

• 短篇论著 •

血清和尿液中黄醇结合蛋白胶乳增强免疫比浊试剂盒的制备及性能评价

方 亮, 王 芬, 刘献文, 邬期望

(美康生物科技股份有限公司, 浙江宁波 315104)

摘 要:目的 利用胶乳增强免疫比浊原理, 建立一种血清及尿视黄醇结合蛋白(RBP)的检测方法。方法 通过共价交联将抗人 RBP 多克隆抗体标记到胶乳微球表面, 利用抗体与 RBP 产生的特异性反应, 促使胶乳颗粒产生凝集, 从而建立 RBP 胶乳增强免疫比浊的检测方法, 并对该方法进行了精密度、准确度、线性和相关性实验。结果 该检测方法诊断界值为 0.2 mg/L, 重复测定 2 个浓度的质控品各 20 次, 其批内、日间精密度变异系数(CV) < 5%; 线性范围为 0.2~200.0 mg/L, 平均回收率为 100.1%, 尿液及血清与商品化试剂盒决定系数分别为 0.983 3 和 0.991 3。结论 该研究建立了血清及尿液 RBP 胶乳增强免疫比浊检测方法, 各项性能指标均达到临床检测要求, 可用于临床血清及尿液 RBP 浓度的检测。

关键词:视黄醇结合蛋白; 胶乳增强免疫比浊; 性能评价

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.01.032

中图法分类号:R446.12

文章编号:1673-4130(2018)01-0103-04

文献标识码:B

视黄醇结合蛋白(RBP)是血液中维生素的转运蛋白, 是一种低相对分子质量蛋白, 相对分子量为 21×10^3 , 由肝细胞粗面内质网合成, 能自由通过肾小球, 由肾小管近曲端上皮细胞重吸收并降解^[1-2]。尿液中 RBP 浓度的增加, 往往意味着肾小管近曲端重吸收功能损伤; 尿 RBP 的排量与肾小管间质损伤程度有明显的相关性, 可作为检测肾小管间质的病变程度、指导治疗方案的制定和预后判断的一项灵敏诊断指标^[3-4]。

现阶段临床上广泛使用的 RBP 检测方法为免疫比浊法。但普通免疫比浊法检测由于采用单一多克隆抗体, 导致其特异度高但灵敏度低或灵敏度高但特异度低, 无法同时满足特异度和灵敏度要求。中国专利文献 CN102628867A 报道了采用两种单克隆抗体胶乳增强免疫比浊方法, 其线性范围较宽, 但灵敏度低, 仍然无法同时用于血清和尿液中 RBP 的测定^[5]。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2016 年 12 月宁波美康盛德医学检验所送检的血清和尿液样本各 50 例, 其中血清样本男 28 例, 女 22 例; 尿液样本男 26 例, 女 24 例, 年龄 18~90 岁, 所有样本均在送检当天测试完毕。

1.2 仪器与试剂 抗 RBP 多克隆抗体、RBP 质控品、胶乳微球由美康生物科技股份有限公司提供。尿 RBP 酶联免疫试剂盒由上海西塘生物科技有限公司提供。散射比浊法 RBP 测定试剂盒由 SYSMEX 提供。Hitachi 7180 型全自动生化分析仪。Synergy H1 全功能酶标仪由美国伯腾仪器有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 检测原理 样品中的 RBP 与包被有特异性的 RBP 抗体的胶乳微球结合, 通过样品中的 RBP 将胶乳微球连接起来, 形成较大的结合物, 进而凝集, 而引起体系浊度的变化。在一定范围内, 浊度与 RBP 浓度呈正相关, 通过标准液求得的回归方程, 可以通

过测量得到的浊度计算出 RBP 浓度。

1.3.2 分析参数 采用 Hitachi 7180 全自动生化分析仪, 分析方法采用两点终点法。分析参数: R1 225 μ L、R2 75 μ L、样本 5 μ L、波长 546 nm。测定步骤: 将 R1 和样品加入比色杯, 混合均匀, 37 $^{\circ}$ C 孵化 5 min, 加入 R2, 混合均匀, 立即读取此时的吸光度 A1, 继续孵化 5 min, 读取吸光度 A2, 计算二者吸光度的差值(A2-A1)。按照同样品同方法测试定标液, 得到各浓度定标液对应的吸光度差值, 以各定标液的浓度对应的吸光度差值绘制曲线, 以 logit-log(4p) 函数曲线进行拟合。通过上述方法测得样品的吸光度差值代入定标曲线方程, 计算得到样品的浓度值。

1.3.3 灵敏度及精密度 以精密度不高于 10% 的样本对应的浓度为最低检测灵敏度。按照美国临床实验标准委员会(CLSI)EP5-A2 文件对精密度的评价方法, 分别测定高低两个临床诊断水平的 RBP 浓度(1.0、4.5 mg/L), 在 2 h 内将上述两个浓度分别测定 20 次, 另外每天测定 1 次, 连续测试 20 d, 分别计算平均值($\bar{x}$)、标准偏差(s)、变异系数(CV)。

1.3.4 回收率 采用两个不同 RBP 浓度的血清样本(1、180 mg/L), 按照不同比例混合配制测试样品, 按照正常方法测试其 RBP 浓度, 重复测定 3 次, 求出平均值, 计算出回收率。

1.3.5 线性范围测定 以美国临床实验室标准化协会(CLSI)EP6-P 文件作为线性评价标准。以高浓度样本(200 mg/L)和低浓度样本(1 mg/L)配制出一系列浓度, 并且以生理盐水为 0 值样本(0 mg/L)作为线性实验的样品。采用本文配制的试剂, 依次从低到高、从高到低对上述的浓度梯度样品分别平行测试 5 次, 求出平均值作为纵坐标、以理论值作为横坐标。

1.3.6 抗干扰试验 使用同一份人的血清样品, 加入不同浓度梯度的干扰物质, 然后正常测定, 测试结果以不添加干扰物的样品作为对照, 求出相对偏差作

为干扰率。实验考察结合胆红素、血红蛋白、抗坏血酸(VC)、葡萄糖和尿微量清蛋白(mAlb)浓度分别在150、500、30、1 000、100 mg/dL 时,它们对测定结果的干扰率。

1.3.7 相关性分析 根据 CLSI EP9-A2 文件做方法学比较。尿 RBP 以上海西塘生物科技有限公司尿 RBP 酶联免疫试剂盒在美国伯腾仪器有限公司 Synergy H1 全功能酶标仪的检测结果,考察本研究 RBP 胶乳增强免疫比浊试剂盒在 Hitachi 7180 全自动生化分析仪上的检测结果。血清 RBP 以 Hitachi 7180 型全自动生化分析仪使用 SYSMEX 免疫比浊法 RBP 测定试剂盒对比考察本研究 RBP 胶乳增强免疫比浊试剂盒在 Hitachi 7180 全自动生化分析仪上的检测结果。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 17.0 统计软件分析数据, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 试剂盒的制备

2.1.1 试剂 1(R1) 200 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,2%(w/w)聚乙二醇 6000(PEG 6000),2%氯化钠,pH=7.4。

2.1.2 试剂 2(R2) (1)小颗粒胶乳的标记:小颗粒直径为 90 nm,用 50 mmol/L 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES) pH=6.0 稀释胶乳到 1%,加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDAC)溶液 10 mL (1.917 mg)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液 10 mL (115 mg),室温反应 1 h,6 000 r/min 离心 15 min,去上清,沉淀悬浮于 50 mmol/L MES pH=6.2 的缓冲液中,超声充分分散;相同的离心条件再次离心,小心去除去上清,沉淀重新悬浮于 35 mmol/L MES pH=6.2 的缓冲液中,使乳胶终浓度为 2%,超声分散。为防止起泡可边搅拌边加入等体积的抗体包被液(50 mmol/L MES pH=6.0+0.72 mg 单抗),混合搅拌,室温反应 1 h,胶乳终浓度为 1%。8 000 r/min 离心 25 min,去上清,沉淀悬浮于 50 mmol/L MES pH=6.0 的溶液中,乳胶终浓度为 1%,超声分散,加入相同体积 2.5% 牛血清清蛋白(BSA)溶液 4 ℃ 封闭过夜。离心去上清,用分散液(50 mmol/L Tris pH=7.5+1%BSA+2%蔗糖+0.1%叠氮化钠)分散并保存胶乳,乳胶终浓度为 0.5%。(2)大颗粒胶乳的标记:大颗粒胶乳直径为 200 nm,用 50 mmol/L MES pH=6.0 稀释胶乳到 1%,加入 EDAC 溶液 10 mL (1.917 mg)和 NHS 溶液 10 mL (115 mg),室温反应 1 h,6 000 r/min 离心 15 min,小心去上清,沉淀充分悬浮于 50 mmol/L MES pH=6.2 的缓冲液中,超声充分分散;相同离心条件再次离心,小心去上清,沉淀充分悬浮于 35 mmol/L MES pH=6.2 的缓冲液中,使乳胶终浓度为 2%,超声分散。边搅拌(防止起泡)边加入等体积的抗体包被液(50 mmol/L MES pH=6.0+1 mg 多抗),混合搅拌,室温反应 1.5 h,胶乳终浓度为 1%。6 000 r/min 离心 15 min,轻轻倒出上清,沉淀悬浮于 35 mmol/L MES pH=6.8 缓冲液

中,使胶乳终浓度为 1%,超声分散,加入相同体积 2% BSA 溶液 4 ℃ 封闭过夜。离心去上清,用分散液(75 mmol/L Tris pH=7.5+1.5%BSA+2%蔗糖+0.1%叠氮化钠)分散并保存胶乳,乳胶终浓度为 0.5%。(3)R2 制备:将小颗粒和大颗粒胶乳按照 5:1 比例混合,然后用稀释液(50 mmol/L Tris-HCl pH=7.5、1% BSA、2% 蔗糖、0.1% 叠氮化钠)稀释,使得 R2 中小胶乳终浓度为 0.12%,大胶乳终浓度为 0.024%。

2.2 灵敏度测试 将 5 mg/L 的 RBP 质控品用去离子水稀释成 1 mg/L,接着将 1 mg/L 的样本稀释成 0.5 mg/L,将 0.5 mg/L 的样本稀释成 0.2 mg/L 和 0.1 mg/L,这样就得到了 0.1、0.2、0.5、1.0 mg/L 不同浓度的样本,将每个样品都重复测试 10 次,并分别计算出 $\bar{x}$ 、s、CV。以 CV<10% 的最低浓度作为最低检出灵敏度。见表 1。本检测方法对 RBP 的检测灵敏度为 0.20 mg/L。

表 1 不同稀释浓度的 RBP 样本灵敏度分析

项目	0.0 mg/L	0.1 mg/L	0.2 mg/L	0.5 mg/L	1.0 mg/L
$\bar{x}$ (mg/L)	0.02	0.09	0.21	0.47	1.13
s(mg/L)	0.04	0.01	0.02	0.03	0.03
CV(%)	200.00	11.11	9.04	6.72	2.36

2.3 批内和日间精密度结果 见表 2。

表 2 批内、日间精密度结果

标本	批内			日间		
	$\bar{x}$ (mg/L)	s(mg/L)	CV(%)	$\bar{x}$ (mg/L)	s(mg/L)	CV(%)
低值	1.05	0.043 26	4.12	1.04	0.047 216	4.54
高值	4.51	0.078 023	1.73	4.53	0.084 258	1.86

2.4 回收率 平均回收率 100.1%,见表 3。

表 3 试剂回收试验结果

样本号	理论值(mg/L)	回收浓度(mg/L)	回收率(%)
1	1.0	1.05	105.00
2	36.8	36.30	98.64
3	54.7	71.80	98.90
4	72.6	106.90	98.62
5	90.5	143.10	99.24
6	180.0	180.20	100.11

2.5 线性范围测试 以高浓度样本(200 mg/L)和低浓度样本(1 mg/L)配制出一系列浓度作为线性实验的样品。水平 1 为 1 000 μ L 低浓度 RBP 样本且不添加高浓度 RBP 样本;水平 2 为 990 μ L 低浓度 RBP 样本+10 μ L 高浓度 RBP 样本;水平 3 为 950 μ L 低浓度 RBP 样本+50 μ L 高浓度 RBP 样本;水平 4 为 750 μ L 低浓度 RBP 样本+250 μ L 高浓度 RBP 样本;水平 5 为 500 μ L 低浓度 RBP 样本+500 μ L 高浓度 RBP 样本;水平 6 为 250 μ L 低浓度 RBP 样本+750 μ L 高浓度 RBP 样本;水平 7 为 0 μ L 低浓度 RBP 样本+1 000 μ L 高浓度 RBP 样本。按照上述方法,配制出来的 7 份样本的理论浓度从低到高依次为 0.20、2.20、10.19、50.15、100.10、150.04、200.00 mg/L,以

生理盐水为 0 mg/L,一共得到 8 个不同浓度的样本用于线性实验,见表 4。回归方程为 $Y=0.989\ 2X+0.067\ 8$, $r^2=0.999\ 9$ 。RBP 试剂盒的检测线性范围为 0.20~200.00 mg/L。见图 1。

表 4 胶乳增强免疫比浊 RBP 试剂盒线性分析实验结果

样本号	高浓度:低浓度	稀释因子	$\bar{x}_1$ (mg/L)*	$\bar{x}_2$ (mg/L)†	平均测量值(mg/L)	理论值(mg/L)
1	N/A	N/A	0.00	0.01	0.00	0.00
2	0:100	N/A	0.18	0.22	0.20	0.20
3	1:99	100	2.25	2.27	2.26	2.20
4	5:95	20	10.30	10.08	10.19	10.19
5	25:75	10	50.23	50.22	50.23	50.15
6	50:50	2	100.50	103.20	101.85	100.10
7	75:25	1.05	152.80	148.30	150.55	150.04
8	100:0	1	203.40	201.80	202.60	200.00

注:*表示 RBP 从高至低值测 5 次后平均值;†表示 RBP 从低至高值测 5 次后平均值。N/A 表述不适用

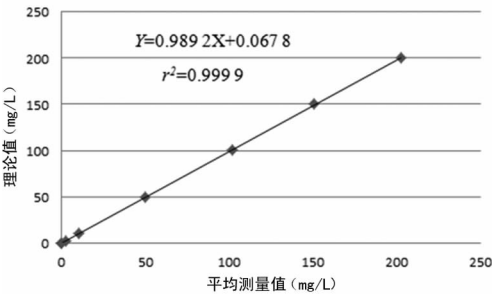


图 1 试剂盒线性回归方程

2.6 抗干扰性 使用同一份人的血清样品,加入不同浓度梯度的干扰物质,然后正常测定,测试结果以不添加干扰物的样品作为对照,求出相对偏差作为干扰率。测试结果显示结合胆红素浓度≤150 mg/dL,血红蛋白浓度≤500 mg/dL,抗坏血酸浓度≤500 mg/dL,抗坏血酸浓度≤30 mg/dL,葡萄糖浓度≤1 000 mg/dL,mAlb 浓度≤100 mg/dL 时,它们对测定结果的干扰率均小于 3%。

2.7 相关性分析

2.7.1 尿液相关性 采用本检测方法和 RBP 的酶联免疫吸附试验(ELISA)免疫检测试剂盒,分别测定 50 份人尿液样本,对测定结果做线性回归分析。本检测方法和对照试剂的决定系数为 $r^2=0.983\ 3$,回归方程 $Y=1.041\ 9X+0.028\ 9$ 。该结果表明检测方法与对照试剂具有很好的相关性。见图 2。

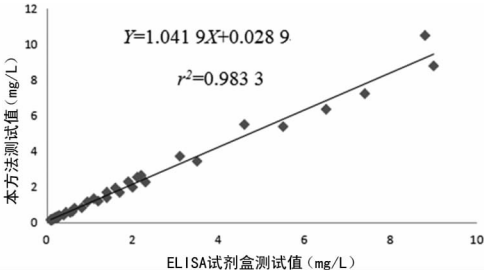


图 2 尿液相关性分析

2.7.2 血清相关性 采用本检测方法和日本 SYS-MEX 的 RBP 试剂盒,分别测定 50 份人血清样本,对测定结果做线性回归分析。本检测方法和对照试剂的决定系数为 $r^2=0.991\ 3$,回归方程 $Y=1.086\ 9X+0.522\ 4$ 。该结果表明检测方法与对照试剂具有很好

的相关性。见图 3。

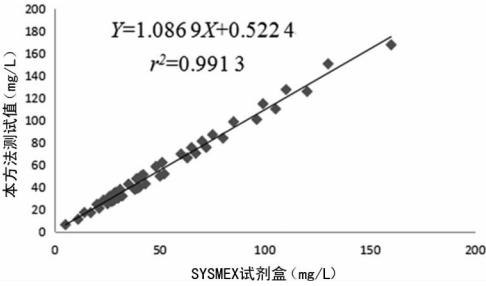


图 3 血清相关性分析

3 讨论

目前,用来评价肾小管损伤的内源性指标主要有尿 NAG、β₂-MG 等^[6-7]。而尿 RBP 和 β₂-MG 在肾脏内的代谢途径一样,而且不受其他疾病的影响,稳定性不受尿 pH 值的影响,是现阶段反映肾小管损伤的高灵敏度的特异性标志物,对了解肾小管损伤及损伤程度、制定治疗方案、监测治疗效果都具有重要的意义^[8-10]。而血清 RBP 则在 2 型糖尿病胰岛 β 细胞功能、消化道、肝病、妊娠征肾病损伤等方面具有重要的诊断价值^[11-13]。因此,尿 RBP 和血清 RBP 都具有各自的临床诊断价值。

目前市面上的胶乳增强免疫比浊试剂盒只能检测尿液或者血清中的 RBP 浓度,为了同时得到尿液和血清的 RBP 浓度需要两套试剂盒甚至两套仪器设备^[14]。本研究使用了抗体致敏的胶乳增强免疫检测方法,试剂 R2 使用了标记有抗人 RBP 多克隆抗体和抗人 RBP 单克隆抗体的两种不同粒径的胶乳微粒。两种不同粒径的胶乳微粒的粒径相差大于 100 nm,其中大粒径胶乳标记有抗人 RBP 多克隆抗体,小粒径胶乳标记有抗人 RBP 单克隆抗体。通过上述方法,扩展了 RBP 检测试剂盒的线性范围,并且对血清和尿液中的各种干扰物具有很好的抵抗能力,可以在临床常用的全自动生化仪使用本研究的一种试剂盒实现同时检测尿液和血清中的 RBP,方便了临床检测,值得临床推广应用。

参考文献

[1] 陈建,周度金. 视黄醇类结合蛋白的分类、结构与功能[J]. 生命的化学,2004,24(2):112-114.

[2] 魏有仁. 肾损伤标志物在中国的现状和展望[J]. 医学检验与临床, 2006, 7(5): 1-6.

[3] 毛建华, 黄永坤, 程时钰, 等. 尿视黄醇结合蛋白检测对肾小管功能的评估[J]. 昆明医学院学报, 1999, 17(3): 51-53.

[4] 袁育林, 农生洲. 尿视黄醇结合蛋白对早期肾功能损伤的诊断价值[J]. 中国医学创新, 2013, 16(1): 162-164.

[5] 北京九强生物技术股份有限公司. 双抗体胶乳增强视黄醇结合蛋白检测试剂盒: CN201110454990. 2[P]. 2012-08-08.

[6] 王蓓, 陈晨, 余黎, 等. 肾损伤的尿液检测指标概述[J]. 安徽医药, 2012, 36(4): 429-432.

[7] 白春洋. 四项生化指标联合检测在糖尿病早期肾损伤诊断中的临床价值[J]. 中国医师杂志, 2011, 13(11): 1549-1550.

[8] 解冰, 江利萍. 多项目联检判断肾小管功能的探讨[J]. 放射免疫学杂志, 2007, 20(1): 26-28.

[9] 张宝栋, 邢薇. 尿视黄醇结合蛋白在早期肾小管损伤诊断中的临床意义[J]. 中华现代临床医学杂志, 2004, 20(9): 1354-1355.

[10] 夏运成, 彭灿辉, 屈申, 等. 尿视黄醇结合蛋白与肾小管间质受损的相关性研究[J]. 南京大学学报, 2011, 36(10): 1008-1011.

[11] 周广朋, 张景岚, 陈树. 2 型糖尿病患者胰岛 β 细胞功能及血清视黄醇结合蛋白、游离脂肪酸水平的变化特点与临床意义[J]. 实用医院临床杂志, 2016, 13(4): 151-153.

[12] 姚丹燕. 血清 RBP 的流程诊断价值[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(9): 222-223.

[13] 李海燕. 血清视黄醇结合蛋白、胱抑素 C 以及 β_2 微球蛋白联合检测在妊高症肾损伤中的价值[J]. 中国实用医药, 2016, 11(30): 141-142.

[14] 俞俊文, 刘献文. 尿 RBP 胶乳增强免疫比浊检测方法的建立及性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(17): 2481-2483.

(收稿日期: 2017-06-25 修回日期: 2017-09-28)

• 短篇论著 •

输注辐照悬浮红细胞对移植抗宿主病的防治及临床应用

张 莉¹, 赵 平², 黄威威³, 郭 瑜^{1△}

(1. 内蒙古医科大学附属医院住院部, 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古医科大学第二附属医院住院部, 呼和浩特 010050; 3. 内蒙古医科大学附属医院重症医学科, 呼和浩特 010050)

摘 要:目的 观察防治移植抗宿主病中输注辐照悬浮红细胞对移植发生率及复发率的影响。方法 选择内蒙古地区某三甲医院 2014 年 6 月至 2016 年 6 月收治的恶性血液系统疾病患者 84 例, 均给予异基因造血干细胞治疗, 将 84 例患者随机分为实验组和对照组各 42 例, 对照组患者常规预防移植抗宿主病, 实验组在常规预防基础上输注辐照悬浮红细胞, 观察两组患者治疗后移植抗宿主病发生情况, 分别于治疗前后检测两组患者的血细胞计数; 给予发生的患者对症治疗, 随访 3 个月, 观察移植抗宿主病的复发情况。结果 移植前, 两组患者血细胞计数比较差异无统计学意义($P>0.05$)。实验组患者移植抗宿主病发生率、随访期间复发率低于对照组, 移植后血细胞计数均高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 移植抗宿主病为异基因造血干细胞移植中严重的并发症之一, 应用输注辐照悬浮红细胞的方式预防时, 可有效减少移植抗宿主病的发生, 改善患者预后。

关键词: 辐照; 红细胞; 移植抗宿主病; 防治; 复发率
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.01.033 **中图法分类号:** R457.1
文章编号: 1673-4130(2018)01-0106-03 **文献标识码:** B

临床上, 恶性血液系统疾病、自身免疫性疾病等治疗时, 比较常用的方法为造血干细胞移植, 异基因造血干细胞移植为其中一种手段, 可实现治愈某些恶性血液病、免疫性疾病, 广泛的应用于临床中。但在应用异基因造血干细胞移植治疗过程中, 相关合并症的发生影响治疗效果, 尤其是移植抗宿主病, 因此, 应用异基因造血干细胞移植治疗患者时, 需采用相应的手段预防移植抗宿主病的发生, 以保证治疗效果, 然而常规预防手段的效果并不理想, 研究表明, 采取输注辐照血液的方式预防时, 具有良好的预防效果, 可有效减少移植抗宿主病的发生, 改善患者预后。本研究中探讨了输注辐照悬浮红细胞防治移植

物抗宿主病的效果, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取内蒙古地区某三甲医院 2014 年 6 月至 2016 年 6 月收治的恶性血液系统疾病患者 84 例, 男 48 例, 女 36 例, 年龄 17~60 岁, 平均(33.6±2.8)岁; 病程 1 个月至 6 年, 平均(7.6±7.1)个月。按照疾病类型分为急性淋巴细胞白血病 22 例, 急性非淋巴细胞白血病 17 例, 急性混合细胞白血病 13 例, 慢性粒细胞白血病 11 例, 非霍奇金淋巴瘤 14 例, 骨髓增生异常综合征 7 例。84 例患者中亲缘全相合异基因造血干细胞移植 23 例, 亲缘半相合异基因造血干细胞移植 27 例, 无关供者异基因造血干

△ 通信作者, E-mail: 447444929@qq.com。
本文引用格式: 张莉, 赵平, 黄威威, 等. 输注辐照悬浮红细胞对移植抗宿主病的防治及临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(1): 106-108.