

• 行业研究 •

血清层粘连蛋白荧光免疫层析检测方法的建立及性能评价*

刘朝阳^{1,2}, 赵方^{1,2}, 栾大伟^{1,2}, 李雅慧^{1,2}, 刘萍^{1,2}, 卢晋英^{3△}

1. 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司, 天津 300300; 2. 天津市化学发光与快速诊断分析技术企业重点实验室, 天津 300300; 3. 天津市第三中心医院, 天津 300000

摘要: 建立一种荧光定量层粘连蛋白(LN)检测方法, 定量检测人血清 LN 水平。将鼠抗 LN 抗体用划线机喷到硝酸纤维素膜表面作为检测线(T), 将链霉素亲和素用划线机喷到硝酸纤维素膜表面作为质控线(C); 用生物素荧光微球标记鼠抗 LN 抗体作为缓冲液。利用双抗体夹心法原理定量检测 LN 水平, 对方法的线性、精密性、空白限、回收率、相关性等性能指标进行验证, 并使用市售化学发光 LN 试剂盒比对。荧光免疫分辨检测 LN 方法的回收率为 86.03%~97.50%, 空白限为 4.22 ng/mL, 线性范围为 20~800 ng/mL, 相关系数(r)为 0.998 9; 批内精密性为 6.51%, 批间精密性为 6.23%。与市售 LN 试剂平行检测 100 份血清标本, 有良好的相关性($Y=1.021 9X-1.172 0, r=0.987 1$)。本研究建立了 LN 荧光免疫检测方法, 各项性能指标均达到临床检验要求, 操作便捷、结果准确, 可用于临床血清 LN 水平的检测。

关键词: 荧光免疫层析法; 层粘连蛋白; 肝纤维化**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.06.020**中图法分类号:** R446.6**文章编号:** 1673-4130(2021)06-0725-05**文献标志码:** A

Establishment and performance evaluation of a fluorescence immunochromatographic assay for detection of serum laminin*

LIU Chaoyang^{1,2}, ZHAO Fang^{1,2}, LUAN Dawei^{1,2}, LI Yahui^{1,2}, LIU Ping^{1,2}, LU Jinying^{3△}

1. Bioscience (Tianjin) Diagnostic Technology Co., Ltd., Tianjin 300300, China; 2. Tianjin Enterprise Key Laboratory, Chemiluminescence and POCT Diagnostic Technology, Tianjin 300300, China; 3. Tianjing Third Central Hospital, Tianjin 300000, China

Abstract: To establish a quantitative detection method for Laminin (LN) based on Time-Resolved Fluorescence Immunoassay. The mouse anti-LN antibody was sprayed onto the surface of the nitrocellulose membrane with a marking machine as the detection line (T). Streptomycin avidin was sprayed onto the surface of cellulose nitrate membrane by marking machine as the quality control line (C). Mouse anti LN antibody was labeled with biotin fluorescent microspheres as buffer. The LN was quantitatively detected by the double antibody sandwich method, the linearity, precision, limit of blank, recovery and correlation of the method were verified, and the commercial chemiluminescence LN kit was used for comparison. The recovery of the fluorescence immunoassay for LN was 86.03%—97.50%. The limit of blank of LN was 4.22 ng/mL, the linear range was 20—800 ng/mL, the correlation coefficient r was 0.998 9, the within-run precision was 6.51%, and the between-run precision was 6.23%. Compared with the commercially available product (100 serum samples), LN showed the high consistency ($Y=1.021 9X-1.172 0, r=0.987 1$). In this study, the fluorescence immunoassay detection method of LN was established. All the performance indexes met the requirements of clinical examination. It was easy to operate and accurate, and could be used for the detection of serum LN level in clinic.

Key words: fluorescence immunoassay; laminin; liver fibrosis

近年来, 肝纤维化日益受到人们的重视, 已成为肝病研究领域的热点。诸多病因如病毒、乙醇、药物

等所致的肝细胞炎症、坏死均可引起肝纤维化。肝纤维化为慢性肝病发展至肝硬化过程中的病理组织学

* 基金项目: 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治专项项目(2018ZX10732202)。

作者简介: 刘朝阳, 女, 中级工程师, 主要从事荧光免疫层析检测技术相关研究。△ 通信作者, E-mail: henry@bioscience-tj.com。

本文引用格式: 刘朝阳, 赵方, 栾大伟, 等. 血清层粘连蛋白荧光免疫层析检测方法的建立及性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(6):

变化,是发展到肝硬化的必经阶段^[1]。其疾病过程为:慢性肝病—肝纤维化—肝硬化—肝癌。研究认为肝纤维化尚有逆转至正常肝的可能,而肝硬化则不能^[2-3]。所以,肝纤维化在一定条件下可被逆转,早期发现、阻断肝纤维化对治疗慢性肝病十分重要^[4]。

层粘连蛋白(LN)是细胞间外间质(ECM)中的非胶原糖蛋白,大量沉积于基质膜的透明层^[5-6]。在肝纤维化发生过程中,患者细胞外基质的代谢产物可释放到人体血液之中,LN即为该种代谢产物,研究发现其可作为非酒精性脂肪肝、肝癌等肝脏疾病中肝纤维化的血清学标志物^[7-11]。本研究旨在建立一种LN荧光免疫检测方法,用于定量检测人血清LN水平,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取天津市三中心医院肝纤维化和肝硬化患者的血清标本,溶血、黄疸、脂血等标本剔除。标本血清为空腹静脉采血,分离出血清立即用于分析,可于4℃冰箱中保存,长期存放应保存在-20℃以下,并避免反复冻融。

1.2 仪器与试剂 喷金划线仪 HM3030、宽型切条机 CM3020、微电脑斩切机,荧光免疫分析仪 P200 为博奥赛斯(天津)生物科技有限公司研制生产。LN 化学发光检测试剂由博奥赛斯(天津)生物科技有限公司提供。荧光微球购自 Thermo 公司,链霉亲和素购自 Sigma 公司,硝酸纤维素膜(NC膜)购自 PALL 公司,其他试剂均为国产分析纯。LN 抗原、抗体均购于梅迪赛斯生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 LN 固相抗体制备 分别将 LN 抗体及链霉亲和素配置成一定浓度的溶液,使用喷金划线仪分别包被在 NC 膜的检测区和质控区,37℃干燥后密封室温保存备用。

包被浓度的选择试验方法:分别选用以下 3 种缓冲液稀释 LN 抗体及链霉亲和素进行包被,测定其包被效果。缓冲液 1#:pH8.0,缓冲液 2#:pH6.4,缓冲液 3#:pH7.2。

1.3.2 荧光标记抗体制备 取 0.10 mL 荧光微球,清洗 1 次(0.10 mol/L 硼酸盐缓冲液)加入 0.12 mg/mL 的活化剂可溶于水的碳二亚胺(EDC),混匀,加入 LN 抗体至 100.00 μg/mL。交联 4 h,加牛血清清蛋白(BSA)至 20.00 μg/mL,封闭过夜,4℃保存备用。

荧光标记抗体稀释比例选择试验方法:LN 抗体微球分别以 1:30、1:50、1:100 比例稀释,测定其效果。

1.3.3 层析时间的选择 比较层析 12、15、18 min 不同时间下对试验结果的影响。

1.3.4 试剂盒的组装 将吸水纸、NC 膜、样品垫按

顺序粘贴组成试剂板,用斩切机将试剂板分切成(4.0±0.2)mm 的试剂条。将试剂条装入卡中扣合,即为完整检测卡。

1.3.5 检测缓冲液配置 LN 荧光标记抗体终浓度以 1/100,质控荧光标记抗体浓度以 1/500,其他以稀释液补充,配置检测缓冲液。

1.4 荧光免疫层析分析

1.4.1 灵敏度 灵敏度以空白限数据来评估。平行测定 20 次零值标准品的相对荧光强度(T/C),计算 T/C 的平均值(\bar{x})和标准差(s)。根据零值标准品和相邻标准品之间的浓度-相对荧光强度结果进行两点回归拟合得出一次方程,将 $\bar{x} + 2 \times s$ 带入上述方程,计算出对应的浓度值,即为检测卡空白限数据。

1.4.2 精密度 抽取 3 个批次的 LN 检测卡,选取高值和低值标本分别重复测试各 10 次,进行精密度检测。计算批内变异系数(CV)与批间 CV,可得出检测卡的精密度数据。

1.4.3 线性试验 将接近线性范围上限的高值标本按一定比例稀释为 5 种浓度,其低值浓度的标本需接近线性范围下限,使用 LN 测定试剂盒(荧光免疫层析法)测定,每一种浓度重复测定 3 次,计算其平均值,将结果平均值和稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,并计算线性相关系数(r)。 $r \geq 0.990 0$ 判定为符合标准。

1.4.4 准确度 准确度以回收试验来评估。取 LN 的临床检测高值标本,与低值标本以 1.0:9.0 的体积比例混合,测试高值标本、低值标本与混合标本的实际浓度值,各平行测定 3 次取均值。

回收率=(混合标本测值×10-低值标本测值×9)/高值标本测值

1.4.5 钩状效应(Hook 效应) 用灭活的小牛血清作稀释液,将 LN 高值校准品配置成一系列浓度,平行测定每种浓度校准品两次荧光强度值,取其均值。

1.4.6 对比试验 与市售 LN 检测试剂盒(化学发光法)平行检测 100 份临床血清标本,记录结果,计算相关性。市售 LN 检测试剂盒按照其说明书进行检测操作。

1.5 统计学处理 采用 2010 版本 Excel 进行趋势分析,采用 SPSS20.0 对检测结果进行统计分析。

2 结果

2.1 方法学建立

2.1.1 包被浓度的选择 随标本浓度值的升高,测试所得 T/C 值随之升高,缓冲液 1# 测试结果与标本相关性较好,选择缓冲液 1#。见图 1。

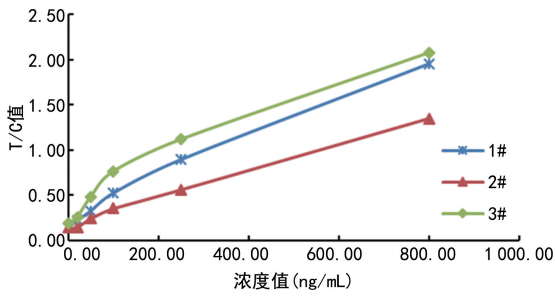


图 1 包被浓度的选择

2.1.2 荧光标记抗体稀释比例的选择 LN 抗体微球稀释实验结果显示,1 : 50 比例稀释的检测缓冲液,随标本浓度值的升高,测试所得 T/C 值随之升高,1 : 30 比例稀释的检测缓冲液测试 T/C 值偏高,表明 LN 抗体微球浓度偏高。综合考虑,以 1 : 50 为基础稀释比例。见图 2。

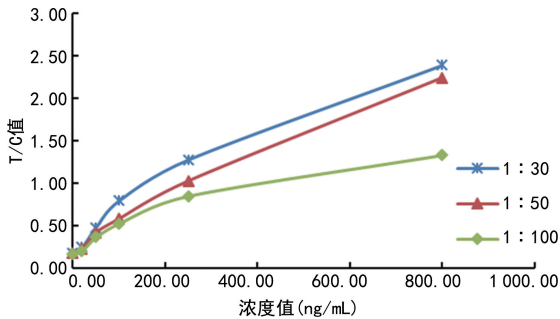


图 2 荧光标记抗体稀释比例的选择

2.1.3 层析时间的选择 层析时间试验结果显示,20 ng/mL 标本在 7.5 min 后测值已经稳定,100 ng/mL 标本在 10 min 后测值趋于稳定,800 ng/mL 标本在 12.5 min 后较稳定。CV 结果显示,层析 12 min 标本 CV > 10.00%,15、18 min CV 均 < 10.00%;综合以上,同时考虑时间效率因素,选择层析时间为 15 min。见图 3、表 1。

2.2 方法学验证

2.2.1 灵敏度 LN 检测卡的空白限分别为 3.35、3.27、4.22 ng/mL,符合行业标准。见表 2。

2.2.2 精密度 经过 3 个批次的 CV 测试,可得出 3 批 LN 检测卡的低值批内精密度分别为 6.12%、3.18%、6.08%,高值标本批内精密度分别为 6.51%、

4.74%、5.21%,选取最大值 6.51% 为本检测试剂盒的批内精密度;高低值标本的批间精密度分别为 5.87%、6.23%,选取最大值 6.23% 为本检测试剂盒的批间精密度。见表 3。

表 1 不同层析时间的标本 CV (%)

时间 (min)	20 ng/mL	100 ng/mL	800 ng/mL
12	10.23	10.45	10.32
15	5.51	6.32	5.87
18	6.36	6.21	6.65

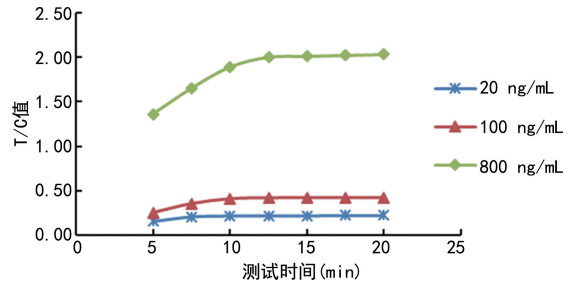


图 3 层析时间的选择

表 2 空白限试验结果

批次	检测次数	\bar{x} (ng/mL)	s	空白限 (ng/mL)
1	20	0.186	0.005	3.35
2	20	0.187	0.005	3.27
3	20	0.188	0.007	4.22

表 3 检测卡精密度分析

标本浓度	批次	\bar{x} (ng/mL)	s	批内 CV (%)	批间 CV (%)
低值标本	1	51.471	3.150	6.12	5.87
	2	47.956	1.525	3.18	
	3	48.832	2.969	6.08	
高值标本	1	256.943	16.727	6.51	6.23
	2	240.169	11.384	4.74	
	3	259.539	13.522	5.21	

2.2.3 线性 在 20~800 ng/mL 的线性范围内, LN 检测卡的线性 r 为 0.998 9。见图 4、图 4。

表 4 线性试验结果 (ng/mL)

稀释比例	理论浓度	实测浓度 1	实测浓度 2	实测浓度 3	实测均值
1 : 163.3	20.00	19.26	20.68	19.16	19.70
1 : 65.3	50.00	55.40	51.05	51.95	52.80
1 : 32.7	100.00	103.80	98.80	87.60	96.73
1 : 13.1	250.00	267.25	281.75	285.00	278.00
1 : 4.1	800.00	787.20	774.80	788.00	783.33

2.2.4 准确度 经过 3 批 LN 检测卡的回收率测试可知,回收率为 86.03%~97.50%,产品重复性较好。见表 5。

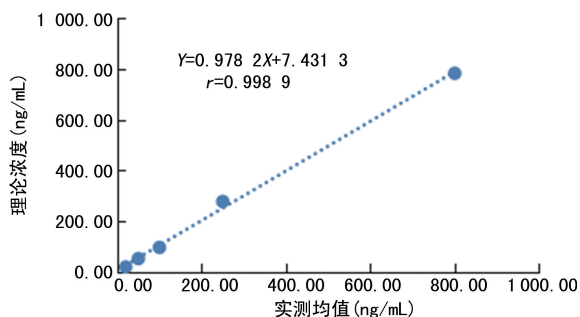


图 4 拟合方程图

表 5 检测卡回收率分析

批次	高值标本测值 (ng/mL)	低值标本测值 (ng/mL)	混合标本测值 (ng/mL)	回收率 (%)
1	618.00	108.15	150.5	86.03
2	602.00	103.60	147.50	90.13
3	604.00	102.90	151.50	97.50

2.2.5 Hook 效应分析 LN 浓度从 800 ng/mL 升至 8 000 ng/mL 时,检测的荧光强度值随浓度增加而升高,没有出现 Hook 效应。见表 6。

表 6 Hook 效应分析

标本浓度(ng/mL)	T/C 值	平均值(ng/mL)
800	1.983	2.039
	2.094	
1 500	2.842	2.871
	2.900	
4 000	3.832	3.871
	3.910	
8 000	4.920	4.871
	4.822	

2.2.6 方法学比较 与化学发光 LN 试剂盒比对,检测 100 份临床标本,两种方法学的检测结果回归方程为 $Y=1.021 9X-1.172 0$, $r=0.987 1$ 。见图 5。

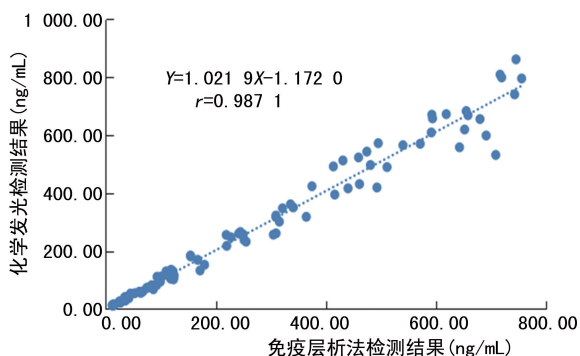


图 5 两种试剂盒测定血清标本 LN 水平的相关性图

3 讨论

LN 属于细胞外基质成分,随着肝纤维化病情发展越来越严重,细胞外基质成分在血清的浓度会明显上升,因此对判断肝病和肝纤维化的严重程度具有重要价值。

本研究开发的 LN 测定试剂盒为荧光免疫分析测定系统,采用荧光示踪物标记抗原或抗体,与待测物进行一系列免疫反应,通过测定反应产物的荧光强度以分析待测物浓度。本研究结果显示荧光免疫分辨检测 LN 方法的回收率为 86.03%~97.50%,空白限为 4.22 ng/mL,线性范围为 20~800 ng/mL, $r=0.996 5$;批内精密度为 6.51%,批间精密度为 6.23%。与市售 LN 试剂平行检测 100 份血清标本,有良好的相关性 ($Y=1.021 9X-1.172 0$, $r=0.987 1$)。这表明本试剂盒测试重现性好,与市售试剂盒有良好的相关性。

时间分辨免疫测定荧光是目前应用非常广泛的微量分析技术之一^[12-16],具有专一性强、灵敏度高、实用性好、检测时间短、价格低廉等优点。时间分辨免疫层析以镧荧光微球为标记物,与传统荧光标记物相比,其有独特的荧光特性:荧光寿命长、stokes 位移大、激发光谱和发射光谱无交叉、特征峰尖锐、标记物体积小、灵敏度高、可定量。该方法最快 15 min 出结果,可用于快速对大量患者的血清学标本进行检测。高通量的免疫学筛查无实验室限制,便于在二级及其以上医院快速推广。同时,基于 LN 检测试剂制备低成本的快检试剂,可以用于社区等基层医疗机构对就医人群进行快速、低成本的筛查,以便实现集中患者、集中资源、集中专家、集中收治,以及实现医疗资源的高效运转。

综上所述,本研究建立的 LN 荧光免疫分析检测方法符合临床检验需求,在临床检验中具备应用价值,值得推广使用。

参考文献

- [1] 贾海英,郭淑丽,王玲玲,等.血清肝纤维化指标在慢性乙型肝炎不同阶段中的对比分析[J].实验与检验医学,2020,38(6):1078-1093.
- [2] 方亮,王芬,刘献文,等.人血清层粘连蛋白直接化学发光免疫分析法的建立及评价[J].国际检验医学杂志,2017,38(21):3055-3057.
- [3] 张燕.分析血清透明质酸对肝纤维化的诊断价值[J].世界最新医学信息文摘,2018,49(18):125.
- [4] 贡雪.肝纤维四项检测在诊断肝纤维化程度中的应用[J].中国现代药物应用,2020,14(18):61-63.
- [5] 张洋,王健,吴铮,等.层粘连蛋白对乙型肝炎病毒感染相关肝癌患者术后复发的预测效果[J].中华(下转第 733 页)

一方面,缓冲体系与真实标本血清基质存在差异,即基质效应也可造成测值结果不一致等;此外,还与各测定原理和技术的不同、数据处理的曲线拟合方式差异等有关。

除定值结果不理想外,WHO 提供的互换性实验结果显示,仅 6 种方法中的 16/190 和标本具有互换性,3 种方法具有部分互换性,7 种方法无互换性。以上结果表明,如果将 16/190 定为国际标准品,既无溯源依据支持,亦无实际数据支持,实际应用中必然存在一定争议。鉴于上述因素,NIBSC 不建议将 16/190 作为人重组 AMH 的国际标准品,但是为了进一步促进 AMH 校准和免疫学分析,他们向 WHO 推荐 16/190 作为参考试剂,并且在说明书中明确说明赋值采用的是当前的免疫分析法,笔者亦认为这种做法是合理的。在未来可尝试以人血清为基质建立 AMH 参考盘,或者采用提取的人源性 AMH 制备国际标准品,以协调 AMH 免疫分析方法之间的差异,促进 AMH 免疫分析的标准化。

参考文献

[1] RZESZOWSKA M, LESZCZ A, PUTOWSKI L, et al. Anti-Müllerian hormone: structure, properties and application[J]. *Via Medica*, 2016, 87(9): 669-674.

[2] 林丽淑, 龙韵洪, 徐丽惠, 等. 抗缪勒氏管激素的结构、功能、临床应用与检测技术[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(24): 3061-3066.

[3] 罗立梅. 抗缪勒氏管激素的临床应用[J]. *医学检验与临床*, 2019, 30(8): 34-36.

[4] 洪艳, 李朋, 黄煜华, 等. 血清抗缪勒管激素检测在无精子

症临床诊治中的意义[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2020, 39(1): 53-57.

[5] 王思源, 王殊. 抗缪勒管激素用于戈舍瑞林在年轻乳腺癌患者化疗期间保护卵巢储备功能的评价[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2019, 51(3): 536-541.

[6] 袁雪菲. 抗缪勒氏管激素与性激素水平在卵巢储备功能评估中的应用[J]. *中国保健营养*, 2019, 29(25): 310.

[7] 吕云峰. 抗缪勒管激素与性激素预测卵巢反应性的临床研究[J/CD]. *国际感染病学(电子版)*, 2020, 9(2): 111.

[8] JAMIL Z, FATIMA S S, AHMED K, et al. Anti-Müllerian hormone: above and beyond conventional ovarian reserve markers [J]. *Dis Markers*, 2016, 20(16): 5246217.

[9] PANKHURST M W, MCLENNAN I S. Human blood contains both the uncleaved precursor of anti-Müllerian hormone and a complex of the NH₂- and COOH-terminal peptides [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 305(10): 1241-1247.

[10] PEPIN D, MIEN H, FOTINI N, et al. An albumin leader sequence coupled with a cleavage site modification enhances the yield of recombinant C-terminal Müllerian Inhibiting Substance [J]. *Technology*, 2013, 1(2): 63-71.

[11] BUDZIK G P, POWELL S M, KAMAGATA S, et al. Müllerian inhibiting substance fractionation by dye affinity chromatography [J]. *Cell*, 1983, 34(6): 307-314.

[12] CATE R L, MATTALIANO R J, HESSION C, et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells [J]. *Cell*, 1986, 45(8): 685-698.

(收稿日期: 2020-07-11 修回日期: 2020-11-27)

(上接第 728 页)

医院感染学杂志. 2020, 30(20): 3058-3061.

[6] 张新弟, 李卫娟, 高娅妮, 等. 血清层粘连蛋白、透明质酸诊断肝纤维化的价值[J]. *中国医药导报*. 2017, 14(23): 1113-1121.

[7] ELFATAH E D, ELKADER E R, ABDELHAK M T, et al. Laminin and chromogranin A as serum markers of liver fibrosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Med Diagn*, 2016, 6(2): 21-31.

[8] 黄伟雄, 郑智鑫, 陈创坤, 等. 血清层粘连蛋白检测在肝纤维化诊断中的临床意义[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2019, 29(8): 91-92.

[9] 李慧萍, 郑雪琴, 赵群, 等. III 型前胶原、IV 型胶原、层粘连蛋白和透明质酸酶在诊断肝纤维化程度中的应用[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16(5): 666-668.

[10] MAK K M, MEI R. Basement membrane type IV collagen and laminin: an overview of their biology and value as fibrosis biomarkers of liver disease [J]. *Anatom Record*, 2017, 300(6): 1371-1390.

[11] TIANHUI L, XIAOMING W, MORTEN A, et al. Molec-

ular serum markers of liver fibrosis [J]. *Biom Insights*, 2012, 7(2): 105-117.

[12] 史咏梅, 何晖, 冯子力, 等. 时间分辨荧光免疫分析技术在医学领域的应用 [J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(19): 2866-2869.

[13] 杨旸, 王作欢, 蒋小武, 等. 基于量子点标记的赭曲霉毒素 A 快速、高灵敏荧光免疫层析检测方法的建立及应用 [J]. *菌物学报*, 2019, 38(6): 1003-1004.

[14] 王云龙, 李娜, 李玉林, 等. 热休克蛋白 90 σ 荧光免疫层析检测方法的建立 [J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(5): 712-716.

[15] LINDA G L, NORDMAN E S, JOHNSON M D, et al. A low-cost, high-performance system for fluorescence lateral flow assays [J]. *Biosensor*, 2013, 3(2): 360-373.

[16] HUI L, DU W, XIAOQIAN T, et al. Time-resolved fluorescence immunochromatography assay (TRFICA) for aflatoxin: aiming at increasing strip method sensitivity [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11(4): 1-7.

(收稿日期: 2020-07-15 修回日期: 2020-12-10)