

甲状旁腺激素荧光免疫层析定量检测技术的研制及应用研究

朱利国¹, 邹贤¹, 范俊², 周锦¹, 黄颀²

(1. 江苏省原子医学研究所附属江原医院, 无锡 214063; 2. 江苏省原子医学研究所, 无锡 214063)

摘要: 研制一种操作简易、灵敏度高的荧光免疫层析试纸条, 用于定量检测甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)。采用双抗体夹心法和荧光免疫层析技术, 将标记抗体 LA001 与荧光微球结合于聚酯膜结合垫上, 检测抗体 CA001 包被在硝酸纤维素膜上作为检测线(T), 另将质控抗体(羊抗鼠 IgG)包被在相互平行的硝酸纤维素膜上作为质控线(C), 过量的鼠源标记的荧光微球在质控线处聚集产生质控荧光信号, 待测样中的 PTH 在 T 处形成被抗体-PTH 抗原-标记抗体的夹心复合物并产生荧光信号, 通过荧光检测仪计算出定量结果。试纸条检测 PTH 灵敏度最低可达 0.8 pg/mL, 与促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)无交叉反应, 不同批次试剂 4 °C 放置 6 个月稳定性好, 批内变异系数(coefficient of variation, CV)为 5.32%, 批间 CV 值为 6.74%。与电化学发光免疫法(electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA)比较相关性较好, $R^2=0.993$, 差异无统计学意义, 甲状旁腺组织结果与非甲状旁腺组织结果则有明显差异($P < 0.01$)。采用该荧光免疫层析试纸条, 不仅可以提供较高的灵敏度和特异度, 而且操作简单, 适合临床工作的需要。

关键词: 甲状旁腺激素; 甲状腺癌; 荧光免疫层析

中图分类号: R392.11

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2018)01-0031-05

甲状腺癌是头颈部最常见的恶性肿瘤, 也是近年来发病率增长速度最快的恶性肿瘤之一, 甲状腺癌的治疗主要以外科手术为主, 行甲状腺全切术后应尽快确定甲状旁腺功能情况, 采取针对性措施防治甲状旁腺功能减退。手术时如果意外切除了甲状旁腺, 患者的血钙浓度会明显降低^[1-2], 引发手足抽搐, 甚至危及生命。甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)由甲状旁腺主细胞分泌, 具有调节和保持血清钙在正常水平的作用, PTH 能直接反映甲状旁腺的功能^[3-4]。如何在手术过程中有效避免损伤甲状旁腺是临床手术中的一大难题。本研究建立一种全新的甲状腺术中快速鉴别甲状旁腺的纳米时间分辨荧光 POCT(point-of-care testing)定量检测方法, 通过在甲状腺手术中, 细针穿刺可疑器官组织, 行该 POCT 定量检测技术, 在 15 min 内快速检测穿刺组织液中的 PTH, 通过 PTH 的浓度高低来判断甲状旁腺。该法为临床工作提供了

科学有效的依据, 本研究在此对该方法学进行性能评估。

1 材料与方法

1.1 研究对象 45 例标本来自 2015 年至 2017 年江原医院甲状腺癌手术患者, 术前均进行入院常规检查, 血液 PTH 均为正常, 取外科甲状腺手术切下标本中肉眼可鉴别的甲状旁腺、肌肉、淋巴结、胸腺、甲状腺、脂肪等组织, 均用 2 mL 注射器针头进行穿刺。所有研究都经医学伦理委员会批准。

1.2 试剂与仪器 PTH 单抗 LA001 和 CA001、质控抗体(羊抗鼠 IgG)、荧光微球、荧光检测仪、PTH 标准品、TSH 标准品, 均来自无锡市江原实业技贸公司; PTH 质控品, 为瑞士 Roche 公司产品; 硝酸纤维素膜, 为美国 Merck-Millipore 公司产品; 样品垫、聚酯膜、底板、吸水纸, 均采购于上海杰一公司; ECLIA 检测试剂盒, 为瑞士 Roche 公司产品。HG-98 免疫荧光检测仪, 为上海互幅公司产品。其他试剂为国产分析纯。

1.3 制备方法

1.3.1 抗体标记荧光微球 使用 pH7.2~7.6 的 MES 活化缓冲液洗涤荧光微球, 加入碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 室温反应 30

收稿日期: 2017-05-24

基金项目: 无锡市科技支撑计划(CSE01N1239); 江苏省卫生与计划生育委员会课题(Z201506)

作者简介: 朱利国(1974—), 男, 学士, 副主任技师, 主要从事临床免疫学研究

通信作者: 黄颀(E-mail: huangbiao@jsnm.org)

min, 洗涤荧光微球, 用 0.05 mol/L、pH7.2~7.6 的磷酸盐缓冲液复溶后加入标记抗体 LA001, 室温反应 2 h, 加入含有 10% BSA 的 0.05 mol/L pH7.2~7.6 的磷酸盐缓冲液, 室温反应 30 min, 洗涤荧光微球, 用含有 1% BSA、0.1% Tween-20、0.05 mol/L pH7.2~7.6 的磷酸盐缓冲液复溶至原体积, 定量喷涂于聚酯膜上, 避光 35℃~38℃ 烘干 1 h, 加入干燥剂室温封存备用。

1.3.2 荧光免疫层析试纸条组装部件处理 (a) 样品垫的处理: 使用含 1% BSA、0.1% Triton-100 的 0.02 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液浸泡样品烘干。(b) 包被膜的制备: 使用含 1% 蔗糖的 0.02 mol/L、pH7.4 的磷酸盐缓冲液, 分别将检测抗体 CA001 和质控抗体稀释至 1 mg/mL, 将两者以 0.5 cm 的间隔喷于硝酸纤维素膜上, 烘干后加入干燥剂室温封存备用。

1.3.3 荧光免疫层析试纸条的组装 在湿度小于 35%、20℃~25℃ 的环境下, 在 PVC 底板上粘贴上包被膜、结合了荧光微球标记的结合垫、样品垫和吸水纸, 形成微滤体系, 并切割成 0.3 cm 宽, 装入卡壳中即制成试纸条(图 1)。

1.4 检测方法

1.4.1 样品预处理 将含待测物穿刺针直接加入 200 μ L 样品上样缓冲液溶液(50 mmol/L Tris-HCl、8 mmol/L NaCl、质量分数 0.1% BSA、50 μ mol/L DTPA、0.1 mL/L Tween-80, 质量分数 0.1% NaN₃、pH 值 7.8)管中, 充分洗涤混匀。

1.4.2 加样 取 60 μ L 上述混合样品加入测试卡加样孔中, 加样孔朝外放入孵育器中, 膜层析反应 10 min。

1.4.3 荧光检测 将测试卡插入荧光检测设备的插卡口, 运行仪器, 仪器通过相应的分析软件自动计算出待测样本中的 PTH 浓度。

1.4.4 标准曲线的绘制 将 PTH 标准品制成 6 个不同的浓度, 分别为 0 pg/mL、10 pg/mL、50 pg/mL、100 pg/mL、200 pg/mL、500 pg/mL, 每个浓度做 5 个平行样。膜层析反应 10 min 后, 仪器读取 T、C 线信号。

1.5 荧光免疫层析试纸条性能测试 (1) 灵敏度: 测定 10 个空白样, 取平均值(\bar{x})和标准差(s), 计

算 $\bar{x} \pm 2s$, 以此数值在标准曲线上查出相对应的剂量。(2) 试纸条在 4℃, 避光条件下保存 6 个月分别抽取同一批次和不同批次的 PTH 荧光免疫层析试纸条, 用已知浓度的 Roche PTH 标准品进行测试, 计算批内和批间变异系数(coefficient of variation, CV)。(3) 将 TSH 标准品制成与 PTH 标准曲线中相对应的 6 个浓度, 进行特异度检测。

1.6 电化学发光免疫法(electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA)检测试剂盒比较 严格按照 ECLIA 检测试剂盒说明书操作要求, 与 PTH 免疫荧光层析检测试纸分别同时对 45 例患者的穿刺洗脱液标本进行平行检测。

1.7 统计学处理 用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 并对服从正态分布的定量资料采用 t 检验进行组间比较, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 对不服从正态分布的定量资料采用秩和检验进行组间比较; 定性资料组间比较采用 χ^2 检验; 相关性分析采用线性相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 检测结果判读 检测时, 由于层析作用液体向前移动, 若试样中 PTH 的含量过少, 试样中的 PTH 与结合垫上标记抗体 LP001 结合的荧光微球结合形成复合物 C1 则相应较少, 结合垫中的标记抗体 LP001 与 C 线上的质控抗体 QP001 大量结合, 因此 T 线将比 C 线荧光浅很多或完全检测不到荧光, 结果为阴性; 若试样中 PTH 的浓度较大, 则复合物 C1 相应较多, 与 T 线处的检测抗体 CP001 结合并大量形成抗体-抗原-抗体复合物 C2, 而且试样中 PTH 越高, T 线显色越深, 结果为阳性。无论是阳性还是阴性结果, 因鼠源性抗体标记的荧光微球过量包被, 因而总有未结合检测抗体 CP001 的部分荧光微球与 C 线处的羊抗鼠 IgG 结合, 在 C 线处出现荧光微球的聚集。如果 C 线没有荧光条带, 无论 T 线有无荧光条带, 结果均无效(图 1)。

2.2 标准曲线绘制 按照统计学方法, 以检测样品荧光值信号为纵坐标, PTH 标准品浓度为横坐标, 建立方程并拟合成标准曲线(图 2)。该标准曲线的 $R^2 = 0.993$ (图 3)。

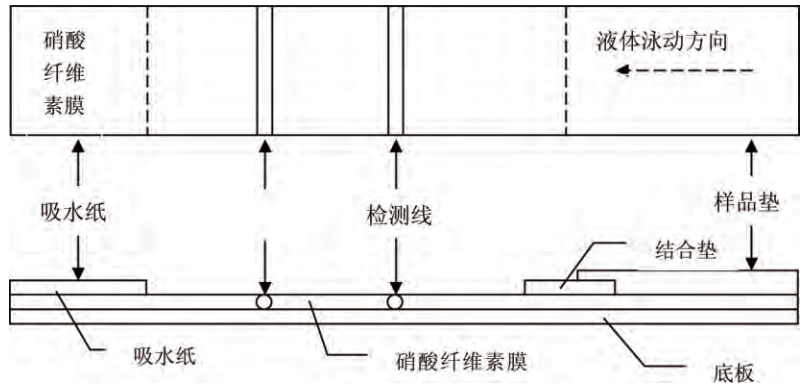


图 1 PTH 荧光免疫层析检测试纸结构图

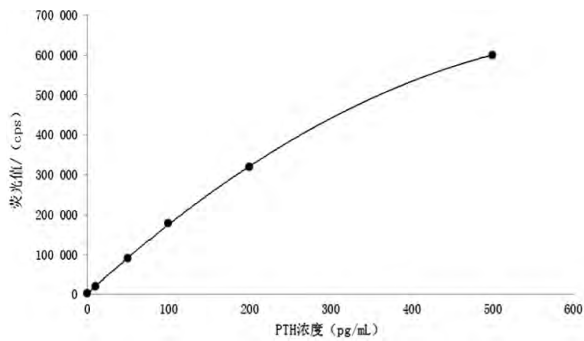


图 2 PTH 荧光免疫层析试纸条标准曲线

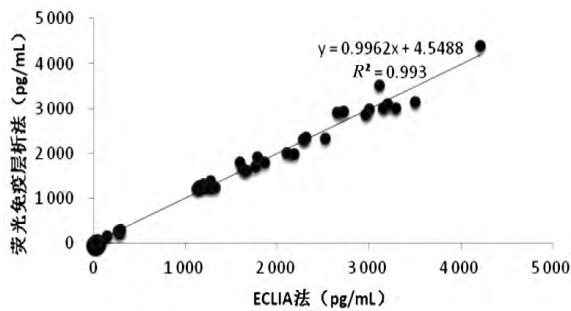


图 3 荧光免疫检测试纸条-ECLIA 试剂盒相关性

2.3 PTH 免疫层析荧光试纸条性能评价 (1)灵敏度: 零剂量点均值读数为 14.66, 在标准曲线上折算为 0.8 pg/mL。(2)稳定性和精密度: 免疫层析荧光试纸条法检测 PTH 高、低两个浓度质控品的批内和批间 CV($n=10$, 表 1)。结果显示, 平均批内 CV 为 5.32%, 平均批间 CV 为 6.74%, 均低于 10%, 表明免疫层析荧光试纸条法检测 PTH 精密度良好。两份不同浓度的质控样品添加标准品后所测得的回收率见表 2, 同一批试剂 4℃ 放置 6 个月后, 参考标准荧光计数无明显变化 ($P < 0.05$), 说明该方法稳定性较好。(3)特异性: 将配制好的 TSH 标准品与对应的 PTH 标准品同时用

试纸条进行检测, 各浓度点交叉反应率 $CR\% = \text{测定值} / \text{测定值 PTH} \times 100\%$, 在上述浓度范围内, 与 TSH 的交叉反应率均小于 0.1%, 说明两者无交叉反应, 方法特异性比较好。

表 1 PTH 免疫层析荧光法的 CV 值

质控样品	浓度 (pg/mL)	CV, % ($n=10$)	
		批内	批间
A	49.1	5.74	7.21
B	177	4.91	6.26

表 2 PTH 免疫层析荧光法的回收率

质控样品	添加标准品浓度 (pg/mL)	理论值 (t, pg/mL)	检测值 (p, pg/mL)	回收率 (p/t, %)
A	10	59.1	57.3	96.95
	100	149.1	142.9	95.84
	500	549.1	556.5	101.35
B	10	187	180.6	96.58
	100	277	285.6	103.1
	500	677	691.3	102.11

2.4 与 ECLIA 方法的比较 对 45 例患者穿刺甲状腺腺体、淋巴结、肌肉组织、脂肪组织、甲状腺腺体, 稀释液分别用 ECLIA 试剂盒与荧光免疫层析试纸条进行检测, 取血清 PTH 值上限 65 pg/mL 为本试剂盒的 cut off 值, 并对数据进行分析。结果表明, 免疫层析试纸条与 ECLIA 试剂盒的相关系数为 0.996 2 (图 3), 可见两者的相关性较好。结果显示甲状腺组织和非甲状腺组织的 PTH 浓度有显著性差异 ($P < 0.01$, 表 3), 相关性具有统计学意义。

表 3 45 例患者不同组织洗脱液 PTH 检测结果 (pg/mL)

方法学	n	甲状旁腺	甲状腺	淋巴组织	脂肪组织	肌肉组织
ECLIA	45	1 668.9±1 093.4	25.2±8.7	26.8±8.8	25.9±7.2	25.7±7.6
荧光免疫层析法	45	1 727.4±1 158.0	25.6±7.8	25.7±7.9	26.5±7.7	28.4±8.4

每组的 ECLIA 与荧光免疫层析法 PTH 相比较高度相关 ($R=0.996\ 2$), 而甲状旁腺组织和非甲状旁腺组织的 PTH 浓度相比较 ($P<0.01$), 有显著性差异

3 讨论

对于甲状腺恶性肿瘤, 最有效的治疗方法是外科手术, 但术中因损伤、误切或影响血供而导致的甲状旁腺功能减退是甲状腺术后最常见的并发症^[5]。甲状旁腺术中保护技术包括甲状旁腺的识别、精细化甲状旁腺保护操作技术、补救性甲状旁腺自体移植技术三方面^[6-7]。甲状旁腺的识别是外科手术中甲状旁腺保护最关键的一步。由于甲状旁腺体积小, 其周围有甲状腺、脂肪、淋巴结、肌肉等组织, 在术中只能凭经验鉴别, 有一定的意外切除率^[8]。目前冰冻病理仍是鉴别甲状旁腺的金标准, 但这需要切除部分甲状旁腺组织, 术中等待时间长、费用高。细针穿刺组织洗脱液的 PTH 检测, 用于术前和术中鉴别甲状旁腺的方法, 已有文献报道^[9-10], 但国内外目前均未有报道纳米荧光快速检测细针穿刺洗脱液 PTH 的方法。本研究结果表明甲状旁腺穿刺组织洗脱液的 PTH 值明显高于非甲状旁腺组织。

通过本 POCT 方法学的建立, 为外科医生提供了一种快速、准确, 并且在手术室就能实现的科学的甲状旁腺鉴别方法, 以便于术中更好地保护甲状旁腺, 降低患者术后甲状旁腺功能减退的发生率^[11-12]。目前 PTH 的检测一般是通过 ECLIA 进行的, 需大型的检测设备, 检测时间加上运送标本时间至少需 30 min 以上, 推广应用在临床上有难度。ECLIA 法精确度和灵敏度都比较高, 但对仪器设备及操作人员有一定要求。课题组研制的荧光免疫层析试纸条具有较高的灵敏度和特异度, 4℃放置 6 个月稳定性好, 平均批内、批间 CV 为 5.32%、6.74%, 与 ECLIA 法检测结果高度相关, 完全符合临床应用要求, 而且操作简单、体积小、便于携带、易于保存^[13]。采用该荧光免疫层析试纸条可实现快速、单人份定量检测, 更适合临床的需求, 同时可实现检测仪器和试剂的产业化, 达到较好的社会效益和经济效益, 值得临床推广应用。

参考文献

- [1] Lekas P, Goldenstein PT, Bargman JM. Myocardial dysfunction and pulmonary edema post parathyroidectomy: the role of hypocalcemia[J]. *Adv Perit Dial*, 2010, 26(4): 125-129.
- [2] 安常明, 唐平章, 徐震纲, 等. 甲状旁腺素检测对甲状腺全切除后低钙症状的诊断价值[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2010, 45(3): 217-221.
- [3] Gourgiotis S, Moustafellos P, Dimopoulos N, *et al.* Inadvertent parathyroidectomy during thyroid surgery: the incidence of a complication of thyroidectomy[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2006, 391(6): 557-560.
- [4] 孙建伟, 杨净渝, 刘春生, 等. 不同甲状腺式对患者术后甲状旁腺功能、血钙变化的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(1): 147-150.
- [5] Costanzo M, Marziani A, Condorelli F, *et al.* Post-thyroidectomy hypocalcemic syndrome: predictive value of early PTH. Preliminary results[J]. *Ann Ital Chir*, 2010, 81(4): 301-305.
- [6] 李文渊. 甲状腺全切术中甲状旁腺辨识及原位保护[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(5): 753-756.
- [7] Dolapci M, Doganay M, Reis E, *et al.* Truncal ligation of the inferior thyroid arteries does not affect the incidence of hypocalcaemia after thyroidectomy[J]. *Eur J Surg*, 2000, 166: 286-288.
- [8] Lo CY. Parathyroid autotransplantation during thyroidectomy[J]. *ANZ J Surg*, 2002, 72(12): 902-907.
- [9] Abdelghani R, Noureldine S, Abbas A, *et al.* The diagnostic value of parathyroid hormone washout after fine-needle aspiration of suspicious cervical lesions in patients with hyperparathyroidism[J]. *Laryngoscope*, 2013, 123(5): 1310-1313.
- [10] Bancos I, Grant CS, Nadeem S, *et al.* Risks and benefits of parathyroid fine-needle aspiration with parathyroid hormone washout[J]. *Endocr Pract*, 2012, 18(4): 441-449.
- [11] Hughes DT, Doherty GM. Central neck dissection for papillary thyroid cancer[J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2009, 135(11): 1092-1097.
- [12] Lee YS, Nam KH, Chun WY, *et al.* Postoperative complications of clinical and economic outcomes from thyroidectomy[J]. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(4): 541-545.
- [13] 朱岚, 周衍, 黄颢, 等. 铁蛋白时间分辨荧光免疫层析法的建立及临床应用[J]. *现代免疫学*, 2016, 36(1): 50-53.

The study and application on the parathyroid hormone fluorescence microsphere-immunochromatography quantification technique

ZHU Li-guo¹, ZOU Xian¹, FAN Jun², ZHOU Jin¹, HUANG Biao² (1. *Jiangsu Institute of Nuclear Medicine Affiliated Jiang Yuan Hospital, Wuxi 214063, China*; 2. *Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China*)

Abstract: To develop a simple and high sensitive fluorescence immunoassay strip for clinical use, we employed dual antibody sandwich method and fluorescence immune-chromatography for measuring the antigen. The fluorescence labeled antibody microspheres LA001 were coated on polyester membrane-bound pad. Detection antibody CA001 was coated on the nitrocellulose membrane as the test line(T), the quality control antibody (goat-anti-mouse IgG) was coated in nitrocellulose membrane in parallel as the control line(C), excess microspheres coated with mouse antibody can gather in the control line(C), which coated with anti-mouse antibody and the parathyroid hormone (PTH) in samples at the test line, could be the formation of antibody-antigen-antibody sandwich complexes and generate a fluorescent signal. Quantitative results could be automatically calculated by fluorescence detector. The results showed that the sensitivity of the test strip is 0.8 pg/mL and has no cross-reaction with TSH; the reagent has good stability for 6 months at 4 °C. Intra-assay CV was 5.32% and inter-assay CV was 6.74%. Compared with the electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) method, the correlation is good and the difference is not statistically significant. In conclusion, the fluorescent immune-chromatographic test strip provides high sensitivity, specificity, simple operation, low cost and is suitable for clinical detection.

Key words: PTH; thyroid cancer; fluorescence immune-chromatography