

时间分辨荧光免疫法检测胎盘生长因子的方法建立及性能评价

谭玉华¹, 曹春玲², 张润锋², 潘晓芳², 李高成¹, 余海枷¹, 梁天铨¹, 冯健明¹

(1. 广州市丰华生物工程有限公司体外诊断试剂研发中心, 广州 510730; 2. 广东省医疗器械质量监督检验所综合检验四室, 广东中山 528437)

摘要: **目的** 建立检测胎盘生长因子 (placental growth factor, PLGF) 的时间分辨荧光免疫分析法 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA), 并对其性能进行评价。**方法** 利用捕获 PLGF 单克隆抗体包被微孔板, 钕标记检测 PLGF 单克隆抗体, 建立一种双抗体夹心 TRFIA 定量测定孕妇血清中的 PLGF 浓度。对该方法的检测低限、生物检测限、功能灵敏度、精密度、线性、干扰试验、交叉反应试验和 HOOK 效应等性能指标进行评价。选择 125 例孕周在 9 ~ 40 周, 无溶血、黄疸和脂血的孕妇血清剩余样本, 用于方法学比对研究, 比对试验结果的相关性采用线性回归分析。**结果** 该方法的捕获抗体包被浓度为 7.0 $\mu\text{g/ml}$, 钕标记物使用工作稀释度为 1:500, 样本最适反应时间为 90 min, 检测低限为 1.00 pg/ml, 生物检测限为 8.00 pg/ml, 功能灵敏度为 10.00 pg/ml, 批内 CV 和批间 CV 均在 5.00% 以内, 线性范围为 9.00 ~ 10 500.00 pg/ml, 分别在低浓度和高浓度质控品中添加有干扰物质的 16 种干扰样本与基础样本检测结果的相对偏倚在 -3.49% ~ 2.20% 内; 检测 5 000 pg/ml 糖基化 PLGF-1, 5 000 pg/ml 糖基化 PLGF-2, 5 000 pg/ml 未糖基化 PLGF-3, 10 000 pg/ml 未糖基化血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)/ PLGF-1 异二聚体, 50 000 pg/ml 糖基化 VEGF165 和 40 000 pg/ml 可溶性 FMS 样酪氨酸激酶 -1, 交叉反应率分别为 41.82%, 27.86%, 19.68%, 0.042%, 0.063% 和 0.004 5%; 检测样品 PLGF 浓度高达 115 000 pg/ml 时仍未出现 HOOK 效应; 样本 PLGF 浓度在 5.74 ~ 4 197.00 pg/ml 间, 与电化学发光法 (electrochemiluminescence, ECL) 检测结果的线性回归方程为 $Y=1.070 9X-30.192$, ($r=0.980 6$, $t_r=55.42$, $P<0.05$)。**结论** 该方法灵敏度高、精密度好、线性范围宽、抗干扰能力强、特异度好、检测范围宽, 与参比方法检测结果的相关性良好, 可以满足临床需要。

关键词: 时间分辨荧光免疫法; 胎盘生长因子; 性能评价

中图分类号: R373.19; R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 01-112-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2023.01.021

Establishment and Performance Evaluation of A Time-resolved Fluorescence Immunoassay for the Detection of Placental Growth Factor

TAN Yu-hua¹, CAO Chun-ling², ZHANG Run-feng², PAN Xiao-fang², LI Gao-cheng¹, YU Hai-jia¹, LIANG Tian-cheng¹, FENG Jian-ming¹

(1. R & D Center of IVD Reagents, Guangzhou Fenghua Bioengineering Co. Ltd, Guangzhou 510730, China; 2. Comprehensive Inspection Room 4, Guangdong Medical Device Quality Supervision and Inspection Institute, Guangdong Zhongshan 528437, China)

Abstract: Objective To establish a time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) for the detection of placental growth factor (PLGF) and evaluate its performance. **Methods** A double-antibody sandwich TRFIA was established to quantitatively determine the concentration of PLGF in serum of pregnant women, which based on the microplate was coated with the monoclonal antibody to capture PLGF, and the detection of PLGF monoclonal antibody was labeled by europium. The performance indicators such as lower limit of detection, biological limit of detection, functional sensitivity, precision, linearity, interference test, cross-reaction test and HOOK effect of the method were evaluated. A total of 125 remaining serum samples from pregnant women with no hemolysis, jaundice and lipemia between 9 to 40 weeks of gestation were selected for methodological comparison study, and the correlation of the comparison test results was analyzed by linear regression. **Results** The concentration of capture antibody was 7.0 $\mu\text{g/ml}$. The working dilution of europium label was 1:500. The optimal reaction time of the sample was 90 min. The lower limit of detection was 1.00 pg/ml. The biological limit of detection was 8.00 pg/ml.

作者简介: 谭玉华 (1980-), 男, 医学硕士, 临床医学检验技师, 医疗器械工程师, 二级企业培训师, 三级健康管理师, 研究方向: 医疗器械 (含体外诊断试剂) 的研发、注册、应用与医学检验, E-mail: tanywhy@aliyun.com.

The functional sensitivity was 10.00 pg/ml. The intra-assay CV and inter-assay CV were both within 5%. The linear range was 9.00 to 10 500.00 pg/ml. The relative bias of the detection results of the 16 interfering samples with interfering substances added to the low-concentration and high-concentration quality controls and the basic samples was within -3.49% to 2.20%. When detected 5 000 pg/ml glycosylated PLGF-1, 5 000 pg/ml glycosylated PLGF-2, 5 000 pg/ml unglycosylated PLGF-3, 10 000 pg/ml unglycosylated vascular endothelial growth factor (VEGF)/ PLGF-1 heterodimer, 50 000 pg/ml glycosylated VEGF165 and 40 000 pg/ml soluble FMS-like tyrosine Kinase-1 the cross-reaction rate(%) was 41.82%, 27.86%, 19.68%, 0.042%, 0.063% and 0.004 5%, respectively. The HOOK effect was not found in PLGF samples up to 115 000 pg/ml. When the concentration of PLGF in the sample was 5.74 to 4 197.00 pg/ml, the linear regression equation of TRFIA and electrochemiluminescence (ECL) detection results was $Y=1.070 9X-30.192$ ($r=0.980 6$, $t_r=55.42$, $P < 0.05$). **Conclusion** The quantitative detection of PLGF by TRFIA has high sensitivity, good precision, wide linear range, strong anti-interference ability, good specificity, wide detection range, and good correlation with the detection results of reference methods, which is valuable for clinical application.

Keywords: time-resolved fluorescence immunoassay; placental growth factor; performance evaluation

胎盘生长因子 (placental growth factor, PLGF) 对胎盘形成和胎儿发育有着重要作用, 其表达异常与异位妊娠、先兆流产、胎儿宫内生长受限、先兆子痫、21-三体综合征等多种不良妊娠结局相关^[1]。近年来从基础研究到临床研究均证明或提示 PLGF 可独立或与其他指标联合用于早孕期子痫前期预测^[2]。PLGF 在血液中的含量为皮克级水平, 且研究表明孕妇血清中 PLGF 小于 12pg/ml 时提示严重胎盘功能不全, 强烈预示 14 天内早产^[3-4], 因此对低浓度的 PLGF 准确定量具有重要意义, 需要一种高灵敏的方法进行检测。目前已报道检测 PLGF 的方法有酶联免疫吸附法^[5]、荧光免疫层析法^[6]和电化学发光法, 但酶联免疫吸附法存在酶标记物的不稳定性、定量范围窄和灵敏度低的缺陷; 荧光免疫层析法检测结果的精密度不高、批内和批间差增大; 目前电化学发光法为封闭系统, 设备昂贵, 试剂成本较高。时间分辨荧光免疫法 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 是一种将时间分辨技术与荧光免疫技术相结合的超微量化学发光法。因此本研究旨在建立一种基于 TRFIA 定量检测 PLGF 的高灵敏度方法, 并对其分析性能进行评价, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 125 例孕期在 9 ~ 40 周, 无溶血、黄疸和脂血的孕妇血清剩余样本用于方法学比对试验。样本均为非本研究试验目的而专门采集, 对患者不存在因样本采集、检测对健康带来的伤害, 不需要患者支付任何费用, 不需要进行其他专门的配合, 可视作对患者几乎没有任何风险, 或受试者的风险不大于最小风险, 因此不再提交伦理委员会评审及受试者知情同意书^[8-9]。

1.2 仪器与试剂 两株不同位点的鼠抗人 PLGF 单克隆抗体 (捕获 PLGF 单克隆抗体货号: HA131-1M; 检测 PLGF 单克隆抗体货号: HA131-2M) 以及重组人 PLGF 蛋白 (货号: B0607-04-01) 由广州

诺煜辰生物科技有限公司提供; 牛血清清蛋白 (天津康源生物技术有限公司); N1-(P-异硫氰基苄基)-二乙三胺四乙酸铈钠 (美国 PerkinElmer 公司); 截留分子量为 30 000 的超滤离心管 (美国 Millipore 公司); 96 孔微孔板 (深圳市金灿华实业有限公司); 丙烯葡聚糖凝胶 Sephacry™ S-200 [通用电气医疗系统贸易发展 (上海) 有限公司]; 其他试剂为国产分析纯; PLGF 检测试剂盒 (电化学发光法) 及配套的 PLGF 定标液 (罗氏诊断公司)。增强液、浓缩洗液、实验缓冲液、样本稀释液和 AutoTRFIA-4 型全自动荧光免疫分析仪 (广州市丰华生物工程有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 TRFIA 检测 PLGF 方法的建立

1.3.1.1 校准品的制备: 重组人 PLGF 蛋白用 50 mmol/L, pH 7.80 Tris-HCl 溶液 (含 50.0 g/L 牛血清清蛋白和 0.5 g/L 叠氮钠) 配制成 A ~ F 的 6 个校准品溶液和 2 个质控品溶液, 然后冻干保存。按照 GB/T 21415-2008^[10] 进行计量学溯源, 以罗氏诊断公司的 PLGF 检测程序作为制造商选定测量程序, 为 TRFIA 检测 PLGF 的校准品进行赋值, 校准品 A ~ F 的浓度分别为 0, 10.93, 45.24, 399.79, 1 887.80 和 8 967.50 pg/ml, 低浓度质控品和高浓度质控品的允许浓度范围分别为 176.83 ~ 228.96 pg/ml 和 1 733.50 ~ 2 260.40 pg/ml。

1.3.1.2 微孔反应板的制备: 将捕获 PLGF 单克隆抗体用 10 mmol/L, pH 4.5 磷酸盐缓冲液稀释至最适工作浓度作为包被液。将浓缩洗液用纯化水稀释 25 倍后作为洗涤工作液。含有 10.0 g/L 牛血清清蛋白的 50 mmol/L, pH 4.5 磷酸盐缓冲液作为封闭液。在 96 孔微孔板各孔中加入 100 μ l 包被液, 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 过夜孵育 22 ± 2 h, 弃去包被液。用洗涤工作液洗涤 1 次, 然后每孔加入 280 μ l 封闭液, 37 ± 1 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育 3 h, 弃去封闭液, 真空抽干过塑冷藏。

1.3.1.3 铋标记物的制备: 将 1 mg 的检测 PLGF 单克隆抗体加入截留分子量为 30 000 的超滤离心管中, 10 000 r/min 离心 9 ~ 10 min。再用 50 mmol/L, pH 9.6 的碳酸盐缓冲液重复离心洗涤 3 ~ 5 次。将处理好的 1 mg 检测 PLGF 单克隆抗体加入含有 1 mg N1-(P-异硫氰基苄基)-二乙三胺四乙酸铋钠冻干粉小瓶中, 2 °C ~ 8 °C 避光缓慢振荡孵育 48 ± 2 h, 标记反应液用 50 mmol/L, pH 7.8 Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sephacry™ S-200 柱(0.5 cm × 30 cm) 进行层析, 采用 $A_{280\text{nm}}$ 紫外光吸收法监测收集第一洗脱峰。

1.3.1.4 TRFIA 定量检测 PLGF 方法: 采用 Auto TRFIA-4 型全自动荧光免疫分析仪中的 PLGF 检测程序: 将浓缩洗液用纯化水按体积比 1:25 倍稀释, 作为洗涤工作液加入洗板机中备用。吸取 50 μl 的校准品、质控品或待测样本依次加入微孔反应板的微孔中, 同时向每孔中加入 100 μl 的铋标记物工作液, 在室温(20 ~ 25 °C)下缓慢振荡孵育至最适反应时间, 然后用洗板机洗涤 6 次。向每孔中加入增强液 100 μl , 于室温下缓慢振荡 5 min 后, 检测荧光计数值[单位: 计数/秒(counts per second, Cps)], 并用配套的软件进行结果分析。样本最适反应时间确定: 通过检测校准品 A ~ F, 选择 60, 75, 90, 105 和 120 min 作为反应时间, 按照以上方法检测荧光计数值, 选择荧光计数值趋于稳定的时间点为样本最适反应时间。

1.3.2 参比方法操作: 罗氏诊断公司的 PLGF 检测试剂盒(电化学发光法)作为参比试剂, 检测程序采用 PLGF 定标液进行校准。严格按照试剂盒说明书和仪器操作说明书进行操作。

1.3.3 分析性能评价

1.3.3.1 剂量-反应曲线建立: X 轴的浓度经对数(Log)函数转换, Y 轴的荧光计数值采用对数(Log_B)函数转换, 并采用三次样条插值(spline)函数进行剂量-反应曲线拟合, 相关系数(correlation coefficient, r) 应不低于 0.990 0。

1.3.3.2 分析灵敏度评价: ①检测低限(lower limit of detection, LLD): 为样品单次检测可以达到非空白检测响应量对应的分析物量。平行检测 0 pg/ml 校准品 A 12 次的空白荧光计数值, 并计算空白荧光计数值的平均值($x_{\text{空白}}$)、标准偏差($s_{\text{空白}}$)和 95% 的可能性荧光值($x_{\text{空白}} + 2s_{\text{空白}}$), 95% 的可能性荧光计数值在剂量-反应曲线上拟合得到的浓度值即 LLD。②生物检测限(biological limit of detection, BLD): 某样品单次检测可能具有的最小响应量刚大于空白检测低限响应量, 该样品内含有的分析浓度或其他量值。将检测限样品 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 9.00 和 10.00 pg/ml

天间检测 12 次, 将各检测限样品的荧光计数值均值($x_{\text{检测限样品}}$)减去 $x_{\text{空白}}$ 得到净荧光计数值($x_{\text{净}}$), 当 99.7% 的可能性出现的最低荧光计数值($x_{\text{净}} - 3s_{\text{检测限样品}}$), 大于空白荧光计数值减去空白荧光计数值平均值可能具有的最高值($3s_{\text{空白}}$), 说明检测限样品荧光计数值有 99.7% 的可能性一定大于空白样品的荧光计数值, 能定量地报告结果, 即为 BLD。③功能灵敏度(functional sensitivity, FS): 以天间重复变异系数(coefficient of variation, CV)为 20% 时对应检测限样品具有的平均浓度。将检测限样品 1.00, 2.00, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 7.00, 8.00, 9.00 和 10.00 pg/ml 天间检测 12 次, 计算各检测限样品检测荧光计数值的变异系数, 当检测限样品检测荧光计数值的 CV 小于并接近 20% 时对应分析物量即为 FS。

1.3.3.3 精密度评价: 批内检测低浓度和高浓度质控品各 10 次, 批间检测低浓度和高浓度质控品各 30 次, 计算批内 CV 和批间 CV。

1.3.3.4 线性评价: 将高浓度样本采用样本稀释液稀释成浓度分别为 9.00, 45.00, 450.00, 2 100.00 和 10 500.00 pg/ml 的 5 个浓度线性评价样品, 对每一浓度的样品重复测定 2 次, 计算其平均值, 将测定浓度的平均值与理论浓度用最小二乘法进行直线拟合, r 应不低于 0.990 0。

1.3.3.5 干扰试验: 在低浓度和高浓度的质控品中分别添加干扰物质至以下水平: 180 g/L 血红蛋白, 21.54 mmol/L 三酰甘油, 818 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素, 1 324 $\mu\text{mol/L}$ 对乙酰氨基酚, 171 $\mu\text{mol/L}$ 左旋抗坏血酸, 3.62 mmol/L 阿司匹林, 5.0 mmol/L 肝素钙, 5%(v/v) 乙醇(99.5%), 1 400 nmol/L 叶酸, 21 $\mu\text{mol/L}$ 庆大霉素, 60 g/L 人血清清蛋白, 2 425 $\mu\text{mol/L}$ 异丁苯丙酸, 45 g/L 总蛋白(γ -球蛋白), 600 IU/ml 类风湿因子, 效价为 1:1 000 的抗核抗体和 125 ng/ml 人抗小鼠抗体, 添加有等体积空白溶剂的低浓度或高浓度的样本为基础样本, 计算干扰样本与基础样本检测结果的相对偏倚。

1.3.3.6 交叉反应试验: 一定浓度的交叉反应物质的实测结果与相应物质的含量的比值的百分率即交叉反应率。参照参比试剂或同类试剂说明书中声称的以下交叉物质的交叉反应率, 检测 5 000 pg/ml 糖基化 PLGF-1, 5 000 pg/ml 糖基化 PLGF-2, 5 000 pg/ml 未糖基化 PLGF-3, 10 000 pg/ml 未糖基化血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) / PLGF-1 异二聚体和 50 000 pg/ml 糖基化 VEGF165 的交叉反应率应分别小于 43%, 28%, 20%, 4% 和 0.1%。检测 40 000 pg/ml 可溶性 fms 酪氨酸激酶-1(soluble fms-like tyrosine kinase-1,

sFlt-1) 的交叉反应率应不高于本研究的 BLD 与 sFlt-1 的含量的比值的百分率 (即 sFlt-1 的实测值应低于 BLD)。

1.3.3.7 HOOK 效应评价: 将重组人 PLGF 蛋白用样本稀释液稀释成理论浓度为 10, 40, 400, 2 000, 10 000, 20 000, 40 000, 50 000, 60 000, 70 000, 80 000, 90 000, 100 000, 105 000, 110 000, 115 000, 120 000, 125 000, 130 000, 140 000, 150 000, 160 000 和 200 000 pg/ml 的样品, 检测其荧光计数值。当样品 PLGF 浓度达到一定高浓度, 检测荧光计数值不升高, 反而下降时即出现 HOOK 效应。

1.3.3.8 方法学比对试验: 将本研究方法与参比方法平行检测 125 份孕妇血清剩余样本中的 PLGF 含量, 采用最小二乘法进行线性回归分析, r 应不低于 0.975。

1.4 统计学分析 结果数据采用 Microsoft Excel 软件进行统计分析。计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $CV = 100\% \times s/x$, 两种方法检测结果的相关性采用线性回归分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 捕获抗体和钨标记物的最适使用工作浓度 经方阵 (棋盘) 滴定法, 捕获 PLGF 单克隆抗体的最适包被浓度为 $7.0 \mu\text{g/ml}$, 钨标记物的最适使用工作稀释度为 1:500。

2.2 样本最适反应时间 在不同样本反应时间下, 校准品 A ~ F 检测荧光计数值趋于稳定时的最适反应时间为 90 min。

2.3 剂量-反应曲线 见图 1。校准品 A ~ F 的浓度值与荧光计数值拟合得到的剂量-反应曲线的 r 达到 1。

2.4 分析灵敏度 见表 1。平行检测校准品 A 12 次

的空白荧光计数值 ($x_{\text{空白}} \pm s_{\text{空白}}$) 为 531.25 ± 61.59 CPs; 95% 的可能性荧光值 ($x_{\text{空白}} + 2s_{\text{空白}}$) 为 654.43 CPs, 在剂量-反应曲线上拟合得到 LLD 为 1.00 pg/ml。BLD 和 FS 分别为 8.00 pg/ml 和 10.00 pg/ml。

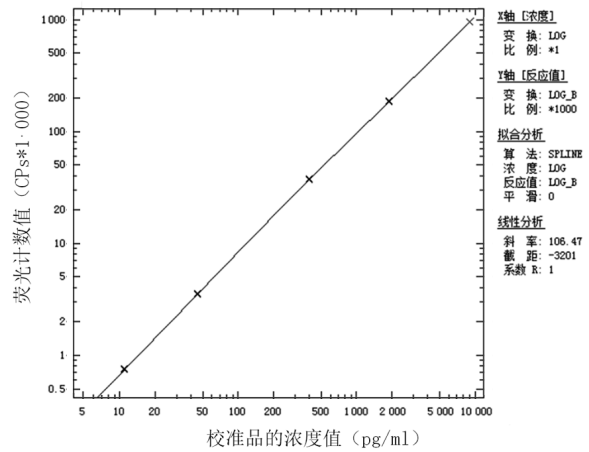


图 1 剂量-反应曲线

表 1 BLD 和 FS 评价结果

PLGF 水平 (pg/ml)	$x_{\text{净}}$	$s_{\text{检测限样品}}$	$x_{\text{净}} - 3s_{\text{检测限样品}}$	CV (%)
1	136.42	217.53	-516.17	159.46
2	201.08	173.67	-319.93	86.37
3	273.58	166.47	-225.83	60.85
4	362.25	153.2	-97.35	42.29
5	494.58	171.7	-20.52	34.72
6	618.25	178.55	82.60	28.88
7	646.83	165.53	150.24	25.59
8	769.75	172.07	253.54	22.35
9	785.25	172.87	266.64	22.01
10	1 023.33	156.75	553.08	15.32

2.5 精密度 见表 2。检测低浓度和高浓度质控品的批内 CV 和批间 CV 均在 5.00% 以内。

表 2 精密度评价结果

类别	批内实验结果			批间实验结果		
	\bar{x} (pg/ml)	s (pg/ml)	CV (%)	\bar{x} (pg/ml)	s (pg/ml)	CV (%)
低浓度	199.88	3.55	1.78	198.28	7.48	3.77
高浓度	1 947.97	52.22	2.68	2 010.11	77.91	3.88

2.6 线性 在线性范围 9.00 ~ 10 500.00 pg/ml 内, 实测浓度与理论浓度的线性回归方程为 $Y=1.020 5X-30.379$, $r=1$ 。

2.7 抗干扰能力 见表 3。分别在低浓度和高浓度质控品中添加有干扰物质的 16 种干扰样本, 与基础样本的相对偏倚在 -3.49% ~ 2.20% 内。

2.8 交叉反应 检测 5 000 pg/ml 糖基化 PLGF-1, 5 000 pg/ml 糖基化 PLGF-2, 5 000 pg/ml 未糖基化 PLGF-3, 10 000 pg/ml 未糖基化 VEGF/ PLGF-1 异

二聚体, 50 000 pg/ml 糖基化 VEGF165 和 40 000 pg/ml sFlt-1, 交叉反应率分别为 41.82%, 27.86%, 19.68%, 0.042%, 0.063% 和 0.004 5%。

2.9 HOOK 效应 当样本中 PLGF 浓度超过 115 000 pg/ml 时, 荧光检测值开始出现下降, 表现出 HOOK 效应。

2.10 方法学比对 见图 2。在 5.74 ~ 4 197.00 pg/ml 内, 与参比方法检测结果的线性回归方程为 $Y=1.070 9X-30.192$ ($r=0.980 6$, $t_r=55.42$, $P < 0.05$)。

表3 抗干扰能力评价结果

干扰物质 (浓度)	低浓度质控品			高浓度质控品		
	基础样本 (pg/ml)	干扰样本 (pg/ml)	干扰率 (%)	基础样本 (pg/ml)	干扰样本 (pg/ml)	干扰率 (%)
血红蛋白 (180 g/L)	179.32	181.82	1.39	1 781.14	1 784.54	0.19
三酰甘油 (21.54 mmol/L)	179.18	174.06	-2.86	1 782.02	1 778.52	-0.20
胆红素 (818 μmol/L)	178.26	179.30	0.58	1 778.98	1 782.24	0.18
对乙酰氨基酚 (1 324 μmol/L)	176.54	172.28	-2.41	1 778.78	1 773.64	-0.29
左旋抗坏血酸 (171 μmol/L)	178.36	176.30	-1.15	1 779.84	1 778.82	-0.06
阿司匹林 (3.62 mmol/L)	177.78	173.89	-2.19	1 774.56	1 770.36	-0.24
肝素钙 (5.0 mmol/L)	179.42	181.10	0.94	1 781.02	1 779.28	-0.10
99.5%(v/v)乙醇 [5%(v/v)]	179.40	175.18	-2.35	1 779.88	1 776.02	-0.22
叶酸 (1 400 nmol/L)	179.68	175.62	-2.26	1 779.56	1 773.68	-0.33
庆大霉素 (21 μmol/L)	177.96	176.92	-0.58	1 779.94	1 780.90	0.05
人血清清蛋白 (60 g/L)	178.44	178.38	-0.03	1 781.78	1 781.50	-0.02
异丁苯丙酸 (2 425 μmol/L)	179.12	172.86	-3.49	1 776.34	1 770.70	-0.32
总蛋白 (γ-球蛋白) (45 g/L)	178.98	181.76	1.55	1 780.96	1 782.42	0.08
类风湿因子 (600 IU/ml)	179.64	183.60	2.20	1 780.24	1 782.54	0.13
抗核抗体 (效价为 1:1 000)	178.76	182.24	1.95	1 780.78	1 783.20	0.14
人抗小鼠抗体 (125 ng/ml)	179.58	182.34	1.54	1 778.66	1 781.46	0.16

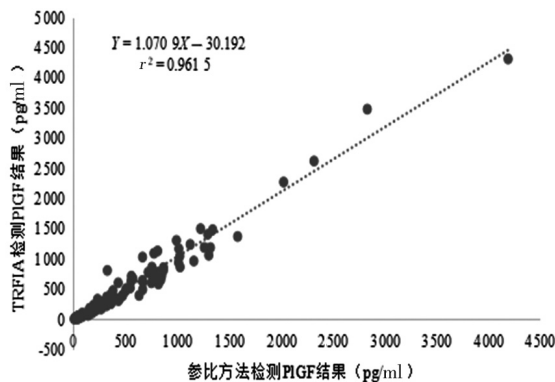


图2 线性回归曲线

3 讨论

胎盘生长因子 (PLGF) 是一种高度特异性的标志物, 对滋养层细胞和内皮细胞功能有独特的调节作用, 能够促进新生血管生成, 与妊娠期高血压疾病、胎儿生长受限、流产和 21-三体综合征等高危妊娠的发生、发展关系密切。随着“三孩政策”的实施, 高龄、高危产妇增加, 随之而来的妊娠期高血压疾病、胎儿生长受限、流产及 21-三体综合征等高危妊娠发生率将逐渐增高, 因此, 对 PLGF 的深入研究将有助于揭示这些疾病的发病机制, 并为疾病的早期预测、动态监测提供新的手段和方法^[1]。

本研究基于时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA) 定量检测 PLGF, 其检测低限 (1.00 pg/ml) 优于文献 [6] 报道的荧光免疫层析法的检测低限 (6.08 pg/

ml) 和文献 [5] 报道的酶联免疫吸附法的检测低限 (12 pg/ml)。本研究的生物检测限 (8.00 pg/ml) 优于文献 [6] 报道的荧光免疫层析法的检出限 (10.0 pg/ml)。本研究的功能灵敏度 (10.00 pg/ml) 与参比方法说明书上声称的功能灵敏度一致。本研究的线性范围 (9.00 ~ 10 500.00 pg/ml) 宽于文献 [6] 报道的荧光免疫层析法的线性范围 (20.0 ~ 9 000.0 pg/ml), 明显宽于文献 [5] 报道的酶联免疫吸附法的线性范围 (15.6 ~ 2 000 pg/ml)。本研究中的 16 种干扰物质对 PLGF 检测结果的干扰率在 ±10% 以内, 表明已达到常规方法抗干扰能力^[11]。PLGF 为 VEGF 家族成员之一, 其碱基序列与 VEGF 有高度同源性, PLGF-1, PLGF-2 和 PLGF-3 属于 PLGF 异构体, 且 PLGF 可与 VEGF 形成异二聚体, 而 sFlt-1 为 PLGF 的可溶性受体^[2], 本研究检测糖基化 PLGF-1, 糖基化 PLGF-2, 未糖基化 PLGF-3, 未糖基化 VEGF/PLGF-1 异二聚体、糖基化 VEGF165 和 sFlt-1 的交叉反应率均符合可接受标准。据报道健康孕妇血清中 PLGF 水平分泌呈峰形, 28 ~ 30 孕周时达到高峰 (约 180 pg/ml)^[3], 但在患有子痫前期的孕妇中, PLGF 水平呈下降趋势^[12], 本研究检测高达 115 000 pg/ml 的 PLGF 样本仍未出现 HOOK 效应, 因此本研究的检测范围已能满足临床检测需要。与参比方法检测结果的 r 达 0.980 6 ($t_r=55.42, P < 0.05$), 表明两种方法间检测结果具有良好的相关性。 (下转第 146 页)

- 15:2561-2572.
- [22] ZHANG Tingting, KAWAGUCHI N, YOSHIHARA K, et al. Silibinin efficacy in a rat model of pulmonary arterial hypertension using monocrotaline and chronic hypoxia[J]. *Respiratory Research*, 2019, 20(1): 79.
- [23] WEI Liuping, ZHANG Bo, CAO Weiwei, et al. Inhibition of CXCL12/CXCR4 suppresses pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and cell cycle progression via PI3K/Akt pathway under hypoxia[J]. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 2015, 35(4): 329-339.
- [24] YI Dan, LIU Bin, WANG Ting, et al. Endothelial autocrine signaling through CXCL12/CXCR4/FoxM1 axis contributes to severe pulmonary arterial hypertension[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(6): 3182.

收稿日期: 2021-11-25

修回日期: 2022-09-30

(上接第116页)

综上所述, 本研究方法定量检测 PLGF 的灵敏度高、精密度好、线性范围宽、抗干扰能力强、特异度好、检测范围宽, 与参比方法检测结果的相关性良好, 可以满足临床需要。

参考文献:

- [1] 匡德凤, 华绍芳. 胎盘生长因子在高危妊娠中的研究进展 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2019, 46(3): 293-296.
- KUANG Defeng, HUA Shaofang. Research progress of placental growth factor in high-risk pregnancy [J]. *Journal of International Obstetrics and Gynecology*, 2019, 46(3): 293-295.
- [2] 沈伟卫, 吕时铭. 胎盘生长因子: 一项预测子痫前期的重要指标 [J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41(11): 879-882.
- SHEN Weiwei, LÜ Shiming. Placental growth factor: a useful predictable marker in predicting preeclampsia [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2018, 41(11): 879-881.
- [3] 张悦, 杨青, 李蕊, 等. 20 ~ 24 孕周 PLGF 水平在子痫前期预测中的临床价值 [J]. *河北医药*, 2017, 39(20): 3144-3146.
- ZHANG Yue, YANG Qing, LI Rui, et al. Clinical value of PLGF levels in the prediction of preeclampsia from 20 to 24 weeks of gestation [J]. *Hebei Medical Journal*, 2017, 39(20): 3144-3146.
- [4] National Institute for Health and Care Excellence (NICE). PLGF-based testing to help diagnose suspected pre-eclampsia (Triage PLGF test, Elecsys immunoassay sFlt-1/PLGF ratio, DELFIA Xpress PLGF 1-2-3 test, and BRAHMS sFlt-1 Kryptor/BRAHMS PLGF plus Kryptor PE ratio) [EB/OL]. London, UK: NICE, 2016.
- [5] 张晟, 高小平, 陆华, 等. 可溶性人胎盘生长因子 ELISA 检测试剂盒的建立及性能分析 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2016, 24(11): 772-777, 789.
- ZHANG Sheng, GAO Xiaoping, LU Hua, et al. Performance analysis of a ELISA kit for detection of soluble placental growth factor [J]. *Chinese Journal of Family Planning*, 2016, 24(11): 772-777, 789.
- [6] 马锦琪, 李鹰, 黄建荣, 等. 胎盘生长因子荧光免疫层析法检测的临床性能评估 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2021, 41(1): 54-58, 64.
- MA Jinqi, LI Ying, HUANG Jianrong, et al. Performance evaluation of placental growth factor by fluorescence immunochromatography [J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)*, 2021, 41(1): 54-58, 64.
- [7] 陈陆, 宋玉杰, 王晶, 等. 子痫前期标志物 sFlt-1 与 PLGF 的检验性能及临床预测能力评估 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2019, 26(11): 1810-1817.
- CHEN Lu, SONG Yujie, WANG Jing, et al. The experimental and clinical validation of the preeclampsia markers sFlt-1 and PLGF [J]. *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*, 2019, 26(11): 1810-1817.
- [8] 赵强元, 刘敏, 齐永志, 等. 体外诊断试剂临床试验免除知情同意的伦理学探讨 [J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(18): 2425-2426.
- ZHAO Qiangyuan, LIU Min, QI Yongzhi, et al. Ethical discussion on exemption of informed consent for clinical trials of in vitro diagnostic reagents [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2014, 35(18): 2425-2426.
- [9] 周伶俐, 魏力强. 临床实验室应用不同检测系统检测血清心肌钙蛋白 I 结果的一致性分析研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 33(2): 137-141, 161.
- ZHOU Lingli, WEI Liqiang. Consistency analysis of serum cardiac troponin I with different detection systems in clinical laboratory [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 33(2): 137-141, 161.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 21415-2008 (ISO 17511:2003): 体外诊断医疗器械 - 生物样品中量的测量 - 校准品和控制物质赋值的计量学溯源性 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of China. GB/T 21415-2008(ISO 17511:2003): In vitro diagnostic medical devices - Measurement of quantities in biological samples - Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials [S]. Beijing: China Standard Press, 2008.
- [11] 白晶, 王治海, 杨大伟, 等. TRFIA 全血降钙素原检测试剂盒的性能评价 [J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(22): 3313-3315.
- BAI Jing, WANG Zhihai, YANG Dawei, et al. Performance evaluation of whole blood procalcitonin detection reagent kit by time-resolved fluoroimmunoassay [J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2017, 14(22): 3313-3315.
- [12] 刘姝, 董旻岳. PLGF 在孕早期子痫前期和唐氏综合征筛查中的临床应用 [J]. *中国现代医生*, 2019, 57(28): 165-168.
- LIU Jiao, DONC Minyue. Clinical application of PLGF in preeclampsia and Down's syndrome screening in early pregnancy [J]. *China Modern Doctor*, 2019, 57(28): 165-168.

收稿日期: 2022-05-18

修回日期: 2022-07-02