

# 全自动时间分辨荧光免疫分析技术检测血清抑制素A的方法 建立及性能评价

谭玉华<sup>1</sup>, 冯健明<sup>1</sup>, 于婷<sup>2</sup>, 余海枷<sup>1</sup>, 陈龙<sup>1</sup>, 戴林彬<sup>1</sup>

(1. 广州市丰华生物股份有限公司, 广州 510730; 2. 中国食品药品检定研究院体外诊断试剂检定所, 北京 100050)

**摘要:** **目的** 建立一种全自动时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)技术检测血清抑制素A(INH A)的方法, 并对其性能进行评价。**方法** 抑制素 $\beta$ A单克隆抗体包被微孔板作为微孔反应板, 钕标记抑制素 $\alpha$ 单克隆抗体作为钕标记物, 采用全自动TRFIA仪定量检测孕妇血清中INH A浓度, 对其分析灵敏度、准确度、回收率、线性、精密度、校准品均匀性和特异度等性能指标进行评价。选择69例孕周在14~21周的无溶血、黄疸和脂血的孕妇血清样本同时进行化学发光法及TRFIA法检测进行方法学比对试验, 一致性采用 $t$ 检验、线性相关分析、回归分析和Bland-Altman法分析。**结果** 抑制素 $\beta$ A单克隆抗体最适包被浓度为 $4\mu\text{g/ml}$ , 钕标记抑制素 $\alpha$ 单克隆抗体母液最适稀释比为1:1 000, 检测下限、生物检测限和功能灵敏度分别为0.75、10.00和25.00pg/ml, 检测国际标准品的相对偏差在 $-9.28\%\sim-2.17\%$ , 回收试验的平均回收率在 $92.71\%\sim100.79\%$ 。在 $20.00\sim2\,000.00\text{pg/ml}$ 范围内, 线性相关系数可达0.999 5, 批内和批间变异系数(CV)分别在 $1.56\%\sim1.71\%$ 和 $1.61\%\sim2.22\%$ , 校准品B~F的瓶间CV在 $2.23\%\sim3.47\%$ 。交叉反应中, 检测高浓度的人促甲状腺激素(hTSH)、人促黄体激素(hLH)、泌乳素(PRL)、人促卵泡激素(hFSH)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、人甲胎蛋白(hAFP)、 $\alpha$ 2-巨球蛋白(AMG)、激活素A(ACTA)、激活素AB(ACTAB)、激活素B(ACTB)、抑制素B(INH B)和卵泡抑素(FST), 结果均不高于10pg/ml。自建方法与对比方法定量测定结果高度相关( $r=0.996\ 8$ ,  $t_r=101.99$ ,  $P<0.05$ ), 95.65%的相对偏差数据点在95%一致性限( $-7.48\%$ ,  $7.63\%$ )内, 且95%一致性限的置信区间( $-9.07\%$ ,  $9.24\%$ )在 $\pm 10\%$ 内。**结论** 自建方法具有灵敏度高、准确度好、线性范围宽、精密度好和特异度高等优点, 与对比方法检测结果具有高度的相关性和一致性, 满足临床检测需求。

**关键词:** 时间分辨荧光免疫分析; 抑制素A; 性能评价

中图分类号: R446.11; Q503 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2026)02-023-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2026.02.005

## Establishment and Performance Evaluation of Automatic Time Resolved Fluorescence Immunoassay for the Detection of Serum Inhibin A

TAN Yuhua<sup>1</sup>, FENG Jianming<sup>1</sup>, YU Ting<sup>2</sup>, YU Haijia<sup>1</sup>, CHEN Long<sup>1</sup>, DAI Linbin<sup>1</sup>

(1. Guangzhou Fenghua Bioengineering Co.Ltd., Guangzhou 510730, China; 2. Institute for in Vitro Diagnostic Control, National Institutes for Food and Drug Reagents Testing, Beijing 100050, China)

**Abstract: Objective** To establish an automatic time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) for the detection of serum inhibin A (INH A) and evaluate its performance. **Methods** The microwell plate was coated with anti-inhibin  $\beta$  A monoclonal antibody served as microwell reaction plate. Europium-labeled anti-inhibin  $\alpha$  monoclonal antibody was used as the europium marker. The INH A concentrations in maternal serum were quantitatively detected by automatic TRFIA instrument. Performance indicators including analytic sensitivity, accuracy, recovery rate, linearity, precision, calibration uniformity, and specificity were evaluated. A total of 69 serum samples from pregnant women without hemolysis, jaundice and lipemia were selected from 14 to 21 weeks of gestation and tested concurrently using chemiluminescence and TRFIA methods for methodological comparison. The consistency was analyzed by  $t$  test, linear correlation analysis, regression analysis and the Bland-Altman method. **Results** The optimal coating concentration for anti-inhibin  $\beta$  A monoclonal antibody was  $4\mu\text{g/ml}$ . The optimal dilution ratio for the parent solution of europium-labeled anti-inhibin  $\alpha$  monoclonal antibody was 1:1 000. The detection limit, biological detection limit and functional sensitivity were 0.75, 10.00 and 25.00 pg/ml, respectively. The relative deviation for international standards ranged from  $-9.28\%$  to  $-2.17\%$ , and the average recovery rate was from 92.71% to 100.79%.

**作者简介:** 谭玉华(1980-), 男, 医学硕士, 医疗器械高级工程师, 临床医学检验技师, 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、注册与应用, 临床医学检验和标准化研究, E-mail: tanywhy@aliyun.com。

冯健明(1978-), 男, 本科, 主管检验技师, 研究方向: 医疗器械(含体外诊断试剂)的研发、注册与应用, E-mail: 845776124@qq.com, 并列第一作者。

**通讯作者:** 于婷(1978-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 体外诊断试剂质量控制与评价、标准化研究以及标准物质研制, E-mail: yuting@nifdc.org.cn。

The linear correlation coefficient reached 0.999 5 within the range of 20.00 to 2000.00 pg/ml. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation ranged from 1.56% to 1.71% and 1.61% to 2.22%, respectively. The bottle-to-bottle coefficient of variation for calibrators B ~ F ranged from 2.23% to 3.47%. In the cross-reactivity testing, high concentrations of human thyrotropin (hTSH), human luteinizing hormone (hLH), prolactin (PRL), human follicle-stimulating hormone (hFSH), human chorionic gonadotropin (hCG), human alpha-fetoprotein (hAFP),  $\alpha$  2-macroglobulin (AMG), activin A (ACTA), activin AB (ACTAB), activin B (ACTB), inhibin B (INH B) and follistatin (FST) were detected, and the results were not higher than 10 pg/ml. The quantitative results of the self-developed method were highly correlated with those of the reference method ( $r=0.996\ 8$ ,  $t_r=101.99$ ,  $P<0.05$ ). 95.65% of the relative deviation data points fell within the 95% consistency limits (-7.48% to 7.63%), and the 95% confidence interval of the consistency limits (-9.07% to 9.24%) fell within  $\pm 10\%$ . **Conclusions** The self-developed method has the advantages of high sensitivity, good accuracy, a wide linear range, good precision, and high specificity, which has high correlation and consistency with the reference method, meeting clinical testing requirement.

**Keywords:** time resolved fluorescence immunoassay; inhibin A; performance evaluation

抑制素A(inhibin A, INH A)是一种由 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基经二硫键连接而成的异二聚体糖蛋白激素,在先兆子痫、妊娠期糖尿病、早产、低出生体重、巨大儿和胎儿生长受限等不良妊娠结局预测<sup>[1-4]</sup>,以及唐氏综合征(down syndrome, DS)产前筛查<sup>[5-7]</sup>方面具有重要的临床指导意义。特别是在产前筛查中加入INH A后,可提高DS的检出率,并可降低假阴性<sup>[6-7]</sup>。由于早期INH A检测试剂盒所用的抗体为两种针对抑制素 $\alpha$ 亚基的不同抗体,易与各种形式的抑制素和抑制素前体物质的抗原决定簇部位发生反应,特异度不高<sup>[7-9]</sup>,灵敏度差<sup>[7]</sup>,且方法学间检测结果偏差较大<sup>[7,10]</sup>。本研究旨在利用全自动时间分辨荧光免疫分析(time-resolved fluorescence immunoassay, TRFIA)技术建立一种高灵敏度、高特异度和操作简单的检测孕妇血清INH A的方法,并对其性能进行评价。

## 1 材料与方 法

1.1 研究对象 选择69例孕周在14~21周的孕妇血清样品用于方法学比对试验,样品均无溶血、黄疸和脂血。样品均非本研究试验目的而专门采集的,不涉及受检者隐私信息,对受检者几乎无任何损害和潜在风险,所有受检者在就诊时均已完成知情同意,因此本研究不再提交伦理委员会评审及受试者知情同意书<sup>[11]</sup>。

1.2 仪器与试剂 INH A国际标准品(NIBSC编号:91/624, 150 000 IU/安瓿,约含5  $\mu$ g重组人INH A,英国国家生物制品检定所);鼠源抑制素 $\beta$  A单克隆抗体(抗INH  $\beta$  A)和鼠源抑制素 $\alpha$ 单克隆抗体(抗INH  $\alpha$ )(广州诺煜辰生物科技有限公司);人促甲状腺激素(human thyrotropin, hTSH)(美国Medix公司);30%(v/v)过氧化氢(国药集团化学试剂有限公司);人甲胎蛋白(human alpha-fetoprotein, hAFP)(英国BBI Solutions Ltd);INH A抗原(英国Randox公司);人促黄体激素(human luteinizing hormone, hLH)、人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)和截留分子量

为30 000的超滤离心管(美国Merck公司); $\alpha$  2-巨球蛋白( $\alpha$  2-macroglobulin, AMG)(上海泽叶生物科技有限公司);泌乳素(prolactin, PRL)、人促卵泡激素(human follicle-stimulating hormone, hFSH)、激活素A(activin A, ACTA)、激活素B(activin B, ACTB)和卵泡抑素(follistatin, FST)(美国MedChemExpress公司);激活素AB(activin AB, ACTAB)(美国Neuromics公司);抑制素B(inhibin B, INH B)(南京欧凯生物科技有限公司);牛血清清蛋白(安徽康源生物技术有限公司);丙烯葡聚糖凝胶Sephacry<sup>TM</sup> S-200(美国GE公司);N<sub>1</sub>-(P-异硫氰基苄基)-二乙三胺四乙酸铀钠(美国Revvity公司);INH A测定试剂盒(化学发光法)和Access2型化学发光仪(美国Beckman Coulter公司);增强液、浓缩洗液、实验缓冲液、样品稀释液和AutoTRFIA-4型全自动荧光免疫分析仪(广州市丰华生物股份有限公司);其他试剂为国产分析纯。

## 1.3 方 法

### 1.3.1 全自动TRFIA检测血清INH A的方法建立

1.3.1.1 校准品和质控品的制备:以INH A国际标准品为对照,INH A抗原采用含50 g/L牛血清清蛋白的50 mmol/L, pH7.8三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液稀释成0、25.00、100.00、500.00、1 000.00和2 000.00 pg/ml的校准品A~F( $S_A \sim S_F$ ),以及115.00、250.00和500.00 pg/ml的质控品。

1.3.1.2 微孔反应板的制备:采用棋盘滴定法确定抗INH  $\beta$  A最适包被浓度,将抗INH  $\beta$  A用20 mmol/L, pH 9.6碳酸盐缓冲液稀释成包被液,采用含有50 g/L蔗糖和10 g/L BSA的20 mmol/L, pH7.4的磷酸盐缓冲液作为封闭液,再参考文献[12]的方法制备微孔反应板。

1.3.1.3 铀标记物的制备:将抗INH  $\alpha$ 与N<sub>1</sub>-(P-异硫氰基苄基)-二乙三胺四乙酸铀钠按质量比1:1混合,再参考文献[12]的方法,制作铀标记物母液。采用棋盘滴定法确定铀标记物母液最适工作浓度,铀标记物母液采用实验缓冲液<sup>[14]</sup>稀释成铀标记物工作液。

1.3.1.4 建立全自动TRFIA检测INH A程序:将浓缩洗液用纯化水按体积比1:25稀释成洗涤工作液。将30%(v/v)过氧化氢采用实验缓冲液<sup>[14]</sup>稀释成4.5%(v/v)的过氧化氢工作液。AutoTRFIA-4型全自动荧光免疫分析仪操作如下:向微孔反应板的微孔中依次加入75  $\mu$ l校准品、质控品或样品,同时每微孔中加入37  $\mu$ l样品稀释液<sup>[15]</sup>和37  $\mu$ l过氧化氢工作液,室温振荡孵育3h,然后在每微孔中加入50  $\mu$ l钨标记物工作液,继续在室温下振荡孵育1h,采用洗涤工作液洗涤微孔反应板6次,加入200  $\mu$ l增强液,缓慢振荡孵育5min,在判读仪中检测荧光计数值(fluorescence value, FV)[单位:计数/秒(counts per second, CPs)],并用配套的软件进行结果分析。

1.3.2 比对方法操作:严格按照Beckman Coulter公司的INH A测定试剂盒(化学发光法)和Access2型化学发光仪的说明书操作。

### 1.3.3 性能评价

1.3.3.1 剂量-反应曲线建立:采用双对数(log-log<sub>B</sub>)数学模型,三次样条插值(spline)函数拟合剂量-反应曲线,线性相关系数( $r$ )应不低于0.990 0。

1.3.3.2 分析灵敏度评价:参照文献[12]的方法进行检测下限(lower limit of detection, LLD)、生物检测限(biological limit of detection, BLD)和功能灵敏度(functional sensitivity, FS)评价。

1.3.3.3 准确度评价:检测50.00、100.00和1 000.00 pg/ml的INH A国际标准品各稀释3次,3次结果的相对偏差均应在1/2室间质评评价标准( $\pm 20.00\%$ )<sup>[13]</sup>范围内。

1.3.3.4 回收试验:将浓度为2 000.00 pg/ml的INH A标准品溶液(A)按体积比1:9分别加入到低、中、高浓度的人血清样品(B)中,得到低、中、高浓度的回收样品(A+B),重复检测样品(B)和回收样品(A+B)各3次,回收率(rate of recovery,  $R$ )应在85.00%~115.00%范围内。

1.3.3.5 线性评价:将高值样品稀释成理论浓度为20.00、60.00、200.00、300.00、500.00、1 000.00和2 000.00 pg/ml,对每一浓度样品重复测定2次,计算其平均值( $\bar{x}$ )为实测浓度,将实测浓度与理论浓度用最小二乘法进行线性拟合, $r$ 应不小于0.990 0。

1.3.3.6 精密度评价:同一批次试剂盒平行检测低、中、高3个浓度的质控品各10次,计算批内变异系数(coefficient of variation, CV),均应不大于1/4室间质量评价标准(20%)<sup>[13,16]</sup>。用3个批号的试剂盒重复测定每个质控品各10次,得到的30次测量结果,计算批间CV,均应 $\leq 1/3$ 室间质量评价标准(20%)<sup>[13,16]</sup>。

1.3.3.7 校准品均匀性评价:参照YY/T 1652-2019<sup>[17]</sup>的试验方法,取同一批号校准品( $S_B \sim S_F$ )10套,对每套校

准品的各浓度点各取1孔进行检测,并对其中一套校准品的各浓度点各测10次,计算校准品的 $CV_{\text{批间}}$ ,各校准品的 $CV_{\text{批间}}$ 均应 $\leq 1/3$ 室间质量评价标准(20%)<sup>[13,16]</sup>。

1.3.3.8 特异度评价:检测浓度为100 000 000 pg/ml的hTSH, 100 000 000 pg/ml的hLH, 100 000 000 pg/ml的PRL, 1 000 pg/ml的hFSH, 10 000 000 pg/ml的hCG, 20 000 000 pg/ml的hAFP, 10 000 000 pg/ml的AMG, 10 000 pg/ml的ACTA, 10 000 pg/ml的ACT-AB, 10 000 pg/ml的ACTB, 10 000 pg/ml的INH B和1 000 000 pg/ml的FST,检测值均应不高于BLD。

1.3.3.9 方法学比对试验:自建方法与对比方法平行检测69例孕妇血清样中的INH A含量。线性回归分析的 $r$ 应不低于0.975 0; Bland-Altman法分析中95%的相对偏差数据点应在95%一致性限(limits of agreement, LoA)内,且95%LoA的置信区间(confidence interval, CI)应在1/2室间质量评价标准( $\pm 20\%$ )<sup>[13,16]</sup>范围内。

1.4 统计学分析 采用Excel软件对计量资料进行统计分析,正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用 $t$ 检验;方法学比对试验结果的相关性采用Pearson相关性分析;比对试验结果的一致性采用MedCalc软件进行Bland-Altman法分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

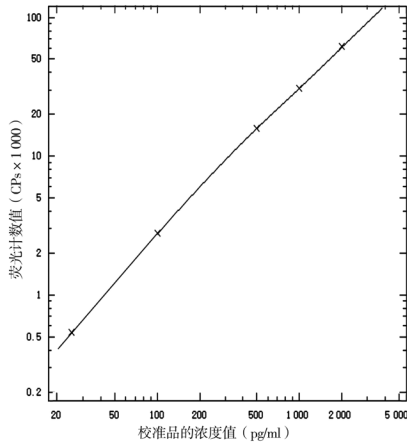
## 2 结果

2.1 最适工作浓度 见表1。当抗INH  $\beta$  A包被浓度为4.00  $\mu$ g/ml,钨标记抗INH A  $\alpha$ 母液稀释比为1:1 000时,反应基本达到饱和, $S_A$ 的FV小于1 000 CPs, $S_B$ 的FV与 $S_A$ 的FV的比值( $S_B/S_A$ )以及SF的FV与 $S_A$ 的FV的比值( $S_F/S_A$ )最大,且 $S_B/S_A$ 大于2.10,确定为最适工作浓度。

表1 不同浓度包被抗体与钨标记物的检测结果

包被浓度 ( $\mu$ g/ml)	钨标记物母液 稀释比例	$S_A$ FV (CPs)	$S_B/S_A$	$S_F/S_A$
3.00	1:500	554	1.94	111.04
	1:1000	511	1.98	112.40
	1:1500	505	1.94	110.11
	1:2000	467	0.96	55.63
4.00	1:500	573	1.96	112.36
	1:1000	520	2.15	119.12
	1:1500	516	1.97	111.54
	1:2000	498	1.09	60.37
5.00	1:500	602	1.97	113.12
	1:1000	536	1.98	118.58
	1:1500	521	1.95	116.65
	1:2000	507	1.10	66.78

2.2 剂量-反应曲线 见图1。S<sub>A</sub>~S<sub>F</sub>的浓度值与相应FV拟合得到的剂量-反应曲线的r为1.000 0。



注: X轴(浓度)采用log函数转换,比例为1:1; Y轴(FV)采用log<sub>B</sub>转换,比例为1:1 000;采用spline函数拟合剂量-反应曲线。

图1 剂量-反应曲线

2.3 分析灵敏度 零浓度S<sub>A</sub>平行检测10次的空白FV( $\bar{x}_{\text{空白}} \pm s_{\text{空白}}$ )为530.20 ± 15.68 Cps,其95%的可能性FV( $\bar{x}_{\text{空白}} + 2s_{\text{空白}}$ )为561.55 Cps,在剂量-反应曲线上拟合得到LLD为0.75 pg/ml;当检测10.00 pg/ml样品时,其净FV的95%的可能性出现的最低FV( $\bar{x}_{\text{净}} - 2s_{\text{净}}$ )为34.55 Cps,已能大于2s空白(31.36 Cps),得到BLD为10.00 pg/ml;当检测25.00 pg/ml样品时,其FV的CV为18.84%,接近并小于20%,得到FS为25.00 pg/ml。

2.4 准确度 见表2。检测50、100.00和1 000.00 pg/ml的INH A国际标准品的平均相对偏差分别为-8.42%、-3.92%和-3.39%。

国际标准品 (pg/ml)	实测浓度 (pg/ml)	相对偏差 (%)	平均相对偏差 (%)
50	45.36	-9.28	-8.42
	45.94	-8.12	
	46.07	-7.86	
100	95.41	-4.59	-3.92
	96.26	-3.74	
	96.56	-3.44	
10 000	978.26	-2.17	-3.39
	965.81	-3.42	
	954.11	-4.59	

2.5 回收率 见表3。2 000.00 pg/ml的INH A标准品溶液(A)加入到低、中、高浓度的人血清样品(B)中, R分别为92.71%、99.70%和100.79%。

2.6 线性 在20.00~2 000.00 pg/ml范围内,国际标准品的实测浓度与理论浓度的线性回归方程为Y=0.946 6X-10.05 5, r=0.999 5。

表3 回收试验评价结果 (pg/ml)

类别	测试1	测试2	测试3	$\bar{x}$	R (%)	
低浓度	样品(B)	132.91	130.41	129.31	130.87	92.71
	样品(A+B)	308.51	303.31	297.81	303.21	
中浓度	样品(B)	252.21	242.51	246.31	247.01	99.70
	样品(A+B)	432.11	423.91	409.11	421.71	
高浓度	样品(B)	497.76	502.96	505.51	502.08	100.79
	样品(A+B)	645.54	656.21	658.62	653.46	

2.7 精密度 低浓度质控品的批内和批间检测结果分别为115.22 ± 1.93 pg/ml和115.89 ± 2.23 pg/ml, CV分别为1.67%和1.93%;中浓度质控品的批内和批间检测结果分别为254.19 ± 4.35 pg/ml和253.28 ± 5.62 pg/ml, CV分别为1.71%和2.22%;高浓度质控品的批内和批间检测结果分别为506.97 ± 7.92 pg/ml和506.86 ± 8.14 pg/ml, CV分别为1.56%和1.61%。

2.8 校准品均匀性 见表4。S<sub>B</sub>~S<sub>F</sub>的CV<sub>瓶间</sub>在2.23%~3.47%间。

表4 校准品均匀性评价结果 (pg/ml)

校准品	$\bar{x}_1$	s <sub>1</sub>	$\bar{x}_2$	s <sub>2</sub>	CV <sub>瓶间</sub> (%)
B	25.32	0.84	25.03	0.42	2.87
C	99.71	4.53	98.81	3.35	3.06
D	499.31	23.84	496.86	20.28	2.51
E	1 020.71	45.60	1 016.41	28.73	3.47
F	2 016.16	88.63	1 988.76	76.37	2.23

2.9 特异度 检测高浓度的hTSH、hLH、PRL、hFSH、hCG、hAFP、AMG、ACTA、ACTAB、ACTB、FST和INH B,实测浓度分别为0.01、0.01、0.01、0.1、0.01、0.01、0.01、0.01、0.01、0.01、0.01和5.17pg/ml,交叉反应值均不高于10.00 pg/ml。

2.10 自建方法与对比方法的方法学比对结果 见图2、图3。自建方法与对比方法定量检测样品结果的差异无统计学意义( $t=0.119, P>0.05$ );与对比方法测定结果高度相关( $r=0.996 8, t_1=101.99, P<0.05$ );采用Bland-Altman法分析,95.65%的相对偏差数据点在95%LoA(-7.48%, 7.63%)内,且95%LoA CI(-9.07%, 9.24%)在±10%内,两种方法定量测定结果具有一致性。

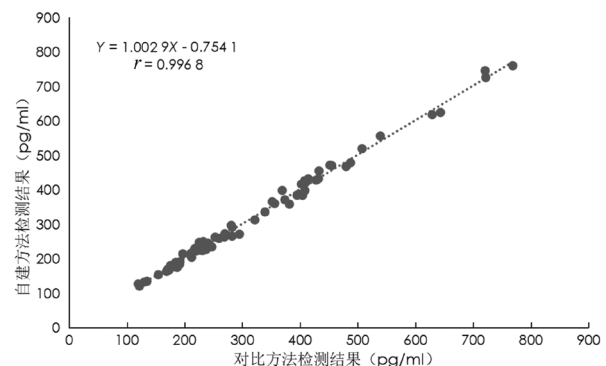


图2 线性回归曲线

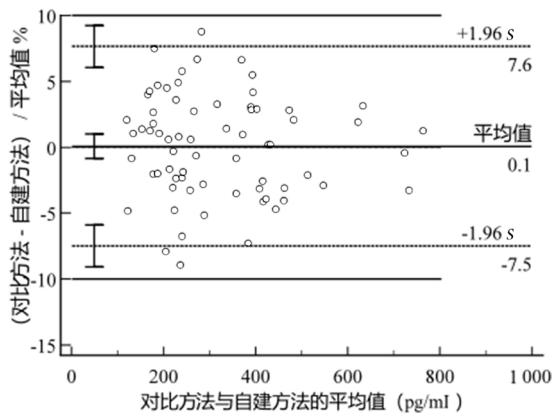


图3 自建方法与对比方法检测结果的Bland-Altman法分析

### 3 讨论

近年来INH A在妊娠相关疾病的研究中受到关注,其水平的变化可能反映了妊娠过程中的内分泌和代谢状态<sup>[18]</sup>。INH A在孕中期的正常妊娠母体血清中的浓度与相应孕周呈现U型模式,在孕15~25周(U模型的底部)的INH A平均浓度波动小,处于相对稳定的水平,是DS产前筛查的又一潜在标志物。有研究<sup>[7, 19]</sup>报道INH A在怀有DS胎儿的孕妇血清中明显升高,采用四联(hAFP、游离hCG  $\beta$ 亚基、游离雌三醇和INH A)筛查比三联(hAFP、游离hCG  $\beta$ 亚基和游离雌三醇)筛查的检出率高,而四联筛查的假阳性率显著低于三联筛查,因此INH A加入孕中期DS筛查方案,可使一定数量的孕妇避免羊膜穿刺术检查,从而降低侵入性检查对孕妇带来的各种风险。另有研究<sup>[20]</sup>发现妊娠结局为胎儿结构异常的孕中期孕妇血清INH A表达水平高于妊娠结局正常的孕妇,表明血清INH A升高是出生缺陷的危险因素,对出生缺陷预测有一定参考价值。

由于INH A天然提纯抗原的难获得性以及重组表达的困难性,使得目前商业化的检测试剂盒是基于其两个亚基不同表位的单克隆抗体所建立的双抗体夹心免疫学方法<sup>[7, 9]</sup>,但是这些抗体都是针对单一的表位,且都需要对待测血清样品进行长时间的预处理才能暴露其位点进行反应。既往研究报道<sup>[7]</sup>了Serotec和DSL(dingnostic system laboratories)两种基于酶联免疫技术检测INH A的方法,均为手工操作,难以完成INH A大批量样品的检测。Serotec方法在INH A检测过程中样品处理复杂,需用十二烷基硫酸钠(SDS)溶液加热处理,还需过氧化氢对血清样品进行预处理,以氧化蛋氨酸残基增加抗原抗体间的亲和力,提高INH A检测的敏感度。虽然DSL方法在Serotec方法的检测流程上进行了简化改良,但均为中等灵敏度,限制了其在临床上的广泛应用。直至现在国内也仅少数地区的产前诊断中心开展INH A用于孕中期DS筛查<sup>[19]</sup>。而TRFIA是一种非放射性超微量分析的发光免疫技术,具有灵敏度高和特异度

好的特点,且随着全自动技术的应用,TRFIA已成为新生儿甲状腺功能减退症筛查的主流检测方法和肾上腺皮质增生症筛查的主要检测方法<sup>[21]</sup>。本研究应用全自动TRFIA技术检测孕妇血清INH A,同DSL方法无需采用SDS溶液热处理样品,仅需采用过氧化氢直接在反应孔内氧化处理样品并与反应孔内包被的抗INH  $\beta$  A反应,但本研究(4h)较DSL法(5h)的分析时间进一步缩短;且支持大批量样品同时处理,提高检测效率,减少了人工操作步骤,适用于孕妇大群体的产前筛查<sup>[19]</sup>。

另外抑制素家族成员结构的相似性以及种属间序列的高度保守性使得其建立特异的抗体成为困难,早期INH A检测难以区分二聚体和 $\alpha$ 亚基的游离形式,因此检测结果间差异较大。既往研究<sup>[8]</sup>认为INH A在DS产前筛查中的作用,可能关键取决于所检测到的抑制素种类,从而取决于检测方法中所使用的抗体。在外周血液循环中,抑制素有32 kDa二聚体、58~73 kDa大二聚体、大的游离 $\alpha$ 亚基前体及游离的处理后 $\alpha$ 亚基多种存在形式,其中32 kDa的二聚体为抑制素的成熟形式,主要包括INH A和INH B,两者均有 $\alpha$ 亚基,其区别在于 $\beta$ 亚基形式不同,分别为 $\beta$  A亚基和 $\beta$  B亚基。INH A主要存在于妊娠期间的母体血清中,以前体、成熟、处理后多种形式存在,整个妊娠阶段,母体血清中以分子重量为30~36 KDa的成熟INH A为主。INH A检测抗体的标准化、血清样品处理及检测方法标准化是检测结果准确和可比的关键,因此迫切需要更特异的抗体,建立更敏感的检测方法并使检测指标标准化。本研究采用了特异的抗INH  $\beta$  A(识别表位为81~112氨基酸)作为捕获抗体和抗INH  $\alpha$ (识别表位为233~264氨基酸)作为检测抗体,在高灵敏和高特异的TRFIA技术原理上,联合应用了具有自主知识产权的改良实验缓冲液<sup>[14]</sup>和样品稀释液<sup>[15]</sup>,进一步提高了INH A检测的灵敏度和特异度。本研究的LLD达0.75 pg/ml,优于文献<sup>[22]</sup>报道的Access平台的LLD(1 pg/ml);校准品溯源至英国国家生物制品检定所(NIBSC)的INH A国际标准品(91/624),使检测结果标准化,准确度良好(回收率92.71%~100.79%);线性范围达20~2000 pg/ml,宽于既往报道<sup>[7]</sup>的检测范围(50~500 pg/ml),能覆盖子痫前期孕妇血清中的INH A浓度( $818.12 \pm 108.81$  pg/ml)<sup>[18]</sup>和妊娠结局为胎儿结构异常的孕妇血清中的INH A浓度( $478.25 \pm 93.48$  pg/ml)<sup>[20]</sup>,可满足临床检测需要。与文献<sup>[1, 10]</sup>报道的方法学结果比较,本研究表现出了良好的精密度,与糖蛋白激素家族中具有 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基的hTSH、hLH、hFSH和hCG,转化生长因子- $\beta$ 超家族中的ACTA、ACTAB、ACTB、INH B、FST,以及hAFP、PRL和

AMG的交叉反应结果均小于BLD,表明具有良好的特异度。与Beckman Coulter公司的化学发光法比较,检测结果间具有良好的相关性( $r=0.9968$ )和一致性。目前临床INH A检测主要采用Beckman Coulter公司的化学发光法试剂盒,由于进口试剂和设备昂贵,普及率不高。本研究实现技术自主,产品国产化不仅是技术替代,更可大幅降低成本,更易临床推广应用,提升检测可及性。

综上所述,本研究建立的全自动TRFIA检测INH A,样品处理简单,操作简便,具有灵敏度高、准确度高、线性范围宽、精密度好和特异度高等优点,与对比方法检测结果间具有高度的相关性和一致性,满足临床检测需求。

#### 参考文献:

- [1] KEIKKALA E, FORSTÉN J, RITVOS O, et al. Serum Inhibin-A and PAPP-A2 in the prediction of pre-eclampsia during the first and second trimesters in high-risk women[J]. *Pregnancy Hypertension*, 2021, 25: 116-122.
- [2] SAKITA M, ANGEL H K, ADA W T, et al. Evaluation of first trimester maternal serum inhibin-A for preeclampsia screening[J]. *PLoS One*, 2023, 18(7): e0288289.
- [3] YUE C Y, ZHANG C Y, NI Y H, et al. Are serum levels of inhibin A in second trimester predictors of adverse pregnancy outcome?[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0232634.
- [4] YEATON-MASSEY A, BAER R J, RAND L, et al. Adverse pregnancy outcomes by degree of maternal serum analyte elevation: a retrospective cohort study[J]. *AJP Reports*, 2020, 10(4): e369-e379.
- [5] QURESH Z, DHARAVATH C. Biochemical serum markers influencing maternal age risk for down's syndrome in quadruple marker[J]. *Cureus*, 2022, 14(3): e23555.
- [6] 黄雪珍,陈倩岚,蔡锦梅,等. 孕妇血清抑制素 A 联合胎盘生长因子在孕早期唐氏综合征产前筛查中的预测价值 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(8): 1044-1046, 1055.  
HUANG X Z, CHEN Q L, CAI J M, et al. Application of serum inhibin A combined with placental growth factor in prenatal screening of Down's syndrome in early pregnancy[J]. *Journal of Molecular Diagnosis and Therapy*, 2020, 12(8): 1044-1046, 1055.
- [7] KNIGHT G J, PALOMAKI G E, NEVEUX L M, et al. Clinical validation of a new dimeric inhibin-A assay suitable for second trimester Down's syndrome screening[J]. *Journal of Medical Screening*, 2001, 8(1): 2-7.
- [8] WALLACE E M, SWANSTON I A, MCNEILLY A S, et al. Second trimester screening for Down's syndrome using maternal serum dimeric inhibin A[J]. *Clinical Endocrinology*, 1996, 44(1): 17-21.
- [9] THIRUNAVUKARASU P P, WALLACE E M. Measurement of inhibin A: a modification to an enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Prenatal Diagnosis*, 2001, 21(8): 638-641.
- [10] SAHOTA D S, TSANG F H K, GU J S, et al. A technical and clinical evaluation of the new Thermofisher BRAHMS unconjugated estriol and inhibin-A assays and their use in second trimester Down syndrome screening[J]. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2021, 81(5): 371-378.
- [11] 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, 37(2): 137-141, 161.  
ZHOU L L, WEI L Q. Consistency analysis of serum cardiac troponin I with different detection systems in clinical laboratory[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(2): 137-141, 161.
- [12] 谭玉华,曹春玲,张润锋,等. 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 [J]. *现代检验医学杂志*, 2023, 38(1): 112-116, 146.  
TAN Y H, CAO C L, ZHANG R F, et al. Establishment and performance evaluation of a time-resolved fluorescence immunoassay for the detection of placental growth factor[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2023, 38(1): 112-116, 146.
- [13] 国家卫生健康委临床检验中心. 国家卫生健康委临床检验中心室内质量评价标准 [EB/OL].[2025-03-12] <https://www.nccl.org.cn/showEqaPlanProDetail?id=730>. National Center for Clinical Laboratories. The national center for health committee for clinical laboratory room between quality evaluation standard[EB/OL].[2025-03-12] <https://www.nccl.org.cn/showEqaPlanProDetail?id=730>.
- [14] 谭玉华,刘灿,赵凡一,等. 一种改良实验缓冲液及其应用 :201810170146.9[P].2020-10-09.  
TAN Y H, LIU C, ZHAO F Y, et al. An improved experimental buffer and its application: 201810170146.9 [P]. 2020-10-09.
- [15] 谭玉华,梁天铨,余海枷,等. 一种样品稀释液试剂及其应用 :202311073071.X[P].2023-11-21.  
TAN Y H, LIANG T C, YU H J, et al. A sample diluent reagent and its application: 202311073071.X[P].2023-11-21.
- [16] 国家卫生健康委临床检验中心. 临床检验定量测定项目室内质量控制允许不精密度 [EB/OL].(2023-09-05)<https://www.nccl.org.cn/showEqaPtDetail?id=3053>. National Center for Clinical Laboratories. Quantitative determination of clinical inspection project indoor quality control allows not precision [EB/OL].(2023-09-05)<https://www.nccl.org.cn/showEqaPtDetail?id=3053>.
- [17] 国家药品监督管理局.YY/T 1652-2019: 体外诊断试剂用质控物通用技术要求 [S]. 北京: 中国标准出版社出版, 2019.  
National Medical Products Administration (NMPA). YY/T 1652-2019: General technical requirements for quality control materials for in vitro diagnostic reagents [S]. Beijing: Standards Press of China, 2019.
- [18] 崔蕾,高丽丽,程玉珊,等. 抑制素 -A 与传统生化指标对子痫前期的预测价值研究 [J]. *空军航空医学*, 2024, 41(4): 322-326.  
CUI L, GAO L L, CHENG Y S, et al. The predictive value of inhibin-A versus traditional biochemical indices in preeclampsia[J]. *Aviation Medicine of Air Force*, 2024, 41(4): 322-326.
- [19] 肖文光,金凤,莫赛军. 时间分辨荧光免疫技术检测抑制素 A 在孕中期唐氏综合征产前筛查中的应用 [J].  
(下转第 45 页)

- study [J]. *eClinical Medicine*, 2022, 50: 101523.
- [21] TANG J, GOU W L, FU Y Q, et al. Association between postterm pregnancy and adverse growth outcomes in preschool-age children[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2022, 116(2): 482-490.
- [22] DENG K, LIANG J, MU Y, et al. Preterm births in China between 2012 and 2018: an observational study of more than 9 million women[J]. *Lancet Global Health*, 2021, 9(9): e1226-e1241.
- [23] LIU Y X, LIU W L, ZHUANG G Y, et al. Colonisation of group B *Streptococcus* and its effects on pregnancy outcomes in pregnant women in Guangzhou, China: a retrospective study [J]. *BMJ Open*, 2023, 13(11): e078759.
- [24] SAITO Y, KOBAYASHI S, IKEDA-ARAKI A, et al. Association between pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain and perinatal outcomes in pregnant women diagnosed with gestational diabetes mellitus: the Japan environment and children's study[J]. *Journal of Diabetes Investigation*, 2022, 13(5): 889-899.
- [25] ELORANTA A M, GUNNARSDOTTIR I, THORISDOTTIR B, et al. The combined effect of pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain on the risk of pre-labour and intrapartum caesarean section-the ICE-MCH study[J]. *PLoS One*, 2023, 18(1): e0280060.
- [26] FRØEN J F, ARNESTAD M, FREY K, et al. Risk factors for sudden intrauterine unexplained death: epidemiologic characteristics of singleton cases in Oslo, Norway, 1986-1995[J]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2001, 184(4): 694-702.
- [27] 梁嘉宁,孙悦,管梓妤.生育的集体动态:低生育率背景下生育意愿同伴效应研究[J].*西华大学学报(哲学社会科学版)*, 2025, 44(2): 66-77.  
LIANG J N, SUN Y, GUAN Z Y. Collective dynamics of fertility: peer effects on fertility intentions in low-fertility contexts[J]. *Journal of Xihua University (Philosophy & Social Sciences)*, 2025, 44(2): 66-77.
- [28] SYSOEVA A P, NEPSHA O S, MAKAROVA N P, et al. Influence of extracellular vesicles from the follicular fluid of young women and women of advanced maternal age with different miRNA profiles on sperm functional properties[J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2022, 173(4): 560-568.
- [29] FANG H Y, LIU J, QIAN K, et al. Intestinal ultrasound combined with blood inflammatory markers is a more efficient tool in evaluating severity of crohn's disease: a pilot study [J]. *Gastroenterology Research and Practice*, 2023, 2023: 2173396.
- [30] 冯宁,陈帅,窦明月,等.外周血IL-6、IL-10、SIRI在细菌性肺炎感染患者中的表达特征[J].*临床医学研究与实践*, 2024, 9(25): 18-21.  
FENG N, CHEN S, DOU M Y, et al. Expression characteristics of IL-6, IL-10 and SIRI in peripheral blood of patients with bacterial pneumonia infection [J]. *Clinical Research and Practice*, 2024, 9(25): 18-21.
- [31] OMAIR M, BAIG M S, FAROOQUI W A, et al. Relationship of neutrophil lymphocyte ratio, monocyte lymphocyte ratio and neutrophil monocyte ratio with treatment response in pulmonary tuberculosis patients during intensive phase treatment[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2024, 24(1): 615.
- [32] CURSI L, LANCELLA L, MARIANI F, et al. Monocyte-to-lymphocyte, neutrophil-to-lymphocyte and neutrophil-to-monocyte plus lymphocyte ratios in children with active tuberculosis: a multicentre study[J]. *Acta Paediatrica*, 2023, 112(11): 2418-2425.
- [33] 李革,余怡如,陈放,等.超敏CRP和单核细胞/淋巴细胞比值在妊娠糖尿病孕晚期发生不良妊娠结局中的价值研究[J].*微循环学杂志*, 2022, 32(4): 70-74.  
LI G, YU Y R, CHEN F, et al. Association of hypersensitive CRP and monocyte/lymphocyte ratio with adverse pregnancy out-comes in pregnant women with gestational diabetes mellitus in the third trimester[J]. *Chinese Journal of Microcirculation*, 2022, 32(4): 70-74.
- [34] AGAOGLU Z, TANACAN A, IPEK G, et al. Systemic inflammation response index and systemic immune-inflammation index for prediction of pregnancy loss: a case-control study[J]. *Reproductive Sciences*, 2024, 31(6): 1565-1572.

收稿日期: 2025-04-17

修回日期: 2025-05-22

## (上接第28页)

- 中文科技期刊数据库(文摘版)医药卫生, 2021(11): 245-247.  
XIAO W G, JIN F, MO S J. Application of time-resolved fluorescence immunoassay to detect inhibin-A in prenatal screening of Down syndrome during the second trimester[J]. *Chinese Science and Technology Journal Database(Abstract Edition)Medicine and Health*, 2021(11): 245-247.
- [20] 赵金萍,董添.孕妇孕中期血清PAPP-A联合Inhibin-A水平预测出生缺陷的临床价值[J].*中国计划生育学杂志*, 2024, 32(8): 1909-1913.  
ZHAO J P, DONG T. Clinical value of the levels of serum pregnancy-associated plasma protein A combined with inhibin-A of women during the second trimester of pregnancy for predicting their birth defects[J]. *Chinese Journal of Family Planning*, 2024, 32(8): 1909-1913.
- [21] 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会新生儿遗传代谢病筛查学组, 国家卫生健康委员会临床检验中心新生儿遗传代谢病筛查室间质评专业委员会. 新生儿遗传代谢病筛查实验室检测技术规范专家共识[J]. *中华新生儿科杂志*, 2023, 38(8): 449-454.  
Screening Group of Neonatal Genetic Metabolic Disease, Special Committee of Birth Defects Prevention and Control, Chinese Preventive Medical Association, Newborn Genetic Metabolic Disease Screening Laboratory Quality Evaluation Professional Committee from Clinical Laboratory Center of National Health Commission. Consensus on laboratory testing technical guidelines of neonatal genetic metabolic disease screening[J]. *Chinese Journal of Neonatology*, 2023, 38(8): 449-454.
- [22] LAMBERT M G M, PALOMAKI G E, CANICK J A. Inhibin a measurement using an automated assay platform[J]. *Prenatal Diagnosis*, 2008, 28(5): 399-403.  
收稿日期: 2025-03-04  
修回日期: 2025-05-04