维普资讯 http://www.cqvip.com

临床研究 文章编号:0253-3626(2008)05-0629-02

3 种不同方法检测甲胎蛋白的比较

陈海蔚,伍 勇

(中南大学湘雅三医院检验科,长沙 410003)

【摘 要】目的:比较测定甲胎蛋白(Alpha-fetoprotein,AFP)的 3 种不同方法。方法:采用时间分辨荧光免疫分析法(Time-resolved fluoroimmuno assay,TRFIA)、放射免疫法(Radio immuno assay,RIA)与酶联免疫吸附法(Enzme linked immunoabsorbent assay,ELISA)。分别进行线性、精密度、对比实验比较。结果:3 种方法中,TRFIA 法线性范围最宽;精密度试验中 TRFIA 法批内为 3.3%,批间为 4.7%;RIA 法批内为 5.3%,批间为 8.9%;ELISA 法批内为 10.5%,批间为 15.2%。比较试验显示 RIA 法与 TRFIA 法的结果相关性比 ELISA 法与 RIA 法好。结论:TRFIA 法测定 AFP 优于 RIA 法和 ELISA 法。

【关键词】甲胎蛋白;时间分辨荧光免疫分析法;放射免疫法;酶联免疫吸附法

【中国图书分类法分类号】R446.61 【文献标识码】B 【收稿日期】2007-07-10

Determination of serum α-fetoprotein by TRFIA, RIA and ELISA

CHEN Hai-wei, et al

(*Department of Clinical Laboratary, the Third Xiangya Hospital, Central South University*)

【Abstract】 *Objective*: To assess the efficacy of time-resolved fluoroimmuno assay (TRFIA) for quantative determination of α-fetoprotein (AFP) in comparison with radio immuno assay (RIA) and enzme linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Methods*: Thirty serum samples from randomly selected patients were collected to test AFP content with TRFIA, RIA and ELISA respectively. *Results*: The linear range of AFP was 1 to 1 000 ng/ml for TRFIA, 5 ~ 400ng/ml for RIA and 5 ~ 300ng/ml for ELISA. The intraassay coefficients of variation (CV) and interassay CV were 3.3% and 4.7% for TRFIA, 5.3% and 8.9% for RIA, and 10.5% and 15.2% for ELISA, respectively. Correlation tests revealed that the results of RIA were more closely correlated with those of TRFIA than with those of ELISA. *Conclusion*: TRFIA is shown to be a better method for AFP quantitation than RIA and ELISA in terms of precision and linear range.

【Key words】 Alpha-fetoproteins; Time-resolved fluoroimmuno assay; Radio-immuno assay; Enzme-linked immunoabsorhent assay

AFP 是诊断肝癌最特异的标志物,AFP 检测是发现和诊断原发性肝癌细胞瘤的重要手段[1,2]。对于 AFP 的检测,已有酶标法(EIA)、RIA、化学发光免疫分析法(CLIA),常规多采用 RIA 法,此法有较高的灵敏度和准确性,但试剂存在放射性环境污染及标记物半衰期短、批间差异大等缺陷;ELISA 法简单,易于普及,但定量欠精确,线性范围窄,且存在"钩状效应"等不足。TRFIA 有灵敏度高、特异性强,且不存在同位素的放射性污染等优点,被认为是超微量免疫分析的实验室诊断方法之一[3,4]。为了进一步了解该方法测定 AFP 的特点,我们对这 3 种方法测定 AFP 作一比较。

1 材料与方法

作者介绍:陈海蔚(1970-),女,主管技师,研究方向:临床生物化学。

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器 ANYTEST2000 时间分辨荧光测定仪、酶标仪、洗板机均为苏州新波生物技术有限公司产品;γ-计数仪为上海日环仪器一厂生产的 SN-695B 型产品。

1.1.2 试剂 ANYTEST2000 时间分辨荧光测定仪 AFP 测定试剂盒为苏州新波生物技术有限公司生产,自带标准物,批号为 20040610。RIA 法所用试剂为北京原子高科核技术应用股份有限公司生产的 AFP 放免试剂盒,自带标准物,批号为 20030505。ELISA 法所用试剂为上海科华生物工程股份有限公司进口的美国 BiossedAFP 酶标包板,批号为 HK90353。

1.2 原理与方法

1.2.1 原理 3 种 AFP 测定均采用双抗体夹心法,不同之处主要为标记物不同:TRFIA 法为稀土离子 Eu^{3+} 标记;RIA 法为放射性元素标记;ELISA 法为辣根过氧化物酶。TRFIA 法的原理为:单克隆 AFP 抗体包被、封闭→加入检测样品(含 AFP 抗原)→加入 Eu^{3+} 标记的单克隆 AFP 抗体→加入增强液→检测产物荧光强度→根据产物和相对荧光强度的比值,

维普资讯 http://www.cqvip.com

求出 AFP 的含量[5,6]。

1.2.2 方法 TRFIA 法:AFP 标准品和样品 25μl/孔→分析缓冲液 200μl→室温慢速振动 60min→洗板 2 次→已稀释(1∶50)的 Eu^{3+} 标记溶液 200μl→室温慢速振动 60min→洗板 6 次→增强液 200μl→室温慢速振动孵育 5min→测定荧光值,自动计算 AFP 值。

RIA 法:血清样本 100μl+^{125}I-AFP+ 抗血清 100μl 混匀,37℃温育 3h,测总 T(每分钟脉冲数),与此平行同做 NSB 管(非特异性管)、SO 管(最大吸收管)、标准管,各管加分离剂 1 000μl,混匀,室温孵育 15min、3 500r/m 离心 15min,弃上清,γ 计数仪测定各管衰变率。

ELISA 法:稀释液 100μl/孔→血清样本 20μl→37℃孵育 30min→洗板 4 次→酶标抗体 150μl/孔→37℃孵育 30min→洗板→显色→酶标仪 450nm 读数测定,自动拟合曲线并计算 AFP 含量。

1.2.3 检测样本 随机抽检 30 份病人血清标本。

2 结 果

2.1 线性比较

将 AFP 标准品(苏州新波生物技术有限公司提供)1 000ng/ml 按不同的浓度稀释后做线性实验。结果显示,ELISA 法、RIA 法和 TRFIA 法分别当 AFP 浓度在 5~300ng/ml、5~400ng/ml、1~1 000ng/ml 范围内呈现良好的线性关系。

2.2 精密度试验比较

取一混合血清(AFP 含量为 62ng/ml)分别用 3 种方法同时平行 20 次计算批内误差;连续 10d,次/d,计算批间误差,结果见表 1。

2.3 对比试验

将随机抽检的 30 份病人血清标本分别用 3 种方法进行检测,并对 3 种方法进行比较。回归方程:设 Y 为 RIA 法所测 AFP 含量,X_1 为 TRFIA 法所测 AFP 含量,X_2 为 ELISA 法所测 AFP 含量,结果见表 2。

3 讨 论

表 1 TRFIA 法、RIA 法和 ELISA 法的精密度试验

方法	批内 CV(%)	批间 CV(%)
TRFIA 法	3.3	4.7
RIA 法	5.3	8.9
ELISA 法	10.5	15.2

CV:变异系数

表 2 TRFIA 法、RIA 法和 ELISA 法的相关试验

	TRFIA 法与 RIA 法	ELISA 法与 RIA 法
回归方程	$Y=1.17X_1+11.3$	$Y=1.46X_2+12.1$
γ	0.989	0.980

Y 为 RIA 法所测 AFP 含量;X_1 为 TRFIA 法所测 AFP 含量;X_2 为 ELISA 法所测 AFP 含量($P<0.05$)

通过 3 种方法测定 AFP 比较,曲线线性范围不同,ELISA 法为 5~300ng/ml,RIA 法为 5~400ng/ml,TRFIA 法为 1~1 000ng/ml。TRFIA 法利用了具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合物为示踪物[7],代替荧光物质、酶、同位素、化学发光物质,标记抗体、抗原、激素、多肽、蛋白质、核酸探针及生物细胞,大幅度降低了非特异性结合并提高了灵敏度。TRFIA 法的固相技术,也是保持其灵敏度的一个重要因素,因此在包被抗体之前,往往要对抗体进行纯化,以提高抗体的包被量和均一性。另外,增强液在 TRFIA 中的作用特别重要,优质的增强液是提高检测灵敏度的另一个关键因素,加入增强液后,可以使 Eu^{3+} 从反应复合物中解离下来,游离的 Eu^{3+} 同增强液中的另一种螯合剂形成一种胶态分子团,这种分子团在激发光的激发下能够发出强烈荧光,信号可以增强 100 万倍。

从表 1 可知,TRFIA 法的批内、批间精密度均比 RIA 法、ELISA 法好,这可能是由于 TRFIA 法利用了具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合物为示踪物,几乎完全消除了背景荧光的干扰,且试剂稳定性好,因而检测重现性好。RIA 法具有灵敏度高,但其标记物为放射性同位素,有潜在的放射性污染,试剂具有半衰期,并且每次操作都要做标准曲线,尤其是反应时间长,致使其精密度不如 TRFIA 法。ELISA 法检测影响因素较多[8,9]。另外,ELISA 法定量 AFP 试剂盒的线性及标准问题是测定结果准确性的关键[8]。ELISA 法的"钩状效应",即测定显色随着待测标本中抗原浓度的增加而升高至一定程度后,测定吸光度随抗原浓度的增加而开始下降至不显色,容易造成假阴性结果。

从表 2 可以看出,RIA 法与 TRFIA 法的结果相关性比 ELISA 法与 RIA 法好。这可能是因为 RIA 法与 TRFIA 法较 ELISA 法精密度高,线性范围宽,而 AFP 定量 ELISA 试剂盒间存在线性和标准的问题[8]。

(下转第 640 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

等；告知患者及家属禁止用其它任何物品自行填塞鼻孔，防止逆行感染；避免用力咳嗽和拧鼻，防止液体引流受阻而逆流；禁止做鼻腔冲洗、滴药以及经鼻腔行气管插管实施抢救和经鼻腔插胃管实施胃肠减压或鼻饲等。同时密切观察体温变化，有无呕吐，头痛，颈项强直等脑膜刺激症状，如有异常及时向医生汇报，早期发现，早期处理。

脑脊液鼻漏病人由于活动受限，治疗时间长，病情反复，花费大，及担心治疗效果，常表现出焦虑、恐惧、烦躁，甚至拒绝治疗，影响了对医嘱的依从性。护士应多巡视病人，多与其交谈，及时了解病人的心理状况，并根据患者的具体情况作出相应的干预措施，协同解决病人的心理顾虑，恢复其对治疗的信心，增加其对医嘱的依从性，最大限度配合治疗和护理。护士应向病人讲解鼻漏的形成原理，讲解经鼻内镜行修补术的先进性和优越性，强调其微创性和可耐受性，增强患者对治疗的信心；解释绝对卧床休息的意义及重要性，解释治疗、护理程序及配合要求，说明只要配合治疗，疾病是可以痊愈的；主动与患者及家属就费用方面进行详细沟通，并及时向患者和家属反馈治疗进展，讲清各种检查、治疗、护理的必要性，并使其了解医疗系统收费原则，增加其对医护的信任，从而增加对医嘱的依从性。针对经济困难者，尽量避免直接与患者进行有关费用方面的沟通，可与医生联系，在病情允许情况下尽早手术，缩短住院日以减少费用，必要时可与相关社会团体或组织联系，帮助获得社会的支持。

部分患者因治疗时间较长，或认为自己精神状态不错，日常生活可以自理，不能坚持而出现松懈、侥幸心理，对医嘱的依从性有降低的倾向。

个别患者出现对鼻内镜修补术期望过高的现象，当术后发生与术前预期稍有差异时即感失望、烦躁。

总之，护士需利用各种机会与脑脊液鼻漏患者患者及家属交流、沟通，了解其心理状况，在手术前后对患者提供必要的行为干预、支持性心理干预等措施，可有利于稳定患者情绪，消除其思想顾虑，提高患者对医嘱的依从性，使积极配合治疗，促进漏口早日愈合。

参 考 文 献

[1] 黄漫容，邝燕华.脑脊液鼻漏护理综述[J]. 中华护理杂，2003；38(6)：469-471.

[2] 王忠诚.神经外科学[M]. 武汉：湖北科学技术出版社，1998.359.

[3] 余 蓉，冯先琼.鼻内窥镜下脑脊液鼻漏修补术的护理[J]. 实用护理杂志，1998；14(8)：416.

(责任编辑：关蕴良)

(上接第 625 页)

ration：implication for biventricular pacing therapy [J]. Pacing Clin Electrophysiol，2003；26(2)：562-570.

[3] 吴金星，雷 寒，廖 惠，等.定量组织速度成像对冠脉搭桥术短期疗效的评价[J]. 重庆医学，2007；36(3)：237-239.

[4] Richardson P，Mckenna W，Bristow M，et al.Report of the 1995 WHO/ISFC task force on the definition and classification of myocardiomyopathies[J]. Circulation，1996；93(5)：841-842.

[5] Tskayama M，Norris RM，Takayama MA，et al. Postystolic shortening of acutely ischemic canine myocardium predicts early and late recovery of function after coronary artery reperfusion[J]. Circulation，1988；78(4)：994-1007.

[6] Brown MA，Norris RM，Takayama M，et al. Postystolic shortening is a marker of potential for early recovery of acutely ischaemic myocardium in the dog[J]. Cardiovasc Res，1987；21(10)：703-716.

(责任编辑：谭乐勤)

(上接第 630 页)

TRFIA 法具有敏度高、操作简便、示踪物稳定、标准曲线范围宽、不受样品自然荧光干扰、无放射性污染、多标记等优点，灵敏度超过 RIA 法 4 个数量级。现已成为生物医学研究和临床超微量生化检验中一项最有发展前景的分析手段。

参 考 文 献

[1] 刘宝善.消化器官肿瘤学[M]. 北京：人民卫生出版社，2004.475.

[2] 商健彪，李彦豪，刘方颖，等. 肝细胞性肝癌 18F-FDG PET 显像与血清甲胎蛋白的相关性研究[J]. 第一军医大学学报，2004；24(6)：697-699.

[3] 李振甲，陈泮藻，高 平. 时间分辨荧光分析技术与应用[M]. 北京：科学出版社，1996.24.

[4] 魏 东，邓爱文，牟成惠. ICA、RIA 和 ELISA 法测定甲胎蛋白的比较[J]. 第一军医大学学报，2001；21(6)：459-460.

[5] L'homme R，Brouwers E，Al-Maharik N，et al. Time-resolved fluoroimmuno assay of plasma and urine O-desmethy-langolensin[J]. Steroid Biochem Mol Biol，2002；81(4-5)：353-361.

[6] 杭建峰，吴英松，李 明. 时间分辨荧光免疫分析的研究进展及应用[J]. 热带医学杂志，2004；4(3)：340-342.

[7] Uehar M，Arai Y，Watanabe's，et al. Compaarison of plasma and urinary phytoestrogens in Japanese and Finish women by time-resolved fluoroimmuno assay[J]. Biofactors，2000；12(1-4)：217-225.

[8] 毛爱珍，许 斌. ELISA 定量 AFP 试剂盒的线性及标准问题[J]. 临床检验杂志，1997；15(2)：112-113.

[9] 郑怀亮，韩 松. 临床检验 ELISA 指南[M]. 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1995.166-168.

(责任编辑：关蕴良)