



ICA、RIA和ELISA法测定甲胎蛋白的比较

20世纪70年代初,甲胎蛋白(AFP)的临床应用使得肝癌的诊断水平获得大幅度的提高,它的定量检测已作为肝癌诊断的特异性指标之一。目前常用的测定方法有放射免疫法(RIA)与酶联免疫吸附法(ELISA) [1]。前者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;后者简单,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。磁粒子捕获免疫发光法[2](ICA)既灵敏、准确、特异性好、线性范围宽,又无放射污染,是测定AFP的又一新方法。本研究对这3种方法测定AFP作一比较。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器 ACS-180化学发光免疫分析仪为美国康仁公司产品;酶标仪为芬兰雷勃集团公司的Labsystems Dragon Wellscan MK3;洗板机为美国GBS公司产品; γ -计数器为上海核福光电仪器有限公司SN-682型产品。

1.1.2 试剂 ACS-180 化学发光免疫分析仪AFP测定试剂盒为美国康宁公司广州宝迪公司代理,批号为:24JUN00。RIA法所用试剂为北京海科锐生物技术中心生产的AFP放免试剂盒,自带标准物,批号为:99055。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Biossed AFP酶标包板,批号为HK-90265。

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:RIA为放射性元素标记;ELISA为辣根过氧化物酶;ICA法为吡啶脂化学发光剂,其原理为以吡啶酯作为发光底物,采用双抗体夹心法模式[3],即标本中AFP抗原与固相中的单克隆AFP抗体结合,再与液相中以吡啶酯标记的单克隆AFP抗体结合。因待测AFP抗原总量与仪器测得的发光单位存在正比关系,由此求出AFP的含量。

1.2.2 方 法

ICA法:AFP预冲洗液200 μ l,吸干,血清样本10 μ l加Lift Reagent 50 μ l、Solid phase 250 μ l,37 $^{\circ}$ C、7.5 min后分离、洗涤,加发光剂1、2各300 μ l,测定发光值,全部仪器自动化操作,自动计算AFP含量。

RIA法:血清样本100 μ l+ 125 I-AFP+抗血清100 μ l混匀,37 $^{\circ}$ C温育3 h,测总T(每分钟脉冲数),与此平行同做NSB管(非特异性管)、S0管(最大吸收管)、标准管,各管加分离剂1 000 μ l,混匀,室温15 min、3 500 r/m离心15 min,弃上清, γ -计数器测定各管衰变率。

ELISA法:稀释液100 μ l/孔 \rightarrow 血清样本20 μ l \rightarrow 37 $^{\circ}$ C、30 min \rightarrow 洗板4次 \rightarrow 酶标抗体150 μ l/孔 \rightarrow 37 $^{\circ}$ C、30 min \rightarrow 洗板 \rightarrow 显色 \rightarrow 酶标仪450 nm读数测定,自动拟合曲线并计算AFP含量。

2.1 线性比较

将标准液(美国康仁公司提供)1 100 ng/ml按不同的浓度稀释后做线性实验。结果显示, RIA、ELISA和ICA法分别当AFP浓度在5~400 ng/ml、5~300 ng/ml、1~950 ng/ml范围内呈良好的线性关系。

2.2 精密度试验比较

取一混合血清(AFP含量为58 ng/ml)分别用3种方法同时平行20次测定计算批内误差;连续10 d, 2次/d, 计算批间误差, 结果见表1。

表 1 精密度试验
Fig.1 Precision test of ICA, RIA and ELISA

Method	Intraassay CV(%)	Interassay CV(%)
ICA	2.5	5.8
RIA	5.0	9.2
ELISA	10.3	14.6

CV: Coefficients of variation

2.3 对比试验

将随机抽检的30份病人标本分别用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ICA法所测AFP含量, X_2 为ELISA所测AFP含量, 结果见表2。

表 2 相关试验
Fig.2 Correlation test of ICA, RIA and ELISA

	ICA with RIA	ELISA with RIA
Regression equation	$Y=12.1X_1+11.2$	$Y=1.34X_2+11.9$
γ	0.991	0.983

Y:AFP level assayed by RIA; X_1 :AFP level assayed by ICA;

X_2 :AFP level assayed by ELISA

3 讨论

3种方法测定AFP比较, 曲线线性范围不同, ELISA法为5~300 ng/ml, RIA法为5~400 ng/ml, ICA法为1~950 ng/ml。由于ICA法采用微细的磁粉为包被固相, 增大了包被面积, 增加了包被量, 使反应线性范围大大加宽。

从表1可知, ICA法的批内、批间精密度均比RIA法和ELISA法好, 这可能是由于前者为全自动上机检测, 且试剂稳定性好, 因而检测重现性好。ELISA法检测影响因素较多[4][5], 酶标本身不稳定, 易受温度和酸碱度变化的影响。另外, ELISA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[6]。有学者认为CV过大是方法学所固有的(敏感性、免疫物易降解等)[7]。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, AFP高值反而测为低值, 标本需稀释才能准确测定。ELISA与RIA法均存在手工操作误差, 重线性不及ICA法。

ICA法以量度Acridinium Ester标记物化学发光为基础, 灵敏度可达到 10^{-15} g/ml (RIA法为 10^{-12} g/ml, ELISA法为 10^{-9} g/ml), 其标记物的优点是低背景噪音、化学反应简单、快速而无须催化剂、有效期长且稳定, 弥补了RIA与ELISA法批间误差大、结果不稳定的缺点。另外, ICA法无放射污染, 随着试剂成本的降低, 有望在临床检验科得以推广应用。

参考文献:

- [1] 朱忠勇. 实用医学检验[M]. 北京:人民军医出版社, 1992. 310-5.
- [2] 章谷生. 发光和发光免疫技术[A]. 余传霖, 陆德源, 章谷生. 现代医学免疫学[M]. 上海医科大学出版社, 1998. 716-20.
- [3] Kricka IJ. Chemiluminescent and bioluminescent techniques[J]. Clin Chem, 1991, 37:1472-8.
- [4] 裘丽珠. 影响酶联免疫吸附试验的几项因素[J]. 上海免疫学杂志, 1984, 4(3):155-8.
- [5] 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. 166-8.
- [6] 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):112-3.
- [7] 许斌, 毛爱珍. ELISA定性试验的室内质控[J]. 临床检验杂志, 1996, 14(3):124-5.

参考文献:

- [1] 朱忠勇. 实用医学检验[M]. 北京:人民军医出版社, 1992. 310-5.
- [2] 章谷生. 发光和发光免疫技术[A]. 余传霖, 陆德源, 章谷生. 现代医学免疫学[M]. 上海医科大学出版社, 1998. 716-20.
- [3] Kricka IJ. Chemiluminescent and bioluminescent techniques[J]. Clin Chem, 1991, 37:1472-8.
- [4] 裘丽珠. 影响酶联免疫吸附试验的几项因素[J]. 上海免疫学杂志, 1984, 4(3):155-8.
- [5] 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. 166-8.
- [6] 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):112-3.
- [7] 许斌, 毛爱珍. ELISA定性试验的室内质控[J]. 临床检验杂志, 1996, 14(3):124-5.