

β_2 -微球蛋白放射免疫测定的质量控制

陈泮藻 李振甲

(中国人民解放军总医院中心实验室, 北京)

提 要

放射免疫分析法(RIA)在临床检验中占有重要地位,目前人们越来越重视 RIA 结果的准确性和可靠性。本文以 β_2 mG 为例阐述建立 RIA 质量控制方法和制定质量控制指标。采用自制质控血清和国产微机放免仪的数据处理程序,均能满足 WHO 对质控的要求。

放射免疫分析法(RIA)具有微量、特异性强、灵敏度高、操作简便,利于组装药盒等优点,RIA 方法自从建立以来,短短二十多年,发展极为迅速,应用范围极广,测定药盒日益增加。RIA 是临床检验和实验医学中一次重大技术革新,它在各种生物活性物质的测定中占有重要的地位。目前人们越来越重视 RIA 结果的准确性和可靠性,很多国家都已经设立 RIA 质量控制机构,并制定一系列质量控制标准^[2]。本文对 β_2 -微球蛋白(β_2 mG)-RIA 质量控制作一点介绍。

一、实验材料与方法

1. 实验材料 β_2 mG 系由尿液中提取;免疫家兔制备特异性抗血清, ^{125}I - β_2 mG 由 401 所提供;分离剂为 30% PEG(聚乙二醇);缓冲液为 0.1M pH7.4 的 PBS(磷酸盐生理盐水),组成 β_2 mG RIA 测定药盒^[1]。

2. β_2 mG RIA 操作步骤 列于表 1。

3. β_2 mG 质控血清制备 收集 β_2 mG 浓度不同的混合血清,用 PBS 事先稀释成 1:200。按每管 200 μl 分装冰冻保存(-20°C 以下),作为质控(QC)血清,测定时与待测样品同样操作。

4. 计算 为消除人工绘制曲线时各种主观因素的干扰,本文采用 logit-log 线性回归

表 1 操作程序表

	NSB	S_0	S_{1-7}	u_0	u
缓冲液	400	200	—	200	—
标准液	—	—	200	—	—
样 品	—	—	—	200	200
^{125}I - β_2 mG	200	200	200	200	200
抗血清	—	200	200	—	200

摇匀 37°C 水浴 1 小时, 4°C 过夜

PEG	600	600	600	600	600
混合血清	50	50	50	50	50

摇匀 4°C , 10 分钟, 3500rpm 离心 20 分钟, 分离 B 与 F。

法: $\text{logity} = \ln \frac{y}{1-y}$ 绘制剂量反应曲线, 得一直线, 未知样品测定值通过线性公式

$$\text{logit } y = a + b \log x$$

计算出来。同时利用北京核仪器厂生产的微机多探头 ^{125}I 放免测定仪和应用 BASIC 语言编制的相应的放免数据处理程序, 储存于微处理机内, 采用离线方法, 从键盘输入数据, 即可从荧光屏和打印机上给出结果和质控指标值^[3]。

二、结果和讨论

1. 标准抑制曲线的 logit-log 转换 绘于图 1。未知样品的结果从转换后标准曲线上查得。

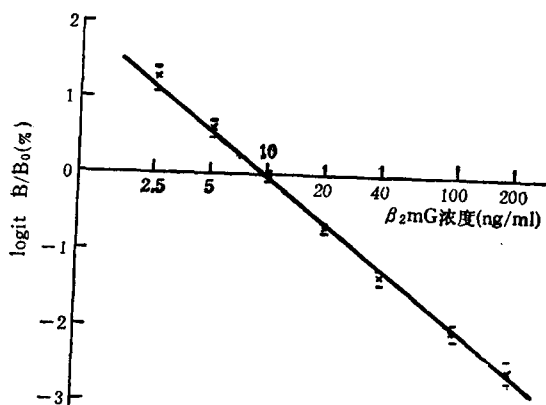


图1 $\beta_2\text{mG}$ 标准抑制曲线

2. $\beta_2\text{mG}$ RIA 质量控制参数 本文选择能从标准曲线、质控样品和操作水平三方面反映 RIA 测定水平的几项指标,包括非特异结合管,零标准结合管;以 logit-log 座标表示标准曲线线性回归系数 (r ——相关系数, b ——斜率, a ——截距),批内平均变异系数 ABCV 又称反应误差相互关系 (RER),以及 B/B_0 结合率为 75%、50%、25% 所对应的 $\beta_2\text{mG}$ 浓度 (ng/ml) 为 ED75、ED50、ED25,并由手工和微处理机计算出上述每项质控参数的 10 次测定结果的平均值,作为基数值,以一个 $\pm 10\%$, 2 个 $\pm 10\%$ 、3 个 $\pm 10\%$ 作为界限值,分别在座标纸上绘出波动曲线,即为“质控图”。这样的“质控图”可用于控制 RIA 药盒的质量,和检查 RIA 操作者的技术水平。

本文测定 10 次标准抑制曲线线性回归系数中相关系数 (r)。均大于或等于 0.99,符合质量控制对 r 值 ($r \geq 0.99$) 的要求。而 ED75、ED50、ED25 的基础值分别为 0.72 ± 0.06 ; 1.97 ± 0.15 ; $5.36 \pm 0.41 \text{ ng/ml}$ 。这三个 ED 值分别反映 RIA 测定中,标准曲线浓度低、中、高值的波动范围,即反映标准曲线形状和左右上下波动的幅度。可作为 RIA 操作技术质量和检查药盒质量的指标之一。有人还用 ED90 来检查该测定方法的灵敏度。

对于测定结果质量控制,除了用批内和批间变异系数 (CV) 反映外,还引了 ABCV,它是反映操作者加样、分离和测量中的技术误差。

WHO 建议用它来检查一次测定中批内实验误差,是质量控制指标的另一个重要方面,本实验 ABCV 的基数值 $\bar{X} \pm \text{SD} = (3.13 \pm 1.29)\%$ 。WHO 建议 $\text{ABCV} \leq 0.04$,则这批测定结果为合格;若大于 0.04,则说明这次测定有问题应检查原因。

3. $\beta_2\text{mG}$ 的 QC 血清 用自制的 $\beta_2\text{mG}$ QC 血清、每种 QC 血清先连续测定 10 批,结果稳定可靠时,分别求出平均值 $\pm$ 标准差和变异系数 (CV 应小于 15%),以每种 QC 血清的平均值为 QC 血清的靶值。本文 QC 血清的靶值 $\pm \text{SD}$ 分别为 1.14 ± 0.08 ; $2.33 \pm 0.237 (n=9)$; $4.99 \pm 0.33 \text{ ng/ml}$; CV 分别为 7.0%; 10.2%; 6.6%。以靶值为基线;将不同时间测定结果和以靶值 $\pm 10\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 30\%$ 的范围绘于图 2。

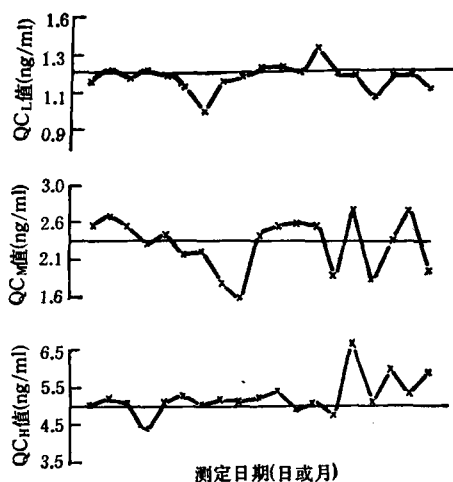


图2 质控血清与测定日期的关系

本文采用在一次 RIA 测定中,三个 QC 血清值中有二个在同一方向,超过靶值的 20% 范围,或其中一次超过靶值的 30% 范围时,则该批实验应检查原因或重做。为此,QC 质控图为每次测定结果准确性提供了一个依据,同时可以反映本实验室测定质量水平。

4. 目前 RIA 已应用于临床疾病的诊断。受到医学界的重视。另方面,RIA 是一项灵敏度很高的方法,所用生物试剂 (Ag、Ab 和标准品、标记品、生物分离剂) 可变性和易变性都较大,

免疫微球在放射免疫分析及细胞识别中的应用

沈荣森 王仁芝 宋家云 刘桂波

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

提 要

用 ^{60}Co 辐照法聚合了直径1微米、大小均匀的羟基微球。用羟基微球制备了固相二抗,并成功地应用于 T_3 、 T_4 、 TSH 、 β_2 -MG和地高辛的RIA中。观察了用固相二抗识别人辅助T淋巴细胞的效果,结果与荧光标记二抗法的结果相符。

在多种免疫分析中,分离结合部分(B)与游离部分(F)是不可少的步骤。在现有的方法中,固相法简便、快速、分离效果好和影响因素少,是首选的分离手段和发展的方向。其中,应用高分子免疫微球是近年发展的新技术^[1]。因微球能制成规则的形状、所需的大小和很高的单分散度,并可用带有的官能团与免疫配基化学偶联,故具有更多的优越性。

国外已应用免疫微球,但制备方法多属保密或专利。近年国内也进行了羧化聚苯乙烯免疫微球应用于免疫反应的研究工作^[2]。本文报告亲水性的免疫微球固相二抗的制备、性质和在血清3,5,3'-三碘甲腺原氨酸(T_3)、甲状腺素(T_4)、促甲状腺激素(TSH)、 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)和地高辛(Digoxin)等的放射免疫分析(RIA)中的应用,并初步观察了用于细胞识别中的效果。

有的随着存放时间的延长也经常在变化,再加上操作技术、试剂、测量仪器也都会给整个实验带来误差。它们都直接影响测定结果准确性和可靠性的因素。因此,提高生产药盒的质量,保证实验室测定结果的准确性,都有必要确定商品药盒的标准化和质量控制。这样,既有利于控制操作误差和监督测定结果,又有利于提高临床诊断符合率和对患者疗效的观察。

材 料 和 方 法

一、免疫微球固相二抗的制备

1. 羟基微球的制备

聚合单体为甲基丙烯酸-2-羟基乙酯(2-Hydroxyethyl methacrylate)和少量N,N'-亚甲基双丙烯酸酰胺(N,N'-Methylene bisacrylamide)。用 ^{60}Co 辐照法聚合^[3]。将产物离心分离,沉淀用蒸馏水洗涤,并悬浮于蒸馏水中,4℃贮存。

取悬液烘干,称重,计算聚合物浓度和聚合率;取悬液制样,在电镜下观测,统计微球的计数平均直径($\bar{d}$)及其相对标准偏差(SD)。

2. 羟基微球的活化

羟基微球用CNBr法活化^[4]。活化后离心分出沉淀,用冷的0.1mol/L NaHCO_3 溶液洗涤,然后立即与第二抗体偶联。

参 考 文 献

- [1] 陈泮藻等:《生物化学与生物物理进展》,1985,(3),76.
- [2] 李振甲等:《激素的放射免疫分析》,科学技术文献出版社,1985,127—129.
- [3] 吴德福等:《微机多探头 ^{125}I 碘放免测定仪FT-630的数据处理》,北京核仪器厂资料,北京,1985.

[本文于1987年3月9日收到]