

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.08.014

化学发光技术中磁珠浓度对光信号水平的影响

刘 栋^{1,2}, 仝 慧¹, 陈 斌¹, 胡 健², 张 宁², 王晓琴^{2△}

1. 陕西省铜川市人民医院检验科, 陕西铜川 727000; 2. 西安交通大学第一附属医院检验科, 陕西西安 710061

摘 要:目的 观察化学发光技术中链霉亲和素磁珠浓度对发光信号的影响。方法 (1)在全自动化学发光分析仪中夹心法模式和竞争法模式分别使用其混合试剂和高值/低值混合血清,夹心法采用 β -HCG 测量程序,竞争法模式采用 Prog 测量程序,观察在不同浓度磁珠中的光信号变化;(2)在分光光度计上 620 nm 波长测量不同浓度磁珠的吸光度和透光率;(3)在全自动化学发光分析仪中测量一定量的发光物质在不同浓度磁珠中的光信号强度;与磁珠浓度 0 mg/mL 相比,差异超过 10% 认为会导致较大差异。结果 (1)随着磁珠浓度的增加,光信号呈现为上升期、平台期和下降期。(2)磁珠浓度越大,吸光度越大,透光率越小。(3)当磁珠浓度在夹心法模式中 < 0.36 mg/mL、竞争法模式中 < 0.72 mg/mL 时,光信号减少程度在 10% 以内。当磁珠浓度在夹心法模式中 > 0.36 mg/mL、在竞争法模式中 > 0.72 mg/mL 时,磁珠浓度越大,光信号越弱,磁珠浓度与光信号水平呈负相关(夹心法 $R^2 = 0.8377$,竞争法 $R^2 = 0.8943$)。结论 应用磁珠的化学发光技术中,磁珠浓度增大或减少过多均可导致光信号减弱,使夹心法项目检测结果假性降低而竞争法项目检测结果假性升高。

关键词:化学发光技术; 磁珠; 链霉亲和素

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)08-1080-04

Influence of magnetic bead concentration on light signal level in chemical luminescence technology

LIU Dong^{1,2}, TONG Hui¹, CHEN Bin¹, HU Jian², ZHANG Ning², WANG Xiaoqin^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Tongchuan Municipal People's Hospital, Tongchuan, Shaanxi 727000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China

Abstract: Objective To observe the effect of streptomavidin magnetic beads concentration on luminescent signals in chemical luminescence technology. **Methods** (1) In the full-automatic chemical luminescence analyzer, their mixed reagents and high/low-value mixed serum were used respectively, the sandwich method mode adopted the β -HCG measurement procedure, the competition method mode adopted the Prog measurement procedure, and the changes of luminescent signals in different concentrations of magnetic beads were observed; (2) the absorbance and light transmittance of magnetic beads with in different concentrations were measured at 620 nm wavelength on spectrophotometer; (3) the light signal intensity of a certain amount of luminescent substances in different concentrations of magnetic beads was measured by the full-automatic chemical luminescence analyzer; compared with the concentration 0 ng/mL of magnetic beads, the difference of more than 10% was considered to lead to a great difference. **Results** (1) With the increase of magnetic beads concentration, the optical signal presented the rising period, platform period and downward period. (2) The greater the concentration of magnetic beads, the greater the absorbance and the smaller the light transmittance. (3) When the concentration of magnetic beads was < 0.36 mg/mL in the sandwich method mode and < 0.72 mg/mL in the competition method mode, the reduction degree of received optical signals was within 10%. When the concentration of magnetic beads was > 0.36 mg/mL in the sandwich method mode and > 0.72 mg/mL in the competition method mode, the higher the concentration of magnetic beads, the weaker the received optical signal. The concentration of magnetic beads was negatively correlated with the light signal level (sandwich method $R^2 = 0.8377$, competition method $R^2 = 0.8943$). **Conclusion** In the chemical luminescence technology by applying magnetic beads, the increase or decrease too much of the magnetic beads concentration can lead to the weakening of light signal, which makes the false decrease of the test results of sandwich method items and the false increase of the test results of competition method items.

Key words: chemical luminescence technology; magnetic beads; streptomavidin

作者简介:刘栋,男,副主任技师,主要从事临床生化检验和实验室质量控制方面的研究。△ 通信作者, E-mail: wangxiaoqin@ hotmail. com。

本文引用格式:刘栋,仝慧,陈斌,等.化学发光技术中磁珠浓度对光信号水平的影响[J].检验医学与临床,2021,18(8):1080-1083.

化学发光技术是 20 世纪 70 年代发展起来的一种实验室检测技术,结合了抗原抗体反应的特异性及化学发光反应的灵敏度,因此具有更高的检测灵敏度和检测线性范围,尤其是随着磁珠的应用,使得其反应过程从非均相变为均相,从而更容易实现自动化,反应速度更快,各种误差更小,检测结果重复性更高,因此被广泛用于各种化学物质的检测中,是 21 世纪最具有发展前景的检测技术之一。在化学发光分析中,通常采用磁珠作为固相吸附材料。应用最为广泛的是将链霉亲和素结合在磁珠上^[1],通过生物素和链霉亲和素之间的强结合力来捕获含有生物素的发光物质,再通过磁珠的磁性以达到分离,并通过对发光信号的检测以实现对待测物质的定量测定。磁珠本身虽然与发光物质无关,却可通过其磁性对发光物质进行捕获,因此,反应体系中磁珠量的变化可能也会对光信号产生影响,从而影响检测结果。但文献中相关报道较少,本研究拟通过实验观察对此进行评价验证。

1 材料与方法

1.1 仪器设备与材料 罗氏 E 601 全自动电化学发光免疫分析系统;低速离心机;分光光度计;罗氏公司链霉亲和素磁珠试剂和专用稀释液;罗氏 β -人绒毛膜促性腺激素(β -HCG)、甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 199(CA199)、糖类抗原 125(CA125)、脑钠肽(BNP)、肌钙蛋白 I(TNI)、总前列腺特异抗原(TPSA)、游离前列腺特异抗原(FPSA)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、鳞状细胞癌抗原(SCC)、细胞角蛋白 19 片段(CYFRA21)、促甲状腺激素(TSH)、孕酮(Prog)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)、三碘甲状腺原氨酸(T3)、甲状腺素(T4)试剂;高值混合血清(β -HCG、AFP、CEA、CA199、CA125、BNP、TNI、TPSA、FPSA、NSE、SCC、CYFRA21、TSH)、低值混合血清(Prog、FT3、FT4、T3、T4)。

1.2 实验材料准备

1.2.1 不同浓度磁珠制备 (1)高浓度磁珠按照 PIKETTY 等^[2]报道的方法进行制备。已知罗氏公司生产的磁珠试剂浓度为 0.72 ng/mL,以此为原材料,采用离心法进行 2 倍、5 倍和 10 倍浓缩,分别制备浓度为 1.44、3.60、7.2 ng/mL 的磁珠试剂。原倍磁珠试剂充分混匀,分别取出 60、30、12 mL 分别装于 3 组容器中,1 000 r/min 离心 15 min,第 1 组吸取上清液 54 mL 至清洁容器中,第 2 组吸取上清液 24 mL,第 3 组吸取上清液 6 mL,上清液均置于另一清洁容器中待用。第 1 组剩余的 6 mL 即为 10 倍浓缩磁珠,浓度为 7.2 ng/mL;第 2 组剩余的 6 mL 即为 5 倍浓缩磁珠,浓度为 3.6 ng/mL;第 3 组剩余的 6 mL 为 2 倍浓缩磁珠,浓度为 1.44 ng/mL。(2)低浓度磁珠采用稀释法对原倍磁珠试剂进行 20 倍、10 倍、5 倍和 2 倍稀释制成。分别取原倍磁珠试剂 3、1.2、0.6、0.3 mL,分别添加离心后上清液 3、4.8、5.4、5.7 mL,分别制成 2 倍稀释(浓度为 0.36 ng/mL)、5 倍稀释(浓度为

0.144 ng/mL)、10 倍稀释(浓度为 0.072 ng/mL)和 20 倍稀释(浓度为 0.036 ng/mL)磁珠试剂各 6 mL。充分混匀,标识清楚,4~8 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 定量发光物质制备 采用 9 000 IU/mL 的 β -HCG 标本 100 μ L+常规 β -HCG R1 试剂 720 μ L+常规 β -HCG R2 试剂 800 μ L,充分混匀,37 °C 水浴 9 min,再加入 10 倍稀释的磁珠(0.072 mg/mL)520 μ L,充分混匀,37 °C 水浴 9 min;取出后 3 000 r/min 离心 15 min,小心吸取上清液 1 400 μ L 弃去。沉淀物质即为定量发光物质。4 °C 冰箱保存待用。

1.2.3 混合试剂制备 (1)分别取 β -HCG、AFP、CEA、CA199、CA125、BNP、TNI、TPSA、FPSA、NSE、SCC、CYFRA21、TSH 试剂 1(R1)各 2 mL,混匀,装入洁净容器中,标注“混合 R1 夹心法”;同样取试剂 2(R2)各 2 mL,混匀,装入洁净容器中,标注“混合 R2 夹心法”,4~8 °C 冰箱保存备用。

(2)分别取 Prog、FT3、FT4、T3、T4 R1 各 2.4 mL,混匀,装入洁净容器中,标注“混合 R1 竞争法”;同样取 R2 各 2.4 mL,混匀,装入洁净容器中,标注“混合 R2 竞争法”,4~8 °C 冰箱保存备用。

1.2.4 混合血清制备 已收集的冻存于 -80 °C 的各项(夹心法 β -HCG、AFP、CEA、CA199、CA125、BNP、TNI、TPSA、FPSA、NSE、SCC、CYFRA21 和 TSH,竞争法 Prog、FT3、FT4、T3 和 T4)高值和低值标本各 10 份;夹心法中每个标本中均含有一个或几个上述项目的高值结果;竞争法中每个标本均含有一个或几个上述项目的低值结果。高值标本浓度均在其检测上限附近;低值标本均在其检测下限附近。每份高值标本各取样 100 μ L,充分混匀,共 1 000 μ L;分为 2 份,每份 500 μ L,标识为“夹心法高值混合血清”。同法制备“竞争法低值混合血清”。-80 °C 冰箱保存备用。一份用于实验检测,另一份用于复查备用。

1.3 检测方法

1.3.1 观察磁珠浓度与光信号之间的关系 罗氏 E 601 检测平台上,夹心法模式混合 R1/R2 试剂+夹心法高值混合血清+不同浓度磁珠,采用 β -HCG 测量程序进行夹心法模式测量;竞争法模式混合 R1/R2 试剂+竞争法低值混合血清+不同浓度磁珠,采用 Prog 测量程序进行竞争法模式测量。观察磁珠浓度与光信号之间的关系,计算相关系数 R^2 。

1.3.2 观察不同浓度磁珠的吸光度和透光率 721 分光光度计 620 nm 波长处以空气调吸光度为 0、透光率为 100%,分别测量不同浓度磁珠的吸光度和透光率。

1.3.3 观察定量发光物质在不同浓度磁珠中的光信号变化 分别采用 β -HCG 和 Prog 测量程序,用罗氏专用稀释液替代 R1 和 R2,不同浓度磁珠分别替代原倍磁珠,定量发光物质作为标本,罗氏 E 601 检测平台上分别测量其光信号水平。

1.4 统计学处理 磁珠浓度与光信号、吸光度、透光率的关系采用线性回归方法进行回归方程和 R^2 的计算;定量发光物质的光信号强度以磁珠浓度为 0 mg/

mL 时的光信号值为基准,差异在 10% 以内认为无差异^[3];光信号差异超过 10% 时,以差异幅度和磁珠浓度采用线性回归方法进行回归方程和 R^2 的计算。

2 结 果

2.1 磁珠浓度与光信号值的关系 随着磁珠浓度的增加,光信号分别呈现上升期、平台期和下降期。夹心法模式在磁珠 20 倍稀释(0.036 mg/mL)至原倍(0.72 mg/mL)之间随着磁珠浓度的增加,光信号逐渐增加,光信号从 31 190 增加至 306 418,增加幅度 882.42%(夹心法上升期 $Y=389\ 690X+33\ 929$, $R^2=0.983\ 5$),磁珠浓度越大,光信号越高。磁珠浓度在 0.72~1.44 mg/mL 时光信号保持恒定不变,光信号从 306 418 至 308 131,变化幅度-0.56%,小于 10%。磁珠浓度在 1.44~7.2 mg/mL 时,随着磁珠浓度的增加,光信号逐渐下降,光信号值从 308 131 减小至 85 295,下降幅度-72.32%(夹心法下降期 $Y=37\ 315X+342\ 111$, $R^2=0.939\ 1$),磁珠浓度越大,光信号值越低。竞争法模式光信号变化曲线与夹心法模式相似但不完全相同,上升期磁珠浓度为 0.036~0.36 mg/mL(竞争法上升期 $Y=325\ 333X+35\ 666$, $R^2=0.849\ 9$),平台期磁珠浓度为 0.36~0.72 mg/mL,下降期磁珠浓度为 1.44~7.20 mg/mL(竞争法下降期 $Y=19\ 644X+156\ 692$, $R^2=0.776\ 8$)。见图 1。

2.2 不同浓度磁珠的吸光度和透光率 磁珠浓度越

大,吸光度越大,透光率越低。见表 1。

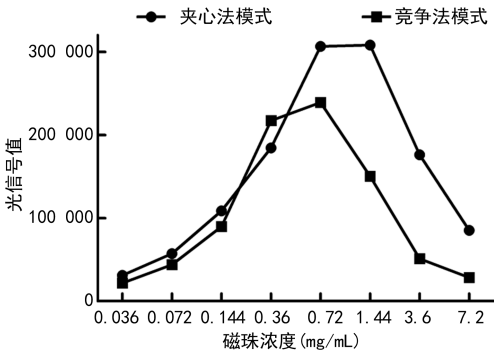
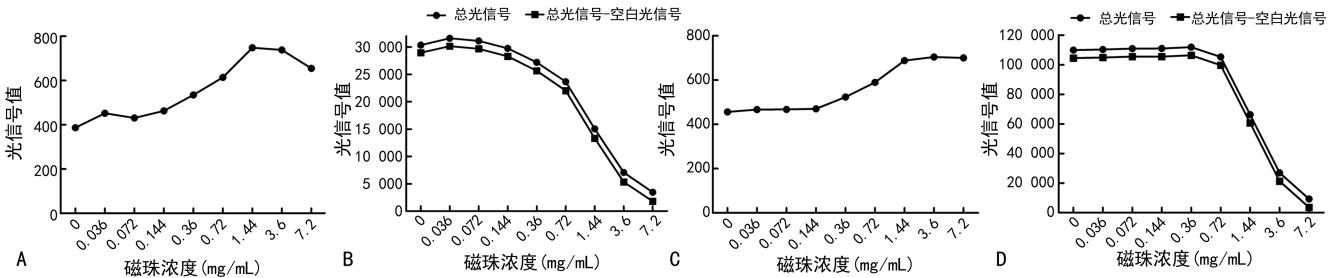


图 1 磁珠浓度与光信号的关系

2.3 定量发光物质在不同浓度磁珠中的光信号变化 定量发光物质实验中,当磁珠浓度在夹心法模式中 <0.36 mg/mL、在竞争法模式中 <0.72 mg/mL 时,与磁珠浓度为 0 mg/mL 时相比,光信号减少程度在 10% 以内;当磁珠浓度在夹心法模式中 >0.36 mg/mL、在竞争法模式中 >0.72 mg/mL 时,与磁珠浓度为 0 mg/mL 时相比,光信号减少程度在 10% 以上;且磁珠浓度越大,光信号水平越低,差异幅度越大。磁珠浓度与光信号水平的差异幅度呈负相关(夹心法 $Y=-0.138\ 7X-0.070\ 9$, $R^2=0.837\ 7$;竞争法 $Y=-0.529\ 1X-0.058\ 1$, $R^2=0.894\ 3$)。见图 2。



注:A 为夹心法模式空白光信号;B 为夹心法模式总光信号与总光信号-空白光信号;C 为竞争法模式空白光信号;D 为竞争法模式总光信号与总光信号-空白光信号。

图 2 定量发光物质在不同浓度磁珠中的光信号变化

表 1 不同浓度磁珠的吸光度和透光率		
磁珠浓度(mg/mL)	吸光度(A)	透光率(T%)
0	0.054	85.9
0.036	0.170	66.5
0.072	0.268	54.5
0.144	0.458	35.2
0.36	1.038	8.9
0.72	3.214	0.0
1.44	3.214	0.0
3.6	3.214	0.0
7.2	3.214	0.0

3 讨 论

尽管磁珠本身与发光物质的生成无关,却发挥着捕获发光物质以供测量光信号的作用。本研究发现,

磁珠浓度在 0~0.36 mg/mL 时,在夹心法模式和竞争法模式中,磁珠浓度均与光信号呈正相关;而当磁珠浓度 >0.72 mg/mL 时,在两种模式中,磁珠浓度与光信号呈负相关(图 1)。呈现正相关是因为当发光物质质量一定时,磁珠相对不足,随着磁珠浓度的增加,对发光物质的捕获量也在增加,因此二者之间呈正相关。而当磁珠相对充足时,所有的发光物质均可被捕获,此时过多的磁珠反而可能会对光信号的接收识别产生屏蔽作用。目前在化学发光技术中常用的磁珠直径多在 1~5 μm ,相较于微米级别的磁珠,吸附于其上的粒径为纳米级别的链霉亲和素对光信号的影响几乎可以忽略。因此,这种屏蔽效应可能主要是由磁珠本身所产生,磁珠浓度越大,屏蔽作用越强。屏蔽作用可能由以下原因产生:在目前的化学发光仪器设计中,光信号的测量主要有两种模式,一种是以磁

铁/电极吸附状态直接测量发光信号;另一种是先吸附,再解吸附后以混悬液状态进行光信号测量。在第 1 种测量模式中,由于磁铁或电极的表面积有限,过量的含磁珠物质不能以单层排列状态吸附,而是以层叠状态被吸附。这种层叠状态可能导致位于底层的发光物质所发出的光信号被其上层的磁珠遮挡而不能传至光信号接收器(图 2)。在第 2 种测量模式中,混悬液由于磁珠浓度增加而透光率下降(表 1),也会导致被光信号接收器接收的光信号减弱。磁珠浓度越大,层叠越多或透光率越小,可测得的光信号越低。因此,磁珠浓度过高或过低均可导致光信号减弱。

在应用磁珠的化学发光检测中,光信号减弱可导致夹心法项目检测结果假性降低而竞争法项目检测结果假性升高。这与外源性生物素对基于生物素-链霉亲和素的化学发光技术的干扰表现相同。典型的表现是在甲状腺功能检查组合中,采用夹心法模式的 TSH 检测结果假性降低,而采用竞争法模式的 T₃、T₄、FT₃、FT₄ 检测结果假性降低,从而完美模拟了 Graves 病的实验室表现,极易导致甲状腺功能正常人群被误诊为 Graves 病^[4-5]。这种影响也可导致采用夹心法模式的肌钙蛋白检测结果假阴性而使心肌梗死患者被漏诊,从而丧失最佳救治时间^[6-7]。学者们普遍认为其干扰的本质是由于反应体系中的链霉亲和素相对不足所致^[4,8],因此多位学者在体外采用磁珠试剂和血清标本混合的方式,以吸附去除血清标本中的生物素,结果均显示可明显降低外源性生物素对检测结果的干扰程度^[3,9-10]。刘栋^[11]在全自动化学发光仪器中使用 2~10 倍浓缩的磁珠试剂进行抗生物素干扰,也取得了较好的效果。这些均说明磁珠浓度的改变可对光信号产生影响。

虽然化学发光技术理论上不受朗伯-比尔定律的限制^[12],但前提是所有的发光物质所发出的光信号均位于同一个空间平面且空间距离的透光性能维持恒定。而当磁珠浓度改变超过一定限度时,则可能改变含有磁珠的发光物质在磁铁/电极表面的单层吸附状态,也会改变即使是很微小的空间距离的透光性能(表 1)。因此,化学发光技术不受朗伯-比尔定律的限制在技术实践层面可能是不完全准确的。本研究还发现,当磁珠浓度在 0.36~0.72 mg/mL 时,光信号保持相对稳定(图 1),定量发光物质光信号测量也显示在此浓度范围内,与磁珠试剂 0 mg/mL 相比,光信号改变幅度小于 10%(图 2)。这说明该范围是较为适宜的磁珠浓度范围,既避免了由于磁珠浓度太低所导致的链霉亲和素不足,也避免了磁珠浓度过高而对光信号的屏蔽作用。

综上所述,在使用磁珠的化学发光分析中,磁珠浓度过大或过小均可导致光信号减弱,产生类似于外源性生物素干扰的表现,从而对临床诊疗产生严重影

响。实验室人员应重视磁珠浓度的管理和控制,在磁珠试剂的储存、运输和使用过程中采取有效措施,保证磁珠试剂浓度的稳定。

参考文献

- [1] SAMARASINGHE S, MEAH F, SINGH V, et al. Biotin interference with routine clinical immunoassays: understand the causes and mitigate the risks[J]. *Endocr Pract*, 2017, 23(8): 989-998.
- [2] PIKETTY M L, PRIE D, SEDEL F, et al. High-dose biotin therapy leading to false biochemical endocrine profiles: validation of a simple method to overcome biotin interference[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(6): 817-825.
- [3] HASLAM S, OAKEY J, BROWN A, et al. A comparison of biotin interference in routine immunoassays on the Roche Cobas 8000, Beckman Coulter DXi and Siemens Advia Centaur XPT immunoassay platforms [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2019, 57(11): e287-e290.
- [4] 张国峰, 郭锐, 关海霞. 重视化验单之外的信息: 由生物素干扰检验而被误诊为 Graves 病甲状腺功能亢进症的实例谈诊断甲状腺疾病的要素[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2017, 33(9): 723-725.
- [5] KUMMER S, HERMSEN D, DISTELMAIER F. Biotin treatment mimicking Graves' disease[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(7): 704-706.
- [6] MAIR J, LINDAHL B, MULLER C, et al. What to do when you question cardiac troponin values[J]. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 2018, 7(6): 577-586.
- [7] WILLEMAN T, CASEZ O, FAURE P, et al. Evaluation of biotin interference on immunoassays: new data for troponin I, digoxin, NT-Pro-BNP and progesterone[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(10): e226-e229.
- [8] LUONG J H T, MALE K B, GLENNON J. Biotin interference in immunoassays based on biotin-strept (avidin) chemistry: an emerging threat[J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(5): 634-641.
- [9] TRAMBAS C, LU Z, YEN T, et al. Depletion of biotin using streptavidin coated microparticles: a validated solution to the problem of biotin interference in streptavidin-biotin immunoassays [J]. *Clin Biochem*, 2018, 55: 216-226.
- [10] MROSEWSKI I, URBANK M, STAUCH T, et al. Interference from high-dose biotin intake in immunoassays for potentially time-critical analytes by roche[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2020, 144(9): 1108-1117.
- [11] 刘栋. 生物素对基于生物素-链霉亲和素化学发光技术干扰的影响因素和特征研究[D]. 西安: 西安交通大学, 2020.
- [12] 陶义训, 吴文俊. 现代医学检验仪器导论[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 132.