

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.06.06

# 尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白化学发光检测方法的建立及性能评价

李奎<sup>1</sup>, 刘啸林<sup>2</sup>, 于林<sup>1</sup>, 李双法<sup>1</sup>, 丁蒙蒙<sup>1</sup>, 刘珂<sup>1</sup>, 付光宇<sup>1</sup>(1. 郑州安图生物工程股份有限公司, 郑州 450016; 2. 河南大学生命科学学院, 河南开封 475001)

**摘要:**目的 建立定量检测尿中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)的化学发光法并评价。方法 以辣根过氧化物酶标记 NGAL 单抗、磁微粒包被 NGAL 单抗, 基于化学发光平台, 采用双抗体夹心法模式, 建立尿液 NGAL 定量检测方法, 并评价空白限、线性范围、精密性、干扰、回收率和方法学等指标。结果 空白限为 0.1 ng/mL, 线性范围为 10~1 500 ng/mL, 分析内和分析间精密性(CV)均小于 8%, 血红蛋白 100 mg/dL、三酰甘油 3 000 mg/dL、胆红素 50 mg/dL、抗坏血酸 10 mg/dL、肌酐 1 000 mg/dL、尿素 12.5 g/dL 干扰率小于 10%; 回收率为 90.9%~103.1%; 第 95 位百分位数法确定本方法参考区间为 0~111.08 ng/mL; 与 Abbott NGAL 检测试剂进行方法学对比, 相关系数( $r$ )为 0.990 5, 总符合率为 96.1%。结论 本研究建立的尿液 NGAL 定量检测方法性能良好, 具有一定的临床应用价值。

**关键词:**中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白; 化学发光法; 性能评价

**中图分类号:**R446.1

**文献标志码:**A

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)作为一种新型敏感的肾损伤标志物备受关注<sup>[1]</sup>。正常情况下, NGAL 由肾脏少量表达, 在肾脏损伤前期, 肾小球缺血 2 h 内显著升高<sup>[2]</sup>。研究表明, 尿 NGAL 比血、尿肌酐更能特异性地反映急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的损伤程度<sup>[3]</sup>。NGAL 可以作为 AKI 早期诊断的一个敏感指标<sup>[4]</sup>。

目前 NGAL 的检测方法主要有化学发光法、免疫比浊法、ELISA 等, 如美国 Abbott 化学发光法、丹麦 BioPorto 比浊法及美国 R&D System 的 ELISA 法等<sup>[5]</sup>。Kift 等<sup>[6]</sup>研究显示, 化学发光法与比浊法具有比 ELISA 方法更宽的检测范围和灵敏度。另有研究报道, 不同方法学 NGAL 参考范围及其 AKI 判断临界值各不相同, 差异较大<sup>[7-9]</sup>。本实验采用化学发光法定量检测人尿液中 NGAL 的含量, 为 AKI 的诊断和患者治疗监测提供辅助手段。

## 1 材料与方 法

**1.1 标本来源及处理** 收集 2019 年 3 至 7 月河南省人民医院住院患者尿液标本 204 份, 另收集 203 份同期健康者尿液标本。尿液标本 400×g 离心 5 min, 取上清液于 -20 ℃ 保存备用。

**1.2 主要仪器与试剂** AutoLumo A2000 plus 全自动化学发光测定仪(郑州安图生物公司), ARCHITECT i2000SR 全自动免疫分析仪(美国 Abbott 公司); 尿 NGAL 测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检

测法, 批号 89159U100, 美国 Abbott 公司), 小鼠抗人 NGAL 单克隆抗体(克隆号 5A6、2H5)、NGAL 天然纯化抗原、辣根过氧化物酶(郑州伊美诺公司), 发光底物 A(鲁米诺)、发光底物 B(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)(郑州安图生物公司), 磁珠(粒径 1.0 μm, 粒径变异系数 <5%, JSR Life Sciences 公司), 牛血清清蛋白(BSA, Sigma 公司)。

### 1.3 方 法

**1.3.1 小鼠抗人 NGAL 单克隆抗体酶结合物的制备** 用过碘酸钠法对小鼠抗人 NGAL 单克隆抗体进行辣根过氧化物酶标记, 并通过半饱和硫酸铵法纯化、透析, 按体积比 1:1 加入 50% 甘油混匀, 于 -20 ℃ 保存。用含 10 g/L BSA 的 0.05 mol/L pH 7.4 Tris-NaCl 稀释液将酶结合物稀释为不同比例。

**1.3.2 磁微粒包被抗体的制备** 将 500 μg 的磁珠原液加入 300 μL 0.1 mol/L pH 5.0 的 MES 包被缓冲液中反复吹打混匀, 置于磁珠分离器上吸弃上清液, 重复 3 次, 等比加入碳二亚胺和 sulfo-NHS 活化, 室温反应 1 h, 置于磁珠分离器上吸弃上清液, 分别加入小鼠抗人 NGAL 单克隆抗体 30 μg、60 μg、120 μg 偶联过夜, 偶联结束后, 置于磁珠分离器上吸弃上清液后加入含 20 g/L BSA 的 0.05 mol/L pH 7.4 Tris-NaCl 封闭保护液, 混匀后置于磁珠分离器, 弃上清液, 重复 5 次后, 最后加入封闭保护液定容至 3 mL, 得到包被抗体浓度为 10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL 的磁微粒混悬液, 置于 2~8 ℃ 保存。

**1.3.3 校准品制备及赋值** NGAL 无国家标准品或

国际标准品,根据 GB/T 21415-2008 描述,校准品结果溯源至 ARCHITECT i2000SR 系统。校准品稀释液为含 20 g/L BSA 的 0.2 mol/L pH 7.4 PBS,无基质效应。将 NGAL 抗原用校准品稀释液配制不同浓度,浓度分别接近 0 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL、1 500 ng/mL,分装保存于 -20 ℃。

用 ARCHITECT i2000SR 系统及配套尿 NGAL 测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法)对上述制备的校准品进行赋值,并用赋值后的校准品和建立的尿 NGAL 磁微粒化学发光法同时定标,建立标准曲线,同步测定 20 份临床梯度浓度尿液样本。将得到的两组结果值进行线性回归,确定两者测定结果的偏倚程度。

**1.3.4 磁微粒化学发光法检测 NGAL 准备测试样本(校准品或待测样本)并正确放置 AutoLumo A2000 plus 试剂位,点击启动按钮进行定标程序或样本检测程序。执行定标程序时,完成 20 μL 校准品(0、9.8、100.1、498.5、999.3、1 490.6 ng/mL)、20 μL 磁微粒混悬液(20 μg/mL)、50 μL 酶结合物(1:3 000 稀释)、50 μL 样本稀释液的分注;执行样本检测程序时,用样本稀释液按体积比 1:9 稀释待测样本,完成 20 μL 稀释后样本、20 μL 磁微粒混悬液(20 μg/mL)、50 μL 酶结合物(1:3 000 稀释)、50 μL 样本稀释液的分注。反应液混匀后 37 ℃ 温育 15 min,用清洗液对反应液进行清洗分离,完成 50 μL 底物 A 液和 50 μL 底物 B 液的分注,将反应液混匀,检测发光强度。仪器自动操作系统通过存储的四参数 Logistic 拟合的定标曲线及样本测试的发光信号值计算样本测试结果。**

**1.4 统计学分析** 线性拟合采用 Excel 软件进行,性能评价按照 EP 文件的实验要求,实验结果采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。

## 2 实验与结果

**2.1 抗体效价确定** 酶结合物稀释比例为 1:1 000、1:2 000、1:3 000、1:4 000,磁微粒包被抗体浓度为 10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL,相互组合方阵实验,考核不同浓度样本,酶结合物稀释比例 1:3 000、磁珠包被浓度 20 μg/mL 时发光值最大,最终确定该浓度为工作浓度。

**2.2 标准曲线** 通过临床样本及 ARCHITECT i2000SR 系统对校准品赋值,以校准品浓度为 X、发光值 lg 为 Y,建立四参数 Logistic 曲线拟合数学模型,

函数方程为  $Y = (9.57 - 4.27) / [1 + (X/22.6)^{-0.4}] + 4.27$ ,  $r^2 = 0.999\ 96$ ,见图 1。本方法与 ARCHITECT i2000SR 系统检测 20 份临床样本的结果相关性良好,  $r^2 = 0.999\ 4$ ,斜率为 0.996 9,校准品赋值偏倚在 10% 以内。

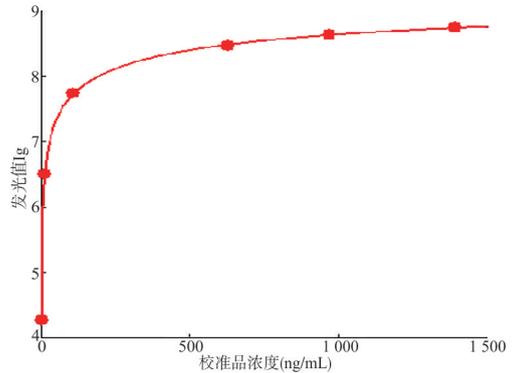


图 1 磁微粒发光 NGAL 标准曲线

## 2.3 分析性能评估

**2.3.1 空白限** 按照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)标准 EP17-A2 方法,将零浓度校准品重复测定 20 次,计算得到 20 个发光值,计算平均值( $\bar{x}$ )和标准差( $s$ ),得出  $\bar{x} + 2s$  的发光值。根据零浓度校准品(校准品 1)和校准品 2(10 ng/mL)的浓度-发光值的结果进行两点回归拟合,得出曲线方程为  $Y = 304\ 381X + 18\ 673$ 。 $\bar{x} + 2s$  所对应的发光值为 49 111,将其代入上述方程,经计算检测浓度为 0.1 ng/mL,即为本实验建立的 NGAL 检测方法的空白限。

**2.3.2 线性范围** 按照 CLSI 标准 EP6-A 方法,建立本试剂盒的线性范围。10 份浓度约为 2 000 ng/mL 的临床高值样本和 1 份浓度接近 0 的低值样本按照不同比例混合,制备 10 组系列浓度的样本,每个样本重复测定 4 次,求其平均值,对各组数据进行多项回归分析。实验结果表明,10 组样本在 10~1 500 ng/mL 浓度范围内,每个样本的实际测定浓度与理论浓度相对偏差均小于 10%,回归方程的  $r^2$  均大于 0.990,斜率  $1.0 \pm 0.5$ ,因此本研究建立的 NGAL 检测方法在 10~1 500 ng/mL 范围内线性良好。

**2.3.3 精密性** 按照 EP5-A2 的方法分别测定高(750.8 ng/mL)、中(228.6 ng/mL)、低(47.6 ng/mL)浓度精密性质控品样本 3 份,各重复测定 20 次,计算分析内变异。3 份精密性质控品样本每天各检测 2 次,每次 2 个重复,2 次检测之间至少间隔 2 h。连续检测 20 d,每天改变精密性样本的检测顺序,利用 MVS 软件计算分析间变异(日间变异)。结果显示,分析内精密性(CV)、分析间精密性(CV)均小于

8%,具有良好的精密度。见表 1。

表 1 分析内和分析间精密度实验结果

样本浓度 (ng/mL)	分析内精密度(n=20)		分析间精密度(n=80)	
	$\bar{x}\pm s$ (ng/mL)	CV(%)	$\bar{x}\pm s$ (ng/mL)	CV(%)
47.6	48.0±1.77	3.68	47.55±1.75	3.68
228.9	222.8±9.01	4.04	230.47±5.8	2.52
750.8	786.16±45.64	5.81	769.54±27.34	3.55

2.3.4 干扰试验 取高、低浓度样本分别按一定浓度添加干扰物血红蛋白、三酰甘油、胆红素(DMSO

溶解)、抗坏血酸、肌酐、尿素进行测定,重复 3 次,计算平均值和干扰率。干扰率=[(干扰样本浓度-对照样本浓度)-(溶剂样本浓度-对照样本浓度)]/对照样本浓度×100%。结果显示,100 mg/dL 血红蛋白、3 000 mg/dL 三酰甘油、50 mg/dL 胆红素、10 mg/dL 抗坏血酸、1 000 mg/dL 肌酐、12.5 g/dL尿素的干扰率均小于 10%,对检测体系干扰不明显。见表 2。

表 2 添加干扰物对检测结果的影响

干扰物	干扰物 添加浓度	高值样本			干扰率 (%)	低值样本			干扰率 (%)
		对照样本 浓度均值 (ng/mL)	干扰样本 浓度均值 (ng/mL)	仅添加溶剂 浓度均值 (ng/mL)		对照样本 浓度均值 (ng/mL)	干扰样本 浓度均值 (ng/mL)	仅添加溶剂 浓度均值 (ng/mL)	
血红蛋白	1 000 mg/dL	754.28	971.10	—	3.4	18.19	90.41	—	141.2
	500 mg/dL	785.17	805.39	—	-13.2	19.22	68.41	—	92.6
	100 mg/dL	871.72	828.62	—	-4.9	20.60	22.72	—	6
三酰甘油	3 000 mg/dL	727.39	696.69	—	4.2	17.58	16.74	—	-4.8
	1 500 mg/dL	729.64	714.62	—	0.4	18.27	17.68	—	-2.1
	500 mg/dL	760.03	771.32	—	8	19.01	18.16	—	-4.3
胆红素	50 mg/dL	823.22	755.39	726.51	3.5	17.58	17.13	18.50	-7.8
	25 mg/dL	847.51	766.63	772.38	-5.5	17.58	17.67	18.03	-8.6
	10 mg/dL	854.34	759.10	827.16	-0.4	17.58	17.48	19.61	-4.5
抗坏血酸	10 mg/dL	854.37	913.55	—	6.9	18.50	17.96	—	-2.9
	5 mg/dL	854.37	925.94	—	3.5	19.03	18.62	—	-1.1
肌酐	1 000 mg/dL	693.52	677.85	—	-2.3	16.02	15.16	—	-5.4
	500 mg/dL	698.91	703.86	—	4.2	13.66	12.99	—	-7.5
尿素	25 g/dL	450.52	406.52	—	-9.8	10.30	8.08	—	-21.5
	12.5 g/dL	497.17	472.17	—	1.3	11.14	10.05	—	7.1

2.4 参考值范围确定 依据《体外诊断试剂分析性能评估指导原则——参考值(参考区间)(征求意见稿)》,用本方法试剂测定河南省人民医院检验科 203 份健康人尿液样本,并分析 NGAL 水平的分布情况,结果见图 2。203 份健康人群尿液 NGAL 水平呈偏态分布,采用第 95 位百分位数法确定本方法参考区间为 0~111.08 ng/mL。

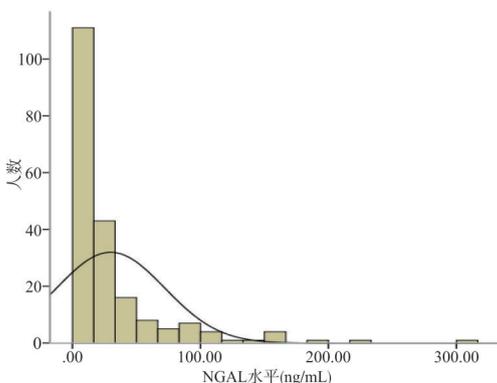


图 2 健康人尿液 NGAL 水平检测浓度分布(n=203)

2.5 准确度

2.5.1 回收率 根据《体外诊断试剂分析性能评估

系列指导原则(征求意见稿)》文件进行试剂盒的回收率评估。选择高值样本 5 份,按照体积比 1:9 分别加入 5 份基质标本中,即加入高值样本体积 0.1 mL,基质样本体积 0.9 mL,制成回收标本,每个回收样本重复检测 3 次,求均值,计算回收率。回收率  $R = [C \times (V_0 + V_s) - C_0 \times V_0] / (C_s \times V_s) \times 100\%$  ( $V_0$ :低值标本的体积,  $V_s$ :高值标本的体积,  $C$ :回收标本的检测浓度,  $C_0$ :低值标本的检测浓度,  $C_s$ :高值标本的检测浓度)。结果表明,本方法检测 5 份样本的回收率均为 90.9%~103.1%。见表 3。

表 3 回收试验结果

回收 样本	高值样本浓度 ( $C_s$ , ng/mL)	基质样本的浓度 ( $C_0$ , ng/mL)	检测浓度均值 (ng/mL)	回收率 (%)
1	1 387	0.04	137.44	99.1
2	1 269.5	0.03	123.55	97.3
3	1 370	0.04	140.84	102.8
4	1 250.5	0.04	128.96	103.1
5	1 223	0.09	111.19	90.9

2.5.2 方法学比对 2 种方法同时检测 204 例新鲜临床尿液样本,ARCHITECT i2000SR 系统检测样本

浓度范围为 18.9 ~ 1 460 ng/mL。以 ARCHITECT i2000SR 系统 NGAL 检测试剂结果为 X 轴,以安图磁微粒化学发光 NGAL 检测试剂结果为 Y 轴,相关性拟合曲线为  $Y=1.038 7X-9.834 6$ ,  $r=0.990 5$ ,用 SPSS 软件进行线性回归统计,斜率  $b$  对应  $P>0.05$ ,说明斜率与 1 差异无统计学意义,相关性良好,见图 3。

ARCHITECT i2000SR 系统 NGAL 检测试剂参考值范围第 95 百分位数  $\leq 131.7$  ng/mL,本方法参考值范围为 0~111.08 ng/mL,定性分析结果见表 4。临床样本两法检测结果的阳性符合率为 96.9% (94/97),阴性符合率为 95.3% (102/107),总符合率为 96.1%。经 Kappa 系数检验,  $k = 0.922$ ,  $P < 0.001$ ,说明本方法与 ARCHITECT i2000SR 系统 NGAL 检测试剂吻合度有统计学意义且具有高度的一致性。

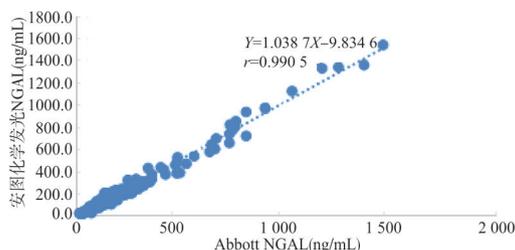


图 3 临床尿液 NGAL 不同方法学检测结果相关性分析 ( $n=204$ )

表 4 安图与 Abbott NGAL 试剂检测临床样本的结果符合率

安图 NGAL	Abbott NGAL		共计
	阴性	阳性	
阴性	102	3	105
阳性	5	94	99
共计	107	97	204

### 3 讨论

本方法的空白限为 0.1 ng/mL,线性范围为 10~1 500 ng/mL,分析内、分析间精密度不高于 8%,满足临床患者 NGAL 定量检测分析。血红蛋白、三酰甘油、胆红素、抗坏血酸、肌酐、尿素等尿液中常见干扰物在一定浓度下干扰率均小于 10%,对检测结果影响小。试剂回收率在 90.9%~103.1% 范围内,与 Abbott NGAL 检测试剂进行方法学对比,临床相关

性  $r=0.990 5$ ,总符合率 96.1%,两者具有良好的相关性且一致性高。

本研究建立的 NGAL 化学发光定量检测方法,搭配全自动化学发光测定仪检测临床尿液样本,具有高通量,线性范围宽、高精密度和高特异性等优点,可满足临床患者 NGAL 的定量分析,为 AKI、慢性肾病等患者提供治疗效果监测及诊断辅助手段。

### 4 参考文献

- [1]Nielsen SE, Schjoedt KJ, Astrup AS, *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and kidney injury molecule 1 (KIM1) in patients with diabetic nephropathy: a cross-sectional study and the effects of lisinopril[J]. *Diabet Med*, 2010, 27(10): 1144-1150.
- [2]Uettwiller-Geiger DL, Vijayendran R, Kellum JA, *et al.* Analytical characteristics of a biomarker-based risk assessment test for acute kidney injury (AKI)[J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 455: 93-98.
- [3]Paragas N, Qiu A, Zhang Q, *et al.* The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time[J]. *Nat Med*, 2011, 17(2): 216-222.
- [4]许文燊, 鄢盛恺. 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白——一种新的肾损伤标志物[J]. *临床检验杂志*, 2011, 29(4): 285-287.
- [5]林艳, 陈志雄, 蔡瑞云, 等. 酶联免疫吸附法分析法检测中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白方法学的建立及临床应用评价[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(18): 2620-2623.
- [6]Kift RL, Messenger MP, Wind TC, *et al.* A Comparison of the analytical performance of five commercially available assays for neutrophil gelatinase-associated lipocalin using urine[J]. *Ann Clin Biochem*, 2013, 50(Pt3): 236-244.
- [7]Zhang A, Cai Y, Wang PF, *et al.* Diagnosis and prognosis of neutrophil gelatinase-associated lipocalin for chronic kidney injury with sepsis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Crit Care*, 2016, 20: 41.
- [8]Grenier FC, Ali S, Syed H, *et al.* Evaluation of the ARCHITECT urine NGAL assay: assay performance, specimen handling requirements and biological variability[J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(6): 615-620.
- [9]Lippi G, Aloe R, Storelli A, *et al.* Evaluation of NGAL test, a fully-automated neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) immunoassay on Beckman Coulter AU 5822[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2012, 50: 1581-1584.

(收稿日期:2019-12-25)

(本文编辑:刘群)