

生物检定

免疫测定用前列腺特异性抗原国家标准品的定值研究

刘艳, 孙楠, 黄颖, 高尚先, 王玉梅*, 张春涛*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 制备并标定免疫测定用前列腺特异性抗原国家标准品。方法: 使用英国国家生物标准与检定所(NIBSC)来源的前列腺特异性抗原(PSA)国际标准品进行量值传递, 使用化学发光法、酶联免疫法、时间分辨免疫荧光法3种反应原理的8种试剂盒进行联合标定, 同时进行了均匀性和稳定性评价, 对定值的不确定度做了分析和估计。结果: 本次换批制备PSA国家标准品定值为 $190 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 不确定度为 $\pm 27 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 瓶间精密密度为0.98%; 4℃保存11周, 经 t 检验直线斜率 $< t_{0.95, 6} * S(b_1)$, 样品稳定; 37℃保存11周, 经 t 检验直线斜率 $> t_{0.95, 6} * S(b_1)$, 样品中总前列腺特异性抗原(tPSA)显著降解, 游离前列腺特异性抗原(fPSA)浓度显著升高。结论: 本次换批制备的PSA国家标准品定值过程合理, 具有较好的均匀性和稳定性, 适用于tPSA免疫检测相关试剂盒的产品研究及质量评价, 该标准品高温条件保存不稳定, 运输过程应保持冷链。

关键词: 前列腺特异性抗原(PSA); 丝氨酸蛋白酶; 丝氨酸残基; 体外诊断试剂; 免疫检测; 国家标准品; 定值

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)03-0519-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.03.22

Quantification study of national standard material of prostate specific antigen (PSA) for immunoassay

LIU Yan, SUN Nan, HUANG Ying, GAO Shang-xian,
WANG Yu-mei*, ZHANG Chun-tao*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To prepare and calibrate the new batch of national standard material of prostate specific antigen (PSA) for immunoassay. **Methods:** PSA international standard material from National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) was used for value transfer, and eight kinds of kits included in three mechanisms, CLIA, ELISA and TRFIA were used for joint calibration. In addition, the homogeneity and stability were evaluated, the quantification uncertainty was analyzed and estimated at the same time. **Results:** The quantitative value of the national standard material in this batch of PSA was $190 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the uncertainty was $\pm 27 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Precision between bottles was 0.98%. Stability test showed that it was stable after storage at 4℃ for 11 weeks with t -test

* 通信作者 张春涛 Tel:(010)67095433; E-mail: zhanget2@126.com

王玉梅 Tel:(010)53851678; E-mail: w_yumeish@sina.com

第一作者 Tel:(010)67095393; E-mail: liuyan2006@nifdc.org.cn

straight slop $< t_{0.95,6} * S(b_1)$, but unstable after storage at 37 °C for 11 weeks with t -test straight slop $> t_{0.95,6} * S(b_1)$ 。 The results showed that the PSA in the sample was significantly degraded while the concentration of fPSA significantly increased **Conclusion:** The quantification process of this new batch of PSA national standard material is reasonable with good homogeneity and stability. It can meet the need of product research and quality evaluation of PSA kits. PSA national standard material is unstable when it was stored at an elevated temperature, so cold chain should be applied to its transportation.

Keywords: prostate specific antigen (PSA); serine proteinase; amino-acid residue; *in vitro* diagnostic reagent; immunoassay; national standard material; quantification

前列腺特异性抗原 (prostate specific antigen, PSA) 是一种激肽释放酶样的丝氨酸蛋白酶, 相对分子质量为 33 kD, 由 237 个氨基酸残基组成; 主要由前列腺腺泡及导管上皮细胞分泌产生。虽然 PSA 因为较好的器官特异性, 和较差的疾病特异性, 在前列腺癌的鉴别诊断中饱受争议^[1-2], 但目前在临床实践中, 联合检测血清中总前列腺特异性抗原 (total prostate specific antigen, tPSA) 和游离前列腺特异性抗原 (free prostate specific antigen, fPSA) 以及 PSA 相关导出参数和动力学参数如 PSA 速率、PSA 倍增时间等^[3-4] 均依赖于 tPSA 的检测, 在前列腺癌的鉴别诊断、疗效监测、预后观察等方面均具有较大的价值^[5]。因此 PSA 的准确定量具有重要意义。本研究制备了第 5 批免疫测定用 PSA 国家标准品, 对其进行了标定并对均匀性和稳定性做了评价, 在联合定值的过程中, 根据检测技术的发展, 使用了检测灵敏度更高的化学发光法、时间分辨免疫荧光法和微粒子酶免疫检测法进行定值, 以全自动仪器为主, 使该标准品的应用范围更广, 拟用于定量检测 tPSA 的试剂盒的质量控制和评价。

1 仪器、试剂与材料

1.1 主要仪器

IMMULITE 2000 XPi 化学发光免疫分析仪 (西门子医学诊断产品 (上海) 有限公司); ADVIA Centaur XP 全自动化学发光免疫分析仪 (西门子医学诊断产品 (上海) 有限公司); ARCHITECT i2000 sr 全自动免疫分析仪 (雅培贸易 (上海) 有限公司); Elecsys 2010 电化学发光全自动免疫分析仪 (罗氏诊断产品 (上海) 有限公司); BHP9507 化学发光免疫分析仪 (日本滨松株式会社); ANYTEST2000 时间分辨荧光分析仪 (苏州新波生物技术有限公司); MICROLAB®540B 分液仪 (瑞士 Hamilton 公司); CPA225D 电子天平 (赛多利斯公司); LYO-13 冻干机 (上海东富龙科技有

限公司)。

1.2 试剂与材料

PSA-ACT 复合物 (PSA-ACT Complex) (PSA 质量浓度: $134.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; Biospacific 公司, 批号: PAK16); PSA 国际标准品 (PSA-fPSA (90:10), 英国国家生物标准与检定所 (NIBSC), 96/670, $1 \mu\text{g}$), 即 tPSA 国际标准品; fPSA 国际标准品 (NIBSC, 96/668, $1 \mu\text{g}$); 氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钾、十二水合磷酸氢二钠均为分析纯。

PSA 测定试剂盒 (化学发光法)、fPSA 测定试剂盒 (化学发光法), 来自西门子医学诊断产品 (上海) 有限公司、罗氏诊断产品 (上海) 有限公司、强生 (上海) 医疗器材有限公司、贝克曼库尔特商贸 (中国) 有限公司、北京源德生物医学工程有限公司, 其中分别使用了西门子医学诊断产品 (上海) 有限公司用于 Immulite 系统和 Centaur 系统的 2 种试剂盒。

PSA 测定试剂盒 (时间分辨免疫荧光法)、fPSA 测定试剂盒 (时间分辨免疫荧光法), 来自苏州新波生物技术有限公司和广州市达瑞生物技术股份有限公司。

tPSA 测定试剂盒 (微粒子酶联免疫检测法)、fPSA 测定试剂盒 (微粒子酶联免疫检测法), 雅培贸易 (上海) 有限公司产品。

2 方法与结果

2.1 国家标准品的制备

以蒸馏水配制 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS; 称取牛血清白蛋白 (BSA) 20 g, 溶解到 2 000 mL PBS 中, 配制成 1% 的 BSA 基质液; 准确量取 PSA-ACT 复合物原料 2.95 mL, 以 BSA 基质液稀释, 并定容至 1 100 mL, 配制质量浓度为 $360 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液; 用分液器分装, $0.5 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$, 委托吉林省食品药品检验所冻干, 即得。

2.2 国家标准物质的标定

2.2.1 标定方案

标准物质含量标定及均匀性和稳定性检验使用

了目前国内市场上已获得产品注册证书的 8 个公司的 8 种 PSA 检测试剂盒和 5 种 fPSA 检测试剂盒,其中国产试剂盒 3 种,进口试剂盒 5 种,涉及化学发光法、时间分辨免疫荧光法和酶联免疫法 3 种分析方法。

将 PSA 国际标准品和 fPSA 国际标准品用样本稀释液配制成 100、75、50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5 ng · mL⁻¹ 8 个浓度的溶液,使用不同的 PSA 试剂盒分别检测上述 PSA 和 fPSA 样本并将测定结果进行比对,效价比 (potency ratio, PT, 即各浓度样本实测浓度与理论浓度比值的平均值) 符合要求范围 (PT 在 0.8~1.2 之间) 时,认为该试剂盒有效,可用于后续的定值试验,经检测,其中一种试剂盒对 PSA 与 fPSA 检测比对结果的 PT 为 1.610 7,被剔除,不参与后续的检测。

根据预实验结果,设定待标定国家标准品 PSA 含量为 90 ng · 支⁻¹,将其用 0.5 mL 蒸馏水复溶并配制成 100、75、50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5 ng · mL⁻¹ 8 个质量浓度的溶液,用同一试剂盒对 PSA 国际标准品和国家标准品进行测定并将结果进行比对,计算国家标准品的 PSA 含量。国家标准品中 fPSA 的含量以同样方案进行,配制质量浓度为 6.25、3.12、1.56、0.78、0.39 ng · mL⁻¹ 的溶液。上述每个样本均重复测定 2 次,记录浓度值和信号值。

2.2.2 数据处理与定值

以中国食品药品检定研究院开发的体外诊断试剂结果统计分析软件分别对国际标准品 PSA- 国家标准品 PSA 进行两条直线斜率的 *t* 检验及 PT^[6] 计算。各试剂盒的数据结果显示,两直线斜率 *t* 检验均无差异,即两条直线平行,PSA 检测结果的 PT 值如表 1 所示,均值为 1.050 7,SD 为 0.070 2,依据拉依达准则^[7],数据均可纳入计算,因此国家标准品 PSA 标定浓度为 180 × 1.050 7 = 190 ng · mL⁻¹,相当于 95 ng · 支⁻¹,赋值不确定度 $u_1^2 = 0.004\ 928$ 。

表 1 7 种试剂盒对 PSA 标定的 PT 值

测量次数 (times)	PT 值 (PT value)	平均值 (mean value)	残差 (residual)
1	1.116 1	1.050 7	0.065 4
2	1.064 8		0.014 1
3	1.008 9		-0.041 8
4	0.976 1		-0.074 6
5	1.104 9		0.054 2
6	0.964 7		-0.086 0
7	1.137 3		0.086 6

同样的方法,预实验估计 fPSA 浓度约为 3.2 ng · mL⁻¹,有 5 种试剂盒参与了国家标准品 fPSA 含量的标定,其中 1 组数据 *t* 检验 $t > t_{0.05(5)}$ ($t = 7.223$, $t_{0.05(5)} = 2.571$), $P < 0.05$,剔除,其余 4 组数据 PT 值分别为 0.993 4、1.064 8、0.859 4 和 0.919 1,均值为 0.959 2,因此国家标准品 fPSA 标定浓度约为 3 ng · mL⁻¹,相当于含量为 1.5 ng · 支⁻¹。

2.2.3 均匀性检验

使用 tPSA 定量测定试剂盒 (电化学发光法) (检测范围为 0.003~100 ng · mL⁻¹)、fPSA 测定试剂盒 (电化学发光法) (检测范围为 0.010~50 ng · mL⁻¹),根据标准物质均匀性检验的取样原则,随机抽取 20 支样品,均制成 50 ng · mL⁻¹ 溶液,其中 19 支每支测定 1 次,1 支连续测定 19 次,结果见图 1,瓶间精密度的 0.98%,计算瓶间精密度不确定度分量 $u_2^2 = 0.000\ 097$,通过方差分析法得到 *F* 值 1.10,根据自由度 (1, 17), $F_{0.05}$ 为 3.59,因此 $F < F_{0.05}$,样品分布均匀。

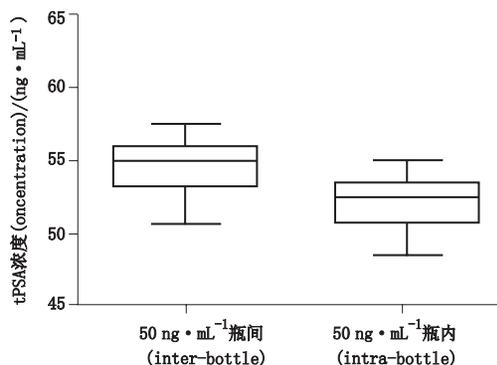


图 1 PSA 国家标准品均匀性检验

Fig. 1 Homogeneity tests for national standard material of PSA

2.2.4 不确定度的分析

按表 2 中的 3 个不确定度分量,按公式 $u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2}$,计算合成不确定度 (u_c),取包含因子 $k=2$,则扩展不确定度 $U = 190 \times 0.142\ 1 = 27\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 2 扩展不确定度的计算

不确定度分量 (uncertainty component)	不确定度 (uncertainty) <i>u</i>	合成不确定度 (combined uncertainty) u_c	扩展不确定度 (expanded uncertainty) <i>U</i>
联合定值过程 (fixed value process) u_1	0.070 2	0.074 5	0.142 1
均匀性检验 (homogeneity test) u_2	0.009 9		
国际标准品 ^[8] (international standard) u_3	0.004 6		

2.2.5 稳定性检验

2.2.5.1 冷藏稳定性 随机取 PSA 国家标准品分别在 4 °C 放置 1、2、3、4、5、7、9、11 周, 将上述标准品复溶稀释, PSA 质量浓度为 75、50、25、12.5、6.25 ng · mL⁻¹, fPSA 质量浓度为 3.0、1.18、0.789、0.393、0.2 ng · mL⁻¹, 用试剂盒分别检测 tPSA 和 fPSA 浓度, 将 -80 °C 保存的国家标准品复溶稀释后做平行比对, 4 °C 与 -80 °C 保存标准品检测结果 PT 值结果见图 2, 4 °C 保存 1~11 周, 与 -80 °C 保存的标准品比较, PSA 检测结果均在标准品定值的不确定度范围内, 经 *t* 检验直线斜率 $|b_1| < t_{0.95,6} * S(b_1)$ ($b_1=0.00035$, $t_{0.95,6}=2.447$, $S(b_1)=0.006086$)^[7], 因此认为 4 °C 保存 11 周, 标准品是稳定的。

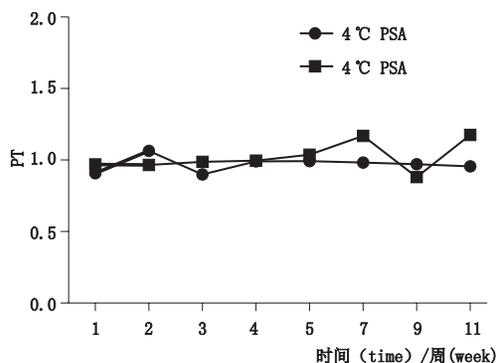


图 2 PSA 国家标准品冷藏稳定性试验结果
Fig. 2 Results of cold storage stability test for national standard material of PSA

2.2.5.2 加热稳定性 随机取 PSA 国家标准品在 37 °C 放置 1、2、3、4、5、7、9、11 周, 稀释方法同“2.2.5.1”项方法, 以 -80 °C 放置的国家标准品做平行比对, PT 值结果见图 3, 经 *t* 检验直线斜率 $|b_1| > t_{0.95,6} * S(b_1)$ ($b_1=-0.01146$, $t_{0.95,6}=2.447$, $S(b_1)=0.0022$), 37 °C 放置 11 周, 随着放置时间的延长, tPSA 显著降解, fPSA 浓度显著升高, 因此该标准品 37 °C 存放不稳定, 应避免高温存放。

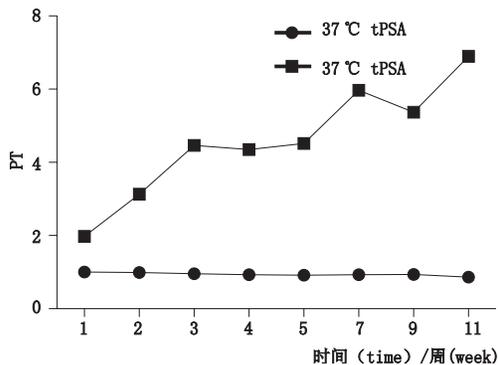


图 3 PSA 国家标准品加热稳定性试验结果
Fig. 3 Results of heating stability test for national standard material of PSA

2.2.5.3 长期稳定性 该标准品标定试验 1 年后, 取 -80 °C 保存的 PSA 国家标准品, 按“2.2.1”“2.2.2”项的方法, 使用 5 种 PSA 测定试剂盒检测, PT 值为 1.122 6、1.170 4、0.954 0、1.118 8 和 0.950 4, 均值为 1.063 24, PSA 修正浓度为 180 × 1.063 24=191 ng · mL⁻¹, 在定值不确定度波动范围内。

3 讨论

PSA 主要存在于男性精液中, 具有生物学活性的 PSA 经酶解后失去活性, 在血液中以 fPSA 存在。而少量进入循环系统的活性 PSA 主要与 α₁- 抗糜蛋白酶 (PSA-ACT)、α₂- 巨球蛋白酶 (PSA-AMG)、α₁- 蛋白酶抑制剂等结合, 以结合状态存在, 避免其酶活性存在的破坏作用, 正常生理情况下, 前列腺体与血液系统之间的组织屏障限制 PSA 的流动, 血中 PSA 浓度极低且相当稳定。当肿瘤或其他病变破坏此屏障时, 可导致外周血 PSA 水平升高^[9]。目前获批上市的 tPSA 试剂盒检测到的实际上是 fPSA 与 PSA-ACT 之和。

本次换批制备的 PSA 国家标准品, 以 PSA-ACT 为原料, 但其含量在冻干后降低近 50%, 说明冻干过程可能对 PSA-ACT 稳定性有较大影响, 导致其结构破坏, 另外, 在后期的标定中, 有少量的 fPSA 被检出, 可能来源于 PSA-ACT 的分解。目前, 该类试剂盒的性能评价主要参考医药行业标准 YY/T 1163-2009 《总前列腺特异性抗原 (tPSA) 定量测定试剂 (盒) (化学发光免疫分析法)》, 本次制备的 PSA 标准品中, fPSAP 的含量偏低, 因此配对分子的等克分子反应性项目需要联合使用 fPSA 对试验样品进行配制, 配制过程中同时也应考虑该标准品中 fPSA 的含量。

标准物质是具有准确量值的测量标准^[10-11], 此前中国食品药品检定研究院的免疫测定用前列腺特异性抗原国家标准品在相关产品的研发、标准制定、产品性能验证和市场监管中发挥了重要作用, 本次换批制备, 沿用了以往的制备方法和工作经验, 根据可获得的参考测量程序和参考物质情况, 确定了量值传递方案^[12], 使用了世界卫生组织认可的来源于 NIBSC 的 PSA 和 fPSA 国际标准品进行量值传递, 联合了符合纳入标准的市场占有率较高的 8 个试剂盒生产厂家进行了标准品的赋值, 满足标准品的定值要求。

在定值过程中, 探索性分析了不确定度产生的来源, 包括国际标准品、协作标定过程以及均匀性引入的不确定度因素, 初步估计了定值的不确定度; 均匀

性检验表明样品分布均匀;稳定性检验表明样品在-80℃冷冻条件下可长期稳定保存,在冷藏条件下可稳定保存至11周,但在高温条件下易分解,因此应避免高温存放。

根据国家食品药品监督管理总局数据查询,目前我国已批准上市的国产和进口(总)前列腺特异性抗原检测试剂盒接近40种,主要以化学发光法、酶联免疫法和时间分辨荧光免疫分析法为主,本次制备的PSA国家标准品在定值过程中,使用了多种方法学和检测系统进行评价,可适用于不同的免疫检测平台,为行业标准的贯彻实施提供实物标准品保障,其制备和发放将有助于我国PSA试剂盒生产企业对其相关产品进行准确赋值,为纸质标准的实施提供实物标准的支持^[13-15],为试剂盒的注册和上市后监管提供科学有力的保证。

参考文献

- [1] 王莉,赵娅南,李志燕. TPSA、FPSA、FPSA/TPSA和Ferr检测对于前列腺癌的诊断价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2014, 21(2): 160
WANG L, ZHAO YN, LI ZY. Diagnostic value of TPSA, FPSA, FPSA/TPSA and Ferritin for prostate cancer [J]. Labeled Immunoassay Clin Med, 2014, 21(2): 160
- [2] 杨宗珂,王德林,杨研,等. 前列腺特异性抗原及其相关指标在前列腺癌鉴别诊断中的应用价值[J]. 中国医学装备, 2015, 12(12): 31
YANG ZK, WANG DL, YANG Y, et al. Research on clinical application value of prostate specific antigen indexes in the differential diagnosis of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer [J]. China Med Equip, 2015, 12(12): 31
- [3] 戴波,瞿元元,孔蕴毅,等. PSA倍增时间对去势抵抗性前列腺癌患者多西他赛化疗后总生存期的影响[J]. 临床泌尿外科杂志, 2013, 28(2): 113
DAI B, ZHAI YY, KONG YY, et al. Prognostic value of prostate-specific antigen doubling time for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer treated with docetaxel-based chemotherapy [J]. J Clin Urol, 2013, 28(2): 113
- [4] ALBERTS AR, SCHOOTS IG, ROOBOL MJ. Prostate-specific antigen-based prostate cancer screening: past and future [J]. Int J Urol, 2015 Apr 6. doi: 10.1111/iju.12750 [Epub ahead of print]
- [5] MILKOVIC B, DZAMIC Z, PEJCIC T, et al. Evaluation free-to-total prostate specific antigen (F/T PSA), prostate specific antigen density (PSAD) and (F/T)/PSAD sensitivity on reduction of unnecessary prostate biopsies for patients with PSA in gray zone [J]. Ann Ital Chir, 2014, 85(5): 448-453.
- [6] 王玉梅,刘艳,孙楠,等. 免疫测定用甲胎蛋白国家标准品的制备与定值[J]. 中国药事, 2014, 28(8): 843
WANG YM, LIU Y, SUN N, et al. Preparation and calibration of national standard material of alpha fetoprotein for immunoassay [J]. Chin Pharm Aff, 2014, 28(8): 843
- [7] 国家标准物质管理委员会编著. 标准物质定值原则和统计学原理[M]. 北京: 中国质检出版社, 2011: 84
National Standard Material Management Committee. Fixed Value and Statistical Principles of The Standard Substance [M]. Beijing: China Zhijian Publishing House, 2011: 84
- [8] WHO International Standard Prostate Specific Antigen (90:10) NIBSC code: 96/670 Instructions for use (Version 5.0, Date 30/11/2011) [EB/OL]. [2016-1-18].
<http://www.nibsc.org/documents/ifu/96-670.pdf>
- [9] SALMAN JW, SCHOOTS IG, CARLSSON SV, et al. Prostate specific antigen as a tumor marker in prostate cancer: biochemical and clinical aspects [J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 867: 93. doi: 10.1007/978-94-017-7215-0_7
- [10] 国家标准物质管理委员会编著. 标准物质的研制管理与应用[M]. 北京: 中国计量出版社, 2010: 13
National Standard Material Management Committee. Development Management and Application of Reference Materials [M]. Beijing: China Metrology Publishing House, 2010: 13
- [11] 魏霞. 正确使用标准物质/标准样品[J]. 化学分析计量, 2014, 23(3): 85
WEI X. Proper use of reference material [J]. Chem Anal Meterage, 2014, 23(3): 85
- [12] GB/T 21415-2008/ISO 17511:2003 体外诊断医疗器械生物样品中量的测量校准品和控制物质赋值的计量学溯源性[S]. 2008
GB/T 21415-2008/ISO 17511:2003 In Vitro Diagnostic Medical Devices—Measurement of Quantities in Biological Samples—Metrological Traceability of Values Assigned to Calibrators and Control Materials [S]. 2008
- [13] 杨振,黄杰,于婷,等. 我国体外诊断试剂国家标准物质现状及对策分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(7): 765
YANG Z, HUANG J, YU T, et al. Present situation and the countermeasure analysis of national IVD standard substances in China [J]. Chin J Biol, 2015, 28(7): 765
- [14] 刘艳,孙楠,王玉梅,等. 体外诊断试剂行业标准制定工作的现状分析及展望[J]. 中国医疗器械杂志, 2014, 38(6): 383
LIU Y, SUN N, WANG YM, et al. Situation and suggestions on IVD industrial standards [J]. Chin J Med Instrum, 2014, 38(6): 383
- [15] YY/T 1163-2009 总前列腺特异性抗原(t-PSA)定量测定试剂(盒)(化学发光免疫分析法)[S]. 2009
YY/T 1163-2009 Total Prostate Specific Antigen (t-PSA) Quantitative Detection Reagent (Kit) (Chemiluminescent Immunoassay) [S]. 2009

(本文于2016年4月11日收到)