

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 358—2011

血清(浆)脂蛋白(a)的免疫测定

Immunoassay of serum or plasma lipoprotein(a)

2011-12-14 发布

2012-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准参考美国国家临床实验室标准化委员会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) I/L15-A (ISBN 1-56238-331-0) 文件 (Apolipoprotein Immunoassays: Development and Recommended Performance Characteristics; Approved Guideline) 和国际临床化学家联合会 (International Federation of Clinical Chemistry, IFCC) 脂蛋白(a)测定标准化方案, 结合中国实际情况制定。

血清高脂蛋白(a)已公认为动脉粥样硬化性心、脑血管性疾病的独立危险因素, 测定血清(浆)脂蛋白(a)水平可用于评估该类疾病发生的危险性。本标准旨在对临床实验室血清(浆)脂蛋白(a)的常规测定方法进行规范, 亦可为生产厂商生产脂蛋白(a)测定试剂提供参考依据。

本标准由卫生部临床检验标准专业委员会提出。

本标准起草单位: 南京军区南京总医院。

本标准主要起草人: 汪俊军、庄一义、张春妮、李勇。

引 言

Lp(a) 和低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 结构相似, 除含有载脂蛋白 B (apolipoprotein B, apoB) 外, 还含有一个特异的与纤维蛋白溶酶原结构相似的 apo(a)。Apo(a) 多肽链中 Kringle IV-2 有 3 到 40 个不等的拷贝数, 形成 apo(a) 不同的多态性, 相对分子质量从 187 000~662 000 之间变动。血清 Lp(a) 浓度与 apo(a) 多态性大小成反比。Apo(a) 的生理功能尚不清楚, 可能是转运脂质到组织细胞。血清高 Lp(a) 已公认为致动脉粥样硬化的独立危险因素。

血清(浆)脂蛋白(a)的免疫测定

1 范围

本标准旨在对临床实验室血清(浆)脂蛋白(a) [lipoprotein(a), Lp(a)]待测标本的采集、处理和储存,选择科学的方法、试剂及保证测定结果可溯源至参考系统提供了原则;亦可为生产厂商生产 Lp(a)测定试剂盒提供参考依据。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

吸收 absorb

通过加入可溶性的反应物除去及中和另一反应物。如:通过加入可溶性的抗原除去相应的抗体。

2.2

吸附 adsorb

通过将可溶性物质(如抗原、抗体)非特异、非共价地结合于细胞或惰性颗粒(如塑料、玻璃或胶乳、皂土、纤维素等)的表面而除去。

2.3

抗原 antigen

免疫原

能刺激机体免疫系统,诱导特异性免疫应答,并能与相应的免疫应答产物(抗体或致敏淋巴细胞)在体内或体外发生特异性反应的物质。

2.4

抗体 antibody

由浆细胞产生的能与相应抗原发生特异性结合的免疫球蛋白。

2.5

亲和力 affinity

表示受体-配体间内在结合力。在免疫测定中,受体为抗体,配体为分析物。

2.6

结合力 binding capacity

受体(如抗体等)结合配体(如抗原等)的能力。

2.7

交叉反应性 cross-reactivity

由存在的同抗原决定簇相似但不等同的免疫原而引起的抗原-抗体反应。

2.8

等位基因 allele

位于同源染色体的相同位置上控制某一性状的不同形态的基因。

2.9

多态性 polymorphism

群体内存在和等位基因相关的若干种表现型,是单一基因座等位基因变异性在群体水平的体现。

2.10

免疫测定 immunoassay

利用抗原-抗体特异性反应建立的检测相应抗体或抗原的方法。

2.11

免疫透射比浊测定 immunoturbidimetric assay

抗原、抗体在反应体系中快速形成抗原抗体复合物,使反应液中浊度增加。当一定波长的光线通过反应样品时被免疫复合物反射、吸收而减弱。在一定范围内,透射光被吸收的量与免疫复合物量呈正相关,而复合物量与抗原和抗体的量亦呈函数关系。

2.12

酶免疫吸附测定 enzyme-linked immunosorbant assay

利用抗原-抗体的免疫学反应和酶的高效催化功能的特点,具有生物放大作用,反应灵敏。酶与抗体(或抗原)交联后,再与结合在固相支持物表面的相应抗原或抗体反应,形成酶标记抗体-抗原复合物,作用于酶底物出现颜色反应,液体显色的强弱和酶标记抗体-抗原复合物的量成正比,借此反映出待检测的抗原或抗体量。

2.13

参考物质 reference material, RM

材料或物质,其一种或多种特性值足够均匀且已被确定,用于测量系统校准、测量程序评估或为其他物质赋值。

2.14

一级参考物质 primary reference material

具有最高计量学特性、其值由一级参考测量程序确定的参考物质。

2.15

二级参考物质 secondary reference material

用一级参考物质和参考方法定值的、与样品基质相同或足够相似的参考物质,用于参考方法和常规测定方法之间的准确性转移,亦可用作校准物质。

2.16

参考方法 reference method

经充分论证具有高精密度和准确度的方法,用于二级参考物质和校准物质的定值及常规方法的评价。

2.17

参考系统 reference system

由一级参考物质、一级参考方法和参考实验室和/或参考实验室网络组成的系统,是常规测定的准确性基础。

2.18

量值传递 value transfer

将特定分析物的量值从较高级别参考物质传递到另一参考物质的一种有效方案。

2.19

校准物 calibrator

校准物质 calibration material

在常规测定中作校准用的物质,在校准函数中其值作独立变量的参考物质。

2.20

产品校准物 product calibrator

用于制造商最终产品的校准物。

2.21

质控物质 quality control material

具有一定浓度的冰冻或冻干血清,样品测定时穿插在样品序列中顺次测定,用以控制测定质量。

3 免疫原

不同来源的抗原间存在着个体基因型、异型等特征,应保证以其制备的抗体对临床检测没有影响。因此,作为免疫原的材料要尽可能地代表整体人群样本库中的各种多态型,以免引起抗体特异性出现偏倚。

常采用超速离心结合层析技术,从混合人血清中提取天然 Lp(a);Lp(a)解离后可再行分离 apo(a)。新制备的 Lp(a)会发生凝集,抗原性逐渐减弱。在纯化过程中如对脂蛋白进行脱脂处理,脂质含量不同可影响抗原位点的表达。

以人工合成蛋白为免疫原制备抗体应保证制备的抗体对临床检测各种多态型的样本均无影响;作为参考物质,应证明同天然的 Lp(a)具有相同的免疫反应性。

免疫原应与 apoA I、apoA II、apoB48、apoB100、apoC II、apoC III、apoD、apoE、纤维蛋白溶酶或纤维蛋白溶酶原无交叉反应。

4 抗体(单克隆和多克隆抗体)

4.1 抗体制备

用 Lp(a)纯品免疫动物(羊、兔等)得到多克隆抗血清,再经吸附、吸收等除尽抗 apoB 等杂抗体,获得 apo(a)抗血清;用 apo(a)免疫动物可直接得到 apo(a)抗血清。抗体应具备高亲和力和高效价。单克隆抗体尽量选用具高亲和力的 IgG 类,弃用分泌 IgM 类单抗的杂交瘤细胞;从腹水中制备单克隆抗体应提纯免疫球蛋白。抗 apo(a)单、多克隆抗体应与纤维蛋白溶酶原、人血清中其他蛋白质和载脂蛋白无交叉反应。

4.2 抗体鉴定

多克隆抗血清的特异性须采用二维电泳或免疫印迹等灵敏的方法进行鉴定,尽量不采用免疫电泳和免疫扩散等灵敏度、精确度低的方法。单克隆抗体的特异性须通过竞争抑制试验进行分析,使用放射免疫、酶联免疫或免疫印迹等方法;应保证选用的单抗能够与所有样本中的各种多态型的 Lp(a)结合。

抗体应与待测样本中高含量的血浆蛋白无非特异性反应,包括以下主要血浆蛋白:白蛋白、 α_1 -抗凝血酶、 α_2 -HS 糖蛋白、 α_2 -巨球蛋白、抗纤维蛋白酶 III、C 反应蛋白、血浆铜蓝蛋白、C1、C3、C4、C5、血纤蛋白原、纤维连接蛋白、结合珠蛋白、血红蛋白 A、血红蛋白 F、血红素蛋白、IgA、IgD、IgM、Ig 轻链、 α -酸性粘蛋白、纤维蛋白溶酶原、前白蛋白、SP3 和转铁蛋白等。

5 标本的采集、处理和贮存

5.1 受检者准备

取血前两周保持正常饮食习惯,前三周内保持体重稳定;近期无创伤或重大疾病(如心肌梗塞、中风、重大手术、全身性感染等);取血前数天至数周停用影响脂代谢药物(治疗用药需注明);取血前 12 h 内不饮酒、前 6 h 内不做剧烈运动;取血前需禁食 12 h;除卧床患者外,取血前至少静坐 10 min,坐姿采血。

5.2 采血方法

取前臂静脉血。止血带的使用不超过 1 min,避免溶血。

5.3 重复采血

因分析和生理因素影响结果,可重复测定。应在 1 周~8 周内对同一受试者采血测试 2 次以上,取均值。

5.4 样本的处理和贮存

一般采用血清或血浆测定。血清样品采取后在室温静置 30 min~45 min 令其自行凝固,3 h 内离心分离血清。血浆测定结果高于血清。样品宜尽快检测,如当日不能完成,在 4 ℃ 保存不超过 4 d, -20 ℃ 下可保存 6 个月, -70 ℃ 保存时间更久。避免反复冻、融。长期冰冻可引起 Lp(a)测定结果升高。

6 测定方法

Lp(a)的免疫化学定量方法包括:

- a) 凝胶分析:单向免疫扩散(Radial Immunodiffusion, RID)、电泳免疫测定(Electroimmunoassay, EIA);
- b) 液相分析:免疫透射比浊测定(Immunoturbidimetric Assay, ITA)、免疫散射比浊测定(Immunonephelometry Assay, INA)、乳胶凝集免疫透射比浊法(Latex Agglutinative Immunoturbidimetric Assay, LAITA);
- c) 固相分析:酶联免疫吸附测定(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、放射免疫测定(radioimmunoassay, RIA)、荧光免疫测定(Fluoreacence immunoassay, FIA)。

目前国内临床实验室常用的方法主要为免疫透射比浊法,IFCC Lp(a)测定标准化计划采用 ELISA 为参考方法。

6.1 免疫透射比浊测定

6.1.1 原理

待测标本中 Lp(a)与试剂中特异性抗体相结合,形成抗原抗体复合物,使反应液中浊度增加,透射光被吸收的量与免疫复合物量呈正相关,而复合物量与抗原和抗体的量亦呈函数关系。通过 Lp(a)校准血清所作的剂量-效应曲线计算待测标本中 Lp(a)含量。

6.1.2 仪器

免疫透射比浊法须用波长 340 nm 滤光片分光光度计。检测大批样品宜用全自动或半自动生化分析仪。使用手工操作的光度计或半自动分析仪,还应配备高精密度的稀释器及加样器。光度计吸光值读数在 1.0 时,不精密度(CV)小于 1%。

6.1.3 试剂的配制

6.1.3.1 样品稀释液(R1)

一般为 pH7.4~8.0 的磷酸盐或 Tris-HCl 缓冲液,含聚乙二醇-6000、表面活性剂和 NaN₃, 340 nm 处吸光度应<0.03,4 ℃ 可存放 1 年。

6.1.3.2 抗血清应用液(R2)

apo(a)抗血清,部分或全部 R1 成分,可添加蛋白质或氨基酸作为稳定剂,试剂应无色透明,340 nm 处吸光度应 <0.03 ,4℃可存放1年。

6.1.4 参考物质

包括校准物和质控物。

按 IFCC Lp(a)测定标准化的量值传递方案对校准物和质控物进行赋值,使其准确性可溯源至国际参考物质。

6.1.5 操作步骤

6.1.5.1 手工操作

免疫比浊手工测定 Lp(a)必须采用双试剂法,除去血清(浆)样品及试剂 R1、R2 空白读数。不同批号试剂测定必须做校准曲线,以 50 mg/L~800 mg/L 浓度范围内 4 点~6 点为宜。样品用量根据不同的抗体和测定条件,样品与反应总体积比为 1:30~1:50,波长 340 nm,20℃以上反应 20 min。

6.1.5.2 自动化分析

采用双试剂、双波长(如 340 nm/600 nm)、二点法进行自动化分析,根据反应进程确定读点时间,一般为 8 min~10 min。样品与反应液总体积比为 1:20~1:40,剂量-效应曲线同手工法,用非线性 Logit-log4P(5P)或样条函数拟合曲线计算结果。

6.1.6 技术指标

6.1.6.1 精密度

批内 CV:自动化分析仪 $<4\%$,手工法 $<8\%$,试剂空白吸光度 <0.05 。

6.1.6.2 灵敏度

Lp(a)浓度在 200 mg/L 时吸光度值读数位于 0.04~0.07。

6.1.6.3 特异性

抗体应仅与待测样本中 Lp(a)和游离 apo(a)发生特异性反应,而与待测样本中其他血浆蛋白无非特异性反应。

6.1.6.4 检测范围

检测范围:Lp(a)下限 ≤ 20 mg/L、上限 ≥ 800 mg/L,Lp(a)浓度为 1 200 mg/L 时不发生抗原过剩现象。

6.1.6.5 抗干扰能力

胆红素水平 ≤ 200 mg/L、血红蛋白 $\leq 5 000$ mg/L 和甘油三酯 ≤ 6 mmol/L 的样本对测定结果无影响。严重脂浊标本对测定有干扰。乳糜血症的样本可将血清放置冰箱过夜或高速离心吸出液面奶油样层后再行测定。

6.2 酶联免疫吸附测定

大多采用单克隆或多克隆抗 apo(a)建立的双抗体夹心法;亦可采用抗 apo(a)和抗 apoB 为捕获和

检测抗体建立的 ELISA 法,抗 apoB 抗体与纤溶酶原无交叉反应,可有效地排除纤维蛋白溶酶原干扰。

本法的关键技术是保证酶标记抗体稳定;分析变异主要由高倍稀释样本引起。本法灵敏度高、特异性好,高血脂、胆红素等无干扰,可手工操作或自动化分析。

7 参考方法

采用 IFCC Lp(a)测定标准化计划所确定的参考方法。分别采用单克隆抗体 a-6(识别 Kringle IV-2)和 a-40(识别 Kringle IV-9)为包被、检测抗体建立的 ELISA 法。由于每一个 Lp(a)分子仅含一个 Kringle IV-9 拷贝,本法不受 apo(a)多态性的影响。

8 参考物质

8.1 一级校准物的制备

由两个独立的国际参考实验室分别从同一份新鲜血清中提取 Lp(a)纯品,该血清中 apo(a)表型为单一区带,Kringle IV-2 的拷贝数为 19;分别采用超速离心和各自的层析技术(赖氨酸-琼脂糖或 Sephacryl S 400)分离、纯化 Lp(a)。提纯的 Lp(a)经氨基酸分析进行定量,Lp(a)绝对质量用摩尔单位表示;该参考物质的反应性与新鲜血清或血浆中 Lp(a)具平行性。

8.2 二级校准物的制备

用 Lp(a)一级校准物作标准,经参考方法对二级校准物 SRM2B(冻干人血清,含蔗糖、赖氨酸和 NaN_3 等,Kringle IV-2 拷贝数以 16、17 和 18 为主)进行赋值,为 107 nmol/L。2004 年 SRM 2B 被 IFCC 正式接受为 Lp(a)的国际参考物质,即二级校准物。

8.3 制造商工作校准物和产品校准物的制备

按与 WHO/IFCC apoA1、B 测定标准化相同的量值传递方案对制造商工作校准物、产品校准物进行赋值,使其准确性可溯源至国际参考物质。

9 参考范围

人群中血清(浆)Lp(a)水平呈偏态分布,个体差异极大,健康人群含量范围为:0 mg/L~1 000 mg/L。高 Lp(a)已确认为动脉粥样硬化性心血管疾病的独立危险因素。一般将 Lp(a)参考值定为 300 mg/L 以下。基于标准化的 Lp(a)参考值有待确定。

10 建议

Apo(a)有多种多态性,其分子大小的不均一性对免疫化学测定 Lp(a)的结果有着不同程度的影响。由于参考物质与待测样本中 apo(a)的大小、分布不可能完全一致,即使采用国际参考物质亦不能避免测定结果的不准确性,从而高估或低估 Lp(a)值。另外,apo(a)分子大小的不均一性对不同测量程序的测定结果影响程度不同,即抗体对不同分子大小的 apo(a)反应性和亲和性间的差别,导致不同测量程序间结果的可比性出现差异。因此,不同测量程序、商品试剂盒间的测定结果存在着差异。保持具不同 Lp(a)水平的待测样本中 apo(a)大小尽可能与校准品一致,可有效减少 apo(a)的颗粒大小不同造成的测定差异,即不采用同一校准品的系列稀释物,而选用 5 份 apo(a)分子大小不同的校准品(从小到大,对应于相应的 Lp(a)水平),替代以前来源于单一标准品的系列稀释物作为测定用系列参考物质。

Lp(a)国际参考物质中 Lp(a)值采用 nmol/L 表示,基于标准化的 Lp(a)参考值尚有待确定。

现阶段建议如下:

- a) 临床和流行病学研究中要尽量减少或排除 apo(a)大小引起的偏差,以准确测定 Lp(a)水平;
- b) 要求 Lp(a)生产厂家力争将 apo(a)大小引起的测定偏差、不精确等影响降到最低;
- c) 协调、统一样本的收集、储存方法;
- d) 校准物宜溯源于 WHO 认可的 IFCC 二级参考物质;
- e) 现阶段不建议对普通人群进行高 Lp(a)筛查。建议对心血管疾病高危人群 Lp(a)水平进行测定,特别是 LDL-C 处于临界水平或高 apoB 水平的人群。对高 Lp(a)人群宜进行干预,针对性地改善危险因素;
- f) 如果测定方法受 apo(a)大小的影响,大于 50 nmol/L 的 Lp(a)样本宜重测,由建立有效方法的参考实验室承担。

参 考 文 献

- [1] NCCLS 指南: I/L15-A (ISBN 1-56238-331-0); 1997: Apolipoprotein immunoassays: development and recommended performance characteristics; approved guideline
- [2] Tate JR, Rifai N, Berg K, et al. International federation of clinical chemistry standardization project for the measurement of lipoprotein(a). Phase 1. Evaluation of the analytical performance of lipoprotein(a) assay systems and commercial calibrators. *Clin Chem* 1998; 44: 1629-1640
- [3] Tate J R, Berg K, Couderc R, et al. International federation of clinical chemistry and laboratory medicine (IFCC) standardization project for the measurement of lipoprotein(a). Phase 2: Selection and properties of a proposed secondary reference material for lipoprotein(a). *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 949-958
- [4] Marcovina SM, Albers JJ, Scanu AM, et al. Use of reference material proposed by the international federation of clinical chemistry and laboratory medicine to evaluate analytical methods for the determination of plasma lipoprotein(a). *Clin Chem* 2000; 46: 1956-1976
- [5] Dati F, Tate JR, Marcovina SM, et al. First WHO/IFCC International reference reagent for lipoprotein(a) for immunoassay Lp(a) SRM 2B [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2004, 42(6): 670-676
- [6] Levine DM, Sloan BJ, Parker TS, et al. Automatic measurement of lipoprotein(a) immunoturbidimetric assay analysis. The second international conference on Lp(a). New Orleans, USA 1992; 75
- [7] 庄一义, 汪俊军. 应用单克隆抗体的脂蛋白(a)免疫比浊测定. *中华医学检验杂志*, 1997; 20: 281-284
- [8] Anuurad E, Boffa MB, Koschinsky ML, et al. Lipoprotein(a): a unique risk factor for cardiovascular disease. *Clin Lab Med* 2006; 26: 751-772
-