

血清 HCY 胶乳增强免疫比浊检测方法的建立及性能评价

周垂备, 刘献文, 方亮, 邵绯霞, 梁毅
美康生物科技股份有限公司, 浙江 宁波 315105
DOI:10.61369/MRP.2025090030

摘 要 : 目的: 本文旨在利用胶乳增强免疫比浊的原理, 开发一种用于检测血清同型半胱氨酸 (HCY) 的方法, 并对其性能进行初步评估。方法: 该方法采用胶乳增强免疫比浊技术进行竞争性免疫检测。通过还原剂将样本中同型半胱氨酸的不同形式还原为游离的 L-HCY。随后游离的同型半胱氨酸经重组 S-腺苷-L-同型半胱氨酸水解酶 (SAHH), 经水解后转化为 S-腺苷-L-同型半胱氨酸 (SAH)。SAH 抗原复合物与样本中经转化的 SAH 进行竞争, 与标记有鼠抗人 SAH 抗体的胶乳颗粒形成抗原抗体复合物, 产生浊度。浊度大小的产生与样本中 HCY 浓度的高低呈负相关。建立一种胶乳增强免疫比浊法用于检测 HCY。评定该方法的精密度, 线性范围, 准确度及方法学比较等性能。收集宁波鄞州中医院中老年血清样本 100 份, 应用建立的方法进行检测, 结果与西门子胶乳增强免疫比浊法进行比较。结果: 本方法精密度变异系数 (CV) 小于 5%; 线性范围 3.0 ~ 60.0 $\mu\text{mol/L}$; 测定同型半胱氨酸凝冻人血清国家标准品 (360047-202001) 的相对偏差应不大于 10%; 与西门子乳胶增强免疫比浊法的相关系数 R^2 为 0.9829。结论 研究表明, 所建立的方法具有优良的性能, 适合用于临床检测血清 HCY。

关 键 词 : 同型半胱氨酸; 胶乳增强免疫比浊; 性能评价

Establishment and Performance Evaluation of Serum HCY Latex Enhanced Immunoturbidimetric Detection Method

Zhou Chuibei, Liu Xianwen, Fang Liang, Shao Feixia, Liang Yi
Medical System Biotechnology Co., Ltd., Ningbo, Zhejiang 315105

Abstract : Objective Using the principle of latex to enhance immune turbidimetric principle, a detection method for serum homocysteine (HCY) was established. And conduct a preliminary evaluation of its performance. Methods Competitive immune detection method using latex enhanced immune turbidimetric technology. Different forms of homocysteine in the sample were reduced to free homocysteine (L-HCY) by reducing agent. Free homocysteine is then converted to S-adenosine-L-homocysteine (SAH) by recombinant S-adenosine-L-homocysteine hydrolase (SAHH). The SAH antigen complex competes with the transformed SAH in the sample to form an antigen antibody complex with latex particles labeled with murine anti-human SAH antibodies, creating turbidity. The turbidity generated is negatively correlated with the concentration of HCY in the sample. Establish a latex-enhanced immune turbidity method for detecting HCY. The precision, linear range, accuracy and methodological comparison performance of this method were evaluated. 100 serum samples of middle-aged and elderly people in NingBo Yinzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine were collected and tested using established methods. The results were compared with Siemens latex enhanced immune turbidity method.. Results The precision coefficient of variation (CV) of this method is less than 5%; the linear range is 3.0 ~ 60.0 $\mu\text{mol/L}$; the relative deviation of homocysteine frozen human serum (360047-202001) should not exceed 10%; the correlation coefficient R^2 of the Siemens latex enhanced immune turbidity method is 0.9829. Conclusion The established method has good performance and can be used for the detection of clinical serum HCY..

Keywords : homocysteine; latex enhances immunity; performance evaluation

同型半胱氨酸 (HCY) 是一种含硫氨基酸, 为蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中产生的重要中间产物。同型半胱氨酸可以在 N5-CH₃-FH₄ 转甲基酶的作用下合成甲硫氨酸^[1]。在正常条件下, 浓度保持在较低水平的同型半胱氨酸在体内可被分解代谢。但是, 由于原发性原因以及继发性原因会影响血同型半胱氨酸的代谢, 并会造成同型半胱氨酸浓度堆积的增加, 简称高血同。冠心病、外周血管病和脑血

管病的发病危险性将明显增高^[2]。

目前主要有高效液相法，酶循环法，以及化学发光免疫法等多种方法来检测 HCY。高效液相法（HPLC）需要进行衍生化处理，操作较为复杂，只能单个样本进行检测，效率低，不能满足市场需求，只能是进行科学研究用。酶循环法操作简单，是目前检测 HCY 在全自动生化分析平台常用方法，收费低，但此方法主要使用的是酶，而且是多种酶一起使用，每种酶的保存条件和适应的缓冲环境都不一样，导致酶法 HCY 试剂稳定性一直是市场的一个痛点。发光免疫法结果准确，操作简单，试剂稳定，但测试所需时间长，收费贵。由于这些方法的限制，操作复杂、不能自动化分析或自动化分析设备测试速度慢、收费贵等缺点^[3]。所以，急需研制出成本适中、性能不错的国产试剂盒。胶乳增强免疫比浊法在医学检验领域已成为一种非常重要的检验手段，其优点是灵敏度高，线性范围广，全自动化^[4]。本研究旨在建立一种高效、准确的检测人血清中 HCY 的胶乳增强免疫比浊方法，并对其性能就行评价，为中老年人心血管疾病筛查提供新方法。

一、资料与方法

（一）标本来源

采集自宁波市鄞州中医院2024年8月出诊的100例中老年血清标本，供方法学比对实验使用。其中年龄在45-75周岁的男性有50例；女性50例，年龄在50-80周岁之间。

（二）仪器及试剂

鼠抗人 SAH 抗体，SAH-BSA 抗原复合物、重组 S-腺苷-L-同型半胱氨酸水解酶、胶乳微球由美康生物科技有限公司提供。还原剂 DTT，底物腺苷由 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司提供。比对试剂：由德国西门子医学诊断产品有限公司提供的同型半胱氨酸测定试剂盒(乳胶增强散射比浊法)。Hitachi 7180 型全自动生化分析仪。

（三）方法

1.检测原理 本试剂盒采用胶乳增强免疫比浊技术的竞争性免疫检测方法。通过 R1 中还原剂将样本中不同形式的同型半胱氨酸还原成游离的同型半胱氨酸(L-HCY)。然后将游离的同型半胱氨酸通过 R2 中的重组 S-腺苷-L-同型半胱氨酸水解酶(SAHH)转化为 S-腺苷-L-同型半胱氨酸(SAH)。同时，R2 中的 SAH-BSA 抗原复合物与样本中转化后的 SAH 竞争，与标记有鼠抗人 SAH 抗体的 R3 中的乳胶粒形成抗原抗体复合物，生成浊度。与样本中 HCY 浓度呈负相关的浊度大小。

2.分析参数 采用 Hitachi 7180 全自动生化分析仪对参数进行分析，采用两点终点法分析方法。分析参数：R1 100 μ L、R2 100 μ L、R3 67 μ L，样品 10.7 μ L 波长600 nm.测定步骤：将 R1 和样本加入比色杯中，充分混合后在37℃下孵育1.5分钟。接着加入 R2，继续混合均匀，再在37℃孵育3.5分钟。加入 R3 后，立即测量此时的吸光度 A1，随后继续孵化5分钟，再测量吸光度 A2，接着计算二者吸光度之差(A2-A1)。按照相同样品和相同方法，对定标液进行测试，获取不同浓度定标液的吸光度差值，然后将这些吸光度差值与各定标液的浓度对应起来，绘制出曲线。采用 Logit-log(4p) 函数曲线进行拟合。通过上述方法获取样品的吸光度差值，并将其代入标准曲线方程，从而计算出样品中同型半胱氨酸的浓度。

3.SAH-BSA 抗原复合物的制备 取50mL 离心管，往离心管

里面加入25 mM HEPES(PH7.1)15 mL，然后准确称取3 mg BSA 加入到上述离心管中，立即颠倒混匀至 BSA 完全溶解；取一定量 EDC 用 25 mM HEPES(pH7.1)缓冲液溶解至10 mg/mL 的浓度，然后取30 μ L 的 EDC 溶液加入上述离心管中，用手快速混匀后在室温下混合反应30 min；取 1.2 mg SAH 加入 25 mM HEPES(PH7.1)缓冲液10 mL，加热至60℃使 SAH 完全溶解，将溶解好的 SAH 溶液全部加入到上述50 mL 离心管中，继续在室温下混合充分反应3 h；反应结束后，将上述反应液体用透析袋透析24 h，中间用 25 mM HEPES(pH7.1)缓冲液换液3 次，以便去除未反应的 EDC 和 SAH 小分子，有助于保存 SAH-BSA 的稳定性。

4.标记有鼠抗人 SAH 抗体的胶乳颗粒的制备 用50 mL 离心管，往离心管里面加入15 mL 浓度为50 mM 的 HEPES(pH 7.6)缓冲液，往上述离心管中加入120 μ L 胶乳微球；取一定量的 EDC 用50 mM HEPES(pH 7.6)缓冲液溶解到10 mg/mL 的浓度，往上述离心管内加入30 μ L 的 EDC 溶液，迅速搅拌均匀，室温下上下颠倒反应30 min；取 1.2 mg 鼠抗人 SAH 抗体，加入到上述离心管中，用手快速混匀后在室温下上下颠倒反应3 h；待反应结束后，加1.2 mg BSA 封闭，密闭时间为1 h；封闭后，在18000 rpm 转速下离心30 min，弃去上清液；将12 mL 的保存液加入离心管中，用细胞破碎仪将乳胶颗粒超声混匀，得到标有鼠抗人 SAH 抗体的胶乳颗粒混悬液。

5.精密度验证 参考 CLSI EP5-A3 文件。对两个高低浓度样本各进行10次重复测定，分别采用本研究建立的试剂盒，计算出测定值平均值(x)和标准差(s)。根据公式计算批内变异系数 CV，公式为 $CV = S/\bar{X} \times 100\%$ 。对上述浓度2个样品分别用3个不同批次的试剂盒进行测定，每批10次测试，并对各批次间的 CV 进行测算。

6.线性范围验证 参考 NCCLS EP6-A 文件。用浓度为3.0 μ mol/L 的低浓度样品稀释浓度为60.0 μ mol/L 的高浓度样品，混合成至少5个稀释浓度(Xi)。每一稀释浓度用试剂测定，每一浓度重复测定3 次，每一稀释浓度检测结果的平均值(YI)分别求出。线性回归方程是以稀释浓度(xi)为自变量求出的，线性回归的相关系数 r 是以检测结果均值(yi)为因变量求出的。

7.准确度验证 (1)正确度 用国家标准品进行检测，对每一

个浓度样本进行 3 次检测，测算出测定结果的平均值，并计算均值与靶值的相对偏差。（2）方法学比对 方法学将采用本研究建立的同型半胱氨酸检测试剂盒，以西门子同型半胱氨酸乳胶增强散射比浊法检测系统为比对系统，以严格按照操作说明对收集的 100 份血清样品进行检测，并以西门子试剂盒测定值为横坐标，以本研究所建立的试剂盒测定值作为纵坐标，进行线性回归拟合。

二、结果

（一）精密度检测

批次内、批次间的精密度评价结果如表 1 所示。结果显示，本研究所建立的试剂盒批内、批间精密度 CV<5%。

表 1 精密度分析

HCY 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	批内 CV(100%)			批间 CV (100%)
	批次 1	批次 2	批次 3	
10.05	2.45	2.33	2.48	2.44
30.15	1.78	2.01	1.87	1.89

（二）线性范围测试

本研究所建立的试剂盒在 3.0 ~ 60.0 $\mu\text{mol/L}$ 范围内的实测值与理论值之间展现出良好的线性相关性。该线性回归方程可以表示为 $y = 1.0098x - 0.2493$ ，决定系数 $r^2 = 0.9996$ 。

（三）正确度测试

本研究建立的试剂盒测试批号为 360047-202001 的同型半胱氨酸冰冻人血清国家标准品，相对偏差 < 10%。结果见表 2。

表 2 正确度实验

国家标准品	靶值 ($\mu\text{mol/L}$)	测试均值 ($\mu\text{mol/L}$)	相对偏差 (100%)
水平 1	10.81 ± 0.3	11.22	3.79
水平 2	32.11 ± 0.6	33.25	3.55

（四）方法学比较测试

两者的线性回归方程为 $y = 0.9885x + 2.0875$ ，相关系数 r^2 为 0.9829。研究结果显示，这一研究所建立的试剂盒与 Siemens 的检测系统具有很好的一致性。

三、讨论

心脑血管疾病是一种对人类健康构成严重威胁的常见病，尤其对 50 岁以上的中老年人影响显著。它的特点是患病率、致死率和死亡率均较高，即便采用最先进和完善的治疗方法，依然难以完全解决这一问题。仍有超过 50% 的脑血管意外幸存者无法完全自理，全球每年死于心脑血管疾病的人数高达 1500 万，居所有死因之首。全国心血管病中心资料显示，截至 2025 年 7 月，我国心脑血管病患者已突破 3 亿人。由此可见，开发一款可以早期筛查中老年人心脑血管疾病的试剂盒已迫在眉睫。同型半胱氨酸（HCY）在临床上主要用于心血管疾病风险评估、营养状况评估及血栓风险预测，并可作为肾脏功能和妊娠期健康监测的重要指标。同型半胱氨酸是诱发心血管疾病的一个独立危险因素，主要作为心血管疾病的危险指标，特别是冠状动脉硬化和心肌梗塞^[5]。

该研究提供了血清 HCY 检测的新途径。既有酶循环法的操作简单检测效率高等优点，同时试剂稳定性比传统的酶循环法有了很大的提升。本研究所建立的胶乳增强免疫比浊法，是三组分试剂，适用于市面上绝大部分全自动生化分析仪，进一步开发后可应用于辅助筛查中老年心血管疾病，其特点是精密度好，线性范围广，临床关联性好。国家正在不断推进国内替代进口体外诊断试剂的进程，此项研究也为主要试剂生产企业提供了借鉴途径。

参考文献

[1] 江军, 罗毅, 张顺洪, 等. 攀枝花市中老年人人群同型半胱氨酸 (Hcy) 水平与脑卒中的关联性研究 [J]. 实用中西医结合临床, 2024, 24(11): 77-81.

[2] Deopujari CE, Karmarkar VS, Shaikh ST, et al. Neuroendoscopy in the surgical management of lateral and third ventricular tumors: Looking beyond microneurosurgery [J]. Neurol India, 2021, 69(6): 1571-1578.

[3] 刘靖, 徐萍, 陶虹霏, 等. 冠心病合并高血糖高血脂与同型半胱氨酸 (Hcy) 的相关性分析 [J]. 当代医学, 2022, 28(6): 74-76.

[4] 骆建华. 颈动脉粥样硬化和同型半胱氨酸 (Hcy) 与社区老年高血压、糖尿病的关系 [J]. 糖尿病新世界, 2022, 3(6): 49-52.

[5] 凌静. 肾综合征出血热患者血清同型半胱氨酸 (Hcy)、胱抑素 C(Cys-C) 水平变化及临床意义 [J]. 系统医学, 2021, 1(6): 13-15.