

# t-PAIC 单克隆抗体制备及磁微粒化学发光免疫检测

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2023.04.007

王兢磊<sup>1</sup> 孔飞志<sup>1</sup>  
党智笙<sup>2</sup> 钱纯巨<sup>2</sup>  
聂立波<sup>1</sup>

1. 湖南工业大学  
生命科学与化学学院  
湖南 株洲 412007  
2. 深圳市亚辉龙生物科技  
股份有限公司  
广东 深圳 518116

**摘 要:**以组织型纤溶酶原激活剂-抑制剂复合物(t-PAIC)为免疫原制备和筛选了一对特异性单克隆抗体,并建立了一种检测人体血浆 t-PAIC 的磁微粒化学发光免疫检测方法。通过与参比方法比对,选定了反应速度更快的一步法作为反应模式,然后对 t-PAIC 检测方法的检测性能进行了评估。结果显示:该方法的空白限为 0.43 ng/mL,检出限为 0.91 ng/mL;线性范围为 0.91~100 ng/mL;重复性 CV 小于 4%,精密度 CV 小于 3%;样本回收率在 100%~110% 之间;常见干扰物对检测结果无明显影响。构建了 t-PAIC 检测方法的参考区间,健康成年男性参考范围为 1.85~15.91 ng/mL,健康成年女性参考范围为 1.90~9.43 ng/mL。t-PAIC 检测方法反应快速,在血栓疾病诊断中有重要的应用价值。

**关键词:**单克隆抗体;化学发光;人组织型纤溶酶原激活剂-抑制剂复合物;吡啶酯

**中图分类号:**R392.11;R446.62

**文献标志码:**A

**文章编号:**1674-7100(2023)04-0059-09

**引文格式:**王兢磊,孔飞志,党智笙,等. t-PAIC 单克隆抗体制备及磁微粒化学发光免疫检测[J]. 包装学报, 2023, 15(4): 59-67.

静脉血栓栓塞症(venous thrombus embolism, VTE)严重威胁人类生命健康。据报道,全球每 10 万人约有 115~269 例患有 VTE<sup>[1]</sup>, VTE 相关的病死率为 12%,只有 7% 的死亡病例在生前得到正确诊断<sup>[2]</sup>。目前,影像学检测虽然是诊断 VTE 的金标准,然而由于 VTE 发病隐秘易被漏检,影像学检测如静脉造影是有创检查且价格昂贵等原因<sup>[3]</sup>,影像学检测无法满足临床对 VTE 诊断的全部需要。目前,在 VTE 的诊断与防治中,研究主要集中在凝血-纤溶系统的生物标志物上。监测生物标志物水平变化,可以在血栓发生的早期观察到血液凝集的动态趋势,从而

预防 VTE,降低 VTE 风险。

纤溶酶能特异性催化纤维蛋白水解,从而达到溶栓的目的。纤溶酶的激活主要由纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator, t-PA)完成<sup>[4]</sup>, t-PA 被内皮细胞分泌后便会迅速与纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor type-1, PAI-1)以 1:1 结合,形成组织型纤溶酶原激活物-抑制剂复合物(tissue-type plasminogen activator inhibitor complex, t-PAIC)而快速失去活性<sup>[5-6]</sup>。因此,检测循环血液中 t-PAIC 水平变化可以反映纤维蛋白形成或血栓前高凝状态<sup>[7-8]</sup>。t-PA 和 PAI-1 均可由受损后

**收稿日期:**2023-02-25

**基金项目:**湖南省自然科学基金资助项目(2020JJ6102);湖南省教育厅科学研究基金资助项目(19A144);湖南省大学生创新创业训练计划资助项目(202211535029)

**作者简介:**王兢磊(1997-),男,湖南郴州人,湖南工业大学硕士生,主要研究方向为生物标志物免疫检测,  
E-mail: 13974172456@163.com

**通信作者:**聂立波(1973-),女,湖南宁乡人,湖南工业大学教授,主要从事生物传感检测技术研究,  
E-mail: libonie@aliyun.com

的血管内皮分泌和释放,从而导致 t-PAIC 的水平上升,因此 t-PAIC 也被视为反映内皮细胞受损程度的敏感标志物<sup>[9-10]</sup>。

t-PAIC 作为近年来新兴的血栓标志物,可作为判断 VTE 发生的敏感筛查指标。检测 t-PAIC 水平对预测血栓早期形成具有重要的临床价值<sup>[11]</sup>。季洪良等<sup>[12]</sup>研究发现,下肢骨折术后发生 VTE 患者在第 1, 3, 7 天 t-PAIC 水平显著高于未发生 VTE 患者( $p < 0.05$ ); t-PAIC 预测术后 VTE 发生的灵敏度和特异度分别为 40.0% 和 90.9%, 检测 t-PAIC 水平是术后筛查 VTE 的有效指标。L. Bollen 等<sup>[13]</sup>研究证实 t-PAIC 是 VTE 的最佳诊断指标之一,其性能优于 PAI-1 抗原检测。

目前在 t-PAIC 检测领域中,多为传统的 ELISA 法,实验耗时较长、干扰因素较多、重复性不好。因此,开发一种快速的 t-PAIC 体外检测方法,将能为血栓疾病的早期预防提供帮助。吖啶酯是一种重要的化学发光剂,具有发光强度高、发光速度快的优点,被广泛应用于临床检测、环境检测等领域。本研究将 t-PA 和 PAI-1 基因进行原核表达,在体外合成 t-PAIC,并在此基础上制备了单克隆抗体。通过吖啶酯发光技术,开发了一种快速、灵敏、准确的 t-PAIC 定量磁微粒化学发光免疫检测法,并依据美国临床实验室标准化协会(the Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)发布的 EP 系列文件进行性能评估。

## 1 实验

### 1.1 实验材料、试剂及仪器

#### 1) 主要材料与仪器

限制性内切酶 BamH I、Hind III、高保真 DNA 聚合酶、T4 连接酶、人肝脏 cDNA 均购自 Takara Bio 株式会社;表达载体 pET-28a 购自 Novagen(德国)公司;大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自 Bio-Rad(美国)公司;甲苯磺酰基磁珠购自 JSR(日本)株式会社;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、吖啶酯、ProteinIso™ Protein G 亲和层析介质和 Sephadex G-100 层析柱购自 Sigma(德国)公司;50X HAT 选择培养基购自 Thermo Fisher(美国)公司;牛血清白蛋白(BSA)购自 Roche(瑞士)公司;HISCL t-PAIC 检测试剂盒(化学发光法)和 HISCL-5000 型全自动免疫分析仪购自希森美康(日本)株式会社;BALB/c 小鼠、Sp2/0 细胞

和 iFLASH-3000 型全自动免疫分析仪及配套清洗液、激发液、预激发液由深圳亚辉龙生物科技股份有限公司提供;其余试剂为市售进口或国产分析纯试剂。

本文实验均以科研为目的对小白鼠进行繁殖和使用,且贯彻落实《实验动物管理条例》,按照国科发财字[2006]398号制定的文件《关于善待实验动物的指导性意见》的要求进行动物实验。

#### 2) 试剂的配制

LB/Kana 培养基:氯化钠(质量浓度,下同)10 mg/mL,胰化蛋白胨 10 mg/mL,酵母提取物 5 mg/mL,卡那霉素 50  $\mu$ g/mL, pH=7.0。盐酸胍溶液:4 mol/L 盐酸胍, pH=5.5。磁珠封闭液:0.05 mol/L Tris-HCl, 0.5%(质量分数,下同)BSA, 0.1% Tween-20, pH=7.40。磁珠保存液:0.05 mol/L Tris-HCl, 1% BSA, pH=7.4。

### 1.2 t-PAIC 重组蛋白的制备和鉴定

根据 GenBank 中登录的 t-PA(登录号:AY221101.1)与 PAI-1(登录号:M16006.1)基因序列,选取蛋白质编码区片段,利用设计软件 Primer5.0 和 Oligo 辅助设计引物,并在引物中分别引入酶切位点 BamH I 和 Hind III(下划线部分)。

t-PA 引物 P1:

CGCGGATCCTACCTACGTTACTTCTCTCCCGAG。

P2:

CCCAAGCTTTCACGG TCGCATGTTGTCAC。

PAI-1 引物 P3:

GCGGATCCTACGCCTACAGAGG TCGGGAG。

P4:

CCCAAGCTTTCAG GGTTCATCACTTGGC。

以人体肝脏总 cDNA 为模板,PCR 扩增 t-PA 与 PAI-1 的编码区基因,反应流程按厂家说明书进行设计。

将 t-PA 基因和 PAI-1 基因分别连接克隆载体 pET-28a,并转染大肠杆菌感受态细胞(BL21)培养。挑取阳性单克隆提取质粒,送往上海生工生物科技股份有限公司测序验证。测序正确的质粒命名为 pET-28a-t-PA 和 pET-28a-PAI-1。挑取单克隆接种于 LB/Kana 培养基振荡培养过夜,菌液接种至新的 LB/Kana 培养基中培养至吸光度为 0.8 左右,加入适量异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl thiogalactoside, IPTG)诱导表达目的蛋白。将培养基离心处理,收集菌体沉淀,使用 PBS 溶液清洗 3 次后再超声裂解



细菌, 取细菌裂解液上清液, 使用镍柱纯化并获得目的蛋白 t-PA、PAI-1。使用超滤管对目的蛋白进行浓缩, 将目的蛋白置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

PAI-1 重组蛋白使用盐酸胍溶液重新激活后<sup>[14]</sup>, 迅速将 PAI-1 稀释液置换成中性缓冲液, 配置成质量浓度为  $500\text{ }\mu\text{g/mL}$  溶液, 并与  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$  的 t-PA 溶液等体积混合, 在室温的条件下孵育  $20\text{ min}$ 。孵育完成后, 取混合液进行 10 倍稀释, 混合液、混合液稀释液与纯化后的 t-PA 和 PAI-1 蛋白一同进行 10% 聚丙烯酰胺蛋白电泳鉴定 (SDS-PAGE)。最后, 使用 Sephadex G-100 分子层析柱纯化混合液获得重组 t-PAIC, 超滤浓缩后采用高效液相色谱 (HPLC) 验证纯度, 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.3 t-PAIC 单克隆抗体的制备和鉴定

将  $500\text{ }\mu\text{L}$  重组 t-PAIC ( $4\text{ mg/mL}$ ) 作为抗原与  $500\text{ }\mu\text{L}$  的完全弗氏佐剂混合, 以  $200\text{ }\mu\text{L/只}$  的剂量免疫 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠, 在小鼠腹腔、背部、皮下等进行多点注射。之后每隔 2 周以  $80\text{ }\mu\text{L}$  重组 t-PAIC 抗原混合等体积不完全弗氏佐剂加强免疫 1 次。第 3 次免疫 7 d 后, 取小鼠尾静脉血, 并以酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测血清抗体的效价, 对效价高于  $1:32\ 000$  的小鼠腹腔注射抗原加强免疫。无菌操作取小鼠脾脏制备细胞悬液, 按小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞数量比 4:1 配制, 在聚乙二醇 (PEG) 的作用下融合。细胞融合完成后使用 HAT 培养基进行筛选, 挑取阳性细胞单克隆, 培养于 96 孔细胞板中。当细胞长至孔底面积  $1/5$  时, 采用间接 ELISA 法检测细胞培养基, 筛选阳性杂交瘤细胞株。采用有限稀释法<sup>[15]</sup>对单克隆阳性孔进行 3 次亚克隆, 筛选稳定产生抗 t-PAIC 抗体的杂交瘤细胞株。将重组抗原 t-PAIC、t-PA、PAI-1 包被在 96 孔酶标板上, 采用间接 ELISA 法, 检测单克隆细胞株培养液, 根据结果筛选产生 t-PAIC 特异性抗体的细胞株并保存。取 8 周龄的 BALB/c 小鼠腹部注射  $0.5\text{ mL}$  石蜡进行敏化, 一周后腹部注射细胞数约  $1\times 10^6$  的杂交瘤细胞, 7 d 后采集腹水。腹水以正辛酸-饱和硫酸铵法<sup>[16]</sup>与 Protein G 亲和层析进行纯化。

### 1.4 t-PAIC 磁微粒化学发光检测法的建立

取适量对甲苯磺酰基磁珠于磁分离器上静置  $5\text{ min}$ , 弃去上清液, 随后加入  $1\text{ mol/L}$  PBS 缓冲液清洗 3~5 遍后, 磁分离磁珠并弃去上清液。加入适量含  $1\text{ mol/L}$  硫酸铵的 PBS 缓冲液和  $100\text{ }\mu\text{g}$  抗 t-PAIC

抗体,  $37^{\circ}\text{C}$  混匀后孵育  $16\text{ h}$ , 孵育完成后清洗磁珠 3~5 遍。然后加入  $10\text{ mL}$  磁珠封闭液  $37^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 封闭完成后, 磁分离磁珠并清洗 3~5 遍。最后, 加入磁珠保存液, 将磁珠质量浓度稀释至  $10\text{ mg/mL}$ ,  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  保存磁珠。

在  $5\text{ mL}$  的  $0.1\text{ mol/L}$  碳酸盐缓冲液中混合  $16\text{ }\mu\text{g}$  吡啶酯和  $200\text{ }\mu\text{g}$  抗 t-PAIC 抗体,  $25^{\circ}\text{C}$  避光混匀孵育  $2\text{ h}$ 。向反应体系加入适量的赖氨酸,  $25^{\circ}\text{C}$  混匀孵育  $1\text{ h}$  以终止反应。混合液经离心脱盐柱纯化 (离心转速  $1000g$ , 时间  $2\text{ min}$ ), 收集脱盐液, 再加入适量碳酸盐缓冲液直至收集液体积至  $5\text{ mL}$ , 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

使用希森美康 t-PAIC 检测试剂盒 (化学发光法) 为参比方法, 本研究建立的 t-PAIC 检测方法分别使用一步法和二步法的反应模式作为实验方法, 同时检测 30 例 t-PAIC 浓度在检测范围内均匀分布的血浆样本。测量过程由全自动化学发光仪 iFLASH-3000 完成。将实验方法与参比方法的测试结果进行相关性比对, 选择最优的反应模式。

### 1.5 性能测定

#### 1.5.1 空白限和检出限

空白限: 根据美国临床和实验室标准协会发布的文件 EP17-A2: 2012《临床实验室测量程序检测能力的评估》, 准备 5 份接近零值的样本, 每个样本重复测试 3 次, 连续检测  $4\text{ d}$ , 计算空白限。

检出限: 根据文件 EP17-A2: 2012 的要求, 准备 5 份浓度分别为空白限浓度 1~5 倍的样本, 每个样本重复测试 3 次, 连续检测  $4\text{ d}$ , 计算检出限。

#### 1.5.2 线性范围

准备 1 份浓度接近检测范围上限的高值样本, 和 1 份浓度接近检测范围下限的低值样本, 按照不同比例混合, 制备出至少 4 个不同水平的系列浓度样本, 作为线性范围测定样本, 将每一水平的样本重复测试 3 次, 根据文件 EP06-A 的要求评估线性范围。

#### 1.5.3 重复性和精密度

将已知 t-PAIC 浓度值的样本混合, 以制备高、中、低 t-PAIC 浓度的混合样本。使用 t-PAIC 检测方法重复测定各浓度混合样本各 20 次, 计算各样本的变异系数 (CV) 即为重复性, 重复性需小于 15%。

将各浓度混合样本分别分装成 40 份, 置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存, 使用建立的 t-PAIC 检测方法每天检测各浓度样本 2 遍, 每遍重复检测 2 次, 连续检测  $20\text{ d}$ , 计算各浓度混合样本检测结果的 CV 即为精密度, 精密

度需小于 15%。

#### 1.5.4 回收率

以 1:9 的体积比混合高值样本与低值样本, 制备 3 份回收样本, 每个回收样本重复检测 3 次, 结果取平均值, 通过理论值和实际检测值计算回收率。

#### 1.5.5 抗干扰能力

将已知 t-PAIC 浓度的样本各分装为两份, 其中一份作为对照样本, 另一份添加一定终浓度的血红蛋白、胆红素、甘油三酯、t-PA、PAI-1 作为干扰样本, 随后检测两份样本并计算偏差值。

#### 1.5.6 参考区间的建立

收集正常成年男性与女性血浆样本各 150 例, 采用本研究建立的 t-PAIC 检测方法测定以上血浆样本, 并建立参考区间。

#### 1.6 数据分析

采用 Excel 软件对实验数据进行线性相关拟合。实验结果采用专业数据统计软件 SPSS22.0 进行统计学分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组质粒的鉴定

以人体肝脏总 cDNA 为模板, PCR 扩增 t-PA 和 PAI-1 编码区基因, 插入 pET-28a 质粒的多克隆位点, 构建重组质粒 pET-28a-t-PA 和 pET-28a-PAI-1。重组质粒 pET-28a-t-PA 和 pET-28a-PAI-1 经 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定结果如图 1 所示, 其中 M 泳道为 DNA Marker; 1 泳道为重组质粒 pET-28a-t-PA 双酶切产物; 2 泳道为重组质粒 pET-28a-PAI-1 双酶切产物。

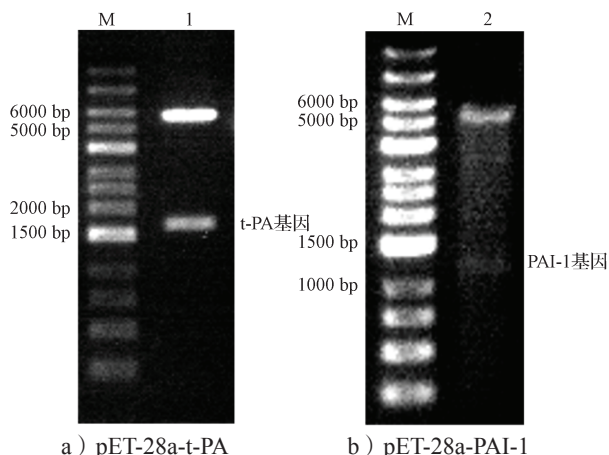
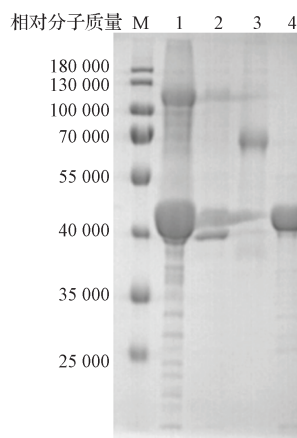


图 1 pET-28a-t-PA 及 pET-28a-PAI-1 双酶切鉴定结果  
Fig. 1 Identification results of pET-28a-t-PA and pET-28a-PAI-1 by restriction enzyme digestion

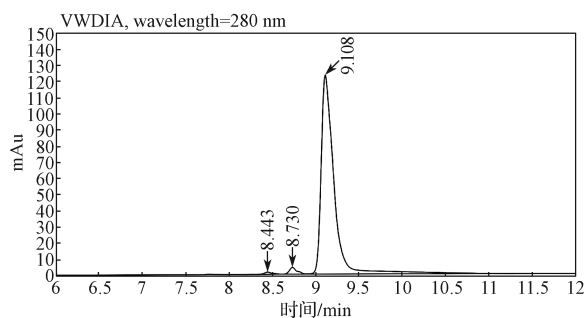
由图 1 可知, 重组质粒 pET-28a-t-PA 和 pET-28a-PAI-1 经 BamH I 和 Hind III 双酶切后, 分别在约 1700 bp 处 (见图 1a) 和约 1200 bp 处 (见图 1b) 可见 t-PA 基因和 PAI-1 基因的条带。与 t-PA 和 PAI-1 基因预期大小一致, 表明重组质粒构建成功。重组质粒基因测序结果完全正确, 表明表达载体构建成功。

### 2.2 t-PAIC 重组蛋白的鉴定与纯化

t-PAIC 重组蛋白的 SDS-PAGE 鉴定及高效液相色谱纯度验证结果如图 2 所示, 其中 M 泳道为蛋白质 Marker; 1 泳道为 t-PAIC 体外合成混合液; 2 泳道为稀释 10 倍的 t-PAIC 体外合成混合液; 3 泳道为 t-PA 重组蛋白; 4 泳道为 PAI-1 重组蛋白。



a) SDS-PAGE 鉴定



b) HPLC 纯度验证

图 2 重组蛋白 t-PAIC 的 SDS-PAGE 鉴定及 HPLC 纯度验证结果

Fig. 2 Results of recombinant protein t-PAIC by SDS-PAGE identification and purity determination by HPLC

由图 2a 可知, t-PAIC 体外合成混合液于 110 000 处出现明显条带, 与 t-PAIC 预期相对分子质量结果一致 (见条带 1, 2); t-PAIC 的单体蛋白 t-PA 在约 65 000 处出现明显条带 (见条带 3), PAI-1 蛋白在约 45 000 处出现条带 (见条带 4), 与预期结果一致。

图 2b 中 t-PAIC 重组蛋白纯化后, 经高效液相色谱验证, 主峰占总面积 97.4%, 表明 t-PAIC 重组蛋白具有较高的纯度。

### 2.3 t-PAIC 单克隆抗体的特异性

经 3 次有限稀释法筛选获得 6 株能稳定产生抗 t-PAIC 抗体的细胞株。为检测所获单克隆抗体的特异性, 以每孔 200 ng 包被重组蛋白 t-PAIC、t-PA 和 PAI-1 于 96 孔酶标板, 加入 1:1000 稀释的单克隆细

胞株培养液作为一抗, 羊抗鼠酶标抗体作为二抗进行间接 ELISA 法检测, 结果如图 3 所示。

由图 3 可知, 1F4 抗体和 5B7 抗体与单体蛋白 t-PA 反应; 4C9 抗体、7D6 抗体和 7F8 抗体与单体蛋白 PAI-1 反应; 3A11 抗体仅与 t-PAIC 特异性反应。因此, 后续实验以 3A11 抗体作为包被磁珠的捕获抗体, 7D6 抗体对单体蛋白 PAI-1 反应性不高, 因此作为标记吖啶的检测抗体以建立 t-PAIC 检测方法。

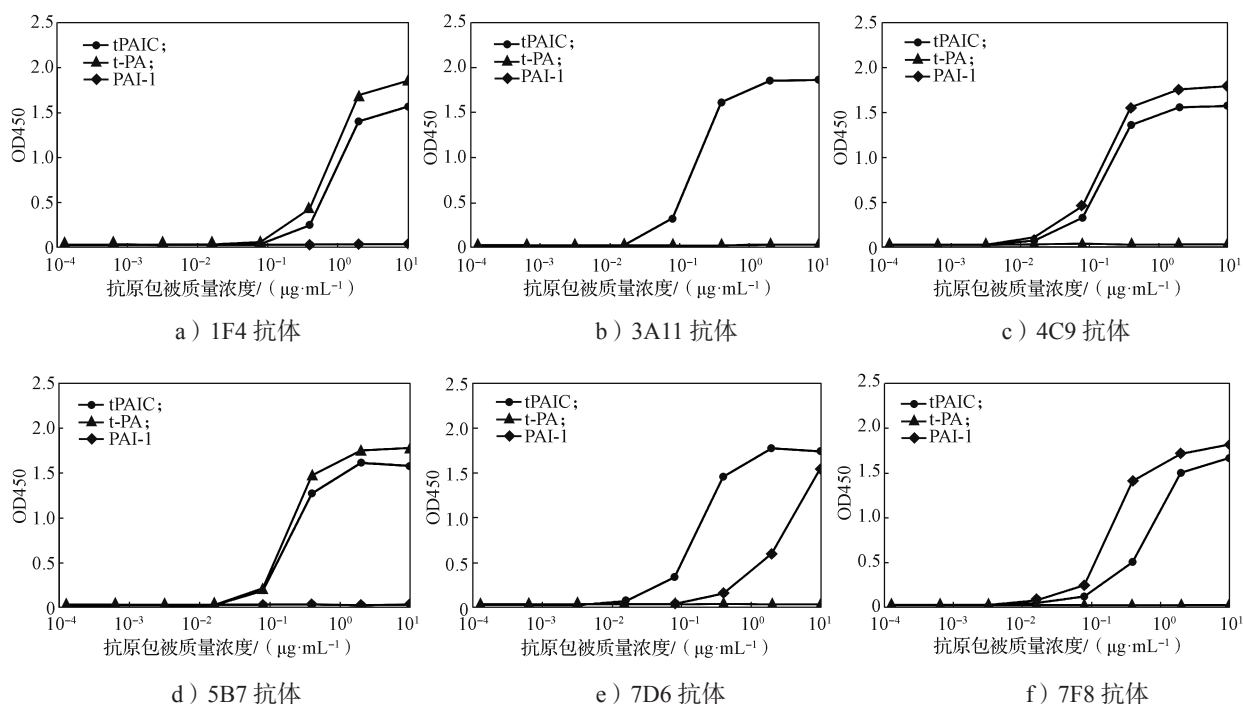


图 3 特异性分析

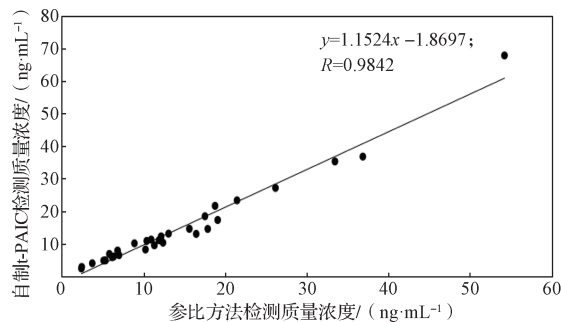
Fig. 3 Selectivity study

### 2.4 反应模式的选择

本研究建立的 t-PAIC 检测方法分别采用一步法和二步法两种反应模式。一步法反应模式具体如下: 在反应管中加入 10  $\mu$ L 样本、50  $\mu$ L 磁微粒试剂和 100  $\mu$ L 吖啶试剂, 37  $^{\circ}$ C 孵育 10 min 后, 加入洗涤液清洗磁微粒 3 次; 加入 100  $\mu$ L 预激发液和 200  $\mu$ L 激发液, 测量相对发光计数 (RLU)。二步法反应模式具体如下: 在反应管中加入 10  $\mu$ L 样本和 50  $\mu$ L 磁微粒试剂, 37  $^{\circ}$ C 孵育 10 min 后, 加入洗涤液清洗磁微粒 3 遍; 再加入 100  $\mu$ L 吖啶试剂, 37  $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 加入洗涤液清洗磁微粒 3 次; 加入 100  $\mu$ L 预激发液和 200  $\mu$ L 激发液, 测量 RLU。二步法通过更多的清洗步骤, 达到减少干扰、增加与参比方法相关性

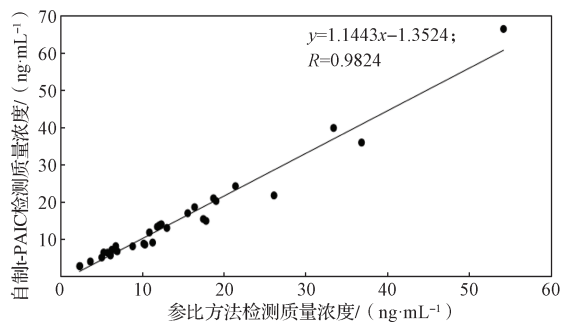
的作用, 其缺点是检测时间较一步法更长。

t-PAIC 检测的一步法、二步法与参比方法同时检测 30 例血浆样本, 比对结果如图 4 所示。



a) 一步法与参比方法比对结果





b) 二步法与参比方法的比对结果

图 4 t-PAIC 检测法不同反应模式与参比方法的比对结果  
Fig. 4 Comparison results of different t-PAIC reaction modes with reference method

由图 4 可知, t-PAIC 检测的一步法与参比方法的相关系数  $R_{\text{一步法}}=0.9842$ , 二步法与参比方法的相关系数  $R_{\text{二步法}}=0.9824$ , 两者相关性均大于 0.95, 相关性良好, 且一步法与二步法的相关系数无明显差别。因此, 后续实验采用 t-PAIC 检测一步法进行。

## 2.5 性能分析

### 2.5.1 空白限和检出限

采用非参数分析法对空白限样本的检测结果进行分析。95% 空白限检测结果小于 0.43 ng/mL, 因此 t-PAIC 检测方法的空白限设置为 0.43 ng/mL。

根据空白限的测量结果, 制备并测量检出限样本, 使用非参数分析法分析检测结果, 得到检出限为 0.91 ng/mL。因此, t-PAIC 检测方法的检出限设定为 0.91 ng/mL。

### 2.5.2 线性范围

将 t-PAIC 重组抗原投入新生牛血清中制备一份质量浓度为 100.46 ng/mL 的高值样本, 命名为 H 样本; 新生牛血清作为质量浓度为 0 ng/mL 的低值样本, 命名为 L 样本。将 H 样本与 L 样本分别以 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 的体积比混合, 以及 H 样本与 L 样本本身, 制备成系列浓度样本。然后对每一种样本进行浓度测定, 对实测浓度与理论浓度进行最小二乘法拟合, 结果如图 5 所示。

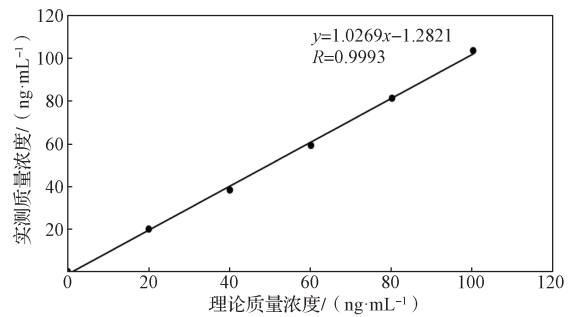


图 5 线性拟合结果

Fig. 5 Linear fitting results

由图 5 可知, t-PAIC 检测方法的回归方程为  $y=1.0269x-1.2821$ , 线性相关系数  $R=0.9993>0.99$ , 线性相关性良好。结合检出限的测量结果, 将建立的 t-PAIC 检测方法的线性范围设置为 0.91~100 ng/mL。

### 2.5.3 重复性和精密度

本研究建立的 t-PAIC 检测方法对低、中、高值样本的检测结果如表 1 所示。由表可知, 低、中、高值样本的重复性分别为 1.54%、1.82%、3.84%; 精密度分别为 1.44%、2.42%、2.34%。所有样本的重复性与精密度的 CV 均小于 5%。比希森美康 t-PAIC 检测试剂盒的重复性和精密度 (CV 低于 20%) 低, 说明本研究建立的 t-PAIC 检测方法的检测结果误差小, 具有临床应用价值。

### 2.5.4 回收率

3 个回收样本的检测结果如表 2 所示。由表可知, 回收率在 100%~110% 之间, 平均回收率为 103.3%, 表明 t-PAIC 检测方法测定的结果接近真实值, 准确度良好。

### 2.5.5 抗干扰能力

向 t-PAIC 样本中加入一定终浓度的血红蛋白、胆红素、甘油三酯、t-PA、PAI-1, t-PAIC 检测方法的测试值变化如表 3 所示。由表可知, 每组 t-PAIC 浓度的干扰偏差值均在  $\pm 10\%$  之内, 由此可认为常见干扰物对 t-PAIC 检测结果无明显影响。

表 1 重复性、精密度检测结果

Table 1 Repeatability and precision test results

样本	重 复 性			精 密 度		
	平均质量浓度 / (ng·mL <sup>-1</sup> )	标准偏差	CV/%	平均质量浓度 / (ng·mL <sup>-1</sup> )	标准偏差	CV/%
低值样本	7.36	0.113	1.54	7.19	0.104	1.44
中值样本	19.41	0.353	1.82	18.96	0.459	2.42
高值样本	53.60	1.442	3.84	51.62	1.206	2.34

表 2 回收率检测结果  
Table 2 Recovery test results

回收样本	高值样本质量浓度 / (ng·mL <sup>-1</sup> )	低值样本质量浓度 / (ng·mL <sup>-1</sup> )	理论质量浓度 / (ng·mL <sup>-1</sup> )	回收测定值 / (ng·mL <sup>-1</sup> )	回收率 /%
样本 1	69.24	2.75	9.40	10.06	107.0
样本 2	38.48	1.88	5.54	5.60	101.1
样本 3	24.06	1.97	4.18	4.26	101.9

表 3 抗干扰能力研究  
Table 3 Anti-interference ability study

干扰物类型	干扰物终质量浓度 / (mg·L <sup>-1</sup> )	对照样本 t-PAIC 质量浓度 / (ng·mL <sup>-1</sup> )	干扰样本 t-PAIC 质量浓度 / (ng·mL <sup>-1</sup> )	干扰偏差值 /%
血红蛋白	5.00	6.15	5.94	-3.4
		34.89	32.55	-6.7
胆红素	6.00	8.66	8.56	-1.2
		42.03	41.45	-1.4
甘油三酯	30.00	6.09	5.77	-5.3
		46.59	42.20	-9.4
t-PA	0.03	5.00	4.72	-5.6
		35.31	34.61	-2.0
PAI-1	0.10	6.71	6.84	1.9
		40.11	37.82	-5.7

#### 2.5.6 参考区间

采用本研究建立的 t-PAIC 检测方法对 300 例成年人(男性与女性各 150 例)血浆进行测试,参考区间结果如表 4 所示。由表可知,t-PAIC 参考区间取 5%~95% 以内分布的测定值,最终确定健康男性参考区间为 1.85~15.91 ng/mL,健康女性参考区间为 1.90~9.43 ng/mL。

表 4 参考区间  
Table 4 Interval of reference

样本类型	测试数	5% 分位质量浓度 / (ng·mL <sup>-1</sup> )	95% 分位质量浓度 / (ng·mL <sup>-1</sup> )
男性	150	1.85	15.91
女性	150	1.90	9.43
总计	300	1.88	12.67

### 3 结论

通过基因工程技术,获得了原核表达 t-PA 和 PAI-1 重组蛋白,并在体外合成了 t-PAIC 重组蛋白。以纯化的高浓度 t-PAIC 蛋白免疫 BALB/c 小鼠,获得 6 株分泌抗 t-PAIC 抗体的单克隆细胞株,然后根据吖啶酯快速发光的特点,成功建立了人体血浆的 t-PAIC 检测方法,并对该检测方法进行一系列性能评估,得到以下结论。

1) 经间接 ELISA 鉴定,3A11 和 7D6 单克隆细胞株产生的抗体对 t-PAIC 具有一定的特异性。

2) 根据国际评价标准,验证本研究建立 t-PAIC 检测方法的空白限为 0.43 ng/mL,检出限为 0.91 ng/mL,线性范围为 0.91~100 ng/mL,各浓度样本重复性 CV 小于 4%,精密度 CV 小于 3%,回收率在 100%~110% 之间,常见干扰物对检测结果无明显影响,整体性能优于希森美康 t-PAIC 检测试剂盒,具有临床应用价值。

3) 本研究建立的 t-PAIC 检测方法对男性和女性成年人样本的血浆进行检测,确定 t-PAIC 在男性中的参考区间为: 1.85~15.91 ng/mL,女性的参考区间为: 1.90~9.43 ng/mL。

综上所述,本研究建立的 t-PAIC 磁微粒化学发光免疫检测法具有优良的性能参数(空白限、检出限、精密度、线性范围等),可提供可靠的检验结果。此外,该检测方法还初步建立了健康成年男性和女性 t-PAIC 的参考区间,可为临床诊断 VTE 提供临床依据。

#### 参考文献:

- [1] HEIT J A, SPENCER F A, WHITE R H. The Epidemiology of Venous Thromboembolism[J]. Journal

- of Thrombosis and Thrombolysis, 2016, 41(1): 3–14.
- [2] 贾奇柯, 孔瑞泽, 张承磊, 等. 静脉血栓栓塞症的流行病学[J]. 中国血管外科杂志(电子版), 2013, 5(1): 62–64.  
JIA Qike, KONG Ruize, ZHANG Chenglei, et al. Epidemiology of Venous Thromboembolism[J]. Chinese Journal of Vascular Surgery (Electronic Version), 2013, 5(1): 62–64.
  - [3] 李晓强, 张福先, 王深明. 深静脉血栓形成的诊断和治疗指南[J]. 3 版. 中国血管外科杂志(电子版), 2017, 9(4): 250–257.  
LI Xiaoqiang, ZHANG Fuxian, WANG Shenming. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Deep Venous Thrombosis[J]. 3rd ed. Chinese Journal of Vascular Surgery (Electronic Version), 2017, 9(4): 250–257.
  - [4] BERTELMANN T, STIEF T, BÖLÖNI R, et al. Fibrinolysis in Normal Vitreous Liquid[J]. Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis, 2014, 25(3): 217–220.
  - [5] 徐莹, 薛国辉, 华琳. 系统性红斑狼疮患者中 TAFI、PAI-1 及 t-PA 水平变化及其与疾病活动度的关系[J]. 医学信息, 2020, 33(20): 54–56.  
XU Ying, XUE Guohui, HUA Lin. Changes of TAFI, PAI-1 and T-PA Levels in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Their Relationship with Disease Activity[J]. Medical Information, 2020, 33(20): 54–56.
  - [6] 刘劲燕, 郭璐. 静脉血栓栓塞症的发病机制及早期诊断标志物的研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2019, 16(3): 266–269.  
LIU Jinyan, GUO Lu. Research Progress on the Pathogenesis and Early Diagnostic Markers of Venous Thromboembolism[J]. Practical Journal of Clinical Medicine, 2019, 16(3): 266–269.
  - [7] MENG Y, LIU N, XUE B R, et al. Blood Coagulation Biomarkers for Postoperative Venous Thromboembolism Diagnosis in Orthopedic Traumatic Patients: A Case Control Study[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2016, 39: 751–755.
  - [8] 李梅, 唐永钦, 李祥. 血清组织型纤溶酶原激活物-抑制剂复合物水平与冠心病的关联分析[J]. 安徽医药, 2020, 24(1): 54–57.  
LI Mei, TANG Yongqin, LI Xiang. The Correlation Analysis of the Level of Serum Tissue Plasminogen Activator-Plasminogen Activator Inhibitor-1 Complex with Risk of Coronary Heart Disease[J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal, 2020, 24(1): 54–57.
  - [9] KANAMORI H, MARUTA A, SASAKI S, et al. Diagnostic Value of Hemostatic Parameters in Bone Marrow Transplant-Associated Thrombotic Microangiopathy[J]. Bone Marrow Transplantation, 1998, 21(7): 705–709.
  - [10] ZHANG J, XUE M M, CHEN Y, et al. Identification of Soluble Thrombomodulin and Tissue Plasminogen Activator-Inhibitor Complex as Biomarkers for Prognosis and Early Evaluation of Septic Shock and Sepsis-Induced Disseminated Intravascular Coagulation[J]. Annals of Palliative Medicine, 2021, 10(10): 10170–10184.
  - [11] 郭晓艳, 卫延辉, 郭学军. 围手术期静脉血栓栓塞症早期诊断新型血栓分子标志物研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2022, 39(9): 888–892.  
GUO Xiaoyan, WEI Yanhui, GUO Xuejun. Research Progress of Novel Thrombotic Molecular Markers in Early Diagnosis of Perioperative Venous Thromboembolism[J]. Journal of Xinxiang Medical University, 2022, 39(9): 888–892.
  - [12] 季洪良, 闫本纯, 郑洋洋, 等. 血栓分子标志物预测下肢骨折患者术后发生静脉血栓栓塞的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(20): 2514–2517.  
JI Hongliang, YAN Benchun, ZHENG Yangyang, et al. The Value of Thrombus Molecular Markers in Predicting the Occurrence of Postoperative Venous Thromboembolism in Patients with Lower Extremity Fracture[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2020, 41(20): 2514–2517.
  - [13] BOLLEN L, PEETERMANS M, PEETERS M, et al. Active PAI-1 as Marker for Venous Thromboembolism: Case-Control Study Using a Comprehensive Panel of PAI-1 and TAFI Assays[J]. Thrombosis Research, 2014, 134(5): 1097–1102.
  - [14] GONG L H, LIU M, ZENG T, et al. Crystal Structure of the Michaelis Complex Between Tissue-Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activators Inhibitor-1[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(43): 25795–25804.
  - [15] 向双林, 曾子安, 杨开怀, 等. 阪崎肠杆菌单克隆抗体的制备及其免疫检测[J]. 现代食品, 2021(24): 133–138.  
XIANG Shuanglin, ZENG Zian, YANG Kaihuai, et al. Preparation of Monoclonal Antibody Against *Cronobacter Sakazakii* and Its Immunoassay[J]. Modern Food, 2021(24): 133–138.
  - [16] 裘雪梅, 朱立鑫, 杨妮, 等. 吡啶酯偶联单克隆抗体建立化学发光法检测黄曲霉毒素 B[J]. 畜牧与饲料科学, 2020, 41(6): 78–83.



QIU Xuemei, ZHU Lixin, YANG Ni, et al. Detection of Aflatoxin B1 with the Chemiluminescence Method Established by Acridinium Ester Coupling with Monoclonal Antibody[J]. Animal Husbandry and Feed

Science, 2020, 41(6): 78-83.

(责任编辑: 李玉华)

## Preparation of Monoclonal Antibody of t-PAIC and Its Magnetic Particle Chemiluminescence Immunoassay

WANG Jinglei<sup>1</sup>, KONG Feizhi<sup>1</sup>, DANG Zhisheng<sup>2</sup>, QIAN Chungen<sup>2</sup>, NIE Libo<sup>1</sup>

(1. College of Life Science and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China;  
2. Shenzhen Yhlo Biotech Co., Ltd., Shenzhen Guangdong 518116, China)

**Abstract:** A pair of specific monoclonal antibodies were prepared and screened by using tissue type plasminogen activator inhibitor complex (t-PAIC) as immunogen, and then a magnetic particle chemiluminescence immunoassay method was established for the detection of human plasma t-PAIC. In comparison with the reference method, the one-step method with a faster reaction speed was finally selected as the reaction mode. Then the performance of the method was estimated, the results showed that the limit of blank (LOB) was 0.43 ng/mL, the limit of detection (LOD) was 0.91 ng/mL, and the linear range was 0.91~100 ng/mL. The coefficient of variance (CV) of repeatability was less than 4%, and the CV of precision was less than 3%. The sample recovery rate was between 100%~110%, and the common interfering substances had no obvious influence on the detection results. Finally, the reference interval of the method was constructed. The reference range for healthy adult males was 1.85~15.91 ng/mL, and that of 1.90~9.43 ng/mL for healthy adult women. The method has the advantage of rapid reaction, which is of important application value in the diagnosis of thrombotic diseases.

**Keywords:** monoclonal antibody; chemiluminescence; tissue-type plasminogen activator inhibitor complex; acridinium ester