

## 引文格式:

安倩, 余枝广, 柴凡, 等. 凝血酶-抗凝血酶复合物化学发光免疫分析检测方法的建立 [J]. 集成技术, 2023, 12(6): 72-82.

An Q, Yu ZG, Chai F, et al. Establishment of chemiluminescence immunoassay method for determination of thrombin-antithrombin complex [J]. Journal of Integration Technology, 2023, 12(6): 72-82.

## 凝血酶-抗凝血酶复合物化学发光免疫分析检测方法 的建立

安倩<sup>1,2</sup> 余枝广<sup>2</sup> 柴凡<sup>2</sup> 孙怀娟<sup>2</sup> 李俊鑫<sup>1</sup> 万晓春<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院深圳先进技术研究院 生物医药与技术研究所 抗体药物研究中心 深圳 518055)

<sup>2</sup>(深圳麦科田生物医疗技术股份有限公司 深圳 518055)

**摘 要** 凝血酶-抗凝血酶复合物(thrombin-antithrombin complex, TAT)是人体凝血和抗凝血平衡的产物,反映人体的凝血状态,其检测结果可用于血栓性疾病的辅助诊断。该研究建立了人血浆样本中TAT化学发光免疫分析检测方法,并对其性能进行评估。该研究以TAT为免疫原制备杂交瘤抗体,以双抗体夹心模式建立TAT化学发光免疫分析检测方法。经过反应优化,磁珠浓度和吖啶酯抗体浓度确定为0.20 g/L和0.2 mg/L,样本量为50  $\mu$ L,在37  $^{\circ}$ C条件下,磁珠抗体和待测物孵育5 min,再与吖啶酯标记抗体孵育5 min。结果表明,该方法与含有凝血酶原(0.20 mg/mL)和抗凝血酶III(0.31 mg/mL)的样本没有交叉反应,且与日本希森美康的TAT试剂的检测结果相关性较高( $r > 0.95$ )。此外,该方法的各项性能指标良好:空白限 $LoB \leq 0.20$  ng/mL,检出限 $LoD \leq 0.40$  ng/mL,在0.40~120 ng/mL范围内的线性相关系数为0.998,准确度在 $\pm 8\%$ 的范围内,可满足临床上对血栓性疾病进行辅助诊断的需求。

**关键词** 凝血酶-抗凝血酶复合物; 化学发光免疫分析; 检测方法; 性能评估

中图分类号 R 392.11 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20230313001

收稿日期: 2023-03-13 修回日期: 2023-05-28

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金委员会区域联合基金-青年基金项目(2020A1515110840); 深圳市科技创新委员会基础研究(面上项目)(JCYJ20190807170801656)

作者简介: 安倩, 博士, 研究方向为血栓体外诊断标志物及试剂盒研发; 余枝广, 博士, 研究方向为化学发光免疫检测技术; 柴凡, 博士, 研究方向为化学发光免疫检测技术; 孙怀娟, 硕士, 研究方向为分子诊断技术; 李俊鑫, 博士, 研究方向为抗体药物和核酸药物; 万晓春(通讯作者), 博士, 研究员, 研究方向为抗体药物和核酸药物, E-mail: wan@siat.ac.cn.

## Establishment of Chemiluminescence Immunoassay Method for Determination of Thrombin-Antithrombin Complex

AN Qian<sup>1,2</sup> YU Zhiguang<sup>2</sup> CHAI Fan<sup>2</sup> SUN Huaijuan<sup>2</sup> LI Junxin<sup>1</sup> WAN Xiaochun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>( Center for Antibody Drug, Institute of Biomedicine and Biotechnology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China )

<sup>2</sup>( Medcaptain Medical Technology Company Limited, Shenzhen 518055, China )

\*Corresponding Author: wan@siat.ac.cn

**Abstract** Thrombin-antithrombin complex (TAT) is the product of coagulation and anticoagulation balance. Its detection reflects thrombin status and can be used as an auxiliary in the diagnosis of thrombotic diseases. A chemiluminescence immunoassay method was established to analyze TAT in human plasma samples, and its analytical performance was evaluated. The TAT was used as immunogen for monoclonal antibody preparation. TAT measurement method was established using double antibody sandwich format. After the optimization of reaction, the bulk reagent concentrations of magnetic microparticle coated with antibody and acridinium labeled antibody were 0.20 g/L and 0.2 mg/L, respectively, and the sample size was 50  $\mu$ L. The reaction of magnetic particle coated antibody and sample were incubated for 5 min at 37  $^{\circ}$ C, and 5 min for subsequent reacting with the antibody labeled with acridinium. There was no cross-reaction with samples containing 0.20 mg/mL prothrombin or 0.31 mg/mL antithrombin III. Besides, there was a high correlation ( $r > 0.95$ ) between this method and TAT test kit of Sysmex.  $LoB$  is less than or equal to 0.20 ng/mL.  $LoD$  is less than or equal to 0.40 ng/mL. The linear correlation coefficient is 0.998 in the detection interval of 0.40 to 120 ng/mL, and the accuracy is within the range of  $\pm 8\%$ . A quantitative chemiluminescence immunoassay method for TAT measurement has been established, and the performance meets customer needs for clinical utility.

**Keywords** thrombin-antithrombin complex; chemiluminescence immune assay; test method; performance evaluation

**Funding** This work is supported by Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2020A1515110840), and Shenzhen Basic Research Fund (JCYJ20190807170801656)

## 1 引 言

凝血酶-抗凝血酶复合物(thrombin-antithrombin complex, TAT)是凝血酶原(prothrombin)被激活后生成的凝血酶(thrombin, T)被抗凝血酶(antithrombin III, AT)迅速结合后形成的以共价键相连的复合物,分子质量约为 96 ku<sup>[1-4]</sup>。TAT的形成反映了凝血酶的生成,标志着凝血系统的激活,是反映机体高凝状态的特异性分子标

志物<sup>[5-6]</sup>。定量检测血浆中的 TAT 含量对弥漫性血管内凝血(disseminated or diffuse intravascular coagulation, DIC)、脓毒症、深静脉血栓等血栓性疾病的诊断具有十分重要的意义。此外, TAT 检测结合其他凝血检测项目对抗凝和溶栓治疗具有指导价值<sup>[7-9]</sup>。

目前,检测 TAT 的方法主要有酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法、化学发光免疫分析法。化学发光免

疫分析具有灵敏度和特异性高、重复性好、线性范围宽等优点，是体外诊断试剂开发的主流平台。化学发光试剂的抗体原料是影响试剂性能的决定性因素。目前，市面上的 TAT 检测试剂盒采用的原料多为针对 T 抗原和 AT 抗原的抗体，两个抗体分别结合 TAT 抗原上的位点，形成“抗体-抗原-抗体”的双抗体夹心结构。健康人血浆中的 TAT 含量小于 4.0 ng/mL，血浆中 AT 抗原 (0.20~0.30 mg/mL) 和凝血酶原 (0.15~0.20 mg/mL) 的含量比“出血-凝血”平衡状态下产生的 TAT 高<sup>[3]</sup>。传统的 TAT 检测方法采用针对 AT 单体和 T 单体的抗体与 TAT 形成双抗体夹心，AT 单体和 T 单体的抗体会与血浆中大量存在的 AT 单体或凝血酶原结合，对 TAT 的测定产生一定干扰，从而影响试剂的准确度和灵敏度，因而本研究采用针对 TAT 的特异性抗体来建立 TAT 化学发光免疫分析检测方法。

## 2 材料与方 法

### 2.1 一般资料

TAT 由人凝血酶 (Haematologic Technologies Inc.) 和抗凝血酶 (Haematologic Technologies Inc.) 混合反应制备而成。对照试剂为希森美康公司的 TAT 检测试剂盒 (希森美康医用电子 (上海) 有限公司)。临床血浆样本由深圳市第二人民医院提供。本研究中用到的设备为深圳麦科田 Immu F6 全自动化学发光免疫分析仪和日本希森美康全自动化学发光免疫分析仪 HISCL-5000。

### 2.2 方 法

#### 2.2.1 凝血酶-抗凝血酶复合物抗体的制备和纯化

将人凝血酶和抗凝血酶 III (摩尔比为 1:1.2) 于 37 °C 反应 15 min，生成 TAT。为获得高纯度的 TAT，将上述反应混合物进行 SDS-PAGE 非还原电泳，切胶回收 TAT 条带，选用 TAT 抗原作为免疫原进行小鼠免疫，2~3 轮免疫后取血清进

行效价测试，效价合格后进行杂交瘤细胞融合，经过两次筛选得到针对 TAT 的杂交瘤细胞株，在小鼠腹腔中培养杂交瘤细胞，收集腹水，采用 protein G 亲和纯化法纯化抗体。

#### 2.2.2 酶联免疫吸附试验测定凝血酶-抗凝血酶复合物抗体的亲和力

包被板制备：分别将 AT、T 抗原和 TAT 用包被液 (碳酸盐缓冲液) 稀释到 1 nmol/L，AT 抗原包被板每孔添加 100 μL 1 nmol/L 的 AT，T 抗原包被板每孔添加 100 μL 1 nmol/L 的 T，TAT 包被板每孔添加 100 μL 1 nmol/L 的 TAT，4 °C 包被过夜 (18~20 h)。

封闭：取出包被板平衡至室温，用洗涤液 (磷酸盐缓冲液) 洗板 2 次，每孔加 150 μL 封闭液 (含 5% 脱脂牛奶的磷酸盐缓冲液)，在 37 °C 封闭 0.5 h，甩干置于湿度小于 30% 的 4 °C 干燥箱中干燥 24 h。

显色：分别添加 100 μL 不同浓度 (0、0.005 mg/L、0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L、4.0 mg/L、8.0 mg/L、16.0 mg/L) 的抗体 3B16 和抗体 8D9 于不同抗原包被板，37 °C 反应 60 min，洗板后加入 100 μL 酶标工作液 (含羊抗鼠 IgG-HRP)，37 °C 反应 30 min，洗板后加显色剂 A (含过氧化氢) 和显色剂 B (含四甲基联苯胺) 各 50 μL，显色 15 min，加入终止液 (50 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 50 μL，测定 450 nm 处的吸光值 (optical density, OD<sub>450</sub>)。

#### 2.2.3 凝血酶-抗凝血酶复合物的检测方法

采用双抗体夹心化学发光免疫分析法对 TAT 进行检测，其检测步骤如下。首先，样本与包被捕获抗体的磁珠混合并孵育，样本中的 TAT 和包被在磁珠上的抗体结合。反应完成后，磁场吸住磁珠，清洗液洗去未结合的物质。其次，添加吖啶酯标记抗体，混合并孵育，标记有吖啶酯的抗体会与磁珠抗体上的 TAT 结合，形成抗体-抗原-抗体的夹心复合物。反应完成后，磁场吸住磁

珠, 清洗液洗去未结合的物质。最后, 将预激发液和激发液加入反应混合物中, 发生化学发光反应。通过光电倍增管对反应中产生的光子数进行测量, 所产生的光子数与样本中的 TAT 浓度成正比。

#### 2.2.4 试剂工作液的制备

磁珠抗体工作液: 取一定量磁珠于离心管中, 用磁珠包被稀释液 A ( $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-NaOH}$  缓冲液) 清洗磁珠 2 次后重悬; 加入捕获抗体 (抗体 3B16), 再加入磁珠包被稀释液 B ( $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-NaOH}$  缓冲液, 含  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ),  $37\text{ }^\circ\text{C}$  孵育; 用清洗液 (磷酸盐缓冲液, 含牛血清白蛋白、ProClin-300、Tween-20) 清洗并封闭 24 h; 用磁珠稀释液 (Tris 缓冲液, 含牛血清白蛋白、ProClin-300、Tween-20) 按照一定比例稀释磁珠母液, 配成磁珠工作液。

吡啶酯标记抗体工作液: 将吡啶酯溶液 (N,N-二甲基甲酰胺溶剂) 与检测抗体 (抗体 8D9) 以一定的比例混合, 避光反应 1 h; 用磷酸钠缓冲液 (50 mmol/L, pH 6.0) 透析 3 次, 得到吡啶酯标记抗体母液; 用吡啶酯标记物稀释液 (吗啉乙磺酸缓冲液, 含牛血清白蛋白、ProClin-300、Tween-20) 将吡啶酯标记抗体母液稀释到所需要的浓度, 得到吡啶酯标记抗体工作液。

#### 2.2.5 校准质控品的配制和校准品溯源

用校准品稀释液 (含有 1% 牛血清白蛋白、0.9% NaCl、pH 值 7.4 的 Tris 缓冲液) 将 TAT 抗原稀释为一系列不同浓度 (0~120.0 ng/mL), 作为一组工作校准品。工作校准品的浓度覆盖试剂的线性范围。用校准品稀释液将 TAT 抗原分别稀释为 4.0 ng/mL 和 20.0 ng/mL 左右, 分别作为质控品 L 和 H。

用日本希森美康全自动化学发光免疫分析仪 HISCL-5000 配套的 TAT 检测试剂盒 (化学发光法) 中的校准品校准仪器, 测定一系列血浆样本, 同时采用本研究制备的 TAT 化学发光免疫分

析检测试剂 (简称 “本试剂”) 测定血浆样本的发光值; 采用 L4P fitting ToolCSharp 工具, 将希森美康检测系统测得的浓度和本试剂测得的发光值进行拟合, 得到曲线; 用同一批试剂测定工作校准品, 将工作校准品的发光值代入曲线中, 反算工作校准品的浓度, 此浓度和对应的发光值拟合的曲线为本试剂的主曲线。

#### 2.2.6 样本量和工作液浓度的优化

选用样本量 10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$ , 磁珠浓度 0.20 g/L、0.25 g/L、0.30 g/L, 吡啶酯抗体浓度 0.15 mg/L、0.20 mg/L、0.25 mg/L, 设计正交实验表, 采用正交实验对这 3 个变量进行优化, 确定每个因子的最佳水平, 分析因子效应。

#### 2.2.7 最佳孵育时间的优化

在 2.2.6 小节的基础上进行最佳孵育时间的优化。第一步, 磁珠抗体和待测物孵育 5 min; 第二步, 第一步的产物与吡啶酯标记抗体孵育 5 min, 表示为 5 min-5 min, 分别调整两步反应的孵育时间为 7 min-5 min、5 min-7 min, 进行测试, 计算样本的信噪比 (signal to noise ratio, S/N)。信噪比为样本的信号值与校准品稀释液 ( $S_0$ ) 的发光值之比。

#### 2.2.8 性能评估

##### (1) 线性范围

将高值样本按一定比例稀释为 5 个浓度样本, 高值样本浓度达到检测区间 (0.4~120 ng/mL) 的上限, 低值样本的浓度须接近检测区间 (0.4~120 ng/mL) 的下限, 对每一浓度的样本重复测定 3 次, 计算其平均值。将测定浓度的平均值与理论浓度用最小二乘法进行线性拟合, 得到线性回归方程, 并计算线性相关系数  $r$ 。

##### (2) 准确度

测试溯源后的准确度样本 I ( $(4.0 \pm 0.8) \text{ ng/mL}$ ) 和准确度样本 II ( $(20.0 \pm 4.0) \text{ ng/mL}$ ), 每个样品重复测定 3 次, 根据  $B_i = (X_i - T) / T \times 100\%$  计算相对偏差。其中,  $B_i$  为相对偏差,  $X_i$  为准确样本

I 或 II 的测试浓度,  $i$  为测试次数,  $T$  为准确度样本 I 或准确度样本 II 溯源后的标定浓度。

### (3) 最低检出限

$LoD = LoB + 1.645 \times SD$ 。其中,  $LoB =$  空白样本结果的均值  $+ 1.645 \times SD1$ ,  $SD$  为低值样本的合并标准差,  $SD1$  为空白样本的标准差<sup>[10]</sup>。

### (4) 精密度

根据美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 制定的精密度测试方案 (EP5-A2)<sup>[11-12]</sup>, 每天取出 TAT 重复性样本 I ( $(4.0 \pm 0.8) \text{ ng/mL}$ ) 和重复性样本 II ( $(20.0 \pm 4.0) \text{ ng/mL}$ ), 并测定两轮, 每轮重复 2 次, 共测试 20 天, 分析并计算试剂的精密度。

### (5) 临床样本相关性比对

选取覆盖线性范围的 249 例临床枸橼酸钠血浆样本, 分别用日本希森美康 (Sysmex) 的 TAT 检测试剂盒和本试剂进行检测, 并对检测结果进行相关性和一致性分析。

## 2.3 统计学处理

采用 MedCalc、Minitab 19 和 SPSS 20.0 软件进行统计处理和分析, 以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 抗体与凝血酶、抗凝血酶、凝血酶-抗凝血酶复合物抗原的亲和力

抗体与抗原的 ELISA 实验结果显示 (图 1), 实验条件下, 抗体 3B16 与 TAT 抗原的亲和力最高, 与 T 抗原也有一定的亲和力; 抗体 8D9 与 AT 抗原的亲和力最高, 其次是 TAT 抗原, 与 T 抗原没有亲和力。

### 3.2 凝血酶-抗凝血酶复合物检测反应体系的优化

如图 2 所示, 磁珠浓度从  $0.20 \text{ g/L}$  提高到  $0.30 \text{ g/L}$  的过程中, 随着磁珠浓度的升高, 信噪比从 25 下降至 21 后保持稳定; 吡啶酯浓度在  $0.15 \sim 0.25 \text{ mg/L}$  范围内, 信噪比随着吡啶酯抗体

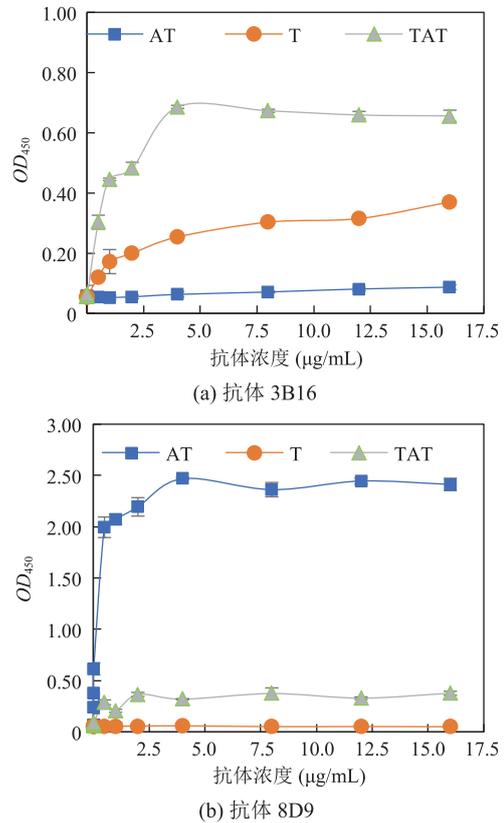


图 1 抗体与 TAT、AT、T 抗原的亲和力测试

Fig. 1 The affinity tests of the antibody to TAT, antithrombin III and thrombin

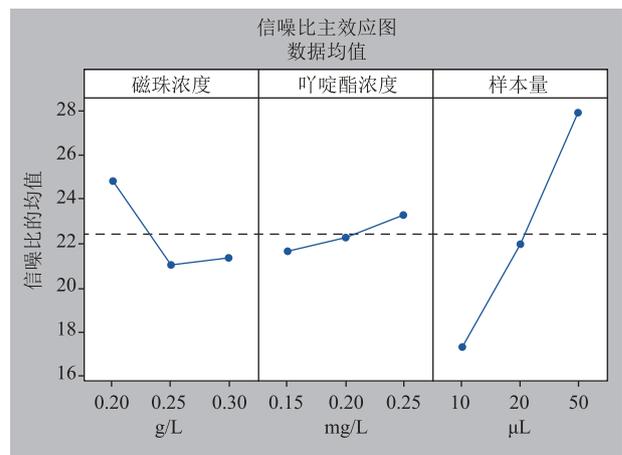


图 2 磁珠浓度、吡啶酯标记抗体浓度和样本量与信噪比的主效应图

Fig. 2 The effect of magnetic beads concentration, acridinium labeled antibody conjugate concentration and sample value on  $R_{S/N}$

浓度的提高而升高; 样本量对信噪比及其斜率的影响最大, 在 50  $\mu\text{L}$  时达到最大信噪比 28。

### 3.3 孵育时间的优化

采用优化好的反应体系, 设置不同的孵育时间, 对校准品稀释液( $S_0$ )、经过希森美康测定的高值(H)和低值(L)两个血浆样本进行测定。首先将样本和磁珠捕获抗体进行孵育, 清洗后, 再与吡啶酯标记抗体孵育。结果如图 3 所示, 分别提高样本与捕获抗体的孵育时间或与检测抗体的孵育时间, 本底  $S_0$  的信号值(593~624)和低值样本 L 的信号值(10 572~11 351)均没有显著性变化( $P>0.05$ )。在孵育时间为 7 min-5 min 时,

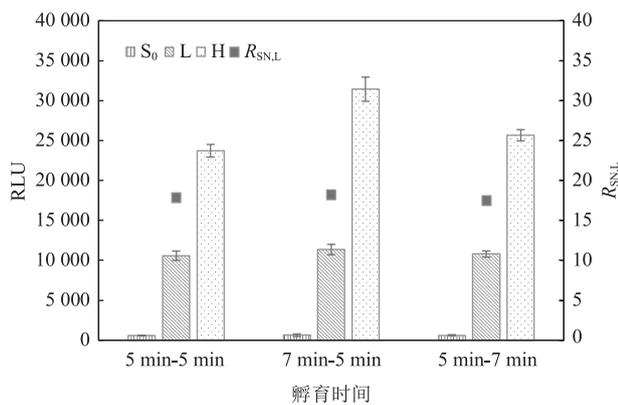


图 3 孵育时间对反应信号和信噪比的影响

Fig. 3 The effect of incubation time on RLU and  $R_{SNL}$

样本的发光值(relative light unit, RLU)最大。分别计算不同孵育时间下低值样本的信噪比  $R_{SNL}$ , 5 min-5 min, 7 min-5 min、5 min-7 min 的  $R_{SNL}$  分别为 17.8、18.2、17.5。

### 3.4 线性范围

将接近 120 ng/mL 的 TAT 样本稀释成 5 个浓度梯度, 稀释液为低于 0.4 ng/mL 的 TAT 样本。测定稀释的样本并对检测结果进行分析, 相关系数( $r$ )为 0.998。

### 3.5 分析特异性测试

分别对含有 0.20 g/L 的人凝血酶原和 0.31 g/L 的抗凝血酶 III 的样本进行测定, 测试结果(如表 1)低于检出限(0.4 ng/mL)。

### 3.6 准确度

测定经过溯源的准确度样本 I 和准确度样本 II, 测量浓度和标定浓度之间的相对偏差分别为 -2.8%~3.5% 和 -7.3%~-0.1%(表 2), 在  $\pm 8\%$  以内。

### 3.7 精密度

分别对重复性样本 I 和重复性样本 II 连续测试 20 d, 结果表明, 试剂的精密度良好, 批内不精密度在 5% 以下, 总不精密度也控制在 10% 以内(如表 3 所示)。

表 1 凝血酶原和抗凝血酶 III 分析特异性测试

Table 1 The specificity test of prothrombin and antithrombin III

重复次数	凝血酶原 (0.20 mg/mL)		抗凝血酶 III (0.31 mg/mL)	
	测量浓度 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	测量浓度 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)
1	0.10		0.05	
2	0.12	0.12	0.01	0.04
3	0.13		0.05	

表 2 准确度测试

Table 2 Accuracy testing

重复次数	准确度样本 I			准确度样本 II		
	测量浓度 (ng/mL)	标定浓度 (ng/mL)	相对偏差	测量浓度 (ng/mL)	标定浓度 (ng/mL)	相对偏差
1	4.42		3.5%	19.78		-7.3%
2	4.15	4.27	-2.8%	21.32	21.34	-0.1%
3	4.36		2.1%	19.97		-6.4%

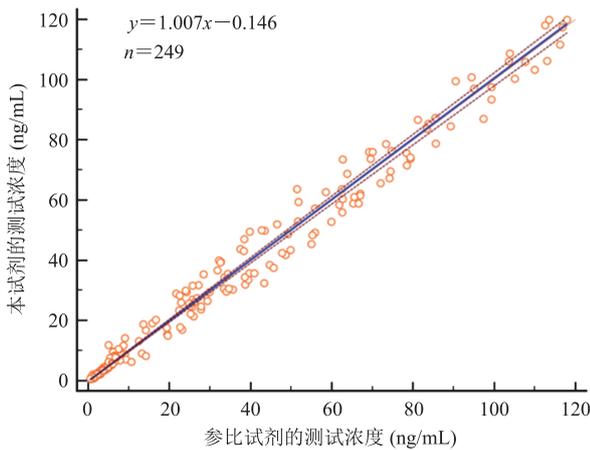
表3 精密度测试

Table 3 Precision testing

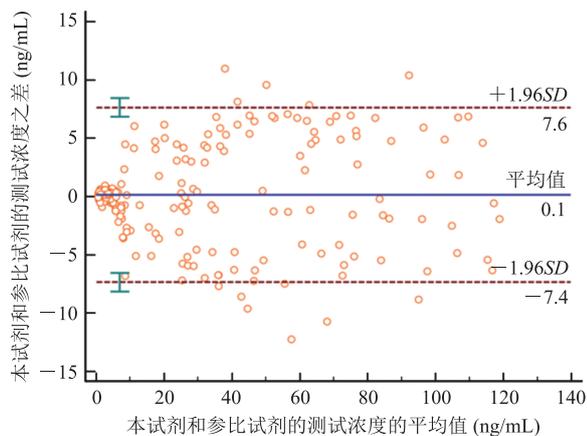
样本	均值 (ng/mL)	批内不精密度		总不精密度	
		SD (ng/mL)	CV (%)	SD (ng/mL)	CV (%)
重复性样本 I	4.02	0.145	3.6	0.281	7.0
重复性样本 II	19.42	0.738	3.7	1.336	6.8

### 3.8 与参比试剂的相关性比对

使用本试剂和日本希森美康 TAT 检测试剂盒对 249 例样本分别进行平行测定, 采用 Passing-Bablok 回归分析本试剂和希森美康试剂的一致性(如图 4), 经计算  $r=0.993$ 。



(a) Passing-Bablok 回归曲线



(b) Bland-Altman 图

图4 本试剂与希森美康 TAT 检测试剂的相关性

**Fig. 4 Correlation between this kit and TAT kit of Sysmex**  
经 Bland-Altman 图分析, 纳入统计分析的 249 例样本中, 有 12 例超出了均值  $\pm 1.96SD$ ,

即有 95.2% 的样本测试结果绝对偏差位于一致性界限内。

## 4 讨论

TAT 是凝血与抗凝血相互作用的产物, TAT 水平体现了体内的凝血酶变化, 进而反映机体的凝血状态。在临床中, TAT 联合血栓调节蛋白 (Thrombomodulin, TM)、纤溶酶 -  $\alpha 2$  - 抗纤溶酶抑制剂复合物 (plasmin antiplasmin complex, PIC) 和组织型纤溶酶原激活物-纤溶酶原激活抑制物-1 复合物构成新血栓四项。新血栓四项为凝血、纤溶和血管内皮损伤的分子标记物, 它们的检测对多种血栓性疾病的诊断具有重要意义, 如 DIC<sup>[13-14]</sup>、脑梗死<sup>[15]</sup>、脓毒症<sup>[16]</sup>等, 且能够预示一些疾病的发展, 如非小细胞肺癌<sup>[17]</sup>、急性缺血性脑卒中<sup>[4]</sup>等。

根据 TAT 和 TM 的联合检测结果, 可以对 DIC 进行分期<sup>[18]</sup>。根据血液凝固性出血和纤溶情况, DIC 可分为高凝期、消耗性低凝期和继发性纤溶亢进期。隋艳芬<sup>[18]</sup>的研究表明, TAT 和 TM 的水平与 DIC 的分期正相关, DIC 患者血浆中的 TAT 和 TM 水平均高于健康人, 继发性纤溶亢进期 DIC 患者的 TAT 和 TM 水平均最高, 其次是消耗性低凝期和高凝期。研究表明, 非显性 DIC 患者的 TAT 水平为正常参考范围的 5 倍以上, 而常规凝血指标凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间、凝血时间、纤维蛋白原、血小板计数则保持在正常范围内, 表明通过 TAT 水平监测凝血状态的灵敏度高于传统凝血检测项目<sup>[19-20]</sup>。张

锦丽等<sup>[21]</sup>在研究急性脑梗死时也有类似发现, 其研究表明, 急性脑梗死患者的凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间、凝血时间没有显著性变化, 而 TAT 水平显著提高。TAT 和 D 二聚体水平和凝血指标联检有助于冠状动脉粥样硬化性心脏病的早期诊断和病情发展情况判断<sup>[22]</sup>。Lundbech 等<sup>[23]</sup>的研究表明, 局限性癌症患者血浆中的 TAT 和人凝血酶原片段(F1+2)的含量显著提高, TAT 和 F1+2 水平可以作为判定癌症患者高凝状态的指标。Masago 等<sup>[17]</sup>在研究晚期非小细胞肺癌时发现, 低的 PIC 和 TAT 的比值, 以及低的蛋白 S 活性预示着不良预后。

目前, 希森美康医用电子(上海)有限公司在我国临床 TAT 检测中占据了较大的市场份额。本研究以 TAT 为免疫原制备 TAT 抗体, 通过试剂配方和反应体系的优化, 以日本希森美康公司的 TAT 检测试剂盒为参比试剂, 制备 TAT 化学发光免疫分析检测试剂盒。

通过 ELISA 实验对筛选得到的抗体进行亲和力和力测定, ELISA 实验结果表明, 抗体 3B16 与 TAT 抗原的亲和力最高, 抗体 8D9 与 AT 抗原的亲和力最高(图 1)。在正常人血浆中, AT 和凝血酶原的浓度分别为 0.20~0.30 mg/mL 和 0.15~0.20 mg/mL, 远大于机体在“出血-凝血”平衡状态下产生的 TAT。传统的 TAT 检测方法采用 AT 抗体和 T 抗体与 TAT 形成“T 抗体-TAT-AT 抗体”双抗体夹心结构。为了避免血液中高浓度的 AT 和凝血酶原对 TAT 测试的干扰, 本研究以抗体 3B16(TAT 抗体)为捕获抗体, 与样本中的 TAT 抗原结合, 清洗除去样本中的 AT 抗原和凝血酶原, 然后再与吲哚酯标记的抗体 8D9(AT 抗原的抗体)孵育, 形成“TAT 抗体-TAT-AT 抗体”的结构, 这将在很大程度上减少血浆中 AT 单体和凝血酶原的干扰。用本试剂分别测定含有 0.31 mg/mL 的 AT 和 0.20 mg/mL 的凝血酶原的样本, 测定结果小于 0.2 ng/mL,

表明正常人血浆中的 AT 和凝血酶原对本试剂进行 TAT 的定量测定无影响。

灵敏度是评估体外诊断试剂性能的重要指标, 分析灵敏度是待测物可检测到的最低浓度。反应的样本量、抗体浓度影响试剂的灵敏度, 因而需要对其进行优化。本研究通过正交实验优化反应的样本量、磁珠工作液浓度和吲哚酯标记抗体的浓度。结果表明(图 2), 样本量对信噪比的影响最大, 在样本量为 10~50  $\mu$ L 之间, 随着样本量的提高, 信噪比明显提高。在吲哚酯抗体浓度为 0.15~0.25 mg/L 范围内, 随着吲哚酯浓度的提高, 信噪比小幅度提高。当磁珠浓度为 0.20 g/L 时, 信噪比最高, 随着磁珠浓度提高至 0.30 g/L, 信噪比逐渐降低, 后趋于稳定。信噪比是样本信号值与校准品稀释液信号值之比, 可初步反映试剂的灵敏度。样本的信噪比越高, 即样本信号值与本底(校准品稀释液的发光值)的拉开程度越大, 发光值波动对浓度值的测定影响越小, 试剂准确度和灵敏度越高。在样本量为 50  $\mu$ L、磁珠工作液浓度为 0.20 g/L、吲哚酯抗体标记物工作液浓度为 0.25 mg/L 的条件下, 测定试剂的最低检出限, 测定结果  $\leq 0.4$  ng/mL, 与参比试剂希森美康 TAT 检测试剂盒的检出限( $LoD \leq 0.4$  ng/mL)相当, 因而没有继续提高样本量和吲哚酯抗体的浓度。

化学发光免疫分析的基础是抗原抗体反应, 抗原抗体反应时的孵育时间影响发光值, 进而影响试剂的性能, 因此对孵育时间进行优化。分别延长第一步和第二步的反应时间, 低值样本的信号值无显著性差异( $P > 0.05$ ), 当孵育时间为 5 min-5 min 时, 样本的信噪比较高且测试时长较短, 较短的测试时间可以提高检测通量, 因而选择孵育时间为 5 min-5 min。

通过希森美康 HISCL 5000 测量程序对校准品进行量值溯源, 4 参数拟合得到的标准曲线的  $r$  为 0.999, 本试剂与希森美康试剂的性能比

如表 4 所示,  $LoB \leq 0.20 \text{ ng/mL}$ , 检出限  $LoD \leq 0.40 \text{ ng/mL}$ , 试剂在  $0.40 \sim 120 \text{ ng/mL}$  内的线性相关系数为 0.998。对溯源至希森美康 HISCL 5000 的准确度样本 I 和 II 进行测定, 相对偏差分别为  $-2.8\% \sim 3.5\%$  和  $-7.3\% \sim -0.1\%$ , 试剂的准确度在  $\pm 8\%$  的范围内, 满足临床要求, 为后续试剂进行临床比对提供有力的支撑。

采用本方法和日本希森美康的 TAT 检测试剂盒对 249 例临床样本进行测试, 将本研究的检测结果与希森美康参比试剂进行相关性分析,  $r=0.993$ , 表明本试剂与希森美康参比试剂的测值相关性良好。经过 Bland-Altman 统计分析(图 4(b)), 纳入统计分析的 249 例样本中, 有 12 例超出了均值  $\pm 1.96SD$ , 即有 95.2% 的样本测试结果绝对偏差位于一致性界限内, 认为本试剂与希森美康参比试剂的检测结果一致。

抗原、抗体、酶、引物等核心原料是体外诊断试剂的核心壁垒, 原材料的高质量发展是实现体外诊断试剂进口替代的根本途径。我国体外诊断试剂原料大部分依赖进口, 2020 年的进口原料占比接近 90%<sup>[24]</sup>。国外原料一旦断供, 将给中国生命科学的发展带来极大风险。此外, 我国人口老龄化日趋严重, 医疗保健服务面临的压力也日益增大, 体外诊断试剂的国产化将降低国民医疗成本, 有利于社会的稳定发展。本研究开发的 TAT 抗体以及 TAT 检测试剂为生物试剂的国产化

建设奠定了基础。

## 5 结论与展望

本研究建立了 TAT 化学发光免疫分析检测方法, 与含有凝血酶原 ( $0.20 \text{ mg/mL}$ ) 和抗凝血酶 III ( $0.31 \text{ mg/mL}$ ) 的样本没有交叉反应。本试剂与参比试剂日本希森美康的 TAT 检测试剂盒的测值相关性较高 ( $r > 0.95$ ), 在灵敏度、准确度、精密度和特异性方面表现较好, 未来或许可以作为希森美康 TAT 检测试剂盒的替代。

目前, TAT 检测主要开设于医院的检验科, 样本类型为枸橼酸钠血浆。胸痛中心、卒中中心以及 ICU 的患者常常需要进行 TAT 检测, 以判断患者的凝血状态。如果 TAT 试剂盒可以支持全血检测及床旁检测, 则可帮助医生快速判断患者的病情, 为患者争取宝贵的时间。未来可以对全血样本的 TAT 检测进行可行性研究。

## 参考文献

- [1] Deguchi K, Noguchi M, Yuwasaki E, et al. Dynamic fluctuations in blood of thrombin/antithrombin III complex (TAT) [J]. American Journal of Hematology, 1991, 38(2): 86-89.
- [2] 周帅辉, 王伟杰, 余正, 等. 高纯度纤溶酶- $\alpha 2$ -纤溶酶抑制剂和凝血酶-抗凝血酶复合物的制备 [J].

表 4 本试剂与希森美康试剂的性能比对

Table 4 Comparison of the performance of Sysmex with our study

性能指标	测试系统	
	希森美康	本研究
检测范围	0.4~120 ng/mL	0.4~120 ng/mL
最低检测限	$\leq 0.4 \text{ ng/mL}$	$\leq 0.4 \text{ ng/mL}$
准确度(相对偏差)	$\leq \pm 20\%$	$\leq \pm 8\%$
类似物干扰	—	在凝血酶原的浓度 $\leq 0.20 \text{ mg/mL}$ , AT 的浓度 $\leq 0.31 \text{ mg/mL}$ 时无明显干扰
检测时间	17 min	18 min
对比相关性	相关系数 $r > 0.95$	

- 生物学杂志, 2022, 39(1): 110-114.
- Zhou SH, Wang WJ, Yu Z, et al. Preparation of high-purity plasmin- $\alpha$ 2-plasmin inhibitor and thrombin-antithrombin complex [J]. *Journal of Biology*, 2022, 39(1): 110-114.
- [3] 王振义, 李家增. 血栓与止血基础理论与临床 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004, 120-122.
- Wang ZY, Li JZ. Basic theory and clinic of thrombus and hemostasis [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2004, 120-122.
- [4] Ye NF, Liu ZZ, Wang XF, et al. Evaluation of analytic and clinical performance of thrombin-antithrombin complex and D-dimer assay in prognosis of acute ischemic stroke [J]. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2020, 31(5): 303-309.
- [5] 胡艳晶, 张益明, 宋景春, 等. 凝血酶-抗凝血酶复合物联合纤溶酶- $\alpha$ 2 抗纤溶酶复合物诊断创伤性弥散性血管内凝血的临床价值 [J]. *医学研究生学报*, 2020, 33(12): 1283-1287.
- Hu YJ, Zhang YM, Song JC, et al. Clinical value of thrombin-antithrombin complex combined with  $\alpha$ 2-plasmin inhibitor-plasmin complex in the diagnosis of traumatic disseminated intravascular coagulation [J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2020, 33(12): 1283-1287.
- [6] Iijima H, Gohdo T, Imai M, et al. Thrombin-antithrombin III complex in acute retinal vein occlusion [J]. *American Journal of Ophthalmology*, 1998, 126(5): 677-682.
- [7] 李占君, 焦婷婷, 张成磊, 等. 血栓调节蛋白、凝血酶-抗凝血酶复合物在弥散性血管内凝血诊断中的应用 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2019, 41(2): 183-185.
- Li ZJ, Jiao TT, Zhang CL, et al. The application of thrombomodulin and thrombin-antithrombin complex in the diagnosis of disseminated intravascular coagulation [J]. *Journal of Ningxia Medical University*, 2019, 41(2): 183-185.
- [8] 焦甜甜, 朱桂珍, 鲁杨, 等. 凝血酶-抗凝血酶复合物在动静脉内瘘狭窄的维持性血液透析患者经皮腔内血管成形术后再狭窄预测中的价值 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2021, 35(5): 469-472.
- Jiao TT, Zhu GZ, Lu Y, et al. Value of thrombin-antithrombin complex to the prediction of restenosis of arteriovenous fistula after percutaneous transluminal angioplasty in patients undergoing maintenance hemodialysis [J]. *Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy*, 2021, 35(5): 469-472.
- [9] Lee SY, Niikura T, Iwakura T, et al. Thrombin-antithrombin III complex tests: a useful screening tool for postoperative venous thromboembolism in lower limb and pelvic fractures [J]. *Journal of Orthopaedic Surgery*, 2017, 25(1): 1-6.
- [10] YY/T 1789.3-2022. 体外诊断检验系统 性能评价方法 第 3 部分: 检出限与定量限 [S]. YY/T 1789.3-2022. *In vitro diagnostic test systems—Performance evaluation method—Part 3: Limit of detection and limit of quantitation* [S].
- [11] Tholen DW, Kallner A, Kennedy JW, et al. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline [J]. *Evaluation*, 2004, 24(25): 44-49.
- [12] 周齐洋, 徐海伟, 梁辰, 等. 25-羟基维生素 D 化学发光定量免疫分析方法的建立 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2021, 28(1): 127-131+169.
- Zhou QY, Xu HW, Liang C, et al. The establishment of chemiluminescence quantitative immunoassay for 25-hydroxyvitamin D [J]. *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*, 2021, 28(1): 127-131+169.
- [13] 林静, 孙志鹏, 李娟, 等. 联合检测 TM、TAT、PIC、t-PAIC 水平对 DIC 的诊断价值 [J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(12): 1413-1416.
- Lin J, Sun ZP, Li J, et al. Value of combined detection of the levels of serum TM, TAT, PIC and t-PAIC for the early diagnosis of disseminated intravascular coagulation [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2019, 40(12): 1413-1416.
- [14] Zhang J, Xue MM, 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.

- [15] Zhao XX, Yang SY, Lei RN, et al. Clinical study on the feasibility of new thrombus markers in predicting massive cerebral infarction [J]. *Frontiers in Neurology*, 2022, 13: 942887.
- [16] Li JZ, Zhou JY, Ren H, et al. Clinical efficacy of soluble thrombomodulin, tissue plasminogen activator inhibitor complex, thrombin-antithrombin complex,  $\alpha$ 2-plasmininhibitor-plasmin complex in pediatric sepsis [J]. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 2022, 28: 1-9.
- [17] Masago K, Fujita S, Mio T, et al. Clinical significance of the ratio between the alpha 2 plasmin inhibitor-plasmin complex and the thrombin-antithrombin complex in advanced non-small cell lung cancer [J]. *Medical Oncology*, 2011, 28(1): 351-356.
- [18] 隋艳芬. 血栓调节蛋白、凝血酶-抗凝血酶复合物水平与弥散性血管内凝血分期的相关性 [J]. *中国民康医学*, 2022, 34(18): 120-122.  
Sui YF. Correlations among thrombomodulin and thrombin-antithrombin complex levels and disseminated intravascular coagulation staging [J]. *Medical Journal of Chinese People's Health*, 2022, 34(18): 120-122.
- [19] 钟林翠, 宋景春, 林青伟, 等. 血栓调节蛋白联合凝血酶-抗凝血酶复合物对弥散性血管内凝血诊断价值的临床研究 [J]. *医学研究生学报*, 2019, 32(11): 1184-1188.  
Zhong LC, Song JC, Lin QW, et al. Clinical study on the diagnostic value of thrombomodulin combined with thrombin-antithrombin complex in disseminated intravascular coagulation [J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2019, 32(11): 1184-1188.
- [20] Innocenti F, Gori AM, Giusti B, et al. Prognostic value of sepsis-induced coagulation abnormalities: an early assessment in the emergency department [J]. *Internal and Emergency Medicine*, 2019, 14(3): 459-466.
- [21] 张锦丽, 贺茂林. 急性脑梗死凝血酶抗凝血酶 III 复合物的研究 [J]. *中国康复理论与实践*, 2005, 11(7): 529-530.  
Zhang JL, He ML. Change of thrombin antithrombin III complex after acute brain infarction [J]. *Chinese Journal of Rehabilitation Theory and Practice*, 2005, 11(7): 529-530.
- [22] 熊旭光, 唐其柱, 刘文卫. 凝血酶-抗凝血酶复合物及 D-二聚体在冠心病早期诊断中的价值 [J]. *实用老年医学*, 2015, 29(2): 131-133.  
Xiong XG, Tang QZ, Liu WW. Value of thrombin-antithrombin complexes, D-dimer in the early diagnosis for coronary artery disease [J]. *Practical Geriatrics*, 2015, 29(2): 131-133.
- [23] Lundbeck M, Krag AE, Christensen TD, et al. Thrombin generation, thrombin-antithrombin complex, and prothrombin fragment F1+2 as biomarkers for hypercoagulability in cancer patients [J]. *Thrombosis Research*, 2020, 186: 80-85.
- [24] 高倩, 江洪, 陈禹保. 我国体外诊断行业发展现状与对策建议 [J]. *中国生物工程杂志*, 2022, 42(10): 105-111.  
Gao Q, Jiang H, Chen YB. *In vitro* diagnostics industry in China: current status and development strategies [J]. *China Biotechnology*, 2022, 42(10): 105-111.