

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,?(?):??

Citing format

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,?(?):??

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^{1,2}, 余枝广², 柴凡², 孙怀娟², 李俊鑫¹, 万晓春¹,

1 (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)

2 (深圳麦科田生物医疗股份有限公司 深圳 518055)

摘要: 凝血酶-抗凝血酶复合物 (Thrombin antithrombin, 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 TAT 化学发光免疫分析测定方法, 并对其性能进行评估。采用 TAT 为免疫原制备杂交瘤抗体, 以双抗体夹心模式建立 TAT 化学发光免疫定量检测方法。经过反应的优化, 磁珠和吖啶酯抗体的工作浓度确定为 0.20 mg/mL 和 200 ng/mL, 样本量为 50 μ 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) 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($R > 0.99$), 各项性能指标良好, 可满足临床上对血栓性疾病辅助诊断的需求。

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

doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20230313001

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

来稿日期: 2023/3/13 修回日期: 2023/5/28 录用日期: 2023/6/29

Funding: This project is supported by Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (No.2020A1515110840), and the Shenzhen Basic Research Fund (No.JCYJ20190807170801656)

Establishment of chemiluminescence immunoassay method for determination of thrombin-antithrombin complex

AN Qian^{1,2}, YU Zhiguang², CHAI Fan², SUN Huaijuan² LI Junxin¹, WAN Xiaochun¹

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

2 (Medcaptain medical technology company limited, Shenzhen 518055, China)

Corresponding Author: WAN Xiaochun. Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China. Email: wan@siat.ac.cn

Abstract: Thrombin antithrombin (TAT) complex 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 complex in human plasma samples, and its analytical performance was evaluated. The TAT complex 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 mg/mL and 200 ng/mL, respectively, and the sample size was 50 μ L. The reaction of magnetic particle coated antibody and sample were incubated for 5 min, 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 ($R > 0.99$) between this method and TAT test kit of Sysmex. A quantitative chemiluminescence

来稿日期: 2023/3/13 修回日期: 2023/5/28 录用日期: 2023/6/29

immunoassay method for TAT measurement has been established, and the performance meets customer needs for clinical utility.

Keywords: Thrombin-antithrombin complex; performance evaluation; test method; chemiluminescence immune assay

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) 迅速被抗凝血酶 (antithrombin III, AT III) 结合形成的以共价键相连的复合物, 分子量约为 96 kD^[1-4]。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^[5,6]。定量检测血浆中的 TAT 含量对于弥漫性血管内凝血 (DIC)、脓毒症、深静脉血栓 (DVT) 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于抗凝和溶栓治疗具有指导价值^[7-9]。

目前检测 TAT 的方法主要有 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 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, 成为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 TAT 的含量小于 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) 的含量相比于出凝血平衡状态下产生的 TAT 水平较高^[3]。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 的测定产生一定的干扰, 从而影响试剂的准确度和灵敏度, 因而本研究采用针对 TAT 复合物的特异性抗体来建立 TAT 化学发光免疫分析方法。

2. 材料与方法

2.1 一般资料

TAT 复合物由人凝血酶 (Haematologic Technologies Inc.) 和抗凝血酶 III (Haematologic Technologies Inc.) 混合反应制备而成。对照试剂为希森美康公司

来稿日期: 2023/3/13 修回日期: 2023/5/28 录用日期: 2023/6/29

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 Immuf6 全自动化学发光免疫分析仪和日本希森美康化学发光免疫分析仪 HISCL-5000。

2.2 方法

2.2.1 TAT 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 复合物，将混合物进行 SDS-PAGE 非还原电泳，切胶回收 TAT 抗原，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 复合物的杂交瘤细胞株，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 TAT 抗体的亲和力

包被板制备：分别将 AT，T 抗原和 TAT 复合物用包被液（碳酸盐缓冲液）稀释到 1 nM，每孔添加 100 μ L，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 μ L 封闭液（含 5% 脱脂牛奶的 PBS 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 μ L 不同浓度的抗体 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 μ L 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 和 B 各 50 μ L，显色 15 min，加入终止液（50 mM H_2SO_4 ）50 μ L，测定 OD_{450} 。

2.2.3 TAT 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，其检测原理如下：第一步，样本与包被有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。第二步，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。然后，将预激发液和激发液加入到反应混合物中，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。

来稿日期：2023/3/13 修回日期：2023/5/28 录用日期：2023/6/29

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 K_2HPO_4)， 37°C 孵育；用清洗液 (Tris 缓冲液，含 BSA、ProClin-300、Tween-20) 清洗并封闭 24 h；用磁珠稀释液 (Tris 缓冲液，含 BSA、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 (DMF 溶剂) 与检测抗体 (抗体 8D9) 以一定的比例混合，避光反应 1 小时；用磷酸钠缓冲液 (50 mM, 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将吡啶酯标记抗体母液稀释到所需要的浓度。

2.2.4 校准质控品的配制和校准品溯源

用校准品稀释液 (含有 1%BSA、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作为工作校准品。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。

选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)，使用其校准品校准仪器，测定一系列血浆样本；采用本试剂测定样本的发光值；采用 L4P fitting ToolCSharp 工具以希森美康的浓度和本试剂测得的发光值进行拟合，得到曲线；采用同一批试剂测定工作校准品，将工作校准品的发光值带入曲线中计算得到工作校准品对应的浓度，此浓度和对应的发光值之间拟合得到的曲线为试剂的主曲线。

2.2.5 样本量和工作液浓度的优化

选用样本量 10 μL 、20 μL 、50 μL ，磁珠浓度 0.20 mg/mL、0.25 mg/mL、0.30 mg/mL，吡啶酯抗体浓度 150 ng/mL、200 ng/mL、250 ng/mL 设计正交实验表，采用正交实验对这三个变量进行优化，确定每个因子的最佳水平，分析因子效应。

2.2.6 最佳孵育时间的优化

在 2.2.5 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，

来稿日期：2023/3/13 修回日期：2023/5/28 录用日期：2023/6/29

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(S/N, signal to noise ratio)。信噪比为样本的信号值与校准品稀释液(S0)的发光值之比。

2.2.7 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，高值样本浓度达到检测区间的上限，低值浓度的样本须接近线性区间下限，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直线拟合，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±0.8 ng/mL) 和准确度样本 II (20.0±4.0 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 为测试浓度，T 为溯源后的标定浓度。

(3) 最低检出限。LOD=LOB+1.645×SD。其中 LOB=空白样本结果的均值+1.645×SD1，SD 为低值样本的合并标准差，SD1 为空白样本的标准差^[10]。

(4) 精密度 根据临床和实验室标准协会 (CLSI) 制定的精密度测试方案 (EP5-A2) ^[11,12]，每天取出 TAT 重复性样本 I (4.0±0.8 ng/mL) 和重复性样本 II (20.0±4.0 ng/mL)，每天测定两轮，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 T、AT 和 TAT 抗原的亲合力

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 复合物的亲合力最高，与 T 抗原也有一定的亲合力；抗体 8D9 与 AT 抗原的亲合力最高，其次是 TAT，与 T 抗原没有亲合力。

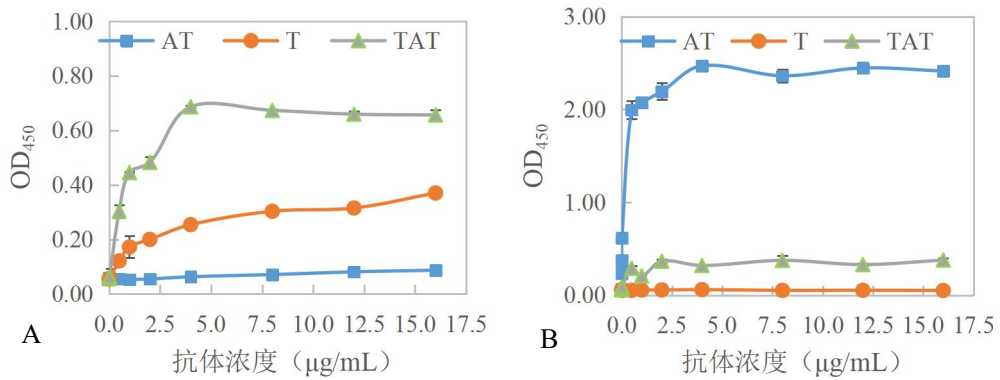


图 1. 抗体与 TAT、AT、T 抗原的亲和力测试 (A: 抗体 3B16; B: 抗体 8D9)

Fig.1 The affinity tests of the antibody to TAT complex, Antithrombin III and Thrombin. (A: 3B16; B: 8D9)

3.2 TAT 检测反应体系的优化

如图 2 所示, 磁珠浓度从 0.20 mg/mL 提高到 0.30 mg/mL 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 150-250 ng/mL 范围内, 信噪比随着吡啶酯抗体浓度的提高而升高; 样本量对信噪比及其斜率的影响最大, 在 50 µL 时达到最大信噪比 28。

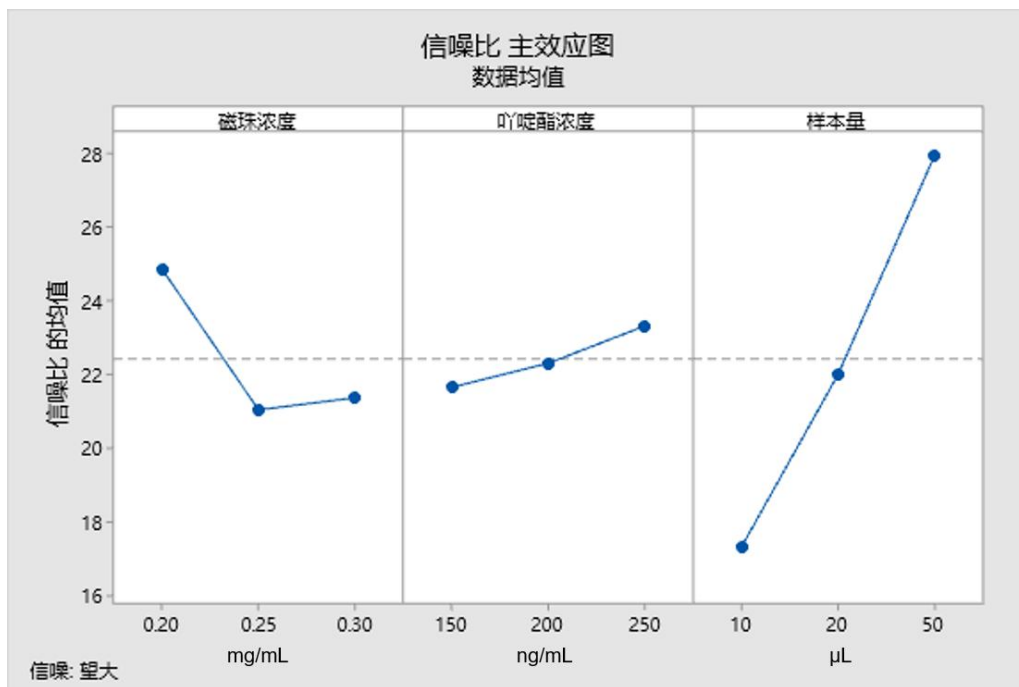


图 2. 磁珠浓度、吡啶酯标记抗体浓度和样本量与信噪比的主效应图

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

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（S0）、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。首先是样本和磁珠捕获抗体孵育进行反应，清洗后，再与吡啶酯检测抗体孵育。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S0的信号值（593~624）和低值样本L的信号值（10572~11351）均没有显著性变化（ $P>0.05$ ）。在孵育时间为7.0 min-5.0 min时，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S/N-L，5.0 min-5.0 min，7.0 min-5.0 min、5.0 min-7.0 min的S/N-L分别为17.8、18.2、17.5。

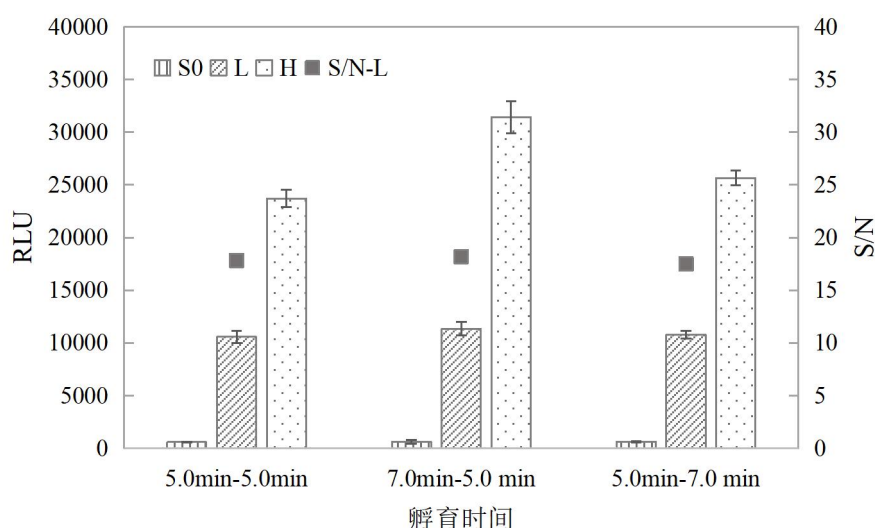


图3. 孵育时间对反应信号和信噪比的影响

Fig.3 The effect of incubation time on RLU and S/N.

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 mg/mL的人凝血酶原和0.31 mg/mL的抗凝血酶III的样本进行测定，测试结果（如表1）低于最低检出限（0.4 ng/mL）。

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	凝血酶原（0.20 mg/mL）	抗凝血酶III（0.31 mg/mL）
----	------------------	---------------------

来稿日期：2023/3/13 修回日期：2023/5/28 录用日期：2023/6/29

次数	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	

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±8%以内。

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%

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 天, 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。

表 3 精密度测试

Table 3. Precision testing.

样本	均值 ng/mL	批内变异		总变异	
		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

来稿日期: 2023/3/13 修回日期: 2023/5/28 录用日期: 2023/6/29

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，经计算 $R=0.9929$ 。

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 ± 1.96 SD，即有 95.2% 的样本测试结果绝对偏差位于一致性界限内。

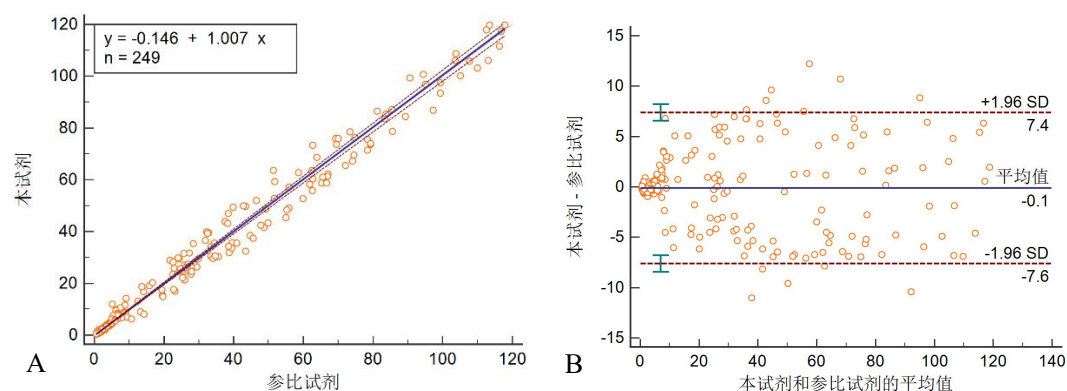


图 4. 本试剂与希森美康 TAT 检测试剂的相关性 (A. Passing-Bablok 回归曲线; B. Bland-Altman 图)

Fig.4 Correlation between this kit and TAT kit of Sysmex (A: Passing-Bablok regression curve; B: Bland-Altman graph)

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 (tissue plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor-1 complex, tPAI-C) 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^[13, 14]、脑梗死^[15]、脓毒症^[16]等，且能够预示一些疾病的发展，如非小细胞肺癌^[17]，急性缺血性脑卒中^[4]。

TAT 和 TM 的联合检测，可以对 DIC 进行分期^[18]。根据血液凝固性出血和纤溶，DIC 可分为高凝期、消耗性低凝期和继发性纤溶亢进期。隋艳芬的研究表明，TAT 和 TM 的水平与 DIC 的分型呈正相关，DIC 患者血浆中 TAT 和 TM 水

来稿日期：2023/3/13 修回日期：2023/5/28 录用日期：2023/6/29

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^[18]。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，而同时常规凝血指标 PT、APTT、TT、FIB、PLT 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^[19, 20]。张锦丽等人在研究急性脑梗死时也有类似的发现，其研究表明，急性脑梗死患者的 PT、APTT、TT 没有显著性变化，而 TAT 水平显著提高^[21]。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^[22]。Lundbech 的研究表明，局限性癌症患者血浆中 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^[23]。Masago 等人在研究晚期非小细胞肺癌时发现，低的 PIC 和 TAT 的比值和低的蛋白 S 活性预示着不良预后^[17]。

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 复合物为免疫原制备 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 化学发光检测试剂盒。

通过 ELISA 实验对筛选得到的抗体进行亲和力的测定，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）。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，远大于机体在抗凝时产生的 TAT。传统的 TAT 检测方法采用针对 AT 单体和 T 单体的两个抗体与 TAT 复合物形成“T 抗体-TAT 复合物-AT 抗体”的双抗体夹心结构，为了避免血液中高浓度的 AT 和凝血酶原对 TAT 复合物测试的干扰，本研究采用抗体 3B16（TAT 抗体）为捕获抗体，与样本中的 TAT 抗原结合，清洗除去样本的 AT 抗原和凝血酶原，然后再与吖啶酯标记的抗体 8D9（AT 抗原的抗体）孵育，形成“TAT 抗体-TAT 复合物-AT 抗体”的结构，这样将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 AT 和凝血酶原对本试剂进行 TAT 的定量测定没有影响。

灵敏度是体外诊断试剂性能评估的重要指标，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

来稿日期：2023/3/13 修回日期：2023/5/28 录用日期：2023/6/29

化。本研究采用正交实验优化反应的样本量、磁珠工作液浓度和吡啶酯标记抗体的浓度。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 μ L 之间，随着样本量的提高，信噪比明显提高。在吡啶酯抗体浓度为 150 -250 ng/mL 范围内，随着吡啶酯浓度的提高，信噪比小幅度提高。磁珠浓度为 0.20 mg/mL 时信噪比最高，随着磁珠浓度提高至 0.3 mg/mL，信噪比相比于 0.2 mg/mL 均较低。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）拉开程度大，发光值波动对浓度值的测定影响较小，试剂具有较高的准确度和灵敏度。在样本量 50 μ L、磁珠工作液浓度 0.2 mg/mL 和吡啶酯抗体标记物工作液浓度 250 ng/mL 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 TM 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吡啶酯抗体的浓度。

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，低值样本的信号值没有显著性差异（ $P>0.05$ ），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 5.0 min-5.0 min。

采用希森美康 HISCL 5000 测量程序对校准品进行量值溯源，四参数拟合得到标准曲线的 R 为 0.999，测定试剂的性能（表 4），空白限 LoB \leq 0.20 ng/mL，最低检出限 LoD \leq 0.40 ng/mL，试剂在 0.40-120 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%~3.5%和 -7.3~0.1%，试剂的准确度在 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。

表 4. 本试剂与希森美康试剂性能的比对

Table 3. 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 ng/mL	\leq 0.4 ng/mL

来稿日期：2023/3/13 修回日期：2023/5/28 录用日期：2023/6/29

准确度（相对偏差）	$\leq \pm 20\%$	$\leq \pm 8\%$
类似物干扰	N/A ^a	在凝血酶原 ≤ 0.20 mg/mL, AT ≤ 0.31 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 $R^2 > 0.95$	

注：a：N/A 表示未找到相关信息。

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， $R=0.9929$ ，表明本试剂与希森美康相关性良好。经过 Bland-Altman 统计分析（图 4B），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 95.18% 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原因。我国体外诊断试剂原料大部分依赖进口，2020 年进口原料占比接近 90%^[24]。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基础。

5. 结论与展望

本研究建立了 TAT 化学发光免疫检测方法，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。本试剂与日本希森美康测值相关性较高（ $R > 0.99$ ），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以及床旁检测，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。

来稿日期：2023/3/13 修回日期：2023/5/28 录用日期：2023/6/29

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- α 2-纤溶酶抑制剂和凝血酶-抗凝血酶复合物的制备 [J]. 生物学杂志, 2022, 39(01): 110-114.

Zhou SH, Wang WJ, Yu Z, et al. Preparation of high-purity plasmin- α 2-plasmin inhibitor and thrombin-antithrombin complex [J]. Journal of Biology, 2022, 39(01): 110-114.

[3] 王振义, 李家增. 血栓与止血基础理论与临床 [M]. 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 Scientific and Technical Publishers, 2004, 120-122.

[4] Ye N, Liu Z, Wang X, 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(05):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- α 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, 2020,12(33):1283-1287.

Hu YJ, Zhang YM, Song JC, et al. Clinical value of thrombin-antithrombin complex combined with α 2-plasmin inhibitor-plasmin complex in the diagnosis of traumatic disseminated intravascular coagulation [J]. Journal of Medical Postgraduates, 2020, 12(33):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] 李占军, 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. Application of thrombomodulin and

来稿日期: 2023/3/13 修回日期: 2023/5/28 录用日期: 2023/6/29

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, Zhun 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 1783.3-2022. 中华人民共和国医药行业标准: 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 1783.3-2022. Pharmaceutical industry Standard of the People's Republic of China: In vitro diagnostic test systems: Performance evaluation methods-Part 3 Detection limits and quantitative limits [S].

[11] Tholen DW, Kallner A, Kennedy JW, et al. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline-Second Edition [J]. 2004.

[12] 周齐洋, 梁辰, 冯杰, 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.

Zhou QY, Liang C, Feng J, et al. The establishment of Chemiluminescence quantitative immunoassay for 25-hydroxyvitamin D [J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2021, 28(1):127-131.

[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

来稿日期: 2023/3/13 修回日期: 2023/5/28 录用日期: 2023/6/29

coagulation [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2019, 40(12):1413-1416.

[14] Zhang J, Xue 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.

[15] Zhao X, Yang S, Lei R, et al. Clinical study on the feasibility of new thrombus markers in predicting massive cerebral infarction [J]. Frontiers in Neurology, 2022, 13. doi: 10.3389/fneur.2022.942887.

[16] Li J, Zhou J, Ren H, et al. Clinical Efficacy of Soluble Thrombomodulin, Tissue Plasminogen Activator Inhibitor complex, Thrombin-Antithrombin complex, alpha 2-Plasmininhibitor-Plasmin complex in Pediatric Sepsis1 [J]. Clinical and application thrombosis-hemostasis, 2022,28:1-9.

[17] Masago K, Fujuta 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):120-123.

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): 120-123.

[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

来稿日期: 2023/3/13 修回日期: 2023/5/28 录用日期: 2023/6/29

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, 07: 529-530.

Zhang JL, He ML. Change of thrombin-antithrombin complex after acute brain infarction [J]. *Chinese Journal of Rehabilitation Theory and Practice*, 2005, 07: 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] Lundbech 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. Development status and countermeasures of in vitro diagnosis industry in China [J]. *Chinese Journal of Bioengineering*, 2022, 42(10):105-111.