



DSL-2800 非提取胰岛素样生长因子-1 免疫放射法

天津市协和医药科技有限公司
免费咨询热线：800-8180100

I.用途：

DSL-2800 活性非提取胰岛素样生长因子-1 (IGF-I) 包被管放免试剂盒为血清或 EDTA 血浆中的 IGF-I 的定量测量提供材料。本文对于与生长发育相关的紊乱造成的疾病的体外诊断性应用将提供依据。

II.简介：

胰岛素样生长因子 I (IGF—I) 是一种 7.6kDa, 70 个氨基酸的小肽, 介导生长激素 (GH) 的作用。IGF—I 作为激素原合成, 包含 A,C,B,D 和 E 链。成熟的 IGF-1 包含 A, C, B 链, 与 IGF-2 和胰岛素的结构相似。

IGF-1 由肝和其他一些组织分泌, 被认为对合成部位或其附近有促有丝分裂和促进新陈代谢的作用, 称之为 IGF-I 的旁分泌作用。IGF-I 也在周围血循环中出现, 通常是一种高分子复合物, 与 IGF 结合蛋白-3 (IGFBP-3) 和一不稳定酸亚单位 (ALS) 结合。小比例的 IGF-1 则和其他 IGF 结合蛋白相连。循环中未结合的 IGF-1 的量估计 <5%。血浆 IGF-1 的水平依赖于 GH 水平及其他一些因素, 包括适宜的营养。血浆 IGF-1 的水平也可以阻止垂体 GH 的合成, 可是, 反馈机制尚未完全阐明。

在人类, 血浆 IGF-1 水平在胚胎期和新生儿是低的, 在儿童期逐步上升, 在青春期中达高峰, 在整个成年期逐步下降。平均血浆 IGF-1 水平在各年龄组均以妇女较高。妇女在孕期 IGF-1 的水平上升。IGF-1 在尿中也可检测到。与 IGF 结合蛋白结合后血浆 IGF-1 水平稳定无昼夜变化。

血浆 IGF-1 水平低见于 GH 缺乏, 营养不良, GH 受体缺乏综合征 (Laron 侏儒) 及各种慢性病。异常低水平的 IGF-1 是 GH 缺乏的诊断指标, 虽然大多数的 GH 缺乏的儿童血浆 IGF-1 水平可能在正常范围, 而正常的矮个子的儿童可能有 IGF-1 水平降低。血浆 IGF-1 水平还可以用于监测短期或长期的 GH 处理后的反应。GH 过多时, 异常 IGF-1 检出可作为诊断工具和监测手段。IGF-1 是 GH 作用于软骨最初的传递介质。注射外源性 GH 后能提高内源性 GH 的活性。当矮小儿童 GH 正常而 IGF-1 基础值低时, 如注射外源性 GH, 则 IGF-1 升高, 同时生长率增加, 可认为该矮小儿童有变异的生长激素分子。当矮小儿童 GH 基础值升高而 IGF-1 值降低时, 用外源性 GH 不能使 IGF-1 值升高, 也不显示生长反应, 可能该矮小儿童为生长激素受体缺陷, 高水平 GH 是由于缺乏 IGF-1 介导的负反馈作用。

对血浆 IGF-1 的检测由于 IGF 结合蛋白的存在而显得复杂, 后者会使 IGF-1 因反应而被影响。众多的实验都设计为在检测前分离 IGF-1 和 IGF 结合蛋白。在酸中进行凝胶色谱层析法是效果最好的一种, 但它不能用于常规检测。用甲醇或丙酮沉淀 IGF 片段后再酸化所得结果与前者近似。

以上标本处理过程均费时费力。因此, DSL 开发了一种简单的非提取的 IGF-1 免疫放射方法, 具有高度的敏感性和特异性。

III.试验原理：

本试验采用最先由 Miles 提出的双位点放免法 (IRMA) 原理。DSL-2800 IGF-I IRMA 是一种非竞争性检测法, 此法中被测物介于两个抗体之间, 形成“三明治夹心”。第一个抗体被固定于试管内壁、另一抗体被放射性元素所标记以便于检测。待测物存在于患者试样中, 标准品及质控品与两个抗体相连而形成“三明治”的络合物。未结合部分因转移和刷洗试管而除掉。

IV.试剂：

DSL-2800 活性 IGF-I 包被试管 IRMA 药盒，包括可供 100 支试管使用的试剂，每盒含：

A. IGF-I 标准品：（经真空冷冻干燥）

6 支小瓶，以 A-F 标记。在含有非汞防腐剂的蛋白减缓冲液中配制近似浓度为 0, 8, 30, 100, 300 和 1000 ng/ml 的系列标准液。准确浓度参见小瓶上的标签。在失效期前于 2~8℃密封保存。用 1ml 去离子水复溶，在使用过程中，贮存在 -20℃直到 4 周。标准品的折合含量，考虑到样品稀释问题已用稀释倍数 51 校正。绝对浓度范围近似 0.16~19.6 ng/ml。

注：DSL IGF-I 来自重组人 IGF-I 并经世界卫生组织（WHO）专为 IGF-I 免疫法测定提供的国际参考试剂所校正。

B. 抗-IGF-I-[I-125]试剂：

1 瓶 22 ml，内含以叠氮化钠为防腐剂的蛋白减缓冲溶液配制而成的浓度 < 10uCi(370KBq)的 [I-125]-标记的山羊抗-IGF-I（多克隆抗体）。贮存于 2~8℃。

C. 以抗-IGF-I 包被的试管：（浅绿色金属边）

含 4 包，每包 25 支塑料试管。试管内壁固定有抗-IGF-I（小鼠单抗）免疫球蛋白。将试管于原包装中贮存。并将其重新密封隔潮贮存于 2~8℃干燥处。

注：用抗体包被过程中有时可有晶体附着于试管壁内，但不影响检测。

D. 样品稀释剂：

1 瓶 105 ml，含以叠氮化钠为防腐剂的样品缓冲液。贮存于 2~8℃温度下。

E. 洗涤液：

1 瓶 60 ml，含以非离子型表面活性剂的缓冲溶液。室温下保存。

F. IGF-I 质控：

I 和 II 两瓶，含有以非汞防腐剂的蛋白减缓冲溶液配制而成的高、低两个浓度的 IGF-I，控制范围见标签，于 2~8℃下密封贮存。重新使用时用 1 ml 去离子水复融，于 -20℃贮存 4 周。

注：所有试剂及样品必须达到室温并于使用前轻轻振摇混匀。

V. 预防措施：

- 适用于体外诊断性应用。
- 放射性物质-禁止人或动物内用或外用。
- 放射性物质只能由内科医生、临床实验室或医院用于体外检测，不可内服或外用给药，由此可对人或动物产生放射性。

在处理放射性物质时应注意以下预防措施：

- 将放射性物质贮存于标记区域。
- 将放射性物质所在之处严禁进食、饮水或使用化妆品。
- 禁止用嘴吸气。
- 接触放射性物质要戴手套，使用后彻底洗手。
- 用可处理的吸收纸覆盖工作区。
- 及时彻底清扫所有碎屑，并处理作为放射性废物的被污染物质。
- 将液态的放射性废物排入当地的公卫污水系统。

注意：潜在的生物危害性材料：

该试剂盒可能含有由人血清或血浆制成的试剂。所用血清或血浆已采用 FDA 认可的方法检测过并已发现对 HIV-1/2 抗体无放射性，对 HCV 及 HB_sAg 也无放射性。由于没有一种方法能够确保完全不含 HIV-1/2、HCV、HB_sAg 或其它具有感染性的因素，所以这些试剂应经生物安全性标准 2 来进行处理。这一标准曾在 1998 年的疾病控制中心/国家健康研究院的“微生物及生物医学实验室中的生物安全性”手册中介绍，并被推荐用于任何具有潜在感染性的人血清或血浆标本。

警惕化学危害：

正如IV所述，一些试剂中含有叠氮化钠防腐剂，这样的试剂中叠氮化钠含量 $\leq 0.09\%$ ，它可与铅、铜等反应形成具有爆炸性的叠氮化金属化合物。故需用大量水冲洗处理非放射性物质。

VI. 标本的收集与准备:

采用血清或 EDTA 血浆并注意静脉穿刺的有关预防措施。标本可于 2~8℃ 贮存 24 小时，也可在 $\leq -20^\circ\text{C}$ 下保存 30 天。避免反复冻溶。在室内研究中，23 个血清和 EDTA 血浆样品使用 DSL-2800 比较结果如下：

样品范围：56-295ng/ml

[血浆]=0.85[血清]+2.40, $\gamma=0.98$

不要使用明显溶血或高脂血症的标本。冷冻样品应在使用前旋转或倒转以混匀。血清和 EDTA 血浆应在使用前按 1 : 50 比例用样品稀释剂稀释，见实验部分。

VII. 注意事项:

透彻理解本篇插叙对于成功使用该产品是很有必要的。应用精密的实验技术及正确运用本文要求才可得到可靠结果。每种检测必须有一条标准曲线。

对于单独检测不要将许多成分混在一起。不要使用过期产品。

检测试剂从冰箱取出后，达到室温后再进行量取。使用后应按照“试剂部分”的要求贮存。标准品及质控品在使用前应混匀，混匀可利用倒转或旋动，而不要涡旋。要确保每支检测试管中的试剂的绝对均匀，彻底地振摇及涡旋是必要的。

质控品的测量值不准确可能是由于操作不精确、样品处理不当或试剂变质引起的。未充分洗涤试管及转移可造成重复性差甚至错误的结果。

VIII. 实验步骤:

A. 供试材料: (见表)

DSL-2800 活性非提取 IGF-I 包被试管放免试剂盒

材 料	数 量	编 号
IGF-I 标准品 A	1 小瓶	2801
IGF-I 标准品 B	1 小瓶	2802
IGF-I 标准品 C	1 小瓶	2803
IGF-I 标准品 D	1 小瓶	2804
IGF-I 标准品 E	1 小瓶	2805
IGF-I 标准品 F	1 小瓶	2806
抗-IGF-I-包被试管	4 包	2810
抗 IGF-I [$I-^{125}$]试剂	1 小瓶	2820
样品稀释剂 A	1 小瓶	2850
洗涤浓缩液 B	1 小瓶	10-9730
IGF-I 质控品 I	1 小瓶	2851
IGF-I 质控品 II	1 小瓶	2852

B. 自备材料:

- 12×75mm 塑料或玻璃试管，总计数用；
- 12×75mm 试管所用试管架；
- 去离子水；
- 20ul 及 50ul 移液管；
- 200ul 及 3ml 刻度吸管；
- 涡旋混合器；

- 倾注用海绵试管架或类似装置；
- 擦拭试管用的吸收性材料；
- 10^{-6} 数量级计数器；
- 对数坐标纸或计算机 IRMA 数据分析程。

C. 血清或 EDTA 血浆样品的予稀释：

- 用便于处理的玻璃试管标记患者的血样，
- 吸取 20 μ l 样品加入被标记的试管中，
- 加入 1ml 稀释剂，涡旋并在室温下静置 20-30 分钟。（约 25℃）

D. 试剂制备：

洗涤浓缩液：

取 60ml 置于干净容器中并加 1500ml 去离子水，于室温下密封可保存 2 周。

E. 检测步骤：

所有试剂使用前均应达到室温并混匀。标准品、质控品及未知物一式两份。

- 标记两支普通（未包被）试管作为总计管。标记包被试管，一式两份。未用试管应立即封好，放回冰箱。于 2-8℃ 贮存。
- 吸取 50 μ l 标准品、质控品及未知物，移入相应试管底部。
- 立即向所有试管中加入 200 μ l 抗-IGF-I [I^{-125}] 试剂。
- 轻轻振摇试管架混合，在室温下将试管放于振动器上，转速 180 γ pm。
- 倾注除总计管外的所有试管，同时利用海绵试管架将其倒入放射性废物接受器中。在吸收材料上轻击试管加速液体流出并控 1~2 分钟以控干。吸收材料轻拭试管以去除附着于管壁的水珠，然后将试管直立。如水珠未完全拭干会影响测定重复性差甚至出现错误结果。
- 除总计管中，在各试管中加入 3ml 清洗液，并倾注完全。
- 重复步骤 6 两次。
- 在计算器中计数 1 分钟。

IX. 结果：

此次实验的结果是通过数曲线计算得到的。其它演算方法可能会有一点微小的差别。

- 从每个标准品、质控品及未知物的每分平均计数中（cpm）减去 0ng/ml 标准品的每分平均计数，从而计算出每分净计数。按下式计算每个标准品、质控品及未知物的 %B/T：

$$\%B/T = \frac{\text{净 cpm}}{\text{总平均 cpm}} \times 100\%$$

- 在对数坐标纸上以每个标准品为纵坐标，以 IGF-I 浓度横坐标绘制净 cpm 或 %B/T 曲线。通过各点绘制标准曲线，使各点尽量均匀分布在曲线两侧。
- 根据每个质控品及未知物的净 cpm 或 %B/T 值，利用坐标曲线测出 IGF-I 浓度。
- 如样品测量值高于曲线最高点，则用样品稀释剂精确稀释，重新测定。
- 低于最地点的样品读数应如实记录。
- 样品可直接从曲线读数，不重新稀释是十分必要的。

X. 局限性：

- *此试剂盒提供的试剂对于测定血清或 EDTA 血浆中 IGF-I 水平是比较完善的。
- *避免试剂或样品的反复冻融。
- *溶血、黄疸及高脂血症的标本可能会产生错误的结果，应避免使用。
- *由于 IRMA 检测方法自身所具有的“高剂量钩”特异性效应，对于 IGF-I 预期浓度高于 6000ng/ml 的样品要比最高浓度（1000 ng/ml）的标准品产生的结果要小，故对于预期浓度超出此范围的样品在检

测前应用样品稀释液进行稀释。

XI. 质量控制：

*DSL 质控及商业质控应在已确立的置信范围内。DSL 质控品的置信限列于质控品的标签上。

*每次检测均应包括高、低两个水平的质控品。

经典活性非提取 IGF-I IRMA 标准曲线数据

试管编号	试管标记	界限 (cpm)	平均 (cpm)	B/T (%)	IGF-I (ng/ml)
01, 02	总计管	151077, 150567	150822		
03, 04	标准品 A	1520, 1327	1424		0.0
05, 06	标准品 B	3597, 3711	3654	1.5	8.3
07, 08	标准品 C	6460, 6605	6533	3.4	33.3
09, 10	标准品 D	13062, 13440	13251	7.8	100.0
11, 12	标准品 E	38102, 39718	38910	24.9	333.0
13, 14	标准品 F	91423, 90435	90929	59.3	1000.0
15, 16	质控品 I	14185, 14326	14256	8.5	107.5
17, 18	质控品 II	39993, 42053	41023	26.3	347.9

注意：以上数据不可代替试验数据

XII. 预期值：

每个实验室应建立自己的正常值范围，使用 DSL-5600 IGF-I IRMA 药盒，在三个独立研究中所测得的血清中 IGF-I 水平，儿科的数据是从正常身高、体重的儿童中得到的。所有数据均以 ng/ml 为单位。

年龄	男			女	
	个数	均值	标准差	中位数	绝对范围
0-1	52	35.3	23.9	29.0	3.7-100.0
1-2	33	44.2	30.0	37.3	6.1-131.0
2-3	21	66.4	36.4	58.1	24.3-152.0
3-4	12	66.1	32.5	58.4	44.0-117.0
4-5	18	76.3	31.7	75.3	30.0-150.0
5-6	18	108.3	55.4	93.2	33.0-276.0
6-7	19	134.4	73.3	122.0	43.0-373.0

年龄	男性				
	个数	均值	标准差	中位数	绝对范围
7-8	33	193.4	92.3	169.0	23.9-392.0
8-9	22	182.2	63.7	199.5	81.4-290.0
9-10	24	222.3	125.7	201.5	72.0-526.0
10-11	22	151.6	70.0	156.0	30.0-289.0
11-12	24	175.2	118.8	135.0	29.0-466.0
12-13	19	255.6	130.3	294.0	55.0-570.0

13-14	28	397.0	218.2	384.0	71.0-972.0
14-15	15	576.9	241.1	551.0	153.0-995.0
15-16	15	530.4	121.5	518.5	358.0-870.0
16-18	20	454.4	111.6	476.0	239.0-630.0
18-20	23	489.0	206.7	475.0	197.0-956.0
20-23	29	0420.1	114.7	413.0	215.0-628.0
23-25	23	320.7	106.3	304.0	169.0-591.0
25-30	47	236.7	81.2	241.0	119.0-476.0
30-40	41	211.9	102.5	188.0	100.0-494.0

年龄	女性				
	个数	均值	标准差	中位数	绝对值范围
7-8	20	205.0	111.9	185.5	20.0-484.0
8-9	12	275.3	96.1	295.0	22.1-383.0
9-10	21	277.6	119.6	289.0	30.0-428.0
10-11	21	307.3	158.7	277.0	108.0-648.0
11-12	17	358.2	186.0	340.0	97.0-699.0
12-13	21	444.9	226.4	481.0	163.0-991.0
13-14	26	489.0	165.0	493.0	203.0-831.0
14-15	18	499.3	135.9	504.0	288.0-756.0
15-16	21	494.2	142.7	499.0	261.0-752.0
16-18	21	436.9	120.8	471.0	236.0-624.0
18-20	15	367.9	106.1	341.0	193.0-575.0
20-23	25	288.9	109.8	279.0	110.0-521.0
23-25	19	274.9	93.1	273.0	129.0-480.0
25-30	45	253.5	106.6	236.0	96.0-502.0
30-40	24	217.7	76.2	209.0	130.0-354.0

年龄	男		女		
	个数	均值	标准差	中位数	绝对范围
30-40	80	214.0	88.3	193.5	100.0-494.0
40-50	43	180.4	48.3	175.0	101.0-303.0
50-70	41	153.7	49.3	145.0	78.0-258.0

注：见“方法比较”部分的 DSL-5600 与 DSL-2800 之间的联系。

XIII. 实验特性参数：

所有的特性参数均由血清样品得到以 ng/ml 为单位，若折合成 nmol/l,则：

$$\text{ng/ml} \times 0.13 = \text{nmol/l}$$

A. 灵敏度：

平均加上 0 ng/ml IGF 标准品 20 个样品的两个标准偏差，通过内插法计算得到的理论灵敏度或最小检测限为 2.06 ng/ml 或 2pg/tube（按 1：50 稀释进行校正）

B. 精密度：

对 3 个血清样品进行 10 次测定得到组内精密度。

样品	数量	平均值 (ng/ml)	SD (ng/ml)	变异系数 (%)
I	10	34.03	2.38	7.0
II	10	142.45	5.25	3.9

III	10	373.86	14.68	3.9
-----	----	--------	-------	-----

对3个血清样品在同一天进行单独测定12次均值的平均值来测组间精密度:

样品	数量	平均值(ng/ml)	SD (ng/ml)	变异系数(%)
I	12	32.54	2.42	7.4
II	12	140.56	5.36	3.8
III	12	383.36	15.96	4.2

C. 回收率:

含有不同水平内源性 IGF-I 的三个人血清样品用已知量 IGF 作内标测定:

样品	内源性(ng/ml)	加入量 (ng/ml)	预期值(ng/ml)	实测值 (ng/ml)	回收率 (%)
I	18.98	200	218.98	197.45	90
		400	418.98	405.20	97
		600	618.98	613.20	99
		800	818.98	786.45	96
II	114.81	200	314.81	271.01	86
		400	514.81	448.67	87
		600	714.81	578.54	81
		800	914.81	767.74	84
III	116.89	200	316.89	324.44	102
		400	516.89	483.96	94
		600	716.89	640.85	89
		800	916.89	806.43	88

D. 稀释的线性:

将三个人血清样品用 0ng/ml IGF-I 标准品稀释并测定:

样品	稀释比	预期值 (ng/ml)	实测值 (ng/ml)	回收率 (%)
I	—	—	208.98	—
	1:2	104.49	96.01	92
	1:4	52.55	44.57	85
	1:8	26.12	22.39	86

	1 : 16	13.06	9.62	74
--	--------	-------	------	----

样 品	稀 释 比	预期值 (ng/ml)	实测值 (ng/ml)	回收率 (%)
II	—	—	442.93	—
	1 : 2	221.47	242.78	110
	1 : 4	110.73	114.47	103
	1 : 8	55.37	53.06	96
	1 : 16	27.68	20.74	75
	1 : 32	13.84	12.64	91
III	—	—	768.41	—
	1 : 2	384.21	403.83	105
	1 : 4	192.10	175.31	91
	1 : 8	96.05	93.72	98
	1 : 16	48.03	34.22	71
	1 : 32	24.01	17.12	71
	1 : 64	12.01	8.52	71

E. 特异性:

IGF-I 抗血清的交叉反应性依靠以下肽类激素进行测定:

化 合 物	% 交 叉 反 应 性
人:	
IGF-I	100
IGF-2	检测不出
胰岛素	检测不出
前-胰岛素	检测不出
生长激素	检测不出

F. 种间血清比较:

无交叉性血清	有交叉性血清
小白鼠	豚鼠
家鼠	家鼠
	绵羊
	马
	牛

	山羊
	猪

G. 方法比较:

DSL-2800 试剂盒与对样品进行萃取的 DSL-5600 试剂盒进行比较, 对 146 个血清样品进行检测并进行回归分析:

n=146

DSL-2800 浓度范围: 7-1727ng/ml

回归: $DSL-2800=1.2[DSL-5600]-22.7$

$\gamma = 0.98$

注: 浓度在 1000 ng/ml 以上的样品按 1:3 稀释进行分析。

XIV.参考文献: