

微板干试剂测定血糖方法学的建立及其在体检筛查中的应用

白 晓,李军民[△],谈 昀,张 红,赵 花,曾宪飞

(武警陕西省总队医院检验科,西安 710054)

摘要:目的 研制一种通过微板干试剂葡萄糖氧化酶法快速检测血糖的新方法,并小批量在普查糖尿病中应用。方法 将改良葡萄糖试剂冻干于 96 孔板中并封存。检测时微板中每孔由排枪加入 200:1 比例去离子水和待检标本混匀的预处理液,复溶冻干试剂并进行反应,水浴 10 min,用酶标仪检测并计算结果。结果 该法在 1~24 mmol/L 范围内线性良好,其准确性在允许偏差±5%内,变异系数(CV)<5%,干扰实验均能满足检测的要求。对 120 例体检者应用本法进行血糖测定,其结果与日立 7060 全自动生化分析仪测定结果具有较好的相关性($r=0.9875$)。结论 微板干试剂葡萄糖氧化酶法快速检测血糖结果准确可靠,检测过程简便,适合基层医疗机构快速检测及批量普查。

关键词:血糖;微板;干试剂

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.04.018

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)04-0360-02

Establish of methodology of blood glucose detection by microplate dry reagent and its applicatin in health examination screening

Bai Xiao, Li Junming[△], Tan Yun, Zhang Hong, Zhao Hua, Zeng Xianfei

(Department of Laboratory, Shaanxi Corps Hospital of Armed Police Forces, Xi'an, Shaanxi 710054, China)

Abstract: Objective To establish a new assay for rapid determination of blood glucose with dry reagent on a microplate reader for application in small batches of diabetes screening. **Methods** The improved glucose reagent was frozen and dried in the orifice plate, and sealed with plastic film for detection by the microplate reader after adding the specimen conditioning fluid. **Results** The linear of the method was good within the range of 1~24 mmol/L. The accuracy was within the allowable deviation($\pm 5\%$) and the repetitiveness CV was less than 5%. The interference experiment could meet the testing requirements. According to determination of blood glucose in 120 persons, the detection results by this method were well correlated with those of Hitachi 7060 automatic biochemical analyzer($r=0.9875$). **Conclusion** The rapid detection of microplate dry reagent glucose oxidase on blood glucose is accurate and reliable, the determination process is easy and convenient, which is suited to rapid detection of basic medical institutions and batch determination.

Key words: blood glucose; microplate; dry reagent

血糖测定是体检中常规项目之一,目前多使用全自动生化分析仪进行检测,但此法并不适用于基层医疗机构对单项目批量体检者快速筛查。为了提高基层医疗机构检测水平,便于批量体检者普查需求,作者将葡萄糖氧化酶试剂进行改良后,直接干燥于微孔板使用酶标仪进行检测^[1],建立一种快速、简单、准确的新方法,并对体检的 120 份标本进行了初步应用研究。该方法操作简单,对小批量单项血糖检查甚至单个样本能进行快速而准确的测定,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 检测对象 本院进行血糖体检项目的 120 例体检标本,其中男 58 例,女 62 例;年龄 31~74 岁,平均 41.9 岁。患者血清标本无溶血、脂血及黄疸。

1.1.2 仪器与器材 STAT FAX 2100 全自动酶标仪,吸光度(OD)值线性测定范围为 0.000~3.000;酶标反应微孔板(Cell-star, USA);Eppendorf 可调式移液排枪;ModulyoD-230 冷冻干燥机(美国 Thermo 公司);日立 7060 全自动生化分析仪。

1.1.3 试剂

1.1.3.1 测定试剂^[2] 葡萄糖酶试剂(保定长城临床试剂有限公司)中按 0.5% 加入 3-羟基-2,4,6-三溴苯甲醇(TBHA)^[3],并添加 10 g/L 清蛋白作为赋形剂以此作为测定用试剂^[4],取微孔板一块,每孔加入 300 μ L 试剂进行冻干,置于-70 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。待其结晶后,放入冷冻干燥机真空抽干 6 h,并注意其真空度变化。经过升华、解吸附,于真空度达 83 mbar 时取出,将干

燥好试剂的微孔板用塑胶加热法密封,放入装有硅胶的密封袋内,置于 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.1.3.2 标准液 参考《全国临床检验操作规程》精确称取经 80 $^{\circ}$ C 烘烤 4 h 以上并置于干燥器至恒重的无水葡萄糖 1.802 g,以 12 mmol/L 苯甲酸溶液溶解并移入 100 mL 容量瓶内,再以 12 mmol/L 苯甲酸溶液稀释至 100 刻度处,得到 100 mmol/L 的葡萄糖标准储存液,根据需要另配制为 1~30 mmol/L 的葡萄糖标准应用液。

1.2 方法 按照试剂与待检血清的反应比例 200:1,用微量定量加样器吸取待检血清 10 μ L,置于已加入 2 mL 去离子水的试管内,混匀后由加样排枪从上述处理液中吸取待检血清 300 μ L 于干燥好试剂的微孔板内进行复溶,水浴箱孵育 10 min 后于酶标仪在 505 nm 波长进行吸光度检测,与试剂配套标准品浓度和吸光度比值计算结果并打印报告输出。

1.3 统计学处理 实验数据用百分率(%)及 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS11.5 统计学软件进行配对 t 检验和回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 线性范围 用 100 mmol/L 葡萄糖标准储存液制备系列葡萄糖标准液^[5],使葡萄糖含量为 1~30 mmol/L,结果显示 OD 值与相应浓度在 1~24 mmol/L 范围内呈直线相关,其回归方程为: $Y=0.0731X+0.0842$, $r=0.9958$ 。

2.2 与定值血清比较 使用低、中、高浓度定值血清进行测定(分别使用试剂盒正常范围标准品作为中值浓度靶值;自配低、

高浓度定值血清,在日立 7060 全自动生化分析仪上测定 5 次,取均值为靶值),每份样本以本法同时在酶标仪上测定 5 次,取均值与靶值比较,计算相对偏差率分别为 2.04%、0.68% 及 -1.88%,平均为 0.28%,在允许误差(±5%)范围内。

2.3 精密度测定

2.3.1 批内精密度 取低、中、高值葡萄糖标准液,同时测定 15 次,计算 $\bar{x}$ 、 s 和变异系数(CV),其均值分别为 2.10、4.97 和 15.23 mmol/L; s 分别为 0.05、0.08 和 0.13 mmol/L,CV 分别为 2.15%、1.64% 和 0.88%。

2.3.2 日间精密度 将上述 3 种标准液每天测定 1 次,同时测定 2 遍,共测定 8 d,计算 $\bar{x}$ 、 s 和 CV,葡萄糖浓度均值分别为 2.07、4.88 和 15.31 mmol/L; s 分别为 0.08、0.10 和 0.16 mmol/L;CV 分别为 3.74%、2.10% 和 1.05%。

2.4 干扰性实验^[6] 参考 Fujita 等^[7]用血清建立对照组和加入至少 3 个浓度的三酰甘油、血红蛋白、胆红素干扰物分别作为血脂、溶血、黄疸标本实验组,每组样品同时测定 3 次,计算干扰率,以可疑干扰物最大浓度的干扰率在±3%内,未见明显干扰。由结果计算,当胆红素在 175.60 μ mol/L 时,干扰率为 2.52%;当三酰甘油浓度为 11.20 mmol/L 时,干扰率为 2.44%;当血红蛋白浓度为 7.34 g/L 时,干扰率为 2.69%,血清中加入上述物质及浓度均未见明显干扰。

2.5 体检筛查中的初步应用 运用本法及日立 7060 全自动生化分析仪检测 120 名体检者的血糖浓度,测定结果($\bar{x}\pm s$)如下:本法(5.47±2.37)mmol/L,全自动分析仪(5.41±2.31)mmol/L,回归方程:

$$Y=0.9619X+0.1503, r=0.9875, P>0.05.$$

结果显示,本方法与日立 7060 全自动生化分析仪测定结果差异无统计学意义,具有较好的一致性。

3 讨论

目前,多由临床大型生化仪器进行血糖检测,而多数基层和社区中小医院等卫生单位由于受经济、维修、试剂等种种条件的限制,至今尚未能普遍推广应用^[8];较为普及的半自动生化仪虽价格适中、体积微小,但在工作量较大时,不便于人群的筛查应用。

本方法使用实验室常用的微板、酶标仪^[9-10],通过对血糖测定试剂及方法进行改进,建立了能适应较大样本单项检测的微板干试剂葡萄糖氧化酶法,使微孔板中每孔均相当于一个待检标本反应池,可同时多标本检测,保证了试剂孵育时间和检测反应时间的基本一致,同时该法将试剂预先干燥好,测定时即拆即用,省去了添加液体试剂的繁琐,使操作步骤更为简单,小型医疗机构均可配备和使用。在本法研究中,作者将液体试剂加入 0.5% TBHBA 及 10 g/L 清蛋白,分别作为色原和赋形剂,直接冻干于 96 孔微板中,保持了试剂原本反应性能,也具有较好的复溶性。按照试剂与待检血清的反应比例 200:1 进行标本预

处理,由加样排枪从上述处理液中吸取 300 μ L 加入微孔板内进行试剂复溶,并在水浴箱中孵育 10 min,结合临床常用酶标仪进行测定并计算输出结果。由实验结果表明,该干试剂在 1~24 mmol/L 范围内线性良好,在方法学评价中其准确性在允许偏差±5%内,重复性 CV<5%,干扰实验等均能满足检测的要求。同时作者用微板干试剂葡萄糖氧化酶法检测了 120 名体检者的血糖结果,与日立 7060 全自动生化分析仪测定结果具有较好的一致性($r=0.9875$),能够满足临床测定的基本要求。以上均说明该法能有效应用于临床的普筛及初步诊断检测。

微板干试剂测定血糖方法虽然在检测的预处理以及试剂反应时间一致性的控制上可能会造成一些不可避免的误差,但基于基层医疗机构检验人员少、经济条件不好的情况下,本法试剂用量少、成本低,在经济实用的同时提高了小批量单项血糖检查工作的效率。在大力发展基层、社区医疗的今天,随着酶标仪广泛普及应用,该方法具有推广应用的价值。

参考文献:

[1] Frenchik MD,McFaul SJ. A microplate assay for the determination of hemoglobin concentration[J]. Clin Chim Acta,2004, 339(1/2):199-201.
[2] 王翰林. 干试剂在血糖血脂微量快速检测上的应用研究[J]. 四川医学,2009,30(9):1465-1467.
[3] 刘琳琳,王华忠,吴杰红,等. 以 TBHBA 为色原的唾液葡萄糖全自动分析法的建立及应用[J]. 重庆医学,2006,35(17):1552-1553.
[4] Marion G,Hanns-Christian A,Klaus M. Freeze drying of human serum albumin (HSA) nanoparticles with different excipients[J]. Int J Pharm,2008,363(1/2):162-169.
[5] 孙艳艳,谢杰红. 便携式血糖仪的临床应用价值评估[J]. 中国实验诊断学,2009,13(10):1461-1462.
[6] 李桂云. 标本溶血对 15 项生化检验结果的影响及分析[J]. 检验医学与临床,2006,3(4):164-165.
[7] Fujita T,Kawakami Y,Kohda S,et al. Assay of magnesium in serum and urine with use of only one enzyme,isocitrate dehydrogenase (NADP+) [J]. Clin Chem,1995,41(9):1302-1305.
[8] 潘德刚. 基层部队半自动生化分析仪使用现状及建议[J]. 医疗卫生装备,2006,27(1):76.
[9] 张鹏. 微孔板速率法在丙氨酸氨基转移酶检测中的应用[J]. 现代检验医学,2007,22(6):60-61.
[10] 桑胜云,胡荣芬. 酶标仪微量酸碱法测定献血员血红蛋白[J]. 临床输血与检验,2009,2(3):49-50.

(收稿日期:2011-01-20 修回日期:2011-07-20)

(上接第 359 页)

for gastric cancer[J]. Cells Mol Immunol,2004,11(5):351-356.
[7] 刘婷,华川. 树突状细胞抗肿瘤免疫的研究进展[J]. 重庆医学,2009,38(16):2090-2092.
[8] Brian CS,Donald R,Drake III. A novel approach for the generation of human dendritic cells from blood monocytes in the absence of exogenous factors[J]. J Immunol Methods,2008,335(1/2):53-64
[9] 张明顺,张江全,王慧娟. 内皮细胞穿越模型中系统性红

斑狼疮患者树突状细胞分化及功能状态的初步研究[J]. 中华风湿病学杂志,2006,10(1):18-21.
[10] Jung ID, Lee JS, Kim YJ, et al. Sphingosine kinase inhibitor suppresses dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and impairing p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Immunology,2007,121(4):533-544.

(收稿日期:2011-03-10 修回日期:2011-08-30)