

## 鼠降钙素基因相关肽两种不同检测方法比较

张 凯, 郝秀华, 张金英, 邓子辉, 王录焕, 薛 辉, 颜光涛  
解放军总医院 基础医学研究所生化研究室, 北京 100853

**摘要:** 目的 对放射免疫分析法 (RIA) 和酶联免疫分析法 (ELISA) 检测鼠降钙素基因相关肽 (CGRP) 的效能进行评价。方法 分别采用 RIA 法和 ELISA 法检测 CGRP 标准品、质控品和 100 例正常 MCAO 模型大鼠血浆标本中 CGRP 浓度, 作精密度和比对分析。结果 RIA 法和 ELISA 法检测正常 MCAO 模型大鼠血浆中 CGRP 结果具有显著相关性 ( $P < 0.01$ ), 相关系数  $r$  分别为 0.986 和 0.962。结论 RIA 法和 ELISA 法检测 CGRP 结果一致, 符合科研检测的要求。

**关键词:** 鼠降钙素基因相关肽; 放射免疫分析; 酶联免疫分析

中图分类号: R 446 文献标识码: A 文章编号: 1005-1139(2012)01-0082-03 DOI: CNKI:11-3275/R.20110810.1443.001  
网络出版时间: 2011-08-10 14:43:04 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20110810.1443.001.html

### Two different methods for detection of calcitonin gene-related peptide in rats: A comparative study

ZHANG Kai, HAO Xiu-hua, ZHANG Jin-ying, DENG Zi-hui, WANG Lu-huan, XUE Hui, YAN Guang-tao

Biochemistry Laboratory, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

The first author: ZHANG Kai. Email: zk79622@163.com

**Abstract: Objective** To evaluate the efficiency of radioimmunoassay (RIA) and enzyme linked immunoassay (ELISA) in detecting calcitonin gene-related peptide (CGRP) in rats. **Methods** CGRP levels in standard substance and quality control of CGRP, 100 plasma samples from normal rats and middle cerebral artery occlusion (MCAO) model of rats were measured by RIA and ELISA, respectively, and their precision rates were compared. **Results** The relative coefficient of CGRP in normal rats and MCAO model of rats detected by RIA and ELISA was 0.986 and 0.962, respectively ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The CGRP detected by RIA is consistent with that detected by ELISA, thus both RIA and ELISA can be used in detection of CGRP.

**Key words:** calcitonin gene related peptide; radioimmunoassay; enzyme linked immunoassay

降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP) 是一种主要分布于中枢和外周神经、心血管、消化、内分泌等系统的舒血管生物活性肽, 由 37 个氨基酸组成, 分子量为 3 786Da, 在心脑血管性疾病中具有改善血液循环、增加血供的重要作用<sup>[1-2]</sup>。多项临床检测结果表明, 血浆中 CGRP 水平的变化与心脑血管性疾病的发生发展和预后密切相关, CGRP 测定在临床和科研中具有重要价值。为满足科研需要, 本课题组在前期实验中建立了针对鼠 CGRP 的放射免疫分析 (RIA) 检测方法, 并初步在脑缺血再灌注损伤模型中进行了应用<sup>[3]</sup>。为进一步评价此 RIA 检测方法的灵敏度和准确性, 本次实验将其和已商品化的鼠 CGRP ELISA 检测试剂盒进行比较, 报告如下。

#### 材料和方法

**1 材料** 雄性 SD 大鼠 50 只, 体质量 200-220g, 由本院动物实验中心提供。标准品 CGRP-rat 为 American Peptide 公司产品, CGRP-rat 放射免疫分析试剂盒为本实验室自制<sup>[4]</sup>, CGRP-rat ELISA 检

测试剂盒购于美国 Cusbio 公司, 其他化学试剂均为国产分析纯。

**2 动物模型和标本采集** 雄性 SD 大鼠 50 只, 体质量 200-220g, 由本院动物实验中心提供采用改良的 Longa 线栓法<sup>[4-5]</sup>制备 MCAO 大鼠模型, 分别于模型制作前、模型成功后 12h 收集动物静脉血, 分离血浆, 分装, -80℃ 保存, 1 周之内同时采用两种方法测定。

**3 试剂与仪器** ELISA 试剂为美国 Cusabio 公司生产的配套 CGRP 测定试剂, RIA 试剂为本课题组建立的 CGRP 检测试剂盒配套试剂, 质控品为两个水平的 CGRP 质控; 检测仪器分别为 ELISA ZS-2SWK 酶标仪 (北京新凤机电技术有限公司) 和 sn-682 型放射免疫计数仪 (上海核所日环光电仪器有限公司)。

**4 样品准备** 将标准品 CGRP-rat 按 0.1、0.3、0.9、2.7、8.1、24.3ng/ml 的浓度进行倍比稀释; 待测样品为预先采集的正常和 MCAO 模型大鼠血浆标本共 100 例。

**5 ELISA 法** 按照美国 Cusabio 公司生产的 CGRP-rat ELISA 检测试剂盒说明书进行操作, 反应结束后用 ELISA ZS-2SWK 酶标仪测定 OD<sub>450</sub> 读

数, 对照鼠 CGRP 标准曲线, 确定待测血浆中 CGRP 的表度量。

**6 RIA 法** 按照本课题组前期建立的鼠 CGRP RIA 试剂盒说明书进行操作, sn-682 型放射免疫计数仪测定结果。

**7 统计学分析** 采用 SPSS10.0 统计软件, 检测数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用 t 检验或单因素方差分析, 变量的变化采用直线相关分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结果

**1 线性试验** 将标准液按 0.1、0.3、0.9、2.7、8.1、24.3ng/ml 浓度分别用 ELISA 法和 RIA 检测, 结果显示用 ELISA 法检测在  $< 0.3\text{ng/ml}$  范围内结果发生偏离, 在  $> 0.3\text{ng/ml}$  时, 两法测定结果的相关性良好 ( $r=0.912, P < 0.01$ )。见图 1。

**2 两种方法精密度评价** 对两个水平的 CGRP 质控品分别用 ELISA 和 RIA 两种方法连续进行 20 次盲测, 检测结果无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); 经方差分析两个水平测定值之间的总体差异有统计学意义 (水平 1:  $F=61.67$ ; 水平 2:  $F=22.87$ ;  $P < 0.05$ )。见表 1。

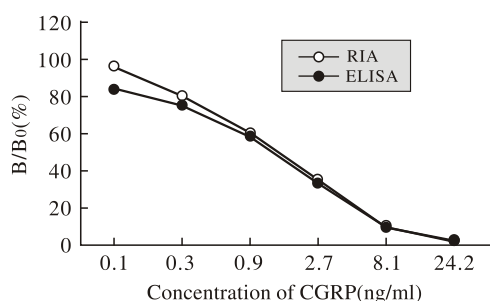


图 1 ELISA 法和 RIA 法检测 CGRP 的标准曲线  
Fig 1 Standard curves for CGRP detected by RIA and ELISA

表 1 ELISA 法和 RIA 检测方法的精密度比较  
Tab 1 Precision rate of ELISA and RIA in detecting CGRP ( $\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$ )

Methods	CGRP 1	CV(%)	CGRP 2	CV(%)
ELISA	1.93 ± 0.08	4.02	20.83 ± 2.33 <sup>a</sup>	4.99
RIA	2.13 ± 0.11 <sup>b</sup>	4.45	21.04 ± 2.62 <sup>a,b</sup>	4.63

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs CGRP 1; <sup>b</sup> $P > 0.05$ , vs ELISA

**3 两种方法的比对试验和偏倚估计** 为了评价 RIA 法测定 CGRP 的准确性, 收集正常和 MCAO 模型大鼠血浆标本 100 例。根据 EP09-2A 文件<sup>[6]</sup>, 以 ELISA 法为比较方法 (X), RIA 法为试验方法 (Y), 求得线性回归方程为  $Y=1.12X-0.16$ 。当分析物 CGRP 为低浓度水平即  $X=1 \mu\text{g/ml}$  时, 计算得到

平均偏倚  $\% = [(1.12 \times 1 - 0.16) - 1] / 1 \times 100\% = 4\%$ ; 当分析物 CGRP 为高浓度水平即  $X=20 \mu\text{g/ml}$  时, 计算得到平均偏倚  $\% = [(1.12 \times 20 - 0.16) - 20] / 20 \times 100\% = 11.2\%$ 。对两种方法测得的结果进行线性回归分析, 相关系数 ( $r$ ) 分别为 0.986、0.962 ( $P < 0.01$ ), 提示 RIA 法测定 CGRP 的结果与 ELISA 法测定的结果无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 ELISA 法和 RIA 检测方法的比对试验  
Tab 2 Comparative tests of ELISA and RIA ( $\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$ )

Group	ELISA	RIA	r
Control (n=50)	1.51 ± 0.68	1.45 ± 0.41 <sup>b</sup>	0.986
MCAO (n=50)	37.1 ± 7.55 <sup>a</sup>	36.03 ± 6.4 <sup>a,b</sup>	0.962

<sup>a</sup> $P < 0.01$ , vs Control; <sup>b</sup> $P > 0.05$ , vs ELISA

### 讨论

CGRP 在心脑血管性疾病中具有重要作用, 近年来备受研究关注。血浆中 CGRP 水平的变化与疾病发生发展和预后密切相关, 可作为发病机制探讨、临床疗效判断的重要参考指标, 因此建立灵敏高效的血浆 CGRP 检测方法在临床和科研中非常必要。目前科研中检测鼠 CGRP 主要采用 ELISA 法, 虽然此方法的灵敏度和重复性均较好, 但试剂盒多从国外进口, 价格昂贵, 为降低实验成本、同时保证检测的灵敏性和特异性, 本课题组建立了针对鼠 CGRP 的放射免疫分析 (RIA) 检测方法。

RIA 是经典的免疫标记技术, 通过将放射性核素的高灵敏性和免疫学抗原抗体反应的高特异性相结合, 对微量样品的检测具有无法取代的优势。本实验中, 我们比较了 ELISA 和 RIA 两种方法对 CGRP 标准品 0.1-24.3ng/ml 范围内的检测结果, 相关性良好 ( $r=0.912, P < 0.01$ ); 而且 RIA 法检测的线性范围远远  $< 0.3\text{ng/ml}$ , 可达  $0.1\text{ng/ml}$ , 灵敏度更好, 能够更好的满足检测要求。

精密度反映实验结果的重现性, 包括批内精密度和批间精密度, 分别反映同 1 份标本在 1d 内、或不同天内使用同一试剂在不同时间点检测结果的重现性, 二者都对实验室结果常规检测质量的评价有重要影响<sup>[7-8]</sup>。本实验中分别用 ELISA 和 RIA 两种方法对两种浓度水平的 CGRP 质控品进行了连续 20 次盲测, 发现在每个浓度水平这两种方法的检测结果一致, 无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); 并且批内和批间精密度均  $< 5$ , 重复性好, 从而提示 RIA 与 ELISA 检测结果总体符合情况良好。

(上接83页)

EP09 2A 是由美国临床实验室标准委员会 (CISI) 制定的应用临床标本进行方法学比较和偏倚估计的推荐方法<sup>[9-10]</sup>。按照室间质评 CGRP 允许总误差为 20% 来判断, 则采用 RIA 方法检测的偏倚低浓度时 <1/2 允许误差 (4%<10%), 高浓度时 <1/2 允许误差 (11.2%<20%), 说明实验方法与比较方法实验效果基本等同。本次实验同时采用 ELISA 法和 RIA 法分别测定正常和 MCAO 模型大鼠血浆标本 100 例, 并对结果进行相关分析, 相关系数分别为 0.986、0.962(P<0.01), 表明两种方法检测值间具有显著相关性。

鉴于以上比较, 本课题组所建立的鼠 CGRP RIA 检测方法灵敏度高、特异性强、稳定性均较好, 与目前商品化的进口鼠 CGRP ELISA 方法检测结果一致, 而且对微量样品的检测线性范围更好, 可满足科研工作中对 CGRP 的检测要求。

#### 参考文献

- 1 Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, et al. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing [J]. *Nature*, 1983, 304 ( 5922 ): 129-135.
- 2 Zhang D, Zhang P, Wang Y, et al. The influence of brain injury or peripheral nerve injury on calcitonin gene-related peptide concentration variation and fractures healing process [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2009, 37 ( 2 ): 85-91.
- 3 张凯, 郝秀华, 张金英. 鼠降钙素基因相关肽放射免疫分析方法的建立及应用 [J]. *军医进修学院学报*, 2011, 32 ( 11 ): 1161-1163.
- 4 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 ( 1 ): 84-91.
- 5 司艺玲, 张金英, 颜光涛. 瘦素对小鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29 ( 4 ): 598-601.
- 6 National Committee for clinical Laboratory Standards. *Methods Comparison and Bias Estimate Using Patient Samples; Approved Guideline-Second Edition, Document EP9-2A* [ S ]. NCCLS, 2002.
- 7 Thomas L. 实验结果的应用和评估 [ A ]. 吕元, 译. *临床实验诊断学* [ C ]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 958.
- 8 谭爱华. ELISA 法检测中应注意的问题 [J]. *实用医技杂志*, 2008, 15 ( 19 ): 2496-2497.
- 9 杨蓬勃, 谢志贤. 两种检测血清癌胚抗原方法的比较 [J]. *军医进修学院学报*, 2009, 30 ( 3 ): 336-338.
- 10 唐汝新, 胡玲玲, 王建平. 癌胚抗原两种不同检测方法的比较 [J]. *检验医学与临床*, 2010, 7 ( 19 ): 2115-2116.