

自身抗体检测蛋白芯片制备条件的优化及初步应用

王国强, 高雪芹, 韩金祥, 潘继红, 黄海南

山东省医药生物技术研究中心 卫生部生物技术药物重点实验室, 山东省现代医用药物与技术重点实验室, 济南 250062

摘要: 选择临床上常用的用于自身免疫性疾病抗体检测所对应的 12 种抗原, 运用 NBT/BCIP 显色反应策略, 研制一种可同时检测 12 种常用自身抗体的蛋白芯片检测系统。应用 NBT/BCIP 终点检测体系对每一种抗原的点样液、点样浓度、血清稀释度进行优化, 制备出可同时检测 12 种自身抗体的蛋白芯片, 并通过对 678 例病人血清和 120 例非病人血清的检测进行敏感度和特异度评价。优化的点样液为 0.1%TBST, 血清稀释度为 1:4, 12 种抗原的最佳点样浓度分别为: ANA 520 $\mu\text{g/mL}$, Ro-60/SSa 465 $\mu\text{g/mL}$, La/SSb 530 $\mu\text{g/mL}$, Jo-1 530 $\mu\text{g/mL}$, Scl-70 525 $\mu\text{g/mL}$, Sm 520 $\mu\text{g/mL}$, Ro-52/SSa 615 $\mu\text{g/mL}$, RF 340 $\mu\text{g/mL}$, CCP 465 $\mu\text{g/mL}$, u1RNP 410 $\mu\text{g/mL}$, CENP-B 490 $\mu\text{g/mL}$, dsDNA 580 $\mu\text{g/mL}$; 通过对 678 份阳性血清和 120 份阴性血清的检测, 该蛋白芯片技术对 12 种自身抗体检测的敏感度在 80%~96.3%之间, 特异度在 86.7%~100%之间, 与传统的检测技术有较高的符合率。我们研究的自身抗体检测蛋白芯片技术体系具有快速、方便、高通量、廉价等优势, 易于商业化, 适合不同条件的临床需要。

关键词: 显色反应蛋白芯片, 自身抗体, 自身免疫性疾病

Protein-chip for Autoantibodies Profile Detection

Guoqiang Wang, Xueqin Gao, Jinxiang Han, Jihong Pan, and Hainan Huang

Key Laboratory for Biotech-drugs of the Ministry of Health, Key Laboratory for Modern Medicine and Technology of Shandong Province, Shandong Medicinal and Biotechnology Center, Jinan 250062, China

Abstract: We selected 12 antigens corresponding to commonly used autoantibodies in clinical practice to prepare antigen microarray. We chose NBT/BCIP color reaction as the end detection strategy to develop a new autoantibody protein chip detection system. Using this system, we optimized the best spotting solution, spotting concentration of the 12 antigens and the dilution of serum. We prepared a protein chip that could detect 12 autoantibodies simultaneously using the optimized antigen concentration. We established a new method to determine the cutoff of each autoantibodies by evaluation of 678 positive and 120 negative serum of clinical sample. We also evaluated the sensitivity and specificity of our new detection system. The optimal spotting solution was 0.1% TBST, the dilution of serum was 1:4 and the best spotting concentration of the 12 antigens were ANA 520 $\mu\text{g/mL}$, Ro-60/SSa 465 $\mu\text{g/mL}$, La/SSb 530 $\mu\text{g/mL}$, Jo-1 530 $\mu\text{g/mL}$, Scl-70 525 $\mu\text{g/mL}$, Sm 520 $\mu\text{g/mL}$, Ro-52/SSa 615 $\mu\text{g/mL}$, RF 340 $\mu\text{g/mL}$, CCP 465 $\mu\text{g/mL}$, u1RNP 410 $\mu\text{g/mL}$, CENP-B 490 $\mu\text{g/mL}$ and dsDNA 580 $\mu\text{g/mL}$ respectively. It had higher coincidence rate compared to current clinical used methods. We have developed a 12 antigens protein chip for the detection of autoantibodies based on the NBT/BCIP color reaction system. This system was fast, convenient, efficient, and cost-effective.

Keywords: color reaction protein chip, autoantibodies, autoimmune disease

Received: December 12, 2007; **Accepted:** March 21, 2008

Supported by: Shandong Province Important Key Technology Tacking Project (No.011100105).

Corresponding author: Xueqin Gao. Tel: +86-531-82919608; E-mail: xueqingao666@163.com

山东省重大科技攻关项目(No. 011100105)资助。

自身免疫性疾病(Autoimmune disease, AID)是指机体对自身抗原发生免疫反应而导致自身组织损害所引起的疾病^[1]。近年来,随着人类对 AID 认识的提高,以及临床经验的积累和实验室诊断技术的进步,AID的发病率呈明显上升,约占世界总人口的3%~5%^[2],已成为严重影响人类健康的一类疾病。自身抗体是 AID 最重要的特征,国际上通用的此类疾病的诊断标准,除了相应的临床症状外,主要还是依据患者血清中检测到的自身抗体^[3],自身抗体检测对 AID 的诊断和鉴别诊断、病情评估与治疗监测、病程转归与预后判断等都具有重要的临床应用价值。目前检测自身抗体的方法,多为繁琐的手工操作,检测程序复杂,多数检测方法不能同时检测多种自身抗体,而且存在很多难以控制的影响质量的因素^[4]。因此,临床迫切需要一种操作简便,快速可靠,能同时检测多种自身抗体的新方法。生物芯片技术是 20 世纪末期产生的高通量、平行检测技术,它一经产生就显示了其极大的优势,基因芯片已在高通量基因测序、基因表达研究及临床疾病诊断等领域中发挥了重要的作用;而蛋白芯片技术在自身抗体检测中的作用也进行了广泛的研究^[5-11],为这一问题的解决带来希望。本研究在本实验室已建立的蛋白芯片技术平台上,采用检测成本低的显色策略,选择临床上常用的用于自身免疫性疾病抗体检测所对应的 12 种抗原,对每一种抗原的点样液、点样浓度、血清稀释度进一步优化,采用以 BCIP/NBT 为底物的碱性磷酸酶显色法,制备可同时检测 12 种自

身抗体的蛋白芯片,建立了显色反应的蛋白芯片检测体系。在此基础上,检测了 678 份阳性 AID 患者血清和 120 份阴性健康献血员血清,以评估该蛋白芯片对 12 种自身抗体检测的敏感度和特异度及其临床应用前景。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

抗原的来源: Ro-52/SSa、La/SSb、Jo-1 和 Goat IgG 购自 Sigma; Ro-60/SSa、Scl-70、CENP-B 和 u1RNP 购自 Diarect; Sm 购自 Immunovision; 抗环呱氨酸多肽(CCP)采用商业合成; ANA、dsDNA 本实验室自行制备,12 种抗原的性质及所针对的自身抗体见表 1。AD 阳性血清和标准抗体血清取自山东省职业卫生与职业病防治研究所风湿专科门诊和山东省济南市中心医院中心实验室;人 IgG、牛血清白蛋白(BSA)、Tween20 和 BCIP/NBT 显色液购自 Sigma; 3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APES)和碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgG 购自北京中杉金桥生物技术公司;磨砂边玻片和盖玻片购自美国 Sigma 公司; Cartisian5500 点样仪, UMAX PowerLook III 扫描仪。

1.2 蛋白芯片制备条件的优化

1.2.1 点样液和血清稀释度的优化

根据本实验室以往点样液优化的结果,选择含不同浓度 Tween20 的 TBST 为点样液,优化阵列设计如图 1 所示。采用我们实验室已经建立的并得到专利授权的 APES 处理的玻片作为点样的基

表 1 12 种自身抗原蛋白性质及其所对应的自身抗体
Table 1 12 kinds of antigen's origin and their corresponding autoantibody

Antigen	Origin	Corresponding autoantibody
Ro-52/SSa	Recombinant (expressed in <i>E.coli</i> bacterial cells)	Anti-Ro-52/SSa antibody
Ro-60/SSa	Recombinant (expressed in <i>E.coli</i> bacterial cells)	Anti-Ro-60/SSa antibody
La/SSb	Recombinant (expressed in <i>E.coli</i> bacterial cells)	Anti-La/SSb antibody
Jo-1	Recombinant (expressed in <i>E.coli</i> bacterial cells)	Anti-Jo-1 antibody
Scl-70	Recombinant (expressed by recombinant baculovirus)	Anti-Scl-70 antibody
CENP-B	Recombinant (expressed by recombinant baculovirus)	Anti-CENP-B antibody
u1RNP	Recombinant (express in <i>E. coli</i> bacterial cells)	Anti-u1RNP antibody
Sm	Affinity purified (from Bovin Thymus)	Anti-Sm antibody
Goat IgG	Purified IgG (from goat serum)	RF
CCP	Peptide synthesis	Anti-CCP antibody
Nuclear Antigen	Hep-2 cell extracts	ANA
dsDNA	Human genomic DNA	Anti-dsDNA antibody

片^[12],以 Cartisian5500 点样仪点样,每个样品点重复 4 次。蛋白芯片反应过程:1) 将点制好的蛋白芯片在点样仪中干燥过夜;2) 在杂交盒中 37°C 固定 30 min;3) 用封闭剂 37°C 封闭 30 min;4) PBS 洗 3 次,每次 15 s;5) 与标准抗体血清进行反应(标准抗体血清用 PBS 稀释,稀释度分别为 1:1、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32,在同一张玻片上,每一个阵列与一种稀释度的血清反应),37°C 反应 30 min;6) PBS 洗 3 次,每次 15 s;7) 与碱磷酶标记的山羊抗人 IgG (1:1000 稀释)于 37°C 反应 30 min;8) BCIP/NBT 显色 20~30 min;9) UMAX PowerLook III 扫描仪扫描图像, Totallab 软件进行结果分析。每个反应重复 3 次。

点样液和血清稀释度的确定:选择既可以很好的固定抗原,又可以提高检测的灵敏性的点样液作为芯片的点样液;选择信噪比最高的血清稀释度作为芯片的血清反应稀释度。

1.2.2 抗原浓度及阳性对照和阴性对照(即芯片阳性 Cutoff 值和阴性 Cutoff 值)的确定

抗原浓度和阳性对照的确定:用优化好的点样液按照图 2 所示阵列点制芯片(每个样品点重复 4 次),在优化好的血清稀释度(其余条件相同)下检测 AID 阳性血清 240 份(每种自身抗体检测 20 份),每个反应重复 3 次。

在抗原的浓度-灰度值线性范围之内选取连续的 3~4 个信噪比高、均一稳定的浓度点,以单侧 99.5%的可信限分别确定每个浓度点的 Cutoff 值(灰度值),通过 Human IgG 的浓度-灰度标准曲线(相同检测条件下),选取 12 种抗原的线性 Cutoff 值范围内所共有的最低灰度值作为芯片的 Cutoff 值,该灰度值对应的每个抗原的浓度即为芯片中该抗原的点样浓度,对应的 Human IgG 的浓度为芯片的阳性对照 II 中 Human IgG 的浓度,即为芯片的阳性 Cutoff 值;阳性对照 I 中 Human IgG 的浓度是根据“灰区”(阳性 Cutoff 值和阴性 Cutoff 值之间的区域)的大小,综合考虑假阳性和假阴性率的情况下确定,既为强阳性的判定标准,又为芯片的质控区。

阴性对照的确定:用优化好的点样液和抗原浓度按照图 3 所示阵列点制芯片(每个样品点重复 4 次),在优化好的血清稀释度(其余条件相同)下检测 AID 阴性血清(来自健康献血员,经过相同的检测方法,

不含有该 12 种自身抗体的阴性血清标本)100 份,每个反应重复 3 次。

以单侧 99.5%的可信限确定每个抗原的阴性 Cutoff 值,计算它们的均值,在综合考虑标准差和变异系数的情况下得出一个共同的阴性 Cutoff 值,通过 Human IgG 的浓度-灰度标准曲线(相同检测条件下),以相同灰度值所对应的 Human IgG 浓度作为芯片阴性对照中 Human IgG 的浓度。

	A	B	C	D	E	F
1	○	○	○	○	○	○
2	○	○	○	○	○	○
3	○	○	○	○	○	○
4	○	○	○	○	○	○
5	○	○	○	○	○	○
6	○	○	○	○	○	○
7	○	○	○	○	○	○
8	○	○	○	○	○	○
9	○	○	○	○	○	○
10	○	○	○	○	○	○

图 1 蛋白芯片点样液优化阵列分布图

Fig.1 Spot arrangement for optimizing spotting solution of the protein chip

A~F: TBST which contain 0.1%, 0.02%, 0.04%, 0.1%, 0.2%, 0.4% Tween20 respectively; 1: 1000 µg/mL Human IgG; 2: 1000 µg/mL BSA, 3: corresponding blank spotting solution, 4~10: the concentration gradients of antigen, they were 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL, 1000 µg/mL respectively; A: human IgG; B~F stand for single antigen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○

图 2 蛋白芯片抗原浓度、阳性对照优化阵列分布图

Fig.2 Spot arrangement for optimizing concentrations of antigens and positive control of the protein chip

A1~A9: human IgG, the concentration of them were 5, 20, 50, 100, 200, 300, 500, 750 and 1000 µg/mL respectively; B1~B9: different concentrations of antigen, the concentration of them were 5, 20, 50, 100, 200, 300, 500, 750 and 1000 µg/mL respectively

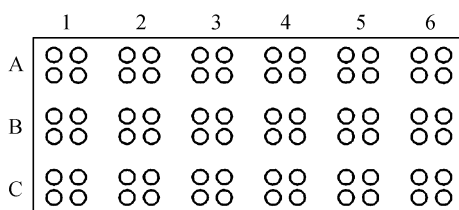


图 3 蛋白芯片阴性对照优化阵列分布图

Fig. 3 Spot arrangement for optimizing negative control of the protein chip

A1~A6: human IgG, the concentration of them were 5, 10, 20, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$ respectively; B1~B6: ANA, Ro-60/SSa, La/SSb, Jo-1, Scl-70 and Sm respectively; C1~C6 stand for Ro-52/SSa, RF, CCP, u1RNP, CENP-B and dsDNA respectively

1.3 蛋白芯片的制备及初步评价

1.3.1 蛋白芯片的制备

根据 1.2 的优化结果制备蛋白芯片, 阵列分布如图 4 所示。

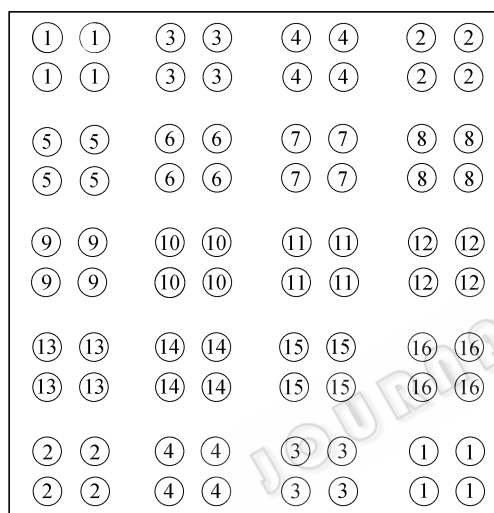


图 4 蛋白芯片阵列分布图

Fig. 4 Spot arrangement of the protein chip

1: PC I; 2: NC; 3: PC II; 4: BC; 5: ANA; 6: Ro-60/SSa; 7: La/SSb; 8: Jo-1; 9: Scl-70; 10: Sm; 11: Ro-52/SSa; 12: RF; 13: CCP; 14: u1RNP; 15: CENP-B; 16: dsDNA

1.3.2 蛋白芯片敏感度和特异度的评价

用自制的蛋白芯片检测临床血清标本。收集了 AID 阳性血清标本 678 份, 分别来自山东省职业卫生与职业病防治研究所风湿专科门诊和山东省济南市中心医院中心实验室, 均为从临床中收集的符合疾病分类或诊断标准的 AID 患者阳性血清, 其中 RA 204 例, SLE 158 例, MCTD 104 例, DM/PM 76 例, SS 72 例, PSS/SSC 64 例, 针对 12 种自身抗体, 除抗 dsDNA 抗体较少, 收集 30 份外, 其它每种至少收集了 40 份; 阴性血清标本(来自健康献血员, 经过相同

的检测方法, 不含有该 12 种自身抗体的阴性血清标本)120 份。临床采用的检测方法和试剂为: 抗核抗体(ANA)用 IIF, 抗 dsDNA 抗体、抗 La/SSb 抗体、抗 Sm 抗体、抗 u1RNP 抗体、抗 Jo-1 抗体、抗 CENP-B 抗体、抗 Scl-70 抗体采用 ELISA, 检测试剂盒均购自欧盟(德国)医学实验诊断有限公司; 抗 Ro-52/SSa 抗体、抗 Ro-60/SSa 抗体采用 ELISA, RF 采用胶乳增强免疫比浊法, 检测试剂盒购自德国 ORGENTEC 公司, 抗 CCP 抗体采用 ELISA, 检测试剂盒购自 EURO-DIAGNOSTICA, 以上各种 AID 诊断均符合国际风湿性疾病分类标准。将筛选出的自身抗体阳性血清和阴性血清编盲后, 根据优化条件进行稀释; 将制备好的蛋白芯片经 37°C 温育 30 min、37°C 封闭 30 min、37°C 与血清反应 30 min、37°C 与碱性磷酸酶标记的二抗反应 30 min、BCIP/NBT 显色 20~30 min, UMAX PowerLook III 扫描仪扫描图像, Totallab 软件进行灰度分析; 以同一芯片相应区域的阴性、阳性对照的灰度值作为样品阴性或阳性判定的 Cutoff 值。然后对芯片检测结果和先行确定的样本结果进行解盲、比对, 以先行确定的样本结果作为金标准, 计算蛋白芯片对每种自身抗体检测的敏感度和特异度, 并进行统计和分析。

2 结果

2.1 蛋白芯片制备条件的优化结果

2.1.1 点样液和血清稀释度的优化结果

通过对 5 种点样液和 6 种血清稀释度的比较, 信噪比最高的血清稀释度为 1:4, 筛选出的含 0.1% Tween20 的 TBST 作为点样液, 既可以很好的固定抗原, 又可以提高检测的灵敏性, 如图 5 所示。

蛋白芯片的 Human IgG 和 12 种抗原(点样液为含 0.1% Tween20 的 TBST, 血清稀释度为 1:4 时)的浓度-灰度值线性关系如图 6 所示, R^2 均大于 0.97, 线性关系较好, 说明该蛋白芯片在我们所选择范围的抗原浓度下可以进行血清中相应抗体的定性和半定量检测。

2.1.2 抗原浓度及阳性对照和阴性对照的选择

通过对 12 种抗原的线性 Cutoff 值的综合分析, 如图 7 所示, 12 种抗原的点样浓度分别为: ANA 520 $\mu\text{g/mL}$, Ro-60/SSa 465 $\mu\text{g/mL}$, La/SSb 530 $\mu\text{g/mL}$, Jo-1 530 $\mu\text{g/mL}$, Scl-70 525 $\mu\text{g/mL}$, Sm 520 $\mu\text{g/mL}$,

Ro-52/SSa 615 $\mu\text{g/mL}$, RF 340 $\mu\text{g/mL}$, CCP 465 $\mu\text{g/mL}$, u1RNP 410 $\mu\text{g/mL}$, CENP-B 490 $\mu\text{g/mL}$, dsDNA 580 $\mu\text{g/mL}$ 。阳性对照 II 为 250 $\mu\text{g/mL}$ Human IgG, 也即芯片的阳性 Cutoff 值。通过对 12 种抗原的阴性 Cutoff 值的综合分析(均值、标准差及变异系数等), 选择了以 5 $\mu\text{g/mL}$ Human IgG 作为芯片的阴性对照, 也即芯片的阴性 Cutoff 值。在分析了“灰区”(阳性 Cutoff 值和阴性 Cutoff 值之间的区域)的大小, 综合考虑假阳性和假阴性率的情况下确定确定芯片的阳性对照 I 为 500 $\mu\text{g/mL}$ Human IgG, 作为强阳性的判定标准和芯片的质控区。

2.2 蛋白芯片对血清标本的检测应用结果

显色反应自身免疫性疾病抗体检测芯片的制备采用

1.2 的优化结果, 该芯片对 12 种自身抗体的检测敏感度分别为: ANA 93.1%, 抗 Ro-60/SSa 抗体 81.4%, 抗 La/SSb 抗体 91.1%, 抗 Jo-1 抗体 81.0%, 抗 Scl-70 抗体 84.5%, 抗 Sm 抗体 93.5%, 抗 Ro-52/SSa 抗体 90.8%, RF 90.1%, 抗 CCP 抗体 91.2%, 抗 u1RNP 抗体 96.3%, 抗 CENP-B 抗体 80.9%, 抗 dsDNA 抗体 80%; 特异度分别为: ANA 93.3%, 抗 Ro-60/SSa 抗体 98.3%, 抗 La/SSb 抗体 100%, 抗 Jo-1 抗体 95.8%, 抗 Scl-70 抗体 97.5%, 抗 Sm 抗体 89.2%, 抗 Ro-52/SSa 抗体 95.0%, RF 86.7%, 抗 CCP 抗体 90.8%, 抗 u1RNP 抗体 96.7%, 抗 CENP-B 抗体 95.0%, 抗 dsDNA 抗体 98.3%。

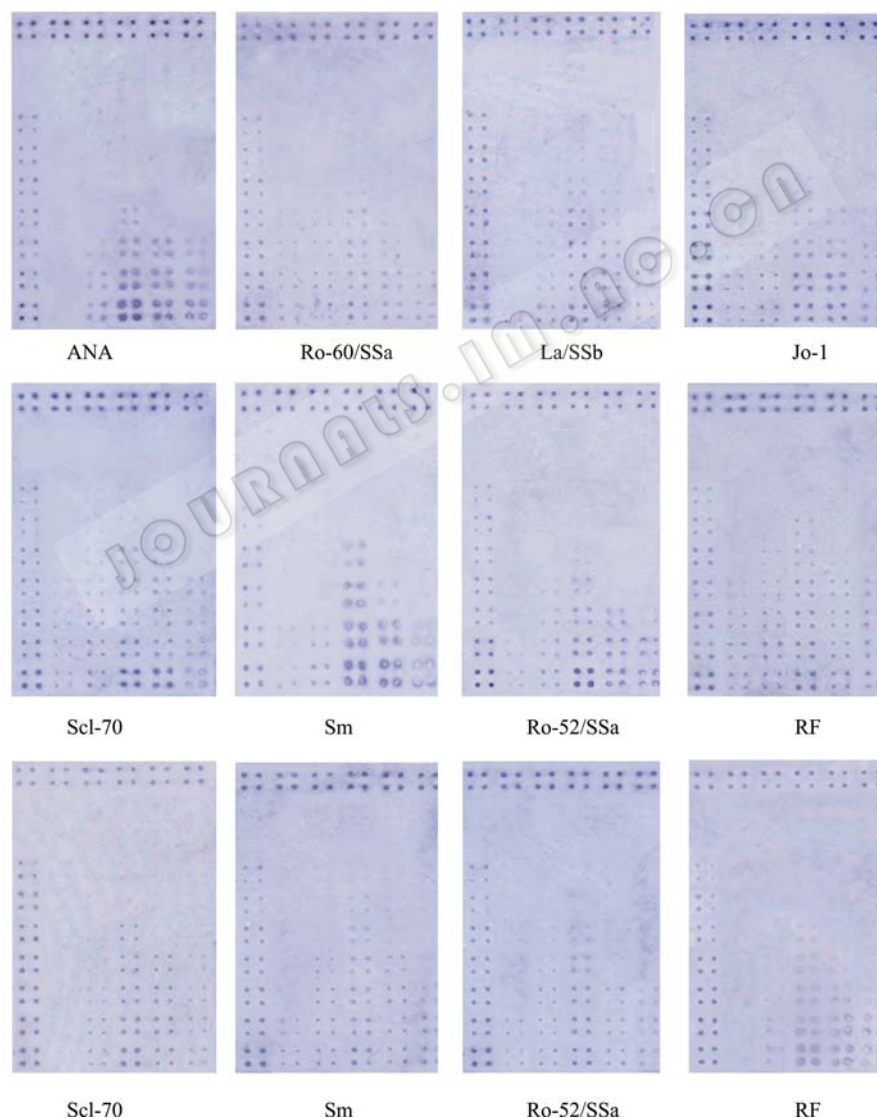


图 5 12 种抗原的点样液优化结果(血清稀释度 1:4)扫描图像

Fig. 5 Scanning images of the results achieved from optimizing of spotting solution for 12 kinds of antigen (dilution of serum is 1:4)

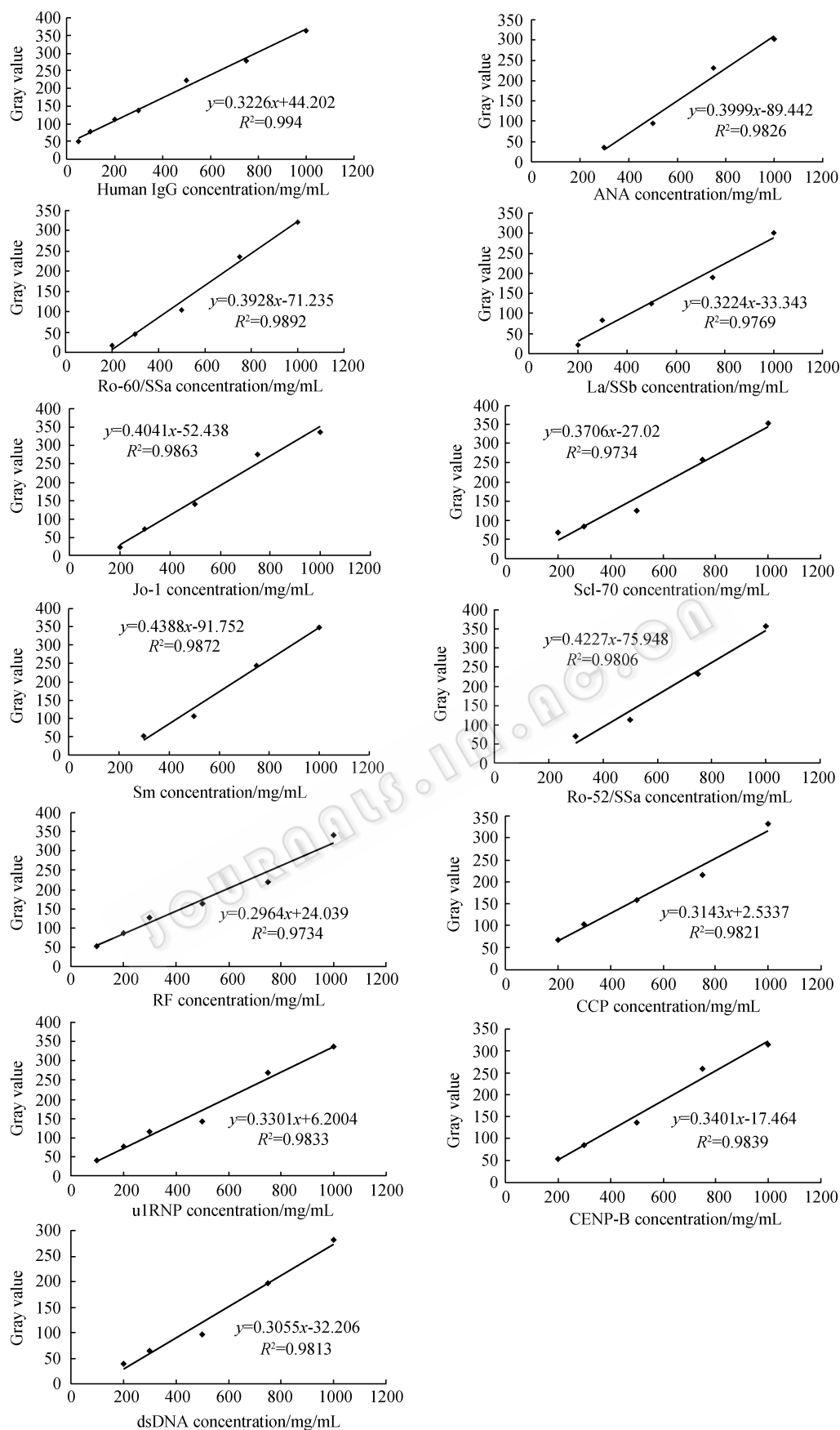


图 6 Human IgG 和 12 种抗原浓度-灰度线性关系拟合结果

Fig. 6 Fitted results of linear relationship between concentration and gray value of Human IgG and 12 kinds of antigens

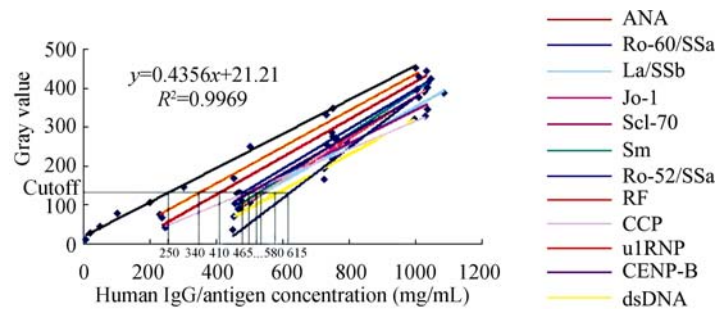


图 7 抗原浓度和阳性 Cutoff 值确定法示意图

Fig. 7 Scheme for determination of antigen concentration and positive Cutoff value

表 2 蛋白芯片检测临床标本结果

Table 2 The results of clinical samples detected by the protein chip

Detection index	Positive samples		Negative samples		Sensitivity (%)	Specificity (%)	False positive rate (%)	False negative rate (%)	χ^2 value*	P*
	Total	Positive	Total	Postive						
ANA	72	67	120	8	93.1	93.3	6.7	6.9	0.31	>0.1
Ro-60/SSa	43	35	120	2	81.4	98.3	1.7	18.6	2.50	>0.1
La/SSb	56	51	120	0	91.1	100.0	0.0	8.9	3.20	>0.05
Jo-1	42	34	120	5	81.0	95.8	4.2	19.0	0.31	>0.1
Scl-70	58	49	120	3	84.5	97.5	2.5	15.5	2.08	>0.1
Sm	62	58	120	13	93.5	89.2	10.8	6.5	3.76	>0.05
Ro-52/SSa	65	59	120	6	90.8	95.0	5.0	9.2	0.08	>0.1
RF	81	73	120	16	90.1	86.7	13.3	9.9	2.04	>0.1
CCP	68	62	120	11	91.2	90.8	9.2	8.8	0.94	>0.1
u1RNP	54	52	120	4	96.3	96.7	3.3	3.7	0.13	>0.1
CENP-B	47	38	120	6	80.9	95.0	5.0	19.1	0.27	>0.1
dsDNA	30	24	120	2	80.0	98.3	1.7	20.0	1.13	>0.1

* The results of 12 indexes conducted with Matched χ^2 test using SPSS 10.0 for Windows software

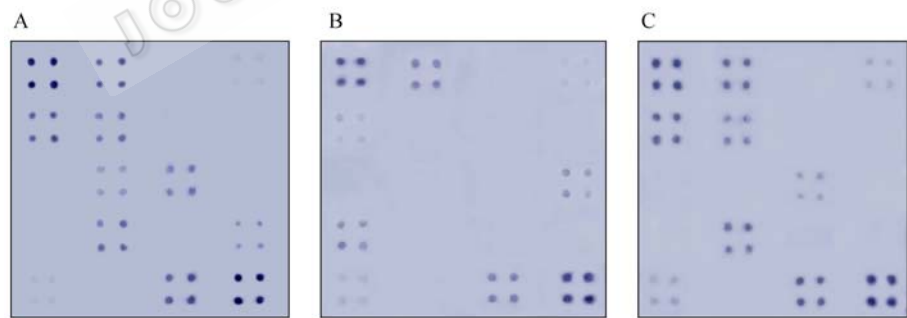


图 8 蛋白芯片对 SLE(A)、RA(B)和 MCTD(C)各一例患者血清样本检测结果

Fig. 8 Representative result of serum samples from patients diagnosed with SLE (A), RA (B) and MCTD (C) detected by the protein chip

针对 12 种自身抗体的检测指标采用 SPSS 10.0 for Windows 软件进行配对 χ^2 检验, 结果显示自身免疫性疾病抗体检测芯片检测结果与临床检测结果无显著性差异, 两者具有较高的符合率, 见表 2。图 8 显示 1 例 SLE、1 例 RA 和 1 例 MCTD 患者血清样本

检测结果。

3 讨论

近年来, 随着人类对 AID 认识的提高, 以及临床经验的积累和实验室诊断技术的进步, AID 的发

病率呈明显上升, 约占世界总人口的 3%~5%, 我国约有患者 12 000 多万。该类疾病可累及多器官、多系统, 对患者造成的危害极大。自身抗体是 AID 最重要的特征, 故自身抗体检测不仅对临床早期诊断自身免疫性疾病具有重要作用, 也在疾病分型、判断预后和治疗效果监测等多方面具有重要的意义^[13]。目前临床上开展的自身抗体检测方法主要有间接免疫荧光法, 酶联免疫吸附法, 免疫印迹法, 免疫斑点法, 免疫沉淀法等, 多数检测方法仍以手工操作为主, 检测程序较复杂, 多数检测方法不能同时检测多种自身抗体, 其检测结果受检测方法、试剂、仪器及实验人员的经验等诸多因素的影响, 因此, 临床迫切需要一种操作简便、快速可靠, 能同时检测多种自身抗体的新方法。

蛋白芯片具有的高通量、平行检测、自动化等优点, 为简便、快速、同时检测多种自身抗体的解决带来了希望^[14]。目前国外 Zeus 公司等已经构建了包括 10 种自身抗原的蛋白芯片, 且在自身免疫疾病中的检测中结果与传统方法的结果相似, 国内也有相关方面的研究, 但是蛋白芯片的检测均是采用荧光检测的方法。该方法虽然灵敏度好, 但需要专用的扫描仪, 对于基层的检验单位却难以全面实现, 使应用受到了限制。

NBT/BCIP 显色方法是一种常用的、稳定的检测系统, 底物反应产物呈蓝色或紫色, 既可定性又可定量, 作为终点检测系统广泛的应用在免疫组织化学、原位杂交、Western blotting 等检测中, 在实验室和临床上应用广泛。然而, 经检索 NBT/BCIP 显色方法在蛋白芯片中的应用至今国内外还没有相关的报道, 因此, 有必要将这种常用的检测方法和新的蛋白芯片技术体系结合, 开发更适用于不同级别临床检测需要的简便、快速、同时检测多种抗体或抗原的蛋白芯片。

本研究将这种常用的检测方法和蛋白芯片技术相结合, 期望得到更实用的适用于不同级别临床检测的新的技术体系。在前期工作^[15]的基础上, 选择了临床上常用的用于自身免疫性疾病抗体检测所对应的 12 种抗原, 抗原的种类由原来的 6 种增加到 12 种, 增加了所诊断疾病的种类, 同时改进了部分抗原的制备方法, 获得了更高纯度的抗原。采用以 BCIP/NBT 为底物的显色法作为终点信号的检测方

法, 对每一种抗原的点样液、点样浓度、血清稀释度进行了优化。在本研究中, 优化方案更趋合理, 点样液、抗原浓度、阳性、阴性对照都是用各自抗原优化, 相互联系, 优化结果通过计算得出, 没有人为因素的干扰, 同时 cutoff 值的设定也更加严谨。以该体系制备了可同时检测临床常见 12 种自身抗体的蛋白芯片, 运用该芯片检测临床标本 798 例, 结果显示该蛋白芯片检测的敏感度都在 80% 以上, 大部分检测指标可达到 90% 以上; 特异度除 Sm 和 RF 分别为 89.2% 和 86.7% 外, 其余的检测指标都达到了 90% 以上。与传统的 IIF 法和 ELISA 法相比, 无显著性差异, 均具有较高的符合率。此外, 该芯片中 dsDNA 抗原采用人类基因组 DNA, 与目前检测双链 DNA 抗体均采用的质粒 DNA 相比, 增加了反应的特异性; 抗 CCP 抗体和 RF 的联合检测对 RA 的早期诊断具有重要的临床价值^[16]; SSA 抗原能区分 52 000 和 60 000 亚基相对应的自身抗体, 对 SLE 和 SS 的鉴别诊断有重要的参考价值^[17]。

综上所述, 本研究所建立的蛋白芯片技术与传统的检测技术相比, 具有快速(在 1.5~2 h 内即可完成 12 种抗体的检测)、方便(可以单人份检测, 也可多人份同时检测)、高通量(可同时检测 12 种自身抗体)、自动(检测结果自动判读, 可减少人为因素的干扰)、廉价(有利于向基层推广)等优势, 易于商业化, 适合不同条件的临床需要。展示了良好的临床应用前景, 值得进一步研究并在临床推广使用。

REFERENCES

- [1] Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med*, 2001, **345**: 340-350.
 - [2] Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, *et al*. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol*, 1997, **84**: 223-243.
 - [3] James K, Carpenter AB, Cook L, *et al*. Development of the antinuclear and anticytoplasmic antibody consensus panel by the association of medical laboratory immunologists. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000, **7**(3): 436-443.
 - [4] Li YZ. Importance should be attach to clinic application of autoantibodies detection and quality assurance. *Chin J Lab Med*, 2006, **29**(9): 769-773.
- 李永哲. 自身抗体检测技术临床推广应用和质量保证工作中应重视的问题. 中华检验医学杂志, 2006, **29**(9): 769-773.

- [5] Joos TO, Schrenk M, Höpfl P, *et al.* A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis*, 2000, **21**(13): 2641–2650.
- [6] Robinson WH, Steinman L, Utz PJ. Proteomics technologies for the study of autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* 2002, **46**(4): 885–893.
- [7] Robinson WH, Steinman L, Utz PJ. Protein arrays for autoantibody profiling and fine-specificity mapping. *Proteomics*, 2003, **3**(11): 2077–2084.
- [8] Feng Y, Ke X, Ma R, *et al.* Parallel detection of autoantibodies with microarrays in rheumatoid diseases. *Clin Chem*, 2004, **50**(2): 416–422.
- [9] Poetz O, Ostendorp R, Brocks B, *et al.* Protein microarrays for antibody profiling: specificity and affinity determination on a chip. *Proteomics*, 2005, **5**(9): 2402–2411.
- [10] Hamelinck D, Zhou H, Li L, *et al.* Optimized normalization for antibody microarrays and application to serum-protein profiling. *Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**(6): 773–784.
- [11] Li QZ, Zhou J, Wandstrat AE, *et al.* Protein array autoantibody profiles for insights into systemic lupus erythematosus and incomplete lupus syndromes. *Clin Exp Immunol.* 2007, **147**(1): 60–70.
- [12] Han JX, Xu H, Gao XQ, *et al.* The method for preparation of protein, DNA and lipids microarray using APES modified slide. CN, 1763528. 2006.
- 韩金祥, 徐华, 高雪芹, 等. 利用 APES 修饰玻片制备蛋白质、DNA 及脂类微阵列的方法. CN, 1763528. 2006.
- [13] Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, *et al.* Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American college of pathologists. *Arch Pathol Lab Med*, 2000, **124**(1): 71–81.
- [14] Hultschig C, Kreutzberger J, Seitz H, *et al.* Recent advances of protein microarrays. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, **10**(1): 4–10.
- [15] Xu H, Han JX, Gao XQ, *et al.* Preparation conditions optimization and preliminary application of the microarray for detecting autoantibodies. *Chin J Rheumatol*, 2006, **10**(6): 27–31.
- 徐华, 韩金祥, 高雪芹, 等. 自身免疫性疾病抗体检测微阵列制备条件的优化和初步应用. 中华风湿病学杂志, 2006, **10**(6): 27–31.
- [16] Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, *et al.* Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*, 2007, **146**(11): 797–808.
- [17] Bahun-Riedinger I. Auto-antibodies to anti-ENA SSA/RO (52 and 60 kD): an auto-immunity laboratory's experience. *Rev Med Interne*, 2004, **25**(6): 421–428.