论著

文章编号:1000-5404(2007)21-2080-03

微阵列检测血样感染相关四项指标的实验研究

黄 敏[1],张敏丽[2],蒲晓允[1] ([1]第三军医大学新桥医院检验科,重庆 400037;[2]军事医学科学院放射医学研究所,北京 100871)

提 要:目的 利用蛋白芯片技术检测血样感染相关四项指标,并与ELISA酶联免疫技术进行客观分析评价。**方法** 对230份国家参比品同时进行蛋白芯片与ELISA酶联免疫的检测,并观察蛋白芯片对诊断血样感染四项指标的敏感性和特异性。**结果** 用统计学的配对计数资料检验得出:$\chi^2=0.5$,$P=0.125$,说明两种方法检测结果无统计学差异。**结论** 蛋白微阵列检测结果无论是与参比品本身还是与ELISA试剂盒都有极高的符合率,是一种很有发展前途的检验技术。

关键词: 蛋白微阵列;乙型肝炎病毒;人类免疫缺陷病毒;丙型肝炎病毒;梅毒螺旋体

中图法分类号: R319; R446.11 **文献标识码:** A

Protein microarray for simultaneous detection of pathogens in blood transfusion

HUANG Min[1], ZHANG Min-li[2], PU Xiao-yun[1] ([1]Department of Laboratory Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Radio Medicine Institute, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100871, China)

Abstract: Objective To study the diagnostic value of multiplex protein microarray and ELISA for human serum pathogens. **Methods** Totally 230 national standard samples were tested by multiplex protein microarray and ELISA respectively for the pathogens of HBV, HIV, HCV and treponema pallidum (TP). **Results** The matched pair test for numeration data showed $\chi^2=0.5$, $P=0.125$, indicating that no statistical significance between the two methods. **Conclusion** Multiplex protein microarray shows high specificity and sensitivity to the four pathogens so that it is worth extensive application.

Key words: microarray; hepatitis B virus; human immunodeficiency virus; hepatitis C virus; treponema pallidum

乙肝病毒表面抗原(HBsAg)、丙肝病毒抗体(抗-HCV)、人类免疫缺陷病毒抗体(抗-HIV)和梅毒螺旋体抗体(抗-TP)已被卫生部规范为输血前必检4项。本实验在前实验单张芯片检测两种抗体的基础上,将HBsAb和HIV、HCV、TP抗原按一定顺序点至玻片上,制成可同时检测抗体和抗原的多元蛋白免疫芯片。结果表明,多元蛋白芯片的检测灵敏度和特异性与ELISA法相当,具有操作简便,费用低廉的特点。为建立一种新型的高效、快速的免疫检测技术进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

HBsAb和HIV、HCV、TP融合抗原(军事医学科学院分子病毒研究室与深圳益生堂生物有限公司共同研制)。兔抗人IgG抗体购于Sigma公司。小牛血清:杭州四季青公司。HBV抗原的ELISA检测试剂盒和HIV、HCV抗体的ELISA检测试剂盒均购于华美生物公司。TP抗体的ELISA检测试剂盒购于金伟凯生物公司。国家参比品购于中国药品生物制品鉴定研究所。其他试剂为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 点样 载玻片分成10个区,各区之间用薄胶带隔开以避免污染,将HBsAb、HIV、HCV、TP融合抗原用0.01 mol/L PBS(pH 7.0)配成50 mg/L浓度,用点样仪将其点样于醛基化玻片上,37 ℃温浴2 h后晾干。洗涤与封闭:用含10%小牛血清的PBS(pH 7.2) 37 ℃封闭2 h,洗涤晾干放于4 ℃冰箱过夜后备用。

1.2.2 抗体及各抗原坐标点的排列矩阵模式 见图1。

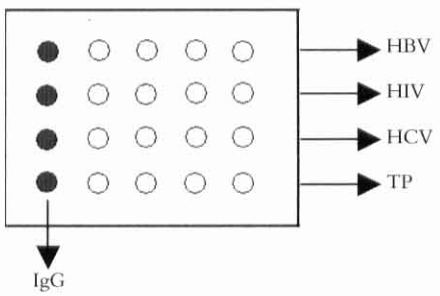


图1 抗原抗体排列矩阵模式

1.2.3 检测操作 取出制备好的芯片加1∶10倍稀释血清10 μl,37 ℃水浴30 min,PBS-T(pH 7.2)洗涤5次。HBV孔中加入酶标Ab,HIV、HCV、TP每孔中加入兔抗人IgG,各孔37 ℃孵育30 min,PBS-T洗涤5次。每孔再加入TSA-CY3荧光,工作浓度为1∶1 000,37 ℃孵育30 min.,PBS-T洗涤4次。

作者简介:黄 敏(1978-),女,河南省潢川县人,硕士,主管技师,主要从事快速检验方面的研究。电话:(023)68755637

收稿日期:2007-05-25;修回日期:2007-09-10

1.2.4　200 份正常人血清的检测和 Cutoff 值的确定　　按操作方法检测 200 例健康人血清样本，计算 200 份样本的均值及标准差，将均值加上 3 个标准差定为判断样本阴性或阳性的 Cutoff 值，大于或等于该值判为阳性，小于该值则判为阴性。

1.2.5　多元蛋白微阵列与 ELISA 试剂盒法检测　　中国药品生物制品鉴定研究所 HBV 抗原参比品和 HIV、HCV、TP 3 种抗体参比品的结果进行比较，并用 χ^2 检验判断两种方法的符合率。

1.2.6　线性范围实验　　蛋白微阵列法检测 HBV、HIV、HCV 和 TP 四种定值血清观察线性范围。

1.2.7　敏感性实验　　蛋白微阵列法检测 HBV、HIV、和 TP 四种定值血清观察最低检测限。

1.2.8　重复性实验　　分别取 HBV(10 ng/ml)、HIV(20 ng/ml)、HCV(10 ng/ml)和 TP(2 NCU/ml)的定值血清同时重复测定 8 次，计算批内变异系数；再取上述定值血清每天测定 1 次，共 8 次，计算批间变异系数。

1.2.9　特异性实验　　取其它血液传播性疾病 HAV、HEV、GBV-C、GMV、TTV 呈阳性的血清合计 32 份，按照操作方法进行检测，观察荧光强度的变化。

2　结果

2.1　微阵列外观、检测示例

图 2 经醛基化处理的玻片，表面覆以隔栅，形成 10 个检测孔，其中 1、2 号孔为阴性对照孔。

图 3 国家参比品检测后扫描仪扫描成像，1～10 号各孔依次所加样品为阴性对照、P1、N1(HBV 参比品)P20、N20(HCV 参比品)P4、N4(HIV 参比品)P2、N2(TP 参比品)。



图 2　微阵列外观



图 3　检测示例

2.2　200 份正常人血清的检测和 Cutoff 值的确定

按照操作方法检测 200 例健康人血清样本，计算 200 份样本的均值及标准差，将均值加上 3 个标准差定为判断样本阴性或阳性的 Cutoff 值。见表 1。

表 1　各指标均值、标准差和 Cutoff 值的确定

HBV			HIV			HCV			TP		
x	s	Cutoff	x	s	Cutoff	x	s	Cutoff	x	s	Cutoff
0.13	0.06	0.31	0.17	0.09	0.44	0.21	0.05	0.36	0.15	0.09	0.42

2.3　与 ELISA 试剂盒检测相关参比品的比较

ELISA 试剂盒检测 HBV、HIV、HCV 和 TP 4 种国家参比品符合率分别为 96.25%、90%、96.25%、93%。多元蛋白微阵列法检测 HBV、HIV、HCV 和 TP 4 种国家参比品符合率分别为 95%、87.5%、95%、93%。见表 2。用统计学的配对计数资料检验得出：$\chi^2 = 0.5$，$P = 0.125$，说明两种方法检测结果无统计学差异。见表 3。

表 2　两种方法检测国家参比品的比较

检测方法	HBV		HIV		HCV		TP	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
微阵列	39/40	38/40	19/20	17/20	38/40	39/40	9/10	19/20
ELISA	38/40	38/40	17/20	18/20	38/40	38/40	9/10	19/20

表 3　两种方法检测国家参比品的比较

微阵列	ELISA		合计
	+	-	
+	15	1	16
-	1	213	214
合计	16	214	230

2.4　线性范围测定

蛋白微阵列法检测 HBV、HIV、HCV 和 TP 四种定值血清，检测范围分别为 10～150 ng/ml、20～80 ng/ml、10～320 ng/ml、2～4 NCU/ml(临检中心单位/ml)。

2.5　敏感性实验

蛋白微阵列法检测 HBV、HIV、HCV 和 TP 四种定值血清，最低检测限分别为 1 ng/ml、10 ng/ml、5 ng/ml、1 NCU/ml。

2.6　重复性实验

分别取 HBV(10 ng/ml)、HIV(20 ng/ml)、HCV(10 ng/ml)和 TP(2 NCU/ml)的定值血清同时重复测定 8 次，批内变异系数分别为 4.92%、8.96%、7.27%、4.95%；再取上述定值血清每天测定 1 次，共 8 次。批间变异系数分别为 18.25%、14.02%、10.14%、16.69%。结果显示 HBV 和 TP 未能达到国家卫生部对诊断试剂批间差异要求(国家标准为≤15%)。

2.7　特异性实验

蛋白芯片检测 HBV、HIV、HCV 及 TP 参比品结果如下：HBV 阳性参比品 1 份为 HCV 阳性；HCV 阳性参比品 1 份为 HIV 阳性；TP 阳性参比品 1 份为 HIV 阳性；HIV 阳性参比品 2 份为 HCV、TP 同时阳性；其他血液传播性疾病 HAV、HEV、GBV-C、GMV、TTV 呈阳性的血清合计 32 份，结果多元蛋白芯片与 HAV、HEV、GBV-C、GMV、TTV 无交叉反应。

3　讨论

生物芯片是 20 世纪 90 年代发展起来的一种新的技术平台，具有集成化、高密度、高通量的优势。根据固相载体上固定的生物分子的不同，可以将生物芯片划分为基因芯片或 DNA 芯片、蛋白芯片以及芯片实验室(Lab-on-Chip)。随着研究的进一步深入，蛋白芯片或蛋白微阵列已广泛应用于许多研究领域[1-3]。目前，应用蛋白微阵列实现生物医学多参数的同步检测，成为生物医学检测的主流。蛋白微阵列运用于医学检验，则是结合了微阵列的高通量、集成化和免疫检测技术的灵敏、特异的优点，可以方便、快速并且准确地大批量多样本、多项目平行检测[4]。

在前实验单张芯片检测两种抗体中，我们是在固

相玻片载体上，利用化学共价键结合的方法，固定上待测抗体的相应抗原，用来检测特异性抗体。目前在检验领域，在同一个检测系统中需要解决同时检测抗原和抗体。本研究在前实验研究的基础上采用双抗体夹心法，检测时将含有 HBsAg 的血清加入反应池中，反应后清洗掉未结合的 HBsAg，再加入相应的酶标记抗体，形成固定抗体-检测物-标记抗体的夹心式结构来检测特异性抗原。

本实验将四种病原体集成在一起，制成可同时检测抗体和抗原的蛋白免疫的芯片，从而使诊断更方便、更快捷。在检测结果中发现，HBV 阳性参比品 1 份为 HCV 阳性；HCV 阳性参比品 1 份为 HIV 阳性；TP 阳性参比品 1 份为 HIV 阳性；HIV 阳性参比品 2 份为 HCV、TP 同时阳性。国外已有关于 HCV 和 H IV 合并感染的报道[5]，目前其发病原因尚没有有效的说法，二者协同感染和密切相关原因可能与以下因素有关：①二者有共同的及重要的传播途径，即体液（包括血液）传播；②HCV 和 HIV 感染后都是因为免疫反应而引起机体免疫力降低，从而引发并发症。加之相同的反应中介物，从而导致相合性感染。当然这里也不排除是由于几份样本相互混合的原因。另外在蛋白质微阵列检测过程中，各抗原之间始终存在的交叉反应还有许多的研究工作要做。

参考文献：

[1] Weller M G. Classification of protein microarrays and related techniques[J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 375(1): 15-17.

[2] Krska R, Janotta M. Technology and applications of protein microarrays[J]. Anal Bioanal Chem, 2004, 379(3): 338-340.

[3] Espina V, Woodhouse E C, Wulfkuhle J, *et al*. Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies[J]. J Immunol Methods, 2004, 290(1-2): 121-133.

[4] 黄 辉，郑小林，蒲晓允. 微流控芯片技术在生物学中的应用[J]. 重庆医学，2006，35(10)：950-952.

[5] Eyster M E, Diamondstone L S, Lien J M, *et al*. Natural history of hepatitis C virus infection in multitransfused hemophiliacs: effect of coinfection with human immunodeficiency virus. The Multicenter Hemophilia Cohort Study[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 1993, 6(6): 602-610.

（编辑 陈聪连）

（上接 2079 页）

表 1 癌症合并 DM 患者营养治疗前后血糖水平（mmol/L）

组别	n	空腹	餐后 2 h
化-放疗组	115		
治疗前		6.78±2.13	11.39±4.68
治疗后		5.89±1.23	6.68±2.73[a]
手术组	40		
治疗前		6.31±1.21	11.33±1.0
治疗后		5.20±1.75[a]	6.62±0.91[a]

a：$P<0.05$，与治疗前比较

3 讨论

对于癌症患者的营养支持问题历来存在着不同意见，对于癌症合并 DM 患者的饮食控制也存在模糊认识。癌症是一种慢性消耗性疾病，癌症患者基础代谢率高于正常，而癌症伴有 DM 时更易发生代谢紊乱，并可使分解代谢增加 20% 以上[3]。英国 Bkurtz[4] 指出：即使某些病例可使癌细胞迅速增加，但营养治疗对癌症的疗效，远远超过了癌细胞的生长速度。因此，营养治疗和放、化疗同样重要。癌症伴有 DM 的患者，合理的膳食在治疗中起着举足轻重的作用，控制饮食，合理营养是治疗癌症合并 DM 的基础[5]。

肠内营养时，应尽量选用血糖指数低的、少刺激的流质饮食。我们选用益力佳和纽纯素作为糖尿病专用肠内营养支持配方，因益力佳含有能量缓释系统和高单不饱和脂肪酸，能更好的控制总体代谢水平，改善血脂和血糖应答反应，降低胰岛素需要量，减少患大血管疾病的危险性。纽纤素不仅可提供人体所需各种营养素，还含有较多的膳食纤维，能减缓餐后葡萄糖的吸收，有利于 DM 患者血糖水平的控制。

癌症合并 DM 患者，由于放射治疗使血糖应激性升高不易控制，导致酮症酸中毒。同时由于放疗造成饮食减少，代谢消耗增加，容易出现低血糖反应。因此要加强血糖的检测与控制。本组患者在化疗、放疗前，给予饮食控制或饮食控制基础上加服降糖药物或注射胰岛素，较好的控制了血糖水平，使患者能顺利完成化疗和放疗。外科手术的患者，手术后由于激素分解增加、反馈性抑制胰岛素的分泌、出现胰岛素抵抗，甚至导致患者已存在的胰岛素分泌障碍，在术后出现分泌衰竭[6]，加重了代谢紊乱。本研究手术组患者，术前 1～2 周停服降糖药，改用正规胰岛素，纠正高血糖和酮症。术后用胰岛素控制血糖或在静脉营养 3 L 袋中加入胰岛素，一般 4～6 g 糖加胰岛素 1 U，使血糖调控在 5.5～8.3 mmol/L[7]，尿糖阴性～(+)，有效的防止了酮症酸中毒及严重感染的发生。在肠外支持中，补充适量维生素、微量元素，纠正水、电解质及酸碱失衡，防治各种并发症；尽快恢复饮食，也是不容忽视的问题。

总之，合理的营养支持将有助于癌症合并 DM 患者的血糖控制，有效改善其营养状况，提高生活质量和对化疗、放疗、手术的耐受性。

关键词：癌症；糖尿病；营养治疗

中图法分类号：R459.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] 黄孟珍，杨建英. 癌症病人伴糖尿病的饮食问题探讨[J]. 护士进修杂志，2001，16(9)：653-654.

[2] 廖二元，超楚生. 内分泌学[M]. 北京：人民卫生出版社，2001：1414.

[3] 陈仁寿. 现代临床营养学[M]. 北京：人民军医出版社，1996：49.

[4] Bkurtz R, Owens N S 著. 陈少先译. 癌症护理[M]. 淮化：安徽淮安矿务局矿工总医院出版，1984：50.

[5] 梅笑群，石元刚. 黄芪多糖和大豆异黄酮对糖尿病大鼠糖代谢的影响[J]. 第三军医大学学报，2007，29(5)：416-418.

[6] 李 宁. 糖尿病围手术期 TPN 应用问题[J]. 中国实用外科杂志，1999，19(3)：139-141.

[7] 宋 军，安庆茂，王 剑. 胃肠恶性肿瘤合并糖尿病围手术期的肠外营养支持探讨[J]. 肠外与肠内营养，2004，11(1)：29-30，35.

（编辑 龙 亮）