

同时检测血清中多种抗体的蛋白质微阵列研究*

丁亚平¹⁾ 陈立炎¹⁾ 张 文¹⁾ 曹恒杰¹⁾ 倪世明¹⁾
周枚芬¹⁾ 梁 好¹⁾ 凌志光¹⁾ 耿永尧¹⁾ 王升启^{2)**}

(¹⁾深圳益生堂生物企业有限公司, 深圳 518026; (²⁾军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 建立一种用蛋白质微阵列法可同时检测血清中艾滋病毒 (HIV)、丙型肝炎病毒 (HCV) 和梅毒螺旋体 (TP) 抗体的方法. 将基因工程 HIV、HCV 和 TP 3 种融合抗原共价结合于固相载体玻片上, 制成蛋白质微阵列, 血清样本经稀释、加样、孵育、洗涤后, 加上 Cy3 荧光标记二抗, 洗涤, 激光共聚焦扫描, 将获得的图片用 Bio-discover 公司的 Imagene 专用分析软件进行分析, 所获数据在经过自行编写的软件, 根据 Cutoff 值自动生成判断结果. 用此蛋白质微阵列系统检测了 400 例阴性血清, 确定了 Cutoff 值, 检测中国药品生物制品检定研究所的 HIV、HCV 和 TP 3 种参比品, 并与 3 种 ELISA 试剂盒的结果进行了比较. 蛋白质微阵列的艾滋病毒阳性和阴性符合率均为 100% (20/20); 丙型肝炎病毒阳性和阴性符合率均为 95% (38/40). 梅毒螺旋体参比品阳性符合率为 100% (10/10), 阴性符合率为 100% (20/20), 蛋白质微阵列与三种 ELISA 试剂检测国家 HIV、TP、HCV 参比品 (共 150 份血清样本), 结果具有高度的符合率.

关键词 蛋白质微阵列, 检测, 艾滋病毒, 丙型肝炎病毒, 梅毒螺旋体

学科分类号 Q331

生物芯片的设计思想是将大量的 DNA 等检测配基固相结合于一块很小的固相载体上, 从而实现在一块芯片上做一次实验, 就可以完成以往需要多次实验所能得到的检测结果.

在生物芯片研制方面有多种技术思路. 包括在玻片表面, 附着微凝胶颗粒, 再将寡核苷酸固定在凝胶上形成 DNA 微阵列^[1]; Affymetrix 公司研制了 DNA 固相合成基因芯片^[2, 3]. 更加复杂的芯片技术, 使过去在一个实验的各个实验步骤, 微缩于一个芯片上, 这种技术被称为芯片实验室^[4, 5].

目前最为简便实用的生物芯片制造方法, 是通过机器人点样系统生产的以玻片为固相载体的芯片. 该方法不需要原位固相合成, 只需要将事先合成的寡核苷酸探针、通过 PCR 扩增, 克隆产生的 cDNA 文库或者基因表达的蛋白质产物, 通过机器人点样系统的微型点针或喷针, 按照一定的排列方式点到玻片的表面, 形成微矩阵^[6, 7].

根据固相载体结合的是核酸或是蛋白质, 可将生物芯片分为 DNA 芯片和蛋白质芯片. 芯片技术与传统的免疫技术相结合检测病原微生物是一种全新的检测方法, 它集芯片技术的高通量, 多靶位和免疫技术的灵敏度高、特异性好于一体, 可将多种检测项目集中于一块芯片上^[8, 9].

当前艾滋病毒、丙型肝炎病毒和梅毒螺旋体的

检测主要采用酶免疫学方法 (ELISA) 和重组蛋白质印迹 (RIBA) 法, 前者用于初选筛查, 后者用于确证, 操作比较繁琐. 用蛋白质微阵列法检测多种微生物的感染, 从文献报道上来看还处于方法学的摸索阶段^[10, 11].

本文用蛋白质微阵列法同时检测血清中的艾滋病毒、丙型肝炎病毒和梅毒螺旋体抗体, 在蛋白质微阵列的制备, 反应系统的优化, 荧光信号数据处理等方面做了一些有益的探索, 为蛋白质微阵列技术在临床方面应用提供了一套参考方案.

1 材料与方法

1.1 材料

载玻片: ERIE Scientific 公司产品. 氨基硅烷试剂 (3-aminopropyltriethoxysilane): Sigma 公司产品. 戊二醛: Sigma 公司产品. 丙型肝炎病毒 (HCV) 和梅毒螺旋体 (TP) 融合抗原由军事医学科学院基础医学研究所分子病毒研究室与深圳益生堂生物企业有限公司共同研制; 艾滋病毒 (HIV) 融合抗原由中国预防医学科学院病毒学研究所毕胜

* 国家自然科学基金重点项目 (39889001) 以及军队杰出人才基金项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931422, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2001-12-04, 接受日期: 2002-01-23

利教授提供. Cy3 荧光标记的兔抗人 IgG F_C 段抗体购于 Sigma 公司. 小牛血清: 杭州四季青公司. HIV, HCV 抗体的 ELISA 检测试剂盒购于华美生物工程公司, 批号分别为 20000602, 20000402. TP 抗体的 ELISA 检测试剂盒购于金伟凯生物技术有限公司, 批号为 20010318. 3 种试剂盒均通过中国药品生物检定研究所批检合格. 中国药品生物检定研究所的 HIV (I / II) 和 TP 的 ELISA 抗体检测参比品生产日期为 2000 年 5 月, HCV 的 ELISA 抗体检测参比品生产日期为 2001 年 3 月. 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 蛋白质微阵列的制备: 在 Yoshioka 等^[12]的方法基础上稍加改进, 具体步骤为: 载玻片的预处理: 将玻片分别用强碱和浓硫酸浸洗; 双蒸水冲洗, 晾干. 玻片氨基化: 将清洗后的玻片浸入 2% 的氨基硅烷乙醇溶液中, 室温作用 30 min, 用乙醇冲洗, 晾干. 玻片醛基化: 将氨基化玻片浸入 2.5% 戊二醛的 0.1 mol/L, PBS (pH 7.2) 溶液中, 室温作用 2 h, PBS 冲洗, 晾干. 抗原点样: 将有 10 个孔的隔栅膜贴覆于玻片表面, 粘牢, 将 3 种融合抗原及人 IgG 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.0) 配成 25 mg/L 的浓度, 用 Cartesian 机器人点样系统将 3 种融合抗原及人 IgG 按一定排列矩阵喷点于玻片的每孔中. 37 °C 孵育 2 h. 洗涤与封闭: 将玻片用 PBS-T (0.01 mol/L 磷酸盐, pH 7.2, 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20) 洗涤 4 次, 10 s/次, 晾干后再用 10% 的小牛血清 PBS (0.01 mol/L 磷酸盐, pH 7.2, 0.9% NaCl) 37 °C 封闭 2 h. 洗涤, 晾干备用.

1.2.2 检测操作: 将检测血清或血浆用样本稀释液稀释 10 倍, 加入蛋白质微阵列反应孔中, 每个蛋白质微阵列的下方左右两孔分别加入阳性和阴性对照. 37 °C 孵育 30 min, 洗涤 4 次, 10 s/次. 每孔加入 Cy3 荧光标记的兔抗人 IgG, 37 °C 孵育 30 min. 洗涤 4 次, 10 s/次.

1.2.3 激光共聚焦扫描荧光信号数据处理: 经加样检测操作后的玻片用 Scanarray3000 型激光共聚焦扫描仪扫描成像, 扫描仪的激光强度设定为 60% ~ 80%, 光电倍增管强度设定为 80%.

1.2.4 图像处理及荧光信号数据分析: 扫描后的图象用 Imagen 图象分析软件对图形进行分析, 获得含有每个抗原点荧光强度值的 TXT 文件, 再用本室编写的数据分析软件自动处理 TXT 文件上的

各点荧光强度数值, 得出每孔内 3 种抗原检测的抗体荧光强度的均值与阴性孔内相应抗原荧光强度均值的比值的对数值, 以此数值作为确定 Cutoff 值或确定阴性或阳性的参考值.

1.2.5 400 份正常人血清的检测和 Cutoff 值的确定: 400 份正常人血清来自 301 医院的健康人体检, 按照上述方法进行检测操作, 最终得出每份血样的 3 种抗原与阴性对照的对数值, 取这些数值的平均数, 计算标准差, 以均值加上 3 倍标准差作为每种抗原的 Cutoff 值.

1.2.6 蛋白质微阵列法检测中国药品生物制品检定研究所 HIV、TP 和 HCV 3 种抗体检测参比品与 ELISA 试剂的结果比较. 3 种参比品中 HIV 阴阳性参比品各有 20 份; TP 的阳性参比品有 10 份, 阴性参比品有 20 份; HCV 的阴阳性参比品各有 40 份, 共有 150 份参比品, 按上述操作检测这 150 份参比品, 并与 3 种 ELISA 试剂盒分别检测的结果进行比较, 结果用卡方检验判断两种方法的符合率.

2 结 果

2.1 微阵列外观, 抗原排列矩阵模式及检测示例

经醛基化处理的玻片, 表面覆以隔栅, 形成 10 个检测孔, 其中第 10 号孔为阴性对照孔, 检测时, 其他孔样品的荧光强度与阴性孔中相应的抗原荧光强度相比后, 取对数值, 再与 Cutoff 值相比较, 从而判定样本的阴阳性 (图 1).



Fig 1 Appearance of the protein microarray

图 2 显示每孔中, 各抗原及人 IgG 坐标点的排列矩阵模式: 右侧横框三排从上到下依次为 TP、HIV 和 HCV 融合抗原, 每种抗原点 4 个点, 左侧竖框 3 个点为人 IgG 坐标点, 任何样品检测后坐标点均应显示较强的荧光.

图 3 为国家参比品检测后 Scanarray3000 激光共聚焦扫描图象, 激光强度设为 80%, 光电倍增管

(PMT) 参数设为 80%, 1~10 号各孔依次所加样本为 P1 (TP 参比品), N4, P9, N5, P16, N16, P17, N19, P18 (HIV 参比品), 阴性对照。

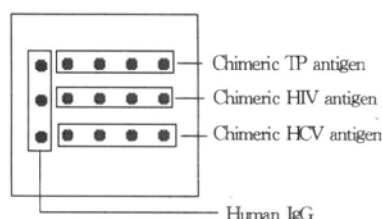


Fig. 2 The array model of the three antigens and human IgG

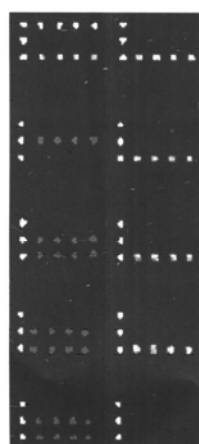


Fig. 3 Scanning image of several HIV samples from national panel

2.2 400 份正常人血清的检测和 Cutoff 值的确定

按照操作方法检测 400 例健康人血清样本, 并用激光共聚焦扫描, 经软件分析后, 得到每份血清样本 3 种抗原与相应阴性对照相比的对数值, 计算每种抗原 400 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。结果见表 1。

Table 1 The detecting result of 400 samples from healthy person and Cutoff value

HIV			TP			HCV		
AV	SD	Cutoff	AV	AV	Cutoff	AV	SD	Cutoff
0.12	0.07	0.33	0.17	0.08	0.41	0.15	0.09	0.42

AV: average value. SD: standard deviation.

2.3 与 ELISA 试剂检测相关参比品的比较

蛋白质微阵列法和 ELISA 试剂盒检测 HIV、TP 国家参比品阴阳性符合率均为 100%, 蛋白质

微阵列法检测 HCV 国家参比品阳性第 37, 40 号样品未检出, 阴性第 8, 18 号为假阳性, 而 ELISA 试剂盒阳性参比品的第 17 号未检出, 阴性第 8, 18 号为假阳性。蛋白质微阵列和试剂盒均能达到检测要求。结果见表 2。

Table 2 Comparison of tow method in detecting three national panels

	HIV		TP		HCV	
	positive	negative	positive	negative	positive	negative
Microarray	20/20	20/20	10/10	20/20	38/40	38/40
ELISA	20/20	20/20	10/10	20/20	39/40	38/40
Qualified index	20/20	19/20	10/10	20/20	38/40	38/40

2.4 与 ELISA 试剂检测非相关参比品的比较

2.4.1 蛋白微阵列法与 HIV ELISA 试剂盒, 检测 TP 及 HCV 参比品结果的比较: 蛋白质微阵列法和 HIV ELISA 试剂盒检测 HCV、TP 国家参比品时, 蛋白质微阵列法检测 HCV 国家参比品阳性第 38、39 号样品为 HIV 抗体阳性, 而 HIV ELISA 试剂检测 HCV 阳性参比品的第 39 号为阳性, 其他检测结果均为阴性。用统计学的配对计数资料 χ^2 检验得出: $\chi^2 = 0$, $P > 0.05$, 说明两种方法检测结果无统计学差异。结果见表 3。

Table 3 Comparison of microarray and HIV ELISA kit in detecting TP and HCV national panels

microarray	HIV ELISA kit		SUM
	+	-	
+	1	1	2
-	0	108	108
SUM	1	109	110

2.4.2 蛋白质微阵列法与 TP ELISA 试剂盒检测 HIV 及 HCV 参比品结果的比较: 蛋白质微阵列法和 TP ELISA 试剂盒检测 HCV、HIV 国家参比品时, 蛋白质微阵列法检测 HCV 国家参比品阳性第 8、30、33、34、35 号样品为 TP 抗体阳性, 检测 HIV 国家参比品阳性第 4, 19 号样品为 TP 抗体阳性; 而 TP ELISA 试剂盒检测 HCV 阳性参比品的第 8、33、34 号为阳性, 检测 HIV 国家参比品阳性第 19 号样品为阳性, 其他检测结果均为阴性。用统计学的配对计数资料 χ^2 检验得出: $\chi^2 =$

1.33, $P > 0.05$, 说明两种方法检测结果无统计学差异, 结果见表 4.

Table 4 Comparison of microarray and TP ELISA kit in detecting HIV and HCV national panels

Microarray	TP ELISA kit		SUM
	+	-	
+	4	3	7
-	0	113	113
SUM	4	116	120

2.4.3 蛋白质微阵列法与 HCV ELISA 试剂盒检测 TP 及 HIV 参比品结果的比较: 蛋白质微阵列法和 HCV ELISA 试剂盒检测 TP、HIV 国家参比品时, 蛋白质微阵列法检测 HIV 国家参比品阳性第 1~6、8、12~18 号样品为 HCV 抗体阳性, 阴性参比品第 1~9、11、14~20 号样品为 HCV 抗体阳性; 检测 TP 国家参比品阳性第 1、2、3、4、6 号样品为阳性; 而 HCV ELISA 试剂盒检测 HIV 阳性参比品的第 1~6、8、12~18 号为阳性, 阴性参比品第 1~9、11、14~19 号样品为 HCV 抗体阳性; 检测 TP 国家参比品阳性第 1、2、3、4、6 号样品为阳性, 其他检测结果均为阴性. 用统计学的配对计数资料 χ^2 检验得出: $\chi^2 = 0$, $P > 0.05$, 说明两种方法检测结果无统计学差异, 结果见表 5.

Table 5 Comparison of microarray and HCV ELISA kit in detecting HIV and TP national panels

Microarray	HCV ELISA kit		SUM
	+	-	
+	35	1	36
-	0	34	34
SUM	35	35	70

3 讨 论

蛋白质微阵列的多指标检测模式, 不仅可以节省劳动力, 另一个优势在于这种“并行”的检测模式, 可以克服各指标间由于单项检测时间差和实验操作差异造成的检测结果的不同步, 从而能够真实地反应机体在某个时间点上的整体运作机理; 例如在蛋白质组学研究方面, 需要将同一个细胞或组织

的所有功能蛋白同时结合在一个固相载体上进行检测, 从而了解各蛋白质间的相互作用; 在临床病理指标变化的监测方面, 需要对心肌梗塞病人进行多种酶的同步检测, 对自身免疫性疾病进行自身抗体谱的检测, 肿瘤的筛选和病情监测需要对多项肿瘤标志物进行检测.

本文用蛋白质微阵列法检测了 400 例健康人血清, 确定了 Cutoff 值; 检测国家 HIV、TP、HCV 三套 ELISA 参比品, 结果显示: 蛋白质微阵列无论是与参比品本身还是与 ELISA 试剂盒检测结果都有极高的符合率. 蛋白质微阵列法只需进行 150 次样本的检测操作, 而 ELISA 试剂盒得出同样的结果需进行 450 次样本检测操作, 前者的检测效率远高于后者. 在检测结果中发现, TP 和 HIV 参比品中有 36 份样本为 HCV 阳性, 其中有 14 份 HIV 和 HCV 同时为阳性, 5 份 TP 和 HCV 同时为阳性, 并且 HCV 往往为强阳性 (荧光强度值大于 1.0), 这里不排除是由于两份样本相互混合的原因. 另外在蛋白质微阵列检测过程中, 各抗原之间存在交叉反应始终是研制过程中所担心的, 从检测结果看, 每种抗体单独阳性时并不会使其余两种显示阳性. 这从 ELISA 结果也能得到印证.

本文选择了人 IgG 抗体作为蛋白质微阵列多项检测的模式, 检测是针对不同抗原的同种抗体, 二抗荧光标记物为一种抗人 IgG, 而蛋白质微阵列多指标检测的模式还应包括不同抗原性的多种指标的检测, 例如, 多种肿瘤标志物, 多种病原微生物抗原等等, 这方面还有许多探索性的工作要做, 例如可将生物素和荧光标记的分支 DNA, 或将免疫组化中的 ABC 法引入芯片检测, 从而提高灵敏度和线性范围等等.

参 考 文 献

- 1 Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, *et al.* DNA analysis and diagnostic on oligonucleotide microchips. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (10): 4913~4918
- 2 McCall G, Labadie J, Brock P, *et al.* Light-directed synthesis of high density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (23): 13555~13560
- 3 Lipshutz R J, Fodor S P A, Gingeras T R, *et al.* High density sythetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics*, 1999, **21** (Suppl): 20~24
- 4 Chiem N, Harrison D J. Microchip systems for immunoassay: an integrated immunoreactor with electrophoretic separation for serum theophylline determination. *Clin Chem*, 1998, **44** (3): 591~598
- 5 von Heeren F, Verpoorte E, Manz A, *et al.* Micellar electrokinetic chromatography separations and analyses of biological samples on a cyclic planar microstructure. *Anal Chem*, 1996, **68**

- (13): 2044~ 2053
- 6 Cheung G V, Morley M, Aguilar F, *et al.* Making and reading microarrays. *Nature Genetics*, 1999, **21** (Suppl): 15~ 19
 - 7 Shalon D, Smith S J, Bron P A, *et al.* A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using tow-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res*, 1996, **6** (7): 639~ 645
 - 8 Ekins R P, Chu F W. Mutianalyte microspot immunoassay-microanalytical "compact disk" of the future. *Clin Chem*, 1991, **37** (11): 1955~ 1967
 - 9 Mendoza L G, McQuary P, Mongan A, *et al.* High-throughput microarray-based Enzyme-Linked immunosorbent assay. *Biotechniques*, 1999, **27** (4): 778~ 788
 - 10 Rowe C A, Tender L M, Feldstein M J, *et al.* Array biosensor for simultaneous identification of bacterial, viral, and protein analytes. *Anal Chem*, 1999, **71** (17): 3846~ 3852
 - 11 Silzel J W, Cercek B, Dodson C, *et al.* Mass sensing, mutianalyte microarray immunoassay with imaging detection. *Clin Chem*, 1998, **44** (9): 2036~ 2043
 - 12 Yoshioka M, Yukarimukai J. Immobilization of ultra-thin layer of monoclonal antibody on glass slide. *Chromatography*, 1991, **566** (2): 361~ 368

Studies on Simultaneously Detecting Multiple Antibodies in The Serum Using Microarray*

DING Ya-Ping¹⁾, CHEN Li-Yan¹⁾, ZHANG Wen¹⁾, CAO Heng-Jie¹⁾, NI Shi-Ming¹⁾,
ZHOU Mei-Fen¹⁾, LIANG Hao¹⁾, LING Zhi-Guang¹⁾, GENG Yong-Yao¹⁾, WANG Sheng-Qi^{2)**}

¹⁾ *Yishengtang Biological Products Corporation Limited, Shenzhen 518026, China;*

²⁾ *Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)*

Abstract An optimized method has been established to simultaneously detect multiple antibodies of HIV, TP and HCV in the serum by the way of microarray. Chimeric antigens of HIV, TP and HCV are covalently bound to the surface of glass slide; serum samples are diluted and added to the well of microarray, unbound antibodies are washed away after incubation, and Cy3 labeled second antibody is added to the well followed by incubation and washing. The microarray is scanned by laser confocal scanner, and the resulting images are treated by the software of Imogene (produced by Bio-discover Co.). The data obtained is then treated by the software produced by own; the evaluated result of each sample is finally gained automatically by the Cutoff value of each antigen. 400 normal serum sample are detected and Cutoff value of each antigen are determined. National panels of HIV, TP and HCV had also been detected by this system and the results were compared with those detected by ELISA method. The coordinate ratios of positive and negative samples of HIV panel are both 100% (20/20); these kinds of the coordinate ratios of positive and negative samples of HCV are both 95% (38/40) and the coordinate ratios of positive and negative samples of TP are 100% (10/10) and 100% (20/20) respectively. This result is highly in accord with that of ELISA method.

Key words microarray, detection, HIV, HCV, TP

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China for Key Program (39889001) and The Foundation of Outstanding Person of the Army.

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931422, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

Received: December 4, 2001 Accepted: January 23, 2002