

丙型肝炎病毒分片段抗体检测 蛋白质芯片的制备及临床评价*

张 文^{1,2)} 周枚芬²⁾ 陈立炎²⁾ 丁亚平²⁾ 曹恒杰²⁾ 黄 坚²⁾ 耿永尧²⁾ 王升启¹⁾**

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

摘要 为了制备丙型肝炎病毒分片段抗体检测蛋白质芯片, 并对其临床应用价值进行评价, 将基因工程表达的丙型肝炎病毒分片段抗原, 点至经特殊处理的玻片上, 制成蛋白质芯片. 收集来自三家临床单位用于临床验证的 905 份血清标本. 分别用丙肝病毒分片段抗体检测蛋白质芯片、ELISA 丙肝病毒抗体检测试剂进行检测. 部分样本同时采用进口 RIBA 抗体检测试剂进行了检测, 分别比较蛋白质芯片法与 ELISA 法以及 RIBA 试剂的符合率. 结果表明: a. 905 份血清标本, ELISA 法检出阳性 294 份, 阴性 611 份. 阳性标本用蛋白质芯片法检测, 融合抗原 292 份显示阳性结果、2 份阴性结果, 根据蛋白质芯片的核心抗原, 以及 NS3, NS4, NS5 分片段抗原综合判断确定阳性样本 288 份阳性, 阴性样本 2 份, 4 份样本结果不确定. ELISA 法检出的 611 份阴性标本用两种蛋白质芯片法检测, 检出阴性均为 611 份. 两种蛋白质芯片法与 ELISA 法的阳性符合率分别为 99.3% 和 98.9%, 与 ELISA 法的阴性符合率均为 100%. 用 RIBA 试剂检测 6 份 ELISA 法为阳性, 蛋白质芯片法为非阳性的样本, 结果均为非阳性. b. 290 份经 RIBA 试剂确认的阳性标本 104 份, 单片段阳性标本 66 份, 阴性标本 120 份, 用蛋白质芯片法检测, 检出阳性标本 103 份, 单片段阳性标本 61 份, 阴性标本 126 份, 二者具有很高的符合率 ($P > 0.01$). 丙型肝炎病毒分片段抗体检测蛋白质芯片, 检测灵敏度和特异性高于 ELISA 法, 对血清样本的确认程度与进口的 RIBA 试剂高度一致, 具有操作简便, 费用低廉的特点, 是一种新型、高效的体外诊断试剂.

关键词 丙型肝炎病毒, 抗体, 蛋白质芯片, 临床评价

学科分类号 Q78

丙型肝炎是一种严重威胁人类健康的世界性血源性传染病, 加强血源及血液制品的监控是有效防止感染丙肝病毒的重要手段^[1].

目前, 检测丙肝病毒的方法有两类^[2]: 一是检测 HCV (丙型肝炎病毒) 抗体, 二是检测 HCV RNA. 由于检测 RNA 的实验室条件要求比较高, 操作复杂, 易产生假阳性反应, 并且价格昂贵、对实验人员要求高等原因, 限制了其在临床上的广泛应用. 现在普遍使用的仍为检测 HCV 抗体的方法, 其中以检测血清中抗-HCV 抗体的 ELISA 法较为普遍, ELISA 法主要的特点是操作简便, 检测快速, 但仍有不足之处, 主要是在低危人群中仍发现大量的不确定及假阳性结果. 由美国 Chiron 公司推出的用于验证 EIA 试验结果的确证试剂 (RIBA 试剂), 可以分别对 HCV 病毒的核心抗体、NS3、NS4、NS5 抗体进行检测, 提高了 HCV 抗体检测的特异性, 但由于其操作繁琐, 结果无量化且成本高昂, 限制其临床应用.

蛋白质芯片是伴随着基因芯片发展起来的一项新技术, 已开始应用于多个方面, 如蛋白质与蛋白质的相互作用, 蛋白质的亚细胞定位, 蛋白质的功

能等^[3~6]. 蛋白质芯片已成功地应用于多种细胞因子^[7], 自身免疫性疾病^[8]及过敏原^[9]等的检测.

本文以经过化学修饰的载玻片为固相基质, 将 HCV 的融合抗原、核心抗原、非结构区的 NS3、NS4、NS5 抗原, 经过机器人点样系统按一定顺序点至玻片上, 制成丙型肝炎病毒分片段抗体检测蛋白质芯片. 并通过对病理标本的检测进行了临床验证. 结果表明, 蛋白质芯片的检测灵敏度和特异性高于 ELISA 法, 对血清样本的确认程度与进口的 RIBA 试剂一致, 具有操作简便, 费用低廉的特点, 是一种新型、高效的体外诊断试剂.

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

载玻片 (ERIE Scientific 公司), 氨基硅烷 (Sigma-Aldrich 公司), 戊二醛 (Sigma-Aldrich

* 国家自然科学基金重点资助项目 (39889001), 军队杰出人才基金项目和国家高技术“863”计划资助项目 (2002AA2Z2032).

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2003-04-18, 接受日期: 2003-05-28

公司). HCV 融合抗原、HCV 核心抗原、NS3、NS4、NS5 抗原 (军事医学科学院制备). 人 IgG (华美生物工程公司). 点样仪 (Cartisian 公司). 酶标仪 (Wallac, 1420 multilable counter). 扫描仪 (ScanArray 3000).

丙型肝炎病毒分片段抗体检测试剂盒 (蛋白质芯片), 由军事医学科学院放射医学研究所与深圳益生堂生物企业有限公司联合生产 (产品批号为 20001028 及 20001228). Chiron RIBA HCV 3.0 SIA (产品批号为 QA 7498). 丙肝病毒抗体 ELISA 检测试剂由华美生物工程公司生产 (批号 20001023).

1.2 标本来源

本次临床考核的血清或血浆标本分别由浙江大学医学院附属第一医院、解放军 302 医院、北京市红十字血液中心三家单位各自收集、编号、保存 (-20°C). 来源于浙江大学医学院附属第一医院的临床标本 490 份; 来源于中国人民解放军 302 医院的临床标本 298 份; 来源于北京市红十字血液中心提供的血清标本 407 份. 由于某些标本的质量问题, 实验标本总数为 905 份.

1.3 蛋白质芯片的制备

1.3.1 载玻片 (ERIE Scientific co.) 的预处理: 参照 Yoshioka 等的方法并加以改进, 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 (Sigma-Aldrich Co.) 乙醇溶液中, 室温作用 30 min, 用乙醇冲洗, 晾干. 玻片醛基化: 将氨基化玻片浸入含 2.5% 戊二醛 (Sigma-Aldrich Co.) 的 0.1 mol/L PBS (pH 7.2) 溶液中, 室温作用 2 h, PBS 冲洗, 晾干, 上述操作均在室温下完成.

1.3.2 抗原点样: 将有 10 个孔的隔栅膜贴覆于玻片表面, 粘牢, 将基因工程表达的 HCV 融合抗原, HCV 核心抗原, NS3、NS4、NS5 抗原及人 IgG 分别用 0.01 mol/L PBS (pH 7.0) 配成 100 mg/L 的浓度, 用 Cartisian 机器人点样系统将各种 HCV 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.

1.3.3 洗涤与封闭: 将玻片用 PBS-T (0.01 mol/L PBS, pH 7.2, 0.05% Tween 20) 洗涤 4 次, 10 s/次, 晾干后再用含 10% 小牛血清的 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2) 37°C 封闭 2 h. 洗涤, 晾干备用.

1.4 样本检测

1.4.1 杂交检测: 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 (Sigma-aldrich Co.), 工作浓度为 1:400, 37°C 孵育 30 min. PBS-T 洗涤 4 次.

1.4.2 图像扫描: 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%.

1.5 临床验证

ELISA 试剂检测操作 (检测所有 905 份血清)、蛋白质芯片检测操作 (检测所有 905 份血清)、RIBA 检测试剂操作 (检测来源于北京市红十字血液中心提供的血清标本 407 份, 以及其他蛋白质芯片确认结果与 ELISA 法结果不符的血清样本) 均按说明书进行. 数据的统计学分析: 905 份血清样本的 ELISA 检测数据结果分别与蛋白质芯片法的融合抗原显示结果, 以及其余 4 种抗原的综合确认结果比较计算的符合率, 并通过 χ^2 分析, 判断数据间差异的显著性. 比较 407 份血清的蛋白质芯片确认结果与 RIBA 检测结果的符合率, 并通过 χ^2 分析, 判断数据间差异的显著性. 以 RIBA 试剂为判断标准, 验证蛋白质芯片与 ELISA 检测结果不符的血清样本.

2 结 果

2.1 丙型肝炎病毒分片段抗体检测蛋白质芯片的制备

制备的蛋白质芯片各抗原矩阵、点阵图以及样本检测结果分别见图 1, 图 2 和图 3.



Fig. 1 The appearance of the protein-microarray

There are 10 wells on each slide. The 10th well is the negative control well.

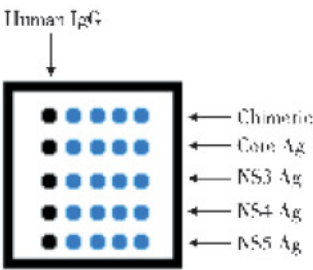


Fig. 2 The array model of different HCV antigen in each well
Chimeric, Core, NS3, NS4 and NS5 antigens are arrayed in four points on five lines. There are five human IgG points on the left side.

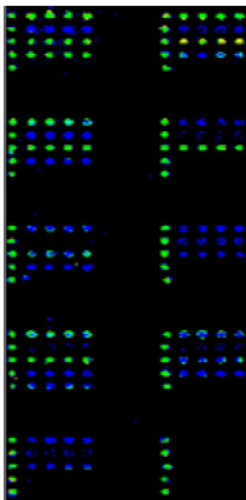


Fig. 3 Examples of scanning imagine

2.2 各抗原片段 Cutoff 值的确定

按照操作方法检测 400 例健康人血清样本，并用激光共聚扫描，经软件分析后，得到各种 HCV 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（表 1）。

2.3 ELISA 法和蛋白质芯片法检测 905 份血清样本的结果比较

分别用 ELISA 法和蛋白质芯片法检测来自三家临床单位的 905 份血清样本，结果 ELISA 法检出阴性样本 611 份，阳性样本 294 份。294 份阳性标本中，蛋白质芯片的融合抗原检出阳性样本 292 份，阴性样本 2 份；611 份阴性样本中，蛋白质芯片的融合抗原检出阴性样本 611 份。统计学分析表明，蛋白质芯片的融合抗原检测法与 ELISA 法相比，阴性符合率为 100%，阳性符合率为 99.3%。ELISA 法检出的阳性样本 294 份中，根据蛋白质芯片的核心抗原、NS3、NS4 以及 NS5 分片段抗原综合判断确定阳性样本 288 份阳性，阴性样本 2 份，不确定结果 4 份；ELISA 法检出的 611 份阴性样本中，蛋白质芯片的分片段抗原检出阴性样本 611 份。统计学分析表明，蛋白质芯片的分片段抗原检测法与 ELISA 法相比，阴性和阳性符合率分别为 100% 和 98.9%。

Table 1 Average value and standard deviation of each HCV antigens and their Cutoff value

Chimeric atigen			Core antigen			NS3 antigen			NS4 antigen			NS5 antigen		
AV	SD	Cutoff	AV	SD	Cutoff	AV	SD	Cutoff	AV	SD	Cutoff	AV	SD	Cutoff
0.17	0.08	0.42	0.15	0.09	0.42	0.22	0.07	0.45	0.10	0.10	0.42	0.29	0.07	0.50

AV: Average value. SD: Standard deviation.

2.4 6 份 ELISA 阳性而蛋白质芯片确认抗原检测为阴性样本的 RIBA 试剂检测结果

从表 2 和表 3 可见，以 ELISA 法检测阳性、蛋

白质芯片融合抗原检测与确认结果为阴性的 2 份标本，用 Chiron RIBA HCV 3.0 SIA 确认试剂进行了复检，结果为阴性；抗-HCVEIA检测阳性、蛋白

Table 2 Detection of the 6 samples which show positive and negative result by ELISA and protein-chip method respectively using RIBA reagent

6 samples	ELISA	Protein-chip	RIBA3.0	PCR
A23	+	IND	IND	/
A70	+	-	-	/
A71	+	IND	-	+
2 423	+	IND	IND	/
2 813	+	IND	IND	/
16	+	-	-	/

IND means indefinite.

质芯片检测确认结果可疑的 4 份标本, 用 Chiron RIBA HCV 3.0 SIA 确认试剂进行了复检, 其中 3 份标本仍为可疑结果, 1 份为阴性, 此份阴性标本用 HCV RNA PCR 进行检测为阳性.

Table 3 Comparison of protein-chip method and RIBA reagent method on detection of the former 6 samples by 4 different HCV antigens

	CORE		NS3		NS4		NS5	
	RIBA	Chip	RIBA	Chip	RIBA	Chip	RIBA	Chip
A23	+	+	-	-	-	-	-	-
A70	-	-	-	-	-	-	-	-
A71	-	-	-	+	-	-	-	-
2 423	+	+	-	-	-	-	-	-
2 813	-	-	+	+	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-

2.5 蛋白质芯片法和 RIBA 试剂检测 290 份血清样本的比较

北京市红十字血液中心 290 份经 ELISA 法检测弱阳性的血清样本, 分别用蛋白质芯片法和 RIBA 试剂进行检测, RIBA 试剂检测阳性标本 104 份, 单片段阳性标本 66 份, 阴性标本 120 份. 蛋白质芯片法对上述 290 份样品进行检测, 检出阳性标本 103 份, 单片段阳性标本 61 份, 阴性标本 126 份. 二者具有很高的-致性 ($P>0.05$).

3 讨 论

用丙型肝炎病毒分片段抗体检测蛋白质芯片试剂盒对 294 份 ELISA 法检测为阳性的血清进行检测, 288 份为阳性 (分片段抗体检测结果), 2 份标本蛋白质芯片检测初筛及确证结果均为阴性, 采用 Chiron RIBA HCV 3.0 SIA 试剂对上述 2 份标本进行检测, 结果为阴性; 4 份分片段检测确证结果可疑的标本, 用 Chiron RIBA HCV 3.0 SIA 试剂进行复检, 3 份可疑, 1 份阴性, 后者经 PCR 证实为阳性结果; 抗-HCV EIA 阳性伴 ALT 异常血清 46 份, 蛋白质芯片检测初筛及确证结果均为阳性. 上述结果说明丙型肝炎病毒分片段抗体检测蛋白质芯片具有良好的检测灵敏度, 可降低 ELISA 试剂检测的假阳性, 同时, 蛋白质芯片确证阳性的病例, 可充分说明病人的感染性及肝病的存在. 检测了三家单位 307 份抗-HCV EIA 阴性的其他肝病血清, 58 份自身免疫性疾病患者血清, 246 份正常人血清, 结果均为阴性, 说明该试剂与其他肝炎病毒抗体无交叉反应, 不受自身免疫性疾病等抗体的影响, 特异性好, 在临床诊疗中具有其应用价值.

在本次实验中, 通过对红十字血液中心的 290 份国内外抗 HCV EIA 初筛阳性的血液复检标本进行对比检测, 发现丙型肝炎病毒分片段抗体检测蛋白质芯片与进口 RIBA 确证试剂检测结果具有很高的-致性, 说明丙型肝炎病毒分片段抗体检测蛋白质芯片具有理想的检测准确率. 与这些国外确证试剂相比, 丙型肝炎病毒抗体蛋白质芯片检测试剂具有操作简便、样品用量少、结果可量化显示等优点, 适用于血站及血液制品单位使用. 该试剂盒使用了生物芯片这一新技术, 具有较强的扩充整合能力, 是未来诊断试剂的发展方向.

参 考 文 献

1 刘锡光. 病毒性肝炎实验诊断学. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 450~475

LIU X G. Laboratory Diagnostics of Viral Hepatitis. 2nd. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999. 450~475

2 郝 飞, 余宙耀. 丙型肝炎基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 241~269

HAO F, YU Z Y. Basis and Clinic of Hepatitis Virus C. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999. 241~269

3 Zhu H, Snyder M. Protein arrays and microarrays. Curr Opin Chem Biol, 2001, 5 (1): 40~45

4 Ross-Macdonald P C, Coelho P S, Romemer T, *et al.* Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. Nature, 1999, 402 (25): 413~418

5 Martzen M R, McCraith S M, Spinelli S L, *et al.* A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. Science, 1999, 286 (5): 1153~1155

6 Bussow K, Cahill D, Niefeld W, *et al.* A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. Nucleic Acids Res, 1998, 26 (21): 5007~5008

7 Huang R P, Huang R C, Fan Y, *et al.* Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system. Anal Biochem, 2001, 294

(1): 55 ~ 62

- 8 Joos T O, Schrenk M, Hopfl P, *et al.* A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis*, 2000, **21** (13): 2641 ~ 2650

- 9 Wiltshire S, O'Malley S, Lambert J, *et al.* Detection of multiple allergen-specific IgEs on microarrays by Immunoassay with rolling Circle amplification. *Clin Chem*, 2000, **46** (12): 1990 ~ 1993

Preparation and Clinical Evaluation of Protein-chip for Different HCV Antibody Detection *

ZHANG Wen^{1,2)}, ZHOU Mei-Fen²⁾, CHEN Li-Yan²⁾, DING Ya-Ping²⁾,
CAO Heng-Jie²⁾, HUANG Jian²⁾, GENG Yong-Yao²⁾, WANG Sheng-Qi¹⁾ **

(¹⁾ *Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China;*

(²⁾ *Yishengtang Biological Products Co., Ltd. Shenzhen 518026, China)*

Abstract To prepare and evaluate the clinical application of protein-chip for different HCV antibody detection, 905 serum samples were collected from three different hospitals. The samples were detected by ELISA method and protein-chip method respectively. Inconsistent samples were proved by imported HCV RIBA diagnostic kit. The results showed that (1) In all 905 serum samples, 294 positive samples and 611 negative samples were detected by ELISA method. Among the 294 positive samples, 292 positive samples and 2 negative samples were detected by chimeric antigen on the protein-chip and 288 positive samples, 2 negative samples, 4 indefinite samples were detected by the 4 segments of HCV antigens on the protein-chip. Among the 611 negative samples, 611 samples show negative result detected by chimeric antigen on the protein-chip and the 4 segments of HCV antigens on the protein-chip. The coordinate ratio of positive results are 99.3% and 98.9% respectively compared with ELISA method. The coordinate ratio of negative result are the same 100%. The 6 samples that were positive determined by ELISA method and non-positive by protein-chip method were detected with RIBA reagent. All the 6 samples show non-positive result. (2) 290 samples were detected with RIBA reagent. Among the 290 samples, 104 samples showed positive result, 66 samples showed positive result to single antigen segment, and 120 samples showed negative result. The 290 samples were also detected by protein-chip method. Among the 290 samples, 103 samples showed positive result, 61 samples showed positive result to single antigen segment, and 126 samples showed negative result. The result shows high coordinate ratio between the two methods ($P > 0.05$). It can be concluded that protein-chip reagent for detection of different HCV antibodies has higher sensitivity and specific than ELISA method and has the same accuracy as imported RIBA reagent. It will be a convenient and low costs reagent for diagnosis of HCV.

Key words hepatitis virus C, antibody, protein-chip, clinical evaluation

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China for Key Program (39889001), The Military Foundation for Outstanding People and State 863 High Technology R&D Project of China (2002AA2Z2032).

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

Received: April 18, 2003 Accepted: May 28, 2003