



PLA2R-IgG 间接荧光定量免疫层析分析的构建与应用*

张 艺^{1)**} 周 颖^{2)**} 周 衍¹⁾ 马 骥¹⁾ 叶 燕²⁾ 殷 皓²⁾

俞 蕾²⁾ 周 彬^{1,3)} 王春新^{2)***}

(¹⁾ 江苏省原子医学研究所, 国家卫生健康委员会核医学重点实验室, 江苏省分子核医学重点实验室, 无锡 214063;

(²⁾ 南京医科大学附属无锡人民医院医学检验科, 无锡 214023; (³⁾ 南京医科大学原子医学教学科研基地, 南京 211166)

摘要 目的 血清抗磷脂酶A2受体抗体IgG (PLA2R-IgG) 水平是诊断和治疗特发性膜性肾病 (IMN) 的重要依据, 而目前国内外常规检测手段主要是酶免法。为提升检测的便捷性, 同时满足灵敏、宽量程分析需求, 本研究构建了一种新的 PLA2R-IgG 检测技术。方法 采用包裹钬元素的微球示踪, 对反应步骤进行选择, 对微球制备液的 pH、微球-抗体反应比例和反应时间优化, 本文基于间接法构建了 PLA2R-IgG 的荧光定量免疫层析检测方法, 并进行了初步临床评价。结果 本方法的灵敏度达 0.7 RU/ml, 标准曲线方程为 $y=0.771x-1.437$, 相关系数 0.995, 线性测量范围为 0.7~1 500 RU/ml, 回收率为 86.27%~98.98%, 平均批内变异系数为 8.13%, 交叉反应率均小于 0.1%, 试剂 37°C 储存 10 d 稳定。本方法与市售酶免试剂盒相关性为 0.953, 阴阳性判断一致, 对 IMN 的检出率为 76.9%。结论 采用两步法反应的 PLA2R-IgG 间接荧光定量免疫层析分析, 快速、灵敏、准确, 具有临床实用性。

关键词 抗磷脂酶A2受体抗体, 免疫层析, 钬, IgG, 特发性膜性肾病

中图分类号 R-33

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0002

特发性膜性肾病 (idiopathic membranous nephropathy, IMN) 发病率在中国呈逐年上升趋势, 其诊断的金标准为肾脏活检^[1-2]。然而肾脏穿刺具有侵入性和复杂性, 需要操作专业的医护才能开展, 而且需要患者入院进行, 这使得 IMN 的准确诊断受到了局限。Beck 等^[3-4]发现 70% 以上的 IMN 患者体内存在磷脂酶 A2 受体 (phospholipase A2 receptor, PLA2R) 的抗体 IgG, 随着研究深入, 肾脏病权威组织“改善全球肾脏病预后组织 (Kidney Disease Improving Global Outcomes, KDIGO)”制定了 IMN 的临床实践指南, 提出血清 PLA2R-IgG 作为首要诊断依据, 根据测定结果再考虑是否活检^[5], 因此该指标的检测必要且关键。同时, PLA2R-IgG 水平与 IMN 疾病进程和缓解相关, 能够指导个性化用药, 低浓度水平意味着可持续使用保守疗法^[5-6]。因此, 定量分析 PLA2R-IgG 也是新方法必备的性能。目前临床主要采用酶联免疫吸附分析 (enzyme-linked immune sorbent

assay, ELISA) 作为检测手段^[7]。ELISA 检测线性范围宽, 适合批量测试, 但不适合门诊患者随到随检。因此, 研制单人份、快速且定量的 PLA2R-IgG 检测方法十分必要。

本研究首次报道采用两步法进行 PLA2R-IgG 的间接免疫层析分析 (immunochromatographic assay, ICA), 令抗原抗体能在短小的试纸条上充分反应, 在保证快速性的前提下, 提高检测的特异性; 使用镧系元素钬 (Eu) 作为发光物质, 发挥该元素荧光信号强、背景低、抗干扰的特性, 进而实现 PLA2R-IgG 抗体的快速、灵敏、定量检测。

* 江苏省 333 工程高层次人才培养工程 (PYJF201808), 江苏省妇幼健康科研项目 (F202033) 和无锡市科技发展项目 (N20202038) 资助。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0510-85350328, E-mail: wangcx_wxph@163.com

收稿日期: 2022-01-03, 接受日期: 2022-02-17

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

HG-98免疫层析定量分析仪为上海互轭公司产品, 酶标仪为美国Bio-Rad公司生产, 喷金划膜仪和切条机由杭州赛凯生物公司制造。带羧基的Eu荧光微球 (Bangs Laboratories, 美国), 重组表达的PLA2R抗原 (无锡傲锐东源), 抗人IgG单抗 (Hytest, 芬兰); 羊抗鼠IgG抗体、样品垫、硝酸纤维素膜、吸水纸、6 cm底板和卡壳购自杰一生物 (中国)。N-羟基丁二酰亚胺 (NHS), 2-[N-吗啉]乙磺酸 (MES), 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和牛血清白蛋白 (BSA) 购自Sigma-Aldrich (美国)。其他试剂均为国药沪试生产, 纯度为分析纯。PLA2R-IgG抗体标准品和ELISA检测试剂盒为德国欧蒙医学实验诊断股份公司产品。

1.2 抗体偶联荧光微球的制备

将1 mg羧基微球溶解在500 μL 的制备液 (0.1 mol/L的MES溶液) 中, 先用超声仪分散, 再离心15 000 $\times g$, 时长20 min, 将上清液小心地吸去, 重复两次; 之后, 向微球中加入100 μL 含有1 mg NHS和1 mg EDC的水溶液, 用制备液补齐体积至500 μL , 避光振荡反应0.5 h后, 用该溶液洗涤微球3次; 再将一定量的抗人IgG单抗加入至已活化的微球中, 避光振荡2 h; 然后, 向反应液中加入

10 μL 含10% BSA的Tris-HCl缓冲液 (0.05 mol/L, pH7.2), 避光振荡0.5 h; 用蒸馏水洗涤去除多余抗体, 方法同前; 最后, 将偶联了抗人IgG单抗的微球复溶于含1%BSA和0.1% Tween-20的Tris-HCl缓冲液 (0.05 mol/L, pH7.2) 中, 使其浓度为2.5 g/L。

1.3 试纸条的制备

PLA2R-IgG-ICA试纸条由样品垫、硝酸纤维素膜 (NC膜)、吸水纸和6 cm底板构成, 制备时, 先把硝酸纤维素膜贴在背板中央, 再把PLA2R抗原或羊抗鼠二抗分别喷涂在硝酸纤维素膜上, 构成间隔5 mm的检测线 (test line, T line) 和质控线 (control line, C line)。30 $^{\circ}\text{C}$ 烘干膜条2 h, 以固定上述蛋白质。然后, 将样品垫和吸水纸分别粘贴于上述硝酸纤维素膜两端, 形成2 mm的重叠。最后, 将切割成4 mm宽的免疫层析试纸条带装入单人份的塑料卡壳中, 再放入铝膜袋长期保存。

1.4 检测步骤

将血清样本用稀释液 (含有0.5%BSA的pH7.8 0.05 mol/L的Tris-HCl缓冲液) 按适当比例稀释, 滴加入速测卡加样孔内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育。再加入由稀释液配制的抗人IgG单抗标记的Eu微球, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育适当时间。随后将速测卡插入HG-98免疫层析定量分析仪检测, 仪器自动显示检测结果。反应过程示意图1。

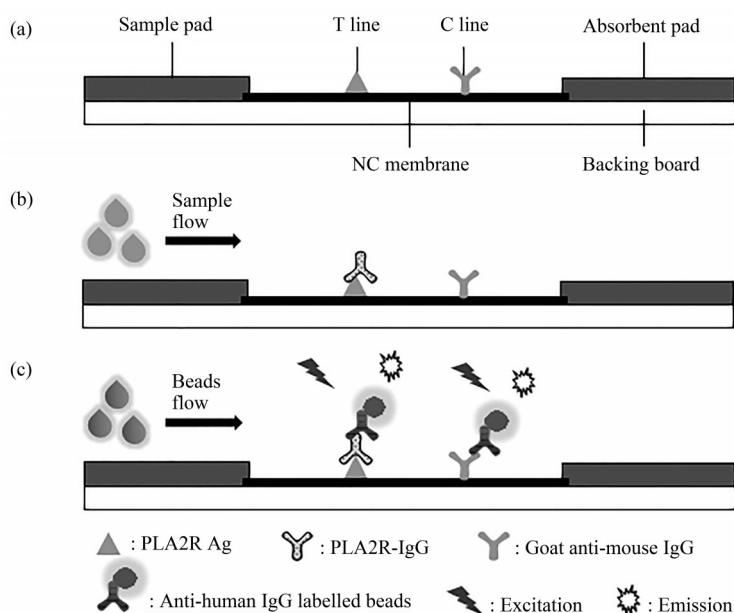


Fig. 1 Reaction principle diagram of PLA2R-IgG-ICA

(a) The structure of the ICA strip. (b) The reaction in the first step of PLA2R-IgG-ICA. (c) The reaction in the second step of PLA2R-IgG-ICA.

1.5 性能考核

参照现行国家标准^[8],对构建的PLA2R-IgG-ICA进行方法学考核。a.线性:检测PLA2R-IgG标准品0、10、20、100、500、1 500 RU/ml,各3次,对结果进行线性拟合并计算相关系数 R ;b.准确性:通过向两个低值样本等体积添加PLA2R-IgG标准物质,每个添加样重复测定2次,实测值与理论值的比值为回收率;c.精密度:对浓度为19.8 RU/ml和102.7 RU/ml两个血样各重复测定10次,通过计算均值(Mean)和标准差(SD),获得变异系数(CV);d.灵敏度:平行测定20次标准品稀释液,计算所测浓度的 $Mean+2\times SD$ 的值,此值即为灵敏度;e.特异性:检测高纯度的350 IU/ml抗过氧化物酶抗体和3 250 IU/ml抗甲状腺球蛋白抗体,若交叉反应率低于1%则认为特异性较好;f.加速稳定性:将37℃放置10 d与2~8℃保存的试剂同步检测标准品,计算各浓度点漂移率,若平均偏差小于15%,认为试剂稳定。

1.6 临床应用

IMN患者的血清样本采集由南京医科大学附属无锡人民医院提供,经医院伦理委员会批准,批准号:2020LLSL-IIYZ-08-01,收集时间是2020年10月~2021年4月。血样使用分离胶血清管采集,离心分离后分装保存于-40℃冰箱,检测前恢复至

室温使用。方法比对的相关性用Passing-Bablok分析,相关系数 $R>0.9$ 且 $P<0.05$ 认为相关性好;阴阳一致性和其他参数的比较通过Pearson卡方检验统计分析, $P<0.05$ 认为有显著性差异。

2 结 果

2.1 PLA2R-IgG免疫层析法的反应模式

本研究采用间接法检测,首先对反应步骤进行考察。传统的免疫层析法采用一步法检测,将样品与微球一起加在样品垫上,经毛细管层析作用与T线和C线的抗原、抗体反应。从图2a的1和2条带荧光照片可知,一步法荧光微球与样品在样品垫和NC膜交叠处产生蓄积,形成非特异条带。此外,从图2b的剂量曲线可知,一步法测量低浓度和高浓度标准品时曲线弯曲,影响线性范围。为解决此现象,本研究采用两步加样:先加入PLA2R-IgG标准品或稀释样品,令抗体与T线的PLA2R抗原反应,同时未反应的干扰物可被吸水纸吸附;再加入微球标记的抗人IgG抗体,经层析作用,于T线形成PLA2R抗原-人PLA2R IgG-微球抗人IgG抗体的复合物,过量的微球可被C线的羊抗鼠IgG捕获,未反应的试剂被吸水纸吸收。从图2可知,两步法比一步法降低了微球的非特异结合,且检测的线性范围更宽。

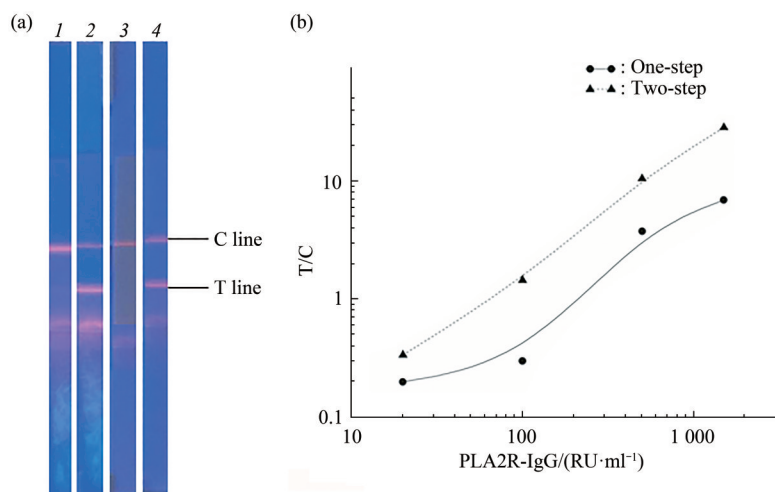


Fig. 2 Comparison of PLA2R-IgG-ICA between one-step and two-step methods

(a) Fluorescence of ICA strips: 1 and 2 were performed by one-step method, 3 and 4 were by two-step, 1 and 3 were added with blank buffer, 2 and 4 with 1 500 RU/ml standard; (b) the standard curves of PLA2R-IgG by different reaction steps.

2.2 检测方法的优化

为优化微球标记效率,本研究对微球制备液的

pH和Eu微球-抗体反应比率进行选择,按照二步法反应,用标记的微球分别检测空白和高值标准品

(1 500 RU/ml 的 PLA2R-IgG), 每个浓度水平测量 2 次。用 pH4.5、5.0 和 5.5 的制备液标记的微球分别检测标准品 (图 3)。当制备液 pH 为 5.0 时, 空白标准品的 T/C (T 线与 C 线荧光信号的比值) 低, 高浓度标准品 T/C 最高, 所以采用 pH5.0 为制备液的最佳反应 pH 体系。

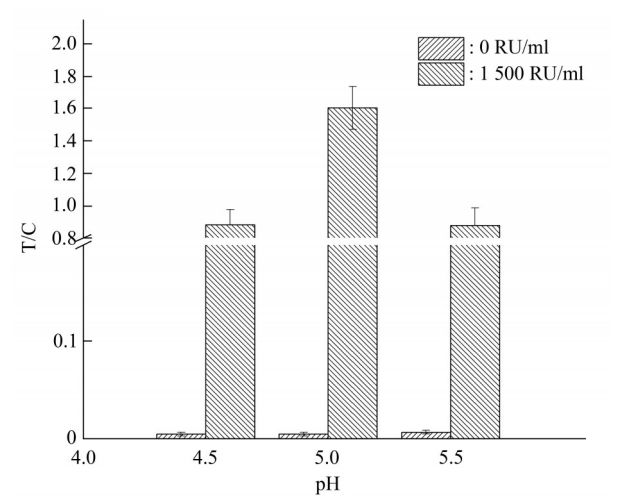


Fig. 3 The effect of pH of MES buffer

为提高微球-抗体荧光信号, 降低非特异吸附, 对 Eu 微球和抗人 IgG 单抗的反应质量比按 10 : 1、25 : 1、50 : 1 和 100 : 1 进行筛选 (图 4)。当按照 25 : 1 反应时, 反应的高值标准品 T/C 高、空白标准品 T/C 较低, 效果最佳, 因此选择该条件制备微球。

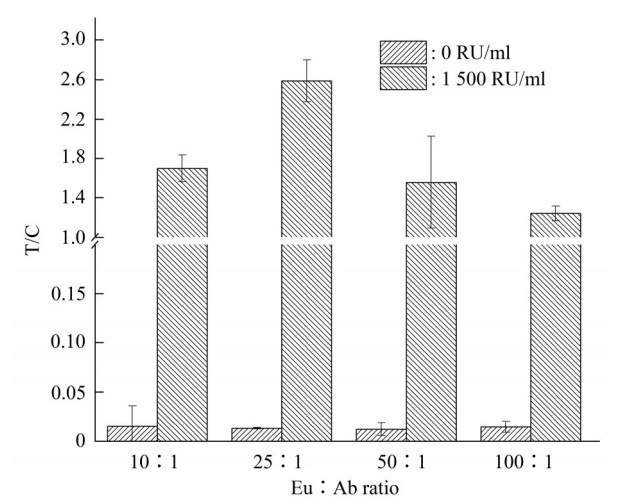


Fig. 4 The effect of the reactive ratio of Eu-microspheres vs anti-human IgG

为方便操作, 令每步反应时间一致, 然后考察了 5、10 和 15 min/步对结果的影响 (图 5)。综合空白和高值标准品荧光计数的差异与时效, 选择 10 min/步为最适反应时间, 即总孵育时间为 20 min。

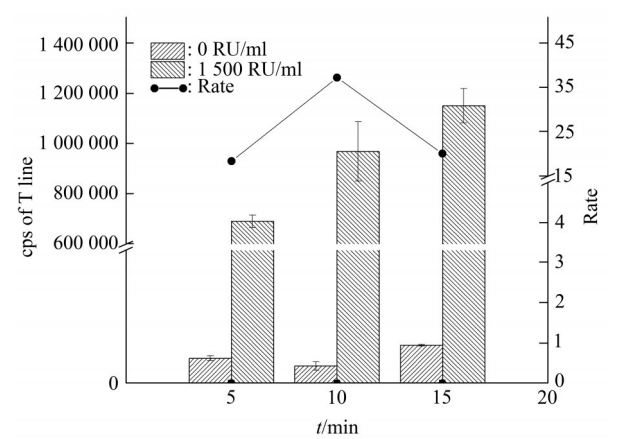


Fig. 5 The effect of different reaction time

2.3 检测方法的性能指标

采用优化方案构建的 PLA2R-IgG ICA 灵敏度为 0.7 RU/ml, 标准曲线方程为 $y=0.771x-1.437$, 相关系数 $R=0.995$, 线性测量范围为 0.7~1 500 RU/ml (图 6)。向健康体检者血清样本中添加系列标准品, 计算方法的添加回收率。由表 1 可知本方法回收率为 86.27%~98.98%, 在 80%~120% 范围内, 判为方法准确。平行测定 2 例 PLA2R-IgG 浓度值分别为 (18.91 ± 1.94) RU/ml 和 (111.50 ± 6.70) RU/ml 的血样, 平均批内 CV 为 8.13%, 小于 15%, 认为

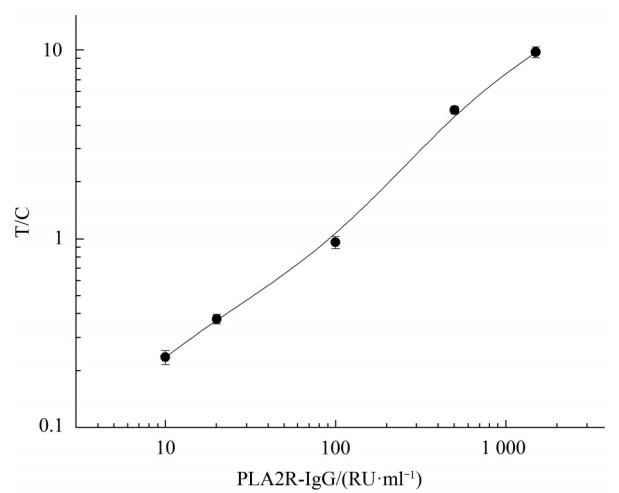


Fig. 6 The standard curve of PLA2R-IgG ICA

方法重复性好。用本方法分别检测 350 IU/ml 抗过氧化物酶抗体和 3 250 IU/ml 抗甲状腺球蛋白抗体, 结果分别为 0.6 RU/ml 和 0.3 RU/ml, 交叉反应率均小于 0.1%, 认为新方法具有特异性。为考核按此方法制备试剂的稳定性, 将已稀释微球溶液和试纸

条置于 37℃ 烘箱 10 d, 再检测标准品, 与 2~8℃ 保存的试剂相比, 各浓度点偏移程度分别为: 4.7%、14.7%、13.1%、0.4% 和 4.2%, 平均值为 7.4%, 因此可知试剂存于 37℃ 10 d 稳定。

Table 1 The recoveries of PLA2R-IgG ICA

Number	Added/(RU·ml ⁻¹)	Found/(RU·ml ⁻¹)	Theoretical value/(RU·ml ⁻¹)	Recovery/%
1	0	4.35±0.01	—	—
	20	12.38±0.79	14.35	86.27
	100	47.89±3.34	54.35	88.10
	500	238.00±9.05	254.35	93.57
	1 500	730.75±29.06	754.35	96.87
2	0	5.12±0.08	—	—
	20	14.18±1.05	15.12	93.75
	100	49.07±1.75	55.12	89.02
	500	230.35±4.03	255.12	90.29
	1 500	747.00±41.15	755.12	98.92

2.4 临床应用

采用本方法与市售的 ELISA 试剂盒同步检测 52 例 IMN 患者的血清样本 (图 7), 得到的相关性回归方程 $y=0.805x+0.373$, $R=0.953$ 。 $R>0.9$ 且 $P<0.01$ 认为两种检测相关。本方法与 ELISA 试剂盒的正常参考值均为 20 RU/ml, <20 RU/ml 判为阴性, 否则为阳性。表 2 显示了两个方法的一致性比较和临床样本的一般信息, 结果表明: IMN 患者的性别与 PLA2R-IgG 水平有显著相关 ($P<0.05$), 而是否老年患者、肾小球滤过率 (eGFR, 按 CKD-EPI 公式计算) 异常程度与 PLA2R-IgG 水平无显著关系 ($P>0.05$), 与市售 ELISA 试剂盒阴阳性判断一致 ($P<0.05$)。本方法对 IMN 的检出率为 76.9% (40/52), 与现有报导相符 [3]。

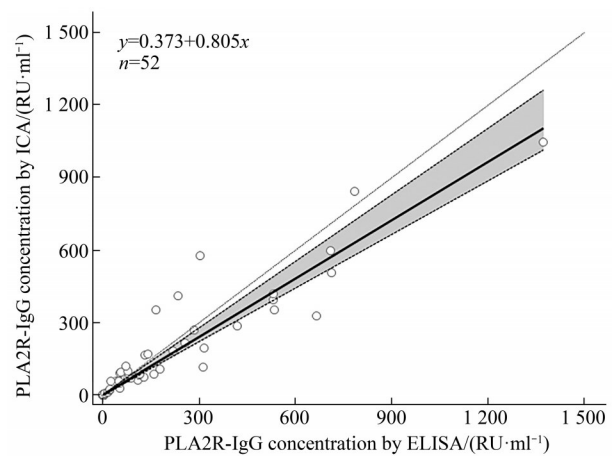


Fig. 7 The correlation of PLA2R-IgG-ICA and ELISA for detection IMN samples

Table 2 The results of PLA2R-IgG in serum samples of IMN patients with clinical parameters

Indicators		n	ICA-/%	ICA+/%	P
Gender	Male	35	12 (34.3)	23 (65.7)	0.006
	Female	17	0 (0.0)	17 (100.0)	
Age	<60	30	8 (26.7)	22 (73.3)	0.473
	≥60	22	4 (18.1)	18 (81.8)	
eGFR/(ml·min ⁻¹ ·1.73m ⁻²)	80-120	19	5 (26.3)	14 (3.7)	0.674
	>120 or <80	33	7 (21.2)	26 (78.8)	
PLA2R-IgG (ELISA)/(RU·ml ⁻¹)	<20	12	12 (100.0)	0 (0.0)	0.000
	≥20	40	0 (0.0)	40 (100.0)	

3 讨 论

本研究构建了一种采用镧系元素为荧光剂的PLA2R-IgG-ICA, 反应时间 20 min, 灵敏度 0.7 RU/ml, 线性范围跨 3 个数量级, 测量上限至 1 500 RU/ml, 且方程回归系数 $R>0.990$, 对 IMN 的临床检出率达到 76.9%, 与国内外报道相符。而同类的 ELISA 试剂盒灵敏度 0.6 RU/ml, 线性范围 6~1 500 RU/ml, 回归系数 $R>0.975$, 且需要 1.25 h 反应。综上, PLA2R-IgG-ICA 性能指标与 ELISA 近似, 能准确定量, 且反应时间大幅减短。而 ICA 具有单人份特性, 因此本检测方法在小样本量和随到随检方面具有优势。

由于人血清中抗体混杂, 若同时加入荧光剂标记的二抗, 容易在层析试纸条上产生非特异结合, 并造成勾状效应, 缩短测量范围, 造成结果判读不准^[9], 这些现象在本研究采用一步法检测 PLA2R-IgG 时也存在。为解决上述问题, 本方法采用两步法加液, 将样本与示踪微球先后加入样品垫, 令待测物与 NC 膜中的靶抗原充分反应, 使得再加入的微球二抗能更精准的捕获 T 线上的一抗, 进而形成目标免疫复合物。本研究首次通过二步法反应, 提高了试纸条免疫反应的充分性, 提升了标记抗体的靶向性, 增加了反应灵敏度和测量范围。本方法总孵育时间 20 min, 较常规 ICA 的 15 min^[10] 适当延长, 但与 ELISA 相比仍具有时间优势。

床旁检测价格低廉、操作便捷、即时高效, 不使用复杂的仪器, 也不需要专业的检验人员, 因此特别适合于迅速指导临床治疗, 在单人次临床检测中发挥越来越大的作用^[11-13]。ICA 为床旁检测的最常见形式, 广泛用于医学检测、治疗监测、食品安全等领域^[13-16]。ICA 常采用胶体金示踪, 根据颜色的深浅判断结果, 只能定性和半定量检测。而通过前期研究可知: 镧系元素的激发光波长范围较宽, 发射峰范围窄, 本底荧光强度低, 有助于提高检测灵敏度^[17-19], 将镧系元素与 ICA 融合将大幅度地提高检测的灵敏度和特异性, 实现 ICA 的全定量检测^[20-21]。本研究使用含 Eu 的微球作为示踪物, 用微球将 Eu 包裹其中, 使后者与水相隔离, 避免了荧光猝灭, 也无需使用增强液等信号放大试剂, 从而进一步提高了反应效率和便捷度, 并且在已构建的夹心法的基础上^[20], 拓展了镧系元素 ICA 的反应类型, 再次证明间接法在该检测体系上的可行性。

然而 ICA 受层析介质的影响, 不同厂家的硝酸纤维素膜、吸水纸都可能产生不同的层析效果, 而且试纸条长短也会影响免疫反应^[22]。本方法仅针对杰一公司提供的试纸条原材料, 在 6 cm 试纸条上进行了 PLA2R-IgG 检测研究, 其他长度和厂家的试纸条是否适用于本指标检测有待进一步考量。

4 结 论

本文基于首创的两步法反应和 Eu 荧光微球示踪的免疫层析技术, 实现了即时、定量、灵敏、准确检测人血清中 PLA2R-IgG。与市售 ELISA 试剂相比, 本方法具有单人份和随到随测的优势, 具有普及推广前景。

参 考 文 献

- [1] 张雅琪, 郝亚宁, 冯学亮, 等. 单中心特发性膜性肾病发病趋势及与血清 PLA2R 抗体的相关性分析. 中华肾脏病杂志, 2016, **32**(9): 647-652
Zhang Y Q, Hao Y N, Feng X L, et al. Chinese Journal of Nephrology, 2016, **32**(9): 647-652
- [2] 王莹莹, 王文革, 邓蓉蓉, 等. 甘肃省 1828 例肾活检病理资料及流行病学特点. 中华肾脏病杂志, 2019, **35**(3): 212-214
Wang Y Y, Wang W G, Deng R R, et al. Chinese Journal of Nephrology, 2019, **35**(3): 212-214
- [3] Beck L H Jr, Bonegio R G, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. N Engl J Med, 2009, **361**(1): 11-21
- [4] El-Husseini A, Saxon D, Jennings S, et al. Idiopathic membranous nephropathy: diagnostic and therapeutic challenges. Am J Nephrol, 2016, **43**(2): 65-70
- [5] Floege J, Barbour S J, Catran D C, et al. Management and treatment of glomerular diseases (part 1): conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) controversies conference. Kidney Int, 2019, **95**(2): 268-280
- [6] Rodas L M, Matas-Garcia A, Barros X, et al. Antiphospholipase 2 receptor antibody levels to predict complete spontaneous remission in primary membranous nephropathy. Clin Kidney J, 2019, **12**(1): 36-41
- [7] Liu Y, Li X, Ma C, et al. Serum anti-PLA2R antibody as a diagnostic biomarker of idiopathic membranous nephropathy: the optimal cut-off value for Chinese patients. Clin Chim Acta, 2018, **476**: 9-14
- [8] 国家食品药品监督管理总局. 中华人民共和国医药行业标准 时间分辨荧光免疫检测系统第 2 部分: 时间分辨荧光免疫分析定量检测试剂(盒). 北京: 中国标准出版社, 2015: 5
National Food and Drug Administration. Pharmaceutical Industry Standard of the People's Republic of China, Detection System of Time-resolved fluoroimmunoassay-Part 2: Quantitative Reagent (kit) for Time-resolved Fluoroimmunoassay. Beijing: China

- Standards Press, 2015: 5
- [9] 刘奕彦, 叶青. 免疫层析法检测 2019 新型冠状病毒抗体假阳性的原因分析和对策. 病毒学报, 2021, **37**(3): 712-718
Liu Y Y, Ye Q. Chinese Journal of Virology, 2021, **37**(3): 712-718
- [10] 王华俊, 赵雪丽, 闫若潜, 等. 猪伪狂犬病病毒 gE 抗原时间分辨荧光免疫层析检测方法的建立. 中国兽医学报, 2020, **40**(11): 2108-2112, 2118
Wang H J, Zhao X L, Yan R Q, *et al.* Chinese Journal of Veterinary Science, 2020, **40**(11): 2108-2112, 2118
- [11] Caliendo A M, Gilbert D N, Ginocchio C C, *et al.* Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. Clin Infect Dis, 2013, **57**(Suppl 3): S139-S170
- [12] Nayak S, Blumenfeld N R, Laksanasopin T, *et al.* Point-of-care diagnostics: recent developments in a connected age. Anal Chem, 2017, **89**(1): 102-123
- [13] Kozel T R, Burnham-Marusich A R. Point-of-care testing for infectious diseases: past, present, and future. J Clin Microbiol, 2017, **55**(8): 2313-2320
- [14] 许俊丽, 刘贝贝, 王玉龙, 等. 胶体金免疫层析试纸法检测农产品中戊唑醇残留. 分析化学, 2019, **47**(11): 1823-1831
Xu J L, Liu B B, Wang Y L, *et al.* Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2019, **47**(11): 1823-1831
- [15] Wen T, Huang C, Shi F J, *et al.* Development of a lateral flow immunoassay strip for rapid detection of IgG antibody against SARS-CoV-2 virus. Analyst, 2020, **145**(15): 5345-5352
- [16] 谭贵良, 潘子强, 张世伟, 等. 肉眼读取-荧光微球竞争免疫层析法半定量快速检测保健食品中的西布曲明. 食品科学, 2021, **42**(8): 313-318
Tan G L, Pan Z Q, Zhang S W, *et al.* Food Science, 2021, **42**(8): 313-318
- [17] Huang B, Wang L, Cao Y N, *et al.* Improvement of idiopathic membranous nephropathy diagnosis with ultrasensitive quantitative detection of anti-phospholipase A2 receptor. J Allergy Clin Immunol, 2017, **139**(6): 1988-1990.e2
- [18] Zhang Y, Yang X, Qian J, *et al.* Simultaneous detection of Mycoplasma pneumoniae IgG and IgM using dual-label time resolved fluoroimmunoassay. Anal Biochem, 2018, **548**: 1-6
- [19] 范俊, 张艺, 王珂, 等. 人表皮生长因子受体 2 时间分辨荧光免疫分析法的建立. 中华核医学与分子影像杂志, 2018, **38**(5): 336-339
Fan J, Zhang Y, Wang K, *et al.* Chinese Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2018, **38**(5): 336-339
- [20] 周衍, 范俊, 蒋叶华, 等. 时间分辨荧光微球免疫层析技术定量检测人血清胃蛋白酶原 I 的实验研究. 第三军医大学学报, 2017, **39**(18): 1803-1807
Zhou Y, Fan J, Jiang Y H, *et al.* Journal of third military medical university, 2017, **39**(18): 1803-1807
- [21] 郭明明, 肖华龙, 周剑波, 等. 时间分辨荧光免疫层析法联合检测血清肿瘤标志物. 中华核医学与分子影像杂志, 2018, **38**(4): 266-270
Guo M M, Xiao H L, Zhou J B, *et al.* Chinese Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2018, **38**(4): 266-270
- [22] Shao X Y, Wang C R, Xie C M, *et al.* Rapid and sensitive lateral flow immunoassay method for procalcitonin (PCT) based on time-resolved immunochromatography. Sensors (Basel), 2017, **17**(3): 480

Development and Application of an Indirect Fluorescent Immunochromatographic Assay for Quantitative Detection of PLA2R-IgG*

ZHANG Yi^{1)**}, ZHOU Ying^{2)**}, ZHOU Yan¹⁾, MA Qi¹⁾, YE Yan²⁾, YIN Hao²⁾, YU Lei²⁾,
ZHOU Bin^{1,3)}, WANG Chun-Xin^{2)***}

⁽¹⁾NHC Key Laboratory of Nuclear Medicine, Jiangsu Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine,
Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China;

²⁾Department of Medicine Laboratory, The Affiliated Wuxi People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China;

³⁾Department of Radiopharmaceuticals, School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

Abstract Objective Serum anti-phospholipase A2 receptor antibody IgG (PLA2R-IgG) is an important basis for the diagnosis and treatment of idiopathic membranous nephropathy. By now, its conventional detection method is ELISA. To improve the reaction convenience, and obtain the assay sensitivity and wide detecting range, a novel immunoassay was established for PLA2R-IgG detection. **Methods** Here, based on europium fluorescent microspheres an indirect immunochromatographic assay (ICA) for PLA2R-IgG was developed and evaluated. The reaction process was firstly chosen, and the method parameters were assessed like pH of activating buffer for microspheres, the ratio of europium microspheres to antibodies, and reaction time. **Results** The performance metrics of the newly proposed assay were analyzed that the sensitivity was 0.7 RU/ml of PLA2R-IgG, the standard curve equation was $y=0.771x-1.437$ with 0.995 of R , the linear working range was 0.7–1 500 RU/ml, the recoveries were 86.27%–98.98%, the average variable coefficient of intra assay was 8.13%, the cross reaction ratio were above 0.1% and PLA2R-IgG-ICA reagents were stable for 10 d at 37°C. The correlation was 0.953 between developed method and commercial ELISA kits, the consistency was also high. The positive detection rate was 76.9%. **Conclusion** The established PLA2R-IgG-ICA using two-step dosing was rapid, sensitive, quantitative and accurate with potential clinical application.

Key words anti-phospholipase A2 receptor antibody, immunochromatographic assay, europium, IgG, idiopathic membranous nephropathy

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0002

* This work was supported by grants from Jiangsu Province “333” Project (PYJF201808), Maternal and Child Health Research Project of Jiangsu Province and Medical (F202033), and Wuxi Sci-Tech Development Fund (N20202038).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-510-85350328, E-mail: wangcx_wxph@163.com

Received: January 3, 2022 Accepted: February 17, 2022