

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.12.006

文章编号: 1005-8982(2016)12-0025-05

论著

抗环瓜氨酸肽抗体胶体金定量检测方法的建立

王梦露¹, 王云龙², 石晓卫³, 李玉林⁴, 王继创⁴, 程蕾⁴

(1. 郑州大学生命科学学院 河南 郑州 450001; 2. 郑州职业技术学院 河南 郑州 450001; 3. 新乡医学院三全学院 河南 新乡 453003; 4. 河南省生物工程技术研究中心 河南 郑州 450001)

摘要: **目的** 建立一种检测人血清中抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体含量的胶体金定量检测方法。**方法** 采用间接胶体金技术,对胶体金最佳标记抗体 pH、最低标记抗体量、最佳 T 线包被浓度、金标定量仪最佳读数时间、批内批间精密性、回收率、临床标本检测等研究,建立抗 CCP 抗体胶体金定量检测方法并评价其性能。**结果** 实验确定胶体金标记最佳 pH 及最低标记抗体量为 1 ml 胶体金溶液中加入 0.2 mol/ml 碳酸钾 K_2CO_3 3 μ l、鼠抗人 IgG 8.8 μ g; T 线包被浓度选择 CCP-BSA 偶联抗体 1.5 mg/ml; 使用金标定量仪时,最佳读数时间为 14 min。性能评价结果显示建立的检测方法线性范围为 50~500 RU/ml, $R^2=0.993$; 精密性质控品 L_1 批内 CV=2.6%,批间 CV=4.52%;精密性质控品 L_2 批内 CV=2.5%,批间 CV=4.28%;高、中、低值血清的回收率为 100.96%、97.17%、91.46%;与国外试剂盒平行检测 40 份抗 CCP 抗体临床血清,结果显示两者相关性较好,回归方程: $Y=1.004X+7.968$, $R^2=0.955$ 。**结论** 初步建立一种检测人血清中抗 CCP 抗体含量的胶体金定量检测方法,该方法具有较高的准确性和精密性。

关键词: 抗 CCP 抗体;胶体金;定量检测

中国分类号: R392.22

文献标识码: A

Establishment of colloidal gold quantitative detection method of anti-CCP antibody

Meng-lu Wang¹, Yun-long Wang², Xiao-wei Shi³, Yu-lin Li⁴, Ji-chuang Wang⁴, Lei Cheng⁴

(1. School of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China; 2. Zhengzhou Technical College, Zhengzhou, Henan 450001, China; 3. Sanquan college of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China; 4. Henan Biotechnology Research Center, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract: **Objective** To establish a colloidal gold quantitative method for detection of anti-CCP antibody levels in human serum. **Methods** Indirect colloidal gold technique was used to detect colloidal gold labeled antibody best pH, minimum amount of labeled antibody, the best package concentration of T line, optimal reading time of Colloidal gold quantitative instrument, precision, recovery and clinical samples. Anti-CCP antibody colloidal gold quantitative detection method was established and its performance was evaluated. **Results** The colloidal gold marked optimal pH and minimum amount of labeled antibody was 1 ml colloidal gold solution with 0.2 mol/ml K_2CO_3 3 μ l, rat IgG 8.8 μ g; T lines has been selected CCP-BSA coupling antibody 1.5 mg/ml. The best reading time of colloidal gold quantitative meter was 14 min. Linear ranged 50~500 RU/ml, $R^2 = 0.993$. **Conclusions** A quantitative colloidal gold kit for detection of anti-CCP with high performance is established.

Keywords: Anti-CCP antibody; colloidal gold; quantitative detection efficiency

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种日常多见的、发病周期较慢的、致残性较高的自身免疫性疾病^[1-2],发病期间多引起骨吸收、骨破坏、骨纤维化等不可逆性的关节病变,最终可造成患者残疾^[3]。2010年,欧洲抗风湿病联盟(EULAR)及美国风湿病学会(ACR)共同提出了鉴定RA的新分类标准,该标准把抗环瓜氨酸肽(cyclic citrullinated peptide, CCP)抗体和类风湿因子(rheumatoid factor, RF)共同作为RA的临床血清学诊断依据^[4],视为新的RA血清学诊断指标^[5]。针对RA诊断,抗CCP抗体的敏感性为68%,特异性为98%^[6]。

目前,抗CCP抗体的检测技术主要有酶联免疫法、化学发光法及胶体金法^[7]。酶联免疫法及化学发光法灵敏度及线性均较胶体金法好,但操作较胶体金法复杂,且适合多样本的检测,一次检测需2 h左右,一定程度上限制对其的推广。随着金免疫层析技术的发展,金免疫层析法在定性的同时亦可实现定量检测^[8],胶体金定量检测技术具有出结果快,使用简便,稳定性较好,效期较长等诸多优点^[9],适合基层医院、室外现场诊断及家庭自检使用,是现代“病人床边检测”(point of care testing, POCT)广为应用的方法^[10-13]。本实验探索建立检测人血清中抗CCP抗体含量的胶体金定量检测方法,以期满足临床检验的需要。

1 材料与方法

1.1 材料

抗CCP抗体线性参考品($P_1=900$ RU/ml、 $P_2=700$ RU/ml、 $P_3=500$ RU/ml、 $P_4=300$ RU/ml、 $P_5=200$ RU/ml、 $P_6=100$ RU/ml、 $P_7=50$ RU/ml、 $P_8=20$ RU/ml)、精密性质控品($L_1=200$ RU/ml、 $L_2=100$ RU/ml)、羊抗鼠多克隆抗体、CCP-BSA偶联复合物由河南省生物工程技术研究中心提供,抗CCP抗体检测对照试剂盒购自德国欧蒙,金标定量仪由天根生化科技有限公司提供,临床血清标本由郑州大学第一附属医院提供,无溶血,乙肝(5项)、丙肝、梅毒、艾滋病检测阴性,其他化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 胶体金的制备 采用柠檬酸三钠 $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 还原法制备胶体金溶液。取100 ml双蒸水放入圆底烧瓶,加热至沸腾时开始搅拌,加入10%氯金酸 $HAuCl_4$ 溶液100 μ l,沸腾2 min后,加入10%

柠檬酸三钠 $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 溶液150 μ l,溶液颜色稳定后继续煮沸6 min,自然冷却至室温,双蒸水补加至100 ml,置入4℃冰箱保存备用。

1.2.2 标记抗体 pH 值确定 向胶体金溶液中加入不同量碳酸钾 K_2CO_3 调节胶体金溶液 pH 值,通过 OD492/OD630 双波长扫描读数选择最佳标记 pH 值,即选出加入碳酸钾 K_2CO_3 的量。

1.2.3 标记最低抗体量的确定 向最佳标记 pH 环境的胶体金溶液中加入不同量1 mg/ml 鼠抗人 IgG 抗体,通过 OD492/OD630 双波长扫描读数选出使胶体金稳定的最低抗体量,最低量的10%作为胶体金标记的最适抗体量。

1.2.4 T 线包被浓度的选择 用0.01 mol/ml pH=7.4 PBS 缓冲液作稀释液,在T线处包被CCP抗原偶联物,浓度分别为2.0、1.5、1.0和0.5 mg/ml,在C线处包被羊抗鼠 IgG,浓度为1.0 mg/ml,组装成试纸条,分别用阳性血清及阴性血清检测,根据显色情况选择合适的包被浓度。

1.2.5 最佳线性范围确定 选择已定值的血清参考品($P_1=900$ RU/ml、 $P_2=700$ RU/ml、 $P_3=500$ RU/ml、 $P_4=300$ RU/ml、 $P_5=200$ RU/ml、 $P_6=100$ RU/ml、 $P_7=50$ RU/ml、 $P_8=20$ RU/ml)作为样本,以金标定量仪读数为纵坐标,定值血清参考品浓度(RU/ml)为横坐标,绘制曲线,选择最佳线性范围。在金标定量仪读数时,分别读取峰高和峰面积两个参数,通过曲线绘制结果,选择最佳读数参数。

1.2.6 精密性 取精密性质控品血清 L_1 、 L_2 各20份,对同一批抗CCP抗体胶体金试纸条及不同批次的抗CCP抗体胶体金试纸条进行检测,分别计算批间精密性、批内精密性。精密性 $CV=SD/\text{平均数} \times 100\%$;临床对检测试剂要求批间精密性 $CV<15\%$,批内精密性 $CV<10\%$ 。

1.2.7 回收率 用抗CCP抗体低值血清稀释高值血清获得预测浓度为500、200和50 RU/ml的3份血清,通过线性参考品标定这3份血清,通过公式:回收率 = 测定浓度 / 预测浓度 $\times 100\%$,计算所制备的抗CCP抗体检测试剂的回收率。

1.3 临床标本检测

以建立的抗CCP抗体胶体金定量检测方法,与德国欧蒙产抗CCP抗体试剂盒(ELISA)对比检测40份临床RA患者血清标本,评价制备的胶体金定量检测方法的检测效果,德国欧蒙产试剂盒为间接ELISA

方法,主要方法步骤为:加样后室温温育 60 min,洗板 3 次,加入酶结合物室温温育 30 min 后洗板 3 次,加底物避光温育 30 min,加终止液,酶标仪 450 nm 读数,从试剂盒标准曲线中得出抗 CCP 抗体含量。

2 结果

2.1 最佳标记 pH 值确定

向容量 300 μl 的 10 孔板条内每孔加入 200 μl 胶体金溶液;每孔分别加入 0、2.0、4.0、5.0、6.0、7.0、11.0、16.0、20.0 和 24.0 μl,0.02 mol/ml 碳酸钾 K₂CO₃,1.0 mg/ml 的鼠抗人 IgG 抗体 2.5 μl,10% 氯化钠 NaCl 40 μl,室温静置 2 h,OD492/OD630 双波长扫描读数,实验重复 3 次。结果见表 1,第 4~6 孔的胶体金颜色最为稳定,且 OD 值较为稳定,即 200 μl 胶体金溶液中,0.02 mol/ml 碳酸钾 K₂CO₃ 加入 5~7 μl 时,溶液最为稳定,取中间值,即 0.02 mol/ml K₂CO₃ 加入 6 μl 时,达到最佳标记 pH 值。

2.2 最低标记抗体量确定

将 10 支 1.5 ml 离心管中分别加入 1 ml 胶体金溶液,3 μl 0.2 mol 碳酸钾 K₂CO₃,分别加入 0、1、2、3、4、5、6、7、8 和 9 μl 2.0 mg/ml 鼠抗人 IgG 抗体,10% 氯化钠 NaCl 40 μl,室温静置 2 h,OD492/OD630 双波长扫描读数,实验重复 3 次。从表 2 酶标仪读数可以发现,向 1 ml 胶体金溶液中加入鼠抗人 IgG ≥ 8 μg 时溶液较稳定。按照 2、4、6、8、10、12、14、16 和 18 μg 抗体量标记胶体金,包被量质控 C 线一致、检测 T 线一致,加入相同量的参考品血清 P₄(300 RU/ml),相同时间下观察 T 线显色情况,低于 8 μg 显色逐渐减弱,与酶标仪检测结果相一致。以最低量增加 10% 作为胶体金标记最佳抗体量,因此 1 ml 胶体金溶液选择最适标记抗体量为 8.8 μg。

2.3 T 线包被浓度的选择

当同时用血清参考品 P₄(300 RU/ml)检测时,结果见图 1 所示,包被浓度为 1.5 mg/ml 时,条带显色最佳。将 P₁(900 RU/ml)血清不断梯度稀释,下一个浓度为上一个浓度的 1/2,用 4 种不同包被浓度的试纸条检测梯度血清,包被量为 1.5 mg/ml 的显色梯度最明显,结果最稳定。最终选择 T 线包被浓度为 1.5 mg/ml。

2.4 线性范围确定

室内血清质控品检测结果分别用峰高及峰面积表示,对应曲线见图 2A、图 2B,两者对于不同浓度室内血清参考品检测结果的总体趋势基本相同,分析两条曲线可知,在 P₃(500 RU/ml)~P₇(50 RU/ml)范围内,两者均有良好的线性;通过对 P₃(500 RU/ml)~P₇(50 RU/ml) 范围内峰高及峰面积结果最线性分析,均有良好的线性关系。其中对峰高数据分析,线性方程为:Y=1.12X-44.67,R²=0.993;对峰面积数据分析,线性方程为 Y=1.085X-46.93,R²=0.990,均符合 R²>0.98 的要求,见图 2C、图 2D。综上分析可知,检测结果用峰高或峰面积表示均可,用峰高检测最佳,试纸条最佳线性范围为 50~500 RU/mL,R²=0.993。



从左到右 T 线包被浓度分别为:2.0 mg/ml、1.5 mg/ml、1.0 mg/ml 和 0.5 mg/ml

图 1 检测 T 线不同包被浓度检测结果

表 1 确定最佳 pH 实验酶标仪 OD492/OD630 双波长扫描读数

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
结果(OD 值)1	-0.082	0.171	0.223	0.285	0.283	0.289	0.273	0.237	0.215	0.217
结果(OD 值)2	-0.046	0.234	0.245	0.266	0.262	0.261	0.252	0.212	0.258	0.241
结果(OD 值)3	-0.076	0.183	0.239	0.278	0.271	0.279	0.263	0.245	0.233	0.231

表 2 确定最佳标记蛋白量实验酶标仪 OD492/OD630 双波长扫描读数

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
结果(OD 值)1	-0.086	0.019	0.115	0.179	0.264	0.263	0.259	0.262	0.264	0.257
结果(OD 值)2	-0.008	0.108	0.170	0.234	0.288	0.287	0.287	0.278	0.284	0.277
结果(OD 值)3	-0.039	0.133	0.182	0.204	0.284	0.281	0.282	0.278	0.276	0.279

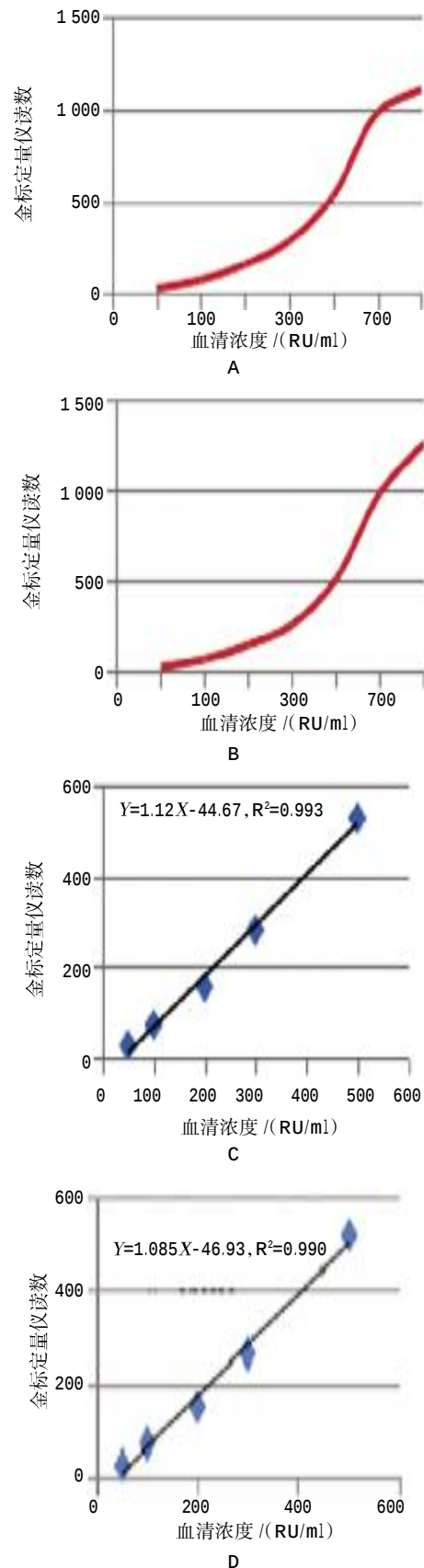


图 2 最佳线性范围确定
A: 峰高检测结果; B: 峰面积检测结果; C: 最佳线性范围的确定 (峰高); D: 最佳线性范围的确定 (峰面积)

图 2 最佳线性范围确定

2.5 精密性实验

用建立的抗 CCP 抗体定量检测方法及精密性质控品 L₁、L₂ 分别对同批次及不同批次的胶体金试纸条进行精密性检测, 由表 3 可知, 精密性质控品 L₁ 批内 CV=2.6%, 批间 CV=4.52%; 精密性质控品 L₂ 批内 CV=2.5%, 批间 CV=4.28%, 均满足精密度批内 < 10%, 批间 < 15% 的要求。

2.6 回收率实验

用低值血清稀释高值血清获得的高中低值 3 份血清进行回收率检测。结果显示, 高值血清的回收率为 100.96%; 中值血清的回收率为 97.17%; 低值血清的回收率为 91.46%, 满足回收率控制在 85% ~ 115% 的要求。见表 4。

2.7 临床标本检测

本研究建立的抗 CCP 抗体胶体金定量检测方法与德国欧蒙产抗 CCP 抗体检测试剂盒 (ELISA) 同时对 40 份临床血清进行检测, 见图 3。结果显示, 两者具有很好的相关性, 回归方程为: $Y=1.004X+7.968$, $R^2=0.955$ 。

表 3 精密性检测结果

组别	平均数	SD	CV%
L ₁			
批内	71.9	1.868	2.60
批间	71.2	3.219	4.52
L ₂			
批内	155.8	3.894	2.50
批间	152.6	6.530	4.28

表 4 回收率检测结果

组别	OD 值	预测浓度 / (RU/ml)	测定浓度 / (RU/ml)	回收率 / %
高值	1.625	500	504.82	100.96
中值	0.719	200	194.33	97.17
低值	0.286	50	45.73	91.46

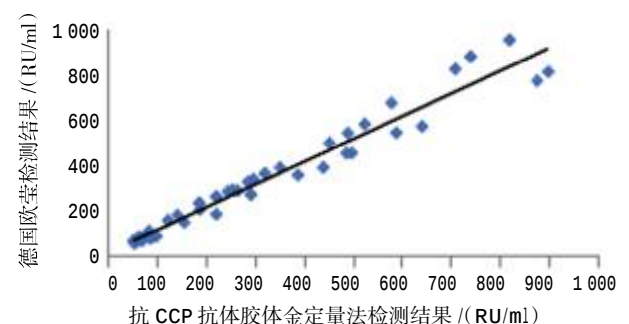


图 3 40 份临床血清检测结果

3 讨论

当前针对抗 CCP 抗体检测的技术方法主要有:酶联免疫法,化学发光法,胶体金免疫层析法等^[4]。酶联免疫法和化学发光法可以精准定量,但检测时间较长,对检测环境要求较高,操作较为繁琐;胶体金法简便快速^[5],但现在市面仅有定性检测试剂盒。本研究拟建立一种胶体金定量检测技术,具有出结果快,使用简便,稳定性较好等诸多优点,适合基层临床医院、室外现场诊断及家庭自诊等使用。

在胶体金标记过程中,最为关键的两个环节是控制 pH 值及标记蛋白的量,只有在 pH 值接近或略高于蛋白等电点时,两者产生吸附力更强。每种蛋白等电点不同,需找出实验标记抗体蛋白的最佳 pH 值,在胶体金溶液中,碳酸钾 K_2CO_3 用量影响胶体金 pH 值,可通过控制碳酸钾 K_2CO_3 用量,调节溶液 pH 值,确定碳酸钾 K_2CO_3 用量即确定了标记蛋白最佳 pH 值。抗体蛋白标记过多,既浪费抗体,又容易使试纸条产生拖带现象,蛋白标记过少,降低试纸条灵敏度及稳定性。在最佳标记 pH 环境中,加入不同量抗体蛋白,对胶体金溶液稳定性产生影响,通过酶标仪检测,可确定胶体金稳定时,加入蛋白的量,考虑到操作过程的损失及胶体金溶液的稳定性,选择使胶体金稳定的最少蛋白量的 110% 为试纸条加入抗体蛋白最低量。胶体金定量检测中使用金标定量仪,检测结果以光谱峰的形式显示,会出现与峰对应的峰高、峰面积及峰宽等一组数据。通过对室内质控品检测发现,峰高及峰面积与待检物浓度相关性较好,为今后金标定量仪的使用提供一定的参考。

本研究初步建立了一种检测人血清中抗 CCP 抗体含量的胶体金定量检测方法,为进一步研制出适用于临床诊断的抗 CCP 抗体胶体金定量检测方法打下了良好的基础。

参 考 文 献:

- [1] BARBARROJA N, PECEZ-SANCHEZ C, RUIZ-LIMON P, et al. Anticyclic citrullinated protein antibodies are implicated in the development of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(12): 2706-2716.
- [2] 何媛. 风湿性关节炎的自身抗体免疫学指标检测及应用进展[J]. *实验与检验医学*, 2013, 31(4): 344-347.
- [3] 付琳等. 抗环瓜氨酸肽抗体检测方法的研究进展 [J]. *广东医学*, 2012, 33(12): 1850-1853.
- [4] 许笃亮, 黄健. 环瓜氨酸肽抗体在类风湿性关节炎诊断中的意义研究进展[J]. *济宁医学院学报*, 2014, 37(3): 208-211.
- [5] 杜民, 姜海燕. 金免疫层析试条定量测试原理及应用 [M]. 科学出版社, 2007.
- [6] HARICH R, ROGER C, GARNIER L, et al. Comparison of anti-CCP auto antibodies measurement by ELSA and a bead based assay in a large patient cohort[J]. *Clin Bio Chem*, 2014, 47(7): 485-488.
- [7] 梁鹏, 张劲丰, 苏荣, 等. 电化学发光法检测抗环瓜氨酸肽抗体的诊断效能评价[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(18): 2535-2536.
- [8] 郝芬. 鞣酐时间分辨荧光免疫检测试剂及降钙素原胶体金半定量免疫层析检测试剂的研究[D]. 南方医科大学, 2013.
- [9] 张慧斐, 苏正仙, 李俊金, 等. 金标免疫层析法检测抗环瓜氨酸肽抗体的诊断价值评价[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 9(6): 401-408.
- [10] RANTALAIHO V, KAUTIAINEN H, KORPELA M, et al. Physicians' adherence to tight control treatment strategy and combination DMARD therapy are additively important for reaching remission and maintaining working ability in early rheumatoid arthritis: a subanalysis of FIN-RACo trial [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(4): 788-790.
- [11] ROSEN S M. Biomarkers of chemical exposure: a new frontier in clinical chemistry[J]. *IVD Technology*, 2014, 2: 22.
- [12] HARICH R, ROGER C, GARNIER L, et al. Comparison of anti-CCP autoantibodies measurement by ELSA and a beadbased assay in a large patient cohort[J]. *Clin Bio Chem*, 2014, 47(7): 485-488.
- [13] 王云龙, 唐秋艳, 陈兴业. 免疫诊断试剂实用技术 [M]. 海洋出版社, 2009.
- [14] 吴晓宇, 黄海东, 李招云, 等. 13715 例抗环瓜氨酸肽和抗角蛋白抗体检测临床分析[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2014, 24(2): 93-97.
- [15] 葛艳玲, 宋慧, 赵玉靖. 单独检测抗环瓜氨酸肽抗体以诊断类风湿性关节炎[J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(1): 94-97.

(张蕾 编辑)