

• 论 著 •

# 蛋白质芯片检测法在过敏原特异性抗体检测中的应用

彭杰雄<sup>1</sup>, 林连成<sup>2</sup>, 林文浩<sup>1</sup>, 邓兆享<sup>1</sup>

(武警广东边防总队医院检验科, 广东深圳 518029; 2. 广东省深圳市赛尔生物技术有限公司 518000)

**摘要:**目的 探讨蛋白质芯片技术诊断过敏性疾病的可行性。方法 应用蛋白质芯片方法, 将 10 种常见过敏原抗原集成到活化的玻璃芯片上, 并保持蛋白质活性, 通过与 202 例患者标本的反应, 同时得到 10 种过敏项目的检测结果。结果 蛋白质芯片法检测结果与对照方法间符合率较高, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 蛋白质芯片方法可以高通量、即时地检测过敏原血清中 IgE 的变化, 灵敏度达 0.5 IU/mL, 可满足临床上对变态反应性疾病的诊断要求。

**关键词:** 蛋白质阵列分析; 过敏反应; 超敏反应; 免疫球蛋白 E

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.06.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)06-0631-02

## Application of protein chip technology for the detection of allergen-specific antibodies

Peng JieXiong<sup>1</sup>, Lin LianCheng<sup>2</sup>, Lin WenHao<sup>1</sup>, Deng ZhaoXiang<sup>1</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, Guangdong Provincial Frontier defence Corps Hospital of Armed Police Force, Shenzhen 518029, China; 2. Shenzhen Sciarray Biotech Co., Ltd, Shenzhen 518000, China)

**Abstract:** **Objective** This assay tries to utilize protein chip technology for the detection of allergic diseases. **Methods** The assay chose 10 most often allergic agents as antigens, which were spotted on glass slide chip activated with CHO-dominants, and the antigen's activities were kept in good condition. **Results** 102 positive sera and 100 negative sera were detected and the results indicate that the protein chip technology and the control method have high consistence and no significance was found ( $P > 0.05$ ) between them. **Conclusion** protein chip technology used in this assay provided a high-through-put and simultaneous detection of serum IgE antibody to more than 10 allergic agents at one test. Its sensitivity approached to 0.5 IU/mL. The protein chip technology could meet the clinical need of diagnosis for allergic diseases.

**Key words:** protein array analysis; anaphylaxis; hypersensitivity; immunoglobulin E

变态反应性疾病是由过敏原刺激机体后引起的 I 型超敏反应所致<sup>[1]</sup>。现用蛋白质芯片检测法作为体外检测方法, 检测临床诊断为过敏性疾病的患者血清标本, 并与 Pharmacia UNICAP 过敏原监测系统进行比较, 探讨用蛋白质芯片方法高通量并行过敏原疾病检测的可行性。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集患者血清标本 102 例, 健康对照组 (无过敏史健康者) 血清标本 100 例。患者血清经 Pharmacia UNICAP 过敏原监测系统检测和临床症状确诊, 标本均由中山大学中山三院提供, 低温 ( $-86^{\circ}\text{C}$ ) 冻存。

**1.2 仪器与试剂** 蛋白质芯片基片, 由深圳市赛尔生物技术有限公司赛尔生物研究所提供, 为玻璃三维醛基芯片 (批号: 20090817, 20090910)。芯片上已经固定有两组过敏原抗原, 每组含 5 个项目。即吸入组: 尘螨、冬春季花粉、夏秋季花粉、多价兽羽毛和蟑螂; 食物组: 鸡鸭蛋、虾、牛奶、咸水鱼和牛肉。芯片点阵为  $5 \times 6$  矩阵, 共含有 30 个位点, 每两个位点代表 1 个待测项目。标本稀释液、洗涤液和示踪物批号均为 20090817。人标准 IgE 血清, 1 745 IU/mL, 经 WHO 标准 IgE 参考标定, 购于中国生物制品总公司卫生部兰州生物制品研究所。晶芯 personalArrayer 16 生物芯片点样仪, 购自北京博奥生物技术有限公司。蛋白质芯片阅读仪为深圳赛尔生物技术有限公司与中科院光电研究所联合研制产品。

**1.3 方法** (1) 在芯片上加入待测标本 (预先按 1:5 稀释后) 200  $\mu\text{L}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  条件下温育 30 min, 洗涤并甩干。(2) 加入示踪物两滴,  $37^{\circ}\text{C}$  条件下温育 30 min, 洗涤并甩干。(3) 加入显色剂两滴,  $37^{\circ}\text{C}$  条件下温育反应 10 min。(4) 终止反应: 甩干后用蒸馏水数滴终止反应。(5) 在蛋白质芯片阅读仪上进行软件

分析, 亦可肉眼观察反应情况。

在芯片灵敏度分析中, 采用抗人 IgE 单抗作为点样物, 点成  $4 \times 4$  的矩阵, 采用夹心法检测标本中人 IgE 含量。将标准 IgE 参考血清用标本稀释液做系列倍比稀释, 然后加入芯片反应格中, 按上述反应步骤进行操作, 最高稀释度仍能出现位点显色者, 判为其检测底限。

**1.4 统计学处理** 采用  $\chi^2$  检验进行统计分析。

### 2 结果

蛋白质芯片法检测结果显示, 102 例特异性过敏原血清, 有 64 例标本尘螨为阳性, 其余依次为蟑螂 (53 例)、冬春季花粉 (41 例)、夏秋季花粉 (36 例)、多价兽羽毛 (27 例)、虾 (16 例)、牛奶 (13 例)、鸡鸭蛋 (5 例) 和咸水鱼 (2 例)。其中有 80 例标本同时对两种 (含两种) 以上物质过敏 (见图 1~2)。图 3 为单独对虾过敏患者的检测结果。100 例健康对照者血清标本检测结果均为阴性。检测结果显示, 对鸡鸭蛋、咸水鱼和牛肉过敏者较少, 尤其对牛肉过敏者只有 1 例。



图 1 尘螨和蟑螂同时过敏血清结果

通过对蛋白质芯片法和 UNICAP 法比较,两者差异无统计学意义( $P>0.05$ ),尤其在夏秋季花粉、牛肉、鸡鸭蛋和咸水鱼项目完全吻合。

标准人 IgE 参考品经 3 490 倍稀释后,其浓度变为 0.5 IU/mL。再做进一步稀释,则无法检测出来。因此,本实验的灵敏度为 0.5 IU/mL。见图 4。

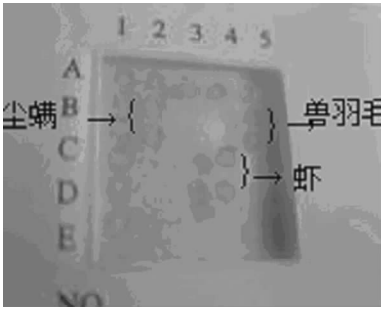


图 2 尘螨、兽羽毛及虾同时过敏血清结果

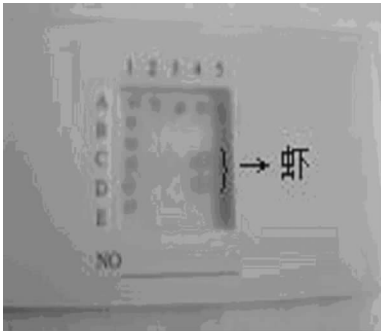


图 3 虾过敏血清结果

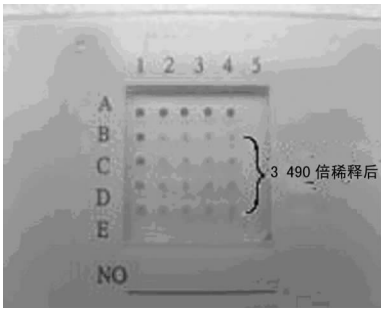


图 4 用标准 IgE 参考品测定灵敏度

3 讨 论

变态反应性疾病的诊断方法有体内试验和体外试验<sup>[2]</sup>,放射性变应原吸附剂试验(radio-allergosorbent test, RAST)是目前公认的检测 I 型变态反应的有效方法之一,但因其费用昂贵、花费时间长、放射性同位素易过期而且污染环境等不利因素而较少应用<sup>[2-4]</sup>。ELISA 试验在国际上也仅有瑞典的 Pharmacia UNICAP、西门子的 Immulite 和美国的 HyCOR-Agilent 采用<sup>[5]</sup>。其中,Pharmacia UNICAP 在国内应用得比较广泛<sup>[6-7]</sup>。引起变态反应性疾病的过敏原是多种多样的,随地域和人群的不同而有很大差异,主要有吸入性过敏原和食物性过敏原之分<sup>[8]</sup>。

生物芯片技术为大面积、高通量、即时检测提供了可能<sup>[9-10]</sup>。有学者仅对牛奶和鸡蛋两种食源性过敏原及引起过敏的抗原决定簇进行了高通量的并行检测,初步显示了蛋白质芯片对标本量需求少的优势<sup>[11-12]</sup>。本组用蛋白质芯片技术来

对选定的吸入性和食物性过敏原共 10 种项目进行了检测,并与 Pharmacia UNICAP 试剂检测的结果进行了比较。从整体检测结果来看,两者的一致性较高。本组蛋白质芯片检测方法灵敏度测定结果为 0.5 IU/mL,即 1.2 ng/mL。与 WHO 公布的健康者血清中 IgE 含量在 39 ng/mL 以下相比较,本研究方法完全可以满足临床上对过敏原监测的灵敏度要求<sup>[13]</sup>。据文献报道,CAP 系统在检测过敏原中的灵敏度较高,且在国内临床上被普遍使用<sup>[6-7]</sup>。本组通过与 Pharmacia UNICAP 系统比较,所得结果与其符合程度较高。该蛋白质芯片检测方法可同时检测 10 种或以上过敏原种类,同时得到检测结果,比传统的单项检测或逐项检测节省标本,提高效率,也有利于临床横向分析和作出诊断,是值得推广和应用的新方法之一。

由于本组试验未能检测总 IgE 含量,蛋白质芯片尚存在精确定量的问题,有待于下一步研究解决。

参考文献

[1] Plebani M, Borghesan F. Clinical efficiency of in vitro and in vivo tests for allergic diseases[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 1995, 74(6): 23-28.

[2] 赵俊芳. 过敏原的体内和体外检测[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(5): 450-452.

[3] William PB, Dolen WK. Comparison of skin testing and three in vitro assays for specific IgE in the clinical evaluation of immediate hypersensitivity[J]. Ann Allergy, 1992, 68(15): 35-42.

[4] Kelso JM, Sodhi N. Diagnostic performance characteristic of the standard Phadebas RAST, and Pharmacia CAP system versus skin testing[J]. Ann Allergy, 1991, 67(21): 511-514.

[5] Robert G, Hamilton A. Proficiency survey-based evaluation of clinical total and allergen specific IgE assay performance[J]. Arch Pathol Lab Med, 2010, 134(13): 975-982.

[6] 正小卉, 杨毅, 王晓川. CAP 检测系统在食物过敏患儿诊断中的应用[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 19(7): 574-575.

[7] 张健媛, 柯培峰. CAP 检测系统在过敏性鼻炎诊疗中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(7): 588-590.

[8] 顾瑞金译. 帕特森变态反应性疾病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 82-119.

[9] 陈忠斌. 生物芯片技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 3-25.

[10] Hartmann M, Roeraade J, Stoll D. Protein microarray for diagnostic assays[J]. Chem, 2008, 393(29): 1407-1416.

[11] Ott H, Baron JM. Clinical usefulness of microarray-based IgE detection in children with suspected allergy[J]. Allergy Clin Immunol, 2008, 63(11): 1521-1528.

[12] Inmaculada C, Zamora J. Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based Immunoassay[J]. Blood, 2008, 122(3): 589-594.

[13] 文昭明. 变态反应性疾病的诊治[M]. 北京: 国医药科技出版社, 1997: 31.

(收稿日期: 2010-08-06)