·论　　著·

反向蛋白质微点阵对怀孕女性 TORCH 感染的检测*

何文军[1]，唐　芳[2]，李　涛[1]，吴子安[1]，吴新忠[1]，江　帆[2]，左连东[2]，余婷玉[1]，谭志容[1]，徐　宁[1△]
（1. 广东省中医院检验科，广东广州 510120；2. 广州市人口和计划生育科学研究所，广东广州 510410）

摘　要：目的　评价反向蛋白质微点阵方法是否能用于怀孕女性 TORCH 感染的检测。**方法**　建立检测 TORCH 感染的反向蛋白质微点阵方法，比较反向蛋白质微点阵和酶联免疫吸附试验（ELISA）方法检测 2 000 份怀孕女性的新鲜血清 TORCH 感染的阳性符合率，评价反向蛋白质微点阵检测 TORCH 的可行性。**结果**　建立的反向蛋白质微点阵方法与 ELISA 方法对 TORCH 感染检测的阳性符合率分别为 100.0%、91.1%、97.2%、91.3%和 93.0%，通过蛋白芯片法与 ELISA 法各项指标检测结果均具有较好的一致性（$P>0.05$），但反向蛋白质微点阵对风疹病毒、巨细胞病毒和疱疹病毒的检测率高于相对应的 ELISA 方法。**结论**　反向蛋白微点阵法检测 TORCH 感染，具有简便、快速，敏感性较高和特异性强等优点，是临床优生优育辅助诊断的有效方法，未来值得推广使用。

关键词：反向蛋白质微点阵；　TORCH 感染；　酶联免疫吸附试验
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2015.24.006　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2015)24-3522-03

Detection of TORCH infection in pregnant women by using reverse phase protein array*

He Wenjun[1], *Tang Fang*[2], *Li Tao*[1], *Wu Zian*[1], *Wu Xinzhong*[1], *Jiang Fan*[2], *Zuo Liandong*[2], *Yu Tingyu*[1], *Tan Zhirong*[1], *Xu Ning*[1]
(1. *Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong* 510120, *China*; 2. *Guangzhou Municipal Scientific Research Institute of Population and Family Planning, Guangzhou, Guangdong* 510410, *China*)

Abstract: Objective　To evaluate whether the reverse phase protein array (RPPA) method can be used for detecting TORCH infection in pregnant women. **Methods**　The RPPA method was established for detecting TORCH infection. The positive coincidence rates of TORCH infection detected by the RPPA method and ELISA method in 2000 fresh serum samples from pregnant women were compared for evaluating the feasibility of RPPA in TORCH detection. **Results**　The positive coincidence rates of established RPPA and ELISA for detecting TORCH infection was 100.0%, 91.1%, 97.2%, 91.3% and 93.0% respectively, indicating that the detection results of various indexes by RPPA and ELISA had better consistency ($P>0.05$), but the positive detection rates of RPPA for Rubellavirus, CMV and HSV-1, 2 were higher than those of correspondent ELISA method. **Conclusion**　RPPA method for detecting TORCH infection has the advantages of simpleness, rapidness, high sensitivity and strong specificity, is an effective method of auxiliary diagnosis for bearing and rearing better children in clinical, and is worthy of being promoted and used in the future.

Key words: reverse phase protein array;　TORCH infection;　enzyme linked immunosorbent assay

优生优育是提高人口素质的重要手段，世界各国非常重视产前诊断。孕期致畸病原体感染是重要的致畸因素之一，可导致大量畸形儿的出生，给家庭与社会带来沉重负担。这些病原体主要包括弓形体、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒Ⅰ、Ⅱ型及其他感染（包括微小病毒属、人免疫缺陷病毒、肝炎病毒、梅毒螺旋体等）。这些病原体均能通过胎盘垂直传播给胎儿，还可通过孕妇下生殖道逆行扩散，引起胎儿感染以及胎儿分娩时的围产期感染，导致流产、早产、死胎或胎儿宫内生长迟缓（IUGR）、智力发育不全、小头畸形、脑水肿、听力障碍等先天畸形，以及新生儿感染、青春期发育障碍，临床上称为 TORCH 综合征。但这类感染对孕妇本身影响较小，常缺乏明显临床症状。孕妇感染并不代表胎儿感染，对这些孕妇的胎儿进行产前诊断、确诊宫内感染非常重要。（鉴于对 TORCH 感染潜伏性、危害性的认识，和目前早期诊断与有效治疗手段的欠缺，重视对孕妇的产前 TORCH 感染的筛查诊断，以及对感染孕妇的胎儿进行产前诊断，以确诊是否存在宫内感染）。目前，在美国孕妇常规检查风疹病毒、乙型肝炎病毒、梅毒螺旋体、B 组链球菌和人免疫缺陷病毒[1]，在中国北京地区也已将围产期检测 TORCH 感染列为常规检测项目。

TORCH 感染的诊断主要依靠病原学、免疫学和分子生物学诊断。这些方法存在各种各样的缺陷，如病原学诊断包括显微镜检查、动物接种、组织细胞培养病理检查等，但其阳性率较低，往往受到条件限制，检测时间较长，且需要活体微生物方可检测，因此不适用于临床筛查[2]。应用普通的免疫学技术进行孕妇的血清学检测作为围产期感染的主要诊断方法已有许多年。目前大多数实验室采用酶免疫技术中的酶联免疫吸附试验（ELISA）的方法检测病原体特异性 IgG 和 IgM 来诊断孕妇的感染[3-4]，但此类方法每次所检测的病原体种类有限，需对各病原体逐一检测，费用较高，患者难以承受。分子生物学技术普遍存在着扩增产物易污染而导致假阳性、操作繁琐、检测费用较高等缺点，不适合高通量检测。

随着反向蛋白质微点阵技术的发展，反向蛋白质微点阵也越来越多用于临床标本的检测以及蛋白质相互作用的研究[5]。在本研究中，设计反向蛋白质微点阵检测 TORCH 感染，并与

*　基金项目：广东省人口和计划生育委员会科研项目（2012338）。　作者简介：何文军，男，副主任技师，主要从事医学检验工作。　△　通讯作者，E-mail：xu_ning21@163.com。

常规 TORCH 的检测方法对比，评价该反向蛋白质微点阵检测 TORCH 的灵敏度、特异度等，为该方法的临床应用提供依据。

1　材料与方法

1.1　标本来源　新鲜血清标本 2 000 份，均来自本院和广州市人口和计划生育科学研究所妇科门诊进行孕期体检的孕妇，年龄 19～40 岁，室间质评标本来自国家卫计委临床检验中心。

1.2　反向蛋白质微点阵的设计　所有 TORCH 的蛋白抗原购自 Sigma 公司，委托深圳市赛尔生物科技有限公司加工成反向蛋白质微点阵或蛋白质微点阵，即先把 TORCH 病原体的抗原定量后固定在硝酸纤维包被的玻片上，然后用标准的抗体或被 TORCH 感染后的血清孵育，用洗涤液洗涤没有结合的血清或抗体标本，然后加入生物素标记的抗 IgM 抗体孵育后，洗涤再加入显色液进行显色，信号用 Dakocytomation-催化系统扩增扫描，用商品化的软件 Microvigene 获得信号强度（图 1）。

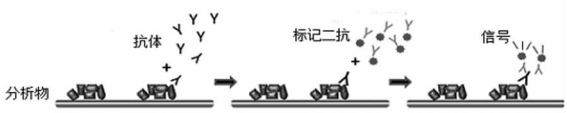

图 1　反向蛋白微点阵检测示意

1.3　反向蛋白质微点阵对 TORCH 感染标本的检测　血清标本用标本稀释液按 1∶20 进行稀释后取 200 μL 加于芯片槽中，布满芯片方槽，置于 37 ℃温育 30 min，洗涤 3 次，吸干水滴后，加示踪物 2 滴，37 ℃温育 30 min；洗涤 3 次，吸干水滴，加显色剂 1 滴，37 ℃显色 8～12 min，甩干后于蛋白芯片阅读仪下进行灰度值扫描，通过与 cutoff 值的比值（T/cutoff）对检测结果进行判断，比值大于或等于 1.00 为阳性，小于 1.00 者为阴性。

1.4　ELISA 检测 TORCH 感染标本　ELISA 试剂盒检测新鲜血清样品，操作按照试剂盒说明书。血清标本用标本稀释液按 1∶80 进行稀释后，取 100 μL 已稀释标本加于微孔板中，室温反应 30 min，洗涤 3 次，加酶标抗体 100 μL，室温反应 30 min，再洗涤 3 次，加入 TMB 底物 100 μL，室温避光显色 10 min，用终止液终止反应后，用 ST-360 酶标仪在 450 nm 下进行结果判读。

1.5　统计学处理　采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。各组间阳性率比较用配对 χ^2 检验，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结　　果

2.1　反向蛋白质微点阵对标准 TORCH 抗原的检测　采用标准的 TORCH 抗原先包被，然后用卫计委临床检测中心提供的 TORCH 阳性和阴性样品对设计的反向蛋白质微点阵进行检测。结果同预期的完全一致，所有的阳性样品均为阳性，所有的阴性样品为阴性。然后对阳性样品进行稀释检测，当样品以 1∶40 稀释后仍可检测到阳性信号。上述结果表明设计的反向蛋白质微点阵能够检测 TORCH 感染。

2.2　反向蛋白质微点阵对临床样品的检测　用反向蛋白质微点阵对新鲜的孕检标本进行 TORCH 检测，同时用 ELISA 试剂盒检测 TORCH 感染，结果见表 1。

表 1　比较反向蛋白质微点阵和 ELISA 方法检测孕妇的 TORCH 感染[n(n)]

反向蛋白质微点阵	酶联免疫吸附试验				
	弓形虫感染者	风疹病毒感染者	巨细胞病毒感染者	人疱疹病毒 1 感染者	人疱疹病毒 2 感染者
阳性	82(82)	34(31)	107(104)	207(189)	72(67)
阴性	1 918(1 918)	1 966(1 969)	1 893(1 896)	1 793(1 811)	1 928(1 933)
总数	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000
阳性符合率	100.0%	91.1%	97.2%	91.3%	93.0%

()：用 ELISA 的检测结果。

3　讨　　论

反向蛋白质微点阵是将待分析样品固定在经过特殊处理的玻片上，然后用抗体对那些待分析样品进行分析（图 1）。该技术是在传统的正向蛋白微点阵技术基础上于 2001 年创立，最初是从肿瘤组织获取细胞群，分析存活前检查点和生长调节蛋白的状态[6]。之后，反向蛋白质微点阵技术被许多研究者采用，不仅用于脂膜微囊组织，而且用于各种其他生物样品，包括异质性的组织样品、细胞培养物、血清/血浆样品、卵巢流出物、针吸样品和多肽[5]。目前反向蛋白质微点阵不被限于临床前研究，而且还可以用于癌症的临床试验检测、细胞途径的鉴定、细菌感染检测[7-9]、免疫性疾病和病毒-宿主的相互作用[9-11]。反向蛋白质微点阵能够检测疾病和非疾病状态下治疗前、中和后的蛋白动力学[12]，能同时定量检测多个样品的蛋白表达水平[5,13]。

蛋白质微点阵技术提供了必要的分析灵敏度，甚至能检测超低丰度的蛋白，主要由于其灵敏度增加、减少样品体积/浓度的要求，在一个芯片上可以分析数千个样品。反向蛋白质微点阵不是 2 个位点的夹心类型抗体点阵，仅需要一个抗体用于检测，待分析的数目远大于正向蛋白质点阵。典型的反向蛋白质微点阵只需要纳米级别的样品。这些待分析物来源于培养的细胞或体内的动物组织或临床样品。每个分析的样品点大小从几十到几百微米，因此，反向蛋白质微点阵具有高通量，可以同时分析数千个样品，其检测的原理类似其他免疫实验。

本研究中的阳性对照也来自卫计委的临床检测中心，保证了阳性标本的可靠性。在反向蛋白质芯片的点阵设计上，每个 TORCH 感染均设置 2 个阳性复孔和 2 个阴性对照复孔。用反向蛋白质微点阵对卫计委临床检测中心提供的 TORCH 质控品的检测结果与预期的结果一致，此外与其他抗体没有交叉反应。用反向蛋白质微点阵对临床收集的 TORCH 感染样品进行检测，对于弓形虫的检测，蛋白芯片检测与常规的 ELISA 试剂盒的检测阳性符合率为 100%（$P>0.05$），证明反向蛋白质微点阵检测弓形虫感染具有和 ELISA 方法相类似的灵敏度和特异度。对于风疹病毒的检测，反向蛋白质微点阵的检测阳性率高于 ELISA 试剂盒，后来对反向蛋白质微点阵检测阳性的患者随访，再用 ELISA 方法检测证明反向蛋白质微点阵检测结果是正确的。该结果证明 反向蛋白质微点阵对风疹病毒感染的灵敏度高于 ELISA 方法。对于巨噬细胞病毒和单纯疱疹病毒的检测，反向蛋白质微点阵的灵敏度也高于 ELISA 方

法。所以，从检测的灵敏度来说，反向蛋白质微点阵对 TORCH 感染的检测超过 ELISA 方法。最重要的是，在一块芯片上能同时检测所有的 TORCH 项目，能同时检测多个标本，大大节约了成本和人力。凌云等[14]研究发现反向蛋白质微点阵法检测弓形虫的灵敏度高于 ELISA 法。

尽管反向蛋白质微点阵对 TORCH 感染的检测具有简单、快速、经济和灵敏度高等特点，但该方法用于临床之前，仍需要多中心大样品进行测试。

参考文献

[1] Edward R, Newton MD. Diagnosis of perinatal TORCH infections [J]. Clin Obst Gyne, 1999, 42(1): 59-70.

[2] Sever JL. TORCH tests and what they mean[J]. Am J Obstet Gynecol, 1985, 152(5): 495-498.

[3] Fung JC, Tilton RC. TORCH serologies and specific IgM antibody determination in acquired and congenital infections[J]. Ann Clin Lab Sci, 1985, 15(3): 204-211.

[4] Montoya JG, Liesenfeld O, Kinney S, et al. VIDAS test for avidity of Toxoplasma-specific immunoglobulin G for confirmatory testing of pregnant women[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(7): 2504-2508.

[5] Amaya M, Baer A, Voss K, et al. Petricoin III E& Narayanan A. Proteomic strategies for the discovery of novel diagnostic and therapeutic targets for infectious diseases[J]. Pathogens and Disease, 2014, 71(2): 177-189.

[6] Paweletz CP, Charboneau L, Bichsel VE, et al. Petricoin EF III & Liotta LA. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front[J]. Oncogene, 2001, 20(1): 1981-1989.

[7] Mueller C. Liotta LA & Espina V (2010) Reverse phase protein microarrays advance to use in clinical trials[J]. Mol Oncol, 2010, 4(3): 461-481.

[8] Einspahr JG, Calvert V, Alberts DS, et al. Functional protein pathway activation mapping of the progression of normal skin to squamous cell carcinoma[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2012, 5(3): 403-413.

[9] Popova T, Espina V, Bailey C, et al. Anthrax infection inhibits the AKT signaling involved in the E-cadherin-mediated adhesion of lung epithelial cells[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2009, 56(2): 129-142.

[10] Baer A, Austin D, Narayanan A, et al. Induction of DNA damage signaling upon Rift Valley fever virus infection results in cell cycle arrest and increased viral replication[J]. J Biol Chem, 2012, 287(10): 7399-7410.

[11] Austin D, Alan B, Lundberg L, et al. p53 activation following rift valley fever virus infection contributes to cell death and viral production[J], 2012, 14(1): 36327.

[12] Spurrier B. Ramalingam S & Nishizuka S (2008) Reverse-phase protein lysate microarrays for cell signaling analysis[J]. Nat Protoc, 2008, 3(1): 1796-1808.

[13] Hu S, Xie Z, Qian J, et al. Functional protein microarray technology[J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2011, 3(3): 255-268.

[14] 凌云，李华，冯春颜，等. 蛋白芯片法检测弓形虫的临床应用[J]. 临床医学工程，2010(8)：81-82.

（收稿日期：2015-05-24）

（上接第 3521 页）

相对探针法而言，SYBR Green I 染料法性价比高且操作简便，因而应用更为广泛，但由于 SYBR Green I 能与任何双链 DNA 结合，因此需要优化反应体系并结合熔解曲线分析以确保反应特异性[9]。本研究小组建立的 CRLF2 RQ-PCR 检测方法经一系列评估实验显示：本方法特异性强，线性范围广，荧光信号与扩增 Ct 值相关系数大于 0.999，质粒标准品经反复冻融 3 次后，批内及批间变异系数均低于 4%，证明该方法完全符合实验要求，可应用于临床 CRLF2 检测。笔者将该建立的方法初步应用于健康及 ALL 儿童的临床标本检测，所有样本的 CRLF2 mRNA 水平均在标准品线性范围内，因此本方法具有特异性强，可行性好的特点，完全符合检测要求。

综上所述，本研究成功建立了 CRLF2 基因 RQ-PCR 检测方法，为 ALL 儿童个体化诊疗和 CRLF2 转化医学研究提供了参考工具。

参考文献

[1] Ekiz HA, Can G, Baran Y. Role of autophagy in the progression and suppression of leukemias[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2012, 81(3): 275-285.

[2] Mi JQ, Wang X, Yao Y, et al. Newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in China (II): Prognosis related to genetic abnormalities in a series of 1091 cases[J]. Leukemia, 2012, 26(7): 1507-1516.

[3] 祝亮方，陈鑫基，胡建达. eIF4E 在白血病中的表达及其临床意义[J]. 中国实验血液学杂志，2013，21(1)：1-6.

[4] Russell LJ, Capasso M, Vater I, et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2 is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2009, 114(13): 2688-2698.

[5] I-Ming C, Richard C, Harvey, et al. Oncology Group Study disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK and minimal residual[J]. Blood, 2012, 119(15): 3512-3522.

[6] Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2010, 115(26): 5312-5321.

[7] Cario G, Zimmermann M, Romey R, et al. Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol[J]. Blood, 2010, 115(26): 5393-5397.

[8] 付晶晶，周红平，刘发娣，等. 2012 年江西地区重症手足口病病原分析[J]. 国际检验医学杂志，2013，34(22)：3024-3028.

[9] 何紫琪，李从荣，童永清. 乙型肝炎病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 国际检验医学杂志，2014，35(4)：464-466.

（收稿日期：2015-05-08）