

- [11] 孙颖,王海涛,方芳,等. 过敏性紫癜性肾炎伴肺出血二例[J]. 中华肾脏病杂志,2016,32(1):60-61.
- [12] KAMINUMA O, SAEKI M, NISHIMURA T, et al. Differential contribution of adhesion molecules to Th1 and Th2 cell-mediated lung and bowel inflammation[J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40(10):1801-1805.
- [13] 罗颖,黄艳艳,金言,等. 微小 RNA-21 对过敏性紫癜患儿 B 细胞白细胞介素 10 表达的影响[J]. 中华儿科杂志, 2018, 56(12):939-944.
- [14] 树叶,罗鸯鸯,罗勇奇,等. 过敏性紫癜患者 CD4<sup>+</sup> T 细胞
- 叉头框蛋白 3 基因甲基化水平及其与调节性 T 细胞的关系[J]. 中华皮肤科杂志, 2019, 52(3):162-166.
- [15] 陈佳佳,梁学军,刘敏,等. 儿童 1 型糖尿病酮症酸中毒合并腹型过敏性紫癜二例[J]. 中华糖尿病杂志, 2018, 10(6):427-429.
- [16] 蔡青青,解新芳,李晓萍,等. 新月体 IgA 肾病与新月体过敏性紫癜肾炎的临床病理及预后分析[J]. 中华肾脏病杂志, 2016, 32(11):801-807.

(收稿日期:2020-02-15 修回日期:2020-09-12)

• 短篇论著 •

## 糖尿病自身抗体微阵列芯片检测试剂盒的研制与初步评价<sup>\*</sup>

胡纪文<sup>1</sup>,陈卓诚<sup>1</sup>,张大准<sup>2</sup>,段江磊<sup>2</sup>,高 龙<sup>1</sup>,林 珊<sup>1</sup>,黄日雄<sup>1</sup>,张秀明<sup>1△</sup>

(1. 广东省深圳市罗湖医院集团医学检验中心,广东深圳 518001;

2. 广东省深圳市伯劳特生物制品有限公司,广东深圳 518054)

**摘要:**目的 研制糖尿病自身抗体微阵列芯片(Array-ELISA)检测试剂盒,评价其检测性能,探讨其临床应用价值。方法 制备糖尿病自身抗体 Array-ELISA 检测试剂盒,评价 10 份阴性参考品和 10 份阳性参考品符合率、2 份精密度参考品重复性、检出限参考品的性能指标。用 Array-ELISA 检测 1 型糖尿病(T1DM)组血清 42 份,评价其灵敏度和特异度。结果 Array-ELISA 检测 10 份阴性参考品和 10 份阳性参考品符合率均为 100%,重复性变异系数<15%,检出限[谷氨酸脱羧酶抗体(GADA)、酪氨酸磷酸酶抗体(IA-2A)、锌转运体 8 抗体(ZnT8A)、胰岛细胞抗体(ICA)、胰岛素抗体(IAA)5 种抗体阳性指数(PI 值)]分别为 1.998、1.941、2.123、1.987、1.938。Array-ELISA 联合检测 T1DM 组 GADA、IA-2A、ZnT8A、ICA、IAA 5 种抗体的灵敏度为 88.10%,特异度为 90.70%。结论 糖尿病自身抗体 Array-ELISA 检测试剂盒检测 T1DM 自身抗体具有较高的灵敏度和特异度,该方法能够为糖尿病的分型及精准治疗提供指导。

**关键词:**1 型糖尿病; 自身抗体; 微阵列芯片

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2020.23.022

**文章编号:**1673-4130(2020)23-2915-04

**中图法分类号:**R587.1

**文献标识码:**B

1 型糖尿病(T1DM)包括免疫介导和特发性两种亚型<sup>[1]</sup>。自身免疫性糖尿病(免疫介导型)是以胰岛 β 细胞自身免疫破坏为重要病因的一种疾病,患者体内存在一种或多种针对胰岛 β 细胞胰岛素合成、转运和分泌的关键酶的自身抗体,这些自身抗体在糖尿病的预测、诊断、分型及治疗方面具有重要意义<sup>[2-3]</sup>。本研究参照文献[4]建立微阵列芯片(Array-ELISA),用于联合检测 T1DM 组谷氨酸脱羧酶抗体(GADA)、酪氨酸磷酸酶抗体(IA-2A)、锌转运体 8 抗体(ZnT8A)、胰岛细胞抗体(ICA)、胰岛素抗体(IAA)5 种抗体。研究报道如下。

### 1 资料与方法

#### 1.1 标本

**1.1.1 参考品血清标本来源与制备** 本研究参考品

原材料为不同阳性程度的血清标本和体检者血清标本,经乙型肝炎病毒抗原、丙型肝炎病毒抗体、艾滋病病毒抗体检测均为阴性,用斯德润(北京)医疗诊断用品有限公司生产的糖尿病自身抗体谱检测试剂盒[免疫印迹法(IBT)]检测,阳性参考品和精密度参考品按照检测结果选择合适的阳性血清标本混合,必要时可用阴性血清标本稀释。阴性参考品用阴性血清标本混合。

10 份阳性参考品抗体型别包含 GADA、IA-2A、ICA、ZnT8A、IAA,10 份阴性参考品 GADA、IA-2A、ICA、ZnT8A、IAA 抗体全部为阴性。2 份精密度参考品为 R1(GADA/IA-2A/ICA/ZnT8A/IAA)、R2(GADA/IA-2A/ICA/ZnT8A/IAA)。检测限参考品 1 系列用于对 GADA、IA-2A、ZnT8A 的最低检测限

<sup>\*</sup> 基金项目:广东省深圳市 2018 年罗湖区软科学研究计划项目;广东省深圳市医疗卫生三名工程(SZSM201601062)。

<sup>△</sup> 通信作者,E-mail:zxm0760@163.com。

评价,2 系列用于对 ICA 和 IAA 的最低检测限评价。检测限参考品 L3 为混合阳性血清标本,必要时可用阴性血清标本稀释,其相应抗体阳性指数(PI)范围为 1.8~2.4;L3 用阴性血清标本稀释 1 倍后得到对应的 L2,其相应抗体 PI 范围为 0.9~1.2;L2 用阴性血清标本稀释 1 倍后得到对应的 L1,其相应抗体 PI 范围为 0.4~0.6。

**1.1.2 临床比对血清来源** 选取 2018 年 1 月至 2019 年 12 月在深圳市罗湖区人民医院和罗湖区中医院门诊就诊的 T1DM 患者的 42 份血清作为 T1DM 组,另选取同期在罗湖区中医院门诊就诊的 2 型糖尿病(T2DM)患者的 30 份血清、体检健康者的 54 份血清分别作为 T2DM 组、对照组。

**1.2 仪器和试剂**

**1.2.1 仪器** AD1500/AD6020 芯片点样仪(Biodot 公司);全自动洗板机 PW-960(深圳汇松科技公司);BLOT BioChip Scanner I 生物芯片阅读器(深圳市伯劳特生物制品有限公司);WH-001 微孔板雾化封闭机(北京汇众亿通智能科技有限公司);Synergy H1 多功能微孔板检测仪(Biotek 公司)。

**1.2.2 试剂及试剂盒** 96 孔板(Biomat 公司);GAD65 抗原/IA-2 抗原(菲鹏生物);ICA 抗原/ZnT8 抗原(北京华信行公司);insulin 抗原(Lee Biosolutions, Inc.);人 IgG(Equitech-Bio, Inc.);兔抗人 IgG(Jackson ImmunoResearch Inc.);抗人 IgG-HRP(百美瑞生物);HRP 结合物稳定剂(Surmodics, Inc.);The Blocking Solution/Liquid Plate Seal(Candor Bioscience);TMB 沉淀型底物(英创生物);其它化学试剂均为 AR 级。斯德润(北京)医疗诊断用品有限公司生产的糖尿病自身抗体谱检测试剂盒(IBT),批号:010306D/0A。

**1.3 方法**

**1.3.1 Array-ELISA 设计** 按照图 1 模式图的布局进行 Array-ELISA 设计,PR 点为位置参考点,PC 点为阳性对照点,NC 点为阴性对照点,CO 点为临界值对照点,SC 点为标本对照点,GAD、IA2、ICA、ZnT8、INS 分别为抗原点。

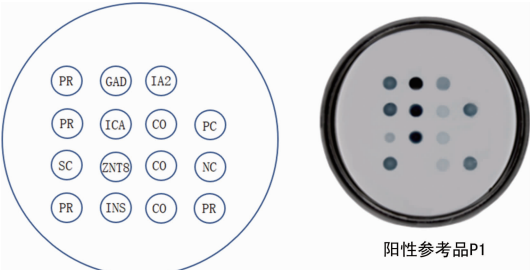


图 1 糖尿病自身抗原 Array-ELISA 模式和实物图

**1.3.2 96 孔 Array-ELISA 制备** 上述各芯片点样液配制,用 PBS(0.01 mol/L PBS,含 15%甘油、10%海藻糖,pH 值 7.2)配制 40 μg/mL 的 GAD 抗

原、60 μg/mL 的 IA-2 抗原、10 μg/mL 的 ICA 抗原,用 Tris(0.02 mol/L Tris,含 15%甘油、10%海藻糖,pH 值 8.5)配制 20 μg/mL 的 ZnT8 抗原,用 CB(0.05 mol/L CB,含 15%甘油、10%海藻糖,pH 值 9.6)配制 80 μg/mL 的 INS 抗原、2 μg/mL 的 RAH 作 SC 点、2 μg/mL 的 IgG 作 PR 及 PC 点、0.12 μg/mL 的 IgG 作 CO 点、0.05 μg/mL 的 IgG 作 NC 点。使用 BioDot AD6020 芯片点样仪按照图 1 模式以每点 20 nL 在 96 孔板底部点样,点样结束后放入冰箱(2~8 ℃)固定 16 h。次日洗板 2 次,加入 2%的酪蛋白室温封闭 1 h,吸干封闭液,在 37 ℃烘箱中干燥 2 h。密封后置于 4 ℃保存待用。

**1.3.3 检测试验** 96 孔 Array-ELISA 平衡至室温后,用 Tris 样品稀释液稀释血清 26 倍,取稀释液 100 μL 加入反应孔中,室温反应 60 min;洗涤 3 次;将 0.3 mg/mL 的抗人 IgG 抗体稀释 2 000 倍,每孔加入 50 μL,室温反应 30 min;洗涤液 3 次;每孔加入 TMB 芯片底物 50 μL,室温反应 30 min,吸取底物后,将 96 孔芯片放入生物芯片阅读器,用 DM-5Abs 程序进行扫描判读,软件统计各抗体的 PI,PI≥1.0 为阳性,PI<1.0 为阴性。

**1.3.4 性能评价**

**1.3.4.1 符合率** 检测 10 份阳性参考品和 10 份阴性参考品 PI 值结果,计算符合率。

**1.3.4.2 重复性** 分别检测 R1、R2 批内 10 次 PI 值结果,计算变异系数(CV)值。

**1.3.4.3 最低检出限** L1 相应抗体检测结果应为阴性,L2 相应抗体检测结果可为阴性或者阳性,L3 相应抗体检测结果应为阳性。

**1.3.5 临床应用评价** 以 Array-ELISA 为试验方法,糖尿病自身抗体谱检测试剂盒(IBT)为比对方法,同步检测 3 组血清标本,计算各抗体阳性符合率、阴性符合率、总符合率,Kappa 值。以总符合率大于 90.00%为符合率可接受的标准,Kappa 值>0.75, P>0.05 时为一致性较好。根据检测结果,统计灵敏度、特异度,评价方法的临床适用性。

**1.3.6 统计学处理** 采用 SPSS22.0 软件进行数据统计和分析。一致性分析采用 Kappa 一致性检验,0.0≤Kappa≤0.2 为微弱一致性,0.2<Kappa≤0.4 为弱一致性,0.4<Kappa≤0.6 为中度一致性,0.6<Kappa≤0.8 为高度一致性,0.8<Kappa≤1.0 为极强一致性。

**2 结果**

**2.1 阳性参考品符合率** 试验结果显示 10 份阳性参考品检测均为阳性,符合率为 100.00%。

**2.2 阴性参考品符合率** 试验结果显示 10 份阴性参考品检测均为阴性,符合率为 100.00%。

**2.3 重复性检测** 试验结果显示,样品各抗原的批内重复性 CV 均小于 15.00%。

**2.4 最低检测限检测** 分别用检测限参考品 1 系列、2 系列进行 5 种糖尿病自身抗体检测,各抗体 PI 结果显示,L1 均为阴性,L2、L3 均为阳性。见表 1。

**2.5 方法学比较** 采用 Array-ELISA 与 IBT 法同步检测 T1DM 组、T2DM 组和对照组血清标本,GA-DA 阳性符合率 95.45%,阴性符合率 94.23%,总符合率 94.44%;IA-2A 阳性符合率 73.33%,阴性符合率 100.00%,总符合率 96.83%;ICA 阳性符合率 93.75%,阴性符合率 98.18%,总符合率 97.62%;ZnT8A 阳性符合率 100.00%,阴性符合率 99.08%,总符合率 99.21%;IAA 阳性符合率 90.91%,阴性符合率 97.39%,总符合率 96.83%。5 种抗体的总符合率均大于 90.00%。5 种抗体 Kappa 值统计均大于 0.75,*P* 值均大于 0.05,两种检测方法具有高度的一

致性。见表 2、3。

| 表 1 最低检测限检测结果(PI) |       |       |       |       |       |      |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 参考品               | GADA  | IA-2A | ICA   | ZnT8A | IAA   | 结果判断 |
| 参考品 1             |       |       |       |       |       |      |
| L1                | 0.423 | 0.438 | —     | 0.402 | —     | 符合   |
| L2                | 1.166 | 1.013 | —     | 1.043 | —     |      |
| L3                | 1.998 | 1.941 | —     | 2.123 | —     |      |
| 参考品 2             |       |       |       |       |       |      |
| L1                | —     | —     | 0.425 | —     | 0.456 | 符合   |
| L2                | —     | —     | 1.132 | —     | 1.023 |      |
| L3                | —     | —     | 1.987 | —     | 1.938 |      |

注:“—”表示无数据。

表 2 Array-ELISA 与 IBT 法检测血清 5 种抗体结果(*n*)

| Array-ELISA | IBT  |     |     |       |     |     |     |     |     |       |     |     |     |     |     |
|-------------|------|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
|             | GADA |     |     | IA-2A |     |     | ICA |     |     | ZnT8A |     |     | IAA |     |     |
|             | +    | —   | 合计  | +     | —   | 合计  | +   | —   | 合计  | +     | —   | 合计  | +   | —   | 合计  |
| +           | 21   | 6   | 27  | 11    | 0   | 11  | 15  | 2   | 17  | 17    | 1   | 18  | 10  | 3   | 13  |
| —           | 1    | 98  | 99  | 4     | 111 | 115 | 1   | 108 | 109 | 0     | 108 | 108 | 1   | 112 | 113 |
| 合计          | 22   | 104 | 126 | 15    | 111 | 126 | 16  | 110 | 126 | 17    | 109 | 126 | 11  | 116 | 126 |

| 表 3 Array-ELISA 与 IBT 法检测血清 5 种抗体结果一致性比较(%) |       |        |       |        |       |
|---------------------------------------------|-------|--------|-------|--------|-------|
| 项目                                          | GADA  | IA-2A  | ICA   | ZnT8A  | IAA   |
| 阳性符合率                                       | 95.45 | 73.33  | 93.75 | 100.00 | 90.91 |
| 阴性符合率                                       | 94.23 | 100.00 | 98.18 | 99.08  | 97.39 |
| 总符合率                                        | 94.44 | 96.83  | 97.62 | 99.21  | 96.83 |
| Kappa                                       | 0.82  | 0.83   | 0.90  | 0.97   | 0.82  |
| <i>P</i>                                    | 0.13  | 0.13   | 1.00  | 1.00   | 0.63  |

**2.6 临床应用评价** 使用本研究所建立的糖尿病自身抗体 Array-ELISA 检测试剂盒对 3 组血清 5 种抗体进行检测,T1DM 组 5 种抗体的阳性率高于 T2DM 组及对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 4。Array-ELISA 检测 T1DM 5 种抗体的灵敏度除 GA-DA 为 59.52%较高外,其余 4 种自身抗体指标的灵敏度均低于 50.00%。但 5 种抗体联合检测 T1DM 的灵敏度达 88.10%,特异度为 90.70%,见表 5。

表 4 Array-ELISA 检测 3 组血清 5 种抗体的结果[*n*(%)]

| 组别     | <i>n</i> | GADA       | IA-2A      | ICA        | ZnT8A      | IAA        |
|--------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| T1DM 组 | 42       | 25(59.52)* | 10(23.81)* | 16(38.10)* | 16(38.10)* | 10(23.81)* |
| T2DM 组 | 30       | 1(3.33)    | 0(0.00)    | 0(0.00)    | 1(3.33)    | 1(3.33)    |
| 对照组    | 54       | 1(1.85)    | 1(1.85)    | 1(1.85)    | 1(1.85)    | 2(3.70)    |

注:与 T2DM 组和对照组比较,\**P*<0.05。

表 5 Array-ELISA 检测 T1DM 5 种自身抗体的效果评价(%)

| 项目  | GADA  | IA-2A | ICA   | ZnT8A | IAA   | 5 种联合检测 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| 灵敏度 | 59.52 | 23.81 | 38.10 | 38.1  | 23.81 | 88.10   |
| 特异度 | 98.15 | 98.15 | 98.15 | 98.15 | 96.30 | 90.70   |

3 讨论

在 T1DM 发病前、发病早期和发病后会产生许多自身抗体,直到目前为止,与 T1DM 相关的自身抗体仍不断被发现。通过大量的研究,人们已经清楚地认

识到,要确切地诊断 T1DM,仅一种自身抗体指标的预测能力是非常有限的。研究表明,联合多种抗体测定可提高胰岛自身抗体的检出率<sup>[5]</sup>。谢志国等<sup>[6]</sup>报道,在新诊断的 T1DM 患者中,单独检测 GADA 阳性

率为 70.2%(144/205);联合检测 GADA+IA-2A,任一抗体阳性者 166 例,阳性率提高至 81.0%(与 GADA 单独检测相比,  $P < 0.05$ );在检测 GADA 和 IA-2A 的基础上,进一步联合检测 ZnT8A,任一抗体阳性者为 170 例,阳性率进一步提高至 82.9%,但与 GADA+IA-2A 联合检测相比,阳性率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。研制并应用可实现多种胰岛自身抗体联合检测的方法有重要的临床意义,可减少 T1DM 尤其是临床特征不典型的 T1DM 患者的漏诊<sup>[7]</sup>。本研究研制的糖尿病自身抗体检测试剂盒 Array-ELISA 可同时检测 ICA、IAA、GADA、IA-2A 和 ZnT8A 5 种抗体,对 42 例临床确诊 T1DM 患者血清标本进行检测,5 种抗体联合检测的灵敏度为 88.10%,特异度为 90.70%,阳性检测结果可以有效鉴别诊断 T1DM,指导临床精准治疗。

糖尿病自身抗体的测定方法主要包括免疫组化法、放射免疫分析法(RIA)、ELISA、IBT、化学发光法(CLIA)、放射配体分析法(RBA)等。其中免疫组化法具有准确度高、特异度强、重复性好且直观的特点,但由于操作繁琐耗时已逐渐被 ELISA 替代。RIA 是一种十分经典的方法,较早应用于胰岛自身抗体的测定,具有较高的灵敏度和特异度,但是由于存在放射性污染,目前临床已经很少使用。ELISA 是应用较成熟的一种方法,可得到较可靠的结果,但利用该法进行多指标联合测定则存在检测费时、报告周期较长等不足。IBT 结合了聚丙烯酰胺凝胶电泳的高分辨率和免疫标记技术的高特异度及灵敏度的优点,近年来开始应用于胰岛自身抗体的测定,该方法简便,可一次同时测定几种自身抗体,其特异度好,但灵敏度也有待提高<sup>[8-9]</sup>。CLIA 是近年发展起来的检验方法之一,具有高通量、高特异度及灵敏度、检测速度快等优点,但一次只能检测一个抗体。多年来的标准化工作证实,RBA 因其灵敏度和特异度高,结果重现性好,检测线性范围宽,被欧美发达国家认定为胰岛自身抗体检测的参考方法(金标准)<sup>[10]</sup>,但该方法操作复杂,检测步骤多,影响因素多,并不适合临床检测。因此,发展准确快速、灵敏特异、并可以同时测定多指标的新技术和新方法非常必需。本研究研制的糖尿病自身抗体检测试剂盒 Array-ELISA 与 IBT 相比,两种方法均可以检测 5 种自身抗体,同时对临床标本进行检测,5 种自身抗体的总符合率均在 90.00%以上,Kappa 值均大于 0.75,两种方法具有高度一致性。

目前有部分检测试剂可以在诊断 DM 基础上初步分型,如英国 RSR(GADA、IA-2A、ZnT8A)免疫放射 IRMA 试剂盒、德国 MedipanGmbH(GADA、IA-

2A)ELISA 检测试剂盒、美国 Biomerica(GADA、IAA、ICA)ELISA 检测试剂盒,国内深圳市伯劳特公司糖尿病分型试剂盒(IBT 法)、深圳赛尔(GADA、IAA、ICA)ELISA 检测试剂盒、斯德润(北京)医疗诊断用品有限公司生产的糖尿病自身抗体谱检测试剂盒。相比于现有试剂盒,本研究制备的试剂盒采用 Array-ELISA 技术,应用标准 96 孔板作为固相,兼容各种酶标洗板机及自动酶免分析系统,解决了手工操作印迹膜条的操作复杂、重复性差、均一性差等问题,同时又具有高通量的特点。检测结果由生物芯片阅读仪自动判读,检测结果客观,避免人工肉眼判断的主观性,更加适用于临床上对糖尿病自身抗体的检测,有效辅助糖尿病的分型诊断,从而实现 T1DM 患者的早期正确诊断。

## 参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 1 型糖尿病诊治指南[S]. 北京:中华医学会糖尿病学分会,2012.
- [2] 郑朝安. 1 型糖尿病的发病机制[J]. 国际儿科学杂志, 2020,47(4):274-278.
- [3] 王竹,李霞,颜湘,等. 胰岛素自身抗体电化学发光法的建立与应用[J]. 中华医学杂志,2020,100(6):424-429.
- [4] 李裕昌,康晓平,张雨,等. 5 种呼吸道病毒 Array-ELISA 检测方法的建立[J]. 生物技术通讯,2015,26(3):403-407.
- [5] 刘艺文,余洁,马明磊,等. 1 型糖尿病患者血清胰岛自身抗体阳性率及其与临床指标的相关性[J]. 中国医刊, 2019,54(4):371-375.
- [6] 谢志国,郭婷,李霞,等. 新诊断 1 型糖尿病患者器官特异性自身抗体研究[J]. 中华糖尿病杂志,2019,11(7):477-481.
- [7] LIU Y W, LI J, WU J X, et al. A plasmon-enhanced fluorescence protein microchip with high-sensitivity for multiple islet autoantibodies measurements in autoimmune diabetes diagnosis[J]. J Biomed Nanotechnol, 2018, 14(8): 1496-1504.
- [8] 黄干,杨涛,刘煜,等. 中国胰岛自身抗体检测标准化计划报告:检测方法调查及准确性评估[J]. 中华糖尿病杂志, 2016,8(12):723-728.
- [9] 陈恒,沈敏,戴皓,等. 锌转运体 8 自身抗体电化学发光法的建立与应用[J]. 中华糖尿病杂志,2020,12(8):613-618.
- [10] 谢志国,王竹,黄干,等. 建立胰岛自身抗体检测质量评价体系提高自身免疫糖尿病的诊断水平[J]. 中华医学杂志,2019,99(18):1361-1364.

(收稿日期:2020-06-28 修回日期:2020-10-19)