

· 论 著 ·

# 心肌肌钙蛋白 I 自身抗体间接酶联免疫吸附分析法的建立

吴 豫<sup>1</sup>, 唐古生<sup>2</sup>, 赵伟国<sup>3</sup>, 沈 茜<sup>2</sup>

**[摘要]** **目的** 建立以重组心肌肌钙蛋白 I-C(cTnI-C)融合蛋白为包被抗原的间接酶联免疫吸附分析法(ELISA),检测人血循环中的抗 cTnI 自身抗体,为判断心肌损伤的预后提供依据。**方法** 采用自行构建表达的 cTnI-C 融合蛋白作为包被抗原,以棋盘法优化实验条件,建立检测人血清 cTnI 自身抗体的间接 ELISA 方法。采用建立的间接 ELISA 法在 121 例急性心肌梗死(AMI)中筛查抗 cTnI 自身抗体,并用蛋白印迹法(WB)进行确证。**结果** 121 例 AMI 血清抗 cTnI 抗体的阳性率为 10.74%,ELISA 试验的灵敏度 100%,特异性 95.37%,Kappa 值为 0.815。**结论** 以 cTnI-C 融合蛋白作为包被蛋白建立的间接 ELISA 法具有良好的敏感度、特异性,可用于人血清抗 cTnI 自身抗体的筛查。

**[关键词]** 心肌梗死;重组人心肌肌钙蛋白 I-C;肌钙蛋白 C;人循环心肌肌钙蛋白 I 自身抗体;间接酶联免疫吸附分析法

[中图分类号] R542.22 [文献标志码] A [文章编号] 1672-271X(2011)03-0211-04

## Establishment of an indirect ELISA method with recombination cTnI-C fusion protein for detection of cTnI autoantibody

WU Yu<sup>1</sup>, TANG Gu-Sheng<sup>2</sup>, ZHAO Wei-Guo<sup>3</sup>, SHEN Qian<sup>2</sup>. 1. Department of Laboratory Medicine, 94 Hospital of PLA, Nanchang, Jiangxi 330002, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Beyond Diagnostics Inc., Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To establish an indirect ELISA using cTnI-C recombinant protein as coating antigen in detecting cTnI autoantibody, and to provide with a method for detection of cTnI autoantibody in blood circulation and the prognostic test for myocardial damage. **Methods** cTnI-C recombinant protein was used as coating protein to establish indirect ELISA through checkerboard method. Screening of cTnI serum autoantibody in 121 AMI patients was done by indirect ELISA and was confirmed by western blotting. **Results** cTnI autoantibody was positively detected in 10.74% of the 121 AMI patients. The sensitivity of detecting cTnI autoantibody with this recombinant protein was 100% and specificity was 95%. Kappa value was 0.82. **Conclusion** The cTnI-C fusion protein can be used to indirect ELISA in detecting cTnI autoantibody.

**[Key words]** myocardial infarction; cardiac troponin I-C; troponin C; cTnI autoantibody; indirect ELISA

重组心肌肌钙蛋白 I(cTnI)自身抗体是 1996 年 Bohner 等<sup>[1]</sup>首次报道的能对 cTnI 检测产生负性干扰的物质。近年来研究表明, cTnI 自身抗体不仅会使 cTnI 检测结果显著降低<sup>[2]</sup>, 还是急性冠脉综合征病情进展的独立危险因素<sup>[3-4]</sup>, 并可能与心肌损伤后的心室肥厚、心室重构和心力衰竭有着密切关

系<sup>[5]</sup>, 故掌握人体内循环抗 cTnI 自身抗体情况对判断心肌损伤患者的预后有一定临床意义。然而目前检测人循环抗 cTnI 自身抗体方法学建立报道较少。因此我们采用了具有良好稳定性和免疫原性的基因重组 cTnI-TnC 融合蛋白作为包被抗原, 建立了检测人循环 cTnI 自身抗体的间接 ELISA 方法, 现报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** cTnI-C 融合蛋白采用基因重组原核表达, 制备方法和纯化鉴定见文献<sup>[6]</sup>。鼠抗人 cTnI 单克隆抗体(浓度为 7.3 μg/L)和正常小鼠血清由长海医院科研中心馈赠。辣根过氧化物酶

基金项目: 南京军区重点课题资助(10Z016)

作者简介: 吴 豫(1972-), 女, 河北保定人, 硕士, 主管技师, 从事临床免疫学检验工作

作者单位: 1. 330002 江西南昌, 解放军 94 医院检验病理科; 2. 200433 上海, 第二军医大学附属长海医院实验诊断科; 3. 200433 上海, 上海博阳生物科技有限公司

通讯作者: 沈 茜, E-mail: msminli@hotmail.com

(HRP) 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体和 HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体购自美国 KPL 公司。脱脂奶粉购自上海光明乳业集团。显影、定影液购自美国柯达公司。牛血清白蛋白(BSA)购自国药集团化学试剂公司。四甲基苯胺兰底物反应液(TMB)购自上海科华公司。Multiskan Ascent 型酶标仪由芬兰 Thermo Lab2 systems 公司生产。自动洗板机由美国 Bio-Rad 公司生产。Access-2 cTnI 检测系统由美国 Backman Coulter 公司生产。

**1.2 包被抗原工作浓度** 以正常小鼠血清作为确定 cTnI-C 初步包被浓度的阴性对照,小鼠抗人 cTnI-C 单克隆抗体为阳性对照,将阴性及阳性血清和 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 分别倍比稀释后,采用棋盘法在 96 孔酶标板上进行方阵滴定,取阳性值 1.0 左右,阴性值 0.2 左右,空白对照小于 0.1 的反应孔蛋白浓度作为包被抗原浓度。

**1.3 抗 cTnI 自身抗体阳性对照血清筛查** 用间接 ELISA 法对 80 份 AMI 血清(1:20 稀释)进行初步盲筛,HRP 标记的羊抗人 IgG 按试剂说明书推荐浓度稀释,从中选出 1 份  $A_{450nm}$  最高的血清。再用常规免疫印迹技术(WB)对初筛出来的吸光度最高血清进行鉴定,此血清作为间接 ELISA 检测 cTnI 自身抗体建立、条件优化及检测的阳性对照血清。

**1.4 间接 ELISA 方法最适实验条件的确定** 以筛选出的 cTnI 抗体阳性血清作为确定 cTnI-C 最终包被浓度的阳性对照,健康对照组混合血清作为阴性对照,采用棋盘法进行方阵滴定,确定最佳血清稀释度和最佳酶标抗体的稀释度。于 450 nm 检测的吸光度,按阳性血清与阴性血清吸光度之比(P/N 值)最大,且阴性血清及空白对照的吸光度较低的原则确定反应条件。

**1.5 cTnI 自身抗体阳性结果判定标准的确定** 用建立的间接 ELISA 方法检测 210 份健康对照组血清,经统计学分析得到阴性血清在 450 nm 的吸光度平均值,以  $\bar{x}_{450nm} + 3s$  作为确定 cTnI 自身抗体阳性的临界值。

**1.6 灵敏度和特异性试验** 用建立的间接 ELISA 法检测 121 例 AMI 血清的 cTnI 自身抗体,血清样本全部用 WB 法再次进行鉴定。

**1.7 阻断试验** 取其中 1 例 cTnI 自身抗体阳性患者血清(吸光度 1.934, WB 阳性)、健康体检者混合血清,分别加入 cTnI 浓度(Access-2 测定)为 0.625、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00  $\mu\text{g/L}$  的 cTnI-C 融合蛋白进行阻断,37℃ 孵育 30 min 后,用建立的间接 ELISA 法检测其吸光度变化。

**1.8 干扰试验** 用建立的间接 ELISA 法检测 10 例 HBV 阳性血清、10 例 HCV 阳性血清、6 例自身免疫病(均无心血管疾病史)血清的 cTnI 自身抗体。然后加入 cTnI 浓度为 0.625、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00  $\mu\text{g/L}$  的 cTnI-C 融合蛋白进行阻断,再次用建立的间接 ELISA 法检测其吸光度变化。

**1.9 重复性实验** 按建立的间接 ELISA 方法,用 4 块反应板在不同时间对阳性和阴性血清各 6 份做“板内重复试验”和“板间重复试验”,每份样品每板重复 7 次,并对检测结果进行统计学分析,判断检测结果的重复性。

**1.10 统计学处理** 采用 SPSS 11.0 统计软件包进行统计学分析,计数资料采用  $\chi^2$  检验并计算 Kappa 值,  $Kappa \geq 0.75$  则表示两者一致性较好。

## 2 结果

**2.1 最佳 cTnI 自身抗体检测试验条件** 经过方阵滴定, cTnI-C 的包被浓度为 10  $\mu\text{g/L}$ 。在 80 例 AMI 血清中盲筛出  $A_{450nm}$  最高的血清为 1.934, 该血清于预包被在硝酸纤维素膜上相对分子质量为 43000 处出现清晰的阳性条带(图 1)。该血清作为实验参考血清。确定最佳血清稀释度为 1:50, 最佳酶标二抗工作稀释度为 1:8000。

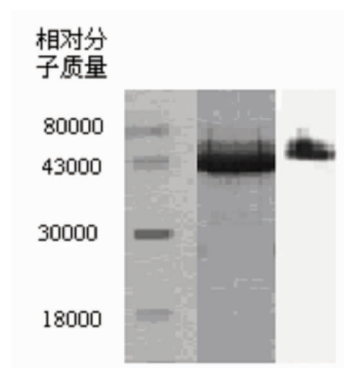


图 1 cTnI 自身抗体阳性血清 WB 鉴定

**2.2 间接 ELISA 方法检测结果的判定标准** 210 例健康体检者的  $A_{450nm}$  为 0.016 ~ 0.628 ( $0.19 \pm 0.12$ ), 以  $\bar{x}_{450nm} + 3s$  作为 cTnI 自身抗体的阳性临界值(cutoff 值), 为 0.55。

**2.3 特异性观察** 为了排除包被抗原 cTn-C 融合蛋白中 TnC 对检测结果的干扰, 取 30 例正常体检者血清采用间接 ELISA 法对 TnC 自身抗体进行了筛查。正常血清 TnC 自身抗体 ELISA 的  $A_{450nm}$  为 0.16 ~ 0.52 ( $0.28 \pm 0.13$ ), 以  $\bar{x}_{450nm} + 3s$  作为 TnC 自身抗体的阳性临界值(cutoff 值), 为 0.67。121 例 AMI 血清随机抽取 50 份进行 TnC 自身抗体筛查,

其中包括 cTnI 自身抗体阳性血清。 $A_{450nm}$  范围为 0.28 ~ 0.61,无一例高于 cutoff 值,因此本实验结果完全可以排除 TnC 的干扰。

对 121 例 AMI 血清全部用 WB 进行再次确认。AMI 患者血清中 18 例 ELISA 筛查高于 cutoff 值,其

中有 13 例得到了 WB 的确认,5 例为假阳性(图 2)。而低于 cutoff 值的血清样本没有发现阳性条带。试验灵敏度为 100%,特异性为 95%,Kappa 值为 0.815,ELISA 和 WB 试验具有较好的一致性(表 1)。

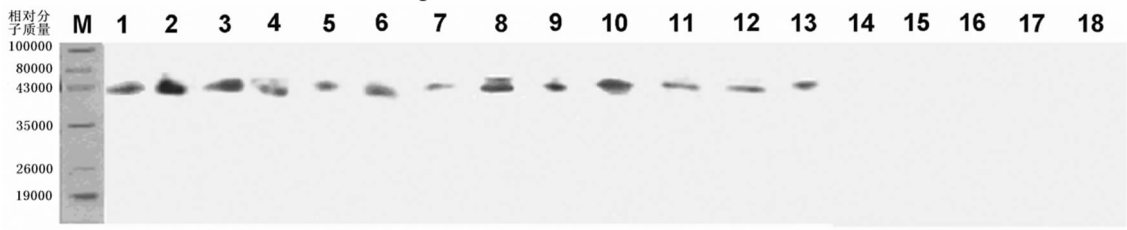


图 2 AMI 患者抗 cTnI 自身抗体 WB 确证结果

M 为蛋白分子量标准带;1 ~ 13 为 13 例 cTnI 自身抗体患者血清 WB 结果,与相对分子质量 43 000 附近之目的蛋白特异性结合;14 ~ 18 为 5 例 cTnI 自身抗体 ELISA 结果经 WB 确证为假阳性

表 1 ELISA 和 WB 检测 AMI 患者 cTnI 自身抗体结果(例)

ELISA 法	WB 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	13	5	18
阴性	0	103	103
合计	13	108	121

注:Kappa 值为 0.815

**2.4 阻断试验结果** 在 1 例 cTnI 自身抗体阳性血清(吸光度 1.934, WB 阳性)和健康人混合血清中分别加入 cTnI 浓度为 0.625、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00  $\mu\text{g/L}$  的 cTnI-C 融合蛋白后,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,再次采用建立的间接 ELISA 法检测吸光度,cTnI 自身抗体阳性患者血清的  $A_{450nm}$  从 1.934 下降到了 0.183,而健康人血清的  $A_{450nm}$  则没有明显变化(表 2),说明加入的 cTnI-C 融合蛋白能够特异性竞争结合 cTnI 自身抗体。

表 2 cTnI 自身抗体阳性血清阻断试验结果( $A_{450nm}$ )

cTnI( $\mu\text{g/L}$ )	cTnI 自身抗体阳性血清	健康对照血清
0.00	1.934	0.223
0.63	1.623	0.256
6.25	1.213	0.302
12.50	0.756	0.298
25.00	0.196	0.321
50.00	0.208	0.214
100.00	0.183	0.238

**2.5 干扰试验结果** 在 HBV、HCV 和自身免疫病

患者血清中检测 cTnI 自身抗体,有 2 例 HCV 阳性血清的 cTnI 检测  $A_{450nm}$  高于临界值( $A_{450nm}$  分别为 0.623 和 0.589);有 2 例类风湿关节炎患者  $A_{450nm}$  高于临界值( $A_{450nm}$  分别为 0.689 和 0.668)。在这些血清中加入 cTnI 浓度为 0.625、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00  $\mu\text{g/L}$  的 cTnI-C 融合蛋白再次进行间接 ELISA 检测后,其吸光度未发生明显变化,说明类风湿因子等内源性干扰因素会影响 cTnI 自身抗体检测。

**2.6 重复性观察** 用 4 块酶标板检测 5 份阳性血清和 6 份阴性血清,结果显示,板内变异系数 2.0% ~ 12.7%,板间变异系数 4.0% ~ 13.1%,说明该方法的重复性良好。

3 讨论

建立间接 ELISA 法的核心材料是包被抗原的特异性和纯度。cTnI 是心肌肌钙蛋白复合物的亚单位,游离的 cTnI 单体非常不稳定,在人体血液循环中的半衰期只有 5 min,有学者测定了人体内血清中的 cTnI、cTnI-TnC 和 cTnI-TnC-cTnT 的复合物,证实血清中 cTnI 稳定存在的主要形式是二聚体复合物 cTnI-TnC<sup>[7-8]</sup>。因此本研究采用了具有良好免疫原性的基因重组 cTnI-TnC 融合蛋白作为包被蛋白用于检测 cTnI 自身抗体,且纯度达 85% 以上,保证了间接 ELISA 法的特异性和稳定性。

在本试验中建立检测 cTnI 自身抗体的间接 ELISA 法缺乏阳性对照,为此采用小鼠单克隆抗体 (下转第 230 页)

减少醋酸所致小鼠腹痛的扭体次数,同时显著延长小鼠热板的痛阈时间,具有显著的解热和镇痛作用<sup>[1]</sup>。十味板蓝根颗粒具有明显的抗炎作用,对交叉莱胶及二甲苯所致肿胀有明显的抑制作用,能显著的抑制醋酸所致小鼠腹腔内炎性物质的渗出,对急性和慢性炎症均有明显的抑制作用<sup>[7]</sup>。体外细胞实验结果,十味板蓝根颗粒剂浓度在 500  $\mu\text{g/ml}$  以上能明显抑制对柯萨奇病毒 B3 株(CVB3)和单纯疱疹病毒 II 型(HSV-II)致细胞病变作用。板蓝根及其为主药的多种制剂是治疗上呼吸道感染,尤其是治疗病毒性感染的常用药物,如板蓝根片、板蓝根颗粒剂及板蓝根注射液<sup>[8]</sup>。其复方制剂疗效佳,本品中配伍多味中药材,中医辨证施治,全方配伍共奏疏风发汗解表,清热解毒利咽之功,对治疗上呼吸道感染疗效甚佳。

研究表明纯中药制剂十味板蓝根颗粒剂可明显调节患者的临床症状,起效快,疗程短,疗效确切,对控制病情、促进患者机体恢复起到良好的作用,安全且无毒副反应,值得推广使用。

(上接第 213 页)

建立了初步的间接 ELISA 方法,在 AMI 患者中进行了筛查,对  $A_{450\text{nm}}$  最高的血清经过 WB 确证后,用于待检血清稀释度和酶标记 HRP 二抗工作浓度确定。为了保证采用该方法筛查来的 cTnI 自身抗体血清绝大部分为真阳性,将检测 cTnI 自身抗体阳性的临界值定为  $\bar{x}_{450\text{nm}} + 3s$ 。在本研究中,筛查了 121 例 AMI 血清,18 例高于临床诊断值的血清中有 13 例阳性和 5 例假阳性。而低于 cutoff 值的血清样本没有发现阳性条带。ELISA 试验灵敏度为 100%,特异性为 95%,Kappa 值为 0.82,且和 WB 试验具有较好的一致性。

为进一步探讨筛查出的 cTnI 自身抗体阳性标本的特异性,选择其中 1 例 cTnI 抗体阳性血清加入 cTnI-C 融合蛋白共同反应后,其  $A_{450\text{nm}}$  值明显下降至完全被阻断,由此可见,本研究建立的间接 ELISA 法所检测出来的 cTnI 自身抗体是针对 cTnI 特异性的抗体。在对该方法的干扰试验研究中,HCV 和 RF 均会对试验产生一定程度的假阳性干扰,虽无特异性,还需进一步优化试验条件减轻这种干扰。

总之,以 cTnI-C 融合蛋白作为包被蛋白建立的间接 ELISA 法具有良好的敏感度、特异性,与 WB 有较好的一致性,可作为人循环抗 cTnI 自身抗体的筛查方法。

## 【参考文献】

- [1] 邱彦,司梁宏,刘静,等. 十味板蓝根颗粒解热镇痛作用的实验研究[J]. 中药材,2009,32(7):1117-1119.
- [2] 叶任高,陆再英. 内科学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2005:11-14.
- [3] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2002:58-59.
- [4] 肖柳. 中医药治疗上呼吸道感染的临床研究进展[J]. 实用中医内科杂志,2010,24(2):28-29.
- [5] 孙春玲,宋好玲,程会云,等. 中医药在治疗上呼吸道感染中的应用综述[J]. 中华实用中西医杂志,2010,21(5):372-373.
- [6] 王晓波,于晓华,刘卫平. 某应急兵站秋季野外驻训期间发病情况调查[J]. 东南国防医药,2008,10(2):157-158.
- [7] 司梁宏,黄宁,刘静,等. 十味板蓝根颗粒剂抗炎作用的实验研究[J]. 解放军药理学学报,2008,24(6):519-520.
- [8] 石磊,万宗明,董璿瑾,等. 四种板蓝根提取物抗流感病毒实验研究[J]. 武警医学院学报,2010,19(9):689-691.

(收稿日期:2011-03-07;修回日期:2011-04-14)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)

## 【参考文献】

- [1] Bohner J, Pape KW, Hannes W, et al. False-negative immunoassay results for cardiac troponin I probably due to circulating troponin I autoantibodies [J]. Clin Chem, 1996,42(12):2046.
- [2] 吴豫,唐古生,赵伟国,等. 循环心肌肌钙蛋白 I 自身抗体对五种常用的肌钙蛋白 I 检测系统负性干扰分析[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(9):749-753.
- [3] Pettersson K, Eriksson S, Wittfooth S, et al. Antiantibodies to cardiac troponin associate with higher initial concentrations and longer release of troponin I in acute coronary syndrome patients [J]. Clin Chem, 2009,55(5):938-945.
- [4] 丁雪燕,罗助荣. 急性冠脉综合征血清脑钠肽水平及阿托伐他汀对其影响[J]. 东南国防医药,2009,11(1):37-39.
- [5] Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, et al. Autoantibody against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice [J]. Nat Med, 2003,9(12):1477-1483.
- [6] 吴豫,赵伟国,沈茜. 循环心肌肌钙蛋白 I 自身抗体的检测及临床意义[J]. 中华检验医学杂志,2008,31(7):801-806.
- [7] Mockel M, Heller G Jr, Berg K, et al. The acute coronary syndrome diagnosis and prognosis evaluation by troponin I is influenced by the test system affinity to different troponin complexes [J]. Clin Chem Acta, 2000,293(1-2):139-155.
- [8] Datta P, Foster K, Dasgupta A. Comparison of immunoreactivity of five human cardiac troponin I assay toward free and complexed forms of the antigen: implications for assay discordance [J]. Clin Chem, 1999,45(12):2266-2269.

(收稿日期:2010-10-11;修回日期:2011-01-08)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)