

血清碳酸酐酶 II 抗体 ELISA 方法的建立及应用评价

肖敬川, 王顺兰, 曹 卉[△]

(中南大学湘雅医学院附属海口医院中心实验室, 海口 570208)

摘要:目的 建立人血清碳酸酐酶(CA) II 抗体的酶联免疫吸附试验(ELISA)检测方法,并对高血压肾病、慢性肾小球肾炎及 2 型糖尿病肾病患者和健康人群血清 CA II 抗体水平进行应用评价。方法 使用 CA II 蛋白、CA II 的单克隆抗体及相应酶标抗体建立血清 CA II 抗体 ELISA 检测方法,并进行精密度、灵敏度、稳定性、抗干扰性等方法学评价。结果 血清 CA II 抗体 ELISA 检测方法批内精密度的 6.0%, 批间精密度 8.6%, 灵敏度为 0.032, 且具有较好的抗干扰性和稳定性。慢性肾小球肾炎和 2 型糖尿病肾病患者血清 CA II 抗体水平明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 高血压肾病组血清 CA II 抗体水平与健康对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 建立满足临床检验需求的血清 CA II 抗体 ELISA 方法具有可行性, CA II 抗体可能作为自身抗体参与了慢性肾小球肾炎和 2 型糖尿病肾病的发生进展。

关键词:自身抗体; 碳酸酐酶 II 抗体; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.08.016

中图法分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2018)08-0953-03

文献标识码:A

Establishment and application evaluation of the ELISA method for anti-carbonic anhydrase II antibody

XIAO Jingchuan, WANG Shunlan, CAO Hui[△]

(The Central Laboratory of Central South University Xiangya School of Medicine
Affiliated, Haikou Hospital, Haikou, Hainan 570208, China)

Abstract: Objective To establish an ELISA detection method for human serum carbonic anhydrase (CA) II antibody, and to evaluate the level of serum CA II antibody in patients with hypertensive nephropathy, chronic glomerulonephritis, type 2 diabetic nephropathy and healthy people. **Methods** To establish the ELISA method using CA II, anti-CA II monoclonal antibody and enzyme labeled secondary antibody, the evaluation of the degree of precision and sensitivity, and stability and anti-interference performance of the ELISA were made. **Results** The detection accuracy of serum CA II antibody ELISA was 6.0%, the precision between the batches was 8.6%, the sensitivity was 0.032, and with favorable anti-interference performance and stability. The level of serum anti-CA II antibody was significantly higher in patients with chronic glomerulonephritis and 2-type diabetic nephropathy compared with the normal control ($P < 0.05$). There was no significant difference in serum CA II antibody level between hypertensive nephropathy group and healthy control group ($P > 0.05$). **Conclusion** It is feasible to establish a serum CA II antibody ELISA method to meet the needs of clinical test. CA II antibody may be used as autoantibody to participate in the development of chronic glomerulonephritis and type 2 diabetic nephropathy.

Key words: autoantibody; anti-carbonic anhydrase II antibody; enzyme-linked immunosorbent assay

碳酸酐酶(CA)是一组含锌的金属酶,可以催化 CO_2 和 HCO_3^- 之间的相互转化并广泛参与机体的多种生理过程^[1-2]。目前碳酸酐酶 II (CA II) 抗体在自身免疫性疾病、1 型糖尿病等疾病中已有较多的检测报道^[3-4], 但国内对于无自身免疫性疾病的肾病患者和健康人群的血清 CA II 抗体水平报道极少。本研究旨在建立一种灵敏、准确、快捷的应用于临床 CA II 抗体检验的方法, 并对此方法进行初步的应用评价。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 10 月至 2016 年 5 月在本院肾内科住院患者 116 例为研究对象。其中, 高血压肾病患者(HRD 组)29 例, 男 13 例, 女 16 例; 年龄 50~70 岁, 中位数年龄 59 岁; 慢性肾小球肾炎患者(CGN 组)31 例, 男 15 例, 女 16 例; 年龄 46~67 岁, 中位数年龄 57 岁; 2 型糖尿病肾病患者(2-DN 组)26 例, 男 11 例, 女 15 例; 年龄 53~72 岁, 中位数年龄 62 岁; 另选取同期体检健康者 30 例为对照组, 男 14 例,

作者简介:肖敬川,男,主管技师,主要从事分子生物学的基因检测研究。 [△] 通信作者, E-mail:42412481@qq.com。

本文引用格式:肖敬川,王顺兰,曹卉. 血清碳酸酐酶 II 抗体 ELISA 方法的建立及应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(8):953-955.

女 16 例;年龄 51~70 岁,中位数年龄 60 岁;对照组排除急性感染、自身免疫性及肿瘤疾病等。所有受试者均对本研究知情同意。

1.2 仪器与试剂 酶标板(Costar);酶标仪(Bio-RAD xMark);重组人 CA II 蛋白(Sigma 公司, C6624);重组人 CA X 蛋白(Sigma 公司, A4112);兔抗人 CA II 单克隆抗体(Abcam 公司, ab124687);ALP 标记的酶标二抗及底物 NPP(KPL 公司);配制缓冲液等其他试剂为国内分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 操作步骤 用包被缓冲液稀释 CA II 至 5 μg/mL 后包被酶标板,包被的酶标板密封置于 4 °C 过夜;洗涤缓冲液清洗 3 次,加 50 μL 封闭缓冲液,室温 20 °C 放置 30 min;洗涤缓冲液洗板 3 次,每孔加 50 μL 经 1:200 稀释的待测血清样品及阴性对照,37 °C 放置 1 h;然后洗涤缓冲液清洗 3 次,每孔加入封闭缓冲液稀释的酶标二抗 50 μL,37 °C 放置 1 h;加入 75 μL NPP 底物缓冲液,37 °C 避光反应 30 min;每孔加入 25 μL 终止液,读取 405 nm 处吸光度(A)值。

1.3.2 最佳稀释倍比的确定 抗原包被浓度为 5 μg/mL,标准样品按照 1:1 000~1:32 000 倍比稀释,在每个标准样品倍比稀释孔分别使用不同的稀释倍数(1:400~1:6 400)的酶标二抗,其他实验条件一致,对比各孔 405 nm 处吸光度(A)值,确定酶标二抗最佳稀释倍数,并建立直线回归方程。

1.3.3 灵敏度、精密度及稳定性 灵敏度^[5]:使用公式 $A_{灵敏度} = A_{零剂量} + t_{0.95} \times S/n$ 计算 95% 可信区间下的灵敏度(n=20)。精密度^[6]:取高(1:1 000)、中(1:8 000)、低(1:32 000)3 个浓度的标准品,每份样品同一酶标板上检测 5 次,计算批内变异;每份样品在不同的酶标板上检测 5 次,计算批间变异。稳定性^[6]:新鲜配制的试剂储备于 4 °C 冰箱,高、中、低 3 个浓度的标准品分别于第 0、3、5、7 天分 4 次取出,按照操作程序检测同一浓度标准品,由检测的数值计算变异系数。

1.3.4 干扰实验 分别使用黄疸、乳糜、溶血的血清标本及 CA X 同工酶以 50% 比例混入 CA II 抗体的标准品,与相同浓度的标准品进行检测对比。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 回归方程的建立 以 CA II 抗体标准品稀释倍数(T)的自然对数(LnT)为自变量 X,以对应的吸光度(A)值为因变量 Y,使用 SPSS19.0 软件建立回归方程,所得模型检验的方差分析结果 P<0.001, R² = 0.984,表明建立的 A 值与 LnT 直线回归方程有效,回归方程为 Y = -0.356X + 0.084。

2.2 方法学试验结果 本实验的灵敏度经计算为

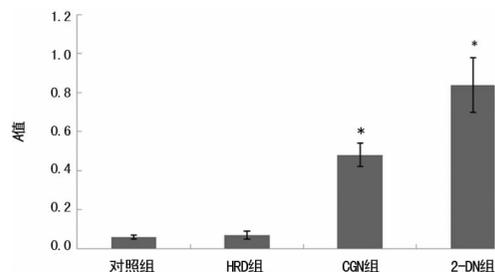
0.032。精密度测定的结果为批内和批间的变异系数均小于 10.0%(见表 1)。稳定性试验中,各个时间点的测定结果之间的变异系数也均小于 10.0%。

表 1 不同浓度标准品的批内和批间变异(%)

统计学指标	批内变异			批间变异		
	低浓度	中浓度	高浓度	低浓度	中浓度	高浓度
变异系数	5.8	5.4	6.7	8.4	7.9	9.6

2.3 干扰试验结果 分别使用胆红素 485 μmol/L 的黄疸标本、三酰甘油 19.8 mmol/L 的乳糜标本、血红蛋白浓度 14 g/L 的溶血标本及 CA X 抗体进行干扰试验,结果显示均不能对 CA II 抗体标准品的结果造成明显影响。

2.4 临床样本检测的应用 HRD 组血清 CA II 抗体水平(0.07±0.02)与对照组(0.06±0.01)比较,差异无统计学意义(P>0.05);CGN 组血清 CA II 抗体水平(0.48±0.06)明显高于对照组(0.06±0.01),差异有统计学意义(P<0.05);2-DN 组血清 CA II 抗体水平(0.84±0.14)明显高于对照组(0.06±0.01),差异有统计学意义(P<0.05),见图 1。



注:与对照组比较,* P<0.05

图 1 对照组、HRD 组、CGN 组和 2-DN 组 A 值的检测结果

3 讨论

CA II 抗体作为一种自身抗体已经得到很多科研工作者的认同和实际应用^[4,7]。自身抗体的临床检测方法目前主要采用的是间接免疫荧光法(IIF)和免疫印迹法(IBT)。IIF 方法使用具有较大核仁细胞的组织或者 Hep-2 作为抗原来源,用于细胞内抗原的定位或相应抗体的检测,该方法能够区别不同的荧光类型,特异性较高,但此实验主要基于手工操作,结果判断主观因素较大,容易造成结果判断的个人差异和室间差异^[8]。ELISA 法与 IIF 法相比,以吸光度 A 值代替滴度,以特异性抗体取代荧光模式,酶标记试剂相对稳定,相对而言,对结果的判定主观因素减少,更加客观。而且,IIF 法检测主要基于扫描自身抗核抗体,更多地应用于常规普查,疾病诊断特异性差。IBT 法是通过将特定抗原固化在膜条的特定位置,以待测血清或血浆样品为第一抗体的检测方法,抗原纯度较高,免疫反应特异性也较强,且可在膜条的不同位置固化不同特定抗原,实现同时对多种抗体的检测^[8]。

与 ELISA 法相比,IBT 法是一种定性检测,对于自身免疫性疾病活动期的动态监测需求难以实现。这两种方法虽然灵敏度和可靠性不错,但是操作复杂,主观影响因素多,在目前临床检验信息化、自动化及分子生物学技术方向的发展趋势下^[9],不适宜广泛应用。展望前景,随着新的筛选特异性抗原优势表位技术的应用如蛋白质组学技术和噬菌体展示技术的开发,会更加迅速提升 ELISA 法对特异性抗体的检测能力^[9],ELISA 法对于自身抗体检测的潜力优势会愈发明显。本研究成功建立了人血清 CA II 抗体的 ELISA 检测方法,其灵敏度、精密性、稳定性及抗干扰能力等指标都能满足 ELISA 常规检测的要求,操作简单快捷,优化以后可以进行批量检测,能满足临床检验的需求,具备进入临床应用的潜质。同时,ELISA 方法操作简单,易于自动化,检测结果受人主观经验影响因素少,易于和各种信息化设备对接,能够非常好地适应未来临床检验的发展趋势。

本研究选取的高血压肾病、慢性肾小球肾炎和 2 型糖尿病肾病为临床上的常见病。在慢性肾小球肾炎的病变进展中,肾小球毛细血管被破坏,造成肾组织损伤,导致隐蔽抗原暴露,在部分易感人群中可以诱导机体自身免疫应答,产生自身抗体^[10]。自身抗体免疫反应可以产生免疫复合物,而慢性肾小球肾炎的发病与免疫复合物在肾单元的沉积有很大关系^[11]。免疫复合物沉积在肾小球后可激活补体系统,肾脏组织由于肾小球和肾小管上皮细胞低表达补体调节蛋白而易受到补体介导的肾脏损伤^[12]。本研究结果显示,CA II 抗体在慢性肾小球肾炎组比对照组明显升高,提示 CA II 抗体可能作为一种自身抗体参与了慢性肾小球肾炎的疾病发展过程。

2 型糖尿病肾病是 2 型糖尿病的慢性并发症之一。随着肾活检的开展,研究人员发现 2 型糖尿病除高血糖直接损伤肾脏导致糖尿病肾病以外,原发性高血压、脂蛋白、免疫复合物等也是导致糖尿病肾病肾损伤的重要因素^[13]。免疫复合物能够通过吸引外周血中的炎性细胞或者激活肾小球细胞释放血管活性物质、细胞因子,以及激活补体系统后促进 C5b-9 攻膜复合物的形成等一系列途径损伤肾小球单位^[14]。本研究中 2 型糖尿病肾病血清中 CA II 抗体水平与健康对照组相比有明显差异,提示 CA II 抗体可能作为自身抗体的一种,以形成免疫复合物的方式参与了 2 型糖尿病肾病的进展。高血压肾病患者血清 CA II 抗体水平与对照组没有明显差异,从另一角度佐证了 2 型糖尿病肾病具有自身免疫的特征。

慢性肾小球肾炎和 2 型糖尿病肾病在病因上有很大的不同,本研究发现在这 2 种疾病发展过程中都有自身抗体形成免疫复合物导致损伤的共性,而高血

压肾病没有体现这一点,希望这对于后续研究探讨慢性肾小球肾炎和 2 型糖尿病肾病影响因素时有所提示。目前,自身抗体的研究已经越来越得到广大研究人员的重视,通过自身抗体这个方向能够拓展研究人员对于疾病的探索思路。

参考文献

- [1] KLIER M, ANDES F T, DEITMER J W, et al. Intracellular and extracellular carbonic anhydrases cooperate non-enzymatically to enhance activity of monocarboxylate transporters[J]. J Biol Chem, 2014, 289(5): 2765-2775.
- [2] 万祥祥, 宋皓军, 陈声灿, 等. 碳酸酐酶 IV 与人类疾病[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(11): 1560-1566.
- [3] ALVER A, SENTURK A, CAKIRBAY H, et al. Carbonic anhydrase II autoantibody and oxidative stress in rheumatoid arthritis[J]. Clin Biochem, 2011, 44(17/18): 1385-1389.
- [4] TALAR W, GASIOROWSKA A, OLAKOWSKI M, et al. Utility of serum IgG, IgG 4 and carbonic anhydrase II antibodies in distinguishing autoimmune pancreatitis from pancreatic cancer and chronic pancreatitis[J]. Adv Med Sci, 2014, 59(2): 288-292.
- [5] 李金明. 临床酶免疫测定技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2005.
- [6] 杨静, 曾昭伟, 王学谦, 等. 人血清癌胚抗原的生物素-亲和素 ELISA 检测方法的建立[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(8): 871-873.
- [7] ALVER A, MENTESE A, MENTESE U, et al. Anti-carbonic anhydrase II antibodies in end-stage renal disease patients[J]. Med Princ Pract, 2014, 23(4): 331-335.
- [8] 刘向东. 自身免疫性肝病的自身抗体检测技术[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(3): 161-163.
- [9] 石豪. 论临床医学检验的现状与发展趋势[J]. 中国卫生标准管理. 2017, 8(10): 112-113.
- [10] 赵林双, 廖玉华, 王敏, 等. 慢性肾小球肾炎患者血清 β 1 和 M2 受体自身抗体的变化[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(5): 469-471.
- [11] SUMIDA K, UBARA Y, NOMURA K. ANCA-associated crescentic glomerulo nephritis with immune complex deposits[J]. Clin Nephrol, 2012, 77(6): 454-460.
- [12] 林志, 张颖丽, 吕建军, 等. C3aR 和 STAT3 因子作为免疫复合物肾脏损伤生物标记物的研究[J]. 毒理学杂志, 2012, 6(3): 165-169.
- [13] 黄俊, 刘芳, 谢林仲, 等. 2 型糖尿病合并肾损伤临床和肾脏病理分析[J]. 华西医学, 2010, 25(3): 500-502.
- [14] NANGAKU M, COUSER W G. Mechanisms of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury[J]. Clin Exp Nephrol, 2005, 9(3): 183-191.