

• 生物技术与方法 •

I型前胶原氨基端肽化学发光免疫分析检测方法的建立及评价

任和, 韩霜, 陈祥, 李帅鹏, 白仲虎

江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

任和, 韩霜, 陈祥, 等. I型前胶原氨基端肽化学发光免疫分析检测方法的建立及评价. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4406-4414.

Ren H, Han S, Chen X, et al. Development and evaluation of a chemiluminescence immunoassay for type I procollagen N-terminal peptide. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4406-4414.

摘要: 为了建立定量检测人血清中 I 型前胶原氨基端肽 (Type I procollagen N-terminal peptide, PINP) 的化学发光免疫分析检测方法, 首先在谷氨酸棒状杆菌中分泌表达了 PINP- α 1 链重组蛋白, 以其为免疫原制备单抗, 获得了 2B10、8C12 和 1F11 共 3 株可稳定分泌抗 PINP- α 1 链的单抗杂交瘤细胞株。进一步配对筛选后, 以单抗 8C12 偶联生物素作为捕获抗体, 单抗 1F11 标记辣根过氧化物酶作为检测抗体, 二者与样本中的 PINP 结合形成夹心复合物, 再与包被有链霉亲和素的磁微粒形成完整的检测系统, 从而定量检测人血清中 PINP 的浓度。对该方法进行条件优化后, 确定捕获抗体、检测抗体的最佳工作浓度均为 3 μ g/mL, 孵育时间为 30 min; 本方法的最低检测限为 1.22 ng/mL, 批内、批间的变异系数均在 10% 以内, 线性范围为 5–1 100 ng/mL, 回收率在 93%–107% 之间。通过对 160 份临床样本进行检测, 本方法检测结果与罗氏诊断试剂盒检测结果的相关系数 R^2 为 0.906 2。开发的磁微粒化学发光免疫分析检测方法可定量检测人血清中 PINP 的含量, 有望成为骨骼疾病检查的辅助手段。

关键词: 磁微粒, 化学发光法, I 型前胶原氨基端肽, 性能评估

Development and evaluation of a chemiluminescence immunoassay for type I procollagen N-terminal peptide

He Ren, Shuang Han, Xiang Chen, Shuaipeng Li, and Zhonghu Bai

National Engineering Laboratory of Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: To develop a magnetic nanoparticle chemiluminescence immunoassay (CLIA) for the determination of type I procollagen N-terminal peptide (PINP) in human serum, we expressed a recombinant PINP- α 1 protein in *Corynebacterium glutamicum* and used it as an immunogen to immunize BALB/c mice. We obtained three hybridoma cell lines that stably secret

Received: February 1, 2021; **Accepted:** March 28, 2021

Supported by: Key Research and Development Program of Jiangsu Province, China (No. BE2018621).

Corresponding author: Zhonghu Bai. Tel: +86-510-85328539; E-mail: baizhonghu@jiangnan.edu.cn

江苏省重点研发项目 (No. BE2018621) 资助。

网络出版时间: 2021-04-12

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210412.0940.001.html>

antibody against PINP- $\alpha 1$ protein. After further pairing and screening, we chose a monoclonal antibody 8C12 coupled with biotin as the capture antibody, and a monoclonal antibody 1F11 labeled horseradish peroxidase as the detection antibody. The antibodies combined with the serum samples, forming a sandwich complex which was used to detect the concentration of PINP in serum. After optimizing the conditions, we determined that the best working concentration of the capture antibody and the detection antibody were 3 $\mu\text{g/mL}$, and the incubation time was 30 minutes. The quantitative assay had a detection range of 5–1 100 ng/mL, with recovery rates between 93%–107% and the minimum detection limit of 1.22 ng/mL achieved. The intra-and inter-assay precisions were lower than 10%. The correlation coefficient of PINP results between this CLIA method and the Roche electrochemiluminescence immunoassay system was 0.906 2. Therefore, this CLIA method is specific and can be used to quantitatively detect the content of PINP in serum, which has the potential to become an auxiliary approach for bone disease examination.

Keywords: magnetic particle, chemiluminescence, type I procollagen N-terminal peptide, performance evaluation

骨质疏松是一种世界常见病,全球大约有超过 2 亿名患者。随着我国老龄化社会的加剧,老年人口日益增长,骨质疏松已经逐渐发展为一种多发病,是引起老年人骨骼伤痛、骨损伤和生活质量恶化的主要原因^[1-2]。因此,对于骨质疏松的早期诊断筛查已经成为研究的热点内容。骨质疏松由机体骨代谢紊乱引起,骨骼作为人体的主要器官,时刻不停地进行着新陈代谢,包括吸收代谢和合成代谢两部分,正常状态下二者处于平衡状态。当骨吸收异常亢进,吸收速率大于合成速率时,平衡状态被破坏,就会引起骨代谢紊乱、骨骼结构损伤^[3]。国际上确诊骨质疏松的金标准检测方法是骨密度监测,但骨密度反应的是骨骼形态学的改变,往往需要几年时间才会发生变化,因此不能及时反馈人体骨骼生长情况和骨质疏松相关药物的治疗效果,并且骨密度检测仪器成本较高,特定医院才会配置,不适合大范围推广^[4]。

近年来血清标志物在骨质疏松的辅助诊断中起着越来越重要的作用,但常规检测指标不够完善,操作复杂且影响因素多,缺乏特异性。研究表明^[5], I 型前胶原氨基端肽 (PINP) 是一种高度特异性的骨代谢血清标志物,能够快速准确反映人体骨骼变化情况,可以用于骨质疏松的诊断筛查和相关药物治疗效果的临床监测。PINP 即 I 型胶原合成时氨基末端被切割后产生的一段多肽,由两条 $\alpha 1$ 链和一条 $\alpha 2$ 链组成,呈螺旋三聚

体结构。Risteli 等^[6]研究发现,血液中的 PINP 稳定存在,食物和昼夜节律不会影响其浓度改变,当骨代谢紊乱时, PINP 的浓度异常变化。高骨转化性疾病通常与 PINP 的异常表达有关,如软骨病、佩吉特氏病 (Paget disease)、原发和继发性甲状旁腺功能亢进等^[7]。血清 PINP 浓度的测定在评价骨代谢疾病、肿瘤骨转移疾病、内分泌紊乱和浆细胞骨髓瘤等疾病时同样起着重要的作用^[8-9]。因此, PINP 作为骨代谢检测指标,可以有效反映机体骨质的修复型状态,为骨质疏松等疾病的监测提供可靠的依据。

目前 PINP 的检测手段有放射性免疫检测法和化学发光检测法,放射性免疫检测法灵敏度低,而且有一定局限性。化学发光法既有免疫反应的特异性,又有高敏感性,以发光物质为示踪物,灵敏度高、线性范围宽、重复效果好、操作方便,在体外诊断行业得到了广泛应用^[10]。目前国外市场上有罗氏诊断公司生产的 PINP 电化学发光法检测试剂盒和 Orion 诊断公司生产的 PINP 放射性免疫分析检测试剂盒出售。国内暂无相关 PINP 检测试剂盒的研究,因此临床上只能依赖进口厂商提供的检测试剂。本研究以制备的 PINP- $\alpha 1$ 链重组蛋白为抗原,利用杂交瘤技术获得针对 PINP- $\alpha 1$ 链的单克隆抗体,利用磁微粒化学发光平台,建立了一种检测 PINP 的磁微粒化学发光免疫分析法,以期能够实现对骨代谢疾病的辅助诊断。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料与试剂

大肠杆菌DH5 α 、谷氨酸棒状杆菌CGMCC1.15647, 由本实验室保存; BALB/c 小鼠: 4 周龄, 清洁级, 购自江南大学动物实验中心; HisTrap HP 亲和柱纯、Ni-NTA 凝胶层析、链霉亲和素偶联磁微粒(直径 0.9 μm), 购自 GE 公司; 弗氏完全佐剂 (FCA)、弗氏不完全佐剂 (FIA)、血蓝蛋白 (KLH)、牛血清白蛋白 (BSA), 购自 Sigma 公司; 标准蛋白分子量 Marker、生物素化标记试剂、辣根过氧化物酶 (HRP)、TMB 显色液, 购自 Thermo Fisher 公司; 160 例临床血清样本, 由无锡市人民医院提供; 化学发光底物液 A 液 (异鲁米诺、TRIS) 和 B 液 (硼砂), 本实验室自制; PINP 电化学发光检测试剂盒, 购自美国罗氏诊断公司。

1.1.2 仪器

AKTA avant25 蛋白纯化系统, GE 公司; Elecsys E601 全自动免疫分析仪, 美国罗氏诊断公司; CIA600 化学发光测定仪, 江苏泽成生物技术有限公司; 洗板机, 英国 Anthos 公司, 型号 Fluido 2; 旋涡混匀器, 北京倍爱康生物技术有限公司, 型号 MIXER-I; 生化培养箱, 上海坤天实验仪器有限公司, 型号 SPX-80B。

1.2 方法

1.2.1 PINP- α 1 链的重组表达纯化和鉴定

PINP-COL1A1 基因序列经过密码子优化后交由苏州金维智公司合成 (GenBank 登录号: X00820.1)。合成序列在 5' 端添加谷氨酸棒状杆菌的内源信号肽 cspB, 3' 端添加 6 \times His 标签, 并最终通过 *Hind* III 和 *Eco*R I 克隆至表达载体 pXMJ19 中。重组载体首先转化至大肠杆菌进行筛选, 然后将测序正确的阳性载体转化至谷氨酸棒状杆菌 CGMCC1.15647 中诱导表达, IPTG 终浓度为 1 mmol/L。培养 36 h 后, 离心收集发酵液上清。蛋白纯化按照以下步骤进行: 收集含有 PINP- α 1

链的发酵上清液并利用 AKTA 蛋白纯化系统和 HisTrap HP 亲和柱纯化上清中的目的蛋白。最后采用 SDS-PAGE 分析和罗氏电化学发光检测系统分别对蛋白纯度和活性浓度进行测定。

1.2.2 PINP- α 1 链单克隆抗体的制备

取 PINP- α 1 链重组蛋白与 KLH 偶联形成抗原并与弗氏完全佐剂乳化, 乳化完全后免疫 BALB/c 小鼠 3 只, 抗原免疫量为 35 μg /只, 每 2 周进行 1 次, 共进行 3 次。最后 1 次免疫后的第 7 天取小鼠血清进行效价检测, 达到融合标准后取出脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0) 融合, 利用次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶 (Hypoxanthine-aminopterin-antithymidin, HAT) 培养基对杂交瘤细胞进行选择培养, 2 周后吸取细胞上清, 采用酶联免疫检测方法筛选阳性细胞株。利用有限稀释法进行阳性细胞株克隆培养以获得可稳定分泌抗 PINP- α 1 链的细胞株。取 BALB/c 小鼠, 采用体内诱生法制备腹水型单抗, 通过 Protein G 柱将腹水抗体进行亲和纯化。

1.2.3 抗体标记及标准品制备

生物素化捕获抗体制备: 抗体用 0.1 mol/L 碳酸氢钠缓冲液 (pH 8.0) 稀释到 1 mg/mL, 取 1 mg 的生物素化试剂 (NHS-LC-LC-Biotin) 溶解于上述溶液中。室温下持续搅拌。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 透析 8 h, 以除去游离的生物素, 透析期间更换液体 4 次。将透析后的抗体溶液通过 1 mL 分子筛层析柱, 以 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 缓慢洗脱, 收集生物素化的 PINP- α 1 链抗体。加入等体积甘油后分装, -20°C 冰冻避光保存。

辣根过氧化物酶标记检测抗体: 取辣根过氧化物酶 (HRP) 溶解于 1.25% 戊二醛溶液中, 室温过夜。反应后的酶溶液通过脱盐色谱柱, 用生理盐水洗脱, 收集棕色流出液。取 2.5 mg 待标记抗体, 用磷酸盐缓冲液稀释至 1 mL, 逐滴加入 HRP 溶液中并搅拌。加入 1 mol/L 碳酸钠缓冲液 (pH 9.5) 0.25 mL 和 0.2 mol/L 赖氨酸 0.25 mL, 混合均匀,

室温放置 2 h。加入 2.5 mL 饱和硫酸铵, 4 °C 静置 60 min。4 000 r/min 离心 20 min, 除上清, 半饱和硫酸铵清洗沉淀物 2 次后溶解于少量 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中。于 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 透析 8 h, 透析期间更换液体 4 次。透析后加入等体积甘油分装后, -20 °C 冰冻避光保存。

标准品制备: 将 PINP- α 1 链抗原用磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) (含 2% 牛丙种球蛋白, 0.5% 小鼠血清) 配制成 1 200、600、300、50、10、0 ng/mL 共 6 个工作校准品溶液, 分装后 -20 °C 冻存。

1.2.4 抗体鉴定及筛选

以 Western blotting 方法验证抗体特异性, 取 25 μ g PINP- α 1 链蛋白加入至上样缓冲液中, 样品沸水煮 5 min 后进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完成后将含有目的蛋白的胶条于 250 mA 恒流转膜 1.5 h (0.4 μ m 硝酸纤维素膜), 封闭液 TBST (含 5% 脱脂牛奶) 室温封闭 2 h, 将标记 HRP 的 PINP- α 1 链单抗以封闭液 1:1 000 进行稀释, 室温孵育 1 h, 加入底物显色。以 1 株单抗为包被抗体, 其余单抗为检测抗体, 将 PINP- α 1 链抗原配制成 P6 (1 200 ng/mL) 和 P3 (100 ng/mL) 两个检测样本, 采用双抗体夹心酶联免疫检测方法对抗体进行配对筛选。

1.2.5 条件优化

捕获抗体与检测抗体浓度的选择: 采用棋盘滴定法^[11], 将生物素化捕获抗体配制成 0.1、1、1.5、3、5、10 μ g/mL 共 6 个浓度梯度; HRP 标记的检测抗体配制成 0.5、1、3、5 μ g/mL 共 4 个浓度梯度, 以 PINP- α 1 链抗原 (1 200 ng/mL) 为检测样本, 用建立的检测方法进行信号值测定。

最佳反应时间的选择: 以确定工作浓度的捕获抗体和检测抗体对 PINP- α 1 链抗原进行检测, 设置 5 个不同的孵育时间 (8、10、20、30、40 min), 选择信号值接近最高值的时间为最佳反应时间。

1.2.6 化学发光检测方法开发

采用双抗体夹心化学发光法测定血清中

PINP 的含量。取 40 μ L 样本或校准品加入平底试管中, 加入 80 μ L 捕获抗体和 80 μ L 检测抗体, 振荡器混匀 2 min。在 37 °C 培养箱避光反应 30 min, 取 35 μ L 偶联链霉亲和素的磁微粒加入平底试管中, 振荡器混匀 2 min, 37 °C 避光反应 7 min, 磁板架上静置 2 min, 磁微粒沉淀后, 去除上清。取 300 μ L 清洗液加入试管中, 振荡器混匀 2 min, 磁板架上静置 2 min, 去除上清, 此清洗步骤重复进行 5 次。取化学发光底物液 A、B 等比例混合, 向试管中各加入 200 μ L 底物液, 立即放入化学发光测定仪检测。检测结果利用化学发光免疫分析仪数据管理软件分析处理, 通过四参数 Logistic 方程生成 PINP 标准曲线, 将样本信号值代入标准曲线中计算浓度。

1.2.7 分析性能评价

最低检测限: 重复测试校准品 1 (0 ng/mL) 20 份, 计算信号平均值 \bar{x} , 和标准差 s , 参考最低检测限测定方法, 将 $\bar{x}+2s$ 带入建立的 PINP 标准曲线进行计算, 得到的浓度值即为本方法的最低检测限。

精密度: 根据 NCCLS EP5-A2 文件, 用本文建立的方法对高、低浓度的 2 个血清样本进行检测, 选取 3 个不同批次 (20200910、20201010、20201210) 的试剂每天重复测定 2 次, 连续测定 20 d, 分别计算批内、批间的变异系数。

线性范围: 选取通过罗氏 PINP 检测系统定值的高值血清样本 (1 150.45 ng/mL) 倍比稀释得到系列样本浓度作为预测值, 每个样本重复测试 2 次, 所有测试在同一次运行中完成, 计算平均值记录为实际浓度值, 将预测值作为 X 轴, 实际值作为 Y 轴, 进行结果的线性回归分析, 将曲线拟合结果较好的区间作为检测方法的线性范围。

准确度: 将浓度为 8 500 ng/mL、5 000 ng/mL、500 ng/mL 的 PINP- α 1 链抗原各取 0.1 mL, 分别加入到 1 mL 浓度为 10 ng/mL 的 PINP 血清样本中, 每个样品重复测定 3 次, 以均值浓度计算回

收率, 回收率=(检测样本测定浓度-基础样本测定浓度)/添加物浓度×100%。

临床评价: 从无锡市人民医院检验科选取分布在检测范围内的 160 例 PINP 血清样本, 用本文建立的方法和罗氏诊断公司的 PINP 检测方法同时对血清进行测试, 两种检测方法各重复测定 3 次, 计算血清浓度的平均值。以罗氏参比试剂检测结果为 X 轴, 本文检测结果为 Y 轴, 进行回归分析。

2 结果与分析

2.1 PINP- α 1 链重组蛋白制备结果

PINP- α 1 链基因原核表达载体 PINP-pXMJ19 转化谷氨酸棒状杆菌后, 经过 IPTG 诱导, 得到了良好的分泌表达, 蛋白条带大约为 28 kDa (图 1), 符合预期。经过柱层析纯化, 纯度达到 95%以上。由表 1 可知, 通过罗氏电化学发光检测系统测定, 纯化后的重组蛋白在稀释 10 000 倍后仍能与试剂盒中的抗体反应, 说明重组蛋白有较好的抗原反应性。

2.2 PINP- α 1 链抗体鉴定及筛选结果

PINP- α 1 链抗原免疫小鼠 7 周后, 检测其尾血效价达到标准后进行细胞融合。共筛选到 3 株融合杂交瘤细胞阳性信号较强, 且分泌稳定, 分别命名为 8C12、2B10、1F11, 取阳性杂交瘤细胞悬浮液注射入小鼠腹腔, 常规方法制备腹水抗体, 以 Protein G 柱纯化抗体。通过 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定, 8C12 浓度为 5.07 mg/ml, 2B10 浓度为 6.92 mg/ml, 1F11 浓度为 6.84 mg/ml。通过 Western blotting 鉴定抗体的结合特异性, 以纯

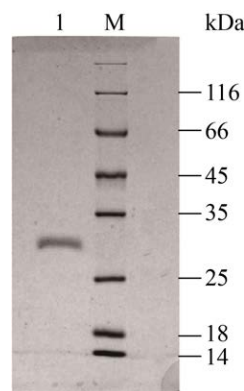


图 1 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白的纯度

Fig. 1 Analysis of the purity of recombinant protein by SDS-PAGE. M: protein marker; 1: 3 μ L recombinant protein after purification.

化的 PINP- α 1 链蛋白为样品, 分别用 3 株单抗与其结合。结果如图 2 所示, 3 株单抗均可与 PINP- α 1 链蛋白反应, 表明制备的 PINP- α 1 链单抗特异性较好。以 2 个不同浓度的抗原 P6 和 P3 为样本, 对 3 株抗体进行配对筛选。结果如图 3 所示, 当 P6 的 OD_{450} 值越高, 且 P6/P3 的比值越大时, 样本间有更宽的信号空间。在后续的标准曲线建立以及血清测定中, 抗体识别不同浓度样本所产生的信号空间同样更宽泛, 分辨能力更强。故选择组合 2, 即将 8C12 作为捕获抗体、1F11 作为检测抗体用于后续检测方法的建立。

2.3 捕获抗体及检测抗体工作浓度的确定

当捕获抗体达到 3 μ g/mL 后, 信号值基本处于平稳状态, 因此选择 3 μ g/mL 作为捕获抗体的工作浓度。并且由图 4 可知, 当检测抗体为 3 μ g/mL 信号值最大, 故选择 3 μ g/mL 作为检测抗体的工作浓度。

表 1 PINP- α 1 链抗原反应性测试

Table 1 Antigen reactivity test of PINP- α 1

Sample	Concentrations (dilution ratio)				
	10 times	100 times	1 000 times	10 000 times	NC (PBS)
PINP- α 1 (ng/mL)	>1 200	>1 200	147.00±8.82	27.25±1.32	<5

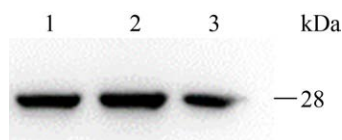


图2 Western blotting 鉴定 PINP- α 1 链单克隆抗体
Fig. 2 Identification of PINP- α 1 monoclonal antibody by Western blotting. 1: 1F11; 2: 8C12; 3: 2B10.

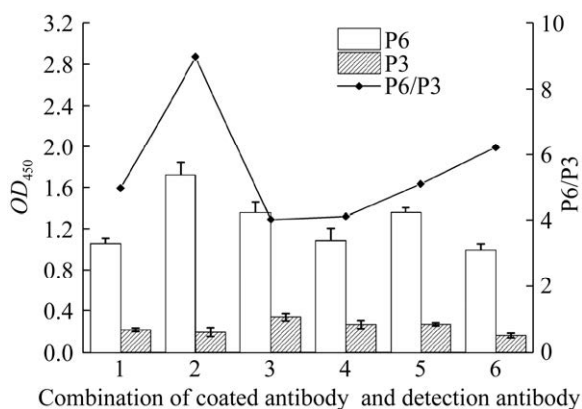


图3 包被抗体和检测抗体筛选结果
Fig. 3 Screening of coated antibody and detection antibody. 1: 8C12 (coated antibody)/2B10 (detection antibody); 2: 8C12 (coated antibody)/1F11 (detection antibody); 3: 2B10 (coated antibody)/8C12 (detection antibody); 4: 2B10 (coated antibody)/1F11 (detection antibody); 5: 1F11 (coated antibody)/8C12 (detection antibody); 6: 1F11 (coated antibody)/2B10 (detection antibody).

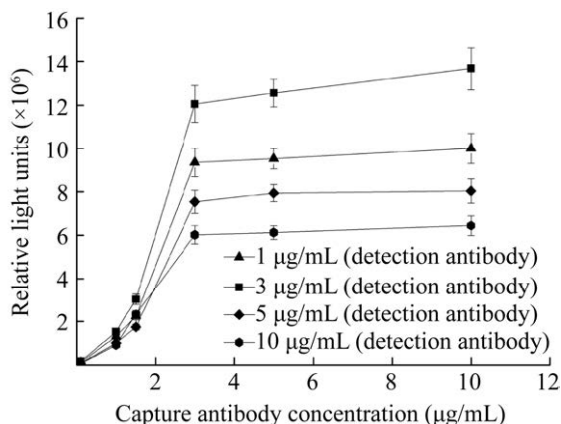


图4 捕获抗体与检测抗体工作浓度的优化
Fig. 4 Optimization of the working concentration of capture antibody and detection antibody.

2.4 反应时间的确定

如图5所示,当孵育时间为30 min时,样本信号值已基本达到饱和,因此将孵育时间确定为30 min。

2.5 化学发光法分析性能评价

2.5.1 最低检测限

将配制好的6个不同浓度(1 200、600、300、50、10、0 ng/mL)的标准品分别重复测定3次,得到1组浓度值与信号值数据,建立的四参数 Logistic 方程相关为 $Y=34\ 662.724\ 7+(64\ 899\ 948.669\ 7-34\ 662.724\ 7)/(1+(X/4\ 508.913\ 2)^{-1.072\ 6})$, $R^2=0.993\ 8$,将 $\bar{x}+2s$ 对应的信号值423 51代入标准曲线中,计算得到浓度值为1.22 ng/mL。即本方法最低检测限为1.22 ng/mL。

2.5.2 精密度

对高、低浓度2个样本的检测数据进行分析,结果如表2所示,3个批次内的变异系数和批次间的变异系数均小于10%。

2.5.3 线性范围

结果如表3所示,在4.49–1 150.45 ng/mL之间,样本理论浓度和实际浓度间的线性关系良好,拟合后线性回归方程(图6)为 $Y=0.943\ 6X+6.434\ 1$, R^2 大于0.990,并且相对偏差均在±10%以内,故将本方法的线性范围定为5–1 100 ng/mL。

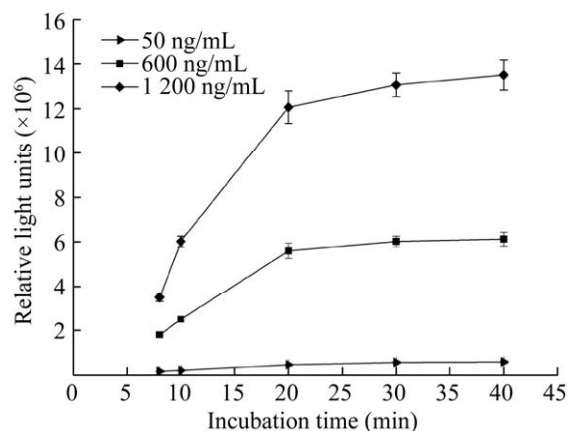


图5 不同孵育时间对信号值的影响
Fig. 5 Optimization of incubation time.

表 2 PINP 检测试剂精密度检测结果

Table 2 Precision of the PINP assay

Proposed concentrations (ng/mL)	20200910		20201010		20201210		Inter-assay precision	
	PINP (ng/mL)	CV (%)	PINP (ng/mL)	CV (%)	PINP (ng/mL)	CV (%)	PINP (ng/mL)	CV (%)
957.92	949.73±34.43	3.62	926.71±56.79	6.13	939.51±45.79	4.87	937.51±64.91	6.92
17.64	14.64±0.31	2.12	15.82±0.64	4.05	15.93±0.73	4.58	15.19±0.97	6.39

表 3 PINP 检测试剂线性范围检测结果

Table 3 Linear range of the PINP assay

Samples	Desired values (ng/mL)	Measured values (ng/mL)			Deviations (%)
		Test 1	Test 2	Average	
1	1 150.45	1 055.31	1 072.13	1 063.72	-7.54
2	575.23	611.64	603.94	607.79	5.66
3	287.61	261.46	295.46	278.46	-3.18
4	143.81	135.75	134.27	135.01	-6.12
5	71.90	78.16	75.18	76.67	6.63
6	35.95	33.49	31.49	32.49	-9.63
7	17.98	18.13	16.67	17.40	-3.20
8	8.99	7.94	8.81	8.38	-6.82
9	4.49	5.32	4.48	4.90	9.04

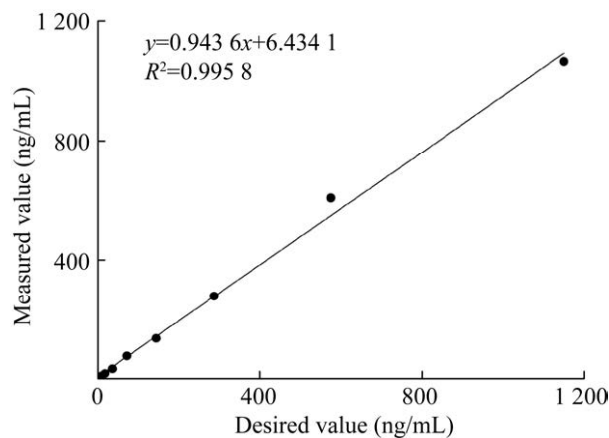


图 6 PINP 检测试剂线性拟合结果

Fig. 6 Linear fitting of the PINP assay.

2.5.4 准确度

经计算, 3 个不同浓度水平的检测样本回收率分别为 107%、105%、93%, 均在允许的误差 (100±15)% 以内, 满足要求。

2.5.5 临床评价

用本方法与罗氏 PINP 检测系统检测临床血清 160 份。经分析计算, 相关系数 $R^2=0.9062$, 两种检测方法有良好的一致性 (图 7)。

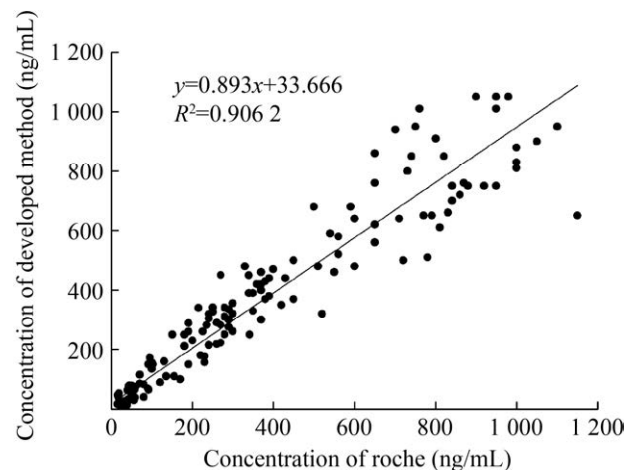


图 7 本方法与罗氏检测方法比对结果

Fig. 7 Correlation between the Roche method and the method developed in this study.

3 讨论

骨代谢生化标志物可以反映骨代谢状态, 是协助骨质疏松等疾病鉴别诊断、治疗效果评价的关键指标^[12-13]。近年来, 对于骨代谢标志物的检测发展迅速, 临床应用日益广泛。常见的骨代谢标志物包括骨碱性磷酸酶 (BALP)、骨钙素

(OC)、I型胶原N端交联端肽 (NTX-I)、破骨细胞抑制因子 (OGP)、尿脱氧吡啶校正肌酐 (DPD) 等。这些标志物虽能够反映骨骼吸收与骨形成的动态变化,对骨骼相关疾病的预防和诊断鉴别有一定的参考价值,但它们各自有优点和缺陷,会受到一些临床变化因素的干扰,例如年龄、性别、节律变化和饮食等因素的影响^[4,14],因此这些不同的骨代谢标志物存在变异性,导致其临床价值不能够统一。PINP是一种新型骨代谢标志物,在机体内稳定存在,不会受到激素、食物和昼夜节律等干扰因素的影响,避免了其他标志物的缺点。研究表明,骨代谢疾病经药物治疗一段时间后,机体PINP浓度变化速率是上述其他几种标志物的5倍以上^[14],说明PINP比以往常用的标志物更加灵敏和特异地反映了骨骼的生长变化。因此PINP不仅可以快速、特异地反映机体骨骼重建的变化情况,也为评价骨骼疾病的治疗效果提供了有效的手段。

PINP由两条 $\alpha 1$ 链和一条 $\alpha 2$ 链组成,两条 $\alpha 1$ 链较长,伸展在外侧,使其抗原结构域裸露出来,因此PINP的免疫位点大多数位于 $\alpha 1$ 链^[6]。起初,我们试图借鉴前人研究经验^[15],从骨转移癌患者的胸水中纯化提取天然的PINP多肽抗原,但这种方法需使用胶原酶,目标蛋白很容易被降解;另外考虑到后续检测方法的建立需要大量的多肽抗原作为标准品,因此需要稳定可行的抗原获得途径。谷氨酸棒状杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 是生产氨基酸的重要工业微生物^[16],近年来逐渐用于蛋白表达。虽然这一新兴的表达系统仍处于初步阶段,但谷氨酸棒状杆菌独有的特性依然引起了研究者的兴趣。例如,与细胞相比培养成本低、生长迅速;与大肠杆菌等原核表达系统相比无内毒素、胞外蛋白酶活性低、分泌能力强^[17]。目前,谷氨酸棒状杆菌已成功应用于单链可变片段(scFv)^[18]和N-末端脑利钠肽(NT-proBNP)^[19]等多种医用蛋白的表达。我们依托本实验室成熟的谷

氨酸棒状杆菌表达系统,首次利用谷氨酸棒状杆菌表达了PINP- $\alpha 1$ 链多肽,通过添加内源信号肽cspB,使目标产物分泌到细胞上清中,最终获得了高纯度的目标蛋白,以其为抗原制备抗体,建立了定量检测PINP的化学发光免疫分析法。

目前世界范围内只有罗氏诊断和Orion诊断两家公司提供商用PINP检测试剂盒。有文章报道^[20],Orion诊断试剂检测的是血清中PINP三聚体的浓度,罗氏诊断试剂不仅能检测PINP三聚体,还可以检测体内少量游离的PINP- $\alpha 1$ 链,并且二者结果高度相关,都能准确检测人体内PINP的含量。我们从无锡市人民医院收集了160例临床血清样本,与罗氏公司的PINP检测试剂盒进行方法学比对,结果表明两种方法的相关系数 R^2 大于0.90,达到了体外诊断试剂的相关要求,并且本方法的准确度、精密度、线性、检测限等性能指标均达到了商用试剂盒的标准。但当样本浓度大于500 ng/mL时,本方法的检测结果与罗氏诊断的结果产生离散情况,可能是抗体的分辨能力存在差异或是抗体试剂的缓冲体系需要继续优化。我们接下来尝试改变抗体稀释液的成分,通过添加抗体阻断剂、聚乙二醇(PEG)等中性大分子和表面活性剂以减少免疫反应的非特异性吸附,从而提高检测结果的准确性。另外手工实验影响因素较多,容易使实验结果的一致性产生差异,因此后续计划将本文建立的检测方法适配到一种全自动化学发光检测仪并进一步优化检测程序,提高检测方法的稳定性。将本方法应用到骨代谢疾病筛查,具有很高的社会经济价值。

REFERENCES

- [1] Keene GS, Parker MJ, Pryor GA. Mortality and morbidity after hip fractures. *BMJ*, 1993, 307(6914): 1248-1250.
- [2] Osnes EK, Lofthus CM, Meyer HE, et al. Consequences of hip fracture on activities of daily life and residential needs. *Osteoporos Int*, 2004, 15(7): 567-574.

- [3] 孙云. 骨 I 型胶原羧基端降解产物 ELISA 方法建立与应用[D]. 天津: 天津医科大学, 2010.
Sun Y. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation in urine established and evaluated[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2010 (in Chinese).
- [4] Kim MY, Jee SH, Yun JE, et al. Hemoglobin concentration and risk of cardiovascular disease in Korean men and women—the Korean heart study. *J Korean Med Sci*, 2013, 28(9): 1316-1322.
- [5] 蒋文艳, 吕静, 闫玉珠, 等. 骨质疏松症患者血清骨代谢标志物分析与相关性研究. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(4): 546-549, 609.
Jiang WY, Lv J, Yan YZ, et al. Analysis and correlation study of serum bone metabolic markers in patients with osteoporosis. *Chin J Osteoporos*, 2020, 26(4): 546-549, 609 (in Chinese).
- [6] Risteli J, Niemi S, Kauppila S, et al. Collagen propeptides as indicators of collagen assembly. *Acta Orthop Scand Suppl*, 1995, 266: 183-188.
- [7] Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(8): 584-593.
- [8] Koivula MK, Richardson J, Leino A, et al. Validation of an automated intact N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) assay. *Clin Biochem*, 2010, 43(18): 1453-1457.
- [9] Eriksen EF, Brixen K, Charles P. New markers of bone metabolism: clinical use in metabolic bone disease. *Eur J Endocrinol*, 1995, 132(3): 251-263.
- [10] 汪晨, 吴洁, 宗晨, 等. 化学发光免疫分析方法与应用进展. *分析化学*, 2012, 40(1): 3-10.
Wang C, Wu J, Zong C, et al. Chemiluminescent immunoassay and its application. *Chin J Anal Chem*, 2012, 40(1): 3-10 (in Chinese).
- [11] 张忠河. 骨钙素化学发光免疫分析法的建立及初步临床应用[D]. 济南: 山东大学, 2011.
Zhang ZH. The establish and clinical application of osteocalcin test by chemiluminescence immunoassay[D]. Ji'nan: Shandong University, 2011 (in Chinese).
- [12] Sobreira ML, Rogatto SR, Dos Santos RM, et al. An unexpectedly high rate of thrombophilia disorders in patients with superficial vein thrombosis of the lower extremities. *Ann Vascul Surgery*, 2017, 43: 272-277.
- [13] 艾笛, 于方, 王振威. 唑来膦酸治疗骨质疏松症患者的不良反应和治疗体会. *北京医学*, 2018, 40(11): 1094-1095.
Ai D, Yu F, Wang ZW. Adverse reactions and treatment experience of zoledronic acid in the treatment of osteoporosis. *Beijing Med J*, 2018, 40(11): 1094-1095 (in Chinese).
- [14] Kregge JH, Lane NE, Harris JM, et al. PINP as a biological response marker during teriparatide treatment for osteoporosis. *Osteoporos Int*, 2014, 25(9): 2159-2171.
- [15] Melkko J, Kauppila S, Niemi S, et al. Immunoassay for intact amino-terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem*, 1996, 42(6): 947-954.
- [16] Hasegawa S, Suda M, Uematsu K, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for high-yield L-valine production under oxygen deprivation conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(4): 1250-1257.
- [17] Liu XX, Yang YK, Zhang W, et al. Expression of recombinant protein using *Corynebacterium Glutamicum*: progress, challenges and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2016, 36(4): 652-654.
- [18] Yim SS, An SJ, Choi JW, et al. High-level secretory production of recombinant single-chain variable fragment (scFv) in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(1): 273-284.
- [19] Peng F, Liu XX, Wang XY, et al. Triple deletion of *clpC*, *porB*, and *mepA* enhances production of small ubiquitin-like modifier-N-terminal pro-brain natriuretic peptide in *Corynebacterium glutamicum*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2019, 46(1): 67-79.
- [20] Koivula MK, Ruotsalainen V, Björkman M, et al. Difference between total and intact assays for N-terminal propeptide of type I procollagen reflects degradation of pN-collagen rather than denaturation of intact propeptide. *Ann Clin Biochem*, 2010, 47(1): 67-71.

(本文责编 郝丽芳)