

中华医学会系列杂志

ISSN 1009-9158
CN 11-4452/R

中华检验医学杂志[®]

ZHONGHUA JIANYAN YIXUE ZAZHI

2020年11月 第43卷 第11期 抽印本

CHINESE JOURNAL OF LABORATORY MEDICINE

Volume 43 Number 11
November 2020



中华医学会

CHINESE
MEDICAL
ASSOCIATION

·指南与共识·

化学发光法微阵列蛋白芯片临床应用专家共识

中国医学装备协会检验医学分会

通信作者:徐英春,Email:xycpumch@139.com

【摘要】 微阵列蛋白芯片是研究蛋白质与蛋白质相互作用和识别疾病相关自身抗原的平台,也可以高通量的形式检测抗原与抗体之间免疫结合反应。该方法是一种微型化的固相免疫检测方法,在肿瘤、感染性疾病、自身免疫性疾病及变态反应性疾病的筛查、辅助诊断和治疗监测中逐渐得到临床认可。该共识对以平面基质为载体,采用化学发光法检测的蛋白芯片的临床应用进行规范化和标准化。

【关键词】 蛋白质阵列分析; 微阵列蛋白芯片; 固相免疫; 高通量; 化学发光法

Expert consensus on clinical application of protein microarrays by chemiluminescence

Laboratory Medicine Branch of China Medical Equipment Association

Corresponding author: Xu Yingchun, Email: xycpumch@139.com

【Abstract】 Protein microarrays are platforms for studying protein-protein interactions and identifying disease-related self-antigens/autoantigens, which elicit an immune response in a high-throughput format. It is a miniaturized solid-phase immunoassay method, which has been gradually recognized because of its clinical practice in disease screening, auxiliary diagnosis and treatment monitoring of tumors, infectious diseases, autoimmune diseases and allergic diseases. This consensus has standardized and normalized the clinical application of protein chip with plane matrix as carrier and utilizing chemiluminescent technique.

【Key words】 Protein array analysis; Protein microarrays; Solid-phase immunoassay; High-throughput; Chemiluminescence

化学发光法微阵列蛋白芯片(以下简称“蛋白芯片”)技术以其高通量、高灵敏度、微型化、样本用量少等优点,在肿瘤、感染性疾病、自身免疫性疾病及变态反应性疾病的筛查、辅助诊断和治疗监测中逐渐得到临床认可^[1-6],具有广阔的应用前景。为保证蛋白芯片有效应用于临床,涉及临床适用指征、芯片要求、实验流程关键点质量控制、数据分析、芯片结果验证、结果报告与临床解释、患者检测结果咨询等诸多重要环节,迫切需要对该技术临床应用进行规范化和标准化。中国医学装备协会检验医学分会召集国内相关领域的专家对蛋白芯片技术临床应用中的各个环节展开交流讨论,形成以

下专家共识。

一、微阵列蛋白芯片概念和范围

微阵列蛋白芯片是研究蛋白质与蛋白质相互作用和识别疾病相关自身抗原的平台,也可以高通量的形式检测抗原与抗体间免疫结合反应^[7]。它是一种微型化的固相免疫检测方法,可同时检测多种分析物。实现检测的方式是,首先在玻片上固定多个蛋白抗原或抗体点,然后与血清样品中的相应特异性抗体或抗原结合,再加入荧光或发光物标记的抗体或抗原,最后对荧光或化学发光信号等进行检测,然后利用所制定的科学算法对图像处理 and 模式识别进行分析,从而实现对特定抗原或抗体的

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200512-00469

收稿日期 2020-05-12 本文编辑 干岭

引用本文:中国医学装备协会检验医学分会.化学发光法微阵列蛋白芯片临床应用专家共识[J].中华检验医学杂志,2020,43(11):1075-1079. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200512-00469.



检测^[8]。

本共识适用的范围仅限于以平面基质为载体及采用化学发光法检测的蛋白芯片的临床应用。

二、基本原理和特点

芯片上的多个蛋白质探针与被测样本中对应的物质结合,经洗脱去除未结合的其他物质后,加标有示踪标记物的抗原/抗体形成复合物,然后化学反应产生光信号,用配套的芯片分析仪读取光信号,对样品中的物质进行定量检测。其特点是多指标平行检测(高通量)、高灵敏度、微型化、样本用量少、结果具有可视性、配合自动分析仪可实现操作自动化。

三、预期用途

1. 疾病的早期筛查:蛋白芯片通量高,1张芯片可同时检测多个指标,克服了单个指标筛查灵敏度不高的缺点。肿瘤标志物蛋白芯片可一次并行检测多项指标,提高了恶性肿瘤筛查的灵敏度,有利于肿瘤的早诊早治^[9-10]。同时,因其比单个指标测定的累积成本低而降低了筛查费用,更有利于项目筛查的普及,可应用于恶性肿瘤高危人群的风险筛查,也可应用于临床初诊中原发灶不明肿瘤的筛查^[11]。自身抗体的多重分析有助于筛选系统性风湿病的自身抗体谱^[12]。过敏原蛋白芯片适用于过敏原因不明的患者,多项目的过敏原筛查有助于过敏性疾病的预防和治疗^[13-14]。

2. 疾病的实验室诊断:某些用于疾病实验室诊断的标志物可采用蛋白芯片进行检测。如某些自身抗体具有高度的特异性,检测这些自身抗体的蛋白芯片可用于自身免疫病的实验室诊断。心脏标志物蛋白芯片可同时检测心肌损伤酶学标志物肌酸激酶(creatin kinase, CK)及其同工酶(CK-MB)、心肌损伤蛋白类标志物肌钙蛋白I、肌红蛋白、心力衰竭生物标志物氨基末端脑钠肽前体等,多指标蛋白芯片联合检测,有助于为心肌损伤、心肌梗死或心力衰竭诊断提供实验室依据,提高早期诊断的灵敏度^[15]。蛋白变应原微阵列最多能够将近5000种变应原固定在1张芯片上^[16-17],因而只需要极少量的患者血清,通过微阵列分析一次性检测相应数量的特异抗体,有助于变态反应性疾病的实验室诊断。

3. 疗效监测:多项研究表明,血清学检测指标可用于疾病的疗效观察^[11, 18-23]。但观察治疗前后单指标的变化,可能因为检测项目的不敏感而限制其临床应用。而多指标蛋白芯片检测为疗效监

测提供了一个普遍适用的方法。如对肝癌的疗效观察,临床研究资料表明,原发性肝癌患者甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)阳性率较高,但转移性肝癌AFP阳性率很低而其他肿瘤标志物如癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)却较高。因此,单纯AFP不适用于转移性肝癌患者的疗效监测指标,而使用多指标蛋白芯片作为监测标志物,可为肝癌的疗效监测提供一个简便且更为有效的方法。某些自身抗体参与组织的免疫病理损伤,与疾病的活动性有关,自身抗体蛋白芯片有助于观察治疗反应、指导临床诊疗^[24]。

4. 预后判断:临床研究表明,血清标志物可用于疾病的预后判断。如肿瘤复发和转移,肿瘤转移灶因部位不同,会导致血清相关标志物的改变。多项目联合检测可提高肿瘤转移复发的检测敏感性,有利于判断预后^[25]。多指标肿瘤标志物蛋白芯片也适用于转移灶部位未明的转移监测^[19]。自身抗体蛋白芯片也可用于自身免疫病的预后判断^[26]。变应原微阵列在变态反应研究、变态反应病的筛查和诊断、治疗效果、改进特异性免疫治疗和预防方面有着广阔的应用前景^[24, 27]。

四、标本要求

1. 标本的采集、运送和保存:标本采集应在临床诊疗操作前进行。标本采集后应尽快分析测定。不能及时检测的,标本应置2~8℃冷藏,冷藏不超过24h,不能在24h内检测的标本,应贮存于-20℃,需1周以上长期贮存的标本应置于-70℃以下。

2. 注意事项:血液标本应避免溶血,应避免被汗液、唾液或呼吸道分泌物等污染,应避免热处理(如灭活人类免疫缺陷病毒)等,血清和血浆标本应避免反复冻融,因为反复冻融会导致抗原变性。具体关于标本保存处理的影响因素应参照所用商品化试剂盒说明书。生理变化影响、药物影响、非肿瘤疾病影响等应参照所用商品化试剂盒说明书。

五、环境要求

实验室应提供能满足分析仪要求的环境(具体参照所使用的仪器说明书)。

六、仪器定期校准及维护保养

1. 定期校准:根据《医疗机构临床实验室管理办法》,需定期对配套仪器的参数和整机性能等进行校准,以确保产品符合原有设定的各项指标参数。主要包括:(1)光信号采集系统的准确性(波长/杂散光/读数位置正确性/线性范围);(2)反应区

域温度的稳定性(正确性/波动);(3)加样系统的准确度、精密度和携带污染等。

2. 维护与保养:根据所制订仪器维护保养程序进行日常和定期的维护与保养,具体内容包含对设备的外部除尘、加油、紧固及内部清洁、零部件定期更换、局部检查等维护保养。

七、分析系统性能验证

按照 GB/T 22576-2008^[28]要求,实验室应验证相关分析性能是否能达到厂家所声称的性能指标。

1. 时机:参考 CNAS-GL037 临床化学定量检验程序性能验证指南^[29],以下情况应进行性能验证:

(1)检验程序常规应用前;(2)任何严重影响检验程序分析性能的情况发生后,应在检验程序重新启用前对受影响的性能进行验证。影响检验程序分析性能的情况包括但不限于:仪器主要部件故障、仪器搬迁、设施(如纯水系统)和环境的严重失控等;(3)常规使用期间,实验室可基于检验程序的稳定性,利用日常工作产生的检验和质控数据,定期对检验程序的分析性能进行评审,应能满足检验结果预期用途的要求。现用检验程序的任一要素(仪器、试剂、校准品等)变更,如试剂升级、仪器更新、校准品溯源性改变等,应重新进行验证。

2. 指标:根据不同蛋白芯片检验项目的预期用途,选择对检验结果质量有重要影响的参数进行验证。一般包括:正确度或准确度、精密度、检出限和定量限、可报告范围等。

3. 方法:初次使用前,原则上推荐多指标全部验证,对于发病率低的特定项目,可选择替代品如质控品和/或在其后的临床应用中通过阳性病例的发现进行验证。使用过程中,根据需要选择重要的指标。

4. 判断标准:应满足产品说明书所声称的性能。

八、芯片质控

试剂批号更换时,为保证新批号试剂与原批号具有相同的检测性能,可随机抽取新批号芯片,选择一定数量临床标本(含正常、截断值附近浓度、高值阳性)对一定数量标志物(>20%)进行芯片批间质检,并制定批间质检合格判断标准。

九、项目校准

参照产品说明书或厂家声明进行,通常在以下情况下需要进行项目校准:新批次试剂盒开启时、新分析软件安装后。此外,当日常检测中室内质控出现了趋势性变化或超出了实验室规定接受限,采

取了一般性纠正措施后,不能识别和纠正问题时,以及仪器进行了大的维护、维修或更换了重要的配件后,亦应进行项目重新校准。

十、室内质控

使用蛋白芯片开展临床检测,可采用常规的定量检测室内质控统计学方法进行每批标本检测的室内质量控制,所用室内质控品可以为商品化或自制质控品。质控品应均匀稳定,并与患者待测样本具有相似或相同的基质,瓶间变异性应小于分析系统的变异。如果没有商品化质控品,实验室可自制质控品。质控品中分析物的浓度应位于临床有意义的浓度范围内。若使用定值质控品,使用说明书上的原有标定值只能作参考,必须由实验室作重复测定来确定其后续室内质控所使用的均值和标准差。每检测批至少覆盖 100% 的常规项目和一个特殊项目,在实验室规定周期内所有检测项目均有质控阳性记录。

十一、室间质量评价/能力验证或实验室比对

实验室应按 GB/T 20470-2006^[30] 和 WS/T 414-2013^[31]的要求,参加室间质量评价/能力验证,并根据室间质评/能力验证的结果是否满意来改进检测质量。部分项目如无室间质量评价/能力验证计划,应与相关(示范或参比或相同方法学)实验室定期进行相应检测项目的室间比对,有比对频次、标本数、合格标准的方案。

十二、报告与结果解释

蛋白芯片法的检测报告应包括以下信息:

(1)检测实验室和检测项目的名称;(2)检测的仪器、方法和试剂;(3)本实验室使用的参考区间或检出限;(4)患者信息及标本种类、标本采集时间、送检时间、检测时间、报告时间等;(5)结果解释和/或进一步检查建议。

蛋白芯片用于筛查时,应有明确的阳性预测值和阴性预测值,并注意给予进一步检测或检查的建议。

十三、局限性

由于方法学或抗体特异性等原因,使用不同生产商的试剂对同一项目进行检测可能会得到不同的检测结果。因此,在项目监测过程中,用不同试剂检测所得结果不应直接相互比较,以免造成错误的解释。建议实验室在报告中注明所用试剂生产厂家及参考区间。

极个别的临床样本中加入样本处理液后人抗小鼠抗体(human anti-mouse antibody, HAMA)处理

不彻底,阴性质控点能够和人血清中的 HAMA 结合,可产生假阳性(定量检测假性增高)结果。

蛋白芯片质量控制中若出现单指标失控的情况,应至少随机选择 3 张蛋白芯片复查,以检查是芯片制造的批量品控问题还是偶然误差。如随机 3 张芯片复查结果在控,则可认为该芯片项目可报告;如 3 张复查芯片中任一张或 1 张以上出现同样单项目失控,则此项目检测结果不可靠。单项目不合格蛋白芯片的其他检测项目应认为可用于临床标本检测。

执笔人(按姓氏拼音为序):杜娟(中国医学科学院北京协和医院检验科)、李金明(国家卫生健康委员会临床检验中心临床免疫室)、李永哲(中国医学科学院北京协和医院检验科)、童明庆(江苏省人民医院检验科)、许斌(江苏省临床检验中心)

专家组成员(按姓氏拼音为序):曹颖平(福建医科大学附属协和医院检验科)、陈燕(福建省肿瘤医院检验科)、崔玉宝(无锡市人民医院检验科)、邓昆(重庆医科大学附属第三医院检验科)、邓志刚(郴州市第一人民医院核医学科)、杜娟(中国医学科学院北京协和医院检验科)、冯贵生(山西省人民医院核医学科)、冯珍如(北京大学第一医院检验科)、俸家富(四川省绵阳中心医院检验科)、关秀茹(哈尔滨医科大学附属第一医院检验科)、黄晶(吉林大学第一医院检验科)、江咏梅(四川大学华西第二医院检验科)、姜晓峰(哈尔滨医科大学附属第四医院检验科)、李国强(陕西省汉中市中心医院)、李金明(国家卫生健康委员会临床检验中心临床免疫室)、李士军(大连医科大学附属第一医院检验科)、李新辉(中南大学湘雅医院核医学科)、李永军(河北医科大学第二医院检验科)、李永哲(中国医学科学院北京协和医院检验科)、廖曼甜(湘潭市中心医院核医学科)、马菊芬(长治医学院附属和济医院检验科)、穆红(天津第一中心医院检验科)、秦晓松(中国医科大学附属盛京医院检验科)、沈茜(海军军医大学附属第一医院检验科)、童明庆(江苏省人民医院检验科)、王华梁(上海市临床医学检验中心)、王培(国家电网公司北京电力医院核医学科)、王书奎(江苏省南京市第一人民医院)、伍勇(中南大学湘雅三医院检验科)、武志芳(山西医科大学第一医院核医学科)、夏云(重庆医科大学附属第一医院检验科)、谢卫民(湘雅常德医院检验科)、徐蓉生(四川省肿瘤医院核医学科)、徐英春(中国医学科学院北京协和医院检验科)、许斌(江苏省临床检验中心)、杨福洲(四川省雅安市人民医院核医学科)、易斌(中南大学湘雅医院检验科)、易丹(湖南省人民医院核医学科)、袁耿彪(重庆医科大学附属第二医院核医学科)、詹启敏(北京大学医学部)、张成伟(辽宁省健康产业集团阜新矿总医院检验科)、张丽(中国医学科学院北京协和医院检验科)、周恒(江南大学附属医院检验科)、赵先进(山西省长治市人民医院检验科)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Schena M, 童明庆, 王台虎. 蛋白质微阵列(蛋白质科学与技术丛书)[M]. 化学工业出版社, 2008:80-107.
- [2] 梁臻龙, 王成彬. 芯片实验室技术在 POCT 应用的研究进展[J]. 临床检验杂志(电子版), 2015, 4(3):934-937.
- [3] 伊洁, 徐英春, 窦亚玲. 多重荧光定量 PCR 和液态芯片技术对下呼吸道病毒检测的应用比较[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(7):544-547. DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2016.07.02.
- [4] 齐军. 蛋白芯片技术及在肿瘤实验室诊断中的应用现状[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(10):639-640. DOI:10.3760/j:issn:1009-9158.2003.10.039.
- [5] 李永哲. 蛋白芯片技术在自身抗体检测中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(12): 1116-1119. DOI: 10.3760/j:issn:1009-9158.2006.12.015.
- [6] 崔鲂, 夏云, 张莉萍, 等. 生物芯片法在结核分枝杆菌检测中的应用价值探讨[J]. 重庆医学, 2009, 38(19):2411-2412, 2415. DOI:10.3969/j.issn.1671-8348.2009.19.008.
- [7] Gupta S, Manubhai KP, Mukherjee S, et al. Serum profiling for identification of autoantibody signatures in diseases using protein microarrays[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1619:303-315. DOI:10.1007/978-1-4939-7057-5_21.
- [8] Jambari NN, Wang X, Alcocer M. Protein microarray-based IgE immunoassay for allergy diagnosis[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1592: 129-137. DOI: 10.1007/978-1-4939-6925-8_10.
- [9] Pan J, Song G, Chen D, et al. Identification of serological biomarkers for early diagnosis of lung cancer using a protein array-based approach[J]. Mol Cell Proteomics, 2017, 16(12): 2069-2078. DOI: 10.1074/mcp. RA117.000212.
- [10] Wu D, Zhang P, Ma J, et al. Serum biomarker panels for the diagnosis of gastric cancer[J]. Cancer Med, 2019, 8(4): 1576-1583. DOI:10.1002/cam4.2055.
- [11] Kallioniemi OP. Biochip technologies in cancer research[J]. Ann Med, 2001, 33(2): 142-147. DOI: 10.3109/07853890109002069.
- [12] McBride JD, Gabriel FG, Fordham J, et al. Screening autoantibody profiles in systemic rheumatic disease with a diagnostic protein microarray that uses a filtration-assisted nanodot array luminometric immunoassay (NALIA) [J]. Clin Chem, 2008, 54(5): 883-890. DOI: 10.1373/clinchem.2007.098418.
- [13] Klimek L, Vetter D, von Bernus L, et al. Microarray technique for component resolved diagnosis (CRD) in type-I allergies. An innovative technology at the border between research tool and routine diagnostics[J]. HNO, 2011, 59(10):988-993. DOI:10.1007/s00106-010-2224-5.
- [14] Lupinek C, Wollmann E, Baar A, et al. Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: the MeDALL allergen-chip[J]. Methods, 2014, 66(1): 106-119. DOI: 10.1016/j.ymeth.2013.10.008.
- [15] 赵先进. 常见心肌损伤标志物应用价值的比较和分析[J]. 山西医药杂志, 2008, 37(18):840-841.
- [16] Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development[J]. Clin Chem Lab Med, 2005, 43(12):

- 1321-1326. DOI: 10.1515/CCLM.2005.226.
- [17] Wöhrl S, Vigl K, Zehetmayer S, et al. The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice [J]. *Allergy*, 2006, 61(5): 633-639. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2006.01078.x.
- [18] 李丹, 詹启敏. 肿瘤个体化医学研究的需求和挑战[J]. 转化医学研究(电子版), 2011, 1(1):69-79.
- [19] 杨上英, 曹颖平. 肺癌肿瘤标志物的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(11): 1010-1012. DOI: 0.3969/j.issn.1673-4130.2008.11.019.
- [20] 袁琳, 胡丽华, 陈凤花, 等. 多肿瘤标志物蛋白芯片诊断前列腺癌[J]. 临床血液学杂志(输血与检验版), 2007, 4(3): 108-110. DOI:10.3969/j.issn.1004-2806-B.2007.03.005.
- [21] 熊玲静, 梁昌华, 李新辉, 等. 乳腺癌骨转移与其生物学标记因子的关系[J]. 中华核医学杂志, 2003, 23(4): 208-210. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2003.04.005.
- [22] 李士军, 谭庆丰, 陈洪流, 等. 血清肿瘤标志物 CEA、CA19-9 对结直肠癌的诊断价值[J]. 肿瘤基础与临床, 2010, 23(4): 298-300. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5412.2010.04.008.
- [23] Uchida T, Fukawa A, Uchida M, et al. Application of a novel protein biochip technology for detection and identification of rheumatoid arthritis biomarkers in synovial fluid[J]. *J Proteome Res*, 2002, 1(6):495-499. DOI: 10.1021/pr025531w.
- [24] Delfani P, Sturfelt G, Gullstrand B, et al. Deciphering systemic lupus erythematosus-associated serum biomarkers reflecting apoptosis and disease activity[J]. *Lupus*, 2017, 26(4): 373-387. DOI: 10.1177/0961203316669240.
- [25] 彭彦, 王燕, 郝学志, 等. 多项肺系统肿瘤标志物异常在晚期肺腺癌治疗中的作用[J]. 中国肺癌杂志, 2017, 20(10): 690-694. DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2017.10.05.
- [26] Shi L, Gehin T, Chevolot Y, et al. Anti-heat shock protein autoantibody profiling in breast cancer using customized protein microarray[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(5): 1497-1506. DOI:10.1007/s00216-015-9257-2.
- [27] Lupinek C, Wollmann E, Baar A, et al. Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: the MeDALL allergen-chip[J]. *Methods*, 2014, 66(1): 106-119. DOI: 10.1016/j.ymeth.2013.10.008.
- [28] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国国家标准 GB/T 22576-2008/ISO 15189:2007 医学实验室质量和能力的专用要求 [EB/OL]. (2008-12-15) [2020-08-06]. <https://max.book118.com/html/2015/0323/13649431.shtml>.
- [29] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL037:2019. 临床化学定量检验程序性能验证指南 [EB/OL]. (2019-02-15) [2020-08-06]. <https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkzn/2019/04/896307.shtml>.
- [30] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国国家标准 GB/T 20470-2006 临床实验室室内质量评价要求 [EB/OL]. (2006-09-01) [2020-08-06]. <http://www.biaozhun8.cn/biaozhun85705>.
- [31] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. WS/T 414-2013 室内质量评价结果应用指南 [EB/OL]. (2013-06-03) [2020-08-06]. <http://www.bzko.com/Common/ShowDownloadUrl.aspx?urlid=0&id=198706>.