

- 增生李斯特氏菌毒力[J]. 食品科学,2010,31(23):164-168.
- [7] 杨大伟,刘云国,谭乐义,等. 食品中A型肉毒梭菌PCR-DHPLC检测方法的建立[J]. 食品工业科技,2011,32(6):398-400.
- [8] 郑秋月. 热加工食品和水产品中致病菌检测技术体系建立[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2009.
- [9] 曹际娟,闰平平,徐君怡,等. 单核细胞增生李斯特氏菌PCR-DHPLC检测新技术的建立[J]. 生物技术通报,2008(增刊):415-419.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2641—2010 食品中常见致病菌检测PCR-DHPLC法[S]. 北京:中国标准出版社,2011.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1870—2007 食品中致病菌检测方法实时PCR法[S]. 北京:中国标准出版社,2007.

实验技术与方法

蛋白质芯片快速诊断铁缺乏的准确性分析

殷继永,孙静,黄建,霍军生

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:目的 对蛋白质芯片检测平台快速诊断铁缺乏人群的准确性与发现铁储量不足的能力进行分析。方法 采用免疫比浊法与蛋白质芯片法进行血清铁蛋白与可溶性转铁蛋白受体的方法学对照试验。计算蛋白质芯片法的灵敏度、特异度、阳性似然比、阴性似然比、约登指数及 Kappa 值。对两种方法所得铁储量进行配对比较 t 检验。结果 蛋白质芯片法诊断铁缺乏与比浊法相比,灵敏度较高、特异性较好、具有较高的诊断价值与真实性;其判断铁缺乏的能力与比浊法具有高度的一致性。但蛋白质芯片法筛查出更多有可能铁储量不足的情况,能更好地起到快速筛查的作用。结论 蛋白质芯片法作为快速筛查工具能同时检测 SF 和 sTfR,对铁缺乏的诊断准确性较高,可用于进一步的应用研究。

关键词:蛋白质芯片;铁缺乏;准确性

中图分类号:R155;R556.3;R151 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)02-0145-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.02.010

Accuracy analysis of orotein microarray in iron deficiency rapid diagnosis

YIN Ji-yong, SUN Jing, HUANG Jian, HUO Jun-sheng

(Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Centre for Disease Prevent and Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To analyze the ability and accuracy of protein microarray for body iron stores (BIS) and iron deficiency diagnosis. **Methods** The protein microarray was compared with commercially available traditional tests for serum ferritin and soluble transferrin receptor, evaluated by indicator including the sensitivity, specificity, Youden's index, likelihood ratio, Kappa index. The BIS results were compared between protein microarray and immunoturbidimetry by paired t test. **Results** The protein microarray showed higher sensitivity, better specificity and coherence with immunoturbidimetry on iron deficiency estimates. At the same time, more BIS insufficient were discovered by protein microarray. **Conclusion** The protein microarray, a new rapid diagnosis technique, could be used to simultaneously detect SF and sTfR, opposed high diagnosis potencial on iron deficiency estimates and it was valuable for more application research.

Key words: Protein microarray; iron deficiency; accuracy ability

铁缺乏(iron deficiency, ID)会引发成年人生理

活力减低、儿童大脑发育受损等一系列营养性疾病^[1]。血清铁蛋白(serum ferritin, SF)与转铁蛋白受体(soluble transferrin receptor, sTfR)是目前评价铁状况的两个最佳参数^[2],通过检测机体 SF 与可溶性 sTfR 可准确地反应机体铁储量的相关信息^[3]。传统的酶联免疫法、免疫比浊法是目前检测 SF 与 sTfR 的主要方法,但都无法实现 SF 和 sTfR 的同时

收稿日期:2013-12-11

基金项目:863 计划(2010AA023004)

作者简介:殷继永 男 助理研究员 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail:jjyin7579@163.com

通讯作者:霍军生 男 研究员 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail:jshuo@263.net.cn

检测,特别是当血清样本量较小时尤为不便,严重影响了识别铁缺乏人群的检测效率。目前急需一种简便、快速、可靠的方法实现对 SF 和 sTfR 的同时检测,以便快速识别处于铁缺乏危险的人群。

蛋白质芯片利用其高通量的检测特点能在一个小阵列中完成对同一样品的不同目标蛋白的同时检测,基于此,本课题组在前期研究中已成功建立了同时检测 SF 和 sTfR 的蛋白质芯片检测平台^[4],但对此平台诊断铁缺乏的准确性及发现铁储量不足情况的能力还需要进一步的分析,以确定此检测平台在诊断铁缺乏人群时的检测效力。本研究通过方法学对照试验,完成了对蛋白质芯片检测平台在诊断铁缺乏人群与发现铁储量不足情况时的检测效力的评判。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

按照《卫生统计学》^[5]中关于样本量大小的要求,从本科室贫血调查收集的血清中随机选取 26 份血清样品,将每份血清分别分为 A、B 两部分,其中 26 份 A 集合血清用于蛋白质芯片法的检测,26 份 B 集合血清以比浊法检测。

1.1.2 主要仪器与试剂

PersonalArrayer™ 16 Microarray Spotter 蛋白芯片点样仪、LuxScan™ 10K Microarray Scanner 芯片扫描仪均购自博奥生物有限公司,7080 全自动生化分析仪(日本日立)。

标准品:SF 标准品(4.1 mg/ml, Code:30-AF15, 美国 Fitzgerald)、sTfR 标准品(1 mg/ml, Code:05-52172, 美国 ARP-1);抗 SF 鼠抗(2 mg/ml, Code:ab10060)、抗 SF 兔抗(10 mg/ml, Code:ab7332)、抗 sTfR 鼠抗(2 mg/ml, Code:ab38168)均购自美国 Abcam,抗 sTfR 兔抗(0.18 mg/ml, Code:NB100-62443, 美国 Nuvos),Cy3-羊抗兔 IgG(1 mg/ml, Code:PA43002, 美国 GE);三维基片(Polymer Slide-G)、点样液 A(Code:440015)均购自博奥生物有限公司,小牛血清白蛋白 BSA、无关兔 IgG 均购自中杉金桥,1% PBST 洗涤液,磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L PBS, pH 7.4);比浊法检测 SF 试剂盒、比浊法检测 sTfR 试剂盒均购自罗氏公司。

1.2 方法

1.2.1 准确性分析

1.2.1.1 方法学对照试验

蛋白质芯片法:蛋白质芯片抗体点样与封闭参考已建立的检测方法^[4]进行。加血清抗原前,弃封

闭液,用 1% PBST 洗涤液洗涤 5 次(5 min/次)后甩干(1 000 r/min, 2 min, 20 °C);将 SF 标准品、sTfR 标准品以 3% BSA 稀释 5 个混合标准浓度(SF 512.5 ng/ml, sTfR 625 ng/ml; SF 128.125 ng/ml, sTfR 312.5 ng/ml; SF 32.03 ng/ml, sTfR 156.25 ng/ml; SF 16.0 ng/ml, sTfR 78.13 ng/ml; SF 2.0 ng/ml, sTfR 19.53 ng/ml),以 3% BSA 为阴性对照,做标准曲线;同时取 A 集合血清,按 1:8 稀释后用蛋白质芯片法同时检测各血清中 SF 和 sTfR;以 30 μl/阵加入用于蛋白质芯片检测的抗原,37 °C 反应 1 h。兔抗与 Cy3 标记二抗的加入参照已建立的检测方法^[4]进行,充分反应后终止反应,用蛋白质芯片扫描仪在 532 nm 处测定 SF 和 sTfR 信号值。

比浊法:取 B 集合血清参照比浊法检测 SF 试剂盒、比浊法检测 sTfR 试剂盒说明书,分别测定 SF 和 sTfR。

1.2.1.2 准确性判定方法

铁缺乏判断标准为:SF < 15 ng/ml^[1], sTfR > 2.2 μg/ml^[6]。

按公式 1~6 分别计算蛋白质芯片检测方法诊断铁缺乏的灵敏度、特异度、阳性似然比、阴性似然比、约登指数及比较其与比浊法一致性的 Kappa 值。

灵敏度计算公式:

$$Se = \frac{A}{A+C} \times 100\% \quad \text{公式 1}$$

Se:灵敏度;A:真阳性人数;C:假阴性人数。

特异度计算公式:

$$Sp = \frac{D}{B+D} \times 100\% \quad \text{公式 2}$$

Sp:特异度;B:假阳性人数;D:真阴性人数。

阳性似然比计算公式:

$$+LR = \frac{Se}{1-Sp} \quad \text{公式 3}$$

+LR:阳似然比,比值越接近 10 越好;Se:灵敏度;Sp:特异度。

阴性似然比计算公式:

$$-LR = \frac{1-Se}{Sp} \quad \text{公式 4}$$

-LR:阴性似然比,比值越接近 0 越好;Se:灵敏度;Sp:特异度。

正确指数(约登指数)计算公式:

$$Y = (Se + Sp) - 1 \quad \text{公式 5}$$

Y:约登指数,越接近 1 真实性越高;Se:灵敏度;Sp:特异度。

Kappa 值计算公式:

$$Kappa = \frac{N(A+D) - (R_1C_1 + R_2C_2)}{N^2 - (R_1C_1 + R_2C_2)} \quad \text{公式 6}$$

Kappa: <0 弱一致性;0~0.2 轻度一致;0.21~0.40 一致性尚好;0.41~0.60 中度一致;0.61~0.80 高度一致;0.81~1.00 最强一致。

N : 样本总数; A : 真阳性人数; D : 真阴性人数; R_1C_1 : 两种方法阳性数的乘积; R_2C_2 : 两种方法阴性数的乘积。

1.2.2 铁储量的比较

根据方法学对照试验所得 SF 和 sTfR 的检测结果,对 26 份血清样品进行铁储量的比较。铁储量判断以公式 7 为准。

$$BIS = -\frac{\log\left(\frac{sTfR}{SF}\right) - 2.8229}{0.1207} \quad \text{公式 7}$$

BIS: 铁储量,单位 mg/kg。

根据此公式,当结果为正值时,表示机体储存铁的实际含量;当结果为负值时,表示机体缺铁的量。

1.2.3 蛋白芯片准确性的质量控制

芯片点样时,在 PSG 蛋白质芯片的每一个阵列中除点入目标蛋白的鼠单抗外,同时将阳性控制样(0.1 mg/ml 兔 IgG)、阴性控制样(0.1 mg/ml BSA)、空白控制样(pH = 7.4 PBS)分别依次点入。每阵列中点样方案如图 1 所示。

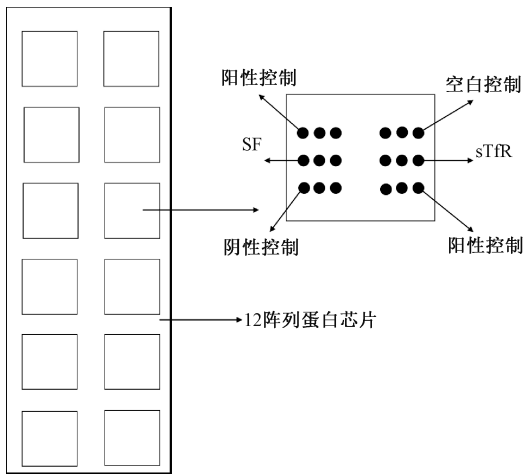


图 1 蛋白质芯片实验反应质量控制

Figure 1 The quality control of protein microassay

1.3 统计学分析

方法对照试验以配对比较 t 检验进行分析($\alpha = 0.01$),以 χ^2 检验($\alpha = 0.01$)比较两种方法诊断铁缺乏是否一致;两种方法铁储量的比较以配对比较 t 检验进行分析($\alpha = 0.01$);所有试验数据以 Excel 2003、SPSS 11.0 进行分析处理。

2 结果

2.1 准确性分析

方法学对照试验结果显示:以蛋白质芯片法与比浊法分别检测 26 份血清的 SF、sTfR,并进行配对比较

t 检验,差异均无统计学意义($P_{SF} = 0.012 > 0.01$, $P_{sTfR} = 0.014 > 0.01$)。

从上述试验结果得出,两种方法检测 SF 的结果均大于成年人正常值下限(15 ng/ml),可以认为两种方法都未发现贫血患者。因此,根据文献[7]提出的中国人群的铁缺乏判断标准($sTfR > 2.2 \mu\text{g/ml}$),利用 sTfR 的检测结果,对两种方法判断铁缺乏患者数据进行 χ^2 检验,结果见表 1。此结果显示, $P = 0.625 > 0.01$ 可以认为两种方法检出铁缺乏者的差异无统计学意义,二者具有检出一致性。

表 1 蛋白质芯片法与比浊法判断铁缺乏的比较结果($\alpha = 0.01$)

Table 1 The comparing of protein microarray and immunoturbidimetry for ID

蛋白芯片法	比浊法		合计
	铁缺乏患者	未见铁缺乏患者	
铁缺乏患者	11	1	12
未见铁缺乏者	3	11	14
合计	14	12	26

以 sTfR 检测数据为依据,根据公式 1~6 求得蛋白质芯片法筛查铁缺乏患者与比浊法相比较的灵敏度为 78.57%,较灵敏;特异度为 91.67%,特异性较好;阳性似然比为 9.43,阴性似然比为 0.23,显示出蛋白质芯片法具有较高的诊断价值;约登指数为 0.70,提示蛋白质芯片法具有较高的真实性;Kappa 值为 0.694 1,提示蛋白质芯片检测铁缺乏与比浊法相比具有高度的一致性。

2.2 铁储量分析

按照公式 7 计算两种方法分别检测的 26 份血清样品的铁储量,进行配对 t 检验(见表 2)。结果显示,两种方法所检测的铁储量差异有统计学意义($P = 0.006 < 0.01$),可以认为蛋白质芯片检测所发现的铁储量不足情况多于比浊法检测的结果。

表 2 蛋白质芯片法与比浊法对人群铁储量的比较结果($\bar{x} \pm s, \alpha = 0.01, \text{mg/kg}$)

Table 2 The comparing of BIS for protein microarray and immunoturbidimetry

方法	铁储量	差值
蛋白质芯片法	-12.24 ± 1.6	-0.95 ± 1.6 ^a
比浊法	-11.29 ± 2.6	

注:a 为两种方法检测所得铁储量比较 $P < 0.01$

2.3 质量控制分析

本研究所设立的阳性控制为 0.1 mg/ml 兔 IgG,用来控制试验操作程序中的假阴性,当操作正常且各试剂性质正常时,各阵列中此点位均为信号值相一致的阳性信号;当操作失误而没有加入二抗时,此处则无信号;当操作失误而没有加入兔多抗时,此处为弱信号,信号值高于 SF、sTfR 点位但低于正

常阵列阳性控制点位;当操作失误没有加入任何抗原、抗体时,此处信号与 SF、sTfR 点样信号相近,均为弱信号。此控制安排在每阵列的对角位置,用于平均分配点阵。研究中所设立的空白控制为 PBS,用以控制点样时点样针清洁程度。因点样液中含有游离的 Cy3,而空白控制 PBS 点样液中不含有 Cy3,因此,此点位在点样结束时不显示荧光信号,点样后扫描如含有荧光信号,则说明点样针清洗不到位,提示此点样操作中已将上一份样液中的样品带入下一个点位。本研究所设立的阴性控制为 0.1 mg/ml BSA,用于控制试验过程中的假阳性。无论在阴性对照阵列还是在样品阵列中,此点位都应是均一的弱信号值。当样品阵列中此位点信号值高于阴性对照阵列中此位点的信号值时,提示样品阵列中可能存在假阳性现象。

当试验结束扫描芯片后,只有在上述的质量控制均已符合要求时,此芯片对检测目标的检测结果才被认为是有效结果。

3 讨论

应用蛋白质芯片进行铁缺乏诊断时,对芯片本身设计的质量控制可以很好地保证检测结果的准确性。本研究中设计的各质量控制点在试验中均发挥出了各自应有的作用,为本研究中真实有效的试验数据的获得与最终结论推断的准确性提供了质量保证。本课题组前期方法学建立时关于方法自身准确度的研究结果^[4]显示,蛋白质芯片检测 SF 与 sTfR 的稀释倍数为 1:8 时,稀释回收率最接近 100%。因此,本研究采用 1:8 的稀释倍数,以便在方法间比较时获得较高的准确性。

关于文中所涉及的 α 检验水准如何确定的问题一直是大家讨论的问题。按照人卫版《卫生统计学》^[5]关于如何确定 α 检验水准以防第 I 类错误与第 II 类错误发生的解释,在本研究的试验设计之初,将 α 检验水准确定在 0.01,这是因为芯片法是一种新的检测方法,本研究希望更客观地反应此新方法的准确性而不希望过高地估计此方法的准确性,从而造成有偏好性的淘汰传统比浊法。因此本研究将全部试验的 α 检验水准定在 0.01 而没有选择 0.05。当然从表 1 的结果可以看出后期的试验结果证明即使定为 0.05,两种方法发现铁缺乏的能力也是没有差异的,但为了遵从与试验设计的一致性,在文中仍将 α 检验水准定为 0.01。

在检测 SF 和 sTfR 的方法中,尚未有公认的检测金标准。比浊法是目前检测 SF 和 sTfR 的常用方法^[4],因此本研究以此方法作为对照方法来分析蛋

白质芯片诊断铁缺乏的准确性。蛋白质芯片作为疾病筛检试验的一种工具,分析其准确性主要是通过对其实行真实性(效度)评价指标的考察。真实性主要以其灵敏度、特异度、约登指数、似然比及 Kappa 值等指标进行判断^[8]。其中,灵敏度指实际有病而按该试验的标准被正确地判为有病的百分比;特异度指实际无病按该诊断标准被正确地判为无病的百分比;约登指数又叫正确指数,表示筛检方法发现真病人与非病人的能力,指数越大,其真实性越高;似然比,因其只涉及灵敏度与特异度,而不受患病率的影响,因此能更为全面地反映筛检试验的诊断价值;Kappa 值是用于分析两种检验方法间一致率的常用指标,也能反映出检验方法的准确性。理想化的筛检方法,其灵敏度、特异度和约登指数均应为 100%。但实际工作中,因受筛查实施可行性的影响,所选筛检方法的上述指标很难均达到 100%,且常表现为灵敏度高则特异度低,反之亦然的现象。在本研究对评价指标的考察结果显示,蛋白质芯片诊断铁缺乏表现出了较为理想的真实性。似然比的结果显示,蛋白质芯片的阳性似然比为 9.43,阴性似然比为 0.23,同样显示出蛋白质芯片法具有较高的诊断价值;需要说明的是,因没有金标准,只能与常规比浊法进行比较,所以这里的“较高”不是比“比浊法”更高的意思,而是与其比较,两种方法较为接近。Kappa 值的判断标准在高于 0.6 时为高度一致,本研究中 Kappa 值为 0.694 1,同样显示出了其与传统方法较为理想的一致性结果。因此可以认为,蛋白质芯片技术在诊断人群铁缺乏时接近常规比浊法,二者具有高度的一致性,此方法可以较为真实准确地诊断人群铁缺乏状况。

由于 sTfR 的区间在正常人和缺铁人群中有很 大范围的重叠,因此在证明两种方法在诊断铁缺乏的准确性上具有一致性后,进一步比较了两种方法发现铁储量不足情况的能力,以期证明蛋白质芯片作为快速诊断筛查的工具是否能够起到提早警示的作用。铁储量的提出是随着对 sTfR 的深入研究而逐步展开的,Pauli 等^[9]基于 SF 和 sTfR 的作用提出了 sTfR/logSF 这一比值,认为当机体的铁参数在临界值附近时,sTfR/logSF 可以更敏感地发现铁缺乏,当比值在 1.8 ~ 2.2 之间时,机体发生铁缺乏(ID),当高于 2.2 时,机体处于红细胞生成缺铁期(iron deficiency erythropoiesis, IDE)。Punnonen 等^[10]的研究认为这一比值是一个识别铁储量缺乏患者的杰出参数。但 Cook 等^[2]基于 SF 和 sTfR 的作用及以前的研究结果于 2003 年提出了更直接表述机体储存铁情况的铁储量公式(公式 7)。根据这

一公式,当结果为正值时,表示机体储存铁的实际含量;当结果为负值时,表示机体缺铁的量。本研究中,参考了 Cook 等^[2]的公式作为计算铁储量的公式。用蛋白质芯片法与比浊法评价铁储量不足情况的配对比较 t 检验的结果显示,在经 χ^2 检验两种方法判断铁缺乏患者的能力相一致的前提下,蛋白质芯片法诊断铁储量不足的能力要高于免疫比浊法,其能更及时地发现目标人群铁储量的不足。

蛋白质芯片自应用于临床实践以来,一直是作为一种快速诊断的筛查工具。在目前没有诊断铁缺乏金标准的情况下,以比浊法作为对照方法进行比较,从本研究结果得出的结论是:蛋白质芯片法检测所发现的铁储量不足情况多于比浊法检测的结果。在这里,无意作出蛋白质芯片法优于比浊法的结论,只是以此说明芯片法筛查出了更多的有可能铁储量不足的情况,从而能更有效地起到快速筛查的目的,更早期地对可能的铁缺乏者起到提示作用。

简便、快速、准确、高通量、少样本量地检测反应人体营养状况的标记物是营养学检测的发展目标。本研究在实现了对 SF、sTfR 同时检测蛋白质芯片检测方法的初步建立之后,对此检测平台诊断铁缺乏的准确性进行了分析,以判断此检测平台在实际快速诊断检测中快速筛查出铁储量不足情况的可行性;在比较中证明蛋白质芯片法筛查出了更多的有可能铁储量不足的情况。希望能利用蛋白质芯片这一快速诊断筛查新技术在现有研究基础上最终建立一个能同时检测人血清中多种营养标志

物的检测系统,并在进一步的研究中能仅用几微升的血清完成对人体各种营养状况的评价。

参考文献

- [1] WHO, UNICEF, UNU. Iron deficiency anemia: prevention assessment and control[R]. Geneva:WHO,1998.
- [2] Cook J D,Flowers C H,Skikne B S. The quantitative assessment of body iron[J]. Blood,2003,101(9):3359-3364.
- [3] Erhardt J G, Estes J E, Pfeiffer C M, et al. Combined measurement of ferritin, soluble transferrin receptor, retinol binding protein, and C-reactive protein by an inexpensive, sensitive, and simple sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay technique[J]. J Nutr,2004,134(11):3127-3132.
- [4] YIN J Y, HUO J S, SUN J, et al. Study on the method of quantitative analysis of serum ferritin and soluble transferrin receptor with protein microarray technology[J]. Biomed Environ Sci,2012,25(4):430-439.
- [5] 方积乾. 卫生统计学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003.
- [6] 张海晨,宋云霄. 血清可溶性转铁蛋白受体参考范围的建立及其在缺铁性贫血诊断中的意义[J]. 诊断学理论与实践,2008,7(3):339-340.
- [7] Vikstedt R, Piia von L, Takala T, et al. Rapid one-step immunofluorometric assay for measuring soluble transferrin receptor in whole blood[J]. Clin Chem,2004,50(10):1831-1833.
- [8] 李立明. 流行病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004.
- [9] Suominen P,Punnonen K,Rajamäki A,et al. Serum transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index identify healthy subjects with subclinical iron deficits[J]. Blood,1992(8):2934-2939.
- [10] Punnonen K, Irjala K, Rajamäki A, et al. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency[J]. Blood,1997,89(3):1052-1057.

农业部关于印发《2014 年农产品质量安全专项整治方案》的通知

各省、自治区、直辖市及计划单列市农业(农牧、农村经济)、农机、畜牧、兽医、农垦、渔业厅(局、委、办),新疆生产建设兵团农业(水产)局:

根据中央农村工作会议和全国农业工作会议精神,按照《国务院办公厅关于加强农产品质量安全监管工作的通知》(国办发[2013]106号)要求,在巩固已有整治成果的基础上,2014年农业部将继续开展农产品质量安全专项整治,现将《2014年农产品质量安全专项整治方案》印发给你们,请认真贯彻执行。

附件:《2014年农产品质量安全专项整治方案》

(相关链接:http://www.moa.gov.cn/govpublic/ncpzlaq/201403/t20140311_3809812.htm)

农业部

二〇一四年二月二十八日