

一种用于检测 1 型糖尿病的抗原蛋白质表达及鉴定方法的临床应用

袁晓燕 宋宇 曲业敏 李武 袁锦云 丛海燕 鞠毅 姚继承 王明义

作者单位: 264200 山东威海, 威海市立医院检验科(袁晓燕), 中心实验室(宋宇、曲业敏、丛海燕、鞠毅、王明义)
518122 广东深圳, 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司试剂生产部(李武), 试剂研发部(袁锦云)
264200 山东威海, 威海威高生物科技有限公司研发部(姚继承)

通信作者: 王明义, Email: wangmingyi1973@outlook.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.01.015

【摘要】 目的 表达并鉴定一种用于检测 1 型糖尿病的抗原蛋白质, 探讨其在化学发光检测系统中的临床应用。**方法** 利用 Primer 5.0 软件设计引物, 扩增谷氨酸脱羧酶 65 (GAD65) 的部分蛋白质编码区 (CDS) 并克隆至 pFastBac1 载体中, 经测序验证后在 SF9 细胞中表达。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定所得蛋白。利用该蛋白制备一种用于 1 型糖尿病检测的试剂盒, 将其运用于化学发光检测系统, 计算阳性检出率, 并比较化学发光检测系统与蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 阳性检出率的差异。**结果** 成功表达了与 GAD65 抗体特异结合的抗原蛋白质, SDS-PAGE 显示其相对分子质量为 65 000, 与预测值相符; 亲和层析纯化后蛋白纯度 $\geq 95\%$ 。所制备的化学发光检测试剂盒的阳性检出率明显高于 Western blotting [78.95% (30/38) 比 52.63% (20/38), $P < 0.05$]。**结论** GAD65 抗体特异结合抗原蛋白纯度高、特异性强, 利用该蛋白制备的相应试剂盒可应用于化学发光检测系统, 提高了 GAD65 抗体的阳性检出率和对 1 型糖尿病的诊断效率, 避免传统检测方法的漏检, 值得在临床推广。

【关键词】 1 型糖尿病; 谷氨酸脱羧酶 65; 化学发光检测系统

基金项目: 国家科技重大专项 (2009ZX10004-719, 2013ZX10004217)

Expression, identification and clinical application of an antigen protein for detection of type 1 diabetes mellitus

Yuan Xiaoyan, Song Yu, Qu Yemin, Li Wu, Yuan Jinyun, Cong Haiyan, Ju Yi, Yao Jicheng, Wang Mingyi. *Clinical Laboratory, Weihai Municipal Hospital, Weihai 264200, Shandong, China (Yuan XY); Central Laboratory, Weihai Municipal Hospital, Weihai 264200, Shandong, China (Song Y, Qu YM, Cong HY, Ju Y, Wang MY); Reagent Production Department, Shenzhen New Industry Biomedical Engineering Co., Ltd., Shenzhen 518122, Guangdong, China (Li W); Reagent R & D Department, Shenzhen New Industry Biomedical Engineering Co., Ltd., Shenzhen 518122, Guangdong, China (Yuan JY); R & D Department, Weihai Weigao Biotechnology Co., Ltd., Weihai 264200, Shandong, China (Yao JC)*

Corresponding author: Wang Mingyi, Email: wangmingyi1973@outlook.com

【Abstract】 Objective To express and identify an antigen protein for the detection of type 1 diabetes mellitus, and investigate its application to the chemiluminescence detection system. **Methods** The partial coding sequence (CDS) region of glutamate decarboxylase 65 (GAD65) was amplified by Primer 5.0 software and cloned into pFastBac1 vector. After sequencing, it was expressed in SF9 cells. The protein was identified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). A kind of kit for the detection of type 1 diabetes mellitus was prepared using this protein, it was applied to chemiluminescence detection system, the positive rate was calculated, and the positive rates of chemiluminescence immunoassay and Western blotting were compared. **Results** The specific binding protein of GAD65 antibody was successfully expressed. SDS-PAGE showed that its relative molecular mass was 65 000, which was consistent with the predicted value, and the purity of protein was more than 95%. The positive rate of the prepared kit was significantly higher than that of Western blotting [78.95% (30/38) vs. 52.63% (20/38), $P < 0.05$]. **Conclusions** The expressed protein of GAD65 antibody specific binding antigen has high purity and specificity. The corresponding kit can be used in the chemiluminescence detection system, and can improve the positive detection rate of GAD65 antibody, avoid the missed detection of traditional detection methods, and improve the diagnostic efficiency of type 1 diabetes, which is worthy of clinical promotion.

【Key words】 Type 1 diabetes mellitus; Glutamate decarboxylase 65; Chemiluminescence detection system

Fund program: National Science and Technology Major Project (2009ZX10004-719, 2013ZX10004217)

糖尿病是一种因胰岛素分泌不足导致的代谢性疾病,以高血糖症为主要特征,受多种遗传和环境因素影响。目前糖尿病可分为 1 型、2 型、特殊类型糖尿病和妊娠糖尿病^[1-2]。1 型糖尿病主要由于胰岛 β 细胞的破坏导致体内胰岛素不足,须给予胰岛素维持治疗。1 型糖尿病患者免疫系统破坏,体内会产生多种针对胰岛细胞自身抗原的抗体^[3],如胰岛细胞抗体(islet cell antibody, ICA)、胰岛素自身抗体(insulin autoantibody, IAA)、谷氨酸脱羧酶 65(glutamate decarboxylase 65, GAD65)抗体、蛋白质酪氨酸磷酸酶抗体(protein tyrosine phosphatase antibody, IA-2A)等^[4]。

GAD65 抗体存在于多数新诊断 1 型糖尿病患者体内,在表现出临床症状前即可产生。目前 1 型糖尿病自身抗体的检测方法主要有酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)等,ELISA 效率低且特异性不足,Western blotting 相关诊断试剂的敏感性和特异性较低。化学发光检测敏感性高、特异性强、耗时短、效率高,可进行全自动操作,1 h 即可完成测试。随着化学发光技术在体外诊断中的应用,开发一种适用于化学发光技术的 1 型糖尿病相关抗原试剂盒就显得尤为重要^[5]。本研究提供一种融合抗原蛋白质,可用于化学发光平台检测 GAD65 抗体,提高 1 型糖尿病的诊断效率,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 选择 2019 年 1 月—2020 年 9 月本院收治的 38 例 1 型糖尿病患者作为研究对象,均符合 1999 年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)糖尿病诊断标准^[6],依赖胰岛素治疗;另选择同期 50 名健康体检者作为健康对照组。本研究符合医学伦理学标准,并通过本院伦理委员会审批(审批号:20210421),所有检测均获得知情同意。

1.2 仪器与试剂 Veriti 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪购自美国 ABI 公司;RDY-SP1Z 电泳仪、805 凝胶成像仪均购自上海山富科学仪器有限公司。Maglumi 4000 Plus 全自动化学发光免疫分析仪购自深圳市新产业生物医学工程股份有限公司;GAD65 抗体 Western blotting 试剂盒购自深圳伯劳特生物制品有限公司。PCR 试剂盒和 DNA 分子标记物购自北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶、小牛肠碱性磷酸酶试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司;PCR 引物及重组质粒测序由华大基因完成;GAD65 抗体检测试剂、校准品、质控品和定标

液均购自圳市新产业生物医学工程股份有限公司。

1.3 细胞株、菌株和质粒 人 GAD65(hGAD65)购自美国 OriGene 公司;pFastBac1 载体、SF9 细胞和相应培养基以及其宿主 DH10BacTM 感受态细胞购自美国 Life Tech 公司;大肠杆菌感受态细胞 Trans5 α 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.4 研究方法

1.4.1 引物设计与合成 利用 Primer 5.0 软件根据 hGAD65(NM_000818.2)的 cDNA 序列设计扩增 hGAD65 蛋白质编码区(coding sequence, CDS)的特异性引物。见表 1。

表 1 抗原引物

引物名称	引物序列(5'-3')	酶切位点
hGAD65PF-5	CGGGATCCATGGCGTTTCTCCATGCAACAG	BamH I
hGAD65PR-1	GGAATTCTTATAAATCTGTCCAAGCGCTT	EcoR I

1.4.2 筛选抗原蛋白质的表达 以人互补 DNA(complementary DNA, cDNA)质粒为模板,利用相应的上下游引物 PCR 扩增出目的条带。回收目的基因片段,分别双酶切 pFastBac1 载体和纯化的目的片段,直接纯化回收 hGAD65 片段和 pFastBac1 线性载体的酶切产物。酶切纯化后的目的片段和线性载体片段,连接体系为 10 μ L, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化至大肠杆菌 Trans5 α 细胞。将转化产物涂布于含氨苄 100 μ g/mL 的 LB 固体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。在含有重组杆粒的 LB 平板上随机挑取多个单菌落,进行菌液 PCR 和双酶切并测序验证阳性样品。将获得的阳性杆粒载体转化至 DH10BacTM 感受态细胞中,筛选阳性克隆。将阳性重组杆粒转染至 SF9 细胞中, 27 $^{\circ}$ C 下孵育 72 h,直至观察到病毒感染征象,收获杆状病毒。收集细胞,提取蛋白,采用亲和层析法纯化重组蛋白,再用离子交换柱进一步纯化蛋白。

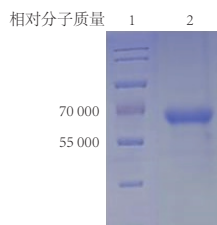
1.4.3 表达的抗原蛋白质在 1 型糖尿病中的临床应用 所有被检标本均为受检者空腹静脉血,分离血清并分装后置于 -20 $^{\circ}$ C 保存待检。化学发光免疫分析仪借助由主曲线经两点定标得到的一条工作曲线,自动计算每个样本的 GAD65 抗体浓度,结果以 kU/L 表示,阳性判断标准为 ≥ 30 kU/L。

1.5 统计学方法 使用 SPSS 8.0 统计软件分析数据,计数资料以率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选最优抗原蛋白质的鉴定 得出的目的蛋白纯化后的纯度达到电泳纯,其相对分子质量与

预测值相符,约为 65 000(见图 1)。经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和图像分析表明,其纯度均可达 95% 以上。



注: SDS-PAGE 为十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳;
1 为分子标记, 2 为谷氨酸脱羧酶 65 (GAD65) 抗原蛋白

图 1 抗原蛋白的 SDS-PAGE 结果

2.2 表达的抗原蛋白质在 1 型糖尿病中的临床应用 不同方法诊断 1 型糖尿病的 GAD65 抗体阳性检出率均明显高于健康对照组(均 $P < 0.01$); 且采用化学发光检测系统的阳性检出率明显高于采用 Western blotting ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同方法检测 GAD65 抗体阳性率比较

组别	例数 (例)	化学发光检测系统		Western blotting	
		阳性例数 (例)	阳性率 (%)	阳性例数 (例)	阳性率 (%)
健康对照组	50	1	2.00	0	0.00
1 型糖尿病组	38	30	78.95 ^{ab}	20	52.63 ^a

注: GAD65 为谷氨酸脱羧酶 65, Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验; 与健康对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 Western blotting 比较, ^b $P < 0.05$

3 讨论

1 型糖尿病起病急, 预后差, 及时筛查和早发现、早治疗非常重要^[3]。目前已在 1 型糖尿病患者血清中发现了部分破坏胰岛组织细胞的自身抗体^[7], 其中 GAD65 抗体出现最早, 持续时间长, 且阳性率随年龄增加而递减, 因此尽早准确检出 GAD65 抗体对 1 型糖尿病的诊断十分重要^[4, 8-9]。

Baekkeskov 等^[10]首次证明 GAD 是 1 型糖尿病的自身抗原。本研究选用的 GAD65 抗体融合蛋白为第 90~585 位的截短蛋白质, 其表达比全长蛋白质更容易, 表达量更高, 在用于检测糖尿病时敏感性更好, 特异性更高。但在对胰岛素自身抗体的实际检测中部分抗体浓度甚微, 一般检测方法不易测出。

本研究采用 Western blotting 试剂盒测定的 GAD65 抗体阳性率为 52.63%, 相关文献报道 ELISA 试剂盒测定的 GAD65 抗体阳性率为 58.7%^[9], 放射免疫法阳性率为 55.2%^[11], 可见上述方法的阳性检出率均不高, 且由于这些方法存在测定过程复杂、成本高、

耗时长等问题, 应用受到了一定限制。为解决上述问题, 本研究筛选出一种与 GAD65 抗体特异结合的抗原蛋白, 制备了相应的试剂盒并应用于化学发光检测系统, 其阳性率可高达 78.95%, 明显优于传统检测方法, 且化学发光分析的敏感性高、特异性强、检测时间短、效率高, 可进行高通量检测, 自动化程度高^[12], 因此这种筛选抗原蛋白试剂盒的应用大大提高了临床对 1 型糖尿病的检测效率。

综上所述, 本研究开发了一种可用于筛选 1 型糖尿病的 GAD65 抗体特异结合抗原蛋白, 制备了能应用于化学发光检测系统的相应试剂盒, 且通过临床试验证明了其应用提高了 GAD65 抗体的阳性检出率, 避免了使用传统检测方法造成的漏检或假阳性现象, 值得在临床推广。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 1 刘学欣, 郝志华, 霍丽静, 等. 某大型综合医院职工 2015—2018 年体检生化指标趋势分析与探讨 [J]. 实用检验医师杂志, 2020, 12 (1): 42-46. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.01.013.
- 2 魏彦艳, 李晓霞. 尿蛋白电泳在糖尿病早期肾损伤中的预测价值 [J]. 实用检验医师杂志, 2015, 7 (1): 5-8. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.01.03.
- 3 吕楚凤, 方成. 糖尿病及糖尿病肾病的自身免疫 [J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25 (3): 281-284. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6187.2017.03.018.
- 4 陈秀珍, 江继勇, 项明. 谷氨酸脱羧酶抗体检测在 1 型糖尿病诊断中的临床应用 [J]. 现代医药卫生, 2002, 18 (11): 1024. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2002.11.100.
- 5 安有芳, 张璐雯, 陈艳, 等. 化学发光法测定胰岛素及 C 肽在 2 型糖尿病诊断中的应用 [J]. 医学信息 (中旬刊), 2011, 24 (9): 4655-4656. DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2011.09.503.
- 6 World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus [R]. Geneva: World Health Organization, 1999.
- 7 李朝贵, 马松涛. 1 型糖尿病患者血清自身抗体联合检测的临床意义 [J]. 中国社区医师, 2020, 36 (20): 109-110, 112. DOI: 10.3969/j.issn.1007-614x.2020.20.061.
- 8 池莲祥, 聂本遂, 刘香萍, 等. GADA、ICA、IAA 及 IA-2 测定在糖尿病诊断分型中的意义 [A]. 中华医学会. 2006 年中华医学会糖尿病分会第十次全国糖尿病学术会议论文集 [C]. 北京: 中华医学会, 2006: 1.
- 9 赵彩虹. 检测 GAD-Ab、ICA 及 IAA 对糖尿病诊断的临床意义 [J]. 检验医学与临床, 2018, 15 (17): 2641-2643. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2018.17.038.
- 10 BAEKKESKOV S, AANSTOOTH H J, CHRISTGAU S, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase [J]. Nature, 1990, 347 (6289): 151-156. DOI: 10.1038/347151a0.
- 11 陈佩宏. 不同品牌自身免疫性糖尿病抗体检测试剂盒结果分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37 (12): 1689-1691. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.12.038.
- 12 柏明见, 何美琳, 冯璟, 等. 化学发光免疫分析法与酶联免疫斑点试验诊断结核病的相关性研究 [J]. 实用检验医师杂志, 2018, 10 (2): 71-73. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2018.02.002.

(收稿日期: 2020-10-22)

(本文编辑: 邵文)