

• 生物技术与方法 •

## 软骨寡聚基质蛋白荧光免疫层析定量检测方法建立

张永生<sup>1</sup>, 王云龙<sup>2,3</sup>, 王继创<sup>2</sup>, 李玉林<sup>2</sup>, 王晓军<sup>4</sup>, 王旭东<sup>4</sup>

1 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052

2 河南省生物工程技术研究中心, 河南 郑州 450002

3 郑州职业技术学院, 河南 郑州 450010

4 河南省职工医院, 河南 郑州 450002

张永生, 王云龙, 王继创, 李玉林, 王晓军, 王旭东. 软骨寡聚基质蛋白荧光免疫层析定量检测方法建立. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2332-2341.

ZHANG YS, WANG YL, WANG JC, LI YL, WANG XJ, WANG XD. Development of a fluorescence immunochromatography for quantitative detection of cartilage oligomeric matrix protein. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2332-2341.

**摘要:** 本研究旨在建立一种可用于类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 辅助诊断的人软骨寡聚基质蛋白 (cartilage oligomeric matrix protein, COMP) 荧光层析检测方法。采用双抗体夹心法原理制备免疫层析试纸条, 并进行性能评价及方法学对比。通过对临床样本的检测得到受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线, 计算试纸条灵敏度、特异性、阳性和阴性预测值。线性范围为 0.39–50.00 ng/mL; 批内批间变异系数均小于 15%; 试纸条 37 °C 加速破坏 20 d, 荧光信号强度变化范围在 15% 以内; 与类风湿因子 (rheumatoid factor, RF)、抗环瓜氨酸肽 (anti-cyclic citrullinated peptide, anti-CCP) 抗体无交叉反应; 与 ELISA 试剂盒平行检测 48 份临床血清样本, 相关性良好。采用本研究制备的试纸条检测样本, COMP 区分 RA 患者和健康人的 cut-off 值为 22.55 ng/mL (灵敏度为 0.821, 特异度为 0.842, 阳性预测值为 0.741, 阴性预测值为 0.895)。同时使用 ELISA 试剂盒进行同样样本检测, 两种检测方法灵敏度、特异度均能达到 80% 以上。这种可定量检测 COMP 的荧光层析试纸条具有快速、简便、灵敏等优点, 可为 RA 患者提供快速辅助诊断。

**关键词:** 软骨寡聚基质蛋白; 类风湿性关节炎; 时间分辨荧光免疫层析; 定量检测; 受试者工作特征曲线

Received: September 26, 2021; Accepted: December 9, 2021

Supported by: Key Scientific and Technological Research Projects in Henan Province, China (182102310685)

Corresponding author: WANG Yunlong. E-mail: biowyl@126.com

基金项目: 河南省科技攻关项目 (182102310685)

# Development of a fluorescence immunochromatography for quantitative detection of cartilage oligomeric matrix protein

ZHANG Yongsheng<sup>1</sup>, WANG Yunlong<sup>2,3</sup>, WANG Jichuang<sup>2</sup>, LI Yulin<sup>2</sup>, WANG Xiaojun<sup>4</sup>, WANG Xudong<sup>4</sup>

1 The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

2 Henan Bioengineering Research Center, Zhengzhou 450002, Henan, China

3 Zhengzhou Technical College, Zhengzhou 450010, Henan, China

4 Henan Provincial Staff Hospital, Zhengzhou 450002, Henan, China

**Abstract:** The purpose of this study was to develop a fluorescence chromatography method for the detection of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in the auxiliary diagnosis of rheumatoid arthritis (RA). The principle of double antibody sandwich method was used to prepare immunochromatographic test strips, and the performance evaluation and methodological comparison were carried out. Through the detection of clinical samples, a receiver operating characteristic (ROC) curve was obtained, and the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of the test strip were calculated. The linear range was 0.39–50.00 ng/mL. The coefficients of variation inter and intra batches were less than 15%. The test strip was stable at 37 °C for 20 days, and the variation range of fluorescence signal intensity was within 15%. There was no cross reaction with rheumatoid factor (RF) and anti-cyclic citrulline peptide (anti-CCP) antibody. Forty-eight clinical serum samples were detected in parallel with ELISA kit, and the correlation was good. The test strip prepared in this study was used to detect the sample, the cut-off value of COMP between RA patients and healthy people was 22.55 ng/mL (sensitivity 0.821, specificity 0.842, positive predictive value 0.741, negative predictive value 0.895). At the same time, the same sample was tested with ELISA kit, the sensitivity and specificity of the two methods reached more than 80%. A quantitative COMP fluorescence chromatography test strip was developed, which has the advantages of celerity, simplicity and sensitivity, and may provide rapid auxiliary diagnosis for RA patients.

**Keywords:** cartilage oligomeric matrix protein; rheumatoid arthritis; time-resolved fluorescence immunochromatography assay (TRFIA); quantitative detection; receiver operating characteristic curve

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以滑膜慢性增生、软骨破坏和关节周围侵蚀为主要特征的慢性自身免疫性疾病, 主要表现为关节肿痛、晨起僵直, 甚至导致关节内软骨和骨质严重破坏, 影响全球约 0.5%–1.0%的成人<sup>[1-3]</sup>。RA 患者进行快速诊断和相关治疗是十分重要的, 已经证明可有效延缓病情进展<sup>[4-5]</sup>。目

前对 RA 患者的诊断主要是临床诊断、影像学检查以及实验室检查, 这些检查往往需要专业的人员操作, 且需要大型仪器, 不适用于基层或社区医疗机构<sup>[6-7]</sup>, 一定程度上影响了疾病的及时治疗。已有研究报道的反映软骨损伤的血清标志物为 RA 患者便捷、快速诊断提供可能性<sup>[8]</sup>。

COMP 是一种 435 kDa 的均一五聚体非胶原细胞外基质蛋白, 主要定位于肌腱、软骨和心包组织<sup>[9-10]</sup>。最新研究表明, 血清 COMP 可作为 RA 诊断的血清学标志物, 也是识别严重关节损伤患者的重要指标<sup>[11]</sup>。目前对于 COMP 的检测方法主要是 ELISA, 但其具有操作复杂、检测时间长、不宜单样本检测等缺点。本研究建立一种 COMP 时间分辨荧光免疫层析检测方法, 有望实现在医院、社区和家用等多个领域对 RA 患者进行便捷快速诊断。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

硝酸纤维素膜 (CN-140) 购自赛多利斯; 吸水纸、玻璃纤维棉 (8975#)、PVC 底板购自怀远县通成纸制品有限公司; COMP 参考品、COMP 单克隆抗体、多克隆抗体 (兔 IgG), 羊抗兔 IgG 均由河南省生物工程技术研究中心提供;  $\text{Eu}^{3+}$  羧基荧光微球购自 Bangs; 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 购自 Sigma 公司; HM3030 型三维划膜喷金仪、ZQ2002 型微电脑自动斩切机购自上海金标生物科技有限公司; FIC-S2011-D5 荧光定量分析仪购自杭州峰航科技有限公司; Multiskan GO1510 酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司; 100 mm×20 mm BK-M4v 荧光灯购自宁波圣兰特电子科技有限公司; 各类缓冲液等试剂均为国药集团化学试剂有限公司化学纯; ELISA 试剂盒购自郑州常量生物科技有限公司; 临床血清样本收集于郑州大学第一附属医院。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验原理

本研究采用  $\text{Eu}^{3+}$  (铕离子, 亦即一种稀土离子) 时间分辨荧光免疫层析法检测血清

COMP 水平。 $\text{Eu}^{3+}$  具有比一般标记物更高的荧光寿命, 具有激发光谱很宽而发射光谱很窄的特性, 结合时间分辨荧光分析仪, 可消除非特异性荧光, 最终实现“零”本底测试。应用双抗体夹心法原理, 将待测血清和样本稀释液按照一定比例混合后加入加样孔中, 血清中的 COMP 会和结合垫上  $\text{Eu}^{3+}$  羧基荧光微球标记的 COMP 单克隆抗体结合形成抗原-抗体复合物, 并通过毛细作用沿着液体层析方向移动, 通过层析作用逐渐在硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上移动, 被固定在检测线上的另一株 COMP 单克隆抗体特异性地捕获, 形成抗体-抗原-抗体复合物, 兔 IgG 继续移动与质控线上的羊抗兔 IgG 抗体结合。用 100 mm×20 mm BK-M4v 荧光灯观察试纸条, 当待测样品中存在 COMP 时, 试纸条上检测线呈现荧光; 当检测样品为阴性时, 只有质控线呈现荧光。质控线无荧光时, 则证明试纸条无效。同时可用荧光分析仪测定检测线与质控线荧光强度, 检测线的荧光强度与待测物浓度成正比。COMP 荧光免疫层析试纸条定量检测原理及结果判读如图 1 所示。

#### 1.2.2 微球标记抗体复合物制备

取 40  $\mu\text{L}$   $\text{Eu}^{3+}$  羧基荧光微球于 1 mL 纯化水中, 15 000 r/min 离心 15 min, 缓冲液重悬, 加入 40  $\mu\text{L}$  10 mg/mL EDC 和 200  $\mu\text{L}$  10 mg/mL NHS, 室温旋转反应 30 min 后, 15 000 r/min 离心 15 min, 缓冲液重悬, 200 W 超声处理 10 s; 于上述液体中加入 COMP 单克隆抗体、兔 IgG 多克隆抗体, 28  $^{\circ}\text{C}$  旋转混匀 1.5 h; 弃上清, 用 1.0 mL 封闭液重悬, 28  $^{\circ}\text{C}$  旋转混匀 1.0 h, 200 W 超声处理 10 s, 保护液 1.0 mL 复溶, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存备用。

#### 1.2.3 试纸条制备

将母液浓度均为 8.0 mg/mL 的包被抗体、抗兔 IgG 分别与 10 mmol/L PB 缓冲液按照 1 : 7

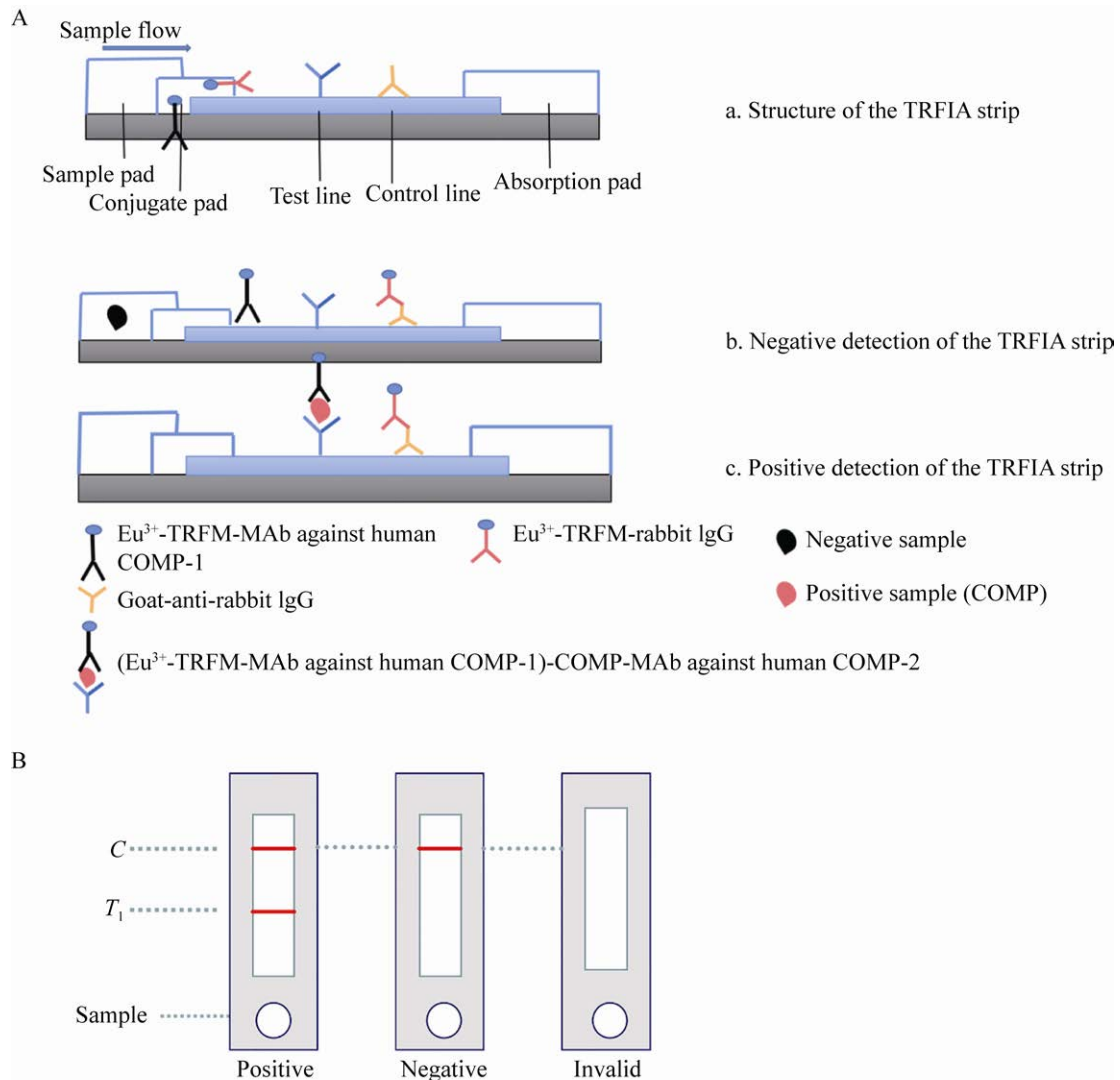


图1 COMP 荧光免疫层析试纸条定量检测原理及结果判读

Figure 1 Quantitative detection principle (A) and result interpretation (B) of COMP fluorescence immunochromatography test strip.

进行混合,得到浓度为 1.0 mg/mL, 并采用超微量紫外分光光度计进行测定; 将 NC 膜贴在 PVC 板对应位置上, 将稀释好的包被抗体、抗兔 IgG 以 1.0  $\mu\text{L}/\text{cm}$  进行划膜, 均匀地包被于 NC 膜上, 分别作为检测线 T 线、质控线 C 线, 并放入 37  $^{\circ}\text{C}$  干燥箱干燥 4 h。将 1.2.2 制备好的微球标记抗体复合物以 8.0  $\mu\text{L}/\text{cm}$  的量均匀喷涂于宽 12 mm、长 30 cm 微球垫上, 放入

37  $^{\circ}\text{C}$  干燥箱干燥 4 h。依次将吸水纸、微球垫、样品垫贴于包被板上, 吸水纸与 NC 膜重叠 1–2 mm, 微球垫与 NC 膜重叠 1–2 mm, 样品垫与微球垫重叠 1–2 mm。使用微电脑自动斩切机切成 4.0 mm 宽的试纸条, 加入装有干燥剂的铝箔纸内封口后备用。COMP 荧光免疫层析试纸条结构示意图及实物图如图 2 所示。

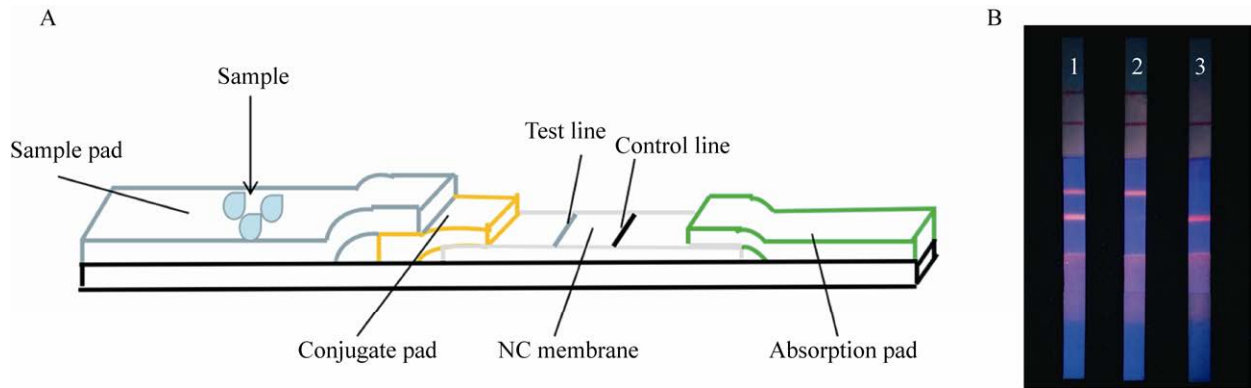


图 2 COMP 荧光免疫层析试纸条结构示意图及实物图

Figure 2 Structure (A) and physical (B) diagram of COMP fluorescence immunochromatography test strip. 1: positive; 2: negative; 3: invalid.

#### 1.2.4 试纸条检测

用移液器吸取待测样本 70  $\mu\text{L}$  于试纸条样品垫上, 点样 10 min 后, 放入荧光定量分析仪中检测, 读取  $C$  值、 $T$  值, 并计算  $T/C$  值分析样品中 COMP 浓度;

### 1.3 工艺优化

#### 1.3.1 最适缓冲液类型

缓冲液在蛋白标记过程中发挥着重要作用, 对微球与标记蛋白的偶联效率有一定影响; 本研究采用 pH 值均为 7.0 的硼酸盐、MES、磷酸盐 3 种缓冲液, 分别进行 3 组微球活化、蛋白标记实验。采用 1.2.2、1.2.3 试纸条制备方法, 分别滴加相同浓度的 COMP 参考品, 对比 3 组试纸条  $C$  值、 $T$  值荧光信号强度、 $T/C$  值。

#### 1.3.2 最适标记抗体量

采用 1.2.2、1.2.3 试纸条制备方法, 取 40  $\mu\text{L}$  微球, 加入 EDC (10.0 mg/mL) 40  $\mu\text{L}$ 、NHS (10.0 mg/mL) 200  $\mu\text{L}$ , 活化 30 min。分别加入标记蛋白 10、20、40、60、80、100  $\mu\text{g}$ , 偶联 1.5 h, 制备蛋白-微球复合物。将 6 组复合物各自以 10.0  $\mu\text{L}/\text{cm}$  量喷涂于预先处理的微球垫中, 真空干燥 4 h; 采用上述试纸条制备方法, 共制

备出 6 组试纸条, 滴加相同浓度 COMP 参考品, 用 FIC-S2011-D5 荧光定量分析仪 (杭州峰航科技有限公司) 测定  $T$  值, 筛选最佳标记蛋白量。

### 1.4 性能评价

#### 1.4.1 线性范围

使用高值线性参考品 50 ng/mL, 进行倍比稀释 (0.39、0.78、1.56、3.12、6.25、12.50、25、50 ng/mL), 对试纸条检测, 每个浓度重复检测 3 次, 以参考品浓度的对数值为横坐标、 $T/C$  均值的对数值为纵坐标, 进行双对数最小二乘法拟合标准曲线。

#### 1.4.2 最低检出限

使用零浓度参考品对试纸条进行检测, 重复检测 20 次, 计算  $T/C$  均值 ( $\bar{x}$ ) 及标准差 ( $s$ ), 计算 ( $\bar{x} \pm 2s$ ) 浓度值, 并将其代入定标曲线, 计算最低检出限。

#### 1.4.3 精密性评价

采用上述方法制备 3 批试纸条, 分别选取 5.0、10.0、20.0 ng/mL 3 个浓度精密性参考品进行测定, 每个浓度重复测定 10 次, 计算批内批间变异系数。

#### 1.4.4 准确度测定

向阴性样本中分别加入不同浓度参考品,

分别为 5.0、10.0、20.0 ng/mL，采用上述方法制备的试纸条进行检测，每个浓度测定 10 次，计算各浓度回收率平均值。回收率=(实测浓度/预测浓度)×100%。

#### 1.4.5 特异性

将 15.0 ng/mL 环瓜氨酸肽抗体 (anti-CCP)、15.0 ng/mL 类风湿因子 (RF) 分别与浓度为 20.0 ng/mL COMP 参考品等体积混合，采用上述方法制备的试纸条进行测定，测定 COMP 浓度。

#### 1.4.6 稳定性

将制备好的试纸条干燥后封口，置于 37 °C 加速破坏 3、5、7、10、15、20 d，采用相同浓度 COMP 参考品进行测定，重复测定 10 次，观察 C 值、T 值、T/C 值变化，分析试纸条稳定性。

#### 1.5 方法学比对

应用本方法制备的试纸条与商业化的 ELISA 检测试剂盒平行测定从医院收集的 48 例临床血清样本 COMP 含量，并进行相关性分析。

#### 1.6 临床评价

采用本研究建立的 COMP 荧光免疫层析检测方法制备的试纸条对临床确诊的 84 例 RA 患者和 152 例正常人血清进行检测，通过受试者工作特征 (ROC) 曲线评价试纸条诊断的准确性、灵敏度、特异性。同时采用 ELISA 试剂盒作为对照试剂，通过 Multiskan Go1510 酶标仪进行相同临床样本检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 最适缓冲液类型

采用相同 COMP 参考品对 3 种缓冲液制备的试纸条进行检测，C、T 荧光强度、T/C 值检测结果如图 3 所示，MES 缓冲液 C、T 荧光信号强度、T/C 值均高于其余两种缓冲液，故

MES 缓冲液为最佳缓冲液。

### 2.2 最适标记抗体量

最适标记抗体量结果如图 4 所示，随着标记抗体量的增加，T 线荧光强度、T/C 值先增加后降低。当标记抗体量为 40 μg 时，T 线荧光强度、T/C 值均达到最高，故 40 μg 为最适标记抗体量。

### 2.3 线性范围

采用本研究建立的时间分辨荧光免疫层析检测方法进行 COMP 线性参考品检测，结果如图 5 所示，COMP 在 0.39–50.00 ng/mL 范围内线性最好， $y=0.8629x-0.953$ ， $R^2=0.9987$ 。

### 2.4 最低检测限

最低检出限结果如表 1 所示，计算零浓度

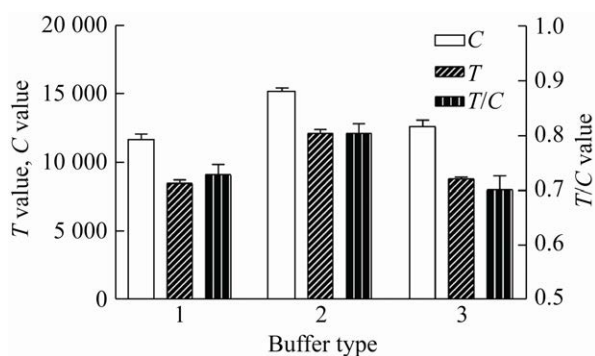


图 3 最适缓冲液类型

Figure 3 Optimum buffer type. 1: borate saline buffer; 2: MES buffer; 3: phosphate buffer.

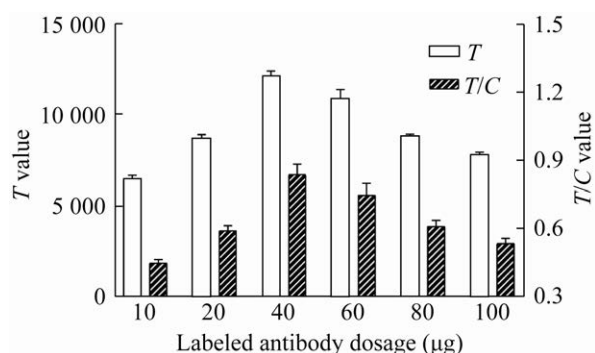


图 4 最适标记抗体量

Figure 4 Optimal labeled antibody dosage.

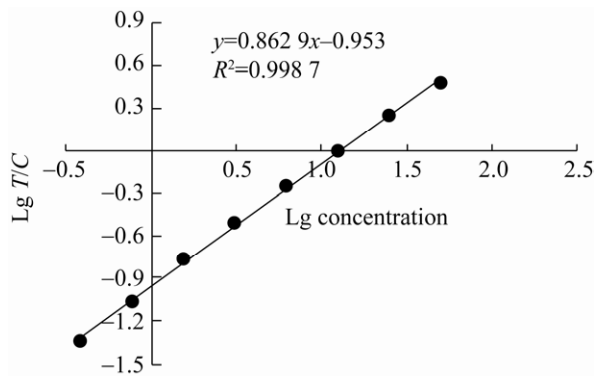


图 5 荧光免疫层析法检测人软骨寡聚基质蛋白标准曲线

Figure 5 Standard curve of COMP detection by fluorescence chromatography.

表 1 零浓度参考 COMP 蛋白  $T/C$  平均值和标准偏差的测试结果

Table 1 Test result of zero concentration reference COMP protein  $T/C$  mean and standard deviation

$\bar{x}$	$2s$	$\bar{x} \pm 2s$
0.02	0.01	0.03

参考品 20 次检测结果的  $\bar{x}$  和  $s$ , 将  $\bar{x} \pm 2s$  代入阴性参考品和相邻浓度线性参考品两点进行拟合得出的一次线性方程  $y=0.0667x+0.02$ , 得到最低检出限为 0.15 ng/mL.

## 2.5 精密性评价

精密性检测结果如表 2 所示, 3 批试纸条批内批间精密性均小于 15%; 符合试纸条精密性要求。

## 2.6 准确度测定

准确度测定结果如表 3 所示, 低值、中值、高值 3 个浓度参考品回收率分别为 104.82%、104.01%、105.05%, 均在 85%–115% 范围中, 符合要求。

## 2.7 特异性

检测结果表 4 所示, RA 患者常见血清标志物 anti-CCP、RF 对检测结果无明显影响, 试纸条特异性较好。

表 2 精密性检测结果

Table 2 Precision detection

Batch	Reference concentration (ng/mL)	$T/C$ mean value $\bar{x}$	Standard deviation (s)	$CV = s / \bar{x}$ (%)
Batch1	5.0	0.417	0.031	7.4
	10.0	0.836	0.074	8.8
	20.0	1.558	0.155	10.0
Batch2	5.0	0.434	0.042	9.7
	10.0	0.836	0.081	9.7
	20.0	1.547	0.157	10.2
Batch3	5.0	0.395	0.039	9.8
	10.0	0.827	0.079	9.5
	20.0	1.606	0.192	12.0
Inter batch	5.0	0.415	0.040	9.6
	10.0	0.833	0.075	9.1
	20.0	1.570	0.165	10.5

表 3 准确度测定结果

Table 3 Accuracy detection

Sample	Addition concentration (ng/mL)	Determination of concentration (ng/mL)	Recovery rate (%)
Low value	5.0	5.24±0.30	104.82
Median	10.0	10.40±0.78	104.01
High value	20.0	21.01±1.11	105.05

## 2.8 稳定性

试纸条稳定性检测结果如图 6 所示, 加速 20 d,  $C$  线、 $T$  线荧光信号强度、 $T/C$  值变化均在 15% 以内, 试纸条稳定性较好。

## 2.9 方法学比对

用本方法制备的试纸条与商业化的 ELISA 检测试剂盒平行测定从医院收集的 48 例临床血清样本 COMP 含量, 方法学比对结果如图 7 所示,  $y=1.001x-0.18$ ,  $R^2=0.9819$ , 表明两种方法检测血清 COMP 含量相关性较好。

表 4 特异性检测结果

Table 4 Specificity detection

Interfering substance and concentration	Theoretical concentration (ng/mL)	Actual concentration
Anti-CCP (15.0 ng/mL)	10.0	10.19±0.40
RF (15.0 ng/mL)	10.0	10.27±0.58



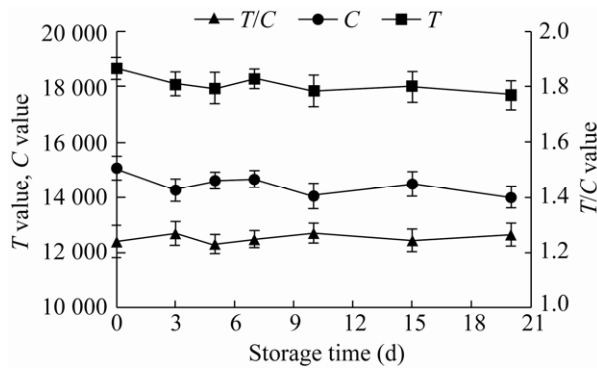


图 6 稳定性检测结果  
Figure 6 Stability detection.

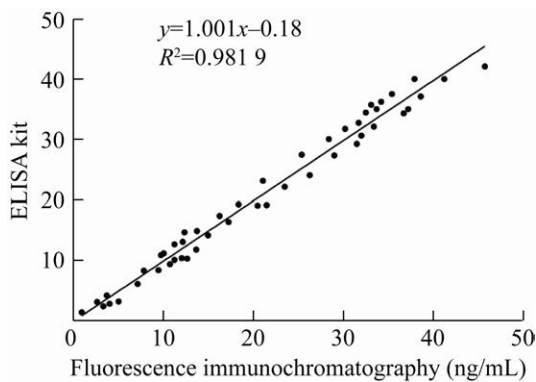


图 7 方法学比对结果  
Figure 7 Methodological comparison.

### 2.10 临床评价

采用本研究制备的试纸条,通过受试者工作特征 (ROC) 曲线分析临床确诊的 84 例 RA 患者和 152 例正常人血清中 COMP,结果如图 8 所示, AUC=0.912, 95%置信区间 (0.875 8, 0.948 3), 故该试纸条诊断准确率高。如表 5 所

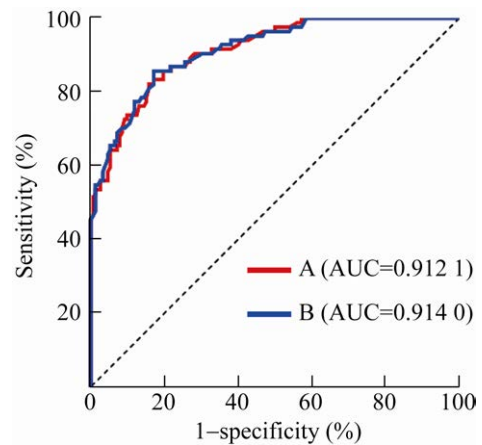


图 8 受试者工作特征曲线  
Figure 8 Receiver operating characteristic curve. (A) time resolved fluorescence immunochromatography. (B) ELISA kit.

示, 该 cut-off 为 22.55 ng/mL, 灵敏度为 0.821, 特异度为 0.842, 阳性预测值为 0.741, 阴性预测值 0.895。使用 ELISA 试剂盒进行样本检测, cut-off 为 23.85 ng/mL, 灵敏度为 0.857, 特异度为 0.829, 阳性预测值为 0.735, 阴性预测值为 0.913。两种检测方法灵敏度、特异度均能达到 80%以上, 诊断准确率均较高。

## 3 讨论

RA 是一种常见的炎性关节炎, 可以表现为一种轻微的、非破坏性的疾病, 也可以表现为一种严重的、快速破坏性的关节疾病, 快速诊断和相关治疗至关重要<sup>[12-13]</sup>。目前对 RA 的实验室诊断主要是通过 RF、抗 CCP 抗体。RF 的

表 5 时间分辨荧光免疫层析和 ELISA 试剂盒进行类风湿性关节炎患者 (n=84) 和健康对照受试者 (n=152) COMP 检测结果比较

Table 5 Comparison of COMP detection between RA patients (n=84) and healthy control subjects (n=152) by time-resolved fluorescence immunochromatography assay and ELISA Kit

Methods	Cut-off value (ng/mL)	AUC (95% CI)	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
TRFIA	22.55	0.912 (0.875 8, 0.948 3)	0.821	0.842	0.741	0.895
ELISA kit	23.85	0.914 (0.877 9, 0.950 2)	0.857	0.829	0.735	0.913

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.



诊断阳性率可达 80%，但是由于 RF 也可在其他结缔组织疾病中表达，故诊断特异性较低<sup>[14]</sup>。有研究报道，抗 CCP 抗体特异性可高达 90%以上，但灵敏度不高<sup>[15-16]</sup>；COMP 是近年来国外研究较多的软骨代谢标志物，属于糖蛋白 G 家族，是软骨非胶原蛋白的主要成分<sup>[17-19]</sup>。当软骨破坏时，COMP 首先进入滑膜液，随后进入血液，因此关节液、血液中 COMP 含量可反映软骨损伤程度<sup>[20]</sup>。研究表明，COMP 可以作为区分 RA 患者与正常人的血清学标志<sup>[21-22]</sup>。

目前对血清 COMP 的检测手段主要是 ELISA<sup>[23]</sup>，但其缺点是操作步骤复杂、检测时间长等。采用 ELISA 方法加完待测样本、酶标结合物、显色剂后，均需要经过 37 °C 孵育，每次孵育时间均在 30 min 甚至更长，且检测过程中需要经过多次洗板，从点样到检测结束，整个过程需要 2-3 h；荧光免疫层析技术，仅需将待稀释好的样品加入到试纸条样品垫上，10-15 min 后放入荧光定量分析仪中检测，读取数据即可；免疫层析技术是基于抗原抗体特异性免疫反应的新型膜检测技术<sup>[24-25]</sup>，主要分为胶体金免疫层析技术、荧光免疫层析技术两类。荧光免疫层析技术具有操作简便、检测快速、成本相对较低、特异性强和灵敏度高等优点，可实现对待测样本定量检测<sup>[26-28]</sup>。

本研究采用时间分辨荧光免疫层析技术，以 Eu<sup>3+</sup> 荧光微球标记 COMP 单克隆抗体，通过对缓冲液类型、标记抗体量进行优化，使得试纸条精密性、准确性、特异性、稳定性较好；同时与商业化 ELISA 试剂盒平行检测 48 例临床血清样本，相关性较好；经 ROC 曲线分析得，COMP 区分 RA 患者和健康人的 cut-off 值为 22.55 ng/mL，AUC=0.912，95% 置信区间 (0.875 8, 0.948 3)，试纸条诊断准确率高。综上所述，本研究所制备的荧光免疫层析试纸条，

可实现血清 COMP 快速定量检测，可为基层医院提供一种 RA 诊断和预后的辅助检测手段，适合临床推广应用。但由于本研究检测样本数较少，后期需加大临床样本检测进行验证。

## REFERENCES

- [1] Sokka T, Kautiainen H, Toloza S, et al. QUEST-RA: quantitative clinical assessment of patients with rheumatoid arthritis seen in standard rheumatology care in 15 countries. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66(11): 1491-1496.
- [2] Rudan I, Sidhu S, Papan A, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in low- and middle-income countries: a systematic review and analysis. *J Glob Health*, 2015, 5(1): 010409.
- [3] Delay L, Gonçalves Dos Santos G, Dias EV, et al. Sexual dimorphism in the expression of pain phenotype in preclinical models of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin N Am*, 2021, 47(2): 245-264.
- [4] Emery P, Solem C, Majer I, et al. A European chart review study on early rheumatoid arthritis treatment patterns, clinical outcomes, and healthcare utilization. *Rheumatol Int*, 2015, 35(11): 1837-1849.
- [5] Contreras-Yáñez I, Pascual-Ramos V. Window of opportunity to achieve major outcomes in early rheumatoid arthritis patients: how persistence with therapy matters. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 177.
- [6] Littlejohn EA, Monrad SU. Early diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis. *Prim Care*, 2018, 45(2): 237-255.
- [7] 徐鲲, 石涛, 栾希英. 磁共振成像在早期类风湿性关节炎诊断中的效果探讨. *影像研究与医学应用*, 2019, 3(23): 220-221.  
Xu K, Shi T, Luan XY. Effect of magnetic resonance imaging in the diagnosis of early rheumatoid arthritis. *J Imaging Res Med Appl*, 2019, 3(23): 220-221 (in Chinese).
- [8] Haikal SM, Abdeltawab NF, Rashed LA, et al. Combination therapy of mesenchymal stromal cells and interleukin-4 attenuates rheumatoid arthritis in a collagen-induced murine model. *Cells*, 2019, 8(8): 823.
- [9] El Defrawy AO, Gheita TA, Raslan HM, et al. Serum and synovial cartilage oligomeric matrix protein levels in early and established rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol*, 2016, 75(9): 917-923.
- [10] Lorenzo P, Aspberg A, Saxne T, et al. Quantification of

- cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and a COMP neoepitope in synovial fluid of patients with different joint disorders by novel automated assays. *Osteoarthritis and cartilage*, 2017, 25(9): 1436-1442.
- [11] Andersson MLE, Svensson B, Petersson IF, et al. Early increase in serum-COMP is associated with joint damage progression over the first five years in patients with rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord*, 2013, 14: 229.
- [12] Krabben A, Huizinga TW, Mil AH. Biomarkers for radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(2): 147-169.
- [13] Christensen AF, Lindegaard H, Hørslev-Petersen K, et al. Cartilage oligomeric matrix protein associates differentially with erosions and synovitis and has a different temporal course in cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP)-positive versus anti-CCP-negative early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 2011, 38(8): 1563-1568.
- [14] Verheul MK, Böhringer S, Van Delft MA, et al. The combination of three autoantibodies, ACPA, RF and anti-CarP antibodies is highly specific for rheumatoid arthritis: implications for very early identification of individuals at risk to develop rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*, 2018, 70(11): 1721-1731.
- [15] 徐士荣, 徐骏, 徐红珍, 等. RF、抗 CCP 抗体、抗 AKA 及 CRP 联合检测在类风湿关节炎诊断中的应用价值. *检验医学与临床*, 2020, 17(2): 199-201.
- Xu SR, Xu J, Xu HZ, et al. Value of combined detection of RF, anti-CCP antibody, anti-AKA with CRP in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Lab Med Clin*, 2020, 17(2): 199-201 (in Chinese).
- [16] 马婉珍. 抗 CCP 抗体、抗 MCV 抗体和类风湿因子在早期类风湿关节炎中的诊断价值. *吉林医学*, 2020, 41(9): 2124-2126.
- Ma WZ. Diagnostic value of anti CCP antibody, anti MCV antibody and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. *Jilin Med J*, 2020, 41(9): 2124-2126 (in Chinese).
- [17] Ekman S, Lindahl A, Rüetschi U, et al. Effect of circadian rhythm, age, training and acute lameness on serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) neo-epitope in horses. *Equine Vet J*, 2019, 51(5): 674-680.
- [18] Sakthiswary R, Rajalingam S, Hussein H, et al. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis and its correlation with sonographic knee cartilage thickness and disease activity. *Clin Rheumatol*, 2017, 36(12): 2683-2688.
- [19] Nguyen MVC, Adrait A, Baillet A, et al. Identification of cartilage oligomeric matrix protein as biomarker predicting abatacept response in rheumatoid arthritis patients with insufficient response to a first anti-TNF $\alpha$  treatment. *Jo Bone Spine*, 2019, 86(3): 401-403.
- [20] Garnero P, Piperno M, Gineyts E, et al. Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60(6): 619-626.
- [21] Ruthard J, Hermes G, Hartmann U, et al. Identification of antibodies against extracellular matrix proteins in human osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(3): 1273-1277.
- [22] Lewander P, Dahle C, Larsson B, et al. Circulating cartilage oligomeric matrix protein in juvenile idiopathic arthritis. *Scand J Rheumatol*, 2017, 46(3): 194-197.
- [23] Yamanokuchi K, Tagami M, Nishimatsu E, et al. Sandwich ELISA system for cartilage oligomeric matrix protein in equine synovial fluid and serum. *Equine Vet J*, 2009, 41(1): 41-46.
- [24] 李建武, 宋春美, 刘芳, 等. 免疫层析试纸技术及其在食品安全检测中的应用. *食品科学*, 2014, 35(8): 36-41.
- Li JW, Song CM, Liu F, et al. Immunochromatographic strip technology and its application in food safety detection. *Food Sci*, 2014, 35(8): 36-41 (in Chinese).
- [25] Li H, Wang D, Tang X, et al. Time-resolved fluorescence immunochromatography assay (TRFICA) for aflatoxin: aiming at increasing strip method sensitivity. *Front Microbiol*, 2020, 11: 676.
- [26] Di Nardo F, Anfossi L, Giovannoli C, et al. A fluorescent immunochromatographic strip test using quantum dots for fumonisins detection. *Talanta*, 2016, 150: 463-468.
- [27] Wang Z, Li H, Li C, et al. Development and application of a quantitative fluorescence-based immunochromatographic assay for fumonisin b1 in maize. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(27): 6294-6298.
- [28] Anfossi L, Di Nardo F, Cavalera S, et al. A lateral flow immunoassay for straightforward determination of fumonisin mycotoxins based on the quenching of the fluorescence of CdSe/ZnS quantum dots by gold and silver nanoparticles. *Mikrochim Acta*, 2018, 185(2): 94.

(本文责编 郝丽芳)