

CA19-9 双位点夹心 免疫放射分析法的建立

燕强奋, 陈永利, 王衍真

(中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413)

摘要: 采用两株 CA19-9 单克隆抗体, 一株用于¹²⁵I 标记、另一株包被于试管作为固相抗体, 用血清稀释 CA19-9 抗原, 制备标准品, 建立了 CA19-9 双位点夹心免疫放射分析方法(IRMA)。分析采用两步法, 本法最小检测限为 2.0 U/mL, 批内、批间变异系数分别为 6.4%~9.5%和 6.0%~12.6%; 样品添加实验结果显示, 回收率为 88.1%~106.1%; 血清样品倍比稀释后的测定值和稀释度的相关系数为 0.990。CA19-9 浓度至 11 800 U/mL 时测定未见“弯钩”效应。69 例健康人血清样品测定值为 0.3~29.6 U/mL($\bar{x}\pm s$ 为 7.4±5.8 U/mL), 和法国 CIS 公司的 CA19-9 免疫放射分析药盒同时测定 84 例人血清样品, 二者测定值相关方程为 $y=1.32x-17.6$, 相关系数 $r=0.896$ 。

关键词: 肿瘤标志物; CA19-9; 免疫放射分析; 单克隆抗体

中图分类号: R817-33; R446.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7512(2007)01-0016-04

Development of a CA19-9 Immunoradiometric Assay

YAN Qiang-fen, CHEN Yong-li, WANG Yan-zhen

(Department of Isotope, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China)

Abstract: An IRMA for determination of CA19-9 in human serum based on two monoclonal antibodies are developed, one of which is coated on polystyrene tubes as solid phase and another is labelled with ¹²⁵I as the tracer. Two-step assay procedure is employed and mouse IgG is used to block heterophilic antibody interference. The intra- and interassay of the IRMA are 6.4%-9.5% and 6.0%-12.6% respectively, the detection limit of the assay is 2.0 U/mL, and recovery is 88.1%-106.1%. The results of dilution test demonstrate good correlation between dilution times and values ($r=0.990$). No “hook effect” is observed when the concentration of CA19-9 is up to 11 800 U/mL. The value for normal samples ($n=69$) is 7.4 ± 5.8 U/mL. The assay is compared with a commercial kit by simultaneously assaying serum samples ($n=84$). Correlation coefficient (r) is 0.896. The performance characteristics show that the assay may be used in clinical application or research.

Key words: tumor markers; CA19-9; immunoradiometric assay; monoclonal antibody

肿瘤标志物是肿瘤细胞或机体应答肿瘤而产生的物质,测定血清中肿瘤标志物含量在癌症诊断、监测及预后等方面有重要意义。CA19-9 是一种类粘蛋白形式的糖蛋白,具有唾液酸化的乳-N-岩藻戊糖 II 抗原决定簇,是消化道癌如胰腺癌、结肠癌、胃癌等肿瘤的较特异标志物,常用于上述癌症的监测、预后及辅助诊断^[1~3]。Delvillano BC 等^[4]采用单克隆抗体 116NS19-9 建立了 CA19-9 免疫放射分析法,其它多种 CA19-9 单克隆抗体亦见报道^[5]。本工作拟用 CA19-9 的两株单克隆抗体(241 和 192)分别作固相抗体和标记抗体,建立 CA19-9 免疫放射分析法。

1 主要实验材料

CA19-9 单克隆抗体和抗原:美国 Fitzgerald Industrial International 公司产品,两株单克隆抗体克隆号和浓度分别为 241、2.4 g/L 和 192、2.6 g/L,抗原为标准级;Na¹²⁵I 溶液(无还原剂,放化纯度 > 98%);美国杜邦公司产品;氯胺-T (Ch-T);美国 Sigma-Aldrich Co. 公司产品;Sephadex G-25;瑞士 Pharmacia Biotech 公司产品;血清样品从临床医院收集;CA19-9 免疫放射分析药盒;法国 CIS bio international 公司产品;正常小鼠 IgG 和羊抗小鼠 IgG 抗体由本所自备;六角聚苯乙烯试管:北京友好塑料厂产品。

2 实验方法

2.1 ¹²⁵I 标记 CA19-9 单克隆抗体及正常小鼠 IgG 量的确定

采用 Ch-T 法标记^[6],Sephadex G-25 柱(1 cm×25 cm)分离纯化,用纸层析法测定标记率、标记物放化纯度及比活度^[7]。用磷酸缓冲液(含 0.9% NaCl,0.05 mol/L,pH 7.5,PBS)将标记物稀释至工作浓度,加入正常小鼠 IgG。为了确定正常小鼠 IgG 加入量,用 100 μL 羊抗小鼠 IgG 抗血清作为样品进行测定,观察反应体系中加入不同量小鼠 IgG 后,抗小鼠 IgG 抗体和 CA19-9 单抗结合的变化。

2.2 固相抗体的制备

用 0.05 mol/L,pH 7.5 磷酸缓冲液将 CA19-9 单克隆抗体配制成 2.5 μg/L 溶液,取

200 μL 加入底部为六角形的 12 mm×78 mm 聚苯乙烯试管中,2~8 ℃ 下静置过夜。弃去管中上清液,用洗涤液(0.01 mol/L,pH 7.5 的 PBS)洗涤试管。再加入 500 μL PBS(0.05 mol/L,pH 7.5,含 10 g/L 牛血清白蛋白),室温下放置 3 h,弃去管中上清液,室温干燥备用。

2.3 CA19-9 系列标准品的制备

稀释 CA19-9 抗原配制成一系列 CA19-9 浓度的标准品,加入 0.1% NaN₃,分装、冻干,于 2~8 ℃ 下储存备用。取部分标准品作为实验样品,分别以冻干态 37 ℃ 下和液态 2~8 ℃ 下存放,观察标准品的稳定性。

2.4 免疫放射分析程序

采用两步法,在固相包被试管中,加入标准品(或样品)和温育液(含 0.1% BSA 的 0.05 mol/L,pH 7.5 PBS)各 100 μL,37 ℃ 反应 3 h。弃去管中上清液,用去离子水洗涤试管 2 次。加入 200 μL ¹²⁵I-CA19-9 单克隆抗体(放射性活度约为 2×10⁵ min⁻¹),2~8 ℃ 下温育 18~22 h,弃去管中上清液,用 1 mL 去离子水洗涤试管 2 次,测量各管放射性计数率。

3 结果与讨论

3.1 正常小鼠 IgG 加入量确定

标记抗体中加入不同量小鼠 IgG,用 100 μL 羊抗小鼠 IgG 抗血清作为样品进行测定,结果列于表 1。由表 1 可知,小鼠 IgG 能显著阻断抗小鼠 IgG 抗体和 CA19-9 单抗(MAbs)的结合,以未加小鼠 IgG 时标记抗体结合率为 100%,则加入 0.134、0.268 和 0.536 g/L 小鼠 IgG 后,结合率分别下降为 16.9%、11.2% 和 9.0%;当加入 0.268 g/L 小鼠 IgG 时,标记抗体的结合计数率为 2 225 min⁻¹,已接近正常人样品和 CA19-9 标记单抗结合计数率的平均值,因此,本工作选定小鼠 IgG 加入量为 0.268 g/L。

3.2 标准品的稳定性

标准品(B、C、D、E、F,冻干)于 37 ℃ 下放置 9 d、溶解后存放在 2~8 ℃ 下,28 d 后,以存于 -20 ℃ 下的冻干品做对照,按免疫分析程序进行分析,结果列于表 2。由表 2 可知,在 37 ℃ 下放置 9 d,CA19-9 活性保留平均为 93.0%。溶解后存放在 2~8 ℃ 下,28 d 后 CA19-9 活性保留

平均 83.7%。因此选择冻干标准品存放在 2~8℃下,用前溶解。

表 1 抗小鼠 IgG 抗体与 CA19-9 单抗的结合

小鼠 IgG 加入量/ (g · L ⁻¹)	结合计数率/ min ⁻¹	相对结合率/%
0	19 787	100
0.134	3 351	16.9
0.268	2 225	11.2
0.536	1 771	9.0

表 2 标准品稳定性实验结果

存放条件	样品活性 / %					
	B	C	D	E	F	平均
9 d, 37℃	88.1	96.3	90.6	97.0	93.2	93.0
28 d, 2~8℃	71.4	85.2	75.9	96.2	90.0	83.7

3.3 方法学鉴定

3.3.1 标准曲线和灵敏度 CA19-9 免疫放射分析标准曲线示于图 1。以 20 个零标准管的计数率 $\bar{x}+s$ 对应的浓度为最小检测限。最小检测限为 2.0 U/mL。

3.3.2 精密度 3 个样品多次测定,结果列于表 3。由表 3 可知,批内变异系数为 6.4%~9.5%;批间变异系数为 6.0%~12.6%。

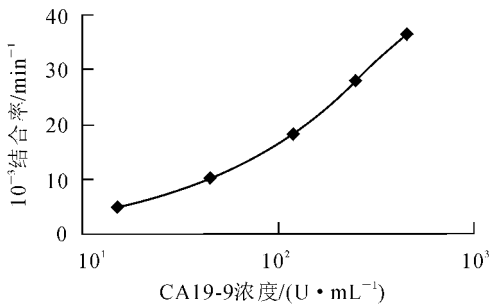


图 1 CA19-IRMA 标准曲线

表 3 样品精密度测定

样 品	批内 (n=20)		批间 (n=20)	
	$\bar{x} \pm s$	CV / %	$\bar{x} \pm s$	CV / %
1	32.4 ± 3.07	9.5	31.6 ± 4.0	12.6
2	75.5 ± 4.84	6.4	72.7 ± 7.0	8.2
3	143.5 ± 10.6	7.4	137.8 ± 9.6	6.0

3.3.3 回收率 按体积比 1 : 11 将已知量 CA19-9 分别加入 4 份血清样品中,测定结果列于表 4。由表 4 可知,本法的回收率为 88.1%~106.1%。

3.3.4 稀释实验 两份血清样品,用小牛血清稀释后测定,结果列于表 5。从表 5 可知,高值段线性略差。计算测定值和稀释度相关方程为 $y=330.8x+18.1, r=0.990$ (样品 1), $y=193.0x+12.3, r=0.990$ (样品 2)。表明方法的健全性是可接受的。

表 4 回收实验结果

样品	CA19-9 / (U · mL ⁻¹)			回收率 / %
	加入值	测定值	期望值	
1	0	39.5		
	13.7	51.6	49.6	104.0
	27.5	63.2	63.4	99.7
2	0	73.4		
	13.7	80.1	80.4	99.6
	27.5	91.7	94.2	97.3
3	0	102.0		
	142.4	249.5	235.1	106.1
	284.8	346.9	377.5	91.6
4	0	150.5		
	142.4	274.4	279.2	98.3
	284.8	371.6	421.6	88.1

表 5 稀释实验结果

稀 释 度	测定值 / (U · mL ⁻¹)	
	样品 1	样品 2
1/1	333.0	197.5
1/2	204.8	123.8
1/4	122.2	64.8
1/8	66.1	36.7
1/16	33.4	12.8
1/32	16.2	
1/64	7.4	

3.3.5 “弯钩”效应 血清中加入 CA19-9,配制一系列高浓度 CA19-9 血清(浓度至 11 800 U/mL)进行测定,结果示于图 2。图 2 中未见“弯钩”效应。

3.4 正常参考值

测定了 69 例健康人血清样品,CA19-9 浓度测定值为 0.3~29.6 U/mL, $\bar{x} \pm s = 7.4 \pm 5.8$ U/mL,和 Delvillano BC 等^[4]报道的 8.4 ± 7.4 U/mL 较接近。

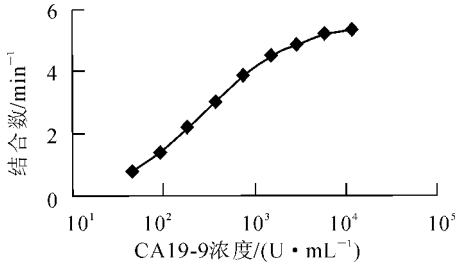


图 2 弯钩效应实验结果

3.5 和国外药盒比较

用本法和 CIS bio international 公司的 CA19-9 IRMA 药盒同时测定了 84 例血清样品,本法所测 CA19-9 血清浓度为 3.0~323.9 U/mL, CIS 药盒所测浓度为 1.1~230.8 U/mL,两者相关方程为 $y = 1.32x - 17.6$ (y 为本法所得结果, x 为 CIS 法所得结果),相关系数 $r = 0.896$ 。测定值有一定差异,可能是由于单克隆抗体较强的特异性造成的^[8]。

4 小 结

CA19-9 作为消化道癌症较特异的肿瘤标志物在临床检测中应用较普遍。现有 CA19-9 测定法大多是基于单克隆抗体 116NS19-9 的各种免疫分析法。本工作采用另外两株 CA19-9 单抗,建立了双位点夹心免疫放射分析方法。方法学各项技术指标(灵敏度、精密性、回收率)均满足免疫分析要求。

参考文献:

- [1] 孙信诚, 刘根寿. 肿瘤标记物在胰腺癌中的诊断价值[J]. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 1997, 18(3): 117-118.
- [2] BECHTEL B, WQAND AJ, WROBLEWSKI K, et al. Conformational Analysis of the Tumor-associated Carbohydrate Antigen 19-9 and Its Le a Blood Group Antigen Component as Related to the Specificity of Monoclonal Antibody CA19-9 [J]. Biol Chem, 1990, 265(4): 2 028-2 037.
- [3] JOHANSSON C, NILSSON O, BAECKSTROM D, et al. Novel Epitopes on the CA50-Carrying Antigen; Chemical and Immunochemical Studies [J]. Tumor Biology, 1991, 12: 159-170.
- [4] DELVILLANO BC, BRENNAN S, BROCK P, et al. Radioimmunoassay for Amonoclonal Antibody-Defined Tumor Marker CA19-9[J]. Clin Chem, 1983, 29: 549-552.
- [5] RYE PD, BOVIN NV, VLASOVA EV, et al. Summary Report on the ISOBM TD-6 Workshop: Analysis of 20 Monoclonal Antibodies Against Sialyl Lewis x and Related Antigens. Montreux, Switzerland, September 19-24, 1997 [J]. Tumor Biology, 1998, 19: 390-420.
- [6] HUNTER WM, GREENWOOD FC. Preparation of Iodine-131 Labelled Human Growth Hormone of High Specific Activity [J]. Nature, 1962, 194: 495-496.
- [7] 王玉肖, 燕强奋, 于洁. 抗 TSH 单克隆抗体的碘标记及其在免疫放射分析中的应用 [J]. 同位素, 1993, 6(4): 203-207.
- [8] KOBAYASHI I, OHI H, MONIWA N, et al. Characterization of CA125 Antigen Identified by Monoclonal Antibodies that Recognize Different Epitopes [J]. Clinical Biochemistry, 1993, 26(5): 391-397.