

前列腺抗原酶促化学发光免疫分析方法学的建立

张雪峰, 刘一兵, 贾娟娟, 许文革, 李子颖, 陈永利, 韩世泉

(中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413)

摘要:应用鲁米诺-过氧化氢发光体系建立定量测定血清前列腺特异性抗原含量的酶促化学发光免疫分析方法。该方法测量范围为 $1.5 \sim 80 \mu\text{g/L}$, 灵敏度为 $0.12 \mu\text{g/L}$, 批内变异 $< 5\%$, 批间变异 $< 15\%$ 。回收率为 $83.8\% \sim 118.7\%$, 稀释实验测定值与稀释度呈线性相关, 相关系数为 0.999 。本方法与免疫放射分析方法的相关方程 $y = 1.07x + 0.68$, 相关系数 $r = 0.97$ 。

关键词:酶促化学发光免疫分析方法; 前列腺特异性抗原; 单克隆抗体

中图分类号: R697.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-6931(2008)02-0112-05

Chemiluminescence Immunoassay for Prostate-Specific Antigen

ZHANG Xue-feng, LIU Yi-bing, JIA Juan-juan, XU Wen-ge,

LI Zi-ying, CHEN Yong-li, HAN Shi-quan

(China Institute of Atomic Energy, P. O. Box 275-35, Beijing 102413, China)

Abstract: The chemiluminescence immunoassay (CLIA) for serum total prostate-specific antigen (T-PSA) was developed. The reaction of luminol with hydrogen peroxide was introduced into this chemiluminescence system. The detection limit is established as $0.12 \mu\text{g/L}$ ($n=10$, mean of zero standard + 2SD) and the analytical recovery of PSA is $83.8\% \sim 118.7\%$. The intra-assay and inter-assay CVs vary from $4.4\% \sim 5.0\%$ and $6.2\% \sim 11.7\%$, respectively. The experimental correlation coefficient of dilution is found to be 0.999 . Compared with immunoradiometric assay (IRMA) kits, the correlative equation is $y = 1.07x + 0.68$, and correlation coefficient $r = 0.97$. The standard range for the method is $1.5 \sim 80 \mu\text{g/L}$, and it presents good linearity.

Key words: chemiluminescence immunoassay; prostate-specific antigen; monoclonal antibody

前列腺特异性抗原(PSA)是由前列腺上皮细胞和尿道周围腺体产生的一种相对分子质量为 $3.3 \sim 3.5$ 万道尔顿的单链糖蛋白。正常情况下, PSA 主要存在于前列腺液和精液中, 血液中浓度很低 ($0 \sim 4 \mu\text{g/L}$)。当前列腺病变

时, PSA 进入血液, 引起血液 PSA 浓度升高, 因此, PSA 检测技术应用于前列腺疾病的诊断、疗效观察和愈后判断^[1-3]。化学发光免疫测定技术(CLIA)是继放射性同位素和酶标记技术后发展起来的免疫标记技术, 它是在化学发

光反应的基础上,将免疫反应与化学发光相结合而建立起来的新技术^[4-5],它既具有免疫反应的特异性,又具有化学发光反应的高灵敏性,且无放射性同位素污染^[6-8]。前列腺特异性抗原酶促化学发光免疫分析方法的建立可为前列腺癌和炎症诊断、疗效观察和愈后判断提供科学、准确、可靠的临床依据,也可为酶促化学发光免疫分析方法应用于其他抗原的检测以及国产化学发光免疫分析仪器的研制提供参考。

1 实验仪器和试剂

1.1 主要仪器

发光检测仪及其软件为 Wallac 公司产品;伽玛计数器(GAMMA-C12),DPC 公司;1260 II 型 Y 计数器(LKB)。

1.2 主要材料和试剂

辣根过氧化物酶(HRP)、吐温(Tween)、过氧化氢(H₂O₂)均为 Sigma 产品;Sephadex G-100 购自上海化学试剂厂(进口分装);96 孔发光板购自深圳金灿华实业有限公司;牛血清白蛋白系上海赛达生物有限公司产品;包被单克隆抗体(P27A10)和标记单克隆抗体(P27B1)、发光底物、前列腺特异性抗原免疫放射分析试剂盒、前列腺特异性抗原放射免疫分析试剂盒均由中国原子能科学研究院原子高科医学二部提供。实验用化学试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 抗原的纯化

PSA 的制备和纯化参考文献^[9],精液进行低速和高速 2 次离心,低速 2 000 r/min 离心 30 min,高速 28 000 r/min 离心 30 min。对 0.01 mol/L、pH=7.8 的 Tris-HCl 透析后,用 Sephadex G-100 凝胶层析进行分离纯化,用放射免疫分析试剂盒对收集到的蛋白溶液进行鉴定并测定 PSA 含量。参照临床应用实际和其他分析方法标准品浓度的设置,结合酶促化学发光分析方法自身灵敏度高、检测范围宽等特点,最终将标准品浓度范围设定为 1.5~80 μg/L。

2.2 固相抗体的制备

用 0.1 mol/L、pH=9.5 的碳酸缓冲液(CB)稀释包被抗体至 10 mg/L,并加入发光板(每孔 200 μL)中。置 4 °C 过夜。次日,弃去包被液,拍

干。加入封闭液(含 0.4% 明胶,每孔 250 μL),37 °C 封闭 1 h。倒出封闭液,晾干备用。

2.3 酶标抗体的制备

采用改良高碘酸钠氧化法^[10]制备 PSA 的酶标记物,辣根过氧化物酶与抗 PSA 标记单克隆抗体用量均为 1 mg。酶标记物经 0.01 mol/L、pH=7.4 的 PB 于 4 °C 透析过夜后,加入等体积甘油于 -20 °C 下保存备用。

3 实验结果

3.1 方法学建立

1) 包被浓度的选择。包被抗 PSA 单克隆抗体 P27A10,包被浓度分别为 6、8、10、12、14 mg/L。酶标记物稀释 5 000 倍,两步法反应,反应时间为 1 h,结果示于图 1。图 1 表明,标准品各点发光值略有增加。选定 10 mg/L 作为本分析方法的包被浓度。

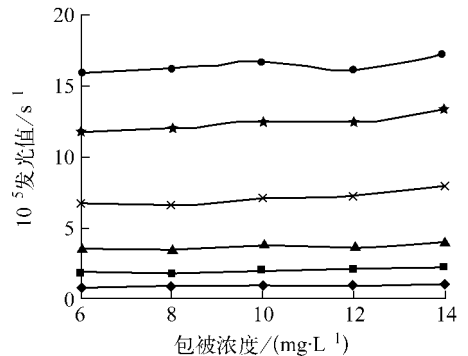


图 1 包被浓度的选择

Fig. 1 Selecting concentration of antibody used for coating

标准品浓度, μg/L: ◆——1.5; ■——4; ▲——10; ×——20; ★——40; ●——80

2) 酶标记物稀释度的选择。在确定了最佳包被浓度后,将酶标记物分别稀释 2 000、5 000、10 000 倍。计算曲线信噪比和相关系数,以寻找最佳包被浓度。结果列于表 1。据此,选定酶标记物稀释度为 1:5 000。

3) 反应时间的选择。确定了最佳包被浓度和酶标记物稀释度后,分别为两步反应设定不同的反应时间,观察发光值的变化,结果示于图 2。通过实验,最后选用每步反应 1 h、总反应时间为 2 h 作为本分析方法的反应时间。

表 1 酶稀释度的选择

Table 1 Selecting dilution level of labeled Mab

稀释度	信噪比	曲线相关系数
1 : 2 000	4.9	0.990
1 : 5 000	5.5	0.997
1 : 10 000	4.3	0.994

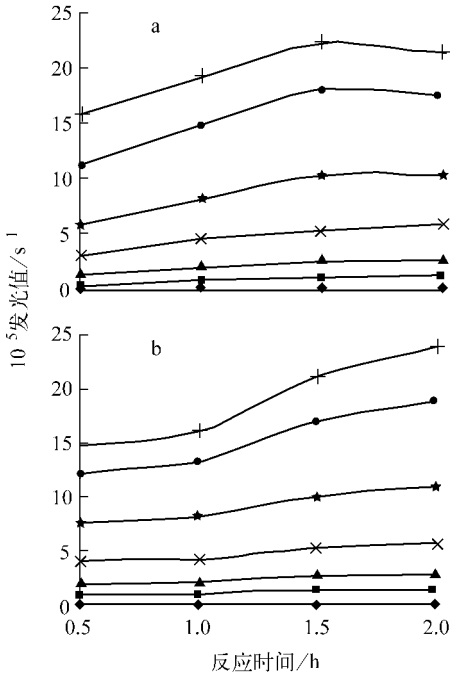


图 2 第 1 步(a)和第 2 步(b)反应时间选择

Fig. 2 Selecting incubation period

of the first (a) and the second (b) step

标准品浓度, $\mu\text{g/L}$: \blacklozenge —0; \blacksquare —1.5; \blacktriangle —4;

\times —10; \blackstar —20; \bullet —40; $+$ —80

3.2 方法学鉴定

1) 标准曲线及灵敏度。PSA 酶促化学发光免疫分析曲线示于图 3,同时测量 10 个“零”标准的发光值,求出 $\bar{x} + 2SD$,并将此值代入曲线方程,求得灵敏度为 $0.12 \mu\text{g/L}$ 。

2) 精密度。重复测定含有不同 PSA 浓度的人血清标本,观察批内、批间变异,结果列于表 2。

3) 健全性。将 1 份高值 PSA 血清样品进行倍比稀释,稀释度与检测值呈线性相关,得到的相关方程为 $y = 33.3x + 0.16$, $r = 0.999$,结果示于图 4。

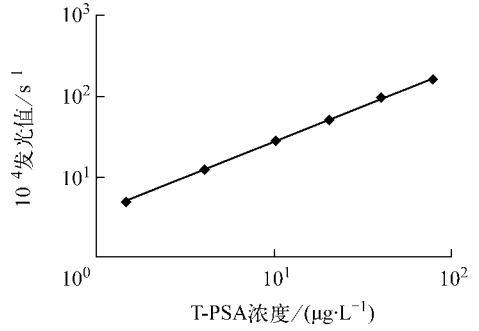


图 3 T-PSA 酶促化学发光免疫分析方法标准曲线

Fig. 3 Standard curve for PSA assay

表 2 批内、批间变异系数测定结果

Table 2 Intra-assay and inter-assay CVs

样品	批内变异			批间变异		
	平均值	SD	CV/%	平均值	SD	CV/%
1	3.40	0.15	4.4	7.17	0.84	11.7
2	11.73	0.59	5.0	20.69	1.54	7.4
3	31.17	1.56	5.0	44.18	2.76	6.2

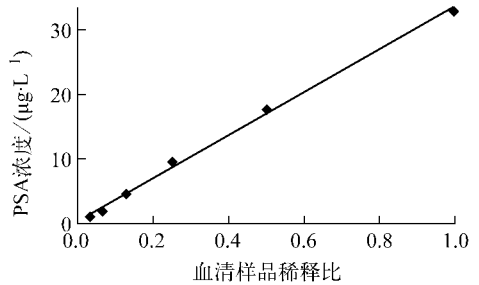


图 4 T-PSA 酶促化学发光免疫分析方法健全性

Fig. 4 Correlation coefficient of dilution experiment

4) 回收率。向 3 份血清样品中加入已知浓度的 PSA 标准品,测定其回收率,结果列于表 3。由表 3 可知,回收率为 $83.8\% \sim 118.7\%$ 。

表 3 回收实验测定结果

Table 3 Analytical recovery of PSA

血清样品	测量值/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	计算值/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率/%
1	51.69	56.42	91.5
	43.21	36.42	118.6
	25.42	21.42	118.7
2	13.07	13.75	95.1
	8.54	8.75	97.6
	6.32	5.75	109.9
3	4.77	5.69	83.9
	2.94	2.91	101.0
	2.44	2.69	90.7

5) “弯钩”效应。当血清样品 PSA 浓度达到 250 $\mu\text{g/L}$ 后,会出现“弯钩”效应(图 5)。

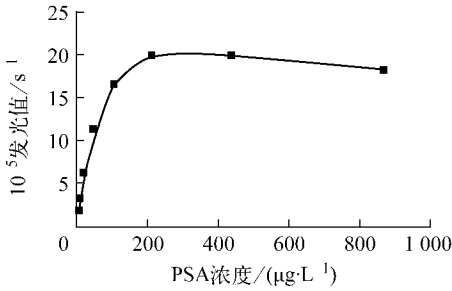


图 5 “弯钩”效应
Fig. 5 “Hook” effect

3.3 方法学比较

用本方法与免疫放射分析方法测定 55 份血清样品 PSA 浓度,结果示于图 6,相关方程为 $y=1.07x+0.68$,相关系数 $r=0.97$ 。

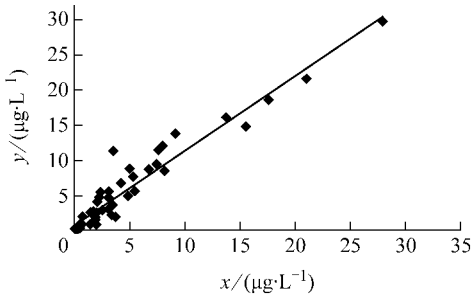


图 6 酶促化学发光分析方法与免疫放射分析方法的相关曲线

Fig. 6 Relationship between CLIA and RIMA
 x ——免疫放射分析方法测定值;
 y ——酶促化学发光免疫分析方法测定值

3.4 试剂盒主要试剂组分稳定性

1) 包被板稳定性。包被 1 批发光板,封闭后抽真空,于室温和 37 $^{\circ}\text{C}$ 下放置。考察其稳定性,结果示于图 7。由图 7 可见,20 d 内,室温下的包被板是稳定的,37 $^{\circ}\text{C}$ 下的包被板,前 3 d 略有下降,3 d 后基本稳定。

2) 标准品稳定性。将标准品置于室温和 37 $^{\circ}\text{C}$ 下,经一段时间后,用经化学发光分析方法测定其 PSA 含量,结果示于图 8,标准品在室温下能保存 20 d,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下只能保存 5 d。

3) 酶标记物稳定性。将酶标记物稀释至

1 : 500,置于室温和 37 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,一段时间后考察其稳定性,结果示于图 9。由图 9 可知,酶标记物在室温下可保存 15 d,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下可保存 5 d。

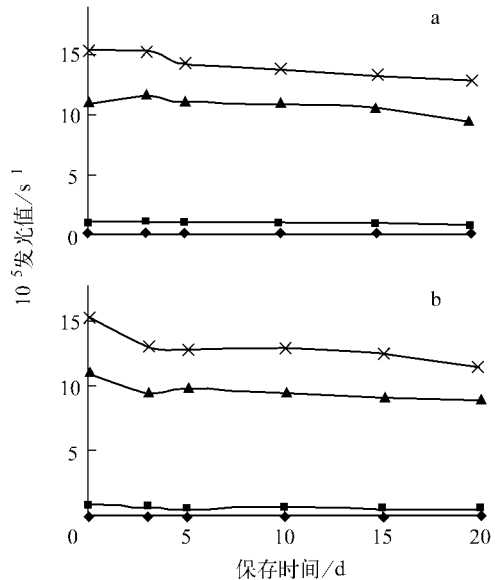


图 7 室温(a)和 37 $^{\circ}\text{C}$ (b)下包被板的稳定性
Fig. 7 Stabilities of coated plates at room temperature (a) and 37 $^{\circ}\text{C}$ (b)

标准品浓度, $\mu\text{g/L}$: \blacklozenge ——0; \blacksquare ——1.5; \blacktriangle ——40; \times ——80

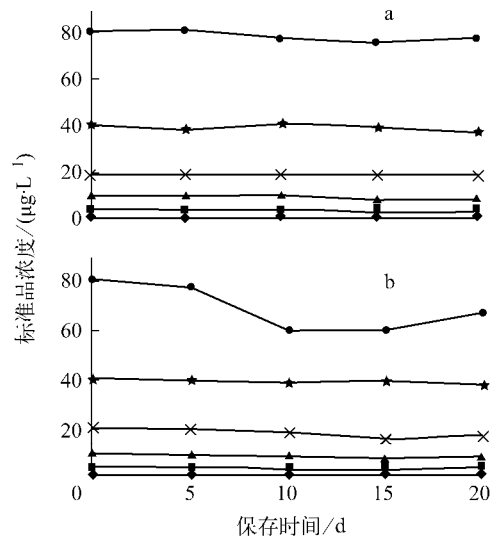


图 8 室温(a)和 37 $^{\circ}\text{C}$ (b)下标准品稳定性
Fig. 8 Stabilities of standards at room temperature (a) and 37 $^{\circ}\text{C}$ (b)

标准品浓度, $\mu\text{g/L}$: \blacklozenge ——1.5; \blacksquare ——4; \blacktriangle ——10; \times ——20; \blackstar ——40; \bullet ——80

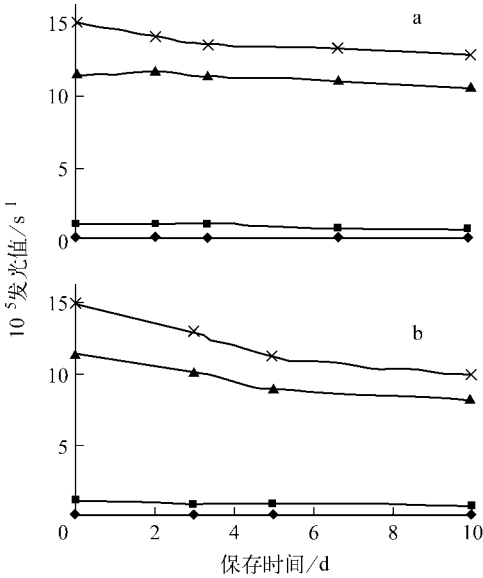


图9 室温(a)和 37 °C (b)下酶标记物的稳定性
Fig. 9 Stabilities of labeled MAb
at room temperature (a) and 37 °C (b)

标准品浓度, $\mu\text{g/L}$: \blacklozenge —0; \blacksquare —1.5; \blacktriangle —40; \times —80

4 结论

已建立的 PSA 酶促化学发光免疫分析方法对血样的测量值与免疫放射分析方法的测量值比对良好, 经与放射免疫分析方法的相关性实验分析, $y = 0.59x + 0.76$, $r = 0.90$, 表明该方法的测定值低于放射免疫分析方法的测定结果。出现这种情况有两个原因: 血清对酶促化学发光免疫分析方法的固液相反应存在干扰, 放射免疫分析属于液液相反应, 无此类干扰; 本方法学用两株单克隆抗体夹心法, 单克隆抗体特异性强, 放射免疫分析方采用多克隆抗体, 特异性稍弱, 可能会发生交叉反应。

前列腺特异性抗原酶促化学发光免疫分析方法与免疫放射分析方法和酶联免疫分析方法相比, 在灵敏度、测量范围等测量指标上有所提高。在灵敏度方面, 以前建立的免疫放射分析方法和酶联免疫分析方法的灵敏度分别为 0.5 和 0.2 $\mu\text{g/L}$, 而酶促化学发光免疫分析方法则达到了 0.12 $\mu\text{g/L}$ 。在测量范围方面, 免疫放射分析方法和酶联免疫分析方法分别为 2.5~

100 和 1.3~40 $\mu\text{g/L}$, 酶促化学发光免疫分析为 1.5~80 $\mu\text{g/L}$, 适合临床检测要求。

参考文献:

- [1] MAATMAN T J. Comparative analysis of fluctuation of serum tumor markers in advanced cancer of prostate[J]. Urology, 2002, 42(6): 672-676.
- [2] BARAK M, MECZ Y, LURIE A, et al. Evaluation of prostate-specific antigen as a marker for adenocarcinoma of the prostate[J]. Lab Clinical Method, 1989, 113: 598-603.
- [3] HAUKAAS S, SKAARLAND E, HALVORSEN O J, et al. Cushing's syndrome in prostate cancer: An aggressive course of prostatic malignancy[J]. Urol Int, 1990, 63(2): 126-129.
- [4] OHNO K, ARAKAWA H, YODA R, et al. Development of novel high-sensitivity chemiluminescence assay for luminol using thiourea derivatives[J]. Luminescence, 1999, 14(6): 355-360.
- [5] WHITEHEAD T P, KRICKA L J, CARTER T J, et al. Analytical luminescence: Its potential in the clinical laboratory[J]. Clinica Chimica Acta, 1979, 25(9): 1 531-1 546.
- [6] LIN S, HAN S Q, LIU Y B, et al. Chemiluminescence immunoassay for chloramphenicol[J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 382: 1 250-1 255.
- [7] PORAKISHVILI N, FORDHAM J L, CHARREL M, et al. A low budget luminometer for sensitive chemiluminescent immunoassays [J]. Immunological Methods, 2000, 234: 35-42.
- [8] WEERASEKERA D A, KIM J B, BARNARD G J, et al. Measurement of serum thyroxine by solid-phase chemiluminescence immunoassay [J]. Clinical Biochemistry, 1983, 20: 100-104.
- [9] WANG M C, VALENZUELA L A, MURPHY G P, et al. Purification of a human prostate specific antigen [J]. Milestone in Urology, 1979, 167(3): 1 226-1 230.
- [10] 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速的辣根过氧化物酶标记物酶标记抗体的过碘酸钠法[J]. 免疫学杂志, 1983, 33: 97-100.