

• 论 著 •

基于磁颗粒化学发光免疫分析方法检测鳞状细胞癌抗原*

田 峰¹, 齐素文^{2△}(1. 广东省深圳市光明新区人民医院检验科, 广东深圳 518110; 2. 深圳大学医学院
生物医学工程系, 广东深圳 518060)

摘要:目的 建立一种快速、灵敏的化学发光免疫分析方法检测人血清中鳞状细胞癌抗原(SCCA)水平。方法 使用异鲁米诺(ABEI)和异硫氰酸荧光素(FITC)分别标记 SCCA 的单克隆抗体,与待测 SCCA 抗原通过夹心法免疫反应形成抗原抗体复合物,采用包被有 FITC 的磁颗粒作为固相分离载体,加入底物之后检测发光强度。结果 本方法线性范围达到 22 ng/mL,灵敏度为 0.025 ng/mL,批内变异系数(CV)和批间 CV 分别小于 6% 和 7%。与现有的 SCCA 检测方法进行比对,相关系数为 0.990 1。结论 基于磁颗粒化学发光免疫分析检测 SCCA 的方法性能稳定、可靠,可用于定量检测人血清中 SCCA 浓度。

关键词:鳞状细胞癌抗原; 异鲁米诺; 化学发光免疫分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1823-03

Determination of squamous cell carcinoma antigen based on the magnetic particles chemiluminescence immunoassay*

Tian Feng¹, Qi Suwen^{2△}(1. Department of Clinical Laboratory, Guangming District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518110, China;
2. Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

Abstract: Objective To establish a rapid and sensitive chemiluminescence immunoassay for detecting squamous cell carcinoma antigen (SCCA) in human serum. **Methods** Fluorescein isothiocyanate (FITC) and N-(aminobutyl)-N-(ethylisoluminol) (ABEI) were used to label two different monoclonal antibodies of anti-SCCA. SCCA in serum combined with labeled antibodies and formed a sandwiched immunoreaction. After adding the substrate solution, the relative light unit of ABEI was measured. Magnetic particles coated with anti-FITC antibody were used as solid separation carrier. **Results** The results demonstrated that the method was linear to 22 ng/mL with a detection limit of 0.025 ng/mL. The coefficient of variation (CV) was less than 6% and 7% for intra-assay and inter-assay precision, respectively. Compared with the commercial kit, the proposed method showed a correlation of 0.990 1. **Conclusion** chemiluminescence immunoassay based on magnetic particles displays acceptable performance for quantification of SCCA and is appropriate for use in clinical diagnosis.

Key words: squamous cell carcinoma antigen; N-(aminobutyl)-N-(ethylisoluminol); chemiluminescence immunoassay

鳞状细胞癌抗原(SCCA)是一种异构体的糖蛋白,相对分子质量为 $45 \times 10^3 \sim 55 \times 10^3$ ^[1],Kato 等^[2]在 1997 年首次发现它是一个肿瘤相关抗原。SCCA 在正常的皮肤和其他鳞状上皮细胞中浓度很低^[3-4],在头部和颈部、肝脏等上皮癌组织中高浓度表达,现已被证明有助于肺癌、鳞状细胞癌的诊断^[5-7]。目前临床常用于检测血清中 SCCA 的方法包括酶联免疫吸附试验(ELISA)^[8]、化学发光酶免疫法(CLEIA)和化学发光免疫分析法(CLIA)等。然而,ELISA 法有其局限性,如重复性差、灵敏度低、线性范围窄等。CLEIA 是一种间接发光检测方法,使用酶催化发光,但是酶促反应容易受到温度波动的干扰。CLIA 是一种直接发光检测方法,使用发光物质如吖啶酯和 N-(氨基丁基)-N-(异鲁米诺)(ABEI)直接标记抗原或抗体,不需要酶的参与。因此,笔者研究了一种采用 ABEI 标记单克隆抗体、磁珠(MPS)作为分离载体的化学发光方法,用于检测人体血清中的 SCCA 浓度,试验的各项参数均进行了优化并对整个分析系统进行了评价分析。

1 材料与方法

1.1 样品来源 收集 40 份医院患者血清标本储存在 -20 ℃ 备用。

1.2 仪器与试剂 SCCA 原液、异硫氰酸荧光素(FITC)、N-羟基(NHS)、ABEI 和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。羊抗鼠 FITC 标记抗体包被的磁珠(5.0 mg/mL)购自意大利 Adaldis 公司。两种针对不同表位的鼠抗人 SCCA 单克隆抗体购自美国 Fitzgerald 公司。化学发光底物[氢氧化钠(NaOH)和过氧化氢(H₂O₂)]、牛血清清蛋白(BSA)和二甲基甲酰胺购自北京金科生物科技有限公司。FYL-YS-150L 恒温箱(北京福意联公司)和 ZWL-100H 摇床(郑州南北仪器设备有限公司)用于温育和振荡操作。Maglumi2000 自动分析仪购自深圳新产业生物医学工程有限公司。雅培(中国)有限公司提供 SCCA 市售试剂盒和 i2000 化学发光分析仪进行方法比较。

1.3 方法

1.3.1 缓冲液及校准品的制备 洗涤缓冲液为 0.05 mol/L 的 Tris 溶液(0.05%吐温 20)。0.1 mol/L 的 Tris-盐酸(HCl)缓冲液(pH 7.6,含 0.5% BSA 和 0.5% 甘油)作为 ABEI-SCCA 和 FITC-SCCA 抗体的稀释缓冲液。碳酸盐缓冲液(pH 9.3)和磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)用于 FITC 和 ABEI 标记 SCCA 抗体。BSA/PBS 液[0.003 mol/L 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄),0.003 mol/L 磷

* 基金项目:广东省深圳市科技计划项目(201303254)。 作者简介:田峰,男,副主任检验技师,主要从事临床生化检验研究。 △ 通讯作者,E-mail:qisuwen@szu.edu.cn。

酸氢二钾离(KH₂PO₄), 0.150 mol/L NaCl, 10 g/L BSA, pH 7.4]稀释 SCCA 原液, 制备校准品。校准品的浓度分别为 0.0、2.5、5.0、10.0、15.0 和 22.0 ng/mL, 分别设定为 S₀、S₁、S₂、S₃、S₄ 和 S₅。校准品分装、冻干后储存在 -70 °C 备用。

1.3.2 FITC 标记 SCCA 抗体制备 FITC 标记 SCCA 抗体的方法参考文献[9]并稍作修改。称取 12 mg FITC, 用 100 μL 二甲基甲酰胺溶解, 然后再慢慢加入 1.0 mL 0.1 mol/L 碳酸氢钠(NaHCO₃)缓冲液(pH 9.3)。SCCA 抗体放入透析袋中, 用 0.2 mol/L NaHCO₃ 缓冲液 4 °C 洗脱过夜。透析得到的 SCCA 抗体和 FITC 溶液混合, 在 4 °C 条件下搅拌 24 h, 用 300 mL PBS(pH 7.4) 在 4 °C 对混合液进行透析 3 d, 中间对透析液进行 4 次交换。收集 FITC 标记的 SCCA 抗体溶液, 3 000 r/min 离心 30 min, 收集上清。测试溶液在 280 nm 和 495 nm 处的吸光度, 估算抗体的浓度。FITC-SCCA 抗体加入甘油之后分装, -20 °C 储存备用。

1.3.3 ABEI 标记 SCCA 抗体制备 ABEI 标记 SCCA 抗体参考文献[10]进行。配制 2 mmol/L ABEI 溶液 200 μL, 2 mg NHS, 2 mg EDC, 然后加入 1 mL PBS (pH 7.4) 溶解, 接着加入 1.5 mg SCCA 抗体, 混匀, 37 °C 温育 1 h。混合液透析 2 d 后, 用 0.1 mol/L PBS(pH 7.4)洗脱未参与反应的试剂, 3 000 r/min 离心 30 min, 收集上清, 储存在 -20 °C 备用。

1.3.4 免疫反应 本试验使用 ABEI 作为化学发光物质, 采用抗体夹心法结合磁珠分离技术检测 SCCA, 免疫分析步骤如下: 首先, 加入 100 μL 待测血清或者 SCCA 校准品, 然后分别加入 30 μL 的 ABEI-SCCA 抗体和 FITC-SCCA 抗体, 37 °C 温育 25 min, 形成双抗体-抗原夹心复合物, 加入包被有抗 FITC 抗体的磁珠 40 μL; 37 °C 温育 5 min(捕获时间), 在磁铁作用下将抗原抗体复合物沉淀吸到反应管底部, 加入 400 μL 洗液, 除去游离的抗体和样品中杂质成分, 重复清洗 3 次, 最后加入 100 μL 发光底物(50 μL NaOH 和 50 μL H₂O₂)检测相对发光强度值(RLU)。

1.3.5 方法学评价 (1)线性范围: 在优化条件下, 测试 S₀、S₁、S₂、S₃、S₄ 和 S₅ 的 RLU, 得到标准曲线方程及线性范围上限。(2)灵敏度: 重复测定标准品 S₀ 10 次, 求发光平均值及其标准偏差, 再由发光平均值减去 2 倍标准偏差后的值代入校准曲线所求得的浓度, 计算平均检测限。(3)精密性: 低、中、高 3 种不同浓度的样品分别进行 20 次重复测定, 计算批内变异系数(CV); 对 3 个样品每天重复测试 4 次, 连续测试 5 d, 计算批间 CV。(4)临床比对: 使用该方法对 40 份血清标本进行检测, 每一个临床样品的检测值与雅培 SCCA 试剂盒测定值比较。以参比方法测定值为 X 轴, 本研究方法的测定值为 Y 轴, 作图得相关曲线。

1.4 统计学处理 每个校准品浓度重复测试 2 次, 以校准品浓度为横坐标, RLU 为纵坐标, 采用双对数作图法绘制标准曲线并拟合线性回归方程, 根据样品的 RLU 值, 计算血清样品中 SCCA 的浓度。

2 结 果

2.1 免疫试剂的优化 免疫试剂是影响免疫检测灵敏度的一个关键参数, 本实验对 ABEI-SCCA 抗体、FITC-SCCA 抗体溶液的最佳浓度进行了研究。ABEI-SCCA 抗体原液进行了一系列稀释, 稀释比例从 1 : 400 到 1 : 800, 抗体的最佳稀释比例参考校准曲线的测试结果。根据线性范围(最高 RLUS₅/RLUS₀)最宽, 灵敏度(最高 RLUS₁/RLUS₀)最高的原则,

ABEI-SCCA 抗体原液 1 : 600 的稀释比例被认为最佳, 见表 1。对 FITC-SCCA 抗体溶液进行一系列稀释, 稀释比例从 1 : 500 到 1 : 2 500。同样, 根据 RLUS₁/RLUS₀ 和 RLUS₅/RLUS₀ 的值, 选择 FITC-SCCA 1 : 1 000 的稀释比例进行后续的研究, 见表 2。

表 1 ABEI-SCCA 抗体稀释度优化

| 稀释度 | RLU | | | | |
|---------|----------------|----------------|----------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | S ₀ | S ₁ | S ₅ | S ₁ /S ₀ | S ₅ /S ₀ |
| 1 : 400 | 605 | 55 369 | 525 874 | 92 | 869 |
| 1 : 500 | 582 | 50 597 | 502 638 | 87 | 864 |
| 1 : 600 | 541 | 49 278 | 485 621 | 91 | 898 |
| 1 : 700 | 489 | 46 541 | 425 687 | 95 | 871 |
| 1 : 800 | 478 | 41 187 | 398 745 | 86 | 834 |

表 2 FITC-SCCA 抗体稀释度优化

| 稀释度 | RLU | | | | |
|-----------|----------------|----------------|----------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | S ₀ | S ₁ | S ₅ | S ₁ /S ₀ | S ₅ /S ₀ |
| 1 : 500 | 555 | 48 561 | 485 467 | 87 | 875 |
| 1 : 1 000 | 505 | 45 632 | 457 841 | 90 | 907 |
| 1 : 1 500 | 463 | 40 589 | 405 875 | 88 | 877 |
| 1 : 2 000 | 448 | 39 687 | 368 746 | 89 | 823 |
| 1 : 2 500 | 420 | 35 874 | 335 674 | 85 | 799 |

2.2 温育时间的优化 免疫反应的温育时间可直接影响免疫检测的灵敏度。如图 1 所示, 当温育时间延长, 免疫复合物增多, RLU 随之增加, 当时间达到 25 min 之后, 发光强度趋于缓慢下降, 表明抗原和抗体之间的反应已经达到平衡。因此, 免疫反应的温育时间设定为 25 min。

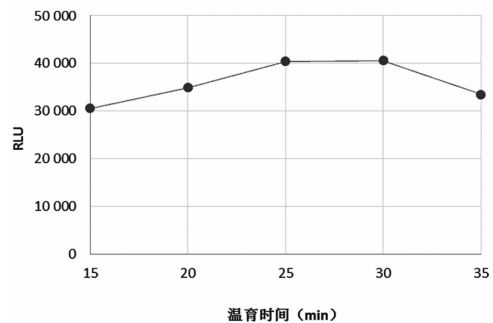


图 1 温育时间优化结果图

2.3 方法学评价

2.3.1 标准曲线 标准曲线方程为 log(Y) = 1.689 4 log(X) + 2.741 2, 线性范围上限为 22 ng/mL, 相关系数为 0.974 9。

2.3.2 灵敏度 该方法的检测限为 0.025 ng/mL。

2.3.3 精密性 批内精密性[均值(CV)]分别为[1.14 ng/mL(5.56%)],[2.65 ng/mL(5.23%)]和[6.86 ng/mL(4.08%)]; 批间精密性[均值(CV)]分别为[1.13 ng/mL(6.30%)],[2.54 ng/mL(5.79%)]和[6.67 ng/mL(4.36%)]。

2.3.4 临床对比 使用该方法对 40 份血清标本进行检测, 与雅培 SCCA 试剂盒测定值的比较作图得相关曲线, 见图 2。曲线方程为 Y = 1.014 8X + 0.015 1, 相关系数为 0.990 1, 两者

相关性良好。

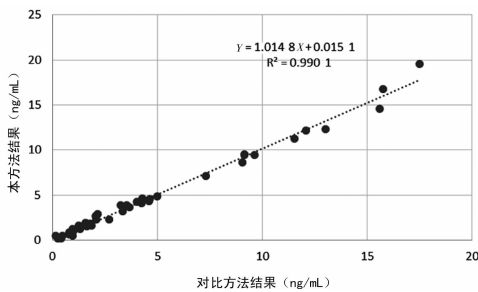


图 2 本方法与商品试剂盒测试 40 份标本的对比结果

3 讨 论

本研究基于磁珠分离系统,建立了一种灵敏、快速的化学发光免疫分析方法用于检测人体血清中 SCCA 水平。该发光系统主要包括包被有抗 FITC 抗体的磁珠, FITC 标记的 SCCA 抗体, ABEI 标记的 SCCA 抗体及发光强度检测系统 4 个部分。SCCA 抗原和标记的抗体形成“夹心反应物”,试剂的浓度和反应时间是影响免疫反应的关键参数。研究结果显示,当 ABEI-SCCA 抗体和 FITC-SCCA 抗体的稀释比例增大时, S_1 和 S_5 的 RLU 呈下降趋势。考虑到线性范围 ($RLUS_5/RLUS_1$ 比值)和灵敏度 ($RLUS_1/RLUS_5$ 比值),分别选择了 1 : 600 和 1 : 1 000 作为最优的稀释比例。免疫反应时间的长短也是影响免疫检测灵敏度的关键参数之一,研究显示,随着温育时间延长, RLU 增加,当温育时间为 25 min 时达到最大,因此免疫反应的时间设为 25 min。本方法检测步骤包括加试剂、温育、洗涤、捕获等,完成一个完整的测试只需 40 min,而采用 CLEIA 法检测一般需要一个多小时^[11]。Erickson 等^[12]研发了基于微孔板的 ELISA 测定血清 SCCA,尽管结论显示这种方法的性能参数符合要求,但手工 ELISA 操作需要更长的时间,检测效率不高。

本方法与其他 SCCA 检测方法相比具有几个优点。首先,灵敏度高,本方法 SCCA 检测的灵敏度为 0.025 ng/mL,而 ELISA 方法的灵敏度为 0.3 ng/mL。其次,免疫反应不需要通过酶的催化作用,并能避免一些非特异性反应。另外,磁珠用来作为分离载体,很好地解决了使用微孔板作为分离载体带来的不均匀性及包被抗体数量较少的问题,从而可以提高反应的线性范围,有较好的临床应用价值。

参考文献

[1] 杨冰,张洁清,李力,等. 鳞状细胞癌抗原用于宫颈鳞癌疗效及复

发监测的意义[J]. 中国基层医药, 2011, 18(22): 3131-3133.

[2] Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma[J]. Cancer, 1977, 40(4): 1621-1628.

[3] Kaddi CD, Wang MD. Models for predicting stage in head and neck squamous cell carcinoma using proteomic data[J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2014, 2014: 5216-5219.

[4] Schoenfeld JD. Immunity in head and neck cancer[J]. Cancer Immunol Res, 2015, 3(1): 12-17.

[5] Shah TM, Patel AK, Bhatt VD, et al. The landscape of alternative splicing in buccal mucosa squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2013, 49(6): 604-610.

[6] Sánchez De Cos J, Masa F, de la Cruz JL, et al. Squamous cell carcinoma antigen (SCC Ag) in the diagnosis and prognosis of lung cancer[J]. Chest, 1994, 105(3): 773-776.

[7] Ho YJ, Hsieh JF, Tasi SC, et al. Tissue polypeptide specific antigen and squamous cell carcinoma antigen for early prediction of recurrence in lung squamous cell carcinoma[J]. Lung, 2000, 178(2): 75-80.

[8] Erickson JA, Lu J, Smith JJ, et al. Immunoassay for quantifying squamous cell carcinoma antigen in serum[J]. Clin Chem, 2010, 56(9): 1496-1499.

[9] 李智勇,张倩云,赵利霞,等. 板式磁颗粒化学发光免疫分析在癌胚抗原测定中的应用[J]. 中国科学:化学, 2010, 61(5): 812-819.

[10] Tian D, Duan C, Wang W, et al. Sandwich-type electrochemiluminescence immunosensor based on N-(aminobutyl)-N-ethylisoluminol labeling and gold nanoparticle amplification[J]. Talanta, 2009, 78(2): 399-404.

[11] Zhang Q, Wang X, Li Z, et al. Evaluation of alpha-fetoprotein (AFP) in human serum by chemiluminescence enzyme immunoassay with magnetic particles and coated tubes as solid phases[J]. Anal Chim Acta, 2009, 631(2): 212-217.

[12] Erickson JA, Lu J, Smith JJ, et al. Immunoassay for quantifying squamous cell carcinoma antigen in serum[J]. Clin Chem, 2010, 56(9): 1496-1499.

(收稿日期: 2015-05-12)

(上接第 1822 页)

71(3): 293-298.

[8] Ramachandran J, Sajith KG, Priya S, et al. Serum cholinesterase is an excellent biomarker of liver cirrhosis[J]. Trop Gastroenterol, 2014, 35(1): 15-20.

[9] Fawzy MM, Amin Sakr M, Omar Khalifa M, et al. Alpha-L-fucosidase as a tumour marker of hepatocellular carcinoma[J]. Arab J Gastroenterol, 2012, 13(1): 9-13.

[10] Wang K, Guo W, Li N, et al. Alpha-1-fucosidase as a prognostic indicator for hepatocellular carcinoma following hepatectomy: a large-scale, long-term study[J]. Br J Cancer, 2014, 110(7): 1811-

1819.

[11] 曾文冰. 血清 AFU 检测诊断原发性肝癌的意义[J]. 黑龙江医学, 2014, 38(3): 268-269.

[12] 朱远航, 朱冬林, 张敏, 等. AFP、AFU 联合 β 2-MG 在原发性肝癌诊断中的价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(14): 2045-2047.

[13] 王华, 闫福堂, 袁军, 等. 血清 AFU 和 AFP 联合检测在原发性肝癌诊断中的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(16): 2093-2094.

(收稿日期: 2015-04-28)