

液相芯片技术定量检测人血清 PSA 反应模式的建立

薛理焯¹ 邢金春¹ 龙瑶² 颜晓梅²

(1.福建医科大学附属厦门第一医院泌尿外科 2.厦门大学化学化工学院 福建厦门 361003)

[摘要] 目的 建立利用液相芯片技术定量检测人血清中前列腺特异性抗原的反应模式,并对该方法进行评价。方法 应用液相芯片技术检测 50 例前列腺增生患者血清中的前列腺特异性抗原(PSA),评价该方法的线性范围、最低检测限、精密度等指标,并将结果与化学发光免疫分析法(CLIA)进行相关性分析。结果 液相芯片技术检测 PSA 标准曲线的线性范围为 0.022~129.6ng/mL,PSA 的最低检测限为 0.018ng/mL,检测 PSA 的批内 CV 为 2.18%~2.28%,批间 CV 为 1.61%~4.18%。用液相芯片技术和化学发光法分别对受检血清标本进行 PSA 定量分析,结果表明两法差异无显著性($P > 0.05$), $r = 0.9984$,相关性良好。结论 液相芯片技术具有线性范围广、灵敏度高、重复性好、节省样品和时间等优点,具有临床应用潜力。

[关键词] 液相芯片技术;前列腺特异性抗原;反应模式

[中图分类号] R446 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-9701(2009)01-45-03

The Establishment of Using Liquid Chip Technology to Quantify Prostate Specific Antigen in Human Serum

XUE Liye¹ XING Jinchun¹ LONG Yao² YAN Xiaomei²

1.Department of Urology, The First Hospital of Xiamen Affiliated to Fujian Medical University 2.The College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361003

[Abstract] Objective To quantify prostate specific antigen in human serum using liquid chip method and evaluate the performance of the method. Methods Liquid chip method was employed to detect the PSA in 50 cases of benign prostatic hyperplasia patients' serum, evaluating the index of linear range, detection limit and accuracy, and make a correlation analysis with chemiluminescence immunoassay(CLIA). Results The linear range for the measurement of PSA was 0.022~129.6ng/mL and the lowest detection limit for PSA was 0.018 ng/ml. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.18%~2.28% and 1.61%~4.18% respectively. Liquid chip method and CLIA were used to quantify PSA in human serum. The results showed that there were no significant differences in these two methods($P > 0.05$), but they had a good correlation($r = 0.9984$). Conclusion Liquid chip immunoassay has wide linear range, high sensitivity, repeatability, saving time and samples, with potential clinical applications.

[Key Words] Liquid chip method; Prostate specific antigen; Reaction mode

液相芯片(Liquid chip)是美国纳斯达克上市的 Luminex 公司研制出的新一代生物芯片技术,它既能为后基因组时代科学研究提供强大的技术支持,又能提供高通量的新一代分子诊断技术平台,但其临床应用尚处于起步阶段。

前列腺特异性抗原(PSA)作为前列腺的肿瘤标志物对于前列腺癌的普查、诊断、分期、疗效监测及预后判断等具有重要价值,它是前列腺产生并分泌的一种糖蛋白,对前列腺组织具有特异性,正常人血及尿中 PSA 较低,在前列腺癌时明显增高,但在前列腺增生症时也可有不同程度增高,个别甚至可达前列腺癌的程度。

本研究利用液相芯片技术检测前列腺增生患者血清中的前列腺特异性抗原的含量,建立利用液相芯片技术定量检测人血清中前列腺特异性抗原的反应模式,评价该方法的线性范围、最低检测限、精密度等指标,并将结果与化学发光免疫分析法(CLIA)进行相关性分析。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选择自 2008 年 7 月~2008 年 9 月的前列腺增生症患者血清标本 50 例,年龄 54~89 岁,平均 71.2 岁。术前评估包括常规查体、血 PSA 检测、前列腺 B 超检查、直肠指诊等;其中 PSA > 10ng/mL、直肠指诊提示有可疑硬结者均行磁共振或前列腺穿刺活检。所有患者行前列腺摘除术后均行病理检查以确诊。

1.2 实验材料

美国罗氏公司生产的 2010 型全自动电化学发光免疫分析仪 Luminex 200 液相芯片检测仪(美国 Beckman Coulter 公司),4.1 μ m 微珠(CP-40-10 stock in D.I. water, 3.3×10^8 /mL)购自美国 Spherotech 公司。N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)均购自美国 Pierce 公司。抗前列腺特异性抗原单克隆抗体 L1C00401、L1C00402 及前列腺特异性抗原标准品购自上海领潮生物科技有限公司。山羊抗小鼠抗体

(GAM 2.0mg/mL)购自河南华美生物工程有限公司。牛血清白蛋白(BSA)购自北京元亨圣马生物技术研究所。藻红蛋白(R-PE)购自美国 Prozyme 公司。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。土温 20(Tween20)购自上海生物工程有限公司。叠氮化钠(NaN_3)购自厦门绿茵试剂玻璃仪器有限公司。其他无机盐类药品均为分析纯。

1.3 方法与统计

按仪器操作手册及实验室相关要求做线性、精密度、相关性测试。采用 SPSS 13.0 for Windows 软件包处理获得试验数据。

2 结果

2.1 线性范围

液相芯片能够检测的血清样品中的 PSA 标准曲线的线性范围为 0.022~129.6ng/mL(如图 1)。

2.2 最低检测限

计算得出 PSA 的最低检测限为 0.018ng/mL(如图 1)。

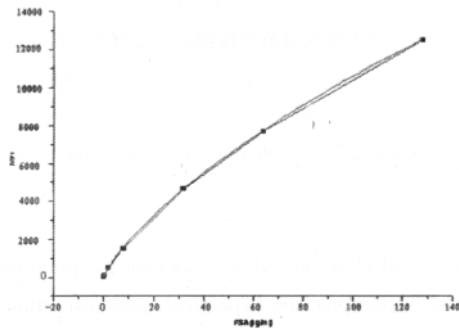


图 1 液相芯片法检测 PSA 时的标准曲线

2.3 精密度试验

用液相芯片技术对低、中、高值质控品分别进行精密试验,每份样品连续测定 8 次,计算 \bar{x} 、 s ,求批内 CV 值。每日测定 1 次,连续测定 8d,计算 \bar{x} 、 s ,求批间 CV 值。结果见表 1 2,PSA 的批内 CV 为 2.18%~2.28%,批间 CV 为 1.61%~4.18%,说明具有较好的重复性。

表 1 批内精密度试验

	低值	中值	高值
$\bar{x} \pm s$ (ng/mL)	7.26 ± 0.16	17.93 ± 0.39	33.80 ± 0.77
CV%	2.20	2.18	2.28

表 2 批间精密度试验

	低值	中值	高值
$\bar{x} \pm s$ (ng/mL)	7.41 ± 0.31	18.05 ± 0.29	32.48 ± 0.72
CV%	4.18	1.61	2.22

2.4 相关性试验

用液相芯片技术和化学发光法分别对受检血清标本进行 PSA 定量分析,结果表明,两法差异无显著性($P > 0.05$), $r = 0.9984$,提示两法相关性良好。见图 2。

3 讨论

液相芯片是基于美国 Luminex 公司 XMAP (Flexible multi-

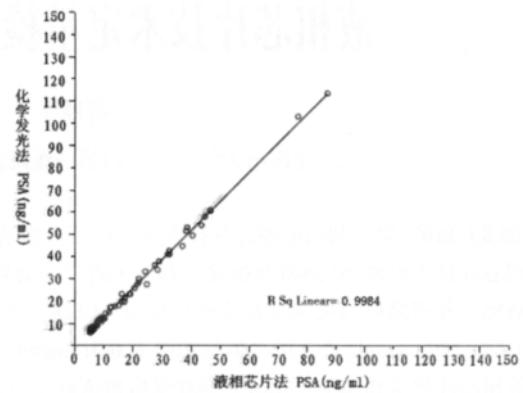


图 2

analyte profiling)技术的一种非常灵活的新型生物芯片技术平台,可进行蛋白、核酸等生物大分子检测及酶学分析、受体和配体识别分析等研究,被喻为后基因组时代的芯片技术。其原理为双抗体夹心免疫分析,它是在不同荧光编码的微球上进行抗原-抗体、酶-底物、配体-受体的结合反应以及核酸杂交反应,通过红、绿两束激光分别检测微球编码和荧光信号来达到定性和定量的目的,一个反应孔内可以完成多达 100 种不同生物学反应^[1,2]。

液相芯片的独特设计使它拥有常规检测方法难以媲美的优点:通量大,可对多种目的分子同时分析,大大提高工作效率;液相环境更有利于保持生物大分子的天然构象,也更有利于反应进行;灵敏度、准确性高,重复性、灵活性好;只需要微量的样品即可进行检测^[3,4]。以检测细胞因子为例,ELISA 的检测范围仅 1~2 个数量级,而液相芯片法最高检测浓度为 16000~32000 pg/mL,达到 3~4 个数量级,灵敏度也远胜于 ELISA,为 2~4 pg/mL,而且两种方法的检测结果相关性好,因此液相芯片法将来极有可能成为 ELISA 的替代方法^[5,6]。目前国外将液相芯片技术用于基础研究和临床检测日益增多,包括检测细胞因子、过敏原、自身抗体、激素、SNP 以及感染性疾病诊断、HLA 分型、基因表达分析等^[7-10],国内报道尚不多见。

在本研究中我们制备了单克隆抗体交联微球以及生物素标记抗体,采用双抗体夹心法定量测定人血清中的 PSA,建立利用液相芯片技术定量检测人血清中 PSA 的反应模式,从而评价该方法的线性范围、最低检测限、精密度等指标,并将结果与化学发光免疫分析法(CLIA)进行相关性分析,比较两者在检测血清 PSA 上的优势。

在研究中我们体会到与现有的化学发光及 ELISA 法相比,优点主要在于以下几个方面:(1)高敏感:在研究中我们得出 PSA 的最低检测限为 0.018ng/mL。其灵敏度是常规的 ELISA 方法的灵敏度 10~100 倍^[11]。与化学发光法相比,敏感性等同或略高。(2)线性范围宽:在研究中我们得到 PSA 标准曲线的线性范围为 0.022~129.6ng/mL,比常规的 ELISA 方法高 10 倍以上,可以达到 3~5 个数量级,检测浓度范围可以在 pg~ μ g 级^[11]。(3)检测血清用量少、反应快速快:只需要 1 μ L 标本和 2h 即可完成 PSA 的检测,较之 CLIA 大大节约了试剂、标本用量、人力以及操作时间,而且检测成本也比国外进口试剂更低,因为杂交或免疫反应

在悬浮的液相中进行,有利于生物分子间的相互作用,反应时间可缩短到十几分钟^[11]。(4)重复性好 我们发现该方法变异系数低于5%,具有较好的重复性,液态芯片杂交发生在准均相的液体环境中,在反应中有利于生物大分子保持其正确空间构象,使检测结果稳定。同时在对每个指标的检测中,在同一个反应体系中有其相对应的1000~5000颗相同的微球。检测时,抽取其中的100~500颗读数,最终的数据是取其所有值的中位数,这样可以使误差减到最小,从而使检测结果重复性好。(5)高通量:一次可以同时检测多种(100种)生理病理指标^[12,13]。这与传统方法的逐个检测相比是一个质的飞跃。这在我们今后的研究中将会进一步验证。因此液相芯片技术具有线性范围广、灵敏度高、重复性好、节省样品和时间等优点,具有临床应用潜力。

在本实验中,我们建立了液相芯片技术临床应用的反应模式,并评价了该方法的线性范围、最低检测限、精密度等指标,发现其是一种优于传统检测技术的快速、高通量、多样本检测手段,可广泛应用于临床。今后我们将进一步筛选特异性的肿瘤标志物,从而建立液相芯片技术高通量检测肿瘤标志物的反应模式,并促进实现自动化操作,进而广泛应用于临床。

[参考文献]

- [1] Kellar KL, Douglass JP. Multiplexed microsphere-based flow cytometric immunoassay for human cytokines[J]. *J Immunol Methods* 2003, 279: 277-285.
- [2] Dunbar SA, Vander Zee CA, Oliver KG, et al. Quantitative multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein application of the Luminex Lab MAPTM system[J]. *J Microbiol Methods* 2003, 53: 245-252.
- [3] de Jager W, Rijkers GT. Solid-phase and bead-based cytokine immunoassay: a comparison[J]. *Methods* 2006, 38(4): 294-303.
- [4] Ray CA, Bowsher RR, Smith WC, et al. Development, validation and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum[J]. *J Pharm Biomed Anal* 2005, 36(5): 1037-1044.
- [5] Hulse RE, Kunkler PE, Fedynyshyn JP, et al. Optimization of multiplexed bead-based cytokine immunoassays for rat serum and brain tissue[J]. *J Neurosci Methods* 2004, 136(1): 87-98.
- [6] de Jager W, Prakken BJ, Bijlsma JW, et al. Improved multiplex immunoassay performance in human plasma and synovial fluid following removal of interfering heterophilic antibodies[J]. *J Immunol Methods* 2005, 300(1-2): 124-135.
- [7] Johannisson A, Jonasson R, Dernfalk J, et al. Simultaneous detection of porcine proinflammatory cytokines using multiplex flow cytometry by the xMAP technology[J]. *Cytometry A* 2006, 69(5): 391-395.
- [8] Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection[J]. *Clin Chim Acta* 2006, 363(1-2): 71-82.
- [9] Lukacs Z, Dietrich A, Ganschow R, et al. Simultaneous determination of HIV antibodies, hepatitis C antibodies and hepatitis B antigens in dried blood spots—a feasibility study using a multi-analyte immunoassay[J]. *Clin Chem Lab Med* 2005, 43(2): 141-145.
- [10] Flagella M, Bui S, Zheng Z, et al. A multiplex branched DNA assay for parallel quantitative gene expression profiling[J]. *Anal Biochem* 2006, 352(1): 50-60.
- [11] Biagini RE, Sammons DL, Smith JP, et al. Comparison of a multiplexed fluorescent covalent microsphere immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxins[J]. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004, 11(1): 50-55.
- [12] 陈玮,李明,吴英松,等. 用液相芯片技术定量测定人血清 CEA、AFP 和 HBsAg[J]. *中山大学学报(医学科学版)* 2007, 28(1): 105-109.
- [13] 彭娟,陈玮,吴英松,等. 液相芯片技术定量检测人血清 CEA、AFP 和 NSE[J]. *热带医学杂志* 2007, 7(1): 19-23.

(收稿日期 2008-10-11)

(上接第40页)

帕沙星及环丙沙星等在防治肺结核病的适用性上有进一步发展^[7]。尽管在结核病治疗中不能以异烟肼、利福平等相提并论,其具有抗结核活性强与其他抗结核药无交叉耐药,肯定氟喹诺酮类药物(尤其新品种)在今后控制和治疗结核病上会有新贡献^[8-9]。

[参考文献]

- [1] Wael E, Shams M, Martin E, Evans. Guide to selection of fluoroginolones in patients with lower respiratory tract infections[J]. *Drug* 2005, 65(7): 949-991.
- [2] Elisabeth M, Frank S, Daniel J, et al. Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in intensive Care units (SARI): 1. Antimicrobial use in German intensive Care units[J]. *Intensive Care Medicine* 2004, 30(6): 1089.
- [3] 王强,金岩,李婉. 药品的解剖学治疗学化学分类索引及规定日剂量[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2003: 17, 148, 190.
- [4] 张国伟,明德松,吴一波,等. 金葡菌对第二、三、四代喹诺酮类抗菌药物的耐药性[J]. *中华医院感染学杂志* 2005, 15(1): 28.
- [5] Noviello S, Janniello F, Leone S, et al. In vitro activity of Prulifloxacin, levofloxacin and Ciprofloxacin against urinary pathogens[J]. *Infej Med* 2006, 14(1): 24-28.
- [6] 翁德新. 常用氟喹诺酮类药物的严重或罕见的不良反应[J]. *中国现代应用药学杂志* 2007, 24(7): 654-656.
- [7] 郑卫东. 氟喹诺酮类在结核病治疗中的应用[J]. *现代医药卫生* 2008, 24(3): 398-399.
- [8] 田文轩,韩爱云. 喹诺酮类药物的研究及应用[J]. *中国医药导报* 2006, 3(12): 57-58.
- [9] 谢励明,王振元,叶斌主. 75例老年人氟喹诺酮类药物不良反应分析[J]. *国际医药卫生导报* 2004, 10(14): 132-133.

(收稿日期 2008-07-05)