

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00924

流动注射化学发光同时检测甲胎蛋白和癌胚抗原

林洁华 张 慧 梅振华 胡孔诚*

(青岛科技大学化学与分子工程学院, 生态化工教育部重点实验室, 青岛 266042)

摘 要 将包被有单克隆抗体的两个透明微型检测池串联在流动注射分析装置上, 利用移动式微型检测池建立了一种能同时检测甲胎蛋白和癌胚抗原的流动注射化学发光免疫分析方法, 为提高分析效率提供了一种有效途径。样品抗原和辣根过氧化物酶标记的相应抗体分别导入微管进行孵育, 形成三明治式免疫夹心结构。在注入鲁米诺和 H_2O_2 后, 两微型检测池中分别形成较稳定的酶催化化学发光体系。通过切换检测池, 使两个透明微型检测池中发生的酶促增强化学发光反应相继得到检测, 从而实现两种待测物的同时检测。考察了一系列影响化学发光检测的参数, 如免疫反应时间、鲁米诺和 H_2O_2 的浓度及反应介质的 pH 值。在最佳实验条件下, 甲胎蛋白和癌胚抗原的检测线性范围分别为 $1.25 \sim 50.00 \mu\text{g/L}$ 和 $1.25 \sim 40.00 \mu\text{g/L}$, 检出限分别为 1.06 和 $1.00 \mu\text{g/L}$ 。对人血清实际样品进行了检测, 取得了满意的结果。

关键词 流动注射化学发光; 甲胎蛋白; 癌胚抗原; 串联微型检测池

1 引 言

癌症是全人类所面临的最危险的疾病之一。对肿瘤标记物的检测在疾病普查、癌症的临床诊断和患者的康复评估方面起着极重要作用^[1, 2]。由于抗原-抗体的特异性分子识别具有很高的选择性, 免疫分析技术已成为临床肿瘤标记物定量分析中的主要方法。免疫传感器选择性好、灵敏度高、操作简便, 与其它换能器相结合在近年来得到迅速发展。目前已出现许多用于单组分肿瘤标记物检测的免疫传感器的报道^[3, 4]。

在临床检测中, 许多疾病的诊断通常需要综合研究多种肿瘤标记物的数据来断定, 仅对单个肿瘤标记物的检测是不足以诊断疾病的。因此, 多组分肿瘤标记物的同时检测迅速发展起来并极大促进了癌症的精确诊断^[5, 6]。与传统的单组分免疫分析相比, 多组分免疫分析法具有样品分析通量高、样品消耗低、分析时间短等优点^[7]。文献[3, 8]对多组分免疫分析的发展历程进行了详细综述。有关多种标记物模式^[9]或不同免疫反应区域的区间分辨模式^[10, 11]的多组分免疫分析方法报道较多。许多电化学免疫传感器^[12, 13]和光学阵列法^[14, 15]用于多组分肿瘤标记物的检测。

化学发光 (CL) 分析技术以其灵敏度高、选择性好、装置简单和检测速度快等优点在多组分分析中引起广泛重视^[16~20]。Sun 等^[21]将芯片技术与化学发光技术联用, 实现了人体血清中 CA125、CA15-3、CEA、AFP、PSA 等 12 种肿瘤标记物的平行检测, 用于 1000 多例癌症病人的血清检测, 综合灵敏度达 68.18%。Fu 等^[7, 20]将底物区带分辨技术用于多组分肿瘤标记物的连续化学发光检测, 以甲胎蛋白 (AFP) 和癌胚抗原 (CEA) 为目标分析物, 聚醚噻吩为捕获抗体的固定化膜材料, 建立了基于双通道分辨技术的流通式两组分免疫分析体系, 联合检测 AFP 和 CEA 的检出限分别为 1.5 和 $0.25 \mu\text{g/L}$ ^[21]。本研究建立了测定 AFP 和 CEA 两组分肿瘤标记物的化学发光酶联免疫分析法 (CL-EIA)。以分别包被了 AFP 单克隆抗体和 CEA 单克隆抗体的微孔板 (微型检测池) 为免疫反应器, 基于夹心式免疫反应模式, 结合流动注射化学发光分析技术, 在自制的串联可移动式免疫流通检测池中同时检测 AFP 和 CEA。

本研究采用两种固定了单克隆抗体的微型检测池串联的模式, 实现了单通道同时分离检测甲胎蛋白和癌胚抗原。使用串联的模式组装微型免疫检测池, 在串联阵列中分别固定和标记。各微型检测池中的固定化单克隆抗体与注入的待测物及酶标抗体发生夹心免疫反应, 随后再与发光底物反应, 进行信

2009-10-24 收稿; 2010-03-03 接受

本文系国家自然科学基金 (Nos. 20775038, 20905041) 及山东省自然科学基金 (Nos. Y2008B02, Y2008B32, Q2007B03) 资助

* E-mail: hukongcheng@126.com

号检测。采用外部手柄来灵活切换串联式检测池在光窗处的位置,实现多组分混合样品的同时测定。本方法虽然比并联式检测池消耗样品量多,但是可控性和可操作性强,并且采用一次性使用的杯状微孔板(用过即抛型)作为检测池,成本低,避免了传感器应用中的再生步骤,节约了测定时间。本研究为探索单通道多组分在线化学发光免疫分析技术提供了一定的理论依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

检测装置包括可移动的自制检测池床(图 1)和两个固定了单克隆抗体(anti-AFP, anti-CEA)的微型检测池。聚四氟乙烯管(内径 0.8 mm)和硅胶管(内径 1.0 mm)作为整个系统中的管道流路材料。从透明微型检测池发出的化学发光信号由 IFM-E 型光学分析器(西安瑞迈电子仪器有限公司)检测,利用两微型检测池中间的不透光部分作为光路开关,类似于分光光度计的样品拉杆,拉动检测池床使不同微型检测池处于化学发光分析仪光电倍增管上方,检测该池发光强度。

甲胎蛋白和癌胚抗原诊断试剂盒(郑州埔赛生物与技术有限公司),包含一系列不同浓度的标准抗原、辣根过氧化物酶标记的二抗体以及预先固定了单克隆抗体的微孔板(微型检测池)。鲁米诺(Luminox GmbH & Co KG, 德国); H_2O_2 (30%, 上海化学试剂厂)。

0.01 mol/L 鲁米诺溶液: 将 0.1772 g 鲁米诺溶解在 0.1 mol/L NaOH- NaHCO_3 溶液(pH 11.0)中避光保存,使用前用 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH 9.2)稀释; 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 6.8)。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 多重免疫分析程序

图 1 为单通道同时分离检测甲胎蛋白和癌胚抗原的流程,除可移动的自制检测池床需要手动拉杆控制光路的开关和切换微型检测池外,其它步骤均由计算机自动控制。首先开动泵 P2 甲胎蛋白和癌

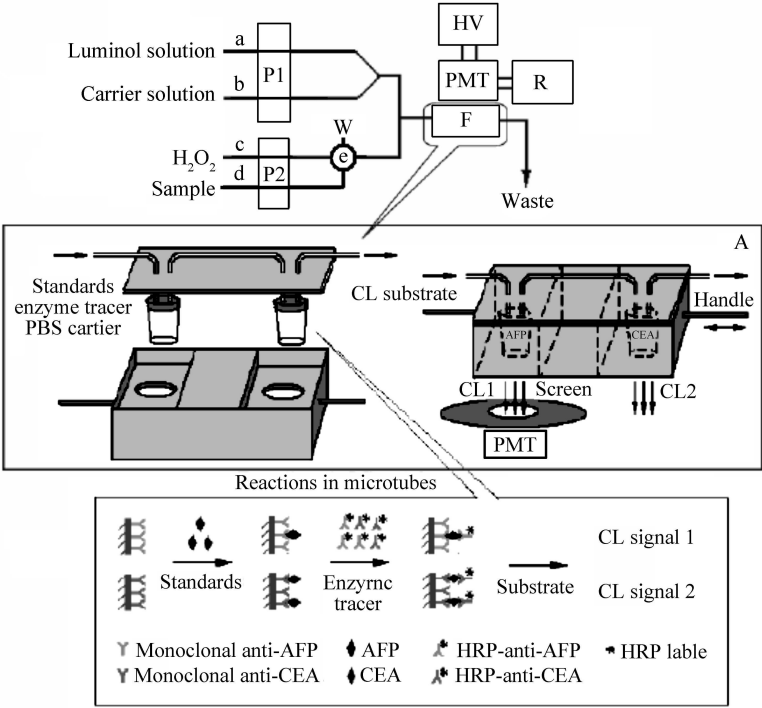


图 1 串联微型检测池流动注射化学发光免疫分析过程示意图

Fig 1 Schematic diagram of series-wound and subminiature measure cell flow-through chemiluminescent multi-analyte immunoassay procedure

e 换向阀(进样阀)(Sample valve); P 蠕动泵(Peristaltic pump); PMT 光电倍增管(Photomultiplier tube); R 记录仪(Recorder); HV 高压电源(High voltage); F 可移动的检测池组件(Mobile flow cell); A 放大的可移动检测池内部结构(Magnified flow cell).

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胚抗原混合样品 (AFP 和 CEA 抗体酶标混合溶液) 由管路 d 泵入且流经进样阀 e 完成采样 (进样阀的采样管截取样品流 500 μL), 接着进样阀 e 切换到载液管路 c 中载液 (0.1 mol/L PBS, pH 6.8) 将 500 μL 混合样品送入微型检测池并停留孵育 40 min 保持阀 e 阀位不变使载液管 c 中载液冲洗微型检测池 3 min 切换阀 e 阀位再由管路 d 泵入 HRP 标记的混合抗体, 同样经进样阀 e 采样 500 μL 后由管路 c 中的载液带入微型检测池并停留孵育 20 min。最终甲胎蛋白和癌胚抗原样品以及它们各自的酶标抗体分别固定到各自相应的微型检测池中完成夹心免疫反应。每个微型检测池体积约为 250 μL (扣除柱塞体积)。

由管路 c 中 0.1 mol/L PBS (pH 6.8) 冲洗微型检测池 3 min 后开动泵 1, 由管路 a 和 b 将鲁米诺溶液和 H_2O_2 溶液混合并注入微型检测池。通过拉动微型检测池床拉杆, 控制光路开关和将各检测池置于仪器检测窗口上方来检测各微型检测池中产生的酶促化学发光信号。

3 结果与讨论

3.1 最佳检测条件

酶联免疫化学发光分析条件的优化包括孵育时间、化学发光底物浓度和 pH 值等。本实验进行了单克隆抗体与其抗原之间免疫反应最佳时长的选择实验, 结果如图 2A 所示。由图 2A 可知, 化学发光信号强度随着孵育时间的延长而增加, 但在 40 min 后趋于稳定, 因此抗原孵育免疫反应时间定为 40 min。同样由图 2B 得出, 酶标抗体与抗原之间的最佳孵育免疫反应时间为 20 min。

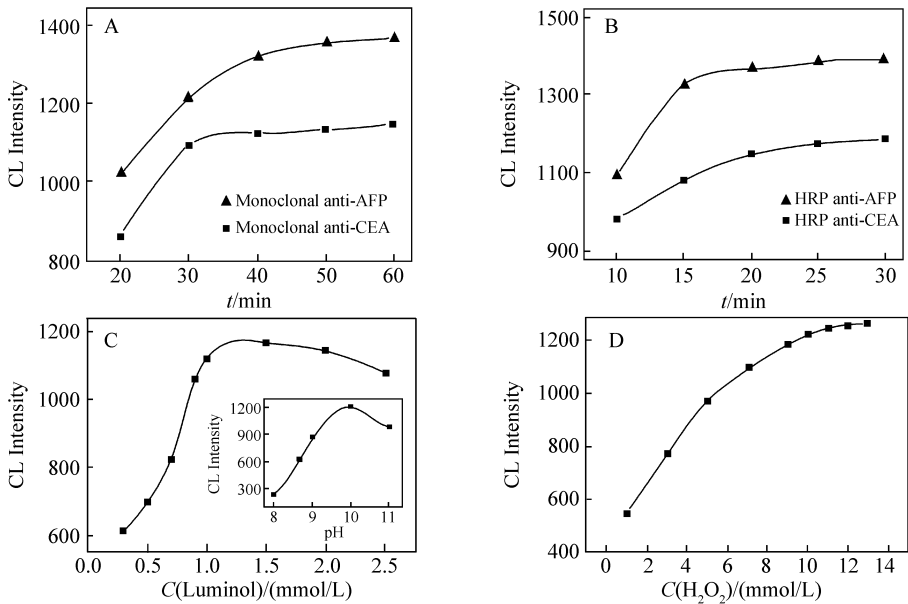


图 2 AFP 和 CEA 流动注射化学发光分析最佳条件优化实验

Fig 2 Effects on flow-through chemiluminescent immunoassay of AFP and CEA

a 第一步孵育时间 (Incubation time for the first step); b 第二步孵育时间 (Incubation time for the second step); c 鲁米诺浓度 (插图 pH 值) (Luminol concentration, Inset pH value); d H_2O_2 concentration, 其它实验条件 (Other conditions): a b 5 $\mu\text{g/L}$ AFP, 5 $\mu\text{g/L}$ CEA, 1.0 mmol/L luminol, 10 mmol/L H_2O_2 , at pH 10.0; c d 5 $\mu\text{g/L}$ AFP.

设计串联检测池需要满足的一个重要条件是两池间的反应互不干扰或者干扰较小, 由于采用了夹心免疫的固定模式, 酶标抗体是固定在两微型检测池中的, 本身不产生交叉干扰, 鲁米诺和 H_2O_2 的混合溶液流经前池接触酶标抗体发生酶促化学发光反应, 然而流出前池后酶促效果快速减弱, 这保证了串联设计的可行性。本实验考察了底物鲁米诺浓度及缓冲体系的 pH 值、 H_2O_2 浓度对化学发光免疫测定的影响, 实验结果如图 2C 和图 2D 所示, 鲁米诺和 H_2O_2 的浓度分别在 1.0 和 10 mmol/L 时发光强度达到最大值, 随着浓度的进一步增大, 化学发光信号不再明显变化, 因此本实验中鲁米诺和 H_2O_2 的最佳浓度分别选择为 1.0 和 10 mmol/L。图 2C 表明, 在 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲体系中, 当 pH = 10.0 时, 发光强度达到最大值。因此, 最佳的缓冲体系的 pH = 10.0。

3 2 甲胎蛋白和癌胚抗原的免疫分析

在最佳实验条件下, AFP 和 CEA 的免疫分析的工作曲线如图 3 所示。对 AFP 和 CEA 检测的线性范围分别为 1.25~ 50.0 μg/L 和 1.25~ 40.0 μg/L, 相关系数分别为 0.9982 和 0.9989, 检出限(3δ)分别为 1.06 和 1.00 μg/L。AFP 和 CEA 的 ELISA 免疫分析试剂盒的临床诊断指标分别为 25.0 和 5.0 μg/L, 所以本实验的免疫传感器系统提供的灵敏度足以满足实际应用。高含量的血清肿瘤样品可用 0.1 mol/L PBS (pH 6.8) 稀释后检测。

3 3 交叉反应评价

交叉反应是多重免疫分析中应加以考虑的重要因素。本实验中, 因 AFP 和 CEA 是在两个分离通道中分别检测的, 所以可避免来源于反应产物扩散效应^[20, 22]的交叉干扰, 在肿瘤标记物和它们相应的抗体之间潜在的交叉反应是唯一影响多重免疫反应可靠性的因素。为了研究 AFP 和 CEA 之间的交叉反应, 在 10 μg/L AFP 标准溶液中添加 CEA 并与 HRP-antiAFP 孵化反应的系列实验。结果表明, 化学发光信号仅增加 1.5%, 对测定 AFP 无实质性影响。因此, 两种肿瘤标记物在单次实验中同时得到检测, 交叉反应的影响可忽略不计(结果未列出)。

3 4 精密度和重现性

平行实验是用载流冲洗管路和检测池并更换检测池中的固定化抗体杯状微孔板(一次性使用)后, 用相同浓度的 AFP 和 CEA 重复进样测定, 发光强度在进行 9 次重复实验后没有发现明显变化。AFP 和 CEA 的标准偏差分别为 2.3% 和 3.2%, 显示了较好的分析精密性和重现性。

3 5 实际样品分析与对比

采集了 5 个实际人血清样品, 对其中的 AFP 和 CEA 采用本方法和传统的免疫放射法(RMA)分别进行分析检测, 结果列于表 1。表 1 数据表明, 两种方法的结果基本一致。

3 5 实际样品分析与对比

采集了 5 个实际人血清样品, 对其中的 AFP 和 CEA 采用本方法和传统的免疫放射法(RMA)分别进行分析检测, 结果列于表 1。表 1 数据表明, 两种方法的结果基本一致。

表 1 人血清样品中 AFP 和 CEA 的多重免疫分析与传统免疫分析结果对比

Table 1 Comparison of detection results with traditional ones of AFP and CEA in human serum samples by flow-through chemiluminescent multi-analyte immunoassay method

AFP			CEA		
本方法 This method (μg/L)	RMA 法 RMA method (μg/L)	相对误差 Relative deviation (%)	本方法 This method (μg/L)	IRMA 法 IRMA method (μg/L)	相对误差 Relative deviation (%)
21.05	22.99	- 8.4	7.44	7.88	- 5.6
139.50	154.60	- 9.8	9.05	9.86	- 8.2
5.62	6.00	- 6.3	8.82	9.56	- 7.7
5.35	5.60	- 4.5	7.76	8.29	- 6.4
10.62	10.02	6.0	7.32	6.74	8.6

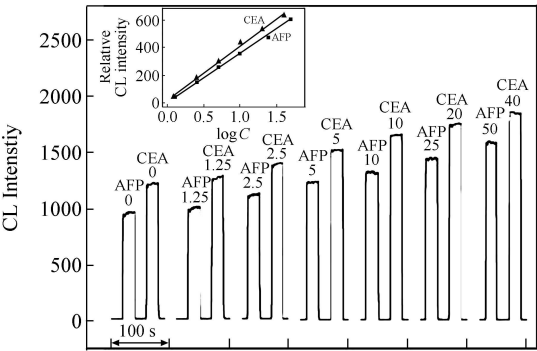


图 3 不同浓度条件下 AFP 和 CEA 同时检测的流动注射化学发光强度

Fig 3 CL intensity for simultaneous detection of AFP and CEA with different concentrations by flow-through chemiluminescent method

References

1 Maruvada P, Wang W, Wagner P D, Srivastava S. *Biotechniques*, **2005**, 38(1): S9~ S15

2 Faraggi D, Kramar A. *Urol Oncol*, **2000**, 5(5): 211~ 213

3 Wu J, Fu Z F, Ju H X. *Trends in Anal Chem.*, **2007**, 26(7): 679~ 688

4 Wang J. *Biosens Bioelectron.*, **2006**, 21(10): 1887~ 1892

5 Song S P, Li B, Hu J, Li M Q. *Anal Chim. Acta*, **2004**, 510(1): 147~ 152

6 Capek H, Ohlstrom M, Louhimo J, Sternan U H, Alifhan H, Haglund C. *Anticancer Res*, **2002**, 22(4): 2311~ 2316

7 Fu Z F, Yang Z J, Tang J H, Liu H, Yan F, Ju H X. *Anal Chem.*, **2007**, 79(19): 7376~ 7382

8 Fu Z F, Liu H, Yang Z J, Ju H X. *Current Trends in Biotech. Pharmacy*, **2007**, 1(1): 1~ 17

- 9 Liu G, Wang J, Kim J, Jan M R. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(23): 7126~ 7130
- 10 Kojima K, Hiatsuka A, Suzuki H, Yano K, Ikebukuro K, Kanube I. *Anal. Chem.*, **2003**, 75(5): 1116~ 1122
- 11 Wilson M S. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(5): 1496~ 1502
- 12 Wilson M S, New W Y. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(18): 6476~ 6483
- 13 Wu J, Yan Y T, Yan F, Ju H X. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(15): 6072~ 6077
- 14 Knecht B G, Strasser A, Dietrich R, Märtlbauer E, Niessner R, Weller M G. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(3): 646~ 654
- 15 Cho E J, Tao Z, Tehan E C, Bright F V. *Anal. Chem.*, **2002**, 74(24): 6177~ 6184
- 16 Liu Ru-Xia(刘瑞霞), Lü Ji-Ru(吕九如). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(2): 267~ 270
- 17 Fall B J, Eberlein-König B, Behrendt H, Niessner R, Ring J, Weller M G. *Anal. Chem.*, **2003**, 75(3): 556~ 562
- 18 SHI Gen(石根), TANG Bao-Jun(唐宝军), WANG Xu(王栩), ZHAO Li-Xia(赵利霞), LIN Jie-Ming(林金明). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(11): 1541~ 1547
- 19 LIU Jun-Tao(刘军涛), LIU Ru-Ping(刘儒平), WANG Mi-Xia(王蜜霞), LIU Chun-Xia(刘春秀), LUO Jin-Ping(罗金平), CAI Xin-Xia(蔡新霞). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(7): 985~ 988
- 20 Fu Z F, Yan F, Liu H, Yang Z J, Ju H X. *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 23(7): 1063~ 1069
- 21 Sun Z, Fu X, Zhang L, Yang X, Liu F, Hu G. *Anticancer Res.*, **2004**, 24(2): 1159~ 1165
- 22 HE Shu-Hua(何树华), HE De-Yong(何德勇), ZHANG Zhu-Jun(章竹君). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 34(11): 1622~ 1624

Chemiluminescence Immunoassay for Simultaneous Detection of α -Fetoprotein and Carcinoembryonic Antigen

LIN Jie-Hua, ZHANG Hui, MEI Zhen-Hua, HU Kong-Cheng*

(Key Laboratory of Electrochemical Engineering, Ministry of Education, College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042)

Abstract A novel flow-through chemiluminescent (CL) immunoassay was designed for the simultaneous detection of α -fetoprotein (AFP) and carcinoembryonic antigen (CEA). Two transparent microtubes immobilized with monoclonal antibodies were set in a mobile flow cell. Based on a sandwich immunoassay format, two mixtures of the sample antigens and corresponding horseradish peroxidase (HRP) labeled antibodies were introduced into the channels for on-line incubation. After the injection of luminol and H_2O_2 solution, different CL signals from the two transparent microtubes were sequentially detected by moving the mobile flow cell. The effects on the chemiluminescence detection, such as the immunological reaction time, the concentrations of luminol and H_2O_2 , and the pH value of the buffer solution, were carried out. Under the optimal experimental conditions, AFP and CEA could be detected in the linear ranges of 1.25–50 $\mu\text{g/L}$ and 1.25–400 $\mu\text{g/L}$ with detection limits of 1.06 and 1.0 $\mu\text{g/L}$, respectively. The actual samples of human serum were analyzed with satisfactory results.

Keywords Flow injection chemiluminescence; α -Fetoprotein; Carcinoembryonic antigen; Series micro-testing pool

(Received 24 October 2009; accepted 3 March 2010)