

光学蛋白芯片法定量检测血清 CA15-3 抗原方法学研究

向双¹, 牛宇², 孟永宏², 靳刚², 王元书¹, 赵子彦¹

1. 山东省医学科学院药物所 山东省罕见病重点实验室, 山东 济南 250062

2. 中国科学院力学研究所, 北京 100080

Detection of CA15-3 antigen in serum using optical protein chip based on imaging ellipsometry biosensor

XIANG Shuang¹, NIU Yu², MENG Yong-hong², JIN Gang², WANG Yuan-shu¹, ZHAO Zi-yan¹

1. Institute of Materia Medica, Shandong Academy of Medical Sciences, Key Laboratory for Rare Disease of Shandong Province, Jinan 250062, P. R. China

2. Institute of Mechanic, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, P. R. China

【摘要】 目的: 建立以椭圆偏光生物传感器为基础的光学蛋白芯片(OPG-IE)定量检测CA15-3抗原方法。方法: 探索OPG-IE生物分子芯片系统检测CA15-3抗原方法及建立了CA15-3抗原浓度-灰度检测标准曲线, 依据标准曲线定量检测了80份血清(对照组及癌症患者组)样本, 并将检测结果与电化学发光法(ECLIA)进行比较。结果: 所建立的OPG-IE检测CA15-3方法, 在46.33、23.16和11.58 IU/mL的组间变异系数($n=6$)分别为7.67%、10.57%和9.40%, 试验结果有良好的重复性。浓度-灰度标准曲线的 $R^2=0.97$, 检测最小值为5.30 IU/mL。对照组CA15-3抗原浓度为 (2.84 ± 0.73) IU/mL, 癌症患者组为 (52.45 ± 7.50) IU/mL, 两组浓度差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。ROC曲线和 t 检验分析80份血清OPG-IE和ECLIA检测结果, 显示差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。结论: 初步建立了OPG-IE CA15-3抗原检测方法, 并且成功的应用于血清检测。

中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(11): 821-824

【ABSTRACT】 **OBJECTIVE:** To investigate the feasibility of optical protein chip based on imaging ellipsometry biosensor (OPG-IE) applying to CA15-3 antigen assay. **METHODS:** The technological method for detecting CA15-3 antigen by OPG-IE and its concentration gray standard curve were established, then 80 serum samples from both normal and cancer patients were examined. The detection results of CA15-3 antigen were compared with detections by electrochemistry luminescence method (ECLIA). **RESULTS:** Our method for detecting CA15-3 antigen showed a good repeatability, the coefficient of variation values were 7.67%, 10.57% and 9.40% at 46.33, 23.16 and 11.58 IU/mL, respectively ($n=6$). Pearson correlation coefficient (R^2) of concentration gray scale standard curve was 0.97, and the lowest detectable limit of standard curve was 5.30 IU/mL. Concentrations of CA15-3 antigen were differed significantly in normal (2.84 ± 0.73) IU/mL and cancer patients (52.45 ± 7.50) IU/mL ($P < 0.05$). There was no significant difference between the detections by OPG-IE and ECLIA ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** A method for detecting CA15-3 antigen was established and it was tested in clinical serum examination.

Chin J Cancer Prev Treat, 2011, 18(11): 821-824

【关键词】 蛋白质阵列分析; 抗原, CA15-3/血液; 肿瘤标记, 生物学

【KEYWORDS】 protein array analysis; antigens, CA15-3/ blood; tumor markers, biological

【中图分类号】 R73-3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5269(2011)11-0821-04

【基金项目】 国家 863 项目(2008AA02Z419)

【第一作者简介】 向双, 女, 湖北仙桃人, 硕士, 主要从事新药临床药理、毒理研究和肿瘤标志检测工作。

Tel: 86-531-59990151 E-mail: xiangxiangf@sina.com

【通讯作者简介】 王元书, 男, 山东济南人, 研究员, 主要从事新药临床药理、毒理研究和肿瘤标志检测工作。

Tel: 86-531-82919960 E-mail: yangys189@163.com

CA15-3 抗原是常见的肿瘤标志之一,为一种多形态的高糖基化、高相对分子质量的跨膜糖蛋白^[1],表达量在部分乳腺癌患者中增加,并随着乳腺癌的恶化而增加^[2]。此外,CA15-3 抗原表达量在其他恶性肿瘤如肺癌、肝癌^[3]和胃癌^[4]等患者血清中也常增加。椭圆偏光生物传感器为基础的光学蛋白芯片(optical proteinchip based on imaging ellipsometry biosensor, OPG-IE)技术将椭圆偏光技术与蛋白芯片技术相结合,已经成功检测了乙肝五项抗原和 H5 亚型禽流感病毒等^[5-6]生物大分子,本研究尝试建立 OPG-IE 检测血清 CA15-3 抗原的方法,并用建立的方法进行 80 例临床样本检测及与 ECLIA 法检测结果进行比较。

1 材料与方法

1.1 标本来源

从山东省医学科学院附属医院(山东省肿瘤医院东院)2009-11-2010-04 采集的对照组(健康体检无癌症者)和不同癌症组 271 例血清样本中随机抽取 80 份。其中,对照组 18 名(非肿瘤患者,既往无肿瘤患病史,临床体检排除肿瘤患病):男 8 名,女 10 名。年龄 43~63 岁,平均年龄 51 岁,中位年龄 48.5 岁。癌症组 62 例(临床确诊肿瘤患者):男 33 例,女 29 例。年龄 38~81 岁,平均年龄 60.1 岁,中位年龄 60 岁。其中,乳腺癌 8 例均为女性患者,年龄 45~80 岁,平均年龄 54 岁,中位年龄 49 岁;消化道癌 31 例,男 21 例,女 10 例。年龄 38~81 岁,平均年龄 62.1 岁,中位年龄 63 岁;肺癌 23 例,男 12 例,女 11 例。年龄 40~80 岁,平均年龄 60.0 岁,中位年龄 60 岁。

1.2 材料和试剂

试验设备:中国科学院力学研究所研制的以椭圆偏光生物传感器为基础的光学蛋白质芯片系统,德国罗氏 Cobas E-411 全自动电化学发光免疫(ECLIA)分析仪。

试验材料:单晶硅片(洛阳单晶硅片厂);CA15-3 单克隆抗体(上海领潮生物科技有限公司);Sigma 公司生产的蛋白 A,封闭溶液(10×Blocking Buffer),PBS,吐温-20(Tween 20)等,德国罗氏 CA15-3 抗原电化学发光检测试剂盒。

1.3 试验方法

由山东省医学科学院附属医院检验科抽取上述研究对象清晨空腹静脉血,静置离心后抽取血清, ECLIA 法检测血清 CA15-3 抗原,同时留取血清置于 -70℃冰箱保存用于 OPG-IE 法检测。

OPG-IE 检测:OPG-IE 由蛋白质芯片和椭圆偏光显微成像系统 2 个部分构成^[7]。蛋白质芯片是通过硅片表面进行适当处理,使抗体蛋白稳定吸附在硅片表面,从而形成能特异捕捉对应抗原的分子膜层,当含有对应抗原的样本溶液经过固定着抗体的硅片表面时,

抗原与抗体特异识别结合,使得反应区域的分子膜层厚度增加,并且在一定范围内分子膜层厚度增加值与样本中抗原浓度呈正相关。椭圆偏光显微成像系统是一种超薄膜检测系统,它的工作原理是以偏振光波为探测光照射样本,样本对入射光波进行调制,使得反射光中载有样本信息,联合使用 CCD 摄像、计算机采样和图像处理技术,定量地显示单层生物大分子层及生物分子之间相互作用所引起的生物分子层厚度变化。基片表面膜层的厚度(或分子表面密度)用灰度值表示,膜层的厚度(或分子表面密度)愈大,灰度值愈高。

本试验首先研究制备 CA15-3 抗原检测芯片,试验过程如下:1)切割硅片并进行清洗、亲水化、氨基化和羧基化表面处理;2)在硅片表面依次固定蛋白 A、固定 CA15-3 抗体、封闭硅片表面裸露位点以减少非特异性蛋白的吸附。处理后的硅片表面覆盖着具有活性的 CA15-3 抗体,可以特异性捕捉待测样本中的 CA15-3 抗原。经过优化各种试验条件建立了 OPG-IE 检测 CA15-3 抗原的方法,在此基础上通过检测不同浓度的 CA15-3 抗原建立浓度-灰度标准曲线以用于检测血清样本。

在制备 CA15-3 抗原检测芯片上加入待测血清 10 μL,血清中的 CA15-3 抗原可与蛋白芯片表面的 CA15-3 抗体发生特异性结合,导致芯片表面膜层的厚度改变,通过椭圆偏光显微成像系统成像并测量记录芯片表面的灰度值达到检测目的。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 18.0 和 Stata/SE 11.0 for windows 统计学分析软件,应用 Wilcoxon 秩和检验分析 OPG-IE 测得的不同试验分组数据,比较对照组与癌症患者组 CA15-3 抗原浓度;应用 ROC 曲线分析和配对 *t* 检验,比较 OPG-IE 和 ECLIA 2 种方法所测数据。检验水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 光学蛋白芯片检测 CA15-3 抗原的成像效果与灰度值

CA15-3 抗原光学蛋白芯片在椭圆偏光显微成像系统中的成像效果及灰度值见图 1。图 1A 中的 8 个检测位点装配有 CA15-3 抗体的生物膜层区域,血清样本流经这些区域,样本中的 CA15-3 抗原与 CA15-3 抗体结合,使得膜层厚度增加,通过椭圆偏光显微成像系统可以直接观察并测量灰度值,表现为空白位点(1a/1b)的灰度值比添加阳性血清位点(3 份血清,每份 2 点,分别为 1c/1d、2a/2b 和 2c/2d)的灰度值低;图 1B 显示了 8 个检测位点的实测灰度值。

2.2 CA15-3 抗原浓度-灰度曲线

CA15-3 检测曲线见图 2。曲线上 CA15-3 抗原浓

度为 5.79、11.58、23.16、46.33 和 61.77 IU/mL。从图 2 可以看出, CA15-3 原来在~ 46 IU/mL 与灰度值呈现良好的响应特性。在~ 50 IU/mL 范围内, 拟合标准曲线方程为 $Y = 1.23X + 87.616$, 皮尔森相关系数 (R^2) 0.97。当血清样本中 CA15-3 抗原浓度 > 46 IU/mL 时, 需要用 PBS 缓冲液稀释血清样本。

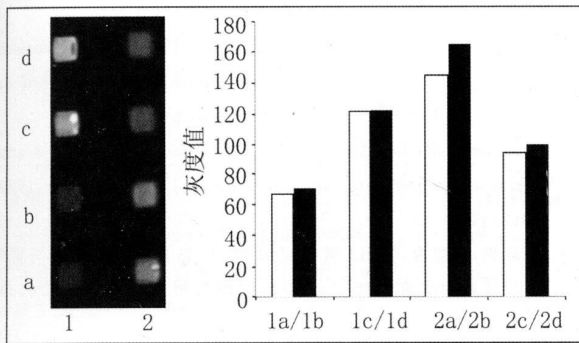


图 1 光学蛋白芯片检测 CA15-3 抗原成像及灰度值

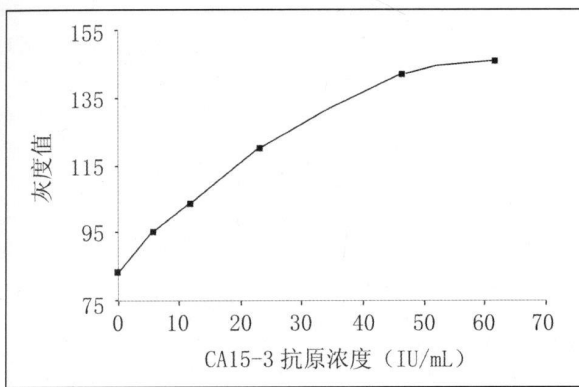


图 2 光学蛋白芯片检测 CA15-3 抗原浓度-灰度曲线

2.3 OPC IE 检测的灵敏度与精确度

采用 $LOD = 3N/S$ 公式计算最低检测限, 其中 N 为检测噪声, 其值为 11 次重复测量空白对照样本的标准差; S 为灵敏度, 其值为浓度-灰度标准曲线线性部分的斜率。计算结果为 OPC-IE 检测 CA15-3 抗原的最低检测限位 5.30 IU/mL。

为了评价 OPC-IE 检测的重复性, 用同一样本重复检测 6 次, 计算相对标准偏差, 结果在 46.33 和 11.58 IU/mL, 分别为 7.67% 和 9.40%, < 10%; 在 23.16 IU/mL 为 10.57%, 略高于 10%。表明该方法的重复性良好。

2.4 血清 CA15-3 抗原检测结果

对照组 CA15-3 抗原浓度平均值为 (2.84 ± 0.73) IU/mL, 癌症患者组 CA15-3 抗原浓度平均值为 (52.45 ± 7.50) IU/mL, 明显高于对照组, 两组浓度差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

2.5 OPC-IE 法与 ECLIA 法检测血清 CA15-3 抗原

结果比较

利用构建的 OPC-IE 检测 CA15-3 抗原方法对 80 份临床样本进行检测, 同时应用 ECLIA 法作对比检测。以 OPC-IE 法检测结果为 Y 轴, ECLIA 法检测结果为 X 轴, 作散点图(图 3)。个别样本 2 种方法的检测值有较大差异, 可能原因是 CA15-3 抗原浓度高于 50 IU/mL 的血清稀释引起的偏差(见图 3)。

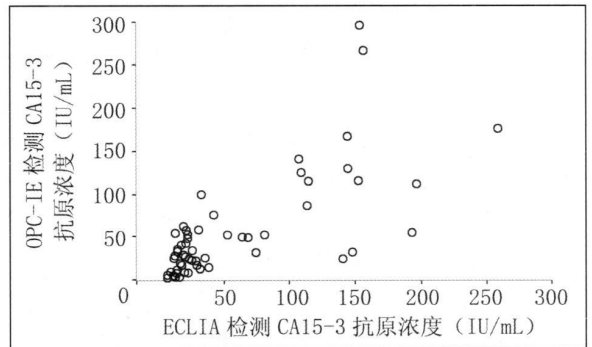


图 3 OPC-IE 与 ECLIA 检测 CA15-3 抗原浓度散点图

ROC 曲线方法广泛应用于医学诊断试验性能的评价。通过改变诊断节点, 获得多对灵敏度和特异度值, 以灵敏度为横坐标, 特异度为纵坐标, 绘制 ROC 曲线, 计算与比较 ROC 曲线下面积, 以此反映诊断试验的诊断价值和不同诊断方法的一致性。当灵敏度等于特异度时, 是 1 条从原点到右上角的对角线, 这条线叫机会线, 见图 4 的 Reference 线。ECLIA 方法检测的 CA15-3 抗原所得 ROC 曲线下面积为 0.984 ± 0.01 , OPC-IE 方法检测的 CA15-3 抗原所得 ROC 曲线下面积为 0.978 ± 0.01 , 2 种方法两者曲线下面积差异 $P = 0.72$, 大于检验水平 $\alpha = 0.05$, 差异无统计学意义。同时 2 种方法的检测结果用配对 t 检验比较 $P = 0.78$, 大于检验水平 $\alpha = 0.05$, 2 种方法检测的样本 CA15-3 抗原浓度差异无统计学意义, 故 2 种方法检测结果一致。

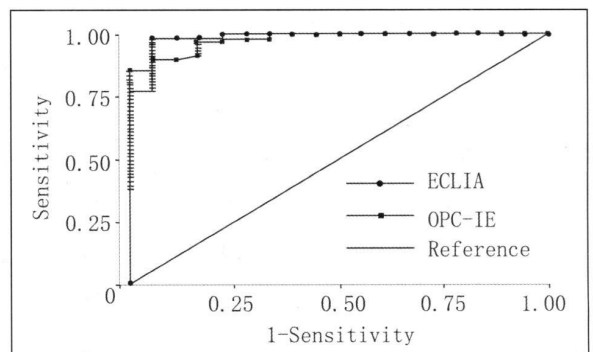


图 4 OPC-IE 与 ECLIA 检测 CA15-3 抗原浓度 ROC 曲线

3 讨论

血清肿瘤标志物作为一项癌症检测指标在临床得到广泛应用,在癌症诊断、治疗和预后评定中起着重要的作用,具有创伤小、成本低等优势。CA15-3 抗原是常见的肿瘤标志物之一,它是由 MUC1 基因编码的肿瘤相关糖蛋白,在乳腺癌、肺癌等患者血清中表达量增加^[8-10]。

传统的免疫学分析技术在 CA15-3 抗原检测中有广泛的应用,如放射免疫分析(RIA)^[3]、酶联免疫分析(ELISA)^[11]等,这些方法具有试验技术成熟的优势,检测限可以达到 5 IU/mL^[12],并且已经成功应用于临床,但是样品消耗大、需标记等缺点促使人们尝试和寻找更加便宜、方便和快捷的试验检测技术。本研究将椭圆偏光技术与蛋白芯片技术相结合,通过比较 CA15-3 抗原添加前后分子膜层的厚度变化来计算抗原的浓度,不需要标记和加二次抗体,简化了操作的流程;并且微量级量的检测样本量进一步减少创伤及降低检测成本。

OPC-IE 检测血清 CA15-3 抗原试验结果显示,不同血清的椭圆偏光系统成像结果灰度值较空白对照灰度值增加,且增加程度存在差异,表明建立的检测方法可分辨出不同 CA15-3 抗原浓度的血清样本。该方法可以直接检测 CA15-3 抗原浓度低于 46 IU/mL 的血清,高于这个浓度的血清稀释一定倍数后也可以检测;且同一样本多次检测结果的相对标准偏差低于或者略高于 10%,试验有良好的重复性,试验结果可靠。OPC-IE 检测结果中对照组与癌症患者组 CA15-3 抗原浓度,两者差异有统计学意义($P < 0.05$),与文献资料的结论相符合。80 份血清样本的 OPC-IE 检测结果与 ECLIA 方法检测结果用 ROC 曲线和配对 t 检验比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),2 种方法的检测结果具有一致性。从以 OPC-IE 和 ECLIA 2 种方法检测结果做的图中可以看出,由于对浓度血清因为进行稀释加入了一些检验误差,使得部分样本的 2 种检测结果出现了较大的差异,但是检测结果大致相似,说明所建立 OPC-IE 检测血清 CA15-3 抗原的方法初步成功,但是仍然需要改进。

综上所述,本研究初步建立了 OPC-IE 检测血清 CA15-3 抗原浓度的方法,可以大致满足临床检测的需求。但是与其他检测方法相比,仍略显粗糙和存在不足,例如 OPC-IE 检测 CA15-3 抗原检测限为 5.30 IU/mL,低于传统方法的 5 IU/mL 和 SRP 方法

的 0.025 IU/mL^[8]。该检测方法还需要不断地改进,随着该技术的发展和完善,相信在临床医学诊断、分子生物学、生物化学、细胞生物学及药理学等领域将会有广泛的应用。

【参考文献】

- [1] 崔志刚,张立新,宋波. MUC1 在泌尿系肿瘤的相关研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志,2006,13(9):712-715.
- [2] Gion M, Mione R, Nascimben O, et al. The tumour associated antigen CA15.3 in primary breast cancer. Evaluation of 667 cases[J]. Br J Cancer, 1991, 63(5): 809-813.
- [3] Colomer R, Ruibal A, Genoll J, et al. Circulating CA 15.3 antigen levels in non-mammary malignancies[J]. Br J Cancer, 1989, 59(2): 4.
- [4] 陈亚男,姜懿凌,罗阳. 胃癌组织 MUC 黏蛋白表达及其与胃癌分型关系的研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志,2008,15(13):1032-1035.
- [5] Qi C, Zhu W, Niu Y, et al. Detection of hepatitis B virus markers using a biosensor based on imaging ellipsometry[J]. Journal of viral hepatitis, 2009, 16(11): 822-832.
- [6] Qi C, Tian X S, Chen S, et al. Detection of avian influenza virus subtype H5 using a biosensor based on imaging ellipsometry[J]. Biosensors & bioelectronics, 2010, 25(6): 1530-1534.
- [7] Wang Z H, Meng Y H, Ying P Q, et al. A label-free protein microfluidic array for parallel immunoassays[J]. Electrophoresis, 2006, 27(20): 4078-4085.
- [8] Chang C C, Chiu N F, Lin D S, et al. High sensitivity detection of carbohydrate antigen 15-3 using a gold/zinc oxide thin film surface plasmon resonance based biosensor[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(4): 1207-1212.
- [9] Liu Y M, Zheng Y L, Cao J T, et al. Sensitive detection of tumor marker CA15.3 in human serum by capillary electrophoretic immunoassay with chemiluminescence detection[J]. Journal of Separation Science, 2008, 31(6-7): 1151-1155.
- [10] Zhu H, Dale P S, Caldwell C W, et al. Rapid and label-free detection of breast cancer biomarker CA15.3 in clinical human serum samples with optofluidic ring resonator sensors[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(24): 9858-9865.
- [11] 高寒,姜军,杨新华,等. 5种血清标志物的不同组合对提高乳腺癌诊断的意义[J]. 第三军医大学学报,2007,29(12):1255-1257.
- [12] Moham madnejad J, Rasaei M J, Saqhafi B, et al. A New Competitive enzyme linked immunosorbent assay (MRP83 CA15-3) for MUC1 measurement in breast cancer[J]. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 2006, 27(2): 139-149.

收稿日期:2010-11-02 修回日期:2011-01-25

(编辑:史本玲)