

CA242 高灵敏时间分辨荧光免疫分析及其初步应用

黄飏 盛世乐 朱岚 刘海燕 陆云 张珏 谢敏浩

【摘要】 目的 采用时间分辨荧光免疫分析技术 (TRFIA) 建立高灵敏的恶性肿瘤相关糖类抗原 (CA) 242 的快速全自动检测方法并进行初步应用。**方法** 以抗 CA242 单克隆抗体 601# 包被 96 孔微孔板, 以 Eu^{3+} - N^2 -[p-异氰酸苄基]-二乙烯三胺四乙酸标记抗 CA242 单克隆抗体 242#, 发光增强系统为以 β -二酮体为主的增强液。采用平衡饱和法建立 CA242 TRFIA, 采用 Auto DELFIA₁₂₃₅ 系统考核 CA242 TRFIA, 并进行健康人和胃癌患者血清样本的检测。**结果** 该方法的批内和批间 CV 分别为 2.92% 和 5.36%, 平均回收率为 98.75%, 灵敏度为 0.2 kU/L, 可测范围为 0.2 ~ 200 kU/L, 最高浓度点计数的 20%、50%、80% 对应的效应点值 (ED_{20} 、 ED_{50} 、 ED_{80}) 分别为 25.2 kU/L、53.3 kU/L 和 112.5 kU/L。CA50、CA19-9 对 CA242 分别有 15% 和 32% 的交叉反应, 癌胚抗原 (CEA)、甲胎蛋白 (AFP)、CA125 对 CA242 TRFIA 均无交叉反应。 Eu^{3+} 标记 242# 抗体于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存 6 个月免疫反应性基本无损, 同批试剂连续 6 个月应用分析结果稳定, 检测健康体检检查人员的血清, 样品的平均值为 (6.52 ± 5.15) kU/L, 建议阳性阈值为 17 kU/L, 临床结果与酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的结果相符, r 为 0.916。116 例胃癌患者血清 CA242 的阳性率为 26.7%。**结论** CA242 TRFIA 的灵敏度高、稳定性好, 可用于血清 CA242 含量的免疫测定。

【关键词】 荧光免疫测定; 抗原, 肿瘤相关, 碳水化合物; 消化系统肿瘤

A high sensitivity time resolved fluoroimmunoassay of CA242 and its preliminary clinical application
HUANG Biao*, SHENG Shi-le, ZHU Lan, et al. * Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China

【Abstract】 Objective CA242 is valuable in the screening, diagnosis and prognosis prediction in pancreatic and colorectal tumors. The aim of this study was to establish a two-site time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) of CA242 based on the sandwich technique and to study its clinical usefulness. **Methods** By the equilibrium method, the monoclonal antibodies (McAb) directed against a specific antigenic site on the CA242 was No. 601#, and the europium labelled McAb prepared from the europium chelate N -(p-isothiocyanatobenzyl)-diethylenetriamine- N , N , N -tetraacetic acid directed against a different antigenic site on the CA242 molecule was No. 242#. The luminescent enhancement system contained mainly 2-naphthoyl-trifluoroacetone. CA242 in sera from patients and healthy controls were determined by CA242-TRFIA by auto DELFIA₁₂₃₅ system. **Results** The intra- and inter-assay CV of the CA242-TRFIA were 2.92% and 5.36%, respectively, and the recovery rate was 98.75%. The sensitivity was 0.2 kU/L and the measurement range was 0.2 ~ 200 kU/L. The cross-reacting rates with CA50 and CA19-9 were 15% and 32%, respectively, while those with carcino-embryonic antigen (CEA), alpha fetoprotein (AFP) and CA125 were negligible. The europium labelled No. 242# was at least stable for six months at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Serum samples from healthy blood donors were analyzed, resulting in a mean value of (6.52 ± 5.15) kU/L, with an estimated reference limit ≤ 17 kU/L. The linear correlation of TRFIA and ELISA measurements resulted in a correlation coefficient of 0.916. The observed positive rate of CA242 in 116 gastric cancer cases was 26.7%. **Conclusion** The newly developed CA242-TRFIA technique was highly sensitive and stable in the immuno-determination of serum CA242.

【Key words】 Fluoroimmunoassay; Antigens, tumor-associated, carbohydrate;
Digestive system neoplasms

糖类抗原 (CA) 242 (CA242) 是一种唾液酸化的

黏蛋白型糖类抗原, 于 1985 年经 CA242 单克隆抗体 (简称单抗) 筛选而得。CA242 与 CA19-9、CA50 的抗原决定簇为同种黏蛋白表面的不同糖链结构, 其已应用于胰腺癌、胃癌和结直肠癌等消化道恶性肿瘤的诊断^[1-2]。由于 CA19-9、CA50 等在良性阻塞性黄疸及肝实质损害性疾病时易出现假阳性, 而血

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9780.2009.04.016

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK020133); 江苏省卫生厅科研项目 (H200856)

作者单位: 214063 无锡, 江苏省原子医学研究所 (黄飏、朱岚、刘海燕、张珏、谢敏浩); 上海交通大学医学院附属仁济医院核医学科 (盛世乐); 复旦大学附属华山医院核医学科 (陆云)

清 CA242 水平很少或仅轻微升高, CA242 假阳性率明显低于 CA19-9 及 CA50, 其特异性明显优于 CA19-9 及 CA50, 因此在消化道恶性肿瘤的诊断中, CA242 比 CA19-9、CA50 更有价值^[3]。新近研究表明, CA242 对肺腺癌也有较高的灵敏度和特异性。本研究利用时间分辨荧光免疫分析技术 (TRFIA) 的高灵敏度和较好的稳定性^[4], 建立了夹心法 CA242 TRFIA, 现报道如下。

材料与方法

1. 材料与试剂。抗 CA242 单抗 (克隆号分别为 242# 和 601#), CA242, CA19-9, CA50, 癌胚抗原 (CEA), 甲胎蛋白 (AFP) 参考标准由北京佳瑞公司提供。Eu³⁺ 标记试剂盒为美国 PE 公司产品。二乙三胺五乙酸 (DTPA) 为美国 Sigma 公司产品。PD-10 和 Sepharose CL-6B 为瑞典 Pharmacia 公司产品。增强液和洗涤液由本室自制。其他试剂均为国产分析纯。全自动 TRFIA 检测仪 (Auto DELFIA₁₂₃₅) 为美国 PE-Wallac 公司产品。CA242 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒为瑞典 CanAg 公司产品。

2. 样本来源。检测血清由江苏省江原医院提供, 胃癌患者均经胃镜和病理检查确诊, 健康人为健康体检者。空腹采集外周血 5 ml, 分离血清。

3. 固相抗体制备。将 601# 单抗用 50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃、pH 值 9.6 的缓冲液稀释成 10 mg/L 的包被液, 96 孔微孔板各孔加 200 μl, 4 °C 放置过夜。弃去包被液, 冲洗 3 次, 加 200 μl 含 3 g/L 牛血清白蛋白 (BSA) 的上述缓冲液封闭, 4 °C 放置过夜。弃去封闭液, 真空抽干, 板条密封后置 -20 °C 冷冻保存。

4. Eu³⁺-242# 单抗制备。参照 Eu³⁺ 标记试剂盒说明书操作。取 242# 单抗 0.4 ml, 经 PD-10 柱转换缓冲条件, 至 pH 值 9.0, 50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液 (含 0.155 mol/L NaCl)。取 500 μl 加入 0.1 mg 的 Eu³⁺-N²-[p-异氰酸苄基]-二乙三胺四乙酸 (Eu³⁺-DTTA) 中, 25 °C 下磁力搅拌反应 20 h。反应液用 Sepharose CL-6B 柱 (1 cm × 40 cm) 层析, 吸光度 (A)₂₈₀ 监测收集蛋白质峰, 用洗脱缓冲液稀释后分装。

5. 测定方法。采用平衡法建立 CA242 TRFIA, 反应缓冲液为 pH 值 7.8 的 50 mmol/L Tris-HCl, 含 8 mmol/L NaCl、质量分数 0.1% BSA、50 μmol/L DTPA、0.1 ml/L 吐温-80 和质量分数 0.1% NaN₃, 先在包被有 601# 单抗的 96 孔微孔板上, 每孔依次加入 50 μl CA242 参考标准或待测血清。取 150 μl V (反应缓冲液): V (Eu³⁺-242# 单抗) = 50:1 的溶液, 于 25 °C 对

其振荡保温 2 h 后, 洗涤 6 次, 再加增强液 200 μl, 25 °C 振荡反应 5 min, 荧光检测。全部过程均在 Auto DELFIA₁₂₃₅ 上自动完成, 软件由本所编制。

6. 临床验证。CA242 TRFIA 试剂盒与进口的 CA242 ELISA 试剂盒检测相同的样本, 并进行相关性分析。采用 CA242 TRFIA 试剂盒检测 210 名健康人血清, 确定参考值, 检测 116 例胃癌患者血清的 CA242 浓度, 并与 CA50、CEA 比较, 分析其临床意义。

7. 数据分析。CA242 TRFIA 标准曲线由 Auto DELFIA₁₂₃₅ 自带的双对数程序处理。

结 果

一、Eu³⁺-242# 单抗的理化和免疫学鉴定

Eu³⁺-242# 单抗经 Sepharose CL-6B 层析, 收集第 1 洗脱峰。以 PE 公司提供的 Eu³⁺ 标准为参考, 第 1 洗脱峰的 Eu³⁺ 含量为 31 μmol/L, 242# 单抗蛋白含量为 3.2 μmol/L, 即平均每个 242# 单抗上连接了 9.7 个 Eu³⁺。

二、CA242 TRFIA 的考核

经双对数函数处理程序处理所得的 CA242 TRFIA 标准曲线见图 1。

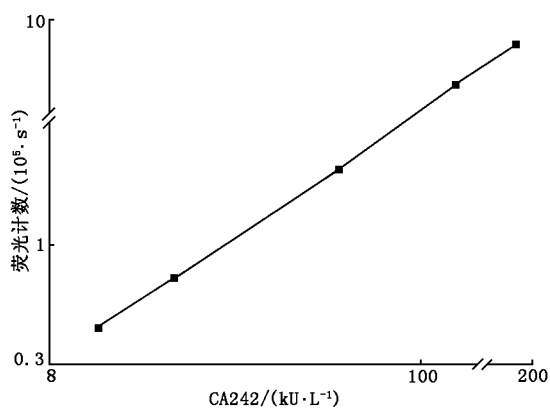


图 1 CA242 TRFIA 标准曲线

1. 方法的特异性。将 CEA、AFP、CA50、CA125 和 CA19-9 分别配成 10 ~ 500, 10 ~ 1000, 10 ~ 150, 10 ~ 500 和 10 ~ 140 kU/L 一系列不同水平, 代替标准曲线中的 CA242 参考标准。在上述值范围内, CA50、CA19-9 对 CA242 分别有 15% 和 32% 交叉反应, CEA、AFP、CA125 对 CA242 TRFIA 均无交叉反应。

2. 精密度、回收率和健全性。按操作步骤操作, 10 孔平行测定不同浓度的质量控制样品, 计算测定结果的 $\bar{x}$ 与 s ; 在 1 份健康人血清中分别添加不同浓度的参考标准品, 双孔平行测定添加样品, 测定结果表明本方法的批内和批间 CV 分别为 2.92% 和

5. 36%, 在可测范围内其平均回收率为 98.75%。

把 V (高含量的 CA242 血清样品): V (缓冲液) = 1: (2 ~ 32) 的溶液用本方法测定, 换算后的 CA242 含量非常接近; 用该系列稀释血清代替 CA242 参考标准作标准曲线, 其斜率与 CA242 的标准曲线斜率基本一致, 表明 CA242 TRFIA 有良好的健全性。

3. 灵敏度和稳定性。以零剂量点发光值 $\bar{x} + 2s$ 后的发光值在标准曲线上得到的相应值为 0.2 kU/L。8 条不同时间进行的 CA242 TRFIA 最高浓度点计数的 20%、50%、80% 对应的效应点值 (ED_{20} 、 ED_{50} 和 ED_{80}) 分别为 25.2、53.3 和 112.5 kU/L。

三、临床应用

1. 与 CA242 ELISA 试剂盒对照。采用 CA242 TRFIA 检测 210 名健康体检检查人员的血清, 样品的平均值为 (6.52 ± 5.15) kU/L, 建议阳性阈值为 17 kU/L, CA242 TRFIA 和瑞典 CanAg 公司的 CA242 ELISA 试剂盒对 32 例血清样品进行检测, 两者结果基本相符, r 为 0.916, 其中 ELISA 试剂盒检出的阳性血清样品采用 CA242 TRFIA 检测均为阳性。

2. 胃癌患者检测结果。检测 116 例胃癌患者血清中的 CA242、CA50、CEA, 其含量 ($\bar{x} \pm s$) 分别为 (24.78 ± 50.38) kU/L, (17.41 ± 39.17) kU/L 和 (8.28 ± 20.56) $\mu\text{g/L}$, 阳性例数 (阳性率) 分别为 31 例 (26.7%)、16 例 (13.8%) 和 15 例 (12.9%)。

讨 论

恶性肿瘤细胞膜上某些糖抗原的表达与肿瘤的发生和发展密切相关。CA242 是近年来应用于临床较新的一种消化道肿瘤相关抗原, 胰腺癌、直肠癌和胃癌患者 CA242 水平会异常, 其应用正逐步得到临床的关注^[5-6]。本研究在胃癌患者中的应用表明, 其检出率明显好于 CEA 和 CA50, CA242 的应用对于提高胃癌等疾病的早期诊断率、判断疗效和预后都具有重要意义。

目前血清 CA242 的检测方法主要有 ELISA 法、免疫放射分析法 (IRMA) 等, 前者的灵敏度不高, 检测范围有限; 后者受放射性核素半衰期的影响, 有效期短, 临床上只能手工操作, 工作量大且易产生人为误差, 此外还有一定的放射性污染。TRFIA 采用离子标记, 标记位点多, 可极大地提高方法学的灵敏度, 而且对生物活性影响小。TRFIA 测定的基础是抗原抗体反应, 测定时加入增强液, 荧光增强上百万倍, 测定其荧光强度, 即可确定抗原的量。因此, CA242 TRFIA 排除了非特异荧光干扰, 具有测量灵

敏度高、操作简便、示踪物稳定、定量分析量程宽、无放射性污染和应用范围广等优点^[7-8]。如 CA242 的进口 ELISA 试剂盒的灵敏度为 1 kU/L, 检测范围在 150 kU/L 以内。而笔者研制的 CA242 ELISA 试剂盒灵敏度提高 5 倍, 检测范围可以扩大 30% 以上。其中 Eu^{3+} -242# 单抗经标准曲线比较鉴定, 免疫反应性基本无损失; 试剂盒于 -30°C 保存 6 个月后免疫反应参数基本未改变。批内及批间重复性研究结果表明本方法是可靠的。由于 CA242 与 CA50、CA19-9 都是糖蛋白上肿瘤相关四糖, 包括 S-Lea、S-Lex、S-Lac4 等乳四糖的衍生物, 所以其有一定的交叉反应。

笔者采用该 CA242 TRFIA 试剂盒对健康人、胃癌患者的 CA242 水平进行了测定, 研究了 CA242 对恶性肿瘤诊断的价值。其中 CA242 在胃癌组表达水平较健康对照组明显升高, 阳性率较 CEA、CA50 高 1 倍, 是一种较好的胃癌血清学指标。

CA242 TRFIA 和瑞典 CanAg 的 CA242 ELISA 试剂盒对照检测, r 为 0.916, 两者结果相符。但 ELISA 技术应用的普遍问题是稳定性难以满足临床工作的需要, 每次分析时, 即使单样品检测也必须制标准曲线作为相对测量的依据。笔者建立的 CA242 TRFIA 同批试剂连续 6 个月应用分析, 发现标准曲线基本重合, 无明显漂移, 可以用同批试剂单次标准曲线作为今后分析的固定参考。这既可减轻临床应用时的工作强度, 又可提高试剂盒的经济价值。

CA242 TRFIA 的分析时间仅为 2 h, 且分析系统高度自动化, 这可提高获得临床检验结果的速度, 又可大幅度降低人为误差和提高检出结果的可靠性。

参 考 文 献

- [1] Von Kleist S, Hesse Y, Kananeeh H. Comparative evaluation of four tumor markers, CA242, CA19-9, TPA, and CEA in carcinomas of the colon. *Anticancer Res*, 1996, 16: 2325-2331.
- [2] 张晨鹏, 盛世乐, 黄钢. 肿瘤标记物 CA-242 的临床应用进展. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2006, 26: 1069-1072.
- [3] 陈智周, 范振符, 朱争艳, 等. 糖类抗原 CA242 的免疫放射分析. *中华核医学杂志*, 1991, 4: 241-243.
- [4] 黄飏, 肖华龙, 张祥瑞, 等. 胃蛋白酶原 I 时间分辨荧光免疫分析法的建立. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 24: 492-495.
- [5] 余剑英, 李菁. 血清 CA242、CA125、CA19-9 含量对消化系统肿瘤的诊断价值. *实用预防医学*, 2005, 12: 787-788.
- [6] 赵明, 季晓鹏, 高世生, 等. 血清 CA242 测定对几种恶性肿瘤的诊断评价. *放射免疫学杂志*, 2004, 17: 108-109.
- [7] 万文徽. 肿瘤标志物临床应用与研究. 2 版. 北京: 北京大学医学出版社, 2007: 353-356.
- [8] 胡志刚, 刘洁, 陈国千, 等. HBV 前 S1 抗原时间分辨荧光免疫分析方法的建立. *中华核医学杂志*, 2006, 26: 251-252.

(收稿日期: 2008-12-12)