

## 论著·基础研究

## 磁性微球时间分辨免疫技术定量检测糖类抗原 199 的研究

朱利国<sup>1</sup>, 范俊<sup>2</sup>, 黄飏<sup>2</sup>, 浦洪波<sup>1</sup>, 潘凌峰<sup>1</sup>, 孙倩<sup>1</sup>

(1. 江苏省原子医学研究所附属江原医院检验科, 江苏无锡 214063;

2. 江苏省原子医学研究所, 江苏无锡 214063)

**摘要:**目的 建立检测糖类抗原(CA)199 的磁珠时间分辨荧光免疫分析法(Nano-TRFIA)。方法 采用磁珠耦联标记抗 CA199 单克隆抗体(B1), Eu<sup>3+</sup> 标记抗 CA199 单克隆抗体(Eu<sup>3+</sup>-CA199-B7), 采用双抗体夹心法建立基于磁性微球法的 CA199 检测方法 Nano-TRFIA, 并对 90 份血清标本进行该方法血清学检测。结果 Nano-TRFIA 检测 CA199 的灵敏度为 0.2 U/mL, 甲胎蛋白、CA125 对 CA199-TRFIA 均无交叉反应。磁珠耦联 B1 4℃ 保存 3 个月免疫反应基本无损; 同批试剂连续 3 个月应用分析结果稳定, 样品的平均添加回收率为 97.91%, 批内和批间变异系数(CV)分别为 4.84% 和 8.32%。Nano-TRFIA 检测血清 CA199 结果与电化学发光法(ECLIA)检测结果显著相关( $Y=0.9698X+4.0153$ )。以 ECLIA 为金标准, Nano-TRFIA 检测血清 CA199 时 2 份标本出现了假阳性。结论 Nano-TRFIA 的灵敏度、特异度、准确度等均符合临床应用要求, 为进一步临床验证奠定了基础。

**关键词:**磁性微球; 糖类抗原 199; 时间分辨荧光

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.04.002

中图法分类号:R-331

文章编号:1673-4130(2018)04-0389-04

文献标识码:A

## Quantitation of CA199 based on Magnetic Microspheres time resolved fluoroinnnunoassay technology

ZHU Ligu<sup>1</sup>, FAN Jun<sup>2</sup>, HUANG Biao<sup>2</sup>, PU Hongbo<sup>1</sup>, PAN Lingfeng<sup>1</sup>, SUN Qian<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Jiangyuan Hospital of Jiangsu

Institute of Nuclear Medicine, Wuxi, Jiangsu 214063, China;

2. Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi, Jiangsu 214063, China)

**Abstract:** Objective To establish the time-resolved fluoroimmunoassay(TRFIA) of CA199 based on Magnetic Microspheres(Nano-TRFIA). **Methods** Based on a sandwich-type immunoassay format, analytes in samples were captured by magnetic particles coated with anti-CA199 antibody B1 and "sandwiched" by anti-CA199 antibody B7 labeled with europium chelates. A total of 90 serum samples were analysed by this new method. **Results** The sensitivity was 0.2 U/mL, the intra. and inter. assay CV of the Nano-TRFIA were 4.84% and 8.32% respectively, and the average recovery rate was 97.91%. The cross-reacting rates with alpha fetoprotein and CA125 were negligible. The labeled B1 with Magnetic Microspheres was at least stable for three months at 4℃. Serum samples from patients and healthy blood donors were analyzed, the linear correlation of TRFIA and ECLIA measurements was positive( $Y=0.9698X+4.0153$ ). As the gold standard of ECLIA, Nano-TRFIA had two false positive. **Conclusion** The newly developed Nano-TRFIA based on Magnetic Microspheres technique was highly sensitive, stable and specific in the immuno-determination of serum CA199. The results showed that the methods of Nano-TRFIA based on Magnetic Microspheres could be used for the clinic.

**Key words:** Magnetic Microspheres; carbohydrate antigen199; time-resolved fluoroinnnunoassay

糖类抗原(CA)199 是乳酰-N-岩藻五糖 II 的唾液酸衍生物, 是由 5 个糖单位组成的糖脂。通过病理学检查已证实 CA199 广泛存在于胎儿结肠、小肠、胃、胰和肝的细胞中。成人胃肠道器官和肺组织中可检测出微量的 CA199, 而成人唾液、精液、胃液、羊水、尿液、卵巢囊肿液, 胰腺、胆囊、十二指肠的分泌物, 以及

其他含黏蛋白的体液中 CA199 的水平都很高, 故常以血清或血浆为检测标本<sup>[1]</sup>。CA199 主要的检测方法包括免疫放射法(IRA)、酶联免疫吸附法(ELISA)、电化学发光法(ECLIA)和时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)。而本研究将磁性微球(纳米磁珠)作为固相载体<sup>[2-3]</sup>建立了检测 CA199 的磁珠时间分辨荧光免

作者简介:朱利国,男,副主任技师,主要从事临床免疫分析研究。

本文引用格式:朱利国,范俊,黄飏,等. 磁性微球时间分辨免疫技术定量检测糖类抗原 199 的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(4): 389-

疫分析法(Nano-TRFIA),现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 90 份血清样品均来自江苏省原子医学研究所附属江原医院就诊者,年龄 24~83 岁,其中 30 份样品经 ECLIA 检测 CA199( $\geq 37$  U/mL)为阳性,其余 60 份标本均为阴性标本( $< 37$  U/mL)。

1.2 仪器与试剂 NHS 耦联磁珠、缓冲液和封闭液为英芮诚 Prot Elut 公司产品,2 株抗体(抗 CA199 单克隆抗体 B1 和  $\text{Eu}^{3+}$ -CA199-B7)及 CA199 参考标准、增强液和洗涤液由江苏省无锡市江原实业技贸总公司提供,CA199 质控品由罗氏公司提供。牛血清蛋白(BSA)为 Sigma 产品。96 孔微孔板系 Nunc 产品,去离子超纯水由本室自制,其他试剂均为国产分析纯。DR6606 型时间分辨荧光免疫分析仪为广州达瑞公司产品。CA125、甲胎蛋白(AFP)标准液为达安基因公司产品。

1.3 方法

1.3.1 免疫磁珠的制备 严格按英芮诚 Prot Elut 公司提供的操作步骤完成耦联 CA199-B1 抗体磁珠的制备,完成后将该磁珠置于 1 mL 的保存试剂中(含 0.05%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液),放置 4℃备用。

1.3.2 测定方法 96 孔微孔板中先加入 5  $\mu\text{L}$  被磁珠耦联的抗 CA199-B1 单抗,再依次加入 50  $\mu\text{L}$  CA199 参考标准和待测血清,再加入 150  $\mu\text{L}$  以 50 mmol/L (pH7.8) 的 Tris-HCl 反应缓冲液(含 8 mmol/L NaCl、0.1%BSA、0.2%牛 IgG、0.1 mL/L 的吐温-80 和 0.1%NaN<sub>3</sub>)1:30 稀释的  $\text{Eu}^{3+}$ -抗 CA199-B7,25℃振荡孵育 10 min 后,磁性分离,保留磁珠;用含 14.5 mmol/L NaCl、0.2 mL/L 吐温-80 和 0.2% NaN<sub>3</sub> 上述缓冲液洗涤液重复上述步骤洗涤 5 次,再加增强液 200  $\mu\text{L}$ ,25℃振荡反应 3 min,荧光检测。检测过程和拟合结果在 DR6606 型时间分辨荧光免疫分析仪上完成。

1.4 统计学处理 用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析。

2 结果

2.1 磁珠耦联的抗 CA199-B1 单抗的理化鉴定 分别检测耦联反应前与反应后的溶液中鼠 IgG 抗体的量,加入纳米磁珠前检测值为 28  $\mu\text{g}$ ,反应结束分离去除纳米磁珠后上清液中检测值为 4.8  $\mu\text{g}$ 。标记率为  $23.2/28.0=82.86\%$ 。

2.2 实验条件的选择

2.2.1 耦联 CA199-B1 抗体磁珠加样量的选择 在反应微孔中分别加入 50  $\mu\text{L}$  的参考标准后,分别加入 2、5、10、15、20  $\mu\text{L}$  耦联 CA199-B1 抗体的磁珠微球,按反应条件检测,考察并验证不同的免疫磁珠上样量对检测结果的影响,结果见图 1。由图 1 可知,随抗体标记浓度的增加,各浓度点的结合率呈现先增后降的趋势,耦联 CA199-B1 抗体磁珠量为 5  $\mu\text{L}$  时就有最大

值。因此,本着简便经济的原则选择耦联 CA199-B1 抗体磁珠量为 5  $\mu\text{L}$  的免疫磁珠进行后续实验。

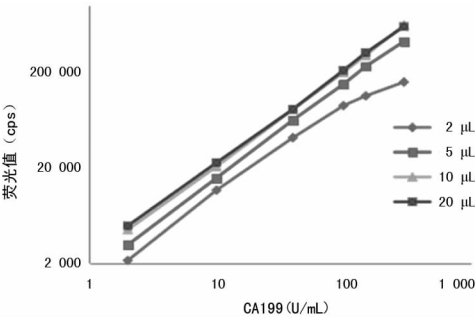


图 1 抗体标记量对检测结果的影响

2.2.2 上样量的选择 在保持其他条件不变情况下,比较不同上样量对测量结果的影响。在反应微孔中分别加入 10、20、50、100  $\mu\text{L}$  的 CA199 参考标准液进行检测,结果见图 2。由图 2 可知,随着上样量的增加,各浓度点的结合率均增大。当上样量为 50  $\mu\text{L}$  时,继续增加上样量,结合率增加不明显,可认为反应微孔中的双抗体夹心吸附基本达到饱和,因此后续选择 50  $\mu\text{L}$  上样量进行实验。

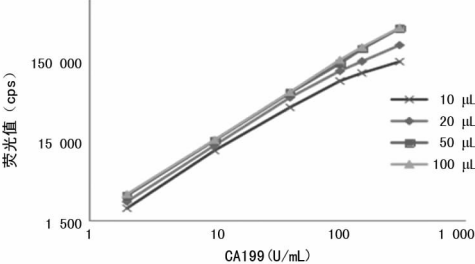


图 2 上样量对检测结果的影响

2.2.3 检测时间的选择 在反应微孔中加入 5  $\mu\text{L}$  的标记纳米磁珠,再加入 50  $\mu\text{L}$  的参考标准,按反应条件分别在 5、10、15、20、25、30 min 时检测,考察检测时间对结果的影响,结果见图 3。由图 3 可知,随检测时间的延长,各浓度点的结合率基本呈现增加的趋势。而随着检测时间增加,各浓度点的结合率不再发生较大的变化,趋于平稳,反应微孔中的双抗体夹心吸附在反应 10 min 时基本达到饱和,因此,按照快速简便的原则,选择检测时间为 10 min。

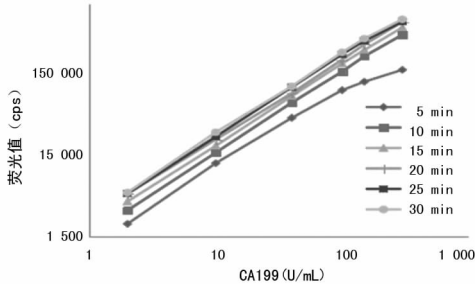


图 3 检测时间对检测结果的影响

2.3 标准曲线数据 按照自编程软件,用双对数函数处理所得标准曲线,以检测样品荧光值为纵坐标,CA199 标准品水平为横坐标,建立方程并拟合成标准

曲线见图 4。

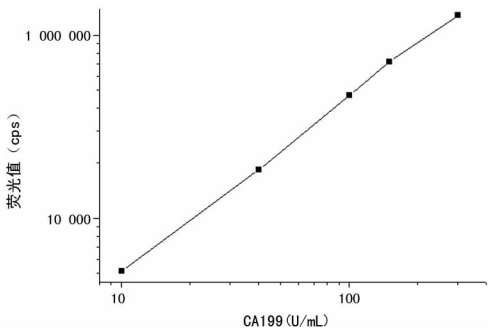


图 4 磁性微球时间分辨荧光免疫分析技术检测 CA199 的标准曲线

2.4 纳米磁珠时间分辨免疫技术定量检测 CA199 的方法学评价

2.4.1 灵敏度与稳定性 以零浓度点计数(cps)均值( $\bar{x}$ )加 2s 后的计数率在标准曲线上所得到的相应值为检测的灵敏度,可知本方法的灵敏度为 0.2 U/mL。4℃保存的抗 CA199-B1、Eu<sup>3+</sup>-CA199-B7 冻干粉剂在 3、6 个月后分别测定,最高浓度点的结合率平均仅下降 9%和 6%,说明试剂盒稳定性较好,可较长时间保存应用。

2.4.2 精密度和回收率 采用 Nano-TRFIA 测定罗氏质控血清中 CA199 低、高 2 种浓度的 10 次批内和批间变异系数(CV)分别为 4.34%~5.33%和 4.99%~11.64%,见表 1,平均 CV 分别为 4.84%和 8.32%,符合批内 CV<10%和批间 CV<15%的要求。低、高 2 组质控品浓度分别为 20.6、100.0 U/mL,样品浓度为 25.8 U/mL,添加样品后实测样品浓度分别为 43.46、128.51 U/mL,回收率分别为 93.66%、102.15%,添加样品后的平均回收率为 97.91%。

表 1 纳米磁珠时间分辨免疫技术定量检测 CA199 的精密度的试验

浓度	批内		批间	
	批内均值 ( $\bar{x}\pm s$ , U/mL)	CV(%)	批内均值 ( $\bar{x}\pm s$ , U/mL)	CV(%)
低	20.83±2.22	5.33	22.04±5.13	11.64
高	101.42±8.81	4.34	105.54±10.54	4.99

2.4.3 特异度 采用 Nano-TRFIA 测量 500 U/mL 水平的 AFP 时,测定值为 1.5 U/mL,测量浓度为 250 U/mL 的 CA125 时测定值为 1.2 U/mL,说明该试剂盒与 AFP 及 CA125 之间无交叉反应,抗体特异度比较好。

2.4.4 临床血清标本分析 采用 Nano-TRFIA 检测 90 例本院就诊者的血清标本,并作比较,见图 5。Nano-TRFIA 和 ECLIA 两者结果基本相符,两者高度相关,其中 ECLIA 检出的阳性血清样品采用 Nano-TRFIA 检测均为阳性。以 ECLIA 为金标准,其中有 2 份标本出现假阳性。从图 5 可以看出, $Y=0.9698X+$

$4.0153$ ,  $r^2=0.9887$ 。Nano-TRFIA 与 ECLIA 法测定血清中 CA199 结果高度相关。

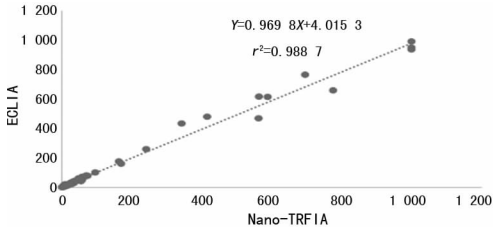


图 5 ECLIA 与 Nano-TRFIA 测定 CA199 的相关试验 (n=90)

3 讨论

CA19-9 是一种低聚糖类相关抗原,由腺癌细胞产生,经胸导管引流到血液中,引起外周血中 CA19-9 水平的升高,该指标异常与消化系统疾病相关,尤其在胃癌、结直肠癌、胰腺癌等疾病的良恶性鉴别中有较大意义<sup>[4-7]</sup>。

目前 CA199 的全定量检测方法主要有 IRA、ELISA、ECLIA、TRFIA 等,随着方法学的发展和对指标精确定量等要求的提高,其中一些方法的缺点也日益突显,如 ELISA 灵敏度不高,IRA 有放射性污染,TRIFA 自动化程度不高、反应时间长等。本文所建方法与其他检测方法相比较具有独特优势,首先 NHS 磁珠是以超顺磁性四氧化三铁(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)为核<sup>[8-9]</sup>,磁珠直径小,可以均匀地分散于液相中,反应体系可以暴露更多的结合位点,明显减小抗原-抗体反应的空间位阻,利于抗体与血清标本中特异度结合效率提高<sup>[10-11]</sup>,且可提高检测的特异度及灵敏度,NHS 磁珠具有超顺磁性,可通过施加外部磁场进行快速移动和分离,无需离心即可将免疫反应形成的免疫复合物与未结合的其他物质分开,经过洗涤液的充分洗涤,可以有效降低检测过程中的干扰,提高检测灵敏度和降低检测信噪比;免疫磁珠均匀分散于溶液中,与 CA199 抗体接触机会更大,从而加快免疫磁珠与 CA199 抗体的结合速率<sup>[12-13]</sup>,反应时间只需要 10 min,大大提高了临床检测速度。本研究将纳米磁性微球引入到 TRFIA 技术中,构建 Nano-TRFIA 方法。这个改变解决了 TRFIA 自动化检测的技术瓶颈,既突出了 TRFIA 高灵敏、宽范围的特性,又可缩短反应时间。Nano-TRFIA 法灵敏度高,与 ECLIA 结果高度相关( $r^2=0.9887$ );平均 CV 分别为 4.84%和 8.32%,完全符合临床使用需求。本研究中测量结果与现有方法比较存在一定的差异,初步分析为如下两个原因:(1)目前 CA199 检测均基于免疫检测技术,但不同公司所用的标记方法不同,所使用的试剂来源也不一样,导致系统之间存在差异;(2)2 例差异标本的测定值在正常参考值范围的上限附近,这种称为灰区的测值有可能影响结果判断的准确性,需要进一步作临床追踪检测才可能进行(下转第 395 页)

MTBDRplus 检测速度快,可同时进行 MTB 鉴定和 RIF、INH 耐药鉴定,可以为临床提供更为快速、有效的诊断依据,对传统比例法药敏试验进行了一定的补充。

## 参考文献

- [1] WU X, YANG Y, HAN Y, et al. Effect of recombinant Rv1009 protein on promoting the growth of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Applied Microbiol, 2008, 105(4): 1121-1127
- [2] 张立兴,屠德华,端木宏谨,等. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京:中国教育文化出版社,2006.
- [3] 菅记涌,王嫩寒,易俊莉,等. Genotype MTBDRplus 方法快速检测北京地区临床结核分枝杆菌分离株利福平和异烟肼耐药性效果评价[J]. 中国防痨杂志,2010,61(10): 189-192.
- [4] 蒋云宇,张德坤,缪昌东. HAIN 技术快速检测耐药结核病及耐多药结核病效果评价[J]. 江苏预防医学,2017,28(1):103-104.
- [5] 欧维正,厉宁,蒙俊,等. Hain 和基因芯片技术在结核分枝杆菌异烟肼耐药性检测中的应用评价[J]. 中国病原生物学杂志,2016,11(12):1062-1065.
- [6] 陈琛. Hain Test 法用于脊柱结核诊断的实验研究[D]. 太原:山西医科大学,2016.
- [7] 梁佳元,杨立军,刘敏,等. Hain 和 Xpert MTB/RIF 技术对结核分枝杆菌药物灵敏度的检测[J]. 中国热带医学,

2017,17(3):263-265.

- [8] 刘亚芹,杨振斌,冯冬霞. HAIN 用于检测原发性耐药结核的研究[J]. 中国实验诊断学,2014,18(8):1266-1269.
- [9] FREDDIE B,SVEN H,MELLES H,et al. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis:a meta-analysis[J]. BMC Infect Dis,2009,9:67-82.
- [10] PHAM M,LEMBERG D A,DAY A S. Probiotics: sorting the evidence from the Myths[J]. Med J Aust,2008, 188(5):304.
- [11] DOUSTDAR F,KHOSRAVI A D,FARNIA P,et al. Molecular analysis of isoniazid resistance in different genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from iran [J]. Microb Drug Resist,2008,14(4):273-279.
- [12] JIAO W W,MOKROUSOV I,SUN G Z,et al. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China [J]. Chin Med J,2007,120(9):814-819.
- [13] 叶远馨,陆小军,宋兴勃,等. Hain 法检测不同来源标本结核耐药性及突变位点分析[C]//中华医学会. 中华医学会第七次全国中青年检验医学学术会议论文集:2012 年卷. 北京:中华医学会,2012:195-198.
- [14] 于霞,尚媛媛,赵立平,等. 分子杂交法快速鉴定结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的初步评价[J]. 检验医学,2014, 29(10):1037-1040.

(收稿日期:2017-07-23 修回日期:2017-09-29)

(上接第 391 页)

试验结果的判断和临床意义的分析。

综上所述,本文所建方法将 TRFIA 的灵敏性、磁分离技术的高反应效率相结合,在显著缩短反应时间的基础上,获得可靠的临床检验结果且重复性良好,如果有相关配套设施跟进即可形成全自动化操作,具有良好的推广意义。

## 参考文献

- [1] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2015.
- [2] 焦艳华,梁媛媛,郭卫强. 基于磁性微球 HCG 化学发光免疫检测方法的研究[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版),2014,13(5):495-498.
- [3] 周敏,陆仁飞,杨旻. 磁分离酶联免疫法检测 SCC-Ag 的方法学研究[J]. 南通大学学报(医学版),2014,34(2): 107-110.
- [4] 熊会玲,范彦,胡美,等. 血清 CA199 对良恶性胆道疾病的意义[J]. 临床消化病杂志,2013,25(6):327-329.
- [5] 刘太峰,赫红姣,张一帆. PET-CT 在消化道肿瘤术后 CEA、CA199 升高患者中的应用价值[J]. 中国医学创新, 2012,9(27):70-71.
- [6] 李凤焕,王晓东,向鑫. 消化道恶性肿瘤血清 CA199 检测的临床意义[J]. 中国医药导刊,2013,15(5):876-878.
- [7] KELLY P J, ARCHBOLD P, PRICE J H, et al. Serum

CA199 levels are commonly elevated in primary ovarian mucinous tumours but cannot be used to predict the histological subtype[J]. J Clin Pathol,2010,63(2):169-173.

- [8] WU H B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry[J]. Clin Chim Acta,2006,369(2):119-124.
- [9] ZHANG Q Y,WANG X,LI Z J,et al. Evaluation of a-fetoprotein(AFP) in human serum by chemiluminescence enzyme immunoassay with magnetic particles and coated tubes as solid phases[J]. Analytica Chimica Acta,2009, 631(2):212-217.
- [10] 殷实,古宏晨,徐宏. 基于磁性纳米颗粒磁学信号的生物检测技术[J]. 生物医学工程学杂志,2013,30(4):879-883.
- [11] OSAKA T,MATSUNAGA T,NAKANISHI T,et al. Synthesis of magnetic nanoparticles and their application to bioassays[J]. Analytical Bioanal Chem,2006,384(3):593-600.
- [12] JIN S Q,YIN B C,YE B C. Multiplexed bead-based mesofluidic system for detection of food-borne pathogenic bacteria[J]. Appl Environ Microbiol,2009,75(21): 6647-6654.
- [13] KIM S M,CHAE M K,YIM M S,et al. Hybrid PET/MR imaging of tumors using an oleanolic acid-conjugated nanoparticle[J]. Biomaterials,2013,34(33):8114-8121.

(收稿日期:2017-07-25 修回日期:2017-09-27)