

前列腺特异抗原 PSA 酶联 免疫分析试剂盒的研制

崔素珍, 王玉肖, 黄文林, 刘一兵, 陈 健

(中国原子能科学研究院同位素研究所, 北京 102413)

摘要:一株 PSA 单抗用于固相包被, 另一株单抗与辣根过氧化物酶偶联制备抗 PSA 酶标记物, 以四甲基联苯胺(TMB)为底物, 采用二步法, 建立了 PSA 酶联免疫分析试剂盒(ELISA)制备方法。本方法的灵敏度为 $0.2 \mu\text{g/L}$, 批内变异系数 $< 5.3\%$, 批间变异系数 $< 6.4\%$, 回收率为 $96.6\% \sim 105.5\%$, 特异性鉴定显示与其他肿瘤标志物无明显交叉反应。正常参考值 $< 4.0 \mu\text{g/L}$ 。本法所制试剂盒与 PSA-ELISA 试剂盒(Maxim Biotech, Inc.)对照, 两者相关方程为 $y = 0.993x - 0.16$, 相关系数 $r = 0.932$ ($n = 48$)。该方法具有简便、快速和准确的特点, 适于临床检测和科研应用。

关键词:前列腺特异性抗原(PSA); 酶联免疫分析法(ELISA); 前列腺癌(PCa)

中图分类号: R730.45; R981⁺⁹ **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7512(2000)03-0147-05

前列腺特异性抗原(Prostate-specific Antigen, PSA)是由前列腺上皮细胞产生的糖蛋白, 相对分子量为 $33 \text{ kD}^{[1]}$ 。人在正常情况下, PSA 的血液浓度很低; 当前列腺发生病变时, PSA 大量进入血液, 引起血液 PSA 浓度升高。前列腺增生症及前列腺癌是中老年男性的常见病, 尤其是前列腺癌更是威胁 50 岁以上男性生命的恶性肿瘤。近年来, 国内外学者对前列腺癌的研究越来越深入, 最重要的进展是对 PSA 的确认, PSA 已被认为是目前前列腺癌较好的肿瘤标志物。血清 PSA 的测定有利于对前列腺癌的诊断、疗效观察、预后判断^[2]。国内外已广泛应用血清 PSA 免疫检测法对前列腺癌进行早期诊断和疗效评价。本文拟采用从精浆中提取纯化的 PSA 和抗 PSA 单抗, 研制 PSA-ELISA 试剂盒。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

前列腺特异抗原(PSA)参照文献[1]提取纯化; 包被和标记用单抗由本室单抗组提供; 辣根过氧化物酶、四甲基联苯胺(TMB)、尿素过氧化氢均购自 Sigma 公司; 酶标板购自 Costar 公司; PSA-ELISA 商品药盒购自 Maxim Biotech, Inc; 酶标仪为奥地利 SLT 公司产品。临床血

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. ht

收稿日期: 2000-05-16; 修回日期: 2000-06-19

作者简介: 崔素珍(1963~), 女(汉族), 山西人, 副研究员, 核医学专业

清标本取自:100例健康男性(23~63岁),经体检排除前列腺疾病;38例良性前列腺疾病患者(48~72岁);10例经临床确诊为前列腺癌的患者(58~80岁)。血清标本均由医院检验科提供。

1.2 实验方法

1.2.1 酶标记物的制备 采用改良高碘酸钠氧化法^[3]制备 PSA 的酶标记物。辣根过氧化物酶与抗 PSA 单抗用量均为 1 mg,酶结合物混合液用等体积饱和硫酸铵沉淀,沉淀物溶于少许 0.02 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液中,经相同缓冲液透析过夜后,加入等体积甘油于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 固相抗体的制备 向聚苯乙烯微量滴定板孔中加入含 PSA 包被单抗的 pH9.6 碳酸缓冲液(200 μ L/孔),置 4 °C 冰箱内过夜,37 °C 封闭 2 h 后,酶标板可用于免疫反应。

1.2.3 标准品的配制 将纯化的 PSA 抗原标定后依次稀释,配制成 0~50 μ g/L 的系列标准品。

1.2.4 底物溶液和终止剂 将 TMB 和 H₂O₂ 分别溶于 pH5.0 柠檬酸缓冲液中,使其浓度分别为 0.6、1.2 mmol/L,使用时以体积比 1:1 配制即为底物溶液。终止剂为 2 mol/L H₂SO₄ 溶液。

1.2.5 PSA-ELISA 分析程序 采用二步法加样程序。取已包被了抗体的微量滴定板条做双孔,每孔加样 100 μ L,再加 100 μ L 温育液摇匀,置 37 °C 温育 2 h;弃反应液,用洗涤液(含 0.05% Tween-20)洗 3 次,加酶标记物 200 μ L/孔,37 °C 温育 2 h;弃反应液,洗板 5 次,加底物溶液 200 μ L/孔,避光显色 30 min;以 2 mol/L H₂SO₄ 溶液 50 μ L/孔终止显色,于 450 nm 处测定其光密度 OD。绘制标准曲线,并计算血样 PSA 含量。

1.3 方法学比较

用本法与 Maxim Biotech 公司的 PSA-ELISA 试剂盒检测同一批标本($n=48$),比较相关性。

2 结 果

2.1 方法学鉴定

2.1.1 标准曲线及灵敏度 PSA 酶联免疫分析曲线示于图 1。同时测定 20 个零标准的 PSA 含量,以 $x + 2s$ 计算得其分析灵敏度为 0.2 μ g/L。

2.1.2 精密度 重复测定三份含有不同浓度 PSA 的人血清标本,观察批间、批内变异,结果列于表 1。

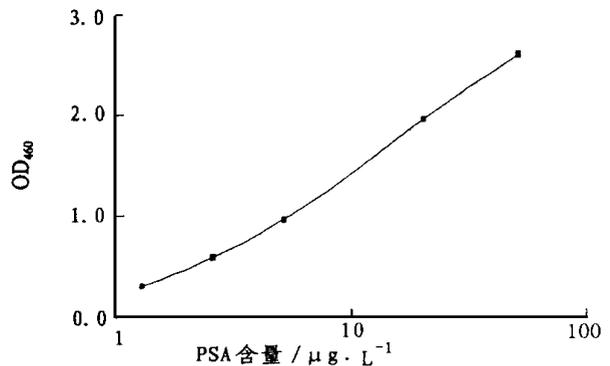


图 1 PSA ELISA 标准曲线

表 1 PAS-ELISA 试剂盒的批内与批间变异

样 品	$x/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		$s/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		CV/%	
	批内	批间	批内	批间	批内	批间
A	3.0	3.3	0.1	0.2	2.4	5.2
B	8.7	9.4	0.3	0.4	2.9	3.9
C	32.2	32.6	1.7	2.1	5.3	6.4

注:批内 $n=22$, 批间 $n=7$

2.1.3 准确性 取三份不同 PSA 浓度的血清样品分别加入一定量的 PSA 标准品,测定 PSA 的回收率,结果列于表 2。由表 2 可知,本法回收率为 96.6%~105.5%,说明本法准确性较好。

表 2 PSA-ELISA 回收实验结果

PSA 含量预期值/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	PSA 含量测定值/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/%
3.6	3.8	105.5
8.8	8.5	96.6
33.7	35.0	103.8

2.1.4 稀释试验 取 PSA 含量较高的人血清,进行倍比稀释。测定结果列于表 3。经计算两样品的稀释相关系数分别为 0.996 和 0.990。

表 3 样品倍比稀释后其 PSA 含量

 $\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$

稀释倍数	PSA 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
	样品 1	样品 2
1	43.5	24.1
2	25.1	15.7
4	15.6	7.5
8	8.5	4.0
16	4.4	1.6

2.1.5 特异性 用零标准品对高浓度的 AFP、CEA、PAP 进行系列稀释(10~1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$),并作为样品在本系统中测定,结果显示 AFP 和 CEA 均无任何交叉, PAP 在浓度低于 1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时亦无交叉反应。

2.1.6 "弯钩"效应 配制一系列高浓度 PSA 样品(浓度为 21.8~350 $\mu\text{g}/\text{L}$)进行测定,未见"弯钩"效应。

2.2 正常参考值

测定了 100 例健康男性血样,以 $x+2s$ 为血清 PSA 含量的正常参考值上限。均值为 2.5 $\mu\text{g}/\text{L}$,标准差 0.7 $\mu\text{g}/\text{L}$ 正常参考值上限为 3.9 $\mu\text{g}/\text{L}$ 与目前国际上大多数方法采用的正常值(4.0 $\mu\text{g}/\text{L}$)^[2]接近。

2.3 临床病理值

经测定, 38 例良性前列腺疾病患者的血清 PSA 含量为 $22.5 \pm 12.5 \mu\text{g/L}$; 10 例前列腺癌患者血清 PSA 含量为 $82.3 \pm 65.7 \mu\text{g/L}$ 。两组分别与正常组进行了比较, 其 PSA 含量明显升高, 统计学分析表明病理值与正常值之间有非常显著差异 ($P < 0.001$)。

2.4 与进口 PSA-ELISA 药盒的比较

分别以 Maxim Biotech 公司的 PSA-ELISA 药盒和本药盒测定 48 例患者血样 PSA 浓度, 并进行相关性比较。两者的相关方程为 $y = 0.993x - 0.16$, 相关系数 $r = 0.932$ 。

3 讨 论

PSA 是目前应用较广泛的诊断前列腺癌的血清肿瘤标志物, 虽然其对于良、恶性前列腺疾病的鉴别仍有待商讨, 但近年来衍生出的 PSA 密度 (PSAD)^[4] 和血清中游离 PSA 与总 PSA 含量的比值^[5] 等测定法, 大大提高了 PSA 的特异性。文献[6]曾对正常男性血清 PSA 在不同年龄组中的分布进行了分析, 结果显示年龄大于 50 岁的男性血清 PSA 含量有上升趋势。因此对 50 岁以上男性定期检测血清 PSA 含量可及早发现病变。这对于前列腺癌的早期诊断、监测、随访均具有重要的临床意义。

目前国内 PSA 的应用越来越广泛, 但大多使用的是进口试剂盒, 价格昂贵。本工作研制的 PSA-ELISA 原料均为本室自制, 降低了成本, 利于推广。研究结果表明, 本试剂盒的准确性、精密度、重复性、稳定性均符合质量控制要求, 适于临床检测和科研应用。

参考文献:

- [1] Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP. Purification of a Human Prostate-specific Antigen [J]. Invest Urol, 1979, 17(2):159.
- [2] Oesterling JE. Prostate-specific Antigen: A Critical Assessment of the Most Useful Tumor Marker for Adenocarcinoma of the Prostate [J]. J Urol, 1991, 145:907~923.
- [3] 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J]. 上海免疫学杂志, 1993, 3(2):97~100.
- [4] 周国强, 丁明霞, 周青莲. PSA 及 PSAD 测定对前列腺癌的诊断价值[J]. 中华泌尿外科杂志, 1998, 19(9):537~539.
- [5] Kim Petterson. Free and Complexed Prostate-specific Antigen (PSA): in Vitro Stability, Epitope Map, and Development of Immunofluorometric Assays for Specific and Sensitive Detection of Free PSA and PSA- α -antichymotrypsin Complex [J]. Chin Chem, 1995, 41:1480~1488.
- [6] 崔素珍, 王玉肖, 刘一兵. 前列腺特异抗原免疫放射分析及临床应用[J]. 同位素, 1998, 11(3):149~152.

The Establishment of an Enzyme-linked

Immunosorbent Assay for Prostate-specific Antigen

CUI Su-zheng, WANG Yu-xiao, HUANG Wen-lin, LIU Yi-bin, CHEN Jian

(Department of Isotope, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China)

Abstract: The two-step assay is based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Using two anti-PSA monoclonal antibodies, one of them is coated on the microtiter plate, the other is labeled with horseradish peroxidase (HRPO). TMB-H₂O₂ solution is used as the substrate of HRPO. The sensitivity of the assay is 0.2 μg/L. The intra-assay CVs and the inter-assay CVs of 3 samples are lower than 5.3% and 6.4% respectively. The analytical recoveries are ranged from 96.6% to 105.5%. The reference cut-off value from 100 healthy men is 4.0 μg/L. The correlation coefficient comparing with PSA-ELISA (Maxim Biotech, Inc.) is 0.932 ($n=48$). This assay is a rapid, sensitive and precise method. It is suitable for clinical and research application.

Key words: prostate-specific antigen (PSA); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); prostatic cancer (PCa)

专利简讯:

临床介入射线防护装置

【公告日】991124【分类号】A 61B00610【公告号】CN 2349990Y

【申请号】98245948.3【申请日】981216【申请人】武汉市江汉射线防护技术开发中心

【摘要】本实用新型涉及一种临床介入射线防护装置,包括诊断床头防护部分和诊断床侧防护部分,特征是所述诊断床头防护部分由主防护屏和升降防护屏组成,它们都由金属框架和内嵌的两层钢板及一层铅板构成,在升降防护屏下挂有一铅橡皮软帘,升降防护屏通过升降机构与主防护屏铰接,所述诊断床侧防护部分是由悬挂在诊断床边的铅橡皮软帘构成。该装置能有效保护医护人员,使医护人员在临床介入操作时不穿戴任何防护器材。

《同位素》编辑部摘自《科技信息》2000年第2期