

Luminex 液相芯片同时检测 tPSA 和 fPSA 方法的建立与评价

谢 冲 唐群业 王国民[△]

(复旦大学附属中山医院泌尿外科 上海 200032)

【摘要】 目的 建立用 Luminex 液相芯片技术同时测定前列腺特异性抗原(total prostate specific antigen, tPSA)和游离前列腺特异性抗原(free prostate specific antigen, fPSA)的方法,并对该方法进行评价。**方法** 制备抗体交联微球及藻红蛋白标记二抗,用双抗体夹心法对临床血清标本进行测定,并与 ELISA 方法进行比较。**结果** Luminex 液相芯片技术同时测定 tPSA、fPSA 与 ELISA 测定结果高度相关。Luminex 方法测定 tPSA 的灵敏度为 0.03 ng/L,批内精密密度为 4.38%~5.86%,批间精密密度为 3.40%~6.73%;测定 fPSA 的灵敏度为 0.013 ng/L,批内精密密度为 5.08%~7.94%,批间精密密度为 3.77%~5.74%。**结论** Luminex 方法同时测定 tPSA、fPSA 具有灵敏度高、重复性好、系统误差小等优点,具有广泛的临床应用前景。

【关键词】 Luminex; 液相芯片; 前列腺特异性抗原; 检测

【中图分类号】 Q 789 **【文献标志码】** A

Development and evaluation of Luminex liquichip assay for simultaneous detection of total and free prostate specific antigen

XIE Chong, TANG Qun-ye, WANG Guo-min[△]

(Department of Urology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective To develop Luminex liquichip assay for simultaneous detection of total prostate specific antigen (tPSA) and free prostate specific antigen (fPSA), and then to evaluate the method and its value. **Methods** Microspheres coupled with capture antibody and second antibody conjugated with PE were prepared. A sandwich immunoassay was established to detect tPSA and fPSA in human serum samples. **Results** The results of Luminex liquichip assay and ELISA were highly correlated. The sensitivity, intra-assay variation and interassay variation were 0.03 ng/mL, 4.38% - 5.86% and 3.40% - 6.73% respectively for tPSA. The sensitivity, intra-assay variation and interassay variation were 0.013 ng/mL, 5.08% - 7.94% and 3.77% - 5.74% respectively for fPSA. **Conclusions** The Luminex liquichip assay was good at high sensitivity, high reproducibility, and little systematic error. It is worthwhile for clinical application.

【Key words】 Luminex; liquichip; total prostate specific antigen; detection

液相芯片技术是 20 世纪 90 年代中期发展起来的,被喻为后基因组时代的芯片技术,也被称为 xMAP 技术。它是集流式细胞技术、激光技术、数字信号处理技术及传统化学技术为一体的新型生物分子检测技术^[1],具有通量大、灵活性好、灵敏度高、动力学范围广等优点^[2-3],它的发明对分子生物检测领域具有里程碑意义。

前列腺特异性抗原(total prostate specific antigen, tPSA)是一种主要由前列腺上皮细胞产生的糖蛋白。它在体内主要由两种形式存在,一种是游离前列腺特异性抗原(free prostate specific antigen, fPSA),另一种是与各种蛋白酶抑制物结合形成的结合前列腺特异性抗原(complex prostate specific antigen, cPSA)^[2]。在过去的 20 年中,血清

tPSA 一直是诊断前列腺癌的主要标志物。然而良性前列腺增生等疾病也可导致 tPSA 的非肿瘤特异性增高,使 tPSA 检测缺乏足够的特异性。因此许多学者建议将 fPSA 及 fPSA/tPSA 测定作为临床上鉴别前列腺增生和前列腺癌的常规检查项目^[3]。目前实验室常用的血清 tPSA 检测方法有酶联免疫吸附剂测定(ELISA)^[4]、放射免疫分析法(RIA)^[5]和化学发光免疫法(CLEIA)^[6]等。这些传统的免疫检测方法有造价高、耗时长、具有放射性等缺点,而且所有检测方法一次都只能测定一个生物标志物。因此,我们尝试建立运用 Luminex 液相芯片技术同时检测 tPSA 和 fPSA 的方法。

资料和方法

资料

标本来源 血清标本(前列腺癌组和对照组各 20 例)均来自复旦大学附属中山医院泌尿外科。其中前列腺癌组为临床确诊病例,对照组为健康自愿献血者。

试剂和仪器 荧光聚苯乙烯球(美国 Luminex 公司),96 孔滤过板(filter plate,美国 Millipore 公司),ELISA tPSA、fPSA 试剂盒(美国 Biolegend 公司),EDC 和 Sulfl-NHS(美国 Fisher 公司),抗 PSA 单克隆抗体 5G6(ab10186)和抗 PSA 单克隆抗体 8A6(ab10187)(美国 Abcam 公司),抗 PSA 单克隆抗体 5A6(sc52171,美国 Santa cruz 公司);Luminex 100 液相芯片检测仪(美国 Luminex 公司),ACS180 化学发光免疫分析仪(美国 Bayer 公司)。

方法

微球的交联 100 μL 微球(1.25×10^6)悬液于 10 000 r/min 离心 2 min,去除上清后用振动和声裂法将微球重悬于 25 μL PBS(pH 7.2)。微球悬液再次离心后去除上清,将微球重悬于 20 μL PBS。在微球悬液中先后加入 2.5 μL Sulfo-NHS 溶液(50 $\mu\text{g/L}$)和 2.5 μL EDC 溶液(50 $\mu\text{g/L}$),混匀后室温避光振动 10 min、超声裂解 10 min。10 000 r/min 离心 2 min,沉淀用 62 μL MES 缓冲液(pH 6.0)洗 2 次,再重悬于 25 μL MES 缓冲液。将 31.25 μg 包被抗体稀释于 100 μL MES 缓冲液中,再加入微球悬液。将新的微球悬液在室温避光下振动 1 h、超声裂解 1 h。离心微球后将微球重悬于 200 μL PBS,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

藻红蛋白标记二抗 含 SPDP[N-琥珀酰-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯]的乙醇溶液 30 μL (1.1 $\mu\text{g/L}$),加入 70 μL 的二抗(抗 tPSA 5A6) PBS 溶液(50

mmol/L,pH 7.5),在室温中反应 2 h。再加入巯基化 PE 400 μL (1.7 $\mu\text{g/L}$),室温反应 12 h,加入 100 μL 的 50 mmol/L 碘乙酸钠封闭残余巯基,用 PB 透析过夜。

Luminex 液相芯片检测 用清洗缓冲液(0.05% Tween-20,0.01 mol/L PBS,pH 7.4)预湿 96 孔滤过板,真空抽滤去除液体。将血清样本按 1:10 比例稀释在含 10%羊血清的清洗缓冲液里。将标准品和血清样本分别加入 96 孔滤过板,每孔 50 μL 。将 Luminex 荧光微球稀释到 $10^5/\text{mL}$,每孔加入 50 μL 。室温避光振荡孵育 60 min(700 r/min)后真空抽滤去除孔内液体,用清洗缓冲液洗涤 96 孔滤过板 3 次。每孔加入藻红蛋白标记的二抗(浓度 1:500)100 μL 。室温避光振荡孵育 30 min,清洗 3 次。最后每孔加入 120 μL 清洗缓冲液,室温避光振荡 5 min 后将 96 孔滤过板放入 Luminex 100 读取各孔荧光值。

绘制标准品曲线 以平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)为横坐标,标准品 tPSA 值和 fPSA 值为纵坐标绘制出 tPSA、fPSA 标准浓度的荧光强度剂量曲线,并建立线性方程。

tPSA、fPSA 值 将各样品血清的荧光强度代入线性方程,求出其 tPSA、fPSA 值。

ELISA 检测 将以上相同血清运用 ELISA 方法检测其 tPSA、fPSA 值。

评价指标

灵敏度 测定 10 个空白孔的荧光值,计算其平均值(\bar{x})、标准差(s),求 $\bar{x} \pm 3s$,计算得 tPSA 和 fPSA 最低检测下限。

精密性 选取 tPSA 和 fPSA 高、中、低各 3 例进行测定。计算批内精密性时,3 例血清标本各设 8 个复孔;计算批间精密性时,3 例血清标本各测 3 次,每次各设 8 个复孔。计算 PSA 质量浓度的平均值(\bar{x})、标准差(s)及变异系数(CV)。

相关性比较 用 SPSS 12.0 统计学软件对所有血清标本的 Luminex 液相芯片法检测结果和 ELISA 法检测结果做线性相关分析,并计算其相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

标准品曲线 tPSA 标准品的荧光强度剂量曲线见图 1。由标准浓度得到的线性方程为 $y = 0.0022x + 0.2028$, $R^2 = 0.9997$ 。fPSA 标准品的荧光强度剂量曲线见图 2。由标准浓度得到的线性方程为 $y = 0.1994x + 10.283$, $R^2 = 0.9995$ 。

灵敏度 计算得 Luminex 方法检测 tPSA 和 fPSA 的灵敏度分别为 0.03 ng/mL 和 0.013 ng/mL。

精密度 Luminex 方法同时检测 tPSA 和 fPSA 的批内精密度(表 1),Luminex 方法同时检测

tPSA 和 fPSA 的批间精密度(表 2)。实验结果说明 Luminex 方法同时检测 tPSA 和 fPSA 重复性好。

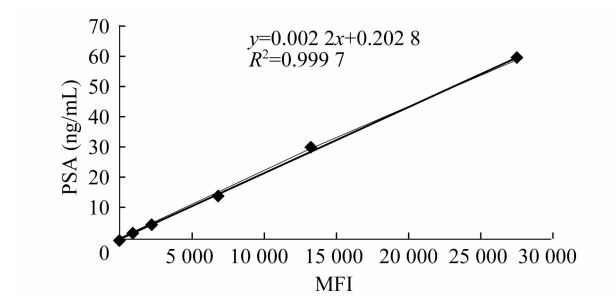


图 1 tPSA 标准品荧光强度剂量曲线
Fig 1 tPSA standard curve

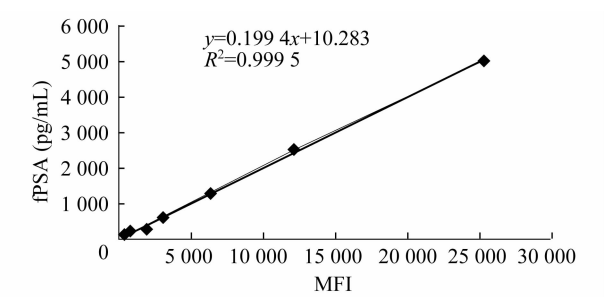


图 2 fPSA 标准品荧光强度剂量曲线
Fig 2 fPSA standard curve

表 1 批内精密度测试结果

Tab 1 Intra-assay variation in the Luminex bead-based immunoassay

Antigen	Case (n)	Mean (ng/mL)	SD	CV (%)
tPSA	1	1.3	0.057	4.38
	2	3.4	0.246	7.23
	3	14.6	0.856	5.86
fPSA	1	0.2	0.011	5.50
	2	1.2	0.061	5.08
	3	1.8	0.143	7.94

表 2 批间精密度测试结果

Tab 2 Interassay variation in the Luminex bead-based immunoassay

Antigen	Case (n)	Mean (ng/mL)	SD	CV (%)
tPSA	1	1.5	0.051	3.4
	2	3.4	0.142	4.18
	3	15.2	1.024	6.73
fPSA	1	0.2	0.009	4.50
	2	1.3	0.049	3.77
	3	2.7	0.155	5.74

相关性 用 SPSS 12.0 软件分析前列腺癌组患者 Luminex 法和 ELISA 法测定的 tPSA 和 fPSA 值,并做线性相关分析,其相关系数分别为 0.994、0.983,两者差异无统计学意义($P>0.05$);对正常

人组两种方法测定的 tPSA 和 fPSA 做线性相关分析,相关系数分别为 0.976、0.991,两者差异无统计学意义($P>0.05$)。结果表明 Luminex 方法和 ELISA 方法测定结果有高度相关性(图 3)。

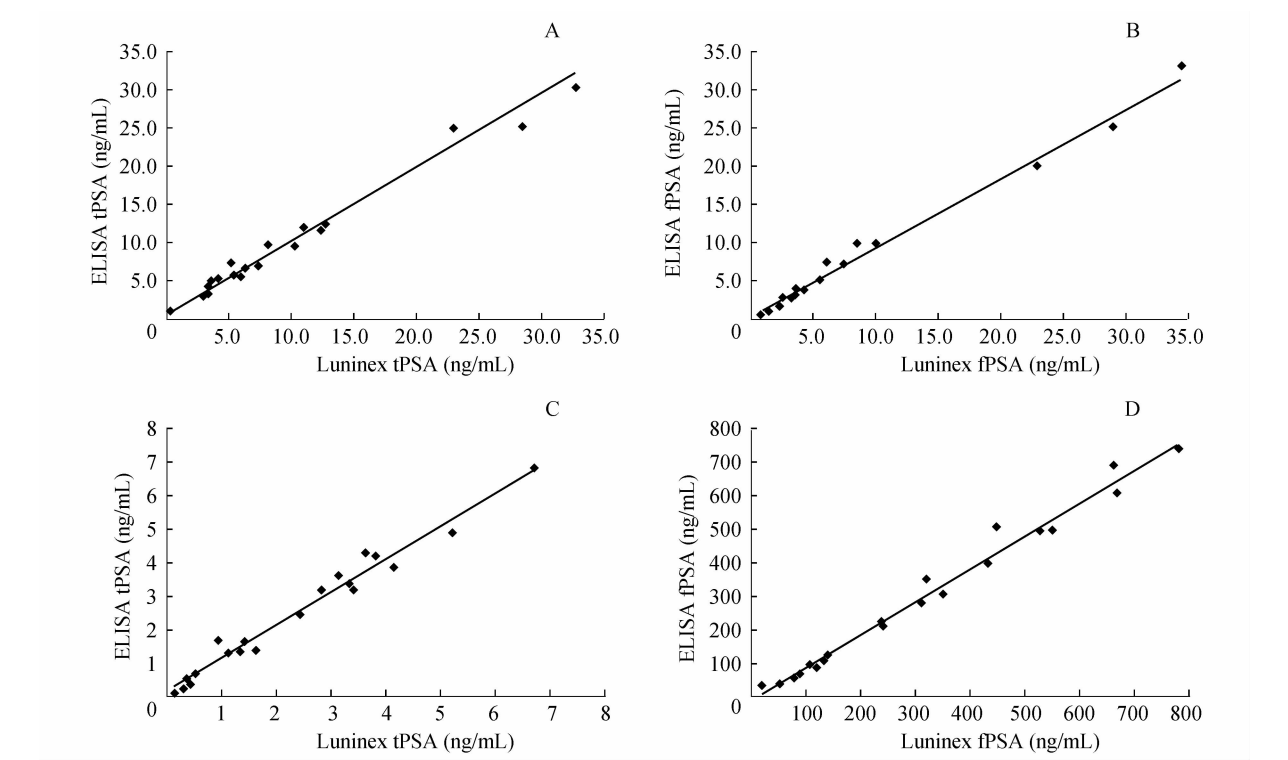


图 3 Luminex 和 ELISA 检测结果比较
Fig 3 Comparison between Luminex and ELISA
A:Prostate cancer group tPSA; B:Prostate cancer group fPSA; C:Healthy people tPSA; D:Healthy people fPSA.

讨 论

血清 tPSA 检测是早期诊断前列腺癌以及前列腺癌术后观察的有效指标。然而由于良性前列腺增生等疾病也可引起血清 tPSA 浓度升高,因此 tPSA 检测诊断前列腺癌的特异性并不高,特别是对于 tPSA 值为 4~10 ng/mL 的浓度范围,其诊断特异性仅为 38%,成为了临床诊断的灰色区域^[7]。随着对前列腺疾病研究的不断深入,目前发现与良性前列腺增生患者和正常人相比,前列腺癌患者血清中 fPSA 浓度水平明显偏低。因此一个新的临床指标——游离前列腺特异抗原百分率被广泛使用^[8]。然而目前实验室常用的 tPSA 检测方法均不能同时检测血清 tPSA 和 fPSA,重复检测不仅造成了时间和资源的浪费,而且给患者也带来痛苦。因此我们尝试运用液相芯片技术建立同时检测血清 tPSA 和 fPSA 的方法,并对其作出评价。

虽然液相芯片技术已经广泛运用于免疫检测^[9-11]、核酸检测^[12]及激素水平测定^[13]等诸多领域,且其最大优点是一次可以快速、同时检测多达 100 个生物标志物,但是由于 fPSA 是 tPSA 的组成部分,同时检测 fPSA 和 tPSA 则不同于同时检测两个完全不同的生物标志物。首先,我们选择了 3 种不同的抗 tPSA 单克隆抗体^[14-16],其中抗 tPSA 单克隆抗体 5G6 和抗 tPSA 单克隆抗体 5A6 是特异性的抗 tPSA 抗体,抗 tPSA 单克隆抗体 8A6 是特异性的抗 fPSA 抗体。然后将抗 tPSA 单克隆抗体 5G6 和抗 tPSA 单克隆抗体 8A6 分别结合于 10 号和 20 号荧光微球上。当微球与血清混合后,血清中的 tPSA 特异性的与 10 号微球相结合,而 fPSA 则同时与 10 号和 20 号微球相结合。加入二抗后,包括 fPSA 在内的所有 tPSA 再同时与 5A6 抗体结合。根据 Luminex 液相芯片技术的检测原理,当 10 号微球通过检测时,其 MFI 值为 tPSA 的检测值,当 20 号微球通过检测时,其 MFI 值为 fPSA 的检测值。

将 Luminex 液相芯片技术同时检测 tPSA 和 fPSA 的值与传统的 ELISA 方法检测结果进行比较,两种方法检测前列腺癌组患者血清 tPSA 和 fPSA 值的相关性分别为 0.994、0.983,差异均无统计学意义($P>0.05$);两种方法检测出的对照组血清 tPSA 和 fPSA 值相关性分别为 0.976、0.991,差异均无统计学意义($P>0.05$),说明两种方法检测结果不仅对 tPSA 值较高的前列腺癌患者而且对 tPSA 值较低的正常人都呈高度相关性。Luminex

液相芯片技术检测 tPSA 和 fPSA 的实验结果表明其对 tPSA 和 fPSA 检测的线性范围完全满足临床实际使用的需要。目前采用 4 ng/mL 作为 tPSA 的阈值虽然存在很大争议,但由于它是多年大规模临床实验的结果,仍被普遍接受。Luminex 液相芯片检测与传统 ELISA 方法检测 tPSA 结果高度相关,因此也仍可采用此阈值作为标准。

由于 ELISA 工作曲线的置信区间为 2~3 对数级^[17],当血清 tPSA 检测值高于最高标准浓度时,其血清样本必须要经不同程度的再次稀释以满足实验精确度,而 Luminex 液相芯片技术采用荧光分析,反应发生在液相环境中,因此克服了大分子检测时受表面张力、空间效应等对反应动力学的干扰,使其置信区间达 4~5 对数级^[18],从而省略了繁琐的稀释步骤,实验效率大大提高。此外相对于传统的 ELISA 检测方法,Luminex 液相芯片技术还具有如下优点:(1)血清样本需求量大,每次检测只需血清 5 μ L,约为 ELISA 检测所需血清量的 1/10,这对临床上某些外周血极难提取的患者尤有意义。(2)反应时间短,完成整个过程只需 90 min,且操作流程简单。(3)检测成本大幅下降。与 ELISA 等传统方法分别检测 tPSA 与 fPSA 相比,用 Luminex 液相芯片同时检测 tPSA 与 fPSA 成本只为传统检测方法的 1/5~1/3。随着 Luminex 技术的应用和推广,Luminex 设备及检测成本必定会进一步下降,检测成本的降低也使得开展大规模的前列腺癌筛查成为可能。(4)可以同时快速检测多种生物学指标,这是 ELISA 等传统检测方法无法比拟的。因此,在以后的研究中,还可同时检测多种其他前列腺癌的生物标志物,进一步提高前列腺癌的诊断率。

Luminex 液相芯片的主要缺点是检测血清中的特异性抗体时,检测的背景信号过高,给实验造成干扰^[19]。其产生的原因是血清中含有的某些抗体可以直接非特异性的结合在微球表面,而这种非特异性的结合与微球呈现的抗原性无关,因此不能被系统所识别。这种效应类似于在免疫测定中由异嗜性抗体导致的干扰^[20]。为了消除这种非特异结合,经过反复实验我们得出以下方法:首先我们选用了 Luminex 公司研制的 SeroMap 微球,这是一种专门用于血清检测的荧光微球;然后我们用含 10% 山羊血清的 PBS 封闭液稀释血清,以阻止微球的非特异性结合;最后我们在反应体系中加入 0.5% 的聚乙烯醇和 0.8% 聚乙烯吡咯酮使微球的非特异性结合降到最低^[19]。

Luminex 公司最近又推出了新一代液相芯片检测平台 Flexmap 3D,把基于微球的多通路检测技

术推向了新的发展阶段。Flexmap3D 更大地提高了检测效率,可以同时对一个样本中的 500 种不同目的分子进行检测,并且可以一次检测 384 个不同样本。可以预见,在未来的 5~10 年,液相芯片技术将逐渐取代传统的 ELISA 等检测手段,在临床上广泛应用于肿瘤标志物的早期诊断、遗传性疾病的基因诊断、感染性疾病病原体鉴别以及自身免疫性疾病的早期诊断等方面。

参 考 文 献

- [1] Linkov F, Yurkovetsky Z, Lokshin A. Hormones as biomarkers: practical guide to utilizing Luminex technologies for biomarker research[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 520: 129–141.
- [2] Eggener SE, Yossepowitch O, Roehi KA, et al. Relationship of prostate-specific antigen velocity to histologic findings in a prostate cancer screening program[J]. *Urology*, 2008, 71(6): 1 016–1 019.
- [3] Stephan C, Rittenhouse H, Cammann H, et al. New markers and multivariate models for prostate cancer detection [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(7): 2 589–2 600.
- [4] Luca B, Tommaso PG, Andrea M, et al. Detection of prostate-specific antigen coupled to immunoglobulin M in prostate cancer patients[J]. *Cancer Detect Prev*, 2007, 31(5): 402–407.
- [5] Akimoto S, Ichikawa T, Ito H. Relationship of prostate-specific antigen levels to prostate volume and age in mass screening subjects[J]. *Urol Int*, 1998, 60(4): 216–219.
- [6] Sahin H, Aflay U, Batun S, et al. Cerebrospinal fluid prostate specific antigen (CSF PSA) in prostate cancer patients with lower spine metastasis[J]. *Int Urol Nephrol*, 2005, 37(4): 727–730.
- [7] Horninger W, Cheli CD, Babaian RJ, et al. Complexed prostate-specific antigen for early detection of prostate cancer in men with serum prostate-specific antigen levels of 2 to 4 nanograms per milliliter[J]. *Urology*, 2002, 60(4): 31–35.
- [8] Partin AW, Brawer MK, Bartsch G, et al. Complexed prostate specific antigen improves specificity for prostate cancer detection: results of a prospective multicenter clinical trial [J]. *J Urol*, 2003, 170(5): 1 787–1 791.
- [9] Brian DT, Fiona H, Lind C, et al. Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation [J]. *Nephrology*, 2009, 14(2): 247–254.
- [10] Wong SJ, Demarest VL, Boyle RH, et al. Detection of human anti-flavivirus with a West Nile virus recombinant antigen microsphere immunoassay[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(1): 67–72.
- [11] Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by Luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts [J]. *Transplantation*, 2009, 87(10): 1 505–1 513.
- [12] Bellisario R, Colinas RJ, Pass KA, et al. Simultaneous measurement of thyroxine and thyrotropin from newborn dried blood-spot specimens using a multiplexed fluorescent microsphere immunoassay[J]. *Clin Chem*, 2000, 46(9): 1 422–1 424.
- [13] Smith PL, WalkerPeach CR, Fulton RJ, et al. A rapid, sensitive, multiplexed assay for detection of viral nucleic acids using the FlowMetrix system[J]. *Clin Chem*, 1998, 44(9): 2 054–2 056.
- [14] Wan XS, Xu Y, Ware JH, et al. Three immunoassays based on monoclonal antibodies specific for prostate specific antigen (PSA), alpha-1-antichymotrypsin (ACT), and the PSA-ACT complex[J]. *Prostate*, 2003, 56(2): 131–141.
- [15] Matsumoto K, Konishi N, Samori T, et al. ELISA for a complexed antigen with a monoclonal antibody blocking reaction with the free antigen-assay-specific for complexed prostate-specific antigen[J]. *J Immunol Methods*, 2000, 234(1–2): 99–106.
- [16] Chen Z, Chen H, Stamey TA. Monoclonal antibodies 2F5 and 4G10 against prostate specific antigen (PSA) complexed to alpha1-antichymotrypsin[J]. *J Urol*, 1998, 160(3): 870–875.
- [17] Nakaya M, Kito Y, Matsuki N, et al. A novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for feline insulin[J]. *J Vet Med Sci*, 2009, 71(7): 1 005–1 007.
- [18] Rajesh K, Anna T, Chalam KV. Multiplex immunoassay analysis of biomarkers in clinically accessible quantities of human aqueous humor[J]. *Molecular Vison*, 2009, 15: 60–69.
- [19] Waterboer T, Sehr P, Pawlita M. Suppression of non-specific binding in serological Luminex assay [J]. *J Immunol Methods*, 2006, 309(1–2): 200–204.
- [20] Martins TB. Heterophile antibody interference in a multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for quantitation of cytokines in human serum [J]. *Clin Diag Lab Immunol*, 2004, 11(2): 325–329.

(收稿日期: 2010-01-13; 编辑: 王蔚)