

## · 方法研究 ·

## 胃蛋白酶原 II 时间分辨荧光免疫分析法的建立

张祥瑞, 黄 飏, 朱 岚, 李跃松, 蒋叶华, 肖华龙

(江苏省原子医学研究所, 江苏 无锡 214063)

**摘要:** 建立胃蛋白酶原 II (PG II) 的时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA)。包被 PG II 单抗 8101<sup>#</sup> 和使用 DTTA 络合 Eu<sup>3+</sup> 标记 PG II 单抗 8102<sup>#</sup>, 建立 PG II TRFIA。结果用 Log-Logit 函数和四参数 Logit 函数数据处理。批内和批间 CV 分别为 2.1% 和 3.8%, 平均回收率为 104.6%, 灵敏度为 0.02 μg/L。标准曲线呈直线, ED<sub>50</sub> 为 16.21 μg/L。与 PG I、AFP、CA50、CA125 及 CA242 等无交叉反应。Eu<sup>3+</sup> 标记单抗在 -30℃ 保存, 可达一年以上, 免疫活性基本无损失。同批试剂连续分析 8 个月结果稳定, 与 IRMA 测定结果基本吻合。应用 TRFIA 检测血清 PG II 具有灵敏度高、操作简便和时间短等特点, 是一种适用于人群胃病普查的良好方法, 具有推广应用价值。

**关键词:** 胃蛋白酶原 II; 时间分辨荧光免疫分析; 胃疾病; 单克隆抗体

**中图分类号:** R446.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-1703(2004)02-0099-03

胃蛋白酶原 II (PG II) 主要由胃贲门的贲门腺, 胃窦的幽门腺及近十二指肠的 Brunner's 产生, 前列腺和胰腺也产生少量 PG II, 胃粘膜合成的 PG II 约为总量的 25%。PG II 大部分在胃腔内活化成胃蛋白酶, 只有约 1% 透过胃粘膜毛细血管进入血液循环, 由尿排出, 血清 PG II 浓度可反映其分泌水平<sup>[1,2]</sup>。当胃粘膜发生病变时, 血清 PG II 含量也随之发生改变。已有报道将 PG I、II 水平作为胃癌的诊断及肿瘤的预后判断。目前血清 PG II 检测方法为 IRMA 和 ELISA。TRFIA 是以镧系元素标记为示踪螯合物和时间分辨荧光检测相结合的一种新型的微量分析, 以其灵敏度高、操作简便、示踪物稳定, 无放射性等优点, 成为一种生物医学和临床超微量生化检验新手段。本文采用双位点夹心法建立 PG II TRFIA, 并进行评估。

### 材料与方 法

#### 1 材料与试剂

PG II 单抗 8101<sup>#</sup>、8102<sup>#</sup> 及 PG II 参考标准, 由北京佳瑞生物技术公司提供; Eu<sup>3+</sup> 标记试剂, 由 EG&G-Wallac 提供; 二乙烯三胺五乙酸 (DTPA), 由 Sigma 提供; 去离子超纯水, 用 Barnstead 公司的超纯水器制备; 增强液, 洗涤液及封

闭液均由本实验室自配。PD-10 柱和 Sepharose CL-6B 柱, 由 Pharmacia 提供; 96 孔板为国产聚苯乙烯板, 经羧基化处理; 全自动 TRF 检测仪, 由 EG&G-Wallac 提供。血清样品来自本所临床部体检人员。

#### 2 实验方法

2.1 标记抗体的制备 参照 Eu<sup>3+</sup> 标记盒说明书操作。将 PG II 单抗 8102<sup>#</sup> 经 PD-10 柱转换缓冲体系, 洗脱液为含 0.155 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> pH8.5 缓冲液。紫外 (1.46A<sub>280</sub>-0.74A<sub>260</sub>) 监测, 选择蛋白峰管合并定量, 浓缩至 2 mg/mL。取 500 μL 加入含 0.2 mg Eu<sup>3+</sup>-N<sup>1</sup>-[p-异硫氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸 (Eu<sup>3+</sup>-DTTA) 小瓶中, 25℃ 振荡, 反应过夜 (16h)。反应液经 Sepharose CL-6B 柱层析。监测标记蛋白峰计数, 并测定免疫活性, 合并高活性管。计算浓度并按比例稀释后, 分装冻干。

2.2 固相抗体包被板的制备 将单抗 8101<sup>#</sup> 用 0.05 mol/L pH9.6 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 溶液稀释至 10 μg/mL, 包被 96 孔板, 200 μL/孔, 4℃ 过夜。弃去包被液, 用封闭液 250 μL/孔, 封闭过夜, 置于 -20℃ 冷冻, 保存备用。

2.3 样品的检测 在包被 PG II 单抗 8101<sup>#</sup> 板上, 每孔依次加 50 μL PG II 参考标准 (或待测血

清), 加含 0.1% BSA 的 Tris - HCL 液 150 $\mu$ L, 25 $^{\circ}$ C 振荡, 孵育 2h, 洗 4 次。每孔加 200 $\mu$ L 以 1:50 的 Eu<sup>3+</sup> - PG II 抗体, 25 $^{\circ}$ C 振荡孵育 1h, 洗 4 次, 加增强液 200 $\mu$ L/孔, 25 $^{\circ}$ C 振荡孵育 5min 后, 用 TRF 检测仪检测荧光, 程序软件由本室编制。

2.4 方法学考核 灵敏度、特异性、精密度、回收率和稳定性。

### 3 数据分析

PG II - TRFIA 标准曲线由 Auto DELFIA 1235 的 Log - Logit 函数处理系统自动绘出。

## 结 果

### 1 标记及包被结果

抗体标记效率检测: Eu<sup>3+</sup> - PG II - 单抗经 Sepharose CL - 6B 层析。以 EG&G Wallac 提供的 Eu<sup>3+</sup> 标准为参考, 第一洗脱峰的 Eu<sup>3+</sup> 含量为 20.9  $\mu$ mol/L, 单抗 8102<sup>#</sup> 蛋白含量为 1.7  $\mu$ mol/L, 即平均每个 IgG 上连接 12.3 个 Eu<sup>3+</sup>。选择 PG II 参考标准高点 (50  $\mu$ g/L) 与低点 (5  $\mu$ g/L) 作为样品, Eu<sup>3+</sup> - PG II 单抗 1:50 稀释, 进行 TRFIA 检测。结果显示标准高点发光计数为 22 万, 低点为 2 万, 相差达 1 个数量级, 定量分辨率较好, 被测物和发光计数基本成算术级数正比关系。

### 2 PG II - TRFIA 的方法学考核

特异性: 将 PG I、AFP、CA50 和 CA125 以及 CA242 高值标准液配成一系列不同浓度, 作为样品进行检测。在其浓度范围内, 对 PG II TRFIA 无交叉反应。精密度和回收率: 批内和批间 CV 分别为 2.1% 和 3.8%, 平均回收率为 104.6%。灵敏度: 以零剂量点发光值均值加 2s 后的发光值在标准曲线上得到的相应值为 0.02  $\mu$ g/L。稳定性: 标记抗体及包被板在 -30 $^{\circ}$ C 保存可达一年, 同批试剂连续分析 8 个月结果稳定。

### 3 PG II - TRFIA 标准曲线和血清样品

PG II - TRFIA 标准曲线经 Log - Logit 函数数据处理。8 条不同时间进行的 PG II TRFIA 的效点均值 ED<sub>20</sub>、ED<sub>50</sub> 和 ED<sub>80</sub> 分别为 7.843  $\pm$  0.2  $\mu$ g/L、16.21  $\pm$  0.1  $\mu$ g/L 和 34.69  $\pm$  1.3  $\mu$ g/L。可测范围: 0.02 - 50  $\mu$ g/L。50 份血清同时用本文 TRFIA 与 IRMA 药盒测定的结果相关系数为 0.930, 表明两种方法基本符合。

## 讨 论

PG II 主要由成熟的腺细胞产生, 故 PG II 与

癌细胞的分化程度关系不大。胃癌患者行胃全切后, 血清 PG II 水平很低; 复发时, 会升高。据报道这可能是由于高分化管状或乳头状腺细胞分泌所致。如果同时 PG I 也有所升高, 则提示转移的癌细胞与原发癌细胞有同源异质性。国外研究证明 PG II 在很多组织癌细胞中也都有表达, 除了胃癌之外, 还与其他肿瘤如: 十二指肠癌、胰腺癌、肾癌、前列腺癌、膀胱癌、子宫癌和卵巢癌等有关, 与恶性黑素瘤也有相关, 但与直肠癌、子宫颈癌或肺癌以及皮肤癌没有相关。PG II 在乳腺癌中也有所表达。据分析, PG II 在不同肿瘤中的分泌情况与肿瘤所处发展时期的激素水平有关<sup>[4]</sup>。有报道正常血清中 PG II 的量还与性别有关, 男女性别之间有显著性差异<sup>[2]</sup>。本文检测 50 份样品, 男性 PG II 的量平均值为 11.77  $\mu$ g/L; 女性为 12.23  $\mu$ g/L, 未见明显差异。

国内外对 PG II 的研究报道较多, 由于抗体、分析方法的不同以及种族差异, 正常值参考范围也不一样<sup>[1]</sup>。本文建立了 PG II 正常血清参考值为 PG II < 27  $\mu$ g/L, 并与 PG I / PG II 的比值结合分析。

PG 作为胃病的体外检测已越来越受到关注, 有报道在确诊胃癌患者中, 有 1/3 的患者在几年前血清 PG 值已不正常, 利用血清 PG I、PG II 的测定, 进行胃癌早期诊断的普查以及胃癌的预防干预计划, 已在日本、挪威和芬兰等国家实施。日本胃癌检测计划利用 PG 进行大面积的人群普查, 使胃癌的早诊率提高到 90%<sup>[5]</sup>。我国也是胃癌高发国家之一, 胃癌的大面积普查应当摆在重要地位, 但目前国内 PG 的体外检测一直以 RIA 和 ELISA 为多, 多采用标记抗原法, 灵敏度和稳定性有所不足。本文建立的 PG II - TRFIA 采用两步法, 有利于减少样品对分析系统的干扰, 分析时间仅为 3h, 可在 Auto DELFIA 1235 TRFIA 检测仪上全自动操作, 这样既可提高临床检验的速度, 又可大幅度降低人为误差和增加检出结果的可靠性<sup>[3]</sup>, 更适合于临床的使用及人群普查。结合 PG I - TRFIA 结果及 PG I / PG II 的比值来判断胃癌及相关疾病, 为胃癌的大面积普查奠定了一个良好的方法学基础。

### 参考文献:

- [1] 蒋孟军, 肖志坚, 杨希震, 等. 胃蛋白酶原与胃癌的相关性研究 [J]. 中国实验临床免疫杂志, 1999, 11: 32 - 35.

- [2] Ichinose M, Miki K, Furihata C, et al. Radioimmunoassay of group II pepsinogen in human serum[J]. Clin Chim Acta, 1982, 122:61-69.
- [3] 黄彪, 肖华龙, 朱利国, 等. CA19-9 时间分辨荧光免疫分析方法建立及应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2001, 8:25-27.
- [4] Merino A M, Vazquez J, Rodriguez J C, et al. Pepsinogen c expression in tumors of extragastric origin[J]. Int J Boil Mark 2000, 15:165-70.
- [5] 陈智周, 范振符, 等. 胃蛋白酶原 I、II 在早期胃癌普查中的意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24:1-3.

## Time Resolved Fluoroimmunoassay of Pepsinogen II

ZHANG Xiang-ru, HUANG Biao, ZHU Lan, et al.

(Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China)

**Abstract:** A new time resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) using a double antibody method for human pepsinogen II (PG II) in serum was developed, with the monoclonal antibody (McAb) 8101<sup>#</sup> coated on the 96 well solid phase, binding to a specific antigenic site on the PG II, and the europium-labelled PG II McAb 8102<sup>#</sup> prepared through the chemical reaction with europium-chelate of N-(p-isothiocyanatobenzyl)-diethylenetriamine-N,N,N,N-tetraacetic acid, directing against a different antigenic site on the PG II. The fluorescence enhancement system was an enhancement solution mainly containing  $\beta$ -naphthyltrifluoroacetone. The intra- and interassay CV of the TRFIA were 2.1% and 3.8%, and the average recovery rate was 104.6%, the sensitivity was 0.02 $\mu$ g/L. The TRFIA provided a linear dose response with ED<sub>50</sub> of 16.21 $\mu$ g/L. The cross-reaction with PG I, AFP, CA50, CA125 and CA242 was negligible. The europium-labelled 8102<sup>#</sup> was stable for more than one year at -30 $^{\circ}$ C and the results of the TRFIA with the same labelled reagents were stable for eight months, and the results correspond well to IRMA. The method of detecting serum PG II with TRFIA is highly sensitive, less time consumed and easier for operation.

**Key words:** Pepsinogen II; Time-resolved fluoroimmunoassay; Gastric disease; Monoclonal antibody  
(王仁芝编委审 陈泮藻编辑)