

胃蛋白酶原双标记时间分辨荧光免疫分析及其初步临床应用*

张珏 黄彪** 朱岚 张艺 刘海燕 马智鸿 郭力宁

(江苏省原子医学研究所, 无锡 214063)

摘要 采用钐(Sm^{3+})标记抗胃蛋白酶原 I 单克隆抗体(PG I)及铕(Eu^{3+})标记抗胃蛋白酶原 II 单克隆抗体(PG II), 建立了双标记时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA), 同时检测人血清 PG I 和 PG II. 将抗 PG I 单克隆抗体 8003[#]、抗 PG II 单克隆抗体 8101[#] 以一定比例共包被于 96 孔微孔板上, 用 Sm^{3+} 标记抗 PG I 单抗 8016[#]、 Eu^{3+} 标记抗 PG II 单抗 8102[#], 采用双抗体夹心法建立 PG I / PG II 的双标记 TRFIA. 标准曲线由 TRFIA 检测仪自带的 Log-LogB 函数处理. PG I 可测范围为 0.2~300 $\mu\text{g/L}$, 批内和批间变异系数(CV%)分别为 5.2%和 8.1%, 平均回收率为 96.9%; PG II 可测范围为 0.05~55 $\mu\text{g/L}$, 批内和批间变异系数(CV%)分别为 7.1%和 11.7%, 平均回收率为 103.7%; 双标记 PG I / PG II-TRFIA 与 PG I-ELISA 法、PG II-ELISA 法的测定结果高度相关, 具有较好的一致性, 相关系数分别为 0.9426 和 0.9396. 检测 300 例健康人员的 PG I 为 $(157.3 \pm 51.0) \mu\text{g/L}$, PG II 为 $(10.6 \pm 5.9) \mu\text{g/L}$, PG I / PG II 比值为 $(14.8 \pm 4.3) \mu\text{g/L}$. PG I 的正常参考值范围在 55.3~259.3 $\mu\text{g/L}$ 之间, PG II 正常参考值为 <23 $\mu\text{g/L}$, PG I / PG II > 6. 双标记 PG I / PG II-TRFIA 方法的研究在国内外尚未见报道, 是一种灵敏、简便、快速、经济并可用于大批量样品筛查的方法, 有利于各种胃病的大规模普查筛选及患者病程监测.

关键词 胃蛋白酶原 I, 胃蛋白酶原 II, 双标记, 时间分辨荧光免疫分析法

学科分类号 R446.6, R392.3

胃蛋白酶原(pepsinogens, PG)是由胃黏膜组织特异性分泌的胃蛋白酶前体. 99%的 PG 释放入胃腔, 但仍有 1%进入血液, 作为血清 PG 可被检测出来. 根据分布和免疫原性不同, PG 分为 PG I、PG II 两种亚型^[1], PG I 主要由胃底腺的主细胞和颈黏液细胞分泌, PG II 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.

血清中 PG 水平可准确地反映胃黏膜的功能和组织学状况^[2], 当胃黏膜发生病变时, 血清中 PG I、PG II 的含量也随之发生改变, 因此胃黏膜不同部位的病变和严重程度可由 PG I、PG II 以及 PG I / PG II 比值的变化反映出来, 测定血清 PG I、PG II 的含量对胃部疾病的诊断有一定的临床参考价值^[3~5]. 相对于胃镜和病理活检而言, 建立灵敏、便捷的 PG 检测方法作为胃病的早期体外诊断技术非常有效^[6~10], 病人痛苦少, 简便易行, 可作为胃黏膜状况如炎症、溃疡、萎缩性变化等的指针, 筛出胃癌高危人群有利于胃癌的早期诊断以及胃癌的预防干预. 本研究采用稀土离子 Sm^{3+} 和 Eu^{3+}

为标记物, 建立 PG I、PG II 双标记时间分辨荧光免疫分析方法(PG I / PG II-dual-label TRFIA), 一次检测可同时得到血清中 PG I、PG II 以及 PG I / PG II 比值三个参数值, 克服了放射免疫分析法(RIA)、酶联免疫分析法(ELISA)只能分别测定 PG I、PG II 后再计算 PG I / PG II 比值而带来的误差积累, 特别是对提高 PG I / PG II 比值参数检测准确性具有突出的优势, 这无疑将有利于进一步促进 PG 及 PG I / PG II 比值的临床应用研究. 同时该方法可实现少量样本的快速检测, 可降低检测成本, 便于应用和推广 PG 的 TRFIA 检测技术, 满足临床大规模胃病普查的需要, 提高胃癌的早期诊率及更好地进行胃癌的术后监测.

* 江苏省科学技术厅社会发展资助项目(BS2006015).

** 通讯联系人.

Tel: 0510-85220770, E-mail: huangbiao78@hotmail.com

收稿日期: 2007-08-19, 接受日期: 2007-10-11

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

PG I 单克隆抗体(PG I McAb)8003[#] 和 8016[#]、PG II 单克隆抗体(PG II McAb)8101[#] 和 8102[#]、PG I 参考标准品、PG II 参考标准品由北京佳瑞生物技术公司提供; Eu³⁺标记试剂由 Perkin-Elmer 公司提供; 二乙烯三胺五乙酸(DTPA), 由 Sigma 公司提供; 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 SepharoseCL-6B 柱由 Pharmacia 公司提供; 96 孔板为国产聚苯乙烯板, 经羧基化处理; PG I -ELISA、PG II -ELISA 试剂盒由 Biohit 公司提供; 全自动 TRFIA 检测仪 Auto DELFIA₁₂₃₅, 由 Perkin-Elmer 公司提供; 临床血清样品来自江苏省江原医院, 其中健康对照组血样收集自未有上腹部疼痛、十二指肠功能紊乱及肝、肾疾病的健康体检人员, 十二指肠溃疡、胃溃疡、浅表性胃炎、胃癌血样收集自经电子胃镜、组织病理确诊的人员。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 固相抗体包被板的制备. 将 PG I McAb8003[#]、PG II McAb8101[#] 分别用 50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液(pH 9.6)稀释至 10 μg/L, 随后按 1:1 比例混合作为包被液, 96 孔微孔板每孔加 200 μl, 4℃放置过夜. 弃去包被液, 冲洗 3 次, 每孔加 200 μl 含 3 g/L BSA 的上述缓冲液封闭,

4℃放置过夜. 弃去封闭液, 真空抽干, 板条密封后置-20℃冷冻保存.

1.2.2 Sm³⁺- PG I McAb 的制备. 参照 Sm³⁺标记盒说明书操作. 取 PG I McAb 8016[#] 1 ml, 经 PD-10 柱转换缓冲条件, 洗脱液为含 0.155 mol/L NaCl 的 50 mmol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液(pH 8.5). 收集蛋白质峰, 浓缩至 2 g/L. 取 500 μg PG I McAb 加入含 200 μg 的 Sm³⁺-N₂-[p- 异氰酸- 苄基]- 二乙烯三胺四乙酸(Sm³⁺-DTTA)冻干粉的小瓶中, 25℃磁力搅拌反应 18 h. 反应液用 80 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.8)平衡的 Sepharose CL-6B 柱 (1 cm × 40 cm)层析, A₂₈₀ 监测收集蛋白质峰, 稀释后分装冻干, -20℃保存待用.

1.2.3 Eu³⁺- PG II McAb 的制备. 参照 Eu³⁺标记盒说明书操作, 制备步骤与 1.2.2 同.

1.2.4 测定方法(图 1). 采用夹心一步法建立 PG I /PG II 双标 -TRFIA, 即在同时包被有抗 PG I /PG II McAb 的 96 孔微孔板上, 每孔加入 25 μl PG I /PG II 参考标准(PG I: 0、10、50、100、200、300 μg/L; PG II: 0、2、5、10、30、50 μg/L)或待测血清, 再加入 200 μl Eu³⁺-PG II McAb/Sm³⁺-PG I McAb(分别 1:25 稀释), 25℃振荡孵育 2 h 后, 用洗涤液洗涤 6 次. 每孔再加增强液 200 μl, 25℃振荡反应 5 min, 荧光检测. 检测过程在 Auto DELFIA₁₂₃₅ 上完成, PG I -PG II 双标 -TRFIA 标准曲线由 Auto DELFIA₁₂₃₅ 自带的双对数函数数学模型处理给出, 软件由本实验室自编.

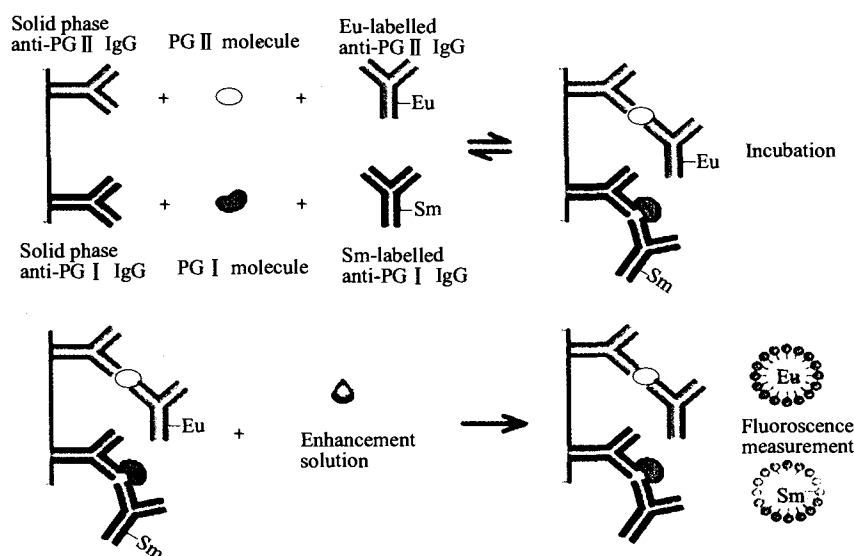


Fig. 1 Schematic illustration of dual label TRFIA for PG I and PG II

1.2.5 方法学考核.

a. 稳定性. 比较计数为最高浓度点计数的20%、50%、80%时效应点对应的浓度(ED_{20} 、 ED_{50} 、 ED_{80}), 根据长期多次测定判断剂量反应曲线的位置漂移来考核方法的稳定性.

b. 灵敏度. 考察待分析物能从检测背景中可靠地识别出的最小量或最低浓度. 以10组标准曲线零浓度点计数的平均值($\bar{x}$)和标准差(s), 求 $\bar{x} + 2s$, 从标准曲线中找到对应浓度.

c. 回收率(R). 在已知低浓度血清中加入高、中、低质控, 按检测方法测量, 计算实测值与理论值比值.

d. 特异性. 将高浓度 PG II (50 $\mu\text{g/L}$)、PG I (300 $\mu\text{g/L}$) 为被测样品, 分别检测 PG I 抗体、PG II 抗体与被测物质的交叉反应程度.

e. 与 PG I、PG II-ELISA 试剂盒的比较. 严格按照 PG I-ELISA、PG II-ELISA 试剂盒说明书操作, 与 PG I-PG II 双标-TRFIA 分别同时做50份样品.

2 结 果

2.1 Sm^{3+} 及 Eu^{3+} 标记抗体的理化和免疫学鉴定

标记抗体经 Sepharose CL-6B 层析, 收集第一

洗脱峰. 以 PE 公司提供的 Sm^{3+} 、 Eu^{3+} 标准, 稀释度为 1:100, 作为参考, PG I 标记抗体第一洗脱峰的 Sm^{3+} 含量为 43.6 $\mu\text{mol/L}$, 8016# 蛋白含量为 4.9 $\mu\text{mol/L}$, 即平均每个 8016# IgG 上连接了约 10.4 个 Sm^{3+} ; PG II 标记抗体第一洗脱峰的 Eu^{3+} 含量为 37.5 $\mu\text{mol/L}$, 8102# 蛋白含量为 6.8 $\mu\text{mol/L}$, 即平均每个 8102# IgG 上连接了 6.1 个 Eu^{3+} .

2.2 反应动力学考察

考察了 PG I /PG II 双标标准品、不同类型血清样本在不同免疫反应温度和反应时间下的荧光计数. 结果显示, 标准品、血清样本在 25 $^{\circ}\text{C}$, 大约 120 min 左右达到平衡, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 时, 大约 60 min 可达到平衡. 由于全自动机器 $\text{Auto DELFIA}_{1235}$ 设定在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行测试, 因此选择后续的测试条件为 25 $^{\circ}\text{C}$, 120 min.

2.3 双标 PG I -PG II-TRFIA 的考核

双标 PG I -PG II-TRFIA 的结果经对数函数数据处理程序处理所得的标准曲线见图 2.

2.3.1 方法的灵敏度和稳定性. 以零剂量点计数率(cps)均值($\bar{x}$)加 $2s$ 后的计数率在标准曲线上得到的相应浓度值为检测的灵敏度. 双标记 PG I /PG II-TRFIA 的灵敏度为: PG I 0.2 $\mu\text{g/L}$ 、PG II 0.05 $\mu\text{g/L}$. 10 组不同时间进行的 PG I /PG II

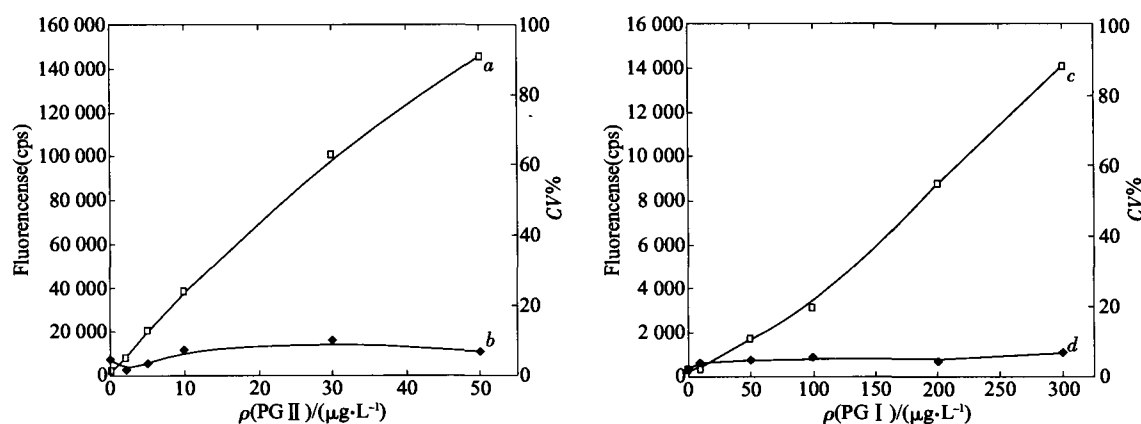


Fig. 2 Calibration curves of the dual label TRFIA for PG I and PG II, respectively

a: The calibration curve of Eu^{3+} -labeled PG II assay; b: The within-run precision of the standard of PG II; c: The calibration curve of Sm^{3+} -labeled PG I assay; d: The within-run precision of the standard of PG I.

-TRFIA 的效应点均值 ED_{80} 、 ED_{50} 和 ED_{20} 分别为: PG I (21.87 ± 0.30) $\mu\text{g/L}$, (64.32 ± 0.20) $\mu\text{g/L}$, (165.0 ± 2.9) $\mu\text{g/L}$; PG II (3.546 ± 0.200) $\mu\text{g/L}$, (8.746 ± 0.700) $\mu\text{g/L}$, (23.79 ± 1.30) $\mu\text{g/L}$, 说明剂量反应曲线的位置漂移小, 方法的稳定性好. 试剂

盒放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 7 天后测定, 各浓度点的结合率平均只下降 11%, 说明试剂盒的货架期可以满足实际应用的需要.

2.3.2 方法的特异性. 采用双标记 PG I -PG II-TRFIA 检测, PG II 浓度在 50 $\mu\text{g/L}$ 时 PG I 测定值

为 0.07 $\mu\text{g/L}$ 、PG I 浓度在 300 $\mu\text{g/L}$ 时 PG II 测定值为 0.01 $\mu\text{g/L}$ 。结果说明 PG I、PG II 之间无交叉反应，抗体的特异性很好。

2.3.3 方法的精密度和回收率。双标记 PG I /PG II -TRFIA 在 PG I 0.2 ~300.0 $\mu\text{g/L}$ 、PG II 0.05 ~

55.00 $\mu\text{g/L}$ 之间的批内和批间变异(CV%): PG I 为 5.2%和 8.1%、PG II 为 7.1%和 11.7%，符合批内 CV < 10%和批间 CV < 15%的要求，3 个添加样品的平均回收率为: PG I 96.9%、PG II 103.7%，见表 1。

Table 1 Recovery of PG I , PG II by the dual-label-TRFIA

	S/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	q/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)			M/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)			Recovery/%			Average recovery (R) /%
		q ₁	q ₂	q ₃	M ₁	M ₂	M ₃	R ₁	R ₂	R ₃	
PG I	3.42	50	100	200	48.77	105.18	198.99	913	101.7	97.8	96.9
PG II	1.37	5	10	20	6.18	11.88	23.42	97.1	104.5	109.6	103.7

S: Concentration of the sample; q: Concentration of the quality control; M: Tested concentrations of the sample.

2.3.4 临床血清样本的分析。分别用双标记 PG I /PG II -TRFIA、PG I -ELISA、PG II -ELISA 试剂盒对 50 份临床血清样本进行检测，并作比较(图 3)。从图 3 可以看出，对于 PG I， $y=0.9452x+11.5050$ ，

$r=0.9426$ ；对于 PG II， $y=0.6667x+3.2449$ ， $r=0.9396$ ，双标记 PG I /PG II -TRFIA 与 ELISA 法的测定结果高度相关，具有较好的一致性。

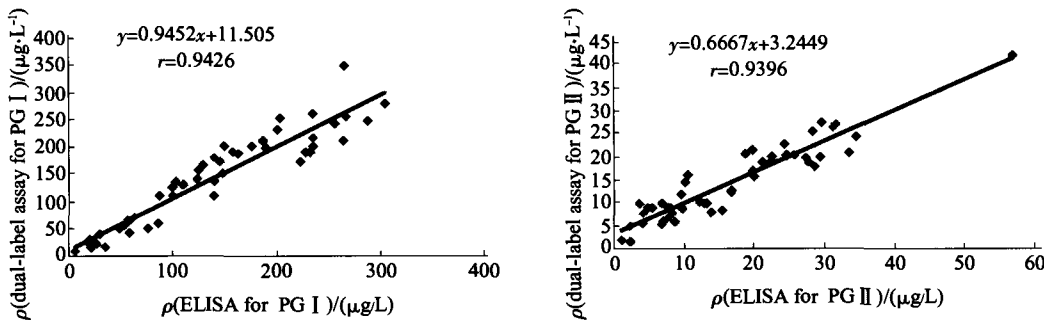


Fig. 3 Correlation between the ELISA and dual-label assay of PG I , PG II in human sera (n=50)

采用双标记 PG I /PG II -TRFIA 对 431 份血清样本进行了测定，结果见表 2。300 例健康体检人员的 PG I 为(157.3 ± 51.0) $\mu\text{g/L}$ ，PG II 为(10.6 ± 5.9) $\mu\text{g/L}$ ，PG I /PG II 比值为(14.8 ± 4.3) $\mu\text{g/L}$ 。PG I 的正常参考值以 $\bar{x} \pm 2s$ 计算，范围在 55.3 ~ 259.3 $\mu\text{g/L}$ 之间；PG II 以 $\bar{x} + 2s$ 为上限，正常血

清参考值为 PG II < 23 $\mu\text{g/L}$ ；PG I /PG II 比值以 $\bar{x} - 2s$ 为下限，正常参考值为 PG I /PG II > 6。胃溃疡、十二指肠溃疡者的 PG I 水平大大高于其他组，萎缩性胃炎的 PG I 水平、PG I /PG II 比值与健康组比较，降低显著，胃癌患者的 PG I /PG II 比值降低较为明显。

Table 2 Serum PG levels and the ratio of PG I /PG II in healthy group, duodenal ulcer, gastric ulcer, atrophic gastritis, superficial gastritis and gastric cancer

	Number	Average ages	PG I /($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	PG II /($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	PG I / PG II
Healthy volunt	300	38.5	157.3	10.6	14.8
Duodenal ulcer	22	45	268.7	24.3	11.0
Gastric ulcer	38	35	236.2	21.55	10.96
Atrophic gastritis	11	41	72.5	12.65	5.73
Superficial gastritis	56	32.5	171	12.27	13.94
Gastric cancer	4	52	110.96	29.59	3.78

3 讨 论

大量的研究报道证实，血清胃蛋白酶原 PG 水

平可准确地反映胃黏膜的功能和组织学状况，将 PG 作为反映胃黏膜状况如炎症、萎缩性变化等的生物标志物，已获得学术界和临床的一致认同。当

发生基底腺黏膜萎缩性胃炎时, 会伴随着血清 PG I 含量的下降而 PG II 水平却相当恒定, 从而使得 PG I /PG II 比值降低^[9]. 研究发现, 慢性浅表性胃炎患者血清 PG I > 240 $\mu\text{g/L}$ 发生异型增生的几率明显增加^[11]. PG I 水平及 PG I /PG II 比值能较好地反映慢性胃炎的程度^[9]. 胃癌的发生通常认为是由慢性胃炎而起, 进而发展为严重的萎缩性胃炎并伴随着肠化生, 到异型增生并最终发展为胃癌, 因而 PG I 水平及 PG I /PG II 比值可以被视作胃癌的亚临床标志物. 当发生幽门螺旋杆菌(*Hp*)感染的非萎缩性胃炎时, 血清 PG I、PG II 都会增加, 而 PG II 较 PG I 增加多, PG I /PG II 的值变小^[12, 13]. 根除 *Hp* 后 PG I、PG II 值下降而 PG I /PG II 比值升高^[12, 14], 定期进行血清 PG 的测定, 可以观察 HP 的治疗效果, 更可以了解其预后, 有目的地进行胃镜检查, 可给病人带来更多的方便. 由此可见, 血清 PG 的检测技术在 PG 的临床研究和评价中起着至关重要的作用.

对 PG 的免疫学检测, 大多采用放射免疫分析法(RIA), 在国外该方法已被 ELISA 所替代. 目前已有商品化的 ELISA 试剂盒进入国内市场, 但价格较为昂贵. 而且 ELISA 法的示踪物为酶标记, 在灵敏度和稳定性方面有所欠缺, 此外, 测量精度也不够高. TRFIA 是超微量检测领域中一项新的检测技术, 检测限在 10^{-18} mol/L, 大大高于 ELISA 的 10^{-10} mol/L 和 RIA 的 10^{-12} mol/L. TRFIA 采用非放射性镧系原子标记技术, 标记位点多, 极大地提高了方法学的灵敏度; 标记方法属原子标记, 对生物活性影响小; 激发光和发射光谱之间 Stock 位移大, 可提高方法学的稳定性; 相对长的荧光发射周期可有效避免环境因素的干扰. 此外, 不同的镧系原子具有不同的发射波长, 如: 铽(Tb^{3+}) 544 nm, 铕(Eu^{3+}) 613 nm, 钐(Sm^{3+}) 643 nm 和镝(Dy^{3+}) 572 nm, 配合荧光检测仪的时间门电路的使用, 针对不同分析物进行标记, 可实现对同一样品不同物质的多指标分析. 由于 Sm^{3+} 可与 Eu^{3+} 采用相同的含 β -萘甲酰三氟丙酮(β -NTA)增强液体系, 因而我们选择 Eu^{3+} 、 Sm^{3+} 作为示踪物进行双标记 TRFIA 分析.

采用双标记 TRFIA 技术进行血清 PG 检测, PG I 灵敏度为 0.2 $\mu\text{g/L}$ 、PG II 为 0.05 $\mu\text{g/L}$, PG I 测量范围为 0.2~300.0 $\mu\text{g/L}$ 、PG II 为 0.05~50 $\mu\text{g/L}$. 同批试剂连续的稳定性分析显示标准曲线基本重合, 无明显漂移, 非常稳定, 因而可用同

批试剂单次标准曲线作为以后分析的固定参考, 并且试剂在 4~8℃ 下贮存 12 个月性能仍然稳定, 其货架寿命可以满足实际应用的要求. PG 双标记 TRFIA 法与 PG I、PG II 酶联免疫法具有较好的相关性, 而双标记方法分析反应时间短, 仅需 2 h, 分析全过程可全自动操作, 提高了临床检验速度, 加大了检验数量, 可减轻临床的工作强度, 待检标本用量少(仅 25 μL), 且在同一测试分析体系中, 采用双标记技术同时检测, 一次测量可以得到 PG I、PG II 及 PG I /PG II 比值 3 个结果, 而 RIA 或 ELISA 只可分别测定, 再进行 PG I /PG II 比值的计算, 容易造成误差的积累. 采用双标记技术还可降低系统误差对双指标检测的影响, 也可大幅度降低人为误差, 增加检出结果的可靠性, 提高血清 PG 临床评价的准确性, 这是放射免疫法、酶联免疫法所无法达到的. 双标记 PG I -PG II -TRFIA 方法的研究在国内外尚未见报道, 本研究的临床初步应用结果与单标记 TRFIA 法、约登指数法等的研究报道一致^[15, 16], 作为一种灵敏、简便、快速、经济的可进行大批量临床样品筛查的方法, 有利于各种胃病的大规模普查筛选及患者病程的监测, 同时可解决 PG 进口试剂垄断市场且价格昂贵的问题, 具有非常好的推广应用价值.

参考文献

- 1 Miki K, Mortta M, Sasajima M, *et al.* Usefulness of gastric cancer screening using pepsinogen test method. *AM J Gastroenterol*, 2003, **98**(4): 735~739
- 2 蒋孟军, 肖志坚. 胃癌患者血清胃蛋白酶原含量的检测及临床意义. *实用癌症杂志*, 2000, **15**(1): 40~42
Jiang M J, Xiao Z J. *The Practical Journal of Cancer*, 2000, **15**(1): 40~42
- 3 孙丽萍, 袁媛. 胃蛋白酶原含量检测及其在胃疾病诊治中的应用. *世界华人消化杂志*, 2001, **9**(10): 1174~1176
Sun L P, Yuan Y. *World Chin J Digestol*, 2001, **9**(10): 1174~1176
- 4 Yamaji Y, Mitsushima T, Ikuma H, *et al.* Inverse background of *Helicobacter pylori* antibody and pepsinogen in reflux oesophagitis compared with gastric cancer: analysis of 5732 Japanese subjects. *Gut*, 2001, **49**(9): 335~340
- 5 陈智周, 范振符. 胃蛋白酶原 I、II 在早期胃癌普查中的意义. *中华肿瘤杂志*, 2002, **24**(1): 1~3
Chen Z Z, Fan Z F. *Chin J Oncol*, 2002, **24**(1): 1~3
- 6 Sippon P, Harkonen M, Alanko A, *et al.* Diagnosis of atrophic gastritis from a serum sample. *J Minerva Gastroenterol Dietol*, 2003, **49**(1): 11~21
- 7 张祥瑞, 黄飏, 朱岚, 等. 胃蛋白酶原 II 时间分辨荧光免疫分析法的建立. *标记免疫分析与临床*, 2004, **11**(2): 99~101
Zhang X R, Huang B, Zhu L, *et al.* *Labeled Immunoassays and*

- Clinical Medicine, 2004, 11(2): 99~101
- 8 黄 巍, 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(6): 492~495
Huang B, Xiao H L, Zhu L, *et al.* Chin J Microbiol Immunol, 2004, 24(6): 492~495
 - 9 Mik K, Ichinose M, Shimizu A, *et al.* Serum pepsinogens as a screening test of extensive chronic gastritis. Gastroenterol Jpn, 1987, 22(2): 133~141
 - 10 Kodoi A, Yoshihara M, Sumii K, *et al.* Serum pepsinogen in screening for gastric cancer. J Gastroenterol, 1995, 30(4): 452~460
 - 11 吕 萍, 吕海涛, 刘 静, 等. 慢性胃病患者血清胃蛋白酶原 I 水平增高的病理意义探讨. 临床荟萃, 2005, 20 (9): 497~499
Lu P, Lu H T, Liu J, *et al.* Clin Focus, 2005, 20 (9): 497~499
 - 12 Wagner S, Haruma K, Gladziwa U, *et al.* *Helicobacter pylori* infection and serum pepsinogen A, pepsinogen C, and gastrin in gastritis and peptic ulcer: significance of inflammation and effect of bacterial eradication. Am J Gastroenterol, 1994, 89(8): 1211~1218
 - 13 Asaka M, Kimura T, Kudo M, *et al.* Relationship of *Helicobacter pylori* to serum pepsinogens in an asymptomatic Japanese population. Gastroenterology, 1992, 102(3): 760~766
 - 14 Ohkusa T, Takashimizu I, Fujiki K, *et al.* Changes in serum pepsinogen, gastrin, and immunoglobulin G antibody titers in *Helicobacter pylori*-positive gastric ulcer after eradication of infection. J Clin Gastroenterol, 1997, 25(1): 317~322
 - 15 Huang B, Xiao H L, Zhang X R, *et al.* Ultrasensitive detection of pepsinogen I and pepsinogen II by a time-resolved fluoroimmunoassay and its preliminary clinical applications. Anal Chim Acta, 2006, 571(1): 74~78
 - 16 Aoki K, Misumi J, Kimura T, *et al.* Evaluation of cut-off levels for screening of gastric cancer using serum pepsinogens and distribution of levels of serum pepsinogen I, II and of PG I/PG II ratios in a gastric cancer case-control study. J Epidemiol, 1997, 7(3): 143~151

Dual-label Time-resolved Fluoroimmunoassay for Pepsinogen I and Pepsinogen II and Its Preliminary Application*

ZHANG Jue, HUANG Biao**, ZHU Lan, ZHANG Yi, LIU Hai-Yan, MA Zhi-Hong, GUO Li-Ning

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

Abstract A dual-label time-resolved fluoroimmunoassay was established for simultaneously detecting pepsinogen I (PG I) and pepsinogen II (PG II) in human serum. Two capture monoclonal antibodies, 8003[#] of PG I and 8101[#] of PG II, were co-coated in 96 microtitration wells. The counterpart tracer monoclonal antibodies, 8016[#] of PG I and 8102[#] of PG II, were labeled with Eu³⁺ and sm³⁺-chelates, respectively. The samples were assayed by one-step sandwich protocol with the time-resolved fluorometry. The measurement ranges of PG I were 0.2~300.0 μg/L with the within-run and between-run precision was 5.2% and 8.1%, and that of PG II were 0.05~55.0 μg/L with the within-run and between-run precision was 7.1% and 11.7%, respectively. The average recovery rates of PG I and PG II were 96.9% and 103.7%, respectively. The results obtained by the dual-label assay agreed well with those by enzyme-linked immunosorbent assays of PG I and PG II, whose correlation ratio were 0.9426 of PG I and 0.9396 of PG II, respectively. The means of 300 healthy volunteers were (157.3 ± 51.0) μg/L for serum PG I, (10.6 ± 5.9) μg/L for serum PG II, and (14.8 ± 4.3) for the PG I/PG II ratio. The normal ranges of serum PG I levels for healthy volunteers were 55.3~259.3 μg/L, those of serum PG II levels were less than 23 μg/L, the PG I/PG II ratio was more than 6. The proposed dual-label TRFIA for simultaneous detection of PG I and PG II is a simple, sensitive, and rapid method. It could provide serology high-screening of the samples for gastric diseases and would allow investigations into the possible diagnostic value of analysis in various clinical condition.

Key words pepsinogen I, pepsinogen II, dual-label, time-resolved fluoroimmunoassay

*This work was supported by a grant from The Program of Social Development from Jiangsu Science and Technology Department, China(BS2006015).

**Corresponding author.

Tel: 86-510-85220770, E-mail: huangbiao78@hotmail.com

Received: August 19, 2007 Accepted: October 11, 2007