

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.21.002

可视化检测技术测定前列腺特异抗体的应用*

李 敏, 韩笑杰

(浙江工业大学药学院, 杭州 310014)

摘要:目的 通过改良酶联免疫吸附试验(ELISA)信号放大系统,实现前列腺特异抗体(PSA)的可视化检测。方法 应用 H_2O_2 与氯金酸反应生成纳米金的原理,当 H_2O_2 减少时,纳米金粒径变大,导致吸收波长改变,颜色从红色变为蓝色。结果 实验首先确定了产生颜色变化的 H_2O_2 临界值是 $100 \mu\text{mol/L}$ 。在测定 PSA 的 ELISA 双抗体夹心法的最后一步,利用链霉亲和素-HRP 消耗 H_2O_2 ,导致 H_2O_2 低于临界值 $100 \mu\text{mol/L}$,检测液从红色变为蓝色。结论 应用可视化检测技术,可检测到的 PSA 最低水平为 0.1 ng/mL 。可视化检测技术具有灵敏度高,操作方便,无需仪器等优点,值得推广。

关键词: 纳米金; 过氧化氢; 前列腺特异抗体; 酶联免疫吸附试验

中图分类号: R931.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)21-3168-03

Application of visual detection technique in the determination of prostate specific antigen*

LI Min, HAN Xiaojie

(School of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310014, China)

Abstract: Objective Visual detection of prostate specific antigen (PSA) was carried out by improving ELISA signal amplification system. **Methods** The principle is the formation of gold nanoparticle by the reaction of H_2O_2 with gold chloride trihydrate. When H_2O_2 was reduced, the size of gold nanoparticle becomes larger, resulting in the change of absorption wavelength, and the color changes from red to blue. **Results** Firstly, the critical value of H_2O_2 for color change was determined to be $100 \mu\text{mol/L}$. In the final step of ELISA assay for PSA, H_2O_2 was consumed by streptavidin-HRP, resulting in H_2O_2 below $100 \mu\text{mol/L}$, so the solution changed from red to blue. **Conclusion** By using visual detection technology, minimum detection limit of PSA was 0.1 ng/mL . Visual detection technology has the advantages of high sensitivity, convenient operation, no need for instruments, etc., and is worth promoting.

Key words: gold nanoparticle; hydrogen peroxide; prostate specific antigen; ELISA

前列腺特异抗体(PSA)是一种 hKlk3 基因编码,由前列腺上皮细胞分泌的单链糖蛋白,主要被分泌到前列腺液中,水解精液凝固蛋白,使精液化。PSA 在前列腺中水平较高,在血清中水平则较低。前列腺癌患者的血清中可检测到较正常值略高的 PSA。PSA 作为前列腺癌的肿瘤标志物,对于前列腺癌的预防、治疗和预后有重要作用。使用酶联免疫吸附试验(ELISA)双抗体夹心法检测技术,目前从男性血清中可检测到 $0\sim 4 \text{ ng/mL}$ 的 PSA,当 PSA 水平更低时,由于 ELISA 信号检测灵敏度较低,就无法检测。本研究改良 ELISA 最后一步的信号放大系统,使信号发生与过氧化氢减少导致的纳米胶体金颜色的变化联系在一起,实现用肉眼来观测检测结果。由于应用了纳米技术,使检测信号更加灵敏。

1 材料与方法

1.1 材料

实验使用的生化试剂三水合氯金酸、

$30\% H_2O_2$ 、蔗糖、BSA 均购于生工生物工程(上海)有限公司。ELISA 缓冲液购于生工生物工程(上海)有限公司。PSA 标准品购于 Sigma-Aldrich 公司。ELISA 使用的鼠抗 PSA 单克隆抗体、兔抗 PSA、生物素修饰羊抗兔 IgG 和链霉亲和素-HRP 均购于生工生物工程(上海)有限公司。实验使用的 SC-T45 分光光度计购自光量国际贸易有限公司。

1.2 方法

1.2.1 纳米金胶体颜色变化的 H_2O_2 临界值研究

H_2O_2 是一种既具有氧化性,又具有还原性的物质。 H_2O_2 具有强氧化性,充足的 H_2O_2 可以将氯金酸中的金离子还原为纳米金颗粒,纳米金粒径较小,分布均匀,反应液呈红色。 H_2O_2 制备纳米金的反应是可逆的。当反应液中的 H_2O_2 水平降低时,已经形成的纳米金胶体会发生聚集,形成较大颗粒,其折射光线的的能力瞬间发生改变,溶液就会从红色转变为蓝色。

* 基金项目:浙江省分析测试科技计划项目(2015C37050)。

作者简介:李敏,女,副教授,主要从事肿瘤标志物检测技术的研究。

由于纳米金颜色的转变取决于纳米金颗粒的大小,极微弱的 H_2O_2 水平改变就会导致纳米金颗粒大小的变化,从而导致颜色的变化。测定导致颜色发生瞬变的 H_2O_2 临界值水平,是实现可视化检测的关键步骤。

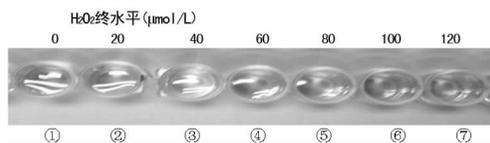
实验全过程都需要添加胶体金颗粒的保护剂,以维持胶体金的稳定。实验选取蔗糖作为保护剂,研究 H_2O_2 产生纳米金颜色变化的临界值。具体方法:将三水合氯金酸溶解在蔗糖(0.2 mmol/L, pH6.5)中,制备 0.1 mmol · L⁻¹ · L⁻¹ 的氯金酸溶液。酶标板用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,然后用去离子水洗 2 次,在酶标板中加入不同水平的 H_2O_2 ,使终水平为 0、20、40、60、80、100、120 $\mu\text{mol/L}$,每个相邻孔的差值在 20 $\mu\text{mol/L}$ 。然后在酶标板每个孔中加入 0.1 mmol/L 的氯金酸溶液。该方法研究 H_2O_2 导致变色的临界水平和差值,评价检测系统的可行性和灵敏度。孔中的样品显色后,用光度计测定每个孔中液体的最大吸收波长。纳米金胶体在稳定的状态下,最大吸收波长在 550 nm,呈现红色。当纳米金发生聚集,颗粒变大时,最大吸收波长会发生红移,波长将大于 550 nm。临界值认定为 H_2O_2 的终水平(加入等体积氯金酸后稀释 1 倍),而不是加入量。

1.2.2 前列腺癌标志物 PSA 的可视化检测 H_2O_2 水平的改变可以引起纳米金颜色的改变,获得 H_2O_2 临界值核心数据后,即可设计 PSA 的可视化检测方法。前面的步骤与 ELISA 双抗体夹心方法一致。在最后的信号放大时,当测试样品有 PSA 时,处于临界值的 H_2O_2 会被链霉亲和素-HRP 消耗,与 H_2O_2 水平密切相关的纳米金粒径发生改变,颜色就会从红色变为蓝色,实现 PSA 的可视化检测。操作方法:96 孔酶标板加入鼠抗 PSA 的单克隆抗体 100 μL ,用 PBS 按照 1 : 1 000 稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 包埋过夜。洗涤液洗板 3 次后,用封闭液[标准蛋白质溶液(BSA)溶解于 PBS],室温封闭 1 h。洗涤液洗板 3 次,加入用 BSA 稀释的不同水平 PSA 标准品 100 μL ,室温反应 2 h。洗涤液洗板 3 次,加入兔抗 PSA,用封闭液稀释 1 : 1 000,室温反应 2 h。洗涤液洗板 3 次,加入生物素修饰羊抗兔 IgG 100 μL ,用封闭液稀释 1 : 1 000,室温反应 1 h。洗涤液洗板 3 次,加入链霉亲和素-HRP 结合物 100 μL ,用封闭液稀释 1 : 1 000,室温反应 30 min。洗涤液洗 3 次,PBS 洗 2 次,去离子水洗 2 次,加入 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 100 μL ,室温反应 30 min 后,加入新鲜配制的 0.1 mmol · L⁻¹ · L⁻¹ 氯金酸溶液 100 μL 。30 min 后,观察酶标板孔中的颜色变化。PSA 标准品的稀释水平为 10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰、10⁻¹¹、10⁻¹² g/mL。实验对照品为 BSA,操作步骤与 PSA 的一致。

2 结 果

2.1 H_2O_2 临界值的测定 当 H_2O_2 水平高于 100

$\mu\text{mol/L}$ 时,孔中溶液呈现红色,其最大吸收波长经测定在 550 nm 左右,见图 1。当 H_2O_2 水平小于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,肉眼可以清晰辨认为蓝色,其最大吸收波长发生红移,经测定在 580 nm 左右,见表 1。



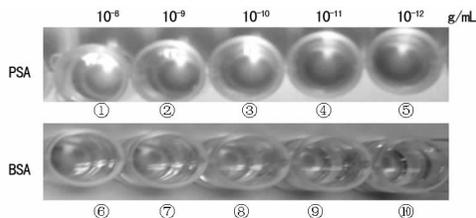
注:①~⑤实际为红色;⑥~⑦实际为蓝色

图 1 不同 H_2O_2 水平反应的胶体金颜色转变

表 1 不同 H_2O_2 水平反应的胶体金的光学性质研究

序号	H_2O_2 加入水平($\mu\text{mol/L}$)	H_2O_2 终水平($\mu\text{mol/L}$)	颜色	波长(nm)
1	0	0	无	0
2	40	20	无	0
3	80	40	无	0
4	120	60	蓝色	580
5	160	80	蓝色	580
6	200	100	红色	550
7	240	120	红色	550

2.2 前列腺癌标志物 PSA 的测定 通过检测不同的 PSA 水平,发现当 PSA 水平为 10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰ g/mL 时,都显示出蓝色,当水平为 10⁻¹¹、10⁻¹² g/mL 时,显示红色,见图 2。以 BSA 作为对照,所有水平结果均显示为红色。



注:①~③实际为红色;④~⑩实际为蓝色

图 2 PSA 可视化检测结果

3 讨 论

本实验结果表明,当 H_2O_2 水平高于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,加样孔中的氯金酸在 H_2O_2 的还原作用下,全部都转变为稳定的胶体金颗粒,呈现红色,其最大吸收波长经测定在 550 nm 左右。当 H_2O_2 水平小于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,肉眼可以清晰辨认为蓝色,其最大吸收波长发生红移,经测定在 580 nm 左右。因此确定发生颜色变化的 H_2O_2 临界值为 100 $\mu\text{mol/L}$,实现颜色转变的差值为 20 $\mu\text{mol/L}$,差值的水平区间很小,提示新型检测方法的灵敏度较高。 H_2O_2 临界值的测定为设计可视化检测方法,提供了重要的数据支持。使用双抗体夹心法对 PSA 进行检测,前期步骤与常规 ELISA 相同,在最后一步的显色反应中,用辣根过氧化物酶去作用处于显色临界值的 H_2O_2 。这样,如果检测体系中存在 PSA,检测系统就会存在消耗 H_2O_2 ,

微量 H_2O_2 水平的改变就会引起颜色变化。表明该种检测方法的 PSA 最低检测限为 10^{-10} g/mL, 比目前临床上使用的 PSA ELISA 试剂盒灵敏度要高。由于检测系统应用了双抗体夹心法, 包埋抗体为抗 PSA 的单克隆抗体, 检测的准确率也较高。可视化检测技术的最大优点是无需使用酶标仪, 直接用肉眼就可以对结果进行观察, 适用于普通实验室。

肿瘤的早期检测是治愈肿瘤的最佳手段^[1-2]。在临床上, 肿瘤标志物 PSA 的检测对前列腺癌的早期诊断、治疗和预后具有重要的意义^[3-6]。目前使用的 ELISA 试剂盒检测血清 PSA 水平灵敏度较低, 有假阳性、倒钩现象, 这些缺陷都是使用酶标仪引起的^[7-8]。HAESE 等^[9]在临床上检测 PSA, 应用普通 ELISA 技术, 可以检测的 PSA 水平为 4 ng/mL。KOBORI 等^[10]在临床上检测 PSA, 应用普通 ELISA 技术, 可以检测的 PSA 水平为 2 ng/mL。本文所构建的可视化检测系统可以作为检测 PSA 的有效检测方法, 其检测灵敏度达到 0.1 ng/mL, 要比 HAESE 等^[9]和 KOBORI 等^[10]的检测结果灵敏 20~40 倍。可视化检测技术无需使用酶标仪, 因此克服了由酶标仪引起的 ELISA 倒钩、假阳性等检测缺陷。可视化检测技术由于不需使用昂贵的检测仪器, 通过肉眼观察颜色改变判定检测结果, 具有操作简单, 灵敏度高, 检测费用低等优点。改变的颜色色系为从红色变为蓝色。未超标样品的检测结果为红色, 如果样品中的肿瘤标志物超标, 则呈现蓝色。红色转变为蓝色肉眼极易察觉。因此, 这是一种设定了某个标准值后, 界定是否超标的检测技术。当需要调整标准值时, 只需对样品的稀释度进行调整就可以。当然, 该方法也具有一定的局限性, 该方法只能针对最低检测限度做出定性的检测, 而不能对单一样品的水平进行精确的测定。

肿瘤标志物可视化检测技术只需肉眼观察就可判断结果, 无需使用仪器, 检测成本低, 可以应用于贫困地区及条件差的实验室。该项技术应用纳米材料的颜色变化来设计信号传递方式。这种基于纳米反应的生物信号传递方式较 ELISA 发光机制能使生物信号最大限度地放大。因此, 肿瘤标志物可视化检测技术灵敏度极高, 某些由于水平低而无法检测的肿瘤标志物可以被测定, 为检测多种肿瘤的肿瘤标志物复合物筛查创造条件。已能检测的肿瘤标志物当提高检测灵敏度后, 肿瘤标志物检测水平可以进一步降低, 使已经发生肿瘤但由于肿瘤标志物水平低而检测为假阴性的患者, 能够在肿瘤早期做出诊断, 减少假

阴性的发生率。

综上所述, 肿瘤标志物可视化检测技术操作简单, 费用低, 可广泛应用于贫困地区居民和普通人群的肿瘤筛查, 从而大幅度提高我国肿瘤早期诊断率, 使大量肿瘤患者能在早期得到有效治疗, 延长生存时间, 为真正征服恶性肿瘤带来希望。该项技术既能提高公民的健康水平和生活质量, 又能节约国家医疗资源和投入, 具有较好的社会效益。

参考文献

- [1] 马玉, 马雅静, 李旭哲, 等. 健康体检人群肿瘤标志物的异常状态: 分子水平肿瘤早期筛查的临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(1): 12-16.
- [2] 李林海. 常见肿瘤标志物的临床应用及进展[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(12): 995-998.
- [3] 谢冲, 黄其伟, 王国民, 等. 多种肿瘤标志物联合前列腺特异性抗原检测在前列腺癌诊断中的价值[J]. 中华泌尿外科杂志, 2015, 36(3): 204-206.
- [4] 褚靖, 谢群, 杨信, 等. 不同 PSA 相关肿瘤标志物在前列腺癌中的诊断价值[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(13): 2123-2124.
- [5] 赵乔妹, 时宇, 张静, 等. 联合检测 F-PSA、T-PSA 及 F-PSA/T-PSA 比值在前列腺疾病诊断中的意义[J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 6(22): 487-489.
- [6] 王伟, 李传刚, 刘辉, 等. 前列腺特异性抗原对前列腺癌诊断价值的探讨[J]. 中国医科大学学报, 2016, 45(1): 61-62.
- [7] 高吟. 探讨 ELISA 法乙肝表面抗原弱阳性标本的复检对策及意义[J]. 中国保健营养, 2016, 8(2): 360-361.
- [8] 刘凤兰, 杜立新. 浅谈用酶联免疫法与胶体金法检测乙肝表面抗原的优缺点[J]. 当代医药论丛, 2015, 13(11): 47-48.
- [9] HAESE A, DWO RSCHACK R T, PARTIN A W. Percent free prostate specific antigen in the total prostate specific antigen 2 to 4 ng/mL range does not substantially increase the number of biopsies needed to detect clinically significant prostate cancer compared to 4 to 10 ng/mL range[J]. J Urol, 2002, 168(2): 504-508.
- [10] KOBORI Y, KITAGAWA Y, MIZOKAMI A, et al. Free-to-total prostate-specific antigen (PSA) ratio contributes to an increased rate of prostate cancer detection in a Japanese population screened using a PSA level of 2.1-10.0 ng/mL as a criterion[J]. Int J Clin Oncol, 2008, 13(3): 229-232.

(收稿日期: 2018-01-14 修回日期: 2018-05-06)