

特征光谱吸收法测量人血清前列腺特异性抗原浓度的研究

朱健铭^{1,2}, 陈真诚²

1. 中南大学地球科学与信息物理学院, 湖南 长沙 410083

2. 桂林电子科技大学生命与环境科学学院, 广西 桂林 541004

摘要 采用免疫层析金标试纸配合特征光谱吸收法检测前列腺特异性抗原(PSA, prostate-specific antigen)浓度,采用合适发射光波长(520~535 nm)的LED照射已用PSA标准液处理过的胶体金标记试纸,用合适接收波长(520~540 nm)的光电二极管测试试纸特定区域的反射光强度,据此得出表征试纸吸光的量,再用线性拟合方法确定PSA浓度与试纸吸光度的关系。研究中采用不同浓度的PSA标准液标定了实验检测系统,发现在浓度范围为5~50 ng·mL⁻¹时,PSA的浓度与试纸的吸光度成线性关系。在该浓度范围内对不同于标定浓度的21种PSA标准液做了检测实验,检测值与真实值的相关系数为0.910。实验证明,采用特征光谱吸收法测量PSA浓度的方法是可行的。

关键词 前列腺特异性抗原; 光谱吸收; 金标试纸; 免疫层析法

中图分类号: TP212.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2012)01-0196-04

引言

前列腺癌是中老年男性常见的恶性肿瘤之一,在发病早期一般没有明显的临床症状,病程发展较慢,往往难以被患者觉察^[1]。近年来,随着人民生活水平的提高,逐渐西化的饮食习惯以及工作压力的增大,我国前列腺癌发病率出现显著上升趋势^[2]。治愈肿瘤的关键是早期诊断,而PSA是临床上使用较多的用于前列腺癌诊断的肿瘤标志物之一^[3-8]。

早期前列腺癌的血清标志物检查通常是采用PSA和PAP(前列腺酸性磷酸酶),患者需到医院通过化学发光免疫分析仪采血检测。此法检测费用较高,没有明显临床症状的患者往往忽略了此项检查,因此不适合用作筛查手段。国内外许多学者都致力于研究PSA的检测方法及其对前列腺癌早期诊断的价值^[9-14],但这些检测手段都较为复杂,不适合家庭应用。本文提出了一种采用特征光谱检测金标试纸上PSA浓度的方法,用PSA标准液做了检测实验,检测准确度高,有望用于人血清PSA检查。

1 检测原理

20世纪90年代出现了一种采用胶体金标记的免疫检测方法,即免疫层析法(Immunochromatography)。由于此法检

测速度快,准确度高且容易实现,故在体液检测中得到了广泛应用^[15-17]。如图1所示是采用免疫层析法检测人血清PSA浓度的基本原理。将适量含有PSA的血清滴在胶体金标记的免疫层析试纸上,试纸上被胶体金标记的PSA单克隆抗体与血清中的PSA特异性结合,形成免疫复合物。在层析作用下,它们向试纸末端移动,并在途中与T区(测试区)和C区(控制区)的PSA多克隆抗体反应并显色。

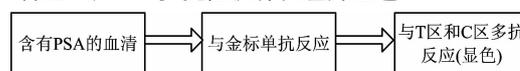


Fig. 1 Schematic of the principle of immunochromatography

根据试纸上T区和C区的显色情况,检测结果可以分为三类,分别是:(1)C区不显色,表示试纸已过期或失效;(2)C区显色,T区不显色,表示血清中没有PSA;(3)C区显色,T区也显色,表示血清中有PSA,T区颜色的深浅与PSA浓度的高低有关。

特征光谱吸收法^[18,19]的检测原理是采用合适波长范围的光照射未用PSA处理的胶体金标记免疫试纸,照射光波长应根据胶体金粒径分布状况来选择,通常在520~535 nm范围内。一部分照射光被试纸吸收,再用合适波长范围的光电二极管测试反射光强度,光电二极管的光谱响应范围应包含照射光的波长范围且具有较高的响应灵敏度。记录此时光电二极管的输出信号M1,然后用同样方法检测用PSA标准

收稿日期: 2011-01-15, 修订日期: 2011-05-16

基金项目: 国家(863计划)重点项目(2007AA022006)资助

作者简介: 朱健铭, 1984年生, 中南大学地球科学与信息物理学院博士研究生 e-mail: zjmcsu@126.com

液处理过的试纸, 测量得到光电二极管的输出信号 M_2 。 M_1 与 M_2 的差值 ΔM 应正比于被固定在 T 区中被胶体金标记的免疫复合物的浓度。通过大量实验, 采用拟合方法可确定 ΔM 与 T 区免疫复合物浓度的关系, 即能进而确定样品中 PSA 浓度。

2 检测系统组成

依据上述检测原理, 设计出的检测系统如图 2 所示, 包含前置信号采集模块、信号处理模块、输入输出模块和微处理器模块等。前置信号采集模块包括检测暗室、恒流源、发光二极管和光电二极管。信号处理模块完成光电二极管输出信号的电流-电压转换、滤波和放大等。微处理器模块完成信号的 A/D 转换, 数据处理, 结果计算等。输入输出模块包含键盘输入、液晶显示、闪存等子模块, 完成系统功能控制、检测结果显示和数据存储等功能。

检测过程中需防止灯光和自然光的干扰, 故前置信号采集模块中的发光二极管、光电二极管和试纸的检测区域均需置于暗室中。该暗室要具有较好的避光性能且方便检测操作。为此在系统电路板上用黑色 PVC 材料制作了一个 $12\text{ mm} \times 12\text{ mm} \times 64\text{ mm}$ 的长方体暗室, 如图 3 所示, 整个暗室分为 5 个子暗室, 用 4 块厚为 1 mm 的隔板 2 隔开, 每个子暗室的大小均为 $12\text{ mm} \times 12\text{ mm} \times 12\text{ mm}$ 。

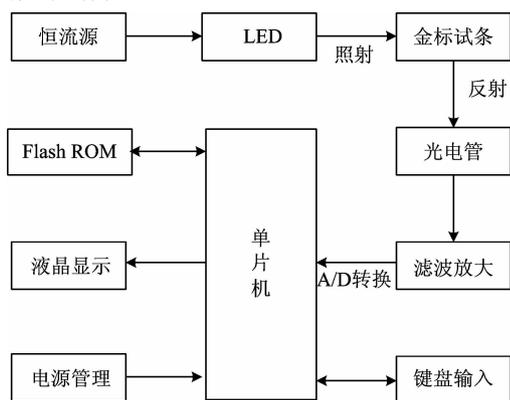


Fig. 2 Block diagram of measuring system

暗室的侧面有一个 $10\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 的开口 1, 用于将试纸插入暗室, 4 个隔板上也有大小相同, 位置一致的开口 3, 这样能使试纸水平插入暗室。所有的开口均用黑色丝绒填充, 以防止外界光线进入以及每个子暗室内的光线相互干扰, 填充度以方便试纸插入为宜。中间 3 个子暗室是检测室, 供检测试纸的特定区域用, 两端的子暗室是隔离室, 可以更好地隔离外界光进入检测室。发光二极管 4 和光电二极管 5 在电路板上的位置如图 4 所示, 3 个检测室均安装有独立的一对发光二极管和光电二极管, 目的是能够独立检测试纸相应区域的吸光度, 防止交叉干扰。试纸从侧面开口 1 插入暗室内, 遮盖了暗室顶部, 发光二极管发射的光部分被试纸上的胶体金和背景吸收, 剩余的光反射回来被底部的光电二极管吸收, 形成光电流。如图 5 所示是制作的检测系统样机实物图。

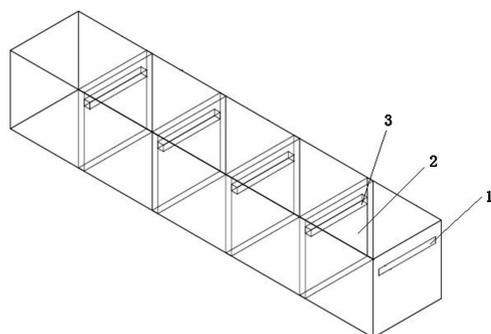


Fig. 3 3D view of measuring darkroom

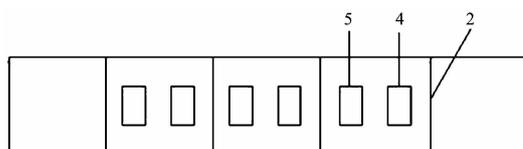


Fig. 4 Fixing schematic of components in measuring darkroom

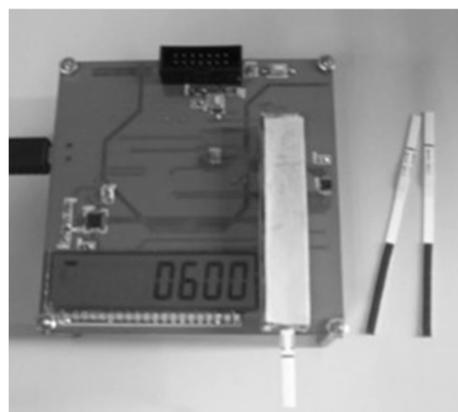


Fig. 5 Frontal view of measuring system prototype

3 数据处理

数据处理是整个系统检测准确与否的关键环节, 包含检测系统标定和检测算法两个部分, 其流程图分别如图 6(a) 和 (b) 所示。

根据图 6(a) 的检测系统标定流程, 其算法实现如下:

- (1) 控制环境温度和湿度恒定, 标定时环境温度 21°C , 湿度 74% ;
- (2) 采集未用 PSA 标准液处理的试纸数据 20 组, 校正后求得其均值 s ;
- (3) 配制 20 种不同浓度的 PSA 标准液, 每种浓度的标准液点样 20 条试纸, 待其完全反应后放入干燥箱干燥待用;
- (4) 取出一组浓度相同的 20 条试纸分别采集数据并校正, 获得 20 个数据的均值 a_1 , 用同样的方法测得其余 19 组数据的均值 a_2, a_3, \dots, a_{20} ;
- (5) a_1, a_2, \dots, a_{20} 构成样本向量 \mathbf{A} , 求得差值向量 $\mathbf{B} = \mathbf{A} - s$;

图 6 对 **B** 中数据作线性拟合^[20-24], 可以得到浓度 c 和吸光度 x 的关系 $c=ax+b$ 。

根据图 6(b) 的检测算法流程, 其算法实现如下:

(1) 多次采集点样试纸数据并校正, 得其均值 t , 令 $x=t-s$;

(2) 将 x 代入 $c=ax+b$ 中, 求得浓度 c 。

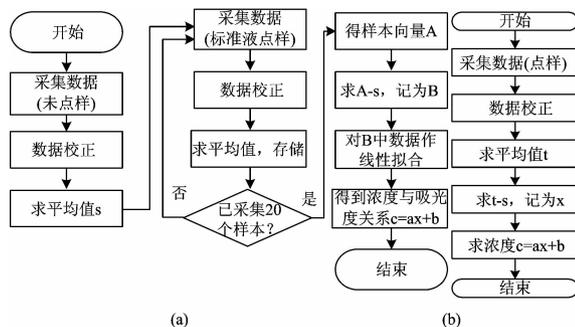


Fig. 6 Flow chart of system calibrating algorithm (a) and measuring algorithm (b)

拟合情况, 相关系数 R 达到了 0.910。可以看到有 6 组检测值非常接近真实值, 有少数几组检测值与真实值的偏差较大, 这可能是试纸显色不均一或试纸的一致性不好造成的。

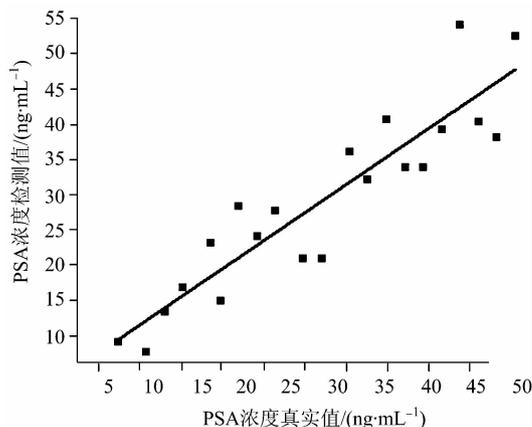


Fig. 7 Experiment results of the concentrations of PSA

4 实验结果

采用 21 种浓度不同的 PSA 标准液 (浓度范围为 $5 \sim 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 且与标定时使用的 PSA 标准液浓度均不同) 做了检测实验, 检测时环境温度 $19 \sim 21 \text{ }^\circ\text{C}$, 湿度 70% 。先用未用 PSA 处理过的试纸采集 5 次数据并校正, 求得平均背景值, 然后点上 PSA 标准液, 完全反应干燥后, 再分别采集 T 区和 C 区数据, 最后用标定得出的公式 $c=ax+b$ 计算出 PSA 浓度值。如图 7 所示, 这是 PSA 浓度检测值与真实值的

5 结论

对特征光谱吸收法测量人血清 PSA 浓度进行了研究并制作了检测系统样机。采用不同浓度的 PSA 标准液标定了系统, 并用 21 种均与标定浓度不同的 PSA 标准液做了检测实验, 检测值与真实值的相关系数达到了 0.910。实验证明, 采用特征光谱吸收法测量 PSA 浓度是可行的。由于时间仓促, 还未用病人血清做更多的临床实验, 下一步的主要工作是直接用含有 PSA 的血清做实验, 进一步完善检测系统。

References

- [1] WANG Zhao-xia, WANG Yan, ZHANG Wei-dong (王朝霞, 王燕, 张维东). The Practical Journal of Cancer (实用癌症杂志), 2009, 24(2): 205.
- [2] Lane J A, Hamdy F C, Martin R M, et al. European Journal of Cancer, 2010, 46(17): 3095.
- [3] JI Guo-yi, WANG Wei-hua, ZHAO Wei, et al (计国义, 王伟华, 赵微, 等). Chinese Journal of Laboratory Diagnosis (中国实验诊断学), 2009, 13(1): 100.
- [4] Kang D Y, Jang Y H, Lee J H, et al. Current Applied Physics, 2009, 9(2): 33.
- [5] Cao C, Li X, Lee J, et al. Biosensors and Bioelectronics, 2009, 24(5): 1292.
- [6] Kumar V M, Hassan M I, Singh A K, et al. Clinica Chimica Acta, 2009, 403(1-2): 17.
- [7] PAN Gao-yun, XIA Jian-ke, ZHU Zhang-qian, et al (潘高云, 夏建克, 朱张茜, 等). Chinese Primary Health Care (中国初级卫生保健), 2010, 24(2): 126.
- [8] CHEN Xi, SONG Wei-hua (陈曦, 宋卫华). Labeled Immunoassays and Clinical Medicine (标记免疫分析与临床), 2010, 17(1): 46.
- [9] Schalken J A. European Urology Supplements, 2009, 8(3): 97.
- [10] Vugt H A, Roobol M J, Venderbos L D, et al. European Journal of Cancer, 2010, 46(3): 669.
- [11] Hara N, Koike H, Nobushita T, et al. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, 2010, 28(4): 355.
- [12] Dwek M V, Jenks A, Leatham A. Clinica Chimica Acta, 2010, 411(23-24): 1935.
- [13] Korfage I J, Bergh R, Essink M L. European Journal of Cancer, 2010, 46(17): 3073.
- [14] Osman N I, Chow K, Ng W, et al. British Journal of Medical and Surgical Urology, 2010, 3(4): 167.
- [15] Matapatara W, Likitthanaset M. Journal of Biotechnology, 2010, 150(1): 426.
- [16] Byzova N A, Zvereva E A, Zherdev A V, et al. Talanta, 2010, 81(3): 843.
- [17] Gimeno C, Costa E, Navalpotro D, et al. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2010, 68(1): 80.
- [18] CHEN Zhen-cheng, ZHU Jian-ming (陈真诚, 朱健铭). Journal of Guilin University of Electronic Technology (桂林电子科技大学学报),

- 2010, 30(5): 497.
- [19] LI Hui, LIN Qi-zhong, WANG Qin-jun, et al(李 慧, 蔺启忠, 王钦军, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2010, 30(9): 2433.
- [20] Emery X. Computers & Geosciences, 2010, 36(9): 1150.
- [21] Dornheim H, Brazauskas V. Journal of Statistical Planning and Inference, 2011, 141(4): 1422.
- [22] Strobach P. Journal of Computational and Applied Mathematics, 2011, 235(9): 3033.
- [23] CHEN Zhen-cheng, JIN Xing-liang, ZHU Jian-ming, et al(陈真诚, 金星亮, 朱健铭, 等). J. Cent. South Univ. Technol. (中南大学学报·自然科学版), 2009, 16: 982.
- [24] ZHU Jian-ming(朱健铭). Changsha: Central South University(长沙:中南大学), 2010, 6: 35.

Research on Serum Prostate-Specific Antigen Measurement by Characteristic Spectral Absorption Method

ZHU Jian-ming^{1, 2}, CHEN Zhen-cheng²

1. School of Geosciences and Info-Physics, Central South University, Changsha 410083, China

2. School of Life and Environmental Sciences, Guilin University of Electronic Technology, Guilin 541004, China

Abstract A serum prostate-specific antigen (PSA) measurement method was studied using immunochromatography-based colloidal gold-marked test-strips and characteristic spectral absorption method. Some LEDs in the range from 520 to 535 nm irradiated the test-strips sampled by PSA, and then a photodiode in the range from 520 to 540 nm measured the reflex light at the specific area. Accordingly, the absorbency of the strip could be calculated, then the relationship between PSA level and strip absorbency could be ascertained by linear fit method. The experimental measurement system was calibrated by different PSA standard solutions in this research. As a result, in the range between 5 to 50 ng · mL⁻¹, the levels of PSA have a linear relationship with the absorbency of test-strips. Some experiments were completed by 21 different PSA standard solutions within that range, and then the correlation coefficient of the results is equal to 0.910, which proves that the proposed method for serum PSA level measurement is feasible.

Keywords Prostate-specific antigen; Spectral absorption; Colloidal gold-marked test-strip; Immunochromatography

(Received Jan. 15, 2011; accepted May 16, 2011)