

论著

文章编号:1000-5404(2013)06-0500-04

基于纳米金探针和蛋白芯片高灵敏检测肺癌 CEA 和 CYFRA21-1 标志物

王文涛¹, 贾春平², 金庆辉², 赵建龙², 张国俊¹ (450052 郑州, 郑州大学第一附属医院呼吸内科¹; 200050 上海, 中国科学院上海微系统与信息技术研究所²)

[摘要] **目的** 构建基于纳米金探针和蛋白芯片的快速、多肿瘤标志物高灵敏检测体系。**方法** 将待检测的肿瘤标志物捕获抗体(捕获待测抗原)结合在醛基化修饰的玻璃片上;用检测抗体制备纳米金探针;经过免疫反应形成三明治夹心结构(蛋白芯片-目标蛋白-纳米金探针)。利用纳米金沉积的方法进行染色,通过肉眼或显微镜观察显色结果。**结果** 该蛋白检测体系在1 h内可检测两种肿瘤标志物,其中CEA可检测到最低浓度为45 pg/mL, CYFRA21-1可检测到90 pg/mL,与传统的酶联免疫吸附法(ELISA)相比,检测灵敏度大大提高。并利用此体系,检测肺癌患者及正常人血清,结果与临床所用电化学分析方法一致。**结论** 该检测体系操作简单、方便、快速,同时具有高灵敏度、多指标联合检测等优点,在临床蛋白检测中具有重要的价值和应用前景。

[关键词] 纳米金探针;蛋白芯片;纳米金沉积;肿瘤标志物;肺癌

[中图分类号] R318;R730.4;R734.2

[文献标志码] A

Highly sensitive detection of tumor markers CEA and CYFRA21-1 for lung cancer based on gold nanoparticle probes and protein chip

Wang Wentao¹, Jia Chunping², Jin Qinghui², Zhao Jianlong², Zhang Guojun¹ (¹Department of Respiratory Medicine, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052; ²Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Science, Shanghai, 200050, China)

[Abstract] **Objective** To construct a rapid and highly sensitive detection system based on gold nanoparticle probes and protein chip. **Methods** The capture antibody (capture for target antigen) was combined to the aldehyde modified glass, and the nanoparticle probes were prepared using detection antibody. Then, the sandwich structures (protein chip-the target protein-gold nanoparticle probes) were created through the interaction between the antibody and antigen, and dyed by the gold deposition solution. The results were observed with the naked eye or by microscopy. **Results** For this protein detection system, CEA and CYFRA21-1 could be detected as low as 45 pg/mL and 90 pg/mL respectively in 1 h. The sensitivity was improved greatly, compared with the traditional ELISA method. Using this system, the lung cancer patients and normal people detection results were consistent with clinical used method (electrochemical analysis). **Conclusion** This system for CEA and CYFRA21-1 detection is an easy, rapid, convenient method with high sensitivity and multiple detection, which might have an important value and great application prospect in the clinical protein detection.

[Key words] gold nanoparticle probe; protein chip; gold deposition; tumor markers; lung cancer

Supported by the National High Technology Research and Development Plan of China (973 Program, 2012CB933303), the National Natural Science Foundation of China (81101645) and the Project of Shanghai Committee of Science and Technology (12nm0503702). Corresponding author: Zhang Guojun, Tel: 86-371-66295033, E-mail: zlgj-001@126.com; Jia Chunping, Tel: 86-21-62518014, E-mail: jiachp@mail.sim.ac.cn

早期肺癌患者的5年生存率可达90%以上,但大

多数肺癌确诊时已至中晚期。因此,做到对肺癌的“早发现、早诊断、早治疗”有着重要的临床价值。目前,肺癌的筛查主要靠CT等影像学检查^[1],其不易对肿瘤定性且假阳性率较高、价格昂贵,不适合进行大规模筛查^[2]。随着蛋白质组学的研究,把血清肿瘤标志物作为肺癌高危人群的筛查方法具有广泛的应用前景。但目前对肺癌而言,尚无特异性好、敏感度高的标

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(973计划,2012CB933303);国家自然科学基金(81101645);上海市科委项目(12nm0503702)

[通信作者] 张国俊,电话:(0371)66295033, E-mail: zlgj-001@126.com

贾春平,电话:(021)62518014, E-mail: jiachp@mail.sim.ac.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130106.1002.009.html> (2013-01-06)

志物,且很难利用单一标志物对肺癌进行评价。目前临床主要使用多种肿瘤标志物联合检测。癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)在多种肿瘤中均升高。血清CEA水平的动态变化可用于恶性肿瘤的早期诊断,还能反映患者对治疗的反应和预后,其值呈进行性升高者多预后不良^[3]。细胞角蛋白19(cytokeratin19)的可溶性片段CYFRA21-1是非小细胞性肺癌较敏感的肿瘤标志物,尤其对肺鳞癌特异度高^[4]。CEA和CYFRA21-1联合应用诊断非小细胞肺癌符合率可达78%^[5]。目前临床多使用放射免疫法、酶联免疫吸附法、电化学分析法等方法,这些方法对检测的灵敏度都有所提高,但操作麻烦,且提高检测灵敏度有限,不能对早期肺癌患者进行微量检测。

纳米材料和芯片技术的发展使肿瘤标志物在肺癌早期的高灵敏度和特异性检测成为可能。芯片技术具有高通量、高灵敏度和能够多元分析等特点^[6]。纳米金具有表面效应、小尺寸效应、量子效应、宏观量子隧道效应和独特的生物相容性,对生物分子有很强的吸附功能,可以与蛋白质、核酸等非共价结合^[7]。本研究将检测抗体标记到纳米金颗粒上,通过抗原抗体免疫反应结合在芯片上,再用纳米金沉积的方法放大信号,从而建立高灵敏度、方便、快速的检测体系,为临床诊治的普及提供支持。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集郑州大学第一附属医院临床病理确诊的90例肺癌患者和30例体检的健康人血清。

1.2 仪器

荧光倒置显微镜(BX51, OLYMPUS);离心机(5804R, Eppendorf);摇床(STS-3型,上海琪特分析仪器有限公司);分子杂交仪(FYY-3型,兴化市仪器分析厂);硝酸纤维薄膜过滤器(0.22 μm,美国Corning Incorporated公司);芯片点样仪(ProSys5510A, Cartesian TECHNOLOGIES)。

1.3 试剂

Tween20、聚乙二醇8000(Polyethylene Glycol, PEG), 聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl-pyrrolidone, PVP), 四氯金酸均购自Sigma-Aldrich公司。脱脂奶粉购自上海生工生物技术服务有限公司。CEA、CYFRA21-1抗原及捕获抗体、检测抗体购自Abcam、Medix Biochemia、Xema公司等。溶液:磷酸盐缓冲液(1 mmol/L PBS, pH 7.4), 洗液(1 mmol/L PBS, 0.05% Tween20, pH 7.4), 纳米金探针重悬液(0.1 mol/L PB, 0.2% BSA, pH 7.2), 金增强反应液(四氯金酸0.5 mmol/L、盐酸羟胺10 mmol/L), 配制上述溶液的试剂Na₂HPO₄、NaCl、KCl、KH₂PO₄、H₂SO₄、K₂CO₃、蔗糖均购自上海凌峰化学试剂有限公司。所用试剂为分析纯, 配制试剂用水为二次蒸馏水, 试剂配制后用0.22 μm的滤膜过滤。醛基基片购自上海百傲科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 蛋白芯片的制作 将CEA、CYFRA21-1抗体及质控点(抗鼠IgG)和点样液按1:1的比例配制好,按照点样仪的操作步骤进行点样,点样后将蛋白芯片放在25℃恒温箱中静置过夜,4℃保存。

1.4.2 纳米金探针的制备 制备纳米金探针,首先应先确定最佳的蛋白加入量。本研究经过梯度实验确定了抗体CEA和CYFRA21-1的最佳加入量。取500 μL纳米金溶液离心处理,弃去部分上清保留到100 μL,用0.2 mol/L K₂CO₃将纳米金溶液pH值调至8.5~9.0,后加入0.8 μL CEA检测抗体或2.5 μL CYFRA21-1检测抗体,混匀,加入1/10体积的10% PEG8000,4℃静置过夜。离心1~2次,最后加入50 μL纳米金探针重悬液,并加入1.5 μL的5 mol/L NaCl,储存于4℃备用。以上离心条件均为4℃,9 000 r/min离心50 min。

1.4.3 免疫检测 用脱脂奶粉液封闭蛋白芯片10 min,将制备好的纳米金探针和待测蛋白质样品按一定比例混合后加入蛋白芯片上,37℃孵育45 min,用洗液洗去未反应的纳米金探针,加金增强反应液37℃或室温染色5~10 min,后快速倒掉染色液用双蒸水轻轻冲洗蛋白芯片中止染色。如果信号较弱,可重复染色1~2次加强信号。

1.4.4 结果分析 用肉眼或荧光倒置显微镜观测并进行结果分析,有褐色点出现的为阳性结果,应用Image-Pro plus 6.0软件计算褐色点的光密度值对待测蛋白进行间接测定。反应原理及流程见图1。

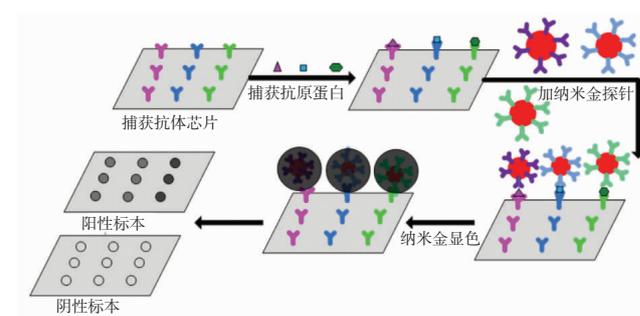


图1 多种肿瘤标志物检测反应原理及流程

1.5 统计学分析

数据处理采用SPSS 17.0统计软件,率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 最佳蛋白稳定量的确定

只有加入最佳的蛋白量,才能使纳米金探针最稳定并保持最佳的抗体活性。测定纳米金最佳蛋白稳定量,需在最佳pH值下进行。先用0.2 mol/L K₂CO₃将纳米金溶液pH值调至8.5~9.0,将纳米金分为100 μL/管,每管依次加入0.4、0.6、0.8、1.0 μL CEA检测抗体,混匀后室温静置10 min,加1/10体积的1 mol/L NaCl,观察纳米金溶液的颜色变化。观察到蛋白加入量为0.4 μL的纳米金溶液颜色明显变灰,0.6 μL的纳米金溶液颜色稍微变灰,加入0.8、1.0 μL的纳米金溶液颜色未发生变化,故确定100 μL纳米金溶液中检测抗体最佳蛋白稳

定量 CEA 为加入 0.8 μL (浓度为 5 mg/mL), CYFRA21-1 为 2.5 μL (浓度为 2 mg/mL)。

2.2 纳米金探针加入量的优化

对同一标准品用不同体积 (即不同浓度) 的纳米金探针检测的结果见图 2。纳米金探针加入量在 2~4 μL 时, 随着纳米金探针加入量的增加检测信号 (光密度值) 不断增大, 在 4 μL 以后, 光密度值开始下降, 同时非特异信号及背景信号开始增强。因此, 选择加入 4 μL 纳米金探针为最佳加入量 (浓度 CEA 为 1 nmol/L, CYFRA21-1 为 1.4 nmol/L)。

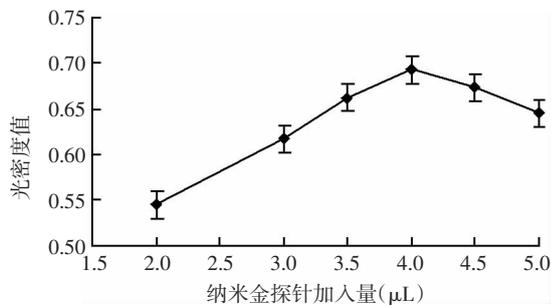
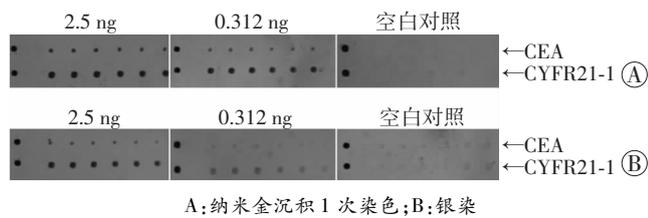


图2 纳米金探针加入量优化结果

2.3 不同染色方法对检测结果的影响

采用纳米金沉积的方法进行染色, 并传统的银染方法进行对比。见图 3。



A: 纳米金沉积 1 次染色; B: 银染
图3 蛋白芯片不同染色方法的结果对比

2.4 标准曲线的绘制

通过测定蛋白芯片上显色点的光密度值, 间接对待测蛋白进行定量检测。检测 CEA 和 CYFRA21-1 抗原标准品后绘制的标准曲线见图 4。CEA 浓度在 45 pg/mL~25 ng/mL 之间线性关系良好, $R^2 = 0.991$; CYFRA21-1 浓度在 90 pg/mL~25 ng/mL 之间线性关系良好, $R^2 = 0.994$ 。灵敏度试验确定 CEA 蛋白的灵敏度为 45 pg/mL, CYFRA21-1 为 90 pg/mL。传统的 ELISA 方法检测 CEA 的灵敏度为 1.65 ng/mL, 故该检测方法大大提高了检测的灵敏度。

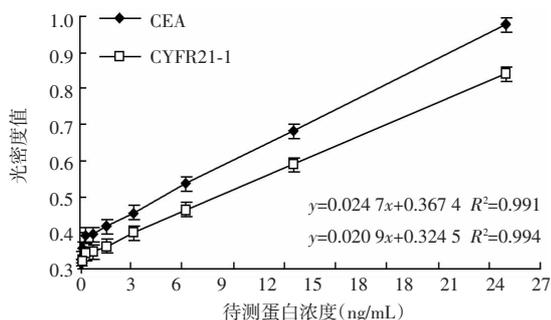


图4 CEA 和 CYFRA21-1 检测的标准曲线

2.5 血清标本检测结果

本研究筛查血清 120 例, 其中肺癌患者 90 例, 健康体检者 30 例, 部分检测结果见图 5。

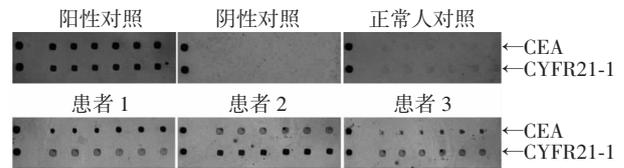


图5 血清中 CEA 和 CYFRA21-1 检测结果

检测肺癌患者及正常人血清, 本方法与临床电化学分析法的结果对比情况见表 1。90 例肺癌患者中 CEA 和 CYFRA21-1 分布情况如下: CEA 阳性 18.89%, CEA 和 CYFRA21-1 阳性 41.11%, CYFRA21-1 阳性 14.44%, CEA 和 CYFRA21-1 阴性 25.56%。在检测的肺癌患者中, 本检测体系的检测敏感性 CEA 为 60.0% (54/90), CYFRA21-1 为 55.6% (50/90), 两者联合检测为 74.4% (67/90)。

表1 2种方法检测血清结果

方法	肺癌患者 (n=90)				正常体检者 (n=30)			
	CEA 阳性	CEA 阴性	CYFRA21-1 阳性	CYFRA21-1 阴性	CEA 阳性	CEA 阴性	CYFRA21-1 阳性	CYFRA21-1 阴性
电化学分析法	51	39	48	42	6	24	4	26
本检测体系	54	36	50	40	7	23	4	26
χ^2	0.206		0.090		0.098		0.000	
P	0.650		0.765		0.754		1.000	

3 讨论

纳米金颗粒在水溶液中呈胶体状, 也称为胶体金, 具有生物相容性好 (容易标记生物分子)、比表面积大 (可标记大量生物分子)、独特的光学和电学物理特性 (容易检测) 等优势, 在生物分子检测中越来越受到重视^[7]。纳米金颗粒主要以两种方式应用于生物检测: 一种是作为示踪标志物及检测信号, 即基于纳米金的光学特性 (10~20 nm 的纳米金溶液呈红色), 目前临床上常用的免疫层析试纸条即是基于此, 但是这类检测体系的灵敏度不高^[8]; 另一种是作为生物分子偶联及信号放大的载体, 由于纳米金颗粒具有较大的比表面积, 一个纳米颗粒上可同时标记多个生物分子^[9]。纳米金作为桥梁将检测抗体与多个信号分子连接起来, 可以大大提高检测灵敏度, 甚至可以检测到 fM 级的生物分子^[9-10]。但是, 这类检测方法还需要后续的检测装置 (如酶标仪、荧光检测仪或 PCR 扩增等) 将放大的检测信号识别出来。

制备纳米金探针时, 通过加入最佳的蛋白量, 才能使纳米金探针最稳定并保持最佳的抗体活性, 从而达到最好的检测效果。本研究通过梯度优化, 确定了 100 μL 纳米金溶液中最佳蛋白稳定量 CEA 为 0.8 μL (浓度为 5 mg/mL), CYFRA21-1 为 2.5 μL (浓度为

2 mg/mL)。抗原抗体反应的最佳条件由抗原抗体浓度、缓冲液 pH 值、盐离子浓度及温度等条件决定,尤其在本检测体系中,检测抗体是标记在纳米金颗粒上,一个直径为 15 nm 的纳米金颗粒上可以标记 10 多个抗体分子^[11],检测抗体的浓度即纳米金探针的浓度对免疫反应的结果影响很大。过多,会使非特异信号或背景信号增强,造成误诊;过少,则会反应不充分,使检测信号降低,造成漏诊。本研究对纳米金探针加入量进行梯度优化,从而确定了 CEA 和 CYFRA21-1 的最佳加入量。基于纳米金探针的显色方法通常采用检测纳米金本身的颜色或者进一步经过银沉积放大信号,本研究利用纳米金的晶核催化作用,在纳米金表面通过一次或两次金增强反应再次沉积一层金,通过金沉积的处理,使得作为标记物的纳米金颗粒体积变大,提高了生物分析的检测灵敏度^[12]。纳米金沉积染色可在几分钟内完成,比银染反应快,无背景干扰,检测灵敏度比银染高 1~2 个数量级。并且,纳米金沉积液配制方便,所需试剂较少,染色后的芯片阳性信号较强,背景信号弱,并对于一次染色效果欠佳的芯片可进行重复染色加强信号。

尽管应用纳米金生物复合探针检测生物分子、提高检测灵敏度的新方法及文章层出不穷,但极少能真正应用于临床,其主要原因是这些新方法在带来超高灵敏度的同时,会导致大量非特异信号的产生,尤其在检测人体血清样本时,由于血清中含有上千种、含量差异很大的蛋白质,所以对检测方法的特异性要求很高。本研究中纳米金作为载体标记多个检测抗体分子,从而增大与捕获在芯片上的抗原分子的结合率,使信号得到放大,检测信号增强;其次当抗体标记于纳米金颗粒表面时,非特异性吸附颗粒比抗体单独存在时更易被洗去,从而降低了背景信号。同时,采用优于银染法的纳米金沉积染色,使背景信号进一步减弱,并可以多次加强染色,从而使灵敏度大大提高,既应用了纳米金本身的光学特性,可以非常方便地观察及检测信号,又充分发挥了纳米金比表面积较大的特性,获得较高的检测灵敏度,并在选择特异性抗体、纳米金探针标记、蛋白芯片的封闭处理、显色方法等检测条件方面做了系统的优化,在提高检测灵敏度的同时,也保证检测体系的特异性,从而满足临床的需求。在检测的肺癌患者中,本检测体系的检测敏感性 CEA 为 60.0%, CYFRA21-1 为 55.6%,两者联合检测为 74.4%,较任何单一检测均有所提高。与临床所用的电化学免疫分析法相比,肺癌患者和正常人的检测结果,两种方法整体一致($P > 0.05$)。

本研究基于纳米金探针和蛋白芯片,采用纳米金沉积染色的方法增强放大信号,实现对蛋白进行可视化的半定量检测,目前在 1 h 内可高灵敏检测 CEA 和 CYFRA21-1 两种肿瘤标志物,可进一步建立多指标联合检测体系,达到多种肿瘤标志物同时快速检测的目的;同时,本实验所使用仪器简单,实验结果通过肉眼或普通的显微镜即可进行分析。因此,该检测体系有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] Crosswell J M, Baker S G, Marcus P M, *et al.* Cumulative incidence of false-positive test results in lung cancer screening: a randomized trial [J]. *Ann Intern Med*, 2010, 152(8): 505-512.
- [2] Bigbee W L, Gopalakrishnan V, Weissfeld J L, *et al.* A multiplexed serum biomarker immunoassay panel discriminates clinical lung cancer patients from high-risk individuals found to be cancer-free by CT screening [J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(4): 698-708.
- [3] Lazarev S M, Massard Z H, Reshetov A V, *et al.* Role of biological tumor markers CEA, Cyfra-21, NSE TU M2-PK in diagnosis and treatment of lung cancer [J]. *Vestn Khir Im I I Grek*, 2010, 169(1): 39-43.
- [4] Mizuguchi S, Nishiyama N, Iwata T, *et al.* Clinical value of serum cytokeratin 19 fragment and Sialyl-Lewis X in non-small cell lung cancer [J]. *Ann Thorac Surg*, 2007, 83(1): 216-221.
- [5] Wu G P, Ba J, Zhao Y J, *et al.* Diagnostic value of CEA, CYFRA 21-1, NSE and CA 125 assay in serum and pleural effusion of patients with lung cancer [J]. *Acta Cytol*, 2007, 51(4): 679-680.
- [6] Sanchez-Carbayo M. Antibody microarrays as tools for biomarker discovery [J]. *Methods Mol Biol*, 2011(785): 159-182.
- [7] Jain P K, Lee K S, El-Sayed I H, *et al.* Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine [J]. *J Phys Chem B*, 2006, 110(14): 7238-7248.
- [8] Tanaka R, Yuhi T, Nagatani N, *et al.* A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 385(8): 1414-1420.
- [9] Ambrosi A, Castaneda M T, Killard A J, *et al.* Double-codified gold nanolabels for enhanced immunoanalysis [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(14): 5232-5240.
- [10] Kim D, Daniel W L, Mirkin C A. Microarray-based multiplexed scanning immunoassay for protein cancer markers using gold nanoparticle probes [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(21): 9183-9187.
- [11] Liu M, Jia C, Huang Y, *et al.* Highly sensitive protein detection using enzyme-labeled gold nanoparticle probes [J]. *Analyst*, 2010, 135(2): 327-331.
- [12] Zhang J, Pearce M C, Ting B P, *et al.* Ultrasensitive electrochemical immunosensor employing glucose oxidase catalyzed deposition of gold nanoparticles for signal amplification [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 27(1): 53-57.

(收稿:2012-10-30;修回:2012-12-20)

(编辑 邓强庭)