

化学发光免疫分析法检测血清中前列腺特异抗原复合物

周友俊¹ 李娇霞¹ 程绘珺¹ 杨乔芬¹ 何美琼¹ 郭丽萍¹ 邓智勇^{*2}

(昆明医科大学附属延安医院核医学科¹, 第三附属医院核医学科², 昆明 650051)

摘要 采用杂交瘤技术构建抗前列腺特异抗原- α 1-抗胰凝乳蛋白酶(Prostate specific antigen - α 1-antichymotrypsin complex, PSA-ACT)单克隆抗体(单抗)细胞株,共获得 8 株稳定分泌 PSA-ACT 单抗的细胞株,纯化后进行免疫特性鉴定并做单抗配对。选择其中一对单抗,采用辣根过氧化物酶(HRP)催化鲁米诺(lumino)- H_2O_2 化学发光体系,建立了测定人血清中 PSA-ACT 浓度的化学发光酶免疫分析方法(CLEIA)。对包被缓冲液、包被抗体浓度、酶标抗体稀释度、温育时间、发光反应时间和免疫反应步骤等实验参数进行了优化。在最佳实验条件下,PSA-ACT 浓度在 5 ~ 40 ng/mL 范围内线性关系良好($R^2 = 0.9943$),检出限为 0.53 ng/mL,批内相对标准偏差(RSD)为 4.6% ~ 6.6%,批间 RSD 为 5.7% ~ 8.0%,回收率为 95.4% ~ 104.2%,与游离前列腺特异性抗原 F-PSA 的交叉反应率为 0.6%。本方法简单、稳定、灵敏、快速,为开发检测 PSA-ACT 的 CLEIA 试剂盒奠定了基础。

关键词 前列腺特异抗原;前列腺癌;化学发光酶免疫分析;辣根过氧化物酶

1 引言

前列腺癌(Prostate cancer, PCa)是男性最常见的肿瘤之一,近年来其发病率呈明显的上升趋势^[1-3]。早期诊断和治疗对控制 PCa 尤为重要。前列腺特异抗原(Prostate specific antigen, PSA)是目前临床广泛采用的 PCa 检测标志物^[4-10]。PSA 在精液里以游离态(Free-PSA, F-PSA)存在,血液中通常为结合态(Complexed-PSA, C-PSA),正常男性血液中可检测到的 PSA (T-PSA)一般低于 4 ng/mL。当 T-PSA > 10 ng/mL 时,患者患前列腺癌的几率极高,但 T-PSA 含量为 4 ~ 10 ng/mL 时,PSA 检测的特异性仅为 59.2%,假阴性率即漏诊率可达 38% ~ 48%^[11]。因为 PSA 不具有肿瘤特异性,除 PCa 外,良性前列腺增生、炎性病变和梗死等前列腺病变,甚至年龄的增长,都能引起 T-PSA 含量的升高,因此, T-PSA 含量 4 ~ 10 ng/mL 成为了临床诊断灰区。

研究者提出了不同的 PSA 指数,用于校正 T-PSA 检测值,提高 PSA 检测的准确率。目前,临床上应用最多的是采用测定 F-PSA 水平并计算 F-PSA/T-PSA (F/T) 比值的方法进行进一步筛查^[12-14]。但是, F-PSA 在血清中不稳定,且 F/T 比值在诊断前列腺癌时缺乏统一标准,亦难以根据这一范围内的 PSA 筛查和诊断 PCa^[15]。

血清中 C-PSA 主要以前列腺特异抗原- α 1-抗胰凝乳蛋白酶(PSA- α 1-antichymotrypsin complex, PSA-ACT)的形式存在。研究表明,以血清中 PSA-ACT 含量作为检测指标,可提高对 PCa 早期诊断的特异性和准确性^[16-19]。与同时检测 T-PSA 和 F-PSA 相比,PSA-ACT 检测具有稳定、简单、成本低、不受年龄因素影响等优势,其敏感性和特异性均优于 T-PSA 检测,且可以降低 PCa 的筛查成本^[15,20-22]。

PSA-ACT 的检测方法与 F-PSA 及 T-PSA 类似,酶联免疫分析法(ELISA)是最常用的方法^[23,24],但目前还没有检测 PSA-ACT 的商业化试剂盒。

与 ELISA 法相比,化学发光酶免疫分析法(CLEIA)具有灵敏度高、线性范围宽、操作简单且易于实现高通量检测等特点^[25,26]。本研究制备了抗 PSA-ACT 单克隆抗体(单抗),采用辣根过氧化物酶(HRP)催化鲁米诺(lumino)- H_2O_2 化学发光体系,建立了双抗体夹心化学发光酶免疫分析方法,用于 PSA-ACT 的高灵敏度检测,为开发可用于临床检验的 PSA-ACT 试剂盒奠定了实验基础。

2015-11-25 收稿;2016-06-07 接受

本文为云南省应用基础研究(昆医联合专项)项目(No. 2014FB077)资助

* E-mail: 13888158986@163.com

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

BHP 9540 微孔板发光分析仪(北京滨松光子技术有限公司);MX-F 型固定式混匀仪(上海大龙医疗器械有限公司);WZ-2A 型微量振荡器(北京海淀电子医疗仪器厂)

Sp2/0 骨髓瘤细胞(国家生物医学分析中心病毒安全检测实验室提供);6~8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠(军事科学院实验动物中心);RPMI 1640 培养基、牛血清蛋白(BSA)(美国 Gibco 公司);PSA-ACT Antigen(加拿大 Biospecific 公司);PSA Antigen F-PSA Ag protein(英国 Biorbyt 公司);弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂和 HAT/HT 培养基(美国 Sigma 公司);单克隆抗体分型试剂盒(Southern Biotech 公司);rProtein A 蛋白纯化试剂盒(美国 GE 公司);BCA 蛋白浓度试剂盒(江苏碧云天生物技术研究);辣根过氧化物酶(HRP,美国 MP Biomedicals 公司);鲁米诺化学发光底物液(苏州贝尔达生物医药科技有限公司);其它试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

2.2 动物免疫和细胞融合

采用免疫原 PSA-ACT 对 6~8 周龄的雌性 Balb/c 鼠进行背部皮下免疫,初次免疫剂量为 20 μg /只;15 日后进行初次加强免疫(10 μg /只),此后每隔 28 天进行一次加强免疫。第 4 次加强免疫 10 天后断尾取血,以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSA 为包被原,采用间接 ELISA 法^[20]检测血清中抗 PSA 抗体的效价。取抗血清效价大于 1:8000 的小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行细胞融合,采用 HAT 培养基对杂交瘤细胞进行培养,去除未融合的脾细胞和骨髓瘤细胞。

2.3 杂交瘤细胞株的筛选及培养

2.3.1 抗体亚类鉴定 按 Southern Biotech 单克隆抗体分型试剂盒说明书,以浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSA 抗原包被酶标板,依次加入细胞培养上清(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$)和 1:500 稀释的 HRP 标记二抗进行反应。根据 OD₄₅₀ 值最高的孔所对应的酶标二抗确定该孔抗体的亚类。

2.3.2 抗体特异性筛选 分别以 T-PSA, F-PSA, PSA-ACT 为抗原进行包被,采用间接 ELISA 法对杂交瘤细胞进行筛选,随后对阳性细胞株进行克隆。多次筛选、克隆后,获得可分泌单一抗 PSA-ACT 抗体的细胞株。

2.4 单克隆抗体的制备

对可分泌单一抗 PSA-ACT 抗体的细胞株进行扩大培养,用体内诱生法制备腹水。选取 10 周龄的雌性小鼠,接种杂交瘤细胞前 7 天注射石蜡油,抑制自身免疫功能。将阳性杂交瘤细胞稀释后注入小鼠腹腔,7 天后收集小鼠腹水,以间接 ELISA 法测定腹水效价。利用 rProtein A 亲和柱法纯化腹水,得到的纯化抗体用 PBS 透析 3 次, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.5 单克隆抗体的鉴定

采用 SDS-PAGE 测定抗体的纯度,采用 BCA 法测定抗体的浓度。以甲胎蛋白(Alpha Fetoprotein, AFP)、癌胚抗原(Carcinoembryonic antigen, CEA)、广谱肿瘤标志物(Carbohydrate antigen 50, CA50)、卵巢癌相关抗原(Carbohydrate antigen 125, CA125)、乳腺癌相关抗原(Carbohydrate antigen 153, CA153)、F-PSA 等为包被原,采用间接 ELISA 进行交叉反应检测。采用间接 ELISA 相加实验,分析抗体针对的抗原表面决定簇。以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSA 包被酶标板,先分别加入所有单抗,测定 450 和 630 nm 处的吸光度比值($\text{OD}_{450}/\text{OD}_{630}$)^[27],再将所有单抗两两配对加入,测定 $\text{OD}_{450}/\text{OD}_{630}$,比较前后吸光度值的变化,进而对单抗按作用位点进行分类。

2.6 单克隆抗体配对

在单克隆抗体分类的基础上,选择针对抗原上不同决定簇的两个单抗进一步配对分析,分别用一个抗体作为包被抗体,另一个作为酶标抗体,PSA-ACT 抗原稀释梯度 0, 5, 10, 20, 40 和 60 ng/mL ,采用间接 ELISA 检测,每组抗体对均要进行正配与反配,挑选具有高灵敏度和良好线性的一对抗体,建立化学发光酶免疫分析法。

2.7 PSA-ACT 化学发光酶免疫分析方法的建立

用包被缓冲液将纯化后的 PSA-ACT 单抗稀释至适当的浓度,加入 96 孔板中,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。PBS 洗涤 3 次,每孔加入 300 μL 含 1% BSA 的磷酸盐-吐温缓冲溶液 (PBST),室温封闭 3 h,弃封闭液,干燥,4 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存^[21]。采用改良的过碘酸盐氧化法^[28]制备 HRP 标记的抗体 (HRP-IgG),加入等体积甘油,密封冷冻保存。以质控血清作为标准品基质,按比例将适量的 PSA-ACT 加入到基质血清中,得到浓度分别为 0 (S_0), 5 (S_1), 10 (S_2), 20 (S_3), 40 (S_4) 和 60 ng/mL (S_5) 的系列标准品,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

在包被抗体板每孔中加入 50 μL 样品或标准品,50 μL 酶标抗体,振荡混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h,洗涤 5 次,按化学发光底物试剂盒说明书加入适量发光底物,避光反应一定时间后,测定各孔的相对发光强度 (Relative light unit, RLU),绘制 PSA-ACT 浓度和对应 RLU 值间的双对数标准曲线。

3 结果与讨论

3.1 单克隆抗体制备

3.1.1 杂交瘤细胞株筛选 共进行 6 次细胞融合,细胞融合率在 78% ~ 92% 之间。初次筛选得到 17 株阳性细胞株,经过多次克隆,共得到 8 株能稳定分泌 PSA-ACT 单抗的细胞株,分别为 PSA2, PSA9, PSA13, PSA17, PSA21, PSA28, PSA36 和 PSA44。

3.1.2 单克隆抗体亚类鉴定及效价测定 8 株杂交瘤细胞的培养上清间接 ELISA 检测结果显示,2 株属于 IgG1 类,2 株属于 IgG2a 类,4 株属于 IgG2b 类,无 IgG3 及 IgM 类。轻链均为 κ 类。杂交瘤细胞扩大培养,制备腹水后,以 ELISA 法检测腹水效价。抗体亚类及腹水效价见表 1。

表 1 单克隆抗体亚类及腹水效价

Table 1 Subtypes, light chain types and ascites titer of 8 monoclonal antibodies (mAb)

抗体编号 Number	亚类/型 Subtype	效价 Ascites titer
PSA2	Ig G2b/ κ	1 : 256000
PSA9	Ig G1/ κ	1 : 256000
PSA13	Ig G1/ κ	1 : 512000
PSA17	Ig G2b/ κ	1 : 512000
PSA21	Ig G2b/ κ	1 : 512000
PSA28	Ig G2b/ κ	1 : 256000
PSA36	Ig G2a/ κ	1 : 512000
PSA44	Ig G2a/ κ	1 : 512000

PSA: 前列腺特异抗原 (Prostate specific antigen)。

3.1.3 单克隆抗体浓度及纯度 腹水经 rProtein A 纯化后,用 BCA 法测得 8 个单克隆抗体蛋白浓度为 1.25 ~ 5.00 mg/mL,SDS-PAGE 电泳检测结果 (图 1) 表明,抗体 PSA17 和 PSA28 的纯度较高。

3.1.4 单克隆抗体特异性 (1) 交叉反应 8 株单抗的交叉反应实验结果如表 2 所示。8 株单抗与所测试的肿瘤标记物的反应很微弱,可以认为没有交叉反应。(2) 抗原结合位点分析 用相加系数 (Additivity value, AV) 评价位点分析结果。 $AV = [(OD_{McAb1+2}) / (OD_{McAb1} + OD_{McAb2})] \times 100\%$ 。当 $AV < 50\%$ 时,认为两种抗体针对抗原的同一位点,或两种抗体结合不同位点但相互抑制;当 $AV > 50\%$ 时,认为两种抗体针对抗原的不同位点。

实验结果表明,PSA2 与 PSA13、PSA17 识别不同的抗原位点,PSA9 与 PSA13、PSA17 识别不同的抗原位点,PSA13 与 PSA21、PSA28 识别不同的抗原位点,PSA17 与 PSA28、PSA44 识别不同的抗原位点。因此,共得到 8 对识别不同的 PSA-ACT 位点的单抗细胞株 PSA2-PSA13, PSA2-PSA17, PSA9-PSA13, PSA9-PSA17, PSA13-PSA21, PSA13-28, PSA17-PSA28 和 PSA17-PSA44。

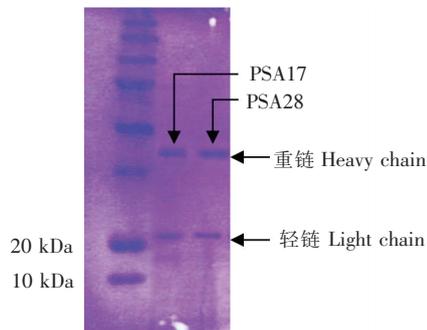


图 1 前列腺特异抗原- α 1-抗胰凝乳蛋白酶 (PSA-ACT) 单克隆抗体 PSA17 和 PSA28 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE map of human prostate specific antigen- α 1-antichymotrypsin complex (PSA-ACT) specific monoclonal antibodies PSA17 and PSA28

表 2 8 株抗体交叉反应结果

Table 2 Cross-reactivity t of 8 mAb

抗原 Number	PSA2	PSA9	PSA13	PSA17	PSA21	PSA28	PSA36	PSA44	阳性 Positive control	阴性 Negative control
甲胎蛋白 Alpha fetoprotein, AFP	-	-	-	-	-	--	-	-	+	--
癌胚抗原 Carcinoembryonic antigen, CEA	--	-	-	--	-	-	-	--	+	--
广谱肿瘤标志物 Carbohydrate antigen 50, CA50	-	-	-	-	-	-	-	--	+	--
卵巢癌相关抗原 Carbohydrate antigen 125, CA125	-	--	-	-	-	--	-	-	+	--
乳腺癌相关抗原 Carbohydrate antigen 153, CA153	-	--	-	-	-	-	-	-	+	--
游离前列腺 特异抗原 Free-prostate specific antigen, F-PSA	-	-	--	-	-	-	-	-	+	--
前列腺特异抗原 Prostate specific antigen, PSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	--
前列腺特异抗原 PSA 背景 Background	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

注: PSA(背景)是背景值,加相同体积的封闭液代替抗体溶液,其它条件完全相同。

Note: PSA(background), Adding the same volume of blocking solution instead of antibody, other conditions are identical (+) represents OD450/630 > 1.0; (-) represents 0.02 < OD450/630 < 1; (--) represents OD450/630 < 0.02.

3.1.5 单克隆抗体配对 8 组备选抗体对配对实验结果显示, PSA17/PSA28 线性良好 ($R=0.991$), 灵敏度高, 所以选择这对抗体建立化学发光酶免疫分析法。

3.2 PSA-ACT 化学发光酶免疫分析方法建立

3.2.1 实验条件的优化 本实验选择的最佳实验条件为: 0.06 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 7.4) 作为包被缓冲液; 抗体包被浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 120 min; 酶标抗体稀释度 1:500, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温不振荡温育 1 h; 加入发光底物 10 min 后测量。

3.2.2 免疫反应步骤 在化学发光酶免疫分析测定体系中, 可选择一步法和两步法免疫反应步骤, 所建立方法的灵敏度和操作时间会有差别。一步法的基本操作程序如 2.7 所述; 两步法是指将样品或标准品与酶标抗体分别温育, 即在包被抗体板孔中加入 50 μL 样品或标准品, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, 洗板后加入 50 μL 酶标抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。其它步骤与一步法相同。

本实验中两种方法分析的灵敏度基本一致, 线性关系良好, 但两步法耗时 150 min, 一步法耗时 90 min, 所以最终选择一步法进行测定。

3.2.3 方法的分析性能 在最佳反应条件下, 以化学发光酶免疫分析法测定 PSA-ACT 浓度, 标准曲线如图 2 所示。相对发光强度的对数和 PSA-ACT 浓度的对数在 PSA-ACT 浓度 5 ~ 40 ng/mL 范围内线性关系良好 ($R^2 = 0.9943$), 线性方程为 $y=2.2504x+2.5142$, 以 $(x+2\text{SD})$ 对应的浓度值为方法的检出限^[29], 测得检出限为 0.53 ng/mL。

以含低 (5.0 ng/mL)、中 (9.0 ng/mL)、高 (40 ng/mL) 3 种浓度 PSA-ACT 的血清进行 8 孔平行测定, 重复 3 次, 测得批内相对标准偏差 (RSD) 为 4.6% ~ 6.6%, 批间 RSD 为 5.7% ~ 8.0%。

采用建立的 CLEIA 法对 5, 10, 20, 40 和 60 ng/mL 的 F-PSA 进行检测, 计算得到 F-PSA 与

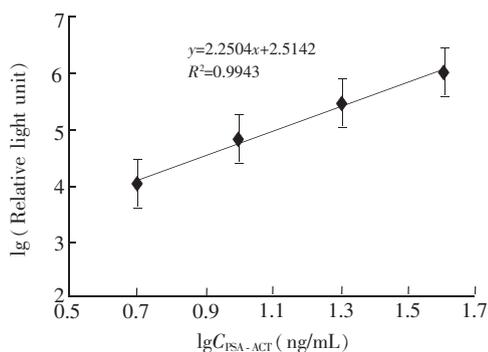


图 2 化学发光酶免疫分析法测定 PSA-ACT 的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for determination of PSA-ACT

PSA-ACT 的交叉反应率为 0.6%, 表明本方法的特异性良好。

3.3 实际血清中的回收率

在 3 份临床采集的人血清样品中, 分别加入 5, 10 和 20 ng/mL PSA-ACT 标准品, 在最佳实验条件下测定, 计算回收率。结果见表 3。与已报道的采用免疫技术原理检测 PSA-ACT 的方法^[19]相比, 本方法灵敏度稍低, 稳定性和重现性好, 用于实际样品检测, 结果令人满意。本研究结果为进一步开发检测 PSA-ACT 的 CLIA 试剂盒奠定了基础。

表 3 血清样品中 PSA-ACT 回收率测定 ($n=3$)

Table 3 Recovery of PSA-ACT spiked in human serum samples ($n=3$)

血清样品 Serum sample	本底值 Found (ng/mL)	加标量 Added (ng/mL)	测定值 Total found (ng/mL)	回收率 Recoveries (%)
样品 1 Sample 1	1.53	5.0	6.74±0.07	104.2
		10	11.48±0.26	100.4
		20	21.09±0.31	97.8
样品 2 Sample 2	3.67	5.0	8.71±0.12	100.8
		10	13.21±0.45	95.4
		20	23.56±0.25	99.5
样品 3 Sample 3	17.46	5.0	22.25±0.18	95.8
		10	27.36±0.29	99.0
		20	37.77±0.35	101.5

References

- HU Ling-Mei. *Chinese Journal of Cell Biology*, **2012**, 25(1): 14-17
胡玲美. 中国细胞生物学报, **2012**, 25(1): 14-17
- Maatman T J. *J. Urol.*, **2002**, 42(6): 672-676
- LI Song. *Foreign Medical Sciences(Urology and Nephrology Foreign Medical Sciences)*, **1998**, 18(4): 168-170
李颂. 国外医学-泌尿系统分册, **1998**, 18(4): 168-170
- Zhu L, Leinonen J, Zhang W M, Finne P, Stenman U H. *Clin. Chem.*, **2003**, 49(1): 97-103
- Zhou A M, Tew ari P C, B lueste in B I, Ca idwe ll G W, Larsen F L. *Clin. Chem.*, **1993**, 39(12): 2483-2491
- Hu Y, Diamandis E P. *J. Urol.*, **1995**, 3(153): 1004-1008
- Chen Z X, Prestigiacomo A, Stamey T A. *Clin. Chem.*, **1995**, 41(9): 1273-1282
- Matsumoto K, Konishi N, Samori T, Kimura E, Doi M, Kato S, Yuki Y I. *J. Immunol. Methods*, **2000**, 234: 99-106
- Matsumoto K, Konishi N, Hiasa Y, Kimura E, Takahashi Y, Shinohara K, Samori T. *Clin. Chim. Acta*, **1999**, 281(1-2): 57-69
- Rafferty B, Rigsby P, Rose M, Stamey T, Rose G D. *Clin Chem.*, **2000**, 46(9): 1310-1317
- Tang J W, Kevin M S, Harry G R, Lisa S M, Stephen D M. *Euro. J. Biochem.*, **2000**, 267(13): 4040-4045
- SHI Guo-Wei. *West China Medical Journal*, **1996**, 16(5): 198-202
施国伟. 华西医学, **1996**, 16(5): 198-202
- YANG Liu-Ping, YOU Li. *Foreign Medical Sciences(Urology and Nephrology Foreign Medical Sciences)*, **1998**, 18(1): 33-35
杨柳平, 游离. 国外医学-泌尿系统分册, **1998**, 18(1): 33-35
- Semjonow A, Oberpenning F, Brandt B, Zechel C, Brandau W, Hertle L. *Urology*, **1996**, 48(6A): 10-15
- CHANG Xiao-Tong, WANG Zhen-Hui, HOU Li-Juan. *China Journal of Modern Medicine*, **2004**, 14(1): 24-31
常晓彤, 王振辉, 侯丽娟. 中国现代医学杂志, **2004**, 14(1): 24-31
- Wu J T, Liu G H. *J. Clin. Lab. Anal.*, **1998**, 12(1): 32-40
- Kobayashi T, Kamoto T K, Mitsumori K, Ogura K, Ide Y. *British J. Urol. Inter.*, **2005**, 95(6): 761-765
- Wu J T, Zhang P, Liu G H, Wilson L. *J. Clin. Lab. Anal.*, **1998**, 12: 14-19
- Lei Z, Sari J, Taija M H, Marikki L, Anna S, Stig N, Ulf-Hakan S, Hannu K. *The Prostate*, **2013**, 73: 219-26
- YANG Li-Guo, HU Shao-Cha, WEI Ping-Hua. *Enzyme Immunoassay*. Nnanjing: Nanjing University Press., **1998**: 381-398
杨利国, 胡少刹, 魏平华. 酶免疫测定技术. 南京: 南京大学出版社, **1998**: 381-398
- SHI Gen, TANG Bao-Jun, WANG Xu, ZHAO Li-Xia, LIN Jin-Ming. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2007**, 35(11): 1541-1547
石根, 唐宝军, 王栩, 赵利霞, 林金明. 分析化学, **2007**, 35(11): 1541-1547

- 22 Matsumoto K, Konishi N, Hiasa Y, Kimura E, Takahashi Y, Shinohara K, Samori T. *Clin. Chim. Acta*, **1999**, 281(1-2): 57-69
- 23 Christensson A, Bjork T, Nilsson O, Dahlen U, Matikainen M T, Cockett A T, Abrahamsson P A, Lilja H. *J. Urol.*, **1993**, 150(1): 100-105
- 24 Lilja H, Cockett A T, Abrahamsson P A. *Cancer*, **1992**, 70(Supplement S1): 230-234
- 25 XIAO Qin, LIN Jin-Ming. *Chinese J. Anal Chem.*, **2015**, 43(6): 929-938
肖勤, 林金明. *分析化学*, **2015**, 43(6): 929-938
- 26 SUN Yuan-Ming, WANG Hong, LEI Hong-Tao, SHEN Yu-Dong. *Chinese J. Anal Chem.*, **2015**, 43(6): 871-875
孙远明, 王弘, 雷红涛, 沈玉栋. *分析化学*, **2015**, 43(6): 871-875
- 27 Du G M, Liu M J, Gan Y, Wei Y, Wu Y. *Mol. Biol. Tissue Culture.*, **2013**, 14(6): 816-819, 837
- 28 Rhyu M S. *JNCI-J. Natl. Cancer Inst.*, **1995**, 87(12): 884-894
- 29 Waite K V, Maberly G F, Ma G, Eastman C J. *Clin. Chem.*, **1986**, 32(10): 1966-1968

Chemiluminescence Immunoassay for Quantitative Analysis of Prostate Specific Antigen Complexed to $\alpha 1$ -Antichymotrypsin in Human Serum

ZHOU You-Jun¹, LI Jiao-Xia¹, CHENG Hui-Jun¹, YANG Qiao-Fen¹, HE Mei-Qiong¹, GUO Li-Ping¹, DENG Zhi-Yong^{*2}

¹(Nuclear Medicine, Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650051, China)

²(Nuclear Medicine, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650051, China)

Abstract Eight mouse hybridoma cell lines which stably secreted monoclonal antibodies (McAbs) against human prostate-specific antigen- $\alpha 1$ -antichymotrypsin complex (PSA-ACT) were obtained through hybridoma technique. After purification, the immunological characters of 8 McAbs were identified and classified by epitopes analysis through indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A pair of McAbs was chosen from above 8 McAbs, based on which a highly sensitive, simple and rapid chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) was developed for determination of PSA-ACT in human serums using the lumino- H_2O_2 reaction catalyzed by horseradish peroxidase (HRP) as the chemiluminescence system. Several experiment factors such as coating buffer, coating concentration, dilution ratio of PSA-ACT-HRP complex, incubation time, immunoreaction protocol and chemiluminescence reaction time were optimized. The results showed that the linear range of the proposed method for PSA-ACT determination was 0-40 ng/mL ($R^2=0.9943$), with the detection limit of 0.53 ng/mL. The inter-assay relative standard deviations (RSDs) were 4.6% -6.6%, and intra-assay RSDs were 5.7% -8.0%. The recoveries of PSA-ACT at three spiked levels in serum samples were 95.4% -104.2%. The proposed method exhibited a cross-reactivity of 0.6% with free-PSA. The proposed method is stable, sensitive, rapid and simple, and provides a foundation for the development of PSA-ACT CLEIA kit and shows great value in clinical auxiliary diagnosis of prostate cancer.

Keywords Prostate-specific antigen complexed to $\alpha 1$ -antichymotrypsin; Prostate cancer; Chemiluminescence enzyme immunoassay; Horseradish peroxidase

(Received 25 November 2015; accepted 7 June 2016)