

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.01.032

AFP 蛋白芯片技术的检测流程优化 *

刘海东¹ 王振顺¹ 刘超¹ 张爱英^{2Δ} 李宁^{1,2Δ}

(1 首都医科大学附属北京佑安医院 北京 100069; 2 北京市肝病研究所 北京 100069)

摘要 目的:通过优化现有的蛋白芯片检测过程,在保证检测准确性的同时缩短甲胎蛋白(Alpha Fetal protein, AFP)的检测时间,提高检测效率,为原发性肝癌的筛查提供经济、便捷、省时、有效的检测方法。**方法:**本研究在传统蛋白芯片检测流程(1-1.5 小时)的基础上,通过优化检测流程将检测时间缩短至 18 分钟,并且通过和传统方法进行比较,评价该优化方法的检测效能。**结果:**与传统蛋白芯片检测方法相比,本优化方法的检测时间缩短至 18 分钟。重复检测同一样本,传统方法 AFP 水平为 16.50 ± 1.172 ng/mL,优化方法 AFP 水平为 18.33 ± 1.029 ng/mL,结果无明显统计学差异($P=0.251$)。**结论:**本研究成功地优化了 AFP 的蛋白芯片检测流程,在缩短检测时间的同时,保证了检测的准确率,是一种经济省时易操作的 AFP 检测方法。

关键词:甲胎蛋白;原发性肝癌;蛋白芯片;优化

中图分类号:R446.6;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)01-146-04

Optimization of Protein Microarray Procedure for Detecting Alpha-fetoprotein*

LIU Hai-dong¹, WANG Zhen-shun¹, LIU Chao¹, ZHANG Ai-ying^{2Δ}, LI Ning^{1,2Δ}

(1 Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100069, China;

2 Beijing Institute of Hepatology, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100069, China)

ABSTRACT Objective: To optimize the traditional protein microarray procedure for detecting AFP (Alpha Fetal protein) by shortening the detection time, providing an effective, economical, easily performed and time-saving method for screening primary liver cancer. **Methods:** The optimized procedure significantly shortened the detection time to 18 minutes on the basis of traditional protein microarray detection procedure (1-1.5 hours). Serum sample was examined using improved and traditional procedure of protein microarray to verify the accuracy of improved procedure. **Results:** Compared with the traditional procedure of protein microarray, the improved procedure shortened the detection time to 18 minutes. The results of repetition test of the same sample indicated that no statistically significant difference was found in the AFP levels between traditional procedure and improved procedure (16.50 ± 1.172 ng/mL vs 18.33 ± 1.029 ng/mL, $p=0.251$). **Conclusion:** On the premise of ensuring detection accuracy, this study successfully optimized the AFP protein microarray detection procedure by shortening the detection time.

Key words: Alpha Fetal protein; Primary Liver Cancer; Protein microarray; Optimization

Chinese Library Classification (CLC): R446.6; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)01-146-04

前言

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)为我国常见恶性肿瘤之一,2015 年中国癌症统计数据显示其死亡率在恶性肿瘤中列第三位,仅次于肺癌和胃癌^[1-5]。其中,肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占原发性肝癌的 90%以上^[6,7],但其病因至今尚不完全清楚,可能与病毒性肝炎、黄曲霉毒素、肝硬化、遗传、烟酒等因素有关^[8,9]。目前,治疗肝癌的手段主要包括外科手术治疗、射频消融、介入治疗、肿瘤生物治疗、靶向治疗和免疫

治疗等,其中外科手术治疗是公认的治疗原发性肝癌最主要、最可靠的手段^[3,10,11],早期 HCC 患者手术治疗后的 5 年生存率达到 50-70%^[12]。

目前,肝癌的术前诊断主要依靠影像学辅助血清肿瘤标志物的检测。近年来,130 多种肝癌相关的肿瘤标志物包括甲胎蛋白、甲胎蛋白异质体(AFP-L3)、高尔基蛋白 73(GP73)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、微小 RNA(miRNA)等被发现并报道^[13-17],其中甲胎蛋白是目前乙肝相关肝癌定性诊断的最佳标志物,对乙肝相关肝癌的确诊、预后推测、疗效判断及复发转移的

* 基金项目:国家“十二五”科技成果转化立项项目子课题(2015ZX10004801);国家艾滋病和病毒性肝炎等重大疾病传染病防治科技重大专项(2012ZX10002017-007);北京市属医学科学院所公益发展改革试点项目(京医研 2016-2);北京市科委课题(D121100003912002);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划(2013-3-074);北京市教育委员会项目(KM201510025020);北京市医院管理局重点医学专业发展计划(ZYLYX201311);2017 北京市肝病研究所自主课题项目

Δ 通讯作者:李宁,北京佑安医院院长,北京市肝病研究所所长, E-mail: liningbjyah@vip.sina.com;

张爱英, E-mail: zhangaiying1996@163.com

(收稿日期:2017-05-28 接受日期:2017-06-21)

监测具有良好的临床价值^[18,19]。目前常用的 AFP 检测技术主要有酶联免疫吸附试验 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)、电化学发光免疫分析法、蛋白芯片方法等,其中蛋白芯片技术有费用低廉、所需样本少等优点^[20-22],但传统检测时间为 1-1.5 小时,与电化学发光技术(18 分钟)相比还存在不足。因此,本研究旨在优化 AFP 蛋白芯片技术的检测流程,在保证检测准确性的同时,通过优化检测流程缩短蛋白芯片技术的检测时间,从而提高蛋白芯片技术的检测效率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本选择 本研究血清标本为首都医科大学附属北京佑安医院北京乙型肝炎数据库样本资源库中,经术后病理确诊的肝细胞癌患者术前预留血清。

1.1.2 试剂和仪器 鼠源 AFP 单克隆抗体(深圳菲鹏公司);醛基芯片(上海百傲公司);HRP 标记的兔源 AFP 多克隆抗体(深圳菲鹏公司);10%牛血清白蛋白 (美国 sigma);HRP 发光底物(德国 Merck Millipore 公司);伯乐成像仪 (BIO-RAD CHEMI-DOC MP imaging system 美国 BIO 公司),Nano-Plotter TM- 压电式微量喷墨点阵制备系统(德国 GESIM 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 芯片的点样 利用 Nano-Plotter TM - 压电式微量喷墨点阵制备系统,依次将鼠源 AFP 单克隆抗体 (点样浓度 1 mg/mL)和 10%牛血清白蛋白(BSA)点在芯片上,点样 3 次,芯片为醛基芯片,每张芯片包含 10 个检测方格,每个方格检测一份血清,一次检测 10 份血清(图 1)。

1.2.2 芯片的检测传统检测流程 如图 2 所示:① 每个检测孔加入检测 PBS 稀释血清 15 μ L(稀释比例 1:1),放置在湿盒内,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟,使血清中的 AFP 蛋白与芯片上固定的鼠源

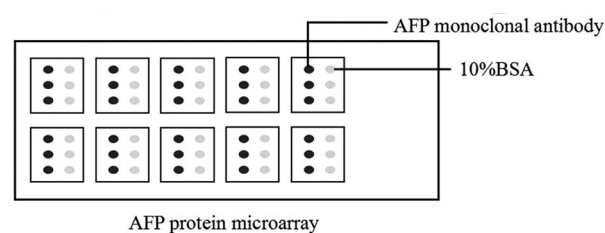


图 1 蛋白质芯片示意图

Fig.1 Sketch map of protein chip

AFP 单克隆抗体结合形成抗原 - 抗体复合体;然后利用 0.05% 的 PBS-Tween 洗涤芯片,每次 5s,洗涤 5 次,清洗非特异结合;

② 每个检测孔再加入 PBS 稀释的 HRP 标记 AFP 抗体 15 μ L(稀释比例 1:150),放置在湿盒内,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟,使 HRP 标记 AFP 抗体通过血清中的 AFP 与芯片上的鼠源 AFP 单克隆抗体结合形成 HRP 抗体 - 抗原 - 抗体复合体;然后利用 0.05% 的 PBS-Tween 洗涤芯片,每次 5s,洗涤 5 次,清洗非特异结合;

③ 最后加入 HRP 发光底物,通过伯乐成像仪对 HRP 信号进行检测量化。固相载体上的化学发光像素与标本中受检抗原的量成正向相关。芯片点样抗体和检测用的抗体分别取自不同种属的动物,这种点夹心法具有很高的特异性。

优化检测流程:① 利用 PBS 稀释 HRP 标记的兔源 AFP 多克隆抗体(稀释比例 1:75),将稀释后的 HRP-AFP 抗体(7.5 μ L)与检测血清(7.5 μ L)混合后加入检测孔,放置在湿盒内,37 $^{\circ}$ C 孵育 18 分钟,使 HRP 标记 AFP 抗体通过血清中的 AFP 与芯片上的鼠源 AFP 单克隆抗体结合形成 HRP 抗体 - 抗原 - 抗体复合体,然后利用 0.05% 的 PBS-Tween 洗涤芯片,每次 5s,洗涤 5 次,清洗非特异结合;② 加入 HRP 发光底物,通过伯乐成像仪对 HRP 信号进行检测量化。

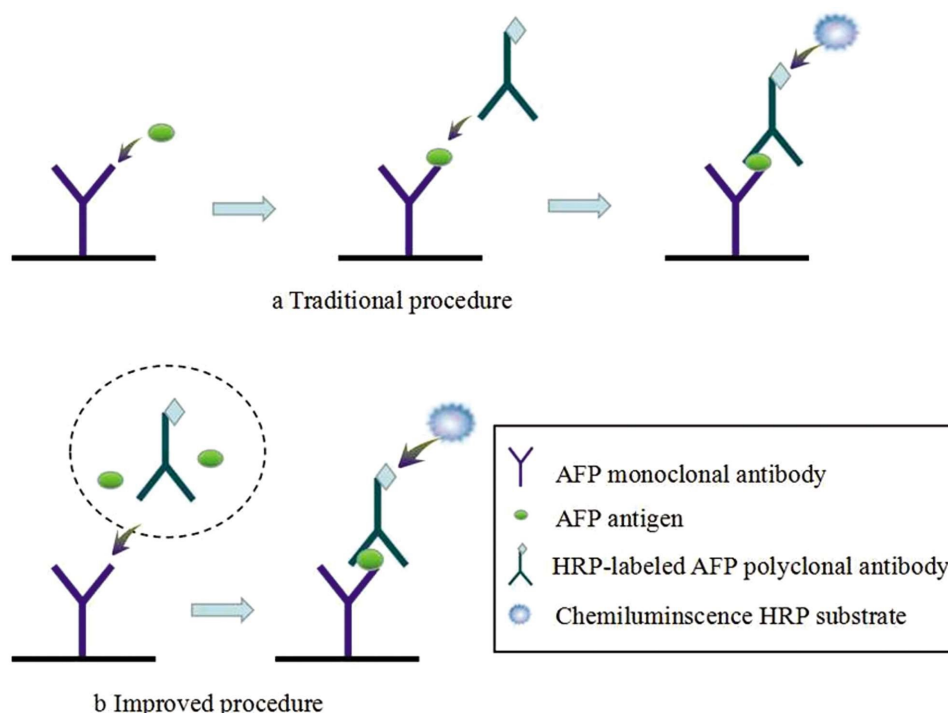


图 2 AFP 蛋白质芯片流程图

a 传统检测流程图 b 优化检测流程图

Fig.2 Flow chart of the AFP protein chip a Traditional procedure b Improved procedure

1.2.3 标准曲线的制作 将 AFP 抗原标准品(240 ng/mL)进行倍数稀释,浓度分别为 80、40、20、10 和 5 ng/mL。利用传统及优化的检测流程,分别进行检测量化。AFP 标准品蛋白的梯度浓度为横坐标,以梯度浓度的标准品经化学发光成像检测方法检测到的对应像素值为纵坐标,得出标准曲线。

1.3 统计学方法

以上试验均重复 3 次,数据取 3 次试验结果的平均值。统计学处理采用 IBM SPSS 22.0 软件分析处理,计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示,采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

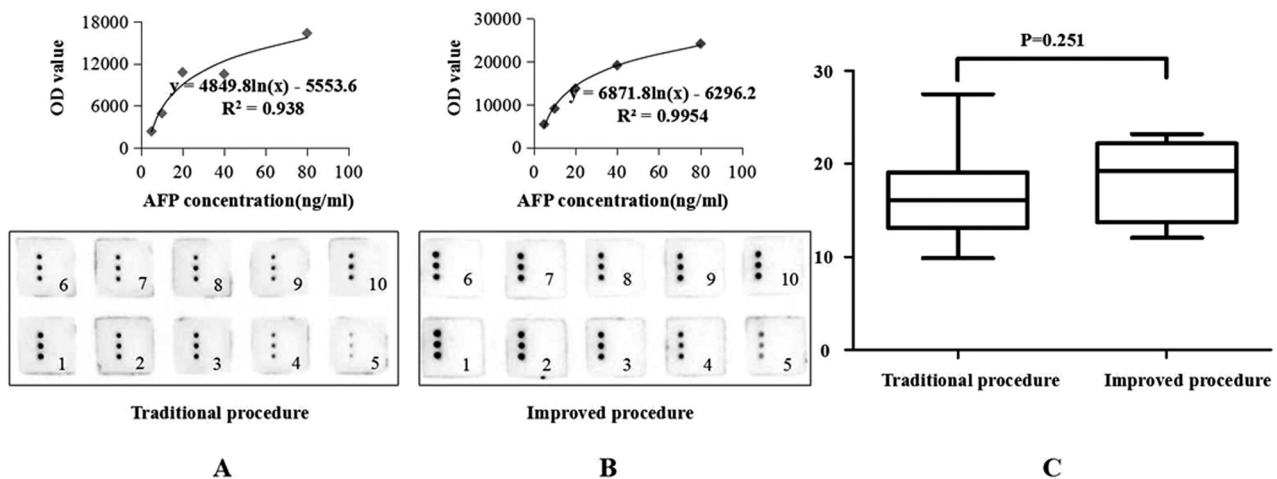


图 3 蛋白芯片传统流程与改进流程检测结果的比较

图 3A:传统流程的扫描结果和标准曲线:1-5 AFP 标准品(1: 80 ng/mL, 2:40 ng/mL, 3: 20 ng/mL, 4: 10 ng/mL, 5: 5 ng/mL), 6-10 HCC 血清

图 3B:优化流程的扫描结果和标准曲线:1-5 AFP 标准品(1: 80 ng/mL, 2:40 ng/mL, 3: 20 ng/mL, 4: 10 ng/mL, 5: 5 ng/mL), 6-10 HCC 血清

图 3C:蛋白芯片传统流程与改进流程检测结果的比较,独立样本 t 检验, $P = 0.251$

Fig.3 Comparison of traditional procedure and improved procedure by protein microarray

Fig.3A: Scan result and the standard curve of traditional procedure: 1-5 AFP standard (1: 80 ng/mL, 2:40 ng/mL, 3: 20 ng/mL, 4: 10 ng/mL, 5: 5 ng/mL), 6-10 HCC serum

Fig.3B: Scan result and the standard curve of improved procedure: 1-5 AFP standard (1: 80 ng/mL, 2:40 ng/mL, 3: 20 ng/mL, 4: 10 ng/mL, 5: 5 ng/mL), 6-10 HCC serum

Fig.3C: Comparison of traditional procedure and improved procedure by protein microarray, independent sample t test, $P = 0.251$

3 讨论

据报道,目前发现的肝癌血清标志物达 100 多种,其中 AFP 是临床上最常用的肝癌血清标志物^[23]。AFP 是一种胎儿生长发育过程中表达的胎原蛋白,通常在成人体内含量很低。但是在原发性肝癌或者部分良性肝病中,AFP 基因重新被激活并大量表达,因此 AFP 被认为是肝癌的经典血清标志物。近年来随着研究的不断深入,人们发现 AFP 具有抗凋亡和促进增殖等功能,同时与肝癌细胞的恶性生长、转移和侵袭密切相关,因此被广泛应用于靶向药物研发、肿瘤疾病监测及预后评估^[24-26]。

近年来,蛋白芯片技术在肿瘤标志物检测中的应用得到广泛认可^[27-29]。本团队在既往研究中采用蛋白芯片技术在肝癌肿瘤标志物检测方面进行了大量的研究,并与 ELISA、电化学发光等方法进行验证,实现标志物检测准确、经济、微量^[30,31]。但

通过软件分析对伯乐成像仪扫描结果进行分析,获得 1-5 格 AFP 标准品各个梯度浓度 (80 ng/mL、40 ng/mL、20 ng/mL、10 ng/mL 和 5 ng/mL)的化学发光像素值。以标准物的梯度浓度为横坐标,每个梯度浓度标准品的四个像素值平均值为纵坐标,绘出标准曲线。传统检测流程标准曲线回归方程 $y = 4849.8\ln(x) - 5553.6$, $R^2 = 0.938$,优化检测流程标准曲线回归方程 $y = 6871.8\ln(x) - 6296.2$, $R^2 = 0.9954$ (图 3A、3B)。并计算出同一样品(6-10)多次重复检测结果,传统检测 AFP 水平为 16.50 ± 1.172 ng/mL,优化检测为 18.33 ± 1.029 ng/mL,结果无明显统计学差异($P = 0.251$)(图 3C)。

是传统的蛋白芯片方法检测时间需要 1-1.5 小时,与目前临床上应用的电化学发光技术相比耗时较长,不利于大样本筛查。为解决这一问题,在前期研究基础上,本研究通过优化检测流程,将 HRP 标记的 AFP 抗体和检测样本同时加入芯片进行检测,并缩短孵育时间,在保证检测准确率的同时,明显缩短了检测时间。对同一样本进行 15 次检测,传统方法检测的 AFP 水平为 16.50 ± 1.172 ng/mL,优化方法检测的 AFP 水平为 18.33 ± 1.029 ng/mL,结果无明显统计学差异($P = 0.251$)。

抗原与抗体相是非共价、可逆结合,所形成的复合物并不牢固,因此除了抗原、抗体本身的性质、活性、含量外,反应时间、温度、PH、洗涤次数等都会对实验结果产生影响。传统检测流程的 HRP 标记 AFP 抗体与 AFP 抗原是在 PBS 稀释液中结合,可能会对抗原抗体的结合能力产生影响,优化检测流程将稀释后的 HRP-AFP 抗体与检测血清混合后加入检测孔,并在 37℃湿盒内孵育,使抗原抗体特异性结合的环境更接近于生理

环境;传统检测流程在捕获抗体与 AFP 抗原在 37℃ 湿盒内孵育后洗涤一次,捕获抗体-抗原复合物与 HRP 标记的检测抗体结合后,进行第二次洗涤。改进后的方法只洗涤一次。洗涤液中的 Tween 为非离子表面活性剂、去污剂,在用 0.05% PBS-Tween 清洗非特异性结合的抗原、抗体的过程中,可能会对特异性结合的抗原抗体产生影响,对检测结果造成影响,优化检测流程减少了操作步骤、PBS-Tween 洗涤次数,在缩短检测时间的同时减少了误差。目前,本优化流程仅是针对单一 AFP 进行检测,在多种肿瘤标志物联合检测中的效能仍需要进一步试验进行验证。

总之,本研究提出的 AFP 蛋白芯片优化方法,在传统蛋白芯片检测技术的基础上,实现了血清 AFP 快速准确的检测,该方法方便省时,同时经济实用,适合于进行大规模的肝癌筛查,有助于提高原发性肝癌诊断率。

参考文献(References)

- [1] Cong WM, Wu MC New insights into molecular diagnostic pathology of primary liver cancer: Advances and challenges [J]. Cancer Lett, 2015, 368: 14-19
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65: 87-108
- [3] Wang C-H, Wey K-C, Mo L-R, et al. Current Trends and Recent Advances in Diagnosis, Therapy, and Prevention of Hepatocellular Carcinoma [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2015, 16: 3595-3604
- [4] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66: 115-132
- [5] Yoo SY, Badrinath N, Woo HY, et al. Oncolytic Virus-Based Immunotherapies for Hepatocellular Carcinoma [J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017: 5198798
- [6] Deng GL, Zeng S, Shen H. Chemotherapy and target therapy for hepatocellular carcinoma: New advances and challenges[J]. World J Hepatol, 2015, 7: 787-798
- [7] European OF, R, Treatment Of C, Llovet J, et al. European Association For The Study Of The Liver, European Organisation For Research And Treatment Of Cancer [J]. EASL-EORTC clinical practice guidelines: Management of hepatocellular carcinoma, 2012
- [8] Borena W, Strohmaier S, Lukanova A, et al. Metabolic risk factors and primary liver cancer in a prospective study of 578,700 adults [J]. Int J Cancer, 2012, 131: 193-200
- [9] Mittal S, El-Serag HB Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population[J]. J Clin Gastroenterol, 2013, 47 Suppl: S2-6
- [10] Kawaguchi Y, Honda G, Endo I, et al. Current Technical Issues for Surgery of Primary Liver Cancer[J]. Liver Cancer, 2017, 6: 51-58
- [11] Hsu C, Chen BB, Chen CH, et al. Consensus Development from the 5th Asia-Pacific Primary Liver Cancer Expert Meeting (APPLE 2014) [J]. Liver Cancer, 2015, 4: 96-105
- [12] Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008[J]. J Hepatol, 2008, 48(Suppl 1): S20-37
- [13] Lok AS, Sterling RK, Everhart JE, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein as biomarkers for the early detection of hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2010, 138: 493-502
- [14] Zhou J, Lv R, Song X, et al. Association between two genetic variants in miRNA and primary liver cancer risk in the Chinese population[J]. DNA Cell Biol, 2012, 31: 524-530
- [15] Wang XY. The Diagnostic Value of Combined Detection of Serum GP73, AFP and AFP-L3 in Primary Liver Cancer [J]. Labeled Immunoassays & Clinical Medicine, 2017
- [16] Liu T, Yao M, Liu S, et al. Serum Golgi protein 73 is not a suitable diagnostic marker for hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2017 [Epub ahead of print]
- [17] Di TL, Roncalli M. Tissue Biomarkers in Hepatocellular Tumors: Which, When, and How[J]. Frontiers in Medicine, 2017, 4: 10
- [18] Lim TS, Kim DY, Han KH, et al. Combined use of AFP, PIVKA-II, and AFP-L3 as tumor markers enhances diagnostic accuracy for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients [J]. Scand J Gastroenterol, 2016, 51: 344-353
- [19] Sang JP, Jang JY, Jeong SW, et al. Usefulness of AFP, AFP-L3, and PIVKA-II, and their combinations in diagnosing hepatocellular carcinoma[J]. Medicine, 2017, 96: e5811
- [20] Zhang A, Sven S, Wang S, et al. A Chemiluminescent Protein Microarray Method for Determining the Seroglycoid Fucosylation Index [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 31132
- [21] Zhou SM, Cheng L, Guo SJ, et al. Lectin RCA-I specifically binds to metastasis-associated cell surface glycans in triple-negative breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2015, 17: 36
- [22] Hu S, Wan J, Su Y, et al. DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors[J]. Elife, 2013, 2: e00726
- [23] An S-L, Xiao T, Wang L-M, et al. Prognostic Significance of Preoperative Serum Alpha-fetoprotein in Hepatocellular Carcinoma and Correlation with Clinicopathological Factors: a Single-center Experience from China[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2015, 16: 4421-4427
- [24] Zhao Y, Wang M, Cui C, et al. Significance of combined tests of serum golgi glycoprotein 73 and other biomarkers in diagnosis of small primary hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Biomark, 2015, 15: 677-683
- [25] Schutte K, Balbisi F, Malfertheiner P. Prevention of Hepatocellular Carcinoma[J]. Gastrointest Tumors, 2016, 3: 37-43
- [26] Li M, Li H, Li C, et al. Alpha-fetoprotein: a new member of intracellular signal molecules in regulation of the PI3K/AKT signaling in human hepatoma cell lines[J]. Int J Cancer, 2011, 128: 524-532
- [27] Clarke C H, Weinberger S R, Clarke M S F. Application of ProteinChip® Array Technology for Detection of Protein Biomarkers of Oxidative Stress[M]. Critical Reviews of Oxidative Stress and Aging: Advances in Basic Science, Diagnostics and Intervention (In 2 Volumes), 2014: 366-379
- [28] Deng J, Bi L, Zhou L, et al. Mycobacterium tuberculosis proteome microarray for global studies of protein function and immunogenicity [J]. Cell Rep, 2014, 9: 2317-2329
- [29] Xu Z, Huang L, Zhang H, et al. PMD: A Resource for Archiving and Analyzing Protein Microarray data[J]. Sci Rep, 2016, 6: 19956
- [30] Zhao Y, Zhang Y, Lin D, et al. Protein microarray with horseradish peroxidase chemiluminescence for quantification of serum alpha-fetoprotein[J]. J Int Med Res, 2015, 43: 639-647
- [31] Zhang A, Yin C, Wang Z, et al. Development and application of a fluorescence protein microarray for detecting serum alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma [J]. J Int Med Res, 2016, 44: 1414-1423