

技术与方法

磁免疫电化学发光检测肺癌血清 p53 抗体*

闫贵虹 邢 达** 谭石慈

(华南师范大学激光生命科学研究所, 广州 510631)

摘要 肿瘤抑制基因——p53 基因的突变可能产生 p53 抗体. p53 抗体在肿瘤的诊断、预后及监测等方面具有重要的临床价值. 目前检测 p53 抗体的方法, 如酶联免疫分析方法, 需要多个步骤, 比较费时, 且大部分检测指标只能是半定量, 具有一定的局限性. 提出了一种磁免疫电化学发光 (IM-ECL) 分析方法定量检测人血清 p53 抗体. 这种新的分析方法检测人血清 p53 抗体的最低检测极限可达到 10 ng/L, 标准曲线的动力学范围和线性范围达到 5 个数量级 (0.01 ~ 1 000 $\mu\text{g/L}$). 我们应用 IM-ECL 分析法检测肺癌病人血清, 只需要 50 μl 的样品量, 30 min 的孵育时间和少于 50 s 的采集时间, 得出肺癌血清中 p53 抗体的阳性率为 28.6 %, 然后通过标准曲线定量阳性血清中 p53 抗体的浓度. 从肺癌血清的结果中发现, 随着临床分期的升高, p53 抗体浓度增加. IM-ECL 分析方法在检测限、线性范围、分析时间等方面都优于酶联免疫分析, 是一种可行的快速、灵敏、定量检测人血清 p53 抗体的分析方法.

关键词 磁免疫, 电化学发光, p53, 肺癌, 血清抗体

学科分类号 Q632, R730.45

肿瘤抑制基因 p53 对肿瘤学诊断具有非常重要的意义, 在人类 50% 的癌症中都发现有 p53 基因的突变^[1]. p53 基因最主要的突变形式是错义突变^[2], 这导致突变型的 p53 蛋白在肿瘤细胞核内聚集, 有一些病人机体内因此发生免疫反应产生 p53 抗体. 用酶联免疫方法检测到血清中 p53 抗体与 p53 基因突变有一定的关系^[3]. 尽管 p53 抗体产生的机理目前还不清楚, 但是血清中的 p53 抗体是 p53 基因突变的间接结果, 而且它的产生不依赖于 p53 基因突变的位点已得到证实.

研究表明, 许多恶性肿瘤病人的血清中都检测到有 p53 抗体^[4,5]. p53 基因的突变在癌症的早期就被发现^[6,7], 在一些肝癌病人中, p53 抗体的存在与甲胎蛋白无关^[5], 甚至在某些无症状的病人中也检测到 p53 抗体的存在^[8,9].

p53 抗体可作为癌症诊断和预后的标记物^[4,10]. 在癌症病人体内, p53 抗体浓度的变化与肿瘤的发展与衰退有关. p53 抗体经常存在于恶性肿瘤病人体内, 特别是存在于治疗后复发的病人中, 预示了较低的存活率.

检测 p53 抗体的方法很多, 当前最通用的是酶联免疫分析方法, 有些公司已经开发了试剂盒 (如法国的 PharmaCell 公司和德国的 Dianova 公司). 酶联免疫分析方法需要多个步骤和很长的孵育时间 (每一步都超过 1 h), 而且通过这种方法得到的结果大都是半定量的.

近年来, 磁免疫分离 (IMS) 和电化学发光 (ECL) 分析方法不断发展^[11~14]. 二者结合的磁免疫电化学发光 (IM-ECL) 分析方法已被用于检测一些抗原、抗体和半抗原, 如癌胚抗原和甲胎蛋白^[12~16]. 磁免疫分离方法通过磁珠分离和免疫反应能从大量复杂的生物样品中捕获被检测抗原或抗体. 电化学发光检测分析方法的灵敏度比其他化学发光检测技术都要高, 而且它通过电激发, 比较容易控制. 电化学发光检测是通过检测标记在抗体上的发光物——三联吡啶钌来实现的. 其发光原理为: 在三联吡啶钌 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) 与三丙胺 (TPA) 的发光体系中, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和 TPA 在阳极 (工作电极) 表面同时各失去一个电子, 使 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 被氧化成三价的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, 成为一种强氧化剂; 另一方面, TPA 被氧化成 $\text{TPA}^{+\cdot}$, 很不稳定, $\text{TPA}^{+\cdot}$ 自发失去一个质子 (H^+), 形成自由基 $\text{TPA}^\cdot$, 是一种很强的还原剂, 可将一个电子给三价的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, 使其形成激发态的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$. 激发态的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ 通过荧光机制衰减, 发射出波长 620 nm 的光子, 重新变成基

* 国家重大基金研究资助项目 (2002CCC00400) 和广东省自然科学基金团队项目 (015012).

** 通讯联系人.

Tel: 020-85210089, Fax: 020-85216052

E-mail: xingda@scnu.edu.cn

收稿日期: 2003-03-27, 接受日期: 2003-04-26

态的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. 该过程在电极上周而复始地进行, 产生许多光子.

为了用 IM-ECL 分析方法检测人血清中的 p53 抗体, 实验中设计了抗原包被的磁珠富集被检测的抗体, 再连接上用活化钉标记的二抗, 通过电化学发光检测系统检测发光来定量分析抗体的浓度. 本文报道用 IM-ECL 分析方法检测经稀释于正常人血清中的极低浓度的 p53 抗体, 并且做出了标准曲线, 定量分析了临床诊断过的肺癌病人血清中的 p53 抗体的浓度.

1 材料和方法

1.1 材料

六水合二氯三联吡啶钉 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、生物素 N-羧基琥珀酰亚胺酯 (biotin-NHS ester)、三丙胺 (TPA, 98%) 为美国 Sigma 公司产品.

发光标记物三联吡啶钉 N-羧基琥珀酰亚胺酯 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS ester) 合成原料: 二氯联吡啶钉 ($\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$), 2, 2'-联吡啶-4, 4'-二羧酸 ($\text{bpy}(\text{COOH})_2$), 六氟磷酸钠 (NaPF_6), 均为美国 Sigma 公司产品. 链霉亲和素包被磁珠 ($\Phi = 2.8 \mu\text{m}$)、磁分离器 (DynaL MPC-1) 为美国 Dynal 生物技术公司产品. 鼠抗人 p53 单克隆抗体为丹麦 Dako 公司产品. 兔抗人 p53 多克隆抗体为英国

Serotec 公司产品. 羊抗兔 IgG, 兔抗人 IgG 为洛阳华美生物工程公司产品. 重组人 p53 蛋白为加拿大 BD 公司产品. 三蒸水配制磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4, 本实验室制备). 血清样品 (20 个正常人血清, 7 个肺癌病人血清) 由中山大学肿瘤医院提供. 其他试剂为国产分析纯.

1.2 抗体和蛋白质的标记

发光标记物 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS ester 的合成参照文献 [17]. 我们设计了一种新的检测体系, 如图 1 所示. 由于是检测抗体, 所以 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS ester 标记在二抗上, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS ester 与二抗的配制比例按 50:1, 标记步骤参照文献 [17]. Biotin-NHS ester (溶于二甲基甲酰胺) 与鼠抗人 P53 单克隆抗体的配制比例按 10:1, 室温振荡 1 h, 未标记的活化生物素和活化钉通过超滤离心管 (美国 Millipore 公司) 除去. 生物素标记的抗体先与链霉亲和素包被的磁珠相连 (每毫克磁珠含 $10 \mu\text{g}$ 抗体), 室温振荡 1 h, 然后置于磁分离器中用 PBS (含 1.5% Tween-20) 和 PBS 清洗两次除去未连接的抗体. 磁珠用 PBS 重组到原来的体积, 再和人 p53 蛋白室温振荡孵育 30 min. 置于磁分离器中用 PBS 清洗除去未连接的蛋白质. 标记好的抗体和蛋白质于 4°C 短期保存.

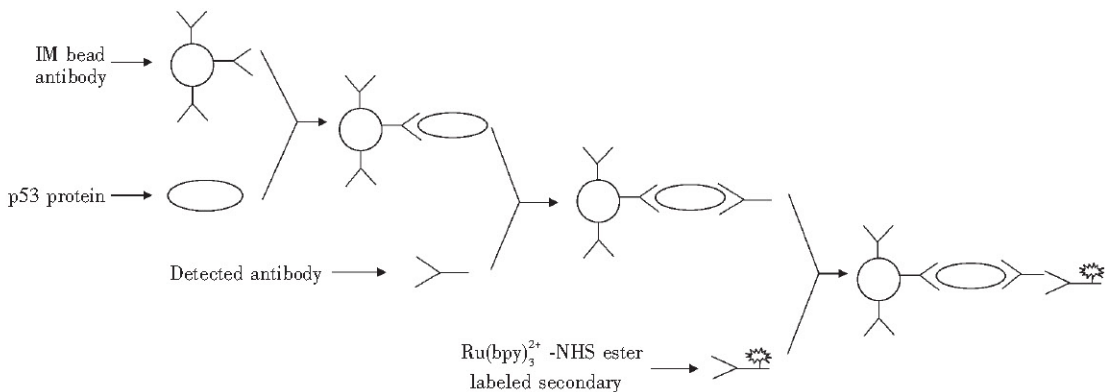


Fig. 1 Diagram of assay procedure

1.3 ECL 检测

ECL 检测分析系统由本课题组自行设计, 如图 2 所示. 在系统中, 核心部分是样品池与超微弱光信号采集部分, 密闭于暗箱中. 样品池为样品反应、产生电化学发光的部位, 其内包括工作电极、对电极和 Ag/AgCl 参比电极. 工作电极采用圆片状铂电极; 对电极采用围绕工作电极的圆环状铂丝电

极. 样品池的工作电极下方放置一个磁铁, 用来进行磁富集. 光信号通过光纤束 (南京春晖公司, $\Phi = 5 \text{ mm}$) 传输, 到达可对单光子计数的光电倍增管 (PMT, Perkinelmer MP-962) 光电阴极, 变成电信号后再经过前置放大器、放大器及甄别器, 输出标准的晶体管-晶体管逻辑电平 (TTL) 脉冲, 由计算机上的 USB 数据采集卡 (Advantech PCL-836) 计

数, 然后由计算机软件 Labview 处理和显示. 工作电极与对电极之间的电压由恒电位仪 (福建三明 HDV-7C) 给出, 使得工作电极与参比电极之间的电压恒定.

把 1.2 中 p53 蛋白包被的磁珠 (每管为 36 μg) 和 50 μL 血清样品室温振荡孵育 15 min. 然后置于磁分离器中用 PBS 清洗两次, 再加入活化钉 ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -NHS ester) 标记的二抗 (每管为 10 μg) 共同振荡孵育 15 min. 未连上的二抗通过用 PBS 清洗磁珠除去. 最后磁珠和三丙胺一起加入反应池, 磁珠被置于工作电极底部的磁片吸附于工作电极表面, 当给定工作电极与参比电极之间恒定电压 1.25 V ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 与 TPA 反应电压), 标记在二抗上的活化钉就和溶液中的 TPA 反应, 产生光子, 光信号由 PMT 检测.

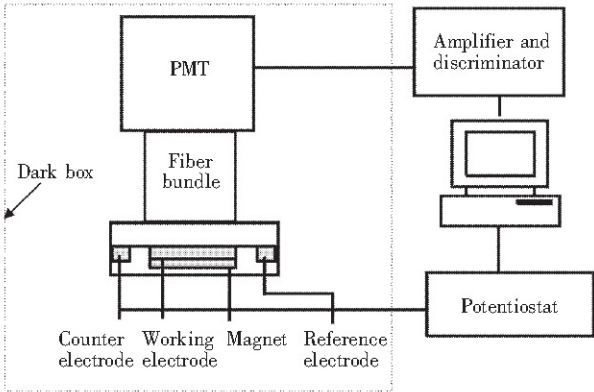


Fig. 2 Diagram of the essential components of ECL detection instruments

1.4 IM-ECL 检测 p53 抗体定标曲线的制定

为了定量检测癌症病人血清中 p53 抗体浓度, 要制定标准曲线. 我们用 IM-ECL 分析方法检测 20

个正常人血清样品的发光值. 根据参考文献 [12], 阳性临界值根据正常人血清的发光平均值 (V_{negative}) 和标准方差 ($V_{\text{stdev}(\text{neg})}$) 确定, 如公式 (1) 显示.

$$V_{\text{cutoff}} = V_{\text{negative}} + 2.5 V_{\text{stdev}(\text{neg})} \tag{1}$$

把 20 个正常人血清混合, 加入标准兔抗人 p53 多克隆抗体制成浓度分别为 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1 000, 10 000 $\mu\text{g/L}$ 的血清样品. 为了验证重复性, 我们准备了三组相同浓度系列的样品, 每天准备一组并检测, 分三天完成. 每个血清样品采集 50 个 1 s 的数据, 然后用 Excel 统计平均值及标准方差. 根据检测到的发光值制定标准曲线, 标准曲线反映发光值随血清中 p53 抗体浓度的变化而变化的趋势.

1.5 定量分析肺癌病人血清 p53 抗体

7 个临床诊断为肺癌病人血清样品用 IM-ECL 分析方法检测两次. 每次采集 50 个 1 s 的数据, 然后用 Excel 统计平均值及标准方差. 发光值高于阳性临界值的血清样品确定为 p53 抗体阳性, 并根据标准曲线定量分析其 p53 抗体浓度.

2 结 果

2.1 临界值

用 IM-ECL 分析方法检测 20 个正常人血清样品平均发光值为 93.72, 标准方差为 25.21, 根据公式 (1), 计算出 p53 抗体的阳性临界值为 156, 换算为相应的 p53 抗体浓度为 0.019 $\mu\text{g/L}$.

2.2 系统稳定性

三组相同浓度系列的检测结果见表 1. 每一个血清样品的发光值为 50 s 采集的平均值, 对于相同抗体浓度的血清样品, 标准差反映了 50 s 检测值之间的偏差. 平均发光读数是 3 次测量的平均

Table 1 Reproducibility of p53 antibodies IM-ECL assay

ρ (p53 antibodies) / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$		ECL reading ¹⁾ ($\bar{x} \pm s$)		Average ECL reading ²⁾ ($\bar{x} \pm s$)
0.01	140.68 $\pm$ 13.13	144.73 $\pm$ 16.45	182.85 $\pm$ 26.62	156.09 $\pm$ 23.27
0.1	185.20 $\pm$ 27.69	205.34 $\pm$ 24.75	185.02 $\pm$ 21.19	191.85 $\pm$ 11.68
1	183.36 $\pm$ 34.68	346.24 $\pm$ 24.27	227.44 $\pm$ 29.14	219.01 $\pm$ 32.28
10	291.33 $\pm$ 40.33	325.86 $\pm$ 44.58	283.24 $\pm$ 22.02	300.15 $\pm$ 22.65
100	623.08 $\pm$ 66.28	499.39 $\pm$ 37.26	717.45 $\pm$ 60.40	613.31 $\pm$ 109.35
1 000	1 056.88 $\pm$ 119.97	962.79 $\pm$ 113.55	968.53 $\pm$ 96.77	996.07 $\pm$ 52.75
10 000	1 045.82 $\pm$ 117.29	943.96 $\pm$ 79.02	923.73 $\pm$ 59.05	971.17 $\pm$ 65.44

¹⁾ Each analysis represents a single run with 50 s acquisition time of each concentration on each day. Standard deviations come from 50 s acquisition time. ²⁾ Indicates ($\bar{x} \pm s$) of three independent assays.

值, 标准差反映了样品间的相对误差, 主要是由系统误差、随机测量误差和抽样误差造成的. p53 抗体的浓度低至 0.01 $\mu\text{g/L}$ 时, 检测到的发光值与阳性临界值基本一致, 所以该系统检测 p53 抗体的最低检测限为 0.01 $\mu\text{g/L}$. 根据结果显示, IM-ECL 系统具有比较好的稳定性.

2.3 定标曲线

表 1 显示, ECL 读数随着血清样品中 p53 抗体浓度的增加而增加, 动力学范围从 0.01 $\mu\text{g/L}$ 到 1 000 $\mu\text{g/L}$. 当 p53 抗体浓度超过 1 000 $\mu\text{g/L}$ 时, 出现前区效应, ECL 读数不再随样品中 p53 抗体浓度增加而增加, 这可能是由于抗原或二抗饱和引起的.

图 3 显示发光值-浓度双对数标准曲线, 图 3 中纵轴数值为发光值减去正常人血清平均读数 93.72 的三组平均值. 对 p53 抗体浓度从 0.01 $\mu\text{g/L}$ 到 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的发光值进行线性回归得 $r^2=0.9655$.

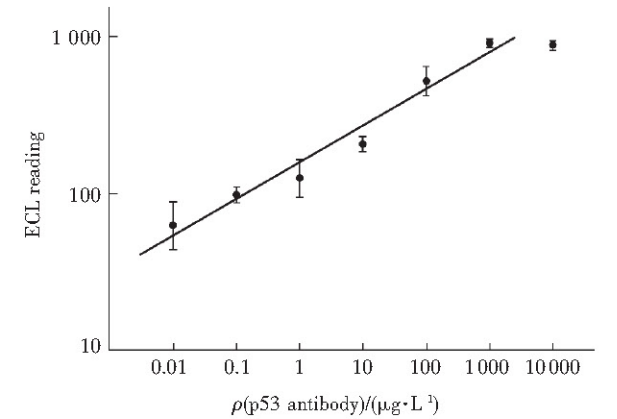


Fig. 3 A standard linear regression curve
The linear regression is come from round dot. ECL values represent the means from three independent assays. $r^2=0.9655$.

2.4 定量分析癌症病人血清中的 p53 抗体

肺癌 7 例, 其中 I 期 1 例, II 期 2 例, III 期 3 例, IV 期 1 例. 每一例病人血清样本用 IM-ECL 分析方法检测两次取其平均值, 结果如表 2 所示. 从肺癌血清的结果中看出, 7 个样品中有两个血清 p53 抗体阳性, 阳性率 28.6%. 其中有一例处于 III 期; 另外一例处于 IV 期. 根据标准曲线 (图 3), 计算出这两个血清样本中的 p53 抗体浓度分别为 11.504 $\mu\text{g/L}$ 和 638.202 $\mu\text{g/L}$. III 期样品中还有一个样本其中一次的发光读数是 159.15, 处于临界

范围 (临界值 + 20%), 但两次平均读数处于临界值之下, 所以认为是阴性的. 从几例肺癌样品的结果看出, p53 抗体的浓度与癌症的进展有关系. 由于样品数量的限制, 虽然没能做统计学的分析, 但是仍然可以看到一个趋势, 随着癌症分期的升高, 血清 p53 抗体的浓度也升高.

Table 2 P53 antibodies IM-ECL assay results of lung carcinoma sera

Stage	ECL reading ($\bar{x} \pm s$) ¹⁾	ρ (p53 antibodies) / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Qualitative results
I	51.21 $\pm$ 9.08	NC	-
II	84.45 $\pm$ 14.61	NC	-
	54.07 $\pm$ 1.32	NC	-
III	135.56 $\pm$ 33.36	NC	-
	104.64 $\pm$ 3.73	NC	-
	371.03 $\pm$ 25.16	11.504	+
IV	803.47 $\pm$ 35.06	638.202	+

NC: not calculate because the ECL reading is below the positive critical line. ¹⁾ Indicates ($\bar{x} \pm s$) of three independent assays.

3 讨 论

本研究发展了一种新的 IM-ECL 检测血清中 p53 抗体的分析方法, 利用抗原包被的磁珠富集被检测的抗体, 连接上用活化钉标记的二抗, 通过电化学发光检测系统检测发光来检测抗体的含量. 用这种分析方法检测人血清中 p53 抗体的最低检测极限可达到 10 ng/L. 与酶联免疫分析方法相比, 检测更加快速, 1 h 内就可以完成. 用我们设计的这种检测分析方法, 血清中的许多其他抗体都可以被检测.

IM-ECL 检测分析方法检测人血清 p53 抗体的标准曲线的动力学范围比较广, 线性范围从 0.01 $\mu\text{g/L}$ 到 1 000 $\mu\text{g/L}$. 在我们的分析当中, 癌症病人血清的发光值没有超过标准曲线的动力学范围. 但抗体浓度过高时出现的前区效应在免疫学中比较普遍, 而且在其他的试剂及分析中也发现类似的现象^[12,14]. 如果在其他的血清样品检测中发现发光值等于或高于线性范围的最高值时, 就需要将这一未知样品稀释一定的倍数以后再进行测量.

实验中发现检测较高浓度的 p53 抗体时, 电化学发光信号由于电极的钝化而有一定的下降趋势. 所以在以后的分析中, 检测时间还应该缩短, 只需要 10~20 s 就可以.

在 IM-ECL 测定中, 需要在工作电极后面放置磁铁进行磁富集. 磁铁距离光电倍增管光电阴极较近时, 会影响光电倍增管的正常工作, 而工作电极距离光电倍增管光电阴极太远, 又会使测得的发光强度值衰减. 所以我们在工作电极与光电倍增管光电阴极之间加一条石英光纤束进行导光, 这样既可以避免磁铁对光电倍增管的影响, 又可以近距离的地接收光子, 提高接收效率.

我们选择鼠抗人 p53 单克隆抗体连接磁珠并用来捕获 p53 蛋白, 因为多克隆抗体会占用很多 p53 蛋白的抗原决定簇, 可能会使被检测的抗体难以与 p53 蛋白结合. 做标准曲线时, 我们选用标准兔抗人 p53 多克隆抗体作为被检测的抗体, 以增加检测的灵敏度, 因为人血清中的 p53 抗体也是多克隆抗体.

有人报道过 p53 的过表达存在于肺癌中, 而且大部分与基因突变有关^[18]. 用我们的 IM-ECL 方法检测肺癌血清的 p53 抗体阳性率为 28.6%, 与前人报道的用酶联免疫分析方法测到的 24% 和 21.7% 相近^[19,20]. 尽管我们的实验受到临床癌症血清样品数量的限制, 但是分析结果显示与前人的报道相一致.

人血清 p53 抗体的 IM-ECL 检测分析方法简单、快速, 且灵敏度较高. 可以定性或定量地分析临床样品, 为临床检测肿瘤标记物——p53 抗体等提供了一种新的分析方法.

参 考 文 献

- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B H, *et al.* p53 mutations in human cancers. *Science*, 1991, **253** (5015): 49 ~ 53
- Soussi T. The humoral immune response to the tumor-suppressor gene-product p53 in human cancer: implications for diagnosis and therapie. *Immunology Today*, 1996, **17** (8): 354 ~ 356
- Wild C P, Ridanpaa M, Anttila S, *et al.* p53 antibodies in the sera of lung cancer patients: comparison with p53 mutation in the tumour tissue. *Int J Cancer*, 1995, **64** (3): 176 ~ 181
- Angelopoulou K, Diamandis E P, Sutherland D J A, *et al.* Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor supressor gene protein in various cancers. *Int J Cancer*, 1994, **58** (4): 480 ~ 487
- Volkman M, Muller M, Hofmann W J, *et al.* The humoral immune response to p53 in patients with hepatocellular carcinoma is specific for malignancy and independent of the alpha-feto-protein status. *Hepatology*, 1993, **18** (3): 559 ~ 565
- Bennet W P, Colby T V, Travis W D, *et al.* p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. *Cancer Res*, 1993, **53** (20): 4 817 ~ 4 822
- Shin D M, Kim J, Ro J Y, *et al.* Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res*, 1994, **54** (2): 321 ~ 326
- Raedle J, Roth W K, Oremek G, *et al.* α -Fetoprotein and p53 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*, 1995, **40** (12): 2 587 ~ 2 594
- Ryder S D, Rizzi P M, Volkmann M, *et al.* Use of specific ELISA for the detection of antibodies directed against p53 in patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol*, 1996, **49** (4): 295 ~ 299
- Houbiers J G A, van der Burg S H, van de Watering L M G, *et al.* Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer*, 1995, **72** (3): 637 ~ 641
- Yu H, Bruno J G. Immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella typhimurium* in foods and environmental water samples. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62** (2): 587 ~ 592
- Kijek T M, Rossi C A, Moss D, *et al.* Rapid and sensitive immunomagnetic electrochemiluminescent detection of staphylococcal enterotoxin B. *Journal of Immunological Methods*, 2000, **236** (1): 9 ~ 17
- Gatto-Menking D L, Yu H, Bruno J G, *et al.* Sensitive detection of biotoxoids and bacterial spores using an immunomagnetic electrochemiluminescence sensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 1995, **10** (6): 501 ~ 507
- Shelton D R, Kams J S. Quantitative detection of *Escherichia coli* O157 in surface waters by using immunomagnetic electrochemiluminescence. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67** (7): 2 908 ~ 2 915
- Blackburn G F, Shah H P, Kenten J H, *et al.* Electrochemiluminescence detection for development of immunoassays and DNA probe assays for clinical diagnostics. *Clin Chem*, 1991, **37** (9): 1 534 ~ 1 539
- Yang H J, Leland J K, Yost D, *et al.* Electrochemiluminescence: a new diagnostic and research tool. *Bio/Technology*, 1994, **12** (2): 193 ~ 194
- Terpetschnig E, Szmackinski H, Malak H, *et al.* Metal-ligand complexes as a new class of long-lived fluorophores for protein hydrodynamics. *Biophys J*, 1995, **68** (1): 342 ~ 350
- Xie Y, Yao K T, Hu W X. Mutation and expression of p53 gene in nasopharyngeal carcinoma, cervical carcinoma and lung cancer. *Clin J Pathol*, 1997, **26** (4): 229 ~ 232
- Schlichtholz B, Tredaniel J, Lubin R, *et al.* Analyses of p53 antibodies in sera of patients with lung carcinoma define immunodominant regions in the p53 protein. *Br J Cancer*, 1994, **69** (5): 809 ~ 816
- Zhao F, Zhou Q H, Zhang L L. Pre- and post- operative sequential changes of serum p53 antibodies and clinical significance in patients with lung cancer. *Clin J Lung Cancer*, 2000, **3** (4): 253 ~ 256

Immunomagnetic-electrochemiluminescent Detection of p53 Antibodies in Human Lung Cancer Serum *

YAN Gui-Hong, XING Da **, TAN Shi-Ci

(*Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China*)

Abstract The mutation of tumor suppressor p53 gene probably produce p53 antibodies. p53 antibodies are of importance to tumor's diagnosis, prognosis and relapse monitor. Current method to detect p53 antibodies, i. e. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), requires long time with multi-step, and the assay is only semi-quantitative. Immunomagnetic electrochemiluminescence (IM-ECL) assay was developed for quantitative detection of p53 antibodies in human serum. Results indicate that the detection limit of this assay is 10 ng/L. A stable calibration curve with a wide linear range from 0.01 to 1 000 $\mu\text{g/L}$ was established, thus, made quantitation possible. Serum samples from lung cancer patients were tested using the IM-ECL assay. The assay uses only 50 μL of sample per test and requires a 30 min incubation period in addition to a 50 s acquisition time. The positive rate of p53 antibodies was 28.6% in lung cancer sera. Concentrations of p53 antibody in the positive carcinoma sera were quantified from the calibration curve. A trend was found that higher the p53 antibody concentration in the lung cancer serum likely linked to a higher diagnostic stage of the cancer. IM-ECL assay is significantly better in terms of detection limit, linear range, and assay time, compared to the similar parameters of common ELISA. The results suggests that IM-ECL is a feasible method for rapid, sensitive and quantitative detection of p53 antibodies in human serum.

Key words immunomagnetic, electrochemiluminescence, p53, lung cancer, serum antibody

* This work was supported by grants from The National Major Fundamental Research Project of China (2002CCC00400) and The Team Project of Natural Science Foundation of Guangdong Province (015012).

** Corresponding author. Tel: 86-20-85210089, Fax: 86-20-85216052, E-mail: xingda@senu.edu.cn

Received: March 27, 2003 Accepted: April 26, 2003