

# 血清 HER2 蛋白化学发光免疫检测试剂的开发及分析性能评估

汪力恒<sup>1,2</sup>, 刘建芳<sup>1</sup>, 殷鹏<sup>1</sup>, 朱焕章<sup>2</sup>

1. 雅培贸易(上海)有限公司研发分公司, 上海 200233; 2. 复旦大学生命科学学院, 上海 200438

**摘要:** **目的** 开发一种自动化、经济、定量、操作简便、样本易获得的人表皮生长因子受体 2 (HER2) 的检测方法。**方法** 本研究采用体外诊断化学发光免疫分析法定量检测血清中 HER2 蛋白的含量, 将 HER2 单克隆抗体作为一抗包被于羧基磁珠上, 并将另一二抗标记于吖啶酯上, 进行双抗体夹心检测。**结果** 本研究建立的 HER2 蛋白检测方法的检测范围为 0 ~ 500 ng/ml, 精密密度为 CV < 5%, 分析灵敏度 (LOD) 为 0.075 ng/ml, 功能灵敏度 (LOQ) 为 0.093 ng/ml, 线性范围为 2.135 ~ 780.427 ng/ml, 用 HAMA 阳性血清测试抗干扰实验, 显示对本试剂盒无干扰, 加速稳定性实验显示试剂可稳定存放 1 年。**结论** 与在售化学发光试剂相比, 本文建立的 HER2 蛋白检测方法在各项分析性能表现优异。成功搭建了 HER2 蛋白检测的原型试剂。

**关键词:** 人表皮生长因子受体 2; 乳腺癌; 体外诊断; 化学发光免疫检测

中图分类号 R 737.9 R 446.6 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2018)03-0419-05

## Development and performance evaluation of chemiluminescent immunoassay reagent for serum HER2 protein

WANG Li-heng\*, Liu Jian-fang, YIN Peng, ZHU Huan-zhang

\* Research and Development branch of Abbott Laboratories Trading (Shanghai) CO., Ltd., Shanghai 200233, China

Corresponding author: ZHU Huan-zhang, E-mail: hzzhu@fudan.edu.cn

**Abstract: Objective** To develop an automated, economical, quantitative, easy to operate and easily obtained sample detection of human epidermal growth factor receptor-2 (HER2). **Methods** Chemiluminescence immunoassay was used in vitro to quantitatively detect the content of HER2 protein in serum. One HER2 monoclonal antibody (primary antibody) was coupled to the carboxyl magnetic beads, and another HER2 monoclonal antibody (secondary antibody) was labeled to acridinium ester, to assemble a double antibody sandwich method detection reagent. **Results** The detection range of HER2 protein in this research was from 0 to 500 ng/ml, and precision was CV lower than 5%. The limited of detection and quantification were 0.075 and 0.093 ng/ml, respectively. Linearity range is from 2.135 to 780.427 ng/ml. The anti-interference test of HAMA positive serum test showed no interference to this kit. The accelerated stability experiment showed that the reagents could be stably stored for 1 years. **Conclusions** Compared with Her2 protein chemiluminescence reagents sold on the market, the detection in this study has an excellent expression in various analytical performance, which establish a HER2 protein chemiluminescence detection prototype successfully.

**Key words:** Human epidermal growth factor receptor-2; Breast cancer; Diagnosis in vitro; Chemiluminescence immunoassay

乳腺癌是当今女性常见的恶性肿瘤之一。我国近年的统计资料表明, 上海市乳腺癌发病率在女性恶性肿瘤中居首位, 天津市和北京市乳腺癌发病率均居女性恶性肿瘤的第 2 位, 并且有增加的趋势<sup>[1]</sup>。人表皮生长因子受体 2 (HER2) 高表达被视为乳腺癌预后不良的重要预测因素<sup>[2]</sup>。

因此, 开发一种自动化、经济、定量、操作简便、样本易获得的 HER2 的检测方法显得尤为重要。本研究采用了体外诊断免疫分析中的化学发光法全自动定量检测血清中的 HER2 蛋白含量, 可以在一定程度上弥补免疫组织化学 (IHC) 以及原位杂交技术 (ISH) 的缺点。

## 1 材料与方法

1.1 材料 重组人 HER2 抗原冻干粉购自美国 Abcam 公司。抗体:从无锡傲锐东源和深圳菲鹏两家公司购买了 HER2 抗体对各一对。表面包裹羧基功能基团的磁珠购自日本 JSR 公司。发光标记物:用于发光的吡啶酯。包被抗体稀释液:0.1 mol/L 的 MES (Sigma) 缓冲液;标记抗体稀释液:0.1 mol/L 的 MES (Sigma) 缓冲液;校准曲线稀释液:含有 1% 牛血清白蛋白 (Sigma) 的 50 mmol/L 的 Tris 缓冲液。

1.2 试剂的配制 校准曲线的配制:将重组 HER2 抗原冻干粉复溶并稀释至 500、200、50、10、5、1、0.5、0 ng/ml,依次编号 STD01-STD08,分装保存于 -20 °C 以下。磁珠包被抗体溶液的配制:按照磁珠供应商提供的操作指南,以 10 μg/mg (抗体/磁珠) 的浓度将一抗包被于羧基磁珠上并保存于包被抗体稀释液中。吡啶酯标记溶液的配制:按吡啶酯试剂盒说明书,将二抗与吡啶酯进行标记并保存于标记抗体稀释液中。

1.3 检测 将配制的包被抗体及标记抗体进行组合,配制的校准曲线点作为样本,使用 Architect i2000 全自动免疫分析仪 (雅培公司) 进行原型试剂的开发。

1.4 原型试剂盒的组装 (1) 固定包被抗体和标记抗体的浓度及反应模式,挑选性能更优的抗体对 (更高的信号值、更低的背景值、更高的灵敏度等); (2) 反应模式的筛选 (一步法或两步法、样本加样量、孵育时间等); (3) 包被抗体与标记抗体的浓度测试。

1.5 原型试剂盒分析性能验证 按照 EP 文件,进行精密性、灵敏度、检测范围、稀释线性、抗干扰、稳定性等分析性能的测试。

## 2 结果

2.1 抗体对的选择 使用无锡傲锐东源和深圳菲鹏购买的两种 HER2 的抗体对,分别将一抗包被于磁微粒上,将二抗标记于吡啶酯上,并将磁微粒和吡啶酯稀释至工作浓度,组装成两种不同的原型试剂。在反应模式、样本加样量等条件完全相同的情况下分别测试不同浓度的 HER2 校准曲线点。由图 1 可知,在相同的反应条件下, Vendor-2 的抗体对获得比 Vendor-1 更高的信号值。所以后续实验将着重优化 Vendor-2 的抗体对的分析性能。

2.2 样本加样量、吡啶酯工作液浓度的筛选 在选定了 HER2 校准曲线测试更优的抗体对之后,测试不同样本加样体积 (50 μl 与 30 μl) 与不同吡啶酯标记物浓度 (50 ng/ml 与 100 ng/ml) 对校准曲线测试的影响。按照信号值高低以及不同浓度抗原和校准

品零点的比率排列,可得到如下趋势:100 ng/ml 吡啶酯溶液 + 50 μl 样本加样量 > 50 ng/ml 吡啶酯溶液 + 30 μl 样本加样量 > 100 ng/ml 吡啶酯溶液 + 30 μl 样本加样量。虽然 100 ng/ml 吡啶酯溶液 + 50 μl 样本加样量的组合可以得到最高的信号值,但 50 ng/ml 吡啶酯溶液 + 30 μl 样本加样量同样可以得到足够好的结果,考虑到成本以及本底控制等方面因素,50 ng/ml 吡啶酯溶液 + 30 μl 样本加样量的组合是一个最优模式。结果如图 2 和表 1 所示。

### 2.3 分析性能验证

2.3.1 精密度 配制浓度为 10、50 和 300 ng/ml 的低、中、高 3 个不同浓度的样本作为精密度样本,每个样本每天测 2 批,每批测 5 个重复,一天中的两次测试中间隔不小于 2 h,进行 5 d 连续的测试。见表 2。

2.3.2 分析灵敏度 (LOD) 和检测范围 笔者开发的原型试剂的检测范围为 0 ~ 500 ng/ml,如表 3 所示。最小分析灵敏度为 0.075 ng/ml。分析灵敏度的浓度与 HER2 校准品 0 点的 20 次重复检测高于平均 RLU 的两个标准偏差相关。可用于评估最小可检测浓度。

2.3.3 功能灵敏度 (LOQ) 对校准曲线点 1 ng/ml 进行系列稀释,并以浓度值作为横坐标,变异系数 (CV) 作为纵坐标,寻找 CV 接近 20% 的点作为功能灵敏度。见图 3。本原型试剂的功能灵敏度为 0.093 ng/ml。

2.3.4 稀释线性 将抗原添加到正常阴性血清中,使其浓度值在 700 ~ 800 ng/ml,将它作为高值样本,正常阴性血清作为低值样本,并按照一定比例配制涵盖整个检测区间的系列样本。将每个样本的理论值作为横坐标,实测值作为纵坐标,进行相关性分析。结果如图 4 所示,二者之间的相关性  $R^2 > 0.99$ ,且斜率 = 0.9926。表明此 HER2 原型试剂在 2.135 ~ 780.427 ng/ml 区间内的稀释线性表现优异。

2.3.5 抗干扰实验 根据购买的 HAMA 阳性血清说明要求,将此 HAMA 阳性血清 1:20 倍稀释于正常阴性血清中,并对稀释后的 HAMA 血清进行三次重复测试,结果如表 4 显示,HAMA 血清对 HER2 原型试剂没有干扰。

2.3.6 稳定性 实验将原型试剂组分 (磁珠包被抗体,吡啶酯标记抗体) 于 37 °C 放置 7 d,和 4 °C 保存试剂同时做一套校准曲线。比较两套试剂之间的差异。HER2 原型试剂在 37 °C 放置 7 d 后,将 4 °C 原型试剂与 37 °C 放置 7 d 的原型试剂的校准曲线拟合的浓度值进行比较。结果无明显差异,如表 5 和图 5 所示。

2.4 HER2 原型试剂盒与市售试剂盒的性能对比 笔者设计开发的这套人血清 HER2 蛋白检测原型试

剂,与现在市面上在售的同样检测方法的化学发光免疫检测试剂盒对比,在测量范围,分析灵敏度,功能灵敏度,精密密度以及稀释线性等分析性能的评估中,都获得了相对理想的实验结果。表 6 是本原型试剂盒与市面上在售的化学发光以及酶联免疫法 HER2 检测试剂盒分析性能的比较。通过比较发现,本研究建立的 HER2 原型试剂盒较市售试剂盒有更宽的检测范围,更高的分析灵敏度,且具有较好的热稳定性,可以作为一个很有潜力的血清 HER2 检测试剂盒,做进一步的临床性能评估。

表 2 3 个不同浓度精密密度样本检测数据

样本	数量	平均值 (ng/ml)	批内 SD	批内 CV (%)	日内 SD	日内 CV (%)	日间 SD	日内 CV (%)	总 SD	总 CV (%)
低	50	12.94	0.42	3.2	0.19	1.4	0.32	2.4	0.56	4.3
中	50	57.39	1.95	3.4	1.31	2.3	1.33	2.3	2.70	4.7
高	50	322.43	8.98	2.8	7.64	2.4	9.05	2.8	14.87	4.6

表 3 校准曲线检测范围及分析灵敏度结果

样本	靶浓度 (ng/ml)	平均发光值	CV (%)	平均值 (ng/ml)	CV (%)	平均准确度
STD01	500	468209.2	2.9	500.111	3.5	100.0
STD02	200	214155.7	3.4	199.926	3.8	100.0
STD03	50	60641.2	4.2	50.313	4.5	100.6
STD04	10	12715.4	3.9	9.609	4.1	96.1
STD05	5	6604.4	2.1	4.836	2.1	96.7
STD06	1	1502.3	5.6	1.049	5.7	104.9
STD07	0.5	825.9	6.8	0.577	6.7	115.5
STD08	0	185.8	29.3	0.15	23.3	Inf
LOD	-	276.1	-	0.075	-	-

表 4 抗 HAMA 血清干扰实验结果

样本	平均值	CV	平均浓度 (ng/ml)	CV
HAMA 1:20 倍稀释血清	4036	9.7	2.976	10.4
正常阴性血清	2966	3.2	2.135	3.5

表 5 4 °C 和 37 °C 放置 7 d 试剂校准曲线测试浓度值结果

样本	靶浓度 (ng/ml)	4 °C 原型试剂 (ng/ml)	37 °C 放置 7 d 后 试剂 (ng/ml)	回收率 (37 °C / 4 °C, %)
STD01	500	501.377	512.010	102.1
STD02	200	197.452	194.805	98.7
STD03	50	53.163	49.632	93.4
STD04	10	9.866	10.112	102.5
STD05	5	4.773	5.196	108.9
STD06	1	0.980	1.008	102.9
STD07	0.5	0.553	0.478	86.4
STD08	0	0.192	0.077	40.1

表 1 不同样本加样量不同吡啶酯工作液浓度原型试剂校准曲线非零点与零点比值

类别	100 ng/ml 吡啶酯溶液 + 50 μl 样本加样量	100 ng/ml 吡啶酯溶液 + 30 μl 样本加样量	50 ng/ml 吡啶酯溶液 + 30 μl 样本加样量
STD01 / STD08	3983.7	1734.8	2759.0
STD02 / STD08	2116.0	807.8	1262.0
STD03 / STD08	628.0	245.1	357.3
STD04 / STD08	135.5	51.0	74.9
STD05 / STD08	69.2	26.9	38.9
STD06 / STD08	15.6	6.1	8.9
STD07 / STD08	7.8	4.1	4.9

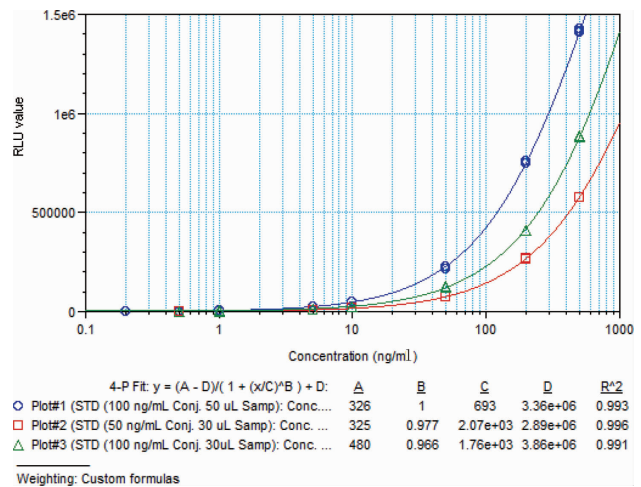


图 2 样本加样量、吡啶酯工作液浓度筛选结果

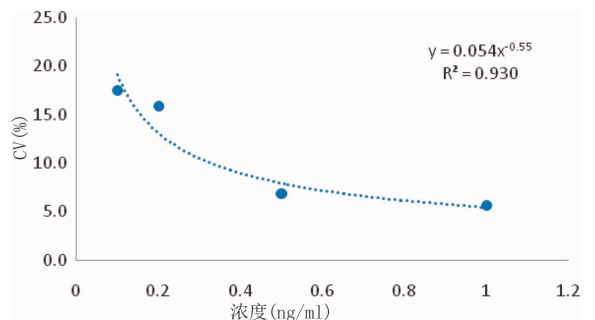


图 3 功能灵敏度的计算

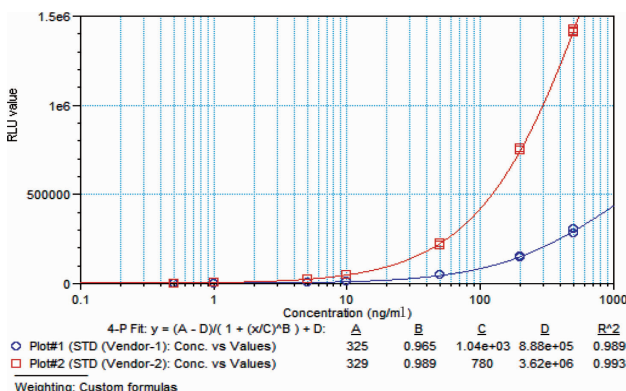


图 1 抗体对筛选结果

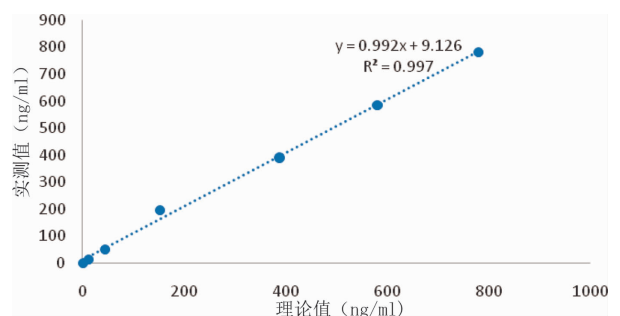


图 4 稀释线性评估结果

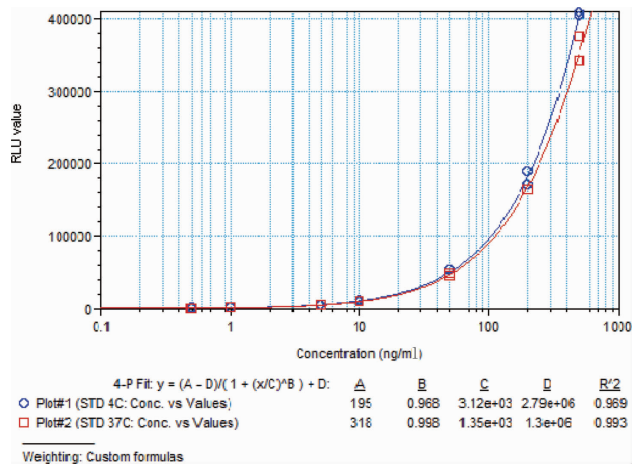


图 5 4 °C 与 37 °C 放置 7 d 原型试剂拟合的校准曲线对比

表 6 原型试剂与在售 HER2 免疫检测试剂的性能对比

项目	原型试剂 HER2 蛋白测定 试剂盒 (化学发光法)	西门子医学诊断产品 HER2/neu 蛋白 测定试剂盒 (化学发光法)	R&D systems 人类 ErbB/Her2 定量检测试剂盒 (ELISA)
孵育时间	22 min	8.25 min	4.5 h
样本类型	人类血清	人类血清	细胞上清, 血清, 血浆, 尿液
样本加样量	30 μl	20 μl	50 μl
方法学	化学发光-双抗体 夹心法	化学发光-双抗体 夹心法	酶联免疫-双抗体 夹心法
分析物	HER2 抗原	HER2 抗原	HER2 抗原
测量范围	0 ~ 500 ng/ml	0 ~ 350 ng/ml	0 ~ 5000 pg/ml
校准曲线拟合方法	4 参数拟合	内置校准	4 参数拟合
分析灵敏度	0.075 ng/ml	0.5 ng/ml	4.86 pg/ml
功能灵敏度	0.093 ng/ml	未知	未知
健康人群预计值	未做	0 ~ 15.2 ng/ml	2.33 ~ 14.8 pg/ml
精密度	<5%	<10%	<10%
稀释线性	2.135 ~ 780.427 ng/ml	NA	NA
抗干扰	HAMA	HAMA	ErbB1, ErbB3, ErbB4, FAK, GRB2, L1CAM, SOS2
样本是否预稀释	不稀释	不稀释	10 倍稀释
样本保存	未做	2 ~ 8°C 8 h	< -20°C
稳定性	37 °C, 7 d	4 °C, 1 年	4 °C, 1 年
溯源性	Abcam	内部标准品	未知

### 3 讨论

女性乳腺癌的发病率在国内呈现逐年增高趋势,是近十几年来我国发病率增高速度最快的恶性肿瘤,死亡率排在所有恶性肿瘤患者的第 6 位<sup>[3]</sup>。此外,乳腺癌也是一种最常见的肿瘤形式,在美国也成为因肿瘤导致妇女死亡排名第二的癌症<sup>[4]</sup>。

提高乳腺癌的诊疗水平十分紧迫,分子靶向治疗的发展为乳腺癌患者带来了福音。而血清学检测具有方便快捷、实时性以及连续性等特点,使血清学 HER2 蛋白成为指导乳腺癌患者临床用药和评价预后的潜在肿瘤标志物<sup>[5]</sup>。

HER2 基因,也被称作 Neu, ErbB-2, CD340 等,定位于染色体 17q12-21.32 上,编码 185 kDa 的跨膜受

体样蛋白,具有酪氨酸激酶活性,属于酪氨酸激酶 I 型受体家族<sup>[6]</sup>。HER2 蛋白结构分为,细胞外区(配体结合区);跨膜区(传导信号);细胞内区(激酶活性)。有报道表明,细胞外区可在正常个体的血液中存在,但在转移性乳腺癌妇女中明显升高<sup>[7]</sup>,尚有报道 HER2 蛋白在很多其他类型的上皮起源肿瘤中过度表达,如胰腺癌、宫颈癌、结直肠癌、卵巢癌等<sup>[8-11]</sup>。乳腺癌 HER2 检测指南已明确指出,只有 HER2 过度表达的乳腺癌患者用曲妥珠单抗治疗才有效。HER2 阳性肿瘤是一种高危肿瘤,对某些常规的化疗和激素治疗反应性差,预后不好<sup>[12]</sup>。故 HER2 检测的灵敏度和特异度就显得尤为重要。

现阶段 HER2 常用的检测方法是创伤性组织学方法,包括免疫组织化学(IHC)和原位杂交技术(ISH)等。有研究表明原位杂交法和免疫组化方法两种不同方法在检测乳腺癌 HER2 表达中检出阳性率均良好,免疫组织化学检出 HER2 表达越高,双色银染原位杂交检测的阳性率与其一致性也越高<sup>[13]</sup>。免疫组织化学对 HER2 蛋白的检测主要是应用抗体检测组织中 HER2 蛋白的过度表达,这也是乳腺癌患者中 HER2 状态的首要方式。当 IHC 重复检测 HER2 的结果难以确定或者针对于疑难病例的患者,可利用 ISH 核酸探针检测 HER2 的基因扩增<sup>[14]</sup>。近期发现存在于血清中的 HER2 蛋白胞外区域段可以用酶联免疫法(ELISA)或者化学发光法(CLIA)检测到,而且乳腺癌患者血清中 HER2 的水平与组织中 HER2 的表达是正相关的,血清 HER2 可以作为组织 HER2 检测的补充手段<sup>[15]</sup>。检测血清中 HER2/neu 水平可以避免组织活检对患者的伤害,也可以在肿瘤的治疗中,继续进行复发性或转移性乳腺癌监测。

本研究中开发的化学发光检测人血清中 HER2 蛋白的原型试剂在分析性能评估上具有检测时间短、自动化程度高、检测通量高、性能稳定等优点。实验结果达到并超过在售化学发光检测 HER2 试剂的性能。还需要在乳腺癌临床样本中进一步验证其临床效能,以期优化血清 HER2 水平检测,为推动血清 HER2 检测在乳腺癌及其他癌症诊疗中的应用提供更多参考。

### 参考文献

- [1] 高云,张文. 女性乳腺癌发病的若干危险因素[J]. 医学综述, 2000,6(3):111-112.
- [2] 张艳秋,王映凡,王简,等. HER-2 阳性乳腺癌的新辅助治疗现状及展望[J]. 临床肿瘤学杂志,2017,22(3):264-271.
- [3] 代敏,任建松,李霓,等. 中国 2008 年肿瘤发病和死亡情况估计及预测[J]. 中华流行病学杂志,2012,33(1):57-61.

- [4] Sardesai SD, Storniolo AM. Lapatinib: an oral dual tyrosine kinase inhibitor for HER-2-positive breast cancer. [J]. Womens Health (Lond), 2015, 11(3): 281-294.
- [5] 马丽, 石远凯, 韩晓红. 乳腺癌患者血清中人类表皮生长因子受体 2 检测的临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(2): 190-192.
- [6] 潘玉龙, 符磊, 熊黎强, 等. CT 联合尿液中 Her2 和 uPA 对输尿管癌的诊断研究[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2015(12): 75-77, 129.
- [7] Kandl H, Seymour L, Bezwoda WR. Soluble c-erbB-2 fragment in serum correlates with disease stage and predicts for shortened survival in patients with early-stage and advanced breast cancer[J]. Br J Cancer, 1994, 70(4): 739-742.
- [8] 刘雅坤, 张辉, 康山, 等. HER2 蛋白在上皮性卵巢癌中的表达及曲妥珠单抗对卵巢癌 SKOV3 细胞的影响[J]. 实用妇产科杂志, 2016, 32(3): 187-192.
- [9] 苏春永, 杨晓光. 胰腺癌中 COX-2、Her-2/neu 的表达及与预后的关系[J]. 河北医药, 2015(13): 1929-1932.
- [10] 孙新超. Her-2 蛋白在宫颈癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(14): 38-39.
- [11] 杨悦, 万义增, 陈素贤, 等. 结直肠癌组织中 EGFR 及 HER-2 的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015, 31(6): 615-618.
- [12] 沈国栋, 王弦, 吴强, 等. 染料木素抑制 HER2 阳性人乳腺癌与卵巢癌细胞增殖作用的研究[J]. 中国临床保健杂志, 2012, 15(5): 517-520, 563.
- [13] 罗教秀, 储兵, 曹晓珊, 等. 免疫组化法与双色银染原位杂交法用于乳腺癌 HER-2 检测诊断中的应用价值分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(6): 610-613.
- [14] Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(1): 118-45.
- [15] 曾利军, 陈建魁, 于农, 等. 复发转移乳腺癌患者血清 HER2 水平与组织表达状态的相关性[J]. 临床误诊误治, 2011, 24(10): 4-7.

收稿日期: 2017-09-26 编辑: 王国品

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 对作者署名的一般要求

作者姓名在文题下按序排列, 具体排序应在投稿前即确定, 在编排过程中不应再作改动, 确需要改动时必须出示单位证明。作者应是: (1) 参与选题和设计, 或参与资料的分析与解释者; (2) 起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容者; (3) 能对编辑部的修改意见进行核修, 在学术界进行答辩, 并最终同意该文发表者。同时具备以上 3 项条件者方可署名为作者。仅参与研究项目资金的获得或收集资料者不能列为作者, 仅对科研小组进行一般管理者也宜列为作者。对文章中的各主要结论, 均必须至少有 1 位作者负责。如有外籍作者, 应征得本人同意, 并在投稿时向编辑部提供相应证明材料。集体署名的文稿, 在题名下列出单位, 并于文末列出整理者姓名, 并须明确对该文的主要负责人, 在论文首页脚注通讯作者姓名、单位、邮政编码及 E-mail 地址。通讯作者一般只列 1 位, 由投稿者确定。如需注明协作组成员, 则于文末参考文献前列出协作组成员的单位及姓名。

本刊编辑部