

# T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术检测人CEA

朱自满, 李世拥, 安萍, 白雪, 于波

朱自满, 李世拥, 安萍, 白雪, 于波, 北京军区总医院全军普通外科中心 100700  
国家自然科学基金资助项目, No. 30471700  
通讯作者: 于波, 100700, 北京市东城区南门仓五号, 北京军区总医院全军普通外科中心. yubo66@126.com  
电话: 010-66721188  
收稿日期: 2007-05-31 修回日期: 2007-09-13

## Detection of human carcinoma-embryonic antigen using fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique

Zi-Man Zhu, Shi-Yong Li, Ping An, Xue Bai, Bo Yu

Zi-Man Zhu, Shi-Yong Li, Ping An, Xue Bai, Bo Yu, the Chinese PLA Center of General Surgery, Beijing General Military Hospital, Beijing 100700, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471700  
Correspondence to: Dr. Bo Yu, the Chinese PLA Center of General Surgery, Beijing General Military Hospital, 5 South Door Cang, East Cheng District, Beijing 100700, China. yubo66@126.com  
Received: 2007-05-31 Revised: 2007-09-13

### Abstract

**AIM:** To establish a new method for the detection of human carcinoma-embryonic antigen (CEA) using fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique (FACTT).

**METHODS:** Avidin was used to bridge biotinylated detection antibody and biotinylated DNA. T7 RNA polymerase was added to perform RNA amplification. RNA products were quantified by adding the RNA intercalating dye RiboGreen. CEA was determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**RESULTS:** The detection limit of FACTT for human CEA was  $2 \times 10^{-3}$  mg/L, which was 125 times more sensitive than ELISA (0.25 mg/L), which was performed in parallel.

**CONCLUSION:** The FACTT has a higher sensitivity than sandwiched ELISA for the detection of human CEA, and may be a powerful and very

sensitive tool for early stage clinical diagnosis.

**Key Words:** T7 RNA polymerase; Fluorescent amplification; Carcinoma-embryonic antigen; Enzyme-linked immunosorbent assay

Zhu ZM, Li SY, An P, Bai X, Yu B. Detection of human carcinoma-embryonic antigen using fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(27): 2927-2930

### 摘要

**目的:** 建立检测人癌胚抗原(CEA)的T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术(fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique, FACTT).

**方法:** 以亲和素作为连接分子, 连接生物素化的检测抗体和生物素化的DNA, 加入T7RNA聚合酶进行转录扩增反应, 对生成的RNA产物进行荧光检测, 并同时夹心酶联接免疫吸附剂测定(ELISA)方法检测人CEA.

**结果:** 成功的建立了检测人CEA的T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术, 其检测CEA的灵敏度达 $2 \times 10^{-3}$  mg/L, 比夹心ELISA方法灵敏度(0.25 mg/L)高125倍.

**结论:** T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术较夹心ELISA方法具有更高的敏感性, 有可能作为一种新的检测方法用于临床的早期诊断.

**关键词:** T7 RNA聚合酶; 荧光扩增技术; 癌胚抗原; 酶联接免疫吸附剂测定

朱自满, 李世拥, 安萍, 白雪, 于波. T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术检测人CEA. 世界华人消化杂志 2007;15(27):2927-2930  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2927.asp>

### 0 引言

T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术(fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique, FACTT)是由Zhang *et al*<sup>[1]</sup>建立的一种新的抗原检测方法. 他将抗原抗体的反应的特

**背景资料**  
CEA(癌胚抗原)是一种糖蛋白, 是由Gold(戈德)和Freedman(弗里德曼)在结肠癌患者和内胚层(胃肠道)的上皮肿瘤中首次发现的, FACTT即T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术, 原理与免疫PCR相似, 目前临床上均使用酶联免疫吸附试验检测肿瘤标志物.

### 名词解释

FACTT: T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术, 是一种新的抗原检测方法, 他将抗原抗体反应的特异性、T7RNA聚合酶的线性扩增能力及荧光检测的敏感性结合在一起, 较ELISA具有更高的敏感度。

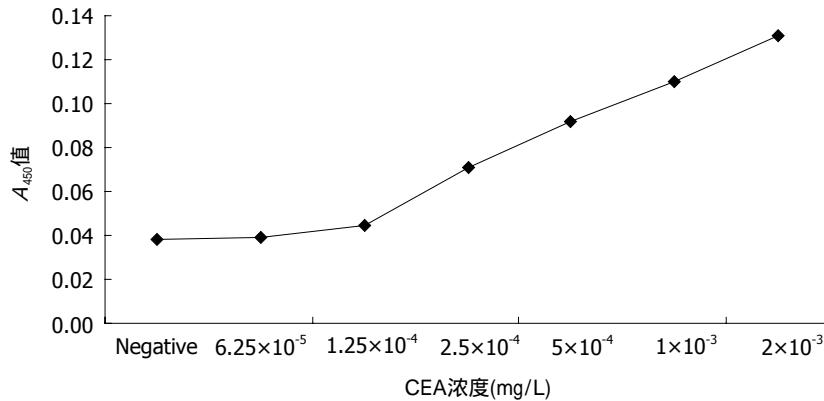


图1 双夹心ELISA方法检测人CEA的结果。

异性、T7 RNA聚合酶的线性扩增能力以及荧光检测的敏感性结合在一起, 提高了对抗原检测的敏感性, 而且整个实验过程均在室温下进行, 而免疫PCR则需要不断改变反应体系的温度, 所以本实验的重复性更好。目前临床上均使用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测肿瘤标志物, 检测极限范围大多在0.01-50 mg/L之间<sup>[2]</sup>。本研究通过建立检测人CEA的T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增方法, 并与夹心ELISA方法比较其灵敏度, 为进一步使用该方法检测其他肿瘤标志物奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** CEA捕获抗体、检测抗体、生物素化抗体及CEA标准品, CEA夹心ELISA检测试剂盒均购自Canag公司; 亲和素、生物素, RiboGreen购自Invitrogen公司, DNA模板pGEM<sup>®</sup>购自Promega公司(含有T7启动子及T7终止子), NTP、T7 RNA polymerase plus购自Ambion公司。引物序列: F: 5'CTCTTCGCTATTACGCCAGG 3'; R: 5'CAATACGCAAACCGCCTC3', 由鼎国公司合成, 其中上游引物5'端碱基上带有生物素标记。荧光连续测读仪Thermo Ascent公司。

**1.2 方法** 生物素化DNA指示分子的构建按文献报道进行<sup>[3-5]</sup>。根据DNA的核苷酸序列用DNA Star软件设计1对引物, 其中上游引物的5'端碱基上带有生物素标记。以pGEM<sup>®</sup>为模板进行PCR扩增, 扩增产物回收后纯化并定量测定, 保存在-20℃。夹心ELISA方法严格按照说明书进行操作。FACTT方法检测人CEA按文献进行<sup>[1]</sup>。取96孔板一块, 每孔加60 μL捕获抗体(用碳酸盐-碳酸氢盐包被缓冲液稀释成5 mg/L)4℃过夜。加10 g/L酪蛋白封闭液, 22℃ 1 h。加20 μL待检抗原(包括对照品, 位于1 mL/L的FBS中)22℃孵育1 h。加20 μL稀释的生物素化检测抗体(180 mg/

L)22℃孵育1 h。加5 mg/L链亲和素22℃孵育1 h。加500 mg/L生物素化DNA(扩增模块)22℃孵育1 h。洗板液PBST(含1 mL/L Tween20的PBS)洗板6次, 在每次结合孵育后。洗板后, 每孔加20 μL反应混合液, 组成: 60 U T7RNA聚合酶(ambion), 1.25 μmol NTP, 1×T7缓冲液。37℃孵育3 h。加入RNase抑制剂, 加20 μL RiboGreen(1:200稀释, 按说明书进行)。在荧光光谱仪上测量(激发波长485 nm, 发射波长535 nm)。

## 2 结果

**2.1 双抗夹心ELISA 法检测人CEA的结果** 取2 mg/L的人CEA标准品, 以稀释液倍比稀释后得系列稀释度的待测品, 浓度分别是2 mg/L、1 mg/L、0.5 mg/L、0.25 mg/L、0.125 mg/L、0.0625 mg/L, 每个浓度设3个复孔。检测极限的判定: 大于阴性对照组的平均A值加上其3倍的标准差所对应的浓度值。结果双抗夹心ELISA法最低可检测出0.25 mg/L的人CEA(图1)。

**2.2 FACTT方法检测人CEA的敏感度** 取2 mg/L的人CEA标准品, 以稀释液作10倍系列稀释后获得系列稀释度的待测品, 浓度分别是2 mg/L、0.2 mg/L、2×10<sup>-2</sup> mg/L、2×10<sup>-3</sup> mg/L、2×10<sup>-4</sup> mg/L、2×10<sup>-5</sup> mg/L, 每个浓度设3个复孔。检测极限的判定: 大于阴性对照组的平均A值加上其3倍的标准差所对应的浓度值。FACTT方法最低可检测出2×10<sup>-3</sup> mg/L的人CEA(图2)。

## 3 讨论

FACTT(fluorescent amplification catalyzed by T7 polymerase technique), 即T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术<sup>[1]</sup>, 原理与免疫PCR相似<sup>[6]</sup>, 只是用T7 RNA聚合酶代替免疫PCR中的Taq聚合酶, 终产物为RNA分子。通过1个对DNA和检测抗体具双重活性的连接分子, 使作为标志物的DNA分

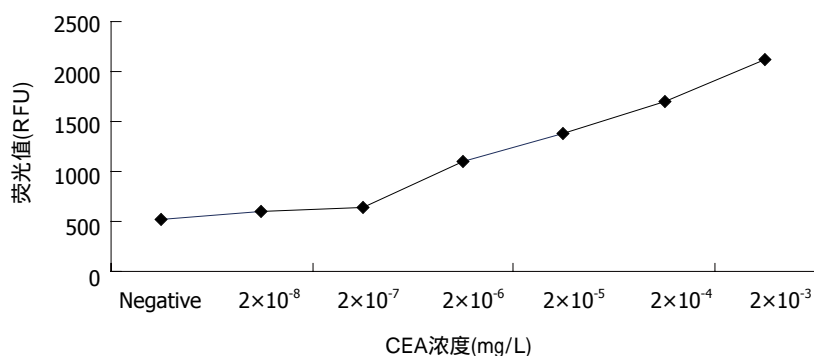


图 2 FACTT方法检测人CEA结果。

同行评价  
本文阐述了T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增技术较ELISA方法具有更高的敏感性, 可用于临床的早期诊断, 方法成熟, 分析有据, 有一定的可读性和应用性。

子特异地结合到抗原-抗体复合物, 作为标志物的DNA分子含有T7启动子及T7终止子<sup>[7-8]</sup>, 随后加入的T7 RNA聚合酶以DNA标志物为模板生成线性的RNA, 线性RNA产物的存在标明DNA标志物分子特异地与抗原-抗体复合物发生了连接, 进而证明抗原的存在; 而RNA产物的定量分析可间接反映被测抗原的浓度. FACTT实验体系的基本组成包括待检测抗原、一对抗体(针对待检测抗原不同表位的捕获抗体及检测抗体)、连接分子、DNA指示分子、T7 RNA聚合酶和RNA荧光检测染料<sup>[9]</sup>.

CEA(癌胚抗原)是一种糖蛋白, 是由Gold(戈德)和Freedman(弗里德曼)在结肠癌患者和内胚层(胃肠道)的上皮肿瘤中首次发现的<sup>[10-11]</sup>. 免疫学检测发现体内存在许多CEA样的分子. 所以本实验采用针对人CEA的一对mAb, 可克服这些交叉反应性CEA样分子的干扰, 其中检测mAb针对Gold抗原决定簇IV, 捕捉mAb针对Gold抗原决定簇V<sup>[12]</sup>.

FACTT中作为标志物的DNA分子应包含有T7启动子及T7终止子, 而且长度应足够, 还要保证DNA分子的纯度, 不选用待检测样品中可能存在的DNA分子. 本研究选用含有T7启动子及T7终止子的pGEM<sup>®</sup>线性载体作为DNA模板, 根据其序列设计一对引物, 其中上游引物的5'端生物素化, 进行PCR获得大量生物化的DNA指示分子, 纯化并定量后使用, 实验结果表明所产生的生物化DNA完全能满足实验的需要. 确定了生物化DNA及生物化抗体的最佳浓度.

FACTT的终产物是通过T7 RNA聚合酶扩增的RNA分子, Ribogreen荧光染料能特异性地检测线性RNA分子, 不与游离的核糖核酸分子结合, 因此能极大地提高检测RNA分子的灵敏度<sup>[9]</sup>.

我们建立了检测人CEA的T7 RNA聚合酶催化的荧光扩增方法, 实验中采用亲和素作连接分子, 生物素化抗体和生物素化DNA分子是以

游离的方式加入, 使亲和素与生物素结合, 冲洗后, 再加入生物素化的DNA. 结果表明, FACTT方法可检测到 $2 \times 10^{-3}$  mg/L的人CEA, 比夹心ELISA检测方法灵敏度高125倍.

FACTT是新近发展的一种免疫检测技术, 他提高了ELISA检测的灵敏度, 可以检测出ELISA测不出的抗原物质, 而且FACTT均在室温下进行, 反应条件温和, 有别于免疫PCR, 需要改变反应的条件, 所以FACTT的重复性更好.

FACTT作为一种新的检测抗原方法, 虽然具有灵敏度高的优点, 但是操作步骤较多, 洗板次数频繁, 而且实验的最终产物为RNA. 由于RNA酶的无处不在, 所以RNA容易受到污染而降解. 为了避免RNA酶的污染, 实验操作要严谨, 注意实验环境及所有使用液体的无RNA酶处理, 可以避免或减少终产物RNA分子的降解. 如果将检测抗体与DNA分子预结合成复合物或者直接连接, 则可以大大减少实验步骤, 节约实验时间, 减少污染的机会, 将有助于临床大规模使用.

#### 4 参考文献

- Zhang H, Cheng X, Richter M, Greene MI. A sensitive and high-throughput assay to detect low-abundance proteins in serum. *Nat Med* 2006; 12: 473-477
- Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J Immunol Methods* 1992; 150: 5-21
- Allen RC, Rogelj S, Cordova SE, Kieft TL. An immuno-PCR method for detecting *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *J Immunol Methods* 2006; 308: 109-115
- Tian P, Mandrell R. Detection of norovirus capsid proteins in faecal and food samples by a real time immuno-PCR method. *J Appl Microbiol* 2006; 100: 564-574
- Guo YC, Zhou YF, Zhang XE, Zhang ZP, Qiao YM, Bi LJ, Wen JK, Liang MF, Zhang JB. Phage display mediated immuno-PCR. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: e62
- Sano T, Smith CL, Cantor CR. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 1992; 258:

- 120-122
- 7 Butler ET, Chamberlin MJ. Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. I. Isolation and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1982; 257: 5772-5778
- 8 Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res* 1984; 12: 7035-7056
- 9 Jones LJ, Yue ST, Cheung CY, Singer VL. RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal Biochem* 1998; 265: 368-374
- 10 Gold P, Freedman SO. Freedman, Demonstration of Tumor-Specific Antigens in Human Colonic Carcinomata by Immunological Tolerance and Absorption Techniques. *J Exp Med* 1965; 121: 439-462
- 11 Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122: 467-481
- 12 Hammarstrom S, Shively JE, Paxton RJ, Beatty BG, Larsson A, Ghosh R, Bormer O, Buchegger F, Mach JP, Burtin P. Antigenic sites in carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 1989; 49: 4852-4858

编辑 程剑侠 电编 李军亮

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 第二届北京国际消化疾病高峰论坛在京举行



图1 北京国际消化疾病高峰论坛会场。

**本刊讯** 第二届北京国际消化疾病高峰论坛于2007-09-21/23在北京昆仑饭店举行(图1), 作为消化疾病的国际性期刊, *World Journal of Gastroenterology(WJG)*应邀参加了此次会议, 并与GUT主编Robin Spiller教授(图2)、副主编William Grady教授(图3)亲切合影, 并赠送了最新出版的*WJG*期刊。



图2 GUT主编Robin Spiller教授(右)和WJG科学编辑长有德博士(左)。

本届论坛由中国医学论坛报社、北京大学医学部消化疾病研究中心、英国医学杂志集团以及GUT杂志社共同主办, 是继2005年“首届北京国际消化疾病高峰论坛”成功举办后的第二次东西方消化领域的高层学术交流。GUT主编Robin Spiller教授、北京大学医学部第三医院消化科周丽雅教授等18位消化疾病领域的著名中外专家, 就炎症肠病、功能性肠病、脂肪肝与肝纤维化、门静脉高压与肝硬化、病毒性肝炎、Barrett食管与非糜烂性反流病(NERD)、幽门螺杆菌(*H pylori*)与胃癌、结直肠癌、胰腺炎及其遗传学消化疾病, 分为9个热点主题, 中西方专家两两组合进行报告, 然后面对面交流和讨论, 指出面临的新问题, 预测消化疾病的发展和演化趋势, 并分析和比较消化疾病发病特点与发展变化趋势在中国与西方国家的异同。

参加论坛的代表500多位中, 部分特邀发言专家任职*WJG*编委。

从本届国际性消化疾病大会可以看出, *WJG*作为消化疾病学领域的国际性唯一一本周刊, 栏目设置和刊登内容紧密跟踪消化疾病国际研究前沿, 论坛的9个主题都是*WJG*长期以来和最新关注的重点和热点。报告专家报道和述评了各自及其他相关研究组发表的最新研究成果, 其中*WJG*发表论文被国内外专家引用4篇, 显示了*WJG*作为消化疾病领域的国际性和发表论文的高质量。

*WJG*以本届国际性消化疾病论坛为窗口, 及时动态的跟踪消化疾病研究的难点和重点, 将最前沿的科研成果吸引到*WJG*以第一时间发表, 同时, 也适时调整设置栏目, 适应消化疾病发展的新特点、新趋势。(科学编辑: 长有德 2007-09-25)



图3 GUT副主编William Grady教授(左)和WJG科学编辑长有德博士(右)。