

时间分辨荧光免疫层析法联合检测 血清肿瘤标志物

郭明明 肖华龙 周剑波 傅利新 周彬 张珏 黄彪

214063 无锡,江苏省原子医学研究所、卫生部核医学重点实验室、江苏省分子核医学重点实验室(郭明明、周彬、张珏、黄彪);214023 无锡市人民医院检验科(肖华龙);214400 江阴市人民医院检验科(周剑波);214063 无锡市江原实业技贸总公司(傅利新)

通信作者:黄彪, Email: huangbiao@jsnm.org

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.04.009

【摘要】 目的 建立时间分辨荧光免疫层析法(TRFMIA)联合检测血清甲胎蛋白(AFP)和癌胚抗原(CEA)的反应体系,并对其进行评价。**方法** 以包裹有Eu螯合物的荧光微球作为标记物,共价偶联抗AFP单克隆抗体(简称单抗)AC18[#]和CEA单抗AE03[#],将抗AFP单抗AC17[#]、抗CEA单抗AE05[#]和羊抗兔IgG抗体喷涂于硝酸纤维素膜上,作为检测线和质控线,制作免疫层析试纸条,确定检测方法线性范围、最低检测限等指标,并将该法与时间分辨荧光免疫法(TRFIA)和电化学发光免疫分析法(ECLIA)进行直线相关分析。**结果** 标准曲线显示,AFP可测范围为0.07~1 000.00 kU/L,批内和批间CV分别为5.93%和11.07%,平均回收率为92.77%;CEA可测范围为0.12~500.00 μg/L,批内和批间CV分别为7.53%和12.13%,平均回收率为94.73%。TRFMIA与TRFIA和ECLIA检测的AFP和CEA结果有较好的相关性,相关系数为0.93~0.97。**结论** 成功建立时间分辨荧光免疫层析试纸条联合检测法,可同时检测AFP和CEA。

【关键词】 甲胎蛋白类;癌胚抗原;荧光免疫测定;化学发光测定法

基金项目:江苏省科技支撑计划-社会发展(BE2014608)

Simultaneous detection of tumor markers in human serum using time-resolved fluorescence microspheres immunochromatographic assay Guo Mingming, Xiao Hualong, Zhou Jianbo, Fu Lixin, Zhou Bin, Zhang Jue, Huang Biao

Key Laboratory of Nuclear Medicine, Ministry of Health, Jiangsu Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China (Guo MM, Zhou B, Zhang J, Huang B); Department of Clinical Laboratory, Wuxi People's Hospital, Wuxi 214023, China (Xiao HL); Department of Clinical Laboratory, Jiangyin People's Hospital, Jiangyin 214400, China (Zhou JB); Wuxi Jiangyuan Industrial Technology and Trade Corporation, Wuxi 214063, China (Fu LX)

Corresponding author: Huang Biao, Email: huangbiao@jsnm.org

【Abstract】 Objective To develop a time-resolved fluorescent microspheres immunochromatographic assay (TRFMIA) for detection of alphafetoprotein (AFP) and carcinoembryonic antigen (CEA) in human serum and to evaluate its performance. **Methods** The Eu-time-resolved fluorescent polystyrene particles conjugated with monoclonal antibody AC18[#] for AFP and AE03[#] for CEA were used as fluorescent labels. The monoclonal antibody AC17[#] for AFP, AE05[#] for CEA and goat anti-rabbit antibody were immobilized on the nitrocellulose membrane as the test lines and control line. Several performances indicators were measured, including linear range, detection limit, and specificity. AFP and CEA were measured by the new method and the results were compared with those obtained by time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) and electro-chemiluminescence immunoassay (ECLIA) using linear correlation analysis. **Results** The measurement ranges of AFP were 0.07–1 000.00 kU/L with the intra- and inter-assay CV of 5.93% and 11.07%, and those of CEA were 0.12–500.00 μg/L with the intra- and inter-assay CV of 7.53% and 12.13% respectively. The average recovery rate of AFP and CEA was 92.77% and 94.73%, respectively. Measurements obtained by TRFMIA had strong correlation coefficients ranging from 0.93 to 0.97 when compared with those obtained by TRFIA and ECLIA. **Conclusion** TRFMIA, which can simultaneously detect AFP and CEA, has been successfully established.

【Key words】 Alpha-fetoproteins; Carcinoembryonic antigen; Fluoroimmunoassay; Chemiluminescent measurements

Fund program: The Program of Social Development Fund from Jiangsu Science and Technology Department (BE2014608)

肿瘤标志物在肿瘤早期检测和诊断、临床分期、病理分型、疗效评估、监测及预后判断等方面具有重要意义。但单一检测往往灵敏度及特异性不高,对多种肿瘤标志物进行联合检测,可提高诊断的灵敏度。时间分辨荧光免疫层析法(time-resolved fluorescent microspheres immunochromatographic assay, TRFMIA)是一种新型的免疫层析技术,结合了镧系元素独特的荧光特点,快速、定量、灵敏、稳定。本研究利用表面羧基化修饰、包裹有 Eu 螯合物的荧光微球与免疫层析技术结合,建立定量检测多种肿瘤标志物的联合检测体系,并以甲胎蛋白(α-fetoprotein, AFP)和癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)为例,探讨该技术用于多种肿瘤标志物联合检测的可行性,现报道如下。

材料与方法

1. 主要材料与仪器。AFP 单克隆抗体(简称单抗; AFP McAb) AC17[#]和 AC18[#]、CEA 单抗(CEA McAb) AE03[#]和 AE05[#]、AFP 参考标准品、CEA 参考标准品、糖类抗原(carbohydrate antigen, CA)19-9 标准品、CA242 标准品、羊抗兔抗体、质控标记微球、AFP-时间分辨荧光免疫法(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)和 CEA-TRFIA 试剂盒均由无锡市江原实业技贸总公司提供。CA125 标准品、CA15-3 标准品、CA50 标准品购自广州中山大学达安基因股份有限公司。BM 100010-Eu-时间分辨荧光纳米微球购自上海西宝生物科技有限公司。吸水纸、样品垫、硝酸纤维素膜购自上海杰一生物技术有限公司。1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC]和 *N*-羟基琥珀酰亚胺(*N*-hydroxysuccinimide, NHS)购自美国 Sigma 公司。HG-98 免疫定量分析仪购自上海互幅科学仪器有限公司。全自动 TRFIA 检测仪 DELFIA1235 购自美国 Perkin-Elmer 公司。Elecsya 170 电化学发光分析仪及试剂盒购自美国罗氏公司。临床血清标本分别来自江苏省原子医学研究所江原医院、无锡市人民医院和江阴市人民医院。其他试剂均为国产分析纯。

2. 制备包被膜。在聚氯乙烯底板上粘贴包被膜,使用含质量分数 1% 蔗糖的 0.02 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.4),将检测抗体 AFP McAb AC17[#]、CEA McAb AE03[#]和羊抗兔 IgG 稀释至 0.75 g/L,将三

者以 0.35 cm 的间隔喷于硝酸纤维素膜上,30 °C 烘箱中放置 3 h 后装入铝膜袋封存备用。

3. 抗体标记微球。以 $m(\text{AFP 抗体}) : m(\text{微球})$ 为 1:50、1:10、1:5、1:1 分别标记 200 μl 免疫微球,具体如下:4 °C 保存的 10 g/L Eu-时间分辨荧光微球经超声重悬后,取 200 μl 于 1.5 ml 离心管中,室温 1.4×10^4 r/min 离心 15 min(半径 6.4 cm),弃上清,加入 600 μl 2-吗啉乙磺酸(2-morpholinoethanesulfonic acid, MES)活化缓冲液(pH 值 4.5)洗涤 2 次后,加入 400 μl 活化缓冲液,再加入 50 μl 10 g/L 的 EDC 和 50 μl 10 g/L 的 NHS,室温下避光振荡 30 min,以活化缓冲液洗涤,用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.2)重悬至 800 μl 后均分成 4 管,分别加入相应量的 CEA McAb AE05[#],补充 Tris-HCl 缓冲液至终体积 400 μl,室温下避光振荡 2 h;分别加入 4 μl 封闭剂[质量分数 10% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA),0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液,pH 值 7.2],室温下避光振荡 30 min, 1.4×10^4 r/min 离心 15 min(半径 6.4 cm),弃上清,用去离子水洗涤标记微球。最后用含有质量分数 1% BSA、体积分数 0.1% 吐温-20(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween-20)、0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.2)分别重悬至 200 μl,4 °C 避光保存备用。参考文献[1],选择 $m(\text{AFP 抗体}) : m(\text{微球}) = 1 : 25$ 为标记比例,标记免疫微球,标记过程同上,标记微球 4 °C 避光保存备用。

4. 荧光免疫层析试纸条的组装。在相对湿度小于 35%、20~25 °C 的环境下,在聚氯乙烯底板上粘贴样品垫和吸水纸形成微滤体系,将其切割为 0.4 cm 宽,制成试纸条(图 1),将试纸条装入卡壳中制成卡条,装入铝膜袋封存备用。

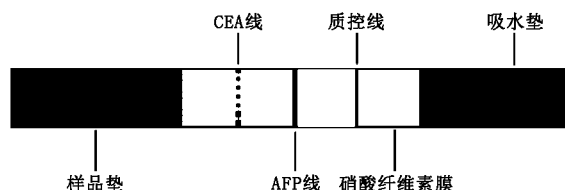


图 1 时间分辨荧光免疫层析联合检测甲胎蛋白(AFP)和癌胚抗原(CEA)试纸条示意图

5. 测定方法。采用夹心法建立同时检测 AFP 和 CEA 的方法,即在同时包被有 AFP 抗体和 CEA 抗体的试纸条上,加入 20 μl 标准品(AFP: 0、1、10、

100、500、1 000 kU/L;CEA: 0、1、5、10、100、500 μg/L)或待测血清,再加入 50 μl 体积分数 1% 稀释的混合标记微球(稀释液含质控标记微球),室温下静置 15 min,检测试纸条并绘制标准曲线。

6.方法学考核。(1)最低检测限。考察待分析物从检测背景中可靠识别出的最小量或最低浓度,分别以 10 组标准曲线零管计数求得 \bar{x} 和 s ,计算 $\bar{x}+2s$,在标准曲线上找到对应浓度。(2)特异性。考察抗体与被测物质的交叉反应程度,CA19-9(400 kU/L)、CA242(200 kU/L)、CA125(770 kU/L)、CA15-3(14 kU/L)和 CA50(200 kU/L)标准品作为样本测量,分析 AFP 和 CEA 抗体的特异性。(3)回收率。在已知浓度样本(S)中加入低、中、高质控品(q),按检测方法测定样本(m),计算实测值与理论值的比值。(4)精密度。选择低、中、高浓度的 3 组样本进行精密度试验。考察批内精密度时,AFP、CEA 每个浓度(质量浓度)样本各设 7 个复管;考察批间精密度时,3 组样本各测 3 次,每次各设 7 个复管,计算 \bar{x} 、 s 及 CV 。

7.临床样本检测。分别使用 TRFIA 试剂盒、电化学发光免疫分析法(electro-chemiluminescence immunoassay, ECLIA)试剂盒与 TRFMIA 试纸同时测试 125 例样本,考察 3 种方法鉴别诊断肝癌结果的相关性。严格按照 TRFIA 和 ECLIA 试剂盒说明书操作;行荧光微球 TRFMIA 时,按照测定方法操作,样本值由数据分析软件给出。正常参考值范围:AFP,0~10 kU/L;CEA,0~5 μg/L。

8.统计学处理。采用 IBM SPSS 19.0 软件分析数据,符合正态分布的计量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用单因素方差分析、配对 t 检验、 χ^2 检验和直线相关分析处理数据。 $P<0.05$ 为差异或相关性有统计学意义。

结 果

1. CEA McAb AE05[#]标记量的选择。在卡条加样区分别加入 20 μl 标准品后,加入 50 μl 不同标记量的稀释微球,室温下静置 15 min 后检测结果见图 2。由图 2 可知,对于 CEA 抗体标记,随着标记量的增加,各质量浓度点结合率逐渐增加,抗体/微球质量比为 1:5 时,即能达到较好的结合;质量比增至 1:1 时,高质量浓度点的荧光计数未见增加;考虑到检测成本,最终选择抗体/微球的质量比 1:5 作为标记量。

2.检测结果的判读。加样后,液体向前移动,先后与包被膜上的抗体形成免疫复合物,因此,卡条经仪器读取后即可显示 3 条荧光条带,分别为 CEA 线、AFP 线和质控线,质控线荧光扫描值基本一致,

CEA 和 AFP 线的荧光计数值分别随样本或标准品中 CEA 和 AFP 浓度(质量浓度)的增加而升高。以浓度(质量浓度)为横坐标,荧光值信号为纵坐标,拟合得标准曲线(图 3)。

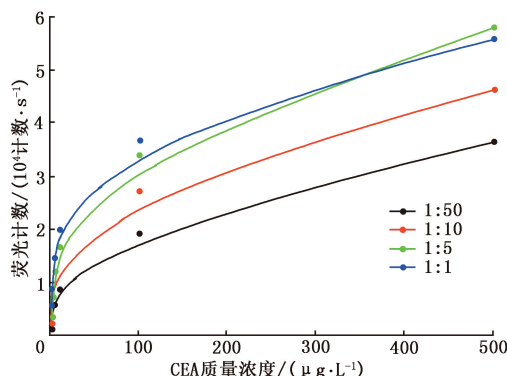


图 2 癌胚抗原(CEA)单克隆抗体(McAb) AE05[#]的不同标记比对 CEA 检测结果的影响。图例比例为抗体与微球的质量比

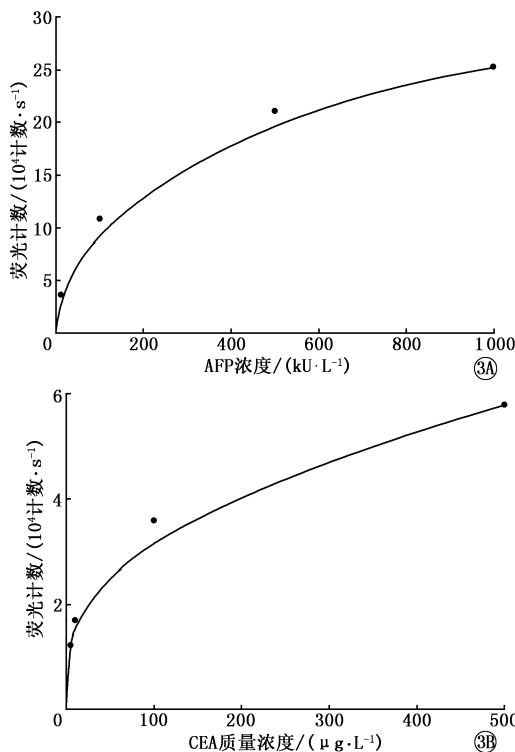


图 3 时间分辨荧光免疫层析技术检测甲胎蛋白(AFP)(3A)和 CEA(3B)的标准曲线

3.方法考核结果。(1)最低检测限和稳定性。以零浓度点计数率(counts per second, cps) $\bar{x}+2s$ 后的计数率在标准曲线上所得到的相应浓度(质量浓度)值为检测最低检测限,本试纸条检测范围为:AFP, 0.07~1 000.00 kU/L;CEA, 0.12~500.00 μg/L。试剂盒于 4 °C 避光条件下保存 6 个月后测定,对于检测 AFP 和 CEA,结合率分别为 93.4%(594 106/636 128)和

88.8% (123 528/139 095), 平均下降 6.6% 和 11.2%; 试剂盒放于 37 °C 7 d 后测定, 结合率分别为 88.9% (565 512/636 128) 和 86.9% (120 861/139 095), 平均下降 11.1% 和 13.1%; 说明试剂盒稳定性较好, 货架期较长。

(2) 精密度和回收率。采用 TRFMIA 测定血清 AFP 和 CEA, 低、中、高 3 种浓度或质量浓度 (22.31、56.89 和 362.16 kU/L, 7.38、22.21 和 301.30 μg/L) 的 20 次测定结果见表 1。检测 AFP 批内和批间平均 CV 分别为 5.93% 和 11.07%, 检测 CEA 批内和批间平均 CV 分别为 7.53% 和 12.13%, 符合批内 CV < 10% 和批间 CV < 15% 的要求。选择 25.20 kU/L AFP 和 42.00 μg/L CEA 做添加回收率试验, AFP 和 CEA 平均回收率分别为 92.77% 和 94.73% (表 2)。

(3) 特异性。采用 TRFMIA 分别检测高浓度 CA19-9 (400 kU/L)、CA242 (200 kU/L)、CA125 (770 kU/L)、CA15-3 (14 kU/L)、CA50 (200 kU/L) 标准品, 试纸条显示其 AFP 对应值分别为 0.06、0.02、0.11、0.07 和 0.23 kU/L, CEA 值分别为 0.33、0.19、0.01、0.05 和 0.40 μg/L, 表明高浓度 (质量浓度) 标准品与试纸条间无交叉反应, 抗体特异性较好。

4. 临床血清样本的分析。不同方法检测肝癌组与健康对照组的结果比较。分别用 TRFMIA 试纸、TRFIA 试剂盒和 ECLIA 试剂盒对 35 例原发性肝癌、20 例转移性肝癌和 70 名健康对照组患者血清

AFP 和 CEA 进行检测。结果表明, 三者所得 3 组患者的 AFP 和 CEA 差异均无统计学意义 (F 值: 0.536~4.023, 均 $P > 0.05$; 表 3)。对于 AFP, TRFMIA 与 TRFIA 和 ECLIA 的相关系数分别为 0.96 和 0.93; 对于 CEA, 相应值分别为 0.93 和 0.97; TRFMIA 与 TRFIA 法和 ECLIA 法测定结果高度相关。

5. 联合检测与单项检测的比较。分别采用 AFP+CEA 联合检测与单项检测对原发性肝癌组和转移性肝癌组进行判断, 联合检测对原发性肝癌患者的阳性检出率为 88.57% (31/35), 高于仅检测 CEA (57.14%, 20/35; $\chi^2 = 8.13$, $P < 0.05$); 联合检测对转移性肝癌患者的阳性检出率为 85.00% (17/20), 高于仅检测 AFP (40.00%, 8/20; $\chi^2 = 8.64$, $P < 0.05$)。

讨 论

肿瘤标志物的检测有助于原发肿瘤的早发现、早治疗及肿瘤治疗效果监测, 但单项检测的灵敏度和特异性有关; 而血清学肿瘤标志物进行联合检测可相互补充, 避免漏诊, 提高对肿瘤的检出率, 具有重要的参考价值^[2-3]。目前, 用于多肿瘤标志物联合检测的方法很多, 如放射免疫法^[4]、微阵列酶联免疫法^[5]、固相蛋白芯片技术^[6]、表面增强的激光分析/电离化飞行时间质谱法^[7]等, 但上述均需大型的检测仪器, 操作繁琐或价格较贵。荧光微球免疫层析技术是检验医学的新兴技术, 具有灵敏度高、

表 1 时间分辨荧光免疫层析法检测血清 AFP 和 CEA 的精密度

肿瘤标志物	样本检测值 ($\bar{x} \pm s$)			批内平均精密度	样本检测值 ($\bar{x} \pm s$)			批间平均精密度
	S1	S2	S3		S1	S2	S3	
AFP (kU/L)	19.39±1.02	58.70±4.34	379.71±19.80	5.93%	20.99±2.38	55.10±7.68	383.33±30.76	11.07%
CEA (μg/L)	7.09±0.60	23.77±2.13	288.92±15.04	7.53%	6.99±0.96	26.34±3.32	292.40±29.83	12.13%

注: 批内测定 7 次, 批间测量 3 次; AFP 为甲胎蛋白, CEA 为癌胚抗原

表 2 时间分辨荧光免疫层析法检测血清 AFP 和 CEA 的回收率

肿瘤标志物	样本浓度		质控浓度		样本检测值		回收率 (%)		平均回收率 (%)	
AFP (kU/L)	25.20	40.30	126.80	315.38	30.02	70.16	160.63	91.66	92.32	94.33
CEA (μg/L)	42.00	8.75	53.58	170.12	31.20	42.43	96.11	104.87	88.78	90.62

注: 测定样本 (20 μl) 为样本 (10 μl) 与质控 (10 μl) 的混合样本; 回收率 = 测定浓度 / 理论浓度 × 100%

表 3 不同方法测得的患者血清 AFP 与 CEA ($\bar{x} \pm s$)

方 法	AFP (kU/L)			CEA (μg/L)		
	PHC 组	MHC 组	对照组	PHC 组	MHC 组	对照组
TRFMIA	2 555.15±1 418.04	12.03±10.80	1.64±0.85	9.14±6.79	205.31±164.56	1.38±0.51
TRFIA	1 994.04±1 310.69	13.18±11.78	1.41±0.47	9.73±7.83	248.36±227.49	1.95±0.70
ECLIA	2 679.19±1 681.73	11.40±9.41	1.54±0.57	7.73±5.99	264.92±208.73	1.14±0.71

注: ECLIA 为电化学发光免疫分析法, TRFIA 为时间分辨荧光免疫法, TRFMIA 为时间分辨荧光免疫层析法; MHC 组为转移性肝癌组 (20 例), PHC 组为原发性肝癌组 (35 例), 对照组 70 名

特异性好、成本低廉、操作简便等优点,已应用于莱克多巴胺^[8]、大肠杆菌 O157:H7^[9]、AFP^[1]、空肠弯曲杆菌^[10]等的检测,并展现出明显优势。

荧光微球指直径在纳米至微米级(0.01~10.0 μm)范围内负载有荧光物质、受外界能量刺激能激发出荧光的固体微粒。基于荧光微球相对稳定的形态结构及发光行为、发射强而稳定、基本不受外界环境介质变化的影响等优点^[11],荧光微球免疫层析法具有较好的应用前景。荧光微球 TRFMIA 采用包裹有镧系元素(Eu)螯合物的荧光纳米微球作为示踪标记物,同时结合了镧族元素荧光的长寿命和纳米微球的信号放大效应,灵敏度高、稳定性高、特异性好、线性范围宽,且检测所需时间短^[11]。

本研究探讨了 TRFMIA 用于多肿瘤标志物联合检测的可行性,采用双抗体夹心法建立了同时定量检测血清 AFP 和 CEA 的反应体系。该法检测血清 AFP 的灵敏度为 0.07 kU/L,CEA 为 0.12 μg/L;对 AFP 测量范围为 0.07~1 000.00 kU/L,对 CEA 测量范围为 0.12~500.00 μg/L;检测 AFP 的平均回收率为 92.77%,CEA 为 94.73%。该反应体系在 4℃ 下贮存 6 个月性能仍稳定,货架寿命可满足实际应用需求。该法与 TRFIA 和 ECLIA 检测 AFP 和 CEA 的结果均有较好的相关性,联合检测 AFP 和 CEA 可提高对肝癌的阳性检出率,有助于鉴别原发性肝癌和转移性肝癌。TRFMIA 反应时间短,仅需 15 min,即可同时得到 2 个量化指标。配套荧光检测仪经济、小型,更适合基层单位。该法既利于大规模临床样本普查筛选和患者病情监测,又可进行单人份操作,灵敏、快速、经济、简便,具有较好的推广应用价值。本研究不足之处在于精密度较低,尤其是检测 AFP 和 CEA 的批间 CV 较大,分别为 11.07% 和 12.13%,这可能会对检测结果造成影响;可在使用时添加质控来校准标准曲线消除 CV 造成的影响,但其可行性需在今后的研究和应用中加以验证。

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] 郭明明,周衍,周剑波,等. 荧光微球时间分辨免疫层析技术定量检测甲胎蛋白的研究[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(10): 897-901. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20150189.

Guo MM, Zhou Y, Zhou JB, et al. Quantitation of alpha fetoprotein (AFP) in human serum using fluorescence microspheres time-resolved immunochromatographic technology[J]. Immunol J, 2015, 31(10): 897-901. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20150189.

[2] 李艳平,王群,赵姿红,等. 联合检测肿瘤标志物在肺癌诊断中的临床价值[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2013, 33(5):

336-339. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2013.05.005.

Li YP, Wang Q, Zhao ZH, et al. Diagnostic value of combined detection of serum tumor markers for lung cancer[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2013, 33(5): 336-339. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2013.05.005.

[3] 许峰,吴翼伟,章斌. 血清 IGF-1 及 CEA、CYFRA21-1、NSE 联合检测在肺癌诊治中的价值[J]. 中华核医学杂志, 2011, 31(3): 205-209. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9780.2011.03.016.

Xu F, Wu YW, Zhang B. Combination of IGF-1 with CEA, CYFRA21-1, NSE for the diagnosis and prediction of treatment response in lung cancer[J]. Chin J Nucl Med, 2011, 31(3): 205-209. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9780.2011.03.016.

[4] 杨宗桥,付敏,付善书. 电化学发光法与放射免疫法测定血清甲胎蛋白的比较[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(5): 611-612. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.05.058.

Yang ZQ, Fu M, Fu SS. Comparison research on ECLIA and IRMA in determination of AFP in serum[J]. Lab Med Clin, 2012, 9(5): 611-612. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.05.058.

[5] 任传路,丁庆莉,蒋天如,等. 微阵列酶联免疫法检测多项肿瘤标志物诊断原发性肝癌的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(24): 2967-2968. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.011.

Ren CL, Ding QL, Jiang TR, et al. Clinical value on Array-ELISA in diagnosing primary hepatocarcinoma by detecting multi-tumor markers[J]. Int J Lab Med, 2012, 33(24): 2967-2968, 2973. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.011.

[6] Liu F, Du F, Chen X. Multiple tumor marker protein chip detection system in diagnosis of pancreatic cancer[J]. World J Surg Oncol, 2014, 12: 333. DOI: 10.1186/1477-7819-12-333.

[7] 侯淑玲,张巧花,王军,等. 应用表面增强激光解吸电离-飞行时间-质谱技术筛选淋巴瘤患者血清特异性生物标志物[J]. 白血病·淋巴瘤, 2011, 20(11): 672-675. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9921.2011.11.010.

Hou SL, Zhang QH, Wang J, et al. Serum specific biomarkers for detection of lymphoma using SELDI-TOF-MS[J]. J Leuk Lymph, 2011, 20(11): 672-675. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9921.11.010.

[8] 刘道峰,邓省亮,赖卫华,等. 莱克多巴胺荧光微球免疫层析检测方法的建立[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 73-77. DOI: 10.3969/j.issn.1003-5788.2012.01.019.

Liu DF, Deng SL, Lai WH, et al. Development of lateral flow assay of ractopamine based on fluorescent microspheres[J]. Food Mach, 2012, 28(1): 73-77. DOI: 10.3969/j.issn.1003-5788.2012.01.019.

[9] Xie QY, Wu YH, Xiong QR, et al. Advantages of fluorescent microspheres compared with colloidal gold as a label in immunochromatographic lateral flow assays[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 54: 262-265. DOI: 10.1016/j.bios.2013.11.002.

[10] Xu D, Wu XL, Li B, et al. Rapid detection of Campylobacter jejuni using fluorescent microspheres as label for immunochromatographic strip test[J]. Food Sci Biotechnol, 2013, 22(2): 585-591. DOI: 10.1007/s10068-013-0118-5.

[11] 吴伟兵,王明亮,景宜,等. 单分散荧光微球的制备及其光学性能研究[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2010, 34(3): 15-19.

Wu WB, Wang ML, Jing Y, et al. Preparation of monodisperse fluorescent microspheres and their optical properties[J]. J Nanjing For Univ(Nat Sci ED), 2010, 34(3): 15-19.

(收稿日期:2017-11-17)