

微板式磁化学发光酶免疫分析法对 人绒毛膜促性腺激素(HCG)的灵敏快速测定

赵利霞 林金明* 屈 锋*

(中国科学院生态环境研究中心 北京 100085)

摘要 以磁性酶免疫测量分析为模型,建立了微板式磁化学发光酶免疫分析法.利用 3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷酸氧基)苯-1,2-二氧杂环丁烷(AMPPD)-碱性磷酸酶(ALP)化学发光体系对人绒毛膜促性腺激素(HCG)进行测定,测量的灵敏度较分光光度法提高了 13 倍.测定的线性范围为 0.15 ~ 500 mIU/mL;批内变异系数(C.V.%)和批间变异系数(C.V.%)均在 18%之内;回收率在 80% ~ 116%之间;利用本法对血清样品进行了测定,并与其它化学发光免疫分析方法进行了比较,其相关系数为 0.965.首次将酶免疫分析方法用于唾液中人绒毛膜促性腺激素(HCG)的测定,为建立非侵入式样品测定方法打下了基础.

关键词 化学发光,人绒毛膜促性腺激素(HCG),磁性酶免疫测量分析,唾液

Micro-plate Magnetic Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Rapid, Sensitive Determination of Human Chorionic Gonadotropin (HCG)

ZHAO, Li-Xia LIN, Jin-Ming* QU, Feng

(Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

Abstract A micro-plate magnetic chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of human chorionic gonadotropin (HCG) based on the improvement in the method of the magnetic immunoenzyme spectrophotometric assay was established. The enzyme alkaline phosphatase (ALP) was used as labeled reagent, which reacted with the chemiluminescence reagent of 3-(2-spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3-phosphoryloxy)phenyl-1,2-dioxetane (AMPPD) in buffer solution. The sensitivity of the present chemiluminescent method was 13 times higher than that of spectrophotometry. The linear range was 0.15 ~ 500 mIU/mL HCG; the within run and between run CVs were both below 18%. This method was applied to detect HCG in serum and the percent recovery was in the range of 80% ~ 116%. Compared with other chemiluminescence immunoassays, the correlation coefficient was 0.965. It was firstly reported to use enzyme immunoassay for the detection of HCG in saliva, which will break a new way for establishing a non-invasive method.

Keywords chemiluminescence, human chorionic gonadotropin (HCG), enzyme immunoassay, saliva

人绒毛膜促性腺激素(HCG)是由胚胎和胞体滋养层大量产生的一种糖蛋白,其分子量为 36700 Da.由两个非共价结合的,大小不同的亚单位组成.血清中的 HCG 是诊断异位妊娠的重要指标,也是诊断早孕和滋养细胞疾病的主要标记物^[1].因此,HCG 水平的测定对计划生育和临床疾病的诊断是非常重要的.目前在临床诊断中,建立快速、灵敏的

HCG 测定方法仍是人们关注的焦点.已经报道的方法有放射免疫分析^[2]、电化学免疫分析^[3,4]、荧光免疫分析^[5]和化学发光免疫分析^[6~8]等.国际上,美国 DPC 公司的酶放大免疫分析系统,拜尔公司的 ACS:180 全自动免疫分析系统^[9]和加拿大的 Elecsys®2010 电化学发光免疫分析仪^[10]等,也为 HCG 的临床诊断提供了可靠的依据.

* E-mail: jmlin@mail.rcees.ac.cn

Received May 7, 2003; revised July 11, 2003; accepted August 31, 2003.

国家杰出青年科学基金(No. 20125514)资助项目.

“双抗体夹心”免疫分析技术一般是将一抗体结合到固相载体,如孔板、微管、微球或磁珠等上作为捕获抗体,用另一个可溶性的标记抗体对待测物进行定量.通过改变抗体、抗原的加入顺序,产生各种不同的免疫分析方案,但每一个方案都有一个必不可少的步骤,即固定化的抗体与抗原或抗原-抗体复合物反应.这会由于空间扩散的缺陷而导致反应动力学降低,温育时间长.另外,使用不可溶的抗体会使抗体-抗原的免疫亲和性降低,灵敏度受到限制.Rattle^[11]等使用可溶性的异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗体作为捕获抗体,并采用FITC结合的磁珠分离技术,克服了以上缺陷,灵敏度得到了提高.这种酶免疫光度分析已经推向市场,但与化学发光法结合而建立的化学发光酶免疫分析技术,目前国内处于起步阶段.

众所周知,唾液的成分与血液成分极其相似^[18].由于唾液的采样,是一种非侵入式的技术,可以由患者本人进行样品收集.用唾液代替血清作为样品基质对甾类激素的测定越来越受到人们的关注^[12~17].唾液中各种甾类激素和糖蛋白激素的含量一般较血清中的含量低10~100倍^[18],因此,必须建立一种灵敏度高的免疫测定方法.苗海玉等^[19]用放免法对唾液中的HCG进行了初步探讨,Deacon^[20]使用毛细管填充式免疫传感器对唾液中的HCG进行了分析,但使用酶免疫分析对唾液中HCG的测定还未见报道.

本文以3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷酸氧基)苯-1,2-二氧化杂环丁烷(AMPPD)作为发光底物,使用超灵敏的化学发光体系对磁性酶联免疫光度测定法进行改进,灵敏度提高了13倍.根据这一特点,以HCG为模型,我们建立了一种以唾液为测定对象的微板式磁化学发光酶免疫分析法.对唾液中HCG的检测具有实用价值,为进一步开发非侵入式样品检测方法打下基础.

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

LP-5000 化学发光分析仪(日本MICROTEC NITION公司),8×12孔/板(SUMOLIN,日本住友会社),10~100 μL可调定量加样器(北京青云航空仪表有限公司).微量振荡器(江苏海门市麒麟医用仪器厂).自制磁感应强度为2500 Hz的磁性分离器,恒温振荡器(常州国华电器有限公司).

牛肠碱性磷酸酶(ALP, 1 U/mL, Sigma公司); HCG, ALP标记HCG抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记HCG抗体、偶联FITC抗体的磁珠(北京倍爱康生物技术有限公司);洗涤液:0.1 mol/L Tris-HCl-0.05 % Tween 20, pH 7.4;样品稀释液:含0.1 %小牛血清白蛋白的洗涤液;底物稀释液:pH=9.5的Na₂CO₃-NaHCO₃缓冲溶液;底物溶液:AMPPD(DPC公司).

1.2 方法

1.2.1 免疫反应的改进

(1) 管式分析改进为96孔板分析

设计了适合于微板式磁性分离免疫分析的磁感应强度为2500 Hz的磁性分离器.将10 μL抗原、20 μL抗体溶液加入到酶标板孔中,用微量振荡器混匀,温育15 min后,再加入20 μL磁珠分离液,再混匀、温育5 min.然后将微孔板放入磁性分离器中,1 min后,将上清液倒掉,即可分离.如此重复3次.

(2) 样品量的减少

磁酶免疫分析中使用的抗体、抗原的量分别为100, 200 μL,磁珠分离液为200 mL;利用本方法对HCG进行测定时,使用的抗体、抗原和磁珠分离液的量均减为原来的1/10[如改进(1)所述].

(3) 抗体的稀释

用本文建立的方法对HCG进行测定时,使用的HCG的抗体的浓度是磁酶免疫分析中使用HCG抗体浓度的1/3.

1.2.2 化学发光测定

向板孔内加入10 μL底物溶液,放置30 min后,用LP-5000板式免疫发光测量分析仪测量化学发光信号.并将数据贮存入相应的定量程序.

1.3 样品的收集

(1) 血清样品的收集

全血溶液来自于北京大学第三临床医院,以转速为1500 r/min离心10 min,取上清溶液.

(2) 唾液样品的收集

参照文献[18],分别取4个非孕妇女和1个怀孕(30周左右)妇女的唾液,以转速3000 r/min离心10 min,然后冻溶,再以转速为3000 r/min离心10 min.收集上清液.置于-20 °C冷藏,备用.

2 结果与讨论

2.1 利用化学发光法对酶免疫测定分析改进的基本原理

磁性酶免疫分析中,待测物分别与ALP和FITC标记的单克隆抗体反应,形成酶标抗体-抗原-FITC标记抗体的双抗体夹心复合物;再加入磁分离剂(含有与FITC结合的磁微粒),使复合物与磁性分离结合,在永久磁铁下使其沉淀到管底,分离出游离酶标抗体.加入底物单磷酸酚肽(PMP),ALP催化PMP水解释放出酚肽,在pH=10.5的缓冲溶液中呈桃红色.据此,用分光光度法进行管式测定.此免疫分析方法稳定性好,目前已经推向市场.但使用分光光度法检测,灵敏度受到了限制.

化学发光法具有灵敏度高,线性范围宽等优点.因此,化学发光免疫分析在临床化学和环境检测领域中一直受到关注.以AMPPD为化学发光底物,ALP可以催化裂解AMPPD产生强的化学发光,此化学发光强度与ALP的浓度成正比,且发光信号可以持续7 d.根据这一特点,本文使用AMPPD-ALP体系对上述分光光度法测定的磁酶免疫分析进行改进,建立了一种微板式磁性化学发光酶免疫分析方法(见图1),

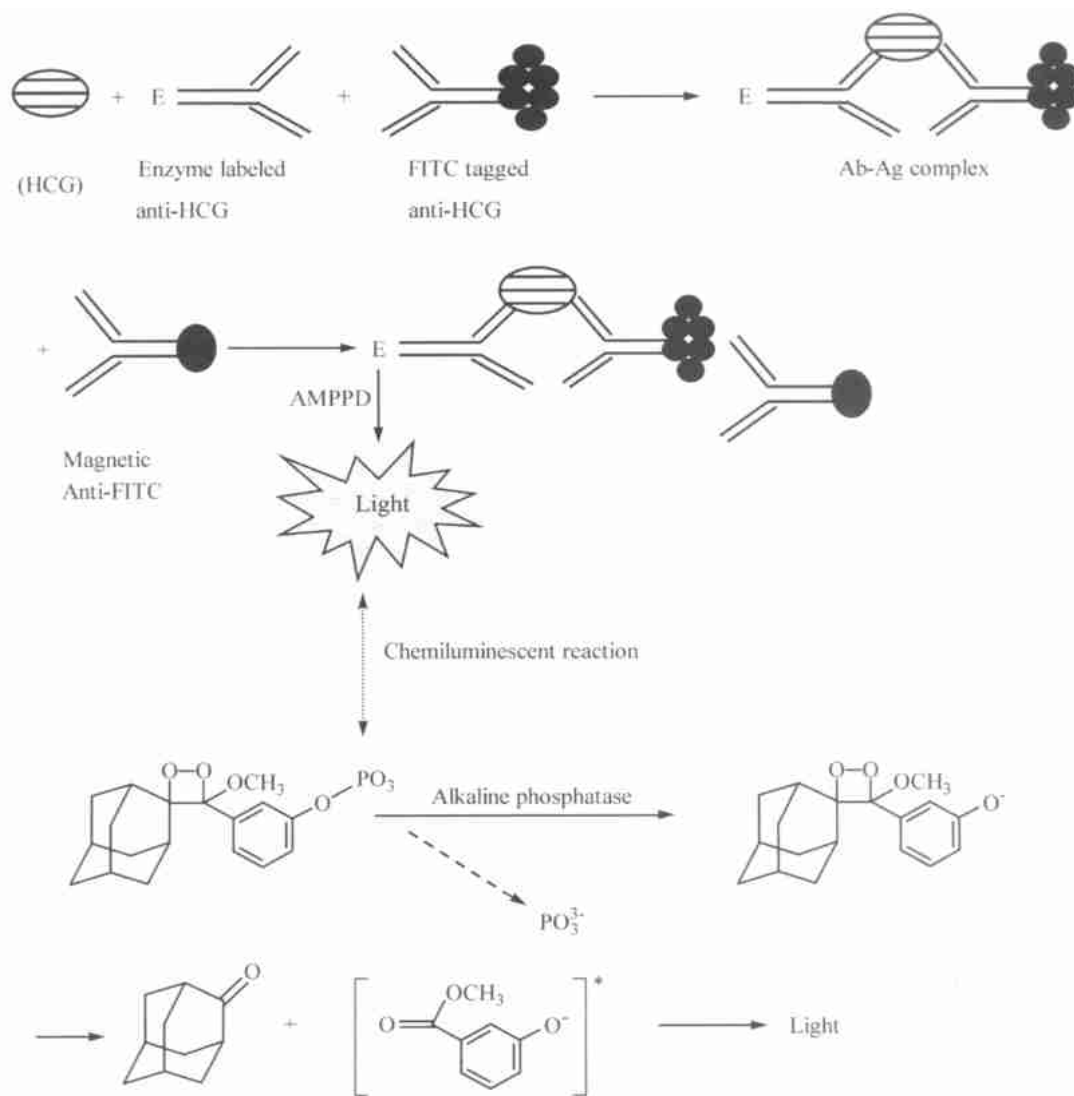


图1 化学发光磁酶免疫分析原理示意图

Figure 1 Principle schematic diagram of chemiluminescence magnetic enzyme immunoassay

并以 HCG 为测定对象进行了研究. 结果表明, 利用本法对 HCG 进行测定, 其灵敏度较分光光度法可以提高 13 倍.

2.2 化学发光检测条件的确定

2.2.1 底物浓度对测定的影响

分别在 pH 9.5 的 1 mL $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ 缓冲液中, 加入 5 μL 碱性磷酸酶 (1×10^{-5} U/ μL) 和不同量的 AMPPD 溶液, 30 放置 30 min, 测定其发光强度 (图 2), 结果表明, 加入 AMPPD 的量在 1 ~ 10 μL 范围内, 发光强度与 AMPPD 加入量近似于直线关系, 加入量大于 10 μL 时发光强度趋于平缓. 本实验采用 AMPPD 浓度为 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

2.2.2 介质的 pH 值和酶促反应时间对化学发光反应的影响

固定 AMPPD 的量 10 μL , 分别在不同 pH 值的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲溶液中, 对 AMPPD-ALP 反应体系进行发光测量 (图 3). 结果发现, 发光过程与 pH 值有关: 当 pH 为 9.5 时, 化学发光强度在 30 min 内逐渐增大, 0.5 h 后, 发光强度趋于

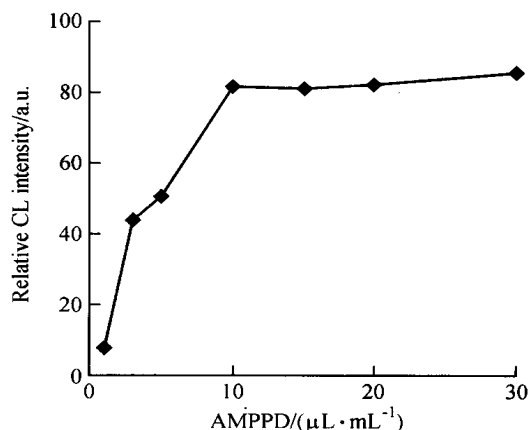


图2 底物浓度对化学发光强度的影响

Figure 2 Effect of the AMPPD concentration on CL intensity

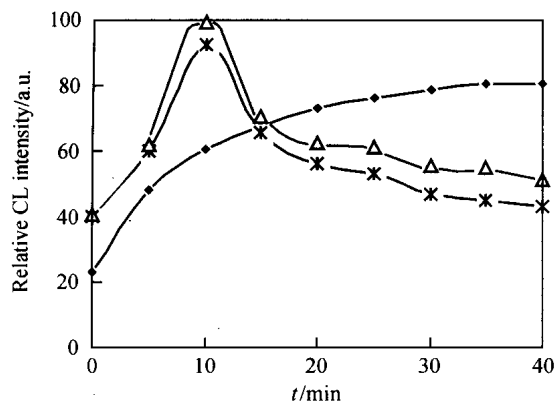


图3 酶促反应时间和 pH 值对化学发光强度的影响

Figure 3 Effect of reaction time and pH on the CL intensity
—pH=9.50; * —pH=9.90; —pH=10.40

平缓.这是 AMPPD 由酶裂解而产生的 AMP⁻D,相对比较稳定,降解之前浓度不断增大.到 0.5 h 之后,其发光趋于稳定.但当 pH 值增大时,发光强度先增大,后减小,且最大值随 pH 值增大而增大.这可能是由于反应中产生化学发光的是间氧基安息香酸阴离子,它的 pK_a 值大约为 9.0,而质子化的电荷转移过程是非常低的,当 pH 值增大时,可能会促使间氧基安息香酸阴离子浓度的增多,致使发光强度增大,很难出现平台现象.因此,我们选择介质的 pH 值 9.5,反应时间为 30 min.

2.3 免疫反应改进实验

2.3.1 抗体的稀释

抗原和抗体的比例不同,可形成不同形式的 $(Ag)_m-(Ab)_n$ 类可溶性免疫复合物^[21].抗体的稀释度会影响到化学发光测定的灵敏度.阳性质控血清与阴性质控血清的比值 (P/N) 反映了本体系的灵敏度.在抗原一定的情况下,将抗体分别进行稀释,用化学发光法进行 P/N 测定,结果如图 4.

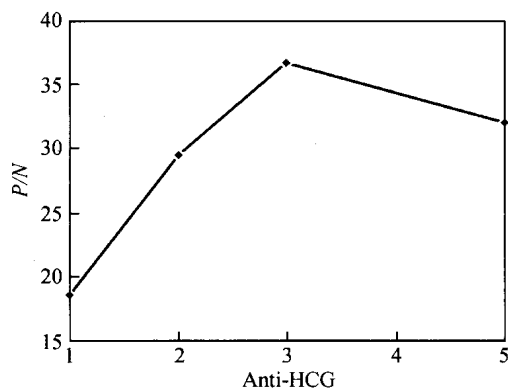


图4 抗体的稀释度对测定灵敏度的影响

Figure 4 Effect of different dilutors of anti-HCG on the P/N

实验可知:抗体的稀释度逐渐增大时,灵敏度逐渐增大.

当抗体的稀释系数大于 3 时,其灵敏度开始降低.故本实验选用稀释系数 3 为化学发光免疫酶反应体系抗体稀释度.

采用本方法不仅使总的抗体量减少为原来的 $1/3$,降低了成本,并且灵敏度提高了 2.0 倍.

2.3.2 样品量的减少

在微板式磁化学发光酶免疫分析中,测定发光信号时从上方读取数值,溶液高度、磁珠数量对测定结果都会有影响.因此,对微板式磁化学发光酶免疫分析方法的温育体积进行了考察.分别取阴性血清和阳性血清 1, 5, 10, 20, 50 μL ,按照分光光度法测定之抗原、抗体、磁微粒的比例进行微板式磁性酶免疫化学发光测定,结果如表 1.我们发现,即使仅加入 1 μL 血清样品, P/N 值也可测得;但在 50 μL 处有略微降低,这可能是由于磁珠量太大时,底部的一部分光被黑色磁珠遮挡所致;其他体积的变化对灵敏度影响不大.本实验加入 HCG 体积为 10 μL ,这使抗体的量相应地又减为原来的 $1/10$,大大降低了成本.

表 1 样品的加入量对化学发光测定的影响

Table 1 P/N data in different incubation volumes

HCG μL	1	5	10	20	50
P/N^a	35.8	47.2	42.8	46.5	28.1

^a阳性质控血清与阴性质控血清的比值.

2.3.3 管式分析改进为板式分析

建立一种快速、灵敏的检测方法在临床诊断中具有重要的意义.我们设计了磁感应强度为 2500 Hz 的磁性分离器(如图 5).将微孔板从一侧插入到磁性分离器中,1 min 后,将上清液倒掉,然后抽出,完成分离.洗涤时重复上述过程.用 96 孔板代替单管分析,可以节省时间.使用微板式磁免疫酶分析只需 1 h 就可完成 96 个样品的分析,且使用过程中,试剂几乎无丢失,操作简单、方便.此磁性分离器还可适用于 12, 24, 40, 48, 384 孔等所有等尺寸的酶标板,使用范围广,尤其可以建立 384 微孔板的快速、灵敏的免疫分析,在临床化学、环境污染、以及对大规模的流行病检测方面具有广阔的应用前景.

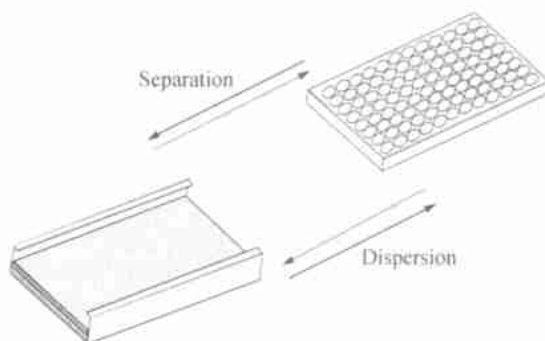


图5 微板式磁性分离操作示意图

Figure 5 Schematic diagram of microplate magnetic separation

2.4 非特异性吸附

96孔聚苯乙烯微量反应板对抗原/抗体等蛋白质有吸附能力.因此,本文考察了游离抗原、抗体的非特异性吸附对实验结果的影响.对向孔中仅加入抗原、抗体溶液与向孔中加入抗原、抗体和磁珠分离液两种情况进行实验考察,结果如表2所示.

从表中可以看出在加入磁珠后,化学发光信号随待测物浓度的变化而会有很大的变化;而不加磁珠时,测得的发光信号随待测物浓度的变化没有很大变化;且各浓度的信号均接近于零浓度的发光信号.这可能是由于在实验过程中,抗原和抗体混合温育的时间较短.因此,非特异性吸附对此实验的影响很小.

表2 非特异性吸附的研究

Table 2 Study of non-specific adsorption

HCG 浓度/ (mIU · mL ⁻¹)	无磁珠时的 发光信号	加入磁珠的 发光信号
0	1637	1552
5	1274	5893
12.5	1425	11124
25	1698	16588

2.5 标准曲线和灵敏度

在最佳的反应条件下,用化学发光法测定了HCG的线性范围,如图6所示,以化学发光强度(5 s积分)为纵坐标,HCG浓度为横坐标,测得的线性范围在0.15~500 mIU/mL,其变异系数在8%之内.

使用本文建立的化学发光酶免疫分析方法测定了HCG的灵敏度:对零标准管进行8次平行测定,并计算出其标准偏差,根据检测限定义求得其检测限为0.072 mIU/mL.并与其他“灵敏的”非同位素标记方法的检测限进行了比较(表3).

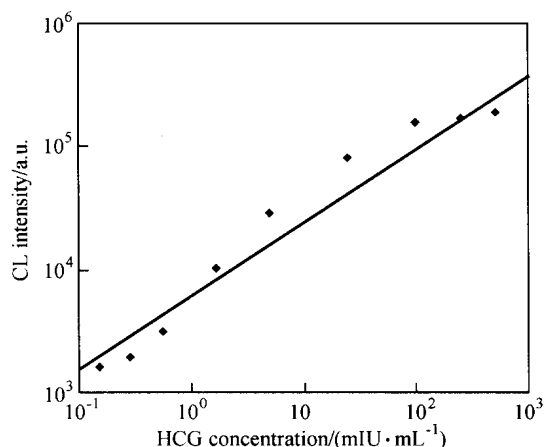


图6 化学发光法测定HCG的校准曲线

Figure 6 Calibration curve of chemiluminescence signal (5 s integrate) vs. HCG concentration

2.6 精密度和回收实验

分别用4个和3个不同的血清样品进行12次平行测定以及连续3 d的测定,求得其批内变异系数和批间变异系数均在5.5%~18.5%之间(表4).

将一阳性血清和一阴性血清分别用不同倍数的稀释,并测定回收率,检验本法测定的可靠性.表5结果表明,回收率均在80%~116%之间.

2.7 样品测定

2.7.1 血清中的样品测定及与其它方法的相关性

用本文建立的方法对15份病人血清进行测定,并与使用美国DPC公司的免疫试剂及仪器测定的诊断结果进行比较,其相关性很好.以DPC公司的免疫试剂及仪器测定的结果为横坐标 x ,本法的测定结果为纵坐标 y ,绘制相关曲线,其曲线方程为 $y = 1.097x - 2.618$,相关系数 $r = 0.965$.结果如图7所示.

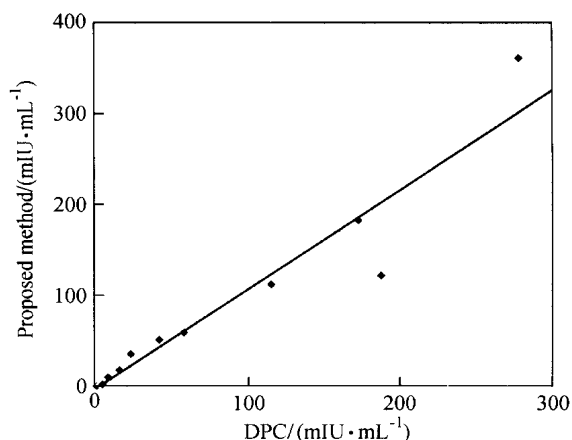


图7 本法与DPC系统测定方法的比较

Figure 7 Correlation between proposed methods and the methods of DPC

2.7.2 唾液中人绒毛膜促性腺激素的初步测定

利用本文建立的微板式磁化学发光酶免疫分析方法,对四个非孕妇女和一个怀孕妇女的唾液进行初步测定,结果(如表6)发现,测定的回收率除了一个是136%之外,其它均在85%~120%之间.测定的值均为血清含量的1/10~1/100之间,这与文献报道^[18]相符.因此,利用本法对唾液样品的测定是完全可行的.

3 结论

本文对磁性免疫酶光度分析法从三个方面进行了改进,建立了一种孔板式化学发光磁性酶免疫分析方法,大大降低了成本,节约了时间,在1 h内可以检测96个样本.利用本法对HCG进行测定,灵敏度较原来的磁性免疫酶分析方法提高了13倍.基于此,首次将免疫酶分析方法用于唾液样品基质的初步测定,证明了本法用于唾液测定的可行性.

表 3 与其他非同位素标记免疫分析的灵敏度的比较

Table 3 Sensitivity of nonisotopic immunoassays of HCG compared

Assay method	Label	Detection limit/ (mIU mL ⁻¹)	Solid support	Ref.
MMCLEIA	ALP	0.072	Magnetic partical (labeled anti-FITC)	—
IEMA	ALP	< 1	Magnetic partical (labeled anti-FITC)	[19]
Immulite (DPC)	ALP	0.5	(Polystyrene) bead	[8]
Elecsys [®] 2010	Ru(bpy) ₃ ²⁺		Magnetic partical	[11]
Liaison [®]		0.5	Magnetic partical	—
ACS:180 (Bayer)	AE	1	Magnetic partical	[10]

ALP:碱性磷酸酶;Ru(bpy)₃²⁺:联吡啶;AE:吖啶酯. MMCLEIA:微板式磁性化学发光酶免疫分析法;IEMA:免疫酶磁性分析法; Immulite (DPC):美国 DPC 公司的酶放大免疫分析系统;Elecsys[®]2010:加拿大的电化学发光免疫分析仪;ACS:180 (Bayer):拜尔公司的 ACS:180 全自动免疫分析系统.

表 4 微板式磁性化学发光酶免疫分析对 HCG精密度的测定

Table 4 Precision of microplate magnetic chemiluminescent immunoenzymetric HCG assay

Sample		Mean/ (mIU mL ⁻¹)	Range/ (mIU mL ⁻¹)	SD	C. V. / %
Intra-assay (n = 12)	1	240.4	185.8 ~ 286.4	40.6	9.9
	2	155.8	112.5 ~ 181.1	28.0	10.9
	3	54.2	40.0 ~ 70.3	10.0	11.5
	4	18.5	15.5 ~ 22.8	2.3	5.5
Inter-assay (n = 30, detection of three days)	1	136.4	119.2 ~ 154.8	10.5	13.7
	2	232.6	212.8 ~ 252.9	15.8	18.7
	3	227.3	212.8 ~ 238.9	9.0	11.5

表 5 两个不同样品的 HCG的稀释和回收率测定

Table 5 HCG dilution results for two samples

Sample	Dilutor	Observed value/ (mIU mL ⁻¹)	Expected value/ (mIU mL ⁻¹)	Recovery/ %
1	1	1.20	—	—
	2	0.70	0.60	116
	3	0.32	0.40	80
	4	0.28	0.30	93
2	1	85.80	—	—
	2	48.00	42.90	112
	3	31.20	28.60	109
	4	22.50	21.45	105
	5	17.00	17.16	99
	10	8.54	8.50	101

表 6 唾液中 HCG样品的初步测定

Table 6 Preliminary determination of HCG in the saliva

Sample	Added/ (mIU mL ⁻¹)	Determined/ (mIU mL ⁻¹)	Recovery/ %
1	0	0.412	—
	2.5	3.44	120
	12.5	17.43	136
	50	61.82	122
2	0	0.486	—
	2.5	3.62	85
	12.5	16.05	116
	50	48.65	94

续表

Sample	Added/ (mIU mL ⁻¹)	Determined/ (mIU mL ⁻¹)	Recovery/ %
3	0	0.599	—
	2.5	3.73	85
	12.5	14.34	101
	50	59.02	114
4	0	0.384	—
	2.5	2.95	103
	12.5	13.03	101
	50	51.65	102
5	0	9.792	—
	12.5	24.91	121
	50	61.63	104

1~4—4个未孕妇女的唾液样品;5—怀孕30周左右的妇女的唾液样品

References

- Swaminathan, N. *Bahl. OP. Fed. Proc.* **1970**, 29, 599.
- Xu, R.-Q. *Zhonghua Fuchanke Zazhi* **1981**, 16, 29 (in Chinese).
(徐仁淇, 中华妇产科杂志, **1981**, 16, 29.)
- Kokado, A.; Arakawa, H.; Maeda, M. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 407, 119.
- He, Z.-H.; Gao, N.; Jin, W.-R. *J. Chromatogr. B* **2003**, 784, 343.
- Nakamura, N.; Lim, T.-K.; Jeong, J.-M.; Matsunaga, T. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 439, 125.
- Zhang, F.; Li, Q.-G.; Li, Z.-Q.; Chen, J. *Chin. J. Anal. Chem.* **1993**, 21, 698 (in Chinese).
(张帆, 李庆阁, 李兆强, 陈静, 分析化学, **1993**, 21, 698.)
- Vankrieken, L.; Hertogh, R. D. *Clin. Chem.* **1995**, 41, 36.
- Lin, J.-M.; Tsuji, A.; Maeda, M. *Anal. Chim. Acta* **1997**, 339, 139.
- Han, P.-Z. *Foreign Medicine · The Fascicule of Radiomedicine and Nuclearmedicine* **2000**, 24, 196 (in Chinese).
(韩佩珍, 国外医学·放射医学核医学分册, **2000**, 24, 196.)
- Korest, J.-C.; Masse, J.; Lane, A. *Clin. Biochem.* **1998**, 31, 81.
- Rattle, S. J.; Purnell, D. R.; Williams, P. I. M.; Siddle, K.; Forrest, G. C. *Clin. Chem.* **1984**, 30, 1457.
- Filaire, E.; Bernain, X.; Sagnol, M.; Lac, G. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2001**, 86, 179.
- Morineau, G.; Boudi, A.; Barka, A.; Gourmelen, M.; Degeilh, F.; Hardy, N.; Al-Halak, A.; Soliman, H.; Gösling, J. P.; Julien, R.; Brerault, J.-L.; Boudou, P.; Aubert, P.; Villette, J.-M.; Pruna, A.; Galons, H.; Fiet, J. *Clin. Chem.* **1997**, 43, 1397.
- Cook, N. J.; Scafefer, A. L.; Lepage, P.; Jones, S. D. M. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 395.
- Yao, J.-K.; Moss, H. B.; Kirillova, G. P. *Clin. Biochem.* **1998**, 31, 187.
- Putignano, P.; Dubin, A.; Toja, P.; Invitti, C.; Bonfanti, S.; Redaelli, G.; Zappulli, D.; Cavagnini, F. *Eur. J. Endocrinol.* **2001**, 145, 165.
- Anfossi, L.; Tozzi, C.; Giovannoli, C.; Baggiani, C.; Graudi, G. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 468, 315.
- Lac, G. *Pathol. Biol.* **2001**, 49, 660.
- Mao, H.-Y.; Zhao, X. *Zunyi Yixueyuan Xuebao* **1997**, 20, 67 (in Chinese).
(苗海玉, 赵宪, 遵义医学院学报, **1997**, 20, 67.)
- Deacon, J. K.; Thomson, A. M.; Page, A. L.; Stops, J. E.; Roberts, P. R.; Whiteley, S. C.; Attridge, J. W.; Love, C. A.; Robinson, G. A.; Davidson, G. P. *Biosen. Bioelectron.* **1991**, 6, 193.
- Xie, S.-W.; Yang, G.-Z.; Xu, Y.-P. *Clinical Immunology Technique*, Shanghai Science and Technology Press, Shanghai, **1982**, p. 21 (in Chinese).
(谢少文, 杨桂贞, 许以平, 临床免疫技术, 上海科学技术出版社, 上海, **1982**, p. 21.)

(A0305074 SHEN, H.; ZHENG, G. C.)