

·技术研究·

用液相芯片技术定量测定人血清 CEA、AFP 和 HBsAg

陈 玮^{1,2}, 李 明², 吴英松², 李妙艳², 何蕴韶¹

(中山大学达安基因诊断中心, 广东 广州 510665; 2. 广州达瑞抗体工程技术有限公司, 广东 广州 510665)

摘 要: 【目的】采用液相芯片技术同时定量测定人血清中癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白(AFP)和乙肝表面抗原(HBsAg), 并对该方法进行评价。【方法】制备抗体交联微球及生物素标记抗体, 用双抗体夹心法对临床血清标本进行测定。【结果】同时检测 CEA、AFP 和 HBsAg 时的线性范围分别为 0.032~200 ng/mL、0.022~55 U/mL、0.26~1 000 ng/mL, 最低检测限分别为 8.90 pg/mL、0.013 U/mL、0.24 ng/mL, 批内变异系数(CV) < 9%, 批间 CV < 14%。检测 CEA、AFP、HBsAg 的灵敏度分别为 96.4%、95.8%、92%, 特异度分别为 95.6%、94.2%、100%, 准确度分别为 96%、95%、96%。其检测结果与化学发光免疫分析法(CLIA)或时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)之间呈显著的等级相关关系。该方法仅需 1 μ L 标本, 3 h 即可完成检测。【结论】液相芯片技术具有可联合检测多项指标、高通量、线性范围广、灵敏度高、重复性好、节省样品和时间等优点, 具有临床应用潜力。

关键词: 液相芯片; 微球悬浮阵列技术; Luminex; 肿瘤标志物; 乙型肝炎表面抗原

中图分类号: R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)01-0105-05

Quantitative Determination of Carcinoembryonic Antigen (CEA), Alpha Fetoprotein (AFP), and Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) in Human Serum by Multiplexed Luminex Assay

CHEN Wei^{1,2}, LI Ming², WU Ying-song², LI Miao-yan², HE Yun-shao¹

(1. Da'an Gene Diagnostic Center of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510665, China;

2. Guangzhou DaRui Antibody Engineering Corporation Limited, Guangzhou 510665, China)

Abstract: 【Objective】To simultaneously quantify carcinoembryonic antigen (CEA), alpha fetoprotein (AFP), and hepatitis B surface antigen (HBsAg) in human serum using multiplexed Luminex assay and evaluate the assay performance. 【Methods】Biotinylated detection antibodies and microspheres coupled with capture antibodies were prepared. A sandwich immunoassay was established to measure the three analytes in serum samples. 【Results】Linear ranges were 0.032~200 ng/mL, 0.022~55 U/mL, 0.26~1 000 ng/mL, and detection limits were 8.90 pg/mL, 0.013 U/mL, 0.24 ng/mL for CEA, AFP, and HBsAg, respectively. The intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 9% and 14% respectively. For CEA, AFP, and HBsAg, sensitivity were 96.4%, 95.8% and 92%, specificity were 95.6%, 94.2% and 100%, and accuracy were 96%, 95% and 96%, respectively. Significant Spearman rank correlations were found between the results obtained by Luminex assay and by chemiluminescence immunoassay (CLIA) or time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA). Only 1 microliter of serum and 3 hours were needed for Luminex assay. 【Conclusion】With the advantages of unique capability of multiplexing and high-throughput, good reproducibility, increased detection range and sensitivity, Luminex assay would have a great potential in clinical application.

Key words: liqui chip; suspension bead array; Luminex; tumor markers; hepatitis B surface antigen

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 105-109; 114]

肿瘤标志物对于肿瘤普查、诊断、分期、疗效监测及预后判断等具有重要价值, 临床上常联合检测

多种标志物以提高肿瘤诊断的阳性率和特异性, 但目前常用的检测手段如放射免疫测定、酶联免疫

收稿日期: 2006-09-15

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(2005037607)

作者简介: 陈 玮(1973-), 女, 四川成都人, 博士后, 助理研究员, 通讯作者。E-mail: cw1224@126.com

测定、化学发光法等仅能单独检测。液相芯片是一种新型生物芯片技术平台,它在不同荧光编码的微球上进行抗原-抗体及核酸杂交反应,通过两束激光分别检测微球编码和荧光信号以达到定性和定量分析目的。除了具有快速、灵敏、灵活、高通量等显著特点外,液相芯片最大优势在于可同时对同一样本中多达 100 种不同目的分子进行分析^[1]。本研究应用液相芯片技术利用双抗体夹心免疫分析原理同时检测了人血清中的癌胚抗原(CEA)、甲胎蛋白(AFP)和乙肝表面抗原(HBsAg),评价了该方法的线性范围、最低检测限、精密度、灵敏度、特异度、准确度等指标,并对检测结果与化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay, CLIA)和时间分辨荧光免疫分析法(time-resolved fluorescence immunoassay, TRFIA)进行了相关性分析。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

单克隆抗体购自芬兰 Medix 公司和美国 Fitzgerald 公司,癌胚抗原(CEA)和甲胎蛋白(AFP)抗原购自美国 Biodesign 公司,重组乙肝表面抗原(HBsAg)购自上海精睿生物科技有限公司。羧基化微球购自美国 Luminex 公司。牛血清白蛋白(BSA)购自美国 Fitzgerald 公司。2-吗啉乙磺酸(MES)、N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)和生物素-N-羟基琥珀酰亚胺酯购自美国 Sigma-Aldrich 公司。碳二亚胺(EDC)购自美国 Pierce 公司。藻红蛋白标记的链霉亲和素(SA-PE)购自美国 Molecular Probes 公司。带滤膜离心管、MultiScreen MABVN 1.2 μm 滤板和真空抽滤装置购自美国 Millipore 公司。Bio-Plex 检测系统购自美国 Bio-Rad 公司。100 份正常血清标本(健康体检者)、100 份 CEA/AFP 阴性和阳性血清标本(采用 Bayer 全自动化学发光免疫分析仪检测 CEA 和 AFP)和 100 份 HBsAg 阴性和阳性血清标本(采用 Roche 电化学发光免疫分析法检测)来自解放军 301 医院、南方医院和广州军区总医院。HBsAg 时间分辨荧光免疫分析试剂盒由广州达瑞抗体工程有限公司提供。

1.2 微球的交联^[2]

取 100 μL 羧基化微球,用去离子水、活化缓冲

液(0.1 mol/L NaH_2PO_4 , pH 6.2)各洗 1 次,重悬于 80 μL 活化缓冲液。先后加入 10 μL 新鲜配制的 Sulfo-NHS 溶液(50 mg/mL)、10 μL EDC 溶液(50 mg/mL),混匀,室温避光振摇 20 min。然后 11 340 $\times\text{g}$ 离心 4 min,沉淀用 150 μL 交联缓冲液(0.05 mol/L MES, pH 5.0)洗 2 次,重悬于 100 μL 交联缓冲液。加入 7 μg 包被抗体,并用交联缓冲液补足体积至 500 μL ,室温避光温和振荡 2 h。离心微球,沉淀加入 250 μL 封闭/贮存液(1 mg/mL BSA, 体积分数 0.02% 吐温 20, 0.01 mol/L 叠氮钠, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.4)室温振摇 30 min,封闭/贮存液洗 2 次并最后用 300 μL 重悬微球,4 $^\circ\text{C}$ 避光保存。

1.3 抗体的生物素标记

将 0.5 mg 检测抗体加入带滤膜离心管中,4 300 $\times\text{g}$ 离心 5 min,再用 0.05 mol/L NaHCO_3 (pH 8.8)反复洗 5 次并调整质量浓度至 2 mg/mL。加入 10 μL 生物素-N-羟基琥珀酰亚胺酯(10 mg/mL),混匀,室温静置 60 min。反应结束后,于 PBS 中透析 24 h,分装抗体,4 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.4 标准品的制备

用标准品稀释液(15 mg/mL BSA, 体积分数 0.01% 吐温 20, 0.01 mol/L 叠氮钠, 0.01 mol/L PBS, pH 7.4)配制同时含有 3 种抗原的不同质量浓度(溶液标度)的标准品。

1.5 交叉反应的检测

已交联 CEA、AFP、HBsAg 包被抗体的微球分别单独与 1 种抗原及 1 种生物素标记抗体孵育后,检测荧光值。

1.6 操作方法

用分析缓冲液(10 mg/mL BSA, 0.01 mol/L 叠氮钠, 0.01 mol/L PBS, pH 7.4)配制稀释微球混合物,使不同编码的微球均为 80 个/ μL 。滤板上各孔加入 100 μL 分析缓冲液预湿,真空抽滤去除液体,各孔分别加入 25 μL 标准品、血清标本(预先用分析缓冲液 25 倍稀释)或者分析缓冲液,最后每孔加入 25 μL 稀释微球混合物,室温避光振荡孵育 60 min。真空抽滤去除孔内液体,每孔用 100 μL 洗涤液(体积分数 0.05% 吐温 20, 0.01 mol/L PBS, pH 7.4)洗 3 次,随后每孔加入 25 μL 生物素标记抗体,室温避光振荡孵育 60 min。同前抽滤并洗涤 3 次后,每孔加入 25 μL SA-PE,室温避光振荡孵育 30 min。再次抽滤并洗涤 3 次后,每孔加入

125 μ L 洗涤液重悬微球,并在 Bio- Plex 检测系统上读取各孔荧光值。

1.7 评价指标

1.7.1 线性范围 将 CEA、AFP 和 HBsAg 3 种标准品混合并稀释成不同质量浓度(溶液标度)进行测定,做出各自的标准曲线。

1.7.2 最低检测限 测定 20 个空白孔的荧光值,计算其平均值(\bar{x})及标准差(s)。以 $\bar{x}+2s$ 再减去本底值代入 CEA、AFP、HBsAg 的标准曲线方程中,所得值即为最低检测限。

1.7.3 精密度 选取 CEA、AFP、HBsAg 水平均高于正常值的 3 个血清标本进行测定。考察批内精密度时,3 个血清各设 8 个复孔;考察批间精密度时,3 个血清各测 3 次,每次各设 8 个复孔,计算 CEA、AFP、HBsAg 质量浓度(溶液标度)的平均值、标准差及 CV 值。

1.7.4 正常参考值范围 检测 100 份健康体检者血清标本,用 SPSS 13.0 软件统计 CEA、AFP、HBsAg 水平的分布情况,以百分位数法得出正常参考值范围。

1.7.5 与 CLIA 和 TRFIA 的比较 用液相芯片法测定 100 份 CEA/AFP 临床血清标本和 100 份 HBsAg 临床血清标本,统计各项指标的阳性和阴性血清数,计算液相芯片法的检测灵敏度、特异度和准确度。用 HBsAg 时间分辨荧光免疫分析试剂盒测定上述 100 份 HBsAg 临床血清标本。

1.8 统计学处理

使用 SPSS 13.0 for Windows 软件进行统计学处理。对两个样本率的比较采用四格表卡方检验;对液相芯片法与 CLIA 或 TRFIA 的检测结果采用 Spearman 等级相关分析。检验水准, $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 交叉反应

CEA、AFP、HBsAg 的 3 对抗体与无关抗原或抗体反应时荧光值低,而与相应抗原或抗体反应时特异信号高(表 1),说明抗体特异性好,无明显交叉反应。

2.2 线性范围

同时检测 CEA、AFP、HBsAg 时,CEA 标准曲线的线性范围为 0.032~200 ng/mL,AFP 为 0.022~55 U/mL,HBsAg 为 0.26~1 000 ng/mL,分别达到

表 1 三对抗体的特异性

Table 1 Specificity of three pairs of antibody

| Capture antibody | Analyte | Antibody | Fluorescence intensity |
|------------------|---------|----------|------------------------|
| CEA | - | CEA | 5 |
| CEA | - | AFP | 5 |
| CEA | - | HBsAg | 7 |
| CEA | CEA | CEA | 9 563 |
| CEA | AFP | AFP | 7 |
| CEA | HBsAg | HBsAg | 8 |
| CEA | CEA | AFP | 6 |
| CEA | CEA | HBsAg | 8 |
| AFP | - | CEA | 6 |
| AFP | - | AFP | 5 |
| AFP | - | HBsAg | 8 |
| AFP | CEA | CEA | 5 |
| AFP | AFP | AFP | 10 326 |
| AFP | HBsAg | HBsAg | 10 |
| AFP | AFP | CEA | 6 |
| AFP | AFP | HBsAg | 9 |
| HBsAg | - | CEA | 4 |
| HBsAg | - | AFP | 5 |
| HBsAg | - | HBsAg | 6 |
| HBsAg | CEA | CEA | 6 |
| HBsAg | AFP | AFP | 8 |
| HBsAg | HBsAg | HBsAg | 10 256 |
| HBsAg | HBsAg | CEA | 5 |
| HBsAg | HBsAg | AFP | 9 |

3.8、3.4、3.6 个对数值(图 1)。

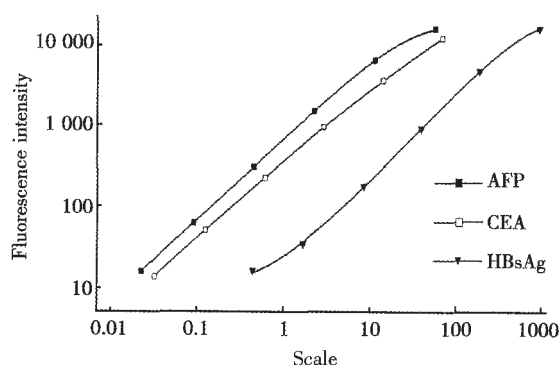


图 1 液相芯片法联合检测 CEA、AFP、HBsAg 时的标准曲线

Fig.1 Standard curves of CEA, AFP, and HBsAg using multiplexed Luminex assay

* CEA or HBsAg:ng/mL; AFP:U/mL

2.3 最低检测限

计算得出 CEA、AFP、HBsAg 的最低检测限分

别为 8.90 pg/mL、0.013 U/mL、0.24 ng/mL。

批间 CV 为 5.8%~13.8%(表 2,3), 说明具有较好的重复性。

2.4 精密度

CEA、AFP、HBsAg 的批内 CV 为 4.8%~8.9%,

表 2 批内精密度测试结果

Table 2 Results of intra-assay precision

(n=8)

| Sample | CEA | | AFP | | HBsAg | |
|--------|-------------------------|-------|------------------------|-------|-------------------------|-------|
| | $\bar{x} \pm s$ (ng/mL) | CV(%) | $\bar{x} \pm s$ (U/mL) | CV(%) | $\bar{x} \pm s$ (ng/mL) | CV(%) |
| 1 | 22.3 \pm 1.2 | 5.4 | 170.2 \pm 0.4 | 6.1 | 60.1 \pm 4.1 | 6.8 |
| 2 | 167.4 \pm 10.0 | 6.0 | 70.8 \pm 3.7 | 5.2 | 480.3 \pm 42.7 | 8.9 |
| 3 | 253.2 \pm 12.2 | 4.8 | 20.1 \pm 1.1 | 5.5 | 261.4 \pm 16.5 | 6.3 |

表 3 批间精密度测试结果

Table 3 Results of interassay precision

(n=3 \times 8)

| Sample | CEA | | AFP | | HBsAg | |
|--------|-------------------------|-------|------------------------|-------|-------------------------|-------|
| | $\bar{x} \pm s$ (ng/mL) | CV(%) | $\bar{x} \pm s$ (U/mL) | CV(%) | $\bar{x} \pm s$ (ng/mL) | CV(%) |
| 1 | 23.5 \pm 1.5 | 6.4 | 181.5 \pm 4.3 | 7.9 | 56.4 \pm 4.1 | 7.3 |
| 2 | 160.9 \pm 9.3 | 5.8 | 68.3 \pm 5.0 | 7.3 | 460.3 \pm 63.5 | 13.8 |
| 3 | 268.9 \pm 19.1 | 7.1 | 21.8 \pm 1.5 | 6.9 | 272.2 \pm 25.0 | 9.2 |

2.5 正常参考值范围

用液相芯片法检测 100 份健康体检者血清标本, CEA 最低值为 0 ng/mL, 最高值为 6.80 ng/mL, 平均值为 1.85 ng/mL, 标准差为 2.98 ng/mL, 99.1% 的样本 CEA 水平在 6.7 ng/mL 以下, 因此该方法检测血清 CEA 的正常参考值范围为 0~6.7 ng/mL; 检测 AFP 的最低值为 0.13 U/mL, 最高值为 15 U/mL, 平均值为 2.62 U/mL, 标准差为 2.30 U/mL, 99.1% 的样本 AFP 水平在 10 U/mL 以下, 因此检测血清 AFP 的正常参考值范围为 0~10 U/mL; 检测 HBsAg 时所有标本均为 0 ng/mL, 因此检测血清 HBsAg 的正常参考值为 0 ng/mL。

2.6 与其它方法的比较

以 Bayer 化学发光免疫分析法或 Roche 电化学发光免疫分析法 (electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA) 作为参照标准, 液相芯片法检测临床阳性和阴性血清标本的灵敏度、特异度和准确度(表 4~6)。

由于 Roche 电化学发光法检测 HBsAg 仅能定性, 因此又使用了 HBsAg 时间分辨荧光免疫分析试剂盒对这 100 份 HBsAg 临床血清标本进行定量测定。然后对两种不同方法所得测值之间的关系采用 Spearman 等级相关分析, 得出液相芯片法与 CLIA 测定 CEA 的相关系数 $r_s=0.967$, $P < 0.01$; 与 CLIA 测定 AFP 的相关系数 r_s 为 0.943, $P < 0.01$;

表 4 液相芯片法检测 CEA 的灵敏度、特异度和准确度

Table 4 Sensitivity, specificity, and accuracy of Luminex immunoassay for detection of CEA¹⁾

| Luminex | CLIA | | Total |
|----------|----------|----------|-------|
| | Positive | Negative | |
| Positive | 53 | 2 | 55 |
| Negative | 2 | 43 | 45 |
| Total | 55 | 45 | 100 |

1) Sensitivity = 96.4%, Specificity = 95.6%, Accuracy = 96%, $\chi^2 = 84.491$, $P < 0.01$, $n=100$

表 5 液相芯片法检测 AFP 的灵敏度、特异度和准确度

Table 5 Sensitivity, specificity, and accuracy of Luminex immunoassay for detection of AFP¹⁾

| Luminex | CLIA | | Total |
|----------|----------|----------|-------|
| | Positive | Negative | |
| Positive | 46 | 3 | 49 |
| Negative | 2 | 49 | 51 |
| Total | 48 | 52 | 100 |

1) Sensitivity = 95.8%, Specificity = 94.2%, Accuracy = 95%, $\chi^2 = 81.018$, $P < 0.01$, $n=100$

与 TRFIA 测定 HBsAg 的相关系数 $r_s=0.926$, $P < 0.01$, 表明液相芯片法与 CLIA 或 TRFIA 的血清测值之间存在显著的等级相关关系。比较液相芯片法与 CLIA/TRFIA(表 7), 可见液相芯片法在精密度方面与 CLIA/TRFIA 相当, 但检测范围更宽, 而且标本用量远远少于后者。

表 6 液相芯片法检测 HBsAg 的灵敏度、特异度和准确度
Table 6 Sensitivity, specificity, and accuracy of Luminex immunoassay for detection of HBsAg¹⁾

| Luminex | ECLIA | | Total |
|----------|----------|----------|-------|
| | Positive | Negative | |
| Positive | 46 | 0 | 46 |
| Negative | 4 | 50 | 54 |
| Total | 50 | 50 | 100 |

1) Sensitivity = 92%; Specificity = 100%; Accuracy = 96%. $\chi^2 = 85.185$, $P < 0.01$

表 7 液相芯片法与 CLIA/TRFIA 的比较

Table 7 Comparison of Luminex immunoassay and CLIA/TRFIA

| | Luminex | | | CLIA | | TRFIA |
|--------------------------|-------------|------------|--------------|------------|-----------|--------------|
| | CEA (ng/mL) | AFP (U/mL) | HBsAg(ng/mL) | CEA(ng/mL) | AFP(U/mL) | HBsAg(ng/mL) |
| Linear range | 0.032-200 | 0.022-55 | 0.26-1000 | 1-1000 | 1-1000 | 0.2-150 |
| Lower detection limit | 0.0089 | 0.013 | 0.24 | 0.2 | 0.9 | 0.2 |
| Precision (CV%) | | <14 | | <7 | <4.6 | <15 |
| Sample amount (μ L) | | 1 | | 60 | 60 | 100 |

荧光编码微球与两束激光检测实现对被测物的定性和定量分析, 一个反应孔内可以完成 100 种不同的生物学反应^[3,4]。液相芯片的独特设计使它拥有常规检测方法难以媲美的优点: 通量大, 可对多种目的分子同时分析, 大大提高工作效率; 液相环境更有利于保持生物大分子的天然构象, 也更有利于反应进行; 灵敏度、准确性高, 重复性、灵活性好; 只需要微量的样品即可进行检测^[5,6]。以检测细胞因子为例, ELISA 的检测范围仅 1-2 个数量级, 而液相芯片法最高检测浓度为 16 000-32 000 pg/mL, 达到 3-4 个数量级, 灵敏度也远胜于 ELISA, 为 2-4 pg/mL, 而且两种方法的检测结果相关性好, 因此液相芯片法将来极有可能成为 ELISA 的替代方法^[7,8]。目前国外将液相芯片技术用于基础研究和临床检测日益增多, 包括检测细胞因子、过敏原、自身抗体、激素、SNP 以及感染性疾病诊断、HLA 分型、基因表达分析等^[9-12], 国内报道尚不多见。

CEA、AFP 是临床常用的肿瘤标志物, HBsAg 阳性与肝癌的发病密切相关, 因此我们利用液相芯片技术对上述 3 项指标联合检测, 开发出可用于健康体检、早期发现肿瘤的诊断试剂。在本研究中制备了单克隆抗体交联微球以及生物素标记抗体, 采用双抗体夹心法同时定量测定人血清中的 CEA、AFP、HBsAg。其检测范围达到 3.4 个对数值以上, CEA、AFP 的最低检测限也远低于 CLIA, 这

3 讨 论

液相芯片是一种非常灵活的多功能技术平台, 可进行蛋白、核酸等生物大分子检测及酶学分析、受体和配体识别分析等研究, 被喻为后基因组时代的芯片技术。其基础是 1997 年由美国 Luminex 公司开发出来的 xMAP (flexible multi-analyte profiling) 技术。它主要通过可偶联探针的

就保证了高浓度和低浓度血清标本即使采用同一稀释倍数也均可位于检测范围之内, 省去了高浓度血清有时需要多次稀释的麻烦。该方法变异系数低于 14%, 具有较好的重复性, 检测临床血清标本的灵敏度、特异度和准确度均较高, 血清测值与其它方法 (CLIA、TRFIA) 之间呈显著的等级相关关系。液相芯片法仅需要 1 μ L 标本和 3 h 即可同时完成 3 项检测, 较之 CLIA 或 TRFIA 大大节约了试剂、标本用量、人力以及操作时间, 而且检测成本也比国外进口试剂更低, 因此是一种优于传统检测技术的快速、高通量、多样本检测手段, 今后若能实现自动化操作, 必将具有广阔的应用前景。

本研究中对 HBsAg 的检测出现了 4 例假阴性结果。由于这 4 份血清标本的 TRFIA 测值均低于 5 ng/mL, 因此我们认为假阴性结果可能与标本稀释 25 倍后待测物浓度低于该方法的最低检测限有关。液相芯片法与 TRFIA 检测 HBsAg 的结果相关性稍差可能是由于 TRFIA 的线性范围较窄 (0-150 ng/mL), 而部分血清标本中的 HBsAg 水平大大高于该范围, 因此对于这些标本来说, TRFIA 的测值可能不太准确。下一步我们将筛选具有高亲和力的 HBsAg 抗体, 以进一步提高 HBsAg 的检测灵敏度。

(下转第 114 页 to page 114)

- 2004, 79(8):1017- 1023.
- [10] CADEMARTIRI F, RUNZA G, LUCCICHENTI G, et al. Coronary artery anomalies: incidence, pathophysiology, clinical relevance and role of diagnostic imaging[J]. *Radiol Med*, 2006, 111(3):376- 391.
- [11] 杨思源. 小儿心脏病学[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 1996: 291- 292.
- [12] LIPTON M J, BARRY W H, OBREZ I, et al. Isolated single coronary artery: diagnosis, angiographic classification, and clinical significance[J]. *Radiology*, 1979, 130(1):39- 47.
- [13] NAKAMURA M, MATSUOKA H, KAWAKAMI H, et al. Giant congenital coronary artery fistula to left branchial vein clearly detected by multidetector computed tomography[J]. *Circ J*, 2006, 70(6):796- 799.
- [14] 赵迎新, 张维君, 周玉杰, 等. 先天性冠状动脉瘘的临床分析[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2003, 19(5):269- 271.
- [15] KULKARNI M, SODANI A, ROSITA, et al. Right myocardial bridge on CT coronary angiography [J]. *J Assoc Physicians India*, 2004, 52(8): 661- 662.
- [16] MANGHAT N E, ROOBOTTOM C A, MARSHALL A J, et al. Images in cardiology. Intramyocardial bridging of the left anterior descending artery: appearance of arterial compression on ECG gated multidetector row CT[J]. *Heart*, 2006, 92(2): 262- 275.

(编辑 张恩健)

(上接第 109 页 from page 109)

参考文献:

- [1] DUNBAR S A, VANDER ZEE C A, OLIVER K G, et al. Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP™ system [J]. *J Microbiol Methods*, 2003, 53(2):245- 252.
- [2] BIAGINI R E, SAMMONS D L, SMITH J P, et al. Simultaneous measurement of specific serum IgG responses to five select agents [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 382(4):1027- 1034.
- [3] WATERBOER T, SEHR P, PAWLITA M. Suppression of non-specific binding in serological Luminex assays [J]. *J Immunol Methods*, 2006, 309(1- 2):200- 204.
- [4] PANG S, SMITH J, ONLEY D, et al. A comparability study of the emerging protein array platforms with established ELISA procedures [J]. *J Immunol Methods*, 2005, 302(1- 2):1- 12.
- [5] de JAGER W, RIJKERS G T. Solid-phase and bead-based cytokine immunoassay: a comparison [J]. *Methods*, 2006, 38(4):294- 303.
- [6] RAY C A, BOWSER R R, SMITH W C, et al. Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 36(5): 1037- 1044.
- [7] HULSE R E, KUNKLER P E, FEDYNYSHYN J P, et al. Optimization of multiplexed bead-based cytokine immunoassays for rat serum and brain tissue [J]. *J Neurosci Methods*, 2004, 136(1): 87- 98.
- [8] de JAGER W, PRAKKEEN B J, BIJLSMA J W, et al. Improved multiplex immunoassay performance in human plasma and synovial fluid following removal of interfering heterophilic antibodies [J]. *J Immunol Methods*, 2005, 300(1- 2):124- 135.
- [9] JOHANNISSON A, JONASSON R, DERNFALK J, et al. Simultaneous detection of porcine proinflammatory cytokines using multiplex flow cytometry by the xMAP technology [J]. *Cytometry A*, 2006, 69(5):391- 395.
- [10] DUNBAR S A. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 363(1- 2):71- 82.
- [11] LUKACS Z, DIETRICH A, GANSCHOW R, et al. Simultaneous determination of HIV antibodies, hepatitis C antibodies, and hepatitis B antigens in dried blood spots—a feasibility study using a multi-analyte immunoassay [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2005, 43(2): 141- 145.
- [12] FLAGELLA M, BUI S, ZHENG Z, et al. A multiplex branched DNA assay for parallel quantitative gene expression profiling [J]. *Anal Biochem*, 2006, 352(1): 50- 60.

(编辑 张敏瑞)