

· 实验研究 ·

神经元特异性烯醇酶和癌胚抗原胶体金免疫层析联合检测*

孙红英¹ 方菲¹ 赵露晶² 邢国杰¹ 沈鹤柏^{1△}

(1 上海师范大学生命与环境科学学院 上海 200234 2 上海柏纳生物技术有限公司 上海 201801)

摘要 目的:应用双抗夹心胶体金免疫层析方法,实现对神经元特异性烯醇化酶(NSE)和癌胚抗原(CEA)两种肺癌肿瘤标志物的快速联合检测。方法:采用柠檬酸三钠还原法制备 20nm 胶体金颗粒,并分别对鼠抗 NSE、CEA 单克隆抗体进行标记,分别与之相配对的另一单克隆抗体被喷在硝酸纤维素膜(NC 膜)上,制成免疫层析检测试条。溶液中的抗原 NSE、CEA 与金标记抗体结合后沿着硝酸纤维素膜移动,与膜上固定的抗体结合形成肉眼可见的红色线条。结果:该试纸条只与 NSE、CEA 有特异性反应,与 CA125、CYFRA21-1、TPA 等肺癌标志物无交叉反应。标准样品中两种抗原的检测灵敏度分别可达到 5ng/mL 和 3ng/mL。结论:胶体金免疫层析技术检测 NSE、CEA 特异性强、灵敏度高、简便快速,不需特殊仪器设备,有广泛应用价值。

关键词 NSE; CEA; 联合检测; 胶体金; 免疫层析

中图分类号: R446 R446.61 **文献标识码**: A **文章编号**: 1673-6273(2011)07-1261-05

Joint Detection of Neuron-specific Enolase and Carcinoembryonic Antigen with Gold Immunochromatography Assay(GICA)*

SUN Hong-ying¹, FANG Fei¹, ZHAO Lu-jing², XING Guo-jie¹, SHEN He-bai^{1△}

(1 college of life and environment sciences, shanghai normal university, shanghai, 200234, China;

2 BIO-NANO TECHNOLOGY, Shanghai, 201801, China)

ABSTRACT Objective: To realize the rapid joint detection for Neuron-specific enolase and carcinoembryonic antigen by double antibodies sandwich gold immunochromatography assay. **Methods:** Colloidal gold with diameter 20nm was prepared through reducing chloroauric acid with trisodium citrate. Gold nanoparticles were coupled with monoclonal anti-NSE/CEA. Another corresponding monoclonal antibody to the two antigens was fixed on the NC membrane to prepare GICA test strips. The gold-anti-NSE/CEA conjugate reacts with NSE/CEA in solution and migrates on the nitrocellulose membrane on which anti-NSE/CEA was immobilized, and produced the visual red lines. **Results:** This kind of test strips could react with NSE and CEA specifically, and there were no cross-reactions with other lung cancer markers, such as CA125, TPA, CYFRA21-1. The sensitivity of NSE was 5ng/mL and CEA was 3ng/mL by detecting the standard samples. **Conclusion:** GICA is a sensitive, specific, simple and rapid assay for detecting NSE and CEA. It need not any special devices and has significant practical value.

Key words: NSE; CEA; Joint detection; Colloidal gold; Immunochromatography

Chinese Library Classification(CLC): R446, R446.61 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)07-1261-05

前言

肺癌(lung cancer)是人类常见、发病率高、死亡率高、治疗效果较差的恶性肿瘤。因其发病早期无特异性临床症状和表现,待患者有临床表现后再就诊时,大多已属于晚期,临床治疗效果和中位生存期都令人不满意^[1]。早期发现和诊断肺癌,对肺癌的治疗和预后有着重要的意义。神经元特异性烯醇化酶(Neuron-specific enolase, NSE)是神经元和神经内分泌细胞所特有的一种酸性蛋白酶^[2]。血清 NSE 作为小细胞肺癌的一种肿瘤标志物起初是由 Carney DN 报道的^[3]。其在正常人血液中的含量在 12.5 ng/ml 以下,在肺癌组织中的含量是正常肺组织中的 3~35 倍,是小细胞肺癌(SCLC)敏感特异的肿瘤标志物^[4]。和非小细胞肺癌相比, NSE 在小细胞肺癌病人血清中有明显的

增加^[5]。癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)是一种人类胚胎抗原决定簇的酸性糖蛋白,是在胚胎时胃肠道、肝、胰腺合成的一种蛋白质^[6]。正常成人血清中 CEA 含量极低,小于 5 ng/ml。CEA 存在于多种肿瘤组织,是目前应用最广泛的肿瘤标志物之一,在肺癌、胃肠肿瘤、乳腺癌、类癌和肝癌病人中均升高^[7-8]。它是一种非特异性肿瘤标志物,约有 30%~70%的肺癌 CEA 水平明显升高,目前的研究结果显示 CEA 的水平与疾病预后及治疗效果密切相关。

血清蛋白标志物的传统检测方法是 ELISA,即酶联免疫吸附试验,具有很高的灵敏性及可重复性,但每次只能检测一种标志物,不能满足多种标志物同时检测的需要。由于尚未发现特异性和灵敏度均较高的肿瘤标志物,因此目前多采用几种肿瘤标志物联合测定,以提高阳性检出率^[9-11]。本文将 NSE、CEA

* 基金项目:上海市科委项目(0752nm028)(08JC140600)(0952nm028)

作者简介:孙红英(1984-)女,硕士研究生,主要研究方向:纳米生物技术, E-mail: sdau.sun@163.com

△通讯作者:沈鹤柏, E-mail: shenhb@shnu.edu.cn

(收稿日期:2010-12-07 接受日期:2010-12-31)

两种肺癌肿瘤标志物进行联合检测,可以进一步提高确诊肺癌的可能性。

免疫层析法(immunochromatography)是一种将免疫技术和色谱层析技术相结合的快速免疫分析方法^[12],其原理是将特异的抗体或抗原先固定于硝酸纤维素(NC)膜的某一区带,当该干燥的硝酸纤维素一端浸入样品后,由于毛细管作用,样品将沿着该膜向前移动,当移动至固定有抗体或抗原的区域时,样品中相应的抗原或抗体即与该抗体或抗原发生特异性结合,再通过标记技术使该区域显示一定的颜色,从而实现特异性的免疫诊断^[13-14]。胶体金免疫层析(GICA)就是利用胶体金本身的显色特点结合免疫层析技术诊断特异性的待测物。它不仅快速、灵敏度高、特异性强、稳定性好、操作简便、无需任何仪器设备,而且结果判断直观可靠、容易被基层人员掌握,现在已广泛应用于临床诊断及药物检测等领域^[15-16]。本文利用胶体金免疫层析技术对NSE和CEA两种肺癌标志物进行同时检测,具有一定的推广价值和实用价值。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

热电(雷勃)THERMO Multiskan Spectrum 全波长酶标仪(Thermo Scientific); AllegraTM 64R 台式高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特有限公司); Zetasizer(马尔文仪器有限公司); 透射电子显微镜 TEM (JEM-2010, JEOL, Japan); HM3010 单维往复划膜仪、ZQ 微电脑自动斩切机(上海金标生物科技有限公司); 磁力加热搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司); HAuCl₄(国药集团化学试剂有限公司); 柠檬酸三钠(上海青析化工有限公司); 兔抗鼠二抗(ROCKLAND-INC 公司); NSE、鼠抗 NSE 单克隆抗体(L1C00501)、鼠抗 NSE 单克隆抗体(L1C00502)、CEA、鼠抗 CEA 单克隆抗体(L1C00201)、鼠抗 CEA 单克隆抗体(L1C00202)、CA125、CYFRA21-1、TPA(上海领潮生物科技有限公司); 牛血清白蛋白(Sigma 公司); casein(Sigma 公司); NC 膜(美国 Millipore 公司); 玻璃纤维(Ahlstrom 公司); 吸水纸(上海金标生物科技有限公司)。

1.2 胶体金的制备

量取 0.01% 氯金酸溶液 100 mL 放入经酸洗,洗净并干燥过的锥形瓶中,置于双显恒温加热磁力搅拌器上加热至沸腾。维持加热状态并调节搅拌速度至 800 rpm 左右。在剧烈搅拌下一次性准确快速地加入新鲜配置的 1% 柠檬酸三钠 2.0 mL。当溶液由灰色变为酒红色后再继续搅拌 15 min。将反应完毕的溶液用双蒸水定容至原体积,避光冷却至室温。

1.3 胶体金的 Zeta 电位、粒径测定和紫外扫描

用 Zetasizer 对制得的胶体金和免疫金复合物进行 Zeta 电位、粒径分布测定;用透射电子显微镜 TEM 对纳米金的粒径和形态进行测定;用 THERMO Multiskan Spectrum 全波长酶标仪对胶体金进行紫外扫描。

1.4 胶体金标记抗体条件的确定

1.4.1 最佳 pH 值的确定 将胶体金溶液用 0.1 M 的 K₂CO₃ 溶液分别调 pH 至 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,分别加入 20 μg NSE 单克隆抗体(L1C00502)或 20 μg CEA 单克隆抗体(L1C00202),涡旋混合均匀后,室温反应 10 min 后,各管中分

别加入 200 μL 10% 的 NaCl 水溶液,静置 2 h,观察各管中溶液颜色的变化。

1.4.2 抗体最适稳定量的确定 将胶体金溶液用 0.1 M 的 K₂CO₃ 溶液调 pH 至最佳值,在离心管中各加入 200 μL 胶体金溶液,分别加入 0.8、1.6、2.0、2.4、3.0、4.0、5.0、6.0 μg NSE 单克隆抗体(L1C00502)或 CEA 单克隆抗体(L1C00202),反应 10 min 后,各管加入 10% 氯化钠溶液 40 μL,静置 2 h,观察各管颜色变化。

1.5 胶体金的标记

将 1 mL 胶体金溶液用 0.1 M 的 K₂CO₃ 溶液调至所需 pH 值,加入适量的 NSE 单克隆抗体(L1C00502)或 CEA 单克隆抗体(L1C00202),涡旋混合均匀,反应 10 min 后,加入 100 μL 10% 的 BSA 溶液,混合均匀反应 10 min 后,金标复合物在 13000 rpm 下离心 15 min,弃去上清液,沉淀物用硼酸盐缓冲溶液(含 2% 的蔗糖,2% 的 BSA,0.01 M 的 HB)重新悬浮之至原体积。再次高速离心 15 min,弃去上清液,用金标稀释液将沉淀物稀释到原体积的 1/5,4℃ 保存。将标记好的胶体金按比例涂抹在结合垫上,然后在 37℃ 真空干燥箱内干燥 4 h。

1.6 试纸条的制备

将 NC 膜粘贴在带有粘性的 PVC 底板中间。用 HM3010 单维往复划膜仪将兔抗鼠 IgG、NSE 单克隆抗体(L1C00501)和 CEA 单克隆抗体(L1C00201)从上到下依次喷在 NC 膜上,分别作为质控线(C 线)、检测线 1(T1)和检测线 2(T2)。将整个板在 37℃ 干燥箱中干燥 1 h。然后将按吸水纸、NC 膜、结合垫、样品垫从上到下的顺序粘贴在 PVC 底板上。用 ZQ 微电脑自动斩切机将大板切割成 4 mm 宽的试纸条。将切好的试纸条装在检测卡里面与干燥剂封装在铝箔袋内保存在 4℃ 下待用。

1.7 检测步骤和结果判定

1.7.1 检测步骤:

将 NSE、CEA 溶液按比例混合均匀,配成所需要的浓度。然后取 100 μL 滴加到检测卡上的加样孔里面,10-15 min 后观察结果。

1.7.2 结果判定:

a.当样品中同时存在 NSE、CEA 抗原时,每种抗原首先与金标单抗中对应的单抗结合,当液相层析到达检测线处时,金标单抗结合的每种抗原被膜上的与之对应的另一种单抗捕捉,产生两条红色的条带,未与单抗结合的金标单抗继续向上层析,当到达质控线处时,羊抗鼠 IgG 会与金标单抗中的单抗结合,质控线处同样出现红色条带,判定为阳性结果。b.如果样品中只存在一种抗原(NSE 或 CEA),两条检测线就只有一条产生红色(T1 或 T2)质控线出现红色条带。c.如果被检样品中两种抗原均不存在,则检测线处不出现红色条带,只在质控线处出现红色,判定为阴性结果。如图 1 所示:

1.8 试纸条的灵敏度和检测范围

用 PBS 溶液将 NSE、CEA 分别稀释到以下浓度:

NSE、CEA 单独检测:

NSE(ng/mL) 0、5、15、50、100、200、300、400、500

CEA(ng/mL) 0、3、5、15、30、50、100、200、300、400、500

NSE/CEA 联检:

NSE(ng/mL) 0、5、15、50、100、200、300、400、500

CEA(ng/mL) 0、3、5、50、100、200、300、400、500

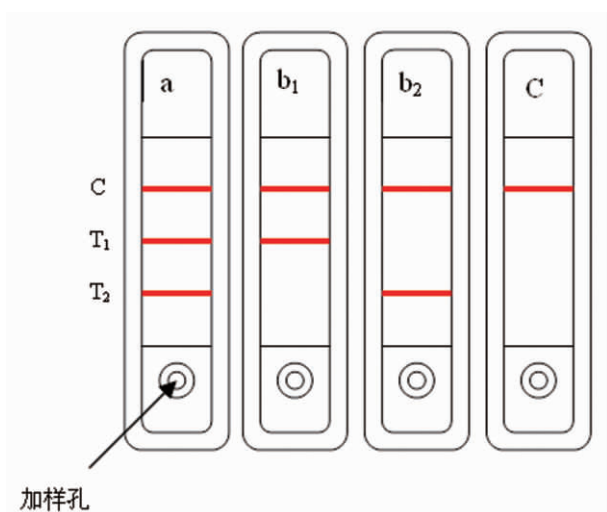


图1 结果判定模拟图: a: NSE、CEA 同时存在; b1: 只存在 CEA ,NSE 不存在;

b2: 只存在 NSE ,CEA 不存在; c: NSE、CEA 均不存在

Fig. 1 Simulated diagram of the results: a: NSE and CEA coexist b1: only CEA exists

b2: only NSE exists c: No NSE or CEA exists

1.9 试纸条的特异性试验

将 100 μ L 含有各种浓度的 CA125、CYFRA21-1、TPA 的溶液混合均匀,滴加到检测卡的加样孔中,15 min 内观察现象,每个浓度重复 3 次。

2 实验结果与分析

2.1 用 Zetasizer 对制得的胶体金进行 Zeta 电位、粒径测定

新制备的 20 nm 胶体金的平均 Zeta 电位是 -30.0 mV,分布宽度为 6.72 mV (图 2)。胶体金颗粒的平均直径大约为 20.01 nm,其中分布最多的是 23.16 nm,分布宽度为 7.967 nm,多分散性 PDI=0.145(图 3)。

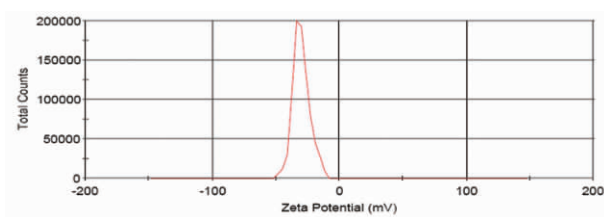


图2 胶体金的 Zeta 电位扫描曲线

Fig 2 The Zeta potential curve of colloidal gold

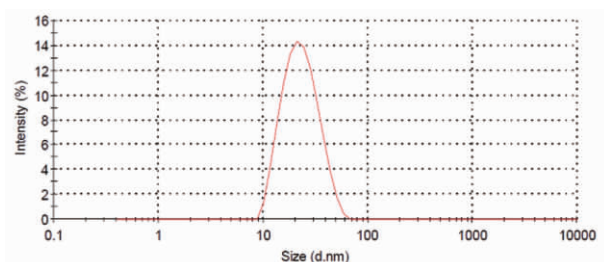


图3 胶体金的粒径分布曲线

Fig 3 The size distribution curve of colloidal gold

2.2 胶体金颗粒的透射电镜观察

用预先处理好的覆盖有 Formvar 膜的镍网侵入胶体金溶液中,取出放入空气中干燥,然后在透射电镜下观察,颗粒粒径在 20 nm 左右,而且粒径分布比较均一,形貌接近于球形,符合

实验的要求(图 4)。

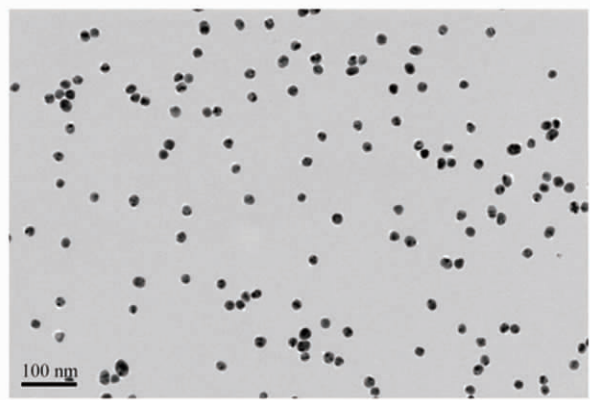


图4 胶体金颗粒的透射电镜图

Fig 4 The TEM picture of gold nanoparticles

2.3 胶体金颗粒的紫外-可见扫描

用 THERMO Multiskan Spectrum 全波长酶标仪的紫外-可见分光光度计对新制备的胶体金颗粒在 400-600 nm 之间进行扫描(如图 5)。从图上可以看到 20 nm 胶体金在 520 nm 处有一最大吸收值,这与文献报道的相一致^[17],符合实验要求。

2.4 标记前和标记后的胶体金粒径分布

通过图 6 可以充分的说明抗体已经成功的标记在了胶体金颗粒上。从图上可以看出标记前胶体金的平均粒径为 21.13 nm,而 CEA 单抗标记后胶体金的平均粒径上升到了 36.26 nm, NSE 单抗标记后胶体金的平均粒径上升到了 30.06 nm。

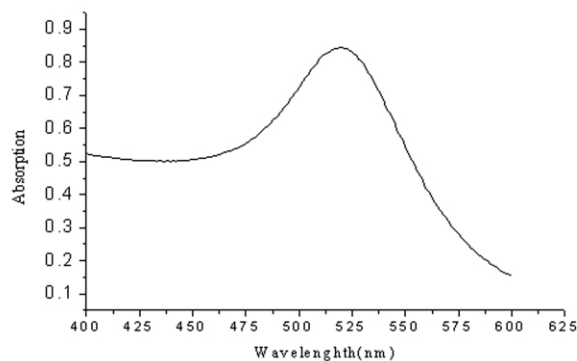


图5 20 nm 胶体金的紫外-可见扫描曲线

Fig 5 The UV-visible curve of colloidal gold with the diameter 20 nm

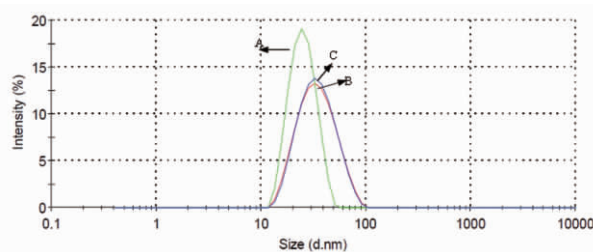


图6 标记前和标记后的金纳米粒子的粒径分布图: A: 20 nm 胶体金的粒径分布; B: CEA 单抗修饰的 20 nm 胶体金的粒径分布; C: NSE 单抗修饰的 20 nm 胶体金的粒径分布

Fig 6 The size distribution of the gold nanoparticles before and after labeled

A: Size distribution of the gold nanoparticles with the diameter 20 nm; B: Size distribution of the gold nanoparticles labeled by CEA antibody; C: Size distribution of the gold nanoparticles labeled by NSE antibody

2.5 胶体金标记条件的确定

2.5.1 最佳 pH 值的确定

NSE 和 CEA 两种抗体 pH 从 5 到 8 之间变化时,胶体金溶液的颜色均发生不同程度的变化,变成灰色。其中随着 pH 的逐渐增大,变化程度逐渐减弱 pH 从 8 到 10 之间,溶液的颜色均保持酒红色不变。最后确定最佳 pH 为 9。

2.5.2 抗体最适稳定量的确定

NSE 抗体 200 μ L 胶体金溶液中 NSE 抗体量小于 3 μ g 时,溶液颜色均不同程度的变成了灰色、紫色,发生聚沉;而大于 3 μ g 时,溶液颜色为酒红色不变,所以 NSE 抗体最适稳定量为 3 μ g/200 μ L,即 15 μ g/mL。而工作中要比最适稳定量多出 20%,即实际用量为 18 μ g/mL。图 7a(1-9)中 NSE 抗体的质量分别为 0、0.8、1.6、2.0、2.4、3.0、4.0、5.0、6.0 μ g/200 μ L。CEA 抗体 200 μ L 胶体金溶液中 CEA 抗体量小于 4 μ g 时,溶液颜色均不同程度的变成了灰色、紫色,发生聚沉;而大于 4 μ g 时,溶液颜色为酒红色不变,所以 NSE 抗体最适稳定量为 4 μ g/200 μ L,即 20 μ g/mL,而工作中要比最适稳定量多出 20%,即实际用量为 24 μ g/mL。下图 7b(1-9)中 CEA 抗体的质量分别为 0、0.8、1.6、2.0、2.4、3.0、4.0、5.0、6.0 μ g/200 μ L。



图 7 NSE、CEA 单抗最适稳定量的测定 a. NSE 单抗最适稳定量的测定 b. CEA 单抗最适稳定量的测定

Fig 7 The detection of the most appropriate amount of antibody of NSE and CEA a The detection of the most appropriate amount of antibody of NSE ;b The detection of the most appropriate amount of antibody of CEA

2.6 检测卡的检测灵敏度

实验检测了一系列浓度梯度的标准溶液,溶液中抗原浓度介于 0~500 ng/mL 之间,在 15 min 之内观察各条带的显色情况。从下图 7(a, b)NSE、CEA 单独检测的检测卡上可以看出:当 NSE 浓度低于 5 ng/mL 时,检测线不显色,而当浓度大于 5 ng/mL 时,随着抗原浓度的逐渐增大,检测线颜色逐渐加深。CEA 浓度低于 3 ng/mL,检测线不显色,当浓度大于 3 ng/mL,随着抗原浓度的逐渐增大,检测线颜色也逐渐加深。从下图 7(c) NSE、CEA 联合检测的检测卡上可以看出,当 CEA 浓度等于 3 ng/mL, NSE 浓度等于 5 ng/mL, T1, T2 两条检测线可以同时出现,而且强度很弱;当 CEA 浓度小于 3 ng/mL, NSE 浓度小于 5 ng/mL 时,两条检测线均不出现;当 CEA 浓度大于 3 ng/mL, NSE 浓度大于 5 ng/mL 时,两条检测线均随着各自浓度的增加而颜色加深。即此试纸条 NSE 的检测灵敏度为 5 ng/mL,而 CEA 的检测灵敏度为 3 ng/mL。

2.7 试纸条的特异性

将 CA125、CYFRA21-1、TPA 用 PBS 稀释到 5、15、30、60、100、150、200、250 ng/mL 进行检测,发现均只有 C 线变成了红色,而两条 T 线均没有显色,说明该试纸条的特异性良好。



图 8 NSE、CEA 单独检测和联合检测结果

Fig 8 The detection results of NSE、CEA separately and simultaneously A. NSE 单独检测结果图 B. CEA 单独检测结果图 C. NSE/CEA 联合检测结果图

A. The detection results of NSE (0, 5, 15, 50, 100, 200, 300, 400, 500) B. The detection results of CEA:(0, 3, 5, 15, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500) C. The joint detection results of CEA and NSE(CNSE(ng/mL): 0, 5, 15, 50, 100, 200, 300, 400, 500; CCEA(ng/mL): 0, 3, 5, 50, 100, 200v300, 400, 500)

3 讨论

肺癌的早期诊断是提高患者治愈率和降低死亡率的关键,目前,肿瘤标志物虽然在肺癌诊断中有一定的价值,但这些肿瘤标志物在诊断和筛选肺癌时,敏感性并不高^[18],故采用多种相关标志物合理组合进行检测是目前观察及研究肿瘤标志物的一个重要方法,以提高肿瘤诊断的敏感性^[19]。但传统的检测肿瘤标志物的方法为 ELISA 法和放射免疫法。这两种方法对操作人员的专业要求都比较高,需要特定的测量仪器,且操作步骤比较繁琐,不容易在基层医院进行。免疫层析法结合了酶联免疫和色谱层析的优点,抗原抗体特异性结合保证了它的特异性,而它的原理又决定了它具有更高的灵敏度。抗原-抗体-金颗粒复合物不断地通过膜上的捕获带,不仅对被测物有浓缩作用,而且也使标记物被自动分离,不需额外的洗涤步骤,减少了污染机会。

本文建立了一种快速、简易的检测肺癌肿瘤标志物 NSE、CEA 的金标免疫层析检测方法。实验采用双抗夹心法对 CEA 和 NSE 进行联合检测。该方法用胶体金标记抗 NSE、CEA 鼠抗单克隆抗体作为分析探针,与 NSE、CEA 相对应的另一种鼠抗单克隆抗体作为检测线,以羊抗鼠抗体作为质控线,进行 NSE、CEA 的检测分析。利用胶体金产生的信号颜色深浅,可进行定性或半定量检测。检测结果显示,该检测方法特异性强,灵敏度高。目前尚未见这方面的报道。

实验中运用 Frens 法制备了直径为分别为 20 nm 和 40 nm 的胶体金。在制备的过程中发现,40 nm 金纳米颗粒的粒径、形貌和 Zeta 电位分布都比较混乱,且稳定性较差,所以选取了 20 nm 的金纳米粒子进行实验。胶体金颗粒表面带有负电荷,与

蛋白质的正电荷基团因静电吸附而能够牢固结合。从空间位阻的角度来讲, 20nm 金纳米粒子的空间位阻较 40nm 金纳米粒子的小, 从而更有利于抗体与金颗粒的结合^[20]。从图 6 标记前和标记后的金纳米粒子的粒径分布图上可以看出胶体金颗粒因其表面上包覆了一层蛋白质而使得粒径变大, 进一步证实了抗体已经结合到了金纳米颗粒上。通过抗体、胶体金标记物及样品处理缓冲液的优化, 较好地避免了假阳性或假阴性及互相干扰。

随着研究的不断深入, 在现阶段半定量检测的基础上我们将研制定量检测卡, 并不断开发其他肿瘤标志物的快速检测卡。

参考文献(Reference)

- [1] 高媛, 秦军. 肺癌的早期诊断及其研究进展 [J]. 临床肺科杂志, 2008,13(01): 64-65
Gao Yuan, Qin Jun. The early detection and research of lung cancer [J]. Journal of clinical pulmonary medicine, 2008, 13(01): 64-65
- [2] 王勇, 陆长青, 王凡. 丹参诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化[J]. 解剖学杂志, 2007, 30(2): 207-210
Wang Yong, Lu Chang-qing, Wang Fan. Differentiation of rat bone marrow stromal stem cells into neuron-like cells induced by Salvia miltiorrhiza. Chinese Journal of Anatomy, 2007, 30(2): 207-210
- [3] Carney DN, Marangos PJ, Ihde DC, et al. Serum neuron-specific enolase a marker for disease extent and response to therapy of small cell lung cancer[J]. Lancet 1982, 1:583-85
- [4] 郭林, 左桂兰, 许晓峰. 肿瘤标志物联合检测在肺癌诊治中的价值 [J]. 中国肺癌杂志, 2005, 8(6): 544-546
Guo Lin, Zuo Gui-lan, Xu Xiao-feng. The value of combined detection of tumor markers in lung cancer diagnosis. Chin J Lung Cancer, December, 2005, 8(6):544-546
- [5] 冯丽君, 单淑香. 肺癌标记物的临床应用及其研究进展 [J]. 国际呼吸杂志, 2006, 26(11): 842-844
Feng Li-jun, Shan Shu-xiang. The clinical application and research of Lung cancer markers[J]. Int J Respir, 2006, 26,(11):842-844
- [6] Shen GY, Wang H, Deng T, et al. A novel piezoelectric immunosensor for detection of carcinoembryonic antigen [J]. Talanta, 2005, 67: 217-220
- [7] Vincent RG, Chu TM, Lane ww. The value of CEA in patients with carcinoma of the lung[J]. Cancer, 1979, 44: 685-693
- [8] Fakhraddin N, Padideh E. Evidence for CEA release from human colon cancer cells by an endogenous GPI-PLD enzyme [J]. Cancer Letters, 2006, 234: 158-167
- [9] 瞿彩平. 肿瘤标志物联合检测在晚期恶性肿瘤诊疗中的价值[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2002, 9(3): 97-98
Qu Cai-ping. The value of combined testing of serum tumor markers in the diagnosis of terminal malignant tumour [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology and Rehabilitation, 2002, 9(3): 97-98
- [10] 阎欢, 王宪法, 钟述猷. 肝癌和肝硬化患者肿瘤标志物联合检测的意义和临床应用[J]. 天津医科大学学报, 2001, 7(1): 61-62
Yan Huan, Wang Xian-fa, Zhong Shu-you. The meaning and clinical application in tumor marker combined detection with liver cancer and hepatocirrhosis patient [J]. Journal of Tianjin Medical University, 2001, 7(1): 61-62
- [11] Luis H, Antonia E, Cleofe? F, et al. CEA and CA 549 in serum and pleural fluid of patients with pleural effusion [J]. Lung Cancer, 2002,36: 83-89
- [12] 吴刚, 姜瞻梅, 霍贵成. 胶体金免疫层析技术在食品检测中的应用 [J]. 食品工业科技, 2007,28(12): 216-218
Wu Gang, Jiang Zhan-mei, Huo Gui-cheng. The application of Col-loidal gold immunochromatography technology in food testing [J]. Science and Technology of Food Industry. 2007,28(12):216-218
- [13] 周友泉. 免疫胶体金的制备及其在医学检验中的应用[EB / OL]. <http://www.docin.com/p-89252448.html>
Zhou You-quan. The Preparation Immune Colloidal Gold And Application In Medical Test [EB / OL]. <http://www.docin.com/p-89252448.html>
- [14] 王东勇, 张松乐. 免疫胶体金技术在快速诊断中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2003,13(3):391-392
Wang Dong-yong, Zhang Song-le. The application of Immune col-loidal gold technology in rapid diagnosis [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2003,13(3):391-392
- [15] Deng SL, Lan WH, Xu Y, et al. Study on Gold Immunochromatography Assay for Rapid Detection of Aflatoxin B1 [J]. Food Science, 2007, 28(02):232-236
- [16] Peng DP, Hu SS, Hua Y. Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian influenza virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2007, 117:17-25
- [17] Stephan L, Mostafa A. El-Sayed. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles [J]. Phys. Chem.B, 1999, 103(21): 4212-4217
- [18] Ferrigno D, Bacchen G, Biggl A. Serum tumour markers in lung Cancer; history, biology and clinical applications. Eur Respir J, 1994,7 : 186-197
- [19] 毛安华, 李连琨. 肿瘤标志物联合检测在肺癌诊断中的应用价值 [J]. 实用预防学, 2006,13(2):309-311
Mao An-hua, Li Lian-kun. The application value of combined detection of tumor markers in lung cancer diagnosis [J]. Practical Preventive Medicine, 2006, 13(2):309-311
- [20] 李永勤, 杨瑞馥. 以膜为固相载体的免疫胶体金快速试验[J]. 微生物学免疫学进展, 2003,31(1):74-77
Li Yong-qin, Yang Rui-fu. Immune colloidal gold rapid test based on membrane for solid-phase carrier [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2003,31(1):74-77