

- to second-line nilotinib or dasatinib treatment in patients with chronic myeloid leukemia[J]. Haematologica, 2013, 98(5): 714-717.
- [23] Sweet K, Zhang L, Pinilla-Ibarz J. Biomarkers for determining the prognosis in chronic myelogenous leukemia[J]. J Hematol Oncol, 2013, 6(1): 54.
- [24] Paquette RL, Nicoll J, Chalukya M, et al. Frequent EVI1 translocations in myeloid blast crisis CML that evolves through tyrosine kinase inhibitors[J]. Cancer Genet, 2011, 204(7): 392-397.
- [25] Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, et al. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation[J]. J Clin Invest, 2010, 120(7): 2254-2264.
- [26] Cramer K, Nieborowska-Skorska M, Koptyra M, et al. BCR/ABL and other kinases from chronic myeloproliferative disorders stimulate single-strand annealing, an unfaithful DNA double-strand break repair[J]. Cancer Res, 2008, 68(17): 6884-6888.
- [27] Hughes TP, Ross DM, Melo JV. Challenges of treatment: tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemia [M]. New York: Springer International Publishing, 2014: 53-65.
- [28] Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Hochhaus A, et al. Anti-oxidant vitamin E prevents accumulation of imatinib-resistant BCR-ABL1 kinase mutations in CML-CP xenografts in NSG mice[J]. Leukemia, 2013, 27(11): 2253-2254.
- [29] Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis[J]. Mutat Res, 2011, 711(1/2): 193-201.
- [30] Koptyra M, Cramer K, Slupianek A, et al. BCR/ABL promotes accumulation of chromosomal aberrations induced by oxidative and genotoxic stress[J]. Leukemia, 2008, 22(10): 1969-1972.
- [31] Chen H, Liao SB, Cheung MP, et al. Effects of sperm DNA damage on the levels of RAD51 and p53 proteins in zygotes and 2-cell embryos sired by golden hamsters without the major accessory sex glands[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(4): 885-892.
- [32] Gierut JJ, Mathur PS, Bie W, et al. Targeting protein tyrosine kinase 6 enhances apoptosis of colon Cancer cells following DNA damage[J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(11): 2311-2320.
- [33] Stoklosa T, Poplawski T, Koptyra M, et al. BCR/ABL inhibits mismatch repair to protect from apoptosis and induce point mutations[J]. Cancer Res, 2008, 68(8): 2576-2580.
- [34] Hamilton A, Helgason GV, Schemionek M, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival[J]. Blood, 2012, 119(6): 1501-1510.
- [35] Xiang Z, Kaur V, Aburiziq IK, et al. Natural history of chronic myelomonocytic leukemia: gene sequencing identifies multiple clonal molecular abnormalities associated with rapid progression to acute myeloid leukemia[J]. Clinical case reports, 2014, 2(6): 265-270.

(收稿日期: 2015-07-08)

• 综 述 •

时间分辨荧光免疫分析技术在医学领域的应用*

史咏梅¹, 何 晖², 冯子力¹, 谭 华¹, 伍碧梅¹, 朱 海³, 涂承宁¹, 柯明剑¹, 叶立青¹,
唐明慧¹, 杨 泽¹综述, 汪海波^{1△}审核

(1. 珠海出入境检验检疫局保健中心, 广东珠海 519020; 2. 广州市疾病预防控制中心, 广东广州 510080; 3. 深圳市易瑞生物技术有限公司, 广东深圳 518102)

关键词: 时间分辨荧光免疫分析; 稀土金属元素; 医学诊断

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 19. 039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)19-2866-04

标记免疫分析技术是在抗原与抗体特异性反应的基础上标记各种可测量的标记物, 是目前在微量检测领域独具优势的免疫分析技术。20 世纪 60 年代初期, Yallow 和 Berson 创立了放射性免疫分析方法(RIA), 因其具有极好的微量分析性能而迅速被应用于临床诊断和医学科学研究, 但因其放射性危害、试剂昂贵且保存期短等劣势被限制了进一步发展。此后酶标记免疫分析技术(EI)、化学发光免疫分析技术(CLIA)、电化学发光免疫分析技术(ECLIA)、荧光免疫分析技术(FIA)、时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)等非 RIA 相继问世, 其中 TRFIA 在检测灵敏性方面超过 RIA 2~3 个数量级, 被认为是非常具有发展潜力的非放射性标记免疫分析技术。本文就 TRFIA 的研究及在医学领域的应用综述如下。

1 TRFIA 的原理及特点

1.1 TRFIA 的基本原理 TRFIA 是在 FIA 的基础上发展起

来的一种特殊的荧光分析技术, 其利用镧系元素的三价离子及其螯合物为示踪物, 标记抗体、抗原、激素、多肽、蛋白质、核酸探针及生物细胞, 待反应体系(目前常用的有抗原抗体反应、生物素亲和素反应、核酸探针杂交等)发生后, 吸收紫外光, 发出特异荧光, 待激发光杂散光及本底荧光衰变后, 用特定的分析检测仪测定反应产物中的荧光强度。通过与相对荧光强度比较, 从而判断反应体系中分析物的浓度。

1.2 TRFIA 的主要特点 镧系的某些稀土金属如铕(Eu)、铽(Tb)、钐(Sm)的三价离子与其配体形成的螯合物具有相似的独特荧光特性, 如荧光寿命长、激发光和发射光的波长差(stokes 位移)大、激发光谱和发射光谱无交叉、特征峰非常尖锐等特点。通过有效利用波长分辨和时间分辨技术排除非特异荧光, 实现了高信噪比和灵敏度, 以时间分辨技术测量特异荧光, 对待检物质进行定量分析。解决了普通荧光分析中材料

* 基金项目: 国家质检总局科技项目(2013IK248); 广东省科技厅项目(2013B040402001)。 作者简介: 史咏梅, 女, 主管技师, 主要从事卫生检疫试验方法研究。△ 通讯作者, E-mail: wanghb1013@hotmail. com。

和样品中的非特异荧光而产生的高背景问题。与其他标记免疫技术比较,克服了 RIA 放射性危害和 EIA 的酶生物学活性不稳定的特点,另外 TRFIA 还具有示踪物质稳定、重复性好、灵敏度高、易于自动化、线性范围宽、不受本底荧光干扰、多位点标记^[1]、大样本检测、用时短等优点,成为生物医学研究和超微量测定领域一项最有前景的分析方法。TRFIA 的以上优越性来源于镧系稀土离子的固有特性:(1)激发光和发射光的 Stokes 位移较大,可达 290 nm(普通荧光波长 28 nm),经过干涉滤光片进行波长分辨,使激发光对发射光的干扰减到最低,有效排除非特异性荧光干扰。(2)荧光寿命长,一般的镧系螯合物荧光衰变时间在 60~900 ns,为传统荧光的 103~106 倍。如 Eu^{3+} 的荧光衰变时间为 714 us,普通荧光反应中的荧光团的衰变时间为 1~100 ns,样品中蛋白荧光衰变时间也很短,通常为 1~10 ns。所以延迟检测时间,待背景荧光完全衰减后测定,有利于消除蛋白质的荧光背景干扰。如使用链霉素亲和素-生物素的检测系统可更好地降低非特异性荧光的干扰^[2]。(3)激发光谱带很宽,最大波长可达 300~500 nm,有利于增强激发能,提高标记物的比活性。(4)发射光谱带很窄,甚至不到 10 nm,有利于降低本底荧光强度,提高分辨率。(5)稀土元素与配体的螯合物很稳定,可保存 1~2 年。(6)生成的荧光体系可重复激发,通过对多次激发荧光求和算平均数,提高准确性。(7)不同的稀土元素有不同的荧光波长和寿命,并且具有良好的分辨性,从而可实现多个待检物同时分析。(8)三价稀土离子体积小(为原子标记),保证了被标记的物质稳定(尤其对蛋白的影响小),又可以实现多位点标记^[3]。

2 标记物的种类及特点

镧系元素中的 Eu、Tb、Sm、Nd、Dy 等 5 种元素因其荧光寿命长,尤其是 Eu 和 Tb,且具有较强的荧光强度而被用作 TRFIA 技术中的示踪剂,其中 Eu、Tb 和 Sm 最为常用。

镧系元素作为金属离子几乎不能与抗原抗体直接结合,因此在此标记时需要一种双功能基团的螯合剂,其分子内或带氨基和羧基或带有异硫氰酸基和羧酸基,其一端与稀土离子连接,另一端与抗原或抗体的自由氨基(组氨酸、酪氨酸)连接。此外,用于荧光螯合物的理想螯合剂还应满足以下条件:(1)与稀土离子结合稳定并易与蛋白形成共价结合;(2)形成的螯合物须有很强的荧光并尽量少与血清中的其他组分发生反应;(3)所需要的激发光波长大于 300 nm,以避免固相塑料材料对激发光的吸收。目前 TRFIA 技术中与稀土离子配合的常用螯合剂有五大类:(1)多胺基多羧基类螯合剂,如乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙三胺四乙酸(DTTA)和二乙三胺五乙酸(DTPA)等,它们具有氨基或异硫氰酸基等活性基团,并且含有多个氮原子和氧原子的配位基团,与稀土离子有很强的螯合力。所形成的螯合物稳定性高、水溶性好,但是荧光不强,无法直接进行测量而受到限制。研究者利用这类螯合剂用于 TRFIA,建立了经典的 Pharmacia LKB 测定体系^[4],它分两步进行,根据反应特点又称为解离-增强镧系荧光免疫分析。(2) β -二酮类螯合剂,此类螯合剂能高效地向稀土离子传递能量,使其所形成的螯合物发光效率和荧光强度极高,如噻吩甲酰三氟丙酮(TTA)、三甲基乙酰三氟丙酮(PTA)等,以 β -萘酰三氯丙酮(β -NTA)最常用。但由于此类螯合物不稳定,常用做增强液而不能用于标记。(3)菲罗啉类螯合剂,主要用于一种通用免疫分体系-Cyber Fluoro 体系(又称直接固体法),如 4,7-二(氯磺酰基苯基)-1,10-菲罗啉-2,9-二羧酸(BCPDA)。由于具有可与稀土离子形成稳定络合物,高效向稀土离子传递能量,除了在 Cyber Fluoro 体系中作为荧光标记物使用,还被广

泛用于免疫分析和核酸杂交领域。(4)水杨酸类螯合剂,此螯合剂能够克服 LKB 体系中无法直接定量和易受环境污染的缺点。其优点是多胺基多羧基部分能够使稀土离子与其形成稳定的络合物;芳环部分能够有效地把激发能传递给稀土离子,使之产生很强的荧光;该类螯合剂非常易与蛋白偶联。(5)联吡啶类螯合剂,此螯合剂是吡啶、联吡啶及一些大环类化合物的衍生物,由于穴状结构的存在,与一些稀土离子形成稳定的络合物,其具备的多环体系,保证稀土离子不易被取代,并且使稳定性增强及溶剂影响很小,而且体系有较强的荧光和较大的稳定常数。

3 TRFIA 的反应模式

到目前为止,TRFIA 的反应模式主要 3 种方式:固相双位点夹心非竞争法和 2 种竞争法,2 种竞争法包括了标记抗原的免疫分析法和标记抗体的免疫分析法。

3.1 固相双位点夹心非竞争法 固相双位点夹心非竞争法也称标记抗体的非竞争法。固相双位点夹心法主要用来测定蛋白质类大分子化合物。大分子抗原一般含有两个以上的抗原决定簇,使用针对被测物上不同抗原决定簇的两个单克隆抗体,一个标记稀土离子(如 Eu^{3+}),另一个包被固相载体。免疫反应形成免疫复合物后,再将 Eu^{3+} 从复合物上完全解离下来,在增强液中与另一种螯合剂结合,在协同剂的作用下形成 Eu^{3+} 包裹于其内部的微胶囊(胶态分子团)。它在激发光作用下能发射出特异性荧光信号,其强弱与待测抗原浓度相关。如我国学者建立的双抗体夹心法 TRIFA 测定肌钙蛋白 I^[5],对检测体系的标准曲线、最低检测限、精密度和交叉反应等相关性能进行评价,证实可应用于临床急性心肌梗死患者的诊断及疾病检测。

3.2 标记抗原的竞争免疫分析法 该法先将固定量的抗体包被在固定相上,再将固定量的稀土离子标记抗原和待检样品(抗原)与之反应,样品中的抗原浓度越高,固相抗体结合的标记抗原量就越少,即固相抗体上的荧光信号强度与样品中的抗原浓度呈反比^[6-7]。

3.3 标记抗体的竞争免疫分析法 利用标记抗体与固相化抗原及待测目标抗原之间的竞争反应。固相化抗原和标记抗体的浓度固定,样品中的抗原浓度越高,标记抗体与固相化抗原所形成的免疫复合体的量越低,检测的荧光信号强度与样品中的抗原浓度呈反比。如谭玉华等^[8]建立的竞争法 TRIFA 检测总四碘甲腺原氨酸(T4),灵敏度达 6.895 nmol/L,具有良好的应用价值。此法多用于小分子抗原和半抗原物质的检测。

4 TRFIA 技术在医学诊断及研究的应用

4.1 在微生物方面的应用 自 1979 年 TRFIA 的理论形成后,研究者们便致力于将其用于试剂开发和应用上,早期主要是研制微生物诊断试剂,上世纪 80 年代即建立了 TRFIA 方法测定风疹病毒抗体、流感病毒、乙肝表面抗原、丙型肝炎病毒抗体等。2005 年建立了以双抗体夹心法为基础的检测新型冠状病毒 SARS-CoV-N 抗原的年 TRFIA 技术,灵敏度达 0.02 ng/mL。近年来国内秦雯等^[6]建立了检测限较低的乙肝五项标志物 TRFIA 法对早期指导临床对乙型肝炎病毒感染的诊断、疗效的观察及预后的判断有较大价值。廖群等^[7]比较了 TRFIA 和 TPPA 测定梅毒特异性抗体,前者灵敏度为 100.0%,特异度为 98.2%,最低检测浓度 0.15 NCU,具有明显的检测性能优势。谭玉华等^[8]报道了以巨细胞病毒 HCMV pp150+pp52+pp6 作为包被抗原, Eu^{3+} 标记羊抗人 IgG 作为示踪物,配制以 β -萘甲酰三氟丙酮为主的增强液测定 HCMV IgG,与同类试剂盒进行方法学比对结果最低检测限、重复性、阴性参考品

符合率、阳性参考品符合率均能达到国家检定标准。Qi 等^[9]利用 TRFIA 免疫层析配合免疫纳米磁性捕获的方法,将大肠杆菌 O157:H7 检测灵敏度从 10^5 CFU/mL 提高到 10^3 CFU/mL。Tan 等^[10]建立了风疹病毒 IgG 的 TRFIA 方法,并开发了相关试剂盒。

4.2 内分泌领域的应用 TRFIA 技术问世以来在该领域临床应用最为广泛。内分泌激素是一些具有免疫反应性不能刺激机体产生抗体的半抗原。对半抗原激素的测定,一般多用竞争性时间分辨荧光免疫法。Bertoft 等^[11]于 1984 年建立了固相竞争法检测血清睾酮浓度,检测限可达 15 fmol/L,与 RI 法检测结果有良好相关性($r=0.982$)。Sm³⁺ 和 Eu³⁺ 被用于双标记检测体系可同时检测孕妇血清中的甲胎蛋白(AFP)、绒毛膜促性腺激素(hCG)和雌三醇(E3)。1992 年高平等在国内首次以血清孕酮为对象建立了小分子类固醇激素的 TRFIA 分析法,并引入生物素-亲和素系统,该法线性范围 0.1~100.0 ng/mL,灵敏度为 0.05 ng/mL。以 SAM-Ig G-CTTA-Eu 作标记二抗,王永成等^[12]建立了以竞争抑制为基础的 TRFIA 测定游离雌二醇(E2)的方法,比均相方法灵敏度有很大提高,测定雌二醇(E2)的线性范围为 2.5-200 pg/mL。2002 年 Wu 等^[13]合成了高荧光性 β -二酮螯合物用于检测血清总甲状腺素(T4),对 27 例样本进行了间接 TRFIA 法检测血清 T4,结果与 CLIA 和 DELFIA 方法的相关性大于 0.95。近年来 Wang 等^[14]建立了一步法检测游离 T4 技术,一个小时内完成,检测限 0.6 pmol/L,通过对 110 份样品检测显示与 DELFIA 法具有良好相关性($r=0.975$)。国内的妇幼保健机构应用 TRFIA 法对新生儿甲状腺功能低下进行早期诊断和监测,被证实具有很高应用价值。陈丕亮等^[15]采集新生儿足跟血于特定滤纸上时间分辨免疫荧光法进行先天性甲状腺功能减低症(CH)和苯丙酮尿症(PKU)筛查,为进一步提高新生儿疾病筛查质量及干预措施提供依据。谢伟贤等^[16]研究表明轻度溶血、中度溶血、重度溶血标本之间胰岛素浓度检测结果比较差异无统计学意义($P>0.05$),但随着溶血时间的延长胰岛素浓度呈明显下降趋势。

4.3 肿瘤标记物的应用 大部分的肿瘤标记物属蛋白类完全抗原,主要采用非竞争性 TRFIA 法检测。1988 年 Cooper 应用解离增强(DELFIA)TRIFA 检测了 440 例不同种类癌症患者 CA50 水平,发现 95%胰腺癌、68%肝癌、54%晚期结肠癌、48%肺癌 Ca50 水平升高。2000 年国内肖华龙等用双位点夹心法, Eu³⁺ 标记单抗检测 CEA,灵敏度达到 0.2 ug/L,线性上限 508.9 ug/L。以双功能螯合剂异氰酸苄基二乙烯三胺四乙酸耦合 Eu³⁺ 并标记 CA19-9 单抗,黄飏等^[17]建立了 DELFLA 法分析 CA19-9,结果与 CA125、CA153 和 AFP 均无交叉反应。蔡军等^[18]建立了双抗体夹心法检测 AFP,测试 102 例受试者,结果显示与 RIA 法比较精密度好,线性范围上限(1000 U/mL)比 RIA 法(500 U/mL)更高。潘宇红等^[19]使用芬兰 WALLAC 公司的全自动时间分辨荧光测定仪对病理结果阳性标本进行恶性肿瘤特异性生长因子(TSGF)及癌胚抗原(CEA)联合检测,证实可提高阳性检出率,减少漏诊。国内 Xie 等^[20]建立了 C50 定量检测试剂盒,检测限为 0.2 U/mL。

4.4 寄生虫检测的研究应用 早在 1987 年 Aceti 等^[21]报道了利用 Eu³⁺ 标记螯合物检测血液样品诊断侵袭性阿米巴感染,结果与对流免疫电泳(CIEP)、间接血凝实验(IHA)、ELISA 等作比较,符合率分别是 94.0%、93.2%、97.1%;随后又研究了将包虫病患者血清、其他寄生虫患者血清及健康患者对照血清对 TRFIA 和 ELISA 2 种方法进行了比较,TRFIA 法

的阳性检出率可达 95.1%,高于 ELISA 法的 81.4%,在定位囊肿时 TRFIA 较 ELISA 有更高的灵敏度。Jonge^[22]报道用 TRIFA 法定量检测血吸虫阳极循环抗原(CAA),结果与夹心法 ELISA 作比较,检测下限是后者的 10 倍,而其线性范围上限也超出 100 倍。2002 年 Sorensen^[23]研究了同时检测弓形体 IgM 和 IgA 抗体的 TRFIA 方法,可用于筛查新生儿弓形体发病情况。周彬等^[24]研制了全自动 TRFIA 仪器检测的双标记弓形虫 TOX-IgG/IgM 试剂盒,用临床确诊样本进行性能验证结果表明该方法稳定性好,平均变异系数(CV)<10%,灵敏度小于 0.9 kU/L,两抗体之间反应交叉率小于 0.65%,特异度高,检测结果与德国赛润 ELISA 试剂的一致性高($P<0.05$)。Kapel 等^[25]首先用夹心法 TRFIA 检测抗隐孢子虫粪抗体,结果显示 IgA、IgM 和 IgG 的批内 CV<6%。Fischer 等^[26]运用解离增强时间分辨荧光杂交 PCR 诊断为卡氏肺囊虫肺炎,这种基于肺囊虫的表面糖蛋白引物的 PCR 检测方法灵敏度为 91%,特异度为 94%。国内学者 Xu 等^[27]建立了以华支睾吸虫重组谷胱甘肽转移酶 2 蛋白为检测抗原的 TRFIA 法用于疾病诊断,该法灵敏度为 95.80%,特异度为 93.60%,与日本血吸虫、钩口线虫、鞭虫、弓形虫的交叉反应小于 10%。

4.5 其他领域应用 在生物医学基础其他领域 TRFIA 还被用来检测人神经胶质瘤细胞系 H4 细胞分泌的 p-淀粉样蛋白分泌抑制因子、NK3.3 细胞分泌的人白细胞介素-13 及体液中的组胺、肿瘤坏死因子和 γ -干扰素和脑脊液补体 C3 等浓度测定。研究者也利用该技术实现了端粒酶、羧肽酶等酶活性的检测和心肌标志物肌钙蛋白的测定^[28]。以稀土离子标记的 DNA 探针也被广泛用于 PCR 技术^[29],并用于对 HIV DNA、前列腺特异性抗原 mRNA^[30]、腺病毒 DNA 及细菌、病毒及人体蛋白核酸浓度等基因突变的检测。TRFIA 还被用于检测排泄物成瘾药物^[31]、食品中细菌毒素浓度等领域。

5 小 结

TRFIA 法在被创立 30 年来发展迅速,应用日益广泛,特别是在超微分析技术领域独具所长,显示了巨大潜力,已成为医学临床检测和基础研究的重要手段。随着生命科学技术的发展和多学科交融进程的推进,TRFIA 分析技术必将得到更深入的研究和开发,推出越来越多的更加成熟的检测方法和技术手段。

参考文献

- [1] Zhang Z, Liu JF, Yao Y, et al. A competitive dual-label time-resolved fluoroimmunoassay for the simultaneous determination of chloramphenicol and ractopamine in swine tissue[J]. Chinese Sci Bull, 2011, 56(15): 1543-1547.
- [2] Du L, Cheng S, Wang S. Determination of diethylstilbestrol based on biotin-streptavidin-amplified time-resolved fluoro-immunoassay[J]. Luminescence, 2012, 27(1): 28-33.
- [3] 陈振华, 陈政君, 侯经远, 等. 一种新型多元均相时间分辨荧光免疫分析方法的建立[J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2013, 35(4): 474-479.
- [4] Soini E, Kojola H. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates—a new Generation of nonisotopic immunoassays[J]. Clin Chem, 1983, 29(1): 65-68.
- [5] 张洁, 卢玲玲, 潘晓夫, 等. 时间分辨荧光免疫分析法检测心肌肌钙蛋白 I 方法学的建立及临床应用[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(8): 1093-1097.
- [6] 秦雯, 胡大春, 肖利华. 时间分辨荧光法检测乙型肝炎病毒血清标志物的检出限探讨[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(1): 34-36.

- [7] 廖群,刘小玲,郭惠. 时间分辨免疫荧光法用于梅毒抗体测定的探讨[J]. 中国实验诊断学,2014,18(3):447-450.
- [8] 谭玉华,于婷,范主桥,等. 时间分辨荧光免疫法人巨细胞病毒 IgG 抗体定量测定试剂盒的研制[J]. 标记免疫分析与临床,2013,20(6):446-450.
- [9] Qi H,Zhong Z,Zhou HX,et al. A rapid and highly sensitive protocol for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on immunochromatography assay combined with the enrichment technique of immunomagnetic nanoparticles[J]. Int J Nanomedicine, 2011,6(6):3033-3039.
- [10] Tan Y, Yu T, Li Y, et al. Development and performance evaluation of time-resolved fluorescence immunoassay quantitative kit on determination of rubella virus IgG antibody[J]. Intern J Labor Med, 2014,35(4):472-474.
- [11] Bertoft E, Eslola J, Nanto, et al. Competitive solid-phase immunoassay of testosterone using time-resolved fluorescence[J]. FEBS Lett, 1984,173(2):213.
- [12] 王永成,唐棣,常文保,等. 时间分辨荧光免疫分析法间接测定雌二醇[J]. 分析科学学报,2001,17(2):89-92.
- [13] Wu FB, Han SQ, Zhang C, et al. Synthesis of a highly fluorescent beta-diketone-europium chelate and its utility in time-resolved fluoroimmunoassay of serum total thyroxine[J]. Anal Chem, 2002, 74(22):5882-5889.
- [14] Wang Z, Lao HM, Liu T, et al. Labelled antibody-based one-step time-resolved fluoroimmunoassay for measurement of free thyroxine in serum[J]. Ann Clin Biochem, 2011,48(Pt 6):550-557.
- [15] 陈丕亮,陈亚. 2010-2012 年甘肃省新生儿疾病筛查状况及分析[J]. 中国优生优育,2013,19(6):470-472.
- [16] 谢伟贤,黄泽棋,王晓娟,等. 溶血对时间分辨免疫荧光分析法测定胰岛素的影响[J]. 检验医学与临床,2014,11(4):443-444.
- [17] 黄飏,肖华龙,朱利国. CA19-9 时间分辨荧光免疫分析方法的建立及应用[J]. 标记免疫分析与临床,2001,8(1):25-27.
- [18] 蔡军,陈凤英,梁玉,等. 时间分辨荧光免疫分析法测定血清甲胎蛋白[J]. 医药论坛杂志,2005,26(20):42-44.
- [19] 潘宇红,孙钧铭,陈永伟,等. 肿瘤特异性生长因子和癌胚抗原联合检测对肺癌的诊断价值[J]. 临床检验杂志,2001,19(6):371.
- [20] Xie M, Huang H, Hang J, et al. Evaluation of the analytical and clinical performances of time-resolved fluoroimmunoassay for detecting carcinoma antigen 50[J]. J Immunoassay Immunochem, 2015,36(3):265-283.
- [21] Aceti A, Pennica A, Caferro M, et al. Application of time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) for the diagnosis of invasive amoebiasis[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1987,81(5):764-767.
- [22] de Jonge N, Boerman OC, Deelder AM. Time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for the detection of the schistosome circulating anodic antigen[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1990, 83(5):659-663.
- [23] Sorensen T, Spenter J, Jaliashvili I, et al. Automated time-resolved immunofluorometric assay for *Toxoplasma gondii*-specific IgM and IgA antibodies: study of more than 130,000 filter-paper blood-spot samples from newborns[J]. Clin Chem, 2002,48(11):1981-1986.
- [24] 周彬,张珏,王珂,等. 弓形虫 IgG 和 IgM 抗体双标记时间分辨荧光免疫分析的建立及其初步临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2010,33(10):957-959.
- [25] Kapel N, Meillet D, Buraud M, et al. Determination of anti-Cryptosporidium coproantibodies by time-resolved immunofluorometric assay[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1993,87(3):330-332.
- [26] Fischer S, Gill VJ, Kovacs J, et al. The use of oral washes to diagnose pneumocystis carinii pneumonia; a blinded prospective study using a polymerase chain reaction-based detection system[J]. J Infect Dis, 2001,184(11):1485-1488.
- [27] Xu J, Wang L, Deng C, et al. The serological diagnosis of human clonorchiasis by time-resolved fluoroimmunoassay based on GST2-specific IgG4 detection[J]. Parasitol Res, 2014, 113(1):149-155.
- [28] Järvenpää ML, Kuningas K, Niemi I, et al. Rapid and sensitive cardiac troponin I immunoassay based on fluorescent Europium (III)-chelate-dyed nanoparticles[J]. Clin Chim Acta, 2012, 414(414):70-75.
- [29] Ylikoski A, Elomaa A, Ollikka P, et al. Homogeneous time-resolved fluorescence quenching assay (TruPoint) for nucleic acid detection[J]. Clin Chem, 2004,50(10):1943-1947.
- [30] Nurmi J, Wikman T, Karp M, et al. High-performance real-time quantitative RT-PCR using lanthanide probes and a dual-temperature hybridization assay[J]. Anal Chem, 2002, 74(14):3525-3532.
- [31] José A, Aurelia A, Fernando M, et al. Simultaneous determination of nabumetone and its principal metabolite in medicines and human urine by time-resolved fluorescence[J]. Analyst, 2012, 137(4):5144-5152.

(收稿日期:2015-07-12)

• 综 述 •

肝素结合蛋白研究进展*

张 扬,张 慧 综述,马慧霞[△] 审校
(新疆医科大学,新疆乌鲁木齐 830011)

关键词: 感染性疾病; 脓毒症; 肝素结合蛋白; 多形核白细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)19-2869-04

感染性疾病是一类严重威胁人类健康的疾病。脓毒症是病死率较高的感染性疾病之一,尽早诊断及治疗对提高脓毒症

疗效及预后有重要的作用,所以现在临床面临的最大挑战是如何尽早对脓毒症患者明确诊断。近年来肝素结合蛋白(HBP)

* 基金项目:新疆维吾尔自治区人民医院内科科研项目(20140212)。 作者简介:张扬,女,硕士研究生在读,主要从事临床检验诊断学方面研究。
[△] 通讯作者,E-mail:mahuixia-xj@163.com。