

• 论 著 •

人血清癌胚抗原发光免疫分析方法的建立及性能评价^{*}

杨进波¹,焦 蓉¹,曹 琳¹,武军驻²,孙 莉³,童 伟¹

1. 湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院检验科,湖北襄阳 441000;2. 武汉大学基础医学院生物化学与分子生物学系,湖北武汉 430071;3. 襄阳职业技术学院医学实训中心,湖北襄阳 441000

摘 要:**目的** 建立一种人血清癌胚抗原(CEA)发光免疫分析方法并进行性能评价。**方法** 根据生物学上抗原与抗体会发生特异性反应的原理,将 CEA 捕获抗体包被在羧基磁珠表面,与血清中的 CEA 及吖啶酯标记的 CEA 抗体反应形成双抗夹心“三明治”免疫复合物,清洗复合物后,加入预激发液和激发液,用化学发光免疫分析仪检测反应过程中的发光强度,四参数 Logistic 方程拟合后计算出标本中 CEA 浓度,并对线性范围、准确度、精密度及与雅培 CEA 检测系统相关性进行性能评估。**结果** 该方法空白限为 0.2 ng/mL,线性范围为 0.4~1 000.0 ng/mL,批内精密度分别为 5.12%、5.17%,批间精密度分别为 5.52%、5.60%,与雅培 CEA 检测系统测定结果拟合方程为 $Y=1.0046X+0.0734$,相关系数(r)=0.9949。**结论** 该方法各项性能指标均能满足医院检验需求,与进口试剂结果比较有很好的相关性,有较好的临床检验应用前景。

关键词:癌胚抗原; 免疫分析; 临床检验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.09.003 **中图法分类号:**R446.6

文章编号:1673-4130(2022)09-1037-05 **文献标志码:**A

Establishment and performance evaluation of luminescent immunoassay for human serum carcinoembryonic antigen^{*}

YANG Jinbo¹, JIAO Rong¹, CAO Lin¹, WU Junzhu², SUN Li³, TONG Wei¹

1. Department of Clinical Laboratory, Xiangyang First People's Hospital, Hubei University of Medicine, Xiangyang, Hubei 441000, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Wuhan University School of Basic Medical Sciences, Wuhan, Hubei 430071, China; 3. Medical Training Center, Xiangyang Vocational and Technical Collage, Xiangyang, Hubei 441000, China

Abstract:**Objective** To establish a luminescent immunoassay for human serum carcinoembryonic antigen (CEA) and evaluate its performance. **Methods** According to the principle of specific reaction between antigen and antibody in biology, CEA capture antibody was coated on the surface of carboxyl magnetic beads, which reacted with serum CEA antigen and acridine ester labeled CEA antibody to form double antibody sandwich immune complex, then the immune complex was cleaned, and pre-trigger solution and trigger solution were added, the luminescence intensity of the reaction was measured by chemiluminescence immunoanalyzer, CEA concentration in the samples was calculated after fitting with four parametric Logistic equations, and the linear range, accuracy, precision and correlation with the Abbott CEA detection system were evaluated. **Results** The minimum detection limit of this method was 0.2 ng/mL, the linear range was 0.4–1 000.0 ng/mL, the intra-batch coefficient of variation was 5.12%, 5.17%, and the inter-batch coefficient of variation was 5.52%, 5.60%, the fitting equation with the test results of Abbott CEA detection system was $Y=1.0046X+0.0734$, and correlation coefficient (r) was 0.9949. **Conclusion** All the performance indexes of this method can meet the requirements of hospital testing, and it has a good correlation with imported reagents, and good application prospects in clinical examination.

Key words: carcinoembryonic antigen; immunoassay; clinical examination

肿瘤标志物可用于胃癌、肠癌、肺癌、肝癌等常见 肿瘤疾病的预防筛查、辅助诊断及复发监测^[1]。癌胚

^{*} 基金项目:国家重点研发计划(2019YFF0216501-Z19);湖北省卫生健康委员会科研(指导性)项目(WJ2021F064)。
作者简介:杨进波,男,副主任技师,主要从事临床生化检验研究。
本文引用格式:杨进波,焦蓉,曹琳,等.人血清癌胚抗原发光免疫分析方法的建立及性能评价[J].国际检验医学杂志,2022,43(9):1037-1040.

抗原(CEA)是一种广谱肿瘤标志物,可通过细胞膜分泌进入人体体液中^[2]。健康人群血液中 CEA 浓度很低,部分吸烟人群血液中 CEA 浓度会升高^[3]。目前,CEA 被广泛应用于各类恶性肿瘤的辅助诊断、筛查。化学发光免疫分析法是将化学光信号检测技术和免疫分析法相结合的一种新技术,该方法的灵敏度高,仪器操作智能简便,检测时间短,并且没有放射性污染^[4-5]。本研究通过双抗夹心法原理建立人血清 CEA 发光免疫分析方法,并对各项性能进行了评估,选取雅培 CEA 检测系统作为参比系统,调试检测结果与世界公认的检测系统靠拢,以期为国内临床快速检测 CEA 提供方法。

1 材料与方法

1.1 材料来源 血清标本由湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院提供。

1.2 仪器与试剂 SMART 500 全自动化学发光免疫分析仪(科斯迈生物技术有限公司)、雅培 i2000 全自动化学发光免疫分析仪(美国雅培公司)、BY-L600 型立式低速离心机(白洋医疗器械有限公司)、移液器[大龙兴创实验仪器(中国)有限公司]、CEA 捕获抗体和检测抗体(金斯瑞生物科技有限公司)、CEA(海肽生物科技有限公司)、吖啶酯[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司(Sigma-Aldrich)]、羧基磁珠(重庆博蓝鹰生物技术有限公司)、CEA 测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法,美国雅培公司)、ProClin 300[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司(Sigma-Aldrich)]、新生牛血清(杭州四季青生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 吖啶酯标记 CEA 检测抗体 取 pH=7.4 的磷酸盐缓冲液置换抗体缓冲体系,调整抗体浓度为 1 mg/mL。吖啶酯用无水 N,N-二甲基甲酰胺配制成 3 mg/mL 的溶液。取 500 μ L 抗体溶液,加入一定量的吖啶酯溶液,室温避光振荡反应 40 min。反应结束后用 G25 脱盐纯化柱纯化后加入等体积甘油,储存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.3.2 羧基磁珠偶联 CEA 捕获抗体 取 1 mL 浓度为 10 mg/mL 的羧基磁珠于 EP 管中,磁力架磁性分离磁珠和保存液,移液枪移除上清液,加入 1 mL MES 缓冲液,反复清洗 2 次后混合重悬于 1 mL MES 缓冲液中。重悬液中依次加入 EDC 和 NHS 活化剂,置于混匀仪中反应 30 min,反应结束后置于磁力架中静置,移除上清液,加入 1 mL MES 缓冲液,反复清洗 2 次。清洗结束,加入 0.5 mL MES 缓冲液重悬,再加入 0.5 mL 预处理的 CEA 捕获抗体,置于混匀仪中反应 120 min。反应结束后,用 1 mL MES 缓冲液反复清洗 3 次。加入磁珠封闭液封闭 120 min 后用 1 mL MES 缓冲液反复清洗 3 次,加入磁珠保存液于 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.3.3 CEA 校准品配制 新生牛血清中加入 0.1% ProClin 300,混匀仪混匀 60 min 后制备成校准品稀

释液,经雅培 i2000 全自动化学发光免疫分析仪检测 CEA 浓度低于检测下限,可用作 CEA 校准品的配制。将 CEA 用校准品稀释液分别配制成浓度为 0.0、1.0、2.5、50.0、100.0、1 000.0 ng/mL 的校准品,各浓度使用雅培 CEA 检测系统进行标定,溯源至国际标准品 NIBSC73/601。

1.3.4 检测方法设定 使用 SMART 500 全自动化学发光免疫分析仪设定检测程序,将 20 μ L 标本、包被在羧基磁珠上的 CEA 捕获抗体、吖啶酯标记的 CEA 标记抗体加入到反应杯中,37 $^{\circ}$ C 恒温条件下孵育反应一定时间形成磁珠-CEA 捕获抗体-抗原-CEA 标记抗体-吖啶酯复合物。利用磁场吸引复合物,清洗液洗涤后,加入 100 μ L 预激发液和 100 μ L 激发液。免疫复合物中的吖啶酯在两种试剂的作用下会形成激发态中间体,激发态回到基态时会发出恒定波长的可见光,通过 SMART 500 全自动化学发光免疫分析仪中的传感器可检测到反应过程中的发光强度。发光强度与标本中的 CEA 浓度在线性范围内呈正相关,四参数 Logistic 方程进行拟合后,即可计算得到血清标本中 CEA 的浓度。

1.3.5 羧基磁珠偶联 CEA 捕获抗体浓度及工作浓度的筛选 采用棋盘实验法。分别向 10 mg 磁珠中加入 0.05、0.10、0.20 mg 的 CEA 捕获抗体进行偶联,分别按照 200:1、100:1、50:1 的质量比进行偶联(因素 A)。每个羧基磁珠偶联物,其工作浓度分别按照 1:5、1:10、1:20 的稀释比例进行稀释(因素 B),采用双因素交叉实验,评估校准品拟合的线性及校准品 1(S_1)与零浓度校准品(S_0)信噪比(S_1/S_0)。

1.3.6 吖啶酯标记 CEA 检测抗体浓度及工作浓度的筛选 采用棋盘实验法。分别向 5 μ g 吖啶酯试剂中加入 25、50、100 μ g 的 CEA 检测抗体进行标记,分别按照 1:5、1:10、1:20 的质量比进行标记(因素 A)。每个浓度的标记物其工作浓度分别按照 1:500、1:1 000、1:2 000 的比例进行稀释(因素 B),采用双因素交叉实验。评估校准品拟合的线性和 S_1/S_0 。

1.3.7 反应时间选择 确定了羧基磁珠偶联 CEA 捕获抗体、吖啶酯标记 CEA 检测抗体的工作浓度后,进一步探究最佳的反应时间。设定反应时间分别为 5、8、10、15 min,通过评估不同时间下校准品的回归曲线选择最佳反应时间。

1.4 统计学处理 采用 Excel2019 及 SPSS20.0 软件进行数据处理及统计分析。呈偏态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用配对 Wilcoxon 符号秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 方法学建立

2.1.1 羧基磁珠偶联 CEA 捕获抗体浓度及工作浓度确定 随着 CEA 捕获抗体浓度的升高,其线性相关系数(r)呈升高趋势。随着羧基磁珠浓度的升高,

信噪比随之降低。因此,根据 CEA 校准曲线的线性和信噪比情况,筛选出最优的偶联条件为羧基磁珠与 CEA 捕获抗体质量比为 100 : 1,羧基磁珠工作浓度为 1 : 10,在该条件下其 r 值和信噪比最优,并且原料用量较少。见表 1。

表 1 不同包被浓度及稀释比例的选择			
包被浓度(因素 A,mg)	稀释比例(因素 B)	信噪比	r
0.05	1 : 5	2.5	0.998 3
	1 : 10	2.7	0.998 9
	1 : 20	2.4	0.999 2
0.10	1 : 5	3.2	0.999 9
	1 : 10	3.6	0.999 8
	1 : 20	3.0	0.999 7
0.20	1 : 5	3.8	0.999 8
	1 : 10	3.1	0.999 8
	1 : 20	2.5	0.999 7

2.1.2 吡啶酯标记 CEA 检测抗体浓度及工作浓度确定 吡啶酯标记的 CEA 偶联物稀释至 1 : 1 000 时,其信噪比降低,在稀释比例为 1 : 1 000 时,标记物的线性和信噪比能达到最优。因此,筛选出最优偶联条件为吡啶酯与 CEA 检测抗体质量比为 1 : 10,吡啶酯标记的 CEA 偶联物的稀释比例为 1 : 1 000 时,其校准曲线拟合的 r 值和信噪比最优,并且原料用量较少。见表 2。

表 2 不同标记物浓度及稀释比例的选择			
标记比例(因素 A)	稀释比例(因素 B)	信噪比	r
1 : 5	1 : 500	3.7	0.998 3
	1 : 1 000	4.5	0.998 2
	1 : 2 000	4.1	0.998 1
1 : 10	1 : 500	3.7	0.999 8
	1 : 1 000	4.1	0.999 9
	1 : 2 000	3.5	0.999 8
1 : 20	1 : 500	3.6	0.999 9
	1 : 1 000	4.1	0.999 7
	1 : 2 000	3.5	0.999 6

2.1.3 反应时间确定 设定反应时间分别为 5、8、10、15 min,评估不同时间下校准品的回归曲线,结果见图 1。随反应时间的延长,校准品各个浓度点的相对发光值也随之升高,升高到一定时间后基本达到平衡,为实现临床快速检测,因此反应时间选择 10 min。

2.2 试剂性能评价

2.2.1 空白限检测 用 S_0 作为标本进行检测,重复测定零浓度校准品 20 次,得到 20 次测量结果的相对发光值(RLU),计算其平均值(\bar{x})和标准差(s),得出 $\bar{x} \pm 2s$,将($\bar{x} \pm 2s$)代入校准品曲线公式,计算得出对应的浓度值为 0.2 ng/mL,即为本方法的空白限。

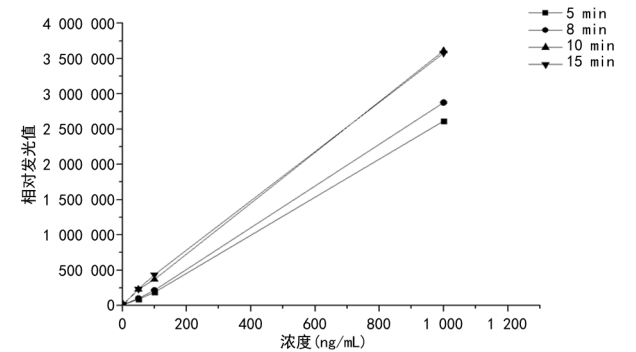


图 1 不同反应时间下的校准品相对发光值

2.2.2 线性范围 接近线性范围上限的 CEA 高浓度标本和接近线性范围下限的 CEA 低浓度标本混合成 5 个稀释浓度(x_i)(包括下限、中限及上限),即配制浓度为 0.40、200.16、400.24、600.16、800.08、1 000.00 ng/mL 的线性参考品,每个稀释浓度测试 3 次,分别求出测定结果的均值(y_i)。以稀释浓度(x_i)的对数为自变量,以测定结果均值(y_i)的对数为因变量拟合线性,见图 2,根据拟合的线性方程,结果表明本方法在 0.4~1 000.0 ng/mL 范围内的 r 为 0.999 6,线性范围符合行业标准要求。

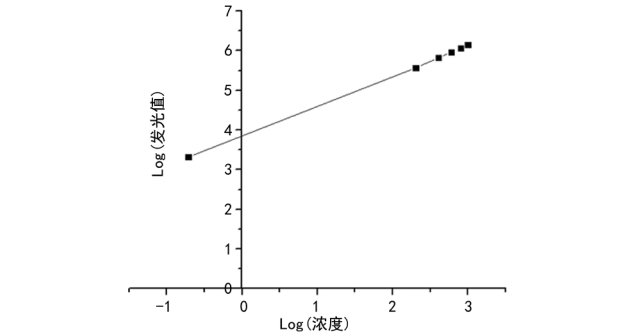


图 2 线性范围实验结果

2.2.3 准确度 取已知浓度的高浓度 CEA 标本(浓度记为 X_s)和已知浓度的低值血清标本;将参考品与低值血清标本以 1 : 9 的体积比进行混合,然后分别检测低值血清标本和混合标本,每个标本重复检测 3 次,计算检测结果的平均值 X_0 和 X 。根据公式回收率(P)= $(10X - 9X_0) / X_s \times 100\%$ 计算出 P ,本方法的 P 为 102.70%,说明 P 在 85.00%~115.00% 范围内,符合准确度要求。

2.2.4 精密度 配制预期浓度为 100 ng/mL 和 10 ng/mL 高、低两个浓度的样品,分别重复检测 10 次,计算高、低两个浓度的批内精密度,见表 3。重复 3 次实验,分别统计高、低两个浓度的 30 次检测结果并计算高、低两个浓度的批间精密度,见表 4,结果显示,本检测方法批内精密度分别为 5.12%、5.17%,批间精密度分别为 5.60%、5.52%,这一结果表明本检测方法的精密度均优于行业标准要求。

2.2.5 HOOK 效应 使用 CEA,配制浓度为 160 000、120 000、60 000、30 000、15 000、1 000 ng/mL 的 CEA 高值标本。同时配制后的高值标本,

制作浓度相对发光值曲线,见图 3,分析曲线可知,当 CEA 浓度超过 120 000 ng/mL 时出现拐点,说明 CEA 浓度最高达到 120 000 ng/mL 时,未出现 HOOK 效应。

表 3 批内精密度($n=10$,ng/mL)				
质控编号	质控浓度	测定均值	标准差	CV(%)
QC I	10	9.68	0.50	5.12
QC II	100	100.42	5.19	5.17

表 4 批间精密度($n=30$,ng/mL)				
质控编号	质控浓度	测定均值	标准差	CV(%)
QC I	10	9.92	0.56	5.60
QC II	100	97.98	5.41	5.52

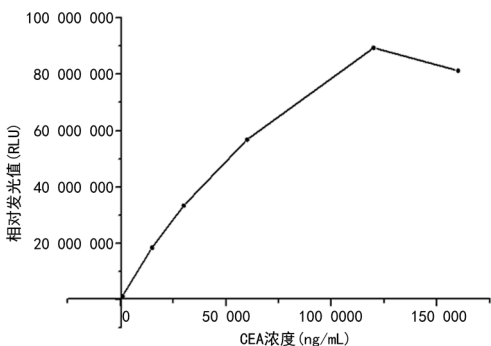


图 3 HOOK 效应浓度-RLU 值曲线

2.2.6 与雅培 CEA 检测系统比对 使用雅培 CEA 检测系统,与本法同时测定 200 份临床血清标本 CEA 浓度,二者相关性见图 4,相关性方程为 $Y=1.004\ 6X+0.073\ 4$, $r=0.994\ 9$ 。通过分析这两种方法的标本检测结果比较,差异无统计学意义($P=0.468$)。结果表明,本方法与雅培 CEA 检测系统临床标本结果的相关性较好。

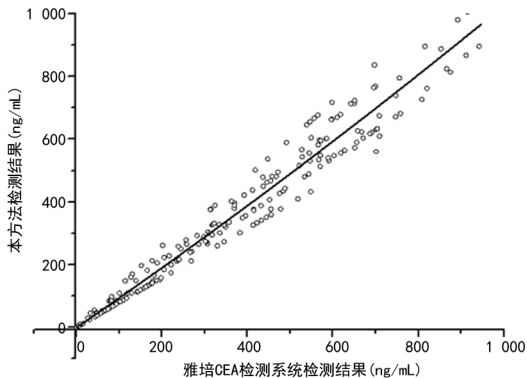


图 4 两种试剂盒测定结果的相关性

3 讨 论

化学发光免疫分析法是一种高灵敏度、高特异度的检测方法,即将高灵敏度的化学分析方法和高特异度的免疫学反应相融合的一项技术,符合临床检验需求。化学发光免疫分析法以其线性范围宽、灵敏度高、特异度高、精确定量等优势,逐步替代传统的酶联免疫吸附试验和定性产品,同时早期的微孔板式化学

发光法也逐步被磁微粒化学发光技术所取代^[6-7]。从目前化学发光法市场占有率和主流技术应用看,非酶参与的直接化学发光免疫分析法、电化学发光法占比高于酶促化学发光法,直接化学发光法标记物相对分子质量很小,便于对小分子物质进行标记,能检测的项目多于酶促化学发光法,在临床检验中应用更广泛。以吖啶酯标记的化学发光免疫分析法属于直接化学发光法,体系标记简单,无需酶催化和增强剂的作用,能明显降低化学发光背景值,提高信噪比,干扰作用少,同时,还表现出光释放集中迅速、发光强度和发光效率高的特点^[8],此外,由于其相对分子质量较小,易与抗体结合,且对抗体构像影响小,标记后比较稳定,现如今在直接化学发光免疫分析法中成为主流。

在一般情况下,CEA 能够通过胃肠道代谢作用,维持一种动态平衡,并处于较低浓度。在恶性肿瘤发生、发展过程中,血清中的 CEA 可进入血液循环,因此,在胰腺癌、肺癌、结肠腺癌、肝细胞癌和胃癌患者血清中 CEA 浓度明显升高^[9]。CEA 作为临床试验中的肿瘤标志物,已逐渐成为临床上诊断肿瘤的重要辅助指标之一,定量检测血清中的 CEA 浓度在恶性肿瘤手术后的疗效评估及预后观察中发挥重要作用^[10-11],另外,CEA 也可辅助检测用于部分癌症患者的靶向治疗^[12]。目前,临床上用于检测 CEA 的手段方法多样,同时也有不少研究对 CEA 检测方法进行了报道。薛盼等^[13]构建了基于辣根过氧化物酶(HRP)催化发光的 CEA 分析检测方法,该方法可基本满足医院检测,但是由于 HRP 不及碱性磷酸酶(ALP)稳定^[14],目前大多数试剂厂家将 HRP 体系更换为更加稳定的 ALP 体系。李雪萌^[15]构建了一种基于纳米材料的 CEA 荧光免疫检测方法,该方法的优点是设备更加小巧便携,操作更加灵活,但在准确度、灵敏度及抗背景干扰等性能方面不及化学发光法。周齐洋等^[16]报道了基于链霉亲和素-生物素体系的 CEA 直接发光检测方法,该方法性能出色,各项技术指标均达到国家标准要求,但是该方法用的主要试剂均为进口试剂,且仪器为封闭系统。

本研究成功建立了基于磁微粒化学发光系统的 CEA 定量检测方法,并应用所建立的方法与雅培 CEA 检测系统同时检测 200 份临床血清标本。本方法性能评估结果显示,所建立方法的空白限、准确度、线性范围、批内精密度、批间精密度等性能指标均满足行业标准,与雅培 CEA 检测系统临床标本结果的相关性较好,说明本研究所研制的 CEA 定量检测方法达到了临床诊断的要求。本研究采购的大部分主要原料为国产试剂,生产成本较低,可降低检测费用。此外,本研究中 CEA 定量检测方法使用仪器为国产开放式全自动化学发光免疫分析仪,适宜国内临床推广,有助于推进国内诊断试剂国产化。(下转第 1045 页)

酸、维生素 B-(12)及 25-羟基维生素 D-3 水平的临床研究[J]. 中国现代医生, 2018, 56(12): 48-50.

[11] 王丹,殷梅. 性激素与缺血性脑卒中关系的研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(23): 4689-4693.

[12] 李海侠,龚美亮,邓新立,等. 中国老年人维生素 D 水平多中心调查分析[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(1): 39-44.

[13] 单娜,孙凡,赵丽. 血清 25-羟维生素 D、维生素 B12 及同型半胱氨酸水平与老年急性缺血性脑卒中患者认知功能障碍及复发的相关性分析[J]. 川北医学院学报, 2021, 36(3): 347-351.

[14] 陈小飞,詹峰,许治本,等. 血浆 CA-125、D-D、25-(OH)D3 水平预测 STEMI 患者 MVA 的价值对比[J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(4): 532-537.

[15] 张素洁,居漪,李卿,等. 健康人群血清 25-羟基维生素 D 水平分析[J]. 检验医学, 2020, 35(10): 1028-1031.

[16] 王涛,张洁,祁范范,等. 不同糖耐量人群血清 25(OH)D3 水平及与胰岛 β 细胞功能的关系[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2016, 36(4): 226-229.

[17] 王芊,刘婷,郑柳,等. IMA、Hcy、Lp(a)及 Lp-PLA2 在动脉硬化疾病中的水平差异分析[J]. 西南国防医药, 2020, 30(9): 796-799.

[18] DING X J, CHEN Y, DUAN X, et al. The correlation be-

tween serum Hcy level and clinical indicators in systemic lupus erythematosus patients[J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2019, 50(4): 619-621.

[19] ZHANG H, WANG B, YE Y, et al. A ratiometric fluorescent probe for simultaneous detection of Cys/Hcy and GSH[J]. Org Biomol Chem, 2019, 17(44): 9631-9635.

[20] LIU W, WANG T, SUN P, et al. Expression of Hcy and blood lipid levels in serum of CHD patients and analysis of risk factors for CHD[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(3): 1756-1760.

[21] PU H, HUANG Z, SUN D W, et al. Recent advances in the detection of 17 β -estradiol in food matrices: a review[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019, 59(13): 2144-2157.

[22] RIEDER J K, DARABOS K, WEIERICH M R. Estradiol and women's health: considering the role of estradiol as a marker in behavioral medicine[J]. Int J Behav Med, 2020, 27(3): 294-304.

[23] LI H J, MARTINEZ P E, LI X, et al. Transdermal estradiol for postpartum depression: results from a pilot randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. Arch Womens Ment Health, 2020, 23(3): 401-412.

(收稿日期: 2021-10-21 修回日期: 2022-01-10)

(上接第 1040 页)

参考文献

[1] 何伟明,卢光兴,梁碧玉,等. 肿瘤标志物联合检测在消化系统肿瘤中的研究现状及应用前景[J]. 中国全科医学, 2018, 569(14): 1750-1756.

[2] 巩晓瑞,马锐. 肿瘤标志物的临床意义及研究进展[J]. 医学与哲学, 2018, 39(12): 52-56.

[3] 董佳,刘安娜,王厚照. 吸烟对男性血清癌胚抗原含量的影响[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(24): 2760-2761.

[4] 陆龙飞,葛胜祥,张军. 化学发光免疫分析法研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(5): 289-295.

[5] QIN X, CHUN X X. Research progress on chemiluminescence immunoassay combined with novel technologies[J]. Trends Analyt Chem, 2020, 124: 115780.

[6] LUCYNA H G, BARTLOMIEJ F, JUSTYNA C, et al. A novel chemiluminescent immunoassay for detection of Toxoplasma gondii IgG in human sera[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2016, 85(4): 422-425.

[7] FU H J, YUAN L P, SHEN Y D, et al. A full-automated magnetic particle-based chemiluminescence immunoassay for rapid detection of cortisol in milk[J]. Anal Chim Acta, 2018, 1035: 129-135.

[8] 李泓彦,何志强,刘莉莉. 吡啶酯发光免疫分析技术的研究与发展[J]. 生物技术世界, 2016, 14(5): 325.

[9] 周常富,纪金星. 四种常见肿瘤标志物联合检测在肝胆系统良恶性疾病中的临床价值[J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(35): 3161-3166.

[10] HALL C, CLARKE L, PAL A, et al. A review of the role of carcinoembryonic antigen in clinical practice[J]. Ann Coloproctol, 2019, 35(6): 294-305.

[11] 王鹏,江晓华,冉凤伟,等. 多种血清肿瘤标志物在转移性乳腺癌中的诊断价值及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(21): 2595-2598.

[12] 鄢丽敏,张志勇,闫继东,等. 肺腺癌表皮生长因子受体基因突变与血清肿瘤标志物的关系[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(7): 1056-1058.

[13] 薛盼,章竹君,张晓明,等. 化学发光免疫分析检测人血清中的癌胚抗原[J]. 分析化学, 2011, 39(1): 95-98.

[14] MITCHELL H T, NOXON I C, CHAPLAN C A, et al. Reagent pencils: a new technique for solvent-free deposition of reagents onto paper-based microfluidic devices[J]. Lab Chip, 2015, 15(10): 2213-2220.

[15] 李雪萌. 基于纳米材料的癌胚抗原荧光免疫分析方法的构建[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.

[16] 周齐洋,王楠,陈秀发,等. 测定癌胚抗原的吡啶酯化学发光免疫分析方法的建立[J]. 标记免疫分析与临床, 2013, 20(6): 451-454.

(收稿日期: 2021-10-10 修回日期: 2021-12-28)