



化学发光免疫分析方法与应用进展

汪晨 吴洁 宗晨 徐洁 鞠焜先*

(南京大学生命分析化学国家重点实验室, 南京 210093)

摘要 化学发光免疫分析方法具有选择性好、灵敏度高、分析速度快、设备简单等特点, 在环境、临床、食品、药物检测等领域得到了广泛应用。在实际应用中, 常常需要对大量复杂样品或低丰度分析物样品进行测定。而经典商品化的免疫分析方法所需时间长、样品消耗多、成本高, 不能满足上述要求。因而建立快速、高通量、高灵敏和低成本的免疫检测方法已成为化学发光免疫分析方法的研究热点和发展趋势。本文简要总结近5年来化学发光免疫分析方法的研究进展及其应用, 并展望其发展方向。

关键词 化学发光免疫分析; 免疫传感; 快速检测; 多通道检测; 评述

1 引言

近年来, 化学发光免疫分析方法由于其具有灵敏度高、特异性强、适用面广、所需设备简单、线性范围较宽等优点, 日益受到人们的青睐^[1-5]。在生命科学、临床医学以及环境、食品、药物等领域得到广泛应用^[6,7]。免疫分析过程所涉及的免疫反应主要是抗原与抗体间的识别。这些生物分子的体积大、扩散速率小, 且由于对识别位点的空间阻碍作用, 受传质速率和反应动力学控制的免疫反应速率一般比较低。因而传统的免疫分析方法需要较长的温育时间, 常常需要数小时才能完成整个分析过程, 大大限制了样品通量和应用范围。为缩短免疫分析的时间, 研究工作者已设计了不同的方法, 通过提高传质速率和反应动力学来实现快速免疫检测, 从而扩展化学发光免疫分析的应用范围。

在实际应用中, 经常涉及到复杂体系多组分的测定。如在临床肿瘤诊断中, 由于肿瘤标志物的特异性不足, 常选择几种肿瘤标志物组成标志物组, 通过联合检测提高临床诊断的特异性^[8,9]; 又如在环境监控中, 经常需要同时监测天然水体中多种杀虫剂与除草剂的浓度指标, 以综合评价环境污染状况^[10,11]。测定混合体系中多组分的含量通常只能采用多次单组分分析法, 这种方法所需时间长、试剂消耗多、工作量过大。多组分同时或顺序检测具有分析通量高、所需时间短、样品消耗少、分析成本低等突出优点, 已成为近年来的研究热点。已报道的新型化学发光多组分免疫分析方法中, 有的通过设计芯片^[12-17]结合流动注射、电感耦合元件 (CCD) 技术达到多组分测定; 有的利用固相载体的特性, 通过温度分辨模式^[18]达到同时检测的目的。

另一方面, 在实际应用中, 常常需要检测低丰度分析物样品, 发展高灵敏的化学发光免疫分析方法, 是近年来免疫分析方法发展的主要方向。降低噪音和增强信号是提高免疫分析灵敏性的主要途径。降低噪音主要用小蛋白对生物功能界面进行封闭, 以防止干扰物的非特异性吸附。免疫分析信号增强技术主要集中在功能界面的构建与信号探针放大两个方面。随着纳米技术的发展, 纳米材料, 如金纳米粒子、碳纳米管、碳纳米角、SiO₂ 纳米粒子、量子点以及它们的复合纳米结构, 已用于超灵敏免疫传感器的构建, 纳米粒子在生物标记分析中的广泛应用取得了突破性的进展^[19,20]。一些纳米粒子不仅可以作为模拟酶直接催化化学发光反应^[21-24], 还可以用来负载大量的酶, 通过酶催化反应实现信号放大^[25-31], 使纳米技术在高灵敏化学发光免疫分析中得到广泛应用, 也促进了化学发光免疫分析的快速发展。

本文简要介绍了化学发光免疫分析方法的原理, 总结了近几年来化学发光免疫分析方法的研究进

2011-07-02 收稿; 2011-09-10 接受

本文系国家重大基础研究发展计划项目 (No. 2010CB732400)、国家自然科学基金 (Nos. 20875044, 20821063, 21075055) 和江苏省自然科学基金 (No. BK2008014) 资助

* E-mail: hxju@nju.edu.cn

展 并就化学发光免疫分析方法的前景进行了展望。

2 化学发光免疫分析法

化学发光分析是根据化学反应产生的辐射光的强度来确定物质含量的分析方法。化学发光免疫分析是将化学发光系统与免疫反应相结合,用化学发光相关的物质标记抗体或抗原,与待测的抗原或抗体反应后,经过分离游离态的化学发光标记物,加入化学发光系统的其它相关物产生化学发光,进行抗原或抗体的定量或定性检测。化学发光免疫分析中使用最多的4类标记物为鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物、吖啶酯衍生物、过氧化物酶和碱性磷酸酶。

以酶为标记物的化学发光仍然是化学发光免疫分析的主流,辣根过氧化物酶(HRP)与碱性磷酸酶(ALP)是两种常见的标记酶,均有其相应的化学发光底物,在临床检验中有广泛应用,开发催化活性更高、稳定性更好、发光动力学曲线更符合免疫分析的酶和底物是化学发光免疫分析的研究热点之一。

标记技术是现代免疫分析的关键技术之一。新的标记免疫分析技术,在环境监测^[32,33]、临床诊断^[34,35]、食品安全^[36,37]、药物分析^[38,39]与微生物检验^[40,41]等领域得到了广泛应用,展示了良好的应用前景。由于纳米粒子具有良好的生物相容性和信号放大效果,纳米技术广泛用于生物标记,例如,金纳米粒子(AuNPs)可以用于标记抗体,增强鲁米诺过氧化氢体系的化学发光^[23,24]。量子点是一种能够接受激发光产生荧光的半导体纳米颗粒,不易失活、受外部环境的影响小、性质稳定、重现性好,且比化学发光免疫分析法常用标记酶具备更好的光学特性,成本也相对较低。Huang等^[42]用化学发光作为能量供体,激发量子点发光,实现了基于化学发光能量转移的灵敏检测。

化学发光免疫分析方法既具有化学发光分析的高灵敏性,又具有免疫反应的高度特异性。在临床诊断、食品安全及环境监测等领域有广泛的应用和前景^[43-45]。

3 化学发光免疫分析方法的应用

3.1 快速化学发光免疫分析方法

传统的免疫分析方法常常需要数小时才能完成,长的温育时间还导致免疫试剂在管道内壁的吸附,增加了不同测定之间的信号交叉,因而限制了样品的检测通量和免疫分析方法的应用价值。为了克服这些不足并实现免疫分析的高通量,可通过外场驱动或对溶液进行有效混合策略加快抗原、抗体等生物大分子的传质速率,或提高反应体系的温度来加速免疫反应的动力学,从而实现快速免疫检测。

提高传质速率的方法有电场驱动^[46]、电磁搅拌^[47]、改变电渗流^[48]、超声波驱动^[49]等方法。2007年, Morozov等^[50]结合电场驱动和磁场富集的方法,构建了一个微流控器件,在流通池内施加一定的电压,使带有电荷的待测物向微阵列表面移动,同时在温育过程中用磁铁将标记有磁珠的分子探针富集在微阵列的表面。这种双重加速的方法使整个分析过程在3 min内完成。

外力驱动的加速方式都需要附加设备, Yang等^[51]在免疫反应过程中,匀速通入氮气形成微气泡,可使温育时间缩短一半(图1)。这种微气泡加速免疫反应的方法简单灵活,成本低廉,可使整个分析流程,包括预温育和免疫传感器的再生,16 min即可完成。

利用通道的几何形状促使流体混合,同样可以加速免疫分析^[52]。当流体经过一个弧形的管道,由于离心力的作用,会产生截面上的横向二次流动,从而产生混合作用。Liu等^[53]设计了一种三维螺旋玻璃管用于温育过程,温育液在管内流动产生湍流现象,加速了免疫试剂的混合,从而加速免疫反应。提

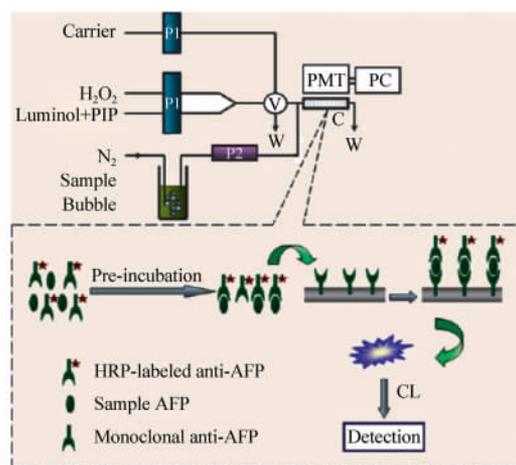


图1 微气泡加速化学发光免疫分析方法^[51]

Fig. 1 Micro-bubble accelerated immunoreaction for fast flow-injection immunoassay^[51]

高免疫反应动力学是加速免疫分析的另一重要因素。红外辐射可以快速加热和控制温度^[54, 55]。结合了三螺旋玻璃管和可控红外加热石英管的温育系统(图 2), 通过双重加速免疫反应, 可使免疫反应在 90 s 内完成, 所有的分析步骤在 3 min 内完成。

3.2 多组分化学发光免疫分析方法

在单个分析流程中同时实现多组分的检测, 具有分析通量高、所需时间短、样品消耗少、分析成本低等突出优点^[56], 是免疫分析长期追求的目标, 也是近年来免疫分析的研究热点。多组分免疫分析模式主要有多组分同时检测模式和顺序检测模式两种。同时检测模式常结合空间分辨技术与阵列检测器实现对多个待测物进行同时检测, 顺序检测则是在一段时间内对多个组分逐个进行检测。近年来, 基于电极阵列和多通道电化学工作站的安培免疫传感器阵列在多组分免疫分析领域得到了广泛的应用。而随着顺序注射多组分分析中主要问题的解决, 多组分化学发光免疫分析方法得到了快速发展。

Fu 等^[14]提出了底物区带分辨化学发光多组分免疫传感系统, 在单个分析流程中检测两种肿瘤标志物: 癌胚抗原 125 (CA125) 和癌胚抗原 (CEA)。将两种肿瘤标志物的捕获抗体同时固定于醛基活化的 UltraBind™ 膜上, 构成免疫反应器, 然后将样品、HRP 标记的 CA125 抗体与 ALP 标记的 CEA 抗体注入免疫反应器进行在线温育, 在夹心免疫反应后依次通入 HRP 与 ALP 的化学发光底物区带, 实现两种肿瘤标志物的类同时检测。该研究组还提出了通道分辨的概念^[15], 发展了一套自动化的流通式化学发光多组分免疫传感系统。该系统利用移动光门分别检测 3 个通道中的化学发光信号, 实现 3 种肿瘤标志物的类同时检测。随后他们进一步结合通道分辨和底物分辨技术, 提出了二维分辨新概念^[16], 设计了双通道流通池, 用于化学发光多组分免疫分析, 可同时检测 4 种肿瘤标志物(图 3)。该研究组为了克服检测组分数不足的缺点, 进一步设计了进样分辨^[57]和支持物分辨技术^[58]。进样分辨化学发光多组分免疫分析基于异相夹心免疫分析, 以环氧基修饰的磁性微珠作为固定捕获抗体的载体。它将固定了 4 种捕获抗体的磁珠, 对应的 4 种 ALP 标记的抗体和 4 份待测样品分别装入 4 个装有微型磁搅拌子的小试管中, 在水浴以及磁力搅拌的条件下进行同时温育, 后由 4 个玻璃管道同时进样, 并进行磁性分离和顺序洗涤, 再将 ALP 化学发光底物通入 4 个管道与磁珠混合, 并依次将形成的 4 个通道内的混合物通过检测器进行检测。支持物分辨技术也称为载体分辨技术, 它将捕获抗体分别固定在不同的玻璃管内壁, 将这些玻璃管串联后通入温育混合物, 进行在线温育, 通过一个简单的冲洗步骤, 在不同的玻璃管内形成不同的夹心免疫复合物, 借助移动光门, 顺序采集化学发光信号可以实现多组分的顺序定量。该传感系统为临床应用提供了一个有前景的多组分免疫分析方法。作为免疫固定相, 磁性微球具有大的表面积, 并且便于抗体-抗原复合物从分离介质中分离^[59~62]。Zhang 等^[63]将抗体分别固定在磁性纳米微球上和涂层管上用于检测甲胎蛋白 (AFP), 比较了

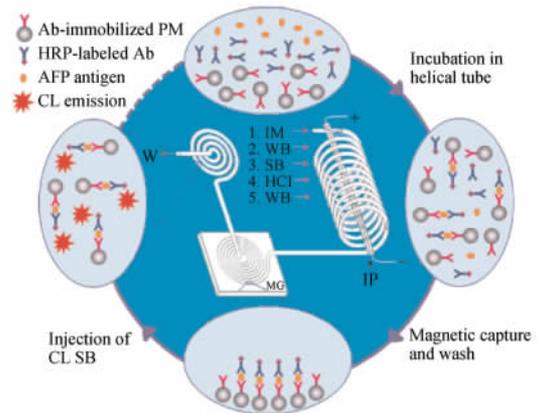


图 2 螺旋管混合、红外加热的双重加速化学发光免疫分析方法^[53]

Fig. 2 Dually accelerated immunoreaction by infrared heating and passive mixing^[53]

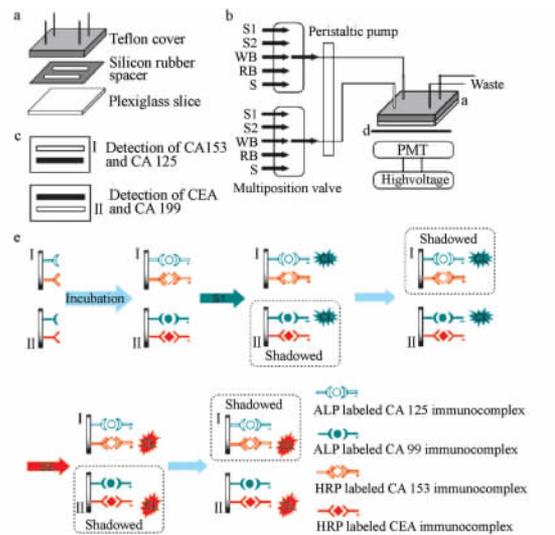


图 3 通道底物二维分辨的化学发光多组分免疫分析方法^[16]

Fig. 3 Channel and substrate zone two-dimensional resolution for multiplex immunoassay of tumor markers^[16]

在线温育通过一个简单的冲洗步骤, 在不同的玻璃管内形成不同的夹心免疫复合物, 借助移动光门, 顺序采集化学发光信号可以实现多组分的顺序定量。该传感系统为临床应用提供了一个有前景的多组分免疫分析方法。作为免疫固定相, 磁性微球具有大的表面积, 并且便于抗体-抗原复合物从分离介质中分离^[59~62]。Zhang 等^[63]将抗体分别固定在磁性纳米微球上和涂层管上用于检测甲胎蛋白 (AFP), 比较了

这两种固相载体的分析优势,并以磁性微球为固相载体检测了 59 种人体血清样本,检测结果与商用方法的结果一致。

近年来,智能水凝胶研究得到发展,其中热敏性水凝胶具有随温度变化而发生溶解和溶胀状态突变的性质。Kang 等^[18]根据这种现象,结合底物分辨技术,将 4 种抗体分成 2 组,分别固定在热敏性的聚 *N*-异丙基丙烯酰胺(PNIP)和磁珠上,升温至“临界析相温度”(35 °C)时 PNIP 沉淀析出;通过磁力分离磁珠后,分别用同一种固定相的抗体结合抗原及不同酶标记的抗体,形成夹心免疫复合物;通入各自对应的化学发光底物,可以顺序检测 4 种不同的抗体,如图 4 所示。这种分辨方式一定的问题,分析过程涉及到繁琐的手动操作,给操作的自动化带来困难,且分析时间较长。

Liu 等^[64]在 96 孔板中进行免疫反应,借助带有旋转轴的化学发光检测仪检测信号,从而实现了操作的自动化,避免了手动操作的繁琐。每个孔的检测时间为 1 s,即只需要 2 min 即可完成 96 种组分的检测。这种顺序检测方法的各组分是按时间顺序依次检测的,如果检测大量的组分,就会产生时间累加的效应,从检测第一个组分到最后一个组分需要间隔很长时间。

空间分辨模式是在免疫反应器的不同区域固定不同组分相应的免疫试剂,使不同组分的免疫反应在不同的空间位置发生,然后以阵列检测器进行检测,以实现多组分的检测。CCD 的应用使得化学发光免疫分析的检测更加方便,同时也促进了化学发光成像检测技术的发展。化学发光免疫分析方法结合 CCD 图像传感器,可以满足在短时间内同时测量大量样品的要求。Urbanowska 等^[65]用 96 孔板作为固相载体固定抗体,用化学发光成像法同时检测 6 种蛋白质。Magliulo 等^[66]设计了一种新型的聚苯乙烯 96 孔微量滴定板,将每个大孔内又分隔成 4 个小孔。每种细菌的单克隆抗体分别固定于小孔中,待测样品加入大孔内,特定细菌会与特定抗体特异性结合,然后向大孔内加入各自的酶标抗体,加入发光底物,用 CCD 积分拍摄,可以同时检测 96 × 4 种样品,如图 5 所示。

将微流控芯片技术应用于化学发光免疫分析,可以拓展免疫分析的应用领域。在微流控芯片上实现阵列式的分析和检测,可以大幅度提高芯片的检测容量,对多种样品进行同时分析,非常适合疾病诊断、药物筛选等方面的应用。Sun 等^[12]设计了一个三维芯片,可以用化学发光图像分析方法同时检测 96 种组分的样品。Wolter 等^[13]克服了传统 CCD 静态检测方法的耗时及不利于自动化等缺点,发展了流动注射化学发光阵列体系。他们将捕获抗体固定在聚乙二醇修饰的芯片上,设计了 6 × 7 的阵列,再用生物素化的抗体识别细菌,最后利用亲和素化的 HRP 与信号抗体结合,催化鲁米诺和 H₂O₂ 的反应,得到化学发光信号。进样以及冲洗过程都采用流动注射技术,控制不同的阀,实现了整个分析过程的自动化。测定所有不同浓度、不同种类的细菌在 13 min 内完成,如图 6 所示。

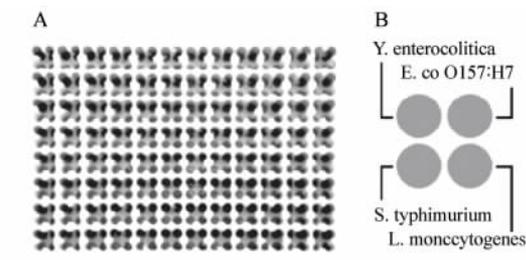


图 5 基于新型 96 孔板的化学发光成像免疫分析方法用于多组分检测^[66]

Fig. 5 New 96 × 4 well microtiter plate for multiplexed chemiluminescent imaging immunoassay^[66]

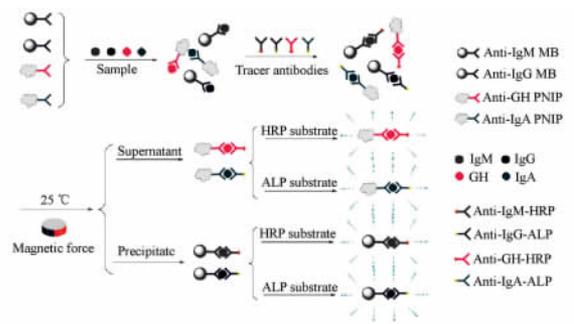


图 4 温度底物二维分辨的多组分化学发光免疫分析方法^[18]

Fig. 4 Homogeneous temperature- and substrate-resolved technologies for CL detection of four proteins^[18]

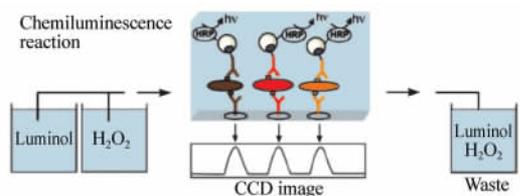


图 6 微流控芯片的化学发光成像免疫分析方法用于三种细菌的检测^[13]

Fig. 6 A flow-through chemiluminescence microarray readout system for the detection of three bacteria^[13]

3.3 高灵敏化学发光免疫分析方法

在实际检测中, 现有的检测手段灵敏度和特异性不够理想, 高灵敏高选择性的检测方法越来越显示出其重要性。纳米技术的发展为高灵敏化学发光免疫分析方法的发展提供了契机, 纳米粒子在生物标记分析得到了广泛应用, 已有多种信号放大方法用于高灵敏免疫分析方法的构建。

Zhang 等^[23]发现不同粒径的 AuNPs 可以增强鲁米诺过氧化氢体系的化学发光, 其中 38 nm 粒径的 AuNPs 增强效果最明显。Wang 等^[24]合成了特殊形状的不规则金纳米粒子(IGNPs), 并且发现 IGNPs 对鲁米诺过氧化氢化学发光体系的催化活性是球状 AuNPs 的 100 倍, 同时他们将抗体固定在 IGNPs 表面, 形成夹心免疫复合物。由于 IGNPs 的催化活性, 在无酶的情况下, 加入化学发光底物即可得到化学发光信号。

Ambrosi 等^[67]提出了双编码的 AuNPs 用于放大免疫分析信号, 即在 AuNPs 表面连接大量 HRP 标记的抗体。由于 HRP 具有催化活性, 因而能显著增强信号。Yang 等^[26]将这种双编码的标记物用于放大化学发光信号, 同时在发光体系中加入增强剂对碘苯酚, 进一步增强信号。以 AFP 为检测模型, 线性范围为 0.008 ~ 0.3 $\mu\text{g/L}$, 检出限为 5 ng/L, 如图 7 所示。AuNPs 的粒径较小, 不能负载足够多的酶, 因而研究者尝试用更多的纳米材料负载大量的酶。Bi 等^[29]采用了多层酶包裹的纳米碳管作为标记物放大化学发光检测信号。先将多壁碳纳米管用酸处理使其表面带有羧基, 用层层组装方法将多层邻苯二甲酸二乙二醇二丙烯酸酯(PDDA)与 HRP 吸附在碳纳米管表面, 标记抗体后进行免疫反应形成免疫复合物。这种层层吸附的方法使得标记物连接了大量的酶, 线性范围为 0.02 ~ 2.0 $\mu\text{g/L}$, 检出限为 8.0 ng/L, 比传统方法低 2 个数量级。

由于酶标抗体的位阻较大, 研究者将酶直接连接到纳米材料表面, 再以一定的比例固定抗体, 既能连接大量酶, 又减小位阻。Wu 等^[30]用 HRP 直接标记硅纳米粒子, 发展了新型高灵敏的免疫检测方法。首先用晶种生长的方法合成 SiO_2 纳米粒子, 粒径为 (103 ± 7) nm, 然后用环氧丙基醚丙基三甲氧基硅烷作为交联剂处理硅纳米粒子, 从而分别连接 HRP 和 AFP 抗体。采用两步夹心免疫法, 第一步免疫反应结束后, 将 HRP 功能化的硅纳米粒子信标注入流通池, 保证免疫反应导入酶量的最大化, 从而实现信号增大。硅纳米粒子还能降低物理吸附, 进一步提高检测灵敏度。检测线性范围为 0.01 ~ 3.0 $\mu\text{g/L}$ 。与传统夹心免疫方法相比, 该方法信号增强了 61 倍, 具备高灵敏度和可重复性。该方法简单方便、低耗、特异性好, 可以推广到临床运用。利用三维有序 SiO_2 纳米多孔膜的高负载量。Yang 等^[68]提出了一种新的高灵敏化学发光免疫分析方法。该多孔的 SiO_2 膜以聚苯乙烯球(PS)为模板, 通过在玻璃片表面自组装沉积 5 nm SiO_2 纳米粒子, 然后煅烧除去模板制得。以 γ -缩水甘油醚丙基三甲氧基硅(GPTMS)为交联剂, 可将 SiO_2 纳米多孔膜进行链霉亲和素的功能化, 与生物素标记抗体结合, 制得的化学发光免疫传感器(图 8)。多孔膜

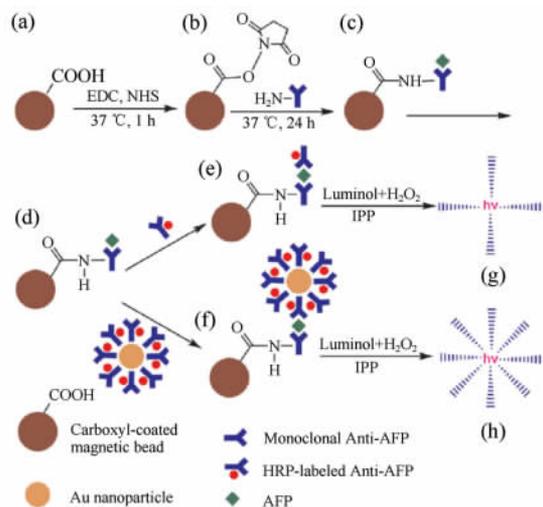


图 7 基于酶标抗体功能化的 AuNPs 信号放大的超灵敏化学发光免疫分析方法^[26]

Fig. 7 Ultrasensitive enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay amplified by double-codified gold nanoparticles labels^[26]

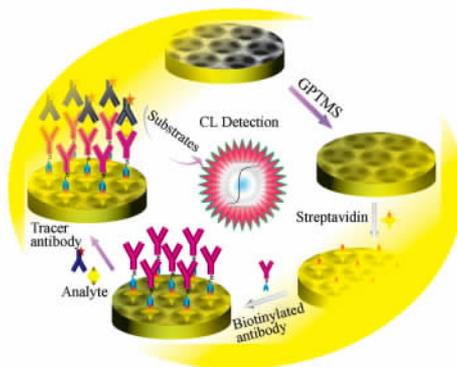


图 8 功能化三维有序 SiO_2 纳米多孔膜为载体的化学发光免疫分析方法^[68]

Fig. 8 Three-dimensional ordered nanoporous silica film for highly efficient chemiluminescent immunosensing^[68]

可以促进免疫试剂的传质,因而制得的化学发光免疫传感器具有宽的检测线性范围、快的分析速度与良好的重现性和稳定性。以糖类抗原(CA 125)为模型分析物,其线性范围为0.5~400 U/mL,可达3个数量级,而不用三维有序SiO₂纳米多孔膜为载体的免疫分析方法,在相同条件下的线性范围仅为5~40 U/mL。

天然酶在保存过程中结构的变化很容易丧失催化活性,纯化天然酶的昂贵代价也制约了它们的应用,而且天然酶的催化活性也会因为大分子肽包埋活性位点而被制约。研究者努力制备人工模拟酶用于信号放大,新型的信号增强技术,如DNA酶放大技术^[69]、滚环扩增法^[70]以及杂交连锁反应^[71]等不断涌现,但目前还没有运用到化学发光免疫检测中,这也为新型化学发光免疫检测方法提供了机遇。

4 发展与展望

化学发光免疫分析法具有选择性好、灵敏度高、分析速度快、设备简单等优点,近年来在环境、临床、食品、药物检测中得到了广泛运用。实际检测常常需要对大量、复杂、低丰度的样品进行测定,因而化学发光免疫分析法逐渐向快速、高通量、高灵敏检测的方向发展。本文总结了近几年化学发光免疫分析法的应用进展,涉及到降低温育时间,多组分检测,以及信号放大技术。这些例子都证明了化学发光免疫分析法具有广泛的应用前景和可操作性。

此外,化学发光成像技术、化学发光免疫分析与分离技术的联用,可以使免疫分析的选择性、灵敏度和检测速度、检测通量得到进一步提高。为了更好地适应临床、环境等领域的实际应用,需要大力发展微型化、集成化和自动化的化学发光免疫分析仪器。随着分子生物学及纳米与传感技术的进步,新的化学发光免疫分析原理与高灵敏的免疫分析方法将得到不断发展,开发催化活性更高、稳定性更好、发光动力学曲线更符合免疫分析的酶和底物并推广到临床检测,发展新型标记技术用于信号放大,建立化学发光免疫分析新方法,都将是未来的发展方向及研究重点。

References

- 1 Roda A, Pasini P, Guardigli M, Baraldini M, Musiani M, Mirasoli M. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2000**, 366(6): 752~759
- 2 Zhao L X, Sun L, Chu X G. *Trends Anal. Chem.*, **2009**, 28(4): 404~415
- 3 Fan A, Cao Z J, Li H, Kai M, Lu J Z. *Anal. Sci.*, **2009**, 25(5): 587~597
- 4 ZHENG Guo-Jin, FANG Lu-Qiu, LI Zhen-Jia, YING Xi-Tang, LIN Jin-Ming. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2011**, 39(1): 62~65
郑国金,方卢秋,李振甲,应希常,林金明. *分析化学*, **2011**, 39(1): 62~65
- 5 Wu J, Fu Z F, Yan F, Ju H X. *Trends Anal. Chem.*, **2007**, 26(7): 679~688
- 6 LIN Jin-Ming, ZHAO Li-Xia, WANG Xu. *Chemiluminescence Immunoassay*. Beijing: Chemical Engineering Press, **2008**: 4~6
林金明,赵利霞,王栩. *化学发光免疫分析*,北京:化学工业出版社, **2008**: 4~6
- 7 XUE Pan, ZHANG Zhu-Jun, ZHANG Xiao-Ming. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2011**, 39(1): 95~98
薛盼,章竹君,张晓明. *分析化学*, **2011**, 39(1): 95~98
- 8 CHENG Jie-Ke. *Analysis of Unicell*. Beijing: Science Press, **2005**: 127~128
程介克. *单细胞分析*.北京:科学出版社, **2005**: 127~128
- 9 LI Tian-Xing. *Modern Clinical Immunology Detection*. Beijing: Military Physic Science Press, **2001**: 167~252
李天星. *现代临床免疫学检验*.北京:军事医学科学出版社, **2001**: 167~252
- 10 Brecht A, Abuknesha R. *Trends Anal. Chem.*, **1995**, 14(7): 361~371
- 11 Samsonova J V, Rubtsova M Y, Kiseleva A V, Ezhov A A. *Biosens. Bioelectron.*, **1999**, 14(3): 273~281
- 12 Sun S, Yang M H, Kostov Y, Rasooly A. *Lab Chip*, **2010**, 10(16): 2093~2100
- 13 Wolter A, Niessner R, Seidel M. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(15): 5854~5863
- 14 Fu Z F, Liu H, Ju H X. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(19): 6999~7005
- 15 Fu Z F, Yan F, Liu H, Lin J H, Ju H X. *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 23(10): 1422~1428

- 16 Fu Z F, Yang Z J, Tang J H, Liu H, Yan F, Ju H X. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(19): 7376 ~ 7382
- 17 Fu Z F, Yan F, Liu H, Yang Z J, Ju H X. *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 23(7): 1063 ~ 1069
- 18 Kang H Y, Miao J R, Cao Z J, Lu J Z. *Analyst*, **2009**, 134(11): 2246 ~ 2252
- 19 Giokas D L, Vlessidis A G, Tsogas G Z, Evmiridis N P. *Trends Anal. Chem.*, **2010**, 29(10): 1113 ~ 1126
- 20 Jain K K. *Clin. Chim. Acta*, **2005**, 358(1): 37 ~ 54
- 21 Duan C F, Cui H. *Chem. Commun.*, **2009**, (18): 2574 ~ 2576
- 22 Zhang Z F, Cui H, Shi M J. *Chem. Commun.*, **2006**, (8): 1017 ~ 1021
- 23 Zhang Z F, Cui H, Lai C Z, Liu L J. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(10): 3324 ~ 3329
- 24 Wang Z P, Hu J Q, Jin Y, Yao X, Li J H. *Clin. Chem.*, **2006**, 52(10): 1958 ~ 1961
- 25 Bi S, Yan Y M, Yang X Y, Zhang S S. *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15(18): 4704 ~ 4709
- 26 Yang X Y, Ying S G, Bi S, Zhang S S. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24(8): 2707 ~ 2711
- 27 Zhong Z Y, Wu W, Wang D, Wang D, Shan J L, Qing Y, Zhang Z M. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 25(10): 2379 ~ 2383
- 28 Cui R J, Huang H P, Yin Z Z, Gao D, Zhu J J. *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 23(11): 1666 ~ 1673
- 29 Bi S, Zhou H, Zhang S S. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, 24(10): 2961 ~ 2966
- 30 Wu Y F, Chen C L, Liu S Q. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(4): 1600 ~ 1607
- 31 Du D, Zou Z X, Shin Y S, Wang J, Wu H, Engelhard M H, Liu J, Aksay I A, Lin Y H. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(7): 2989 ~ 2995
- 32 Yang W P, Zhang Z J, Hun X. *Talanta*, **2004**, 62(4): 661 ~ 666
- 33 Martín-Esteban A, Fernández P, Cámara C. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1997**, 357(7): 927 ~ 933
- 34 Fu Z F, Hao C, Fei X Q, Ju H X. *J. Immunol. Methods*, **2006**, 312(1): 61 ~ 67
- 35 Dai Z, Yan F, Chen J, Ju H X. *Anal. Chem.*, **2003**, 75(20): 5429 ~ 5434
- 36 Micheli L, Grecco R, Badea M, Moscone D, Palleschi G. *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 21(4): 588 ~ 596
- 37 Nandakumar R, Nandakumar M P, Mattiasson B. *Biosens. Bioelectron.*, **2000**, 15(5): 241 ~ 247
- 38 Yang H H, Zhu Q Z, Qu H Y, Chen X L, Ding M T, Xu J G. *Anal. Biochem.*, **2002**, 308(1): 71 ~ 76
- 39 Eremenko A V, Bauer C G, Makower A. *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 358(1): 5 ~ 13
- 40 Ivnitcki D, Abdel-Hamid I, Atanasov P, Wilkins E. *Biosens. Bioelectron.*, **1999**, 14(7): 599 ~ 624
- 41 Ivnitcki D, Abdel-Hamid I, Atanasov P, Wilkins E, Stricker S. *Electroanalysis*, **2000**, 12(5): 317 ~ 325
- 42 Huang X Y, Li L, Qian H F, Dong C Q, Ren J C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45(31): 5140 ~ 5143
- 43 Stanley P E, Kricka L J. *Bioluminescence and Chemiluminescence: Progress and Current Applications*. Singapore: World Scientific, **2003**: 2 ~ 10
- 44 Kricka L J, Stanley P E. *Luminescence*, **2002**, 17(6): 386 ~ 401
- 45 Kricka L J, Voyta J C, Bronstein I. *Bioluminescence and Chemiluminescence*, **2000**, 305: 333 ~ 345
- 46 Wu J, Yan Y T, Yan F, Ju H X. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(15): 6072 ~ 6077
- 47 Luxton R, Badesha J, Kiely J, Hawkins P. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(6): 1715 ~ 1719
- 48 Coleman J T, Mckechnie J, Sinton D. *Lab Chip*, **2006**, 6(8): 1033 ~ 1039
- 49 Yang Z, Matsumoto S, Goto H, Matsumoto M, Maeda R. *Sens. Actuators, A*, **2001**, 93(3): 266 ~ 272
- 50 Morozov V N, Groves S, Turell M J, Bailey C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129(42): 12628 ~ 12629
- 51 Yang Z J, Fu Z F, Yan F, Liu H, Ju H X. *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 24(1): 35 ~ 40
- 52 Oddy M H, Santiago J G, Mikkelsen J C. *Anal. Chem.*, **2001**, 73(24): 5822 ~ 5832
- 53 Liu H, Yang Z J, Yan F, Xu Y M, Ju H X. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(10): 4043 ~ 4047
- 54 Roper M G, Easley C J, Legendre L A, Humphrey J A C, Landers J P. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(4): 1294 ~ 1300
- 55 Slyadnev M N, Tanaka Y, Tokeshi M, Kitamori T. *Anal. Chem.*, **2001**, 73(16): 4037 ~ 4044
- 56 Kricka L J. *Clin. Chem.*, **1992**, 38(3): 327 ~ 328
- 57 Liu H, Fu Z F, Yang Z J, Yan F, Ju H X. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(14): 5654 ~ 5659
- 58 Yang Z J, Liu H, Zong C, Yan F, Ju H X. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(13): 5484 ~ 5489
- 59 Xiao Q, Li H F, Lin J M. *Clin. Chim. Acta*, **2010**, 411(15): 1151 ~ 1153
- 60 Li Z Y, Zhang Q Y, Zhao L X, Li Z J, Hu G M, Lin J M, Wang S. *Sci. China. Chem.*, **2010**, 53(4): 812 ~ 819

