

## 时间分辨荧光免疫分析及其应用前景

中国医学科学院放射医学研究所 赵启仁综述

中国医学科学院首都核医学中心 王世真审

**摘 要:**介绍了时间分辨荧光免疫分析的基本原理、国内外研究现状和应用前景。着重叙述了本法的固有特点及有关理论,以加深对它的理解。

放射免疫分析法的灵敏度高、特异性强,因此它使体内超微量活性物质的分析获得了巨大发展。但是它也有一些缺点,如操作带有放射性;由于核衰变导致标记物存放时间短,以及由于找不到比 $^{125}\text{I}$ 更合适的核素,其灵敏度的进一步提高受到限制等。因此,近年来,非同位素免疫分析法应运而生,发展很快。主要有酶免疫分析、发光免疫分析和荧光免疫分析等,其中被公认最有发展前途的一种是八十年代初发展起来的时间分辨荧光免疫分析(TrFIA)。它用镧系元素作为示踪物标记抗原或抗体,利用时间分辨荧光测定法排除样品中非特异性荧光干扰,从而有效地提高了测量的灵敏度。此外,它的特异性、动态范围、测量速度及标记物的稳定性等均优于其它非放射性免疫分析法。不少作者对其概念、成就和前景作了评述<sup>[1-5]</sup>。

### 基本原理

TrFIA是利用具有双功能基团结构的螯合剂将镧系元素标记到抗原(或抗体)上,经免疫反应,与抗体(或抗原)形成免疫复合物。由于结合于免疫复合物的镧系元素能发出荧光,故分离除去未结合的成分后,利用时间分辨荧光仪即可测量样品中镧系元素发射的荧光强度,从而确定待分析物的量。

TrFIA有两种分析系统,第一种称为解离增强镧系荧光免疫分析(DELFIA)。

此法需要具有双功能基团结构的螯合剂,使其一端与镧系元素联结,另一端与抗体分子上的自由氨基联接,制成Eu标记抗体,它与待测样品中的抗原结合成免疫复合物。理想情况下,测定复合物中镧系元素的荧光强度就能确定样品中抗原的量,但实际上这种复合物的荧光强度相当弱,只有再加入一种增强溶液(Enhancement solution),使镧系元素从复合物中解离下来,并为增强液中所含的另一种螯合剂所螯合,形成新的螯合物,从而在紫外等光的激发下发射很强的荧光,增强效果上百万倍。用时间分辨荧光仪测定其荧光强度,即可确定抗原的量。该系统前后用了两种不同的螯合剂,前一种要满足对抗体标记的要求,后一种则要满足荧光测定的要求。

第二种是一次螯合固相分析系统,文献上多称Cyber Fluor分析系统。它经由一种具有双功能基团结构的新型螯合剂BCPDA[4,7-双(氯磺酰基苯基)-1,10-菲咯啉-2,9-二羧酸]把链霉亲和素与镧系元素连接,作为通用试剂。再把抗体与已被活化的生物素结合起来,通过生物素与链霉亲和素的结合,完成抗体的标记<sup>[6-10]</sup>。若用夹心法,最终形成的免疫复合物是抗体<sub>1</sub>-抗原(标准或样品)-(抗体<sub>2</sub>-生物素)-(链霉亲和素-BCPDA-镧系元素)。以固相形式,用Cyber Fluor 615型时间分辨荧光仪测荧光强度,以确定抗原的量。此法特点是利用生

物素链霉亲合素系统的反应生物放大作用和高亲和力特点, 只经一次整合并以固相形式测定荧光强度。

第一种分析系统比较成熟, 但第二种分析系统发展也较快。以下以第一种分析系统为重点加以叙述。

### 镧系元素螯合物的荧光特征

TrFIA中使用的镧系元素有Eu(铕)、

Sm(钐)、Tb(铽)、Nd(钕)和Dy(镝)等, 其中以Eu最为常用。以下叙述以它为例。

Eu等镧系元素被适宜的紫外光吸收配位体(即增强液中的螯合剂)整合, 受到紫外光、激光和氙灯等光的激发而发射荧光时, 有以下特征<sup>[1-3]</sup>: ①激发光与发射光之间有很大的斯托克斯(stokes)位移(见表1), 如 $\text{Eu}^{3+}$ -2-NTA, 其激发光为340nm, 而发射光为613nm, stokes位移为

表1 一些镧系元素螯合物的荧光特征<sup>[3]</sup>

镧系元素离子	配位体	最大激发波长 (nm)	最大发射波长 (nm)	衰变时间 ( $\mu\text{s}$ )	相对荧光强度 <sup>d</sup>
$\text{Sm}^{3+}$	2-NTA <sup>a</sup>	340	600, 643	65	1.5
$\text{Sm}^{3+}$	PTA <sup>b</sup>	295	600, 643	69	0.3
$\text{Eu}^{3+}$	2-NTA	340	613	714	100.0
$\text{Eu}^{3+}$	PTA	295	613	925	36.6
$\text{Tb}^{3+}$	PTA	295	490, 543	96	8.0
$\text{Dy}^{3+}$	PTA	295	573	~1	0.2
$\text{Nd}^{3+}$	BTA <sup>c</sup>	295	830	—	—

a. 2-萘甲酰基三氟丙酮

b. 三甲基乙酰三氟丙酮

c. 本甲酰基三氟丙酮

d. 比较最大发射波长上的积分面积, 以 $\text{Eu}^{3+}$ -2-NTA为100

273nm(图1), 而普通荧光标记仅为28nm, 这样就很容易把激发光和发射光分开; ②激发光谱带较宽, 可增加激发能, 提高灵敏度; ③发射光的谱带很窄, 50%发射的谱带宽度 $<10\text{nm}$ , 这样可以利用 $613 \pm$

5nm附近的通带滤波器, 只允许此波段内荧光通过供测量, 而排除其余波长的荧光, 能量损失也不太大, 而且在此波段内来自生物样品的荧光最小, 从而有效地降低了本底荧光; ④荧光衰变时间长。如 $\text{Eu}^{3+}$ -2-NTA的荧光衰变时间为 $714\mu\text{s}$ , 而 $\text{Eu}^{3+}$ -PTA甚至达到 $925\mu\text{s}$ 。相比之下, 样品中一些蛋白质的荧光衰变时间很短, 仅为 $1 \sim 10\text{ns}$ (表2), 相差5~6个数量级。这样在时间分辨荧光仪上, 当脉冲光源激发之后, 可以适当延迟一段时间, 待血清、溶剂、样品管和其它成分的短半衰期荧光完全衰变后再测量, 使所测到的本底荧光主要来自非特异结合, 从而极有效地降低了本底荧光(图2)。而普通荧光免疫分析所以出现高本底荧光, 主要是由于样品中蛋白质和荧光素两者的发射光谱有较大部分重叠所致; ⑤荧光标记的

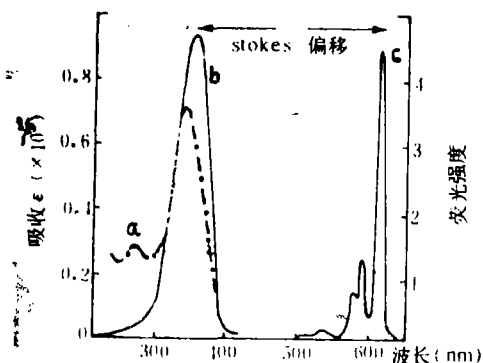


图1 (a)  $\text{Eu}^{3+}$ -2-NTA的吸收光谱;  
(b) 激发光谱; (c) 发射光谱

相对比活性高<sup>[1]</sup>。正是以上这些特点,使TrFIA有很高的灵敏度(表3)和特异性。

表2 一些荧光体和蛋白质的荧光衰变时间<sup>[1]</sup>

荧光物质	荧光衰变时间(ns)
荧光素-异硫氰酸酯	4.5
二氯三嗪氨基荧光素	4.5
丹磺酰氯	14.0
苯胺基萘磺酸	16.0
若丹明B-异硫氰酸酯	3.0
丽丝胺若丹明B磺酰氯	3.0
N-(3-吡)马来酰亚胺	100
人血清白蛋白	4.1
细胞色素C	3.5
球蛋白	3.0
Eu-(β-萘甲酰基三氟丙酮) <sub>3</sub>	500 000

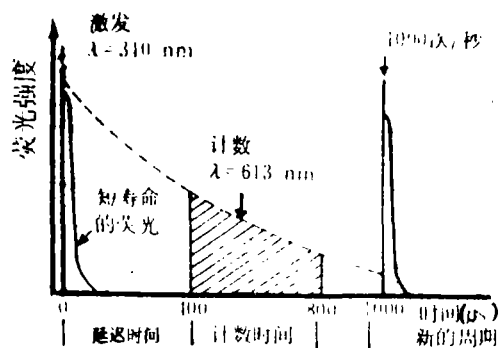


图2 TrFIA测量示意图

表3 血清促甲状腺素分析的灵敏度比较<sup>[1]</sup>

分析类型	灵敏度( $\times 10^6$ IU/L)
时间分辨荧光免疫分析	0.02
增强发光免疫分析	0.04
酶免疫分析	0.1
免疫放射分析	0.02~0.1
免疫放射分析	0.07~0.25
放射免疫分析	0.7

## Eu的光谱性质

Eu原子基态的外层电子结构是 $4f^7 6s^2$ 。它失去3个电子后,形成 $4f^7$ 结构稳定的 $\text{Eu}^{3+}$ 。 $\text{Eu}^{3+}$ 与卤化物、磷酸盐、硫酸盐和硝酸盐可形成弱的络合物。在水溶液中, $\text{Eu}^{3+}$ 被8~10个水分子所包围。这些水分子对 $\text{Eu}^{3+}$ 所发荧光有严重的猝灭作用,但可被许多无机或有机的配位体除去。这些配位体还影响络合物的荧光性质。

当用强辐射激发Eu时,Eu自身会发射荧光,但其量子产额很低。只有 $\text{Eu}^{3+}$ 被适宜的螯合剂螯合,才能形成量子产额高的螯合物。它们的一大特征是:配位体在特征波长上吸收辐射,而 $\text{Eu}^{3+}$ 在特征波长上发射辐射。这是由于能量是从配位体转移到 $\text{Eu}^{3+}$ 的。有机配位体吸收能量,使分子处于单线激发态,它或由辐射跃迁(配位体荧光)或由非辐射跃迁从激发态 $S_1$ 返回到基态 $S_0$ ,或者变成三重态 $T_1$ 。三重态分子或者经由 $T_1 \rightarrow S_0$ 辐射(分子磷光)或经非辐射过程返回基态,也可以把能量转移给被激发的金属离子如 $\text{Eu}^{3+}$ 。激发态 $\text{Eu}^{3+}$ 占优势的辐射跃迁是最低激发态 $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ ,发射荧光波长为613nm,这是我们的观察对象。

Eu螯合物的荧光寿命在 $10^3 \sim 10^4$ ns或者更长,主要是由 $\text{Eu}^{3+}$ 的 $^5D_0$ 态的半衰期决定的,虽然它也受配位体、环境温度和存在的试剂的影响。而上述的 $S_1 \rightarrow S_0$ ,  $S_1 \rightarrow T_1$ 等的辐射跃迁则要比 $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ 的辐射跃迁快几个数量级。所以这些跃迁所产生的荧光、磷光并不干扰 $\text{Eu}^{3+}$ 的荧光。

为使上述能量转移过程顺利进行,应满足如下要求:(1)非辐射跃迁及 $S_1 \rightarrow S_0$ 和 $T_1 \rightarrow S_0$ 的辐射跃迁应是最小的;(2)金属离子的共振能级的能量应接近,而且最好略低于配位体三重态的能量;(3)激发态金属离子的无辐射跃迁几率应是最小的。可见能量转移过程与配位体特性密切相关,也就

成为我们寻求良好配位体的重要依据之一。

### 镧系元素Eu标记抗体

制备Eu标记的化合物,需要通过具有双功能基团结构的螯合剂,把 $\text{Eu}^{3+}$ 与抗体连接起来。理想的螯合剂应该是:与 $\text{Eu}^{3+}$ 能形成稳定的络合物;具有以共价键与蛋白质结合的结构;标记抗体后,对抗体的免疫活性、溶解度、稳定性、亲合力或特异性影响不大;与血清成分有最小的非特异结合;在激发波长上有高的消光系数;能把激发能有效地转移到所整合的 $\text{Eu}^{3+}$ 上,且有高的量子产额;易于合成标记所需的衍生物<sup>[3, 5, 7]</sup>。实际上,要同时满足标记抗体和产生高量子产额两方面的要求是有困难的。所以在DELFA系统中,把它们分开处理。先介绍标记用的螯合剂。

用于标记的螯合剂有:N-(P-异硫氰酸苯基)-DTTA<sup>[3]</sup>,氨基苯基-EDTA<sup>[11]</sup>,氨基苯基-四氮杂环十二烷四醋酸<sup>[12]</sup>、异硫氰酸苯甲基-DTTA<sup>[13]</sup>,1-(对-苯双氮)-EDTA<sup>[14]</sup>,二乙烯三胺五醋酸酐<sup>[15]</sup>,异硫氰酸苯基-EDTA<sup>[16]</sup>等。它们有以下特点:①有双功能基团结构;②螯合镧系元素Eu等形成稳定的、在水中溶解度高的螯合物,当金属离子与螯合剂分子为1:1时,稳定常数可达 $10^{10} \sim 10^{22}/(\text{L} \cdot \text{mol})$ ,再加上温和的反应条件,有利于保持抗体的免疫活性;③多羧酸类螯合剂整合Eu的效率高,能提高标记比活性;④ $\text{Eu}^{3+}$ -多羧酸螯合物的荧光很弱,但在低pH时, $\text{Eu}^{3+}$ 可以完全从配位体上解离下来,为下一步被另一种螯合剂整合创造了条件。

不同的螯合剂,标记比活性对抗体免疫活性的影响有明显差异。重氮化氨基苯基-EDTA是首先用于 $\text{Eu}^{3+}$ 标记的,当标记的比活性大于 $5\text{Eu}^{3+}/\text{IgG}$ 时,会引起抗体凝集,免疫活性下降。但是当用异硫氰酸基取氮代基时,即使比活性达到 $15 \sim 20\text{Eu}^{3+}/$

$\text{IgG}$ ,也不会影响免疫活性和在水中的溶解度。P-异硫氰酸苯基-DTTA的 $\text{Eu}^{3+}$ 螯合物比相应的EDTA衍生物更稳定,且在低pH下解离 $\text{Eu}^{3+}$ 也更快。特别是 $\text{N}_1$ -(P-异硫氰酸苯基)-DTTA的 $\text{Eu}^{3+}$ 螯合物, $\text{Eu}^{3+}$ 的解离速度特别快,2分钟内即可完成。因此,在近来的DELFA中,几乎都使用 $\text{N}_1$ -(P-异硫氰酸苯基)-DTTA。

### 荧光增强

Eu标记的免疫复合物在高pH(pH7~9)时发光极弱,这是因为像 $\text{N}_1$ -(P-异硫氰酸苯基)-DTTA这样的螯合剂虽然能很好地屏蔽 $\text{Eu}^{3+}$ ,但是其结构不能把激发能有效地转移到 $\text{Eu}^{3+}$ 。

许多作者报道, $\beta$ -二酮- $\text{Eu}^{3+}$ 或 $\beta$ -二酮- $\text{Tb}^{3+}$ 络合物受激后会发强荧光。每个 $\text{Eu}^{3+}$ 共有8个配位位点,而且每个 $\text{Eu}^{3+}$ 的配位体最多是三个。每个 $\beta$ -二酮分子具有供配位的两个氧原子,三个这样的分子就占据了 $\text{Eu}^{3+}$ 周围的6个配位位点。这样所剩的2个位点就被水分子的氧所占据,对荧光形成严重猝灭。为此,加入一种协同剂三正辛基氧化膦(TOPO),每个TOPO分子具有一个氧原子,这样,两个TOPO分子取代那两个水分子,结果形成 $\text{Eu}^{3+}(\beta\text{-二酮})_3(\text{TOPO})_{2-3}$ 结构的复合物。当加入一种非离子型表面活性剂Triton X-100时,会形成一种微胶囊,它的内侧为疏水端,能溶解脂溶性的二酮体,外侧为亲水端,与水结合。这样,微胶囊有效地阻止了 $\beta$ -二酮体吸收的能量向水中发散,而更多地转移给 $\text{Eu}^{3+}$ 。

在低pH(pH2~3)和存在过量的吸收配位体氟化 $\beta$ -二酮化合物时, $\text{Eu}^{3+}$ 很快地从螯合剂的多羧酸中完全解离下来。这种解离 $\text{Eu}^{3+}$ 、增强荧光强度的低pH溶液称为增强溶液。解离所需的最佳pH值与 $\beta$ -二酮化合物的性质有关。当用 $\beta$ -萘甲酰基三氟丙酮( $\beta$ -NTA)时,pH在3.0~3.3<sup>[14]</sup>,而使

用三甲基乙酰三氟丙酮(PTA)时 pH需大于4. 对于 $\text{Eu}^{3+}$ ,最佳的增强溶液组成是:  $\beta$ -N TA $15\mu\text{mol}$ , TOPO $50\mu\text{mol}$ , Triton X-100 0.1%; 邻苯二甲酸-醋酸缓冲液(0.1mol/L), pH3.2, 它也可用于 $\text{Sm}^{3+}$ 标记抗体。对于 $\text{Tb}^{3+}$ ,最佳增强溶液组成是: PTA $50\mu\text{mol}$ , TOPO  $50\mu\text{mol}$ , TritonX-100 0.2%, 醋酸盐缓冲液(0.1mol/L), pH4.5. 它也可用于 $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ 和 $\text{Dy}^{3+}$ . 还用于 $\text{Eu}^{3+}$ 和 $\text{Tb}^{3+}$ 的双标记测量。新增强溶液的研究还在不断深入<sup>[17]</sup>。

综上所述,  $\text{Eu}^{3+}$ 的荧光波长是由离子自身决定的, 然而荧光的半衰期和强度却与配位体和所处微环境有关。增强液的应用使荧光强度得到很大增加, 从而提高了灵敏度。

但是增强液也容易受到污染, 使本底升高。我们在实验中观察到, 配制增强液的水应是去离子石英亚沸三蒸水, 试剂尽量用光谱纯的, 所用容器常规处理后, 再用1% EDTA浸泡, 并用三蒸水反复冲净; 分装容器还要密封良好, 尽量减少空气中金属离子污染。

## 免疫反应

TrFIA的免疫反应原理与RIA相同。有两种分析方法。

### 1. 双位点夹心法

此法为试剂过量分析法。使用直接针对抗原不同决定簇的两种特异单克隆抗体。一种包被在固相上, 而另一种用 $\text{Eu}^{3+}$ 标记。其免疫反应原理示于图3。hCG, LH,



图3 固相双位点夹心法免疫反应原理图

注: 为了简化, 固相抗体与待测抗原的反应以及其复合物再与 $\text{Eu}^{3+}$ -抗体的反应, 这两步合画在一起

FSH, TSH<sup>[16]</sup>, AFP<sup>[18]</sup>和胰岛素<sup>[13]</sup>等已用此法进行了分析。此法的优点是:  $\text{Eu}^{3+}$ 标记物的探测灵敏度高, 连接反应温和, 标记物可溶性好以及即使在标记比活性较高(到 $20\text{Eu}^{3+}/\text{IgG}$ )情况下, 仍能保持抗体的免疫活性, 因此被广泛使用。当然在有些情况下, 也可以把多克隆抗体和单克隆抗体组合应用, 如HBsAg分析, 应用的就是单克隆抗体和多克隆抗体的组合。对某些病毒用的是多克隆抗体。

### 2. 竞争法

本法常用于小分子半抗原分析。把小分子半抗原以共价键和蛋白(如卵白蛋白)结合, 形成固相抗原, 先后把待测样品(或标准)和 $\text{Eu}^{3+}$ 标记抗体分别加入固相抗原孔中, 则两种不同形式的抗原就与定量的 $\text{Eu}^{3+}$

标记抗体竞争结合。洗涤后, 加入增强液, 测量抗原抗体复合物上 $\text{Eu}^{3+}$ 的荧光强度, 最后由标准曲线求样品中的抗原浓度。

## 荧光测量

在免疫反应全过程完成后, 洗掉未结合的成分, 加入增强液并在板式振荡器上振荡10~15分钟, 再静置10~15分钟, 这样就完成了 $\text{Eu}^{3+}$ 从免疫反应复合物上的解离和被增强液中螯合剂螯合的过程。然后用时间分辨荧光仪测量Eu螯合物的荧光。

Arcus 1230时间分辨荧光仪的测量时序如图2所示, 激发光激发样品后, 延迟 $400\mu\text{s}$ , 这期间短半衰期荧光基本衰变完了, 测量 $400\mu\text{s}$ , 恢复 $200\mu\text{s}$ 。这样, 完成一个周期刚好1ms。接着新周期开始。每秒钟

有1000个周期,取计数总和为样品计数。因为Eu的螯合物很快从激发态回到基态,所以可以反复激发。该仪器的主要指标是:灵敏度:  $10^{-17}$  mol Eu/孔;动态范围: 4个数量级;最大样品容量: 360个;每个样品测一秒钟,一小时可测1500个样品。

## 应用

表4列出了1988年5月统计的Pharmacia公司陆续推出的商品试剂盒。此外还有睾酮、孕酮和胰岛素等试剂盒。以此便可看到TrFIA的应用已经比较广泛。

表4 一些商品试剂盒

测定物名称	最小检出值	标准曲线范围
促甲状腺激素	0.03mIU/L	0.25~324 mIU/L
乙型肝炎表面抗原	0.2μg/L	—
皮质醇	15nmol/L	100~2000nmol/L
甲胎蛋白	0.1kIU/L	1~1000kIU/L
人绒毛膜促性腺激素	0.5IU/L	2~10000IU/L
促黄体生成激素	0.12IU/L	1~250IU/L
铁蛋白	2.0μg/L	5~1500μg/L
地高辛	0.26nmol/L	0.32~5.12nmol/L
三碘甲状腺原氨酸	0.08nmol/L	0.5~10nmol/L
新生儿促甲状腺激素	—	1~100mIU/L
甲状腺素	1nmol/L	10~300nmol/L
卵泡刺激素	0.05IU/L	1~250IU/L
泌乳素	0.04μg/L	0.25~250μg/L
癌胚抗原	0.2μg/L	1~500μg/L
碳水化合物抗原	0.2kIU/L	5~300kIU/L
免疫球蛋白	0.25kIU/L	1~1000kIU/L
雌二醇	0.05nmol/L	0.05~15nmol/L
性激素结合球蛋白	0.8nmol/L	0.25~200nmol/L
先天性梅毒	0.125IU/L	1~250IU/L

此外,还用于其它研究,举例如下。

不少作者测定了甾体激素,如牛奶中的孕酮<sup>[19]</sup>,血清和滤纸上干血斑中17-α-羟基孕酮<sup>[20]</sup>,血清中的类固醇<sup>[21]</sup>,尿中未结合的雌激素和总雌激素<sup>[22]</sup>及尿中雌酮-3-葡萄糖醛化物<sup>[23]</sup>。有的作者用于监视妇女卵巢功能和预测怀孕以及用非分离方法测定尿代谢物。用于测定病毒和细菌的报道也较多。如蝉脑炎复合病毒抗原的分析<sup>[24]</sup>,应用标记重组融合蛋白测定免疫缺乏病毒抗体<sup>[25]</sup>,粪便中腺病毒和轮状病毒的同时测定<sup>[26]</sup>,用单克隆抗体测定potato病毒<sup>[27]</sup>,

用BCPDA做螯合剂测定小肠腺病毒<sup>[28]</sup>。有的还测定了结合于纤维素的细菌<sup>[29]</sup>以及把抗生蛋白链菌素用于病毒和细菌杂交实验的DNA探针<sup>[30]</sup>。对肿瘤相关抗原的测定及评价的报道较多,例如,有的作者<sup>[31]</sup>对CA-50、SPAN-1和CA19-9在诊断胰腺癌中的应用进行了比较研究;也有用Eu<sup>3+</sup>-DTPA标记的癌细胞测量NK细胞的活性<sup>[32]</sup>。对游离甲状腺素、血清中总甲状腺素和甲状腺球蛋白的测定以及抗胰岛素抗体和前列腺素-F<sub>2</sub>-α的测定报道更多<sup>[33,34]</sup>。近年来也发展了许多特殊应用,范围不断扩

大。例如,蛋白酶活性<sup>[35]</sup>、白细胞介素-2<sup>[9]</sup>、7-甲基-2'-脱鸟苷咪唑<sup>[36]</sup>、稠环芳烃<sup>[37]</sup>、5-甲基-2'-脱氧胞苷<sup>[38]</sup>以及神经生长因子<sup>[39]</sup>的测定。不少作者正在研究在同样样品中同时测定多种分析物的可能性,显然这是很有吸引力的<sup>[40, 41]</sup>。

目前,我国的科技人员正在仪器、方法学及关键试剂和实验配套用品等各方面进行研究,虽然尚未形成系列商品,但在不少方面已取得了可喜的进展,前景是好的。

### 参 考 文 献

- 1 Eleftherios PD. Clin Biochem, 1988; 21: 139-150
- 2 Savitsky AP et al. Ian SSS Flz, 1990, 54(3):518-523
- 3 Hemmälä I. Scand J Clin Lab Invest, 1988; 48:389-400
- 4 Eleftherios PD et al. Am Clin Lab, 1989; 8(2):26-28
- 5 Mikola H et al. Steroids, 1991; 56(1): 17-21
- 6 Ramon AE et al. Clin Biochem, 1988; 21:173-178
- 7 Eleftherios PD et al. J Immunol Methods, 1988; 112:43-52
- 8 Lleana K et al. Clin Chem, 1990; 36(3):503-508
- 9 Knopf HP et al. J Immunol Methods, 1991; 138(2):233-236
- 10 Mikkala VM et al. Anal Biochem, 1989; 176(2):319-325
- 11 Meares CF et al. Anal Biochem, 1984; 142(1):68-78
- 12 Meares CF. Nucl Med Biol, 1986; 13: 311
- 13 Toivonen E et al. Clin Chem, 1986; 32:637
- 14 Hemmälä I et al. Anal Biochem, 1984; 137(2):335
- 15 Dechand H et al. Clin Chem, 1986; 32:1323
- 16 Lovgren T et al. Talanta, 1984; 31: 909
- 17 Degan P et al. J Biolumin Chemilumin, 1990; 5(3):207-212
- 18 Suonpää MU et al. Clin Chem Acta, 1985; 145:341
- 19 Racigolupo MA et al. J Steroid Biochem, 1990; 26(4):257-259
- 20 Gonzalez RR et al. Clin Chem, 1990; 36(9):1667-1672
- 21 Shoblom P et al. Hum Reproduc, 1990; 5(4):396-401
- 22 Thomas CMG et al. Clin Chem, 1990; 36(10):1774-1778
- 23 Bernard G et al. Clin Chem, 1989; 35(4):555-559
- 24 Pomelova VG et al. J Virol Methods, 1991; 31(23):293-300
- 25 Siitari H et al. J Clin Microbiol, 1990; 28(9):2022
- 26 Peltyszyn S et al. Clin Chem, 1990; 36(6):1086
- 27 Jarvekulg L et al. Ann Appl Biol, 1989; 114(2):279-291
- 28 Brown M et al. J Clin Microbiol, 1990; 28(6):1398-1402
- 29 Kuusela P et al. FEMS Microbiol, 1986; 36:57
- 30 Dahlén P et al. Molecular Cellular Probes, 1987; 1:159
- 31 Kobayashi T et al. Scand J Gastroenterol, 1991; 26(7):787-797
- 32 Blomberg K et al. J Immunol Methods, 1986; 86:225
- 33 Nuutila P et al. Clin Chem, 1990; 36(7):1355-1360
- 34 Luke FJ et al. Clin Chem Anal, 1990; 189(3):257-266
- 35 Karp MT et al. J Appl Biochem, 1983; 5:399
- 36 Began P et al. J Immunol Methods, 1990; 133(1):119-125
- 37 汤又文等. 分析化学, 1990; 18(10): 962-965
- 38 Rasi S et al. J Immunol Methods, 1989; 117(1):33-38
- 39 Arumae U et al. J Immunol Methods, 1989; 122(1):59-65
- 40 Siitari H et al. J Virol Methods, 1990; 28(2):179-188
- 41 Ekins RP et al. J Clin Immunoassay, 1990; (134):169-181