

• 临床检验研究论著 •

应用 FITC 系统建立非均衡竞争三碘甲腺原氨酸化学发光法*

王小明¹, 孔海霞², 雷 鹏², 宋启超³, 张 影³, 刘 萍^{2,3,Δ}

(1. 江西省萍乡市人民医院检验科 337000; 2. 重庆医科大学检验医学院 400016;

3. 博奥赛斯(天津)生物科技有限公司, 天津 300162)

摘要:目的 制备抗人三碘甲腺原氨酸(T_3)多克隆抗体,应用异硫氰酸荧光素(FITC)系统开发新型非均衡竞争技术,建立一种能广泛应用于临床检测总三碘甲腺原氨酸(TT_3)的方法。方法 以 T_3 -牛血清清蛋白(BSA)为抗原免疫新西兰大白兔,制备抗人 T_3 多克隆抗体,亲和层析法纯化特异性的抗人 T_3 多克隆抗体并连接辣根过氧化物酶(HRP)。用 FITC 标记 T_3 类似物,采用抗 FITC 抗体包被发光板, FITC- T_3 类似物与抗 FITC 抗体结合形成固相抗原,固相抗原与 T_3 校准品或样本中的 T_3 非均衡竞争结合 T_3 -HRP 抗体,建立标准曲线,血清中 TT_3 通过标准曲线计算浓度。由此建立 TT_3 化学发光检测方法进行方法学评价并与直接用 T_3 -牛血清 γ 球蛋白(BGG)包被(非 FITC 系统)的检测系统进行比较。将该方法应用于临床 100 份血清标本的检测,定量结果与德国 Roche 2010 电化学发光全自动免疫分析系统(Elecsys 2010)结果进行比较。结果 抗体对 T_3 具有高度特异性,线性相关系数 $r > 0.99$,线性范围为 0.1~8 ng/mL,分析灵敏度为 0.1 ng/mL,精密度测试批内、批间变异系数 $CV < 5\%$,检测结果优于非 FITC 系统的检测。对于临床血清标本的检测,其定量结果与德国 Elecsys 2010 定量试剂盒的结果有很好的相关性,相关系数为 0.961 9,临床符合率良好。结论 该方法精密性好、灵敏度高、稳定性强,有良好的准确性,适用于临床标本的检测。

关键词:异硫氰酸荧光素; 三碘甲腺原氨酸; 多克隆抗体; 化学发光法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.08.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)08-0899-03

Detection of human serum total triiodothyronine by non-equilibrium competitive chemiluminescence immuno assay using FITC system*

Wang Xiaoming¹, Kong Haixia², Lei Peng², Song Qichao³, Zhang Ying³, Liu Ping^{2,3,Δ}

(1. Department of Clinical Laboratory, First People's Hospital of Pingxiang City, Pingxiang Jiangxi

337000, China; 2. Department of Medical Laboratory, Chongqing University of Medical Science,

Chongqing 400016, China; 3. Petec Biotechnology Co., Ltd, Tianjin 300162, China)

Abstract: Objective To prepare polyclonal antibodies(mAb) against human triiodothyronine(T_3) and to establish a new method of non-equilibrium competitive chemiluminescence immunoassay(CLIA) with fluorescein isothiocyanate(FITC) for detection of serum total T_3 (TT_3). **Methods** Polyclonal antibody of human T_3 , prepared by immunizing New Zealand rabbits with human T_3 -bovin serum albumin(BSA), was purified by affinity chromatography and was labeled with horse radish peroxidase (HRP). FITC was conjugated to T_3 analogue. Microwell was coated by anti-FITC antibody. In this assay, calibrators(or samples), FITC- T_3 analogue and anti- T_3 antibody-HRP were added to coated microwell plate. FITC- T_3 analogue would combine to anti-FITC antibody to form solid phase T_3 analogue on microwell. T_3 , if exist in samples, would combine to anti- T_3 antibody-HRP compete with solid phase T_3 analogue, and less T_3 analogue-anti- T_3 antibody-HRP complex would be formed on microwell. The amount of complex, which showed negative correlation with concentration of TT_3 in samples, would be measured through CLIA reaction. Compared with the method of coating by T_3 -BGG(non-FITC system), sensitivity, precision, stability and clinic correlation for this method were evaluated. This method as well as Roche Elecsys 2010 System were used for detecting TT_3 in 100 clinical serum samples. **Results** The prepared antibody was with high specificity to T_3 . The linear correlation coefficient of constructed CLIA with FITC system for the detection of human TT_3 was more than 0.99, with linear range of 0.1~8 ng/mL, sensitivity of 0.1 ng/mL, intra-assay and inter-assay precision under 5%, which was better than those of non-FITC system. Compared with Elecsys 2010 system, the correlation coefficient was 0.961 9. **Conclusion** The quantitative diagnostic kit for TT_3 by non-equilibrium competitive CLIA using FITC system could provide a rapid and accurate determination of TT_3 and be suitable for application for clinical diagnosis.

Key words: fluorescein isothiocyanate; triiodothyronine; polyclonal antibody; chemiluminescence

临床上检测血清中总三碘甲腺原氨酸(total triiodothyronine, TT_3)浓度对诊断甲状腺功能亢进及对此疾病采取治疗措施具有重大意义^[1-2]。 TT_3 常用的检测方法有放射免疫分析法、酶免疫分析法、免疫荧光分析法、化学发光免疫分析法和电化学发光免疫分析法等^[3-6]。其中,化学发光免疫分析法因其灵敏度高、特异性强、检测范围宽,特别是无放射性危害等优

势,在逐步取代放射性免疫分析法和酶免疫分析法。

抗 FITC 单克隆抗体与 FITC 反应,不仅特异性高,而且亲和力也高于抗体与多肽抗原的结合^[7-8]。现采用抗异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)抗体包被发光板, FITC- T_3 类似物与抗 FITC 抗体间接结合形成固相抗原,用抗人三碘甲腺原氨酸(3,5,3'-triiodothyronine, T_3)类似物取代 T_3 作为竞

争抗原,非均衡性竞争结合辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase,HRP)标记 T₃ 抗体,拟以 FITC 系统为平台建立非均衡竞争检测 TT₃ 的化学发光免疫分析方法^[9-10]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2.2~2.4 kg 的雄性新西兰大白兔,购自军事医学科学院实验动物中心。

1.2 仪器与试剂 Bioscience PETECK96-1 型微孔板发光分析仪、BIOS-401 型微孔板脱水机由博奥赛斯(天津)生物科技有限公司提供;化学发光包被板由深圳金灿华公司提供;自动化酶免分析仪 SM-3 由美国 Thermo 提供;紫外分光光度计 7252PC 由上海光谱仪器有限公司提供。弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂、T₃ 类似物、T₃ 纯品、L-T₄、D-T₄、D-T₃、rT₃、FITC、8-苯胺-1-萘磺酸(8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid,ANS)购自 Sigma 公司;羊抗兔 IgG-HRP 购自北京中杉公司;Hi TrapTM Protein A 亲和层析柱购自 Pharmacia 公司;抗 FITC 抗体购自 Fitzgerald 公司;其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 抗原的合成 使用碳二亚胺试剂 EDC 将甲酯化-T₃ 和牛血清清蛋白(bovin serum alboumin,BSA)、牛血清 γ 球蛋白(Bovine serum gamma globulin,BGG)耦联^[11]。

1.3.2 抗人 T₃ 多克隆抗体的制备 将 200 μg /支 T₃-BSA (溶于 0.9%生理盐水)与等体积的弗氏完全佐剂充分混合乳化后,于家兔后肢及皮下多点注射,以后每 2 周免疫 1 次(以不完全弗氏佐剂取代完全弗氏佐剂,其余同上)。免疫 4~5 次,每次免疫后的第 10~14 天,从兔耳静脉采血间接 ELISA 检测抗体效价,直至制备获得满意的抗体效价,制备相应的兔抗血清。

1.3.3 抗体的纯化及浓度的检测 取含有抗 T₃ 多克隆的家兔血清,用 60%的硫酸铵分级沉淀,将沉淀溶解,用 Biogel P-10 柱除盐后,冻干浓缩。收集到的 IgG 再用装有 L-甲状腺素(L-T₄)、D-甲状腺素(D-T₄)、3-碘-L-甲状腺原氨酸(3-iodo-L-tyrosine)、3,5-二碘-L-甲状腺原氨酸(3,5-diiodo-L-tyrosine)、反三碘甲状腺原氨酸(rT₃)洗脱纯化,收集吸附后的多抗,经 ELISA 检测证明其是否与 L-T₄、D-T₄、3-iodo-L-tyrosine、3,5-diiodo-L-tyrosine、rT₃ 交叉反应。应用紫外光谱 280、260 nm 吸收差法测定纯化后 T₄ 抗体的浓度为 2.24 mg/mL。

1.3.4 包被板的制备 FITC 系统包被板的制备:将抗 FITC 用包被缓冲液稀释成 5 μg/mL 的溶液,每孔 100 μL 加入微孔板中,37℃包被 2 h 后,去除孔内液体,洗板 3 次,拍干后,按照每孔 200 μL 加入封闭液,37℃封闭 2 h,弃去封闭液,37℃烘干 4~6 h 后取出,加入适量干燥剂,2~8℃密封保存。非 FITC 系统包被板的制备:将 TT₃-BGG 用包被缓冲溶液稀释至 2.5 μg/mL,每孔 100 μL 加入微孔板中,其余步骤同上。

1.3.5 FITC-T₃ 类似物的制备 参考改良 Marsshall 法^[12]。用 FITC 标记 T₃ 类似物,游离的 FITC 经 PBS 充分透析除去,并用紫外分光光度计测定 A495、A280 值。

1.3.6 酶结合抗体的制备 采用常规高碘酸钠氧化法制备,制备后加入等体积甘油混匀后-20℃保存^[13]。

1.3.7 质控品的配制 将适量 T₃ 抗原加入到阴性人血清中,配制成高值质控品(quality control materials of high value, QcH)、中值质控品(quality control materials of middle value, QcM)和低值质控品(quality control materials of low value, QcL)。

1.3.8 TT₃ 化学发光方法实验 FITC 系统化学发光检测方法:取包被抗 FITC 抗体的微孔板,每孔加入 50 μL 校准品或样品,50 μL FITC-T₃ 类似物工作液和 50 μL T₃ 抗体-HRP 工作液。室温下震荡 10 s,37℃反应 1 h,洗板,加入发光液检测,避光 5 min 在 Bioscience PETECK96-1 型微孔板发光分析仪上读数。非 FITC 系统化学发光检测方法:取包被有 T₃-BGG 的发光板,每孔加入 50 μL 校准品,50 μL T₃ 抗体-HRP 工作液,混匀,37℃反应 1 h,洗板,加入发光液检测,避光 5 min 在 Bioscience PETECK96-1 型微孔板发光分析仪上读数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行配对 t 检验,χ² 检验分析临床检测结果不一致的原因,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗体的效价 间接 ELISA 法检测其效价为 1:16 000。

2.2 抗体的纯化 采用 SDS-PAGE 电泳检测抗体纯度,5 μg 标本检测。SDS-PAGE 结果显示纯化后的抗体蛋白在约 55×10³ 及 25×10³ 有明显条带,说明制备的抗体纯度较高。

2.3 线性范围和灵敏度 应用 FITC 系统检测试剂的线性范围为 0.1~8 ng/mL,以 5 个系列校准品浓度和一个零值校准品建立标准曲线,线性相关系数的绝对值|r|=0.999 4,经计算其灵敏度为 0.1 ng/mL。非 FITC 系统化学发光检测试剂线性相关系数的绝对值|r|=0.998 8,灵敏度为 0.37 ng/mL。FITC 系统检测方法的灵敏度较非 FITC 系统化学发光检测提高了 3 倍。

2.4 精密度 FITC 系统测定 TT₃ 精密度优于非 FITC 系统化学发光法,其批内变异(CV)小于 5%,而非 FITC 系统化学发光法批内变异在 10%左右,两者比较差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 FITC 系统化学发光法与非 FITC 系统化学发光法测定 TT₃ 的批内精密度[$\bar{x} \pm s, (%)$]

项目	重复次数(次)	FITC 系统	非 FITC 系统
QcL(CV)	第 1 批	0.64±0.04(4.68)	0.65±0.07 ^a (10.12)
	第 2 批	0.63±0.03(4.69)	0.63±0.07 ^a (10.79)
	第 3 批	0.65±0.03(4.61)	0.66±0.06 ^a (9.20)
QcM(CV)	第 1 批	2.03±0.07(3.47)	2.09±0.19 ^a (9.19)
	第 2 批	2.01±0.09(4.38)	1.92±0.20 ^a (10.37)
	第 3 批	2.00±0.08(4.15)	1.97±0.21 ^a (10.85)
QcH(CV)	第 1 批	5.26±0.22 (4.18)	5.20±0.50 ^a (9.60)
	第 2 批	5.26±0.22(4.86)	5.24±0.54 ^a (10.34)
	第 3 批	5.18±0.21(4.05)	5.18±0.53 ^a (10.25)

^a:P<0.05,与 FITC 系统化学发光法比较。

2.5 特异性 T₃ 的干扰因子主要有 L-T₄、D-T₄、3-iodo-L-tyrosine、3,5-diiodo-L-tyrosine 和 rT₃,应用 FITC 建立的化学发光法检测的交叉反应结果均小于 0.01%。

2.6 临床参考区间确定 选择 629 例健康人群血清样品,应用 FITC 系统检测,建立该方法临床参考区间(95%可信区间)为 0.43~1.52 ng/mL。

2.7 与进口试剂系统(Elecsys 2010)测定值的比较 应用建立的 FITC 系统与进口的罗氏公司 Elecsys 2010 系统同时测定,Bioscience PETECK96-1 测定值为(1.77±1.24)ng/mL; Elecsys 2010 测定值为(2.04±1.18)ng/mL,差异无统计学意

义($P>0.05$)。

2.8 与 FITC 系统检测方法进口试剂的相关性分析 使用进口试剂和该方法测定临床标本 100 例,以该方法测定 TT_3 浓度为纵坐标,以进口试剂测定值为横坐标,利用 Excel 软件进行线性回归分析,计算出相关系数(r)和回归系数并对相关系数进行 t 检验。直线回归方程为 $Y=1.0054X-0.2828$,线性回归系数为 1.0054,相关系数为 0.9619,两者差异有统计学意义($P<0.05$),表明两种方法测定的 TT_3 浓度值密切相关。相关系数为 0.9619,表明两种方法之间测定的 TT_3 浓度值符合性良好。

2.9 FITC 系统检测方法测定值不一致的分析 120 例标本中有 4 例(3.33%)测定值结果不一致,卡方检验差异无统计学意义($P>0.05$)。对于不符合的标本,经罗氏公司和博奥赛斯公司产品重复性检测,检测值没有明显改变。使用雅培产品进行复测,测得 2 例与罗氏结果一致,2 例与博奥赛斯结果一致。配对 χ^2 检验,差异无统计学意义($P>0.05$)。经分析显示没有规律性的偏差产生,多为临界偏差,所以考虑产生不一致的原因是由标本的个体差异、两种方法测定原理的差异及操作随机误差造成。

2.10 开瓶稳定性分析 试剂盒开封 0、10、20、30、35 d 后质控品的检测值与罗氏试剂的检测结果比较,在开封 35 d 后 3 个质控品的测定浓度与罗氏试剂检测结果出现显著性差异并超出质控范围,所以把开封稳定性定为 30 d。见表 2。

表 2 化学发光免疫分析 TT_3 稳定性实验 $[\bar{x}\pm s, (\%)]$

项目	开封天数 (d)	重复次数 (次)	本研究检测结果	罗氏试剂检测结果
QcL(CV)	0	10	0.7±0.03(3.90)	0.7±0.02(2.73)
	10	10	0.64±0.03(4.81)	0.63±0.02(3.64)
	20	10	0.67±0.06(9.02)	0.65±0.03(5.11)
	30	10	0.67±0.07(10.72)	0.67±0.04(6.71)
	35	10	0.68±0.09(13.54) ^a	0.66±0.06(8.78)
QcM(CV)	0	10	2.56±0.09(3.51)	2.53±0.06(2.50)
	10	10	2.58±0.18(6.9)	2.59±0.10(3.94)
	20	10	2.7±0.21(7.7)	2.57±0.12(4.53)
	30	10	2.54±0.21(8.26)	2.49±0.13(5.39)
	35	10	2.52±0.41(16.15) ^a	2.48±0.17(6.85)
QcH(CV)	0	10	5.70±0.23(4.07)	5.63±0.20(3.48)
	10	10	5.75±0.37(6.45)	5.56±0.26(4.61)
	20	10	5.26±0.40(7.62)	5.42±0.03(5.60)
	30	10	5.55±0.47(8.53)	5.27±0.37(7.04)
	35	10	5.32±0.64(12.03) ^a	5.44±0.47(8.64)

^a: $P<0.05$,与罗氏试剂检测结果比较。

3 讨 论

方法的分析性能够满足临床要求是医学实验室认可和检验结果互认的根本保证^[14-15]。本组使用 FITC 系统建立非均衡竞争化学发光免疫分析方法测定血清 TT_3 浓度,旨在建立一种操作简便、检测准确的方法。实验结果显示,该方法测定 TT_3 高、中、低 3 个水平的质控品的精密度,批间精密度小于 5%,与非 FITC 系统化学发光方法比较,有较好的灵敏度和准确性,已达到进口产品的水平。

本研究是通过抗-FITC 系统将抗原间接包被在微孔板上,标记抗体的方法,与传统包被抗体标记抗原方法比较,有效避免了加样延迟时间对反应的影响。若采用传统方法在包被抗体的微孔板中先后加入校准品或样品和酶结合物,当加入校准品或样品后反应即开始,微孔板中的抗体会先与校准品或样品中的抗原反应,再与酶结合物中的抗原反应,会产生反应延迟时间,导致酶标记抗体结合的抗原竞争力弱于先加入的样品或校准品中的抗原。而该方法则是将 FITC 抗原间接包被在微孔板上,然后先后加入校准品或样品和酶结合物,当加入样品或校准品时,样品中或校准品中的抗原不会与包被在板上的抗原反应,只有当最后加入酶标记抗体时反应才开始,这样不会产生加样延迟时间对反应产生的影响。此外,用抗-FITC 抗体间接包被可以加大包被浓度,以提高包被板的精密性,该法优于直接包被抗原,精密性提高了 2.5 倍。

本研究采用 T_3 类似物取代 T_3 作为竞争抗原,增加了 TT_3 校准品(或样品)与抗 T_3 -HRP 抗体的结合力,使灵敏度大为提高,从实验结果表明使用 T_3 类似物作为固相抗原,灵敏度达到 0.1 ng/mL,已达到进口试剂盒的灵敏度标准。

本研究建立 TT_3 化学发光检测方法在临床符合性方面大为提高,100 例血清标本检测结果表明与使用进口试剂盒测定结果具有良好的相关性,相关系数为 0.9619。本组将进一步扩大样本量并与不同进口试剂盒进行检测值的比对,并对实验条件进行优化。

综上所述,本组应用 FITC 系统建立的非均衡竞争化学发光免疫分析法具有灵敏度高、精密性好等特点,并且使用该方法检测临床标本与使用进口试剂测定结果相关性良好,检测快速,价格低廉,适用于临床应用。

参考文献

- [1] 黄茂政. T_3 、 T_4 、 rT_3 、 FT_3 、 FT_4 和 s -TSH 测定在甲亢、甲减病中的应用[J]. 右江民族医学院学报,1996,10(1):85-87.
- [2] 王贵生,张巧云. 甲状腺功能检测的分析前干扰因素[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(12):244-246.
- [3] 张卫国,吴国球. 自动化学发光免疫分析法测定血清 T_3 、 T_4 和 TSH 的评价[J]. 现代医学,2005,33(7):111-113.
- [4] 徐立根,孙有香,焦岩. 国产 T_3 、 T_4 、 FT_3 和 FT_4 RIA 对比测定研究[J]. 放射免疫学杂志,2005,18(9):1-4.
- [5] Ambrosio R, Sannino ML, Cortese L, et al. Validation and application of an immunofluorimetric assay for detection of serum free triiodothyronine and free thyroxine concentrations in buffalo under various physiological conditions[J]. J Vet Diagn Invest, 2009, 21(14):668-673.
- [6] Marion P, Michael A, Hans-Otto H, et al. Autoantibodies against thyroid hormones and their influence on thyroxine determination with chemiluminescence immunoassay in dogs[J]. Journal of Veterinary Science, 2010, 11(3):191-196.
- [7] Ghosh S, Howlett M, Boag D, et al. Interference in free thyroxine immunoassay[J]. Eur J Intern Med, 2008, 19(5):221-222.
- [8] Yang H, Lou CC, Xu MM, et al. Investigation of folate-conjugated fluorescent silica nanoparticles for targeting delivery to folate receptor-positive tumors and their internalization mechanism[J]. International Journal of Nanomedicine, 2011, 41(6):2023-2032.
- [9] 周新,涂值光. 临床生物化学和生物化学检测[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:385-386.

0508111。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计学软件,数据以($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结 果

各组小鼠的指标检测结果见表 1。

表 1 正常对照组小鼠和各试验组小鼠指标检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	WBC($\times 10^9/L$)	CRP	C ₃	IgM
正常对照组	20	6.02±0.35	0.17±0.07	0.20±0.04	0.09±0.03
庆大霉素治疗 3 d 组	20	13.06±1.03*	1.76±0.30*	0.71±0.13*	0.51±0.05*
庆大霉素治疗 7 d 组	20	6.85±0.71*	0.94±0.19*	0.27±0.06	0.15±0.04*
庆大霉素+鸡枞多糖治疗 3 d 组	20	10.24±1.56*△	0.98±0.17*△	0.49±0.08*△	0.37±0.05*△
庆大霉素+鸡枞多糖治疗 7 d 组	20	5.64±0.71	0.30±0.15△△	0.15±0.04△△	0.13±0.03

*: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; △: $P < 0.05$, 与庆大霉素治疗 3 d 组和庆大霉素+鸡枞多糖治疗 3 d 组比较; △△: $P < 0.05$, 与庆大霉素治疗 7 d 组和庆大霉素+鸡枞多糖治疗 7 d 组比较。

3 讨 论

病原微生物是否对机体造成感染和是否致病,取决于病原体致病力强弱与侵袭宿主机体的数量、侵袭力、毒力及其逃避或抵抗宿主攻击力有关^[5]。WBC、CRP、C₃、IgM 均可作为细菌感染的指标。CRP 是肝脏合成的一种急性时相反应蛋白,在炎症反应后 6~8 h 血清 CRP 即可明显上升,故可作为细菌感染的早期诊断指标^[6-9]。IgM 是初次体液免疫应答中最早出现的抗体,血清中如检测出 IgM,提示新近发生感染,可用于感染的早期诊断。

本研究中正常对照组与各试验组各项指标均有不同程度差异,说明经过细菌的接种后,都发生了不同的免疫反应。机体在受感染时,各种免疫细胞、免疫因子都参与反应,使机体处于一种稳定状态。C₃ 是存在于血液中的一组不稳定球蛋白,能结合于抗原-抗体复合物,通过免疫吸附促炎性和中和溶解病毒等作用,其可通过黏附在病原体表面利于宿主细胞吞噬,形成膜攻击复合体导致病原体溶解、释放过敏原而引起炎症反应等多条途径来清除病原体^[10]。同时也可以介导炎症反应,导致组织损伤^[11-12]。机体炎症反应有正、反作用,炎症反应的目的是清除异己和坏死细胞,但是过度的炎症反应会导致机体各组织的损伤。多糖具有多种生理功能,维持机体的免疫稳态作用。在有鸡枞多糖与庆大霉素参与的反应中,与单纯的庆大霉素比较,各项指标均低于单纯的庆大霉素治疗,说明加入鸡枞多糖时,小鼠机体处于一个相对较低的免疫反应状态,从而避免过高、过强的免疫反应,造成机体免疫反应损伤。

(志谢:贵阳医学院解剖教研室王继芬老师为本组试验提供技术指导。)

参考文献

[1] 王一心,杨桂芝,狄勇. 鸡枞菌降血脂作用的实验研究[J]. 中华临

床医学研究杂志,2003,11(80):13185-13186.
 [2] 王一心,狄勇,杨桂芝. 鸡枞菌在大鼠高胆固醇血症中的抗氧化作用[J]. 中国预防医学杂志,2005,6(1):10-12.
 [3] 谭晓虹,方秀梅. 云南产鸡枞菌多糖含量测定[J]. 张家口医学院学报,2004,21(1):2-3.
 [4] 赵晓丽,胡大春. 大肠埃希菌耐药机制的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(5):438-441.
 [5] 金惠铭,王建枝. 病理生理学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2006:6-7.
 [6] Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein[J]. Immunol Today, 1994, 15(7):81-88.
 [7] 王燕. C 反应蛋白的临床应用进展[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(6):530-532.
 [8] 沈小明,张佩芸,华伊农. C 反应蛋白的临床应用的价值[J]. 中华医学研究杂志,2005,5(8):803-804.
 [9] 王辉,李勤,龚志伟,等. 超敏 C 反应蛋白与白细胞计数在炎症感染中的意义[J]. 中国实验诊断学,2009,9(9):1277-1278.
 [10] Atkinson C, Zhu H, Qiao F, et al. Complement-dependent P-selectin expression and injury following ischemic stroke[J]. Immunology, 2006, 177(10):7266-7274.
 [11] Tabakman R, Lecht S, Sephanova S, et al. Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury[J]. Prog Brain Res, 2004, 146(23):387-401.
 [12] Van Beek J, Elward K, Gasque P. Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection[J]. Ann NY Acad Sci, 2003, 992(46):56-71.

(收稿日期:2011-12-02)

(上接第 901 页)

[10] 林珍,王栩,任世奇,等. 化学发光酶免疫法测定游离三碘甲腺氨酸[J]. 分析化学研究报告,2008,16(5):609-613.
 [11] Deen C, Claassen E, Gerritse K, et al. A novel carbodiimide coupling method for synthetic peptides enhanced anti-peptide antibody responses[J]. J Immunol Methods, 1990, 129(51):64-71.
 [12] 蔡文琴,王伯云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都:四川科技出版社,1994:45-60.

[13] 董雪,钟青萍,黄安诚,等. 河豚毒素直接竞争 ELISA 检测方法的研究[J]. 现代食品科技,2009,25(11):977-981.
 [14] 秦晓光. “检查结果互认”和质量管理[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(16):132-135.
 [15] 李金明,申子瑜. 正确认识临床实验室认可与提高检验质量之间的关系[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(19):136-139.

(收稿日期:2012-01-21)