

## 多组分免疫传感及其应用

付志锋, 吴洁, 鞠焯先\*

(南京大学化学系 生命分析化学教育部重点实验室, 江苏南京 210093)

**摘要:** 多组分免疫传感是免疫分析领域的一个研究热点, 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。目前多组分免疫传感多采用空间分辨或多标记物模式。该文综述了近十年来多组分免疫传感技术的进展及其应用, 并对其发展前景进行了展望。

**关键词:** 免疫传感器; 多组分; 高通量; 综述

## Multianalyte immunosensing and its application

Fu Zhi-feng, Wu Jie, Ju Huang-xian\*

(Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science (Ministry of Education of China), Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract:** Multianalyte immunosensing has gained increasing attention due to its high sample throughput, short assay time, low sample consumption and reduced overall cost. Most of the current developed approaches for multianalyte immunosensing are based on spatially resolution or multiple-labels mode. This paper reviews the progress of multianalyte immunosensing and its applications in the recent decade and discusses the development in this field.

**Key words:** immunosensor; multianalyte; high throughput; review

### 0 引言

基于抗原-抗体特异性反应与高灵敏度检测手段的免疫分析, 是分析复杂样品体系的有效方法。近年来, 随着生物传感器技术的发展而出现的免疫传感技术, 在环境监测<sup>[1-2]</sup>、临床诊断<sup>[3-4]</sup>、食品安全<sup>[5-6]</sup>、药物分析<sup>[7-8]</sup>与微生物检验<sup>[9-10]</sup>等领域得到了广泛的应用。这些应用领域经常需要检测样品中多种组分的含量。如在临床肿瘤诊断中, 为了提高诊断的准确性, 常将几项相关的肿瘤标志物组成联合标志物组, 通过联合检测这几项肿瘤标志物, 实现对某种肿瘤的准确诊断<sup>[11-12]</sup>; 又如在环境监控中, 经常需要同时监测自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水平<sup>[13-14]</sup>。测定混合体系中多种组分的含量, 传统上多采用平行单组分分析法, 即每个分析流程只测定其中一种组分含

量, 多次平行执行该流程, 最后得到所有所需组分含量。该分析模式所需时间长, 试剂消耗多, 且劳动量过大。在单个分析流程中同时或者近同时实现多种组分的检测是免疫分析长期追求的一个目标, 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<sup>[15]</sup>, 因此成为近年来免疫传感中的研究热点, 并发表了大量论文, 提出了各种构思新颖的分析模式。目前报道的多组分免疫分析模式主要包括空间分辨模式和多标记物模式。

### 1 空间分辨模式

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反应器的不同空间位置发生, 然后以阵列检测器进行检测, 以实现多组分的同时检测。该模式多见于阵列法, 其换能方式包括光学(化学发光、荧光、紫外-可见吸收光度)和电化学(安

\* 通讯联系人

培、电容)方法,使用的阵列检测器包括电荷耦合元件(CCD)检测器和多通道电化学工作站等。

传统的传感阵列多在尼龙膜或者功能化玻璃片上的不同区域固定不同组分相应的抗原或者抗体,于是在这些免疫反应载体上形成了不同组分免疫复合物的阵列,这些复合物多以荧光试剂<sup>[16-21]</sup>或者酶<sup>[21-23]</sup>进行标记,以高灵敏度的 CCD 或者激光扫描阵列检测器进行荧光<sup>[16-21]</sup>、化学发光<sup>[22]</sup>或吸收光度检测<sup>[21-23]</sup>。

### 1.1 光学检测

Weller 研究组结合传感阵列与流动分析技术,构建了自动化的多组分的免疫传感阵列。他们把十种抗生素的半抗原以点样的方法固定于

硅烷化处理的载玻片上,形成半抗原的阵列,并把点好样的载玻片固定到流通池中,通入样品与抗体的混合物并完成温育步骤后,再通入辣根过氧化物酶标记的二抗进行第二步温育,最后通入化学发光底物同时检测牛奶中的十种抗生素<sup>[24]</sup>。类似的方法还可以测定人血中的多种 IgE<sup>[25]</sup>。

Ligler 研究组提出了一种自动化程度高、耗费试剂少、无需样品预处理的微型化阵列型免疫传感系统。使用一种多通道流动技术与抗体鸡尾酒(antibody cocktail)方法构建多组分免疫分析阵列,如图 1 所示,用流动技术在平面波导的表面上纵向固定不同种捕获抗体的组合,再横向通入样品进行温育,然后横向通入不同荧光标记示踪

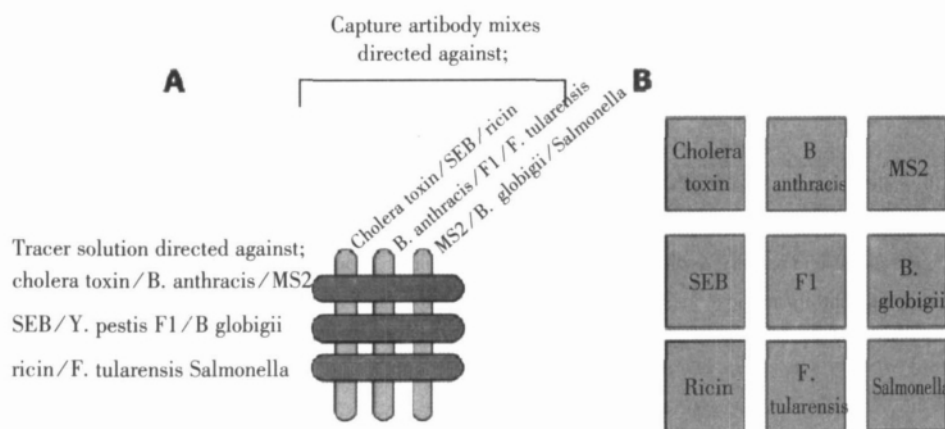


图 1 多通道流动型免疫传感阵列(九组分)

Fig. 1 Multichannel flow - assistant immunosensing array for nine analytes

抗体的组合,从而形成不同免疫复合物的阵列。最后以激光波对示踪抗体上的荧光标记物进行激发,以 CCD 进行检测,测定了多种蛋白质、细

菌和毒素等<sup>[26-34]</sup>。

Barzen 等<sup>[35]</sup>构建了一个三组分的流动注射免疫传感器(图 2),在换能器表面的不同区域固

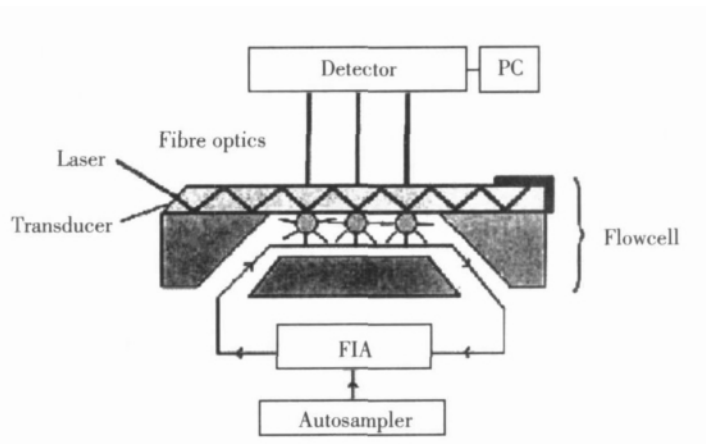


图 2 流动注射全内反射荧光三组分免疫传感器

Fig. 2 Flow - injection total internal reflection fluorescent immunosensor for three analytes

定三种小分子环境污染物的半抗原,以流动注射技术通入样品与荧光标记的抗体后,以消失波进行激发,并以光纤、滤波器与光电二级管组成的检测单元以 lock-in 的模式检测各组分的全内反射荧光。Rodriguez - Mozaz 等<sup>[36]</sup>使用类似的装置和方法测定了莠去津、isoproturon 与雌激素酮三种环境有机污染物,并将其结果与液相色谱-质谱的方法进行了对照。Fernández - Sánchez 等<sup>[37]</sup>在聚乙烯条上分别固定 t-PSA 和 f-PSA 抗体线,以胶体金标记的 PSA 抗体作为示踪抗体,以单步侧向流动免疫分析技术通入含有 t-PSA 和 f-PSA 的样品和示踪抗体后,在 t-PSA 和 f-PSA 抗体线上出现胶体金的粉红色,并以比色方法进行定量。Zhang 等<sup>[38]</sup>以类似的侧向流动免疫分析技术同时分析了食品中的西维因与硫丹的残留物。

以毛细管固定抗体作为流动式免疫传感器通道,并把固定不同抗体的毛细管并联,以流动分析技术平行测定不同生物战剂,这种装置也可以认为是免疫传感器通道的阵列<sup>[39-40]</sup>。Haasnoot 等<sup>[41]</sup>在表面等离子体共振的四个流动检测通道中分别固定四种氨基糖苷类抗生素,并把这四个流动通道串连,形成了一个多组分传感单元。并通入样品和混合抗体,于是固定的四种抗生素分别和样品中的抗生素竞争结合抗体,最后进行同时检测。

Piyasena 等<sup>[42]</sup>构建了一个免疫亲和微柱,在微柱里分段填入分别固定两种免疫试剂的珠子,为防止两段之间互相干扰,其间加填一段未固定任何免疫试剂的珠子。使用的检测器为常规非阵列型的荧光仪,该柱安放在马达驱动样品架上,以流动技术注入样品完成温育后,以马达驱动微柱沿径向移动,实现两段区带的分别检测,该方法被成功地用于癌胚抗原与 FLAG 缩氨酸的测定。Kakabakos 研究组<sup>[43]</sup>提出一种四区带毛细管免疫传感器。他们用微泵往塑料毛细管中分段注入四种杀虫剂的半抗原,这些半抗原分段吸附在毛细管内壁形成四个免疫反应带,这四个独立反应带上分别结合相应组分形成荧光标记免疫复合物后,用马达驱动毛细管被激发光源扫描,实现四组分的荧光检测。他们还使用类似的传感器同时检测了血液中的三种荷尔蒙<sup>[44]</sup>。该技

术通过传感单元的马达驱动移动,实现各反应区相应的组分的分别检测,以非阵列型检测器实现了空间分辨模式的检测,是一种有益的尝试。

## 1.2 电化学检测

基于电极阵列的电化学免疫传感器近年来也在多组分免疫分析领域得到了广泛的应用,成为继光学免疫传感阵列后的另一种重要的免疫传感阵列。最常见电化学免疫传感阵列是基于安培检测法的多组分电化学免疫传感器<sup>[45-50]</sup>。此类免疫传感阵列通常共用一个参比电极和一个对电极,而多个工作电极形成阵列,在不同的工作电极上测定不同的组分。临近的工作电极之间由于电化学反应产物扩散引起的交叉作用是必须考虑的因素,为避免由交叉作用引起的不同工作电极的相互干扰,需控制各工作电极间的距离。图 3 为一个典型的八工作电极阵列,可用安培法同时测定多种蛋白质<sup>[46]</sup>和肿瘤标记物<sup>[47]</sup>。Kong 研究组在电沉积聚吡咯<sup>[51]</sup>和  $\gamma$ -氧化钒 sol-gel<sup>[52]</sup>修饰的八电极阵列上固定抗体,以  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$  为电化学探针,以电容法同时测定肝纤维化标志物。王磊磊等<sup>[53]</sup>将压电石英晶体阵列应用于补体免疫分析,发展了一种新型的同步免疫分析方法,对补体系统的四种成分( $\text{C}_4$ 、 $\text{C}_5$ 、 $\text{C}_{1q}$ 、B 因子)进行了分析测试。

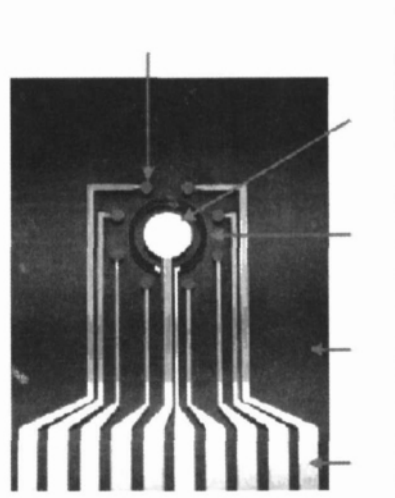


图 3 多组分电化学免疫传感器

Fig. 3 Multianalyte electrochemical immunosensor:  
W1 - W8 (work electrode), CE (counter electrode),  
RE (reference electrode)

## 1.3 荧光编码技术

阵列免疫传感系统要求在小块的免疫反应

器上规则地固定各种组分相应的免疫试剂,各免疫反应区域严格要求面积和形状一致,以减少误差。这就经常需要一些复杂的点样技术,如平板印刷术、喷墨打印术、显微机械加工术等。Walt 研究组<sup>[54]</sup>使用的荧光编码技术可很好地解决这一问题。所谓编码技术是把两种荧光染料以不同比例混合后分别修饰到不同的微反应器(如微珠)上,这时不同微反应器所发出两种波长的荧光所占比例不同,根据这种比例可对微反应器进行编码,以识别不同的微反应器。他们在编码的微珠上固定不同的免疫试剂,并在刻蚀出大量微孔的光纤末端形成微阵列,进行免疫反应后,根据微珠的编码识别不同组分的荧光信号<sup>[55-56]</sup>。Zhi 等<sup>[57]</sup>在编码的金属粒子表面分别固定 IgA、IgG 和 IgM 的抗体,并随机排布成阵列,形成过氧化物酶标记的免疫夹心物后以化学发光检测这三种物质。Ray 等<sup>[58]</sup>用 Luminex LabMAP 以类似的编码技术同时检测了五种细胞因子。

基于空间分辨的多组分免疫传感模式是当前研究最多,应用最广的多组分免疫传感模式。从理论上讲,可以在同一个免疫反应器上构建大量阵列,也就是说可以同时检测种类繁多的物质,也可以同时检测大量样品。高分析通量和多检测对象是阵列法的主要优点,结合流动分析技术,可大大提高检测系统的自动化程度,并进一步提高分析速度。但是,目前文献中报道的阵列法很多都使用较为复杂的阵列装置,提高了加工难度。同时,阵列法对免疫试剂的固定技术要求较高,要求各个阵列点较为均一,且不能相互粘连,在电极阵列中还需保持足够的距离以避免交叉反应。编码技术消除了阵列点样的复杂工序,却在微反应器的制备中增加了编码步骤,检测中也相应地增加了编码识别过程。阵列法的另一个缺点是对检测器要求较高,大多采用昂贵的阵列检测器,如 CCD 和多通道电化学工作站等<sup>[59]</sup>。

## 2 多标记物模式

多标记物模式是另一种常见的多组分免疫传感模式,其基本原理是以不同的示踪物标记不同组分,通过区分不同标记物的信号来实现不同组分的识别。如在荧光和吸收光度法检测中以波长识别,电化学法中以工作电位识别,时间分辨

荧光法中既可用波长识别,也可用衰减时间进行识别。

### 2.1 波长识别与时间分辨

Swartzman 等<sup>[60]</sup>以双标记物荧光法同时测定了细胞因子 IL-8 和 IL-6,以结合了羊抗鼠 IgG 的聚苯乙烯珠作为免疫反应器,分别固定这两种组分的捕获抗体,再以 Cy5 与 Cy5.5 分别标记这两种组分的示踪抗体,形成免疫复合物后,进行荧光测定,以两个光电倍增管分别检测两种标记物发出的不同颜色的荧光,实现两种组分的同时检测。Goldman 等<sup>[61]</sup>用最大发射波长分别为 510、555、590 与 610 nm 四种量子点标记抗体,同时实现了四种毒物的免疫传感。由于四种量子点发射波长比较接近,发生了严重的光谱重叠现象(图 4),因此需对信号进行解卷积处理。

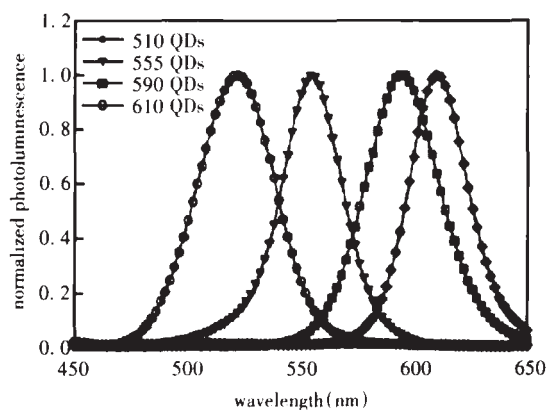


图 4 四色量子点的发射光谱

Fig. 4 Emission spectra of four colors of quantum dots

Matsumoto 等<sup>[62]</sup>用镧、钐双标记物建立了同时测定甲胎蛋白与癌胚抗原的免疫分析方法。他们在多孔板上同时固定这两种组分的捕获抗体,与两种组分的混合样品反应后,再温育结合 BHHCT-Eu<sup>3+</sup> 标记的抗甲胎蛋白和生物素化抗癌胚抗原,通过测定镧在 615 nm 处的固相时间分辨荧光得到甲胎蛋白的浓度,然后加入 BHHCT-Sm<sup>3+</sup> 标记的链霉亲和素-牛血清白蛋白进行生物素-亲和素结合反应,完成反应后,用氢氧化钠将钐溶解下来后测定其液相时间分辨荧光,得到癌胚抗原浓度。

Wu 等<sup>[63]</sup>分别用镧和钐标记促甲状腺素和甲状腺素的抗体,以时间分辨荧光法同时测定血清中这两种组分。测定促甲状腺素分析窗为:激发

波长 340 nm、发射波长 615 nm、延迟时间 0.4 ms、窗口时间 0.4 ms、循环时间 1.0 ms；测定甲状腺素激发波长和循环时间不变，延迟时间、发射波长和窗口时间分别为 0.050 ms、642 nm 和 0.10 ms。通过发射波长和衰减时间的分辨，实现对两种组分的同时检测。同样以这两种稀土元素标记抗体，Bookout 等<sup>[64]</sup>同时测定了植物提取液中的 Cry 3A 和 CP4 EPSPS。Aererbeck 等<sup>[65]</sup>用这两种元素标记的白喉和破伤风抗原，以双抗原夹心法同时测定了血清中这两种病毒的抗体。

Ito 等<sup>[66]</sup>结合多标记物模式与空间分辨模

式，用铈和钐两种标记物同时测定了孕妇血清中的甲胎蛋白、人绒毛膜促性腺激素与雌激素三醇。其具体原理如图 5 所示，在微孔板中混合固定甲胎蛋白和人绒毛膜促性腺激素抗体，在可转移固相板上固定羊抗兔 IgG，与含三种抗原的样品、人绒毛膜促性腺激素与雌激素三醇抗体、铈标记的牛血清白蛋白-雌激素三醇的混合液温育后，取出可转移固相板。往微孔板中加入铈标记的甲胎蛋白抗体和钐标记的人绒毛膜促性腺激素抗体后，以时间分辨荧光检测这两种组分；把可转移固相板插入另一个空白的微孔板后，对

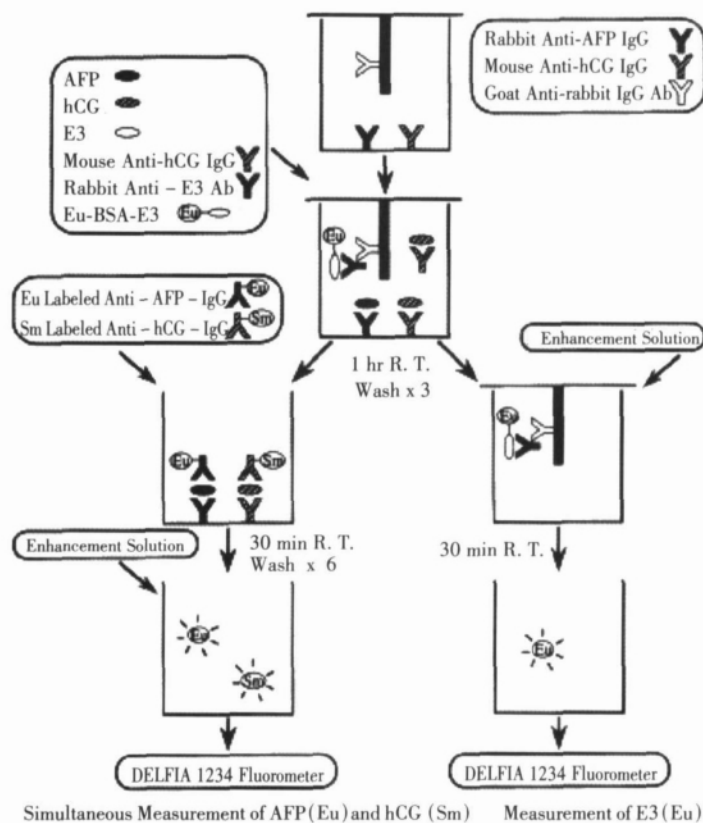


图 5 时间分辨荧光同时检测甲胎蛋白、人绒毛膜促性腺激素与雌激素三醇原理示意图

Fig. 5 Schematic illustration of simultaneous determination for  $\alpha$ -fetoprotein, human chorionic gonadotropin and estriol by time-resolved fluoroimmunoassay

雌激素三醇进行测定。这种新颖的方法打破了有几种组分,就需要多少种标志物的常规思维。

## 2.2 电位识别

Bordes 等<sup>[67]</sup>以电化学免疫传感方法同时测定去甲替林和苯妥英,这两种药物分别以二茂钴和二茂铁标记,标记抗原与未标记样品抗原竞争结合抗体后,未结合的标记抗原在 Nafion 修饰的

碳糊电极上富集,并以方波伏安法分别在 -1.05 V 和 0.26 V 处分别测定这两种组分。但是该方法重现性较差,只能用于半定量分析。Liu 等<sup>[68]</sup>以 ZnS、CdS、PbS 和 CuS 四种纳米晶分别对四种蛋白质的抗体进行标记,并在抗体包被的磁珠上进行夹心免疫反应,反应后的磁珠以硝酸处理,得到的溶液以方波溶出伏安法测定,在四个不同电

位处分别得到四种纳米晶的溶出峰,实现了对四种蛋白质的同时检测。

Zhang 等<sup>[69]</sup>以  $\text{Eu}^{3+}$  和  $\text{Sm}^{3+}$  分别标记甲胎蛋白和人绒毛膜促性腺激素抗体,在抗体包被的微孔板上完成夹心免疫反应后,用硝酸将  $\text{Eu}^{3+}$  和  $\text{Sm}^{3+}$  溶出,以诱导耦合等离子体质谱进行同时检测。

### 2.3 底物区带分辨

基于多标志物的模式有一个很大的问题,就是不同的标记物经常有着截然不同的最优分析条件,如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶与半乳糖酶的最优 pH 值分别为 5~7、8~10 和 6~8。简单地在同一分析体系中联合使用多种标记物,只能在不同标记物的最优分析条件中选择一个妥协性条件,这导致了分析效果的降低。标记物越多,条件选择难度越大,因此目前大多数基于多标记物的多组分传感方法其组分数都不超过两个<sup>[15]</sup>。同时,不同标记物虽然可以波长或者电位等参数进行分辨,但是其分辨效率往往有限,信号重叠

问题有时候非常突出<sup>[61]</sup>。如果使用化学发光进行检测,由于化学发光检测不考虑发光波长,发光强度是唯一的考察因素,因此信号的分辨更是一个难以逾越的障碍。

Ju 研究组<sup>[59]</sup>结合流动分析技术与化学发光检测,实现了一种基于底物区带分辨技术的多组分免疫传感,检测了癌症病人血清中的癌抗原 125(CA 125)和癌胚抗原(CEA)。如图 6 所示,在免疫反应器上同时固定 CA 125 和 CEA 的捕获抗体,免疫反应器固定在流通池中构成传感器并连接在流路中,通过流动技术注入样品、辣根过氧化物酶标记的 CA 125 抗体和碱性磷酸酶标记的 CEA 抗体并温育后,依次通入辣根过氧化物酶化学发光底物区带、清洗缓冲液区带和碱性磷酸酶化学发光底物区带,可以依次得到 CA 125 和 CEA 相应的化学发光信号。由于两种化学发光底物区带的分开,消除了发光检测条件不兼容的问题。更重要的是,该方法使本来无法通过波长进

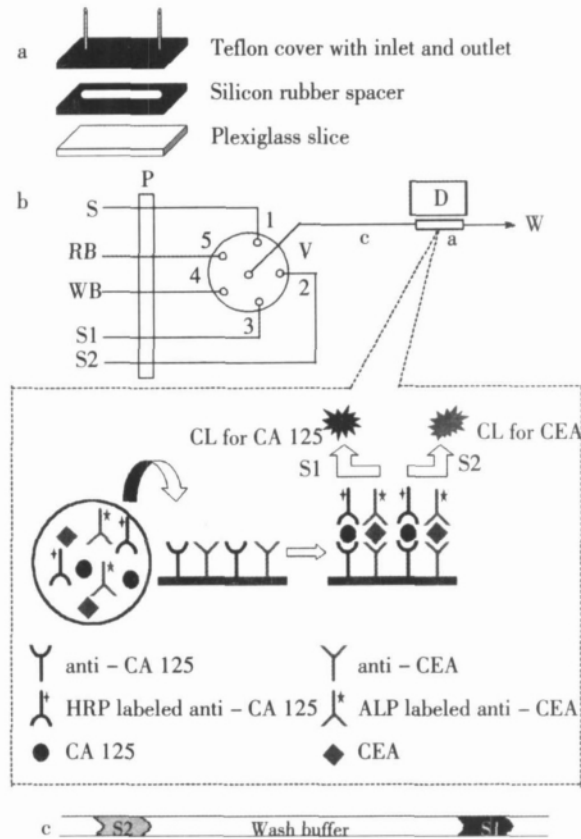


图 6 基于底物区带分辨技术的流通式多组分免疫传感系统

Fig. 6 Scheme of flow-through multianalyte immunosensing system based on substrate zone-resolved technique: (a) flow cell; (b) flow-through analysis system; (c) substrate zones in the flow path; (S) sample, (RB) regeneration buffer, (WB) wash buffer, (S1) HRP substrate, (S2) ALP substrate, (V) multiposition valve, (D) detector, (W) waste

行分辨的化学发光信号通过底物区带进行分辨,进而使多标记物模式在化学发光免疫传感中得到应用。如采用荧光或者吸收光度等检测手段,还可以解决常见的谱带重叠问题。理论上讲,可以使用种类更多的酶标记更多的组分,以进一步增加可检测组分的数量。遗憾的是,目前在化学发光免疫分析中得到广泛使用的酶标记物只有辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。

### 3 其它模式

Haake 等<sup>[70]</sup>以液相色谱分离四种杀虫剂,馏分在柱后与这四种组分皆有结合作用的多克隆抗体结合,导致游离抗体的减少,以反射干涉光传感器检测游离抗体,实现对四种杀虫剂的定量。该方法采用非标记型的反射干涉光传感检测模式,简化了实验步骤。Zhou 等<sup>[71]</sup>提出了一种温控型均相多组分免疫分析方法,顺序检测 IgG 和 IgA,采用夹心免疫反应模式,辣根过氧化物酶催化化学发光检测。这两种蛋白质的一抗分别固定在热敏性的聚 N-异丙基丙烯酰胺(PNIP)和磁珠上,固定一抗的两种免疫载体与样品及酶标二抗反应形成夹心复合物后,升温至 35℃,这时 PNIP 沉淀出来(PNIP 临界沉淀温度为 31℃),将沉淀物进行离心分离,并将磁珠以磁力分离。沉淀物洗净后加入到化学发光底物液中进行分别检测。

González - Martínez 等<sup>[72]</sup>比较了固定蛋白质 A/G 的流动注射免疫传感器的三种多组分免疫分析模式,用于测定三种杀虫剂。第一种模式是顺序模式,即在传感器上顺序执行三种组分的分析过程,每完成一个组分的检测后再再生传感器,完成三组分的检测共需 72 min。该模式最适合于对混合样品中某一已知成分进行快速检测。第二种模式是递加模式,即完成第一组分的检测后,不经再生,立即通入第二组分,以信号增加量测定第二组分,然后通入第三组分,以信号增加量测定第三组分,最后一次性再生传感器,洗脱所有组分,全过程耗时 51 min。该模式适合于快速半定量分析。第三种模式是同时模式,即在反应器中同时通入三种组分及其相应抗体,进行检测,得到信号需要进行调制,全过程只需 24 min。该模式适合野外条件下大量筛查。

基于竞争法和酶标抗原的场流动分区技术也被可用于多组分免疫传感,其基本原理是在不同粒径的微珠上固定不同组分的抗体,在流动场中由于粒径的不同导致不同组分的微珠在不同时间流出,实现各组分的顺序检测<sup>[73]</sup>。

### 4 交叉作用

在多组分免疫传感中,异种抗原抗体间的交叉作用是一个需要考察的重要因素,一些结构相似的小分子的多组分免疫传感中交叉作用现象尤其常见。这些小分子类似物的结构非常相似(如环境水样中多种农药残留物以及某种药物的多种代谢产物),其中某一种组分的抗体常常会对接结构相似的其它组分产生类似的免疫结合作用,从而导致分析结果的较大误差。为了消除这种交叉作用带来的影响,尽量得到较为准确的分析结果,目前多结合化学计量学和抗体阵列方法来对分析结果进行校正<sup>[74-78]</sup>。

### 5 结论与展望

近十年来,该领域的新技术、新方法层出不穷。当前研究最多、应用最广泛的当属空间分辨模式。其主要优点为分析通量高,可同时检测组分多;缺点是装置相对复杂,且常需要昂贵的阵列检测器。今后该模式应当致力于发展制作方法相对简单的阵列装置与更为便宜的检测器,以提高其普适性;并进一步在体积较小的传感装置上提高其集成度,实现更多组分的同时检测。基于多标志物的多组分免疫传感模式集中于稀土元素标记和时间分辨荧光检测方面,由于其一些固有缺陷,如分析条件不兼容、信号重叠、可用标记物有限等,近年来研究热度已大为下降。为了进一步发展基于多标记物的模式,需要寻找更多对分析条件要求不苛刻,信号分辨程度高的标记物,以增加可同时分析物数量。多组分免疫分析还应当致力于发展一些小型化、便携式、可反复使用的传感装置,以方便野外作业与移动作业,并降低使用成本。

### 参考文献

- [1] Jain S R, Borowska E, Davidsson R, et al. A chemiluminescence flow immunosensor based on a porous mono-

- lithic metacrylate and polyethylene composite disc modified with Protein G [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2004, 19: 795 ~ 803.
- [ 2 ] Martín - Esteban A, Fernández P, Cámara C. Immunosorbents: a new tool for pesticide sample handling in environmental analysis [J]. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, 357: 927 ~ 933.
- [ 3 ] Fu Z F, Hao C, Fei X Q, et al. Flow - injection chemiluminescent immunoassay for  $\alpha$  - fetoprotein based on epoxysilane modified glass microbeads [J]. *J. Immunol. Methods*, 2006, 312: 61 ~ 67.
- [ 4 ] Dai Z, Yan F, Chen J, et al. Reagentless amperometric immunosensors based on direct electrochemistry of horseradish peroxidase for determination of carcinoma antigen - 125[J]. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 5 429 ~ 5 434.
- [ 5 ] Micheli L, Grecco R, Badaea M, et al. An electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 determination in milk using screen - printed electrodes [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 21: 588 ~ 596.
- [ 6 ] Nandakumar R, Nandakumar M P, Mattiasson B. Quantification of nisin in flow - injection immunoassay systems [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2000, 15: 241 ~ 247.
- [ 7 ] Yang H H, Zhu Q Z, Qu H Y, et al. Flow injection fluorescence immunoassay for gentamicin using sol - gel - derived mesoporous biomaterial [J]. *Anal. Biochem.*, 2002, 308: 71 ~ 76.
- [ 8 ] Eremenko A V, Bauer C G, Makower A, et al. The development of a non - competitive immunoenzymometric assay of cocaine [J]. *Anal. Chim. Acta*, 1998, 358: 5 ~ 13.
- [ 9 ] Ivnitski D, Abdel - Hamid I, Atanasov P, et al. Biosensors for detection of pathogenic bacteria [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 1999, 14: 599 ~ 624.
- [10] Ivnitski D, Abdel - Hamid I, Atanasov P, et al. Application of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria [J]. *Electroanalysis*, 2000, 12: 317 ~ 325.
- [11] 程介克. 单细胞分析 [M]. 北京: 科学出版社 2005, 127 ~ 128.
- [12] 李天星. 现代临床免疫学检验 [M]. 北京: 军事医学科学出版社 2001, 167 ~ 252.
- [13] Brecht A, Abuknesha R. Multi - analyte immunoassays application to environmental analysis [J]. *Trends Anal. Chem.*, 1995, 14: 361 ~ 371.
- [14] Samsonova J V, Rubtsova M Y, Kiseleva A V, et al. Chemiluminescent multiassay of pesticides with horseradish peroxidase as a label [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 1999, 14: 273 ~ 281.
- [15] Kricka L J. Multianalyte testing [J]. *Clin. Chem.*, 1992, 38, 327 ~ 328.
- [16] Moreno - Bondi M C, Alarie J P, Vo - Dinh T. Multi - analyte analysis system using an antibody - based biochip [J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 375, 120 ~ 124.
- [17] Chen C S, Durst R A. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* with an array - based immunosorbent assay using universal protein G - liposomal nanovesicles [J]. *Talanta*, 2006, 69: 232 ~ 238.
- [18] Song S P, Li B, Hu J, et al. Simultaneous multianalysis for tumor markers by antibody fragments microarray system [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2004, 510: 147 ~ 152.
- [19] Belleville E, Dufva M, Aamand J, et al. Quantitative microarray pesticide analysis [J]. *J. Immunol. Methods*, 2004, 286: 219 ~ 229.
- [20] Wadkins R M, Golden J P, Pritsiolas L M, et al. Detection of multiple toxic agents using a planar array immunosensor [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 1998, 13: 407 ~ 415.
- [21] Christodoulides N, Tran M, Floriano P N, et al. A microchip - based multianalyte assay system for the assessment of cardiac risk [J]. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 3 030 ~ 3 036.
- [22] Roda A, Mirasoli M, Venturoli S, et al. Microtiter format for simultaneous multianalyte detection and development of a PCR - chemiluminescent enzyme immunoassay for typing human papillomavirus [J]. *Clin. Chem.*, 2002, 48: 1 654 ~ 1 660.
- [23] Strasser A, Dietrich R, Usleber E, et al. Immunochemical rapid test for multiresidue analysis of antimicrobial drugs in milk using monoclonal antibodies and hapten - glucose oxidase conjugates [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2003, 495: 11 ~ 19.
- [24] Knecht B G, Strasser A, Dietrich R, et al. Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk [J]. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 646 ~ 654.
- [25] Fall B I, Eberlein - König B, Behrendt H, et al. Microarrays for the screening of allergen - specific IgE in human serum [J]. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 556 ~ 562.
- [26] Sapsford K E, Rasooly A, Taitt C R, et al. Detection of campylobacter and shigella species in food samples using an array biosensor[J]. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 433 ~ 440.

- [27] Delehanty J B, Ligler F S. A microarray immunoassay for simultaneous detection of proteins and bacteria [J]. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 5 681 ~ 5 687.
- [28] Rowe C A, Scruggs S B, Feldstein M J, et al. An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes [J]. *Anal. Chem.*, 1999, 71, 433 ~ 439.
- [29] Golden J P, Taitt C R, Shriver - Lake L C, et al. A portable automated multianalyte biosensor [J]. *Talanta*, 2005, 65: 1 078 ~ 1 085.
- [30] Rowe - Taitt C A, Golden J P, Feldstein M J, et al. Array biosensor for detection of biohazards [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2000, 14: 785 ~ 794.
- [31] Rowe - Taitt C A, Hazzard J W, Hoffman K E, et al. Simultaneous detection of six biohazardous agents using a planar waveguide array biosensor [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2000, 15: 579 ~ 589.
- [32] Taitt C R, Anderson G P, Lingerfelt B M, et al. Nine - analyte detection using an array - based biosensor [J]. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 6 114 ~ 6 120.
- [33] Rowe C A, Tender L M, Feldstein M J, et al. Array biosensor for simultaneous identification of bacterial, viral, and protein analytes [J]. *Anal. Chem.*, 1999, 71: 3 846 ~ 3 852.
- [34] Spasford K E, Ngundi M M, Moore M H, et al. Rapid detection of foodborne contaminants using an array biosensor [J]. *Sens. Actuators B. Chemical*, 2006, 113: 599 ~ 607.
- [35] Barzen C, Brecht A, Gauglitz G. Optical multiple - analyte immunosensor for water pollution control [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2002, 17: 289 ~ 295.
- [36] Rodriguez - Mozaz S, de Alda M J L, Barceló D. Fast and simultaneous monitoring of organic pollutants in a drinking water treatment plant by a multi - analyte biosensor followed by LC - MS validation [J]. *Talanta*, 2006, 69: 377 ~ 384.
- [37] Fernández - Sánchez C, McNeil C J, Rawson K, et al. One - step immunostrip test for the simultaneous detection of free and total prostate specific antigen in serum [J]. *J. Immunol. Method*, 2005, 307: 1 ~ 12.
- [38] Zhang C, Zhang Y, Wang S. Development of multianalyte flow - through and lateral - flow assays using gold particles and horseradish peroxidase as tracers for the rapid determination of carbaryl and endosulfan in agricultural products [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54: 2 502 ~ 2 507.
- [39] Yacoub - George E, Meixner L, Scheithauer W, et al. Chemiluminescence multichannel immunosensor for biodetection [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 457: 3 ~ 12.
- [40] Koch S, Wolf H, Danapel C, et al. Optical flow - cell multichannel immunosensor for the detection of biological warfare agents [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2000, 14: 779 ~ 784.
- [41] Haasnoot W, Cazemier G, Koets M, et al. Single biosensor immunoassay for the detection of five aminoglycosides in reconstituted skimmed milk [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2003, 488: 53 ~ 60.
- [42] Piyasena M E, Buranda T, Wu Y, et al. Near - simultaneous and real - time detection of multiple analytes in affinity microcolumns [J]. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 6 266 ~ 6 273.
- [43] Mastichiadis C, Kakabakos S E, Christofidis I, et al. Simultaneous determination of pesticides using a four - band disposable optical capillary immunosensor [J]. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 6 064 ~ 6 072.
- [44] Petrou P S, Kakabakos S E, Christofidis I, et al. Multi - analyte capillary immunosensor for the determination of hormones in human serum samples [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2002, 17: 261 ~ 268.
- [45] Ogasawara D, Hirano Y, Yasukawa T, et al. Electrochemical microdevice with separable electrode and antibody chips for simultaneous detection of pepsinogens 1 and 2 [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 21: 1 784 ~ 1 790.
- [46] Wilson M S, Nie W Y. Electrochemical multianalyte immunoassays using an array - based sensor [J]. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 2 507 ~ 2 513.
- [47] Wilson M S, Nie W Y. Multiplex measurement of seven tumor markers using an electrochemical protein chip [J]. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 6 478 ~ 6 483.
- [48] Wilson M S. Electrochemical immunosensors for the simultaneous detection of two tumor markers [J]. *Anal. Chem.*, 2005, 77: 1 496 ~ 1 502.
- [49] Kojima K, Hiratsuka A, Suzuki H, et al. Electrochemical protein chip with arrayed immunosensors with antibodies immobilized in a plasma - polymerized film [J]. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 1 116 ~ 1 122.
- [50] Ding Y, Zhou L P, Halsall H B, et al. Feasibility studies of simultaneous multianalyte amperometric immunoassay based on spatial resolution [J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, 19: 153 ~ 161.
- [51] Shi M H, Peng Y Y, Zhou J, et al. Immunoassays based on microelectrodes arrayed on a silicon chip for high

- throughput screening of liver fibrosis markers in human serum [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 21: 2 210 ~ 2 216.
- [52] Jiang D C, Tang J, Liu B H, et al. Ultrathin alumina sol - gel - derived films: allowing direct detection of the liver fibrosis markers by capacitance measurement [J]. *Anal. Chem.*, 2003, 75: 4 578 ~ 4 584.
- [53] 王磊磊, 方晖, 曾庆音, 等. 压电晶体传感器阵列在补体系统免疫分析中的应用 [J]. *分析科学学报*, 2001, 17: 358 ~ 362.
- [54] Michael K L, Taylor L C, Schultz S L, et al. Randomly ordered addressable high - density optical sensor arrays [J]. *Anal. Chem.*, 1998, 70: 1 242 ~ 1 248.
- [55] Szurdoki F, Michael K L, Walt D R. A duplexed microsphere - based fluorescent immunoassay [J]. *Anal. Biochem.*, 2001, 291: 219 ~ 228.
- [56] Rissin D M, Walt D R. Duplexed sandwich immunoassays on a fiber - optic microarray [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2006, 564: 34 ~ 39.
- [57] Zhi Z L, Murakami Y J, Morita Y, et al. Multianalyte immunoassay with self - assembled addressable microparticle array on a chip [J]. *Anal. Biochem.*, 2003, 318: 236 ~ 243.
- [58] Ray C A, Bowsher R R, Smith W C, et al. Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum [J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, 36: 1 037 ~ 1 044.
- [59] Fu Z F, Liu H, Ju H X. Flow - through multianalyte chemiluminescent immunosensing system with designed substrate zone - resolved technique for sequential detection of tumor markers [J]. *Anal. Chem.*, 2006, 78, 6 999 ~ 7 005.
- [60] Swartzman E E, Miraglia S J, Mellentin - Michelotti J, et al. A homogeneous and multiplexed immunoassay for high - throughput screening using fluorometric microvolume assay technology [J]. *Anal. Biochem.*, 1999, 271: 143 ~ 151.
- [61] Goldman E R, Clapp A R, Anderson G P, et al. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents [J]. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 684 ~ 688.
- [62] Matsumoto K, Yuan J L, Wang G L, et al. Simultaneous determination of  $\alpha$  - fetoprotein and carcinoembryonic antigen in human serum by time - resolved fluoroimmunoassay [J]. *Anal. Biochem.*, 1999, 276: 81 ~ 87.
- [63] Wu F B, Han S Q, Xu T, et al. Sensitive time - resolved fluoroimmunoassay for simultaneous detection of serum thyroid - stimulating hormone and total thyroxin with Eu and Sm as labels [J]. *Anal. Biochem.*, 2003, 314: 87 ~ 96.
- [64] Bookout J T, Joaquim T R, Magin K M, et al. Development of a dual - label time - resolved fluorometric immunoassay for the simultaneous detection of two recombinant proteins in potato [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48: 5 868 ~ 5 873.
- [65] Aggerbeck H, Nørgaard - Pedersen B, Heron I. Simultaneous quantitation of diphtheria and tetanus antibodies by double antigen, time - resolved fluorescence immunoassay [J]. *J. Immunol. Methods*, 1996, 190: 171 ~ 183.
- [66] Ito K, Oda M, Tsuji A, et al. Simultaneous determination of alpha - fetoprotein, human chorionic gonadotropin and estriol in serum of pregnant women by time - resolved fluoroimmunoassay [J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, 20: 169 ~ 178.
- [67] Bordes A L, Limoges B, Brossier P, et al. Simultaneous homogeneous immunoassay of phenytoin and Phenobarbital using a Nafion - loaded carbon paste electrode and two redox cationic labels [J]. *Anal. Chim. Acta*, 1997, 356: 195 ~ 203.
- [68] Liu G D, Wang J, Kim J, et al. Electrochemical coding for multiplexed immunoassays of proteins [J]. *Anal. Chem.*, 2004, 76: 7 126 ~ 7 130.
- [69] Zhang S C, Zhang C, Xing Z, et al. Simultaneous determination of  $\alpha$  - fetoprotein and free  $\beta$  - human chorionic gonadotropin by element - tagged immunoassay with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Clin. Chem.*, 2004, 50: 1 214 ~ 1 221.
- [70] Haake H M, de Best L, Irth H, et al. Label - free biochemical detection coupled on - line to liquid chromatography [J]. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 3 635 ~ 3 641.
- [71] Zhou Y, Zhang Y H, Lau C W, et al. Sequential determination of two proteins by temperature - triggered homogeneous chemiluminescent immunoassay [J]. *Anal. Chem.*, 2006, 78: 5 920 ~ 5 924.
- [72] González - Martínez M Á, Puchades R, Maquieira Á. Comparison of multianalyte immunosensor formats for on - line determination of organic compounds [J]. *Anal. Chem.*, 2001, 73: 4 326 ~ 4 332.
- [73] Roda A, Mirasoli M, Melucci D, et al. Toward multianalyte immunoassays: a flow - assisted, solid - phase format with chemiluminescence detection [J]. *Clin.*

- Chem., 2005, 51: 1 993 ~ 1 995.
- [74] Jones G, Wortberg M, Hammock B D, et al. A procedure for the immunoanalysis of samples containing one or more members of a group of cross - reacting analytes [J]. Anal. Chim. Acta, 1996, 336: 175 ~ 183.
- [75] Reder S, Dieterle F, Jansen H, et al. Multi - analyte assay for triazines using cross - reactive antibodies and neural networks [J]. Biosens. Bioelectron., 2003, 19: 447 ~ 455.
- [76] Piehler J, Brecht A, Giersch T, et al. Affinity characterization of monoclonal and recombinant antibodies for multianalyte detection with an optical transducer [J]. Sens. Actuators B. Chemical, 1997, 39: 432 ~ 437.
- [77] Samsonova J V, Rubtsova M Y, Kiseleva A V, et al. Chemiluminescent multiassay of pesticides with horseradish peroxidase as a label [J]. Biosens. Bioelectron., 1999, 14: 273 ~ 281.
- [78] Bhand S, Surugiu I, Dzgoev A, et al. Immuno - arrays for multianalyte analysis of chlorotriazines [J]. Talanta, 2005, 65: 331 ~ 336.