

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.01.014

抗人 β -HCG 单克隆抗体的制备及化学发光 检测方法的建立*

关 雪¹ 刘福凯² 杨昕蕾² 陈剑锋¹ 杨永良¹ 梁重阳³

(1 哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心 黑龙江 哈尔滨 150086;

2 哈尔滨医科大学附属第一医院实验动物中心 黑龙江 哈尔滨 150001; 3 吉林大学再生医学科学研究所 吉林 长春 130021)

摘要 目的:制备人绒毛膜促性腺激素(β -HCG)单克隆抗体,建立人 β -HCG 双抗体夹心 CLIA 检测方法。**方法:**用人 β -HCG 抗原免疫小鼠,通过细胞融合、筛选后得到杂交瘤细胞株,然后将细胞株扩大培养并纯化上清液获得抗体,测定抗体亲和力、特异性及表位,最后建立双抗体夹心 CLIA 方法。**结果:**获得 4 株抗人 β -HCG 的杂交瘤细胞株(β -1-1、 β -2-1、 β -3-1、 β -4-1)。用 β -1-1 和 β -2-1 建立的双抗体夹心法的检测范围为 0.5 mIU/mL-800 mIU/mL,灵敏度 0.23 mIU/mL,检测结果的相对偏差均在 $\pm 10\%$ 内,回收率在 90%以上。**结论:**本研究最终成功制备了抗人 β -HCG mAb,建立了定量检测人 β -HCG 的双抗体夹心 CLIA 方法,为 β -HCG 检测及疾病的诊断奠定基础。

关键词:人绒毛膜促性腺激素(β -HCG);单克隆抗体;夹心 CLIA

中图分类号:Q95-3, Q75, Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)01-68-06

Preparation of Monoclonal Antibodies Against Human β -HCG and Establishment of a Sandwich CLIA System*

GUAN Xue¹, LIU Fu-kai², YANG Xin-lei², CHEN Jian-feng¹, YANG Yong-liang¹, LIANG Chong-yang³

(1 Animal Laboratory Center, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China;

2 Animal Laboratory Center, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

3 Institute of Frontier Medical Science of Jilin University, Changchun, Jilin, 130021, China)

ABSTRACT Objective: To prepare human chorionic gonadotrophin (β -HCG) monoclonal antibody, and establish double antibody sandwich CLIA detecting system for human β -HCG. **Methods:** Mice were immunized with human β -HCG antigen, and then hybridoma cell lines were obtained by cell fusion and screened for the clones which expressed the antibody. The positive cell clones were expanded further for a large volume of supernatant, from which the antibodies were purified and tested for affinity, specificity and epitope. Finally the obtained antibodies were used to establish the double antibody sandwich CLIA system. **Results:** 4 monoclones of anti-human β -HCG (β -1-1, β -2-1, β -3-1, β -4-1) antibody were obtained. β -1-1 and β -2-1 were used to establish the double antibody sandwich system with detection range of 0.5 mIU/mL-800 mIU/mL, sensitivity of 0.23 mIU/mL, relative detection deviation of $\pm 10\%$ and recovery rate of over 90%. **Conclusion:** The double antibody sandwich CLIA system for quantitative detection of human β -HCG, using the prepared anti-human β -HCG mAbs, was successfully established, which lay the foundation for the diagnostic β -HCG detection in the diseases.

Key words: Human chorionic gonadotrophin (β -HCG); Monoclonal antibody; Sandwich CLIA

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)01-68-06

前言

人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG),是由胎盘滋养层细胞分泌的一种糖蛋白,由 α 和 β 亚单位组成二聚体, α -亚单位为垂体前叶激素所共有, β -亚单位是HCG所特有的。其主要功能是刺激黄体,有利于雌激素和黄体酮持续分泌,促进子宫蜕膜形成,及胎盘生长成熟。血清中 β -HCG测定在临床上用于正常妊娠^[1]、多胞胎和病理性如异位妊娠、先兆流产、葡萄胎及绒毛膜癌^[2]的检测,而且在预后评价中具有重要意义。化学发光免疫分析法^[3-5]具有灵敏度高、线性

范围广、特异性高和准确性好等特点,采用这种方法进行HCG检测是至关重要的。

本实验以鲁米诺发光体系^[6-9]和两种针对 β -HCG不同抗原表位的单克隆抗体为基础,采用双抗体夹心的抗原抗体反应模型,建立了定量测定人血清 β -HCG蛋白的双抗体夹心化学发光检测法(CLIA)。

1 材料与方法

1.1 实验材料

Balb/c小鼠,7周龄,雄性,北京维通利华实验动物技术有

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81202446)

作者简介:关雪(1984-),女,硕士,主要研究方向:实验动物繁育与管理,

E-mail: dk7154@sina.com, 电话: 18545001980

(收稿日期:2013-06-02 接受日期:2013-06-28)

限公司提供【SCXK(京)2006-0009】;β-HCG 蛋白购于美国 Fitzgerald 公司,纯度大于 96%;化学发光底物鲁米诺、牛血清白蛋白(BSA)、弗氏佐剂、红细胞裂解液、PEG 3350、HAT、HT、胎牛血清(FBS)、辣根过氧化物酶均购于 Sigma 公司;微孔板发光分析仪购自北京滨松光子;96 孔微孔板购自深圳金灿华实业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫 第一次用弗氏完全佐剂,于腹腔、腋窝及腹股沟注射,每只剂量为 60 μg/0.5 mL,第 2 次起用弗氏不完全佐剂,剂量为每只 60 μg/0.5 mL,间隔两周后用相同剂量进行第三次注射。10 d 后测尾血,使用 ELISA^[10]方法测定,如滴度未达到 1:104,OD 值未达到 1.0 以上,则继续免疫,如 ELISA 测定已达滴度,则可于融合前 3 d 进行腹部加强免疫,剂量为每只 60 μg/0.5 mL,不加佐剂。

1.2.2 细胞融合与筛选 取对数生长期的 Sp2/0 细胞与脾细胞按 1:5 比例混和在一起,800×g 离心 10 min,弃上清,在 90 s 内缓慢滴加聚乙二醇(PEG,相对分子质量 4000000),并迅速加入 37℃ 预温的培养基。离心后用添加 1% HAT 和 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基悬浮,加在 96 孔细胞培养板中,在 37℃,5% CO₂ 的培养箱中封闭培养 11 d 后,取细胞上清,在包被 β-HCG 蛋白的 ELISA 板中进行间接 ELISA 筛选,并将确定的阳性孔的细胞进行亚克隆。

1.2.3 融合细胞放大培养、抗体的纯化与透析 将亚克隆后的融合细胞用细胞培养转瓶进行扩大培养,观察细胞状态直至 90% 以上的细胞死亡后取上清,0.4 μm 滤纸过滤,用过饱和硫酸铵法对抗体进行纯化,然后用透析袋透析过夜,换液 3-4 次,再经 PEG 浓缩,最后用分光光度计测定抗体含量。

1.2.4 特异性鉴定 在同时包被有 α-HCG、β-HCG 和 HCG 蛋白的 ELISA 板中,用间接 ELISA 方法测定纯化获得抗体的特异性。

1.2.5 亲和力测定 纯化后的抗体用 Beatty^[11]方法进行亲和力测定。

1.2.6 表位鉴定 用过碘酸钠法将抗体标记辣根过氧化物酶,通过直接竞争 ELISA 法鉴定针对抗原不同表位的特异性抗体。

1.2.7 夹心 CLIA 方法的建立 抗体最佳工作浓度的确定:将 β-HCG 蛋白包被,HRP 标记抗体第一孔 1:100 倍稀释,依次做 4 倍梯度稀释,用直接 ELISA 方法测定其 OD 值,将稍高于 1/2MaxOD 值作为酶标抗体最佳工作浓度。分别将 0.5、1.0、1.5 和 2.0 μg/mL 的捕捉抗体包被,β-HCG 蛋白对倍稀释,用酶标抗体最佳工作浓度做夹心化学发光检测,选择检测发光值最高、能检测 β-HCG 蛋白浓度最低的包被浓度为最佳包被浓度。

检测范围的确定: 将 α-HCG、β-HCG 和 HCG 蛋白标准品按照 0.1 mIU/L-1000 mIU/L 浓度范围作对倍稀释,用建立的夹心 CLIA 方法测定其发光值,绘制标准曲线,确定最佳线性范围。

最低检测限的确定: 将样品稀释液用建立的方法同时做 20 次测定,取其平均值(M)及标准差(SE),M+2SE 得出的发光值对应标准曲线上的浓度值即为最低检测限(最小检出量)。

特异性验证: 通过在血清中加入不同浓度的交叉反应物来考察抗 β-HCG 抗体的交叉反应,对浓度为 40 mIU/L 的 TSH、

浓度为 100 mIU/mL 的 FSH 和浓度为 200 mIU/mL 的 LH 进行测定,其 β-HCG 测定的结果应小于 4 mIU/mL。

准确性验证: 选取 β-HCG 蛋白标准品浓度分别为 500 mIU/mL、100 mIU/mL、2 mIU/mL,将其作为样品进行检测。分别测量 1 次后,其平均结果记为 M,根据公式:测量偏差=(M-理论值)/理论值×100%,即可计算出准确度。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立

第 3 次免疫后尾部血清效价检测如图 1。效价为 1/2Max-OD 所对应的血清的稀释倍数。1 号和 2 号小白鼠的血清效价分别为 3:100K 和 1:100K,对抗原的反应性都很高(图 1)。

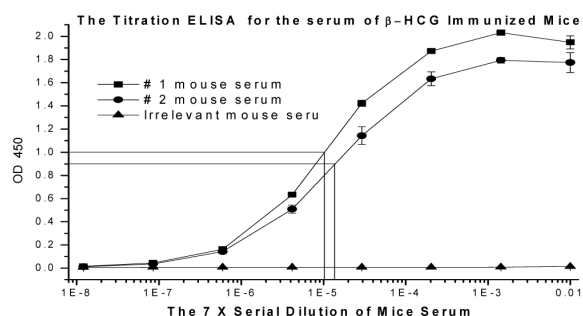


图 1 β-HCG 第三次免疫小鼠后的效价

Fig.1 The titer after the third β-HCG immunization in mice

选择 2 号小鼠进行细胞融合。待融合后第 10d 进行 ELISA 筛选,将 OD 值 > 0.5 定为阳性,OD 值 ≤ 0.5 定为阴性。共得到与 β-HCG 反应为阳性的细胞株 7 株(表 1,包被浓度 1.0 μg/mL;阳性孔编号顺序为:板号-行号-列号,板号为 1-15,行号为 A-H,列号为 1-12;用“+++”表示为强阳性,用“++”表示为中强度阳性,用“+”表示为阳性)。

将确定的 7 个阳性孔中的细胞继续培养,经过 HAT、HT 选择性培养基的筛选,确定 4 株抗体分泌稳定的杂交瘤细胞株,并进行三次亚克隆,最终每个亚克隆挑选出 1 个相对细胞株长势旺盛、抗体分泌相对多的细胞,分别命名为 β-1-1、β-2-1、β-3-1 和 β-4-1。

2.2 特异性抗体的获得

2.2.1 抗体的纯化 将每株细胞用 300 mL 含 5% 血清的 RPMI-1640 培养基扩大培养,约 21 d,有 90% 以上的细胞死亡,离心去沉淀,经过饱和硫酸铵法纯化后,测定质量浓度约为 2 mg/mL。

2.2.2 特异性鉴定 分别将 TSH、FSH、LH、α-HCG、HCG 和 β-HCG 蛋白包被,对纯化后的抗体采用间接 ELISA 方法测定其 OD 值,并计算 S/N 值。如图 2 所示,4 种单抗均不与 TSH、FSH、LH、α-HCG 有交叉反应,而与目的蛋白 β-HCG、HCG 有阳性反应。

2.2.3 将 β-HCG 蛋白稀释 0.60 μg/mL、0.30 μg/mL、0.15 μg/mL 三个浓度并包被,4 种单抗稀释后采用非竞争间接 ELISA 测定 OD 值并作图,分别找出每个抗体的 3 条曲线的 1/2MaxOD 所对应的浓度,换算成摩尔浓度,根据 $Ka = (n-1)/2(n[Ab'] - [Ab])$ 公式,计算出每个抗体的亲和常数 Ka(表 2)。

表 1 β -HCG 融合杂交瘤细胞的间接 ELISA 筛选

Table 1 Screening for anti- β -HCG-antibody-secreting fusion hybridoma cells by indirect ELISA

Number	OD(450 nm)	Positive strength
3E8	0.92	++
5E9	1.114	+++
7B3	0.85	++
10B2	0.7	+
11C4	0.907	++
15C5	0.895	++
15A3	0.685	+

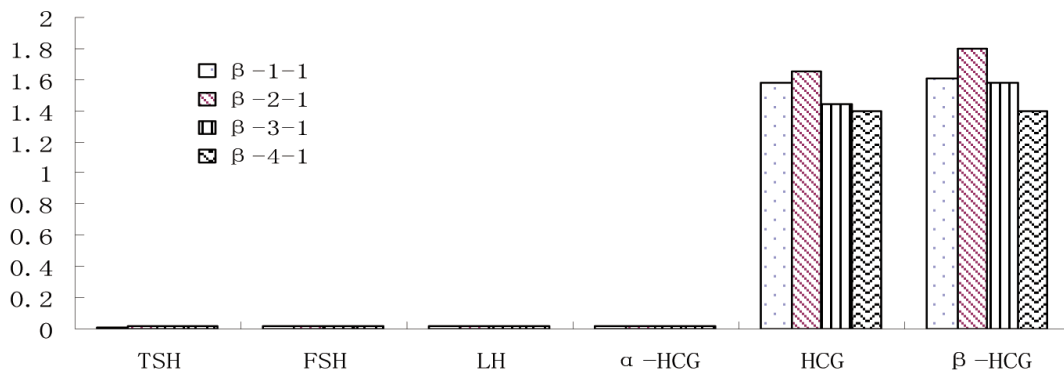


图 2 β -HCG 单克隆抗体与相关蛋白的交叉反应

Fig.2 Cross-reaction analysis of anti- β -HCG monoclonal antibody

表 2 β -HCG 单克隆抗体的亲和力

Table 2 Affinity of β -HCG monoclonal antibody

Number	Concentration (μ g/mL)	Ka (L/mol)	MKa $\pm$ SD (L/mol)
β -1-1	0.60	4.30×10^9	$(4.47 \pm 0.15) \times 10^9$
	0.30	4.51×10^9	
	0.15	4.60×10^9	
β -2-1	0.60	2.95×10^9	$(2.69 \pm 0.23) \times 10^9$
	0.30	2.62×10^9	
	0.15	2.50×10^9	
β -3-1	0.60	0.39×10^9	$(0.40 \pm 0.22) \times 10^9$
	0.30	0.19×10^9	
	0.15	0.63×10^9	
β -4-1	0.60	6.67×10^9	$(6.32 \pm 0.31) \times 10^9$
	0.30	6.19×10^9	
	0.15	6.09×10^9	

2.2.4 表位的鉴定 将 β -2-1 进行 HRP 酶标记,测定其最佳工作浓度为 1:10K。将 β -HCG 蛋白包被,用 β -2-1-HRP 与其它三株抗体进行竞争 ELISA 反应,如图 3, β -2-1 与自身 β -2-1 和 β -4-1 有竞争,与 β -1-1 和 β -3-1 对 β -HCG 都没有竞争反应,即 β -2-1 与 β -1-1 和 β -3-1 分别针对 β -HCG 不同表位。(图 3)。

2.2.5 夹心 CLIA 检测方法的建立 最佳包被浓度的确定:选择 β -1-1 作为夹心 CLIA 方法中的捕捉抗体,将其分别稀释成

0.5、1.0、1.5 和 2.0 μ g/mL 的质量浓度进行包被,按照夹心 CLIA 方法测定对倍稀释的 β -HCG 蛋白的发光值并作图,结果表明,当 β -1-1 包被 1.5 μ g/mL 时检测的发光值最高,可检测 β -HCG 的最低量最小。

检测范围的确定: β -HCG 标准品稀释梯度为 0.1 mIU/mL-1000 mIU/mL 测定,绘制回归曲线。结果表明,其具有良好线性

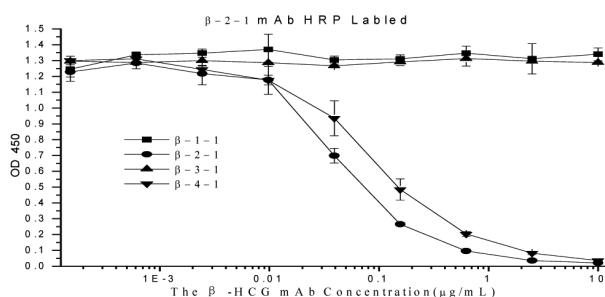


图3 β -HCG 单克隆抗体表位的鉴定

Fig.3 Epitope identification of the anti- β -HCG monoclonal antibody

关系的区间为 0.5 mIU/mL-800 mIU/mL(图 4),最高检测上限为 800 mIU/mL。标准曲线计算公式为 $\text{Log}(Y)=4.3230+0.9878 \text{Log}(X)$ 。

最低检测限的验证:用零浓度标准品作为样本进行检测,重复测定 20 次,得出 20 次测量结果的 RLU 值(相对发光值),计算其平均值(M)和标准差(SE),得出 $M+2SE$,根据试剂盒所

用校准品的定标曲线方程,将 $M+2SE$ 的 RLU 值带入上述方程 $[\text{Log}(Y)=4.3230+0.9878 \text{Log}(X)]$ 中,求出对应的浓度值,即为最低检测限。结果如表 3 所示,最低检测线为 0.23 mIU/mL。

特异性验证:通过在血清中加入不同浓度的交叉反应物来考察抗 β -HCG 抗体的交叉反应,对浓度为 40 mIU/L 的 TSH 进行测定,其测定结果小于 4 mIU/mL;对浓度为 100 mIU/mL 的 FSH 进行测定,其测定结果小于 4 mIU/mL;对浓度为 200 mIU/mL 的 LH 进行测定,其测定结果小于 4 mIU/mL。结果见表 4。

由表 4 可知:TSH、FSH 及 LH 几乎不会对 β -HCG 的检测结果造成干扰,表明 β -HCG 抗体的特异性较好。

准确性:选取 β -HCG 蛋白标准品高、中、低的浓度分别为 500 mIU/mL、100 mIU/mL、2 mIU/mL,将其作为样品进行检测。分别测量 1 次后,其平均结果记为 M,根据公式:测量偏差 = $(M - \text{理论值}) / \text{理论值} \times 100\%$,即可计算出准确度。

由表 5 结果表明:高、中、低值准确度的检测结果的相对偏差均在 $\pm 10\%$ 内,说明 β -HCG 夹心 CLIA 具有较好的准确性。

表 3 β -HCG 夹心 CLIA 灵敏度检测结果

Table 3 Detection sensitivity analysis of β -HCG sandwich CLIA

Number	RLU
1	4675
2	4685
3	4485
4	4786
5	4648
6	4657
7	4635
8	4697
9	4887
10	4587
11	4764
12	4605
13	4674
14	4782
15	4584
16	4867
17	4567
18	4765
19	4563
20	4763
M	4683.8
SE	105.70
M+2SE	4895.19
Lowest limit of detection(mIU/mL)	0.23

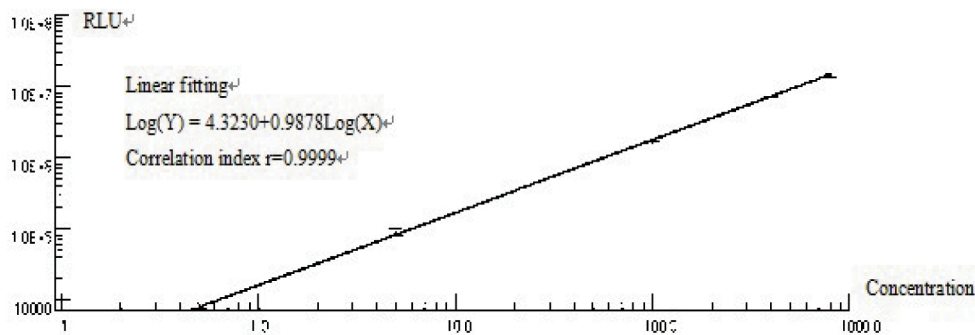


图4 β-HCG 夹心 CLIA 标准曲线 (mIU/mL)

Fig.4 Standard curve of β-HCG sandwich CLIA

表4 β-HCG 夹心 CLIA 特异性验证结果

Table 4 Specificity analysis of β-HCG sandwich CLIA

Number	TSH (mIU/mL)	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)
1	1.32	1.56	1.42
2	1.01	1.32	1.42
3	1.65	1.48	1.32
4	1.85	1.20	1.05
5	1.42	1.25	1.26
6	1.32	1.30	1.42
7	1.36	1.62	1.05
8	1.25	1.42	1.35
9	1.05	1.32	1.25
10	1.54	1.52	1.65

表5 β-HCG 夹心 CLIA 准确度测定结果

Table 5 Detection accuracy analysis of β-HCG sandwich CLIA

Theoretical concentration (mIU/mL)	M (mIU/mL)	Relative deviation (± 10%)
500	480.26	-3.95%
100	95.82	-4.18%
2	1.98	-1.00%

3 讨论

β-HCG 是监测正常妊娠、多胞胎和病理性如异位妊娠、先兆流产、葡萄胎及绒毛膜癌的重要临床指标,在预后评价中同样具有重要意义,并且是临床上女性的常规检测项目,及时准确的检测 β-HCG 对疾病的诊断和治疗有重要意义^[12-19]。

本实验使用 β-HCG 蛋白作为抗原,免疫小鼠后血清效价很高,说明小鼠对 β-HCG 蛋白反应性很强,融合后阳性率达到 50% 以上。通过筛选,获得 S/N 值大于 40 的杂交瘤细胞 7 株,在用选择性培养基筛选的同时做了 3 次 ELISA 的确认,最后确定 4 株能稳定分泌抗体的杂交瘤细胞。将 4 株杂交瘤细胞 3 次亚克隆后用转瓶和培养基扩大培养,这种方法与小鼠腹腔生产抗体比较,除去了小鼠腹水中杂蛋白的干扰,使纯化出的抗体特异性增加。扩大培养 21 d 后,90% 以上的杂交瘤细胞死

亡,抗体分泌完全,此时收集细胞上清,采用过饱和硫酸铵法纯化出免疫球蛋白 IgG。4 株纯化出的抗体特异性强,不与相关的蛋白 α-HCG、TSH、FSH 及 LH 有交叉反应, Ka 值均达到 109 L/mol 以上。用两株抗 β-HCG 不同表位的单克隆抗体建立的双抗体夹心 CLIA 方法灵敏度较高,在 0.50-800 mIU/L 范围内具有较好的线性关系,且特异性及准确性均可达到相应的要求。

目前在临床诊断中,国外全自动分析系统^[20]为 β-HCG 的临床检测提供可靠的依据,但是这些系统非常昂贵,难以推广普及。国内 β-HCG 检测方法主要有胶体金试纸法、放射免疫分析法及酶联免疫分析等。胶体金试纸检测法快速、简单,但灵敏度较低,一般只能用于定性及半定量检测;放射免疫分析具有放射污染不利于推广;酶联免疫分析依靠比色法或偏振光法进行检测,所受的干扰因素太多,这些都影响到检测的灵敏度和稳定性。因此,需要建立一种快速灵敏及适合我国医疗现状的

β -HCG 分析方法。CLIA 具有操作简单、灵敏度高、特异性强、检测范围宽等优点克服了 ELISA 灵敏度低的缺点,本研究建立的双抗体夹心 CLIA 检测 β -HCG 的方法可以进一步通过实验,对其灵敏度、最低检测限、检测范围及准确度进行优化,进而制作成检测试剂盒并运用到临床,为 β -HCG 蛋白的精确检测及疾病的诊断做出贡献。

参考文献(References)

- [1] 杨廷富. 人绒毛膜促性腺激素的临床意义及检测进展 [J]. 检验医学与临床, 2007, 4(10): 976-978
Yang Ting-fu. The clinical significance of the human chorionic gonadotropin and testing progress[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2007, 4(10): 976-978
- [2] Michael G, Gregory W, Annete G, et al. Genetic immunization with the free human chorionic gonadotropin β subunit elicits cytotoxic T lymphocyte responses and protects against tumor formation in mice[J]. Lab Invest, 1997, 76(7): 859-871
- [3] Bonini PA, Banfi G, Murone M. Enhanced chemiluminescence in the measurement of proteins and haptens: evaluation of chorionic gonadotropin (hCG) and free thyroxine [J]. J Biolumin Chemilumin, 1990, 5(3): 193-195
- [4] Luppa P, Spötl G, Saller B, et al. Cross-reactivity of a commercial chemiluminescence immunoassay for human chorionic gonadotropin with the free beta-subunit[J]. J Biolumin Chemilumin, 1992, 7(3): 195-201
- [5] 苏军, 李瑞娟, 杨萌萌, 等. 夹心与竞争化学发光免疫分析检测人血清透明质酸的比较分析[J]. 放射免疫学杂志, 2013, 26(1): 81-84
Su Jun, Li Rui-juan, Yang Meng-meng, et al. Comparative Analysis of Sandwich and Competitive Chemiluminescence Immunoassay For the Detection of Hyaluronic Acid From Human Serum[J]. Journal of Radioimmunology, 2013, 26(1): 81-84
- [6] Anderson D J, Guo B, Xu Y, et al. Clinical chemistry[J]. Anal Chem, 1997, 69(12): 165-230
- [7] Timothy G B, Seitz W R. Mechanism of cobalt catalysis of luminol chemiluminescence[J]. Anal Chem, 1975, 47(9): 1639-1643
- [8] Miniotti K S, Georgiou C A. High throughput flow injection bioluminescent method for olive oil antioxidant capacity[J]. Food Chem, 2008, 109(2): 455-461
- [9] Maya F, Estela J M, Cerda V. Improving the chemiluminescence-based determination of sulphide in complex environmental samples by using a new, automated multi-syringe flow injection analysis system coupled to a gas diffusion unit[J]. Anal Chim Acta, 2007, 601(1): 87-94
- [10] 赵远, 鲁帅尧, 占龙, 等. ELISA 方法检测恒河猴血清中抵抗素[M]. 北京: 实验动物科学, 2011, 28(3): 68-70
Zhao Yuan, Lu Shuai-rao, Zhan Long, et al. ELISA method to detect rhesus serum resistin[M]. Beijing: Laboratory Animal Science, 2011, 28(3): 68-70
- [11] Beatty JD, Beatty BG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay [J]. J Immunol Methods, 1987, 100(1-2): 173-179
- [12] Al-Azemi M, Ledger WL, Diejomaoh M, et al. Measurement of inhibin A and inhibin pro-alphaC in early human pregnancy and their role in the prediction of pregnancy outcome in patients with recurrent pregnancy loss[J]. Fertil Steril, 2003, 80(6): 1473-1479
- [13] Yaron Y, Ochshorn Y, Heifetz S, et al. First trimester maternal serum free human chorionic gonadotropin as a predictor of adverse pregnancy outcome[J]. Fetal Diagn Ther, 2002, 17(6): 352-356
- [14] Laigaard J, Christiansen M, Frohlich C, et al. The level of ADAM12-S in maternal serum is an early first-trimester marker of fetal trisomy 18[J]. Prenat Diagn, 2005, 25(1): 45-46
- [15] Natale A, Busaca I, Cardiani I, et al. Human chorionic gonadotropin patterns after a dose of methotrexate for ectopic pregnancy [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002, 100(2): 227-230
- [16] Zimmermann G, Baier D, Majer J, et al. Expression of β -HCG and α -HCG mRNA and HCG hormone in human decidua tissue in patients during tubal pregnancy [J]. Mol Hum Reprod, 2003, 9(2): 81-89
- [17] 郭瑛, 王冬娥, 彭建明. 血清 β -人绒毛膜促性腺激素及孕酮监测在氨甲喋呤治疗异位妊娠中的临床价值 [J]. 检验医学与临床, 2009, 6(10): 780-781
Guo Ying, Wang Dong-e, Peng Jian-ming. Clinical value of serum B-HCG and progesterone monitoring in therapy of ectopic pregnancy with MTX[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2009, 6(10): 780-781
- [18] Gillott DJ, Iles RK, Chard T. The effects of beta-human chorionic gonadotropin on the in vitro growth of bladder cancer cell lines[J]. Br J Cancer, 1996, 73(3): 323-332
- [19] Acevedo HF, Tong JY, Hartsock RJ. Human chorionic gonadotropin-beta subunit gene expression in cultured human fetal and cancer of different types and origins[J]. Cancer, 1995, 76(8): 1467-1475
- [20] Mora-Brugues J, Gascon-Rocche N, Rodriguez-Espinosa J, et al. Evaluation of Ciba Corning ACS:180 automated immunoassay system[J]. Clin Chem, 1994, 40: 407-410