

C 肽与胰岛素双标记时间分辨荧光免疫分析法的建立及初步临床应用*

马 强¹⁾ 李来庆²⁾ 贺 安¹⁾ 林冠峰¹⁾ 邹丽萍¹⁾ 李 明¹⁾ 吴英松^{1)**}

(¹⁾ 南方医科大学生物工程学院抗体工程研究所, 广州 510515; ²⁾ 广州市达瑞抗体工程技术有限公司, 广州 510663)

摘要 建立钐(Sm^{3+})标记检测 C 肽(C-peptide)及铕(Eu^{3+})标记检测胰岛素(insulin)的双标记时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA), 并初步尝试检测人血 C 肽以及胰岛素含量. 将抗 C 肽单克隆抗体(Biodesign No. E54094M)与抗 insulin 单克隆抗体(Biodesign No. E86306M)混合包被 96 孔板, 然后用 Sm^{3+} 标记抗 C 肽单克隆抗体(Medix No. 9103), Eu^{3+} 标记抗 insulin 单克隆抗体(Biodesign No. E86802M), 运用双抗体夹心一步法建立 C 肽 / 胰岛素双标记时间分辨荧光免疫分析法. 结果显示: C 肽分析灵敏度为 $0.2 \mu\text{g/L}$, 线性范围为 $0.5 \sim 22 \mu\text{g/L}$, 平均回收率达到 99.6%, 分析内和分析间变异系数分别为 4.6%~6.0%和 5.1%~7.6%. 胰岛素分析灵敏度为 0.8 mU/L , 线性范围为 $3.6 \sim 180 \text{ mU/L}$, 平均回收率为 99.4%, 分析内和分析间变异系数分别为 3.7%~6.0%和 5.1%~8.0%. C 肽 / 胰岛素双标记检测试剂与 PerkinElmer 公司对应的单标记进口试剂盒分别同时测定血清样本 200 份, 检测结果高度相关, 具有较好的一致性, 相关系数分别为 0.98 与 0.99. 总之, 自建 C 肽 / 胰岛素双标记时间分辨荧光免疫分析方法的性能均可以达到临床检测要求, 有望替代现有国内外较为昂贵的单标记试剂, 可用于胰岛素分泌不足导致的糖尿病诊断及糖尿病的大规模普查筛选.

关键词 双标记, 时间分辨荧光免疫分析, C 肽, 胰岛素

学科分类号 R392.6, R446.6

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00037

糖尿病是一组由胰岛素分泌绝对或相对不足所导致的以慢性高血糖为特征的代谢综合征^[1]. 最新研究显示, 该疾病在中国成年人群中, 约有 9 240 万例病例, 占总人口数的 9.7%, 此外, 另有 1 482 万成年人具有前驱糖尿病症状, 约占总人口数的 1.55%^[2-3]. 目前临床诊断筛查中, 血清 C 肽和胰岛素水平对糖尿病的分型诊断、治疗方案选择和疗效监测具有重要的临床参考意义, 是筛查诊断糖尿病患者主要的常规必检项目^[4], 此外, 对于胰岛素瘤的诊断亦有重要参考价值. 在体内, C 肽(C-peptide)与胰岛素(insulin)均来自于胰岛 β 细胞的分泌产物胰岛素原, 一个分子的胰岛素原经酶切后, 裂解成一个分子的胰岛素和一个分子的 C 肽. 二者以等分子数共存于分泌颗粒, 并同时释放至毛细血管循环中, 且 C 肽不被肝脏破坏, 半寿期较胰岛素明显为长^[5], 故联合二者检测, 能准确测定血循环中 C 肽水平, 能反映 β 细胞合成与释放胰岛素功能.

本研究采用相同增强液体系的 Sm^{3+} 和 Eu^{3+} 作为标记物^[6], 初步建立 C-peptide/insulin 双标记时间

分辨荧光免疫分析方法(C-peptide/insulin-TRFIA), 单次检验可同时得到血清中 C-peptide、insulin 两个参数值, 克服化学发光免疫分析法、放射免疫分析法等单次反应只能测定一个指标的不足, 并且此检测方法操作简便、分析手段简洁、样本量需求小、成本低廉、能更好地满足临床大规模糖尿病筛查的需要.

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

C-peptide 单克隆抗体(C-peptide McAb)购于 Medix 公司, 其编号为 9103 标记、Biodesign 公司, 其编号为 E54094M 包被; Insulin 单克隆抗体(Insulin McAb)购于 Biodesign 公司, 其编号为

* 国家科技重大专项资助项目(2009ZX10004-706).

** 通讯联系人.

Tel: 020-61648321, E-mail: wg@fimmu.com

收稿日期: 2011-01-21, 接受日期: 2011-03-22

E86306M 包被、E86802M 标记; C-peptide 抗原购自 Sigma 公司, C 肽抗原(目录号: C-5051, 批号: 071K49592, 规格: 每瓶 250 μg)为冻干品; insulin 抗原为 Sigma 公司重组抗原, 规格: 50 mg, 29.1 U/mg, 为冻干品, 分子式: $\text{C}_{257}\text{H}_{383}\text{N}_{65}\text{O}_{77}\text{S}_6$, 分子质量: 5807.57; Eu^{3+} 、 Sm^{3+} 标记试剂盒购自 PE 公司; C-peptide-TRFIA、Insulin-TRFIA 试剂盒为 PerkinElmer 公司生产; 牛血清白蛋白为 CALBIOCHEM 公司生产; Sephadex-G50 填料购自 GE 公司; 洗涤液、包被液、分析缓冲液、增强液、封闭液均自制. 96 孔板购自 Costar 公司; 全自动 TRFIA 监测仪 AutoDELFIA1235 及 1420 为 Perkin-Elmer 公司产品. 临床血清样品来自南方医院.

1.2 实验方法

1.2.1 固相抗体包被板的制备. 将 C-peptide McAb E54094M 和 Insulin McAb E86306M 用包被液混匀, 分别稀释成 3 mg/L 和 1.5 mg/L, 200 μl 每孔铺板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡孵育 2~4 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜. 弃去包被液, 洗板 3 次, 每孔再加入 250 μl 封闭液封闭, 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡孵育 2 h. 弃去封闭液, 拍干, 真空包装, 板条密封后置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存.

1.2.2 Sm^{3+} -C-peptide McAb 的制备. 按照 Sm^{3+} 标记试剂盒说明书操作. 取 C-peptide 标记抗体 1 mg, 加入 Milipore 公司 50KD 带有滤膜的超滤离心柱离心管中, 取 500 μl 加入离心柱, 9 000 r/min 离心

8 min, 弃去离心管中废液, 再在离心柱中加入 200 μl 标记缓冲液, 再次 9 000 r/min 离心 8 min, 重复 4 次. 收集离心柱中液体转移到离心管中, 再加入 5 g/L 的 Sm^{3+} 标记物 100 μl , 27 $^{\circ}\text{C}$ 震荡避光孵育过夜. 反应液经用 50 mmol/L pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sephadex-G50 柱层析, 收集液体, 1 ml 分装, 收集 36 管. 每管中取 10 μl 分装液, 并加入增强液 200 μl , 震荡孵育 5 min, 放入全自动检测仪 AutoDELFIA1235 中检测, 收取第一峰, 用 0.22 μm 针头式过滤器过滤, 并在其中加入 10% 高纯度 BSA, 体积比为 1:50. 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存.

1.2.3 Eu^{3+} -Insulin McAb 的制备. 参照 Eu^{3+} 标记盒说明书操作, 制备过程同 Sm^{3+} -C-peptide McAb 的制备.

1.2.4 测定方法. 利用双抗体夹心一步法建立 C-peptide/Insulin-TRFIA(图 1). 在上述包被的 96 孔板中加入待测血清 25 μl 或加入 C-peptide/Insulin 标准品(C-peptide: A, 0 $\mu\text{g/L}$, B, 0.5 $\mu\text{g/L}$, C, 4.7 $\mu\text{g/L}$, D, 13.7 $\mu\text{g/L}$, E, 22 $\mu\text{g/L}$; insulin: A, 0 mU/L, B, 3.6 mU/L, C, 14 mU/L, D, 75 mU/L, E, 180 mU/L), 再加入 200 μl 1:100 Sm^{3+} -C-peptide McAb 和 1:150 Eu^{3+} -Insulin McAb 混合液, 室温震荡孵育 2.0 h, 然后用洗涤液洗板 6 次, 拍干后再每孔加入 200 μl 增强液, 震荡孵育 5 min 后在全自动 TRFIA 检测仪 AutoDELFIA1235 及 1420 上测试.

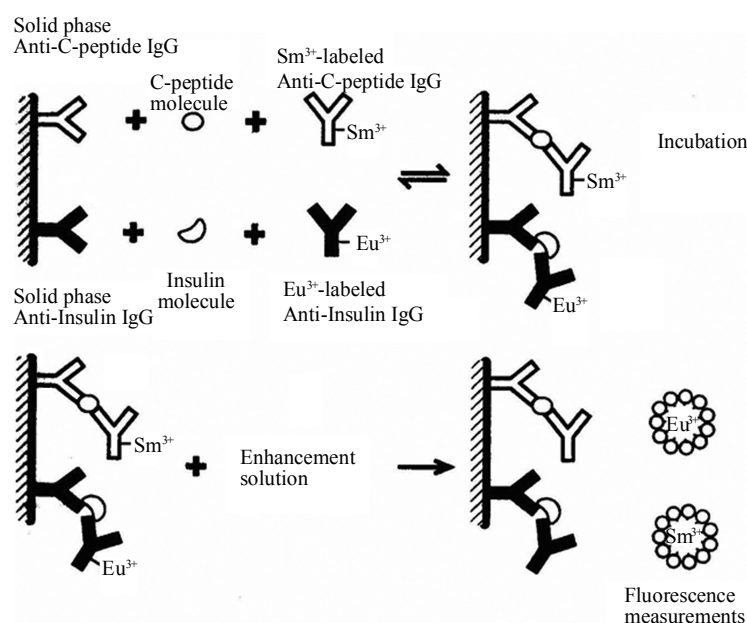


Fig. 1 The illustration of the dual-labeling time-resolved fluoroimmunoassay for detection of C-peptide and insulin(C-peptide/insulin-TRFIA)

2 结 果

2.1 Sm^{3+} 及 Eu^{3+} 标记抗体的理化性质

标记抗体经 Sephadex G50 层析柱层析, 收集第一峰. 以 PerkinElmer 公司提供的 Eu^{3+} 、 Sm^{3+} 标准可以测定标记率(即每个抗体分子上标记的 Eu^{3+} 或 Sm^{3+} 的平均个数), 分别稀释为 1:150 和 1:100 作为参考, Eu^{3+} 标记抗 insulin 单克隆抗体与 Sm^{3+} 标记抗 C-peptide 单克隆抗体的标记率分别为 9.4 个/IgG 分子和 7.8 个/IgG 分子, 蛋白质回收率分别为 92%和 90%.

2.2 反应动力学考察

考察了 C-peptide、insulin 标准品、不同类型血清样本在不同免疫反应温度和反应时间下的荧光技术. 结果显示: 标准品、血清样本在 25℃ 下震荡孵育 2 h 达到平衡, 在 37℃ 反应 1 h 达到平衡. 由于全自动 TRFIA 检测仪 1235/1420 设定在 25℃ 条件下进行测试, 因此选择在 25℃ 下震荡孵育 2 h 为测试条件.

2.3 双标 C-peptide/insulin-TRFIA 的性能考核

标准曲线 C-peptide/insulin 双标记 TRFIA 的标准点及其对应荧光值如表 1 所示.

Table 1 The reference standards and the corresponding fluorescence of C-peptide/Insulin-TRFIA ($n=8$)

	C-peptide		Insulin	
	Concentration of standard point/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	Fluorescence(CPS)	Concentration of standard point/ $(\text{mU}\cdot\text{L}^{-1})$	Fluorescence(CPS)
A	0	285 ± 15	0	985 ± 42
B	0.50	944 ± 132	3.60	$4\,153 \pm 326$
C	4.70	$9\,193 \pm 486$	14.0	$16\,442 \pm 763$
D	13.70	$31\,367 \pm 1\,441$	75.0	$89\,858 \pm 1\,514$
E	22.00	$55\,416 \pm 2\,536$	180	$222\,451 \pm 5\,578$

经双对数函数处理的标准曲线如图 2 所示. C-peptide 和 insulin 标准曲线的相关系数分别为 0.999 8 和 0.999 6, 表明线性相关性良好.

2.3.1 标准曲线数据分析. C-peptide/Insulin-TRFIA 的标准曲线由全自动 AutoDELFIA1235 检测仪自带的对数函数处理(图 2).

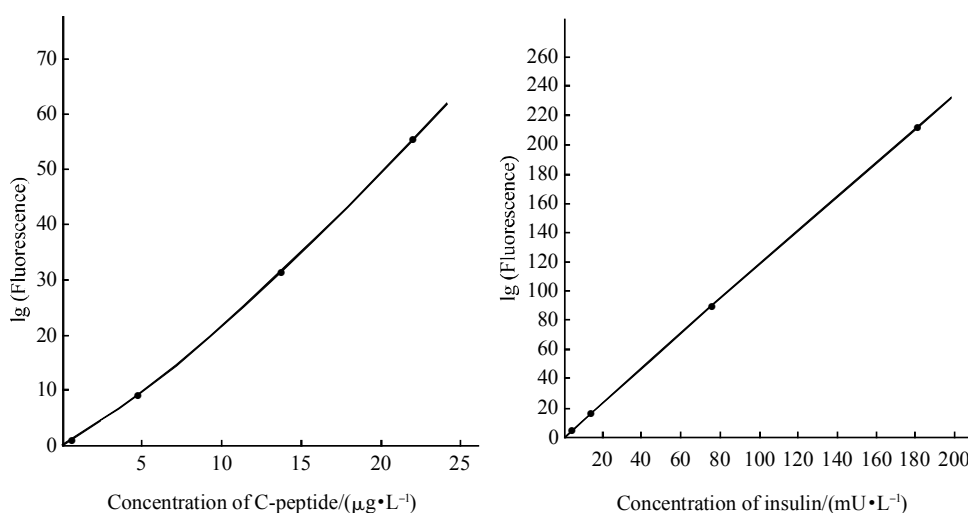


Fig. 2 The standard curve of C-peptide/Insulin-TRFIA

2.3.2 灵敏度. 以零参考标准品(A 点)作为标本重复测量 20 次, 计算其荧光均值 $\bar{x}$ 及标准差 SD ,

$\bar{x} + 2SD$ 所得的荧光值代入标准曲线方程计算得出其灵敏度. C-peptide 的最低检测下限为 0.25 $\mu\text{g/L}$;

insulin 的最低检测下限为 0.1 mU/L. 此灵敏度与 PE 公司相应的单标记试剂灵敏度基本相同.

2.3.3 精密度实验. 如表 2 所示. C-peptide 分析内和分析间变异系数分别为 4.6%~6.0%和 5.1%~7.6%, insulin 分析内和分析间变异系数分别为 3.7%~6.0%和 5.1%~8.0%.

Table 2 The precision of C-peptide/Insulin TRFIA

Samples		C-peptide			Samples		Insulin		
		Average /(μg•L ⁻¹)	Standard deviation(SD)	Coefficient of variation/%			Average /(mU•L ⁻¹)	Standard deviation(SD)	Coefficient of variation/%
Intra-assay (n=10)	1	8.7	0.40	4.6	1	3.8	0.23	6.0	
	2	13.6	0.82	6.0	2	16.6	0.80	4.8	
	3	20.5	1.15	5.6	3	74.3	2.75	3.7	
Inter-assay (n=10)	1	8.8	0.45	5.1	1	4.1	0.33	8.0	
	2	14.7	1.05	7.1	2	17.5	1.13	6.4	
	3	20.8	1.58	7.6	3	78.2	4.03	5.1	

2.3.4 回收率. 在已知 5 个不同浓度的 C-peptide 和 insulin 血清中加入不同浓度的 C-peptide 和 insulin 纯抗原, 使得血清中 C-peptide 和 insulin 的最终期望浓度分别为 20 μg/L 和 100 mU/L, 计算回收率, 如表 3 所示. C-peptide 的回收率在 99.0%~101.5%之间, 平均回收率为 100.3%. insulin 的回收率在 99.6%~102.4%之间, 平均回收率为 101.28%, 表明添加物与血清被测物一致, 基本没有血清基质物的干扰.

Table 3 The recovery test of C-peptide/insulin TRFIA

Samples	C-peptide			Insulin		
	Original concentration /(μg•L ⁻¹)	Actual measured value/(μg•L ⁻¹)	Recovery percent /%	Original concentration /(mU•L ⁻¹)	Actual measured value/(mU•L ⁻¹)	Recovery percent /%
1	0.6	20.2	101.0	3.1	100.5	100.5
2	2.2	20.1	100.5	15.0	102.1	102.1
3	7.8	19.8	99.0	30.4	101.8	101.8
4	12.2	20.3	101.5	70.5	102.4	102.4
5	18.6	19.9	99.5	12.6	99.6	99.6
Average recovery percent			100.3	101.28		

2.3.5 特异性. 采用双标记 C-peptide/insulin-TRFIA 检测, CEA、hTSH、hLH、Free-β-hCG、CA50、CA242、CA15-3、hFSH、CA199、CA125、tPSA、人血清白蛋白等系列浓度标准品做 C-peptide/Insulin TRFIA 样品交叉反应检测, 结果均无交叉反应.

2.3.6 与国外同类试剂盒的相关性. 200 份临床血样同时用自制试剂盒与 Perkin-Elmer(PE)公司所制试剂盒测定的数值进行相关性分析, 结果两种方法所得的数值有显著相关性(图 3), C-peptide-TRFIA 自制 $y = 0.864341 + 0.990840x$, $r = 0.989274$, $n = 200, P < 0.001$; Insulin-TRFIA 自制 $y = 0.0196188 + 1.013196x$, $r = 0.992807$, $n = 200, P < 0.001$.

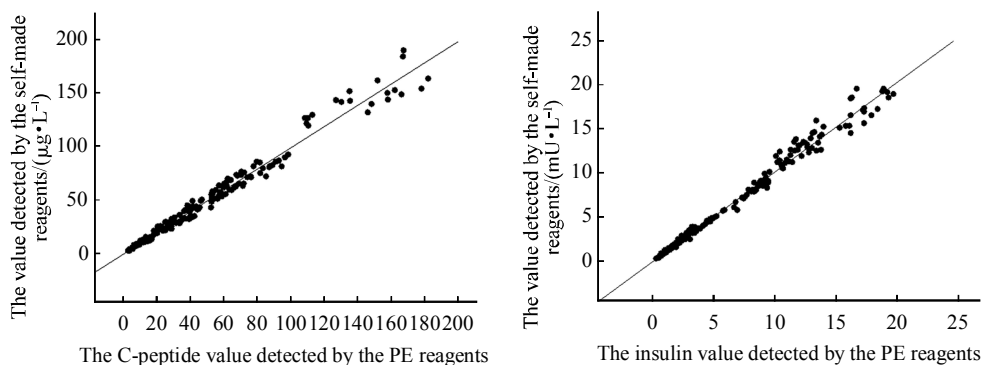


Fig. 3 Correlation between the self-made reagents and the PE reagents

3 讨 论

C 肽与胰岛素均来自于胰岛 β 细胞的分泌产物胰岛素原,二者以等分子数共存于分泌颗粒并同时释放至毛细血管循环中^[7]。其中胰岛素是机体内唯一降低血糖的激素,胰岛素能促进全身组织对葡萄糖的摄取和利用,并抑制糖原的分解和糖原异生,因此,胰岛素有降低血糖的作用。胰岛素分泌过多时,血糖下降迅速,脑组织受影响最大,可出现惊厥、昏迷,甚至引起胰岛素休克。相反,胰岛素分泌不足或胰岛素受体缺乏常导致血糖升高,即引发糖尿病,故直接检测人血中胰岛素的含量能够直接反应机体胰岛素的分泌情况,因胰岛素能够被肝脏破坏,其半衰期较短。而 C 肽不被肝脏破坏,半衰期较胰岛素明显为长^[7],因此联合二者检测能准确反应机体胰岛素分泌情况。胰岛素和 C 肽测定可用于糖尿病的分型。I 型糖尿病餐前、餐后 C 肽均低于正常人,其空腹胰岛素水平低于正常或不能测得,口服葡萄糖后无高峰,呈低平坦。II 型糖尿病患者空腹胰岛素水平正常或稍高,刺激后高峰延迟至 2~3 h 出现^[8]。若不用胰岛素治疗,餐前、餐后 C 肽水平及变化与正常人基本一致,此外,二者联合对于检测胰岛素瘤也有重要的参考价值^[9]。

与传统酶标记、同位素标记等技术相比,TRFIA 检测样本具有灵敏度高、操作简便、示踪物稳定、标准曲线范围宽、不受样品自然荧光干扰、无放射性污染、标记物储存时间长等优点,是优于酶免、放免的一种超微量定量免疫分析检测技术^[10-12],此外,TRFIA 中 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Dy^{3+} 、

Nd^{3+} 等 5 种镧系离子都具有很窄的特征性发射光谱,并且彼此在波长和衰减时间方面差异显著^[13]。因此在测量时选择不同的滤光片,能够精确地测量出混合物中不同镧系元素的含量,很适宜进行样本的多通道检测。其中 Eu^{3+} 和 Sm^{3+} 采用相同的含 β -萘甲酰三氟丙酮(β -NTA)增强液体系,更便于进行系统的简化操作^[14-16]。

本文研究采用稀土离子 Eu^{3+} 和 Sm^{3+} 为标记物,研究建立了 C-peptide 与 insulin 的双标记 TRFIA 法,一次检测可同时确定血清中 C-peptide 和 insulin 含量,克服了化学发光免疫分析法、放射免疫分析法等一次反应只能测定一个指标的不足。其中 C 肽分析灵敏度为 $0.2 \mu\text{g/L}$,胰岛素分析灵敏度为 0.8 mU/L ,检测灵敏度均优于酶免等现有试剂盒的检测能力。C 肽分析内和分析间变异系数分别为 $3.1\% \sim 5.6\%$ 和 $3.5\% \sim 7.7\%$,胰岛素分析内和分析间变异系数分别为 $2.8\% \sim 6.1\%$ 和 $3.4\% \sim 8.1\%$ 。说明试剂的稳定性良好,性能无明显漂移。双标记方法检测周期较短,只需要约 120 min,全程自动化操作,能够最大限度减轻临床工作强度。此外,检测样本需求量小,患者容易接受。C 肽/胰岛素双标记检测试剂与 PerkinElmer 公司对应的单标记进口试剂盒分别同时测定血清样本 200 份,检测结果高度相关,具有较好的一致性,相关系数分别为 0.98 与 0.99,此结果提示,本研究结果可以替代价格昂贵的进口试剂盒,减轻患者经济负担。

总之,C-peptide/insulin 双标记时间分辨荧光免疫分析方法的建立,有利于准确、快速地检测血样中 C-肽以及胰岛素的含量,加之成本低廉,比较适合在大规模筛查中应用。

参 考 文 献

- [1] Fox T E, Kester M. Therapeutic strategies for diabetes and complications: a role for sphingolipids?. *Adv Exp Med Biol*, 2010, **688**: 206-216
- [2] Yang S H, Dou K F, Song W J. Prevalence of diabetes among men and women in China. *N Engl J Med*, 2010, **362**(25): 2425-2426
- [3] Shi Z. Prevalence of diabetes among men and women in China. *N Engl J Med*, 2010, **362**(25): 2425-2426
- [4] Brandenburg D. History and diagnostic significance of C-peptide. *Exp Diabetes Res*, 2008, **2008**: 576862
- [5] Palmer J P. C-peptide in the natural history of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 2009, **25**(4): 325-328
- [6] Huang B, Xiao H, Zhang J, *et al.* Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay for simultaneous detection of aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Arch Toxicol*, 2009, **83**(6): 619-624
- [7] Hills C E, Brunskill N J. Intracellular signalling by C-peptide. *Exp Diabetes Res*, 2008, **2008**: 635158
- [8] 张 驰, 周智广, 林 健, 等. ABC 分型法对急性起病 1 型糖尿病亚型诊断的研究. *中华医学杂志*, 2008, **88**(12): 797-801
Zhang C, Zhou Z G, Lin J, *et al.* *National Medical J Chin*, 2008, **88**(12): 797-801
- [9] Neal J M, Han W. Insulin immunoassays in the detection of insulin analogues in factitious hypoglycemia. *Endocr Pract*, 2008, **14**(8): 1006-1010
- [10] Myyrylainen T, Talha S M, Swaminathan S, *et al.* Simultaneous detection of human immunodeficiency virus 1 and hepatitis B virus infections using a dual-label time-resolved fluorometric assay. *J Nanobiotechnology*, 2010, **8**(1): 27
- [11] Zhang J, Gao L, Zhou B, *et al.* Simultaneous detection of deoxynivalenol and zearalenone by dual-label time-resolved fluorescence immunoassay. *J Sci Food Agric*, 2010, **91**(2): 193-197
- [12] Zhang J, Guo J Z, Xiao H L, *et al.* Simultaneous detection of different serum pepsinogens and its primary application. *World J Gastroenterol*, 2010, **16**(24): 3072-3077
- [13] 宁明哲, 童明庆. 稀土元素钬标记技术的应用研究. *临床检验杂志*, 2004, **22**(4): 74-76
Ning M Z, Tong M Q. *Chin J Clin Lab Sci*, 2004, **22**(4): 74-76
- [14] Sheng S L, Wang Q, Huang G, *et al.* Simultaneous determination of alpha-fetoprotein immune complexes and alpha-fetoprotein concentration in hepatocellular carcinoma using dual-label time-resolved immunofluorometric assays. *J Clin Lab Anal*, 2009, **23**(3): 179-185.
- [15] De Pauw P E, Vermeulen I, Ubani O C, *et al.* Simultaneous measurement of plasma concentrations of proinsulin and C-peptide and their ratio with a trefoil-type time-resolved fluorescence immunoassay. *Clin Chem*, 2008, **54**(12): 1990-1998
- [16] Ankelo M, Westerlund A, Blomberg K, *et al.* Time-resolved immunofluorometric dual-label assay for simultaneous detection of autoantibodies to GAD65 and IA-2 in children with type 1 diabetes. *Clin Chem*, 2007, **53**(3): 472-479

Development of The Dual-labeling Time-resolved Fluoroimmunoassay for Detection of C-peptide and Insulin and Its Initially Application*

MA Qiang¹⁾, LI Lai-Qing²⁾, HE An¹⁾, LIN Guan-Feng¹⁾, ZOU Li-Ping¹⁾, LI Ming¹⁾, WU Ying-Song^{1)**}

¹⁾ College of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

²⁾ Guangzhou Darui Antibody Co. Ltd, Guangzhou 510663, China)

Abstract To simultaneously detecting the C-peptide and insulin in human serum, a dual-labeling time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) for detection of C-peptide and insulin was preliminary founded. Two capture monoclonal antibodies were mixed together and then coated in human serum. Two counterpart tracer monoclonal antibodies, were labeled with Eu^{3+} (anti-Insulin) and Sm^{3+} (anti-C-peptide) chelates, respectively. The double antibody sandwich in one step method was used to develop the TRFIA for simultaneously detection of the C-peptide and insulin in human serum. These results showed that sensitivity of C peptide analysis was up to $0.2 \mu\text{g/L}$, linear range is $0.5 \sim 22 \mu\text{g/L}$, the recovery percent is 99.6%, The intra- and inter-assay coefficient of variation were $4.6\% \sim 6.0\%$ and $5.1\% \sim 7.6\%$, respectively; sensitivity of insulin analysis was up to 0.8 mU/L , linear range is $3.6 \sim 180 \text{ mU/L}$, the recovery percent is 99.4%, the intra- and inter-assay coefficient of variation were $3.7\% \sim 6.0\%$ and $5.1\% \sim 8.0\%$, respectively. Moreover, 200 samples were tested by the self-made and commercially available C-peptide and insulin kit (PerkinElmer) kits at the same time. The correlation coefficient was 0.98 and 0.99, respectively. In conclusion, the self-made dual-labeling time-resolved fluoroimmunoassay for simultaneously detection of C-peptide and insulin might be a simple, sensitive and rapid method for rapid diagnosis for the diabetes caused by the lack of insulin secretion, it would also provide an alternative route for serology high-screening of the samples for C-peptide and insulin in clinical application.

Key words dual-labeling, time-resolved fluoroimmunoassay, C-peptide, insulin

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00037

*This work was supported by a grant from Important National Science & Technology Specific Projects of China (2009ZX10004-706).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-61648321, E-mail: wg@fimmu.com

Received: January 21, 2011 Accepted: March 22, 2011