

动力学法在酶联免疫吸附试验定量检测中的应用^{*}

尹利民(昆明市第一人民医院检验科 650011)

【摘要】 目的 研究动力学法在酶联免疫吸附试验(ELISA)定量检测中的应用。**方法** 对甲胎蛋白(AFP)标准品随时间变化的吸光度值进行连续监测,并分别用动力学法及终点法建立 AFP 定量标准曲线。**结果** AFP 不同浓度标准品在 5 min 内的吸光度值与显色时间呈正比。动力学法的标准曲线中标准品浓度与吸光度值变化率呈直线关系。**结论** 在 ELISA 定量检测过程中,动力学法与传统终点法相比存在明显优势。

【关键词】 动力学法; 酶联免疫吸附试验; 定量

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.07.042 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2012)07-0852-02

酶联免疫吸附试验(ELISA)自建立以来以其灵敏度高、特异性好等优点,在生命科学各领域得到广泛应用^[1-2]。近年来,该技术不断改进,形成了多种分析方法,并且在检测的灵敏度、特异性、操作简单化、高效性等方面都有很大提高。目前,用 ELISA 进行定量检测的诊断试剂也非常多;然而传统的 ELISA 在结果计算时均是采用终点法。有研究表明,终点法在 ELISA 在定量检测方面存在明显缺陷,并不能给出真正定量的结果^[3]。Tsang 等^[4]于 1980 年在检测曼氏血吸虫时先报道了动力学法在 ELISA 定量检测中的应用,然而关于动力学法在 ELISA 定量检测中的应用国内少见报道。本文拟将动力学法应用于甲胎蛋白(AFP)的 ELISA 定量检测进行初步探索,并与传统的终点法 ELISA 进行比较,比较其在定量检测中的优势,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器 采用 Thermo Multiskan Ascent 酶标仪,美国宝特 FLX50 全自动洗板机。

1.2 试剂及标准品 采用 AFP ELISA 定量测定试剂盒(批号:20110917)及配套标准品(批号:20110701),郑州安图绿科生物工程有限公司生产。

1.3 检测程序 (1)分别加入不同浓度的标准品(50 μL)与酶标抗体(50 μL)混合液于包被好的酶标反应板中,37 ℃ 孵育 1 h,洗板 6 次;(2)终点法加入显色液和底物液各 50 μL,37 ℃ 孵育 5 min,孵育结束后立即加入终止液,在 450 nm 波长处测量吸光度(A)值。动力学法,分别加入显色液和底物液各 50 μL,加入后立即置于酶标仪上在 620 nm 处进行比色,每隔 15 秒测量一次吸光度结果。

1.4 统计学处理 采用 Stata11 对试验结果进行数据处理。

2 结果

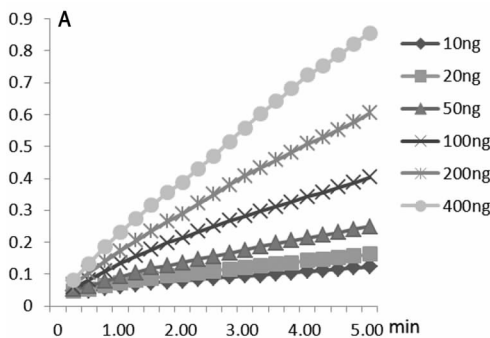


图 1 不同浓度标准品吸光度变化曲线

AFP 不同浓度标准品 A 值变化曲线见图 1。在 5 min 内,AFP 标准品的 A 值与显色时间呈正比。图 2 和图 3 分别给出了 AFP 动力学法和终点法的定量曲线,终点法的定量曲线采用四参数法拟合。动力学法的标准曲线中标准品浓度与 A 值变化率呈直线关系。

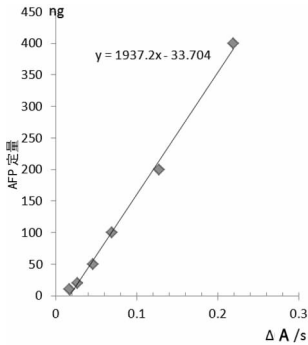


图 2 动力学法 ELISA 检测的定量曲线

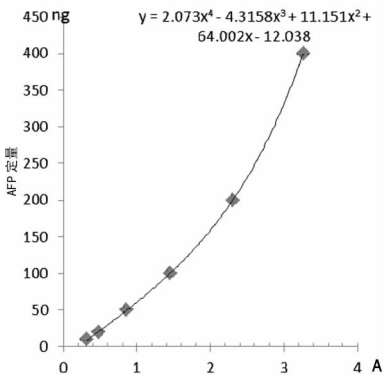


图 3 终点法 ELISA 检测的定量曲线

3 讨论

ELISA 是目前免疫学检验领域应用最广泛的技术手段之一,是将抗原、抗体反应的高度特异性与酶对底物催化作用的高效性结合起来,检测标本中微量物质的一种方法,操作快速简便。ELISA 的操作常涉及到标本的收集、保存、试剂准备、加样、温育、洗板、显色、比色等步骤,其中任何一环节的操作不当都会影响测定结果。显示和比色阶段对 ELISA 定量检测结果的影响尤为显著。目前 ELISA 定量检测试剂的显色物质通常为过氧化氢和四甲基联苯胺(TMB),TMB 在辣根过氧化物酶的催化下经过氧化氢作用后产生颜色,颜色随时间递

^{*} 基金项目:云南省应用基础研究计划项目(2011FB155)。

增,经终止液终止反应后测量其 A 值,然后通过特定的方法绘制标准曲线。传统的 ELISA 是在 96 孔板上进行,用手工方法操作时,加入显色液与终止液之间的时间间隔很难做到各孔间均一致。即使使用全自动酶免仪进行操作,将各孔间加入显色液与终止液间的时间间隔控制一致,但加入终止液后微孔板内液体的 A 值并非不再发生变化,除非将终止液与显色液充分混匀,否则,A 值还在不断增加。无论是全自动酶免仪还是手工操作,只能整板加完终止液后才能进行混匀,因此,第一孔的显色过程明显长于最后一孔。此外,有研究表明,加入终止液后如不能及时进行比色,比色结果随时间的延长有明显的下降趋势^[5]。

另外,终点法 ELISA 在结果计算时,标准曲线的拟合有对数曲线法、四参数法等不同种拟合方法,哪种方法是最科学的定量拟合方法还存在争议。因此,终点法在 ELISA 在定量检测方面存在诸多缺陷。而动力学法 ELISA 由于是通过测量 A 值随时间的变化速率来测定待测物质的浓度,因而可以避免终点法 ELISA 的诸多缺陷。动力学法的 ELISA 标准曲线呈直线,因而,动力学法 ELISA 定量相对于终点法 ELISA 的曲线拟合结果更准确。然而,动力学法 ELISA 在定量检测中的应用也需要一些前提条件,首先是实验室应具有可以连续监测 A 值的酶标仪。其次,动力学法 ELISA 需要在读取 A 值前期连续振板。其原因为,动力学法的 ELISA 定量原理是基于酶促反应动力学,底物浓度相对应微孔板上的酶是大大过量的,因而,酶促反应才能以最大反应速度进行,反应速度与微孔板上的酶量呈正比。酶促反应发生在微孔板的固液交界面,由于是

非均相的反应,因此,需要在测量的间期,通过不断振动微孔板,使固液交界面上的酶始终接触到新鲜、足量的底物。另外,由于酶标仪的光路尺寸有限,通过振板也可使反应有色物质在微孔中充分混匀,减少测量过程的不稳定。通过本试验的初步研究,动力学法在 ELISA 定量检测中与传统的终点法 ELISA 相比,具有许多优势,值得进一步研究推广。

参考文献

- [1] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G [J]. Immunochemistry, 1971,8(9):871-874.
- [2] Van Weemen BK, Schuurs AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates[J]. FEBS Lett, 1971,15(3):232-236.
- [3] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes[J]. J Immunol, 1972,109(1):129-135.
- [4] Tsang VC, Wilson BC, Maddison SE. Kinetic studies of a quantitative single-tube enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Clin Chem, 1980,26(9):1255-1260.
- [5] 李颖,黄永升. 比色时间与存放温度对酶联免疫吸附试验结果判读的影响[J]. 检验医学与临床,2011,8(4):450-452.

(收稿日期:2011-11-22)

基于问题的学习教学模式在临床生物化学检验实验教学中的应用

林勇平,刘利东,肖洪广,杨伟文,刘忠民[△](广州医学院第一附属医院检验科,广州 510120)

【摘要】 目的 为提高临床生物化学检验实验教学的教学效果与质量,在教学中开展了“基于问题的学习(PBL)”教学模式的改革,探讨 PBL 教学模式在临床生物化学检验实验教学中的作用。**方法** 选取 50 名 2010 级医学检验专业本科学生,在部分章节的实验教学中开展了 PBL 的教学改革,教学效果的评价通过操作和理论考核方式,以 50 名 2009 级医学检验本科生(对照班)进行对比分析,并采用调查问卷分析学生对 PBL 教学模式的评价。**结果** 开展 PBL 教学章节成绩比较,PBL 班的操作考核和理论考核成绩均较对照班高,其差异具有统计学意义($P<0.05$),学生对 PBL 教学模式的评价良好。**结论** 在临床生物化学检验实验教学中采用 PBL 的教学模式,可促进学生的实践和应用能力的培养,提高学习的积极性和主动性,取得了良好的教学效果,值得进一步研究与推广。

【关键词】 PBL 教学模式; 临床生物化学检验; 实验教学

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.07.043 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2012)07-0853-03

为适应我国社会主义现代化建设和医疗卫生事业发展需要,作者将“培养具有扎实的基础知识、基础理论和基础技能,具有较强创新精神和实践能力的高素质实用型人才”作为本课程教学目标,并将其贯穿于教学活动之中^[1]。在实验教学中,开展了基于问题的学习(problem-based learning,PBL)模式的教学改革^[2],注重对学生的综合引用和操作能力的培养,提高了学生对学习的积极性和主动性,激发了他们的创造性,取得了良好的教学效果。

1 资料与方法

依据 Barrows^[3]在医学教育中所用的典型模型,及临床生物化学检验实验教学实际情况,基本教学流程如下。

1.1 前期准备 召开教师会议对教师开展 PBL 课程培训,学习 PBL 的理念和方法;制订、调整实验教学计划 and 方案,以适

应 PBL 教学开展。

1.2 组建 PBL 小组 选定医学检验专业 2010 级五年制本科学生 50 名学生为研究对象,按学号顺序组建 PBL 小组;学生每 5 人为一组,整个教学过程以小组为单位。

1.3 创设情境及提出问题 (1)创建情景:教师根据实验教学内容,结合临床生化检验工作中的实际问题和课程标准要求,设计、创建情境问题。(2)问题提出与探究:在实验之前,教师将设计的引导问题及部分参考书目留给每个 PBL 小组,PBL 小组成员利用课余时间,通过查阅书籍、文献和网络等,由小组讨论确定的学习要点和目标。在该阶段教师发挥“引导者”作用,鼓励学生的批判性思维,及时发现自己知识的缺陷,从而激发起共同的学习目标。

1.4 解决问题 (1)问题解决方案:在组长主持下,小组成员

[△] 通讯作者,E-mail:gylzm08@126.com。