

# 体外活性检测技术有哪些？体外生物活性测定方法分享

产品名称	体外活性检测技术有哪些？体外生物活性测定方法分享
公司名称	北京义翘神州科技股份有限公司
价格	.00/件
规格参数	
公司地址	北京市北京经济技术开发区科创十街18号院9号楼
联系电话	400-8909989 15101180634

## 产品详情

体外诊断试剂被广泛应用于医学科研与临床检验中，因质量稳定、效果可靠，其不但为科研和诊疗提供了依据，也为疾病的预防、控制提供了技术资料。体外诊断试剂品类繁多，涉及众多学科门类，因学科间交叉现象日渐增多、新技术层出不穷，很难以某个原则为标准对其简单分类。

### 体外诊断试剂

从临床角度可将其分为临床血液学体液检验类试剂、临床化学类试剂、临床免疫学试剂，及微生物学、细胞组织学、分子生物学试剂等。从方法学角度可将其分为化学显色法、免疫比浊法、酶联免疫法、胶体金法、免疫荧光法、化学发光试剂、分子生物学试剂、免疫组化试剂、免疫细胞化学试剂等。

临床生化试剂主要用于配合半自动和全自动生化分析仪等仪器进行检测。常用的临床生化试剂所采用的分析方法和原理有多种，具体介绍如下。

#### 1.光谱分析技术

吸光光度法是根据溶液中物质对光选择性吸收的特性进行分析的方法。有色溶液对光线有选择性吸收的特性，不同物质由于其分子结构不同，对不同波长光的吸收能力不同。每种物质都有特定的吸收光谱。当一定波长的光通过该物质的溶液时，根据物质对光的吸收程度（吸光度）求出该物质含量的方法称为吸光光度法。

吸光光度法可分为比色法和分光光度法两大类。比色法又可分为目视比色法和光电比色法。分光光度法与光电比色法的原理类似，都是通过光电池或光电管测量溶液透光度的强度，来进行分析的方法。

当利用比色法测定溶液中的某种化学成分时，通常需加入显色剂，使其产生有色化合物。颜色的深浅与待测化学成分的含量成正比，可据此测定待测物的浓度。

发射光谱法是通过测量物质的发射光谱的波长和强度，来进行定性和定量分析的方法。

许多物质是光致发光的，即它们可吸收电磁辐射。然后重新发射出相同或更长波长的辐射。光致发光常见的类型是荧光和磷光。利用荧光强度进行分析的方法称为荧光法。在荧光分析中，待测物质分子成为激发态时所吸收的光称为激发光，处于激发态的分子回到基态时所产生的荧光称发射光。荧光测定的是待测物质分子受光激发后所发射的荧光的强弱，而不是测激发光的强弱。凡能产生荧光的化合物均可采用荧光分析法来进行定性或定量测量。

散射光谱技术是测定光线通过溶液混悬颗粒后的光吸收或光散射程度的一类定量测量方法。它主要用于免疫检测系统中，常称免疫浊度法。

## 2. 电化学分析法

利用物质的电化学性质测定化学电池的电位、电流或电量变化来进行分析的方法称电化学分析法。电化学分析法有多种。

1) 测定原电池电动势以求物质含量的分析方法称为电位法或电位分析法。

2) 通过对电阻的测定以求物质含量的分析法称为电导法；

3) 借助某些物理量的突变作为滴定分析终点的指示，称为电容量分析法。

目前在临床中应用的电化学分析法主要是离子选择电位分析法。该方法利用电极电位及溶液内活性物质两者间的关系来进行分析。

从方法学角度，可将临床免疫诊断试剂分为免疫比浊法（在散射光谱技术中已介绍）、酶联免疫法、化学发光等不同类型。

## 3. 酶联免疫法

该技术是将酶高效催化反应的专一性和抗原抗体反应的特异性结合的一种免疫标记检测技术。其原理是，将酶与抗体或抗原结合成酶标记结合物。酶标记结合物既保留了抗原或抗体的免疫学活性，又保留了酶对底物的催化活性。在酶标记抗体与抗原的特异性反应完成后，加入酶作用的相应底物。通过酶催化底物完成显色反应，对抗原或抗体进行定位、定性和定量测定。

## 4. 免疫荧光技术

该技术是利用物质吸收光能后产生激发态而发光的特性，将具有这种特性的荧光素用化学方法结合在特异的抗体或抗原上，又不损害其抗体或抗原活性的一种荧光显微镜下的示踪技术。

## 5. 流式细胞术

该技术是对单细胞或其他生物粒子膜表面及内部的成分进行定量分析和分选的检测手段。它可高速分析上万个细胞，并能同时从一个细胞中测得多个参数。同传统的荧光镜检查相比，该方法具有速度快、准确度高等特点。

## 6. 胶体金技术

该技术可按照液体的流动形式分为胶体金免疫渗滤试验和胶体金免疫层析试验。

## 7. 化学发光免疫分析

该技术是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合，用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术。化学发光免疫分析包含免疫反应系统和化学发光分析系统两部分。

临床分子生物学诊断试剂即通常所说的基因诊断试剂，其采用的技术原理主要包括核酸分子杂交技术、DNA测序技术、基因芯片技术等。

## 8.核酸分子杂交技术

该技术也称基因探针技术，是利用核酸的变性、复性和碱基互补配对的原理，用已知的探针序列检测样本中是否含有与之配对的核苷酸序列的技术。

## 9.DNA序列分析

该分析技术是分子生物学重要的基本技术。以某测序仪为例，其采用4种荧光染料分别标记终止物或引物，经Sanger测序反应后，反应产物带有不同的荧光标记。

一个样品的4个测序反应产物可在同一泳道内电泳，从而降低测序泳道间迁移率差异对其的影响。通过电泳将各个荧光标记片段分开。同时，激光检测器同步扫描，激发的荧光经光栅分光，以区分代表不同碱基信息的不同颜色荧光，并在CCD摄影机上同步成像。

电脑可在电泳过程中对仪器运行情况进行同步检测，结果能以电泳图谱、荧光吸收峰图或碱基排列顺序等方式输出。此方法测序为一代测序的基本原理。

高通量测序技术是对传统测序的革命性改变，可一次性对几十万到几百万条DNA分子进行序列测定。第二代测序技术将片段化的基因组DNA两侧连上接头，随后用不同的方法产生几百万个空间固定的PCR克隆阵列。目前该技术已发展到第三代测序技术，即单分子测序技术。

不同的细胞因子有其特有的生物学活性，细胞因子的生物学活性检测是利用细胞因子对特定细胞株（靶细胞或反应细胞）的生物学效应来评估样本中相应细胞因子的含量或活性。有以下3种方法可进行生物学活性检测。

### 1、四唑盐（MTT）比色法

MTT法又称MTT比色法，是一种检测细胞存活和生长的方法。此法的原理是：活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的MTT还原为难溶性的蓝紫色结晶物，并沉积在细胞中，而细胞无此功能。二甲基亚砜（DMSO）能溶解细胞中的蓝紫色结晶物，用酶联免疫检测，以在490nm波长处测定其光吸收值，可间接反应活细胞数量。在一定细胞数范围内，MTT结晶物形成的量与细胞数成正比。

用此法测细胞活力，为保证结果的准确性，在试验前测定每种细胞的贴比率、倍增时间以及不同接种细胞数条件下的生长曲线，再确定每孔细胞接种数和培养时间，以保证培养终止时不会过满。另外，实验时设空白对照，比色时，以空白孔调零。

该方法已广泛用于一些生物活性因子的活性检测、大规模的抗肿瘤药物筛选、细胞毒性试验以及肿瘤放射敏感性测定等。它的特点是灵敏度高、经济。

### 2、细胞蛋白质含量测定法（考马斯亮蓝测定法）：

也称考马斯蓝染色法，基本原理为考马斯亮蓝在酸性溶液与蛋白质结合，在595nm波长处，其OD值与蛋白质含量成正比。此种方法主要用于测定受体及细胞外代谢物的特异性活性。

考马斯亮蓝G-250染料，在酸性溶液中与蛋白质结合，使染料的吸收峰（ $I_{max}$ ）的位置，由465nm变为595nm，溶液的颜色也由棕黑色变为蓝色。通过测定595nm处光吸收的增加量可知与其结合蛋白质的量。研究发现，染料主要是与蛋白质中的碱性氨基酸特别是精氨酸和芳香族氨基酸残基相结合。

考马斯亮蓝染色法的突出优点是：

（1）、灵敏度高，据估计比Lowry法约高四倍，其蛋白质检测量可达1mg。这是因为蛋白质与染料结合后产生的颜色变化很大，蛋白质-染料复合物有更高的消光系数，因而光吸收值随蛋白质浓度的变化比Lowry法要大的多。

（2）、测定快速、简便，只需加一种试剂，完成一个样品的测定，只需要5分钟左右。由于染料与蛋白质结合的过程，大约只要2分钟即可完成，其颜色可以在1小时内保持稳定，且在5分钟至20分钟之间，颜色的稳定性好。因而完全不用像Lowry法那样费时和严格地控制时间。

（3）干扰物质少。如干扰Lowry法的 $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Mg^{2+}$ 离子、Tris缓冲液、糖和蔗糖、甘油、巯基乙醇、EDTA等均不干扰此测定法。

此法的缺点是：

（1）、由于各种蛋白质中的精氨酸和芳香族氨基酸的含量不同，因此考马斯亮蓝染色法用于不同蛋白质测定时有较大的偏差，在制作标准曲线时通常选用g—球蛋白为标准蛋白质，以减少这方面的偏差。

（2）、仍有一些物质干扰此法的测定，主要的干扰物质有：去污剂、TritonX-100、十二烷基硫酸钠(SDS)等。

### 3、细胞蛋白质合成测定法（ $^3H$ -亮氨酸掺入法）

基本原理为：细胞在合成蛋白质时需要摄取外源性氨基酸，用同位素标记氨基酸如 $^3H$ -亮氨酸可以掺入细胞蛋白合成代谢中，通过测定细胞的放射性强度，可了解细胞蛋白质合成代谢情况。

（1）取对数生长期细胞，用0.25%胰蛋白酶消化，悬浮于含10%胎牛血清的RPMI培养基中，调整细胞密度 $10^7$ - $10^9$ 个/L，接种于24孔培养板，每孔1ml。

（2）将培养板置 $37^\circ C$ 、5% $CO_2$ 培养箱中培养至细胞处于对数生长期时，每孔100ul预温 $37^\circ C$ 的 $^3H$ -亮氨酸。

（3）继续培养4-24h。

（4）终止培养，取出培养板，小心吸取培养上清，用预冷的PBS洗涤，晾干。如果细胞松散，可先用甲醇固定10min。

（5）把培养板放在冰盖上，每孔加1ml10%三氯醋酸（TCA），在 $4^\circ C$ 放置10min，吸取上清。

（6）甲醇洗涤、晾干。

（7）每孔加0.5ml10.3mol/LNaOH，1%SDS，室温下放置30min。

（8）混匀，移入闪烁液，用液体闪烁计数仪测定每分钟脉冲数（cpm），以cpm/106细胞或cpm/mg蛋白表示。对悬浮生长的细胞则采用离心法处理。

用生物学活性检测法得到的细胞因子含量一般以活性单位来表示，生物活性检测法敏感性往往高于细胞因子的免疫学检测法，且不需要各种标记的特异性抗体，可直接反映待测细胞因子的活性水平。美迪西合成的化合物活性测定一般在初筛活性的纯度能达到95以上，对于后期需要动物试验或者重复初筛实验，化合物活性测试纯度能达到98以上，常用的检测方法：酶标仪、测量OD值、做生长曲线等。

更多[义翘神州](https://cn.sinobiological.com/services/activity-assay-service)体外活性检测技术服务可查看详情：<https://cn.sinobiological.com/services/activity-assay-service>