DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.015

论著

文章编号:1000-5404(2002)01-00032-03

压电石英晶体传感器检测血浆凝血酶原时间及其初步应用

张 波[1],府伟灵[1],杨 新[1],蒋天伦[1],陈 鸣[1],俞 凡[2] ([1]第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038;[2]信息产业部第26研究所,重庆 400060)

提 要:目的 建立一种压电石英晶体传感器检测血浆凝血酶原时间(PT)的方法。方法 采用AT切向、基频10MHz的银膜石英晶体作为压电元件;观察血浆凝集过程中晶体振荡频率的变化,确定血浆凝集反应的起点和终点。结果 ①血浆标本加入反应体系后,晶体振荡频率呈阶梯状快速下降,接着频率瞬时上升,然后再缓慢降低达到平稳,频率阶梯下降的起点为血浆凝集反应的起点,频率从快速上升变为下降的转折点为血浆凝集的终点,计算两点之间的时间即为血浆凝血酶原时间。②该方法的检测结果与*STAGO*磁珠检测法的相关性好($\gamma=0.97$),批内$CV=0.78\%$,批间$CV=2.38\%$。结论 压电石英晶体传感器检测血浆凝血酶原时间,血浆凝集反应起点和终点确定方便、可靠。且操作简单、快速、成本低廉,检测结果准确,是一种敏感性高、重复性好的血浆凝血酶原时间检测新方法,可用于常规检测。

关键词:压电;石英晶体;传感器;凝血酶原时间
中图法分类号:R446.11;TP212.3 文献标识码:A

Detection of prothrombin time with piezoelectric quartz crystal sensor

ZHANG Bo, FU Wei-ling, YANG Xin, JIANG Tian-lun, CHEN Ming, YU Fan (Department of Clinical Laboratories, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To establish a piezoelectric quartz crystal sensor to determinate the prothrombin time(PT) of plasma. **Methods** The quartz crystal sensor was 10 MHz AT-cut quartz with silver coated electrodes. The oscillating frequency changes were observed in the course of the coagulation reaction of plasma sample, the start point and the end point of the coagulation reaction were showed by the frequency change tendency. **Results** After the plasma sample was added into the reaction system, oscillation frequency of the crystal was decreased as a ladder, then rose abruptly and descended gradually to balance. The start of the ladder-like frequency decrease was regarded as the start point of coagulation reaction, the turning point of the frequency from rise to decrease as the end point of the reaction. The time between the start point and the end was calculated as PT. It was showed there was a significant correlation between the results from our method and the automatic coagulation analyzer (STAGO, France) ($\gamma=0.97$), and the variances within and between batches were 0.78% and 2.38% respectively. **Conclusion** Our method for determining the prothrombin time of plasma is simple, rapid, specific, accurate and cheap, and it might be a valuable method for PT detection in clinical laboratory.

Key words: piezoelectricity; quartz crystal; sensor; prothrombin time

凝血酶原时间(PT)是指血浆在体外加入足够的组织凝血活酶和适量的钙离子后,血浆凝固所需的时间。凝血酶原时间取决于血浆的凝血酶原、纤维蛋白原以及凝血因子Ⅴ、Ⅶ、Ⅹ的水平,因此,凝血酶原时间测定是外源性凝血系统的常用过筛实验[1]。目前PT检测的方法和商业化的凝血检测仪器很多,都是以血浆凝集反应为检测的基础,血浆凝固的终点可用自动化凝血分析仪确定或肉眼观察。肉眼观察,秒表计时,检测结果误差较大,重复性差[2];自动化仪器检测结果可靠、快速、结果重复性好,但仪器昂贵,检测成本高,国产化仪器少,仍需寻找准确、简单、快速、成本低廉的新方法。

压电石英晶体传感器是一种新型传感测量技术,其振荡频率对反应过程质量和体系性状如密度、粘度、电导率、介电常数等的变化非常敏感,具有ng级的质量检测能力,是获取实时在线信息的强有力手段。特别是压电石英晶体传感器在液相振荡获得成功以来,广泛应用于生物传感器领域,成为生物传感器研究的热点之一[3,4]。压电石英晶体传感器分为质量效应型和非质量效应型两种。Sauerbrey首先推导出压电石英晶体振荡频率与晶体表面质量负载的数学关系式。文献[5,6]总结了与液体接触的非质量效应型石英晶体频率偏移公式(1)。本实验利用压电石英晶体传感器在液相中振荡的频率变化与溶液密度、粘度及表面质量负载的关系,建立一种检测血浆凝血酶原时间的新方法,获得了满意的结果。

$$\Delta f=-f_0^{3/2}(\rho_L\eta_L/\pi\rho_q\mu_q)^{1/2} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

ρ_L、η_L为液体的密度和粘度,ρ_q、μ_q为石英的密度和剪切模量

1 材料和方法

1.1 仪器与器材

石英晶体为AT切向,电极被覆银膜,基本频率10 MHz,晶体直径8.5 mm,银膜电极直径4.0 mm。购自成都仁和电子有限公司,ISSO9002质量认证。石英晶体振荡频率检测仪采用自

基金项目:国家"九五"科技攻关项目(96-A23-04-04);国家自然科学基金资助面上项目(39870831);国家高技术计划生物技术领域青年基金资助项目("863"项目);全军"九五"医学科研计划资助面上项目(98MO94);全军"十五"医学科研计划资助面上项目(01MA180);全军"十五"医学科研计划指令性课题(01LO65);重庆市科委风险投资基金资助项目
作者简介:张 波(1969-),男,四川省安岳县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事医学实验诊断及相关新技术、新仪器方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68753687
通信作者:府伟灵(E-mail:weilingfu@yahoo.com)
收稿日期:2001-10-30;修回日期:2001-12-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

激式振荡电路, TTL 电平输出, 检测室为 12 cm× 7 cm× 4 cm 的金属密闭室, 室内有保湿、恒温装置, 抗电磁辐射、气流冲击等外界因素的影响, (由我室与信息产业部第 26 研究所合作研制)。ACL-8454 多功能记数卡(ANDLINK 公司)有 12 个信道, 内置于方正 PIII 飞越型计算机(北大方正集团公司)。《PESA 分析软件 2.0》具有频率、时间、频率变化趋势图等记录分析功能, 我室自行设计开发。*STAGO* 全自动凝血分析仪(法国 *STAGO* 公司)。

1.2　主要试剂

血浆凝血酶原时间检测试剂 1: 组织提取的凝血活酶混合物干粉; 试剂 2: 含有 $CaCl_2$ 的试剂溶解液, 为 *STAGO* 公司原装试剂。使用前配制。

1.3　实验方法

1.3.1　压电石英晶体传感器振荡频率检测系统的构建　　压电石英晶体传感器谐振频率检测系统的结构见图 1。主要由石英晶体振荡器、振荡频率检测电路、频率信号采集及处理系统组成。

Quartz crystal detection cell ⇨ Oscillation and detection circuit ⇨ Data acquisition ⇨ Analysis and storage

图 1　压电石英晶体传感器频率检测系统的结构示意图

Fig 1　Schematic diagram of the construction of the piezoelectric quartz crystal sensor system

压电石英晶体频率检测仪的 TTL 频率信号输出接口通过数据线与计算机的频率采集卡接口连接, 频率数据记录与处理由《PESA 分析软件 2.0》自动完成。

1.3.2　石英晶体检测池的制作　　镀银膜的石英晶体先用丙酮浸泡 40 min 后, 转移至无水乙醇中浸泡 30 min, 取出后氮气吹干; 用树脂胶粘剂把石英晶体固定在聚乙烯小板直径 8 mm 的圆孔上, 形成检测池的底部。检测池的容积为 150 μl。

1.3.3　血浆凝血酶原时间的检测方法　　血浆凝血酶原时间检测试剂 1 和试剂 2 使用前配制成混合溶液, 置 37 ℃的检测室内预温。取预温后的混合液 80 μl 加入石英晶体检测池中, 检测晶体振荡频率至稳定, 再加入 40 μl 待测血浆标本, 迅速混匀, 继续检测频率 90 s, 至频率相对稳定。频率采集的闸门时间、时间间隔均为 0.1 s, 计算机自动采集记录频率及其对应时间。根据石英晶体频率在血浆凝集过程中的变化规律, 确定血浆凝集反应的起点和终点, 计算这两点之间的时间差即为血浆凝血酶原时间。

1.4　统计学分析

采用 SPSS 统计分析软件进行线性回归分析。

2　结果

2.1　血浆凝血酶原时间检测方法的建立

在血浆凝集反应过程中, 石英晶体振荡频率的变化过程见图 2。加入血浆后, 血浆凝集反应随之启动, 石英晶体振荡频率呈阶梯状快速下降, 下降的起点所对应的时间点即为血浆凝集反应的起点, 准确记录该点频率对应的时间(T_1); 随着血浆凝集反应的不断进行, 石英晶体检测池中反应体系的粘度和密度也不断增大, 石英晶体的振荡频率继续快速下降, 在血浆凝集的终点, 纤维蛋白原在酶促作用下逐渐转变成纤维蛋白, 原来附着在石英晶体表面的纤维蛋白原也转变成纤维蛋白随着纤维蛋白复合体和血浆凝块的形成、收缩而从石英晶体表面掉下来。此时, 由于石英晶体表面质量负载减小, 晶体振荡频率快速升高。随后由于血凝块快速沉积附着在晶体表面, 晶体振荡频率又随之下降并逐渐达到平衡。因此频率上升到下降的转折点对应于血凝块形成、收缩的瞬时状态, 为血浆凝集反应的终点(T_2)。计算起点和终点的时间(T_2-T_1), 即为血浆凝血酶原时间。

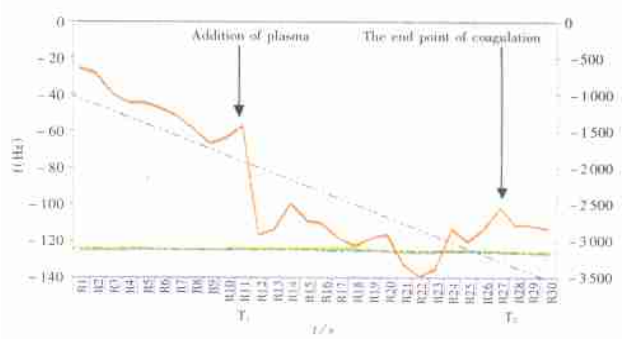


图 2　血浆凝集反应过程石英晶体振荡频率的变化趋势图

Fig 2　Tendency of the oscillation frequency change of the crystal in the coagulation reaction of plasma

2.2　精密度实验

取 *STAGO* 凝血检测仪用的高(H)、低(L)值质控血清, 分别作批内、批间测定 20 次。批内: $\bar{x}_L=14.5$、$s\bar{x}_L=0.12$、$CV_L=0.83\%$, $\bar{x}_H=27.1$、$s\bar{x}_H=0.21$、$CV_H=0.78\%$; 批间: $\bar{x}_L=15.7$、$s\bar{x}_L=0.29$、$CV_L=1.84\%$, $\bar{x}_H=29.3$、$s\bar{x}_H=0.70$、$CV_H=2.38\%$。

2.3　方法比较

应用压电石英晶体传感器(X 法)检测了 40 份临床标本, 并同时用法国 *STAGO* 凝血分析仪(Y 法)平行检测。结果作线性相关分析见图 3。统计学分析得出两种方法的相关系数为 0.97。结果表明压电石英晶体传感器检测血浆凝血酶原时间结果与 *STAGO* 凝血分析仪检测的结果一致性好, 结果可靠, 能用于临床血浆凝血酶原时间的测定。

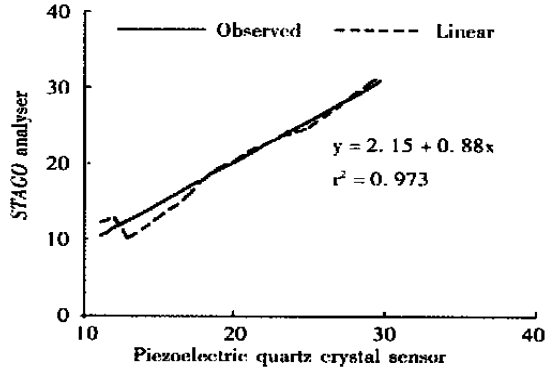


图 3　压电石英晶体传感器法和 ***STAGO*** 凝血检测仪法测定结果的比较

Fig 3　Comparison of the prothrombin time by piezoelectric quartz crystal sensor and *STAGO* coagulation analyzer

3　讨论

目前, 血浆凝血酶原时间的检测方法和仪器很多, 都是以血浆凝集过程的变化规律作为检测的基本原理。组织凝血活酶和钙离子混合溶液的加入, 启动血液凝集反应, 通过一系列酶促反应, 血浆纤维蛋白原变

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

成纤维蛋白单体并交叉连接形成网，从而形成血凝块。凝血酶原时间测定的关键是血浆凝集反应起点和终点的正确判定。

压电石英传感器对反应体系液体粘度、密度以及晶体表面质量负载的变化有高度的敏感性，具有 ng 级的质量检测能力，其振荡频率与液体粘度、密度以及晶体表面质量负载成负相关关系。在凝血反应启动后，检测池中反应溶液的粘度随着血浆的凝集，纤维蛋白的形成而不断加大，晶体表面质量负载也由于纤维蛋白的附着逐渐增加，导致晶体的振荡频率呈阶梯状快速下降。因此，晶体频率的变化规律如实地反映了血浆凝集的全过程，与溶液粘度对晶体频率的影响结果符合[7]。随着血浆凝集反应的进行，达到血浆凝集过程的终点时，溶液粘度虽不再变化，但附着在晶体表面的纤维蛋白随血块收缩离开晶体表面，导致晶体表面质量负载瞬间减小，晶体振荡频率快速上升；随后血凝块又快速沉积、附着在晶体表面，晶体质量负载快速增加，晶体振荡频率下降并迅速达到相对平稳状态，从理论上也符合石英晶体频率变化对质量效应的响应规律[8]。因此，应用压电石英晶体传感器测定血浆凝血酶原时间具有可靠的理论依据和实验基础[9]。综上所述，在血浆凝集反应过程中，晶体频率变化的规律为频率快速下降又瞬时上升，再缓慢降低达到平稳。石英晶体振荡频率的这种变化过程为血浆凝集反应起点和终点的判断提供了客观依据，晶体频率阶梯状下降的起点为血浆凝集反应的起点，随后晶体频率的快速上升变为下降的转折点即是血浆凝集反应的终点，计算两点之间的时间即为血浆凝血酶原时间。

本研究建立的压电石英晶体传感器检测血浆凝血酶原时间的方法，与目前采用的 *STAGO* 凝血分析仪检测结果符合，两种方法的相关系数为 0.97，且压电石英晶体传感器操作简单，仪器成本低廉，是一种检测血浆凝血酶原时间敏感、快速、简单、成本低廉的新方法。具有广阔的应用前景和推广使用价值。

参考文献：

[1] 丛玉隆，王叔娟. 今日临床检验学[M]. 北京：中国科学技术出版社，1997. 180－183.
[2] 丛玉隆. 关于卫生部出凝血时间操作规程《通知》的理解[J]. 中华检验医学杂志，2001，24(3)：183－185.
[3] Pavey K D, Ali Z, Olliff C J, *et al*. Application of the quartz crystal microbalance to the monitoring of Staphylococcus epidermidis antigen－antibody agglutination[J]. Pharm Biomed Anal, 1999 20(1－2)：241－245.
[4] Zhou A, He D, Nie L H, *et al*. Determination of the binding parameters of drug to protein by equilibrium dialysis/piezoelectric quartz crystal sensor [J]. Anal Biochem, 2000, 282(1)：10－15.
[5] Nomura T, Okuhara M. Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids[J]. Anal Chim Acta, 1982, 142(2)：281－284.
[6] Kanazawa K K, Gordon J G. The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with a liquid[J]. Anal Chim Acta, 1985, 175(9)：99－105.
[7] Shigeru K, Naoki K. Detection of antistreptolysin O antibody：application of an initial rate method of latex piezoelectric immunoassay[J]. Anal Chem, 1992, 64(21)：2 483－2 487.
[8] Park I S, Kim W Y, Kim N. Operational characteristics of an antibody－immobilized QCM system detecting Salmonella spp[J]. Biosens Bioelectron, 2000, 15(3－4)：167－172.
[9] 周铁安，谢乃贤，聂利华，等. 血液凝固过程压电响应机理研究及临床应用[J]. 湖南大学学报，1998，25(5)：34－37.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)01-0034-02

细胞同步化能显著提高逆转录病毒载体的转染效率

Synchroization of cells significantly improves transduction efficiency of retroviral vector

杨金亮[1]，黄晋生[2]，房殿春[1]，张海荣[2]（[1]第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心，重庆 400038；[2]海军总医院中心实验科，北京 100037）

本研究采用低温处理细胞，使之同步化，可以明显提高逆转录病毒载体的转染效率，现报告如下。

1 材料和方法

1.1 细胞株及培养

人胃癌细胞株 SGC-7 901、逆转录病毒包装细胞 PA317 和 NIH3T3 细胞由本室冻存保种，前者培养于含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液中，后二者培养于 DMEM 培养液中，培养条件为 37 ℃、5% CO_2 和饱和湿度，每隔 3～4 d 消化传代 1 次。

1.2 逆转录病毒包装、收获和滴度测定

包含人 B7-1 基因全长 cDNA 的逆转录病毒载体 pLXSN-B7 由上海生化研究所的王顺友博士构建并惠赠。pLXSN-B7 转染 PA317 细胞采用电穿孔法[1]，转染后 48 h，用含 G418 1 000 μg/ml 的培养液筛选，2 周后挑取单克隆细胞进行扩大培养，适时冻存保种。病毒上清收集、保存和滴度测定按文献[2]进行。

1.3 细胞同步化法[3]

采用低温处理法使细胞同步化，收集分裂期细胞。

1.4 逆转录病毒感染 SGC-7 901 细胞

取培养于 6 孔板上的对数生长期细胞（约 60% 汇合）和已同步化的分裂期细胞，弃尽培养液，加 pLXSN-B7 病毒上清 2 ml

（下转 38 页）

作者简介：杨金亮（1967－），男，山西省平顺县人，博士，主治医师，主要从事消化道肿瘤的免疫和基因治疗研究，发表论文 10 余篇。电话：(023)65180109

收稿日期：2001-01-05；修回日期：2001-09-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net