

室温洗 2 次,每次 30 min。

1.6 曝光 将胶膜置滤纸上,晾干后用保鲜膜加封,用 X 光片在 -70°C 曝光 2—4 h,得到放射自显影结果。

2 结果与讨论

采用琼脂糖凝胶杂交法得到了比较满意的结果,它具有如下特点:

2.1 用本法取得的杂交结果具有带型清楚,整齐等特点,X 光片显影背景低(见图 1)。本方法敏感度达 50 pg(见图 2)。其总体杂交效果可与 DNA 印迹杂交相媲美。

2.2 方法简便,省时。本方法采用琼脂糖凝胶电泳后抽干成膜代替硝酸纤维薄膜或尼龙膜,不仅省略了繁琐的吸印步骤,而且减少了曝光时间。使实验周期由原来的 10 d 减为 2 d。

2.3 节省材料,本实验以价格低廉的琼脂糖凝胶代替价格昂贵的硝酸纤维膜或尼龙膜,具有一定的经济效益。

2.4 DNA 带型不扩散,虽然核酸在胶膜中与琼脂糖分子结合疏松,不如在常用杂交膜上那样牢固,但核酸位于胶膜中间,经 65°C 固定后,不易发生 DNA 分子的扩散或逃逸。

本文介绍了 DNA 印迹杂交替代法,与经典的 DNA 印迹法比较,具有许多独到之处。它不仅节约实验器材和时间,而且还有操作简单方便等特点。可在条件较差的实验室完成 DNA 杂交实验。

参 考 文 献

- 1 Southern E M. *J Mol Biol*, 1975; 98: 503
- 2 Fabric D. *Molecular and Cellular Probes*, 1990; 4: 53

酶偶联法尿素氮测定最适条件的探讨

宋耀虹 李学仁 马德均 林其遒

(北京协和医院,北京 100730)

关键词 血尿素氮,脲酶,谷氨酸脱氢酶

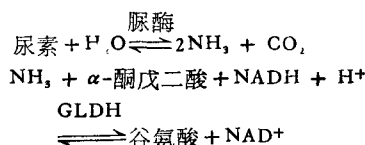
血尿素氮(BUN)测定是临床上检查肾功能最常用的指标之一。其测定方法有比色法和酶法二类,用脲酶检测又可配以各种技术,如电化学法测定 CO_2 和 NH_3 的释放^[1,2],比色法^[3]或酶偶联法^[4],另外还可采用固定化脲酶的酶电极^[5]和酶试纸^[6]。本文是采用脲酶、谷氨酸脱氢酶偶联反应测定 BUN,此法具有特异性高、快速、准确、可使用单一试剂、便于自动分析等特点。

1 材料与方 法

1.1 试剂 谷氨酸脱氢酶(GLDH),腺苷二磷酸(ADP)均为中国科学院生物物理所生化试剂厂产品;脲酶,四川省生化试剂一厂产品;还原型辅酶 I(NADH_2),中国科学院上海生化所东风试剂厂; α -酮戊二酸,生化试剂,中国科学院微生物所;三羟甲基甲烷(Tris),成都化学试剂厂产品。

1.2 仪器 自动生化分析仪 PACER(美国 Ames 公司);ENCORE(美国 Baker 公司);连续流动式自动生化分析仪 SMA PLUS(日本 Technicon 公司)。

1.3 方法 酶偶联法测定尿素氮的原理如下:



在相同条件下,测定空白、标准和样品的 340 nm 吸光度下降程度,然后按下式计算样品中尿素氮的含量。

$$C_{\text{样品}} = \frac{\Delta A_{\text{样品}}}{\Delta A_{\text{标准}}} \times C_{\text{标准}}$$

式中 $C_{\text{标准}}$ 为标准液浓度 (mg/dL); $C_{\text{样品}}$ 为未知样品中 BUN 的浓度 (mg/dL); ΔA 为线性范围内一定时间的吸光度差值。

2 实验结果

2.1 脲酶及谷氨酸脱氢酶用量的选择 首先作不同活性单位 GLDH 对 NADH_2 氧化速率的影响,其反应条件为:缓冲液 pH 8.0, 110 mmol/L Tris-HCl; α -酮戊二酸 12 mmol/L; NADH , 0.25 mmol/L; 脲酶

6000U/L; ADP 3mmol/L 及 BUN 为 45mg/dL, 结果见图 1, 表 1. 可见 GLDH 量大时, NADH_2 氧化速率快, 延滞时间和线性时间短, 但吸光度变化值 (ΔA) 大. 由于 8000U/L 与 10000U/L GLDH 的反应曲线基本接近, 故选择 GLDH 为 8000U/L. 然后固定 GLDH 为 8000U/L, 选用不同活性单位的脲酶, BUN 为 50mg/dL, 其他反应条件同上, 测不同单位脲酶对 NADH_2 氧化速率的影响见图 2, 表 2. 实验结果显示, 脲酶量为 12000U/L 时, 线性反应时间较长, ΔA 值也较高, 并与 16000U/L 脲酶用量的反应曲线基本接近. 故确定脲酶用量为 12000U/L, GLDH 为 8000U/L.

表 1 不同单位 GLDH 与 NADH_2 氧化速率的关系

GLDH U/L	延滞时间 s	线性反应 时间 s	n	线性反应时间内 ΔA_{10s} $X \pm SD$
4000	180	80	8	0.039 ± 0.002
6000	150	50	5	0.050 ± 0.002
8000	120	50	5	0.059 ± 0.001
10000	110	50	5	0.061 ± 0.001

表 2 不同单位脲酶与 NADH_2 氧化速率的关系

脲酶 U/L	延滞时间 s	线性反应 时间 s	n	线性反应时间内 ΔA_{10s} $X \pm SD$
4000	140	110	11	0.035 ± 0.001
8000	100	60	6	0.048 ± 0.001
12000	90	50	5	0.057 ± 0.002
16000	90	30	3	0.060 ± 0.003

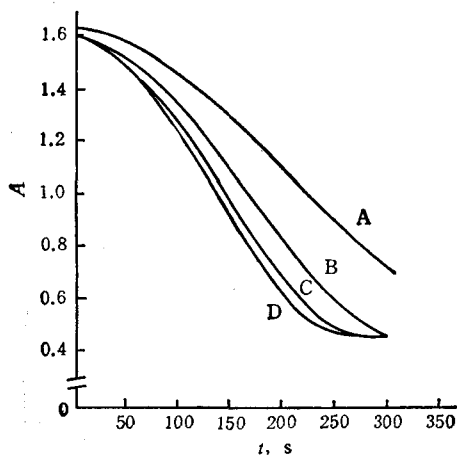


图 1 不同单位 GLDH 与 NADH_2 氧化速率的关系
GLDH: A 4000U/L; B 6000U/L; C 8000U/L;
D 10000U/L BUN = 45mg/dL

2.2 α -酮戊二酸的浓度 据文献[4]报道, 低浓度的 α -酮戊二酸(α -KG)能获得 NADH_2 氧化的高速

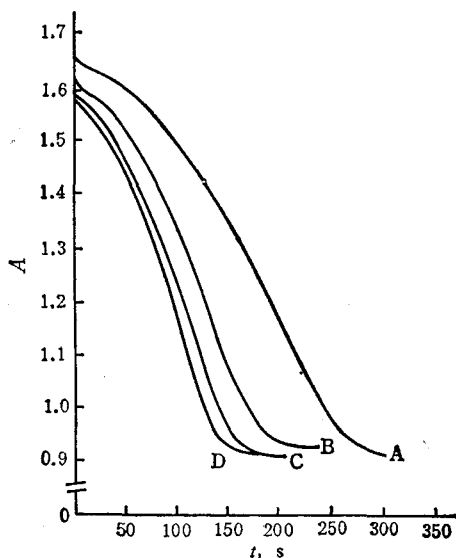


图 2 不同单位脲酶与 NADH_2 氧化速率的关系
脲酶: A 4000U/L; B 8000U/L; C 12000U/L;
D 16000U/L BUN = 50mg/dL

表 3 α -KG 浓度不同时酶偶联法与二乙酰-脲法比较

方法	α -KG mmol/L	样品数 n	$X \pm SD$ mg/dL	百分误差 %
二乙酰-脲法		5	44.4 ± 30.1	
	2.5	5	42.6 ± 31.5	-4.1
酶偶联法	5.0	5	43.9 ± 29.5	-1.1
	7.5	5	48.3 ± 35.6	+8.8

率, α -KG 浓度一般在 10mmol/L 内反应较好. 我们初选 α -KG 浓度为 2.5mmol/L, 5.0mmol/L 和 7.5mmol/L, 在下列反应条件: 脲酶 12000U/L; GLDH 8000U/L; NADH_2 0.3mmol/L; ADP 3mmol/L; pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液, 对 5 个不同浓度的 BUN (20.6, 89.3, 58.0, 16.0, 38.0mg/dL) 样品, 以二乙酰-脲法为对照进行测定, 见表 3. 结果表明当 α -KG 浓度为 5.0mmol/L 时, 本法与二乙酰-脲法的测定值最接近, 其百分误差最小, 故 5.0mmol/L α -KG 为本实验的较佳浓度.

2.3 缓冲液浓度 酶偶联法采用 Tris-HCl 缓冲液, 在测定体系中, 缓冲液浓度和 pH 不同会影响酶的反应速率, 当 Tris 浓度为 80mmol/L, pH 为 8.0 时, BUN 测定值与二乙酰-脲法最接近.

2.4 腺苷二磷酸 (ADP) 的浓度 ADP 是谷氨酸脱氢酶的稳定剂和激活剂, 不同浓度 ADP 对 BUN 测定是有影响的, 用上述的判断方法, 确定本实验 ADP 的最适用量为 1mmol/L.

根据以上实验确定了酶偶联法尿素氮测定的最佳条件: NADH_2 为 0.3mmol/L, 脲酶 12000U/L, GLDH

8000U/L, α -酮戊二酸 5mmol/L, ADP- Na_2 1mmol/L, Tris 缓冲液为 80mmol/L, pH8.0 $\pm$ 0.1.

2.5 延滞反应和线性反应时间 在上述最佳条件下, 使用 ENCORE 分析仪研究程序对不同浓度的 BUN 样品(60mg/dL, 80mg/dL)进行测定, 延滞时间为 60s, 线性时间为 50s, 线性时间决定于所测样品浓度, 浓度低时, 线性时间长, 浓度高时, 线性时间短.

2.6 线性测定范围 用 10—100mg/dL 的尿素氮标准液, 在 ENCORE 分析仪上测定, 线性范围是 0—80mg/dl.

2.7 回收实验 在正常人的混合血清 (BUN 为 6.5mg/dL) 中分别加入 10, 30, 50, 60mg/dL 尿素氮作回收实验, 回收率为 97.2—103.3%.

2.8 重复性实验 同时测定 cv 值为 1.3—3.2%, 日间 cv 值为 0.71—3.5%.

2.9 稳定性观察 将测定试剂分别置室温 (21 $^{\circ}\text{C}$) 和冰箱 (6 $^{\circ}\text{C}$) 中观测, 在室温可稳定 8h, 冰箱可保存 32h, 如果组成试剂盒贮存于冰箱 (4—8 $^{\circ}\text{C}$), 至少可稳定 6 个月.

2.10 相关实验 酶偶联法与二乙酰一脲法 (SMA PLUS 自动生化分析仪) 相关, $n=79$, $r=0.99$, $Y=1.02X+0.125$ (Y 为本法, X 为二乙酰一脲法). 酶偶联法与美国 Baker 公司的 BUN 试剂盒相关, $n=34$, $r=0.99$, $Y=0.98X+1.004$ (X 为 Baker 产品).

2.11 95% 分布范围的测定 我们共测定健康成人 108 例, 男 67, 女 41, 年龄从 25—66 岁, 频数分布为正偏态, 95% 分布范围为 8—22mg/dl.

3 讨 论

3.1 关于氨的干扰问题 氨是测定底物, 若任何

一种试剂或水溶液含有氨离子, 则能使吸光度发生非特异性的变化, 样品测定值会假性升高, 同时还会影响试剂的稳定性.

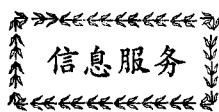
3.2 酶偶联法是带有标准品的动力学法, 由于采用速率法或固定时间监测法, 一些固定的干扰因素 (如溶血、黄疸、脂质) 一般不影响反应. 若血红蛋白在 500mg/dL 以上或胆红素在 18mg/dL 以上可作标本空白去除干扰.

3.3 酶偶联法是采用酶作为分析试剂, 血清、血浆均可使用, 但不能用氟化钠作抗凝剂, 因为氟化钠对脲酶有抑制作用. 尿标本一般需稀释 10 倍后再测定.

3.4 在选择 α -酮戊二酸, ADP, Tris 缓冲液浓度时, 以二乙酰一脲法测定结果为对照的理由是: 我们用连续流动式生化分析仪 (SMA PLUS) 采用二乙酰一脲法测定 BUN 值, 其特点是仪器本身带有透析器能去除蛋白、胆红素、血红蛋白、脂类等干扰, 自动控制温度和时间, 故实验结果可靠, 准确, 稳定, 并与进口酶盒相关良好.

参 考 文 献

- 1 Guibault G G, Montalvo J, Smith R. *Anal Chem*, 1969; 41: 600
- 2 Guibault G G, Shu F. *Anal Chem*, 1972; 44: 1261
- 3 Cirje M, Sandru D. *Viata Med*, 1965; 12: 1617
- 4 Tiffany T O, Jansen J M *et al. Clin Chem*, 1972; 18: 829
- 5 Kuan J W, Lan H K Y, Guibault G G. *Clin Chem*, 1975; 21: 67
- 6 奥田 清. 临床检查, 1978; 22(11): 1203



信息服务

国产生化试剂福司可林研制成功

福司可林 (forskolin) 是医学和生物化学中研究环核苷酸系统的良好试剂, 用途广泛. 目前从 sigma 公司进口此生化试剂, 价格昂贵, 且不易买到. 中国科学院动物研究所立足于国内资源, 已研究开发出了这种生化试剂. 经研究单位实验证明, 此试剂与 sigma 试剂对比, 两者具有同等生物活性. 从而填补了我国这一空白, 可供应国内市场, 价格优惠.

福司可林的重要生理效应是激活腺苷酸环化酶, 使细胞中的 cAMP 含量显著增加, 从而对各种系统和

各种器官, 如脑、心脏、肺脏、肝脏、甲状腺、性腺、胰腺等具有广泛的调节作用. 它在生物化学、生理学、细胞生物学和药理学研究中, 已成为一种必不可少的生化试剂, 被广泛使用.

福司可林的分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_7$, 分子量为 410, 白色晶体, 熔点: 230—232 $^{\circ}\text{C}$, 经 HPLC 制备, 含量达 98% 以上.

[北京 100080, 中国科学院动物研究所内分泌研究室
刘纯益 姚文贞 电话 255·1668]