

(0.5—1.0min) 浸渍, 活性最高. 以后, 随着浸渍时间的延长, 酶膜活性就逐步下降. 另外, 我们还对 POD 丝素膜作了活性渗漏试验, 结果表明即使在 25℃ 的磷酸缓冲液 (pH7.0) 中浸渍 5h, 也未发现酶膜中有任何 POD 的渗漏.

3 讨 论

日本学者应用中性盐溴化锂溶解丝素后, 制成了固定化葡萄糖苷酶、脂酶^[3]、葡萄糖氧化酶等丝素膜, 并应用于生物传感器. 由于溴化锂价格较贵, 制成酶膜的费用大. 本文试用氯化钙溶解丝素, 然后制成固定化过氧化物酶丝素膜. 试验结果表明, 用这种方法制成的固定化过氧化物酶的丝素膜的性质与我们用溴化锂溶解后制成的固定化 POD 丝素膜性质基本相仿 (未发表的资料), POD 经这二种丝素膜固定化后都大大地改善了其对热和 pH 的稳定性. 稍有不同的是后者最适酶促反应温度为 50℃, 而前者为 50—60℃; 前者最适 pH 为 7.0—8.0, 而后者为 5.0—7.0. 两者对热的稳定性相仿, 都是在较高温度下不易失活. 这些结果表明用氯化钙溶解后制成的丝素膜同样是一种较好的固定化酶生物材料. 今后我们将继续进一步研究在医用材料方面的应用, 至于能否适用于生物传感器, 我们将另作深入的探讨.

致谢 感谢本校吴友良教授和贡成良老师对本工作的大力支持.

参 考 文 献

- 1 Asakura T, Yoshimizu H, Kuzuhara A *et al.* J Seric Sci

Jpn, 1988; **57**: 203

- 2 Demura M, Asakura T. Biotechnol Bioeng, 1989; **33**: 598
- 3 Demura M, Xomura T, Hiraide T. SEN-I GAKKAISHI, 1990; **46** (9): 391
- 4 Asakura T, Nakayama N. SEN-I GAKKAISHI, 1989; **45** (6): 252
- 5 张雨青. 实验室研究与探索, 1994; **40** (2): 74
- 6 Bruno S 著. 钱嘉渊译. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 276—278
- 7 Miyairi S, Sugiura M, Fukui S. Agric Biol Chem, 1978; **42** (9): 1661

Preparation of the Peroxidase-Immobilized Fibroin Membrane and Its Characteristics.

Zhang Yuqing, Zhou Yuzhen (*Suzhou Sericulture College, Suzhou 215151, China*).

Abstract The aqueous solution of the silk fibroin from silkworm *Bombyx mori* cocoons was obtained by treatment of the neutral salt (CaCl₂). Peroxidase (POD) was immobilized in the silk fibroin membrane. Activity and characteristics of the POD-immobilized fibroin membrane were analysed. The results show that the activity of the POD-immobilized membrane is high; Optimum pH range for the enzyme membrane, being at pH5.0—7.0, was widened in comparison with the free enzyme; and its thermal stability was good.

Key words fibroin, peroxidase, immobilized enzyme, POD-immobilized fibroin membrane, silkworm

在 96 孔板中进行抗脂质过氧化的微量测定*

孙士勇 徐 波 李秋菊 李润沼

(北京医科大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 以 Fe²⁺/半胱氨酸诱导大鼠肝微粒体为基本模型, 根据硫代巴比妥酸 (TBA) 反应原理, 优化不同反应条件, 建立了一种在 96 孔板上进行抗脂质过氧化测定的一步反应方法. 该方法的灵敏度不低于

传统的试管法,而且还具有微量、快速、简便等优点,特别适用于大规模筛选和研究抗氧化剂。此外,也可用于其它系统诱导的抗脂质过氧化的测定。

关键词 微粒体, 脂质过氧化, 抗氧化剂

由活性氧自由基引起的脂质过氧化作用与多种病理过程如恶性肿瘤、动脉粥样硬化、缺血再灌注损伤、衰老等有密切关系。因此,抗氧化剂在这些疾病的防治过程中有着非常重要的意义^[1-3]。目前测定脂质过氧化(lipid peroxidation, LPO)的方法有多种,其中硫代巴比妥酸(TBA)法是最为常用的方法^[4]。常规TBA法多在试管中进行,操作过程繁琐,不适用于抗氧化剂的大规模筛选。本研究在此基础上,以 Fe^{2+} /半胱氨酸诱导大鼠肝微粒体脂质过氧化为基本模型,建立了一种适用于大规模筛选抗氧化剂的96孔板一步反应测定LPO方法,并优化了各种实验条件。实验证明该法具有微量、快速、简便等优点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 Wistar大白鼠,体重 $235 \pm 30\text{g}$,雌雄兼用,由本校实验动物提供。

1.2 试剂 硫代巴比妥酸(TBA)为Fluka公司产品,十二烷基硫酸钠(SDS)和半胱氨酸为Sigma公司产品,三氯醋酸(TCA)和硫酸亚铁(FeSO_4)为北京化工厂产品,维生素C为北京芳草医药化工研制公司产品。

1.3 大鼠肝微粒体制备 按文献[5]方法进行。

1.4 抗LPO的96孔板法测定 测定在平底96孔培养板(Costar公司产品)中进行,反应液总体积 $100\mu\text{l}$,含鼠肝微粒体 $75\mu\text{g}$, FeSO_4 $10\mu\text{mol/L}$,半胱氨酸 1mmol/L 和不同浓度的被试物质(对照组加等体积溶剂)。混匀后,置 37°C 温育20min,然后加入 $100\mu\text{l}$ TBA反应液(含0.67%TBA,10%TCA和5%SDS), 60°C 加热30min后,在酶标仪(Bio-Rad Mode 400)上于540nm和595nm进行双波长比色测定。LPO以540nm处吸收值(A_{540})表示。

1.5 抗LPO的试管法测定 反应液总体积为 1ml ,其中含微粒体 1mg , FeSO_4 $10\mu\text{mol/L}$,半胱氨酸 1mmol/L 和不同浓度被试物质(对照组加等体积溶剂)。 37°C 反应20min,然后加入0.67%TBA(由15%TCA配制) 1ml , $90-100^\circ\text{C}$ 加热15min后,以 1500r/min 离心10min,取上清液于540nm进行比色分析。

1.6 蛋白质含量测定 采用Brade-ford法^[6]进行。

2 结果与讨论

2.1 微粒体浓度对LPO测定的影响 本实验采用 Fe^{2+} /半胱氨酸诱导大鼠肝微粒体产生LPO。因此,选用适宜浓度微粒体是测定的基本条件。由图1可以看出,LPO随微粒体浓度增加而增加,当其浓度超过 1mg/ml 时,会因三氯醋酸的加入和加热引起的蛋白质变性沉淀增加而使浊度加强,影响在酶标仪上进行比色。故选择微粒体浓度在 $0.5-0.75\text{g/L}$ 之间比较适宜。

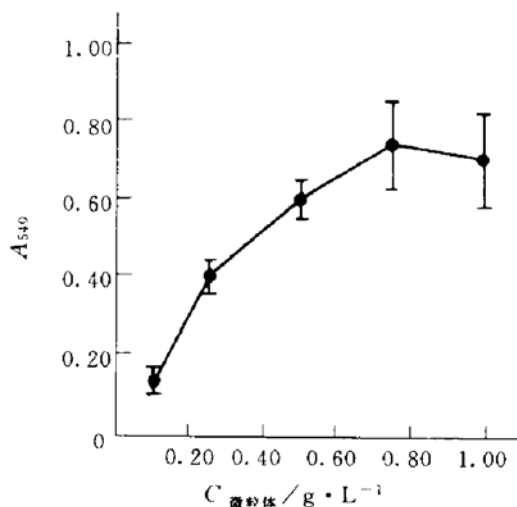


图1 微粒体浓度对96孔板中测定脂质过氧化的影响

FeSO_4 和半胱氨酸的浓度分别为 $10\mu\text{mol/L}$ 和 1mmol/L , $\bar{x} \pm s$, $n=8$ 。

2.2 FeSO_4 与半胱氨酸浓度选择 适当浓度的 Fe^{2+} 和半胱氨酸是保证诱导肝微粒体产生适量 LPO 的基础. 图 2 显示, FeSO_4 10—100 $\mu\text{mol/L}$ 、半胱氨酸 1—10 mmol/L 能明显诱导 LPO 生成, 本实验选用浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ FeSO_4 和 1 mmol/L 半胱氨酸. 应注意的是 FeSO_4 开瓶后放置时间越长, 会吸潮或部分被氧化, 此时应相应增加 FeSO_4 浓度如 50 $\mu\text{mol/L}$, 否则 LPO 的生成量即 A_{540} 会偏低. 半胱氨酸单独使用并不明显诱导 LPO 生成(结果略), 但其加强 FeSO_4 对 LPO 的诱导.

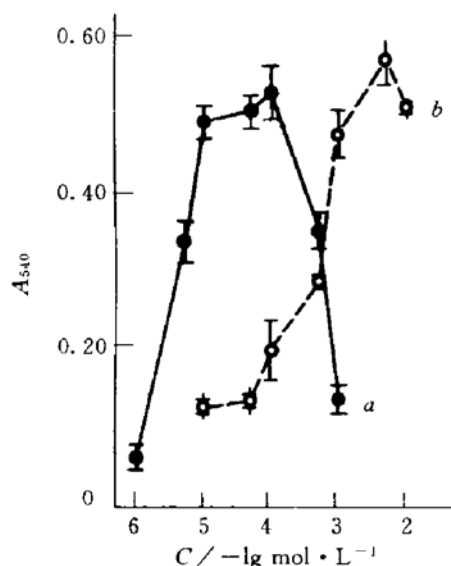


图 2 在 96 孔板中选择诱导微粒体的最适 FeSO_4 和半胱氨酸浓度

a: 半胱氨酸浓度, 固定为 1 mmol/L ; b: FeSO_4 浓度, 固定为 50 $\mu\text{mol/L}$. $\bar{x} \pm s$, $n=4$.

2.3 37℃ 温育时间对 LPO 生成的影响 图 3 表明, 加入 FeSO_4 和半胱氨酸后, 随温育时间延长 LPO 生成逐渐增加, 到 30min 后基本达最高值. 因此选择 15—30min 温育时间已足以满足本实验的要求.

2.4 60℃ 加热时间对 TBA 反应的影响 一般的 TBA 反应多在 90—100℃ 反应 10—15min 即可. 由于本方法在塑料制品 96 孔板上进行, 为避免高温引起的塑料板变形, 我们改用 60℃ 温育进行 TBA 反应. 为此我们观察了 60℃ 加热时间对 TBA 反应的影响. 结果表明 (图 3),

随加热时间延长, TBA 反应相应增加, 至 30min 后基本达高峰. 故 30min 被选择为 TBA 反应的终点.

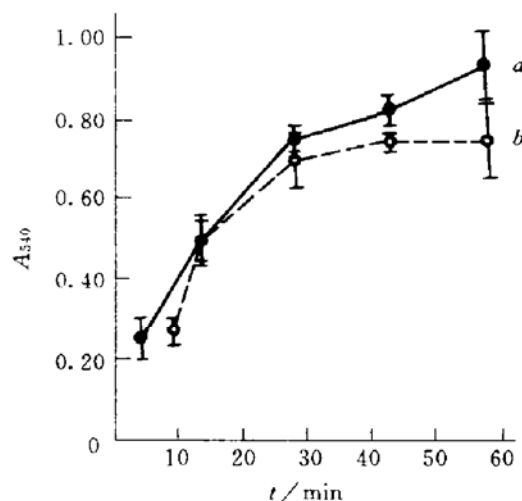


图 3 37℃ 温育和 60℃ 加热时间对 96 孔板中脂质过氧化形成的影响

a: 37℃ 温育, b: 60℃ 加热. FeSO_4 和半胱氨酸的浓度分别为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 1 mmol/L . $\bar{x} \pm s$, $n=8$.

2.5 TBA 和 TCA 浓度对测定系统的影响

在 TBA 反应时, 加入一定浓度的 TCA 使溶液酸化才能保证 TBA 反应的进行^[7], 但加入 TCA 会使微粒体蛋白质变性沉淀, 再加上 60℃ 的加热反应, 会使溶液浊度增加, 影响了在酶标仪上的直接比色测定. 而加入一定量的 SDS 会使反应澄清透明, 不出现蛋白质沉淀. 为此, 我们进行了不同浓度 TCA 和 SDS 对 TBA 反应影响的研究, 结果见表 1. 可见 TBA 反应程度与 TCA 浓度无关, 但无 TCA 时反应无法进行. 当 TCA 浓度低于或高于 10% 时, 96 孔板放置尤其在外界温度较低 ($<20^\circ\text{C}$) 的条件下, 反应液会出现混浊. TCA 的作用主要使反应呈酸性环境. SDS 浓度对 A_{540} 吸收也无多大影响, 但低于 5% 时溶液不澄清. 本测定法只有在选用 TCA 浓度为 10% 和 SDS 浓度为 5% 时进行实验才不会出现这种现象, 即使过夜放置也无混浊出现. 由此可见, 在 96 孔板上进行 LPO 测定时, 加入适量的 TCA 和 SDS 是很有必要的.

表 1 TCA 和 SDS 浓度对 96 孔板中 TBA 反应的影响

试剂	浓度/%					
	0	2.5	5	10	15	20
TCA (A_{540}) ¹⁾	0	0.64±0.05	0.64±0.04	0.64±0.05	0.68±0.07	0.64±0.05
SDS (A_{540}) ²⁾	0.52±0.03	0.57±0.03	0.60±0.02	0.57±0.03	0.59±0.05	

1) SDS 浓度固定在 5%; 2) TCA 浓度固定在 10%. 微粒体、 FeSO_4 和半胱氨酸浓度分别为 0.6g/L, 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 1mmol/L. $\bar{x} \pm s$, $n=8$.

2.6 96 孔板法与试管法测定抗 LPO 的比较

本测定方法不仅适用于测定 Fe^{2+} /半胱氨酸诱导生成 LPO, 也适用于测定其它系统诱导生成的 LPO. 图 4 和图 5 所示为 96 孔板法和试管法测定维生素 C 和 Fe^{2+} 诱导微粒体产生 LPO 的比较研究. 维生素 C 和 FeSO_4 均能明显诱导微粒体生成 LPO, 以其浓度为 500 $\mu\text{mol/L}$ 最为明显. 用试管法测定所得到的结果与用 96 孔板法相近, 这不仅说明了 96 孔板法的可靠性, 也表明其灵敏度并不低于试管法.

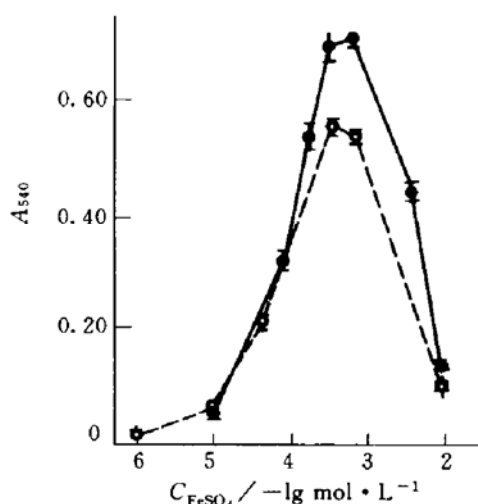


图 4 用 96 孔板法和试管法测定维生素 C 诱导脂质过氧化的比较

●—●: 96 孔板法; ○---○: 试管法.
微粒体浓度为 0.75g/L. $\bar{x} \pm s$, $n=4$.

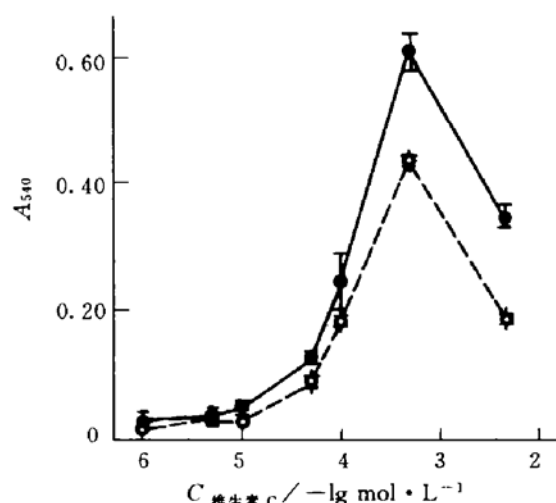


图 5 用 96 孔板法和试管法测定 FeSO_4 诱导脂质过氧化的比较

●—●: 96 孔板法; ○---○: 试管法.
微粒体浓度为 0.75g/L. $\bar{x} \pm s$, $n=4$.

表 2 利用 96 孔板法和试管法测定一些抗氧化剂抗氧化作用的比较

抗氧化剂	IC_{50}	
	96 孔板法	试管法
R8605/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	13.58	10.47
姜黄素/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	1.68	1.99
毛蕊花甙/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	23.49	35.80
930262/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	7.90	12.12
920262/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	26.45	25.69

注: 96 孔板法与试管法中微粒体分别为 0.6g/L 和 1.0g/L. FeSO_4 和半胱氨酸分别为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 1mmol/L.

另外, 我们还利用 96 孔板法和试管法同时测定了几种抗氧化剂抑制 Fe^{2+} /半胱氨酸诱导 LPO 生成的作用. 由表 2 可以看出, 二种方法测定出的 IC_{50} 并无太大差别. 在试管中以大

鼠肝微粒体为材料进行抗脂质过氧化的研究很多, 但在 96 孔板中测定大鼠肝微粒体脂质过氧化的方法文献中尚未见报道. 本法只一步反应即可完成抗脂质过氧化测定, 免去了离心沉

淀等繁琐费时的步骤,具有微量、快速、简便等优点,非常适用于大规模筛选抗氧化剂。另外,也适用于多种抗氧化剂活性的比较(同条件)研究。迄今,我们已应用 96 孔板法筛选了 400 多种化合物,并发现了一些具有抗氧化活性的化合物。

参 考 文 献

- 1 Jackson R L, Ku G, Thomas C E. *Med Res Rev*, 1993; **13** (2): 161
- 2 孙士勇. 国外医学肿瘤学分册, 1990; **17** (2): 65
- 3 Halliwell B, Gutteridge M C. *Human Toxicol*, 1988; **7**: 7
- 4 Slater T F. *Methods Enzymol*, 1984; **105**: 284
- 5 孙士勇, 韩 锐. 中国医学科学院学报, 1993; **15** (1): 58
- 6 Bradeford M M. *Anal Biochem*, 1976; **72** (1, 2): 248
- 7 Hageman J J, Bast A, Vermeulen N P E. *Chem Biol Interactions*, 1992; **82** (3): 243

One-Step Microassay for the Measurement of Anti-Lipid Peroxidation in 96-Wells Plate.
Sun Shiyong, Xu Bo, Li Qiuju, Li Runzhao
(*National Laboratories of Natural and Biomimetic Drug, Beijing Medical University,*

Beijing 100083, China).

Abstract Based on the mode of formation of microsomal lipid peroxidation induced by Fe^{2+} /cysteine and the principle of TBA reaction, a simple one-step microassay for the studying and screening of antioxidants in 96-wells plate was established. The comparative studies between the procedures in 96-wells plate and in test tube were also conducted. This microassay requires only small volume of diluted microsome and tested compounds, having the advantages of reliability, rapidness, simplicity and convenience. It is especially suitable for the pilot screening of antioxidants as well as the simultaneous study for many samples. This method can also be used to measure the lipid peroxidation induced by other systems.

Key words microsome, lipid peroxidation, antioxidant

尿中微量白蛋白的测定及应用

魏有仁 侯林浦 王 玫 湛玉良

(中日友好医院, 北京 100029)

朱立华

(北京医科大学第一医院, 北京 100034)

摘要 应用免疫浊度法在自动分析仪上测定了尿中微量白蛋白。对 140 名健康人一次尿样品测定后求出排出率的参考范围(可信区间 95%), 上限为 2.83g/mol 肌酐。此法结合尿中 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)测定应用于糖尿病和高血压患者以检测早期肾损伤。结果表明此法能灵敏地检出早期的尿中白蛋白漏出, 对肾损伤早期诊断比传统的尿蛋白试验更为可靠。尿中溶酶体酶(如 NAG)对肾小管损伤是更特异和灵敏的标志物。联合应用尿中微量白蛋白和酶的测定可进一步提高检出率, 获得更有价值的信息。同时用血清 IV 型胶原测定对糖尿病人作了观察。结果糖尿病人血清 IV 型胶原均值也明显高于健康人对照组。这一指征反映了肾单位基底膜胶原蛋白的合成动态。

关键词 微量白蛋白, N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶, IV 型胶原, 免疫比浊法, 肾损伤, 糖尿病, 高血压

尿中微量白蛋白(microalbumin, mAlb)和糖化血红蛋白测定的应用被称为 80 年代对糖尿病学的两大贡献^[1]。这一进展深化了对糖尿

病肾合并症发病规律的认识, 在早期诊断、早