

cosaminidase, NAG) determination were applied in the patients with diabetes mellitus and with hypertension for detecting the incipient nephrological changes. The results showed that this index was sensitive to detect the early elevation of albumine excretion in urine and has been proven to be a more valuable diagnostic tool in the early diagnosis of renal damage than the traditional urine protein test. As the urinary lysosome enzyme (e. g. NAG) is more specific and sensitive marker of renal tubular injury, it is suggested to combine the microalbumin and the enzyme assays to yield

more valuable informations. The serum type IV collagen determination with the enzyme immunoassay was performed simultaneously in the same group of patients with diabetes mellitus. It was found that the mean value of serum type IV collagen was higher than that of the control group. This index indicated the dynamic process of collagen peptide synthesis occurred in the basement membrane.

Key words microalbumin, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, type IV collagen, immuno-turbidimetry, renal damage, diabetes mellitus, hypertension

肌酸激酶同工酶及其亚型的快速测定方法

王 玻 杨振华

(北京医院检验科, 北京 100730)

摘要 用琼脂糖凝胶电泳法同时测定肌酸激酶 (CK) 同工酶及其亚型 (CK-MB 亚型、CK-MM 亚型), 其特点是以不连续缓冲液体系为基础, 在较低电压条件下, 30min 完成分离过程, 能同时报告 CK-MB 同工酶, CK-MB₁, CK-MB₂ 以及 CK-MM₁, CK-MM₂, CK-MM₃ 的百分含量. CK-MB 和 CK-MM 同工酶的亚型最低检出限分别为 2.2U/L, 3.2U/L. 该法具有快速、灵敏度高、重复性好、无需特殊仪器、操作简单等优点.

关键词 CK-MB 亚型, CK-MM 亚型, CK-MB 同工酶

人类肌酸激酶 (CK) 主要由三种同工酶 (CK-BB, CK-MB 和 CK-MM) 组成. 血清中一般只能检出 CK-MB 和 CK-MM 同工酶, 它们还能进一步分为 CK-MB₁, CK-MB₂ 以及 CK-MM₁, CK-MM₂, CK-MM₃ 亚型^[1,2]. 目前, 国内、外建立了多种方法分别测定 CK-MB 同工酶, CK-MB 亚型以及 CK-MM 亚型, 如电泳法^[3]、等电聚焦法^[4]、高效液相色谱法^[5]、色谱聚焦法^[6]和免疫印迹法^[7]等. 但这些方法有的分离时间长、灵敏度不高, 有的所需仪器、试剂昂贵. 最近 Helena 公司推出的 REP/EDC 电泳系统能够同时分离 CK-MB 和 CK-MM 亚型, 但其价格昂贵、需要特殊的仪器和试剂. 本

文介绍的方法选用了合适的不连续缓冲体系, 只需采用普通电泳装置, 即可在 30min 内完成分离过程, 最后采用荧光光密度计扫描, 不仅能够定量测定 CK-MB 同工酶, 而且还可同时完成 CK-MB, CK-MM 亚型的定量测定, 既方便、快速, 又具有较高的灵敏度.

1 材料与试剂

1.1 仪器

DYY-III 2 型稳压稳流电泳仪系北京六一仪器厂生产; 电泳槽系自行设计并由北京六一仪器厂生产; 循环水冷却采用 Pharmacia 公司

生产的 2117 多功能电泳系统的冷却装置; 荧光扫描使用 Beckman 公司生产的 Appraise 型荧光光密度计。

1.2 试剂

1.2.1 琼脂糖为中科院生物物理所试剂厂生产; CK 基质为 Beckman 公司 Dri-STAT 试剂盒, 使用时按浓缩四倍复溶基质。

1.2.2 电泳槽阴极缓冲液 (pH7.8) 的配制 称取吗啡啉丙磺酸 (MOPS) 10.46g 溶于 800ml 蒸馏水中, 用 1mol/L NaOH 调至 pH7.8, 最后加水至 1L。

1.2.3 电泳槽阳极缓冲液 (pH7.8) 的配制 称取巴比妥 5.52g, 巴比妥钠 6.18g, 加水 800ml, 煮沸溶解, 冷却后加水至 1L。

1.2.4 琼脂糖凝胶缓冲液 (pH6.6) 的配制 取 2-氨基-2-甲基 1,3 丙二醇 3.5g, 巴比妥钠 1.55g, 硼酸 0.23g, 咪唑 1.7g, EDTA 0.55g, 加水 800ml, 溶解后用 1mol/L 盐酸调至 pH6.6, 最后加水至 1L。

2 方 法

取琼脂糖 110mg, 加入琼脂糖凝胶缓冲液 11ml, 在沸水浴中充分溶解后将其均匀倒在 10cm×10cm 的玻璃板上, 待其冷却后放入 4℃ 冰箱中搁置 30min 后使用。

在琼脂糖凝胶板上一侧距边缘 2cm 处放一条 2cm×12cm 的滤纸, 数分钟后取走滤纸, 小心在滤纸位置处铺一加样用塑料薄膜 (上有 10 个 1cm×6cm 的长孔), 赶尽加样孔周围的气泡, 在每一加样孔中加 5—10μl 待测血清, 静置 5—10min 后取走加样薄膜。将琼脂糖凝胶板放在电泳槽中央的冷却板上 (板下的冷却室中为 4℃ 循环水), 加样孔靠近阴极侧。在阴、阳极槽中分别加入阴、阳极缓冲液各 50ml, 板与槽之间用 12 层滤纸搭桥。电泳条件: 稳流 40mA, 时间 30min。电泳结束后在凝胶板表面铺上 0.5ml CK 基质液, 45℃ 温育 10—15min 后用流水冲洗板面 30s, 将琼脂糖凝胶板快速烘干, 在紫外灯下可观察到 5 条荧光区带。用荧光光密度计对区带进行扫描即可分别得到 CK-

MB 同工酶及其亚型、CK-MM 亚型的百分比。

3 结 果

3.1 线性和样品不同稀释度对测定结果的影响

取一份总 CK 活性为 1024U/L, CK-MB 同工酶占总 CK 活性的 8.8% (约 90U/L) 的 AMI 标本, 用 56℃ 灭活 30min 的血清进行倍比稀释, 观察样品的不同稀释度对测定结果的影响。

表 1 CK-MB 同工酶及其亚型的线性范围

CK-MB /U·L ⁻¹	CK-MB 同工酶 /CK 总酶/%	CK-MB ₁ /%	CK-MB ₂ /%
90	8.8	58.2	41.8
45	9.0	59.8	40.2
22.5	9.1	56.5	43.5
11.25	8.6	55.4	44.7
5.6	8.3	60.1	39.9
2.8	8.9	57.5	42.5
$\bar{x} \pm s$	8.78 ± 0.29	57.92 ± 1.84	42.10 ± 1.87
CV	3.3	3.2	4.4

表 2 CK-MM 亚型的线性范围

总 CK 活性 /U·L ⁻¹	CK-MM ₁ /%	CK-MM ₂ /%	CK-MM ₃ /%
1024	31.1	43.8	25.1
512	32.3	44.6	23.2
256	31.1	45.4	23.5
128	32.7	41.1	26.2
64	30.8	43.6	25.6
32	29.6	40.8	29.6
$\bar{x} \pm s$	31.27 ± 1.11	43.21 ± 1.87	25.53 ± 2.31
CV	3.5	4.3	9.0

从表 1、2 可看出, CK-MB 同工酶及其亚型在 2.8—90U/L, CK-MM 亚型在总酶活性 32—1024U/L 的范围内, 样品的不同稀释度对测定结果影响很小。

3.2 精密度

进行2次电泳, 每次7个标本, 共测定14次.

用上述标本对该法的精密度进行测定, 共

表3 CK-MB 同工酶及其亚型的精密度测定

	CK-MB 同工酶/总 CK 活性		CK-MB ₁		CK-MB ₂	
	$\bar{x} \pm s$	CV	$\bar{x} \pm s$	CV	$\bar{x} \pm s$	CV
第一次 (n=7)	8.77±0.30	3.4	58.01±2.34	4.0	41.99±2.34	5.6
第二次 (n=7)	8.75±0.35	4.0	59.94±1.67	2.8	40.06±1.67	4.2
合计 (n=14)	8.76±0.31	3.5	59.98±2.19	3.7	41.02±2.19	5.3

表4 CK-MM 亚型精密度测定

	CK-MM ₁		CK-MM ₂		CK-MM ₃	
	$\bar{x} \pm s$	CV	$\bar{x} \pm s$	CV	$\bar{x} \pm s$	CV
第一次 (n=7)	30.94±1.66	5.4	43.84±1.84	4.2	25.2±2.96	11.7
第二次 (n=7)	30.17±1.40	4.6	44.10±1.98	4.5	25.73±1.88	7.3
合计 (n=14)	30.56±1.53	5.0	43.97±1.84	4.2	25.48±2.40	9.4

从表3、4可看出, CK-MB 同工酶及其亚型, CK-MM 亚型的测定均有较好的精密度.

3.3 灵敏度和正常值

用本法对40名正常体检者(男、女各20名)血清进行测定, 总CK活性为75±23U/L (最高为128U/L, 最低为32U/L), 见图1. 其中, 有30例(占75%)可检出CK-MB同工酶及其亚型, 它们的总CK活性均在56U/L以上, CK-MB同工酶最低可检出2.2U/L (CK-MB₁占1.3U/L, CK-MB₂占0.9U/L). CK-MB同工酶占总CK的比例为: 3.3±0.6%; CK-MB₁和CK-MB₂亚型在CK-MB同工酶中所占比例分别为: 64.9±3.68%和35.1±3.68%, MB₂/MB₁比例为0.55±0.09. Puleo^[8]和 Bhayana^[2]曾分别采用 Helena 公司的 REP/EDC 电泳系统分离 CK-MB 亚型, 其 CK-MB 同工酶最低检出限为 1.2U/L 和 4.0U/L, 本法与之相比, 可得到与之相当的最低检出限. 在

CK-MM 亚型测定中, 40 名体检者均可检出 CK-MM 亚型, CK-MM₁、CK-MM₂ 和 CK-MM₃ 在 CK-MM 同工酶中所占比例分别为: 63.2±5.5%、27.3±4.57%和 9.5±3.2%, MM₃/MM₁ 比值为 0.15±0.06. SiragEldin 等^[9-11]采用不同方法对CK-MM亚型进行测

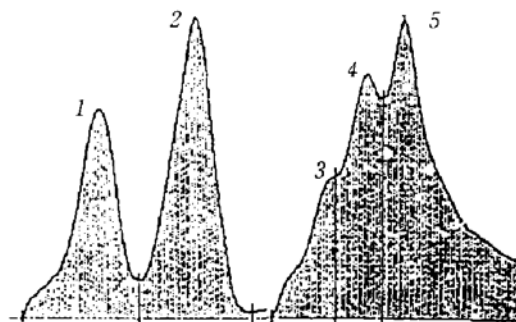


图1 正常体检者血清 CK-MB, CK-MM 亚型扫描图

扫描峰 1, 2, 3, 4, 5 分别为 CK-MB₂, CK-MB₁, CK-MM₃, CK-MM₂ 和 CK-MM₁.

定,其最低检出限分别为总CK活性的50、30、30、100U/L.本法对CK-MM亚型测定的最低检出限为总CK活性32U/L,和上述作者报导的方法相比,具有较高的灵敏度.

3.4 特异性实验

采用澳斯帮公司生产的CK试剂盒(其中 R_1 含咪唑缓冲液; R_2 含ADP, G6PDH, 己糖激酶, NADP, AMP等; R_3 为肌酸磷酸)进行实验.在凝胶板上点6个相同样本进行电泳,电泳结束后将胶从中央分成两部分(各有三个相同样本),一侧加 R_1 、 R_2 和 R_3 ,另一侧只加 R_1 和 R_2 ,温育后在紫外灯下进行观察:加 R_1 、 R_2 和 R_3 一侧CK-MB, CK-MM亚型位置处有清晰的区带出现,未加 R_3 一侧胶面无区带出现.因此,可以认为所测区带皆为CK.

3.5 凝胶板烘干是提高灵敏度的重要因素

取一份AMI血清标本(总CK1120U/L, CK-MB138U/L)进行倍比稀释,总CK为:1120、560、280、140、70、35U/L; CK-MB为:138、69、34、17、8.5、4.25U/L.按本法在同一凝胶板上进行电泳,电泳结束后加基质液温育并在紫外灯下进行观察,总CK和CK-MB活性分别在140U/L和17U/L以上时,可见CK-MM和CK-MB亚型区带;如在扫描前烘干凝胶板,则可在紫外灯下见到所有稀释比例的亚型区带.从此实验可以看出,琼脂糖凝胶板是否被烘干,将大大影响方法的灵敏度.

4 讨 论

本室已分别建立了CK-MB同工酶和CK-MM亚型的测定方法^[12,13],由于选用了NBT显色法,灵敏度不够理想.为解决此问题,本法在不连续缓冲液体系中同时选用三种不同的缓冲液.在琼脂糖凝胶缓冲液中选用了两种弱碱:咪唑和2-氨基-2-甲基1,3丙二醇,它们都能和氯离子构成离子对,而氯离子已证明是一种很好的前导离子.由于前导和后向导离子的界面作用,可将酶蛋白压缩不弥散,因而短时间电泳就能分离得到境界清楚的亚型区带.实验证明,尽管2-氨基-2-甲基1,3丙二醇在CK反

应最适pH7.0左右的缓冲能力较弱,但其对CK-MM亚型有良好的分离效果;而咪唑不仅能提高CK-MB亚型的分离效果,而且还可加快电泳速度,缩短电泳时间,并且由于其在pH7.0左右有较强的缓冲能力,使得电泳结束时凝胶板的pH接近CK反应的最适pH.本室过去在分离CK-MM亚型时选用巴比妥缓冲液做为电泳槽缓冲液,对亚型的分离虽有很好的作用,但如果采用荧光法进行测定则在凝胶烘干时,板面将出现严重的盐类结晶,从而影响区带的扫描.为此,曾改用MOPS缓冲液取代巴比妥缓冲液做为电泳槽缓冲液,但分离亚型效果欠佳.为了既利用巴比妥缓冲液对亚型分离效果好的优点,又克服其在烘干时出现盐类结晶的缺点,我们在阴极槽中加入MOPS缓冲液,在阳极槽中加入巴比妥缓冲液,这样在样品由阴极向阳极电泳结束时,只在阳极滤纸搭桥处出现少量结晶,不影响荧光扫描.

目前测定CK-MB同工酶及其亚型的方法很多,但都存在一个共同的缺点,即灵敏度不高,当CK活性处于正常值范围时,CK-MB同工酶及其亚型的测定就变得困难了.本法由于选用了合适的不连续缓冲液体系,并在荧光扫描前烘干琼脂糖凝胶,使得灵敏度大为提高,当CK-MB>2.2U/L时,CK-MB亚型的分离即可得到良好的结果.

总之,本法操作简单、快速、价格低廉并可同时测定CK-MB同工酶及其亚型、CK-MM亚型,在临床上有很好的实用价值.

参 考 文 献

- 1 Wu A H B. Clin Chem, 1989; **35**: 7
- 2 Vipin Bhayana, Steve Cohe, Fred Y Leung *et al.* Clin Chem, 1993; **39**: 488
- 3 Chapelle J P, Heusghem C. Clin Chem, 1980; **26**: 457
- 4 Hashimoto H, Grace A M, Billadelo J J *et al.* J Lab Med, 1984; **103**: 470
- 5 Schlabach T D, Alpert A J, Regnier F E. Clin Chem, 1978; **24**: 151
- 6 Nohara R, Sobel B E, Abendschein D R. Clin Chem, 1988; **34**: 235
- 7 Grace A M, Strauss A W, Sobel B E. Anal Biochem, 1985; **149**: 209

(下转第178页)

果表明,它依然能作用于超螺旋DNA,产生缺口状DNA,酶活性和未被修饰的相仿,暗示此色氨酸残基与此酶活性无关,但进一步酶切形成线状DNA的活性要低于天然的 camphorin,其中原因有待进一步的研究。

我们根据凝胶原位负染色法使用扫描技术测定了 camphorin 中色氨酸残基被修饰前后 SOD 活性的变化。结果表明,当色氨酸残基被修饰后, camphorin 的 SOD 活性损失约 40%,暗示色氨酸残基虽不是其 SOD 活力所必需,但对其活性有很大影响。

Camphorin 中唯一的色氨酸残基与其三种酶活性有上述如此不同的关系,暗示这三种酶活性中心可能在蛋白质分子中占据不同的部位。这是十分有意义的现象,进一步的详尽研究正在进行之中。

参 考 文 献

- 1 Stirpe F, Barbier L, Battelli M *et al.* Biotechnology, 1992; 10: 405
- 2 Ling J, Liu W Y, Wang T P. Biochem Biophys Acta,

1995; (in press)

- 3 刘望夷,凌俊. 生命的化学, 1994; 14 (5): 1
- 4 Ling J, Liu W Y, Wang T P. FEBS Lett, 1994; 345: 143
- 5 Spande T F, Witkop B. Methods in Enzymology, 1967; 11: 495
- 6 Katzin B J, Collins E J, Robertus J D. Proteins, 1991; 10: 251

Relationship Between the Three Enzymatic Activities of Camphorin and Its Single Tryptophan Residue. Qin Ling, Ling Jun, Ruan Kangcheng, Liu Wangyi (Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China).

Abstract Recent study indicated that camphorin, a new ribosome-inactivating protein (RIP), contained only one tryptophan residue. This single tryptophan residue had obviously different relation with the three enzymatic activities of camphorin.

Key words camphorin, tryptophan, fluorescence

(上接第 176 页)

- 8 Puleo P R, Guadagno P A, Roberts R *et al.* Clin Chem, 1989; 35: 1452
- 9 Sirag E E, Gerchen G, Harm K. J Clin Chem Clin Biochem, 1986; 24: 847
- 10 Morell R L, Carlson C J, Emilson B *et al.* Circulation, 1983; 67: 1283
- 11 Wu A H B, Gorhet T G. Clin Chem, 1985; 31: 1841
- 12 罗玲,杨振华. 中华医学检验杂志, 1990; 13 (1): 13
- 13 王波,王燕玲. 中华医学杂志, 1990; 70: 401

Rapid Assay of Creatine Kinase Isoenzymes and Its Isoforms by Using Agarose Gel Electrophoresis. Wang Bo, Yang Zhenhua (Laboratory of Medicine, Beijing Hospital, Beijing 100730, China).

Abstract An agarose gel electrophoretic method for separating creatine kinase (CK) isoenzymes and its isoforms (CK-MB and CK-

MM isoforms) simultaneously was established. It is based on a suitable discontinuous buffer system. By passing a larger current through the gel under a lower applied voltage, the separating time was shortened to 30 min. The measurements of CK-MB%, CK-MB₁%, CK-MB₂%, CK-MM₁%, CK-MM₂%, CK-MM₃% can be completed within one hour. The method is sufficiently sensitive to detect the CK-MB isoenzyme and CK-MM isoforms at the concentration of lowest detection limit 2.2U/L and 32U/L respectively. Thus, this system can be used to rapidly, sensitively and precisely quantify the isoenzymes and isoforms of CK.

Key words CK-MB isoforms, CK-MM isoforms, CK-MB isoenzyme