

一种测定血脂的简便方法——薄层层析法

费 正 庄庆祺 梅美珍

(上海医科大学药学院生物化学教研室)

提 要

用石油醚:乙醇(2:1)抽提样品中脂质,点样在硫酸铵硅胶板上,用石油醚:乙醚:冰醋酸(82:18:1 V/V)展开。在 180℃ 烘烤使硫酸铵分解产生硫酸,碳化脂质而显色。用薄层层析扫描仪扫描。测得游离胆固醇回收率为 99.5 ± 3.29 , 重复性试验 CV 为 1.54%。10 例正常人血清中游离胆固醇为 51.27 ± 9.94 , 胆固醇酯为 128.3 ± 17.85 , 总胆固醇为 179.7 ± 25.53 , 甘油三酯为 132 ± 51.93 。本法具有稳定、简便、安全、准确、灵敏及可同时测得多种血脂等优点。可用于科研及临床研究。

血中胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)与动脉粥样硬化的关系密切,已成为临床检验常规项目。目前用化学方法分别测定游离胆固醇(FC)和胆固醇酯(CE)需要经过许多繁复的分离步骤,测定 TG 同样非常花费时间,故建立简便、快速的测定血脂方法已成为当务之急。

早在 1965 年 Gunter Schlierf^[1] 等人就提出用薄层层析法(TLC 法)来分离血清中的脂质,他们是用浓硫酸作显色剂。操作时腐蚀性大,危害性强,显色也不均匀,时间稍长,斑点就会褪色。使得定量结果不稳定,影响实验结果的准确性。故 TLC 法一直得不到推广。我们经过多次的反复实验,终于发现采用硫酸铵硅胶板来做 TLC 分析,能克服上述的缺点。我们改进的方法具有显色较为均匀,稳定性好,操作简便,不需要使用腐蚀性很强的浓硫酸喷雾,且一次层析就能测出 FC, CE, TG 等血脂的含量,重复性和回收率均很好等优点。

材 料 与 方 法

1. 材料与仪器:

硅胶 60G (EMERCK)。胆固醇标准品(上海食品公司制药厂)。胆固醇油酸酯、甘油三软脂酸酯(Sigma 公司)。其它试剂为国产分析纯。

血样:华山医院提供正常人血脂样品。

连续薄层层析展开仪(上海玻璃仪器二厂)。岛津 CS-910 双波长薄层层析扫描仪(日本岛津公司)。

2. 样品的制备

取 0.2ml 血清,加入 0.8ml, pH 7.4, 0.02 mol/L 磷酸缓冲液。然后与 3ml 石油醚:乙醇(2:1 V/V) 3ml 混匀,强烈振荡 1—2 分钟,吸取上层石油醚 1ml (内含被抽提的脂质)。再重复抽提一次合并 2ml 石油醚,于 56℃ 水浴蒸干。加入乙醇 100 微升,供点样用。

3. TLC 板的制备

取硅胶 60G,加入适量硫酸铵和蒸馏水(硅胶:水为 1:2)。用铺板仪在 20 × 20 厘米的玻璃板上铺成 0.25—0.3 毫米厚度的硫酸铵硅胶板。稍干后于 110℃ 活化 1 小时,即可备用。

4. 点样、展开与显色

用平头 10 微升微量进样器点样,点以 10 微升的样品。旁边点 FC、CE、TG 标准品作为外标定量用。用石油醚:乙醚:冰醋酸(82:18:1 V/V/V) 作为展开剂。连续薄层层析展开仪展开约 15 分钟即可。取出 TLC 板,待展开剂挥发后,于 180℃ 烘 10 分钟左右,以各斑点均显出无污染或很少污染为准。

5. 定量扫描

用岛津 CS-910 双波长薄层层析扫描仪, 单波长、锯齿波, 反射法在 580nm 处扫描, $SX = 3$, 扫描速度为 20mm/min。通过扫描测得各样品的面积, 采用外标法与标准品比较, 换算成各血脂的浓度。单位: mg/dl 血清。

结 果

1. 扫描波长的选择 用双波长薄层层析扫

表 1 FC、CE、TG 标准曲线数据

面积 \ 浓度(μg)	2	4	6	8	10
FC 面积	3399	7077	11193	15276	18555
CE 面积	3059	5228	7962	9742	11358
TG 面积	871	1308	1735	2103	2365

注: FC 的回归方程 $y = 1925.5x - 453.3$ $r = 0.9993$ 。
CE 的回归方程 $y = 1136.4 + 1055x$ $r = 0.9952$ 。
TG 的回归方程 $y = 541.5 + 85.98x$ $r = 0.9955$ 。

表 3 10 例正常人血清中 FC 和 CE 的测定

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
FC mg/dl	53.7	55	57	63	64	44	34	50	38	54
CE mg/dl	139	150	140	124	127	133	86	129	115	140

注: FC 平均值为 51.27 ± 9.94 ($\bar{x} \pm S.D.$)。CE 平均值为 128.3 ± 17.85 ($\bar{x} \pm S.D.$)。

表 4 10 例正常人血清 TC 及 TG 的 TLC 法与邻苯二甲醛法、乙酰丙酮法比较 (单位 mg/dl 血清)

例数	TC		TG	
	TLC 法	邻苯二甲醛法	TLC 法	乙酰丙酮法
1	193	195	109	105
2	205	227	170	170
3	200	181	69	60
4	180	164	135	167
5	190	157	118	126
6	177	198	225	190
7	120	159	62	71
8	179	178	145	100
9	153	145	98	76
10	194	212	198	176

注 (1) TC 为 FC 和 CE 之和。

注 (2) TLC 测 TC 为 179.7 ± 25.53 ($\bar{x} \pm S.D.$)；邻苯二甲醛法为 181.6 ± 26.27 ($\bar{x} \pm S.D.$)。TLC 法 TG 为 132 ± 51.93 ($\bar{x} \pm S.D.$)；乙酰丙酮法为 124.2 ± 48.61 ($\bar{x} \pm S.D.$)。经 t 检验, 它们差别均无显著意义 ($P > 0.05$)。

描仪, 自动寻得血脂的最大吸收波长为 580nm。

2. 标准曲线的制备 取不同浓度 (2, 4, 6, 8, 10 μg) FC、CE、TG 标准品制备标准曲线, 扫描结果见表 1。

3. 回收率及稳定性试验

血样中加 100 μg 标准胆固醇, 测得胆固醇的回收率为 99.5 ± 3.29 ($\bar{x} \pm S.D.$)。表明我们的抽提溶剂, 可把血中脂质抽提完全。结果见表 2。用硫酸铵硅胶板显色, 稳定性好, 一天后仅下降 4.4% ($n = 6$)。

表 2 5 例样品的回收率试验

	空白血样	1	2	3	4	5
FC(μg)	74.76	168.9	174.2	178.5	177.04	174.76
回收率(%)	/	94.14	99.44	102.06	102.3	100

注: FC 的回收率为 99.5 ± 3.29 ($\bar{x} \pm S.D.$)。

4. 重复性试验

取一血样, 做五次重复性试验, 结果分别为

239.12, 232.72, 230.48, 231.04, 231.04。平均值为 232.88 ± 3.588 ($\bar{x} \pm S.D.$)。

$$CV = 1.54\%$$

说明重复性很好, 实验结果是可信的。

5. 血清 FC、CE、TC 以及 TG 的测定

用硫酸铵硅胶板血脂层析情况见图 1 (图版 III)。测定 10 例正常人血清的 FC 为 51.27 ± 9.94 ($\bar{x} \pm S.D.$)。CE 为 128.3 ± 17.85 ($\bar{x} \pm S.D.$)。TC 为 179.7 ± 25.53 ($\bar{x} \pm S.D.$)。TG 为 132 ± 51.93 ($\bar{x} \pm S.D.$)。本法测得的 TC 与 TG 分别和邻苯二甲醛法测定总胆固醇以及乙酰丙酮法测定甘油三酯结果相比较, 经 t 检验, 两者差别无显著意义 (P 均 > 0.05)。结果见表 3 及表 4。

^{35}S 标记 DNA 探针检测真核单拷贝基因*

陈俊杰 文 一 游乐然 王若菡 张秋萍

(华西医科大学生化教研室, 成都)

提 要

本室采用国产 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ dATP 制备 DNA 探针, 用于检测真核单拷贝基因并初步获得了满意结果。本文还叙述了 ^{35}S 取代 ^{32}P 标记 DNA 探针和 Southern 吸印杂交时, 适宜的反应条件, 优点及其意义。

^{32}P 标记 DNA 探针已在分子生物学领域中得到广泛应用。但是, 由于 ^{32}P 半衰期短 (14.3 天), 加之有的地区交通运输条件限制, 使得国内不少单位开展有关研究诸多不便, 采用 ^{35}S 可在一定程度上解决这一问题。有文献报道 ^{35}S 取代 ^{32}P 标记 DNA 进行菌落杂交、斑点杂交、质粒 DNA 的 Southern 吸印杂交以及

DNA 序列分析^[1-2]。但 ^{35}S 标记 DNA 探针用于检测真核 DNA 的 Southern 吸印杂交尚未见报告。

本文介绍我室采用国产 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ dATP 制备 ^{35}S 标记的 DNA 探针, 用于真核 DNA 的 Southern 吸印杂交并获得成功。

* 国家自然科学基金资助项目

讨 论

血清各脂质的含量测定, 对于进一步研讨冠心病以及动脉粥样硬化的发病机理及临床应用都是十分重要的。故血脂含量的测定历来是人们极为关心和致力于研究的课题。现在常用于血脂测定的方法很多, 如各种化学显色法、酶法^[2], 气相色谱法^[3]等都有缺点, 如腐蚀性危害性大, 检测灵敏度差, 准确性不高, 每批酶活力不一致, 操作过程繁复等。关于这一点李健斋曾有关专门的论述^[2]。我们采用硫酸铵硅胶板 TLC 法测定血脂, 一次仅需 0.2ml 血清, 用 CS-910 双波长薄层层析扫描仪外标法定量, 就可准确地同时测得血清中的 FC、CE、TG 以及 TC 的含量, 大大简化了操作步骤, 与其它方法相比, 本法灵敏度高, 专一性强, 用直接参考物作为各血脂成份定量的依据、快速、在同一块板上就可分析 10 个样品, 操作简便。由于我

们是用硫酸铵与硅胶混合在一起直接铺板, 故显色均匀, 稳定性好, 无腐蚀危害性, 数天内斑点基本不褪色。利用 TLC 法测定血清中的 TC 与邻苯二甲醛法比较以及利用 TLC 法测定 TG 与乙酰丙酮法比较, 经 t 检验差别均无显著意义 (P 均 > 0.05)。

TLC 法是一种较经典的方法, 随着硫酸铵硅胶板的使用, 使得许多以前无法直接测定的化合物 (如甾体化合物等) 变成有可能测定。同时也可减少繁琐的操作步骤。本法还可推广到测定其它各种组织中的脂质。

参 考 文 献

- [1] Schlierf, G.: *J. Lipid Res.* 1965, **6**, 317.
- [2] 赵善政等: 《中华医学会上海分会医学检验学会 1982 年度论文选编》, p. 100—108.
- [3] 周国英等: 《生物化学与生物物理学报》1982, **14**, 425
- [4] 李健斋: 《中华医学检验杂志》1982, **5**(1), 36.

[本文于 1987 年 7 月 25 日收到]

陈蔚梅等:《 ^{35}S - α -dATP 用于缺口转移标记探针 DNA 及蓖麻蚕核型多角体病毒 (ArNPV) 多角体蛋白基因的初步定位》一文的附图 2 图版 III

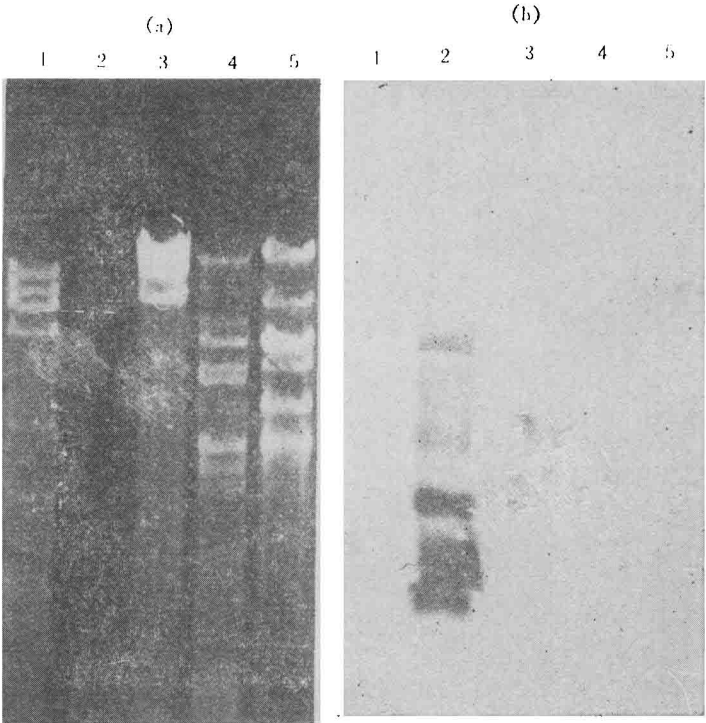


图 2 ArNPV DNA 的限制性内切酶酶切图谱及其与 ^{35}S -pMAVI DNA 的杂交图谱

(a) 酶切图谱

(b) 杂交图谱

1. ArNPV DNA+XhoI; 2. pMAVI DNA; 3. ArNPV DNA+BgIII; 4. ArNPV DNA+(BgIII+EcoRI); 5. ArNPV DNA+EcoRI

费正等:《一种测定血脂的简便方法——薄层层析法》一文的附图

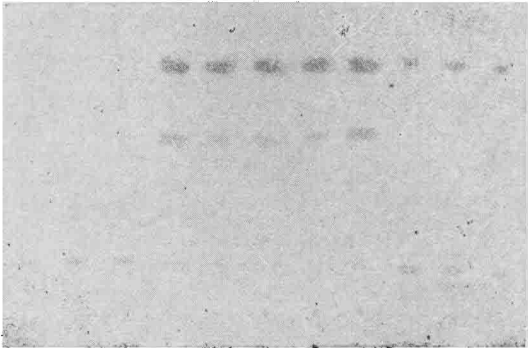


图 1 硫酸铵硅胶板层析血脂图谱

(1) 磷脂 (PL); (2) 游离胆固醇 (FC); (3) 甘油三酯 (TG); (4) 胆固醇酯 (CE)

陈俊杰等:《 ^{35}S 标记 DNA 探针检测真核单拷贝基因》一文的附图



图 1 人血 DNA 酶解片段与 ^{35}S 标记人载脂蛋白 AI 基因探针杂交的放射自显影图谱

1. Pst I、消化; 2. Hind III 消化; 3. BamHI 消化; 4. EcoRI 消化