

经验交流

聚焦色谱法测定肌型肌酸激酶亚型

孔庆银 杨振华 杨树德 唐志毅

(北京医院检验科, 北京 100730)

摘要 报道了测定 CK-MM 亚型的聚焦色谱法。此法简单, 快速, 结果可靠, 线性范围宽, 最低检测限 (8U/L) 较正常参考值低, 比国外报道的类似方法高 6 倍以上, 分离度亦有改进。测定了 20 例健康人血清亚型分布, 与文献报道结果相近。该法自动化程度高, 已在急性心梗的诊断中实际应用。

关键词 聚焦色谱, FPLC, 肌酸激酶同工酶, 肌型肌酸激酶亚型, 急性心肌梗塞

胞质肌酸激酶(CK)是由 M 和 B 亚基组成的二聚体, 有三种同工酶: MM, BB 和 MB。这些同工酶具有一定的组织特异性, MM 存在于横纹肌, BB 主要位于脑和平滑肌, MB 除了心肌在其它组织中存在极少^[1]。

肌型肌酸激酶(CK-MM)同工酶在人血清中主要存在着三种亚型, 即 MM₃, MM₂ 和 MM₁。它们的等电点有差异, 分别是 MM₃: 6.86, MM₂: 6.49, MM₁: 6.24^[2]。测定 CK-MM 亚型对早期诊断急性心肌梗塞(AMI), 推断 AMI 发病时间, 判断溶栓疗法后是否重建冠脉循环, 出现再灌注很有价值。常见的测定方法有电泳、等电聚焦(IEF)、高效液相色谱(HPLC)等。电泳是最常用的方法, 但灵敏度稍差, 易使蛋白变性; IEF 的分辨率很高^[3], 但由于时间长, 电压高, 酶易失活; HPLC 分析速度快, 但因柱子寿命短, 成本高限制了它的应用^[4]。

我们使用快速蛋白液相色谱(FPLC)仪器、MonoP 柱和柱后反应系统建立了 CK-MM 亚型的聚焦色谱法, 此法具有快速, 进样后 40min 打印结果, 灵敏度高, 酶蛋白不变性, 柱子可重复多次使用等优点, 特别适用于急诊标本。

1 材料与方法

1.1 仪器

Pharmacia 公司 FPLC 仪器和 Mono P (HR5/20) 柱。Waters 公司三通装置, 温箱, 荧光检测器(420 型)和 0.22 μ m 滤膜。

1.2 试剂

Pharmacia 公司多缓冲液(polybuffer) 96。三羟甲基氨基甲烷(Tris, A. R., 国产)。所用去离子水通过 Milli-Q Plus 纯水器纯化。

1.3 试剂配制

缓冲液 A: 75mmol/L Tris-醋酸缓冲液, pH8.9。

缓冲液 B: Polybuffer 96-醋酸缓冲液, pH6.5, Polybuffer 96 以 1:10 稀释。

CK 基质: 长征公司 CK-NAC, 每一瓶加 27ml 去离子水溶解, 临用前配制。

1.4 标本处理

血样在 2000r/min 离心 10min, 取血清, 加 EDTA 以防止羧肽酶的水解作用(终浓度为 10mmol/L), 经 0.22 μ m 滤膜过滤。

1.5 方法

总 CK 活性在日立 7150 自动生化仪上 30℃

动态法测定, 试剂盒由长征公司提供。

CK-MM 亚型测定方法: 用 A 液以 0.45ml/min 流速平衡 MonoP 柱, 到流出液 pH 值与 A 液一致; 改用 B 液洗脱, 当加入 3ml 时, 进样 0.05ml 血清。当加入 7ml 时, CK 基质以 0.14ml/min 的速度加入, 对应压力计读数为 176kPa; 二者混合后, 37℃保温, 通过 3.0m 长的塑料螺旋管, 发生反应, 生成 NADPH, 荧光检测器检测, 激发光 338nm, 发射光 455nm; B 液体积为 21ml 时结束反应。

2 结果与讨论

2.1 流速的选择

在 0.5, 0.45, 0.40ml/min 三个流速下测定同一个样本的亚型含量, 保持其它条件不变, 分离效果相差不大, 选取中间流速 0.45ml/min。

2.2 线性范围

取一份总 CK 活性为 2085U/L 的标本, 用无活性血清对倍稀释为 2085, 1043, 522, 261, 131, 66, 33, 17U/L 8 个水平血样, 分别测定, 观察不同浓度标本对测定结果的影响, 结果见表 1。

表 1 血清 CK-MM 亚型测定的线性范围

CK/ (U/L)	MM ₃ /%	MM ₂ /%	MM ₁ /%
2085	13.4	34.5	52.1
1043	11.7	33.8	54.5
522	10.8	34.4	54.8
261	10.3	35.5	54.2
131	9.9	34.1	55.9
66	10.3	34.7	55.0
33	12.2	32.5	55.3
17	10.1	35.3	54.6
$\bar{X}$	11.1	34.4	54.5
s	1.2	0.9	1.1
CV (%)	11.0	2.7	2.1

从表 1 可以看出, 在 17—2085U/L 的范围内, CK-MM 亚型的测定均具有良好的线性。

2.3 精密度

一份总 CK 活性为 520U/L 的标本, 共测

定 10 次, MM₁, MM₂ 和 MM₃ 的 $\bar{x} \pm s$ (%) 分别是 54.9 ± 1.1, 35.0 ± 0.9, 10.1 ± 0.90, 测定结果的变异系数分别为 2.0, 2.6 和 8.9, 均小于 10%, 表明该方法测定精密度较好。

2.4 检测限

将无 CK 活性血清和一已知活性血清分别测定, 以信号噪音比 $S/N=2$ 计算最小检测限。

Waters 420 荧光检测器为 8U/L。

SPD-6AV UV-VIS (岛津) 检测器为 70U/L。

2.5 参考值范围

用本法对 20 名健康人血清进行测定, 男女各 10 名。对男女两组之间的所测值进行统计分析发现, 总 CK 活性有显著的性别差异 ($P < 0.05$), 而各亚型含量差别不显著 ($P > 0.05$)。MM₁, MM₂ 和 MM₃ 的 $\bar{x} \pm s$ (%) 分别是 57.2 ± 6.1, 32.0 ± 3.1 和 10.8 ± 3.8, 与国外报道的结果相近。

临床应用表明, 健康人和 AMI 患者血清 CK-MM 亚型色谱图有显著不同。一例健康人 CK : 56U/L, MM₁ : 50.0%, MM₂ : 36.1%, MM₃ : 13.9%, 以 MM₁ 为主; 一例心梗患者发病后 5h, CK : 237U/L, MM₁ : 7.1%, MM₂ : 14.1%, MM₃ : 78.8%; 发病后 9h, CK : 1080U/L, MM₁ : 10.1%, MM₂ : 12.4%, MM₃ : 77.5%, 均以 MM₃ 为主。

2.6 讨论

实验中发现, 在 CK-MM₃ 出峰前, 有一个非常强的峰, 以灭活血清进样, 发现该峰仍存在, 而与 MM₁, MM₂, MM₃ 相应保留体积则无响应; 血清进样后, 按每管 0.5ml 收集流出液, 在日立 7150 生化仪上测定, 与第一个峰相应流出液未检测到 CK 酶活性, 后面 3 个峰流出液则有 CK 活性, 证明前面的强峰和 CK 无关, 可能是白蛋白的非特异作用。

在 MM₁ 出峰后发现一个小峰, 与 Wevers^[2]用 IEF 分离出的 MM_x 估计是同一个新的亚型, 有的称之为 MM₀, 因为它的位置在电泳时更靠近阳极。

本文与文献^[4]的比较见表 2。

表 2 方法改进比较

	本 文	文 献 [4]
检测器类型	荧光检测器	紫外检测器
检测限	8 U/L	50 U/L
标本用量	25—100 μ l	500 μ l
线性范围	17—2085 U/L	未做
精密度 CV 值	2.0—8.9%	未做
分离效果对比	好	差
差别原因	高压气体压入基 质, 平缓无脉冲	蠕动泵易产生 脉冲

参 考 文 献

- 1 Abendschein D R. Clin Biochem, 1990; **23**: 399
- 2 Wevers R A, Wolters R J, Soons J B J. Clin Chim Acta, 1977; **78**: 271
- 3 Guslits B G, Jacobs H K. Clin Chim Acta, 1983; **130**: 55
- 4 Abendschein D R, Fontanet H L, Nohara R. Clin Chem, 1990; **36**: 723

科技消息

国家级新药“蚓激酶”和“蚓激酶胶囊”研制成功

摘 要 治疗血栓病的特效药“蚓激酶”及“蚓激酶胶囊”由中国科学院生物物理研究所研制成功, 该药适用于血栓形成和栓塞病的预防和治疗, 尤其对缺血性脑血管病瘫痪及语言障碍的康复效果显著, 是一种有前途、安全的纤溶药物。

关键词 蚓激酶, 蚓激酶胶囊, 血栓

治疗血栓病的特效药“蚓激酶”及“蚓激酶胶囊”由中国科学院生物物理研究所研制成功, 卫生部于 1992 年 4 月正式颁发了新药证书和试生产文号。该药质量标准同时被确认为部颁标准试行。该项基础研究工作, 已于 1990 年被国家科委确定为国家级重大科技成果予以登记和公布, 并列入了国家科委“火炬计划”项目和 1994 年“国家科技成果重点推广计划”项目, 荣获 1993 年中国科学院科学技术进步二等奖。

心、脑血管疾病是危害人类生命和健康的主要疾病, 血栓的形成则是致病的主要原因之一。据世界卫生组织 (WHO) 统计, 全世界每年大约有 1200 万人死于心脏病和脑卒中。我国每年死于心、脑血管病者超过全部死亡人数的 50%, 在大城市发病率尤高, 是我国死亡率最高的疾病之一。“蚓激酶”及“蚓激酶胶囊”的诞生, 是广大心、脑血管病患者的福音。

“蚓激酶”的研制得益于祖国医学的启示, 蚯蚓作为中药早在《本草纲目》中便有记载, 地龙 (蚯蚓) 归肝、脾、膀胱经, 清热定惊、通络、平喘、利尿活血, 主治肢体麻木、半身不遂、关节麻痛、高血压等病。中国科学院生物物理研究所的吴聘、樊蓉等科研人员看准了这一项目的应用前景, 经过调研后于 1984 年提出了“蚯蚓纤维蛋白溶酶原激活因子 (PAF) 及其溶栓效

应研究”课题, 得到两任所长梁栋材教授和王书荣教授的支持。在研究过程中, 研究人员作了大量的药理、药理学实验, 进行了药物理化特性测试并与同类药物进行了全面比较, 在溶栓速度和溶栓效果方面都明显优于其它药物。在社会各界的关心和帮助下, 全体课题组同志经过八年的艰苦努力, 终于完成了基础研究、应用研究和全部临床试验。在临床试验阶段, 是与江西江中制药厂协作完成的。

“蚓激酶”是以人工养殖的特种蚯蚓为原料, 采用现代生物化学技术, 分离纯化制得的蛋白水解酶, 它不仅可直接降解血中的纤维蛋白, 还能激活血纤维蛋白原中的纤溶酶原, 间接降解纤维蛋白, 改善血小板聚集功能, 适用于血栓和栓塞病的预防和治疗。通过动物实验后, 在卫生部指定临床试验基地 (北京宣武医院等) 进行的第一、二期临床试用证明: “口服蚓激酶胶囊对 453 例缺血性脑血管病的治疗, 总有效率达到 93.7%, 显效率达 73.60%。此药对脑血管病瘫痪肢体及语言障碍康复效果显著, 同时对肝肾功能、血糖及血脂均无影响”, 是一种有前途、安全的纤溶药物。

[中国科学院生物物理研究所 (北京 100101) 侯全民]

leaf structure of tRNA^{le} was showed according to the Holley mode as well as the amount of free energy in the each of stems versus loops.

Key words bovine liver tRNA, nucleotide sequence, cloverleaf structure

The Change of Ca²⁺ in SR and Mit of Isolated Ischemia-Reperfusion Rat Heart. Che Chengri, Li Xiangshan, Jin Jihuan, Wang Mingyong, Li Suxiang, Li Dan. (*Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Affiliated Hospital, Yian Bian Medical College, Yanji 133000*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (1): 73

The strength of radiation of ⁴⁵Ca²⁺ in sarcoplasmic reticulum vesicle (SR) and mitochondria (Mit) was measured by liquid scintillation counting method. Comparing the effects of ATP - MgCl₂, SOD and verapamil on the ⁴⁵Ca²⁺ concentration in SR and Mit which prepared from isolated ischemia reperfused rat hearts. The result showed that the ⁴⁵Ca²⁺ cpm of SR of the three groups were higher than that of control, while the ⁴⁵Ca²⁺ cpm of Mit of the three groups were lower than that of control. These results suggested that the three kinds of reagent could protect reperfusion injury of heart cell through enhance ⁴⁵Ca²⁺ storage in SR and inhibiting the ⁴⁵Ca²⁺ accumulation in Mit.

Key words ischemia-reperfusion, sarcoplasmic reticulum vesicle, mitochondria, calcium

Novel Properties of Bilayer Membrane Formed by Diazafluorenone Schiff Base Amphiphiles. Tai Zihou, Qian Xiangping, Zou Juan, Zhang Gencheng. (*State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210008*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (1): 76

A new kind of diazafluorenone Schiff base amphiphiles were synthesized. Bilayer membrane formed with these compounds possess good stability and oscillation properties. When 0.1 mol/L AgNO₃ presented in bathing solution and an electrical field was applied on this system, a maximum value of the current, 4.0 μA, was obtained. A possible application in the development is indicated.

Key words diazafluorenone, Schiff base, amphiphile, bimolecular membrane

The Purification and Characterization of Bacteriophage T7 Lysozyme of Recombinant Strains. Hua Ling, Li Dianjun, Xu Yongrui, Niu Zeling, Cui Daoshan. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (1): 79

The culture solution of recombinant strains of lysozyme was treated by ultrasonic wave, purified by DE52 chromatography and CM52 chromatography, a polyacrylamide gel electrophoresis pure T7 lysozyme of Mr 17000 was obtained, the optimal react pH is 8.0, 21% of total enzyme activity lost at 37°C in 5 min.

Key words T7 lysozyme, purification, characterization

Measurement of Creatine Kinase MM Isoforms by Chromatofocusing. Kong Qingyin, Yang Zhenhua, Yang Shude, Tang Zhiyi. (*Dept. of Laboratory Medicine, Beijing Hospital, Beijing 100730*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (1): 83

A rapid and sensitive method of isoforms of CK (EC 2.7.3.2) -MM in human serum by chromatofocusing was reported. The assay system involved Mono P (HR5/20) column, fast protein liquid chromatography (FPLC)

system and post column reactor. The result of CK-MM isoforms was obtained within 40 min after serum application to equilibrated column. The lower limit of sensitivity for CK activity is 8 U/L and the linear capacity is 17 — 2085 U/L, with CV values of 2.1%, 2.7% and 11.0% for MM₁, MM₂ and MM₃ respectively.

Key words chromatofocusing, CK-MM isoforms, acute myocardial infarction (AMI), FPLC, creatine kinase isoenzyme

A New Medicine of State Level "Lumbrokinase" and "Lumbrokinase Capsule" Has Been Developed and Prepared Success.

Hou Quanmin . (*Institute of Biophysics , Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog.*

Biochem. Biophys. (China), 1994; **21** (1): 85

A highly effective medicine for the cure of thrombotic diseases, lumbrokinase and lumbrokinase capsule has been successfully developed and prepared by scientists in the Institute of Biophysics, Academia Sinica. The medicine is applicable in prevention and treatment of thrombosis and embolic diseases and is especially effective for treatment of ischemic cerebrovascular disorder induced paralysis and language trouble. Notable improvement and recovery were observed among the hospitalized patients on clinical trial. It is a promising and specific fibrinolytic medicine safe to use.

Key words lumbrokinase, lumbrokinase capsule, thrombosis

(上接第 87 页)

参 考 文 献

- 1 Crick F H C. *J Mol Biol*, 1968; **38**: 365
- 2 Woese C R. *The genetic code*. New York: Harper & Row, 1967; 2
- 3 Saxinger C, Ponnamperna C. *Origins of Life*, 1974; **5**: 189
- 4 Crothers D M, Seno T, Soll D G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972; **69**: 3063
- 5 Shimizu M. *J Mol Evol*, 1982; **18**: 297
- 6 Karin M F, Stephen S, Nassim U *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 209
- 7 Senaratne N, Hobbish M K, Ponnamperna C. Holand, Frederick R Erich, 1990: 148
- 8 Cech T R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **83**: 4360
- 9 Orgel L E. *J Mol Biol*, 1968; **38**: 381
- 10 Noller H F. *Annu Rev Biochem*, 1984; **53**: 119
- 11 Noller H F, Hoffarth V, Zimniak L. *Science*, 1992; **256**: 1416
- 12 Piccirilli J A, McConnell T S, Zaug A J *et al.* *Science*, 1992; **256**: 1420
- 13 Michael Y. *Science*, 1992; **256**: 1420
- 14 Weiner A M, Maizels N. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; **84**: 7383
- 15 Jeffries A C, Symons R H. *Nucl Aci Res*, 1989; **17**: 1371
- 16 Ogilvie K K, Usman N, Nicoghoshian K *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **85**: 5764
- 17 Usher D A, Profy A T, Walstrum S A *et al.* *Origins of Life*, 1984; **14**: 642
- 18 Lacey G C, Hall L M, Mullins D A. *Origins of Life*, 1985; **16**: 89
- 19 Dail W C, Lacey G C. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980; **96**: 491
- 20 Francklyn C, Shimmel P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 8655