

血清乳酸脱氢酶同功酶的分离及测定

重庆医学院生化教研室

乳酸脱氢酶(LDH)是葡萄糖酵解过程中相当关键的酶,其主要作用在于催化丙酮酸与乳酸相互转换的化学反应。实验证明,LDH实际上包含着几种具有同样催化效能的蛋白质,但它们的分子组成、理化性质与免疫学特性却有明显差异,这些蛋白质统称为LDH同功酶。用电泳方法从血液中可分离出的LDH同功酶有:泳动速度最快的LDH-1,其次为LDH-2,LDH-3,LDH-4,和泳动速度最慢的LDH-5。

近年研究表明,LDH同功酶在各组织中的谱型是不同的,具有相对的组织特异性。自1959年Wieme, R. T.等运用电泳方法分离人血清中LDH同功酶获得成功以来,临床上常采用血清乳酸脱氢酶同功酶谱型分析来协助诊断疾病和判断预后,特别是对心肌梗塞^[1]、肿瘤^[2,3]与肝脏疾病^[4,5]等具有重要的临床意义。

血清LDH同功酶分离的常用方法有:淀粉板电泳;淀粉凝胶电泳;纸电泳;琼脂电泳;琼脂糖凝胶电泳;DEAE纤维素柱层析;丙烯酰胺凝胶电泳及醋酸纤维薄膜电泳等^[6,7]。其中,醋酸纤维薄膜电泳分离法的优点是:设备简单、操作方便,标本用量少,电泳时间短,各区带分离清楚而稳定,便于保存。

LDH同功酶的定量测定,根据不同的分离方法,可采用:光密度法;荧光比色法;分光光度法及比色法等。醋酸纤维薄膜电泳分离血清LDH同功酶后的定量测定,一般均采用光密度法^[6,7,8]。应用二甲亚砆正丙醇液洗脱薄膜色泽,再用分光光度计测定各区带含量的方法,国内外尚未见报道;为适应我国基层单位的具体情况,我们对本法进行了初步探讨。

材料与方法

1. 醋酸纤维薄膜电泳分离血清LDH同功酶

(1) 电泳装置与一般电泳相同。

(2) 采用pH 8.6,离子强度0.05的巴比妥钠-巴比妥酸缓冲液。电泳槽中缓冲液温度维持在15—24℃之间。

(3) 电泳时电压为100伏,电流为1.2毫安/条。

(4) 采用国产醋酸纤维薄膜,每条为2.5厘米×7.0厘米。

(5) 血清用量每条5微升,加样于距阴极端1.5厘米处。

2. LDH同功酶的显色

(1) 试剂 新配下列试剂:

1毫克/毫升吩噻二甲酯硫酸盐(PMS)水溶液;

10毫克辅酶I溶于1毫升0.1M, pH 7.5的磷酸缓冲液;

12毫克氯化2-(4-碘苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-苯基四唑(INT)溶于3毫升磷酸缓冲液;0.5M乳酸钠1毫升。

应用时,将上述溶液充分混和;但PMS水溶液仅需0.3毫升,且应待其他三种溶液混和后再加入。

(2) 步骤 取与电泳条相应大小的醋酸纤维薄膜,先浸于0.1M, pH 7.5的磷酸缓冲液中,使之充分湿润;取出夹在双层滤纸间吸干后再浸于显色试剂中。

电泳结束后,将电泳薄膜条置于载玻片上。而后取浸有显色试剂的薄膜条,小心覆盖在电泳薄膜条上。覆盖时要绝对避免有气泡,否则在有气泡的局部可产生白色斑点;覆盖时也要防止拖移,否则常可形成区带间界线模糊,或在区带的边缘呈刺样条纹。

将覆盖好的醋酸纤维薄膜条连同载玻片一起置于有盖的玻璃器皿内,在37℃水浴中保温40分钟。

待保温结束,将薄膜条在2%醋酸中漂洗三次,每次1分钟;最后用滤纸把它吸干。

3. LDH同功酶的定量测定

(1) 洗脱液 正丙醇9份与二甲亚砆1份混匀即可。

(2) 步骤 先进行洗脱,然后比色。

将已显色的薄膜之各区带分别剪成小片置于试管中;每一试管加洗脱液2毫升,充分振摇,静置20分钟后再振摇一次,即可比色。

用分光光度计比色,在波长490毫微米读光密度;最后计算出各区带的相对值。

实验结果

1. 吸收波长

二甲亚砆正丙醇溶液洗脱具有LDH同功酶活力的染色区带后,用自动紫外分光光度计测其吸收光谱曲线,得最大吸收峰在490毫微米(图1)。

2. 色泽稳定时间

在具有LDH同功酶染色区带薄膜小片的试管中,加洗脱液经充分振摇,静置20分钟再振摇一次后,其色泽已基本洗脱,光密度读数达最大值;其后两个半小

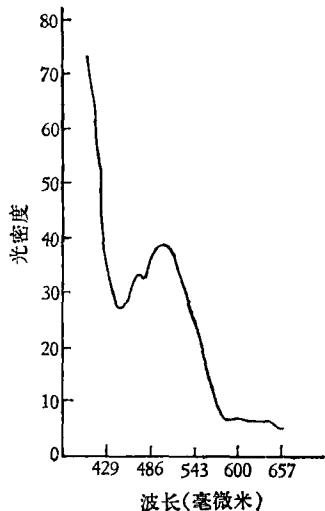


图1 二甲亚砷正丙醇液洗脱 LDH 同功酶色带后的吸收光谱曲线

时内光密度读数基本稳定,即使再加振摇也不影响其读数(图2)。

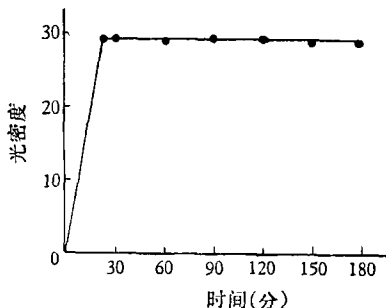


图2 二甲亚砷正丙醇液洗脱 LDH 同功酶色带后的色泽稳定时间

3. 溶液色泽浓度与光密度的关系

将若干条 LDH 同功酶色带置于同一试管中,加适量二甲亚砷正丙醇液进行洗脱,而后取出一定量,

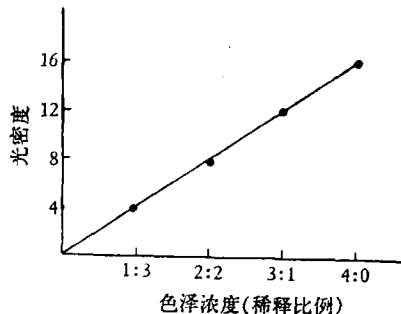


图3 二甲亚砷正丙醇液洗脱 LDH 同功酶色泽区带后色泽浓度与光密度的关系

按 4:0, 3:1, 2:2, 1:3 之比例稀释,即其浓度分别代表 100%, 75%, 50% 与 25%, 结果见色泽浓度与光密度间呈直线关系(图3)。

4. 重复性测定

取 5 份血清标本,分别重复测定一次 LDH 同功酶含量的百分率,其结果见表 1,说明重复性比较满意。

5. 正常人血清中 LDH 同功酶之谱型

采用本法,测定 111 例正常人血清的结果见表 2。表 2 中还比较了我们所得的正常值,与国内外报道的用醋酸纤维薄膜电泳法分离所得的结果。

表1 血清 LDH 同功酶含量百分率之重复测定

标本号	测定次数	LDH-1 (%)	LDH-2 (%)	LDH-3 (%)	LDH-4 (%)	LDH-5 (%)
1	1	31.4	25.0	7.3	5.5	30.9
	2	30.5	24.5	8.6	6.4	30.0
2	1	32.8	32.4	6.9	0	27.8
	2	33.3	32.3	6.9	0	27.5
3	1	32.2	39.6	15.9	0	12.3
	2	32.8	40.6	16.4	0	10.0
4	1	25.9	35.9	20.2	11.2	6.7
	2	26.6	35.6	20.0	11.2	6.7
5	1	27.4	32.2	19.4	13.7	7.2
	2	27.6	30.6	21.0	13.4	7.4

表2 正常人血清 LDH 同功酶之谱型(含量百分率)

作者	例数	LDH-1 (%)	LDH-2 (%)	LDH-3 (%)	LDH-4 (%)	LDH-5 (%)
本文	111	27.1±2.8	34.7±4.3	20.9±2.4	11.7±3.3	5.7±2.9
Homer 等 ^[6]	20	26.8±4.0	34.6±3.9	22.4±2.0	10.1±2.6	6.2±3.6
Bergerman ^[8]	50	23.2±5.6	38.1±5.6	21.8±6.4	9.4±4.2	6.9±3.3
Opher 等 ^[4]	100	25.1±3.0	32.8±4.0	20.8±3.1	12.2±2.9	8.5±2.7
上海市闸北区中心医院 ^[9]	20	24—34	35—44	19—27	0—5	0—2

讨 论

按 Preston^[7]报告的方法^[7],血清经醋酸纤维薄膜电泳分离 LDH 同功酶后,显色试剂中使用硝基四氮唑蓝(NBT)溶液。据该作者方法在薄膜上呈现的色带,

我们曾用多种试剂尚未能将其满意洗脱;也曾用 7:3 的甲醇:冰醋酸溶液使薄膜透明,再用光密度计作定量测定,但薄膜在透明过程中 LDH 同功酶区带的色泽明显消褪;如以 1:1 的甲醇:冰醋酸溶液将薄膜完全溶解后比色,或用液体石蜡使之透明后再用光密度法测

定, 则均因其操作较烦且读数低而未能采用。鉴于 DiGiorgio^[10] 以 1:9 的二甲亚砷正丙醇液短时洗涤薄膜, 以使色带与非色带区色泽对比清晰; 我们用 INT 代替 NBT 染色, 再以 1:9 二甲亚砷正丙醇液洗脱色泽, 而后作定量测定, 结果比较满意。

我们在定量测定过程中, 系用自动紫外分光光度计, 因有放大系统, 所以只需将电泳条的各色带洗脱, 灵敏度已足够满意。如采用一般分光光度计或光电比色计, 则宜将电泳条与覆盖条的相应各色带一起洗脱, 再测定其光密度; 否则因读数过低而影响其正确性, 特别对 LDH-4, LDH-5 之影响更大。如果将薄膜条宽度适当增加, 如增至 5.0 厘米, 血清用量增加一倍, 则既能适用于一般分光光度计或光电比色计, 也可提高光密度读数, 唯薄膜及试剂之用量也将相应增多, 色泽洗脱时间也应适当延长。若薄膜条之宽度不变而仅增加血清用量, 则因其点样时间延长, 且未能增加酶促反应的面积, 所以效果不甚满意。

小 结

本文报告了在测定 LDH 同功酶时, 经电泳分离后, 用 1:9 的二甲亚砷正丙醇液来洗脱经 INT 染色的醋酸纤维薄膜各区带色泽, 再以分光光度计进行定量

测定的方法; 并对本测定方法的条件与可靠性作了一些探讨。

用本法测定了 111 例正常人血清 LDH 同功酶含量百分率的正常值(%), 其结果为: LDH-1, 27.1 ± 2.8 ; LDH-2, 34.7 ± 4.3 ; LDH-3, 20.9 ± 2.4 ; LDH-4, 11.7 ± 3.3 ; LDH-5, 5.7 ± 2.9 ; 与有关资料中报告用光密度法测定的正常值相近似。

主要参考资料

- [1] Auvinen, S.: *Acta Med. Scand.*, Supp. 539, 1972.
- [2] Criss, W. E.: *Cancer Res.*, **31**, 1523, 1971.
- [3] Schwatz, M. K.: *Clin. Chem.*, **19** 10, 1973.
- [4] Opher, A. W. et al.: *ibid.*, **12**, 308, 1966.
- [5] Lubrano, T. et al.: *ibid.*, **17**, 882, 1971.
- [6] Homer, G. M. et al.: *Am. J. Clin. Path.*, **51**, 287, 1969.
- [7] Preston, J. A. et al.: *ibid.*, **43**, 256, 1965.
- [8] Bergerman, J.: *Clin. Chem.*, **12**, 797, 1966.
- [9] 上海市闸北区中心医院检验科: 快速检验诊断资料汇编 (人民卫生出版社, 1972 年), 169 页。
- [10] DiGiorgio, J.: *Clin. Chem.*, **17**, 326, 1971.

[本文于 1975 年 1 月 3 日收到]

(上接第 24 页)

基顺序配对是相对的, 因此方法本身的灵敏度还是有一定的限度的。Chiarugi (1969)^[1] 的工作中也指出, 这种杂交技术对不同品种大鼠间的反应灵敏度是比较低的。所以认为本文所得的结果尚不能用遗传上的差异来解释的。

综合上述实验结果表明, 核酸分子杂交原理及其技术可用于比较肿瘤细胞和正常细胞间核酸核苷酸顺序的同一性和差异性; 并为进一步探讨这些差异性在肿瘤发生中的生物学意义提供一个较灵敏的研究技术。当然, 核酸杂交技术的灵敏度, 特别是应用于较高等有机体的研究中, 还有一定的限度。因此, 在肿瘤研究中, 除杂交技术本身外, 尚需要其它有效的、灵敏的分析技术的相互配合。

参 考 资 料

- [1] Chiarugi, V. P.: *Biochem. et. Biophys. Acta*, **179**, 129—135, 1969.
- [2] Drews, J. et al., *Europ. J. Biochem.*, **3**, 284—292, 1968.
- [3] Garrett, C. T. et al.: *Cancer Res.*, **33**, 1662—1669, 1973.
- [4] Marmur, J.: *J. Mol. Biol.*, **3**, 208—218, 1961.
- [5] Marmur, J. et al.: *ibid.*, **5**, 109—118, 1962.
- [6] Mendecki, J. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 494—501, 1969.
- [7] Nygaard, A. P. et al.: *ibid.*, **12**, 98—104, 1963.
- [8] Scherrer, K. et al.: *ibid.*, **7**, 486—490, 1962.
- [9] Shearer, R. W. et al.: *Cancer Res.*, **32**, 339—342, 1972.

[本文于 1975 年 3 月 20 日收到]