

研究简报

膜上斑点法显示人红细胞 b_5 还原酶活性*兰风华¹⁾ 唐玉钗 朱忠勇 吴玉水

(南京军区福州总医院全军医学检验中心, 福州 350001)

摘要 人红细胞 NADH-细胞色素 b_5 还原酶是使高铁血红蛋白还原的主要酶类, 其缺陷将导致遗传性高铁血红蛋白血症。目前, 主要通过分光光度法测定 b_5 还原酶活性。我们将 b_5 还原酶抗体点于硝酸纤维膜上, 以此捕获并富集红细胞胞浆 b_5 还原酶。有 b_5 还原酶活性的斑点用噻唑蓝染色。此法简单直观, 可用于 b_5 还原酶的定性和半定量测定, 为遗传性高铁血红蛋白血症的诊断提供了一种新的实验手段。

关键词 NADH-细胞色素 b_5 还原酶, 遗传性高铁血红蛋白血症, 抗体, 红细胞, 酶活性测定, 硝酸纤维膜

人 NADH-细胞色素 b_5 还原酶 (即 EC 1.6.2.2, 简称 b_5 还原酶) 是一种以 NADH 为辅酶, 以细胞色素 b_5 为天然底物的氧化还原酶类^[1], 广泛分布于人体各组织细胞, 具有重要的生理功能。存在于体细胞的 b_5 还原酶参与脂肪酸代谢、胆固醇合成、药物的生物转化等; 在红细胞内, b_5 还原酶是使高铁血红蛋白还原成正常血红蛋白的主要酶类。临床上, b_5 还原酶缺陷将导致遗传性高铁血红蛋白血症^[2]。

测定红细胞 b_5 还原酶活性, 是诊断遗传性高铁血红蛋白血症的关键。目前, 主要通过分光光度法测定红细胞 b_5 还原酶活性^[3]。其基本原理是, 在 b_5 还原酶和 NADH 的存在下, b_5 还原酶底物 (天然的或人工的, 如细胞色素 b_5 , 铁氰化钾等) 被还原, 在特定波长的吸光度发生变化, 变化的大小反映了 b_5 还原酶活性的高低。该方法虽为定量测定法, 但要求严格控制反应条件, 重复性较差。

我们在 b_5 还原酶的免疫学研究^[4]中发现, 吸附在硝酸纤维膜上的 b_5 还原酶仍保持其酶活性, 并可用沉淀性底物噻唑蓝进行显色。由

此想到, 可将 b_5 还原酶抗体 (多价抗体或单克隆抗体) 点在硝酸纤维膜上, 以此捕获红细胞胞浆中存在的 b_5 还原酶, 从而建立一种检测 b_5 还原酶的直观方法。实验按以下程序进行: a. 将浓度为 1~10 g/L 的兔抗 b_5 还原酶抗体 (IgG) 或抗 b_5 还原酶单克隆抗体点于 1 cm×1 cm 大小的硝酸纤维膜片上 (每片 1 μ l), 室温下干燥; b. 用 5% 牛血清白蛋白-PBS 封闭 1 h; c. 0.05% 吐温 20-PBS 洗涤 5 次, 每次 5 min 以上; d. 与红细胞胞浆或 5 mg/L b_5 还原酶液 (每片 0.4 ml) 室温下孵育 1 h; e. 重复 c; f. 浸于含噻唑蓝的底物缓冲液 (10 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0, 0.5 g/L NADH, 50 μ mol/L 2, 6-二氯酚靛酚, 0.5 g/L 噻唑蓝)^[5] 中约 5 min。存在 b_5 还原酶活性的斑点呈紫蓝色。结果如图 1 所示, 点有 b_5 还原酶抗体 (一个多抗, 两个单抗) 的膜片均显示出着色斑点。 b_5 还原酶浓度低至 25 μ g/L 仍可显色。点有对照抗体 (抗

* 总后勤部卫生部“八五”重点资助课题。

¹⁾ 第四军医大学生化教研室, 西安 710032。

收稿日期: 1995-10-11, 修回日期: 1996-01-24

人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体) 的膜片未见显色, 说明本方法有特异性。

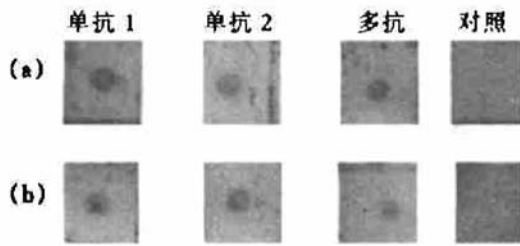


图 1 膜上斑点法显示 b_5 还原酶活性
硝酸纤维膜片分别点有: 单克隆抗体 IE3 (单抗 1)、单克隆抗体 2B2 (单抗 2)、多价抗体(多抗)和对照抗体(对照)。封闭后, 与(a) b_5 还原酶液(5 mg/L)或(b)红细胞胞浆孵育, 显色方法见文。红细胞胞浆的制备: 正常人红细胞用四倍体积的蒸馏水低渗裂解后, $10\ 000 \times g$ 离心 20 min 除去沉渣即得。

本方法操作简单, 无需使用任何仪器, 结果易辨, 且反应条件易于控制, 重复性好, 具有分光光度法无可比拟的优点。将红细胞胞浆作系列稀释, 与 b_5 还原酶标准液对照, 可对红细胞胞浆 b_5 还原酶进行半定量测定。我们认为, 本方法将为 b_5 还原酶的活性检测和遗传性高铁血红蛋白血症的实验诊断带来方便, 并为其他酶类的活性检测提供一种新模式。

致谢 日本 Yubisui 博士 (Department of Biochemistry, Medical University of Oita, Japan) 为我们提供 b_5 还原酶纯品。本院血液科杨瑞芬教授审阅了全稿, 在此深表谢意。

参 考 文 献

- 1 Hulquist D E, Passon P G. *Nature*, 1971; 229: 252
- 2 Mansouri A, Lurie A A. *Am J Hematology*, 1993; 42: 7

- 3 Board P G. *Clinica Chimica Acta*, 1981; 109: 233
- 4 兰风华, 唐玉钗, 黄长晖等. 单克隆抗体通讯, 1995; 11 (3~4): 61
- 5 Kaplan J C, Beutler E. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967; 29: 605

Visualization of Human Red Cell NADH-Cytochrome b_5 Reductase Activity as Spot on Nitrocellulose Membrane. Lan Fenghua, Tang Yuchai, Zhu Zhongyong, Wu Yushui (*Clinical Laboratory Diagnostics Center, PLA Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350001, China*).

Abstract Human erythrocyte NADH-cytochrome b_5 reductase, or b_5 reductase, plays a major role in the reduction of methemoglobin, deficiency of which will lead to hereditary methemoglobinemia. Determination of b_5 reductase activity is usually done by spectrophotometry. A new method has been developed for the qualitative and semi-quantitative detection of b_5 reductase activity, in which antibodies against b_5 reductase was dot-blotted onto nitrocellulose membrane, and this in turn was used to capture and enrich b_5 reductase from hemolysate. Spots carrying b_5 reductase activity were visualized with the precipitable substrate MTT, or 3-(4, 5-dimethyl thiazolyl-2)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide. Being straightforward and easy to follow, this method provides a new approach for the diagnosis of hereditary methemoglobinemia.

Key words NADH-cytochrome b_5 reductase, hereditary methemoglobinemia, antibody, erythrocyte, activity determination, nitrocellulose membrane