

• 临床生物化学与检验论著(全军检验大会优秀论文) •

xMagTM 异硫氰酸根磁微粒偶联 GOD 和 HRP 测定葡萄糖的研究吴杰红¹, 张伟², 吴森³, 蒲晓允^{1△}(1. 第三军医大学第二附属医院检验科, 重庆 400037; 2. 第三军医大学学员旅三队, 重庆 400038;
3. 川北医学院, 四川南充 637000)

摘要: 目的 建立以 xMagTM 异硫氰酸根磁微粒为载体的葡萄糖检测体系。方法 以 xMagTM 异硫氰酸根磁微粒作为葡萄糖氧化酶(GOD)和辣根过氧化物酶(HRP)的载体, 将葡萄糖氧化酶和辣根过氧化物酶经偶联法固化于经预处理的磁微粒, 从而检测葡萄糖的浓度。结果 用 xMagTM 异硫氰酸根磁微粒检测葡萄糖浓度与临床结果相符。结论 xMagTM 异硫氰酸根磁微粒可作为 GOD 和 HRP 的理想载体, 作为检测葡萄糖的浓度工具。

关键词: 异硫氰酸根; 磁微粒; 葡萄糖氧化酶; 辣根过氧化物酶**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.014**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2012)20-2465-03**The research of using xMagTM isothiocyanato magnetic particle to couple GOD and HRP to determine glucose**Wu Jiehong¹, Zhang Wei², Wu Miao³, Pu Xiaoyun^{1△}(1. Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, China;
2. Third team, Student brigade, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China;
3. North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract; Objective To set up an glucose testing system of using xMagTM isothiocyanato magnetic particles as the carrier. **Methods** To use xMagTM isothiocyanato magnetic particle as the carrier of GOD and HRP and fix GOD and HRP in the magnetic particles of pretreatment to determine the concentration of glucose. **Results** The results of using xMagTM isothiocyanato magnetic particle to determine the concentration of glucose are tally with the clinical results. **Conclusion** xMagTM isothiocyanato magnetic particle can be the ideal carrier of GOD and HRP, and can be a tool to determine the concentration of glucose.

Key words: isothiocyanato; magnetic particle; glucose oxidase; horseradish peroxidase

随着生活水平的逐步提高, 糖尿病的发病率呈上升趋势, 糖尿病及其并发症成为威胁人类健康的杀手。糖尿病是由于遗传和环境因素共同作用而引起的一组以糖代谢紊乱为主要表现的临床综合征。慢性长期的高血糖可以引起心血管、肾脏、神经系统、眼部等多器官的损害, 控制血糖水平对减少及缓解糖尿病并发症有重要意义。因此血糖的测定具有重要价值。血清葡萄糖的检测是临床生化项目中重要的项目之一, 其检测方法有多种, 常用的是葡萄糖氧化酶(GOD-POD)法和己糖激酶(HK)法^[1-2]。其中 GOD-POD 法由于成本相对低廉, 应用更为广泛一些, 因此本实验应用此方法进行葡萄糖的测定, 其反应原理为葡萄糖氧化酶能催化葡萄糖氧化成葡萄糖酸, 并产生过氧化氢, 在色原性氧受体的存在下, 过氧化物酶催化过氧化氢, 氧化色素原, 生成的有色化合物在 505 nm 处有最大吸收, 产生的颜色强度与血清葡萄糖浓度成正比^[3]。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 恒温振荡器 THZ-C(重庆医药公司), 磁铁, 微量核酸蛋白检测仪 Thermo DR2000(基因有限公司), 容量瓶 500 mL, 小烧杯, 电子称量器, 加样枪, EP 管数支, 葡萄糖氧化酶(批号: 1001138742, 1 840 U/mg, Sigma 公司); 辣根过氧化物酶(批号: 1000629312, 175 U/mg, Sigma 公司), 十二水磷酸氢二钠(上海强顺化学试剂有限公司, 批号: 20050916, 500 g), 无水磷酸二氢钾(重庆北碚化学试剂厂, 批号: 20100511, 500 g), 氢氧化钠(重庆川东化工有限公司, 批号: 20080303, 500 g), 4-氨基安替比林(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20080708), xMagTM 异硫氰酸根末端磁粒蛋白偶联试

剂盒(西安金磁纳米生物技术有限公司, 批号: XMK0205, 包括异硫氰酸根磁性微粒 5 mL, 偶联 BP 5 mL, 清洗液 WP 5 mL, 保存液 SP 5 mL, 封闭剂 5 支, 去离子水), BP、WP 在使用前用去离子水 10 倍稀释。

1.2 实验步骤

1.2.1 HRP 与异硫氰酸根微粒的偶联 (1) HRP 溶液的配制: 用电子称量器准确称取 1.1 mg HRP 溶解于 1.1 mL 偶联液 BP 中(浓度为 1.0 μg/μL, 总体积为 1.1 mL), 取出 80 μL 溶液于离心管中, 并标记为 HRP pre, 留作偶联效率检测用。(2) 异硫氰酸根末端磁性微粒的预处理: 将异硫氰酸根末端磁性微粒摇匀后, 用移液器移取 1 mL 置于 5 mL 离心管中, 磁性分离 2 min, 弃上清, 加入 500 μL 偶联液 BP, 轻摇混匀。磁性分离, 弃上清, 重复该预处理操作 1 次。(3) 偶联反应: 将 1 mL HRP 溶液加入步骤(2)的离心管中, 置于恒温摇床, 37 °C、180 r/min 振荡反应 20 min, 反应完毕, 磁性分离 2 min, 取上清液于一离心管中, 并标记为 HRP post, 留作偶联效率检测用。(4) 清洗: 在步骤(3)的 HRP 离心管中加入 1 mL 清洗液 WP, 轻摇混匀, 磁性分离, 取上清液于一离心管中, 并标记为 HRP wash1, 重复该操作 1 次, 取上清液于一离心管中, 并标记为 HRP wash2, 留作偶联效率检测用。(5) 封闭: 在步骤(4)的离心管中加入 3 mL 封闭液, 置于恒温摇床, 37 °C、180 r/min 振荡反应 2 h, 磁性分离, 弃上清。(6) 清洗: 在步骤(5)的离心管中加入 1 mL 清洗液 WP, 轻摇混匀, 磁性分离, 弃上清。重复该清洗操作 3 次。(7) 保存: 在步骤(6)的离心管中加入 1 mL 保存液 SP, 轻摇混匀, 2~8 °C 保存备用。

△ 通讯作者, E-mail: puxiaoyong@yahoo.com

1.2.2 GOD与异硫氰酸根微粒的偶联 (1)GOD溶液的配制:用电子称量器准确称取5.75 mg GOD溶解于5.75 mL偶联液BP中(浓度为1.0 μg/μL,总体积为5.75 mL),取出80 μL溶液于一离心管中,并标记为GOD pre,留作偶联效率检测用。(2)异硫氰酸根末端磁性微粒的预处理:将异硫氰酸根末端磁性微粒摇匀后,用移液器移取5 mL置于20 mL离心管中,磁性分离2 min,弃上清,加入2 500 μL偶联液BP,轻摇混匀。磁性分离,弃上清,重复该预处理操作一次。(3)偶联反应:将5.74 mL GOD溶液加入步骤(2)的离心管中,置于恒温摇床,37 °C、180 r/min振荡反应20 min,反应完毕,磁性分离2 min,取上清液于一离心管中,并标记为GOD post,留作偶联效率检测用。(4)清洗:在步骤(3)的GOD离心管中加入5 mL清洗液WP,轻摇混匀,磁性分离,取上清液于一离心管中,并标记为GOD wash1,重复该操作1次,取上清液于一离心管中,并标记为GOD wash2,留作偶联效率检测用。(5)封闭:在步骤(4)的GOD离心管中加入15 mL封闭液,置于恒温摇床,37 °C、180 r/min振荡反应2 h,磁性分离,弃上清。(6)清洗:在步骤(5)的GOD离心管中加入5 mL清洗液WP,轻摇混匀,磁性分离,弃上清。重复该清洗操作3次。(7)保存:在步骤(6)的GOD离心管中加入5 mL保存液SP,轻摇混匀,2~8 °C保存备用。

1.2.3 HRP和GOD偶联效率的计算 以偶联液BP调零,分别测定pre、post样品在280 nm处的吸光值,以清洗液WP调零,分别测定wash1、wash2样品在280 nm处的吸光值,并按照以下公式计算两种酶在磁微粒表面的偶联效率,以效率乘以加入酶的量,即为偶联在磁微粒表面的酶的量。

$$\text{偶联效率} = \frac{\text{OD}_{280(\text{pre})} - \text{OD}_{280(\text{post})} - \text{OD}_{280(\text{wash1})} - \text{OD}_{280(\text{wash2})}}{\text{OD}_{280(\text{pre})}} \times 100\%.$$

1.2.4 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.0)的配制 (1)首先用电子称量器准确称取4.0 g氢氧化钠溶解于100 mL蒸馏水中,配成1 mol/L的氢氧化钠溶液;(2)称取无水磷酸二氢钾1.325 g及十二水磷酸氢二钠5.46 g溶解于200 mL蒸馏水中,再用1 mol/L的氢氧化钠溶液调节pH至7.0,然后用蒸馏水稀释至250 mL。

1.2.5 配制酚试剂 方法:取GOD 120 U和HRP 120 U及4-AAP 1 mg加上述磷酸盐缓冲液至8 mL左右,调节pH7.0。再加磷酸盐缓冲液至10 mL,混匀待用。酚溶液的配制:苯酚100 mg溶于100 mL蒸馏水中,贮存于棕色瓶中。酶酚混合试剂:酶试剂和酚溶液等量混合,贮存于棕色瓶中。

1.2.6 反应 操作见表1。

表1 各管操作反应比较

试剂	空白管(mL)	标准管(mL)	测定管(mL)
蒸馏水	0.02	—	—
Glu标准液	—	0.02	—
血清	—	—	0.02
酶酚混合试剂	3.0	3.0	3.0

—:无数据。

1.2.7 测吸光度 用微量加样枪吸取2 μL样品,在微量核酸蛋白检测仪Thermo DR2000上在505 nm波长,以空白管调零,测定标准管和待测管的吸光度。按以下公式计算各管的葡萄糖浓度:

$$\text{待测葡萄糖浓度} (\text{mmol/L}) = \frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度}} \times \text{标准管浓度} (6.18)$$

2 结果

2.1 HRP和GOD偶联效率的测定 所测结果为: HRP(pre)=0.118、GOD(pre)=0.121、HRP(post)=0.038、GOD(post)=0.082、HRP(wash1)=0.019、GOD(wash1)=0.014、HRP(wash2)=0.013、GOD(wash2)=0.008、HRP(BP)=0.001、GOD(BP)=0.001、HRP(WP)=0.001、GOD(WP)=0.001、HRP偶联效率=42.73%×1.1 mg×1 840 U/mg=865 U、GOD偶联效率=15.83%×5.74 mg×175 U/mg=159 U。

2.2 磁微粒葡萄糖检测体系的颜色反应 水浴15 min后取出样品,能够见到产生了红色的颜色反应。见图1~3。



图1 磁微粒葡萄糖检测体系的颜色反应(空白管)



图2 磁微粒葡萄糖检测体系的颜色反应(标准管)

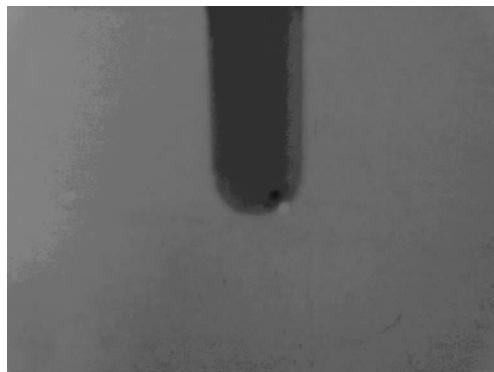


图3 磁微粒葡萄糖检测体系的颜色反应(检测管)

2.3 各测定管吸光度测定 见图4~6。

2.4 血糖浓度测定结果 见表2。

表2 血糖浓度测定比较

项目	空白管	标准管	测定管
吸光度	0.002	0.021	0.076
血糖浓度(mmol/L)	0.000	6.180	24.06

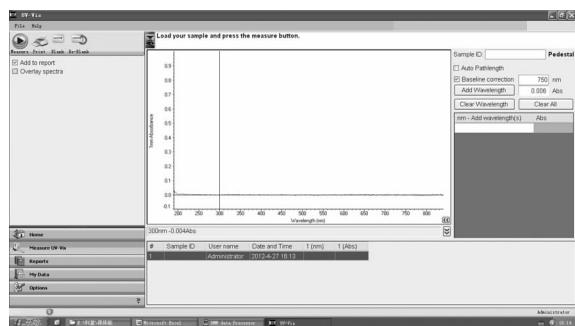


图 4 空白管吸光度

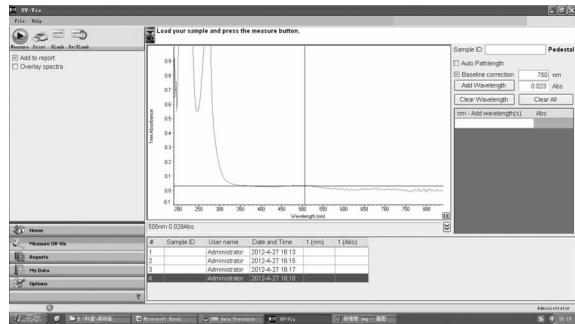


图 5 标准管吸光度

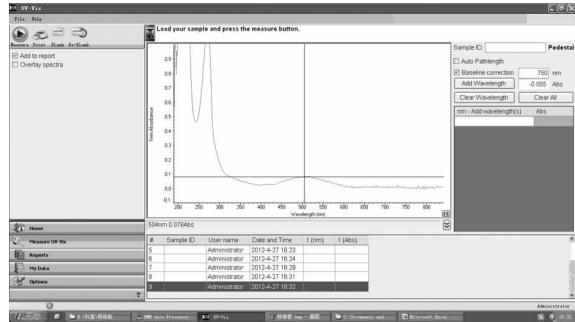


图 6 测定管吸光度

• 临床生物化学与检验论著(全军检验大会优秀论文) •

脑血管病患者高 Hcy 血症与叶酸和维生素 B₁₂关系的初步研究

郑伟, 孟冬娅, 罗军, 韩笑, 李坤, 胡晓芳[△]

(沈阳军区总医院检验科, 辽宁沈阳 110840)

摘要:目的 探讨脑血管病患者高同型半胱氨酸(Hcy)血症与叶酸、维生素B₁₂之间的相关性。方法 脑血管病组患者(于确诊入院的第1天清晨)以及对照组体检者在空腹状态下采集前臂无抗凝静脉血3 mL。无抗凝静脉血1 h内离心(3 000 r/min, 10 min)分离血清后,置于-70 ℃保存待测。应用日立-7600全自动生化分析仪,采用酶法检测血清Hcy浓度。应用AIA-1800全自动化学发光免疫分析仪,采用化学发光免疫法分别检测叶酸和维生素B₁₂浓度。结果 脑梗塞(CI)组、脑出血(CH)组和对照组的血清Hcy水平比较差异有统计学意义($F=19.58, P<0.01$)。其中,CI组的血清Hcy水平[(24.04±6.36) μmol/L]明显高于CH组[(20.39±5.56) μmol/L],差异有统计学意义($P<0.01$)。与之相反,CI组和CH组血清叶酸、维生素B₁₂水平均明显低于对照组($P<0.01$),但CI组和CH组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。相关分析结果显示,脑血管病组的血清叶酸和维生素B₁₂水平与Hcy水平呈负相关($r_1=-0.80, r_2=-0.83$)。结论 高Hcy血症是导致脑血管病发生的独立危险因素。而Hcy与叶酸、维生素B₁₂之间存在的负反馈调节机制可能是导致脑血管病发生的关键因素。

关键词:高同型半胱氨酸血症; 脑血管病; 叶酸; 维生素B₁₂

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)20-2467-03

高同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)血症是脑血管病患

3 讨 论

本研究结果显示,以xMagTM异硫氰酸根磁微粒为载体检测葡萄糖浓度的方法是可行的,但是也存在一些问题,一是葡萄糖氧化酶的偶联率比较低,二是葡萄糖氧化酶的单位浓度比较小,所以本实验采取了同比例缩小10倍的方法进行检测,具体的试验结果与临床结果相符程度有待于下一步研究。

葡萄糖的检测方法主要有红外光谱法、高效液相色谱法、气质联用以及各式各样的酶传感器等,它们或成本高或要求在沸腾状态下测定、操作不便、试剂稳定性差等原因在实际应用中受限。葡萄糖的检测最常用的酶学方法有葡萄糖氧化酶法和己糖激酶法,其特点是具有较高的灵敏度、准确度和精密度,反应条件温和,操作简便。

本实验利用磁微粒对酶的吸附作用及该体系对酶的保护作用,研究了以磁微粒为载体检测血清葡萄糖的体系。通过预期试验,此工作达到了初步的目的。在后续的工作中还应验证该体系检测血清葡萄糖的特异度、准确性、精密度及线性,同时考虑通过加入葡萄糖变旋酶减少该体系检测时间。在该体系研制成熟后结合重庆大学研制的微型光谱分析仪自带磁力搅拌系统及37 ℃恒温孵育系统,为研制适合野战、基层等小型医疗机构的便携式检测设备的试剂打下基础。

参考文献

- [1] 屈跃军, 卢占勇, 卢朋友. 己糖激酶法与氧化酶法试剂测葡萄糖在生化分析仪上的应用体会[J]. 实用医技杂志, 2005, 12(4): 846.
- [2] 高芳远. 35例糖尿病患者的护理[J]. 检验医学与临床, 2007, 3(4): 221.
- [3] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 260.

(收稿日期:2012-08-09)

[△] 通讯作者, E-mail: hxf630212@msn.com。

者重要的病理特征^[1-2],也是增加脑血管病发生的独立危险因