文章编号:1000-5404(2006)19-2009-02

技术方法

全自动电泳分离测定乳酸脱氢酶同工酶的实验观察

郭绍丽,马 琳,刘晨梅,张连祥,王兆成 (天津市胸科医院检验科,天津 300051)

提 要:目的 通过实验使LDH-ISO电泳试剂国产化,达到LDH-ISO电泳的自动化和普及。**方法** 进行LDH-ISO电泳凝胶板最适条件的选择、试剂最佳浓度、显色试剂的实验研究及与国外试剂的比较。**结果** LDH-ISO同一凝胶板检测结果一致性*CV*为3.23%~6.88%,同一批凝胶板检测结果一致性*CV*为2.53%~9.0%,不同批凝胶板检测结果的一致性*CV*为4.57%~15.33%,表明凝胶板检测结果的一致性好。研制的LDH-ISO琼脂糖凝胶板与进口的电泳凝胶板的LDH-ISO电泳的5条区带均无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 本实验完成了LDH-ISO琼脂糖凝胶板的制备及酶促反应显色试剂的最佳配方,实现了试剂的国产化。

血清乳酸脱氢酶同工酶(LDH-ISO)的测定是以琼脂糖凝胶作支持物,在一定的缓冲条件下进行电泳分离后,对琼脂糖凝胶板上的LDH活性区带进行显色反应,根据各区带颜色深浅确定其含量。通常情况下,使用进口LDH-ISO商品试剂盒进行检测。我们对LDH-ISO琼脂糖电泳凝胶板、显色试剂进行研究,在自动电泳分析仪上进行分离与显色应用,取得了满意效果,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 仪器

北京金桑特SH 2020自动电泳分析系统,法国Sebia自动电泳分析仪。

1.2 试剂

自配LDH-ISO琼脂糖凝胶板,法国Sebia LDH-ISO琼脂糖凝胶板。

1.3 LDH-ISO电泳琼脂糖凝胶板最佳浓度和显色试剂的实验

选择琼脂糖凝胶板最适pH、Tris-巴比妥缓冲液浓度及离子强度、琼脂糖浓度;观察显色液中NAD^+、乳酸锂、NBT、PMS浓度及pH。

1.4 LDH-ISO琼脂糖凝胶板精密度观察

取1份血清分别检测同1张凝胶板及不同批凝胶板的分离结果。

1.5 LDH-ISO琼脂糖凝胶板与法国Sebia LDH-ISO琼脂糖凝胶板电泳结果比较

选取10份血清,用制备的LDH-ISO琼脂糖凝胶板在SH2020电泳仪上进行电泳,法国Sebia LDH-ISO琼脂糖凝胶板在Sebia电泳仪上做LDH-ISO电泳,观察研制的LDH-ISO琼脂糖凝胶板及其显色试剂与进口的LDH-ISO电泳凝胶板分离结果有无显著性差异。

1.6 统计学处理

组间比较行配对t检验。

2 结果

2.1 LDH-ISO琼脂糖凝胶电泳的最适条件和琼脂糖的最佳浓度

制备LDH-ISO琼脂糖凝胶板缓冲液的最适pH为8.6;最适浓度80 mmol/L离子强度为0.065;琼脂糖最佳浓度为10.0 g/L。

2.2 LDH-ISO琼脂糖凝胶板电泳显色最适条件

酶促反应显色试剂的NAD^+浓度为7.54 mmol/L,乳酸锂浓度为52 mmol/L,NBT浓度为2.5 g/L,PMS浓度为0.8 g/L,显色试剂的pH值为9.2。

2.3 LDH-ISO琼脂糖凝胶板检测血清LDH-ISO精密度观察

同1张凝胶板检测重复24次,结果5条区带测定范围:LDH_1为20.1%~23.1%,LDH_2为12.4%~15.6%,LDH_3为12.3%~15.7%,LDH_4为23.7%~29.1%,LDH_5为21.2%~24.7%。*CV*为3.23%~6.88%,表明凝胶板的均匀度好。

同一批凝胶板5张,每张点样6个,重复30次,结果5条区带测定范围:LDH_1为55.3%~61.7%,LDH_2为9.1%~12.3%,LDH_3为10.3%~16.3%,LDH_4为20.1%~24.2%,LDH_5为40.4%~50.7%。*CV*为2.53%~9.00%,表明同一批凝胶板检测结果的一致性好。

不同批凝胶板5张,每张点样6个,重复30次,结果5条区带测定范围:LDH_1为8.0%~11.3%,LDH_2为30.5%~33.2%,LDH_3为4.1%~5.3%,LDH_4为0.6%~2.4%,LDH_5为1.7%~4.9%。*CV*为4.57%~15.33%,表明不同批的凝胶板检测结果一致性好。

2.4 制备的LDH-ISO琼脂糖凝胶板与法国Sebia LDH-ISO琼脂糖凝胶板电泳结果比较

2种凝胶板的LDH-ISO电泳的5条区带结果均无显著性差异($P>0.05$)。结果见表1。

作者简介:郭绍丽(1956-),女,天津市人,副主任技师,主要从事临床生化及临床输血方面的研究。电话:(022)23147047

收稿日期:2006-02-24;修回日期:2006-06-07

表1　LDH-ISO 电泳凝胶板和 Sebia 凝胶板电泳结果的比较($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

凝胶板	LDH_1(%)	LDH_2(%)	LDH_3(%)	LDH_4(%)	LDH_5(%)
Sebia	41.5±15.9	26.0±9.0	7.2±2.1	9.2±10.2	15.0±14.9
研制	41.7±15.5	26.4±8.7	7.2±2.4	9.1±11.2	14.8±14.6
t	0.456	0.374	0.346	0.49	0.477
P	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

3　讨论

电泳法是测定 LDH-ISO 的最常用方法，支持物有醋酸纤维素薄膜、淀粉胶、琼脂糖、聚丙烯酚胺凝胶等[1]。醋酸纤维素薄膜电泳方法最简单，但点样不能太多，且区带淡，有时 LDH_4 与 LDH_5 不能分开。聚丙烯酚胺凝胶电泳虽然分离区带清晰，但操作繁琐、价格昂贵，且试剂有毒需要防护。淀粉胶电泳制板时易碎裂，缺乏韧性，电渗现象较强，影响分离效果。

琼脂糖凝胶是由半乳糖及其衍生物构成的中性物质，凝胶颗粒不带电荷，用作电泳支持物其结构均匀、含水量大，对样品吸附小，电泳图谱清晰，分辨率高；且琼脂糖凝胶透明无紫外吸收，电泳过程中和结果可直接用紫外光测定；电泳后区带易染色，样品易脱色，便于定量分析，应用于自动电泳分析仪上操作简单，结果可靠，重复性好，并可制成干膜长期保存；另外试剂无毒性、无污染、价格低廉[2]。

LDH-ISO 琼脂糖凝胶在自动电泳分析仪上分离 LDH，应选择合适的 pH 和电泳缓冲体系。pH 过低时电泳区带展开不完全，而且有向阴极端移动的现象；随着 pH 的增加电泳区带逐渐清晰，在 pH 8.6 时分离效果最佳。离子强度越低区带展开越长，离子强度与缓冲液中的各组分电解情况成正比[3]，合适的浓度才能保证相当的离子强度，我们应用离子强度 0.065 的 Tris-巴比妥缓冲液从电泳区带分离结果看效果最佳。

不仅分离 LDH-ISO 电泳过程需要合适的 pH，电泳后进行酶促反应，为使其酶活性反应完全也应有合适 pH 环境。但 LDH-ISO 各组分又有不同的最适 pH，LDH 催化乳酸生成丙酮酸的最适 pH 8.75～9.75，LDH_5 为 8.75，LDH_1 为 9.75，LDH_2～LDH_4 pH 介于 LDH_1 和 LDH_5 之间。提高 pH LDH_1 前会出现非酶活性区带，这是由于血清中的巯基对 NBT 的非特异性还原所致。经实验证实，我们选择最适为 pH 9.2 的条件进行显色反应，同时应用适当的血清用量以减少巯基对 NBT 的还原作用，结果令人满意。

本研究对 LDH-ISO 琼脂糖凝胶在自动电泳分析仪上分离血清时 LDH-ISO 的支持介质、合适的 pH、电泳缓冲体系及酶促反应显色试剂进行了实验研究。最终确定最佳实验条件，完成了 LDH-ISO 琼脂糖凝胶板的制备及酶促反应显色试剂最佳配方的确定。试验结果表明，LDH-ISO 分离结果与进口电泳材料无差异，可以用于电泳自动分析仪。本研究实现了 LDH-ISO 电泳试剂的国产化，降低成本，将有助于 LDH-ISO 电泳自动化和普及。

关键词：乳酸脱氢酶同工酶；自动化；琼脂糖凝胶板
中图法分类号：R446.19　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] JEPPSON J O, LAURELL C B, FRANZEN B. Agarose gel electrophoresis[J]. Clin Chem, 1979,25(4):629－638.
[2] 潘爱萍. 电泳技术的自动化与临床应用[J]. 医学文选,2003,22(6):929－931.
[3] 刘晨梅,郭绍丽,蔡　忠,等. 血清蛋白凝胶电泳自动化分析的应用[J]. 中国医学检验杂志,2004,5(5):487－489.

（编辑　汪勤俭）

《中国学术期刊文摘》中文版和英文版2007年征订启事

《中国学术期刊文摘》分中文版（简称CSAC）和英文版（简称CSAE）两种，各自收录了我国高水平学术期刊中基础科学、医学、农业科学和工程技术领域约40个学科的论文文摘，全景展现我国的科研成果与进展。作为综合性科技类检索刊物，《中国学术期刊文摘》致力于将我国科学技术各领域的原创性学术成果全面、快速地向科技工作者交流、传播，其中CSAE是我国第一份综合性英文版科技类学术检索刊物。

《中国学术期刊文摘》由中国科学技术协会主管，科技导报社主办并负责编辑、出版、发行，对科研单位、高等院校、图书馆以及广大科技工作者检索和了解我国的科技研究成果、学术研究动向具有重要的参考价值。

《中国学术期刊文摘（中文版）》刊号为CN 11－3501/N，ISSN 1005－8923，2007年为半月刊，大16开，国内定价38.00元/册，全年定价912元，邮发代号：82－707。《中国学术期刊文摘（英文版）》刊号为CN 11－5411/N，ISSN 1673－4084，2007年改为月刊，大16开，国内定价15.00元/册，全年定价180元，邮发代号：80－487。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆订阅。

地　址：北京市海淀区学院南路86号科技导报社　　邮　编：100081
联系人：姚玉琴　　电　话：(010)62103122　　E-mail：wzbjb@cast.org.cn