DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.028

进行估计。$A_{260/280}$值应大于 1.8,说明无 DNA 酚和蛋白质残余;同时,该值应小于 2.0,表明 RNA未发生降解。既混有 DNA 酚、蛋白质残余,又已发生降解的 RNA样品,该值也可在 1.8~2.0之间。因此,有必要进行 RNA的甲醛变性电泳以检测 RNA样品的完整性。

SDS-Phenol法是一种细菌总 RNA制备方法,我室将其适当改进后用于动物细胞总 RNA的快速提取,经我们验证,改进 SDS-Phenol法提取的 RNA样品甲醛变性电泳证实 RNA完整性好,蛋白质测定为阴性,纯度略高于 AGPC法,我们已将该法提取的 RNA成功地用于 RT-PCR 斑点杂交、Northern印迹及 Runoff Assay等 RNA分析技术中。若样品 RNA纯度要求还高,可增加一次乙醇沉淀操作,收获的 RNA样品 $A_{260/280}$值可达 1.85±0.03(n=19),纯度达 92%±3% (n=19)。同时,改进 SDS-Phenol法 RNA产量明显高于 AGPC法,特别适用于从少量细胞标本中提取 RNA,如外周血及骨髓新分离的单个核细胞、体液脱落细胞等。改进 SDS-Phenol法也适用于各种细胞培养、大量培养的细菌样品的 RNA提取。总之,该法操作简单,全程只需 2 h,无需超速离心和多次酚-氯仿抽提,是一种快速高效的细胞总 RNA提取方法,值得推荐使用。

关键词 RNA纯化;细胞 RNA
中图法分类号 Q522

参考文献

1 Chomczynski P N. Single-step method of RNA isolated by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987; 162: 156
2 Frederick M A, Roger B, David D M, *et al*. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. Jhohn wiley & Sons. Inc, 1995. 4~7

(收稿: 1998-03-09;修回: 1998-03-27)
(编辑 汪勤俭)

氨气敏电极终点法测定腺苷脱氨酶活性

Assay of adenosine deaminase activity by end-point method with NH_3 sensitive electrode

阳明福* 李 文 张世德 牟绍洪 (第三军医大学医学检验系分析化学教研室)重庆,400038

提 要 目的:建立血清腺苷脱氨酶传感器分析方法。方法:血清样品与腺苷溶液恒温反应 30 min,三氯乙酸终止反应,调溶液 pH值 9.0,氨气敏电极测定,标准曲线法定量。结果:线性范围 5~100 U/L,日内、日间相对标准偏差(RSD)分别为 2.86%、3.92%,平均回收率 101.7%。结论:方法线性范围宽,准确度高,重现性好,且操作简便,无需较多的酶试剂,可用于临床样品测定。

腺苷脱氨酶(Adenosine deaminase, ADA, EC 3.5.4.4)是一种与机体免疫系统有重要联系的核酸分解代谢酶类,可特异性催化腺苷产生不可逆的脱氨反应[1]。近年来,测定体液中 ADA水平对白血病等多种疾病的诊断与鉴别诊断,治疗和免疫功能障碍研究都有重要意义,已被越来越广泛地应用。现行的测定方法主要有 NH_3比色法[2]、酶偶联分光光度法[3,4]和凝胶电泳法[5]。尚未见过传感器进行测定的研究报道。本文以氨气敏电极为传感器,建立了血清腺苷脱氨酶活性的传感器分析方法,准确、精密,成本低,操作简便,适用于临床样品测定。

1 材料与方法

1.1 原理

$$\text{腺苷} + H_2O \xrightarrow{ADA} \text{肌苷} + NH_4^+$$

通过调节溶液的 pH值,使 $NH_4^+ \longrightarrow NH_3$,然后用氨电极测量。$NH_3$的生成量与 ADA活性相关,氨电极的响应值(E)与 NH_3浓度负对数线性相关。故可通过氨气敏电极测定 NH_3浓度而测定 ADA活性。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 PXJ-1-30离子分析仪(萧山科学仪器厂),pNH3-1型氨气敏电极(泰县电分析仪器厂)。

1.2.2 试剂 腺苷、腺苷脱氨酶均为 Sigma产品,KH_2PO_4、

* 阳明福,男,31岁,讲师,硕士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Na_2HPO_4、HCl、NaOH均为分析纯,水为双蒸水。

1.3 方法

1.3.1 氨气敏电极的准备与洗涤 将 NH_3电极中的 pH玻璃电极浸在内电解液(0.1 mol/L NaCl溶液)中活化 2 h,然后装好透气膜,加入内电解液,将活化后的 pH玻璃电极装入,注意 pH电极与透气膜之间不能挤压太紧。再将装好的 NH_3电极在内电解液中活化 5 h,备用。检测过样品的氨气敏电极可插入 pH= 1.0的 HCl溶液中,连续搅拌洗涤。

1.3.2 ADA活性测定 2 ml 6 mmol/L腺苷—磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L KH_2PO_4- 0.1 mol/L Na_2HPO_4),加入 0.2 ml血清样品,混匀 37℃水浴 30 min,加入 0.4 ml 50%三氯乙酸溶液终止反应。然后用 1.0 mol/L NaOH溶液调至 pH值 9.0,再加双蒸水至总体积 10.0 ml,以氨气敏电极为指示电极,饱和甘汞电极为参比电极,插入此溶液后,搅拌 5 min读数。从标准曲线上查得 ADA活性。

单位定义:每升血清标本中 ADA在上述条件下,每分钟解腺苷生成 1μmol/L NH3为 1单位(U/L)。

2 结果与讨论

2.1 最适 pH选择

2.1.1 酶促反应体系的 pH值 在 pH为 4.0~10.0的磷酸盐缓冲溶液中,配成相同浓度腺苷溶液,然后测定同一样品的 ADA活性。结果显示 pH为 7.4的缓冲溶液中酶活性最大。故酶反应均在 pH为 7.4的磷酸盐缓冲溶液中进行。

2.1.2 氨气敏电极测试的 pH条件 取酶反应终止后的溶液 2 ml分别用 1.0 mol/L NaOH溶液调至 pH为 7.4、8.0、9.0、10.0,观察氨电极的响应。在 pH值 7.4~9.0之间,电极响应信号随 pH值升高而增大,pH为 9.0、10.0的两溶液中,电极响应值相差甚微,由于溶液 pH值太高,会导致含氮化合物分解产生 NH_3,影响分析结果的准确与稳定。所以,本文用氨电极测定时,均把待测溶液的 pH值调至 9.0。

2.2 氨气敏电极的响应时间

NH_3从待测溶液中通过透气膜扩散进入内电解液,在内电解液中建立 $NH_3+H^+ \rightleftharpoons NH_4^+$ 的平衡,这些过程均需要时间。因此,不能将电极插入待测液中即读数,需稳定一定时间。实验结果表明,电极插入溶液 5 min内仪器显示数值变化较大,5 min后基本不变或变化甚微。故具体测定时,均在电极插入待测液 5 min后读数。

2.3 标准曲线

称取 ADA标准品(1.5 Unit/mg)于 pH= 7.4的磷酸盐缓冲溶液中,配成 100 U/L溶液。取此溶液用磷酸盐缓冲稀释为 5、10、20、40、60、80(U/L)的酶标准液。将 0.2 ml酶标准液加入腺苷溶液中,再加入 0.1 ml人血清(经过 70℃灭活),然后按 ADA活性测定方法测定。以标准酶活性单位对数为横坐标,电位响应值的负值为纵坐标。电位响应值与 ADA活性之间有良好线性关系,线性范围的活性单位为 5~100 U/L。

2.4 精密度

取一份正常人血清样品,1 d内重复取样测定 10次,测定结果为 22.78± 0.65 U/L,日内相对标准偏差 RSD为 2.68%。样品藏于 4℃,每天测 4次,连续测定 3 d,测定结果为 23.86± 0.94 U/L,日间 RSD为 3.92%。

2.5 回收率

标准加入法进行回收实验。以正常人血清为样品,分别加入 5、10、20、30、40、60(U/L)酶标准液进行测定,结果如附表。

附表 回收实验结果

实验编号	加入酶标(U/L)	回收酶(%)	回收率(%)
1	5	5.22	104.4
2	10	10.36	103.6
3	20	20.78	103.9
4	30	29.31	97.7
5	40	39.4	98.5
6	60	61.20	102.0
平均回收率(%)		101.7	

2.6 应用实例

我们用本法测定了 10个健康人血清样品,结果为 21.34± 0.72 U/L,与文献基本一致。

3 结论

本方法测定血清腺苷脱氨酶,所用仪器简单,操作简便,无需复杂价昂的酶试剂,测定成本低,结果准确可靠。可用于临床非批量样品测定。

关键词 氨气敏电极;终点法;腺苷脱氨酶

中图法分类号 Q557.3

参考文献

1 Akedo H, Nishihara, Shinkai K *et al*. Multiple forms of human adenosine deaminase. Biochim Biophys Acta, 1972, 276: 257

2 叶应妩,王琉三.全国临床检验操作规程.南京:东南大学出版社,1991:211~212

3 伍先托,林果为,丁训杰等.脑脊液腺苷脱氨酶偶联分光光度

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

测定及其临床意义.中华医学检验杂志,1993;16(3):140
4 崔云龙,李 玲,梁 慧等.两点法测定腺苷脱氨酶及临床初步应用.中华医学检验杂志,1994;17(2):19
5 周玉贵,刘昌元,祝正观等.血清腺苷脱氨酶同工酶琼脂糖凝胶电泳测定法.临床检验杂志,1996;14(3):118

(收稿:1997-09-25;修回:1998-06-08)
(编辑 仇玉福)

口服左氟沙星患者血清和胆汁的体外杀菌效价

Bactericidal effects of serum and bile in patients after oral administration of levofloxacin *In vitro*

林 彩* 董 慧 罗 东 陈勇川 白 洁 (第三军医大学附属西南医院药剂科)重庆,400038

提 要 目的:测定口服左氟沙星后的血清和胆汁的杀菌效价。方法:采用微量平板稀释法。结果:左氟沙星对链球菌、变形杆菌、肺炎克雷伯氏菌有强大的杀菌活性,且杀菌作用能维持在8 h以上;对大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌也具有良好的杀菌作用,其杀菌作用也能维持8 h以上,但其血清杀菌效价为1:4,对绿脓假单胞菌的杀菌作用较低,8 h后无作用。结论:左氟沙星对胆道的链球菌、肺炎克雷伯氏菌、变形杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌有较好的杀菌作用,对绿脓假单胞菌作用较差。

左氟沙星(Levofloxacin,可乐必妥)是日本第一制药株式会社于1986年开发的新喹诺酮氧氟沙星的光学活性 L型异构体[S-(-)-OFLX],对革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌有高度抗菌活性[1]。本研究测定9例患胆囊炎、胆管炎、胆结石和施胆囊切除手术并均行胆管引流的患者,应用可乐必妥后的血清及胆汁杀菌效价,旨在了解可乐必妥对常见临床分离细菌的杀菌效价,为临床制定合理的给药方案,提高临床疗效提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 病例选择

9例肝胆外科住院者。男性2例,女性7例;平均年龄47±15.1(23~66)岁;平均体重54.7±8.0 kg(44~68 kg)。

1.2 抗菌药物

可乐必妥片100 mg/片(日本第一制药株式会社)。

1.3 培养基

液体 M-H培养基和固体 M-H琼脂培养基(中国药品生物制品检定所)。

1.4 给药方法和标本收集

每位受试患者在试验前1周停用抗生素,分别口服可乐必妥片,剂量均为200 mg,分别于给药后1.5 h(峰时)和8 h(谷时)采取血标本;于给药后3~4 h(峰时)及6~8 h(谷时)收集胆汁标本,将血和胆汁标本3000×g离心,分离上清液,置4℃冰箱保存待测。

1.5 菌液配制

78株受试菌均由西南医院细菌室从临床标本分离,经细菌室常规鉴定,包括大肠埃希氏菌9株,金黄色葡萄球菌24株,绿脓假单胞菌10株,链球菌10株,变形杆菌9株,肺炎克雷伯氏菌13株。以金黄色葡萄球菌(ATCC25923),大肠埃希氏菌(ATCC25922),绿脓假单胞菌(ATCC27853)为标准菌株质控。

受试菌除链球菌转入含5%脱纤维兔血平板,其余均转入营养琼脂斜面上经37℃培养24 h再分别接种于 M-H培养液中,37℃增菌2~3 h,然后以 M-H培养液稀释为10^5 CFU/ml浓度的菌悬液。

1.6 杀菌效价测定方法

采用微量平板稀释法,将血清和胆汁用 M-H培养液(链球菌用含5%脱纤维兔血 M-H培养液)倍比稀释成不同浓度,取50μl各系列浓度血清或胆汁以及50μl菌悬液,接种于96孔平皿中,振荡混匀,经37℃培养24 h,次日将未长菌小孔内容物接种于不含抗菌药物的 MH平皿上(链球菌接种于含5%脱纤维兔血 MH平板上),37℃再培养24 h,以未见细菌生长的最低血清或胆汁稀释度为杀菌效价。

1.7 数据处理

分别统计应用可乐必妥后的血清和胆汁的峰时及谷时对每类细菌的杀菌效价的中位数。

2 结果

六类细菌中,可乐必妥对链球菌、变形杆菌、肺炎克雷伯氏菌的胆汁杀菌效价最高(1:32~>1:256),血清杀菌效价也最高(1:8~1:16),杀菌效价能维持8 h以上;对大肠埃希氏菌和金黄色葡萄球菌的胆汁杀菌效价较高(1:8~1:16),其杀菌作用也能维持8 h以上,但血清杀菌效价为1:4,对绿脓假单胞菌的杀菌效价较低,8 h后无作用,且效价低于治疗水平,故建议

* 林 彩,女,32岁,主管药师,学士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net