DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.03.032

猪肾组织谷氨酰胺生物传感器的研制

邵 方 (第三军医大学训练部化学教研室) 630038
府伟灵 时凤丽 (第三军医大学西南医院检验科) 630038

脑脊液(CSF)中谷氨酰胺(Gln)含量的测定在临床医学分析中具有重要意义[1]。传统的纳氏比色分光光度法费时、费事,且所需试剂昂贵。本文报告的猪肾组织切片谷氨酰胺生物传感器制作方便,操作简单,测量迅速且价廉,可以直接用于临床 CSF 中 Gln 的测定。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

1.1.1 主要仪器

1.1.1.1 SL-3 型数字显示离子计(苏州标准局实验厂)

1.1.1.2 PNH_3-1 型氨气敏电极(上海电光器件厂)

1.1.1.3 江湾-Ⅰ型振动式切片机(上海二医大)

1.1.1.4 Millipore 超纯水仪(日本)

1.1.2 试剂

除专门说明外,实验所用溶液均为去离子水(R≥16MΩ)和分析纯试剂配制而成。

1.2 生物组织传感器的制备

1.2.1 猪肾组织的预处理

取新鲜公猪肾一只,用手术刀将皮质部切成截面为 $1cm^2$ 的长条,经 4℃的生理盐水洗净积血后于-20℃下冰冻保存备用。

1.2.2 猪肾切片及组织电极的安装

将冰冻的猪肾皮质部组织条用振动式切片机切成 0.2mm～0.6mm 的薄片,用双层单丝尼龙网(150 目)夹住该组织片,在 20%的甘油 PBS 液中浸泡 5 秒钟,再同气透膜一起装入氨气敏电极端部,并将其浸泡在活化缓冲液(0.1mol/L PBS,pH=7.80,0.02% NaN_3)中,于 4℃活化一昼夜即可待用。每次测量前,电极需在工作缓冲液(0.1mol/L PBS,pH=7.80,0.02% NaN_3,0.001mol/L 碘代乙酸)中洗至空白电位低于-60mV 方可进行测量。

2 结果

2.1 校正曲线

该传感器具有如下响应特征:

线性范围:7.08×10^{-5}mol/L～1.12×10^{-2} mol/L;

检查限:3.24×10^{-5}mol/L(下限),2.45×10^{-2} mol/L(上限);

斜率:52.1mV/de cade;

线性范围对数回归得:截距为 175.1mV,斜率为 52.9,相关系数等于 0.9989。

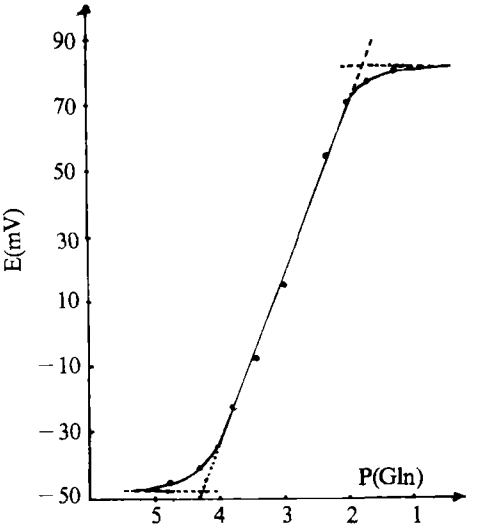


图 1 谷氨酰胺校正曲线

测试液:0.1mol/L PBS,0.02% NaN_3,0.001mol/L 碘代乙酸。pH=7.80

2.2 响应速度

该传感器在线性范围内响应时间均在 4～8min 以内,表明它具有较快的响应速度。

2.3 温度与 pH 的影响

实验发现,使用该传感器进行测量时,待测液最适温度为 26℃,最适 pH 为 7.80。

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

2.4 选择性

该传感器兼有气敏电极气透膜高选择性和谷氨酰胺酶高度专一性的优点，因而在其线性范围内，12 种可能共存物：L-谷氨酸、L-丙氨酸、L-缬氨酸、L-精氨酸、L-丝氨酸、L-组氨酸 、L-半胱氨酸、L-天门冬氨酸、甘氨酸、L-天冬氨酸、尿素和肌酐的响应值均在-60mV 以下，其干扰可忽略不计。主要干扰来自于 CSF 中葡萄糖酵解所产生的 CO_2。我们采取的解决办法是：(1)控制溶液的 pH 为 7.80，抑制糖酵解酶的活性。(2)在工作液中加入巯基抑制剂—碘代乙酸，抑制糖酵解[5]。实验结果见图 2。

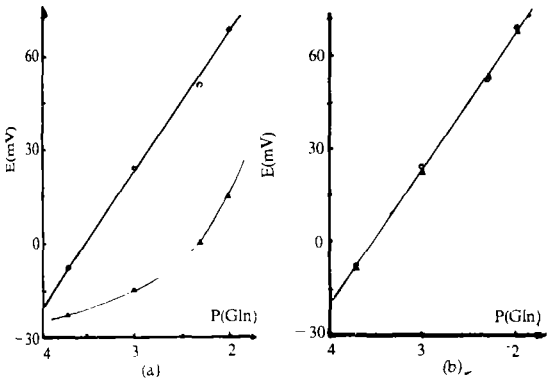


图 2 (a)未加碘代乙酸时 Gln 校正曲线；(b)加有 1mmol/L 碘代乙酸时 Gln 校正曲线

"0"示在缓冲液中测试点；"△"示在加有 3mmol/L 葡萄糖的缓冲液中测试点。

2.5 重现性与回收率

在 2×10^{-4}mol/L～1×10^{-2}mol/L 范围内重现性实验表明，该传感器最大变导系数为 3.17%，回收率为 95.7%～102.8%。能够满足一般临床医学常规分析的要求(附表)。

附表 实验重现性与谷氨酰胺回收率

Gln 浓度 (mol/L)	平均电位响应 (mV)	标准差 (s)	变异系数 (%)	回收率 (%)
2×10^{-4}	-21.8	0.80	3.67	95.7
1×10^{-3}	15.3	0.23	1.50	96.1
1×10^{-2}	69.8	0.60	0.86	102.8

2.6 寿命实验

该传感器在 32d 内，连续测定 120 次以上，响应特性无显著变化，校正曲线呈平行下移趋势，斜率在 51±2 内变化。结果见图 3。故每日测定前，需用标准点进行抽查，我们实验发现，最长不过 3d 必须重做标准曲线，否则难以获得理想的实验结果。

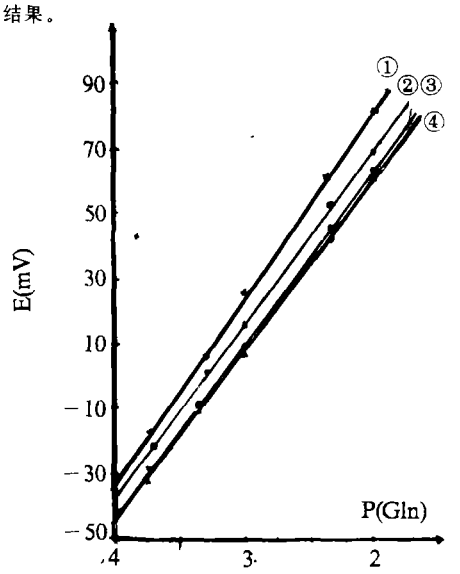


图 3 标准曲线随时间变化图

(1)、(2)、(3)、(4)4 条曲线分别为电极制好后第 6、10、14、16d 所测曲线。

3 讨论

本文报道的猪肾组织谷氨酰胺生物传感器对国内现有的这类传感器[3][4]作了多方面的改进：把使酶活性损失较大的戊二醛固定液换成了较温和的甘油固定液，从而提高了电位响应值和检测灵敏度，扩宽了检测范围；更换 Tris-HCl 缓冲液为 PBS 缓冲液，提高了需磷酸型谷氨酰胺水解酶的活性；我们还特别注意了 CSF 中葡萄糖酵解产生的 CO_2 对测定的干扰，首次选用了国内易得的碘代乙酸为糖酵解酶抑制剂[2][5]，从而消除了糖的干扰，使得该传感器可直接用于 CSF 中 Gln 的测定，具有一定的临床应用价值。

关键词 谷氨酰胺；生物传感器；猪；肾；脑脊髓液

参考文献

1. 肖镇详。临床脑脊液学。北京：人民卫生出版社，

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

1983;73
2. Rechnitz CA, Arnold MA, Meyerhoff ME. Bio-selective membrane electrode using tissue slices. Nature, 1972;278:466
3. 王德才 马文科 许春向。谷氨酰胺组织传感器的研究。中国电子学会敏感技术学会第一届学术论文摘要集 1987;12(B06)
4. 顾文照。生物传感器的研究进展。中国药科大学学报 1988;19(3):216
5. 狄克松 M,威勃 EC 著,戚正武 杨福愉 王忠炎,等译。酶。上海:上海科学技术出版社,1964:353

(收稿:1991-10-15;修回:1992-02-13)

(上接 245 页)

给予强的松 15mg/晨,优降糖 2.5mg/早、晚,降糖灵 75mg/d,血糖在 2 周后缓降至正常范围,尿糖转阴。半月后,多次在午夜 2～5 时出现心悸、大汗、头晕,两次测得血糖为 3.0mmol/L、5.6mmol/L,随即停用全部降糖药,半月后仍有上述症状,但程度略减轻,在排除饮食和药物因素后,连续测定夜间 23 时、1 时、3 时、7 时血糖,生长激素、胰岛素、糖皮质激素,胰高糖素水平,结果:血糖 1.44～3.6mmol/L, 血浆皮质醇分别为:66.21nmol/L、38.63nmol/L、33.12nmol/L、41.4nmol/L,余激素水平正常。皮质醇节律测定呈低水平曲线,晨 8 时无峰值。尿 17-OH 及 17-KS 明显低于正常。因缺药,未行 ACTH 兴奋试验。依检查及临床表现,诊断:多腺体自身免疫综合征Ⅰ型。经调整强的松剂量与用法,中、晚餐前服 D_{860}0.5g,患者白天高血糖得到控制,夜间低血糖现象消失,症状改善出院。

讨论

多腺体自身免疫综合征(PGAS)是指患一种内分泌腺功能减退的病人伴有另一种或多种其它内分泌靶腺特异性或/和非器官特异性自身免疫性疾病。其中甲状腺、甲状旁腺、肾上腺、胰岛及性腺最易受累。根据受累器官不同常分Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型。本例根据患者有甲亢、皮肌炎和肾上腺皮质功能减退,诊为 PGAS Ⅱ型。较特殊的是通过寻找低血糖原因而发现了肾上腺皮质功能减退,而此时尚未出现皮肤色素沉着。低血糖是慢性肾上腺皮质功能减退常见的症状,临床上常因表现不典型而被忽略,本例低血糖突出,在于患者同时存在 NIDDM,按常规剂量投入了降糖药,使低血糖表现明显化。

PGAS 是一种自身免疫性内分泌疾病,从大量的研究已得到证实[2][3][4][5]。由于各腺体病变出现可前可后,表现变化不一,诊断十分困难,提高对本病的认识非常重要。治疗上无固定模式,具体病人具体对待。若患者抗体滴度高可考虑用免疫抑制剂、血浆置换[1]。

关键词 内分泌疾病;肾上腺皮质疾病

参考文献

1. 徐晨 张孔潜。自身免疫多内分泌病综合征。国外医学:内分泌分册 1985;4:202
2. Trence DL, Morley JE. Poly-glandular autoimmune syndromes. Am J Med 1984;77(1):107
3. Loriaux DL. The polyendocrine deficiency. New Engl J Med 1985;312(24):1568
4. 彭汇生。自身免疫性垂体炎。国外医学:内分泌分册 1988;3:146
5. Mulaisho C, Magbool G. Evolution of polyglandular autoimmune syndrome type I in a Saudi Arabian family. Ann Saudimed 1988;6:449
6. Papadopoulos KI, Hallengren B. Polyglandular autoimmune syndrome type II in patients with idiopathic Addison's disease. Acta Endocrinol 1990;122(4):472

(收稿:1991-05-03;修回:1992-02-10)

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