DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.05.012

PRc测定时则以0～4℃孵育时SB最高，最稳定；25℃和37℃孵育下SB均不稳定，随孵育时间延长，SB迅速降低，与刘以训[2]的观点相符，即受体是一种热不稳定的蛋白质，遇热后受体破坏，孕酮受体尤为娇嫩。

通过对上述条件的摸索，我们认为人子宫内膜ERc、PRc的测定条件与大鼠子宫ERc、PRc测定条件基本相同。在ERc测定时胞浆蛋白浓度在较大范围内不影响测定结果，因此在临床上取材少的情况下，可将胞浆稀释至0.5～2 mg/ml的低蛋白浓度水平，不影响结果，在25℃孵育2～3 h可测得高水平的SB，而且节约时间，也可在0～4℃下孵育2～16h，测得较高水平的SB。PRc测定时，过去认为由于PRc的含量高，可以用较低浓度胞浆蛋白的胞浆进行测定，我们的结果表明，在1～3 mg/ml胞浆蛋白浓度时，随胞浆蛋白浓度升高，SB进行性增高，因此在胞浆蛋白浓度在此范围内测得的SB是不可靠的，这一点值得注意。PRc的测定宜采用0～4℃孵育，以免受体受热破坏，孵育时间以3～4 h为宜，即缩短实验时间，又保证了结果的可靠，与Mackland[3]的结果相一致。

总之，我们认为DCC法测定ERc、PRc是一种简便易行的方法，所需样本少，实验周期短，并且由于各项影响实验结果的因素容易控制，故方法稳定，测定结果可靠，为临床科研及诊治疾病中可行而实用的一种新的检测手段。

参考文献

1. 陈贵安，等。中华妇产科杂志 1984；19：88
2. 刘以训。生殖与避孕。1978；1(2)：53
3. McGuire WL, et al. Progesterone Receptors in Normal And Neoplastic Tissues. Raven Press, New York, 1977:23～38

(收稿：1988.1.7，修回：1988.6.25)

PVC固定化脲酶膜测定尿素氮的研究

王厚行（野战外科研究所中心室）

临床测定尿素氮常用二乙酰乙肟法，因其要在强酸中煮沸、有异味，特异性、重复性、稳定性均欠佳而深感不便[1]。用Berthelot氏脲酶法测定尿素氮则有反应条件温和、准确、特异、稳定、灵敏的优点；但是脲酶昂贵，而且其活性中心的-SH基极其容易与重金属离子结合而使酶失活，因此对水质和器具的处理要求甚高。为了克服这些缺点，作者试图研制贮存期及使用寿命长的PVC固定化脲酶膜以代替天然脲酶。现将初步结果报告如下。

一、试剂

1. PVC固定化脲酶膜：本室制备。脲酶由四川省校办企业公司生化试剂一厂购得。本研究使用者为3 mg脲酶/11mg膜重。

2. Berthelot氏脲酶法测定尿素氮的试剂参照文献(2)配制。其中，硫酸铵标准溶液与尿素氮标准溶液亦用相应pH值的20mmol/L磷酸盐-10 mmol/L EDTA缓冲液（以下简称缓冲液）配制和稀释。

二、操作

1. 酶活力测定及尿素氮含量测定参照文献(2)。

2. Km值计算按Lineweaver-Burk作图法。

三、结果与讨论

1. 酶膜稳定性 天然脲酶在室温很快

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

失活。而酶膜在室温保存2个月仍有很高活力。在缓冲液中浸泡20天，第一次测定与第77次测定相比，活力仅下降15%。

稳定性是关系到固定化酶能否实际应用的重要问题。在大多数情况下，酶经固定化后，稳定性都有所增加[3][4]：粗酶制剂中常含有蛋白分解酶，从而使酶的失活加速；酶一经固定化后由于载体的立体障碍使蛋白分解酶难以接近。载体为酶提供了保护层，以防止引起酶失活的因素所致的构象变化。此外，固定化酶的局部酶浓度较高，这种局部总蛋白浓度升高本来就有增加稳定性的作用；大多数固定化酶的高酶载量亦意味着在正常情况下只有部分酶参加反应，因而部分酶失活后，仍有充分数量的酶参加反应。

2. 最适pH　在37℃、在不同pH的缓冲液中，使天然脲酶作用于尿素，测得最适pH为8。用酶膜代替天然脲酶，测得表观最适pH为7.5。见图1。

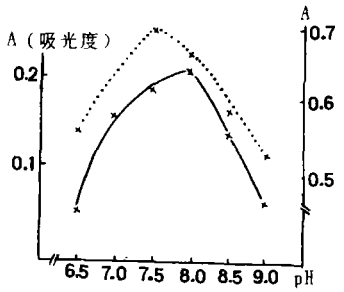


图1　天然脲酶pH-活性曲线
（实线；左侧纵座标）
PVC固定化脲酶膜表观
pH-活性曲线
（虚线；右侧纵座标）

固定化酶根据载体、酶载量、形状等，其表观最适pH与天然酶相比或碱移或酸移或不变。就固定化脲酶膜而言，因其在pH9.3以下的酶促反应中吸收H^+，使其酶膜的pH高于外部溶液，因而使表观最适pH低于天然脲酶。在本研究中PVC固定化脲酶膜的表观最适pH酸移0.5。同样的现象也有其他作者报告[5][6]。

$$O=C\begin{matrix}\diagup NH_2\\ \diagdown NH_2\end{matrix}+H^+\xrightarrow{2H_2O}2NH_4^+ + HCO_3^-$$

3. Km值　用Berthelot氏脲酶法测定尿素（37℃、pH8.0、20mmol/L磷酸盐－10mmol/L EDTA缓冲液）时脲酶的Km未见报道。本研究测出为6.6mmol/L。与Carr[7]报道的4 mmol（pH6.7～7.6）、试剂手册[8]所载4 mmol/L（pH8.0、Tris缓冲液）相近似。而PVC固定化脲酶膜的表观Km亦未见报道，本研究测得为25mmol/L（37℃、pH7.5、20mmol/L磷酸盐－10mmol/L EDTA）。见图2。

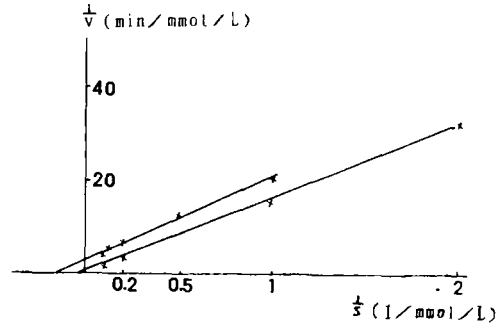


图2　脲酶固定化前后的Lineweaver-Burk图
上线：天然脲酶；下线：PVC固定化脲酶膜

学者们[9][10]认为固定化酶由于基质和产物的扩散限制，其表观Km大都有增大的趋势。尽管酶膜的扩散限制小，亦都增大。本研究测得的PVC固定化脲酶膜的表观Km比天然脲酶的Km约大4倍，与之相符。

4. 正常值　30例献血员血清尿素氮正常值为5.23±1.16mmol/L。与折田[11]等报告的5.01±1.11mmol/L基本一致，而高于杨开祺[1]等报告的数值（男4.28±0.94mmol/L，女4.24±0.93mmol/L）。

5. 重复性试验　17.85mmol/L尿素氮标准液重复测定18次，按吸光度(A)的平均值为17.85mmol/L，SD为0.88mmol/L，CV为4.9%。同一份血清重复测定10次，$\bar{X}$为9.66 mmol/L，SD为0.85mmol/L，CV为8.1%。

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

6. 回收试验：用4个不同含量的血清标本，加入1.78mmol/L尿素氮，其回收率在93～94%。

方法学研究的初步结果证明本法的精密度和准确度良好，可适用于临床常规检验工作；但提示血清中有干扰本实验的物质存在。为此，作者探讨了各种空白管，发现不加酶膜的血清空白与不加酶膜的水（无氨）或标准液空白相比，其A值高0.01～0.04，相当于0.46～1.89mmol/L。因此，测定标准时应以标准液或水为空白，测定血清时应以混合血清为空白。此外，溶血、脂血血清，只要单独做空白，对试验结果无干扰，与用天然脲酶时的情况一致[11][12]。本法亦适用于EDTA抗凝血浆标本。考虑到所有固定化酶都有活力衰减的趋势，只是固定化方法不同衰减有快、慢之分。因此，本法不适于用标准曲线查对，而要在每批标本测定时附一个标准管。

本文是研究固定化酶及其临床应用的初步尝试。从初步结果可见，本文报告的方法是一种颇有潜力的新型方法。但是作者认为从基础到临床应用都还有许多问题需要进一步研究。

（本文曾在1986年全军生化专业组学术会议、全国工业生化学术会议报告；实验工作由李青同志完成。）

参 考 文 献

1. 杨开祺等。一种准确、快速、微量尿素氮测定法—脲酶靛酚反应。陕西医药资料（检验专辑） 1985；3:34
2. Kaplan A, et al. Serum Urea (Urease-Berthelot). Selected Methods of Clinical Chemistry, Vol. 9 (ed. Faulkner WR, et al). Washington, DC American Association for Clinical Chemistry, 1982: 357
3. 千畑一郎。固定化酶（胡宝华等译）。河北人民出版社 1981:139
4. Trevan MD. Immobilized Enzyme. Chichester. John Wiley & Sons 1980:18
5. Thomas D, et al. Biochimie 1972; 54:229
6. Konecny J, et al. Biochim Biophys Acta 1975; 403:573
7. Carr PW, et al. Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemisty. New York, John Wiley & Sons 1980:183
8. 上海化学试剂采购供应站。试剂手册。上海科学技术出版社 1985:1274
9. Wingard, LB, et al. Immobilized Enzyme Principles. New York, Academic Press 1976:128
10. Goldstein, L. Methods of Enzymology. Vol. XLIV (ed: Mosbach K). New York. Academic Press 1976:397
11. 折田义正·他。尿素窒素（BUN），非蛋白窒素。日本临床 1985(增刊):234
12. 刘泽民，等。血清尿素氮的酶法测定。临床检验杂志 1988；4(3):134

（收稿：1987.7.29，修回1988.6.29）

一种塑料包埋制备骨磨片的新方法

刘晓霞 钱湘文（野战外科研究所）

塑料包埋组织学技术，在国内外得到越来越广泛地应用。我们在Bancroft[1]工作的基础上，利用甲基丙烯酸甲酯（MMA）对骨穿透力甚强，并能牢固支持组织以承受磨片，适用于较大骨组织包埋的优点，总结出一种塑料包埋制备骨磨片的新方法，其包埋介绍如下：

一、固定

福尔马林贮藏性极佳，渗透迅速，组织能长期承受浸渍，对面积较大的骨组织块效果较好，所以

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