

血清胆红素的酶法定量分析

王菊君 白玉芬 曹恩华

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

胆红素的测定是临床诊断的一项重要指标^[1]。目前, 临床上测定胆红素多数采用重氮试剂法, 影响因素很多^[2]。寻找新的测定方法具有现实意义。自1987年我们开始了胆红素氧化酶的研究, 已从我国土样中筛选到一株疣孢漆斑菌J-1, 培养后分离纯化, 得到了胆红素氧化酶。此酶具有潜在的临床应用价值^[3]。本文主要介绍胆红素氧化酶的一些特性及血清胆红素酶法分析新方法。

材 料 和 方 法

一、胆红素氧化酶 由J-1菌株产生, 经QAE-Sephadex A50等分离纯化的胆红素氧化酶, 配成10—20IU/mL溶液, 备用。

二、胆红素标准液的配制 精确称取10.1010mg胆红素(Fluha Co., 99%)加入1mL二甲基亚砜, 3mL 0.1mmol/L NaHCO₃溶液溶解, 然后加入4%人血清白蛋白溶液80mL, 2mL 0.1mmol/L HCl混合, 最后用4%人血清白蛋白溶液稀释至100mL, 即成10mg/dL的胆红素标准液, 避光, 2—8°C保存。(为了保存较长时间, 也可以制备成干粉, 使用时, 加入适量水复溶, 用新鲜配制的胆红素标准液标定后, 作为标准使用。)

三、胆红素氧化酶活性测定 1mL 0.1mol/L磷酸缓冲液pH=7.0加胆红素标准液0.05mL, 37°C保温5min, 然后加入一定量酶液, 立即测定440nm OD值的变化, 计算酶活性。酶活性单位定义为在37°C, 每分钟能催化氧化胆红素产生1 μ mol/L的胆绿素的酶量为1个单位。

四、血清胆红素(总胆红素)的含量测定 具体操作如Table 1。

Table 1

	Blank	Sample		Standard	
		A ₁	A ₂	S ₁	S ₂
Buffer (μ L)	1050	1010	1000	1010	1000
Enzyme (μ L)	10	0	10	0	10
Standard (μ L)	0	0	0	50	50
Serum (μ L)	0	50	50	0	0

Table 1 中各溶液混合均匀, 37°C保温 5 min, 以空白管调零, 测定各管在 440nm 吸光值, 样品中胆红素含量(mg/dL) = $\frac{A_1 - A_2}{S_1 - S_2} \times \text{标准浓度}$ 。测定是在Hitachi U-3200紫外分光光度计上进行。定值血清购自 BM CO. 及 Beckman CO.

结果与讨论

Fig.1 表明, 胆红素经胆红素氧化酶作用后, 生成胆绿素, 其460nm吸收峰消失, 出现胆绿素两个特征峰即 390nm 和660nm。这和薄板层析的结果一致。上述反应 5 min 内即可达到平衡, 在 1 h 内很稳定 (Fig.2)。此酶具有很好的特异性, 如果以它对胆红素的作用为100% 那么它对胆绿素的作用仅为 2%, 对血红蛋白无作用。Fig.3、Fig.4 表明, pH = 7 时, 显示最高的酶活性。在 40°C 反应速率最快, 直至 60°C。30—45°C 酶可以稳定30min。

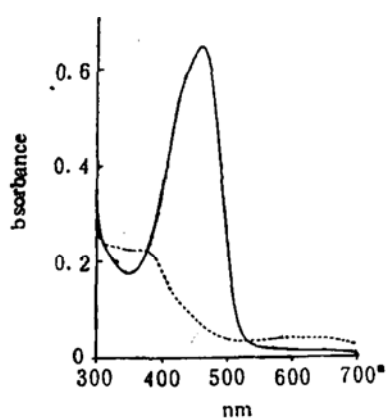


Fig.1 Absorption spectra of bilirubin in phosphate buffer (—) and after oxidation with bilirubin oxidase (.....), 0.14U/mL

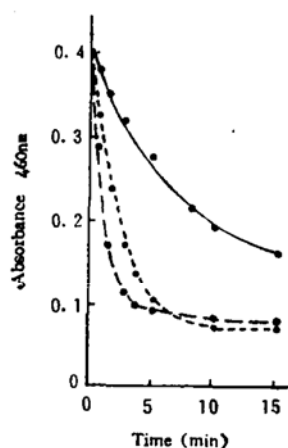


Fig.2 Dynamic reaction curve of bilirubin oxidase. —, 0.05U/mL, , 0.14U/mL, ---, 0.33U/mL bilirubin, 4μg/mL

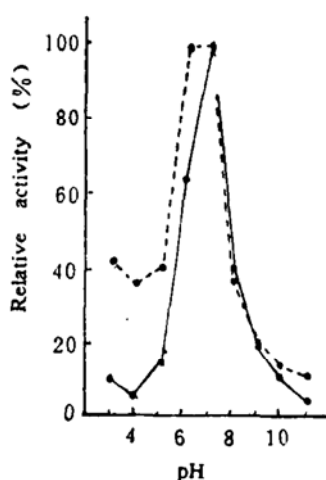


Fig.3 Effect of pH on bilirubin oxidase activity
—, buffer with sodium cholate, ----, buffer without sodium cholate

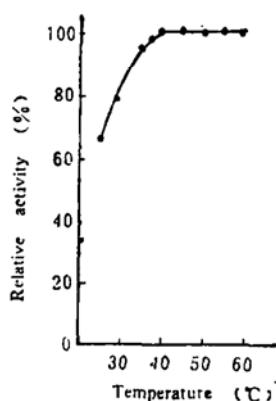


Fig.4 Effect of temperature on bilirubin oxidase activity

胆红素经胆红素氧化酶催化反应生成胆绿素,其440—460nm吸光度的降低与胆红素的浓度成正比,线性浓度范围为0—20mg/dL。根据此原理,我们设计了用胆红素氧化酶测定血清胆红素的新方法。由Table 1可见,酶法测定结果与重氮试剂法一致,相关系数 $r = 0.999$, $Y = 0.957x + 0.174$ 。Table 2显示了不同单位对不同来源定值血清的测定,结果都在定值范围之内。测定10份样品,批内CV=2.58%,批间CV=3.87%,天与天之间(10天)重复试验CV=3.64%。测定正常值(成人)范围0.1—1.0 mg/dL。血清中还原性物质如Vc常用的抗凝剂,一些药物如氨茶碱、氨苄青霉素、咖啡碱、庆大霉素以及血红蛋白等对测定无干扰。

Table 2 Comparison of results with 2 different methods

Serum	Total bilirubin (mg/dL)	
	Enzymatic method	J-G method
1	1.92	1.96
2	2.44	2.56
3	2.51	2.56
4	2.56	2.85
5	3.56	3.61
6	3.58	3.61
7	9.56	9.25

Table 3 Results determined by different Laboratories

Serum	Total bilirubin (mg/dL)	
	Assigned Value	Enzymatic method
1	2.6	2.51, 2.46, 2.48
2	3.6	3.66, 3.58, 3.61
3	10.0	9.50, 9.53, 9.56
4	4.61	4.46
5	4.9—6.0	5.03

1-3, The results determined by National Clinical Test Center.

4, The results determined by Xie He hospital.

5, The results determined by Beijing Clinical Test center

综上所述,我们利用自己筛选的菌种,分离得到了胆红素氧化酶,由此建立的酶法测定血清胆红素的新方法操作简单、结果稳定、专一性好、精密度也很高,有临床应用前景。

参 考 文 献

- [1] Meisels M J. in Neonatology, Ayerg, G.B. Ed, Lippincott, Philedelphia, 1981 p, 473-544
- [2] 孟泽. 中华医学检验杂志, 1982, 5, 32
- [3] Murao S, Tanaka N., *Agric Biol Chem*, 1981, 45:2383
- [4] Cowger M L. *Biochem Med*, 1971, 5, 146
- [5] Lavin a et al. *Science*, 1985, 230:543
- [6] Otsuji et al. *Clin Biochem*, 1988, 21:33

Enzymatic Quantitation of Bilirubin in Sernm

Wang, Ju-jun Bei, Yu-fen Cao, En-hua

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100080)