

率明显低于观察组,两组患者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 两组 PEF 治疗前后比较 见表 3。观察组与治疗组在改善 PEF 方面差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 两组疗效比较					
组别	<i>n</i>	显效	有效	无效	总有效率(%)
观察组	30	18	5	7	76.7
治疗组	30	22 ^a	7	1 ^a	96.7 ^a

注:与观察组比较,^a $P<0.05$ 。

表 2 两组不良反应比较					
组别	<i>n</i>	肌肉震颤	心律失常	恶心	总发生率(%)
观察组	30	3	2	6	36.7
治疗组	30	0 ^a	1	2 ^a	10.0 ^a

注:与观察组比较,^a $P<0.05$ 。

表 3 两组 PEF 治疗前后比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	治疗前 PEF(L/min)	治疗后 PEF(L/min)	<i>P</i>
观察组	30	181.25±10.56	270.14±13.79	<0.05
治疗组	30	183.75±11.37	277.43±14.82	<0.05

3 讨 论

中度哮喘发作时主要雾化吸入速效 β_2 受体激动剂和激素,在此基础上联合应用茶碱类药物可迅速缓解患者的症状。茶碱具有舒张支气管平滑肌作用,并具有强心、利尿、扩张冠状动脉、兴奋呼吸中枢和呼吸肌等作用^[4]。有研究资料显示,低浓度茶碱具有抗炎和免疫调节作用。作为症状缓解药,尽管现在临床上在治疗哮喘时仍然静脉使用茶碱,但短效茶碱治疗哮喘发作或恶化还存在争议,但是它可能改善呼吸驱动力。茶碱

虽然有扩张支气管的作用,但其不良反应较大。在治疗哮喘时应在使用茶碱时联合雾化吸入治疗以减少茶碱用量,防治茶碱中毒的概率。本文研究结果显示,应用多索茶碱与氨茶碱对患者进行治疗,患者临床症状与体征均能够明显改善,而多索茶碱其有效率却明显的高于氨茶碱,两组患者均具有一定的不良反应发生率,此外口服氨茶碱伴有恶心、呕吐、心悸、心律失常、血压下降、抽搐、惊厥,少数人可有兴奋失眠等^[5]。但治疗组不良反应显著低于观察组,这与相关的文献报道相一致^[6]。但其不良反应的发生率却明显的低于氨茶碱。多索茶碱与传统的茶碱类药物进行对比,安全有效,费用也不高,不良反应明显减少,应予临床普遍推广应用。

参考文献

[1] Khalil D, Hirota J, Nair P. Cholinergics, airway eosinophils and asthma exacerbation in the elderly[J]. Indian J Chest Dis Allied, 2011, 53(1): 59-61.

[2] 林江涛. 我国支气管哮喘防治指南解读[J]. 中国药物应用与监测, 2011, 6(8): 131-135.

[3] 程新军, 邢晓龙. 氨茶碱与多索茶碱治疗轻中度支气管哮喘疗效比较[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2010, 31(16): 2589-2590.

[4] Wu L, Brazel CS. Surface crosslinking for delayed release of proxiphylline from PHEMA hydrogels[J] Int J Pharm, 2008, 349(1/2): 53-55.

[5] 王薇. 氨茶碱的临床应用与用药安全[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(8): 140-141.

[6] 高曼妮. 多索茶碱与氨茶碱治疗慢性阻塞性肺病疗效对比[J]. 浙江临床医学, 2010, 12(9): 979-980.

(收稿日期: 2012-02-15)

• 临床研究 •

神经元蛋白含量测定方法的比较研究

魏 聪¹, 刘远程¹, 刘 寒^{2△} (泸州医学院: 1. 附属中医医院检验科; 2. 电教中心, 四川泸州 646000)

【摘要】 目的 为培养的小鼠神经元蛋白质含量测定选择最佳方案。方法 采用四种较为常用的蛋白质含量测定方法: 考马斯亮蓝法(Bradford)、酚试剂法(Lowry)、二喹啉甲酸(BCA)和 Bio-Rad DC 法分别对培养的小鼠神经元全细胞蛋白质提取样品进行测定, 并对结果进行比较。结果 蛋白质含量测定及重复性实验对比分析可见, 用 Bradford、BCA 和 Bio-Rad DC 法测定神经元蛋白质样品, 结果均较稳定; 而 Lowry 法不稳定。结论 确定神经元蛋白含量的最佳测定方法为 Bio-Rad DC 法。

【关键词】 双向电泳; 蛋白质含量测定; 酚试剂法

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 14. 030 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)14-1738-03

双向电泳(2-DE)作为蛋白质组研究的三大核心技术之一, 是目前分离复杂蛋白质组分最常用的工具。而蛋白质样品的制备及蛋白质含量的测定则是双向电泳的基础。在双向电泳之前必须对蛋白质含量进行测定以确定蛋白质的上样量, 如果测定结果不精确会对蛋白质电泳的结果造成相当大的影

响^[1]。因此, 蛋白质含量测定是蛋白质组分析中一项基本而重要的环节。

由于不同组织、不同细胞中的蛋白质的差异具有统计学意义, 它们对蛋白质含量测定方法也有不同的要求。针对不同的组织细胞如何选择一种适合、简便、快速、灵敏的蛋白质含量测

△ 通讯作者, E-mail: zcy_2004_116@tom. com。

定方法就成为首先要解决的问题。目前蛋白质含量的测定方法有十几种,一般实验室中最常用的是考马斯亮蓝法(Bradford)、酚试剂法(Lowry)、二喹啉甲酸(BCA)和 Bio-Rad DC 法。为了比较这几种方法在神经细胞蛋白样品测定中的优缺点,本研究采用以上 4 种方法分别测定培养的成年小鼠神经细胞蛋白质含量并进行比较,最后通过十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进一步验证测定结果,为神经元蛋白质含量测定选取适宜的测定方法,为后续实验研究提供有力的技术保障。

1 材料与方法

1.1 试剂 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、过硫酸铵、标准蛋白、尿素、酚试剂、两性电解质(Biolyte)、SDS、磷酸三丁酯(TBP)、丙磺酸(CHAPS)、四甲基乙二胺(TEMED)、Bio-Rad DC 蛋白测定试剂盒,均购自 Bio-Rad 公司;G-250 为 Sigma 公司产品;其他常用试剂为国产分析纯。

1.2 溶液配制

1.2.1 细胞裂解液 4%CHAPS, 8 mol/L 尿素, 1% TBP, 0.5%Biolyte 由纯水配置而成。

1.2.2 固定液 50%甲醇, 10%乙酸, 40%蒸馏水。

1.2.3 显色液 0.25% Bradford G-250, 由固定液配置而成。

1.2.4 标准蛋白 用细胞裂解液将标准蛋白配制成浓度为 5 mg/mL 的母液, 临用前稀释为 2 mg/mL。

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白质的提取 用含 0.02%EDTA 的 0.25%的胰酶收集培养瓶中小鼠神经细胞^[2], 1 500 r/min 离心后取细胞沉淀, 按 1:5 的比例加入细胞裂解液, 4℃震荡 30 min。4℃, 12 000 r/min 离心 1 h, 收集的上清液即为蛋白质提取物。分装, -80℃保存备用。

1.3.2 蛋白质含量的测定

1.3.2.1 Bradford 法 以不含 Biolyte 的细胞裂解液为空白, 2 mg/mL 标准蛋白作标准, 按参考文献[3]操作, 测定神经细胞的蛋白质含量。每个样本为三复孔, 取平均值计算其蛋白质含量。

1.3.2.2 Lowry 法 按参考文献[4]操作, 先加入 5 mL 碱性铜液, 室温放置 10 min, 再快速加入 0.5 mL 酚试剂, 摇匀, 室温放置 30 min, 用 650 nm 波长比色。余同上。

1.3.2.3 BCA 法 按参考文献[5]操作, 将样品溶液与工作试剂混合, 37℃放置 30 min, 用 562 nm 波长比色。余同上。

1.3.2.4 改良 Bio-Rad DC 法 Bio-Rad DC 法是 Bio-Rad 公司为了减少蛋白质样品中一些还原剂、去污剂对蛋白质含量测定的影响而在 Lowry 法的基础上建立的一种蛋白质含量的测定方法, 它主要包括了试剂 A、试剂 B、试剂 C 3 种, 但是在应用过程中, 本实验人员发现该法仍然存在一些不足之处, 故对此法作了以下的一些技术改良, 具体如下(1)试剂 C 的处理: 1 mL 试剂 A 中加入试剂 B 20 μL, 混匀, 立刻加热使之澄清, 需临用前配制。(2)加入试剂 C、试剂 B 后的两次静置都需要避光放置。其余步骤按试剂盒要求操作, 余同上。

1.3.3 SDS-PAGE 按文献[6]的电泳法进行, 每个加样孔依次加入按以上 4 种方法测定的 100 μg 蛋白质, 各为双复孔, 再进行 SDS-PAGE: 浓缩胶电流 8 mA/cm, 分离胶电流 15 mA/cm, 直至溴酚蓝前沿至胶前沿约 1 cm 处停止电泳。经 Brad-

ford 染色后观察电泳图谱, 对采用不同蛋白质含量测定方法所得的等量蛋白质电泳图谱, 进行对比。

2 结果

2.1 神经细胞蛋白质含量的测定 用以上 4 种方法, 以标准蛋白为测定经培养的成年小鼠神经细胞蛋白质, 样品分别用细胞裂解液稀释 1 倍, 结果见表 1。

表 1 4 种方法测定神经细胞蛋白质的含量(mg/L, $\bar{x} \pm s$)

方法	神经细胞蛋白质
Bradford 法	2.013±0.021
Lowry 法	2.753±0.159
BCA 法	2.113±0.031
Bio-Rad DC 法	2.934±0.020

2.2 实验性重复 取 3 份不同成年小鼠神经细胞蛋白质样品(样品用细胞裂解液稀释 1 倍), 采用以上 4 种方法每份重复 10 次。求均数($\bar{x}$)和标准差(s)并测定批内变异系数, 结果见表 2。另取 1 份成年小鼠神经细胞蛋白质样品, 连续测定 7 d, 每天 1 次, 结果见表 3。

表 2 4 种方法测定结果的批内变异系数(% , $\bar{x} \pm s$)

方法	神经细胞蛋白质
Bradford 法	2.6±0.02
Lowry 法	4.9±0.06
BCA 法	2.3±0.03
Bio-Rad DC 法	3.1±0.02

表 3 4 种方法测定结果的批间变异系数(% , $\bar{x} \pm s$)

方法	神经细胞蛋白质
Bradford 法	2.7±0.04
Lowry 法	5.9±0.07
BCA 法	2.8±0.03
Bio-Rad DC 法	2.9±0.03

3 讨论

3.1 测定结果和重复性实验显示 对于神经细胞蛋白质样品, Bradford 法和 BCA 法的结果略低于改良 Bio-Rad DC 法, 批内系数和批间系数都较为稳定, Lowry 法的批内系数和批间系数皆偏高, 提示测定结果不稳定。SDS-PAGE 电泳图谱显示与蛋白质含量测定结果基本一致。神经细胞蛋白质样品, 改良 Bio-Rad DC 法测定样品的电泳效果明显好于 Bradford 法、BCA 法和 Lowry 法, 条带清晰、无拖尾现象。

3.2 由于在蛋白质提取中广泛应用的两性电解质、变性剂和去污剂等可能对实验结果造成影响, 本研究观察了两性电解质 Biolyte 对蛋白质测定的影响^[1]。在蛋白质含量测定过程中, 分别采用含有和不含有 Biolyte 的细胞裂解液作为空白, 观察 Biolyte 对实验结果的影响。结果表明对于 Bradford 法、BCA 法和 Lowry 法, 若选用含有 Biolyte 的细胞裂解液为空白, 空白管背景色会明显加深, 导致蛋白质含量的测定结果明显偏低, 甚至测不出结果, 原因可能与 Biolyte 的多氨基多羧酸结构与

R250 显色液或酚试剂的某些基团发生反应,从而导致使标本底偏高,影响实验结果,但确切原因仍有待于进一步的实验研究。对于改良 Bio-Rad DC 法,若选用含有 Biolyte 的细胞裂解液为空白,则蛋白质含量的测定结果明显比不含有 Biolyte 的细胞裂解液为空白的测定结果较高,约提高 20%左右,故在测定过程中最好以不含 Biolyte 的细胞裂解液为对照,蛋白质样品在样品测定后再加入 Biolyte。实验结果显示对于神经细胞蛋白质含量测定可选用 Bradford 法、BCA 法和改良 Bio-Rad DC 法。其中改良 Bio-Rad DC 法更佳。Lowry 法不适于神经细胞蛋白质含量测定,这可能与神经细胞中脂质含量比较高,细胞裂解液中的一些还原剂和去污剂影响测定结果有关。

参考文献

[1] 甘淋,李娟,何涛.几种蛋白质含量测定方法的比较研究

[J].泸州医学院学报,2004,27(6)500-502.

[2] 郑志斌,杨玲.神经细胞培养-理论与实践[M].北京:科学出版社,2002:236-237.

[3] 朱厚础.蛋白质纯化与鉴定实验指南[M].北京:科学出版社,1999:158-159.

[4] 中国生物制品标准化委员会.中国生物制品规程[M].北京:化学工业出版社,2000,672.

[5] Chattaraj SC, Das SK. Interference of thimerosal in the bicinchoninic acid protein microassay [J]. Boll Chim Farm, 2000,139(1):30-33.

[6] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999:123-146.

(收稿日期:2012-02-15)

• 临床研究 •

快速自动微板血源筛查法在疑难配血中的应用

钟展华,严凤好,李雪群,万小春(广东省惠州市中心血站 516000)

【摘要】 目的 建立一种为需要进行疑难配血的患者自动化、快速、准确的血源筛查方法。**方法** 从医院送检的疑难配血标本中选取 2 个具有代表性的标本,一个标本同时含有 IgG 类抗-C 和抗-e,另一个标本含有 IgG 类抗-D,使用 U 型板、凝聚胺溶液和自动加样器联合应用的方法在 528 个供血者全血标本中为上述两个标本筛查相合血源,同时使用手工试管法进行平行实验,记录并对比上述两种方法筛查总过程使用的时间,筛查出的供者标本数。**结果** 快速微板自动血源筛查法、试管法均能筛查出相合血源,微孔板筛查所需要的总时间较短,试剂用量也较少。**结论** 快速微板自动血源筛查法在疑难配血中筛查相合血源,具有快速、准确的效果。

【关键词】 快速自动微板血源筛查法; 凝聚胺溶液; 疑难配血

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.14.031 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)14-1740-02

输血前试验的 3 个步骤:ABO、RhD 血型检定、抗体筛查和交叉配血是保证临床输血的安全和有效手段,通常情况下,只要 ABO、RhD 血型检定正确,供(受)者 ABO、RhD 同型配血都是相容的;如果同型配血不相容,则被称疑难配血,在疑难配血中,医务人员有时遇到的情况是受血者血清中含有临床意义的同种抗体,需要筛选相应抗原阴性的供血者。如果相应抗原阴性的供血者(特别是多种抗原同时为阴性的)在人群中的频率较低的时候,就需要对大量的供血者标本进行筛查,才能筛选出相应抗原阴性的供血者。作者建立一种使用 U 型板、凝聚胺溶液、全自动加样器联合应用的自动化、快速、准确的供血者标本快速筛查方法,可以为需要进行疑难配血的受血者从血站的血库中快速筛查出相合血液,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 本市医院 2010 年至 2011 年送检到本实验室的疑难配血标本 118 例,本课题选取有代表性的标本 2 例,分别标号 NO.1、NO.2。NO.1 为已经确认血清中同时含有 IgG 类型抗-e、抗-C、“O”型受血者标本,NO.2 为已经确认含 IgG 类型的抗-D“O”型受血者标本。2011 年 5 月 16~19 日在本站献血的献血者全血标本 528 例,血型均为 O 型,标本均按《献血者健康检查标准》化验完毕且均合格。

1.2 主要试剂 BASO 凝聚胺三步法试剂,由珠海贝索公司

生产;抗球蛋白、谱细胞、IgM 的抗-D、抗-E、抗-e、抗-C、抗-c 试剂均由上海血液生物医药有限公司生产;抗 M、N、 K^{a} 、 K^{b} 、S、s 试剂由加拿大 Dominion 公司生产、已经本实验室确认的 1 人份无意外抗体及自身抗体的献血者红细胞和血浆、生理盐水。以上试剂均在有效期内使用。

1.3 主要器材 STAR 全自动加样器,瑞士 Hamilton 公司生产,配套英文控制软件版本为 3.2.0.3289;恒温振荡器(上海微百科技);CT6D 平板离心机(日本日立);DK-600S 三用水浴箱(广东环凯);KA-2200 离心机(日本久保田);anthos ht3 酶标仪(奥地利 anthos);10~100 μL 、20~200 μL 可调量程微量移液器(美国 Thermo);96 孔 U 型板和 96 孔平底板。

1.4 疑难配血标本的处理 用常规方法对医院送检的疑难标本进行检测,包括血型鉴定和抗体筛查,使用手工试管法和 BASO 凝聚胺试剂,判定疑难配血的标本所含的抗体类型及是否含有自身抗体。

1.5 STAR 全自动加样仪过程

1.5.1 将 118 个献血者全血标本分 5 次排列在 STAR 加样器上,将献血者的全血标本进行稀释到 5%后进行加样,用平底板做稀释板,将献血者稀释后的血样分别加 30 μL 到 2 块 U 型板上。

1.5.2 将标本 NO.1 和 NO.2 的标本分别加 30 μL 到 2 块 U