

结果显示 ASO、RF、CRP、IgG、IgM、IgA 6 个项目在给定的范围内呈线性。而 C3、C4 呈非线性,原因可能为:C3、C4 的检测范围较小,稀释增加了基质效应,故在日常工作中,C3、C4 稀释后的结果是不可靠的。

在临床工作中,高值标本对低值标本的携带污染不容小觑,IMMAGE800 特种蛋白仪标本针携带污染率为 0.025%,小于 0.05%,可满足临床需求,不影响加样顺序。

由于种族不同、区域不同、人群分布不同、人群生活习惯不同,故应建立适合本实验室的参考值范围;首先根据说明书的健康成人参考值范围进行验证,随机选择 20 位健康成人,验证参考值范围;经验证,参考值符合要求。故认为可以使用厂家的参考值范围。

通常一个检测系统应用到临床之前,实验室必须对其进行性能验证,最主要的性能指标包括精密度、准确度、检测线性范围以及参考范围是否符合当地人群^[12]。IMMAGE800 虽然不属于新的检测系统,但因为使用年限长达 8 年,故也需要进行性能验证。根据验证结果,证明该仪器在按时按需进行保养情况下,可保持良好的工作状态。

参考文献

- [1] Ledue TB, Collins MF, Ritchie RF. Development of immunoturbidimetric assays for fourteen human serum proteins on the Hitachi 912[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(5): 520-528.
- [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient sample; approved

guideline[S]. EP9-A, NCCLS, 1986.

- [3] Füzéry AK, Levin J, Chan MM, et al. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges[J]. Clin Proteomics, 2012, 10(1): 1-14.
- [4] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 5 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003.
- [5] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006.
- [6] 魏昊, 丛玉隆. 中国实验室国家认可委员会技术委员会医学分会. 医学实验室质量管理与认可指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2004.
- [7] 程文琴, 章复湘, 张如. 医院传染病信息管理系统的应用研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(14): 3107-3109.
- [8] 李萍. 临床实验室质量和能力要求[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(8): 958-960.
- [9] 郭拥军, 李大为, 文江平, 等. 罗氏 Modular P-800 生化分析仪检测 6 种血清特种蛋白性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(11): 1220-1221.
- [10] 韩静, 胡梅, 杨桂花, 等. BNII 特种蛋白测定 IgG、IgA 和 IgM 性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(10): 1292-1294.
- [11] 张莉, 吴炯, 郭玮, 等. 医学检验检测系统应用前的性能评价[J]. 检验医学, 2006, 21(6): 560-563.
- [12] 张葵. 定量检测系统方法学性能验证实验的基本方法[J]. 临床检验杂志, 2009, 27(5): 321-323.

(收稿日期: 2016-01-27)

• 临床研究 •

肌红蛋白在氧化镍纳米粒子中的固定及新型生物传感器的制备

马大威

(黄石市阳新县第三人民医院, 湖北黄石 435000)

摘要:目的 对肌红蛋白(Mb)在氧化镍纳米粒子中的固定情况和新型生物传感器的制备情况进行探讨。方法 测试氧化镍纳米粒子改性石墨电极(GE)上 Mb 所表现出来的电化学情况, 同时进行新型生物传感器制备。结果 Mb 固定在 Mb/氧化镍(NiO)/二甲亚砜(DMSO)膜中时, 其分子所具有的活性能够得到更好的维持, 其对 H₂O₂ 具有电催化活性, 且表现米氏常数具体为 0.21 mmol/L、灵敏度表现为 417 mA cm²/L/mol, 具有极高的亲和性; Mb 的检出限表现为 0.039 μmol/L。结论 Mb 存在明显和稳定的氧化还原峰, Mb 分子与电极间发生的电子传递受到 DMSO 的严重影响; 将其固定于 Mb/NiO/DMSO 膜中时, 更有利于其分子活性的维持, 其对 H₂O₂ 表现出高亲和性。

关键词:肌红蛋白; 氧化镍纳米粒子; 新型生物传感器

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.10.045

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)10-1404-03

肌红蛋白(Mb)为具有 1 个含铁血红素辅基和 153 个氨基酸的多肽链共同组合而成的一个亚铁血红素蛋白, 其相对分子质量为 17.5 × 10³, 其在机体中主要存在于心肌、骨骼肌等组织中^[1]。加强对蛋白质电催化、直接电化学的深入研究, 对认识机体电子转移机制、相关具有生命物质在机体中的代谢情况等均具有极为重要的价值^[2]。目前, 诸多学者在研究过程中, 利用纳米材料、离子聚合物等进行组装、交联等之后, 使血红素蛋白质能够被固定在电极表面, 进而实现对 Mb 与电极存在的传递关系进行研究。本研究中主要对 Mb 在纳米粒子上的固定情况进行探讨, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 在本研究中, 在石墨电极的表面进行氧化镍(NiO)纳米粒子修饰, 然后将 Mb 固定于石墨电极的表面, 进

而实现对蛋白质在电极上所发生的直接电化学反应进行分析和研究。

1.2 仪器与试剂 本研究所应用到的相关仪器主要有: CHI660C 电化学工作站(生产企业: 上海辰华仪器公司)、Vector22FT-IR 傅立叶红外光谱(生产企业: Bruker 公司)、扫描电子图像分析仪(生产企业: 德国 Gemini 公司)、TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(生产企业: 北京普析通用仪器有限责任公司), 此外还有石墨电极(GE)和饱和甘汞电极(SCE)。研究中所用的试剂主要有: M1882 Mb, 研究所用水均为二次蒸馏水, 使用到的其他试剂全部为分析纯。研究过程中还需要溶液 A、溶液 B、溶液 C 共 3 种溶液; A 种为 Mb 浓度为 2.0 g/L 水溶液; B 种为 NiO 浓度为 4.0 g/L 二甲亚砜(DMSO)悬浮液; C 种为溶液 NiO 浓度为 4.0 g/L 水溶液。

1.3 方法 (1) 纳米 NiO 制备: 本研究主要应用气相法中的喷雾热分解法来实现纳米 NiO 的制备; (2) 电极制备: 本研究所用石墨电极的面积为 0.2635 cm^2 。进行试验之前, 首先需对石墨电极进行打磨处理, 然后使用氧化铝 ($0.05 \mu\text{m}$) 在麂皮上继续实施打磨操作, 使其呈现出镜面。在实施抛光操作之前, 均须使用二次蒸馏水对电极进行彻底清洗。抛光操作结束之后需要依次使用丙酮、二次蒸馏水对电极进行超声清洗, 清洗的时间为 5 min, 清洗完毕后将其放置于室温环境中晾干; (3) 电极制备: 本研究需进行 6 种电极的制备, 其分别为裸电极、NiO/DMSO/GE 电极、Mb/GE 电极、Mb/NiO/GE 电极、Mb/DMSO/GE 电极、Mb/NiO/DMSO/GE 电极。将所有电极放置于干燥瓶中, 放置时间为 2 h, 使水分得到有效挥发, 进而形成均匀膜。将电极放置于密封瓶中, 放置时间为 12 h, 密封瓶恒温为 18°C 。电极制成之后使用二次蒸馏水将其进行彻底冲洗, 然后进行护理放置以备研究使用。测试方法: 本研究应用的电极系统为三电极系统, 首先将 GE 修饰成为工作电极, 而辅助电极则为铂丝, 参比电极为 SCE。电极系统设计好之后将其与电化学工作站进行连接, 然后实施电化学测量试验。在无特别说明的情况下, 将相对于 SCE 的电位作为测量中的电位值。实施循环伏安试验的环境, 须将恒温控制在 (18 ± 0.2) $^\circ\text{C}$ 的范围内, 且整个试验须在静止的电化学电解池中实施。在测试过程中, 合理地将电解池温度升高, 且相应温度位置保持时间为 20 min 恒温, 然后对循环伏安图进行记录。通过这样的方法来实现对 Mb/NiO/DMSO/GE 所表现出来的实际稳定性进行分析。在实施试验之前, 需进行的相关电化学测试(均通过时间为 15 min 的纯氮, 将存在于电解液中的溶解氧去除)。在试验实施的整个过程需始终保持处在氮的环境中。实施安培检测操作时, 将工作电位设置为 -350 mV , 将检测所测得的电流-起始电流所得数值作为催化电流。在聚四氟乙烯片上分别滴上 Mb, Mb/DMSO 溶液, Mb/NiO/DMSO 或 Mb/NiO/ H_2O 悬浮液, 然后将聚四氟乙烯片放置于空气中进行晾干, 然后揭下膜, 实施 KBr 压片操作之后进行测试。将 20 次扫描所得结果的平均值制成每次测量的图谱。分别在玻璃片上进行 NiO 修饰、Mb 修饰、Mb/NiO/DMSO 修饰, 然后实施扫描电子图像分析。

1.4 统计学处理 本研究所得相关数据均使用 Microsoft Excel 2003 进行统计学分析和处理。

2 结果

当 Mb 混合到水、DMSO 溶液、NiO/水悬浮液、NiO/DMSO 溶液中时, Mb 均能够保持其原有的结构; 将 Mb 固定在 Mb/NiO/DMSO 膜中时, 更利于保持 Mb 分子的活性, 且其天然结构也不会遭受破坏, 其对 H_2O_2 具有电催化活性, 且表现米氏常数具体为 0.21 mmol/L 、灵敏度表现为 $417 \text{ mA cm}^2/\text{mol}$, 具有极高的亲和性, Mb 的检出限表现为 $0.039 \mu\text{mol/L}$; 当 pH 值在 5~10 范围之内时, 溶液 pH 值与式量电位表现出线性关系, 其斜率为 -42.3 mV/pH ($r=0.9993$), 不仅接近于 -43.9 mV/pH , 同时也与 291K 时的理论值 (-57.8 mV/pH) 接近, 这说明 Mb 的电子传递受溶液 pH 值影响。

3 讨论

Mb 为一种氧结合蛋白, 其在机体中主要存在于平滑肌、骨骼肌、心肌等组织中。存在肌肉中的所有蛋白中, Mb 所占比例为 2% 左右^[3]。Mb 具有极小的相对分子质量, 其相对分子质量仅为 17.8×10^3 , 明显小于肌酸激酶(CK-MB) 和乳酸脱氢酶^[4]。Mb 位于细胞质的内部。在病理生理学中, 存在于机

体中的心脏标志物出现时间的早晚和分子在细胞中的部位、分子大小均存在密切联系。相对分子质量越小, 更易于其直接透过细胞存在的微小间隙, 进入到血液中。所以当心肌损伤发生时, Mb 会较早出现, 目前, 其为急性心梗出现之后能够最早检测得到的标志物。

当 Mb 处在溶液时, 其对溶液的吸收均会存在一个吸收峰, 这个吸收峰就是其在该种溶液中的 Soret 吸收带^[5]。但 Soret 吸收带消失或者发生迁移时就提示蛋白质的结构出现了相应的变化。在 Mb 分子中, 多肽链二级结构信息主要依靠酰胺 I、II 红外吸收带提供。在蛋白质失去活性时, 其分子中的酰胺 I、II 所具有的特征吸收带会发生明显变化, 吸收带甚至会完全消失^[6]。本研究结果显示, 当 Mb 固定在 Mb/NiO/DMSO 膜中时, 其分子活性不易失去, 且天然结构也不会发生明显变化。

DMSO 在蛋白质电子传递过程中发挥着极为重要的作用, 导致这种现象出现的原因主要为 DMSO 能够降低存在于 Mb 分子周围环境中双电层常数, 进而降低了蛋白质电子在进行传递过程中外部重组能, 最终导致蛋白质电子在传递过程中的速度不断加快^[7]。但是在 Mb 电子传递过程中, NiO 纳米粒子发挥着更加重要的作用, NiO 纳米粒子可创造出一个三维界面, 这个三维界面能够让受限的方位同样也适合蛋白质分子与电极表面间的直接电子传递, 因此, 蛋白质分子的电子传递会得到有效加快^[8-9]。同时, NiO 纳米粒子具有强烈的吸附性, 其更多的 Mb 会被其吸附, 且将 Mb 吸附之后洗脱难度大, 因此表现出较强的信号。

在本研究中, 当将 Mb/NiO/DMSO/GE 在 pH 值为 7.0 的聚丁二酸丁二醇酯(PBS)中进行连续性扫描时发现, 其表现出来的标准偏差为 0.887%, 这个标准偏差表明 Mb/NiO/DMSO 修饰电极存在良好的重复性。当将修饰电极放置于恒温为 4°C , pH 值为 7.0 的 PBS 中, 放置时间为 60 d, 然后进行测试, 测试结果显示峰电流值是原来峰电流值的 94%, 这个结果表明 Mb/NiO/DMSO/GE 存在良好的稳定性。将蛋白质固定在导电性物质表面时, 其出现的行为会和其所处于溶液中的行为发生一定的变化。热力学稳定性试验所得结果表明, Mb/NiO/DMSO/GE 热力学稳定性的增加与 NiO 纳米粒子的存在具有密切联系^[10]。

溶液中的 pH 值对 Mb 直接电子传递存在明显性影响。当溶液的 pH 值处于 5~10 的范围之内时, 溶液 pH 值和式量电位表现出明显的线性关系, 具有 -42.3 mV/pH 的斜率, 该斜率接近于 -43.9 mV/pH , 同时也与 291 K 时的斜率理论值较为接近。这个结果表明, 在电子传递过程过程中还有 1 个电子和 1 个质子参与。当溶液的 pH 值为 7.0 时, 电子传递出现最高的峰电流值。因此在进行实验时, 所应用的电解质溶液通常会选择 pH 值为 7.0 的 PBS 缓冲体系。

对于 H_2O_2 , Mb/NiO/DMSO/GE 表现出明显的电催化作用。当将 H_2O_2 加入到 pH 值为 7.0 的 PBS 中之后, 还原峰电流会表现出明显增加的趋势, 而氧化峰电流则表现出明显减小的趋势。这种现象在 NiO/DMSO/GE 上, 或者在裸 GE 上均未出现。这种表明, H_2O_2 所表现出来的催化还原作用主要是由于有 Mb 分钟存在于电极上, 且 H_2O_2 表现出来的催化效果具有明显性。在本研究中, 当在连续性地加入适量的 H_2O_2 加入到 pH 值为 7.0 的 PBS 中时, 在将工作电位选择为 -350 mV 时, 修饰电极对 H_2O_2 表现出较为理想的电催化活性, 同时, 在短短 5 s 的时间之内, 稳态电流可高达 95%。这个结果说明了

电催化响应具有极快的速度,所以可有应用于 H₂O₂ 的检测,且会大大提高检测的速度。

参考文献

[1] 李晶,杨晓英. 新型碳纳米材料——石墨烯及其衍生物在生物传感器中的应用[J]. 化学进展, 2013, 10(Z1): 380-396.

[2] 宋英攀,冯苗,詹红兵. 石墨烯纳米复合材料在电化学生物传感器中的应用[J]. 化学进展, 2012, 15(9): 1665-1673.

[3] 欧阳瑞燮. 聚焦 2011 年度中国期刊基于功能纳米材料的生物传感器的研究进展[J]. 分析化学, 2012, 40(12): 1938-1944.

[4] Sen AR, Naveena BM, Muthukumar M, et al. Colour, myoglobin denaturation and storage stability of raw and cooked mutton chops at different end point cooking temperature[J]. J Food Sci Technol, 2014, 51(5): 970-975.

[5] 谷广哲,董社英,黄廷林,等. 基于中空氧化镍纳米微球和离子液

体复合膜固定血红蛋白的 NaNO₂ 生物传感器[J]. 高等学校化学学报, 2012, 15(9): 1926-1931.

[6] 张谦,张玲,李景虹. 石墨烯及其复合材料在酶电化学生物传感器中的应用[J]. 分析化学, 2013, 41(5): 641-649.

[7] 王学亮,郁章玉,焦奎. 纳米材料在电化学生物传感器中的应用及纳米仿生界面的构建[J]. 理化检验: 化学分册, 2012, 12(5): 621-628.

[8] 冯晓苗,李瑞梅,杨晓燕,等. 新型碳纳米材料在电化学中的应用[J]. 化学进展, 2012, 18(11): 2158-2166.

[9] 黄春芳,姚桂红,邱建丁. 表面分子印迹磁性纳米粒子的制备及其血红蛋白传感应用[J]. 电化学, 2014, 12(6): 521-526.

[10] 宋娟,顾斌,李鑫,等. 纳米材料应用于氧化还原蛋白质直接电化学的研究进展[J]. 材料导报, 2012, 6(S1): 14-18.

(收稿日期: 2016-01-03)

• 临床研究 •

2 型糖尿病患者血清胱抑素 C 和糖化血红蛋白联合检测的应用研究

马统雄, 王晓兰, 孙艺轩

(甘肃省华亭煤业集团有限责任公司总医院检验科, 甘肃平凉 744100)

摘要:目的 研究糖化血红蛋白(HbA1c)和血清胱抑素 C(CysC)联合检测在防治糖尿病早期肾损伤中的应用。方法 根据尿微量清蛋白水平将 2 型糖尿病患者分为肾功能正常组、轻微受损组、明显受损组;比较各分组及健康对照组之间 HbA1c、CysC 的水平。结果 肾功能轻微受损与明显受损组中的 HbA1c 和 CysC 水平,都显著高于肾功能正常组与健康对照组;肾功能明显受损组中 HbA1c 和 CysC 水平值均高于轻微受损组。结论 HbA1c 和 CysC 联合检测在 2 型糖尿病患者血糖控制水平的判断,早期糖尿病肾病诊断及延缓糖尿病肾病发生、发展等方面具有重要意义。

关键词:糖尿病肾病; 尿微量清蛋白; 糖化血红蛋白; 胱抑素 C

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 10. 046

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)10-1406-02

2 型糖尿病(T2DM)是非胰岛素依赖型糖尿病或成人型糖尿病,此型糖尿病患者能产生胰岛素,但产生的量不足以满足机体的需要,或者机体已经对胰岛素产生抵抗。它的并发症是由于脂质的产生,导致血管和微血管的损害及肾、眼、神经损害的慢性进行性病变。其最常见的并发症就是糖尿病肾病(DN)。本文主要是通过通过对 DN 患者联合检测糖化血红蛋白(HbA1c)与血清胱抑素 C(CysC),对比分析其在早期糖尿病患者肾损伤中应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2012 年 8 月至 2014 年 8 月本院内科糖尿病专科住院及门诊 T2DM 患者 200 例,年龄 32~80 岁。全部按照中国糖尿病协会颁布的糖尿病诊断标准进行诊断,空腹血糖大于等于 7.0 mmol/L,糖耐量试验 2 h 血糖或随机血糖大于等于 11.1 mmol/L。此外分别对每例患者进行尿微量清蛋白(UmAlb)检测,根据 UmAlb 的数值进行分组:正常肾功能组(UmAlb < 30 mg/d),轻微肾功能受损组(30 mg/d < UmAlb < 300 mg/d),明显肾功能受损组(UmAlb > 300 mg/d),另外选取对照组 70 例,男 35 例,女 35 例,年龄 18~72 岁,均为体检合格健康者(排除肾脏疾病和糖尿病,且 B 超、心电图、胸片和实验室检测全部正常者)。

1.2 仪器与试剂 HbA1c 检测采用日本东曹生产的 G8 全自动 HbA1c 分析仪及配套试剂,其反应原理是高压液相色谱法; CysC 检测采用西门子-1800 全自动生化分析仪及宁波美康公司的检测试剂,其反应原理是胶乳增强免疫比浊法。

1.3 方法 所有检测者抽取空腹静脉血,抗凝标本[乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝剂]用于 HbA1c 的测定,而未抗凝标本血清分离后用于测定 CysC。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件对所有检测数据进行统计分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示计量检测结果资料,用 *t* 检验进行组间对照比较。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾功能正常组与健康对照组比较 通过对 200 例的检验结果进行分析,其中 42 例肾功能正常组,70 例轻微肾功能受损组和 88 例明显肾功能受损组。在这 42 例肾功能正常组中, CysC 为(0.79 ± 0.16)mg/L, HbA1c 为(5.12 ± 0.74)%;健康对照组 60 例中, CysC 为(0.75 ± 0.10)mg/L; HbA1c 为(4.75 ± 0.64)%;肾功能正常组 CysC 和 HbA1c 均高于健康对照组,但差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 1 对照组与和研究组 CysC 与 HbA1c 检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CysC(mg/L)	HbA1c(%)
健康对照组	70	0.75 ± 0.10	4.75 ± 0.64
肾功能正常组	42	0.79 ± 0.16	5.12 ± 0.74
肾功能轻微受损组	70	1.13 ± 0.42 ^I II	5.84 ± 0.92 ^I II
肾功能明显受损组	88	1.58 ± 0.62 ^I II III	6.69 ± 1.38 ^I II III

^I: *P* < 0.05, 与肾功能正常组对比; ^{II}: *P* < 0.05, 与健康对照组比较; ^{III}: *P* < 0.05, 与肾功能轻微受损组对比。