

硝酸纤维素膜印迹法测定 对虾微量血淋巴碱性磷酸酶相对活性

王秀华, 杨冰, 黄健, 雷质文

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘 要:用硝酸纤维素膜(NCM)印迹法测定日本对虾(*Penaeus japonicus*)血淋巴碱性磷酸酶(ALP)的相对活性,以标准 ALP 梯度稀释液为参照,比较 NCM 印迹法与 ALP 测定试剂盒法对标准 ALP 梯度液的测定结果。数据回归分析显示,NCM 印迹法所得结果同标准 ALP 梯度稀释液活性的回归关系极显著($P < 0.01$);用 NCM 印迹法测定 ALP 相对活性的灵敏度为试剂盒的 100 倍。分别用 NCM 印迹法与 ALP 测定试剂盒测定对虾血淋巴的 ALP 相对活性,测得结果呈强直线相关性($P < 0.01$),说明用 NCM 印迹法测定对虾血淋巴 ALP 相对活性具可行性。

关键词:硝酸纤维素膜印迹法;日本对虾;碱性磷酸酶;相对活性

中图分类号:S945.1;Q55

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2002)03-0220-04

碱性磷酸酶(ALP)直接参与磷代谢,对钙质吸收,骨骼形成,磷酸钙沉积、甲壳素分泌及形成有重要的作用^[1]。在对虾养殖中,ALP 可作为一项衡量对虾非特异性免疫能力的指标,通过测量对虾血淋巴中 ALP 的活性高低可以判断对虾的非特异性免疫机能的强弱^[2]。目前国际上公认的 ALP 活性测定方法是以磷酸对硝基酚(4-NPP)为底物,在波长 400~410 nm 连续检测,而国内广泛采用以磷酸苯酯二钠(简称磷酸苯二钠)为底物的金氏比色法^[3]。本研究使用硝酸纤维素膜(NCM)显色法测定 ALP 相对活性,并对其可行性进行检验,旨在研究对虾及其他生物血清中的 ALP 活性指标提供新的测定技术。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验虾

日本对虾(*Penaeus japonicus*)为本实验室养

殖,并投喂免疫增强剂饵料,从不同实验组中取虾 10 尾,体长 10~12 cm。

1.1.2 试剂

氮蓝四唑(NBT)、5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸(BCIP)及标准 ALP 均购于 Roche 公司。

1.1.3 硝酸纤维素膜(NCM)

购自 Pall Corporation, Lot# 80247。

1.2 方法

1.2.1 试剂配制

Buffer I: 含 100 mmol/L NaCl、5 mmol/L Mg-Cl₂、100 mmol/L Tris·Cl (pH 9.5); 生色底物混合物:按照文献[4]方法配制;封闭剂:100 mg Blocking Reagent II (Roch, Lote)溶于 10 mL Buffer I; PBS:将 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄ 和 0.24 g KH₂PO₄ 溶于 800 mL 双蒸水中,用 HCl 调 pH 至 7.4,加双蒸水定容至 1 L,高压灭菌 20 min。

1.2.2 采集对虾血淋巴

用一次性 1 mL 注射器从对虾的心脏、胸足基部和腹节等处抽取血淋巴,注入洁净无菌的 1.5 mL 离心管中, -70℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 样品显色

按样品数,用铅笔在 NCM 上划格(5 mm×5 mm/格),设置 2 套平行的样品测试组及对照组,并

收稿日期:2001-08-29。

基金项目:国家重点基础研究项目(G1999012002);国家高新技术研究发展计划(2001AA620206)。

作者简介:王秀华(1969-),男,助理研究员,主要从事水产动物病害及免疫学研究。E-mail: aqadis@public.qd.sd.cn

在测试膜与对照膜上做标记;将 NCM 浮于双蒸水上,待沉入水中后,取膜置滤纸上晾干;将血淋巴样品于冰水中解冻,15 000 r/min 离心 1 min 后,冰水存放;分别点血淋巴上清液于测试膜与对照膜上(1 μ L/格);晾干后,置膜于杂交袋中,加入封闭剂(0.2 mL/cm² 膜面积),室温封闭 30 min。取出膜,用 Buffer I 洗涤 5 min,把测试膜及对照膜置于 2 个杂交袋中,按 0.1 mL/cm² 膜面积的量,向测试膜的杂交袋内加生色底物混合物,对照膜杂交袋中加相应体积的 Buffer I。暗处显色,出现蓝色后,移膜至装有 50 mL PBS (含 2 mmol/L EDTA) 的培养皿中终止显色,5 min 后取出晾干。

1.2.4 显色图像与 ALP 活力的转换

用扫描仪及应用软件 Sigmascan 对显色结果进行分析,得出每一样品显色的灰度值(I)及显色面积(S)。以公式 $A = \log(256/I)$ 求得吸光值 A ;样

品的酶活力为 $E = (A - A_{\text{空白}}) \times S$;ALP 相对活力 = $E_{\text{实验膜}} - E_{\text{参照膜}}$ 。

1.2.5 对照方法

即 ALP 试剂盒法。用碱性磷酸酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所生产)测定。ALP 活性定义为:100 mL 血清在 37 $^{\circ}$ C 与底物作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。

2 结果

2.1 NCM 印迹法及 ALP 试剂盒法测定标准 ALP 活力

将 7.5×10^{-4} U 的标准 ALP 溶液进行二倍梯度稀释,分别用 NCM 印迹法及 ALP 试剂盒法进行其活性的测定,显色结果见图 1 中 B1、B2 和 b1、b2,求得活性结果见表 1。

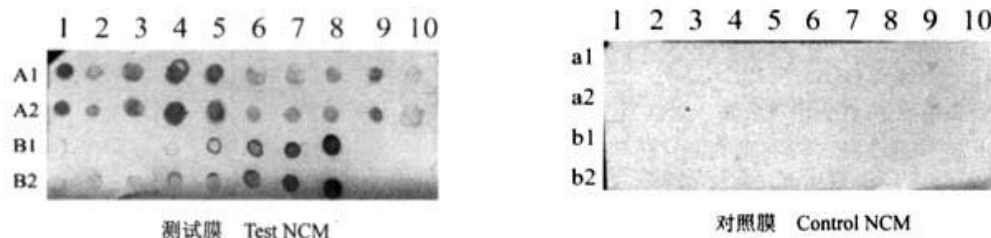


图 1 样品在 NCM 上的显色结果

Fig. 1 Coloration of samples on NCM (nitrate cellulose membrane)

A1、A2 为对虾血淋巴在测试膜上的显色结果 Lines A1 and A2 show the results of coloration of hemolymph on test NCM;
B1、B2 为标准 ALP 梯度稀释液在测试膜上的显色结果 Lines B1 and B2 show the results of coloration of diluted standard ALP on test NCM;
a1、a2 为对虾血淋巴在对照膜上的显色结果 Lines a1 and a2 show the results of coloration of hemolymph on control NCM;
b1、b2 为标准 ALP 梯度稀释液在对照膜上的显色结果 Lines b1 and b2 show the results of coloration of diluted standard ALP on control NCM.

2.2 NCM 印迹法测定对虾 ALP 活性的可行性分析

2.2.1 标准 ALP 活力与 2 种测定方法所测结果的线性分析 分别对表 1 中印迹法及试剂盒法所得数据同标准酶活性数据进行回归分析,回归直线如图 2,并对回归关系进行 F 检验, $F_{0.01(1,4)} = 21.2$, $F_{\text{印迹法}} = 768.05$, $F_{\text{印迹法}} > F_{0.01(1,4)}$; $F_{0.01(1,3)} = 34.12$, $F_{\text{试剂盒}} = 16\ 258$, $F_{\text{试剂盒}} > F_{0.01(1,3)}$, 显示 2 种方法所测结果回归关系均极显著($P < 0.01$)

2.2.2 ALP 活性的灵敏度比较

根据表 1 测定结果,NCM 印迹法测定 ALP 的最小分辨活力以标准 ALP 计算为 $0.23 \times$

表 1 不同方法对标准 ALP 梯度稀释液测定结果

Table 1 ALP activity determined by different methods

标准 ALP 活性 /($\times 10^{-4}$ U) Standard ALP activity	NCM 印迹法/ (相对活性)($\bar{X} \pm \text{SD}$) Relative activity ALP by NCM	ALP 试剂盒法/ (金氏单位)($\bar{X} \pm \text{SD}$) ALP activity by ALP kit
0.12	—	—
0.23	6.4 ± 0.08	—
0.47	17.72 ± 0.18	2.87 ± 0.92
0.94	37.01 ± 0.17	8.68 ± 1.23
1.88	71.03 ± 0.22	23.58 ± 1.00
3.75	194.49 ± 0.03	57.62 ± 1.05
7.50	426.18 ± 1.22	128.43 ± 18.39

注:“—”未测出 Undetectable

0.000 1U×1 μL, ALP 试剂盒法测定标准 ALP 的最小可分辨活力为 $0.47 \times 0.000 1U \times 50 \mu L$, 可知 NCM 印迹法的灵敏度为试剂盒法的 100 倍。

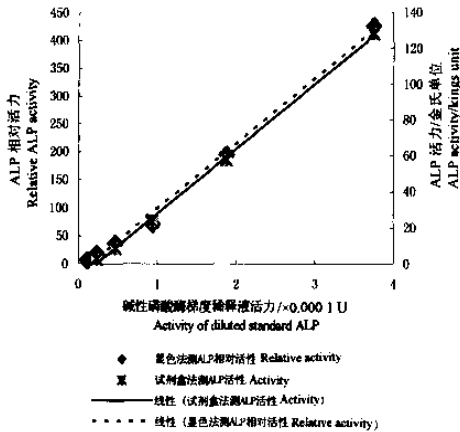


图2 不同方法测定 ALP 活性与标准酶活性回归直线图

Fig. 2 Regression lines of ALP activities determined by diluted standard ALP, NCM and commercialized ALP kit

2.3 对虾血淋巴的 ALP 相对活性

用 NCM 印迹法及 ALP 试剂盒法分别对 10 尾日本对虾血淋巴 ALP 活性进行测定, 比较 2 种方法所得结果的差异, 显色结果见图 1 中 A1、A2 和 a1、a2。计算结果见表 2。

表 2 用 NCM 印迹法与 ALP 测定试剂盒法测定日本对虾 ALP 活性 ($n = 10, \bar{X} \pm SD$)

Table 2 ALP activity in haemolymph of shrimps determined by two different methods ($n = 10, \bar{X} \pm SD$)

样品号 Sample	NCM 印迹法测 ALP 相对活性 Relative ALP activity by NCM	ALP 测定试剂盒法测 ALP 活性/金氏单位 ALP activity by ALP kit/Kings unit
1	47.03 ± 9.60	1.46 ± 0.17
2	13.32 ± 0.37	0.62 ± 0.08
3	39.97 ± 4.95	0.86 ± 0.04
4	101.65 ± 17.35	2.92 ± 0.10
5	65.37 ± 12.62	2.89 ± 0.07
6	17.16 ± 3.17	0.62 ± 0.26
7	17.41 ± 2.22	0.56 ± 0.02
8	18.13 ± 3.24	1.06 ± 0.24
9	27.82 ± 1.78	1.40 ± 0.01
10	15.58 ± 13.56	0.66 ± 0.01

2.3.1 对虾血淋巴中 ALP 活性相关性分析 表 2 中的结果进行统计处理所得值进行直线回归分析如

图 3, 并对回归关系进行 F 检验, $F = 40.59$, $F_{0.01(1,8)} = 11.26$, $F > F_{0.01(1,8)}$, 表明 2 种测量方法所得值回归关系极显著 ($P < 0.01$), 说明应用 NCM 印迹法测对虾血淋巴 ALP 相对活力所得数据较试剂盒法测得数据可比性强, 相对活力数据可靠。

3 讨论

有报道^[5-7]表明, ALP 为 1 种衡量生物体免疫能力的指标, 通过测量其活力的高低可以估测生物体的健康程度。测定 ALP 活性方法最常用的是磷酸苯二钠法 (ALP 试剂盒采用)^[2-3,8], 另一种是连续检测法, 即以磷酸对硝基酚 (4-NPP) 为底物, 在碱性条件下, 被碱性磷酸酶作用生成黄色的对硝基酚, 用 405 nm 波长检测, 根据吸光度增加的速率可以算出碱性磷酸酶的活性。用该法测定每个样品至少要 5 min, 如果待分析的样品量大, 需要较长工作时间。应用磷酸苯二钠法, 每个样品最小需要 0.1 mL 血淋巴, 当用于测定的对虾体长较小时, 特别是分析同一尾虾的多个血清指标时, 血淋巴量常常难以满足, 且该法灵敏度较低。

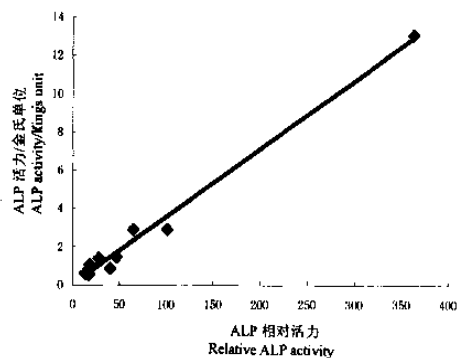


图3 对虾血淋巴中 ALP 的相对活性与活性的回归直线图

Fig. 3 Regression lines of ALP activity and relative activity in shrimp hemolymph

与这 2 种方法相比, NCM 印迹法具有以下优点: ①所需样品微量。在分析对虾血淋巴时只需 1 μL 血淋巴即可进行 ALP 活性的测量, 因此在分析体长较小、血淋巴较少的单尾对虾样品时颇具优势。②灵敏度高, 可提高测量的准确度。③可在短时间内对大量样品进行分析。由于 NCM 印迹法在操作过程中, 步骤较少, 且在点样后所有样品在同一时间内显色, 消除了磷酸苯二钠法在操作过程中因

存在酶与底物的作用时间上的差别而带来的误差,并节省时间,检测效率提高。

NCM 印迹法的不足之处主要有:①需要特定条件,必须经过扫描仪和图像分析软件对膜上显色斑点进行数字化处理,才能得出检测数据,否则只能是半定量的结果。②测得的 ALP 活性为相对值,仅可以进行同一张膜上的不同样品间活性大小的相对比较,如欲求其标准单位需用标准 ALP 做标准曲线换算。

本方法的误差来源主要有以下几个方面:1) 点样不准确,这将影响到斑点的面积或显色强度。2) 样品被冲洗掉或斑点显色区域过于扩散,这通常是因为样品在膜上未固定完全而引起漂移所致,使得面积的界定不准确、显色偏淡、甚至样品之间相互干扰。应尽可能减少样品中的杂质如蛋白质等对点样位点的封闭作用,必要时进行一定的稀释。点样前应戴手套操作以免沾污膜表面,膜封闭前应使样品在膜上充分干燥。3) 膜扫描亮度不均匀或空白区域采样错误,这可能是因扫描仪光线不均匀、膜发生皱褶、尤其是在光场不均的情况下用数码相机拍照取得的膜图像等问题引起,膜亮度不均时各样品空白区域采样错误会使样品的灰度值或校正的 OD 值发生误差。4) 对膜图像进行过非线性的亮度或对比度调节,例如用 Adobe Photoshop 的“曲线”或扫描仪设置了伽马调节获得的图像都失去了原有的灰度

线性关系。5) 样品中 ALP 活性过大或过小,活性过大会造成显色物堆积甚至显色斑点反白,活性过小会由于背景噪声而造成误差增大。6) 不是同一张膜上的样品斑点进行对比,由于显色温度、时间、底物浓度、缓冲液 pH 等可能造成的差异,不同膜上显色的斑点在没有膜内的标准进行对比时,结果可能出现较大的差异。因此在检测过程中应充分认识到误差的来源,以减少误差出现的机会。

参考文献:

- [1] 陈清西,陈素丽,石 艳,等.长毛对虾碱性磷酸酶性质[J].厦门大学学报(自然科学版),1996,35(20):257-261.
- [2] 刘树青,江晓路,牟海津,等.免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J].海洋与湖泊,1999,30(3):278-282.
- [3] 冯仁丰.实用医学检验学[M].上海:上海科学技术出版社,1996.427-430.
- [4] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E J,曼尼阿蒂斯 T.分子克隆实验指南[M].第2版.北京:科学出版社,1995.897.
- [5] 吴 垠,邢殿楼,祝国芹,等.中国对虾暴发性流行病理研究[J].中国水产科学,1998,5(3):53-57.
- [6] 陈竞春,石安静.贝类免疫生物学研究概况[J].水生生物学报,1996,20(1):74-77.
- [7] Wiwanitkit V. High serum alkaline phosphatase levels, a study in 181 Thai adult hospitalized patients[J]. BMC Family Practice 2001,2(2):1 471-2 296
- [8] 周定刚,郑维明,钟妮娜.催产时雌卵磷酸酶活性的变化及其与排卵的关系[J].水生生物学报,1993,17(2):145-148.

Microdetermination of relative activity of ALP in hemolymph of shrimps by dot blot on nitrate cellulose membrane (NCM)

WANG Xiu-hua, YANG Bing, HUANG Jie, LEI Zhi-wen
(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China)

Abstract: The hemolymph was collected from cultured shrimp *Penaeus japonicus* and nitrate cellulose membrane (NCM) was used for dot blot to test the relative activity of ALP in the hemolymph, and meanwhile the commercialized standard ALP kit was employed to conduct a reference test. The regress analysis on the test results shows that the data from the measurement of dot blot on NCM have a remarkable linear correlation with that from the reference test ($P < 0.01$). The sensitivity of ALP measurement by NCM dot blot is 100 times as much as that of the reference test (by ALP kit). The test results of activity and relative activity of ALP in the hemolymph have a close linear correlation ($P < 0.01$).

Key words: dot blot on NCM; *Penaeus japonicus*; ALP; relative activity