

过氧化氢酶-2 能力验证样品的制备及其均一性和稳定性测定

魏 杰 王 洪 贾松华 岳秉飞

(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

摘要:目的 制备 a、b 两个型别的过氧化氢酶-2 能力验证样品,并对其均匀性和稳定性进行测定评价。方法 均匀性测定均按照 4% 比例随机抽样,冻融稳定性以 4 次冻融为测定终点;时间-温度稳定性以 4、20、37 ℃ 这 3 个温度为观测纵坐标,1、2、3、7、15、30 d 为观测横坐标,在每个坐标交点,a 型、b 型分别随机抽取 2 瓶,测定不同条件下各型别样品的稳定性。结果 a 型、b 型样品在均匀性测定中,均表现为各型别的清晰条带;4 次冻融后仍能稳定存在,且 30 d 内在 4、20 ℃ 和 37 ℃ 三种条件下均能稳定存在。结论 过氧化氢酶-2 样品均匀性和稳定性良好,适于能力验证样品的制备发放需求。

关键词:过氧化氢酶-2;样品;能力验证;均匀性;稳定性

中图分类号: Q95-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0039-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.010

随着实验室认可制度的发展和实验室质量意识的不断提升,作为实验室评定重要部分的能力验证也在迅速发展;而加速这一发展的,正是中国合格评定国家认可委员会于 2002 年启动的能力验证提供者(PTP)认可计划^[1-2]。能力验证提供者计划的实施,不仅能增强参与实验室对提供者的信任,也为计划的有效性、结果的承认与利用起到了积极作用。

对于提供者的认可,需要考察管理、技术等多方面因素来保证项目的顺利实施。而技术核心与出现问题的集中要素都是试样的均匀性与稳定性^[2-3]。

中国食品药品检定研究院 2015 年在北京率先通过了实验动物检测项目的 PTP 认可,并组织全国范围的实验动物检测的能力验证活动。为满足能力验证认可要求,保障能力验证计划的顺利进行,本文即对 2018 年项目“NIFDC-PT-171 实验小鼠肾匀浆中过氧化氢酶-2 的检测”样品制备中的均匀性和稳定性进行研究,并对近几年样品制备工作进行回顾,为样品的研制发放提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 动物来源

a 型 BALB/c 小鼠 20 只,8 周龄,来自中国食品药品检定研究院;b 型 C3H 小鼠 20 只,8 周龄,来自北京维通利华实验动物技术有限公司。生产许可证号分别是 SYXK(京)2017-0013 和 SCXK(京)2016-0011。

1.2 仪器

海尔 BCD 冰箱, THERMO 恒温箱, Sartorius 酸度计, ML4002 电子天平, DY89-1 匀浆机, HITACHI 低温离心机, LABCONACO 冻干机, BIO-RAD 电泳仪。

1.3 试剂和耗材

7 mL 无菌离心管, 灭菌手术器械(剪刀, 镊子, 解剖板), 冰袋, CORNING 冻存管, 稳定保护剂、乙酸纤维素薄膜, 三羟甲基氨基甲烷, 柠檬酸、过氧化氢酶-2 染色试剂盒。

收稿日期:2019-02-27

作者简介:魏 杰与王 洪为共同第一作者

魏 杰(1982—),女,硕士.研究方向:免疫遗传检测.E-mail:jane3040320@163.com

王 洪(1977—),女,硕士.研究方向:免疫遗传检测.E-mail:littstar@163.com

通信作者:岳秉飞(1960—),男,研究员,博士.研究方向:动物遗传学.E-mail:y6784@126.com

1.4 标准样品的制备^[4]及均匀性测定程序

1.4.1 观察动物外观及编号;

1.4.2 二氧化碳安乐死处理,解剖小鼠取肾脏,剥除脂肪等附着物。

1.4.3 按照品系,分别称取 BALB/c、C3H 小鼠肾脏总质量。

1.4.4 按照 W(肾):V(水)=1:2 的比例,分别向装有 BALB/c、C3H 肾脏的 2 支管中加入蒸馏水,用匀浆机匀浆。

1.4.5 配平后置于离心机中离心匀浆液。15 000 r/min 离心 30 min,分别分离上清入新管,得到 a 型和 b 型肾匀浆各 1 份(BALB/c 及 C3H 分别为 a、b 型)。

1.4.6 分别向 2 新管中加入一定比例的稳定保护剂混匀,分装至冻存管中,置于冻干机中冻干。共制得 a 型样品 112 瓶,b 型样品 84 瓶。-20 ℃ 冻存待检。各样品取出实验时均需加入 70 μL 水还原后使用。

1.5 样品的均匀性测定

1.5.1 按照 4% 的比例随机抽取 a、b 型样品试样,还原于微量加样器加样。醋纤膜点样电泳、染色,并判读条带。具体实验条件及判定标准参见 GB/T 14927.1—2008 过氧化氢酶-2 项目^[4]。

1.5.2 如所得 a 型条带和 b 型条带均清晰可读,且与标准规定一致,即认为符合样品的均匀性要求。如未通过均匀性检测,则需重新制样并检测,直到符合标准规定。

1.6 样品的稳定性测定

1.6.1 冻融稳定性:a、b 型样品试样各取 3 管,首次测定于-20 ℃ 冰箱中取出加水还原测定。实验条件同 1.5.1。如所得条带清晰可读且与标准一致,

则认为 1 次冻融稳定性良好。初次冻融后,即将试样放入-20 ℃ 冰箱冷冻,每隔 2 h 再次取出,融化点样测定。结果判读依据与初次相同。如过程中发生拖带、弥散等情况,终止冻融测定并记录测定次数。如过程中一直稳定,也以 4 次冻融为测定终点。

1.6.2 时间-温度稳定性

1.6.2.1 制作一个测试计划表,拟定放置的时间和温度。分别将时间和温度设为观测的横、纵坐标,设定 4、20、37 ℃ 这 3 个温度观测点,1、2、3、7、15、30 d 为观测时间,在每个坐标交点,每个型别的样品分别随机抽取 2 瓶进行编号。

1.6.2.2 编号规则。标记顺序为:时间-温度-型别。如 4 ℃ 存放 a 型 1 d 样品标记为“1-4-a1”、“1-4-a2”,b 型 37 ℃ 存放 4 d 样品标记为“4-37-b1”、“4-37-b2”,等。

1.6.2.3 在取出日期,进行稳定性的检测。如所得条带清晰可读且与标准一致,则认为该温度时间坐标点稳定性良好。如所得条带中任何 1 条发生条带模糊不可读,则认为在该坐标点已经发生了样品的稳定性变化,记录不稳定坐标点。且当不稳定点出现后,其之后的时间温度观测点随之取消。但即使一直稳定,本测定的观测周期也仅为 30 d 时长。

1.6.3 汇总各型别稳定性结果,填写时间温度稳定性表格。稳定用“○”表示,不稳定用“×”表示。

2 结果

2.1 均匀性测定结果

本次抽样按照小样本 4% 的比例抽取了过氧化氢酶-2 标准样品 a 型 4 管、b 型 3 管^[4]。经过两次重复电泳染色所得结果一致,表现为 100% a 型和 100% b 型,见图 1。

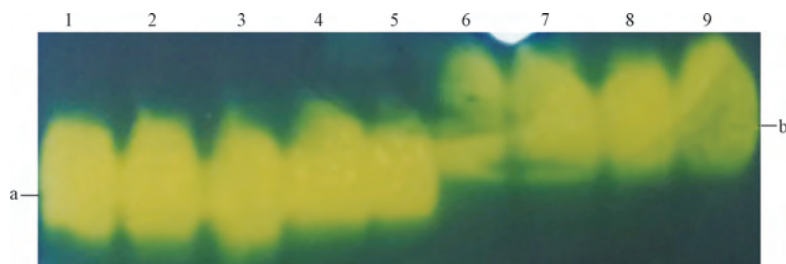


图 1 过氧化氢酶-2 均匀性抽样结果图

注:1~9 分别为 a1、a2、a3、a4、标准 a、标准 b、b1、b2、b3

Fig.1 Sampling results of catalase-2 uniformity

Note: 1~9 shows a1, a2, a3, a4, standard a, standard b, b1, b2, b3 respectively

2.2 冻融稳定性结果

经检验,冻融 1~4 次的 a、b 型过氧化氢酶-2 样品均表现稳定,所制样品的冻融稳定性良好,见图 2。

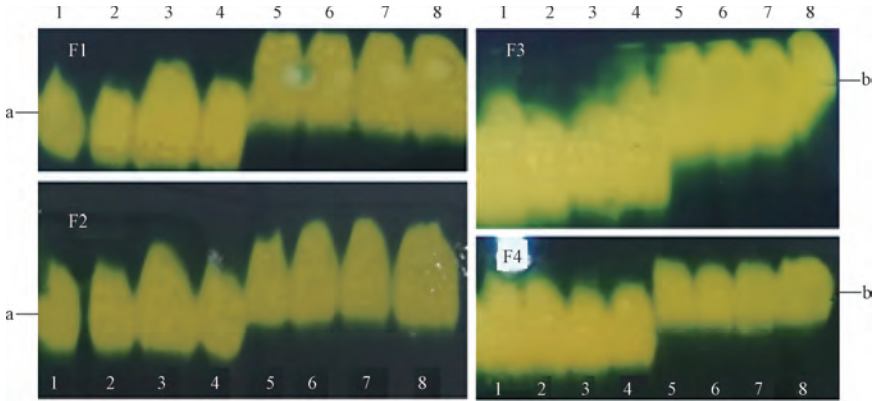


图 2 过氧化氢酶-2 四次冻融稳定性结果图

注:F1~F4 分别代表 1~4 次冻融;每组的 1~3 均为 a 型,4 为标准 a,5 为标准 b,6~8 为 b 型。

Fig.2 4-time freeze thawing stability results of catalase-2

Note: F1~F4 show the first to forth freeze thawing test results; number1 to 3 are the a type samples results, 4 and 5 are standard a and standard b results respectively, and 6 to 8 are the b type samples results.

2.3 时间-温度稳定性测定结果

a 型及 b 型标准样品在 4 ℃、20 ℃ 和 37 ℃ 条件下均可稳定存放至 30 d,不同个体之间没有显著差异,不同型别之间没有显著差异,见表 1。

当然,温度对酶的活性强度仍存在一定影响。4 ℃ 及室温条件下,样品表观颜色基本没有改变且电泳后染料着色度高。37 ℃ 条件下,样品的表观颜色变深,电泳后虽能分辨带型,但染料着色度降低。图 3 给出了 b 型样品 37 ℃ 存放 1~30 d 的加样和染色结果。

表 1 过氧化氢酶-2 样品不同温度时间稳定性结果

Table 1 Results of catalase-2 stability under different time and temperature condition

温度/℃	时间/d					
	1	2	3	7	15	30
4	○	○	○	○	○	○
20	○	○	○	○	○	○
37	○	○	○	○	○	○

注:“○”表示样品稳定

Note: “○” means stable

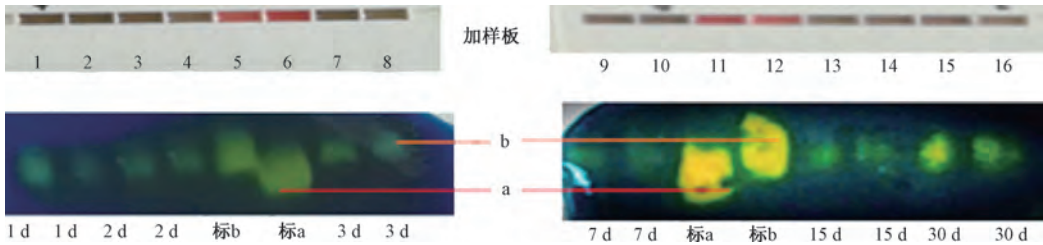


图 3 过氧化氢酶-2 b 型 37℃30 d 稳定性结果图

注:1~16 分别表示 1-37-b1,1-37-b2,2-37-b1,2-37-b2,标准 b,标准 a,3-37-b1,3-37-b2,7-37-b1,7-37-b2,标准 a,标准 b,15-37-b1,15-37-b2,30-37-b1,30-37-b2

Fig.3 30-day stability results of b type catalase-2 at 37 ℃

Note: 1~16 shows 1-37-b1,1-37-b2,2-37-b1,2-37-b2,standard b, standard a,3-37-b1,3-37-b2,7-37-b1,7-37-b2,standard a,standard b,15-37-b1,15-37-b2,30-37-b1,30-37-b2 respectively

3 讨论

3.1 过氧化氢酶与动物选择

过氧化氢酶是一类存在于动植物及微生物体内

的末端氧化酶,其同工酶在物种和组织特异性鉴别、药物毒物等损伤评价等方面有着广泛的应用^[5-7]。不同来源的过氧化氢酶的特点存在差异,就小鼠而言,过氧化氢酶在肝、肾组织中更为丰富,且 1~4 月

龄的小鼠过氧化氢酶活性与年龄无明显相关性,大于4月龄后随年龄增长酶活性降低^[8]。我们在选择动物时使用了2月龄的小鼠,考虑了这一特点,同时兼顾了饲养购买成本。

3.2 样品的型别设计方案

过氧化氢酶-2 是国标 GB/T14927.1—2008 中近交系小鼠检测常规项目之一,其常见带型为快带 a 型和慢带 b 型^[4]。在之前的样品制备中,我们曾做过酯酶-3 的杂合型样品,并通过了均匀性和稳定性验证,对于实际检测也有杂合型的判读应用^[9]。然而,基于文献对于过氧化氢酶-2 杂合型容易误判的研究,本研究仅设定了快带 a 型、慢带 b 型两个容易判读型别^[10]。通过应用标准品比对条带泳动速度的快慢,进行定性判断。

3.3 样品稳定性方案设计

样品从制备到发放需经历存储、运输、实验等环节,温度、时间等因素都会对其品质产生影响。在近几年的样品制备中,我们曾研究过-20、4、20℃和37℃温度坐标以及1~90d时间坐标的存放稳定性,而对于冻融稳定性研究较少^[9,11]。由于采用冷链运输,温度在运输过程中基本可控。但就近两年快递样品代签收的情况,使得部分样品存在冻融状态。为此,在过氧化氢酶-2 样品的制备过程中,我们加强了冻融稳定性研究,共测定了4次冻融结果,其稳定性较好。

生化标记电泳检测是国家标准规定的近交系大、小鼠遗传质量监测方法,也是目前进行近交系小鼠遗传质量检测的有效方法^[12]。但目前所有生化标记检测项目均为定性项目,只能依据电泳快慢进行型别判读,以及通过条带有或无进行稳定性的判断。通过相关研究,我们发现过氧化氢酶在常温下稳定性较好,可以在25℃条件下稳定存在3个月^[13],而我们通常在1个月以内就会完成发放到结果回收。因此时间长度设定在30d以内,温度上也贴合运输和实验中可能存在的温度范围,选择了4、

20℃和37℃进行样品的测定。经测定,在已知的小鼠生化标记样品中,过氧化氢酶-2 在37℃稳定性最佳(酯酶-3 和肽酶-1 在37℃仅能稳定存在1d^[9,11]),30d的样品虽然表现有变色,仍可检测出相应的带型。即能在37℃稳定存在30d,更适于作为样品满足能力验证项目的需求。

参 考 文 献

- [1] 翟培军. CNAL 对能力验证提供者的认可工作启动[J]. 现代测量与实验室管理, 2002, 4: 6.
- [2] 贾汝静, 赵炳南, 张传宝, 等. 医学检验能力验证提供者认可评审不符合项分析[J]. 检验医学, 2016, 31(5): 423-425.
- [3] ISO/IEC GUIDE 43-1: 1997, Proficiency testing by inter laboratory comparisons[S].
- [4] GB11/T 14927.1-2008. 实验动物 近交系小鼠、大鼠生化标记检测法[S].
- [5] 张坤生, 田荟琳. 过氧化氢酶的功能及研究[J]. 食品科技, 2007, (1): 8-11.
- [6] 谢寿安, 吕淑杰, 袁 锋, 等. 华山松大小蠹和红脂大小蠹过氧化氢同工酶酶谱的比较[J]. 西北林学院学报, 2003, 18(2): 61-62.
- [7] 郭国军, 弓飞龙, 唐国盘, 等. 甲苯咪唑对黄河鲤过氧化氢酶活性的影响[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(24): 4830-4838.
- [8] 孔德胜, 王晓然, 李文君, 等. 小鼠组织中过氧化氢酶的活性与年龄的关系[J]. 生物学杂志, 2012, 29(3): 11-14.
- [9] 魏杰, 王洪, 李芳芳, 等. 实验室能力验证用酯酶-3 标准样品的均匀性和稳定性研究[J]. 中国药事, 2015, 29(3): 277-280.
- [10] 王洪, 刘双环, 王淑菁, 等. 近交系小鼠过氧化氢酶-2 遗传生化标记位点的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(6): 12-15.
- [11] 王洪, 魏 杰, 冯育芳, 等. 能力验证项目“实验小鼠肾匀浆中肽酶-3 的检测”样本稳定性分析[A]. 中国药学会第四届药物检测质量管理学术研讨会资料汇编[C]. 厦门, 2017 年.
- [12] 王 洪, 刘双环, 王淑菁, 等. 近交系小鼠 8 个遗传生化标记杂合位点的研究[J]. 实验动物科学, 2011, 28(2): 10-14.
- [13] 冯卓林, 李江华, 刘龙, 等. 添加稳定剂提高过氧化氢酶的稳定性[J]. 工业微生物, 2013, 43(1): 41-45.

Study on Preparation of Catalase-2 Samples Used for Proficiency Testing and Measurement for the Stability and Uniformity

WEI Jie, WANG Hong, JIA Songhua, YUE Bingfei

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To prepare and evaluate catalase-2 sample (a type, b type) with good stability and uniformity. **Method** Extracting 4% samples randomly to finish the uniformity test. Samples were also extracted in the freeze thawing stability test for at most 4 times. As for the time-temperature uniformity, we used time(day) and temperature(℃) as the coordinate value: 1, 2, 3, 7,15, 30 days were used as time coordinate, and 4, 20, 37℃ as temperature coordinate; and 2 bottles of each type samples were observed at every fixed point. **Result** A type and b type clearly performed a and b band on their own., and all of them were able to be stable after 4-time freeze thawing. And also the time-temperature stability test showed that standard samples of a type and b type could be present stable for 30 days at 4,20℃ and 37℃. **Conclusion** Catalase-2 samples behaved well in the uniformity and stability test, which were up for the requirements of proficiency testing.

Key words:Catalase-2; sample; proficiency testing; uniformity; stability

(上接第 38 页)

Breeding and Genotype Identification of *Ifnar* Gene Knockout Mice

CHEN Yakun¹, SUN Jing¹, JIANG Yajun¹, WANG Xinfang¹, LIU Xiaoyu¹,

DAI Lianpan², LU Xuancheng¹, LI Xiaoyan¹

(1.Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206,China)

(2.Beijing Institutes of Life Science, Chinese Academy of Science, Beijing 100101,China)

Abstract: Objective To analyze the identification and breeding method of *ifnar* knockout mice, and provide an ideal animal model for virus further studying. **Method** The introduced homozygous *ifnar* gene knockout mice were bred and reproduced in one cage with one male and two female mice together. The offspring mice genomic DNA was extracted from mice tail and amplified by PCR, and PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis for genotype identification. **Result** The homozygous *ifnar* knockout mice were breeding successfully in our facility, and the genotype can be identified by our established PCR method .

Key words:*Ifnar*; knockout; mouse; breeding; genotype identification