

文章编号: 1006-6144(2009)03-0347-04

# 一种新型分光光度计液槽的设计及其在 临床生化检验中的应用

黄萍<sup>1</sup>, 邓雅斌<sup>1</sup>, 王华<sup>2</sup>, 李东辉\*<sup>1</sup>

(1. 厦门大学医学院抗癌研究中心, 福建厦门 361005; 2. 厦门大学医院, 福建厦门 361005)

**摘要:** 设计并制作了可容纳塑料离心管的新型分光光度计液池。液池适用的样品体积变化范围宽(10~500 μL), 尤其适合于生物临床样品、强碱性介质以及大批样品的分析。该装置应用于血清蛋白质(总蛋白、白蛋白)、尿素氮、葡萄糖的测定及聚合酶链式反应(PCR)反应管的均一性检验, 取得了满意的结果。

**关键词:** 液槽; 分光光度法; 分光光度计

**中图分类号:** O657.32      **文献标识码:** A

分光光度法是生物和临床医学研究中常用的分析手段<sup>[1-4]</sup>。由于生物和临床样品成分复杂, 测定之前需进行预处理, 离心分离是常用的技术。经离心处理的样品在进行分光光测量时需将样品移入玻璃或石英液池, 操作不方便, 对于大批量样品的测定, 这一缺点显得尤为突出。生物样品常易吸附于液池表面造成污染, 在进行后续测定之前, 需清洗液池, 否则会导致测定误差; 对于需要回收的样品, 测定之后还需将样品移回原离心管中, 使操作步骤增多; 对于微量样品的测定需使用微量液池, 操作更加不便。实现样品的带管直接测定, 可使操作步骤大为减少, 且可避免样品污染。此外, 对于腐蚀性介质(如强碱性介质), 玻璃或石英液池并不适用。我们设计了可容纳离心管的液池槽, 实现了样品的带管检测, 并将其应用于血清蛋白质(总蛋白、白蛋白)、尿素氮、葡萄糖的测定, 及聚合酶链式反应(PCR)反应管的均一性检验, 结果令人满意。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

热电 Genesis-5 型分光光度计(美国), 附 1 cm 石英液池、50 μL 微量石英液池。0.5 mL、0.2 mL(薄壁型)PCR 反应管为上海生物工程公司产品。

环氧树脂, 固化剂。总蛋白试剂盒-IP(双缩脲法)、白蛋白试剂盒-ALB(溴甲酚绿法)、尿素氮试剂盒-BUN(二乙酰-茆法)、葡萄糖试剂盒-GLU(氧化酶法)均为北京北化康泰临床试剂有限公司产品。四羧基铝酞菁(Tetracarboxyl Aluminum Phthalocyanine, AlC<sub>4</sub>Pc)由本课题组根据文献合成。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 液池的制作** 以 1 cm 石英液池为内模制成纸质外模。取一定量环氧树脂, 加入适量固化剂, 充分搅拌, 混合均匀。将混合物填入纸模型中, 再将塑料离心管(0.5 mL 或 0.2 mL)垂直插入环氧树脂中, 静置使环氧树脂固化。待树脂充分固化后, 在适当位置从侧面将模型镂空, 使离心管底部暴露, 将离心管取出, 即制成可容纳离心管的液槽(图 1)。

收稿日期: 2008-12-02      修回日期: 2009-04-12

基金项目: 国家自然科学基金(No. 20105005); 福建省科技项目(No. 99H048); 现代分析科学教育部重点实验室资助项目(Analsci200706)

\* 通讯联系人: 李东辉, 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物医学分子光谱学。

**1.2.2 血清蛋白、尿素氮、葡萄糖的测定** 采集临床血清样品,按试剂盒提供的操作步骤分别进行血清蛋白质(总蛋白、白蛋白)、尿素氮、葡萄糖的测定。总蛋白测定波长为 540 nm,白蛋白测定波长为 630 nm,尿素氮测定波长为 520 nm,葡萄糖测定波长为 505 nm。测定结果与临床数据作比较。

**1.2.3 PCR 反应管的均一性检验** 根据 PCR 管管盖上的编号进行分类,分出不同批次的 PCR 管。在设定波长处测定不同批次 PCR 反应管的吸光度,并进行比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 液池结构及光路

图 1 是液池的结构及光路。根据离心管的大小,可制作能容纳 0.5 mL 或 0.2 mL 离心管(或 PCR 管)的液槽。通过设计入射光入口与出射光出口的大小,可以调整测定体积。实验中采用 0.2 mL 液池,因为 0.2 mL 离心管管壁更薄,光损耗小(尤其是对短波长的光),离心管管间差异小,因而具有更好的测定精度。另外,采用 0.2 mL 离心管,可测定更小体积的样品。所设计的液槽具有如下特点:可实现样品的带管直接检测,操作简便;不发生样品间的交叉污染;适合于大批量样品的连续测定及测定后的保存;可用于对玻璃和石英腐蚀性强的介质(如强碱、氢氟酸);可用于塑料离心管、PCR 反应管的生产质控。虽然此液槽的设计初衷是为了解决生物医学样品的带管检测问题,但我们认为,只要不腐蚀或与塑料离心管发生反应,即可使用该液槽进行检测。

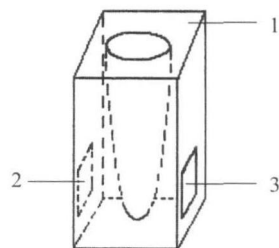


图 1 新型分光光度计液槽

Fig. 1 Schematic illustration of the designed cuvette

1. cuvette; 2. entrance for incident light; 3. outlet for transmitted light.

### 2.2 薄壁型塑料离心管的吸收行为

考察了薄壁型塑料 PCR(空管)在新型液槽中的吸收光谱行为(图 2),可知在 300 nm 以下的紫外区,塑料离心管对光有较强的吸收。因此,在以后的测定和检验工作中,均选定测定波长在 400 nm 以上。

### 2.3 液池的线性响应行为

为考察此装置应用于定量分析的可行性,以  $\text{AlCl}_4\text{Pc}$  为分子光谱探针,测定不同浓度  $\text{AlCl}_4\text{Pc}$  的吸光度,并绘制工作曲线。结果显示,  $\text{AlCl}_4\text{Pc}$  的线性响应关系良好(图 3),表明此装置可用于定量分析。

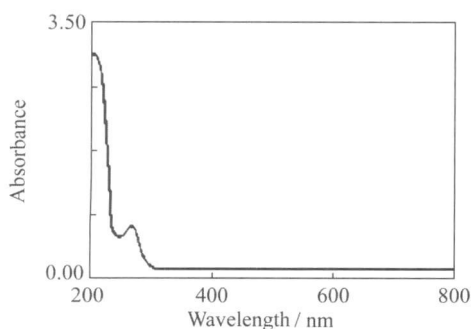


图 2 薄壁型 PCR 的吸收光谱

Fig. 2 Absorption spectrum of a PCR tube

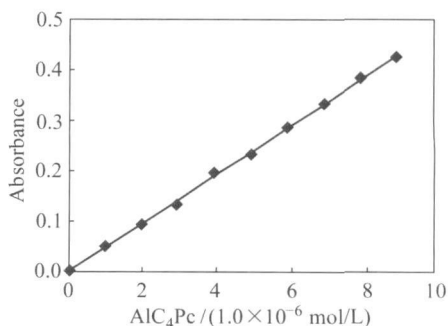


图 3 采用设计的液槽测定  $\text{AlCl}_4\text{Pc}$  的工作曲线

Fig. 3 Calibration curve of  $\text{AlCl}_4\text{Pc}$  in ethanol media determined by the new-designed cuvette

### 2.4 血清蛋白、葡萄糖、尿素氮的测定

将本文设计的液槽用于采集自临床的人血清样品中的总蛋白、白蛋白、尿素蛋白及葡萄糖的测定,并与临床数据作比较。表 1~4 显示,本法测定的结果与临床数据相当吻合,表明了本文设计的液槽的实用性。该液槽可用于临床常规生化检验。

### 3.5 PCR 反应管均一性的检验

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术是一种高效体外扩增技术,近二十年来在生命科学领域得到广泛的应用,也是临床分子诊断的重要手段之一。由于这一技术具有极高的灵敏度,因而

表1 本文设计的液槽测定人血清总蛋白的结果与临床数据之比较

**Table 1 Comparison of the content of total protein in human sera determined by IP kit using the designed cuvette with the clinical data**

No.	Total protein(g/L)		No.	Total protein(g/L)	
	this method	clinical data		this method	clinical data
1	75.0	77.6	4	80.1	74.1
2	84.4	83.2	5	73.8	73.4
3	70.0	72.3			

表2 本文设计的液槽测定人血清白蛋白的结果与临床数据之比较

**Table 2 Comparison of the content of albumin in human sera determined by ALB kit using the designed cuvette with the clinical data**

No.	Albumin(g/L)		No.	Albumin(g/L)	
	this method	clinical data		this method	clinical data
1	45.3	43.9	4	47.2	49.1
2	36.1	38.4	5	41.9	47.1
3	49.5	47.6			

表3 本文设计的液槽测定人血清葡萄糖的结果与临床数据之比较

**Table 3 Comparison of the content of glucose in human sera determined by GLU kit using the designed cuvette with the clinical data**

No.	Glucose(mmol/L)		No.	Glucose(mmol/L)	
	this method	clinical data		this method	clinical data
1	5.1	5.1	4	6.3	6.9
2	5.3	5.4	5	5.3	5.7
3	4.9	5.1			

表4 本文设计的液槽测定人血清白蛋白的结果与临床数据之比较

**Table 4 Comparison of the content of urea in human sera determined by BUN kit using the designed cuvette with the clinical data**

No.	Nitrogen of urea(mmol/L)		No.	Nitrogen of urea(mmol/L)	
	this method	clinical data		this method	clinical data
1	4.0	4.2	4	5.2	5.5
2	6.8	6.9	5	7.1	7.3
3	4.7	5.0			

PCR 实验对反应条件很敏感, 保证反应条件的一致对 PCR 技术, 尤其是定量 PCR 技术是十分重要。作为反应的必用材料, PCR 反应管的质量是否均一对反应结果也会产生直接影响。因此, 选用均一性良好的 PCR 反应管对于 PCR 反应的准确进行具有实际意义。采用生物学检测常用的波长(即表中的波长)对三种批号的进口薄壁 PCR 反应管的吸光度进行测定, 结果列于表 5。表 5 显示, 同一批次的 PCR 管管间差异较小(相对标准偏差均在 5% 以下), 而不同批次的 PCR 管其吸光度则出现较大偏差, 提示在 PCR 反应的实际工作中, 应选用相同批次的 PCR 管。

表5 用设计的新型液槽检测 PCR 管的均一性

**Table 5 Test of homogeneity of PCR tubes using the designed cuvette**

$\lambda$ (nm)	No.	Patch			$\lambda$ (nm)	No.	Patch		
		1	8	16			1	8	16
405	1	0.224	0.220	0.204	546	1	0.190	0.168	0.182
	2	0.232	0.222	0.199		2	0.181	0.167	0.178
	3	0.232	0.227	0.200		3	0.181	0.163	0.176
	4	0.220	0.227	0.207		4	0.189	0.167	0.175
	5	0.230	0.225	0.207		5	0.191	0.166	0.174

(续表5)

$\lambda$ (nm)	No.	Patch			$\lambda$ (nm)	No.	Patch		
		1	8	16			1	8	16
RSD(%)		2.36	1.39	1.87	RSD(%)		2.67	1.17	1.79
450	1	0.203	0.192	0.192	630	1	0.175	0.156	0.176
	2	0.199	0.190	0.196		2	0.179	0.156	0.172
	3	0.201	0.189	0.188		3	0.172	0.158	0.170
	4	0.197	0.193	0.186		4	0.176	0.155	0.167
	5	0.202	0.189	0.186		5	0.177	0.153	0.164
RSD(%)		1.20	0.98	1.74	RSD(%)		1.48	1.20	2.71
492	1	0.200	0.180	0.198	690	1	0.176	0.156	0.172
	2	0.197	0.176	0.195		2	0.178	0.159	0.168
	3	0.188	0.173	0.189		3	0.172	0.155	0.174
	4	0.194	0.173	0.180		4	0.178	0.156	0.167
	5	0.193	0.171	0.185		5	0.175	0.150	0.171
RSD(%)		2.33	2.02	3.87	RSD(%)		1.42	2.12	1.71

## 参考文献:

- [1] VASILAROU A M G, GEORGIOU C A. Journal of Chemical Education[J], 2000, 77(10): 1327.
- [2] Li N, Chozinski A M, Azarenko A, Daley L S, Bowyer W J, Buban T, Edwards G E, Callis J B, Strobel G A. Spectroscopy[J], 1997, 12(1): 37.
- [3] CAO Shu-xia(曹书霞), ZHAO Yu-fen(赵玉芬). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)[J], 2004, 24(10): 1197.
- [4] GUO Yao-jun(郭尧君). The Spectrophotometric Techniques and Their Applications in Biochemistry: Ultraviolet, Visible, and Near-infra(分光光度技术及其在生物化学中的应用: 紫外-可见-近红外)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1987.

## A New-designed Cuvette for Spectrophotometry and Its Applications in Clinical Assay

HUANG Ping<sup>1</sup>, DENG Ya-bin<sup>1</sup>, WANG Hua<sup>2</sup>, LI Dong-hui<sup>\*1</sup>

(1. Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005;

2. Xiamen University Hospital, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract:** A new cuvette which is able to contain a plastic centrifuge tube or a PCR tube for directly spectrophotometric detection was designed and tested. Absorption characteristics of a plastic centrifuge tube in the cuvette was investigated. The tubes showed obvious absorption in ultra-violet region at wavelength less than 300 nm, indicating that the detection wavelength should be set above 400 nm when applying the cuvette for the assay of samples. Plastic tube in this new-designed cuvette showed excellent linear response. Based upon the above investigations, this new-designed cuvette was applied to the determination of total protein, albumin, glucose and urea in human sera, the results were in good agreement with those of clinical assays. Besides, homogeneity of PCR tubes has been examined, and the results suggested that PCR tubes with a same batch number should be used for performing an accurate PCR experiment. In summary, this new-designed cuvette bears the merits of simplicity for use and variable sample volume in a wide range (10~ 500  $\mu$ L), and is suitable for samples with large number. Further, contamination can be avoided for biological and clinical samples by using this cuvette.

**Keywords:** Cuvette; Spectroscopy; Spectrophotometer