

样品硒盐(含硒 4.61 μ g)中,第一次加入硒标准液(加标量 2.50 μ g),测得硒量为 6.99 μ g,回收率为 95%;第二次加入硒标准液(加标量 5.00 μ g),测得硒量为 9.46 μ g,回收率为 97%。

参考文献

1. 程广禄,等. 有机分试手册. 地质出版社;1985: 275

(1995—11—16 收稿)

一种微量快速提取纯化细菌 染色体 DNA 的新方法

山东省卫生防疫站(250014)

傅继华 翟文济 关冰

近年来随着分子生物学技术的迅速发展,细菌染色体 DNA 提取与纯化技术,越来越被更多的研究者所利用,但目前的细菌染色体提取与纯化方法存在需有冷冻离心机、振荡培养箱等特殊设备,且试剂用量大,试验环境污染严重等特点,使很多基层单位及设备不足的单位开展此项工作受到限制。为解决这一矛盾,我们参照国内外目前常用的细菌染色体 DNA 提取与纯化方法,加以改进,建立了一种新的方法,取得了良好的效果,现介绍如下:

将目的菌分纯培养,挑单个菌落种 5ml 普通肉汤或 LB 汤管,37℃振荡培养或静置培养过夜。取菌液 1.5ml 于 eppendorff 离心管 6 000rpm 离心 10min 集菌,弃上清,此时应有明显的细菌沉淀集中在离心管底,如菌量太少,可再加 1.2ml 过夜培养物,重复离心集菌。尽量去除离心管中液体。沉淀用 0.6ml TE 缓冲液(pH8.0)悬菌,使沉淀充分分散。然后加入 100mg/ml SDS(十二烷基磺酸钠)80 μ l,充分混匀后,置 56~65℃作用 5~10min,此时管内液体应透明,如不透明,可适当提高作用温度或延长作用时间,至离心管内液体透亮。加 0.6ml TE 饱和酚,充分颠倒混匀,12 000rpm 离心 10min。离心后,管内液体被分为三层,上层为含有染色体 DNA 的 TE 溶液,中间膜状物为蛋白质,下层为液体酚。小心吸取上层液相(尽量避免吸走中间蛋白膜)移入一新 eppendorff 离心管,加饱和酚、氯仿(三氯甲烷)、异戊醇 0.6ml(25:24:1 V:V:V)充分颠倒混匀,12 000rpm 离心 10min,将上层液相移入另一干净离心管,重复酚氯仿抽提 2~3 次,至中间层蛋白膜消失,上层液相再加 0.6ml 氯仿异戊醇(24:1 V:V)抽提一次。上层

液体移另一新离心管,加 0.8ml 无水冷乙醇、1/10 体积 2.5mol/L NaAc, -70℃ 30min~1h 或 -20℃ 沉淀 2~4h,15 000rpm 离心 15min,弃上清,加 75%乙醇 1ml 悬起沉淀,12 000rpm 离心 10min,弃上清,再加入 75%乙醇 1ml,重新悬起沉淀,离心后弃上清,离心管口向下,置于一干净滤纸上,室温晾干或真空抽干备用。

使用本方法提取得到的染色体 DNA,与传统大量提取方法提取得到的 DNA 的质量相同,可供打点 DNA-DNA 分子杂交或制作染色体 DNA 酶切图谱等分析用。该方法不需冷冻离心机,国产台式离心机即可,节省试剂用量(约为原来的 1/15~1/25),省去异丙醇沉淀等步骤。另外,染色体 DNA 纯化过程中所使用的苯酚、氯仿等有机溶剂,对人体危害较大,该方法试剂用量小,从而减少使用过的废试剂对环境的污染;并具有省时(较原方法缩短 10h)、不需转种扩增受试菌、可一次作大量样品(12 份)等传统方法无法比拟的优点,适用于实验设备受限制及基层实验室,是一种快速、简便、经济、易于推广的新方法,经反复实验证明,并得到国内同行专家的证实。

(1996—01—24 修回)

氟乙酰胺急性中毒的快速检验

谢碧海¹ 谢爱珍² 金丽萍³ 林仁惠⁴

氟乙酰胺,又名敌蚜胺、氟素儿,是一种无味、无臭、高效、剧毒(人口服致死量为 0.1~0.5g)内吸性二重类有机氟农药。可通过消化道、皮肤、呼吸道不同途径引起中毒。氟乙酰胺侵入机体后,主要作用于中枢神经系统、心血管系统和糖代谢过程。多在 0.5~2h 发病。氟乙酰胺吸收后,在体内脱氢形成氟乙酸,先与三磷酸腺苷和辅酶 A 作用,形成氟乙酰辅酶 A,再与草酰乙酸作用,生成氟柠檬酸而抑制乌头酸酶,中断三羧酸循环,故而使柠檬酸积聚,丙酮代谢受阻。

1 实验部分

氟乙酰胺检验不少文献均有介绍^[1-4],但这些方法,样品均采用有机溶剂提取、水浴(60℃)蒸干后再进行测定,一般送到样品后需 3h 以上才能报告结果,往往会贻误抢救时间,使病人得不到及时

1 浙江省丽水地区卫生防疫站(323000)
2 浙江省丽水市人民医院
3 浙江省丽水市卫生防疫站
4 浙江省遂昌县卫生防疫站

正确治疗。笔者针对这一情况,改变样品处理方法,将有机溶剂提取脱水、蒸干测定改为直接用水提取,以水提取液直接测定。

1.1 方法原理

1.1.1 纳氏试剂反应原理 氟乙酰胺水溶液经碱水解的氨,与纳氏试剂作用生成桔红色沉淀。

1.1.2 茜素铬褪色反应原理 在酸性溶液中,茜素磺酸钠与铬盐形成无色络合物,当氟离子存在时夺取铬离子生成无色难解离的氟化铬离子而释放出黄色的茜素磺酸。

1.2 试剂 ①纳氏试剂:取碘化汞 11.5g 和碘化钾 8g,用少量水溶解,再加水至 50ml,再加入 50ml 25% 氢氧化钠溶液,静置过夜,取上清液,贮于棕色瓶中。②茜素铬溶液:a. 硝酸铬溶液:取硝酸铬 0.1g 溶于 20ml 盐酸中,加水至 100ml;b. 茜素磺酸钠溶液:取 0.1g 茜素磺酸钠溶于 100ml 乙醇中微温溶解。临用时将 a、b 液等量混匀即可。

1.3 样品处理

1.3.1 如检样为鼠药原液,则取原药液 0.5ml 加水至 10ml。

1.3.2 如检样为饼干、地瓜片等固态毒饵,则取样适量,加水 20ml,振摇 3min,静置片刻后过滤,滤液作测定用。

1.3.3 如检样有颜色,则加少量活性炭脱色、过滤。

1.4 样品测定

1.4.1 取滤液 5ml 于 10ml 比色管中,加纳氏试剂 2ml 混匀。如含氟乙酰胺则会有下列呈色反应,淡黄→亮黄→深黄→棕黄→桔红色沉淀。含量高时则立即变黄继而出现红棕色沉淀。

1.4.2 取滤液 5ml 于 10ml 比色管中,同时取蒸馏水、氟标准于另两支比色管中作为阴性和阳性对照。向三支比色管中各加茜素铬试剂 1ml 混匀,观察结果。如样品中含有氟乙酰胺溶液紫红色褪去,逐渐变为黄色。如含量高时则立即呈黄色。

2 讨论

2.1 采用直接水溶液提取法,能大大缩短实验时间,一般样品 30min 内能报告结果,比常规有机溶剂提取法缩短 5/6 以上,为中毒病人抢救赢得宝贵时间,同时也能节省试剂成本。

2.2 直接水提取法适用于灭鼠原药和灭鼠毒饵的样品测定。

2.3 当纳氏试剂反应和茜素铬褪色反应均呈阳性时,可判定样品中含有氟乙酰胺。

2.4 正常食品中虽含有微量氟,但不足以使

茜素铬试剂褪色,而新鲜桔汁可使两种试剂反应呈阳性。遇到此种样品测定须防假阳性结果。

2.5 解氟灵是氟乙酰胺中毒有效解毒剂,但许多医院常缺此药,如遇无此药,可给病人饮酒 50~150g 解毒。

参考文献

1. 刘志明. 现代实用毒物分析. 北京:人民卫生出版社;1984:443
2. 刘万忱. 常见环境毒物的急性中毒与快速检验. 哈尔滨:黑龙江科学技术出版社;1991:68
3. 丁革. 常见毒物分析. 第二版. 沈阳:辽宁科学技术出版社;1988:519
4. 公安部人民警察干部学校. 刑事毒物分析. 北京:群众出版社;1979:192

(1995-12-26 收稿)

F-800 型血球计数仪用四种溶血素测定 Hb 结果分析

浙江省宁海县人民医院(315600)

吴海裘 胡家林

为保证先进仪器测定结果的准确性,除严格仪器说明书规程操作外,试剂的质量直接影响测定结果。近几年,随着进口血液分析仪的大量使用,国产试剂正在代替进口试剂用于实际。为了解进口试剂与国产试剂的使用效果,我们用产地不同的四种 F-800 型血球计数仪专用溶血素测定 Hb 质控品,以探讨其测定结果准确性,报告如下:

1 材料和方法

1.1 仪器 Sysmex 系列 F-800 型血球自动计数仪(简称 K-800),日本东亚株式会社产品;校正参考液(浓度 15mg/dl),日本 Sysmex 系列产品;室内 Hb 质控液(靶值 Hb12.3mg/dl),浙江省宁波市临检中心生产,批号 940927;F-800 血球计数仪专用稀释液;四种溶血素分别是 F-800 专用溶血素、台湾元生生物科技股份有限公司生产的 F-800 溶血素、深圳和上海生产的溶血素。

1.2 方法

1.2.1 用 F-800 型血球计数仪标准参考液测试并标准仪器。

1.2.2 仪器自动吸取 Hb 质控液 20 μ l,稀释成 10ml,加入 3 滴溶血素,在 25℃ 水浴中旋转混匀 40 次(约 15s),仪器测 Hb 含量。每一种溶血素分别测同一份室内质控品 2 次,记录结果,莫尼卡质控图制图,如每天测 2 次,共测 20 次。