

基于酚酞指示法半定量健康人群唾液中 尿素酶活性

房艳^{1,2*}, 付萌¹, 高俊海^{1,2}

(1. 谱尼测试集团股份有限公司, 北京 100095; 2. 谱尼测试集团北京科学技术研究院有限公司, 北京 100095)

摘要: **目的** 建立一种半定量唾液中尿素酶活性的酚酞指示法。**方法** 基于尿素酶可以特异性地催化尿素水解并引起溶液 pH 变化, 可直观评价健康人群唾液中尿素酶活性, 通过优化尿素溶液浓度、反应时间等因素并评估其对检测限的影响。**结果** 当尿素溶液浓度为 7 g/L, 反应时间 5 min 时尿素酶活性的检测限为 0.80 U/mL, 反应时间 17 h 时尿素酶活性的检测限为 0.04 U/mL。进一步通过 200 份不同唾液样本实际测试, 确定健康人群唾液中尿素酶活性应不高于 0.064 U/mL。**结论** 该方法操作简便、成本低, 可直观半定量唾液中尿素酶活性, 为口腔和全身疾病的早期评估和诊断提供依据, 也可为胃中易产生尿素酶的幽门螺旋杆菌的检测提供一定的技术参考。

关键词: 尿素酶; 活性; 唾液; 酚酞指示法; 幽门螺旋杆菌

Semi-quantitative determination of urease activity in saliva of healthy human by phenolphthalein indicator method

FANG Yan^{1,2*}, FU Meng¹, GAO Jun-Hai^{1,2}

(1. Pony Testing International Group Co., Ltd., Beijing 100095, China; 2. Pony Testing International Group Beijing Science and Technology Research Institute, Beijing 100095, China)

ABSTRACT: Objective To establish a semi-quantitative method for the detection of the urease activity in saliva was by a phenolphthalein indicator. **Methods** According to the principle that the pH varies as urease specifically catalyzing hydrolysis of urea in a solution and causing pH change, the urease activity in the saliva of healthy people could be visually evaluated. The urea solution concentration, reaction time and other factors were optimized and its impact on the detection limit was evaluated. **Results** While a urea solution with the concentration of 7 g/L was adopted, the limit of detection (LOD) of urease activity were 0.80 U/mL and 0.04 U/mL, corresponding to the reaction time of 5 min and 17 h, respectively. A further study based on 200 saliva samples from healthy human showed that the urease activity in saliva should be less than 0.064 U/mL. **Conclusion** This method is easy to operate with low cost, and suitable for visual semi-quantitative determination of urease activity in saliva, therefore providing a basis for early assessment and diagnosis of oral and systemic diseases and a technical reference for detection of *Helicobacter Pylori* caused by stomach illness.

KEY WORDS: urease; activity; saliva; phenolphthalein indicator method; *Helicobacter Pylori*

基金项目: 特膳食品安全与营养成分检测关键技术北京市工程实验室创新能力建设项目(京发改(审)[2017]184号)

Fund: Supported by Beijing Engineering Laboratory Innovation Ability Construction Project of Key Technology of Special Food Safety and Nutrition Composition Detection (Beijing Development and Reform [2017])

*通讯作者: 房艳, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品、环境、药品、新能源等相关产品及材料的分析化学。E-mail: yfh@ponytest.com

*Corresponding author: FANG Yan, Ph.D, Senior Engineer, Pony Testing International Group, Beijing 100095, China. E-mail: yfh@ponytest.com

1 引言

唾液是一种无色无味、具有黏性的液体,由口腔中 3 对唾液腺(腮腺、颌下腺、舌下腺)与一些小唾液腺分泌的液体混合组成^[1]。唾液中含有多种物质,蛋白质、有机酸、激素等有机物及钠、钾、镁等无机物^[2,3]共占 0.6%,水分占 99.4%。其中,可离子化物质组成可调节唾液 pH,一般情况下,健康人群的唾液 pH 为 6.0~7.9^[4]。

尿素酶是一种含镍的寡聚酶^[5],可由口腔内可能含有的唾液链球菌、内氏放线菌、沃氏葡萄球菌、幽门螺旋杆菌等^[6-9]细菌产生。尿素酶能够引发多种人类疾病,与口腔相关的包括龋齿、牙周炎^[10]等,其他常见症状为胃炎、肾盂肾炎、尿路结石等^[11]。通常,口腔内的尿素酶被视为诊断性生物标志物,可用于评估早期口腔和全身疾病^[12,13]。食用不洁净食品有可能导致幽门螺旋杆菌的传染。

目前,尿素酶的检测方法主要有纳氏试剂比色法^[11,14]、拉曼光谱法^[12]、酚红指示剂法^[15]、胶体金免疫层析法^[16,17]、精密试纸法^[18]等。纳氏试剂含汞,拉曼光谱需使用硝酸银等有毒试剂且设备普及率较低,因此前 2 种方法均未得到广泛应用。酚红指示剂法可以快速定性胃粘膜等活体组织中的尿素酶,但其指示 pH 范围 6.8~8.2 与唾液相近而无法有效评估变化。以胶体金免疫层析法为基础的唾液测试板、精密试纸法也均可实现唾液中尿素酶的定性检测,但唾液中尿素酶的实际活性却鲜有研究。因此,本研究拟利用尿素酶催化尿素水解的特性,直观评价并研究健康人群唾液中尿素酶活性,以期为口腔和全身疾病的早期评估和诊断提供依据,并减轻幽门螺旋杆菌传染。

2 材料与方法

2.1 设备与试剂

Millipore-Q 超纯水净化仪(美国 Millipore-Q 公司); PHS-3c pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

尿素酶(1000 U/mL, 德国 sigma-aldrich 公司); 无水乙醇、酚酞、尿素(分析纯, 北京化工厂); pH 精密试纸(6.8~8.0, 杭州试三科技有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 采样

样品 200 份来源于不同性别、年龄的健康人群的唾液样本,采集当日完成测试。其中 106 份来自男性,94 份来自女性;20 岁~25 岁之间为 80 份,26~30 岁之间为 70 份,31~40 岁之间为 50 份。

2.2.2 溶液配制

尿素-酚酞溶液:分别量取 100 mL 尿素溶液、1 mL 1% 酚酞乙醇溶液于三角瓶中,混匀,现用现配。

2.2.3 预处理

将 10 mL 尿素-酚酞溶液与 1 mL 尿素酶溶液混合,静置适当时间后,观察颜色变化。

3 结果与分析

3.1 尿素溶液浓度的确定

分别将 10 mL 0.1、0.7、7、35、70、140、280 g/L 的尿素溶液与 1 mL 0.5 U/mL 的尿素酶溶液混合,静置 30 min 后,pH 计检测并记录数值(每个浓度三个重复),见图 1。由于尿素酶可以特异性地催化尿素水解,释放出两分子氨和一分子二氧化碳,因此可引发溶液 pH 变化。如图 1 所示,尿素溶液浓度在 0.7~70 g/L 范围内时,pH 变化最为明显,且 4 组样品间无显著差异,因此本研究选择以尿素溶液浓度在 0.7~70 g/L 的范围内进行考察。

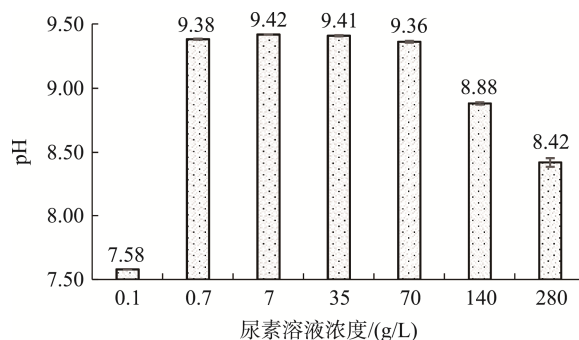


图 1 不同浓度尿素溶液的检测结果($n=3$)

Fig.1 Test results of various concentrations of urea solution ($n=3$)

3.2 尿素酶活性与时间相关性考察

将 10 mL 70 g/L 尿素溶液分别与 1 mL 0.25、0.50、0.60、0.75、1.00、1.25、2.50、5.00 U/mL 的尿素酶溶液充分混合,静置 5、30、60、90 min 后测试 pH 变化(每个浓度三个重复),见表 1。如表 1 所示,静置 5 min 和 30 min 时,pH 升高程度与尿素酶活性呈正比例关系;静置 60~90 min 时,0.75 U/mL 以下的低尿素酶活性组的 pH 下降明显,其余高尿素酶活性组的 pH 基本稳定,可能是由于环境空气中二氧化碳等物质溶入且低浓度组反应释放速率较慢等因素造成的,但不同时间范围的各项溶液均呈碱性($\text{pH} > 8.0$),因此时间因素对 pH 变化的影响不显著。为了直观评价,采用指示剂法进行实验。

3.3 酚酞指示法检测尿素酶活性

将 10 mL 尿素-酚酞溶液(尿素溶液浓度为 70 g/L)分别与 1 mL 0.63、1.25、2.50、5.00、10.00、50.00 U/mL 的尿素酶溶液充分混合,观察溶液颜色变化。5 min 内,尿素酶活性不小于 2.50 U/mL 的实验组溶液呈现肉眼可见的紫红色,且随着反应时间延长溶液颜色加深。

表1 不同活性尿素酶溶液与尿素溶液混合后的pH变化
Table 1 pH variation as different active urease solutions specifically catalyzeshydrolysis of urea solution

序号	尿素酶活性/(U/mL)	5 min	30 min	60 min	90 min
1	0.25	8.01±0.01	8.84±0.01	8.64±0.05	8.59±0.01
2	0.50	8.04±0.01	8.97±0.00	8.96±0.01	9.00±0.00
3	0.60	8.09±0.01	9.02±0.01	8.90±0.02	8.80±0.01
4	0.75	8.12±0.01	9.12±0.01	9.07±0.00	9.03±0.00
5	1.00	8.16±0.00	9.16±0.01	9.17±0.00	9.16±0.01
6	1.25	8.17±0.02	9.27±0.03	9.30±0.03	9.29±0.01
7	2.50	9.05±0.00	9.30±0.01	9.28±0.01	9.24±0.00
8	5.00	9.10±0.01	9.30±0.01	9.28±0.00	9.30±0.00

为进一步优化酚酞指示法对尿素酶活性的检测能力,将尿素-酚酞溶液中尿素溶液的浓度调整为35 g/L和7 g/L分别测试,并测试该条件下尿素酶活性的检测限。结果显示,当尿素溶液浓度为35 g/L时,静置5 min及30 min时的尿素酶活性检测限均为1.00 U/mL。当尿素溶液浓度为7 g/L时,静置5 min时的尿素酶活性检测限为0.80 U/mL,静置30 min时的尿素酶活性检测限为0.50 U/mL,静置17 h时的尿素酶活性检测限为0.04 U/mL。

因此,本研究确定的酚酞指示法为尿素溶液浓度为7 g/L,反应时间5 min可检测样品中不低于0.80 U/mL的尿毒酶活性,反应时间17 h可检测样品中不低于0.04 U/mL的尿素酶活性。

3.4 唾液样品测试

取200份不同的唾液样本,分别取1 mL与10 mL尿素-酚酞溶液(尿素溶液浓度为7 g/L)混合。实验结果表明,5 min时,所有溶液均未发生显色,即所有唾液样本的尿素酶活性均低于0.80 U/mL;放置17 h时,仅3份溶液呈现肉眼可见的紫红色,与尿素酶活性为0.064 U/mL时现象一致,说明仅3份唾液样品中尿素酶活性接近0.064 U/mL,其余唾液样本中尿素酶活性均低于0.064 U/mL,即健康人群唾液中尿素酶活性不高于0.064 U/mL。

4 结论

本研究建立了一种酚酞指示法半定性健康人群唾液中尿素酶的活性,通过优化尿素溶液浓度、反应时间等因素并评估其对检测限的影响,最终确定尿素-酚酞溶液中尿素溶液浓度为7 g/L,且在该条件下反应时间5 min可检测样品中不低于0.80 U/mL的尿毒酶活性,反应时间17 h可检测样品中不低于0.04 U/mL的尿素酶活性。将该方法应用到200份不同唾液样本的实际测试,确定健康人群唾液中尿素酶活性不高于0.064 U/mL。即使用非健康人群的

唾液样本测试时可在17 h内或更短时间观察到显著颜色变化,且反应时间越短则尿素酶活性越高,也代表着健康隐患危险等级越高。该方法操作简便、成本低,可直观半定量唾液中尿素酶活性,为口腔和全身疾病的早期评估和诊断提供依据。同时,唾液中的尿素酶与胃中尿素酶具有同源性^[19],且具有一定的联系^[20],因此该方法也可为胃中易产生尿素酶的幽门螺旋杆菌的检测提供一定的技术参考。

参考文献

- [1] 周志芳. 唾液和血清中尿素氮、肌酐、尿酸含量相关性分析及临床应用研究[D]. 长沙: 中南大学, 2009.
Zhou ZF. Correlation analysis and clinic application levels of UN, Cr and UA of saliva and serum [D]. Changsha: Central South University, 2009.
- [2] 朱兴钢. 唾液的神奇作用[J]. 中学生物学, 2006, 22(9): 8-9.
Zhu XG. The magic of saliva [J]. Middle School Biol, 2006, 22(9): 8-9.
- [3] 周艳萍, 吴忠道. 唾液应用研究新进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2008, 35(2): 96-100.
Zhou YP, Wu ZD. Progress on application of saliva [J]. Int J Med Parasit Dis, 2008, 35(2): 96-100.
- [4] 马伯龙, 王力, 凌涤生. 唾液 pH 值对溶菌酶活性的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 1994, (2): 126.
Ma BL, Wang L, Ling TS. The effect of pH of saliva on activity of lysozyme [J]. Chin J Stomatol, 1994, (2): 126.
- [5] Morou BE, Elias BA, Billings R, et al. Urease activity in dental plaque and saliva of children during a three-year study period and its relationship with other caries risk factors [J]. Arch Oral Biol, 2011, 56(11): 1282-1289.
- [6] Salako NO, Kleinberg I. Incidence of selected ureolytic bacteria in human dental plaque from sites with differing salivary access [J]. Arch Oral Biology, 1989, 34(10): 787-791.
- [7] Chen YY, Weaver CA, Burne RA. Dual functions of *Streptococcus salivarius* urease [J]. J Bacteriol, 2000, 182(16): 4667-4669.
- [8] Dahlen G, Hassan H, Blomqvist S, et al. Rapid urease test (RUT) for evaluation of urease activity in oral bacteria *in vitro* and in supragingival dental plaque *in vivo* [J]. BMC Oral Health, 2018, 18(1): 89.
- [9] 陶丹英, 冯希平. 口腔常见菌的尿素酶及其表达影响因素[J]. 口腔医学, 2010, 30(9): 558-560.

- Tao DY, Feng XP. The influence factor of fungus in oral on urease and its expression [J]. *Stomatology*, 2010, 30(9): 558–560.
- [10] 孙佳, 法永红, 杨永进, 等. 幽门螺杆菌与口腔疾病的相关性研究进展 [J]. *国际口腔医学杂志*, 2015, 42(1): 93–96.
- Sun G, Fa YH, Yang YJ, *et al.* Research progress of the relevant between HP and oral disease [J]. *Int J Stomatol*, 2015, 42(1): 93–96.
- [11] 赵晓丽, 张羽, 张佳凌, 等. 口腔尿素分解活性与乳牙龋相关性的研究 [J]. *口腔医学*, 2018, 38(10): 62–65, 102.
- Zhao XL, Zhang Y, Zhang JL, *et al.* Correlation research of urease activity and dental caries status in primary teeth [J]. *Stomatology*, 2018, 38(10): 62–65, 102.
- [12] Hu S, Gao Y, Wu Y, *et al.* Raman tracking the activity of urease in saliva for healthcare [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 129: 24–28.
- [13] 程兴群, 邓盟, 徐欣, 等. 唾液和唾液组学与疾病早期诊断[J]. *国际口腔医学杂志*, 2014, (2): 213–219.
- Cheng XQ, Deng M, Xu X, *et al.* Saliva and salivaomics in early diagnosis of diseases [J]. *Int J Stomatol*, 2014, (2): 213–219.
- [14] 栾晓玲, 王艳, 冯希平. 口腔细菌尿素酶的检测[J]. *国际口腔医学杂志*, 2011, 38(3): 358–360.
- Luan XL, Wang Y, Feng XP. Detection of urease of bacteria in oral [J]. *Int J Stomatol*, 2011, 38(3): 358–360.
- [15] 邹丽娟. 尿素酶活性值的简易测定法[J]. *江西饲料*, 1994, (2): 20.
- Zhou LJ. A simple method for detection the activity of urease [J]. *Jiangxi Feed*, 1994, (2): 20.
- [16] 叶国钦. 口腔螺旋杆菌感染检测方法及用于检测的唾液试板[P]. *中国*, 103293305, 2013–09–11.
- Ye GQ. The detection method for HP infection in the oral and the test panel [P]. *China*, 103293305, 2013–09–11.
- [17] 张全锋, 余细球, 刘锦涛. 胃幽门螺杆菌与口腔幽门螺杆菌检测方法的研究进展[J]. *国际消化病杂志*, 2016, 36(2): 111–114.
- Zhang QF, Yu XQ, Liu JT. Research progress of the detection method of HP in stomach and saliva [J]. *Int J Digest Dis*, 2016, 36(2): 111–114.
- [18] 余权标, 李雄, 徐丹, 等. pH 值法唾液尿素酶试验检测幽门螺杆菌研究[J]. *中国医学创新*, 2017, 14(12): 55–58.
- Yu QB, Li X, Xu D, *et al.* Study on detection of helicobacter pylori by pH value method [J]. *Med Innov China*, 2017, 14(12): 55–58.
- [19] 孙取念. 口腔与胃内幽门螺杆菌同源性关系的实验研究[D]. 遵义: 遵义医学院, 2016.
- Sun QN. The experimental study on the homology of the *Helicobacter pylori* in oral cavity and that in stomach [D]. Zunyi: Zunyi Medical University, 2016.
- [20] 朱志雾, 晏桂萍. 口腔幽门螺杆菌与胃幽门螺杆菌感染关系的研究进展[J]. *系统医学*, 2017, 2(12): 7–9, 69.
- Zhu ZW, Yan GP. Research progress of the relationship of helicobacter pylori infection between oral cavity and stomach [J]. *Systems Med*, 2017, 2(12): 7–9, 69.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



房 艳, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品、环境、药品、新能源等相关产品及材料的分析化学研究。

E-mail: yfh@ponytest.com