

技术与方法

荧光方法直接测定一氧化氮*

田亚平 沈文梅

(中国人民解放军总医院生化科, 北京 100853)

W. H. BETTS

(The Queen Elizabeth Hospital, Woodville, SA 5011, Australia)

摘要 根据 2, 3-二氨基萘 (2, 3-diaminonaphthalene, DAN) 可与一氧化氮 ($\cdot\text{NO}$) 反应生成荧光性 2, 3-萘酚三唑 (2, 3-naphthotriazole, NAT) 和 $\cdot\text{NO}$ 的气体特性, 设计了一个流动气体和荧光方法相结合的 $\cdot\text{NO}$ 直接测定方法. 此法以惰性气体氮气为流动气体使样品中的待测 $\cdot\text{NO}$ 随流动气体进入测定溶液, 溶液中的 DAN 捕集流动气体中的 $\cdot\text{NO}$ 生成荧光性 NAT. 实验结果表明测定溶液的荧光强度与 $\cdot\text{NO}$ 浓度呈正比, 与酸化亚硝酸盐溶液的浓度亦呈良好线性关系. 用此方法测得五份酸化正常人血浆的 $\cdot\text{NO}$ 浓度为 $(31.04 \pm 4.70) \text{ nmol/L}$, 并可用于连续观察 $\cdot\text{NO}$ 从亚硝基硫醇的自发释放.

关键词 一氧化氮, 荧光, 2, 3-二氨基萘, 流动气体

学科分类号 Q503

自 10 年前有关报道指出一氧化氮 ($\cdot\text{NO}$) 等同内皮舒张因子 (EDRF) 以来^[1,2], 许多关于 $\cdot\text{NO}$ 及其代谢产物的分析方法相继报道^[3-5]. 由于 $\cdot\text{NO}$ 在生物样品中浓度很低且极不稳定, 使其直接测定非常困难. 目前最常用的检测方法是分析其代谢产物, 如亚硝酸盐和硝酸盐等, 此类方法灵敏度较低且不能直接反映 $\cdot\text{NO}$ 在待测样品中的变化. 最近有报道指出 2, 3-二氨基萘 (2, 3-diaminonaphthalene, DAN) 可以捕集 $\cdot\text{NO}$ 产生具有强荧光性的 2, 3-萘酚三唑 (2, 3-naphthotriazole, NAT)^[6]. 虽然 $\cdot\text{NO}$ 可直接与 DAN 反应而被测定, 但在生物样品中有许多因素可影响此反应过程. 为了更特异性地测定样品中的 $\cdot\text{NO}$ 气体的变化, 建立了一个流动气体与荧光分析相结合的 $\cdot\text{NO}$ 直接测定新方法, 可适用于多种样品测定的需要.

1 材料和方法

a. 流动气体测定样品系统见图 1: 惰性气体氮气首先通过待测样品池, 使样品中的 $\cdot\text{NO}$ 随流动气体进入 DAN 测定溶液.

样品池为自行吹制的椭圆型玻璃球, 上下端各接一内径约 1.5 mm 细管, 下端导入流动气体, 并通过样品, 然后由上端的细管将混合流动气体导入 DAN 溶液.

b. DAN 储存溶液: 用二甲基甲酰胺配制 10 mmol/L 的 DAN (Sigma Chemical Co., St.

Louis, MO), 避光保存于 4℃ 冰箱.

c. 碱性溶液: 用双蒸水配制 10 mmol/L 的氢氧化钠溶液.

d. DAN 测定溶液: 用碱性溶液将 DAN 储存溶液稀释至 40 $\mu\text{mol/L}$, 此溶液用前配制, 避光保存.

e. $\cdot\text{NO}$ 水溶液: 50 ml 双蒸水以氮气排氧 30 min, 然后用纯 $\cdot\text{NO}$ 气体 (Matheson Gas Products-UN 1660) 充气 15 min, 保存此溶液于无氧条件下, 并用氧合血红蛋白法确定其 $\cdot\text{NO}$ 浓度.

f. 测定方法: 待测样品 1.0 ml 于样品池中, 2.0 ml DAN 测定溶液于荧光测定管中, 氮气流速恒定于每秒钟 2~3 个气泡, 1 h 后测定 DAN 溶液的荧光强度. 如用于观察 $\cdot\text{NO}$ 从样品中的释放速率, 可于不同时间连续测定荧光强度.

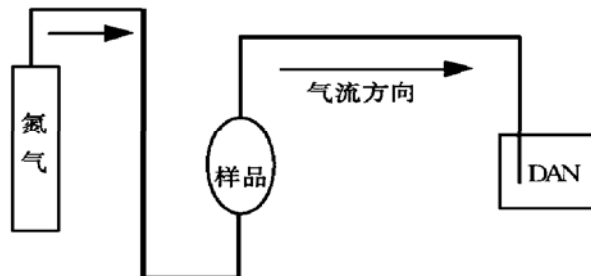


图 1 流动气体测定样品系统示意图

* 国家自然科学基金资助课题 (39880005).

收稿日期: 1997-12-24, 修回日期: 1998-05-11

2 结 果

在 2 ml DAN 测定溶液中加入 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\cdot\text{NO}$ 为测定管, 并用 2 ml DAN 测定溶液为空白, 进行激发光谱扫描和发射光谱扫描, 图 2 显示在激发波长为 380 nm 时的发射光谱扫描结果, 图 3 显示在发射光波长为 405 nm 时的激发光谱扫描结果. 根据此扫描结果确定仪器测定条件为: 激发光波长 380 nm, 发射光波长 405 nm, 缝宽 10, 积分时间 1.0 s.

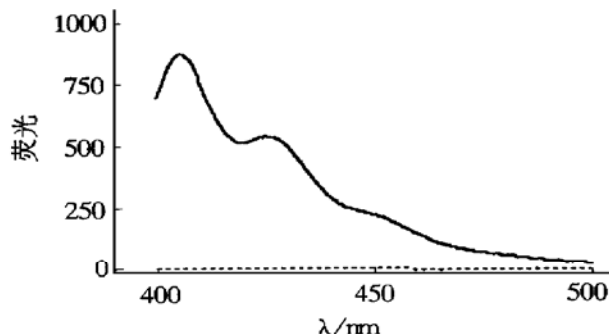


图 2 发射光谱扫描曲线

空白扫描为 2.0 ml DAN 测定溶液; 测定扫描为 2.0 ml DAN 和 $\cdot\text{NO}$ 混合溶液 (40 $\mu\text{mol/L}$ DAN 加入 1.0 $\mu\text{mol/L}$ $\cdot\text{NO}$). 激发光 380 nm, 缝宽 10, 积分时间 1.0 s.

.....: 空白扫描; —: 测定扫描.

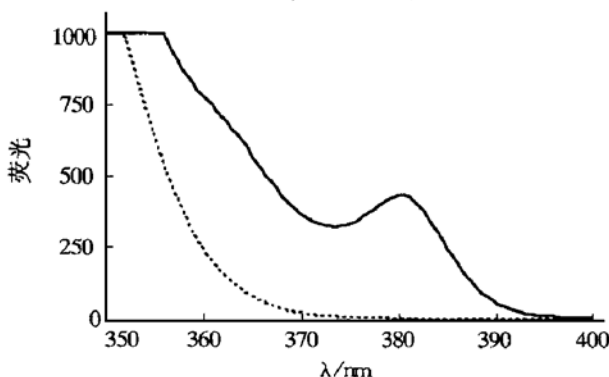


图 3 激发光谱扫描曲线

空白扫描为 2.0 ml DAN 测定溶液; 测定扫描为 2.0 ml DAN 和 $\cdot\text{NO}$ 混合溶液 (40 $\mu\text{mol/L}$ DAN 加入 1.0 $\mu\text{mol/L}$ $\cdot\text{NO}$). 发射光 405 nm, 缝宽 10, 积分时间 1.0 s.

.....: 空白扫描; —: 测定扫描.

DAN 捕集 $\cdot\text{NO}$ 后生成强荧光性的 $\text{NAT}^{[7]}$, 其荧光强度与 $\cdot\text{NO}$ 浓度成正比. 图 4 结果显示: $\cdot\text{NO}$ 浓度与荧光强度在 0~ 896 nmol/L 呈良好的线性关系, 说明所测荧光强度可反映 $\cdot\text{NO}$ 浓度的变化.

白蛋白是生物样品中最常见的蛋白质成分之一, 我们观察了它对荧光测定的影响. 图 5 显示将

不同浓度的白蛋白加入 DAN 测定溶液中, 其荧光强度随白蛋白浓度的增加而升高, 说明蛋白质是荧光测定的重要影响因素之一.

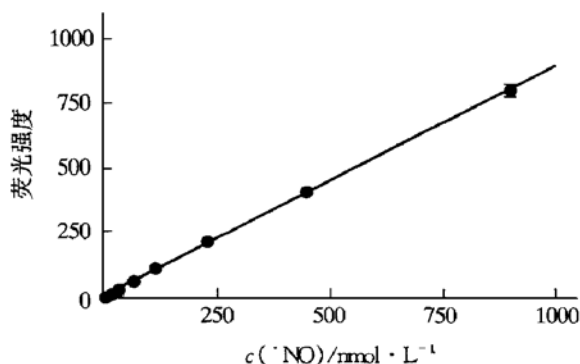


图 4 $\cdot\text{NO}$ 浓度和荧光强度的相关性

在 2.0 ml DAN 测定液中分别加入不同浓度的 $\cdot\text{NO}$ 水溶液, 混匀, 室温 5 min 后测定其荧光强度, 平行测定四管计算均值 ($y = 0.898x + 0.475$).

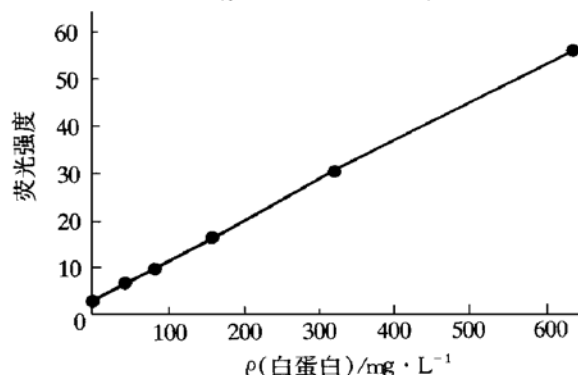


图 5 白蛋白对荧光的影响

DAN 测定液中分别加入 0~ 640 mg/L 白蛋白, 取其 2.0 ml 测定荧光强度.

由于 $\cdot\text{NO}$ 是一个疏水性的易扩散简单小分子, 所以当流动的气性气体通过待测样品时, 它很易随流动气体扩散出样品溶液, 进而被导入 DAN 测定溶液中. 由于本测定系统将样品和测定试剂分开, 通过管道将挥发性的 $\cdot\text{NO}$ 由样品转移至 DAN 溶液, 可基本避免其他干扰因素对 $\cdot\text{NO}$ 测定和荧光的影响. 众所周知, 亚硝酸钠酸化后可挥发出 $\cdot\text{NO}$ 气体, 图 6 结果显示 0~ 25 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度的亚硝酸钠 1.0 ml 酸化后, 所测荧光强度与待测亚硝酸钠浓度呈良好线性.

用此测定体系观察了五份健康人血浆, 测定条件为: 样品 1.0 ml, 100 μl HCl (5 mol/L), 200 μl 无水乙醇 (99.7%) 同时加入样品池中, 用氮气充气 1 h 后, 将 DAN 测定溶液的荧光强度与 $\cdot\text{NO}$ 溶液比较后得此 $\cdot\text{NO}$ 浓度为 (31.04 ± 4.70) nmol/L.

S-亚硝基乙酰半胱氨酸 (SNAC) 是一种常见的亚硝基硫醇, 它可自发缓慢释放 $\cdot\text{NO}$ 气体. 取 1.0 ml 100 $\mu\text{mol/L}$ SNAC 于样品池中, 于不同时间连续观测其 DAN 溶液的荧光变化 (图 7) 发现: 随着时间的延长, 所测荧光强度伴随增加, 呈良好相关性. 此结果证明在观测时间内 SNAC 可连续释放 $\cdot\text{NO}$ 气体.

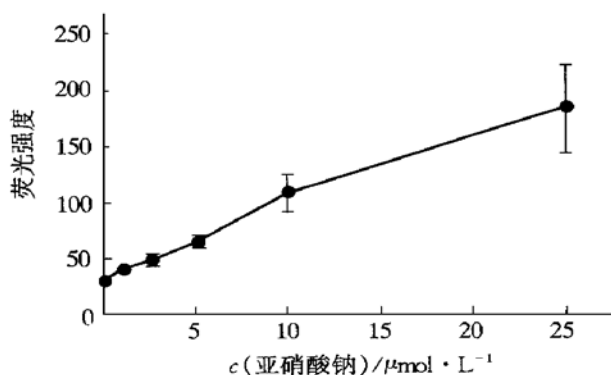


图 6 亚硝酸钠与荧光强度呈正相关

不同浓度的亚硝酸钠溶液 (0~ 25 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 ml 加入样品池中, 用 10.0 μl 盐酸 (5.0 mol/L) 酸化后, 立即用氮气充气 1 h, 测定 DAN 液的荧光强度. 平行测定四管, 计算均值.

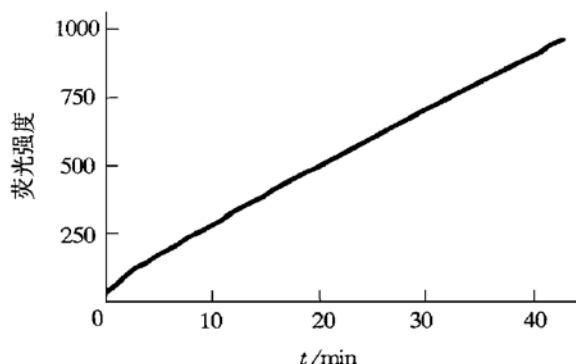


图 7 SNAC 自发释放 $\cdot\text{NO}$ 气体

1.0 ml SNAC (100 mmol/L) 加入样品池中, 连续充入氮气, 每 3 min 测定荧光强度一次.

3 讨 论

由于许多报道指出 $\cdot\text{NO}$ 是非常重要的生物调节因子^[8,9], 一个能直接准确测定生物样品中 $\cdot\text{NO}$ 浓度的灵敏方法对进一步深入系统的探讨其在生物体内的反应机制是非常重要的. 虽然荧光方法具有高灵敏度, 但生物样品中的干扰因素使其应用受到限制. 同时由于 $\cdot\text{NO}$ 的不稳定特性使样品的进一步处理亦较困难. 有幸的是 $\cdot\text{NO}$ 这个活泼的小分子具易扩散的气体特性, 因此有报道指出可将样品加入密闭容器中, 以化学发光法检测上层空气中

$\cdot\text{NO}$ 的浓度^[10]. 此测定体系具有较高的特异性, 可不受生物样品干扰因素的影响. 在此基础上, 我们进一步改进测定系统为定流量流动气体通过样品, 促进 $\cdot\text{NO}$ 气体挥发出溶液, 并通过管道导入 DAN 测定溶液中与其反应产生强荧光性的 NAT. 这样本测定体系即可避免干扰, 特异测定 $\cdot\text{NO}$, 又便于连续观测 $\cdot\text{NO}$ 从某些样品中的自发释放.

由于 $\cdot\text{NO}$ 在溶液中的存在状态使其释放的速度不同, $\cdot\text{NO}$ 水溶液仅需数分钟的充气即可使 $\cdot\text{NO}$ 完全释放, 而亚硝酸盐则需数十分钟, 亚硝基复合物则可持续数小时不断释放 $\cdot\text{NO}$. 因此在应用本方法时可根据待测样品种类适当调整充气时间, 或于不同时间点连续观测 $\cdot\text{NO}$ 的释放. 我们的实验结果表明, 血液样品充气 1 h 可基本使 $\cdot\text{NO}$ 释放完全. 如果待测样品中含有多量 NO_2 , 为避免其对测定结果的影响, 可将从样品中导出的混合气体先通过一氢氧化钠水溶液, 以除去气体中的 NO_2 , 然后再导入 DAN 溶液.

由于生物体系中富含分子氧和多种活性氧, 由各种途径产生的 $\cdot\text{NO}$ 将迅速被氧化为亚硝酸盐和硝酸盐等, 有报道指出在人血浆中可检测到微量亚硝酸盐和少量硝酸盐^[11], 亦可见多种稳定的亚硝基复合物^[12]. 本文发现有微量 $\cdot\text{NO}$ 气体从人血浆中释放, 它主要来源于酸化的亚硝酸盐和亚硝基硫醇复合物. 由于 $\cdot\text{NO}$ 的高反应活性, 它不可能以气态小分子形式存在于有氧溶液中, 而是以稳定的亚硝基复合物或氧化产物形式存在于生物体液中, 因此生物体系中还原性巯基的亚硝基化水平的生物学意义将远较 $\cdot\text{NO}$ 重要.

亚硝基硫醇可自发的缓慢释放 $\cdot\text{NO}$ 气体^[13], SNAC 是常见的亚硝基硫醇复合物. 本文结果显示它可连续不断的使 DAN 测定溶液的荧光强度持续升高, 表明 SNAC 可在此实验条件下自发释放 $\cdot\text{NO}$ 气体, 这一特性可能是生物体重要的自我调节能力, 使生物体内的还原性巯基保持一定亚硝基化水平, 并与 $\cdot\text{NO}$ 的释放保持平衡.

本测定系统将流动气体与灵敏的荧光分析方法相结合, 使其兼具高特异性和高灵敏度, 并可方便的观测 $\cdot\text{NO}$ 的动态变化, 适用于多种生物样品的测定.

参 考 文 献

- 1 Martin W, Villani G M, Jothianandan D, et al. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta.

- J Pharmacol Exp Ther, 1985, **232** (3): 708~ 716
- 2 Palmer R M, Ferrige A G, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, **327** (6122): 524~ 526
- 3 Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, *et al.* Real time measurement of nitric oxide produced *ex vivo* by luminol-H₂O₂ chemiluminescence method. *J Biol Chem*, 1993, **268** (31): 23106~ 23110
- 4 Everett S A, Dennis M F, Tozer G M, *et al.* Nitric oxide in biological fluids: analysis of nitrite and nitrate by high-performance ion chromatography. *J Chromatogr A*, 1995, **706** (1~ 2): 437~ 442
- 5 Larfars G, Gyllenhammar H. Measurement of methemoglobin formation from oxyhemoglobin. A real-time, continuous assay of nitric oxide release by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol Methods*, 1995, **184** (1): 53~ 62
- 6 Misko T P, Schilling R J, Salvemini D, *et al.* A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem*, 1993, **214** (1): 11~ 16
- 7 Miles A M, Chen Y, Owens M W, *et al.* Fluorometric determination of nitric oxide. *Companions to Methods in Enzymology*, 1995, **7**: 40~ 47
- 8 Fiscus R R. Molecular mechanisms of endothelium-mediated vasodilation. *Semin Thromb Hemost*, 1988, **14** (Suppl): 12~ 22
- 9 Kontos H A. Nitric oxide and nitrosothiols in cerebrovascular and neuronal regulation. *Stroke*, 1993, **24** (12 Suppl): 1155~ 1158
- 10 Sung Y J, Hotchkiss J H, Austic R E, *et al.* Direct measurement of nitric oxide in headspace gas produced by a chicken macrophage cell line in a closed culture system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **184** (1): 36~ 42
- 11 Leone A M, Francis P L, Rhodes P. A rapid and simple method for the measurement of nitrite and nitrate in plasma by high performance capillary electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **200** (2): 951~ 957
- 12 Stamler J S, Jaraki O, Osborne J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (16): 7674~ 7677
- 13 Robak J, Gryglewski R J. *In vitro* generation and decomposition

of S-nitrosothiols from direct and indirect nitric oxide donors. *Pol J Pharmacol*, 1995, **47** (1): 63~ 67

Direct Measurement of Nitric Oxide by Fluorometric Method. TIAN Ya Ping, SHEN Wen Mei (Department of Clinical Biochemistry, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China); W. H. BETTS (Rheumatology Unit, The Queen Elizabeth Hospital, Woodville, South Australia 5011, Australia).

Abstract Based on the reaction that 2, 3-diaminonaphthalene (DAN) has the ability trapping [•]NO to yield the highly fluorescent 2, 3-naphthotriazole, a new fluorometric method has been reported, which combines the nitrogen gas purging system and fluorescent analysis together. The results indicated that the fluorescence intensity of the measuring solution is [•]NO concentration and acidified nitrite concentration dependent. Five acidified samples of normal human plasma have been determined and the released [•]NO is about (31.04 ± 4.70) nmol/L. Since this method separates the sample from the measuring solution, it can avoid the interference from the sample to the fluorescence analysis so that it can be used to measure biological sample and continuously observe the [•]NO releasing.

Key words nitric oxide, fluorescence, 2, 3-diaminonaphthalene, gas purging

化学裂解法检测 α nd HPFH 突变*

刘建伟¹⁾ 徐湘民

(第一军医大学分子生物学研究所, 广州 510515)

摘要 为进行中国人遗传性持续性胎儿血红蛋白增多症 (HPFH) 的分子病理学研究, 以四种已知非缺失型 HPFH 突变样品为研究材料, 建立了针对二种 γ -珠蛋白基因 (G_{γ} 和 A_{γ}) 的点突变筛查技术——化学裂解法 (CCM). 为分析 α nd HPFH 点突变提供了简单可靠的分子诊断方法.

关键词 化学裂解法, 点突变检测, γ -珠蛋白基因, 遗传性持续性胎儿血红蛋白增多症

学科分类号 Q319.3

* 国家自然科学基金 (39670333) 和华南生物科学与技术研究中心研究基金 (华生 01 号) 资助项目.

¹⁾ 广州军区后勤部军事医学研究所, 广州 510507. 收稿日期: 1998-02-10, 修回日期: 1998-06-17