

经验交流

一种用分光光度计检测氧自由基的新方法^{*}萧华山 何文锦 傅文庆 曹红云¹⁾ 范子南

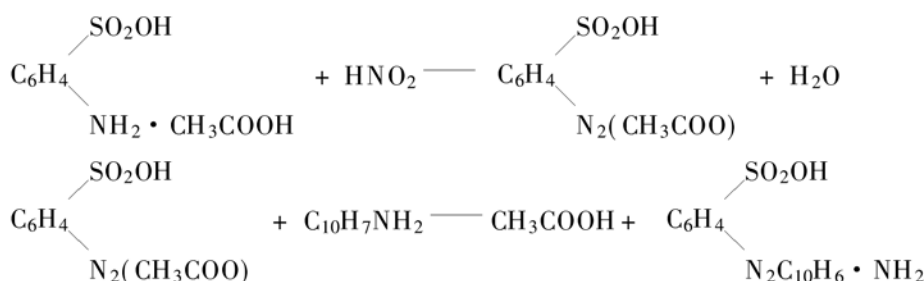
(福建师范大学生物工程学院, 福州 350007)

摘要 报告检测过硫酸铵/*N, N, N', N'*-四甲基乙二胺体系所产生的氧自由基的新方法. O_2^- 与羟胺溶液反应生成 NO_2^- , NO_2^- 经对氨基苯磺酸和 α -萘胺显色在波长 530 nm 处有专一吸收峰, 其颜色深浅与产生的 O_2^- 呈量效关系. 氧自由基清除剂抗坏血酸对 O_2^- 的清除作用也呈明显的量效关系.

关键词 氧自由基, AP-TEMED, 检测

学科分类号 Q6

前文^[1]报道了用 ESR 和自旋捕集相结合的技术直接测定了过硫酸铵/*N, N, N', N'*-四甲基乙二胺 (AP-TEMED) 体系产生的氧自由基, 经计算机波谱模拟和计算波谱参数证实了该体系产生的氧自由基是 O_2^- 和 $\cdot\text{OH}$, 并应用化学发光法, 脂质过氧化法等间接地观察了该体系产生的氧自由基及



根据上述原理, 我们建立了用分光光度法检测 AP-TEMED 体系产生的 O_2^- , 该法具有设备较简单, 试剂便宜易购, 操作简便, 结果较为准确等优点, 适合于一般实验室氧自由基研究工作.

1 材料与方法

设备: 751 分光光度计.

试剂: 国产 AR 级.

AP-TEMED 体系溶液的配制: 贮备液配制见表 1. 将贮液由冰箱取出, 达到室温后再按一定的比例配制成工作溶液.

AP-TEMED 体系产生的 O_2^- 与羟胺氧化的定量测定: 取 7 支试管, 将 A、B 两液按 1: 0.5, 1: 1,

自由基清除剂对其的清除作用, 但这些方法或仪器特殊、或试剂昂贵, 使其在一般实验室的应用受到限制. O_2^- 能与羟胺溶液反应生成 NO_2^- , NO_2^- 经对氨基苯磺酸和 α -萘胺显色在波长 530 nm 处有专一吸收峰^[2], 其化学反应方程式如下:

1: 2, 1: 3, 1: 4, 1: 5, 1: 6 混合, 反应 1 min. 后从每管中吸取混合液 2 ml, 加入 10 mmol/L 盐酸羟胺 0.4 ml, 在 25 °C 混合反应 20 min 后, 往以上

表 1 AP-TEMED 体系溶液的配制

贮液	100 ml 含量	
A	1 mol/L HCl	48.0 ml
	Tris	36.6 g
	TEMED	0.23 ml
B	AP	0.14 g

注: B 液仅能贮存一星期, A 液可贮存 1~2 个月.

^{*} 福建省科委资助项目 (K96016).

¹⁾ 福建省龙岩师范专科学校, 龙岩 364000.

收稿日期: 1997-10-30, 修回日期: 1998-03-09

各管加入 17 mmol/L 对氨基苯磺酸 2 ml 和 7 mmol/L α -萘胺 2 ml, 在 25 °C 下混合反应 25 min, 反应后的显色液用同体积正丁醇充分摇匀, 静置 (或离心) 分层, 取正丁醇相测 A_{530} , 以不加 B 液的作为空白对照, 三次重复.

抗坏血酸清除氧自由基的检测: A、B 两液以 1:4 混合 1 min 后, 加入不同浓度抗坏血酸溶液 1 ml, 以加蒸馏水 1 ml 为对照, 显色步骤同上.

氧自由基清除率计算:

$$\text{清除率} = \frac{a-b}{a} \times 100\%$$

a 为对照的 A_{530} 值, b 为加入抗氧化剂的 A_{530} 值.

2 结果与讨论

2.1 AP-TEMED 体系产生的 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和羟胺的量效关系

前文^[1]结果表明, 在 AP-TEMED 体系中, 反

应开始时 AP 与 O_2 反应, 生成 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 自由基, 故体系中 AP 的量与 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 生成量直接相关. 表 2 结果表明, 应用羟胺反应来检测 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 是一种较灵敏的方法, 因为羟胺反应产物 NO_2^- 的比色测定具有较高灵敏度, 其检测限量可达 1 $\mu\text{g/L}$. 因此可以根据 NO_2^- 显色反应的标准曲线^[2], 将 A_{530} 换算成 $c(\text{NO}_2^-)$, 再依据反应式 “ $\text{NH}_2\text{OH} + 2\text{O}_2^{\cdot -} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ” 直接进行 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的化学计量, 即得到 $c(\text{O}_2^{\cdot -}) = 2 \times c(\text{NO}_2^-)$.

经统计分析, 体系中 AP-TEMED 的比值与 A_{530} 成正相关, 其线性方程为 $A_{530} = -0.0113 + 0.0608X$ (X 为 AP-TEMED 的比值), $r = 0.9653$, 说明其有很好的量效关系, 因此, 根据表 2 则可将 A_{530} 和 $c(\text{O}_2^{\cdot -})$ 的关系式求出: $c(\text{O}_2^{\cdot -}) = 50 \times A_{530}$. 该法能较准确地反映出体系中 $c(\text{O}_2^{\cdot -})$.

表 2 AP-TEMED 体系产生的 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和羟胺的量效关系

AP: TEMED	A_{530}	$c(\text{NO}_2^-) / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$c(\text{O}_2^{\cdot -}) / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
0.5: 1	0.0182 $\pm$ 0.0038	0.4550	0.910
1: 1	0.0445 $\pm$ 0.0262	1.1125	2.225
2: 1	0.0892 $\pm$ 0.0392	2.2300	4.460
3: 1	0.1859 $\pm$ 0.0231	4.6475	9.295
4: 1	0.2405 $\pm$ 0.0183	6.0125	12.025
5: 1	0.2600 $\pm$ 0.0519	6.5000	13.000
6: 1	0.3657 $\pm$ 0.0185	9.1425	18.285

注: $c(\text{NO}_2^-)$ 是根据显色反应的标准曲线换算得来.

2.2 抗坏血酸清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的作用

抗坏血酸具有清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的作用, 在 AP-TEMED 体系中加入 Vit C, 就能有效地清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$, 通过测定 A_{530} 值的变化, 即可计算出 Vit C 对 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的清除率, 从而反证该法的有效性 (表 3).

表 3 抗坏血酸清除 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 的作用

$\rho(\text{Vit C}) / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A_{530}	清除率/ %
0	0.2755	0
0.01	0.0788	71.38
0.1	0.0306	88.89
1	0.0159	94.23

注: 该体系 AP: TEMED = 4: 1.

综上所述, AP-TEMED 体系产生的氧自由基, 除了前文^[1]报道的检测方法外, 用分光光度法也能准确检测, 相比之下, ESR 和化学发光法等仪器特殊, 药品昂贵, 一般实验室很难应用, 而分光光度法简单易操作, 药品价廉, 结果可靠, 尤其是对于离体大量筛选抗氧化药物有重要的价值, 我们用此法筛选抗氧化物质, 为进一步研究其在生物体内的抗氧化作用提供了有力证据.

参 考 文 献

- 1 萧华山, 傅文庆, 赵保路, 等 (Xiao H S, Fu W Q, Zhao B L, et al). 过硫酸铵/ N , N ', N' , N' -四甲基乙胺体系产生的氧自由基及其清除的研究. 生物物理学报 (Acta Biophysica Sinica), 1992, 8 (2): 334~338
- 2 王爱国, 罗广华 (Wang A G, Luo G H). 植物的超氧化物自由

基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯 (Plant Physiology Communications), 1990, (6): 55~57

A Spectrophotometer Method Testing Oxygen Radicals. XIAO Hua Shan, HE Wen Jin, FU Wen Qing, CAO Hong Yun, FAN Zi Nan (Biotechnology College of Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China).

Abstract A spectrophotometer method was used to test oxygen radicals produced by a system of ammonium

persulphate and tetramethylethylenediamine (AP-TEMED). The reaction of hydroxylamine and O_2^- produced NO_2^- and then developed by sulphanilic acid and α -naphthylamine. The results indicated that there was a special absorption at 530 nm when the sample was tested by spectrophotometer, and its color responsiveness showed a quantitative relation to O_2^- . Otherwise, ascorbic acid as a matter deleted oxygen radicals had a significantly quantitative relation too.

Key words oxygen radicals, AP-TEMED, test

山羊小腔卵泡 DNA 含量的荧光分析*

李 键

(四川省畜牧科学研究院, 成都 610066)

康靖全 周 乐 王建辰

(西北农业大学动物医学系, 杨陵 712100)

摘要 用显微手术法剥离山羊 3 mm 以下完整小腔卵泡, 用胶原酶和 Triton X-100 进行处理, 选用荧光试剂 4, 6-二脒基-2-苯吡啶 (4, 6-diamidino-2-phenylindole 2HCl, DAPI), 对其 DNA 含量进行分析. 结果表明, 山羊 3 mm 以下卵泡的 DNA 含量与卵泡直径相关性极显著 ($r = 0.9824 > 0.7800 = r_{0.01}$, $n = 12$). 该法可测定 5 ng 的 DNA. 提示该法在卵泡生长发育的研究中具有重要应用价值.

关键词 荧光分析, DNA, 卵泡, 山羊

学科分类号 S827.3, S814.6

由于 DNA 含量与细胞数量相关性极显著^[1], 所以在组织培养中经常通过测定 DNA 含量来估测细胞数量^[1~4]. 尤其象卵泡这类组织, 无法对其进行细胞计数, 测定其 DNA 含量就成为研究其细胞增殖活动的重要手段. 但用常规方法测定 DNA 含量, 样品的制备、提取、分离步骤十分繁琐, 并且灵敏度低, 还容易受到蛋白质和 RNA 的干扰. 所以本试验中尝试用荧光分析法测定山羊小腔卵泡 DNA 含量.

1 材料与方法

1.1 主要试剂及其配制

199 培养基 (M199) 为 GIBCO 公司产品; Hepes、丙酮酸钠、小牛胸腺 DNA、4, 6-二脒基-2-苯吡啶 (4, 6-diamidino-2-phenylindole 2HCl, DAPI)、Triton X-100、胶原酶 (Collagenase, Type I) 均为 Sigma 公司产品; 犊牛血清 (NCS) 为本室自制.

Dulbecco's PBS: 按文献 [5] 配制.

卵泡剥离液: M199 中含 20 mmol/L Hepes、2.2 g/L $NaHCO_3$ 、2 mmol/L 丙酮酸钠、100 mg/L 链霉素、100 000 IU/L 青霉素、5% NCS, pH 7.4.

DNA 测定缓冲液: 含 100 mmol/L NaCl、10 mmol/L Tris 和 10 mmol/L EDTA. 用 1 mol/L NaOH 调 pH 7.0.

1.2 主要仪器

连续变倍实体显微镜: Olympus SZH 型; 荧光分光光度计: 日立 850 型.

1.3 卵巢采集

手术法摘除山羊卵巢, 卵巢摘除后放到盛 25~35℃ 灭菌 PBS 的保温瓶中, 1 h 以内送至实验室.

1.4 卵泡剥离

将采回的卵巢于 37℃ 卵泡剥离液中清洗 3 次,

* 国家自然科学基金资助项目 (39470519).

收稿日期: 1997-12-04, 修回日期: 1998-03-24