

表 1

测定元素	消 光 值											标准偏差系数%
Cu	0.290	0.290	0.290	0.290	0.300	0.310	0.310	0.295	0.300	0.300	0.300	2.76
Mg	0.375	0.365	0.365	0.385	0.370	0.370	0.375	0.375	0.385	0.375	0.380	1.83
Pb	0.026	0.028	0.028	0.027	0.028	0.024	0.028	0.026	0.028	0.027	0.026	4.86

残余峰,也说明对有机物破坏比较彻底。

(5) 本消化液用于石墨炉原子吸收法测定,具有测定值稳定、重现性好等优点(见表 1、表 2)。

表 1 是在同一全血消化液内分别对 Cu、Mg、Pb 连续 11 次测定的消光值。

表 2 是在同一血液样品中,分别取五份 200 μ l 全血消化后,测定 Cu、Mg、Pb 的含量。

表 2

测定元素值 \ 样品号	1	2	3	4	5
Cu μ g/100ml	88	86	87	86	87
Mg mg/100ml	3.8	3.9	4.0	4.0	4.5
Pb μ g/100ml	11	8	11	7.5	10

参 考 文 献

- [1] Walter, C. S. et al.: *Hydrogen Peroxide*, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1955.
- [2] 浙江大学等合编:《高分子化学》,化学工业出版社,1980,北京。
- [3] Philip, L. Altman: *Biology Data Book* (2nd ed.), 1751, 1974.

[本文于 1983 年 8 月 17 日收到]

脂质过氧化作用的新指标——呼气 及液上气体中低级烃类的测定

丁 军 凯 魏 奉 群

(辽宁省医学科学院基础医学研究所,沈阳)

一、前 言

脂质过氧化作用 (Lipid peroxidation, 简称 LPO) 原指脂肪、油等在空气中自动氧化酸败的现象。实质上是脂质中多元不饱和脂肪酸受氧化作用形成多元不饱和脂肪酸过氧化物的过程。

机体内由于酶的和非酶的脂质的氧化反应也可以生成过氧化脂质。已经确认体内脂质过氧化作用的机制是自由基引发的链反应^[1]。由于机体内存在一系列的保护系统: 如谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX), 维生素 E, 过氧化氢分

解酶, 微量元素 Se 等等, 可分解或去除过氧化脂质。但是在一定条件下, 由于体内正常或异常的化学变化所发生的氧化还原反应, 促使机体受到活性氧 ($\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{O}_2^-$, $\text{R}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{HOO}\cdot$) 作用, 生成过量的过氧化脂质, 超越了体内保护系统的分解和清除能力, 这样就对生物体活性物质的脂质、蛋白质、核酸、多糖及其构成组分发生伤害作用, 如自由基导致 DNA、RNA 交联, 导致蛋白质、氨基酸的氧化破坏或交联, 自由基对多糖高分子的氧化降解以及自由基诱发的脂质过氧化, 能造成生物膜损伤, 细胞变性乃至发生组织机能的下降^[2-7]。

生物膜和亚细胞器官是脂质过氧化作用进行的主要场所和受损害的主要部位^[2]。因膜中的磷脂中含有大量的多元不饱和脂肪酸 (PUFA), 它们都含有次甲基隔开的双键, 这些碳-氢键由于共轭效应而活化, 易于失掉氢原子, 在活性氧的作用下, 通过自由基反应生成氢过氧化物^[8]。

由于 LPO 的实质是自由基链反应, 最理想的情况是测定其反应过程中的自由基。然而由于它的反应速度极快, 即便采用电子自旋共振 (ESR) 技术在一定场合下也难以奏效, 所以一般是测定 LPO 的二次分解产物。过氧化脂质的测定方法很多, 如碘量法, 硫代巴比土酸法 (TBA), 共轭二烯法, 荧光法等。其中经典的和常用的方法是硫代巴比土酸法。该法的缺点是离体测定, 不完全适于检验整体及其完整的器官或细胞中 LPO 的程度, 加上 LPO 的二次分解产物丙二醛也与许多其它细胞组份发生反应^[5,6]。

C. A. Riely 和 G. Cohen^[9] 首先用气相色谱法 (GC) 测定动物机体在脂质过氧化作用过程中释放到呼气中的乙烷, 这一方法灵敏度高、简便, 不必处死动物, 可以继续观察各种因素的时间效应。乙烷是过氧化脂质的二次分解产物, 当脂质过氧化物分解时, 碳链断裂生成醛和乙基自由基, 乙基获氢后即为乙烷, 再经组织、细胞溶到血液中到达肺部, 气体交换时排放于呼气之中^[10]。

C. A. Riely 等将这一方法与 TBA 法做了比较, 结果表明, 两种方法测定的结果是平行的。

这一方法的建立, 推动了体内脂质过氧化作用的研究^[10]。稍后, AL. L. Tappel 建立了呼气中戊烷的测定方法^[11], 进一步推动了这一研究工作。

目前, 脂质过氧化作用和呼气中低级烃类产生的相互关系, 日益受到人们的重视。近几年, 国外学者在整体动物或人的呼气中, 离体器官培养的液上气体中低级烃类的 GC 测定方面取得了一些成果, 我国在这方面的研究工作刚

刚起步^[12]。

二、气相色谱法的测定

1980 年, H. Frank 等人^[8] 根据自己的工作, 提出了较为详细的多元不饱和脂肪酸过氧化降解的反应机制 (图 1)。

气体中低级烃类的气相色谱法测定可分为两种: 即机体呼气中烃类和离体的液上气体中烃类的测定。

上述方法又分为急性、慢性实验两种。急性实验中常采用脂质过氧化作用的引发剂, 如 H_2O_2 , 卤代烷、臭氧、乙醇、异丙基苯氢过氧化物 (Cumene) 等, 其特点是可在短时间内考察某些因素的毒性效果。慢性实验主要是营养学方面, 例如在膳食中人为地降低或增加抗氧化剂 (例如维生素 E 和硒等的含量) 及改变其它因素, 考察它们对脂质过氧化作用的影响。

1. 整体动物的脂质过氧化作用的呼气中烃类的测定

用气相色谱仪—火焰离子化检测器 (FID) 测定, 这是一种非侵入的整体测定方法。柱子的载体用过氧化铝、碳分子筛等, 近年来多采用 Porasil C, Porasil D 和 Porapak Q 等一些多孔硅胶和高分子微球体。柱温采用恒温或程序升温两种方式。不少学者采用程序升温取得较好的效果^[7,13,14]。

气体样品采集的方式分为两种, 一种是循环系统, 它带有一套清除水份、 CO_2 、空气中污染物及给氧的设备, 一种是密闭系统, 无上述设备, 用一定体积的保干器等。两者都是将动物置于容器内一定时间后, 抽取容器内气体, 注入色谱仪内测定。两种方式相比较, 前者要求的条件苛刻, 如需要吸附剂, 冷冻剂和循环泵等, 在一般实验室中难以实现, 而后者要求条件简单, 只要严格控制其背景, 方法还是可行。目前, 国内外多采用后者^[12-14]。气体样品一般用聚四氟乙烯管抽取, 然后用气密性注射器或六通阀气体进样器进样, 后者的重复性较好。

嵯峨等人^[13] 用装填活性氧化铝 (80—100 目) 的不锈钢柱 (3.5m × 3mm 内径) 气相色谱

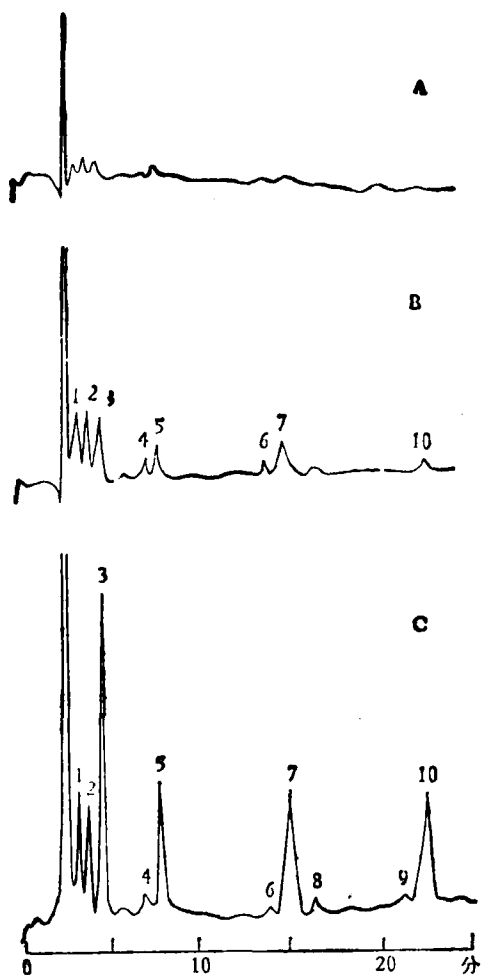


图2 雄性大鼠呼气中挥发性烃类的气相色谱法测定

上述各图分别为不同时间内大鼠在密闭容器内捕气获得的结果。A:5分钟空白 B:4.5小时空白 C:一次剂量5g乙醇/公斤体重后4.5小时结果。

1.乙烷 2.乙烯 3.丙烷 4.异-丁烷 5.正-丁烷
6.异-戊烷 7.正-戊烷 8.丁烯-1 9.反-丁烯-2
10.异-丁烯。操作条件: 6ml六通阀气体进样器,
5m × 3mm内径 Porasil C^R 柱, FID 检测器, N₂
载气流速 35ml/min, 柱温恒温 60℃

氧化作用的一项在体测定指标。

呼气中低级烃类通常以单位时间内动物的每公斤体重的 nmol. 烃气表示。但在特殊情况下, 例如缺乏标准气时, 也可用相对强度 mm² 峰面积/100g 体重表示。Albrecht Wendel 和 E. E. Dumelin 等人^[20]提出一种计算公式:

$$\text{nmol. 烃类/公斤体重} = \left[a_i \cdot (V_G - V_A) + \sum_{i=0}^n a_i \cdot V_i \right] \cdot W_A^{-1}$$

其中 V_G 为呼气室体积(ml); V_A 为测定的动物体积(ml); V_i 为从呼气室中抽取的总的样品体积(ml); W_A 为动物的体重(g); i 为所取的样品数; a_i 为积分校正峰中计算的烃浓度 (pmoles/ml)。它做为一种标准计算方法纳入 1981 年出版的《酶学方法》中, 做为毒理学研究中监控 LPO 的参数^[20]。

2. 离体的脂质过氧化作用的液上气体中烃类的测定

液上气相色谱分析是指对液体或固体中挥发性成分的蒸气相进行气相色谱分析的一种间接测定法, 它是在热力学平衡的蒸气相与被分析样品共存于同一个密闭系统中进行的。由于条件单一, 可变因素少, 观察效果显著, 近年来发展较快。离体的基质包括组织切片, 组织匀浆(脑和肝匀浆), 肝细胞及亚细胞器, 如微粒体, 它们分别在一个密闭的培养皿中适当培育, 并施加某些因素(例如, 过氧化物的引发, V_E 和 Se 的缺乏或补加), 然后抽取其液上气体做气相色谱分析。分析条件基本同上。

G. Cohen^[4] 研究了小鼠脑和肝匀浆中乙烷的产生与脂质过氧化物蓄积的相关性。取 20ml 10%(W/V) 的等渗盐水中的小鼠肝匀浆, 放在硅酮隔膜密封的 18ml 的带有螺纹帽的试管中, 于 37℃ 下培育。2 小时后由注射器采集组织匀浆液上气体, 直接注入气相色谱仪内进行分析, 所加的亚油酸和亚麻酸的最后浓度为 15n moles/l, 结果发现将维生素 E 加到肝匀浆中阻止了脂质过氧化作用, 并迅速阻止了乙烷的产生。他将不饱和脂肪酸加到培养的组织匀浆中, 这增加了烷烃的产生, 亚麻酸只产生乙烷, 而亚油酸只产生戊烷。这意味着低级烃气是特定脂肪酸的标记。

H. Frank 等人^[8]做了大鼠的离体肝脏灌流液上气体分析。在一个密闭的系统中做离体的肝脏灌流, 加进溴代三氯甲烷后 30 分钟, 发现各种烃类增加, 尤其是乙烷、丙烷、丁烷、戊烷和异-丁烯(见图 3)。同时, 他们又做了亚细胞水平的肝脏微粒体培养的液上气体分析。将 1ml 微粒体悬浮液 (7.5mg 蛋白质/ml), 0.5ml 0.01

表 1 接触臭氧 7、28 和 90 天的呼气中乙烷和戊烷及血浆和肺中的维生素 E 水平

接触时间(天)	臭 氧 (ppm)	乙烷和戊烷水平 (pmole/升·公斤体重) ^a				维生素 E(mg/100ml)	
		乙烷 ^b	戊烷 ^b	乙烷 ^c	戊烷 ^c	血浆	肺
7	0	3.3	0			0.42	1.39
	0.5	6.5	6.5			1.39	1.84
	0.8	10.0	-1.4			1.69	1.48
28	0	-0.4	0.1	1.8±3.1	-0.3±0.5	0.49	1.79
	0	4.0	-0.6			0.57	0.94
	0.5	21.4	9.5	18.2±4.5	11.0±2.1	0.25	0.71
	0.8	1.3	2.8	2.0±0.9	1.8±1.5	0.50	1.66
	0.8	2.6	0.7			0.53	1.40
90	0	0	0.6	1.7±1.5	1.5±1.1	0.73	1.63
	0	2.4	2.7			0.70	1.10
	0	2.8	1.1			0.67	1.92
	0.5	7.9	1.3	2.4±9.1	3.6±2.5	0.67	1.68
	0.5	-8.1	6.3			0.85	2.32
	0.5	7.5	3.1			0.49	1.19
	0.8	3.7	4.3	-5.9±19.0	1.6±2.4	0.70	1.30
	0.8	6.3	0.7			0.56	1.12
	0.8	-27.8	-0.3			0.46	1.49

a. 每一值为四次呼气测定的乙烷和戊烷平均值,经两次背景空气样品所获得的平均值校正。

b. 个体值。

c. 均值±SD。

M的氯化镁, 0.5 ml 0.01M 的 NADP⁺, 0.5ml 0.08 M 的异柠檬酸钠和 20 μl 异柠檬酸脱氢酶溶液 (10mg/ml), 全部溶解在 pH7.4 的 0.25 M tris 缓冲溶液中, 装在盖有聚四氟乙烯隔膜的液上气体分析瓶内 (20ml), 于 37℃ 下培育。为增强脂质过氧化作用, 将 4.3mg ADP-钠和 30 μg 硫酸铁 (二价) 溶于 1ml 的同一缓冲液中, 加入分析瓶内, 在适当的时候, 将液上气体瓶从培养箱中拿出, 浸在室温的水浴中, 并用气密注射器抽出 2.5ml 气体供 GC 分析。

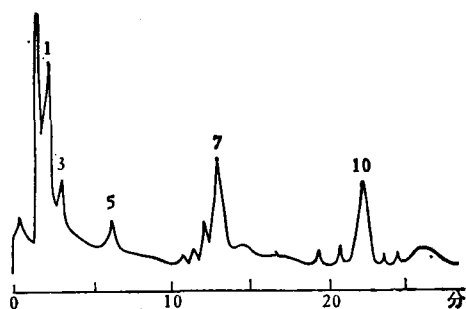


图 3 在密闭系统中离体肝脏灌注溴代三氯甲烷后的液上气体分析

1.乙烷 3.丙烷 5.正丁烷 7.正戊烷 10.异丁烷

最近, David L. Gee 和 AL. L. Tappel^[5]建立了一种离体的肝细胞模型体系, 研究了在离体的肝细胞中脂质过氧化作用产生的三种烃气 (戊烷, 乙烷及乙烯) 与细胞损伤的其它测定法之间的相关性, 考察了溴代三氯甲烷对大鼠摄取不同水平维生素 E 离体的肝细胞的影响 (见表 2)。他们指出这种模型较其它离体体系优越, 优点之一是在离体的肝细胞中维持了只有在完整细胞中所能看到的那种细胞保护机制。利用这种模型研究由脂质过氧化作用引起的细胞损伤, 证明戊烷和乙烷是脂质过氧化作用的良好指标, 它们与细胞中的硫代巴比土酸反应性物质 (TBARS) 水平相关。

1982 年, Martyn T. Smith 等人根据 A. Wendel 的计算公式做了某些修改, 提出离体测定方法的计算公式^[6]:

pmol. 乙烷/10⁶ 细胞

$$= \left[a_i \cdot (V_F - V_C) + \sum_{i=0}^n a_i \cdot V_i \right] \cdot V_C^{-1}$$

其中, V_F = 烧瓶的总体积 (ml)

V_C = 以浓度为 10⁶ 细胞 1 ml 含有的细

表 2

膳食 ^{a,b}	每一样品注入 的 CCl ₄ Br 量 (μ l)	戊烷 ^c	乙烷 ^c	乙烯 ^c	硫代巴比土酸反应性物质 ^d (TBARS) ^d	存活细胞 (起始百分值)	释放的 GPT 活性 ^e
0E	0	195 $\pm$ 24	88 $\pm$ 10	22 $\pm$ 3	107 $\pm$ 14	84	1800 $\pm$ 840
0E	0.25	454 $\pm$ 50	133 $\pm$ 10	40 $\pm$ 3	133 $\pm$ 17	66	2760 $\pm$ 1230
0E	0.50	—	—	—	156 $\pm$ 17	44	3210 $\pm$ 1170
0E	1	486 $\pm$ 43	88 $\pm$ 12	56 $\pm$ 5	176 $\pm$ 27	30	3330 $\pm$ 1020
0E	2.5	—	—	—	171 $\pm$ 18	11	2670 $\pm$ 450
40E	0	109 $\pm$ 44	66 $\pm$ 2	22 $\pm$ 3	70 $\pm$ 8	92	300 $\pm$ 150
40E	0.25	338 $\pm$ 39	104 $\pm$ 9	27 $\pm$ 2	80 $\pm$ 5	92	450 $\pm$ 150
40E	0.5	—	—	—	79 $\pm$ 14	87	600 $\pm$ 180
40E	1	382 $\pm$ 22	120 $\pm$ 9	48 $\pm$ 3	101 $\pm$ 18	78	870 $\pm$ 300
40E	2.5	—	—	—	237 $\pm$ 27	2	2280 $\pm$ 360

a. 喂给人工半合成维生素 E 实验膳食的大鼠 (按每公斤体重补加 40(40E) IU 或 0(0E) IU 的 dl- α -生育酚醋酸酯比例加入)。

b. 实验的肝细胞悬浮液例数, 0E 组为 6 例 40E 组为 4 例。

c. pmole/g 肝细胞 $\pm$ SEM。

d. nmole TBARS/g 肝细胞 $\pm$ SEM。

e. mU GPT/g 肝细胞 $\pm$ SEM。

胞培育的体积(ml)

V_s — 从液上空间抽取的总的样品体积
(ml)

i — 所抽取的样品数目

α_i — 从气相色谱图中计算的乙烷浓度
(pmols/ml)。

三、呼气及液上气体中低级烃类测定的应用

近年来已证明膜结构的脂质过氧化作用与大量的病理现象有关^[3]。例如, A. Noronha-Dutra 等人^[21]用电子显微镜观察, 发现用 $2 \times 10^{-4} M$ 二酰胺或 0.1mM 异丙基苯氢过氧化物诱发一小时, 心肌细胞的超微结构发生了严重的改变。因此, 对生物膜的脂质过氧化作用及其防御机制的研究一直是当今的主要研究课题之一。

AL. L. Tappel^[22] 以及 Britton chance 等^[3]都报导了脂质过氧化作用往往导致红细胞的溶血作用。其机制可能直接涉及膜的脂质结构的损害, 并且通过脂质过氧化物抑制了红细胞膜乙酰胆碱酶的活性。

G. A. A. Kivits 等人^[24] 研究了大鼠活体

内脂质过氧化作用, 即测其呼气中烷烃的组分, 并考察了食饵性脂肪酸, 维生素 E 和硒的作用。

Mavtyn T. Smith 等人^[6] 测定了离体肝细胞中脂质过氧化作用, 指出脂质过氧化作用的结果造成膜的损伤、酶的抑制、溶酶体酶的释放以及蛋白质之间的交联。通过测定释放的乙烷和戊烷, 可以做为在体的实验模型(例如, 离体的灌注, 大鼠肝和组织匀浆)脂质过氧化作用的一项可靠而灵敏的指标。

人们很早就注意到脂质过氧化作用伴随着生物化学的衰老过程。衰老色素的主要标记是脂褐质色素。组织学研究和生物化学研究表明它们是一些脂质-蛋白质的复合物根据生物化学研究表明, 它们是亚细胞膜多元不饱和脂质类的脂质过氧化作用的产物^[2]。

G. Cohen^[4] 通过小鼠脑及肝的组织匀浆的烃类测定指出, 细胞老化的过程中脂质过氧化作用对靶器官诱发的细胞损伤起到重要的作用。嵯峨^[13]利用测定大鼠呼气中的乙烷、乙烯, 丁烷及戊烷, 考察了不同月龄大鼠老化与脂质过氧化作用的关系, 确认在体脂质过氧化作用是老化进程中细胞机制的基本劣化反应, 这可以用直接测定积蓄在细胞中的脂质过氧化作用

产物,例如,荧光性蜡样质和脂褐质色素以及硫代巴比土酸反应物来证明;也可用测定呼气中具有来自脂质氢过氧化物中的挥发性烃类断裂产物来证明。嵯峨等人指出:老化进程中测定呼气烃对澄清自由基反应的机制有很大帮助。结果证明: ω -6 脂肪酸族(例如亚油酸和花生四烯酸)在老化进程中起到重要的作用,与其相关的事实是血小板或某些组织中花生四烯酸的过氧化作用在前列腺素的生物合成中起到重要的作用。

最近, G. A. A. Kivits 等人^[14,22]考察了大鼠活体内脂质过氧化作用,同时观察了食饵性脂肪酸,维生素 E 和硒的作用,他指出活体内脂质过氧化作用在动物整个生命期间一直在进行,像脂褐质这样的色素可由膜中脂质过氧化作用形成,并随年龄的增长而在细胞内积蓄。

已知脂质过氧化物,过氧化氢(H_2O_2)以及超氧阴离子($\cdot O_2^-$)对机体十分有害,毒性很强,它们引发自由基链反应,导致广范的脂质和有机过氧化物的形成^[3]。因此,在研究药物中毒、职业病中毒的机制及其防护方面,低级烃类的测定十分有意义。

目前,开展利用中毒实验测定产生的低级烃类的工作很多^[3-9,17,23]。除了卤代化合物外,已知 LPO 还因受到下列物质的作用而增强:氧化剂和 NO_x 等大气污染物^[23]、Hg、Cd 等重金属^[23]、酒精^[23]、叶绿素分解物等具有光力学作用的色素^[24], Paraquat 等一些农药^[25],它们都能对人体组织造成极大威胁,有必要进一步了解它们的中毒机制。

脂质过氧化作用已成为运动医学中的新研究课题。做大运动量的运动时,人的组织例如肺功能会发生某些改变,一些因素会引起脂质过氧化作用。C. J. Dillard 等人^[25],用 0.3ppm 的臭氧做刺激剂,测定运动与静止时呼气中的戊烷,考察脂质过氧化作用对肺功能的影响,结果表明:脂质过氧化作用仅发生在运动时,并可通过服用 V_E 而被抑制。

从实验的肿瘤细胞中已知,与氧中间体和氢过氧化物有关的酶类,其活性降低往往引起

细胞分化能力丧失^[21]。

为研究克山病的发病机制,观察心肌细胞受损与硒对膜的保护效应,做了豚鼠的呼气烃类的 GC 测定,结果低硒组动物呼气中乙烷含量高于补硒组,两组电镜的细胞形态学观察也有明显的差别^[26]。临床观察表明脂质过氧化作用也与动脉硬化,呼吸系统疾患和心脏病有关^[27]。

总之,脂质过氧化作用研究的范围及涉及的学科愈来愈广,它的生物学意义也显得日益重要。在这些研究中,监测脂质过氧化作用的有效而灵敏的指标——呼气和液上气体中低级烃类的 GC 测定有着十分重要的意义。今后的研究应逐步从以动物为材料向以人为对象过渡^[8],从整体向器官或细胞(亚细胞)水平过渡,这样对基础医学和临床医学都将是十分有益的。

参 考 文 献

- [1] King, M. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 6496, 1975.
- [2] Tappel, A. L.: *Fed. Proc.*, **32**(8), 1870, 1973.
- [3] Britton, Chance, et al.: *Physiol. Rev.*, **59**(3), 527, 1979.
- [4] Cohen, G.: *Ciba Foundation symposium*, **65** (new series) 1979, Excerpta Medica Amsterdam Oxford, New York.
- [5] David, L. Gee et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **60**, 112, 1981.
- [6] Martyn, T. Smith et al.: *Biochem. Pharmacol.*, **31** (1), 19, 1982.
- [7] Sevanian, A. N. et al.: *J. Toxicol. Environ. Health*, **10**, 743, 1982.
- [8] Frank, H. et al.: *Applied Headspace Gas. Chromatography* (Edited by Bruno Kolb), Heyden and Son, Ltd., London. 1980.
- [9] Riely, C. A., et al.: *Science*, **183** (4121), 208, 1974.
- [10] 嵯峨井胜:《生化学》, **50**(12)1290, 1978.
- [11] Dillard, C. T.: *Lipid*, **2**(1), 109, 1976.
- [12] 魏奉群等,《辽宁省医学科学院基础医学研究所年报》, **70**, 1981.
- [13] Masaru, Sagai et al.: *Life Science*, **27**(9), 1731, 1980.
- [14] Kivits, G. A. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **665**, 559, 1981.
- [15] Dumelin, E. E. et al.: *Environ. Res.*, **15**, 38, 1978.
- [16] Dillard, C. J. et al.: *Lipid*, **13**(6), 398, 1978.
- [17] Richard, E. Litov et al.: *Lipid*, **13** (4) 305, 1978.

- [18] 嵯峨井胜:《生化学》, 50(12), 1290, 1981。
 [19] 魏奉群等:《辽宁省医学科学院基础医学研究所年报》, p. 120, 1982。
 [20] Albercht Wendel, et al.: *Methods in Enzymology*, 77, 10, 1981。
 [21] Alberto, A, et al.: *Laboratory Investigation*, 47 (4), 346, 1982。
 [22] Kivits, G. A. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 719(2), 329, 1982。
 [23] 嵯峨井胜, 奥那霸政宪, 松尾光芳:《变异原と毒性》,

5, 212, 1982。

- [24] 木村修一等:《ビタミン》 53, 543, 1979。
 [25] Dillard, C. J., et al.: *J. Appl. Physiol.*, 45, 927, 1978。
 [26] 任宏造等:《中国地方病学杂志》, 1 (3)172, 1982。
 [27] 八本國夫:《过酸化脂质と疾患》, 医学书院, 东京, 1981。

【本文于1983年8月19日收到】

非离子去污剂对红细胞膜薄层等电点聚焦电泳的影响

许彩民 陈 曦* 潘华珍

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

在膜蛋白的研究中, 选择一种有效的溶解和分离膜蛋白的方法十分重要。Merz^[1]等人在含8M尿素的聚丙烯酰胺凝胶上分离红细胞膜获得成功。Ames^[2]等人曾用 SDS 溶解膜蛋白, 在透析除去 SDS 后, 于含有尿素及 Nonidet P40的聚丙烯酰胺凝胶上进行等电点聚焦电泳, 但由于 SDS 及高浓度尿素可使膜蛋白变性, 失去活性, 影响电泳效果。为此我们探索了非离子去污剂对红细胞膜蛋白等电点聚焦电泳的影响, 分别比较了 Triton X-100, Lubrol PX, Nonidet P40, 及 Tween 20 等非离子去污剂的分离效果。

一、材料和方法

1. 试剂 丙烯酸胺 (Serva), 双丙烯酸胺 (Merk) Ampholine pH 3.5—10 (上海东风试剂厂) Triton X-100 (Roth), Nonidet P40 (Fluka), Lubrol PX (Sigm), Tween 20 (Lpc), 考马斯亮兰 R250 (Fluka)。其它均为国产分析纯试剂。

2. 人红细胞膜的制备 按 Dodge^[3] 方法。

3. 样品处理 取红细胞膜 60 μ l (膜蛋白含量 6 mg/ml) 分别加 20 μ l 4% Triton X-100, Nonidet P40, Lubrol PX, Tween 20 及 H₂O, 混匀后于 15,000rpm 离心 10 分钟, 取上清。

4. 制胶 按 T = 5.25%, C = 3%, Am-

pholine (pH3.5—10) 2%, 过硫酸铵 0.075%, 非离子去污剂 0.2% 的配方。制成 0.5 mm 厚胶板, 平放 1—2 小时后即可使用。

5. 电泳 取 1cm 宽滤纸条蘸 1M 氢氧化钠为阴极、0.04M 天门冬氨酸为阳极, 分别铺在电源负极和正极端。恒压 300V, 恒温 4℃, 预电泳 1 小时。在正极加样 20 μ l, 恒功率 10W, 继续电泳 2 小时。

6. 显色与脱色 电泳后的薄层胶浸在固定液(5% 三氯乙酸, 5% 磷基水杨酸)中过夜。换脱色液(水:乙醇:乙酸=8:3:1)洗脱 2 小时。60℃ 染色(用脱色液配制 0.11% 考马斯亮兰 R250)15 分钟, 漂洗至区带清晰。

7. 测 pH 梯度 在薄层胶的两极之间, 每隔 0.5 厘米切下等量胶, 浸泡在 2 毫升蒸馏水中, 置冰箱中过夜, 测 pH 值。

二、结 果

凡胶中含有 Triton X-100, 样品又分别经 Triton X-100, Lubrol PX, Nonidet P40 处理, 其分离效果相同, 电泳图谱清晰。样品虽经 Tween 20 处理, 但仍只能微溶, 电泳后仅呈现少数区带。样品未经任何去污剂处理, 则完全不溶, 也不见区带(图 1)。样品处理同上, 但胶中

* 北京阜外医院。