

mol/L HCl, 充分振摇后分层, 去上层, 下层用 N_2 吹干, 充入 N_2 后密封, 于 -20°C 下保存备用。

2.2 TLC 分离鉴定 PPI 分别取少量洗脱液, 浓缩后作 TLC。磷显色结果表明, A, B 峰分别与标准 PIP, PIP_2 有相同 R_f 值, 两峰分别与标准混合后层析均为单一斑点, 且蓝色加深。此外说明, 中性氯仿: 甲醇主要抽提非 PPI 的磷脂, 而酸性氯仿: 甲醇可抽提出 PPI (见图 2)。

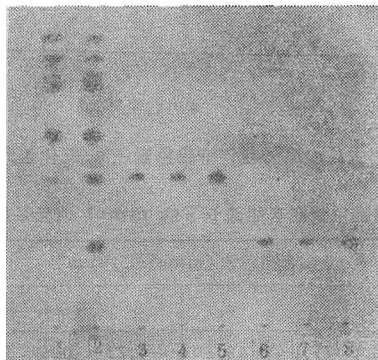


图 2 磷脂抽提液、纯化 PPI 与标准 PPI 的 TLC 图谱

磷显色法, 碱性展开剂展层。1: 中性抽提液, 2: 酸性抽提液, 3: A 峰, 4: 标准 PIP, 5: 3 + 4, 6: B 峰, 7: 标准 PIP_2 , 8: 6 + 7

图 3 表明, A, B 峰经 TLC 后, 过碘酸氧化法检验呈紫红色, 两峰 R_f 值分别与标准 PIP 和 PIP_2 的相

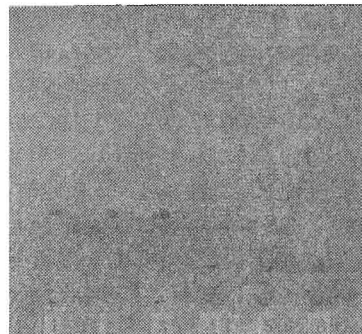


图 3 纯化 PPI 与标准 PPI 的 TLC 图谱

过碘酸氧化法显色, 酸性展开剂展层。1: A 峰, 2: 标准 PIP, 3: 1 + 2, 4: B 峰, 5: 标准 PIP_2 , 6: 4 + 5

等, 加入盐酸后紫红色不消退。

本法分离纯化 PPI 无需脱盐, 经一次柱层析即可获得较高纯度的 PIP 和 PIP_2 , 操作简单, 产率每克鲜脑可得 PIP 0.1 mg, PIP_2 0.8 mg, 故不失为一种分离纯化 PPI 的简便实用方法。

参 考 文 献

- 1 Berridge M J, Irvine R F. *Nature*, 1989; 341: 197
- 2 陈庆辉, 梁念慈. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16: 321
- 3 Dittmer J C. *J Lipid Res*, 1961; 5: 126
- 4 Smith I. *Chromatog Electropho Tech*; 1976; 1: 355

测定线粒体细胞色素 c, c_1, b, aa_3 含量的简单方法

赵 建 钢

杨 同 书

(中国康复研究中心康复医学基础研究所, 北京 100077)

(白求恩医科大学地方病研究所, 长春 130021)

关键词 还原-氧化差光谱, 细胞色素 c, c_1, b, aa_3 , 线粒体

线粒体是细胞中的重要细胞器, 能量代谢的主要场所。在呼吸链中, 细胞色素 c, c_1, b, aa_3 起着电子传递中间体的作用, 其任何一种含量的减少或缺失将影响细胞的呼吸功能。由于细胞色素是一类带有卟啉环的蛋白质, 在可见光区域有明显的吸收, 可以利用这一性质进行比色定量。J. N. Williams^[1] 首先建立了测定线粒体还原-氧化差光谱计算细胞色素含量的方法。W. H. Vanneste^[2] 进行了改进, 修正了计算含量的方程组系数, 简化了计算步骤。本文在前人工作基础上对差光谱测定方法进行简化, 并应用计算机使细胞色素含量的计算快速而准确。

1 材 料 和 方 法

取新鲜待测组织, 按 1:9 (W:V) 与匀浆液 (0.25 mol/L 蔗糖, 0.05 mol/L 硼酸盐缓冲液, pH 7.4) 混合, 玻璃匀浆器匀浆, 然后进行差速离心。第一次离心, 2000r/min, 4°C , 10min, 弃去沉淀。第二次离心, 10 000r/min, 4°C , 10min, 弃去上清。借助匀浆器用匀浆液洗沉淀, 重复第二次离心, 得到沉淀线粒体。用改进的 Lowry 法^[3] 测蛋白含量, 以牛血清白蛋白作标准。

收稿日期: 1991-06-28

修回日期: 1991-11-25

用日立-557 分光光度计测定线粒体还原-氧化差光谱。波长范围 500—650nm, 狭缝 2nm, 扫描速度 120nm/min, 比色杯光径 1cm。将线粒体溶于匀浆液中, 蛋白浓度为 2—4mg/ml, 做基线扫描, 然后于比色杯中加入少许固体连二亚硫酸钠 (2mg/ml), 仔细混匀, 做波长扫描, 记录下列波长处的光吸收值: 550nm, 535nm, 554nm, 540nm, 563nm, 577nm, 605nm, 630nm。将上述吸收值差减得到 4 组光吸收差值 $A_1 = A_{550} - A_{535}$, $A_2 = A_{554} - A_{540}$, $A_3 = A_{563} - A_{577}$, $A_4 = A_{605} - A_{630}$ 。输入计算机就可以按如下程序 (表 1) 计算出细胞色素 c, c_1, b, aa_3 的含量。

表 1 计算细胞色素含量的 Basic 程序

```

10 REM content of cytochromes
20 PRINT "N="
30 INPUT N
40 J = 0
50 FOR I = 1 TO N
60 J = J + 1
70 READ A1, A2, A3, A4
80 B1 = A1/25.1
90 B2 = (A2 - 7.78*B1)/15.6
100 B3 = (A3 + 1.39*B1 - 1.48*B2)/27.5
110 B4 = (A4 + .26*B1 + .483*B2 - .152*B3)/13.1
120 C4 = B4
130 C3 = B3 + .0145*C4
140 C2 = B2 - .449*C3 - .0523*C4
150 C1 = B1 - .41*C2 + .248*C3 - .0275*C4
160 PRINT "(", J, "):"
170 PRINT "C1 = "; C1
180 PRINT "C2 = "; C2
190 PRINT "C3 = "; C3
200 PRINT "C4 = "; C4
210 NEXT I
220 DATA
230 END

```

2 结果和讨论

本法主要涉及两点, 一是为了获得一个理想的线粒体还原-氧化差光谱, 完整的线粒体对测定是必要的。线粒体不要冷冻, 以免破坏结构, 出现不可逆沉淀。测定时的浓度也不宜过高, 以避免混浊引起的光散射。实验中比较了所采用的还原剂和氧化剂, 用连二亚硫酸钠作还原剂获得还原态, 以自然氧化态不加氧化剂作氧化态, 可测得满意的还原-氧化差光谱 (图 1)。这比用抗坏血酸作还原剂和高铁氰化钾作氧化剂^[4]简单并且效果好。利用仪器基线扫描清零的特点, 氧化态和还原态只需一份样品。扫描消除了系统自身的各种吸收干扰, 反映了还原态光谱与氧化态光谱的差示光谱。

其二是含量计算, 计算差光谱中细胞色素的吸收使用下列波长: c : 550—535nm; c_1 : 554—540nm; b : 563—577nm; aa_3 : 605—630nm。在多组分体系中, 任何一种细胞色素在不同的波长处对吸收值都有贡献, 所以考虑某一波长的吸收时, 不能忽略其它组分的作用。利用线粒体细胞色素在差光谱中不同波长处差消光系数 (表 2) 可以建立如下方程组^[2]。

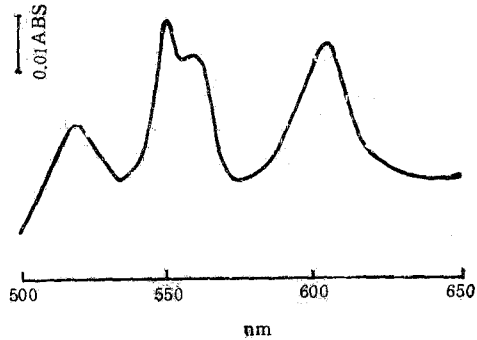


图 1 大鼠心肌线粒体细胞色素还原-氧化差光谱

表 2 细胞色素在各组波长下的 mmol 消光系数差值

$\lambda(\text{nm})$	细胞色素 (mmol/L) $^{-1}\text{cm}^{-1}$				ΔA
	c	c_1	b	aa_3	
550—535	25.1	10.3	-6.22	0.69	A_1
554—540	7.78	18.8	5.08	1.03	A_2
563—577	-1.39	0.91	28.5	-0.36	A_3
605—630	-0.26	-0.59	0	13.1	A_4

$$25.1 C_1 + 10.3 C_2 - 6.22 C_3 + 0.69 C_4 = A_1$$

$$7.78 C_1 + 18.8 C_2 + 5.08 C_3 + 1.03 C_4 = A_2$$

$$-1.39 C_1 + 0.91 C_2 + 28.5 C_3 - 0.36 C_4 = A_3$$

$$-0.26 C_1 - 0.59 C_2 + 13.1 C_4 = A_4$$

式中 A_1, A_2, A_3, A_4 分别为上述各组波长所测得的光吸收差值, C_1, C_2, C_3, C_4 分别为细胞色素 c, c_1, b, aa_3 的浓度。解此四元一次方程组, 需应用行列式消元, 多次代入。为了简化计算, 我们设计了解此方程组的 Basic 程序, 只需向计算机输入 A_1, A_2, A_3, A_4 值和样品例数 N , 就可以方便地得到细胞色素 c, c_1, b, aa_3 的毫摩尔浓度值。本文测定了多组大鼠线粒体细胞色素含量, 比例为 $c:c_1:b:aa_3 = 2:1:2:4$, 结果与文献报道一致。该方法具有简单、快速、准确的特点, 尤其适合多样品的测定。

参 考 文 献

- 1 Williams J N. *Arch of Biochem and Biophys*, 1964; 107:537
- 2 Vanneste W. H. *Biochim Biophys Acta*, 1966; 113: 175
- 3 张龙翔等. 生化实验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 1981; 112—116
- 4 Azzone G F et al. *Methods in Enzymology*, 1979; Vol. LV:46—50