

gy, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; ²⁾ Department of Biochemistry, Hebei Worker's Medical College, Baoding 071000, China).

Abstract Testosterone is prehormone of estradiol and most of it will converted to estradiol in ovary. The production of testosterone was regulated directly by luteinizing hormone and 17 α -hydroxylase which is the rate-limiting enzyme in the production of testosterone. So 17 α -hydroxylase and LHR

gene expression reflect the response to LH of ovarian cells. In order to investigate the ovarian functions, the 17 α -hydroxylase and LHR gene expression was detected simultaneously by using ribonuclease protection assay (RPA) and the sensitivity of RPA is about 8 times more compared with Northern blot.

Key words luteinizing hormone receptor (LHR), 17 α -hydroxylase, ribonuclease protection assay (RPA).

用复合孔雀绿分析无机磷的改良方法

伍期专 王润英* 王燕华 包鹤丘

(北京医科大学第一医院神经病学研究室, 北京 100034)

摘要 在研究酸度、钼酸钠浓度及孔雀绿浓度对显色影响的基础上, 用复合孔雀绿试剂分析无机磷, 该方法平行程度很好. 测定 10 个标准管光吸收的标准差 = 0.0065, 变异系数 = 1.26%, 可以用于测定 Na⁺, K⁺-ATP 酶活力等.

关键词 孔雀绿, 磷, ATP 酶

孔雀绿法分析无机磷是一种灵敏度很高的方法^[1]. 因此在医学生物学领域有广泛的用途. 例如, 可以通过测定 ATP 酶水解 ATP 产生无机磷的量达到分析 ATP 酶活力的目的^[2]. 用来分析蛋白磷酸酶活力^[3], 作为聚丙烯酰胺凝胶的磷酸酶染色的一种技术等^[4]. 但是, 采用试剂分批加入的方法不够稳定, 变异较大, 在分析活力较低的人红细胞膜上的 Na⁺, K⁺-ATP 酶时非常明显. 要解决这一问题首先须减小定磷中的误差来源. 由于孔雀绿呈色的影响因素复杂^[5], 显色剂及局部酸度对于呈色有重大影响, 显色剂分次加入的加样方式, 时间间隔的差别都会对结果产生不可忽视的影响. 虽然并不是每一种方法都可能制成复合显色剂, 但复合显色剂的优点是显然的. 一些经典的定量分析方法, 如 Lowry 蛋白定量法等均采用复合成分的显色液^[6]. 本文在研究不同因素对呈色影响的

基础上, 反复试验进行筛选制成了复合孔雀绿试剂. 其试剂比 Lanzetta^[7]的方法配制更加方便, 价格低且易于得到. 现将结果报道如下.

1 材料及方法

1.1 仪器与试剂 Shimadzu MPS-200 型分光光度计, 日本岛津公司生产. 孔雀绿, 化学纯, 北京旭东化工厂生产. 其余均为中国产分析纯以上试剂.

1.2 方法 研究酸度以及钼酸钠和孔雀绿浓度对显色灵敏度影响的实验中, 基本方法如下: 取磷标准液 (30 μ mol/L) 0.2 ml, 加入 0.23 ml 钼酸钠 (25 ~ 300 mmol/L), 再加入 0.6 ml 盐酸 (0.16 ~ 2 mol/L) 及 0.7 ml 孔雀绿 (0.037% ~ 0.444%). 2 min 后加入

*太原铁路中心医院, 太原 030013.

收稿日期: 1994-11-08, 修回日期: 1995-02-21

1 ml, 14.7%的硫酸酸化. 1 h 后在 625 nm 波长下比色. 空白组用 0.2 ml 蒸馏水代替磷标准液, 其余操作与上相同.

2 结 果

2.1 显色剂浓度对于灵敏度的影响

2.1.1 钼酸钠浓度的影响: 孔雀绿的浓度为 0.148%, HCl 浓度为 1.5 mol/L. 钼酸钠的浓度梯度见图 1. 各液的加入量见方法部分. 由于磷标准液的加入量在本系列实验中是一样的, 因此测定的灵敏度可以由标准管的光吸收减去空白管的光吸收来代表. 由图 1 可见: 在孔雀绿酸度和磷的浓度都保持恒定的条件下, 钼酸钠的浓度越高, 空白管、标准管的光吸收以及标准管与空白管光吸收的差值也就越高, 但是, 它们的增高并不平行. 当钼酸钠的浓度在 25 mmol/L 至 50 mmol/L 范围内变化时, 标准管与空白管光吸收的差值 (即灵敏度) 较小. 但当钼酸钠浓度增至 100 mmol/L 到 200 mmol/L 时灵敏度明显增加. 当钼酸钠增至 300 mmol/L 时则空白光吸收增加较大, 到了实际使用很困难的程度.

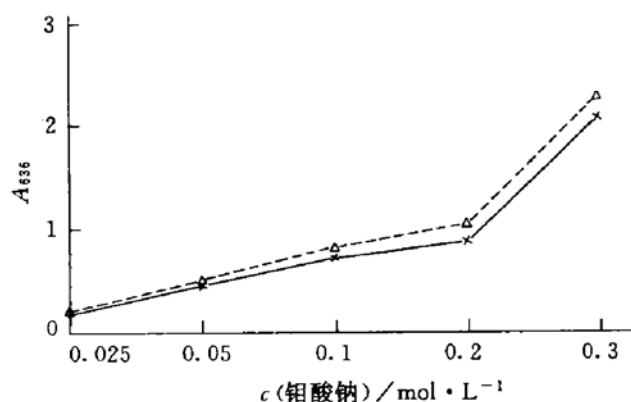


图 1 钼酸钠浓度对显色的影响

x-x: 对照, Δ---Δ: 样品. 样品均为 30 μmol/L 磷标准液.

2.1.2 孔雀绿浓度的影响: 如图 2 所示: 在钼酸钠和磷的浓度都保持恒定的条件下, 孔雀绿的浓度越高, 空白管、标准管的光吸收以及标准管与空白管光吸收的差值也就越高. 但当孔

雀绿浓度增至 0.296% 以上时, 空白光吸收继续增加, 但灵敏度 (光吸收的差值) 增加不明显.

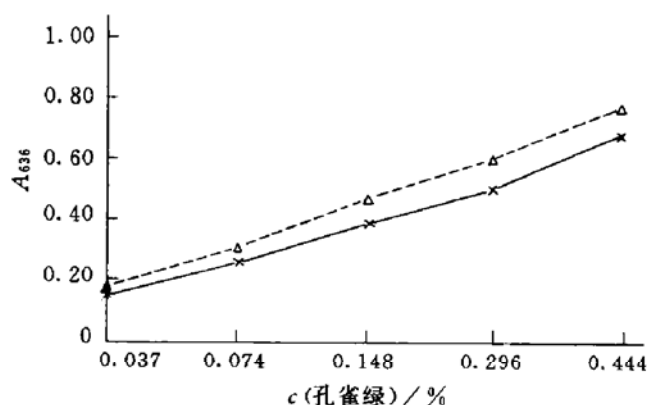


图 2 孔雀绿浓度对显色影响

x-x: 对照, Δ---Δ: 样品. 样品浓度 30 μmol/L 磷标准液.

2.1.3 盐酸酸度的影响: 如图 3 所示: 酸度对于显色也有重大影响. 酸度低则光吸收高, 但灵敏度并不高. 酸度适当增高则光吸收低, 灵敏度也可达到较好水平.

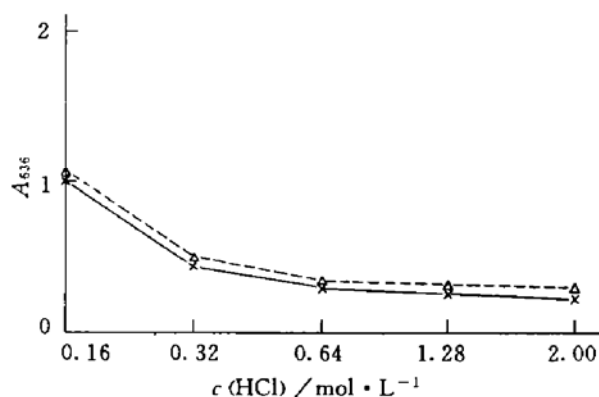


图 3 盐酸浓度对显色的影响

x-x: 对照, Δ---Δ: 样品. 样品浓度 30 μmol/L 磷标准液.

2.2 复合孔雀绿试剂分析无机磷的方法

复合显色剂并不是用孔雀绿定磷方法中的几种显色剂混合制成. 事实上如果将 Muszbek 等所用的试剂混合起来并不能正常显色. 另外, 为了实用的方便, 复合显色剂还要考虑其保存的问题. 我们通过一系列的实验得到显色性能

好, 便于保存的复合试剂的配方.

2.2.1 试剂: 显色 A 液: 100 mmol/L 钼酸钠的 1% 浓硫酸 98% 液; 显色 B 液: 1.5 mmol/L 盐酸; 显色 C 液: 0.148% 孔雀绿的 1.5% 聚乙烯醇 (PVA) 液. 先配制 PVA, 沸水浴加热使 PVA 溶解后加入显色剂, 充分振荡使其完全溶解. 显色液由 A、B 和 C 液在临用前 1 h 按本次实验所需要量混合而成. 其比例为 A : B : C = 0.23 : 0.6 : 0.70. 按以上比例取液并将三者混合均匀即可. 磷标准液: 30 $\mu\text{mol/L}$ 并用密封性能较好的瓶子贮存, 用后置于 4℃ 冰箱中保存. 酸化液: 14.7% 硫酸 (由于配制时产生热量, 不可临用前配制.) 试剂的保存: A 液, 磷标准液均应在 4℃ 冰箱保存. B 液, C 液及酸化液可以在室温保存.

2.2.2 操作方法: 见表 1. 标准曲线见图 4. 用本方法测定 10 个标准管 (磷标准液浓度 60 $\mu\text{mol/L}$) 的光吸收值如下: 0.504, 0.516, 0.527, 0.510, 0.513, 0.516, 0.507, 0.518, 0.515, 0.519. 平均值 = 0.514, 标准差 (s) = 0.0065, 变异系数 (v) = 1.26%. 用本方法测定 55~70 岁年龄组 50 人 $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ 活力 = 0.137 单位 (s = 0.118).

表 1 复合孔雀绿分析无机磷测定加液表

	ml		
	空白	标准	待测样品
磷标准液		0.20	
蒸馏水	0.20		
待测样品			0.20
10% 三氯乙酸	0.20	0.20	0.20
复合显色剂	1.53	1.53	1.53
放置 2 min			
14.7% 硫酸	1.00	1.00	1.00
放置 30 min			
测定 636 nm 光吸收			

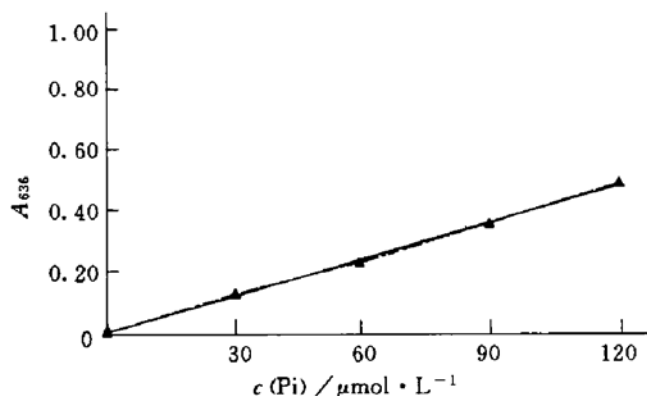


图 4 测定无机磷 (Pi) 标准曲线
实线为标准曲线, Δ 代表实测点, 断线为实测点的连线.

3 讨 论

关于孔雀绿方法测定磷的详细机制有不同的看法. 近来的观点认为其中的显色物是由磷-钼-孔雀绿共同构成的复合物^[8]. 反应的过程可能是: 磷酸根与钼酸根在酸性条件下形成复合物 (磷钼杂多酸?) 这一复合物又与孔雀绿形成一个弱键复合物. 这一复合物就是显色复合物. 当反应体系用适当浓度的硫酸酸化以后, 过量的没有形成复合物的孔雀绿在较高酸度下逐渐褪色成为无色孔雀绿 (孔雀绿的性质), 但显色复合物在同样酸度下不会被破坏. 这就构成了测定的基础. 同时, 在这一较高酸度下孔雀绿已经不再能与磷-钼复合物进行反应, 因此在测定 ATP 酶活力时过量的 ATP 在酸性条件下逐步水解形成的磷酸不会干扰测定^[1].

本方法以聚乙烯醇为助溶剂增加孔雀绿的溶解度, 也可以保持显色复合物稳定.

本方法作为测定 $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ 酶方法的一部分已经连续使用 3a (年) 以上. 效果较好. 由于灵敏度较高, 因此在所用器皿和试管方面应注意干净, 蒸馏水最好用双蒸水. 如果由于实验室条件或试剂产地的不同, 造成空白光的吸收使灵敏度达不到结果中所给的数值时, 可以将显色 A, B, C 液的浓度或比例进行轻微调整. 其原则根据本文结果的第一部分就可以达到要求.

传统的孔雀绿方法虽然灵敏度较高但很不稳定, 因此限制了它的应用. 本文给出了一个用复合孔雀绿试剂分析磷的改良方法. 它不但保持了原来的灵敏度, 并且稳定性 (指标准管与空白管光吸收的差值) 也很好. 由于它的仪器及操作简单, 成本低廉, 因此是一种较理想的方法.

参 考 文 献

- 1 Muszbek L, Szabo T, Fusus L. *Anal Biochem*, 1977; **77**: 286
- 2 Stekhoven F S, Bonting S L. *Physiol Rev*, 1981; **61**: 1
- 3 Fisher D K, Higgins T J. *Pharm Res*, 1994; **11** (5): 795
- 4 Queiroz C C, Meunier J C. *Anal Biochem*, 1993; **209**(2): 228
- 5 上海市医学化验所编. 临床生化检验. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 224
- 6 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* *J Biol Chem*, 1951; **193**: 265
- 7 Lanzetta P A, Alvarez L J, Reinach P S *et al.* *Anal Biochem*, 1979; **100** (1): 95
- 8 Matsubara C, Izumi S, Takamura K *et al.* *Analyst*, 1993; **118** (5): 553

An Improved Method for Phosphorus Analysis by Combined Malachite Green Reagent. Wu Qizhuan, Wang Yanhua, Bao Heqiu (*First Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100034, China*); Wang Runying (*Taiyuan Railway Central Hospital, Taiyuan 030013, China*).

Abstract Based on a study of the influences of the acidity and concentrations of sodium molybdate and malachite green on the colour developing, an improved method for phosphorus analysis by combined malachite green reagent is reported. By testing 10 standard tubes, the results are as the following: $s = 0.0065$ and $v = 1.26\%$. This method can be used in the analysis of the activity of Na^+ , K^+ -ATPase etc.

Key words malachite green, phosphorus, ATPase

一种用聚乙二醇制备微粒体的方法*

王莉娥 杨明学 谢广云

(中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所, 北京 100050)

摘要 介绍一种用聚乙二醇 (PEG) 制备微粒体的方法. 大鼠肝匀浆经聚乙二醇-6000 凝聚, 及两次高速离心即可得到微粒体组分, 与超速离心方法比较, 可省去超速离心步骤, 又缩短了分离制备的时间, 是一种比较简单易行的方法.

关键词 聚乙二醇, 微粒体, 制备, 高速离心

肝微粒体的制备方法有许多种, 常见的有超速离心、氯化钙凝聚、酸沉淀和凝胶过滤等方法^[1]. 目前, 在肝微粒体药物代谢酶的分离纯化过程中, 常用超速离心法制备肝微粒体. 该方法不但耗时, 而且需要昂贵的超速离心机. 用氯化钙制得的微粒体, 因含有钙离子, 给酶的

进一步分离纯化带来了困难. 我们建立了一种用聚乙二醇 (PEG) 制备肝微粒体的方法. 该方法是先将肝匀浆离心去除线粒体部分, 然后在上清液中加入聚乙二醇, 经两次高速离心即

* 卫生部青年科学基金资助项目.

收稿日期: 1994-11-14, 修回日期: 1995-02-06