

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

可得到微粒体组分. 用聚乙二醇制备微粒体即省去超速离心步骤, 又能缩短分离制备的时间, 收集到的微粒体组分可直接用于药物代谢酶的分

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物: 雄性 Wistar 大鼠由中国医学科学院动物繁育场提供.

1.1.2 仪器: Potter's 组织匀浆器为德国 Braun 公司产品; 台式高速冷冻离心机为德国 Heraeus 公司产品.

1.1.3 试剂: 多氯联苯为德国产品, 聚乙二醇-6000 为日本进口广州医药站化学试剂公司分装, NADPH 为 Sigma 公司产品, 细胞色素 c 为上海东风生化技术公司产品, 其它试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 聚乙二醇法制备微粒体: 选用体重 100 ± 10 g 雄性 Wistar 大鼠 5 只, 多氯联苯按 600 mg/kg 剂量一次腹腔注射, 第 5 天禁食断头处死, 迅速取出肝脏, 以下操作均在 4°C 下进行. 将肝脏剪成小块, 用 1.15% KCl 漂洗, 滤纸吸干, 在 4~6 倍体积匀浆液 (0.25 mol/L 蔗糖-10 mmol/L Tris-HCl -1 mmol/L EDTA, pH7.4) 中匀浆 (1300 r/min, 上下 8 次). 匀浆液先以 9000 g 离心 15 min, 弃去沉淀, 上清液中缓慢加入 50% 聚乙二醇至终浓度为 8.5%, 以 10 000 g 离心 20 min, 弃去上清液, 沉淀部分用 150 mmol/L KCl 缓冲液 (150 mmol/L KCl-10 mmol/L Tris-HCl-

1 mmol/L EDTA, pH7.4) 漂洗, 再加入聚乙二醇至终浓度为 8.5%, 重复离心后即得到微粒体组分. 用匀浆液悬浮 -70°C 冰箱保存 (如图 1 所示). 注意: 聚乙二醇应均匀缓慢地加入, 以免造成微粒体酶变性.

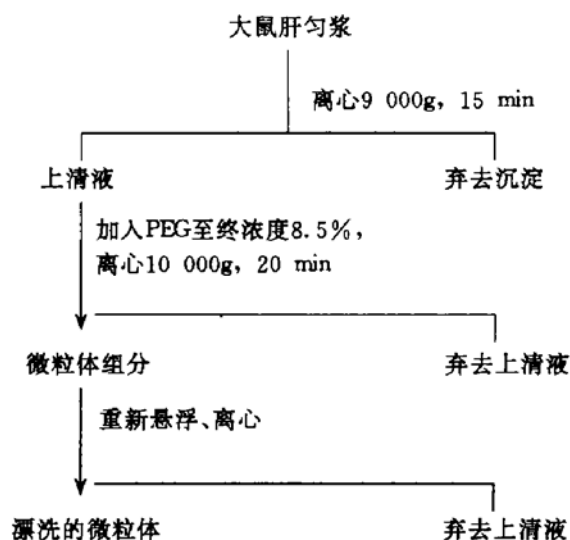


图 1 聚乙二醇法制备微粒体流程图

1.2.2 超速离心法制备微粒体: 按 Guengerich 方法^[2]进行.

1.2.3 其它分析方法: 细胞色素 P_{450} 含量测定采用 Omura 等^[3]的方法, 以所含微摩尔数每克微粒体蛋白表示; NADPH-细胞色素 P_{450} 还原酶 (简称还原酶) 的测定按 Dignam 等人^[4]的方法, 酶活力以还原细胞色素 c 的毫摩尔数每克微粒体蛋白每分钟表示; 蛋白测定采用 Lowry 法^[5].

2 结果与讨论

实验结果如表 1 所示.

表 1 肝微粒体两种制备方法的比较

方法	肝湿重 /g	微粒体蛋白 /mg	P_{450} 比含 / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	还原酶比活 / $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$
聚乙二醇	29	905.7	2.74	0.179
超速离心	30	750.1	2.80	0.08

从以上的结果可以看出, 两种方法制备的微粒体中, 主要成分细胞色素 P_{450} 的含量没有

明显差别, 但 PEG 制备的微粒体蛋白的含量及标志酶 NADPH-细胞色素 P_{450} 还原酶的比活都

较高. 这可能由于 PEG 制备微粒体的回收率高于超速离心法, 同时由于部分非微粒体成分如溶酶体等沉淀所致.

离心沉淀分离法是利用各种亚细胞成分密度不同以及体积(或形态)大小相殊, 再利用不同的离心速度及不同的离心时间而分批收集各亚细胞成分^[6]. 而聚乙二醇法是由于聚乙二醇分子有与盐类似的脱水特性, 与水分子结合后使大分子物质如蛋白质溶解度降低; 同时由于 PEG 是有机溶剂, 又具有绝缘特性, 且 PEG 溶液离子强度和电子密度颇低, 这样蛋白质水溶液由于 PEG 的加入导致溶液介电常数下降, 增加了蛋白质分子上不同电荷的引力, 使蛋白质凝聚以沉淀形式分离出来^[7,8].

微粒体的制备是毒理学和药理学研究的基础. 由于 PEG 法省去了超速离心步骤, 便于在大多数实验室推广使用, 所以用聚乙二醇制备大鼠肝微粒体是一种比较简单易行的方法.

参 考 文 献

- 1 Schenkman J B, Cinti D L. In: Fleischer S ed. Methods in enzymology (Vol. 52, Part C). New York: Academic Press, 1978: 83
- 2 Guengerich F P. In: Hayes A W eds. Principles and methods of toxicology. New York: Raven Press, 1982: 605
- 3 Omura T, Sato R. J Biol Chem, 1964; 239: 2370
- 4 Dignam J D, Strobil H W. Biochemistry, 1977; 16: 1116

- 5 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* J Biol Chem, 1951; 193: 265
- 6 北京医学院主编. 生物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 87
- 7 鲁子贤主编. 蛋白质和酶学研究方法, 第一册. 北京: 科学出版社, 1989: 17
- 8 McPherson A. In: Wyckoff H W eds. Methods in enzymology (Vol. 114 Part A). New York: Academic Press, 1985: 120

Preparation of Microsomes with Polyethylene Glycol. Wang Lie, Yang Mingxue, Xie Guangyun (*Institute of Occupational Medicine, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100050, China*).

Abstract A microsome preparation procedure using polyethylene glycol (PEG) is reported. The liver homogenate of rats is aggregated by polyethylene glycol-6000, and centrifuged at high speed two times. The obtained pellet is the microsomal fraction. Compared with the ultracentrifugation method, this procedure of using PEG to prepare microsomes greatly eliminated the need for an ultracentrifuge and reduces the time necessary for isolation of this fraction. It is simple and feasible.

Key words polyethylene glycol, microsomes, preparation, high speed centrifugation

丝瓜核糖体失活蛋白的分离与纯化*

吴 伸 朱曰荣 郭 峰¹⁾ 刘朵花

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 采用一种改进的方法, 简便快速地从丝瓜 (*Luffa cylindrica*) 籽中得到丝瓜蛋白 α 和 β . 它们在 SDS-PAGE 上均呈一区带, 其分子量分别为 28 000 和 29 000. 等电聚焦测定等电点均为 10. 它们对无细胞体系蛋白质合成都有强烈的抑制活性, 其 ID_{50} 分别为 10 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$, 是目前发现的单链核糖体失活蛋白中活性最高的.

关键词 核糖体失活蛋白, 丝瓜蛋白, 蛋白质纯化, N-糖苷酶, 柱层析