

表 1 薄层扫描法测定寡核苷酸含量的回收率

加入量 (ng)	实测值 (ng)	回收率 (%)	S_x	$\bar{X}(n)$	CV (%)
50	47,51,47	94,102,94	4.6	97(3)	4.8
500	460,480,520,520	92,96,104,104	6.0	99(4)	6.1
1000	920,960,930,1040	92,96,93,104	5.4	96(4)	5.6

结果(见表 1)表明当加入量分别为 50ng, 500 ng 和 1000ng 时,回收率依次为 97%, 99% 和 96%;变异系数(CV%)依次为 4.8%, 6.1% 和 5.6%。上述结果完全可以满足寡核苷酸定量分析要求。

2.4 薄层扫描法与紫外比色法比较 为评价该方法的准确性,分别用薄层扫描法及紫外比色法测定了 4 个纯化的寡核苷酸样品含量,测定结果(见表 2)表明两种方法无显著差异($P > 0.5$),因无法得到足够称出实际重量的样品来配制确切浓度,因此无法评价那一方法更准确,但从方法本身看,薄层扫描法应比紫外法更准确,因为薄层扫描法总是同时采用标准浓度进行标定,这可以克服系统误差,而紫外法则是取样品直接测定,这受仪器等因素影响较大。

由此可见,薄层扫描测定寡核苷酸含量的

表 2 薄层扫描与紫外比色对寡核苷酸定量方法的比较

样品	样品含量 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	
	紫外比色法	薄层扫描法
S_1	0.81	0.73
S_2	0.10	0.11
S_3	0.17	0.19
S_4	0.04	0.04

$P > 0.5$

新方法线性及回收率均属优良,与传统的紫外比色法相比,该方法具有以下优点: a. 可测非纯化样品中寡核苷酸量; b. 样品用量极少; c. 可同时测定多个样品; d. 结果可靠; e. 样品间无交叉污染。

参 考 文 献

- 1 黄培堂,俞伟源. PCR 技术的原理和应用. 北京: 中国科学技术出版社, 1990:136—157
- 2 王升启,马立人. 反义核酸技术及其应用——反义寡核苷酸,军事医学科学院院刊, 1991;15(3): 191
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual* 2nd ed, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: E5
- 4 Anon. Applied biosystems. *User Bulletin*, 1989;11: 20

组织中氧化型和还原型谷胱甘肽荧光测定法

张迺哲 赵会军 付宏杰 宋玉忱*

(河北省医学科学院实验医学研究所,石家庄市 050021)

提 要

介绍了一种同时测定组织中氧化型谷胱甘肽(GSSG)和还原型谷胱甘肽(GSH)的荧光方法,应用邻苯二甲醛作为荧光试剂,GSH 和 GSSG 的标准曲线($2-10\mu\text{g}$)均呈线性关系。测定了 17 例正常人肺组织及肺癌组织胞浆和线粒体内 GSH 含量的亚细胞分布,本法简单、灵敏、重复性好、回收完全,比高效液相层析法容易推广。

关键词 谷胱甘肽,氧化型和还原型谷胱甘肽的测定,荧光法

谷胱甘肽(GSH)广泛存在于活体细胞内,并参与多种生物学反应,在机体对外界异物的

* 河北医学院第四医院外科。

收稿日期: 1992-01-07

修回日期: 1992-02-20

解毒作用和对羟基过氧化物的清除作用中起着重要作用。谷胱甘肽因能直接与亲电子剂发生反应,能保护机体免受电离辐射的影响,被称之为捕捉剂^[1]。还原状态的 GSH,其 SH 基极为活泼,能进行可逆的氧化还原反应,是谷胱甘肽在生物组织中存在的主要形式^[2]。谷胱甘肽的状态,特别是氧化型谷胱甘肽(GSSG)的比例具有昼夜规律,其释放是膜本身具有的独立过程,但受肾上腺素能激素的调节。通过二硫化物的转换可调节酶活性并可使细胞内 GSH 有效地维持在还原状态^[3]。为迅速准确地测定组织及体液中氧化型和还原型 GSH 的含量,我们参照 P. J. Hissin 等人^[4]的方法,结合本实验室条件,建立了荧光分光光度法,测定了人肺正常组织及肺癌组织中还原型 GSH 含量的亚细胞分布。

1 材料和方法

荧光试剂邻苯二甲醛(OPT)为日本和光纯药工业株式会社生产。GSH 和 GSSG 分别为日本山之内制药株式会社和 Sigma 公司产品。N-乙酰顺丁烯二酰亚胺及其它试剂均为国产分析纯试剂。荧光分光光度计为 Opton MQ₃。

GSH 标准物用 0.1mol/L 磷酸钠含 0.005 mol/L EDTA 的缓冲液 pH 8.0, GSSG 标准物用 0.1 mol/L NaOH, 每日制备新鲜原液(1 mg/ml),用前稀释至所需浓度。荧光试剂 OPT 溶液,用分析纯无水乙醇每日新鲜制备。

1.1 组织液的制备 采用人肺癌手术时切下的正常肺组织标本,按 Wevers 等^[5]的方法分离制备线粒体,观察 GSH 在亚细胞中分布情况。

1.2 GSH 含量测定 取 100 μ l 新鲜制备的组织上清液加入 2.8ml 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 pH 8.0 及 100 μ l (1mg/ml) OPT 荧光试剂,充分混合,在室温下放置 15min 后,在 Opton 荧光分光光度计上激发波长 350nm,发射波长 430nm 测定荧光强度,标准管(100 μ l,内含 4 μ g GSH)和空白管(100 μ l H₂O)均需经过上述操作。

1.3 GSSG 含量测定 新鲜制备的组织上清液 500 μ l 加入 200 μ l 0.04 mol/L NEM(N-乙酰顺丁烯二酰亚胺),室温放置 30min 后取 100 μ l 加 2.8ml 0.1mol/L NaOH 及 100 μ l (1mg/ml) OPT 荧光试剂,充分混合室温放置 15min 后,用上述相同的波长测定荧光强度。标准管(100 μ l,内含 10 μ g GSSG)和空白管(100 μ l H₂O),均需经过上述同样操作。

2 结 果

2.1 标准曲线的制作 图 1 为 GSH 和 GSSG 的标准曲线(浓度从 2.0—10.0 μ g),可以看出在此范围内随着标准物浓度的增加,其荧光强度亦相应增加,二者呈直线关系(图内各点为 10 个样品测定结果的平均值)。

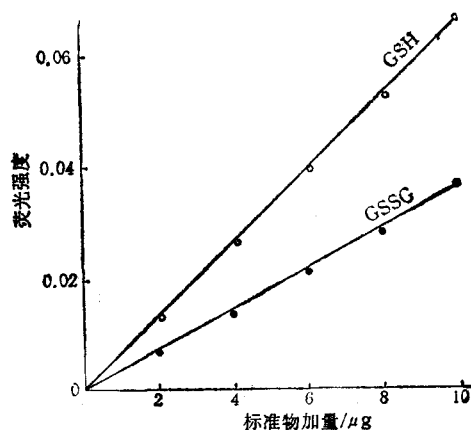


图 1 GSH 和 GSSG 标准曲线

2.2 激发与发射波长的选择 应用 GSH 和 GSSG 标准物及待测标本进行荧光反应后,在荧光分光光度计上扫描,观察激发波长与发射波长的光谱曲线。结果表明,二者的最高激发峰均在 350nm,最高发射峰均在 430nm (图

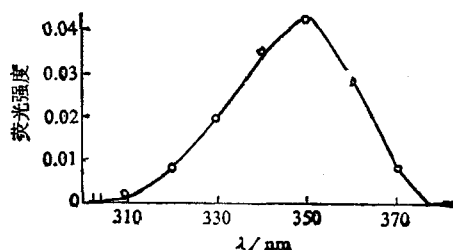


图 2 GSH 激发波长吸收光谱

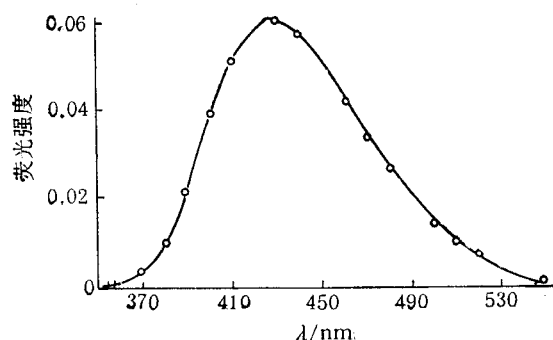


图 3 GSH 发射波长吸收光谱

2, 3 分别为 GSH 标准物激发波长与发射波长吸收光谱曲线)。

2.3 回收实验 正常大鼠肝组织加入一定量的缓冲液及 25% 过氯酸, 用 Teflon 匀浆器制成匀浆, 12000g 离心 30 min, 取上清液分别加入已知浓度的 GSH 及 GSSG 标准物, 进行回收实验。同一匀浆上清液加入 4 μg GSH 其回收率平均为 102%, 加入 4 μg 和 10 μg GSSG 其回收率分别平均为 89.1% 和 96.3% (均为 4 次测定的平均值)。

2.4 重复性 我们用同一份标本连续进行 5 次观察 (1 日内完成), 每次做双样本, 共得 10 个数据, 结果 $\bar{x} \pm SD$ 为 0.34 ± 0.02 CV = 6.1%。

2.5 人肺组织中还原型 GSH 含量的亚细胞分布 17 例人正常肺组织胞浆中每 mg 蛋白质中 GSH 含量平均为 $7.46 \text{ nmol} \pm 1.36 \text{ nmol}$, 线粒体 GSH 含量平均为 $0.34 \text{ nmol} \pm 0.06 \text{ nmol}$, 二者之比为 21.9:1。

3 讨 论

已证明 GSH 具有减少 H_2O_2 和氧自由基的能力, 因而有保护组织损伤减低或消除致死性心律失常的发生, 缩小梗塞面积, 提高动物存活率的作用。已应用于缺血再灌注的研究^[6,3]。

缺血组织再灌注时如产生的氧自由基超出细胞的清除能力时, 将导致脂质过氧化和细胞膜的破坏, 并可使细胞内还原型 GSH 含量减少, 氧化型 GSSG 含量增加, 故有人用测定氧化型和还原型 GSH 的比例 (GSSG/GSH) 以衡量组织氧化应激的能力^[7]。

测定生物标本中 GSH 含量的方法有多种^[8,9], 但能同时测定组织中氧化型和还原型 GSH 含量的却为数不多, 我们所建立的荧光测定法其原理是氧化型或还原型谷胱甘肽与邻苯二甲醛, 在碱性环境下形成荧光复合物, 其最高激发峰在 350nm, 最高发射峰在 430nm, 此法具有简易、灵敏、重复性好、回收完全等优点, 初步应用所测数据与文献报导一致^[10], 较高效液相色谱法更适合在我国普遍推广应用。

参 考 文 献

- 1 Carmichael J, Adams D J, Ansell J *et al.* Glutathione and glutathione transferase levels in mouse granulocytes following cyclophosphamide administration. *Cancer Research*, 1986; 46: 735
- 2 Makerboom T P M, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology*, 1981; 77: 48
- 3 Ishikawa T, Zimmer M, Sies H. Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide. *FEBS*, 1986; 200(1): 128
- 4 Hissin P J, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 1979; 74: 214
- 5 Wevres R A, MUL-Steinbusch, Soons J B J. Mitochondrial CK in the human heart. *Clinica Chimica Acta*, 1980; 101: 103
- 6 汤立达, 孙建中, 吴 可等. 巯基化合物对缺血再灌注所致大鼠离体心脏功能低下的保护作用. *中国药理学与毒理学杂志*, 1991; 5(2): 96
- 7 Harvey P R C, Ilson R C, Strasberg. The simultaneous determination of oxidized and reduced glutathiones in liver tissue by ion pairing reverse phase high performance liquid chromatography with a coulometric electrochemical detector. *Clinica Chimica Acta*, 1989; 180: 203