

置 100 ml 培养瓶中, 37℃ CO<sub>2</sub> 孵育箱中预培养 30 min, 去除贴壁成纤维细胞, 细胞悬液分成 A、B、C 三组, A 组加入佛波醇酯处理后与 B 组平行缺氧处理后氧气复灌, 与未处理的对照组 C 以 85% DMEM+ 15% 胎牛血清为培养基平行培养, 每 24 h 更换培养基. 贴壁生长 4~ 5 d 待测.

分别取样 1.0 ml, 加入 0.1 mol/L NH<sub>4</sub>Cl 溶液, 80℃ 恒温水解 10 min, 加正丁醇处理并离心, 取清液通氮气 3 min 后, 自 - 1.0 至 - 1.6 V 扫描 *e*<sup>''</sup>-*E* 峰.

平行取样, 参照 Ohkawa 法<sup>[1]</sup>, TBA 显色处理, 冷却后在 532 nm 用分光光度法测定, 与伏安法结果对照见表 1.

表 1 各组 SD 大鼠每 10<sup>5</sup> 个心室肌细胞中 MDA 含量

|     | 伏安法测定结果<br>/ nmol | 光度法测定结果<br>/ nmol |
|-----|-------------------|-------------------|
| A 组 | 0.24 ± 0.08       | 0.19 ± 0.05       |
| B 组 | 0.50 ± 0.18       | 0.45 ± 0.20       |
| C 组 | 0.48 ± 0.24       | 0.38 ± 0.07       |

由表 1 数据可见, 伏安法结果与同组分光光度法结果基本相符, 且含量普遍增大 1.11 ~ 1.26 倍, 我们认为伏安法避免了光度法测定前复杂的预处理所造成的样品损耗, 测定时所受的干扰因素少, 故灵敏度有所提高, 结果更接近于实际含量.

参 考 文 献

1 Kosugi H, Kato T, Kikugawa K. Formation of yellow,

orange, and red pigments in the reaction of alk-2-enals with 2-thiobarbituric acid. *Anal Biochem*, 1987, **165** (2): 456 ~ 464

2 Lente F V. Free radicals. *Anal Chem*, 1991, **63** (12): 199R~ 200R

3 Bond A M, Deprez P P, Jones R D *et al.* Polarographic method for the determination of propanedial (malonaldehyde). *Anal Chem*, 1980, **52** (13): 2211~ 2213

4 朱果逸, 汪尔康. 新极谱法. *分析化学*, 1981, **9** (4): 486~ 496

5 Laarse A, Hollaar L, Valk L J M. Release of alpha hydroxybutyrate from neonatal rat heart cell cultures exposed to anoxia and reoxygenation: comparison with impairment of structure and function of damaged cardiac cells. *Cardiovas Res*, 1979, **13** (6): 345~ 353

**Determination of Malondialdehyde in Biological Samples by 2.5th Order Differential Voltammetry.** LI Dongfang, CHEN Xiaole, WANG Naixing (*Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China*).

**Abstract** The reduction of malondialdehyde (MDA) on hanging mercury drop electrode was studied by 2.5th order differential voltammetry. The linear response range of current (*e*<sup>''</sup>) against the concentration of MDA was given from 1.0 × 10<sup>-6</sup> to 1.0 × 10<sup>-3</sup> mol/L in the condition of a base solution of 0.1 mol/L NH<sub>4</sub>Cl at scanning rate of 80 mV/s. The detection limit was 1.0 × 10<sup>-7</sup> mol/L. The method provides succesfully a rapid and simple way to determine the concentration of MDA in the sample of cardiac myocytes.

**Key words** malondialdehyde, differential voltammetry, determination, cardiac myocytes

# 用荧光分光光度法测定组织和血液中一氧化氮

王景华 杨世杰<sup>1)</sup> 杨贵贞  
(白求恩医科大学免疫教研室, 长春 130021)

**摘要** 利用NO<sub>2</sub><sup>-</sup>对4-羟基香豆素的荧光增强效应, 建立了生物样本中NO荧光分光光度测定法, 其检

<sup>1)</sup> 白求恩医科大学分子生物中心, 长春 130021. 收稿日期: 1996-06-13, 修回日期: 1997-09-20

测浓度范围为  $2 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-8}$  mol/L, 采用该方法检测了大鼠大脑皮层和海马组织、细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的巨噬细胞培养上清和血清中 NO 含量。

**关键词** 一氧化氮, 荧光分光光度法, 皮层, 海马, 血清

NO 是一种新型的生物信使分子, 调节机体的心血管系统、神经系统和免疫功能。NO 研究为许多疾病的防治提供了新的思路 and 手段, 已成为近年来研究热点, 因此建立高度灵敏而稳定的 NO 检测方法非常重要。目前, 已经相继报道了用于 NO 检测的电极法、化学发光法、ESR 法、分光光度法和荧光分光光度法<sup>[1]</sup>, 本研究室利用  $\text{NO}_2^-$  对 4-羟基香豆素的荧光增强效应, 改进并建立了一种 NO 荧光分光光度测定法, 该方法检测范围广、灵敏度高且简便易行, 适用于检测组织细胞如皮层和海马组织、活化细胞培养上清如 LPS 诱导的巨噬细胞 (macrophage,  $\text{M}_\phi$ ) 培养上清和血清 NO 含量。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

4-羟基香豆素, Sigma 产品; 二甲基甲酰胺、HCl、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、NaOH、 $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{NaNO}_2$  均为国产分析纯。

### 1.2 仪器

日立 F-3000 荧光分光光度计。

### 1.3 方法

**1.3.1 测定原理:** 在酸性条件下 (pH 1.0), 4-羟基香豆素可与  $\text{NO}_2^-$  反应, 在  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  还原作用下, 生成在碱性条件下 (pH 13) 具有荧光的最终反应混合物, 该荧光物质与 3-氨基-4-羟基香豆素具有相同的荧光光谱, 在激发波长 ( $E_x$ ) 340 nm 和发射波长 ( $E_m$ ) 453 nm 时, 该荧光物质有较高的荧光强度, 并且与反应体系中的本底物质即 4-羟基香豆素的荧光强度差值最大<sup>[2,3]</sup> (图 1), 在  $2 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-8}$  mol/L 范围内, 反应终产物的荧光强度与  $\text{NO}_2^-$  浓度成正比, 据此检测生物样本中  $\text{NO}_2^-$  即间接地测得 NO 的含量。

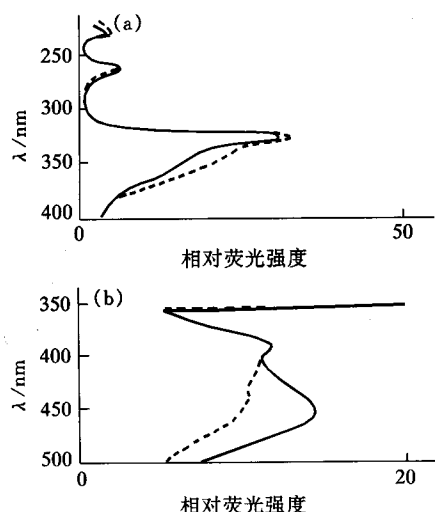


图 1 反应产物与本底的荧光光谱

(a) 激发光谱,  $c(\text{NaNO}_2) = 1 \times 10^{-7}$  mol/L. ----: 最终反应产物, —: 本底 (即 4-羟基香豆素); (b) 发射光谱,  $c(\text{NaNO}_2) = 1 \times 10^{-7}$  mol/L. —: 最终反应产物, ----: 本底空白对照。

**1.3.2 脑组织样本制备:** Wistar 大鼠摘眼球放血后断颈处死, 于冰盘上迅速分离大脑皮层和海马, 分别置于含 1 mmol/L EDTA 的 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 中, 用匀浆器于冰浴中迅速研磨成组织匀浆, 10 000 r/min 4℃ 离心 10 min, 吸取上清。

**1.3.3 LPS 诱导  $\text{M}_\phi$  上清的制备:** 大鼠腹腔内注射 8 ml Hank's 液, 轻轻揉捏, 3 min 后剪开腹壁吸取腹腔灌洗液, 用 Hank's 液洗一次后, 用含 10% NBS 的 IMDM 制成  $1 \times 10^6$ /ml 细胞悬液, 加入 24 孔板 (1 ml/孔) 中, 37℃ 5%  $\text{CO}_2$  培养 2 h,  $\text{M}_\phi$  贴壁后用 Hank's 液洗 3 次, 洗去悬浮细胞, 重新加入含 10% NBS 的 IMDM 和 LPS (10 mg/L), 继续培养 18~24 h, 收集细胞培养上清。

**1.3.4 待测样本预处理:** 采用  $\text{ZnSO}_4$  去蛋白法。待检组织匀浆, 细胞培养上清或血清中加入

ZnSO<sub>4</sub> (终浓度 0.05 mol/L) 和 NaOH (最终浓度 0.07%), 混匀后冰浴 30 min, 10 000 r/min 4℃ 离心 5 min, 分离上清用于 NO 检测。

**1.3.5 NO 检测:** 取 1 ml 待检上清加入 0.5 ml 0.02% 4-羟基香豆素 (溶于二甲基甲酰胺: 2 mol/L HCl = 1:1, 体积比), 混匀后冰浴 5 min, 然后加入 50  $\mu$ l 8% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 室温作用 10 min, 再加入 0.5 ml 1.5 mol/L NaOH, 室温作用 10 min 后, 在  $E_x = 340$  nm,  $E_m = 453$  nm 条件下, 用荧光分光光度计检测相对荧光强度 (RFI), 用 NaNO<sub>2</sub> 做标准品作标准曲线, 结果以每 mg 蛋白质中 NO 的摩尔数或 NO 的摩尔浓度表示。

**1.3.6 蛋白定量:** 大脑皮层和海马组织匀浆上清中蛋白质含量, 按 Bradford 方法测定, 用 BSA 做参照标准。

## 2 结果和讨论

### 2.1 标准曲线及灵敏度

在  $2 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-8}$  mol/L 范围, NaNO<sub>2</sub> 浓度与最终生成混合物的荧光强度呈正相关, 检测下限浓度  $2 \times 10^{-8}$  mol/L, 有研究报道目前 NO 检测最灵敏的化学发光法的检测下限浓度为  $1 \times 10^{-9}$  mol/L<sup>[5]</sup>, 可见本方法有较高的灵敏度。图 2 和图 3 分别为  $2 \times 10^{-7} \sim 10 \times 10^{-7}$  mol/L 和  $2 \times 10^{-7} \sim 10 \times 10^{-8}$  mol/L 范围内的标准曲线。

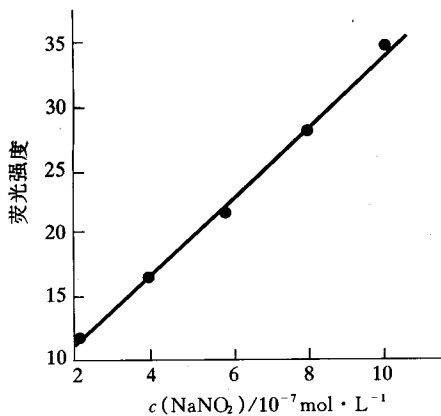


图 2 标准曲线

$$r = 0.9975, Y = 5.172 + 2.809 \times 10^7 X.$$

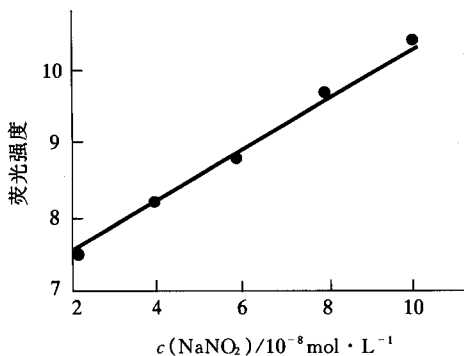


图 3 标准曲线

$$r = 0.9874, Y = 6.139 + 0.410 \times 10^8 X.$$

### 2.2 4-羟基香豆素的最适浓度

如图 4 所示, 4-羟基香豆素浓度为 0.06% 时, 相对荧光强度最高, 因为本底空白对照管的荧光强度随 4-羟基香豆素浓度提高而升高, 为降低本底提高检测灵敏度, 本方法选用 0.02%。

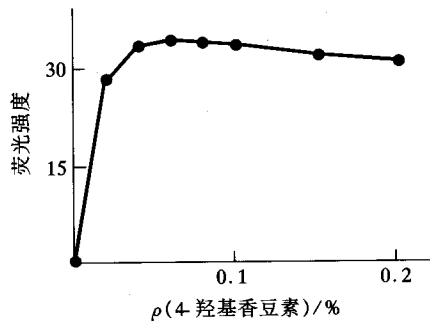


图 4 4-羟基香豆素浓度与反应终浓度产物  
荧光强度相关性分析

$$c(\text{NaNO}_2) = 1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}.$$

### 2.3 反应时间

4-羟基香豆素与亚硝酸盐在室温反应 5 min 生成终产物的荧光强度最强, 随着反应时间延长, 荧光强度反而减弱, 该反应在 0℃ 条件下进行较稳定, 因此, 本方法选用冰浴作用 5 min. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的还原反应在室温作用 10 min, 最终生成物的相对荧光强度达到峰值, 随后逐渐下降, 故本方法还原反应条件为室温作用 10 min。

### 2.4 大鼠大脑皮层和海马中 NO 含量测定

我们利用本检测方法测定了隔-海马伞横切大鼠 (P: 1.8 LR: 1.0 H: 5.0 横切距 4.0) 皮层和海马中 NO 含量, 结果表明: 隔-海马传导通路切断的学习记忆功能障碍大鼠, 海马中 NO 水平与伪手术和正常对照大鼠相比明显降低 ( $P < 0.01$ ), 皮层中 NO 水平未见显著改变 ( $P > 0.05$ ) (表 1).

表 1 大鼠大脑皮层和海马中 NO 含量

|         | <i>n</i> | <i>c</i> (NO) / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ |               |
|---------|----------|---------------------------------------------------|---------------|
|         |          | 皮层                                                | 海马            |
| 隔-海马损伤组 | 6        | 12.53+ 6.00                                       | 53.01+ 11.02  |
| 伪手术组    | 6        | 16.65+ 7.63                                       | 115.96+ 28.52 |
| 正常对照组   | 6        | 17.45+ 5.40                                       | 112.81+ 22.74 |

注:  $\bar{x} \pm s$ .

### 2.5 LPS 活化 M $\phi$ 培养上清和血清中 NO 含量

我们检测了正常 Wistar 大鼠 LPS 诱导 M $\phi$  培养上清和血清中 NO 水平, 结果表明培养上清中 NO 含量 ( $\bar{x} \pm s$ ) 为 ( $1.408 \times 10^{-4} \pm 0.058 \times 10^{-4}$ ) mol/L ( $n = 6$ ), 血清中 NO 含量为 ( $8.20 \pm 0.26 \times 10^{-6}$ ) mol/L ( $n = 6$ ).

### 参 考 文 献

1 菊地和也. NO の測定に关する. 现代医疗, 1995, 27 (3): 147~ 151  
2 Ohta T, Arai Y, Takitani S. Fluorometric determination of

nitrite. Anal Chem, 1986, 58: 3132~ 3135  
3 Kder A, Frazzini V I, Solomon R A *et al.* Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rat. Stroke, 1993, 24: 1709~ 1716  
4 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteir-dye binding. Anal Biochem, 1972, 72: 248~ 254  
5 Termin A, Hoffman M, Bihng R J. A simplifild method for the determination of nitric oxide in biological solutions. Life Science, 1992, 51 (20): 621

**Determination of Nitric Oxide Level of Tissue and Serum by Fluorospectrophotometry.**  
WANG Jinghua, YANG Shijie, YANG Guizhen  
(*Department of Immunology, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021, China*).

**Abstract** According to the principle that NO $_2^-$  is able to enhance the fluorescence intensity of 4-hydroxycoumarin, a spectrofluorometric method for determination of nitric oxide in biological sample was developed. The nitrite concentration in the range of  $2 \times 10^{-5}$  mol/L to  $2 \times 10^{-8}$  mol/L in the sample can be measured. The method has been applied to determine the level of NO in cortex and hippcampus, cultural supernatant of macrophage activated by LPS and serum in rat.

**Key words** nitric oxide, fluoro-sepectrophotometry, cortex, hippcampus, serum

## 抗人 IL-6 单克隆抗体的制备及鉴定

蒋盘宏 莫 畏 窦良军 赵晓萌 袁廷君 宋金华  
(北京市生化试剂高技术实验室, 北京 100022)

**摘要** 用基因重组人 IL-6 免疫 Balb/c 小鼠, 采用小鼠杂交瘤技术, 筛选克隆到分泌抗人重组 IL-6 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 并对其中 2H $_2$ 、1D $_2$  和 4B $_4$  瘤细胞株进行了鉴定. 其抗体类别均为 IgG,