

一种适用于柱层析监测的己糖醛酸测定法

田梦玉 张振强

(西安医科大学)

提 要

本文报道了一种改良的应用咪唑硫酸反应测定己糖醛酸方法。与 Bitter 和 Muir 法对比,本法操作简易,所需样品和试剂量少,而显色度高,适用于无自动分析设备条件下的柱层析监测和多份样品的测定。对应用本法测定己糖醛酸的最佳条件及干扰因素进行了探讨。

在研究结缔组织糖胺聚糖和蛋白聚糖的过程中,经常应用己糖醛酸的测定来作为定量和监测的手段。多年来,人们都习惯于采用 Bitter 和 Muir 方法^[1]。但此法所需样品量多,试剂消耗量大,且需经过两次在沸水浴中加热和随后的冷却步骤,在样品份数多或做柱层析监测时颇感不便。近年来,随着蛋白聚糖柱层析分析的发展,一些学者曾建立了己糖醛酸测定的自动分析法和连续流动监测法^[2-4],但均需要自动分析设备。我们参照 Heinegård 自动分析法^[2],建立了一种简易己糖醛酸测定法,此法不仅简化了操作步骤,减少了样品和试剂用量,而且其显色度和准确度也较高,一次可测上百个样品,很适合于在无自动分析设备条件下的柱层析监测和多份样品的测定。

材 料 和 方 法

材料: D-葡萄糖醛酸(瑞士 Fluka AG. Buchs SG 产品),咪唑(B. D.H. 实验室试剂),硫酸软骨素(成都第三制药厂产品)。其它试剂均为 A. R. 级。

方法:

咪唑硫酸试剂:称 50mg 咪唑,溶于 100ml 含 0.025M 四硼酸钠的浓硫酸中,临用时配制,避光保存。

测定应用 10ml 带塞比色管。样品管及标准管(含 1—20 μ g 己糖醛酸)用水稀释至 200 μ l,空白管加水 200 μ l,然后各加上述咪唑硫酸试剂 1.5ml,混匀,加塞,置 100 $^{\circ}$ C 烘箱中保温 40—45 分钟。取出后冷却至室温,以空白管调零点,在 530nm 波长下测定吸光度。

结 果 及 讨 论

一、线性关系及测定范围 应用本法所做的标准曲线见图 1。己糖醛酸在 24 μ g 以下其浓度与吸光度呈直线关系;超过 24 μ g 则显色度降低。故应用本法测定,样品的己糖醛酸含量宜控制在 1—20 μ g 之间。

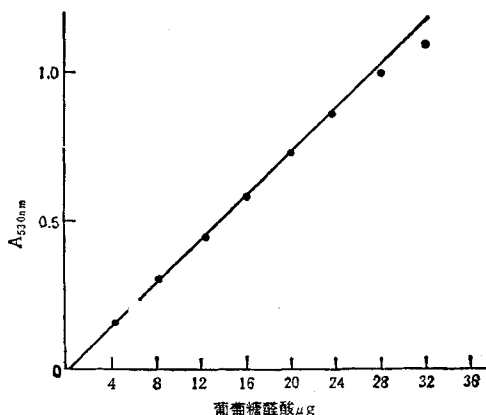


图 1 己糖醛酸测定标准曲线

二、加热时间的影响 一般测定己糖醛酸的方法加热时间多为 15 分钟。我们在建立本法时,发现在 100℃ 加热 15 分钟,仅达到最高显色度的 30%,随着加热时间的延长,显色逐渐加深,至 40 分钟达到最高点,以后则趋于稳定(图 2)。因此,本法采用的加热时间为 40—45 分钟。

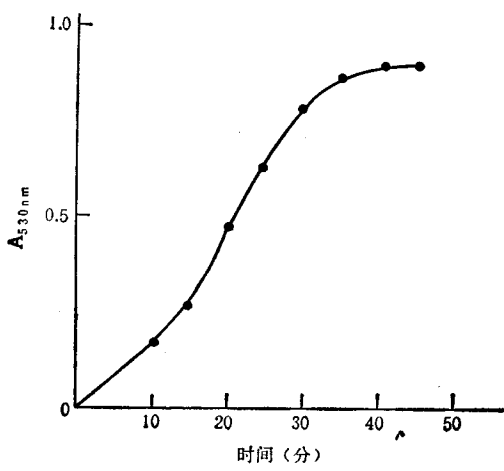


图 2 加热时间对显色度的影响

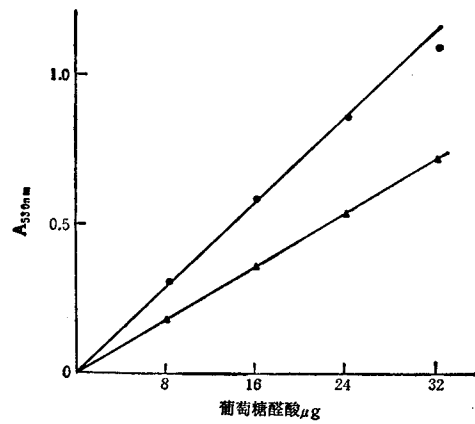


图 3 两种己糖醛酸测定法显色度比较
● 本文方法 ▲ Bitter 和 Muir 法

三、显色灵敏度及稳定性 应用同样体积的标准样品和试剂,将本法与 Bitter 和 Muir 法进行对比,发现前者的呈色强度比后者大 1.5—1.6 倍(图 3)。说明本法的灵敏度较 Bitter 和 Muir 法为高。此外,显色后如置于暗处,则能稳定 24 小时以上。

四、回收率与精密度 用硫酸软骨素溶液

加一定量的己糖醛酸,测得本法的回收率为 97%,而 Bitter 和 Muir 法为 92%。同一硫酸软骨素样品,用本法五次重复测定,其差异系数(C. V.)为 2.6%。说明本法的准确度和精密密度均较高。

五、其它物质的干扰作用 在应用离子交换柱层析分离糖胺聚糖和蛋白聚糖时,往往应用不同浓度的氯化钠进行分步或梯度洗脱。在应用凝胶层析分析这些大分子时,有时应用高浓度的盐酸胍或尿素进行洗脱。为了提高柱层析的回收率,有时还在上述洗脱剂中加入少量去污剂,例如 Triton x-100 等。为此我们观察了这些试剂对本法的干扰作用,结果见表 1 及表 2。

表 1 显示不同浓度的 NaCl 可使本法显色度略有增高。NaCl 浓度在低于 1M 时,显色度较以水为溶剂者增高 3—6%;超过 1M 时,显色度增高 8%。这种轻度的增高,对柱层析监测影响不大,故可不必事先进行透析除盐,而直接用本法进行测定。

表 1 不同浓度的 NaCl 对己糖醛酸显色度的影响

溶 剂*	A530nm	显色度(%)
H ₂ O	0.120	100
0.1M NaCl	0.124	103
0.5M NaCl	0.127	106
0.9M NaCl	0.125	104
1.25M NaCl	0.130	108
1.5 M NaCl	0.130	108

* 12μg 硫酸软骨素各溶于不同溶剂 200μl 中,用本法测定己糖醛酸

表 2 盐酸胍、尿素及 Triton X-100 对己糖醛酸显色度的影响

溶 剂*	颜色	A530nm	显色度(%)
H ₂ O	粉红	0.340	100
0.5M 盐酸胍	粉红	0.240	70
4M 盐酸胍	粉红	0.160	47
7M 尿素	粉红	0.265	78
7M 尿素(内含 0.05M Tris-HCl)	粉红	0.265	78
1% Triton X-100	棕黄	—	—

* 8μg 葡萄糖醛酸各溶于不同溶剂 200μl 中,用本法进行测定

鸟氨酸脱羧酶活性微量测定法

范慕贞 曹淑兰 马宇玲

(中日友好医院临床医学研究所生化室, 北京)

提 要

本文采用一种简单,微量反应系统,根据 ^{14}C -鸟氨酸释放的 $^{14}\text{CO}_2$ 量测定鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 的活性,酶反应在置于液闪计数瓶内的玻璃小管中进行,释放的 $^{14}\text{CO}_2$ 被瓶内滤纸片上的海胺吸收。实验结果表明,加酸释放 $^{14}\text{CO}_2$ 后 30 分钟 $^{14}\text{CO}_2$ 吸收已达最大值,且吸收量与释放量成正比,酶反应测定证明 $^{14}\text{CO}_2$ 释放速度在 40 分钟内保持恒定。ODC 活性与酶浓度呈线性关系,此方法不仅用于 ODC 活性测定,而且亦可用于其他脱羧酶活性的测定。

鸟氨酸脱羧酶 (ODC, EC4, 1,1, 17) 是多胺生物合成的限速酶,多胺是生物界普遍存在的一类多阳离子脂肪胺^[1],它在生物大分子的合成^[2,3]及细胞生长调节中^[4]起重要作用,多胺的生物合成及其相关的酶活性在快速生长的细胞和再生组织及恶性增生的细胞中都有明显的增加^[5],促癌物的研究表明,促癌作用与 ODC 的诱导有关^[5,6],并认为 ODC 的诱导是促癌物引起细胞改变的最早事件^[7],因而 ODC 活性测定可作为鉴定促癌物,筛选抗癌药及研究促癌机理的有用指标,而且这种快速易行的方法比起用长期致癌或阻断癌变的实验来鉴定促癌物或筛选抗癌药要方便得多,本文改进了原有测定方法^[8]用简便的装置和微量反应体系可进行 ODC 或其他脱羧酶活性的测定。

从表 2 可以看出,盐酸胍、尿素均可使本法的显色度降低。7M 尿素可使显色度降低 22%; 0.5M 盐酸胍可使显色度降低 30%,而 4M 盐酸胍可使显色度降低 53%。值得注意的是 Triton x-100 可以严重干扰本法的显色。因此,在柱层析洗脱液中如含有这类去污剂时,必须设法予以去除后,才能用本法进行监测。

材 料 与 方 法

1. 培养细胞 人早幼粒白血病细胞 HL₆₀, 在含 20% 小牛血清的 1640 培养基中于 37℃, 5% CO₂ 培养箱内培养,换新鲜培养基后第二天用于酶活性测定。

2. 酶液制备 培养细胞经离心收集,用 PBS 溶液洗三次, 1×10^6 细胞最后悬浮在 400 微升溶细胞的缓冲液 (EDTA, 10mM; 磷酸吡哆醛, 40mM; 二硫苏糖醇, 2mM; 氟化钠, 5mM; PMSF, 0.5mM; 甘油, 10%; 磷酸缓冲液, pH7.2, 50mM) 中,置液氮反复冻化三次,显微镜下证明细胞已完全破碎,超速离心 (40000rpm, 60 分钟, 4℃) 后的上清液作为酶液 (作为 100% 酶浓度)。

参 考 文 献

- [1] Bitter, T. et al.: *Anal. Biochem.*, 4, 330, 1962.
- [2] Heinegård, D.: *Chemica Scripta*, 4, 199, 1973.
- [3] Ford, J. D. et al.: *Anal. Biochem.*, 84, 539, 1978.
- [4] Jeansonne, N. et al.: *J. Chromatogr.*, 354, 524, 1986.

[本文于 1987 年 3 月 9 日收到]