

- J Pharmacol Exp Ther, 1985, **232** (3): 708~ 716
- 2 Palmer R M, Ferrige A G, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, **327** (6122): 524~ 526
 - 3 Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, *et al.* Real time measurement of nitric oxide produced *ex vivo* by luminol-H₂O₂ chemiluminescence method. *J Biol Chem*, 1993, **268** (31): 23106~ 23110
 - 4 Everett S A, Dennis M F, Tozer G M, *et al.* Nitric oxide in biological fluids: analysis of nitrite and nitrate by high-performance ion chromatography. *J Chromatogr A*, 1995, **706** (1~ 2): 437~ 442
 - 5 Larfars G, Gyllenhammar H. Measurement of methemoglobin formation from oxyhemoglobin. A real-time, continuous assay of nitric oxide release by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol Methods*, 1995, **184** (1): 53~ 62
 - 6 Misko T P, Schilling R J, Salvemini D, *et al.* A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem*, 1993, **214** (1): 11~ 16
 - 7 Miles A M, Chen Y, Owens M W, *et al.* Fluorometric determination of nitric oxide. *Companions to Methods in Enzymology*, 1995, **7**: 40~ 47
 - 8 Fiscus R R. Molecular mechanisms of endothelium-mediated vasodilation. *Semin Thromb Hemost*, 1988, **14** (Suppl): 12~ 22
 - 9 Kontos H A. Nitric oxide and nitrosothiols in cerebrovascular and neuronal regulation. *Stroke*, 1993, **24** (12 Suppl): 1155~ 1158
 - 10 Sung Y J, Hotchkiss J H, Austic R E, *et al.* Direct measurement of nitric oxide in headspace gas produced by a chicken macrophage cell line in a closed culture system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **184** (1): 36~ 42
 - 11 Leone A M, Francis P L, Rhodes P. A rapid and simple method for the measurement of nitrite and nitrate in plasma by high performance capillary electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **200** (2): 951~ 957
 - 12 Stamler J S, Jaraki O, Osborne J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (16): 7674~ 7677
 - 13 Robak J, Gryglewski R J. *In vitro* generation and decomposition

of S-nitrosothiols from direct and indirect nitric oxide donors. *Pol J Pharmacol*, 1995, **47** (1): 63~ 67

Direct Measurement of Nitric Oxide by Fluorometric Method. TIAN Ya Ping, SHEN Wen Mei (Department of Clinical Biochemistry, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China); W. H. BETTS (Rheumatology Unit, The Queen Elizabeth Hospital, Woodville, South Australia 5011, Australia).

Abstract Based on the reaction that 2, 3-diaminonaphthalene (DAN) has the ability trapping [•]NO to yield the highly fluorescent 2, 3-naphthotriazole, a new fluorometric method has been reported, which combines the nitrogen gas purging system and fluorescent analysis together. The results indicated that the fluorescence intensity of the measuring solution is [•]NO concentration and acidified nitrite concentration dependent. Five acidified samples of normal human plasma have been determined and the released [•]NO is about (31.04 ± 4.70) nmol/L. Since this method separates the sample from the measuring solution, it can avoid the interference from the sample to the fluorescence analysis so that it can be used to measure biological sample and continuously observe the [•]NO releasing.

Key words nitric oxide, fluorescence, 2, 3-diaminonaphthalene, gas purging

化学裂解法检测 α nd HPFH 突变*

刘建伟¹⁾ 徐湘民

(第一军医大学分子生物学研究所, 广州 510515)

摘要 为进行中国人遗传性持续性胎儿血红蛋白增多症 (HPFH) 的分子病理学研究, 以四种已知非缺失型 HPFH 突变样品为研究材料, 建立了针对二种 γ -珠蛋白基因 (G_{γ} 和 A_{γ}) 的点突变筛查技术——化学裂解法 (CCM). 为分析 α nd HPFH 点突变提供了简单可靠的分子诊断方法.

关键词 化学裂解法, 点突变检测, γ -珠蛋白基因, 遗传性持续性胎儿血红蛋白增多症

学科分类号 Q319.3

* 国家自然科学基金 (39670333) 和华南生物科学与技术研究中心研究基金 (华生 01 号) 资助项目.

¹⁾ 广州军区后勤部军事医学研究所, 广州 510507. 收稿日期: 1998-02-10, 修回日期: 1998-06-17

遗传性持续性胎儿血红蛋白增多症 (hereditary persistence of fetal hemoglobin, HPFH) 是一类较常见的遗传性血液病^[1,2]。目前全世界已报道的 HPFH 突变已达数十种^[3~5]。其分子基础是 β 珠蛋白基因簇内某些 DNA 片段的缺失 (称缺失型 HPFH) 或者点突变 (称非缺失型 HPFH, 简为 nd HPFH)。中国人 HPFH 的分子基础尚无系统研究资料。阐明中国人 HPFH 的分子基础及其突变分布特征, 是开展该病的遗传咨询及进行基因诊断 (包括产前诊断) 的基础。由于 HPFH 突变异质性较大, 建立有效的基因筛查方法是进行该病分子基础研究的必要步骤。化学裂解法 (chemical cleavage of mismatch, CCM) 是检测点突变的有力工具, 国内尚未见有人采用。本研究以 4 种已知突变样品为研究材料, 建立了检测 nd HPFH 突变的 CCM 方法, 并对其进行了评价, 为更深入的研究打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 nd HPFH 已知突变样品: $G_{\gamma}-114C \rightarrow T$ (pUC 13 克隆): Fukumaki 博士 (Institute of Genetic Information, Kyushu University) 惠赠; $G_{\gamma}-175 T \rightarrow C$: Camaschella 博士 (Dipartimento di Scienze Biomedicine e Oncologia Umana) 和 Thein 博士 (Institute of molecular medicine, John

Radcliffe Hospital) 惠赠; $A_{\gamma}-117 G \rightarrow A$: Camaschella 博士惠赠; $A_{\gamma}-198 T \rightarrow C$: Camaschella 博士和 Thein 博士惠赠。

1.1.2 CCM 主要试剂: 盐酸羟胺 (HA) 和四氧化锇 (OT) 为 Aldrich Chemical Company, Inc. 产品; 哌啶为广州化学试剂公司产品; 酵母 tRNA 为华美生物技术公司产品; $\alpha^{32}P$ -dATP 购自北京亚辉生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增制备用于 CCM 检测 DNA 片段:

a. 引物序列及位置 (表 1): G_{γ} 和 A_{γ} 珠蛋白基因序列之间有极高的同源性^[6], 扩增 G_{γ} 和 A_{γ} 的特异性引物分别为正向的 GR 和 AR, 二者的下游反向引物均为 GA。为便于 CCM 检测, 采用巢式 PCR (Lp1/Lp2) 扩增。内引物序列中小写字母为添加的人工接头, Lp1 添加的人工接头是 *Hind* III, Lp2 添加的人工接头为 *Eco*R I (表 1 中下划线部分), 该接头用作 PCR 片段的进一步末端标记。

b. PCR 反应条件: 反应总体积 50 μ l, 内含引物 GR/GA 或 AR/GA 或 Lp1/Lp2 各 0.25 μ mol/L, dNTP 200 μ mol/L, $MgCl_2$ 1.25 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 2U。外引物扩增参数为: 94 $^{\circ}C$ 变性 1 min, 58 $^{\circ}C$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1.5 min, 30 个循环; 内引物扩增参数为: 94 $^{\circ}C$ 变性 50 s, 56 $^{\circ}C$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 60 s, 30 个循环。最后一个循环均为 72 $^{\circ}C$ 延伸 5 min。

表 1 G_{γ} 和 A_{γ} 珠蛋白基因 5' 及 3' 端 PCR 引物

引物	区域	位置	序列 (5' $\rightarrow$ 3')	DNA 片段
GR	G_{γ} 基因启动子区	- 1227~ - 1204	GACGTCATAATCTACCAAGGTCATG	1 280 bp
AR	A_{γ} 基因启动子区	- 1279~ - 1256	AGCTTAGGGGATAAACTAATTTGA	1 332 bp
GA	G_{γ}/A_{γ} 基因启动子区	+ 39~ + 52	GGCGTCTGGACTAGGAGCTTATTG	—
Lp1	G_{γ}/A_{γ} 基因启动子区	- 397~ - 371	tttaag <u>CTTT</u> AAACTACAGGCCTCACTGGAGC	415 bp
Lp2	G_{γ}/A_{γ} 基因启动子区	- 20~ + 3	tttgaattcTGTGTGGAAGCTGCTGAAGGGTGC	—

1.2.2 CCM/放射自显影检测: 根据文献 [7~ 9] 略加修改。

a. PCR 产物的同位素标记: 将用 *Hind* III 和 *Eco*R I 联合酶切的纯化 PCR 产物 1~ 2 μ g, 加 $\alpha^{32}P$ -dATP 1.5 μ l, Klenow 酶 2U, 室温 20 min 补平标记。乙醇沉淀。Tris $\cdot$ HCl (pH 8.0) 10 μ l 溶解。测放射强度。

b. 异源双链形成: 将 $\alpha^{32}P$ 标记的 PCR 产物

0.5 μ l (大于 6 000 计数/min), 与含突变位点的 PCR 产物 2~ 3 μ l 混合。100 $^{\circ}C$ 变性 5 min, 42 $^{\circ}C$ 退火 2 h。

c. HA 或 OT 处理: 取上述重溶的异源双链, 加 4 mol/L HA (HA 与错配的 C 反应) 20 μ l, 37 $^{\circ}C$ 2 h。或加 4% OT (OT 与错配的 T 反应) 16 μ l, 37 $^{\circ}C$ 20 min, 加终止液 (每 100 ml 含 3 mol/L NaAc 10 ml, 0.5 mol/L EDTA 20 μ l, 酵母 tRNA

2.5 mg) 200 μ l, 乙醇沉淀. 再加 1 mol/L 哌啶 (哌啶从被 HA 修饰的 C 或 OT 修饰的 T 处裂解 DNA 骨架) 50~ 100 μ l 溶解, 90 $^{\circ}$ C 30 min, 乙醇沉淀. 加 6 μ l 超纯水溶解, 2 μ l 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 上样至 8% 的变性 PAG, 600 V 电泳约 1 h, 干胶后自显影 24~ 48 h 冲片.

1.2.3 CCM/银染检测: 非标记的异源双链经 CCM 裂解后, 产物则进行银染检测. 银染方法根据文献 [10] 略加修改.

2 结 果

2.1 PCR 产物的酶切分析

PCR 扩增的基因片段采用限制性内切酶 (*Dde* I, *Hinf* I, *Hpa* II 和 *Sty* I) 分别酶切, 证明为特异性 G_Y 和 A_Y 珠蛋白基因中的目的片段 (结果未显示). 其中 415 bp 的巢式产物用于 CCM 分析.

2.2 CCM 法检测阳性样品的结果

CCM 方法于 1988 年首先由 Cotton 等^[7]报道. 其基本原理是 HA 和 OT 可分别识别和修饰异源双链中错配的 C 和 T, 哌啶从修饰部位裂解核酸骨架, 电泳后根据裂解带的有无及大小即可判断突变的有无及位置.

2.2.1 CCM/放射自显影检测结果: 标记的 WT (野生型) PCR 产物与上述 4 种样品形成异源双链. 经 HA/哌啶裂解后, G_Y -114C $\rightarrow$ T, A_Y -117G $\rightarrow$ A 2 种样品分别产生约 122 nt 和 282 nt 的可见片段, G_Y -175T $\rightarrow$ C, A_Y -198T $\rightarrow$ C 2 种样品未见裂解片段; 经 OT/哌啶裂解后, G_Y -175T $\rightarrow$ C 产生约 183 nt 的可见片段, A_Y -198T $\rightarrow$ C, G_Y -114C $\rightarrow$ T, A_Y -117G $\rightarrow$ A 3 种样品未见裂解片段. 对 MT (突变型) PCR 产物进行标记, 经 HA/哌啶裂解后 G_Y -175T $\rightarrow$ C, A_Y -198T $\rightarrow$ C, A_Y -117G $\rightarrow$ A 3 种样品分别产生约 183 nt, 206 nt 和 125 nt 的可见片段; 经 OT/哌啶裂解后, 未见有裂解条带出现 (结果未显示. 以上片段均经酶切后补平, 掺入 32 P 标记).

根据上述结果, 将标记的 G_Y -WT 和 A_Y -WT PCR 产物分别与 G_Y -114C $\rightarrow$ T 和 A_Y -117G $\rightarrow$ A 样品 PCR 产物形成异源双链; 标记的 G_Y -175T $\rightarrow$ C 和 A_Y -198T $\rightarrow$ C 样品 PCR 产物分别与 G_Y -WT 和 A_Y -WT PCR 产物形成异源双链, 使错配的 C 均位于标记链中. 这时只用 HA 检测, 4 种样品的突变可全部检出 (图 1).

2.2.2 CCM/银染检测阳性样品的结果: 银染的敏感性较同位素标记有明显的降低. 但通过增加被检测样品 DNA 量仍可获得预期结果. 银染时裂解的 2 个片段均可显现, 相当于用同位素同时标记野生型和突变型 PCR 产物的效果, 故只采用 HA 一次即可完成所有突变的检出. 图 2 中可见清楚的特异性裂解条带 (图 2 中片段包含完整的人工接头部分).

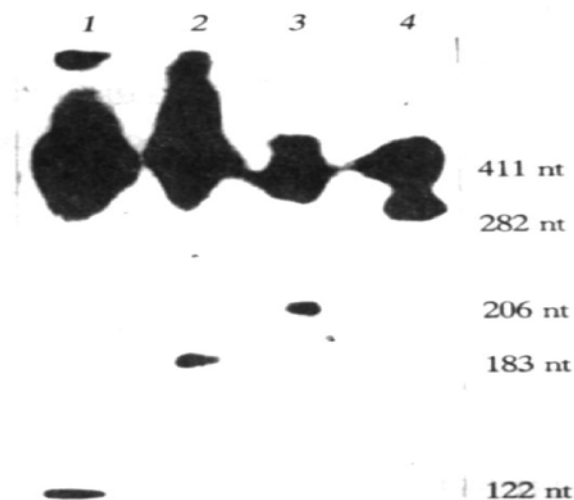


图 1 CCM/放射自显影检测

HA/哌啶裂解. 1: G_Y -114C $\rightarrow$ T/ G_Y -WT (标记); 2: G_Y -175T $\rightarrow$ C (标记) / G_Y -WT; 3: A_Y -117G $\rightarrow$ A/ A_Y -WT (标记); 4: A_Y -198T $\rightarrow$ C (标记) / A_Y -WT.

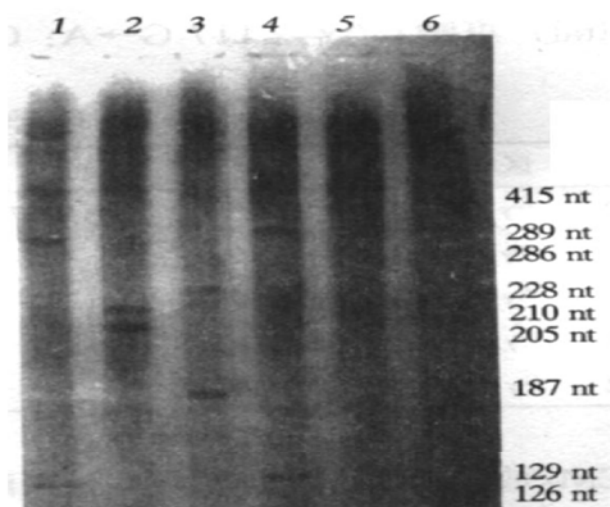


图 2 CCM/银染法检测

HA/哌啶裂解. 1: A_Y -117G $\rightarrow$ A/ A_Y -WT; 2: A_Y -198T $\rightarrow$ C/ A_Y -WT; 3: G_Y -175T $\rightarrow$ C/ G_Y -WT; 4: G_Y -114C $\rightarrow$ T/ G_Y -WT; 5: A_Y -WT; 6: G_Y -WT.

3 讨 论

错配类型是影响 CCM 检出率的重要因素之

一. 本文中四种标准样品的 PCR 产物 (MT) 与相应野生型 PCR 产物 (WT) 形成的异源双链中的错配类型 (WT/MT) 分别为: $G_{\gamma}-114 C/A$ 及 G/T , $G_{\gamma}-175 T/G$ 及 A/C , $A_{\gamma}-117 G/T$ 及 C/A , $A_{\gamma}-198 T/G$ 及 A/C . 用同位素对 WT 进行标记, HA 可以检出 $G_{\gamma}-114 C \rightarrow T$, $A_{\gamma}-117 G \rightarrow A$ 2 种突变, OT 则只检测到 $G_{\gamma}-175 T \rightarrow C$ 1 种突变. 用同位素对 MT 进行标记, HA 可以检出 $G_{\gamma}-175 T \rightarrow C$, $A_{\gamma}-198 T \rightarrow C$ 和 $A_{\gamma}-117 G \rightarrow A$ 3 种突变. 而这时 OT 不能检测到样品中的突变. 这样通过用 MT 和 WT 二种标记, HA 检出了所有 4 个 C 错配和 1 个非 C 错配, OT 只检出 4 个当中的 1 个 T 错配, 说明 HA 有很好的检测 C 错配的能力, 而 OT 对 T 错配的检出率低. 这与突变样品与野生样品间的 T 错配均为 T/G 或 G/T 类型有关^[11]. 对 $A_{\gamma}-117 G \rightarrow A$ 样品来说, 错配的 C 不在标记 MT 链中时, HA 也能检出, 说明 HA 除可以修饰错配的 C 之外, 还可以修饰 T/G 或 G/T (MT/WT) 错配附近配对的 C, 与文献报道的 HA 和 OT 可以互相识别的结果一致^[12]. 上面的结果还可以看出, 单独用标记 WT 或 MT DNA 的检测体系不能检出全部的突变; 而同时采用上述体系 (两次检测) 则可以达到检出 100% 突变的目的, 这时还可以只使用 HA, 不再使用 OT^[12, 13], 简化了操作. 改用银染显色时, 敏感性有较明显的降低, 但通过增加被检测样品的量仍可获得预期结果, 且重复性好. 由于银染可以同时看到裂解产生的两个片段, 不存在错配的 T 或 C 是否位于标记链中的问题, 相当于用同位素同时标记野生型和突变型 PCR 产物的效果, 故我们采用 HA 一次检测, 即完成了所有突变的检出.

CCM 不但可以检出突变的有无, 而且可以判断突变的位置和性质, 检出率高, 可以在一定程度上替代直接测序. 已报道一次分析最大的检测范围可达 1.7 kb^[14]. 从分子筛查兼有突变位点定位及分析范围宽这方面看, CCM 优于变性梯度凝胶电泳 (denaturing gel gradient electrophoresis, DGGE)、单链构象多态性 (single strand confirmation polymorphism, SSCP) 等分析点突变的分子筛查方法. CCM 已在多种基因突变的检测中得到应用, 但尚未见将 CCM 用于 γ 珠蛋白基因点突变分析的报道. 本文建立的方法已初步用于对未知突变的临床样品筛查. 我们认为 CCM 法适合用于突变异质性大的 nd HPFH 突变检测, 并可作为该基因分子筛查的一线方法.

参 考 文 献

- 1 McDonagh K T, Nienhuis A W. The thalassemia. In: Nathan D G, Oski F A, eds. Hematology of infancy and childhood. 4th 2, W B Saunders Company. Harcourt Brace Jovanovich, Inc, 1993. 783~ 853
- 2 周朗, 李学曾, 张捷生. 小儿临床血液病. 天津: 天津科学技术出版社 (Zhuo L, Li X Z, Zhang J S. Clinical Hemopathology of Infancy and Childhood. Tianjin: Tianjin Academic and Technology Press), 1983. 172~ 182
- 3 Bollekens J A, Forget B G. β Thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin. Hematol / Oncol Clin North America, 1991, 5 (3): 399~ 422
- 4 Motum P I, Deng Z M, Huang L, et al. The Australian type of non-deletional G_{γ} -HPFH has a C $\rightarrow$ T substitution at nucleotide 114 of the G_{γ} gene. Br J Haematol, 1994, 86 (1): 219~ 221
- 5 Pissard S, M'rad A, Beuzard Y, et al. A new type of hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH): HPFH Tunisia beta+ (+ G-200) G gamma. Br J Haematol, 1997, 95 (1): 67~ 72
- 6 Shen S H, Slightom J L, Smithies O. A history of the human fetal globin gene duplication. Cell, 1981, 26 (2pt2): 191~ 203
- 7 Cotton R G H, Rodrigues N R, Campbell R D. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85 (12): 4397~ 4401
- 8 Montandon A J, Green P M, Gianelli F, et al. direct detection of point mutations by mismatch analysis: application to haemophilia B. Nucl Acid Res, 1989, 17 (9): 3347~ 3358
- 9 Smooker P M, Cotton R G H. The use of chemical reagents in the detection of DNA mutations. Mut Res, 1993, 288 (1): 65~ 77
- 10 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社 (Lu S D. Experimental Technology for Modern Molecular Biology. Beijing: Advanced Education Press), 1993. 486~ 487
- 11 Forrest S M, Dahl H H, Howells D W, et al. Mutation detection in phenylketonuria by using chemical cleavage of mismatch: importance of using probes from both normal and patient samples. Am J Hum Genet, 1991, 49 (1): 175~ 183
- 12 Cotton R G H, Campbell R D. Chemical reactivity of matched cytosine and thymine bases near mismatched and unmatched bases in a heteroduplex between DNA strands with multiple difference. Nucleic Acids Res, 1989, 17 (11): 4223~ 4233
- 13 Han M, Sternberg P W. *let-60*, a gene that specifies cell fates during *C. elegans* vulval induction encodes a ras protein. Cell, 1990, 63 (5): 921~ 931
- 14 Naylor J A, Green P M, Montandon A, et al. Detection of three novel mutations on two hemophilia A patients by rapid screening of the whole essential region of factor VIII gene. Lancet, 1991, 337 (8742): 635~ 639

Detection of nd HPFH Mutations by Using Chemical Cleavage of Mismatch Technique. LIU Jian-Wei, XU Xiang-Min (Institute of Molecular Biology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China).

Abstract In order to study the molecular pathology of hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) in Chinese, PCR-based chemical cleavage of mismatch (CCM) method was used for defining the point mutations causing non-deletional HPFH. 415 bp G_{γ} -

and γ -globin gene promoter regions of 4 previously identified mutants were amplified by nested PCR, then the mutations were detected by CCM, and the optimal condition was determined. It was proved that CCM is a simple and reliable molecular diagnostic

method for the detection of γ -globin gene point mutations.

Key words chemical cleavage of mismatch, point mutation detection, γ -globin gene, hereditary persistence of fetal hemoglobin

细胞氧化损伤时 8-羟基鸟嘌呤的测定*

张海涛 祝其锋

(广东医学院医用生化研究所, 湛江 524023)

莫丽儿 庄海旗

(广东医学院化学教研室, 湛江 524023)

蔡 春

(广东医学院中心实验室, 湛江 524023)

摘要 利用 H_2O_2 易通过细胞膜而到达核这一特点, 初步探讨了不同浓度 H_2O_2 对 HL-60 细胞 DNA 的氧化损伤程度. 发现 H_2O_2 浓度在 0.4 mmol/L 以上时, 作用 8~24 h 可以用气相色谱/火焰离子检测器 (GC/FID) 检测到氧化损伤标志产物——8-羟基鸟嘌呤 (8-oh-G), 并观测到在 0.4~0.8 mmol/L H_2O_2 作用一定时间时, 8-羟基鸟嘌呤含量随 H_2O_2 浓度升高而升高.

关键词 HL-60 细胞, 8-羟基鸟嘌呤, H_2O_2 , 气相色谱/火焰离子检测器

学科分类号 Q27

许多资料显示自由基和许多人类的疾病有着密切关系. 自由基影响着细胞的代谢过程, 在衰老、肿瘤的发生、心血管疾病等中起着重要作用^[1]. 自由基的生成可以是内源性的, 如氧化酶系统的反应; 也可以是外源的, 如具氧化还原作用的药物、电离辐射过程等. 无论是内源性的, 还是外源性的自由基产生过程, 都能造成 DNA 的氧化损伤. 因而自由基是造成突变的一个重要因素, 它在癌变过程中起着促进作用^[2,3]. 在体内许多自由基毒性是由于 O_2^- 、 H_2O_2 和过渡金属离子产生的高活性 $\cdot OH$ 造成的^[1]. H_2O_2 作为小分子物质, 极易通过细胞膜到达核内, 和核酸某些特异位点的金属离子反应产生高活性的 $\cdot OH$, 造成 DNA 的氧化损伤: DNA 链的断裂和交联^[4,5], DNA 碱基的修饰^[6,7]. 其中 8-羟基鸟嘌呤是重要的 DNA 氧化损伤产物之一, 利用 GC/FID 的高效分离能力, 可检测到一定量的 8-羟基鸟嘌呤.

1 材料与仪器

1.1 试剂

双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 (BSTFA)、乙腈为 Fluka 公司产品; 菲为 BDH 产品; 蛋白酶 K、RNA 酶 A、甲酸为 Sigma 公司产品; RPMI

1640 完全培养基为 LIFE TECHN. 公司产品; 小牛血清为杭州四季青公司; 过氧化氢、苯酚、氯仿均为国产分析纯试剂.

1.2 仪器

衍生瓶: 本课题组设计, 中国科学院上海有机化学研究所加工, 进口隔垫封口; 美国 Varian SP-3400 型气相色谱仪, 3 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.3 μ m 交联 SE-54 覆盖开管熔融石英毛细管柱, 载气为高纯氮气, FID 检测器, 台式自动平衡记录仪; 日本岛津 GC-17A/QP-5000 型气质联用仪, 美国 J&W 公司 DB-5 毛细管柱 (25m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.3 μ m), 载气为高纯氦气, 电离方式为 EI, NISI 谱库; LGJ 型真空冷冻干燥机; 电热式真空恒温干燥箱, PE. Lambda 2S 型紫外/可见光谱仪.

2 实验方法

2.1 细胞培养

HL-60 细胞株 (军事医学科学院赠); 用含 10% 小牛血清 RPMI 1640 完全培养基将生长状况良好的细胞调整至 5.0×10^5 /ml, 培养液体积为 40 ml. 分别按下列处理: A 组加入过氧化氢溶液,

* 广东省重点学科资助课题, 粤高教科 [1997] 14 号.

收稿日期: 1998-02-24, 修回日期: 1998-07-06