

进行电泳。

### (3) 快速染色与脱色:

染色: 凝胶条在 10% 三氯乙酸中固定 10 分钟, 放入 1% 考马斯蓝 R-250 (9% 乙酸 + 45% 甲醇) 溶液中加热煮沸, 再在 80℃ 左右保温 20 分钟即成(染色液可重复使用)。过氧化物酶同工酶的染色可按文献[2]进行。

脱色: 染色后的凝胶条在 90℃ 左右的热水中浸泡, 经常换水, 约 2 小时, 脱色完毕。脱色后的凝胶条可保存在 7% 醋酸中。

## 结果与讨论

1. 测定结果见图 1—3 及其说明, 图 1 与 2 均采用快速染色和脱色方法, 效果与常规方法相同。

2. 测定橡胶乳清蛋白质时, 用“改进高 pH 系统”比用“中性 pH 系统”和“高 pH 系统”的效果好, 图谱较清晰, 谱带稍多。“中性 pH 系统”的效果最差(图 1)。使用“高 pH 系统”的分离凝胶和“改进高 pH 系统”的电极缓冲溶液(硼酸、NaOH 缓冲溶液)所得的结果(图 1C)与“改进高 pH 系统”的结果(图 1A)基本相同, 但个别谱带有改变。测定过氧化物酶同工酶, “改进高 pH 系统”比“高 pH 系统”的结果好(图 3)。

测定人血清蛋白的结果表明, “改进高 pH 系统”与“中性 pH 系统”的效果相似, “高 pH 系统”的效果最差(图 2)。在样品的用量方面, “改进高 pH 系统”为 5—7 微升, “中性 pH 系统”则为 5—15 微升。

3. 本法省去“浓缩凝胶”以及在样品中加入蔗糖溶液这两个步骤, 对试验结果没有影响。

4. 过硫酸铵是凝胶聚合的催化剂, 它的质量对凝胶的聚合有很大的影响, 为保证过硫酸铵不变质, 在开瓶后, 立即用密封的小瓶分装(最好抽真空)。配成的过硫酸铵溶液保存在磨口小瓶中, 即使是在南方夏季

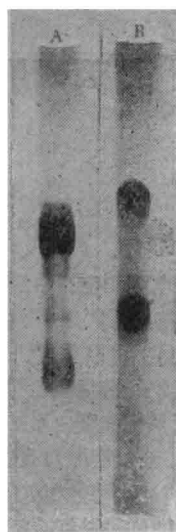


图 3 橡胶乳清过氧化物酶同工酶在不同盘状电泳凝胶系统的图谱

A“改进高 pH 系统” B“高 pH 系统”

的室温条件下, 使用一个月仍不变质。

5. 用热水脱色, 时间不能过久, 否则部分谱带消失。由于盘状(或板状)电泳条件不同, 染色及脱色时间要根据实际情况决定。

硼酸-NaOH 电极缓冲液的药品来源容易, 用量不大, 故一般不连续使用。本试验方法也适合于板状电泳。

## 参 考 文 献

- [1] 莽克强等: 《聚丙烯酰胺凝胶电泳》, 科学出版社, p. 32, 1975。
- [2] 阎炳宗等: 《实验生物学报》, Vol. 16 (2), p. 113, 1983。

[本文于 1984 年 5 月 7 日收到]

## 用比色法测定血液中抗坏血酸含量

司世麟

(河北省科学院生物所, 石家庄)

人不能自身合成抗坏血酸, 只能从食物中摄取, 所以测定体内或食物中抗坏血酸的含量在临床和营养学方面有很重要的意义<sup>[1]</sup>。抗坏血酸有很强的还原性, 人们正是依据这一特性测量它。目前广泛采用的是 2, 6-二氯酚靛酚滴定法<sup>[2]</sup>, 它的缺点是易受其它还原物质的干扰; 常因色素类物质的存在, 给观察滴定终点造成困难; 无法直接测定血液中的抗坏血酸, 除非预先对

血液中的血红蛋白进行特殊处理。也有人用钼酸铵<sup>[3]</sup>或 2, 4-二硝基苯肼作试剂<sup>[4]</sup>, 它们和抗坏血酸生成某种有色物质, 然后比色测定其含量, 但这些方法都较繁琐。

Folin 试剂是一种强氧化试剂, 还原型为蓝色, 在酸性条件下(pH 约等于 2), 其氧化活性降低<sup>[4]</sup>, 除了抗坏血酸一类的强还原剂外, 一般还原性物质几乎不和

它起反应。在生物体内该试剂只和抗坏血酸发生特异性反应,其余还原性物质几乎和该试剂不起反应,据此可以定量测定抗坏血酸。该法既简便易行,又快速有效,不需特殊设备,一般实验室可做到。

## 一、材料和方法

仪器:日本岛津 UV-190 双光束分光光度计。

主要试剂 1. Folin 试剂:按 Folin 酚法测定蛋白含量的方法配制<sup>[1]</sup>,用时需用重蒸馏水稀释 10 倍。2. 10% 三氯乙酸。3. 抗坏血酸标准溶液。准确称取 10.0 mg 抗坏血酸,用 10% 三氯乙酸定容到 100 ml,必须当日使用,当日配制。4. 其他试剂均为分析纯。

## 二、方法

1. 标准曲线的制作 准确吸取 0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 ml 标准抗坏血酸溶液,分别加 0.5 ml Folin 试剂,用重蒸馏水稀释到 5 ml,不加抗坏血酸标准液的管作为空白,10 分钟后,在 760 nm 处测定 OD 值,并作图。

2. 样品测定 吸取 0.2 ml 血清,加 0.8 ml 10% 三氯乙酸,摇匀后冰浴 5 分钟,然后 3000 转/分离心 5 分钟,吸取上清液 0.5 ml,加 Folin 试剂 0.5 ml,用重

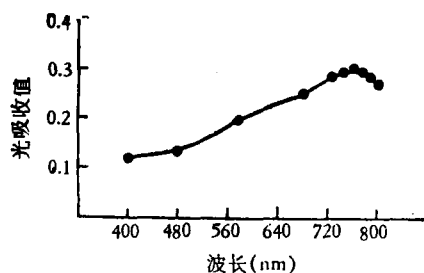


图 1 Folin 试剂和抗坏血酸反应后显蓝色的吸收光谱

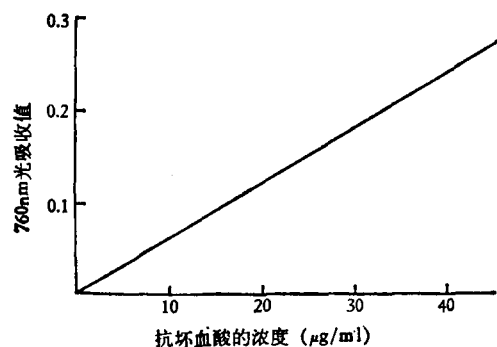


图 2 测定抗坏血酸含量的标准曲线

蒸馏水稀释到 5 ml,摇匀,10 分钟后在 760 nm 处测定其 OD 值,用标准曲线求出抗坏血酸的含量。

## 三、结果和讨论

在酸性条件下, Folin 试剂和抗坏血酸反应后呈

蓝色,光吸收在 760 nm 处最大(图 1)。若抗坏血酸的浓度低于 45  $\mu\text{g}$ ,其最大光吸收值和抗坏血酸的量呈很好的线性关系,超出该范围,就不遵从 Beer 定律(图 2)。

蓝色出现 10 分钟即达最深。在室温下,颜色很稳定,至少 2 小时内无明显变化(2 小时后未测定)。

在碱性条件下,用 Folin 试剂测定蛋白时,常受某些物质的干扰,为此我们做了以下比较试验:① 在每组试管里各加等量的抗坏血酸标准液和 Folin 试剂,其中一管内分别加葡萄糖、腺嘌呤、谷胱甘肽等干扰物,另一管不加,同法测定 OD 值(表 1)。② 在每组试管里各加等量的抗坏血酸标准液和 Folin 试剂,各管内分别加不同量的干扰物,另一管不加,然后测 OD 值(表 2)。结果表明,上述物质对测定并无干扰,甚至各类物质分别加大到 50  $\mu\text{g}$ ,仍无明显影响。这说明在酸性条件下,其他还原性物质和 Folin 试剂的反应大大降低,唯有抗坏血酸和 Folin 试剂起反应。究其原因可能是 Folin 试剂被稀释;或是酸性条件下 Folin 试剂的活性降低。

表 1 关于干扰物的试验

干扰物名称	在 760 nm 处 OD 值	
	加干扰物	未加干扰物
腺嘌呤	0.411	0.407
半胱氨酸	0.416	0.418
谷胱甘肽(还原)	0.415	0.413
脲素	0.414	0.416
葡萄糖	0.412	0.412

表 2 关于干扰物水平的试验

干扰物名称	760 nm 的 OD 值			
	未加干扰物	加不同量的干扰物		
		30 $\mu\text{g}$	40 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$
人血白蛋白	0.345	0.350	0.349	0.342
谷胱甘肽(还原)	0.350	0.342	0.344	0.354
葡萄糖	0.346	0.350	0.349	0.350

为了验证本法测定的灵敏度,即抗坏血酸的回收率,除上述干扰物外,尚需了解人血中是否还有其它干扰物质,我们做了以下对比试验,即在同一条件下,二试管中各加入等量的血清样品和 Folin 试剂,一管内再加入定量的已知抗坏血酸,另一管不加,同法测定 OD 值,并计算抗坏血酸的含量,九次实验证明,已知的抗坏血酸几乎全部被测出,说明本法灵敏度高,重复性好。样品中的其余物质对本法无干扰(见表 3)。

(下转第 76 页)

阻止喷击涡轮工作面后的残余气流串过上球轴承进入滑动轴承,破坏油膜、破坏真空度。由于结构形状、挡风环比涡轮更容易变形破坏,为此作了如图 2b 所示的修改。涡轮的上部端面有一个引风面,在其上部有一个固定挡风环,不随涡轮旋转。

## 试验结果

自从我们在国内首次完成 60,000 rpm 超速离心转子破坏试验<sup>[3]</sup>以来,用上述装置对高速和超速离心机转子 6 种 18 个进行了破坏实验,取得了安全数据,已用于产品制造中。把 70,000 rpm 钛转子在其额定转速 70,000 rpm 破坏,证明了国产 CL-60 型和 PUC-70 型制备超速离心机保护套的安全性。70,000 rpm 的 P70 Ti 转子在 83,440 rpm 测得永久变形为 7 $\mu$ m,在 85,000 rpm 为 10 $\mu$ m (是外径尺寸的千分之 0.054)。这些数据是我们在研制装置时附带取得,因此未测出永久变形的起始转速。但据我们的经验可以提出这样的初步推论: P70 Ti 转

子可安全使用在 70,000 rpm。在装置研制过程中把使用过的 8 $\times$ 10 ml 铝转子在 76,000 rpm 破坏,把 6 $\times$ 10 ml 铝转子在 82,000 rpm 运转,但尚没破坏。

综上所述,对国产转子材料可作出如下初步评价: LC, 铝合金转子可设计成 8 $\times$ 10 ml, 50,000~60,000 rpm; TC, 钛合金转子可设计为 8 $\times$ 10 ml, 70,000 rpm。

“炸头”或超速实验是获得转子安全使用最高转速而进行的实验手段。超速离心机生产厂在得到该数据后尚需进行寿命实验。当然对同类转子,可有一定规律可循,不必对每种转子都进行此类实验。

## 参考文献

- [1] 须藤卓郎:《机械の研究》,第 6 卷,第 9 号, p. 765, 1954。
- [2] Pickels, E.G.: *Rev. Sci. Instrum.*, Vol. 9, 358, 1938。
- [3] 金绿松:《生物化学与生物物理进展》,1980 年,第二期, p.76。

[本文于 1982 年 8 月 17 日收到]

(上接第 81 页)

表 3 人血清中已知的抗坏血酸的测定

样品	抗坏血酸的含量 ( $\mu$ g)		抗坏血酸的回收率%
	样品中未加抗坏血酸	样品加入 100 $\mu$ g 抗坏血酸	
人血清	2.25	100.05	97.8
	3	99	96
	3	102	99
	3	100.5	97.5
	3.5	104.25	101.25
	3.5	105	101.5
	3.6	98	94.4
	4	102	98
	4	98.5	94.5
平均	3.32	101.03	97.71

用本法测定了 20 个健康人血液中的抗坏血酸含量,每百 ml 血中最低含量为 1.125 mg, 最高为 2 mg,

和前人报道的数据相符。

用本法测定辣椒、洋葱、松针等抗坏血酸的含量,结果偏高。

本法不能测定一般生物组织或组织提取物中的脱氢抗坏血酸。

张晶、藉宝霞参加部分工作,河北医学院第三附属医院杨景霞提供试验样品,特此致谢。

## 参考文献

- [1] Cameron, E. et al.: *Cancer and Vitamin C*. 96, 1979。
- [2] 中山大学生物系生化微生物教研室:《生化技术导论》,第 45 页,人民教育出版社,1978。
- [3] Baiji, K. L. et al.: *Analyst*, Vol. 106, 117, 1981。
- [4] Jagota S. K.: *Analytical Biochemistry*, 127, 178, 1982。
- [5] 北京大学生物系生化教研室:《生物化学实验指导》,第 73 页,人民教育出版社,1979。
- [6] 上海第一医学院主编:《医用生物化学》,第 858 页,人民卫生出版社,1979。

[本文于 1984 年 3 月 15 日收到]