

3 仪器主要技术指标

波长范围: 330—850 nm, 连续可调;

波长精度: ± 2 nm;

光谱带宽: 6 nm;

吸光度范围: -0.1—2.3 吸光度;

分辨率: 0.001 吸光度;

稳定性: 优于 0.005 吸光度;

温度控制: 工作温度为 37℃, 30℃ 和 25℃, 准确度为 0.2℃, 样品变温时间为 10s;

吸样: 自动吸样, 样品量可编程控制, 通常为 350—400 μ l;

测量时间: 2—998s, 可选择;

延迟时间: 2—998s, 可选择。

仪器经过反复的测试与实际使用, 结果表

明其技术指标达到并在某些指标上超过国家标准局规定的生化分析仪的国家标准。本仪器的主要技术指标达到国外商品仪器的水平。连续分光的半自动生化分析仪在国内属首创, 填补了国内空白。

在仪器研制过程中, 得到了刘志俊, 赵玉清, 徐冠群, 韩紫杰和贺宝珍等同志的大力支持和帮助, 在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- 1 韩志钧, 郭兑山. 临床化学分析仪导论. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1990: 10—162
- 2 Rhone D P *et al.* *Clin Chem.* 1976; 22:103
- 3 Daniel L P. *Methods in Enzymology*. Vol. 63, New York: Academic Press, 1979: 3—41
- 4 刘泽民等. 中华医学检验杂志, 1984; 7(2): 69

测定 OH $\cdot$ 产生与清除的化学发光体系

陈季武 胡天喜

(华东师范大学生物系, 上海 200062)

提 要

一种产生和检测 OH $\cdot$ 的化学发光体系; 用抗坏血酸-Cu $^{2+}$ -H $_2$ O $_2$ 产生 OH $\cdot$, 加酵母扩增化学发光, 并通过对测定条件的研究, 得到测定的最佳方案。所做结果证明, 其体系灵敏度高、稳定性好、特异性强、操作简便、测量快速, 值得推广。

关键词 羟自由基, 抗坏血酸化学发光体系, 酵母, 硫脲, 苯甲酸

羟自由基 (OH $\cdot$) 是一个氧化能力很强的自由基, 可以发生电子转移、夺取氢原子和羟基化等反应, 可以使糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类都发生氧化, 遭受损伤与破坏, OH $\cdot$ 与衰老、肿瘤、辐射损伤和细胞吞噬有关^[1,2]。因此迫切需要加强对 OH $\cdot$ 作用的研究, 这就需要产生 OH $\cdot$ 体系。产生 OH $\cdot$ 的经典反应是 Fenton 反应和 Haber-Weiss 反应。近年来国外文献报道了还原型抗坏血酸可以使 Cu $^{2+}$ 还原为 Cu $^{+}$ ^[3], 国内文献报道了比色法测定抗

坏血酸体系产生的 OH $\cdot$ ^[4], 而我们在参考文献的基础上, 采用化学发光法测定抗坏血酸体系产生的 OH $\cdot$ 。

目前测定 OH $\cdot$ 方法有几种, 最常用的是气相色谱法和电子自旋共振法, 这些方法需要昂贵的仪器, 操作也较复杂, 而化学发光法仪器不贵, 操作也简单, 与比色法相比, 化学发光法又具有精确度、灵敏度高和测定快速等优点。国

内尚未见用化学发光分析法测定 $\text{OH}^\cdot$ 的报道。

1 材料与方法

1.1 主要仪器 上海技术监督局工厂和华东师范大学生物系合作研制的 SHG-1 型生物化学发光测量仪。

1.2 试剂

1.2.1 用重蒸馏水配制 pH 6.2 的 10 mmol/L 和 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液。

1.2.2 临用前用 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液分别配制成 1.8 mmol/L 抗坏血酸溶液、1.8 mmol/L CuSO_4 溶液和 33.3 mmol/L H_2O_2 溶液。以上试剂均为分析纯(国产)。

1.2.3 称取适量干酵母粉(上海酵母厂产品),悬浮于 10mmol/L 磷酸钠缓冲液中,1500g 离心 10 min,弃上清液,如此清洗酵母二次,重新悬浮于 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液中,浓度为 75mg/ml,隔水煮沸,冷却后使用。

1.3 方法 1.2cm × 5cm 的玻璃管中,加入 0.2 ml 抗坏血酸,0.4 ml CuSO_4 , 0.2ml 酵母,0.6 ml 50mmol/L 磷酸钠缓冲液,上机测本底后,注入 0.6 ml H_2O_2 ,快速混匀,启动发光反应,延迟 10s 后,测出 15s 的积分发光强度。反应最终体积为 2ml。

2 结果与讨论

2.1 化学发光反应的动力学曲线(图 1)

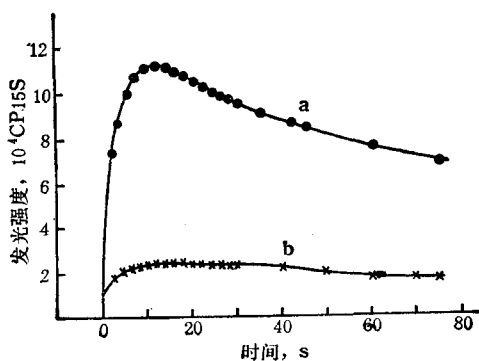


图1 化学发光反应的动力学曲线

原位注射启动发光反应,每次测 2s 的积分

发光强度,连续测试,可以看出, $\text{OH}^\cdot$ 攻击酵母所诱发的发光是一个比较缓慢的过程, 12s 时发光最强,以后随时间缓慢减弱,其中,曲线 a 是产生 $\text{OH}^\cdot$ 的抗坏血酸- Cu^{2+} -酵母- H_2O_2 体系所诱发的发光动力学,曲线 b 是诱发脂质过氧化化的酵母- H_2O_2 体系所产生的发光动力学。图示表明, $\text{OH}^\cdot$ 攻击酵母所诱发的发光远远大于 H_2O_2 直接氧化酵母所产生的发光。这间接说明,在抗坏血酸化学发光体系中, H_2O_2 直接引起损害的可能性极小,它很可能是通过形成活性更强的 $\text{OH}^\cdot$ 而引起损害作用。

2.2 抗坏血酸浓度对发光强度的影响

CuSO_4 浓度为 360 $\mu\text{mol/L}$, 酵母浓度为 7.5 mg/ml 和 H_2O_2 浓度为 10 mmol/L 时,发光强度随抗坏血酸浓度增加而增大,抗坏血酸浓度为 180 $\mu\text{mol/L}$ 时发光最强,并趋于稳定(见图 2)。这表明只需适量抗坏血酸即可使发

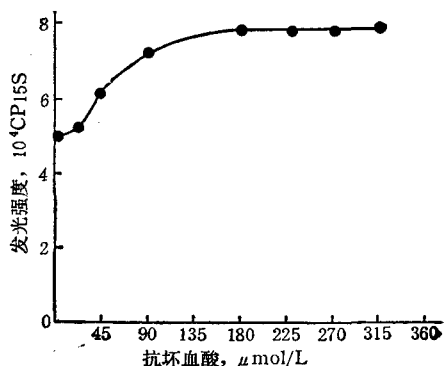


图2 抗坏血酸浓度对发光强度的影响

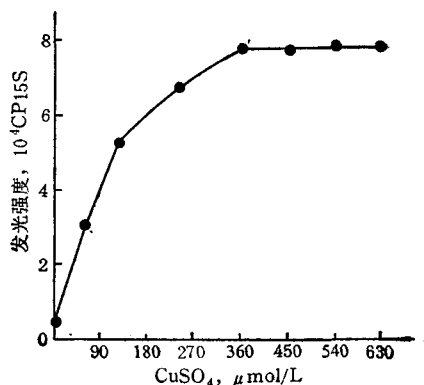


图3 CuSO_4 浓度对发光强度的影响

光最强。

2.3 CuSO_4 浓度对发光强度的影响

抗坏血酸浓度为 $180 \mu\text{mol/L}$ ，酵母浓度为 7.5 mg/ml 和 H_2O_2 浓度为 10 mmol/L 时，发现随着 CuSO_4 浓度增加，发光几乎从无到有，并迅速增大。当 CuSO_4 浓度为 $360 \mu\text{mol/L}$ 时发光强度趋于稳定状态（见图 3）。这表明如果没有痕量 Cu^{2+} 存在，就不能产生 $\text{OH}^\cdot$ 。随着 CuSO_4 浓度增加， $\text{OH}^\cdot$ 的产生增加，逐渐趋于饱和状态。

2.4 酵母浓度对发光强度的影响

抗坏血酸浓度为 $180 \mu\text{mol/L}$ 、 CuSO_4 浓度为 $360 \mu\text{mol/L}$ 和 H_2O_2 浓度为 10 mmol/L

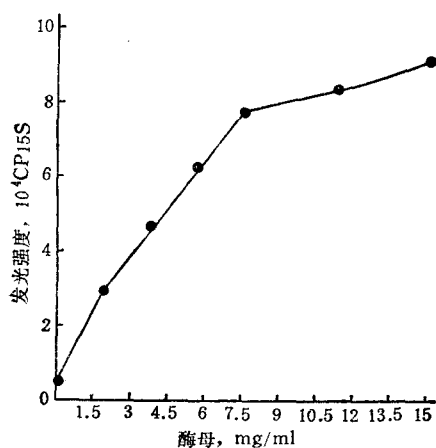


图 4 酵母浓度对发光强度的影响

时，发现随着酵母浓度增加，发光几乎从无到有，并近似线性地增大，当酵母浓度为 7.5 mg/ml 时，发光强度增加缓慢（见图 4）。这表明化学发光依赖于酵母。

2.5 H_2O_2 浓度对发光强度的影响

抗坏血酸浓度为 $180 \mu\text{mol/L}$ ， CuSO_4 浓

度为 $360 \mu\text{mol/L}$ 和酵母浓度为 7.5 mg/ml 时，发现发光强度随着 H_2O_2 浓度增加而增大。最初是呈线性增加，直到 H_2O_2 浓度达 10 mmol/L 时，才趋向缓慢增强（见图 5）。这表明，随着 H_2O_2 浓度增加， $\text{OH}^\cdot$ 从无到有，并迅速增多，到一定数量时，增加趋缓。

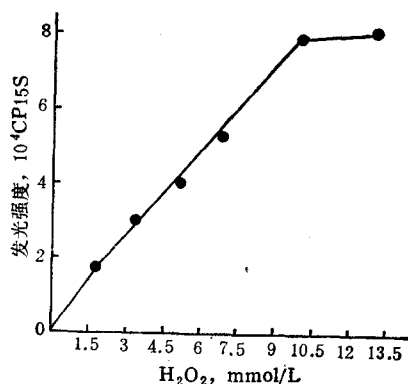


图 5 H_2O_2 浓度对发光强度的影响

2.6 pH 对发光强度的影响

在本测量体系中，其他条件不变，如仅改变 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液的 pH，发光强度在 pH 5.5—6.5 范围内基本不变，大于 pH 6.2 后发光开始增强（见表 1）。

2.7 温度对发光强度的影响

在 10°C — 40°C 范围内，随着温度上升，发光强度逐渐增大（见表 2）。所以发光强度与温度有依赖关系。

2.8 不同缓冲液对发光强度的影响

用磷酸钠缓冲液发光最强，并且信噪比最高，约为 66（见表 3）。

表 1 pH 对发光强度的影响

pH	5.5	5.9	6.2	6.8	7.5	8.5
发光强度(CP15S)	74710	76329	77501	101867	140201	181012

表 2 温度对发光强度的影响

温度($^\circ\text{C}$)	10	15	18	20	22	25	30	37	40
发光强度(CP15S)	10293	43951	57012	66323	77502	90116	106437	126957	136896

2.9 产生 $\text{OH}^\cdot$ 的特异性

由表 4 所知, $\text{OH}^\cdot$ 清除剂硫脲、苯甲酸均能有效地抑制发光, 而 O_2^- 清除剂 SOD 和 $^1\text{O}_2$ 清除剂 β -胡萝卜素均不能抑制发光, 表明

表 3 不同缓冲液对发光强度的影响

缓冲液	浓度 mmol/L	pH	本底	发光强度 CPI5S
$\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$	50	6.2	1277	77813
$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$	50	6.2	2064	74118
Tris-HCl	50	6.2	1805	54839
柠檬酸-柠檬酸钠	50	6.2	826	12149

表 4 产生 $\text{OH}^\cdot$ 的特异性

	浓度	发光强度 (CPI5S)	抑制发光 (%)
$\text{OH}^\cdot$ 生成组		77813	0
加苯甲酸	4 mmol/L	37272	52.1
	10mmol/L	27390	64.8
	40mmol/L	15329	80.3
加硫脲	5 mmol/L	13851	82.2
	10mmol/L	11983	84.6
	40mmol/L	8482	89.1
加 SOD	16U	77123	0.9
	40U	78001	-0.2
加 β -胡萝卜素	25 $\mu\text{mol/L}$	76217	2.0
	50 $\mu\text{mol/L}$	76713	1.4
加维生素 E	10mg	73223	5.9
	15mg	73298	5.8
加过氧化氢酶 (西德进口, 活力单位没标)	0.5 μl	59060	24.1
	1 μl	35950	53.8
	10 μl	8248	89.4
	15 μl	8015	89.7

本体系不产生 O_2^- 和 $^1\text{O}_2$, 只产生 $\text{OH}^\cdot$ 。主要起清除脂质自由基及过氧化脂质自由基作用的维生素 E 只能抑制 6% 发光, 说明在 15s 测量时间内酵母极少发生脂质过氧化, 而过氧化氢酶 (Cat) 虽然不直接清除 $\text{OH}^\cdot$, 但是它能清除 $\text{OH}^\cdot$ 的前体 H_2O_2 , 并且 Cat 与 H_2O_2 反应速率比 H_2O_2 与 Cu^+ 反应速率快得多, 使大部分 H_2O_2 来不及转化为 $\text{OH}^\cdot$ 就被清除。因此大大减少 $\text{OH}^\cdot$ 的产生, 从而抑制了大部分发光。10 μl Cat 与 15 μl Cat 均只能抑制

89%, 说明在清除大部分 H_2O_2 的同时, 有少量 H_2O_2 已转化为 $\text{OH}^\cdot$ 。

2.10 试验方法的可靠性

本体系所做的数据很稳定, 批内变异系数 $\text{CV} = 0.65\%$ ($n = 10$), 批间变异系数也只有 2.17% ($n = 7$)。

上述实验证明, 通常作为抗氧化剂的抗坏血酸在有 Cu^{2+} 和 H_2O_2 时可以启动产生 $\text{OH}^\cdot$, $\text{OH}^\cdot$ 的产生依赖于 Cu^+ , 也依赖于 H_2O_2 , 其中, Cu^{2+} 起催化作用, H_2O_2 是 $\text{OH}^\cdot$ 的前体, 酵母则是很好的化学发光底物, 会有效地扩增化学发光。所以, 抗坏血酸- Cu^{2+} - H_2O_2 -酵母反应链是化学发光的主要途径。还可能存在一条化学发光的次要途径, 即在适宜温度下, 还原型抗坏血酸也可能与 O_2 缓慢反应生成 H_2O_2 , H_2O_2 再与 Cu^+ 反应产生 $\text{OH}^\cdot$, 一般这一系列反应要在 25 $^\circ\text{C}$ 条件下作用 90 min 才进行完毕。而本体系在启动反应后的 25s 内即测得数据, 在这 25s 内, 即使有抗坏血酸与 O_2 缓慢反应, 所产生的 H_2O_2 量也是很少的, 所以这条途径对本体系的化学发光贡献极小, 图 5 也证明了这一点。

所以, 本体系的原理是(图 6): 抗坏血酸首先还原 Cu^{2+} 为 Cu^+ , Cu^+ 可以还原 H_2O_2 为羟离子和羟自由基, 羟自由基攻击酵母, 从酵母壁中获取电子, 同时伴随化学发光 (CL)。^[2]

总之, 本体系优点是灵敏度高、稳定性好、特异性强、操作简便、测量快速、经济实用。

本体系的建立, 对于调查 $\text{OH}^\cdot$ 的产生, 筛选清除 $\text{OH}^\cdot$ 的药物, 防治与 $\text{OH}^\cdot$ 有关的疾病有一定的应用价值。

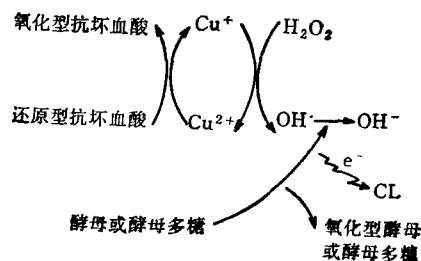


图 6 化学发光测定原理

参 考 文 献

- 1 莫简主编. 医用自由基生物学导论. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 21—25
- 2 胡天喜等编著. 发光分析与医学. 上海: 华东师范大学出版社, 1990: 48—67
- 3 Rowley D A *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1983; 225:279
- 4 王成莲等. 生物化学与生物物理进展, 1989;16(6): 473
- 5 English D K. In: Van Dyke K *et al.* eds, *Cellular Chemiluminescence*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1987; III: 153—166

人血浆载脂蛋白 E 的分离提纯*

解用虹 徐秀双** 郭 刚 郭善一 王维兆

(天津医学院生物化学教研室, 天津 300070)

提 要

利用仅 2.5h 的不连续密度梯度超速离心, 可自人血浆分离获得纯净的极低密度脂蛋白 (VLDL)。VLDL 脱脂后, 其可溶成分经 Heparin-Sepharose CL-6B 亲和层析柱, 可分为低盐洗脱峰 I 和高盐洗脱峰 II。峰 II 经 SDS-PAGE 鉴定为单一染色带, 测定其分子量为 33 900。此即为纯净的人血浆载脂蛋白 E, 载脂蛋白 E 的分离提纯为制备其单克隆抗体和进行血浆浓度及表型测定提供了有利条件。

关键词 载脂蛋白 E, 极低密度脂蛋白, 超速离心, 亲和层析

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apo E) 是人血浆主要载脂蛋白成分之一。其由位于第十九染色体同一位点上的三个等位基因 ϵ_2 , ϵ_3 和 ϵ_4 编码, 人群中存在着三种异构体和 6 种不同的表型。不同异构体受体结合活性差异明显, 因此 apoE 是影响机体血脂水平的重要遗传因子。不同民族血脂水平的差异与 apo E 等位基因频率分布密切相关; 同一民族具有不同等位基因人群血脂水平及动脉粥样硬化的易患性也存在显著性差异^[1-3]。

apoE 参与了中间密度脂蛋白 (IDL) 向低密度脂蛋白 (LDL) 的转变, 影响和决定着 LDL 的代谢。apoE 缺乏是一种遗传性疾病, 患者血浆中 apoE 的浓度不足正常人的 1%。该病患者具有早发的心血管疾病, 结节-皮疹黄色瘤和 III 型高脂蛋白血症等典型的临床特征^[4]。

apoE 基因型及其血浆水平测定在高脂蛋

白血症和动脉粥样硬化发病机理探讨及临床应用上均有重要意义。血浆蛋白成分复杂, apo E 含量又较低, 一般仅为 3—5 mg/dl。利用单克隆抗体特异性强, 结构单一, 来源充足等特点, 建立相应的免疫学方法是测定 apo E 表型和含量的主要途径。抗原的分离提纯是抗体制备的首要工作, 本文报告人血浆 apo E 的分离提纯。

1 材料与方 法

1.1 人血 VLDL 的分离提纯

人血采自高甘油三酯献血员, 常规离心分离血浆。每 100 ml 血浆加入 KBr 25.0 g, 充分混匀, 此时其密度为 1.20 g/ml。VLDL 的分离提纯参照本室方法修改进行^[5]: 在 Be-

* 国家自然科学基金资助课题。

** 1985 级八年制学生。

收稿日期: 1990-12-24 修回日期: 1991-04-13