

- 5 Mastubara C, Nishikawa Y, Yoshida Y, *et al.* A spectrophotometric method for the determination of free fatty acid in serum using acyl-coenzyme A synthetase and acyl-coenzyme A oxidase. *Analytical Biochemistry*, 1983, **130** (1): 128~133

An Improved Method for The Determination of Hydrogen Peroxide in Leaves. LIU Jun, LÜ Bo, XU Lang-Lai (College of Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China).

Abstract Levels of hydrogen peroxide in plant extracts were overestimated by the method of only using titanium (IV) because of the interference of pigments and other materials while underestimated by the method of adding activated charcoal (A. C.) in 5% trichloroacetic acid extracts to remove pigments.

These problems were avoided by a developed method of extraction, which could not only remove the pigments in acetone extracts conveniently but also get a high recovery more than 95%. Hydrogen peroxide was determined by its reaction with the complex of titanium (IV) and 4-(2-pyridylazo) resorcinol against references catalase-treated. The minimum concentration of hydrogen peroxide determined in this essay was $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Levels of hydrogen peroxide in leaves of some plant species ranged from $0.1 \sim 0.8 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$.

Key words hydrogen peroxide, plant leaves, titanium (IV), 4-(2-pyridylazo) resorcinol, extraction

褐藻叶绿体的制备

李爱芬¹⁾ 陈 敏

(烟台大学生物化学系, 烟台 264005)

周百成

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

摘要 在4℃条件下, 采用CaCl₂溶液浸泡褐藻裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 的叶状体, 观察CaCl₂溶液的浓度和浸泡时间对裙带菜叶绿体提取率及其荧光特性的影响。结果表明, 裙带菜的叶状体经过CaCl₂溶液浸泡后, 其叶绿体的提取率有明显地提高。根据裙带菜叶绿体的提取率和室温荧光发射光谱的测定结果, 认为最适的方法是采用0.2 mol/L的CaCl₂溶液浸泡10 min。在这种条件下, 裙带菜叶绿体的提取率是传统制备方法的5倍。室温荧光发射光谱的测定结果说明叶绿体的完整性较好。

关键词 褐藻, 叶绿体, 提取率, 荧光发射光谱

学科分类号 Q946

叶绿体是植物进行光合作用的场所, 其类囊体膜是一种光能转换膜。长期以来, 叶绿体类囊体膜的结构与功能的研究一直是光合作用机理研究的核心问题之一。目前, 叶绿体的提取方法是植物组织破碎, 过滤后离心分离。该方法在绿色植物叶绿体两个光系统的结构与功能的研究中得到了广泛的应用。褐藻是含有叶绿素c的杂色植物, 其叶状体含有大量的褐藻胶质, 它是由β-D-甘露糖醛酸和α-L-古罗糖醛酸单体通过1-4糖苷键连接而成的线形嵌段共聚物, 分子质量很大, 结构也非常复杂, 具有很高的粘稠度, 以致于褐藻叶绿体的提取率很低。文献报道, 褐藻胶质与二价金属离子有很强的结合能力, 在Ca²⁺的存在下能形成凝胶^[1]。基于上述原因, 我们以褐藻裙带菜 (*Undaria*

pinnatifida) 为材料, 选择了适宜的氯化钙浓度浸泡其叶状体, 叶绿体的提取率明显提高, 可以达到大量制备褐藻叶绿体的目的。

1 材料与方法

1.1 裙带菜 (*Undaria pinnatifida*)

采自烟台金沟寨海边低潮带石沼, 洗净后置冰箱内保存或置于海水中通气保存备用。

1.2 叶绿体的制备

按Chu等^[2]的方法并稍加修改, 分离介质为Tris-硼酸(pH 8.5)溶液。

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (0535) 6902116, E-mail: lafhm@sea.ytu.edu.cn

收稿日期: 1999-10-12, 修回日期: 2000-02-28

1.3 叶绿体提取率的计算

$$\text{提取率} = \frac{\text{叶绿体干量}}{\text{叶状体干量}} \times 100\%$$

1.4 室温荧光发射光谱的测定

采用日立 F-850 型荧光分光光度计测定. 荧光发射光谱的波长扫描范围为 640~800 nm, 激发光波长为 436 nm. 狭缝宽度为 5 nm, 扫描速度为 240 nm/min.

2 结 果

2.1 CaCl_2 溶液的浓度对提取率的影响

在 4℃ 条件下, 分别采用 2 倍体积的 0.1、0.2、0.5 和 1.0 mol/L 的 CaCl_2 溶液浸泡裙带菜叶状体 30 min, 经机械破碎后, 离心收集裙带菜的叶绿体, 其得率见表 1. 从表 1 看出, 裙带菜叶状体经 CaCl_2 溶液浸泡后, 其叶绿体的提取率明显提高. 如 0.2 mol/L 的 CaCl_2 溶液浸泡 30 min 时, 叶绿体的提取率为 1.13%, 是对照组的 5 倍. 当 CaCl_2 溶液的浓度超过 0.2 mol/L 时, 裙带菜叶绿体的得率已趋于稳定.

表 1 CaCl_2 浓度对裙带菜叶绿体提取率的影响

$c(\text{CaCl}_2) / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$t / ^\circ\text{C}$	t / h	叶绿体提取率 / %
0	4	0	0.23
0.1	4	0.5	0.79
0.2	4	0.5	1.13
0.5	4	0.5	1.06
1.0	4	0.5	1.12

2.2 CaCl_2 溶液浸泡时间对提取率的影响

采用 2 倍体积的 0.2 mol/L 的 CaCl_2 溶液, 在 4℃ 条件下浸泡裙带菜的叶状体, 浸泡时间分别为 3 min、5 min、10 min、20 min 和 30 min, 其叶绿体的得率如表 2. 由表 2 可知, 在一定浓度的 CaCl_2 溶液中, 裙带菜叶绿体的得率随着叶状体浸泡时间的延长而提高. 超过 10 min 以后, 延长浸泡时间对提高叶绿体的得率意义不大.

表 2 CaCl_2 浸泡时间对裙带菜叶绿体提取率的影响

$c(\text{CaCl}_2) / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$t / ^\circ\text{C}$	t / min	叶绿体提取率 / %
0.2	4	3	0.81
0.2	4	5	0.86
0.2	4	10	1.18
0.2	4	20	1.09
0.2	4	30	1.13

2.3 荧光发射光谱的比较

在室温条件下, 经过 0.2 mol/L 的 CaCl_2 溶液浸泡后制备的叶绿体与传统方法所得对照组叶绿体的荧光发射光谱相同 (图 1), 都有两个荧光发射峰, 分别位于 687 nm 和 732 nm (肩峰). 这个结果同 Wu 等^[3]测定的裙带菜叶状体活体的室温荧光发射光谱相同. 说明我们实验中制备的叶绿体具有很好的完整性, 可以作为进一步研究其光合系统结构与功能的材料.

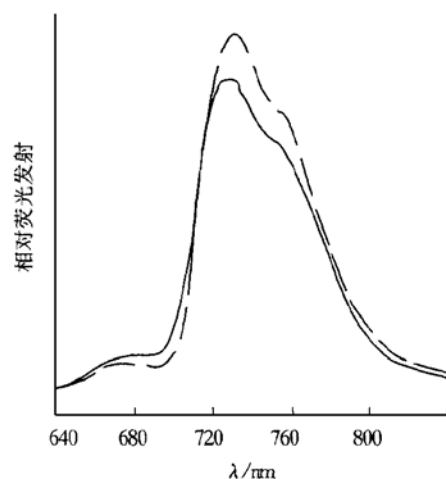


图 1 叶绿体的荧光发射光谱

激发波长为 436 nm. —: 对照; - - -: 0.2 mol/L CaCl_2 浸泡.

3 讨 论

褐藻是海洋中的大型藻类, 在杂色植物中形体结构最复杂, 包括有许多有重要经济价值的藻类, 如海带、裙带菜和马尾藻等. 这些褐藻的育苗和养殖技术的改进都有赖于对其叶绿体类囊体膜的光合作用特性进行深入的研究.

本文使用 CaCl_2 溶液浸泡裙带菜叶状体, CaCl_2 与藻体表面的褐藻胶质形成褐藻酸钙, 藻体表面由光滑、粘稠明显地变为粗糙, 降低了粘稠度, 易于藻体的粉碎和匀浆液的过滤, 使叶绿体的提取率提高.

致谢 感谢刘万卉博士和刘永明高级工程师在荧光光谱的测定方面给予的帮助.

参 考 文 献

- 1 Smidsroed O, Gudmund sk j k-br k. Alginate as immobilization matrix for cells. Trends in Biotechnol, 1990, 8 (3): 71~78
- 2 Chu Z X, Anderson J M. Modulation of the light-harvesting assemblies in chloroplast of a shade plant, *Alocasia macrorrhiza*.

Photobiochem Photobiophys, 1984, 8 (1): 1~ 10

- 3 Wu B G, Zang R B. Chlorophyll fluorescence ratio F685/F735 in brown algae and its variation under excitation by two types of light and dehydration. Chin J Oceanol Limnol, 1993, 11 (1): 1~ 7

Preparation of Chloroplasts from Brown Algae. LI Ai-Fen, CHEN Min (*Department of Biochemistry, Yantai University, Yantai 264005, China*); ZHOU Bai-Cheng (*Experimental Marine Biology Laboratory, Oceanology Institute, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China*).

Abstract Thalli from a brown alga *Undaria pinnatifida* were soaked by CaCl_2 solution with different concentration and time at 4 °C, the effect of CaCl_2 solution on efficiency and inflorescence

emission spectra of chloroplasts were examined. The results show that the efficiency of collected chloroplasts is increased markedly after soaking in CaCl_2 solution. According to the results of collected efficiency and characteristic of inflorescence emission spectra at room temperature of chloroplasts, it was suggested that soaking in the 0.2 mol/L CaCl_2 solution for 10 min is optimum. Under this condition, the efficiency of collected chloroplasts is as 5 fold as control group, and the characteristics of chloroplasts obtained by CaCl_2 soaking are similar to that of traditional method.

Key words brown algae, chloroplasts, collected efficiency, fluorescence emission spectra

一种检测细胞微量点突变的方法* ——等位基因特异的 PCR

殷文璇 刘德培¹⁾ 李竹红 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)
(中国协和医科大学基础医学院)

摘要 为了灵敏、方便地检测出细胞群体中含量极低的点突变, 利用一 β 珠蛋白基因簇 G γ -202 C $\rightarrow$ G 突变的杂合细胞株, 优化传统的等位基因特异 PCR 的反应条件, 以定量的 PCR 产物为模板, 在含 5% 甲酰胺的体系中使用半巢式的等位基因特异引物进行扩增. 结果表明, 该方法灵敏可靠, 可快速检测到细胞群体中低于 0.025% 的点突变.

关键词 等位基因, PCR, 点突变

学科分类号 Q7

等位基因特异 PCR (allele specific PCR, AS-PCR), 又称做 3' 碱基特异 PCR 或扩增阻滞突变体系 (amplification refractory mutation system), 是近几年发展起来的检测突变体的 PCR 技术之一^[1]. 其原理是: 当引物 3' 端与模板互补时, PCR 反应中的延伸作用能从 3' 端延伸下去; 反之, 则不能进行. 如果基因的某一特定位置点发生点突变, 则可用突变序列设计引物, 扩增出突变片段. 故用此方法能够检测正常和异常等位基因或 DNA 片段, 确定纯合子或杂合子, 进行群体分析以及基因表达的限定模式 (imprinting) 的研究^[2,3].

利用 AS-PCR 技术检测点突变时, 由于扩增序列与野生型序列之间仅有一个碱基的差异, 因此优化 PCR 反应条件, 提高反应的特异性是实验成功

的关键. 本文利用野生型 CMK 细胞系以及该系的一株含点突变的杂合子为材料, 在两次第一轮 PCR 扩增的基础上, 进行半巢式 AS-PCR, 并在反应体系中加入 5% 的甲酰胺以减少非特异性扩增的同时, 减少引物、dNTPs 及 Taq 酶的用量. 结果表明, 在这种优化的反应条件下, 可检测出样品中含量极微的点突变 (突变模板占野生型模板量的 0.025%), 表明该方法可应用于检测细胞群体中微量的点突变.

* 国家“863”计划 (BH-03-02-02) 基金资助项目.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (010) 65296426, E-mail: liudp@public.east.cn.net

收稿日期: 1999-10-15, 修回日期: 2000-02-21