

参 考 文 献

- 1 Creighton T E. J Mol Biol, 1979; 129: 235
- 2 Laemmli U K. Nature, 1970; 227: 680
- 3 Creighton T E. Methods in Enzymology, 1986; 131: 156
- 4 Creighton T E, Shortle D. J Mol Biol, 1994; 242: 670

The Key Technique in Urea-gradient Electrophoresis. Zhou Junxian, Wang Xicheng¹⁾, Zhang Yanling, Zhou Junmei (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*; ¹⁾*Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China*).

Abstract An improved procedure by using urea-gradient gel for protein folding and unfolding

investigation is provided. Some key techniques such as urea gradient homogeneity, gel viscosity and gel edge effects have been discussed. An inverse gradient of glycerol is used to compensate for the small effects of urea on the electrophoretic mobilities of both folded and unfolded proteins. The glycerol gradient used here of 15% at 0 mol/L urea to 0% at 8 mol/L urea was designed to give a constant mobility of creatine kinase at all urea concentrations. The gel was photopolymerized in the presence of riboflavin. 5% stacking gel and sample combs were also used on urea gradient gel to improve the sample pattern.

Key words urea-gradient electrophoresis, polyacrylamide gel, protein folding, creatine kinase

改良硫代巴比妥酸荧光法测定血清过氧化脂质

张秀明 严丽娟 柴建开 周伟强 王丽霞

(河南省精神病医院检验科, 新乡 453002)

摘要 对目前使用的过氧化脂质 (LPO) 硫代巴比妥酸 (TBA) 荧光测定法进行了改进. 血清样本在冰醋酸存在的条件下, 100℃ 水解 60 min, LPO 释放的丙二醛 (MDA) 与 TBA 形成复合物, 用甲醇沉淀血清蛋白质并减少非特异性干扰, 以 $\lambda_{ex} = 515 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$ 测定 MDA-TBA 复合物的荧光强度. 此法操作简便、快速, 结果准确, 荧光稳定. LPO 含量 (以 MDA 表示) 在 0~20 $\mu\text{mol/L}$ 与荧光强度呈线性关系 ($r = 0.9994$), 最低检测限为 0.16 $\mu\text{mol/L}$, 回收率为 105.08%, 重复性 $CV = 4.23\%$.

关键词 过氧化脂质, 荧光, 分光光度法

自由基可使脂质发生过氧化作用而形成 LPO. 体内 LPO 与动脉粥样硬化症、心脑血管疾病、肝脏疾病、糖尿病等多种疾病及衰老密切相关^[1]. 血清 LPO 含量可反映体内自由基水平, 是体内脂质过氧化的指标. 目前, 其测定方法以 TBA 反应法应用最广, 这类方法包括比色法^[1~3] 和荧光法^[1,4,5] 两种, 尤以 TBA 荧光法灵敏度高, 特异性好, 但目前使

用的荧光法操作复杂、预处理时间长, 且方法中所用正丁醇具有强烈刺激性气味, 对人体健康有一定危害. 我们参考文献 [1, 3~6] 对其进行了改进, 经方法学检验和临床应用结果满意.

1 材料与方法

1.1 试剂

TEP 标准溶液: 准确吸取 1, 1, 3, 3-四乙氧基丙烷 (Fluka, 含量 > 95%, 比重 0.918) 100 μl , 加甲醇至 50 ml, 含量为 8 mmol/L, 作为贮存液, 4℃ 保存可稳定一个月, 临用前以双蒸水稀释成 8 $\mu\text{mol/L}$ 的 TEP 标准应用液; 20 mmol/L TBA 溶液: 称取 576.6 mg 硫代巴比妥酸 (生化试剂, 上海试剂二厂, 批号: 881228) 溶解在 80 ml 水中, 60℃ 以下加热助溶, 冷至 25℃ 用双蒸水稀释至 100 ml, 再与冰醋酸 (优级纯, 天津市化学试剂一厂) 等量混合; 甲醇 (优级纯, 北京化工厂). 实验用水均为双蒸馏水.

1.2 仪器

日本产 Hitachi 650-60 型荧光分光光度计及 057 型 X-Y 记录仪.

1.3 测定方法

取三支 10 ml 具塞试管, 分别注明测定管、标准管和空白管, 测定管加血清 20 μl , 标准管加 TEP 标准应用液 20 μl , 空白管加水 20 μl , 各管依次加水 2 ml、TBA 溶液 1 ml, 混匀, 100℃ 加热 60 min, 冷水冷却, 各加甲醇 1 ml, 充分混匀, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液以 $\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$ 测定各管荧光强度 (F), 按下式计算出 LPO 含量 (以 MDA 表示): 血清 LPO 含量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} =$

$$\frac{F_{\text{测定管}} - F_{\text{空白管}}}{F_{\text{标准管}} - F_{\text{空白管}}} \times 8.$$

2 结 果

2.1 实验条件选择

2.1.1 TBA 浓度的选择: 比较了 TBA 浓度对荧光强度的影响, 结果见图 1. 我们选择 TBA 浓度为 20 mmol/L, 此时反应体系中 TBA 的实际浓度为 6.7 mmol/L, 与文献 [1, 4, 6] 报道的最适浓度一致.

2.1.2 加热时间的选择: 比较了加热时间对荧光强度的影响, 结果见图 2. 我们选择的加

热时间为 60 min, 与 Wong 等及八木报道的最适反应时间相同^[1,6], 较余嘉丽等^[4]报道的缩短 15 min.

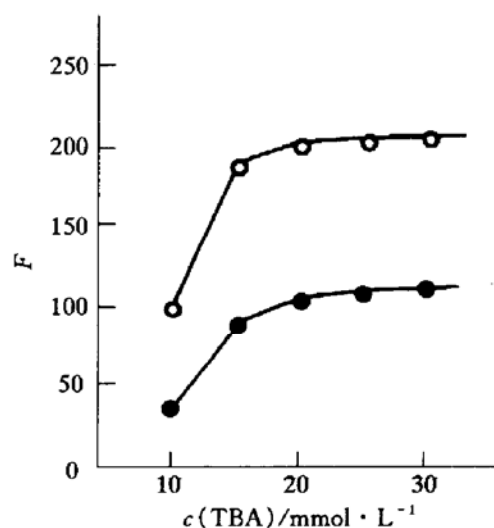


图 1 TBA 浓度对荧光强度的影响

○—○: 标准管; ●—●: 测定管.

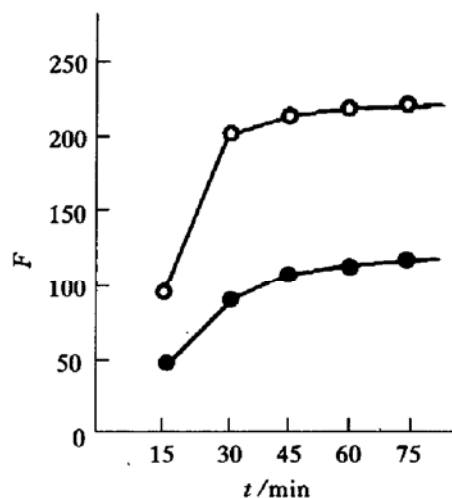


图 2 加热时间对荧光强度的影响

○—○: 标准管; ●—●: 测定管.

2.1.3 甲醇用量的选择: 比较了甲醇用量对荧光强度的影响, 结果见图 3. 甲醇用量对标准管的荧光强度影响较小, 测定管加入甲醇后荧光强度明显降低, 用量在 1~1.5 ml 变化不大, 表明血清中共存有干扰物质, 加入甲醇可减少其干扰, 我们选择甲醇用量为 1 ml.

2.2 荧光光谱

将血清样本和标准应用液按实验方法操作

后分别在荧光光度计上进行激发波长和荧光波长自动扫描,发现 λ_{ex} 均为 525 nm, λ_{em} 均为 550 nm, 与 Wong 等^[6]的报道完全一致. 因激发波长与荧光波长接近时容易受瑞利散射光的干扰^[7], 故激发波长选择 515 nm. 图 4 为固定激发波长 515 nm 时, 在 057 型 X-Y 记录仪上描记的 MDA-TBA 荧光光谱, 测定管和标准管光谱特征相似.

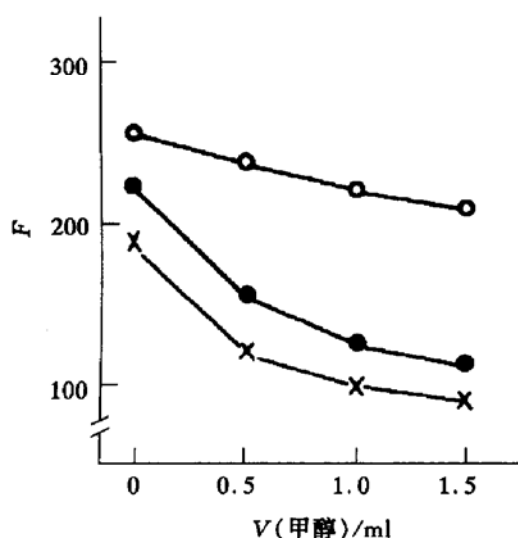


图 3 甲醇用量对荧光强度的影响

○—○: 标准管; ●—●: 测定管 1; ×—×: 测定管 2.

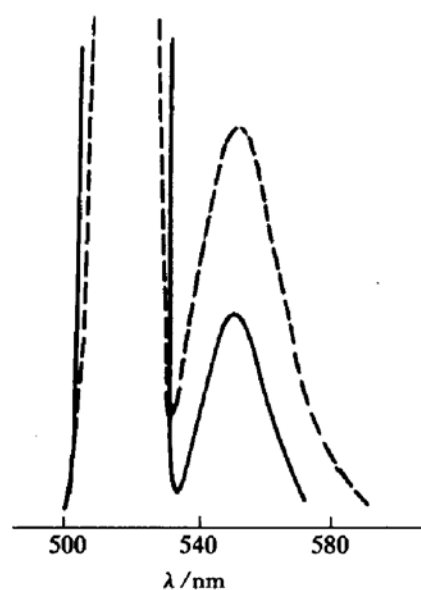


图 4 MDA-TBA 荧光光谱

---: 标准管; —: 测定管.

2.3 方法学评价

2.3.1 标准曲线: 从图 5 可见, TEP 浓度在 20 $\mu\text{mol/L}$ 以下时标准曲线线性良好 ($r = 0.9994$), 回归方程为: $Y = 29.3X - 4.5$.

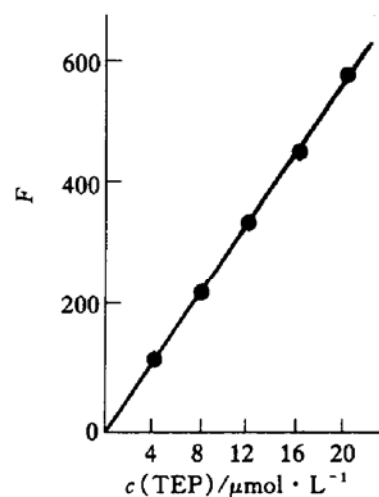


图 5 标准曲线

2.3.2 灵敏度: 按照国际纯粹和应用化学联合会的规定, 测量置信水平为 99.86% 时, 方法的检测限由下式算出:

$$\text{检测极限} = \frac{3\delta_{\text{空白}}}{\text{标准曲线斜率}}$$

式中 $\delta_{\text{空白}}$ 为 10 次测定空白值的标准差.

本法的最低检测限为 0.16 $\mu\text{mol/L}$, 与 Wong 等^[6]采用 HPLC-分光光度法的检测限 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 接近.

2.3.3 回收率试验: 结果见表 1. 平均回收率为 105.08%.

表 1 回收率试验测定结果

标本号	LPO 含量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	加入 TEP 量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	测得总量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	回收值/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率/%
1	3.90	4	7.72	3.82	95.50
		8	12.81	8.91	111.38
		12	16.20	12.30	102.50
2	5.42	4	9.90	4.48	112.00
		8	13.64	8.22	102.75
		12	18.22	12.80	106.67

2.3.4 重复性试验: 用同一份血清样本, 重复测定 10 次, 结果为 $(4.02 \pm 0.17) \mu\text{mol/L}$, $\text{CV} = 4.23\%$.

2.3.5 干扰试验: 按实验方法测得血清 LPO 含量为 $3.18 \mu\text{mol/L}$, 分别加入下列物质测定荧光强度, $-5\% \leq \text{相对误差} \leq 5\%$, 下列物质不干扰测定: 葡萄糖 (16.65 mmol/L), 胆固醇 (8.44 mmol/L), 甘油三酯 (4.52 mmol/L), 胆红素 (0.06 mmol/L), 蛋白质 (20 g/L), Hb (600 mmol/L). 当加入 Hb 1000 mg/L 时可产生 12% 的正干扰, 因此标本应避免溶血.

2.3.6 荧光强度稳定性: 测定管和标准管按实验方法读取第一次荧光强度读数后, 每隔 15 min 测定一次荧光强度, 结果在 120 min 内荧光强度保持稳定, 24 h 仅有轻微降低.

2.3.7 正常参考值: 测定了 30 例正常成年人 (男 20 例, 女 10 例), 血清 LPO 含量为 $(3.97 \pm 0.76) \mu\text{mol/L}$, 与多数文献报道的在 $5 \mu\text{mol/L}$ 以下相符^[1,2].

3 讨 论

八木的 TBA 微量荧光法^[1,4,5]须用磷钨酸使 LPO 随蛋白质一起沉淀, 将沉淀部分与酸性 TBA 共煮形成 MDA-TBA 复合物, 用正丁醇提取后, 以 $\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 553 \text{ nm}$ 定量. 此法操作复杂、预处理时间长, 且方法中所用正丁醇具有强烈刺激性气味, 对人体健康有一定危害. 1987 年, Wong 等^[6]报道用 HPLC-分光光度法测定血浆 LPO 含量, 血浆样本直接与稀磷酸和 TBA 混合, 100°C 水解 60 min, 用甲醇沉淀血浆蛋白质, 形成的 MDA-TBA 复合物经 HPLC 分离后, 在分光光度计上以 532 nm 波长比色测定. 此法无需预处理, 且避免了正丁醇对人体的危害, 但 HPLC 所用仪器昂贵, 难以推广应用. 1990 年, 向荣等^[3]对 TBA 比色法测定血清 LPO 进行了改进, 预处理过程与八木法相同, 反应终止后, 省去了正丁醇提取过程, 离心后的上清液直接进行比色测定, 测定结果与用正丁醇提取的测定结果无明显差异. 我们在上述方法的

基础上, 经反复试验, 发现血清在冰醋酸存在的条件下, 直接与 TBA 混合, 100°C 加热 60 min, LPO 水解释放的 MDA 可充分与 TBA 形成复合物, 在反应终止后, 用甲醇沉淀蛋白质并减少非特异性干扰, 可省去预处理和正丁醇提取或 HPLC 分离等环节, 使操作过程大为简化, 且避免了正丁醇的危害. 实验表明本法操作简便、快速, 结果准确, 荧光稳定, 干扰因素少, 可满足科研和临床需要.

本法具有灵敏度高、特异性好、方法快速等优点, 因此对实验用水的纯度和玻璃仪器的清洁度要求较高, 实验用水必须为双蒸水, 玻璃仪器必须经 50% 的硝酸除荧光, 否则, 空白测定值较高, 干扰测定.

参 考 文 献

- 1 魏明竟. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1984; 5 (1): 6
- 2 钟顺福, 胡文尧, 冯 驰. 临床检验杂志, 1986; 4 (3): 129
- 3 向 荣, 王鼎年. 生物化学与生物物理进展, 1990; 17 (3): 241
- 4 余嘉丽, 奚为乎, 蔡 蕾等. 中华医学检验杂志, 1987; 10 (1): 24
- 5 王振华, 许绍辉. 上海医学检验杂志, 1991; 6 (4): 201
- 6 Wong S H Y, Knight J A, Hopter S M *et al.* Clin Chem, 1987; 33 (2): 214
- 7 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓等. 荧光分析法, 第二版. 北京: 科学出版社. 1990: 8~10

Improvement of the Thiobarbituric Acid Fluorescence Analysis of Serum Lipoperoxides. Zhang Xiuming, Yan Lijuan, Chai Jiankai, Zhou Weiqiang, Wang Lixia. (Department of Laboratory, Psychiatric Hospital of Henan Province, Xinxiang 453002, China).

Abstract The thiobarbituric acid (TBA) fluorescence spectrophotometry of lipoperoxides (LPO), at present used for research, has been improved. This assay of serum LPO involves a hydrolysis in a diluted glacial acetic acid solution at 100°C for 60 min and the hydrolysis product

malondialdehyde (MDA) forms complex with TBA. The methanol precipitation of serum proteins reduces non-specific interference. The fluorescence intensity of the MDA-TBA complex is measured at excitation wavelength 515 nm and emission wavelength 550 nm. The method is simple, rapid, accurate and steady. The fluores-

cence intensity is positively correlative to the LPO concentration in the range of 0 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$. The minimum detection limit is 0.16 $\mu\text{mol/L}$. The average recovery rate is 105.08%. Precision (CV) is 4.23%.

Key words lipoperoxides, fluorescence, spectrophotometry

高效液相色谱测定微量胆固醇氧化产物

董 军 陈文祥 李健斋

(卫生部北京老年医学研究所, 北京 100730)

摘要 介绍一种高效液相色谱测定胆固醇氧化产物的方法, 以苯甲酰氯为衍生剂, 将胆固醇及其氧化产物衍生成苯甲酸酯, 反相高效液相色谱分离, 紫外检测, 内标法定量. 本法灵敏度高, 重现性好, 可应用于胆固醇纯度标准物质的杂质分析及血清中的胆固醇氧化产物测定.

关键词 胆固醇, 胆固醇氧化产物, 高效液相色谱

胆固醇遇光、热、氧等会发生自氧化(非酶氧化), 已报道的胆固醇氧化产物多达几十种, 其中最常见有 7-酮胆固醇、7 β -羟基胆固醇、5 α , 6 β -二羟基胆固醇、5 α , 6 α -环氧胆固醇、25-羟基胆固醇和胆甾烯酮等^[1]. 它们在胆固醇中的水平随胆固醇贮存条件和时间变化而变化. 血清胆固醇测定标准化需制备高纯度的胆固醇作血清胆固醇测定的原始标准(胆固醇纯度标准物质), 在此过程中, 胆固醇氧化产物是需除去的杂质. 原料选择, 纯度鉴定及稳定性考察时均需测定胆固醇氧化产物. 另外, 胆固醇氧化产物也存在于人体内, 且与胆固醇代谢与动脉粥样硬化(AS)有密切的关系^[2]. 因此测定胆固醇氧化产物在 AS 的防治研究中也有重要应用价值. 国外报道的高效液相色谱(HPLC)方法中, 一般只能在较短波长检测具有弱紫外吸收的成分, 不能测定无紫外吸收的 5 α , 6 α -环氧胆固醇和 5 α , 6 β -二羟基胆固醇^[3,4], 由于灵敏度低, 需要用薄层层析或柱层析进行预分离, 去除样品中的胆固醇, 浓缩胆固醇氧化产物, 不仅样品量大, 操作烦

琐, 特异性和回收率也受到影响. 同位素稀释-气相色谱-质谱法是一种较为理想的方法^[5], 但由于费用昂贵, 难以在国内应用. 我们用化学衍生法将胆固醇氧化产物衍生成具有较强紫外吸收的苯甲酸酯, 提高了检测灵敏度, 改善了分离条件, 直接测定几种常见的氧化产物, 效果良好.

1 材料与方法

1.1 试剂

胆固醇氧化产物 7-酮胆固醇, 5 α , 6 β -二羟基胆固醇, 5 α , 6 α -环氧胆固醇, 7 β -羟基胆固醇和 25-羟基胆固醇为 Sigma 产品, 胆甾烯酮为本室制备, 内标 6-氯胆甾醇由胆甾醇合成^[6], 甲醇、乙腈为浙江黄岩化工实验厂色谱纯产品, 衍生剂苯甲酰氯及其他化学试剂均为分析纯产品.

1.2 标本

胆固醇标本为卫生部老年医学研究所生化