2 Market C L. Isozymes. New York: Academic Press, 1975: 1～4

3 Pierre W, Elizabeth A W, Andrew D H. Plant Physiol, 1986; **82**: 753

A Simple, Economical and Specific Staining Method for Isozymes in PAGE. Yang Kai (*Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing* 100081, China); Shang Zhonglin (*Department of Biology, Hebei Normal University, Shijiazhuang* 050016, China).

Abstract A simple and economical staining method for isozyme is described. Filter paper (treated with 0.4% agarose) was soaked in isozyme staining solution for half an hour and was used to stain the isozymes after PAGE, then move the gel and filter paper to a covered plastic box. The staining time would be longer than normal. After staining, put the gel and filter paper into fixing solution and remove the filter paper with tweezers carefully.

Key words isozyme, PAGE, specific staining method

比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基

贾之慎 邬建敏 唐孟成

(浙江农业大学无机及分析化学教研室，杭州 310029)

摘要 Fenton 反应产生的羟自由基能与水杨酸生成羟基化产物 2, 3-二羟基苯甲酸，用比色法测定其含量能间接测定羟自由基的生成量. 通过对测定条件的研究，得到最佳的测定方案. 可作为一种简便的筛选羟自由基清除剂的方法.

关键词 羟自由基，Fenton 反应，比色法，水杨酸

在生物体内，需氧代谢的氧化还原反应所产生的羟自由基，可以引发不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应，并损伤膜结构及功能[1]. 羟自由基的检测对于自由基的生物作用研究有重要意义.

在研究自由基时，反应体系可通过水的辐解、光解以及化学反应来产生羟自由基，Fenton 反应是最常见的化学反应[2]，总反应可用下式表示：

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$$

Fenton 反应产生的羟自由基通常通过气相色谱法和电子自旋共振捕集技术测定[3]，但因仪器昂贵、操作也较复杂，一般实验室难以进行.

羟自由基易攻击芳环化合物产生羟基化合物，Halliwell[4]提出了在羟自由基体系中加入水杨酸，用比色法测定其羟基化产物——2, 3-二羟基苯甲酸. 此法已应用于测定次黄嘌呤-黄嘌呤体系[5]、还原型谷胱甘肽-过氧化氢体系[6]、烟酰胺嘌呤磷酸二核苷酸-过氧化氢体系[7]、抗坏血酸-过氧化氢体系[8]以及水的辐射体系[9]产生的羟自由基.

本文研究了通过比色法测定水杨酸羟基化产物来测定 Fenton 反应产生的羟自由基的实验条件.

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

芦丁（生化试剂，上海试剂二厂出品），槲皮素（色谱纯，Fluka Chemie AG 公司出

收稿日期：1995-06-30，修回日期：1995-11-20

品)，其余均为分析纯试剂．试剂用去离子水配制．721 分光光度计（上海第三分析仪器厂制造）．

1.2 方法

1.2.1 羟自由基的产生：在 10 ml 刻度具塞试管中加入 10 mmol/L 水杨酸 0.5 ml，0.4 mol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液 3 ml，3.8 mmol/L Fe（Ⅱ）的 EDTA 溶液 0.5 ml，加入 4 mmol/L 的 H_2O_2 1 ml 启动反应，于 25℃ 恒温水浴中放置 90 min.

1.2.2 羟自由基的测定：加 6 mol/L HCl 结束反应，再加入 0.5 g NaCl，滴加去离子水至 6 ml 刻度处，混匀．加入冷的乙醚 4 ml，充分混匀，静置后移取上层乙醚 3 ml 于 10 ml 刻度离心管中．将离心管置于 40℃ 恒温水浴中，将乙醚蒸发至干．加入 10% 三氯乙酸 0.15 ml，10% 钨酸钠 0.25 ml，0.5% $NaNO_2$（每天配置）0.25 ml，放置 5 min 后，加入 1 mol/L KOH 0.25 ml，滴加去离子水至 4 ml 处，混匀，于 510 nm 处测定其吸光度 A_o.

1.2.3 羟自由基清除率的测定：在 1.2.1 的体系中加入一定量的清除剂，按 1.2.2 的方法测定吸光度 A_s，按下式计算.

$$清除率 = \frac{A_o - A_s}{A_o} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 水杨酸浓度的影响

加入不同体积的 10 mmol/L 水杨酸，测得吸光度见表 1.

表 1 水杨酸对·OH 生成的影响

水杨酸体积	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
水杨酸最终浓度/mmol·L^{-1}	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
A_{510} 1)	0	0.305±0.011	0.405±0.018	0.55±0.02	0.60±0.02	0.66±0.021

1) $\bar{x} \pm s$, $n = 5$.

在没有水杨酸存在时，不产生 2，3-二羟基苯甲酸，吸光度为零，说明反应最终的有色产物是由水杨酸产生的羟基化产物，水杨酸浓度为 0.4～1 mmol/L 时，已产生足量的羟基化产物供分光光度计测定.

2.2 Fe（Ⅱ）浓度的影响

加入不同体积 3.8 mmol/L Fe（Ⅱ）的 EDTA 溶液，反应后测得吸光度见表 2.

表 2 Fe（Ⅱ）对·OH 生成的影响

Fe（Ⅱ）体积/ml	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Fe（Ⅱ）最终浓度/mmol·L^{-1}	0	0.076	0.152	0.228	0.304	0.380
A_{510} 1)	0	0.305±0.011	0.405±0.02	0.55±0.03	0.60±0.02	0.66±0.022

1) $\bar{x} \pm s$, $n = 5$.

当 Fe（Ⅱ）的浓度为零时，吸光度为零，没有二羟基苯甲酸生成，这表明没有痕量 Fe（Ⅱ）存在，就不能启动 Fenton 反应来产生·OH．当 Fe（Ⅱ）浓度为 0.152～0.380 mmol/L时，已产生足量的二羟基苯甲酸以供测试.

2.3 H_2O_2 浓度的影响

加入不同体积的 4 mmol/L 的 H_2O_2，反应后测得吸光度见图 1.

吸光度随着 H_2O_2 浓度的增大而增大，这表明 H_2O_2 的量和 Fenton 反应产生的·OH 量成正比，H_2O_2 是产生·OH 的必要条件.

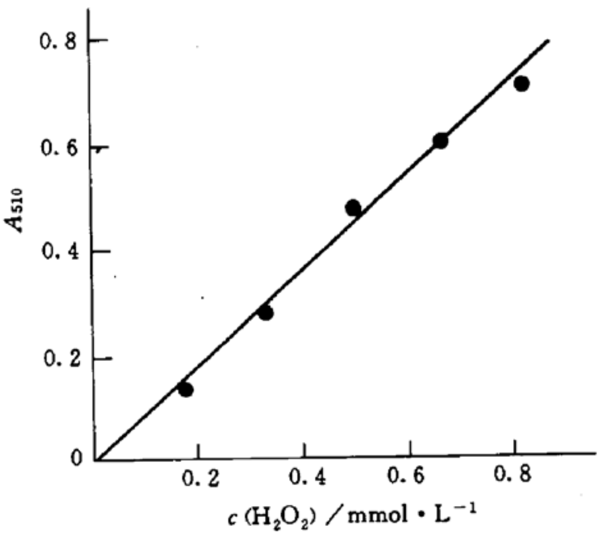
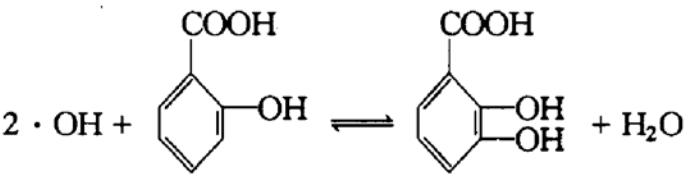


图 1 H_2O_2 浓度对·OH 生成的影响

2.1、2.2 和 2.3 的结果表明二羟基苯甲酸是由 Fenton 反应产生的·OH 与水杨酸反应而产生的，本体系的主要原理是：

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$$



2.4 反应的时间

·OH 的寿命很短（$<10^{-4}$ s），浓度很低（$<10^{-8}$ mol/L），因此要有足够的反应时间，使不断产生的·OH 与水杨酸反应，直至有足够的二羟基苯甲酸产生．在不同的反应时间，测定吸光度，结果见表 3．反应 1 h 后即有足量的二羟基苯甲酸产生，而且产物稳定，吸光度值在 1 h 内保持不变．

表 3 反应时间对·OH 生成的影响

反应时间/min	15	30	45	60	90
A_{510}[1)]	0.20 ±0.01	0.30 ±0.015	0.41 ±0.02	0.84 ±0.02	0.84 ±0.021

1) $\bar{x} \pm s$, $n=5$.

2.5 芦丁、槲皮素清除·OH 作用的测定

芦丁、槲皮素清除 Fenton 反应产生的·OH的作用已被电子自旋共振法证实[3]．在本实验体系中，加入一定量的芦丁、槲皮素．结果表明芦丁、槲皮素对·OH 均有较好的清除作用（表 4），与文献报道结果一致．

表 4 芦丁、槲皮素对·OH 的清除作用

	$c/\mu mol \cdot L^{-1}$	A_{510}[1)]	清除率/%
·OH 生成组		0.530 ± 0.02	
加芦丁	4	0.150 ± 0.012	71.70
	8	0.076 ± 0.01	85.66
	12	0.061 ± 0.012	88.49
	16	0.045 ± 0.015	91.51
加槲皮素	4	0.180 ± 0.012	66.04
	8	0.166 ± 0.013	68.68
	16	0.155 ± 0.010	78.30
	20	0.085 ± 0.010	83.77

1) $\bar{x} \pm s$, $n=5$.

以上实验表明本体系能产生·OH，并能用来研究对·OH 的清除作用．该方法简便实用，易为一般实验室采用．因此本体系的建立对筛选清除·OH 的天然抗氧化剂，研究清除自由基的机理有一定的应用价值．

参 考 文 献

1 Slater T F. British Journal of Cancer, 1987; **55**: 5
2 Packer L. Methods in Enzymology, 1984; **105**: 209
3 陈雨亭，李小洁，赵保路．生物物理学报，1989; **5** (3): 235
4 Halliwell B. FEBS Lett, 1978; **92**: 321
5 Richmond R, Halliwell B. Chauhan J. Anal Biochem, 1981; **118**: 328
6 Rowley D A, Halliwell B. FEBS Lett, 1982; **138**: 33
7 Rowley D A, Halliwell B. FEBS Lett, 1982; **142**: 37
8 Rowley D A, Halliwell B. Clin Sci, 1983; **64**: 649
9 Gray J, Mower H F. Food Chemistry, 1991; **41**: 293

Colorimetric Determination of Hydroxyl Radicals from Fenton Reaction. Jia Zhishen, Wu Jianmin, Tang Mengcheng (*Teaching Group of Inorganic and Analytic Chemistry*, *Zhejiang*

（下转封三，Continued on inside back cover）

·· Song Xuewen, Zhao Chong, Zhou Ren *et al*. (169)
The key technique in urea-gradient electrophoresis ··
································ Zhou Junxian, Wang Xicheng, Zhang Yanling *et al*. (172)
Improvement of the thiobarbituric acid fluorescence analysis of serum lipoperoxides ········
···································· Zhang Xiuming, Yan Lijuan, Chai Jiankai *et al*. (175)
Determination of several cholesterol autoxidation products by high performance liquid chromatography ································ Dong Jun, Chen Wenxiang, Li Jianzhai (179)

Exchange Experiences

A simple, economical and specific staining method for isozymes in PAGE ····················
·· Yang Kai, Shang Zhonglin (183)
Colorimetric determination of hydroxyl radicals from fenton reaction ························
·· Jia Zhishen, Wu Jianmin, Tang Mengcheng (184)

Medical Biochemistry

Studies on the measurement of lactate dehydrogenase isoenzyme Ⅰ activities by using automatic analyzer ···························· Li Guojun, Tian Yaping, Dong Zhennan (187)

(上接第 186 页, Continued from page 186)

Agricultural University, *Hangzhou* 310029, China).

Abstract Hydroxyl radicals from Fenton reaction can react with salicylate to form 2,3-dihydroxybenzoate. The quantitative analysis of hydroxyl radicals can be done through the colorimetric determination of 2,3-dihydroxybenzoate. The determination condition has been studied and a best determination program has been obtained. The test indicated that hydroxyl radicals from this system could be scavenged by reutin and quercitin. This system can be used as a convenient method for the selection of hydroxyl radical scavenger.

Key words hydroxyl radical, Fenton reaction, colorimetry, salicylate