

ΔE 值分别为 32.7、33.2、31.2、32.0 和 33.5 mV. 其相对标准偏差 (RSD) 为 2.9%. 说明传感器重现性良好.

2.7 共存物质的影响

在试验条件下, 对 8.6×10^{-5} mol/L 的 TG 溶液加入适当的干扰物质, 按实验方法进行电位测定, 相对误差不大于 $\pm 5\%$ 时, 下列物质的允许量 (mg) 分别为: 葡萄糖 (1 800), 尿素 (600), 天冬氨酸 (1 330), D、L-亮氨酸 (1 310), NaCl (58.5), CaCl_2 (27.8), 甘油 (126).

2.8 稳定性和使用寿命

酶传感器使用完后, 浸入 pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 于 4℃ 冰箱中保存. 每隔一定时间测量其响应性能, 25 d 后其响应性能基本不变.

3 样品中甘油三酯含量测定

本文报道的甘油三酯酶传感器具有制作简单, 使用方便, 抗干扰性好的特点, 克服了现行化学法操作繁琐、费时和酶法受游离甘油干扰的缺点. 应用该传感器测定了人和兔血清中的甘油三酯含量, 同时按文献 [4] 法进行对照实验和样品加标回收实验. 结果见表 2.

表 2 样品中甘油三酯含量测定结果

样品	测定值 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD / %	文献[4]测定值 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率 / %
人血清 1 号	0.645	4.6	0.779	98.3
人血清 2 号	0.473	5.4	0.573	96.5
兔血清 1 号	0.220	5.6		110.3
兔血清 2 号	0.230	3.6		98.3

注: $n=4$.

参 考 文 献

- 1 Ikuhiro M, Sadao H, Ryo F, *et al.* Error detection of high concentrations of endogenous free glycerol in determination of serum triglyceride with the TBA-80S automated discrete analyzer. Clin Chem, 1992, **38** (7): 1376~ 1377
- 2 Keith N F, Sandy M H. Do enzymatic analyses of serum triglycerides really need blanking for free glycerol. Clin chem, 1991, **37** (7): 1301
- 3 Elin R J, Ruddel M, McClean S. The variability of the glycerol concentration in human serum. Clin Chem, 1983, **29** (6): 1174
- 4 朱忠勇. 实用医学检验学. 北京: 人民军医出版社 (Zhu Z Y. Practical Medical Laboratory Sciences. Beijing: People's Military Surgeon Press), 1992. 300~ 301

Preparation of Triglyceride Enzyme Sensor and Its Application. WANG Yong-Sheng, LI Gui-Rong, LÜ Chang-Yin, WAN Zai-Yang, LIU Chuan-Xiang (*Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China*).

Abstract A triglyceride enzyme sensor has been prepared by immobilizing lipase on pH glass electrode. The immobilized methods of lipase and the response characteristics of the sensor were studied. The linear range of detection is $3.09 \times 10^{-6} \sim 1.91 \times 10^{-3}$ mol/L for triglyceride with a slope of 32.7 mV/pC in the pH 8.5 Tris-HCl buffer solution at 37℃. The response time is 5~ 10 min. The sensor is relatively stable for 25 days. The sensor has been applied to the determination of triglyceride in serum with satisfactory results.

Key words triglycerides, biosensor, lipase, serum

盐藻 β -胡萝卜素异构体胁迫积累的 HPLC 研究*

王 勇 钱凯先

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

摘要 采用 HPLC 技术分析了盐藻在胁迫条件下积累 β -胡萝卜素异构体的规律. 结果表明: 胁迫条件增强, 有利于全反式异构体积累, 胁迫条件减弱有利于顺式异构体的积累. 即: 32℃, 10 000 lx, 18% 盐度积累的全反式异构体含量最多 (2.593 mg/L), 25℃, 自然光照射, 24% 盐度积累的顺式异构体含量最多 (0.630 mg/L); 顺式异构体种类及数量随不同的胁迫条件而不同, 25℃, 自然光照射, 24% 盐度, 培养 30 d 测到全反式异构体及 2 种顺式异构体, 32℃, 10 000 lx, 18% 盐度培养 30 d 测到全反式异构体及一种顺式异构体; 相同胁迫条件不同时间异构体积累也不同. 在 18% 盐度, 25℃, 10 000 lx 光照条件下, 0 d 只测到全反式异构体, 8 d, 19 d 分别测出全反式异构体及 2 种顺式异构体, 34 d 测到全反式异构体及一种顺式异构体.

* 国家自然科学基金 (39370360), 浙江省自然科学基金资助项目 (393208). 收稿日期: 1997-10-20, 修回日期: 1998-03-25

关键词 β -胡萝卜素, 异构体, 胁迫积累, 高效液相色谱
学科分类号 Q2251

β -胡萝卜素是光合作用的捕光辅助色素^[1], 并能保护光合作用的反应器不受光抑制. 这种光抑制是由于叶绿素被高光强辐射过度激活所产生^[2]. 当盐藻 (*Dunaliella salina*) 处于某种不利生长的条件 (即胁迫条件) 下, 出现乙酰辅酶 A 积累并导致 β -胡萝卜素合成和积累^[3]. 乙酰辅酶 A 是最初的底物前体, 经过四个阶段的反应合成 β -胡萝卜素. β -胡萝卜素异构化发生在分子合成过程中的早期, 即形成八氢番茄红素 (Phytoene) 时或在这之前, 在随后的去饱和及环化作用阶段不发生异构化^[4]. β -胡萝卜素具有许多种分子异构体, 在结构上, 处于两端 β -环之间的碳链含有 9 个共轭双键, 理论上可有 272 种异构体, 但由于甲基的阻碍作用, 仅有 4 个不受阻碍的双键, 其异构体有 20 种左右. Zecheister^[5] 在 1962 年分析和报道了 12 种顺式异构体. 在植物中, 生物合成的 β -胡萝卜素是全反式和顺式立体异构体的混和物^[6]. β -胡萝卜素顺式异构体能猝灭生物体内化学活性很高的自由基, 从而降低因自由基诱发的过氧化作用, 具有延缓衰老的功能^[7]. 混和物中其顺式异构体含量越多, 则功效越强. 因此探索利于积累顺式异构体的适宜胁迫条件是本实验的目的.

1 材料与方法

1.1 实验材料

杜氏盐生藻 (*Dunaliella salina* Teodoresce, 简称盐藻) 由中国科学院青岛海洋研究所提供.

1.2 主要仪器与试剂

Waters 高效液相色谱分析系统 (HPLC)、Shimadzu UV-240 紫外可见分光光度计、OLYMPUS 光学显微镜、R-201 旋转蒸发器、层析柱 (1 cm $\times$ 20 cm)、恒流泵、-20 $^{\circ}$ C 低温冰箱、石英电子照明自动器 (HWX-832B 型)、自制盐藻生长反应装置、YNZ-15-50 液氮罐等. β -胡萝卜素标样 (纯度 > 97%), 正己烷、二氯甲烷、三氯甲烷等均为分析纯.

盐藻培养液: 在每升 15% NaCl 溶液中含有下列元素: N (27×10^{-6} g), P (6.2×10^{-6} g), K (7.7×10^{-6} g), C (142.9×10^{-6} g), Fe (0.5×10^{-6} g), B (0.1×10^{-6} g), Zn (0.02×10^{-6} g), Mo (0.21×10^{-6} g), Cu (0.02×10^{-6} g), Co ($0.004 \times$

10^{-6} g), Mn (0.01×10^{-6} g), pH 调至 7.5.

1.3 盐藻生长反应装置和胁迫条件

实验装置一: 自制玻璃水槽, 规格为: 45 cm (长) $\times$ 25 cm (宽) $\times$ 27 cm (高), 每只水槽中安装自动控温电热棒一支, 用小型空气泵通过槽底砂芯均衡水温. 水槽上方装有 15 支平等排列的 40 W 日光灯和 24 只 100 W 白炽钨丝灯, 并用风扇散热. 日光灯组合光强为 3 000 lx. 日光灯加上钨丝灯组合的光强为 10 000 lx. 用石英电子照明自动控制 (HWX-832B 型) 对 CJ10-10 型交流接触器进行控制通断整个工作电路. 从而控制所有光源, 达到自动控制光照与黑暗周期.

实验装置二: 与实验装置一基本相同, 不同之处是用自然漫光代替人造光源.

胁迫条件: 选择光强, 温度、盐度三因子为胁迫因子.

光强: 二种光强, 室内自然光 (以下简称自然光); 10 000 lx 光强.

温度: 二种温度, 25 $^{\circ}$ C; 32 $^{\circ}$ C.

盐度: 三种浓度, 18%, 21%, 24%.

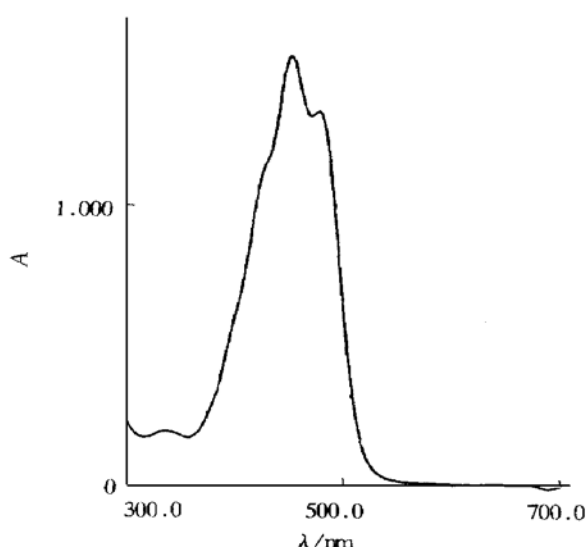
1.4 β -胡萝卜素的提取和萃取

取藻液 70 ml, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 加入 80% 丙酮 20 ml 磨藻泥并移置分液漏斗中, 充分摇匀, 静止片刻, 待液相分层后将上层色素提取液吸入 250 ml 三角烧瓶中, 按上述方法再重复提取一次, 合并色素提取液. 加正己烷 40 ml 进行萃取. 在 30~35 $^{\circ}$ C 水浴中旋转蒸干萃取液^[8].

1.5 β -胡萝卜素的检测

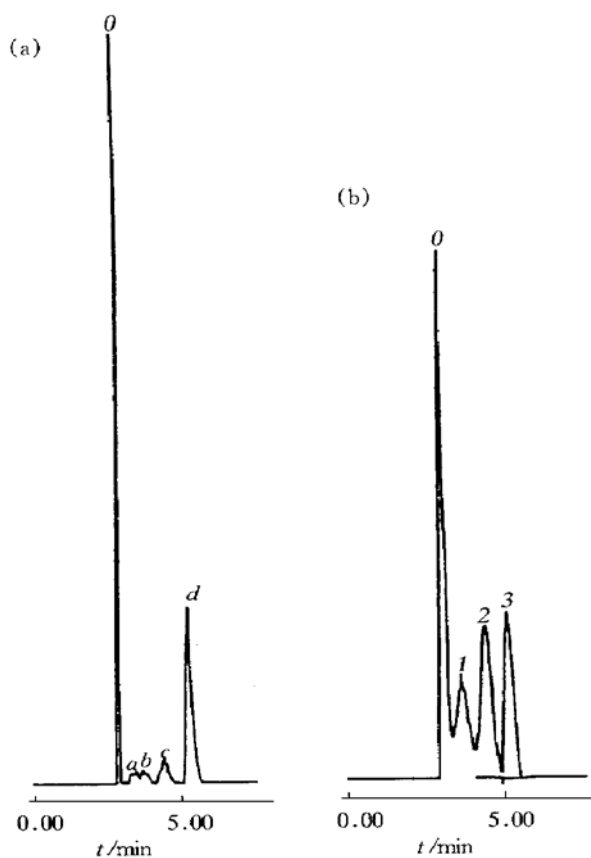
向萃取后的色素中加入二氯甲烷 1 ml. 充分溶解后上柱 (1 cm $\times$ 20 cm). 经中性氧化铝 (100~200 目) 柱层析. 用二氯甲烷洗脱, 速度 4 ml/min, 由于 β -胡萝卜素分离带移动较快, 首先被洗脱下来, 收集样品并定容至 10 ml. 取少量样品用 Shimadzu UV-240 紫外分光光度计检测 300~700 nm 的吸收峰 (图 1).

从盐藻 UV-Vis 光谱图看: 在 540~700 nm 段无吸收峰, 说明没有叶绿素干扰, 在 454 nm~480 nm 段有明显的吸收峰, 其最大吸收峰在 454 nm 和 480 nm, 紫移 2 nm, 在 339.7 nm 处有一小吸收峰. 这说明盐藻 β -胡萝卜素是混和型, 包括全反式和顺式异构体^[9].

图1 盐藻 β -胡萝卜素 UV-Vis 吸收光谱 (300~ 700 nm)

1.6 β -胡萝卜素 HPLC 分析

采用 Waters HPLC 分析系统进行分析, 外标法 (method 04) 定量, 最小峰面积 100. 洗脱条件

图2 β -胡萝卜素 HPLC 图谱

(a) β -胡萝卜素标准样品. 0: 溶剂峰; a, b, c: β -胡萝卜素顺式异构体; d: β -胡萝卜素全反式异构体. (b) 盐藻 β -胡萝卜素. 0: 溶剂峰; 1, 2: β -胡萝卜素顺式异构体; 3: β -胡萝卜素全反式异构体.

为, 甲醇: 氯仿= 60: 40 (V/V), 流速为 1 ml/min, 色谱柱为: 250×4.6C₁₈柱 (Nucleosi 7 μ m).

图 2a 是 β -胡萝卜素标准样品 HPLC 图谱, 其中 0 峰为溶剂峰, a 峰 RT 为 3.515 min, b 峰 RT 为 3.724 min, c 峰 RT 为 4.472 min, 三个峰为 β -胡萝卜素顺式异构体, d 峰 RT 为 5.280 min, 为全反式异构体.

图 2b 是盐藻积累 β -胡萝卜素 HPLC 图谱, 其中 1 峰 RT 为 3.643 min, 2 峰 RT 为 4.504 min, 分别与图 2a 中的 b 峰, c 峰接近, 说明盐藻 β -胡萝卜素中含有 2 种顺式异构体, 而 3 峰 RT 为 5.199 min 与 d 峰接近, 是全反式 β -胡萝卜素. 因此, 实验中观察到至少 3 种异构体, 即全反式异构体和 2 种顺式异构体.

2 结果与讨论

2.1 不同条件下 β -胡萝卜素异构体的积累

盐藻分别培养在盐度为 18%, 21%, 24% 的三种培养液中, 置于 25℃ (昼夜温差 1~2℃), 自然光照射条件下, 培养 30 d, 进行 HPLC 分析, 然后将光强增至 10 000 lx, 温度调整至 32℃ (昼夜温差 1~2℃) 培养 10 d 再进行 HPLC 分析, 分别得到图 3 和图 4.

从图 3 可见, 全反式异构体的积累在 25℃, 自然光条件下, 随着盐度的增加而增加, 当胁迫因子光强和温度分别增高到 10 000 lx 和 32℃ 时, 积累情况发生变化, 18% 盐度中积累全反式量 (2.596 mg/L) > 24% 盐度中 (0.950 mg/L) > 21% 盐度中 (0.031 mg/L), 而且 18% 盐度中积累全反式异构体有显著变化.

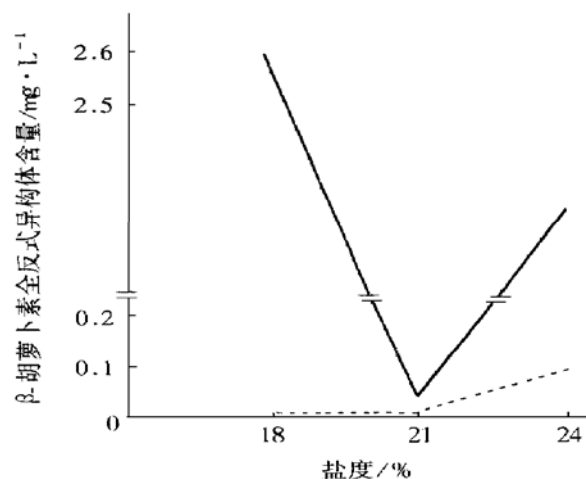


图3 全反式异构体积累图

—: 32℃, 10 000 lx 光强; - - -: 25℃, 自然光照射.

从图 4 可见, 在 25℃, 自然光条件下, 24% 盐度中的顺式异构体 (0.630 mg/L) > 18% 盐度中 (0.345 mg/L) > 21% 盐度中 (0.018 mg/L), 增加光强, 温度 (10 000 lx, 32℃) 后, 不利于顺式异构体积累. 即: 除 18% 盐度中, (0.337 mg/L → 0.354 mg/L) 稍有增加外, 24% 盐度中 (0.086 mg/L → 0.038 mg/L), 21% 盐度中 (0.210 mg/L → 0.018 mg/L) 均呈下降趋势.

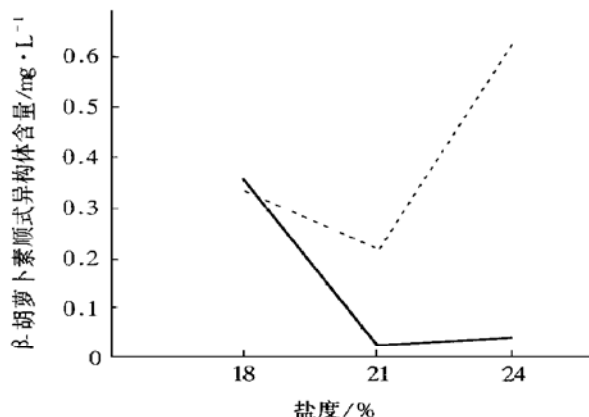


图 4 顺式异构体积累图

—: 32℃, 10 000 lx; ---: 25℃, 自然光照射.

结果表明: 胁迫条件增强有利于全反式异构体积累. 胁迫条件减弱有利于顺式异构体的积累. Ben-Amotz (1988 年)^[4] 也报道: 改变光强, 或增加盐度改变温度都会导致 9 顺式与全反式之间的比率发生改变. 这与我们的结果相符.

2.2 顺式异构体的种类随不同胁迫条件而不同

在盐度为 24%, 光强为自然光, 温度 25℃ 条件下, 培养 30 d 后经 HPLC 检测, 得到 3 种异构体 (图 5a); 在盐度为 18%, 光强为 10 000 lx, 温度 25℃ 条件下, 培养 34 d 后经 HPLC 检测, 得到 2 种异构体 (图 5b). 所以, 不同胁迫条件下培养的盐藻积累的异构体种类不同. 刘建国等实验得到盐藻积累 β -胡萝卜素 6 种异构体.

2.3 顺式异构体随不同时间而不同

在盐度为 18%, 温度 25℃, 光强 10 000 lx 条件下, 不同培养时间中, 异构体的积累情况也不同. 在 0 d 只测出全反式异构体, 8 d, 19 d 时, 分别测出三种异构体, 到 34 d 只测出 2 种异构体 (图 6).

由此可见: 顺式异构体的积累波动性较大, 不同的胁迫条件可得到不同的异构体.

分析其原因, 我们认为: 其一: 顺式异构体对

光较敏感, 顺式异构体氧化比全反式异构体更容易^[10]. 其二: 提取过程对顺式异构体影响比较大. Zechmeister 指出: β -胡萝卜素色素的异构化在非极性溶剂中比在极性溶剂中要大些. 我们的提取萃取液是非极性溶剂.

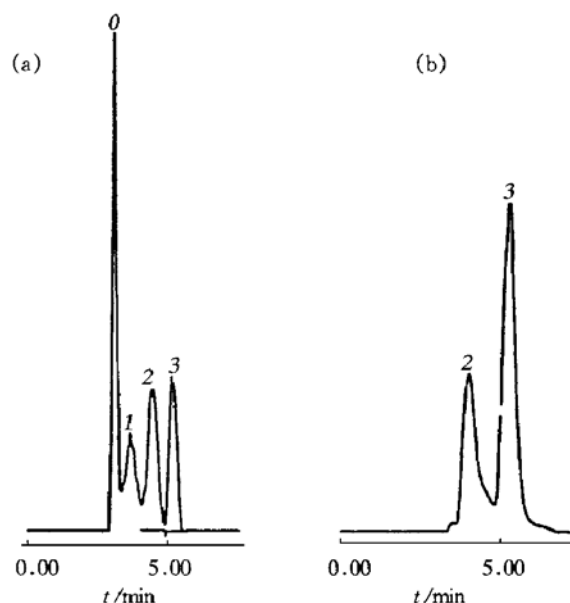


图 5 不同胁迫条件下盐藻 β -胡萝卜素的 HPLC 图谱
(a) 盐度为 24%, 光强为自然光, 温度 25℃, 培养 30 d;
(b) 盐度为 18%, 光强为 10 000 lx, 温度 25℃, 培养 34 d;
0: 溶剂峰, 1, 2: 顺式异构体, 3: 全反式异构体.

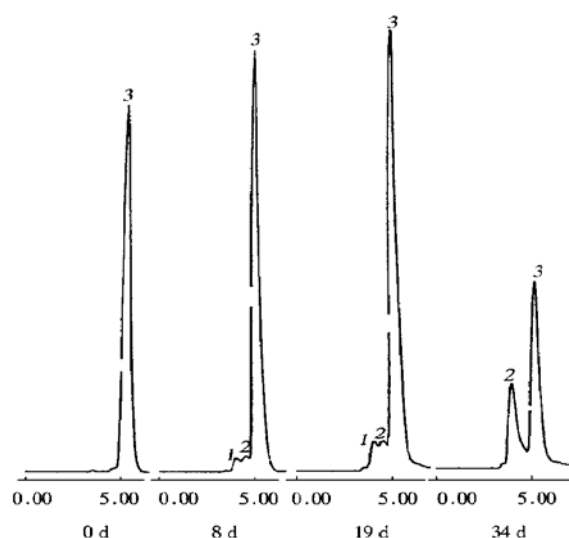


图 6 相同胁迫条件不同培养时间 β -胡萝卜素积累情况
1, 2: 顺式异构体; 3: 全反式异构体.

对 β -胡萝卜素异构体积累只是初步的探讨, 还有许多问题有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Cogdell R. The function of pigments in chloroplasts. In: Goodwin T W ed. Plant Pigments. London: Academic Press, 1988, 183 ~ 230
- 2 Kvinsky N I. Mechanism of inactivation of oxygen species by carotenoids. In: Simic M G, Nygaard O ed. Anticarcinogenesis and Radiation Protection. New York: Plenum Press, 1988, 4~ 46
- 3 Loeblich L A. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and Salinity in the halophilic *D. salina* (chlorophyta). J Mar Biol Ass UK, 1982, **62**: 493~ 508
- 4 Ben-Amotz A, Lers A, Avron M. Stereoisomers of carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol, 1988, **86**: 1286~ 1291
- 5 Zecheister L. *Cis-trans* Isomeric Carotenoids Vitamins A and Arglpolyenes. New York: Academic Press, 1962, 46~ 57
- 6 Ben-Amotz A, Avron M. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. Trends Biotechnology, 1990, **8**: 121 ~ 126
- 7 Ibrahim K, Jafferey N A, Zuberi S J. Plasma Vitamin A and Caroten levels in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. Clin Oncol, 1997, **3**: 203~ 207
- 8 刘建国, 赵学武, 王玉君, 等 (Liu J G, Zhao X W, Wang Y J, et al). 胁迫条件下盐藻 β -胡萝卜素及其异构体积累的研究——盐度的影响. 海洋与湖沼 (Oceanologia et limnologia Sinica), 1994, **25** (1): 71~ 77
- 9 Goodwin T W. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. New York: Academic Press, 1976. 209~ 219
- 10 Jimenez C, Pick U. Differential Reactivity of β -Carotene isomers from *Dunaliella bardawil* Toward Oxygen Radicals. Plant Physiol, 1993, **101**: 385~ 390

Using HPLC to Investigate the Dynamic Rule of Accumulating β -Carotene Isomers in *Dunaliella salina* Under the Special Stress Conditions. WANG Yong, QIAN Kai-Xian (Department of Biological

Sciences and Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China).

Abstract The method of high performance liquid chromatography (HPLC) was used to analyse the dynamic rule about accumulating β -carotene isomers in *Dunaliella salina* under the special stress conditions. The results show: 1. The strength of stress conditions is advantageous to accumulate *trans*-isomer, otherwise, decreasing the stress conditions advantage to accumulate *cis*-isomers. For example, under the conditions of 32 °C with light intensity 10 000 lx, salinity 18%, the amount of *trans*-isomer is most (2.593 mg/L), but the *cis*-isomers amount is most (0.630 mg/L) under 25 °C, indoor-nature light and salinity 24%. 2. The kind and amount of *cis*-isomers are different when the stress conditions are changed. After being cultured 30 days, *trans*-isomer and two *cis*-isomers were obtained under 25 °C, indoor nature light salinity 24%, but only *trans*-isomer and one *cis*-isomer were obtained, when 32 °C with 10 000 lx light intensity and salinity 18%. 3. Even though the stress conditions is the same, it is different of the isomers' kind and amount only when culturing time is changed. For example: under the conditions of 25 °C 10 000 lx, 18% salinity, only *trans*-isomer was found before culturing, after 8 days and 19 days, *trans*-isomer and two *cis*-isomer, after 34 days, *trans*-isomer and one *cis*-isomer were found.

Key words β -carotene isomer, high performance liquid chromatography (HPLC), β -carotene

淋巴细胞凋亡与 p53 蛋白表达关系的研究*

钟叔平

(汕头大学医学院生物化学教研室, 汕头 515031)

摘要 培养 B95-8 细胞, 分离 EB 病毒, 转染外周血和扁桃体淋巴细胞, 建立永生化的 LCLs 和 TLCL 细胞株; 带有 wt P₅₃ 基因的 LCLs 在 DNA 损伤剂——顺铂处理前未检出 p53 蛋白, 经顺铂处理后, LCLs 随作用时间延长细胞存活率明显下降、p53 蛋白水平升高、DNA 电泳显出梯状带; 含 mt P₅₃ 基因的淋巴瘤细胞在顺铂处理前可检出高浓度的 p53 蛋白, 经顺铂处理后, 细胞存活率与 p53 蛋白并无明显改变。这些结果表明: 顺铂引起细胞 DNA 损伤、激活 wt p53 蛋白的表达、继而 wt p53 蛋白又促进了 DNA 损伤细胞凋亡。

* 广东省高教厅自然科学重点资助项目 (1996-32); 李嘉诚科研基金资助项目 (9602)。

收稿日期: 1997-12-01, 修回日期: 1998-02-23