

基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯 (Plant Physiology Communications), 1990, (6): 55~57

**A Spectrophotometer Method Testing Oxygen Radicals.** XIAO Hua Shan, HE Wen Jin, FU Wen Qing, CAO Hong-Yun, FAN Zi Nan (Biotechnology College of Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China).

**Abstract** A spectrophotometer method was used to test oxygen radicals produced by a system of ammonium

persulphate and tetramethylethylenediamine (AP-TEMED). The reaction of hydroxylamine and  $O_2^-$  produced  $NO_2^-$  and then developed by sulphanilic acid and  $\alpha$ -naphthylamine. The results indicated that there was a special absorption at 530 nm when the sample was tested by spectrophotometer, and its color responsiveness showed a quantitative relation to  $O_2^-$ . Otherwise, ascorbic acid as a matter deleted oxygen radicals had a significantly quantitative relation too.

**Key words** oxygen radicals, AP-TEMED, test

## 山羊小腔卵泡 DNA 含量的荧光分析\*

李 键

(四川省畜牧科学研究院, 成都 610066)

康靖全 周 乐 王建辰

(西北农业大学动物医学系, 杨陵 712100)

**摘要** 用显微手术法剥离山羊 3 mm 以下完整小腔卵泡, 用胶原酶和 Triton X-100 进行处理, 选用荧光试剂 4, 6-二脒基-2-苯吲哚 (4, 6-diamidino-2-phenylindole 2HCl, DAPI), 对其 DNA 含量进行分析. 结果表明, 山羊 3 mm 以下卵泡的 DNA 含量与卵泡直径相关性极显著 ( $r=0.9824 > 0.7800 = r_{0.01}, n=12$ ). 该法可测定 5 ng 的 DNA. 提示该法在卵泡生长发育的研究中具有重要应用价值.

**关键词** 荧光分析, DNA, 卵泡, 山羊

**学科分类号** S827.3, S814.6

由于 DNA 含量与细胞数量相关性极显著<sup>[1]</sup>, 所以在组织培养中经常通过测定 DNA 含量来估测细胞数量<sup>[1~4]</sup>. 尤其象卵泡这类组织, 无法对其进行细胞计数, 测定其 DNA 含量就成为研究其细胞增殖活动的重要手段. 但用常规方法测定 DNA 含量, 样品的制备、提取、分离步骤十分繁琐, 并且灵敏度低, 还容易受到蛋白质和 RNA 的干扰. 所以本试验中尝试用荧光分析法测定山羊小腔卵泡 DNA 含量.

### 1 材料与方 法

#### 1.1 主要试剂及其配制

199 培养基 (M199) 为 GIBCO 公司产品; Hepes、丙酮酸钠、小牛胸腺 DNA、4, 6-二脒基-2-苯吲哚 (4, 6-diamidino-2-phenylindole 2HCl, DAPI)、Triton X-100、胶原酶 (Collagenase, Type I) 均为 Sigma 公司产品; 犊牛血清 (NCS) 为本室自制.

Dulbecco's PBS: 按文献 [5] 配制.

卵泡剥离液: M199 中含 20 mmol/L Hepes、2.2 g/L  $NaHCO_3$ 、2 mmol/L 丙酮酸钠、100 mg/L 链霉素、100 000 IU/L 青霉素、5% NCS, pH 7.4.

DNA 测定缓冲液: 含 100 mmol/L NaCl、10 mmol/L Tris 和 10 mmol/L EDTA. 用 1 mol/L NaOH 调 pH 7.0.

#### 1.2 主要仪器

连续变倍实体显微镜: Olympus SZH 型; 荧光分光光度计: 日立 850 型.

#### 1.3 卵巢采集

手术法摘除山羊卵巢, 卵巢摘除后放到盛 25~35℃ 灭菌 PBS 的保温瓶中, 1 h 以内送至实验室.

#### 1.4 卵泡剥离

将采回的卵巢于 37℃ 卵泡剥离液中清洗 3 次,

\* 国家自然科学基金资助项目 (39470519).

收稿日期: 1997-12-04, 修回日期: 1998-03-24

剔除脂肪及黄体组织, 于卵泡剥离液中, 在实体显微镜下用眼科显微器械剥离直径小于 3 mm 的完整小腔卵泡。

### 1.5 样品制备

每个卵泡分别用 0.25 ml 胶原酶液 (200 IU/ml) 于 38.5℃ 消化 4 h (每隔 1 h 漩涡振荡 1 min), 然后加入 0.25 ml 0.4% Triton X-100, -20℃ 保存。

DNA 标准液用小牛胸腺 DNA 配制, 使其最终浓度为 0~320 μg/L。0.25 ml 标准液中加入 0.25 ml 0.4% Triton X-100, -20℃ 保存。

### 1.6 测定

测定前先将样品和标准液在室温下放置 20 min, 然后离心 (5 000 g, 6 min)。取上清液 0.4 ml, 加入 2 ml 测定缓冲液、0.5 ml DAPI (200 μg/L H<sub>2</sub>O), 用荧光分光光度计于 372 nm 激发光和 450 nm 发射光下测定荧光强度。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 标准曲线

在 0~320 μg/L 的 DNA 浓度范围内, DNA 浓度与荧光强度相关相极显著 (图 1)。标准曲线回归方程为  $r = 0.0165 + 3.0478 \times 10^{-3} X$ ,  $r = 0.9991$ 。该法可测定 5 ng 的 DNA。

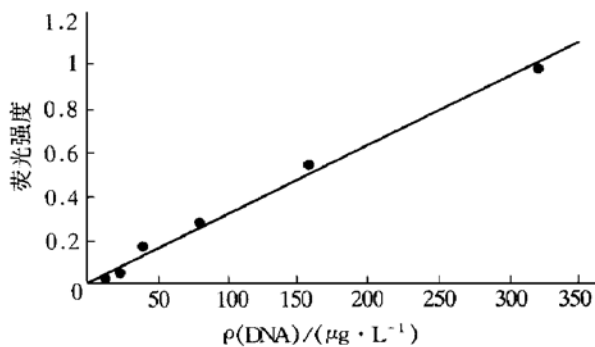


图 1 DNA 测定标准曲线

### 2.2 小腔卵泡 DNA 含量

50 个 0.67~2.67 mm 山羊小腔卵泡 DNA 含量的测定结果见表 1。

统计分析表明, 山羊 3 mm 以下卵泡 DNA 含量与卵泡大小相关性极显著 ( $r = 0.9824 > 0.7800 = r_{0.001}$ ,  $n = 12$ )。其关系见图 2。

表 1 山羊 3 mm 以下卵泡 DNA 含量

卵泡直径/mm	DNA 含量/(ng/个)	卵泡数
0.67	27.09 ± 8.31	2
0.93	83.28 ± 24.54	3
1.07	90.36 ± 32.48	8
1.20	98.07 ± 32.69	7
1.33	148.65 ± 49.55	3
1.47	147.74 ± 39.55	4
1.60	168.22 ± 32.28	6
1.73	221.73 ± 49.94	4
1.87	234.45 ± 46.38	5
2.00	251.01 ± 37.48	3
2.13	230.19 ± 54.16	3
2.67	384.29 ± 10.33	2

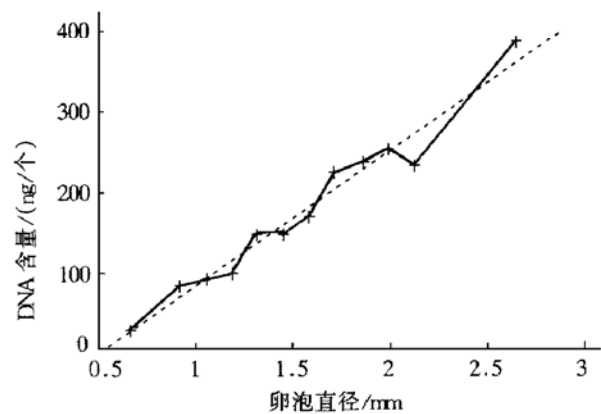


图 2 山羊小腔卵泡直径与 DNA 含量的关系

## 3 讨论

小腔卵泡处于卵泡的快速生长期, 这一时期卵泡颗粒细胞的增殖活动十分活跃。本试验发现, 卵泡 DNA 含量随着卵泡直径的增大而增加, 正是颗粒细胞增殖活动的客观反应。小腔卵泡 DNA 含量与卵泡直径相关性极显著, 说明卵泡 DNA 含量的测定可以成为判断卵泡颗粒细胞增殖活动的重要依据。

荧光试剂 DAPI 与 DNA 双链中 A-T 碱基对具有很高的亲和力, 二者结合后发出荧光, 荧光强度可在特定的发射光波长和激发光波长条件下用荧光分光光度计检测。对 DNA 含量进行荧光分析, 测定方法的灵敏度比其他测定方法高 10 倍以上<sup>[1]</sup>, 而且特异性强, 可避免蛋白质和 RNA 的干扰。结合酶及表面活性剂的应用, 方法简便、快捷。用该

法测定卵泡 DNA 含量, 目前仅见测定腔前卵泡 DNA 的报道<sup>[6]</sup>. 我们在此基础上发展了完整小腔卵泡 DNA 含量的荧光分析法, 可以测定 5 ng 的 DNA, 这在卵泡生长发育的研究中具有重要应用价值.

### 参 考 文 献

- 1 West D C, Sattar A, Kumar S. A simplified in situ solubilization procedure for the determination of DNA and cell number in tissue cultured mammalian cells. *Anal Biochem*, 1985, **147** (2): 289~295
- 2 Downs T R, Wilfinger W W. Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue. *Anal Biochem*, 1983, **131** (2): 538~547
- 3 Wilkins R J, Kearney J T. Fluorometric assay for DNA deposited on filters. *Anal Biochem*, 1984, **136** (2): 301~308
- 4 Roy S K, Greenwald G S. Quantitative analysis of *in vitro* incorporation of (<sup>3</sup>H) thymidine into hamster follicles during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 1986, **77** (1): 143~152
- 5 Hafez E S E. *Reproduction in farm animals*. 5th. Philadelphia: LEA & FEBIGER, 1987, 616
- 6 Nuttinck F, Mermillod P, Massip A, *et al.* Characterization of

*in vitro* growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. *Theriogenology*, 1993, **39** (4): 811~821

**Fluorometric Assay for DNA in Goat Small Antral Follicles.** LI Jian, KANG Jin-Quan, ZHOU Le, WANG Jian-Chen ( *Department of Veterinary Sciences, North West Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100, China* ).

**Abstract** Intact goat small antral follicles were dissected from ovaries by a micro-surgical method. The follicular DNA content was estimated by a fluorometric method using the fluorochrome, 4, 6-diamidino-2-phenylindole 2HCl ( DAPI ). Significant positive correlations were found between the follicular diameters and follicular DNA contents in follicles smaller than 3 mm ( $r = 0.9824 > 0.7800 = r_{0.001}$ ,  $n = 12$ ). It suggested that this method of DNA assay would have great application value in study on follicular growth and development.

**Key words** fluorometry, DNA, follicle, goat

## 液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 质子泵活性的荧光测定\*

王欢 祝雄伟 王延枝<sup>1)</sup>

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

**摘要** 使用荧光猝灭法测定植物液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 质子转运活性. 比较了两种常用荧光染料吖啶橙和喹亚因在不同浓度的测定灵敏度. 探讨了不同蛋白量和缓冲系统对测定结果的影响. 得到了用 5 μmol/L 吖啶橙, 200~250 μg 蛋白质含量, HEPES-Tris (pH 7.0) 为缓冲介质, ATP-Na 为底物的最适体系.

**关键词** 液泡膜, H<sup>+</sup>-ATPase, 泵活性, 荧光猝灭法

**学科分类号** Q73.035

植物液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 在植物细胞内离子平衡的调节中具有重要作用<sup>[1]</sup>. 用荧光猝灭法<sup>[2]</sup>测定质子泵活性灵敏而快捷. 常用于测定液泡膜 H<sup>+</sup>-ATPase 泵活性的荧光染料有吖啶橙 (acridine orange)<sup>[3,4]</sup> 和喹亚因 (quinacrine)<sup>[5]</sup> 等.

一般来说, 植物材料的 V 型 H<sup>+</sup>-ATPase 活性较低, 测定其泵活性的难度大. 我们对两种荧光染料和不同测定体系进行比较研究后, 筛选出一种灵敏度高、方便可行的泵活性测定方法. 测定效果较以前有较大提高, 且结果稳定, 与国外的测定水平<sup>[3~6]</sup> 相当或更好.

### 1 材料与方 法

#### 1.1 试剂

BTP (1, 3-bis [tris (hydroxymethyl) methylamino] propane), 山梨醇 (sorbitol), 吖啶橙 (acridine orange), 喹亚因 (quinacrine), 短杆菌肽 D (gramicidine) 为 Sigma 公司产品, ATP 钠盐为 Serva 公司产品, 其他试剂均为国产分析纯.

\* 国家自然科学基金资助项目 (39570434).

<sup>1)</sup> 通讯联系人.

收稿日期: 1998-01-07, 修回日期: 1998-07-13