DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.01.030

生物组织中LPO的荧光测定

王 涛 汪江淮 陈惠孙 （野战外科研究所）

近年来的研究表明，脂质过氧化物（Lipid Peroxides，简称LPO）在休克、创伤、器官缺血及缺血／再灌流损伤、白内障等病理过程中均起着重要作用[1]。因此，测定体内LPO的水平对于了解自由基与疾病的关系有着一定的意义。

目前，组织和血清LPO的测定大多采用硫代巴比妥酸荧光法[2][3]，本文介绍采用三氯甲烷-甲醇混合液抽提，以硫酸奎宁为标准荧光强度的另一种生物组织中LPO的荧光测定方法。

测定原理[4][5]

LPO的分解产物丙二醛的羰基可与含有氨基的物质产生分子内或分子间交联，形成荧光产物，又称共轭希氏碱（Conjugated Shiff Base，N－C＝C－C＝N），此类荧光产物有脂溶性、水溶性和非溶性三种，其中脂溶性荧光产物主要为丙二醛与磷脂分子中丝氨酸或乙醇胺的交联物，该脂溶性荧光产物经三氯甲烷-甲醇混合液抽提后，即可在相应的最大激发波长和发射波长处测定其荧光强度。

材料

1．试剂

三氯甲烷-甲醇混合液：三氯甲烷（AR），甲醇（AR），临用前按2:1比例配制。

硫酸稀释液（0.1N）：硫酸（AR），按常规方法配制。

硫酸奎宁标准液（1μg/ml）：称取硫酸奎宁1mg(Sigma CO)，加入0.1N硫酸稀释液1000ml，4℃保存。临用前按1ml硫酸奎宁标准液加入2ml 0.1N硫酸稀释液配制。

2．仪器

岛津RF-520型荧光分光光度计。

3．动物

Wistar种大白鼠，性别不拘，体重230±15g，禁食12h，自由饮水。

方法

1．操作步骤

参考Fletcher[4]和陈瑗[5]方法并加以改良。动物放血致死，取心、肝、肾、肺、肠组织，准确称重各器官组织各150mg，剪碎，至玻璃匀浆管内迅速磨至无块状物，加入三氯甲烷-甲醇混合液2ml，在YQ-3型匀浆机上匀浆1min，再用三氯甲烷-甲醇混合液2ml洗涤匀浆管后并入，45℃水浴10min后用强紫外线照射3min，加入重蒸水4ml，旋涡混合器混匀1min，3000rpm离心15min，吸取三氯甲烷层1ml至三氯甲烷-甲醇混合液2ml中，总体积为3ml。

2．测定条件

分别扫描心、肝、肾、肺、肠各组织丙二醛脂溶性荧光产物的激发光和发射光光谱，以确定其最大激发波长和发射波长。各组织LPO的测定波长见表所示。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

各种组织LPO的测定波长

测定波长	心	肝	肾	肺	肠	标准
最大激发波长 (nm)	350	353	345	350	355	355
最大发射波长 (nm)	435	485	475	465	460	445

测定时激发光和发射光的狭缝放在10nm处，放大倍数为50。吸取硫酸奎宁标准液1ml至硫酸稀释液2ml中作为标准荧光强度，三氯甲烷-甲醇混合液3ml作为空白对照。

3．计算

$$\text{LPO (nmol/g湿重组织)} = \frac{m}{S} \quad \frac{C}{W} \cdot b$$

这里m和S分别为测定管和标准管的荧光读数，C为标准管浓度，W为测定样品湿重，b为稀释倍数系数。

讨　论

1．用本文介绍的改良后荧光测定方法对同一份心肌组织待测液重复测定10次，所得批内变异系数为2.59%。Fletcher等[4]的研究亦表明该方法重复性好，准确性高，而且灵敏度较硫代巴比妥酸法要高[6]。

2．Fletcher[4]法是在组织中直接加入三氯甲烷-甲醇混合液进行组织匀浆。我们的体会是按此操作很难匀浆，原因是组织蛋白变性，形成较大的凝块，组织不易打碎。我们采用先将组织剪碎在玻璃匀浆管内快速手工磨至无块状物，然后再加三氯甲烷-甲醇混合液在组织匀浆机上彻底匀浆。陈瑗[5]法是先加缓冲液匀浆后，再以三氯甲烷-甲醇混合液抽提，我们认为虽然用缓冲液组织易制成匀浆，但液体反复转移且不用三氯甲烷-甲醇混合液制成匀浆易造成误差。

3．抽提液中维生素A的量对测定值影响明显，尤其是肝组织中富含维生素A，且测定波长与肝组织LPO测定波长靠近（维生素A Ex：325～340nm，Em：475nm），因此在测定LPO前必须用强紫外线照射破坏维生素A，否则测定结果误差较大。

4．Fletcher[4]和陈瑗[5]法最终测定样品体积均为1ml，而我们所用岛津RF-520型荧光分光光度计需要的测定样品容积为3ml，因此我们在1ml三氯甲烷-甲醇抽提液中加入2ml三氯甲烷-甲醇混合液，相应的在1ml硫酸奎宁标准液中加入2ml硫酸稀释液。

5．本方法应用三氯甲烷-甲醇混合液抽提，测定生物组织中LPO的水平，较之目前常用的硫代巴比妥酸荧光法[2][3]不但操作简便，快速，而且测定试剂易得。

（荧光测定承蒙本所中心仪器室侯淦泉老师大力协助，特此致谢）。

参 考 文 献

1．汪江淮，陈惠孙。休克与自由基。人民军医 1988；2：17

2. Ohkawa H, et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95 (2):351～8

3. Yagi K. Assay for Blood Plasma or Serum. Methods Enzymol 1984; 105:328～331

4. Fletcher BL. et al. Measurement of Fluorescent Lipid Peroxidation Products in Biological Systems & Tissues. Anal Biochem 1973; 52:1

5．陈　瑗，等。受照射小鼠脾和小肠脂质过氧化作用的变化。第一军医大学学报 1983；3：461

6. Tappel AL, Free Radicals in Biology, vol 4, Academic Press. New York 1980:1

（收稿：1988.4.14；修回：1988.8.15）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net