DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.04.014

上易于凝集水珠，这可使杂交液的浓度和pH值发生改变。我们除了在滴加杂交液后加盖盖玻片外，并将切片放入铝盒中，密封后，再将铝盒放入蒸气浴中，防止了水汽凝集，取得了良好效果。

7．原位杂交实验出现假阳性，这是实验中遇到的最大困扰。我们经反复摸索，体会到试剂纯、缓冲液及各种配制液体pH的准确和所用主要试剂必须新鲜配制，这三点是保证防止假阳性出现的重要条件。

参 考 文 献

1. Burrell CJ, et el. Hepatology 1984; 4:20
2. Haase AT. J Histochem Cytochem 1986; 34:27
3. Leary JJ, et al. Pro Natl Acad Sci USA 1983; 80:4045
4. Lee GM, et al. Histochem J 1985; 17: 1221
5. Lawrence JB, Singer RH. Nucleic Acid Res 1985; 13:1777
6. 李奇芬，等。第三军医大学学报1988；1:14

（收稿：1987.7.21，修回：1988.5.1）

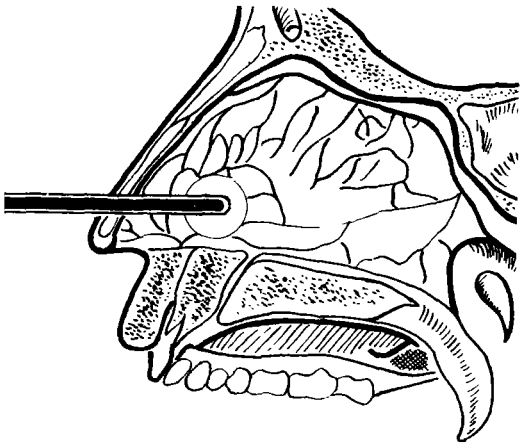
冷冻治疗鼻衄的技术改进

李伯贞 贺晓宁 裴 文 （第一附属医院 耳鼻喉科）

自1982年以来，我科在门诊应用液氮冷冻治疗鼻衄79例，由于在冷冻技术上加以改进，收到较满意的治疗效果。现报道如下：

冷冻治疗鼻中隔易出血区反复鼻衄的病例优于手术治疗。冷冻治疗简便易行，病人不仅可随到随做治疗，而且痛苦少，疗效好。但由于液氮冷冻探头多为圆杆状，与鼻中隔易出血区粘膜接触面很小，而鼻中隔易出血区粘膜下即是软骨和骨，当冷冻探头接触粘膜后难于固定，若稍一滑动即可造成粘膜损伤出血。为此，作者在冷冻区先放一块圆形直径约1 cm，厚约1 mm的小棉片，这样可使冷冻探头易于固定（见图）。这一方法上的改进提高了冷冻效果。一般冷冻40至90s为宜。在79例中，冷冻一次鼻衄痊愈者71例（89.9%），二次痊愈者6例（7.6%），三次痊愈者2例（2.5%）。经一至一年半随访结果，治愈率达96%。个别复发者可随时再冷冻治疗，疗效亦佳。

（收稿：1987.6.16，修回：1988.5.14）



图注：白色圆形区为小棉片，覆盖在易出血区表面，棉片之上为冷冻探头。

大白鼠肝线粒体细胞色素定量

董 燕 王松宝 陈宗荣 （卫防系 防原医学教研室）

JN Williams Jr于1964年报道了用差分光谱法测定鼠肝线粒体细胞色素含量[1]，并用回收实验证实了方法的可靠性。由于此法不需特殊仪器和试剂，且能同时定量四种细胞色素成份（a、b、c、C_1），所以直至近年，国外仍不断有人沿用此法，但国内尚少见报道。

我们在应用原法的基础上，对于测定的

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

某些影响因素进行了探讨，并加以适当的改进，同时测定了28只正常大鼠肝线粒体四种细胞色素含量的个体值，在对方法的精密度和线性关系的考察中也得到较满意的结果。由此说明，应用差分光谱法测定细胞色素含量，不失为一个较为准确、简便、可行的方法。

材 料 与 方 法

一、大鼠肝线粒体的制备和呼吸功能测定

Wistar种正常大鼠，体重200～300g，空腹过夜后断头活杀，立即取肝组织按Apprill法[2]制备线粒体。制备好的线粒体标本用Lowry氏[3]法测定蛋白含量，然后用氧电极测耗氧量，计算呼吸控制率（RCR）[4]。RCR为表达线粒体呼吸功能的灵敏指标，用此项指标可以检验制得的线粒体样本的质量。本文所述进行细胞色素定量的28只正常大鼠肝线粒体样本均先测定了RCR，其均值及标准差为：4.62±0.37，说明线粒体样本的制备质量是合格的。

二、肝线粒体细胞色素定量

1. 试剂

1）0.1mol/L磷酸盐缓冲液，pH7.4

2）20%去氧胆酸钠溶液

3）0.05mol/L抗坏血酸钠溶液（如没有抗坏血酸钠，可用NaOH中和抗坏血酸至pH 6～7，也可以取得同样效果。）

4）0.05mol/L高铁氰化钾溶液

5）固体连二亚硫酸钠（保险粉）

2. 仪器及测量条件

Beckman DU-7HS型紫外可见光扫描分光光度计。扫描速度：600nm/min，扫描范围：500～650nm，比色杯光径：1 cm。

3. 操作步骤

将制备好的线粒体稀释成10mg蛋白/ml，取此稀释样本3.6ml，加磷酸盐缓冲液(pH7.4) 1.44ml，再加20%的去氧胆酸钠溶液0.72ml和重蒸水0.72ml，混匀后在4℃、10 000×g离心30min，然后取上清液测定。分别向两个比色杯中各加入上清液2.7ml，向其中一个比色杯中加入高铁氰化钾溶液0.3ml，将此杯作为氧化杯，向另外一个比色杯中加入抗坏血酸钠溶液0.3ml，作为还原杯，分别混匀，静置1 min，再向还原杯中加入数粒固体连二亚硫酸钠，搅动至完全溶解后置2 min。以空气校正仪器零点，再以氧化杯为空白扫描还原杯，即可得到细胞色素的差分光谱曲线（见图）。

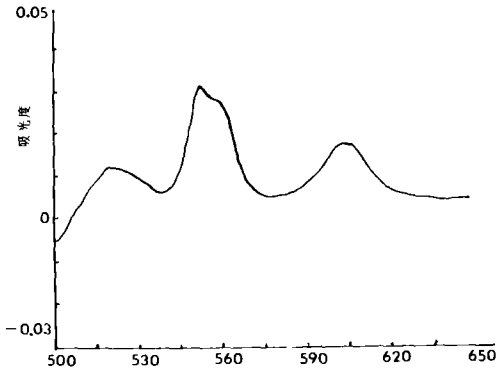


图 细胞色素定量差分光谱曲线图

分别读取535、540、554、563、577、605、630nm处的吸光值，代入公式计算。

4. 结果的计算

原文根据每种细胞色素的特异吸收光谱，通过回收、抑制试验等推导了以下的计算公式：

①$a_{15} = A_{550} - A_{535}$

$a_{25} = A_{554} - A_{540}$

$a_{35} = A_{563} - A_{577}$

$a_{45} = A_{605} - A_{630}$

注：A代表吸光值，A的角码数字代表波长。

式中a_{15}、a_{25}、a_{35}、a_{45}分别代表了细胞色素c、C_1、b、a的吸收光谱。然后继续代入下式计算：

②$b_{15} = a_{15}/21.0$

$c_{25} = (a_{25} - 6.51b_{15})/15.607$

$d_{35} = (a_{35} + 1.16b_{15} - 1.479c_{25})/13.794$

$^{*}e_{45} = (a_{45} + 0.22b15 - 0.698c25 + 0.19d_{35})/11.963$

〔$^{*}e_{45}$一式经用电子计算机解原方程，所得结果与原文略有不同。原文为：$e_{45} = (a_{45} + 0.22b_{15} + 0.482c_{25} - 0.076d_{35})/12.0$，以本文$^{*}e_{45}$公式计算的细胞色素a比原公式平均偏低约8%，其它成份的结果基本不变。〕

③$X_4 = e_{45}$ = 细胞色素a（μmol/ml比色液）

$X_3 = d_{35} + 0.0263X_4$ = 细胞色素b（μmol/ml比色液）

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

$X_2 = c_{15} - 0.0484X_4 - 0.2254X_3$ = 细胞色素C_1（μmol/ml比色液）

$X_1 = b_{15} - 0.4905X_2 + 0.1486X_3 - 0.03X_4$ = 细胞色素c（μmol/ml比色液）

然后将实验结果的单位换算成nmol 细胞色素/mg线粒体蛋白。

结　果

1. 正常大鼠肝线粒体细胞色素含量

我们测定了28只正常大鼠肝线粒体细胞色素含量，结果见(表1)。

Williams 对正常鼠肝线粒体细胞色素含量以"比率"形式进行了计算，Katyare[6]也于1977年以同一形式做了报道，现连同本文结果一并列于（表2）。

表1　正常大鼠肝线粒体细胞色素含量

细胞色素	$\bar{X}\pm SD$
a	0.171±0.031
b	0.230±0.010
C_1	0.143±0.013
c	0.175±0.021

单位：nmol/mg线粒体蛋白

表2　正常大鼠肝线粒体细胞色素比率

作　者	细胞色素 a	b	C_1	c
Williams	1	0.952	0.594	0.866 (1.460)
Katyare	1	1.35		(1.76)
本　文	1	1.345	0.836	1.023 (1.860)

本文所得的细胞色素b、C_1、c的比率均高于Williams报导值，这与前面所述因计算公式的差别导致本文所得细胞色素a偏低有一定关系。但本文所得值与Katyare报导的结果十分相近。

2. 精密度（双管重复性试验）

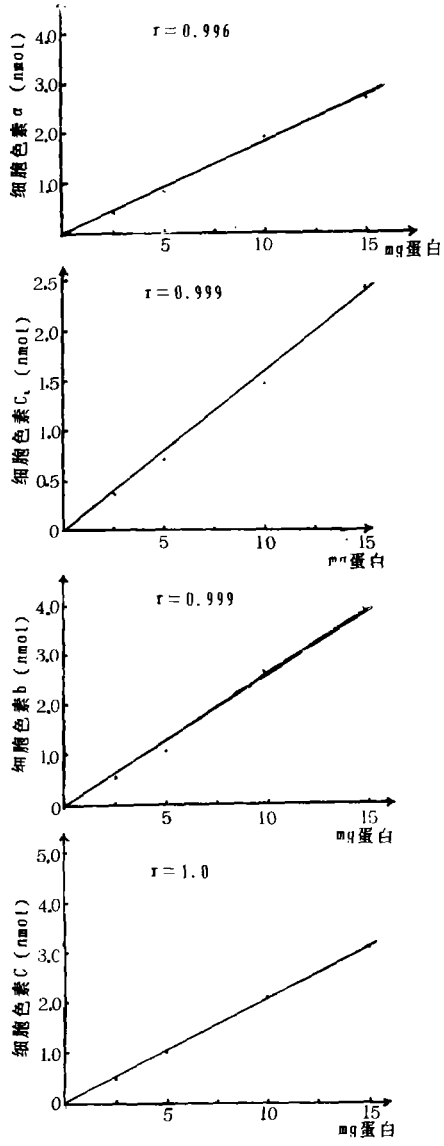
我们采用双管重复测定了11份不同线粒体样本，所得平均值、标准差和变异系数为见(表3)。

表3　11例样本重复性测定的平均值、标准差和变异系数

细胞色素	$\bar{X}\pm SD$	CV%
a	0.183±0.005	2.85
b	0.230±0.008	3.61
C_1	0.139±0.009	6.65
c	0.168±0.008	5.01

3. 细胞色素含量与线粒体蛋白含量的线性关系

我们分别用5 mg蛋白/ml、10mg 蛋白/ml、20 mg蛋白/ml和30mg蛋白/ml 的线粒体样本按前述步骤进行细胞色素定量。所得结果以线粒体蛋白为横座标，以细胞色素含量为纵座标，绘出曲线如下：



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

四种细胞色素含量与蛋白含量的相关系数值均为$|r|>r_{0.01}$ $P<0.01$ 相关非常显著。

讨　论

在实验中，我们根据测定结果易受以下几个因素影响的情况，采取了适当的改进措施：

1．线粒体样本的纯度：Apprill 法是依照差速离心原理来分离线粒体的，所得线粒体约有80±%的纯度，显然线粒体样本的纯度会直接影响细胞色素定量。例如血红蛋白即对测定有干扰作用。所以在制备肝匀浆以前，剪碎肝组织的过程中，应多次洗涤肝脏以除去残血，离心时要准确选用离心力和控制离心时间，制备线粒体的全过程要严格在低温条件下进行，注意保持各次制备条件的一致性，以保证制得的线粒体样本的纯度和质量。这是进行细胞色素定量的前提。

2．在细胞色素定量过程中增加离心的步骤：在定量时加入20%去氧胆酸钠溶液的作用是使线粒体膜溶解。如果样本的纯度差，则溶解后的液体易受其它杂质影响呈较明显的浑浊，即使纯度较好的样本，其经溶解后的液体也有轻度浑浊，且浑浊度随时间不同有变化，这就影响了被测溶液的稳定性和测量的重复性。为此，我们在加入20%去氧胆酸钠溶液后，增加了离心的步骤（4 ℃、10000×g、30min），可将不溶解物全部沉淀掉，得到完全清亮、稳定的上清液用以进行测定。我们对经过离心后的样本经第一次扫描测定后，间隔10min再进行第二次重复扫描，根据两次扫描所得差分光谱计算出的 a_{15}、a_{25}、a_{35}、a_{45}的数值基本完全重复（见表4）。

表4　重复扫描值的比较

细胞色素	吸光值差	
	第一次扫描	第二次扫描
a_{15}	0.0229	0.0229
a_{25}	0.0215	0.0219
a_{35}	0.0156	0.0162
a_{45}	0.0108	0.0104

说明经过离心后的被测溶液本身及其反应在一定时间内是稳定的，排除了未离心样本的浊度变化的干扰。

3．减少加样及加液的误差：此实验属于微量定量分析，有的细胞色素成份如细胞色素 a 的吸光值甚小，除了要求仪器要有较高的灵敏度和精密度外，还应尽量减少两个比色杯的加样误差。鉴于离心以前的加样、加液步骤两杯均是相同的，所以我们将原文中从一开始就分别分杯加样、加液，改为按两倍体积合并加样加液，待离心后再将上清液分杯测定。这样可以减少多次分别加样、加液的误差，既提高了测定的准确性，又简便了操作程序。

（本文所用计算公式经卫勤教研室许汝福同志帮助推导验证，特表感谢。）

（说明：本文所用计算公式②中“e_{45}”一式经推导与原文略有差别。本文所报细胞色素定量结果均按本文公式计算而得。）

参考文献

1. Williams, JN Jr. A method for the Simultaneous quantitative estimation of cytochromes a, b, C_1 and c in mitochondria. Arch Biochem Biophys 1964; 107:537～543
2. Apprill Jr, et al. Liver and skeletal muscle mitochondrial function following burn injury. J Trauma 1977; 17(4):279
3. Lowry OH, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol. Chem 1951; 193:265
4. 陈宗荣，等。放射复合烧伤时大白鼠肝线粒体呼吸功能障碍。创伤杂志 1986；2(1)：7～11
5. Katyare SS, et al. Effect of thyroid deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver. kidney. and brain mitochondria. Arch Biochem Biophys 1977; 182:155

（收稿日期：1988年1月5日，修回日期：1988年6月2日）

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