

技术与方法

一种测定 SOD 活力的新方法 ——碱性二甲基亚砷-鲁米诺化学发光法

赵琢道 黎 鳌 杨宗城 董燕麟*

(第三军医大学西南医院烧伤研究所, 重庆)

提 要

本文介绍一种测定 SOD (超氧化物歧化酶) 活力的新的碱性二甲基亚砷——鲁米诺化学发光法。用碱性二甲基亚砷作为产生 O_2^- 体系, 用鲁米诺作为指示 O_2^- 的化学发光剂, 观察了不同浓度的 NaOH、鲁米诺、pH、碱性二甲基亚砷加入量、测定时间及心绿染料对此法的影响。测定了山羊烟雾吸入伤后 SOD 活力和肺淋巴 SOD 清除量的变化。结果证明, 本法灵敏度高、特异性强、操作简便、方法稳定, 可快速、重复测定粗提取生物样品的 SOD 活力。

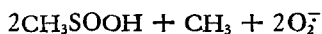
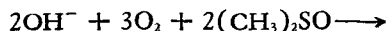
通常测定 SOD 活力用分光光度法(比色分析法)^[1-4]。近几年, 一些人^[5,6]应用化学发光法测定 SOD 活力, 与比色分析方法相比, 前者精确度和灵敏度高、省时间。

无论比色分析或化学发光分析, 都需产生超氧阴离子自由基 (O_2^-) 体系。一般多采用黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶、焦性没食子酸自动氧化等产生 O_2^- 体系^[1-6]。Hyland (1983)^[2]首次报道用碱性二甲基亚砷产生 O_2^- 体系, 用于比色法进行 SOD 活性分析, 但尚未见报道用碱性二甲基亚砷——鲁米诺化学发光体系测定 SOD 活力。

材 料 与 方 法

一、方法原理

NaOH (提供 OH^-) 加入二甲基亚砷 (DMSO), 在有氧条件下, 产生 O_2^- ^[7]:



O_2^- 进一步与化学发光剂鲁米诺 (5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-Phthalazinedione) 反应, 激发鲁米诺, 使其由基态变为激发态, 当其由激发态返回基态时, 就向外发出冷化学光, 此现象即为“化学发光”。因为 SOD 能清除 O_2^- , 抑制了鲁米诺的化学发光。根据发光的强度可测定出所测生物样品中 SOD 活力的变化。见图 1 所示。我们根据上述原理, 建立了测定 SOD 活力的“碱性二甲基亚砷-鲁米诺化学发光法”。

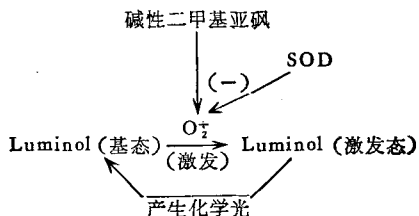


图 1 SOD 活性化学发光测定原理

* 本校训练部生物化学教研室

二、仪器与试剂

1. 液闪计数器

用液闪计数器测定鲁米诺发出的冷化学光,发光强度以光值(脉冲数 cpm)表示。

2. pH8.6 含 0.1mmol EDTA 的 0.2mol/L 磷酸缓冲液。

3. 碱性二甲基亚砷

5mmol/L NaOH 三蒸水溶液(应加的 1% 水量),加入 DMSO (A. R 级)溶液,即配制成内含 5mmol/L NaOH 及含 1% 水的碱性二甲基亚砷溶液。放置冰箱(4℃)备用或临用前 30 分钟配制。

4. 鲁米诺溶液

鲁米诺溶于 0.1mol/L 的 NaOH 溶液中,配制成 1×10^{-2} mol/L 浓度,置有色玻璃瓶存放,冰箱(4℃)保存备用。临用前用 pH8.6 0.2mol/L 的磷酸缓冲液将其稀释为 3×10^{-4} mol/L。

5. 标准 SOD 溶液

SOD 标准品,比活力 2400u/毫克蛋白。用 pH8.6 0.2mol/L 的磷酸缓冲液稀释为 1ng/ μ L 的溶液,放低温冰箱保存备用。

三、生物样品制备

1. 血样品

取动、静脉血 0.05ml(肝素抗凝),加入冷 pH8.6 0.2mol/L 的磷酸缓冲液(4℃) 0.95ml,使其溶血。再加入 0.5ml 无水乙醇和 0.25ml 的氯仿,并在漩涡式混匀器上快速、剧烈混匀。低温离心机(日本 Hitachi RPR20-3)(4℃) $18000 \times g$ 离心 60 分钟,去除血红蛋白。取上清液测其 SOD 活力。

2. 肺淋巴液样品

取肺淋巴液 0.1ml(肝素抗凝),加入上述磷酸缓冲液 0.9ml 后,以后的处理方法如同血样品制备。但要求样品混匀至乳白色,方可离心。取上清液测其 SOD 活力。

3. 肺组织样品

动物死亡或活杀后立即取出肺组织,称取 0.05 克,加入上述磷酸缓冲液 10ml,在 4℃ 下用组织研磨器研磨肺组织 2 分钟,制成 5% 肺组织匀浆。取此匀浆液 0.05ml,如同血样品制

备法处理,取其上清液用做 SOD 活力测定。

4. 肺灌洗液样品

开胸后马上扎闭气管,防止气管内容物溢出,再取出全肺。用 5ml 注射器连接内径 3—4mm 硅胶管,插入双肺内支气管,灌入 10ml 0.154mol/L NaCl 溶液,每次注入后在肺内停留 1 分钟,然后慢慢抽出灌洗液。以同样方法重复 3 次,所有灌洗液放入同一试管内混匀。取此灌洗液 0.1ml,如同肺淋巴液样品制备法处理,取上清液测 SOD 活力。

四、蛋白质的测定

用双缩脲法测定血浆、淋巴液、肺组织匀浆及肺灌洗液的总蛋白浓度。

五、SOD 活力测定及其计算

1. SOD 活力测定

(1) 先把标准 SOD 或粗提取的生物样品加入 3ml(高 4.1cm,内径 10mm)的有机玻璃瓶内,空白对照管加 pH8.6 0.2mol/L 磷酸缓冲液;在诸管内加入鲁米诺溶液(3×10^{-4} mol/L)1ml。置冰水浴 20 分钟。然后诸管内加入碱性二甲基亚砷溶液 0.5ml,快速混匀。最终反应体积 1.7ml, pH9.86。

(2) 将瓶盖紧,放入瓶底垫有 2cm 厚的海绵、20ml 的大闪烁杯内,立即将闪烁杯放入液闪计数器内测定。发光值以每分钟 cpm 表示,每次测定 1 分钟,连续测三次取其均值。

2. SOD 活力单位及肺淋巴 SOD 清除量的计算

(1) 标准曲线的制作

当此化学发光测定体系中有 SOD 存在时,发光强度下降。在一定条件下,反应体系中随着 SOD 浓度增加,发光强度值亦呈线性下降。以空白管发光值为 100%,可计算出加入 SOD 后抑制发光的程度,以抑制发光强度为纵坐标、SOD 浓度 (ng/ml) 为横坐标做图,便可得到图 2 的标准曲线。

(2) SOD 活力单位的计算

用抑制 50% 发光程度时的 SOD 值为一个活性单位,通常用符号 C_{50} 表示, C_{50} 的单位以 ng/ml 表示。

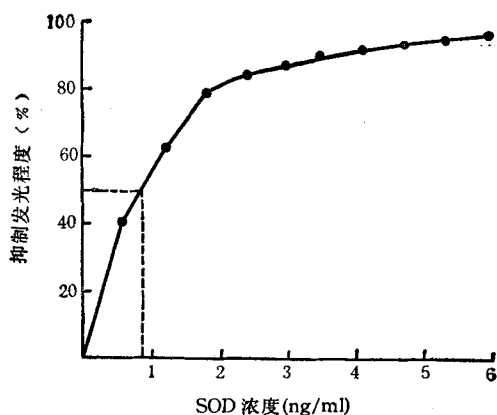


图2 SOD 对 Luminol 发光的抑制

可按下列公式计算出实测生物样品的 SOD 活性:

$$\text{SOD 活性 (U)} = \frac{\text{实测 SOD 含量 (ng/ml)}}{\text{标准曲线 } C_{50} \text{ 值 (ng/ml)}} \quad (1)$$

其结果再除以所测生物样品的总蛋白含量 (mg), 即得实测生物样品的 SOD 比活力 (U/毫克蛋白):

$$\begin{aligned} \text{SOD 比活力 (U/毫克蛋白)} \\ = \text{SOD 活性 (U)} / \text{蛋白含量 (mg)} \quad (2) \end{aligned}$$

(3) 肺淋巴 SOD 清除量的计算

为了更好地反映单位时间内肺淋巴活性氧总的变化, 我们设计出计算肺淋巴每小时 SOD 清除量的公式, 即首先计算出肺淋巴液中每毫克蛋白 SOD 含量 (ng/毫克蛋白), 然后求出每小时肺淋巴液中总的 SOD 含量, 也就是每小时肺淋巴 SOD 清除量 (ng/h):

$$\begin{aligned} \text{肺淋巴 SOD 清除量 (ng/h)} \\ = \text{肺淋巴 SOD 含量 (ng/毫克蛋白)} \\ \times (Q_L \times \text{肺淋巴蛋白浓度 (mg)}) \quad (3) \end{aligned}$$

Q_L : 每小时肺淋巴流量 (ml/h); 肺淋巴蛋白浓度: 毫克蛋白/ml。

结果与讨论

一、NaOH 加入量对发光强度的影响

固定鲁米诺浓度及 DMSO 的量, 随着 NaOH 加入量的增加, 发光强度最初呈线性增

加, 直到 NaOH 量达 4mmol/L 以后, 发光强度趋于稳定, 如图 3 所示。表明实验条件不变, 随着 NaOH 加入量的增加, O_2^- 的产生增加, 逐渐趋于饱和状态。

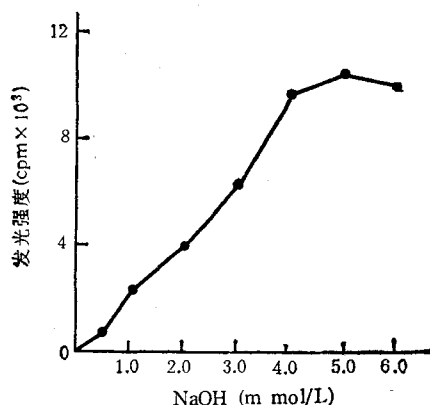


图3 NaOH 加入量对发光强度的影响

二、鲁米诺浓度对发光强度的影响

固定碱性二甲基亚砷加入量, 改变鲁米诺浓度, 发现发光强度随鲁米诺浓度的改变而变化。如图 4 所示, 当鲁米诺浓度为 0.3mmol/L 时, 发光强度逐渐趋于稳定状态。

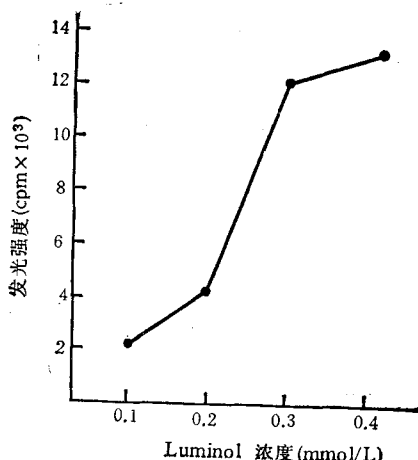


图4 Luminol 浓度对发光强度的影响

三、pH 对发光强度的影响

在本测定体系中, 其他条件不变, 如仅改变 0.2mol/L 磷酸缓冲液的 pH, 发光强度在 pH5.5~7.0 范围增加缓慢, pH7.5 开始增加迅速, 直到 pH8.5~9.0 时, 趋于稳定状态(图 5)。

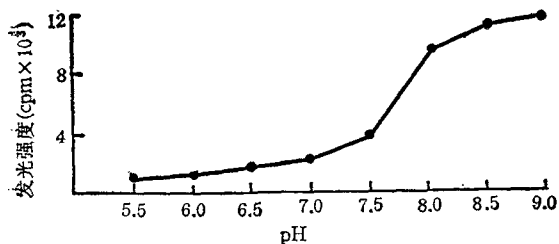


图5 pH对发光强度的影响

四、碱性二甲基亚砷加入量对发光强度的影响

如图6所示,固定鲁米诺浓度及其反应条件,改变碱性二甲基亚砷的加入量。发现发光强度在加入量0.1—0.3ml时,增加缓慢;0.3—0.4时开始增加迅速;0.4—0.6ml时处于稳定。这表明随着碱性二甲基亚砷加入量的增加, O_2^- 的产生也增加,并逐渐达到饱和状态。

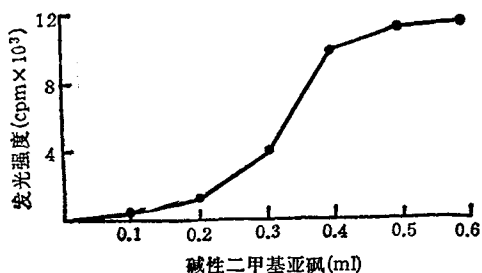


图6 碱性二甲基亚砷加入量对发光强度的影响

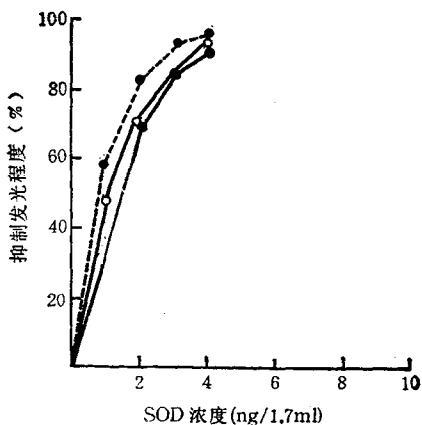


图7 时间对SOD活性分析的影响

—·— 立即测 ○—○ 30' 测 - - - 60' 测

五、时间对SOD活力分析的影响

如图7所示,实验条件不变,改变反应液的

测定时间。发现 C_{50} 值随时间的延长,逐渐缩小,表示测定灵敏度提高。此变化规律可能是由于,随着时间的延长,反应液中的 O_2^- 自动歧化及催化反应,结果导致 O_2^- 的稳态浓度降低,SOD的抑制能力相对增强。

为了控制测定时间、温度对SOD活力测定的影响,必须做到以下两点:①反应液中应保持稳态、饱和的 O_2^- 浓度,否则将得出错误的测定结果;②为了提高测定的灵敏度,我们采用冰水浴后,立即在室温条件反复、连续测定三次,取其平均值。结果证明能获得一个趋势好、 C_{50} 值稳定的反应曲线(图2)。

六、心绿染料对SOD活力测定的影响

本实验中用热-绿(心绿)染料双指示剂稀释法测定肺水。为了观察心绿染料是否对鲁米诺化学发光有干扰作用,是否对SOD活力测定有影响,我们在反应液中加入0.01ml心绿染料(2×10^{-3} mg心绿),测定其影响效应。如图8所示,将加入与未加入心绿染料的测定结果进行比较,发现两反应曲线的 C_{50} 值基本一致,变化规律也基本一致。这证明心绿染料对化学发光SOD活力测定无明显影响。

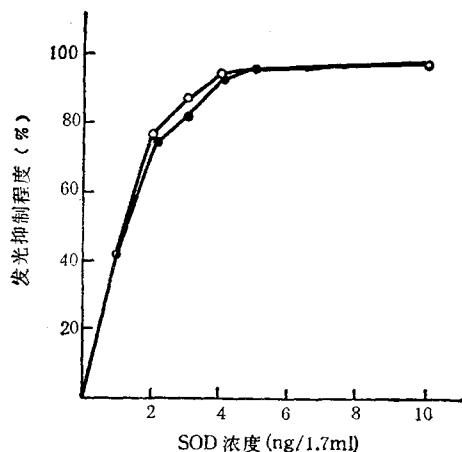


图8 心绿染料对SOD活性分析的影响

○—○ 加心绿染料 - - - 未加心绿染料

七、测定体系的稳定性

本测定体系的 C_{50} 值为1.4ng/1.7ml,如将 C_{50} 值换算为ng/ml表示,则为0.82ng/ml。但计算的SOD比活力值则均不变,为了应用方

介绍一种快速印迹杂交法

唐建清 邵国英 周丹宜 徐荣婷 陈诗书

(上海第二医科大学生物化学教研室)

提 要

本文介绍一种快速的细胞 mRNA 及 DNA 印迹法。本方法以细胞数为单位,将细胞破碎后在高浓度 NaI 存在的条件下直接点样于硝酸纤维滤膜上用于核酸的杂交。用本方法可以检测细胞中特异 mRNA 和 DNA 的含量,主要用于细胞中特异 mRNA 的半定量分析和不同细胞之间特异 mRNA 表达的比较,也适用于分析比较细胞接受各种刺激前后特异 mRNA 含量的变化。

用经典的 Northern Blot 或 Dot Blot 法测定细胞中特异 mRNA 含量时,需要提取细胞的 RNA 成份,分离出 PolyA 阳性的 RNA (主便,也可照 C_{50} 值 $1.4\text{ng}/1.7\text{ml}$ 计算。 C_{50} 值可重复测定的变异系数 (C. V%) 为 5.8%; 复管可重复测定的变异系数 (C. V%) 为 8.7%。表明本测定体系比较稳定。

八、肺淋巴液、血、肺组织匀浆及肺灌洗液 SOD 活力和肺淋巴 SOD 清除量的测定

我们用本测定体系测定了山羊烟雾吸入性损伤早期肺淋巴液、动、静脉血、肺组织匀浆及肺灌洗液粗提取样品的 SOD 活力和肺淋巴 SOD 清除量的变化,观察活性氧在烟雾吸入性肺损伤发生和发展过程中的作用,取得了满意的结果^[8]。

九、本测定体系的特点

1. 用液闪记数仪,可测出 O_2^- 激发鲁米诺所发出的微弱的化学冷光。通常依 C_{50} 值来判断测定的灵敏度,从 C_{50} 值看,本法的灵敏度较高。

2. 鲁米诺的化学发光受 O_2^- 的激发而产生, SOD 的底物也只有 O_2^- , 所以, 此测定体系特异性较强。而且测定中不受乙醇、氯仿等有

要 mRNA), 再用电泳分离转移或直接固定于硝酸纤维滤膜上, 与特异的同位素标记探针杂交, 然后根据杂交带(点)放射性强度的大小机溶剂及心绿染料的影响, 可以测定粗提取的生物样品。

3. 测定步骤少, 操作简便, 易于掌握。且化学发光反应速度快, 测定时间短。由于测定灵敏度高, 用微量的样品即可。

综上所述, 本测定体系适用于常规的重复检测, 对实验研究及临床常规检测有一定价值。

参 考 文 献

- [1] McCord, J. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049, 1969.
- [2] Hyland, K. et al.: *Analytical Biochem.*, **135**, 280, 1983.
- [3] Marklund, S., et al.: *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469, 1974.
- [4] 刘次伯等《西安医学院学报》, **4**, 345, 1983.
- [5] Richard, E., et al.: *Analytical Biochem.*, **116**, 142, 1981.
- [6] 李益新等:《生物化学与生物物理进展》, **2**, 59, 1983.
- [7] Hyland, K., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 531.
- [8] 赵琢道等:《中华实验外科杂志》, 待发表。

[本文于 1986 年 11 月 24 日收到]