

HA 可代谢完毕。水不溶的 HA 经脂质体包埋变成水溶制剂,在动物体内的代谢情况还有待于进行实验,不过可以预期 HA-脂质体若配上相应的抗体,很有可能实现靶体给药。本实验未能制备 HA 浓度大于 0.5mg/ml 的稳定脂质体体系并用于动物实验,这有待于深入研究。

参 考 文 献

- 1 Papahadjopoulos D ed, *Liposomes and their Uses in Biology and Medicine*, Ann N Y Acad Sci; 1978; 308: 345

- 2 傅乃武等. 中华肿瘤杂志, 1988; 10: 80
- 3 傅乃武等. 第二届全国光生物学讨论会论文集, 苏州: 中国生物物理学会编, 1988; 31
- 4 Singleton WS et al. *J Amer Oil Chem Sci*, 1965; 42: 53
- 5 Szaka F et al. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1978; 75: 4194
- 6 Lehrer SS. *Biochemistry*, 1971; 10: 3254
- 7 Einarsson R. *Int J Peptide Protein Res*, 1977; 10 (5): 342
- 8 刘景瑶等. 感光科学与光化学, 1986; (1): 36
- 9 Lakowicz JS. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* New York: Plenum press, 1983: 257—275

超氧化物歧化酶活性的肾上腺素自氧化紫外测定法

葛 春 华

(江南大学医学系, 无锡 214063)

提 要

实验表明肾上腺素自氧化过程的 325nm 吸收峰远比 480nm 吸收峰高和稳定, 并用超氧化物歧化酶 (SOD) 标准样品和人红细胞样品建立了 SOD 活性的肾上腺素自氧化紫外分光测定法 (A_{325})。方法简便、快速, 比用 480nm 的方法更为灵敏, 并有良好的定量性和重复性。

关键词 超氧化物歧化酶, 肾上腺素自氧化, 红细胞

肾上腺素在碱性溶液中自氧化产生的肾上腺素红在 480nm 有吸收峰。超氧化物歧化酶 (SOD, EC 1.15.1.1) 能抑制肾上腺素自氧化。基于此曾建立 SOD 活性肾上腺素自氧化测定法 (A_{480})^[1-3]。此方法简便、快速, 但在 Yoshihiko Oyanagui^[4] 评价的 8 种方法中其灵敏度居中。1978 年 Sun 和 Zigman^[5] 提出肾上腺素自氧化产物肾上腺素红不稳定、其 480nm 吸收峰低平, 而另有产物在紫外部分有稳定的更为明显的吸收区, 用于测定 SOD 活性其灵敏度可提高 6—10 倍。但他们没有建立实际应用的测定方法。本文在研究肾上腺素自氧化过程紫外吸收的基础上, 建立了 SOD 活性肾上腺素自氧化紫外测定法 (A_{325})。

1 材 料 和 方 法

1.1 试剂和仪器 L-肾上腺素是 Fluka 产品, 人红细胞 SOD 由上海生物化学研究所生产 (10000U/mg), 无水乙醇为保证试剂, 其它试剂皆为分析纯。用岛津 UV-265FW 紫外可见记录分光光度计。

1.2mmol/L 肾上腺素溶液用 2mmol/L HCl 现配。SOD 现配成 12 μ g/ml 的溶液。pH7.40 的等渗磷酸缓冲液是用 0.103mol/L 磷酸氢二钠和 0.155mol/L 磷酸二氢钠 7:1 混合再调 pH 而配成。另配 pH 为 7.70, 8.37, 8.73,

9.00 的 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 为 9.87, 10.12, 10.25, 10.67, 10.83 的 0.1mol/L 碳酸缓冲液。血液抗凝除特殊指出外用 0.13mol/L 枸橼酸钠。

1.2 红细胞中 SOD 活性测定 新鲜抗凝血经 3000r/min, 4℃ 离心 6min 后, 去尽上清和白细胞层。再用冷的 pH7.40 等渗磷酸缓冲液洗 3 次后, 离心弃去上清。取红细胞 0.1 ml 加去离子水 5ml, 充分溶血则成 1:50 溶血液。取此溶血液 0.5ml 加去离子水 3.5ml, 无水乙醇 1.0ml 和氯仿 0.6ml, 激烈振荡 2min 后, 在 4℃、2500r/min 离心 10min 除去血红蛋白 (Hb), 上清液为 SOD 提取液。

空白、对照和样品管各加 0.1mol/L, pH 10.12 碳酸缓冲液 1.5ml, 分别加去离子水 1.5, 1.0 和 0.5ml。样品管再加 SOD 提取液 0.5ml。放 37℃ 预温 5min 后, 对照管和样品管各加 1.2mmol/L 肾上腺素 0.5ml, 立即混匀、计时、37℃ 保温。待到 5min 时以空白管校零, 在 325nm 读取对照管和样品管的吸光度 (A), 得 $A_{\text{对}}$ 和 $A_{\text{样}}$ 。样品间比较可用 Hb 量为基准。本文以 1:50 溶血液 0.5ml 为样品, 用氰化高铁血红蛋白法定量 Hb, 算出每 ml SOD 提取液应含 Hbmg 数。SOD 活性以含 0.5mg Hb 的红细胞抑制肾上腺素自氧化的百分率表示。

$$A_{\text{对}} - A_{\text{样}} = \Delta A$$

$$\frac{\Delta A}{A_{\text{对}}} \times 100\% = \text{抑制率}(\%)$$

$$\frac{\Delta A}{A_{\text{对}}} \times 100\%$$

$$\times \frac{0.5\text{mg}}{0.5\text{ml} \times \text{每 ml 提取液应含 Hbmg 数}} \\ - \text{抑制率}(\%, \text{每 } 0.5\text{mg Hb})$$

2 结果与讨论

图 1 和图 2 是对肾上腺素自氧化过程由 550nm 至 250nm 扫描研究的记录。图中所指时间为扫描开始时肾上腺素自氧化的反应时间 (t_0 , min), 由 550nm 扫描至 250nm 用 0.54min, 因此在波长某点 (λ , nm) 自氧化的准确反应时

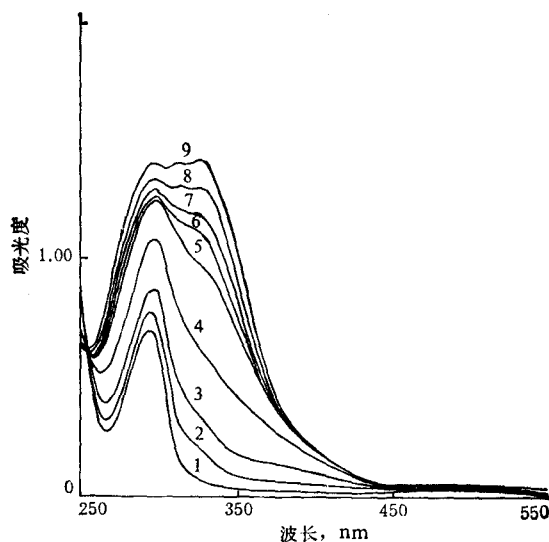


图 1 pH10.12 时不同反应时间的肾上腺素自氧化吸收光谱

图中 1—9 分别代表 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 min

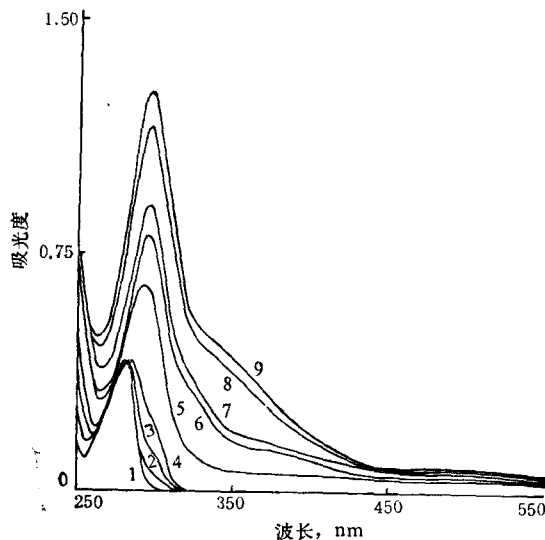


图 2 反应 5min 时不同 pH 的肾上腺素自氧化吸收光谱

1—9 分别为 pH7.70, pH8.37, pH8.75, pH9.00, pH9.87, pH10.12, pH10.25, pH10.67, pH10.83

间 (t_{min}) 可由 $t = t_0 + (550 - \lambda) \times 0.54/300$ 算出。图 1 是在 pH10.12, 50mmol/L 碳酸缓冲液中, 37℃, 0.2mmol/L 肾上腺素自氧化不同反应时间的吸收光谱。肾上腺素自氧化 90 min 过程中, 可见光部分只见 480nm 吸收峰, 此峰先升后降且一直很低平。紫外部分, 在自氧化 1min 时已有明显的 293nm 吸收峰, 随时

间的加长此峰上升速度明显减慢,而 325nm 吸收峰显著并愈益显著。在 90min 时 325nm 吸收峰超过 293nm 吸收峰且两峰相连,显示有一系列中间产物向终产物转变的连续过程。此结果与肾上腺素自氧化过程在紫外部分有高而稳定的吸收区,其可增强测定灵敏度的报道^[5]基本一致。图 1 显示自氧化 1min 至 90min 的 9 条光吸收曲线相互间的间距,在 325nm 处较大,即 325nm 处更能灵敏地反应自氧化程度。因此本法选用 325nm。图 2 是在不同的碱性 pH 下, 37℃, 0.2mmol/L 肾上腺素自氧化反应 5min 的吸收光谱。在 pH7.70—10.83 之间 480nm 吸收峰有升有降且一直低平。在紫外部分, pH9.00 以下主要是肾上腺素的 280nm 吸收峰。在 pH9.87 时此峰消失,而出现明显的 293nm 吸收峰,显示始有明显的自氧化进行。而后随 pH 增加, 293nm 吸收峰增高,出现 325nm 吸收峰。如是本法选用 pH10.1—10.3。

SOD 标准品浓度和红细胞 SOD 提取液用量与 SOD 活性关系的研究,除样品用量和反应时间特殊指出外,其它条件同前。SOD 活性用抑制率(%)表示。图 3 显示 SOD 标准品浓度、反应时间与抑制率的关系。对肾上腺素自氧化反应 5、10 和 20min 的抑制率,当 SOD 终浓度为 0.4 μ g/ml 时分别为 48%、39% 和 22%,当 SOD 终浓度为 4.0 μ g/ml 时分别为 84%、76% 和 69%。SOD 终浓度在 0.4 μ g/ml 以下反应 5 和 10min 时,抑制率与 SOD 浓度都呈直线关系,而反应 5min 时的抑制率较高,故本法选用 5min。任取 5 例正常人新鲜抗凝血制备红细胞 SOD 提取液。用不同量 SOD 提取液反应 5min 测定 SOD 活性,结果如图 4。红细胞 SOD 提取液为 0.6ml 时平均抑制率为 45%,红细胞 SOD 提取液在 0.6ml 以下时抑制率与提取液用量呈直线关系,于是本法红细胞 SOD 提取液选用 0.5ml。上述研究表明本法当抑制率约在 50% 以下时有很好的定量性,当抑制率超过 50% 时,应适当减少 SOD 提取液的用量。

任取 5 例入新鲜抗凝血,用本法每例平行

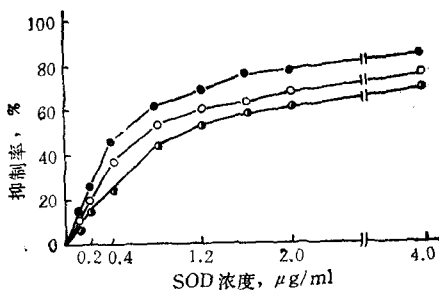


图 3 反应时间、SOD 浓度与 SOD 活性的关系
pH10.12, 反应时间●为 5min, ○为 10min, ●为 20min

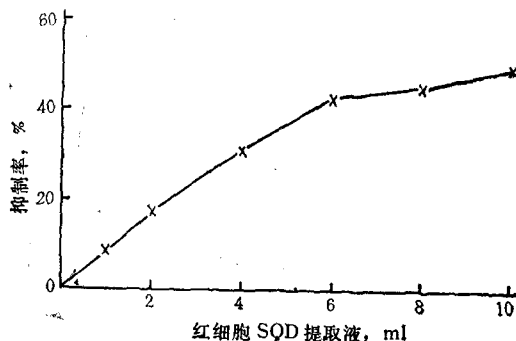


图 4 红细胞 SOD 提取液用量与 SOD 活性的关系
pH10.12, 反应 5min

做 5 份红细胞中 SOD 活性测定。此批内实验的 CV% 都小于 10%。各例在 24h 内先后做 5 次红细胞中 SOD 活性测定。此批间实验的 CV% 也都小于 10%。说明本法有良好的重复性。

由市中心血站健康供血员男女各 20 名(20—42 岁)提供血液。新鲜血液与血液保存液(ACD 液)混合后,立即用本法测定红细胞中 SOD 活性和定量 Hb。得出红细胞中 SOD 活性 $M \pm SD$, 男性为 56.01 ± 8.60 、女性为 51.11 ± 5.52 , 男女间差异显著($0.02 < P < 0.05$)。

参 考 文 献

- McCord J M, Fridovich I. *J Biol Chem*, 1969; 244: 6049
- Misra H P, Fridovich I. *J Biol Chem*, 1972; 247: 3170
- 魏重琴等. 生物化学与生物物理进展, 1988; 15(2): 124
- Yoshihiko Oyanagui. *Anal Biochem* 1984; 142: 290
- Sun M, Zigman S. *Anal Biochem*, 1978; 90: 51