

- [3] Horst Piller: *Microscope Photometry*, 134, 1977
[4] Pogo, A. O. et al.: *Exper. Cell Res.*, 17, 205, 1959.

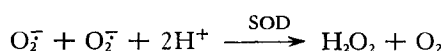
- [5] Naora, H.: *Science*, 115, 248, 1952.
[本文于 1982 年 7 月 2 日收到]

超氧化物歧化酶活力测定的新方法——化学发光法

李益新 方允中

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

超氧化物歧化酶(简称 SOD)能够催化以下歧化反应:



所以 SOD 具有清除 O_2^- 自由基的能力。由于 SOD 的底物 O_2^- 是一种寿命很短的自由基,所以迄今为止,除了应用脉冲射解技术,进行毫秒级快速动力学跟踪;或应用快速冰冻结合 ESR 波谱观察,可以直接获得 SOD 与 O_2^- 反应动力学的信息外,一般都采用间接的活力测定方法,如细胞色素 c 还原法^[1],肾上腺素自氧化法,四氮唑蓝(NBT)法^[2]等等,这些方法在测定准确性、灵敏度以及操作手续等方面各有优缺点,但都属于比色分析的方法。

黄嘌呤氧化酶,在有氧条件下,催化底物黄嘌呤或次黄嘌呤发生氧化反应生成尿酸,与此同时产生 O_2^- ^[3], O_2^- 进一步与化学发光剂 luminol (3-氨基邻苯二甲酰肼)反应,使之激发,当它返回基态时,就向外发光,这种现象称为化学发光。SOD 能清除 O_2^- ,所以抑制了 luminol 的发光,它提供了一种高灵敏度测定 SOD 活力原理的依据。我们用此发光体系,设计了一种测定从牛红细胞中提取的含铜、锌 SOD 活力的方法,称为化学发光法。通过几种发光体系的比较,进一步提高灵敏度,将此法用于 SOD 的辐射失活与自由基作用关系的研究取得较满意的结果^[4]。

实 验 方 法

一、化学发光体系及发光测量

黄嘌呤氧化酶(简称 XO),根据 Massey^[5]

法从牛奶中提取,贮存在 60% 饱和度的硫酸铵中,浓度为 1mg/ml。用前摇匀,吸取悬液,以每分钟 4,000 转离心 10 分钟,弃去上清,浅棕色沉淀物用 0.05M pH7.8 磷酸钾缓冲液溶解至一定浓度。

次黄嘌呤(简称 HX)为英国 Light 公司产品, luminol (简称 L)为英国 Aldrich 公司产品,每次实验前新鲜配制成 0.1 mM 的混合液。

化学发光测量应用 LKB Wallac 1250 型发光仪。实验中所用样品管为高 55mm,内径 10mm 的无色透明硬质玻璃管。测量步骤:先注入一定浓度一定量的 SOD 溶液(作空白对照时加 0.05M pH7.8 的磷酸钾缓冲液),然后注入 XO,最后加入 HX 和 L 的混合液起动反应,最终反应体积 1ml。从起动反应开始,分别以一分钟末的发光强度值(pH10.2 碳酸钠缓冲体系)和峰值读数(pH 7.8 磷酸钾体系)为准进行计算。

二、SOD 活力测定及比活力计算

Cu、Zn-SOD 根据 McCord 和 Fridovich^[1]的方法从牛血中提取、纯化,制得冰冻干燥固体粉末。实验中用 0.05M pH7.8 的磷酸钾缓冲液(含 0.1mMEDTA)溶解成不同浓度。当上述发光体系中有 SOD 存在时,发光强度下降。以空白对照的发光强度值为 100%,可以计算出加入 SOD 后抑制发光的程度,以此对 SOD 浓度作图,可以得到图 1 的曲线。从图中可以求出抑制 50% 发光程度时 SOD 的浓度,用符号 C_{50} 表示, C_{50} 的单位为 ng/ml。SOD 的比活力测定,可以采用两种测定系统。

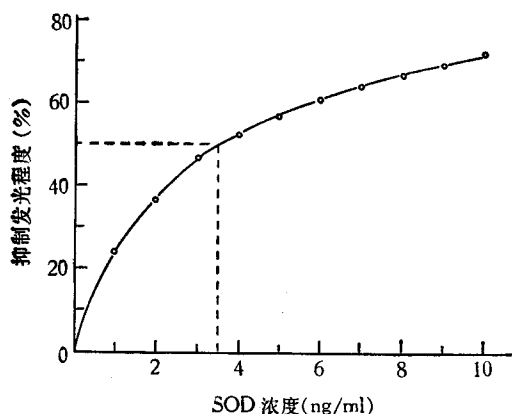


图1 SOD 对 luminol 发光的抑制

(1)采用 0.1M pH 7.8 的磷酸钾缓冲液(含 0.1mM EDTA),新鲜配制的 0.1mM 的 HX 和 L 的混合液 940 μ l, XO(1mg/ml) 50 μ l,一定浓度的 SOD 溶液 10 μ l, 25 $^{\circ}$ C,在此条件下,抑制 50% 发光程度所需的 SOD 浓度 C_{50} 定义为一个活力单位。因为在此条件下,标准 SOD 的 C_{50} 为 100ng/ml,它与细胞色素 c 还原法规定的活力单位相同,而且 SOD 的标准比活力 3300 活力单位/毫克蛋白正是根据细胞色素 c 还原法定出的。若所测样品的 C_{50} 大于 100ng/ml,则实际样品的比活力可按式计算:

$$\frac{100}{\text{实测样品 } C_{50}} \times 3300$$

(2)采用 0.05M pH 10.2 的碳酸钠缓冲体系(含 0.1 mM EDTA),新配制的 HX 和 L 混合液 (0.1 mM)980 μ l XO(0.1mg/ml) 10 μ l,一定浓度 SOD 溶液 10 μ l,这时标准 SOD 的 C_{50} 为 3.5 ng/ml,见图 1 所示。利用这一体系,测量其它 SOD 样品时,实际比活力按下式计算:

$$\frac{3.5}{\text{实测样品 } C_{50}} \times 3300$$

用上述两种测量体系,分别测定了1980年,

表 1 不同制备批数 SOD 的比活力

制备日期、批数	比活力(活力单位数/毫克蛋白)	
	pH7.8 体系测定	pH10.2 体系测定
1980年 10 月制备	3170	3120
1982年 5 月第一批	3300	3300
1982年 5 月第二批	3140	3040

1982 年第一,第二批制备的 SOD 的比活力,结果列于表 1。其中 1982 年 5 月第一批 SOD,用 NBT^[2] 法测定比活力为 3260 活力单位/毫克蛋白,用化学发光体系测定为 3300 活力单位/毫克蛋白。

结果与讨论

一、XO 加入量对发光强度的影响

固定 HX 和 L 的浓度,随着 XO 加入量的增加,发光强度最初增加,逐渐达到饱和状态,如图 2 所示。

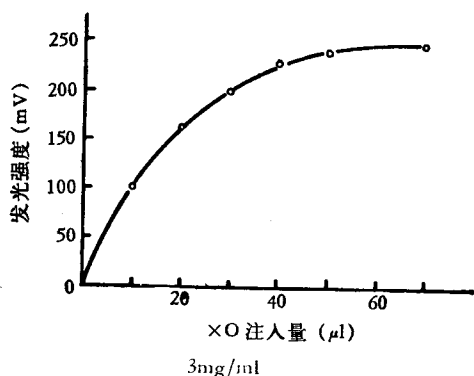


图2 XO 注入量对发光强度的影响
pH7.8 体系, HX 和 L 为 0.1 mM

在 XO 加入过量的情况下,发光强度由 HX 和 L 的浓度决定,由于 HX 和 L 可以精确称量,严格配制成一定浓度,所以保证了实验条件的稳定性和重复性。

二、HX 浓度对发光强度的影响

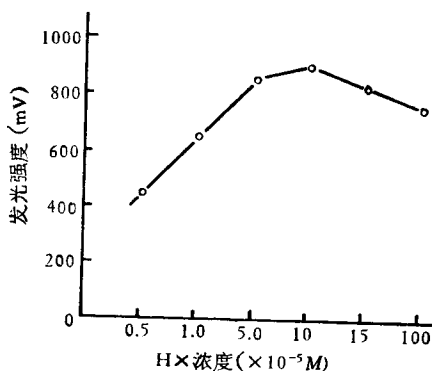


图3 HX 浓度对发光强度的影响
pH10.2 体系, XO (1mg/ml)10 μ l
L: 0.1mM, SOD: 10ng/ml。

固定 XO 加入量和 L 的浓度,改变底物 HX 的浓度,发光强度变化情况见图 3。表明在上述条件固定后,有一个最佳 HX 浓度范围。例如,当 XO (1mg/ml)10 μ l, L 为 0.1mM, SOD 为 10ng/ml 时, HX 浓度为 0.1mM 时发光强度值最高。

三、发光剂 L 对发光强度的影响

固定 XO 加入量和 HX 的浓度,改变 L 的浓度发光强度随 L 改变而变化,见图 4 所示。这时也有一个合适的 L 浓度。

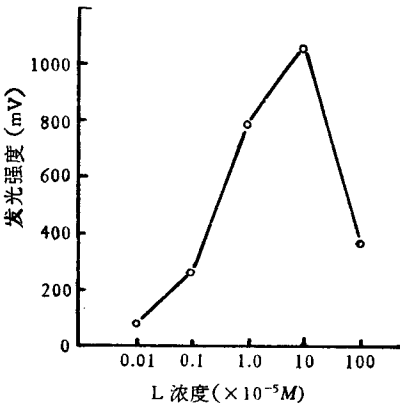


图 4 L 对发光强度的影响

pH10.2 体系, XO(1mg/ml)10 μ l,
HX:0.1mM, SOD:10ng/ml

四、影响 SOD 活力测定灵敏度的因素

超氧化物自由基 O_2^- , 本身具有自发歧化的过程,对于 O_2^- 来说自发歧化为二级反应,而酶促歧化是一级反应,所以在某种意义上说, SOD 是在同自发歧化反应竞争 O_2^- 。 O_2^- 的稳态浓度越低,则 SOD 竞争的能力就越强。所以 SOD 活力测定方法灵敏度的高低取决于: 一是 pH, 二是 O_2^- 的稳态浓度。

(1) pH 对测定灵敏度的影响 1974 年, Puget 等人^[6]采用 pH7.8 的磷酸钾缓冲体系,测定了一种从海洋发光细菌中提取的含铁的 SOD 的活力。我们比较了 pH7.8 的磷酸钾体系, pH9.0 的甘氨酸-NaOH 体系和 pH10.2 的碳酸钠体系,结果表明,随着 pH 升高, C_{50} 值减小,即测定灵敏度增高。标准 SOD 样品,在 pH7.8 的体系中, C_{50} 为 100ng/ml,而在 pH10.2 体系

中, C_{50} 为 3.5ng/ml,灵敏度提高了 30 倍。

(2) O_2^- 稳态浓度对灵敏度的影响 在同一种 pH 体系中, C_{50} 的值又与 XO 加入量成线性关系,如图 5 和图 6 所示。XO 注入量减少, O_2^- 的稳态浓度减小, C_{50} 值也减小,表明测定灵敏度增高,这个规律在三种 pH 体系中都可观察到。

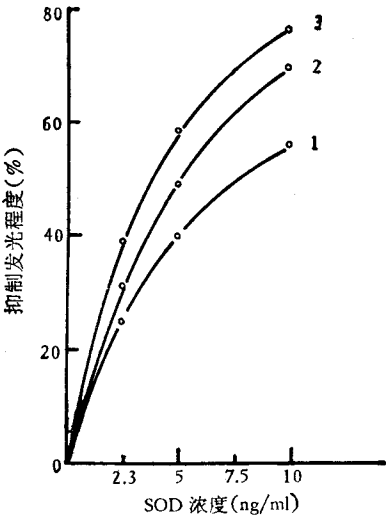


图 5 SOD 对发光强度的抑制

pH10.2 体系, 线 1, 2, 3 分别表示 XO(0.1mg/ml) 注入量为 50, 20, 10 μ l。

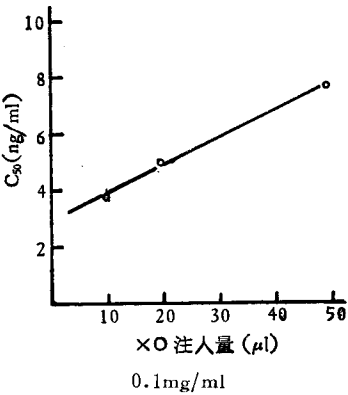


图 6 XO 注入量与 C_{50} 的关系
pH10.2 体系

五、化学发光法的几个特点

(1) 时间响应快 用发光仪附件中的外部加样装置,可以在测量部位上注入反应液,起动反应,立即监测,时间响应快,这样可以跟踪反

应的初速度,少受产物和其它因素的干扰,这一点在研究自由基反应时尤其重要。

(2) 灵敏度高 应用特定的发光测量装置,可以测定微弱的化学冷光,大大提高测量灵敏度。如用 pH10.2 的发光体系,可检测出 10^{-10} — 10^{-11} M 的 SOD。

(3) 专一性较强 luminol 的化学发光受 O_2^- 自由基的激发,特异性较强。而且在测定中不受乙醇、氯仿和丙酮等有机溶剂的影响,适用于粗提取物的测定。我们曾用化学发光法监测从牛血中提取和纯化 SOD 的过程,表明最初的乙醇—氯仿粗提取物就可以被测定。如果可以应用于溶血物中 SOD 的测量,则在临床监测方面将很有价值,这方面的工作尚待进一步研究。

(4) 分析快速,样品用量少 由于化学发光法具有时间响应快,灵敏度高的特点,所以大大

缩短测定时间,样品用量少,这对于常规的重复性测量很有好处,作为相对活力比较时尤为适用。

本法需用高灵敏度的精密发光测量仪器,如发光仪或液体闪烁计数仪,因而其推广应用尚受一定限制。

参 考 文 献

- [1] McCord, J. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049, 1969.
- [2] Beauchamp, C. et al.: *Anal. Biochem.*, **44**, 276, 1971.
- [3] Hodgson, E. K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **430**, 182, 1976.
- [4] 李益新等:《生物化学与生物物理进展》,待发表。
- [5] Massey, V. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 1682, 1969.
- [6] Puget, K. et al.: *Biochimie*, **56**, 1255, 1974.

[本文于 1982 年 8 月收到]

DNA 浮雕图象的电子显微镜方法

钱 力 叶盛钰 徐有成

(中国科学院上海生物化学研究所)

DNA 分子非常细长。双链 DNA 分子的直径约为 $20 \text{ \AA}$, 单链约为 $12 \text{ \AA}$ 。目前用一般的样品制备法在电子显微镜下只能看到 DNA 的平面图象。

随着分子生物学的飞跃发展,在研究 DNA 拓扑异构酶、解链蛋白等酶反应的产物时需要知道核酸分子的空间关系。例如判别联环体(catenate)和重迭的分子,结状分子和无结分子时就必须知道在每个核酸分子链的交叉点上那一条链位于上方,那一条链从下面通过。在研究超螺旋 DNA 的结构时也有必要了解双链与双链之间的盘旋方式。为了能从电镜照片上获得更多的信息,我们改进了电子显微镜样品的制作方法,不但可以看到双链和单链 DNA 的浮雕图象,还可以直接测定质粒 pBR322 DNA 的拓扑环绕数,判明 DNA 分子中两条链的绕向。现将具体方法和操作经验总结如下:

1. DNA 分子的展开 纯净的 DNA 样品可以用水相法或甲酰胺法在细胞色素 C 组成的单分子膜上展开,单链 DNA 则必须用甲酰胺法进行。有关试剂的要求及操作方法见文献 [1,2]。

2. 复膜铜网的准备 在洁净的铜网上,用 3% 火棉胶的醋酸异戊酯或 3% Parlodion 的醋酸戊酯溶液复膜,复火棉胶膜的铜网再喷碳膜强化之。

3. 取样及染色 新鲜制备的复膜铜网从展开有 DNA 分子的细胞色素 C 单分子膜面上取样,用 0.5—2mM 醋酸氧铀的 90% 乙醇染色, 20° — 37°C 干燥后喷涂重金属。

4. 喷涂投影 在旋转真空喷涂仪中,预先将两条直丝形钨丝在高真空中通电流烧灼一次,除去表面的氧化物及其它污染杂质。

将吸附了 DNA 样品的铜网的膜面向上,