

血清锰和铜锌超氧化物歧化酶活力测定

汪义军 庄一义

(南京军区南京总医院生化科)

关键词 血清, Mn-SOD, Cu, Zn-SOD, 核黄素

超氧化物歧化酶(SOD)是催化超氧自由基歧化反应的一类金属酶。人体内存在 Mn-SOD 和 Cu,Zn-SOD。目前测定 SOD 活力方法有化学比色法^[1-3]和化学发光法^[4-6]等。化学发光法测定 Cu,Zn-SOD 灵敏度最高,但应用于 Mn-SOD 活力测定,灵敏度很低^[9],且需昂贵试剂和仪器。比色法灵敏度低,尚不能准确测定血清 SOD 活力。我们采用核黄素光照产生的超氧自由基与羟胺反应,建立了测定 SOD 活力新方法。该法灵敏度高,重复性好,能检测血清 Mn-SOD 和 Cu,Zn-SOD 活力,现将方法报告如下。

材料和方法

一、原理 核黄素光照产生的超氧自由基与羟胺反应生成亚硝酸根,酸性条件下,亚硝酸与氨基苯磺酸和 N-甲苯基二氨基乙烯反应生成红色化合物,而 SOD 抑制此反应,根据抑制率高低,计算 SOD 活力。

由于 Cu,Zn-SOD 在 1—2mmol/LNaCN 存在下完全失活,而 Mn-SOD 活力不变。因此,在测定体系中,加和未加 NaCN 情况下,分别测出 Mn-SOD 和总-SOD(T-SOD)活力,而 Cu,Zn-SOD 即可计算。

二、仪器 恒温箱内装 20W 日光灯管一支。岛津 UV-300 型分光光度计。

三、试剂 N-甲苯基二氨基乙烯为化学纯,其余试剂均为国产分析纯。

1. 0.12mmol/L 核黄素,置棕色瓶,贮冰箱。
2. 1mmol/L EDTA·Na₂。
3. 8mmol/L 羟胺,贮冰箱。
4. 20mmol/L NaCN, 置棕色瓶,贮冰箱。
5. 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.8。
6. 90mg/dl 氨基苯磺酸,含 16% HAC。
7. 1.5mg/dl N-甲苯基二氨基乙烯,含 16% HAC。

将试剂 1、2、3、4、5 按 1:1:2:1:5 体积比混合,作为测定 Mn-SOD 活力的光照剂 A。

将试剂 1、2、3、5 按体积比 1:1:2:6 体积比混合,作为测定 T-SOD 活力的光照剂 B。

将试剂 6、7 按体积比 1:1 混合作为显色剂 C。

四、SOD 活力测定

1. Mn-SOD 活力测定 取血清 10、20、50、100μl 加到样品管 U 中,空白管 B 和样品管各加 1ml 光照试剂 A,30℃,距离 6cm,光照 5min,再加 2ml 显色剂 C,30℃ 保温 20min,550nm 蒸馏水调零,比色。计算抑制率 $(B-U)/B$,绘制抑制曲线,查出抑制率 50% 时所需血清量即为一个单位,结果以每毫升血清单位表示。

2. T-SOD 活力测定 三倍稀释后血清 10、20、50 和 100μl 加入到样品管中,空白管和样品管各加 1ml 光照试剂 B,以后步骤同上。

结果和讨论

一、测定条件

1. 测试波长 在岛津 UV-300 光度仪,测定了呈色后溶液的可见吸收光谱,呈色物在 550nm 处有最大吸收峰,选取 550nm 为测试波长。

2. 光照时间选择 光照时间对酶反应速率影响很大,本法约在 7min 内,酶反应速率不变,光照时间延长,反应速率下降。选取 5min 作为光照反应时间。

3. 核黄素浓度选择 核黄素浓度低于 0.1mmol/L,反应速率下降。选取 0.12mmol/L 核黄素浓度作为测试条件。

4. EDTA·Na₂ 浓度选择 取正常人混合血清 50μl,按照测定 Mn-SOD 活力步骤,测定 EDTA·Na₂ 浓度对 Mn-SOD 抑制率的影响。当 EDTA·Na₂ 浓度为 1mmol/L 时,抑制率最大。因此,选取 EDTA·Na₂ 浓度为 1mmol/L 作为测试条件。

5. 羟胺浓度选择 按 Mn-SOD 测定步骤,试验在不同羟胺浓度下对正常人血清(50μl)的 Mn-SOD 活力影响。羟胺浓度在 6—10mmol/L 范围内抑制率最大,选取羟胺为 8mmol/L 作为测试条件。

6. 稳定性 血清样品当天测定 Mn-SOD 和 T-SOD 活力后,于 4℃ 冰箱放置,其活力三天内基本不变,以后酶活力有所下降。

(下转第 214 页)

THE STUDIES OF CELL FROM L₇₈₁₁ LEUKEMIA MOUSE BY ³¹P-NMR

Zhang Naizhong Wang Fengru Ma Liying Han Qinzhong
Wang Junheng Liu Xiuping
(Harbin Medical University)

Wu Jiazhen Zhou Shuhua
(Institute of Biophysics, Academia Sinica Beijing)

ABSTRACT

Using ³¹P-NMR to study the high energy phosphates of mouse L₇₈₁₁ ascites cells with thymic cells from 615 line mouse as control. The results showed there was clear differences between them.

Even in the late stage of growth, L₇₈₁₁ ascites cells was not completely in an inactive state. For example, the ratio of phosphocreatine (PCr) and α -, β -, γ - adenosine triphosphate (α -, β -, γ -ATP) to phosphate (Pi) was greatly decreased but not completely inactive. The ratio of sugar phosphate (Sp) to phosphocholine (Pcho) plus phosphoethanolamine (PEtn) increased, while glycerol (3) phosphocholine (GroPCho) plus glycerol(3) phosphoethanolamine (GroPEtn) decreased.

Preliminary studies showed that ³¹P-NMR spectra are sensitive monitor to the progressive changes of the high energy phosphate metabolism of the L₇₈₁₁ ascites growth.

Key words ³¹P-nuclear magnetic resonance, ascites cell, thymic cell, phospholipid, high-energy phosphate

(上接第237页)

7. 重复性 取一份正常人血清,分四次测定 Mn-SOD 和 T-SOD 活力,每次4份,共测16次。Mn-SOD: $\bar{x} \pm SD = 17.1 \pm 1.18$, 变异系数 $CV = 6.9\%$, T-SOD: $\bar{x} \pm SD = 53.4 \pm 1.70$, $CV = 3.2\%$ 。

8. 回收率试验 正常人血清加入五份不同量 SOD 标准品,进行回收试验,得回收结果为 97.4—107.2%,平均回收率 101.9%。

二、临床应用

1. 正常值 对90例年龄为1—80岁的健康男女血清 Mn-SOD 和 T-SOD 活力进行测定,其中男46例,女44例,12岁以下和60岁以上各20人,13—59岁50人,经统计学处理,男女之间,各年龄组之间无明显差异。结果如下: Mn-SOD 活力为 17.0 ± 3.6 , T-SOD 活力为 52.4 ± 8.9 Cu,Zn-SOD 活力为 35.4 ± 7.9 。

2. 初步临床观察 对各种肿瘤、冠心病、糖尿病、肾病等病人的血清 SOD 进行了初步观察。其中变化较显著的有癌肿和肾衰病人。癌肿病人血清 Mn-SOD

活力显著升高,而 Cu,Zn-SOD 活力与正常人相比无明显差异。肾衰病人血清 Mn-SOD 和 Cu,Zn-SOD 活力均非常显著高于正常人。其详细结果将另文报道。

综上所述,本文报道的 SOD 活力测定方法,操作简便,快速,用血量少,不需特殊设备和试剂,测定性能良好,适用于临床和科学研究。

参 考 文 献

- 1 McCord JM *et al.* *J Biol Chem*, 1969; **244**: 6049
- 2 Nishikimi M. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976; **63**: 463
- 3 Oyanagui Y. *Biochem Pharmacol*, 1978; **27**: 777
- 4 Minami M *et al.* *Clin Chim Acta*, 1979; **92**: 337
- 5 Elstner E F *et al.* *Anal Biochem*, 1976; **70**: 616
- 6 Oyanagui Y *et al.* *Anal Biochem*, 1984; **142**: 290
- 7 McPhail L C *et al.* *J Clin Invest*, 1979; **63**: 648
- 8 李益新等. 生物化学与生物物理进展, 1983; (2): 59
- 9 赵厚安等. 生物化学杂志, 1988; **4**: 29

[本文于1989年5月15日收到]