

改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法

邓碧玉 袁勤生 李文杰*

(华东化工学院生化组, 上海 200237)

关键词 连苯三酚自氧化法, 活性测定, 超氧化物歧化酶, 磷酸盐缓冲液

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase 简称 SOD) 的测定方法很多^[1]。目前, 国内外采用的连苯三酚自氧化法^[2-4], 其测定缓冲液均用 HCl 配制, 而 Cl^- 对 SOD 有一定的抑制作用。为了提高 SOD 对超氧阴离子 (O_2^-) 的竞争能力, 本法改用 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液。实验表明, 改良法不仅比在 Tris-HCl 缓冲液中测定灵敏度提高了 50%, 而且因减少了 SOD 的加入量, 使酶被 O_2^- 所饱和。实验还表明, SOD 在自氧化速率 30—65% 范围内, 酶的加入量与抑制率成线性关系, 见图 1。

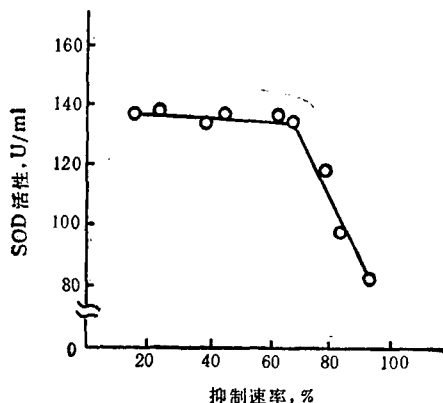


图 1 在磷酸缓冲液中 SOD 活性随抑制速率变化曲线
25℃, pH8.30, 50mmol/L 磷酸盐缓冲液, SOD 浓度: 180μg/ml

一、试剂和仪器

1. 连苯三酚, 分析纯, 贵州遵义化工厂生产, 用 10 mmol/L HCl 配制成 50mmol/L 的溶液。

2. pH8.30, 50mmol/L 的 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液。

3. 仪器 UV-754 紫外分光光度计, 上海第三分析仪器厂; pH 数字显示酸度计, 上海雷磁仪器厂。

二、测定方法

1. 连苯三酚自氧化速率的测定

在 25℃, 4.5ml 50mmol/L, pH8.30 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液中加入 10μl 50mmol/L 的连苯三酚, 迅速摇匀, 倒入光径 1cm 的比色杯内, 在 325nm 波长下每隔 30s 测 A 值一次, 要求自氧化速率控制在 0.070 OD/min 左右。

2. 酶活性测定

测定方法与测连苯三酚自氧化速率相同, 在加入连苯三酚前加入待测 SOD 样液, 测得数据按下列公式计算酶活性:

$$\text{酶活性 (U/ml)} = \frac{0.070 - A_{325\text{nm}}/\text{min}}{0.070} \times 100\% \\ \times \text{反应液总体积} \times \frac{\text{样液稀释倍数}}{\text{样液体积}}$$

参 考 文 献

- 1 袁勤生, 中国医药工业杂志, 1989; 20(10): 473
- 2 袁勤生等, 医药工业, 1983; 1: 16
- 3 Marklund S et al, Eur J Biochem, 1974; 47: 469
- 4 谢卫华等, 医药工业, 1988; 19(5): 217

[本文于 1990 年 1 月 11 日收到, 5 月 4 日修回]

* 李文杰系我院兼职教授。