

极谱氧电极法测定超氧化物歧化酶活性的改进*

张继全 陈幼春

(中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094)

邹岳奇 阎静辉

(河北省科学院生物研究所, 石家庄 050051)

摘要 对SOD的极谱氧电极测定法做了如下修改: a. 室温测定, b. 酶活性用标准SOD标定, c. 反应在磷酸缓冲液中进行, d. 增大邻苯三酚的用量. 改进后克服了易在电极薄膜表面产生气泡等问题, 测定灵敏度及线性范围增大.

关键词 极谱氧电极, 超氧化物歧化酶, 活性测定

李文杰等根据超氧化物歧化酶(SOD)对邻苯三酚自氧化耗 O_2 的表观抑制作用, 提出了SOD活性的极谱氧电极测定法^[1]. 与比色法相比, 此法线性好, 不受样品颜色和浊度等影响. 但由于恒温水浴下极易在电极薄膜表面产生难于消除的气泡, 干扰测定. 针对这一问题, 我们在应用此方法时省却了超级恒温水浴, 使操作更简便易行. SOD活性单位的定义也做了修改, 用已知活性的标准SOD标定. 反应改在磷酸缓冲液中进行, 增大了反应的灵敏度. 另外, 原方法邻苯三酚的使用量也限制了SOD活性的线性测定范围, 增加邻苯三酚用量解决了这一问题.

1 材料与方法

1.1 材料

装置同文献^[1], 但省去超级恒温水浴, 自动记录仪改为上海自动化仪表三厂生产的XWZS-100型10mV长图自动平衡记录仪.

标准品SOD购自上海东华生物化学公司, 比活性为4300U/mg(使用前, 用微量邻苯三酚自氧化法^[2]检查活性). 女贞子购自石家庄市中药采购供应站. 邻苯三酚等化学试剂皆为国产分析纯.

1.2 方法

同文献^[1], 有下列修改: a. 在室温下直

接测定; b. 不再用 Na_2SO_3 标定记录仪指针纵向移动一小格相当 O_2 的微升数; c. 用已知活性的标准SOD标定抑制1mm时相当的SOD活性单位; d. 反应缓冲液改为50mmol/L, pH8.4的磷酸缓冲液; e. 样品加入的同时按下秒表, 1min后手动抬起自动记录仪的笔尖, 标记1min对自氧化的抑制作用.

中草药女贞子粉碎后用10倍(W/W)50mmol/L, pH7.6的磷酸缓冲液抽提过夜, 离心取上清测定.

2 结果与讨论

2.1 结果

不同量标准SOD对50 μ l 60mmol/L的邻苯三酚自氧化的抑制作用见图1. 由图1可见, 每抑制1mm相当于SOD 8.64U.

不同量的女贞子对50 μ l 邻苯三酚自氧化的抑制作用见图2. 由图2可见, 每1 μ l 上清抑制0.123mm, 由此推算每克女贞子相当的SOD活性单位为 $0.123 \times 8.64 \times 1000 \times 10 = 10630$.

2.2 讨论

图1与图2表明, 修改后的方法SOD活性与对邻苯三酚自氧化的抑制作用呈良好的线

* 美国科学励进社资助.

收稿日期: 1993-07-23, 修回日期: 1993-09-23

性关系,证明此方法是可行的。

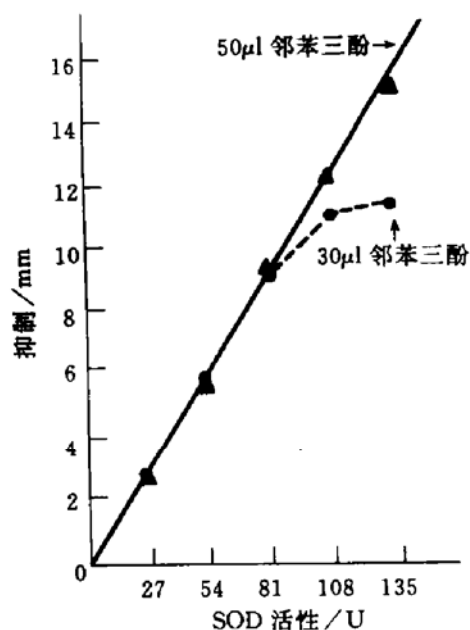


图1 不同量的SOD对50μl和30μl
邻苯三酚自氧化的抑制作用

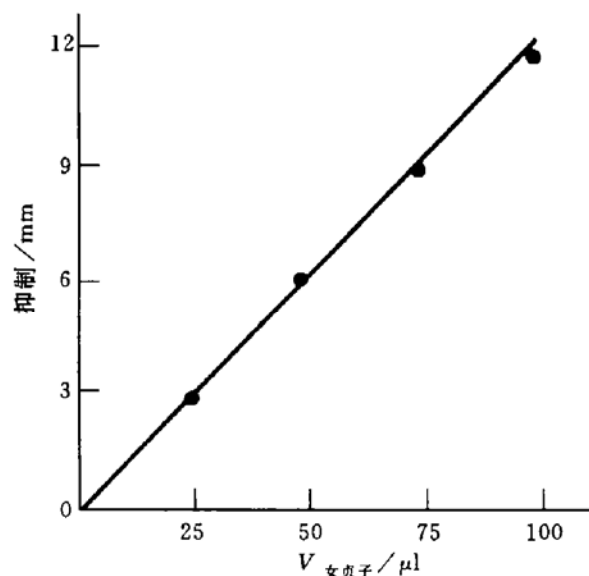


图2 不同量的女贞子对50μl 邻苯三酚
自氧化的抑制作用

直接在室温下测定,可避免因反应室内外温差以及与缓冲液起始温度的差异,而造成的在氧电极表面极易产生并很难消除气泡问题。

用已知活性的SOD来标定抑制毫米数所相当的SOD活性单位,可以将不同次数及不同方法的测量结果进行比较,此法也省略了用 Na_2SO_3 标定每一小格所相当的 O_2 微升数。

如图1,使用30μl的邻苯三酚,在SOD超过约90U时SOD活性与抑制毫米数不再成线性关系。本文改用50μl邻苯三酚进行测定,由图1可见,SOD量达135U时仍有很好的线性关系。

我们发现用磷酸缓冲体系比用Tris-HCl缓冲体系的反应灵敏度高,与邓碧玉等^[2]的报导一致,因此本文采用50mmol/L, pH8.4的磷酸缓冲液进行反应。

由于没有快走纸记录仪,本文用了XWZS-100 (10mV) 小长图自动平衡记录仪,这样就难于根据走纸准确判断时间。为此,我们用秒表直接计时,1min后手动抬起记录笔尖作为结束标志。

在测定过程中,还需注意二个问题:a. 电极薄膜应经常更换,否则基线将逐渐向左漂移;b. 在更换薄膜后如果仍出现无法消除的基线漂移,应该首先考虑更换溶氧控制仪内的电池。

参 考 文 献

- 1 李文杰,程 枫,吴文土. 生物化学与生物物理学报, 1986; 18 (2): 185
- 2 邓碧玉,袁勤生,李文杰. 生物化学与生物物理进展, 1991; 18 (2): 163

40cm). Human normal sera were applied to the column at a flow rate of 0.25ml/min. and the column was washed with 0.01mol/L PBS (pH7.4) at a rate of 3ml/min. Materials adsorbed to the immobilized antibodies were eluted with 6mol/L guanidine-HCl. Between experiments, the column was stored in PBS-azide at 4°C.

Key words affinity chromatography, TSH, normal human serum

Quantitative Method of Heparin. Zhang Changjing, Li Yihe, Li Xianbai. (*Department of Biochemistry, Chongqing Teachers Training College, Chongqing 630047*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 372—373

It is known that the dropping rate of optical absorbing value at 300 nm wave length when ribonucleic acid is hydrolysed with ribonuclease is inhibited quantitatively by heparin. Upon this fact, a standard measuring line is plotted when the inhibition is quantitated by known quantity standard heparin. Any unknown can be determined conveniently by comparing with this standard.

Key words ribonuclease, ribonucleic acid, heparin from hog lung, optical absorbing value
Modifications on the Polarographic Oxygen Electrode Method for Superoxide Dismutase Activity Determination. Zhang Jiquan, Chen Youchun, Zou Yueqi, Yan Jinghui. (*Institute of Animal Science, CAAS, Beijing 100094*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China), 1994; 21 (4): 374—375

The following modifications to the polarographic oxygen electrode method for SOD activity determination were made: (1) directly determining at room temperature, (2) introducing standard SOD as activity unit standard, (3) using phosphate buffer as reaction medium, and (4) increasing the pyrogalllic acid used. These modifications result in: (1) the abolishment of the bubbles easily produced on the electrode surface which severely interfere with the determination, (2) increased sensitivity of determination and (3) broadened linear range of SOD activity.

Key words polarographic oxygen electrode, superoxide dismutase, activity determination