

由于该方法实际上是通过将蛋白酶水解底物反应与酸碱中和反应相偶联,并以指示剂在特定波长下的光吸收值的变化作为测定的指标,因此通过选择不同的指示剂以及使用其他合适的底物,可以测定其他种类的蛋白酶类的活性,从而建立一系列以指示剂为基础的酶活性测定方法.

参 考 文 献

- 1 Evnin L, Craik C S. Enzyme Engineering, 1988; 542: 61
- 2 Rick W. In: Bergmeyer H U ed. Methods of Enzymatic Analysis, New York and London: Academic Press, 1963; 807
- 3 周慧, 鲁治斌, 齐 杰等. 生物化学杂志, 1994; 10 (5): 630

A Quantitative Assay Method for Trypsin Activity. Zhang Dongyi, Tang Jianguo, Zhang Longxiang (Department of Biochem-

istry and Molecular Biology, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China).

Abstract TAME (N_α -p-tosyl-L-arginine methyl ester) is a specific substrate of trypsin. N_α -p-tosyl-L-arginine is released from TAME after tryptic hydrolysis, which reacts with NaOH in the assay mixture and causes the decrease of pH. Using phenol red as the indicator, the pH change of the solution can be monitored by the decrease of the absorbance at 555 nm. The decrease of A_{555} is directly proportional to the amount of trypsin with a linear range of 0.001~0.3 mg. The method is very convenient to use, highly sensitive and specific.

Key words trypsin, assay, TAME, phenol red

邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 产生的羟自由基

金 鸣 蔡亚欣 李金荣 赵 辉

(北京市心肺血管医疗研究中心, 北京 100029)

摘要 报告检测 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 所产生羟自由基的新方法. 羟自由基氧化反应后, 邻二氮菲- Fe^{2+} 的 A_{536} 明显下降, 且 ΔA_{536} 与邻二氮菲, FeSO_4 及 H_2O_2 呈量效关系, 随反应时间延长, ΔA_{536} 依幂函数规律上升. 此法试验结果表明, 甘露醇, 抗坏血酸及硫脲清除羟自由基作用呈明显的量效关系.

关键词 羟自由基, 邻二氮菲- Fe^{2+} , H_2O_2 , FeSO_4

羟自由基是体内最活泼的活性氧, 可介导许多病理变化. 目前, 离体检测羟自由基有电子自旋共振法^[1], 化学发光法^[2], 细胞色素 c 氧化法^[3] 等. 这些方法或仪器特殊, 或试剂昂贵, 使其应用受到限制. $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系可通过 Fenton 反应产生羟自由基^[4], 邻二氮菲- Fe^{2+} 水溶液被羟自由基氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} 后, 其 536 nm 最大吸收峰消失. 根据上述原

理, 我们建立了以 A_{536} 变化反映羟自由基氧化作用的比色测定法, 该法设备简单, 试剂便宜, 操作简便, 适于广泛使用.

1 材料与方 法

设备: 7230 型分光光度计.

试剂: 全部为国产分析纯.

羟自由基检测法: 以 H_2O 将 50 mmol/L 邻二氮菲无水乙醇溶液稀释至 5 mmol/L, 取此液加 0.75 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 0.4 ml 充分混匀后, 加 FeSO_4 溶液, 每加一管立即混匀, 以 H_2O 补充体积, 最后加 H_2O_2 , 反应液 37°C 保温一定时间后, 以 5 mm 比色皿测 536 nm 吸光度 (A_{536}), 计算加 H_2O_2 管与 H_2O 代替 H_2O_2 管 A_{536} 之差 (ΔA_{536}).

抗氧化药清除羟自由基作用, 依上法试验, 邻二氮菲 0.75 mmol/L, FeSO_4 0.75 mmol/L, pH 7.4 PBS 150 mmol/L, H_2O_2 0.01%, 加抗氧化药后加 H_2O_2 , 37°C 保温 60 min, 测 A_{536} . 未损伤管不加 H_2O_2 及抗氧化药. 表观羟自由基清除率 (简称羟自由基清除率) d 计算法:

$$d = \frac{A_{536}(\text{加药}) - A_{536}(\text{损伤})}{A_{536}(\text{未损伤}) - A_{536}} \times 100\%$$

本文数据均为三管平行测定均值, 以 t 检验法进行统计处理.

2 结 果

2.1 FeSO_4 , H_2O_2 及邻二氮菲浓度对 ΔA_{536} 的影响

从图 1 可见, 随 H_2O_2 浓度增加, ΔA_{536} 亦逐步升高. FeSO_4 浓度小于 0.5 mmol/L 时, 随 FeSO_4 浓度增加 ΔA_{536} 逐渐增加, 其浓度达 0.5 mmol/L 后, ΔA_{536} 便不再增大. 络合剂邻二氮菲浓度与 ΔA_{536} 呈量效关系. 根据这些结果, 设正式试验中邻二氮菲, FeSO_4 及 H_2O_2 浓度分别为 0.75 mmol/L, 0.75 mmol/L 及

0.01%, 以使氧化反应后 ΔA_{536} 较大.

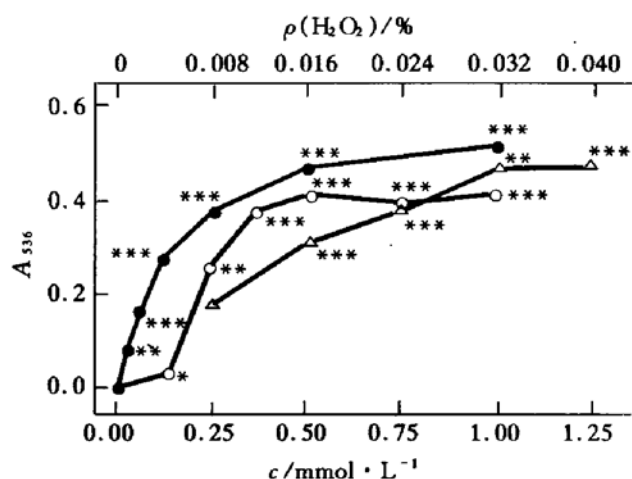


图 1 ΔA_{536} 与 FeSO_4 、邻二氮菲及 H_2O_2 的量效关系
○—○: FeSO_4 (邻二氮菲 0.75 mmol/L, H_2O_2 0.01%); △—△: 邻二氮菲 (FeSO_4 0.75 mmol/L, H_2O_2 0.01%); ●—●: H_2O_2 (FeSO_4 , 邻二氮菲 0.75 mmol/L); 与最低效量比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2.2 保温时间与 ΔA_{536} 的关系

37°C 保温 120 min 的过程中, H_2O 代替 H_2O_2 管的 A_{536} 几乎不变, 加 H_2O_2 管 A_{536} 逐步下降, 保温 15 min 后, ΔA_{536} 即升至 0.494. 随保温时间延长, ΔA_{536} 依幂函数规律逐步上升, 60 min 时, ΔA_{536} 为 0.848, 且其趋于稳定, 故设测定反应 37°C 保温时间为 60 min.

2.3 显色稳定性试验结果

37°C 反应结束后, 室温下 ΔA_{536} 下降较慢 (表 1), 可见本法稳定性较好.

表 1 显色稳定性实验结果

放置时间/min	0	15	30	60	90	120
ΔA_{536}	0.403 ± 0.010	0.401 ± 0.010	0.390 ± 0.010	0.367 ± 0.013	0.368 ± 0.011	0.361 ± 0.016

与 0 min 数据, P 均大于 0.05.

2.4 抗氧化药清除羟自由基作用

甘露醇、抗坏血酸和硫脲均为羟自由基清除剂, 检测此三药清除羟自由基的效应, 以反

证新方法的有效性. 图 2 表明, 以邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测, 它们清除羟自由基均有明显的量效关系.

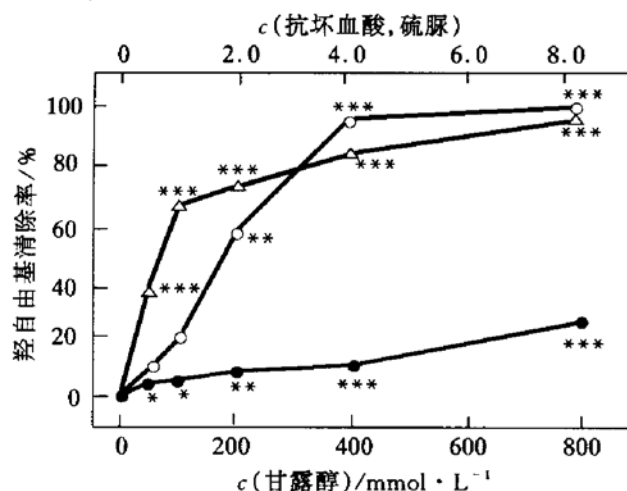


图2 甘露醇、抗坏血酸及硫脲清除羟自由基作用的量效关系

●—●: 甘露醇; ○—○: 抗坏血酸 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);
 Δ — Δ : 硫脲 ($\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). 与损伤管比较:

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

本文试验平均变异系数为 $(1.58 \pm 0.74)\%$, 提示本法重复性较好.

3 讨 论

邻二氮菲- Fe^{2+} 是一常用的氧化还原指示剂, 其颜色变化可敏锐地反映溶液氧化还原状态的改变. 羟自由基是一强氧化剂, 作为反应物, H_2O_2 与 Fe^{2+} 作用可通过 Fenton 反应产生羟自由基^[4]. 从图 1 可见, 随 H_2O_2 浓度的增加, ΔA_{536} 逐渐增大, 提示本法可反映 Fenton 反应产物羟自由基浓度逐步增加的趋势. Fenton 反应中, Fe^{2+} 是催化剂^[4], 图 1 结果表明, 当 Fe^{2+} 浓度达到 0.5 mmol/L 后, 继续增加 FeSO_4 浓度, ΔA_{536} 便不再增大, 提示该剂量便是 Fe^{2+} 催化反应必需量. ΔA_{536} 与保温时间关系结果表明, 随保温时间延长, ΔA_{536} 增加幅度减小, 而随反应延续 H_2O_2 剩余量必然逐渐减少, 提示本法反映了羟自由基氧化作用的累积效应. 测定时, 加样方法对结果有重要影响, 须先将邻二氮菲, PBS 及 H_2O 混匀, 每管加入 FeSO_4 后立即混匀, 否则会使局部颜色过浓, 影响结果重复性.

Fenton 反应是体内产生羟自由基的重要机理, 羟自由基是造成组织脂过氧化, 蛋白质

解聚, 聚合, 核酸断裂, 多糖解聚的重要活性氧. 羟自由基清除率是反映药物抗氧化作用的重要指标. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法简单价廉, 稳定可靠, 人员不需特别训练. 相比之下, 化学发光法, 高效液相法及顺磁共振法则需要特殊设备, 细胞色素 c 氧化法所用试剂则较昂贵, 而邻二氮菲法的效果并不比上述旧方法差, 故本法更适于发展中国家广泛采用. 该法在抗氧化研究中检测离体实验体系中羟自由基的氧化效应, 特别是对于离体大面积筛选抗氧化药物有重要的价值. 虽然其结论与药物在体内清除羟自由基作用尚有距离, 但这些初步结果可为进一步的研究提供线索.

参 考 文 献

- 1 丛建波, 孙存普, 莫 简. 生物化学与生物物理进展, 1993; 20 (4): 326
- 2 陈季武, 胡天喜. 生物化学与生物物理进展, 1992; 19 (2): 136
- 3 王成莲, 刘 莉. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16 (6): 473
- 4 陈 媛, 周 玫. 自由基医学. 北京: 人民军医出版社, 1991: 18~21

1, 10-Phenanthroline- Fe^{2+} Oxidative Assay of Hydroxyl Radical Produced by $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$. Jin Ming, Cai Yaxin, Li Jinrong, Zhao Hui (Beijing Heart Lung and Blood Vessel Medical Center, Beijing 100029, China).

Abstract Hydroxyl radical produced by $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ was assayed by the new method. After oxidized by hydroxyl radical the A_{536} of 1, 10-phenanthroline- Fe^{2+} decreased apparently. The ΔA_{536} was dependent upon the dosage of 1, 10-phenanthroline, FeSO_4 or H_2O_2 individually. The ΔA_{536} increased as the reaction lasted. It was demonstrated that the hydroxyl radical scavenger effect of mannitol, ascorbic acid and thiourea was dosedependent by the new method.

Key words hydroxyl radical, 1, 10-phenanthroline- Fe^{2+} , H_2O_2 , FeSO_4