

一种 SOD 的测活方法

——邻苯三酚自氧化法的改进

邹国林 桂兴芬* 钟晓凌** 朱汝璠

(武汉大学生物系)

超氧化物歧化酶 (SOD) 是在医疗上具有广泛应用前景的酶。它的测活方法很多^[1-8], 一般是根据 SOD 具有抑制 O_2^- 介导的的反应的能力这一原理而建立的。邻苯三酚自氧化法是其中较为简便的一种^[3,9], 本文对这种方法做了下述改进。

材料与 方法

1. 仪器 M750UVIS-A 型微量紫外可见分光光度计和日本岛津双光束双波长自动记录分光光度计。

2. 试剂 SOD (上海生化所东风试剂厂产品), 其它试剂均为分析纯。

3. 邻苯三酚自氧化速率的测定 取 4.5ml 100mM 缓冲液(见表 1), 4.2ml 蒸馏水, 混匀后在 25℃ 水浴保温 20 分钟, 取出后立即加入在 25℃ 预热过的 3mM 邻苯三酚 0.3ml (以 10mN HCl 配制, 空白管用 10mN HCl 代替邻苯三酚的 HCl 溶液), 迅速摇匀倒入比色杯(光径 1cm), 在 25℃ 恒温池中, 每隔 30 秒测 A 值一次。计算线性范围内每分钟 A 的增值, 此即为邻苯三酚的自氧化速率。

4. 酶活力测定 加入邻苯三酚前, 先加一定体积的 SOD 溶液, 蒸馏水减少相应体积, 其它均与上述 3 一致, 计算加酶后邻苯三酚自氧化速率。每毫升反应液中, 每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量定义为一个酶单位。

结果与 讨论

1. 测试波长选定 邻苯三酚自氧化机理十分复杂, 至今还不十分清楚。原法测试波长用 420 nm, 选用依据未作详细说明^[3]。本文结果见图 1 和 2。从图 1 可知邻苯三酚自氧化积累

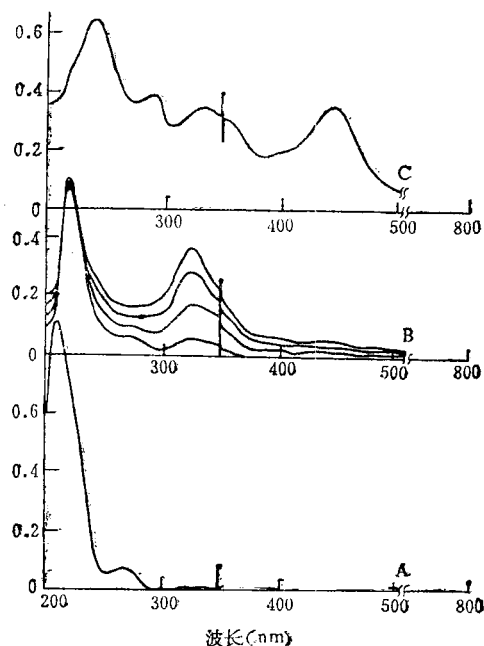


图 1 200--800nm 扫描图

A: 0.1mM 邻苯三酚水溶液扫描图。

B: 0.1mM 邻苯三酚在 pH8.2, 50mM Tris-HCl 缓冲液中的扫描图; 从下而上分别为 1, 3, 5, 7 分钟的扫描。

C: 反应系统与 B 相同。在 1 小时末扫描。

* 河南卫生职工学院生化教研组进修教师

** 湖北工学院化工系进修教师

的初始中间产物吸收峰在 325nm 附近,10 分钟内只看到这个明显的中间产物峰。随着自氧化的继续,后随产物积累,1 小时末在 440nm 附近形成较强的吸收峰。从图 2 可见,初始中间产物的积累在滞后 30 秒起,其量与时间成线性关系,线性时间维持 4 分钟左右。还可看到,325 nm 测试比 420nm 测试其灵敏度提高了 6.4 倍。我们实验了表 1 中的 9 种缓冲液,前 6 种缓冲液,10 分钟内扫描都只在 325nm 附近有明显的中间产物峰,且 $A_{325nm}/分$ 与 $A_{420nm}/分$ 的比值在 5.0 至 10.7 之间(表 1),所以选定 325 nm 作为新的测试波长。

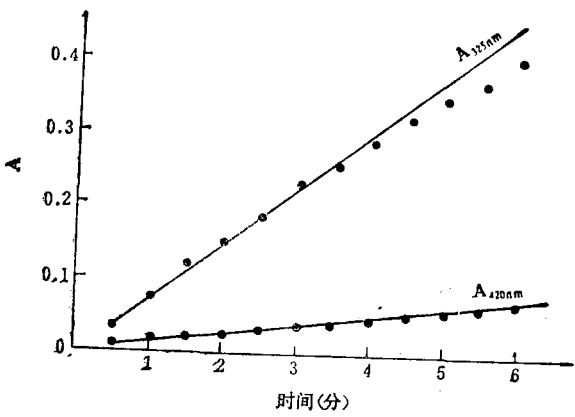


图 2 邻苯三酚自氧化曲线
0.1mM 邻苯三酚 pH8.2, 50mM Tris-HCl。

表 1 不同缓冲系统中邻苯三酚的自氧化

缓冲液(终浓度 50mM)	邻苯三酚 (0.1mM)自氧化速率		A_{325nm}/A_{420nm}	A_{325nm} 线性范围
	$A_{325nm}/分$	$A_{420nm}/分$		
(1) Tris-HCl pH8.2	0.070	0.011	6.4	4'
(2) K_2HPO_4 - KH_2PO_4 pH8.34	0.070	0.010	7.0	4'30''
(3) Tris-二甲胂酸钠-HCl pH8.2	0.040	0.008	5.0	4'
(4) Na_2HPO_4 -柠檬酸 pH8.0	0.032	0.003	10.7	4'
(5) NaOH- KH_2PO_4 pH8.0	0.032	0.003	10.7	4'
(6) 巴比妥钠-HCl pH8.2	0.029	0.003	9.7	5'
(7) 硼砂-硼酸 pH8.2	0	0		
(8) NaOH-KCl-硼酸 pH8.2	0	0		
(9) 广范围缓冲液* pH8.2	0	0		

* 由硼酸、巴比妥酸、柠檬酸、磷酸二氢钾和氢氧化钠配制。

2. 缓冲液选定 原法用 Tris-二甲胂酸缓冲液^[3],袁勤生等用 Tris-二甲胂酸钠-HCl 缓冲液^[9]。本文实验了表 1 的缓冲液,缓冲液(1)至(6)都可用于此种测活方法,不同的缓冲液对邻苯三酚自氧化速率有不同的影响,其中以 Tris-HCl 缓冲液为优。缓冲液(7)至(9)不可用,10 分钟内,325nm 和 420nm 处都测不到 A 值;24 小时末,扫描检测,发现 340nm 附近有较强吸收峰,440nm 附近有很弱的吸收峰。这可能是硼酸的存在阻碍了邻苯三酚的自氧化,因为硼酸可与含二个邻近羟基的化合物可逆地形成环状的硼酸酯。

3. 邻苯三酚浓度选定 实验结果表明自氧

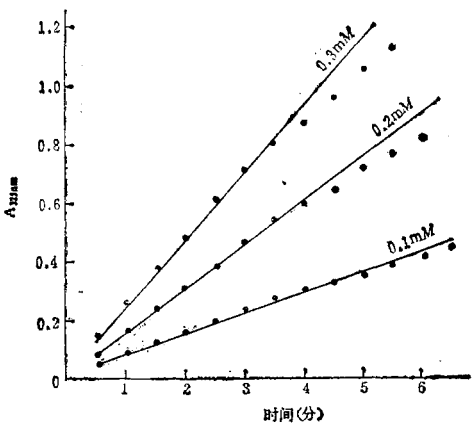


图 3 不同浓度的邻苯三酚自氧化曲线
pH8.2, 50mM Tris-HCl 缓冲液。

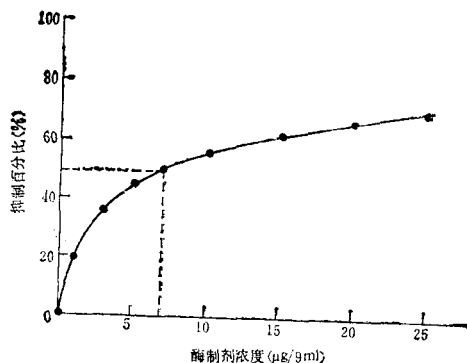


图4 SOD 对邻苯三酚自氧化的抑制
(酶活力测定曲线)

化速率与邻苯三酚浓度成线性关系,与文献[3]报道一致。自氧化的线性范围随邻苯三酚浓度的增大而逐步减小(图3)。此外,增高邻苯三酚的浓度会降低 SOD 对邻苯三酚自氧化抑制的灵敏度。原法用 0.2mM 邻苯三酚,自氧化速率为 0.020A420nm/分^[3],本文用 0.1mM 邻苯三酚,速率为 0.070A325nm/分,即提高了灵敏度,又节省了试剂。

4. pH 对自氧化速率的影响 实验结果表明自氧化速率随 pH 的增大而增大,且线性范围随 pH 的增大而略有减小, pH 增高会降低 SOD 对邻苯三酚自氧化抑制的灵敏度,这些与文献报道相一致,因此本文也将 pH 选为 8.2。

5. 改良的方法 以 0.1mM 邻苯三酚, pH 8.2, 50mM Tris-HCl 缓冲液,反应总体积 9

ml 作为测活系统, 325nm 为测试波长。采用此法对 SOD 测活,结果见图 4,呈典型的酶活力测定曲线,与文献报道相吻合^[3]。如样品中有 Fe^{++} 、 Cu^{++} 、 Mn^{++} 等污染,则缓冲液中应加金属螯合剂。

改良法,其灵敏度得到提高,盐酸比二甲胍价格便宜且易得,邻苯三酚消耗量减少一倍,所以有一定的实用价值。但此法改用紫外光测量,在国内推广会受到一定限制。

扫描工作由周云珍同志协助进行,谨致谢忱。

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] Marklund, S. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469, 1974.
- [4] Cohen, G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 2447, 1974.
- [5] Marklund, S.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 7504, 1976.
- [6] Sun, M. et al.: *Anal. Biochem.*, **90**, 81, 1978.
- [7] Garry, C. et al.: *Anal. Biochem.*, **121**, 207, 1982.
- [8] 李益新等:《生物化学与生物物理进展》, (2), 59, 1983.
- [9] 袁勤生等:《医药工业》, (1), 16, 1983.

[本文于 1985 年 12 月 12 日收到]

(上接第 60 页)

6. 能催化自由基反应的过渡性金属元素的干扰

金属元素摄入和排出的混乱情况所引起的人类和动物的疾病,例如白色素沉着病、Wilson 氏病和肝炎; Fe^{++} 和 Cu^{++} 对脂类过氧化反应的影响。

7. 光敏作用 人和动物上皮细胞光敏损伤过程中的自由基,溶酶体膜的过氧化降解,自由基清除剂与单线态氧猝灭剂的防护作用,肿瘤和溃疡的光疗法。

8. 自由基对细胞损伤的防护方法 自由基清除剂必须以合适的时间、合适的浓度用在细胞的合适部位;

天然产物的自由基清除剂,限制自由基损伤效应的非清除剂机理。

来自全国各单位的科学工作者七十余人参加了讨论班。

T. F. Slater 教授还在中国科学院生物物理研究所、西安第四军医大学、中国科学院细胞生物研究所及广州中山大学讲学,并进行了学术交流。获得了好评。

[兰州大学生物系 郑荣梁
中国科学院生物物理所 忻文娟]