

超氧化物歧化酶活性正、负染色方法的比较*

杨唐斌** 梅尚筠

(华中师范大学生物系, 武昌 430070)

关键词 超氧化物歧化酶 (SOD), 茴香胺, 氯化硝基四唑氮蓝 (NBT)

超氧化物歧化酶(SOD)广泛存在于活细胞中^[1,2], 它是机体内超氧自由基 O_2^- 的清除剂, 对机体细胞有保护作用。由于该酶的基质 O_2^- 极不稳定, 所以迄今对 SOD 的检测都采用间接方法。SOD 在电泳凝胶上酶活性定位的染色方法有正染法和负染法。本文对这两种方法进行了比较研究, 并对某些因素如杂蛋白, 过氧化物酶作了初步分析, 有助于进一步了解检测 SOD 的适宜条件和反应机理。

材料和方法

试剂 猪红细胞 SOD (湖南长沙生化制药厂), 氯化硝基四唑氮蓝 (NBT) (国产), 茴香胺(瑞士), 小牛血清白蛋白 (BSA) (国产)。

酶活性实验 酶活性测定按 Giannapolitis 和 Ries^[3] 方法, 利用 SOD 抑制 NBT 光化还原反应, 5ml 反应混合液中含有 13 mmol/L 蛋氨酸 (Met), 75 μ mol/L NBT, 0.1 mmol/L EDTA, 10 μ mol/L 核黄素(均用 pH7.8 0.05 mol/L 磷酸钠缓冲液用前配制), 50 μ l 酶样, 于 2×40W 日光灯下 10cm 25℃ 照 20 min, 测定 A_{560} , 空白用沸水煮沸 20min 的失活酶液代替, 酶活性单位采用抑制 NBT 光化还原 50% 为一个酶活性单位。

酶液的凝胶电泳 聚丙烯酰胺凝胶的制作按莽克强法改进^[4], 将 3% 浓缩胶聚合以核黄素为引发剂, 电泳在 40°180V 恒压下进行。

酶活性染色定位

正染 按 Misra 和 Fridovich 法^[5]。取出凝胶, 于室温下浸泡于含有 2mmol/L 茴香胺, 0.1 mmol/L 核黄素的 pH7.2 10mmol/L 磷酸钾缓冲液中 1h, 快速水洗两次, 光照 5—15min 显示棕色 SOD 活性谱带。

负染 Beauchamp 和 Fridovich 法^[6]略加改进, 将凝胶浸泡于 375 μ mol/L NBT 中 30min, 再将凝胶放入含有 0.028mol/L 四甲基乙二胺, 2.8×10^{-3} mol/L 核黄素, 10^{-3} mol/L EDTA 的 pH7.8 0.05mol/L 磷

酸缓冲液中, 并在上述光照条件下光照 15—30 min, SOD 活性谱带在蓝色背景上呈现无色透明区带。

结果及讨论

1. 正、负染色方法比较

图 1 是 SOD 正染结果, SOD 催化茴香胺的氧化作用, 凝胶经光照后于 SOD 位置呈现稳定的棕色带。凝胶板宜于线性扫描定量, 且杂蛋白 (以 BSA 代替) 对此染色法无影响, 呈现清晰的 SOD 同工酶带。

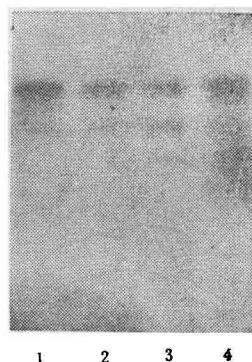


图 1 SOD 酶活性正染方法电泳图谱

样品为标准 SOD (157.4U/ml): 1. 2 μ l SOD; 2. 2 μ l SOD + 40mg BSA; 3. 2 μ l SOD + 80mg BSA; 4. 2 μ l SOD + 120mg BSA

图 2 是负染法, 凝胶上无 SOD 区域 NBT 还原成蓝甲腈的蓝色背景, 清晰透明的谱带是 SOD 抑制 NBT 光化还原的结果。此法也比较灵敏, 和正染法一样, 0.15 个酶单位在凝胶上产生可目测的谱带。

线性扫描表明两种染色方法都很灵敏且分辨率高, 但是背景的均一性正染法却优于负染法。根据凝胶点样量与实测线性密度扫描面积证实正染法与定量关系重复性好, 1.88 SOD 酶单位三次扫描结果峰面积

* 国家自然科学基金资助项目。

** 现通讯地址: 北京航天医学工程研究所科技处生化中心, 100094。

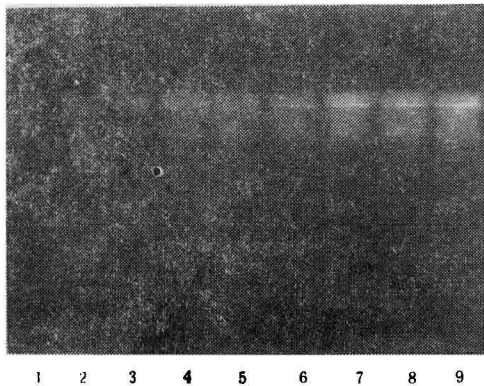


图2 SOD 酶活性负染方法电泳图谱

样品为标准 SOD (157.4U/ml): 1. 0.5 μ l; 2. 1 μ l; 3. 1.5 μ l; 4. 2 μ l; 5. 2.5 μ l; 6. 3 μ l; 7. 3.5 μ l; 8. 4 μ l; 9. 4.5 μ l

为 87218.46 ± 437 。

NBT 染色凝胶在水中浸泡24h,透明带逐渐模糊,但正染法由于核黄素的影响,经漂洗后使黄色背景减弱,而棕色谱带相对增强,故延长凝胶在染色液中的浸泡时间可提高正染法灵敏度。负染法不仅 NBT 用量大,价格昂贵,而且反应较复杂,受诸多因素的影响;正染法既灵敏且茴香胺用量小,价格便宜,适于一般实验室使用。

2. 影响正、负染色法的因素

(1) 杂蛋白对负染色法的影响

图3与图1比较表明, SOD 酶样电泳含杂蛋白(BSA)时,前者呈现杂蛋白带,且使凝胶蓝色背景的颜色变浅,说明大量非 SOD 活性蛋白会妨碍 NBT 还

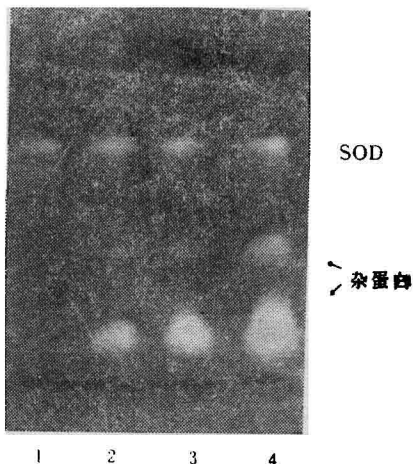


图3 SOD 负染法电泳图谱

样品为标准 SOD(157.4U/ml): 1. 2.5 μ l SOD; 2. 2.5 μ l + 100mg BSA; 3. 2.5 μ l + 200mg BSA; 4. 2.5 μ l + 300mg BSA

原,动物组织含有大量非 SOD 活性蛋白质,尤其哺乳动物有很多血红蛋白,它有似 SOD 活性^[6]。而图1正染法就消除了杂蛋白对 SOD 染色定位的影响。

(2) 过氧化物酶对 SOD 活性染色的影响

图4中1和3都含有5mg辣根过氧化物酶(HRP),却使负染法背景颜色变浅,说明 HRP 妨碍 NBT 的光化还原,影响蓝甲臆的积累。



图4 HRP 对 SOD 负染法凝胶电泳图谱的影响

样品为标准 SOD (157.4U/ml): 1. 2 μ l SOD + 5 μ g HRP; 2. 2.5 μ l SOD; 3. 2.5 μ l SOD + 5 μ g HRP

为了进一步了解 HRP 的干扰程度,在10 μ l酶液中分别加入不同浓度的 HRP,研究了对 SOD 检测的影响,将 HRP 所引起 NBT 光化还原系统的光吸收下降率换算成相应的酶单位,即获得图5所示的结果,从中可看出在5ml NBT 反应混合液中,每增加8个单位 HRP 就相当于提高了0.075个 SOD 单位。这种干扰作用是 HRP 能催化蓝甲臆进一步氧化^[7],有可能这种催化反应与光诱导有关。

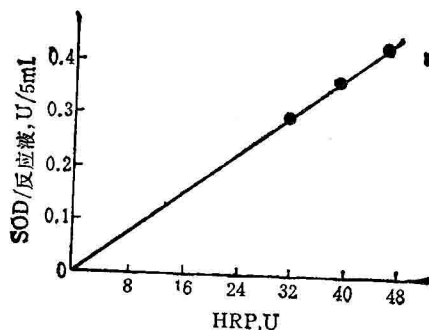


图5 HRP 的干扰所相应的 SOD 酶单位

样品中若含有 HRP, 正染凝胶上也会呈现两条移动缓慢的 HRP 酶带,但通过光照时间的控制很容易区分 HRP 带。由于正染色液中含有茴香胺和核黄素,光照后产生 H_2O_2 ^[8],若加入一定量的过氧化氢酶(Cat)清除 H_2O_2 ,可防止 HRP 带的出现。

伴刀豆球蛋白 A 中铽 (III) 和钴 (II) 之间的能量转移

一种新的金属离子之间距离的探针

马贵斌 杨 频

(山西大学化学系分子科学研究所, 太原 030006)

关键词 伴刀豆球蛋白 A, 铽离子, 钴离子, 离子探针

基于 Förster 偶极-偶极无辐射能量转移机理 估测溶液状态下能量给予体和接受体之间的距离已广泛应用于生物大分子的构象分析中^[1,2], 但仍局限于有机物基团之间的距离测定。Horrocks^[3] 等人用铽和钴离子作为探针测定了嗜热菌蛋白酶分子内一个钙离子与锌离子之间的距离, 测定结果与 X-光衍射结果相吻合。铽是钙的有效荧光探针^[3,4], 钴能占据 Con-A 中锰离子的位置^[5,6]。本文利用铽和钴为探针, 估测了 Con-A 中两金属离子结合位置之间的距离。

一、理论基础

按照 Förster 偶极-偶极无辐射能量转移机理^[1-3], 能量给体与受体间转移效率 E 与真实距离 r 和临界距离 R_0 有下列关系:

$$E = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} \quad (1)$$

$$R_0^6 = 8.78 \times 10^{-18} K^2 \phi_D n^{-4} J \quad (2)$$

式中 K^2 为取向因子, ϕ_D 为无受体时给体的量子产率, n 为介质的折射指数, J 为光谱重迭积分, 由(3)式计算:

$$J = \frac{\int F(\bar{\nu})\epsilon(\bar{\nu})\bar{\nu}^4 d\bar{\nu}}{\int F(\bar{\nu})d(\bar{\nu})} \quad (3)$$

式中 $F(\bar{\nu})$ 是给体的荧光强度, $\epsilon(\bar{\nu})$ 是受体的摩尔

SOD 催化茴香胺氧化作用提供了关于这类酶的一种染色方法, 简单易行, 灵敏度高, 便宜, 且谱带长期稳定, 不易模糊, 保存方便, 利于线性扫描定量, 值得推广。

参 考 文 献

- 1 Privalle C T, Fridovich I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 2723
- 2 Loven O P et al. *Int J Cancer*, 1984; 33: 783
- 3 Giannopolitis C N, Ries S K. *Plant Physiol*, 1977; 59: 309

消光系数, 单位是 $(\text{mol/L})^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\bar{\nu}$ 是波数, 单位是 cm^{-1} 。

能量转移效率 E 由下式测定:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (4)$$

F 和 F_0 分别为给体在存在和不存在受体时的荧光强度。

使用方程(1)可由 R_0 和 E 计算出 r 。

二、材料与方法

1. 仪器和试剂

日本 Hitachi Model-850 荧光光谱仪, 日本岛津 UV-365 型紫外-可见-近红外分光光度仪, 伴刀豆球蛋白 A: 生化试剂, 中国科学院上海药物研究所制品。其它试剂均为分析纯。

2. 试剂的处理

试剂的处理及探针溶液的制备同文献[10]。

三、结果与讨论

1. 铽 (III) 与 Con-A 配合比的确定

向脱离子的 Con-A 溶液中逐渐加入氯化铽(III)的溶液, 在荧光仪上观测 545 nm 处铽 (III) 的敏化特征荧光强度。铽的 F 与 $[\text{Tb}^{3+}]/[\text{Con-A}]$ 的变化关系如图 1。由图 1 可见 $[\text{Tb}^{3+}]/[\text{Con-A}]$ 达到 1:1

- 4 莽克强等, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 北京: 科学出版社, 1975; 32-33
- 5 Misra H P, Fridovich I. *Arch Biochem Biophys*, 1977; 183: 511
- 6 Beauchamp C O, Fridovich I. *Anal Biochem*, 1971; 44: 276
- 7 Giannopolitis C N, Ries S K. *Plant Physiol*, 1977; 59: 315
- 8 Misra H P, Fridovich I. *Arch Biochem Biophys*, 1969; 18: 830

[本文于1990年7月18日收到, 9月28日修回]