

# 超氧化物歧化酶肾上腺素自氧化测定法的研究

魏重琴 艾建芳

(河南医科大学生化教研室, 郑州)

## 提 要

本文研究了超氧化物歧化酶肾上腺素自氧化测定法的影响因素, 发现在测试波长 480nm, 反应液 pH 10.2, 测试温度 30℃ 的条件下, 测试时间随肾上腺素浓度而相应改变。一份正常人红细胞样品测定 20 次, 其变异系数  $CV = 5.03\%$ , 酶提取液在 4℃ 存放 72 小时, 酶比活性不变, 本方法具有微量、快速、灵敏、稳定及重复性良好等优点。

自 McCord 和 Fridovich<sup>[1]</sup> 发现超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 以来, 引起医学各个领域极大的关注。

据报道, 肿瘤<sup>[2,3]</sup>、衰老、高血压冠心病、脑血管疾患<sup>[4]</sup>及先天愚型<sup>[5]</sup>等都显示 SOD 活性的改变。因此, SOD 活性的测定在病理学及生物化学研究中具有重要的意义。SOD 比活性测定方法有许多种<sup>[6-11]</sup>, 其中有些方法不易掌握和应用。肾上腺素自氧化法比较简便易行, 但影响因素及实验条件的控制问题国内报道甚少。本文对肾上腺素自氧化法的各种影响因素进行了研究, 以求建立一种微量、快速、稳定重复性好的 SOD 测定方法, 并适应一般生化实验室的应用。

## 材 料 与 方 法

### 一、试剂

L-肾上腺素 (Fluka, 公司出品, A. R.) 以双蒸馏水配成 2mmol/L。95% 乙醇-氯仿混合液 (1:1, v/v)。SOD (中国科学院上海生物化学研究所产品, 批号 8603067, 50,000U/mg)。结晶牛血清白蛋白 (上海生化试剂厂)。碳酸缓冲液 (pH10.2)。

### 二、测定方法

1. 红细胞 SOD 提取液: 取红细胞 20μl 用生理盐水洗涤三次, 于 3ml 双蒸水中充分溶血后, 边振摇边加入 1ml 4℃ 预冷的乙醇-氯仿混合液 (1:1, v/v), 3000r/min 离心 15 分钟, 上清液即为红细胞 SOD 提取液。

表 1 操作步骤

试 剂	空白管	对照管	样品管
碳酸缓冲液	1.5ml	1.5ml	1.5ml
双蒸馏水	1.5ml	0.5ml	—
酶提取液	—	—	0.5ml
混 匀			
2mmol/L 肾上腺素	—	1ml	1ml

2. 酶活性测定: 按 Sun 等<sup>[8]</sup>及 Misra 等<sup>[11]</sup>方法加以改进, 操作程序如表 1。各管混匀后在 30℃ 水浴中保温 2.5 分钟 (注: 加肾上腺素时, 每隔 1 分钟加一管, 分别以秒表计时)。立即在 721 型分光光度计上 (480nm) 读光密度, 对照管和样品管光密度值分别用 A、B 表示。

酶活性单位: 按酶活性测定条件, SOD 抑制肾上腺素自氧化的 50% 所需酶量定为一个酶活性单位, 每毫升酶单位按下式计算:

$$U/ml = \frac{A - B}{A} \times 100\% \times \frac{50\%}{\text{反应液体积}} \times \frac{\text{样品稀释倍数}}{\text{酶提取液体积}}$$

3. 酶提取液蛋白质含量的测定: 按 Miller 法测定<sup>[12]</sup>, 用结晶牛血清白蛋白制作标准曲线。

4. 酶比活性: 同一酶提取液活性 (U/ml) 与其蛋白质含量 (mg/ml) 之比值, 以 U/mg 蛋白质表示。

## 结果与讨论

### 一、测试波长

肾上腺素自氧化至少通过两个不同途径, 其中之一为  $O_2^-$  的链式反应, 可被 SOD 抑制<sup>[11]</sup>。SOD 抑制肾上腺素自氧化的能力作为测定 SOD 活性的基础。肾上腺素自氧化反应机理非常复杂, 需经历不同的中间产物而后转变为肾上腺素红<sup>[13]</sup>。Misra 等的方法<sup>[11]</sup>选择的测试波长为 480nm; sun 改良法<sup>[9]</sup>则选用 320nm。结果见图 1。由图 1 可知, 肾上腺素自氧化累积的中间产物肾上腺素红有两个吸收峰 (320nm, 480nm)。sun 认为 480nm 吸收带弱而宽, 若选用 480nm 检测 SOD 所得数值较低, 用 320nm 检测可提高灵敏度。但我们的实验结果表明, 选用 480nm 为测试波长, 只要严

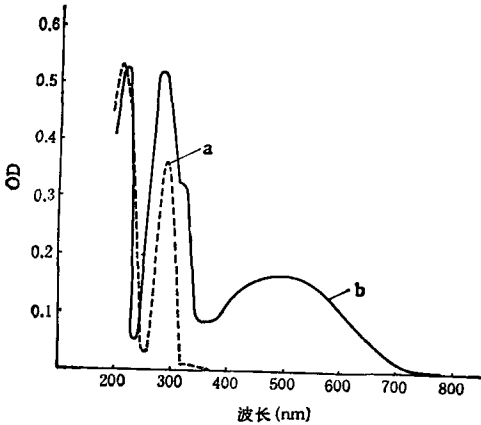


图 1 在波长为 200—900nm 范围内的扫描图(2.5 分钟)  
a 为 2mmol/L 肾上腺素在水中的吸收光谱  
b 为 2mmol/L 肾上腺素在 pH10.2 的碳酸钠缓冲液中的吸收光谱

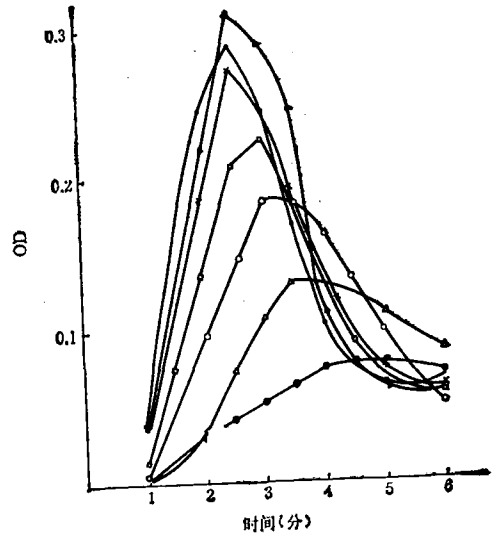


图 2 不同浓度的肾上腺素自氧化曲线  
▲ .....4mmol/L, ● .....3.5mmol/L,  
× .....3mmol/L, □ .....2.5mmol/L,  
○ .....2mmol/L, Δ .....1.5mmol/L,  
● .....1mmol/L

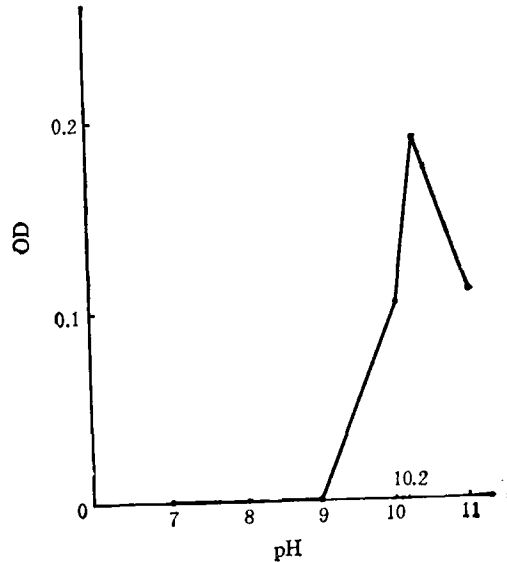


图 3 pH 对肾上腺素自氧化的影响  
(肾上腺素浓度 2mmol/L, 温度 30°C)

格控制在很短的时间间隔内 (2.5 分钟) 完成实验, 完全可以提高灵敏度和准确度, 而且可以不用价值昂贵的紫外分光光度计, 便于在国内一般实验室广泛推广应用。

### 二、肾上腺素浓度的选择

图 2 表明, 肾上腺素浓度在 1—3mmol/L

范围内自氧化速率与其浓度呈线性关系, 自氧化的线性范围在 2mmol/L 时最大。而在 3.5 mmol/L 以上时, 不呈线性关系。且自氧化速率达到高峰的时间随浓度降低而延长, 肾上腺素浓度可决定测定 SOD 活性所需的时间, 肾上腺素浓度应控制在合适光密度值及灵敏度范围内。我们的实验结果表明, 肾上腺素浓度选用 2mmol/L, 测定时间 2.5 分钟较为合适, 3 分钟以后光密度值即开始下降, 测定结果必然偏低。

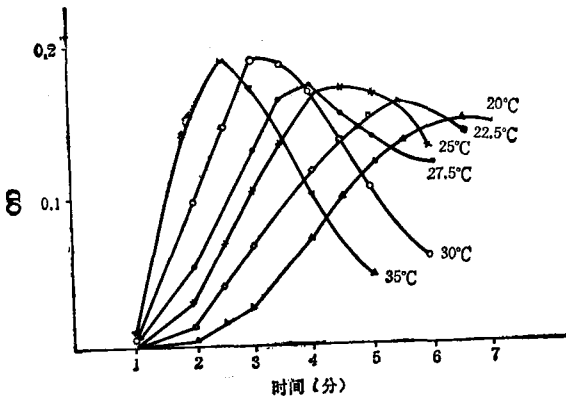


图 4 不同温度对肾上腺素自氧化的影响  
(肾上腺素浓度 2mmol/L, pH10.2)

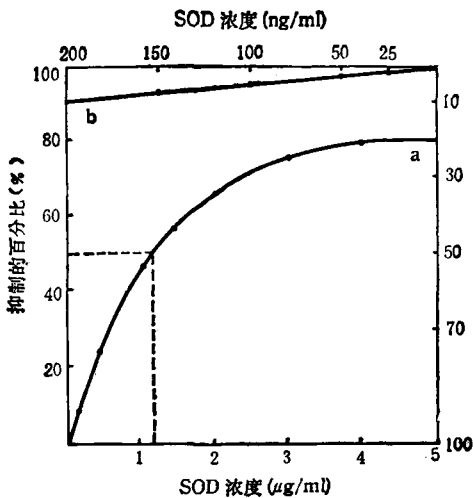


图 5 SOD 对肾上腺素自氧化的抑制

- a. 为 SOD 浓度以  $\mu\text{g/ml}$  表示时对肾上腺素自氧化的抑制曲线
- b. 为 SOD 浓度以  $\text{ng/ml}$  表示时对肾上腺素自氧化的抑制曲线

### 三、pH 对肾上腺素自氧化速率的影响

实验结果表明, 肾上腺素自氧化速率仅在很窄的 pH 范围内达到最高,  $\text{pH} < 10$  或  $\text{pH} > 10.5$  自氧化速率均会受到很大影响。本文采用  $\text{pH} 10.2$  可提高 SOD 活性测定的灵敏度, 与文献[11]报道一致。结果见图 3。

### 四、温度对肾上腺素自氧化速率的影响

在肾上腺素浓度为 2mmol/L, 缓冲液 pH 为 10.2 的条件下, 不同温度对肾上腺素自氧化速率的影响见图 4。可观察到 30°C 线性关系最佳, 线性范围最大, 35°C 时较差, 在 20—27.5°C 之间, 线性关系仅在 2—3 分钟内较好, 故不宜采用。

### 五、SOD 对肾上腺素自氧化的抑制作用

肾上腺素浓度 2mmol/L, 反应溶液 pH 10.2, 温度 30°C, 作为酶活性反应系统的条件, 选定 480nm 为测试波长, 测定不同浓度的 SOD 对肾上腺素自氧化的抑制百分数, 结果见图 5。当 SOD 浓度为 1.2  $\mu\text{g/ml}$  时, SOD 对肾上腺素自氧化的抑制可达 50%。

### 六、稳定性实验

同一份大鼠红细胞 SOD 提取液, 当天测定 SOD 比活性后, 于 4°C 冰箱内放置, 其比活性三天内基本不变, 见表 2。

表 2 SOD 稳定性实验

时间(小时)	4	24	48	72	96	120
SOD 比活性 (U/mg)	53.241	52.410	53.928	49.556	44.420	41.480

注: 同一份正常人红细胞 SOD 提取液作稳定性实验, 结果一致。

### 七、重复性实验

取一份正常人(男, 20 岁)肝素抗凝的血液 (1ml) 按本文介绍的方法制备 20 份红细胞 SOD 提取液, 测定 SOD 比活性,  $\bar{x} \pm \text{SD} = 71.032 \pm 4.212 \text{U/mg}$ , 变异系数  $\text{CV} = 5.03\%$ 。结果在  $\pm 1.20\text{SD}$  之间, 95% 的可信限内, 精确度在 95% 的允许误差范围内。然后将 20 份红细胞 SOD 提取液混合在一起, 测定 SOD 比活性, 共测 15 次,  $\bar{x} \pm \text{SD} = 71.244 \pm 2.306$ ,  $\text{CV} =$

(下转第 130 页)

*halys blomhoffii*) 中分离得到了五种 BPP 组分,并测定了结构。在我国,1981年上海生化所何子安<sup>[6]</sup>等从中国浙江蝮蛇亚种 (*Agkistrodon halys pallas*) 中提纯了一种 BPP 组分,并阐明了其结构。在其他蛇种已知结构的 BPP 中,最大的为十三肽,最小的为五肽,多数在十肽左右,其结构特点是: N 末端都是环谷氨酸, C 末端都是脯氨酸,肽链中脯氨酸含量很高,且往往成双出现。我们从江西蝮蛇毒中提纯得到三个 BPP 组分, P-A、P-B 和 P-C, P-A 为九肽, P-B 为十肽, P-C 为十六肽。从表 1 中可看到, P-A 含四个脯氨酸, P-B 含三个脯氨酸, P-C 含六个脯氨酸,这三个肽链中都含一个谷氨酸。江西蝮蛇毒中 BPP 的氨基酸组成与其他蛇种中 BPP 的组成虽有不同,但脯氨酸含量高,这点是相同的。已有人证明<sup>[13]</sup> BPP 的活性与 C 端脯氨酸二肽有关。BPP 能抑制激肽酶 II 和血管紧张素 I 转化酶(现在认为二者为同一酶)的活性。舒缓激肽是含两个脯氨酸的九肽,血管紧张素 I 是含一个脯氨酸的十一肽, BPP 的结构与两者相类似。BPP 是否通过与舒缓激肽的作用,抑制血管紧张素 I 的转化,这是一个非常有意义的题目。从表 1 中可发现,

江西蝮蛇毒中三种 BPP 组分与浙江蝮蛇及日本蝮蛇毒中 BPP 组分在氨基酸组成上明显的不同之处是 P-A、P-B 和 P-C 中都含组氨酸,而浙江蝮蛇及日本蝮蛇毒中的 BPP 组分都不含组氨酸。

本实验曾得到中科院林土研究所张剑秋,中国医科大学郝文学,赵迺才以及朱明晏、付守庭等的帮助,在此一并致谢。

### 参 考 文 献

- [1] 青木延雄,他:凝固·纤溶·キニン,医学社,日本,1984。
- [2] Cushman, D. W. et al.: *Experientia*, 1973, 29, 1032.
- [3] Cheung, H. S. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1973, 293, 451.
- [4] John, M. S. et al.: *Biochem. Pharmacology*, 1971, 20, 1557.
- [5] Cushman, D. W. et al.: *Biochemistry*, 1970, 9, 2583.
- [6] 何子安等:《生物化学与生物物理学报》,1981,5,451.
- [7] Kato, H. et al.: *Biochemistry*, 1971, 10, 973.
- [8] Ferreira, S. H. et al.: *J. Pharmacol.*, 1965, 24, 163.
- [9] Ferreira, S. H. et al.: *Biochemistry*, 1970, 9, 2583.
- [10] Ondetti, M. A. et al.: *Biochemistry*, 1971, 10, 4033.
- [11] Kato, H. et al.: *Experientia*, 1969, 25, 694.
- [12] Kato, H. et al.: *Experientia*, 1970, 26, 1205.
- [13] Kato, H. et al.: *Experientia*, 1973, 29, 574.

[本文于 1987 年 5 月 30 日收到]

(上接第 126 页)

3.27%。

通过对红细胞 SOD 比活性的测定及其影响因素的探讨,我们建立了一种微量、快速、灵敏、重复性良好的红细胞 SOD 比活性测定方法。适应于儿童及小动物采样,有利于普通生化实验室大批量常规测试工作,可广泛推广应用。

本工作曾得到河南省肿瘤研究所刘增印副研究员的热情帮助,特此致谢。

### 参 考 文 献

- [1] McCord, J. M. and Fridovich, I.: *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 6049.
- [2] Oberley, L. W. et al.: *Cancer Research*, 1979, 39, 1141.

- [3] Marklund, S. L. et al.: *Cancer Research*, 1982, 42, 1955.
- [4] 王赞舜等:《中华老年医学杂志》,1985,4(4)。
- [5] 王灏:《南通医学院学报》,1983,4(2)。
- [6] Marklund, S.: *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 7504.
- [7] Joenge, H. Scand.: *J. Clin. Lab. Invest.*, 1979, 39, 759.
- [8] Sun, M. and Zigman, S.: *Anal. Biochem.*, 1978, 90, 81.
- [9] Tyler, D. D.: *Biochem. J.*, 1975, 147, 493.
- [10] 李益新等:《生物化学与生物物理进展》,1983,(2), 59.
- [11] Misra, H. P. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 3170.
- [12] Miller, G. C.: *Anal. Chem.*, 1958, 31, 964.
- [13] Hawley, M. D. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 1967, 89, 447.

[本文于 1987 年 4 月 7 日收到]