

超氧化物歧化酶活性测定——Pyrogallol-NBT 比色法与化学发光法的比较

蓝开蔚* 黄建鸣 谢之荣 邓碧芳

(四川省肿瘤研究所生化室, 成都)

方允中 刘智峰

(中国军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

提 要

取17份健康人外周血 SOD 粗提液, 用 Pyrogallol-NBT 法和化学发光法进行测定。结果前者均数为 85.7 ± 7.5 ($\mu\text{g/ml}$ 全血), 而后者用 LKB Wallac-1250 型发光仪测得均数为 87.8 ± 10.8 ($\mu\text{g/ml}$ 全血), 两者非常相近。

Pyrogallol-NBT 比色法可以达到化学发光法的效果, 且具有设备简单和操作方便之优点。

超氧化物歧化酶 (SOD ECI, 15.11) 具有清除 O_2^- 自由基的能力。SOD 的存在可能与机体衰老^[1,2], 肿瘤^[3-5], 营养状况^[6,7]和辐射防护等有关。目前测定 SOD 活性的化学法^[8-14], 包括比色法和化学发光法, 基于同一原理——根据 SOD 抑制体系中 O_2^- 自由基的额外电子还原电子受体的作用, 从而抑制电子受体接受电子而产生发光或吸收光谱的变化。不同的测定体系测得的 SOD 活性或含量, 当用同一度量单位表示时, 发现存在着较大的差异。其原因可能是与所用标准 SOD 的单位不同有关。也有文献报道^[15], 是由于测定体系中存在的干扰因素, 尤其在比色法测定体系中, 如共存蛋白, 胺类化合物等干扰因素所致。因此, 本文采用 Pyrogallol-NBT 比色法与不受共存蛋白干扰的化学发光法对正常人外周血 SOD 含量进行了比较实验及分析。

一、材料与方法

1. SOD 粗提液的制备

取肝素抗凝血 0.5ml, 加预冷双蒸水 0.6ml,

表 1 SOD 活性测定程序

试 剂	参比管	参比空白	样品管	样品空白
0.05mol/L Tris-二甲砷酸缓冲液 pH8.2	1.0	1.0	1.0	1.0
16% Triton X-100	0.2	0.2	0.2	0.2
0.98mmol/L NBT	0.5	0.5	0.5	0.5
SOD 粗提液	—	—	0.5	0.5
乙醇应用液	0.5	0.5	—	—
3.6mmol/L 焦性没食子酸	0.01	—	0.01	—
37°C 水浴 5 分钟				
2.0mol/L 甲酸缓冲液 pH 3.5	0.6	0.6	0.6	0.6
721-A 型	540nm 波长比色			

于 0—4°C 溶血 5 分钟, 再依次加入氯仿 0.2ml, 无水乙醇 0.6ml, 剧烈振摇抽提后, 于 0—4°C, 20,000×g 离心 50 分钟, 吸出上清液备用。

2. SOD 活性测定

- 1) Pyrogallol-NBT法^[15] 具体操作见表1。
- 2) 化学发光法 先将粗提液稀释 20 倍,

*已调宁夏医学院生化教研室

然后按文献[14]的方法和用 LKB-1250 型发光仪测定活性。

二、结果与讨论

1. 有关方法学的几项指标

1) SOD 标准抑制曲线 将标准 SOD(中

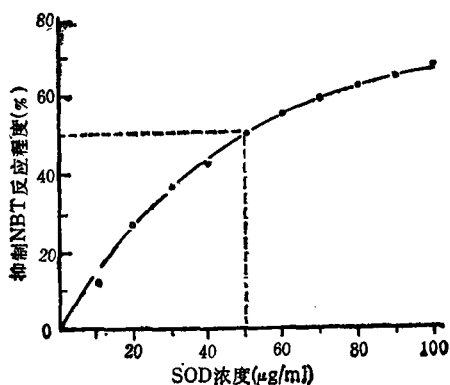


图1 Pyrogallol-NBT 法
SOD 标准液抑制 NBT 反应曲线

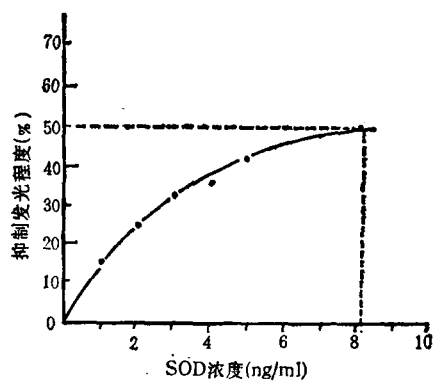


图2 化学发光法
SOD 对 Luminol 发光的抑制曲线

国科学院上海生化所, 批号 8603067)用乙醇应用液配制 100 μg/ml 和 1.0 μg/ml 的标准液, 分别用 Pyrogallol-NBT 法和化学发光法测定不同量标准液的抑制率, 绘制标准抑制曲线, 见图 1 和图 2。按照细胞色素 c 还原法 SOD 活性单位的定义, 从图 1 得出 Pyrogallol-NBT 法 $SODC_{50}$ 为 50.0 μg/ml; 从图 2 得出化学发光法 $SODC_{50}$ 为 8.2 ng/ml。SOD 活性或含量计算方法, 前者采用工作曲线法, 即将不同量标准 SOD 取对数 (lg) 对其抑制率作图, 得一相

关系数 r 为 0.998 的回归直线 $y = -47.25 + 57.37x$; 后者采用比活法:

$$\frac{\text{标准 } SOD C_{50}}{\text{实测样品 } C_x} \times \text{稀释倍数。}$$

2) Pyrogallol-NBT 法的精密度和准确性 取 10 份不同的样品粗提液, 于不同时间各测定

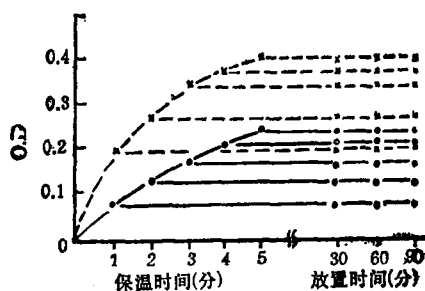


图3 保温时间和放置时间的影响
×---×: 参比管 o——o 测定管

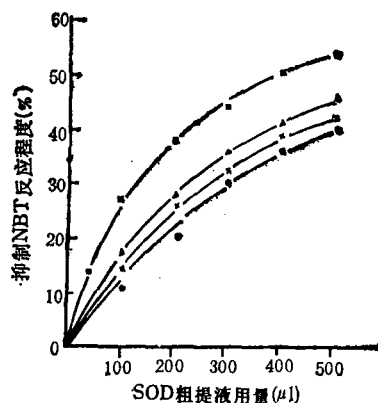


图4 干扰因素对抑制 NBT 反应的影响
□——□ 1mg/ml 肝素 △——△ 4mg/ml (NH₄)₂SO₄
×——× 4mg/ml BSA o——o SOD 粗提液

两次, 得平均批间变异系数 (CV) 为 3.62%; 同时分别向 6 份不同 SOD 含量的粗提液加入已知量的 SOD 标准液进行回收试验, 得回收结果为 90.3—103.8%, 平均为 97.1%

3) Pyrogallol-NBT 法的灵敏度和稳定性 当固定 NBT 浓度时, 体系中 Pyrogallol 自身氧化而产生稳态浓度的超氧自由基 O_2^- , 取决于体系的 pH 值。用不同 pH 值的 Tris-二甲胂酸缓冲液, 测定不同含量 SOD 粗提液, 得知其抑制率与 pH 值的变化成反比。当 pH 值为

8.2时,既能适应 SOD 表现较大活性又能控制 O_2^- 的稳态浓度,且获得较好的灵敏度和误差较小的光密度读数范围。在此条件下,于不同的水浴(37°C)时间和室温放置时间进行试验,见图 3。表明也具有较好的稳定性。

2. 插入性干扰试验 将牛血清白蛋白(BSA), 肝素和 $(NH_4)_2SO_4$ 分别加到不同量 SOD 粗提液中,进行插入性干扰试验,绘制干扰抑制曲线,见图 4。表明这些氨基化合物都具有一定的还原性,同测定体系中的 O_2^- 自由

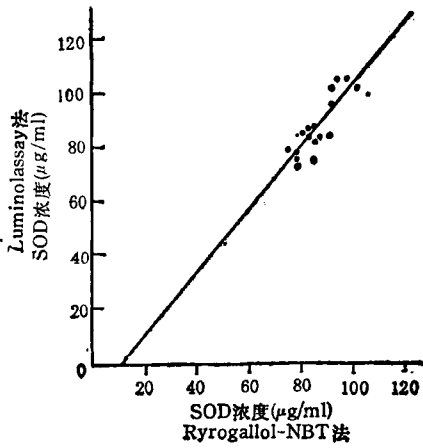


图 5 Pyrogallol-NBT 和化学发光法的回归曲线

$$N = 17 \quad r = 0.823 \quad \hat{y} = -7.92 + 1.11x$$

$$y - \text{Mean} = 16.3 \quad X - \text{Mean} = 15.6$$

基发生作用,干扰了测定体系中 O_2^- 的稳态浓度。试验测得每 1mg 蛋白质的干扰抑制率相当于 2.17µg 标准 SOD 的抑制率。因此,为了保持 O_2^- 自由基在测定体系中的稳定浓度,除控制一定的 pH 值外,应尽可能避免还原性物质的掺入或将其控制在无干扰的范围内,而且在计算 SOD 含量时,应减掉共存蛋白的干扰量,

以获得比较真实的 SOD 活性含量。

3. 测定结果的比较和分析 取 17 份健康人外周血 SOD 粗提液,用 Pyrogallol-NBT 法和化学发光法进行比较测定,按照各自的计算方法进行含量计算,结果前者在减除共存蛋白干扰量后,得均数为 85.7 ± 7.5 (µg/ml 全血),后者得均数为 87.8 ± 10.8 (µg/ml 全血)。二者在统计学上非常相近。同时,对两法测得的各个对应值进行相关和回归分析,相关系数 r 为 0.823 ($P < 0.01$),见图 5。表明 Pyrogallol-NBT 比色法完全可以达到同化学发光法一致的结果,二者有较高的拟合度。

参 考 文 献

- [1] Fridovich, I.: *Science* (Washington D. C.), 1978, 201, 875.
- [2] Hassan, H. M. & Fridovich, I. J.: *J. Bacteriol.* 1979, 132, 505.
- [3] Larry W. Oberley et al.: *Methods in Enzymology*, 1986, 105, 457.
- [4] Larry W. O. et al.: *Cancer Res.*, 1979, 39(4), 1111.
- [5] Isabel, B. B. et al.: *Cancer Res.*, 1980, 40(10), 3636.
- [6] G. de Rosa, C. L. Keen, et al.: *J. Nutri.*, 1980, 111, 795.
- [7] D. M. Williams et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1975, 149, 543.
- [8] McCord, J. M. & Fridovich, I.: *J. Biol. Chem.*, 1969, 257, 2713.
- [9] Oyanagui, Y.: *Biochem. Pharmacol.*, 1978, 27, 777
- [10] Nishikimi, N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, 63, 463.
- [11] Minami, M. et al.: *Clin. Chem. Acta*, 1979, 92, 337.
- [12] Mcphail, L. C. et al.: *J. Clin. Invest.*, 1979, 63, 648.
- [13] Yoshihiko Oyanagui: *Anal. Biochem.*, 1984, 142, 290.
- [14] 李益新:《生物化学与生物物理进展》, 1983(2), 59.

[本文于 1987 年 4 月 18 日收到]

(上接第 100 页)

- [15] Wehrhahn, C. et al.: *Biol. Cybern.*, 1982, 45, 123.
- [16] Wagner, H.: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 1986, 312, 527.
- [17] Wagner, H.: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 1986, 312, 553.
- [18] Wagner, H.: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 1986,

312, 581.

- [19] 张少吾等:《生物物理学报》, 1986, 1(4), 264.
- [20] 张少吾等:《第五届全国生物物理学学术会议论文摘要集》, 1986, 第 109 页.
- [21] 吴卫国等:《解剖学报》, 1986, 17, 96.

[本文于 1987 年 4 月 27 日收到]