

Abstract A convenient, semi-automated flow injection fluoroimmunoassay method has been developed incorporating the flexibility of sample handling of flow injection system containing a immobilized protein A immunoreactor. Protein A can binds the Fc region of most mammalian antibodies at near neutral pH, and the bound antibodies can be eluted from pro-

tein A at acid pH. This peculiar property of protein was exploited to separate the antigen bound to antibody and the unbound ones. Experimental variables have been studied and the method has been used to determine the transferrin contents in human serum.

Key words protein A, fluoroimmunoassay, flow injection, transferrin

用终止剂改进超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法

静天玉 赵晓瑜

(河北大学生物技术研究中心, 保定 071002)

摘要 以二硫苏糖醇 (DTT) 或 *L*-抗坏血酸 (Vit C) 为终止剂改进的经典邻苯三酚法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性. 反应体系: 50mmol/L 邻苯三酚, pH8.20, 总体积 9ml, 25℃, 加一滴 DTT (100mmol/L) 或 Vit C (5%), 约 50μl, 终止自氧化反应. 终止后, 反应体系的 420nm 光吸收在 1h 内保持恒定. 终止剂法的邻苯三酚自氧化率及酶活测定灵敏度与经典法相近, 一个酶活单位相当于纯 SOD 100μg/L.

关键词 超氧化物歧化酶, 邻苯三酚自氧化, 终止反应, O_2^- 清除剂

经典邻苯三酚法 (简称经典法) 是 Marklund 等^[1]于 1974 年发表的一种测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活力的简便方法. 然而该法的呈色反应与光吸收值 (A_{420}) 的测定必须同步进行, 故样品池必须保持恒温, 且不能同时处理多个样品. 丁克祥等^[2]以浓盐酸为终止剂改进了这个方法, 但由于酸化使反应体系的 A_{420} 明显降低. 为提高自氧化率, 必须增加邻苯三酚的剂量, 从而降低了该法的灵敏度; 此外, 用盐酸终止反应后, 必须在 5—8min 内测定 A_{420} ^[3], 这也限制了该法的应用. 本文用二硫苏糖醇 (DTT) 或 *L*-抗坏血酸 (Vit C) 终止邻苯三酚自氧化反应 (简称终止剂法), 克服了上述缺点. 终止后, 反应体系的 A_{420} 在 1h 内保持恒定.

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 邻苯三酚和二

乙撑三胺基五乙酸均为国产分析纯, 普通 (比活 $\geq 5 \times 10^6$ U/g) 及高纯 (比活 $\geq 1 \times 10^7$ U/g) SOD, 系河北大学生物工程公司产品; 721 分光光度计, 上海第三分析仪器厂; 超级恒温器, 重庆实验设备厂.

1.2 方法

1.2.1 经典法自氧化率的测定 在 20ml 试管中加入 9ml Tris-HCl 缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L 二乙撑三胺基五乙酸, pH8.20), 于 25℃ 超级恒温水浴中放置 20min. 用微量注射器加入 40μl 25℃ 预热的邻苯三酚溶液 (45mmol/L 邻苯三酚, 于 10mmol/L HCl 中), 立即混匀并倒入 3cm 光径的样品杯中, 对照杯加 9ml Tris-HCl 缓冲液. 室温 25℃, 每隔 30s 测定一次 A_{420} , 自氧化率 (A_0) 控制在 0.06/min.

1.2.2 终止剂法自氧化率的测定 其步骤与

经典法基本相同,但整个自氧化反应在 25℃ 水浴中进行. 邻苯三酚自氧化准确反应 3min 后,迅速加一滴 (约 50 μ l) DTT 或 Vit C 溶液,立即混匀. 室温下 (不要求恒温) 放置 5min, 于 1 h 内测定 A_{420} . 自氧化率 (A_0) 控制在 0.06/min.

1.2.3 酶活测定 在 Tris-HCl 缓冲液中预先加入一定量的 SOD, 用上述方法测定邻苯三酚自氧化率 (A_s)

$$\text{抑制率} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100\%$$

$$\text{SOD 单位活力 (U/ml)} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times \frac{18}{V} \times N$$

式中 V : 加样体积 (ml); N : 样品稀释倍数.

2 结 果

2.1 终止剂对呈色反应的影响

分别以经典法和终止剂法测定邻苯三酚自氧化率. 图 1 系根据这两种方法绘制的自氧化曲线. 两条曲线完全吻合, 表明终止剂不影响邻苯三酚的呈色反应.

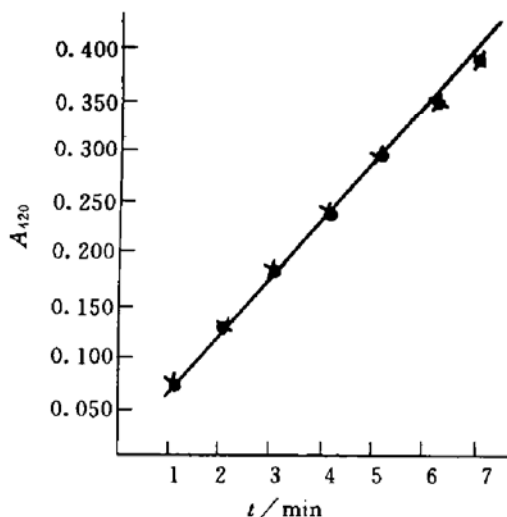


图 1 邻苯三酚自氧化曲线

●—●: 经典方法; ×—×: 终止剂法.

2.2 终止剂浓度及终止时间

反应体系同前. 加入邻苯三酚后, 准确反应 3min, 加入不同剂量的 DTT, 测定自氧化率. 从图 2 可以发现两个明显特点: 第一, 随着 DTT 浓度的提高, 终止时间也相应延长, 当

DTT 终浓度提高到 0.6mmol/L 时, 终止时间可达 1h 以上; 第二, DTT 终止剂一旦失去作用, 邻苯三酚立即恢复自氧化反应. Vit C 也有类似特点, 但自氧化反应不能立即恢复.

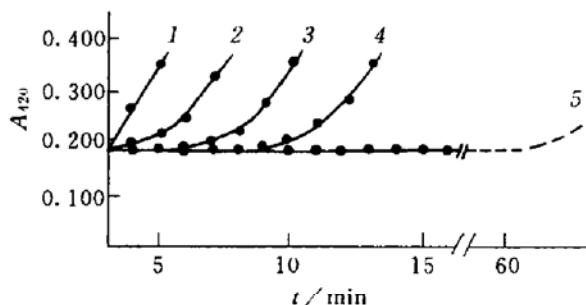


图 2 终止剂 (DTT) 浓度和终止时间的关系

DTT 的浓度: 1: 无 DTT; 2: 60 μ mol/L; 3: 70 μ mol/L; 4: 80 μ mol/L; 5: 600 μ mol/L.

2.3 邻苯三酚自氧化抑制曲线

在 Tris-HCl 中加入不同剂量的高纯 SOD, 按终止剂法测定 SOD 对邻苯三酚自氧化率的抑制百分比. 以 SOD 终浓度 (mg/L) 为横坐标, 抑制百分比为纵坐标作图. 图 3 为典型的酶活力测定曲线. 根据定义, 1ml 反应液, 在上述反应条件下, 使邻苯三酚自氧化率降低 50% 的酶量为一个活力单位. 从图 3 可以看到, 一个活力单位相当于 100ng (0.1 μ g) 纯酶蛋白 (蛋白含量用双缩脲法测定).

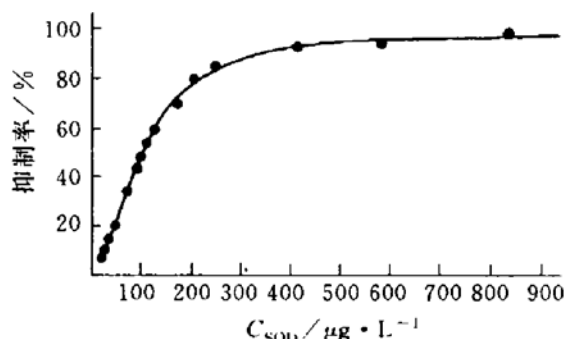


图 3 邻苯三酚自氧化抑制曲线

2.4 终止剂法的重复实验及回收率

对于同一份粗品 SOD 溶液, 以相同的加样量反复测定 20 次, 结果为 298.8 ± 3.6 U/ml

($x \pm s$), 批内 CV 为 1.2%; 对于另一份样品, 以不同的加样量 (抑制比在 30%—50% 范围内), 反复测活 20 次, 结果 $202.6 \pm 3.12 \text{ U/ml}$ ($x \pm s$), 批内 CV = 1.5%. 向三份活力分别为 3270U, 15 000U 和 1750U 的 SOD 样品中加入 SOD 1440U (44%), 2160U (14%) 和 2160U (120%), 用本法测定三个混合样品的总活力并计算回收率, 结果为 102%, 110% 和 97%.

2.5 经典法与终止剂法实测活性比较

取 5 份不同的 SOD 样品, 分别用经典法和终止剂法测定酶活力, 结果如表 1 所示:

表 1 经典法与终止剂法测定的 SOD 活性

样品号	经典法 /U · ml ⁻¹	终止剂法 /U · ml ⁻¹	相对误差/%
1	720	756	4.9
2	191	198	3.6
3	1590	1584	0.4
4	1280	1296	0.9
5	564	594	5.1

间, 终止剂浓度越高, 终止时间就越长.

终止剂既不参与也不影响邻苯三酚的呈色反应, 但能暂时清除引起自氧化反应的 O_2^- . 所以, 经典法和终止剂法的自氧化曲线相互吻合. 图 3 表明终止剂法的灵敏度与经典法相同. 此外, 终止剂法的最大抑制百分比 (98%) 也与经典法 (97.2%—99%)^[1] 基本一致. 实验表明, 终止剂法有较高的重复性和回收率. 由于终止剂的加入, 邻苯三酚自氧化反应与光吸收值的测定独立进行, 并且 A_{420} 在 1h 内保持恒定, 故可以同时测定多个样品. 因此, 终止剂法不但保留了经典法的特点, 而且比后者更加简便.

参 考 文 献

- 1 Marklund S, Marklund G. Eur J Biochem, 1974; 47: 469
- 2 丁克祥, 姚树人. 老年学杂志, 1978; 7 (2): 42
- 3 程君毅. 生化药物杂志, 1988; (2): 53
- 4 Donnelly J K, Mclellan K M, Walker J K et al. Food Chemistry, 1989; 33: 243

The Improved Pyrogallol Method by Using Terminating Agent for Superoxide Dismutase Measurement. Jing Tianyu, Zhao Xiaoyu (Research Center of Biotechnology, Hebei University, Baoding 071002, China).

Abstract The pyrogallol autoxidation method used for superoxide dismutase measurement has been improved by using DTT or Vit C as a terminating agent. The reaction system consists of 50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L diethylene-triaminepentaacetic acid, 0.2mmol/L pyrogallol, pH 8.20 at 25°C in a total volume of 9ml, one drop (about 50μl) of DTT (100mmol/L) or ascorbic acid (5%) being added to stop the autoxidation reaction. The absorbance at 420nm of the reaction system after terminating the reaction keeps constant for an hour.

Key words superoxide dismutase, pyrogallol autoxidation, stopped reaction, O_2^- scavengers

3 讨 论

邻苯三酚自氧化是一类链式反应, 在自氧化过程中, O_2^- 不断消失又不断生成, 达到稳态时, 其浓度保持恒定. 邻苯三酚在自氧化过程中形成一系列在 400—425nm 处有光吸收的中间产物. 当 pH < 9 时, 邻苯三酚的自氧化率呈 O_2^- 浓度依赖性^[1]. SOD 是专以 O_2^- 为底物的金属酶. 在有质子的介质中, 它迅速将 O_2^- 歧化, 产生 O_2 和 H_2O_2 , 从而使邻苯三酚自氧化率降低.

O_2^- 在水溶液中是中等强度的还原剂和弱氧化剂, 它能迅速参与单电子还原反应, 但也能被强还原剂还原^[4]. DTT 和 Vit C 为强还原剂, 当它们作为邻苯三酚自氧化反应终止剂加到反应体系时, 便迅速与 O_2^- 反应, 从而阻止了邻苯三酚自氧化反应继续进行. 但是, 当浓度很低时, 终止剂会很快被 O_2^- 氧化, 于是邻苯三酚的自氧化反应又重新建立. 所以, 终止反应的延续时间实际上是终止剂连续被消耗的时间.