

文章编号: 1000-2243(1999)S0-0065-02

超氧化物歧化酶的荧光分析法

林游宇¹, 郭祥群¹, 冯涛², 郑微云²

(1. 厦门大学化学系, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学环境科学中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 对肾上腺素自氧化反应进行了研究, 发现反应中间产物能发出较强的荧光, 其生成量受超氧化物歧化酶的抑制. 据此建立了分析超氧化物歧化酶的新方法. 该方法线性范围为 0~52.6 ng/mL, 检测限为 8.56 ng/mL, 相对标准偏差为 1.6% ($n=6$).

关键词: 超氧化物; 歧化酶; 荧光分析法

中国图书分类号: O657.32

文献标识码: A

超氧化物歧化酶(SOD)是一种十分重要的体内抗氧化酶, 因而, 它的定量一直是自由基科学及相关学科研究中的一个重要指标. 据文献报道, 肾上腺素自氧化反应能为SOD所抑制^[1]. 此反应测定SOD的灵敏度取决于肾上腺素的浓度, 肾上腺素的浓度越低, SOD对反应的抑制率就越高^[2]. 然而, 肾上腺素自身荧光量子产率很低, 因而在低浓度下难以用荧光分析法加以检测. 实验中发现, 肾上腺素自氧化反应的中间产物能发出很强的荧光, 其激发/发射波长为333 nm/533 nm. SOD的浓度与此中间产物荧光峰值的降低成线性关系. 由于荧光分析法灵敏度较高, 便可以通过降低肾上腺素浓度获得SOD分析的高灵敏度. 为此, 本文提出荧光光度法测定SOD的新方法.

1 主要仪器与试剂

RF-5000 荧光分光光度计 (Shimadzu); 760CRT 双波长紫外可见分光光度计 (上海第三分析仪器厂); 超氧化物歧化酶 (Sigma) 标准溶液 2.63 $\mu\text{g/mL}$; 肾上腺素 (中国生物药品检定所) 标准溶液 1.0 mmol/L (0.01 mol/L HCl); 其余的试剂均为分析纯, 水为二次去离子水重蒸.

2 实验方法

在10 mL容量瓶中加入6 mL 0.1 mol/L pH 9.8的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲溶液, 稀释至刻度. 然后加入20 μL 1.0 mmol/L 肾上腺素溶液, 迅速摇匀, 1 min后开始记录其中间产物的荧光强度动力学曲线, EX/EM=333 nm/533 nm, 读取其峰值. 测定SOD时, 先加入不同浓度的SOD标准溶液后再定容.

3 结果与讨论

收稿日期: 1999-06-07

作者简介: 林游宇(1976-), 女, 硕士研究生.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29677014)

1) 温度的影响 实验表明, 温度越高, SOD 的活性越大. 为与其他常用方法比较, 将反应与测定温度控制在 250 °C.

2) pH 值的影响 实验表明, 随 pH 值升高, 肾上腺素自氧化反应速度加快, SOD 对中间产物荧光峰值的抑制率增大, 但中间产物的荧光峰值随 pH 值升高而下降. 综合考虑各因素, 选择 pH 值为 9.8. 选择最佳缓冲液用量为 6mL.

3) 工作曲线与检测限 在最佳实验条件下, SOD 浓度与中间产物的荧光峰值在 0 ~ 53 ng/mL 范围内成线性, 工作曲线为 $F = -3.5 \times 10^7 c + 39$ ($r = 0.992$), c 的单位为 g/mL. 测定 26ng/mL SOD 的相对标准偏差为 1.6% ($n = 6$). 检测限为 8.6ng/mL SOD.

4) 方法比较 将此方法与改良的邻苯三酚自氧化^[3]、肾上腺素自氧化紫外一可见分光光度法^[1]测定 SOD 方法的灵敏度进行了比较, 结果见表 1:

表 1 不同方法测定超氧化物歧化酶的结果比较

测定方法	工作曲线	线性范围/ g·mL	检测限/ g·mL
邻苯三酚分光光度法	$A = -7.6 \times 10^3 c + 0.023$	$0 \sim 4.2 \times 10^{-7}$	4.6×10^{-7}
肾上腺素分光光度法	$A = -8.3 \times 10^3 c + 0.074$	$0 \sim 3.2 \times 10^{-7}$	7.3×10^{-7}
肾上腺素荧光法	$F = -3.5 \times 10^7 c + 39$	$0 \sim 5.3 \times 10^{-8}$	8.6×10^{-9}

参考文献:

[1] Sun Mol L, Zigman S. An improved Gpectrophotometric assay for superoxide bismutase based on epinephrine autoridatin [J]. Anal Biochem. 1978 90: 81 ~ 89.
 [2] 邹国林, 胡文玉, 邱涛, 等. 几种超氧化物歧化酶测活方法灵敏度的研究 [J]. 武汉大学学报, 1997, 43 (2): 233 ~ 236
 [3] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测活方法——邻苯三酚自氧化法的改进 [J]. 生物化学与生物物理进展. 1986 (4): 71 ~ 73.

Fluorimetric Determination of Superoxide Dismutase

LIN You-yu¹, GUO Xiang-qun¹, FENG Tao², ZHENG Wei-yun²

(1. Department of Chemistry, Xiamen University, Fujian Xiamen 360015, China; 2 The Environmental Science Research Center, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

Abstract: A fluorescent method is proposed for the determination of superoxide dismutase (SOD) based on epinephrine autoxidation. We found that the intermediate product of the autoxidation process of epinephrine autoxidation. Can fluoresce rather strongly at 533nm when excited at 333 nm. The amount of SOD is linearly dependent on the extent of the decrease of the fluorescence of the immediate. Under optimum conditions, the calibration graph was linear over a range of 0 ~ 53ng/mL SOD. The detection limit was 8.6ng/mL SOD. The relative deviation was 1.6% for 26ng/mL SOD ($n = 6$).

Keywords: superoxide; dismutase; fluormetry