

## § 技术与方法 §

# 两种简便又较为准确检测 SOD 酶活性的方法

张博润 刁爱坡\* 欧阳京

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要** 由于SOD的作用底物极不稳定,至今还未建立统一的检测SOD酶活性的方法,该文介绍了两种既简便又较为准确检测样品SOD酶活性的方法,采用这两种方法可较为准确地测定出不同样品的SOD含量及酶活性。

**关键词** 超氧化物歧化酶,酶活性,检测方法

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,简称SOD)广泛存在于生物体内,它是生物体内的超氧自由基( $O_2^-$ )的一种重要的清除剂,是生物体防御氧化损伤的重要酶。由于SOD的底物极不稳定,至今尚未找到一种既简便又准确的检测SOD酶活性的方法,换言之,目前国内外还无一个统一的检测样品SOD酶活性的方法。一般采用的测定SOD酶活性的方法均属间接法,主要有化学测定法,免疫测定法,等电聚胶法和聚丙烯酰胺凝胶电泳法<sup>[1-3]</sup>等。尽管测定SOD的酶活的方法很多,但由于测定方法不同和具体测定条件不同,不同实验室测定同一样品的酶活相差很大,有的甚至相差近千倍,甚至同一人采用不同方法测定同一样品所得数据相差也较大<sup>[4]</sup>。我们在进行酵母菌SOD的研究和检测有关单位送检样品中也发现这一现象,并对其进行了比较研究。<sup>[5,6,9]</sup>本文介绍两种既简便又较为准确检测样品SOD酶活性的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

1.1.1 连苯三酚,贵州遵义化工厂生产,用10mmol/L HCl配制成50mmol/L的溶液。

1.1.2 pH8.30, 50mmol/L的 $K_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$ 缓冲液。

1.1.3 蛋白染色液: 甲醇:水(1:1, v/v) 90ml+10ml冰乙酸+0.25克考马斯亮蓝R250。

1.1.4 蛋白染色脱色液: 甲醇:水:冰乙酸(4.5:4.5:1 v/v/v)。

1.1.5 SOD酶活性正染色液: 2mmol/L茴香胺, 0.1mmol/L核黄素, pH7.2的10mmol/L磷酸缓冲液。

1.1.6 SOD酶活性负染色液 I: 375 $\mu$ mol/L氯化硝基四唑氮蓝(NBT)。

1.1.7 SOD酶活性负染色液 II: 0.028mol/L四甲基乙二胺,  $2.8 \times 10^{-5}$ mol/L核黄素,  $10^{-2}$ mol/L EDTA的pH7.2, 0.05mol/L磷酸缓冲液。

1.1.8 猪血红细胞Cu/Zn-SOD(沈阳农大), 酵母细胞Cu/Zn-SOD(本实验室), 标准Cu/Zn-SOD(Sigma公司), 氯化硝基四唑氮蓝(NBT)(国产), 茴香胺(瑞士)。

1.1.9 UV-754紫外分光光度计, 上海第三分析仪器厂; pH数字显示计, 上海第三分析

\* 沈阳农业大学代培硕士研究生  
1996-06-10收稿

器厂。

## 2 测定方法

### 2.1 连苯三酚法测定 SOD 活性

参照文献 [7] 的方法, 稍作改进, 具体操作如下。

**2.1.1 连苯三酚自氧化速率的测定:** 在 25℃, 4.5ml 50mmol / L, pH8.3  $K_2HPO_4$  -  $KH_2PO_4$  缓冲液中加入 10 $\mu$ l 50mmol / L 的连苯三酚, 迅速摇匀, 倒入光径 1cm 的比色杯, 在 325nm 波长下每隔 30s 测一次 A 值, 要求自氧化速率控制在 0.070 OD / min 左右。

**2.1.2 酶活性测定:** 测定方法与测连苯三酚自氧化速率相同, 在加入连苯三酚前加入待测 SOD 样液, 同时测定 Sigma 公司的 SOD 标准品, 对所测样品 SOD 活性进行校正。测得数据按下列公式计算酶活性 (SOD 酶活性定义: 在 1ml 反应液中, 每分钟抑制连苯三酚自氧化速率达 50% 时的酶量为一个酶活单位, 即 325nm 0.035OD / min 为一个酶活单位):

$$\text{酶活性 (IU/ml)} = \frac{0.070 - A(325\text{nm})/\text{min}}{0.070} \times 100\% \\ \times \text{反应液总体积} \frac{\text{样品液稀释倍数}}{\text{样品液体积}}$$

校正的酶活性 (McCord / ml)

$$= \text{酶活性 (IU/ml)} \times \frac{\text{Sigma 公司标定的 Cu / Zn-SOD 酶活性 (Mc Cordu / ml)}}{\text{测定 Sigma 公司 Cu / Zn-SOD 的酶活性 (IU / ml)}}$$

### 2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定 SOD 酶活性

参照文献 [8] 的方法, 稍作改进, 具体操作如下。

**2.2.1 凝胶电泳:** 按常规方法制胶, 分离胶浓度为 7%, 浓缩胶浓度为 2.5%, 180V 恒压下电泳 5h。

**2.2.2 SOD 蛋白谱带染色:** 电泳完毕后, 取出凝胶浸泡于蛋白染色液 (R250) 中染色 4h, 水洗两次, 再浸泡于脱色液中脱色, 直至出现清晰的蛋白谱带。

**2.2.3 SOD 酶活性正染色:** 电泳完毕后, 将凝胶于室温下浸泡于含有 2mmol / L 茴香胺, 0.1mmol / L 核黄素, pH7.2 的 10mmol / L 磷酸缓冲液中 1h, 快速水洗两次, 光照 5~15min 显示棕色的 SOD 活性谱带。

**2.2.4 SOD 酶活性负染色:** 电泳完毕后, 将凝胶于室温下浸泡于含有 375 $\mu$ mol / L NBT 中 30min, 再将凝胶放入含有 0.028mol / L 四甲基乙二胺,  $2.8 \times 10^{-5}$ mol / L 核黄素,  $10^{-2}$ mol / L EDTA 的 pH7.2, 0.05mol / L 磷酸缓冲液中, 并在上述光照条件下光照 15~30min, 在蓝色背景上呈现无色透明区带则为 SOD 活性谱带。

## 3 结果和讨论

测定 SOD 酶活性的方法很多, 其中连苯三酚自氧化法经过不断的改进, 具有操作简便, 试剂简单等优点。该方法在测定比较纯的 SOD 样品时重复性较好, 但测定纯度不高的 SOD 样品时, 由于样品中的一些杂质对活性测定干扰较大。比如在标准 SOD 样品中加入一些无机盐 [如  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $CuSO_4$  等], 其测定结果与标准品的测定结果有很大的差异。此外, 直接用  $(NH_4)_2SO_4$  和维生素 C (Vc) 溶液代替 SOD 样品进行测定, 连苯三酚自氧化速率会受到抑制, 从而造成样品具有 SOD 活性的假象。实验结果分析表明, 连苯三酚自氧化法在测定一些纯度不高的 SOD 样品时所得数据不准确。因此对于纯度不高的 SOD 样品应经纯化 (如层析, 透析, 离心等) 后, 用此法测定酶活, 若同时以标准 SOD 样品 (如 Sigma 公司的 SOD) 作为对照, 对该方法所测酶活进行校正, 再按材料和方法中所列公式计算其 SOD 酶活性, 便可较准确测得样品的 SOD 酶活性。

用连苯三酚法测定 SOD 活性时, 亦有其不足之处, 如对一些含 SOD 酶活低的样品, 如 SOD 化妆品, SOD 口服液, SOD 食品等, 由于 SOD 含量低, 干扰物质多等原因, 测定结果误差很大。我们近几年在对海内外送检的 SOD 样品的分析中, 建立了采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定 SOD 酶活性的方法, 具体操

作如下: 将待测 SOD 样品与标准 SOD 样品(如 Sigma 公司的 SOD)进行电泳后, 可直接进行 SOD 蛋白谱带染色, SOD 酶活性正染色, SOD 酶活性负染色。通过 SOD 蛋白谱带染色显示出现清晰的蛋白谱带, 即能估计样品中的 SOD 含量, 又能看出样品中 SOD 的纯度; 通过 SOD 正染和负染, 根据凝胶上显示出的 SOD 活性谱带, 可直接判定样品是否含有 SOD。由于 SOD 正染和负染的灵敏度较高, 0.1 个酶活单位(IU)的 SOD 在凝胶上即可显示出可目测的 SOD 活性谱带, 因此可配成一系列 SOD 浓度梯度的标准样品, 同待测样品一起电泳和染色, 用直接目测比较便可较准确的

测得样品的 SOD 活性。通过对 SOD 活性谱带进行线性扫描便可准确地测出样品的 SOD 活性。

我们通过反复实验证明 SOD 正染法比负染法好, 正染后的棕色谱带比负染后的透明谱带保持的时间长, 不易模糊。正染法使用的茴香胺用量小, 价格也比较便宜, 不失为一种测定 SOD 活性的较理想方法, 值得推广。

在分析测定 SOD 活性时, 使用标准 SOD(如 Sigma 公司的 Cu/Zn-SOD)作为对比, 得出的结果准确可信。下表列出了采用这两种方法测定不同来源的 SOD 样品的结果。

综上所述, 在当前国内还无统一的检测样

| 样品名称及<br>标定活性                    | 连苯三酚法     | 电泳法                      |                          |                          |
|----------------------------------|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                                  |           | 蛋白谱带染色                   | 酶活性正染色                   | 酶活性负染色                   |
| Cu/Zn-SOD(Sigma)<br>(3900IU/mg)  | 3850IU/mg | 明显的蛋白<br>谱带(0.5 $\mu$ g) | 明显的活性<br>谱带(0.1 $\mu$ g) | 明显的活性<br>谱带(0.1 $\mu$ g) |
| 猪血Cu/Zn-SOD(沈阳农大)<br>(350IU/ml)  | 328IU/ml  | 明显的蛋白<br>谱带(5 $\mu$ l)   | 明显的活性<br>谱带(10 $\mu$ l)  | 明显的活性<br>谱带(10 $\mu$ l)  |
| 酵母Cu/Zn-SOD(本实验室)<br>(2950IU/mg) | 2950IU/mg | 明显的蛋白<br>谱带(1 $\mu$ g)   | 明显的活性<br>谱带(0.2 $\mu$ g) | 明显的活性<br>谱带(0.2 $\mu$ g) |
| SOD营养品(台湾某公司)<br>(1195IU/g)      | 0 IU/g    | 无蛋白谱带<br>(100mg)         | 无活性谱带<br>(100mg)         | 无活性谱带<br>(100mg)         |
| R-营养品(台湾某公司)<br>(603IU/g)        | 0 IU/g    | 无蛋白谱带<br>(100mg)         | 无活性谱带<br>(100mg)         | 无活性谱带<br>(100mg)         |

品 SOD 酶活性方法的情况下, 采用上述两种方法便能较准确地测定不同样品的 SOD 含量及酶活性。

### 参 考 文 献

- [1] Markland S, Markland G. Eur J Biochem, 1974, 47(11): 469~474.
- [2] Forman H J, Fridovich I. Arch Biochem Biophys, 1973, 158(1): 396~400.
- [3] Beauchamp P C O, Fridovich I. Anal Biochem, 1971, 44(1): 276~287.
- [4] 冯启浩, 袁勤生. 全国食品添加剂通讯, 1992, 3: 42~46.
- [5] 张博润, 田宇清, 黄英等. 微生物学报, 1994, 34(4): 279~284.
- [6] 张博润, 黄英, 田宇清等. 生物工程学报, 1995, 11(1): 77~80.
- [7] 邓碧玉, 袁勤生, 李文杰. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(2): 163.
- [8] 杨唐斌, 梅尚筠. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(6): 468~470.
- [9] 张博润, 黄英, 田宇清等. 微生物学通报, 1994, 21(4): 210~213.