

豬血中超氧歧化酶” 滲瞻 P 活性測定

黃政弘、涂瑞澤；涂耀國

E-mail: 9808764@mail.dyu.edu.tw

摘要

本實驗主要分為二部份，第一部份是以三種不同的 SOD 活性測定法，來偵測不同活性單位的牛血 SOD，以製作標準曲線，並探討對於不同活性單位牛血 SOD 的靈敏度，尋找最適於純化過程中使用的活性測定法。第二部份是由豬血中將 SOD 純化出來，並探討其特性。首先探討 SOD 的活性測定法，在黃嘌呤 + 黃嘌呤氧化酶” k 的反應中，反應混合溶液 3.0 mL 中，黃嘌呤氧化酶” 瑪@度為 0.05 U 時，對於 SOD 的感受性最高。在牛血 SOD 的活性從 0.25 - 5.0 U 時，從吸光值的變化即可得知 SOD 的存在與否。但此反應的混合溶液在配置後經過 24 hr，即不再適用於 SOD 活性的測定。在 NBT 的光還原反應中，從 pH 值與反應吸光值的關係可以得知，當 pH 為 7.8 時，牛血 SOD 的感受性較高。沒有 SOD 存在的情形下，反應開始後 6 min，其吸光值每分鐘增加的平均速率可達 0.0540 /min，於總體積 3.0 mL 加入 1.0 U 的 SOD 標準品時，抑制率為 50%。對於 SOD 的感受性比黃嘌呤氧化酶” t 來得高，當牛血 SOD 的活性單位在 0.0625 - 5.0 U 時，從吸光值的反應上都可以很明顯的看出變化。但必須注意，反應混合溶液超過四天便不能再使用。在以 pyrogallol 的自氧化法測定 SOD 活性時，實驗結果得知，若以牛血 SOD 製作標準曲線時，當牛血 SOD 的活性在 0.0625 - 5.0 U 的範圍內，可以明顯的從每分鐘的吸光值平均增加速率的變化觀察出來，且是以對數的比例減少；當牛血 SOD 的活性為 10.0 U 時，在吸光值的變化上雖可看出變化，但因為吸光值的增加速率已經很小，所以還是在有效的範圍內所測得的值較為可靠。對於 SOD 的靈敏度 pyrogallol 自氧化反應與 NBT 光還原法不相上下。但所需控制的變因卻僅有 pH 值及反應物的濃度，且 pyrogallol 於 0.2 M 的 HCl 酸性溶液中，其貯存期可長達二星期，對於冗長的純化過程來說，可說是一非常容易操作的活性測定法。SOD 從豬紅血球中分離出來之後，經離子交換樹脂與膠滲層析純化，可得到比活性為 3,700 U/mg 的 SOD 蛋白質約 60 mg，回收率大約為 44%。經過 native-PAGE 電泳法的分離可知，豬血中所含的 SOD 有兩種，與牛血 SOD 比較後，其中一種具有與牛血 SOD 大約相同的帶電荷，另一種可能所帶的電荷較牛血 SOD 小，而在豬紅血球中所含的 SOD 是以後者為多。經過膠滲層析 (Bio Gel P-30) 與 SDS-PAGE 的分離之後，發現此兩種豬血 SOD 的分子量約為 34,000 Da，再經加熱變性解離之後，可得二個次單位其分子量約為 17,000 Da。經過以抑制劑鑑定後，證實豬血中所含的 SOD 為 Cu,Zn-SOD。將上述純化所得之豬血 SOD，在 pH 4.0 - 7.8 的溶液中貯存 24 hr 其活性並不受影響；在 pH 7.8 - 11.0 的範圍內，隨著 pH 值的增加則活性下降，當 pH 值上升至 11 時 SOD 的活性最小。在熱安定性方面，豬血 SOD 於 70 °C 下，加熱 30min 後，仍能夠維持 60% 以上的活性；溫度升高至 100 °C 加熱 60 min 後，僅剩下約 1% 的活性。

關鍵詞：豬血、超氧歧化酶

目錄

參考文獻