

MC-Transaction on Biotechnology, 2010, Vol. 2, No. 1, e2

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

光照度對硝基藍四氮唑光照反應的影響

鄭建瑋、簡宏霖、梁致遠*

銘傳大學 健康科技學院 生物科技學系(中華民國 台灣 桃園)

中文摘要

以光照激發核黃素產生超氧自由基的方式,研究硝基藍四氮唑光照還原法的影響因子。結果表明,光照度、硝基藍四氮唑濃度及緩衝溶液的 pH 會影響硝基藍四氮唑光照還原反應後的吸光值。相同光照度,隨著硝基藍四氮唑的濃度增加,光照還原反應後吸光值平均速率遞增。在 pH 7.8、高濃度硝基藍四氮唑條件,隨著光照度的增加,光照還原反應後吸光值平均增加速率隨之增加;低濃度硝基藍四氮唑,雖提高光照度,但能夠反應的硝基藍四氮唑有限,光照還原反應後吸光值平均速率無法隨光照度增加而增加。在相同光照度, pH 7.8 條件下的光照還原反應後吸光值平均增加速率較 pH 7.0 者為高。

關鍵字:核黃素、硝基藍四氮唑、光照度

通訊作者:梁致遠[liang121@mail.mcu.edu.tw]

收稿:2010-10-7 修訂:2010-12-12 接受:2010-12-23

緒 論

超氧自由基(superoxide radical)是氧化與還原反應的中間產物,具毒性,能形成羥基自由基及過氧化氫化合物(hydroperoxide),造成細胞受損、發炎、動脈粥狀硬化及老化[1, 2]。

超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)廣泛存於生物體中的金屬酶,能催化超氧自由基轉為 H_2O_2 及 O_2 ,進而清除細胞所產生的超氧自由基。超氧歧化酶可防止膜脂質的氧化,達到保護的效果[3],研究指出高血壓病患出現超氧歧化酶明顯降低[4];Husain 等[5]發現,酒精誘導的大鼠大動脈一氧化氮下降,大動脈中 Cu、Zn-SOD 和 Mn-SOD 活性明顯下降。

超氧歧化酶的活性可以反映清除超氧自由基的能力,有直接和間接的測定方法。

直接測定是測量反應過程中超氧自由基濃度的變化，進而測出超氧歧化酶的活性，往往需要精密昂貴的儀器及設備。間接測定是產生超氧自由基的系統，檢測產生的自由基，再以超氧歧化酶對此反應的抑制程度，間接測定超氧歧化酶的活性。間接測定方法有嘌呤氧化酶法(xanthine+xanthine oxidase)[6]、鄰苯三酚(pyrogallol)自氧化法[7]及硝基藍四氫唑(nitro blue tetrazolium, NBT)光照還原反應法[8]。

硝基藍四氫唑光照還原反應是測定超氧歧化酶活性常見的方法之一，核黃素是一種光敏感的維生素，在水溶液中受光照容易被破壞，可被紫外線(UV)和可見光激發，利用核黃素在光照下產生活性氧自由基，能將硝基藍四氫唑還原為藍色的Formazan化合物，在 560 nm 波長有最大吸收，當超氧歧化酶存在時，因超氧歧化酶能清除超氧自由基，硝基藍四氫唑的還原作用被抑制，Formazan 化合物減少，透過分光光度計，測定硝基藍四氫唑還原產物可以間接反映超氧歧化酶的活性[9]。

儘管已有對硝基藍四氫唑光照還原影響的因子研究，如溫度、硝基藍四氫唑濃度、過氧化酶的干擾[10, 11]、光照度(Lux)及反應時間[12]等的討論，但實際在操作上往往發生疑問：(1)文獻上使用不同瓦數的燈具，如使用 15 W [8]或 13 W [1]或 20 W 螢光燈[13]等的不同條件作為光源，而不同的光源強度對核黃素產生超氧自由基的能力是否有影響？(2)核黃素經光照反應，不同的 pH 環境下對超氧自由基的影響(3)不同濃度的核黃素經光照反應，對硝基藍四氫唑光照還原反應的影響 (4)不同濃度的硝基藍四氫唑對光照還原反應的影響等。因此本研究透過光照度、照光反應時間、硝基藍四氫唑濃度、緩衝溶液 pH 等因素，進一步研究硝基藍四氫唑光照還原反應發生的關聯性，以期(1)評估核黃素在光照下產生超氧自由基的影響因子(2)探討以硝基藍四氫唑光照還原法作為偵測超氧歧化酶時的影響因子。

材料與方法

(一)材料

1. **光照暗箱**：改造長、寬、高各為 50、40、30 公分的上蓋式塑膠箱，上蓋裝設 30 W 圓型螢光燈管(fluorescent lamp)，使用穩壓器控制電壓，固定測定位置，以照度計(Model YF-170)偵測光照度，藉穩壓器控制光照度，箱內貼滿白色紙板，光照時，箱外鋪蓋黑布遮光。
2. **藥品**：核黃素(riboflavin)、L-甲硫胺酸(L-methionine)、硝基藍四氫唑、磷酸氫一鉀及磷酸氫二鉀均為 Sigma 公司產品。
3. **儀器**：分光光度計(PerkinElmer Lambda35 UV/Vis spectrometer)。

(二) 實驗方法

本實驗硝基藍四氫唑光照還原反應法參考 Beauchamp 與 Fridovich (8)的方法，經修飾而成，取 109.3 mg L-methionine 加入 73.23 ml 100 mM 的磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.8)，待其充分溶解後再加 10 mg 的硝基藍四氫唑，充分溶解成 A 液。配製 4.4 mg/100 mL 的核黃素溶液，充分溶解成 B 液。藥品皆新鮮配製。分析測定時，取 1.53 mL 的 B 液入 A 液，在 3 ml 反應液中，於螢光燈下進行光照還原反應，硝基藍四氫唑光照後還原的產物 Formazan，以分光光度計偵測，在 560 nm 波長有最大吸收。L-甲硫胺酸終濃度為 0.01 M，硝基藍四氫唑終濃度為 167 μ M，核黃素終濃度為 2.4 μ M。實驗為三重覆。

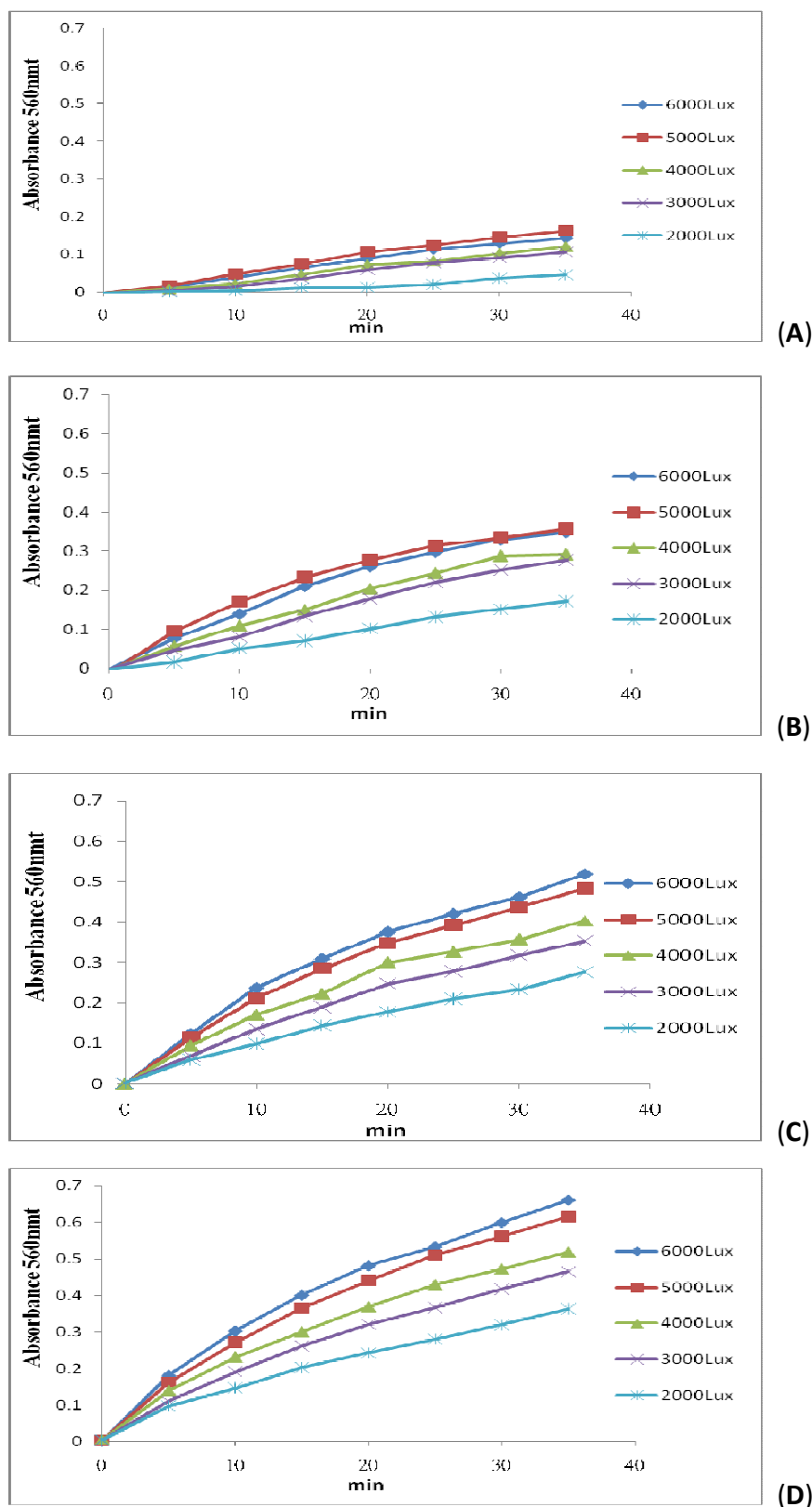
硝基藍四氫唑光照還原反應的影響因素：

- 1.光照度的影響：使用光照暗箱，控制光照為 2000、3000、4000、5000 及 6000 Lux。光照暗箱使用時先暖機至光源穩定，每五分鐘測定硝基藍四氫唑光照還原反應後的吸光度。
- 2.硝基藍四氫唑濃度的影響：以不同硝基藍四氫唑濃度(13.9、27.8、55.5 及 167 μ M)，偵測光照還原反應後 560 nm 的吸光度。
- 3.緩衝溶液 pH 值的影響：調整緩衝溶液的 pH 為 7.0 及 7.8，偵測光照還原反應後 560 nm 的吸光度。

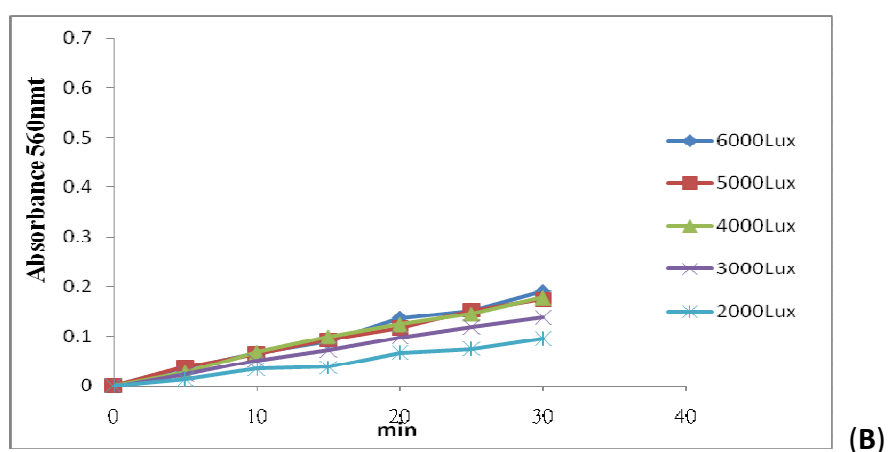
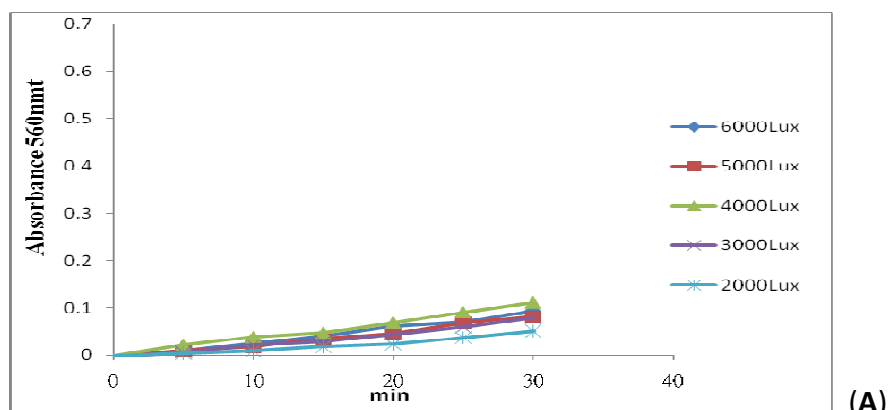
實驗結果

硝基藍四氫唑濃度對生成物吸光值的影響

不同硝基藍四氫唑的濃度進行光照還原反應。圖一及圖二是不同濃度的硝基藍四氫唑在 pH 7.8 及 pH 7.0 環境下，經光照還原反應後的生成物吸光值，隨著硝基藍四氫唑濃度增加，生成物在 560 nm 的吸光值增加。表一是將圖一及圖二的反應時間和生成物的吸光值作比較，得出光照反應後吸光值平均增加速率 (Abs/min)。在 pH 7.8 及光照度為 4000 Lux 條件下，低濃度硝基藍四氫唑(13.9 μ M)的光照還原反應後吸光值平均增加速率為 0.0034/min，隨著硝基藍四氫唑濃度增至 27.8、55.6 及 167 μ M，吸光值平均增加速率增至 0.0093、0.0127 及 0.0166 /min；由表一，在相同的光照度條件，當硝基藍四氫唑的濃度增加，光照還原反應後吸光值平均增加速率增加，表示核黃素經光反應激發產生超氧自由基，當硝基藍四氫唑濃度增加，有足夠的反應物和超氧自由基作用，持續形成 Formazan，增加還原反應後的生成物吸光值。



圖一、(A) 在 pH 7.8，以 $13.9 \mu\text{M}$ 硝基藍四氮唑於不同光照度反應後的生成物吸光值；(B) 在 pH 7.8，以 $27.8 \mu\text{M}$ 硝基藍四氮唑於不同光照度反應後的生成物吸光值；(C) 在 pH 7.8，以 $55.6 \mu\text{M}$ 硝基藍四氮唑於不同光照度反應後的生成物吸光值；(D) 在 pH 7.8，以 $167 \mu\text{M}$ 硝基藍四氮唑於不同光照度反應後的生成物吸光值。



圖二、(A) 在 pH 7，以 55.6 μM 硝基藍四氫唑於不同光照度反應後的生成物吸光值；(B) 在 pH 7，以 167 μM 硝基藍四氫唑於不同光照度反應後的生成物吸光值。

Illuminance(Lux)	2000	3000	4000	5000	6000	(Abs/min)					
						NBT(μM)					
pH7.8											
13.9	0.0010	0.0029	0.0034	0.0048	0.0043						
27.8	0.0050	0.0084	0.0093	0.0119	0.0113						
55.6	0.0083	0.0110	0.0127	0.0154	0.0165						
167	0.0112	0.0145	0.0166	0.0197	0.0211						
pH7.0											
55.6	0.0060	0.0013	0.0016	0.0033	0.0026						
167	0.0022	0.0036	0.0045	0.0074	0.0063						

表一、不同光照度及 pH 下，硝基藍四氫唑光照還原反應 35 分鐘後吸光值平均增加速率。

光照度對生成物吸光值的影響

以不同強度的可見光激發核黃素產生超氧自由基，進行光照還原反應，生成物的吸光值如圖一及圖二。由表一，在 pH 7.8 條件下，低濃度硝基藍四氫唑 (13.9 μM 及 27.8 μM)，光照度由 2000 Lux 增為 4000 Lux 時，光照還原反應後吸光值平均增加速率增加，但光照度增加至 5000 Lux 及 6000 Lux，光照還原反應後吸光值平均增加速率接近，表示在低濃度硝基藍四氫唑下，雖然光照度增加，激發核黃素的光反應增加，但能夠反應的硝基藍四氫唑有限，無法照比例增加。同樣條件下，增加硝基藍四氫唑的濃度至 55.6 μM 及 167 μM ，隨光照度的增加，光照還原反應後吸光值平均增加速率增加，增加核黃素光反應後產生的超氧自由基，在足夠的硝基藍四氫唑濃度，能繼續形成 Formazan。

pH 值對生成物吸光值的影響

比較不同 pH 時各種光照度反應後的吸光值，在 4000 Lux 光照度、pH 7.8 條件的光照還原反應後吸光值平均增加速率是 pH 7.0 的 3.5 倍以上。同樣的情形，在相同的光照度條件，pH 7.8 條件下的吸光值平均增加速率都較 pH 7.0 為高。黃等[1]以 13 W 的螢光燈照射，進行硝基藍四氫唑的光還反應，也有相同類似結果，在 pH 7.8，吸光值平均增加速率較其它 pH 值增加非常明顯。核黃酸在酸性或中性條件下，光照會使核黃素失去側鏈形成光色素(lumichrome)，而在鹼性條件下則形成光黃素(lumiflavin)[13]。在本實驗以不同 pH 比較光照反應後的吸光值，pH 7.8 條件下的吸光值平均增加速率都較 pH 7.0 為高，表示核黃素在鹼性溶液中較不穩定，光照容易分解成光黃素及超氧自由基，核黃素在中性溶液中相對穩定，經光照，產生的超氧自由基有限。

討 論

光照度影響核黃素的激發，進而影響光照還原反應後生成物的吸光值。黃等[1]的研究指出，在 13 W 的螢光燈照射，進行硝基藍四氫唑的光還原反應，在無超氧歧化酶存在情形下，於 pH 7.8 時，其反應前四分鐘吸光值平均增加速率約可達 0.054/min；Beyer 及 Fridovich [12]以相同的反應物濃度和 pH 值，在 20 W 的螢光燈照射 7 分鐘，無超氧歧化酶存在情形下，其吸光值平均增加速率為 0.0623 /min。以不同瓦數螢光燈為光源，在不同的距離，將會產生不同的光照度，在本研究，不同光照度則會影響核黃素的激發，進而影響光照還原反應後生成物吸光值。朱等[14]以不同光照度(4000、5000 及 6000 Lux)比較硝基藍四氫唑清除超氧自由基的活性，在起始反應時樣品濃度最高，超氧自由基清除率也較高。在本研究，光照度會影響核黃素的光反應，不同光照度影響光照還原反應後生成物的吸光值。本研究以 pH 7.8、167 μM 硝基藍四氫唑，在 2000、3000、4000、5000

及 6000 Lux 的光照度條件，隨著光照度的增加，生成物吸光值平均增加速率增加。當以低光照度(2000 Lux)，激發的核黃素有限，生成的產物 Formazan 化合物少，提高光照度，增加核黃素的光反應，進行電子轉移，產生超氧自由基，有足夠的硝基藍四氫唑反應時，生成 Formazan 增加，反應後生成物吸光值增高。

表二是在 pH 7.8 的條件下，光照還原反應的前五分鐘生成物吸光值平均增加速率，在 167 μM 硝基藍四氫唑及 2000、3000、4000、5000、6000 Lux 的光照度條件，其光照還原反應的前五分鐘生成物吸光值平均增加速率為 0.020、0.022、0.028、0.032 及 0.036/min。和表一比較，除低濃度的硝基藍四氫唑(13.9 μM)的反應速率較低外，其它三種處理的前五分鐘生成物吸光值平均增加速率都較光照反應 35 分者為高，表示當有足夠的硝基藍四氫唑參與反應，前五分鐘生成物吸光值平均增加速率應接近反應速率的起始速率。

Illuminance(Lux)	2000	3000	4000	5000	6000
NBT(μM)					
13.9	0.00005	0.00005	0.0016	0.0032	0.0023
27.8	0.0034	0.0094	0.0116	0.0192	0.0155
55.6	0.0119	0.0138	0.0191	0.0229	0.0247
167	0.0195	0.0223	0.0279	0.0327	0.0364

表二、在 pH7.8 及不同光照度下，硝基藍四氫唑光照還原反應的前五分鐘吸光值平均增加速率。

Ohara 等[15]以藍光作用核黃素研究，藉此抑制 B16 黑色素瘤細胞，指出不同波長的光源對核黃素的光反應有不同的表現。核黃素能被光激發，可被紫外線(UV)和可見光激發，基態核黃素主要有四個吸收峰：446 nm、375 nm、265 nm 及 220 nm [16]，在中性條件下經照光可以轉化為光色素，鹼性條件下轉為光黃素(LF)，當吸收 450 nm 附近的在可見光，產生 S_1^0 激發態，進行電子轉移，產生超氧自由基。以螢光燈照射核黃素，不同的光照度會影響核黃素的光反應，光反應後產生的超氧自由基，能將硝基藍四氫唑還原為藍色的 Formazan 化合物，螢光燈發射出的可見光，除光照度影響核黃素的激發，可見光中的藍光可能對核黃素的激發最為有用。

由表一，在不同的 pH 值的緩衝溶液，以 4000 Lux 光照度、pH 7.8 條件的光照還原反應後吸光值平均增加速率是 pH 7.0 的 3.5 倍以上。以硝基藍四氫唑光照還原反應法檢測超氧歧化酶，主要是利用核黃素在光照下產生超氧自由基，超氧歧化酶與硝基藍四氫唑競爭超氧自由基，當硝基藍四氫唑的還原作用被抑制，間接反應超氧歧化酶的活性。Sato 等[17]研究耐熱細菌中的超氧歧化酶，發現在 pH 4.0

-10.0 的範圍內，活性基本不下降；Klug 等[18]的研究結果，也表明牛的超氧歧化酶在較廣的 pH 幅度內催化速率不受 pH 的變化影響，因此在本研究中的 pH 值的變化對超氧歧化酶的活性影響不大。

核黃素在中性溶液中相對穩定，經光照，產生的超氧自由基有限，由圖二，在 pH 7.0 條件下，光照反應後的吸光值都在 0.2 以下，核黃素在鹼性溶液，光照容易分解成超氧自由基，光照反應後的吸光值增大。以本實驗三重覆，各處理的光照反應後的吸光值分析(未發表資料)，吸光值愈低的處理，其相對標準偏差(relative standard deviation)愈大，不易正確量測硝基藍四氮唑的反應變化，隨著反應後吸光值增加，相對標準偏差愈小，愈能正確量測反應的變化，在 pH 7.8 的緩衝溶液的條件，較 pH 7.0 的條件下能正確量測該反應的變化。

以硝基藍四氮唑方法研究植物的超氧歧化酶活性，常用較低的 pH 值(pH 7.0)萃取或作活性染色[19]，在超氧歧化酶活性染色時，緩衝液中添加 N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)作為催化劑，促使電子轉移並加速聚丙烯胺膠體的聚合及顯色。使用分光光度計測量超氧歧化酶，未加入 TEMED，若使用較低的 pH 緩衝溶液，將會測得生成物較低的吸光值，因此宜使用較高的 pH (pH 7.8)緩衝溶液及高的光照度激發核黃素，以產生較多的光反應，利光照還原反應的進行。

參考文獻

- [1] 黃政弘、陳惠婷、涂瑞澤：三種 SOD 活性測定法之比較。大葉學報 1999，8:101-109。
- [2] Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D: Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987, 107:526-545.
- [3] Zimmermann R, Flohe L, Weser U, Hartmann HJ: Inhibition of lipid peroxidation in isolated inner membrane of rat liver mitochondria by superoxide dismutase. *FEBS Lett* 1973, 29:117-120.
- [4] Tomoda H, Morimoto K, Aoki N: Superoxide dismutase activity as predictor of myocardial reperfusion and salvage in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1996, 131:849-856.
- [5] Husain K, Vazquez-Ortiz M, Lalla J: Down regulation of aortic nitric oxide and antioxidant systems in chronic alcohol -induced hypertension in rats. *Hum Exp Toxicol*

2007, 26:427-434.

[6] Granelli K, Bjorck L, Appelqvist LA: The variation of superoxide dismutase (SOD) and xanthine oxidase (XO) activities in milk using an improved method to quantitate SOD activity. *J Sci Food and Agric* 1995, 67: 85-91.

[7] Marklund, S, Marklund G: Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974, 47: 469-474.

[8] Beauchamp C, Fridovich I: Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971, 44: 276-287.

[9] Donnelly JK, McLellan KM, Walker JL, Robinson DS: Superoxide dismutases in foods. A review. *Food Chem* 1989, 33: 243-270.

[10] 邵從本、羅廣華、王愛國、郭俊彥：幾種檢測超氧化物歧化酶活性反應的比較。 *植物生理通訊* 1983，5:46-49。

[11] Constantine NG, Stanley KR: Superoxide Dismutases I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiol* 1977, 59: 309-314.

[12] Beyer WF Jr, Fridovich I: Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem* 1987, 161:559-66.

[13] Russell LF, Vandersilice JT: A comprehensive review of vitamin B2 analytical methodology. *J. Micronutri Anal* 1990,8: 257-310.

[14] 朱靖博、韓少華、王妍妍、王宏豔：氮藍四唑光照法評價丹參水溶性成分清除超氧陰離子($O_2^{\cdot -}$)活性。 *大連工業大學學報* 2009，28:251-254。

[15] Ohara M, Fujikura T, Fujiwara H: Augmentation of the inhibitory effect of blue light on the growth of B16 melanoma cells by riboflavin. *Int J Oncol* 2003, 22:1291-295.

[16] Sen-Varma C, Ghosh S, Bhowmik BB: Photo-effect in phospholipid liposome containing riboflavin. *Chem phys lipids* 1995, 76:49-54.

- [17] Sao S, Harris JI: Superoxide dismutase from *Thermus aquaticus* isolation and characterisation of manganese and apo enzymes. Eur J Biochem 1977, 73: 373–381.
- [18] Klug D, Rabani , Fridovich: A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. J Biol Chem 1972, 247: 4839-4842.
- [19] Wei DS, Kuo CM, Pan SM: Studies on the activity of superoxide dismutase in *Miscanthus floridulus* grown near a copper smelter in Taiwan. Taiwania 1997, 42: 189-200.

The Effect of Illuminance on Light Induced Reduction of Nitro Blue Tetrazolium

Jian-Wei Juen, Hong-Lin Jian, Ji-Yuan Liang*

Department of Biotechnology, School of Health Technology, Ming-Chuan University, (Taoyuan, Taiwan, R.O.C.)

Abstract

Superoxide radicals generated from light-excited riboflavin were used to study the effect of illuminance on the light reaction of nitro blue tetrazolium (NBT). The pH value of buffer, illuminance and the concentrations of NBT were found the major factors correlated with the absorbance of the NBT solution after light induced reduction. At a fixed illuminance, the increasing rate of absorbance of NBT reduction is increased with the NBT concentration. At pH 7.8 and higher NBT concentrations, the increasing rates of absorbance of NBT reduction were raised with the enhanced illuminations. However, at lower concentrations of NBT, the available NBT for reaction was limited, though the illuminance had been enhanced. The increasing rates of absorbance of NBT reduction were not increased with the illuminance.. At a same strength of illuminance, the increasing rates of absorbance of NBT reduction at pH 7.8 were higher than those at pH 7.0.

Keyword: riboflavin, NBT, Illuminance

Corresponding author: Ji-Yuan Liang [liang121@mail.mcu.edu.tw]

Received 7 October 2010/Revised 12 December 2010/Accepted 23 December 2010

MC-Transaction on Biotechnology, 2010, Vol. 2, No. 1, e2

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.