第16卷 第1期 环 境 化 学 Vol. 16, No. 1
1997年 1月 ENVIRONMENTAL CHEMISTRY January 1997

过氧化氢酶活性及活性抑制的紫外分光光度测定*

徐镜波 袁晓凡 郎佩珍
（东北师范大学环境科学系，长春，130024）

摘 要

在体内实验条件下，测定了鲤鱼肝脏过氧化氢酶的活性. 实验结果表明，过氧化氢酶的紫外分光光度法是可靠的. 活性抑制结果表明，对-二硝基苯（*p*-DNB）对鲤鱼肝脏过氧化氢酶均有明显的抑制作用，EC_{50}值为 0.0807mg・l^{-1}. 鲤鱼肝脏过氧化氢酶可作为一项指标用于生态毒理学研究.

关键词：鲤鱼，肝脏，过氧化氢酶，酶活性，抑制.

在水生毒理学研究方面，鱼体肝脏过氧化氢酶（Catalase，简写 Ct）活性及活性抑制的碘量滴定法测定在国内已有报导[1,2]，但应用紫外分光光度法进行鱼体肝脏 Ct 活性的测定研究尚未见到. 本文介绍了鲤鱼肝脏 Ct 活性的紫外分光光度测定和第二松花江典型检出污染物对-二硝基苯（*p*-DNB）对鲤鱼 Ct 活性的抑制. 结果表明，紫外分光光度法具有更加快速简便、准确的特点，适用于亚致死剂量的生态毒理分析，为细胞分子水平的毒性机制探讨提供重要的科学依据.

1 实验部分

1.1 试剂与材料

磷酸盐缓冲溶液Ⅰ（$C=6.7\times10^{-2}$mol・l^{-1}，pH=7.0）；用重蒸馏水溶解 3.522g KH_2PO_4 和 7.268g $Na_2HPO_4\cdot2H_2O$. 定容至1000ml；H_2O_2-磷酸盐缓冲溶液Ⅱ：用磷酸缓冲溶液Ⅰ稀释 0.16ml H_2O_2（30%，*W/V*）至 100ml，该溶液在 240nm，1cm 比色皿下测得吸光度应为 0.500 左右；将磷酸盐缓冲液Ⅰ稀释 10 倍，配成$C=6.7\times10^{-3}$mol・l^{-1}的磷酸缓冲溶液Ⅲ.

UV-190 紫外分光光度计（日本产），电动搅拌机，匀浆器，离心机，计时表，石英比色皿，40L 水簇箱，必备的化学玻璃器材.

实验鲤鱼由长春市水产所养殖基地购得. 鱼苗平均体重 3.9±1.6g；平均体长 7.0±0.8cm. 鱼苗经 5%食盐水消毒后进入实验室驯化. 驯养采用除氯自来水，饲喂市售鱼饵，实验前一天停止进食.

先测化学品对鱼96h 的 LC_{50}值，再以1/6—1/2 浓度的被测溶液，将鱼暴露96h 以上.

* 国家自然科学基金资助课题.

1.2 组织处理

(1) 肝脏：染毒4d后，取每个浓度水簇箱4—6尾鱼，擦干，称重，迅速解剖，取出肝脏，称重.(2) 匀浆：在玻璃匀浆器内按1g肝重加12.5ml磷酸盐缓冲液Ⅱ的比例加入缓冲液. 然后在冰水浴（1—4℃）下用电动搅拌机带动玻璃匀浆器匀浆，匀浆过程始终保持冰水浴，尽可能彻底.(3) 离心：匀浆后，将匀浆液移入离心管离心，转速为1500 $r \cdot min^{-1}$，时间5min，所得上清液用于Ct活性测定.

1.3 Ct活性测定

在室温（21.0±2℃）条件下，用UV-190紫外分光光度计测定鲤鱼肝脏Ct活性. 参比池为0.01ml酶样＋3.0ml H_2O_2-磷酸缓冲液Ⅰ. 样品池为0.01ml酶样＋3.0ml H_2O_2-磷酸缓冲溶液Ⅱ. 采用λ＝250nm，1cm石英比色皿.

测定Ct活性过程中，需测定酶样的蛋白质含量. 本实验选用Folin试剂法[3].

根据被测物LC_{50}值和预试验结果，按等对数间距，将被测物配制成5个以上浓度，包括0%，100%酶活性抑制浓度，并设对照. 按上述步骤分别测定各浓度组的酶活性.

1.4 酶活力计算

在浓度较高、反应时间较短的条件下，Ct催化H_2O_2分解为一级反应[4]，反应速率为：

$$K = (1/\Delta t) \times \ln(C_1/C_2)$$

式中，Δt为t_1，t_2两时刻间的反应时间；C_1，C_2为t_1，t_2时刻H_2O_2的浓度.

由于波长固定，ε_λ为固定常数，则上式亦可表示为：

$$K = (1/\Delta t) \times \ln(A_1/A_2)$$

式中，A_1，A_2为t_1，t_2两时刻的吸光度.

由于一个单位的Ct活性定义为：在25℃，100s内使H_2O_2分解一半时的酶蛋白量，因此，酶活性单位与一级反应的半衰期有关. 半衰期$\tau=\ln 2/K$，则测得半衰期与酶活性关系为：

$$1\ \text{Activity (Unit)} = \frac{100\ (\text{s})}{\tau_{\text{observed}}} = \frac{100}{\ln 2/K} = \frac{100K}{\ln 2}$$

本实验用UV-190紫外分光光度计测定H_2O_2在0—60s内不同时刻的吸光度，求得$\ln A$-t直线的斜率，即为反应速度常数K值.

另外，不同酶样含蛋白质量不同，得到的活性须用蛋白质量校正：

$$\text{Activity}(\text{U} \cdot \text{g}^{-1}\text{-Pr}) = \frac{\text{Activity (U)}}{C_{\text{protein}} \times V_{\text{protein}}}$$

在本实验中，加入的蛋白体积$V_{protein}$＝0.01ml，测得的蛋白质浓度$C_{protein}$以$mg \cdot ml^{-1}$牛血清蛋白表示，则上式可表示为：

$$\text{Activity}(\text{U} \cdot \text{g}^{-1}\text{-Pr}) = \frac{\text{Activiyt (U)} \times 10^5}{C_{\text{protein}}\ (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})}$$

1.5 EC_{50}值计算

将被测物暴露组的浓度值与各浓度组对鲤鱼肝脏Ct活性抑制百分数进行直线回归分析，求出其EC_{50}的估计值.

2 结果与讨论

被测物为 p-DNB. 空白组无死亡. 15d 后实验终止，各浓度梯度死亡率小于 1%.

2.1 实验梯度设计

依据鲤鱼 96h 急性毒性数据，p-DNB 96h 的 $LC_{50}=6.761\times10^{-6}mol\cdot l^{-1}$，用丙酮配制贮备液浓度：$C_0=11.36mg\cdot l^{-1}$. 设置浓度梯度以对照（表 1）. 玻璃水簇箱总体积 40L 左右，实验液体积 20L，配制实验液时，要在快速搅动下用移液管逐渐加入贮备液，务必使之混合均匀. 每个水簇箱投 10 尾鱼，每 24h 换水一次，每次换水 10L，染毒时间 15d.

2.2 空白组鲤鱼 Ct 测定

为确保本实验采用的紫外分光光度法测定鱼体肝脏 Ct 活性的准确性与可靠性，对正常条件鲤鱼（体重 1.9g，体长 5.6cm）平行 6 次测定 Ct 活性. 以 $\ln A$ 对时间 t 作图，应近似一条直线，该直线的斜率代表 Ct 活性，见表 2. 由表 2 求出 $\overline{K}=8.276\times10^{-3}$，$S=1.827\times10^{-4}$，$CV\%=S/K=2.2\%$.

表 1　实验浓度的设计

Table 1　Experimental concentration design

	原始试验液 20L		每天换水 10L	
	加贮备液/ml	加丙酮/ml	加贮备液/ml	加丙酮/ml
对照	0	10	0	5.0
1/6 LC_{50}	3.2	6.8	1.6	3.4
1/4 LC_{50}	5.0	5.0	2.5	2.5
1/3 LC_{50}	6.6	3.4	3.3	1.7
1/2 LC_{50}	10.0	0	5.0	0

表 2　Ct 活性测定结果

Table 2　Results of Ct activity

测定次数	1	2	3	4	5	6
K ($\times10^{-3}$)	−8.516	−8.365	−7.976	−8.212	−8.278	−8.319
r	−0.9996	−0.9997	−0.9997	−0.9998	−0.9987	−0.9996
h	7	7	7	7	7	7

2.3 染毒组鲤鱼的 Ct 活性测定

根据平行样品测定的吸光值，得到 K 的平均值（$\overline{K}$），然后按 $100\overline{K}/\ln2$，求得活性单位数，再用蛋白质浓度校正后即求得各染毒组 Ct 活性测定结果（表 3）. 蛋白质含量测定曲线的回归方程为：$y=0.0198+1.561\times10^{-3}x$，$r=0.996$，$y=A$（吸光度），$x=$Pr 含量. p-DNB 对鲤鱼肝脏 Ct 活性抑制百分数，随着化合物浓度增高，抑制率逐渐加大，经统计分析得到回归方程为 $I=42.21\ln C+106.7$，$r=0.997$，$I=$抑制百分数，C 为 p-DNB 的浓度. 计算得到 p-DNB 的 $EC_{50}=0.0807mg\cdot l^{-1}$.

表3 鲤鱼肝脏Ct活性结果

Table 3 Results of Ct activity of contaminated carp liver

	对照	1/6 LC_{50}	1/4 LC_{50}	1/3 LC_{50}	1/2 LC_{50}
p-DNB/mg · l^{-1}	0	0.189	0.284	0.378	0.567
$K\times10^{-3}$	—12.89	—9.722	—7.256	—5.872	—5.066
活性单位/U (100*K*/ln2)	1.859	1.403	1.047	0.847	0.731
活性/U · g^{-1}-Pr	5.497×10^4	3.602×10^4	2.245×10^4	2.128×10^4	0.914×10^4
I/%	0	34.5	59.2	61.3	83.4

2.4 注意事项

(1) 使用健康、规格相近的同种同龄鱼进行实验.

(2) 样品测定前,对正常对照组鱼平行6次测定 Ct 活性,以确保样品测定结果可靠.

(3) 整个操作过程应尽量保持恒温，且反应时间不宜超过 5min.

(4) 反应体系的 pH 值应尽量保持在 pH=7.

参考文献

[1] 丁树荣等，环境生物学实验技术与方法. 南京大学出版社，1989

[2] 徐镜波等，过氧化氢酶活性及活性抑制的测定. 环境化学，1994，**13** (3) ：279

[3] 吴国利等，生物化学. 北京师范大学出版社，1987

[4] Hans Luck, Methods of Enzymatic Analysis, New York Academic Press, 1965

1995年11月19日收到.

THE DETERMINATION OF ENZYMIC ACTIVITY AND ITS INHIBITION ON CATALASE BY ULTRAVIOLET SPECTROPHOTOMETRY

Xu Jingbo *Yuan Xiaofan* *Lang Peizhen*

(Department of Environmental Science, Northeast Normal University, Changchun, 130024)

ABSTRACT

Liver catalase (Ct) activities of carp were measured by ultraviolet spectrophotometry and the results were reliable. The effect of *p*-DNB on Ct of carp liver were studied in *Vivo*. The results showed that *p*-DNB exhibited fairly strong inhibition to Ct of carp livers. A satisfactory straight line was obtained by plotting the probits of inhibition percentage of Ct against the logarithmic concentration of toxicants, The concentration causing 50% inhibtion of *p*-DNB to Ct carp liver was 0.087mg · l^{-1}. It was proposed that the effect of toxicant on Ct could be used as an index of ecotoxicolgical assessment.

Keywords: carp liver, catalase(Ct),enzymic activity,inhibition.