

96 孔酶标板法测定对虾血淋巴的过氧化物酶相对活性的初步研究*

王秀华 雷质文^① 黄 捷 杨 冰

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

关键词 96 孔酶标板, 对虾血清, 过氧化物酶

过氧化物酶 (POD) 广泛存在于真核生物体内, 在清除自由基 ($O_2^{\cdot-}$), 防止生物分子损伤方面有十分重要的作用。因此通过测量对虾血淋巴的过氧化物酶活性大小可以推测对虾的生理状态, 甚至可用其辅助检测或诊断对虾病害的生理指标。丁美丽等采用改良的连苯三酚自氧

* 国家重点基础研究项目课题“对虾病毒感染的细胞与分子学机理” G1999012002 号资助。

① 现在青岛出入境检验检疫局工作。

收稿日期: 2000-07-03; 修回日期: 2001-07-12

化法测定中国对虾血清的超氧化物歧化酶(SOD)活性^[1],黄灿华等采用同工酶检测技术来研究中国对虾血清的SOD活性^[2]。而测定POD活性时,一般采用沃辛通(Worthington)法^[3],本文首次用96孔酶标板法测定对虾血淋巴的POD相对活性,以期为研究对虾免疫学提供一种更为简便的测定手段。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 日本对虾(*Penaeus japonicus*)为本实验室养殖的投喂免疫增强剂饵料实验用虾,体长10~12 cm。中国对虾(*P. chinensis*)于1999年9月1日取自青岛胶南琅琊台一对虾养殖场。克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)为本实验室养殖的已注射对虾白斑病毒(WSSV)实验用虾,体长5~6 cm。

1.1.2 试剂 缓冲液:7.3 g Na₃C₆H₅O₇·H₂O, 11.86 g Na₂HPO₄·2H₂O, 双蒸水溶解至终体积1 000 ml,显色液:4 mg 邻苯二胺, 30% H₂O 24 μl, 缓冲液 10 ml。

1.2 方法

1.2.1 采集虾血淋巴 用1 ml 一次性注射器从虾的心脏、胸足基部和腹节等处抽取血淋巴,注入洁净无菌的Eppendorf管中,转入-70℃超低温冰箱中保存备用。

1.2.2 POD相对活性的测定 借鉴史成银等的方法^[4],将样品从-70℃冰箱中取出,置于4℃水中解冻,15 000 r/min离心1 min,再置于4℃水中,往96孔酶标板中加血淋巴上清液(20 μl/孔),之后每孔对应加入180 μl 缓冲液 20 μl 显色液,避光迅速摇匀,立即置于551型酶标仪(BIO-RAD in USA)中,读取490 nm处的O.D.值(A₁),15 min后,读取490 nm处的O.D.值(A₂),每个样品测3次(中国对虾血淋巴上清液测一次),血淋巴上清液的过氧化物酶相

表1 96孔酶标板法测中国对虾POD相对活性结果

Tab.1 POD activity of *Penaeus chinensis* on 96 microplate

样品号	A ₁	A ₂	A ₁ -A ₂
990901001	0.113	0.229	0.116
990901002	0.093	0.250	0.157
990901003	0.069	0.148	0.079
990901004	0.118	0.175	0.057
990901005	0.088	0.184	0.096
990901006	0.120	0.183	0.063
990901007	0.108	0.203	0.095
990901008	0.124	0.248	0.124
990901009	0.136	0.238	0.102
9909010010	0.097	0.194	0.097

表2 用沃辛通法和96孔酶标板法分别对日本对虾和克氏原螯虾的测定结果

Tab.2 The determined results of *Penaeus japonicus* and *Procambarus clarkii* on worthington and 96 microplate

样品号	96孔酶标板法测 POD相对活性 (X±SD)	沃辛通法则POD 活性(U/mg) (X±SD)
1	0.011±0.001	0.015±0.001
克氏原螯虾		
2	0.015±0.001	0.029±0.001
3	0.022±0.002	0.033±0.001
4	0.014±0.002	0.024±0.001
5	0.017±0.002	0.038±0.001
6	0.016±0.004	0.033±0.001
7	0.140±0.007	0.122±0.004
日本对虾		
8	0.142±0.008	0.143±0.001
9	0.305±0.006	0.204±0.001
10	0.080±0.010	0.070±0.001
11	0.231±0.045	0.191±0.002
12	0.228±0.010	0.233±0.003

对活性以A₂/A₁表示。

1.3 对照方法

参照沃辛通法,每个样品测3次。

2 实验结果

2.1 中国对虾POD

用96孔酶标板法测定10尾中国对虾血淋巴的POD相对活性,其结果见表1。

2.2 灵敏度比较

用沃辛通法和96孔酶标板法分别对6尾日本对虾和6尾克氏原螯虾的测定结果见表2。

对表2中的结果进行统计处理,求出相关系数并进行相关关系显著性检验,结果如表3。

应用相关系数公式

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}][\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}]}} \quad (1)$$

将表2数据代入公式(1),得出r=0.968(n=12)

对相关系数r进行t检验,自由度df=12-2=10, r_{0.01}=0.708, r>r_{0.01}, P<0.01,知上述两种方法所测得POD值为强直线相关,说明应用96孔酶标板法测量POD相对活性方法所得数据可靠。

3 讨论

POD作为生物体内重要的酶类之一,在甲壳动

表 3 对表 2 中 POD 数值的相关性分析

Tab.3 Correlation analysis on the date of POD from table 2

96 孔酶标板法测得 相对 POD 活性 X	沃辛通法测得 POD 活性 Y	X ²	Y ²	XY
0.011	0.015	0.000 121	0.000 225	0.000 165
0.015	0.029	0.000 225	0.000 841	0.000 435
0.022	0.033	0.000 484	0.001 089	0.000 726
0.014	0.024	0.000 196	0.000 576	0.000 336
0.017	0.038	0.000 289	0.001 444	0.000 646
0.016	0.033	0.000 256	0.001 089	0.000 528
0.140	0.122	0.0196	0.014 884	0.017 08
0.142	0.143	0.020 164	0.020 449	0.020 306
0.305	0.204	0.093 025	0.041 616	0.062 22
0.080	0.070	0.006 4	0.004 9	0.005 6
0.231	0.191	0.053 361	0.036 481	0.044 121
0.228	0.233	0.051 984	0.054 289	0.053 124
Σ=1.221	1.135	0.246	0.178	0.205

物免疫学中已有学者对此着手研究^[5], 在 POD 的活性测量方面较传统的方法有沃辛通法、西格玛法及用萃取化学公司法 (Amano 法改进型)。这 3 种方法在所测量的样品个数较少时、且样品的量 (如血清的体积) 相对较多时, 都可以采用, 但如果用于分析样品个数较多, 尤其样品量较少时, 采用以上 3 种方法测定 POD, 测定所花费的时间很长, 且由于样品量少, 平行样品测定几乎不可能, 测量的误差较大。这种情况在分析体长较小的单尾对虾 POD 活性时会经常出现, 而采用 96 孔酶标板法来测定, 其优越性便显而易见。

比较传统的 POD 测定方法与 96 孔酶标板法可知, 96 孔酶标板法在测定 POD 活性时具有以下优缺点:

优点之一, 所需样品微量化, 由于 96 孔酶标板法每次仅需样品 20 μl, 在对虾测量上可解决因对虾体长较小, 所采集的血清量较少的不足。之二, 快速, 由于在反应体系内, 时间固定, 且所有数据均为酶标仪自动读取, 可在短时间内完成多个样品的分析。在分析多尾对虾血淋巴 POD 时, 解决了分析单尾对虾时的耗时太多的不足。之三, 测量准确度高, 在样品量少的情况下, 同一样品可设多个平行组, 提高测量的准确度。之四, 方法可标准化。

缺点: 该方法所得 POD 的活性为相对值, 仅可以用于比较样品间 POD 相对活性的高

低。

参考文献

- 1 丁美丽, 林林, 李光友等. 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 7~11
- 2 黄灿华, 陈禄华. 中国水产科学, 1999, 6(1): 45~49
- 3 [德]B·施特尔马赫著, 钱嘉渊译. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1982. 271~278
- 4 史成银, 黄健, 宋晓龄. 中国水产科学, 1999, 6(3): 116~118
- 5 刘树青, 江晓路, 牟海津等. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 278~283

STUDIES ON THE POD ACTIVITY IN HEMOLYMPH OF SHRIMP ON 96 MICROPLATE

WANG Xiu-hua LEI Zhi-wen HUANG Jie YANG Bing

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Jul., 3, 2000

Key Words: 96 microplate, Hemolymph of shrimps, POD

Abstract

POD activity in hemolymph of shrimps determined on 96 microplate was reported first time. In order to testify the sensitivity of using the 96 microwell plate to determine the POD activity, two methods including Worthington and 96 microplate were used to determine the POD of *Penaeus japonicus* and crawfishes respectively, the results show that the date from the two methods have a strong linear correlation and prove that the method determining POD activity in hemolymph of shrimps was reliable. (本文编辑:刘珊珊)