

技术与方法

极谱氧电极法测定过氧化氢酶活性

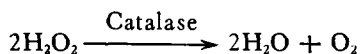
周 群 毛 良

(上海中医学院生化研究组)

提 要

本文采用极谱氧电极法,测定了低氧缓冲溶液中的过氧化氢酶活性。结果表明,此酶活性与动物血量及组织匀浆量呈正比的线性变化。而且它与底物量间关系,以 Lineweaver 和 Burk 作图法表现一典型直线。结果亦证明了方法的灵敏、简便和可靠。

过氧化氢酶 (Catalase, EC. 1. 11. 1. 6.) 广泛存在于需氧微生物、植物和动物细胞内,^[1] 其反应式如下:



通过这种形式,它可降低生物体内有毒害作用的过氧化氢水平,以减少自由基和过氧化脂质的形成,对机体起重要的保护作用。而且在医学领域,就有一种罕见的无过氧化氢酶血症的遗传性纯合体疾病。由于近年来对脂质过氧化研究的日益深入,因此,测定过氧化氢酶成为研究衰老疾病的一个重要指标,并成为中西医结合研究的一个方面。

根据传统的方法,人们主要是采用测定剩余底物的过氧化氢,来确定酶的活性,如紫外分光光度法和滴定法等。但是前者受试样的物理形态,如澄明度等因素的影响,这就限制了它的应用范围;而后者误差较大,方法亦不够简便。更为值得注意的是,上述两种方法可能受存在的过氧化物酶的干扰。因此,用极谱氧电极法来测定产物——氧的生成,似乎具有较大的优越性。此外,这种酶活性测定方法操作简便、灵敏度高,结果直观,并可自动描记,进行动态研

究。

Goldstein 曾经采用 Clark 氧电极法测定动物组织内过氧化氢酶活性,^[2] Schepartz^[3] 也描述了烟叶 (tobacco leaves) 中酶活性的检测。但是,这两位作者的方法是在大大高于空气饱和溶液(即过饱和氧溶液)中测定氧含量的。在测定过程中,释放的氧容易形成气泡,造成两相状态,这样就可能引入误差,并降低方法的灵敏度。

本文对过去报道的过氧化氢酶的氧电极测定方法作了改进,测定在低于氧饱和溶液中进行酶反应,方法简单,结果可靠。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 仪器 Cy-2 型测氧仪(上海华光仪表厂产品),或中科院上海植物生理研究所生产的 SP-2 型测氧仪亦可。记录仪为上海自动化仪表三厂生产的 XWZK 快速自动平衡记录仪及超级恒温水浴。测氧仪是由溶氧测定控制器和氧电极组成。氧电极是由铂电极和 Ag/AgCl 电极组成、采用聚乙烯薄膜的典型 Clark 氧电极。测氧反应容器如图 1。这种反应容器可连

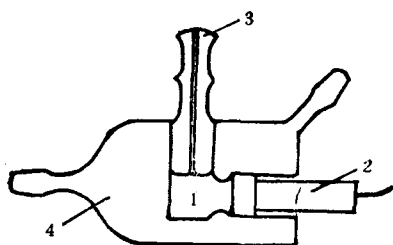


图1 极谱氧电极用反应容器

1.反应室； 2.氧电极； 3.加样孔； 4.恒温套管。

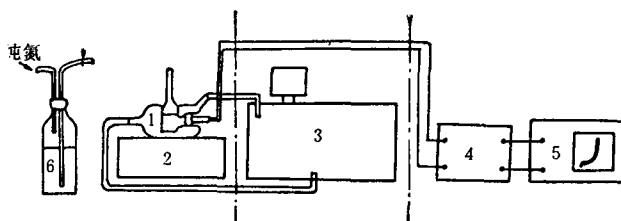


图2 溶氧测定装置示意图

1.反应容器与氧电极； 2.磁力搅拌器； 3.超级恒温水浴； 4.溶氧测定控制器；
5.自动平衡记录仪； 6.低氧缓冲液。

氧含量达到很低水平。然后再通入纯氮气，使溶液氧含量维持在恒定水平，并调节氮气压力，排出低氧缓冲溶液，用于酶活性测定。

2. 氧电极的使用 取备用氧电极，滴入 0.5 mol/L 的 KCl 溶液，再按上聚乙烯薄膜（注意装好的电极内绝对不能有气泡，否则影响电极灵敏度和测定结果）。然后将氧电极装到溶氧测定控制器上，开启控制器并使之达到规定的工作电压。同时开启磁力搅拌器和超级恒温仪，使氧电极平衡半个小时，并观察电极是否达到所需要的灵敏度。如果符合要求，即可使用。^[4]

3. 过氧化氢酶活性测定法 I 首先校正电极。将空气饱和的水加入到 25℃ 反应室内，平衡几分钟后，将灵敏度调节在一定刻度上，然后用亚硫酸钠的无氧水（新鲜配制）调零点，反复二次，确定含氧量 $\mu\text{molO}_2/\text{格}$ 。在 25℃ 条件下水的标准氧含量为 $0.253\mu\text{molO}_2/\text{ml}$ 。

氧电极经校正后，即可进行酶活性测定。在反应室中加入低氧缓冲溶液，平衡一段时间后，加入 $20\mu\text{l}$ 的 H_2O_2 ，使其最终浓度为 33.4

续加样，便于大量样品的氧含量测定。由反应容器、Clark 氧电极、磁力搅拌器、超级恒温循环水浴以及一个溶氧测定控制器和与之连接的自动平衡记录仪组成整个测氧装置。见图 2。

2. 动物 采用本院昆明种小鼠的血液、肝和肾组织进行分析。

二、方法

1. 低氧缓冲溶液的制备 配制 50mmol/L, pH7.0 的磷酸缓冲液，立即抽真空，使溶液中的

mmol/L，再平衡一段时间，最后加入 $10\mu\text{l}$ 过氧化氢酶液。这一过程完全被记录仪所描记，见图 3。

4. 过氧化氢酶活性测定法 II 校正电极，调节灵敏度和零点同上。

在反应室中加入低氧缓冲溶液，平衡一段时间，然后加入定量的过氧化氢酶，再平衡一段时间，最后加入 H_2O_2 ，其最终浓度也为 33.4 mmol/L。见图 4。

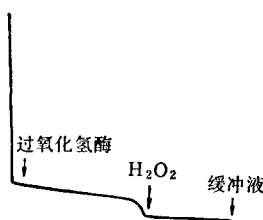


图3 过氧化氢酶活性测定方法 I

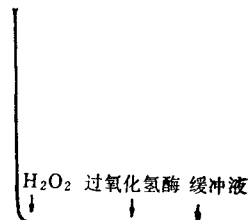


图4 过氧化氢酶活性测定方法 II

5. 酶活性的计算方法 经过实验测定，可得到过氧化氢酶释氧过程中由记录纸上表现的一定走距以及在这种走距下的释氧格数，再根

据其它参数和实验数据,就可计算得到酶活性。

计算公式为:

$$\text{酶活性 } (\mu\text{molO}_2/\text{min}) = \frac{0.253 H \cdot V \cdot v}{n \cdot S}$$

$$\text{单位酶活性 } (\mu\text{molO}_2/\text{min} \cdot \text{mg 蛋白或组织}) = \frac{\text{酶活性 } (\mu\text{molO}_2/\text{min})}{\text{加入酶量 (ml)} \cdot \text{酶液含蛋白量 (mg/ml)}}$$

S: 走距 (mm)

H: 一定走距的释氧格数

V: 反应室体积 (ml)

v: 纸速 (mm/min)

n: 25℃ 标准水和无氧水时含氧量在记录纸上表现的格数差

结果与讨论

Clark 氧电极法测定过氧化氢酶活性, 不仅方法灵敏, 而且结果可靠。本文分别取动物血液、肝和肾组织匀浆, 测定过氧化氢酶活性。结果表明, 酶活性(释氧量)随血液量以及肝和肾组织匀浆量多少而呈正比变化。而且线性条件较好。图 5 所示的是酶活性随溶血液量正比变化的结果。所测定的线性范围可能与采用的氧电极及其灵敏度等因素有关。

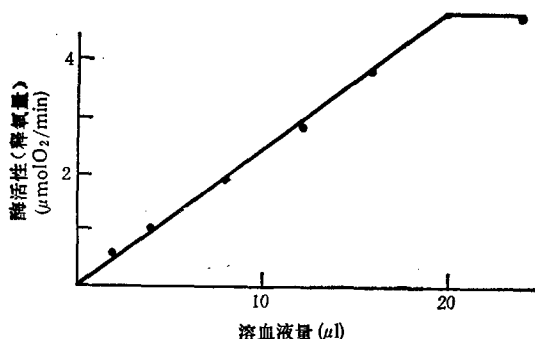


图 5 不同溶血量的酶活性变化

过氧化氢酶活性在一定范围内也随底物量增加而升高。将本实验结果按 Lineweaver 和

Burk 法作图, 可得到一条典型的直线, 见图 6。因此, 本法也适用于酶的动力学研究。

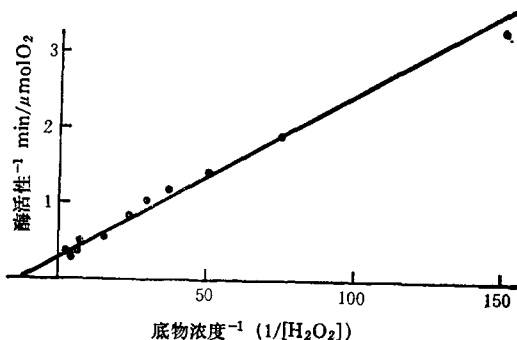


图 6 底物浓度⁻¹与酶活性⁻¹的关系

此外, 氧电极法测定过氧化氢酶实验偏差的批内变异系数也在允许值范围内。其中方法 I 的实验偏差变异系数为 2.27% (9 次测定), 方法 II 的实验偏差的批内变异系数为 4.22% (测定 8 次)。取昆明种小鼠全血溶血液和肝组织匀浆测定过氧化氢酶活性, 得到的正常值分别为 $17.6 \pm 4.38 \mu\text{molO}_2/\text{min} \cdot \text{ml}$ 全血, $2.26 \pm 0.406 \mu\text{molO}_2/\text{min} \cdot \text{mg}$ 肝湿组织。

在方法 I 中, 加入过氧化氢后, 出现缓慢的释氧, 并接近坪值, 这可能是过氧化氢的非酶光分解所引起的。计算酶活性时, 要减去过氧化氢的自身释氧量。

因此, 本文改进的极谱氧电极法可较灵敏而又可靠地测定生物组织中过氧化氢酶的活性。

参考文献

- [1] Dixon, M. et al.: *Enzymes*, Third edition, Lonman Group Limited, London, 1979, 220—221.
- [2] Goldstein, D. B.: *Anal. Biochem.*, 1968, 24, 431.
- [3] Schepartz, A. I.: *Tobacco Sci.*, 1974, 18, 52.
- [4] 李德耀、叶济宇: «植物生理学通讯», 1980, 77(1), 35.

[本文于 1986 年 12 月 24 日收到]