

摘要

酶传感器将酶作为敏感元件,把酶催化反应过程中的物理或化学信号转化为电信号以检测被测物。由于反应的高效性与专一性,酶在生物传感器的研究中被应用广泛。

本文通过对辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, 简称 HRP, EC 1.11.1.7)催化过氧化氢氧化苯酚的反应体系进行数值模拟,研究了酶传感器检测的生化基础。模拟得到:

- 1) 反应方程的求解必须考虑其刚性问题,对于刚性方程,应该使用 ODE15S。
- 2) 催化反应中间复合物 HRP-I 与 HRP-II 随时间变化的动力学曲线,并能确定其存在的时间。
- 3) 多组不同浓度下的反应过程曲线,对比了不同浓度下的反应速率,结果表明数值模拟能有效的减少实验次数与缩短实验周期。

温度和 pH 对酶传感器测量精度影响较大,为了减少酶传感器在实际测量中的误差,指明了当前研究中将温度和 pH 值两个相关因素单独考虑的局限性。准确得到综合考虑了不同温度、pH 值条件下,聚硫堇和纳米金固定辣根过氧化物酶传感器响应电流的特征,结果表明:

- 1) 单因素离散试验点分析,不能准确得到酶传感器的最适工作条件。综合考虑温度和 pH 值,该酶传感器最适工作条件在 40—45℃ 之间,最佳 pH 值在 5.3—5.7 之间;
- 2) 以温度、pH 值与响应电流之间的函数关系作为传感器校正,以及实现线性化处理和非线性补偿电路的基础,能够提高酶传感器的测量精度,扩大使用范围。

复合酶传感器可以对同一样品多个指标同时进行检测,对各单一指标进行处理以获得综合性指标。免疫力是由多指标共同表达的一个综合性指标,通过对中华米虾 (*Caridina denticulata sinensis*) 投喂硒含量分别为 0、0.15、0.30、0.45、0.60、0.75($\mu\text{g/g}$) 的饲料,研究了硒对中华米虾体内超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GPX) 等抗氧化酶活性的影响,并探讨了其可能的作用机制。结果表明:

- 1) 中华米虾体内抗氧化酶具有协同效应,并且对硒表现出明显的剂量效应;

摘 要

2) 当饲料中添加硒浓度为 $0.44\mu\text{g/g}$ 时, 虾体内 SOD、CAT 的活性均为最高; 当硒浓度为 $0.48\mu\text{g/g}$ 时, GPX 活性最高。

分析了当前甲壳动物免疫力研究指标, 指出目前对免疫力进行评判存在的两个缺陷: 1)不能综合反映免疫力水平变化。2)采用不同评判指标得到的结论无法进行科学客观比较。在此基础上, 定义了免疫力综合指数, 规定了计算方法, 明确了两种计算权重的步骤方法, 即层次分析法和主成分分析法。通过对文献数据的实际计算, 阐明了计算方法的具体步骤, 得到了免疫力综合指数, 以定量数据表明试验结果对免疫力的影响, 为客观评价所采取的试验措施提供量化结果。

关键词 酶传感器 辣根过氧化物酶 免疫力综合指数 层次分析 主成分分析

Abstract

Enzyme sensor converts physical and chemical signals, which formed in catalytical reaction, into electrical signals, to detect objects under test. As sensitive components, enzyme has been widely studied because of the efficiency and specificity in reaction.

By simulating Horseradish Peroxidase catalyzing reaction of H_2O_2 oxidizing phenol, the biochemical fundamental of enzyme sensor were studied. The result indicated that:

- 1) Stiffness could not be ignored, and when solving stiffness equations, ODE15S was adapted.
- 2) Obtained the dynamic curves of HRP and its intermediate compounds HRP-I and HRP-II concentrations vary over time, and assured the lifetime of HRP-I and HRP-II.
- 3) The dynamic curves at different substrate concentrations were obtained, and reactive velocities were compared, which showed simulation could greatly reduce the times of experiment and shorten the experiment cycle.

In order to reduce the error signal, ponied out isolated considered temperature and pH value was inconsequently in the actual measurement. Under different temperature and pH, simulated accordingly current of the biosensor, which based on Au colloids and poly (thionine) as matrixes, the detecting system of the biosensor was studied. The result indicated that:

- 1) The function expressions of accordingly current changed with temperature and pH varied were gained, the 40-45°C and pH was between 5.3-5.7 which was the best operating conditions. At discrete test points, only analyzed a single factor could not get the optimum working conditions.
- 2) The function, which current response to temperature and pH value, as the foundation to calibrate enzyme sensor, improve the measurement accuracy and expand the detective scope of enzyme sensor.

Complex enzyme sensor could detect a number of indicators at the same time. A comprehensive index could be obtained after processed. Immunity was a comprehensive index that expressed by many indicators. The effects of selenium supplementation dietary on the activity of enzymic antioxidant in *Caridina denticulata sinensis* were studied in the experiment, and based on the dynamic process, the mechanism was also investigated. The selenium supplementation dietary are 0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60 and 0.75 μ g/g. The results

showed that suitable concentration of selenium in the diet can enhance the activity of enzymic antioxidant system significantly, and it represented the dose effect obviously. SOD, CAT, and GPX structured a cooperative system. The experiment demonstrated that the activity of SOD, CAT, and GPX in *C. d. sinensis* can reach the maximum when the concentration of selenium in the diet is 0.44 μ g /g, 0.44 μ g /g, 0.48 μ g /g.

Through the analysis of the current research index, in comprehensive immunity evaluation two defects were pointed out, 1) The state of immunity change was not comprehensively reflected; 2) Using different evaluation indexes could not be compared. Given this, the comprehensive index of immunity was indicated, and the calculation method was defined, analytic hierarchy process and principal component analysis were used to calculate the weight of each index. Based on the literature data, expounded the steps of the calculation method, and obtained the immunity comprehensive index. The effect of experiment results on immunity showed by amount, the quantitative index to evaluate the immunity was offered.

Keywords Enzyme sensor Horseradish peroxidase Immunity comprehensive index
Analytic hierarchy process Principal component analysis

河北大学

学位论文独创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，也不包含为获得河北大学或其他教育机构的学位或证书所使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

作者签名： 赵建华 日期： 2019 年 6 月 8 日

学位论文使用授权声明

本人完全了解河北大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

本学位论文属于

1、保密 ，在 _____ 年 _____ 月 _____ 日解密后适用本授权声明。

2、不保密 。

（请在以上相应方格内打“√”）

保护知识产权声明

酶促反应器生化基础与

本人为申请河北大学学位所提交的题目为（免疫力指标量化研究）的学位论文，是我个人在导师（陈璞）指导并与导师合作下取得的研究成果，研究工作及取得的研究成果是在河北大学所提供的研究经费及导师的研究经费资助下完成的。本人完全了解并严格遵守中华人民共和国为保护知识产权所制定的各项法律、行政法规以及河北大学的相关规定。

本人声明如下：本论文的成果归河北大学所有，未经征得指导教师和河北大学的书面同意和授权，本人保证不以任何形式公开和传播科研成果和科研工作内容。如果违反本声明，本人愿意承担相应法律责任。

声明人： 赵建华 日期： 2009 年 6 月 8 日

作者签名： 赵建华 日期： 2009 年 6 月 8 日

导师签名： 陈璞 日期： 2009 年 6 月 8 日

第1章 绪论

传感器是能感受规定的被测量并按照一定规律转换成可用输出信号的器件或装置。通常由敏感元件和转换元件组成。其中,敏感元件是指传感器中能直接感受被测量的部分,转换元件指传感器中能将敏感元件输出转换为适于传输和测量的电信号部分^[1]。生物传感器是一种利用生物材料作为敏感元件的新型传感器,集生物学、化学、物理学、信息科学于一体。其最大特点是能在分子水平识别待测物质^[2-3]。由于生物传感器具有检测方便、快速、装置简单、价格低廉、选择性优异、应用面广等众多优点,因而成为传感器研究的重要分支。不仅在临床诊断、药物筛选、毒物监测等方面有着极其广泛的应用前景,而且在医学发展中也是有举足轻重的作用^[4-5]。

根据生物传感器敏感元件的不同,可以分为酶传感器、微生物传感器、免疫传感器、细胞传感器、组织传感器以及类脂类和 DNA 传感器。酶传感器是将酶作为敏感元件,把酶反应过程中的物理或化学信号转化为电信号以检测被测物。由于酶反应具有专一性,高效性,在生物传感器的研究中被广泛应用。1962年,Clark用透析膜将葡萄糖氧化酶包埋在氧电极表面,氧浓度下降与溶液中的葡萄糖浓度相关,输出信号为电流,得到第一个酶传感器,并证实了生物化学物质无试剂分析的可能性^[6]。自此,吸引了众多科学家对酶传感器的研究与应用。

然而,酶传感器产生的信号非常微弱,容易受到多方面因素的影响。传感器的响应电流容易受到环境条件如温度、pH值、固定化以及酶自身活性变化的影响。另外,测量电路和 A/D 转化元件都使传感器的输出信号带有一定的非线性。

1.1 国内外研究进展

酶传感器的研究大致经历了三个发展阶段:第一阶段主要是利用电化学电极与固定了酶的非活性基质膜制成的简单的传感器,这类传感器容易受到氧的制约,且其灵敏度容易受到氧电极灵敏度的影响。以固定葡萄糖氧化酶的葡萄糖传感器为例,其响应机理是利用氧来作为酶的氧化还原活性中心的电子受体,氧在葡萄糖氧化酶作用下,催化氧化葡萄糖,生成 H_2O_2 。由于还原态葡萄糖氧化酶的氧化还原活性中心在酶分子内部,得不到可测量的电信号。可以通过测量反应物中氧的减少量或生成物中 H_2O_2 的产生量

这两种方法获得电信号^[7]。

第二阶段研究者在固定生物材料的同时，加入媒介体来促进电子传递的过程，提高测定的灵敏度。此阶段的传感器在电子传递过程中不涉及到氧的参与，因此避免了氧对传感器测量灵敏度以及准确度的影响。常用的媒介体有有二茂铁及其衍生物、铁氰酸盐、有机介体等^[8]。

第三阶段的生物传感器是把生物活性物质直接固定在电子元件上，生物分子与电极间的电子交换不再经过动态媒介参与，而直接进行电子传递、感知和放大界面物质的变化，从而把生物识别和信号的转换处理结合在一起^[7]。与前两个阶段的酶传感器相比，此阶段的酶传感器既不需要氧分子，也不需要媒介体作为电子传递体，而是使酶的氧化还原中心直接与电极间进行电子传递，从而提高反应器的响应速度和灵敏度。中国科学院长春应用化学研究所董邵俊研究组用直接电化学方法研究了辣根过氧化物酶的氧化还原性质^[6]。可以直接用于进行电化学反应的酶和蛋白质类有氧化还原酶类，肌红蛋白，血红蛋白和细胞色素 C 等。

随着生物传感器研究的不断深入，研究人员现致力于以下几个方面的研究：(1)新材料的开发与利用，如纳米材料的应用使传感器灵敏度更高，便携性更好；(2)采用新的固定化技术一直是研究的热点；(3)可以协同分析多种物质的复合酶传感器以及传感器的集成化是现代传感器要达到的目标；(4)生物传感器的活体实时监测在突发性、重症疾病的监护中的应用，可以避免破坏性取样和测定时间的迟滞；(5)虽然酶电极生化分析仪，BOD 测定仪，手持式血糖测定仪，SPR 分析仪和各类生物芯片已经得到应用，但生物传感器所占的市场份额还不大，生物传感器的市场化是当前研究的另一个热点。

1.2 生物传感器的一般特性

生物传感器的输入—输出关系是传感器的基本特性。生物传感器的不同内部结构参数决定它具有的不同外部特性，因此测量误差也与内部结构参数密切联系。生物传感器所测量的物理量根据其是否随时间变化，可以分为稳态信号和动态信号，所以生物传感器的输出特性分为静态特性和动态特性。由于不同生物传感器所固定的生物材料，以及选取的固定方法不同，静态特性和动态特性也表现出不同的特点，对测量结果的影响也不相同。

1.2.1 生物传感器的静态特性

生物传感器在稳态信号作用下，其输入—输出关系称为静态特性。衡量静态特性的指标有线性度、灵敏度、迟滞和重复性。

线性度是指生物传感器输入与输出之间的线性程度。如果生物传感器的输入—输出特性是线性的，则可以简化传感器的理论分析和设计计算，为标定和数据处理带来方便，避免了非线性补偿环节。由于生物材料不稳定以及在电子传递过程中容易受到环境条件的影响，实际的输出信号常带有一定的非线性。在应用中，通过拟合方法得到输入输出量的拟合曲线，从而使生物传感器的测量带来一定的非线性误差。

灵敏度是指生物传感器在稳态情况下，输出变化与输入变化的比值。在线性传感器中，灵敏度就是它静态特性的斜率，而非线性传感器的灵敏度随时间发生变化。酶催化的反应具有高度灵敏性，因此是作为传感器的良好材料。

迟滞在酶传感器中的产生，是由于电子在传递过程中，电子受到固定化或者溶液介质的阻碍作用，而使对应于同一大小的输入信号，正反行程的输出信号大小不相等。

重复性是指在对同一信号进行多次测量时，生物传感器的输出信号的特征曲线不一致的程度。在酶传感器的使用中，常伴随酶的失活或者部分失活，因此酶传感器在使用一段时间后要重新进行校正。

1.2.2 生物传感器的动态特性

在测定静态信号时，生物传感器的输入—输出特性之间存在一一对应的关系。但在生物传感器的实际使用过程中，被测信号随时间变化。而生物传感器对动态信号的测量，不仅需要精确地测量信号值的大小，还要记录信号变化与时间的关系。

研究动态特性可以从时域和频域两个方面采用顺态响应法和频率响应法来分析。由于输入信号的时间函数形式多种多样，在时域内研究生物传感器的响应特性时，只能研究几种特定的输入时间函数，如阶越函数、脉冲函数和斜坡函数等的响应特性。在频域内一般采用正弦函数得到频率响应特性^[1]。

1.3 酶的固定化

酶的固定化主要是应用物理或化学方法将溶液酶转化为不溶于水的可以重复利用的固定态酶。其主要目的是在不妨碍被分析物自由扩散的情况下，将酶等限制在一定空

间。与游离态酶相比，固定化酶具有一系列的优点：(1)酶可以从反应物中分离，重复使用，降低成本；(2)大多数酶经过固定化后，其稳定性增加；(3)减少其他物质的干扰；(4)便于实现生产的连续化和自动化。固定化方法有^[6]：

1.3.1 基本方法

适合生物传感器的常用固定化方法分为 6 种：夹心法、包埋法、吸附法、共价结合法、交联法和微胶囊法。

夹心法是将活性材料封闭在双层滤膜之间，固定酶的膜类型为超滤膜或透析膜。这种方法操作简单，不需要任何化学处理，固定生物量大，响应速度较快，重现性好。

吸附法是经非水溶性载体物理吸附或离子结合作用，如配位键和疏水作用等固定生物敏感元件。吸附的牢固程度与溶液的 pH 值、离子强度、温度、溶剂性质和种类以及酶浓度有关。吸附过程一般不需要化学试剂，对蛋白质分子活性影响较小，但蛋白质分子容易脱落。

凝胶包埋法是将生物材料包埋并固定在高分子聚合物三维空间网状结构基质中，主要用于固定酶分子和细胞。其特点是不产生化学修饰，对生物分子活性影响较小，膜的孔径和几何形状可任意控制，被包埋物不易渗漏，底物分子可以在膜中任意扩散；缺点是分子量大的底物在凝胶网格内扩散较困难。

共价键合法是使生物活性分子通过共价键，直接或间接与不溶性载体结合而固定的方法。其特点是结合牢固，蛋白质分子不易脱落，载体不易被生物降解，使用寿命长；缺点是操作步骤较多，酶活性可能因为化学修饰而降低，制备具有高活性的固定化酶比较困难。

交联法是借助具有两个功能基团的双功能试剂，使蛋白质结合到惰性载体或蛋白质分子彼此交联成网状结构。广泛用于酶膜和免疫分子膜制备，操作简单，结构牢固，但在进行固定化时需要严格控制 pH 值，一般在蛋白质的等电点附近操作，交联剂浓度要严格控制。

微胶囊法包埋生物活性材料或指示分子，主要采用脂质双分子层组成的内部结构为水相的闭合囊泡。自 20 世纪 60 年代以来，一直作为细胞膜研究的人工模式系统，现广泛地作为药物分子载体用于治疗。

1.3.2 LB 膜技术

LB 膜的基本原理是生物分子在洁净的水表面展开后形成水不溶性液态单分子膜，小心压缩表面积使液态膜逐渐成为一个分子厚度的拟固态膜。利用 LB 膜技术制作酶膜主要有两个优点：一是酶膜可以制得很薄，厚度和层数可以精确控制；二是可以获得高密度的酶分子膜，由此可能协调响应速度和响应活性这对矛盾。但酶分子多溶于水，难以在水相中成膜。

1.3.3 光平版印刷技术

光平版印刷术是利用照相原理与化学腐蚀相结合，在工件表面制取精密、细微和复杂薄层图形。广泛用于印刷电路和集成电路的制作以及印刷制版等过程，其基本原理是利用光刻胶感光后因光化学反应而固化的特点将掩模板上的图形刻制到被加工表面上。

1.4 影响酶传感器特性的因素

在酶传感器中，温度和缓冲液 pH 值常使敏感原件酶发生不可逆失活。反应速率随温度升高而加快，但在较高的温度下由于酶的失活作用，反应速率反而下降。在电阻应变式酶传感器中，温度一方面引起电阻变化，另一方面对酶反应产生影响，当二者数量级相同时，测量精度无法保证；在电容式传感器中，当介电常数的温度系数不为零时，则引起传感器电容值的改变，从而造成温度附加误差。当 pH 值改变时，酶的解离状态发生变化，具有催化活性的酶分子数量随之变化，从而影响反应速率。

另外，由于固定化酶内扩散和外扩散的作用，影响了底物与酶的接触，底物需要通过固定介质才能与酶发生反应；同时，在反应过程中电子的传递受到一定程度的阻碍，从而增大了酶传感器的测量误差。

再者，生物传感器的输出信号非常弱，需要有信号调节电路和转换电路将其放大并转换成容易传输、处理、记录和显示的形式，在电路的设计以及信号转换过程中，不可避免的引起误差。

上述各影响因素使酶传感器输出信号带有一定程度的非线性，影响了测量的灵敏度和精确度。

1.5 研究目的和意义

酶传感器是最早出现的生物传感器，目前研究集中在对新技术、新材料和新方法的开发与利用。

新生物材料的应用，如 DNA 在一定程度上提高了传感器的精确度；新的固定化技术，如纳米技术对提高酶传感器的灵敏度做出了突出贡献，但当前对酶传感器中敏感材料的基本特性研究并不多见。辣根过氧化物酶活性稳定，价格低廉容易得到，在酶传感器、生物修复以及生物降解等研究中广泛应用。因此，反应的动力学机制对研究酶降解有机污染物及检测有毒物质的研究有重要意义。本文通过数值模拟研究了辣根过氧化物酶催化 H_2O_2 氧化苯酚的反应，得到了中间产物的变化规律，以及底物浓度与反应时间之间的关系。并探讨了在温度和 pH 值综合影响下，聚硫堇和纳米金固定辣根过氧化物酶传感器的响应特征，得到了该酶传感器最佳的工作条件。

在实际生产中，被测信号往往并不是单一的稳定信号。为了适应实际测量的需要，复合酶传感器的研究是当前研究的热点之一。多种酶以及酶与其它生物材料的联合固定提高了酶传感器的检测效率。但是为了避免生物材料或被测信号相互干扰，复合传感器对固定的敏感材料以及被测物有严格的要求。

另外，对多指标评价系统的研究并没有明确标准。通过对动物营养免疫研究，发现在甲壳动物免疫力评价中，存在着不同指标间不能进行科学比较，以及不能综合反应免疫力变化情况的问题。本文从动力学角度探讨了饲料中硒对中华米虾抗氧化酶系统的可能作用机制；定义了甲壳动物免疫力综合指标，并确定了数学表达式为权重累加形式，给出了计算权重的两种方法：一是根据评价者主观上对各指标的重视程度来决定权重的层次分析法；一是根据各指标的联系程度或各指标所提供的贡献量来决定指标的权重的主成分分析法。为复合酶传感器进行多指标系统测量的定量研究提供了数学基础。

第2章 辣根过氧化物酶反应动力学的数值模拟

2.1 引言

生化反应动力学是研究生化反应过程的速率及其影响因素的科学。目前,对反应速率及影响因素的研究,多数以经验的方法为主。但随着学科间的融合与发展,采用数值模拟的方法来进行研究正迅速发展起来^[9]。为了研究辅酶重建对基于酶促反应的光学生物传感器性能的影响作用, Jenna Rickus^[10]等人(2005)通过建立模型,以数值积分的方式,研究了酶传感器的灵敏度、响应时间等性能参数。为了考察膜反应器的一系列性能, Elio E.Gonza^[11]等(2007)建立了一个简便而易用的数值模拟方法,模拟了反应器的相关特性,并取得了很好的效果。2006年, Nobuyoshi^[12]等详细探究了多酶反应体系的动态模拟,并给出了以糖酵解酶反应为实例的对比结果。2007年10月, Maria J. Schilstra^[13]对复杂生化过程的数值模拟方法进行了研究,指明了生化反应的数值模拟应遵循的基本理念与基本规律等。

与相关学科的融合,使得对生化反应过程的研究更加方便、灵活。通过采用数值模拟的方法,可使用几个关键的变量来代替复杂的反应过程,并将微观现象与宏观现象联系起来,以预测反应的结果,检测并发现可能被忽略掉的变量与参数,甚至搞清楚反应的机理^[9]。基于此,本文以水相中辣根过氧化物酶催化 H_2O_2 与苯酚反应为代表,对反应从开始进行直到到达稳定状态进行了模拟,并由此探讨了生化反应数值模拟时存在的问题及得到的结论。

2.2 酶促反应的基本方程

1913年, Michaelis-Menten 等人提出了酶催化反应历程^[14]。酶(E)与底物(S)先成中间化合物(ES),然后中间化合物再进一步分解为产物,并释放出酶(E)。



式中, k_{-1}, k_{+1}, k_{+2} ——各级反应速率常数

HRP 是以铁卟啉为辅基的血红素蛋白,在 H_2O_2 存在时,它能够催化一系列底物发生反应。其催化反应过程包含多种中间化合物的形成,首先是 HRP 的血红素基团经过两电子氧化而成为化合物 HRP-I,然后化合物 HRP-I 与底物发生反应形成化合物 HRP-II,

化合物 HRP-II 可以还原为 HRP 状态。HRP-I 与 HRP-II 均在很短的时间内形成，并且滞留的时间非常短^[15]，随即参加下一步的反应。本文忽略了各逆反应的发生，并假定了酶在反应过程中不失活，反应条件稳定。由此，上述反应体系的反应过程包括以下三个步骤^[16]：



式中，HRP——游离态酶；AH₂——苯酚；•AH——苯酚脱氢产物。

上述反应过程，改用微分方程表示，则参与反应的各物质的反应速率为：

$$\frac{d[\text{HRP}]}{dt} = -k_{+1} \cdot [\text{HRP}] \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] + k_{+3} \cdot [\text{HRP-II}] \cdot [\text{AH}_2] \quad (2.5)$$

$$\frac{d[\text{HRP-I}]}{dt} = k_{+1} \cdot [\text{HRP}] \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] - k_{+2} \cdot [\text{HRP-I}] \cdot [\text{AH}_2] \quad (2.6)$$

$$\frac{d[\text{HRP-II}]}{dt} = k_{+2} \cdot [\text{HRP-I}] \cdot [\text{AH}_2] - k_{+3} \cdot [\text{HRP-II}] \cdot [\text{AH}_2] \quad (2.7)$$

$$\frac{d[\text{AH}_2]}{dt} = -k_{+2} \cdot [\text{HRP-I}] \cdot [\text{AH}_2] - k_{+3} \cdot [\text{HRP-II}] \cdot [\text{AH}_2] \quad (2.8)$$

$$\frac{d[\bullet\text{AH}]}{dt} = k_{+2} \cdot [\text{HRP-I}] \cdot [\text{AH}_2] + k_{+3} \cdot [\text{HRP-II}] \cdot [\text{AH}_2] \quad (2.9)$$

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = -k_{+1} \cdot [\text{HRP}] \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] \quad (2.10)$$

式中，[HRP]——游离态酶的浓度；[H₂O₂]——过氧化氢的浓度；[HRP-I]——中间产物 I 的浓度；[HRP-II]——中间产物 II 的浓度；[AH₂]——苯酚的浓度；[•AH]——苯酚脱氢产物的浓度。

2.3 方程求解

在方程(5)-(10)所表述的反应体系中，因变量[HRP-I]、[HRP-II]与[•AH]随自变量[HRP]、[H₂O₂]与[AH₂]的变化而变化。因此，可以通过改变 HRP、H₂O₂ 与 AH₂ 的浓度比例来探讨底物浓度与酶浓度变化对反应动力学的影响。由于[HRP-I]与[HRP-II]相对[HRP]、[H₂O₂]变化极快^[15]，因此该反应体系的方程属于刚性方程组。经验证，上述反应体系的刚性方程组不能通过龙格库塔法^[17]ODE45 进行有效求解，本文采用 ODE15S 求解并得到了反应过程中各组分的动力学曲线。

pH 值在 5-9 之间时, k_{+1} 与 pH 值无关, k_{+2}, k_{+3} 只因底物的不同而变化。各级反应的速率常数分别源于文献^[16]:

$$k_{+1} = 1.0 \times 10^7 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}; \quad (2.11)$$

$$k_{+2} = 2.76 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}; \quad (2.12)$$

$$k_{+3} = 2.85 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}; \quad (2.13)$$

为了验证模拟的可靠性, 这里采用了和文献中相同的浓度, 即当 HRP、 H_2O_2 与 AH_2 的初始浓度分别为 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $5.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对反应进行模拟, 得到 HRP、HRP-I 与 HRP-II 的浓度变化曲线 (如图 2.1 与图 2.2 所示)。

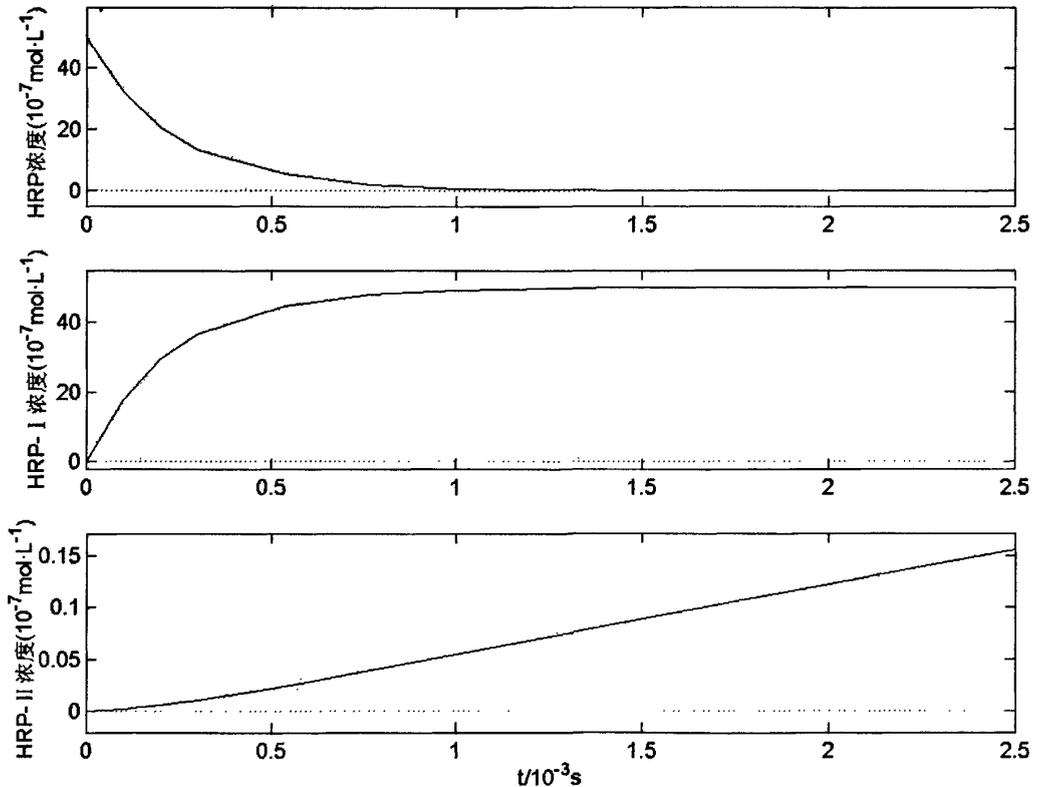


图 2.1 HRP, HRP-I 与 HRP-II 浓度随时间变化

Fig.2.1 Concentrations of HRP, HRP-I and HRP-II vary over time

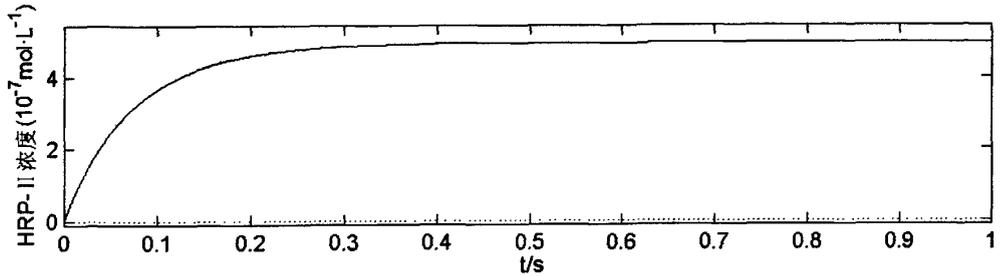


图 2.2 HRP-II 浓度随时间变化

Fig. 2.2 Concentration of HRP-II varies over time

在反应体系中AH₂是氢供体底物，H₂O₂是氢受体底物。对没有引入任何氢供体底物HRP与H₂O₂反应生成HRP-I，继而生成HRP-II这一现象是许多研究中都得到证实^[18]。改变AH₂初始反应物浓度，当HRP，H₂O₂与AH₂的初始浓度分别为5.0×10⁻⁶mol·L⁻¹，5.0×10⁻⁴mol·L⁻¹，5.0×10⁻⁴mol·L⁻¹时获得另外一组浓度变化曲线（如图2.3所示）。

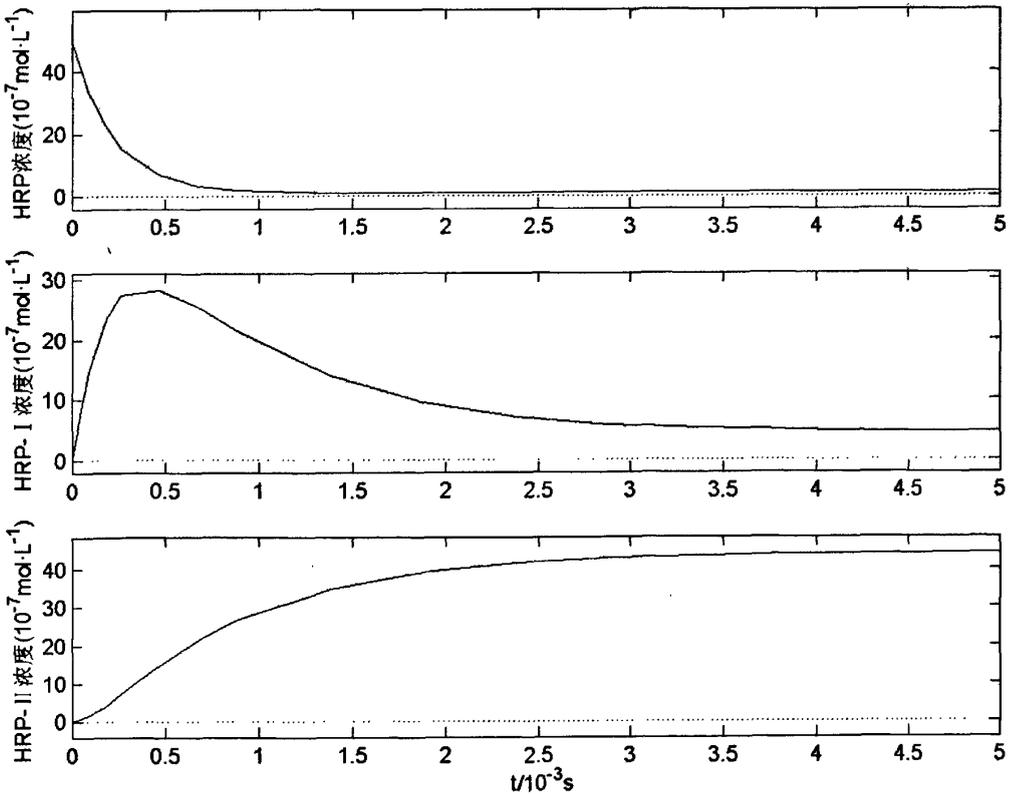


图 2.3 HRP、HRP-I 与 HRP-II 浓度随时间变化

Fig. 2.3 Concentrations of HRP、HRP-I and HRP-II vary over time

2.4 结果与讨论

通过对微分方程组的求解,得到了 HRP 以及其中间产物 HRP-I 与 HRP-II 自反应开始直到到达稳定阶段的浓度变化曲线(如图 2.1,2.2,2.3 所示)。陈建波等^[15]采用停留光谱法检测到 HRP 催化 H_2O_2 氧化联苯胺的反应体系中吸收光谱的变化,证实中间复合物在 0.0025s 内迅速形成,并在 0.005s 后消失(如图 2.4 所示)。与模拟结果基本一致,中间复合物在反应的开始阶段迅速产生,并达到平衡,反应完成后消失。

通过模拟,可知当 HRP, H_2O_2 与 AH_2 的初始浓度分别为 5.0×10^{-6} mol/L, 5.0×10^{-4} mol/L, 5.0×10^{-7} mol/L 时,HRP 浓度在反应初始阶段降低,这是由于游离酶与底物结合成中间复合物,因此 HRP-I 与 HRP-II 浓度升高,并且在反应进行 1.5×10^{-3} s 时 HRP 与 HRP-I 浓度不再变化,HRP-II 浓度继续缓慢上升(如图 2.1 所示)。当反应时间达到 0.5s 时,HRP-II 浓度不再变化,达到稳定(如图 2.2 所示),此时未与底物结合的游离酶以及两种中间复合物的浓度和,等于初始加入的酶的浓度,模拟结果符合 Briggs-Haldane 方程^[9]。由于 AH_2 浓度较低限制了第二步反应的进行,因此反应体系中 HRP-I 浓度要高于 HRP-II。这说明,数值模拟严格遵循着 B-H 方程,能够准确的再现生化反应的过程。

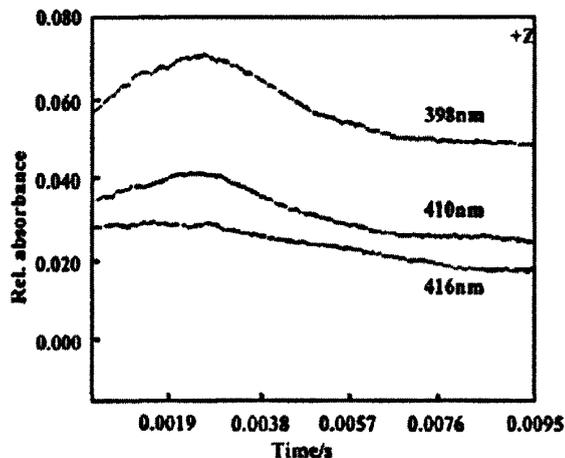


图4 不同波长下吸光度随时间的变化曲线(摘自文献 15)

Fig. 4 The variation in absorbance different wave-lengths (see ref. 15)

提高 AH_2 浓度为 HRP 的 100 倍,其反应过程如图 2.3 所示,由图可知,随着 AH_2 浓度与 HRP 浓度比值的提高,HRP-I 与 AH_2 的反应速率逐渐加快。在反应过程中,HRP 浓度逐渐降低,HRP-I 浓度随着反应的进行先升后降,在 0.5×10^{-3} s 时出现峰值,其原因

可能是由于 k_{+1} 高于 k_{+2} ，即生成 HRP-I 的速率高于 HRP-II，所以在反应初始阶段，HRP-I 有短暂的积累，随着反应的进行，HRP-I 被下一级反应消耗，浓度逐渐降低；而 HRP-II 逐渐升高，最终三者都在 4.5×10^{-3} s 左右达到稳定，浓度不再变化。和前边的反应对比可知，当增大 AH_2 浓度后，反应达到稳定的时间要远远低于增大浓度前的反应体系。

目前，在对酶反应动力学及其中间产物研究过程中，多数采用分光光度法对反应过程中的中间产物进行浓度的分析，以探求生化反应的机制。陈海明^[18]等采用停流快速混合技术，利用快速扫描紫外可见分光光度计得到 HRP 催化过氧化氢氧化苯酚聚合过程的瞬态光谱数据。对该测量数据矩阵用正交投影及遗传算法解析后，确定体系中含有 HRP 及其中间复合物，并且当 HRP 与底物以 1:100 的比例混合时检测到大量 HRP-II，而由于 HRP-I 存在时间较短不易检测到。陈建波^[15]等用停流法探讨了 25℃ 时辣根过氧化物酶氧化联苯胺反应过程中 HRP-I 在 0.005s 后基本完全消失。本文通过设定相同的模拟条件，模拟结果与上述文献通过光谱分析得到的结果基本一致。此外，本模拟可设定不同的浓度值，能够更加方便的研究浓度的逐渐变化与反应速率的关系，而不必在实际中对每一个浓度的都进行试验，可节约大量的试验时间与费用，图 2.5、2.6 给出了不同 AH_2 和 H_2O_2 浓度下的反应过程曲线。

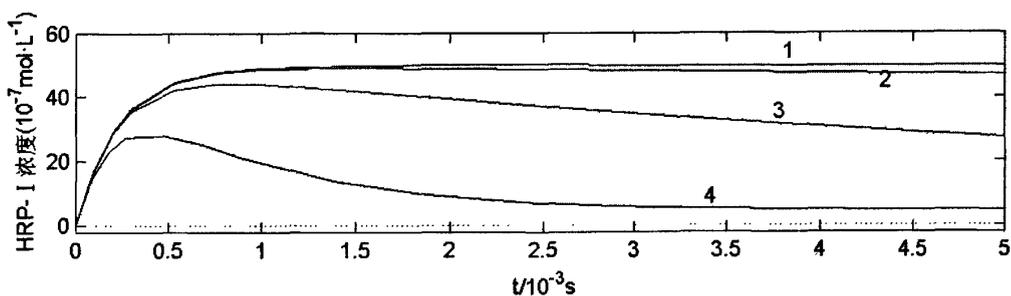


图 2.5 不同 AH_2 浓度下 [HRP-I] 变化

1—— $[\text{AH}_2]=5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, 2—— $[\text{AH}_2]=5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$,
3—— $[\text{AH}_2]=5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 4—— $[\text{AH}_2]=5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

Fig. 2.5 The variation of [HRP-I] at different $[\text{AH}_2]$

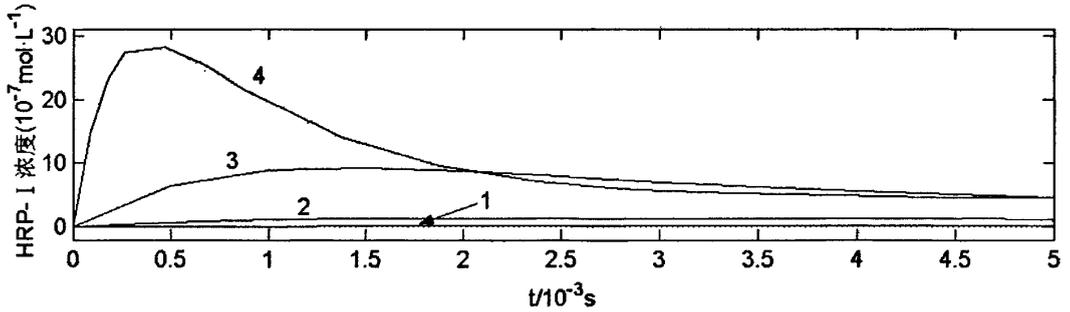


图 2.6 不同 H_2O_2 浓度下 [HRP-I] 变化

1—— $[\text{H}_2\text{O}_2]=5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, 2—— $[\text{H}_2\text{O}_2]=5.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$,
 3—— $[\text{H}_2\text{O}_2]=5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 4—— $[\text{H}_2\text{O}_2]=5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

Fig. 2.6 The variation of [HRP-I] at different $[\text{H}_2\text{O}_2]$ concentrations

2.5 结论

通过具体模拟辣根过氧化物酶的反应，本文得到了模拟生化反应动力学的基本结论：

1. 在使用龙格库塔法求解生化反应动力学的微分方程时，要首先确定方程的刚性问题，即反应体系的方程是否属刚性体系。ODE45 工具模块不适用于解决刚性的系统，应采用 ODE15S。

2. 模拟计算所得到结果符合 Briggs-Haldane 理论方程，并与文献中的实验结果一致，表明对生化反应进行的数值模拟可行、可信，为通过计算机的数值模拟研究生化反应提供了新思路。此外，通过模拟，可明确得到 HRP-I 与 HRP-II 的存在时间，并且随着增加底物浓度，可准确计算反应时间缩短了多少。

3. 利用数值模型对生化反应进行研究，可有效的减少实验次数，大量缩减实验时间，优化反应的最佳浓度，获得不同浓度梯度下的反应过程，事半功倍的描述浓度连续变化情况下的反应。

第 3 章 温度、pH 值对生物传感器检测范围的影响

3.1 引言

生物传感器是分析生物技术的一个重要应用领域，是一个典型的多学科交叉产物，它结合了生命科学、分析化学、物理学和信息科学及其相关技术，能够对所需要检测的物质进行快速分析和追踪^[6]。自 20 世纪 80 年代起，国际上对生物传感器进行了广泛的研究和探索，近些年来，已经研制出一系列在环境监测、临床检验和生化分析等方面具有实用价值的生物传感器^[19-20]。其中，以酶传感器的研究最为广泛。酶传感器是以酶作为生物敏感基元，通过各种物理、化学型信号转换器捕捉目标物与敏感基元之间的反应后，将反应用离散或连续的电信号表达出来，从而得出被测物的浓度^[21]。

酶自身具有不稳定性，容易受到环境温度、缓冲液 pH 值以及固定化等诸多因素的影响，因此酶传感器输出常带有一定的非线性信号。当前研究中，常采用附加设备控制温度和 pH 值，将传感器的工作条件控制在酶催化反应的最佳条件，以此减弱温度和 pH 值对测量的影响，这种处理方法增加了制作工艺的复杂性，并且在实际应用中容易受到工作环境限制。在生物传感器最佳工作条件研究中，国内外学者只对单因素条件进行了探讨，并设定离散试验点进行比较，没有考虑温度和 pH 值共同作用时以及非试验点的响应值，不能得到传感器的精确工作条件。上述问题影响了对传感器性能的研究，降低了传感器的敏感性与测量精度。要提高系统测试的精度，扩大酶传感器在生产实践中的应用范围，就必须降低温度、pH 值对测量结果的影响，将输出信号进行线性化处理或者非线性补偿。本文采用最小二乘多项式和三次样条插值拟合处理数据，得到二者与响应电流之间的函数关系，并且研究了温度、pH 值同时变化对辣根过氧化物酶传感器的影响，设计了生物传感器的检测系统。

3.2 非线性信号的产生与处理

在酶传感器中，温度和缓冲液 pH 值常使敏感原件酶发生不可逆失活。在一定的温度范围内，酶催化反应速率常数与温度的关系符合 Arrhenius 方程^[9]，即：

$$k = A \exp(-E_a / RT) \quad (3.1)$$

式中：A——指前因子； E_a ——反应活化能；R——气体常数；T——绝对温度。由(3.1)式可知，反应速率随温度升高而加快，但在较高的温度下由于酶的失活作用，反应速率反而下降。在电阻应变式酶传感器中，温度一方面引起电阻变化，另一方面对酶反应产生影响，当二者数量级相同时，测量精度无法保证；在电容式传感器中，当介电常数的温度系数不为零时，则引起传感器电容值的改变，从而造成温度附加误差。当pH值改变时，酶的解离状态发生变化，具有催化活性的酶分子数量随之变化，从而影响反应速率。上述各影响因素使生物传感器输出信号带有一定程度的非线性，影响了测量的灵敏度和精确度。

酶传感器中对输出的非线性信号线性化处理,可以采用函数运算法和可变电电压源电桥法。当传感器的系统特性可以用简单的函数关系表示时，则把其运算规则存入系统的微处理器，每一个参量都可以通过计算得到相应的物理量。桥路补偿是温度补偿的常用方法，不平衡单臂电桥已经广泛的应用于自动化仪表的传感器线路中，传感器的输出电阻信号与被测物理量或化学参数呈线性关系，电桥的输出信号能反映出被测物理量或化学量的变化^[22]。

生物传感器是受多因素影响的复杂系统，很难用简单的函数关系进行表达。桥路补偿法会增加电路的复杂性，为传感器的制作增加困难。生物传感器的非线性信号无法用线性化的方法消除非线性误差时，可以选取适当的拟合函数，并把能实现拟合函数的电路作为传感器电路的一部分，在补偿范围内实现生物传感器的线性化。

3.3 温度、pH值变化对传感器的单独影响

石银涛等对聚硫堇和纳米金固定辣根过氧化物酶传感器最优化条件进行了探讨^[23]。分别在20、25、30、37、45、50、55℃测得酶传感器响应电流值，得到最适温度为45℃，传感器对 H_2O_2 的响应在 2.15×10^{-6} — 1.43×10^{-2} mol/L范围内呈良好的线性关系，检出限为 2.00×10^{-7} mol/L，相关系数为0.998。

本文对传感器响应电流随温度变化进行最小二乘多项式与三次样条插值拟合，分别得到两条拟合曲线(图3.1)，从图中可以看出，在拟合基点25℃—50℃之间，随温度升高，响应电流先升高再降低，响应电流最大值出现在40℃—45℃之间。并得到响应电流与温度变化的函数关系为：

$$\begin{aligned}
 I &= f(T) \\
 &= 1.494 \times 10^{-7} T^6 - 3.2628 \times 10^{-5} T^5 + 0.0029 T^4 \\
 &\quad - 0.1350 T^3 + 3.4548 T^2 - 46.0600 T + 251.8247
 \end{aligned}
 \tag{3.2}$$

式中：I——响应电流；T——温度。

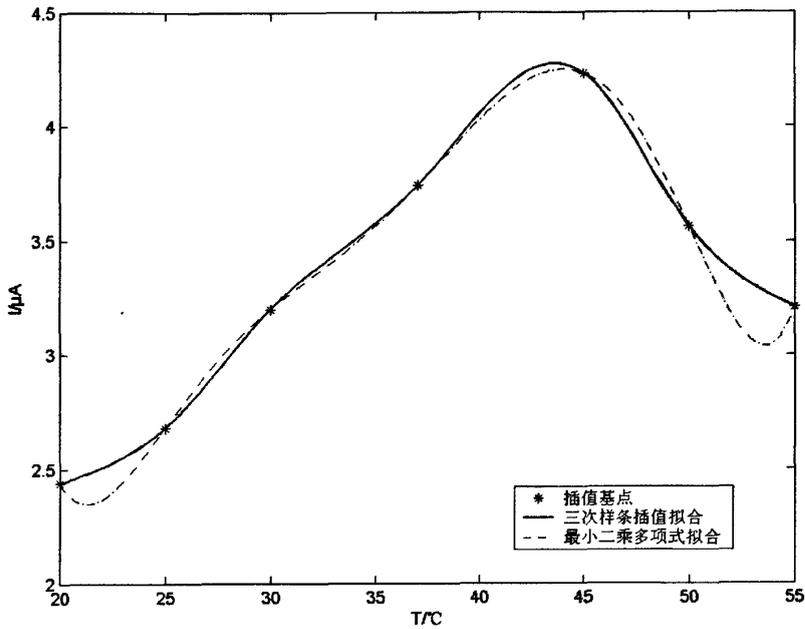


图 3.1 温度对响应电流的影响

Fig.3.1 Effect of the Temperature on the Current Response of the Sensor

在pH值分别为4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0和7.5的缓冲液条件下，得到响应电流随pH值变化曲线^[23]，得到最佳工作pH值为5.5。

采用同样拟合方法得到响应电流随pH值变化的拟合曲线(图 3.2)，从图中得到，pH值在4.5—6.8之间，响应电流的最大值出现在5.4—6.5之间。并得到响应电流随pH变化的函数为：

$$\begin{aligned}
 I &= f(pH) \\
 &= 0.62391 pH^6 - 22.7753 pH^5 + 344.4961 pH^4 - 2762.8695 pH^3 \\
 &\quad + 12386.749 pH^2 - 29421.9612 pH + 28916.356
 \end{aligned}
 \tag{3.3}$$

式中：I——响应电流。

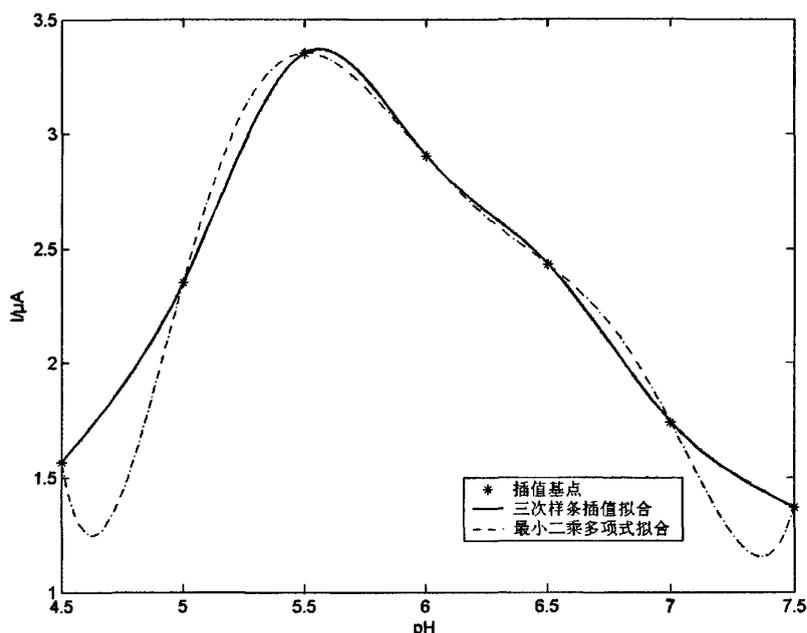


图 3.2 pH 对响应电流的影响

Fig.3.2 Effect of the pH on the Current Response of the Sensor

3.4 结果与讨论

石银涛等^[23]通过对不同温度和pH下传感器的响应电流测定得到最佳工作条件为45℃，pH值为5.5。本文通过最小二乘多项式和三次样条插值拟合，得到酶传感器响应电流随温度、pH值变化曲线(如图3.1、3.2所示)，并得到该酶传感器最佳测定温度为40—45℃之间，最佳pH值在5.3—5.7之间。由图中可以得到，在一定的范围内响应电流随温度、pH值的增加而增大，但是到达一定程度，响应电流均下降。而在基点的两端，两条拟合曲线变化趋势均存在误差。通过三次样条插值拟合得到单调曲线，而最小二乘多项式拟合得到的曲线均是先下降再上升。其可能原因是数据量较少，拟合带来的误差，也可能是酶催化反应过程中，温度和pH值变化影响过氧化氢自身分解，从而响应电流发生变化。

目前，国内外文献中对生物传感器工作条件的研究，仅对单一条件进行探讨，如于宁等对过氧化氢酶传感器优化条件的研究^[24]，并不能准确得到传感器的最佳工作条件。

本文认为，温度和pH值存在着一定关系，二者并不是独立变量。当前研究中将温

度和 pH 值单独考虑并不合理。温度和 pH 值共同影响电流的变化，当其中一个条件固定所得到的函数是电流对另一条件的偏导数，公式(3.2)、(3.3)分别为电流 I 对 pH 值和温度 T 的偏导函数，即：

$$\frac{\partial I}{\partial T} = 1.494 \times 10^{-7} T^6 - 3.2628 \times 10^{-5} T^5 + 0.0029 T^4 - 0.1350 T^3 + 3.4548 T^2 - 46.0600 T + 251.8247 \quad (3.4)$$

$$\frac{\partial I}{\partial pH} = 0.62391 pH^6 - 22.7753 pH^5 + 344.4961 pH^4 - 2762.8695 pH^3 + 12386.749 pH^2 - 29421.9612 pH + 28916.356 \quad (3.5)$$

根据式(3.4)，(3.5)得到 I 和 T、pH 值的三维关系图(图 3.3)，并得到其在各面上的投影图(图 3.4)。由图(3.3)可以得到，I 随 T、pH 变化轨迹为空间一条曲带；由图(3.4)中曲带在各平面的投影得到，当同时考虑 T 和 pH 对 I 的影响时，传感器的最佳工作条件为温度 32.5℃，pH 值为 5.5 左右。

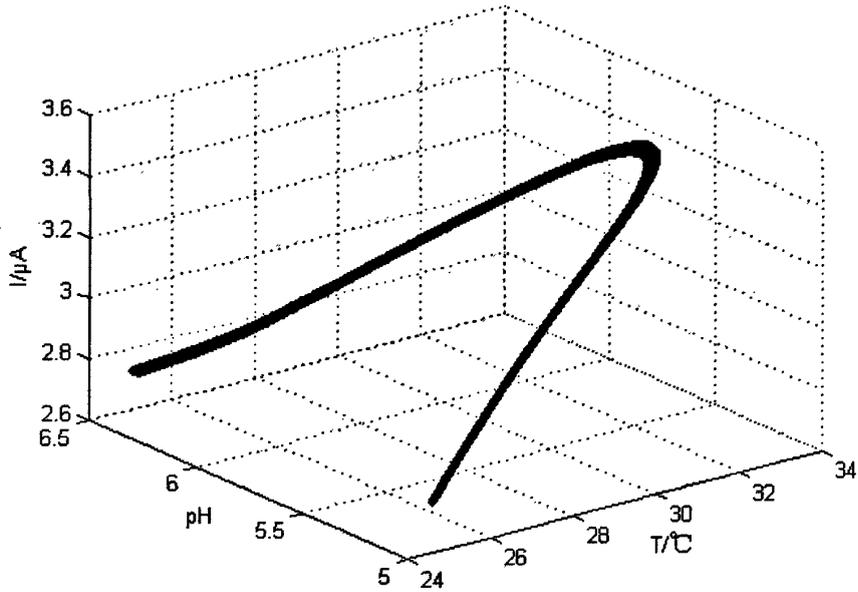


图 3.3 T、pH 和 I 三维关系图

Fig3.3 Effect of the pH and Temperature on the Current Response of the Sensor

第3章 温度、pH 值对生物传感器检测范围的影响

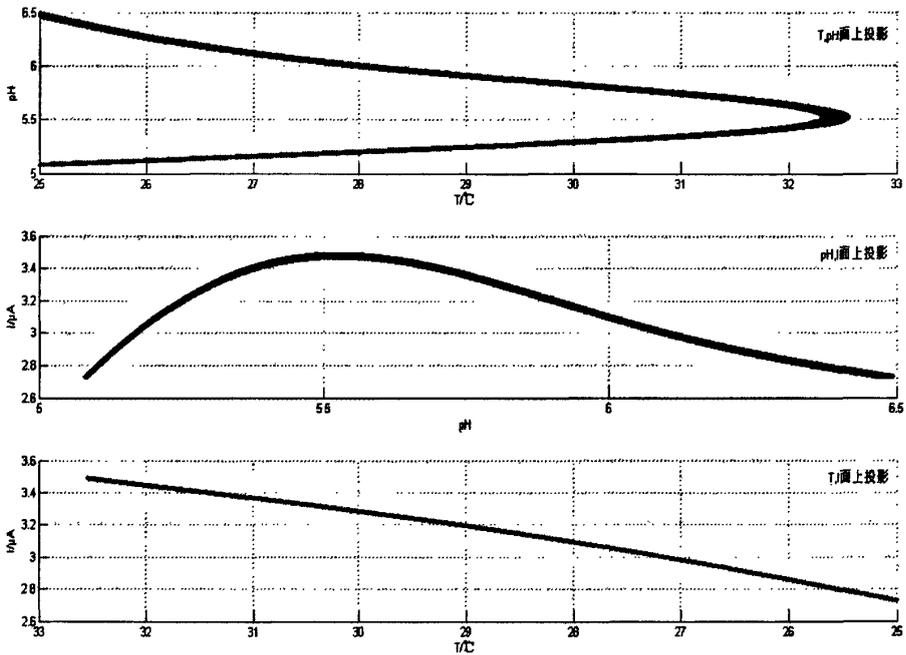


图 3.4 T, pH 和 I 关系各面投影图
Fig3.4 Projection on every ichnography

为了消除温度和 pH 值对生物传感器测量精度以及敏感性的影响，目前研究中采用附加设备固定温度、pH 值，使传感器在理想的状况下进行工作，限制传感器的使用范围，为实际应用带来不变。并且附加设备对传感器工作条件的控制，增加了制作工艺的繁琐。另外，环境温度的变化给实际监测带来较大的测量误差。本文通过上述两种方法拟合，得到响应电流由于受到工作温度，pH 值影响，输出信号呈现出一定非线性。并且得到酶催化反应与温度、pH 值之间的变化曲线和函数关系，在 25-33°C，pH 值在 5-6 之间两条拟合曲线一致。

将函数(3.4)和(3.5)或者实现数据拟合的算法存入传感器的微处理器中，在生物传感器每次使用校正过程中，根据实际情况得到被测物与响应电流的线性关系，以减少温度、pH 变化对测量结果带来的误差，其检测系统示意图(如图 3.5)所示。

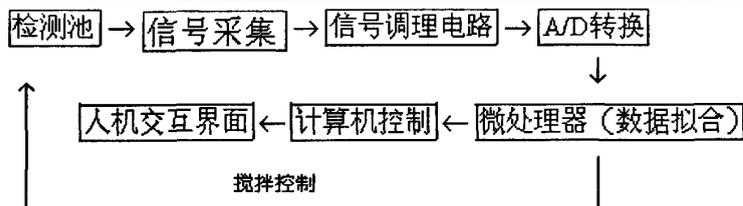


图 3.5 生物传感器检测系统
Fig.3.5 The detecting system of biosensor

另外，可以将实现拟合算法的电路作为传感器电路设计一部分，对所得到的信号进行非线性补偿，基本实现被测物与响应电流的线性化，减少酶传感器带来的非线性误差。监测系统示意图，如图 3.6 所示。

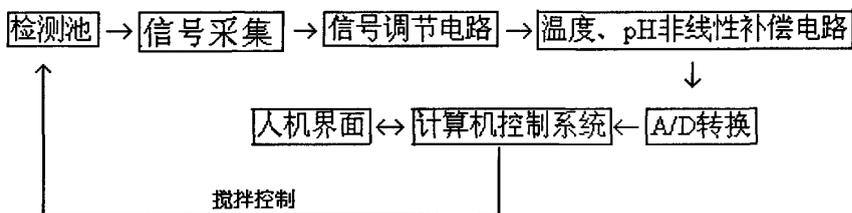


图 3.6 生物传感器检测系统
Fig.3.6 The detecting system of biosensor

上述两个系统，可以将此生物传感器的工作范围扩大为 25-33℃，pH 值在 5-6 之间，并且减弱了温度、pH 值对输出信号的影响。

若将数据拟合算法存入传感器的微处理器，则可以制作如图 3.7、3.8 的人机交互界面。根据实际条件进行设定，得到最终的测量结果。如图 3.7 所示，实际设定 pH 值为 5.8，经过处理得到其电流响应值为 4.015 μA 。

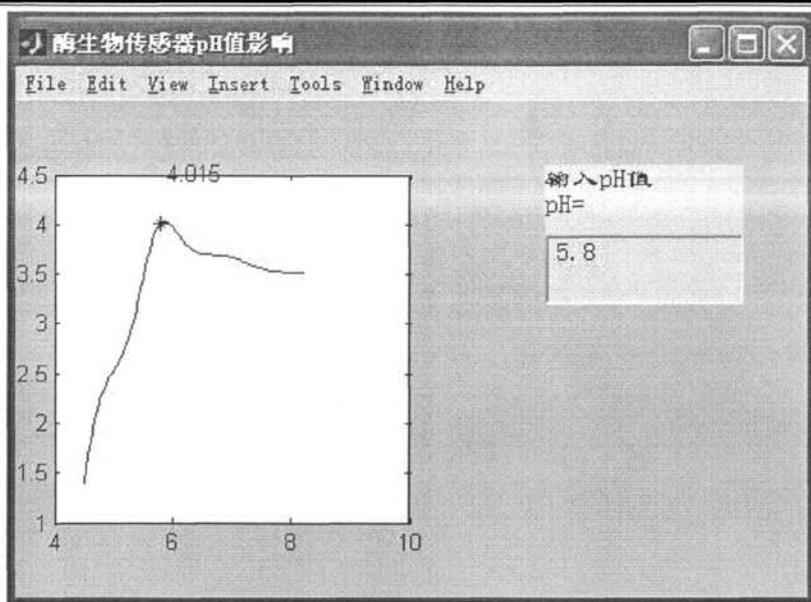


图 3.7 pH 值拟合的人机交互界面

Fig.3.7 Simulate the electric current of different pH

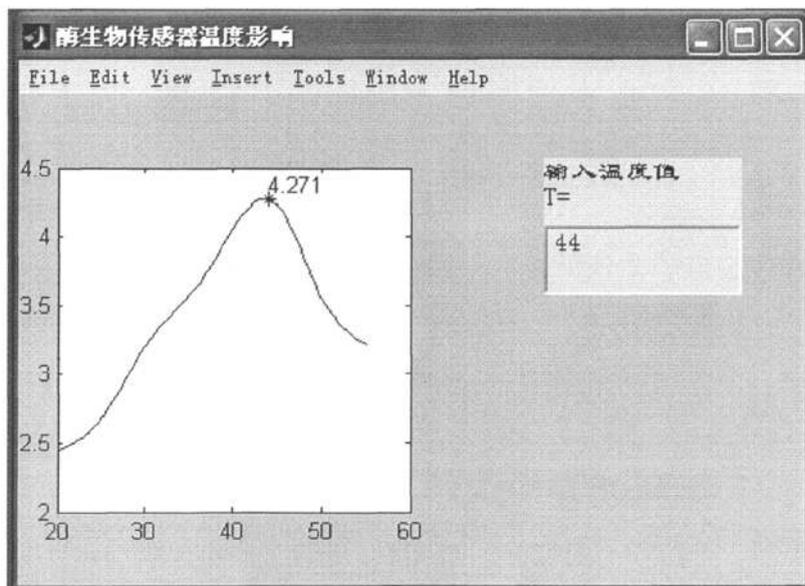


图 3.8 温度拟合的人机交互界面

Fig.3.8 Simulate the electric current of temperature

3.5 结论

通过对试验数据的拟合, 本文得到在酶传感器研制和使用过程中的基本结论:

1. 对单个因素的离散试验点进行分析, 并不能准确的得到酶传感器的最适工作条件。通过拟合, 得到基于聚硫堇和纳米金固定辣根过氧化物酶的生物传感器, 理论最佳工作条件是: 温度在 25-33℃ 之间, pH 值在 5-6 之间。
2. 以温度、pH 值与响应电流之间的函数关系作为传感器校正, 以及实现线性化处理和非线性补偿电路的基础, 能够提高酶传感器的测量精度, 扩大使用范围。

第4章 硒对中华米虾抗氧化酶系统作用机制的探讨

4.1 引言

硒是生命体必需的微量元素，在机体中主要以硒代半胱氨酸形式存在，主要用作谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的活性成分。GPX是机体主要的过氧化物酶之一，能清除机体内脂质过氧化物，使细胞膜上的不饱和脂肪酸免受自由基的伤害^[25,26]。此外，硒还具有催化、构建和调节的基本生物学功能，在动物营养中已逐步得到广泛的研究和应用^[27-29]。硒是构成脱磺酸酶的组分，能促进甲状腺的代谢，从而促进动物的生长^[30]。据报道^[31]，在育苗银鲫基础饲料中添加亚硒酸钠和有机硒均可促进其生长。在一些淡水鱼和海产虾类中，硒可以拮抗汞、铬等有毒元素，对生物体起到保护作用。硒还可以通过影响过氧化物酶的活性对鱼的肉质、色素沉积及肌肉组织等产生作用^[32]。在虾的饲料中添加适量的微量元素可提高其自身的免疫力和抗病力，实现健康养殖^[33]。

利用营养学的方法提高养殖动物的免疫力和抗病力，是实现健康养殖、生产绿色水产品 and 保证水产养殖业可持续发展的重要途径。研制和开发具有免疫功能的饲料以及增强免疫功能的饲料添加剂，借此通过饲料途径改善动物的免疫机能，提高动物的抗病及抗应激能力，对促进水产养殖业和饲料工业的发展具有重要意义。目前，关于微量营养元素对机体作用影响的研究较多，而对其作用机理的探讨并不多见。本文以中华米虾为研究对象，探讨了饲料中不同硒含量对中华米虾抗氧化酶系统的影响，以及其可能的作用机制。

4.2 试验材料

试验前将中华米虾驯化7d，然后选择体长相近(1.7—2.1 cm)的健康虾随机分组，分别养殖于玻璃缸(60cm×60cm×30cm)内，每缸70只。试验期间每天早9:00、晚19:00各投饵1次，投喂量为虾体重的5%，每次投饵前清除缸底的残饵和排泄物，并记录死亡和蜕皮虾数。试验所用基础饲料参照王宏伟^[34]等报道试验中所用饲料。养殖1个月，每缸随机取10只虾，5只虾为一个样品，每个样品平行测定2次，分别测定虾肌肉中SOD、CAT、GPX的活性。饲料中硒含量分别0、0.15、0.30、0.45、0.60、0.75μg/g。

4.3 试验方法

4.3.1 酶活性的测定

取出中华米虾样品，用解剖刀和镊子迅速取背部肌肉 0.100g，准确称重后加入 20 倍体积的磷酸钠缓冲液 (pH6.5)，冰浴下进行超声波匀浆 (工作时间 5s，间隙时间 8s，次数 20 times)，然后将匀浆液放入冷冻离心机中，低温高速离心 (-4℃—0℃，10000r/min，离心 20min)，取上清。采用静天玉、赵晓瑜等改进的邻苯三酚自氧化法方法测定 SOD 活力^[35]；采用社忠斌用钼酸铵间接测定过氧化氢的方法^[36]测定 CAT 活力。

取出中华米虾样品，用解剖刀和镊子迅速取背部肌肉 0.100g，准确称重后加入 20 倍体积的蔗糖—Tris 缓冲液，冰浴下进行超声波匀浆 (工作时间 5s，间隙时间 8s，次数 20 times)，然后将匀浆液放入冷冻离心机中，低温高速离心 (0℃，12000r/min，离心 25min)，取上清液，采用 DTNB 直接法测定 GPX 活力^[37,38]。

4.3.2 蛋白含量测定

蛋白质含量的测定参照王重庆的方法进行^[39]。取 20μL 酶液，加入 80μL 浓度为 0.15mol/L 的 NaCl 溶液，然后再加入考马斯亮蓝染液 5mL，摇匀，静置 2min，倒入 1cm 比色皿中，在 20min—1h 内于 595nm 处比色，测 OD 值。以 100μL 0.15mol/L 的 NaCl 溶液和 5mL 考马斯亮蓝染液作空白对照。

4.3.3 酶比活测定

每毫克蛋白所具有的酶活力定义为该酶的比活力 (U/mg)。即酶比活 = $\frac{\text{酶活力}}{\text{蛋白含量}}$ 。

4.4 结果与讨论

在自然条件下，三种抗氧化酶的活性在机体复杂调控网络的控制下，呈现一种平衡状态。用试验饲料投喂中华米虾 30d 后，三种抗氧化酶的活性随硒的添加量的不同达到重新的平衡状态。并且各种酶的活性变化趋势基本一致，即随着硒添加量的增加活性先升高再降低，硒的添加量为 0.45μg/g 的试验组酶活性显著高于其它试验组 ($P < 0.05$)。通过对试验数据进行拟合表明：硒的添加量为 0.44μg/g 时，SOD，CAT 的比活上升到最大，硒的添加量为 0.48μg/g 时，GPX 活性最大；而硒的浓度再升高时，三种酶活性均

成下降趋势（如图 4.1 所示）。

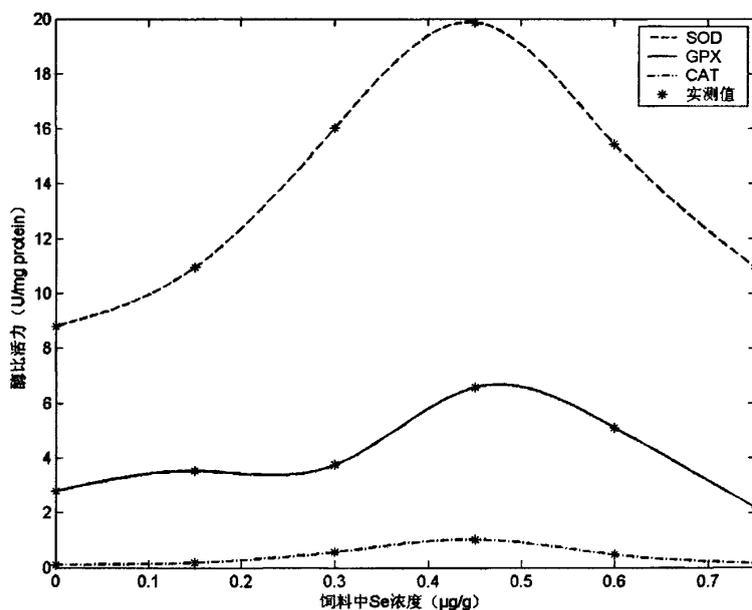


图 4.1 饲料中硒对中华米虾肌肉中抗氧化酶活性的影响

Fig.4.1 The effect of dietary Selenium on the activity of enzymic antioxidant in the muscles of *C. d. sinensis*

机体在代谢过程中会产生大量超氧阴离子，这是代谢所必需的，但是 $O_2^{\cdot-}$ 作为强氧化剂会引起蛋白质与核酸变性、多糖降解及过氧化脂质的生成，从而对生物体造成损伤，降低机体的免疫力。所以必须及时清除机体内多余的 $O_2^{\cdot-}$ ，以保持良好的免疫状态。

生物体的抗氧化系统主要由酶和非酶体系组成，抗氧化酶主要包括 SOD、CAT 和 GPX 等。其中 SOD 作为抗氧化系统的第一道防线，能够直接清除 $O_2^{\cdot-}$ ，使之转化成 O_2 和 H_2O_2 ，其活性与水生生物的免疫水平密切相关，在增强吞噬细胞防御能力和整个机体的免疫功能方面都发挥着重要作用^[40]。SOD 活性越高，清除自由基的能力越强^[41]。王雷等研究也表明了 SOD 的活性与水生动物的免疫水平密切相关^[42]。CAT 是一种含铁氧化酶，在机体内与 D-氨基酸氧化酶、尿酸氧化酶、黄嘌呤氧化酶、L-α-羟氨基酸氧化酶等产生过氧化氢的酶类相偶联，使过氧化氢分解为水和分子氧，是防御机制上的重要酶类，也是初级抗氧化系统的主要成分^[43]。GPX 是机体主要的过氧化物酶之一，能清除机体内脂质过氧化物，保护细胞膜免受自由基对膜上不饱和脂肪酸的伤害^[26]。在细胞

内 GPX 能够清除有害的过氧化代谢产物，阻断脂质过氧化链反应，从而保护细胞膜结构和功能的完整，在生物体的抗氧化防御系统中占有重要地位。酶活性与其对应的机体表现出来的功能，以及饲料添加剂与酶活性的关系并不明确^[44]。

硒对有机体的 SOD 与 CAT 活性没有直接作用，图 4.2 表示了硒对中华米虾抗氧化酶系统的作用机制。

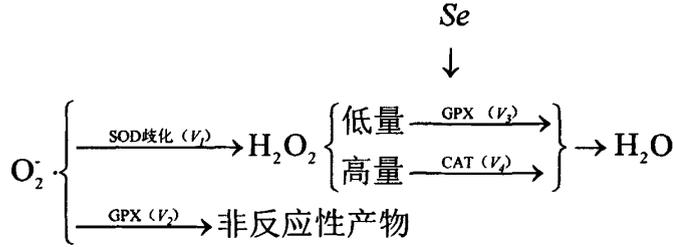


图 4.2 Se 对中华米虾抗氧化酶系统的作用机制
Fig 4.2 Mechanism of selenium on Antioxidant System

图中：→表示反应方向， V_1 、 V_2 、 V_3 、 V_4 表示酶催化反应速率。根据图 4.2 得到中华米虾体内 $\text{O}_2 \cdot$ 与 H_2O_2 变化的方程为：

$$\frac{d[\text{O}_2 \cdot]}{d[\text{Se}]} = -(V_1 + V_2) \times [\text{O}_2 \cdot] \tag{4.1}$$

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{d[\text{Se}]} = V_1 \times [\text{O}_2 \cdot] - V_3 \times [\text{H}_2\text{O}_2] \quad (\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 浓度较低}) \tag{4.2}$$

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{d[\text{Se}]} = V_1 \times [\text{O}_2 \cdot] - V_4 \times [\text{H}_2\text{O}_2] \quad (\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 浓度较高}) \tag{4.3}$$

Hamilton 等研究表明，当食物中硒超过 $4.6\mu\text{g/g}$ 时会影响到剃刀鲸幼体的存活率^[45]。高铭宇等证实饲料中添加适量的硒可明显提高 SOD 和 GPX 的活力，硒缺乏或过量都会使抗氧化酶活性降低，自由基代谢紊乱，脂质过氧化增强，丙二醛(MDA)含量增高。并认为其发生机制可能与 SOD 活力变化相关，硒与 SOD 结构稳定性有关，硒缺乏其稳定性降低，活力必然下降；过量的硒必然影响其它金属元素的摄入，也会导致活性降低^[46]。邓岳松等研究表明过量的硒对鱼类的毒害作用可能机制是攻击特定的脱氢酶系统，尤其是琥珀酸脱氢酶；高浓度的硒化合物可产生活性氧自由基进而损伤生物组织^[47]。

本试验中，随着饲料中硒浓度的不断升高，SOD，GPX 和 CAT 表现出了相同的变

化趋势,即随着硒添加量的增高,酶活性先升高再下降。从反应动力学角度考虑其可能的机制是:硒作为 GPX 的活性中心,米虾对硒的摄入势必增加 GPX 的活性,而酶催化底物反应速率与其活性成正比,因此 V_3 增大。在正常的中华米虾体内 H_2O_2 与 ROOH 处于较低水平的平衡,由方程(4.2)可知, V_3 增大导致 H_2O_2 的瞬时浓度下降。要维持体内的平衡系统,则 V_1 增大,导致 SOD 被激活,活性增高。随着 V_1 的增大,GPX 的清除能力不足以维持体内 H_2O_2 与 ROOH 的平衡,体内 H_2O_2 浓度升高,由方程(4.3)可知,CAT 被激活,活性增强, V_4 增大以便维持平衡。试验结果表明随着硒浓度增大,当硒浓度大于 $0.44\mu\text{g/g}$ 时 SOD, CAT 活性下降,当浓度大于 $0.48\mu\text{g/g}$ 时 GPX 活性下降,其可能原因是高浓度的硒表现出其毒性,使酶的结构发生改变,活性降低。

硒对 SOD、GPX 和 CAT 活性影响的机制也可能是硒的摄入扰乱了机体的平衡,产生大量的 $O_2^{\cdot-}$,由于自身免疫系统的作用,促使其清除机制的加强。由方程(4.1)可知,这势必导致 V_1 , V_2 的升高,即 SOD 与 GPX 活性的增高。而 H_2O_2 的大量积累,由方(4.3)可知 CAT 被激活。随着硒浓度的升高,其毒性进一步增强,酶活性受到影响,呈下降趋势。

由图 4.1 可以发现,GPX 活性下降所对应的硒浓度要高于 SOD, CAT。可能是因为硒离子大量摄入,会影响虾体对其它金属离子的吸收,而这些离子影响到 SOD 和 CAT 的结构。由于硒是 GPX 的活性中心,GPX 对硒表现出更高的适应性。

甲壳动物作为生物进化链上较低等的动物,其本身的免疫系统也是较初级的,并且环境胁迫对其免疫系统的影响较为显著。细胞免疫、体液免疫及模式识别蛋白是甲壳动物免疫的最重要手段。目前,就饲料添加剂对甲壳动物免疫力影响的各个研究中,只考虑单一指标独自的变化,而生物体自身是一个完整的相互作用与影响的有机整体,应该就其各个指标进行综合考察。为了更准确的讨论饲料添加剂对甲壳动物免疫力的影响,我们提出如下免疫力影响系数公式(公式详解见下章:甲壳动物免疫力综合指标定量研究):

$$\varepsilon_{\text{im}} = \sum_{i=1}^n \omega_i \frac{\text{Im}_j - \text{Im}_{0_i}}{\text{Im}_{0_i}} \quad (4.4)$$

式中: ε_{im} ——影响力系数, Im_j ——试验组, Im_{0_i} ——空白对照组, ω_i ——各指标权重。试验中,中华米虾摄入微量元素硒,对生物体整体产生影响。根据公式(4.4),

中华米虾免疫力由多个指标衡量，肌肉中抗氧化酶指标作为其中一部分，并不能直接得到饲料添加剂与中华米虾免疫力的关系，本试验中单一指标硒对肌肉中抗氧化酶活性影响显著，只可以作为饲料营养免疫学的参考。

4.5 结论

通过对投喂不同硒含量的饲料中华米虾肌肉内 SOD、CAT 和 GPX 活性的测定，以及对其可能的作用机制进行分析，得到以下结论：

1. 不同浓度的硒对中华米虾肌肉中抗氧化酶的作用存在着明显的剂量效应。并且当饲料中浓度在 $0.44\mu\text{g/g}$ 时，肌肉中的 SOD 和 CAT 表现为最大活性，当浓度为 $0.48\mu\text{g/g}$ 时 GPX 活性最高。
2. SOD、CAT、GPX 三种酶作为清除活性氧的一个系统，其作用具有协同性。在相同的浓度梯度下，这三种酶所表现的活力变化趋势基本相同。
3. 饲料中硒对中华米虾肌肉内 SOD、CAT、GPX 三种酶活性的作用机制有两种可能：一种是抗氧化能力的提高，另一种可能是自身免疫系统发生的免疫反应。

第五章 甲壳动物免疫力综合指标定量研究

5.1 引言

现代免疫学^[48]认为,免疫是机体识别和排除抗原性异物的一种保护性功能,在正常情况下,它对机体有利;在异常条件下,也可损害机体。甲壳动物属于进化链上较低等生物,其本身免疫系统较为初级,并且环境胁迫对其免疫系统的影响较为显著,因此成为研究、比较发育免疫学理想的试验材料。甲壳动物是当前养殖业的重点之一,其免疫防病的研究,是当前水产养殖中比较活跃的一个领域,而选择一个合适的指标进行科学正确的评价甲壳动物免疫状况,则是有效开展免疫防病治病的前提^[49]。

目前,用于衡量甲壳动物免疫机能的指标包括两个方面,1)细胞免疫;2)体液免疫。饲料添加剂作为免疫系统激活剂,在甲壳动物营养免疫学中已被广泛研究,尽管已有多种指标用于衡量甲壳动物的免疫水平,但由于缺少一个科学有效的指标评价体系,因此并不能准确地综合评价甲壳动物的免疫状态。本文认为,免疫力是一个综合性指标,是甲壳动物机体功能的综合表现。目前采用的不同测定评价指标,只是这个综合指标的一部分,或者这个综合指标中表现特征较为明显的部分,不能全面体现免疫力水平。此外,由于选择的评价指标不同,无法比较不同免疫指标之间的差异,比如测定酚氧化酶活性与测得的细胞吞噬能力这两个指标之间不能进行比较。因此,目前这种多指标评判免疫力的方法,存在着十分明显的缺陷,一是不能综合反映免疫力水平,二是由不同评判指标得到的结论无法直接进行科学客观比较。

为了综合反映甲壳动物的免疫力水平,尤其是某测定指标数量改变后甲壳动物免疫力水平的变化,以及为了满足不同评价指标所得结论的客观比较,本文提出了一种新的甲壳动物免疫力水平评价方法,即甲壳动物免疫力综合指数法。该方法认为甲壳动物免疫力水平是一个综合指标,它是细胞吞噬、包囊等作用以及各种免疫性酶的综合函数,通过给定不同的权重,以定量的方法,将上述指标进行融合处理,得到免疫力综合指数计算表达式,从而可以使用明确的数值结果表达免疫力水平的变化,给出免疫力是否发生变化的量化值,使不同指标之间的评判更加客观与合理。

5.2 确定免疫指标

在甲壳动物免疫学研究中,许多学者对细胞免疫和体液免疫不同方面的指标进行了单独研究。为了量化测定指标对免疫水平的影响,根据当前甲壳动物免疫学研究结果,将影响免疫力水平的试验测定指标按照如图 5.1 所示划分为三个层次,即总评价目标、指标层、措施层。

总评价目标是指要研究的免疫力综合指数,也是免疫力水平的最终量化结果。指标层是指试验测定的不同指标,包括细胞吞噬、包囊作用、结节形成、凝血作用、酚氧化酶系统、抗菌肽、活性氧和凝集素等。措施层是指试验者采取的不同试验方法,例如添加某种微量元素以提高机体免疫力等。

为了量化评价结果,定义免疫力综合指数为上述诸方面指标特征的函数。引入数学的表达方式,则其具体表达为:

$$\varepsilon_{im} = F(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) \quad (5.1)$$

式中, ε_{im} ——免疫力综合指数; x_i ——评价指标分量,即吞噬作用、包囊作用、结节作用、凝血作用、酚氧化酶系统、抗菌肽、活性氧、凝集素等;

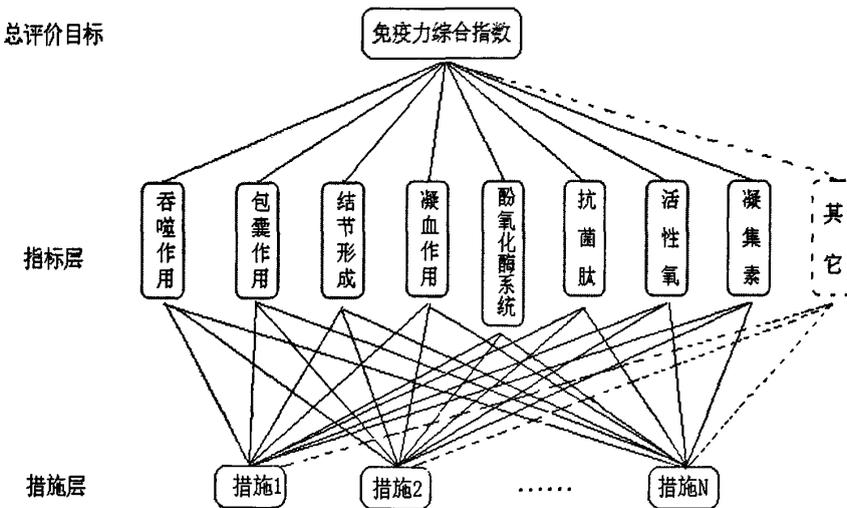


图 5.1 免疫力指标体系层次结构
Fig.5.1 Hierarchy of immunity index system

5.3 选择指标表达形式

在甲壳动物营养免疫学研究中,由于添加剂的影响,各种指标会发生不同变化,这些变化直接或间接反映了机体生理状况,共同决定着机体各方面的功能。将免疫指标具体量化,可以采用不同的数学表达形式,比如幂乘形式、多项式形式和权重累加形式。在影响甲壳动物免疫力各指标中,各指标之间相互影响成倍增加的关系并不明确,幂乘形式的表示方法受到一定的限制,并且幂乘表达式的最终计算结果,其量纲可能会非常复杂或者不一致。多项式形式同样存在量纲复杂、各项不统一、不能直接进行比较和计算的问题。基于上述存在的问题,考虑到各指标共同决定免疫力的大小和它们之间的相互作用关系,以及简单适用的原则,本文采用权重累加形式具体定义免疫力综合指数如下:

$$\varepsilon_{im} = \sum_{i=1}^n \omega_i \frac{Im_{\beta} - Im_{0i}}{Im_{0i}} \quad (5.2)$$

式中: Im_{β} ——加入添加剂后试验组中各指标测得值。 Im_{0i} ——未加入添加剂的空白对照组中各指标测得值。 ω_i ——各指标变化对免疫力水平产生影响的权重,为无量纲系数。

$\frac{Im_{\beta} - Im_{0i}}{Im_{0i}}$ 是试验过程中各指标相对于空白对照试验组变化的百分比,采用这种表达形式将各指标无量纲化,使各指标之间可以进行求和计算。 ε_{im} 为免疫力综合指数,由定义可知为无量纲数,便于指标的计算和不同措施之间进行比较。当 $\varepsilon_{im} > 0$ 时,添加剂提高了机体免疫力;当 $\varepsilon_{im} = 0$ 时,机体免疫力没有变化;当 $\varepsilon_{im} < 0$ 时,机体免疫力下降。 ε_{im} 数值的取正、取零、取负,分别表征了免疫力的提高、不变或降低,而 ε_{im} 数值的大小则表征了免疫力变化幅度的大小。

5.4 指标权重确定方法

从上述定义与分析可知,免疫力综合指数表征着免疫力水平的提高和降低,也可用来比较免疫力水平变化幅度的大小,它是细胞免疫和体液免疫的综合。为了确定各指标值的权重,本文采用多指标综合评价的方法加以确定。

在多指标综合评价中,确定指标权重的方法主要有主观赋权法和客观赋权法。主观

赋权法是根据评价者主观上对各指标的重视程度来决定权重的方法；客观赋权法所依据的赋权信息来源于客观试验，它根据各指标的联系程度或各指标所提供的贡献量来决定指标的权重。本文认为，层次分析法^[50]是一种比较有效的客观赋权法，而主成分分析^[51]则是有效的客观赋权法。

层次分析法的基本思想是将复杂问题分解为各个组成元素，将这些元素按照支配关系分组，形成有序递阶层次结构，根据一定比例标度，通过两两比较将判断定量化，形成比较判断矩阵，计算各个层次不同元素之间的相对重要性，在此基础上进行定性和定量分析。该方法是一种层次权重评价分析方法，它利用较少的定量信息使评价的思维过程数学化，从而为多目标、多准则或无结构特性的复杂评价问题提供简便的方法，尤其适合于对评价结果难于直接准确计量的场合。在实际的操作中，层次分析法包含以下步骤：

- (1) 在确定评价目标后，对影响目标评价的因素进行分类，建立一个多层次结构；
- (2) 比较同一层次中各因素对上一层次同一个因素的相对重要性，构造成对比较矩阵；
- (3) 通过计算，检验成对比较矩阵的一致性，必要时对成对比较矩阵进行修改，以达到可以接受的一致性；
- (4) 在符合一致性检验的前提下，找出与成对比较矩阵最大特征值相对应的特征向量，确定每个因素对上一层次该因素的权重；
- (5) 计算各因素对于系统目标的总排序权重并评价。

层次分析法的整个过程体现了人的判断思维的基本特征，即分解、判断与综合，定性与定量相结合，是一种十分有效的系统分析方法。

主成分分析法也称主分量分析，旨在利用降维思想，把多指标转化为少数几个综合指标。它把给定的一组相关变量通过线性变换转成另一组不相关的变量，这些新的变量按照方差依次递减的顺序排列。在数学变换中保持变量的总方差不变，使第一变量具有最大的方差，称为第一主成分，第二变量的方差次大，并且和第一变量不相关，称为第二主成分。依次类推， N 个变量就有 N 个主成分。一般说来，指标值对原始数据负载的信息量越大，指标权重越大，由此确定各指标的权重。主成分分析的一般步骤：

- (1) 数据标准化；

- (2) 求相关系数矩阵;
- (3) 进行一系列正交变换, 使非对角线上的数置 0, 加到主对角上;
- (4) 得特征根(即相应那个主成分引起变异的方差), 并按照从大到小的顺序把特征根排列;
- (5) 求各个特征根对应的特征向量;
- (6) 计算每个特征根的贡献率, 根据特征根及其特征向量解释主成分评价意义。

5.5 层次分析应用验证

为了阐明上述免疫力综合指数的应用, 本文以刘石林^[52]的论文数据为例加以说明。刘石林在试验中, 对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 分别投喂不同剂量的鲜活蚯蚓和冰冻蚯蚓, 根据免疫指标的变化, 确定了投喂的最佳浓度。同时对中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 也投喂不同剂量的鲜活蚯蚓, 研究了不同免疫指标变化。本文采用前述两种方法分别求得各指标权重, 计算得到免疫力综合指数。

在凡纳滨对虾投喂鲜活蚯蚓的试验中, 刘石林测定了抗菌活力(A)、溶菌活力(B)、酚氧化酶活力(C)和血细胞数(D)(见表 5.1), 认为添加蚯蚓后试验组的免疫力水平显著高于单独投喂人工饲料的试验组($P < 0.05$)。

以上述四个指标为依据, 按照免疫力综合指数计算公式。得:

$$\begin{aligned} \epsilon_{im} &= F(A, B, C, D) \\ &= \omega_A \frac{Im_A - Im_{0A}}{Im_{0A}} + \omega_B \frac{Im_B - Im_{0B}}{Im_{0B}} \\ &\quad + \omega_C \frac{Im_C - Im_{0C}}{Im_{0C}} + \omega_D \frac{Im_D - Im_{0D}}{Im_{0D}} \end{aligned} \quad (5.3)$$

表 5.1 凡纳滨对虾血清中抗菌活力、溶菌活力、酚氧化酶活力和血液中血细胞数量的测定结果
Tab.5.1 The activities of antibacterial, bacteriolytic, phenoloxidase in the haemolymph and the total hemocyte count of *L.vannamei* in different treatments(see ref.52).

饲料	抗菌活力 (Ua)	溶菌酶活力 (UL)	酚氧化酶活力 (U)	血细胞数量 ($\times 10^4 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$)
人工饲料	1.190	0.065	1.54	1550
添加蚯蚓	0.319	0.156	2.47	1986

对虾的免疫系统是一个复杂的系统, 对指标的相对重要程度做出判断很易出现失误。为了正确估计各指标的影响, 对各指标做出正确排序, 按照层次分析法要求, 每次

取两个因子进行比较,得到对免疫力水平影响的相对大小比值。全部指标两两对比后得到比较判断矩阵。对判断矩阵进行处理,得到对应于判断矩阵最大特征值 λ_{\max} 的特征向量 W ,经归一化后即为一层次相应因素对于上一层次某因素相对重要性的排序权值。

在对虾免疫过程中,血细胞通过对病原进行吞噬、包裹、形成肉芽肿等防御反应,清除血窦中的异己颗粒,同时部分血细胞还具有存储和释放酚氧化酶原激活系统的功能。酚氧化酶原系统是对虾重要的防御和识别系统,而抗菌酶和溶菌酶则主要存在于血细胞和血淋巴中,以清除机体侵入的微生物。由此,本文认为:在试验中血细胞数较其它指标更能反映免疫水平,酚氧化酶系统次之,而抗菌酶与溶菌酶则同等重要。采用Saaty等建议引用数字1~9及其倒数作为标度^[50],得到如下比较矩阵:

$$\begin{bmatrix} 1 & 1 & \frac{1}{4} & \frac{1}{5} \\ 1 & 1 & \frac{1}{4} & \frac{1}{5} \\ 3 & 3 & 1 & \frac{1}{3} \\ 5 & 5 & 3 & 1 \end{bmatrix} \quad (5.4)$$

虽然采用上述方法构造成对比较矩阵能减少其它因素的干扰,并能较客观地反映出—对因子影响力的差别,但综合考虑全部比较结果时,难免包含一定程度的非一致性,Saaty对此给出了一致性检验的方法。Saaty定义了一致性指标 CI 和相应的平均随机一致性指标 RI ,定义式分别为

$$CI = \frac{\lambda_{\max} - n}{n - 1} \quad (5.5)$$

$$RI = \frac{\lambda'_{\max} - n}{n - 1} \quad (5.6)$$

式中, λ_{\max} ——判断矩阵最大特征值; λ'_{\max} ——最大特征根的平均值;对 $n=1, \dots, 9$, Saaty给出了 RI 的值,如表5.2所示。

表 5.2 n 对应的 RI 值

Tab. 5.2 Value of RI correspond to n (see ref.50).

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9
RI	0	0	0.58	0.90	1.12	1.24	1.32	1.41	1.45

而计算一致性比例 CR 采用下式:

$$CR = \frac{CI}{RI} \quad (5.7)$$

通过 Matlab 计算并检验, 得到矩阵一致性可以接受, 上述四个指标的权重分别为 0.0911, 0.0911, 0.2508 和 0.5670, 代入免疫力指标公式得到添加鲜活蚯蚓后的免疫力综合指数为 0.5003。即 $\varepsilon_m > 0$, 免疫力活性增强, 这与刘石林做出的试验结论一致。

在添加冰冻蚯蚓的试验中, 刘石林对表 5.3 所示指标进行了测定, 依据上述方法得到各个指标的权重值分别为 0.2722, 0.0793, 0.0793, 0.0793 和 0.4899, 计算其免疫力综合指数为 1.1936。

表 5.3 凡纳滨对虾血清中 CAT, ACP, AKP, 溶菌活力和血液中血细胞数量的测定结果

Tab.5.3 Activities of CAT, ACP, AKP, bacteriolytic in the haemolymph and the total hemocyte count of *L.vannamei* in different treatments (see ref.52).

饲料	CAT (U/mgprot)	ACP (U/mgprot)	AKP (U/mgprot)	溶菌酶活力 (U/mgprot)	血细胞数量 ($\times 10^4 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$)
人工饲料	0.27	77.59	47.44	9.40	1290.0
蚯蚓占 1/4	1.07	107.75	77.23	27.26	1700.3

当投喂的饵料中冰冻蚯蚓占 1/4 时, 刘石林认为凡那滨对虾免疫力指标可得到显著提高($P < 0.05$), 并认为在实际的规模养殖中能替代鲜活蚯蚓。他在不同的试验组中, 对相同研究对象的不同指标进行了测定, 但并未对两组数据中不同指标所表达的免疫力水平状况进行科学有效地分析与比较。本文通过上述计算, 得到二者的免疫力综合指数分别为 0.5003 和 1.1936, 通过具体数值的比较, 可以明确得知, 对于提高凡纳滨对虾免疫力效果, 冰冻蚯蚓要好于鲜活蚯蚓, 这与刘石林的结论一致, 也证明了本文给出的方法正确、可行。

刘石林^[52]对中国明对虾投喂不同剂量的鲜活蚯蚓，并对 CAT, SOD, ACP 和 AKP 活性进行测定，测定结果见表 5.4。

表 5.4 中国明对虾样液中 CAT,SOD,ACP 和 AKP 活性的测定结果
Tab.5.4 Activities of CAT, SOD, ACP and AKP in *F. chinensis* muscles under different treatments (see ref.52).

饲料	CAT(U/mgprot)	SOD(U/mgprot)	ACP(U/mgprot)	AKP(U/mgprot)
人工饲料	89.1	16.9	0.24	1.07
蚯蚓占 1/8	115.5	14.48	0.22	1.05

在本试验中只有 CAT 活性升高，而其它指标均出现不同程度的下降。刘石林认为，该组数据与前两组产生差异源于试验对象不同，前两组试验采用的是非健康状态的凡那滨对虾，而本组试验采用的是健康状态但个体较小的中国明对虾。他认为这些变化不影响对虾健康，本组添加的鲜活蚯蚓对健康中国明对虾免疫力提高不明显，但并未给出免疫力变化的明确判断。

根据前述方法，本文计算得到免疫力综合指数 $\epsilon_m = 0.2810 > 0$ ，明确确定免疫力提高，但由于 ϵ_m 值较小，说明免疫力提高效果不如前两组试验明显。本文认为，由上述不同测定指标得到的结果互相矛盾，不能直接用来进行比较，也不能对免疫力变化做出判断。但通过公式计算，得到免疫力综合指数 $\epsilon_m > 0$ ，且数值上小于前两组。由此可以明确得知，和蚯蚓对凡那滨对虾的影响程度相比，中国明对虾的免疫力水平提高不明显。

5.6 主成分分析应用验证

为了研究冰冻蚯蚓对凡纳滨对虾免疫指标的影响，刘石林根据蚯蚓添加量不同设置了 5 个试验组。表 5.5 列出了测定的各个指标。

表 5.5 凡纳滨对虾血清中 CAT, ACP, AKP, 溶菌活力和血液中血细胞数量的测定结果
 Tab.5.5 Activities of CAT, ACP, AKP, bacteriolytic in the haemolymph and the total hemocyte count of *L.vannamei* in different treatments (see ref.52).

饲料	CAT (U/mgprot)	ACP (U/mgprot)	AKP (U/mgprot)	溶菌酶活力 (U/mgprot)	血细胞数量 ($\times 10^4$ cell·mL ⁻¹)
人工饲料	0.27	77.59	47.44	9.40	1290.0
蚯蚓占 1/8	0.36	72.65	54.40	18.40	1479.8
蚯蚓占 1/4	1.07	107.75	77.23	27.26	1700.3
蚯蚓占 3/8	0.61	122.73	99.43	32.68	1924.1
蚯蚓占 1/2	0.93	157.13	92.82	32.17	1905.0

根据上表，我们得到数据矩阵：

$$\begin{bmatrix} 0.27 & 77.59 & 47.44 & 9.40 & 1290.00 \\ 0.36 & 72.65 & 54.40 & 18.40 & 1479.80 \\ 1.07 & 107.75 & 77.23 & 27.26 & 1700.30 \\ 0.61 & 122.73 & 99.43 & 32.68 & 1924.10 \\ 0.93 & 157.13 & 92.82 & 32.17 & 1905.00 \end{bmatrix} \quad (5.8)$$

通过计算得到各指标相关系数矩阵：

$$\begin{bmatrix} 1.0000 & 0.7224 & 0.6702 & 0.7552 & 0.7013 \\ 0.7224 & 1.0000 & 0.8813 & 0.8472 & 0.8823 \\ 0.6702 & 0.8813 & 1.0000 & 0.9662 & 0.9873 \\ 0.7552 & 0.8472 & 0.9662 & 1.0000 & 0.9914 \\ 0.7013 & 0.8823 & 0.9873 & 0.9914 & 1.0000 \end{bmatrix} \quad (5.9)$$

编程计算，求出各特征值，并按大小顺序排列，然后求出各特征值的特征向量。(5.9)式的特征值按降序排列为：

$$\lambda = [4.3803 \quad 0.4177 \quad 0.1809 \quad 0.0212 \quad 0.0000] \quad (5.10)$$

特征值所对应的特征向量为：

$$\begin{bmatrix} 0.3883 & 0.8969 & 0.1346 & 0.1414 & 0.0815 \\ 0.4432 & -0.0257 & -0.8753 & -0.1621 & -0.1021 \\ 0.4631 & -0.3273 & 0.1175 & 0.7956 & -0.1778 \\ 0.4677 & -0.1291 & 0.4036 & -0.5147 & -0.5804 \\ 0.4687 & -0.2665 & 0.1975 & -0.2364 & 0.7839 \end{bmatrix} \quad (5.11)$$

在主成分分析中,当特征值累计贡献率达到 85%—95%时,其对应为第一、第二, … 第 m 个主成分,选取第一主成分对应的特征向量,将向量各元素平方作为其权重值,得到相应的权重。通过计算,第一主成分的贡献率达到 87.61%,第二主成分的累计贡献率达到 95.96%。得各指标的权重分别为 0.1508、0.1964、0.2145、0.2187 和 0.2197。将试验数据及计算得到的权重值代入式(5.2),得到投喂不同冰冻蚯蚓含量的凡那滨对虾免疫力综合指数为 0.3110、1.1433、1.1889 和 1.0885。

刘石林认为当冰冻蚯蚓含量为 1/4 时,能够显著的提高凡那滨对虾免疫力($P<0.05$),但并未对其最佳投喂措施进行分析比较。通过计算得知,当蚯蚓的添加量为 3/8 时,免疫力综合指数值最大,本文认为其最适添加量为蚯蚓含量占 3/8。

5.7 饲喂中草药后中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)免疫力综合指数计算

刘丽平^[53]等研究了复方中草药对中华绒螯蟹免疫因子的影响,结果表明中草药添加组蟹的噬菌活性与对照组存在显著差异 ($P<0.05$);溶菌酶活性,酚氧化酶活性与对照组差异极显著 ($P<0.01$);抗菌酶活性,过氧化物酶活性差异不显著($P>0.05$),但均值比对照饲料组高,说明该中草药制剂的添加能明显提高中华绒螯蟹的免疫水平(表 5.6)。

表 5.6 饲喂中草药后免疫指标

Tab.5.6 Immunity index after fed with Chinese herbal medicine as additive to normal food(see ref.53).

免疫指标	对照组	免疫组
血细胞吞噬率(%)	68.32	71.51
血细胞吞噬指数	76.32	81.07
溶菌酶活性(U _L)	0.15	0.32
抗菌酶活性(U _a)	0.49	0.51
酚氧化酶活性(A _{PO})	6.13	13.41
过氧化物酶活性(A _{POD})	0.27	0.29

对其试验中所得数据应用主成分分析法进行计算得到各指标的贡献率为 0.1667,免疫力综合指数为 0.4242,即免疫力综合指数大于零,免疫力提高,与原作者研究结果一致。

5.8 免疫力综合指数在哺乳动物中的应用

张红城^[54]等研究了小鼠投喂蜂王浆咀嚼片含量分别为 0, 0.167, 0.333, 0.999 g/kg 的饲料 30d 后, 对小鼠进行碳廓清, ConA 诱导的小鼠淋巴细胞转化, 迟发育变态反应 (DTH) 以及腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验, 对进行了脏/体比值, 半数溶血值 (HC₅₀), 抗体生成细胞数, NK 细胞活性进行测定, 得到表 5.7 数据。

表 5.7 小鼠各免疫指标试验值
Tab.5.7 Experimental value of immunity indexes about mice (see ref.54).

指标	0 g/kg	0.167 g/kg	0.333 g/kg	0.999 g/kg
增重(g)	14.76	14.47	15.02	14.99
脾脏/体重(%)	0.50	0.51	0.52	0.53
胸腺/体重(%)	0.30	0.31	0.31	0.32
DTH(mm)	0.25	0.29	0.34	0.35
淋巴细胞转化能力(OD)	0.01	0.02	0.02	0.02
抗体生成细胞数($\times 10^3$ /全脾)	2.29	36.00	50.80	54.60
HC ₅₀ (OD)	159.00	166.50	172.60	176.40
单核-巨噬细胞碳廓清(a)	5.33	5.67	6.21	6.60
吞噬鸡红细胞(%)	27.60	28.00	28.60	29.70
NK 细胞活性(%)	52.60	61.30	68.40	75.40

该组数据包括 3 个试验组和 1 个对照组的 10 个指标, 通过上表得到原始数据矩阵:

$$\begin{bmatrix} 14.76 & 0.50 & 0.36 & 0.25 & 0.01 & 2.92 & 159.00 & 5.33 & 27.60 & 52.60 \\ 14.47 & 0.51 & 0.31 & 0.29 & 0.02 & 36.00 & 166.50 & 5.67 & 28.00 & 61.30 \\ 15.02 & 0.52 & 0.31 & 0.34 & 0.02 & 50.80 & 172.60 & 6.21 & 28.60 & 68.40 \\ 14.99 & 0.53 & 0.32 & 0.35 & 0.02 & 54.60 & 176.40 & 6.60 & 29.70 & 75.40 \end{bmatrix} \quad (5.12)$$

通过计算得到各指标相关系数矩阵:

$$\begin{bmatrix} 1.0000 & 0.5565 & 0.5419 & 0.6568 & 0.3839 & 0.4513 & 0.5918 & 0.6935 & 0.6470 & 0.5985 \\ 0.5565 & 1.0000 & 0.9952 & 0.9738 & 0.9785 & 0.9545 & 0.9936 & 0.9842 & 0.9582 & 0.9986 \\ 0.5419 & 0.9952 & 1.0000 & 0.9846 & 0.9835 & 0.9786 & 0.9981 & 0.9747 & 0.9274 & 0.9936 \\ 0.6568 & 0.9738 & 0.9846 & 1.0000 & 0.9389 & 0.9671 & 0.9925 & 0.9785 & 0.9066 & 0.9805 \\ 0.3839 & 0.9785 & 0.9835 & 0.9389 & 1.0000 & 0.9726 & 0.9705 & 0.9275 & 0.8934 & 0.9676 \\ 0.4513 & 0.9545 & 0.9786 & 0.9671 & 0.9726 & 1.0000 & 0.9728 & 0.9161 & 0.8306 & 0.9498 \\ 0.5918 & 0.9936 & 0.9981 & 0.9925 & 0.9705 & 0.9728 & 1.0000 & 0.9838 & 0.9328 & 0.9952 \\ 0.6935 & 0.9842 & 0.9747 & 0.9785 & 0.9275 & 0.9161 & 0.9838 & 1.0000 & 0.9729 & 0.9918 \\ 0.6470 & 0.9582 & 0.9274 & 0.9066 & 0.8934 & 0.8306 & 0.9328 & 0.9729 & 1.0000 & 0.9626 \\ 0.5985 & 0.9986 & 0.9936 & 0.9805 & 0.9676 & 0.9498 & 0.9952 & 0.9918 & 0.9626 & 1.0000 \end{bmatrix} \quad (5.13)$$

计算的得到矩阵 5.13 的特征向量，并按降序排列，得到：

$$[9.0715 \ 0.7641 \ 0.1644 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0 \ 0] \quad (5.14)$$

特征值所对应的特征向量为：

$$\begin{bmatrix} 0.2071 & 0.8885 & 0.2120 & 0.1383 & 0.2247 & 0.2040 & 0.06911 & 0.0493 & 0.0632 & 0.0095 \\ 0.3304 & -0.0869 & -0.1537 & -0.4153 & 0.1320 & 0.1564 & 0.3128 & -0.0814 & 0.2056 & 0.7060 \\ 0.3300 & -0.1193 & 0.0768 & -0.3762 & 0.0996 & 0.2793 & -0.5872 & 0.2503 & 0.3942 & -0.2800 \\ 0.3286 & 0.0402 & 0.3393 & -0.1727 & -0.1738 & -0.2718 & -0.1868 & -0.7706 & -0.0915 & -0.0632 \\ 0.3190 & -0.3153 & -0.0475 & 0.2983 & 0.4734 & 0.2959 & 0.4024 & -0.2523 & 0.0732 & -0.4059 \\ 0.3174 & -0.2398 & 0.5055 & 0.5693 & -0.1909 & -0.1019 & -0.0552 & 0.2594 & 0.2068 & 0.3193 \\ 0.3313 & -0.0512 & 0.1127 & -0.1569 & -0.4027 & 0.4266 & 0.1437 & 0.2147 & -0.6557 & -0.0962 \\ 0.3297 & 0.1162 & -0.1446 & -0.1823 & -0.3228 & -0.4962 & 0.4423 & 0.2598 & 0.2862 & -0.3578 \\ 0.3162 & 0.1141 & -0.7098 & 0.4072 & -0.2909 & 0.0896 & -0.2954 & -0.1687 & 0.0355 & 0.0867 \\ 0.3315 & -0.0297 & -0.1223 & -0.0092 & 0.5293 & -0.4976 & -0.2212 & 0.2475 & -0.4780 & 0.0862 \end{bmatrix} \quad (5.15)$$

通过计算得到第一主成分的贡献率为 90.71%，第二主成分的累计贡献率达到 98.36%。第一主成分在判断小鼠免疫力是否提高有着举足轻重的作用；第二主成分的贡献率为 7.65%，它所代表的生物学意义远不及第一主成分，但是比率和排在其后的主成分相比，仍占有较重要的地位。另外，蜂王浆对小鼠免疫力的影响是非线性的，包括特异性免疫和非特异性两类指标，体现的意义不能由一两个性状指标简单构成，而主要是由那些在第一主成分特征向量分量绝对值较大的性状，综合产生的效果。表 5.8 为第一主成分和第二主成分中各指标所对应的向量分量。

第一主成分特征向量各性状分量的值中，脾脏/体重、淋巴细胞转化能力、胸腺/体重、增重、抗体生成细胞数和 DTH 的绝对值较大，其余四项指标的分量值较小。对这些分量绝对值较大的性状进行分析比较，可以看出小鼠的状态变化有两个不同的倾向性。一个方向为体重增加，脏/体比值增大、淋巴细胞转化能力增强，抗体生成细胞数增加，DTH 反应明显；另一个为相反方向。并且从矩阵 5.13 得到，这些指标之间有较大的正相关。脾脏和胸腺分别是特异性免疫的中枢免疫器官和外周免疫器官，淋巴细胞转化能力，抗体生成细胞数以及 DTH 均是衡量特异性免疫的重要指标。

表 5.8 主成分对应的各向量分量

Tab.5.8 Component of every vector of principal constituent.

性状指标	第一主成分特征向量分量	第二主成分特征向量分量
增重	0.2071	0.3304
脾脏/体重	0.8886	-0.0870
胸腺/体重	0.2120	-0.1537
DTH	0.1384	-0.4153
淋巴细胞转化能力	0.2247	0.1320
抗体生成细胞数	0.2040	0.1564
HC ₅₀	0.0691	0.3128
单核-巨噬细胞碳廓清	0.0494	-0.08142
吞噬鸡红细胞	0.0632	0.2057
NK 细胞活性	0.0095	0.7060

第二主成分特征向量各性状分量的值中 NK 细胞活性, HC₅₀, 吞噬鸡红细胞和增重指标的绝对值较大。说明在第一主成分发生分化的基础上, 小鼠的状态在这四个性状上又发生分化。NK 细胞活性为评测特异性免疫的重要指标, HC₅₀, 吞噬鸡红细胞为评测非特异性免疫的重要指标, 并且从矩阵 5.13 得到, 这些指标之间有较大的正相关。

非特异性免疫是长期进化过程中先天形成的, 而特异性免疫是生物体后天接受刺激获得的, 通过主成分分析有效的区分开了两种免疫力指标。通过主成分分析得到, 在投喂不同剂量的蜂王浆咀嚼片的试验中, 小鼠特异性免疫指标在评价其免疫力水平中有重要作用, 在特异性免疫能力增强的同时非特异性也得到增强。

因此, 对于哺乳动物甲壳动物免疫力综合指数公式同样适用。计算得到各指标的权重值分别为: 0.04289、0.1092、0.1089、0.1080、0.1018、0.1007、0.1098、0.1087、0.09998、0.1099, 代入式 5.2 得到 3 个试验组免疫力综合指数分别为 1.295、1.861、2.028。结果与张红城^[54]等研究结果一致, 蜂王浆能够增强小鼠的免疫力。并且通过免疫力综合指数公式计算得到当投喂蜂王浆浓度为 0.999 g/kg 时, 免疫力提高幅度最大。

另外, 通过分析各指标权重值得到, 当前研究中将体重增加作为评价免疫力提高的重要指标并不合理。

5.9 结论

在甲壳动物免疫力水平的研究中，通过不同指标的改变来确定免疫力水平的变化，是目前常见的研究思路，这存在着两个方面的缺陷：1)，免疫力是甲壳动物机体功能的一个综合性指标，目前采用的不同测定评价指标，只是这个综合指标的一部分，或者这个综合指标中表现特征较为明显的部分，不能全面体现免疫力水平。2)，由不同测定指标得到的结论无法直接进行科学客观比较。

为了解决上述问题，提出了建立免疫力综合指数的解决方法，并就此进行了定义，探讨并确定了该指数的具体表达形式为权重累积和的形式。在具体计算指标权重的方法上，使用了层次分析和主成分分析两种方法。通过文献资料试验数据的具体验证，证实了免疫力综合指数能够清晰的界定免疫力水平的变化，为甲壳动物免疫水平研究提供了量化思路。

通过分析蜂王浆对小鼠免疫力的影响得到，主成分分析能够区分特异性免疫和非特异性免疫指标。因此，免疫力综合指数对于哺乳动物同样适用。

第6章 结语及展望

6.1 全文总结

本文通过对辣根过氧化物酶反应动力学的数值模拟,研究了酶传感器的生化反应基础。得到了辣根过氧化物酶催化 H_2O_2 氧化苯酚反应过程中,中间化合物的变化规律,并通过改变底物浓度得到了底物浓度对反应时间的影响,为酶传感器的构建提供了理论基础。

指明了在对酶传感器研究过程中,非线性信号产生的原因。并且明确了酶反应过程中,温度和 pH 值具有相关性,不能单独考虑。综合考虑了在温度和 pH 值的共同影响下,聚硫堇和纳米金固定辣根过氧化物酶传感器的响应特征,并设计其检测系统。

另外,可以同时对同一样品多指标进行测量的复合酶传感器,是酶传感器研究热点之一。当前对于多指标系统的评价,存在着明显缺陷。通过对饲料中硒对中华米虾抗氧化酶系统作用机制的研究,指明饲料对酶活性影响的不确定性,以及酶活性与免疫力之间关系的不确定性。并且定量研究了甲壳动物免疫力,定义了甲壳动物免疫力综合指数,并确定了采用权重累加的数学表达式,分别给出了层次分析法和主成分分析法两种计算权重的方法,为复合酶传感器测量的多指标系统评价提供了量化方法。

6.2 展望

酶传感器的研究是当前分析仪器研究的热点之一。由于时间和实验室客观条件的限制,以及个人能力的不足,只是从酶传感器的生化基础,对其非线性信号产生的部分原因进行了分析,并进行了数学模拟。如果能和具体酶传感器的开发与研制相结合,将更加完善。另外在对多指标系统评价的研究中,免疫力综合指数定义式还有待改进和继续完善,以使其继续推广。这都有待于在今后工作中,进一步深入研究。

参考文献

- [1] 刘迎春,叶湘滨.传感器原理设计与应用[M].长沙:国防科技大学出版社,2002.
- [2] 曾辉,任力锋等.医学领域中的新型生物传感器[J].传感器技术,2002, 21(10):59-62.
- [3] 乔晓艳,贾莲凤.新型生物传感器在生物医学工程中的应用[J].传感器技术,2002, 21(10):62-64.
- [4] R.Lal.Integrated Biosensors: Promises and Peoblems[J]. Bioelectrochemistry and Bioenergetics. APR01, 1992, v27: 121.
- [5] E.Mann-Buxbaum etal.New Microminiaturized Glucose Sensors Using Covalent Immobilization Techniques [J].Sensors and Actuators.B1,1990:518-522.
- [6] 张先恩.生物传感器[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [7] 黎雪莲.新型生物分子固定技术用于构建生物传感器的研究[D].重庆:西南大学,2006.
- [8] 乔丽娜, 周在德, 肖丹.酶传感器中酶的固定化技术[J].化学研究与应用,2005, 17(3):299-302.
- [9] 戚以政,汪叔雄.生化反应动力学与反应器[M]. 北京:化学工业出版社,1999, 417.
- [10] Jenna Rickus. Impact of coenzyme regeneration on the performance of an enzyme-based optical biosensor: A computational study [J]. Biosensors and bioelectronics, 2005, 21:965-972.
- [11] Elio E. Gonzo, Juan C. Gottifredi, A simple and accurate method for simulation of hollow fiber biocatalyst membrane reactors [J]. Biochemical Engineering journal, 2007, 37:80-85.
- [12] Nobuyoshi Ishii, Yoshihiro Suga, Akiko Hagiya, etc. Dynamic simulation of an in vitro multi-enzyme system [J]. FEBS Letters, 2007, 581: 413-420.
- [13] Maria J. Schilstra, Stephen R.Martin, Sarah M. Keating. Methods for Simulating the Dynamics of Complex Biological Processes [J].Methods in Cell Biology, 2008(84):807-842.
- [14] 傅献彩,沈文霞,姚天扬. 物理化学[M].北京:高等教育出版社,1990.
- [15] 陈建波,夏春谷,李树本,等.水相中辣根过氧化物酶的反应动力学和机理研究[J].分子催化,2000,14(2): 125-128.
- [16] 陈建波,夏春谷,尉迟力,等.过氧化物酶催化反应机理和动力学研究进展[J].分子催化,1999,13(4): 312-320.
- [17] 孙祥,徐流美,吴清.Mat lab 7.0 基础教程[M].北京:清华大学出版社,2005,383.
- [18] 陈海明,李通化,陈开.辣根过氧化物酶反应的化学动力学分析[J].分析化学研究报告, 2002, 30: 654-657.
- [19] Mukhopadhyay k, Phadtare S, Vinod V P, et al. Gold nanoparticles assembled on amine-functionalized na- Y zeolite: a biocompatible surface for enzyme immobilization [J]. Langmurir.2003, 19: 3858 -3863.
- [20] Sbrana F, ParodiM T, Ricci D, et al. Langmurir films of thiolated gold nanoparticles transferred onto functionalized substrate: 2-D local organization[J]. Material Science and Engineering C.2002, 22:

参考文献

- 187-191.
- [21] 伍林,曹淑超,易德莲等.酶传感器的研究进展[J].传感器技术,2005, 24(7):4-8.
- [22] 贾智伟,汪诚,刘红飞.传感器信号的线性化处理与非线性补偿[J].电子科技,2002,4: 61-62.
- [23] 石银涛,袁若,王娜等.基于聚硫堇和纳米金固定辣根过氧化物酶的生物传感器[J].西南师范大学学报(自然科学版),2006, 31(3):80-84.
- [24] 干宁,葛从辛.苯胺红 T 与辣根过氧化物酶共固定无试剂过氧化氢传感器的研制[J].传感技术学报,2005, 18(4):689-692.
- [25] 魏文志,杨志强,罗方妮等.饲料中添加有机硒对异育银鲫生长的影响[J].淡水渔业,2001,31(3):45-46.
- [26] 王玉标.硒与人体健康[J].安徽教育学院学报,2003,3:12-14.
- [27] 何志辉,谢祚浑,严生良等.淡水生物学[M].北京:农业出版社,1982, 274-279.
- [28] 吴建设.营养免疫学研究进展之一,微量元素铜的现状[J].中国畜牧杂志,1996,32(2): 54-55.
- [29] 周洪琪.水产动物的营养与免疫、抗病能力[J].内陆水产,2002,5: 20-21.
- [30] 吕社民.硒与甲状腺和甲状腺激素代谢[J].国外医学、医学地理学手册,1994, 15(3):97-101.
- [31] 毛盛勇.有机硒营养的研究进展[J].畜牧业,2000,3: 20-22.
- [32] Mariana. Organic selenium as a supplement for Atlantic salmon. Effects for meat quality [J]. The application of biotechnology in feedstuffs, 1992, 13:505-507.
- [33] Uno Y. Studies on the aquaculture of Macrobrachium nipponense development and feeding ecology [J]. La Mer, 1971, 9:123-128.
- [34] 王宏伟,赵建华,崔爽,等.饲料中硒的添加量与中华米虾抗氧化酶活性[J].动物学杂志, 2005,40(5):912-94.
- [35] 静天玉,赵晓瑜.一种改进的邻苯三酚法测定 SOD 活性的方法[J].生物化学与生物物理学进展,1995,1: 13-15.
- [36] 社忠斌.用钼酸铵间接测定细菌过氧化氢酶[J].中华医学检验杂志,1995,18(2):105.
- [37] 张嘉麟.血液中谷胱甘肽过氧化物酶活力微量测定[J].中华医学检验杂志,1985,8(4):199-202.
- [38] 夏奕明,朱莲珍.血与组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法-DNTB 直接法[J].卫生研究,1987,16(4):29-32.
- [39] 王重庆主编.高级生化实验教程[M].北京:北京大学教育出版社,1994,76-79.
- [40] 牟海津,江晓路,刘树清等.免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶的影响[J].青岛海洋大学学报,1999,29(3):463-468.
- [41] Munoz M, Cedeno R. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp[J]. Penaeus vannamei. Aquaculture, 2000, 191:89-107.
- [42] 王雷,李光友,毛远兴.口服免疫药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J].海洋与湖

沼,1994,25(5): 486-488.

- [43] 朱逢春译.新酶组织化学[M].北京:人民出版社,1983, 25-28.
- [44] S M Moss, S Divakaran, B G Kim. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) [J]. Aquaculture Research, 2001, 32:125-131.
- [45] Steven J Hamilton. Toxicity of selenium and other elements in food organisms to razorback sucker larvae [J]. Aquatic Toxicology, 2002, 59(3-4):253-281.
- [46] 高铭宇,杨鹰,袁莉等.硒和锌相互作用及对肉用鸡胰腺抗氧化功能的影响[J].中国兽医科技,2001,31(4): 23-26.
- [47] 邓岳松,陈权军.纳米硒对尼罗罗非鱼生长的影响[J].内陆水产,2003,6: 28-30.
- [48] 周德庆,微生物学教程[M].北京:高等教育出版社,2004,284-304.
- [49] 黄旭雄,周洪琪.甲壳动物免疫机能的衡量指标及科学评价[J].海洋科学,2007,31(7): 90-96.
- [50] 甘应爱,田丰,李维铮.运筹学[M].北京:清华大学出版社,2005,455-460.
- [51] 高惠璇.应用多元统计分析[M].北京:北京大学出版社,2005,265-280.
- [52] 刘石林.蚯蚓作为饲料成分对对虾生长及其免疫指标的影响[D].青岛:中国科学院海洋研究所,2006.
- [53] 刘丽平,薛辉,周刚.复方中草药对中华绒螯蟹免疫因子的影响[J].南京师大学报,2008,31(1): 109-113.
- [54] 张红城,董捷,胡余明.蜂王浆咀嚼片增强免疫力功能实验研究[J].食品科学,2008,29(8):579-583.

致谢

致 谢

本论文是在恩师马寨璞教授的精心指导和亲切关怀下完成的。三年来，恩师在论文的选题、方法的探索以及文章的完成等方面给予我悉心的指导和帮助，使我硕士阶段的学习得以顺利完成。在与恩师相处的三年里，他严谨的治学态度、活跃的学术思想、渊博的学识和平易近人的为人作风，对我产生深刻的影响，让我终生受益。在此论文完成之际，谨向恩师致以衷心的感谢和诚挚的敬意。

在我攻读硕士学位期间，王宏伟副教授给予了极大的关心和热情帮助。她在学术上给予的帮助，使我受益匪浅；她在生活上给予的关心和照顾，让我倍感亲切。

本论文的完成与本实验室其他成员的通力合作是密不可分的。在此向刘强、吴玲、曹卫荣、石长灿和张春泉等同学在论文写作中给我的大力支持和帮助表示深深的感谢。感谢师弟师妹们在试验过程中给予的帮助及愉快的合作。

感谢所有关心、支持、帮助过我的老师和同学、朋友！

最后，我要感谢我的家人，他们是我坚不可摧的精神支柱，我将永远不会辜负他们对我的希望！

谨以此论文献给所有关心、帮助我的老师、同学和亲友！

攻读学位期间取得的科研成果

1. 马寨璞, 赵建华, 吴玲等. 辣根过氧化物酶反应动力学的数值模拟[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2008, 208(6): 646-651.
2. 马寨璞, 赵建华, 康现江等. 白洋淀水循环特点及其对生态环境的影响[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(5): 405-410.
3. 马寨璞, 赵建华, 吴玲等. 甲壳动物免疫力综合指标定量研究[J]. 河北大学学报(自然科学版).(已接收)
4. 硒对中华米虾抗氧化酶系统作用机制的探讨.(已投稿)