

兔肝匀浆液的制备及谷胱甘肽转硫酶（GST）酶活力测定

刘沛雨 2100012289

1. 实验内容

1.1. 兔肝匀浆液的制备

1.2. 谷胱甘肽转硫酶（GST）酶活力的测定

1.2.1. 使用三种匀浆方法制备 GST 样品

1.2.2. 测定三种制备方法得到的样品的酶活力

1.2.3. 选一种样品测定不同 pH 下的酶活力

2. 实验结果及数据处理

2.1. 原始数据记录

实验过程中记录到的数据如表 1 和表 2 所示。表 1 记录了三种制备方法得到的 GST 样品在 pH=6.5 的条件下催化底物（60 mmol/L GSH 溶液以及 CDNB 的乙醇溶液）进行反应的过程中溶液吸光度的变化情况。玻璃匀浆器法、电动匀浆器法以及生物样品均质器法使用的兔肝质量分别为 0.7g, 0.7g, 0.4g。表 2 记录了使用电动匀浆器制备得到的样品在不同 pH 条件下催化底物进行反应的过程中溶液吸光度的变化情况。数据均通过双光束紫外-可见分光光度计测定得到（波长 340 nm；测定时间 4 min；测定间隔 0.5 min），测定前进行了校零，采用“抛弃零点法”进行测定。

表 1 pH=6.5 时反应过程中溶液吸光度的变化情况

	玻璃匀浆器，pH=6.5			电动匀浆器，pH=6.5			生物样品均质器，pH=6.5		
	T(min)	ABS	ΔABS	T(min)	ABS	ΔABS	T(min)	ABS	ΔABS
1	0	-0.562	0	0	-0.509	0	0	-0.543	0
2	0.5	0.172	0.734	0.5	0.178	0.687	0.5	0.156	0.699
3	1.0	0.305	0.133	1.0	0.316	0.138	1.0	0.282	0.126
4	1.5	0.420	0.115	1.5	0.433	0.117	1.5	0.391	0.109
5	2.0	0.522	0.102	2.0	0.539	0.105	2.0	0.491	0.100
6	2.5	0.615	0.093	2.5	0.633	0.095	2.5	0.583	0.091
7	3.0	0.700	0.085	3.0	0.722	0.088	3.0	0.667	0.084
8	3.5	0.777	0.077	3.5	0.803	0.081	3.5	0.745	0.078
9	4.0	0.849	0.072	4.0	0.882	0.079	4.0	0.817	0.072

表 2 不同 pH 下反应过程中溶液吸光度的变化情况

	电动匀浆器, pH=6.0			电动匀浆器, pH=7.0			电动匀浆器, pH=7.5		
	T(min)	ABS	$\Delta$ ABS	T(min)	ABS	$\Delta$ ABS	T(min)	ABS	$\Delta$ ABS
1	0	-0.570	0	0	-0.611	0	0	-0.783	0
2	0.5	0.140	0.710	0.5	0.182	0.793	0.5	0.204	0.987
3	1.0	0.246	0.106	1.0	0.341	0.159	1.0	0.376	0.172
4	1.5	0.337	0.091	1.5	0.483	0.141	1.5	0.534	0.158
5	2.0	0.415	0.078	2.0	0.608	0.125	2.0	0.676	0.142
6	2.5	0.486	0.070	2.5	0.723	0.115	2.5	0.807	0.131
7	3.0	0.550	0.064	3.0	0.833	0.110	3.0	0.929	0.122
8	3.5	0.617	0.067	3.5	0.938	0.105	3.5	1.039	0.110
9	4.0	0.674	0.057	4.0	1.033	0.096	4.0	1.157	0.118

2.2. 数据处理作图及计算结果

2.2.1. 数据处理与可视化

由于在实验过程中采用“抛弃零点法”测定反应过程中溶液吸光度的变化情况，因此各组实验中第一个时间点（T=0 min）的吸光度 ABS 均为负值（此时测定比色皿被取出，向其中添加 3  $\mu$ L GST 样品以起始反应）。故数据处理过程中需要将该时刻吸光度修正为 0 并且修正 T=0.5 min 时的  $\Delta$ ABS。处理得到的数据如图 1 和图 2 所示。下图还显示了修正后的数据在 T = 0 min 处的切线及其斜率，表征反应起始时的酶催化速率。

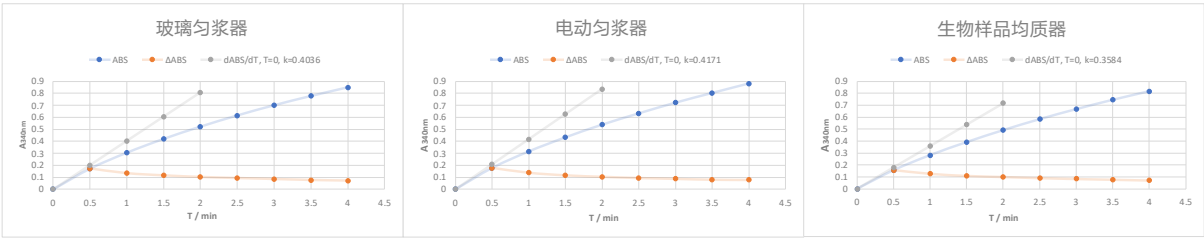


图 1 pH = 6.5 时不同方法制备得到的 GST 样品催化反应的时间—吸光度关系曲线

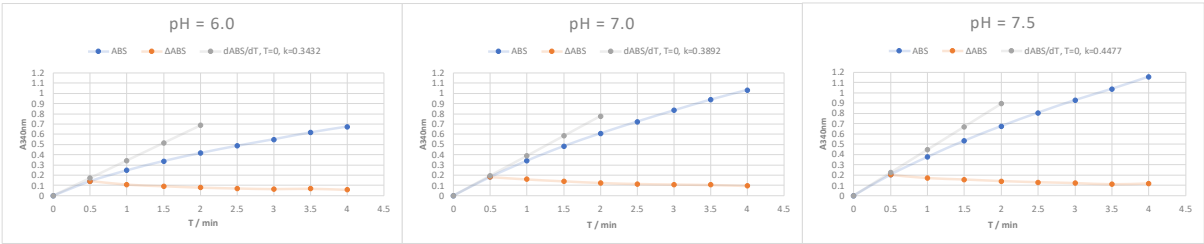


图 2 不同 pH 下使用电动匀浆器制备得到的 GST 样品催化反应的时间—吸光度关系曲线

2.2.2. 结果计算

使用以下公式计算 GST 酶的酶活力 (μmol/min):

$$\frac{\Delta A \cdot v}{\epsilon \cdot L}$$

其中ΔA为反应开始 1 min 后溶液吸光值的变化 (即上表中 T = 1 min 时的 ABS 值), *v*为酶促反应体积(3 mL, 每组实验加入的 3 μL GST 样品可忽略不计), *ε*为产物的消光系数(9.6 L/(mmol·cm)), *L*为比色杯的光程(1 cm)。计算得到的结果如表 3 所示:

表 3 各实验组测定得到的酶活力

实验组别	实验条件	酶活力 (μmol/min)
pH = 6.5, 不同制备方法	玻璃匀浆器	0.0953
	电动匀浆器	0.0988
	生物样品均质器	0.0881
电动匀浆器制备, 不同 pH	pH = 6.0	0.0769
	pH = 7.0	0.1066
	pH = 7.5	0.1175

图 3 为使用电动匀浆器制备得到的 GST 样品的酶活力关于 pH 的变化曲线:

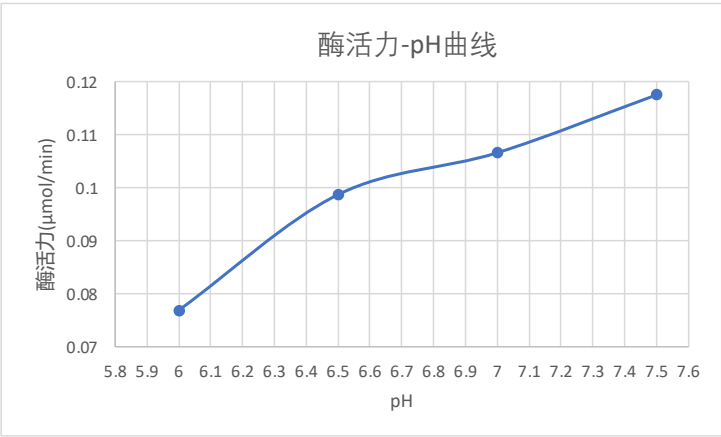


图 3 GST 样品的酶活力关于 pH 的变化曲线

3. 实验结果讨论

3.1. 三种匀浆方法的效果

电动匀浆器效果最好, 而生物样品均质器效果最差, 玻璃匀浆器匀浆效果略差于电动匀浆器。生物样品均质器匀浆效果较差可能与实验仪器有关, 制备得到的样品中仍有部分兔肝组织残块, 导致 GST 酶提取不充分。

3.2. 不同 pH 对 GST 酶活力的影响

如图 3 所示，实验条件下兔肝 GST 酶的最适 pH 可能在 7.5 或以上，当 pH 下降到 6 时，GST 酶活力显著下降，这表明酸性条件下兔肝 GST 酶可能会部分失活，从而使酶的催化能力下降。

### **3.3. 误差分析**

实验测定的 GST 酶的最适 pH 为 7.5，该数据（可能）略高于理论值，主要原因可能为实验过程中使用的 pH = 7.5 的磷酸缓冲液与真实值相比 pH 偏高，导致测定得到的最适 pH 偏高；实验过程中的其他误差也可能使实验结果不准确。