**﻿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. **兔肝匀浆液的制备**
   2. **谷胱甘肽转硫酶（GST）酶活力的测定**
      1. 使用三种匀浆方法制备GST样品
      2. 测定三种制备方法得到的样品的酶活力
      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**
   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。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。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。每组实验均加入3μL GST样品以起始反应；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** | **ABS** | **T(min)** | **ABS** | **ABS** | **T(min)** | **ABS** | **ABS** |
| **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** | **ABS** | **T(min)** | **ABS** | **ABS** | **T(min)** | **ABS** | **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 |

* 1. **数据处理作图及计算结果**
     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 μL GST样品以起始反应）。故数据处理过程中需要将该时刻的ABS修正为0并且修正T = 0.5 min时的ΔABS。处理后得到的数据如图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（均使用6次多项式拟合曲线计算得到切线方程）及其斜率，斜率表征酶促反应的初速度。

**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**

* + 1. **结果计算**

使用以下公式计算GST酶的酶活力（μmol/min）：

其中为反应开始1 min后溶液吸光值的变化值，即上图中切线的斜率（酶促反应速度应以反应的初速度为准）；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）；为产物的消光系数（9.6 L/(mmolcm)）；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 | 0.1261 |
| 电动匀浆器 | 0.1303 |
| 生物样品均质器 | 0.1120 |
| 电动匀浆器制备，不同pH | pH = 6.0 | 0.1073 |
| pH = 7.0 | 0.1216 |
| pH = 7.5 | 0.1399 |

 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**

1. **实验结果讨论**
   1. **三种匀浆方法的效果**

电动匀浆器效果最好，玻璃匀浆器匀浆效果略差于电动匀浆器，而生物样品均质器效果最差。生物样品均质器制备得到的样品中仍有部分兔肝组织残块，导致GST提取不充分。

* 1. **不同pH对GST酶活力的影响**

如图3所示，实验条件下兔肝GST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可能会部分失活。

* 1. **误差分析**

实验测定的GST的最适pH为7.5或以上，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。通过数据拟合得到的切线斜率也存在一定误差，这可能是pH = 7时计算得到的酶活力与pH = 6时相比稍有下降的原因之一。