

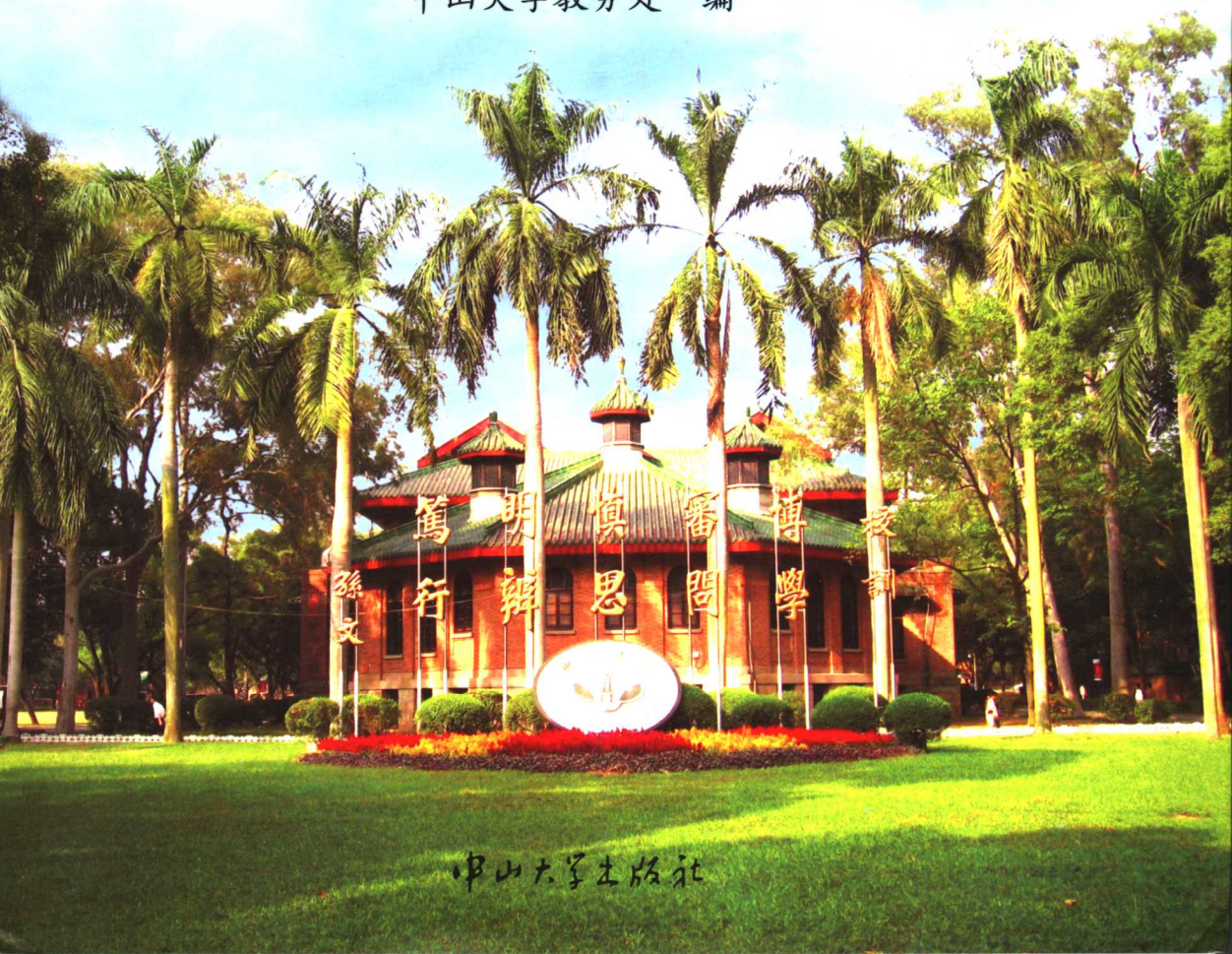
教学研究与实践

Teaching and Learning: Research and Practice

——学生论文集

(下册)

中山大学教务处 编



中山大学出版社

版权所有 翻印必究

图书在版编目 (CIP) 数据

教学研究与实践: 学生论文集/中山大学教务处编. —广州: 中山大学出版社, 2005. 8

ISBN 7-306-02045-5

I. 教… II. 中… III. 高等学校—教学研究—文集 IV. G642.0-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 066423 号

责任编辑: 钟永源

封面设计: 大象

责任校对: 原跻

责任技编: 黄少伟

出版发行: 中山大学出版社

编辑部电话 (020) 84111996, 84113349

发行部电话 (020) 84111998, 84111160

地址: 广州市新港西路 135 号

邮编: 510275 传真: (020) 84036565

印刷者: 广东南海系列印刷公司

经销者: 广东新华发行集团

规格: 787mm×960mm 1/16 75.5 印张 1240 千字 (上、下册)

版次印次: 2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月第 1 次印刷

本书如有印装质量问题影响阅读, 请与承印厂联系调换

《教学研究与实践》编委会名单

主 编：刘济科

副 主 编：王庭槐 张晓珠 尹小川 何 洪

责任编辑：陈 慧 陈 彪 王淑珍 彭凤琴

张燕芬

目 录

植物源性变应原诱导 KM 小鼠 IV 型超敏反应模型的建立	刁梁辉 李梦真 林 圣 肖 迪 邝嘉良 (577)
白芷对酪氨酸酶活力的影响及其动力学研究	王 宁 李月波 周 琳 (584)
油漆中挥发性有害物质的生物学检测	戴晓俐 张颖芬 戴兴红 (592)
阿司匹林对月季切花衰老的影响	翁桁游 梁荫彤 欧珣 蔡冠杰 曹静萍 (600)
可口可乐对小鼠杀精作用及精子死亡率统计	蔡时添 伍国伟 任佳明 费凡 李勇 (608)
染发剂对大鼠骨髓细胞与外周血淋巴细胞染色体的影响	韦庆焜 朱 颖 纪舜霞 陈丁宁 吴松青 (616)
广州市花都王子山常绿阔叶林的结构特征	邱值成 黎玉贤 何 捷 何志坤 吴漫丽 陈 杰 (629)
线虫共生菌 Q58、HB 在不同环境下的形变比较	李 艳 司 晶 (645)
中药栀子的抑菌作用探究	杨日荣 朱文娟 李 光 (656)
噪声对小鼠生理的影响	黄巧茹 张蔚 吴松青 杨淳昌 (667)
盐害对淹水胁迫水稻叶肉细胞的影响	纪 群 戴盛桃 祝天慧 司 晶 张磊 (678)
探索咖啡和茶叶对果蝇繁殖力及寿命的影响	范丽菲 孙侨阳 徐素珍 陈灿明 (688)
行为诱导性的小鼠相互残食实验	胡文钦 王俊舜 马辰宇 李成仁 (698)

废电池对植物的遗传毒性研究

- 韦庆焜 陈丁宁 朱颖 纪舜霞 黄菁菁 (704)
- 产高温淀粉酶的微生物筛选 王荃 黄夏禾 钟丽君 (720)
- 广州市传统城市中轴线城市设计浅析 刘洁贞 (731)
- 染色黑珍珠的实验研究 吴仲玮 蔡伟彬 (741)
- 东莞市高速公路和一级公路网络分析 林 强 (748)
- 对广东省集体建设用地流转的思考
- 佛山市南海区大沥镇调研报告 黄 哲 束长乐 (758)
- 居住空间分异下郊区居住区与周边农村的社会关系研究
- 以广州为例 黄 哲 (765)
- 虎门潮汐水道盐水入侵加剧原因分析及解决措施初探 吴漫丽 (776)
- 山东蓝宝石优化处理实验研究 葛 云 韦彩慧 (791)
- 翡翠 C 货制作流程研究 古志宏 (797)
- 浅析中山大学珠海校区基础设施建设问题 吴志东 (803)
- 王子山林场森林旅游开发可行性研究
- 何 捷 何志坤 吴漫丽 陈 杰 邱值成 黎玉贤 (812)
- SRES A2 和 B2 情景下中国 21 世纪地面气温和降水变化的
- 模拟分析 莫伟强 (819)
- 西太平洋热带涡旋与 2001 年南海夏季风的爆发 郑浩阳 (832)
- 华南地区后汛期水汽汇时空演变特征 秦晓昊 (850)
- 洗衣粉中阴离子表面活性剂的生物降解度测定
- 陈志高 黄 珊 (869)
- 皂粉产品环境性能评价 黄 珊 陈志高 林海健 (877)
- 广州公交车集群现象形成原因分析 黄永刚 许 铀 (886)
- 中庸思维与冲突情境应对策略选择关系的探究
- 伍秋萍 梁凯怡 陈 俊 (893)
- 不同的加工水平对中文字词记忆效果的影响
- 冯敏婷 李兆国 何静雅 庞翠钰 (905)
- 父母教养方式与大中學生自我效能感的关系研究
- 冯敏婷 苏 珊 江晓晖 王璐璐 (916)
- 大学生网络成瘾自评量表的编制 杨天笑 林 菡 张思妍 (926)

三、医药科学

- 人纤溶酶原 K5 基因与真核表达载体 pPICZaA 重组体的构建
..... 陈素洁 (937)
- Foxp3 的研究新进展 张良明 (943)
- SARS 冠状病毒 TW1 多聚酶 putative nsp3 片断的克隆、鉴定
..... 李惠君 林 莉 王林琳 李 娟 古灿基 (952)
- 乳酸杆菌对 apoE 基因缺陷小鼠动脉粥样斑块形成的影响
..... 周 岩 钟小梅 曾雪伟 陈新娟 蔡秋茂 (959)
- 1806 例肾移植患者死因及死亡因素分析 邱妙珍 周仲国 (965)
- SARS 危机对不同人群心理行为长期性影响的研究
..... 覃 建 李 灏 (975)
- 不同免疫用药方案对肾移植术后 CMV 感染发生率的影响
..... 魏 欢 徐晨光 郭智兴 (986)
- 骨髓间质干细胞成肌分化的机制 何藻鹏 叶红坚 (994)
- 三七三醇皂苷对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用
..... 周晓石 赖文珊 韩 超 (1006)
- 西乐葆对非小细胞肺癌的作用效果及作用机制初探
..... 郑聪颖 郑东华 张良明 谢汝莹 成宇璐 (1017)
- 茶多酚单体及其复合物清除超氧阴离子自由基的实验研究
..... 刘涛生 陈乐鸿 陈秀丹 (1023)
- 云南省基诺族 G6PD 缺乏症的调查报告
..... 瞿 燕 文 静 李海源 (1036)
- 广州和内蒙古母子对话方式比较研究 刘倩云 (1041)
- 试析选择性雌激素受体调节剂的作用机制及特性 肖梓栋 (1047)
- 脊髓髓内肿瘤的 MRI 诊断 (附 19 例报告)
..... 秦耿耿 范文哲 毛 仁 谭小月 (1053)
- TP53 基因种属鉴定的初探 李章毅 杨秀安 (1060)
- 3 个 X-STR 基因座复合扩增 梁子君 何锋周 (1065)
- 高校学生网络成瘾程度的改变及其可变因素的追踪研究
..... 方 奋 钟国恒 (1071)
- O-羧甲基壳聚糖的制备和组成测定 陈乐鸿 萧浩鸣 (1080)

富裕地区与不富裕地区监狱警察 SCL-90 比较	王倩雅 陈丹苗 (1087)
广州地区广州管圆线虫中间宿主调查及控制对策	陈湘华 骆焰权 余庆华 (1099)
深圳市社区卫生服务经济运行现状分析	刘裕浩 万东池 沈晓婷 叶文彬 陈彩霞 黄财彬 (1105)
低频磁场对不完全缺血再灌注脑损伤大鼠学习记忆影响 及其机制的初步探讨	陈建洲 刘佛球 冯 芬 陈展洪 郑海生 袁炜嗣 方霖楷 杨纪亮 (1111)
聚羟乙谷氨酰胺-聚谷氨酸苄酯的合成及分子量表征	陈俊榕 梁禹博 王茂彩 王南雄 许洁娜 (1122)
核素显像在 Beagle 犬消化道重建术后胆汁返流检测中的应用	李小悦 (1126)
脆性 X 综合征综述	王 莹 (1138)
CEA 基因质粒的鉴定	刘 珍 梁茂金 易小猛 (1154)
应用高效毛细管电泳高频电导法测定半支莲药材中野黄芩苷含量	谢宗宙 伍嘉琳 何 爽 (1160)
国人颅内动脉瘤组织基因表达谱的研究	李 斯 何艺施 梁爱心 庄 泽 黄妙玲 陈建辉 郑志娟 徐懿敏 钟婵娟 (1167)
SARS 冠状病毒 GD 株多聚酶 nsp5 基因的克隆、表达及序列分析	李 娟 贾 磊 (1176)
后记	(1185)

植物源性变应原诱导 KM 小鼠 IV 型超敏反应模型的建立*

生命科学学院 03 级生物技术 刁梁辉* 李梦真 林 圣 肖 迪 邝嘉良
指导老师 李鸣光教授

摘要: 直接以植物源性变应原新鲜漆树汁液涂抹于部分去毛 KM 小鼠的背部去毛区及耳廓和脚趾处 (即分成不同部位的三组), 以诱导小鼠 IV 型超敏反应。经过初次接触变应原及再次诱导后, 观察到实验组小鼠体表明显的超敏反应症状: 迟滞性发病, 皮肤色泽变化, 松弛皱褶且呈高度水肿。病理学检查观测到血管通透性增高, 组织充血。组织细胞学检查发现总白细胞、淋巴细胞明显增殖, 提示利用植物源性变应原漆树可以建立有效的 IV 型超敏反应 (DTH) 模型, 与传统模型相比具有独特的优点, 弥补了传统模型研究的不足。

关键词: 漆树 IV 型超敏反应 DTH 反应模型 免疫检验

一、引 文

超敏反应 (Hypersensitive Reaction) 共分四种类型^[1], 其中, 国内外目前对 II 型超敏反应研究得较多, 了解也最为透彻, 而对 IV 型超敏反应 (DTH) 的研究很少。有限的研究不仅未能给出确切的 IV 型超敏反应的机理及诱导产生 DTH 后免疫系统的准确变化, 甚至有诸多的矛盾之处。矛盾之一, 便是产生 DTH 后, 效应细胞是 T 细胞还是 B 细胞产生的免疫球蛋白。大部分报道认为, 产生 DTH 效应的只是 T 细胞 (细胞免疫)^[2],

* 本实验由珠海校区生物学基础实验中心提供赞助。

联系方式: ls03dlh@hotmail.com.

而 Ig (尤其是 IgE) 不参与这个过程。而另一些报道认为, DTH 将首先导致 T 细胞的两个亚型 Th2/Th1 比例升高^[3]。而 Th2 细胞能分泌 IL-4, IL-4 促进 B 细胞活化, 产生 IgE, 甚至有的报道认为 DTH 中仅是 Ig 起变化^[4]。

我们认为, 对于 IV 型超敏反应的不同理解, 原因可能在于不同的研究人员采用了不同的 DTH 反应模型。存在这样的一种可能性, 即 DTH 反应还应该再划分为几种亚型 (或许是三种), 每一亚型其致病机理及免疫系统反应略有不同。这几种亚型可能包括了 T 细胞效应型, Ig 效应型, T 细胞与 Ig 共同效应型等。对于不同亚型的 DTH 反应, 应该采用各自的动物模型来进行研究, 方能得到准确可靠的结果。即使该假设不成立, 建立多样的 DTH 反应模型也是必要的, 只有经过不同的模型验证, 才能得出否定或肯定的结论。并且能丰富 IV 型超敏反应的理论和技术实践。

IV 型超敏反应的动物模型, 传统多是采用旧结核菌素 (OT)^[5], 绵羊红细胞 (SRBC) 或其它各类红细胞^[6]或是 2, 4 - 二硝基氟苯 (DNFB)^[7]腹部皮下注射诱导产生。此三者性质和作用效果方面接近。故而如果仅对这一类模型进行研究, 难免存在以偏盖全的嫌疑, 得出不全面甚至错误的结论。另外, 虽然人类中植物源性变应原导致的 DTH 反应极为常见, 但对其机理的直接研究却很少, 多数只限于治疗方法上的探索。本实验以此出发点, 建立了一个新型的以植物源性变应原新鲜漆树汁液为诱导物的 DTH 反应动物模型, 丰富了 DTH 反应研究的实验对象及方法。为进一步深入研究其机理提供基础。

二、材料与方法

(一) 实验动物及分组

20g 左右的健康 KM 小鼠 (雌雄各半, 来自于中山大学动物实验中心), 将其随机分为五组 (每组四只, 二雄二雌), 分别进行如下处理:

A 组: 空白对照, 脱毛处, 右耳廓处及右脚趾处均涂以纯净水。

B 组: 背部脱毛处涂以新鲜漆树汁液。

C 组: 右耳廓处涂以新鲜漆树汁液。

D 组: 右脚趾处涂以新鲜漆树汁液。

E 组: DNFB 对照组, 脱毛处, 耳廓处及脚趾处均涂以 DNFB。

(二) 实验试剂及器材

新鲜漆树汁液 (来源于中山大学珠海校区翰林山上); 纯净水; DN-FB (由中山大学生化实验室提供); 淋巴细胞染液——瑞氏姬姆萨染液 (由中山大学生理实验室提供)。

紫外 (可见) 分光光度计; PAGE 电泳仪; 微量移液枪; 螺旋测微器; 分析天平; Nikon 显微镜; 血细胞计数板等。

(三) DTH 反应的诱导

分组如上, 直接以新鲜的漆树枝条挤出液涂于预定处。经过初次接触变应原两天后, 再次采用大剂量漆树汁于相同部位诱导。等待相应现象的出现并记录分析。

(四) DTH 反应的检验

1. 外观形态的观察

直接肉眼观察两次诱导处 KM 小鼠皮肤的体征与对照组有何不同。测量肿胀度等。

2. 病理学切片的观察

组织包埋法光镜下观察。

3. 组织细胞学检查

通过血细胞分类计数测定血液中总淋巴细胞及 T, B 淋巴细胞数量变化。检测血液中免疫球蛋白 (Ig) 含量的变化。由于实验条件的限制, 仅完成了血液中总白细胞和总淋巴细胞的计数。

三、实验结果

(一) 实验小鼠经再次诱导后两天半左右作用处出现的反应

A 组: 无明显变化

B 组: 略有肿胀, 红黑色, 皮肤松弛老化

C 组: 肿胀对比明显, 微红色, 皮肤松弛老化

D 组: 不明显

E 组: 程度不等的肿胀和发红

结论: 由此可见, 在小鼠耳廓处进行诱导是最佳的选择, 不仅操作简便, 而且效果明显。在背部不仅需要脱毛, 造成表皮的损伤 (无论是化学药剂脱毛还是物理脱毛, 均不可避免地伤及皮肤, 有可能对皮肤中的抗

原提呈细胞有影响)；而且由于皮肤涂上漆树汁后不久变黑色，较难清洗干净，不利于观察。而腿部可能因其皮层较细薄，效果不明显，而且有碍于小鼠的正常活动。故而以下的实验中均只采用 C 组作进一步的研究。

比较 C 组和 E 组的表征，其是相似的。

(二) 对 C 组的实验动物用打孔器获得相同面积的耳廓组织，利用分析天平精确称量其质量

结果如表一所示：

表 1 诱导实验动物耳片肿胀度的比较

实验动物编号	左耳片质量 (mg)	右耳片质量 (mg)	肿胀度 (%)
1	2.3	3.1	34.8
2	2.3	2.7	17.4
3	2.5	3.4	36.0
4	2.2	3.0	36.4

肿胀度 = (右耳片质量 - 左耳片质量) / 左耳片质量 × 100%

结论：经诱导的小鼠耳郭有明显的肿胀。

(三) 组织切片光镜下观察

组织间隙充血，说明血管通透性增高了。

(四) 组织细胞学检查

采用血球计数板经瑞氏——姬姆萨染色后直接镜检计数。结果如表 2 所示：

表 2 血球计数板上单位面积内相关血细胞镜检计数结果

检测指标	对照组均值	实验组均值
总白细胞数	47	54
总淋巴细胞数	8	13

样本数：N = 5

结论：血液中总淋巴细胞在实验组中比对照组中有所增加。但是限于实验手段，所得到的结果并不是十分精确。

由于缺乏更细致的研究工具和试剂,我们无法区分血液中 T, B 淋巴细胞相对数目的变化,甚至 Th1 和 Th2 细胞的相对变化。也无法测定血液中免疫球蛋白含量的变化。故而无法确定在这种 DTH 反应模型中所诱导出的 DTH 反应的效应机制。其更深入的机理还有待进一步的研究。我们的研究目前还仅仅是建立一个相对较为良好的实验模型。

四、讨 论

1. 采用注射变应原的方法存在一个严重的缺陷:由于部分学者认为 DTH 反应需要通过存在于表皮的 LC 细胞及其相关途径提呈抗原(或半抗原),而直接注射则绕过了 LC 等提呈抗原的途径,导致非正常的通路。因此无法证实或反驳该论点,同时与天然诱导的 DTH 反应所经历的过程不相符合。

2. DNFB 本身是一种强烈的致癌物,可用于诱导产生癌症建立模型,故而用其建立超敏反应模型是不恰当的,其致癌效应也会导致免疫系统强烈的改变,故而容易将两种效应产生的效果混淆处理而得出不正确的结论。

3. 本实验建立的实验动物模型采用天然的变应源,并且诱导途径也遵循自然诱导的原则,因而根据其进一步研究的结果是比较真实可靠的 DTH 反应过程。

4. 实验的诱导率几乎达到了 100%,但是程度各异,预实验的部分结果也说明人和小鼠等哺乳动物的个体普遍对漆树汁液敏感,但在敏感程度上存在差异。低敏感性甚至是本不敏感的个体,在经大量、多次诱导后,也能顺利诱导出 DTH 反应。并且其反应强度随着剂量的增大而增强。这种过程在某些其他的免疫反应中已经证明确实存在。据此猜想可能所有的哺乳动物均对漆树汁中致敏成分(漆酚等)敏感或者说或多或少地存在着这种受体,只是由于种间及个体间的差异,其受体数量大小不一。或者其受体的结构不尽相同。

5. 实验中还发现,一些与漆树近缘的种(如盐肤木等)也可产生致敏物(变应原),其所诱发的反应同漆树汁诱导的 DTH 反应是相似的,但是在强度上有所不同。据此推测可能的原因是:①漆树与其近缘种诱导 DTH 反应的变应原在其汁液中的含量不等;②其变应原在结构上存在差

异, 对受体或抗原提呈细胞的敏感性不同。因此, 可否利用这一特点作为漆树科植物分类的依据和判断其科内各植物间相对亲缘关系的依据还有待进一步探究。

参考文献

- [1] [2] Wayne R Thomas, Hypersensitivity: Immunological, ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, Nature Publishing Group, 2001, 1-9
- [3] 谢志强, 陈学荣. 迟发型超敏反应分型及其在变应性皮肤病中的意义. 国外医学皮肤性病学分册, 2001, 27 (1): 27-30
- [4] Hugh A. Sampson, Atopic dermatitis: immunological mechanisms in relation to phenotype, *Pediatr Allergy Immunol* 2001, 12 (Suppl. 14): 62-68
- [5] 曹友清, 许化溪, 李良菊等. 小鼠四型超敏反应模型建立的研究. 镇江医学院学报, 1995, 5 (1): 3-5
- [6] 肖柳英, 林培英, 张丹等. 鸡红细胞致小鼠迟发型超敏反应动物模型及补体 C3 水平. 广州医药, 1997, 28 (6): 60-62
- [7] 宋志琦, 林熙然. 中药黄柏、茯苓及栀子抗迟发型超敏反应作用的实验研究. 中国皮肤性病学杂志, 1997, 11 (3): 143-144

Constitute A Model Of KM Mus musculus'

Type IV Hypersensitivity Reaction Induced By Plant Allergen

L. H. Diao; M. Z. Li; S. Ling; D. Xiao; J. L. Kuang

Abstract: In this experiment, we use the plant allergen to lay on KM Mus musculus's back, auricle and toes directly in order to induce Type IV Hypersensitivity. After the plant allergen first contact them and the second induce, we observed that in the experiment groups KM Mus musculus presented evident symptoms of hypersensitivity reactions: the reactions took 12-24 hours to develop and persisted for 2-3 days, the skins turn to be inflammation. It refers that use the plant allergen can induce effective Type IV Hypersensitivity reaction by KM Mus musculus. Compared with the traditional model induced by other drugs, it has its special merit which can supply the gap of latter.

Key words: Plant allergen; Type IV Hypersensitivity; Mus musculus

鸣谢:

- 感谢珠海校区生物学基础实验中心提供赞助
- 感谢冯东茹老师帮助联系购买小鼠
- 感谢陈裕隆老师在实验初期为我们提供实验室和实验必须的试剂
- 感谢龙天澄老师为我们的实验提出宝贵的意见
- 感谢黎丽娥老师在我们实验过程中给予最大限度的帮助和关照
- 感谢苏菁老师在实验技术上和后期修改给予极大的帮助
- 感谢陈一龄老师、张穗屏老师在我们血细胞记数的时候提供药品和仪器

白芷对酪氨酸酶活力的影响 及其动力学研究

生命科学学院生物化学系 王宁 李月波 周琳
指导老师 何炎明高级工程师 戚康标高级工程师

摘要: 皮肤变黑、色斑产生主要是由于表皮内的酪氨酸酶催化酪氨酸产生黑色素,黑色素沉积于成纤维细胞的结果。本试验着眼于美白古方“八白散”,探讨其君药白芷美白机理,采用不同极性溶剂提取药材,进行酶活性实验,探究其有效抑制浓度;在此基础上,探讨白芷对酪氨酸酶抑制作用的酶促反应动力学。实验表明白芷各极性组分中,无水乙醇和水提取的部分抑制酶活性最好;采用70%乙醇提取物的半数有效抑制浓度应该在50~100mg/ml之间,最低有效抑制浓度在5mg/ml左右;其抑制类型为混合型抑制。

关键词: 白芷 酪氨酸酶 抑制作用 动力学

一、引言

美白剂作为化妆品中的一项重要添加成分,是当今科学研究和工业生产的一个热点。但纯有机物质的美白剂对于皮肤的损伤作用不可估量,而中药作为我国医学理论中的瑰宝,具有性质温和、效果持久,做为美白剂对细胞的毒害作用小等优点。皮肤的颜色取决于黑色素的含量及分布。黑色素形成的生理过程基本概括为:黑色素细胞产生黑色素;黑色素颗粒通过黑色素细胞树枝状突起向角朊细胞转移;转移至角朊细胞的黑色素颗粒随表皮细胞上行至角质层,并随角质层脱落而排泄。其中酪氨酸酶,多巴色素互变酶 (TRP - 2) 和二羟基吲哚酸 (DHICA) 氧化酶 (TRP - 1) 都对黑素的形成具有一定的作用^[1,2]。中药白芷 (*Angelica dahurica*) 的美

白作用为多种美白古方所提及,但对其作用机理现尚无比较详细的阐述,我们通过对白芷各不同极性组分酪氨酸酶抑制作用及其酶促反应动力学的研究,初步阐明白芷美白的酶学机理,为其进一步研究和应用提供科学依据。

二、材料与方 法

(一) 材料

1. 试剂: 酪氨酸酶 25000U/瓶 sigma 公司,配成 100U/ml 的酶溶液
L-Dopa、5g/瓶 sigma 公司
乙酸乙酯、丙酮、无水乙醇均为市售分析纯
2. 仪器: Wellscan MK3 酶标仪
3. 试药: 白芷饮片 50g 购于广州市中顺堂药店,产地广东

(二) 方法

1. 中药提取液的制备:取白芷粉末 2g 置于 100ml 三角锥瓶中,依次采用 30 倍量的乙酸乙酯、丙酮、无水乙醇、水作为溶媒,超声提取 30min,相同溶媒提取液合并蒸干,用 70%乙醇定容至 10ml,折合生药浓度 0.2mg/ml;另取白芷粉末 2g 置于 100ml 三角锥瓶中,加入 60ml 70%乙醇超声提取 30min,过滤浓缩,用 70%乙醇定容至 10ml,折合生药浓度 0.2 g/ml。

2. 药材提取液浓度梯度的建立:将上述提取液按照下述浓度稀释备用:200mg/ml, 100mg/ml, 50mg/ml, 20mg/ml, 10mg/ml, 5mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.2mg/ml。

3. 药材提取液对酪氨酸酶活力影响的测定:

(1) 试剂: PBS: KH₂PO₄ 缓冲溶液, pH 值调值 6.8;

底物: 29.6mg L-Dopa 用 PBS 溶解定容至 50ml, 即成 0.03% 的 L-Dopa 溶液;

酪氨酸酶: 用 PBS 稀释至 100u/ml;

(2) 步骤: 在 96 孔细胞培养板中,依次加入 80ul PBS, 50ul L-Dopa 溶液, 20ul 各浓度药材提取液, 40℃ 温育 10min 后,置于 Wellscan MK3 酶标仪上,依次每孔加入 50ul TyrE, 492nm 下动力学检测;以 20ul

70%乙醇代替药材提取液的阴性孔（其他不变）作为空白对照。

（3）药材抑制酶活性效率的测定：

反应体系的表示：

A 为实验组：TyrE 50ul + L - Dopa 50ul + 20ul 各浓度药液 + 80ul PBS

B 为对照组：TyrE 50ul + L - Dopa 50ul + 20ul 70% 乙醇 + 80ul PBS

C 为正常组：TyrE 50ul + L - Dopa 50ul + 100ul PBS

D 为空白：以 0 秒时反应体系的 A492 值为空白

抑制率的计算：抑制率 = $\frac{A-B}{B-D} \times 100\%$

4. 酶促反应动力学的测定：

试剂：同 3（1）。药液采用 70%乙醇提取、50mg/ml 浓度的白芷提取液；对照采用 70%乙醇代替药液

步骤：在 96 孔细胞培养板中，依次加入 x ul PBS，y ul L - Dopa 溶液，20ul 50mg/ml 药材提取液，40℃温育 10min 后，置于 Wellsan MK3 酶标仪上，依次每孔加入 50ul TyrE，反应 120s 后，492nm 下测定其吸光度值；以 20ul 70%乙醇代替药材提取液的阴性孔（其他不变）作为对照。x，y 值见表 1。

表 1 酶促反应动力学实验底物加入量

x/ul	98	95	90	80	50	0
y/ul	2	5	10	20	50	100

双倒数作图及 Km 值的计算：参照文献所示^[3]。

三、结果与讨论

1. 采用不同溶媒依次提取药材后获得各极性部位，分别按照二之（二）2 稀释成相应浓度，进行酶活性实验，取 60s 各孔反应值，结果见表 2。