



碱性磷酸酶分离提取

王勤

廈門大學生命科學學院





实验目的

- 1. 学习蛋白质分离纯化的一般原理和步骤**
- 2. 掌握牡蛎碱性磷酸酶制备的操作技术**
- 3. 对硝基苯酚标准曲线的制作**





实验原理

廈門大學生命科學學院





蛋白质的分离纯化

separation and purification

材料

→ 鲜度、含量、保存方法

破碎

→ 组织捣碎法、研磨法、匀浆法、超声破碎法、冻融法等

抽提

→ 提取缓冲液 (pH、温度等)、搅拌、增溶剂、抽提液与抽提物的比例等

分离

→ 盐析、有机溶剂 (乙醇、丙酮等)、等电点沉淀等

纯化

→ 离子交换柱层析、凝胶过滤柱层析、亲和层析等

分析及鉴定

→ 酶活力、纯度、分子量

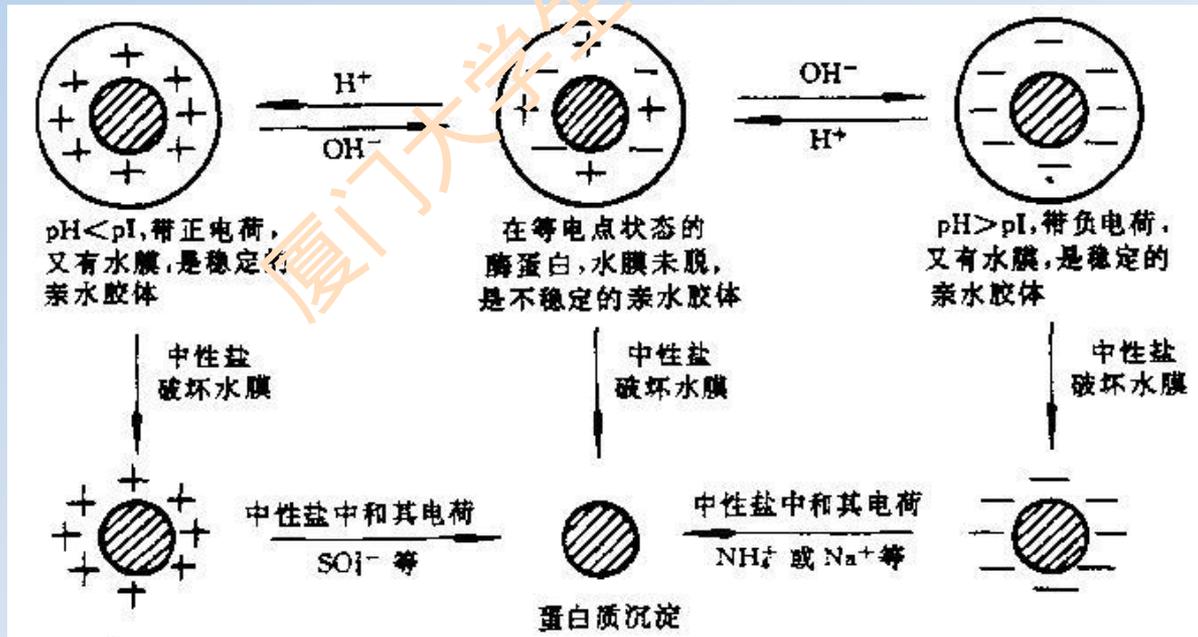




盐析Salting-out

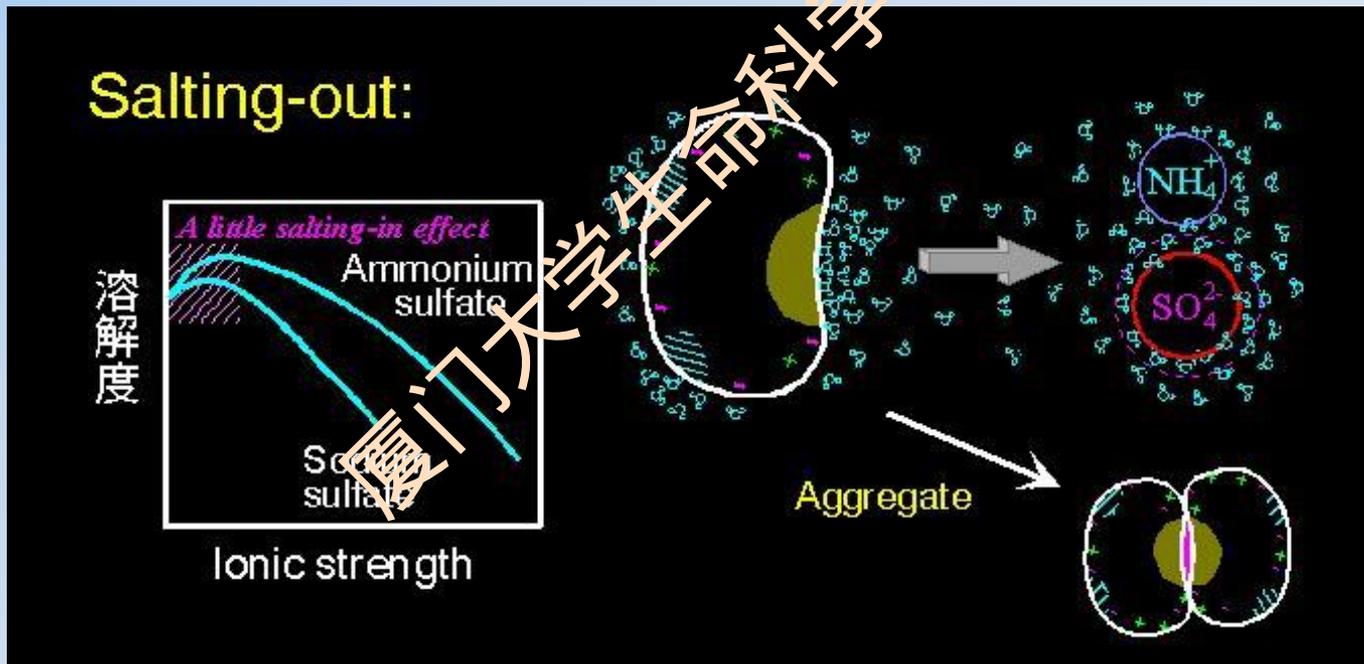
高浓度的盐离子在蛋白质溶液中可与蛋白质竞争水分子，从而破坏蛋白质表面的水化膜，降低其溶解度，使之从溶液中沉淀出来。

各种蛋白质的溶解度不同，因而可利用不同浓度的盐溶液来沉淀不同的蛋白质。这种方法称之为盐析。



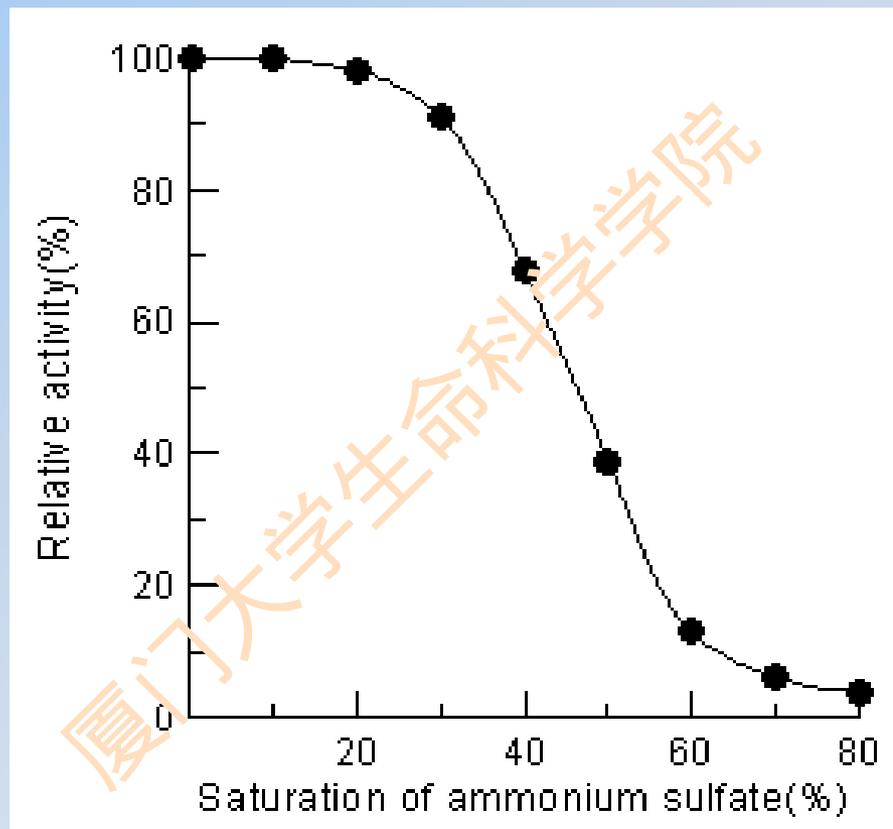


硫酸铵因其溶解度大，温度系数小和不易使蛋白质变性而应用最广。硫酸铵沉淀法可用于从大量粗制剂中浓缩和部分纯化蛋白质。





硫酸铵分级沉淀



上清液中酶蛋白相对活力与硫酸铵浓度曲线





在酶的制备过程中，每经一步处理，都需测定酶的活力和比活力。酶的比活力定义为每mg蛋白所具有的酶活力单位数。

唯有比活力提高较大，提纯步骤才有效。





碱性磷酸酶

- 碱性磷酸酶: Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) 简称为ALPase
- 广泛存在于微生物界和动物界
- 广泛分布于人体各脏器官中，其中以肝脏为最多其次为肾脏，骨骼、肠和胎盘等组织





碱性磷酸酶 (ALP) 的功能

- ALPase能催化几乎所有的磷酸单酯的水解反应，将对应底物**去磷酸化**，产生无机磷酸和相应的醇、酚或糖。这类底物包括核酸、蛋白、生物碱等。它也可以催化磷酸基团的转移反应，将磷酸基团从磷酸酯转移到醇、酚或糖等磷酸受体上。



核酸、蛋白、
生物碱等

核酸、蛋白、
生物碱等





碱性磷酸酶 (ALP) 的应用

- 蛋白质的去磷酸化
- 与磷的代谢直接相关，参与磷与钙物质的消化、吸收、分泌以及对骨骼的形成等生理生化过程
- 肝脏、骨组织相关疾病的诊断指标之一 (ALP↑)
- 免疫诊断试剂产品 (ELISA) 常用的标记酶之一 (ALP的显色反应)





肝功能(十二项)

项目名称	检查结果	单位	参考值	提示
谷丙转氨酶	11	IU/L	0-60	
谷草转氨酶	23	IU/L	0-60	
碱性磷酸酶	60	IU/L	40-150	
谷氨酰转肽酶	11	IU/L	4-89	
总胆红素	13.0	umol/L	3.4-20.5	
直接胆红素	4.3	umol/L	0-6.84	
间接胆红素	8.7	umol/L	0-13.7	
总蛋白	83.7	g/L	60-80	↑
白蛋白	49.4	g/L	35-55	
球蛋白	34.3	g/L	20-35	
A/G	1.44		1.20-2.50	
谷草/谷丙	2.09		0.8-1.4	↑
小结				





实验材料与仪器

• 试剂与材料

新鲜牡蛎

0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5, 含0.1 mol/L NaCl)

硫酸铵固体

透析袋

• 仪器

高速组织捣碎机

离心机

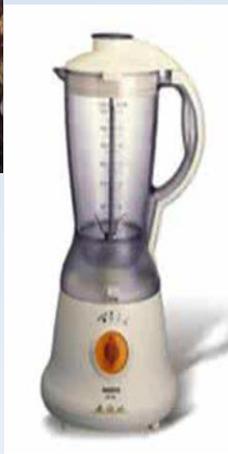
天平

冰箱

烧杯

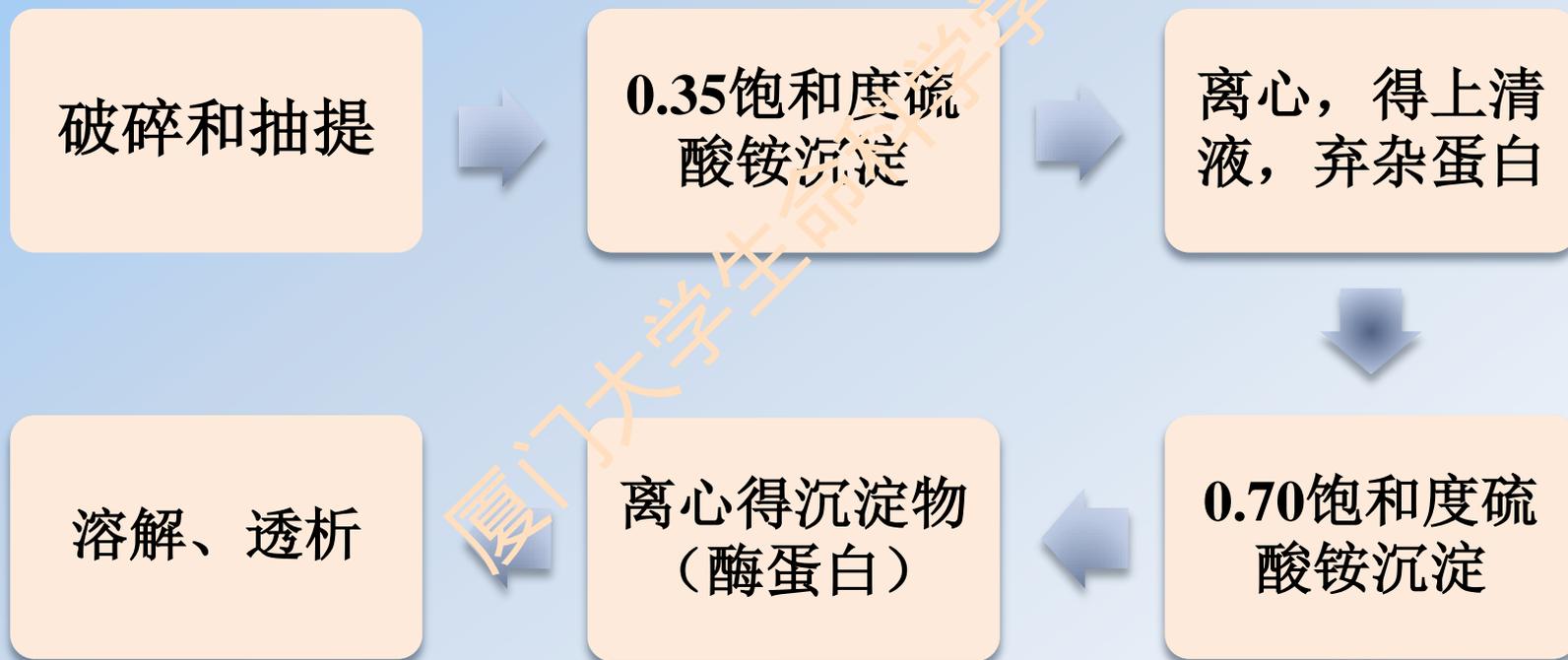
量筒

研钵





实验基本流程





操作方法

牡蛎碱性磷酸酶的分离提取

- (1) 每组称取**25 g**牡蛎（蒸馏水洗净），加入**50 mL**预先冷却的**0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液**（pH 7.5，含**0.1 mol/L NaCl**），（**两组一起**）于高速组织捣碎机匀浆1 min，于冰箱**4°C**放置1 h左右进行抽提。
- (2) 室温或冷冻离心，**4000 r/m 20 min**，**收集离心上清液并量体积**（两组分开）。（**留3 mL上清液**，待测酶的比活力。）
- (3) 在上清液中加入研磨成细粉的固体硫酸铵至**0.35饱和度**（**100 mL加入20.9 g** ）。缓慢加入，不断搅拌溶解，置冰箱静置1 h左右。
- (4) 冷冻离心，**4500 r/m 20 min**，**收集离心上清液，并量体积**。（**留3 mL上清液**，对**0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液** pH 7.5含**0.1 mol/L NaCl**透析平衡，待测酶的比活力。**此步透析不做**）



(5) 0.35 饱和硫酸铵上清液，加入固体研磨成细粉的硫酸铵至 0.70 饱和度（100 mL 加入 23.8 g ）。缓慢加入，不断搅拌溶解，置冰箱静置 1-2 h。

(6) 冷冻离心，4500 r/m 20 min，**收集沉淀物**。

(7) 得到沉淀物，溶于 5 mL 含 0.1 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 7.5）。装入透析袋，对 0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.5 缓冲液透析平衡，至无 SO_4^{2-} 被检测出为止（可用一定浓度 BaCl_2 溶液检验）。

(8) 取出酶溶液，冷冻高速离心（ 0°C 25000 r/m 30 min），**收集离心上清液并量体积**。分装入 5 mL 管中冷冻保存。

(9) **离心上清液** 即为粗酶制剂，检测酶的比活力。





25 g牡蛎

加入**50 mL**预先冷却的0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 7.5，含0.1 mol/L NaCl），于高速组织捣碎机匀浆1 min，于冰箱4°C放置1 h左右进行抽提。（**两组一起**）

匀浆液

室温或冷冻离心，4000 r/m 20 min，**收集离心上清液，并量体积。**
（**留3 mL上清液**，待测酶的比活力。）

上清液

缓慢加入研磨细粉的固体硫酸铵至**0.35**饱和度（100 mL加入20.9 g），不断搅拌溶解，置冰箱静置1 h左右。

冷冻离心，4500 r/m 20 min，**收集离心上清液，并量体积。**（**留3 mL上清液**，待测酶的比活力。）

0.35饱和硫酸铵上清液

加入固体研磨成细粉的硫酸铵至**0.70**饱和度（100 mL加入23.8 g）。缓慢加入，不断搅拌溶解，置冰箱静置1-2 h。

冷冻离心，4500 r/m 20 min，**收集沉淀物。**

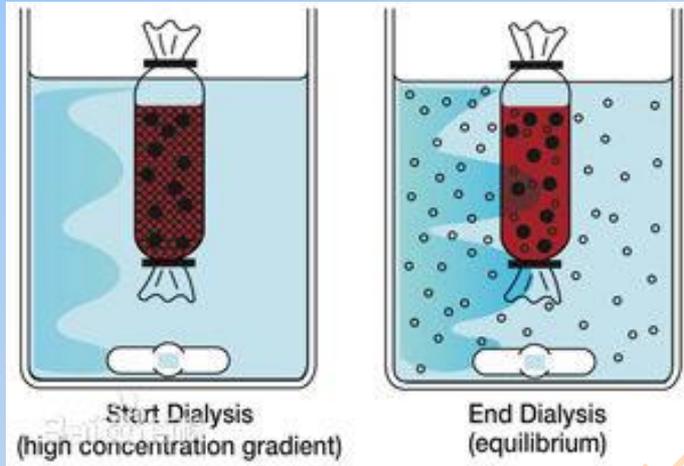
沉淀

溶于5 mL含0.1 mol/L NaCl 的0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.5。装入透析袋，对0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.5缓冲液透析平衡，至无 SO_4^{2-} 被检测出为止。冷冻离心，25000 r/m 30 min，**收集离心上清液，并量体积。**

粗酶液



透析袋的原理和使用



- 半透膜
- 小分子扩散到袋外至袋内外浓度达到平衡 (溶液)
- 大分子截留在袋内 (蛋白质)





硫酸铵溶液饱和度计算表 (25°C)

硫酸铵终浓度,%饱和度

每1升溶液加固体硫酸铵的克数^①

	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
硫酸铵初浓度,%饱和度	0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694	
20			29	59	78	91	123	155	190	225	262	300	340	382	424	520	619	
25				30	49	61	93	125	158	195	230	267	307	348	390	485	583	
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546	
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522	
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506	
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469	
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431	
50										33	66	101	137	176	214	302	392	
55											33	67	103	141	179	264	353	
60												34	69	105	143	227	314	
65													34	70	107	190	275	
70														35	72	153	237	
75															36	115	198	
80																77	157	
90																	79	

①在25°C下, 硫酸铵溶液由初浓度调到终浓度时, 每升溶液所加固体硫酸铵的克数。



硫酸铵溶液饱和度计算表 (0°C)



在 0°C 硫酸铵终浓度, %饱和度

每 100 毫升溶液加固体硫酸铵的克数

	0	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
硫酸铵初浓度, %饱和度	0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2	
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7	
15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	45.0	50.3	54.7	59.2	
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7	
25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2	
30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8	
35				0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3	
40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8	
45						0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.5	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3	
50							0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8	
55								0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	19.7	23.5	27.3	31.3	
60									0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.1	23.1	27.9	
65										0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4	
70											0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9	

①在0°C下, 硫酸铵溶液由初浓度调到终浓度时, 每100毫升溶液所加固体硫酸铵的克数。



将测定的数据或计算结果用下表记录

步骤	总体积 mL	蛋白 mg/mL	总蛋白 mg	酶活力 U/mL	总活力 U	比活力 U/mg	纯化倍数	得率 %
匀浆过滤液								
0.35饱和(NH ₄) ₂ SO ₄ 上清液								
0.7饱和(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀 溶解透析上清液								
Sephadex G100酶液								





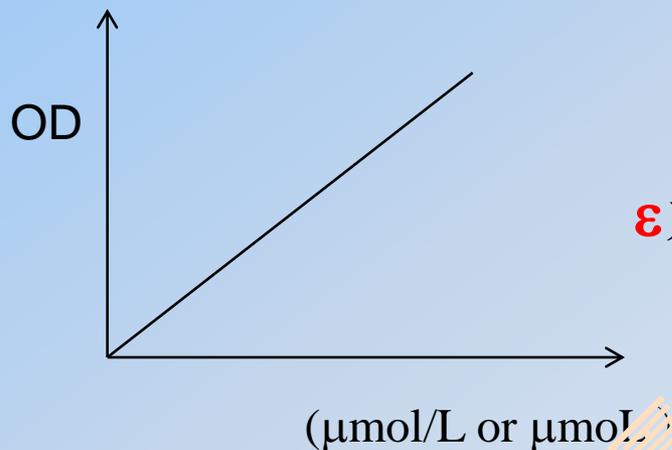
对硝基苯酚标准曲线的制作 即pNP的摩尔消光系数(ϵ)的测定

$$A = \epsilon CL$$

A为吸光度； **ϵ** 为吸收系数；**C**为溶液浓度；**L**为溶液光程的厚度

吸光系数 $\epsilon = A/C$

ϵ 为L=1cm，C为1mol/L时的吸光系数，也称为**摩尔吸光系数**，单位是 $(\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

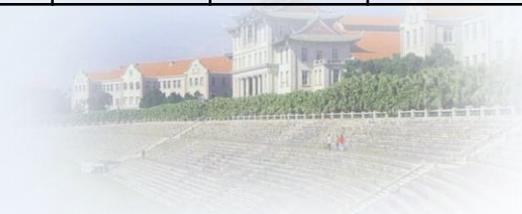


以pNP的绝对量(μmol 数)或浓度($\mu\text{mol/L}$)为横坐标， $\text{OD}_{405\text{nm}}$ 值为纵坐标，绘制标准曲线，求出斜率，单位换算后即为pNP的摩尔消光系数(ϵ)值。



取15支试管编号，0号一支，1—7号各二支，按下表操作

管号	0	1	2	3	4	5	6	7
pNP含量 (μmol)	0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35
0.5 $\mu\text{mol/mL}$ pNP (mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
H ₂ O (mL)	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃ (mL)	各管加入1.0 mL							
20 mmol/L MgCl ₂ (mL)	各管加入0.2 mL							
0.2 mol/L NaOH (mL)	各管加入2.0 mL							
OD _{405 nm}								





注意事项

加入硫酸铵时，需事先将硫酸铵粉末研细。加入过程需缓慢并及时搅拌溶解。搅拌要缓慢，尽量防止泡沫的形成，以免酶蛋白在溶液中表面变性。

廈門大學生醫學院

