

实验十一 碱性磷酸酶比活力测定

厦门大学生命科学学院



实验目的

- 掌握酶活性测定方法的一般原理方法
- 测定碱性磷酸酶制备各步骤酶制剂比活力

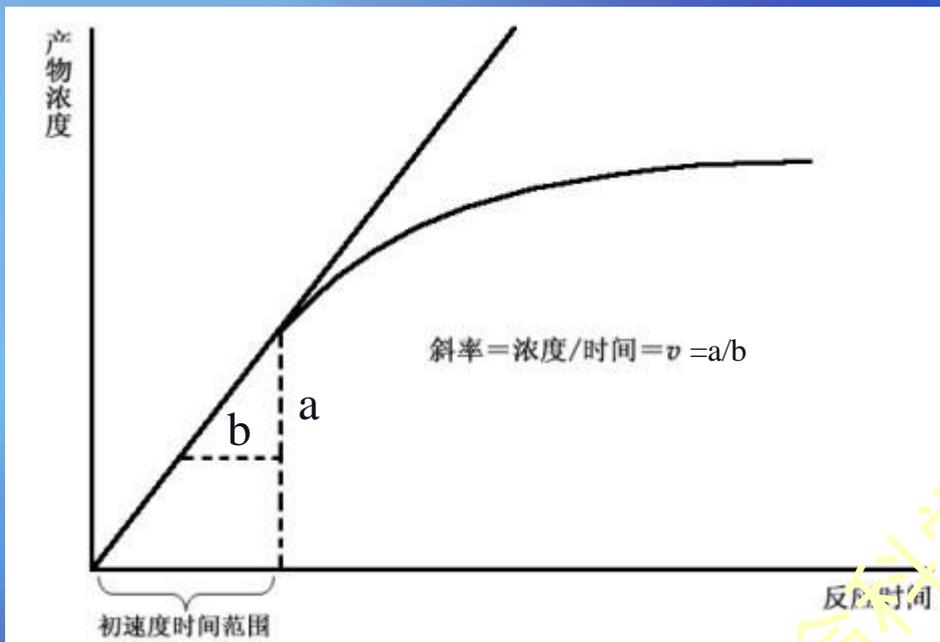
厦门大学生命科学学院

实验原理

- 酶活力：即是酶活性，是表示催化某一特定反应的能力。
- 酶活力可以用在一定条件下所催化的某一特定化学反应速度表示。

酶催化的反应速度越快，酶活性越高，反之则愈低。

- 酶促反应速度 $v = \frac{\text{底物减少量或生成物增加量}}{\text{单位时间}}$



酶促反应进程曲线

- 要真实反映出酶活力的大小，就应该在产物生成量与酶反应时间成正比的这一段时间内进行初速度的测定。

活力测定中应注意的几个问题

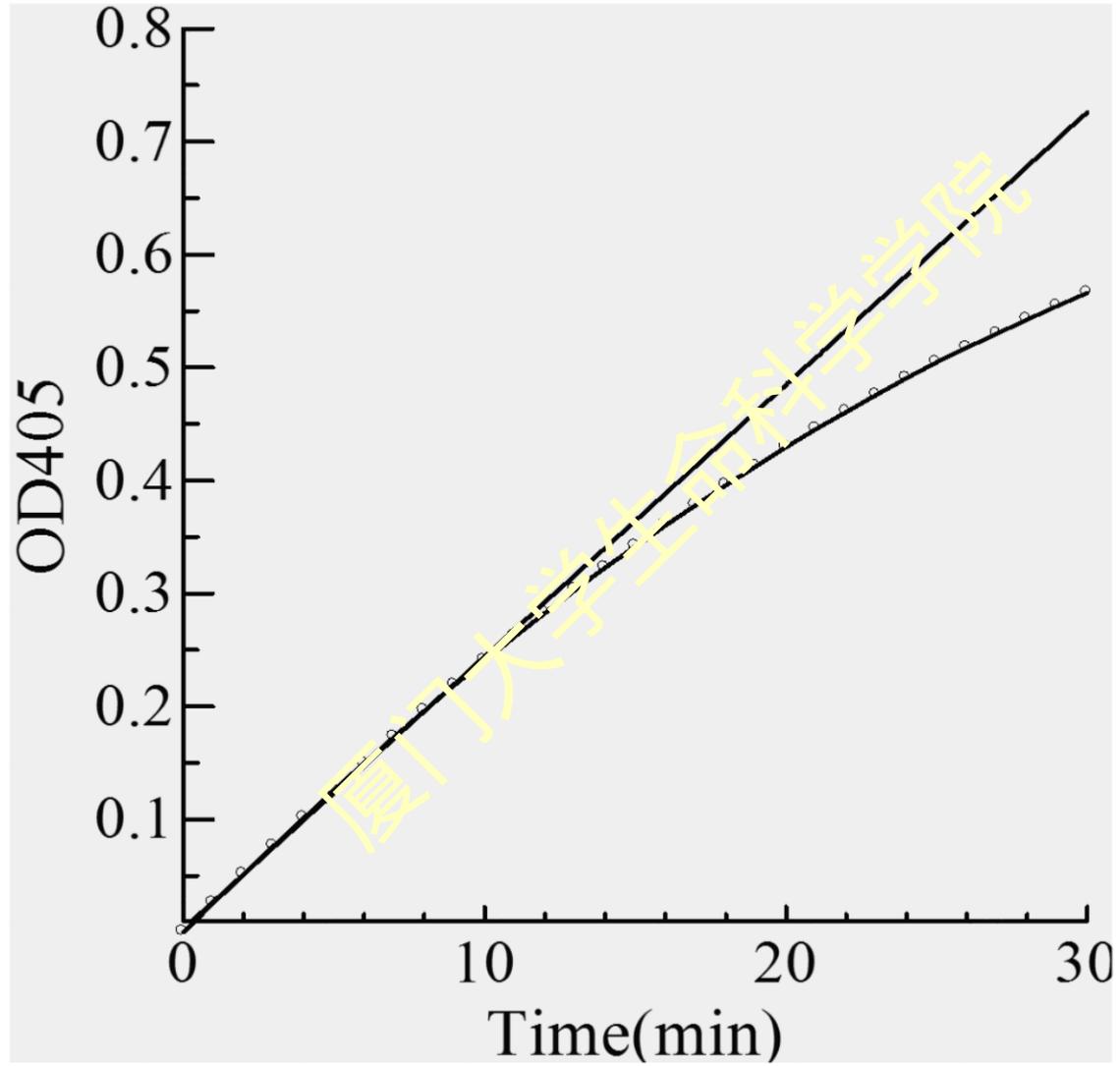
- (1) 活力测定一般测定产物增加速度为好。
- (2) 测活过程应注意外界环境的影响。

方法:

1. 终止测定法 (终点法)

- 终止测定法是在酶和底物反应达到预定的时间时, 立即加入终止剂使酶变性, 终止酶促反应, 在这段反应时间里面, 产物的生成量基本成**线性**增加, 用这段反应时间内的**平均速率**代替反应初速率。

2. 动力学分析法 (连续监测法或速率法)



- 酶催化速度(enzyme velocity)： $\mu\text{mol/L/min}$
- 酶活力单位(the unit of enzyme activity)—对酶进行定量。

一个标准酶单位：在一定条件下，每分钟催化形成 $1\mu\text{mol}$ 产物的酶量。 $1\text{U} = 1\mu\text{mol/min}$

- 比活力(specific activity)

比活力：每毫克酶蛋白所含的酶活力单位。 U/mg (或 $\mu\text{mol/min/mg}$)

比活力反应酶的纯度，比活力越大，酶纯度越高。

- 碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, 简称为ALPase)广泛存在于微生物界和动物界。ALPase能催化几乎所有的磷酸单酯的水解反应,产生无机磷酸和相应的醇、酚或糖。



如何测定ALPase
的活力?

碱性磷酸酶**酶活力单位**定义为：在37°C下，以0.5 mmol/L pNPP为底物，在pH10.1的碳酸盐缓冲液含2 mmol/L Mg²⁺的测活体系中每分钟催化产生1 μmol pNP的酶量定为1个酶活力单位。酶的比活力定义为每mg蛋白所具有的酶活力单位数。

磷酸苯二钠法

- 在pH10 环境中，ALPase催化磷酸苯二钠水解生成苯酚和磷酸氢二钠，苯酚与4-氨基安替比林反应生成色素原，该色素原经铁氰化钾氧化生成红色醌亚衍生物。测定红色物质的吸光度就可以计算酶活性的大小。

- 反应式如下：



■ 操作方法

1 对硝基苯酚标准曲线的制作:

取15支试管编号，0号一支，1—7号各二支，按下列表格操作。

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							
0.1 mol/L NaOH (mL)	各管加入2.0 mL							
OD _{405 nm}								

以对硝基苯酚的绝对量(μmol 数)为横坐标，OD_{405nm}值为纵坐标，绘制标准曲线。求出斜率 k 或者pNP的摩尔消光系数(ϵ)值（单位为 $(\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ）。

2 酶活力的测定

取干净的试管9支，编号，1—3号各2支，作为各步的酶样测定管；01—03各一支，作为相应的样品对照；

管号	01-03	1	2	3
5 mM pNPP(mL)	各0.5mL			
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			
H ₂ O (mL)	各0.50mL			
	混匀，37°C，5分钟			
酶液 (mL)	各0.1mL*，混匀			
	37°C，精确反应10分钟			
0.1 mol/L NaOH (mL)	各管加入2.0 mL，混匀			
酶液 (mL)	0.1mL			
OD _{405 nm}	-			

以各自的0号管调零点，测定各管的OD_{405nm}值，从对照标准曲线求出产物的 μmol 数(或通过 ϵ 算出产物的 μmol 数)，算出酶活力。

3 蛋白浓度的测定

本实验采用双缩脲法测定蛋白浓度。

- 分离提取的三步酶制剂按一定比例用Tris-HCl缓冲液稀释，稀释倍数视溶液的蛋白浓度高低而定。（一般稀释5-10倍）。
- 标准曲线

廈門大學生命科學院

4 结果处理

计算:

$$\text{酶活力(U/mL)} = \frac{B}{t \cdot V_1}$$

$$\text{蛋白浓度(mg/mL)} = \frac{C}{V_2} \cdot S$$

式中: A为稀释倍数, B为由标准曲线查得的pNP μmol 数或者通过摩尔消光系数 ϵ 换算, t为反应时间, C为由标准曲线查得的蛋白mg数, V_1 为测定酶活力所用的酶量(mL数) V_2 为测定蛋白浓度所用的酶量(mL数)

$$\text{酶的比活力 (U/mg)} = \frac{\text{酶活力 (U/mL)}}{\text{蛋白浓度 (mg/mL)}}$$

纯化倍数 = 各步比活力 / 第一步比活力

得率% = 各步总活力 * 100 / 第一步总活力

将测定的数据或计算结果用下表记录。（此为例子）

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	400	7.24		40.3	16120	2.80	1	100
正丁醇处理上清液	470			33.8				
0.35饱和(NH ₄) ₂ SO ₄ 上清液	440			35.3				
0.7饱和(NH ₄) ₂ SO ₄ 沉淀溶解透析上清液	40.3	3.3		214.7	8652	14.0	5.0	53.7
DEAE-32酶液	9.6	3.82		402.2	3861	105.3	37.6	24.0
Sephadex G75酶液	13.2	0.49		229.1	3024			
Sephadex G200酶液	6.8	0.21		509.3				

注意事项

1. 取液量一定要准确。
2. 反应时间一定要精确。
3. 加酶前后一定要将试剂混匀（漩涡混合仪）。
4. 空白对照一定要先加NaOH后加酶。
5. 移液管或微量移液器的使用
6. 比色杯的使用（比色杯杯差）
7. 水浴时试管架可以放进水浴锅中，但要保证水浴锅的水可以没过试管中样品的位置。
8. -20°C 冻着的样品取出后一定要完全化冻且混匀。
9. 匀浆上清液和0.7饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀溶解透析上清液（粗酶液）要留着作为电泳实验样品。粗酶液还要进一步纯化。

管号	1	1'	2	2'	3	3'	4	4'	5	5'
加酶时间	0.5m	1m	1.5m	2m	2.5m	3m	3.5m	4m	4.5m	5m
加NaOH时间	10.5	11	11.5	12	12.5	13	13.5	14	14.5	15
反应时间 (min)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

廈門大學生命科學學院

