



实验十四 碱性磷酸酶米氏常数的测定

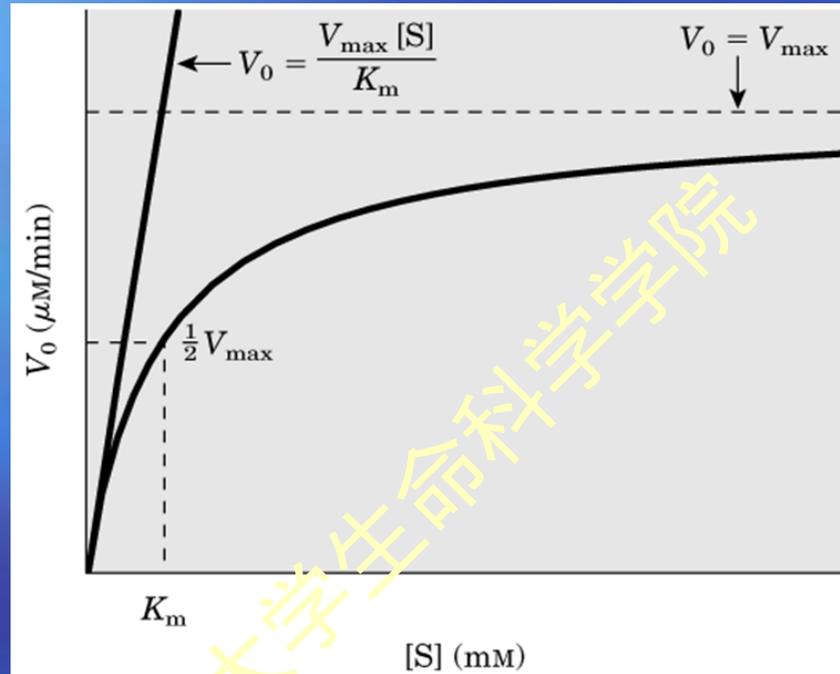
厦门大学生命学院

一、目的要求

1. 学习分光光度法测定的原理和方法
2. 学习和掌握米氏常数 (K_m) 及最大反应速度 (V_m) 的测定原理和方法, 测出碱性磷酸酶在以对硝基苯酚磷酸为底物时的 K_m 和 V_m 值。

二、原理

酶促反应 v - $[S]$ 曲线

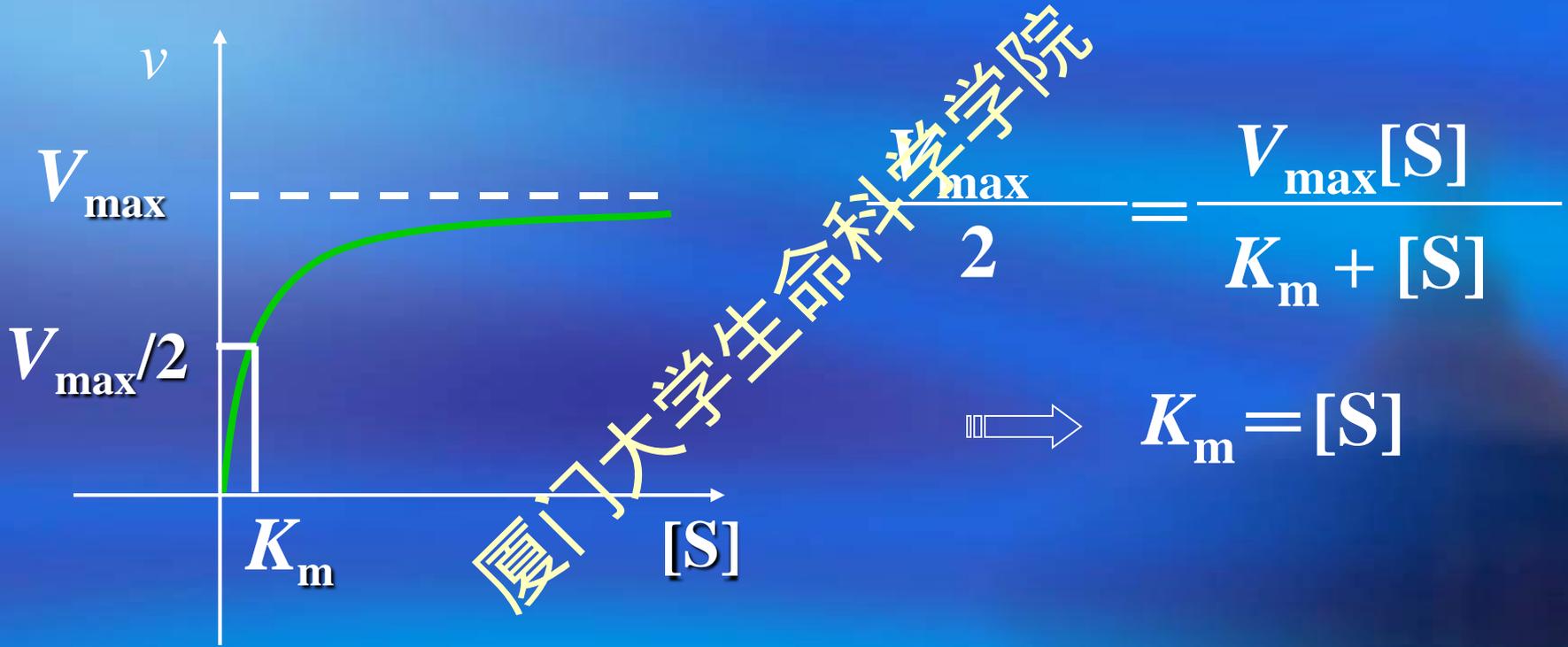


推导出米氏方程

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

其中 $[S]$ 为底物浓度； v 为初速度； V_m 为最大反应速度； K_m 为米氏常数

动力学参数的测定



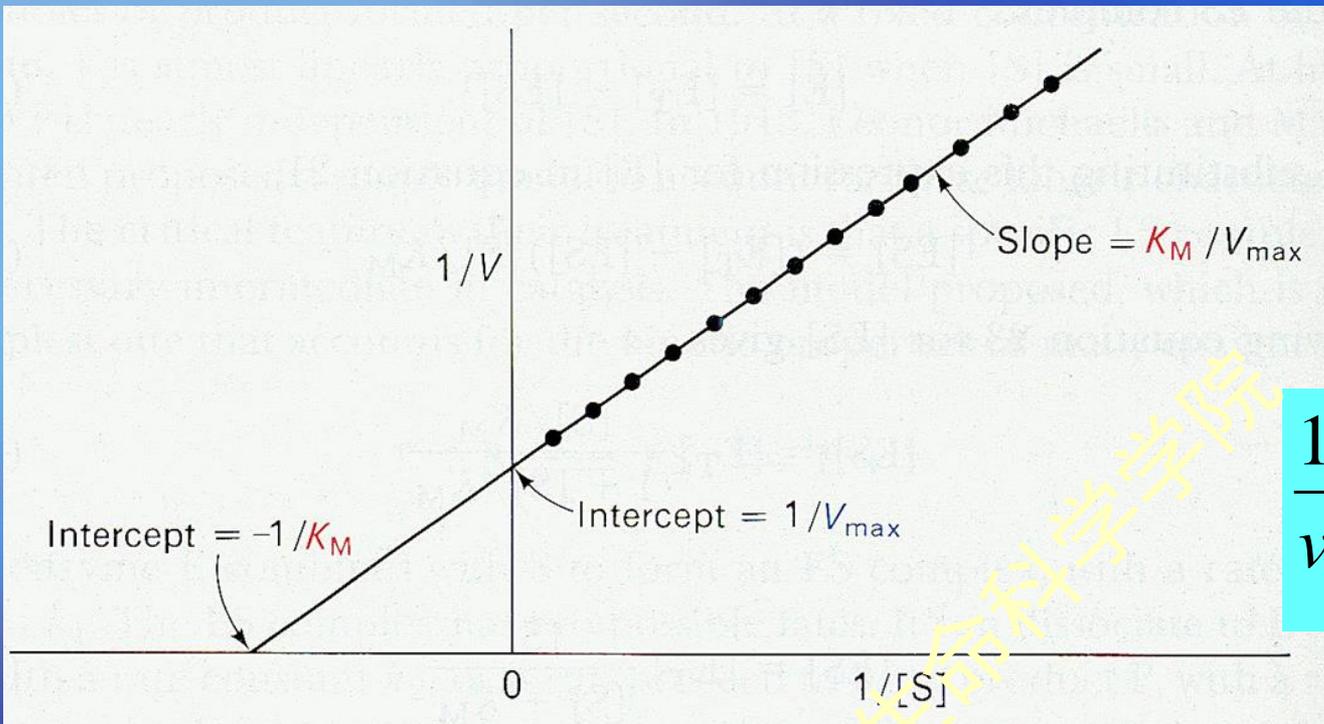
K_m 值等于酶促反应速度为最大反应速度一半时的底物浓度，单位是浓度单位。

米氏常数 K_m 是酶的一个基本特征常数，它包含着酶与底物结合和解离的性质。特别是同一种酶能够作用于几种不同底物时，米氏常数 K_m 往往可以反映出酶与各种底物的亲和力的强弱。

测定 K_m 和 V_m ，可通过作图法求得。最常用的Lineweaver-Burk双倒数作图法。这个方法是将米氏方程转化为倒数形式，即：

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图，可得一条直线



$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

- 本实验测定碱性磷酸酶催化对硝基苯磷酸钠盐(pNPP)水解的 K_m 和 V_m .



可通过分光光度法测定产物pNP的含量, 求出反应速度 v 。

三、试剂与器材

试剂：0.5 μ mol/mL pNP、10 mmol/L pNPP、20 mmol/L MgCl₂、0.1 mol/L 碳酸钠—碳酸氢钠 pH 10.1 缓冲液、0.1 mol/L NaOH、实验十一制备的碱性磷酸酶粗酶液*

器材：恒温水浴锅、722分光光度计

Q.为什么可以用碱性磷酸酶粗酶液测定米氏常数？

四、操作方法

(一) 对硝基苯酚标准曲线的制作*

取5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
pNP含量 (μmol)	0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
0.5 $\mu\text{mol/mL}$ pNP (mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
H ₂ O (mL)	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2
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pNP的摩尔消光系数(ϵ)值。

(二) 测定

15支试管，1-5做两组平行测定管，01-05作为空白对照。

No.	1	2	3	4	5
底物终浓度[S] (mmol/L)	0.5	0.75	1.0	1.5	3
10 mmol/L pNPP (mL)	0.1	0.15	0.2	0.3	0.6
蒸馏水 (mL)	0.6	0.5	0.5	0.4	0.1
碳酸盐缓冲液(pH10.1) (mL)	各加1.0 mL				
20 mmol/L MgCl ₂ (mL)	各加0.2 mL				
预热	混匀，37°C，5分钟				
酶液 (mL)	测定管各加0.1 mL酶液				
反应时间	37°C，精确反应10分钟				
0.1mol/L NaOH (mL)	各加2 mL				
酶液 (mL)	空白管各补加0.1 mL酶液				
OD ₄₀₅					

分别以01-05调零点，测定对应样品管OD₄₀₅。

(三) 数据处理

各管在722分光光度计测定波长405nm的OD值(OD_{405nm})。从对硝基苯酚标准曲线上查出 OD_{405nm} 相当于产物对硝基苯酚的含量，或者通过摩尔消光系数 ϵ 换算，计算出各种底物浓度下的初速度 v_0 （单位以 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 表示），取倒数 $1/v$ 填入表内。以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图，求出酶催化pNPP水解的米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_m 。

五、注意事项

1. 每加一种试剂，试管可以移动一格
2. 取液量一定要准确。
3. 反应时间一定要精确。
4. 加酶前后一定要将试剂混匀。
5. 空白对照一定要先加NaOH，后加酶。
6. 测定OD₄₀₅时要以各自的空白调零点。
7. 不要直接把测定完的样品溶液倒掉，而要倒回原试管。
8. 透析后的粗酶按需解冻。
9. 如果测定值太小或者太大超出标准曲线范围，要适当调整加酶的体积或者酶浓度重新进行实验。

六、思考题

- (1) 在米氏常数测定的操作中，对实验结果影响最大的因素有哪些？为什么？
- (2) 为什么空白对照一定要先加NaOH，后加酶？

厦门大学生命科学学院

- 下周实验:
- 实验十三 离子交换柱层析纯化碱性磷酸酶

廈門大學生命科學學院