**实验八 绿豆超氧化物歧化酶的分离纯化**

一、实验目的：

1. 以对绿豆SOD为例，掌握蛋白质粗提的一般方法。

2. 通过盐析法的操作，掌握蛋白质分离纯化的原理和方法。

3．学习凝胶层析的实验原理，掌握凝胶层析脱盐的方法。

4. 掌握考马斯亮兰法测定蛋白质的原理和方法。

5．了解酶活性的测定原理，掌握SOD活性的沉淀方法

二、实验试剂与器材

当年的绿豆种子，50mmol/L pH7.8磷酸盐缓冲液，高速组织捣碎机，冷冻离心机；

硫酸铵；

葡聚糖凝胶G-25，层析柱；

考马斯亮蓝试剂，标准蛋白质溶液，分光光度计；

SOD反应介质，核黄素。

三、实验原理

**SOD的粗提：**就是将破碎细胞中的蛋白质溶解在适当的溶剂（抽提液）中，通过离心分离，可以得到蛋白质的粗提液。本实验所用的材料为浸泡软化的绿豆种子，用匀浆机破碎组织细胞，用pH7.8的磷酸缓冲液为抽提液，绿豆中的SOD可以溶解在此抽提液中，离心可以获得SOD的粗提液。

**SOD的盐析：**球状蛋白质在较低的离子强度范围内，随着离子强度的增加蛋白质的溶解度增大，这种现象叫盐溶。在较高的离子强度范围内，随着离子强度的增加，球状蛋白质的溶解度降低，当离子强度达到足够大时，球状蛋白质便从溶液中完全沉淀，这种现象叫盐析。硫酸铵、硫酸钠、硫酸镁以及氯化钠等中性盐都可以作为蛋白质的沉淀剂，最常用的中性盐是硫酸铵。研究表明，绿豆粗提液中的SOD在35%～65%饱和度的硫酸铵中沉淀量最大。因而首先用35%饱和度的硫酸铵沉淀除去杂蛋白，离心后，对上清液再用65%饱和度硫酸铵沉淀，此沉淀中含有大量的SOD。

**凝胶层析脱盐：**当混合样液加到凝胶柱上，随着洗脱剂而通过凝胶柱时，分子大小不同的物质受到不同的阻滞作用。颗粒接近或大于网眼的分子，不能进人凝胶的网眼中，在重力作用下它们随着洗脱液在凝胶颗粒之间沿较短流程向下流动，受到的阻滞作用小，移动速度快，先出层析柱(此现象叫做被排阻。被排阻的最小分子量称为该规格凝胶的排阻极限)；而颗粒小于网眼的分子可渗入凝胶网眼之中，它们被洗脱时不断地从一个网眼穿到另一个网眼，逐层扩散，阻滞作用大，流程长，移动速度慢，因而后出层析柱。我们用多个试管分别收集洗脱液，就可以将混合物中各组分彼此分离开来。

**蛋白质含量测定：**考马斯亮兰G-250染料，在酸性溶液中与蛋白质结合，使染料的最大吸收峰的位置（λmax），由465nm变为595nm，溶液的颜色也由棕黑色变为兰色。在595nm下测定的吸光度值A595，与蛋白质浓度成正比。

**SOD活性测定：**核黄素在光照下会产生超氧阴离子自由基，产生的超氧阴离子自由基可还原硝基四唑蓝，产生蓝色甲簪（在560nm有吸收峰），而SOD可以清除超氧阴离子自由基，抑制反应的发生，使蓝色变浅。一个酶的活力单位（U）定义为，将硝基四唑蓝的还原蓝色抑制到对照一半（50%）时所需的酶量。

四、实验方法和结果

**SOD的粗提：**

**SOD的盐析：**

**凝胶层析脱盐：**

**蛋白质含量测定：**

**SOD活性测定：**

五、实验讨论分析

1．本实验为什么选用pH7.8的缓冲液来提取SOD。

2．在蛋白质分离纯化时常常选用硫酸铵沉淀的方法，说明原因。

3．凝胶层析分离混合物时，怎样才能得到较好的分离效果。

4．测定蛋白质含量的方法有哪些。

5．填写下表，并说明分离纯化过程中测定酶的比活力、活力回收率和纯化倍数的意义。

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 步骤 | 总体积  （mL） | 总蛋白  (mg) | 总活力  U | 比活力  (U/mg) | 活力回收率  （%） | 纯化倍数 |
| 粗提液 |  |  |  |  | 100 | 1 |
| 硫酸铵沉淀脱盐液 |  |  |  |  |  |  |