**实验八-1 绿豆超氧物歧化酶的粗提**

一、目的：

本实验通过对绿豆中SOD的分离，掌握从细胞中抽提酶的原理和方法。

二、原理

超氧化物歧化酶(superoxidc dismutase，简称SOD，EC 1.15.1.1)是广泛存在于动物、植物和微生物中的金属酶，它的功能是催化超氧阴离子自由基歧化为过氧化氢和氧：



SOD作为一种重要的抗氧化剂，它对于维持生物体内自由基的产生和清除之间的平衡起着重要的作用。在某些病理情况下，自由基产生和清除功能失去了平衡，不论其原因是自由基产生过量，还是不足，或者是机体清除自由基的能力减弱，都会导致疾病的发生或衰老。目前人们已开始研究它在治疗放射病以及抗炎症和抗衰老等方面的临床应用。

SOD在生物体内是一组同工酶，按照SOD活性中心所含的金属离子不同，SOD可分为Cu·Zn-SOD，Mn-SOD和Fe-SOD三种。这三种酶活性部位的金属离子与酶蛋白都在催化反应中起到关键作用，但它们的性质与分子结构有所不同。Fe—SOD和Mn—SOD的一级结构和空间结构很相似，但均不同于Cu·Zn—SOD的结构。Cu·Zn—SOD一般是由两个相同的亚基组成二聚体，每个亚基的相对分子质量约为16000，含一个铜原子及一个锌原子。不同来源的Cu·Zn—SOD的氨基酸序列，无论是来自细菌、真菌、高等植物细胞浆或叶绿体，还是来自高等动物和人的细胞浆，它们的同源性都很高。Mn—SOD在真核生物中多为四聚体，在原核生物中为二聚体，大多数Fe—SOD为二聚体。这两种SOD的许多性质都很相似，每个亚基的相对分子质量一般为23000，每个亚基含有0.5～1.0个Mn或Fe原子。任何生物来源的Fe—SOD和Mn—SOD的一级结构的同源性都很高。

Cu·Zn—SOD存在于动、植物的细胞质和植物的叶绿体以及某些原核生物中；Mn—SOD存在于真核生物的线粒体和许多原核生物中，Fe—SOD则主要在需氧的原核生物中及植物的叶绿体中存在。由于SOD是存在于植物细胞内的蛋白质，因而在从植物中分离提取SOD时需要首先破碎细胞，然后进行抽提，三种SOD都可以得到。所谓抽提就是将破碎细胞中的蛋白质溶解在适当的溶剂中，通过离心分离，可以得到无细胞抽提液。

本实验所用的材料为浸泡萌动的绿豆种子，用高速组织捣碎，用pH7.8的磷酸缓冲液为抽提液，绿豆中的SOD可以在此溶剂中被抽提出来，离心可以获得酶的粗提液。

三 实验材料与器材

1．实验材料：当年的绿豆种子。

2．器材：

高速组织捣碎机；纱布；冰冻离心机；50mL离心管；2个500mL 烧杯。

四、试剂

50mmol/L pH7.8磷酸盐缓冲液。

五、操作方法

1．材料培养

称取100g绿豆，浸于500mL水中，于27℃约24小时，使绿豆胀大一倍左右。

2．细胞的破碎和酶的浸提

将浸泡的绿豆中的水倒掉，加入预冷的0.5L 50mmol/LpH7.6磷酸盐缓冲液用高速组织捣碎机捣碎，在冰箱的冷藏室内浸泡1h。

3．过滤

用4层纱布挤压过滤，滤液置于烧杯中。

4．离心处理

用冷冻离心机离心，在4℃条件下，10000 r／min离心25min。小心倾出上清液即为粗酶提取液。

5．记录粗酶液体积，将酶液保存在－20℃的冰箱中。在实验 中测定其蛋白质的含量和酶的活性。

六、思考题：

1．本实验为什么选用pH7.8的缓冲液来提取SOD?

**[实验](#_Toc95367465)八-2 硫酸铵沉淀法纯化SOD**

一、目的

使学生掌握盐析和透析方法进行蛋白质分离纯化的原理和方法。

二、原理

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。在较高的高子强度范围内，随着离子强度的增加，球状蛋白质的溶解度减少，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。但是，最常用的中性盐是硫酸铵。因为硫酸铵在水中最稳定，溶解度较大。它是最温和的试剂，提纯蛋白质时，即使硫酸铵的浓度高，也不会引起蛋白质的变性。硫酸铵等中性盐是脱水剂，在一定的盐浓度下，能除去蛋白分子表面的水化层，使蛋白质从溶液中沉淀下来，不同蛋白质由于水化层厚度不同，需要用不同浓度的硫酸铵才能分别沉淀。因而，控制硫酸铵的浓度，就可以使所需蛋白质与其它蛋白质分离开来。

通常在实验中硫酸铵浓度不用摩尔浓度而用饱和度表示，这是因为固体硫酸铵加入水中后出现相当大的非线性的体积变化。使摩尔浓度的计算非常麻烦，所以，硫酸铵浓度不用摩尔浓度表示。用饱和度表示硫酸铵浓度，应用起来十分方便。从硫酸铵饱和度计算表中可以查出，一升溶液需要加入的硫酸铵的克数。

研究表明，绿豆粗抽液中的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。

盐析法有下列优点：

1．不需要特殊设备，方法简单，可以大量制备蛋白质；

2．一般分离效果较好，一步可以提纯4倍；

3．可以使蛋白质溶液浓缩，为高分辨力的层析法提供方便。

盐析法缺点是：

1．必须透析除盐，透析时间很长，易使蛋白质变性；

2．分离区间较大，对溶解度接近的两种蛋白质不易分开，即发生共沉现象。

用硫酸铵沉淀蛋白质，如果不除去无机盐，就无法用电泳法，离子交换层析法作进一步分离提纯，也影响酶活力的测定，因此，必须除去无机盐。用透析法、超滤法和分子筛层析的方法可以从蛋白质制剂中除去无机盐。

透析是利用蛋白质大分子不能通过半透膜而小分子杂质能通过半透膜的性质，使蛋白质和小分子杂质分开的方法。常用的半透膜是玻璃纸、火棉胶薄膜等。将待提纯的蛋白质溶液装在半透膜的透析袋里，然后将透析袋放在蒸馏水或低离子强度的缓冲液中，则小分子杂质通过半透膜而被除去，大分子蛋白质则仍留在袋中。为了缩短透析时间，可以经常换水或流水透析。用4%BaCl2溶液检查透析袋外的溶液是否含有硫酸根离子，当液体中无BaSO4白色浑浊出现时，即表明硫酸铵已被除尽，可以结束透析。

（NH4）2 SO4+BaCl2🡪BaSO4↓+2NH4Cl

三 仪器和器材

冰冻离心机；磁力搅拌器；离心管：50mL；烧杯：500mL；透析袋；透析夹；移液管：2mL；吸耳球；试管。

四、试剂

1．50mmol/LpH7.6磷酸盐缓冲液；

2．4%BaCl2

3．硫酸铵。

五、操作方法

1．35%饱和度的硫酸铵沉淀除去杂蛋白

准确计量酶粗提液体积，计算35%硫酸铵饱和度所需的硫酸铵的用量(0℃条件下每100mL溶液中加入固体硫酸铵19.4g)，在磁力搅拌下慢慢加入硫酸铵，以沉淀非SOD的蛋白质，4℃静置20min，10000r／min离心10分钟后取出上清液。

2．65%饱和度硫酸铵沉淀SOD

上清液再加入硫酸铵，使达到65%饱和(0℃条件下每100mL溶液中再加入固体硫酸铵18.4g)，10000r／min离心10分钟后保留含有SOD的沉淀。

3．透析除盐

将沉淀溶于少量缓冲液中(以沉淀刚溶解为度)，装入透析袋中，于4℃条件下透析24小时，除去硫酸铵，透析液为20 mmol/LpH7.6磷酸盐缓冲液。透析后离心10min弃去沉淀。

4．纯化后酶液的处理

计量酶液的体积，保留上清液1mL于冰箱中。其余保存在冰箱中供进一步纯化用。

六、注意事项

加入的硫酸铵一定要全部溶解，透析液最好选用为20 mmol/LpH7.6磷酸盐缓冲液，透析时要在4℃条件下。

七、思考题

1．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。

2．本实验中为什么选用20 mmol/LpH7.6磷酸盐缓冲液作为透析液？

**实验八-3 葡聚糖凝胶层析脱盐**

一、目的

1．学习凝胶层析的工作原理和操作方法。

2．掌握利用葡聚糖凝胶层析进行蛋白质脱盐的技术。

二、原理

凝胶层析又称凝胶过滤或排阻层析。凝胶过滤的主要装置是填充有层析介质的层析柱。

1．凝胶层析介质的特点

凝胶层析介质有多种，目前使用较多的是葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶及其衍生物。尤其葡聚糖凝胶(商品名称Sephadex)是最常用的层析介质。各种凝胶层析介质虽然化学组成和结构不同，但都有如下的特点：遇水为不溶解的固相；是化学惰性物质；离子基团含量少；颗粒大小和网眼均匀；机械强度较强；具有可选择的多种孔径。

葡聚糖凝胶是由一定平均分子量的葡聚糖和交联剂1—氯—2，3—环氧丙烷交联成的具有三维结构不溶于水的高分子化合物。调节葡聚糖和交联剂配比，可以获得网眼大小不同、型号各异的凝胶。葡聚糖分子量越小，交联剂用量越大，则交联度越大，凝胶网眼越小。葡聚糖凝胶（Sephadex）不溶于水，但分子中含有大量的羟基，因而极性很强，易吸水膨胀，其吸水量与交联度成反比。在Sephadex后面缀上G-X作为交联度的标记。交联度越小，吸水量越大，X值越大。实际上X值约为该胶粒吸水量的10倍。例如：Sephadex G-50和G-100，吸水量分别为5mL/g凝胶与10mL／g凝胶。此外交联度大，机械强度大，较能耐受较高压力，易采用高流速；而交联度小的如Sephadex G-150和G-200，则机械强度小，易被压缩，使用时流速需慢些。实验中选用何种型号应根据被分离的混合物分子的大小及工作目的来确定。

2．凝胶层析的分离原理

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。

当我们从生物组织中用盐析法提取蛋白质后，为了进一步分离纯化的需要，常常需要进行蛋白质的脱盐工作。可采用层析介质为葡聚糖凝胶G—25(或G—15、G—50)，用适当的洗脱剂进行洗脱，经凝胶层析，就可以将大分子蛋白质与小分子盐类分离。

三、实验材料及设备

1，材料：硫酸铵沉降法得到的SOD溶液。

2．器材：层析柱：1.0cm×25cm(内径×柱高)；烧杯：250mL×l,50mL×1；滴定台架、螺丝夹：各1；离心管：5mL×l；刻度试管：10mL×20；滴管：2；移液管：lmL×l；玻棒：1。

四、试剂的配制

1．BaCl2溶液(4%)

2．考马斯亮蓝G-250

称取0.1g考马斯亮蓝G-250，先溶于50mL 95%乙醇中，再加入85%的磷酸100mL，最后用蒸馏水定容至1000mL。

3．脲(6mol／L)

4．洗脱剂：1%NaCl溶液。

五、操作步骤

1．葡聚糖凝胶G-50(或G-15、G-25)的处理

将4g葡聚糖凝胶G—25放置烧杯中，加过量蒸馏水于沸水浴中溶胀2h或在室温下溶胀6h以上。除去上层漂浮的细碎凝胶，重复3～4次。操作中避免剧烈搅拌，防止破坏其交联结构。

2．层析柱的准备

(1)清洗：每组取一支层析柱，清洗干净。

(2)装柱：取层析柱，垂直固定于铁架台上，在下口连接带有滴嘴的乳胶管。层析柱中注入洗脱液（要防止下端出口窝藏气泡），夹上螺旋止水夹。

将溶胀的凝胶沉淀与水的体积之比调整为约为2：l。轻轻搅匀杯中凝胶，用玻璃棒引流入柱，打开出水口，并不断地向柱内补充凝胶，直到凝胶沉淀高度约柱高的2/3为止，凝胶柱内若有气泡和断层或柱床表面干裂和歪斜，都将影响分离效果。必要时，需倒出凝胶，重新装柱。

3．平衡

取15mL洗脱剂，用滴管沿柱内壁旋转着缓缓流下，不可冲动胶平面，打开出水口，经洗脱液的流动，一方面清洗内壁，另一方面使胶床收紧。洗脱平衡完毕，胶床上方保留约3－4cm高水位。关闭出水口。此时，胶床高度≥15cm为宜。

4．准备收集管

取21只干净的刻度试管，1～7编号，排成三排，第一排准备收集洗脱液，每管收集2mL。

5．上样与收集

打开出口排水，当胶床与上方水层的弯月面相切时，关闭出口，用移液枪将0.5mL盐析样品溶液沿柱内壁缓缓加入，勿冲动胶面。上样完毕，打开出水口。当样液进入胶床，其弯月面与胶平面相切时，暂停排液，用滴管将洗脱剂沿柱内壁旋转着加入lcm高水位，然后排液至其弯月面与胶平面相切，再缓缓注入3－4cm高的洗脱剂。开始收集1号管。每管收集洗脱液2mL。

6．洗脱

不断向柱内加洗脱剂，保持胶床上水位3－4cm。出口流速控制在每6秒1滴，直至收集到7号管达2mL时，关闭出口。

7．蛋白质的鉴定

分别从每管2mL的收集液中取0.4mL于对应的后两排试管中，一支管中加2滴BaCl2，根据白色沉淀多少，判断SO42-在各管中的浓度。另一支管加lmL考马斯亮蓝G—250试剂，根据蓝色情况，判断蛋白质在各管中的浓度。

如果鉴定的第7号管中，仍有样品(蛋白质或SO42-)，表明洗脱和收集未完，需增加试管继续洗脱与收集，同上法鉴定其蛋白质和盐浓度情况。

8．凝胶再生

鉴定完毕，打开出水口，继续用2—3倍床体积洗脱剂洗脱，洗脱后关闭出口。以备下次使用。

长时间不同或者用的次数过多，凝胶床体积变小，流速降低，凝胶污染杂质过多，甚至变色，则需要对凝胶进行再生处理，即把凝胶倒出，用6mol／L脲浸泡凝胶0.5h，抽滤，再用水漂洗数次，加入几滴氯仿，摇匀存放在冰箱的冷藏室内保存。

六、结果处理

1．绘制洗脱曲线

根据实验结果，在同一坐标系中，以收集的管号为横坐标，颜色深浅程度为纵坐标，绘制样品洗脱曲线。

2．根据洗脱曲线分析分离效果。

七、思考题

1．利用凝胶层析分离混合物时，应该怎样选择凝胶的类型？

2．凝胶层析分离混合物时，怎样才能得到较好的分离效果?

**实验八-4 考马斯亮兰法（Bradford法）测定蛋白质含量**

一、目的要求

掌握考马斯亮兰法测定蛋白质的原理和方法。

二、实验原理

1976年由Bradford建立的考马斯亮兰法（Bradford法），是根据蛋白质与染料相结合的原理设计的。这种蛋白质测定法具有超过其他几种方法的突出优点，因而正在得到广泛的应用。这一方法是目前灵敏度最高的蛋白质测定法。

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。经研究认为，染料主要是与蛋白质中的碱性氨基酸（特别是精氨酸）和芳香族氨基酸残基相结合。在595nm下测定的吸光度值A595，与蛋白质浓度成正比。

Bradford法的突出优点是：

（1）灵敏度高，据估计比Lowry法约高四倍，其最低蛋白质检测量可达1μg。

（2）测定快速、简便，只需加一种试剂。完成一个样品的测定，只需要5分钟左右。由于染料与蛋白质结合的过程，大约只要2分钟即可完成，其颜色可以在1小时内保持稳定，且在5分钟至20分钟之间，颜色的稳定性最好。因而完全不用像Lowry法那样费时和严格地控制时间。

（3）干扰物质少。如干扰Lowry法的K+、Na+、Mg2+离子、Tris缓冲液、糖和蔗糖、甘油、巯基乙醇、EDTA等均不干扰此测定法。

此法的缺点是：

（1）由于各种蛋白质中的精氨酸和芳香族氨基酸的含量不同，因此Bradford法用于不同蛋白质测定时有较大的偏差，在制作 标准曲线时通常选用 γ—球蛋白为标准蛋白质，以减少这方面的偏差。

（2）仍有一些物质干扰此法的测定，主要的干扰物质有：去污剂、 Triton X-100、十二烷基硫酸钠（SDS）和0.1N的NaOH。（如同0.1N的酸干扰Lowary法一样）。

（3）标准曲线也有轻微的非线性，因而不能用Beer定律进行计算，而只能用标准曲线来测定未知蛋白质的浓度。

三、实验器材

可见光分光光度计、旋涡混合器、试管10支

四、试剂

1．标准蛋白质溶液：可用牛血清清蛋白预先经微量凯氏定氮法测定蛋白氮含量，根据其纯度配制成lmg

2．蛋白试剂的配制：称取100mg考马斯亮蓝G-250溶于50mL95%乙醇，加入100mL85%（W／v）磷酸，将溶液用水稀释到1000mL。试剂的终浓度为0.01%考马斯亮蓝G-250，4.7%（W／V）乙醇，和8.5%（w／V）磷酸。

五、操作方法

1．标准曲线和样品的测定：取9支试管，1支作空白，3支留作未知样品，按下表分别加入样品、水和试剂，最后各试管中分别加入4.0mL考马斯亮兰G—250试剂，每加完一管，立即在旋涡混合器上混合（注意不要太剧烈，以免产生大量气泡而难于消除）。

2．比色：加完试剂2~5分钟后，即可开始用比色皿，在分光光度计上测定各样品在595nm处的光吸收值A595，空白对照为第1号试管。

表1　蛋白质标准曲线和样品蛋白质含量的测定

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 管号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 100μg/mL标准蛋白质溶液（mL）  蒸馏水（mL）  样液（mL）  蛋白质含量（μg）  加入蛋白试剂（mL）  光吸收值（A595） | 0  1.0  0  4 | 0.2  0.8  20  4 | 0.4  0.6  40  4 | 0.6  0.4  60  4 | 0.8  0.2  80  4 | 1.0  0  100  4 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |

六、数据处理和分析

1．标准曲线的制作

用不同浓度的蛋白质溶液作标准曲线，以蛋白浓度为横坐标，光吸收值为纵坐标，绘制标准曲线作为定量的依据。

2．蛋白质含量的确定

记录各样品的光吸收值，在标准曲线上查得对应的蛋白质的含量，计算出各提取阶段所得液体中蛋白质的总含量。

七、注意事项

不可使用石英比色皿（因不易洗去染色），可用塑料或玻璃比色皿，使用后立即用少量95%的乙醇荡洗，以洗去染色。

八、思考题

1．比较各种测定蛋白质含量方法的优缺点。

2．为了更准确测定样品蛋白质的含量，在确定测定方法时应该注意哪些问题？

[实验](#_Toc95367465)**八-5 SOD活性的测定**

一、实验目的：

1．了解SOD活性的测定方法。

2．掌握在酶的提取及纯化过程中计算酶的比活力、活力回收率、纯化倍数的方法及意义。

二、实验原理：

SOD活力的测定方法有很多种，其中以化学法应用最为普遍。化学测定法包括两个方面：一是产生超氧自由基，如黄瞟吟氧化酶起作用时会产生氧自由基，肾上腺素自氧化、邻苯三酚和连苯三酚在碱性条件下自氧化都能产生氧自由基；二是对氧自由基的检测，多数是利用反应液中能与氧自由基起作用，并易于被检测的指示物质的浓度变化来测定SOD活性。常用的测定方法有：黄瞟吟-黄瞟吟氧化酶-细胞色素C法；氮蓝四唑-核黄素法和邻苯三酚法、连苯三酚法。本实验采用氮蓝四唑-核黄素法。

本实验利用氮蓝四唑-核黄素法方法测定SOD的活性。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会使硝基四唑蓝还原，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。一个酶的活力单位定义为将硝基四唑蓝的还原抑制到对照一半（50%）时所需的酶量。根据测定的SOD的活力，来计算酶纯化过程中不同处理步骤获得的酶的比活力、活力回收率和纯化倍数，考核各步处理的综合效果。酶的比活力是指每毫克酶蛋白所含有的酶活力单位数，它是酶制剂纯度的一个指标。酶的回收率是指纯化过程中酶活力的收率，它是提纯后与提纯前酶的总活力的比值。纯化倍数是提纯后与提纯前酶比活力的比值。

三、实验器材

723型分光光度计；移液管；吸耳球；试管

四、实验试剂

1．标准蛋白质溶液：可用牛血清清蛋白预先经微量凯氏定氮法测定蛋白氮含量，根据其纯度配制成lmg／mL的溶液。

2．蛋白试剂的配制：称取100mg考马斯亮蓝G-250溶于50mL95%乙醇，加入100mL85%（W／v）磷酸，将溶液用水稀释到1000mL。试剂的终浓度为0.01%考马斯亮蓝G-250，4.7%（W／V）乙醇，和8.5%（w／V）磷酸。

3．50mmol/LpH7.8磷酸盐缓冲液

4．反应介质：用50mmol/LpH7.8磷酸盐缓冲液配制（内含77.６μmol/L硝基四唑蓝，0.３μmol/LEDTA，13.45mmol/L蛋氨酸）

5．核黄素：用50mmol/LpH7.8磷酸盐缓冲液平配制(内含20μmol/L核黄素)

五、实验步骤

1．超氧化物歧化酶活力的测定

（1）酶液：来自实验31－35保存的样液，用50mmol/LpH7.8磷酸盐缓冲液进行适当（如下要求）的稀释。

（2）SOD活性测定：取7支试管，按下表加入试剂，将对照管用黑纸包裹，然后一起放到光照下，光强3000 lx，照光时间15min，反应后以黑纸包裹的管为对照，测定各管在560nm的吸光度。

表1 SOD活性测定

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 管号 | 对照  （黑纸包裹） | 对照  (A0) | 样1 | 样2 | 样3 | 样4 | 样5 |
| 反应介质（mL）  酶提取液（mL）  核黄素（mL）  50mmol/LpH7.8 PBS  光吸收值（A560） | 2.9  0.3  0.1 | 2.9  0.3  0.1 | 2.9  0.1  0.3 | 2.9  0.1  0.3 | 2.9  0.1  0.3 | 2.9  0.1  0.3 | 2.9  0.1  0.3 |

各样品中酶液用量以抑制反应在30%－70%为宜。

2．蛋白质含量的测定

（1）蛋白质标准曲线的制作：按下列表配制溶液，配制好的各溶液，充分振荡混合，3分钟后以0号管为对照，在595nm处测定吸光度。

表2 蛋白质溶液标准曲线的测定

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 管号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 100μg/mL标准蛋白质溶液（mL）  蒸馏水（mL）  蛋白质含量（μg）  加入蛋白试剂（mL）  光吸收值（A595） | 0  1.0  0  4 | 0.2  0.8  20  4 | 0.4  0.6  40  4 | 0.6  0.4  60  4 | 0.8  0.2  80  4 | 1.0  0  10  40 |

（2）蛋白质含量的测定

取含10～100ug/mL蛋白质溶液1mL于小试管中，然后加入4mL蛋白试剂，充分振荡混合，2分钟后于595nm测定光吸收值。以1mL蒸馏水及4mL蛋白试剂作为空白对照。

表3 蛋白质含量的测定

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 管号 | 对照 | 样1 | 样2 | 样3 | 样4 | 样5 |
| 样液（mL）  蒸馏水（mL）  蛋白质（μg）  加入蛋白试剂（mL）  光吸收值（A595） | 0  1.0  0  4 | 10~100  4 | 10~100  4 | 10~100  4 | 10~100  4 | 10~100  40 |

六、数据处理

1．计算SOD分离纯化过程中各步处理获得的酶液的酶的总活力

SOD活性的计算按下列公式计算。

ΔA：A0管的吸光度－各样品的吸光度；

V：酶液总体积；

A0：A0管的吸光度；

0.1：加入酶液的体积；

利用上述公式计算各步纯化过程获得的酶的总活力。

2．蛋白质标准曲线的制作

以蛋白浓度为横坐标，光吸收值为纵坐标，绘制标准曲线作为定量的依据。

3．计算SOD分离纯化过程中各步处理获得的样液中蛋白质的总的含量

根据各样品的光吸收值，在标准曲线上查得对应的蛋白质的含量，根据测定过程中样液的用量及各步所得的总的体积计算出各提取阶段所得液体中蛋白质的总含量。

4．计算SOD分离纯化过程中各步处理获得的酶的比活力：

5．酶的回收率：指纯化过程中酶活力的收率。提纯后与提纯前酶的总活力的比值。



6．纯化倍数：指提纯后与提纯前酶比活力的比值。



七、SOD分离纯化各步处理的结果及分析

将分离纯化过程中每步测得的数据及计算结果填入下表，并进行分析。

表4 SOD纯化各步结果

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 |  |  |  |  |  |  |
| 丙酮沉淀 |  |  |  |  |  |  |
| DEAE纤维素离子交换层析 |  |  |  |  |  |  |

八、思考题

1．为什么在酶的分离纯化过程中，要测定各步处理的比活力，活力回收率和纯化倍数？

2．根据本实验的结果，请评价硫酸铵沉淀、丙酮沉淀和DEAE纤维素离子交换层析各步处理的效果。