**实验十三 激活剂和抑制剂对酶活性的影响**

一、目的和要求

1．了解激活剂和抑制剂对酶活性的影响。

2．学习鉴定激活剂和抑制剂影响酶活性的原理和方法。

二、实验原理

在酶促反应过程中，酶的活性常常受某些物质的影响，有些物质能使酶的活力增加，称为酶的激活剂；有些物质它们并不引起酶蛋白变性，但能使酶分子上的某些必需基团发生变化，使酶的活性降低，称这些物质为酶的抑制剂。如Cl**－**是唾液淀粉酶的激活剂，而Cu2+则是它的抑制剂。

酶的激活剂种类很多，其中主要是一些简单的无机离子，如Na+、K+、Ca2+、Mg2+、Zn2+、等阳离子和Cl**－**、Br**－**、I**－**、PO43**－**、NO3**－**等阴离子；其次一些中等大小的有机分子，如抗坏血酸、半胱氨酸、谷胱苷肽等是某些含巯基的酶的激活剂；能除去抑制剂的物质也称为激活剂，如EDTA能除去重金属，因而能解除重金属对酶的抑制作用。

酶的抑制剂有许多种，如重金属离子(Ag＋、Hg2+、Pb2＋、Cu2＋等)、砷化物、氟化物、生物碱、有机磷农药等都是抑制剂。

激活剂和抑制剂影响酶活性常具有特异性，如Mg2+对脱羧酶、烯醇化酶等有提高活力的作用，而对肌球蛋白ATP酶则有降低活力的作用。激活剂和抑制剂影响酶活性的剂量是很少的，并且同一种酶可因激活剂的浓度不同而作用不同，如CI**－**在低浓度时为唾液淀粉酶的激活剂，而在高浓度时（达到1／3饱和度）就可抑制唾液淀粉酶的活性。

在本实验中，以稀释的唾液作为淀粉酶液。唾液内的淀粉酶可将淀粉逐步水解为不同阶段的产物，它们遇碘呈不同的颜色，以此来定性研究激活剂和抑制剂对淀粉酶活性的作用。直链淀粉(即可溶性淀粉)不同水解阶段的产物与碘反应的颜色如下：

不同水解的产物：淀粉→ 紫色糊精→红色糊精→麦芽糖及少量葡萄糖

与碘的颜色： 呈蓝色→呈紫色→ 呈红色→ 不显色

三、试剂与器材

试剂：

1．0.1%淀粉溶液 、l%NaCI溶液 、1%CuSO4溶液 、1%Na2SO4溶液

2．KI-I2溶液：称取碘化钾3g及碘1g溶于100mL蒸馏水中。

3．0.2mol/L pH6.6、4.0、9.0的磷酸缓冲液

4．新鲜唾液

器材：

试管，移液管，试管架，漏斗，脱脂棉花，100mL容量瓶，恒温水浴箱，4℃冰箱。

四、操作步骤

1．唾液淀粉酶液的制备：取唾液lmL放人100mL容量瓶中，用蒸馏水稀释至100mL，用脱脂棉花过滤至150mL三角瓶，备用。唾液稀释倍数因人而异，可稀释50～400倍，甚至更高。

2．激活剂和抑制剂对唾液淀粉酶活性的影响

取试管4支，按下表操作。

表1激活剂和抑制剂对唾液淀粉酶活性的影响

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 操作 | 试管号 | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| pH6.6缓冲液(mL) | 各2mL | | | |
| 0.1%淀粉溶液(mL) | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 1%CuSO4溶液(mL) | 1 |  |  |  |
| 1%NaCl溶液(mL) |  | 1 |  |  |
| 1%Na2SO4溶液(mL) |  |  | 1 |  |
| 蒸馏水(mL) |  |  |  | 1 |
| 唾液淀粉酶(mL) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **迅速混匀**，室温放置5-15min（唾液淀粉酶个体差异很大） | | | | |
| KI-I2溶液(滴) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 记录颜色变化 |  |  |  |  |

五、实验结果

六、讨论

**注意事项：**如1，2，3，4管呈色反应无明显差别，可能是唾液淀粉酶活力太高或太低，若酶活力太高可将酶稀释后重做；若酶活力太低，可延长保温时间或增加酶的浓度。

**思考题：**本实验中，为什么要设计第3管?

如果时间允许，可以选做下列实验

表2温度对唾液淀粉酶活性的影响

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 操作 | 试管号 | | | |
| 1 | 2 | 3 |  |
| pH6.6缓冲液(mL) | 各2mL | | | |
| 0.1%淀粉溶液(mL) | 3 | 3 | 3 |  |
| 蒸馏水(mL) | 1 | 1 | 1 |  |
| 恒温放置20min | 4℃ | 室温 | 37℃ |  |
| 唾液淀粉酶(mL) | 1 | 1 | 1 |  |
| 迅速混匀，在各自的温度保温（根据之前的实验确定合适的反应时间） | | | | |
| KI-I2溶液(滴) | 1 | 1 | 1 |  |
| 记录颜色变化 |  |  |  |  |

表3 pH对唾液淀粉酶活性的影响

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 操作 | 试管号 | | | |
| 1 | 2 | 3 |  |
| pH4.0缓冲液(mL) | 2 |  |  |  |
| pH6.6缓冲液(mL) |  | 2 |  |  |
| pH9.0缓冲液(mL) |  |  | 2 |  |
| 0.1%淀粉溶液(mL) | 3 | 3 | 3 |  |
| 蒸馏水(mL) | 1 | 1 | 1 |  |
| 唾液淀粉酶(mL) | 1 | 1 | 1 |  |
| 迅速混匀，室温放置（根据之前的实验确定合适的反应时间） | | | | |
| KI-I2溶液(滴) | 1 | 1 | 1 |  |
| 记录颜色变化 |  |  |  |  |