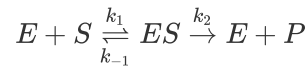


第二次作业

请推导米氏方程，并设计一个实验求某种食物中的某种酶的活性（例如土豆中的酪氨酸酶的活性如何测定）？

米氏方程的推导：

首先我们建立酶与底物结合并发生作用的模型，其中第一步为可逆反应，表明酶与底物的结合是可逆的；第二步为不可逆反应，表明酶-底物复合物一旦发生催化反应，并生成酶和产物，就不可能反方向生成酶-底物复合物：



对以上过程采用稳态假设，即酶-底物复合物的浓度变化速率为0（这是因为相较于第一步，第二步为快反应，导致酶-底物复合物一旦生成便马上消耗，从而 $[ES]$ 几乎无变化），则有

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0, \text{ 因此 } [ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2}, \text{ 又设酶的初始浓度为 } [E]_0, \text{ 则有}$$

$$[E]_0 = [E] + [ES], \text{ 代入原式得 } [ES] = \frac{k_1[S]}{k_{-1} + k_2}([E]_0 - [ES]), \text{ 从而有}$$

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} = \frac{[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}, \text{ 相应的, 酶促反应的速率为 } v_0 = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

，该式即为米氏方程，其中 $v_{max} = k_2[E]_0$ ，代表底物浓度很高时反应能达到的最大速率，

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}, \text{ 即米氏常数。}$$

设计食物中某种酶活性的测定实验：

以测定土豆中酪氨酸酶的活性为例，其原理为：酪氨酸酶能催化单酚类物质生成邻苯二酚类物质(单酚酶活性)，并进一步转化成具有颜色的邻苯醌类物质(二酚酶活性)，该物质对特定波长的光具有特异性吸收，因此可以用紫外可见光谱仪测定溶液吸光度随时间的变化，从而测定出酪氨酸酶存在下的反应速率，进而测定出酪氨酸酶的活性。

因此，可设计如下步骤：

(1) 酪氨酸酶的提取：取适量去皮切碎土豆，加入pH约为6.0的磷酸缓冲溶液，用组织捣碎机捣成匀浆，然后将匀浆在离心机中离心，吸取上清液保存于冰箱中。

(2) 底物的配制：假设我们在pH=6.0的条件下测定酪氨酸酶的活性，则取适量邻苯二酚类物质（如邻苯二酚、多巴），用pH约为6.0的磷酸缓冲溶液溶解并定容，得到0.010 mol/L的底物溶液。

(3) 吸收峰的标定：取1.4 mL已稀释过的马铃薯提取液，加2.6 mL pH值为6.0的缓冲液；加2 mL底物溶液，摇匀。反应约10 min后，取适量混合液于1 cm比色池中，在扫描分光光度计上进行重复扫描，即可获得生成物的吸收光谱(可从混合开始以时间间隔为1 min进行连续扫描，即可观察到吸光度随时间增加的现象)，根据吸收光谱，可获得 λ_{max} 。

(4) 测定不同底物浓度下吸光度随时间的变化：取0.1 mL稀释过的提取液于10 mL比色管中，加入2.9 mL pH值为6.0的磷酸缓冲溶液，再加入2.0 mL 0.010 mol/L底物溶液，同时开始计时，用分光光度计在 λ_{max} 处测定吸光度。开始6 min内每分钟（或每半分钟）读1个数，以后隔2 min读1个数，直至吸光度变化不大为止。再取0.2、0.3、0.4 mL已稀释过的提取液作平行试验。

(5) 酶活性的计算：在底物和生成物浓度不大的情况下，溶液吸光度满足朗伯-比尔定律，即 $A \propto c$ ；又当底物大大过量时，酶全部饱和，因此对底物而言为零级反应，对酶而言为一级反应；取吸光度随时间变化为直线的部分做拟合直线，求出相应的反应初速度，进而求出酶活性。

Reference

- [1] Wang, N. *J. Anhui Agri. Sci.* **2009**, 37(19), 8821.
王宁芳. 安徽农业科学. **2009**, 37(19), 8821.
- [2] Li, H.; Lv, H.; Dong, J. *Chin. J. Spec. Lab.* **2008**, 25(6), 1040.
李好样, 吕海燕, 董金龙. 光谱实验室. **2008**, 25(6), 1040.