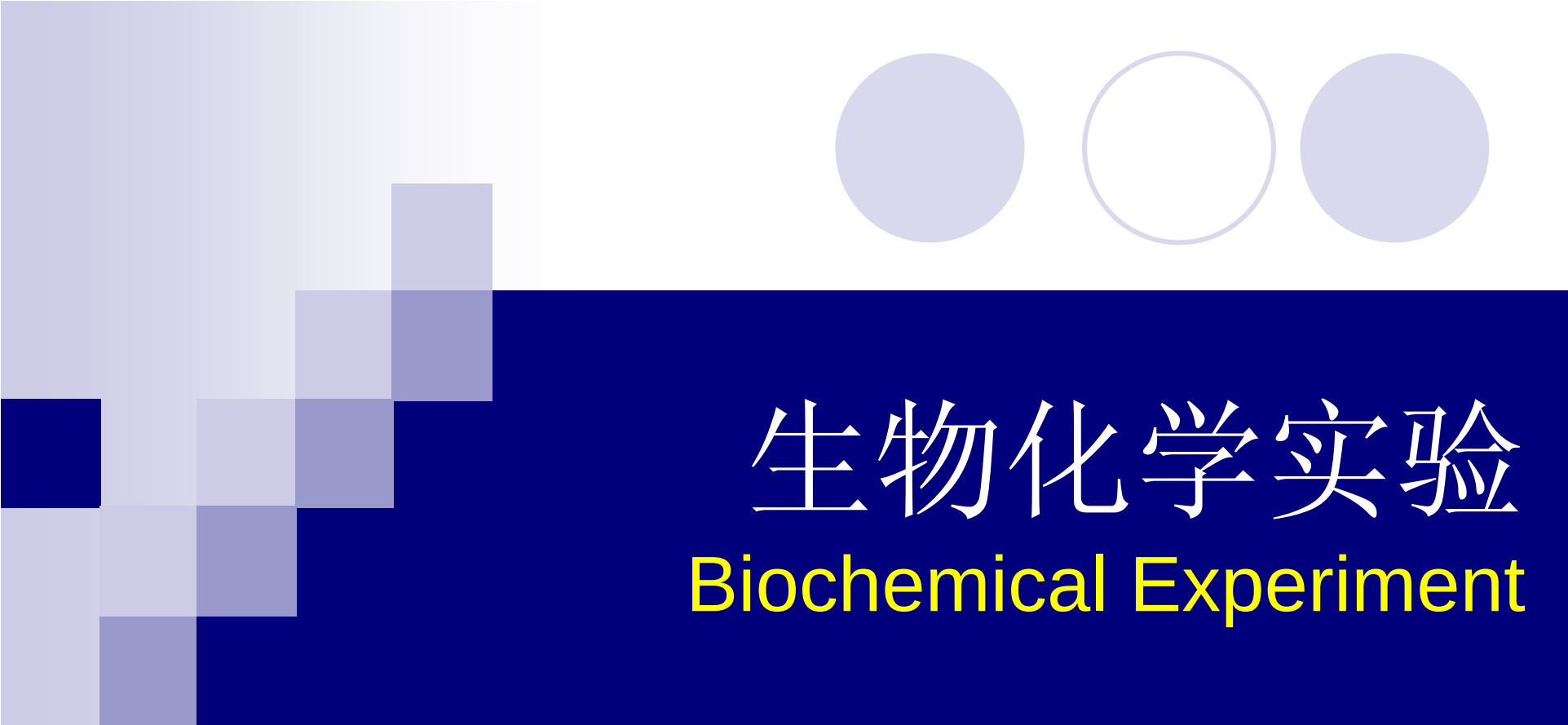




生物化学实验

Biochemical Experiment

胰蛋白酶米氏常数
(K_m) 的测定
——甲醛滴定法



目的要求

- 掌握用滴定法测胰蛋白酶的米氏常数
- 掌握双倒数作图法计算 K_m 和 V_{max}

原理

- 本实验以胰蛋白酶消化酪蛋白为例，采用双倒数作图法测定 K_m 值。
- 胰蛋白酶是胰液中的一个酶，它催化蛋白质中碱性氨基酸（L-精氨酸和L-赖氨酸）的羧基所形成的肽键水解。水解时生成自由氨基。
- 常温下，甲醛能迅速与氨基酸上的氨基结合，形成羟甲基衍生物，使 N^+H_3 上的 H^+ 游离出来，使溶液的酸度增加，这样就可以用碱滴定 N^+H_3 放出 H^+ ，滴定终点在酚酞的变色域内（pH9.0左右）。因此，可用酚酞作指示剂，用标准氢氧化钠溶液滴定。

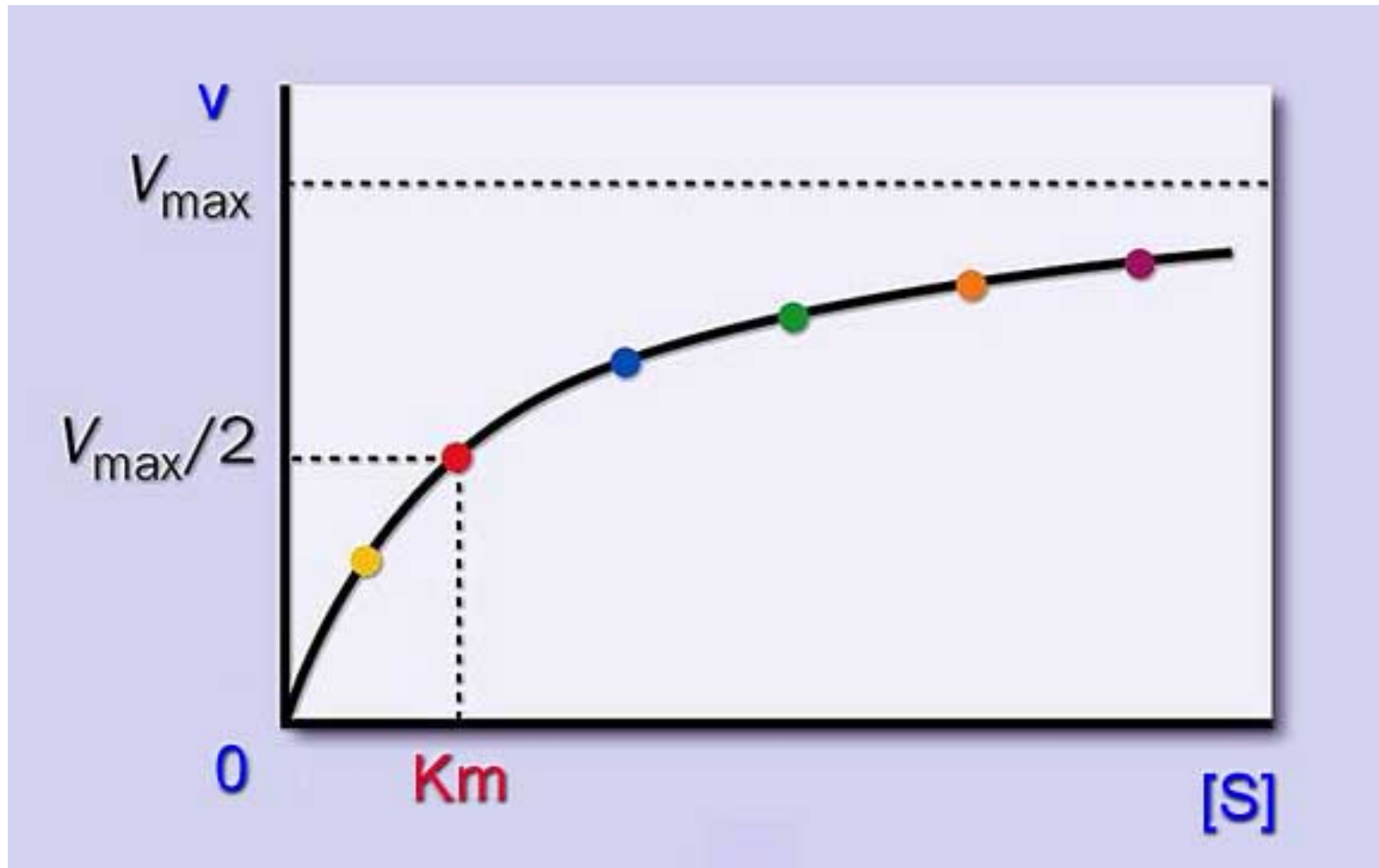
米氏方程

- 1913年，德国化学家Michaelis和Menten根据中间产物学说对酶促反映的动力学进行研究，推导出了表示整个反应中底物浓度和反应速度关系的著名公式，称为米氏方程。
- **K_m**: 是酶的特征常数之一，只与酶的性质有关，不同的酶其K_m值不同。K_m值表示酶与底物之间的亲和程度：K_m值大表示亲和程度小，酶的催化活性低。它等于酶促反应达到最大反应速度一半时所对应的底物浓度。

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

米氏方程

米氏方程中常数的意义



1.理论上，只要连续测定出对应底物的化学反应速度，并增加底物的浓度使反应到达最大速度，通过作图就可以测定出 K_m

① 但事实上要得到 V_{max} ，需要很大的底物浓度，即使将底物浓度增加到很大，也只能趋近于 V_{max} ，而导致 K_m 不精确……

② 那怎么办呢？变换米氏方程！

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

2.双倒数作图法

① 两侧取倒数

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} \cdot [S]}$$

② 变换

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{max} \cdot [S]}$$

③ 得 $y = ax + b$ 直线方程

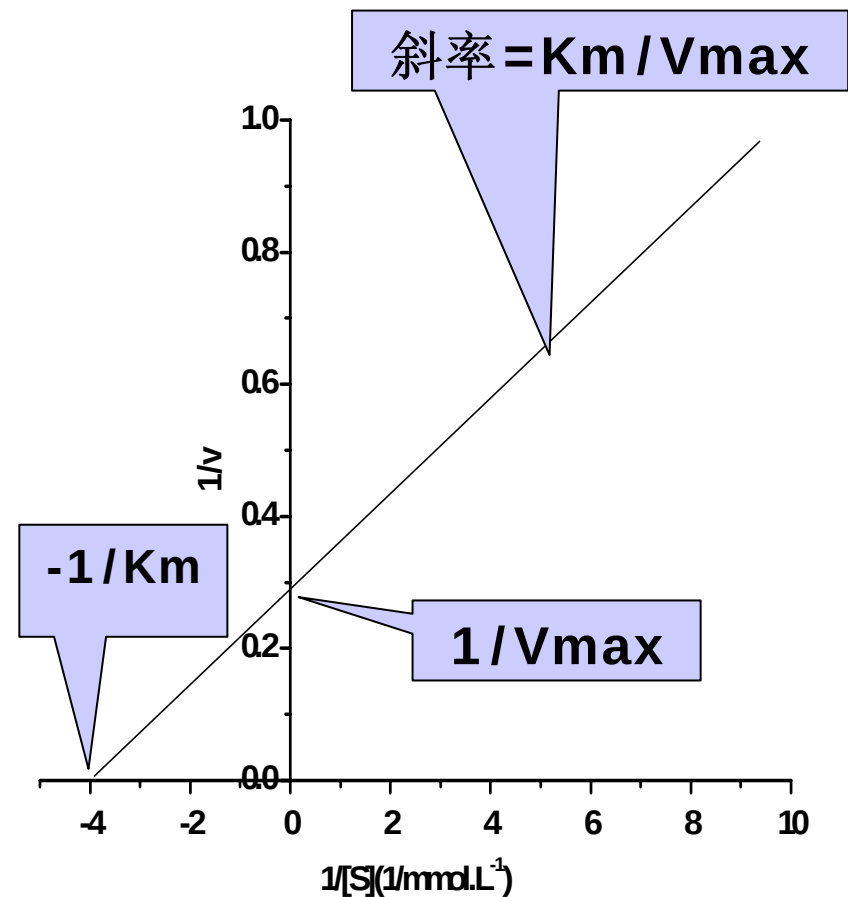
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

➤ 米氏常数 K_m 的测定:

测定 K_m 和 V 的方法很多, 最常用的是Lineweaver-Burk的作图法 — 双倒数作图法。

取米氏方程式的倒数形式:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$





实验器材

- 1、37℃恒温水浴
- 2、量筒
- 3、三角瓶
- 4、碱式滴定管（注意：排尽管内气泡）
- 5、试管

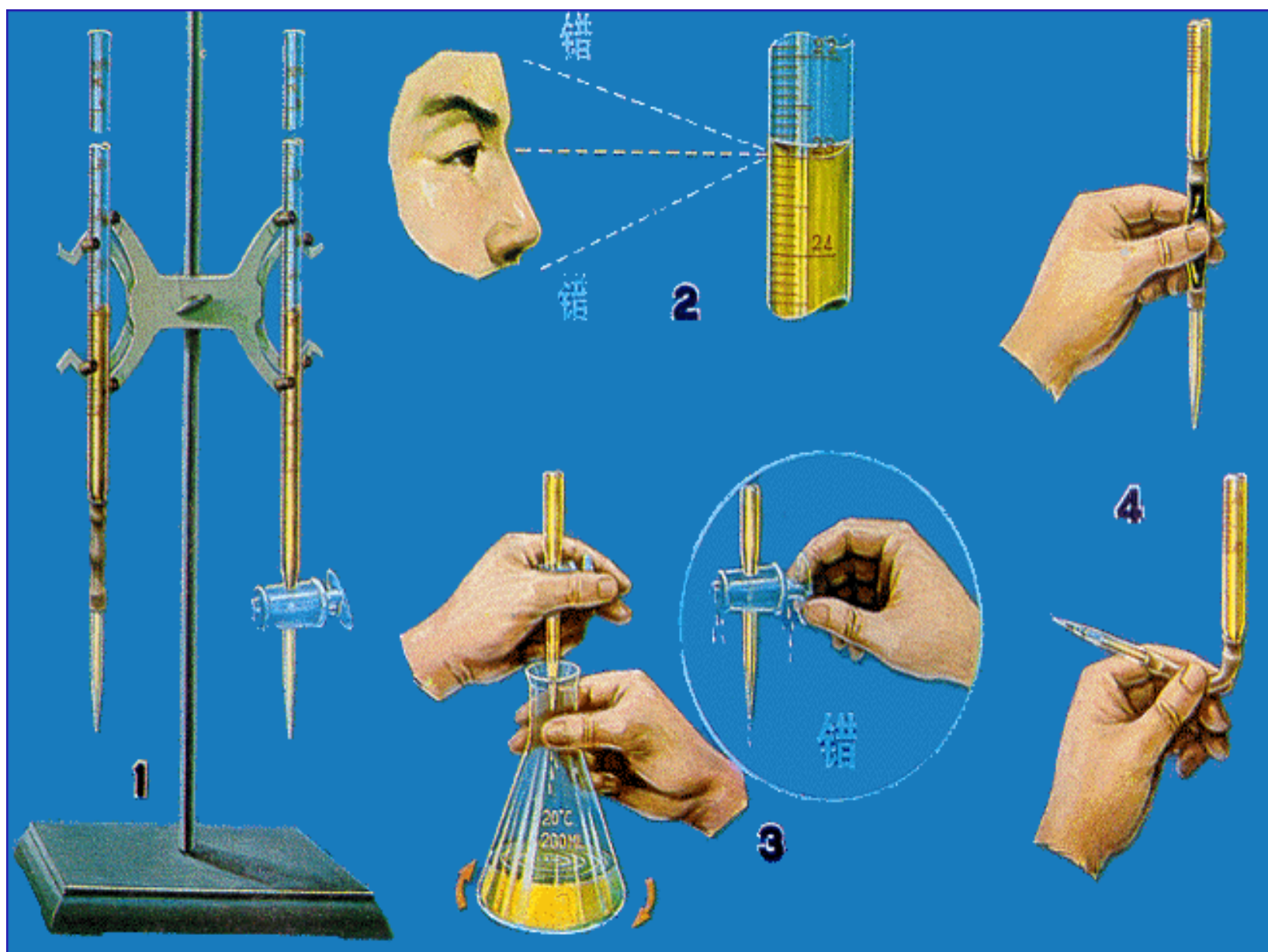
试剂

1. 5% 酪蛋白溶液 (pH8.5)
2. 4%胰蛋白酶溶液
3. 甲醛溶液 (自己稀释)
4. 酚酞
5. 0.1N NaOH (自己稀释)

操作

- 1、用配好的5%的酪蛋白原液配制7个浓度的酪蛋白
- 2、4%胰蛋白酶及酪蛋白37℃保温10min
- 3、取7个三角瓶，每个三角瓶加入甲醛5ml及酚酞10滴
- 4、酪蛋白试管1反应：加1ml胰蛋白酶混匀，反应5分钟，将反应液转入三角瓶中，用0.1N的NaOH滴定，直到获得稳定的粉红色为止。
试管2-7反应同上，计算NaOH量
- 5、以NaOH消耗的毫升数代表在每种底物浓度下的V，以1/V对1/[S]作图，求出胰蛋白酶的米氏常数 K_m 和最大速度 V_{max}

滴定管的使用



1. 滴定管架上的滴定管(左、碱式 右、酸式)。2. 观看管内液面的位置: 视线跟管内液体的凹液面的最低处保持水平。3. 酸式滴定管的使用: 右手拿住锥形瓶颈, 向同一方向转动。左手旋开(或关闭)活塞, 使滴定液逐滴加入。4. 碱式滴定管的使用: 左手捏挤玻璃球处的橡皮管, 使液体逐滴下降。如果管内有气泡, 要先赶走气泡。



注意事项

- 1、甲醛要稀释
- 2、酶促反应的时间要精确控制
- 3、滴定过程中要不断晃动锥形瓶
- 4、滴定终点的判断：30s内不褪色可视为稳定。