

多酚氧化酶的制备和性质研究



一、实验目的

学习从组织细胞中制备酶的方法，掌握多酚氧化酶的作用和化学性质

二、原理

多酚氧化酶是一种含铜的酶，最适pH为6~7，它催化的氧化还原反应可以通过溶液颜色的变化来鉴定。它的最适底物是邻苯二酚，间苯二酚和对苯二酚与邻苯二酚的结构相似，也可以被氧化成各种有色的物质。

许多因素都影响酶的催化活性，如温度、pH、底物浓度、酶浓度等。要测定这些因素对于酶反应的影响，一般是测定不同条件下酶的反应速度。

三、试剂

0.01M邻苯二酚溶液

柠檬酸缓冲液 (pH 4.8, 0.05M)

饱和硫酸铵溶液

四、操作方法

(一) 酶抽提物制备

- 1、取土豆匀浆液15ml，加入等体积的饱和硫酸铵溶液，混合后4℃放置30分钟
- 2、6000转/分离心20分钟（注意离心前配平），倒掉上清。
- 3、将沉淀物用约8ml柠檬酸缓冲液溶解，即得到酶粗制品。

(二) 多酚氧化酶的作用

1、取三支干净的试管编号为1、2、3。

2、按下面要求制备各管

管1：加15滴酶抽提液和15滴0.01M邻苯二酚

管2：加15滴酶抽提液和15滴水，混合均匀

管3：加15滴0.01M的邻苯二酚，15滴水，混合均匀

3、将三支试管放于37℃水浴上。

4、每隔5分钟震荡试管并观察每管中溶液颜色的变化并记录。

什么是生物大分子？

- 生物大分子：
 - 蛋白质、核酸、脂类、糖类。
- 特点：
 1. 生物活性和在新陈代谢中的作用；
 2. 由简单的结构组合而成

生物大分子的制备

- 蛋白质、酶和核酸等生物大分子的结构与功能的研究是
 - 探求生命奥秘
 - 生物大分子结构与功能
 - 生物大分子的制备
- 生物大分子制备的总体思路
 - 1、材料的选择和预处理
 - 2、细胞的破碎
 - 3、提取
 - 4、分离纯化
 - 5、干燥与保存

一、生物大分子制备——生物材料的选择与预处理

选择适当的生物材料。

选择的材料应含量高、来源丰富、制备工艺简单、成本低，尽可能保持新鲜，尽快加工处理。

动物组织要先除去结缔组织、脂肪等非活性部分，绞碎后在适当的溶剂中提取，如果所要求的成分在细胞内，则要先破碎细胞。

植物要先去壳、除脂。

微生物材料要及时将菌体与发酵液分开。

生物材料如暂不提取，应冰冻保存。动物材料则需深度冷冻保存。

二、生物大分子制备—— 细胞的破碎：

(1)机械法： 研磨： 将组织置于研钵或匀浆器； 组织捣碎器

(2)物理法：

1) 反复冻融法：

2) 超声波处理法：

3) 压榨法：

4) 冷热交替法：

(3)化学与生物化学方法:

- 1) 自溶法:
- 2) 溶胀法:
- 3) 酶解法:
- 4) 有机溶剂处理法:
- 5) 碱处理

三、生物大分子制备——生物大分子的提取

影响提取的因素主要有：

目的产物在提取的溶剂中溶解度的大小；
由固相扩散到液相的难易；
溶剂的pH值和提取时间等。

(1) 水溶液提取：

蛋白质和酶的提取一般以水溶液为主。稀盐溶液和缓冲液对蛋白质的稳定性好，溶解度大，是提取蛋白质和酶最常用的溶剂。

(2) 有机溶剂提取

四、生物大分子制备——分离纯化

常用的分离纯化方法和技术有：

- (1) 根据蛋白质溶解度不同——沉淀法
盐析
有机溶剂沉淀
等电点沉淀
- (2) 根据蛋白质分子大小的差别
透析、超滤、凝胶过滤
- (3) 根据蛋白质带电性质不同
电泳、离子交换层析
- (4) 根据配体特异性的分离方法
亲和层析

五、生物大分子制备——样品的干燥和保存

- 冰冻干燥
- 保存（以保存蛋白质和酶为例）：
 - (1)低温保存：
 - (2)制成干粉或结晶保存：
 - (3)在保护剂下保存：

分析测定

要了解的生物大分子的物理、化学性质主要有：

- ①在水和各种有机溶剂中的溶解性。
- ②在不同温度、pH值和各种缓冲液中的稳定性。
- ③固态时对温度、含水量和冻干时的稳定性。
- ④各种物理性质：
- ⑤其他化学性质：
- ⑥对其他生物分子的特殊亲和力。

分析测定方法

方法主要有两类：

即生物学和物理、化学的测定方法。

■ 生物学的测定法主要有：

- 酶的各种测活方法
- 蛋白质含量
- 免疫化学方法
- 放射性同位素示踪法

■ 物理、化学方法主要有：

- 比色法
- 气相色谱和液相色谱法
- 光谱法
- 电泳法
- 核磁共振等。