



溶菌酶的提纯结晶 和活力测定

南昌大学生物学实验教学中心 汪艳璐

实验目的及要求

学习溶菌酶的提纯方法和酶活力的测定

实验的基本原理

鸡蛋清内含有丰富的溶菌酶（lysozyme），向蛋清中加入一定量的中性盐，并调节pH至溶菌酶的等电区，溶菌酶即可结晶析出。如结晶不纯，可重结晶。

溶菌酶之所以溶菌，是因为它能催化革兰氏阳性细菌细胞壁黏多糖水解。测定溶菌酶活力，可用某些细菌细胞壁作底物，以单位时间内被它水解的细胞壁的量表示酶活力的大小。

主要仪器设备

可见分光光度计

恒温水浴锅

烧杯

真空干燥器

吸管

抽滤瓶

离心机

匀浆器

布氏漏斗

纱布

量筒

电子天平

主要试剂

1. 氯化钠 (C.P) : 应研细
2. 五氧化二磷
3. 1mol/L NaOH溶液
4. 丙酮 (无水, C.P)
5. 0.1mol/L磷酸缓冲液 (pH6.2)
6. 溶菌酶晶种
7. 牛肉膏蛋白胨固体、液体培养基
8. 底物悬液: 溶菌小球菌 (*Micrococcus lysodeik Licus*) 的细胞壁

实验步骤

1. 底物悬液的制作

将菌种接种于液体培养基扩大培养（28℃, 24h），离心（4000rpm, 20min），倾去上清液，沉淀为菌体。加入少量蒸馏水，用玻璃棒搅成悬液，离心，倾去上清液，如此反复洗涤菌体数次，最后用少量蒸馏水制成悬液，冷冻干燥。亦可将菌体铺于玻板上吹干，刮下，置干燥器中。取干菌粉5mg，置匀浆器中，加入少量pH6.2磷酸缓冲液，研磨数分钟，倾出，用少量缓冲液洗匀浆器，一并稀释至20-25ml。比色测定 $A_{450\text{nm}}$ 。此悬液吸光度应在0.5-0.7范围内。

2. 溶菌酶的提纯结晶

(1) 将2只鸡蛋的蛋清置于小烧杯中（蛋清pH不得低于8.0），慢慢搅拌数分钟，使蛋清稠度均匀，然后用两层纱布滤去卵带或碎蛋壳，量记蛋清体积。

- (2) 按100ml蛋清加5g氯化钠的比例，向蛋清内慢慢加入氯化钠细粉，边加边搅，使氯化钠及时溶解，避免氯化钠沉于容器底部，否则将因局部盐浓度过高而产生大量白色沉淀。
- (3) 加完氯化钠，用1mol/L NaOH调节pH至9.5-10.0，随加随搅匀，避免局部过碱。加入少量溶菌酶结晶作为晶种，4℃放置数天。当肉眼观察有结晶形成后，吸取晶液一滴，置载玻片上，用显微镜观察（100×），记录晶形。
- (4) 4000rpm，离心3min，结晶用0℃丙酮洗涤2次，置真空干燥器干燥。

3、活力测定

- (1) 酶液的制备：准确称取干酶粉5mg，用0.1mol/L pH6.2磷酸缓冲液溶解成1mg/ml酶液。用时稀释10倍，则每毫升酶液酶量为100ug。
- (2) 将酶液和底物悬液分别置25℃水浴中保温10-15min，然后吸底物悬液3.0ml置比色杯中，比色测定 $A_{450\text{nm}}$ ，此为零时读数。然后加入酶液0.2ml（20ug酶），迅速摇匀，从加入酶计时，每隔30s测一次 $A_{450\text{nm}}$ ，共测3次。

(3) 本实验的酶活力单位定义为：每分钟 $A_{450\text{nm}}$ 下降0.002为一个活力单位（25℃，pH6.2）

$$P = (A_0 - A_1) / m \times 500$$

式中 P：每毫克酶的活力单位（U/mg）；

A_0 ：零时450nm处的吸光度；

A_1 ：1min时450nm处的吸光度；

m：样品的质量（mg）；

500：0.002的倒数，即相当于除以0.002。

注意事项

1. 鸡蛋清的搅拌速度切忌不能起泡，搅拌方向不得改变，搅棒应光滑，这些都是防止蛋白变性的措施。
2. 氯化钠细粉应慢慢加入，并边加边搅，防止因局部盐浓度过高而产生大量白色沉淀。
3. 调pH时，氢氧化钠应随加随搅匀，避免局部过碱。
4. 底物悬液中加入酶液后应迅速摇匀并从加入酶液开始计时。