

SHENGWUHUAXUE SHIYAN ZHIDAO

生物化学实验指导

毕冰 李晓岩 王宏伟 史金铭 编



东北林业大学出版社

生物化学实验指导

毕 冰 李晓岩 王宏伟 史金铭 编

出版社

图书在版编目 (C I P) 数据

生物化学实验指导 / 毕冰等编. -- 哈尔滨 : 东北
林业大学出版社, 2011. 4

ISBN 978 - 7 - 81131 - 803 - 6

I. ①生… II. ①毕… III. ①生物化学—实验—高等
学校—教学参考资料 IV. ①Q5 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 074537 号

责任编辑: 倪乃华

封面设计: 彭 宇



NEFUP

生物化学实验指导

Shengwuhuaxue Shiyan Zhidao

毕 冰 李晓岩 王宏伟 史金铭 编

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

东 北 林 业 大 学 印 刷 厂 印 装

开本 787 × 1092 1/16 印张 13 字数 292 千字

2011 年 4 月 第 1 版 2011 年 4 月 第 1 次印刷

印数 1—1 000 册

ISBN 978 - 7 - 81131 - 803 - 6

定价: 26.00 元

前 言

本书是在原自编《生物化学实验》教材基础上重新编写完成的。此次编写为了适应不同生物相关专业的生物化学教学在教材、学时等方面的调整，对原教材进行了补充与修正。在实验项目选定方面，既涵盖了糖、脂、蛋白质、酶、维生素、生物氧化以及物质代谢等《生物化学》的各章节，又注重实验方法的多样性与技术手段的先进性，保留了部分基础性实验，增加了许多综合性技能实验；在实验内容及操作设计编排方面，作者根据多年的实验教学经验做了许多修正和改进，使其更加科学、合理与实用。同时，在附录中增加了常规实验仪器的正确使用说明、常用生化实验参数以及实验安全、注意事项等内容。本书重新编写后，体现了实验内容的全面、实验方法与技术手段的先进，可满足不同生物相关专业、不同学时的生物化学实验教学使用，对于提高学生实验动手能力、全面掌握生化实验技能均有帮助。本书也可供研究生、教学辅助人员参考使用。

在编写过程中，孙中武教授给予作者大力支持与帮助，并对本书编写提出了许多宝贵意见与建议，在此我们向他表示衷心的感谢。

由于本书涉及的知识面广，作者知识有限，书中难免有不足与错误，敬请读者批评指正。

编 者

2010年9月于东北林业大学

目 录

实验一 纸层析法分离氨基酸	(1)
实验二 血清(卵清)蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	(6)
实验三 酵母核糖核酸的分离及组分鉴定	(11)
实验四 酶的特性	(13)
实验五 肌糖原的酵解作用	(17)
实验六 3, 5 - 二硝基水杨酸比色定糖	(19)
实验七 氨基移换反应的定性实验	(21)
实验八 蛋白质的等电点测定和沉淀反应	(24)
实验九 甲醛滴定法	(27)
实验十 蛋白质及氨基酸的呈色反应	(29)
实验十一 糖的颜色反应	(34)
实验十二 甘油三酯的颜色反应	(36)
实验十三 维生素的颜色反应	(37)
实验十四 核黄素可见、紫外吸收光谱的测定	(39)
实验十五 薄层层析法分离核苷酸、核苷、碱基	(41)
实验十六 酪蛋白的制备	(43)
实验十七 维生素 C 的定量测定	(45)
实验十八 血清脂蛋白琼脂糖电泳	(47)
实验十九 米氏常数的测定	(49)
实验二十 离子交换层析分离混合氨基酸	(53)
实验二十一 胡萝卜素的柱层析分离	(55)
实验二十二 碱性磷酸酶比活性测定	(57)
实验二十三 肝糖原的提取和定量	(63)
实验二十四 血糖的定量测定——GOD - POP 法	(66)
实验二十五 动物组织中 DNA 的提取	(68)
实验二十六 蛋白质的透析	(71)
实验二十七 小麦萌发前后淀粉酶活性的比较	(72)
实验二十八 血清 γ - 球蛋白的提纯	(75)
实验二十九 寡糖和多糖的水解	(78)
实验三十 卵黄中卵磷脂的提取和鉴定	(80)
实验三十一 脂肪碘值的测定	(82)
实验三十二 皂化价的测定	(85)
实验三十三 油脂酸价测定法	(87)
实验三十四 淀粉酶粗提液的制备——硫酸铵沉淀法	(89)

实验三十五	考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度	(91)
实验三十六	植物叶片中硝酸还原酶活性的测定	(94)
实验三十七	植物组织中丙二醛含量的测定	(97)
实验三十八	SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 测定蛋白质相对分子质量	(99)
实验三十九	葡聚糖凝胶过滤层析法测定蛋白质相对分子质量	(107)
实验四十	琥珀酸脱氢酶的作用及竞争性抑制观察	(112)
实验四十一	DNA 的琼脂糖凝胶电泳	(114)
实验四十二	生物氧化与电子传递	(118)
实验四十三	聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳法分离血清蛋白质	(120)
实验四十四	尿中肌酐、尿酸含量的测定	(125)
实验四十五	发色底物测定大釉中的 α - 葡萄糖苷酶活力	(128)
实验四十六	二苯胺显色法测定 DNA 的含量	(130)
实验四十七	动物肝脏 RNA 的制备及琼脂糖电泳的鉴定	(132)
实验四十八	亲和层析纯化乳酸脱氢酶	(135)
实验四十九	乳酸脱氢酶粗提液的制备及活力测定	(139)
实验五十	蛋白质及肽的 N 末端氨基酸测定	(142)
实验五十一	血清蛋白的盐析及清/球值的测定	(146)
实验五十二	凝胶过滤层析	(149)
实验五十三	聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定 IgG 纯度	(152)
实验五十四	DEAE - 离子交换剂纯化血清 IgG	(157)
实验五十五	从猪肝中分离提取 DNA 和 RNA	(160)
实验五十六	总氮量的测定——微量凯式定氮法	(162)
实验五十七	索氏提取法测定脂肪含量	(166)
附录一	生物化学实验室规则及实验报告	(168)
附录二	实验室安全、防护知识及常识	(170)
附录三	生物化学实验室常用仪器简介	(175)
附录四	常用缓冲溶液的配制	(192)
附录五	氨基酸的一些理化常数	(198)
附录六	常用酸碱和固态化合物的一些数据	(200)
参考文献		(202)

实验一 纸层析法分离氨基酸

氨基酸的单向纸上层析

一、实验目的

通过氨基酸的分离，学习纸层析法的基本原理及操作方法。

二、实验原理

纸层析属于分配层析，主要是根据被分析的样品在两种互不相溶的溶剂系统中的分配系数（即二相中浓度比值）不同而达到分离的目的，相当于一个连续的反向液抽提过程。

纸层析是以纸作为惰性支持物的分配层析，滤纸纤维的—OH 基为亲水性基团，可吸附展开溶剂中的水作为固定相，有机溶剂作为流动相，它沿滤纸自下向上移动，称为上行层析；反之，使有机溶剂自上而下移动，称为下行层析。将样品点在滤纸上进行展层，样品中的各种氨基酸即在二相中不断进行分配，由于它们各自的分配系数不同，在流动相中移动速率不等，因而使不同的氨基酸得到分离和提纯。氨基酸经层析在滤纸上形成距原点不等的层析点，氨基酸在滤纸上的移动速率用 R_f 表示。

$$R_f = \frac{\text{点样圈中心至显色斑点的距离}}{\text{点样圈中心至展层前沿的距离}}$$

只要实验条件（如温度、展层溶剂的组分、pH 值、滤纸的质量等）不变， R_f 值是常数，因此可作为定性分析的参考。如果溶质中氨基酸组分较多或其中某些组分的 R_f 值相同或近似，用单向层析不宜将它们分开，可进行双向层析，在第一溶剂展开后将滤纸转动 90° ，以第一次展层所得的层析点为原点，再用另一种溶剂展层，即可达到分离目的。由于氨基酸无色，可利用茚三酮反应使氨基酸层析点显色，从而定性和定量。

三、操作步骤

1. 滤纸。在滤纸距纸边 2 cm 处用铅笔画一线，沿线每 2.5 cm 画一圆圈为点样处，直径等于 0.5 cm。
2. 点样。用微量加样器取标准品氨基酸，吸管与滤纸垂直，轻轻接触纸面，直径等于 0.5 cm。一滴滴完后用冷风吹干，再点第二次，共点三次。将点完样的滤纸两側面对齐，成筒状，用针线缝合。
3. 展层。取出层析缸内的培养皿，加入正丁醇: 甲酸: 水 = 15: 3: 2 共 20 mL，再加入茚三酮少许，放入层析缸内，将点样后的滤纸放入展层溶剂中，当溶剂展层至滤纸上沿 1 cm 处展层结束，用铅笔画出展层前沿位置，先用冷风吹干，再用热风吹显色，用

铅笔描出各显色斑点的形状。

4. R_f 值的测定。按照实验原理中 R_f 的计算公式求出 R_f 值。

四、注意事项

1. 铅笔、格尺自备。
2. 点样圈不能距离纸边太近，各点之间的距离不能太近。
3. 一定要保证完全吹干。
4. 缝合时滤纸的两个纸边不能相互接触并且底边应对齐。
5. 使用移液管时应先看清管的刻度、每一格代表多少后再量取。
6. 使用移液管时应右手拿管，左手拿吸耳球并用食指堵管口。
7. 展开剂取完后不要忘记加显色剂茚三酮。

五、试剂和器材

(一) 试剂

1. 标准品氨基酸；
2. 正丁醇；
3. 甲酸；
4. 蒸馏水；
5. 茚三酮。

(二) 器材

1. 层析缸；
2. 滤纸；
3. 培养皿；
4. 吸耳球；
5. 药勺；
6. 微量加样器；
7. 吹风机；
8. 针线；
9. 移液管。

氨基酸的双向纸上层析

一、实验目的

1. 学习双向纸层析的原理。
2. 掌握纸层析分离混合氨基酸的操作方法。

二、实验原理

纸层析操作按溶剂展开方向可分为上行、下行和径向三种。氨基酸分离一般用上行

法。上行法又分单向（成分较为简单的样品）和双向（单向时斑点重叠分离不开，于是在其垂直方向用另一种溶剂系统展层）。双向层析谱可分辨十几种以上的样品。

双向层析 R_f 值由两个数值组成，在第一向计量一次，第二向计量一次，分别与已知的氨基酸在酸碱系统的 R_f 值对比，即可初步决定它为何种氨基酸的斑点。将斑点剪下，在同一张纸剪下一块大小相同的空白纸作为对照，用硫酸铜—乙醇溶液洗脱，用 722 型分光光度计测定其吸光度，在标准曲线上查出氨基酸的含量。

三、操作步骤

1. 滤纸。取层析滤纸（12 cm × 12 cm）一张，在距纸边 1.2 cm 处画一基线；再将滤纸旋转 90°，距纸边 1.2 cm 处画一线与上线垂直。

2. 点样。以毛细管吸取混合氨基酸溶液点于二线交点处，样品点的直径控制在 2 mm 左右，不可过大。待样品干燥后再点一次，共点三次。滤纸上点样斑点干燥后，把滤纸卷成圆筒形，纸的两边以铬丝相连，但不可重叠相碰。

3. 展层。在层析缸中平稳的放入装有第一相层析溶剂的培养皿。将圆筒形滤纸放入，点样一端接触溶剂，以点样处不浸入溶剂为准。待溶剂自下而上均匀展开，约 2h 后溶剂到达距纸边 0.5 cm 处取出滤纸，悬挂于室温中，用吹风机充分吹干，然后裁去未走过溶剂的滤纸边缘，将滤纸旋转 90°，卷成如前圆筒状，放入盛第二相溶剂的层析缸内展开，约 1h 后溶剂展开到距纸边 0.5 cm 时取出，用吹风机吹干。

4. 显色。用喷雾器将茚三酮均匀地喷在滤纸上，然后悬滤纸于 65 °C 烘箱内，烘 30 min，即可看到紫红色氨基酸斑点，将图谱上的斑点用铅笔圈出。用直尺量出各斑点中心与原点的距离以及溶剂前沿与原点的距离，求出各氨基酸的 R_f 值。将各显色斑点的 R_f 值与标准氨基酸的 R_f 值比较，可得知该斑点的准确成分。

四、注意事项

1. 烘箱加热温度不可过高，且不可有氨的干扰，否则图谱背景会泛红。
2. 第一向溶剂最好在使用前再按比例混合，否则会引起酯化，影响层析效果。
3. 整个实验操作应戴手套进行。

五、试剂和器材

（一）试 剂

1. 标准氨基酸混合溶液；
2. 正丁醇；
3. 甲 酸；
4. 蒸馏水；
5. 吡 啶；
6. 95% 乙醇；
7. 质量体积分数为 0.1% 茚三酮丙酮液。

溶剂系统：

第一相体积比为正丁醇: 88% 甲酸: 水 = 15: 3: 2；

第二相体积比为正丁醇:吡啶:95%乙醇:水=5:1:1:1。

(二) 器 材

1. 层析缸;
2. 滤 纸;
3. 培养皿;
4. 吸耳球;
5. 药 勺;
6. 微量吸管;
7. 吹风机;
8. 针 线;
9. 移液管;
10. 喷雾器;
11. 烘 箱。

【实验参考资料】

1. 纸层析法

纸层析法是以滤纸作为支持物的分配层析法,是20世纪40年代发展起来的一种生化分离技术。由于该法设备简单、操作方便、所需样品量少、分辨力较高等优点而广泛地用于物质的分离,并可进行定性和定量的分析;缺点是展开时间较长。

2. 分配层析法

分配层析法是利用物质在两种或两种以上不同的混合溶剂中的分配系数不同而达到分离的目的的一种实验方法。在一定条件下,一种物质在某种溶剂系统中的分配系数是一个常数即 $\alpha = \text{溶质在固定相的浓度} / \text{溶质在流动相的浓度}$ 。

3. 溶剂系统

溶剂系统由有机溶剂和水组成,水和滤纸纤维素有较强的亲和力,因而其扩散作用降低形成固定相,有机溶剂和滤纸亲和力弱,所以在滤纸毛细管中自由流动,形成流动相。由于混合液中各种氨基酸的分配系数值不同,因而其在两相中的分配数量及移动速率(即迁移率 R_f 值)就不同,从而达到分离的目的。

4. 影响 R_f 值的主要因素

R_f 决定于被分离物质在两相间的分配系数以及两相间的体积比。由于在同一实验条件下,两相体积比是一常数,因此主要决定于分配系数。不同物质分配系数不同, R_f 值也就不同。

(1) 物质的结构和分子极性。物质的结构不同极性也不同,在两相中的溶解度也就不同,物质的极性决定了物质在水和有机溶剂之间的分配情况,极性大的易溶于水中,即固定相中 R_f 值小;反之 R_f 值则较大。

(2) 层析溶剂。首先,溶剂的纯度要高,否则需经预先处理(酸碱抽提、重蒸馏、脱水干燥等);其次,溶剂系统选择应考虑被分离的物质在溶剂系统中的 R_f 值在0.05~0.85,样品被分离物质的组分的 R_f 值之差最好大于0.05;再次,有些溶剂系统必须新鲜配制,如正丁醇—甲酸—水系统久放易引起酯化;最后,溶质和溶剂之间若能形成

氢键，则对分配系数的影响很大。

(3) pH 值。溶剂、滤纸和样品的 pH 值都会影响物质的解离，从而影响物质的极性和溶解度，使 R_f 值改变；溶剂的 pH 值还可以影响流动相的含水量，溶剂的酸碱度大，吸水量多，使极性物质的 R_f 值增加（将滤纸和溶剂用缓冲溶液处理）。

(4) 滤纸。层析滤纸由高纯度棉花制成，要求滤纸清洁，质地均一，厚薄一致，纤维松紧度适中，具有一定的机械强度，要被溶剂所饱和。不同型号的滤纸厚薄程度、纤维松紧度各不相同，因此，滤纸纤维结合水的量不一样，两相的体积比也就不同， R_f 值也不同。另外，滤纸的杂质也会影响 R_f 值，必要时进行预处理（可用 0.01 ~ 0.4 mol/L 的 HCl 处理除去金属离子）。

(5) 实验室的温度和时间。温度影响物质在两相中的溶解度，既影响分配系数，也影响滤纸纤维的水合作用，影响固定相的体积，还显著地影响溶剂系统的含水量，即影响流动相的组分比例。层析必须在恒温条件下进行，某些对温度敏感的溶剂系统最好不配制成饱和溶液。层析时间长 R_f 值大。

(6) 展开方式。下行法（层析缸上部有一盛展开剂的液槽，滤纸点样端向上进入槽中，重现性差，斑点易扩散） R_f 值大，上行法 R_f 值小；环行法（最好用无方向性的特制滤纸）用圆形滤纸层析时，由于内圈较外圈小，限制了溶剂的流动， R_f 值较小。

(7) 样品溶液中杂质。如氯化钠的存在会影响氨基酸的 R_f 值。

实验二 血清（卵清）蛋白的醋酸纤维薄膜电泳

一、实验目的

学习醋酸纤维薄膜电泳的操作，掌握电泳的一般原理。

二、实验原理

带电颗粒在电场的作用下，向着与其本身所带电性相反的电极移动，这种现象称为电泳。带电颗粒之所以能在电场中向一定的方向移动，并具有一定的迁移速度，是取决于带电颗粒本身性质的影响，以及电场强度、溶液的 pH 值、离子强度及电渗等因素的影响。蛋白质具有两性性质，在溶液中可解离的基团除肽链末端的 α -氨基和 α -羧基外，还有很多侧链基团在一定的 pH 值条件下能解离而使蛋白质带电。当溶液的 pH 值 $> pI$ （等电点）时，蛋白质带负电荷，在电场中向正极移动，而溶液的 pH 值 $< pI$ 时，则带正电荷，电泳时向负极移动。一个混合的蛋白质样品由于各蛋白质的等电点不同，在相同 pH 值溶液中所带的电荷性质不同，电荷的数目不同，在电场中各种蛋白质泳动的方向和速度也不相同，从而使蛋白质混合样品得到分离。

醋酸纤维薄膜电泳是利用醋酸纤维薄膜作为支持物进行分离分析的电泳方法。醋酸纤维素薄膜是纤维素的醋酸酯，由纤维素的羟基经乙酰化而制成，它溶于丙酮等有机溶液中，即可涂布成均一细密的微孔薄膜，厚度以 0.1 ~ 0.15 mm 为宜。太厚吸水性差，分离效果不好；太薄则膜片缺少应有的机械强度而易碎。

三、操作步骤

（一）浸泡

用镊子夹取醋酸纤维薄膜放入缓冲液中浸泡 20 min。

（二）点样

把膜条从缓冲液中取出，夹在两层粗滤纸内吸干多余的水分，然后平铺于玻璃板上（无光泽面朝上）。将点样器先放在血清（或卵清）中蘸一下，再在膜条一端 2 ~ 3 cm 处轻轻垂直水平落下并立即提起，这样即在膜条上点了细条状的血清样品。

（三）电泳

将膜条平悬于电泳槽支架的滤纸桥上，膜条上点样一端靠近负极。盖严电泳室，通电，调节电压到 160 V，每厘米膜条电流强度 0.4 ~ 0.7 mA，时间为 40 min。

（四）色

电泳完毕后将膜条取出，放在染液中浸泡 10 min。染色液为氨基黑 10 B。

（五）漂洗

将膜条从染色液中取出后先用自来水冲洗至无染液滴下，移至漂洗液中漂洗数次，至无蛋白区底色脱净为止，可见到色带清晰的电泳图谱。

漂洗液为乙醇:冰醋酸:水 = 45:5:50。

(六) 透明

用滤纸吸干多余的水分，将膜条放入透明液中数秒后立即提起，平铺于玻璃板上，用吹风机吹干。

透明液为无水乙醇:冰醋酸 = 7:3。

(七) 浸泡

将膜片上的各蛋白质分离区带分段剪下，分别置于相应的标有编号的试管内，然后各加入 0.4 mol/L 的氢氧化钠溶液进行浸泡。浸泡淡色带所加入的 0.4 mol/L 氢氧化钠溶液的量为 4 mL，深色带为 8 mL（此时的稀释倍数是淡色带的 2 倍）。室温下的浸泡时间为 30 ~ 60 min。若在 37 °C 水浴中浸泡，则为 10 ~ 15 min。浸泡期间振荡数次，使蛋白质区带浸出。另外，再剪取与色带膜条大小相同的无色带膜条作为空白，以相同的方式浸泡在 0.4 mol/L 氢氧化钠溶液中。

(八) 比色

浸泡完毕，将浸出的有色溶液在分光光度计上进行比色测定。测定波长为 620 nm，光径为 1 cm。若浸出液有混浊或沉淀，则以 4 000 r/min 的转速离心 10 ~ 20 min 来除去，然后再取上清液进行比色测定。

(九) 计算

比色测定结束后，各组分的含量按下式计算：

$$\text{某蛋白质组分百分含量} = \frac{\text{某蛋白质组分的光吸收值}}{\text{样品中各蛋白质组分的光吸收值总和}} \times 100\%$$

上式中深色带蛋白质组分的光吸收值应乘以稀释倍数，如血清白蛋白组分的分离区带为深色带，浸泡时所加入的 0.4 mol/L 氢氧化钠的量是其他淡色带的 2 倍，所以应乘以 2。

四、实验结果

标出所得电泳图谱中各谱带分别为何种蛋白。



从负极到正极依次为 γ -球蛋白、 β -球蛋白、 α -球蛋白 2、 α -球蛋白 1、清蛋白。

五、注意事项

1. 在粗滤纸内吸干时不要用力压，轻轻吸干即可。
2. 点样时，样品量不要太多，越细越直为好。
3. 膜条应夹在两层湿滤纸桥中间，滤纸桥之间不能有气泡。
4. 膜条点样的一端应在负极，通常黑色为负极。

5. 漂洗分4次,从第一个培养皿开始到第四个培养皿依次进行漂洗。

6. 放入透明液时,应左手拿玻璃板,右手用镊子夹好膜条,放入透明液中数秒钟立即提起并迅速铺于玻璃板上。用吹风机完全吹干后取出。

六、试剂和器材

(一) 试剂

1. 巴比妥缓冲液

称取巴比妥 1.66 g 和巴比妥钠 12.76 g,溶于少量蒸馏水后定容1 000 mL。

2. 染色液

称取氨基黑 10 B 0.5 g,加入蒸馏水 40 mL、甲醇 50 mL 和冰乙酸 10 mL 混匀,在具塞试剂瓶中贮存。

3. 漂洗液

取 95% 乙醇 45 mL、冰乙酸 5 mL 和蒸馏水 50 mL 混匀,在具塞试剂瓶内贮存。

4. 透明液

无水乙醇 7 份 + 冰醋酸 3 份。

5. 血清(或卵清)

(二) 器材

1. 醋酸纤维薄膜;

2. 电泳仪;

3. 点样器;

4. 滤纸;

5. 培养皿;

6. 铁镊子;

7. 玻璃板;

8. 玻璃棒;

9. 滤纸。

【实验参考资料】

1. 醋酸纤维薄膜电泳的优点。

(1) 醋酸纤维素薄膜与滤纸相比较,有以下优点。

①醋酸纤维素薄膜对蛋白质样品吸附极少,无“拖尾”现象,染色后背景能完全脱色,各种蛋白质染色带分离清晰,因而提高了测定的精确性。

②快速省时。由于醋酸纤维素薄膜亲水性较滤纸小,薄膜中所容纳的缓冲液也较少,电渗作用小,电泳时大部分电流是由样品传导的,因此分离速度快、电泳时间短,一般电泳 45 ~ 60 min 即可,加上染色、脱色,整个电泳完成仅需 90 min 左右。

③灵敏度高,样品用量少。血清蛋白仅需 2 μ L 血清,甚至加样体积少至 0.1 μ L,仅含 5 μ g 蛋白样品也可得到清晰的分离带。临床医学检验利用这一点检测在病理情况下微量异常蛋白的改变。

④应用面广。某些蛋白质在纸上电泳不易分离,如胎儿甲种球蛋白、溶菌酶、胰岛

素、组蛋白等用醋酸纤维薄膜电泳能较好地分离。

⑤醋酸纤维素薄膜电泳染色后，经冰乙酸、乙醇混合液或其他溶液浸泡后可制成透明的干板，有利于扫描定量及长期保存。

(2) 醋酸纤维素薄膜电泳与聚丙烯酰胺凝胶电泳相比，操作简单，但分离效果不太好。如血清蛋白在醋酸纤维素薄膜电泳中只能分离出 5~6 条区带，而聚丙烯酰胺凝胶电泳可分离出数十条区带。

2. 注意事项。

(1) 醋酸纤维素薄膜的预处理。市售醋酸纤维素薄膜均为干膜片，薄膜的浸润与选膜是电泳成败的关键之一。将干膜片漂浮于电极缓冲液表面，其目的是选择膜片厚薄及均匀度，如漂浮 15~30 s 时，膜片吸水不均匀，则有白斑点或条纹，这提示膜片厚薄不均，应舍去不用，以免造成电泳后区带扭曲，界线不清，背景脱色困难，结果难以重复。由于醋酸纤维薄膜亲水性比纸小，浸泡 30 min 以上是保证膜片上有一定量的缓冲液，并使其恢复到原来多孔的网状结构。最好是让漂浮于缓冲液的薄膜吸满缓冲液后自然下沉，这样可将膜片上聚集的小气泡赶走。点样时，应将膜片表面多余的缓冲液用滤纸吸干。

(2) 缓冲液的选择。醋酸纤维素薄膜电泳常选用 pH 值为 8.6 的巴比妥缓冲液，其浓度为 0.05~0.09 mol/L。选择何种浓度与样品及薄膜的薄厚有关。选择时，先初步定下某一浓度，如电泳槽两极之间的膜长度为 8~10 cm，则每厘米膜长需电压 25 V，电流强度为每厘米膜宽 0.4~0.5 mA。当电泳达不到或超过这个值时，则应增加缓冲液浓度或进行稀释。缓冲液浓度过低，则区带泳动速度快，并由于扩散变宽；缓冲液浓度过高，则区带泳动速度慢，区带分布过于集中，不易分辨。

(3) 加样量。加样品的多少与电泳条件、样品的性质、染色方法与检测手段灵敏度密切相关。作为一般原则，检测方法越灵敏，加样量则越少，对分离更有利。如加样量过大，则电泳后区带分离不清楚，甚至互相干扰，染色也较费时。如电泳后用洗脱法定量时，每厘米加样线上需加样品 0.1~0.5 μL ，相当于 5~1 000 μg 蛋白。血清蛋白常规电泳分离时，每厘米加样线加样量不超过 1 μL ，相当于 60~80 μg 的蛋白质。但糖蛋白和脂蛋白电泳时，加样量则应多些。对每种样品加样量均应先作预实验加以选择。

点样好坏是获得理想图谱的重要环节之一，以印章法加样时，动作应轻、稳，用力不能太重，以免将薄膜弄坏或印出凹陷而影响电泳区带分离效果。

(4) 电量的选择。电泳过程应选择合适的电流强度，一般电流强度为每厘米宽膜 0.4~0.5 mA 为宜。电流强度高，尤其在温度较高的环境中，可引起蛋白质变性或由于热效应引起缓冲液中水分蒸发，使缓冲液浓度增加，造成膜片干涸。电流过低，则样品泳动速度慢且易扩散。

(5) 染色液的选择。对醋酸纤维素薄膜电泳后染色应根据样品的特点加以选择。其原则是染料对被分离样品有较强的着色力，背景易脱色；应尽量采用水溶性染料，不宜选择醇溶性染料，以免引起醋酸纤维素膜溶解。应控制染色时间。时间长，薄膜底色深不易脱去；时间短，着色浅不易区分或造成条带染色不均，必要时可进行复染。

(6) 透明及保存。透明液应临用前配制，以免冰乙酸及乙醇挥发影响透明效果。这些试剂最好选用分析纯的。透明前，薄膜应完全干燥。透明时间应掌握好，如在透明

液中浸泡时间太长则薄膜溶解，太短则透明度不佳。

透明后的薄膜完全干燥后才可以浸入石蜡中使薄膜软化。如有水，则液体石蜡不易浸入，薄膜不易平展。

实验三 酵母核糖核酸的分离及组分鉴定

一、实验目的

了解核酸的组成成分，掌握鉴定核酸各组分的方法。

二、实验原理

酵母中的核糖核酸可溶于碱，在碱提取液中加酸性乙醇溶液可以使解聚的核糖核酸沉淀，由此得到粗核糖核酸。核糖核酸含有核糖、嘌呤碱、嘧啶碱和磷酸各种组分。加硫酸煮沸可使其水解，从水解液中可以测出上述组分的存在。

三、操作步骤

(一) 分离

将 5 g 酵母悬浮于 30 mL 0.04 mol/L 氢氧化钠溶液中，在乳钵中研磨均匀移入 150 mL 锥形瓶内，在沸水浴中加热 30 min 后冷却，离心（3 000 r/min）15 min。将上清液倾入 10 mL 酸性乙醇溶液中，一边搅拌一边缓慢倾入。待核糖核酸完全沉淀后离心（3 000 r/min）3 min，弃上清液。用 95% 乙醇洗沉淀液两次，再用乙醚洗一次。将沉淀液转移至布氏漏斗中抽滤。沉淀液可在空气中干燥。

(二) 组分鉴定

取 200 mg 核糖核酸加入 1.5 mol/L 硫酸 10 mL，沸水浴中加热 10 min 制成水解液进行组分鉴定。

1. 嘌呤碱。取一支试管，加入过量的浓氨水（用吸管吸约超过 1 mL），并加入 1 mL 0.1 mol/L 硝酸银，再加入 1 mL 水解液，观察有无嘌呤碱的银化合物沉淀生成。

2. 核糖。取一支试管，加入水解液 1 mL、三氯化铁浓盐酸溶液 2 mL，加入苔黑酚乙醇溶液 0.2 mL，放入沸水浴中 10 min。溶液如果变绿，说明有核糖存在。

3. 磷酸。取一支试管，加入水解液 1 mL 和定磷试剂 1 mL，在沸水浴中加热。溶液如果变成蓝色，说明有磷酸存在。

四、实验结果

写出实验结果并分析。

五、注意事项

1. NaOH 先少量多次加入，研磨均匀后再加入剩余部分。
2. 离心时，首先一定用天平配平。
3. 检测嘌呤碱时，加入药品的顺序不能颠倒，一定沿管壁加入，试管不要振荡。