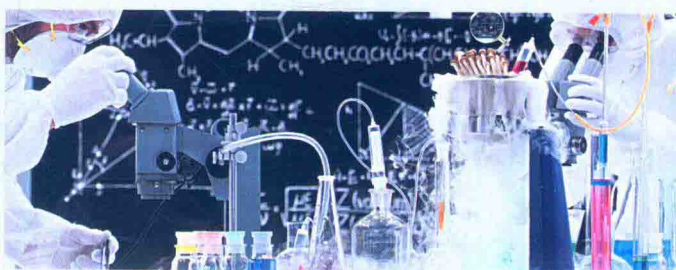




普通高等教育“十三五”规划教材
市级精品课程配套教材

生物化学 实验指导

EXPERIMENTAL INSTRUCTION
OF BIOCHEMISTRY



姜余梅 主编



中国轻工业出版社

全国百佳图书出版单位

普通高等教育“十三五”规划教材
市级精品课程配套教材

生物化学实验指导

(可供食品科学与工程、食品质量与安全、生物技术、粮食工程、生物工程、制药工程、酿酒工程等专业使用)

主 编 姜余梅

副主编 王艳萍 吕晓玲



中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验指导/姜余梅主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2017. 3

ISBN 978 - 7 - 5184 - 1252 - 5

I. ①生… II. ①姜… III. ①生物化学—化学实验—医学院校—教材 IV. ①Q5 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 320555 号

责任编辑: 马一妍 责任终审: 滕炎福 封面设计: 锋尚设计
版式设计: 锋尚设计 责任校对: 吴大鹏 责任监印: 张可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印刷: 北京君升印刷有限公司

经销: 各地新华书店

版次: 2017 年 3 月第 1 版第 1 次印刷

开本: 787 × 1092 1/16 印张: 8.25

字数: 190 千字

书号: ISBN 978 - 7 - 5184 - 1252 - 5 定价: 28.00 元

邮购电话: 010 - 65241695 传真: 65128352

发行电话: 010 - 85119835 85119793 传真: 85113293

网址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社邮购联系调换

151547J1X101ZBW

本书编委会

主 编 姜余梅 (天津科技大学)

副 主 编 王艳萍 (天津科技大学)

吕晓玲 (天津科技大学)

参编人员 (按姓氏笔画为序)

王 芳 (天津科技大学)

王 浩 (天津科技大学)

王汝华 (天津科技大学)

王志伟 (天津科技大学)

刘常金 (天津科技大学)

朱振元 (天津科技大学)

闫路娜 (河北科技大学)

侯丽华 (天津科技大学)

郭红莲 (天津科技大学)

唐 洁 (西华大学)

康英姿 (天津医科大学)

曾朝懿 (西华大学)

秘 书 王汝华 (天津科技大学)

| 前言 | Preface

《生物化学实验指导》是在天津科技大学使用多年的讲义《生物化学实验讲义》和《酶工程实验》的基础上,对照天津市级精品课程《生物化学》的教学大纲,邀请同行专家集体编写而成。本教材可满足我国食品和生物技术及医学领域高等教育培养目标的需要,可作为食品科学与工程、食品质量与安全、生物技术、粮食科学与工程、生物工程、制药工程、酿酒工程等专业本科生的实验教材,也可供相关专业研究生、科研机构人员参考。

为帮助学生理解并掌握生物化学的基本理论、基本知识和基本技能,编者严格把握教材内容的深度和广度,突出科学性、实用性、先进性和启发性,力争使学生能在有限的时间内掌握学科精髓。本教材围绕轻工和医学专业教育中的蛋白质和核酸等生物大分子分离与鉴定、酶工程、基因工程、糖脂相关实验等必修课程中的实践环节进行了科学的规范,将基础理论有机地渗透在实验指导知识中,系统性强,利于教学;本教材能使学生在扎实掌握基础知识之后训练他们的实验操作技能,培养学生的创新意识、实践能力和理论联系实际的能力。另外,本教材还结合了作者本人及编写组成员长期从事生物化学实验教学的经验和成果,是一本适合于现阶段轻工和医学相关专业本科教学的好教材。本教材可与各种版本的《生物化学》教材配套使用。

参加本教材编写的人员来自多所高等院校的教学一线,本教材的编写得到了参编学校的大力支持,在此表示感谢。天津科技大学食品工程与生物技术学院领导对本教材的出版给予了大力支持,中国轻工业出版社也做了大量工作,在此一并致谢。本教材在编写过程中参考了已出版的优秀的生物化学实验指导书,在此对作者深表感谢。

此次出版的《生物化学实验指导》是编者们的改进和完善生物化学教学,特别是实验教学的一次有意义的实践,由于时间、人力及编者水平和能力有限,本书难免存在不足之处,敬请广大师生和读者批评指正。

姜余梅

2017年1月于天津

绪 论	1
生物化学实验须知	1
实验室一些常用知识介绍	2
第一章 蛋白质相关实验	7
实验一 氨基酸的分离鉴定——纸层析法	7
实验二 离子交换层析分离混合氨基酸	9
实验三 味精中谷氨酸钠测定	10
实验四 蛋白质的两性反应和等电点测定	12
实验五 醋酸纤维素薄膜电泳法分离血清蛋白	14
实验六 垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质	17
实验七 IEF/SDS - PAGE 双向电泳分离鉴定蛋白质	20
实验八 蛋白质的制备及其含量测定	23
第二章 酶相关实验	34
实验九 马铃薯多酚氧化酶制备及性质实验	34
实验十 米氏常数 K_m 值的测定	37
实验十一 碱性蛋白酶活力的测定（福林 - 酚试剂法）	40
实验十二 细菌血栓溶解酶活力测定	42
实验十三 小麦萌芽前后淀粉酶活力的比较	44
实验十四 酵母蔗糖酶的提取及其酶促动力学研究	47
实验十五 植物中 SOD 的分离提取及性质研究	51
第三章 糖相关实验	55
实验十六 糖的呈色反应和定性鉴定	55
实验十七 还原糖和总糖的测定	57
实验十八 HPLC 法测定单糖组成	59
实验十九 糖酵解中间产物的鉴定	62
实验二十 发酵过程中无机磷的利用和 ATP 的生成	64

实验二十一 胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响	66
实验二十二 植物中多糖的提取、纯化与鉴定	68

第四章 脂相关实验

71

实验二十三 种子粗脂肪的提取	71
实验二十四 脂肪酸的 β -氧化	72
实验二十五 脂肪酸值的测定——碱滴定法	75

第五章 核酸相关实验

78

实验二十六 DNA 样品检测——琼脂糖凝胶电泳技术	78
实验二十七 核酸浓度测定——紫外线 (UV) 吸收法	79
实验二十八 质粒 DNA 的提取	81
实验二十九 植物组织中 DNA 和 RNA 的提取和鉴定	83
实验三十 小鼠肝脏组织的 RNA 提取及鉴定	86
实验三十一 基因组 DNA 的 Southern 杂交分析	88

第六章 其他实验

93

实验三十二 大孔吸附树脂法分离纯化果蔬花青素	93
实验三十三 植物材料中总黄酮的提取与含量测定	95
实验三十四 维生素 C 的定量测定	97

附录一 常用缓冲溶液的配制

101

附录二 实验室主要仪器使用操作规程与注意事项

109

附录三 蛋白质分离纯化的主要方法及原理

117

附录四 电泳的主要方法及原理

120

参考文献

123

绪论

生物化学实验须知

生物化学实验课的目的：训练学生掌握生物化学实验最基本的操作技能；了解生物化学的基本知识；加深理解课堂讲授的某些生物化学理论。同时，通过实验，培养学生观察、思考、分析问题、动手解决问题和提出问题的能力；养成实事求是、严谨认真的科研态度，以及敢于创新的开拓精神；树立勤俭节约、爱护公物及仪器设备的良好作风。

为了上好生物化学实验课，并保证安全，特提出如下注意事项。

一、实验室规则

(1) 实验课必须提前 5min 到实验室，不迟到，不早退，应自觉遵守课堂纪律。

(2) 使用仪器、药品、试剂和各种物品必须注意节约，应特别注意保持药品和试剂的纯净，严防混杂污染。

(3) 实验台、试剂药品架必须保持整洁，仪器药品摆放井然有序。实验完毕，需将药品、试剂排列整齐仍放回原处，仪器洗净倒置放好，实验台面抹拭干净，经教师验收仪器后，方可离开实验室。

(4) 使用和洗涤仪器时，应小心谨慎，防止损坏仪器。使用精密仪器时，应严格遵守操作规程，发生故障应立即报告教师，不要自己动手检修。

(5) 在实验过程中要听从教师的指导，严肃认真地按操作规程进行实验，并简要、准确地将实验结果和数据记录在实验记录本上。课后写出实验报告，由课代表收齐交给教师。

(6) 实验时小心仔细，全部操作应严格按操作规程进行，万一遇有盛试剂器皿不慎打破、皮肤破伤或试剂入口等意外情况发生时，应立即报告指导教师，及时处理，切勿隐瞒。

(7) 仪器损坏时，应如实向教师报告，认真填写损坏仪器登记表，然后补偿一定金额。

(8) 每次实验课安排同学轮流值日，值日生要负责实验室当天的卫生和安全检查，注意关闭火、煤气、门窗、灯等。

二、实验记录

实验课前应认真预习实验内容，将实验名称、实验原理、实验内容和步骤等简单扼要地

写在记录本上。实验记录本要标明页码,不能随意撕掉任何一页。

实验中使用的试剂纯度和终浓度以及使用的仪器类型等都要记录清楚。实验中观察到的现象、结果和得出的数据,应及时直接记在记录本上,绝对不可以随意记在单片纸上。原始记录必须准确、简练、清楚。

三、实验报告的书写

实验结束后,应及时整理和总结实验结果,写出实验报告。

1. 标题

标题应包括实验名称、实验时间、实验室名称、实验组号、实验者及同组者姓名、实验室条件。

2. 实验目的

3. 实验原理

应简述基本原理,不要完全照抄实验指导书。

4. 操作步骤

操作步骤(或方法)可以采用流程图的方式或自行设计的表格来表达。

5. 实验结果

将实验中的现象、数据进行整理、分析,得出相应的结论。建议尽量使用图表法来表示实验结果,这样可以使实验结果清楚了。

6. 讨论

包括对实验结果及观察现象的小结、对实验中遇到的问题和思考题的探讨以及对实验的改进意见等。

7. 思考题

四、生物化学实验课评分标准

(1) 平时成绩。

(2) 期末实验考试成绩。

实验室一些常用知识介绍

一、玻璃仪器的洗涤及一些常用的洗涤剂

1. 玻璃仪器的洗涤

(1) 新购买的玻璃仪器含游离碱较多,首先用自来水洗去表面灰垢,然后用洗衣粉刷洗,自来水冲净后,浸泡在1%~2%盐酸溶液中过夜以除去玻璃表面的碱性物质。最后,用自来水冲洗干净,并用蒸馏水冲洗2次。

(2) 对于使用过的玻璃仪器,应先用自来水冲洗,再用毛刷蘸取洗衣粉刷洗。用自来水充分冲洗后再用蒸馏水冲洗2次。凡洗净的玻璃仪器壁上都不应带有水珠,否则表示尚未洗

净,需重新洗涤。

(3) 比较脏的仪器或不便刷洗的仪器,使用前应用流水冲洗,以除去粘附物,如果仪器上有凡士林或其他油污,应先用软纸擦除,再用有机溶剂擦净,最后用自来水冲洗。待仪器晾干后,放入铬酸洗液中浸泡过夜。取出后用自来水充分冲洗,再用蒸馏水冲洗2次。

(4) 普通玻璃仪器可在烘箱内烘干,但定量的玻璃仪器如吸管、滴定管、量筒、容量瓶等不能加热,应晾干备用。另外,分光光度计中的比色杯的四壁是用特殊胶水粘合而成的,受热后会散架,所以也不能烘干。

对疑有传染性的样品(如肝炎病人的血清),其容器应先消毒再清洗。盛过剧毒药物或放射性同位素物质的容器,应先经过专门处理后再清洗。

2. 一些常用的洗涤剂

(1) 肥皂水或洗衣粉溶液 这是最常用的洗涤剂,主要是利用其乳化作用以除去污垢,一般玻璃仪器均可用其刷洗。

(2) 铬酸洗液(重铬酸钾-硫酸洗液) 铬酸洗液广泛用于玻璃仪器的洗涤,其清洁效力来自于它的强氧化性(Cr^{6+})和强酸性。铬酸洗液具有强腐蚀性,使用时应注意安全。铬酸洗液可反复使用多次,如洗液由红棕色变为绿色或过于稀释则不宜再用。

配法是将重铬酸钾先溶解于自来水中,可慢慢加温,使溶解,冷却后徐徐加入浓硫酸,边加边搅动。配好后的洗涤液应是棕红色或橘红色,储存于有盖容器内。

(3) 50~100g/L 乙二胺四乙酸二钠($\text{EDTA}-\text{Na}_2$)溶液 加热煮沸,利用EDTA和金属离子的强配位效应,可去除玻璃器皿内部钙镁盐类的白色沉淀和不易溶解的重金属盐类。

(4) 45%的尿素洗液 是蛋白质的良好溶剂,适用于洗涤盛蛋白质制剂血样的容器。

(5) 乙醇-硝酸混合液 用于清洗一般方法难于洗净的有机物,最适合于洗涤滴定管。

二、生物化学常用缓冲液

1. 磷酸盐缓冲液(PBS)

磷酸盐是生物化学研究中使用最广泛的一种缓冲剂,由于它们是二级解离,有2个 pK_a ,所以用它们配制的缓冲液,pH范围最宽:

NaH_2PO_4 : $\text{pK}_{a1}=2.12$, $\text{pK}_{a2}=7.21$

Na_2HPO_4 : $\text{pK}_{a1}=7.21$, $\text{pK}_{a2}=12.32$

配酸性缓冲液:用 NaH_2PO_4 , pH为1~4。

配中性缓冲液:用混合的两种磷酸盐, pH为6~8。

配碱性缓冲液:用 Na_2HPO_4 , pH为10~12。

磷酸盐缓冲液的优点为:

- (1) 容易配制成各种浓度的缓冲液;
- (2) 适用的pH范围宽;
- (3) pH受温度的影响小;
- (4) 缓冲液稀释后pH变化小,如稀释10倍后pH的变化小于0.1。

其缺点为:

- (1) 易与常见的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 以及重金属离子缔合生成沉淀;
- (2) 会抑制某些生物化学过程,如对某些酶的催化作用会产生某种程度的抑制作用。

2. Tris 缓冲液 (三羟甲基氨基甲烷)

Tris 缓冲液在生物化学研究中使用得越来越多,有超过磷酸盐缓冲液的趋势,如在 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳中都使用 Tris 缓冲液,而很少再用磷酸盐。

Tris 缓冲液的常用有效 pH 范围是在“中性”范围,例如,Tris - HCl 缓冲液 pH 为 7.5 ~ 8.5, Tris - 磷酸盐缓冲液 pH 为 5.0 ~ 9.0。

Tris - HCl 缓冲液的优点是:

(1) 因为 Tris 碱的碱性较强,所以可以只用这一种缓冲体系,配制由酸性到碱性的大范围 pH 的缓冲液;

(2) 对生物化学过程干扰很小,不与钙离子及重金属离子发生沉淀。

其缺点是:

(1) 缓冲液的 pH 受溶液浓度影响较大,缓冲液稀释 10 倍, pH 的变化大于 0.1;

(2) 温度效应大,温度变化对缓冲液 pH 的影响很大,例如 4℃ 时缓冲液的 pH 为 8.4, 则 37℃ 时的 pH 为 7.4, 所以一定要在使用温度下进行配制,室温下配制的 Tris - HCl 缓冲液不能用于 0 ~ 4℃;

(3) 易吸收空气中的 CO₂, 所以配制的缓冲液要盖严密封;

(4) 此缓冲液对某些 pH 电极发生一定的干扰作用,所以要使用与 Tris 溶液具有兼容性的电极。

3. 硼酸盐缓冲液 (BBS)

常用的有效 pH 范围 8.5 ~ 10.0, 因而它是碱性范围内最常用的缓冲液,其优点是配制方便,只使用一种试剂,缺点是能与很多代谢产物形成络合物,尤其是能与糖类的羟基反应生成稳定的复合物而使缓冲液受到干扰。

4. 氨基酸缓冲液

此缓冲液使用的范围宽,可用于 pH2.0 ~ 11.0, 最常用的有:

甘氨酸 - HCl 缓冲液: pH2.0 ~ 5.0。

甘氨酸 - NaOH 缓冲液: pH8.0 ~ 11.0。

甘氨酸 - Tris 缓冲液: pH8.0 ~ 11.0 (此缓冲液用于广泛使用的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳的电极缓冲液)。

组氨酸缓冲液: pH5.5 ~ 6.5。

甘氨酸胺 (glycine amide) 缓冲液: pH7.8 ~ 8.8。

甘氨酸甘氨酸 (glycylglycine) 缓冲液: pH8.0 ~ 9.0。

此类缓冲体系的优点是: 为细胞组分和各种提取液提供更接近天然的环境。

其缺点是: (1) 与羧酸盐和磷酸盐缓冲体系相似, 也会干扰某些生物化学反应过程, 如代谢过程等; (2) 试剂的价格较高。

三、pH 的测定

测定溶液 pH 通常有两种方法, 最简便但较粗略的方法是用 pH 试纸, 分为广泛和精密 pH 试纸两种。

精确测定溶液 pH 要使用 pH 计, 其精确度可达 0.005 个 pH 单位, 关键是要正确选用和校对 pH 电极。过去是使用两个电极, 即玻璃电极和参比电极, 现在它们已淘汰, 被两种电

极合一的复合电极所代替。

玻璃电极对溶液中的氢离子浓度敏感，其头部为一薄玻璃泡，内装有 0.1mol/L HCl ，上部由银-氯化银电极与铂金丝联结。当玻璃电极浸入样品溶液时，薄玻璃泡内外两侧的电位差取决于溶液的 pH，即玻璃电极的电极电位随样品溶液中氢离子浓度（活度）的变化而变化。

参比电极的功能是提供一个恒定的电位，作为测量玻璃电极薄玻璃泡内外两侧电位差的参照。常用的参比电极是甘汞电极（ Hg/HgCl ）或银-氯化银电极（ Ag/AgCl ）。参比电极电位是氯离子浓度的函数，因而电极内充以 4mol/L KCl 或饱和 KCl ，以保持恒定的氯离子浓度和恒定的电极电位。使用饱和 KCl 是为使电极内沉积有部分 KCl 结晶，以使 KCl 的饱和浓度不受温度和湿度的影响。

现在 pH 测定已都改用玻璃电极与参比电极合一的复合电极，即将它们共同组装在一根玻璃管。使用时应注意：

- (1) 经常检查电极内的 4mol/L KCl 溶液的液面，如液面过低则应补充 4mol/L KCl 溶液。
- (2) 玻璃泡极易破碎，使用时必须极为小心。
- (3) 复合电极长期不用，可浸泡在 2mol/L KCl 溶液中，平时可浸泡在无离子水或缓冲溶液中，使用时取出，用水冲洗玻璃泡部分，然后用吸水纸吸干余水，将电极浸入待测溶液中，稍加搅拌，读数时电极应静止不动，以免数字跳动不稳定。
- (4) 使用时复合电极的玻璃泡和半透膜小孔要浸入到溶液中。
- (5) 使用前要用标准缓冲液校正电极，其数据见书后附录，常用的 3 种标准缓冲液 pH 分别为 4.00、6.88 和 9.23 (20°C)，精度为 $\pm 0.002\text{pH}$ 单位。校正时先将电极放入 pH 为 6.88 的标准缓冲液中，用 pH 计上的“标准”旋钮校正 pH 读数，然后取出电极洗净，再放入 pH 为 4.00 或 9.23 的标准缓冲液中，用“斜率”旋钮校正 pH 读数，如此反复多次，直至二点校正正确，再用第三种标准缓冲液检查。标准缓冲液不用时应冷藏。
- (6) 电极的玻璃泡容易被污染。若测定浓蛋白质溶液的 pH 时，玻璃泡表面会覆盖一层蛋白质膜，不易洗净而干扰测定，此时可用 0.1mol/L HCl 的胃蛋白酶溶液浸泡过夜。若被油脂污染，可用丙酮浸泡。若电极保存时间过长，校正数值不准时，可将电极放入 2mol/L KCl 溶液中， 40°C 加热 1h 以上，进行电极活化。
- (7) 在黏稠性试样中测试之后，电极必须用去离子水反复冲洗多次，以除去黏附在玻璃膜上的试样。有时还需先用其他溶剂洗去试样，再用水洗去溶剂，浸入浸泡液中活化。
- (8) 避免接触强酸强碱或腐蚀性溶液，如果测试此类溶液，应尽量减少浸入时间，用后仔细清洗干净。
- (9) 避免在无水乙醇、浓硫酸等脱水性介质中使用，它们会损坏球泡表面的水合凝胶层。
- (10) 塑壳 pH 复合电极的外壳材料是聚碳酸酯塑料（PC），PC 塑料在有些溶剂中会溶解，如四氯化碳、三氯乙烯、四氢呋喃等，如果测试中含有以上溶剂，就会损坏电极外壳，此时应改用玻璃外壳的 pH 复合电极。

pH 测定时会有几方面的干扰：

- (1) 钠离子的干扰 多数复合电极对 Na^+ 和 H^+ 都非常敏感，尤其是高 pH 的碱性溶液， Na^+ 的干扰更加明显。例如，当 Na^+ 浓度为 0.1mol/L 时，可使 pH 偏低 0.4~0.5 个单位。为

减少 Na^+ 对 pH 测定的干扰, 每个复合电极都应附有一条校正 Na^+ 干扰的标准曲线, 有的新式的复合电极具有 Na^+ 不透过性能, 如不具备以上两个条件, 则可以将电极内的 KCl 换成 NaCl。

(2) 浓度效应 溶液的 pH 与溶液中缓冲离子浓度和其他盐离子浓度有关, 因为溶液 pH 取决于溶液中的离子活度而不是浓度, 只有在很稀的溶液中, 离子的活度才与其浓度相等。生化实验中经常配制比使用浓度高 10 倍的“贮液”, 使用时再稀释到所需浓度, 由于浓度变化很大, 溶液 pH 会有变化, 因此稀释后仍需对其 pH 进行调整。

(3) 温度效应 有的缓冲液的 pH 受温度影响很大, 如 Tris 缓冲液, 因此配制和使用都要在同一温度下进行。

蛋白质相关实验

实验一 氨基酸的分离鉴定——纸层析法

纸层析法 (paper chromatography, PC) 是生物化学上分离、鉴定氨基酸混合物的常用技术, 可用于蛋白质的氨基酸成分的定性鉴定和定量测定。本实验采用纸层析法分离氨基酸。氨基酸是无色的, 利用茚三酮反应, 可将氨基酸层析点显色作定性、定量用。

一、实验目的

通过对氨基酸的分离, 学习运用纸层析法分离混合物的基本原理, 掌握纸层析的操作方法。

二、实验原理

纸层析是以滤纸作为惰性支持物的分配层析, 滤纸纤维上有亲水性的羟基, 通过吸附一层水作为固定相, 通常把有机溶剂作为流动相。有机溶剂自上而下流动称为下行层析, 自下而上流动称为上行层析。流动相流经支持物时, 与固定相之间连续抽提, 使物质在两相间不断分配而得到分离。物质被分离后在纸层析图谱上的位置用 R_f 值 (比移值) 来表示:

$$R_f \text{ 值} = \text{原点到层析点中心的距离} / \text{原点到溶剂前沿的距离}$$

在一定条件下某种物质的 R_f 值是常数, 其大小受物质的结构、性质、溶剂系统物质组成与比例、pH、选用滤纸质地和温度等多种因素影响。此外, 样品中的盐分、其他杂质以及点样过多均会影响分离效果。无色物质的纸层析图谱可用光谱法 (紫外光照射) 或显色法鉴定, 氨基酸纸层析图谱常用茚三酮或吡啶酮作为显色剂, 本实验采用茚三酮作为显色剂。

三、实验准备

1. 仪器设备

层析缸, 喷雾器, 电吹风机。

2. 材料

毛细管, 培养皿, 层析滤纸 (新华一号), 针线, 直尺。

3. 主要试剂

(1) 扩展剂 4 份水饱和的正丁醇和 1 份冰乙酸的混合物。将 20mL 正丁醇与 5mL 冰乙酸放入分液漏斗中与 15mL 水混合, 充分振荡, 静置后分层, 放出下层水层, 取漏斗内的扩展剂约 5mL 置于小烧杯中作平衡溶剂, 其余的倒入培养皿中备用。

(2) 氨基酸溶液 5mg/mL 的赖氨酸、甘氨酸、脯氨酸、谷氨酸、丙氨酸、亮氨酸溶液以及它们的混合液。

(3) 显色剂 0.5% 水合茚三酮正丁醇溶液。

四、实验方法

1. 准备

将盛有平衡溶剂的小烧杯置于密闭的层析缸中, 取长 22cm、宽 14cm 的层析滤纸一张, 在滤纸的一端距边缘 2~3cm 处用铅笔画一条直线, 在此直线上每间隔 2cm 做一记号, 等待点样。

2. 点样

用毛细管将各氨基酸样液分别点在 7 个位置上, 注意一定要每个点用一个毛细管, 避免混用污染。样点干燥后再点 2~3 次, 每点在滤纸上的扩散直径范围在 3mm 内为最佳。

3. 扩展

用针线将滤纸缝成圆筒状, 注意纸的两边不能接触, 留一定缝隙。将盛有约 20mL 扩展剂的培养皿迅速置于密闭的层析缸中, 并将滤纸垂直立于培养皿中, 点样的一端在下, 扩展剂的液面需低于点样线 1cm, 待溶剂上升至距离滤纸上端 2cm 左右时取出滤纸, 用铅笔在溶剂前沿画一边界线, 自然干燥或用电吹风机吹干溶剂。

4. 显色

用喷雾器均匀喷上 5g/L 茚三酮正丁醇溶液, 然后置 100℃ 烘箱中烘烤 5min 或用电热风吹干即可显出各层析斑点。

5. 计算

计算各种氨基酸的 R_f 值。

五、注意事项与建议

(1) 点样时要避免手指或唾液等污染滤纸有效面 (即展层时样品可能达到的部分)。

(2) 点样斑点不能太大 (直径应小于 0.3cm), 防止层析后氨基酸斑点过度扩散和重叠, 且吹风温度不宜过高, 否则斑点变黄。

(3) 展层开始时切勿使样品点浸入溶剂中。

Q 思考题

(1) 为什么不同的氨基酸有不同的 R_f 值?

(2) 影响本实验 R_f 值精确性的因素有哪些?

实验二 离子交换层析分离混合氨基酸

离子交换层析是生物化学领域中常用的一种层析方法，广泛地应用于各种生化物质如氨基酸、蛋白、糖类、核苷酸等的分离纯化。

一、实验目的

学习用阳离子交换树脂柱分离氨基酸的操作方法和基本原理。

二、实验原理

离子交换层析 (ion exchange chromatography, ICE) 是分离和制备样品混合物的液-固相层析方法，是基于待测物质的阳离子或阴离子和相对应的离子交换剂间的静电结合，即根据物质的酸碱性、极性等差异，通过离子间的吸附和脱吸附原理将电解质溶液各组分分开。它是从复杂混合物体系中分离性质极为相似的生物分子的有效手段之一。由于带电荷不同的各种物质对离子交换剂有不同亲和力，通过改变洗脱液的离子强度和 pH，控制这种亲和力，即可使这些物质依据亲和力大小顺序依次从层析柱中洗脱下来。

氨基酸是两性电解质，分子上的净电荷取决于氨基酸的等电点和溶液的 pH，各种氨基酸分子结构不同，在同一 pH 时所带电荷的性质（正、负）和多少不同，与离子交换树脂的亲和力有差异，因此可根据亲和力从小到大的顺序被洗脱液分别洗脱下来，达到分离的效果。

三、实验准备

1. 仪器设备

玻璃层析柱，恒压洗脱瓶，移液管，部分收集器，水浴锅，分光光度计，电炉。

2. 材料

试管，苯乙烯磺酸钠型阳离子交换树脂（100~200 目）。

3. 主要试剂

(1) 2mol/L 氢氧化钠溶液。

(2) 2mol/L 盐酸溶液。

(3) 标准氨基酸溶液 将天冬氨酸和赖氨酸分别配成 2mg/mL 的 0.1mol/L 盐酸溶液。

(4) 混合氨基酸溶液 将上述天冬氨酸和赖氨酸溶液按 1:4 比例混合。

(5) 柠檬酸-氢氧化钠-盐酸溶液 (pH 5.8, 钠离子浓度 0.45mol/L) 取柠檬酸 7.13g、氧化钠 4.65g 分别溶于水后混合，加入浓盐酸 2.63mL，定容至 250mL；4℃ 冰箱保存。

(6) 显色剂 2g 水合茚三酮用适量 95% 乙醇溶解，加水定容至 100mL。

四、实验方法

1. 层析柱的准备

将强酸性阳离子交换树脂用氢氧化钠处理成 Na^+ 型后用水洗至中性，搅拌 1h 后装入层

析柱,使之自然沉降到一定高度,准备随后用缓冲液平衡。

2. 平衡

用 pH 5.8 的柠檬酸缓冲液匀速缓慢地流经离子交换柱,调节流速为 $2 \sim 4 \text{ mL/min}$,收集洗脱液至 4 倍床体积时即可视为离子交换柱已经平衡,调节流速为 0.5 mL/min ,可准备加待测样。

3. 加待测样及分离

保持缓冲液流速不变的同时使缓冲液面降至贴近层析柱树脂颗粒表面,立即小心地从贴近树脂颗粒表面的柱上端仔细加入混合氨基酸样品液 $0.25 \sim 0.5 \text{ mL}$,当样品液弯月面靠近树脂顶端时,立即小心加入 0.5 mL 柠檬酸缓冲液,待缓冲液弯月面靠近树脂顶端时,再加入 0.5 mL 柠檬酸缓冲液。此后可用滴管小心注入柠檬酸缓冲液至高于树脂颗粒表面约 1 cm 。用试管收集洗脱液,每管收集 2 min (或每管收集 1 mL),至氨基酸全部被洗脱下来为止。(特别提示:操作中小心,切勿搅动床面;操作要及时迅速,切勿使树脂柱干涸)

4. 氨基酸的鉴定

向各管收集液中加入 1 mL 水合茚三酮显色剂并振荡混匀,在沸水浴中加热 15 min ,冷却至室温后测定各管吸光度值。以收集的管数为横坐标,以吸光度值 A 为纵坐标,绘制洗脱曲线。(用两种氨基酸的纯溶液为样品,按上述方法和条件分别操作,将得到的洗脱曲线与混合氨基酸的洗脱曲线对照,即可确定两个峰为何种氨基酸。)

五、注意事项与建议

- (1) 在装柱时避免使柱内液体流干而使装柱失败。装好的层析柱应均匀,没有气泡,树脂顶面平整,否则要重装柱。
- (2) 调节流速前要排除恒流泵与柱间连接管内所有气泡,以免影响流速。
- (3) 样品体积不要过大,样品的含量不能超过层析柱内离子交换能力,否则影响分离效果。

Q 思考题

- (1) 何谓氨基酸的离子交换? 本实验采用的离子交换剂属于哪一种?
- (2) 实验中柠檬酸缓冲液用于离子交换树脂的平衡,为何在洗脱操作时又用该缓冲液? 实验中为什么要用 pH 5.8 的柠檬酸缓冲液? 可不可以用其他 pH 的缓冲液? 如果可以,应选用的 pH 为多少? 并阐述原理。
- (3) 茚三酮显色剂在与氨基酸显色时,是与氨基酸的什么基团反应? 反应条件是什么? 显色时为什么要沸水浴加热? 显色原理是什么?
- (4) 本实验分离的两种氨基酸,是否可以采用阴离子交换树脂分离? 如果使用阴离子树脂,条件和结果如何? 请说明原理。
- (5) 除氨基酸外,用离子交换柱层析法还适合分离哪些物质? 为什么?

实验三 味精中谷氨酸钠测定

味精是以碳水化合物(淀粉、大米、糖蜜等糖质)为原料,经微生物(谷氨酸棒杆菌