



高等院校生命科学实验系列教材

生命科学技术

主 编 郝福英
编 者 周先碗 黄玉芝 薛友纺 陈丹英
魏春红 樊启昶 焦仁杰 侯巧明
王绒疆 袁洪生 董 巍



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

高等院校生命科学实验系列教材

生命科学实验技术

主 编	郝福英			
编 者	周先碗	黄玉芝	薛友纺	陈丹英
	魏春红	樊启昶	焦仁杰	侯巧明
	王绒疆	袁洪生	董 巍	



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

生命科学实验技术/郝福英主编. —北京:北京大学出版社,2004.8
(高等院校生命科学实验系列教材)

ISBN 7-301-07519-7

I. 生… II. 郝… III. 生命科学-实验 IV. Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 056492 号

书 名: 生命科学实验技术

著作责任者: 郝福英 主编

责任编辑: 郑月娥

标准书号: ISBN 7-301-07519-7/Q · 0097

出版发行: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区中关村北京大学校内 100871

网 址: <http://cbs.pku.edu.cn> 电子信箱: zpup@pup.pku.edu.cn

电 话: 邮购部 62752015 发行部 62750672 编辑部 62752038

排 版 者: 兴盛达打字服务社 82715400

印 刷 者: 世界知识印刷厂

经 销 者: 新华书店

787 毫米×1092 毫米 16 开本 16.5 印张 410 千字

2004 年 8 月第 1 版 2004 年 8 月第 1 次印刷

定 价: 27.00 元

未经许可,不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。

版权所有,翻版必究

前言

《生命科学实验技术》一书是教学改革成果,书内精选了生命科学各专业最新或最近数年内发展起来的实验技术,例如双向电泳(生化),细胞凋亡及其鉴定(细胞生物学),蛋白质间的相互作用(生技),核酸的银染法序列分析(分子生物学),发育相关基因的表达、诱变及其功能研究(发育学),转基因果蝇(遗传学)等等,都是生命科学新的研究课题中的实验技术。书内选编的其他实验技术则是生命科学必须掌握的实验方法,也是教师多年教学经验的结晶。本书可为提高学生分析问题和解决问题的能力起到极大的促进作用,同时可为生命科学的学生打下坚实的、范围广泛的专业基础。

本书分为十部分,设计了46个实验,选做其中35个实验,完成250学时的教学。学院全部学生必做23个实验,占200学时,在实验目录中带符号*标记;其余实验用50学时按专业分别选做3~5个。这种教学方式,经过一年的实践,受到学生的欢迎,也取得了较好的效果。

综上所述,本书有三方面的特点:

(1) 新。很多新实验出于科研课题组,实验课的教员也来自科研课题组。

(2) 成熟。每个实验都由教师们亲自设计,反复验证并且有明确的实验结果和数据,为后续学生进入科学研究阶段,顺利完成论文题目打下基础。

(3) 全面。所有学生都做生命科学各专业精选出的有特色的实验,以拓宽知识面,掌握全面技术,使今后学生无论是继续提高或者到国外深造都有较宽的选择专业的余地。

生命科学学院一贯重视实验教学,重视培养学生掌握实验技术的能力,从国内或国外的毕业生反馈的信息来看,学生的动手能力普遍得到提高,受到用人单位的欢迎。这本书的实验内容会在以前相关教材的基础上提高一大步,迈上新台阶,学生们一定会受益匪浅,取得更大进步。

本书的出版得到院领导许崇任教授的极大支持和关怀,得到参加编写此书教师的大力协助,体现了教师们的教学水平和辛勤劳动,在此表示感谢!本书一定还存在不少缺点和错误,请读者批评指正。

编者

2004年2月25日于北京大学

757074/04

目 录

A 生物化学部分

* 实验 1	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(1)
* 实验 2	聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳	(8)
* 实验 3	聚丙烯酰胺凝胶双向电泳	(14)
* 实验 4	鸡卵粘蛋白的分离纯化	(21)
* 实验 5	胰蛋白酶粗提取与活性测定	(26)
* 实验 6	亲和层析纯化胰蛋白酶	(29)
* 实验 7	胰蛋白酶动力学测定	(33)
实验 8	蛋白质 N-末端氨基酸分析	(42)
实验 9	猪脾 DNA 的制备及其含量测定	(50)
	实验 9.1 猪脾 DNA 的制备	(50)
	实验 9.2 紫外吸收法测定 DNA 的含量	(52)
实验 10	抗血清的制备	(55)
* 实验 11	抗血清测定	(59)
* 实验 12	酶联免疫吸附测定	(67)

B 分子生物学部分

实验 13	质粒 DNA 的分离纯化	(73)
实验 14	质粒 DNA 的限制性内切酶酶切及琼脂糖凝胶电泳分离、鉴定	(78)
实验 15	大肠杆菌感受态细胞的制备及质粒 DNA 分子导入原核细胞	(84)
* 实验 16	DNA 重组	(89)
	* 实验 16.1 粘端连接法	(91)
	* 实验 16.2 粘-平端连接法	(96)
* 实验 17	PCR 基因扩增	(102)
* 实验 18	细菌总 RNA 分离纯化及其鉴定	(106)
* 实验 19	DNA 核苷酸序列分析	(109)
* 实验 20	蛋白质转移	(115)
	* 实验 20.1 酶联免疫反应检测生物大分子	(115)
	* 实验 20.2 蛋白质化学发光免疫反应检测生物大分子	(118)

C 遗传与发育学部分

- * 实验 21 人类外周血淋巴细胞的培养及染色体核型分析 (125)
 - * 实验 21.1 人体微量血细胞培养(全血培养)及染色体制片 (125)
 - * 实验 21.2 染色体的 G 带核型分析 (127)
- 实验 22 人类染色体的荧光原位杂交分析 (130)
- 实验 23 用 P 因子构建 *dcaf-1* 转基因果蝇及对 *dcaf-1* 突变株
突变表型的拯救实验 (133)
- * 实验 24 发育相关基因的表达、诱变及其功能研究 (143)
 - * 实验 24.1 斑马鱼发育特异基因表达原位杂交 (143)
 - * 实验 24.2 斑马鱼发育相关基因的过量表达和对发育影响的观察 (143)
 - * 实验 24.3 反转录病毒介导斑马鱼插入突变与诱变效率的初步判断 ... (144)
 - * 实验 24.4 线虫发育相关基因的诱变 (145)
 - * 实验 24.5 线虫突变品系互补实验判定两个隐形突变基因
是否为等位基因 (146)

D 细胞生物学部分

- * 实验 25 动物细胞的传代培养 (147)
- * 实验 26 磷酸钙介导的外源基因导入哺乳动物细胞 (150)
- * 实验 27 细胞凋亡的检测 (152)

E 动物生理学部分

- 实验 28 蟾蜍皮肤感受器传入冲动的记录 (155)
- 实验 29 玻璃微电极制备、充灌和电极电阻测量 (159)
- 实验 30 在体蟾蜍心肌细胞动作电位的记录 (161)
- 实验 31 蟾蜍骨骼肌细胞静息电位和动作电位的观察和记录 (164)
- 实验 32 几种离子和神经递质对蟾蜍离体心脏搏动的影响 (168)
- 实验 33 家兔动脉血压的调节 (172)
- 实验 34 家兔减压神经对血压的调节作用及神经冲动的引导 (177)

F 微生物学部分

- 实验 35 酵母菌单倍体原生质体融合 (181)
- 实验 36 多粘菌素 E 发酵及管碟法测定生物效价 (184)
- 实验 37 大肠杆菌 λ 噬菌体的局限性转导 (191)

G 环境生态学部分

- 实验 38 种群的 Logistic 增长及计算机模拟 (194)
- 实验 39 用黑白瓶测氧法测定水体初级生产力 (196)

H 植物生理学部分

- 实验 40 植物激素对植物形态建成的作用 (198)
- 实验 41 还原糖含量的测定 (202)

I 生物技术学部分

- 实验 42 土壤农杆菌介导的烟草基因转化 (205)
- 实验 43 外源基因在原核细胞中表达和初步纯化 (210)
- 实验 44 DNA 的 Southern 分析 (215)

J 组织学部分

- 实验 45 动物组织石蜡切片制作 (220)
- 实验 46 核酸、肝糖和碱性磷酸酶的组织化学染色 (225)

附 录

- 附录 I 生物化学实验常用数据表 (228)
- I.1 常用缓冲溶液的配制方法 (228)
- I.2 常用蛋白质相对分子质量标准参照物 (234)
- I.3 常用市售酸碱的浓度 (235)
- 附录 II 人体染色体 G 带特征 (236)
- 附录 III 显微摄影 (239)
- 附录 IV 部分仪器介绍 (247)
- IV.1 RM6240B 多道生理信号采集处理系统操作简介 (247)
- IV.2 SWF-IW 型微电极放大器简介和使用指南 (250)
- IV.3 PIP5 型玻璃微电极拉制仪简单结构和使用说明 (253)
- IV.4 生理实验常用换能器 (254)

实验 1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

在聚丙烯酰胺凝胶系统中,加入一定量的十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,简称 SDS),蛋白质样品就会与 SDS 结合形成带负电荷的复合物,由于蛋白质的相对分子质量不同,所形成复合物的相对分子质量也不同,在电泳中反映出不同的迁移率。根据标准蛋白质样品在电泳中的迁移率和相对分子质量所作出的标准曲线,就可以推算出被测蛋白质样品相对分子质量的近似值。利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质相对分子质量最常用的方法是不连续系统垂直板电泳。

【实验目的】

学习和掌握 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法和测定蛋白质相对分子质量的基本原理和实验技术。

【实验原理】

聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质相对分子质量的方法,主要是根据蛋白质组分的相对分子质量的大小、形状以及所带净电荷的多少等因素所造成的电泳迁移率的差别而进行分离鉴定的。如果在聚丙烯酰胺凝胶系统中,加入一定量的十二烷基硫酸钠,此时的蛋白质分子的电泳迁移率主要取决于它的相对分子质量大小,而其他因素对电泳迁移率的影响几乎可以忽略不计。当蛋白质的相对分子质量在 15 000~200 000 之间时,电泳迁移率与相对分子质量的对数呈直线关系,符合下列方程式:

$$\lg M_r = -b \cdot m_R + K$$

式中: M_r 为蛋白质的相对分子质量, m_R 为相对迁移率, b 为斜率, K 为截距。在一定条件下, b 和 K 均为常数。

若将已知相对分子质量的标准蛋白质的迁移率与相对分子质量的对数作图,可获得一条标准曲线。未知蛋白质在相同条件下进行电泳,根据它的电泳迁移率即可在标准曲线上求得相对分子质量。有人对 37 种不同蛋白质的已知相对分子质量进行测定,获得较好的结果(见图 1-1)。

SDS 是一种阴离子去污剂,它在水溶液中以单体和分子团(micellae)的混合形式存在。这种阴离子去污剂能破坏蛋白质分子之间以及与其他物质分子之间的非共价键,使蛋白质变性而改变原有的空间构象。特别是在强还原剂的条件下,如在巯基乙醇存在下,由于蛋白质分子

内的二硫键被还原剂打开,不易再被氧化,这就保证了蛋白质分子与 SDS 分子充分结合,形成带负电荷的蛋白质-SDS 复合物。这种复合物由于结合了大量的 SDS,使蛋白质丧失了原有的电荷状态,形成了仅保持原有分子大小特征的负离子团块,从而降低或消除了各种蛋白质分子之间天然的电荷差异。

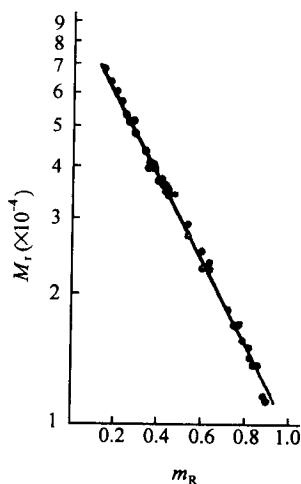


图 1-1 37 种蛋白质的相对分子质量对电泳迁移率图

相对分子质量范围为 11 000~70 000, 10% 凝胶, pH 7.2 SDS-磷酸盐缓冲系统

SDS 与蛋白质结合后,还引起了蛋白质构象的改变。蛋白质-SDS 复合物的流体力学和光学性质表明,它们在水溶液中的形状,近似于雪茄烟形的长椭圆棒。不同相对分子质量的蛋白质-SDS 复合物短轴的长度都一样,约为 1.8 nm,而长轴的长度则随蛋白质相对分子质量的大小变化成正比。这样的蛋白质-SDS 复合物在凝胶中的迁移率,不再受蛋白质原有电荷和形状的影响,而只与椭圆棒的长度有关,也就是蛋白质相对分子质量有关,椭圆棒的长度是蛋白质相对分子质量的函数。

采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的相对分子质量具有简便、快速、重复性好等特点。不需要复杂的仪器设备,只需要微克级的蛋白质样品就可进行测定。在蛋白质相对分子质量为 15 000~200 000 范围内测得的相对分子质量与用其他测定相对分子质量的方法相比,误差一般不超过 10%。因此,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质相对分子质量的方法得到迅速的发展和广泛的应用。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳作为一种单向电泳技术,按照凝胶电泳系统中的缓冲液、pH 和凝胶孔径的区别来分类,可分为 SDS-连续系统电泳和 SDS-不连续系统电泳两类;按照所制成的凝胶形状和电泳方式又可分为 SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直管型电泳和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直板型电泳两类。或称为 SDS-连续系统垂直管型凝胶电泳、SDS-不连续系统垂直管型凝胶电泳、SDS-连续系统垂直板型凝胶电泳和 SDS-不连续系统垂直板型凝胶电泳。无论采用哪一种,其基本原理都是相似的,具体操作也大同小异。由于 SDS-不连续系统具有较强的浓缩效应,因而它的分辨率比 SDS-连续系统电泳要高一些,所以更多人更喜欢采用不连续系统方法。

【器材与试剂】

一、器材

垂直板电泳槽,直流稳压电源(电压 300~600 V,电流 50~100 mA),50 μ L 或 100 μ L 的微量注射器,水浴锅,大培养皿(直径 15 cm)。

二、试剂

标准相对分子质量蛋白质,甘氨酸,三羟甲基氨基甲烷(Tris),HCl,十二烷基硫酸钠(SDS),N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED), β -巯基乙醇,过硫酸铵(AP),丙烯酰胺(Acr),N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(Bis),甲醇,乙醇,乙酸,三氯乙酸,考马斯亮蓝 R-250 (Coomassie brilliant blue R-250)。

(1) 30%凝胶储液: 29.1 g Acr,0.9 g Bis,加蒸馏水定容至 100 mL。

(2) 分离胶缓冲液: 36.3 g Tris,48 mL 1 mol/L HCl,加蒸馏水定容至 100 mL,pH 8.9。

(3) 浓缩胶缓冲液: 5.98 g Tris,48 mL 1 mol/L HCl,加蒸馏水定容至 100 mL,pH 6.7。

(4) 电极缓冲液: 1 g SDS,6 g Tris,28.8 g 甘氨酸,加蒸馏水定容至 1000 mL,pH 8.3。

(5) 0.05 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液: 称取 0.61 g Tris,加入 50 mL 蒸馏水使之溶解,再加入 3 mL 1 mol/L HCl,混匀后在 pH 计上调至 pH 8.0,最后加蒸馏水定容至 100 mL。

(6) 样品溶解液: 在 0.01 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中含有 1% SDS,1% β -巯基乙醇,10%甘油,0.02%溴酚蓝。配制方法: 100 mg SDS,0.1 mL β -巯基乙醇,1.0 mL 甘油,2 mg 溴酚蓝,2 mL 0.05 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液,加蒸馏水 10 mL。

(7) 10%(W/V)过硫酸铵: 称取 1 g 过硫酸铵,溶于 10 mL 蒸馏水中。

(8) 固定液: 45 mL 95%乙醇,10 mL 冰醋酸,加蒸馏水定容至 100 mL。

(9) 染色液: 0.25%(W/V)考马斯亮蓝 R-250-酸-乙醇-水染色液。称取 0.25 g 考马斯亮蓝 R-250,加入 45 mL 95%乙醇,10 mL 冰醋酸,加蒸馏水定容至 100 mL,混匀,滤纸过滤。

(10) 脱色液: 7%醋酸-20%乙醇(V/V)混合液。

【实验步骤】

一、电泳槽组装

垂直板型电泳槽型号很多。目前用得比较多的有 Bio-Rad 产的小型电泳槽、Pharmacia 产的小型电泳槽、北京六一厂产的小型电泳槽。

现以六一厂产的电泳槽为例简单介绍一下。

将垂直板型电泳装置内的板状凝胶模子取出,分别将长短两块玻璃镶嵌在橡皮胶条内,玻璃与玻璃之间有一层夹芯空隙,如图 1-2 所示。

凝胶电泳槽模子由三部分组成: 一个压制成“U”形的硅橡胶带、两块长短不等的玻璃板、样品槽模板。胶带的内侧有两条凹槽,可将两块相应大小的玻璃板嵌入胶条内。玻璃板之间形成 2~3 mm 厚的间隙,以便在制胶时将胶液灌入玻璃板之间的间隙中。灌胶前,先将玻璃板洗净、晾干、嵌入胶带槽中。将玻璃板嵌入凹槽时,长玻璃板下沿与胶带框底之间保持 2~3 mm 距离,以使此端的凝胶与一侧的电极相通,而短玻璃板的下沿则插入橡胶框的底槽内。由此便形成一个“夹芯”凝胶腔,如图 1-3 所示。

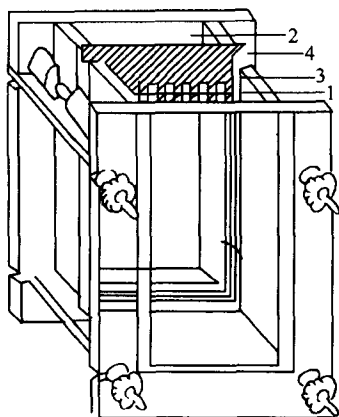


图 1-2 垂直板电泳槽

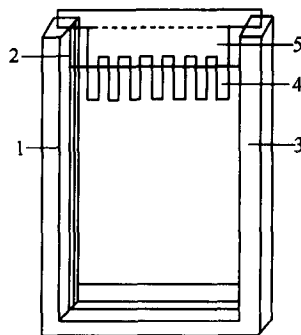


图 1-3 凝胶电泳槽模子示意图

把上述装好的凝胶腔置于仰放的电极上槽，合上电极下槽。用4条长螺丝将2个半槽固定在一起，在上螺丝时，按照对角线的顺序逐个将螺丝拧紧，均匀用力，不能用力过猛或先拧紧一个后再拧另一个，这样电泳槽受力不均会使玻璃板压碎、电泳槽弄坏，造成漏胶、渗液等现象。

将电泳槽和凝胶模子串成一体的垂直板型电泳装置，垂直放置在水平台面上，准备灌注胶液。

二、分离胶凝胶液的配制

首先根据所测定蛋白质相对分子质量的范围，选择某一合适分离胶的浓度，按表 1-1 所列的试剂用量和加样顺序配制合适浓度的凝胶。

表 1-1 不连续系统各种浓度分离胶的配制

试 剂	凝 胶 浓 度				
	7%	10%	12%	15%	18%
凝胶储液/mL	3.5	5.0	6.0	7.5	9.0
分离胶缓冲液/mL	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
双蒸水/mL	7.5	6.0	5.0	3.5	2.0
10% SDS/mL	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
TEMED/ μ L	30	30	30	30	30
10% 过硫酸铵/ μ L	30	30	30	30	30
总体积/mL	15	15	15	15	15

三、分离胶凝胶液的注入与聚合

在分离胶凝胶液的灌注前，先用滴管吸取少量的用电极缓冲液配制的1%琼脂糖溶液，灌入凝胶模板底部（长玻璃板外侧，下沿凹形小槽内），其液面高度约0.5~1.0 cm。待琼脂糖凝固后，既可将长玻璃板下面的窄缝封住，同时又可作为导电的盐桥。然后将所配制的分离胶溶

液沿凝胶腔的长玻璃板内侧缓缓倒入或用滴管加入。在灌入时小心不要产生气泡。将胶液加到距短玻璃板上沿 2.5~3.0 cm 高度为止。用注射器注射针头沿玻璃板内壁缓缓注入 0.5 cm 左右高度的蒸馏水,使凝胶被水密封住。水封时注入的蒸馏水不要破坏胶面,否则会使顶部的凝胶浓度变稀,而且容易出现锯齿形,从而改变预定的凝胶孔径和造成凝胶表面不平坦。灌完凝胶液后,室温静置,使凝胶液发生聚合反应,聚合时温度尽量保持与电泳时的温度相同。

四、浓缩胶凝胶液的制备

首先根据所测定蛋白质相对分子质量的范围,选择相应的浓缩胶凝胶浓度,相对分子质量高的选择低浓度,相对分子质量低的选择略高一点的浓度。按表 1-2 所列的试剂用量和加样顺序配制不同浓度的凝胶。

表 1-2 不连续系统各种浓度浓缩胶的配制

试 剂	凝 胶 浓 度		
	3%	4%	5%
凝胶储液/mL	0.50	0.70	0.85
浓缩胶缓冲液/mL	0.7	0.7	0.7
双蒸水/mL	3.75	3.55	3.30
10% SDS/ μ L	50	50	50
TEMED/ μ L	10	10	10
10% 过硫酸铵/ μ L	15	15	15
总体积/mL	5	5	5

五、浓缩胶凝胶液的注入与聚合

用注射器或滴管吸出分离胶胶面顶端的水层,并用无毛边的滤纸条吸出残留的水分。将按比例混合好的浓缩胶溶液,用滴管滴加在分离胶上面,等凝胶液上升到距短玻璃板上端约 0.5 cm 时,然后把样品槽模板插入胶液顶部,使胶液与短玻璃板的高度相等。插入样品槽模板的目的是使胶液聚合后,在凝胶顶部形成数个相互隔开的凹槽,在加样时以便将样品液加在该凹槽中。灌完胶后,室温静置,使凝胶聚合 1 h 左右。

六、蛋白质样品的处理

标准蛋白质样品的处理:称取标准蛋白质样品各 1 mg 左右,分别放入带塞的小管中,加入 1 mL 样品溶解液,使各种蛋白样品的终浓度达到 1.0 mg/mL 左右。如果使用标准蛋白试剂盒,加入样品溶解液的体积见使用说明书。待样品充分溶解后轻轻盖上盖(不要盖紧,以免加热时发生爆裂),置于 100 °C 的沸水浴中加热 2 min,取出冷却至室温,即可加样。

待测蛋白质样品的处理:若待测蛋白质样品是固体,则与标准蛋白质样品处理方法相同;若待测样品是一个溶液,可先配制浓度大的样品溶解液,然后将待测样品与高浓度的样品溶解液等体积混匀,并置于 100 °C 的沸水浴中加热 2 min,即可。若待测样品浓度太低需要事先浓缩,样品的盐浓度太高则需先行透析、除去盐以后再浓缩。

处理好的样品溶液可在冰箱中保存,使用前在 100 °C 水浴中加热 1~2 min,以去除可能出现的亚稳态聚合物。

七、加样

上下电泳槽都加入约 400 mL 的电极缓冲液,上槽电极缓冲液一定要没过短玻璃板。用双手握紧梳子两端,轻轻用力往上提,将梳子小心拔出,孔内不能含有气泡。然后在每个孔内加入 10~15 μL 样品液,没有加样的多余的加样孔,最好每孔补加 10 μL 左右的样品溶解液。如果样品浓度较稀,可以适当多加一些样品液,但最多不要超过 40 μL 。

八、电泳

加完样以后,上槽接负极,下槽接正极,打开直流电源。将电压调至 60 V,稳压 20 min 左右,等样品液全部进入浓缩胶以后,将电压上升到 150 V,稳压 4~6 h。直到溴酚蓝指示剂距离前沿 0.5 cm 左右停止电泳。

九、固定

电泳结束后,将电泳槽的螺丝拧开,取出凝胶玻璃板,卸下橡胶框,用镊子轻轻将短玻璃板撬开,在溴酚蓝区带中心用金属丝做好标记,然后将玻璃板反扣过来,成一定角度(约 60°),玻璃板朝上,凝胶朝下,下面用一个盛有固定液的培养皿接收剥离的凝胶,用小刀片小心将凝胶剥离玻璃板,一边拨离,凝胶一边卷曲往下坠落,直到凝胶完全掉入培养皿中。摇匀,使凝胶完全浸泡在固定液中,固定 2 h 以上或固定过夜。

十、染色

吸出固定液,用蒸馏水涮洗一遍,加入考马斯亮蓝 R-250 染色液,室温下染色约 4 h 以上或在 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中染色 30~60 min。

十一、脱色

染色完毕,倾出染色液,加入脱色液,每隔 2~3 h 更换一次脱色液,直到凝胶的蓝色背景完全褪去、蛋白质的电泳条带清晰为止。

【实验结果】

一、标准蛋白电泳图谱(见图 1-4)

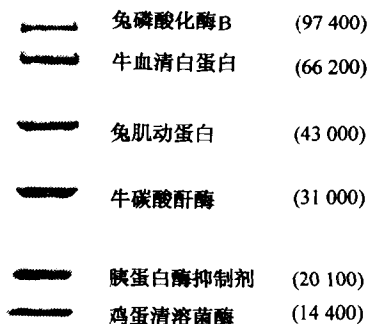


图 1-4 标准蛋白电泳图谱

二、相对分子质量(M_r)的计算

1. 相对迁移率 m_R 的计算

通常以相对迁移率 m_R 来表示迁移率,相对迁移率的计算方法如下:用游标卡尺或普通米尺分别量出样品区带中心及溴酚蓝指示剂(金属丝标记的位置)距凝胶顶端的距离,然后计算

出每一种蛋白的 m_R 值,如图 1-4 所示。

按下面公式计算相对迁移率:

$$\text{相对迁移率 } m_R = \frac{\text{样品迁移距离 (cm)}}{\text{指示剂迁移距离 (cm)}}$$

2. 蛋白质标准曲线的绘制

以标准蛋白质相对分子质量的对数值为纵坐标,以相对迁移率为横坐标,绘制蛋白质相对分子质量的标准曲线,如图 1-5 所示。

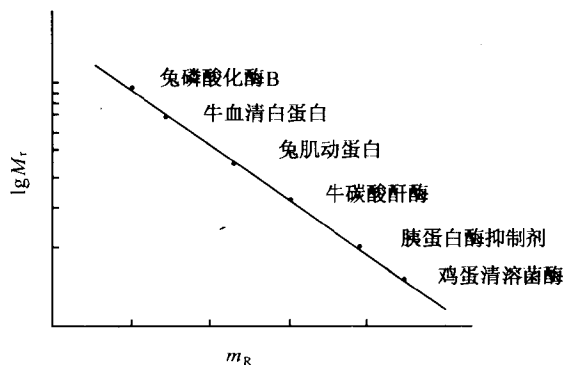


图 1-5 蛋白质相对分子质量的标准曲线

3. 未知蛋白相对分子质量的计算

根据待测蛋白与标准蛋白同样电泳条件下迁移的距离,计算出其相对迁移率 m_R 值。然后按测得的 m_R 值从蛋白质标准曲线上查得该蛋白质相对分子质量的近似值。

【参考文献】

- [1] 周先碗,胡晓倩. 生物化学仪器分析与实验技术. 北京: 化学工业出版社, 2003
- [2] 王重庆,李云兰,李德昌,陈劲秋,周先碗,郝福英,廖助荣,袁洪生. 高级生物化学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1994
- [3] 张龙翔等. 生物化学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1997
- [4] 郭绕君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1998

实验2 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳

等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)是20世纪60年代由瑞典科学家 Rilbe H. 和 Vesterberg 建立的一种高分辨率的蛋白质分析技术。它是利用蛋白质分子或其他两性电解质分子具有不同等电点的性质,在一个稳定、连续、线性的 pH 梯度中进行电泳分离。近年来,等电聚焦电泳技术的分辨率有了很大提高,可以分辨 pI 只差 $0.001pH$ 单位的生物大分子,这是等电聚焦分离技术最突出的优点,同时它还具有重复性好、样品容量大、操作简便快速的特点。一般实验室只需要有等电聚焦电泳仪就可以进行操作。

【实验目的】

掌握蛋白质等电聚焦分离的基本原理和方法,能够根据标准等电点蛋白质测定未知蛋白质的等电点。

【实验原理】

蛋白质是由不同数量和比例的氨基酸组成,氨基酸带有正负两类解离基团,即氨基和羧基。这些基团在一定 pH 溶液中可以结合或解离质子而使蛋白质带正电荷或负电荷,因此蛋白质属于典型的两性电解质。当蛋白质在某一 pH 时,所带净电荷为零,此时 pH 就是该蛋白质的等电点(isoelectric point, pI)。由于各种蛋白质的氨基酸组成不同,因而有不同的等

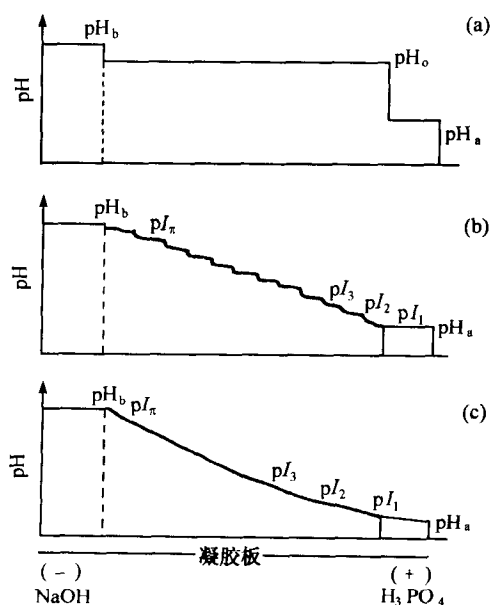


图 2-1 pH 形成示意图

电点,它是蛋白质分子的一个特征物化常数。当溶液的 $\text{pH} > \text{pI}$ 时,蛋白质带负电荷,在电场的作用下向正极移动;当溶液的 $\text{pH} < \text{pI}$ 时,蛋白质带正电荷,在电场的作用下向负极移动;当 $\text{pH} = \text{pI}$ 时,蛋白质所带净电荷为零,在电场的作用下不发生移动。不同蛋白质的氨基酸组成差别很大,因此蛋白质的等电点范围很宽,如 α -酸性糖蛋白(chimpanzee)的 pI 为 1.8,而人胎盘溶菌酶的 pI 为 11.7。可以利用蛋白质不同的等电点对其进行分析和分离。

等电聚焦电泳技术就是在电泳支持介质中加入载体两性电解质(carrier ampholytes),通以直流电后在正负极之间形成稳定、连续和线性的 pH 梯度,蛋白质在 pH 梯度凝胶中受电场力作用泳动,它的分离仅仅决定于其本身的等电点,是一个“稳态”过程。当蛋白质分子一旦到达它的等电点位置,分子所带净电荷为零,就不能再迁移,如果它向等电点两侧扩散,净电荷就不再为零,都会被阴极或阳极吸引回来,直至回到净电荷为零的位置,因此蛋白质在与其本身 pI 相等的 pH 位置被聚焦成窄而稳定的区带(如图 2-1,2-2)。这种效应称为聚焦效应,保证了蛋白质分离的高分辨率,是等电聚焦最为突出的优点。

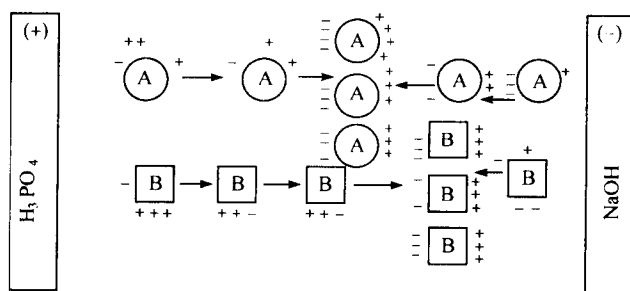


图 2-2 蛋白质分子在 pH 梯度介质中迁移过程示意图

等电聚焦电泳根据蛋白质等电点不同而将其分离,也可以根据蛋白质条带在 pH 梯度中形成的位置测定其等电点。

【器材与试剂】

一、器材

电泳仪(1000~5000 V),等电聚焦电泳槽,制冷循环水浴,微量加样器,加样纸,眼科镊子,眼科剪刀。

实验材料:称取鸡卵清清蛋白、牛血清清蛋白、马血红蛋白、糜蛋白酶原 A 各 1 mg,用 1 mL 双蒸水溶解。

二、试剂

载体两性电解质(pH 3.5~10),标准等电点蛋白质,丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺,液体石蜡,硅油,过硫酸铵(AP),TEMED,考马斯亮蓝 R-250。

(1) 30% 凝胶储液,10% 过硫酸铵,TEMED,考马斯亮蓝 R-250 染色液配制和保存见实验 1。

(2) 电极液:

阳极液: 1 mol/L 磷酸;阴极液: 1 mol/L 氢氧化钠。

(3) 固定液: 35 mL 甲醇,10 g 三氯乙酸,3.5 g 碘基水杨酸,加蒸馏水定容至 100 mL。

(4) 脱色液：25 mL 95%乙醇,10 mL 冰乙酸,加蒸馏水定容至 100 mL。

(5) 标准等电聚焦蛋白质样品：胰蛋白酶原(pI 9.30),植物外源凝集素(碱性带)(pI 8.65),植物外源凝集素(中性带)(pI 8.45),植物外源凝集素(酸性带)(pI 8.15),马肌红蛋白(碱性带)(pI 7.35),马肌红蛋白(酸性带)(pI 6.85),人碳酸酐酶 B(pI 6.55),牛碳酸酐酶(pI 5.85),β乳球蛋白 A(pI 5.20),大豆胰蛋白酶抑制剂(pI 4.55),淀粉葡萄糖苷酶(pI 3.50)。

【实验步骤】

一、安装电泳槽

本实验采用水冷式平板等电聚焦电泳槽,电泳槽内有冷凝管道,电极板上镶有铂金电极丝。将平板电泳槽调水平,槽上铺一张滤纸,上面放一块玻璃板(11.5 cm×11.5 cm,厚 2 mm),玻璃板上放塑料模具(厚 0.5 mm,中间开孔 9 cm×9 cm),用铁文具夹将模具和玻璃板固定在水平电泳槽上,在模具上面,文具夹的另一端再放上一块玻璃板,如图 2-3 所示。

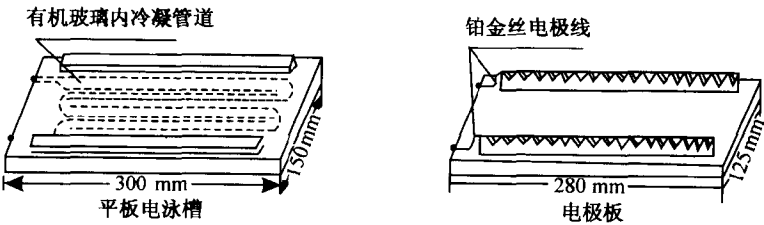


图 2-3 等电聚焦电泳槽基本构造示意图

二、制胶

凝胶浓度 $T=7.5\%$,交联度 $C=3\%$,Ampholyte 的浓度为 2.5% 。按照表 2-1 配制凝胶：

表 2-1 等电聚焦凝胶配方

溶液成分	各成分所需体积
30%凝胶储液/mL	2.0
双蒸水/mL	5.5
载体两性电解质/mL	0.5
10%过硫酸铵/ μ L	60
TEMED/ μ L	10
总体积/mL	8.0

混匀后,从远离文具夹的一端开始灌胶,一边灌胶一边向文具夹方向推动上面的玻璃板,使模具框内充满凝胶溶液,其中不能有气泡,上面的玻璃板一直推到文具夹处,使两块玻璃板利用凝胶溶液的内引力将边框封住。

灌胶后室温放置约 1 h,凝胶聚合,此时可在模具和凝胶的边缘观察到折光,继续放置半小时左右使凝胶老化。然后将两块玻璃板小心打开,凝胶和模具会自然地贴在其中一块玻璃板上,去掉模具和凝胶周围的残胶。