



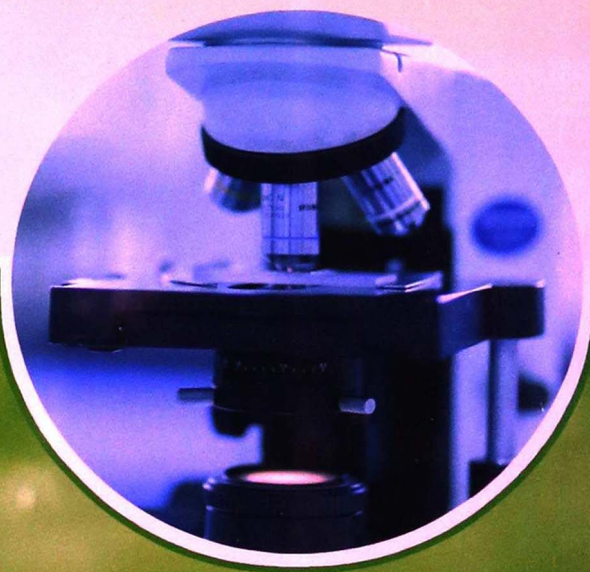
普通高等教育“十二五”规划教材
能力培养型生物学基础课系列实验教材

生物化学实验教程

(第三版)

BIOCHEMISTRY
EXPERIMENT

刘箭 主编



科学出版社

能力培养型生物学基础课系列实验教材

生物化学实验教程

(第三版)

刘 箭 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书比较系统、全面地介绍了生物化学常用实验技术与方法。全书共分为三部分,第一部分为基础性实验,介绍生物化学实验的基本原理和技术。第二部分为综合性实验,主要介绍蛋白质的纯化和鉴定及部分分子生物学实验技术。这两部分内容涵盖蛋白质、核酸、酶、维生素、糖、脂、激素的分离、制备、性质功能及定性和定量分析技术,包括层析法、分光光度法、电泳法、离心分离法及物质代谢研究法等。第三部分为研究性实验,以培养学生独立科研能力为主要目的。

本书的实验方法严谨可靠,可操作性强,可供高等院校生命科学专业学生使用,也可供非师范院校相关专业学生、生命科学研究工作者和中学生物学教师参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验教程/刘箭主编. —3版. —北京:
科学出版社,2014. 1
能力培育型生物学基础课系列实验教材
ISBN 978-7-03-042993-3

I. ①生… II. ①刘… III. ①生物化学—化学实验—
高等学校—教材 IV. ①Q5-33
中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 005943 号

责任编辑:陈 露
责任印制:谭宏宇 / 封面设计:殷 靓

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

南京展望文化发展有限公司排版

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004 年 9 月第 一 版 开本: B5(720×1000)
2015 年 1 月第 三 版 印张: 7 1/4
2015 年 1 月第十四次印刷 字数: 161 000

定价: 22.00 元

能力培养型生物学基础课系列实验教材 第三版编委会

主任委员：安利国

副主任委员：郭善利 徐来祥 孙虎山 黄 勇

委 员：(按姓氏笔画为序)

王洪凯 朱道玉 刘林德 刘顺湖

刘淑娟 安利国 孙虎山 李师鹏

李荣贵 林光哲 姚志刚 徐来祥

郭善利 黄 勇 曹 慧 焦德杰

《生物化学实验教程》第三版编写人员

主 编：刘 箭

副主编：杜希华 徐德立 石东里 尹春光

编 者：(以姓氏笔画为序)

马忠明 王元秀 王洪燕 尹春光

石东里 朱 陶 朱路英 刘连芬

刘 箭 杜希华 杜秋丽 杜桂彩

杨红花 张桂春 胡 巍 贺 君

原永洁 徐德立 蔡云飞 阚世红

第三版前言

本书第一、二版问世后,承蒙读者厚爱,不少高等院校选用该书作为实验教材。本书简明的编写风格、顺畅的实验方案以及明显易得的实验结果,得到许多任课教师和读者好评;同时,读者对文中不足之处也提出了许多宝贵的意见。在此,全体编者向各位读者表示衷心的感谢!

在第三版教材中,我们根据读者的反馈意见和学科发展的特点,为更好地配合生物化学课堂教学内容,又新增了利用分光光度计测定光谱曲线,以期强化分析仪器使用的基础训练,同时还补充了易操作的还原糖测定实验。修订后的教材继续保持前两个版本的简明风格,并更加注重了内容上的严谨性和适用性。

新版教材虽经全体编者悉心勘校,疏漏和不妥之处仍在所难免,恳请读者提出宝贵意见。

编者

2014年11月

目 录

第三版前言

第一部分 基础性实验

实验 1	氨基酸的分离鉴定——纸层析法	(2)
实验 2	凝胶层析法使蛋白质脱盐	(3)
实验 3	蛋白质的沉淀与透析	(6)
实验 4	膜分离技术——离心超滤法纯化和浓缩蛋白质	(8)
实验 5	微量凯氏(Micro-Kjeldahl)定氮法测定蛋白质含量	(10)
实验 6	利用分光光度计测定双缩脲反应的有色产物吸收光谱	(14)
实验 7	BCA 法测定蛋白质含量	(16)
实验 8	考马斯亮蓝法(Bradford 法)测定蛋白质含量	(18)
实验 9	紫外吸收法测定蛋白质含量	(20)
实验 10	乙酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白	(22)
实验 11	聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳分离血清蛋白	(25)
实验 12	酶的特异性	(29)
实验 13	酶促反应动力学——pH、温度、激活剂、抑制剂对酶促 反应速度的影响	(31)
实验 14	琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制	(35)
实验 15	脲酶 K_m 值的测定	(36)
实验 16	过氧化物酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳分离及鉴定	(39)
实验 17	酵母 RNA 的提取与组分鉴定	(42)
实验 18	动物肝脏 DNA 的提取与检测	(44)
实验 19	RNA 定量测定——改良苔黑酚法	(46)
实验 20	核酸的定量测定——紫外分光光度法	(48)
实验 21	乙酸纤维素薄膜电泳分离核苷酸	(50)
实验 22	维生素 C 的定量测定——2,6-二氯酚靛酚滴定法	(52)
实验 23	还原糖的测定——3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法	(54)
实验 24	血糖含量的测定(Folin-Wu 法)	(56)



实验 25	植物组织中可溶性糖含量的测定(蒽酮法)	(58)
实验 26	饱食、饥饿、肾上腺素、胰岛素对肝糖原含量的影响	(60)
实验 27	小麦萌发前后淀粉酶活性的比较	(62)
实验 28	脂肪酸的 β -氧化	(64)
实验 29	血清中谷丙转氨酶活性的测定	(67)

第二部分 综合性实验

实验 30	细胞色素 C 的提取制备与含量测定	(70)
实验 31	凝胶层析法测定蛋白质相对分子质量	(73)
实验 32	质粒的提取、酶切与电泳分析	(77)
实验 33	聚合酶链反应	(81)
实验 34	蛋白质印迹(Western-Blotting)	(84)

第三部分 研究性实验

实验 35	转基因植物的 PCR 鉴定	(92)
实验 36	植物热激蛋白的 Western-blotting 分析	(93)
实验 37	读码框架影响融合蛋白表达正确性	(94)
附录一	实验报告范例	(96)
附录二	生物化学实验常用参考数据	(101)
主要参考文献		(108)

第一部分

基础性实验

实验 1 氨基酸的分离鉴定

——纸层析法

【实验目的】

1. 学习氨基酸纸层析的基本原理。
2. 掌握氨基酸纸层析的操作技术。

【实验原理】

纸层析法 (paper chromatography) 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;也是定性或定量测定多肽、核酸碱基、糖、有机酸、维生素、抗生素等物质的一种分离分析工具。纸层析法是用滤纸作为惰性支持物的分配层析法,其中滤纸纤维素上吸附的水是固定相,展层用的有机溶剂是流动相。在层析时,将样品点在距滤纸一端约 2~3 cm 的某一处,该点称为原点;然后在密闭容器中层析溶剂沿滤纸的一个方向进行展层,这样混合氨基酸在两相中不断分配,由于分配系数(K_d)不同,结果它们分布在滤纸的不同位置上。物质被分离后在纸层析图谱上的位置可用比移值(rate of flow, R_f)来表示。所谓 R_f ,是指在纸层析中,从原点至氨基酸停留点(又称为层析点)中心的距离(X)与原点至溶剂前沿的距离(Y)的比值(图 1-1):

$$R_f = \frac{\text{原点至层析点中心的距离}}{\text{原点至溶剂前沿的距离}} = \frac{X}{Y}$$

在一定条件下某种物质的 R_f 值是常数。 R_f 值的大小与物质的结构、性质、溶剂系统、温度、湿度、层析滤纸的型号和质量等因素有关。

【器材与试剂】

1. 器材

层析缸(或标本缸)、点样毛细管(或棉棒)、小烧杯、培养皿、量筒、喉头喷雾器、吹风机(或烘箱)、层析滤纸(新华一号)、直尺及铅笔。

2. 试剂

(1) 扩展剂(水饱和的正丁醇和乙酸混合液):将正丁醇、乙酸和水以体积比 4:1:1 混合,充分振荡。

(2) 氨基酸溶液:0.5%(m/V)组氨酸、丙氨酸、脯氨酸、亮氨酸以及它们的混合液[各组分均为(0.5%)]。

(3) 显色剂:0.1%(m/V)水合茚三酮正丁醇溶液。

【实验步骤】

1. 准备滤纸

取层析滤纸(长 18 cm、宽 15 cm)一张,在纸的一端距边缘 2 cm 处用铅笔划一条直线,在此直线上做 5 个等距离点,如图 1-1 所示。



2. 点样

用毛细管将各氨基酸样品分别点在这 5 个位置上,干后重复点样 2~3 次。每点在纸上扩散的直径最大不超过 3 mm。

3. 扩展

用线将滤纸缝成筒状,纸的两边不能接触。将盛有约 20 mL 扩展剂的培养皿迅速置于密闭的层析缸中,并将滤纸直立于培养皿中(点样的一端在下,扩展剂的液面需低于点样线 1 cm)。待溶剂上升 10~12 cm 时即取出滤纸,用铅笔描出溶剂前沿界线,自然干燥或用吹风机冷风吹干。

4. 显色

用喷雾器均匀喷上 0.1% 水合茚三酮正丁醇溶液,然后用吹风机热风吹干或者置烘箱中(100℃)烘烤 5 min 即可显出各层析斑点。

5. 计算

用直尺测量并计算出各标准氨基酸的 R_f 值,同时计算出混合氨基酸的四个层析斑点的 R_f 值。通过与标准氨基酸比较,确定混合氨基酸中各氨基酸在滤纸上的位置。

【要点提示】

1. 取滤纸前,要将手洗净,因为手上的汗渍会污染滤纸,并尽可能少接触滤纸;如条件许可,也可戴上一次性手套拿滤纸。要将滤纸平放在洁净的纸上,不可放在实验台上,以防止污染。

2. 点样点的直径不能大于 0.5 cm,否则分离效果不好,并且样品用量大,会造成“拖尾巴”现象。

3. 在滤纸的一端用点样器点上样品,点样点(原点)要高于培养皿中扩展剂液面约 1 cm。由于各氨基酸在流动相(有机溶剂)和固定相(滤纸吸附的水)的分配系数不同,当扩展剂从滤纸一端向另一端展开时,对样品中各组分进行了连续的抽提,从而使混合物中的各组分分离。

【思考题】

1. 纸层析法的原理是什么?
2. 何谓 R_f 值? 影响 R_f 值的主要因素是什么?

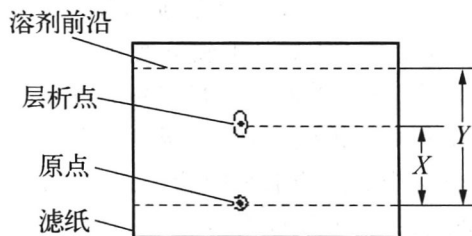


图 1-1 纸层析中的 R_f , $R_f = \frac{X}{Y}$

实验 2 凝胶层析法使蛋白质脱盐

【实验目的】

学习凝胶层析法分离纯化物质的原理与操作技术。

【实验原理】

凝胶层析也称凝胶过滤,其分离纯化物质的原理是:凝胶具有网状结构,小分子物质



能进入其内部,而大分子物质被排阻在外部,当一混合溶液通过凝胶层析柱时,溶液中的物质就按不同相对分子质量被分开了。凝胶层析过程中一般不变换洗脱液,具有设备简单、操作方便、重复性好和样品回收率高等优点。所以,此法除了常用于分离纯化蛋白质(包括酶类)、核酸、多糖、激素、氨基酸和抗生素等物质外,还可用于测定蛋白质的相对分子质量、样品的浓缩和脱盐等方面。目前常用的凝胶有葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶,其中最常用的是葡聚糖凝胶。

葡聚糖凝胶的商品名称为 Sephadex,它是葡萄糖通过 $\alpha-1,6$ -糖苷键形成的葡聚糖长链,与交联剂环氧氯丙烷以醚键相互交联而成的具有三维空间的多孔网状结构物(图 1-2),呈珠状颗粒。

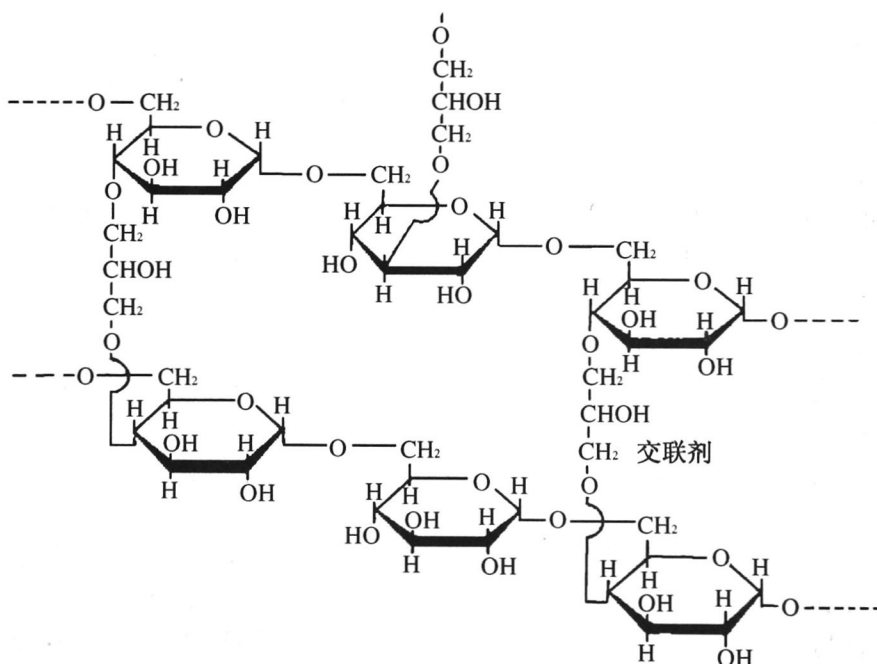


图 1-2 葡聚糖凝胶的多孔网状结构示意图

在合成凝胶时,控制环氧氯丙烷的用量,可以制成网孔大小不同的葡聚糖凝胶,即不同规格的凝胶。葡聚糖凝胶从 G-10 到 G-200 有多种类型。G 后的数字代表每克干胶充分溶胀后吸水的克数乘以 10,也反映了凝胶网孔的相对大小,G 后的数字越小,其溶胀后的网孔越小。一般 G-10 到 G-50 适用于蛋白质与小分子或无机盐的分离,G-75 到 G-200 适用于分子质量大于 10 000 Da 的蛋白质的相互分离。

蛋白质溶液中如含有无机盐离子,用葡聚糖凝胶层析法可使蛋白质与无机盐分离,效果理想。本实验用 G-25 使蛋白质与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分离,当蛋白质的盐溶液进入葡聚糖凝胶时,小分子的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 扩散进入 G-25 的网孔中,而大分子的蛋白质因颗粒直径大,不能进入网孔中,被排阻在凝胶颗粒(固定相)的外面。加入洗脱液(流动相)洗脱时,因大分子的蛋白质从凝胶颗粒的间隙随洗脱液向下流动,首先被洗脱下来,而小分子的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 可以扩散进凝胶颗粒的网孔之中,在层析柱中移动较慢,需要较大的洗脱体积才能从柱中洗出,这样蛋白质与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 很容易地被分离开,从而达到对蛋白质样品脱盐的目的(图 1-3)。

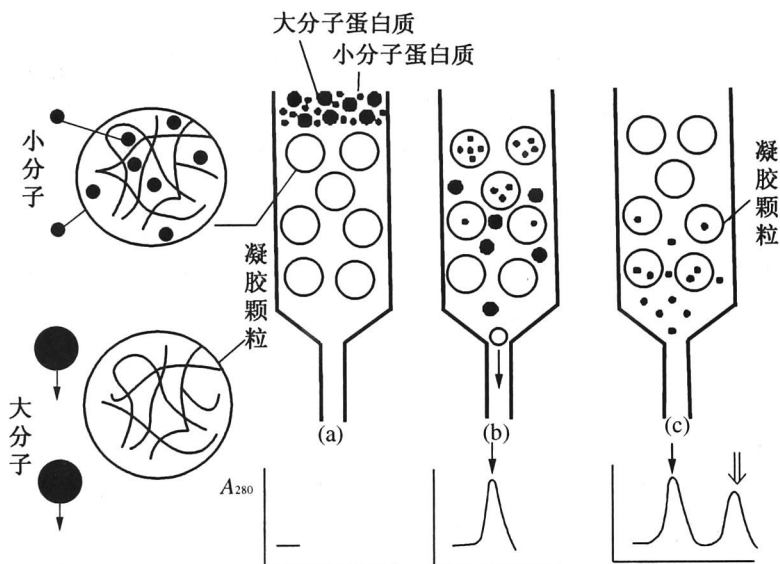


图 1-3 凝胶层析原理示意图

(a) 蛋白质混合物上柱; (b) 样品上柱后, 小分子进入网孔, 大分子不能进入, 故先洗脱下来; (c) 小分子后洗脱下来

【器材与试剂】

1. 器材

铁架台、层析柱(11 mm×300 mm)、滴定管夹、1 mL 刻度滴管、刻度试管、白瓷板、Sephadex G-25(粒度粗 50~100 目)、细乳胶管、螺旋夹、弹簧夹、烧杯。

2. 试剂

(1) 10% (m/V) 磺柳酸溶液

(2) 奈氏(Nessler)试剂: 将 HgI_2 11.5 g 及 KI 8 g 溶于去离子水中, 稀释至 50 mL, 加入 6 mol/L NaOH 50 mL, 静置后取上清液储存于棕色瓶中。

(3) 蛋白质- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液: 实验前配制含 0.25% (m/V) 牛血清清蛋白、0.1% (m/V) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 10% (m/V) 蔗糖的混合溶液。

(4) 去离子水(洗脱液)

【实验步骤】

1. 溶胀凝胶

用去离子水浸泡 Sephadex G-25 凝胶 24 h 以上(中间换一次水)或用去离子水沸水浴溶胀 2 h 左右。

2. 凝胶装柱

将层析柱固定在铁架台上, 两端分别连接乳胶管。上端与洗脱液连通, 装一螺旋夹用于调控洗脱速度。先用少量洗脱液洗柱并排除乳胶管中的气泡, 待柱中洗脱液高度约 2 cm 时, 关闭下端开关式弹簧夹。

将溶胀好的 Sephadex G-25 倒入层析柱中, 使其自然沉降, 沉降后凝胶柱的高度为层析柱的 3/4~4/5 且柱床面平整比较理想。打开下端开口, 排除多余的洗脱液, 床面上维持约 2 cm 高的洗脱液, 再关闭下口。



3. 洗柱

通过细乳胶管小心地将烧杯中的洗脱液与层析柱接通,然后打开下端开口,让洗脱液滴下冲洗层析柱,以除去杂质并使柱床均匀密实(此步也称作平衡)。适当时间后(流下的洗脱液体积一般为柱床体积的2~3倍),再关闭下口。洗柱过程中注意调整流速约2 mL/min。

4. 加样洗脱

用刻度滴管吸取1 mL样品[蛋白质-(NH₄)₂SO₄溶液],其尖头小心沿层析柱内壁伸到床面之上,慢慢将样品加到凝胶床面上(不可搅动床面),此时能看到床面上样品与洗脱液之间有一清晰界面。打开下端开口,待样品全部进入凝胶柱中,接通洗脱液,开始洗脱并收集洗脱液。

5. 收集检查

用刻度试管收集洗脱液,每管收集1 mL。边收集边进行蛋白质与铵盐的检查。

· 铵盐检查:从每管中取收集液2滴置白瓷板穴中,加入奈氏试剂1滴,如有铵盐洗脱下来,则有黄红色沉淀,以“+”的多少表示每穴中出现沉淀的程度。

· 蛋白质检查:向每管剩余的收集液中加入磺柳酸溶液5滴,振荡,如有蛋白质洗脱下来,则出现白色浑浊或沉淀,以“+”的多少表示不同收集管中沉淀的程度。

分析蛋白质和铵盐洗脱的次序,并做出合理解释。

【要点提示】

1. 装柱时,凝胶中的水不宜过多,用玻棒搅动小烧杯中的凝胶,一次将柱加满,凝胶自然下沉后,凝胶的高度应以层析柱长度的3/4~4/5为宜。如果层析柱中凝胶高度不够,应在凝胶床面未形成之前再加入葡聚糖凝胶,要尽量防止由于加胶次数较多,胶中出现节痕。同时,要注意避免柱床内产生气泡。

2. 加入样品时应十分注意不要搅动床面,不要使样品与床面上的洗脱液混合,否则影响分离效果。

3. 如果层析柱的口径和长度较大,可适当增加收集管的数量。

【思考题】

1. 蛋白质溶液中的盐分为何能通过凝胶层析法被去除?
2. 凝胶层析法在蛋白质分析中还有何应用?

实验3 蛋白质的沉淀与透析

【实验目的】

1. 学习蛋白质沉淀和透析的基本原理。
2. 掌握蛋白质的可逆沉淀及透析的基本操作技术。

【实验原理】

多数蛋白质是亲水胶体,凡是能破坏水化膜和能中和表面电荷的因素或物质均可导



致溶液中的蛋白质发生沉淀。蛋白质的沉淀作用可分为可逆的沉淀作用和不可逆的沉淀作用两种。某些试剂[如 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaCl]与蛋白质作用,可使蛋白质沉淀;但当沉淀因素被除去后,蛋白质又可溶于原来的溶剂中,这种沉淀作用称为可逆的沉淀作用。一些物理因素(如剧烈震荡、搅拌、加热等)或化学因素(如重金属离子、有机酸等),会破坏蛋白质的稳定的构象,引起蛋白质变性,即使除去了使蛋白质沉淀的因子,蛋白质仍不能溶于原来的溶剂,此为不可逆沉淀作用。

透析是去除样品溶液中小分子物质的有效方法。透析膜属于半透膜,蛋白质等大分子物质不能透过透析膜,而小分子物质(无机盐、单糖等)可以自由通过透析膜与周围的缓冲溶液进行溶质交换,进入到透析液中。在实验室分离纯化蛋白质的过程中,常利用透析的方法除去蛋白质溶液中的小分子物质。

双缩脲试剂常用于蛋白质的检验,与蛋白质生成特殊的紫红色。在透析去除蛋白质溶液中的 NaCl 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 过程中,可分别用 AgNO_3 溶液和奈氏试剂检查洗出液中的 Cl^- 和 NH_4^+ 。

【器材与试剂】

1. 器材

透析袋、大烧杯、磁力搅拌器、磁子、透析袋夹、试管、试管架、滤纸、漏斗、铁架台、滴管、小量筒。

2. 试剂

(1) 蛋白质- NaCl 溶液:取3个鸡蛋的蛋清,加水800 mL混合后,加饱和 NaCl 溶液200 mL溶解,用3~4层干纱布过滤。

(2) 10%(m/V) HNO_3 溶液

(3) 1%(m/V) AgNO_3 溶液

(4) 10%(m/V) NaOH 溶液

(5) 1%(m/V) CuSO_4 溶液

(6) 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液

(7) 固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

(8) 奈氏试剂

【操作步骤】

1. 蛋白质的检测

利用双缩脲反应进行蛋白质的检查。取待透析的蛋白质- NaCl 溶液2 mL和10% NaOH 溶液1 mL,摇匀,再加1% CuSO_4 溶液1~2滴,边加边摇,观察是否有紫红色出现。 CuSO_4 不可过量,否则生成的蓝色 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 会掩盖浅紫红色。

2. 蛋白质的可逆沉淀

1) 取卵清蛋白- NaCl 溶液2 mL,倾斜试管,沿管壁慢慢加入饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液2 mL,轻轻混匀,静置5 min,观察球蛋白沉淀。

2) 过滤,除去析出的蛋白质沉淀,再向滤液中加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末至饱和,观察清蛋白沉淀。

3. 蛋白质的透析

(1) 准备透析袋:市售的透析袋含有重金属、硫化物等化学杂质,须除去杂质后才能



使用。常用方法是,用 10 mmol/L NaHCO_3 -1 mmol/L EDTA- Na_2 溶液煮沸 30 min,然后用双蒸水充分洗涤透析袋,储存于 1 mmol/L EDTA- Na_2 溶液中,4℃ 保存备用。

(2) 装样:取一段透析袋,将其一端用透析袋夹夹住(或打一死结),由开口端加入含清蛋白沉淀的溶液(不可装的太满,留出一半空隙,并适当排出空气,以防透析袋胀破),用透析袋夹夹住袋口(或打一死结)。

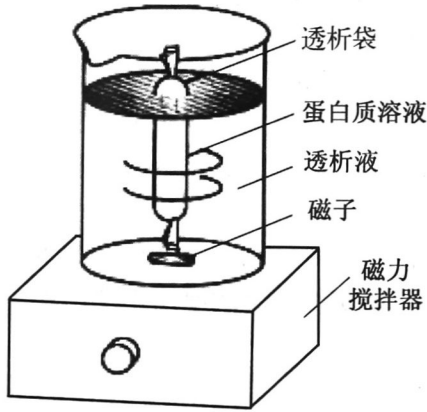


图 1-4 透析装置

(3) 透析:如图 1-4,取一个大烧杯,加入 10 倍以上样品液体积的去离子水或缓冲溶液,将装好样品的透析袋悬于大烧杯中,底部放一个磁子,用磁力搅拌器缓慢搅拌以促进溶液交换。透析过程中需更换洗脱溶液数次(约 30 min 一次),至达到透析平衡为止(洗出液中无 Cl^- 和 NH_4^+),约需 2 h。

(4) 检查透析效果:每次更换洗脱液时,同时检查洗出液中是否有 Cl^- 和 NH_4^+ 。

• Cl^- 检查方法:取试管 1 支,加入洗出液约 2 mL,加 10% HNO_3 溶液 1~2 滴至酸性,然后加 1% AgNO_3 2~3 滴,观察是否有白色沉淀。

• NH_4^+ 检查方法:取洗出液 2 滴置白瓷板穴中,加奈氏试剂 1 滴,观察有无黄红色沉淀。

【要点提示】

1. 蛋白质-盐溶液的渗透压与溶液的 pH 有关。当蛋白质-盐溶液透析时,带电荷的蛋白质分子不能透过半透膜,而溶液中对立的离子可透过半透膜使膜两边的离子产生不均等的分布,引起 pH 的变化(Donnan 效应)。故盐溶蛋白经透析后可能会出现沉淀或变性。

2. 本实验是用于蛋白质脱盐,若用于浓缩,可将透析袋包埋于吸水性极强的聚乙二醇或甘油中进行脱水。作透析洗脱液用的水必须不含 Cl^- 和 NH_4^+ 。

【思考题】

1. 透析前的蛋白质- NaCl 混合液是否可以用硝酸银溶液检测 Cl^- ?
2. 双缩脲反应检验蛋白质的原理是什么?
3. 透析时为什么将透析袋置于透析液层的中部?

实验 4 膜分离技术——离心超滤法 纯化和浓缩蛋白质

【实验目的】

1. 学习离心超滤分离技术的原理。
2. 掌握离心超滤法纯化、浓缩蛋白质的基本操作方法。



【实验原理】

超滤是一种加压膜分离技术,以压力为推动力,利用微孔超滤膜,使溶剂和小分子溶质透过超滤膜,而溶液中的大分子溶质被滤膜截留,从而达到大分子与小分子物质分离的一种膜分离技术。

离心超滤是超滤的一种,其基本装置是一个底部为坚固的超滤模板的离心超滤柱,膜板上具有一定规格的微孔,当高速离心对液体产生压力时,小于微孔直径的小分子(包括无机盐和水分子)在压力的作用下透过超滤模板,而大于微孔直径的蛋白质分子被截留在超滤模板之上。随着小分子的不断排出,被截留的蛋白质浓度越来越高,达到使蛋白质纯化和浓缩的效果(图 1-5)。



图 1-5 离心超滤示意图

离心超滤操作简便,只需要高速离心机,无需其他特殊设备,速度快,既可除去溶液中的盐分等可溶性小分子,又可以浓缩样本,是蛋白质生物化学中常用的方法。

【器材与试剂】

1. 器材

台式高速离心机、离心超滤管(Millipore Microcon YM-3)、微量取液器、试管及试管架、天平、Tip 头。

2. 试剂

(1) 牛血红蛋白-二硝基苯丙氨酸溶液: 称取牛血红蛋白 20 mg, 二硝基苯丙氨酸 10 mg, 溶于去离子水中, 稀释至 100 mL, 得 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛血红蛋白-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 二硝基苯丙氨酸溶液。

(2) 牛血清清蛋白- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液: 称取牛血清清蛋白 20 mg, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mg, 溶于去离子水中, 稀释至 100 mL, 得 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛血清清蛋白-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液。

(3) 10% (m/V) 磺柳酸溶液

(4) 奈氏(Nessler)试剂: 将 HgI_2 11.5 g 及 KI 8 g 溶于去离子水中, 稀释至 50 mL, 加入 6 mol/L NaOH 50 mL, 静止后取清液储存于棕色瓶中。

【操作步骤】

1. 有色蛋白与小分子物质的分离

1) 取牛血红蛋白-二硝基苯丙氨酸溶液 500 μL (注意观察溶液的颜色), 加到离心超滤管的超滤柱中。



2) 10 000 r/min 离心 15 min。分别观察超滤柱中浓缩液与下部滤液的颜色。

3) 弃净滤液,向上部浓缩液中加入 200 μL 去离子水,混匀,再次离心。重复此步骤,至滤液无色为止。

4) 用吸管直接吸取并回收上部浓缩液;或更换一个离心超滤收集管,反转超滤柱,通过离心将浓缩液甩入收集管。

2. 无色蛋白与小分子物质的分离(脱盐)

1) 取牛血清清蛋白- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液 500 μL ,加到离心超滤管的超滤柱中。

2) 10 000 r/min 离心 15 min。检查滤液中是否有 NH_4^+ 和蛋白质。

3) 更换离心超滤收集管,向上部浓缩液中加入 200 μL 去离子水,混匀,再次离心。重复步骤(2)和(3) 2~3 次。

4) 检查分离效果 每次补加水(或缓冲液)并再次离心后,需检查滤液中是否有 NH_4^+ 和蛋白质。

• NH_4^+ 检查方法:取滤液 2 滴置白瓷板穴中,加入奈氏试剂 1 滴,混匀,如有 NH_4^+ 则出现棕红色沉淀。当最后一次检查滤液中无 NH_4^+ 后,再检查浓缩液中是否有 NH_4^+ 存在。

• 蛋白质检查方法:取滤液 2 滴置小试管中,加入磺柳酸溶液 2 滴,摇匀,如有蛋白质被离心下来,则有白色浑浊或沉淀出现。

5) 回收蛋白浓缩液 当滤液中不再有 NH_4^+ 时,可用吸管直接吸取并回收上部浓缩液;也可更换一个离心超滤收集管,反转超滤柱,通过离心将浓缩液甩入收集管。

【要点提示】

1. 超滤离心时,要选择同样质量的离心管对称放置,以作配平之用。

2. 产品回收率与膜材料的选择以及被分离物质相对分子质量的差异有关,应根据需要选择适宜截留相对分子质量的超滤柱。

3. 实验中所用水或缓冲液必须不含 NH_4^+ 。

【思考题】

1. 离心超滤技术主要有哪些优点?

2. 离心超滤分离后,有色蛋白溶液的颜色变化说明了什么?

3. 最后一次检查滤液无 NH_4^+ 后,为什么仍需检查浓缩液是否有 NH_4^+ 存在?

实验 5 微量凯氏(Micro-Kjeldahl) 定氮法测定蛋白质含量

【实验目的】

1. 学习微量凯氏定氮法的原理。

2. 了解凯氏定氮仪的结构,掌握凯氏定氮法测定蛋白质含量的操作技术。