



生命科学核心课程系列教材

生物化学实验

Biochemistry Experiment

(第二版)

王林嵩 张丽霞 主编



科学出版社

生命科学核心课程系列教材

生物化学实验

(第二版)

王林嵩 张丽霞 主编

科学出版社

内 容 简 介

本书在第一版的基础上,根据应用中发现的问题及生物化学实验的进展做了修改。全书分为四部分,包括 44 个实验。基础性实验部分重在基本实验技能的培训;综合性实验部分着重实验原理的应用和提高分析能力。这两部分涵盖了与生物化学理论相适应的生物化学实验内容和技术,包括糖、脂、蛋白质、核酸、酶、维生素的分离、纯化、定性或定量分析,功能和代谢的研究等。设计性实验部分在前两部分的基础上为学生提供一个独立实验的空间,着重培养学生的独立科研能力。附录介绍了生物化学实验室规则、实验报告书写、常用实验室操作规范、试剂的配制和一些生物化学常用数据。

本书可作为普通高等师范院校及非师范院校本、专科生命科学各专业及农学、食品各专业的生物化学实验教材,也可作为中学生物教师的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验/王林嵩,张丽霞主编. —2 版. —北京:科学出版社,2013
生命科学核心课程系列教材

ISBN 978-7-03-037758-6

I. ①生… II. ①王… ②张… III. ①生物化学-实验-高等学校-教材
IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 124033 号

责任编辑:席 慧 朱玉昆 / 责任校对:张凤琴

责任印制:阎 磊 / 封面设计:迷底书装

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>

安泰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007 年 9 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013 年 6 月第 二 版 印张:10 1/2

2013 年 6 月第六次印刷 字数:263 000

定价:25.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《生物化学实验》编委会名单

主 编 王林嵩 张丽霞

副主编 仇晓文 马克世 王 丽

编 委 (按姓氏笔画排序)

马克世 王 丽 王林嵩

王俊甫 仇晓文 过治军

张丽霞 武安泉

第二版前言

本书第一版自 2007 年出版以来,历经 5 次印刷,一直受到各大高等院校师生和广大读者的欢迎,促进了生物化学实验课程教学,普及了生物化学实验技术。

在当今科学界,生物化学是发展最快的学科之一,生物化学实验也相应有了新的发展。随着生物科学的发展,生物化学实验不断显示出它的重要性,面对学科不断发展的趋势,总结笔者的教学经验和体会,征求其他教学单位和读者的意见,很有必要对本书第一版内容进行删改、补充,使它成为一本更好的生物化学实验课教材,以满足学生和相关人员的学习、参考之用。

再版的编写原则仍然是适应新的实验教学体系,本着少而精,把握基础性、代表性和实用性等原则对第一版的实验内容进行修订,删去了部分目前相对应用较少的内容,补充和引进了一些新的实验方法和技术。

本书沿用第一版格局分为四部分。第一部分为基础性实验,着重于学生基本技能训练;第二部分为综合性实验,着重于学生实验能力的提高;第三部分为设计性实验,着重于学生科研能力和创新能力的培养;附录部分介绍了生物化学实验室规则、实验报告书写、常用实验室操作规范、试剂的配制和一些生物化学常用数据。这些内容对学生的课后学习提供了有力支持。

本书的编写是采用集体讨论,分别执笔的方式,由主编和副主编统稿,其中张丽霞编写实验 1 至实验 14,仇晓文编写实验 15 至实验 27,过治军编写实验 28 至实验 39,王俊甫编写实验 40 至实验 43,马克世和武安泉编写实验 44 和附录。王可可同学在文字录入等方面做了大量工作,在此表示感谢。

鉴于笔者的水平有限,不足之处在所难免,欢迎读者批评指正。

编 者

2013 年 3 月

第一版前言

生物学是一门对实验技术依赖性很强的学科。生物技术的任何一项发明创造,都推动和伴随着生物学基础理论的进一步发展。20 世纪中期的生物学已经进入分子生物学水平,这是与生物化学技术和方法的迅猛发展分不开的。师范院校的生物化学实验教学用书有很多,但若是从适合于地方性普通高等院校教学的角度来说,总感觉找一本合适的教材不容易,不同学校其设备条件、师资和学生情况均不相同,教学要求也有差异。为此,笔者在参考兄弟院校实验教材的基础上,根据多年的教学经验,结合教学改革的要求,编著这本教材。

本书的特点是力求全面培养学生的实验技能,使其能正确理解实验原理和较好地掌握生物化学技术和方法。适应新的实验教学体系,实验内容少而精,既适合普通高等院校生物化学实验教学,又能留给老师和学生一定的发挥空间。本书不仅是一本教材,也可作为实验记录。在内容的安排上基础性实验和综合性实验包括普通生物化学的各章节相应的实验,设计性实验仅涵盖部分章节内容,重点在于创新能力的培育,既有前沿性,又有实用性。附录介绍了生物化学实验室守则、实验报告书写、常用实验室操作规范、试剂的配制和一些生物化学常用数据。每一实验后的“思考题”,有助于学生在实验前后进行思考和总结提高。

本书的编写是采用集体讨论,分别持笔的方式,其中李成伟编写实验一至实验六,胡炳义编写实验七至实验十七,王丽编写实验十八至实验二十八,王琳和靳同霞编写实验二十九至实验三十五和附录。鉴于笔者水平有限,不足之处是难免的,欢迎批评指正。

目 录

第二版前言

第一版前言

第一部分 基础性实验

实验 1	纸层析法分离氨基酸	2
实验 2	醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白	10
实验 3	考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量	14
实验 4	酶的专一性	16
实验 5	酶反应动力学的影响因素	18
实验 6	RNA 定量测定	22
实验 7	DNA 定量测定(二苯胺法)	24
实验 8	紫外吸收法测定核酸含量	26
实验 9	DNA 的琼脂糖凝胶电泳	28
实验 10	肝糖原的提取和鉴定	32
实验 11	卵磷脂的提取和鉴定	34
实验 12	油脂酸价的测定	36
实验 13	维生素 C 的定量测定(2,6-二氯酚靛酚滴定法)	38
实验 14	血清谷丙转氨酶活力测定	40

第二部分 综合性实验

实验 15	SDS-PAGE 测定蛋白质相对分子质量	44
实验 16	蛋白质印迹	50
实验 17	疏水层析分离纯化 α -淀粉酶	53
实验 18	小麦幼苗淀粉酶活性的测定	56
实验 19	正交法测定影响淀粉酶活力的几种因素	58
实验 20	植物组织中过氧化物酶活力的测定	62
实验 21	乳酸脱氢酶活力测定	64
实验 22	酵母蔗糖酶的粗分离	66
实验 23	离子交换柱层析纯化蔗糖酶	69
实验 24	蔗糖酶各级分活性及蛋白质含量的测定	72
实验 25	反应时间对产物形成的影响	76
实验 26	小麦叶片淀粉酶 $V_{\max}$ 和 K_m 测定	78
实验 27	底物浓度对酶促反应速度的影响——米氏常数的测定	80
实验 28	小麦叶片淀粉酶抑制剂动力学反应	82
实验 29	质粒 DNA 的提取、酶切和鉴定	85

实验 30	大肠杆菌感受态细胞的制备	92
实验 31	小牛胸腺 DNA 的制备	94
实验 32	小牛胸腺 DNA 溶解温度的测量	97
实验 33	植物基因组提取(CTAB 法)	100
实验 34	萝卜过氧化物酶基因 <i>rsprxl</i> 的扩增	102
实验 35	实时荧光定量 PCR	104
实验 36	酵母 RNA 的提取与组分鉴定	107
实验 37	粗脂肪的定量测定	109
实验 38	丙二醛的测定	112
实验 39	发酵过程中无机磷的利用和 ATP 的生成(ATP 的生物合成)	115

第三部分 设计性实验

实验 40	蛋白质的沉淀反应和等电点测定	118
实验 41	目的基因的扩增与鉴定	121
实验 42	影响肝糖原含量的因素	125
实验 43	酶反应最适条件的选择	127
实验 44	植物过氧化物酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳	129
主要参考文献		132
附录		133
一、实验室规则		133
二、实验报告书写		133
三、常用实验室操作规范		135
四、试剂的配制		150

实验1



纸层析法分离氨基酸

【实验目的】

掌握分配层析的原理;学习氨基酸纸层析法的操作技术(包括点样、平衡、展层、显色、鉴定及定量);学习未知样品的氨基酸成分分析的方法(水解、层析及鉴定)。

【实验原理】

层析法又叫色层分离法、色谱分析法或色谱法。1903年俄国化学家茨维特(M. Tswett)将叶绿素的石油醚溶液通过 CaCO_3 管柱,并继续以石油醚淋洗,由于 CaCO_3 对叶绿素中各种色素的吸附能力不同,色素被逐渐分离,在管柱中出现了不同颜色的谱带或称色谱(chromatogram),因此称为色层分离法。1931年有人用氧化铝柱分离了胡萝卜素的两种同分异构体,显示了这一分离技术的高度分辨力,从此引起了人们的广泛注意。自1944年应用滤纸作为固定支持物的“纸层析”诞生以来,层析技术的发展越来越快,20世纪50年代开始,相继出现了气相色谱和高效液相层析,其他如薄层层析、亲和层析、凝胶层析等也迅猛发展。层析分离技术操作简便,样品用量可大可小,既可用于实验室分离分析,又适用于工业生产中产品的分析制备。层析法的最大特点是分离效率高,它能分离各种不同性质及类似的物质,而且既可以用于少量物质的分析鉴定,又可用于大量物质的分离纯化制备。现已成为生物化学、分子生物学、生物工程等学科广泛应用而又必不可少的分析工具之一。

根据固定相基质的形式分类,层析可以分为纸层析、薄层层析和柱层析。纸层析是指以滤纸作为基质的层析。薄层层析是将基质在玻璃、塑料或金属板等光滑表面铺成一薄层,在薄层上进行层析。柱层析则是指将基质填装在管中形成柱形,在柱中进行层析。

根据流动相的形式分类,层析可以分为气相层析和液相层析。气相层析是指流动相为气体的层析,而液相层析是指流动相为液体的层析。

根据分离的原理不同分类,层析主要可以分为吸附层析、分配层析、凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析等。

纸层析所依据的原理是分配层析,故属于分配层析的范畴。

(一) 分配层析

分配层析法是利用不同的物质在两个相混而互不相溶的溶剂中的分配情况不同而使之得到分离的方法。将分配层析法中的一种溶剂设法固定起来,再用另外一种溶剂来冲洗这个固定溶剂,同样可达到将不同物质分离的目的。把固定起来的溶剂称为固定相,把用作冲洗的溶

剂叫做流动相。为了将固定相固定起来,需要有一种固体物质把它吸牢,这种固体物质本身对分离不起什么作用,对溶质也几乎没有吸附能力,称为支持物或基质。进行分离时由于被分离物质的组分在两相中的分布不同,因此当流动相移动时,不同组分移动的速度也不相同。易溶于流动相中的组分移动快,在固定相中溶解度大的组分移动慢,于是得到分离。分配层析法中不同溶质的分离取决于其在两相(固定相和流动相)间分配系数的不同,分配系数(α)的定义如下:

$$\alpha = \frac{\text{溶质在固定相的浓度}(C_s)}{\text{溶质在流动相的浓度}(C_L)}$$

滤纸层析法是以滤纸作为惰性支持物的分配层析。滤纸的成分是纤维素,纤维素的一OH为亲水性基团。因此,可吸附一层水或其他极性溶剂作为固定相。通常把有机溶剂作为流动相。当将溶质样品(被分离物)点在滤纸的一端后,该物质溶解在吸附于支持物上的水分子或其他溶剂分子的固定相中,有机溶剂作为流动相自上而下移动,称为下行层析;反之,有机溶剂自下而上移动,称为上行层析。流动相流经支持物时固定相对溶质进行连续的抽提,物质在两相间不断分配即得到分离。滤纸层析原理还可进一步解释如下:可以把滤纸看成一个层析柱,又可把柱看成由许许多多连续的板层构成。如果有 A、B 两物质, A 的分配系数 $\alpha=1$, B 的分配系数 $\alpha=1/3$, 又设固定相为 S, 流动相为 L, 两相互相接触而不相混溶, 则当第一层流动相中加入单位量 A、B 两物质后, 溶质根据一定分配系数在第一层的两相中分配(图 1-1)。流动相继续向下层移动, 固定相与新流下的流动相之间进行第二次分配, 溶质在原来第一层流动相与第二层固定相间进行分配, 以此类推, 不断进行分配, 达到分离目的。

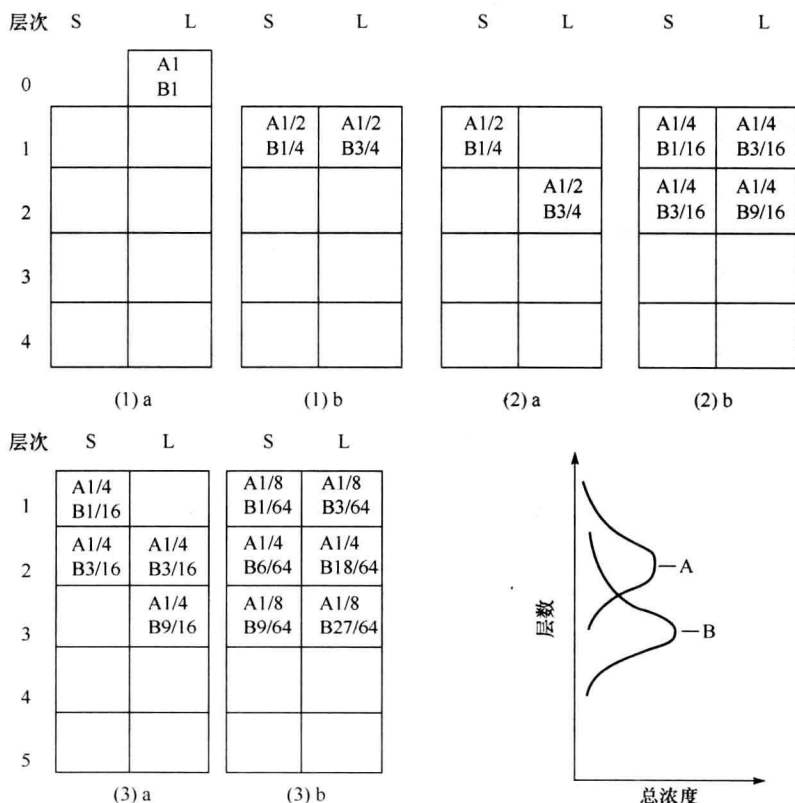


图 1-1 溶质在两相中的分配

S 为固定相; L 为流动相; A、B 为被分离的两种物质; a 为分配前; b 为分配后; (1)、(2)、(3) 表示分配次数

物质分离后在图谱上的位置,可用比移值 R_f 来表示, R_f 的定义:从溶质层析的起点(原点)到层析斑点中心的垂直距离与从原点到溶剂流动前沿的垂直距离的比值。公式如下:

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

物质在滤纸上的移动情况与分配柱层析法一样,也遵守如下关系式:

$$R_f = \frac{A_L}{A_L + \alpha A_S}$$

式中, A_L 为流动相的体积; A_S 为固定相的体积; α 为分配系数。

每一物质的 R_f 值决定于物质在两相间的分配系数(α)和两相的体积比(A_S/A_L),这两相即水(固定相)和有机溶剂(流动相)。

图 1-2 中, X 表示原点到层析点中心的距离。 $X+Y$ 表示原点到溶剂前沿的距离

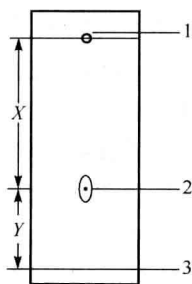


图 1-2 层析图谱

1 为原点;2 为层析点;3 为溶剂前沿

$$R_f = \frac{X}{X+Y}$$

两相体积比在同一实验情况下是不变的,所以 R_f 值的主要决定因素是分配系数(α)。对于每一物质在一定条件下 α 值是固定的,因此 R_f 值为其特征常数,可作为定性鉴定的参考数值。

(二) 影响 R_f 值的主要因素

1. 物质结构对于 R_f 值的影响

物以类聚,极性物质易溶于极性溶剂(水)中,非极性物质易溶于非极性溶剂(有机溶剂)中。所以,物质的极性大小决定了物质在水和有机溶剂之间的分配情况。例如,酸性和碱性氨基酸极性大于中性氨基酸,所以前者在水(固定相)中分配较多,因此 R_f 值低于后者。

— CH_2 —是疏水性基团,如果分子中极性基团数目不变,则— CH_2 —增加(即碳链加长)就使整个分子的极性变低。因此,易溶于有机溶剂(流动相)中, R_f 值也随之增加。例如,氨基酸的 R_f 值大小关系为甘氨酸 < 丙氨酸 < 缬氨酸 < 亮氨酸,二羧基氨基酸中天冬氨酸 < 谷氨酸。

极性基团的位置不同也会引起 R_f 值的变化。例如,在正丁醇-甲酸-水系统中层析时, α -丙氨酸的 R_f 值大于 β -丙氨酸, α -氨基丁氨酸的 R_f 值大于 γ -氨基丁氨酸。

氨基酸化学结构与 R_f 值之间的关系可以从氨基酸的双向图谱(图 1-3)中看出。碱性氨基酸——鸟氨酸、精氨酸、赖氨酸(1,2,3)在同一轨迹上;二羧基氨基酸——天冬氨酸、谷氨酸、 α -氨基己二酸(5,6,7)在同一轨迹上;中性脂肪族支链氨基

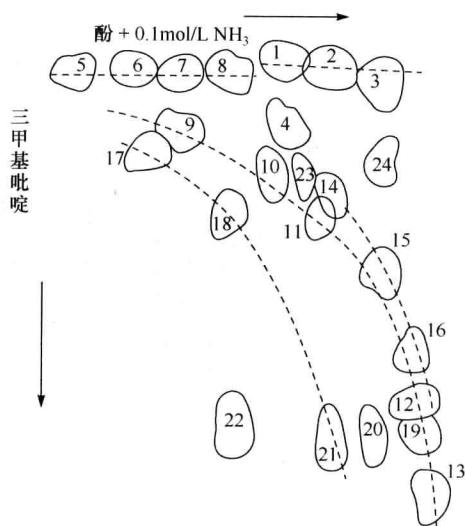


图 1-3 氨基酸纸上层析轨迹图

酸—— α -氨基异丁酸、缬氨酸、异亮氨酸(14,15,16)在同一轨迹上;羟基氨基酸——苏氨酸、丝氨酸和酪氨酸(17,18,21)在同一轨迹上;具苯环的氨基酸——苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸和二羧基苯丙氨酸(19,20,21,22)也在同一轨迹上。

碳链结构上的变化对 R_f 值的影响很小,如亮氨酸和异亮氨酸,缬氨酸和正缬氨酸都很容易分离。

2. 溶质与溶剂间的相互作用对 R_f 值的影响

这种影响是由溶质与溶剂间的相互作用与分配系数的关系所决定的。溶质与溶剂之间若能形成氢键,对分配系数的影响就很大。例如,酚、三甲基吡啶、氨等和水混合后都能很好地与溶质形成氢键。某些溶剂(如酚、正丁醇等)是质子的供给体,而水既是质子的供给体又是质子的接受体。当溶质结构中增加能接受质子的基团(如 $-\text{NH}_2$)时,因酚与水都能给 $-\text{NH}_2$ 提供质子,所以酚和水两相对接受质子的基团的引力基本上是一致的,因此当溶质结构中增加 $-\text{NH}_2$ 时,该物质与酚和水的作用对其在酚和水两相间的分配影响不大,对 R_f 值影响较小。又如,当有机溶剂是质子的接受体(如三甲基吡啶、 NH_3 等),而溶质也是质子的接受体(如 $-\text{NH}_2$),这时有有机溶剂对 $-\text{NH}_2$ 没有引力,而水却有引力,于是水的引力就大于有机溶剂,因此溶质就被拉向水相,对其 R_f 值的影响就大。

3. pH 对 R_f 值的影响

这种影响主要是由 pH 与分配系数的关系所决定的。弱酸与弱碱的解离度受 pH 影响很大,解离度越大,极性越强,极性强的物质在两相溶剂中分配时,偏向于极性强的相,这样,改变 pH 就会同时改变分配系数,从而使 R_f 值也会相应变化。在氨基酸的层析法中,改变溶剂的 pH,使酸性和碱性氨基酸的 R_f 值变动较大,而中性氨基酸的 R_f 值变动较小。在正丁醇中加甲酸,可使酸性氨基酸的极性降低,从而使 R_f 值变大,而使碱性氨基酸的 R_f 值变小。反之,如在正丁醇中加 NH_3 ,可使天冬氨酸和谷氨酸的 R_f 值变小,而使赖氨酸、精氨酸等碱性氨基酸的 R_f 值变大。

4. 滤纸对 R_f 值的影响

滤纸本身的 pH 及含水量对 R_f 值的影响很大,所以用不同的滤纸层析得到不同的 R_f 值及不同的斑点形状。滤纸上含水量的多少随溶剂与滤纸对水的亲和力的大小而异,质地不均一的滤纸常随着纤维的纹理流动紊乱,常使溶剂扩展不一致;此外,滤纸的含水量不均一也不能得到理想的分离效果。

5. 温度对 R_f 值的影响

R_f 值的重现性与恒温情况的好坏有密切关系。温度对 R_f 值的影响主要是因为溶质在固定相与流动相之间的分配随温度的变化而不同。随各溶剂组分的黏度和表面张力的不同其蒸发能力也不同,因此有些溶剂系统对温度的敏感程度强些,有些则差些。敏感程度强的对温度的要求就严格,敏感程度差的对温度的要求就不太严格。温度改变使溶剂系统中的溶解度改变,所以 R_f 值也改变。一般层析展层是在恒温室中进行的,室温为 $20\sim 40^\circ\text{C}$,温度改变不超过 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

无色物质的层析图谱可用光谱法(如核苷酸类物质用紫外光照射)或显色法鉴定。氨基酸纸

层析图谱常用的显色剂有茚三酮、吡啶酮。本实验采用茚三酮为显色剂。茚三酮显色反应受温度、pH 和反应时间影响较大。如果要使结果重复性好,必须严格控制上述条件。样品中如含有大量盐酸会使氨基酸不显出颜色;样品中含大量盐时显色点上会出现白斑;空气中其他的杂质,如 NH_3 、硫化氢或酚等皆会影响显色结果。铜离子可以与氨基酸-茚三酮显色物形成络合物,颜色较稳定,用硫酸铜乙醇溶液洗脱层析后的显色斑点,可以通过比色法定量测定氨基酸的含量。

由于纸上层析设备条件较简单,操作比较简便,并可以分离微量样品,因此纸层析方法已成为生化分析和研究的主要方法之一,广泛应用于氨基酸、肽、核苷酸、糖、维生素及脂肪酸等的分离鉴定。

【试剂和器材】

1. 试剂

(1) 氨基酸标准液(1mg/ml)。6 种氨基酸是天冬氨酸、丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、胱氨酸、亮氨酸,分别配制成浓度为 1mg/ml 的溶液。

(2) 8mmol/L 天冬氨酸溶液:称取 0.1065g 天冬氨酸溶于 100ml 蒸馏水中。

(3) 95%乙醇(市售)。

(4) 80%甲醇(市售)。

(5) 12%氨水:量取 25%浓氨水 68ml,用蒸馏水定容至 100ml。

(6) 0.1%茚三酮丙酮溶液:称取茚三酮 0.1g,加丙酮使溶解成 100ml 即得。

(7) 0.5%茚三酮丙酮溶液:称取茚三酮 0.5g,加丙酮使溶解成 100ml 即得。

(8) 氨基酸混合液(每种氨基酸 5mg/ml)。

(9) 正丁醇。

(10) 0.1%硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$):75%乙醇=2:38 溶液。硫酸铜难溶于乙醇,不能用乙醇直接配制。将硫酸铜溶液和乙醇混合后放置过久亦会产生沉淀,因此必须在临用前按比例混合。

(11) 5.7mol/L 重蒸盐酸溶液。将商售化学纯盐酸用磨口蒸馏器蒸馏,收集恒沸点部分,即为 5.7mol/L 盐酸溶液。

(12) 鸡蛋蛋清。

2. 器材

新华滤纸;培养皿(直径 115mm);电热鼓风干燥箱;恒温水浴和沸水浴装置;分光光度计;离心机(4500r/min);研钵;喷雾器及吹风机;点样管及点样架;针、线、尺;橡皮手套;安瓿瓶(2ml);烧杯(50ml);钟罩(高约 430mm,直径约 290mm,具磨口塞)。

【操作步骤】

(一) 标准氨基酸纸上层析

1. 单向上行层析

1) 氨基酸 R_f 值的测定

(1) 滤纸:选用国产新华 1 号滤纸(若有较多的样品需在纸上分离,可采用新华 3 号滤

纸),戴上橡皮手套,将滤纸裁剪成 $28\text{cm}\times 28\text{cm}$,在距纸边 2cm 处,用铅笔轻轻画一条线,于线上每隔 3cm 处画一小圆圈作为点样处,圈直径不超过 0.5cm 。或将滤纸裁剪成 $20\text{cm}\times 6.5\text{cm}$,在距长一端纸边 2cm 处,用铅笔轻轻画一条线,将其分成4等分,即得3个点样点。

(2) 点样:点样量要合适,样品点太浓,斑点易扩散或拉长,以致分离不清,氨基酸的点样量以每种氨基酸含 $5\sim 20\mu\text{g}$ 为宜,将准备好的滤纸平放在粗滤纸上后放在桌面上,用点样管(也可用血色素管代替)吸取氨基酸样品 $10\mu\text{g}(1\mu\text{g}/\mu\text{l})$,与滤纸垂直方向轻轻碰触点样处的中心,这时样品就自动流出。点样的扩散直径控制在 0.5cm 之内,点样过程中必须在第一滴样品干后再点第二滴,为使样品加速干燥,可用加热装置(如吹风机或灯泡),但要注意温度不可过高,以免氨基酸破坏,特别是谷氨酰胺破坏,会影响定量结果。

将点好样品的滤纸两侧比齐,用线缝好,揉成筒状。注意缝线处纸的两边不要接触。避免由于毛细管现象使溶剂沿两边移动特别快而造成溶剂前沿不齐,影响 R_f 值。

本实验可以做两张单向层析谱,也可以只做一张,每张点6种氨基酸或3种氨基酸($20\text{cm}\times 6.5\text{cm}$)。一张测定酸系统中的 R_f 值,一张测定碱系统中的 R_f 值,如果只做一张时可选择一个系统。

(3) 展层:将揉成圆筒状的滤纸放入培养皿内(注意滤纸不要碰皿壁),周围放三个小烧杯,内盛平衡用的溶剂。盖好钟罩,平衡 $1\sim 2\text{h}$ (每个钟罩内可放三个培养皿)。平衡后,打开钟罩上塞子,将长颈漏斗插入罩内,使管下口碰皿底,沿管加入展层溶剂,然后迅速取出漏斗(注意勿使它碰纸)。或将点好样品的滤纸($20\text{cm}\times 6.5\text{cm}$)悬挂在展层缸内,展层缸底部盛有 $3\sim 5\text{cm}$ 高的展层液,滤纸浸入展层液 $1\sim 1.5\text{cm}$,展层缸应密封,当溶剂展层至距离纸的上沿约 1cm 或滤纸的 $2/3$ 时,取出滤纸,立即用铅笔标出溶剂前沿位置,挂在绳上或点样架上晾干,使纸上溶剂自然挥发,或烘干,直至除净溶剂。

(4) 酸溶剂系统:正丁醇:80%甲酸:水=15:3:2(V/V/V),平衡溶剂与展层溶剂相同。温度 25°C ,时间 $10\sim 20\text{h}$ 。

(5) 碱溶剂系统:正丁醇:12%氨水:95%乙醇=13:3:2(V/V/V),平衡溶剂为12%氨水,温度 25°C ,时间 $14\sim 16\text{h}$ 。注意,使用的溶剂系统需新鲜配制,并要摇匀。平衡溶剂每烧杯放 10ml 左右,展层溶剂每张约需 25ml 。

(6) 显色:将已除尽溶剂的层析滤纸平夹在层析架上,架与地面略平行,用喷雾器将 0.5% 茚三酮无水丙酮溶液均匀地喷在纸上。试剂内不可含水,否则会把样品冲散以致图谱模糊,每张纸用显色剂 25ml ,分别在两面喷雾,滤纸充分晾干后,置 65°C 鼓风箱中 30min ,鼓风保温,滤纸上即显出紫红色斑点。

(7) R_f 值的计算:用尺测量显色斑点的中心与原点(点样中心)之间的距离和原点到溶剂前沿的距离,求出此值,即得氨基酸的 R_f 值。计算出6种氨基酸在酸、碱系统中的 R_f 值。

2) 氨基酸标准曲线的制作

(1) 滤纸:规格、尺寸与前同。

(2) 点样:配制一个浓度为 8mmol/L 的天冬氨酸溶液,在纸上点上不同的量: $5\mu\text{l}$ 、 $10\mu\text{l}$ 、 $15\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{l}$,留一空白点作对照。点样操作与前同。

(3) 展层:展层采取酸性溶剂系统,即正丁醇:80%甲酸:水=15:3:2,展层条件与操作见前。

(4) 显色:除尽溶剂的层析纸用 20ml 茚三酮丙酮溶液在纸的一面均匀喷雾,自然干燥后,置于 65°C 烘箱内,准确地烘 30min ,取出。

(5) 定量测定:剪下层析谱上天冬氨酸斑点,与其面积大小相仿,再剪一块空白纸作比色对照。把剪下的纸片再剪成梳状细条,分别装入干燥试管内,加入 5ml 0.1% 硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): 75% 乙醇 = 2 : 38(V/V) 的溶液洗脱,间歇摇匀,洗脱液呈粉红色,待 15min 后于 520nm 处测定 OD 值。以氨基酸含量(μg)为横坐标,光吸收值为纵坐标作图,其结果应为直线关系,但不同氨基酸其斜率不同。

2. 双向上行纸层析

(1) 滤纸:28cm×28cm,在滤纸上距相邻的两边各 2cm 处用铅笔轻画一条线,在线的交点上点样(图 1-4)。

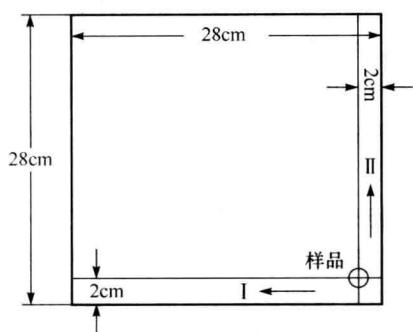


图 1-4 滤纸的剪裁

(2) 点样:样品为混合标准氨基酸,点样量 $15\mu\text{l}$ 或 $20\mu\text{l}$ 。

(3) 展层:双向展层。

第一向为碱系统:正丁醇 : 12% 氨水 : 95% 乙醇 = 13 : 3 : 3(V/V/V)。

第二向为酸系统:正丁醇 : 80% 甲酸 : 水 = 13 : 3 : 2(V/V/V)。

第一向展层一次,必要时亦可展层两次,第二向一般展层一次即可。二向的展层条件分别与酸、碱单向展层的条件相同。进行双向层析时,先用第一向溶剂展层后,使干燥,将纸调转 90° ,再用第二向溶剂展层。

(4) 显色:显色剂采用 0.5% 茚三酮溶液,显色条件与标准曲线制作的显色部分相同。

(5) 定性鉴定与定量测定:双向层析 R_f 值由两个数值组成,即在第一向计量一次(碱系统)和在第二向计量一次(酸系统),分别与已知氨基酸在酸、碱系统的 R_f 值对比,即可初步确定它为何种氨基酸。找出谷氨酸斑点,将它剪下,在同一张纸上再剪下一块大小相仿的空白纸作对照,如前所述,用硫酸铜乙醇溶液洗脱并进行比色测定,所得比色读数在标准曲线上查出谷氨酸含量,计算出样品中谷氨酸的含量。

(二) 样品中氨基酸的分析(以鸡蛋蛋清为例)

1. 水解液的制备

取鸡蛋清 1 滴(约 0.2ml),加到 2ml 的安瓿瓶中,再加入 2ml 经过重蒸的盐酸溶液(5.7mol/L),封口后置于 110°C 烤箱中进行封管酸水解。24h 后打破安瓿瓶。将酸水解液转移到小烧杯中,于沸水浴上蒸去盐酸,内容物蒸干时可加少量蒸馏水,再次蒸发,重复 3 或 4 次,最后加 1ml 蒸馏水。

2. 单向上行纸层析分析

(1) 点样:在滤纸上(规格尺寸同图 1-4)点上不同体积: $10\mu\text{l}$ 、 $20\mu\text{l}$ 、 $25\mu\text{l}$ 、 $30\mu\text{l}$ 的蛋清酸水解液,同时再点上一个标准氨基酸混合液点($15\mu\text{l}$ /点)。操作同前。

(2) 展层:条件同前。采取正丁醇 : 80% 甲酸 : 水 = 15 : 3 : 2 系统,操作同前。

(3) 显色:0.1% 茚三酮丙酮显色,操作同前。

(4) 层析谱:鸡蛋清水解液展层后一般可以分出 10~13 个氨基酸斑点。找出那一种点样量的层析效果最好,并用 6 种标准氨基酸混合液的层析斑点与文献资料上关于鸡蛋清蛋白水解液的成分作比较。

【注意事项】

(1) 使用茚三酮显色法,必须在整个层析操作中避免手直接接触层析纸,因为手上常常有少量含氮物质,显色时它也呈现紫色斑点,污染了层析结果,因此操作时应戴橡皮手套或指套。同时也要防止空气中的氨。

(2) 取一支破损的 0.1ml 吸量管,将下端拉成毛细管,然后在碎磁片边缘上磨尖。注意,在点样时应尽量使用上端的刻度,因为靠近尖端的刻度已不准确。

(3) 层析纸经第一向层析后,上端未经溶剂走过的滤纸(距纸边约 1cm)与已被溶剂走过的部分形成一个分界线,进行第二向层析前,需将第一向上端截去约 2cm 以除去边缘,在截去边缘以前,先将原点到溶剂前沿的距离量好,记下来。

(4) 为了鉴定未知样品中某几种氨基酸的存在,仅用一种溶剂系统展层是不够的。一般应采用 2 或 3 种溶剂系统展层显色后,再分别与该种溶剂系统的标准氨基酸图谱比较,相互印证,才能作出比较确切的结论。

【思考题】

1. 为什么在展层时有时用一种溶剂系统,而有时用两种溶剂系统?
2. 酸性溶剂系统(或碱性溶剂系统)对氨基酸极性基团的解离有何影响?
3. 酸性溶剂系统(或碱性溶剂系统)对碱性氨基酸(赖氨酸、精氨酸、组氨酸)和酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)的 R_f 值有什么影响?
4. 滤纸上点上 $1\mu\text{l}$ 0.02mol/L 的甘氨酸(相对分子质量为 75)溶液,实际上点了多少微克的氨基酸?

实验2



醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白

【实验目的】

掌握醋酸纤维薄膜电泳的原理及操作方法；准确测定血清中各种蛋白质的相对百分含量。

【实验原理】

带电质点向着与它所带电荷相反的电极移动的现象称为电泳。带电质点之所以能在电场中向一定的方向移动,并具有一定的移动速度,取决于带电质点本身所带的电荷、电场强度、溶液的 pH 等因素。蛋白质分子在溶液中的电泳是由于蛋白质分子具有一些自由的可解离的基团如 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{OH}$ 等,因而在某种 pH 溶液中蛋白质分子就带有一定的电荷。一个混合的蛋白质样品由于各蛋白质的等电点不同,在相同的 pH 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同,从而使蛋白质混合样品得到分离。

血清中含有清蛋白、 α -球蛋白、 β -球蛋白、 γ -球蛋白等,各种蛋白质由于氨基酸组分、立体构象、相对分子质量、等电点及形状不同(表 2-1),在电场中移动速度也就不同。由表 2-1 可知,血清中 5 种蛋白质的等电点(pI)大部分低于 7.0,所以在缓冲液(pH8.6)中,它们都解离成负离子,在电场中向阳极移动。

表 2-1 血清蛋白等电点及相对分子质量

蛋白质名称	等电点(pI)	相对分子质量(M_r)
清蛋白	4.88	69 000
α_1 -球蛋白	5.06	200 000
α_2 -球蛋白	5.06	300 000
β -球蛋白	5.12	90 000~150 000
γ -球蛋白	6.85~7.50	156 000~300 000

在一定范围内,蛋白质的含量与结合的染料量成正比,故可将各蛋白质区带剪下,分别用 0.4mol/L NaOH 溶液浸洗下来,进行比色,测定其相对含量。也可以将染色后的薄膜直接用光密度计、凝胶成像系统扫描,测定其相对含量。

本实验采用的醋酸纤维素薄膜电泳,是以醋酸纤维素薄膜为支持物的电泳方法。醋酸纤维素是纤维素经羟基乙酰化形成的纤维素醋酸酯。将它溶于有机溶剂(如丙酮、氯仿、乙酸乙