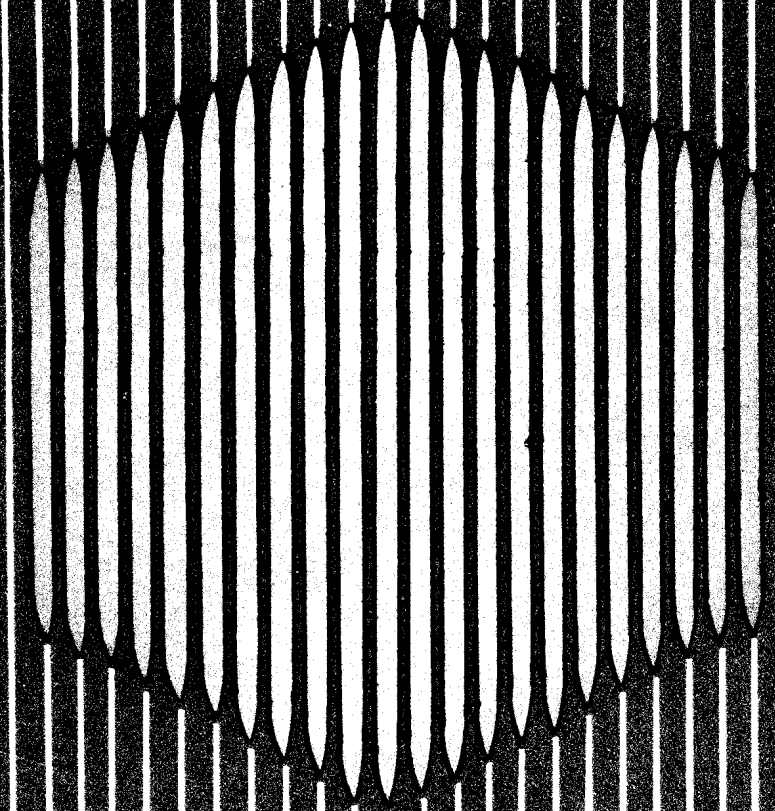


高级生物化学实验选编

作者：[作者姓名] 编著



科学出版社

高级生物化学实验选编

张龙翔 吴国利 主编

*

高等教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

北京印刷厂印装

*

开本787×1092 1/16 印张15.75 字数360 000

1989年9月第1版 1989年10月第1次印刷

印数0001—1 260

ISBN7-04-002333-4/Q·140

定价3.60元

编 者 的 话

《高级生物化学实验选编》一书的主要目的是为高等学校的生物化学专业以及其他有关专业的高年级大学生和研究生提供的一本实验教材。在选材时我们侧重于给学生以生物化学中常用的实验方法和技能的训练，同时也注意引入一些近年发展起来的主要的生物化学研究技术，为大学生和研究生进行生物化学科学研究准备条件。

本书共选编21个实验，内容力求涉及生物化学的各个主要领域。这些实验是从全国十余所大学提供的高级生物化学实验教材中评选后重新整理编写而成的。其中绝大多数实验为各校在历年教学实践中反复采用并证明效果是较好的；有的实验是教师在科研中经常使用的方法，因此本书积累了各校的经验，体现了各校的特色。在使用本教材时，由于各校的实际情况和专业特点各不相同，对大学生和研究生的要求也有所不同，因此可以根据具体情况选用本书中的部分实验。

参加本书编写工作的有：吉林大学刘兰英（实验一），中国科技大学陈曾燮（实验二、实验三），安徽大学刘晓颖（实验四），武汉大学赵永芳、陈蔚梅、张西平（实验五），北京大学姚仁杰、李德昌、周先宛、刘德富、徐浩大、李云蓝、郝富英、刘美华（实验六、实验七、实验十一、实验十四），厦门大学陈璇璇（实验八），北京师范大学金亨涛、米晓红、刘红霞、秦淑媛、陈静、颜卉君、李成文、王秀奇（实验九、实验十七、实验十八），南开大学翟兰敏、黄熙泰、李建平（实验十），中山大学吴应积（实验十二），复旦大学陈军、乔学婴、程岗（实验十三），华东师范大学秦德安、何学民（实验十五），北京农业大学王育东、阎隆飞（实验十六），兰州大学葛瑞昌、王勤（实验十九、实验二十），北京医科大学童坦君（实验二十一）。全书最后的统一编审工作是由北京大学张龙翔教授、北京师范大学吴国利教授完成的。北京大学生物化学教研室副主任李德昌老师在编审工作中协助做了大量的工作，并为本书编写了附录。高等教育出版社谭丽霞同志担任本书的责任编辑，为本书的出版付出了辛勤的劳动。编者在此表示衷心的感谢。

编者欢迎读者在使用本书过程中提出批评指正。

编 者

1988年12月于北京

目 录

实验一	Dansyl-Cl法测定蛋白质的N-末端氨基酸	1	细胞原生质膜	141	
实验二	蛋白质顺序分析(DABITC/PITC双偶合法)	10	实验十七	细胞器的分离及其标志酶的测定	150
实验三	蛋白质的变性作用和复性	16	实验十八	人血清IgG的纯化与鉴定	164
实验四	凝胶等电聚焦法测定蛋白质等电点	23	实验十九	放射免疫测定技术	176
实验五	印迹法	30	实验二十	酶联免疫吸附测定	185
实验六	猪胰蛋白酶结晶的制备及其活性的测定	46	实验二十一	血清蛋白质与酶的测定	192
实验七	亲和层析技术——纯化胰蛋白酶	57	附录		
实验八	碱性磷酸酶的制备和活力测定	69	一、实验室常用仪器的使用方法	205	
实验九	蔗糖酶的提取和性质测定	77	二、常用试剂及生化物质的分子量	219	
实验十	兔肝RNA的制备及鉴定	93	三、一些常见蛋白质分子量参考值	220	
实验十一	猪脾DNA的制备及其含量的测定	98	四、一些常见蛋白质等电点参考值	221	
实验十二	限制性核酸内切酶BamHI的制备	108	五、缓冲溶液的配制方法	222	
实验十三	DNA克隆技术	116	六、常用数据表	232	
实验十四	质粒DNA的分子杂交	123	七、常用碱基核苷和核苷酸物理常数表	234	
实验十五	红细胞膜的制备及其结构成分的分析	129	八、硫酸铵饱和度常用表	240	
实验十六	用二相分配分离法分离植物		九、实验中的准确测量及误差来源	242	

实验一 Dansyl-Cl法测定蛋白质的N-末端氨基酸

内 容 提 要

用荧光试剂1-二甲氨基-萘-5-磺酰氯 (Dansyl-Cl, 简称DNS-Cl)与蛋白质的N-末端氨基酸的 α -氨基发生反应, 得到二甲基萘-5-磺酰蛋白 (简称DNS-蛋白), 此蛋白经酸水解, 得到N-末端氨基酸的DNS-衍生物 (DNS-氨基酸)及游离的各种氨基酸。

DNS-氨基酸在波长254nm或265nm的紫外光下, 显示绿色荧光。通过双向聚酰胺薄膜层析与标准DNS-氨基酸的层析图谱相比较即可确定蛋白质的N-末端氨基酸。

本实验通过对胰岛素N-末端氨基酸的测定, 掌握DNS-Cl法测定蛋白质N-末端氨基酸的基本原理及方法, 了解聚酰胺薄膜层析法的原理及使用方法。本实验同时介绍了此法测定较大蛋白质N-末端氨基酸时可能遇到的各种情况及处理方法。

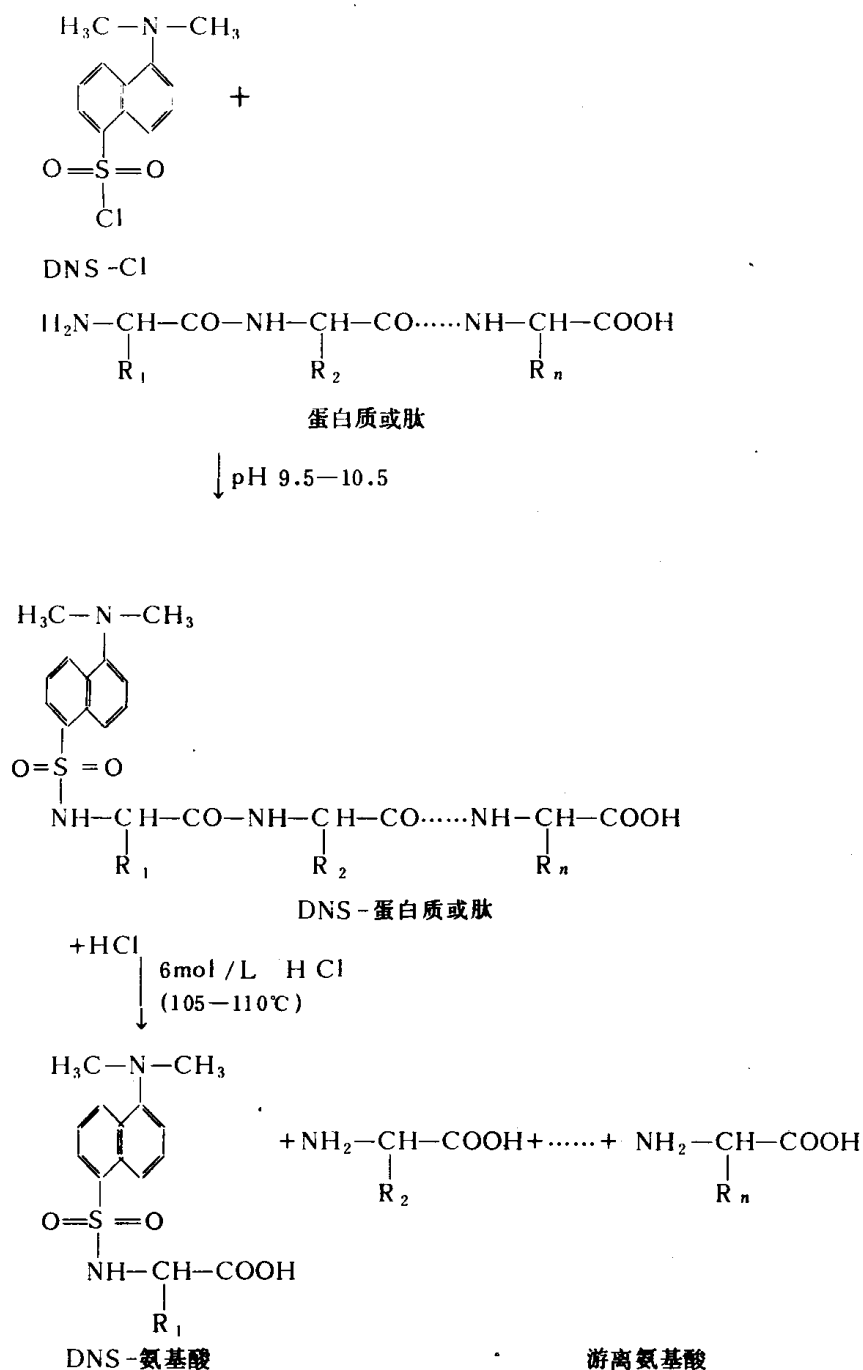
引 论 及 原 理

1956年Hartley和Massey首先用1-二甲氨基萘-5-磺酰氯作为荧光试剂标记 α -胰凝乳蛋白酶的N-末端氨基酸的 α -氨基及其他的反应基团。此后建立了用DNS-Cl测定蛋白质及肽的N-末端氨基酸的方法。

此法比2,4-二硝基氟苯 (FDNB)法有更多的优点, 其灵敏度比FDNB法高100倍左右, 只需 10^{-9} — 10^{-10} mol (摩尔)的样品即可检测出来。并且产生的DNS-氨基酸比相应的DNP-氨基酸更稳定, 更耐酸水解。当将DNS-Cl法与异硫氰酸苯酯 (PTH)法结合使用测定小肽的N-末端氨基酸的排列顺序时, 不仅灵敏, 而且迅速。

用试剂DNS-Cl测定蛋白质及肽N-末端氨基酸时, 首先是在偏碱性 (pH 9.5—10.5)条件下, 使DNS-Cl与蛋白质或肽的N-末端氨基酸结合, 得到二甲基萘-5-磺酰蛋白 (简称DNS-蛋白), 此DNS-蛋白在6mol/L HCl中水解时, 蛋白质中的肽键均发生断裂, 得到游离的氨基酸, 只有N-末端的氨基酸形成二甲氨基萘-5-磺酰氨基酸 (简称DNS-氨基酸)。对此DNS-氨基酸进行鉴定, 即可确定蛋白质的N-末端。

其反应式如下:



大部分氨基酸与 DNS-Cl 的反应在 pH 9.5—10.5 的条件下是适宜的，若高于此范围，则易使试剂 DNS-Cl 被溶液中的羟基离子水解，造成试剂的损失。若低于此 pH 范围，则由于蛋白质中的 α -氨基脱质子化程度降低，不利于反应的进行。因此，在反应体系中，经常使用碳酸氢钠缓冲液维持此 pH 范围。各种氨基酸及某些碱在 pH 9.8 时与 DNS-Cl 的反应程度列于表 1-1 中。

由表 1-1 可见，大部分的氨基酸在 pH 9.8 时与 DNS-Cl 的反应几乎是完全的。

DNS-氨基酸相当稳定，在 6 mol/L HCl 溶液，105℃ 水解 22 小时，除 DNS-Trp

表1-1 各种氨基酸及某些碱与DNS-CL反应的程 度

碱	pK _a	K*	标记百分数(%)**
H ₂ O	—	4.1×10 ⁻⁵	—
OH ⁻	—	15	—
NH ₃	9.26	0.5	39
Ala	9.87	10	>99
Arg(α-)	9.04	6.4	>99
Asn	8.80	3.1	97
Asp	9.82	4.4	93
CysH	9.0	5.7	>99
Gln	9.13	4.8	99
Glu	9.67	5.0	97
Gly	9.78	13	>99
His(α-)	9.18	12	>99
His(imid)	6.1	0.5	53
Ile	9.76	14.5	>99
Ieu	9.74	13.5	>99
Iys(α-)	8.95	3.6	98
Iys(e-)	10.53	42	>99
Met	8.6	3.2	98
phe	9.24	10	>99
Pro	10.60	360	>99
Ser	9.15	4.6	>99
Thr	9.12	4.9	>99
Trp	9.39	35	>99
Tyr(α-)	9.11	(10)	>99
Tyr(离子化酚基)	10.07	280	>99
Val	9.72	13	>99
双-Gly	8.17	3.5	99
三-Gly	7.91	3.0	97

* K_i 是DNS-Cl与相应碱的二级反应速度常数,在22℃水中测定。

** 计算的标记百分数是在pH9.8, 5 mmol/L DNS-Cl条件下测定的。

全部被破坏及DNS-Pro(75%) DNS-Ser(35%) DNS-Thr(30%) DNS-Gly(18%)及DNS-Ala(7%)部分被破坏外,其他DNS-氨基酸几乎没有任何损失。

DNS-Cl不仅可与蛋白质的α-氨基发生反应,而且也可与存在于蛋白质中的其他一级胺,二级胺、酚羟基、巯基及咪唑基发生反应。当蛋白质的N-末端氨基酸含上述基团时,则可得双-DNS-氨基酸。但双-DNS-半胱氨酸及双-DNS-组氨酸中的巯基及咪唑基与DNS的结合键是不稳定的,在酸水解时完全破坏,得到相应的α-DNS-Cys及α-DNS-His,并可产生二甲氨基萘-5-磺酸(DNS-OH)。因此,在DNS-蛋白的酸水解产物中不存在有双-DNS-Cys及双-DNS-His。在偏碱性(pH9.5—10.5)条件下,DNS-Cl不与胍基及脂肪族化合物的羟基发生反应。

DNS-氨基酸在酸性条件下(pH2—3),可被乙酸乙酯抽提,而DNS-OH留在水层,因此用乙酸乙酯的抽提液点样,会减少DNS-OH对层析图谱的干扰,在测定胰岛素的N-末

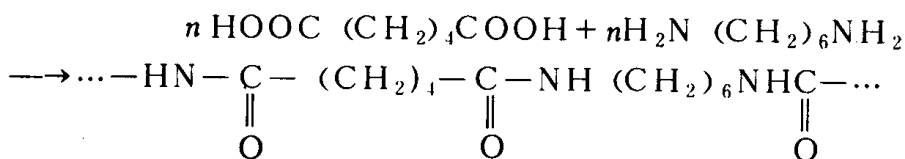
端氨基酸时采取了此法。但在测定未知蛋白质的N-末端氨基酸时,由于DNS - Glu, DNS - Asp, DNS - Arg, DNS - Thr, DNS - Ser 等大部分或部分留于水相,因此,往往被遗漏,而导致错误的结论。所以在测定未知蛋白质的N-末端氨基酸时,一般不用乙酸乙酯抽提法去除DNS - OH,而是采用透析法或是Sephadex G-25柱层析法在DNS-蛋白水解之前去除DNS - OH及其他小分子物质。将DNS-蛋白的水解液,直接点样层析。

DNS-氨基酸在254nm或265nm的紫外灯下观察有明显的绿色荧光。在DNS-蛋白的水解产物中还经常发现有DNS - OH,其中部分是由于DNS-Cl水解产生的,也有一部分是由双-DNS - Cys及双-DNS - His酸水解时产生的,在紫外灯下显蓝色荧光。还可发现有二甲氨基萘-5-磺酰胺(简称DNS - NH₂),它在紫外灯下显蓝绿色荧光。因此,可从荧光颜色的差别将DNS-氨基酸与DNS - OH, DNS - NH₂区别开来。

DNS-氨基酸可通过纸电泳法,高压纸电泳法,纸层析法及薄层层析法进行分离及鉴定。目前最适用的方法是用聚酰胺薄膜层析法。

聚酰胺薄膜层析是1966年以后发展起来的一种新层析技术。特别适合于分析氨基酸衍生物如:DNS-氨基酸,DNP-氨基酸及PTH-氨基酸等,具有灵敏度高,分辨力强、速度快,操作方便等优点。

聚酰胺薄膜是将锦纶涂于涤纶片上制成。锦纶(亦称尼龙)是由己二酸与己二胺聚合而成(锦纶66),故含有大量酰胺基团。



聚酰胺薄膜具有特异的层析分辨能力,是由于它可与被分离的物质之间形成氢键,将极性物质吸附。而被分离物质与其形成氢键的能力不同,使不同的物质被吸附的强度亦不同。在层析时,展层溶剂与被分离物在聚酰胺薄膜表面竞相形成氢键。选择适当的溶剂,使被分离物在溶剂与聚酰胺表面之间的分配系数能有较大差异,经过吸附与解析的展层过程,使被分离物质彼此分开。因此选择适当的溶剂系统是层析分离的关键。

用DNS - Cl法测定胰岛素的N-末端氨基酸是较容易的,但对于某些大的蛋白质的N-末端氨基酸分析有些困难,这是由于蛋白质的溶解度及蛋白质的紧密构象均影响DNS - Cl与蛋白质N-末端氨基酸的反应,因此制备DNS-蛋白的收率较低,这可通过加大DNS - Cl的浓度及使蛋白质事先变性来解决。

实验时间安排

本实验主要分成两个阶段进行:

1. DNS-蛋白(或DNS-肽)的制备及其酸水解。
2. 双向聚酰胺薄膜层析法鉴定DNS-氨基酸。

每个阶段各需一天完成,两天可完成全部实验。

实 验

一、主要仪器、材料及试剂

仪器

紫外灯：波长254nm 或265nm

材料

1. 聚酰胺薄膜 ($7 \times 7\text{cm}$)
2. 小层析缸 $4 \times 9 \times 9\text{cm}$ (或其他规格, 方型、圆型均可。)
3. 真空干燥器
4. 烘箱
5. 吹风机
6. 毛细管
7. 透析袋

试剂

1. DNS-Cl 溶液：取25mgDNS-Cl溶于10ml丙酮中
2. 浓DNS-Cl溶液：取20mgDNS-Cl溶于1ml丙酮中
3. 0.2mol/L NaHCO_3 水溶液
4. 6mol/L HCl 溶液
5. 8mol/L 尿素溶液：用 0.5mol/L 的 NaHCO_3 溶液配制
6. 溶剂系统I
甲酸 (85—90%)：水 = 1.5:100(V/V)
7. 溶剂系统II
苯：冰醋酸 = 9:1(V/V)
8. 溶剂系统III
乙酸乙酯：甲醇：冰醋酸 = 20:1:1(V/V/V)
9. 溶剂系统IV
 0.05mol/L 磷酸三钠：乙醇 = 3:1(V/V)
10. 溶剂系统V
 1mol/L 氨水：乙醇 = 1:1(V/V)

二、操作步骤

1. 胰岛素N-末端氨基酸的测定

(1) 标准DNS-氨基酸的制备

称取0.2—0.3mg标准氨基酸溶于0.5ml、 0.2mol/L 的 NaHCO_3 溶液中, 取0.1ml于细长的小试管中, 加入0.1ml DNS-Cl丙酮溶液, 用 1mol/L 的 NaOH 溶液调pH至9.5—10.5。用胶布封住试管口, 于室温 ($20—25^\circ\text{C}$) 放置3—4小时。反应毕, 用热吹风机吹除丙酮, 用 1mol/L 的 HCl 溶液调pH至2.0—3.0, 加入0.2ml 乙酸乙酯、摇匀, 静止分层后,

在上层的乙酸乙酯液中含有标准 DNS - 氨基酸。在测定胰岛素的 N-末端氨基酸时,可制备 DNS-Gly 及 DNS-Phe 作为标准。

(2) DNS-胰岛素的制备

取 1 mg 胰岛素加入 0.5 ml、0.2 mol/L NaHCO_3 溶液,加入 0.5 ml DNS-Cl 丙酮溶液,用 1 mol/L HCl 溶液调 pH 至 9.5—10.5,用胶布封住试管口,于室温 (20—25℃) 放置 3—4 小时。置于含有 P_2O_5 的真空干燥器中,将此干燥器置于 60℃ 水浴上,抽真空直至样品完全干燥。得到 DNS-胰岛素。

(3) DNS-胰岛素的水解及 DNS-氨基酸的抽提

将 0.5 ml 6 mol/L 的 HCl 溶液加入 DNS-胰岛素中,摇匀,使 DNS-胰岛素充分溶解,将此溶液转移至水解管中,用煤气灯封口,于 110℃ 烘箱中水解 16 小时,水解毕,开管,在水浴上蒸去盐酸,加入少量水,再蒸干。加入 0.5 ml 水,用 1 mol/L HCl 调 pH 至 2—3。加入 0.5 ml 乙酸乙酯,摇匀,则 DNS-氨基酸在上面的乙酸乙酯层内。

(4) DNS-氨基酸的层析

在聚酰胺薄膜 (7×7 cm) 的左下角距两边 1 cm 处划一点 (C 点),在距 C 点 1 cm,距左边 2 cm,距下边 1 cm 处划一点 (A 点),在左上角距左边 2 cm,距上边 1 cm 处划一点 (B 点) (图 1-1 所示)。

在 A 点处用毛细管点上样品 DNS-氨基酸,在 B 点处点上 DNS-Gly,其样品直径 2—3 mm,在溶剂系统 I 中进行第一向展层,直到溶剂前沿距顶 1 cm,取出聚酰胺薄膜,吹干,在 C 点处点上 DNS-Phe,将聚酰胺薄膜转 90° 角,在第二种溶剂系统中进行第二向展层,直到溶剂前沿距顶 1 cm,取出聚酰胺薄膜,吹干。

将聚酰胺薄膜置于 254 nm 或 265 nm 的紫外灯下观察,将绿色的荧光点划好,将样品胰岛素的 N-末端氨基酸与标准 DNS-Gly, DNS-Phe 的层析位置相比较,即可证明胰岛素的 N-末端氨基酸是 Gly 及 Phe。

2. 较大蛋白质的 N-末端氨基酸测定

(1) DNS-蛋白的制备

取 10 μmol 的蛋白质样品,溶解于 0.5 ml 8 mol/L 尿素溶液 (此溶液用 0.5 mol/L NaHCO_3 溶液配制),加入 0.5 ml 浓的 DNS-Cl 溶液 (20 mg/ml、用丙酮配制),用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 9.5—10.5,此混合物在室温反应过夜或在 37℃ 反应 5 小时。

(2) 除盐、尿素及 DNS-OH

将反应液倒入透析袋中,用蒸馏水透析 8 小时 (换 4 次水) 或采用 Sephadex G-25 柱层

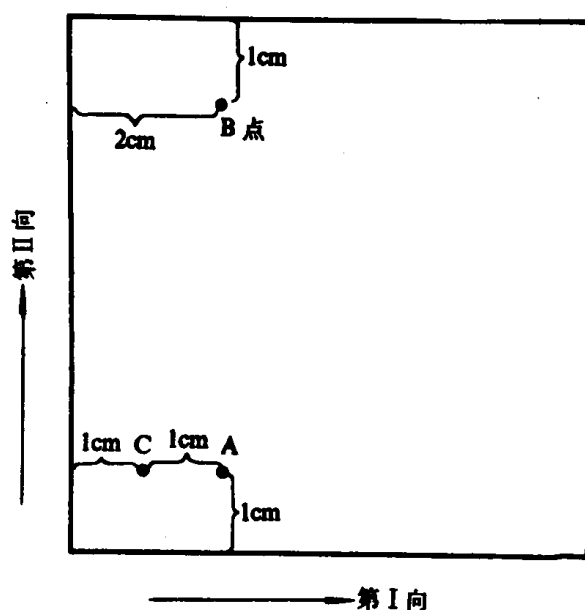


图 1-1 聚酰胺薄膜层析法鉴定胰岛素的 N-末端氨基酸

析法除盐，此法较迅速，并且用紫外灯照射此柱，可观察到蛋白带流动的情况，收集DNS-蛋白流出液。

(3) DNS-蛋白的水解

将脱盐的DNS-蛋白干燥，加入0.5 ml, 6 mol/L HCl 溶液，煤气灯上封口，在105℃水解18小时。小心割破水解管，倒入10 ml 小烧杯中于水浴上蒸干。

(4) DNS-氨基酸的层析

将干燥好的样品溶于10 μl 50%吡啶中，将其点于聚酰胺薄膜的一角（距两边为1 cm处），样品的直径不得超过3—4 mm，吹干。

首先将聚酰胺薄膜在第一种溶剂系统中展层，直到溶剂前沿距上端0.5 cm，取出，吹干。

将聚酰胺薄膜转90°角，于溶剂系统2中进行第二向展层，吹干。

三、实验结果

将聚酰胺薄膜于紫外灯（波长254 nm或265 nm）下观察。可看到三个主要荧光点：一个是蓝色的荧光区，是由DNS-OH产生的；另一个是蓝-绿色的荧光点，是由DNS-NH₂产生的；第三点即是蛋白质N-末端氨基酸的DNS-衍生物（DNS-氨基酸）产生的，它呈现绿色的荧光。将它与标准DNS-氨基酸的双向聚酰胺薄膜层析图谱（图1-2 A）比较，即可初步确定蛋白质的N-末端氨基酸。

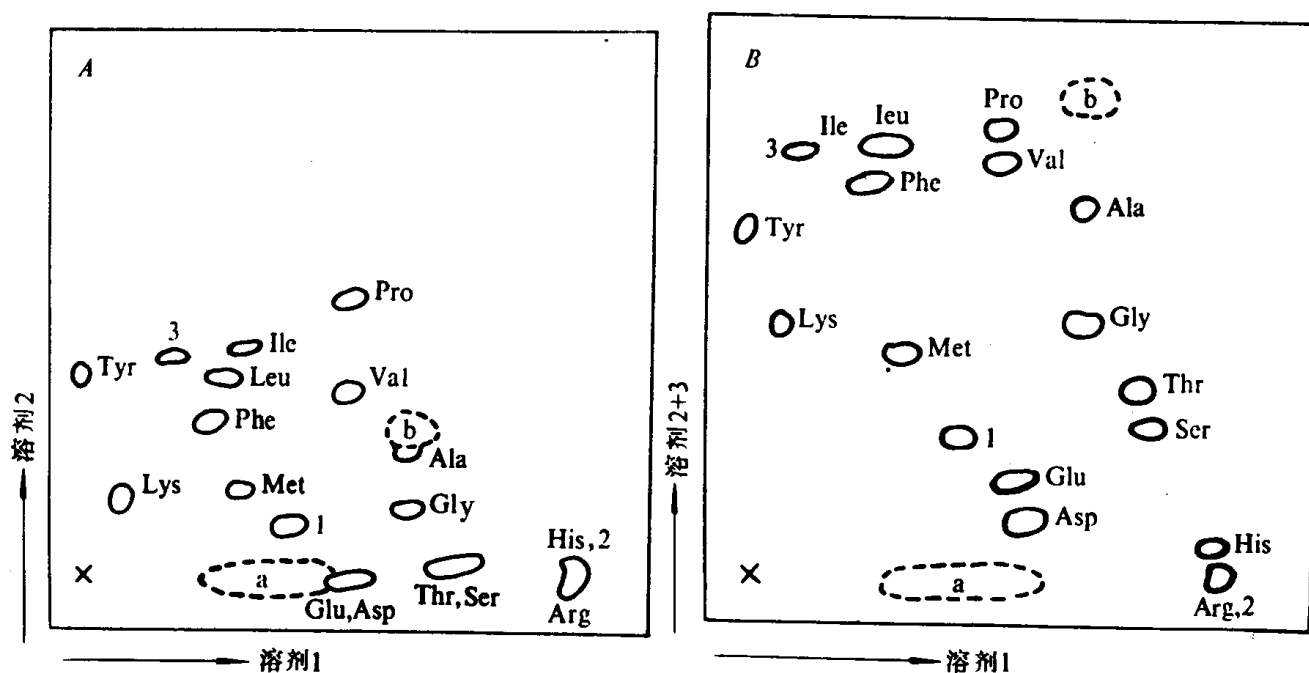


图 1-2 标准DNS-氨基酸聚酰胺薄膜层析图谱
A: 两种溶剂系统的层析图谱; B: 三种溶剂系统的层析图谱
a = DNS-OH b = DNS-NH₂
1 = O-DNS-Tyr; 2 = ε-DNS-Lys; 3 = 双-DNS-His

由图1-2可见,利用溶剂系统2,可将疏水性的氨基酸及某些中性氨基酸的DNS-衍生物分离开来,而对于带电的及其他的中性氨基酸的DNS-衍生物仍保留在聚酰胺薄膜的底部。

为了将DNS-Glu与DNS-Asp, DNS-Thr与DNS-Ser, DNS-Ala与DNS-NH₂分开,应先在溶剂系统1进行第一向层析,再转90°角在溶剂系统2中展层,然后在同一方向用溶剂系统3层析,只走 $\frac{1}{2}$ 距离即可。与标准DNS-氨基酸的层析图谱(图1-2B)比较,即可确定。

对于DNS-Arg和DNS-His用上述溶剂系统很难鉴别。因为它们往往与 ϵ -DNS-Lys混淆在一起,应用第4种溶剂系统进行展层鉴别。

由于DNS-Cys往往被DNS-OH遮盖,若怀疑蛋白质的N-末端氨基酸是Cys时,应用第5种溶剂系统进行分离鉴定。

当肽或蛋白质的头两个氨基酸是DNS-Val-X-,或DNS-Ile-X-时,在酸水解时往往有二肽存在,其DNS-二肽的量可从微量(X=Gly或Ser)到中量(X=Ala、Asp、Glu、Leu、Lys等)。而当X=Ile或Val时,没有游离的DNS-氨基酸的释放,大部分是以二肽的形式存在。这些二肽衍生物在溶剂系统2或3的层析方向上往往位于DNS-Phe和DNS-Val之间的位置。因此,易错误地判断为Phe或Val。

当蛋白质或肽的第一个氨基酸是疏水性的,第二个氨基酸是Pro时,在酸水解时也会产生二肽。

上述二肽DNS-衍生物的判断并不困难,可通过与标准DNS-二肽的层析图谱进行比较,即可确定(细节可参考文献[4])。

DNS-Trp在酸水解时被破坏,不能被鉴别,因此,若蛋白质或肽的N-末端氨基酸是Trp时,应将DNS-蛋白用胰凝乳蛋白酶,将DNS-氨基酸切割下来,再进行鉴定。

在酸水解时,由于DNS-Gln和DNS-Asn被水解成相应的DNS-Glu和DNS-Asp,因此,若经DNS-Cl法测得蛋白质的N-末端是Glu或Asp时,实际上应是Glx或Asx。

值得注意的是当DNS-蛋白质在酸水解后会产生大量的O-DNS-Tyr和 ϵ -DNS-Lys,在层析图谱上往往与DNS-Glu及DNS-Arg的层析点相混淆。

当用DNS-Cl法测定蛋白质N-末端氨基酸有困难时,可采用FDNB法进行测定,两种方法相互比较,最后可确定蛋白质的N-末端氨基酸。

参 考 文 献

1. 陈远聪等,生物化学与生物物理进展,38,1,1975。
2. Gray, W. R., Methods in Enzymology, 139, XI, Academic Press, New York, 1967.

3. Narita, K., et al., Protein Sequence Determination, 42, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1975.
4. Sutton, M. R., et al., Anal. Biochem., 344, 88, 1978.
5. Walker, J. M., Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Proteins, 203, Humane Press, Clifton, New Jersey, 1984.

吉林大学 分子生物学系 刘兰英

实验二 蛋白质顺序分析 (DABITC/PITC 双偶合法)

内 容 提 要

DABITC/PITC 双偶合法是近10年发展和使用的一种微量分析新技术，并已成功地应用于蛋白质微量顺序分析，无论液相或固相技术，手工或自动方法，都获得较满意的结果。

本实验采用手工 DABITC/PITC 双偶合法，此方法简易、灵敏、快速，不需要昂贵的蛋白质顺序测定仪等专门仪器及同位素材料，一般实验室均可进行，特别适宜于小肽的研究。

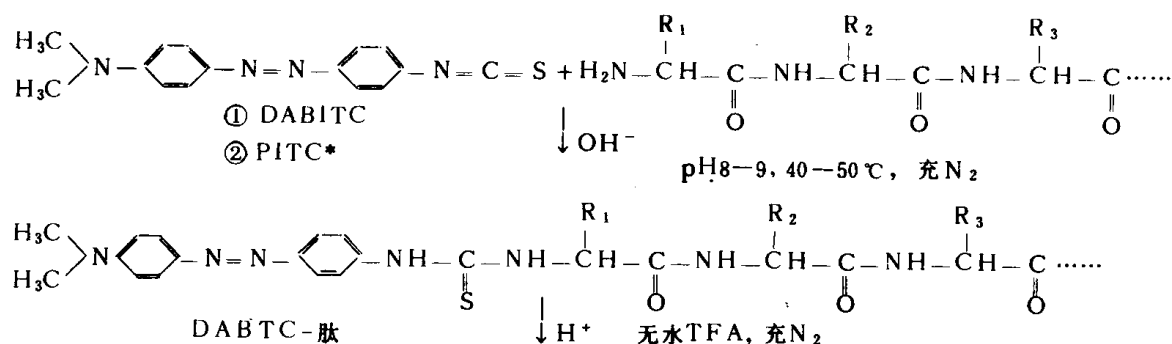
这个方法的优点是样品用量少，使用量可低至 pmol 水平，比经典的 Edman 方法灵敏约 25 倍。此法不需要酸进行高温水解，能测定易被酸破坏的氨基酸，因此 Gln、Asn 和 Trp 都能直接检出。所有 20 种天然氨基酸的 DABTH——氨基酸衍生物都可以用聚酰氨薄膜和硅胶板（分辨 Leu 和 Ile）检定。因为它们是有色化合物，暴露在 HCl 蒸汽中呈现出清晰的红色斑点，并且与杂质颜色不同，易于区别和检出。整个反应和操作时间较短，测定一个氨基酸残基约需 6—8 小时。

通过本实验的学习，可以初步掌握 DABITC/PITC 双偶合法测定蛋白质或肽的顺序方法，了解蛋白质或肽的顺序分析的一般原理和选用方法的原则。

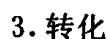
引 论 及 原 理

DABITC (4-N, N-Dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate) 是一种新型的有色 Edman 试剂，其化学名称为 4-N, N-二甲氨基偶氮苯-4'-异硫氰酸酯。有色试剂 DABITC 与多肽或蛋白质反应原理如下：

1. 双偶合



2. 裂解

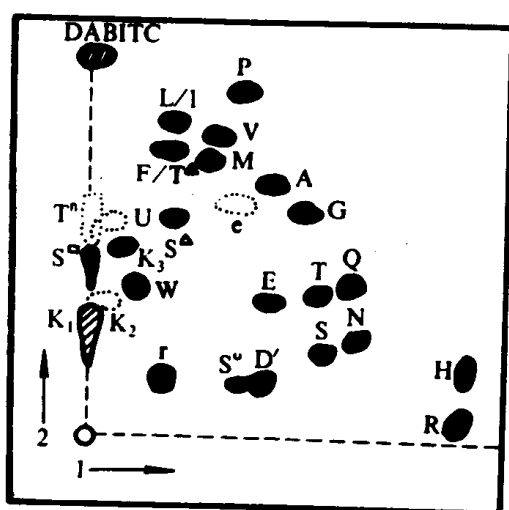


• 11 •

用聚酰胺薄膜检测，在膜上除可见到红色氨基酸衍生物外，还可见到一系列蓝色或紫色的斑点（见图 2-1），这些有色斑点由于它们有不同的颜色与确定的位置，所以在鉴别各个 DABTH-氨基酸时十分有用。

1. Leu与Ile重叠, 可用硅胶板加以区别。

3. Ser一般四个斑点, DABTH-Ser(S).



去氢产物 (s^{Δ})，多聚产物 ($s^{\square}$) 及去氢水合物 (s°)。

5. Gln与Asn约有8—15%水解成Glu和Asp,因此在鉴定时会出现很淡的Glu和Asp斑点。

6. Lys可出现三个不同颜色的衍生物, K_1 (紫色), K_2 (蓝色) 以及 K_3 (红色)。

7. 若样点重现(在下一循环中重复出现)应仔细观察新出现的斑点,尤其对于 Ser、Thr、Lys、Trp 等残基副反应多,回收率低,颜色反应较淡,更应小心注意分辨。

溶剂①: 乙酸: 水 (1:2 V/V), 溶剂②: 甲苯: 正己烷: 乙酸 (2:1:1 V/V), 经 HCl 蒸气熏后各斑点的颜色: 实心区——红色, 空心区——蓝色, 阴影区——紫色。
e 为蓝色标记物 D A B T C-二乙胺。
u 为 PITC 与 D A B I T C 水解产物偶合生成的蓝色硫脲。

第一阶段：仪器的清洗，试剂的配制或重蒸等。

第二阶段：标记化合物和 DABTH-氨基酸的制备和聚酰胺薄膜层析。

第三阶段：样品（小肽）中氨基酸的排列顺序分析和鉴定。

实 验

一、主要仪器、材料及试剂

仪器

1. 2ml 带塞离心管
2. 氮气钢瓶 (含99.99%)

3. 快速混合器
4. 烘箱
5. 恒温水浴
6. 台式高速离心机
7. 电吹风机
8. 微量注射器
9. 低温冰箱 (-20°C)
10. 层析器皿
11. 真空干燥器
12. 真空油泵

材料

1. 聚酰胺薄膜 ($2.5 \times 2.5\text{cm}$ 或 $3.0 \times 3.0\text{cm}$, 黄岩化学实验厂)。
2. 硅胶板 GF 254 ($15 \times 5\text{cm}$, 黄岩化学实验厂)。

试剂

1. 20种标准氨基酸
2. 二乙胺 (A. R. 或重蒸)
3. 乙醇胺 (重蒸)
4. 冰醋酸 (A. R.)
5. 三乙胺 (重蒸)
6. 丙酮 (A. R.)
7. DABITC (上海生化所东风厂产品) —— 用沸丙酮重结晶
8. 氯化氢饱和的乙酸溶液
9. 无水乙醇 (A. R.)
10. *n*-正庚烷 (重蒸)
11. 吡啶——用 KOH (10g/L) 回流, 蒸出, 再用茚三酮 (1g/L) 回流, 蒸出, 最后再用 KOH (10g/L) 回流, 再蒸出。 -20°C 贮存。
12. 乙酸乙酯 (A. R.)
13. *n*-醋酸丁酯 (重蒸)
14. 三氟乙酸 (TFA) —— 用 CrO_3 处理重蒸, 再用 CaSO_4 干燥重蒸, -20°C 保存。
15. 硫代异氰酸苯酯 (PITC) —— 在减压下通氮气重蒸, -24°C 保存。
16. P_2O_5 (C. P.)
17. (1) 聚酰胺薄膜层析溶剂:
 - I 向: 乙酸: 水 = 1:2 (V/V);
 - II 向: 甲苯: 正己烷: 乙酸 = 2:1:1 (V/V)
- (2) 硅胶板层析溶剂 (鉴定 Leu 和 Ile):