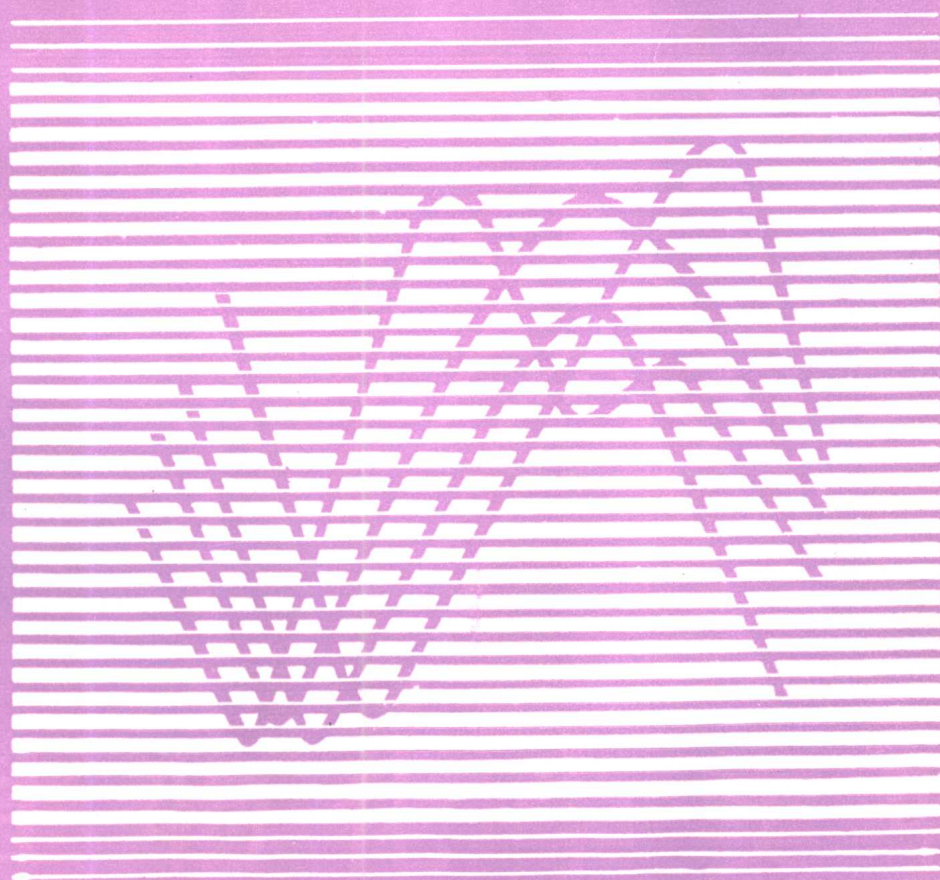


高等医学院校协编教材

生物化学实验

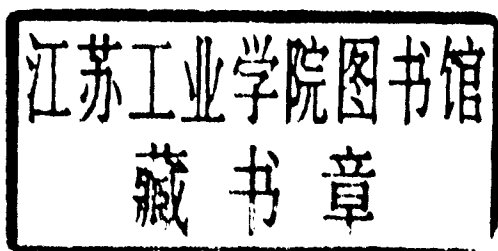


贵州人民出版社

高等医学院校协编教材

生物化学实验

贵阳医学院
衡阳医学院
广州医学院 生物化学教研室合编
湛江医学院
汕头大学医学院



贵州人民出版社

责任编辑 夏同珩
封面设计 梁友竹
技术设计 夏顺利

高等医学院校协编教材

生物化学实验

贵阳医学院等合编

贵州人民出版社出版发行

(贵阳市延安中路9号)

贵州省新华书店经销 贵州新华印刷厂印刷

787×1092毫米 16开本 12.5 印张 300千字

印数 1—9000

1988年8月第1版 1988年8月第1次印刷

ISBN 7-221-00399-8

R·33 定价: 4.00元

前 言

《生物化学实验》现由贵州人民出版社出版。这是一本为高等医学院校学生编写的教材。本书于1985年7月由衡阳医学院、广州医学院和贵阳医学院，根据卫生部颁发的《生物化学教学大纲》（草案）和《高等医学院校五年制医学专业学生基本技能训练项目》（草案）的有关要求，结合三院生化实验教学经验编写，曾内部印刷使用。三年来有七个院校采用了本书。1987年6月原编写单位和湛江医学院、汕头大学医学院共同讨论和总结了使用本书的经验，认为基本达到原编写目的，决定修订后出版。

生物化学实验方法和技术，既是生物化学发展的先决条件，且日益成为医学科学研究和临床实践的重要手段，生物化学实验课是生物化学课程中十分重要的组成部分。本书的主要特点是：内容既有现代生物化学的重要技术和方法，如各种类型的电泳、层析，分光光度法，微量气体分析，同位素示踪等，又有经实践证明效果好又适用的经典方法。为了便于各校使用，尽可能在一个实验内列出几种可供选用的方法。同时为扩大学生视野，活跃思维，将核酸化学编写成一个完整而系统的大型综合性实验，并在大多数实验后以附注形式较深入地介绍有关实验技术的基本原理。最后安排了一个实验设计课，要求学生根据所掌握的知识和教师提供的条件自行设计完成一个实验。以期在完成本书教学后，使学生不仅受到生化实验技术操作技能的基本训练，还能得到如何正确地观察、记录各种实验现象、结果和数据，并进行比较、分析、综合等科学方法和思维的锻炼。当然也有助于加深对生物化学理论的理解和掌握。

本书共四十个实验，方法六十一条，各院校可根据需要选用。

我们殷切地希望使用本书的老师和同学们对本书的不足之处提出批评指正。

编 者

1987年10月

目 录

实验须知	(1)
------	-----

蛋白质和核酸化学

实验1 蛋白质等电点的测定	(3)
实验2 蛋白质的沉淀反应(盐析、有机溶剂、重金属、生物碱试剂)	(4)
附注: 几种分离生物大分子的方法	
实验3 血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳	(9)
附注: 电泳	
一、基本原理	
二、几种电泳法简介	
实验4 聚丙烯酰胺等电聚焦电泳测定牛血清白蛋白等电点	(16)
实验5 凝胶层析分离蛋白质	(18)
一、血红蛋白和鱼精蛋白的分离	(18)
二、脲酶的分离	(19)
附注: 层析法	
一、吸附层析	
二、分配层析	
三、凝胶层析	
四、离子交换柱层析	
五、亲和层析	
实验6 氨基酸的薄层层析	(33)
实验7 DEAE纤维素离子交换层析法分离血清蛋白质	(34)
实验8 血清 γ -球蛋白提纯与纯度鉴定	(37)
实验9 血红蛋白及其衍生物的吸收光谱测定	(38)
附注: 分光法原理	
一、光电比色法	
二、分光光度法	
(一) 721型分光光度计	
(二) 722型分光光度计	
(三) 751型可见紫外分光光度计	
实验10 蛋白质定量	(46)
一、微量凯氏(Kjeldahl)定氮法	(46)

二、比色法

(一) 双缩脲法

(二) Folin-酚试剂法

(三) 考马斯亮兰法

三、紫外分光光度法

实验11 牛胰核糖核酸酶的变性及其复性..... (51)

实验12 肝细胞核酸提取、鉴定和测定..... (56)

一、肝细胞浆、核的分离与鉴定

二、DNA、RNA的提取

三、DNA、RNA的碱基分离

四、核酸的测定

酶

实验13 蔗糖酶的专一性..... (71)

实验14 影响酶活性的因素..... (72)

一、温度对酶活性的影响

附注：关于酶的最适温度的讨论

二、pH对酶活性的影响

附注：酶的最适pH

三、激动剂和抑制剂对酶活性的影响

(一) Na^+ 、 Cu^{2+} 、 Cl^- 和 SO_4^{2-} 对唾液淀粉酶活性的影响

(二) 丙二酸对琥珀酸脱氢酶活性的影响

附注：酶的激动剂与抑制剂

实验15 酶的米氏常数(K_m)测定..... (80)

一、胰蛋白酶的 K_m 值测定

二、过氧化氢酶的 K_m 值测定

附注：米氏常数的意义及应用

实验16 乳酸脱氢酶的组分及作用..... (87)

附注：酶蛋白与小分子物质的分离方法简介

实验17 乳酸脱氢酶同工酶(聚丙烯酰胺凝胶)电泳..... (90)

维 生 素

实验18 胡萝卜素的色层分析..... (94)

实验19 维生素C的定量(2,4-二硝基苯肼法)..... (95)

附注：

一、抗坏血酸2,6-二氯酚靛酚滴定法简介

二、提取抗坏血酸时注意事项

实验20 维生素B₁的定性(荧光法)..... (97)

附表 几种食物中一般营养成分表

物 质 代 谢

实验21 肝糖元的提取、鉴定与定量	(102)
一、肝糖元的提取与鉴定	
二、肝糖元定量测定	
实验22 饱食、饥饿和紧张对肝糖元含量的影响	(104)
实验23 血糖测定	(105)
一、吴宪-Folin法	
二、邻-甲苯胺法	
附注一、测定血糖的其他方法	
附注二、血液样品的采集	
附注三、血滤液的制备	
实验24 胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响	(110)
实验25 运动对血中乳酸含量的影响	(111)
实验26 血清脂蛋白的电泳	(112)
一、血清脂蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	
二、血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	
三、血清脂蛋白聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳	
实验27 转氨基作用 (圆形纸层析法)	(116)
实验28 精氨酸酶的作用	(118)
实验29 细胞色素氧化酶的作用及其抑制与解毒	(120)
实验30 Warburg 氏呼吸计测压法	(121)
一、肝组织耗氧量的测定	
二、谷氨酸含量的测定	
附注一、气体分析法的计算原理	
附注二、中间代谢的主要研究方法简介	
实验31 放射性同位素示踪	(132)
一、 ^3H -胸苷掺入DNA的试验	
二、 ^{32}P 掺入磷脂的试验	
附注 放射性同位素技术	

临 床 生 化

实验32 血清总胆固醇的测定	(140)
附注: 血清总胆固醇测定方法的简单评价	
实验33 血清三酸甘油酯的测定 (抽提法)	(142)
附注: 血清三酸甘油酯测定的其他方法简介	
实验34 血清谷丙转氨酶活性测定	(144)

一、金氏法	
二、赖氏法	
三、改良穆氏法	
附注：酶的活性单位	
实验35 全血非蛋白氮 (NPN) 测定	(149)
一、消化法	
二、改良帕波特Rappoport氏滴定法	
实验36 血清钾钠测定 (火焰光度法)	(154)
附注一、火焰光度法基本原理	
附注二、国产630-C型火焰光度计的使用方法	
附注三、有关血钾钠测定方法的简单评价	
实验37 血清钾的测定 (四苯硼钠比浊法)	(159)
实验38 血清钙的测定	(161)
一、草酸盐-高锰酸钾滴定法	
二、乙二胺四乙酸二钠滴定法	
实验39 血浆二氧化碳结合力的测定	(164)
一、量积法	
1. Van Slyke 量积法	
2. 安生-I型CO ₂ 结合力气量仪测定法	
二、滴定法	
实验40 尿淀粉酶活性的测定 (Winslow 氏法)	(170)
实验设计	(172)
生化实验中的对照设置	(172)

附 录

附录 I 常用缓冲液及酸碱指示剂的配制方法	(174)
附录 II 电动离心机的使用	(178)
附录 III 常用容量仪器的规格、使用、清洗及洗液的配制	(181)
附录 IV 几种动物生化常数表	(189)
主要参考书目	(190)

实 验 须 知

实验目的

1. 通过实验, 加深对生化理论的理解。
2. 较熟练地掌握生化实验的基本操作技术。
3. 培养严谨的科学态度和作风, 逐步提高分析问题和解决问题的能力, 为今后学习医学专业课程打下必要的基础。

实验要求

1. 实验前必须预习实验指导和有关理论, 明确实验目的、原理、预期的结果、操作关键步骤及注意事项, 计划安排实验工作时间。
2. 实验时要严肃认真专心进行操作, 注意实验过程中出现的现象和结果, 结果不对时必须重做。
3. 实验后应把结果如实记录在记录本上, 并进行科学分析, 写好实验报告, 交指导教师批阅。

仪器保管及清洁

1. 常用仪器在第一次实验时按仪器清单清点, 签名后负责保管。如有缺损应向老师报告, 填写破损单, 经老师同意签名后到实验准备室换领。
2. 贵重仪器如分光光度计、离心机等要尽力爱护, 使用前熟悉使用方法, 严格遵守操作规程。非本次实验使用仪器, 未经老师许可不得乱动。
3. 实验后, 必须把仪器洗净放入柜内, 按次序放置好, 以提高工作效率并防止破损。

试剂使用规则

1. 使用试剂前首先仔细辨认瓶签, 看清试剂的种类、浓度是否为实验需要的。
2. 取完试剂后, 立即将瓶塞盖好, 放回原处, 未用完的试剂不得倒回瓶内。
3. 取标准溶液时, 应先将其倒入干净试管中, 再用内外洁净的吸管从试管中吸取, 以免污染标准溶液。
4. 使用滴管时, 须注意滴管尖端朝下, 切勿倒置使试剂流入橡皮帽内, 以致污染溶液。
5. 使用有毒试剂及强酸强碱时, 尽可能用量筒量取, 若用吸管时只能用橡皮球吸取, 切勿用嘴吸取, 以免造成意外。

安全注意事项

1. 低沸点有机溶剂, 如乙醚、石油醚、酒精、丙酮等均系易燃物品, 不得直接在火上加热, 要用水浴加热, 这些物品应远离火源。
2. 凡属发烟或产生有毒气体的化学实验均应在通风柜内进行, 免致产生毒害。
3. 万一发生酸碱灼伤事故, 先用大量自来水冲洗, 然后用饱和 NaHCO_3 溶液中和酸,

用饱和 H_3BO_3 溶液中和碱，用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理氧化剂。

4. 万一发生起火事件，根据发生起火性质分别采用砂、水、 CO_2 或 CCl_4 灭火器扑灭。

5. 离开实验室时，必须关好窗户，切断电源、水源。

实验室清洁

1. 实验室必需经常保持清洁，不得随地吐痰，丢纸屑。

2. 实验用过的固体物（如棉花、滤纸、火柴梗等）不要丢在桌上或水池中，应放入废物缸内。

3. 实验台面经常保持洁净，实验后应抹干净。

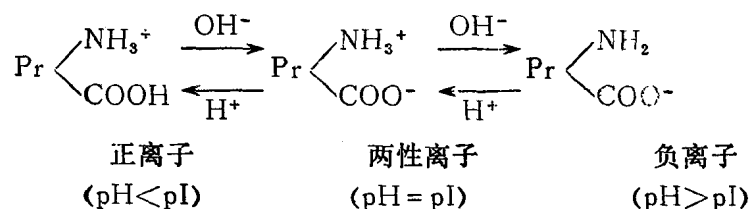
4. 下课时轮流由值日生打扫清洁，经老师检查后，方能离开实验室。

蛋白质和核酸化学

实验1 蛋白质等电点的测定

原 理

蛋白质如同氨基酸一样，是一种两性电解质。若调节溶液的氢离子浓度，使蛋白分子中所带的正负电荷相等，此时溶液的pH值称为该蛋白质的等电点(pI, Isoelectric point)。若溶液的pH值大于该蛋白质的pI，蛋白质分子释放H⁺，分子带负电荷（Pr<^{NH₂}COO⁻）。若溶液的pH值小于该蛋白质的pI，蛋白质分子结合H⁺，分子带正电荷（Pr<^{NH₃⁺}COOH）。



因为不同的蛋白质其氨基酸的种类及数量各不相同，故在不同pH溶液中所带的电荷也不相同，所以每种蛋白质有它自己的等电点。

蛋白质在等电点时，溶解度最小，故将此特性应用于蛋白质的分离及提纯。

操 作

取干燥而直径相近的试管6支，按下表加入各种试剂：

管 号		1	2	3	4	5
试 剂						
蒸 馏 水	(ml)	8.4	3.7	8.0	5.0	7.4
0.01N醋酸	(ml)	0.6	—	—	—	—
0.10N醋酸	(ml)	—	0.3	1.0	4.0	—
1.00N醋酸	(ml)	—	—	—	—	1.6
0.1N酪蛋白醋酸钠	(ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
摇匀后，放置10至20分钟						
各管相当的pH值		5.9	5.3	4.7	4.1	3.5
混浊程度						

观察各管的混浊度，以O、+、++、+++表示，沉淀最多那一管溶液的pH值最接近酪蛋白的等电点。

思考题

1. 为什么蛋白质在等电点时最不稳定而容易沉淀？
2. 为什么多数蛋白质的等电点偏酸性？
3. 试估计各试管中酪蛋白带什么电荷？

试剂

1. 酪蛋白-醋酸钠溶液：称取纯酪蛋白0.25g，置于50ml容量瓶内，加蒸馏水20ml及1.00N NaOH 5ml（必须准确）。振荡使酪蛋白溶解，然后加1.00N醋酸溶液5ml（必须准确）。最后用蒸馏水稀释至刻度，混匀。结果是酪蛋白溶于0.10N醋酸钠液内，酪蛋白浓度为0.5%。

2. 0.01N醋酸溶液。

3. 0.10N醋酸溶液。

4. 1.00N醋酸溶液。

实验2 蛋白质的沉淀反应（盐析、有机溶剂、重金属、生物硷试剂）

原理

维持蛋白质溶液稳定的因素有二，即水化层和电荷，当这两种稳定因素遭到破坏时，蛋白质分子颗粒即聚集沉淀而被析出。能破坏上述稳定因素而使蛋白质沉淀的化学物质有：中性盐类、某些有机溶剂、重金属盐及生物硷试剂等。

不同的因素引起蛋白质沉淀的原理不尽相同，例如： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 达到一定浓度时，则可使蛋白分子颗粒脱水，双电层被压缩，从而蛋白质从溶液中沉淀析出，乙醇在中性或微酸性条件下使蛋白质沉淀，因为乙醇能使蛋白质脱水，降低其在溶液中的稳定性；重金属离子沉淀蛋白质是在硷性条件下，蛋白质分子带负电荷，易与带正电荷的重金属离子（例如： Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 等）结合成不溶解的盐类而沉淀；而某些有机酸沉淀蛋白质是因为在酸性条件下，蛋白质分子带正荷，能与有机酸根结合，形成不溶性蛋白质盐而沉淀；加热蛋白质溶液，能破坏蛋白质分子的构象，即变性，溶解度降低而沉淀。

操作

1. 乙醇、重金属盐、生物硷试剂沉淀蛋白质：取试管6支，标号后各加入1:20鸡蛋清溶液10滴，按下页表操作，观察并记录实验结果。

2. 蛋白质的盐析作用：

（1）取一离心管，加盐析用蛋白质溶液2.5ml，并加等量的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液，摇匀，静置数分钟，有蛋白质沉淀析出，（它应是哪种蛋白质？），离心10分钟（2000rpm）。

（2）将离心后上清液倾入另一离心管内，慢慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末，每加一次用细玻璃棒充分搅拌，直至粉末不再溶解为止，此时可见蛋白质析出（这是什么蛋白质？），离心10分

解(0.050g/ml)。

(3) 将上述沉淀析出的蛋白质，分别加入蒸馏水 1 ml，观察沉淀是否溶解。

试剂 (滴)	1	2	3	4	5	6
95%乙醇	20					
0.5%醋酸铅		5				
3%AgNO ₃			5			
苦味酸饱和溶液				2		
鞣酸饱和溶液					2	
20%磺基水杨酸						2
1%醋酸	1					
10%醋酸			1	1	1	
结 果						

试 剂

1. 1:20鸡蛋清溶液；
2. 苦味酸饱和溶液；
3. 鞣酸饱和溶液；
4. 10%醋酸溶液；
5. 1%醋酸；
6. 95%乙醇；
7. 0.5%醋酸铅溶液；
8. 3%AgNO₃溶液；
9. 饱和(NH₄)₂SO₄溶液；
10. (NH₄)₂SO₄晶体粉末；
11. 盐析用蛋白溶液 取鸡蛋一个，除去蛋黄后，加蒸馏水200ml及饱和 NaCl 溶液100 ml待充分搅匀后，再用数层纱布过滤之；
12. 20%磺基水杨酸溶液。

附注：几种分离生物大分子的方法

研究蛋白质、核酸、酶等生物大分子的结构和功能，首先必须制备高纯度的生物大分子，其方法很多，主要有盐析法、有机溶剂沉淀法、等电点沉淀法、柱层析法、超离心法、电泳法、结晶法、冷冻干燥法等。本注仅简单介绍盐析法、有机溶剂沉淀法、冷冻干燥法和超离心法。

一、盐析及透析法

1. 原理：盐析法是蛋白质和酶分离纯化中广泛使用的方法，原理是蛋白质在盐浓度很低时，其溶解度随着盐溶液浓度升高而增加，此称盐溶（salting in）；随着盐浓度不断增加，蛋白质的溶解度逐步降低而沉淀析出，此称盐析（salting out）。盐析作用是盐类使蛋白质分子脱去水化膜，同时压缩蛋白质分子周围的双电层，致使蛋白分子相互聚集而沉淀。因为不同蛋白质在某种浓度的盐溶液中溶解度不一，所以分离几种蛋白质的混合溶液时，盐的饱和度常由稀至浓逐步增加，当出现第一种蛋白质沉淀并分离后，再继续增加盐饱和度，使第二种蛋白质沉淀，此称为分段盐析。

2. 盐析时必须注意的几个问题：

（1）盐类的选择：盐析时常用中性盐类，如硫酸铵、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠、硫酸镁等。其中最常用的是硫酸铵，其优点是溶解度大，温度系数小（即溶解度受温度影响小），25℃时饱和溶液为767g/L (4.1M)，而0℃时饱和溶液为676g/L (3.9M)。在此溶解度范围内，许多蛋白质都可分段盐析出来，而且不会引起蛋白质变性，故应用广泛。其缺点是对蛋白氮的测定有干扰。

考虑到硫酸铵浓溶液pH在4.5到5.5之间，故使用时常用氨水调节至中性。

（2）盐的饱和度计算法：蛋白质混合物在分段盐析时，加盐浓度是以饱和度来表示的，把饱和溶液的饱和度规定为100%。以硫酸铵分段盐析为例，把蛋白溶液的硫酸铵饱和度从 S_1 提高到另一饱和度 S_2 时，所需硫酸铵的克数可通过表1查出。

在蛋白质混合液中，除了直接加固体硫酸铵外，也可加入硫酸铵饱和液，盐析所需的饱和度可按下列公式来计算：

$$V = V_0 \frac{S_2 - S_1}{1 - S_2}$$

V 为所需添加的硫酸铵饱和液的体积， V_0 为原来蛋白质混合液的体积， S_1 为原来蛋白质混合液的盐饱和度， S_2 为蛋白质溶液所需达到的饱和度。

（3）温度：浓盐对蛋白质有保护作用，一般盐析操作可在室温进行，但某些对热敏感的蛋白质宜在低温下进行。

（4）pH：在等电点时，蛋白质溶解度小，容易析出，故盐析常选择在蛋白质等电点附近进行。

（5）蛋白质浓度：在相同盐析条件下，蛋白质浓度越大越易沉淀，但浓度过高时，容易使其它杂蛋白共沉淀而达不到分离效果，因此，必须根据具体情况选择适当的蛋白溶液浓度。

3. 脱盐：用盐析法沉淀并分离蛋白质后，常需脱盐才能获得纯品，脱盐常用透析法（dialysis）（图2-1）。这种方法是将蛋白质溶液放入透析袋中，透析袋的两端用绳扎紧，把密封的透析袋放入体积大，离子强度低的缓冲液或蒸馏水中，由于透析袋是半透性的，允许小分子物质（无机盐等）透过，但不允许大分子物质（蛋白质、酶等）透过，小分子从透析袋中扩散出来进入缓冲液，因此袋内蛋白质溶液的盐浓度不断下降。一般透析过程时间较长，宜在低温下进行，为了加速透析作用，常需轻轻搅拌，并且要不断更换缓冲液或蒸馏水。

表2-1

室温下由 S_1 提高到 S_2 每升加硫酸铵的克数

$S_2 \backslash S_1$	0.10	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	1.00
0	55	113	144	175	209	242	278	312	350	390	430	474	519	560	608	657	703	760
0.10		57	67	118	149	182	215	250	287	325	365	405	448	494	530	585	634	685
0.20			29	59	90	121	154	188	225	260	298	337	379	420	465	512	569	610
0.25				29	60	91	123	157	192	228	265	304	345	386	430	475	521	571
0.30					30	61	93	125	160	195	232	270	310	351	394	439	485	533
0.35						30	62	94	128	163	199	235	275	315	358	403	449	495
0.40							31	63	96	131	166	205	240	280	322	365	410	458
0.45								31	64	98	133	169	206	245	286	330	373	420
0.50									32	63	100	135	172	211	250	292	335	380
0.55										33	66	101	138	176	214	255	298	344
0.60											33	67	103	140	179	219	261	305
0.65												34	69	105	143	182	224	267
0.70													34	70	108	146	187	228
0.75														35	72	110	149	170
0.80															36	73	112	152
0.85																37	75	114
0.90																	37	76
0.95																		38

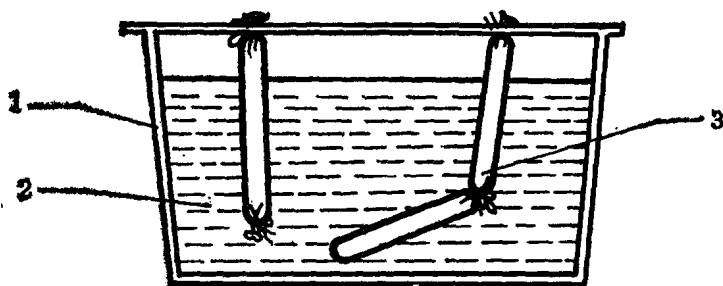


图2-1 透析装置

1.透析缸 2.透析液 3.透析袋

二、低温有机溶剂沉淀法

利用不同蛋白质在不同浓度的有机溶剂中溶解度差异而分离的方法，称有机溶剂分段沉淀法。有机溶剂是通过降低溶液的介电常数和脱水两种作用，致使同一或相邻蛋白质分子表面相反电荷之间吸力增加，从而使蛋白质沉淀析出。常用的有机溶剂为乙醇、丙酮。为了避免有机溶剂对蛋白质的变性作用，必须在低温下进行。可以先将蛋白质溶液冷却至 0°C ，然

后缓缓加入预冷至 -30°C 的有机溶剂，注意搅拌均匀，避免局部浓度过高，就能达到沉淀蛋白质之目的。

三、冷冻干燥

为了防止生物大分子变质，使之易于保存，常需浓缩干燥。冷冻干燥(lyophilization)是常用的浓缩干燥方法之一。此法原理为：①在相同浓度下，被干燥的物质所含溶剂，随着所处环境压力减小，真空度增高，溶剂沸点降低，蒸发速度显著增加；②在相同压力下，水蒸汽压随着温度的下降而下降。故在低温低压下，溶剂结冰并迅速升华成气体被除去。该操作过程是将蛋白质溶液盛放在培养皿中预先冷冻到冰点以下，使之成固体，然后接入真空系统，在低温低压下使溶剂气化而除去。冷冻干燥的装置很多，其中最简单可自行安装者见图 2-2。应用此法干燥所得的产品既疏松，溶解度好，又能保持其天然结构。

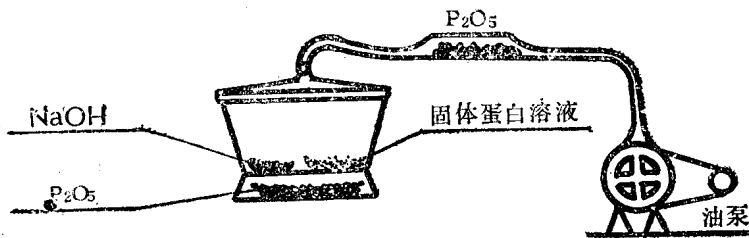


图2-2 冷冻真空干燥装置

四、超离心法

在生化研究工作中，离心法应用很广泛。可用于分离和收集细胞、细胞器和各种生物大分子，实验室中大多数离心机(centrifuge)最大速度不超过4 000至6 000rpm (revolution per minute)，高速离心机(high-speed centrifuge)是指转速达20 000至25 000 rpm 的离心机，并附有冷却真空装置；超速离心机(ultracentrifuge)的转速可高达25 000 rpm 以上，附有真空和冷却装置，目前超离心机的应用非常广泛，成为分离、提纯、鉴别生物高分子的重要技术。为了解超离心技术，必须先了解以下几个基本概念：

1. 离心加速度：超离心是利用离心机在高速运转时所产生的强大离心加速度来分离具有不同沉降系数的生物高分子。其产生的离心加速度一般可用下列方程式来计算：

$$F = \frac{4\pi^2 v^2 r}{g}$$

式中 F 为离心力，单位以重力加速度 g 的倍数(或 $\times g$)表示， g 为重力加速度($980.6\text{cm}^2/\text{sec}^2$)， r 为旋转半径， v 为转速即离心机每秒转数。在实际使用中， v 是以每分钟转数(rpm)表示的，上式改为

$$F = \frac{4\pi^2 v^2 r}{g} \times \left(\frac{1}{60}\right)^2$$

由上式可见， F 大小不仅与rpm有关，而且与旋转半径 r 密切相关，在不同 r 时，离心机转数(rpm)与离心力(F)的换算，见附录 II 附图 II-1。

2. 沉降系数：在单位离心力加速度作用下颗粒的沉降速度称为沉降系数(sedimen-

tation coefficient), 用svedlberg表示, 简写为S。的单位是秒。因为许多生物大分子具有比 10^{-13} 秒更大的沉降系数, 所以规定数量 1×10^{-13} 秒为一个svedlberg单位。如大肠杆菌核蛋白体具有 70×10^{-13} 秒沉降系数, 称70 S。由于被分离的物质, 其质点大小、形状、密度及所使用的介质粘度、密度等因素各不相同, 故沉降系数也各不相同。生化文献中, 对某些被分离的生物高分子或亚细胞组分的化学结构及分子量尚不明确时, 就常以沉降系数这一概念来描述大小, 如大肠杆菌核蛋白体70 S是由50 S和30 S的两个亚基所组成的, 通常蛋白质的沉降系数均在1~200 S单位之间。

3. 沉降系数与分子量: 由沉降系数可求得物质的分子量:

$$M = \frac{RTS_{w,20}}{D_{w,20}(1 - \bar{v}\rho)}$$

式中M为分子量, R为气体常数, $S_{w,20}$ 为理想状态(以20℃的水为介质时)粒子的沉降系数; $D_{w,20}$ 为理想状态时, 粒子的扩散系数; $\bar{v}$ 为偏比容, 等于溶质粒子密度的倒数, ρ 为溶剂密度。尚有其它计算分子量的方法和公式, 此处不一一赘述。

实验3 血清蛋白质醋酸纤维薄膜电泳

原 理

血清中各种蛋白质的等电点, 大部分低于pH7.0, 所以在pH8.6缓冲液中, 它们都电离成负离子, 在电场中向正极移动。由于血清中各种蛋白质等电点不同, 在同一pH下所带电荷量不同, 此外各种蛋白质的分子形状也不相同, 因而在电场中的泳动速度不同。一般说来, 蛋白质分子带的净电荷量越多, 分子量越小, 分子呈球形, 则泳动速度快, 反之, 则慢, 因此可以利用其速度快慢不同将之分开。

本实验用醋酸纤维薄膜为支持物, 依上述原理将血清蛋白分离为白蛋白、 α_1 球蛋白、 α_2 球蛋白、 β 球蛋白及 γ 球蛋白等五个区带。

待蛋白分离后, 用染色剂染色, 蛋白质的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0.4N NaOH浸洗下来, 用来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测定其相对含量。

操 作

1. 点样:

(1) 取醋酸纤维素薄膜小条(2×8cm), 在薄膜无光泽面距一端1.5cm处用铅笔划一线, 表示点样位置。然后将薄膜浸入pH8.6巴比妥缓冲液中。待完全浸透后(指薄膜上无白色斑痕)再取出, 用滤纸吸去多余缓冲液。

(2) 用X光软片或盖玻片蘸新鲜血清, 印在点样线上, 待血清完全渗入薄膜后移开。

2. 电泳: 将点样后的薄膜条置于电泳槽架上(图3-1), 点样面朝下, 点样端置于负极, 在薄膜两端分别搭上数层滤纸(2~4层), 连接缓冲液。薄膜条与滤纸需贴紧。平衡约5分钟后, 以电压为10~15V/cm膜长, 电流为0.4~0.6mA/cm膜宽, 通电约60分钟。

3. 染色: 用镊子将电泳后的薄膜取出, 直接浸入盛有氨基黑10B染色液器皿中, 染色5~10分钟。