

生物化学实验指导

北京农业大学生物学院
植物生物化学教研室编

江苏工业学院图书馆
藏书章

北京农业大学
一九九二年五月

目 录

实验一	蛋白质的两性性质及等电点的测定.....	1
实验二	玉米种子中赖氨酸含量的测定.....	3
实验三	自动部分收集器使用方法.....	5
实验四	凝胶层析脱盐.....	5
实验五	单核苷酸的离子交换树脂柱层析分离.....	8
实验六	植物体内的转氨基作用.....	12

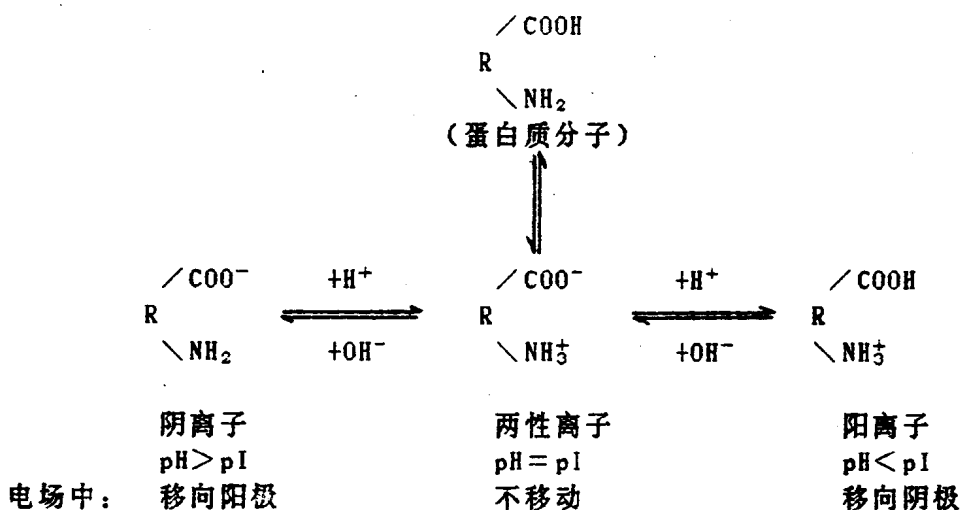
实验一 蛋白质的两性性质及等电点的测定

一。目的

通过实验了解蛋白质的两性性质和等电点的意义及蛋白质分子聚沉的关系。

二。原理

蛋白质是两性电解质。蛋白质分子中可以解离的基团除末端 α - NH_2 与羧基外，还有肽链上氨基残基的侧链基团，如酚基、巯基、胍基、咪唑基等基团，它们都能解离为带电基团。因此，在蛋白质溶液中存在着下列平衡：



调节溶液的pH值使蛋白质分子的酸性解离与碱性解离相等，即所带正负电荷相等，净电荷为零，此时溶液的pH值称蛋白质的等电点。在等电点时，蛋白质分子溶解度最小，溶液的浑浊度最大。

三。仪器和试剂

1. 仪器

- (1) 试管架
- (2) 试管：15ml×6
- (3) 移液管：1ml×4，2ml×4，10ml×2
- (4) 皮头吸管：×2

2. 试剂

- (1) 1N 醋酸
- (2) 0.1N 醋酸
- (3) 0.01N 醋酸
- (4) 0.2N 氢氧化钠
- (5) 0.2N 盐酸
- (6) 0.01% 甲基橙
- (7) 0.5% 酪蛋白溶液

四. 操作步骤

1. 蛋白质的两性反应

(1) 取一支试管, 加0.5%酪蛋白1毫升, 再加甲基橙指示剂4滴。此时溶液呈橙黄色, 无沉淀生成。

(2) 用滴管慢慢加入0.2N 盐酸, 随加随摇动直至有大量的沉淀生成。此时溶液pH值接近酪蛋白的等电点。观察溶液颜色有何变化?

(3) 继续滴加0.2N 盐酸, 沉淀会逐渐减少消失。观察此时溶液的颜色有何变化?

(4) 滴加0.2N 氢氧化钠进行中和, 沉淀又出现。继续滴加0.2N 氢氧化钠, 沉淀又逐渐消失。观察溶液的颜色变化。

解释以上(1)~(4)的颜色及沉淀变化的原因。

注: 甲基橙的变色范围: pH3.1~4.4

2. 蛋白质等电点的测定

(1) 取同样规格的试管5支, 按下表精确地加入各种试剂:

试剂 \ 编号	1	2	3	4	5
蒸馏水 (ml)	8.38	8.75	8.00	5.00	7.40
0.01N 醋酸 (ml)	0.62				
0.1N 醋酸 (ml)		0.25	1.00	4.00	
1N 醋酸 (ml)					1.60
pH值	5.9	5.3	4.7	4.1	3.5

(2) 充分摇匀, 然后向以上各试管依次加入0.5% 酪蛋白1毫升, 边加边摇, 比较摇匀后及5分钟后各管的浑浊度。并作表, 用-、±、+、++、+++等符号表示各管的浑浊度。根据浑浊度判断出酪蛋白的等电点。

注: 最浑浊的一管的pH值即为酪蛋白的等电点。

思考题:

1. 何谓蛋白质的等电点?
2. 在等电点时蛋白质的溶解度为什么最低? 请结合你的实验结果和蛋白质的胶体性质加以说明。
3. 在本实验中, 酪蛋白处于等电点时则从溶液中沉淀析出, 所以说凡是蛋白质在等电点时必然沉淀出来, 上面这种结论对吗? 为什么? 请举例说明。

实验二 玉米种子中赖氨酸含量的测定

一。目的

掌握用比色法测定谷物种子中赖氨酸的含量的方法。

二。原理

赖氨酸是一种必需氨基酸，它的含量多少是谷物籽粒的品质优劣的主要标准之一。

蛋白质中的赖氨酸具有一个游离的 ϵ - NH_2 ，它与茚三酮起颜色反应呈蓝紫色，其颜色的深浅在一定范围内与赖氨酸的含量成线性关系。

亮氨酸与赖氨酸的碳原子数目相同，而且仅有一个氨基（ α - NH_2 ），相当于蛋白质中赖氨酸残基上的 ϵ - NH_2 ，因而可以用亮氨酸做标准进行比较。

三。仪器与试剂

1. 仪器

- (1) 721型分光光度计
- (2) 分析天平
- (3) 恒温水浴
- (4) 具塞试管×8
- (5) 移液管：1ml×1，2ml×2，5ml×2

2. 试剂

- (1) 0.2M 柠檬酸缓冲液 (pH5.0)
称取2.10克柠檬酸和2.94克柠檬酸三钠，溶解于50毫升蒸馏水中，调pH至5.0。
- (2) 茚三酮试剂
称1克茚三酮溶于25毫升95%乙醇中。称40毫克二氯化锡溶于25毫升柠檬酸缓冲液中，将两液混合摇匀，滤去沉淀，上清液置冰箱保存备用。
- (3) 0.02N HCl
取12N HCl 1.8毫升，用蒸馏水稀释定容至1000毫升。
- (4) 亮氨酸标准液
准确称取5毫克亮氨酸，加数滴0.02N HCl使之溶，然后用蒸馏水稀释定容到100毫升，则得浓度为50 $\mu\text{g/ml}$ 的标准液。
- (5) 95%乙醇液
- (6) 4%碳酸钠
称取4克无水碳酸钠，溶于100毫升蒸馏水。
- (7) 2%碳酸钠
取25毫升4%碳酸钠，加25毫升蒸馏水。

四。操作步骤

1. 标准曲线的制作

取七支带塞试管编号，按下表添加试剂：

试管编号	0	1	2	3	4	5	6
取亮氨酸标准液 (ml)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
加蒸馏水 (ml)	2.0	1.9	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0
亮氨酸含量 (μg)	0	5	10	20	30	40	50

再向以上每支试管内加4%碳酸钠和茚三酮试剂各2.0毫升，摇匀后加塞置于80℃水浴中加热30分钟，取出后用流水冷却试管至室温。再向每支试管内加95%乙醇3.0毫升，混匀后用1厘米比色杯在530nm波长下比色。以消光值为纵坐标，亮氨酸含量为横坐标，绘制标准曲线。

2. 样品的测定

(1) 材料准备

取玉米种子，用粉碎机粉碎，过100目筛子，收集过筛后的细粉，放入广口瓶内，加入沸程60—90℃的石油醚，使其淹过粉面，浸泡8小时，不时搅拌进行脱脂。然后过滤，并用干净的石油醚淋洗沉淀若干次，弃去滤液。将干粉晾在干净的滤纸上，置阴凉通风处吹干石油醚。收集干粉，置干燥器内，保存备用。

(2) 测定

取15毫克已粉碎脱脂的玉米样品于具塞干燥试管内，加2%碳酸钠4.0毫升，于80℃水浴中提取20分钟，然后加茚三酮试剂2.0毫升，继续保温显色30分钟，冷却后加95%乙醇3.0毫升，混匀后过滤，然后在530nm波长下比色。

五. 结果计算

$$\text{样品中赖氨酸的含量 (\%)} = \frac{\text{从标准曲线上查得值 (微克)}}{\text{样品重 (毫克)}} \times \text{样液稀释倍数} \times 10^{-3} \times 100$$

六. 附注

由于亮氨酸与赖氨酸的分子量不同，故用亮氨酸标准曲线计算赖氨酸时，需乘以校正系数1.1515，同时还应从最后的计算结果中减去游离的氨基酸含量。各种作物种子中游离氨基酸的含量是：玉米0.01%；小麦0.05%；水稻0.01%；高粱0.04%。

实验三 自动部分收集器使用方法

自动部分收集器用于自动收集柱层析流出液。在正常工作条件下，能连续工作一周左右。

计时收集使用方法如下：

1. 将试管插在收集盘上，连接电源线路（包括安全阀与换管臂之间线路）和滴液乳胶管。
2. 将时间选择旋钮旁边的螺丝拧松，旋钮旋到刻度“0”处，换向开关拨向左方（或右方）开启电源，打开“自动”开关，此时收集盘按逆时针（或顺时针）方向转动，待转到终端管不动时，“换向”键上的报警指示灯亮。
3. 关闭“自动”开关，将时间选择旋钮旋到所需分钟处，换向开关拨向右方（或左方），则报警指示灯暗，收集盘按顺时针（或逆时针）方向略转动后停下（有的收集器需按一下换管键，收集盘才略转动然后停下），此位置即为“起始位置”。
4. 松开换管臂上固定螺丝，按收集盘上的记号找到最里圈（或最外圈）起始的第一个试管，调节臂长和位置，使滴液管口对准起始第一个试管口中央，拧紧螺丝，固定换管臂。
5. 按动“手动”或“换管”键，按一下放开一次，则指示灯亮一次，收集盘相应转换一只试管，可以试按几次，检查滴液口是否依次对准每个试管，若未对准应重复2-4步骤，重新调节。
6. 调节完毕，按步骤2、3将收集盘退至起始位置，准备收集液体，在以后的整个收集过程中不得再改变换管臂的位置。
7. 固定时间选择旋钮旁的螺丝，开启“自动”开关，开始自动收集。若要变更计时刻度，必须关闭自动开关后再旋时间选择旋钮，否则仪器要损坏。

实验四 凝胶层析脱盐

一。目的

了解凝胶过滤的原理，掌握凝胶层析的一般操作技术，分离麦清蛋白和硫酸铵。

二。原理

凝胶过滤的主要装置是填充有层析介质的层析柱。层析介质及分离原理如下：

1. 层析介质

凝胶过滤以水不相溶的固相凝胶作为介质（载体）。层析介质应具备下列特点：

- (1) 凝胶基质应该是化学惰性物体
- (2) 离子基团含量少
- (3) 网眼和颗粒大小均匀
- (4) 凝胶颗粒和网眼大小的选择范围宽广
- (5) 机械强度高

目前使用较多的是具有各种孔径范围的葡聚糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶及这些凝胶的各类衍生物。其中以葡聚糖凝胶最为常用。它具有三维网眼结构，完全不溶于水。葡聚糖凝胶是具有一定平均分子量的葡聚糖和环氧氯丙烷交联而成的高分子化合物。

由于凝胶骨架中的多糖链含有大量的-OH基，因此凝胶具有很强的亲水性，能在水和电解质溶液中膨胀。交联度大的凝胶网眼孔径小，吸水量少，其G值亦小；反之G值增大。G值表示每克干胶吸水量（毫升）的10倍。

2. 分离原理

选用具有一定网眼大小的，经过处理的葡聚糖凝胶装柱作为层析介质。当待测物质被洗脱通过凝胶柱时，分子大小不同的物质受到不同的阻滞作用。半径接近或超过网眼半径的分子，不进入凝胶颗粒的网眼之中（这种现象称为被排阻。被排阻的最小分子量称为该凝胶的排阻极限），受到的阻滞作用小，在重力作用下随着溶剂在凝胶颗粒之间沿着较短流程向下流动，移动速度快而先流出层析柱；而半径小于网眼半径的分子可完全渗入凝胶颗粒内部的网眼之中，它们被洗脱时要经过逐层扩散，阻滞作用大，流程长，移动速度慢，因而后流出层析柱。中等大小分子则在前二者之间按其分子量大小顺次流出。从而使得待测样品中的混合物被分离开来。

由于在一定的层析柱上，分子量大小不同的物质被洗脱的时间是一定的。因此凝胶过滤可用于分离、鉴定及制备。本实验用来进行蛋白质脱盐。

三. 实验材料、仪器和试剂

1. 材料

- (1) 新鲜小麦种子
- (2) 葡聚糖凝胶 G-25

2. 仪器

- (1) 紫外分光光度计
- (2) 部分收集器
- (3) 层析柱
- (4) 烧杯：500ml×1
- (5) 分析天平
- (6) 具塞三角瓶：250ml×1
- (7) 量筒：100ml×1
- (8) 离心机、离心管
- (9) 移液管：2毫升
- (10) 秒表

3. 试剂

- (1) 饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

(2) 1% BaCl_2

四. 操作

1. 溶胀凝胶

称取交联葡聚糖凝胶G-25 8~10克或适量(视层析柱容积而定), 加入500毫升蒸馏水于沸水浴中溶胀5小时。待溶胀平衡后, 用虹吸法除去含有细颗粒的上层液。然后再放些蒸馏水用玻棒搅拌, 稍静置, 待大部分凝胶沉降后, 再虹吸除去含有细颗粒凝胶的上层液, 如此反复操作多次, 至无细颗粒为止。最后将漂洗好的凝胶在真空干燥器中减压除气, 准备装柱。

2. 装柱

层析柱下端的止水螺丝旋紧, 装入1/3柱长的洗脱液, 把溶胀好的凝胶边搅拌边倒入柱中, 同时开启止水螺丝, 控制一定流速, 使柱中的凝胶一直处在溶液中。最好一次连续装完, 若分次装入, 需用玻棒轻轻搅动柱床上层凝胶, 以免出现界面。最后放入略小于层析柱内径的滤纸片, 以防不溶物侵入床面和液滴对床面的冲击。用管道连接下口与部分收集器滴头, 即可投入使用。

3. 用盐析法分离提取麦清蛋白

称2克小麦种子粉碎, 放入三角瓶, 加20毫升蒸馏水, 手振荡半小时, 然后静置半小时, 上清液用离心机(3000转/分)离心15分钟。离心后的上清液再过滤, 滤液应透明。用醋酸酸化滤液至pH4.7, 加等体积的饱和硫酸铵溶液, 边加边搅动, 即有白色絮状沉淀生成。置冰箱过夜, 使麦清蛋白全部盐析沉淀出来。小心倾去大部分上清液, 3000转/分离心20分钟, 倒出上清液, 加2毫升无离子水, 使沉淀溶解, 即得麦清蛋白和硫酸铵混合液, 准备上样。

4. 上样

上样前胶床表面只留约1毫米液层。然后吸取0.5毫升或适量样品提取液, 小心注入层析柱床面中央(勿冲动胶床!)开启收集器, 打开螺旋夹收集并计算体积。待大部分样液已进入胶床, 床面上仅有1毫米左右液层时, 再用皮头滴管加入少量洗脱液, 把剩下的样品洗入胶柱。如此冲洗二次。但要尽量避免样品的稀释。之后, 用滴管小心加入3~5厘米高洗脱液层, 戴上柱帽, 调整流速, 使上、下流速同步保持8滴/分(即每滴10秒), 进行洗脱。

5. 洗脱、收集和鉴定

本实验以计时收集, 每4毫升收一管。然后用紫外分光光度计在280nm处测消光值。记录每管消光值和管号。以管号为横坐标, 以消光值为纵坐标, 绘出洗脱曲线, 确定哪些管中有蛋白。

因 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 无紫外吸收峰, 待比色完毕于各管中分别加2滴1%的 BaCl_2 溶液, 确定哪些管中有 SO_4^{2-} 。从而可以看到凝胶层析脱盐的效果。

思考题:

用分子筛凝胶柱层析法分离混合样品时, 得到较好的分离效果的关键是什么?

实验五 单核苷酸的离子交换树脂柱层析分离

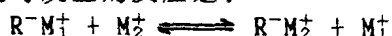
一。目的

用阳离子交换树脂分离RNA经过碱水解所得到的四种单核苷酸，掌握离子交换树脂柱层析的分离原理和方法。

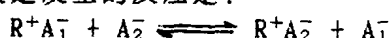
二。原理

本实验采用离子交换树脂柱层析法分离四种单核苷酸。这种方法是通过溶液中的离子与树脂上的离子进行连续的、竞争性的交换平衡而使混合物中各个组分分离，它包括吸附和洗脱两个过程，交换反应的速度服从质量作用定律。进行交换平衡的反应式如下：

阳离子交换时发生的反应是：



阴离子交换是发生的反应是：



(R代表离子交换树脂母体基团， M^+ 、 A^- 分别代表阳离子和阴离子)

要成功地分离某混合物，必须根据其所含物质的解离性质，选择适当类型的离子交换树脂，并控制吸附和洗脱条件。

核苷酸分子中各基团的解离pK值和等电点见下表：

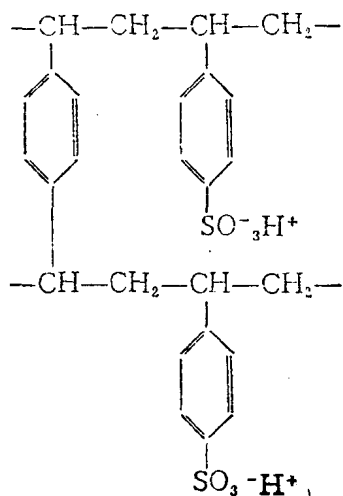
单核苷酸分子中各基团的解离pK值和等电点

解离 pH值 核苷酸	基团	含氮环的 亚氨基* (-N ⁺ H=)	磷酸基 一级解离	磷酸基 二级解离	等电点
2'-UMP和3'-UMP混合物		—	1.02	5.88	—
2'-GMP和3'-GMP混合物		2.3	0.7	5.9	1.5
3'-AMP		3.65	0.89	5.92	2.27
3'-CMP		4.3	0.8	6.04	2.55

* 分别指GMP上-N⁷H=，AMP上-N¹H=，CMP上-N³H=

由上表可见，四种核苷酸的一级解离pK值互相接近，二级解离pK值也相互接近，因而不能作为分离的依据，但含氮环上亚氨基的解离pK值却相差较大，所以在离子交换分离中起决定作用。

本实验用聚苯乙烯—二乙烯苯磺酸型阳离子交换树脂分离四种核苷酸。该树脂的结构如下：

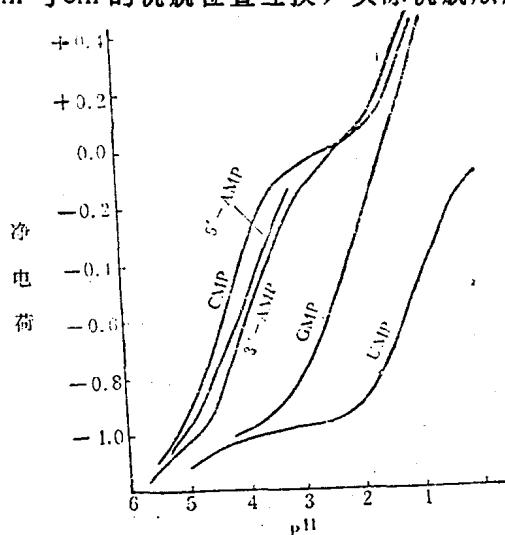


将RNA碱水解液调至pH1.5，上柱，此时，核苷酸的磷酸基团因进行一级解离而带负电荷，二级解离不能进行；UMP无-N⁺H=基，GMP、CMP和AMP的-N⁺H=基各有不同程度的解离而带正电荷。各核苷酸所带净电荷如下，UMP为-0.75，GMP为0，CMP为+0.16，AMP为+0.19。显然，UMP因不带正电荷不与树脂上阳离子发生交换而直接流出；GMP净电荷为0，依靠嘌呤环与树脂母体之间的辅助性吸附力吸附于树脂上；CMP和AMP则因带正电荷与树脂上阳离子发生交换而被吸附，同时也有不同程度的辅助性吸附力存在。

洗脱过程中，逐渐升高pH。在pH2~5之间，由于-N⁺H=解离pK值的不同而使各核苷酸所带的净电荷产生明显差异，同时也由于核苷酸与树脂之间非极性吸附力存在着差异，因此使各核苷酸先后洗脱下来，从而达到分离的目的。

本实验在样品上柱后，先用pH1.5的HCl（0.03N）溶液洗脱，待UMP全部流出后，再换用pH3.5的HCl（0.0003N）溶液洗脱。根据各核苷酸所带净电荷的差异，洗脱次序应为UMP-GMP-AMP-CMP，但由于聚苯乙烯树脂母体对嘌呤碱的辅助性吸附力大于对嘧啶碱的吸附力，因而使AMP与CMP的洗脱位置互换，实际洗脱顺序为UMP-GMP-CMP-AMP。

各核苷酸所带电荷与pH值有密切关系（如图），因此严格控制洗脱液的pH有利于各核苷酸的分离。用离子交换树脂分离核苷酸时，样品浓度一般为1.5~3mg/ml，上样和洗脱时的流速一般为1ml/cm².分。样品过浓和流速过快会使吸附不完全，各核苷酸分离不清，而且洗脱峰平坦。实验所用试剂应该用去离子水或重蒸水配制，以免水中的杂质影响交换反应进行及堵塞树脂间空隙使流速减慢。



核苷酸分子的净电荷与 pH 的关系

三. 实验材料、仪器和试剂

1. 实验材料

(1) 聚苯乙烯-二乙烯苯磺酸型阳离子交换树脂

Dowex 50 × 2, 150~300目，全交换量 ≥ 4.8毫克当量/克

(2) 酵母核糖核酸

2. 仪器

- (1) 层析柱: $1 \times 20\text{cm} \times 1$
- (2) 自动部分收集器: $100\text{管} \times 1$
- (3) 紫外分光光度计
- (4) 离心机
- (5) 离心管: $10\text{ml} \times 1$
- (6) 铁架台、万能夹、固定螺旋、铁环等
- (7) 秒表
- (8) 刻度吸管: $2\text{毫升} \times 1$, $0.5\text{毫升} \times 1$
- (9) 滴管

3. 试剂

- (1) 2N NaOH
- (2) 2N HCl
- (3) 2N HClO_4
- (4) 1N HCl
- (5) 0.3N KOH
- (6) 0.03N HCl ($\text{pH}1.5$)
- (7) 0.0003N HCl ($\text{pH}3.5$)

四. 操作步骤

1. 离子交换树脂的处理:

(1) 将市售树脂用去离子水浸泡几小时使溶胀。用去离子水漂洗几次, 去除漂浮物及杂质。

(2) 用相当于树脂体积4倍的 2N NaOH (新鲜配制, 不含碳酸盐) 浸泡5~6小时后用去离子水洗至中性。浸泡过程中轻轻搅拌几次。

(3) 用相当于树脂体积4倍的 2N HCl 浸泡5~6小时后用去离子水洗至中性。浸泡过程中轻轻搅拌几次。

(4) 重复(2)和(3)步骤一次。

(5) 用适当试剂处理, 使成为所需要的型式 (如用 HCl 处理得氢型, 用 NaOH 或 NaCl 处理得钠型。本实验需氢型, 故只要做到步骤(4)即可, 而且在 2N HCl 处理后用去离子水洗至 $\text{pH}1.5$ 即可备用)

2. 装柱

层析柱先用铁架台和铁夹垂直固定, 在经过预处理的树脂中加入少量 $\text{pH}1.5$ 的 HCl , 搅匀, 缓慢倒入柱内一部分, 然后打开下端活塞, 边排水边继续加树脂。(注意勿使水面低于树脂表面), 直到树脂高度达15厘米左右。要求树脂内无气泡, 更不能有树脂断裂现象, 树脂沉降要均匀, 无明显界面产生, 树脂表面水平, 装完后, 为防止表面树脂被溶液冲起, 可在上面加一滤纸片。

3. 平衡

在洗脱瓶中装入2~3倍床体积的 0.03N HCl ($\text{pH}1.5$) 溶液, 与层析柱进口连接。调节使流速约为 $0.5\text{ml}/\text{分}$ 。平衡必须充分, 否则影响分离效果, 一般过夜后即可使用。平衡后流出液 pH 应为1.5, A_{260} 值应小于0.01。

4. RNA碱水解

实验室制备单核苷酸一般用化学水解法（酸、碱水解）和酶解法。RNA用酸水解可得到嘧啶核苷酸和嘌呤碱基；用碱水解可得到2'-核苷酸和3'-核苷酸的混合物（比例2:3）；用5'-磷酸二酯酶或3'-磷酸二酯酶水解则分别可得到5'-核苷酸或3'-核苷酸。

本实验采用碱水解法。一般情况下磷酸二酯键对碱是比较稳定的，但由于RNA分子中核糖的2'羟基的邻接基团效应，使RNA分子中的磷酸二酯键变得对碱不稳定，因此，RNA可用碱水解，经过2',3'-环核苷酸中间物，生成2'-核苷酸和3'-核苷酸。

碱水解的方法很简单，一般用0.3N KOH，37℃保温18小时就能水解完全。水解毕，用高氯酸HClO₄中和，生成高氯酸钾KClO₄沉淀，离心去除沉淀，上清液即为各单核苷酸的混合液。具体操作如下：

取10毫克酵母RNA，置于10毫升离心管中，加2毫升0.3N KOH溶液，塞上软木塞并用石蜡封口后，于37℃保温18小时。水解完成后，在碱水解液内边搅拌边滴加2N HClO₄调至pH2左右，由于核苷酸在过酸条件下易脱嘌呤，所以调pH时要特别小心，防止局部过酸。pH调好后，置冰浴中10分钟使KClO₄沉淀完全，3000转/分离心15分钟，上清液转移到另一样品瓶中备用。沉淀弃去。

5. 上样

(1) 在部分收集器上安放80支试管。将收集器调节至起始位置，然后连接层析柱出口。吸去床面多余液体。

(2) 吸取0.5毫升样液，沿层析柱壁缓缓加入，同时打开层析柱出口，开始收集流出液。调节洗脱瓶位置，使流速恒定为0.5毫升/分，每8分钟收集一管。

(3) 上样后，用几滴pH1.5 HCl洗涤柱壁，重复洗涤三次。在整个上样过程中，勿使液面低于树脂面，勿搅动树脂面。

6. 洗脱

在洗脱瓶中注入约20毫升pH1.5 HCl溶液，与层析柱进口连接，开始洗脱，维持流速为0.5毫升/分，每8分钟收集一管。这一步洗脱可将UMP洗下。

将洗脱瓶洗净，换入pH3.5的HCl溶液约350毫升，待上述pH1.5 HCl溶液流到液面仅高于树脂面一薄层时，在床面上加少量pH3.5 HCl溶液，然后连接好洗脱瓶与层析柱进口，开始洗脱，仍维持流速在0.5毫升/分，每8分钟收集一管，直至四种单核苷酸全部洗下为止。

7. 流出液紫外吸光度的测定

依次测定每管流出液在260nm波长处的吸光度A₂₆₀。测定第一峰时各管以pH1.5 HCl溶液为空白，以后各峰用pH3.5 HCl溶液为空白。详作记录。

五. 结果

绘制酵母RNA碱水解液用阳离子交换树脂柱层析洗脱曲线，即以洗脱管号为横坐标，A₂₆₀值为纵坐标作图。

思考题：

1. RNA碱水解时，用NaOH代替KOH行不行？
2. 利用本实验的结果，试设计进一步的实验方法，完成RNA的碱基组成分析。

实验六 植物体内的转氨基作用

一。目的

转氨基作用是植物界普遍存在的一种生化反应。它使蛋白质、氨基酸代谢与碳水化合物、脂肪等代谢沟通起来，在一定程度上起着调节蛋白质、碳水化合物、脂肪等代谢的平衡作用。研究植物体转氨基作用，可以使我们了解植物体不同发育阶段代谢动态的一个侧面，从而探索其代谢的途径。

二。原理

通过转氨酶的作用， α -氨基酸上的氨基可转移到 α -酮酸原来酮基的位置上，结果形成一种新的 α -酮酸和一种新的 α -氨基酸。所生成的氨基酸可用纸上层析法检出。

三。仪器和试剂

1. 仪器

- (1) 研钵
- (2) 量筒：10ml
- (3) 离心机
- (4) 试管：3支
- (5) 移液管：0.5毫升 $\times$ 3，2毫升 $\times$ 1
- (6) 恒温箱
- (7) 漏斗
- (8) 层析缸、层析纸、毛细管
- (9) 吹风机

2. 试剂

- (1) 0.1M 丙氨酸
- (2) 0.1M α -酮戊二酸（用NaOH中和至pH7）
- (3) 含有0.4M 蔗糖的0.1M pH8.0磷酸缓冲液
- (4) pH7.5磷酸缓冲液
- (5) 正丁醇
- (6) 甲酸
- (7) 0.1M 谷氨酸
- (8) 0.25% 茚三酮丙酮溶液

四。操作步骤

1. 酶液的制备

取发芽2~3日的绿豆芽3克（去皮），放入研钵加2毫升pH8.0磷酸缓冲液研成匀浆，转入离心管。研钵再用1毫升缓冲液冲洗，并入离心管，于3000转/分下离心10分钟。取上清液备用。

2. 酶促反应

取三个干试管编号，按下表分别加入试剂和酶液：

管号	0.1M α -酮戊二酸 (ml)	0.1M丙氨酸 (ml)	酶液 (ml)	pH7.5缓冲液 (ml)
1	0.5	0.5	0.5	1.5
2	0.5	—	0.5	2.0
3	—	0.5	0.5	2.0

摇匀后置试管于37℃恒温箱中保温30分钟。取出后各加3滴30%乙酸终止酶活动，于沸水浴上加热10分钟，使蛋白质完全沉淀，冷却后离心或过滤，取上清液或滤液备用。

3. 层析

取层析滤纸一张，在距底线2厘米处用铅笔划一水平线，在线上等距离确定5个点，作点样位置。相邻各点相距2.5厘米。取上述上清液或滤液及谷氨酸、丙氨酸标准液分别点样。反应液点5~6滴，标准液点2滴。每点一次用吹风机吹干后再点下一次。最后在垂直于基线的方向上将滤纸卷成圆筒，以线缝合，纸边不能迭在一起或接触。

在层析缸中放入正丁醇:甲酸:水推动剂(15:3:2)。待缸内蒸汽饱和后，将滤纸筒垂直放入，展层。待溶剂前沿上升至距滤纸前沿约2厘米处时取出，用铅笔标出溶剂前沿位置。吹干，剪断缝线，以0.25%的茚三酮丙酮溶液喷雾，置烘箱(60℃)或用热吹风机显色。

五. 结果的记录与分析

从层析图谱上鉴定 α -酮戊二酸和丙氨酸是否发生了转氨基反应并写出反应式。

