



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

Fundamental Biochemistry
Experiments

基础生物化学
实验

周先碗 胡晓倩 编

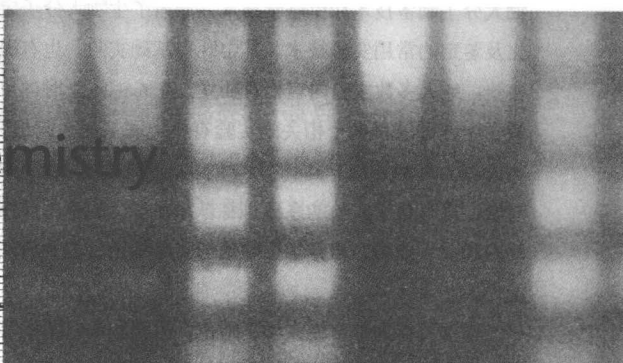
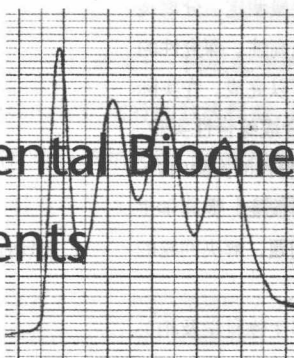


高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

Fundamental Biochemistry
Experiments



基础生物化学实验

Jichu Shengwu Huaxue Shiyan

周先碗 胡晓倩 编



高等教育出版社·北京
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

内容提要

本书本着少而精、应用灵活的原则,共选编了19个具有代表性、较为成熟的生物化学实验,包括定量分析技术、层析技术、电泳技术、生物大分子制备技术和免疫学技术,涵盖了生物大分子定量测定、分离纯化及鉴定的常用实验技术。其中既有基础实验,也有提高性、探究性的实验。绝大多数实验内容相对独立,在6~16学时内可以完成。在实际教学中,可以将多个相关的实验有机地联系在一起组合成综合性实验,构成每学期80~120学时的教学内容,以期通过综合、多样性的实验内容,对学生进行科学实验的系统训练,加强学生的基本操作技能,提高学生动脑和动手能力,培养学生理论与实践相结合的分析问题、解决问题的能力。

本书可作为综合性大学、师范、医药和农林院校等生物科学及相关专业的本科生物化学实验指导教材,也可供相关专业的研究生参考。

图书在版编目(CIP)数据

基础生物化学实验 / 周先碗, 胡晓倩编. —北京: 高等教育出版社, 2011.5

ISBN 978-7-04-032181-4

I. ①基… II. ①周…②胡… 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(2011)第068434号

策划编辑 王莉
插图绘制 宗小梅

责任编辑 王莉
责任校对 殷然

封面设计 张志奇
责任印制 张泽业

出版发行 高等教育出版社
社址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100120
印刷 中国农业出版社印刷厂
开本 787×1092 1/16
印张 9.75
字数 210 000
购书热线 010-58581118

咨询电话 400-810-0598
网址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landaco.com>
<http://www.landaco.com.cn>
版次 2011年5月第1版
印次 2011年5月第1次印刷
定价 18.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换
版权所有 侵权必究
物料号 32181-00

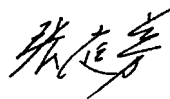
序

北京大学生命科学学院生物化学实验室成立于1953年,是全国最早创建的生物化学实验室,曾隶属于生物学系生物化学专业,2001年后归属生命科学学院教学实验中心,几十年来一直承担着生物化学实验的教学工作,为培养生物学人才和建设生物学重点学科做出了贡献。生物化学作为一门实验科学,其实验课程对于学生学习和掌握实验技术和实验方法,培养学生的科研能力和创新思维能力是十分重要的。北京大学生物学系一向重视生物化学实验室的建设,不断提高生物化学实验的教学水平,同时十分注重教材建设。1958年生物化学教研室出版了全国第一本生物化学实验教材《生物化学实验指导》,近20年来又陆续出版了不同层次的实验教材,如《生化实验方法和技术》、《高级生物化学实验教程》、《生物化学实验原理和方法》等,这是北京大学几代生物化学教师在生物化学实验课改革和建设中的丰硕成果。

基础生物化学实验作为一门独立的实验课程被列为本科生的主干基础课。近10多年来,随着生物化学实验技术的进步和仪器的更新换代,实验内容在不断更新,既保留了基础性实验内容,也加入了科研中实用性很强的实验技术。教学内容经历了从定性分析到定量分析、从独立的简单实验到复杂的综合性实验的过渡,已形成一套有特色的实验教学体系,因此需要编写新的实验教材。

编写本教材的出发点是内容实用、针对性强、篇幅精炼、紧跟生物化学学科发展。本书按生物化学实验技术共分五章,选编了19个实验,包括定量分析技术、层析技术、电泳技术、生物大分子制备技术和免疫学技术。该书的特点是:①坚持加强对本科生基本实验技能系统训练的原则,为他们进入更高层次的专业学习和参加科研工作打下良好的基础;②本着少而精、应用灵活的原则,实验内容既相互关联又相对独立,教师可以根据教学的实际情况有针对性地选择教学内容,也可将几个实验有机地组合成综合性实验对学生进行系统的训练;③选编的实验内容注重实用性和可行性,多数是生物化学实验室比较成熟的实验技术,保证实验内容能适应不同层次的教学需要。

为了使学生对基础生物化学实验技术有全面的了解,理解实验设计的基本原理,掌握具有代表性的实验技能和方法,本书较详细地介绍了每个实验的设计思路和基本原理,这将有利于拓宽学生的学习思路,提高学生的创新思维能力。



2011年1月24日

前言

生物化学是生命科学中最重要的基础学科之一,生物化学实验是生物技术中最重要的实验技术之一,是生物科学和生物技术专业本科生的必修课,也是生物工程、基础医学、农林等专业的本科生基础课程。随着新技术的不断涌现和仪器的更新换代,生物化学实验内容也在不断更新、提高。编写本书的目的在于,通过基础生物化学实验课教学,使学生对基础生物化学实验技术有比较全面、系统的认识,能够准确把握实验的基本设计思想,掌握具有代表性的实验技能和方法,培养学生严谨求实的科学态度和良好的协作精神,使他们逐步建立创新的思维能力、勇于开拓的科学精神。

本着少而精、应用灵活的原则,本书选择了 19 个具有代表性、较为成熟的实验,既有经典的实验内容,也有实用性较好的新技术,包括定量分析技术、层析技术、电泳技术、生物大分子制备技术及免疫学技术等,针对每一种实验技术都设计了相应的实验技能训练内容。绝大多数实验相对独立,在 6~16 学时内可以完成。在实际教学中,可以将多个相关的实验有机地联系在一起组合成综合性的实验,根据课程安排组合成每学期 80~120 学时的教学内容,从多个角度研究生物大分子。通过综合性和多样性的实验内容,学生可以得到更全面的操作技能训练。

本书按实验技术的特性分为五章。第一章“定量分析技术”,主要介绍生物大分子的鉴定,如单糖、蛋白质及核酸的基本组成单位的含量测定,使学生通过实验能够准确掌握定量分析的基本原理和操作技能。第二章“层析技术”,主要介绍生物大分子的分离技术,根据生物大分子的特性选择相应的层析技术,如选择离子交换层析来分离在溶液中解离度较好的离子化合物,凝胶过滤层析适于分离球形生物大分子。第三章“电泳技术”,主要介绍生物大分子的鉴定技术,如 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定蛋白质相对分子质量的大小,聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳鉴定蛋白质的等电点。第四章“生物大分子制备技术”,着重介绍生物大分子的提取、分离和纯化,具有一定的综合性。如细胞色素 c 的制备,它包括了细胞色素 c 的提取、分离、纯化和含量测定。第五章“免疫学技术”,主要介绍抗体产生的基本原理和抗体效价测定方法。除了上述实验内容以外,还编写了常用试剂的参数表、溶液配制表及常用数据表等附录,便于读者查阅。

北京大学生命科学学院的生物化学实验课教学有着悠久的历史。经过几代人的努力,实验内容经历了从易到难、从简单到综合、从粗放的定性分析到超微量的定量分析的一系列改革过程。本书的出版体现了北京大学生物化学实验课教学前辈们几十年来为之奋斗而积

累的丰富经验及在职教师辛勤耕耘、共同努力的结晶。

在本书的编写过程中得到北京大学生命科学学院生物化学实验室教师们的帮助和支持,在此表示感谢。

欢迎广大读者在使用过程中对本书的不足之处和错误提出批评、指正。

编 者

目 录

第一章 定量分析技术	1
实验一 单糖定量测定——3,5-二硝基水杨酸法	1
实验二 蛋白质定量测定(I)——Folin 酚法	4
实验三 蛋白质定量测定(II)——考马斯亮蓝法	7
实验四 蛋白质定量测定(III)——紫外吸收法	11
实验五 核酸定量测定(I)——定磷法	15
实验六 核酸定量测定(II)——紫外吸收法	19
参考文献	21
第二章 层析技术	23
实验七 凝胶过滤层析——测定蛋白质相对分子质量	23
实验八 离子交换层析——分离核苷酸	33
实验九 亲和层析——分离谷胱甘肽转硫酶	42
附:谷胱甘肽转硫酶的动力学研究	48
实验十 金属螯合层析——分离超氧化物歧化酶	54
实验十一 薄层层析——蛋白质氨基酸组成分析	59
参考文献	67
第三章 电泳技术	68
实验十二 聚丙烯酰胺凝胶净电荷电泳——乳酸脱氢酶同工酶的鉴定	68
实验十三 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳——测定蛋白质相对分子质量	77
实验十四 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳——测定蛋白质等电点	84
参考文献	92
第四章 生物大分子制备技术	94
实验十五 细胞色素c的制备及含量测定	94
实验十六 猪脾DNA的提取	99
附:二苯胺显色法测定脱氧核糖核酸含量	102
参考文献	105

第五章 免疫学技术	106
实验十七 抗血清的制备和抗体的纯化	106
实验十八 抗体效价测定及组分鉴定——双向扩散,对流免疫电泳, 微量免疫电泳,双向免疫电泳	110
实验十九 酶联免疫吸附测定——间接法测定抗体效价	118
参考文献	125
附 录	127
一、常用缓冲溶液的配制方法	127
二、硫酸铵饱和度的常用计算表	134
三、常用市售酸、碱的浓度	136
四、常用蛋白质相对分子质量标准参照表	136
五、某些蛋白质的物理性质	137
六、一些常见蛋白质等电点参考值	138
七、常用离子交换纤维素	139
八、离子交换层析介质的技术数据	140
九、凝胶过滤层析介质的技术数据	141
十、部分亲和层析介质的技术数据	143
十一、各种层析介质所允许的最大操作压	144
十二、离心机转速($r \cdot \text{min}^{-1}$)与相对离心力(RCF)的换算	145

第一章 定量分析技术

实验一 单糖定量测定——3,5-二硝基水杨酸法

概述

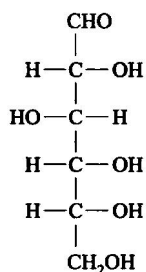
糖的测定方法有多种,根据糖的物理性质和化学性质可以快速分析鉴定。单糖的化学结构决定了它具有还原性,利用化学试剂如费林试剂、蒽酮、3,5-二硝基水杨酸等与还原糖进行化学反应,然后通过比色法来定量测定。本实验以3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法为例测定还原糖浓度。

实验目的

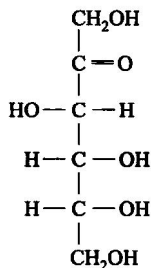
了解还原糖的结构和性质,掌握3,5-二硝基水杨酸定量测定单糖的方法。

实验原理

单糖的化学结构是多羟基的醛或酮,醛糖含有游离的醛基,具有很好的还原性;许多酮糖也是还原糖,如果糖在稀碱溶液中可发生酮式-烯醇式互变,酮基不断地变成醛基,因而果糖也具有还原性。单糖的定量测定就是利用单糖功能基团的还原性来进行的。葡萄糖和果糖这两种单糖分子的链状结构式是



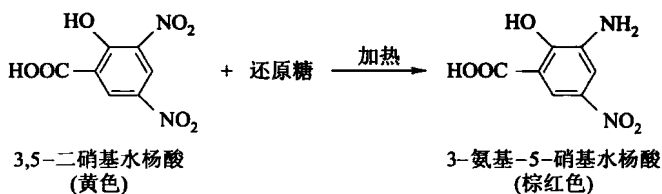
D-(+)-葡萄糖(醛糖)



D-(-)-果糖(酮糖)

本实验利用单糖的还原性质,使用DNS试剂测定还原糖的含量。在碱性条件下,DNS与还原糖一起加热后被还原为棕红色的3-氨基-5-硝基水杨酸,还原糖则被氧化成糖

酸及其他产物。在一定浓度范围内,还原糖的含量与棕红色产物颜色深浅程度呈正比,在 540 nm 波长下测定反应溶液的吸光值,查标准曲线可求出样品中还原糖的含量。该方法操作简便,杂质干扰少。



器材与试剂

1. 实验仪器

电子分析天平,电热恒温鼓风干燥箱,电热恒温水浴,电磁炉(沸水浴),可调式移液器,漩涡混合器,722 型可见分光光度计,玻璃比色皿(光程为 1 cm),容量瓶,试管,试管架及白瓷板等。

2. 实验材料

小麦粉。

3. 实验试剂

(1) 1 mg/mL 葡萄糖标准溶液 准确称取 100 mg 分析纯无水葡萄糖(预先在 105℃ 干燥至恒重),先用少量去离子水溶解,然后定量转移到 100 mL 容量瓶中,定容至刻度,混合均匀。

(2) 6 mol/L HCl 溶液

(3) 100 g/L NaOH 溶液

(4) 碘-碘化钾溶液 称取 5 g 碘,10 g 碘化钾溶于 100 mL 去离子水中。

(5) 酚酞指示剂

(6) 3,5-二硝基水杨酸试剂(DNS 试剂)

甲液:称取 6.9 g 结晶酚加到 15.2 mL 100 g/L NaOH 溶液中溶解,并用去离子水稀释至 69 mL,在此溶液中加入 6.9 g NaHSO₃。

乙液:称取 255 g 酒石酸钾钠加到 300 mL 100 g/L NaOH 溶液中溶解,再加入 880 mL 1% 3,5-二硝基水杨酸溶液。

将甲、乙溶液混合,溶液为黄色,贮于棕色试剂瓶中,室温下放置 1 周后方可使用。

实验步骤

1. 样品处理

(1) 样品中还原糖的提取 准确称取小麦粉 2 g,置于 100 mL 烧杯中,先以少量水调成糊状,然后加入 50 ~ 60 mL 去离子水搅拌均匀。在 50℃ 电热恒温水浴中保温 30 min,过滤,

将滤液转入 100 mL 容量瓶中,加去离子水到刻度,定容后的滤液用于测定还原糖含量。

(2) 样品中总糖的水解及提取 准确称取小麦粉 1 g,置于容量瓶中,溶于 15 mL 去离子水,加入 10 mL 6 mol/L 的 HCl 溶液,混匀后沸水浴加热 30 min。取 1~2 滴水解液置于白瓷板上,加 1 滴碘-碘化钾溶液检查水解是否完全。如果溶液不呈现蓝色,则表示淀粉已经水解完全。待水解液冷却后向其中加入 1 滴酚酞指示剂,用 100 g/L NaOH 溶液中和至溶液呈微红色,过滤,溶液转入 100 mL 容量瓶中,加去离子水到刻度并混合均匀,经适度稀释并混匀后用于总糖含量的测定。

2. 葡萄糖标准曲线的制作及样品测定

取 16 支洁净干燥的试管,按照表 1-1 加样,每个浓度做 2 个平行管。1~6 号试管为制作标准曲线的葡萄糖浓度管,7 号试管为测定样品中还原糖的浓度管,8 号试管为测定样品中总糖的浓度管。标准曲线及样品测定同时进行操作。

表 1-1 葡萄糖标准曲线的制作及样品测定加样表

试剂处理	标准曲线						还原糖	总糖
	1	2	3	4	5	6	7	8
葡萄糖标准溶液/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	-	-
待测单糖溶液/mL	-	-	-	-	-	-	x	y
去离子水/mL	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	$0.5-x$	$0.5-y$
DNS 试剂/mL	0.5							

每管溶液用漩涡混合器混匀,沸水浴中加热 5 min,取出迅速用冷水冷却至室温,分别向各试管中加入去离子水 5 mL,混匀。以去离子水作为空白,在波长 540 nm 处测定吸光值

$A_{540\text{ nm}}$ (1)								
$A_{540\text{ nm}}$ (2)								
$A_{540\text{ nm}}$ 平均值								

实验结果

1. 绘制标准曲线

计算出每个标准葡萄糖浓度 $A_{540\text{ nm}}$ 的平均值,扣除空白管的吸光值,以其为纵坐标,每管标准葡萄糖的含量(mg)为横坐标,在坐标纸上绘制标准曲线。

2. 计算样品中还原糖的质量浓度(7号试管)

用待测还原糖溶液的 $A_{540\text{ nm}}$ 在标准曲线上查出其对应的葡萄糖含量,根据实验中所加入待测还原糖溶液的体积计算出样品中还原糖的质量浓度(mg/mL)。

3. 计算样品水解后还原糖的质量浓度(8号试管)

用待测总糖溶液的 $A_{540\text{ nm}}$ 在标准曲线上查出其对应的葡萄糖含量,根据实验中所加入待测总糖溶液的体积计算出样品中总糖的质量浓度(mg/mL)。

4. 计算小麦粉中还原糖与总糖的质量分数

$$w(\text{还原糖}) = \frac{\text{样品中还原糖质量浓度} \times \text{样品总体积}}{\text{样品质量}} \times 100\%$$

$$w(\text{总糖}) = \frac{\text{样品水解后还原糖质量浓度} \times \text{样品总体积} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品质量}} \times 100\%$$

 注意事项

1. DNS 试剂中含有苯酚,保存时应避光,使用过程中应尽量减少与空气接触。
2. 要想得到精确度高的实验结果,在测定过程中,常在相同的实验条件下由同一人用同样的方法对同一样品进行多次重复测定(称平行测定),所得到的结果取平均值,测定的次数越多,平均值就越接近真实值。
3. 测定还原糖和总糖量所加入样品的体积应以测定的吸光值在标准曲线范围之内为宜,尤其是总糖水溶液的稀释倍数需要通过预实验来确定。

 思考题

1. 小麦粉水解过程中用碘-碘化钾检验的作用是什么?
2. 向试管中加入试剂时需要注意哪些细节才能使结果更加准确?

实验二 蛋白质定量测定(I)——Folin 酚法

概述

实验室蛋白质含量测定有两类方法,一类是根据蛋白质的物理性质,如折射率、相对密度、紫外光吸收等方法进行测定;另一类是利用化学方法,如微量凯氏定氮、双缩脲反应、Folin 酚法(Lowry 法)、考马斯亮蓝法等。这两类方法各有优缺点,灵敏度也有所不同,应用时可以根据实验要求及实验室条件选择适当的测定方法。本实验介绍 Folin 酚法定量测定蛋白质含量,该方法具有操作简便、灵敏度较高的优点,反应 15 min 后有最大显色,并至少可稳定几小时,是生化实验室常用的蛋白质含量测定方法之一。

 实验目的

了解定量测定蛋白质含量的常用方法及其原理,掌握 Folin 酚法的实验操作,学习用制作标准曲线法测定未知样品中蛋白质的含量。

实验原理

Folin 酚法测定蛋白质含量是 Lowry 等人对酚试剂法进行改良的测定方法,将双缩脲反应与酚试剂反应结合,使反应灵敏度比单独使用酚试剂时提高了 3~5 倍,测定范围是 15~250 μg 蛋白质。Folin 酚法测定蛋白质含量分两步反应进行:首先是蛋白质发生双缩脲反应,然后是酚试剂的反应。第一步反应为蛋白质与甲试剂反应,即双缩脲反应,甲试剂由碳酸钠、氢氧化钠、硫酸铜及酒石酸钾钠组成,在碱性条件下蛋白质中的肽键与酒石酸钾钠铜盐溶液作用生成铜-蛋白质络合物。由于实验测定的蛋白质浓度很低,甲试剂反应的生成产物颜色极浅,肉眼几乎分辨不出来。第二步反应为铜-蛋白质络合物与乙试剂(由磷钼酸、磷钨酸、硫酸、溴等成分组成)反应,在碱性条件下磷钼酸盐-磷钨酸盐易被蛋白质中酪氨酸的酚基还原生成深蓝色钼蓝和钨蓝的混合物,其颜色深浅与蛋白质含量成正比,利用分光光度计测定其吸光值,制作标准曲线计算出蛋白质溶液的含量。

双缩脲反应仅与蛋白质中的肽键结构有关,与蛋白质的氨基酸组成无关,因此不受蛋白质氨基酸组成差异的影响;而酚试剂依赖于酪氨酸、色氨酸等特定的氨基酸残基,受到蛋白质氨基酸组成不同的影响,酪氨酸和色氨酸的含量不同会造成显色偏差,因此该方法也适用于测定酪氨酸、色氨酸含量。双缩脲反应的加入使蛋白质氨基酸组成的差异所引起的偏差相对减小,两步反应结合使最终反应灵敏度提高。

此反应的不足之处在于受多种因素干扰,凡干扰双缩脲反应和 Folin 酚反应的因素均可影响测定结果,所以在测定之前应排除干扰因素或做空白试验。

器材与试剂

1. 实验仪器

电子分析天平,可调式移液器,漩涡混合器,722 型可见分光光度计,玻璃比色皿(光程为 1 cm),试管及试管架等。

2. 实验材料

待测蛋白质溶液,使用前用去离子水或缓冲液适当稀释。

3. 实验试剂

(1) 标准蛋白质溶液 结晶牛血清白蛋白,预先经微量凯氏定氮法测定其含氮量,从而精确计算出蛋白质的纯度,根据其纯度用去离子水配制成 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白质溶液。

(2) 甲试剂

溶液①: 20 g/L 碳酸钠溶液 -0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 100 mL。

溶液②: 10 g/L 硫酸铜溶液 1 mL。

溶液③: 20 g/L 酒石酸钾钠溶液 1 mL。

使用前将溶液①、②和③混合,即配制成 Folin 酚甲试剂,此试剂实验当天配制使用,一天内有效。

(3) 乙试剂 称取钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100 g、钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 25 g, 置 2 000 mL 磨口回流装置内, 加去离子水 700 mL、85% 磷酸 50 mL、浓盐酸 100 mL, 充分混匀, 使其溶解。小火加热, 回流 10 h (烧瓶内加小玻璃珠数颗, 以防溶液溢出), 再加入硫酸锂(Li_2SO_4) 150 g、去离子水 50 mL 及液溴数滴。在通风橱中开口煮沸 15 min, 以除去多余的溴。冷却后定容至 1 000 mL, 过滤即成 Folin 酚乙试剂贮存液。该溶液应为鲜黄色, 置棕色瓶中, 可在冰箱中长期保存。若此贮存液放置过久, 颜色变绿, 可加几滴液溴, 煮沸数分钟, 恢复原色后仍可继续使用。该试剂的酸度应为 2 mol/L 左右, 将其稀释 1 倍使用。目前有商品乙试剂出售, 使用方便。

实验步骤

取 14 支洁净干燥的试管, 按照表 1-2 加样, 每个浓度做 2 个平行管。1~6 号试管为制作标准曲线的蛋白质浓度管, 7 号试管为测定未知蛋白质溶液浓度管, 标准曲线及样品测定同时进行操作。

表 1-2 蛋白质标准曲线的制作及样品测定加样表

试管编号 试剂处理	标准曲线						未知
	1	2	3	4	5	6	7
标准蛋白质溶液/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	-
待测蛋白质溶液/mL	-	-	-	-	-	-	x
去离子水/mL	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	$0.5 - x$
甲试剂/mL	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
每管溶液用漩涡混合器混匀, 于室温放置 10 min							
乙试剂/mL	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
每管溶液用漩涡混合器迅速混匀, 室温放置 30 min 后, 以去离子水作为空白, 在波长 640 nm 处测定吸光值							
$A_{640 \text{ nm}}$ (1)							
$A_{640 \text{ nm}}$ (2)							
$A_{640 \text{ nm}}$ 平均值							

实验结果

1. 绘制标准曲线

计算出每个标准蛋白质浓度 $A_{640 \text{ nm}}$ 的平均值, 扣除空白管的吸光值, 以其为纵坐标, 每管标准蛋白质含量 (μg) 为横坐标, 在坐标纸上绘制标准曲线。

2. 计算待测蛋白质溶液的质量浓度

用待测蛋白质的 $A_{640 \text{ nm}}$ 在标准曲线上查出其对应的蛋白质含量, 根据实验中所加入待测蛋白质溶液的体积计算出其质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$ 或 mg/mL)。

注意事项

1. 测定中加入待测蛋白质溶液的体积应使测定值在标准曲线范围内,可以对样品溶液适当进行稀释或调整加样体积来实现;也可以取几个不同的体积进行测定,选取吸光值在标准曲线范围内的点进行计算。
2. 用移液器准确移取溶液,溶液尽量放入试管底部,并注意加样顺序和平行操作。
3. 进行测定时,当 Folin 酚试剂加到碱性的铜-蛋白质溶液中时,必须立即混匀,因为该试剂仅在酸性条件下稳定,但还原反应是在碱性条件(pH 10)下发生,所以要求在磷钼酸-磷钨酸试剂被破坏之前还原反应即能发生。
4. 干扰双缩脲反应和酚试剂反应的因素均可影响测定的结果,常见的干扰试剂有 Tris、蔗糖、硫酸铵、巯基化物、酚类及柠檬酸,在反应之前应除去影响因素,或做空白对照管以排除干扰。若待测样品中含有硫酸铵或样品溶液酸度较高,则需适当增加碳酸钠-氢氧化钠的浓度,可以提高显色效果。

思考题

1. 学习定量测定蛋白质浓度的常用方法及其原理,比较各方法的优缺点。
2. 有哪些因素可干扰 Folin 酚法测定蛋白质含量?
3. 作为标准蛋白质的牛血清白蛋白或酪蛋白在应用时有何要求?

实验三 蛋白质定量测定(II)——考马斯亮蓝法

概述

1976年 Bradford 首次报道了利用考马斯亮蓝 G-250 (coomassie brilliant blue G-250, CBBG-250) 与蛋白质结合的定量测定微量蛋白质的方法,也称 Bradford 法。该方法试剂配制简单,操作简便快捷,干扰因素少,反应非常灵敏,灵敏度比 Folin 酚法还要高几倍,是目前生物化学实验室快速测定微量蛋白质浓度的常用方法。

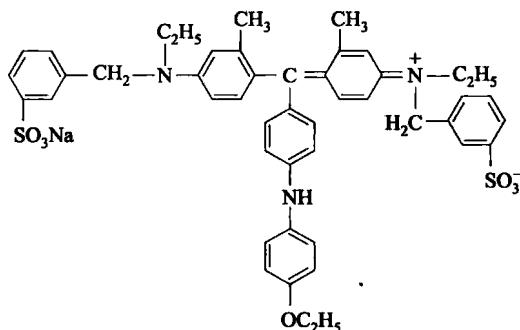
实验目的

学习考马斯亮蓝法定量测定蛋白质浓度的原理和方法。

实验原理

考马斯亮蓝可分为 G 型和 R 型两类,都可以用于聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白质条带的染色,其中考马斯亮蓝 G-250 由于与蛋白质的结合反应十分迅速,常用于蛋白质含量的定量

测定。经研究认为,该染料主要是与蛋白质中的碱性氨基酸(特别是精氨酸)和芳香族氨基酸残基相结合。考马斯亮蓝 G-250 的化学结构为二甲花青亮蓝,是一种甲基取代的三苯基甲烷衍生物,分子式如下:



考马斯亮蓝 G-250 存在着红色和蓝色两种颜色形式,在游离状态下呈现红色,最大光吸收值在 465 nm,当它与蛋白质通过范德华力结合生成蛋白质-CBBG 结合物后,颜色由红色转变成蓝色,最大吸收峰由 465 nm 变成 595 nm。在一定蛋白质浓度范围内,蛋白质和染料的结合符合比尔定律(Beer's law),蛋白质-CBBG 结合物的吸光值与蛋白质含量成正比,通过测定 595 nm 处吸光值的增加量可以得到与其结合的蛋白质的量,因此可用于蛋白质的定量测定。

在室温条件下,蛋白质-CBBG 结合物的结合反应完成十分迅速,约 3 min 即可达到平衡,呈现最大吸光值,并可稳定 1 h 左右。蛋白质与 CBBG 结合之后是以一种不溶的复合物形式分散在溶液中,反应溶液如果不及时测定,蛋白质-CBBG 结合物会发生聚合并析出沉淀。蛋白质-CBBG 结合物具有很高的消光系数,使得在测定蛋白质浓度时灵敏度很高,测定范围为 10~100 μg 蛋白质,微量测定法测定范围是 1~10 μg 蛋白质。此反应重复性好,精确度高,线性关系好。标准曲线在蛋白质浓度较大时稍有弯曲,这是由于染料本身的两种颜色形式光谱有重叠,试剂背景值随更多染料与蛋白质结合而不断降低,但直线弯曲程度很轻,不影响测定结果。

目前科研实验室常采用考马斯亮蓝微量反应板比色法测定蛋白质含量,与常量比色法相比较,测定结果相近,样品用量少(只需几 μL),检测极限低($<1 \mu\text{g}$),所以考马斯亮蓝微量反应板比色法是一种简单、快速、灵敏的蛋白质测定方法,尤其适用于大批量微量样品的蛋白质含量测定。

器材与试剂

1. 实验仪器

电子分析天平,可调式移液器,漩涡混合器,722 型可见分光光度计,玻璃比色皿(光程为 1 cm),试管及试管架,酶标仪,96 孔微量反应板等。

2. 实验材料

待测蛋白质溶液,使用前用去离子水或缓冲液适当稀释。

3. 实验试剂

(1) 标准蛋白质溶液 结晶牛血清白蛋白或球蛋白,预先经微量凯氏定氮法测定其含氮量,从而精确计算出蛋白质的纯度,根据其纯度用 0.15 mol/L NaCl 溶液配制成 1 mg/mL、0.1 mg/mL 和 0.5 mg/mL 的蛋白质溶液。

(2) 考马斯亮蓝试剂(Bradford 试剂)贮液 称量考马斯亮蓝 G-250 100 mg,溶于 50 mL 95% 乙醇溶液中,加入 100 mL 85% 磷酸溶液,用去离子水稀释至 200 mL,滤纸过滤。最终试剂中含 0.5 g/L 考马斯亮蓝 G-250,24% 乙醇,42.5% 磷酸。贮存在棕色瓶中于 4℃ 下避光保存,至少 6 个月保持稳定。使用前按照 Bradford 试剂贮液:去离子水 = 1:4 稀释,如试剂中出现沉淀,需要过滤除去。



实验步骤

1. 标准法制作标准曲线及样品测定

取 16 支洁净干燥的试管,按照表 1-3 加样,每个浓度做 2 个平行管。1~7 号试管为制作标准曲线的蛋白质浓度管,8 号试管为测定未知蛋白质溶液浓度管,标准曲线及样品测定同时进行操作,标准蛋白质溶液为 1 mg/mL。

表 1-3 标准法蛋白质标准曲线的制作及样品测定加样表

试剂处理	标准曲线							未知
	1	2	3	4	5	6	7	8
标准蛋白质溶液/mL	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	-
待测蛋白质溶液/mL	-	-	-	-	-	-	-	x
0.15 mol/L NaCl/mL	0.10	0.09	0.08	0.07	0.06	0.05	0.04	0.10 - x
考马斯亮蓝试剂/mL	5.0							

每管溶液用漩涡混合器混匀,室温放置 5 min 后,1 h 之内以去离子水作为空白,在波长 595 nm 处测定吸光值

$A_{595\text{ nm}}(1)$								
$A_{595\text{ nm}}(2)$								
$A_{595\text{ nm}}$ 平均值								

2. 微量法制作标准曲线及样品测定

取 14 支洁净干燥的试管,按照表 1-4 加样,每个浓度做 2 个平行管。1~6 号试管为制作标准曲线的蛋白质浓度管,7 号试管为测定未知蛋白质溶液浓度管,标准曲线及样品测定同时进行操作。标准蛋白质溶液为 0.1 mg/mL。