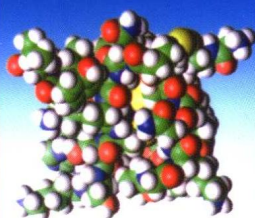
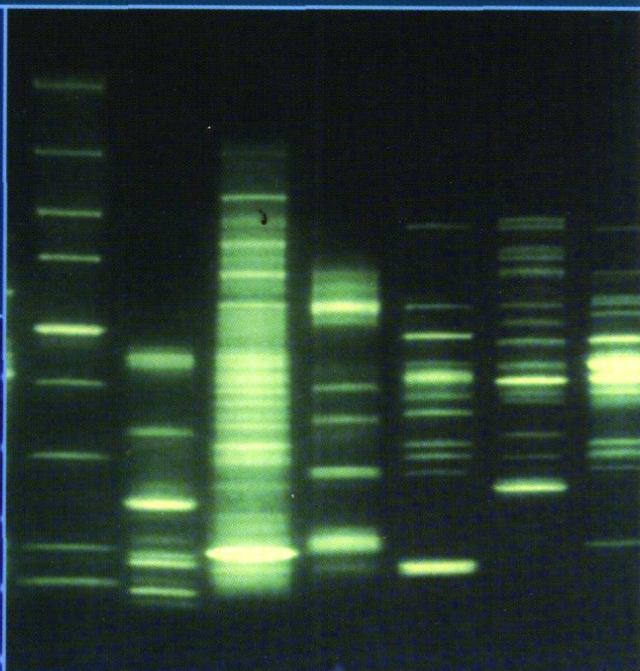
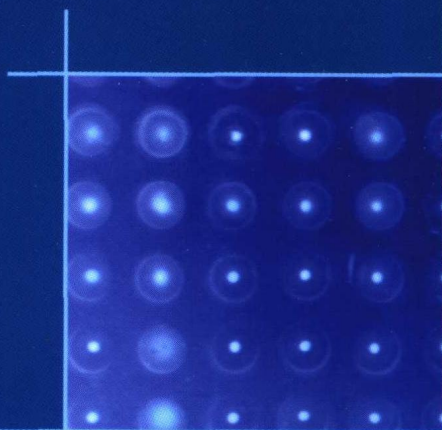




面向 21 世纪 课 程 教 材
Textbook Series for 21st Century

生物化学与 分子生物学实验教程

主 编 梁宋平



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

面向 21 世纪课程教材
Textbook Series for 21st Century

生物化学与 分子生物学实验教程

主 编 梁宋平

编写者 (以姓氏笔画为序)

王贤纯 印大中 吴秀山 张 健

张东裔 陈 平 陈 则 陈嘉勤

李 敏 梁宋平 谢锦云



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

图书在版编目(CIP)数据

生物化学与分子生物学实验教程/梁宋平主编. - 北京:高等教育出版社,2003.3

ISBN 7-04-011758-4

I. 生… II. 梁… III. ①生物化学-教材②分子生物学-教材 IV. ①Q5②Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 104076 号

策 划 邹学英
编 辑 邹学英
封面设计 王凌波
版式设计 李 杰
责任印制 陈伟光

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市东城区沙滩后街 55 号
邮政编码 100009
传 真 010-64014048

购书热线 010-64054588
免费咨询 800-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>

经 销 新华书店北京发行所
印 刷 北京外文印刷厂

开 本 787×1092 1/16
印 张 16.25
字 数 400 000

版 次 2003 年 3 月第 1 版
印 次 2003 年 3 月第 1 次印刷
定 价 26.00 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

前 言

生物化学与分子生物学的发展几乎都是以实验为基础的。“生物化学与分子生物学”这门课程中的很多重要概念和相关的方法学原理,从某种意义上说,是只有在实验室才能真正学会和掌握的。经历过这门学科从本科到研究生系统学习的人都会有一种共同的感受,即如果只停留在这门课程的理论教材学习上,即使你学习再认真,考试得高分,对很多概念与原理的理解有一种雾里看花、隔靴搔痒的感觉。比如教科书中经常提到的凝胶电泳,即使书中描写再详细,插图再逼真,如果你不亲自动手做一次电泳实验,你永远不知电泳是何感觉,犹如只见水面而不知其深浅。很多人还有一种感受,即读过的书很多会被遗忘,但亲身做过的事、亲身走过的地方经多年仍记忆犹新。我回忆起在北大读书时,上过的很多门课的内容,现在大都只留下模糊的印象,大部分算是还给老师了。惟有当年在生物化学实验课上做过的实验,回忆起来仍历历在目。北大生物系的同学在一起回忆当年的学习时,普遍认为当时的生物化学实验课,尤其是其大实验课是最受欢迎的。

生物化学与分子生物学的发展是如此之快,在这个领域几乎每天都有新的发现,新的进展,以致其理论教科书经三五年便需更新。尽管许多生物化学与分子生物学的实验技术经多年仍被广泛使用,但仍有很多新的技术层出不穷。我们编写这本实验教程,目的是让学生们在了解一些最基本最经常使用的实验技术的同时,也对一些当代最新出现的有重要应用前景的实验技术,比如蛋白质组学分析,酵母双杂交技术,基因敲除与转基因技术的基本操作有一个实践的机会。编写本教材的另一个出发点是试图尝试改变以往的生物化学实验以“印证”实验为主的情况,增加“探索与研究”的篇幅。为此,我们请湖南师范大学生物化学与分子生物学领域的几个主要研究方向的教授,挑选近两年他们实验室采用的新的研究技术作为本教材内容。当然,我们要求这些实验既要有普遍意义,同时有可行性,以便其他学校也可开设这些实验。

本书编写者均为承担生物化学与分子生物学科科研与教学多年的教师,多数在国外做过多年研究工作,其中部分实验选自他们的博士论文研究或正在进行的研究,因而有第一手经验。本书的前10个实验可作为本科生的普通生物化学与分子生物学实验教材,其余实验可作为生物化学与分子生物学专业研究生的实验教材,使用者可根据各自的实验条件进行选择。

博士研究生朱奇与刁建波协助了部分实验的撰写工作,常静同志承担了本书原稿的电脑输入工作,特此致谢。我们还要特别感谢高等教育出版社生命科学分社的同志们对本教程出版的大力协助和支持。

本教材难免存在疏漏与错误,恳请同行与使用者予以指正赐教。

梁宋平

2002年10月

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》。行为人将承担相应的民事责任和行政责任,构成犯罪的,将被依法追究刑事责任。社会各界人士如发现上述侵权行为,希望及时举报,本社将奖励举报有功人员。

现公布举报电话及通讯地址:

电 话:(010) 84043279 13801081108

传 真:(010) 64033424

E-mail:dd@hep.com.cn

地 址:北京市东城区沙滩后街 55 号

邮 编:100009

目 录

绪论

生物化学与分子生物学实验课导言	1
-----------------------	---

实验 1

动物细胞蛋白质的提取和含量测定	7
-----------------------	---

实验 2

真核细胞染色体 DNA 的提取及含量测定	16
----------------------------	----

实验 3

细胞中糖类化合物的提取及成分鉴定	20
------------------------	----

实验 4

离子交换柱层析法分离蛋白质	29
---------------------	----

实验 5

SDS - 凝胶电泳测定蛋白质相对分子质量	35
-----------------------------	----

实验 6

IEF 电泳测定蛋白质等电点	42
----------------------	----

实验 7

胰蛋白酶的动力学研究	48
------------------	----

实验 8

胰岛素与肾上腺素对血糖浓度的影响	55
------------------------	----

实验 9

质粒 DNA 的微量制备(碱裂解法)	59
--------------------------	----

实验 10

大肠杆菌感受态细胞的制备及 DNA 分子导入受体细胞	63
----------------------------------	----

实验 11

蛋白质高效液相色谱氨基酸组成分析	67
------------------------	----

实验 12

亲和层析纯化乳酸脱氢酶	74
-------------------	----

实验 13

固相 pH 梯度 IEF-SDS 蛋白质组双向凝胶电泳分析	79
-------------------------------------	----

实验 14

银染蛋白质点 MALDI-TOF 肽质量指纹图分析及 利用数据库进行蛋白质鉴定	87
--	----

实验 15	电喷雾串联质谱法测定蛋白质多肽的相对分子质量和氨基酸序列·····	98
实验 16	蛋白质 N 端手工气相序列分析·····	102
实验 17	蛋白质毒素的 ¹²⁵ I 标记及与受体结合实验·····	108
实验 18	手工 Fmoc 法固相多肽化学合成·····	116
实验 19	免疫印迹技术与酶联免疫吸附测定法·····	126
实验 20	核酸印迹技术·····	139
实验 21	PCR 基因扩增实验·····	146
实验 22	转基因动物技术·····	151
实验 23	真核生物 mRNA 的纯化和 cDNA 文库的构建·····	168
实验 24	重组 DNA 序列在原核细胞中的表达·····	175
实验 25	蜘蛛毒素 HWTX-I 在原核表达系统 pET ₃₁ -b/BL21(DE3)pLysS 中的表达与分离纯化·····	180
实验 26	脂质过氧化物测定方法·····	186
实验 27	脂褐素含量测定方法·····	193
实验 28	重组质粒 DNA 动物体内导入法·····	197
实验 29	核酸酶保护反应·····	201
实验 30	利用 RNAi 技术鉴定基因功能·····	205
实验 31	酵母双杂交技术相关基础实验·····	210
附录	·····	219

绪论

生物化学与分子生物学实验课导言

辩证唯物主义认识论即是实践论,人对外部世界的正确认识根本上说来自于实践。对于自然科学来说,这种实践就是观察和实验,所有的科学知识和理论都来源于观察和实验。这一点在生物化学和分子生物学的发展上体现得尤为典型,可以说,几乎生物化学与分子生物学教科书上每一句结论,都是毫无例外地有一个科学实验作为背景和依据的。从这一点上看,学习生物化学与分子生物学的学生应当更加关注实验课的学习。

一、珍惜实验课的机会

从根本上说,实验课指导老师给学习生物化学和分子生物学的学生开设的实验课与真正的科学研究实验有着基本相同的过程,但是又有很大的区别。老师选择那些已为前人多验证过,而且能很好地揭示某一生物化学与分子生物学原理,同时应用广泛的实验让学生亲自实践,通常只要遵循正确的操作过程,一般都会得到明确的结果。这与真正的科学实验中要不断探索方法而又经常出现失败的情况是不同的。实验课的目的是教学,是使学生在有限的时间内掌握某一实验方法,通过自己亲自动手进一步理解实验背后的某一生物化学理论,并培养实事求是和客观严谨的科学实验素质,这是任何理论课难于达到的。有幸参加实验课的学生应当珍惜这种机会,因为不仅前人长期的探索提供了所要进行的实验的方法,实验课老师也为实验课投入了大量时间进行准备,同时学校和老师要为之准备来之不易的试剂、仪器和各种实验条件。在你的学习生涯中,能有幸在实验课堂上亲自动手实践的机会能有多少次呢?

第二个应当珍惜实验课的理由是,实验课上的学习内容将为你今后的科学生涯打下宝贵的基础。实验课上的内容,尽管很多是认知性的与验证性的,真正探索性的实验很少,但实际上仍是前人探索过程的重复,只要你肯动脑筋,你会从一个重复性实验中领会到前人为什么这样设计实验、为什么这样操作、为什么这样理解和判断结果,这与你今后进行未知世界探索的科学实验从认知论上看是基本相同的,因而能培养你科学的研究思路。另一个方面,科学实验不是一种个人的随意活动,进行科学实验时是不依规则则不能

成方圆的。前人为更有效地进行科学实验总结了很多原则、规定、程序、标准以及统一的实验术语,有些适合于所有的自然科学实验,有些则是专为生物化学和分子生物学实验所设定的,对这些的了解和掌握,都是以后你在科学探索上登堂入室所必备的基本功。比如实验室安全规则,实验中度量衡单位的确定,基本仪器的使用规则,生化试剂的保存要求,放射性药物的处置,实验室资料的处理,实验原始记录的书写,实验结果的统计学分析,书写实事求是、清晰规范的实验报告等等,以上这些,对于有效的科学实验是非常重要的,而你只有到实验室并亲自动手实践,你才能将其了解掌握并长久保存在你的记忆中。

二、进入实验室前必须有所准备

如果你对要进行的实验在毫无准备甚至一无所知的情况下走进实验室,你将受益很少,甚至会遇到麻烦,比如发生安全事故。实验课老师的建议是,你在实验课前准备越充分,则越有可能取得实验成功,且受益越多。你应当事先预习实验课内容,了解实验的目的和将要采用的方法,并将其与理论课上的学习联系起来。在开始实验之前注意从教程和老师那里了解可能出现的安全问题以及应采取的措施;进入实验室时你应当带上实验教程及有关资料以及实验记录本,还有本实验中可能用到的其他用具,如直尺、记号笔、标签纸、计算器和电脑软盘等。

三、生物化学与分子生物学实验室的安全规程

进入实验室的每一个人都必须遵守实验室有关安全的各种规定,以避免给自己和他人造成危害,这也是实验能顺利进行的前提。生物化学和分子生物学实验室有一般化学实验室常有的潜在安全事故因子,如易燃、易爆、具化学毒害性物质,仪器伤人事故,水、电事故等外,还有接触生物毒害物质,发生生物感染,或者被动物伤害,如被大、小鼠咬伤等潜在因素。确保实验室不发生安全事故是教师和实验室管理员而且也是每一个上实验课的学生们的责任。以下是必须注意的生物化学与分子生物学实验室的基本安全规程。

1. 熟悉所有易燃、易爆、有毒、腐蚀、生物毒害等有害物质的标识(教师和实验室管理人员必须保证这些物质有标识,并存放于安全的地方)(图绪-1),实验操作中必须小心谨慎,操作时必须穿工作服,带工作手套,有的还必须带安全眼镜,一般要求在通风橱中进行操作。

2. 对具有放射性的物质必须严格在教师指导下在规定的放射化学实验室内使用,不可在普通实验室内使用(有关放射化学实验室的安全规则详见实验17)。

3. 严禁在实验室吸烟、饮食,以免误食和吸入有毒物质。

4. 使用移液管时,应当用洗耳球吸取液体而不用嘴进行。

5. 在转移、分装易燃有机溶剂时,一定保证附近无火源和开启的电炉。事先要有火灾的应急处理常识,熟知安全出口和水源的位置,以及怎样关闭电闸和报警。火灾发生时,切记人身安全最重要,无安全保障不要进入火场救火。

6. 实验时如被动物咬伤,或在处理生物材料时发生皮肤破损,应及时消毒处理,并应尽快到医院注射相应的疫苗(如狂犬疫苗)以防严重病毒感染。

7. 不要穿拖鞋进实验室,以免溅落的腐蚀性药物或掉下的玻璃器皿伤及裸露的皮肤。

8. 不要穿实验室工作服到食堂或其他公共场所,以免传播工作服上可能粘有的有害物质。

9. 在不知道正确操作程序时切勿自作聪明地使用实验室的仪器,否则很可能损坏仪器设备并有可能引起事故。



图绪-1 有害化学物质的警告标识

四、生物化学与分子生物学实验的测量、数据与单位

生物化学与分子生物学实验基本上都是对一个确定条件下的生物化学变化或某种生物化学物质进行测量,测量的结果以数据和相应的单位或者定性描述来表示。如同其他学科的实验课一样,我们首先要对测量过程的可靠性有所了解。一个实验测量过程或一个实验方法都有其准确度与精确度的问题,准确度是指测量值与理论真实值接近的程度,而精确度是指重复测量之间相互接近的程度。在实际的实验中,我们主要注重测量方法的精确度,因为如能正确地估计和纠正系统误差,精确可以保证准确。

所谓系统误差是一种非随机的系统的偏差,系统误差常常是因为所用仪器用具未经校正或实验操作中某些重要试剂不符合要求,或某些不当的实验步骤设计与操作造成的。与系统误差相对应的是偶然误差,它是指一种非系统的、随机的不精确,主要由于实验操作人员操作过程的不重复性(可由操作过程不专心、粗心地使用量具和读取数据造成)和仪器设备的不稳定性造成。

无论是系统误差还是偶然误差都将影响到实验结果的判断,虽然绝对不产生任何误差的测量过程几乎是不可能实现的,但正确的实验设计,正确而精确的实验操作,采用准确度与精确度高的仪器设备,采用高纯度的化学与生物化学试剂等措施,可以使误差减至最小从而得出与实际情况和规律吻合的实验结论。为了增加实验结果的可靠性,对于系统误差,可通过在实验中加入对照实验和空白实验处理;对于偶然误差,可通过增加平行

实验次数,取其算术平均值来处理。

对于实验数据的记录,特别是定量分析实验中,还应注意有效数字的取舍。所谓有效数字是实际能测量到的数字,除最后一位是可疑外(在仪器上读数时,这一位是估计的)其他各数都是确定的。在实验结果的运算过程中,要注意有效数字的保留,否则会使计算结果不准确。通常应遵循以下运算规则:

1. 几个数相加或相减时,有效数字的保留以小数点后位数最少的数字为准,弃去过多的可疑数时用四舍五入法。

2. 几个数值相乘或相除时,其乘积和商数的相对误差需接近于所有数值中相对误差最大的,如 $0.1545 \times 3.1 / 0.112 = 4.3$,因为在 0.1545、3.1、0.112 三个数值中,3.1 的相对误差最大,即 $\pm 0.1 / 3.1 \times 100\% = \pm 3\%$ 。

实验结果记录中,一般用一个数字加单位描述测量结果。在科学体系内,统一的单位对于有效的交流是必须的。生物化学与分子生物学实验中,所有基本单位一般都采用国际单位制(SI),即国际上承认的米-千克-秒测量系统,但也采用很少数的非国际单位,如升(L),毫升(mL)等。

SI 基本单位及表示倍数的词头分别列于表绪-1、表绪-2。

表绪-1 SI 基本单位

量的名称	单位名称	英文名称	单位符号
长度	米	metre	m
质量	千克	kilogram	kg
物质的量	摩(尔)	mole	mol
时间	秒	second	s
电流	安(培)	Ampere	A
热力学温度	开(尔文)	Kelvin	K
发光强度	坎(德拉)	candela	cd

表绪-2 SI 单位倍数的词头

倍数	词头名称	英文名称	词头符号
10^{-3}	毫	milli	m
10^{-6}	微	micro	μ
10^{-9}	纳(诺)	nano	n
10^{-12}	皮(可)	pico	p
10^{-15}	飞(母托)	femto	f
10^{-18}	阿(托)	atto	a
10^3	千	kilo	k
10^6	兆	mega	M
10^9	吉(咖)	giga	G
10^{12}	太(拉)	tera	T
10^{15}	拍(它)	peta	P
10^{18}	艾(可萨)	exa	E

用 SI 单位表示测量结果时,每个测量值与单位之间隔一个空格,如带有倍数的词头,则词头与单位间不留空格。单位符号以单数形式书写,其后不需加点来表示缩写,也不需要表明复数。

五、从原始记录到实验报告

实验课的一个非常重要的内容是训练学生怎样进行实验原始记录以及怎样完成从原始记录到提交实验报告的过程,这对于学生今后从事科学实验是一个极其重要的基本功训练。虽然教学实验课的实验记录和提交实验报告与真正进行探索性科学实验和写作科研论文有一些明显的区别,如前者是在教师指导下按部就班地进行,可能出现的复杂情况、困难程度以及工作量都远远小于真正的科研探索实验,但是从培养训练的角度来看,它是一种真正科学实验的演习,因此教师对学生进行实验记录和提交实验报告应当提出如同真实探索性科研时同样的要求。

首先学生要认识实验原始记录本的重要性,它是科学研究最重要的工具之一,手边没有笔记本和笔就不要开始做实验。实验记录应具有真实性、现场性、完整性和连续性。原始记录的一条原则是越详细越好,一个训练有素的科学工作者都知道:一项常规程序中发生的最微小的差异,和任何出乎意料的现象一样,不管当时看起来它是多么地不相干,它是一件值得注意、值得记录下来事情。可能被一个初学者看成微不足道的细枝末节,往往是整个实验最重要的方面。实验记录本必须装订结实,有页码,有日期,纸张结实,墨迹明显,记录中不应留任何空白页。

原始实验记录的内容:

1. 实验的标题和识别号;
2. 所记事情发生的日期、时间以及地点(除非这地点是不言而喻的);
3. 实验者预先设想的目标;
4. 本实验所用方法的文献出处;
5. 所有化学反应的平衡反应式;
6. 重要仪器的参数及测量情况,注意记录合理的有效数字;
7. 重要外界因素的记录(例如实验的温度和气压);
8. 不常见的或者不熟悉的仪器设备的描述;
9. 有关化学药品的相对分子质量和物理性质(例如反应物和产物的熔点和沸点,或许还有预期溶解度和毒性等);
10. 所有化学药品生产厂家和纯度级别,所有动物材料细胞的种名和株系名及其来源。
11. 一切非商品材料的来源;
12. 一切原材料或试剂的提纯或试验所用的方法和结果;
13. 一切可能影响实验的偶发性事件,如停电、他人来访、接电话中断实验等;
14. 不正常的操作以及数值和观察结果应当及时在记录本上说明,不要试图依赖记忆;
15. 仪器测出的原始图表与记录粘在一起,不要另外保存。

根据实验的复杂情况,有时候在实验完成之后可在另一个记录本上进行第二次记录,第二次记录的目的是在保留原始记录真实性的基础上使记录更加条理化,更加简洁清晰。实验的第二次记录本将用于同指导老师讨论结果,并为写实验报告或学位论文作准备。抄写一个第二次记录,它会使你再次考虑原始记录中可能的细节并提供了一个副本以防

丢失或损坏。然而,这些记录应保留原始记录的基本特征并更加简明。一系列相似的实验不必重复记录材料和方法,可以采用诸如“方法同实验二”的方式来表示。如果方法是由书本或论文中引用的,提供一个出处即可。进行第二次记录时,要用一种更清晰的方式表示数据,如平均值表格或总结性图表,要用适当的统计检验分析实验结果。

实验完成以后,必须提交一份实验报告。实验报告对于实验者本人是一个非常重要的实验结果的总结,对于教师是一个了解学生实验完成情况的依据。写作实验报告对于学生今后写作科研论文是一个非常有意义的训练。

实验报告的写作过程是一个对实验结果分析归纳、去粕取精、去伪存真、把感性认识上升到理性认识的过程,实验报告通常要有以下内容:

1. 前言:叙述开展本项实验的背景材料,实验目的,选择实验方法和实验材料的依据。如果是探索性实验,则要阐明国内外研究现状,开展本项实验的必要性等。

2. 材料与方法:所有本项实验的试剂和材料的来源、规格、厂家,所有溶液的配制过程,所用仪器型号和操作参数,以及所用动物材料的详细情况。

3. 结果:一般按照实验的实际进行过程,分层次地介绍实验结果。一般用图表来直观地将实验结果展示出来,必要的仪器测试图谱要复印并附在文中,所有的图表要有清晰的说明。要从实验结果中恰如其分地推出结论,对于实验结果中一些非正常的难于解释的结果一定不要忽略。实验结果中一般都应有统计学分析。

4. 讨论:对实验结果进行分析,讨论结果的意义和重要性,以及结果中一些特殊现象的解释,与其他人的结果进行比较,提出实验中存在的问题以及下一步的计划。

5. 致谢:感谢那些在工作中给予过帮助的人。

6. 参考文献:列出所有本实验的参考文献和查寻信息。

在写作实验报告的过程中,要充分利用目前常用的电脑软件,如文字处理软件、图表制作软件、统计学分析软件,以及一些生物化学与分子生物学数据分析的专用软件,这些电脑软件的使用也应当作为实验课训练的内容之一。

以上简要地提到了一些实验课上带有普遍性意义的事,相信本书读者在完成过一些具体的实验之后,会感到上面这些提醒是有帮助的。

(梁宋平)

参考文献

1. Barker K. At the Bench: A Laboratory Navigation. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998
2. Svarney P B. The New York Public Library Science Desk Reference. USA: Macmillan Press, 1995
3. Reeb R, Holmes D, Weyers J 等. 生物分子科学实验技术. 王小菁, 李德红, 孟祥春译. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001
4. 陈荣三, 黄孟健, 钱可萍. 无机及分析化学实验. 北京: 人民教育出版社, 1980

实验 1

动物细胞蛋白质的 提取和含量测定

蛋白质是生命现象的物质基础之一,是生物体最重要的组成部分,因此,对蛋白质的结构与功能研究,是生命科学的核心问题。要研究蛋白质的结构与功能,往往从细胞中提取蛋白质开始。由于不同组织及不同发育时期的细胞的蛋白质组的表达多有差异,对于致力于研究某种或某些目的蛋白质的研究者来说,选择合适的组织及合适发育时期的材料非常重要。材料确定之后,大多数情况下是将细胞破碎,尽可能多地将可溶性的蛋白质抽提出来,然后采用不同的方法比如凝胶电泳、柱层析等分离纯化目的蛋白质。本实验介绍从动物组织细胞中提取可溶性总蛋白质并对其进行定量的实验方法。

实验 1-1 小鼠肝脏细胞蛋白质的提取

一、实验原理

1. 一般动物细胞膜比较脆弱,易于破碎,本实验采用研磨与超声波法相结合,可较容易地将细胞完全破碎,破碎细胞的方法还有冻融法和组织捣碎法等。

2. 选择适当抽提液是蛋白质提取的关键,抽提液的 pH 通常根据目的蛋白的等电点来确定,一般要偏离等电点。一定离子强度的盐溶液有促进蛋白质溶解的作用,但离子强度过高可能造成蛋白质的盐析作用。

3. 蛋白质提取中最常见的问题是目的蛋白质发生变性和被蛋白酶降解,基本的防范措施是尽可能缩短提取时间和在尽可能低的温度下进行提取。为了防止蛋白酶的破坏(肝脏组织中蛋白酶含量较高,更应注意),可在抽提液中加入蛋白酶抑制剂,例如加入苯甲磺酰氟(PMSF)可抑制丝氨酸蛋白酶和某些半胱氨酸蛋白酶,胃蛋白酶抑制剂(pepstatin)可抑制酸性蛋白酶,乙二胺四乙酸(EDTA)可抑制金属蛋白酶。为了防止蛋白质的巯基发生氧化,可加一定量的还原剂如巯基乙醇、二硫苏糖醇。考虑到溶液中如存在重金属离子

(如铝、铜、铁离子)可能会与蛋白质形成不溶复合物,可在溶液中加入一定浓度的 EDTA。

4. 细胞破碎后蛋白质溶解在抽提液中,通常通过离心或过滤去掉不溶性成分后的上清液体积较大,不利于以后分离,应将蛋白质溶液进行浓缩。最常用的浓缩方法是沉淀法,另外还有超滤法、冷冻干燥法等。选择适当的沉淀剂不仅可使样品浓缩,还可以达到去除核酸和部分纯化蛋白质的目的。

5. 蛋白质溶液中加入有机溶剂如丙酮、乙醚后,通过其脱水作用和减少溶剂的极性使蛋白质产生沉淀。有机溶剂沉淀蛋白质时,应预先将有机溶剂冷却到 -10°C 以下。加入硫酸铵到一定浓度,可使蛋白质通过盐析作用而沉淀,不同蛋白质产生沉淀时所要求的硫酸铵的饱和度不一样,因而采用分级沉淀的方法可以达到部分纯化蛋白质的目的。

6. 通过离心将沉淀的蛋白质分离出来后,往往要求重新溶解,并脱去其中的盐分和有机溶剂,可通过透析法和柱层析法达到此目的。

二、实验材料与设备

1. 用品与仪器

超声波清洗仪(带水浴),玻璃珠(直径 $2\sim 2.5\text{ mm}$),碾钵,碾槌,刮勺,冷冻离心机,烧杯,量筒等。

2. 试剂

样品提取缓冲液:称取 Tris 0.606 g , KCl 0.746 g , 甘油 20.00 g , 加双蒸水到总体积 100 mL , 用 HCl 调 pH 到 7.1, 溶液浓度为 Tris $50\text{ }\mu\text{mol/L}$, KCl $100\text{ }\mu\text{mol/L}$, 甘油 $20\text{ g}/100\text{ mL}$ 。

蛋白酶抑制剂溶液:称取 PMSF 1.742 g 溶于 100 mL 乙醇中;另称取 pepstatin A 9.603 mg 溶于 100 mL 乙醇中。以上两种溶液各取 10 mL 混合成为抑制剂液。

3. 实验材料

小鼠。

三、实验操作程序

1. 材料准备

- (1) 用去头法处死小鼠,让血液流尽。以下步骤在冷室中进行。
- (2) 切开腹腔,剪断两侧肝静脉,用 5 mL 生理盐水($0.9\text{ g}/100\text{ mL}$, NaCl 溶液)灌洗肝脏。
- (3) 取下完整肝脏,小心去掉胆囊(不要弄破),切下各肝叶片,去掉各叶片中心部分(血管进入肝脏部分)以及其他组织。
- (4) 将各肝叶片切成 $2\sim 4$ 块,用冰冷生理盐水淋洗。
- (5) 进一步将肝脏切成直径为 5 mm 的小块,用滤纸吸干水分后立即放入液氮中,然后收集到一个有盖的塑料管中,存放在 -70°C 冰箱中备用。

2. 提取可溶性蛋白质

(1) 将冻结的肝脏小块转移到一个事先称重的塑料管中,立即称重。1 只小鼠肝组织的质量一般大约为 $240\sim 260\text{ mg}$ 。

(2) 将一个碾钵和碾槌(带有一个小不锈钢勺)放在聚苯乙烯泡沫塑料上,并将其浸

泡在液氮中。

(3) 将肝组织块放入碾钵内,加入样品提取缓冲液和抑制剂。1 mg 肝组织加 1.5 μL 缓冲液和 0.5 μL 蛋白酶抑制剂,如肝组织重 250 mg,则加入 375 μL 缓冲液,然后加入抑制剂溶液 12.5 μL 。加入上述液体时,均用取样器,逐滴加到放在液氮盒内的小不锈钢勺中,液体很快成为冰珠,易于转移到碾钵内。

(4) 碾磨所有成分成为粉末,注意碾磨中不要有固体颗粒飞出碾钵。

(5) 将碾成的粉末用刮勺完全转移到一个预先称重的 2 mL 的 Eppendorf 离心管中,离心管事先用镊子放在液氮内降温。

(6) 在进行超声波破碎细胞之前,在离心管中加入直径为 2~2.5 mm 的玻璃珠为妥。将离心管内的样品融化,将离心管插在冰上。将密封的离心管浸入盛有 0 $^{\circ}\text{C}$ 水的超声波仪的水浴中,注意水浴的水位要按仪器的要求达一定高度,离心管应放在超声效应的中心。超声处理 10 s 后,用一细不锈钢丝搅拌样品 50 s(离心管不离开水浴),然后将离心管插入水中静置 1 min,上述 2 min 的操作循环共重复 6 次。

(7) 超声波处理完后,用镊子挟住玻璃珠,与管内壁接触,擦除粘附的样品,然后取出玻璃珠。在离心机上离心数秒钟,使管壁上的样品沉入液面,然后将离心管放入液氮中使样品液冻结, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。如马上进行下一步,则将离心管放在冷冻离心机上,以 22 600 g (50 000 r/min)离心强度在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 30 min。

(8) 用玻璃吸管小心吸出上清液,滴入一个已知重量的小试管中,小试管应插在冰上。

(9) 将离心管中的沉淀称重,1 mg 沉淀中加入 2 μL 样品提取缓冲液,0.06 μL 抑制剂,参照步骤(3)、(4),将样品研成粉末。

(10) 将碾细的粉末转移到已用过的离心管中,在冷冻中摇震 45 min,按步骤(7)进行离心,然后用吸管取出上清,与前一管上清合并。这样即得到小鼠肝脏在一般缓冲液中可溶的蛋白的提取液,此样品可进行下一步蛋白质含量分析,或在液氮中速冻之后,在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱存放。

四、讨论

1. 上述样品可直接进行双向凝胶电泳分析,方法参见实验 13。所得的沉淀还可在尿素和非离子型表面活性剂(CHAPS)存在的溶液中进行处理后,作为第二批可溶性蛋白的提取液,再进行双向凝胶电泳,这是蛋白质组研究分步提取样品的处理方法。

2. 上述样品提取液中除了含有蛋白质之外,仍会有核酸和多糖类物质,如果不是作为蛋白质组(用于 2D-胶分离)分析的样品,可以通过硫酸铵分级分离和有机溶剂沉淀法对蛋白质提取物进行部分纯化,同时可以去掉大多数核酸和糖类。

实验 1-2 紫外光吸收法测定蛋白质含量

一、实验原理

蛋白质中普遍含有酪氨酸与色氨酸,由于这两种芳香族氨基酸分子中含有大 π 键,它

们在 280 nm 紫外光附近有光吸收(表 1-1),因而使蛋白质在上述紫外波长附近产生较强的光吸收,利用蛋白质的这一特性可对其进行含量测定。

表 1-1 几种氨基酸的最大紫外吸收波长与消光系数

氨基酸	λ_{\max}/nm	$\epsilon/\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
酪氨酸	275	1.4
酪氨酸盐	295	2.3
色氨酸	280	5.6
苯丙氨酸	257	0.2

紫外光吸收法测定蛋白质含量的优点是简捷和方便,但由于不同蛋白质中酪氨酸与色氨酸含量存在差别,而且样品中混杂的核酸类物质会造成干扰,因而在实际测定中要根据实际情况采用不同的计算方法对实验数据进行处理,以期减少测定误差。

二、实验材料与设备

1. 用品与仪器

紫外分光光度计(上海分析仪器厂 751GW 型或日本日立公司 2000 型),微量自动取液器(200 μL , 100 μL)。

2. 试剂

标准蛋白质溶液:准确称重的纯净蛋白质,配成 1 mg/mL 贮液置于 4℃ 备用。

0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.4; 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 12.0。

三、实验操作程序

1. 普通紫外吸收法

(1) 在 2 个清洁干净的石英比色杯(内径 1 cm)中加入蒸馏水或其他用于溶解标准蛋白质与待测样品的缓冲液,其中一个作为参比杯(在以后测量中不变),另一个作为样品杯,放入紫外分光光度计的相应位置。

(2) 记录下空白杯在 280、260 nm 处光吸收值,或对之进行 250 ~ 350 nm 波长范围内基线扫描。

(3) 移去样品比色杯中的蒸馏水或缓冲液,干燥比色杯(用滤纸吸去残留液,再吹干)。

(4) 在样品比色杯中加入待测样品液,在实验中取前面提取的肝细胞蛋白质提取液,取 30 μL 样品液加入 2 970 μL 双蒸水,混匀,样品液事先通过离心或用 0.2 μm 孔径的滤膜过滤。

(5) 记录下样品液在 260 nm 和 280 nm 波长下的光吸收值,或者从 250 ~ 350 nm 进行吸收扫描从而得出该波长范围内各波长下的光吸收值。

(6) 蛋白质含量的计算

由于样品在 280 nm 和 260 nm 处的光吸收比值反映出样品中残留的核酸类物质的情