

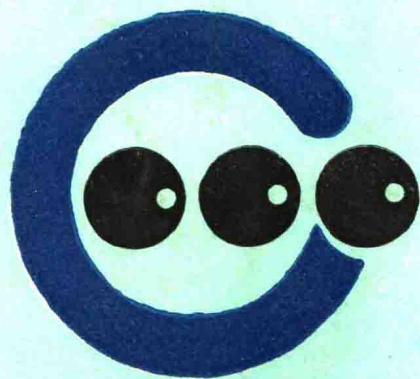
高等医学院校协编教材

生物化学实验

(修订本)

贵阳医学院 衡阳医学院 广州医学院
湛江医学院 镇江医学院 扬州医学院
昆明医学院

编



贵州科技出版社

生 物 化 学 实 验

(修 订 本)

贵阳医学院	衡阳医学院	编
广州医学院	湛江医学院	
镇江医学院	扬州医学院	
昆明医学院		

编 委 名 单

何立望	贵阳医学院
李斌元	衡阳医学院
祝其锋	湛江医学院
赵鼎吕	扬州医学院
黄玉萍	广州医学院
黄治森	镇江医学院
雷大卫	贵阳医学院
田兴亚	昆明医学院

生 物 化 学 实 验

(修 订 本)

何立望 等编

贵州科技出版社出版发行

(贵阳市中华北路289号 邮政编码550001)

贵州省图书馆印刷厂印刷 贵州省新华书店经销

787×1092毫米 16开本 11.375印张 276千字

1992年8月第1版 1992年8月第1次印刷

印数 1——12000

ISBN7-80584-164-0/R·041 定价: 4.50元

再 版 说 明

生物化学是在分子水平上研究生命活动规律的科学，这些规律来自严格的实验研究，因此学生的生化实验课是学习生物化学的重要组成部分。通过实验课，不仅要掌握必需的知识 and 技能，更重要的是在实践中训练分析问题和解决问题的能力，训练科学思维，培养科学工作作风。

实验教材是进行实验的依据。由贵阳医学院、衡阳医学院、广州医学院、湛江医学院、镇江医学院、扬州医学院、昆明医学院共同编写的这本教材，是根据国家教委《临床医学专业本科（五年制）主要课程基本要求》并结合各院校的实验教学经验编写的。在内容的选择上，注重三条原则，一是将生物大分子（蛋白质、核酸、酶）的分离、纯化、鉴定作为重点；二是将生化重要技术（分光分析技术、电泳技术、层析技术）充分使用；三是适当选择一些有代表性的物质代谢实验和临床生化项目，为学生学习后续医学课程打下基础。在3~4小时之内可穿插进行几个实验。

内容的编排上，是将一个一个实验项目，按照理论课教材的顺序排定，在各项目所涉及的有关技术理论和其它某些特殊问题，则在该实验之后用附注形式作补充说明，以便学生扩大视野，深入钻研。在具体实验的描述中，充分注意其科学性、适用性和可行性，确保所定条件下能得到可靠结果。

本书曾于1984年内部印刷供几所院校使用，1988年修订后由贵州人民出版社正式出版。使用本书院校反映，效果较好。这次又进一步进行修订，不仅调整了某些实验项目，而且认真仔细地核对数据，理顺各实验之间的关系，统一规范和表达方式，使全书各实验项目之间的有机联系进一步加强。

本书主要适用对象为医学院校本科生和专科生。也可供其它有关学科人员参考。

这次修订再版中，得到各参编院校领导的大力支持，深表谢忱。

参加修订的七个院校的生化教研室的同志都作了大量的实验研究、资料搜集和改编撰写等工作，审稿会上，祝其锋、李斌元、雷大卫、何立望按统一规范对全部稿件进行了认真研究和修整，最后，委托何立望作了全面的修整和审校及办理其它后期工作。

尽管大家作了很大的努力，毕竟水平有限，可能还存在错误和疏漏之处，殷切地希望使用本书的老师和同学们批评指正，以便再版时修改。

何 立 望

1991年11月

目 录

实验须知	(1)
生化实验的对照设置	(3)

蛋白质和核酸的化学

实验 1 蛋白质的沉淀反应	(4)
附注: 几种分离生物大分子的方法	
实验 2 蛋白质的两性反应和等电点测定	(8)
实验 3 醋酸纤维薄膜电泳	(10)
一、血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳	(10)
二、血红蛋白醋酸纤维薄膜电泳	(12)
附注: 电泳	(13)
实验 4 等电聚焦电泳	(19)
一、牛血清白蛋白等电点的等电聚焦电泳测定	(19)
二、血红蛋白等电聚焦分离及等电点测定	(21)
实验 5 蛋白质分子量的测定	(22)
一、聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳测定蛋白质的分子量	(22)
二、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质的分子量	(25)
实验 6 凝胶层析分离血红蛋白和鱼精蛋白	(27)
附注: 层析法	(29)
实验 7 亲和层析法分离纯化菠萝蛋白酶	(37)
实验 8 氨基酸的薄层层析	(41)
实验 9 DEAE纤维素离子交换层析法分离血清蛋白质	(43)
实验 10 血清 γ -球蛋白分离与纯度鉴定	(45)
实验 11 血红蛋白及其衍生物的吸收光谱测定	(46)
附注: 分光光度法原理	(47)
一、Lambert-Beer氏定律及其应用	(48)
二、光电比色法	(50)
三、分光光度法	(52)
实验 12 蛋白质定量	(55)
一、微量凯氏定氮法	(55)
二、比色法	(58)
(一) 双缩脲法	(58)

	(二) Folin-酚试剂法	(59)
	(三) 考马斯亮蓝染色法	(60)
	三、紫外分光光度法	(61)
实验13	牛胰核糖核酸酶的变性及复性	(63)
实验14	核酸提取、鉴定和测定	(65)
	一、肝细胞核和质的分离	(65)
	二、DNA的提取	(67)
	三、RNA的提取	(68)
	四、DNA、RNA的碱基分离(纸层析法)	(70)
	五、核酸的测定	(71)
	六、酵母RNA的提取及成分鉴定	(78)

酶 和 维 生 素

实验15	蔗糖酶的专一性	(80)
实验16	影响酶活性的因素	(82)
	一、温度对酶活性的影响	(82)
	二、pH对酶活性的影响	(83)
	三、激动剂和抑制剂对酶活性的影响	(84)
	(一) Na^+ 、 Cu^{2+} 、 Cl^- 和 SO_4^{2-} 对唾液淀粉酶活性的影响	(85)
	(二) 丙二酸对琥珀酸脱氢酶活性的影响	(85)
实验17	酶的米氏常数(K_m)测定	(87)
	一、胰蛋白酶的 K_m 测定	(88)
	二、过氧化氢酶 K_m 的测定	(90)
	三、碱性磷酸酶 K_m 值测定	(92)
实验18	乳酸脱氢酶的组分及作用	(94)
实验19	乳酸脱氢酶同工酶(聚丙烯酰胺凝胶)电泳分离	(96)
实验20	胡萝卜素的色层分析	(97)
实验21	维生素B_1的定性(荧光法fluorimetry)	(98)
	附注: 荧光分析法简介	
实验22	维生素C的定量(2,4-二硝基苯肼法)	(100)

物 质 代 谢

实验23	饱食、饥饿和激素对肝糖原含量的影响	(102)
	附注: 中间代谢的主要研究方法简介	
实验24	肝糖原的提取、鉴定与定量	(103)
	一、肝糖原的提取与鉴定	(103)
	二、肝糖原定量测定	(104)
实验25	胰岛素、肾上腺素对血糖浓度的影响	(106)

实验26	血糖测定(邻-甲苯胺法)	(107)
	附注: 一 血液样品的采集	
	二 血滤液的制备	
实验27	糖酵解中间产物——3-磷酸甘油醛的鉴定	(109)
实验28	运动对血中乳酸含量的影响	(111)
实验29	血清脂蛋白电泳	(112)
	一、血清脂蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	(113)
	二、血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	(114)
	三、血清脂蛋白聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳	(115)
实验30	转氨基作用(圆形纸层析鉴定)	(116)
实验31	精氨酸酶的作用	(119)
实验32	细胞色素氧化酶的作用及其抑制与解毒	(121)

临 床 生 化

实验33	糖化血红蛋白测定(琼脂电泳法)	(123)
实验34	红细胞中6-磷酸葡萄糖脱氢酶比活性测定	(125)
	一、紫外分光法	(125)
	二、纸片法	(127)
实验35	血清总胆固醇的测定(硫磷铁法)	(128)
实验36	血浆HDL-Ch、T-Ch测定与动脉硬化指数	(130)
实验37	血清甘油三脂的测定(乙酰丙酮法)	(132)
实验38	过氧化脂质测定	(134)
	一、丙二醛测定	(134)
	二、紫外分光测定法	(135)
实验39	血清载脂蛋白AI及B的免疫定量(单向火箭免疫电泳法)	(136)
实验40	血清谷丙转氨酶活性测定(赖氏法)	(138)
	附注: 酶的活性单位	
实验41	血清尿素氮测定(二乙酰-胍法)	(141)
实验42	血清钠钾测定(火焰光度法)	(143)
	附注: 火焰光度法基本原理	
实验43	血清钙的测定	(148)
	一、草酸盐-高锰酸钾滴定法	(148)
	二、EDTA- Na_2 滴定法	(150)
实验44	血浆二氧化碳结合力的测定	(151)
	一、滴定法	(152)
	二、量积法	(153)
	Van Slyke定压测容法 安生-I型 CO_2 结合力气量仪测定法	

实验设计.....	(158)
-----------	-------

附 录

附录 I 常用缓冲液及酸碱指示剂的配制方法.....	(158)
附录 II 化学试剂的规格与保管.....	(163)
附录 III 常用容量仪器的规格、使用、清洗及洗液的配制.....	(164)
附录 IV 电动离心机的使用.....	(169)
附录 V 几种动物生化常数表.....	(172)

实 验 须 知

实验目的

1. 通过实验, 掌握生化实验的基本操作技术, 提高分析问题和解决问题的能力, 培养严谨的科学态度和作风。

2. 通过实验, 加深对生化理论的理解。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, 结果不良时必须重做。

3. 实验中, 应及时将实验结果如实记录在记录本上, 并请老师当场审核。根据实验结果进行科学分析, 写好实验报告, 交指导教师批阅。

仪器保管及清洁

1. 常用仪器在首次实验时按仪器清单进行清点、签名并负责保管。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, 期末如数归还。

2. 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。

3. 贵重仪器尤其要尽力爱护, 非本次实验使用的仪器, 未经老师许可不得乱动。本次实验必须使用的仪器, 在使用前要了解使用方法, 严格遵守操作规程, 使用后必须在仪器登记本上登记并签名。

试剂使用规则

1. 使用试剂前首先仔细辨认瓶签, 看清试剂的名称、浓度是否为本实验所需要的。

2. 取出试剂后, 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, 应先将标准溶液倒入干净试管中, 再用内外洁净的吸管从试管中吸取, 以免污染瓶中标准溶液。

4. 使用滴管时, 须将滴管尖端朝下, 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, 使用时应远离火源, 若须加热, 要用水浴加热, 不可直接在火上加热。

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, 免致对人造成毒害。

3. 万一发生酸碱灼伤事故, 先用大量自来水冲洗, 酸灼伤者用饱和 NaHCO_3 溶液中和, 碱灼伤者用饱和 H_3BO_3 溶液中和, 氧化剂伤害者用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理。

4.万一发生起火事件，根据发生起火性质分别采用砂、水、CO₂或CCl₄灭火器扑灭。

5.离开实验室时，必须关好窗户，切断电源、水源，以确保安全。

实验室清洁

1.实验室必需经常保持清洁，不得随地吐痰，乱丢纸屑。

2.实验台面经常保持洁净，实验后应抹干净。

3.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。

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。

（饶育雄 广州医学院）

生化实验的对照设置

生物化学中的一切规律都是实验研究的结晶，因此，正确地进行实验工作是揭示生化规律的前提。然而生化研究的材料是生物标本，其化学成分极其复杂，各种成分的含量又极其微小，这给研究工作带来很大困难，加之，实验中所用的试剂、仪器以及标本处理过程都会有各种复杂的情况，这些又给研究工作带来很多麻烦，因此，常常需要设置对照，认真地进行比较和鉴别，才能得到可靠的结果。

设置对照的方式很多，依不同的实验而异，本书中常出现的对照有下列四种类型：

1. 前后对照：一些实验，需依某种处理前后的差异才能看出处理的作用，例如实验26，观察胰岛素和肾上腺素对血糖浓度的影响，若只测定给动物注射激素之后的血糖浓度，就无法说明激素作用的效果是使血糖升高还是降低，因而必须在注射激素之前就先采血测出血糖浓度，作为比较的基础，这种在注射激素之前的血糖浓度就是帮助确定激素作用效果的对照。

2. 相互对照：许多实验中，因将标本作不同的处理而得出不同的结果，彼此之间相互构成对照。例如在作温度对酶活性影响的实验中，4支试管所加的试剂完全相同，仅将各管所置的温度不同，而致反应的结果不同，其中任何一管都是其它三个管的对照，反之，任何三个管也是某一个管的对照，将这些结果相互对照相互比较才能得出酶的活性与温度的关系。

3. 标准对照：标准对照的方式很多，天平的砝码、基准试剂、容量器皿等都是。在生化实验中用得最多的是比色分析中的标准管，用已知浓度的标准液，在与测定液在同样条件下进行处理，然后测其吸光度，依比耳定律进行计算(或查标准曲线)得出测定液中物质的浓度。此外，再如实验5用电泳方法测定蛋白质的分子量的实验，是借助几种已知分子量的标准蛋白质的迁移率及其分子量的对数作图而获得标准曲线，据以求出被测样品的分子量。又如转氨基实验的圆形纸层析鉴定，测定液为两个色斑，其 R_f 不一，各斑是什么物质，必须借助在同样条件下已知氨基酸的 R_f 值进行鉴定。这些标准品就是对被测物进行定性定量的对照。

4. 空白对照：比色分析中，测定液中的许多试剂及其溶剂，也可能有一定吸光性，比色杯对光也有吸收、反射、散射等作用而影响透光。因此，用测定液所测得的吸光度是上述这些因素和被测物质吸光度的总结果，单凭此就无法得出所需被测物的吸光度，若设一空白管，其比色杯和试剂、溶剂等与测定管完全相同，测出其吸光度后，测定管吸光度与空白管吸光度之差就是被测物吸光度，实际工作中，直接用空白管调节仪器零点意即在此，因此，设置空白对照是实验中的重要手段。

设置对照的一个重要原则就是要注意其可比性，一般仅仅使所观察的某一个因素与被测者不同，其它一切条件要尽可能相同才具有可比性。

在生化实验工作中，正确地设置对照是认识事物的重要方法(也即有比较才有鉴别)，有时还是实验成败的关键，这是每一个生化实验人员必须充分注意的。

(何立望 贵阳医学院)

蛋白质和核酸的化学

实验 1 蛋白质的沉淀反应

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，蛋白质分子带正电荷，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，能使蛋白质分子彼此连成凝块。

操 作

1. 盐析沉淀蛋白质：

(1) 取离心管 1 支，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？），然后，2000rpm 离心 5 分钟。

(2) 将离心后的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

加 入 物 (滴)	1	2	3	4	5	6	7
1:20 鸡蛋清	20	20	20	20	20	20	20
95% 乙 醇	20						
3% 硝酸银溶液		5					
0.5% 醋酸铅溶液			5				
苦味酸饱和溶液				2			
鞣酸饱和溶液					2		
20% 磷基水杨酸溶液						2	
5% 三氯醋酸溶液							2
1% 醋酸溶液	1			1	1	1	
结 果							

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？）
2 000rpm离心10分钟。

〔3〕将上两次沉淀析出的蛋白质，分别加入蒸馏水1.0ml，观察沉淀是否溶解。

2. 乙醇、重金属盐、有机酸及生物硷沉淀蛋白质。

取试管7支按上表操作：

试 剂

〔1〕1：20鸡蛋清溶液；

〔2〕盐析用蛋白质溶液：取鸡蛋清20ml加少量蒸馏水充分搅拌，再加蒸馏水至200ml，然后加饱和NaCl溶液100ml搅匀后，用数层纱布过滤，滤液为盐析用蛋白质溶液；

〔3〕95%乙醇；

〔4〕3%硝酸银溶液；

〔5〕0.5%醋酸铅溶液；

〔6〕苦味酸饱和溶液；

〔7〕鞣酸饱和溶液；

〔8〕20%磺基水杨酸溶液；

〔9〕5%三氯醋酸溶液；

〔10〕1%醋酸溶液；

〔11〕饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液；

〔12〕 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末。

（刘四春 衡阳医学院）

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样品，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。本附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，原理是在盐浓度很低时，蛋白质的溶解度随着盐溶液浓度升高而增加，此称盐溶（saling 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（saling 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，致使蛋白质分子相互聚集而沉淀。因为在某种浓度的盐溶液中不同蛋白质溶解度不一，所以分离几种蛋白质的混合溶液时，盐的饱和度由低至高逐步增加，溶解度低的蛋白质首先析出，将其分离后，再继续增加盐饱和度，第二种蛋白质沉淀，依此反复操作的过程称为分段盐析。

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、亚硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。其中最常用的是硫酸铵，其优点是会引起蛋白质变性，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（4.1mol/L）。而0℃时饱和溶液为676g/L（3.9mol/L）。在此溶解度范围内，许多蛋白质都可分段盐析出来，故应用广泛。其缺点是干扰蛋白质含氮量的测定。

硫酸铵浓溶液pH在4.5到5.5之间，故使用时常要用氨水调节至中性。

（2）盐的饱和度算法：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，把蛋白质溶液的硫酸铵饱和度和从 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1-1查出。

表1-1 室温下由 S_1 提高到 S_2 每升加硫酸铵的克数

$S_1 \backslash S_2$	0.1	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6	0.65	0.7	0.75	0.8	0.85	0.9	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

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条件下进行，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，故盐析时常选择在蛋白质等电点附近进行。但在高浓度盐溶液中，蛋白质的等电点会变化应该注意。

(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质溶液浓度。

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（图

1-1)。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。除可用透析法脱盐外，还可采用凝胶层析法脱盐。

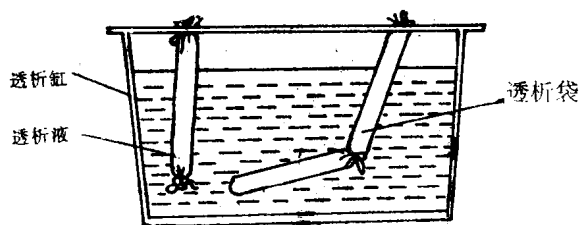


图 1-1 透析装置

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，就能达到沉淀出有活性的蛋白质之目的。

三、冷冻干燥

为了使生物大分子易于保存又防变质，常需浓缩干燥。冷冻干燥是常用的浓缩干燥方法之一。此法原理为：①在真空抽气作用下，样品液中所含溶剂，随着压力减小，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，水蒸气压随着温度的下降而下降。综合上述两种作用，故使标本在低温低压下，溶剂结冰并迅速升华成气体被除去。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，其中最简单又可自行安装者见图 1-2。应用此法干燥所得的产品既疏松，而溶解度又好，能保持其天然结构与活性。

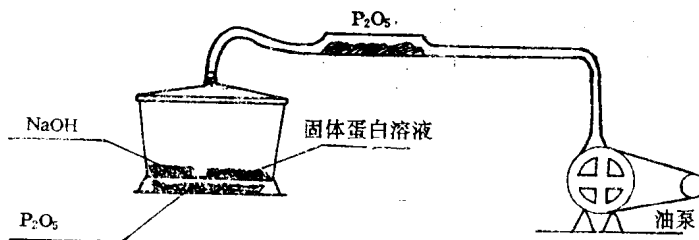


图 1-2 冷冻真空干燥装置

四、超离心法

超速离心机的转速在 25 000rpm 以上，目前最大的已达 85 000rpm。生物大分子在超速离心场作用下可逐渐沉降。分子量和分子形状不同的生物大分子沉降速度不同，故可被分离。

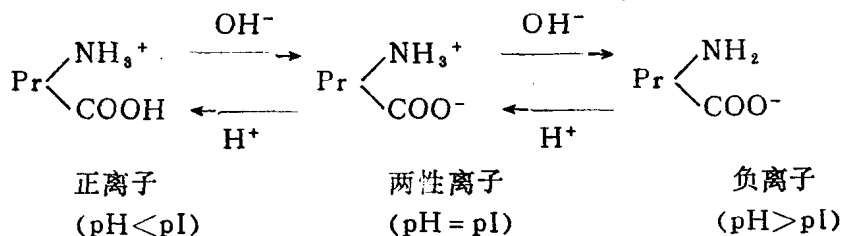
颗粒(生物大分子)在单位离心场作用下的沉降速度称为沉降系数，沉降系数是颗粒在离心力作用下从静止状态到达极限速度所经过的时间。其单位是 Svedberg 单位，即 1×10^{-13} 秒，例如免疫球蛋白 G (IgG) 的沉降系数为 7×10^{-13} 秒，简称 7 S。一般来说，分子量越大，其 S 也越大，彼此间有一数学关系(详见有关专著)。(陈富生 衡阳医学院)

实验 2 蛋白质的两性反应和等电点测定

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，使蛋白质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)。若溶液的pH值大于该蛋白质的pI，蛋白质分子释放出 H^+ 而带负电荷 $\left(Pr < \begin{smallmatrix} NH_2 \\ COO^- \end{smallmatrix}\right)$ 。若溶液的pH值小于该蛋白

质的pI，蛋白质分子结合 H^+ ，而带正电荷 $\left(Pr < \begin{smallmatrix} NH_3^+ \\ COOH \end{smallmatrix}\right)$ 。



因为不同的蛋白质其氨基酸残基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，所以各种蛋白质各有其等电点。

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

一、蛋白质的两性反应

取试管1支，加0.5%酪蛋白溶液20滴，然后依下表逐项加入试剂不断摇匀，同时观察并纪录颜色变化、是否出现沉淀及沉淀变化情况，逐项作出解释。

加 入 物	颜 色 变 化	沉淀及变化	解释结果
0.01%溴甲酚绿 指示剂 (5~7 滴)			
0.02mol/L HCl 逐滴加入			
继续滴加0.02mol/L HCl			
0.02mol/L NaOH 逐滴加入			
继续滴加 0.02mol/L NaOH			

思考题

1. 溴甲酚绿的颜色变化与酪蛋白沉淀的变化之间有什么联系?
2. 根据溴甲酚绿变色的pH范围(3.8~5.4)请估计酪蛋白的等电点大约是多少?

二、酪蛋白等电点的测定

取直径相近的干燥试管5支,按下表操作:

加入物(ml)	1	2	3	4	5
蒸馏水	3.4	3.7	3.0	—	2.4
0.01mol/L醋酸	0.6	—	—	—	—
0.10mol/L醋酸	—	0.3	1.0	4.0	—
1.00mol/L醋酸	—	—	—	—	1.6
0.5%酪蛋白-醋酸钠溶液	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
混匀、放置10~20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“-、+、++、+++”符号表示。根据观察结果,指出哪一pH值是酪蛋白的等电点?

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] 0.5%酪蛋白溶液(以0.01mol/L氢氧化钠溶液作溶剂)。

[2] 0.5%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1.00mol/L NaOH 5ml(必须准确)。摇荡使酪蛋白溶解,然后加1.00mol/L醋酸溶液5ml(必须准确)。最后用蒸馏水稀释至刻度,混匀。

[3] 0.01%溴甲酚绿指示剂,其变色的pH范围是3.8~5.4,指示剂的酸色型为黄色,碱色型为蓝色。

[4] 0.02mol/L氢氧化钠溶液。

[5] 0.02mol/L盐酸溶液。

[6] 0.01mol/L醋酸溶液。

[7] 0.10mol/L醋酸溶液。

[8] 1.00mol/L醋酸溶液。

(陈富生 衡阳医学院)