

高级生物化学实验教程

王重庆 李云兰 李德昌 陈劲秋 编
周先碗 郝富英 廖助荣 袁洪生

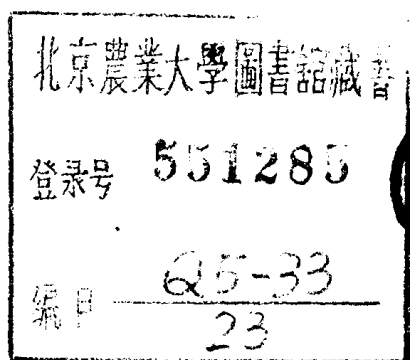
北京大学出版社

ND04101

高级生物化学实验教程

(以姓氏笔划为序)

王重庆 李云兰 李德昌 陈劲秋
周先碗 郝富英 廖助荣 袁洪生 编



北京大学出版社

新登字(京)159号

内 容 简 要

本书是由北京大学生命科学学院生物化学及分子生物学系的生物化学大实验教材中选编而成,共有14个实验。其内容包括蛋白质、酶、核酸等生物大分子分离纯化、分析检测的技术和方法,如结晶酶的制备、等电聚焦电泳测定蛋白质等电点、亲和层析法纯化胰蛋白酶等实验的技术和方法,以满足对生物大分子研究的需要。为适应分子生物学的发展,编写了如质粒DNA的分离纯化和鉴定、质粒DNA的分子杂交及感受态细胞的制备和细胞转化等实验。此外,还编写了免疫化学实验内容,如免疫电泳、ELISA检测法等。在每一实验前,简明扼要地、透彻易懂地阐述实验原理,在其后特意编写了“结果讨论和注意事项”,将教员在多年教学和科研中积累的经验加以总结,“思考题”和“答案”也有助于对实验的进一步掌握。

本书可供综合大学、师范大学、医学院校及农业院校等生物化学专业本科生、生物学系非生化专业研究生的实验指导教材,也可供从事生物化学、分子生物学研究的研究人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

高级生物化学实验教程/王重庆编;—北京:北京大学出版社,1994.6

ISBN 7-301-02514-9

I.高… II.王… III.生物化学-实验-高等学校-教材 IV.Q5-33

出版者:北京大学出版社

地址:北京市海淀区中关村北京大学校内 100871

电话:出版部 2502015 发行部 2559712 编辑部 2502032

排印者:北京大学印刷厂

发行者:北京大学出版社

经销者:新华书店

版本记录:787×1092毫米 16开本 13印张 320千字

1994年6月第一版 1994年6月第一次印刷

定价:13.50元

编 者 的 话

生物学是一门对实验技术依赖性很强的学科。生物学技术的任何一项发明创造，都推动和伴随生物学基础理论的进一步发展。20世纪中期的生物学已进入了分子生物学水平，这是与生物化学技术和方法的迅猛发展分不开的。因此，无论是与生物学有关的教学单位、科研单位还是一些实际应用部门，也都愈来愈重视对生物化学的研究技术和方法的学习及应用。

本书共编写了14个实验内容。这些内容是从北京大学生物化学及分子生物学系高年级学生所学的生化大实验教材中，经过进一步挑选、修改、整理而编写成的。不仅先后在本系本科生、研究生和进修生的数十年教学中反复实践；而且也在11届暑期举办的“北京大学生物学系高级生化技术讲习班”教学中所使用。实践证明，这些内容对生物化学专业及相关专业的本科生以及从事生物化学研究人员的培养是必要的。

本书的特点是力求全面培养学生，使其能正确地理解实验原理和较好地掌握生化技术和方法。为此在实验内容方面安排有蛋白质、酶及核酸等生物大分子物质的分离纯化、分析检测的近代技术和方法；分子生物学实验内容以及免疫化学实验内容。在每一实验后面，编写了“结果讨论和注意事项”，这部分内容都是教员在指导学生实验和科研中遇到的一些现象和问题的经验总结。这将有利于学生更好地掌握实验技术的基本操作和把握住实验操作中的关键因素。所编写的“思考题”也有助于学生在实验前后进行思考和总结提高。

本书的出版是集体劳动的结晶。除本书编者外，还有很多教员参加过实验教学和教材的编写，他们有张庭芳、杨端、姚仁杰、李令媛、刘德富、徐浩大等；另外还有参加实验教学辅助工作的李茹、聂力嘉等，我们在此表示深切的感谢！本书的责任编辑朱新邨、制图员王迎新和封面设计者常燕生也都付出了辛勤的劳动，对此，我们也深表谢意！

本书的编写是采用集体讨论，分别执笔的方式，鉴于我们的水平，缺点和错误是难免的，欢迎批评指正。

编 者

1993年2月

目 录

实验1 猪胰蛋白酶结晶的制备及其活性的测定	(1)
实验2 亲和层析法纯化胰蛋白酶	(10)
实验3 胰蛋白酶的动力学研究	(21)
实验4 DNS法及聚酰胺薄膜层析技术测定蛋白质N-末端和蛋白质的 氨基酸组成分析	(32)
实验5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量	(42)
实验6 聚丙烯酰胺凝胶平板等电聚焦电泳测定蛋白质等电点	(54)
实验7 猪脾脱氧核糖核酸 (DNA) 的制备及其含量测定	(64)
实验8 核糖核酸 (RNA) 的制备及鉴定	(72)
实验9 离子交换层析技术分离单核苷酸	(77)
实验10 DNA重复序列与单一序列的分离	(87)
实验11 质粒DNA的提取、酶切与鉴定	(95)
实验12 质粒DNA的分子杂交	(108)
实验13 大肠杆菌感受态细胞的制备及载体DNA分子导入原核细胞	(115)
实验14 免疫电泳技术及ELISA检测	(120)
附录	(142)

实验1 猪胰蛋白酶结晶的制备 及其活性的测定

内 容 提 要

通过从猪胰脏中制备胰蛋白酶 (trypsin) 结晶实验, 掌握酶的制备、一般分离、提取、纯化的技术和酶在结晶过程中的有关条件; 学习对胰蛋白酶的活力测定及其对酶的比活性、总活性和回收率的计算方法, 并了解胰蛋白酶在制备和结晶过程中应注意的重要环节。

原 理

酶 (enzyme) 主要是一类具有生物催化活性的蛋白质, 它催化效率极高, 其催化反应的速度与其他催化剂 (无机、有机催化剂) 比较, 可高 10^7 — 10^{13} 倍; 而相对于非催化反应, 则可高达 10^8 — 10^{20} 倍之多。酶的另一特点是具有高度的专一性, 几乎可以说, 一种酶只作用一种或一类底物。在生物体内 (动植物、微生物), 无论是消化吸收, 生长发育, 遗传变异以至生命活动的各个过程都是直接、间接地依赖于酶的催化作用。因此, 酶学是生物学研究的一个重要课题; 同时在工农业生产、医疗保健等领域的广泛应用中, 也有了日新月异的发展, 所以, 它也是一门与人类休戚相关的重要学科。

胰蛋白酶结晶最初是以牛的胰脏为材料而制备的, 后来用羊、马、猪、鼠等哺乳动物中的胰脏亦可制备出结晶。所不同的是, 在提取制备过程中所需 pH 值、等电点和结晶体的构型上, 有所区别。

提取制备胰蛋白酶的经典方法, 多采用硫酸铵分级盐析法, 胰蛋白酶在 0.75 饱和度硫酸铵中沉淀, 其中杂蛋白一般则在 0.40 饱和度被沉淀下来, 可被除去。经此反复多次提取, 最后在 pH8.0 磷酸缓冲溶液中结晶, 可得到酶的晶体。

胰蛋白酶在 pH3.0 时最为稳定, 可在低温下贮存数周而不丧失活性; 低于此 pH 时酶易变性; 当高于 pH5.0 以上时, 酶易自溶而会失去活性。因此, 在提取制备胰蛋白酶的全部过程中应注意溶液的 pH 值以及在冷室 (0—5°C) 中进行操作为宜。胰蛋白酶是以无活性的酶原形式存在于动物的胰脏中。胰蛋白酶原在正常生理条件下, 可以被肠激酶、钙离子所激活或自我活化成为有活力的酶。猪胰蛋白酶原分子量为 24000—25000 之间, 而猪胰蛋白酶分子量为 23400, 其原因在肽键中, N-端的赖氨酸与异亮氨酸之间的一个肽键被分解后, 丢失了一个 6 肽, 造成其分子构象发生了一定的改变, 等电点变为 10.8。此时, 酶原转变成具有活性的酶。

当胰蛋白酶遇到重金属离子、有机磷化物和某些反应产物的外界因素, 均能抑制蛋白酶的活性。一些天然高分子蛋白质对胰蛋白酶也产生抑制作用, 如在胰脏和大豆中, 都含有相

当量的胰蛋白酶抑制物——胰蛋白酶抑制剂。

胰蛋白酶能催化蛋白质水解，对于由碱性氨基酸(如精氨酸、赖氨酸)的羧基所组成的肽键有着高度的特异性。胰蛋白酶不仅能够水解肽键，而且也能水解酰胺键和酯键。对其催化水解活性的敏感度为：酯键>酰胺键>肽键。因此，可用蛋白质(如酪蛋白)或人工合成的酰胺及酯类化合物为底物，用来测定胰蛋白酶活力。目前，常用苯甲酰-L-精氨酸对硝基苯胺(简称BAPA)和苯甲酰-L-精氨酸乙酯(简称BAEE)为底物测定酯酶活力。

BAEE在胰蛋白酶催化下水解，BA逐渐增多，用紫外吸收法测定BAEE，作为测定胰蛋白酶活性的专一性方法。

在制备胰蛋白酶过程中，往往混杂着与胰蛋白酶相近似的蛋白水解酶，如胰凝乳蛋白酶(糜蛋白酶)和弹性蛋白酶。由于三者物理化学性质和结构上均十分接近，利用一般常用的提取分离方法，很难将它们之间彼此彻底分开。为了获得高纯度的胰蛋白酶制品，采用亲和层析技术进一步纯化后，可达到十分满意的效果(参阅亲和层析实验中纯化胰蛋白酶部分)。

一、主要仪器、材料和试剂

1. 仪器

紫外分光光度计，恒温水浴，电动搅拌器，电动搅肉机或高速组织匀浆机，落地式离心机，显微镜，秒表。

2. 材料

新鲜猪胰脏，剪刀、镊子、搪瓷盘、乳钵，玻璃标本缸、大玻璃漏斗、抽滤瓶，塑料小桶、纱布、pH试纸，滤纸、玻璃器皿等。

3. 试剂及溶液配制

pH 2.5 乙酸酸化水，2.5mol/L H_2SO_4 溶液，2mol/L NaOH 溶液，5mol/L NaOH 溶液，0.1mol/L HCl 溶液，0.025mol/L HCl 溶液，0.001mol/L HCl 溶液，0.4mol/L pH9.0 硼酸缓冲液(用0.8mol/L 稀释一倍)，三羟甲基氨基甲烷(Tris)，N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE)，硫酸铵。

0.8mol/L pH9.0 硼酸缓冲液：取20mL 0.8mol/L 硼酸溶液，加80mL 0.2mol/L 四硼酸钠溶液，混合后用pH计校正。

二、操作步骤

1. 胰蛋白酶的制备

(1) 胰蛋白酶原的提取与分离：称取1—1.5kg 新鲜猪胰脏，在冰浴下剥除脂肪和结缔组织，在低温下用绞肉机绞碎胰脏(或用高速组织匀浆机捣碎)加1—2倍体积已预冷却的pH2.5—3.0 乙酸酸化水溶液提取(按1g组织相当于1ml体积计算，以后类推)。检查提取液中pH，若高于pH3.0时应及时用10%乙酸调节，使提取液维持在pH2.5—3.0之间。在冷室5℃左右搅拌提取18—24h，而后用4层纱布过滤，尽量拧挤出滤液，滤液呈乳白色，用约300mL pH2.5 乙酸酸化水再提取残渣一次(时间约为1—2h即可)，合并滤液。此时滤液pH值较高，可用5mol/L H_2SO_4 溶液调正pH至2.5—3.0，放置3—5h后，混浊滤液用折叠滤纸在冷室环境下，用玻璃漏斗进行自然过滤，滤液呈黄色透明液体，收集滤液，量其总体积，沉淀物弃去。

滤液体积约 3L, 加固体粉状硫酸铵进行盐析, 使溶液至 0.75 饱和度 (于 5℃ 条件下, 每升滤液加入 492g 硫酸铵), 加时一定要边加边搅拌, 防止局部产生过饱和现象。盐析溶液放冷室中过夜, 次日用 4000r/min 离心机离心, 或用布氏漏斗抽滤, 滤饼经压干后称重, 可得约 80g 胰蛋白酶原粗制品。

(2) 胰蛋白酶原的激活: 将胰蛋白酶原粗品用 10 倍体积的冷蒸馏水, 分多次加入使滤饼溶解, 溶液呈乳白色, 量其体积, 取出 1ml 溶液用于测定溶液中硫酸铵的含量 (约为滤饼重的 1/4)。此前测定溶液中硫酸铵的含量十分重要, 因为硫酸铵可以与活化剂钙离子结合, 生成硫酸钙, 如果钙离子过少会直接影响胰酶原的激活过程 (即按上述滤饼中含有的硫酸铵与钙结合生成 CaSO_4 之后, 尚保持 0.1mol/L CaCl_2 浓度的量计算)。将已研细的固体 CaCl_2 慢慢加入酶原溶液中, 边加边搅拌均匀。使其与硫酸铵结合后剩余的 CaCl_2 浓度为 0.1mol/L, 然后用 5mol/L NaOH 溶液调酶液 pH 至 8.0 (取出 0.5ml 溶液稀释约 200 倍, 待测定激活前胰蛋白酶活性)。

此时, 在酶溶液中加入约 5mg 结晶猪胰蛋白酶, 轻轻搅拌均匀, 置 5℃ 冰箱中使酶原活化。每隔 4—5h 取样 0.5ml 测定胰蛋白酶活性增长情况, 通常激活作用在 18—24h 内进行完全, 停止激活反应后, 留取 1ml 酶溶液待测定胰蛋白酶活力及蛋白质含量, 此样品溶液称为“激活后”的样品酶溶液, 一般比活性达到 3500—4000BAEE/mg 蛋白。

(3) 去除杂蛋白: 量取胰蛋白酶溶液体积后, 用 5mol/L 硫酸溶液调节滤液 pH 至 2.5—3.0, 抽滤除去硫酸钙沉淀, 滤液体积约 1000ml, 加入已研细的硫酸铵粉末, 使其溶液达 0.4 饱和度 (每升滤液加 242g 硫酸铵)。放置 5℃ 冰箱中 5—8h, 抽滤除去沉淀, 滤饼中含有大量胰凝乳蛋白酶和硫酸钙。

胰蛋白酶粗品滤液约 1000ml, 按每升滤液加入固体硫酸铵粉末 250g, 使其溶液达 0.75 饱和度, 放 5℃ 冰箱过夜, 次日抽滤收集沉淀压干后称重, 得粗品滤饼约 10—15g。

2. 胰蛋白酶结晶和重结晶

(1) 胰蛋白酶结晶

- 将上述胰蛋白酶滤饼, 用约 1—1.5 倍体积冷却的 0.4mol/L pH9.0 硼酸缓冲溶液, 分多次缓慢加入, 使滤饼全部溶解, 若有不溶杂质可以过滤除去。酶溶液用 2mol/L NaOH 调节 pH 至 8.0 (此时应特别注意准确, 小心! 偏酸不易结晶析出, 过碱则易丧失酶活)。

- 酶溶液放冰箱中数小时后, 可观察到絮状物沉淀出现于小烧杯中, 待有大量沉淀混浊物形成后, 再慢慢加入约 1/4—1/5 倍体积的 pH8.0 硼酸缓冲溶液, 使胶絮状沉淀更加分散。将溶液放至 5℃ 冰箱中静置 2—5 天, 可得到大量胰蛋白酶的结晶。静置期间应每天在显微镜下观察结晶出现的情况, 必要时可加少量胰蛋白酶结晶接种, 并经常核查酶溶液 pH 是否正确。通过显微镜可以看到许多细小呈棒状的结晶体, 其中还有呈矩形、六角形片状的结晶 (见图 1-1)。待结晶完全后, 以 3000r/min 离心或抽滤, 收集结晶, 称重约为 4—5g (此滤液经盐析后可回收少量胰蛋白酶)。

(2) 胰蛋白酶重结晶

- 用小于 1 倍体积的 0.025mol/L HCl 溶液, 使胰蛋白酶结晶分散开, 并全部溶解。此时溶液 pH 应为 2.5 (留取 0.2ml 酶样品待测定酶的活力及蛋白质浓度)。原液稀释倍数应以酶蛋白浓度及比活性大小而定, 一般约稀释 500—800 倍, 此样品液称为“第一次结晶”样品。

● 酶溶液用相当于结晶1—2倍体积的 0.8mol/L pH9.0 硼酸缓冲液调节 pH至8.0(应避免体积过大)。若此时 pH 小于 8.0, 可用少量 2mol/L NaOH 进行调节, 但pH一定要准确。溶液过稀时结晶很难析出。放冰箱中静置1—2天后, 可形成大量而又紧密的结晶体。在显微镜下观察其结晶形状仍为棒状结晶, 但要比第一次的结晶粗大, 偶而可以发现菱形晶体。第三次的结晶体亦为棒状结晶, 比第二次的结晶体要小些而又整齐, 并伴有菱形晶体出现(见图1-2)。抽滤收集结晶, 称重可得约为1—3g的胰蛋白酶结晶产品。可根据需要, 重复上述步骤进行多次重结晶。取胰蛋白酶结晶测定其比活性, 并计算产品总活性单位。

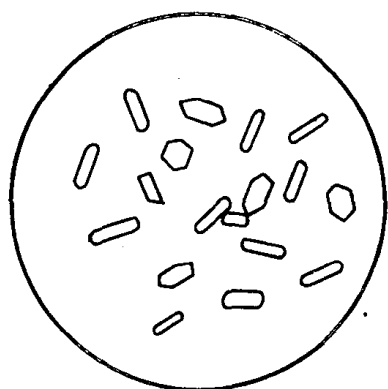


图1-1 猪胰蛋白酶第一次结晶 (×400)

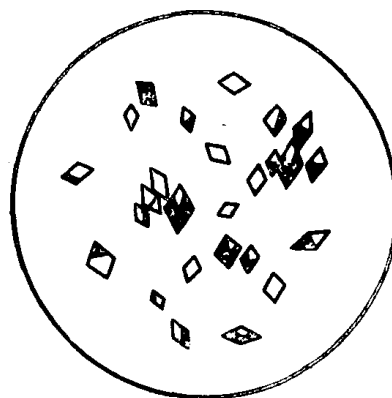


图1-2 猪胰蛋白酶第三次结晶 (×400)

3. 胰蛋白酶活性的测定

(1) 紫外吸收法测定酶溶液的蛋白质含量: 以波长 280nm 下的光吸收值乘以该蛋白质的消光系数的倒数, 即可计算出该蛋白质溶液的含(mg/ml)。用此法测定, 蛋白质含量在 10—100μg/ml 范围内, 符合 Beer 定律。

被测溶液中如含有 NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 以及较弱离子强度的磷酸、硼酸和三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 等, 均对此法无显著的干扰作用。用紫外吸收法操作简便、快速, 适合于在制备过程中监测分析时使用, 其仪器的灵敏度范围完全能满足监测的需要。

测定方法如下: 取待测酶溶液 0.1ml, 用 0.001mol/L HCl 稀释至适当浓度 (稀释倍数拟酶溶液浓度而定), 酶溶液蛋白质含量应为:

$$\text{蛋白质含量(mg 蛋白/ml)} = A_{280\text{nm}} \times 0.74 \times \text{稀释倍数}$$

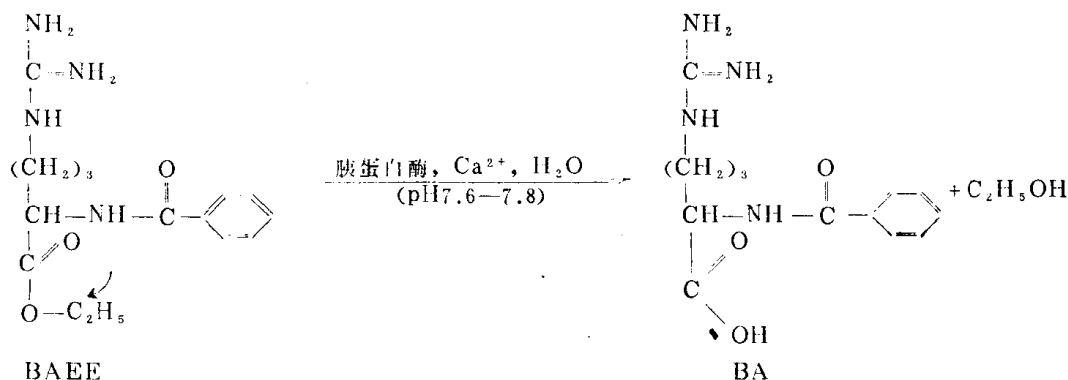
猪胰蛋白酶浓度为 0.1%, 即含量为 1mg/ml 时, 在 280nm 处的比消光系数为: $E_{280\text{nm}}^{1\text{cm}} = 1/0.74^*$ 。

(2) BAEE 测定胰蛋白酶活性: 胰蛋白酶能催化蛋白质的水解, 对于由碱性氨基酸 (如精氨酸、赖氨酸) 的羧基与其他氨基酸的氨基所组成的肽键具有高度的专一性。此外, 胰蛋白酶也能催化由碱性氨基酸的羧基所形成的酯键和酰胺键, 而其高度的专一性仍表现为对碱性氨基酸羧基一侧的选择。因此, 常利用这类人工合成的底物, 研究胰蛋白酶的专一催化活性。而且, 比通常用某些蛋白质底物来研究其活性更为可靠。

本法采用 N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯 [(BAEE) N-benzoyl-L-arginine ethyl ester] 作为底

* 在蛋白质浓度为 0.1%, 即含量为 1mg/ml 时: 猪胰蛋白酶的比消光系数 $E_{280\text{nm}}^{1\text{cm}} = 1/0.74$; 牛胰蛋白酶的比消光系数 $E_{280\text{nm}}^{1\text{cm}} = 1/0.585$; 牛胰蛋白酶的比消光系数 $E_{280\text{nm}}^{1\text{cm}} = 1/0.500$ 。

物，水解反应如下：



N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯(BAEE)在波长 253nm 下的紫外光吸收远远弱于 N-苯甲酰-L-精氨酸(BA)的紫外光吸收。在胰蛋白酶的催化下，随着酯键的水解，N-苯甲酰-L-精氨酸(BA, N-benzoyl-L-arginine)逐渐增多，而反应体系的紫外光吸收亦随之相应增加。据此可建立测定胰蛋白酶活性的专一方法。

胰蛋白酶的 BAEE 单位定义为：在下列试验条件下，引起每分钟光吸收值 $A_{253\text{nm}}$ 增加 0.001 的酶量，规定为 1 个 BAEE 单位。

(3) 测定酶溶液的配制

- 配 0.05mol/L pH3.0 Tris-HCl 缓冲溶液：取 50ml 0.1mol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)加 29.2ml 0.1mol/L HCl 加水定容至 100ml。

- 底物溶液的配制：即每 ml 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH8.0)中含有 0.34mg BAEE 和 22.2mg CaCl_2 。若配 50ml 0.05mol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液，加 111mg CaCl_2 ，加 17mg BAEE (相当于 1mmol BAEE)。

- 酶溶液的配制：将上述在制备胰蛋白酶流程中的含酶蛋白的原液，稀释 200 倍，要现用现配。稀释倍数以控制溶液的蛋白质含量为 10—20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 为宜，稀释液用 0.001mol/L HCl。

(4) 试验规定条件

测定容积 $V = 3.0\text{ml}$ ，比色杯光程 $d = 1.0\text{cm}$ ，波长 $\lambda = 253\text{nm}$ ，反应温度 $T = 25^\circ\text{C}$ ，底物溶液 2.80ml，酶溶液 0.20ml。

(5) 测定操作步骤

- 先将上述底物溶液置 25°C 恒温水浴中预热。
- 选择好两只测定酶活用比色杯，按表 1-1 顺序加入底物溶液。先调整好紫外分光光度计处于使用状态，再向样品比色杯中加入待测酶液，立刻加盖混匀，并开始记录时间，每隔 30s 读记一次光吸收值($A_{253\text{nm}}$)，持续读测 8—10 次，待 $A_{253\text{nm}}$ 增加值趋于平缓后，即可停止测定，计算出每分钟平均 $A_{253\text{nm}}$ 增加值 (只取增加直线部分)。

测定酶活时比色杯加样如表 1-1 所示。

● 测定结果计算

$$\text{样品胰蛋白酶 BAEE 活性单位} = \frac{\text{每分钟 } A_{253\text{nm}} \text{ 增加值}}{0.001}$$

由测得的活性单位数及按前所述方法测出的酶溶液蛋白质含量，即可进一步计算出胰蛋

表1-1 测酶活性加样表

试 剂 \ 比 色 杯	空白 (对照)	样 品
底物溶液/ml	2.80	2.80
酶溶液/ml	0.00	0.20
0.001mol/L HCl/ml	0.20	0.00

白酶的比活性 (活性单位数/mg 蛋白)。

$$\text{比活性} = \frac{\text{样品的胰蛋白酶活性单位数} \times 1000}{e}$$

式中, e 为测活时所用的酶蛋白量 (以 μg 计)。

三、实验结果与数据处理

为了及时检查在提取制备过程中胰蛋白酶活性的变化情况和纯化效果, 应将每次测定酶活数据进行整理和计算, 按表 1-2, 表 1-3 格式予以记录, 以供分析讨论用。

表1-2 激活过程酶活性变化表

测活时间 \ 项 目	总体积/ml	总蛋白质/mg	比活性 (BAEE 单位/mg 蛋白)	总活性* BAEE 单位	回收率/(%)
激活前					
第二次取样					
第三次取样					
⋮					
停止激活					

表1-3 结晶过程酶活性变化表

测活时间 \ 项 目	总体积/ml	总蛋白质/mg	比活性 (BAEE 单位/mg 蛋白)	总活性* BAEE 单位	回收率/(%)
停止激活 (即激活后)					
第一次结晶					
第二次结晶					
⋮					

* 总活性[BAEE] = 比活性 × 酶蛋白总 mg 数。

四、结果讨论和注意事项

胰蛋白酶结晶的制备及其活性的测定实验是酶类具有代表性的内容。尤其是酶活性测定

部分，是检查酶的纯度极其重要指标，酶的活性即酶的催化活力是表示它催化一定化学反应的能力。催化能力的大小是指在单位时间内催化底物反应的多少或产物生成的多少，即是催化反应的反应速度的大小。反应速度愈快，作用的底物或产物的生成量愈多，酶的活力也愈高。在一定酶量和反应条件下，将产物浓度对时间作图，如图 1-3 所示，反应速度是曲线的斜率。

从图中可以看出，反应速度只在最初一段时间内保持恒定，随着反应时间的延长，酶促反应速度逐渐下降，这其中的原因有多种因素，如底物浓度的降低，酶在一定 pH 及温度下失活，产物对酶的抑制，产物浓度的增加而加速了逆反应的进行等。因此，研究酶的活力应以酶促反应的初速度为准。由于在酶促反应中，底物用量常常是过量的，所以，用测定产物生成的量来表示酶促反应速度更为灵敏、准确。为了定量酶活，必须采用国际规定的活性单位来计算酶活。由于在制备酶的过程中，酶的粗品纯度差异较大，反映粗酶差异的办法是用单位蛋白质量的酶活性单位数表示，此为酶的“比活力”。显然，在酶的纯化过程中，虽然酶的总活性有所下降，但随着杂蛋白不断消除，而酶的比活力也愈来愈高。

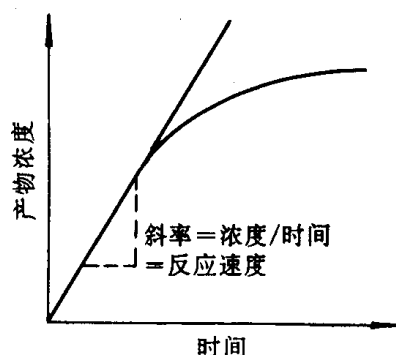


图1-3 酶促反应的速度曲线

本实验内容是北京大学生命科学学院生化及分子生物学系开设大实验课程以来，保留至今的实验之一。早先由牛胰脏中提取、制备结晶胰蛋白酶，后来由于牛胰脏原料来源困难，改用从猪胰脏中制备，该实验内容是经过历届任课教师不断总结和改进的工艺流程。

现将提取制备胰蛋白结晶酶和结晶条件的注意问题说明如下。

1. 制备过程应注意的几个问题

(1) 所用胰脏应是刚屠宰的新鲜组织，避免在室温条件下提取和贮存；不新鲜的胰脏会发生组织自溶和酶原被破坏，直接影响到产率，造成制备实验完全失败。

(2) 盐析时所用盐的饱和度，要严格掌握一致，适宜在温度比较恒定的条件下（冷室）进行分级盐析操作。盐析沉淀后，需在低温下静置若干时间，以沉淀出现分层为宜，沉淀时间放置过短，往往影响分离效果和产率。

(3) 酶原激活过程中，要每隔 4—5h 取样定时监测，观察酶活增长速度的变化。激活过程一般需 15—20h，即可达到完全。出现激活不完全，既有一部分酶原仍未被转化为酶；若激活过头（往往是由于时间拖得过久，或激活温度条件偏高等因素），则酶本身自溶，这些都会造成比活性降低的现象。

(4) 酶激活过程中，一定要严格控制反应的最适 pH 值在 7.8—8.0。如果出现激活反应拖得时间太长，尚未达到激活目的，此时应及时检查所规定的 pH 值是否合适。

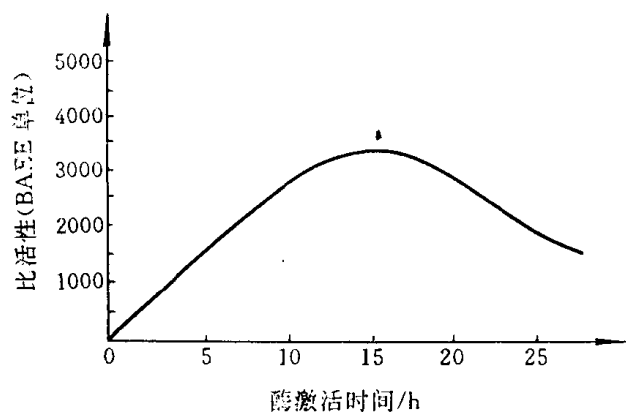


图1-4 在恒温条件下比活性与激活时间的关系

(5) 激活后的酶比活，一般达到3000—4000 BAEE/mg 蛋白时，应立刻用2.5mol/L H_2SO_4 调溶液pH至2.5—3.0，以停止激活反应，在恒温条件下，比活性与激活时间的关系如图1-4所示。

2. 胰蛋白酶在结晶过程中应注意的问题

大多数酶蛋白在特定的环境条件下，当达到一定纯度时，均具有在适当的溶液中形成晶体的能力。

由于蛋白质晶体是一种结构非常复杂，而又有构型多变的特殊现象，很容易受到外界因素的影响而引起构型的变化。因此，不同种类的酶蛋白对形成晶体所要求的环境条件相差很大。制备过程必须严格掌握控制各类不同酶蛋白的物化性质，才能得到所需的蛋白质晶体。

酶蛋白晶体为许多相同的酶蛋白分子在空间有规则地排列成格子状的周期性空间点阵结构。但蛋白质晶体由于分子量大、结构复杂，与一般无机化合物小分子和金属所形成的晶体比较，有着许多性质上的差异，诸如：蛋白质晶体空间点阵式周期低、含水量高和单位晶胞内分子数少等。蛋白质是一种亲水胶体，水分对形成和维持蛋白质晶体的构型具有极为重要的作用。蛋白质晶体含水量一般常高达10—15%，原肌球蛋白的长角片晶体中，含水量竟高达全重的90%。同一种蛋白质在不同条件下结晶时，可以形成不同含水量的晶体，其晶体形状和X射线衍射图谱也不一样。不同种的蛋白质晶体，除含水量差异外，与其肽链组成的性质有关，因而晶体形状也是有差异的。蛋白质在形成晶体过程中，因受到多种条件的影响，可使晶体中的构象重新组合，即在不同条件下，晶体的形成也会有变化。因此，在实验中必须严格、细心地控制提取、分离、纯化等各操作步骤，这是获得胰蛋白酶结晶最为主要的条件。

其次，当酶蛋白溶液的浓度处于过稀状态时，即出现了溶解大于沉淀的趋势，此时的酶蛋白溶液很难形成结晶；相反，酶蛋白溶液的浓度过大时，也会出现沉淀大于溶解现象；此时的晶形多为不规则形状，溶液中的杂质也同时被沉淀下来，影响产品的纯度。

再有，在培养胰蛋白酶结晶过程中，一定要使酶蛋白溶液处于“过饱和态”。酶蛋白的溶解又受pH、温度、盐离子浓度、试剂等因素的直接影响。一定要防止对酶蛋白进行“过酸”或“过碱”处理而导致变性和失活，甚至使酶蛋白的天然构象发生变化和解体。

总之，影响酶蛋白晶体的形成因素是多样的，在操作中一定要小心，谨慎！实验才会得到满意的结果。

思考题

1. 提取制备猪胰蛋白酶原的过程中，应特别注意哪些主要环节和影响因素？
2. pH在制备中起着什么作用？
3. 哪些因素是直接影响形成晶体的主要原因？应注意哪些条件？

4. 如何计算激活过程中, 胰蛋白酶比活的变化?
5. 在实验中, 利用什么办法提高产率和比活率?

答 案

1. 实验用胰脏一定要新鲜, 提取过程中应在 5°C 下进行操作。提取酶液所需 pH 值一定要准确, 应反复多次检查, 盐析时计算硫酸铵的饱和度是以当时提取环境的温度计算加入量。

2. 提取制备胰蛋白酶过程中, 调节 pH 是非常重要的环节, 应严格按操作步骤的要求进行。pH 值直接影响酶的活性、天然构象以及去杂蛋白或过滤的速度。

3. 影响晶体的形成因素很多, 其中最主要的是使酶溶液处于“过饱和态”的环境, 酶溶液“过稀”或“过浓”时均不会出现结晶。酶溶液的 pH 以及离子强度也是重要因素。在酶液结晶过程中应随时用显微镜观察形成晶体的情况。同时检查酶溶液的 pH 的变化。

4. 在实验过程中, 应按要求测定酶激活前后胰蛋白酶的比活变化, 计算时要注意测定过程中的稀释倍数及测定时所用的条件。

5. 提高产量, 应从每步操作中做起, 尤其是从滤液或滤瓶的上清液中回收残余部分。由于在操作过程中某些环节处理不当, 往往是所需的酶随着丢弃的部分而被倒掉。故需要加强每步操作的“监”测。

参 考 文 献

- [1] 张龙翔等《生化实验方法和技术》人民教育出版社, 169—175 页, 1982 年。
- [2] 戚正武等《生物化学及生物物理学报》3 191, 1963 年。
- [3] 吴克佐等《生物化学及生物物理学报》6 32, 1966 年。
- [4] Albert Light. Proteins Structure and Function, Chapter I (中译本) 高等教育出版社, 1984 年。
- [5] Rick, W., “Chymo trypsin”, “Trypsin”, Methods of Enzymatic Analysis, 800—802, 807—814, Bergmeyer, H.U. (Ed) Academic Press, New York and London, 1963.
- [6] Van Melle, P.J., Lewis, S.H., et al. Crystallization of Porcine trypsin, Enzymologia Acta Biocatalytica. 26, 133, 1963.
- [7] Walsh, K.A., Trypsinogens and trypsins of Various species. Methods in Enzymology, Vol XI X, 41—63, 1970.
- [8] 苏拔贤编《生物化学制备技术》科学出版社, 1—78, 222—233, 1986 年。
- [9] 张龙翔等《高级生物化学实验选编》高等教育出版社, 46—56, 1988 年。
- [10] 金长振著《酶学的理论与实际》北京科学技术出版社, 香港雪谷出版社, 8—21, 1989 年。

实验2 亲和层析法纯化胰蛋白酶

内 容 提 要

利用亲和层析(affinity of chromatography)技术纯化胰蛋白酶是一个综合性实验。首先从鸡卵清中分离胰蛋白酶的天然抑制剂——鸡卵粘蛋白,并以此为配基,偶联到琼脂糖凝胶(sepharose-4B)上,制成鸡卵粘蛋白的亲吸附剂,然后通过亲和层析方法从猪胰脏的粗提液中纯化猪胰蛋白酶。

本实验要求掌握亲和层析的原理和方法;凝胶层析和离子交换层析技术;酶活性测定方法和抑制活性测定的原理和方法。

原 理

亲和层析已经广泛应用于生物分子的分离和纯化,如结合蛋白、酶、抑制剂、抗原、抗体、激素、激素受体、糖蛋白、核酸及多醣类等;也可以用于分离细胞、细胞器、病毒等。近几十年来,亲和层析技术发展十分迅速。对于那些分离流程长、浓度低、杂质多、采用常规方法难以进行分离的生物分子来说,亲和层析技术就显示出其独特的优越性。亲和层析在分离、纯化的效率上可以说是最佳的方法。

亲和层析是由吸附层析发展起来的,主要是根据生物分子与特定的固相化配基(ligand)之间的亲和力而使生物分子得到分离的。所谓亲和力是指:范德华力、疏水力、静电力、氢键等,它存在于某些分子内部,也是维系着某些分子之间的结合力。酶与底物、酶与抑制剂、抗原与抗体、激素与激素受体等彼此分子之间的结合力就是亲和力。亲和力是很弱的,只有在彼此分子挨得很近的条件下才显示出来。所以要求两分子之间的结合具有高度特异的分子基础,即分子间的互补结构。利用这种具有亲和力的生物分子间可逆的结合和解离的原理发展起来的层析,就称之为亲和层析。它相对于建立在物理化学原理(如分子颗粒大小、分子带电荷状况等)的分离方法而言,可称为“生物专一吸附”的层析分离方法。在亲和层析过程中,被分离的生物分子在一定的条件下,有选择性地,即高度特异地被结合到共价偶联的不溶性载体的配基亲和吸附剂上,改变原有条件,如选用竞争性抑制剂、底物、辅助因子或采用不同pH的缓冲液、高浓度盐、变性剂等,又可有选择性地从亲和吸附剂上把被分离物质洗脱下来。通过亲和层析,被分离物质的纯度有时一次即可提高几倍、十几倍甚至几百倍。活性回收率也是非常高的。

亲和层析需要选择耐用的、非特异性吸附少的、水不溶性的载体,并可在温和条件下与配基共价偶联,而又不影响配基原有的生物学特性。最常用的载体是琼脂糖凝胶(Sepharese-4B)。它具有机械强度高,透性好,非特异性吸附少等优点。此外,用作载体的材料还可以有纤维素、葡聚糖凝胶、多孔硅胶、树脂等。但是它们都具有不同程度的非特异性吸附。目前

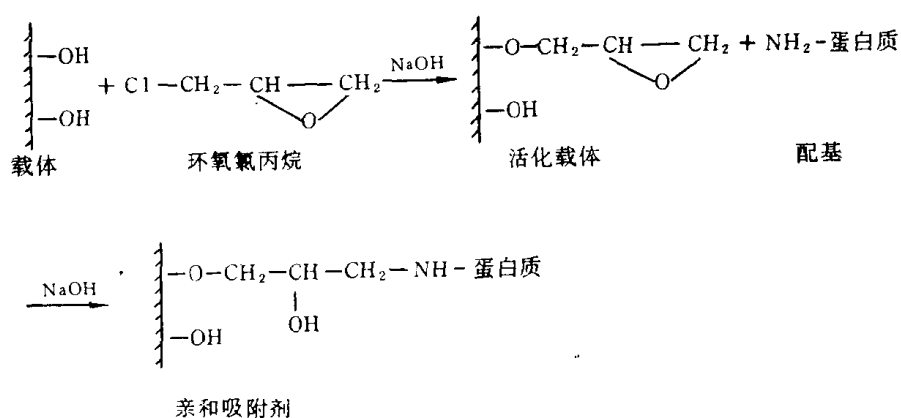
使用得并不多。

1967 年 Axen, Porath 和 Ernback 报道了采用溴化氰活化琼脂糖凝胶, 并把含有氨基的生物分子偶联到多糖基质上的方法。这从而把亲和层析技术向前推进了一步。

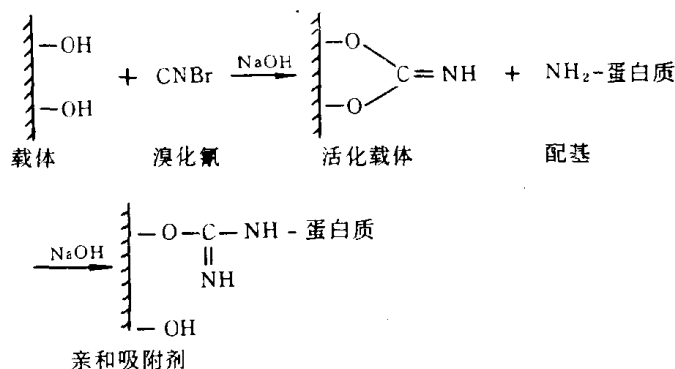
溴化氰活化载体是目前用得最多、效果最好的活化方法。但是, 由于溴化氰容易分解, 在贮藏和使用过程中产生少量有剧毒的氢氰酸及溴。因此, 在操作时要戴防毒器具, 并要求在通风橱内进行实验。

1967 年 Porath 又报道了应用无毒性的环氧氯丙烷在碱性条件下活化载体的方法, 解决了在无通风橱的普通实验室里进行载体活化的难题, 使亲和层析技术得到更加广泛的应用。除了这两种活化剂外, 其他的活化剂还有戊二醛、1,4-丁二酐等。载体的活化及蛋白质配基偶联的反应式如下:

1. 环氧氯丙烷活化载体与蛋白质配基的偶联



2. 溴化氰活化载体与蛋白质配基偶联



上述反应, 活化的载体除了能与氨基发生偶联外, 还能与巯基发生偶联。

3. 活化载体“接臂”

在亲和层析过程中, 如果以一个小分子作为配基(如有机胺类), 而被分离物质又是一个大分子, 二者在结合过程中就会受到空间阻碍, 影响结合。因此, 必须在载体和配基之间连接一段有机小分子, 称之为“手臂”, 使载体上的配基向外延伸以增强配基和被分离物质之间的接触面, 减少空间阻碍, 提高亲和层析的结合效率。合成这种亲和吸附剂要经过载体活化、连接“手臂”、“手臂”活化及配基偶联等步骤。

本实验采用的是猪胰蛋白酶的天然抑制剂——鸡卵粘蛋白作为配基的。鸡卵类粘蛋白是一种特异性胰蛋白酶抑制剂，对猪和牛的胰蛋白酶有很强的抑制作用，但对糜蛋白酶无抑制作用。在 pH 7.6—8.0 的范围内，猪或牛胰蛋白酶能牢固地吸附在鸡卵粘蛋白亲和吸附剂上，在 pH 2.5—3.0 的条件下，又能从鸡卵粘蛋白亲和吸附剂上洗脱下来。因此，采用鸡卵粘蛋白为配基合成的亲和吸附剂，可从猪胰脏的粗提取液中，通过亲和层析直接获得高纯度的猪胰蛋白酶，比活可以达到 $(1.5-2.0) \times 10^4$ BAEE 单位/mg，相当于 5 次重结晶的胰蛋白酶的纯度，纯化效率可达 10—20 倍以上。

一、主要仪器，材料和试剂

1. 仪器

恒温水浴，规格(25—100℃)，751-GW 紫外分光光度计，核酸蛋白质紫外检测仪，pH 酸度计，组织捣碎机，离心机，透析袋，层析柱($\phi 35 \times 300$ mm, $\phi 35 \times 200$ mm, $\phi 10 \times 150$ mm)，尼龙网(200目)，离心杯(50ml)，抽滤瓶(500ml)，布氏漏斗(80mm)，玻璃烧结漏斗(G-3)。

2. 材料

鸡卵清，新鲜猪胰脏，琼脂糖凝胶(sepharose-4B)，葡聚糖凝胶(sephadex G-25)，DEAE-纤维素(DE-32)。

3. 试剂及溶液配制

0.02 mol/L, pH 6.5 磷酸缓冲液，0.5 mol/L NaOH—0.5 mol/L NaCl 混合液，0.5 mol/L NaCl—0.02 mol/L, pH 6.5 磷酸缓冲液，0.5 mol/L HCl，0.2 mol/L, pH 9.5 Na_2CO_3 缓冲液，56% 1,4-二氧六环(V/V)，环氧氯丙烷。

亲和柱平衡液：0.5 mol/L KCl—0.05 mol/L CaCl_2 —0.1 mol/L, pH 7.8 Tris-HCl 缓冲液。

(1) 亲和柱洗脱液：0.5 mol/L KCl—0.1 mol/L, pH 2.5 甲酸溶液。

(2) 标准胰蛋白酶溶液(mg/ml)：用 0.001 mol/L HCl 配制。

(3) BAEE 底物缓冲溶液：0.05 mol/L CaCl_2 —0.05 mol/L, pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液。

(4) 2 mmol/L BAEE 底物溶液：称 68mg BAEE，用 BAEE 底物缓冲液定容至 100ml，临用前配制。

(5) 10% pH 1.15 三氯乙酸溶液：称 10g 三氯乙酸加入 70ml 蒸馏水溶解，用 5 mol/L NaOH 调至 pH 1.15(在 pH 酸度计上调节)，然后加水至 100 ml，放置 4h 以后，再检查一次 pH。

(6) pH 2.5—3.0 乙酸酸化水：取 200 ml 蒸馏水，用 36% 乙酸调至 pH 2.5—3.0。

二、操作步骤

1. 鸡卵粘蛋白的制备

鸡卵粘蛋白是一种糖蛋白，存在于鸡卵清中。它在中性及偏酸性溶液中对热、高浓度脲、有机溶剂(如丙酮)等均有较高的耐受性；在碱性条件下有易变性；在 50% 丙酮或者 10% 三氯乙酸溶液中仍然有较好的溶解度。因此选择合适的 pH 值、丙酮或三氯乙酸的浓度，可从鸡卵清中除去大量的非鸡卵粘蛋白，从而获得较高纯度的鸡卵粘蛋白。鸡卵粘蛋白的分子是由 4 个亚基组成的，它们的氨基酸组成和对胰蛋白酶抑制的生物学活性没有多大差异，但是在糖蛋白的糖基部分(主要是 D-甘露糖，D-半乳糖，葡萄糖和唾液酸)的含量上有一定的差