

生物化学实验

(供医学本科生用)

江 汉 大 学
医学与生命科学学院
生化教研室
二〇〇一年九月

目 录

一、实验须知	(1)
二、实验报告的书写	(1)
三、分光光度法	(2)
四、色谱分析法	(5)
五、电泳技术	(8)
实验一、蛋白质的含量测定—Folin—酚试剂法	(12)
实验二、血红蛋白与核黄素的凝胶柱色谱分离	(14)
实验三、酶的竞争性抑制作用	(16)
实验四、过氧化氢酶 K_m 值的测定	(18)
实验五、血浆高密度脂蛋白—胆固醇含量的测定(肝素 —Mn 法)	(20)
实验六、酶法测定血清总胆固醇	(22)
实验七、血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳	(23)
实验八、血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶垂直板状电泳	(25)
实验九、DNA 含量的测定	(27)
实验十、RNA 含量的测定	(29)
实验十一、小量制备质粒 DNA	(31)
实验十二、PCR 定性测定——人乙型肝炎病毒(HBV) 的检测	(33)

实验须知

一、实验目的

- 1、进行生物化学基本技能的训练。
- 2、验证部分基本理论。
- 3、培养科学思维方法以及独立分析问题和解决问题的能力。

二、实验要求

- 1、课前预习,明确实验目的。
- 2、严格操作规程、动手动脑做好实验。
- 3、如实记录实验数据与结果,写好实验报告,交教师批阅。

三、试剂使用

- 1、仔细辨认标签,确定所需试剂及浓度。
- 2、吸量管与所需试剂瓶号码务必对准。
- 3、用后盖好瓶塞(切勿张冠李戴)归还原处,以免影响他人使用。

四、实验室规则

- 1、穿工作服进入实验室,不迟到、不早退。
- 2、不高声说话,严禁用器械及动物开玩笑。
- 3、严格按操作规程使用仪器,凡不熟悉操作方法的仪器不得随意动用。
- 4、节约试剂,节约水电。
- 5、实验完毕,洗净所用器材,固体废弃物(如用过的滤纸、电泳用凝胶条等)切勿倒入水槽内,以免堵塞!
- 6、值日生负责实验室卫生,倒尽垃圾,关好水、电、门窗,经教师检查后方可离开。

实验报告的书写

实验是理论指导下的科学实践,对培养科学思维、分析判断和解决实际问题的能力是很好的训练。为了做到心中有数,实验前要将有关实验内容及理论依据进行预习。

实验中应一丝不苟,培养自己严谨的科学作风。对实验的结果、现象和数据,应毫不虚假的记录之,字迹要清楚、整洁。

实验完毕则应书写实验报告,其内容应包括下列项目:

- 1、实验日期及实验名称。
- 2、扼要叙述实验原理及目的要求,用自己的语言表达,不能照抄。
- 3、操作步骤要简明扼要,或用箭头表示,尽量设计一定的表格填写,使人一目了然。
- 4、实验结果、现象、数据进行记录、计算,并分析讨论,如标准曲线等则要绘制成图。

分光光度法

分光光度法(Spectrophotometry)是根据物质对不同波长的光波具有选择性吸收的特性(即可产生吸收光谱)而建立起来的一种定量、定性分析的方法,又称为吸收光谱法。

可见、紫外分光光度法(Visible and ultraviolet spectrophotometry)是根据物质对200~700nm光区电磁辐射的吸收特性进行分析的方法。其特点是:

1、灵敏度高,可达 $10^{-4} \sim 10^{-7}$ g/ml。

2、选择性较强。

3、准确度较高。

4、仪器简单,易于操作。

一、原理

(一)光的基本性质

1、光是一种电磁波(或电磁辐射),同时具有波动性和微粒性。描述波动性的重要参数是波长 λ 和频率 ν ,它们和光速 C 的关系是:

$$\lambda = \frac{C}{\nu}$$

光是带有能量的微粒流。这种微粒称为光子或量子。单个光子的能量 E 决定于光的频率或波长。

$$E = h\nu = h \frac{C}{\lambda}$$

其中 h 为普朗克常数(6.626×10^{-34} J·S)。

2、电磁波谱图

可按波长由短及长地将各种电磁波划分成不同的区带,形成相应的电磁波谱图,即

γ 射线—X射线—真空紫外—近紫外—可见光—近红外—远红外—无线电波

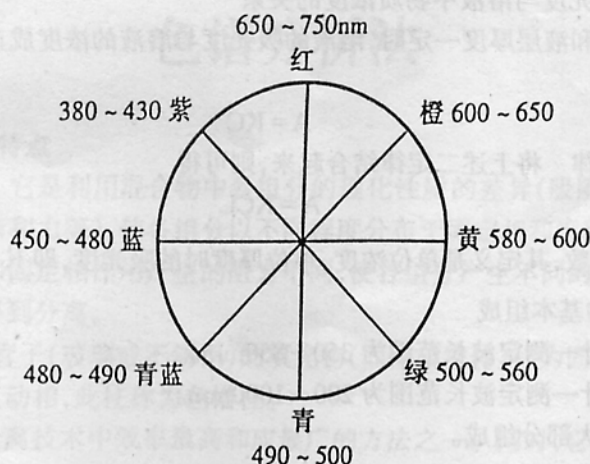
其中人眼能产生颜色感觉的光称为可见光,其波长范围是380~760nm;近紫外光的波长范围是200~380nm。

理论上,将具有某一波长的光称为单色光,单色光由具有相同能量的光子所组成。由不同波长的光组成的光称为复合光,如日光是由七色光组成的一种白光。

(二)物质的颜色和对光的选择性吸收

颜色是物质对不同波长光的吸收特性在人视觉上所产生的反映。溶液呈现不同的颜色是由于溶液中的质点对不同波长的光具有选择性吸收而引起的。

溶液的颜色就是透射光的颜色(或被吸收色光的互补色)。被吸收的色光和透射过去的色光称为互补色光。物质呈现的颜色与吸收波长的关系如图:



(三)吸收光谱

1、吸收光谱的定义 当依次将各种波长的单色光通过一有色溶液,测量每一波长下有色溶液对该波长的吸收程度(吸光度 A),然后以波长(λ)为横座标, A 值为纵座标作图,得到一条 $A-\lambda$ 曲线,称为该溶液的吸收曲线,亦称吸收光谱。

在吸收曲线上的峰称吸收峰,其对应波长称最大吸收波长($\lambda_{\max}$)。

2、吸收光谱的产生 不同的物质由于其化学组成与结构不同,对光的吸收性质也不同,表现出所谓选择性吸收。

物质本身的分子、原子及价电子都处在一定能级的运动状态,当物质吸收了光的辐射能以后会发生能级的跃迁,产生吸收光谱。

物质对光的吸收具有量子化特征,即分子只能吸收恰好是二个能级之差的能量(ΔE)

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu = h \frac{C}{\lambda}$$

分子吸收光谱 { 紫外—可见吸收光谱(电子光谱)
红外吸收光谱(原子振动能级跃迁)
远红外吸收光谱(分子转动能级跃迁)

二、物质对光吸收的定量定律—Lambert - Beer 定律

可见/紫外吸收光谱的最主要用途是在定量分析方面,其定量基础是 Lambert - Beer 定律。

1、透光度($T\%$)当一束平行的单色光通过一浓度为 C ,液层厚度为 L 的溶液时,该溶液将对此入射光进行吸收,使透过的光强减弱

$$T(\%) = \frac{I_t}{I_0} \text{ (其中 } I_t < I_0 \text{)}$$

溶液的透光度与吸光度呈负相关。

2、朗伯定律—吸光度与液层厚度的关系

吸光度(A)的定义是透光度(T)的负对数,

$$\text{即 } A = \lg \frac{I_0}{I_t} = \lg \frac{1}{T} = -\lg T$$

当入射光的波长和溶液的浓度一定时,溶液的吸光度与液层厚度成正比,这种关系称为朗伯定律: $A=KL$ (其中 K 为吸光系数)

3、比尔定律—吸光度与溶液中物质浓度的关系

当 λ 射光的波长和液层厚度一定时,溶液的吸光度与溶液的浓度成正比,这种关系称为比尔定律:

$$A = KC$$

4、朗伯—比尔定律 将上述二定律结合起来,则可得

$$A = KCL$$

其中K为吸光系数,其定义是单位浓度,单位厚度时的吸光度,即 $K = \frac{A}{CL}$

三、分光光度计的基本组成

721 型分光光度计—测定波长范围为 350~850nm。

751 型分光光度计—测定波长范围为 200~1000nm。

分光光度计由五大部分组成。

1、光源

2、单色器

3、吸收池

4、检测器(光电转换元件)

5、显示仪表或记录仪

四、定量分析方法

依据朗伯—比尔定律,在固定波长下测定物质溶液的吸光度,进行定量分析,一般采用以下方法:

1、标准曲线法(工作曲线法)

先配制一系列已知不同浓度的标准溶液,按测定管同样操作方法处理显色,在最大吸收波长光线下,分别读取各管的吸光度。然后以各管A值为纵座标,标准物浓度为横座标,在方格坐标纸上作图即得标准曲线(A—C曲线)。以后对未知浓度样品测定时,无需再作标准管,据测定管A值在标准曲线上找出相应的C值,即为样品溶液的浓度。

标准曲线法的优点是:

(1)、简化重复操作(样品的直接定量)。

(2)、检定所用方法是否符合朗伯—比尔定律。

(3)、确定被测样品的最大浓度范围。

2、对比法

将标准与样品分别在相同条件下显色,测定其吸光度,因是相同物质在相同条件下测定,故可按式计算出样品的浓度。

$$\frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} = \frac{KC_{\text{样}}L}{KC_{\text{标}}L}$$

则: $C_{\text{样}} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \cdot C_{\text{标}}$ (理论公式)

实用公式为:

$$C_{\text{样}} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \cdot C_{\text{标}} \cdot V_{\text{标}} \cdot \frac{100 \text{ 或 } 1000}{V_{\text{样}}} \times \text{样品稀释倍数}$$

色谱分析法

一、色谱法的概念和特点

色谱法又称层析法。它是利用混合物中各组分的理化性质的差异(吸附力、溶解度、分子形状和大小、分子极性、分子亲和力等),使各组分以不同程度分布于固定相和流动相中。由于各组分受流动相作用产生的推动和固定相作用产生的阻力不同,使各组分产生不同的移动速度,使得结构上只有微小差异的各组分得到分离。

在色谱法中,固定在管子(玻璃或不锈钢)的填充物(固体或液体)称为固定相,沿固定相流动的流体(气体或液体)称为流动相,此柱称为色谱柱。

色谱法是目前各种分离技术中效率最高和应最广的方法之一。同时,它又能进行精确的定性、定量分析。在色谱分析中,通常是根据色谱峰的位置来进行定性分析,根据色谱峰的面积或高度进行定量分析。

色谱法的特点:

1、分离效能高:它能够很好地分离理化性质极为相似的混合物,如同系物、同分异构体,甚至同位素,这是经典的物理化学分离方法不易达到的。

2、灵敏度高:可检测 10^{-11} — 10^{-13} g 的物质,适于作痕量分析。所需样品量极少,一般以 μg 计,有时仅以 ng 计。

3、分析速度快:一般只需几分钟或几十分钟便可完成一个试样的分析。

4、操作简便、应用广泛:色谱法几乎能分析所有的化学物质。

目前,成套的色谱仪有很多,它们大多具有高度自动化能力。

色谱法的缺点:对未知物的结构分析比较困难。如果没有待测物的纯品或相应的色谱定性数据相对照,则很难从色谱峰给出定性结果。

二、色谱法的基本原理:

关于色谱法的基本理论主要有两个:(1)塔板理论。(2)速率理论。其中前者是基础。限于篇幅,我们这里只讨论塔板理论。

在讨论塔板理论之前,先谈谈什么是分配系数。

分配系数 K :

分配系数是指在一定的温度和压力下,当分配体系达到平衡时,组分在固定相中的浓度 C_s 与在流动相中的浓度 C_m 之比为一常数。此常数称为分配系数 K ,即

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

K 值的大小表明被分离的组分与固定相分子间作用力的大小。 K 值小的组分在柱中滞留的时间短,较早地流出色谱柱;反之, K 值大的组分在柱中滞留的时间长,则较迟地流出色谱柱。因此,不同组分的分配系数相差越大,越容易实现分离。

塔板理论:

这一理论是从平衡的观点来研究组分分离过程,由詹姆斯(James)和马丁(Martin)于 1941 年最先提出。他们将一根色谱柱比作一个精馏塔,柱内由一系列设想的塔板组成,把色谱柱分成许多小段。在每一小段内,一部分空间为固定相占据,另一部分空间为流动相占据。这样一个小段称作

一个理论塔板。混合物组分随着流动相进入色谱柱后,在每块理论塔板高度间隔内很快地在两相间达成分配平衡,然后随着流动相按一块一块塔板的方式向前移动。经过多次分配平衡,分配系数小的组分先离开精馏塔,分配系数大的组分后离开精馏塔。

色谱分离的过程,实质上是各组分反复多次在两相中不断分配平衡的过程,故塔板理论也称作平衡理论。

有关塔板理论的进一步知识,如各种公式及计算是比较复杂的,这里我们不再提及。下面我们仅举一简单例子,以有助于对塔板理论的理解。

例:

设某一混合物溶液中含氨基酸 A 和氨基酸 B。氨基酸 A 的分配比(分配系数)为 1:1;氨基酸 B 的分配比(分配系数为 1:3),这两氨基酸的浓度均设为 1,它们在二相中的分配情况分别如下表:)

第一次分配之后

A	
固	移
1/2	1/2

B	
固	移
1/4	3/4

第二次分配之后

A	
固	移
1/4	1/4
1/4	1/4

B	
固	移
3/16	9/16
1/16	3/16

第三次分配之后

A	
固	移
1/8	1/8
2/8	2/8
1/8	1/8

B	
固	移
9/64	9/64
6/64	18/64
1/64	3/64

经过三次分配以后可以看出,氨基酸 A 在第二层浓度最大,氨基酸 B 在第三层浓度最大。可以推想,经过多次分配平衡后,氨基酸 A 和 B 将集中在不同的二点上,也即是将它们分离开了。同时,其余部位上的浓度也将接近于零。这里仅仅谈的是三个塔板,而一般的色谱柱少则也有几十上百个塔板,多则如高效液相色谱柱的有效理论塔板往往有 5000—10000 个,而实际柱长仅 0.3 米。因此,色谱法能分离理化性质极为相近的混合物就不难理解了。

三、色谱法的分类:

色谱法的种类很多,分类方法也多种多样,一般可按下述方法分类:

1、按两相所处的状态分类:

按流动相的状态可分为气相色谱法和液相色谱法。

按固定相状态的不同,气相色谱法又可分为气——固相色谱法和气——液相色谱法;液相色谱法也可分为液——固相色谱法和液——液相色谱法。

2、按色谱的原理分类:

(1)吸附色谱法:利用不同组分在吸附剂(固定相)上物理吸附性能不同而得以分离。

(2)分配色谱法:利用不同组分在两相中有不同的分配系数而达到分离。

(3)离子交换色谱法:利用不同组分在离子交换剂(固定剂)上的亲和力大小不同而达到分离。

(4)凝胶色谱法:利用不同组分分子的大小不同,在多孔性物质中受阻滞的程度不同而分离。又称分子筛色谱法。

(5)亲和色谱法:利用不同组分的与固定相的亲和力(如受体与其专一性配体)不同而达到分离。

3、按操作形式不同分类:

(1)柱色谱法:将固定相装在柱内。

(2)平板色谱法:又可分为纸色谱法和薄层色谱法。前者是用多孔滤纸作固定相,后者是将吸附剂涂铺在玻璃板或塑料板上作固定相。

根据以上分类,将各类色谱法列如下表:

色 谱 法	气相色谱	气相吸附色谱	
		气相分配色谱	
	液相色谱	液相吸附色谱	柱色谱
			薄层色谱
		液相分配色谱	纸色谱
			柱色谱
			薄层色谱
		离子交换色谱	
		凝胶色谱	
		亲和色谱	
		高压液相色谱	

电泳技术

电泳技术是利用带电粒子在电场中向自身所带电荷的相反电极一方移动的现象而设计的分离技术。

一、历史回顾

电泳现象早在 1809 年已被发现,但其实际应用却萌芽于约一百年之后。1907 年 C.W.Field 和 O.Teague 进行了白喉毒素的琼脂电泳。又过了三十年,1937 年瑞典科学家 Tiselius 制成了界面电泳仪,使自由界面电泳的技术达到了很高的精度,成为蛋白质类物质研究的重要工具。由于界面电泳仪构造复杂,价格昂贵,难于普遍使用,发展受到限制。至 1950 年,以滤纸为支持物的区带电泳首次介绍以来,由于设备简单,操作方便,性能良好而受到欢迎。此后,区带电泳发展迅速,广泛应用于蛋白质、氨基酸、核酸等的分离。

二、电泳的分类

(一)按分离的原理区分

可分为区带电泳、移界电泳、等速电泳和等电聚焦电泳。

1、区带电泳

不同的离子成分在均一的缓冲液系统中分离成独立的区带,可以用染色等方法显示出来,这是生物科学中应用最广泛的电泳技术。

2、移界电泳

是 Tiselius 最早建立的电泳,它是在 U 形管中进行的,由于分离效果较差,已为其它电泳技术所取代。

3、等速电泳

需专用电泳仪,当电泳达到平衡后,各区带相随,分成清晰的界面,以等速移动。

4、等电聚焦电泳

由多种具有不同等电点的载体两性电解质,在电场中自动形成 PH 梯度,使被分离物质移动至各自等电点的 PH 处聚成很窄的区带,分辨率很高,从表面看与区带电泳相似,但原理不同。

(二)按有无固体支持物区分

根据电泳是在溶液还是在固体支持物中进行,可分为自由电泳和支持物电泳两大类。

1、自由电泳

自由电泳又可分为:①显微电泳(也称细胞电泳),是在显微镜下观察细胞或细菌的电泳行为;②移界电泳;③柱电泳,是在层析柱中进行,可利用密度梯度的差别使分离的区带不再混合,如再配合 PH 梯度,则为等电聚焦;④自由流动幕电泳;⑤等速电泳。

2、支持物电泳

有支持物的电泳是多种多样的。电泳过程可以是连续的或是不连续的,支持物可用滤纸、醋酸纤维薄膜、纤维素粉、淀粉、玻璃粉、凝胶颗粒等。电泳槽可以是水平的、直立的小管或毛细管、柱、平板等。

三、电泳的基本原理

(一)电荷的来源

蛋白质或其它多电解质则由其本身所具有的功能团的解离而带电。蛋白质具有正负两类解离

基团,故称为两性电解质,在一定的 PH 条件下就会解离而带电。带电的性质和多少取决于蛋白质分子的性质及溶液的 PH 值和离子强度。在某一 PH 条件下,蛋白质分子所带的正电荷数恰好等于负电荷数,即净电荷等于零,此时蛋白质点在电场中不移动,溶液的这一 PH 值,称为该蛋白质的等电点(isoelectric point, PI)。如果溶液的 PH 大于 PI,则蛋白质分子会解离出 H^+ 而带负电,此时蛋白质分子在电场中向正极移动。

(二)迁移率

设一带电粒子在电场中所受到的力为 F , F 的大小决定于带电荷 Q 的多少及电场强度力 X 的大小,即:

$$F = QX$$

又按 stoke 定律,一球形粒子运动时所受到的阻力 F' ,与粒子运动的速度 V ,粒子的半径 γ ,介质的粘度 η 的关系为:

$$F' = 6\pi\gamma\eta V$$

当电泳达到平衡,带电粒子在电场作匀速运动时,则:

$$F = F'$$

$$\text{亦即: } QX = 6\pi\gamma\eta V$$

$$\text{移项得: } \frac{V}{X} = \frac{Q}{6\pi\gamma\eta} \quad (1)$$

$\frac{V}{X}$ 表示单位电场强度时粒子运动的速度,称为迁移率(mobility),也称泳动度,以 U 表示:

$$U = \frac{V}{X} = \frac{Q}{6\pi\gamma\eta} \quad (2)$$

由式(2)可见粒子的迁移率在一定条件下决定于粒子本身的性质,即该粒子所带电荷多少及粒子的大小和形状。

粒子泳动速度 V 为单位时间 t (以秒计)内移动的距离 d (以厘米),即:

$$V = \frac{d}{t}$$

电场强度 X 为单位距离 l (以厘米计)内的电势差 E (以伏特计),即:

$$X = \frac{E}{l}$$

以 $B = d/t$, $X = E/l$ 代入(2)式即得:

$$U = \frac{V}{X} = \frac{d/t}{E/l} = \frac{dl}{Et}$$

所以迁移率的单位为厘米²,秒⁻¹,伏特⁻¹。

如有两种以上的带电质点在同一电场中电泳彼此分离的情况,可由泳动距离的差值来判断。

例如 A、B 两种带电质点,其移动的距离分别为 d_A 和 d_B ,代入上式:

$$d_A = U_A \frac{Et}{l}$$

$$d_B = U_B \frac{Et}{l}$$

则:A、B 两物质移动距离之差为:

$$\Delta d = (d_A - d_B) = (U_A - U_B) \frac{Et}{l} \quad (3)$$

(3)式指出 A、B 两物质能否分离决定于两者的迁移率,如两者的迁移率相同,则不能分离,如有差别则能分离。利用各种带电质点的不同迁移率达到分离的效果。

四、影响电泳速度的因素

电泳速度是指单位时间内的移动距离(d/t),它可受到多种因素的影响。

(一)样品

被分离物的带电荷量多少和电泳速度的关系成正比。带电荷量多,电泳速度快,反之则慢。被分离的物质若带电量相同,分子量大的电泳速度慢,分子量小的则电泳速度快。球形分子比纤维状的快。

(二)电场强度

电场强度是指电泳支持物上每 1cm 的电位降,亦即电势梯度,例如支持物为纸时,纸的两端分别浸入两个电极溶液中,电极液与纸的交界面间纸的长度为 20cm,测得电位降为 200V,则纸上电场强度为 10V/cm,电场强度愈高,带电质点移动速度也愈快。根据电场强度的大小,可将电泳技术分为常压电泳(100~500V),高压电泳(500~1000V)。前者电场强度一般为 2~20V/cm,后者为 20~100V/cm。常压纸上电泳则多用于分离氨基酸,多肽、核苷酸等电荷量较小的小分子物质。

(三)缓冲溶液的 PH

溶液的 PH 值是决定物质带电质点解离程度即该物质带净电荷多少的决定因素。对蛋白质、氨基酸等两性电解质来说,缓冲液的 PH 距等电点(PI)越远,质点所带净电荷越多,电泳速度也越快;反之则越慢。当分离蛋白质混合液时,应选择合适的 PH 值,以保证各种蛋白质所带的电荷量适当,以达到最佳的分辨率。为了使电泳过程中溶液的 PH 值恒定,必须使用缓冲溶液。

(四)缓冲溶液的离子强度

电泳缓冲液中的离子强度增加时会降低带电质点的带电量,使电泳速度减慢。原因是带电的粒子会吸引相反符号的离子聚集在其周围,形成一个与运动粒子符号相反的离子氛(ionic atmosphere),它使该粒子向相反的方向运动,从而降低了该粒子的泳动速度。离子的这种阻碍效应是与其浓度和价数相关的。用离子强度(ionic strength)来表示,它的数值如下式:

$$\text{离子强度} = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$$

式中 S 表示共有 S 种离子, C_i 和 Z_i 分别代表每种离子的浓度(mol/L)和价数,价数愈高的离子,离子强度愈高。

例 1:求 0.2MNaCl 溶液的离子强度

$$\begin{aligned}\text{离子强度} &= \frac{1}{2} (0.2 \times 1^2 + 0.2 \times 1^2) \\ &= \frac{1}{2} (0.2 + 0.2) \\ &= 0.2\end{aligned}$$

例 2:求 0.1MZnSO₄ 溶液的离子强度

$$\begin{aligned}\text{离子强度} &= \frac{1}{2} (0.1 \times 2^2 + 0.1 \times 2^2) \\ &= \frac{1}{2} (0.4 + 0.4) \\ &= 0.4\end{aligned}$$

上述例子可以看出多价离子会使离子强度增高,电泳缓冲液常用单价离子的化合物配制。

一般电泳通常选用离子强度等于 0.02~0.2 间的缓冲液。

(五)支持介质

对支持介质的要求是应具惰性较大的材料,且不与被分离的样品或缓冲液起化学反应。此外,

还要求具有一定的坚韧性,不易断裂,容易保存。

1、吸附

支持物对样品具有吸附作用,就会使样品滞留,造成拖尾现象,样品不能形成一条清晰的带,从而使分辨率降低。滤纸的吸附作用最大,醋酸纤维薄膜的吸附作用较小。

2、电渗

在电场中液体对固体的相对移动称当电渗。它是由缓冲液的水分子和支持介质的表面之间所产生的一种电荷所引起。水是极性分子,如滤纸中含有羟基使表面带负电荷,与表面接触的水溶液则带正电荷,溶液向负极移动。由于电渗现象与电泳同时存在,所以电泳时被分离物质的电泳速度也受电渗的影响。如被分离的物质移向负极的,则泳动的速度加快,反之,则泳动速度降低。所以,电泳时颗粒的泳动速度取决于颗粒本身的泳动速度和缓冲液的电渗作用。

实验一 蛋白质的定量测定—— Folin—酚试剂法

蛋白质的定量是生物化学和其它生物科学,食品检验等涉及的分析内容,是临床上诊断疾病及检查康复情况的重要指标,也是许多生物制品和药物分离,提纯及质量检测中最常用的手段。目前测定蛋白质含量的方法很多,各有其特点,本次实验只介绍 Folin—酚试剂法测定蛋白质。此法的特点是灵敏度高,较紫外法高一个数量级,较双缩脲法高两个数量级。不足之处在于操作较麻烦,干扰因素较多。

一、原理

蛋白质中含有酚基的酪氨酸,可与酚试剂中的磷钼钨酸作用产生兰色物质,颜色深浅与蛋白质含量成正比。

二、操作

1、标准曲线的制备:

取中试管 6 支,按下表操作,在试管中分别加入 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0ml 蛋白标准溶液,用生理盐水补足到 1.0ml。加入 5.0ml 的碱性铜试剂,混匀后室温放置 20 分钟后,再加入 0.5ml 酚试剂混匀。

试剂 (ml) \ 编 号	1	2	3	4	5	6
蛋白标准液(0.1mg/ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
0.9% NaCL	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
碱性铜试剂	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
混匀后室温(25℃)放置 20 分钟						
酚试剂	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

混匀放置 30 分钟,以第 1 管为空白,在 650nm 波长比色,读出吸光度,以各管的标准蛋白浓度为横坐标,以其吸光度为纵坐标绘出标准曲线。

2、血清蛋白质测定

稀释血清(或其它蛋白样品溶液):准确吸取 0.1ml 血清,置于 50ml 容量瓶中,用生理盐水稀释至刻度(此为稀释 500 倍),其它蛋白样品酌情而定。再取 3 只试管,分别标以 1,2,3 号,按下表操作。

试剂 (ml)	编 号	测定管	标准管	空白管
稀释标本		1.0	—	—
蛋白标准液		—	0.6	—
0.9% NaCL		—	0.4	1.0
碱性铜试剂		5.0	5.0	5.0
混匀后于室温放置 20 分钟				
酚试剂		0.5	0.5	0.5

混匀各管,30 分钟后,在波长 650nm 比色,读取吸光度。

三、计算

1、以测定管读数查找标准曲线求得血清蛋白含量。

2、无标准曲线时,可按下式计算测定管的蛋白质含量:

$$\text{血清蛋白含量(g\%)} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \times 0.1\text{mg} \times \frac{100\text{ml} \times 500}{1\text{ml} \times 1000} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \times 5$$

四、试剂配制

甲液: Na_2CO_3 2 克溶于 0.1N NaOH 100ml 溶液中。

乙液: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 克溶于 1% 酒石酸钾 100ml 中。

取甲液 50ml, 乙液 1ml 混合, 此液必须临用前配制。

2、酚试剂: 取 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 克和 $\text{Na}_2\text{MoO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25 克, 溶于双蒸水 < 700ml 中, 再加 85% H_3PO_4 50ml 和浓 HCL 100ml, 将上述混合后, 置 1500ml 园底烧瓶中温和地回流 10 小时。回流结束后加入硫酸锂 ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 150 克, 双蒸水 50ml 及液体溴 2~3 滴, 继续沸腾 15 分钟以除去过量的溴(溴有毒, 应在通风橱中进行)。冷却后稀释至 1000ml, 然后过滤, 溶液应呈黄色或金黄色(如带绿色不能用), 置于棕色瓶中保存。取少量酚试剂用标准 NaOH 滴定, 以酚酞为指示剂测出酸度, 临用时使最终酸度为 1N。试剂放置过久, 变成绿色时, 可再加溴数滴煮沸 15 分钟。如能恢复原有的黄色仍可继续使用。

3、蛋白标准液(0.1mg/ml)

准确称取 100mg 牛血清白蛋白, 在 100ml 容量瓶中加生理盐水至刻度。溶后分装, 放于 -20℃ 冰箱保存。

注意事项

各管加入酚试剂时动作要快并立即摇匀, 不应出现浑浊。

实验二 血红蛋白与核黄素的 凝胶柱色谱分离

一、原理：

凝胶渗透色谱就是按照溶质分子的大小不同而进行分离的一种色谱技术，当溶质分子通过色谱柱时，由于凝胶颗粒内部的网络结构具有分子筛作用，分子大小不同的溶质就会受到不同的阻滞作用。本实验血红蛋白分子量大，因不易渗入网孔，被排阻于凝胶颗粒之外，因而所受到阻滞作用小，（颗粒间的缝隙要远大于颗粒内的网孔），先流出色谱床。核黄素分子量小，因能渗透到颗粒内部，洗脱流程长，因此所受到的阻滞作用大，后流出色谱床，这样，就可达到分级分离的目的。

二、操作：

1、凝胶处理：

（1）溶胀与浮选：将凝胶放入过量的水中浸泡6小时（沸水浴中为2小时）。浸泡后搅动凝胶再静置，待凝胶沉积后，倾去上层细粒悬浮，如此反复多次。

（2）平衡：将浸泡后的凝胶，用十倍量的洗胶液处理约1小时，搅拌后继续去除上层细悬浮液。

2、装柱：

将色谱柱垂直装好，自柱底端出口的胶皮管内用重力通入溶液以除去柱管内和砂芯底部的气泡，待气泡排出后，使溶液在底部留至3—5cm高即行关闭，将处理好的凝胶在烧杯内用2倍的溶液搅调成悬浮液，自柱顶部沿管内壁缓缓加入柱中，待底部凝胶沉积至1—2cm时，打开底端出口管，随之继续添加凝胶悬液直至沉积至25cm高度为止。（操作中注意防止产生气泡与节痕）。

3、平衡：

柱装好后，使色谱床稳定5—10分钟，然后接上恒流泵，打开出口用2倍于床体积的洗脱液平衡，使色谱床稳定。流速为0.5ml/分。

注意：在洗脱时，要将恒流泵至色谱柱的连接管内气泡全部排除，以免影响流速。另外务必防止流速过大以及过小，造成色谱床液体流干。

4、色谱床的检查：为了取得良好的色谱效果，须在色谱前对所装色谱柱进行检查。首先观察色谱床是否均匀，床面是否平整，有无“纹路”和气泡等。

5、加样与洗脱：打开平衡好的色谱柱底部出口，使柱内溶液至床表面时关闭，将吸有0.5ml样品的加样滴管在床表面1mm处沿管内壁轻轻转动加样样品，加完后，再打开底端出口使样品流至床表面。用少量洗脱液同样小心清洗表面1—2次，然后将洗脱液在柱内约加至2cm高，接上恒流泵并调好流速即开始洗脱（注意：在加样和洗脱过程中防止冲坏床表面）。

6、收集与测定：收集时可用自动收集器，每管接洗脱液3mL，或以手工操作分管收集15管，收集后用721分光光度计在451nm波长处以洗脱液为空白，对每管收集液进行光吸收测定，测定后以收集管数（或mL）为横座标，吸光度为纵坐标对应作图。

三、仪器

1、色谱柱：高40cm，内径10mm。

2、恒流泵

3、自动收集器

4、刻度吸管、试管

5、721 分光光度计

6、其它

四、试剂

1、葡聚糖凝胶, sephadex G—25

2、洗脱液: 0.05M, PH 7.3 磷酸缓冲液。

3、血红蛋白及核黄素

样品液: $\begin{cases} 0.05\% \text{核黄素 (VitB}_2\text{)} \\ 6\% \text{血红蛋白液 (兔血)} \end{cases}$ 1:1 混合置 4℃ 保存。

注意: 核黄素需新鲜配制。(核黄素也需新生产的)。



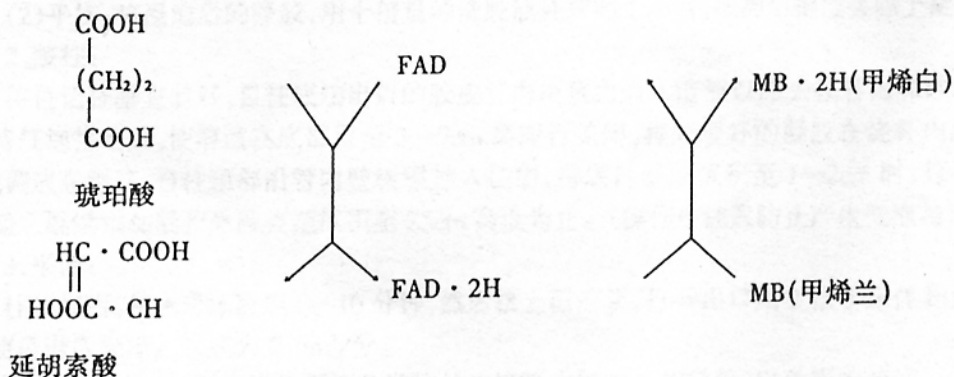
管号					(ml) 液量
1	2	3	4	5	
0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2% 核黄素溶液
—	—	0.2	0.2	0.2	0.2% 核黄素溶液
2	—	—	—	—	蒸馏水
1	1	1	1	1	磷酸缓冲液
2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	样品液

实验三 酶的竞争性抑制作用(琥珀酸脱氢酶)

一、原理:

在化学结构上与底物类似的抑制剂,能与底物竞争和酶分子的活性中心结合,抑制酶的活性。其抑制的程度随抑制剂与底物两者浓度的比而定。如果底物浓度不变,酶活性的抑制程度随抑制剂的浓度增加而增加。反之,若抑制剂的浓度不变则酶活性随底物浓度的增加而逐渐恢复,这种类型的抑制称之竞争性抑制。

草酸、丙二酸等与琥珀酸的结构相似,能竞争性抑制琥珀酸脱氢酶的活性。琥珀酸脱氢酶属于黄酶类脱氢酶,其作用是催化琥珀酸(即丁二酸)脱氢氧化成延胡索酸(即反丁烯二酸)。在生理情况下,脱下的氢可经呼吸链的传递,最后与氧结合成水,并释放出能量。但在体外可用甲烯兰(兰色)作为氢受体,接受琥珀酸脱下的氢而被还原成甲烯白(白色)。借其颜色的消退可鉴定琥珀酸脱氢酶的作用,且可通过其颜色消退的快慢来观察该酶活性的抑制程度。根据这一原理,本实验观察草酸对琥珀酸脱氢酶活性的影响。



操作

1、肝糜液的制备

取小白鼠一只,断头处死,立即剖腹将肝脏全部取出,置于一研钵中,加入玻璃砂少许,充分研碎至糊状,加入 PH 7.4 的磷酸缓冲液 7ml,搅匀后倒入一园底离心管中,离心约 2 分钟 3000 转/分),将上液倒于另一试管中备用,此即为含琥珀酸脱氢酶的肝糜液。

2、另取中试管五支,标号,按下表操作:

试剂(ml)	管号				
	1	2	3	4	5
0.25% 琥珀酸钠液	0.5	—	0.5	2	0.5
5% 草酸钠液	—	0.5	0.5	0.5	2
蒸馏水	2	2	1.5	—	—
肝糜液	1	1	1	1	1
甲烯兰	5 滴	5 滴	5 滴	5 滴	5 滴

摇匀,静置于 37℃ 的水浴中(此后勿再摇动!!),注意观察各管之颜色变化,颜色消退的顺序和时间,并分析之。

试 剂

1、PH 7.4 磷酸缓冲液。

2、0.25% 琥珀酸钠溶液。

3、5% 草酸钠溶液。

4、0.01% 甲烯兰溶液。

实验四 过氧化氢酶 K_m 值的测定

一、原理

当环境的温度、PH 和酶浓度等条件恒定时,酶促反应的速度(V)随底物的浓度 $[S]$ 增高而加快,直至达到一极限,即最大速度(V_{max})。底物浓度与反应初速度的这种关系,米—曼氏推导如下公式,称为米—曼氏方程:

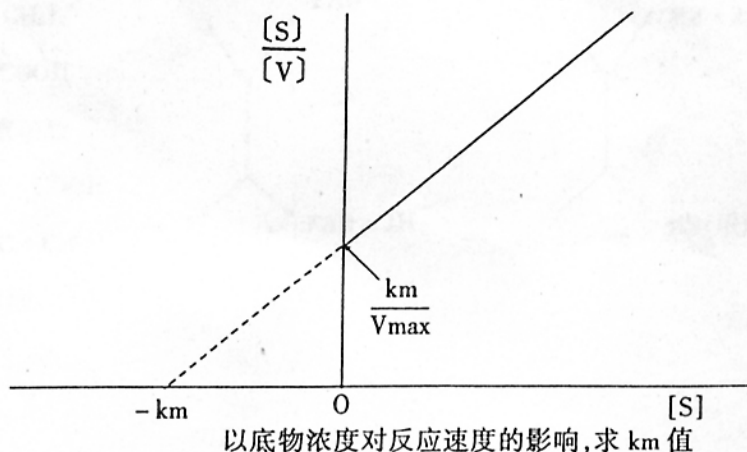
$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

K_m 值是酶的特征性常数,大多数酶的 K_m 值在 $10^{-4} \sim 10^{-3} \text{mol/L}$ 左右。测定 K_m 值是研究酶的一种重要方法,根据 Hanes 作图法,将米曼氏方程重排后得到如下方程式:

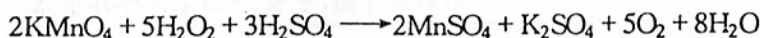
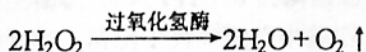
$$\frac{[S]}{V} = \frac{[S]}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}}$$

$$\text{当 } \frac{[S]}{V} = 0 \text{ 则 } \frac{[S]}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} = 0 \text{ 即 } S = -K_m$$

以不同底物浓度 $[S]$ 为横座标, $\frac{[S]}{V}$ 为纵坐标,将各点连成一直线,并向纵轴方向延长,此线在横轴上的截距即为米氏常数(K_m)的负值,如图



本实验以红细胞的过氧化氢酶为例:



H_2O_2 被过氧化氢酶分解为 H_2O 和 O_2 , 剩余 H_2O_2 用 KMnO_4 在酸性溶液中滴定。底物为已知不同浓度的 H_2O_2 , 用 KMnO_4 滴定可求出反应前后 H_2O_2 的浓度差即反应速度, 作图可求出过氧化氢酶的米氏常数(K_m 值)。

二、操作

1、 H_2O_2 浓度的标定

2、血液的稀释(1:2000)

3、反应的测定

取干燥的 50ml 锥形瓶 5 只,编号,按下表操作

试剂 (ml) \ 管号	1	2	3	4	5
H ₂ O ₂	2.5	2.0	1.5	1.0	0.5
蒸馏水	—	0.5	1.0	1.5	2.0
稀释血液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

上述加量必须准确而迅速,加后立即摇匀。记录室温。加入血液后立即计算时间,准确静置 8 分钟,到时间立即加 25% H₂SO₄ 2ml,加入速度愈快愈好,边加边摇,使酶促反应迅速中止。最后用标准 0.002mol/LKMnO₄ 滴定,记录各瓶消耗 KMnO₄ 的 ml 数。

三、计算与作图

1、反应瓶中 H₂O₂ 浓度计算:

$$\begin{aligned}
 [S] &= \frac{\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 摩尔浓度} \times \text{加入 H}_2\text{O}_2 \text{ 的 ml 数}}{3.0\text{ml}(\text{总体积})} \\
 &= \frac{\text{加入 H}_2\text{O}_2 \text{ 的毫摩尔数}}{3\text{ml}} \\
 &= (\text{mmol/ml})
 \end{aligned}$$

2、反应速度的计算(以 8 分钟内被消耗的 H₂O₂ 毫摩尔数表示):

$$\begin{aligned}
 V &= \text{H}_2\text{O}_2 \text{ 摩尔浓度} \times \text{加入 H}_2\text{O}_2 \text{ 的 ml 数} - 0.002 \times 2.5 \times \text{消耗 KMnO}_4 \text{ 的 ml 数} \\
 &= \text{加入 H}_2\text{O}_2 \text{ 的毫摩尔数} - \text{剩余的 H}_2\text{O}_2 \text{ 的毫摩尔数。}
 \end{aligned}$$

3、 $\frac{[S]}{V}$ 的计算

4、求 km 值:以各瓶 [S] 为横坐标, $\frac{[S]}{V}$ 为纵坐标,按原理所述的方法作图,即可求出红细胞 H₂O₂ 酶的 km 值。

四、试剂

1、0.002mol/L KMnO₄ 溶液

2、0.04mol/L H₂O₂ 溶液

3、0.2M PH7.0 磷酸缓冲液

4、25% H₂SO₄ 溶液

实验五 血浆高密度脂蛋白—胆固醇含量的测定

(肝素—Mn 法)

一、目的要求

- 1、掌握测定血浆 HDL—Cho, 的原理及方法;
- 2、了解测定的临床意义;
- 3、复习脂蛋白结构与代谢有关内容。

二、原理

高密度脂蛋白(HDL)是血浆脂蛋白的一种,由肝脏和小肠合成,分泌至血液循环时呈圆盘状,称为新生的 HDL。在循环中受磷脂酰胆碱—胆固醇脂肪酰基转移酶(LCAT)的催化,使颗粒表面的胆固醇接受磷脂水解的脂酸转变为非极性胆固醇,此非极性的胆固醇部分进入疏水核心,使新生的 HDL 逐渐转变成球形的成熟的 HDL。HDL 不仅能与其它脂蛋白相互作用转移其组成成分,而且能将组织细胞的胆固醇运输到肝脏进行代谢(或变成胆酸而排泄)。HDL 是由蛋白质、磷脂、胆固醇、甘油三酯按一定比例组成的。大量流行病学研究表明,血浆 HDL 水平与冠心病的发病率呈负相关,高水平 HDL 有利于预防冠心病的发生。

一定浓度的肝素—Mn 混合液在一定条件下可选择性地使血浆中 VLDL 及 LDL 沉淀下来,而 HDL 仍留在上清液中,从而使 HDL 与 LDL 及 VLDL 分开。

HDL 中含有一定的胆固醇。利用 Cho 的类脂性质,可用有机溶剂进行抽提,然后取一定量抽提液蒸干,加入冰醋酸,利用 Zak 氏三氯化铁显色法,使溶解于冰醋酸中的胆固醇在硫酸存在的条件下与高铁离子作用,产生稳定的红色物质,此物质在 560nm 波长下有最大吸收峰,可作定量分析。

三、操作

1、HDL 的分离

取干燥离心管一支,吸 0.5ml 血浆,加肝素—Mn 混合液 0.05ml,混匀后室温静置 10min。3000rpm,离心 10min。沉淀部分为 VLDL 和 LDL,而 HDL 存在于上清液中。

2、HDL—Cho 的提取(有机溶剂抽提法)

取肝素—Mn 沉淀后的上清液 0.1ml,加酮醇混合液 2.5ml(快速加入,使沉淀均匀),3000rpm,离心 5~6min。取上清液 2ml 于沸水中蒸干,此为样品管(沉淀部分为蛋白质)。

3、胆固醇测定取短管三支,按下表操作

试剂(ml)管号	空白	样品	标准(80ug/ml)
三氯化铁冰醋酸	1.5	1.5	0.5
标准胆固醇(ml)			1.0
浓硫酸(ml)	1.0	1.0	1.0

摇匀,放 60℃ 水浴 10 分钟,560nm 比色。记录吸光度(注:加 H_2SO_4 时需将试管斜置,沿管壁放入)。

计算公式:

每 100ml 血清 HDL—Cho, 含量 = $A_{\text{样}}/A_{\text{标}} \times C_{\text{标}} \times K(\text{mg/dl})$

$k=1.43$

四、试剂配制

1. 标准胆固醇液

a: 贮存液(1000ug/ml): 准确称取胆固醇标准 100mg 溶于 100ml 三氯化铁冰醋酸溶液中。

b: 应用液(80ug/ml): 取贮存液 4ml 加三氯化铁冰醋酸至 50ml。

2. 三氯化铁冰醋酸溶液

a: 贮存液(125mg/ml): 取 1.25 克三氯化铁溶于 100ml 冰醋酸中

b: 应用液(1mg/ml): 取贮存液 2ml 加冰醋酸至 250ml

3. 浓 H_2SO_4 (要求 AR)

4. 丙酮-乙醇混合液(按 1:1 比例配制 V/V)

5. 肝素-Mn 混合液

a: 1.06mol/L 氯化锰液 ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$), 分子量 198): 取 209.9 克 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 溶于 1000ml H_2O 中

b: 肝素液(280mg/ml): 取肝素 280mg 溶于 1ml 水溶液中

c: 肝素-Mn 混合液: 取 a 液 10ml + b 液 0.6ml 混匀即成。

临用前配制,放冰箱保存,至多用一个月。

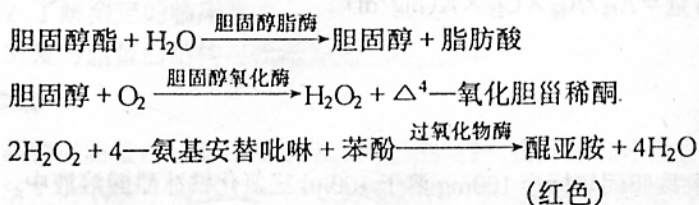
五、临床意义及正常值

正常人血浆总胆固醇为 125-200mg%, HDL 中所含的 cho 占总胆固醇的 1/3-1/4, 人们常用 HDL 中胆固醇的含量表示 HDL 的量。HDL-Cho 水平愈高, 愈有利于将组织中的 Cho 运输出来, 对人们的健康长寿十分有益, 长期坚持体育锻炼者, 其血浆 HDL-Cho 较一般人为高, 冠心病者比一般正常人低。临床在测定血脂时也测定 HDL-Cho 的含量, 对于诊断冠心病以及观察治疗效果是有帮助的。

实验六 酶法测定血清总胆固醇

一、原理

血清中胆固醇约 70% 以酯型存在,其余以游离型存在。酯型胆固醇经胆固醇脂酶作用,水解成脂肪酸及游离胆固醇。游离型胆固醇则经胆固醇氧化酶作用生成过氧化氢,在过氧化物酶的作用下过氧化氢与苯酚及 4-氨基安替吡啉定量氧化缩合生成红色醌亚胺。在一定浓度范围内,红色的深浅与胆固醇的含量成正比,它在 500nm 波长处有最大吸收峰,通过比色测定求出样品中的胆固醇含量。



二、操作

试 剂	空白管	测定管	标准管
血浆		20 μ l	
蒸馏水	20 μ l		
标准胆固醇			20 μ l
应用液(ml)	2.0	2.0	2.0

混匀,37℃保温 20min,500nm 波长处比色。

正常值 = 140~230mg/dl

计算公式:胆固醇含量 = 测定管 OD 值 / 标准管 OD 值 $\times$ 标准液的浓度值(200)

标准液的浓度值单位为:mg/dl;标准值:200mg/dl

三、临床意义

- 1、流行病学调查表明,血清总胆固醇与冠心病的发生呈正相关。
- 2、血浆中 75% 的胆固醇由低密度脂蛋白输送,目前认为低密度脂蛋白是导致动脉粥样硬化的因素。因此,测定血清总胆固醇在一定程度上可以反映低密度脂蛋白的水平。

实验七 血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳

一、原理

由单体丙烯酰胺和交联剂甲叉双丙烯酰胺在催化剂过硫酸铵和加速剂四甲基乙二胺的作用下,聚合交联成三维网状结构的大分子凝胶。以此柱状凝胶为支持物,采用不连续体系(凝胶层, PH 及电位梯度的不连续),按浓缩效应,分子筛效应和电荷效应使血清蛋白在电场中进行分离。此方法分离效果好,分辨率高,可将血清蛋白分出 12~30 个组分。

二、试剂

试剂号	名 称	配 制 方 法	PH
1	分离胶缓冲液	IN HCL 48ml Tris 36.3g 加蒸馏水到 100ml	8.9
2	单体、交联剂	丙烯酰胺 30g 甲叉双丙烯酰胺 0.8g 加蒸馏水到 100ml	
3	催化剂	10%过硫酸铵(临用前配制)100mg/ml	
4	加速剂	四甲基乙二胺 1ml 加蒸馏水稀释到 10ml	
5	浓缩胶缓冲液	IN HCL 48ml Tris 5.98g 加蒸馏水到 100ml	6.7
6	电极缓冲液	甘氨酸 28.8g Tris 6g 加蒸馏水至 100ml 临用前按 1:10 比例稀释	8.3
7	示踪染料溶液	溴酚兰 0.05g 加蒸馏水溶解至 100ml	
8	固定染色液	考马斯亮蓝 G ₂₅₀ 0.1g, 用 12.5%三氯醋酸溶解, 稀释至 100ml	
9	漂洗液	冰醋酸 7ml 加蒸馏水至 100ml	

三、操作

(一)、凝胶柱的制备

1、玻管准备 取清洁干燥,内径 0.5cm×长度 8.0cm 的玻璃管,距上端 1cm 处用记号笔划线。将 0.2ml 40%蔗糖溶液加入橡皮帽中,再将此帽套在玻管下端,垂直放好。

2、分离胶的制备 定量吸取 1 号、2 号、4 号试剂和水加入一小烧杯中,再加入 3 号试剂,用玻棒立即混匀,成为分离胶溶液。用长细滴管吸取分离胶溶液,将其沿管壁注入玻管,超过标记线 2mm,每管胶液用量约 1.2ml。吸取蒸馏水,沿管壁在分离胶的液面上加注 0.5cm 高的水层。加水时应尽量减少胶液表面的震动与混合。将凝胶管静置 30 分钟以进行聚合反应。在聚合过程中,起

初凝胶与水层的界面逐渐消失,待胶体形成后,其界面又将重新可辨。这一现象可用来观察判断凝胶的聚合是否完成。

3、浓缩胶的制备 定量吸取2号、5号、4号试剂和水加入一小烧杯中,再加入3号试剂,用玻璃棒立即混匀,成为浓缩胶溶液。倒去分离胶表面的水层,用少量浓缩胶液稍洗分离胶表面。加入浓缩胶液高度0.7cm,表面水层高度0.3cm(已达玻管上端)。静置30分钟,待界面重现后除去水层,待用。

凝 胶 溶 液 配 制 表

试 剂	分离胶溶液(ml)	浓缩胶溶液(ml)
1 号	1.25	—
2 号	2.5	1.0
5 号	—	1.25
4 号	0.15	0.3
H ₂ O	6.05	7.35
3 号	0.05	0.1
总体积(ml)	10	10
浓度(g%)	7.7	3.0

(二)加样 每条凝胶柱上端加入20 μ l样本混合液(血清和40%蔗糖溶液各12 μ l、0.05%溴酚兰指示剂40 μ l)。每管实际加入血清样本= $\frac{12}{64} \times 20 = 3.75\mu\text{l}$ 。

(三)电泳 把玻管下端的橡皮帽除去,注意先使空气进入小帽,然后再拔下来,以防用力过猛使胶条受损。用长细滴管吸取电极缓冲液排除玻管下端的空气,否则会影响导电。将凝胶玻管上端垂直插入上电极槽底板的橡胶塞孔中。在已插好的凝胶管样品液面上,小心地逐管加满电极缓冲液,然后将电极缓冲液慢慢倒入上、下电极槽中。电极缓冲液的加入量,上槽以电极能完全浸入为宜,下槽以凝胶管浸入3/5为宜。将上槽的电极接电泳仪的负极,下槽连接正极。在3~5mA/管的条件下进行电泳,直到溴酚蓝指示剂接近凝胶柱下端为止,约需1~1.5小时。

(四)剥胶 取下凝胶管,用带10cm长针头的注射器吸取蒸馏水作润滑剂。将针头从浓缩胶一端小心插入管壁和凝胶柱之间。一边注水,一边转动玻管,使针头紧贴管壁呈螺旋式前进,使凝胶柱随水的压力和润滑作用自玻管中的脱出。

(五)固定与染色 将剥出的胶柱放入8号试剂中浸泡30分钟,进行固定与染色。

(六)漂洗 取出胶柱后用清水冲洗掉多余的染料,放入9号试剂中漂洗脱色。脱色后的胶柱置于7%醋酸溶液中可长期保存。

四、器材

1、恒流式电泳仪

2、园盘电泳槽

3、玻璃管(0.5 $\times$ 8cm)

4、50 μ l微量注射器、5ml注射器

5、10cm长的局麻针头、18号针头

6、长细滴管、小烧杯、橡皮帽、吸耳球

实验八 血清蛋白聚丙烯酰胺凝胶 垂直板电泳(PAGE)

一、目的要求

熟悉 PAGE 分离血清蛋白的原理

掌握 PAGE 分离血清蛋白的操作步骤

初步学会电泳结果的合理分析

二、原理

聚丙烯酰胺凝胶是由单体丙烯酰胺(acrylamide Acr)和交联剂 N,N-甲叉双丙烯酰胺(methylene-bisacrylamide Bis)在加速剂和催化剂作用下交联成三维网状的凝胶,以三维网状凝胶为介质,当介质中 PH 大于血清蛋白的 PI 时,血清蛋白带负电荷,在电场作用下,向正极移动,经过介质的分子筛效应,电荷的效应,样品浓缩效应,从而达到分离血清蛋白的目的。

三、操作步骤

1. 配制工作液

①A 液 30g Acr(丙烯酰胺) 0.8g Bis N,N-甲叉双丙烯酰胺溶 100ml 水中(Acr 有神经毒性,须戴上一次性手套)。

30% Acr 0.8% Bis

②B 液 4×分离胶缓冲液 (1.5M PH8.8 Tris-cl),将 18.2g Tris 加入 40ml H₂O 中,用 HCL 调 PH 至 8.8,加水定容至 100ml,

③C 液 4×浓缩胶缓冲液(0.5M Tris-cl PH6.8)

将 6.0g Tris 加入 40ml H₂O 中,用 Hcl 调 PH 至 6.8 加水定容至 100ml

④D 液 10% 的过硫酸铵 5ml

将 0.5g 的过硫酸铵加入 5ml H₂O 中即可。

⑤E 液 电泳缓冲液

将 3.0g Tris 溶于 400ml H₂O,溶解后加入 14.4g 甘氨酸,定容到 1 升。

⑥F 液 5×上样缓冲液

·3.1ml Tris-cl(PH6.8)5ml 甘油 0.5ml 1% 的溴酚兰,加水至 10ml

⑦染色液 考马斯亮兰 R250

0.5g R250 用 7% 醋酸稀释至 100ml

⑧漂洗液 冰醋酸 7ml 加 H₂O 至 100ml

2. 制分离胶 8% 20ml

①快速胶的制备

4.8ml H₂O (混匀取 2ml 制快速胶,加 3μl TEMED 7μl D 液 迅速地封

2.7ml A 液 玻璃板,要快,在 30S 内完成)

2.5ml B 液

50μl D 液

5μl TEMD

②分离胶制备

把上述 8ml 分离胶镶入玻璃板中,放平勿动,上用水封面。30~60min

3、制浓缩胶 5% 4ml

2.3ml H₂O

0.7ml A 液

1ml C 液

30 μ l D 液

5 μ l TEMED, 将 2 中的水倒掉,用滤纸吸干封面处,向玻璃板中倒入浓缩胶,并迅速插入梳子,水平放置,勿动。30~60min

4. 拔梳加样

将 3 中的梳子小心拔出,如胶体变形,可用加样器进行纠正,将血清蛋白中加入 $\frac{1}{4}$ 体积的 F 液,在每凹中加入 20 μ l 样品液(小心加样,上样器中不得带有气泡)。

5. 电泳

稳流每凹 2mA 条件 F,电泳 2~4h

6. 染色

将电泳结束的胶板剥下,用 DH₂O 漂洗 2 次,在大培养皿中加入 100ml 染液染至胶板上出现清晰的亮带为止。

用漂洗液漂洗除去浮色。

7. 观察实验结果,并记录,分析出现的现象。

器材

①垂直电泳槽

②电泳仪

③小烧杯若干

④棕色试剂瓶若干

⑤上样器

注意事项

1. 丙烯酰胺和甲叉双丙烯酸胺是神经性毒剂,并对皮肤具有刺激作用应避免直接接触。

2. 丙烯酰胺和 N,N-甲叉双丙烯酸胺溶液应装在棕色瓶中,置 4℃ 保存可贮存 1—2 月。

3. TEMED 要密封保存,过硫酸铵最好当天配制,以防止氧化失效。

4. 凝胶的聚合速度与温度关系很大,必须根据实验时温度调整 TEMED,过硫酸铵的用量,以使凝胶在 30min 聚合。

思考题

垂直板电泳与盘状电泳比较,优缺点是什么? 试举出一例。

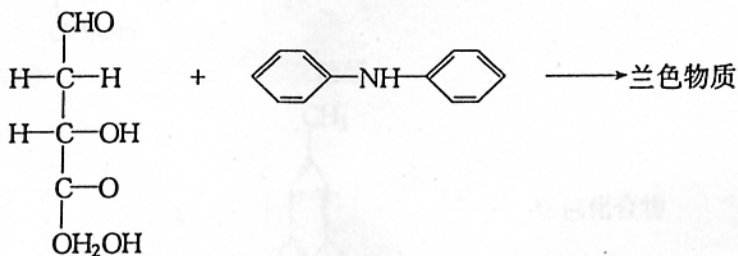
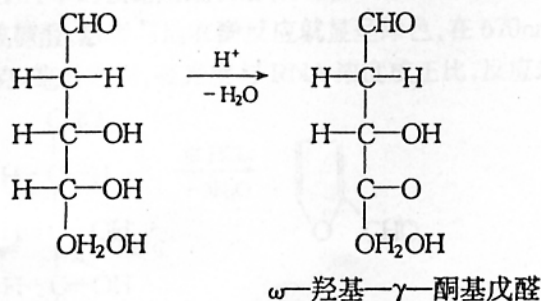
实验九 DNA 含量的测定

——二苯胺法

一、原理

DNA 含量的测定,一般是将其彻底水解,然后测定其组成成分碱基、脱氧核糖及磷酸三种组分中的一种,均可计算出 DNA 的量。

DNA 中的脱氧核糖则以二苯胺法测定。脱氧核糖在酸性条件下脱水生成 ω -羟基- γ -酮基戊醛,后者与二苯胺反应生成兰色的物质,在 595nm 处有最大吸收,反应如下:



ω -羟基- γ -酮基戊醛 二苯胺

当待测样品中 DNA 含量在 10~50 微克/毫升范围内时,吸光度与 DNA 浓度成正比。

二、操作

1. 取含 DNA 的溶液直接作为待测样器液
2. 按下表操作

试剂(ml)	标准管	待测管	空白管
DNA 标准液(0.1mg/ml)	2.0	—	—
待测样品	—	2.0	—
蒸馏水	—	—	2.0
20% HClO ₄	2.2	2.2	2.2
二苯胺试剂	2.0	2.0	2.0

混匀各管,56℃水浴 1 小时

3. 待各管冷却后,以空白管调零点,以 595nm 比色,读取吸光度 A 样和 A 标。

4. 计算

$$\text{DNA 含量 (mg/dl)} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \times 200 \times \frac{1}{1000} \times 50 = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \times 10$$

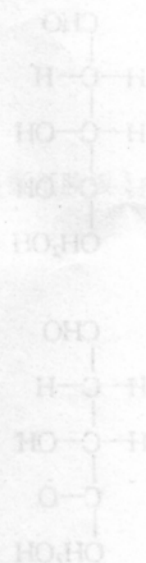
三、试剂

1. 5% HClO_4

2. 20% HClO_4 : 量取 71.4 毫升 70% HClO_4 (AR), 加水至 250ml。

3. 4% 二苯胺冰醋酸溶液: 称取二苯胺 (AR) 20 克, 加入少量冰醋酸 (AR), 微热使二苯胺全部溶解, 再加入冰醋酸至 500ml, 此液不稳定, 只限当天使用。

4. DNA 标准液 (100 微克/ml): 用分析天平精确称取鱼精 DNA 10mg, 加水至 100ml, DNA 在水中较难溶解, 可在实验前一天配制。



标准液	管液	管液	(nm) 吸光
—	—	0.5	(nm) 吸光
—	0.5	—	品料
—	—	—	本
0.5	0.5	0.5	20% HClO_4
0.5	0.5	0.5	二苯胺

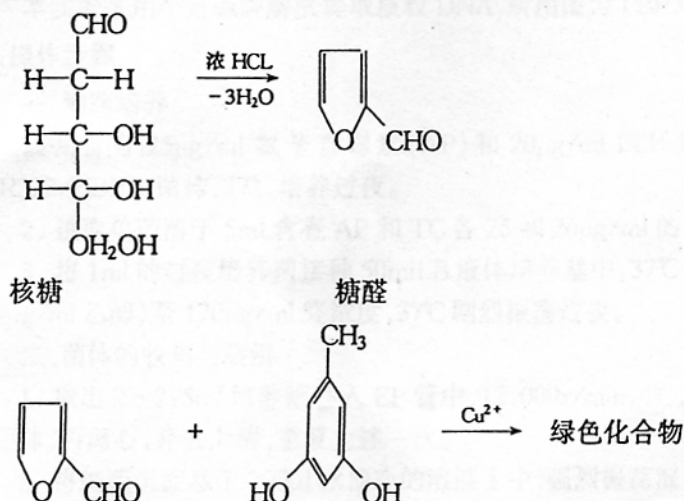
实验十 RNA 含量的测定

——地衣酚法

一、原理

RNA 含量的测定,一般是将其彻底水解然后利用其组成成分碱基,核糖及磷酸的性质和它们各自的特异反应来进行的。RNA 分子中上述三个组分以等分子比例存在,因而不论测定其中任一组分的量均可计算出 RNA 的量。

RNA 中的核糖用地衣酚(即 3,5—二羟甲苯或称苔黑酚)法加以测定。核糖在浓盐酸中脱水环化成糖醛,后者与地衣酚反应就显呈绿色,在 670nm 处有最大吸收。待测样品中若 RNA 在 5~50 微克/毫升之间,吸光度与 RNA 浓度成正比,反应式如下:



二、操作

1、待测样品的稀释

取含 RNA 的样品溶液 2.0ml,加入 5% $HClO_4$ 至 10ml,摇匀。

2、按表操作

管号	标准管	待测管	空白管
试剂(ml)			
RNA 标准(0.1mg/ml)	1.0	—	—
样品稀释液	—	1.0	—
6NHCL	—	—	1.0
地衣酚试剂	3.0	3.0	3.0

混匀各管,沸水浴 10 分钟

3. 待上述各管冷却后,以空白管调零点,670nm 比色,读取吸光度 A 样和 A 标。

4. 计算

$$\text{RNA 含量(mg/dl)} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \times 0.1 \times 5 \times 100 = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \times 50$$

三、试剂

1. 5% 高氯酸(HClO₄)溶液

2. 6NHCL

3. 地衣酚试剂

A、地衣酚贮存液: 称取 5 克地衣酚溶于 10ml 95% 乙醇中, 此液呈深红色。

B、铜离子溶液: 称取 0.75 克结晶氯化铜(CuCl₂·2H₂O)溶于 500ml 12N 盐酸中, 此液呈深黄色。

临用前取 2ml 地衣酚贮存液, 加 100ml 铜离子溶液, 混匀。

4. RNA 标准液(0.1mg/ml)用 1/10 万分析天平精确称取纯 DNA10 毫克, 用 0.001N NaOH 溶解并定容至 100 毫升。

空白	标准液	样品	管号
			(ml) 试剂
—	—	1.0	RNA 标准液(0.1mg/ml)
—	0.1	—	样品液
0.1	—	—	6NHCL
0.1	0.1	0.1	地衣酚试剂

实验十一 小量制备质粒 DNA

一、目的要求

掌握制备质粒 DNA 的原理、方法、步骤,进一步认识质粒 DNA 性质。

二、原理:

质粒是细菌染色体外能自身独立复制的稳定的遗传单位,是细菌内共生型遗传因子,它能在细菌中垂直遗传,并赋予宿主细胞一些表型,无论用质粒 DNA 作为基因分子克隆的载体还是作为细菌分子遗传学研究的材料,都需要抽提和纯化,分离和纯化质粒 DNA 的方法很多,但不外乎三个主要步骤:

①细菌的培养和质粒 DNA 扩增,②细菌的收集和裂解,③质粒 DNA 的分离和纯化

本实验采用小量碱裂解法提取质粒 DNA,所用菌为 PBR322 转化的 Ecoli HB101 菌株。

三、操作步骤

一、细菌培养

1. 用含有 25 μ g/ml 氨苄青霉素(AP)和 20 μ g/ml 四环素(TC)的 LB 琼脂平板,直接接种 PBR322/HB101 菌株,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。
2. 挑取单菌落于 5ml 含有 AP 和 TC 各 25 和 20 μ g/ml 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡过夜。
3. 将 1ml 的过夜培养菌接种 50ml LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀=0.6 时,加入氯霉素 (34 μ g/ml 乙醇)至 170 μ g/ml 终浓度,37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡过夜。

二、菌体的收集与裂解

1. 取出 2~2.5ml 培养液移入 EP 管中,12,000r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 30S,弃上清,用 2MSTE 溶液重悬菌体,再离心,弃去上清,重复上述一次。
2. 将细菌沉淀悬于 200 μ l 冰预冷的溶液 I 中,强烈振荡混匀。
3. 加入 400 μ l 溶液 II,盖严管盖,颠倒 EP 管 8~10 次混匀,放置冰上 3~5min。
4. 加入 300 μ l 溶液 III,可将管盖朝下,温和振荡 10min,冰上放置 3~5min。
5. 12,000r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 5min,取上清移至 1 个新的 EP 管中。
6. 加入等体积的苯酚/氯仿(1:1),振荡混匀,12,000r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 5min,取上清移至另 1 个 EP 管中。
7. 加入 2 倍体积的乙醇,室温振荡混匀,放置 2min。12,000r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 5min,弃上清。
8. 加入预冷的 70% 乙醇,漂洗沉淀,12,000r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 2min 弃上清,室温挥发干燥。
9. 加入 80 μ l TE(PH8.0),溶液含无 DNA 酶的 RNase 20 μ g/ml,溶解 DNA,温和振荡 5min,此法可制得 PBR322, DNA 6~10MG
10. 琼脂糖凝胶电泳查测纯度,紫外定量。

$$OD_{260} \quad MW = \frac{OD_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}}{1000} = \mu\text{g/ml}$$

四、试剂

(1) LB 培养基,每升含蛋白胨 10g 酵母提取物 5g, NaCl 10g,用 NaOH 调 PH 至 7.2,高压灭菌后分装备用,固体培养基在每升液体培养基加入 15 琼脂即可。

(2)STE 溶液:0.1mol/L NaCl;10mmol/L Tris.cl; 1mmol/L EDTA,PH8.0

(3)溶液 I :50mmol/L 葡萄糖,25mmol/L Tri.scl(PH8.0),10mmol/L EDTA

(4)溶液 II :新鲜配制 0.2N NaOH;1%SDS,100ml

(5)溶液 III :5mol/L KAC 60ml,冰醋酸 11.5ml 水 28.5ml 混合最终 PH4.8

(6)苯酚氯仿等体积混合。

(7)70%乙醇

(8)TE 溶液:浓度为 10mmol/L Tris.cl,1mmol/L EDTA 溶液,PH8.0(加无 DNase 的 RNase 至 20 μ g/ μ l)

五、器材

(1)高压灭菌锅 (2)玻璃平皿 (3)三角瓶 (4)恒温培养箱 (5)恒温振荡培养箱

(6)721 分光光度计 (7)低温高速离心机

思考题

1. 质料 DNA 在碱性(PH12—12.6)条件保持天然状态,而不变性为什么?

2. 氯霉素处理培养中的细菌,细菌不再繁殖,而质粒 DNA 的复制却不受影响,为什么?

实验十二 人乙型肝炎病毒(HBV)的 PCR 检测

一、目的:

1、掌握 PCR 技术的原理及操作步骤

2、检测病人血清中是否有 HBV

二、原理:

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)是一种体外扩增特异性 DNA 片段的技术。其基本原理与细胞内 DNA 复制机理类似。因此早在 Watson 和 Crick 提出“DNA 双螺旋结构”学说后不久,人们自然就想到在实验室进行人工模拟的 DNA 复制,因为复制过程并不复杂。然而,经过多年努力仍未取得重大突破。其中主要的障碍是:由于采用热变性(70℃—90℃)解链而造成 DNA 聚合酶的变性沉淀,致使实验过程非常繁杂,成本很高而产出率很低。直到 80 年代中期,由 Mullis 及其同事发现并命名了“TaqDNA 聚合酶”(此酶是从温泉的一种水生栖热菌中得到)后,PCR 技术才迅速发展起来。目前可以说,在各种生物技术中,PCR 是应用最广,并能深入基层之中的少数项目之一。为此,Mullis 等获得 1993 年 Nobel 化学奖。

PCR 扩增反应分为三个步骤:

①变性:加热使 DNA 分子双螺旋中的氢键断裂,双链形成单链 DNA。

②退火:使引物分子与互补的 DNA 单链分子形成杂交链

③延伸:在 DNA 聚合酶作用下,4 种 dNTP 和 Mg^{2+} 存在的条件下,以 5'→3' 方向发生以引物为起点的 DNA 链延伸反应。

三、材料:

1、病人血清

2、HBV 阴性对照

3、HBV 检测试剂盒

四、操作步骤:

1、在 0.5ml 无菌硅化 Eppendorf 管中,分别以被检病人血清,HBV 阴性对照、阳性对照 DNA 为模板,并 PCR 扩增反应,并设置①没有 DNA,②没有引物的两个空白对照。

各管加入以下试剂:

dd H_2O 32~33 μ l

10x Taq 缓冲 5 μ l

4 种 dNTP(2.5mM/L) 5 μ l

引物 1(20PM/ μ l) 2.5 μ l

引物 2(20PM/ μ l) 2.5 μ l

模板 DNA 1—2 μ l(含 HBV 的血清,阴性对照、阳性对照)

以上混匀后 94℃ 变性 10min,取出离心管,台式离心机中快速离心 5~10S,使冷凝于管盖上的液体回到管底,再加入 1 μ l Taq DNA 聚合酶(2—4u),混匀后加 50 μ l 矿物油(使用带有加热帽的 PCR 仪时,不必加石蜡油)

(2)在以下循环参数范围内进行扩增:

94°变性	60S
58℃退火	60S
72℃延伸	60S
循环	30 次

72℃延伸 10min(以保证扩增出的片段都是全长的)。

(3)扩增反应后,各取三种样品反应液 5-20 μ l,用 0.8~2%的琼脂糖电泳,电泳胶中点人与 HBV 大小相近的分子量 Marker DNA(DNA,48.502)

(4)80V 电泳 40min 紫外灯下观察结果,并记录结果。

(以上操作步骤或按照试剂盒中说明去做)

五、注意事项

(1)操作中要严防 DNA 污染,全部器皿均要灭菌,石蜡油分装,一次用一支。

(2)若 PCR 产物呈降解片段,应首先减少模板 DNA 的用量。

(3)PCR 产物非特异性条带较多,应首先提高退火温度,其次减少引物用量。

六、主要仪器及设备:

(1)PCR 仪

(2)电泳槽(小平行板)

(3)离心机

(4)电泳仪

(5)电炉

(6)小烧杯若干

(7)微量取样器

(8)上样器

思考题

①为什么 PCR 扩增具有特异性?

②我们怎样做才能更好地减少 PCR 过程中的假阳性现象?



生物化学实验

印 数: 1000 册
编 号: 02—10—004
单 价: 3.00 元/册
印刷日期: 二〇〇二年七月
