

生物化学实验

吴意珣 王远鹏 王世珍 王海涛 邵文尧 编

厦门大学化学工程与生物工程系

2014-2-20

目 录

实 验 室 守 则.....	1
实验记录及实验报告.....	2
实验一 淀粉的提取和水解.....	4
实验二 总糖与还原糖的测定.....	6
实验三 蛋白质等电点测定.....	9
实验四 酪蛋白的制备.....	11
实验五 氨基酸的分离鉴定—纸层析法.....	13
实验六 蛋白质含量的测定.....	16
实验七 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳.....	29
实验八 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质亚基分子量.....	36
实验九 底物浓度对酶活力的影响（米氏常数的测定）.....	41
实验十 影响酶活性的因素.....	45
实验十一 猪脾 DNA 的制备.....	49
实验十二 DNA 的定量测定.....	52
实验十三 维生素 C 的定量测定.....	54
仪器的使用.....	60
附 录.....	62

实验室守则

1、遵守课堂纪律，认真进行实验

每个学员应该自觉地遵守课堂纪律，维护课堂秩序，保持室内安静，不大声谈笑。实验过程中要听从教师指导，严格认真地按操作规程进行实验。并简要、准确地将实验结果和数据记录在实验记录本上，完成实验后经教师检查同意，方可离开实验室、实验后要认真写好实验报告，由课代表按期收交给教师，不无故拖延。

2、保持整洁

保持环境和仪器的整齐清洁是做好实验的重要条件，也是每个实验者必须养成的良好的工作习惯。实验台面和试剂药品架上都必须保持整洁，仪器药品放置要有次序，不要把试剂、药品洒在实验台面和地上，废液应倒进水槽内（强酸强碱必须都应倒入废品缸内，不可倒入水槽或随地乱扔。实验完毕需将仪器洗净收好，药品试排列整齐。把实验台面抹擦干净，保持实验室整齐清洁。

3、药品使用

使用药品试剂必须注意节约杜绝浪费，要特别注意保持药品和试剂的纯净，药品用后须立即将瓶盖塞紧放回原处，从瓶中取出的试剂，标准溶液等，如未用尽切勿倒回瓶内，避免混杂。

4、仪器使用

各种仪器用具均应注意爱护，细心使用，防止损坏，使用分析天平，分光光度计和电动离心机等贵重精密仪器，要严格遵守操作规程，发现故障立即报告教师，不要自己动手检修，要爱护国家财产，厉行节约。

5、注意安全

为了有效地维护实验室安全，保证实验正常进行，要求：

- 1) 要严格做到：火着人在，人走火灭；
- 2) 勿使乙醚、丙酮、醇类等易燃液体接近火焰，蒸发或加热此类液体时，必须在水浴上进行，切勿用直火加热；
- 3) 凡比水轻且不与水相混溶之物（如醚、苯、汽油等）着火时，应迅速用湿毛巾覆盖火焰，以隔绝空气使其熄灭，绝不能倒水于其上，以免火焰蔓延，对于易与水混溶之物（如乙醇、丙酮等）着火时，可用火扑灭之；
- 4) 有不少药品是有毒或有腐蚀性的不可用手直接拿药品，不可将试剂瓶直接对准鼻子闻，更不可尝药品味道。吸取有毒试剂，强酸和强碱时，均应用洗耳球，严禁用口吸取；
- 5) 离开实验室时，要关好水龙头，拉下电闸，认真负责地进行检查，严防不安全事故；
- 6) 每次实验课由班长安排同学轮流值日，值日生要负责当天实验室的卫生、安全和一切服务性工作。

实验记录及实验报告

一、实验记录

实验课前应认真预习，将实验名称、目的和要求、原理、实验内容、操作方法和步骤等简单地写在记录本中。

实验记录本应标上页数，不要撕去任何一页，事不要抹擦及涂改，写错时可以准确地划去重写，记录时必须使用钢笔或圆珠笔。

实验中观察到的现象、结果和数据，应该及时地直接记在记录本上，绝对不可以用单片纸做记录或草稿。原始记录必须准确、简炼、详尽、清楚，从实验课开始就应养成这种良好的习惯。

记录时，应做到正确记录实验结果，切忌夹杂主观因素，这是十分重要的。在实验条件下观察到的现象，应如实仔细地记录下来；在定量实验中观测的数据，如称量物的重量，滴定管的读数。光电比色计或分光光度计的读数等，都应设计一定的表格准确记下正确的读数，并根据仪器的精确度准确记录有效数字。例如，光密度值为 0.050，不应写成 0.05。实验记录上的每一个数字，都是反映每一次的测量结果，所以，重复观测时即使数据完全相同也应如实记录下来。数据的计算也应该写在记录本的另一页上，一般写在正式记录左边的一页。总之，实验的每个结果都应正确无遗漏地做好记录。

实验中使用仪器的类型、编号以及试剂的规格、化学式、分子量准确的浓度等，都应记录清楚，以便总结实验进行校对和作为查找成败原因的参考依据。

如果发现记录的结果有怀疑、遗漏、丢失等，都必须重做实验。因为，将不可靠的结果当做正确的记录，在实际工作中可能造成难以估计的损失，所以，在学习期间就应一丝不苟，努力培养严谨的科学作风。

二、实验报告

实验结束后，应及时整理和总结实验结果，写出实验报告。按照实验内容可分为定性和定量实验两大类，下面分别列举这两类实验报告的格式，仅供参考。

1、关于定性实验报告

实验（编号）（实验名称）

（一）目的和要求

（二）原理

（三）试剂和仪器

（四）操作方法

（五）结果与讨论

一般每次实验课做数个定性实验，实验报告中的实验名称和目的要求应该是针对这次实验课的全部内容而必须达到的目的和要求。在写实验报告时，可以按照实验内容分别写原理、操作方法、

结果与讨论等。原理部分应简述基本原理。操作方法（或步骤）可以采用工艺流程图的方式或自行设计的表格来表示（某些实验的操作方法可以和结果与讨论部分合并，自行设计各种表格综合书写）。结果与讨论包括实验结果及观察现象的小结、对实验课遇到的问题（和思考题）进行探讨以及对实验的改进意见等。

2、关于定量实验报告

实验（编号）（实验名称）

（一）目的和要求

（二）原理

（三）试剂和仪器

（四）操作方法

（五）结果处理

（六）讨论

通常每次实验课只做一个定量实验，在实验报告中，目的和要求、原理以及操作方法部分应简单扼要的叙述，但是对于实验条件（试剂及仪器）和操作的关键环节必须写清楚，对于实验结果部分，应根据实验课的要求将一定实验条件下获得的实验结果和数据进行整理、归纳、分析和对比，并尽量总结成各种图表，如原始数据及其处理的表格、标准曲线图（以及比较实验组与对照组实验结果的图表）等。（另外，还应针对实验结果进行必要的说明和分析）。讨论部分可以包括：关于实验方法（或操作技术）和有关实验的一些问题，如实验的正常结果和异常现象（以及思考题）进行探讨，于实验设计的认识、体会和建议，对实验课的改进意见等。

实验一 淀粉的提取和水解

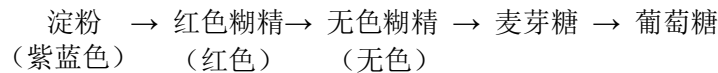
一、目的要求

掌握淀粉提取和水解的原理及操作方法。

二、原理

多糖是自然界分布最广的糖类，由多个单糖分子缩合而成，具有多种生物学功能，如植物纤维素可构成植物的骨架，而淀粉、糖原则作为营养的存储形式。本实验以地瓜为原料，利用多糖能和水形成胶体溶液的原理，采用过滤、离心等方法提取淀粉。

糖苷键对酸和酶敏感，所以淀粉在酸和体内淀粉酶的作用下被降解成单糖，这种降解过程是逐步进行的，降解的中间产物遇碘曾现不同的颜色：



所以根据水解液和碘反应的颜色，可以判断水解是否已完全。本实验中采用酸水解的方法，用过量的酸保证水解完全。

三、试剂与器材

高速组织捣碎机、恒温水浴锅

四、操作方法

(1) 淀粉的提取

甘薯去皮切成小块（约 $0.3 \times 0.3 \times 0.3 \text{cm}^3$ ），准确称取 15g，加入 60mL 蒸馏水，放入组织捣碎机中捣碎 1min（以上步骤可以 4 组合作）。匀浆液用三层纱布过滤，滤渣用少量水洗，滤液合并后置 50°C 恒温水浴中保温 30min。轻轻地尽量倾去上层有色溶液，用 25 mL 蒸馏水重新悬浮白色沉淀，待重新沉淀后再倾去上层溶液，滤纸过滤或用离心机离心（3000 r/m，10 min），再用少量水洗沉淀，3000 r/m 离心 10 min，连滤纸移至培养皿中置烘箱内烘干（ 105°C 烘干 4h）后称重。

(2) 淀粉的水解

称取淀粉 1.0 g，放在大试管中用少量水调成糊状，再加入 15 mL 水和 6 mol/L 盐酸 10 mL，搅拌均匀后放在沸水浴上水解半小时，冷却后用 6 mol/L 氢氧化钠中和至溶液呈中性，然后定容至 100 mL，再取 10 mL 定容到 100 mL 成为稀释 1000 倍的总糖水解液。

五、注意事项

- (1) 淀粉提取时水浴温度不能超过 50°C ，否则会因淀粉溶解度增大而减少产量；
- (2) 倾出上清时要尽可能小心，避免沉降的淀粉被震动起来。

- (3) 离心机使用时要注意先进行离心管的平衡。

六、思考题

- (1) 如何选择生化物质实验中的实验材料？有何标准？
- (2) 材料的破碎方法有哪些？

实验二 总糖与还原糖的测定

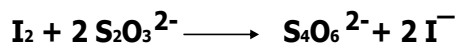
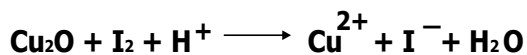
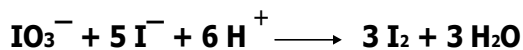
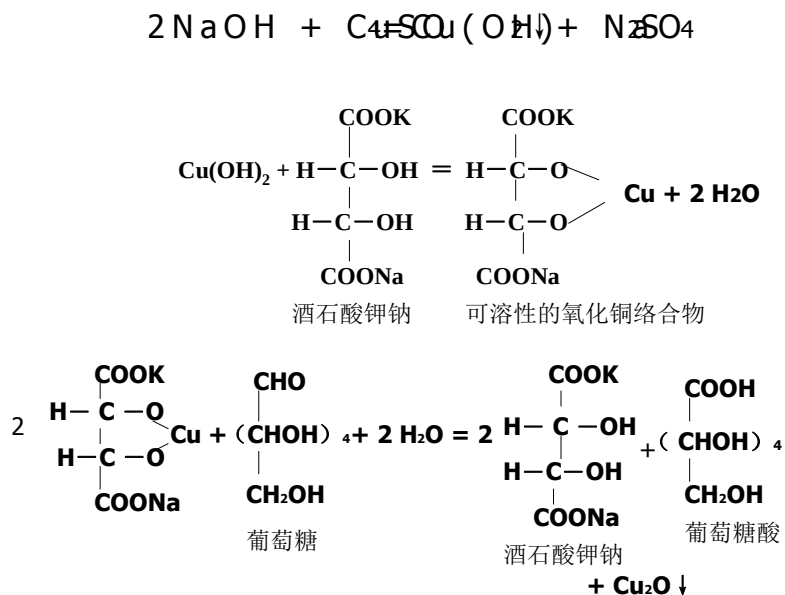
一、目的要求

掌握碱性铜试剂法测定还原糖的原理和操作方法。

二、原理

单糖和某些寡糖含有游离的醛基或酮基，有还原性，属于还原糖；而多糖和蔗糖等属于非还原性糖。利用多糖能被酸水解为单糖的性质可以通过测定水解后的单糖含量对总糖进行测定。

还原糖的测定方法多种，本实验采用间接滴定法。其原理是：在碱性溶液中，二价铜离子被还原糖还原成一价的氧化亚铜，氧化亚铜在酸性环境中与一定量的过量碘起反应，再用标准硫代硫酸钠滴定剩余的碘，即可算出还原糖的含量。反应方程式是：



三、试剂与器材

1. 试剂

(1) 铜试剂：

(A) 13 g 硫酸铜加水至 1000 mL

(B) ①24 g 酒石酸钾钠（用以保持铜离子碱性液中不生成 $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 沉淀）；

②40 g 无水碳酸钠
③50 g 碳酸氢钠 } 用以保持一定的碱性环境

④36 g 草酸钾（用以抑制铜离子的还原）

⑤1.6 g 碘酸钾（用以从碘化钾溶液中释放出一定量的自由碘）

制备溶液 B 时，先用 500 mL 热水溶化①、②、③，再加④、⑤，然后加水至 1000 mL，最后将 (A)、(B) 等量混合。

(2) 0.005 mol/L 硫代硫酸钠：1.24 g 硫代硫酸钠和 0.1 g 碳酸钠加水配成 1000 mL。

(3) 1%淀粉：1 g 可溶性淀粉溶于 100 mL 饱和的 NaCl 溶液中煮沸。

(4) 2%碘化钾：20 g KI 用水溶至 1000 mL。

(5) 1 mol/L 硫酸：166.6 mL 母液溶于水至 1500 mL。

(6) 0.5 mg/mL 标准葡萄糖：0.5 g 葡萄糖加水至 1000 mL。

2. 器材

碱式滴定管、恒温水浴锅或电磁炉

四、操作步骤

(1) 样品中总糖的水解：称取淀粉 1.0 g，放在大试管中用少量水调成糊状，再加入 15 mL 水和 6 mol/L 盐酸 10 mL，搅拌均匀后放在沸水浴上水解半小时，冷却后用 6 mol/L 氢氧化钠中和至溶液呈中性，然后定容至 100 mL，再取 10 mL 定容到 100 mL 成为稀释 1000 倍的总糖水解液。

(2) 取 6 只试管，按照下表的次序加入试剂。另取 6 个小三角烧瓶，按相应的试管顺序编号。

试剂 管号		H ₂ O (mL)	标准葡萄糖 (mL)	总糖水解液 (mL)	铜试剂 (mL)	沸水浴中煮沸 15 分钟
空白试验	1	2			4	
	2	2			4	
标准试验	1	1	1		4	
	2	1	1		4	
总糖试验	1			2	4	
	2			2	4	

(3) 各试管冷却后，摇动试管，使试管底部的红色沉淀分散后倾入相应的三角瓶中；

(4) 分别在每个试管中加入 2 mL 2%碘化钾溶液和 2 mL 1 mol/L H_2SO_4 ，以洗涤管中的残留物，并

转入相应的三角瓶中，最后再用蒸馏水洗涤试管 2 次，每次 1mL，洗涤液均转入相同的三角瓶中；

(5) 用 0.005 mol/L NaS₂O₃ 滴定至碘颜色接近消失时加入淀粉指示剂 5 滴，继续滴定至蓝色消失为止。

五、计算

按照如下公式计算还原糖的含量：

$$(V_{\text{空}} - V_{\text{标}}) / 0.5 \text{ mg} = (V_{\text{空}} - V_{\text{未知}}) / X \quad (X \text{ 为样品中还原糖的含量})$$

$$X = \frac{0.5}{V_{\text{空}} - V_{\text{标}}} \times (V_{\text{空}} - V_{\text{未知}})$$

六、注意事项

- (1) 各试管的处理应一致，测定溶液应同时放入沸水中，再同时从沸水浴中取出。
- (2) 在用碘化钾和硫酸洗涤试管时要洗净，否则会影响滴定结果的准确性。
- (3) 滴定终点时碘与淀粉反应形成的紫蓝色褪尽，溶液呈现二价铜离子的浅蓝色，不要误以为终点未到。

七、思考题

- (1) 碱性铜试剂法测定还原糖是直接滴定还是间接滴定？两种滴定方法各有何优点？

实验三 蛋白质等电点测定

一、目的

了解等电点的意义及其与蛋白质分子聚沉能力的关系。

二、原理

蛋白质的分子量很大，它能形成稳定均一的溶液，主要是由于蛋白质分子都带有相同符号的电荷，同时蛋白质分子周围有一层溶剂化的水膜，避免蛋白质分子之间聚集而沉降。

蛋白质分子所带的电荷与溶液的 pH 值有很大关系，蛋白质是两性电解质，在酸性溶液中成阳离子，在碱性溶液中成阴离子。蛋白质分子所带净电荷为零时的 pH 值称为蛋白质的等电点 (pI)。在等电点时，蛋白质分子在电场中不向任何一极移动，而且分子与分子间因碰撞而引起聚沉的倾向增加，所以这时可以使蛋白质溶液的粘度、渗透压均减到最低，且溶液变混浊。若再加入一定量的溶剂如乙醇、丙酮，它们与蛋白质分子争夺水分子，竭力减低蛋白质水化层的厚度而使混浊更加明显。各种蛋白质的等电点都不相同，但偏酸性的较多，如牛乳中的酪蛋白的等电点是 4.7~4.8，血红蛋白等电点为 6.7~6.8，胰岛素是 5.3~5.4，鱼精蛋白是一个典型的碱性蛋白，其等电点在 pH12.0~12.4。近年来蛋白质的等电点可以采用等电聚焦技术加以准确测定，但需一定的实验条件。本实验采用蛋白质在不同 pH 溶液中形成的混浊度来确定，即混浊度最大时的 pH 值即为该种蛋白质的等电点值，这个方法虽然不很准确，但在一般实验条件下都能进行，操作也简便。

三、器材及试剂

1. 器材：

试管、吸管、移液管、量筒、500mL 容量瓶、试管架

2. 试剂：

(1) 0.01 mol/L 醋酸溶液

(2) 0.1 mol/L 醋酸溶液

(3) 1 mol/L 醋酸溶液

(4) 1 mol/L 氢氧化钠溶液（氢氧化钠和醋酸溶液的浓度要标定）

(5) 酪蛋白

四、操作步骤

1. 制备蛋白质胶液

(1) 称取酪蛋白 3 克，放在烧杯中，加入 50 mL 40℃ 的蒸馏水。

(2) 加入 50 毫升 1 mol/L 氢氧化钠溶液，微热搅拌直到蛋白质完全溶解为止。

(3) 在烧杯中再加入 1 mol/L 醋酸溶液 50 mL，摇匀，使蛋白质完全溶解为止。

(4) 将溶解好的蛋白溶液转移到 500 mL 容量瓶中，并用少量蒸馏水洗净烧杯，一并倒入容量瓶。加入蒸馏水定容至 500 mL，得到略现浑浊的、在 0.1 mol/L NaAC 溶液中的酪蛋白胶体。

2. 等电点测定

按下表顺序在各管中加入蛋白质胶液，并准确地加入蒸馏水和各种浓度的醋酸溶液，加入后立即摇匀。

管号	蛋白质胶液 (mL)	H ₂ O (mL)	0.01 mol/L HAC (mL)	0.1 mol/L HAC (mL)	1 mol/L HAC (mL)	pH	观 察		
							0 分钟	10 分钟	20 分钟
1	1	4.38	0.62	—	—	5.8			
2	1	3.75	1.25	—	—	5.5			
3	1	4.75	—	0.25	—	5.2			
4	1	4.50	—	0.50	—	4.9			
5	1	4.00	—	1.00	—	4.6			
6	1	3.00	—	2.00	—	4.3			
7	1	1.00	—	4.00	—	4.0			
8	1	4.20	—	—	0.80	3.7			
9	1	3.40	—	—	1.60	3.4			

观察各管产生的混浊并根据混浊度来判断酪蛋白的等电点。观察时可用+, ++, +++, 表示浑浊度。

五、思考题

- (1) 在等电点时蛋白质的溶解度为什么最低？请结合你的实验结果和蛋白质的胶体性质加以说明。
- (2) 在分离蛋白质时等电点有何实际应用意义？

实验四 酪蛋白的制备

一、目的要求

- 1、掌握从牛乳中制备酪蛋白的原理和方法。
- 2、了解等电点沉淀在蛋白质制备中的应用。

二、原理

牛奶含有半乳糖、蛋白质、脂肪成份。蛋白质中的酪蛋白通过等电点沉淀，再通过离心而获得，糖类小分子由于处于清液中而分离，沉淀物中所含的脂肪通过有机溶剂抽提而去除，最终得到纯白色、晶状酪蛋白。

三、试剂与器材

材料：牛奶（奶粉配制，3%）

试剂：0.2 mol/L HAc-NaAc 缓冲液、95%乙醇、乙醚

器材：离心机、水浴锅、pH 计

四、操作方法

1. 取 10mL 40℃ 牛奶预热，加入 40℃ 预热的醋酸缓冲液 10mL 左右，边加边搅拌，调 pH 至 4.7，室温冷却，5000r/min 离心 5min，得到沉淀。
2. 沉淀于离心管内加入 4mL H₂O 悬浮，5000r/min 离心 5min，得到沉淀。
3. 沉淀于离心管内加入 20mL 乙醇，放置 5min，微搅动，去脂肪。
4. 漏斗过滤(或 5000r/min 离心 5min)上述悬浮液，在漏斗中加入 20mL 乙醇悬浮沉淀，滤干(或 5000r/min 离心 5min)。
5. 加入 20mL 乙醇乙醚混合液（1:1）洗涤，漏斗过滤(或 5000r/min 离心 5min)，后再加入 20mL 乙醚洗涤脂肪完毕，漏斗过滤。
6. 于 60℃，带滤纸烘干 4h，称重并计算得率。

五、计算

$$\text{实际获得百分率} = \frac{\text{酪蛋白质量 (g)}}{10 \text{ mL 牛奶}} \times 100\%$$

六、注意事项

- 1、牛奶与缓冲液要预热
- 2、缓冲液要缓加缓搅

3、在滤纸上样品的脱脂过程要搅动，不得破损滤纸

4、实验环境要保持空气流通，门窗要开

七、思考题

(1)在酪蛋白制备时为什么要用醋酸缓冲液调 pH 到 4.8?

(2)乙醚、乙醇作用是什么?

实验五 氨基酸的分离鉴定—纸层析法

一、目的

通过对氨基酸的分离，学习纸层析法的基本原理及操作方法。

二、原理

层析法又称色谱法。1903 年，科学家发现用挥发油冲洗菊粉柱时，可将叶子的色素分成许多颜色的层圈。此后，把这种利用有色物质在吸附剂上因吸附能力不同而得到分离的方法称为色谱法（Chromatography）。虽然后来将色谱法应用于无色物质分离，但是这个名字一直沿用下来。

层析法除了吸附层析以外，还有离子交换层析和分配层析。一般认为纸层析是分配层析中的一种，但也并存着吸附和离子交换作用。

分配层析是利用不同的物质在两个互不相溶的溶剂中的分配系数不同而得到分离的。通常用 α 表示分配系数。

$$\alpha = \frac{\text{溶质在固定相的浓度}(C_s)}{\text{溶质在流动相的浓度}(C_L)}$$

一个物质在某溶剂系统中的分配系数，在一定的温度下是一个常数。

纸层析是以滤纸作为惰性支持物的分配层析，滤纸纤维上的 OH 基具有亲水性，因此能吸附一层水作为固定相，而通常把有机溶剂作为流动相。有机溶剂自上而下流动，称为下行层析；自下而上流动，称为上行层析。流动相流经支持物时与固定相之间连续抽提，使物质在两相之间不断分配而得到分离。

纸层析的实际操作是在滤纸的一端（通常距纸边缘 2 厘米），点上样品，干后，在密闭的容器内，待纸饱和了适当的溶剂蒸气后，令溶剂从有样品的一端经过毛细管的作用，流向另一端，使样品中的混合物得到分离。这种操作常称单向层析。为了得到更好的分离，还可以作双向操作或称双向层析。即在滤纸的一角上点样品，先用一种溶剂系统展层后，使滤纸干燥，将纸调转 90°，再用另一个溶剂系统展层。

物质分离后，层析点在图谱上的位置，即在纸上的移动速率，用 R_f 表示。

$$R_f = \frac{\text{原点到层析点中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}}$$

若 X 表示原点到层析点中心的距离。 $X+Y$ 表示原点到溶剂前沿的距离，则

$$R_f = \frac{X}{X + Y}$$

R_f 值的主要决定因素是分配系数（ α ）。对于某一物质在一定条件下的 α 值是固定的。因此 R_f

值为其特征常数。

现将影响 R_f 值的因素概括如下：

1、物质结构的影响：极性物质易溶于极性溶剂（水）中，非极性物质易溶于非极性溶剂（有机溶剂）中，所以物质的极性大小决定了物质在水和有机溶剂之间的分配情况。例如酸性和碱性氨基酸极性大于中性氨基酸，所以前者在水（固定相）中分配较多，因此 R_f 低于后者。

—CH₂—基是疏水性基团，如果分子中极性基数目不变，则—CH₂—基增加，整个分子的极性就降低，因此易溶于有机溶剂（流动相）中， R_f 值亦随之增加，例如氨基酸的 R_f 值：甘氨酸 < 丙氨酸 < 亮氨酸，二羧基氨基酸中，天冬氨酸 < 谷氨酸。

极性基团的位置不同也会引起 R_f 变化，例如在正丁醇-甲酸-水系统中层析时， α -丙氨酸的 R_f 值大于 β -丙氨酸。

2、溶剂的影响：同一物质在不同溶剂中 R_f 值不同，选择溶剂系统时应使被分离物质在适当 R_f 值范围内（0.005 到 0.85 之间），并且不同物质的 R_f 至少差别为 0.05 才能彼此分开。

溶剂的极性大小也影响物质的 R_f 值。在用与水互溶的脂肪醇作为溶剂时，氨基酸的 R_f 值随着溶剂碳原子数目增加而降低。

3、pH 的影响：溶剂系统的 pH 会影响物质极性基团的解离形式，如对于酸性氨基酸，在酸性时所带净电荷比碱性时少，带电荷越少亲水性越小，因此在酸性溶剂中 R_f 值较碱大。而碱性氨基酸则与此相反。借此性质用酸相和碱相溶剂进行双向层析，可使酸碱性不同的氨基酸达到分离的目的。

溶剂的 pH 还可影响有机溶剂（流动相）含水量，溶剂酸碱度大，则含水量多。对于极性物质如氨基酸来说 R_f 值增加，非极性物质则减少。若 pH 不适合，使同种物质有不同解离形式，其 R_f 也略有不同，则此物质层析呈带状图谱。因此溶剂中的酸或碱的含量必须足够，并且层析缸（或箱）中用酸或碱的气体饱和才可以防止上述现象，使物质得到圆点状图谱。

4、滤纸的影响：层析滤纸必须质地均匀、紧密，有一定机械强度，并且杂质较少，如纸中含有 Ca²⁺、Mg²⁺、Cu²⁺ 等金属离子杂质，可与氨基酸形成络合物使层析图谱出现阴影，可用稀酸（0.01 mol/L⁻¹ 或 0.4 mol/L⁻¹HCl）洗涤滤纸将之除去。

5、温度的影响：温度不仅影响物质在溶剂中的分配系数，而且影响溶剂相的组成及纤维素的水合作用。温度变化对 R_f 值影响很大，所以层析最好在恒温室中进行，控制温度相差不超过 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

除上述因素影响 R_f 值外，样品中含有盐份和其他杂质以及点样过多均会影响样品的有效分离。

无色物质的层析图谱可用光谱法（紫外光照射）或显色法鉴定，氨基酸层析图谱常用茚三酮或茚哚醌作显色剂。

茚三酮显色反应受温度、pH、时间影响较大，如果要使实验结果能很好重复，必须严格控制上述条件。样品中如含有大量盐酸会使氨基酸不易显色，如含有大量盐时显色点上会出现白斑，此外空气中的杂质如氨、硫化氢或酚等都会影响显色结果。

铜离子可以与氨基酸-茚三酮显色物形成络合物，颜色较稳定。用硫酸酮乙醇溶液洗脱层析后的

显色斑点，借比色法可定量测定氨基酸含量。

三、器材及试剂

1. 器材

层析缸、毛细管、喷雾器、培养皿、电吹风、层析滤纸（新华一号）

2. 试剂

(1) 展开剂：溶剂系统（24 mL）：正丁醇—乙酸—水（4：1：3，V/V）

(2) 氨基酸溶液：0.5%的脯氨酸、缬氨酸、丝氨酸、酪氨酸、精氨酸溶液及它们的混合液（各组份浓度均为 0.5%）。

(3) 显色剂：0.1%水合茚三酮乙醇溶液。

四、操作步骤

1. 将配好的层析液倒入培养皿中，把培养皿放入层析缸中，盖紧缸盖，放置 30 分钟。

2. 取层析滤纸（长 18—20 厘米，宽 14 厘米）一张。在垂直于纸的纹路一端距边缘 1.5 厘米处用铅笔划一条直线，在此直线上每间隔 2 厘米作一记号，作为点样位置（共 6 点），并用铅笔在点样点下端写出所点氨基酸的名称。

3. 点样：用毛细管吸取样品约 2cm 高，将各氨基酸样品分别点在这六个位置上，用电吹风吹干后再点一次，共点三次。每点在纸上扩散的直径最大不超过 5 毫米。

4. 扩展：用线将滤纸缝成筒状，纸的两边不能接触。将滤纸直立于培养皿中，点样的一端在下，扩展剂的液面需低于点样线 1 厘米。当前沿线到达层析纸 1/2 处时即取出滤纸，用铅笔描出溶剂前沿界线，用电吹风热风吹干。

5. 显色：用喷雾器均匀喷上 0.1%茚三酮溶液，然后用热风吹干即可显出各层析斑点。

6. 用铅笔画出层析斑点并算出 R_f 值。

五、注意事项

1. 为了防止滤纸被手上的汗液污染，在操作时带手套。

2. 重复点样时可用吹风机的冷风吹干样品，喷了茚三酮后的显色则要用热风吹干滤纸。

六、思考题

(1) 如何用纸层析法对氨基酸进行定性和定量的测定？

(2) 纸层析和柱层析、薄层层析、高效液相层析各有什么特点？

(3) 请对试验中所用的几种氨基酸移动快慢的原因给予简要分析。

实验六 蛋白质含量的测定

目的要求

1. 学习和掌握蛋白质含量测定的原理
2. 掌握测定蛋白质浓度的操作技术（采用双缩脲法测定蛋白质浓度）

（一）微量凯氏定氮法测定蛋白质总含量

一、原理

天然有机物(如蛋白质和氨基酸等化合物)的总氮量通常用微量凯氏定氮法(Micro - Kjeldahl Method)来测定。

当被测的天然含氮化合物与浓硫酸共热时分解出氨，氨与硫酸反应生成硫酸铵，此过程称为消化。由于消化过程进行缓慢，实验中常添加硫酸钾和硫酸铜的混合物来促进，硫酸铜是催化剂，硫酸钾可提高消化液的沸点。氧化剂过氧化氢也能加速反应。消化完成后，在凯氏定氮仪中加入强碱消化液，使硫酸铵分解出氨。用水蒸汽蒸馏法将氨蒸入无机酸溶液中，然后再用标准酸溶液进行滴定，滴定所用无机酸的量(mol)相当于被测样品中氨的量(mol)，根据所测得的氨量即可计算样品的含氮量。

上述过程的化学反应如下：

(1) 消化

有机氮化物(C、H、O、N、P、S)+浓 $\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3\uparrow + \text{SO}_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$

$\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

(2) 蒸馏

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NaOH} \rightarrow \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3\uparrow$

(3) 吸收

$\text{NH}_3 + \text{H}_3\text{BO}_3 \rightarrow \text{NH}_4\text{HB}_4\text{O}_7 + \text{H}_2\text{O}$

(4) 滴定

$\text{NH}_4\text{HB}_4\text{O}_7 + \text{HCl} \rightarrow \text{NH}_4\text{Cl} + \text{H}_3\text{BO}_3$

在微量凯氏定氮法中，常用硼酸-指示剂混合液收集氨，氨与溶液中氢离子结合生成铵离子，使溶液中氢离子浓度降低，指示剂颜色发生改变，然后用标准无机酸滴定，直至恢复溶液中原来氢离子浓度，即指示剂变回原来颜色为止。所用无机酸的摩尔数即相当于样品中氨的摩尔数。本法适用范围约为 0.2-1 mg 氮。

因为蛋白质含氮量通常在 16 %左右，所以将凯氏定氮法测得的含氮量乘上系数 6.25，便得到该样品的蛋白质含量。

二、试剂和器材

1. 试剂

- (1) 浓硫酸 (AR),
- (2) 粉末硫酸钾-硫酸铜混合物: $K_2SO_4 : CuSO_4 \cdot 5H_2O = 3 : 1$ 、 $6 : 1$ 或 $10 : 1$,
- (3) 40% (W/V) 氢氧化钠溶液,
- (4) 4% (W/V) 硼酸溶液,
- (5) 0.01 mol/L 标准盐酸 (用硼砂标定): 吸取分析纯盐酸 (比重 1.19, 约 12 mol/L) 8.5 mL, 用蒸馏水稀释至 1 L, 贮于试剂瓶中待标定。准确称取 3 份干燥的硼砂, 每份 0.381-0.383 g 分别放在 150 mL 三角瓶中, 加入 20 mL 蒸馏水使其溶解, 加入三滴甲基红指示剂 (0.1 g 甲基红溶于 250 mL 水中), 用待测的盐酸滴定至橙红色为止, 记下盐酸的滴定体积, 通过计算即可知道盐酸的准确浓度:

$$C_{HCl} = \frac{W \times 1000}{M_r \times V}$$

式中, W 为硼砂称量 (g); V 为 HCl 的滴定体积 (mL); M_r 为硼砂分子量。

- (6) 混合指示剂贮备液: 取 50 mL 0.1% 甲烯蓝乙醇溶液与 200 mL 0.1% 甲基红乙醇溶液混合而成, 贮于棕色瓶中备用。此指示剂在 pH 5.2 为紫红色; pH 5.4 为暗蓝色 (或灰色); pH 5.6 为绿色。变色范围很窄, 变色点 pH 为 5.4, 故混合指示剂很灵敏。

- (7) 标准硫酸铵溶液 (0.3 mg 氮/ mL): 取 141.6 mg 分析纯硫酸铵, 加水溶解, 定容至 100 mL。

2. 待测样品: 豆浆(市售)

3. 器材

- (1) 微量凯氏定氮仪,
- (2) 50 mL 凯氏烧瓶, 100 mL 锥型瓶, 50 mL 酸式滴定管, 100 mL 量筒, 100 mL 容量瓶, 100 mL 烧杯, 酒精灯

三、操作方法

3.1 样品的消化

在凯氏烧瓶中加入催化剂约 50 mg, 用移液管依次加入 3 mL 均一的豆浆和 3 mL 浓硫酸 (移液管要接近凯氏烧瓶底部, 不使样品粘附在瓶口或瓶颈)。另取一支凯氏烧瓶加入 3 mL 水代替豆浆, 其余试剂同上, 此为空白。

将凯氏烧瓶放在通风柜内的电炉上加热, 火力不要太猛, 应以使液体保持微沸状态为宜。瓶内液体逐渐由黄色变为黑色, 继而转为淡黄色, 最后成清澈淡蓝色溶液, 消化即告完全, 取出烧瓶, 冷却, 将瓶内液体转移至 50 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度。

3.2 仪器的装置和蒸洗

按图 1 装好凯氏定氮仪, 再用蒸气进行蒸洗, 以除去 NH_3 和其它干扰物质。蒸洗方法如下:

接通冷凝水, 打开夹子 (J), 往蒸馏瓶 (B) 内加入占球部 1/3 体积的清水, 而后取 5 mL 蒸馏

水从小漏斗 (A) 缓慢地注入反应瓶 (F)，关上夹子 (I)，同时加热蒸馏瓶 (B)，蒸馏反应瓶内的蒸馏水，使其沸腾产生蒸气。产生的气体沿导管上升到冷凝管 (C)，气体经过冷却从冷凝管末端 (G) 流入收集瓶。排出反应瓶 (F) 中的液体，重复蒸洗 2~3 次，以便较熟练掌握蒸洗的方法。(反应瓶 (F) 中的液体排出的方法：样品蒸馏完毕后，继续加热使其沸腾，移开酒精灯，关上夹子 (I)，稍等片刻，由于蒸馏瓶 (B) 中的蒸气较反应瓶 (F) 中的多，所以冷却后蒸馏瓶 (B) 中的压力比反应瓶 (F) 的低，反应瓶 (F) 内的废液迅速地从出样口 (H) 抽出到反应瓶外，随即自加样小漏斗 (A) 往反应瓶 (F) 中较快地倒入一些冷蒸馏水，关上夹子 (I)，稍等片刻，反应瓶 (F) 内的液体又迅速地从出样口 (H) 抽出，然后打开夹子 (K) 排出蒸馏瓶中的热水，关上夹子 (K)，打开夹子 (J)，往蒸馏瓶 (B) 中加入 1/3 球部体积的清水，即可进行下一次蒸馏)。仪器的安装和蒸洗过程中，应很好地掌握几个夹子的开关关系，避免漏气是实验成败的关键步骤。

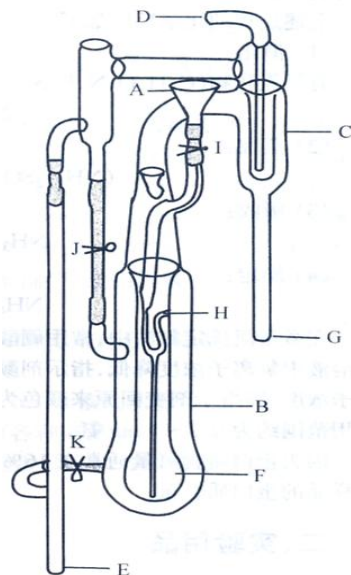


图 1 微量凯氏定氮仪装置图

A. 小漏斗 B. 蒸馏瓶 C. 冷凝管 D. 入水口 E. 出水口 F. 反应瓶
G. 冷凝管末端 H. 出样口 I、J、K. 夹子

3.3 标准硫酸铵的测定

- (1) 吸取 10 mL 4% 硼酸溶液注入三角烧瓶，加入 2 滴指示剂，将其倾斜地放在冷凝管末端 (G) 下，使管末端插入溶液内。
- (2) 用移液管准确吸取 5 mL 标准硫酸铵溶液置于小漏斗 (A)，小心打开夹子 (I)，使其缓慢流入反应瓶 (H)，用 1~2 mL 蒸馏水冲洗漏斗后放入反应瓶 (H)。
- (3) 量取 5 mL 40% NaOH 溶液，置小漏斗 (A)，小心打开夹子，使其缓慢流入反应瓶 (H)，同样用

1~2 mL 蒸馏水冲洗漏斗后放入反应瓶 (H)，关上夹子 (I)，避免蒸馏过程中氨散失。

(4) 加热蒸馏瓶 (B) 使反应瓶内液体开始沸腾，立即收集氨，当三角瓶中溶液由紫红色变成鲜绿色开始计时，蒸馏 5 min 后移动三角瓶使液面离开冷凝管口约 1 cm，继续收集 2-3 min，最后用蒸馏水把末端剩余的氨全部洗到三角瓶中，即算蒸馏完毕。排出废液，量取 5 mL 蒸馏水蒸洗反应瓶一次，就可以进行第二份标准硫酸铵溶液的蒸馏工作。

(5) 将收集的各瓶蒸馏液分别用 0.0100 mol/L 标准盐酸溶液滴定至蓝色消失，使溶液呈淡桔红色为止。

用标准硫酸铵溶液连续测定三次，三次测定的终点颜色应一致，滴定数据差值不超过 ± 0.05 mL。

3.4 样品及空白的测定

将 3.1 操作所得的消化液在定氮仪上进行含氮量测定，方法与标准硫酸铵溶液测定相同，并进行空白测定。

3.5 结果处理

$$\text{样品含氮量(mg/mL)} = \frac{(A - B) \times C \times 14 \times N}{V}$$

若测定的样品含氮部分只是蛋白质，则

$$\text{样品中的蛋白质含量(mg/mL)} = \frac{(A - B) \times C \times 14 \times 6.25 \times N}{V}$$

式中：A 为滴定样品用去的盐酸平均毫升数，B 为滴定空白用去的盐酸平均毫升数，V 为样品的毫升数，C 为盐酸的准确摩尔浓度，14 为氮的原子量，6.25 为系数，N 为样品的稀释倍数。

按上面公式计算每毫升标准硫酸铵溶液的含氮量(mg/mL)和每毫升豆浆中蛋白质含量(mg/mL)。

四、 注意事项

(1) 如果测定的样品不是纯蛋白，测定的总氮量中很可能包含非蛋白氮，若要进行比较准确的测定，就必须分别测定样品中的蛋白氮和非蛋白氮。后者的测定是将样品制成匀浆或抽提液，用三氯醋酸或氢氧化铜等蛋白质沉淀剂将蛋白质沉淀，然后按测总氮的方法分析上清液，便得到非蛋白氮。把总氮量减去非蛋白氮量即得蛋白氮量。将蛋白氮量乘以 6.25 便是蛋白质的含量。

(2) 为保证所有硫酸铵都能转化为氨，需要使溶液呈强碱性，所以要加足量的 40%NaOH 溶液。加入时应缓慢进行，以免产生剧烈反应导致接受瓶内硼酸溶液的倒吸和氨的损失。碱液加入后，有铜氨离子、氢氧化铜或氧化铜等化合物生成，溶液呈蓝色或褐色，并有胶状沉淀产生，这是正常现象。反之，如果颜色不变，说明碱液可能不够。

(3) 蒸馏时要避免火力不稳，否则会发生样品被倒吸到蒸馏瓶的现象。

(4) 在进行下一次蒸馏时，要先将蒸馏瓶中的热水放掉，加入冷水，否则也会发生样品被倒吸到蒸馏瓶的现象。

五、思考题

(1) 写出以下各步的化学反应式

a. 蛋白质的消化; b. 氨的蒸馏; c. 氨的吸收; d. 氨的滴定。

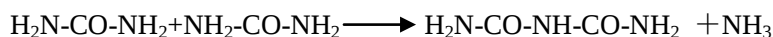
(2) 测定标准硫酸铵和空白的目的是什么?

(3) 消化时加硫酸钾-硫酸铜混合物的作用是什么?

(二) 双缩脲法测定蛋白质浓度

一、实验原理

具有两个或两个以上肽键的化合物皆有双缩脲反应, 因此蛋白质在碱性溶液中, 也能与 Cu^{2+} 形成紫红色络合物, 颜色深浅与蛋白质浓度成正比, 故可用来测定蛋白质的浓度。在一定条件下, 未知样品的溶液与标准蛋白质溶液同时反应, 并于 540 nm 下比色, 可以通过标准蛋白质的标准曲线求出未知样品的蛋白质浓度。本法测定蛋白质范围 1-10 mg。



双缩脲

关于分光光度法测定物质含量的原理介绍如下:

分光光度法是利用物质所特有的吸收光谱来鉴别物质或测定其含量的技术。因为分光光度法极为灵敏、精确、快速和简便, 在复杂组分的系统中, 不需要分离, 即能检测出其中所含的极少量物质, 因此分光光度法目前已成为生物化学研究中广泛使用的方法之一。

当光线通过某种物质的溶液时, 透过的光的强度减弱。因为有一部分光在溶液的表面反射或分散, 一部分光被组成此溶液的物质所吸收, 只有一部分光可透过溶液。

入射光=反射光+分散光+吸收光+透过光

如果我们用蒸馏水 (或组成此溶液的溶剂) 作为“空白”去校正反射, 分散等因素造成的入射光的损失, 则

入射光=吸收光+透过光

I_0 为经过空白校正后入射光的强度; I 为透过光的强度。

根据实验得知

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon c L}$$

式中, c 表示吸收物质的摩尔浓度; L 表示吸收物质的光径, 用 cm 表示; ϵ 表示吸收物质的摩尔消光系数, 它表示物质对光的吸收特性, 不同物质的 ϵ 数值不同。

所以
$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon c L}$$

令 T (透射比) $= \frac{I}{I_0}$, 则 $T\% = \frac{I}{I_0} \times 100$

$\therefore T = 10^{-\epsilon c L}$

由上式可得

$$\lg \frac{1}{T} = \epsilon c L$$

$\lg \frac{1}{T}$ 为物质的消光值 (E) 或吸光度 (A)。

$$\therefore A = \epsilon c L$$

若以 A 对物质的浓度作图, 则得一直线。

上式说明了物质的吸光度与吸收物质的浓度和液层的厚度成正比, 这就是 Beer—Lambert 定律。

二、试剂与器材

试剂: 双缩脲试剂: 溶解 1.50 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 6.0 g $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 于 500ml 水中, 在搅拌下加入 300 ml 10% NaOH 溶解, 用水稀释到 1 升, 贮存在冰箱中, 备用。

2 mg/mL 牛血清白蛋白

器材: 722 型分光光度计、水浴锅

三、操作步骤

1. 取 15 支试管, 按下表编号、加试剂

试管编号	0	1	2	3	4	5	6	样品
牛血清白蛋白(mg)	0	0.6	1.2	2.4	3.6	4.8	6.0	
2mg/mL 牛血清白蛋白体积(mL)	0	0.3	0.6	1.2	1.8	2.4	3.0	—
待测液体积(mL)	—	—	—	—	—	—	—	3.0*
蒸馏水(mL)	3.0	2.7	2.4	1.8	1.2	0.6	0	0
OD_{540}								

2. 各管混匀后, 加入双缩脲试剂 3.0 mL, 37 °C 反应 30 min。

3. 以 0 号管调零, 测定各管 540nm 光吸收值。

四、结果处理

1. 绘制标准曲线

以牛血清白蛋白含量为横坐标, OD_{540} 为纵坐标, 绘制标准曲线。

2. 样品的计算

根据样品的 OD_{540} 从标准曲线上查得样品的蛋白质含量(mg), 再根据样品的体积计算出样品的浓度。

五、注意事项

1. 须于显色后 30 min 内测定, 且各管由显色到比色时间应尽可能一致。

2.样品蛋白质含量应在标准曲线范围内。

(三) Folin—酚试剂法 (Lowry 法) 测定蛋白质浓度

一、原理

蛋白质含有两个以上的肽键($-\text{CO}-\text{NH}-$), 因此有双缩脲反应, 在碱性溶液中, 能与 Cu^{2+} 形成络合物。Folin 酚反应是在双缩脲反应的基础上, 引进 Folin 试剂 (磷钼酸—磷钨酸试剂), 蛋白质—铜络合物能还原磷钼酸—磷钨酸试剂, 生成蓝色物质。在一定条件下, 蓝色强度与蛋白质的量成正比比例。

本法的优点是操作简便、灵敏度高、较紫外吸收法灵敏 10—20 倍, 较双缩脲法灵敏 100 倍, 反应约在 15 min 内有最大显色, 并至少可稳定几小时。其不足之处是此反应受多种因素干扰。对双缩脲反应发生干扰的基团, 如 $-\text{CO}-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CS}-\text{NH}_2$, 在性质上是氨基酸或肽的缓冲剂, 如 Tris 缓冲剂以及蔗糖、硫酸铵、巯基化合物等均可干扰 Folin-酚反应。此外, 所测的蛋白质样品中, 若含有酚类及柠檬酸, 均对此反应有干扰作用。在测试时应排除干扰因素或做空白实验消除。浓度较低的尿素 (约 0.5% 左右)、胍 (0.5% 左右)、硫酸钠 (1%)、硝酸钠 (1%)、三氯乙酸 (0.5%)、乙醇 (5%)、乙醚 (5%)、丙酮 (0.5%) 对显色无影响, 这些物质在所测样品中含量较高时, 则需做校正曲线。含硫酸铵的溶液只须加浓碳酸钠—氢氧化钠溶液即可显色测定。若样品酸度较高, 显色后色浅, 则必须将碳酸钠—氢氧化钠溶液的浓度提高 1-2 倍。

Folin-酚试剂由甲试剂与乙试剂组成。Folin-乙试剂仅在酸性 pH 下稳定, 但上述还原反应只在 pH10 的情况下发生, 故当 Folin-乙试剂加到碱性的铜-蛋白质溶液中时, 必须立即混匀, 以便在磷钼酸-磷钨酸试剂被破坏之前, 还原反应能发生。

本法可测定范围是 25-250 μg 蛋白质。

二、试剂和器材

2.1 试剂

(1) 试剂甲:

- (A) 4%碳酸钠 (Na_2CO_3) 溶液
- (B) 0.2 mol/L 氢氧化钠 (NaOH) 溶液
- (C) 2%酒石酸钾钠溶液 (或酒石酸钾、酒石酸钠)
- (D) 1%硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶液

临用前将(A):(B):(C):(D)=50:50:1:1(V/V)混合, 此混合液即为试剂甲。混合后的溶液一天内有效。

(2) Folin-酚试剂 (试剂乙)

在 1.5 L 容积的磨口回流瓶中加入 100 g 钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g 钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 及 700 mL 重蒸水, 50 mL 85%磷酸, 100 mL 浓盐酸充分混合, 烧瓶内加小玻璃珠数颗, 以防溶液

溢出，接上回流冷凝管以文火回流 10 h。回流结束后，加入 150 g 硫酸锂 (LiSO_4)，50 mL 重蒸水及数滴液溴，开口继续沸腾 15 min，以除去多余的溴。冷却后溶液呈金黄色（如果仍呈绿色，须再重复滴加溴水的步骤），定容至 1 L，过滤，滤液置棕色瓶中保存，可在冰箱长期保存。若此贮存液使用过久，颜色由黄变绿，可加几滴液溴，煮沸数分钟，恢复原色仍可继续使用。使用时用标准 NaOH 滴定酸度，以酚酞为指示剂。该试剂的酸度应为 2 mol/L 左右，将之稀释至相当于 1 mol/L 酸度使用，即为 Folin-酚试剂。

(3) 标准蛋白质溶液：可用结晶牛血清白蛋白，预先经微量凯氏定氮法测定蛋白质含量，再根据其纯度配制成 500 μg 蛋白/mL 溶液。

2.2 测试样品

血清使用前稀释 100 倍或约含 20-250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白质的样品溶液。

2.3 器材

(1) 722 型分光光度计

(2) 恒温水浴锅

(3) 试管及试管架

(4) 0.5mL，1mL 及 5mL 移液管

三、操作方法

3.1 蛋白浓度标准曲线的制作

取 14 支试管，分两组按下表平行操作

试管编号 试剂处理	0	1	2	3	4	5	6
蛋白含量(μg)	0	25	50	100	150	200	250
标准蛋白溶液(mL)	0	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
重蒸水(mL)	0.5	0.45	0.40	0.30	0.20	0.10	0
Folin-酚甲试剂(mL)	各管加入 4mL						
混匀，于 20-25℃放置 10 min							
Folin-酚乙试剂(mL)	各管加入 0.5mL						
迅速混匀，30℃(或室温 20-25℃)水浴保温 30 min，以 0 号管为空白对照，在 650nm 处比色							
OD ₆₅₀							

绘制标准曲线：以 OD₆₅₀ 值为纵坐标，标准蛋白量为横坐标，在坐标纸上绘制标准曲线。

3.2 样品溶液蛋白质浓度测定

取 6 支试管，分两组，按下表平行操作

试管编号		
------	--	--

试剂处理	空白管(×3)	样品管(×3)
样品溶液(mL)	0	0.5
重蒸水(mL)	0.5	0
Folin-酚甲试剂(mL)	各管加入 4mL	
混匀, 于室温 20-25℃放置 10 min		
Folin-酚乙试剂(mL)	各管加入 0.5mL	
迅速混匀, 于 30℃(或室温 20-25℃)保温 30 min		
OD ₆₅₀		

3.3 计算

$$\text{蛋白质浓度(mg/mL)} = \frac{\text{OD}_{650} \text{ 值对应标准曲线蛋白含量} \times 10^{-3}}{\text{测定时所用样品溶液 mL 数}} \times \text{样品溶液稀释倍数}$$

3.4 注意事项

- (1) Folin-酚乙试剂在酸性条件下较稳定, 而 Folin-酚甲试剂是在碱性条件下与蛋白质反应生成碱性的铜-蛋白质溶液。因此当 Folin-酚乙试剂加入后, 应立即混匀, 使还原反应发生在磷钼酸-磷钨酸试剂破坏之前。
- (2) 血清应适当稀释使其蛋白质的含量在标准范围内。

四、思考题

- (1) Folin-酚法测定蛋白含量的原理是什么?
- (2) 有哪些因素会干扰 Folin-酚法测定蛋白含量?

(四) 考马斯亮蓝染色法测定蛋白质浓度

一、原理

考马斯亮蓝 (Coomassie Brilliant Blue) 测定蛋白浓度, 是利用蛋白质一染料结合的原理。考马斯亮蓝 G-250 存在着两种不同颜色形式, 红色和蓝色。此染料与蛋白质结合后颜色由红色形式转变成蓝色形式, 最大光吸收由 465 nm 变成 595 nm。在一定蛋白质浓度范围内, 蛋白质和染料结合符合比尔定律 (Beer's law), 因此可以通过测定染料在 595nm 处光吸收的增加量得到与其结合的蛋白质质量。蛋白质和染料结合是一个很快的过程, 约 2 min 即可反应完全, 呈现最大光吸收, 并可稳定 1 h 左右, 因此测定过程快速, 且不需要严格的时间控制。蛋白质染料复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, 在测定溶液中含蛋白质 5 μg/mL 时就有 0.275 光吸收值的变化, 比 Lowry 法灵敏 4 倍, 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。

此方法干扰物少，研究表明： NaCl 、 KCl 、 MgCl_2 、乙醇、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 不干扰测定。强碱性缓冲剂在测定中有一些颜色干扰，可以通过适当的缓冲液对照扣除其影响。 Tris 、乙酸、 α -巯基乙醇、蔗糖、甘油、 EDTA 、微量的去污剂（如 Triton X-100, SDS）和玻璃去污剂均有少量颜色干扰，用适当的缓冲液对照很容易除掉。但是，大量去污剂的存在对颜色影响太大而不易消除。

由于该法简单、迅速、干扰物质少、灵敏度高，现已广泛应用于蛋白质含量测定。

二、试剂和器材

2.1 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或按牛血清白蛋白 $\text{OD}_{1\text{cm}}^{1\%} = 6.6$ 测定蛋白质含量，再用 0.15 mol/L NaCl 或蒸馏水配制成 1 mg/mL ， 0.1 mg/mL 蛋白溶液。

(2) 考马斯亮蓝试剂

考马斯亮蓝 G-250 100 mg 溶于 50 mL 95% 乙醇中，加入 100 mL 85% 磷酸，用蒸馏水稀释至 1000 mL ，滤纸过滤。最终试剂中含 $0.01\%(\text{W/V})$ 考马斯亮蓝 G-250， $4.7\%(\text{W/V})$ 乙醇， $8.5\%(\text{W/V})$ 磷酸。

2.2 待测样品

未知蛋白质溶液，要求蛋白浓度范围为 $0.1\text{-}5 \text{ mg/mL}$ ，若浓度过高时，需用 0.15 mol/L NaCl 溶液或蒸馏水适当稀释。

2.3 器材

(1) 722 型分光光度计

(2) 微量进样器

(3) 移液管（ 0.1 mL 及 5 mL ）

(4) 试管及试管架

三、操作方法

3.1 标准法制作标准曲线

取 14 支试管，分两组按下表平行操作。

试管编号	0	1	2	3	4	5	6
标准蛋白含量(μg)	0	10	20	30	40	50	60
1 mg/mL 标准蛋白溶液(mL)	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06

蒸馏水(mL)	0.10	0.09	0.08	0.07	0.06	0.05	0.04
考马斯亮蓝试剂(mL)	5 mL						
摇匀，1 h 内以 0 号试管为空白对照，在 595nm 处比色							
OD _{595nm}							

以 OD_{595nm} 为纵坐标, 标准蛋白含量为横坐标, 在坐标纸上绘制标准曲线。

3.2 微量法制作标准曲线

取 12 支试管, 分两组按下表平行操作。

试管篇号	0	1	2	3	4	5
标准蛋白含量(μg)	0	1	3	5	7	9
0.1 mg/mL 标准蛋白溶液(mL)	0	0.01	0.03	0.05	0.07	0.09
蒸馏水(mL)	0.10	0.09	0.07	0.05	0.03	0.01
考马斯亮蓝试剂(mL)	1 mL					
摇匀, 1 h 内以 0 号试管为空白对照, 在 595 nm 处比色						
OD _{595nm}						

以 OD_{595nm} 为纵坐标, 标准蛋白含量为横坐标, 在坐标纸上绘制标准曲线。

3.3 未知样品蛋白质浓度的测定

测定方法同上, 取合适的未知样品体积, 使其测定值在标准曲线的直线范围内, 根据所测定的 OD_{595nm} 值, 在标准曲线上查出其相当于标准蛋白的量, 从而计算出未知样品的蛋白质浓度(mg/mL)。

3.4 注意事项

- (1) 如果测定要求很严格, 可以在试剂加入后的 5-20 min 内测定光吸收, 因为再这段时间内颜色最稳定。
- (2) 测定中, 蛋白-染料复合物会有少部分吸附于比色杯壁上, 但此复合物的吸附量可以忽略。测定完后可用乙醇将蓝色的比色杯洗干净。

四、思考题

- (1) 与其它测定蛋白质浓度的方法相比, 考马斯亮蓝染色法测定有何优点?

(五) 紫外分光光度法测定蛋白质浓度

一、原理

由于蛋白质分子中酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键, 因此蛋白质具有吸收紫外线的性质, 吸收高峰在 280 nm 波长处。在此波长范围内, 蛋白质溶液的光吸收值 (OD₂₈₀) 与其含量呈正比关系, 可用作定量测定。

利用紫外吸收法测定蛋白质含量的优点是迅速、简便、不消耗样品, 低浓度盐类不干扰测定。因此, 在蛋白质和酶的生化制备中 (特别是在柱层析分离中) 得到广泛应用。此法的缺点是: (1) 对

于测定那些与标准蛋白质酪氨酸和色氨酸含量差异较大的蛋白质，有一定的误差；(2)若样品中含有嘌呤、嘧啶等吸收紫外线的物质，会出现较大的干扰。根据蛋白质和核酸的吸收高峰不同，并利用这一性质，通过计算可以适当校正核酸的干扰作用。

二、试剂和器材

2.1 试剂

(1) 标准蛋白溶液；准确称取经微量凯氏定氮法校正的标准蛋白质，用重蒸水配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液。

(2) 待测蛋白质样品溶液；用重蒸水适当稀释。

2.2 器材

(1) 752 型紫外分光光度计

(2) 移液管

(3) 试管和试管架

三、操作方法

3.1 标准曲线法

3.1.1 标准曲线的绘制

取 8 支试管，按下表分别向每支试管加入各种试剂，摇匀。

试管编号	1	2	3	4	5	6	7	8
标准蛋白质溶液(mL)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
蒸馏水(mL)	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0
蛋白质浓度(mg/mL)	0	0.125	0.250	0.500	0.500	0.625	0.750	1.00
OD ₂₈₀								

选用光程为 1cm 的石英比色杯，在 280nm 处分别测定各管溶液的 OD₂₈₀ 值。以蛋白质浓度为横坐标，OD₂₈₀ 值为纵坐标，绘制标准曲线。

3.1.2 样品测定

取适当浓度的待测蛋白质溶液，同样选用光程为 1cm 的石英比色杯，测定 280nm 处的光吸收值，并从标准曲线上查出待测定蛋白质的浓度。

3.2 其它方法

(1) 将待测蛋白质溶液适当稀释，在波长 260nm 和 280nm 处分别测定出 OD 值，然后利用 280nm 及 260nm 下的吸收差求出蛋白质的浓度。

$$\text{蛋白质浓度(mg/mL)} = 1.45 \text{ OD}_{280} - 0.74 \text{ OD}_{260}$$

式中 OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀ 分别是蛋白质溶液在 280nm 和 260nm 波长下测得的光吸收值。

此外，也可先计算出的 OD₂₈₀/OD₂₆₀ 比值后，从表 3.1 中查出校正因子“F”值，同时可查出样品

中混杂的核酸的百分含量，将“F”值代入，再由下述经验公式直接计算出该溶液的蛋白质浓度。

$$\text{蛋白质浓度(mg/mL)} = F \times \frac{1}{d} \times \text{OD}_{280} \times N$$

式中 OD_{280} 为该溶液在 280nm 下测得的吸光值；d 为石英比色杯的厚度(cm)；N 为溶液的稀释倍数。

表 1 紫外吸收法测定蛋白质含量的校正因子

280/260	核酸(%)	因子(F)	280/260	核酸(%)	因子(F)
1.75	0.00	1.116	0.846	5.50	0.656
1.63	0.25	1.081	0.822	6.00	0.632
1.52	0.50	1.054	0.804	6.50	0.607
1.40	0.75	1.023	0.784	7.00	0.585
1.36	1.00	0.994	0.767	7.50	0.565
1.30	1.25	0.970	0.753	8.00	0.545
1.25	1.50	0.944	0.730	9.00	0.508
1.16	2.00	0.899	0.705	10.00	0.478
1.09	2.50	0.852	0.671	12.00	0.422
1.03	3.00	0.814	0.644	14.00	0.377
0.979	3.50	0.776	0.615	17.00	0.322
0.939	4.00	0.743	0.595	20.00	0.278
0.874	5.00	0.682			

注：一般纯蛋白质的光吸收比值($\text{OD}_{280}/\text{OD}_{260}$)约为 1.8，而纯核酸的比值约为 0.5

(2) 对于稀蛋白质溶液， 还可用 215 nm 和 225 nm 的吸收差来测定浓度。从吸收差 ΔOD 与蛋白质含量的标准曲线即可求出浓度。

$$\text{吸收差 } \Delta \text{OD} = \text{OD}_{215} - \text{OD}_{225}$$

式中的 OD_{215} 和 OD_{225} 分别是蛋白质溶液在 215 nm 和 225 nm 波长下测得的光吸收值。

此法当蛋白质含量在 20-100 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内，是服从 Beer 定律的。氯化钠、硫酸铵以及 0.1 mol/L 磷酸、硼酸和三羟甲基氨基甲烷等缓冲液都无显著干扰作用。但是 0.1 mol/L 乙酸、琥珀酸、邻苯二甲酸以及巴比妥等缓冲液在 215 nm 波长下的吸收较大，不能应用，必须降至 5 mmol/L 才无显著影响。由于蛋白质的紫外吸收高峰常因 pH 的改变而出现高低变化，故采用紫外吸收法时要注意溶液的 pH，最好与标准曲线制订时的 pH 一致。

(3) 如果已知某一蛋白质在 280 nm 波长处的吸收值 $\text{OD}_{1\text{cm}}^{1\%}$ ，则取该蛋白质溶液于 280 nm 处测定光吸收值后，便可直接求出蛋白质的浓度。

四、 思考题

(1) 简述紫外分光光度法测定蛋白质浓度的原理及优点。

实验七 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳

一、目的

学习醋酸纤维薄膜电泳的操作，了解电泳技术的一般原理。

二、原理

带电质子在电场作用下，会向两极移动；带正电荷的移向负极，带负电荷的移向正极，这种现象称为电泳。电泳现象早在 19 世纪初期就被人们发现了，并用于胶体化学中，但是电泳技术的广泛应用则在 20 世纪 40 年代左右。近年来各种类型的电泳技术发展十分迅速。例如，纸电泳、醋酸纤维薄膜电泳、纤维素或淀粉粉末电泳、淀粉凝胶电泳、琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳等。在电泳形式上更是丰富多样，有在溶液中进行的，有将支持物做成薄膜或薄层的，也有做成平板的或柱状的。由于与光学系统和自动分部收集器相结合，又组成了等电聚焦仪，等速电泳仪等等，大大地发展和扩大了电泳技术的应用范围。

各种类型的电泳技术概括如表 2：

表 2 电泳技术的种类

类 别	名 称	形 式
不用支持物的电泳技术	1. Tiselless 式微量电泳 2. 显微电泳 3. 等电聚焦电泳 4. 等速电泳 5. 密度梯度电泳	属自由电泳
用支持物的电泳技术	1. 纸上电泳 2. 醋酸纤维薄膜电泳 3. 薄层电泳 4. 非凝胶支持物区带电泳 支持物有：淀粉、纤维素粉、玻璃粉、硅胶、合成树脂粉末 5. 凝胶支持物区带电泳 (1) 淀粉凝胶 (2) 聚丙烯酰胺凝胶 1) 圆盘电泳 2) 平板电泳 3) SDS-圆盘电泳 (3) 琼脂糖凝胶电泳 (4) 琼脂凝胶电泳	包括常压、高压电泳 (水平式或垂直式) 水平式或垂直式 (平板法、柱状法) 垂直式(柱状法) 垂直式或水平式 垂直式(测相对分子质量) 平板法或柱状法(如免疫电泳)
用 法	1. 双向电泳	

	2. 电泳-层析相结合技术 3. 交叉电泳法 4. 连续纸电泳	
--	---------------------------------------	--

任何一种物质的质点，由于其本身在溶液中的解离或由于其表面对其他带电质点的吸附，会在电场中向一定的电极移动。例如，氨基酸、蛋白质、酶、激素、核酸及其衍生物等物质都具有许多可解离的酸性和碱性基团，它们在溶液中会解离而带电。一般说来，在碱性溶液中（即溶液的 pH 值大于等电点 pI），分子带负电荷，在电场中向正极移动。而在酸性溶液中，分子带正电荷，在电场中向负极移动。移动的速度取决于带电的多少和分子的大小。

不同的质点在同一电场中泳动速度不同，常用泳动度（或迁移率）来表示。泳动度的定义是带电质点在单位电场强度下的泳动速度。即：

$$u = \frac{v}{E} = \frac{d/t}{V/l} = \frac{dl}{Vt} \quad (\text{cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}) \quad (\text{厘米}^2 \text{ 伏特}^{-1} \text{ 秒}^{-1})$$

式中： u 为泳动度 ($\text{cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ min}^{-1}$) ($\text{厘米}^2 \text{ 伏特}^{-1} \text{ 分}^{-1}$)；

v 为质点的泳动速度 (cm s^{-1} 或 cm min^{-1}) (厘米 秒^{-1} 或 分^{-1})；

E 为电场强度 (V cm^{-1}) (伏特 厘米^{-1})；

d 为质点泳动距离 (cm) (厘米)；

l 为支持物的有效长度 (cm) (厘米)；

V 为加在支持物两端的实际电压 (V) (伏特)；

t 为通电时间 (s 或 min) (秒 或 分)。

通过测量 d 、 l 、 V 、 t 便可计算出质点的泳动度。

泳动度首先取决于带电质点的性质，即质点所带净电荷的量、质点的大小和质点的形状。一般来说，质点所带净电荷越多，质点直径越小，越接近于球形，则在电场中的泳动速度越快；反之，则越慢。泳动度除受质点本身性质的影响外，还受其他外界因素的影响，如溶液的粘度等。影响泳动速度的主要外界因素还有下列几种：

（一）电场强度（电势梯度）

电场强度是指每 cm 的电压降，它对泳动速度起着十分重要的作用。例如，纸上电泳的支持物滤纸两端相距 20cm ，如电压降为 200V ，则电场强度为 $200\text{V}/20\text{cm}=10\text{V cm}^{-1}$ 。电场强度越高，带电质点移动速度越快。根据电场强度的大小，可将电泳分为常压 ($100\sim500\text{V}$) 电泳和高压 ($500\sim10\,000\text{V}$) 电泳。常压电泳的电场强度一般为 $2\sim10\text{V cm}^{-1}$ ，电泳分离时间较长，需要几小时至几天；高压电泳的电场强度为 $20\sim200\text{V cm}^{-1}$ ，电泳分离时间较短，有时仅需几分钟。常压电泳多用于分离蛋白质等大分子物质，而高压电泳则用来分离氨基酸、小肽、核苷酸等小分子物质。在生产中有时需要进行快速的中间分析，如果没有高压电泳设备，可以把常压电泳小型化，缩短滤纸两端距离，也可达到高压快速的目的。如将原来两端相距 20cm 的滤纸改为 5cm ，外加电压仍为 200V ，电场强度则变为 40V cm^{-1} ，这样就加快了电泳速度。

（二）溶液的 pH 值

溶液的 pH 值决定带电质点解离的程度，也决定物质质点所带净电荷的多少。对蛋白质、氨基酸等两性电解质而言，pH 值距等电点越远，质点所带净电荷越多，泳动速度也越快；反之，则越慢。因此，当分离某一蛋白质混合物时，应选择一个合适的 pH 值，使各种蛋白质所带净电荷的量差异较大，以利于分离。为了使电泳过程中溶液的 pH 值恒定，必须采用缓冲溶液。

（三）溶液的离子强度

离子强度代表所有类型的离子所产生的静电力，也就是全部的离子效应，它取决于离子电荷的总数，而与溶液中盐类的性质无关。溶液的离子强度越高，带电质点的泳动速度越慢；离子强度越低，质点泳动的速度越快。一般最适合的离子强度在 0.02~0.2 之间。

在稀溶液中，离子强度的计算方法，是将每一离子浓度乘以其价数的平方，再将所有乘积相加，以 2 除其和。计算公式如下：

$$\text{离子强度 (I)} = \frac{1}{2} \sum CZ^2$$

式中：C 为离子的摩尔浓度 (mol L^{-1})；

Z 为离子的价数。

例如：求 $0.015\text{mol L}^{-1}\text{Na}_2\text{SO}_4$ 溶液的离子强度，则：

$$\text{离子强度 (I)} = \frac{1}{2} (0.015 \times 2 \times 1^2 + 0.015 \times 2^2) = 0.045$$

（四）电渗现象

液体在电场中对于一个固体支持物的相对移动，称为电渗现象。例如，在纸电泳时，由于纸上带有负电荷，而与纸接触的水溶液因为静电感应带有正电荷，在电场的作用下溶液便向负极移动并带动着质点向负极移动。假如这时进行电泳，则质点移动的表面速度是质点移动速度和由于溶液移动而产生的电渗速度的加和。若质点原来向负极移动，则其表面速度比电泳速度快。若质点原来向正极移动，则其表面速度比电泳速度慢。

因此，在电泳时应尽量避免使用具有高电渗作用的支持物。

醋酸纤维薄膜电泳是用醋酸纤维薄膜作为支持物的电泳方法。

本实验采用的醋酸纤维薄膜电泳是以醋酸纤维薄膜为支持物。它是纤维素的醋酸酯，由纤维素的羟基经乙酰化而成。它溶于丙酮等有机溶液中，即可涂布成均一细密的微孔薄膜。醋酸纤维薄膜对蛋白质样品吸附极少而无“拖尾”现象。快速省时、灵敏度高、样品用量少、操作简单，目前已广泛用于分析检测血浆蛋白、脂蛋白、糖蛋白、胎儿甲种球蛋白、体液、脊髓液、脱氢酶、多肽、核酸及其他生物大分子，为心血管疾病，肝硬化及某些癌症鉴别诊断提供了可靠的依据，因而已成为医学和临床检验的常规技术。

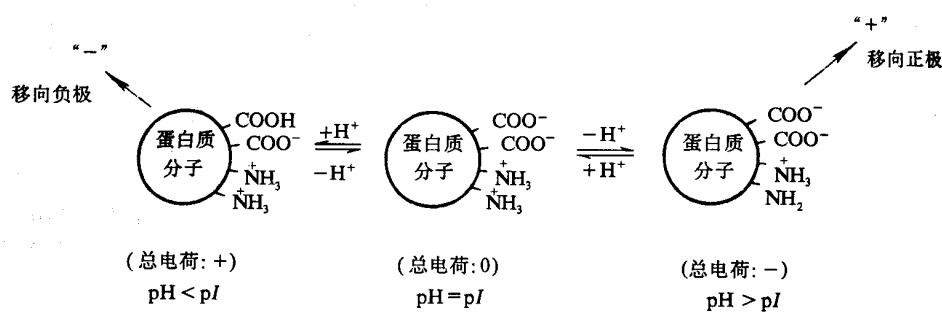


图2 不同 pH 条件下蛋白质分子在电场中运动状态示意图

三、试剂和器材

3.1 试剂

- (1) 巴比妥-巴比妥钠缓冲液(pH8.6, 0.07 mol/L): 称取巴比妥 1.66 g 和巴比妥钠 12.76 g, 溶于少量蒸馏水后定容至 1000 mL。置 4℃ 保存备用。
- (2) 染色液: 称取 0.5 g 氨基黑 10B, 加入蒸馏水 40 mL, 甲醇 50 mL 和冰醋酸 10 mL 混匀, 在具塞试剂瓶内贮存。
- (3) 透明液: 冰醋酸 25 mL 加 95%乙醇 75 mL。
- (4) 漂洗液: 乙醇 45 mL, 冰醋酸 5 mL, 蒸馏水 50 mL。
- (5) 定量洗脱液 (0.4 mol/L NaOH 溶液)

3.2 测试样品: 新鲜血清 (无溶血现象)

3.3 器材

- (1) 电泳仪和卧式电泳槽
- (2) 722 型分光光度计
- (3) 醋酸纤维薄膜 (2 cm × 8 cm) 和镊子或竹夹子
- (4) 培养皿 (直径 9-10 cm) 和点样的玻璃片;
- (5) 直尺和铅笔; 普通滤纸; 单面刀片; 电吹风
- (6) 试管和试管架。

四、操作方法

1. 仪器和薄膜的准备

(1) 醋酸纤维薄膜的剪裁和准备

醋酸纤维薄膜分成有光泽面和无光泽面两面, 选择无光泽一面, 距离边沿 1.5 cm 处划一条直线, 然后把薄膜剪成 2 cm × 8 cm, 将裁好的薄膜无光泽面朝下, 漂浮于巴比妥缓冲液上, 若漂浮的薄膜在 15-30 sec 内迅速润湿, 整条薄膜色泽深浅一致, 可以用于电泳。让膜自然下沉, 待膜完全浸透 (约 0.5 h) 后取出, 夹在清洁的滤纸中间轻轻吸去多余的缓冲液, 同时分辨光泽面和无光泽面。

(2) 制作滤纸桥

剪裁尺寸合适的滤纸条，取双层附着在电泳槽的支架上。使它的一端与支架的前沿对齐，另一端浸入电极槽的缓冲液内，然后用缓冲液将滤纸全部润湿并驱除气泡，使滤纸紧贴在支架上，即为“滤纸桥”。按照同样的方法，在另一个电极槽的支架制作相同的“滤纸桥”。它们的作用是联系醋酸纤维薄膜和两极缓冲液之间的“桥梁”。

(3) 平衡

用平衡装置（或自制的平衡管），使两个电极槽内缓冲液的液面彼此处于水平状态，一般需要平衡 15-20 min。注意，平衡后须将平衡装置的活塞关好(或除去平衡管)。

2. 点样

在薄膜无光泽的一面点样。点样在距负极端 1.5 cm 处（如图 4）。点样时，用玻璃片沾上血清，先在滤纸上练习点样，使血清均匀分布在点样区，形成具有一定宽度，粗细匀称的直线，试点熟练之后，开始点在醋酸纤维薄膜上。此步是实验的关键。

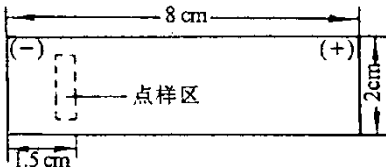


图 3 醋酸纤维薄膜规格及点样位置示意图
虚线处为点样位置

3. 电泳

用镊子将点样端的薄膜平贴在电泳槽负极支架的“滤纸桥”上（无光泽点样面朝下），另一端平贴于正极，如图 5 所示。薄膜要紧贴滤纸桥并绷直，中间不能下垂。

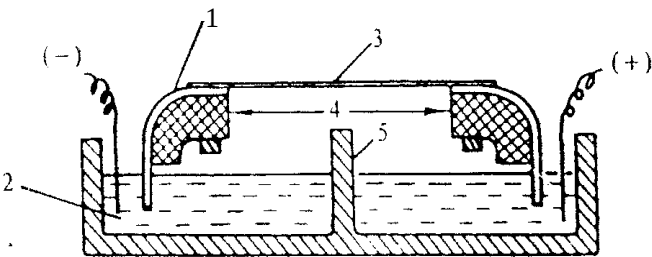


图 4 电泳装置剖视示意图

1. 滤纸桥 2. 电泳槽 3. 醋酸纤维素薄膜 4. 电泳槽膜支架 5. 电极室中央隔板

如果一个电泳槽中同时安放几张薄膜，则薄膜之间应相隔几毫米。盖上电泳槽盖，让薄膜平衡 10 min。用导线将电泳槽的正、负极与电泳仪的正、负极分别连接，注意不要接错。打开电源开关，调节使每厘米膜宽电流强度为 0.3 mA（8 片薄膜则为 4.8 mA）。通电 10-15 min 后，将电流调节到每厘米膜宽电流强度为 0.5 mA（8 片共 8 mA），电泳时间约 50-70 min。电泳结束后调节旋钮使电流为零，关闭电泳仪切断电源。

4. 染色

电泳完毕立即取出薄膜，直接浸入染色液中，染色 5 min，取出后用漂洗液浸洗脱色，每隔 10 min

左右换一次漂洗液，连续更换三次，可使背景颜色脱去，将膜夹于干净的滤纸中，用电吹风的冷风将薄膜吹干。操作中，要注意控制染色和漂洗的时间，防止背景过深或某些区带太浅。

5. 结果判断

一般在染色后的薄膜上可显现清楚的五条区带（图 6）。从正极端起，依次为清蛋白， α_1 球蛋白、 α_2 球蛋白、 β 球蛋白和 γ 球蛋白。

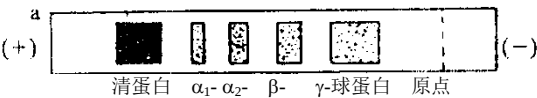


图 5 血清蛋白醋酸纤维薄膜电泳图谱

6. 透明

取一条漂洗清楚的电泳薄膜，待干燥后浸入透明液中约 5 min，取出平贴于玻璃板上，使完全干燥，即成透明膜，电泳图谱仍清晰可见，可以长期保存。

7. 定量洗脱法

用洗脱法测定各蛋白质组分的相对百分含量。将电泳图谱（未经透明处理）的各区带剪下，分别浸于盛有 0.4 mol/L 氢氧化钠溶液的试管中，清蛋白管加入 4 mL 氢氧化钠溶液，其余每管加 2 mL 氢氧化钠溶液，摇匀，放入 37℃ 恒温水浴中浸提 30 min，每隔 10 min 充分摇动一次，以便将色泽完全洗脱下来。该溶液颜色较稳定，在室温下 24 h 内颜色强度无显著变化，然后在 620nm 波长处比色，测定各管的光吸收值分别为 OD_A 、 OD_{α_1} 、 OD_{α_2} 、 OD_{β} 、 OD_{γ} 。按下列方法计算血清各部分蛋白质所占百分率。

先计算光吸收值总和（简称为 T）

$$T = 2 \times OD_A + OD_{\alpha_1} + OD_{\alpha_2} + OD_{\beta} + OD_{\gamma}$$

再计算血清各部分蛋白质所占百分率(即相对百分含量)。

计算公式	正常值
清蛋白% = $\frac{2 \times OD_A}{T} \times 100$	54-73%
α_1 球蛋白% = $\frac{OD_{\alpha_1}}{T} \times 100$	2.78-5.10%
α_2 球蛋白% = $\frac{OD_{\alpha_2}}{T} \times 100$	6.3-10.6%
β 球蛋白% = $\frac{OD_{\beta}}{T} \times 100$	5.2-11.0%
γ 球蛋白% = $\frac{OD_{\gamma}}{T} \times 100$	12.5-20.0%

五、注意事项

(1) 点样好坏是本实验的关键。点样时应将薄膜表面多余的缓冲液吸去，以免缓冲液太多引起样品扩散。但也不能吸得太干，太干样品不易进入薄膜的网孔内，造成电泳起始点参差不齐，影响分离效果。

(2) 点样量不能过大，否则各蛋白区带易拖尾，分离效果不好。点样量应在 0.1–5 μL 范围内为宜。

六、思考题

(1) 简述醋酸纤维薄膜电泳的原理及优点。

(2) 点样端为何放在负极？

(3) 实验中应注意哪些事项？

实验八 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质亚基分子量

一、目的要求

1. 学习电泳原理和技术
2. 学习和掌握 SDS—聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳分离蛋白质技术

二、原理

蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶电泳时，它的迁移率取决于它所带净电荷以及分子的大小和形状等因素。1967年，Shapiro 等人发现，如果在丙烯酰胺凝胶系统中加入阴离子去污剂十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate,简称 SDS)，则蛋白质分子的电泳迁移率主要取决于它的分子量，而与所带电荷和形状无关。

在蛋白质溶液中加入 SDS 和巯基乙醇后，巯基乙醇能使蛋白质分子中的二硫键还原，使多肽组分分成单个亚单位；SDS 能使蛋白质的氢键、疏水键打开，并结合到蛋白质分子上，形成蛋白质—SDS 复合物。在一定条件下，SDS 与大多数蛋白质的结合比为 1.4 g SDS/1 g 蛋白质。由于 SDS 带有大量负电荷，当它与蛋白质结合时，消除或掩盖了不同种类蛋白质间原有电荷的差异，使各种蛋白质的 SDS 复合物都带上相同密度的负电荷。SDS 与蛋白质结合后，还引起了蛋白质构象的改变。SDS-蛋白质复合物的流体力学和光学性质表明，它们在水溶液中的形状，近似于雪茄烟形的长椭圆棒，不同蛋白质的 SDS 复合物的短轴长度一样，约为 18Å，而长轴则随蛋白质的分子量成正比地变化。由于蛋白质的迁移率与蛋白质的净电荷量(q)成正比，与蛋白质在溶液中的摩尔系数(f)成反比(f 由介质的粘滞性、蛋白质分子的大小和形状决定)，而不同的 SDS-蛋白质复合物都带有相同密度的负电荷，并具有相同形状；因此在一定浓度的凝胶中，由于分子筛效应，则电泳迁移率就成为蛋白质分子量的函数。

目前，用 SDS-PAGE 研究过的蛋白质已有 100 余种，均证实此方法测定蛋白质分子量的可靠性。但是不同的凝胶浓度适用于不同的分子量范围。(表 3)

表 3 聚丙烯酰胺凝胶浓度与分子量范围的关系

蛋白质分子量范围	凝胶浓度/(%)
大于 200,000	3.33
25,000 – 200,000	5
10,000 – 70,000	10
10,000 – 50,000	15

此表为 weber 的实验方法，凝胶交联度为 2.6%。

可根据所测未知样品的估计分子量范围选择最适凝胶浓度，并尽量选择分子量范围和性质与待测样品相近的蛋白质作标准蛋白质。标准蛋白质的相对迁移率(蛋白质的电泳迁移距离除以染料迁移距离即为相对迁移率)最好在 0.2-0.8 之间均匀分布。现在，市场有高、中、低分子量标准蛋白试剂出售。进行 SDS-PAGE 时，则可根据已知蛋白质分子量的电泳迁移率和分子量的对数作出标准曲线，

再根据未知蛋白质的电泳迁移率求得分子量。值得指出的是，每次测定未知蛋白质分子量时，都应同时用标准蛋白质制备标准曲线，而不是利用过去的标准曲线。

现在常用的 SDS-PAGE 系统有好几种，缓冲液系统有连续和不连续之分，凝胶形状可以是柱状，也可以是平板状。本实验采用的是不连续垂直板电泳，此系统分辨率高，便于电泳样品间的相互比较，是目前科研工作中广泛采用的一个系统。

三、试剂和器材

1. 试剂

(1) 标准蛋白质：可采用厂家生产的不同分子量范围的 SDS-PAGE 标准蛋白质试剂盒，也可参考常用的标准蛋白质分子量表，从中选择 3-5 种蛋白质，按照每种蛋白 0.5-1 mg/mL 溶解液，自己配制标准蛋白质混合试剂。

(2) 凝胶贮液(Acr:Bis=30:0.8)、分离胶缓冲液(3.0 mol/L pH8.9 Tris-HCl 缓冲液)、浓缩胶缓冲液(0.5 mol/L pH6.7 Tris-HCl 缓冲液)、10% TEMED、10%过硫酸铵(AP)、染色液及脱色液的配制同实验四。

(3) 10%(W/V)SDS 溶液：称 5 g SDS，加重蒸水至 50 mL，微热使其溶解，置试剂瓶中，4℃贮存。在低温下易析出结晶，用前微热，使其完全溶解。

(4) 电极缓冲液(内含 0.1%SDS 的 Tris-Gly 缓冲液,pH 8.3): 称 Tris 6.0 g, Gly 28 g, 加 10% SDS 10 mL, 加蒸馏水使其溶解后定容至 1000 mL。

(5) 样品溶解液：内含 1% SDS, 1%巯基乙醇, 40%蔗糖或 20%甘油, 0.02%溴酚蓝, 0.01 mol/L pH6.7 Tris-HCl 缓冲液。(如样品为液体，则应配制 2 倍样品溶解液，使样品溶解液浓度大一倍，然后等体积混合。)

0.5 mol/L pH6.7 Tris-HCl 缓冲液	0.2 mL
10%SDS	1.0 mL
巯基乙醇	0.1 mL
蔗糖	4.0 g
溴酚蓝	2.0 mg
H ₂ O	8.7 mL

2. 待测样品

待测的已纯化的蛋白质样品。

3. 器材

(1) 垂直板电泳槽 (北京六一仪器厂)

(2) 直流稳压电源 (电压 300-600V, 电流 50-100 mA)

(3) 水泵或油泵，真空干燥器

(4) 移液管 (1, 5, 10 mL), 烧杯 (25, 50, 1000 mL), 细长头滴管, 1 mL 注射器及 10 cm 长针头, 微量进样器 (10 µl), 取液器 (200 µl, 1000 µl), 培养皿 (直径 12 cm), 玻璃板 (13×13 cm), 玻璃纸 2 张

四、操作方法

1. 安装垂直板电泳槽

将平、凹玻璃板和边条安装在制胶架上。

在制胶架底部的密封槽内加入已融化的 1%琼脂(糖)。其目的是封住两块玻璃板底部间的空隙，凝固后的琼脂(糖)中应避免有气泡。在边条与玻璃板的缝隙的外侧也滴加少量的琼脂糖。

待琼脂糖凝固后即可灌胶。

2. 配胶

根据所测蛋白质分子量范围，选择适宜的分离胶浓度。按表 4 的配制方法进行配制。

3. 凝胶板的制作

将混合后的分离胶溶液，用细长头的滴管加至长、短玻璃板间的窄缝内，加胶高度距样品模板梳齿下缘约 1 cm。用 1 mL 注射器在凝胶表面沿短玻璃板边缘轻轻加一层重蒸水(约 3–4 mm)，用于隔绝空气，使胶面平整。约 30 min 后，可看到水与凝固的胶面有折射率不同的界线，则表示凝胶完全聚合。倾去水封层的蒸馏水，用滤纸条吸去多余的水，但不要碰破胶面。用细长头的滴管将混合均匀的浓缩胶加到长、短玻璃板的窄缝内(即分离胶上方)距短玻璃上缘 0.5 cm 处，轻轻加入样品槽模板。静置电泳槽，10 min 左右上胶即可聚合，再放置 10-20 min。将凝胶板从制胶架中取下安装到电泳槽上，在凹板口边缘与电泳槽之间封一些琼脂糖。加入 pH8.3 的 Tris-甘氨酸电极缓冲液，使液面没过短玻璃板约 0.5 cm，轻轻取出样品槽模板，即可加样。

表 4 SDS-不连续体系凝胶的制备

试剂名称	配制 20 mL 不同浓度的分离胶 所需试剂用量/mL			配制 10 mL 浓缩胶 所需试剂用量/mL
	7.5%	10%	15%	3%
凝胶贮液(30%Acr-0.8%Bis)	5.00	6.66	10.0	1.00
分离胶缓冲液(pH8.9 Tris-HCl)	2.50	2.50	2.50	—
浓缩胶缓冲液(pH6.7 Tris-HCl)	—	—	—	1.25
10%TEMED	0.10	0.10	0.10	0.05
10%SDS	0.20	0.20	0.20	0.10
重蒸水	12.10	10.44	7.10	7.55
混匀后，置真空干燥器中，抽气 10 min				
10%过硫酸铵	0.10			0.05

4. 样品的处理

根据标准分子量蛋白试剂盒的要求加样品溶解液，自己配制的标准及未知样品，按 0.5–1 mg/mL 加样品溶解液，溶解后，将其转移到带塞的小离心管中，轻轻盖上盖子(不要塞紧，以免加热时进出)，在 100℃沸水浴中加热 3 min，取出冷却后加样。如处理好的样品暂时不用，可放在 -20℃冰箱保存较长时间，使用前在 100℃沸水浴中加热 3 min，以除去亚稳态聚合。

5. 加样

加样的体积要根据凝胶厚度及样品浓度灵活掌握，一般加样体积为 10-15 μl (即 2-10 μg 蛋白)，若样品较稀，加样体积可达 100 μl ，但注意样品不能超出凹形样品槽。加样槽中不能有气泡，如有气泡，可用注射器针头挑除。加样时，将微量进样器的针头通过电极缓冲液伸入加样槽内，尽量接近底部，注意针头不要碰破凹槽胶面，轻轻加入样品。由于样品溶解液中含有比重较大的蔗糖或甘油，因此样品溶解液会自动沉降在凝胶表面形成样品层。

6. 电泳

将电泳仪的正极与下槽连接，负极与上槽连接，接通冷却水，打开电泳仪开关，开始时电流为 10 mA，待样品进入分离胶后，将电流调至 20-30 mA，当溴酚蓝染料距硅胶框 1 cm 时，停止电泳，关闭电源及冷却水。

7. 染色与脱色

电泳结束后，取下凝胶板，用不锈钢药铲或镊子撬开短玻璃板，从凝胶板上切下一角作为加样标记，在两侧溴酚蓝染料区带中心，插入细铜丝作为前沿标记。将凝胶板放入大培养皿中，加入染色液染色 1-2 h，用蒸馏水漂洗数次，再用脱色液脱色，直至蛋白质区带清晰，即可计算相对迁移率。

8. 绘制标准曲线

将大培养皿放在一张坐标纸上，量出加样端距细铜丝间的距离(cm)以及各蛋白质样品区带中心与加样端的距离(cm)，按下式计算相对迁移率 m_R ：

$$\text{相对迁移率 } m_R = \frac{\text{蛋白质样品距加样端迁移距离(cm)}}{\text{溴酚蓝区带中心距加样端距离(cm)}}$$

以标准蛋白的相对迁移率为横坐标，标准蛋白质分子量为纵坐标在半对数坐标纸上作图，可得到一条标准曲线。根据未知蛋白质样品相对迁移率可直接从标准曲线上查出其分子量。

五、注意事项

(1) SDS-PAGE 有不足之处，尤其是电荷异常或构象异常的蛋白、带有较大辅基的蛋白(如糖蛋白)及一些结构蛋白等测出的分子量不太可靠。如组蛋白 F_1 ，本身带有大量正电荷，虽然结合了正常量的 SDS，仍不能完全掩盖其原有的正电荷，故用 SDS-PAGE 测得的分子量为 35,000，而用其它方法测定的分子量仅为 21,000。因此要确定某种蛋白质的分子量时，最好用 2 种以上的测定方法互相验证。

(2) 在 SDS-PAGE 测定蛋白质分子量还需要注意以下问题：如果 SDS-蛋白质复合物不能达到 1.4 克 SDS/1 克蛋白质的比率并具有相同的构象，就不能得到准确的结果。影响蛋白质和 SDS 结合的因素主要有 3 个：(a)二硫键是否完全被还原：只有在蛋白质分子内二硫键被彻底还原的情况下，SDS 才能定量地结合到蛋白质分子上去，并使之具有相同的构象。(b)溶液中 SDS 的浓度：溶液中 SDS 的总量至少要比蛋白质的高 3 倍，一般常高达 10 倍以上。(c)溶液的离子强度：溶液的离子强度应较低，最高不超过 0.26。因为 SDS 在水溶液中是以单体和分子团的混合体而存在，SDS 结合到蛋白质分子

上的量，仅取决于平衡时 SDS 单体的浓度而不是总浓度，在低离子强度的溶液中，SDS 单体具有较高的平衡浓度。

六、思考题

- (1) 简述 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量的原理。
- (2) 是否所有的蛋白质用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳方法测定得到的分子量都完全可靠？

实验九 底物浓度对酶活力的影响（米氏常数的测定）

一、目的要求

1. 学习分光光度法测定的原理和方法
2. 学习和掌握米氏常数 (K_m) 及最大反应速度 (V_m) 的测定原理和方法, 测出碱性磷酸酶在以对硝基苯酚磷酸为底物时的 K_m 和 V_m 值。

二、原理

酶的底物浓度与酶促反应速度的关系一般情况下符合米氏 (Michaelis-Menten) 理论。根据中间产物学说, 酶促反应的动力学模型可以表示为:



这里, E、S、ES 和 P 分别表示酶、底物、酶底物中间物和产物; k_1 、 k_{-1} 、 k_2 是各步反应的速度常数。按照中间产物学说, 可以推导出米氏方程为:

$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

式中: $[S]$ 为底物浓度 (克分子浓度); v 为初速度 (微克分子浓度变化/ min); V_m 为最大反应速度 (微克分子浓度变化/ min); K_m 为米氏常数 (克分子浓度)。

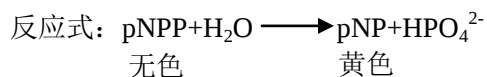
测定 K_m 和 V_m , 特别是测定 K_m 是酶学工作的基本内容之一。在酶动力学性质的分析中, 米氏常数 K_m 是酶的一个基本特征常数, 它包含着酶与底物结合和解离的性质。特别是同一种酶能够作用于几种不同底物时, 米氏常数 K_m 往往可以反映出酶与各种底物的亲和力的强弱。 K_m 数值越小, 说明酶和底物的亲和力越强; 反之, K_m 值越大, 酶和底物的亲和力越弱。

测定 K_m 和 V_m , 可通过作图法求得。作图方法很多, 其共同的特点是将米氏双曲线方程式转变为一般的直线形式。本实验测定碱性磷酸酶催化对硝基苯磷酸水解的 K_m 和 V_m , 采用最常用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图法。这个方法是将米氏方程转化为倒数形式, 即:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

然后以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图, 可得一条直线 (见图 6), 直线的纵轴上的截距为 $1/V_m$, 横轴截距为 $-1/K_m$, 由此即可求 K_m 和 V_m 值。

本实验测定碱性磷酸酶催化对硝基苯磷酸钠盐(pNPP)水解的 K_m 和 V_m 。



可通过分光光度法测定产物 pNP 的含量，求出反应速度 v 。

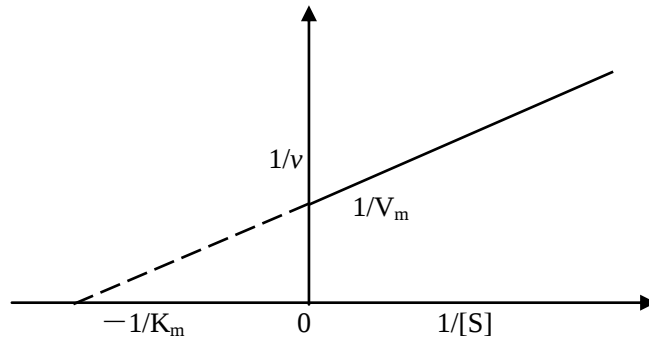


图 6 Lineweaver-Burk 双倒数作图

三、试剂与器材

3.1 试剂

- (1) 0.1 mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 pH10.1 缓冲液
- (2) 20 mmol/L MgCl_2
- (3) 10 mmol/L 对硝基苯磷酸二钠(pNPP)
- (4) 0.2 mol/L NaOH
- (5) 碱性磷酸酶

3.2 器材

- (1) 超级恒温水浴锅
- (2) 秒表
- (3) 可调微量取液器
- (4) 722 分光光度计

四、操作方法

1. 对硝基苯酚标准曲线的制作

取 15 支试管编号，0 号一支，1—7 号各二支，按下列表格操作：

管 号	0	1	2	3	4	5	6	7
pNP 含量 (μmol)	0	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35
0.5 $\mu\text{mol/mL}$ pNP (mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
H_2O (mL)	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Na_2CO_3 - NaHCO_3 (mL)	各管加入 1.0 mL							
20 mmol/L MgCl_2 (mL)	各管加入 0.2 mL							
0.2 mol/L NaOH (mL)	各管加入 2.0 mL							
OD _{405 nm}								

以对硝基苯酚的绝对量(μmol 数)为横坐标, OD_{405} 值为纵坐标, 绘制标准曲线。求出 pNP 的克分子消光系数(ϵ)值。

2. 活力测定

取 18 支试管, 编号。1—6 号为测定管各为 2 支, 作平行实验。1—6 为对应底物浓度的对照管, 按下表操作, 对照管先加 NaOH 终止剂后补加酶液。

No.	1	2	3	4	5	6
底物浓度[S](mmol/L)	0.50	0.60	0.75	1.0	1.5	3.0
10mmol/L pNPP(mL)	0.1	0.12	0.15	0.2	0.3	0.6
重蒸水 (mL)	0.6	0.58	0.55	0.5	0.4	0.1
$\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3(\text{mL})$	各管加入 1.0mL					
$\text{MgCl}_2(\text{mL})$	各管加入 0.2mL					
预热	37°C 5min					
ALPase 酶液(μL)	100 μL					
反应时间(min)	精确反应 10min					
0.2 mol/L NaOH(mL)	各管加入 2.0mL					
空白管补加酶液	1-6 对照管补加 200 μL 酶液					
$\text{OD}_{405\text{nm}}$						
1/OD						
$1/[\text{S}](\text{mmol/L})^{-1}$	2.0	1.67	1.33	1.0	0.67	0.33

3. 数据处理

各管在 722 分光光度计测定波长 405nm 的 OD 值 ($\text{OD}_{405\text{nm}}$)。从对硝基苯酚标准曲线上查出 $\text{OD}_{405\text{nm}}$ 相当于产物对硝基苯酚的含量 (μmol 数), 计算出各种底物浓度下的初速度 v_0 (单位以 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 表示)。以 $1/v$ 对 $1/[\text{S}]$ 作图, 求出酶催化 pNPP 水解的米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_m 。本实验以 $\text{OD}_{405\text{nm}}$ 为相对速度, 以 $1/\text{OD}$ 对 $1/[\text{S}]$ 作图, 求出酶催化 pNPP 水解的米氏常数 K_m 和相对最大反应速度。

五、 注意事项

1. 取液量一定要准确。
2. 反应时间一定要精确。
3. 加酶前后一定要将试剂混匀。
4. 空白对照一定要先加 NaOH, 后加酶。
5. 测定 OD_{405} 时要以各自的空白调零点。

6. 移液管或取液器的使用

7. 如果测定值太小或太大超出量程，要适当调整加酶的体积重新进行实验。

六、思考题

(1) 在测定酶催化反应的米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_m 时，应如何选择底物浓度范围？

(2) 试说明米氏常数 K_m 的物理意义和生物学意义。

(3) 为什么说米氏常数 K_m 是酶的一个特征常数而 V_m 则不是？

实验十 影响酶活性的因素

一、实验目的

观察淀粉在水解过程中遇碘后溶液颜色的变化。观察温度、pH、激活剂与抑制剂对唾液淀粉酶活性的影响。

二、实验原理

人唾液中淀粉酶为 α -淀粉酶，在唾液腺细胞内合成。在唾液淀粉酶的作用下，淀粉水解，经过一系列被称为糊精的中间产物，最后生成麦芽糖和葡萄糖。变化过程如下：

淀粉→紫色糊精→红色糊精→麦芽糖、葡萄糖

淀粉、紫色糊精、红色糊精遇碘后分别呈蓝色、紫色与红色。麦芽糖和葡萄糖遇碘不变色。

淀粉与糊精无还原性，或还原性很弱，对本尼迪克特试剂呈阴性反应。麦芽糖、葡萄糖是还原糖，与本尼迪克特试剂共热后生成红棕色氧化亚铜的沉淀。

唾液淀粉酶的最适温度为 37-40 °C，最适 pH 为 6.8。偏离此最适环境时，酶的活性减弱。

低浓度的 Cl⁻ 离子能增加淀粉酶的活性，是它的激活剂。Cu²⁺ 等金属离子能降低该酶的活性，是它的抑制剂。

三、器材及试剂

1. 器材：

试管、烧杯、量筒、恒温水浴锅、试管夹、试管架

2. 试剂：

(1) 唾液淀粉酶液：实验者先用蒸馏水嗽口，然后含一口蒸馏水于口中，轻嗽一、二分钟，吐入小烧杯中，用脱脂棉过滤，除去稀释液中可能含有的食物残渣。并将该滤液稀释一倍。

(2) 0.5 % 淀粉溶液（含 0.3%NaCl）：将 1 g 可溶性淀粉与 0.3 g 氯化钠，混悬于 5 mL 的蒸馏水中，搅动后缓慢倒入沸腾的 95 mL 蒸馏水中，煮沸 1 分钟，冷却后倒入试剂瓶中。

(3) 碘液：称取 2 g 碘化钾溶于 5 mL 蒸馏水中。再加 1 g 碘。待碘完全溶解后，加蒸馏水 295 mL，混合均匀后贮于棕色瓶内。

(4) 本尼迪克特（Benedict）试剂：将 17.3 g 硫酸铜晶体溶入 100 mL 蒸馏水中，然后加入 100 mL 蒸馏水。取柠檬酸钠 173 g 及碳酸钠 100 g，加蒸馏水 600 mL，加热使之溶解。冷却后，再加蒸馏水 200 mL，最后，把硫酸铜溶液缓慢地倾入柠檬酸钠-碳酸钠溶液中，边加边搅拌，如有沉淀可过滤除去或自然沉降一段时间取上清液。此试剂可长期保存。

(5) 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液

(6) 0.1 mol/L 柠檬酸溶液

(7) 1% NaCl 溶液

(8) 1% CuSO₄ 溶液

(9) 0.5% 淀粉溶液

四、操作步骤:

1. 淀粉酶活性的检测:

取一支试管, 注入 0.5 %淀粉溶液 5 mL 与稀释的唾液 0.5~2 mL。混匀后插入 1 支玻棒, 将试管连同玻棒置于 37 °C 水浴中。不时地用玻棒从试管中取出 1 滴溶液, 滴加在白磁板上, 随即加 1 滴碘液, 观察溶液呈现的颜色。此实验延续至溶液仅表现碘被稀释后的微黄色为止。记录淀粉在水解过程中, 遇碘后溶液颜色的变化。

向上面试管的剩余溶液上加 2 mL 本尼迪克特 (Benedict) 试剂, 放入沸水中加热 10 分钟左右, 观察有何现象? 为什么?

2. 酶的特异性

酶的特异性是指一种酶只能对一种或一类化合物(此类化合物通常具有相同的化学键)起作用, 而不能对别的化合物起作用。如淀粉酶只能催化淀粉水解, 对蔗糖的水解无催化作用。

本实验以唾液淀粉酶(含淀粉酶和少量麦芽糖酶)对淀粉的作用为例, 说明酶的特异性。淀粉和蔗糖都没有还原性, 但淀粉水解产物为葡萄糖, 蔗糖水解产物为果糖和葡萄糖, 均为还原性糖, 能与 Benedict 试剂反应, 生成砖红色的氧化亚铜沉淀。

(1) 检查试剂

取 2 只试管, 按下表操作。

管 号 试 剂	1	2
含 0.3%NaCl 淀粉溶液/mL	3	—
2%蔗糖溶液/mL	—	3
Benedict 试剂/mL	2	2
摇匀, 沸水浴煮沸 2~3min		
观察结果		

(2) 淀粉酶的专一性实验

取 2 只试管, 按下表操作。

管 号 试 剂	1	2
稀释的唾液/mL	1	1
含 0.3%NaCl 淀粉溶液/mL	3	—
2% 蔗糖溶液/mL	—	3
摇匀，置 37℃ 水浴保温 10min		
Benedict 试剂/mL	2	2
摇匀，沸水浴煮沸 2~3min		
观察结果		

3. pH 对酶活性的影响：

酶的催化活性与环境 pH 有密切关系，通常各种酶只在一定 pH 范围内才具有活性，酶活性最高时的 pH，称为酶的最适 pH，高于或低于此 pH 时酶的活性都逐渐降低。不同酶的最适 pH 不同。酶的最适 pH 不是一个特征性的物理常数，对于一个酶，其最适 pH 因缓冲液和底物的性质不同而有差异。

(1) 取 3 支 50 mL 锥形瓶，按下表的比例，制备不同浓度的缓冲液：

锥形瓶号	0.2mol/L 磷酸氢二钠 /mL	0.1M 柠檬酸/mL	缓冲液 pH
1	5.15	4.85	5.0
2	7.72	2.28	6.8
3	9.72	0.28	8.0

(2) 取三支试管，照如下操作：

管 号 试 剂	1	2	3
pH 5.0 缓冲液/mL	2	—	—
pH 6.8 缓冲液/mL	—	2	—
pH 8.0 缓冲液/mL	—	—	2
含 0.3%NaCl0.5%淀粉溶液/mL	1	1	1
以 1 分钟的间隔，依次加入稀释的唾液 1 mL，摇匀			
充分摇匀，置 37℃ 水浴保温 10 min，到达保温时间后，每隔 1 min 依次取出			
KI-I ₂ 溶液/滴	2	2	2
观察结果			

综合以上结果，说明 pH 对酶活性的影响。

4. 温度对酶活性的影响:

对温度敏感是酶的一个重要特性,酶作为生物催化剂,和一般催化剂一样呈现出温度效应,提高温度可以提高酶促反应速度,但另一方面又会加速酶蛋白的变性速度,所以在较低的温度范围内,酶反应速度随温度升高而增大,但是超过一定温度后,反应速度反而下降。酶反应速度达到最大时的温度称为酶的最适温度。酶的最适温度不是一个常数,它与作用时间的长短有关系。

取 3 支试管,各加 3 mL 含 0.3 %NaCl 的 0.5 %淀粉溶液;另取 3 支试管,各加 1mL 淀粉酶液。将此 6 支试管分为三组,每组中盛淀粉溶液与淀粉酶液的试管各 1 支,三组试管分别置入 0 °C、37 °C 与 100 °C 的水浴中。5 分钟后,将各组中的淀粉溶液倒入淀粉酶液中,继续维持原温度条件 5 min 后,立即滴加 2 滴碘液,观察溶液颜色的变化。根据观察结果说明温度对酶活性的影响。

5. 激活剂与抑制剂对酶活性的影响:

酶的活性受某些物质的影响,能使酶活性增加的称为激活剂,能使酶活性降低的称为抑制剂。很少量的激活剂和抑制剂就会影响酶的活性,而且常具有特异性,但激活剂和抑制剂不是绝对的,浓度的改变可能使激活剂变成抑制剂。

取 3 支试管,按下表加入各种试剂。混匀后,置于 37 °C 水浴中的保温。从 1 号试管中用玻棒取出 1 滴溶液,置于白磁板上用碘液检查淀粉的水解程度。待 1 号试管内的溶液遇碘不再变色后,立即取出所有的试管,各加碘液 2 滴,观察溶液颜色的变化,并解释之。

试 管 号 试 剂	1	2	3
1 %NaCl 溶液/mL	1	—	—
0.1 %CuSO ₄ 溶液/mL	—	1	—
蒸馏水	—	—	1
0.5 %淀粉溶液/mL	3	3	3
稀释的唾液/mL	1	1	1
摇匀,放入 37°C 恒温水浴中保温 10~15 min,取出,冷却			
KI-I ₂ 溶液/滴	2 滴	2 滴	2 滴
观察结果			

五、思考题

- (1) 本实验中如何通过淀粉液加碘后的颜色的变化来判断酶促反应快慢的?
- (2) 如何通过加入班氏试剂后生成沉淀多少来反映酶促反应快慢的?
- (3) 通过本实验,结合理论课的学习,小结出哪些因素影响唾液淀粉酶活性?是如何影响的?

实验十一 猪脾 DNA 的制备

一、目的要求

掌握从动物组织中提取、分离、纯化、制备 DNA 的方法。

二、原理

从生物组织提取、分离、纯化，以制备各种用途的核酸材料，是生物化学和分子生物学工作者必需具备的基本实验技能之一。

由于 DNA 主要集中在细胞核内，通常采用细胞核含量较大的生物组织作为制备 DNA 的原料。小牛胸腺组织的细胞核含量比例大，因而 DNA 含量也高；且其脱氧核糖核酸酶 DNase 活性较低，在制备过程中由于此酶所引起的 DNA 降解损失较小，是实验室制备 DNA 的良好原料。

但是，胸腺来源短缺，往往很难及时满足需要。猪脾较易获得，它的细胞核含量也高，可以代替胸腺。用猪脾脏组织制备 DNA，其纯度和产率均可达到采用小牛胸腺组织制备 DNA 时的相似水平，制备流程也基本相似。但是必需指出，在破碎脾脏组织以分离制取细胞核时，以及沉淀析出制取 DNA 钠盐过程中，一定要严格掌握所规定的操作条件并实行监控，这样可以使产率和质量都较为稳定。

在细胞内核酸通常是与某些组织蛋白质结合成复合物——核糖核蛋白（RNP）和脱氧核糖核蛋白（DNP）形式存在的。因而，初步的提取，分离技术即是设法将这两大类的核蛋白分开。

在不同的电解质溶液中，RNP 及 DNP 的溶解度有很大的差别。例如：在低浓度的 NaCl 溶液中，DNP 的溶解度随着 NaCl 浓度的增加而逐渐下降，当 NaCl 浓度为 0.14 mol/L 时，DNP 的溶解度仅为其在纯水中溶解度的约百分之一。但当 NaCl 的浓度继续增加时，DNP 的溶解度又渐次增大，当 NaCl 浓度增至 0.5 mol/L 时，DNP 的溶解度约与其在纯水中的溶解度近似，当 NaCl 浓度继续增至 1.0 mol/L 时，DNP 的溶解度则约为其在纯水中的溶解度的两倍了。且随着盐浓度的上升其溶解度仍继续呈增大之趋势。但 RNP 与之不同，在 0.14 mol/L 盐溶液中 DNP 溶解度很低，而 RNP 的溶解度仍相当大。因此，常常采用 0.14 mol/L 的盐溶液来提取 RNP，以使其与 DNP 分开。

由于 DNP 的浓盐溶液中的溶解度比在稀盐溶液中溶解度大很多，所以为了尽量提取 DNP，往往先采用浓盐溶液（如 1.0 mol/L，甚至 1.71 mol/L NaCl），以增大提取收率。

制得核蛋白质，为了提取核酸，需进一步采用适当的试剂和实验方法，使与核酸结合的蛋白质成分变性除去或溶解除去，常用的方法有“氯仿法”和“苯酚法”。

制品中的多糖类杂质过多的，也需用适当的方法除去。

经上述分离，纯化处理后，核酸溶液，再利用其不溶于有机溶剂的性质而使其在适当浓度的亲水性有机溶剂（如：乙醇）中呈絮状沉淀析出。

重复进行上述处理，即可制成所要求纯度的核酸制品。

提纯后的 DNA（或 DNA 钠盐）呈白色纤维状固体。

三、主要仪器、材料及试剂

1. 仪器：

- (1) 培养皿
- (2) 手术剪刀
- (3) 电动组织捣碎机
- (4) 离心机
- (5) 普通光学显微镜
- (6) 冰箱
- (7) 具塞磨口玻璃锥形瓶
- (8) 弯头滴管
- (9) 真空干燥器
- (10) 烧杯

2. 材料：

新鲜猪腺脏或肝脏、冰块

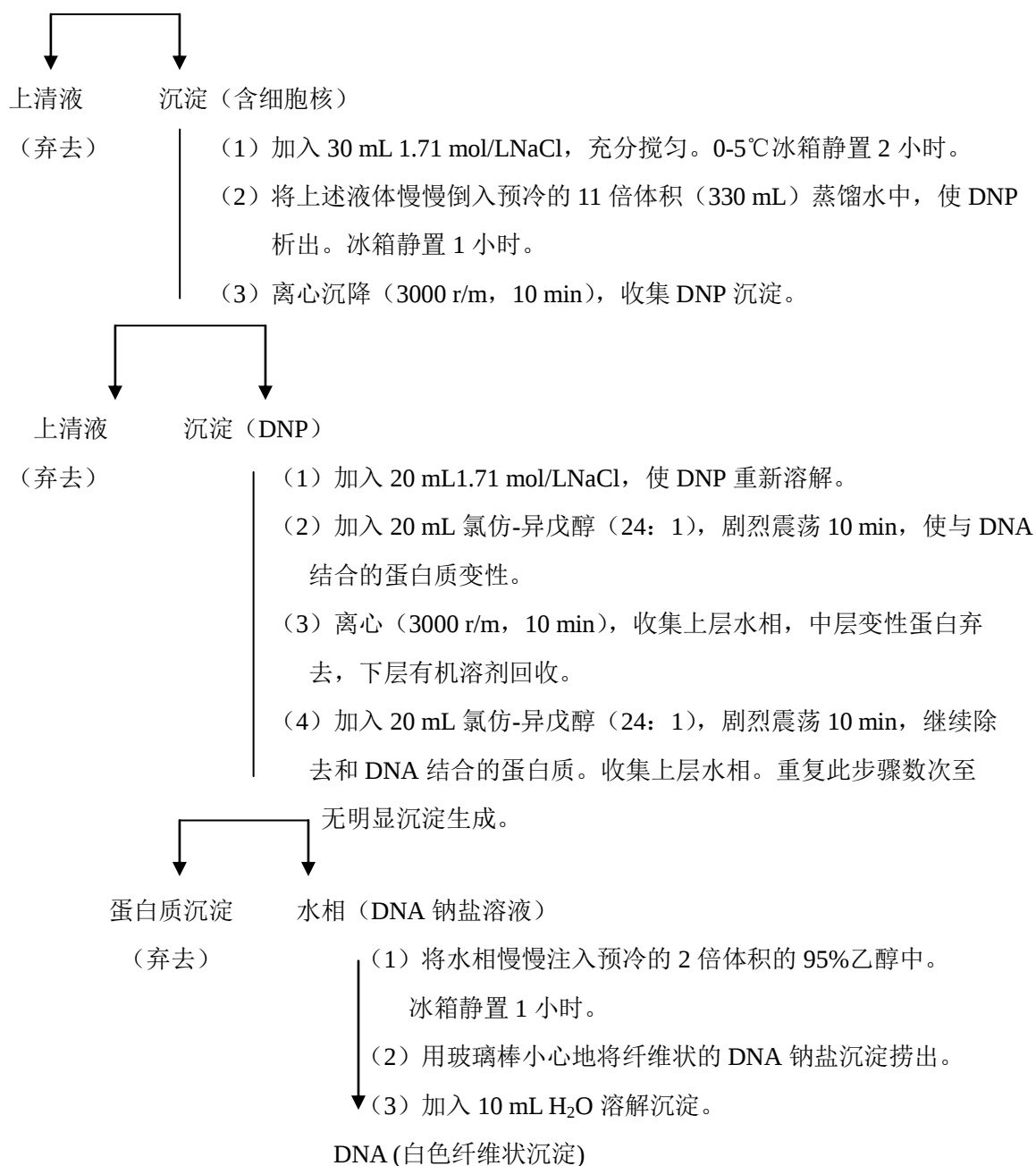
3. 试剂：

- (1) 0.1 mol/L NaCl+0.05 mol/L 柠檬酸钠混合盐提取液（pH7.0）：称取 5.8g NaCl 和 14.7 g 柠檬酸钠，用蒸馏水溶解后稀释至 1000 mL。
- (2) 1.71 mol/L NaCl 溶液（10% NaCl 溶液）
- (3) 氯仿：异戊醇（24：1，V/V）溶液
- (4) 95%乙醇
- (5) 无水乙醇
- (6) 乙醚

四、操作方法

新鲜猪脾或肝脏 5g

- (1) 剪成小块。
- (2) 加入 10 mL 0.10 mol/L 氯化钠-柠檬酸钠的混合提取液，匀浆（每次 5 秒，间隔 30 秒，共 4-5 次）
- (3) 离心沉降（3000 r/m，15 min），收集细胞核沉淀。



五、注意事项

提取过程中的机械力可能使大分子 DNA 断裂成小片段, 所以如果为保证 DNA 的完整性, 各操作步骤均应较温和, 避免太剧烈的振荡。

六、思考题

- (1) 用该方法提取 DNA 应注意哪些步骤?

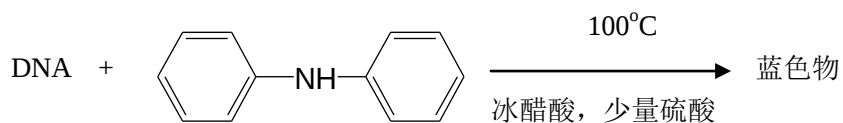
实验十二 DNA 的定量测定

一、实验目的

学习和掌握二苯胺法测定 DNA 含量的方法。

二、原理

核酸含量的测定方法包括紫外吸收法、定磷法和分别针对 DNA 和 RNA 的颜色反应方法。本实验采用针对 DNA 的二苯胺法测 DNA 的含量。在酸性溶液中，DNA 与二苯胺共热生成蓝色化合物，该物质在 595nm 有最大吸收，在 40~400 mg/mL 范围内其峰值与 DNA 含量成正比。



三、试剂和器材

1. 试剂

- (1) DNA 标准液 (1000 mL, 200 $\mu\text{g/mL}$): 取 DNA 钠盐 0.2 g 以 0.01N NaOH 溶解至 1000 mL 溶液。
- (2) 样品液: 用 0.01N NaOH 冲稀或用 0.05 gDNA 溶解至 500 mL 溶液。
- (3) 二苯胺试剂 (4000 mL): 40 g 二苯胺 + 4000 mL 冰乙酸+ 400 mL 高氯酸;
先配 100 mL 1.6%乙醛(1.6 mL 原液加水至 100 mL), 临用前 2000 mL 加 20 mL。

2. 器材

可见分光光度计、恒温水浴锅、分析天平

四、操作步骤

1. 标准曲线的制作

取 12 只试管分成 6 组，按下表操作。取 2 管的平均值，以 DNA 浓度为横坐标，光密度为纵坐标，绘制标准曲线。

试管	0	1	2	3	4	5
标准 DNA/mL	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
蒸馏水/mL	2.0	1.6	1.2	0.8	0.4	0
二苯胺试剂/mL	4	4	4	4	4	4
60 °C 恒温水浴中保温 1 h, 冷却, 在 595 nm 波长处比色						
光密度值						

2. 样品的测定

取待测样品 2 mL，加入二苯胺溶液 4 mL，摇匀，60℃保温 1 h，然后在 595 nm 波长出测定光密度值。根据测得的光密度值，从标准曲线上查得相应的 DNA 的 μg 数，按下式计算待测样品的 DNA 的含量。

$$\text{DNA}\% = \frac{\text{待测样品中测得的 DNA 的 mg 数}}{\text{待测样品液中样品的 mg 数}} \times 100$$

五、注意事项

其他糖及糖的衍生物、芳香醛、蛋白质等都对实验有干扰，测定前应尽可能除去。

六、思考题

- (1) DNA 含量测定的方法有哪些？各有何优缺点？
- (2) 简述二苯胺法测 DNA 的基本原理。

实验十三 维生素 C 的定量测定

一、目的

1. 学习维生素 C 定量测定的一般原理，掌握用碘量法定量测定食物和生物体液中维生素 C 的基本操作技术。
2. 概括了解维生素 C 的生理意义及其在新鲜水果和蔬菜中的含量。

二、原理

维生素 C 是人类膳食中必需的维生素之一，如果缺乏维生素 C，将导致坏血病发生。因此，维生素 C 又称为抗坏血酸，有防治坏血病的功效。抗坏血酸在自然界分布十分广泛，存在于新鲜水果和蔬菜中，尤其是柠檬果实和一些绿色植物（如青辣椒、菠菜等）中含量特别丰富。

抗坏血酸在机体同具有广泛的生理功能，已知体内许多重要物质的代谢反应都需要抗坏血酸的参与。它是脯氨酸羟化酶的辅酶，故有增进胶原蛋白合成的作用。机体中许多含巯基的酶，需要依赖于作为还原剂的抗坏血酸的保护，使酶分子的巯基处于还原状态，从而维持其催化活性。由于抗坏血酸的氧化还原作用，它可促进免疫球蛋白的合成，增强机体的抵抗力。同时还能使氧化型谷胱甘肽转化为还原型谷胱甘肽（简称 GSH），而 GSH 可与重金属结合而排出体外，因此维生素 C 常用于重金属的解毒。此外，抗坏血酸尚有许多其他生理功能，但其作用机理还不十分清楚。

抗坏血酸是一种不饱和的多羟基内酯化合物，稍有酸味的糖类白色晶体，易溶于水，故属于水溶性维生素。在溶液中其分子内 C₂ 和 C₃ 之间的烯醇式羟基上的氢极易解离并释放出 H⁺，而被氧化成脱氢抗坏血酸，氧化后仍具有维生素 C 的生理活性，但它易分解为二酮古洛糖酸，此化合物不再具有维生素 C 的生理活性。维生素 C 有很强的还原性，在碱性溶液中加热并有氧化剂存在时，易被氧化而破坏。还原型和氧化型抗坏血酸可以互相转变，在生物组织中自成一氧化还原系统。

由于维生素在营养学和临床方面的重要意义，故对食物和生物材料中维生素含量的测定是十分必须的。抗坏血酸的定量测定方法很多，有 2, 6-二氯酚靛酚（简称 DCIP）滴定法、碘滴定法、2, 4-二硝基苯肼法、Folin 试剂比色法、紫外吸收法等。

方法一 2, 6-氯酚靛酚滴定法

一、原理

维生素 C 测定广泛采用的是 DCIP 滴定法，它具有简便、快速、比较准确等优点，适用于许多不同类型样品的分析。缺点是不能直接测定样品中的脱氢抗坏血酸及结合抗坏血酸的含量，易受其他还原物质的干扰。如果样品中含有色素类物质，将给滴定终点的观察造成困难。

在酸性环境中，抗坏血酸（还原型）能将染料 2, 6-DCIP 还原成无色的还原型

2, 6-DCIP，而抗坏血酸则被氧化成脱氢抗坏血酸。氧化型的 2, 6-DCIP 在中性或碱性溶液中

呈蓝色，但在酸性溶液中则呈粉红色。因此，当用 2, 6-DCIP 滴定含有抗坏血酸的酸性溶液时，在抗坏血酸未被全部氧化前，滴下的 2, 6-DCIP 立即被还原成无色，一旦溶液中的抗坏血酸全部被氧化时，则滴下微量过剩的 2, 6-DCIP 便立即使溶液显示淡粉红色或微红色，此时即为滴定终点，表示溶液中的抗坏血酸刚刚全部被氧化。依据滴定时 2, 6-DCIP 标准溶液的消耗量 (mL)，可以计算出被测样品中抗坏血酸的含量。氧化型 2, 6-DCIP 与还原型抗坏血酸常在稀草酸或偏磷酸溶液中进行反应。即先将样品溶于一定浓度的酸性溶液中或经抽提后，再用 2, 6-DCIP 标准溶液滴定至终点。

食物和生物材料中常含有其他还原物质，其中有些还原物质可使 2, 6-DCIP 还原脱色。为了消除这些还原物质对定量测定的干扰，可用抗坏血酸氧化酶处理，破坏样品中还原型抗坏血酸后，再用 2, 6-DCIP 滴定样品中其他还原物质。然后从滴定未经酶处理样品时

2, 6-DCIP 标准溶液的总消耗量中，减去滴定非抗坏血酸还原物质 2, 6-DCIP 标准溶液的消耗量，即为滴定抗坏血酸实际所消耗的 2, 6-DCIP 标准溶液的体积，由此可以计算出样品中抗坏血酸的含量。另外，还可利用抗坏血酸和其他还原物质与 2, 6-DCIP 反应速度的差别，并通过控制样品溶液在 PH1—3 范围内，进行快速滴定，可以消除或减少其他还原物质的作用，一般在这样的条件下，干扰物质与 2, 6-DCIP 的反应是很慢的或受到抑制。

生物体液（如血液、尿等）中的抗坏血酸的测定比较困难，因为这些样品中抗坏血酸的含量很低，并且存在许多还原物质的干扰，同时还必须预先进行脱蛋白处理。在生物体液中 含有 巯基、亚硫酸盐及硫代硫酸盐等物质，它们都能与 DCIP 反应，但反应速度比抗坏血酸慢得多。样品中 巯基物质对定量测定的干扰，通常可以藉加入对-氯汞苯甲酸（简称 PCMB）而得到消除。

本实验采用 2, 6-二氯酚靛酚滴定法，以新鲜水果、蔬菜和生物体液为分析材料，进行抗坏血酸含量测定。

二、器材及试剂

1. 材料

松针、新鲜蔬菜（辣椒、青菜、西红柿等）、新鲜水果（桔子、柑子、橙、柚等）、生物体液（血清、血浆等）

2. 器材

天平、容量瓶、锥形瓶、组织捣碎机、滴定管、抽滤装置

2. 试剂:

(1) 2%草酸溶液：草酸 2g，溶于 100 mL 蒸馏水。

（2%草酸液可用 4%偏磷酸—醋酸溶液代替）

(2) 1%草酸溶液：溶 1g 草酸于 100 mL 蒸馏水。

(3) 标准抗坏血酸溶液：准确称取 50.0 mg 纯抗坏血酸，溶于 1%草酸溶液，并稀至 500 mL。贮棕色瓶、冷藏，最好临用时配制。

(4) 1% HCl 溶液。

(5) 0.1% 2, 6-二氯酚靛酚溶液：溶 250 mg 2, 6-二氯酚靛酚于 150 mL 含有 52 mg NaHCO_3 热水中，冷却后加水稀释至 250 mL，滤去不溶物，贮棕色瓶内，冷藏（4℃ 约可保存一至三周）。每次临时使用时稀释 10 倍，并以标准抗坏血酸溶液标定。

(6) 对-氯汞苯甲酸（简称 PCMB）溶液（ 2 mg mL^{-1} ）称取 100 mg PCMB 溶于 50 mL 0.05 mol L^{-1} NaOH 溶液中，过滤后滤液保存备用。（分析尿液样品用）

(7) 抗坏血酸氧化酶（-20℃ 保存）

三、操作步骤：

1. 不同样品用不同方法提取后滴定

(1) 水果汁样品

将果汁充分摇匀后，取 5 mL 样品放入 50 mL 容量瓶中，用 2% 草酸溶液（或 4% 偏磷酸-醋酸）溶液稀释，并定容至 50 mL，混匀后通过快速滤纸过滤（或离心）。取滤液 10 mL 放入锥形瓶内，立即用已标定过的 2, 6-DCIP 溶液快速滴定至样品液呈现玫瑰色，并保持 15—20s 不变即为终点，记录所消耗的 2, 6-DCIP 溶液的体积 (mL)。样品液中抗坏血酸含量宜在 $0.1\text{--}0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ 范围内，如果偏高或偏低则可酌情增减样品用量或进行适当稀释。另取 10 mL 蒸馏水作空白对照滴定。样品液和空白对照均至少各做 3 份，滴定结果取平均值，随时分别做好数据记录。

检测果汁（或其他样品）中干扰物质的存在，可取 5 mL 新鲜果汁放入 50 mL 容量瓶中，加少许抗坏血酸氧化酶晶体，轻轻混匀，放置 10 min，藉以破坏还原型抗坏血酸。然后再加入 2% 草酸（或 4% 偏磷酸-醋酸）溶液稀释至刻度，混匀后过滤，取这种滤液 10 mL 用

2, 6-DCIP 进行滴定，记下消耗的 DCIP 溶液体积 (mL)。

(2) 水果样品

将新鲜水果去皮，可食部分切成小块，称取 25—50g 样品置于匀浆器中或研钵内，加入 25 mL 2% 草酸（或 4% 偏磷酸-醋酸）溶液研磨，抽提液倾入 100 mL 容量瓶中，残渣再加 25 mL 2% 草酸（或 4% 偏磷酸-醋酸）溶液研磨和抽提两次，每次抽提液均倾入容量瓶中，最后用 2% 草酸（或 4% 偏磷酸-醋酸）溶液定容至 100 mL。混匀后用快速滤纸过滤（最初数 mL 滤液弃去）或离心，取滤液或上清液 10 mL 放入 50 mL 锥形瓶内，随即用 2, 6-DCIP 溶液快速滴定至终点，取 10 mL 2% 草酸（或 4% 偏磷酸-醋酸）溶液作空白对照滴定，样品液和空白对照的各平行做 3 份。

(3) 蔬菜样品

称取新鲜蔬菜 100—200g，洗净后淋干并用纱布拭去其表面水份，切成碎块置于组织捣碎器内，加入 100 mL 2% 草酸（或 4% 偏磷酸-醋酸）溶液，捣碎 1—2 min。称取匀浆 20—50g 倾入 100 mL 容量瓶中，用 2% 草酸（或 4% 偏磷酸-醋酸）溶液洗涤匀浆容器数次，洗液均转入容量瓶中，最后稀释至刻度。混匀后用快速滤纸过滤（或离心），弃去最初滤出的滤液。如果样品颜色太深，可采用

白陶土进行脱色处理。吸取滤液 5—10mL 放入锥形瓶中，立即用标定过的 2, 6-DCIP 溶液进行快速滴定。同时用 2%草酸（或 4%偏磷酸-醋酸）溶液作空白对照，分别记下各次滴定所消耗的染料溶液的体积（mL）。

(4) 松针样品

称取松针 1g 用水洗净，淋干并用滤纸吸去表面水分，放在研钵中，加入适量 1% HCl 溶液，充分研磨，静置后将上层抽提液倾入 100 mL 容量瓶中。如此反复研磨抽提 2—3 次，最后用 1% HCl 溶液稀释定容至刻度。混匀后过滤或离心，取滤液 5 mL 放入锥形瓶中，随即用 2, 6-DCIP 溶液滴定。另取 5 mL 1% HCl 溶液作出空白对照滴定。

(5) 生物体液样品

生物体液中维生素 C 的含量测定应采用新鲜样品，分析前必须制备成无蛋白质样品。向离心管中先加入 4 mL 血清（血浆、尿液等），再加入 6 mL 2%草酸（或 4%偏磷酸-醋酸）溶液，充分混匀，离心（3500rpm）10 min。取上清液 8—9 mL 放入锥形瓶内，可直接用 2, 6-DCIP 标准溶液进行滴定。样品和空白对照至少平行各做 3 份，取其平均值。

尿液样品在滴定前还必须用 PCMB 处理，即取 9 mL 无蛋白上清液放入离心管中，再加 1 mL PCMB 溶液（ 2 mg mL^{-1} ），混匀后放置 5—10min。然后离心 10 min，取上清液 8—9mL 放入锥形瓶内，用 2, 4-DCIP 溶液滴定之。

注意：各样品滴定过程宜迅速，一般不超过 2 分钟。滴定所用的染料不应少于 1 mL 或多于 4 mL，如果样品含抗坏血酸太高或太低时，可酌量增减样液。

2. 2, 6-二氯酚靛酚溶液的标定

准确吸取标准抗坏血酸溶液 1.0 mL（含 0.1 mg 抗坏血酸）置 100 mL 锥形瓶中，加 9 mL 1%草酸，用微量滴定管以稀释 10 倍的 2, 6-二氯酚靛酚滴定至淡红色，并保持 15 秒钟不褪色即为终点。由所用染料的体积计算出 1 mL 染料相当于多少 mg 抗坏血酸。

四、计算

$$\text{抗坏血酸 (mg/100g 样品)} = \frac{(V_A - V_B) \times T}{W} \times 100$$

T=1 mL 染料能氧化抗坏血酸 mg 数。

W=10 mL 样液相当于含样品之 g 数。

V_A 为滴定样品时所消耗的染料 mL 数（平均值）； V_B 为滴定空白时所消耗染料的 mL 数。

五、注意事项

（1）2%草酸可抑制抗坏血酸氧化酶，1%草酸因浓度低不能完成上述作用。偏磷酸有同样功效。若样品中含有大量 Fe^{2+} 可用 8%醋酸溶液提取，如仍用偏磷酸或草酸为提取剂， Fe^{2+} 可以还原二氯酚靛

酚，如用醋酸则 Fe^{2+} 不会很快与染料起作用。故可用 4% 偏磷酸-醋酸液代替 2% 草酸液。

(2) 如浆状物泡沫很多，可加数滴辛醇或丁醇。

(3) 若浆状物不易过滤，可离心取上清液测定。

(4) 如滤液颜色太深，滴定时不易辨别终点，可先用白陶土脱色。

(5) 样品中某些杂质亦能还原二氯酚靛酚，但速度均较抗坏血酸慢，故终点以淡红色存在 15 秒钟为准。

六、思考题

(1) 提取 V_C 时，加入 2% 草酸或 4% 偏磷酸-醋酸液的作用是什么？

(2) 如果提取液颜色太深而又无法脱尽，严重影响滴定终点判断时，是否有其它办法能准确判断出终点？（提示：借助仪器）

(3) 提取液中的抗坏血酸氧化酶是否会影响本实验结果？能否加热消除该酶的影响？

(4) 简述本法测定 V_C 的利与弊。

方法二 碘量法

一、原理

维生素 C 包括氧化型、还原型和二酮古乐糖酸三种。当用碘滴定维生素 C 时，所滴定的碘被维生素 C 还原为碘离子。随着滴定过程中维生素 C 全被氧化，所滴入的碘将以碘分子形式出现。碘分子可以使含指示剂（淀粉）的溶液产生蓝色，即为滴定终点。本法测定的是还原型维生素 C 的含量。

二、材料、试剂与器材

1. 材料：猕猴桃

2. 试剂：2 % 草酸：称取 10g 草酸，用蒸馏水定容到 500 mL。

2 % 淀粉溶液：称取 10g 淀粉，用蒸馏水定容到 500 mL。

0.02 M 的 $\text{I}_2\text{-KI}$ 溶液：称取 3.32 g 碘化钾溶于 5 mL 蒸馏水中。再加 2.5 g 碘。待碘完全溶解后，加蒸馏水 995 mL，混合均匀后贮于棕色瓶内。

2.5 mg/mL 的维生素 C：称取 2.5 g 维生素 C 用蒸馏水定容到至 1000 mL。

三、操作方法

(1) 样品处理

水果（猕猴桃）称量后去皮，加入一倍体积 2% 草酸匀浆 1 min，用纱布过滤，滤液定容至一定体积。

(2) 滴定

a 标准维生素 C 溶液 (2.5 mg/mL) 的测定

取 4 mL Vc 溶液于锥形瓶中, 加入 1 mL 淀粉液, 用碘液滴定至蓝色出现 (30 秒中内不褪色), 记下碘液体积 V 标准。

b 样品维生素 C 的测定

取上述猕猴桃液 10 mL 锥形瓶中, 加入 1 mL 淀粉液, 用碘液滴定至蓝色出现 (30 秒中内不褪色), 记下碘液体积 V 样品。

(3) 计算 $10 \text{ mg/V 标准} = M \text{ 样品 (mg) / V 样品}$

根据猕猴桃重量及滤液体积计算每 100 g 猕猴桃中的 Vc 含量。

四、注意事项

(1) 看到淀粉与碘反应产生的蓝色消失较慢时要放慢滴定的速度。

(2) 以显蓝色在 30s 内不褪色为滴定终点。

五、思考题

(1) 简述本法测定 V_C 的利与弊。

(2) 为何以显蓝色在 30s 内不褪色为滴定终点?

仪器的使用

722 型分光光度计操作指南

(1) 仪器操作键介绍

- “方式设定”键 (MODE): 用于设置测试方式
- “100%T/0ABS”键: 用于自动调整 100.0%T(100.0 透射比)或 0ABS(零吸光度)
- “0%T”键: 用于自动调整零透射比
- “波长设置”旋钮: 用于设置分析波长

(2) 样品测试操作

- ① 打开电源开关, 使仪器预热 20 分钟
- ② 用“波长设置”按钮将波长设置在您将要使用的分析波长位置上
- ③ 打开样品室盖, 将挡光体插入比色皿架, 并将其推或拉入光路
- ④ 盖好样品室盖, 按“0%T”键调透射比零
- ⑤ 取出挡光体, 盖好样品室盖, 按“100%T”调 100%透射比
- ⑥ 按“方式键”(MODE)将测试方式设置为吸光度方式
- ⑦ 将您的参比溶液和被测溶液分别倒入比色皿中
- ⑧ 打开样品室盖, 将盛有溶液的比色皿分别插入比色皿槽中, 盖上样品室盖
- ⑨ 将参比溶液推入或拉入光路中, 按“100%T”调零 ABS
- ⑩ 将被测溶液拉入光路中, 此时, 显示器上所显示是被测样品的吸光度参数

(3) 实验完成后, 关闭电源, 洗净比色皿, 并盖好盖布。

核酸蛋白检测仪操作方法

- 1、在仪器使用前, 首先检查检测器, 电源和记录仪三部份电路连接是否正确, 插上电源插头。
- 2、接通记录仪电源开关, 使电源开关拨到“通”指示灯亮。可根据需要调换不同的走纸速度。记录仪量程调在 10mV 档上。
- 3、将检测仪波长旋钮旋到所需波长刻度上, 把量程旋钮拨到 100%T 档。
- 4、按下检测仪电源箱面板上的电源开关, 此时记录仪指针从零点开始向右移动某一刻度, 调节“光量”旋钮使指针停留在记录仪大约中间位置 (即半量程 5 mV), 数字显示为 50 左右。仪器开机稳定时间大约在 1 小时左右, 待基线平直后, 可加样测试。
- 5、把层析柱的出水口接到检测仪比色池进液口, 检测器出样口塑料管接到部份收集器上, 使层析柱中的洗脱液通过。透光率为“0”厂家已调好, 光密度 A 要调零, 量程开关拨到 100%调节光量旋钮, 使记录仪指针在满量程 10 mV 位置时数字显示为 100, 即透光率为 100%。把量程开关拨到“A”挡, 缓慢调节 A 调零旋钮, 使记录仪指示在“0”位, 数字显示为“0”。
- 6、上述 5 个步骤结束后, 就可以在层析柱上加样。当样品经层析柱分离, 通过检测后, 就能作记录仪给出所需样品吸收的图谱。

7、测试完毕，必须切断电源，并用蒸馏水清洗样品池和尼龙管。

注 1:记录仪光吸收 A 读数

当采用 10mV 量程记录仪时，记录仪的满量程读数对应于 A 量程开关所对应的 A 读数范围。如 A 量程开关选定在 0-0.5A 时，则记录仪满量程光吸收 A 读数为 0.5，当记录笔指示在记录纸一半 (50% 刻度)位置时即为 0.25A。

注 2:数字显示光吸收 A 读数(可变量程读数模式)

当 A 量程开关选定在 0-1.0A 档时，此时数显板上显示和读数即为光吸收 A 的实际读数，如显示为 080 即表示为 0.80A。

当 A 量程开关切换在其它量程位置时，则数显光吸收 A 读数为:

A 量程选定在 0-2.0 档时，数显读数 $\times 2$ =实际光吸收读数 A

A 量程选定在 0-1.0 档时，数显读数 $\times 1$ =实际光吸收读数 A

部分收集器的操作方法

1. 将“手/自”框内的键置于自动状态，按“定”和“停”;使定时间为零，放开“停”按“快”或“慢”(“定”仍按着)至所需的定时时间，放开“慢”和“定”，再按一下“停”设定定时时间工作就完毕。若要查看设置时间是否正确，则只需按一下“定”键，就能显示上一次所设时间，若要以秒显示走时时刻，则需按下“秒”键(此键带锁，松开则以分显示)。
2. 定位 将“顺/逆”键置于“顺”或“逆”状态，按“手动”键，使试管架转至终点，这时报警器工作，报警指示灯亮，然后将“顺/逆”键置于“逆”或“顺”状态，本仪器就会自动地对准第一个试管(在“顺”状态，第一臂试管为最内的那根。在“逆”状态，第一臂试管为最外的那根)。如滴管口没对准第一根试管只要松开换节臂调整螺钉，使滴臂口对准第一根试管即可。

离心机的使用

- (1).离心机要置水平位置,以保证旋转轴垂直地球水平面。
- (2).使用前应检查套环是否平衡。
- (3).离心杯及其外套(离心管套)是否平衡。
- (4).样品倾入离心杯后应与离心管套一起两两平衡，平衡后把它们放置于转子的对称位置。
- (5).盖好盖子,打开电源开关,调整离心时间。
- (6).启动离心时转速应由小至大,缓慢升速(一般要 2~3min)。
- (7).达到预定转速后再调整离心时间至预定时间。
- (8).离心完成后要调整调速连杆至零位,同时关上电源。
- (9).要等到转速为零时才能打开离心机盖,取出样品。

附 录

一、一些常见蛋白质分子量参考值 (单位: dalton)

蛋 白 质	分子量
细胞色素 C (cytochrome C)	12 800
糜蛋白酶 (胰凝乳蛋白酶) (chymotrypsin)	11 000 或 13 000
核糖核酸酶 (ribonuclease 或 R Nase)	13 700
R ₁₇ 外壳蛋白 (R ₁₇ coat protein)	13 750
溶菌酶 (lysozyme)	14 300
血红蛋白[h(a) emoglobin]	15 500
天冬氨酸甲酰转移酶, R 链 (aspartate transcarbamylase Rchain)	17 000
肌红蛋白 (myoglobin)	17 200
烟草花叶病毒外壳蛋白 (TWV 外壳蛋白)	17 500
β -乳球蛋白 (β -lactoglobulin)	18 400
胰蛋白酶抑制剂 (大豆) (trypsin inhibitor)	22 500
木瓜蛋白酶 (羧甲基) [papain (carboxymethyl)]	23 000
胰蛋白酶 (trypsin)	23 300
γ -球蛋白, L 链 (γ -globulin, L chain)	23 500
糜蛋白酶原 (胰凝乳蛋白酶原) (chymotrypsinogen)	25 700
枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin)	27 600
碳酸酐酶 (carbonic anhydrase)	29 000
羧肽酶 A (carboxypeptidase A)	34 000
天冬氨酸氨甲酰转移酶, C 链 (aspartate transcarbamylase, C chain)	34 000
转磷酸核糖基酶 (phosphoribosyl transferase)	35 000
胃蛋白酶 (pepsin)	35 000
乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase)	36 000
原肌球蛋白 (tropomyosin)	36 000
甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase)	36 000
醇脱氢酶 (酵母) [alcohol dehydrogenase (yeast)]	37 000
D-氨基酸氧化酶 (D-amino acid oxidase)	37 000
胃蛋白酶原 (pepsinogen)	40 000
肌酸激酶 (creatine kinase)	40 000
醛缩酶 (aldolase)	40 000
烯醇酶 (enolase)	41 000
醇脱氢酶 (肝) [alcohol dehydrogenase (liver)]	41 000
卵清蛋白 (ovalbumin)	43 000
延胡索酸酶 (反丁烯二酸酶) (fumarase)	49 000

γ-球蛋白, H 链 (γ-globulin, H chain)	50 000
亮氨酸氨肽酶 (leucine aminopeptidase)	53 000
谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase)	53 000
丙酮酸激活酶 (pyruvate dehydrogenase)	57 000
过氧化氢酶 (catalase)	60 000
L-氨基酸氧化酶 (L-amino acid oxidase)	63 000
血清白蛋白 (serum albumin)	68 000
磷酸化酶 a (phosphorylase a)	94 000
副肌球蛋白 (paramyosin)	100 000
β-半乳糖苷酶 (β-galactosidase)	130 000
甲状腺球蛋白 (thyroglobulin)	165 000
肌球蛋白 (myosin)	220 000

二、一些常见蛋白质等电点参考值（单位：pH）

蛋 白 质	等 电 点
鲑精蛋白 (salmine)	12.1
鲱精蛋白 (clupeine)	12.1
鲟精蛋白 (sturine)	11.71
胸腺组蛋白 (thymohistone)	10.8
珠蛋白 (人) [globin (human)]	7.5
卵白蛋白 (ovalbumin)	4.71, 4.59
伴清蛋白 (conalbumin)	6.8, 7.1
血清白蛋白 (serum albumin)	4.7-4.9
肌清蛋白 (myoalbumin)	3.5
肌浆蛋白 A (myogen A)	6.3
β -乳球蛋白 (β -lactoglobulin)	5.1-5.3
卵黄蛋白 (livetin)	4.8-5.0
γ_1 -球蛋白 (人) [γ_1 -globulin (human)]	5.8, 6.6
γ_2 -球蛋白 (人) [γ_2 -globulin (human)]	7.3, 8.2
肌球蛋白 A (myosin A)	5.2-5.5
原肌球蛋白 (tropomyosin)	5.1
铁传递蛋白 (siderophilin)	5.9
胎球蛋白 (fetuin)	3.4 -3.5
血纤蛋白原 (fibrinogen)	5.5-5.8
α -眼晶体蛋白 (α -crystallin)	4.8
β -眼晶体蛋白 (β -crystallin)	6.0
花生球蛋白 (arachin)	5.1
伴花生球蛋白 (conarrachin)	3.9
角蛋白类 (keratein)	3.7-5.0
还原角蛋白 (keratins)	4.6-4.7
胶原蛋白 (collagen)	6.6-6.8
鱼胶 (ichthyocol)	4.8-5.2
白明胶 (gelatin)	4.7-5.0
α -酪蛋白 (α -casein)	4.0-4.1
β -酪蛋白 (β -casein)	4.5
γ -酪蛋白 (γ -casein)	5.8-6.0
α -卵清粘蛋白 (α -ovomucoid)	3.83-4.41
α_1 -粘蛋白 (α_1 -mucoprotein)	1.8-2.7
卵黄类粘蛋白 (vitell omucoid)	5.5
尿促性腺激素 (urinary gonadotropin)	3.2-3.3
溶菌酶 (lysozyme)	11.0-11.2

肌红蛋白 (myoglobin)	6.99
血红蛋白 (人) [hemoglobin (human)]	7.07
血红蛋白 (鸡) [hemoglobin (hen)]	7.23
血红蛋白 (马) [hemoglobin (horse)]	6.92
血蓝蛋白 (hemocyanins)	4.6-6.4
蚯蚓血红蛋白 (hemerythrin)	5.6
血绿蛋白 (chlorocruorin)	4.3-4.5
无脊椎血红蛋白 (erythrocruorins)	4.6-6.2
细胞色素 C (cytochrome C)	9.8-10.1
视紫质 (rhodopsin)	4.47-4.57
促凝血酶原激酶 (thromboplastin)	5.2
α_1 -脂蛋白 (α_1 -lipoprotein)	5.5
β_1 -脂蛋白 (β_1 -lipoprotein)	5.4
β -卵黄脂磷蛋白 (β -lipoprotein)	5.9
牛痘病毒 (vaccinia virus)	5.3
生长激素 (somatotropin)	6.85
催乳激素 (prolactin)	5.73
胰岛素 (insulin)	5.35
胃蛋白酶 (pepsin)	1.0 左右
糜蛋白酶 (chymotrypsin)	8.1
牛血清白蛋白 (bovine serum albumin)	4.9
核糖核酸酶 (牛胰) [ribonuclease 或 RNase (bovine pancreas)]	7.8
甲状腺球蛋白 (thyroglobulin)	4.58
胸腺核组蛋白 (thymonucleohistone)	4.0 左右

三、氨基酸的一些物理常数

中文名称	英文名称 (缩写)	分子量	熔点/℃	溶解度	等电点	pK _a (25℃)
DL-丙氨酸	DL-alanine(Ala)	89.09	295d	16.6	6.00	(1)2.35 (2)9.69
L-丙氨酸	L-alanine(Ala)	89.09	297d	16.65	6.00	
DL-精氨酸	DL-arginine(Arg)	174.20	238d		10.76	(1)2.17(COOH) (2)9.04(NH ₂) (3)12.48(胍基)
L-精氨酸	L-arginine(Arg)	174.20	244d	15.0 ²¹	10.76	
DL-天冬酰胺	DL-asparagine(Asn)	132.12	213-215d	2.16		(1)2.02 (2)8.8
L-天冬酰胺	L-asparagine(Asn)	132.12	236d (水合物)	2.989		
L-天冬氨酸	L-aspartic acid(Asp)	133.10	269-271	0.5	2.77	(1)2.09(α -COOH)

						(2)3.86(β -COOH) (3)9.82(NH ₂)
L-瓜氨酸	L-citrulline(Cit)	175.19	234-237d	易溶		
L-半胱氨酸	L-cysteine(Cys)	121.15		易溶	5.07	(1)1.71 (2)8.33(NH ₂) (3)10.78(SH)
DL-胱氨酸	DL-cystine(Cyss)	240.29	260	0.0049	5.05	(1)1.65 (2)2.26 (3)7.85(4)9.85
L-胱氨酸	L-cystine(Cyss)	240.29	258-261d	0.011	5.05	
DL-谷氨酸	DL-glutamic acid(Glu)	147.13	225-227d	2.054	3.22	(1)2.19 (2)4.25 (3)9.67
L-谷氨酸	L-glutamic acid(Glu)	147.13	247-249d	0.864	3.22	
L-谷氨酰胺	L-glutamine(Gln)	146.15	184-185	4.25		(1)2.17 (2)9.13
甘氨酸	Glycine(Gly)	75.07	292d	24.99	5.97	(1)2.34 (2)9.6
DL-组氨酸	DL-histidine(His)	155.16	285-286d	易溶		(1)1.82(COOH) (2)6.0(咪唑基) (3)9.17(NH ₂)
L-组氨酸	L-histidine(His)	155.16	277d	4.16		
L-羟脯氨酸	L-hydroxyproline(Hyp)	131.13	270d	36.11	5.83	(1)1.92 (2)9.73
DL-异亮氨酸	DL-isoleucine(Ile)	131.17	292d	2.229	6.02	(1)2.36 (2)9.68
L-异亮氨酸	L-isoleucine(Ile)	131.17	285-286d	4.12	6.02	
DL-亮氨酸	DL-leucine(leu)	131.17	332d	0.991	5.98	(1)2.36 (2)9.60
L-亮氨酸	L-leucine(Leu)	131.17	337d	2.19	5.98	
DL-赖氨酸	DL-lysine(Lys)	146.19			9.74	(1)2.18 (2)8.95(α -NH ₂) (3)10.53(ϵ -NH ₃)
L-赖氨酸	L-lysine(Lys)	146.19	224d	易溶	9.74	
DL-甲硫氨酸 (蛋氨酸)	DL-methionine(Met)	149.21	281	3.38	5.74	(1)2.28 (2)9.21
L-甲硫氨酸	L-methionine(Met)	149.21	283d	易溶	5.74	
DL-苯丙氨酸	DL-phenylalanine(Phe)	165.19	318-320d	1.42	5.48	(1)1.83 (2)9.13
L-苯丙氨酸	L-phenylalanine(Phe)	165.19	283-284d	2.96	5.48	
DL-脯氨酸	DL-proline(Pro)	115.13	213	易溶	6.30	(1)1.99 (2)10.6
L-脯氨酸	L-proline(Pro)	115.13	220-222d	162.3	6.30	
DL-丝氨酸	DL-serine(Ser)	105.09	246d	5.02	5.68	(1)2.21 (2)9.15
L-丝氨酸	L-serine(Ser)	105.09	223-228d	25 ²⁰	5.68	
DL-苏氨酸	DL-threonine(Thr)	119.12	235 分解点	20.1	6.16	(1)2.63 (2)10.43

L-苏氨酸	L-threonine(Thr)	119.12	253 分解点	易溶	6.16	
DL-色氨酸	DL-tryptophane(Trp)	204.22	283-285	0.25 ²⁰	5.89	(1)2.38 (2)9.39
L-色氨酸	L-tryptophane(Trp)	204.22	281-282	1.14	5.89	
DL-酪氨酸	DL-tyrosine(Tyr)	181.19	316	0.0351	5.66	(1)3.20(COOH) (2)9.11(NH ₂) (3)10.07(OH)
L-酪氨酸	L-tyrosine(Tyr)	181.19	342.4d	0.045	5.66	
DL-缬氨酸	DL-valine(Val)	117.15	293d	7.04	5.96	(1)2.32 (2)9.62
L-缬氨酸	L-valine(Val)	117.15	315d	8.85 ²⁰	5.96	

四、层析法常用数据表

(一) 常用的离子交换纤维素类型

类 型		交换剂名称	缩 写	解 离 基 团	交换摩尔 (mmol/g)	pK
阳 离 子 交 换 剂	强 酸	磷酸纤维素	P	$-\text{O}-\text{P}_3\text{H}_2$	0.7~7.4	PK ₁ 1~2 PK ₂ 6.0~6.5
		甲基磺酸纤维素	SM			
		乙基磺酸纤维素	SE	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	0.2~0.3	2.2
	弱 酸	羧甲基纤维素	CM	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	0.5~1.0	3.6
阴 离 子 交 换 剂	强 碱	三乙基氨基乙基纤维素	TEAE	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	0.5~1.0	10
	弱 碱	二乙基氨基乙基纤维素	DEAE	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	0.1~1.1	0.1~0.5
		氨基乙基纤维素	AE	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{NH}_2$	0.3~1.0	
		Ecteola 纤维素	ECTE-OLA	$-\text{N}^+(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH})_3$	0.1~0.5	7.4~7.6

(二) 常用的凝胶离子交换剂类型

类 型	离子交 换基团	床体积 mL/g	分离范围 (M _r)	交 换 量	
				总交换容量 (mmol/g)	血红蛋白 g/g
强阳离子交换剂 SE-Sephadex C-25 C-50	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	5~9 32~38	$3 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ $3 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$	2.0~2.5	0.7 2.4
SP-Sephadex C-25					0.2

C-50	CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ H			2.3±0.3	7.0
弱阳离子交换剂 CM-Sephadex C-25 C-50	-O-CH ₂ COOH	6~10 32~40	3×10 ⁴ ~2×10 ⁵ 3×10 ⁴ ~2×10 ⁵	4.5±0.5	0.4 9
强阴离子交换剂 QAM-Sephadex A-25 A-50	-O-C ₂ H ₄ N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ -CH ₂ CH(OH)CH ₃	5~8 30~40	3×10 ⁴ ~2×10 ⁵ 3×10 ⁴ ~2×10 ⁵	3.0×4.0	0.3 6
弱阴离子交换剂 DEAE-Sephadex A-25 A-50	-C ₂ H ₄ N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ H	5~9 25~83	3×10 ⁴ ~2×10 ⁵ 3×10 ⁴ ~2×10 ⁵	3.5×0.5	0.5 5

(三) 葡聚糖凝胶的技术数据

分子筛类型	干颗粒直径 (μ)	分子量分级的范围		床体积/ (mL/g 干 胶)	得水值 (mL/g 凝 胶)	溶胀最少平衡 时间 (小时)		柱头压力 (厘米 H ₂ O) (2.5 厘米直径柱)
		肽及球型 蛋白质	葡聚糖 (线性分子)			室温	沸水浴	
Sephadex G-10	40-120	-700	-700	2-3	1.0±0.1	3	1	
Sephadex G-15	40-120	-1500	-1500	2.5-3.5	1.0±0.1	3	1	
Sephadex G-25	粗级 100-300 (=50-100 目) 中级 50-150 (=100-200 目) 细级 20-80 (=200-400 目) 超细 10-40	1 000-5 000	100-5 000	4-6	2.50±0.2	6	2	
Sephadex G-50	粗级 50-150 中级 20-80 细级 10-40 超细	1 500-30 000	500-10 000	9-11	5.0±0.3	6	2	
Sephadex G-75	40-120 10-40 超细	3 000-70 000	1 000-50 000	12-15	7.5±0.5	24	3	40-160
Sephadex G-100	40-120	4 000-	1 000-100 000	15-20	10.0±1.0	48	5	24-96

超细	10-40	1 500 000						
Sephadex G-150 超细	40-120 10-40	5 000-400 000	1 000-150 000	20-30 18-22	15.0±1.5	72	5	9-36
Sephadex G-200 超细	40-120 10-40	5 000-800 000	1 000-200 000	30-40 20-25	20.0±2.0	72	5	4-16

(四) 聚丙烯酰胺凝胶的技术数据

型 号	排阻下限 (分子量)	分离分级范围 (分子量)	膨胀后的床体积 (毫升/克干凝胶)	膨胀所需最少时间 (室温, 小时)
Bio-Gel-P-2	1 600	200-2 000	3.8	2-4
Bio-Gel-P-4	3 600	500-4 000	5.8	2-4
Bio-Gel-P-6	4 600	1 000-5 000	8.8	2-4
Bio-Gel-P-10	10 000	5 000-17 000	12.4	2-4
Bio-Gel-P-30	30 000	20 000-50 000	14.9	10-12
Bio-Gel-P-60	60 000	30 000-70 000	19.0	10-12
Bio-Gel-P-100	100 000	40 000-100 000	19.0	24
Bio-Gel-P-150	150 000	50 000-150 000	24.0	24
Bio-Gel-P-200	200 000	80 000-300 000	34.0	48
Bio-Gel-P-300	300 000	100 000-400 000	40.0	48

注：上述各种型号的凝胶生产厂为 Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, U. S. A.

(五) 琼脂糖凝胶的技术数据

名称、型号	凝胶内琼脂糖百分含量(W/W)	排阻的下限 (M_r)	分离分级的范围(M_r)	生产厂家
Sepharose-4B Sepharose-2B	4 2		$0.3 \times 10^6 - 3 \times 10^6$ $2 \times 10^6 - 25 \times 10^6$	Pharmacia, Uppsala Sweden
Sagavac 10 Sagavac 8 Sagavac 6 Sagavac 4 Sagavac 2	10 8 6 4 2	2.5×10^5 7×10^5 2×10^6 15×10^6 150×10^6	$1 \times 10^4 - 2.5 \times 10^5$ $2.5 \times 10^4 - 7 \times 10^5$ $5 \times 10^4 - 2 \times 10^6$ $2 \times 10^5 - 15 \times 10^6$ $5 \times 10^5 - 15 \times 10^7$	Seravac Laboratories Maidenhead, England
Bio-GelA-0.5M Bio-GelA-1.5M Bio-GelA-5M Bio-GelA-15M Bio-GelA-50M Bio-GelA-150M	10 8 6 4 2 1	0.5×10^6 1.5×10^6 5×10^6 15×10^6 50×10^6 150×10^6	$<1 \times 10^4 - 0.5 \times 10^6$ $<1 \times 10^4 - 1.5 \times 10^6$ $1 \times 10^4 - 5 \times 10^6$ $4 \times 10^4 - 15 \times 10^6$ $1 \times 10^5 - 50 \times 10^6$ $1 \times 10^6 - 150 \times 10^6$	Bio-Rad Laboratories California, U. S. A.

琼脂糖是琼脂内非离子型的组分，它在 0–4℃，pH4–9 范围内是稳定的。

(六) 各种凝胶所允许的最大操作压

凝 胶	建议的最大静水压(cmH ₂ O)
Sephadex	
G-10	100
G-15	100
G-25	100
G-50	100
Sephadex G-75	50
Sephadex G-100	35
Sephadex G-150	15
Sephadex G-200	10
Bio-Gel	
P-2	100
P-4	100
P-6	100
P-10	100
P-30	100
P-60	100
Bio-Gel P-100	60
Bio-Gel P-150	30
Bio-Gel P-200	20
Bio-Gel P-300	15
Sepharose	
2B	1 ^a
4B	1
Bio-Gel	
A-0.5M	100
A-1.5M	100
A-5M	100
Bio-Gel A-15M	90
Bio-Gel A-50M	50
Bio-Gel A-150M	30

a. 每厘米凝胶长度

(七) 固体硫酸铵添加量与浓度 (%饱和度) 的关系表 (25 ℃)

	硫酸铵的最终浓度																	
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	10
	向 1 升溶液中加入的固体硫酸铵克数																	
	0	56	114	134	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
硫酸的起始浓度 (%饱和度)	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	20			57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
	45									31	63	97	132	168	205	245	285	375
	50										33	66	101	137	176	214	302	392
	55											33	66	101	137	176	214	302
	60												34	69	105	143	227	314
	65													34	70	107	190	275
	70														35	72	153	237
	75															36	115	198
	80																36	115
	90																	79

主要参考书:

- 1、林加涵等. 现代生物学实验下册.北京:高等教育出版社,2001
- 2、生化实验方法和技术.张龙翔等. 北京:高等教育出版社,1997