



# 生物化学实验

## Biochemical Experiment

# 人员组成

- 主讲教师：徐跃飞（教授）  
马克里（教授）  
田余祥（教授）  
林琳（副教授）  
董旭（副教授）  
张文利（讲师）  
杨雪松（讲师）  
樊建慧（讲师）
- 实验辅助：任凤（高级实验师）  
王艳（实验师）





# 实验内容安排

共56学时

- 1、生物化学实验规则及常用仪器使用入门（2学时）
- 2、血清 $\gamma$ 球蛋白的提取定量（6学时）
- 3、SDS - PAGE定蛋白质分子呈（8学时）
- 4、碱性碱性磷酸酶的提取，比活性的测定（8学时）
- 5、碱性蛋白酶的 $K_m$ 测定（4学时）
- 6、酶的特异性，温度及PH对酶活性的影响（4学时）
- 7、肝糖原的提取(4学时)
- 8、纸层析法鉴定转氨酶的转氨基作用（4学时）
- 9、真核生物基因组DNA的提取（4学时）
- 10、核酸的定量及电泳鉴定（4学时）
- 11、PCR（4学时）及技能测试（4学时）

# 绪论



## 1 实验目的

- 掌握蛋白质、酶、核酸等重要物质的分离、纯化和测定技术的原理及方法;
- 掌握生物化学的基本知识、基本理论及基本实验技能;
- 培养分析和解决问题能力以及严谨细致的科学作风、创新能力等综合素质。

## 2 通过生物化学实验应该做到



- 学习设计一个实验的基本思路，掌握各个实验的基本原理，学会严密地组织自己的实验，合理地安排实验步骤和时间。
- 训练实验的动手能力，学会熟练地使用各种生物化学实验仪器。
- 学会准确翔实地记录实验现象和数据的技能，提高实验报告的写作能力，能够整齐清洁地进行所有的实验。
- 掌握生物化学的各种基本实验方法和实验技术，尤其是各种电泳技术和层析技术，为今后参加科研工作打下坚实的基础。

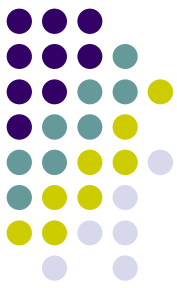
# 3 实验记录与实验报告



## 3.1 实验记录

- ◆实验前写好实验预习报告(钢笔和园珠笔)。
- ◆实验中应及时准确地记录(专用纸,事先在记录纸上设计好各种记录格式和表格)所观察到的现象和测量的数据。
- ◆实验记录要注意有效数字,如吸光度值应为“0.050”,而不能记成“0.05”。每个结果都要尽可能重复观测二次以上,即使观测的数据相同或偏差很大,也都应如实记录,不得涂改。
- ◆实验中要详细记录实验条件,如使用的仪器型号、编号、生产厂等;生物材料的来源、试剂的规格、试剂的浓度等。

# 3 实验记录与实验报告



## 3.2 实验报告

实验报告的格式应为：

- (1) 实验目的；
- (2) 实验原理；
- (3) 实验步骤；
- (4) 实验结果
- (5) 分析讨论

**注意：**实验结果的讨论要充分，要充分运用已学过的知识和生物化学原理，进行深入的探讨，勇于提出自己独到的分析和见解，并欢迎对实验提出改进意见。



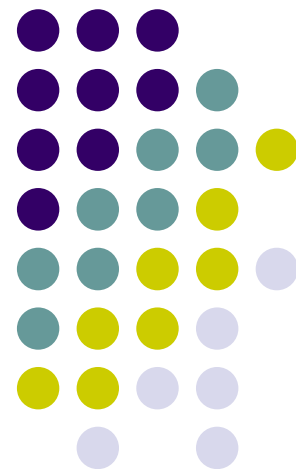
## 4 实验成绩评分方法

- 实验预习情况
  - 实验操作情况
  - 实验报告情况
  - 技能测试 (30%)
  - 实验理论考试成绩 (50%)
- (20%)



# 第一篇

## 生物化学实验基本技术



# 第一节 生物大分子的基本制备技术



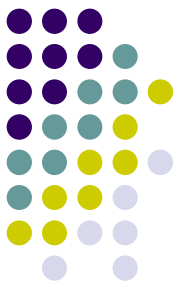
## 一、盐析 (Salting -out) 技术

**定义:** 蛋白质在高浓度盐的溶液中, 随着盐浓度的逐渐增加, 由于蛋白质水化膜被破坏、溶解度下降而从溶液中沉淀出来。各种蛋白质的溶解度不同, 因而可利用不同浓度的盐溶液来沉淀分离各种蛋白质。

**影响因素:**

1. 盐的种类
2. 盐的浓度
3. pH值
4. 温度
5. 蛋白质浓度

## 二、透析和超滤 (Dialysis and Ultrafiltration)



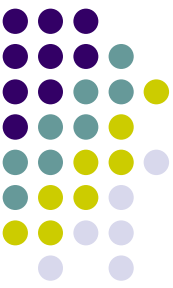
### 1. 透析

是利用蛋白质等生物大分子不能透过半透膜而进行纯化的一种方法。

### 2. 超滤

是利用具有一定大小孔径的微孔滤膜，对生物大分子溶液进行过滤（常压、加压或减压），使大分子保留在超滤膜上面的溶液中，小分子物质及水过滤出去，从而达到脱盐、更换缓冲液或浓缩的目的。

## 第二节 分光光度法



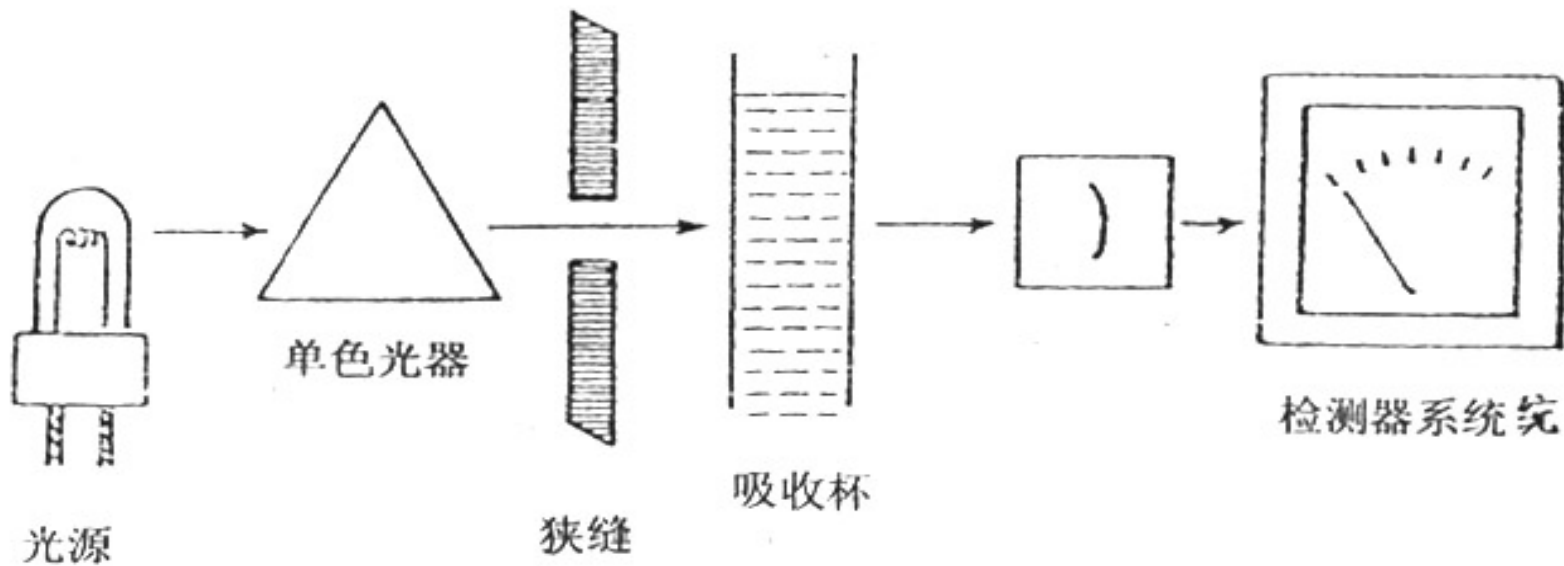
### 一、基本原理

当一束白光通过一杯有颜色的溶液时，具有一定波长的光线选择性的被溶液所吸收。不同物质由于其分子结构不同，对不同波长光线的吸收能力不同，因此每种物质都具有其特异的吸收光谱。吸收光谱的测定可以用来鉴定各种不同的物质。

分光光度法常被用来测定溶液中存在的光吸收物质的浓度。其理论依据是郎伯—比尔 (Lambert-Beer) 定律。

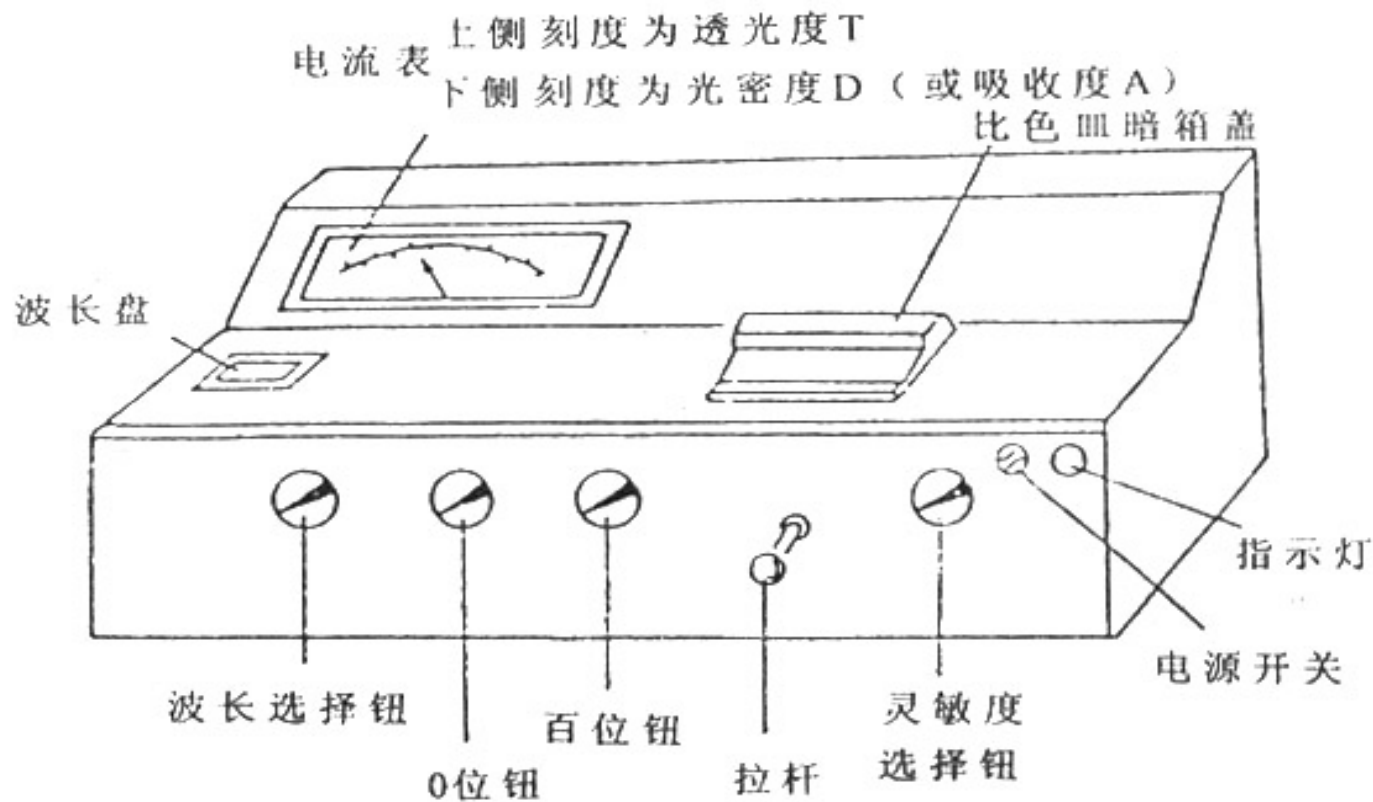
$$A=KCL$$

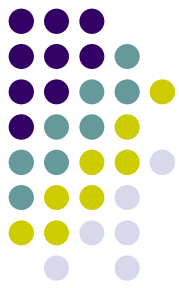
## 二、分光光度计的结构原理



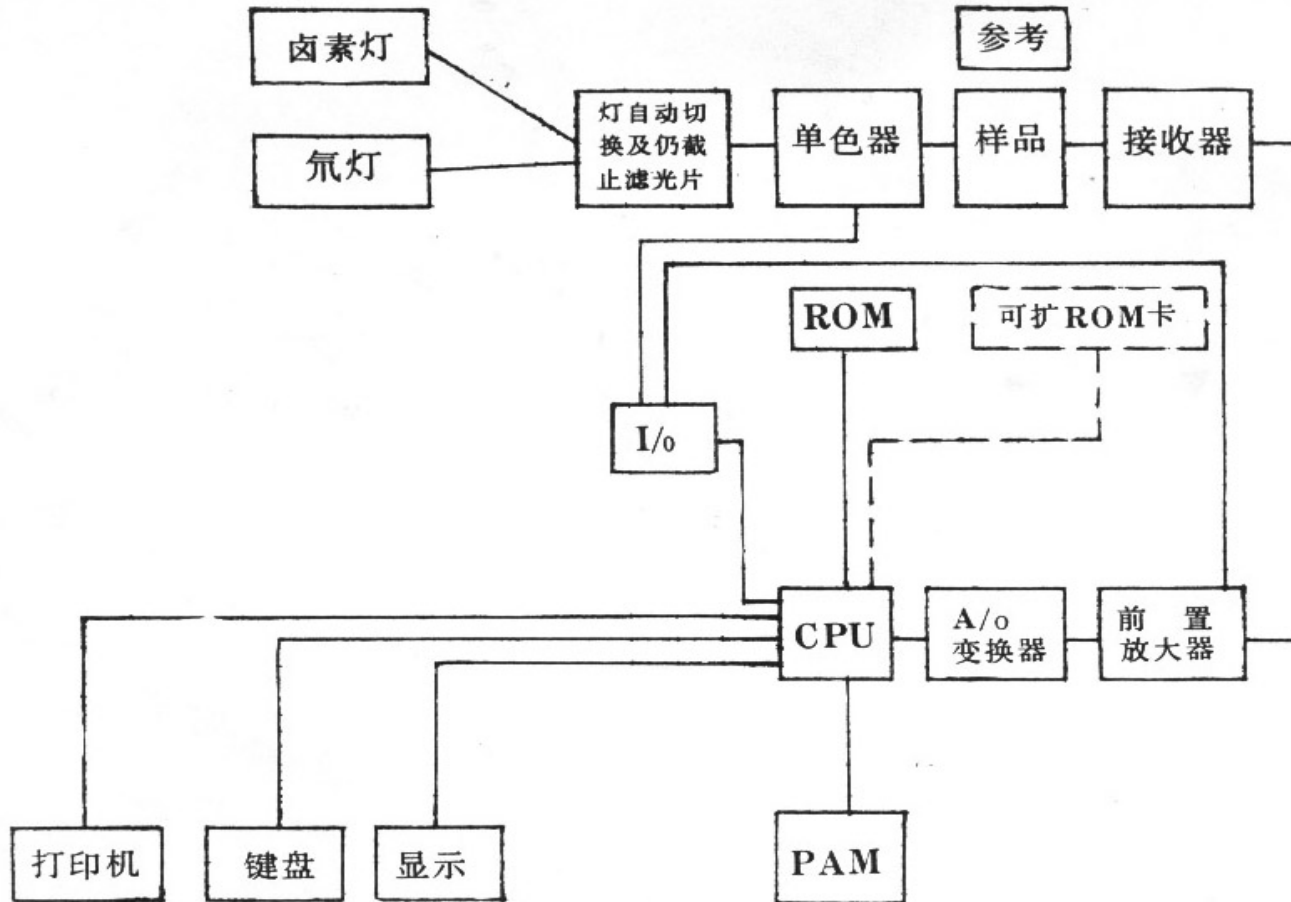
# 三、几种常用的国产分光光度计

## (一) 721型分光光度计





## (二) UV-754型分光光度计



# 第三节 层析技术



## 原理

是一种物理的分离方法，利用混合物中各组分的物理化学性质的差别，使各组分以不同程度分布在两相中，其中一相为固定相，另一相流过此相称作流动相，并使各组分以不同速度移动，从而达到分离的目的。

可分离物质：糖类、有机酸、氨基酸、核苷酸。

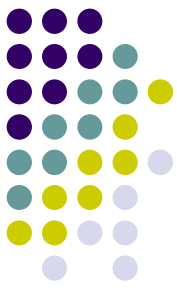




# 层析技术分类

名称	操作方式	固定相	流动相	分离依据
分配层析	纸层析 薄层层析	液体	液体	溶解度
离子交换层析	离子交换柱层析	固体	液体	带电性 静电引力
吸附层析	吸附薄层层析 气体吸附层析	固体 固体	液体 气体	吸附力
亲合层析	酶与底物 抗原与抗体	固体	液体	配体专一性
凝胶层析	凝胶过滤	固体	液体	分子大小

# 常用的层析原理



## 1.分配层析——纸层析

- 原理：溶质在互不相溶的两相中溶解度不同，在终点时达到一种平衡，其比值为一个常数，即分配系数（ $\alpha$ ）。
- $$\alpha = \frac{\text{固定相内溶质的浓度}}{\text{流动相内溶质的浓度}}$$

固定相：滤纸上吸附的水

流动相：有机溶剂（酚）



## 纸层析

- 纸层析是最简单的液-液相分配层析。
- 滤纸是纸层析的支持物。当支持物被水饱和时，大部分水分子被滤纸的纤维素牢牢吸附，因此，纸及其饱和水为层析的固定相，与固定相不相混溶的有机溶剂为层析的流动相。
- 对某些特定化合物，在特定的展层系统，一定的温度条件下， $R_f$ 是个常数。



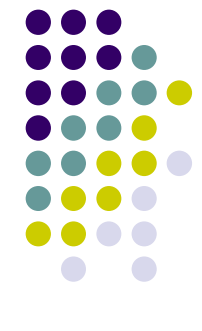
## 2 离子交换层析

- 原理：将能与周围介质进行离子交换的不稳定离子固定于惰性基质上，从而分离介质中的组分。
- 常用的惰性基质：人工合成树脂（单体：苯乙烯、交联剂：二乙烯苯）
- 阳离子交换剂：磺酸甲基、羧甲基、磷酸基
- 阴离子交换剂：二乙基胺乙基、三乙基胺乙基
- 可交换离子：阳离子： $\text{Na}^+$ 、 $\text{H}^+$   
阴离子： $\text{Cl}^-$ 、 $\text{OH}^-$



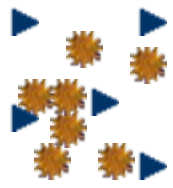
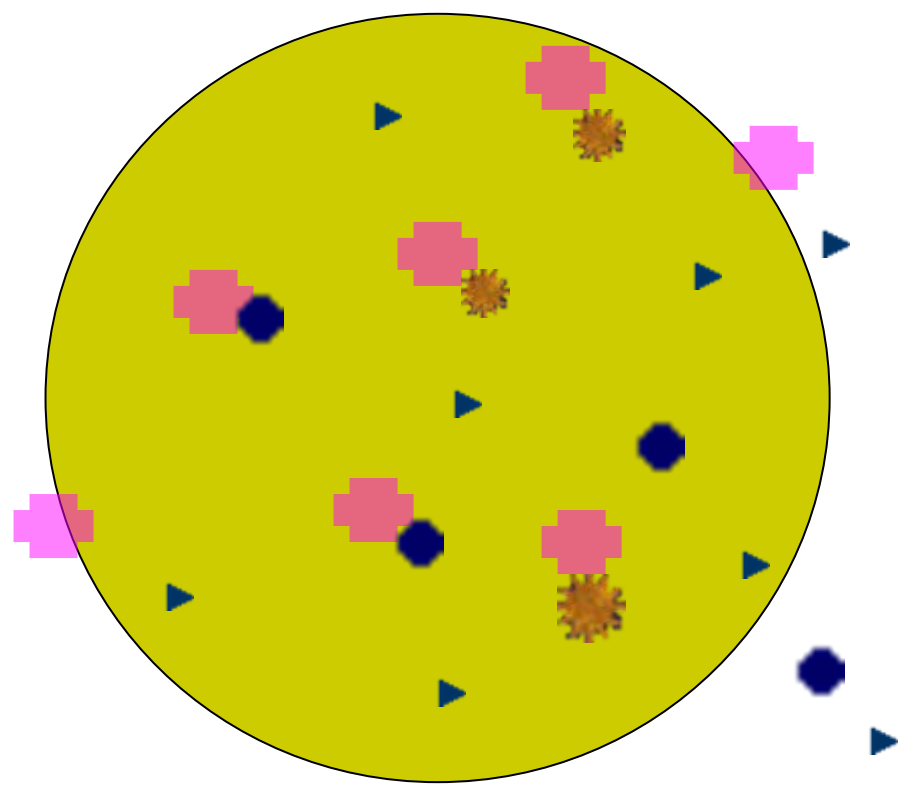
## 示意图（交换树脂表面）



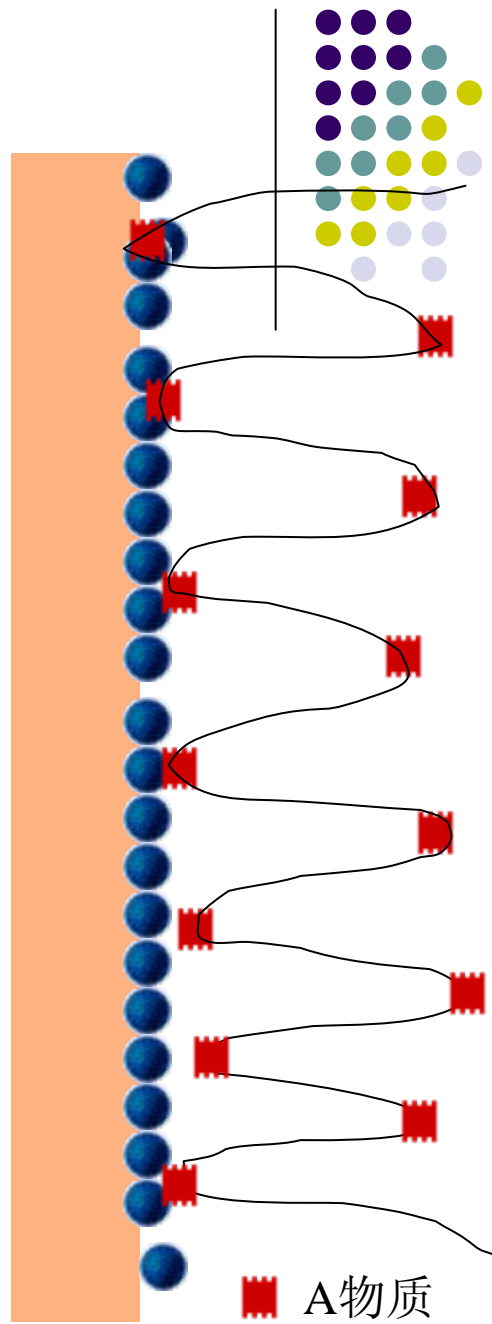
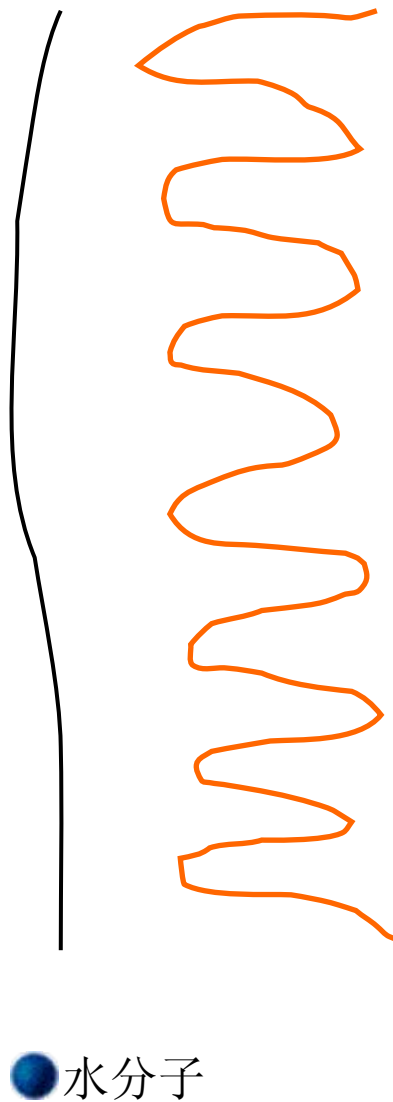
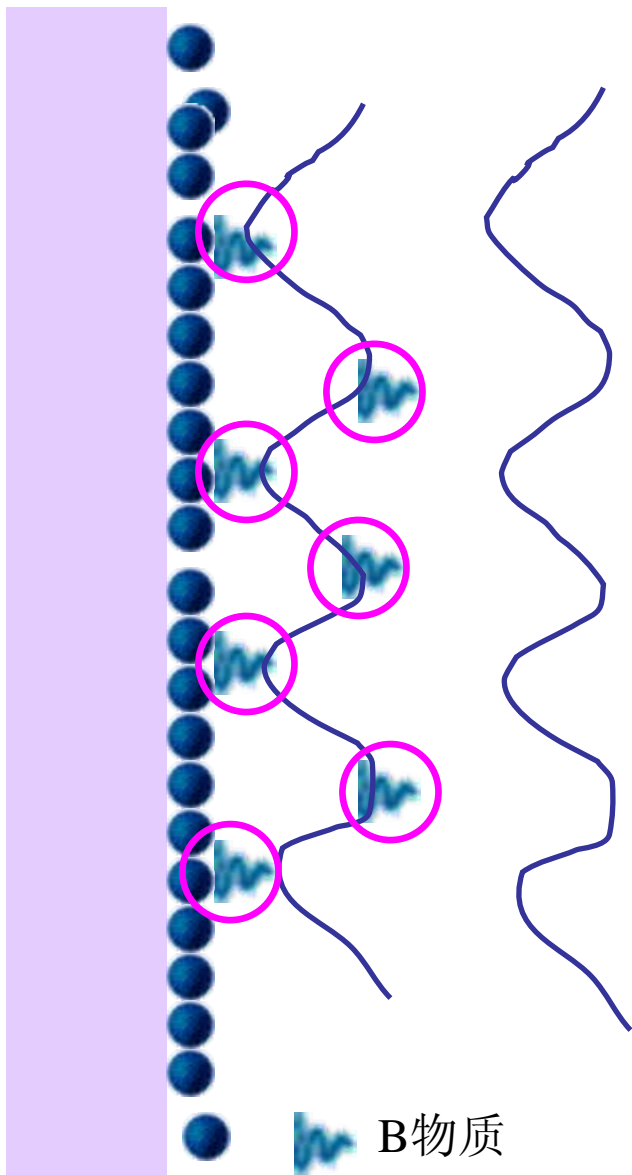


# 示意图（离子交换过程）

-  电离基团（磺酸根）
-  可交换离子（钠离子）
-  交换离子
-  不交换离子



# 示意图





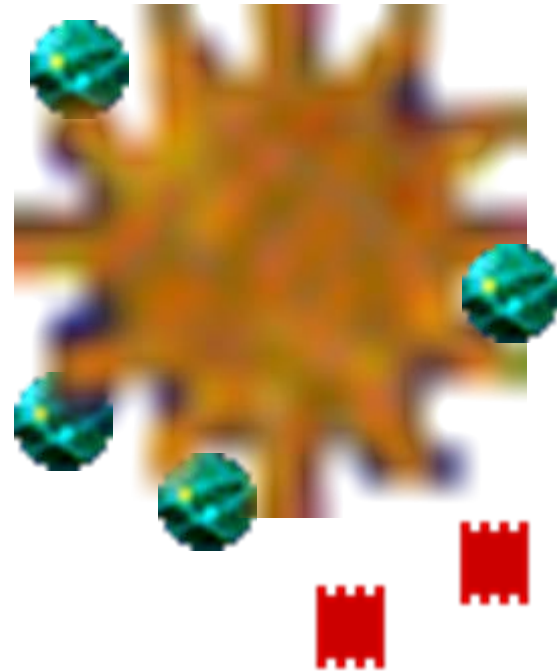
### 3 吸附层析

- 原理：当气体或液体中某组分的分子在运动中碰到一个固体表面时，分子会贴在固体表面上并停留一定时间然后才离开，此为吸附现象。
- 吸附现象形成的原因：吸附作用可能由几种作用力形成，包括被吸附物与吸附剂之间相反电荷基团与基团之间的静电引力(形成离子键)、氢键及范德华引力等。
- 在不同条件下，占主要地位的作用力可能不同，也可能几种力同时起作用
- 吸附剂：氧化铝、活性炭、硅胶；纤维素、淀粉、聚酰胺；滑石、陶土、粘土。





- ☀ 吸附剂
- 易吸附分子
- 不易吸附分子



吸附层析示意图



## 4 亲和层析

- 原理：利用分子间具有专一亲和力而设计的层析技术。
- 专一亲和力分子对：酶与底物、特异性抗原与抗体、DNA和RNA、激素和其受体
- 载体：使亲和物固相化的水不溶性化合物。如：纤维素、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶、聚苯乙烯、乙炔、多孔玻璃。

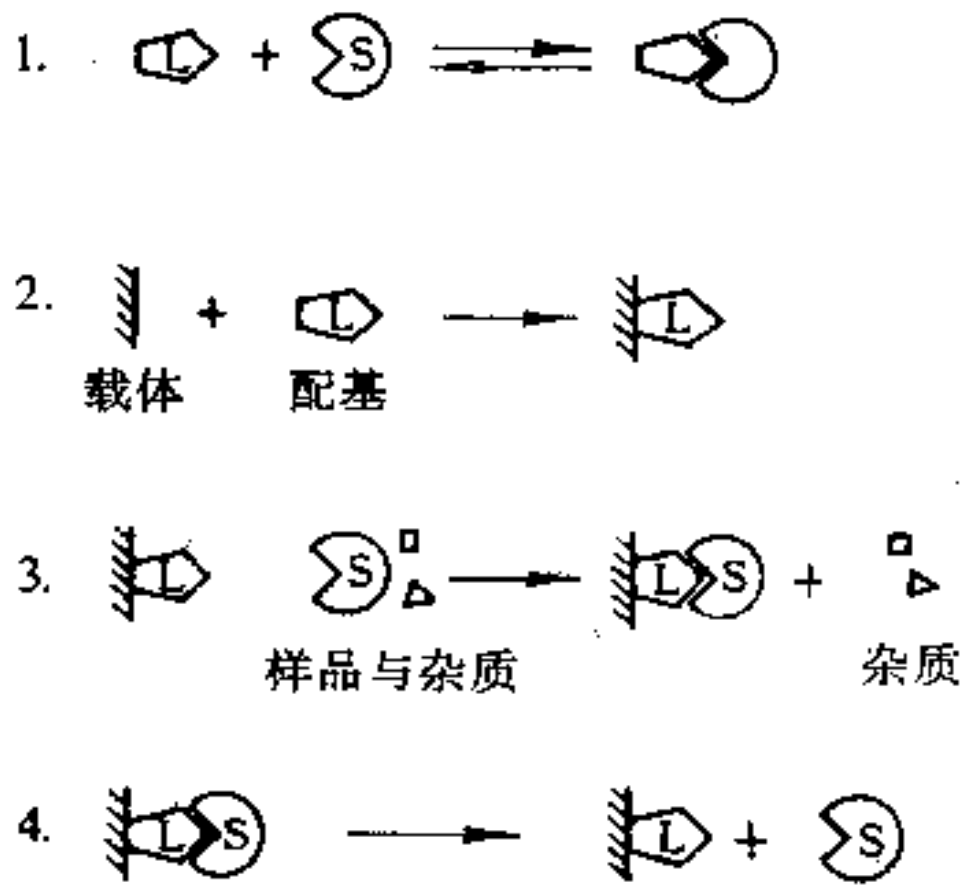
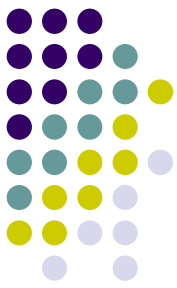


图 7-1 亲和层析法基本过程

- 1. 一对可逆结合的生物分子
- 2. 载体与配基偶联
- 3. 亲和吸附层析
- 4. 洗脱样品

## 5 凝胶过滤



- 原理：被分离物质因分子大小不同，在凝胶中向下移动的速度不同。
- 物质进入凝胶柱之后有两种运动方式：垂直向下移动和无定向的扩散运动。大分子物质直径大无法进入凝胶颗粒内，只能分布于颗粒间隙中向下移动快，而小分子物质可扩散到凝胶颗粒内，因此向下移动慢。
- 凝胶物质：马铃薯淀粉凝胶、琼脂、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、葡聚糖凝胶。

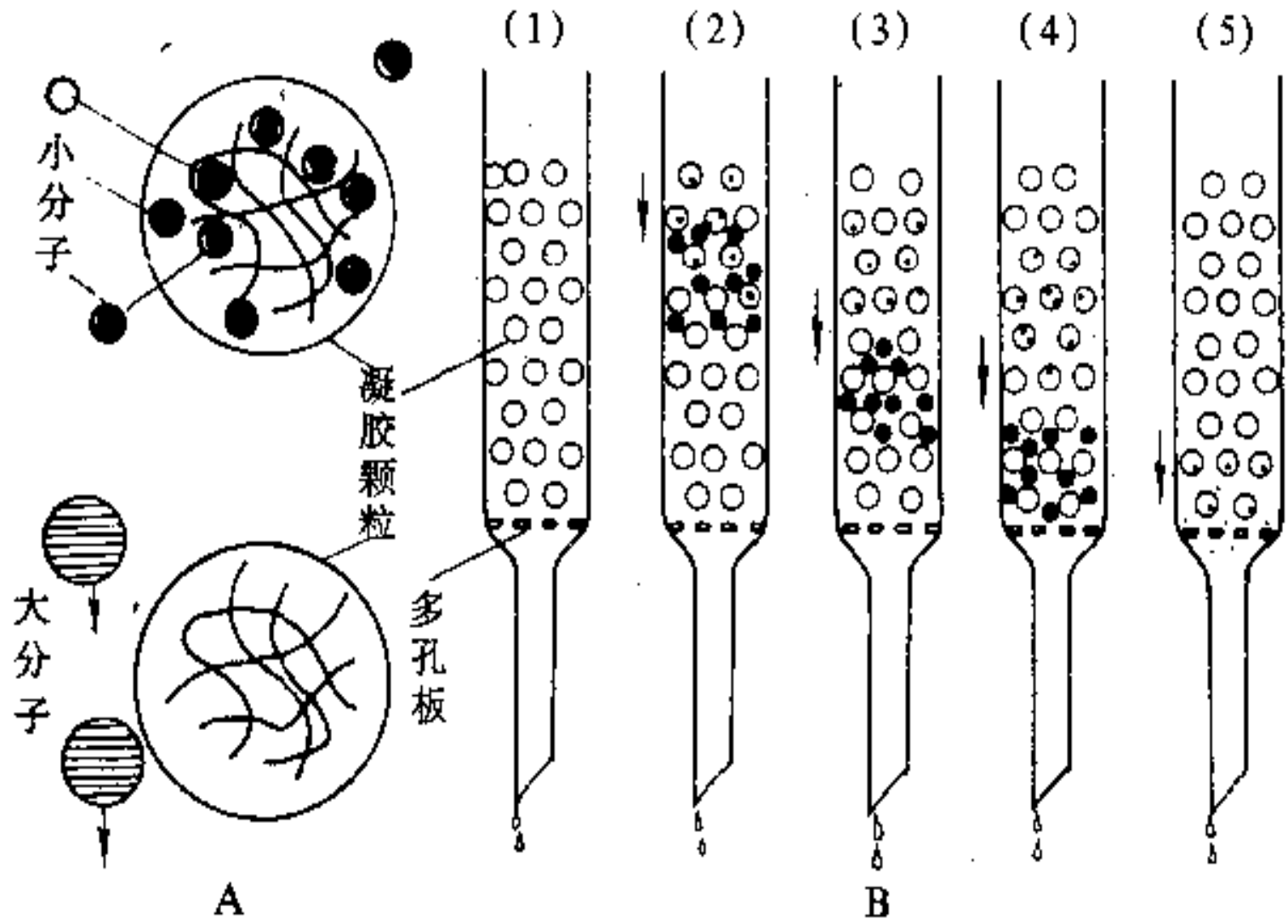
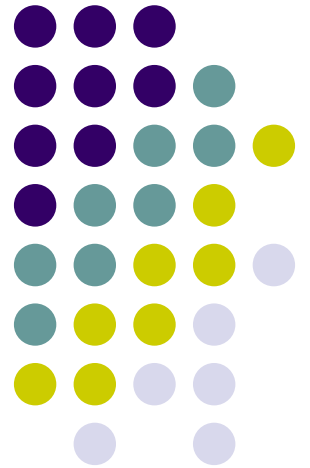


图 6-1 凝胶层析的原理

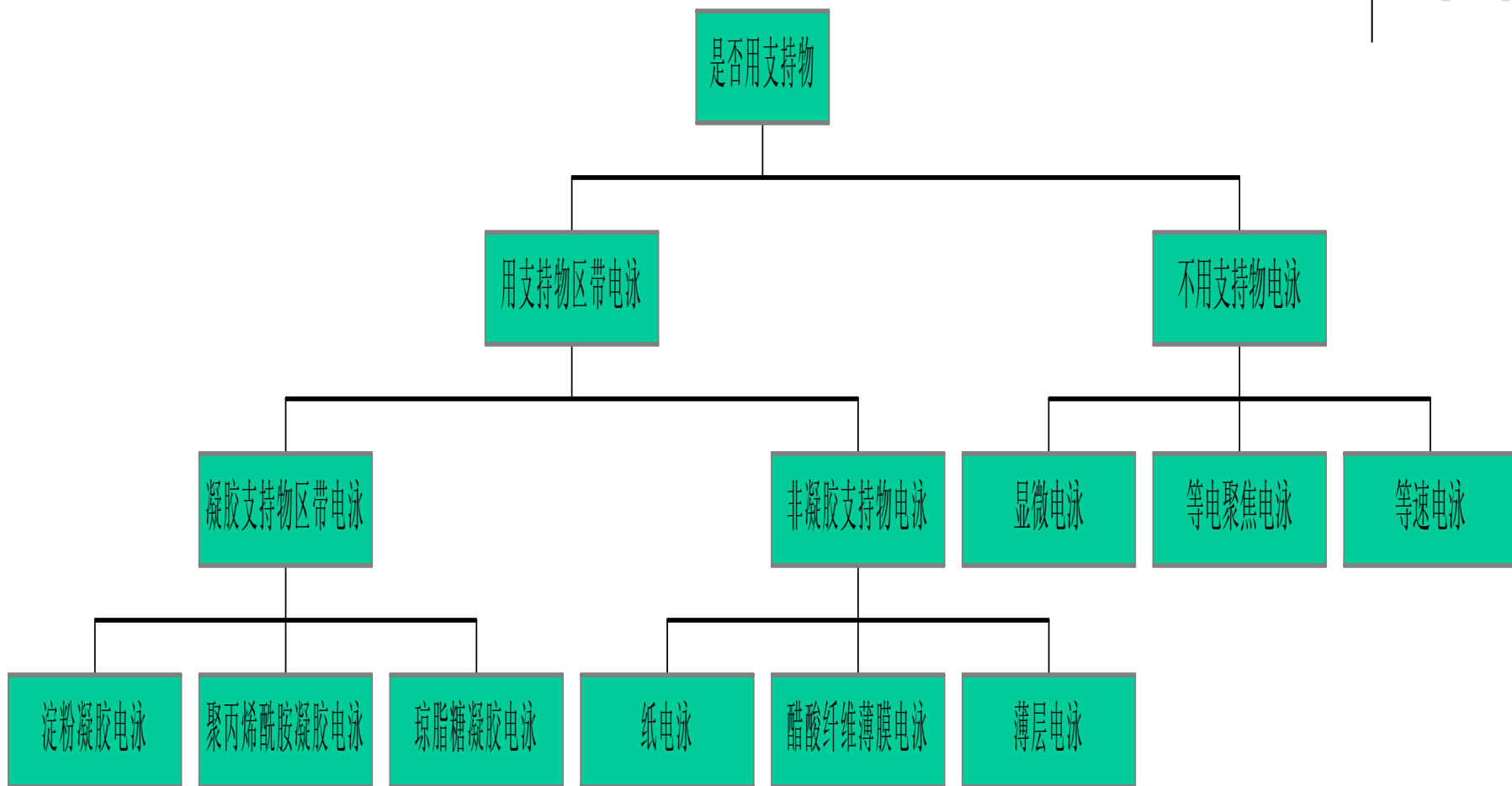
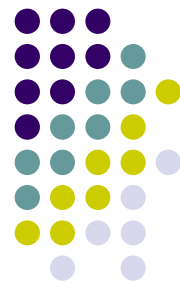
## 第四节 电泳技术

### 一、定义：

在溶液中，带电粒子在外加电场的作用下，向相反电极方向移动的现象，称为电泳。



## 二、电泳技术分类





## 三、电泳技术基本原理

### 1. 基本原理

不同的带电颗粒在同一电场中泳动速度，主要与其所带净电荷量，分子量及分子形状有关。

$pH > pI$  分子带负电荷，在电场中向正极移动；

$pH < pI$  分子带正电荷，在电场中向负极移动；

泳动率

$$u = \frac{v}{e} = \frac{d/t}{V/l} = \frac{dl}{Vt}$$





## 2. 影响电泳速度的因素

### (1) 电场强度

- 泳动速度与电场强度成正比
- 常压电泳 (100—500V). 2—10V/cm, 几小时或几天; 蛋白质等大分子物质;
- 高压电泳 (500—1000V). 20—200V/cm, 几分钟; 氨基酸、小肽、核苷酸等小分子物质;

### (2) 溶液的pH值

- pH距待分离物质的pI越远, 泳动速度越大;

### (3) 溶液离子强度

- 离子强度越小, 电动势越大, 泳动速度越快。

(4) 电渗现象: 在电场中, 液体对于固体支持物的相对移动。

## 四、几种常见电泳的比较



类型	优点	缺点
纸电泳	设备操作简单	分辨率差，电渗现象
醋酸纤维薄膜电泳	设备操作简单，样品用量少	分辨率差
琼脂糖凝胶电泳	快速，分辨率高	电渗现象严重
聚丙烯酰胺凝胶电泳	可调节凝胶孔径，样品用量少分辨率高，无电渗现象	高浓度凝胶难剥离



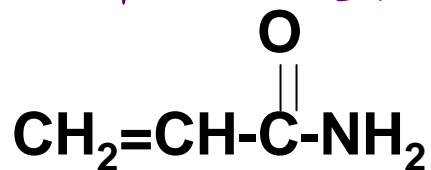
## 五、聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳原理

### 1. 原理

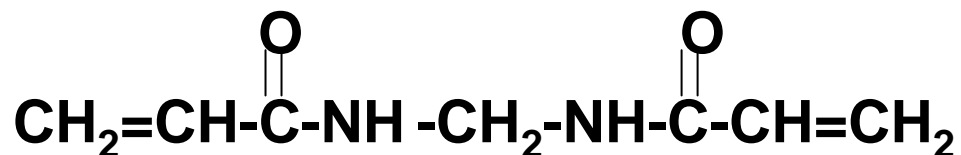
具有电泳和分子筛的双重作用

### 2. 聚丙烯酰胺凝胶的聚合

- 单体：丙烯酰胺 (Acr)
- 交联剂：甲叉双丙烯酰胺交联剂 (Bis)



- 催化剂 聚合形成的三维网状结构。





- 催化剂

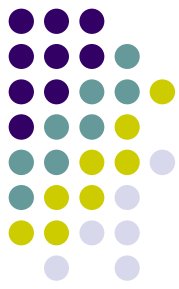
- (1) 过硫酸铵-TEMED系统

- 碱性条件下催化作用
    - 温度与聚合快慢成正比

- (2) 核黄素-TEMED系统

- 光激发的催化反应
    - 用量少，对分析样品无影响
    - 聚合时间可自由控制





## 4. 缓冲系统的选择

- pH、离子种类和离子强度

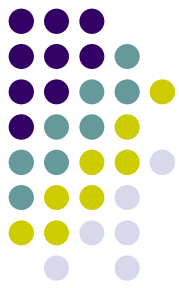
酸性蛋白质      高pH

碱性蛋白质      低pH

- 连续和不连续系统

电泳槽中的缓冲系统和pH 与凝胶相同

电泳槽中的缓冲系统和pH 与凝胶相同，分辨率高



## (1) 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳的四个不连续性

- A. 凝胶层的不连续性

浓缩胶T=2.8% C=20%; 分离胶T=7% C=2.5%

- B. 缓冲液成分的不连续性:

凝胶缓冲液Tris-HCl, 含Cl<sup>-</sup>, 电极缓冲液Tris-Gly, Gly<sup>-</sup>

- C. pH的不连续性:

浓缩胶pH6.7, 分离胶pH8.9, 电极缓冲液pH8.3

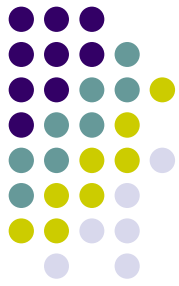
- D. 电位梯度的不连续性

## (2) 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳的三种效应

- 样品的浓缩效应

- 电荷效应

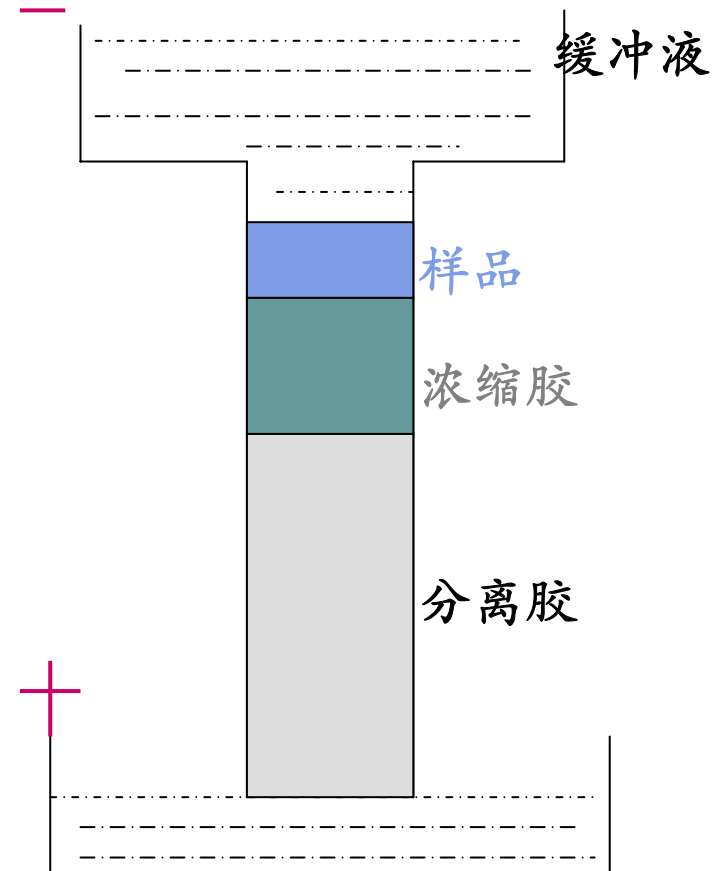
- 分子筛效应



## A. 样品的浓缩效应

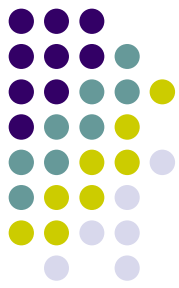
### 缓冲液成分及pH的不连续性

- 浓缩胶pH6.7
- 缓冲液  
浓缩胶Tris-HCl, 电极缓冲液Tris-Gly
- 解离度： $\alpha_{Cl^-} > \alpha_{蛋} > \alpha_{Gly}$
- $m_{Cl^-} A_{Cl^-} > m_{蛋} A_{蛋} > m_{Gly^-} A_{Gly^-}$
- 凝胶中 $Cl^-$ 为快离子， $Gly^-$ 为慢离子，蛋白质样品被夹在中间。

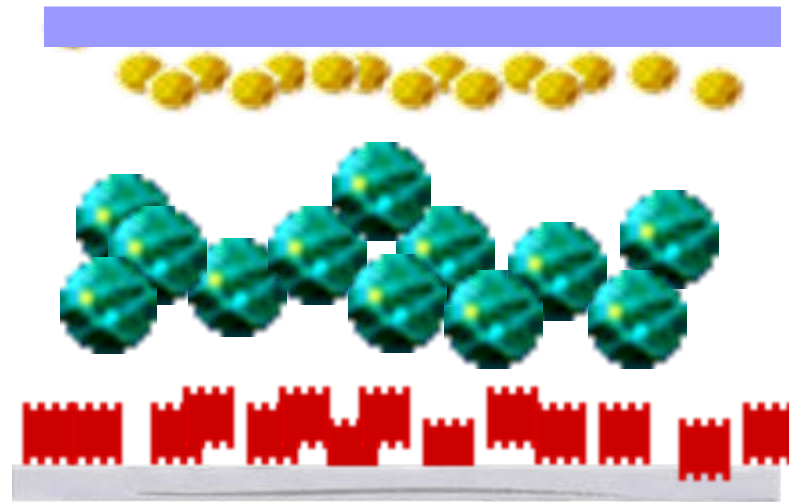




# 缓冲液成分及pH的不连续性导致蛋白质样品浓缩效应示意图



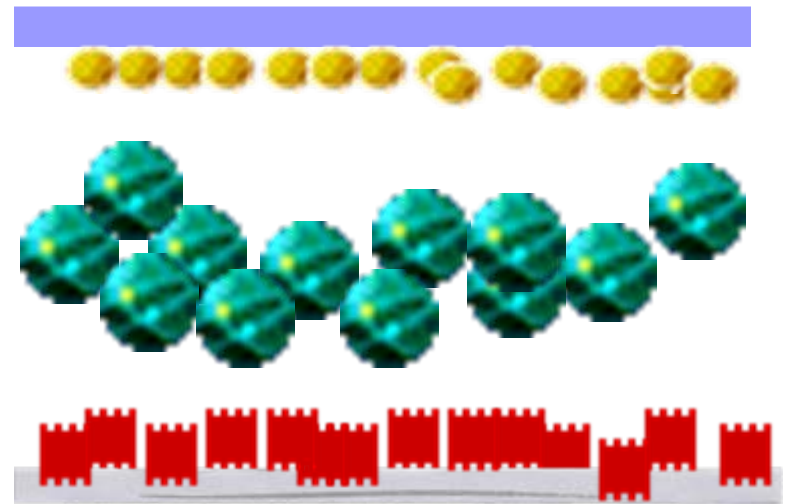
- 快离子
- 慢离子
- 蛋白质
- 样品





# 电位梯度的不连续性

- E: 每厘米的电压降  
 $E = I (\text{电流强度}) / \Gamma (\text{电导率})$
- E与电泳速度成正比
- 电泳开始后, 由于快离子泳动率最大, 在快离子后面形成一个离子浓度低的低电导区, 产生较高的电位梯度, 使蛋白质和慢离子加速移动, 蛋白质样品被进一步浓缩。





# 电位梯度的不连续性

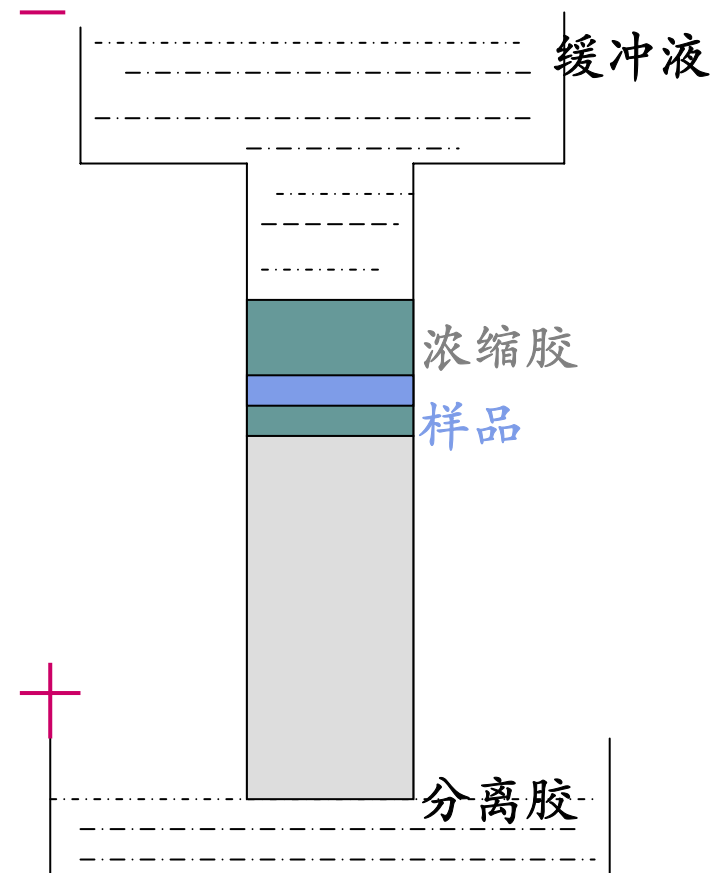
- E: 每厘米的电压降  
 $E = I (\text{电流强度}) / \Gamma (\text{电导率})$
- E与电泳速度成正比
- 电泳开始后，由于快离子泳动率最大，在快离子后面形成一个离子浓度低的低电导区，产生较高的电位梯度，使蛋白质和慢离子加速移动，蛋白质样品被进一步浓缩。

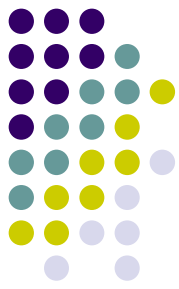




## 四个不连续性造成样品浓缩效应原理包括:

- 缓冲液成分及pH的不连续性
- 电位梯度的不连续性



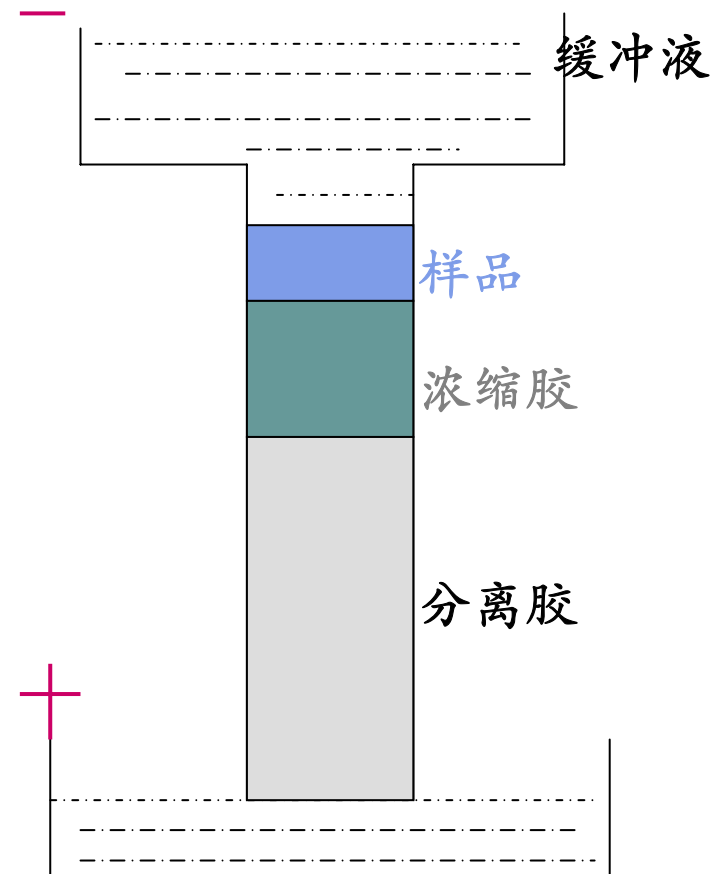


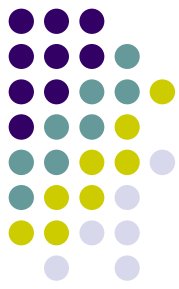
四个不连续性造成样品浓缩效应原理包括:

- **凝胶层的不连续性:**

样品进入浓缩胶有一个堆积浓缩效应 (缓冲液pH8.3)

蛋白质从“-”极向“+”极移动, 从浓缩胶进入分离胶, 速度变慢, 堆积浓缩。



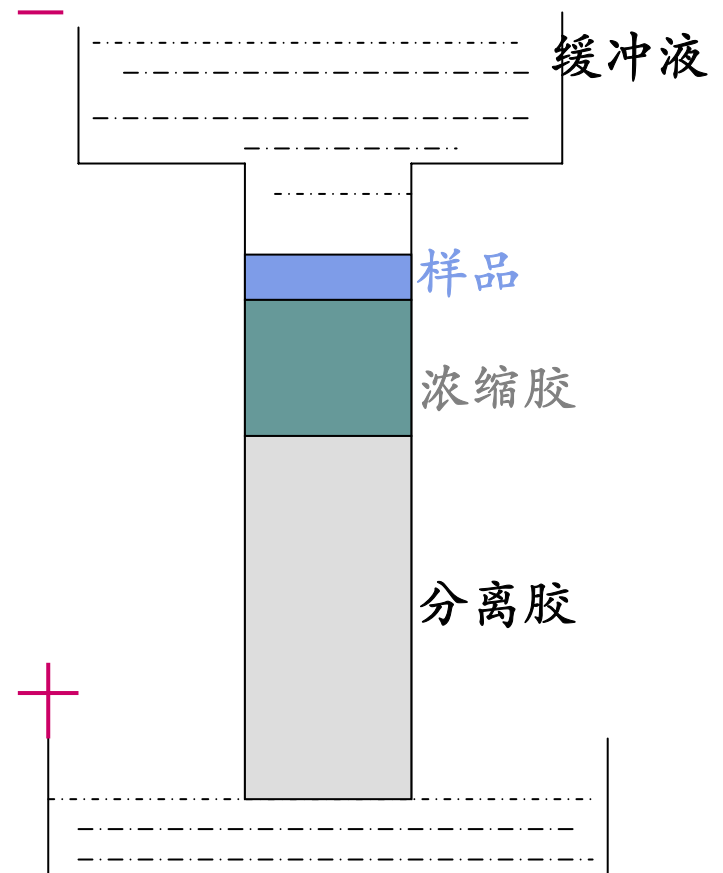


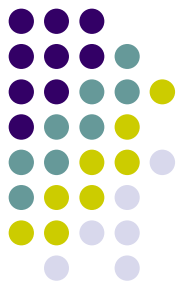
四个不连续性造成样品浓缩效应原理包括:

- **凝胶层的不连续性:**

样品进入浓缩胶有一个堆积浓缩效应 (缓冲液pH8.3)

蛋白质从“-”极向“+”极移动, 从浓缩胶进入分离胶, 速度变慢, 堆积浓缩。



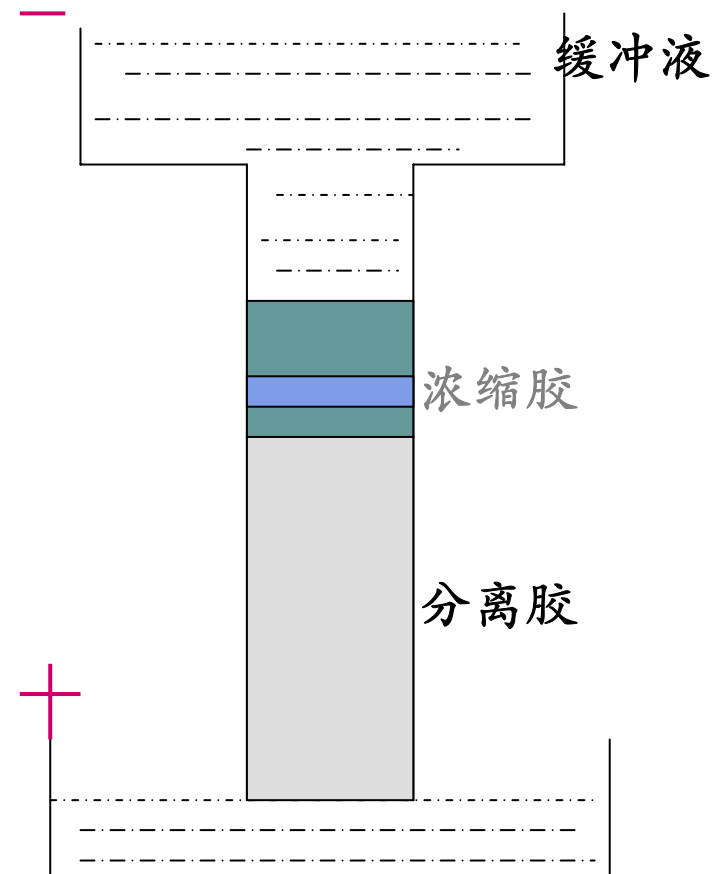


四个不连续性造成样品浓缩效应原理包括:

- **凝胶层的不连续性:**

样品进入浓缩胶有一个堆积浓缩效应 (缓冲液pH8.3)

蛋白质从“-”极向“+”极移动, 从浓缩胶进入分离胶, 速度变慢, 堆积浓缩。



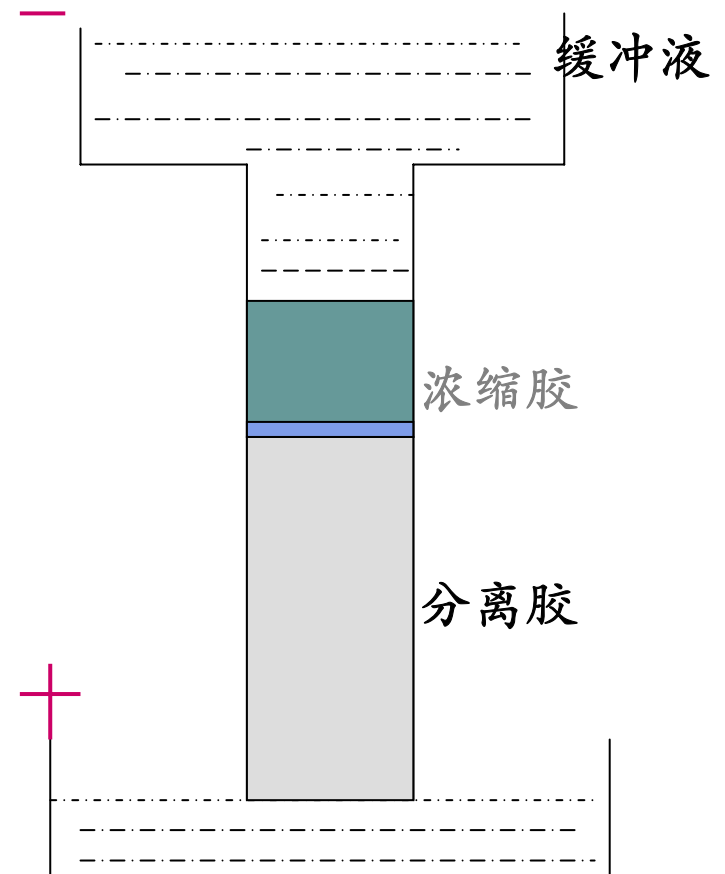


四个不连续性造成样品浓缩效应原理包括:

- **凝胶层的不连续性:**

样品进入浓缩胶有一个堆积浓缩效应 (缓冲液pH8.3)

蛋白质从“-”极向“+”极移动, 从浓缩胶进入分离胶, 速度变慢, 堆积浓缩。

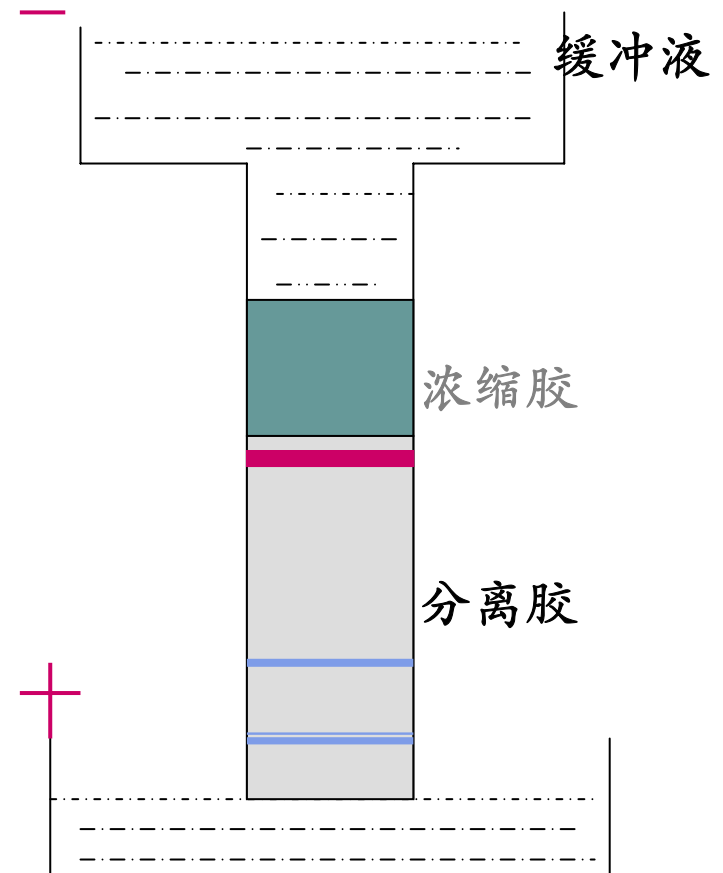






## B. 电荷效应

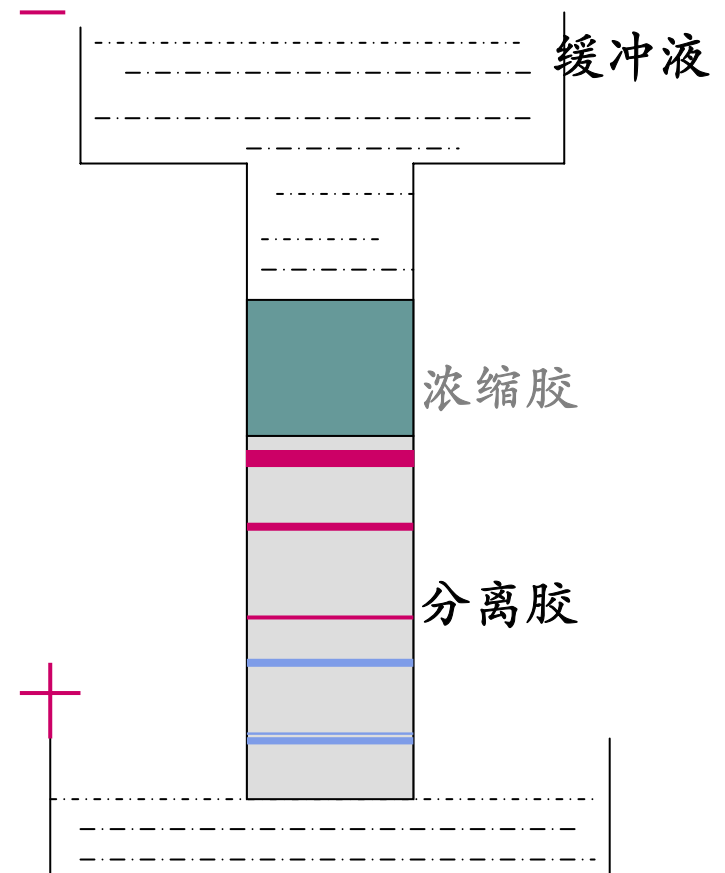
- 蛋白质样品进入分离胶后  
pH增大 (pH 8.9), Gly<sup>-</sup>解离度增大, 不存在快、慢离子之分, 蛋白质样品在均一电场强度和pH条件下泳动。
- 由于各种蛋白质pI不同, 所载有效电荷不同, 因此质点的有效迁移率不同, 形成不同区带。

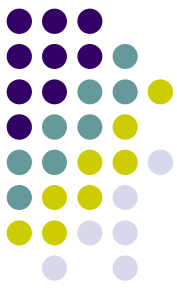




## C. 分子筛效应

- 分离胶的孔径小，各分子由于大小和形状不同，所受阻力不同，表现出不同的泳动速度，即分子筛作用。分子量小，形状为球形的泳动速度最快。





## 第五节 离心技术

### 一、基本原理

物体围绕中心轴旋转时会受到离心力 $F$ 的作用。当物体的质量为 $M$ 、体积为 $V$ 、密度为 $D$ 、旋转半径为 $r$ 、角速度为 $\omega$ （弧度数/秒）时，可得：

$$F=M\omega^2r \text{ 或者 } F=V \cdot D \cdot \omega^2r$$



## 二、离心技术的应用

### 1. 沉降速度离心

是指在离心管内液体密度均一情况下进行的离心。

### 2. 梯度离心

是待分离的物质在具有密度梯度的介质中进行的离心。

**梯度离心**可分为两种，即密度梯度离心（又称沉降速度离心、速度区带离心或差速区带离心）和平衡密度梯度离心（等密度梯度离心和沉降平衡离心）。

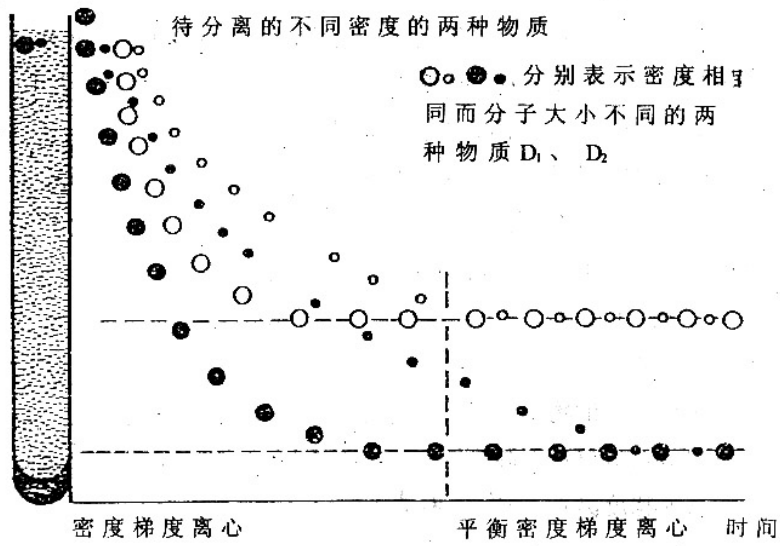


图5—2 两种梯度离心比较

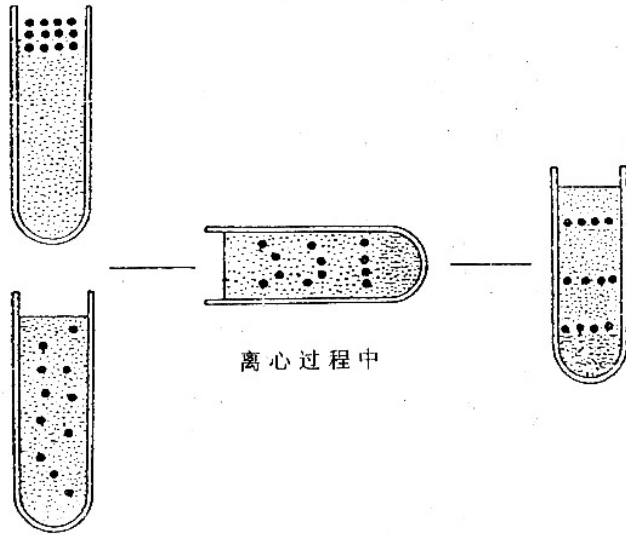
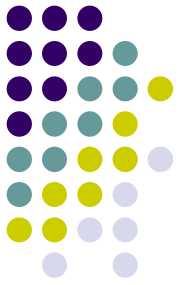


图 5—3 平衡密度梯度离心示意图





## 第二篇

## 实验部分



# 实验一 血清 $\gamma$ -球蛋白的分离纯化

## 一、实验目的

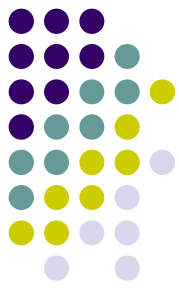
掌握盐析法分离蛋白质的原理的方法

初步掌握凝胶层析分离、纯化生物大分子的原理和方法

## 二、基本原理

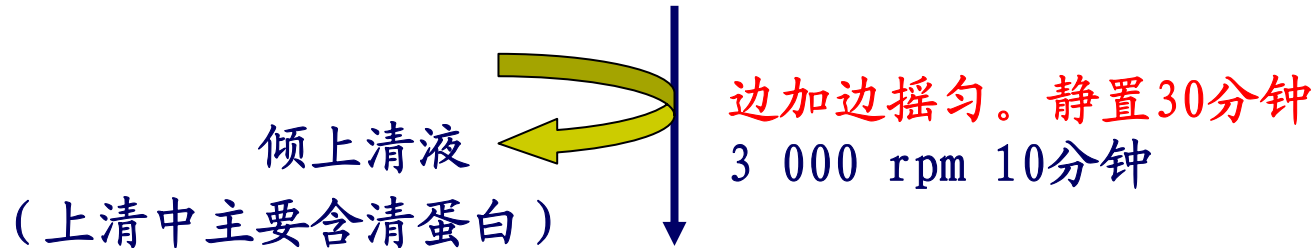
利用硫酸铵分段盐析将血清中的  $\gamma$ -球蛋白与清蛋白、 $\alpha$ -球蛋白、 $\beta$ -球蛋白等加以分离，再用凝胶过滤法除盐即可得到比较纯的  $\gamma$ -球蛋白。

# 三、操作步骤

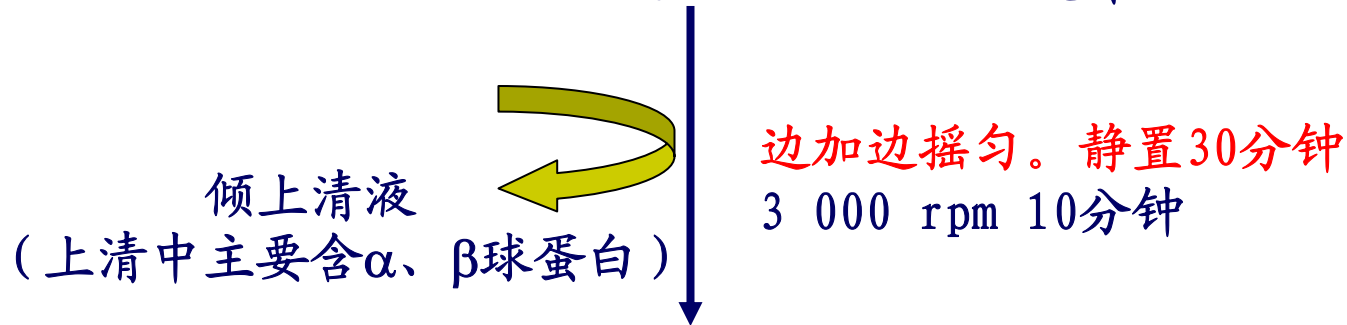


## (一) 盐析

血清1ml+PBS1ml+1ml饱和硫酸铵



沉淀 +1 ml PBS+饱和硫酸铵溶液0.5ml



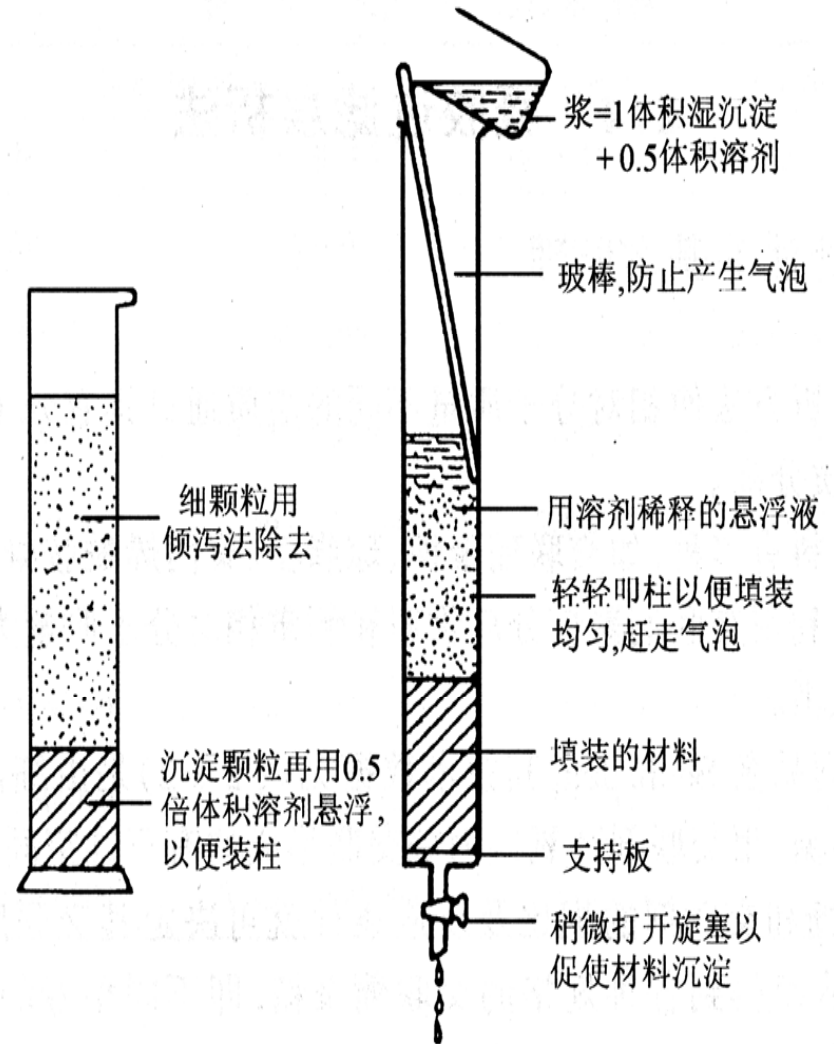
沉淀用7-8滴PBS溶解待层析用



## (二) 脱盐

### 1、装柱

- 层析柱的形状，一般直径与高度的比为1: 15为宜。
- 柱形必须根据层析介质和分离目的而定。待分离物质的性质相近，柱越**细长**，则分离效果越好，但流速较慢。在样品组分并不复杂的情况下，采用“**矮胖柱**”。





## 2、平衡

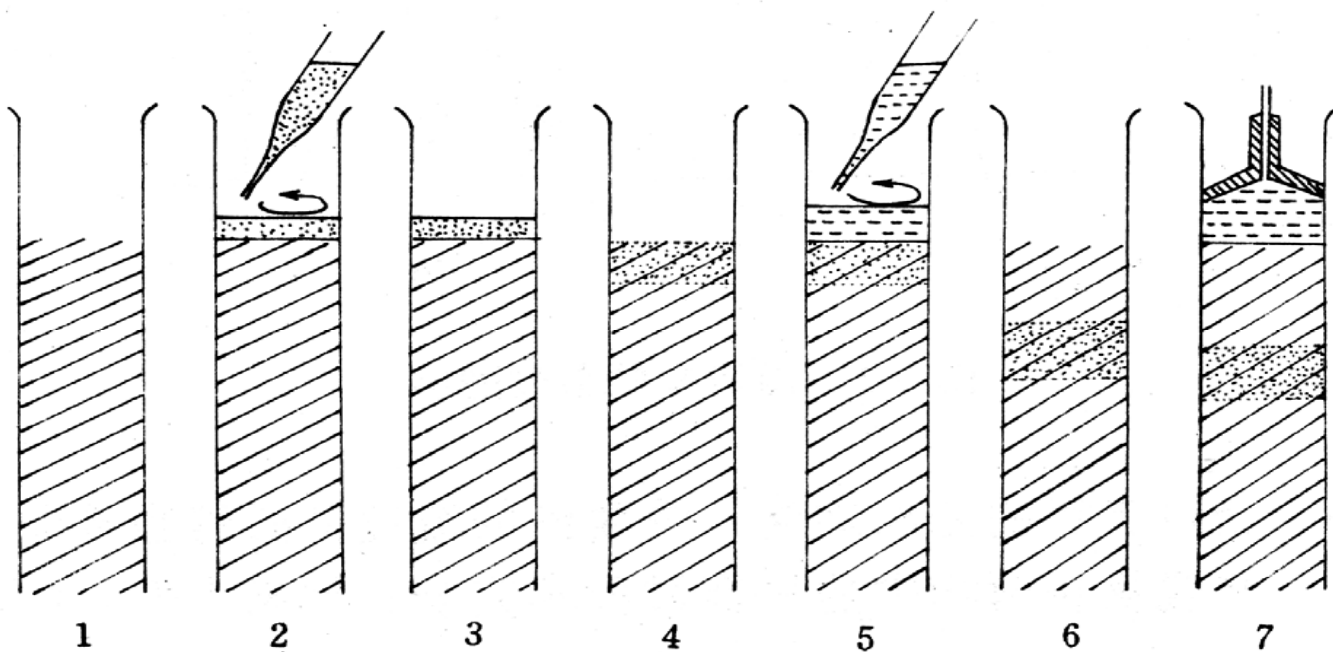
- 层析柱正式使用前，必须平衡至所需的pH和离子强度，一般用起始缓冲液在恒定压力下走柱，其洗脱体积相当于4-6倍床体积，使交换剂充分平衡，柱床稳定。装好的柱必须均匀，无纹路，不含气泡，柱顶交换剂沉积表面十分平坦。
- 本实验平衡体积：10 - 20mL
- 调节流速：0.5mL/min或8-12滴/min

### 3、加样

- 上样量：0.3-0.5mL
- 0.5mL缓冲液冲洗加样处2次

注意：

- 加样的同时开始收集
- 加样时且勿搅动凝胶床面





## 4、洗脱与收集

- 尽量维持恒定柱压
- 每管收集1ml，共收集12管

## 5、鉴定

准备反应板两块。将12管收集液各取1滴分别放入反应板的12个凹孔。一块板的各孔内加纳氏试剂1滴，有 $\text{NH}_4^+$ 者呈黄色至橙色。可用+、-号表示有无呈色或颜色深浅。再向另一块板的各孔内加双缩脲试剂1滴，有蛋白者呈蓝紫色。亦可用+、-号表示有无呈色或颜色深浅。将呈色最深的一管收集液保留供实验2使用



# 实验二 蛋白质含量的测定

## 一、实验目的

学习考马斯亮蓝G-250染色法测定蛋白质含量的原理和方法。

## 二、原理

- 考马斯亮蓝G-250与蛋白质结合后引起染料最大吸收光的改变，从465nm变为595nm；
- 蛋白质-染料复合物有较高的消光系数，蛋白最低检出量为1微克，灵敏度高；
- 反应迅速，2min，且结合物在1h内稳定；
- 干扰物质少。

# 三、操作步骤



## 1、标准曲线的制作

1. 取小试管6支，按下表操作

	1	2	3	4	5	6
标准蛋白液(ml)	0.00	0.10	0.20	0.30	0.40	0.5.0
生理盐水(ml)	1.00	0.90	0.80	0.70	0.60	0.50
考马斯亮蓝(ml)	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00

2. 混匀后静置5min，以1号为空白，595nm比色。

3. 结果处理：以各管光密度为纵坐标。各管所含蛋白质质量为横坐标，制成标准曲线。



## 2、未知样品中蛋白质浓度的测定

### 1. 按下表操作

	测定管	空白管
待测液 (ml)	0.10	-
生理盐水 (ml)	0.90	1.00
考马斯亮蓝 (ml)	5.00	5.00

2. 混匀静置5min 后，以空白管调零，595nm室温比色，根据标准曲线确定样品中蛋白质含量。

## 思考题

用标准曲线法及标准管法测定蛋白质有何区别与意义。



# 实验三 SDS-PAGE分离蛋白质

## 一、实验目的

掌握SDS-PAGE的工作原理和操作方法

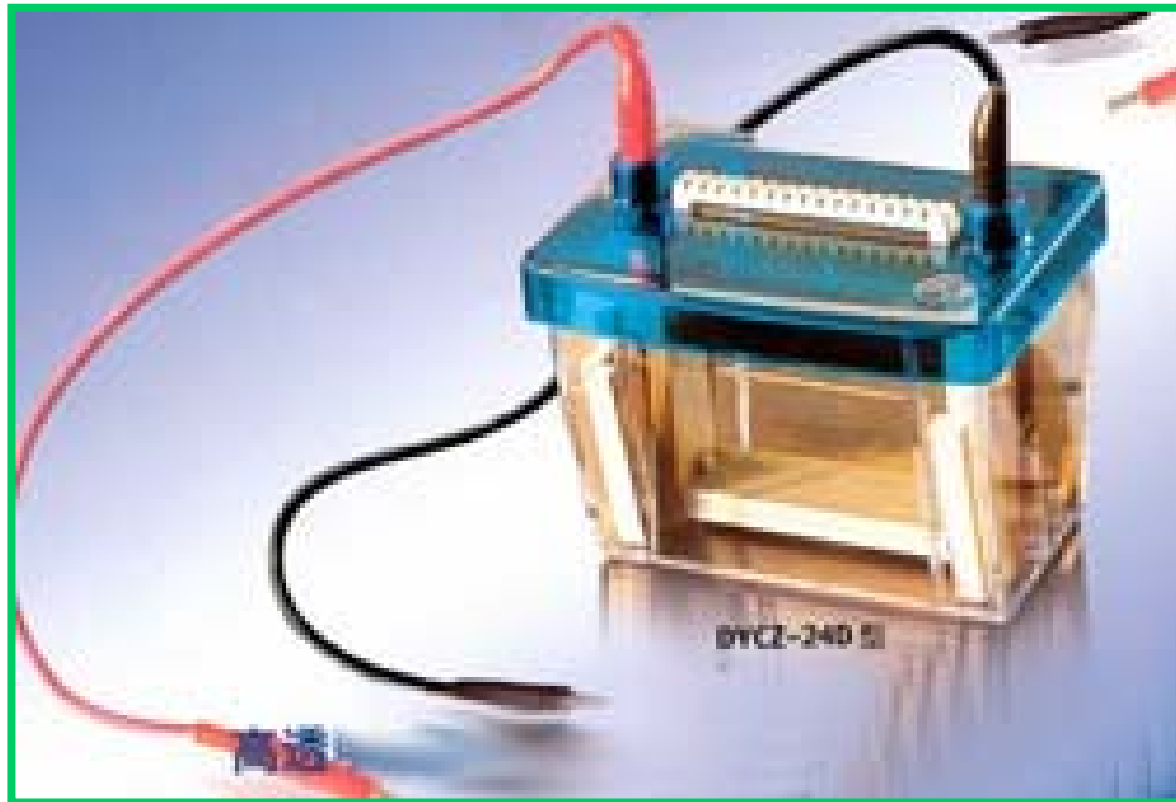
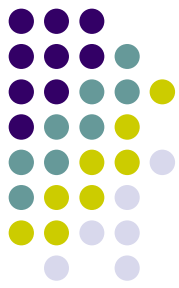
## 二、原理

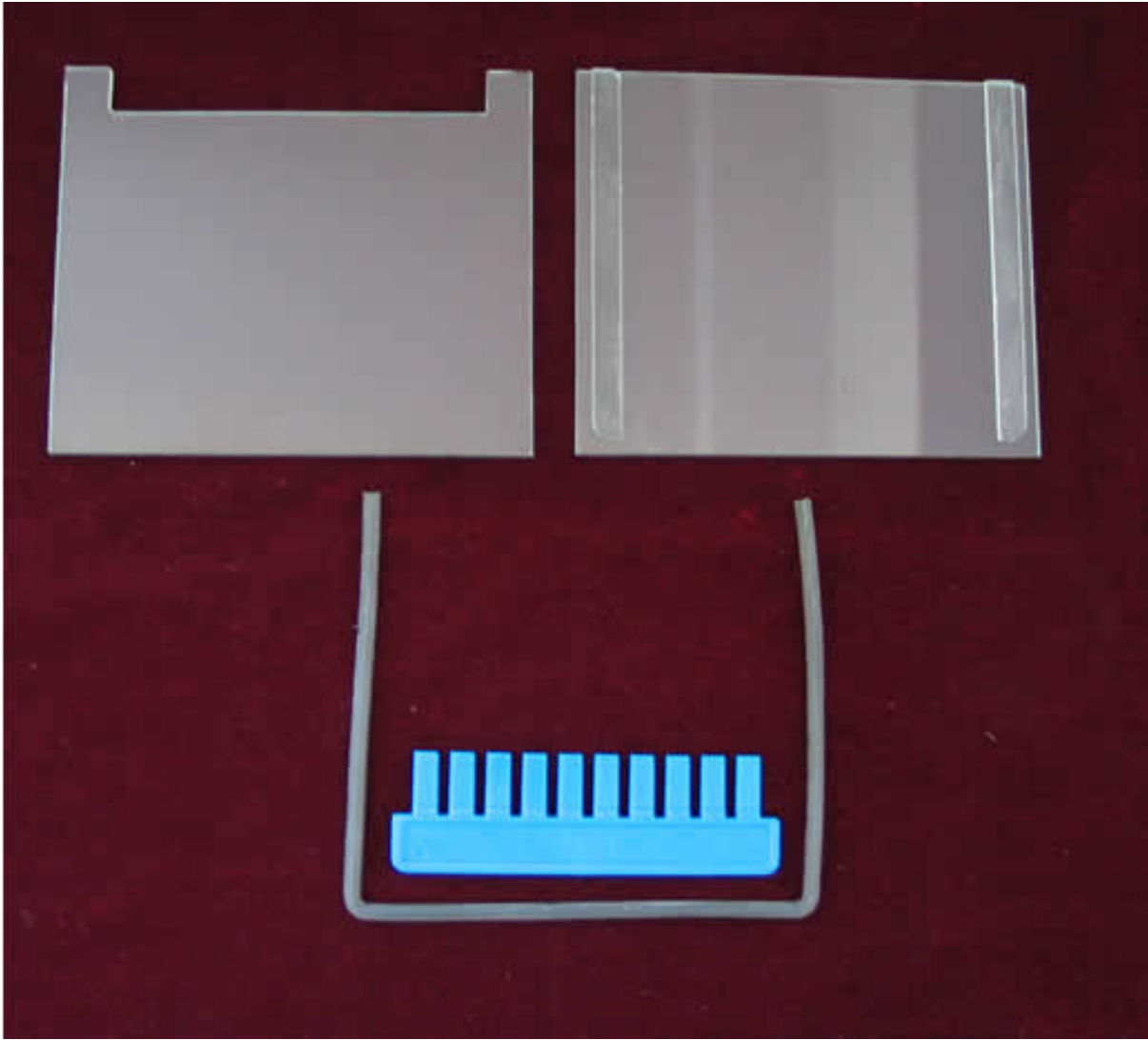
不同蛋白质具有不同的分子量，并在一定的pH溶液中带有不同的电荷。但经过SDS处理后的蛋白质，分子表面完全被负电荷所覆盖，因此在电泳时，电泳迁移率近取决于蛋白质的分子量大小而与其所带电荷的性质无关。

- 分子筛效应
- 浓缩效应



### 三、操作步骤

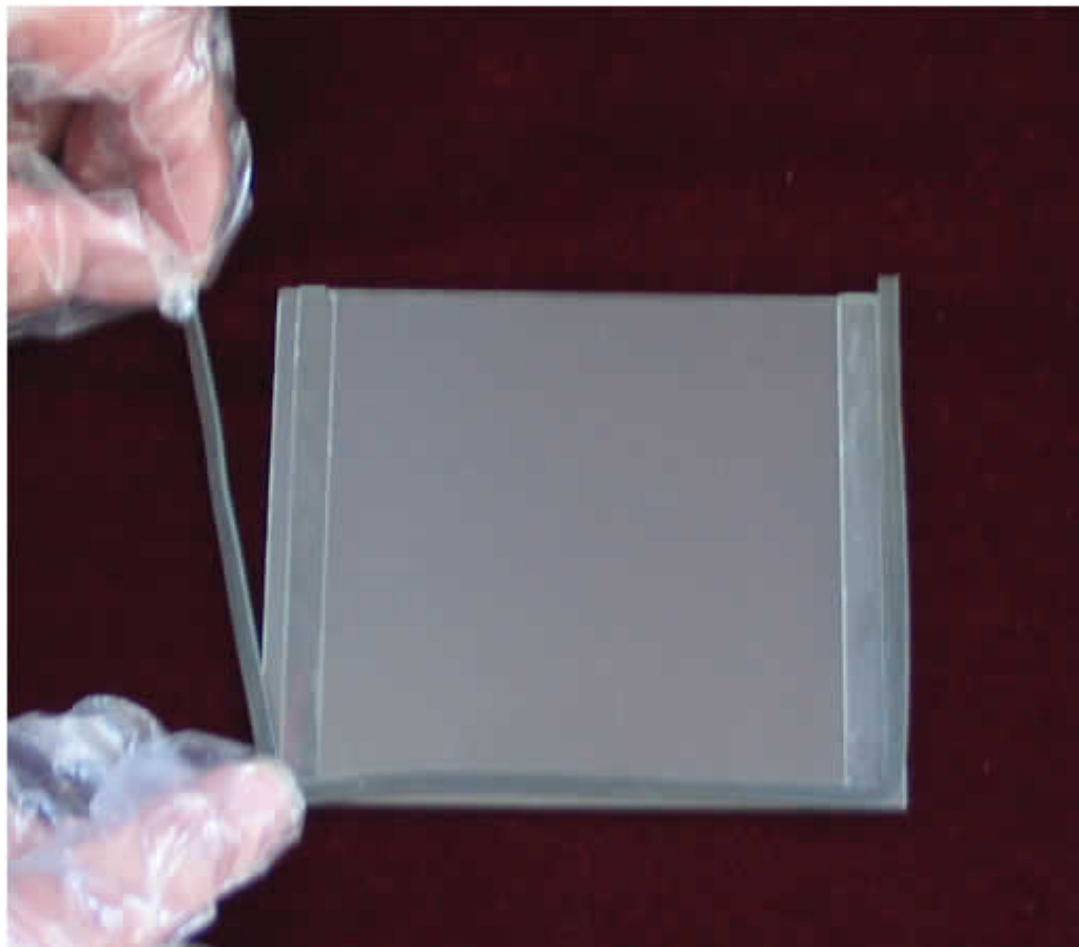




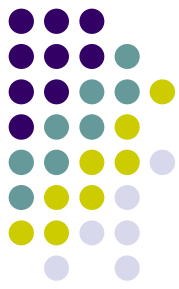
# 1. 安装膜具



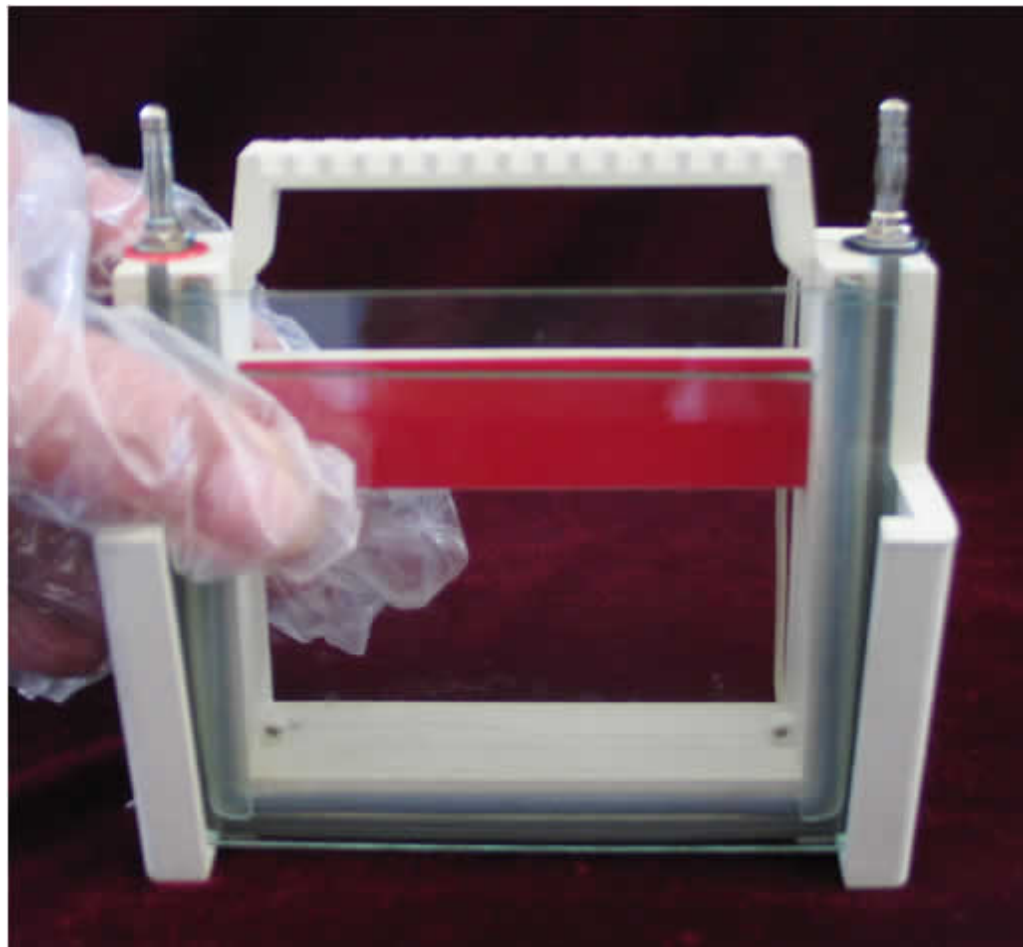
装封胶条，注意封胶条平面朝下，不能有裂口



# 盖上凹玻璃

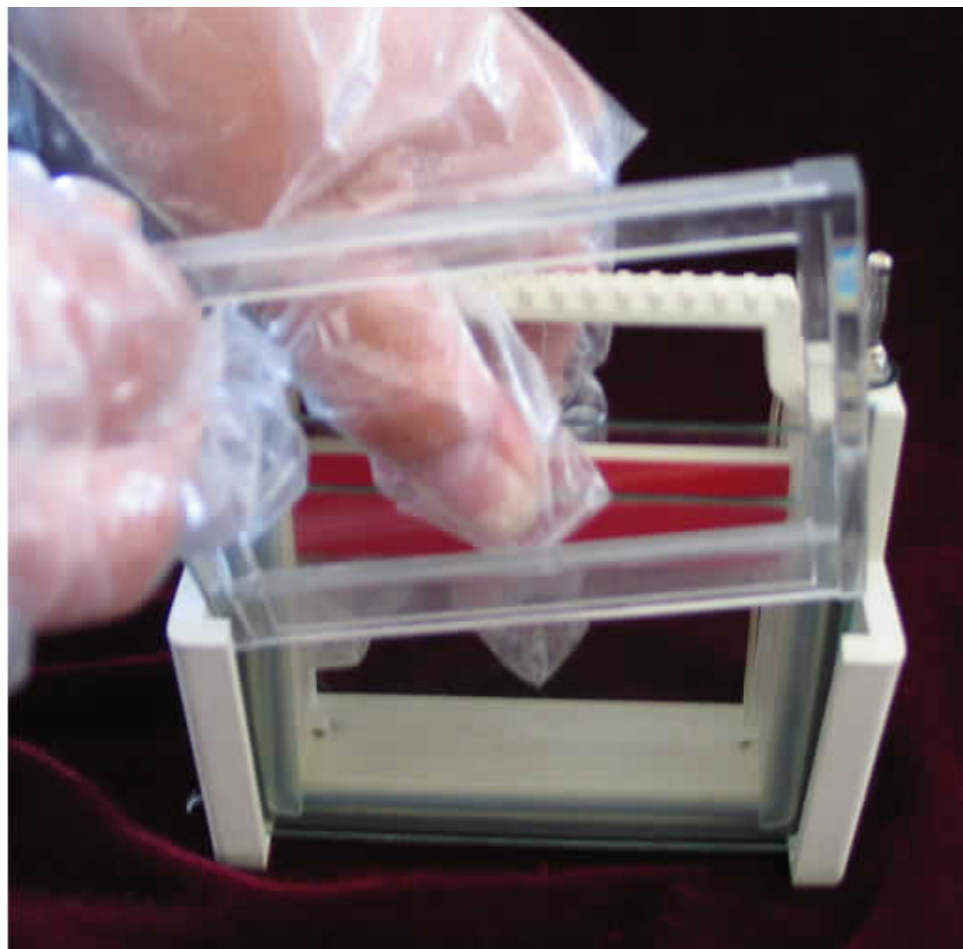


将凹玻璃冲外装进槽里





将楔子插进，将底部插紧





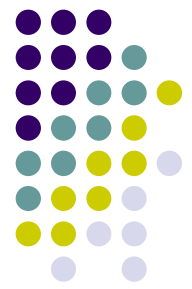
## 2. 配制凝胶溶液

### ◆ 胶的配制(平行电泳两块胶板)

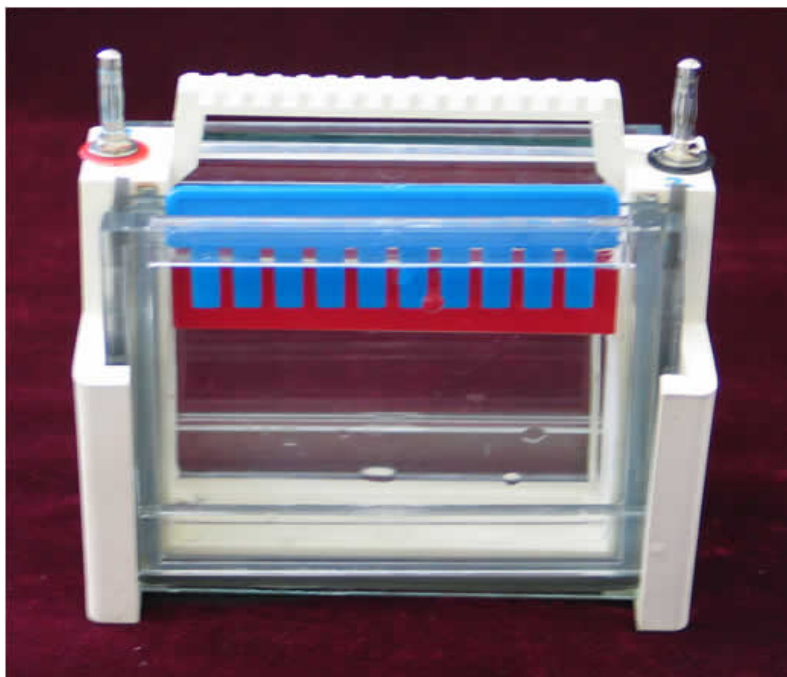
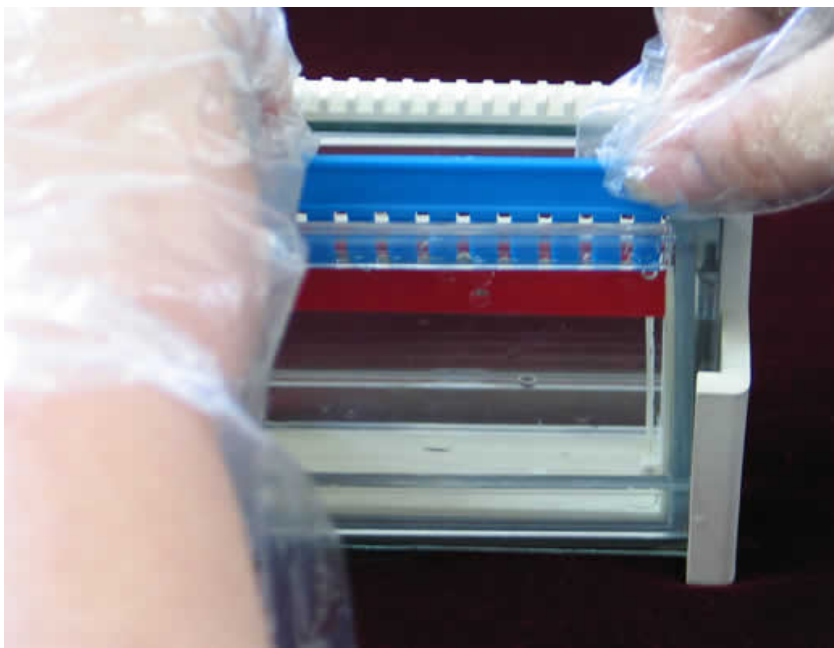
- ★ 胶母液: 8.4ml
- ★ 配胶缓冲液: 13ml
- ★ 蒸馏水: 4ml
- ★ 10% TEMD: 0.2ml, 混匀
- ★ 10%AP: 0.2ml, 混匀

## 3. 灌胶, 加到顶部, 来回倾斜去气泡

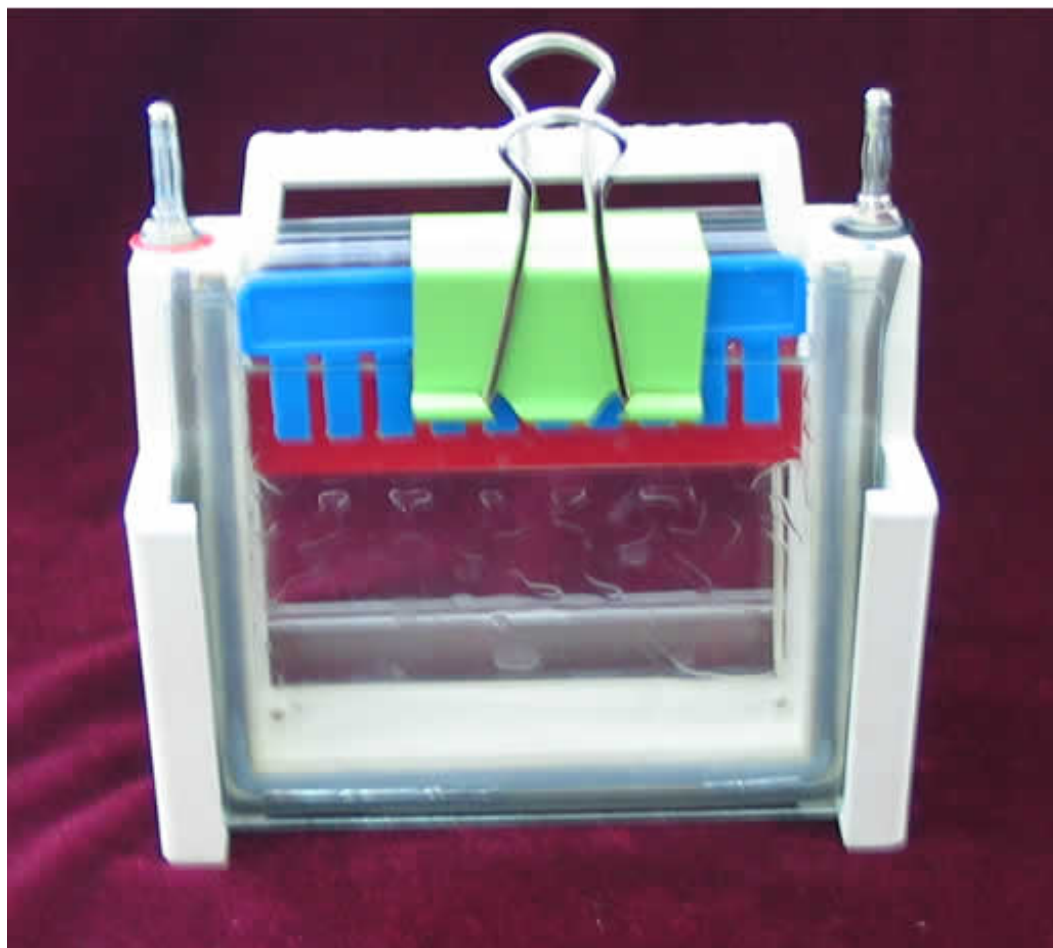




# 插入梳子



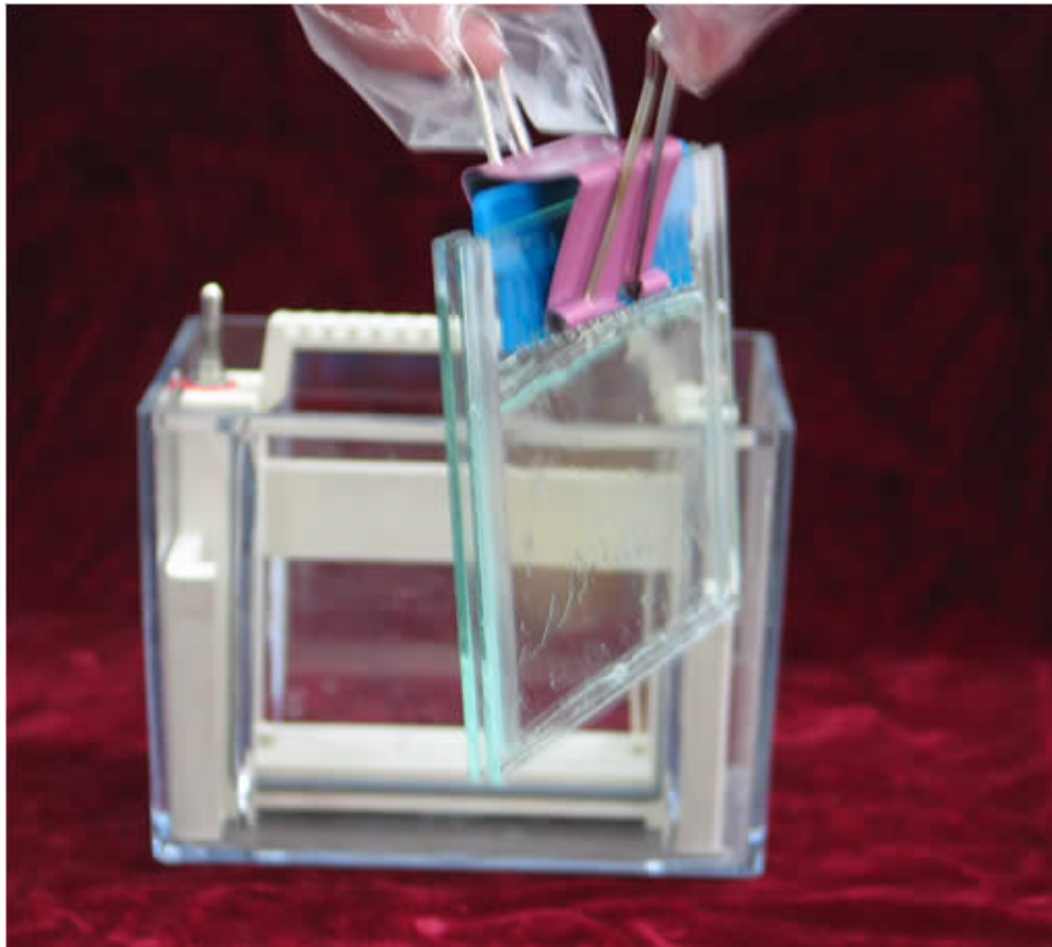
胶凝后用夹子将玻璃夹出



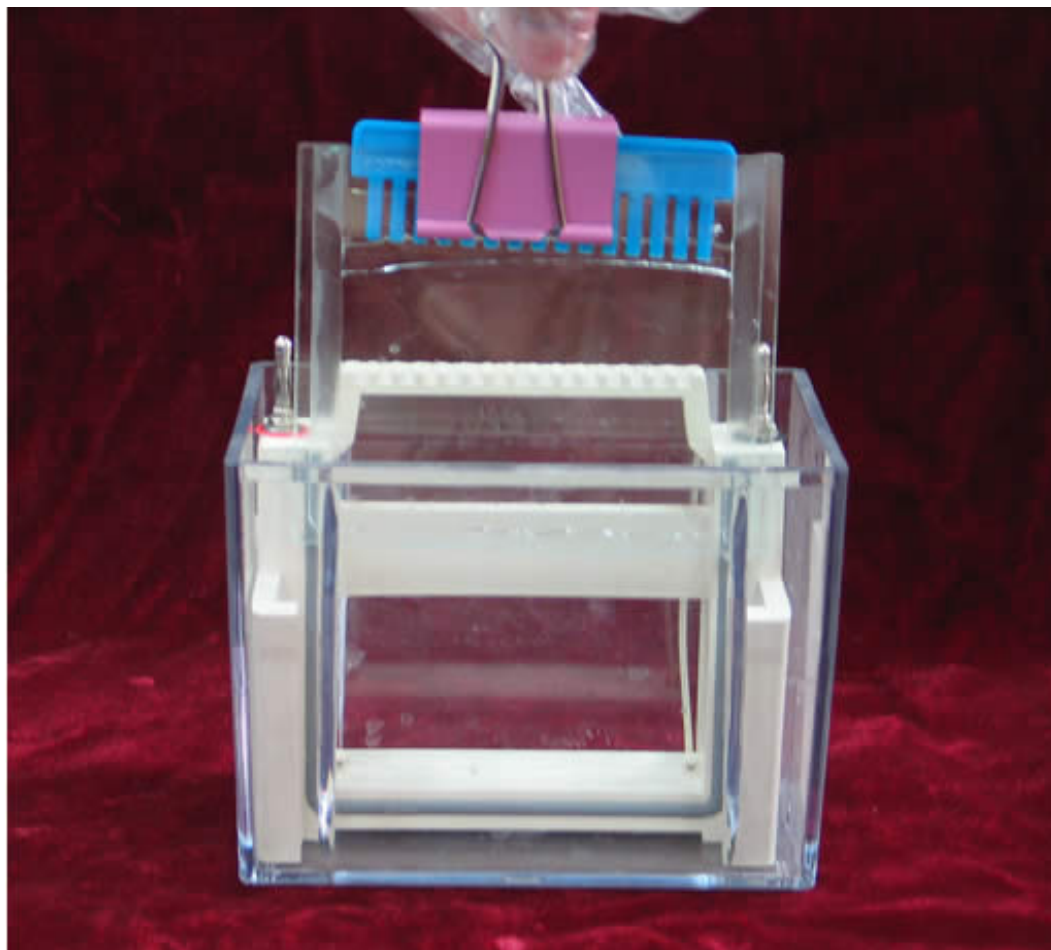
用夹子夹紧玻璃将封胶条轻轻撕掉



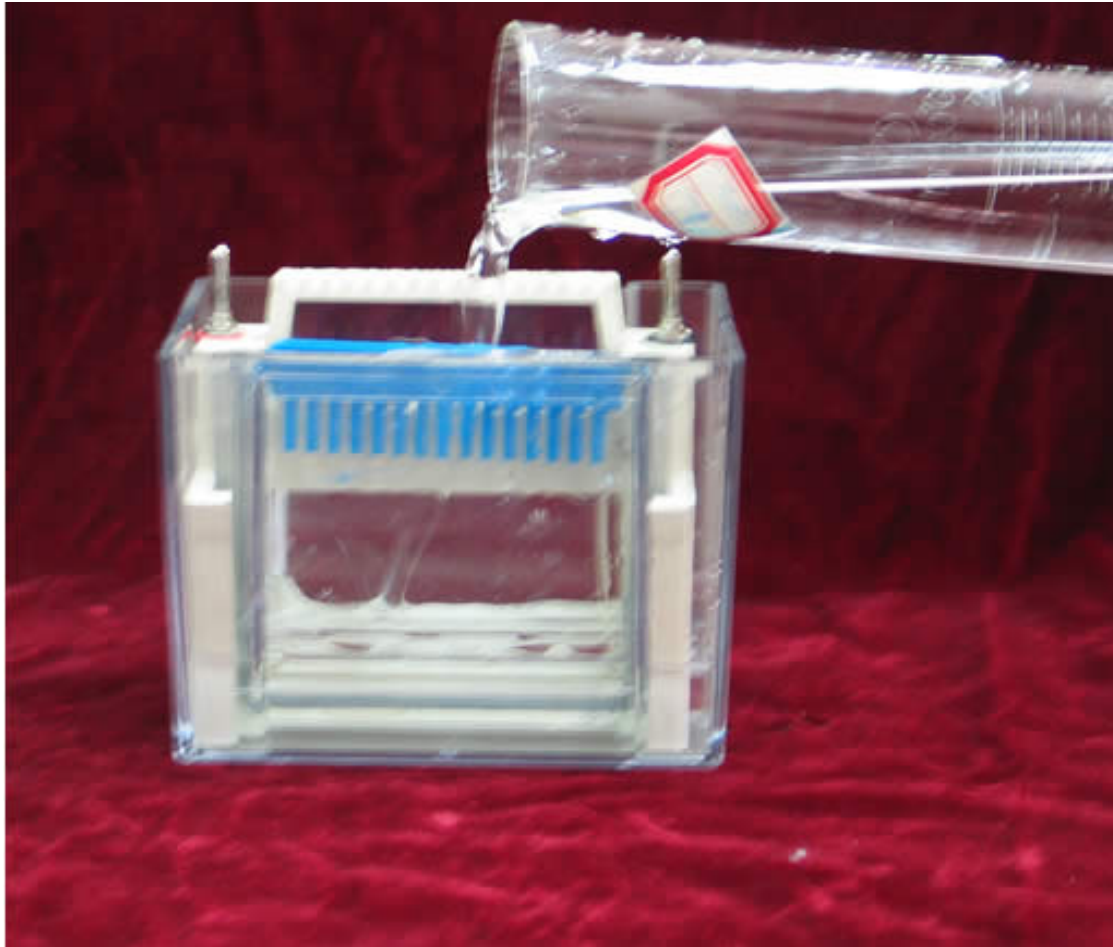
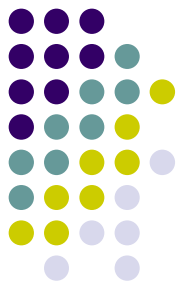
旋转180度，凹玻璃向里

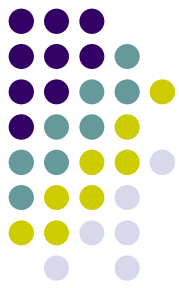


将玻璃放进槽内



# 加缓冲液



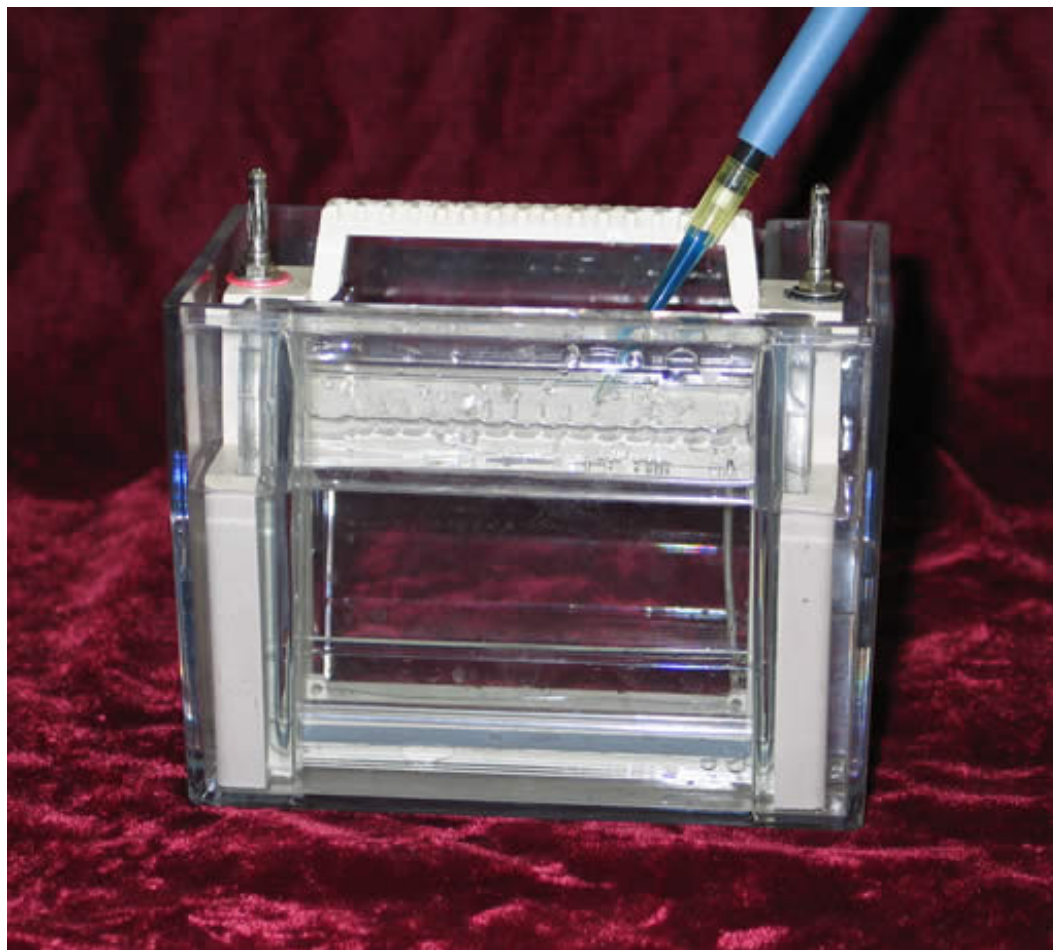


## 4. 样品制备:

取样品液与等体积样品缓冲液混合, 100℃  
加热1~2分钟。

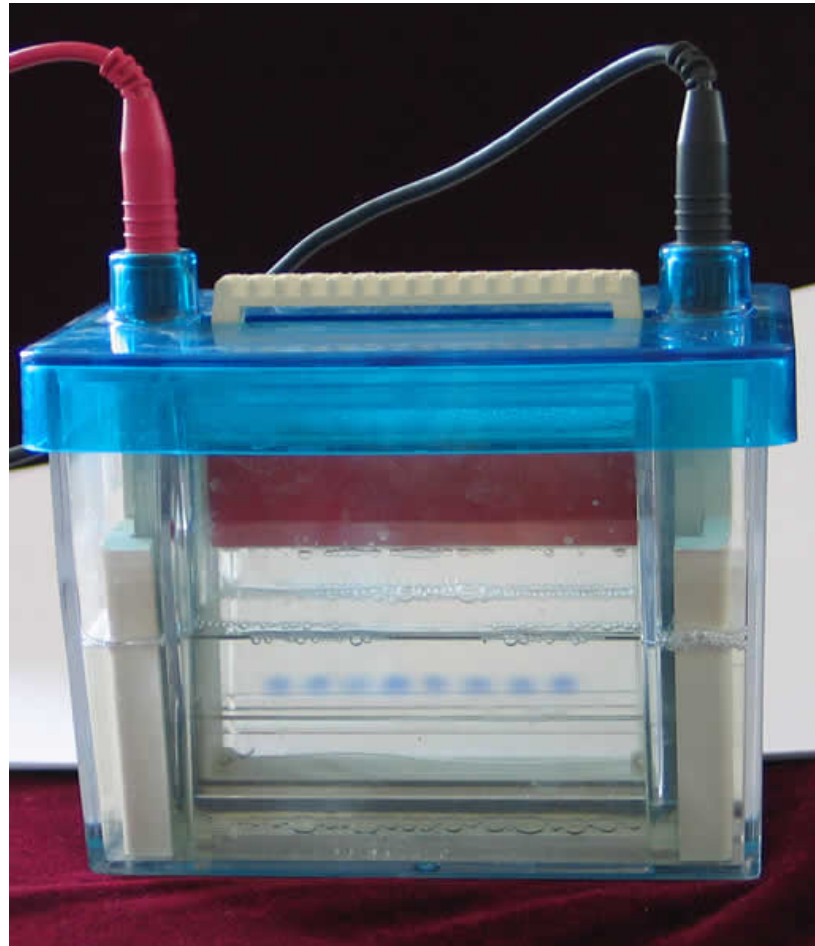


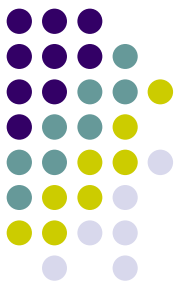
## 5. 加样





## 6. 电泳



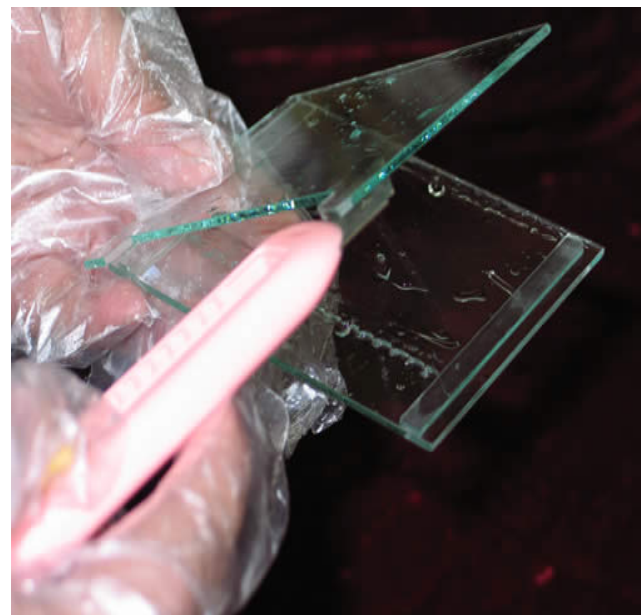
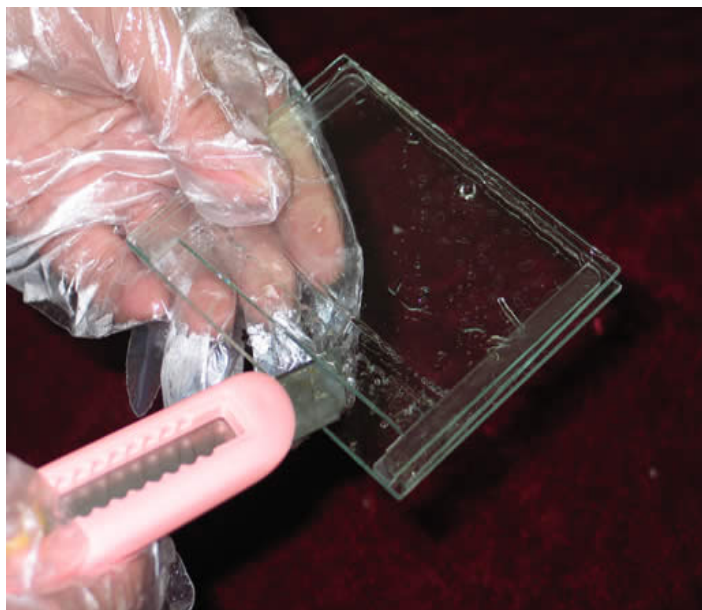


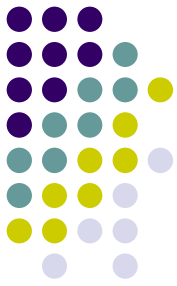
## 电泳:

接通电源，电流恒定为80mA，待溴酚兰指示剂移至离下端0.5cm（约3小时），切断电源，拔去插头，倒出电极缓冲液于大烧杯中（如此缓冲液欲重用时，应把正负电极液分别贮存）。



## 7. 剥 胶





## 8 染色:

考马斯亮蓝染色, 详见教材

## 9 脱色



# 凝胶（脱色之后）结果分析

- 1、计算迁移率（ $R_m$ 值）：计算公式见教材。
- 2、绘制标准曲线：以标准蛋白亚基的 $R_m$ 值为横坐标，以相应分子量的对数值为纵坐标，即可绘制出测定蛋白质分子量的标准的线图。
- 3、计算未知蛋白亚基样品的分子量：根据未知样品样的 $R_m$ 值，从上述标准曲线图中即可查出其分子量。

# 实验四 碱性磷酸酶的提纯及比活性的测定



## 一、实验目的

掌握有机溶剂分段提纯酶的原理和方法

了解提纯酶的完整程序

通过计算纯化倍数和得率来评价酶提取过程的合理性

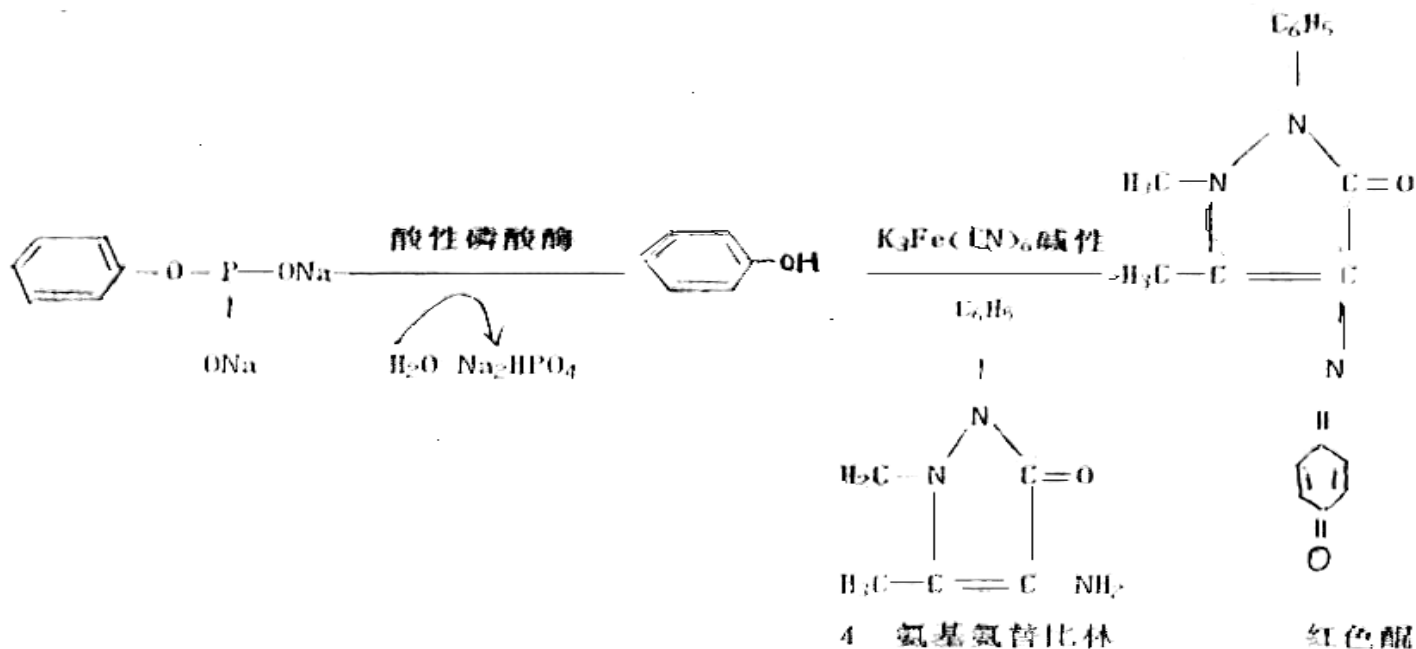
## 二、原理

有机溶剂能降低溶液的介电常数从而增加蛋白质分子不同电荷的引力，导致溶解度的降低；而且有机溶剂可与水作用，能破坏蛋白质的水化膜，故蛋白质在一定浓度的有机溶剂中便沉淀析出。利用不同蛋白在不同浓度的有机溶剂中的溶解度差异而分离的方法，称有机溶剂分段沉淀法。使用的有机溶剂多为乙醇和丙酮。



在一定的pH和温度下，待测液中的碱性磷酸酶作用于基质液中磷酸苯二钠，使之水解释放出酚。酚在碱性溶液中与4-氨基安替比林（AAP）作用并经铁氰化钾氧化，生成红色醌类化合物。以酚作标准液同样显色进行比色，可测知酚的生成量，从而计算出酶的活性单位。

本法以37℃, 15分钟生成酚1 mg所需的酶量为一个酶活性单位。



### 三、操作步骤

#### 1. 碱性磷酸酶的提纯

肝2g剪碎 +2ml 0.01mol/L醋酸镁-0.01mol/L醋酸

匀浆+4ml上液倒入离心管

A液 {  $A_E$  : 0.1ml +4.90ml 0.01mol/L pH8.8Tris  
 $A_p$  : 0.1ml +4.90ml 生理盐水

余液+2ml正丁醇搅拌室温静置10分,

过滤

滤液+等体积冷丙酮混匀

离心2500rpm 5分钟

沉淀+0.5mol/L醋酸镁4ml

B液 {  $B_E$  : 0.1ml +2.90ml 0.01mol/L pH8.8Tris  
 $B_p$  : 0.1ml +1.90ml 生理盐水

余液加95%冷乙醇至乙醇浓度达30%

离心2500rpm 5分钟

上清液+95%乙醇至乙醇浓度为60%

离心2500rpm 5分钟

沉淀加0.01mol/L醋酸镁-0.01mol/L醋酸钠2ml,

C液 {  $C_E$  : 0.1ml +1.90ml 0.01mol/L pH8.8Tris  
 $C_p$  : 0.1ml +0.40ml 生理盐水







## 2、碱性磷酸酶比活性测定

### (1) 酶活性的测定

管号	0	S	1 (A <sub>E</sub> )	2 (B <sub>E</sub> )	3 (C <sub>E</sub> )
不同酶液 (ml)	-	-	0.1	0.1	0.1
0.1mg/ml酚标 (ml)	-	0.1	-	-	-
0.01mol/l pH8.8 Tris缓冲液 (ml)	0.1	-	-	-	-
预温37°C复合基质液 (ml)	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

37°C水浴中准确保温15分钟

铁氰化钾	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
------	-----	-----	-----	-----	-----

放置10分钟，用510nm比色，计算每毫升酶液中的酶活性单位。

### (2) 蛋白质浓度的测定

	0	S	1 (A <sub>p</sub> )	2 (B <sub>p</sub> )	3 (C <sub>p</sub> )
待测液 (ml)	-	-	0.10	0.10	0.10
蛋白标准 (ml)	-	0.10	-	-	-
生理盐水 (ml)	1.00	0.90	0.90	0.90	0.90
考马斯亮蓝 (ml)	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00

混匀静置5min 后，以空白管调零，595nm室温比色，确定样品中蛋白质含量



## [计算]

### 1. 比活性的计算

碱性磷酸酶的比活性=每毫升样品中碱性磷酸酶活性单位数/每毫升样品中蛋白质毫克数

### 2. 得率的计算

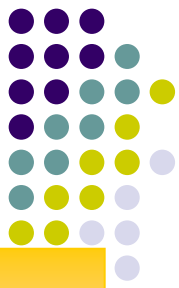
各阶段碱性磷酸酶的总活性=每毫升样品中碱性磷酸酶活性单位×体积

各阶段碱性磷酸酶得率=各阶段酶的总活性单位/匀浆（A液）中的酶总活性单位

### 3. 纯化倍数的计算

纯化倍数=每一步所得比活性/第一步所得比活性

# 实验五 碱性磷酸酶的 $K_m$ 测定



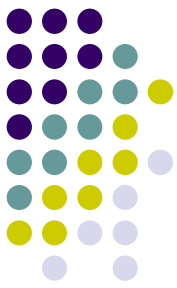
## 一、实验目的

- 掌握底物浓度对酶活性的影响
- 了解AKP的 $K_m$ 值的测定原理和方法，理解 $K_m$ 值的定义

## 二、原理

碱性磷酸酶（AKP）主要存在于骨、肝、肾及肠中。它的最适pH在9-10之间。碱性磷酸酶作用于基质液中的磷酸苯二钠，使之水解释放出酚。酚在碱性溶液中与4-氨基安替比林（AAP）作用pH经铁氰化钾氧化，生成红色醌类化合物。以酚作标准液同样处理显色进行比色，可测知酚的生成量，从而计算出酶的活性单位。

# 操作步骤



	1	2	3	4	5	6	S	B
0.04mol/L基质液 (ml)	0.10	0.20	0.30	0.40	0.80	1.00	—	—
水 (ml)	1.40	1.30	1.20	1.10	0.70	0.50	1.50	1.50
碳酸盐缓冲液 (含AAP)	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
摇匀, 37°C保温5分钟								
0.1mg/ml 酚标准液 (ml)	—	—	—	—	—	—	0.10	—
酶液 酶液 (ml)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	—	0.10
充分摇匀, 37°C准确保温15分钟								
0.5%铁氰化钾 (ml)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00

混匀, 室温放置10分钟后, 用510nm, 以B管调零点, 读记各管吸光度值, 并填入下表, 计算有关数据并作图。



## 底物浓度对酶促反应的影响

	1	2	3	4	5	6
吸光度						
V						
1/V						
[S]						
1/[S]						

(1)计算出各管的酶活性单位（代表反应速度V）：

(2)计算各管底物浓度：

(3)计算出各管的

作图：以为横坐标，以为纵坐标，在方格坐标纸上准确画出各坐标点，连接各点画出直线，向下延长此线与横轴交点为值。由之计算出该酶的 $K_m$ 值。



# 实验六 酶的特异性、温度、pH对酶活性的影响

## 实验目的

掌握酶的特异性及影响酶促反应的因素

### 一、酶的特异性

#### 【基本原理】

淀粉受唾液淀粉酶的作用水解成麦芽糖和少量葡萄糖。通常以测定淀粉水解的程度（底物减少）或麦芽糖生成的数量（产物增加）来衡量淀粉酶的活性。麦芽糖和葡萄糖都具有还原性，能使班氏试剂中的二价铜离子（ $\text{Cu}^{2+}$ ）还原成一价铜离子（ $\text{Cu}^+$ ）生成砖红色的氧化亚铜沉淀。而蔗糖不能被水解也不具有还原性，故不能被班氏试剂还原。

# 操作步骤



取试管3支，编号，按下表操作：

管号	1	2	3
1%淀粉 (滴)	10	10	—
1%蔗糖 (滴)	—	—	10
pH6.8缓冲液 (滴)	10	10	10
稀释唾液 (滴)	5	—	5
煮沸的唾液 (滴)	—	5	—

各管混匀后，置37℃水浴中保温10分钟

斑氏试剂 (滴)	20	20	20
----------	----	----	----

将上述各管放沸水浴中煮沸3-5分钟，观察结果。

记录结果



## 二、温度对酶活性的影响

### 【基本原理】

酶的活性受温度的双重影响。低温时酶活性表现较低，在一定范围内，酶活性随温度上升而增高。通常每升高 $10^{\circ}\text{C}$ ，反应速度增加一倍左右；另一方面，温度越高使酶蛋白变性越快，致使酶活性随温度上升而降低，以致完全丧失活性。当酶促反应速度达到最大值时的温度，称为酶作用的最适温度。

本实验以唾液淀粉酶对淀粉的消化作用为例，观察 $0^{\circ}\text{C}$ 、 $37^{\circ}\text{C}$ 和 $100^{\circ}\text{C}$  三种温度对酶活性的影响。实验中各管除温度外，其它反应条件皆相同。唾液淀粉酶可催化淀粉逐步水解成各种不同大小的糊精及麦芽糖。它们遇碘呈现不同的颜色反应，故可利用碘反应的颜色对比来判定不同温度下酶活性的大小。



# 操作步骤



小试管4支

1号对照

蒸馏水10滴

2号37°C

稀释唾液10滴

3号冰水

稀释唾液10滴

4号沸水

稀释唾液10滴

每隔一定时间  
取液一滴于白  
瓷凹板上做碘  
近浅红色

各取1滴做碘反应

记录结果

37°C水浴

5~10min向各管内加碘液2滴

观察结果



## 三、pH对酶活性的影响

### 基本原理

酶的活性受环境pH的影响极为显著。因pH影响酶蛋白和底物的解离状态，从而明显改变酶与底物的结合和催化作用。每一种酶在一定的条件下都有它发挥作用的最适pH，此时酶的活性最大。当其它条件相同时，离最适pH越近，其活性越大，即所催化的反应速度越快。本实验利用唾液淀粉酶对淀粉的水解作用，在其它条件相同时，对比观察pH变化对酶活性的影响，用碘反应判断结果。

# 操作步骤

小试管4支

1号对照

30d淀粉

磷酸盐缓冲液10d

2号pH5

30d淀粉

磷酸盐缓冲液10d

2号pH.8

30d淀粉

磷酸盐缓冲液10d

2号pH8

30d淀粉

磷酸盐缓冲液10d

37°C水浴中

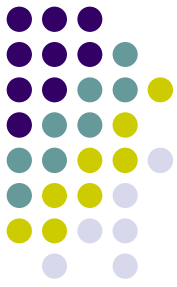
每隔1或2min, 取出1滴溶液做碘反应浅红色

从各管中取出1滴与碘反应

观察各管呈现的颜色

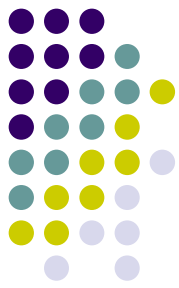


# 思考题



1. 什么是酶的特异性？本实验结果为什么能说明酶具有这种性质？
2. 何为酶的绝对、相对专一性？通过实验说明蔗糖酶具有何种专一性？
3. 说明温度对酶活性影响的本质。请举出应用温度对酶影响的实例。利用最适温度、零下及沸水浴温度各有何实践意义？
4. 酶促反应的最适温度是酶的特征物理常数吗？它与哪些因素有关？
5. 实验二中为什么控制2号管碘反应到阴性时向各管加碘液？实验设计中1号管的作用是什么？有无必要？
6. 联系实验结果及所学理论，说明pH对酶活性的影响有什么规律和实际意义？
7. 通过本次酶学实验，你对下面问题如何认识？
  - (1)酶作为生物催化剂具有哪些特征？
  - (2)进行酶学实验必须注意控制哪些条件？为什么？

# 实验七 肝糖原的提取和鉴定



## 一、实验目的

掌握肝糖原提取的原理和方法

## 二、基本原理

三氯醋酸能使肝组织的酶及其他蛋白质沉淀，保留糖原于上清液中。糖原不溶于乙醇，而可以溶于热水呈胶体溶液。故先用95%乙醇将滤液中糖原沉淀，再将沉淀溶于热水中糖原溶液呈乳样光泽，遇碘呈红棕色。糖原本身无还原性，但在酸性溶液中加热可水解为具有还原性的葡萄糖，后者可将碱性铜溶液（班氏试剂）中二价铜还原为氧化亚铜。利用上述性质可判定肝组织中糖原的存在。

# 三、操作步骤



肝1.2克

5%三氯醋酸6ml, 匀浆

过滤

滤液等体积乙醇

离心3000rpm 5分钟

沉淀加蒸馏水3ml



取该液2滴

加入碘试剂1滴

观察其颜色反应

乳样光泽

取溶液2ml

NaOH 中和  
加浓HCl 10滴  
煮沸20分

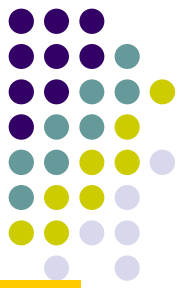
加糖原水解液10滴

加班氏试剂2ml  
煮沸1~2分钟

观察并记录现象



仔细观察实验现象，对之加以描述，并给予理论解释。



# 实验八 用纸层析法鉴定转氨酶的转氨基作用

## 一、实验目的

掌握纸层析法鉴定转氨酶转氨基作用的原理和方法

## 二、基本原理

转氨基作用广泛地存在于机体各组织器官中，是体内氨基酸代谢的重要途径。氨基酸反应时均由专一的转氨酶催化，此酶催化氨基酸的 $\alpha$ -氨基转移到另一 $\alpha$ -酮基酸上。各种转氨酶的活性不同，其中肝脏的谷丙转氨酶（Glutamic Pyruvic Transaminase, GPT）活性较高，它催化如下反应：



本实验以丙氨酸和 $\alpha$ -酮戊二酸为底物，加肝匀浆保温后，用纸层析法检查谷氨酸的出现，以证明转氨基作用。



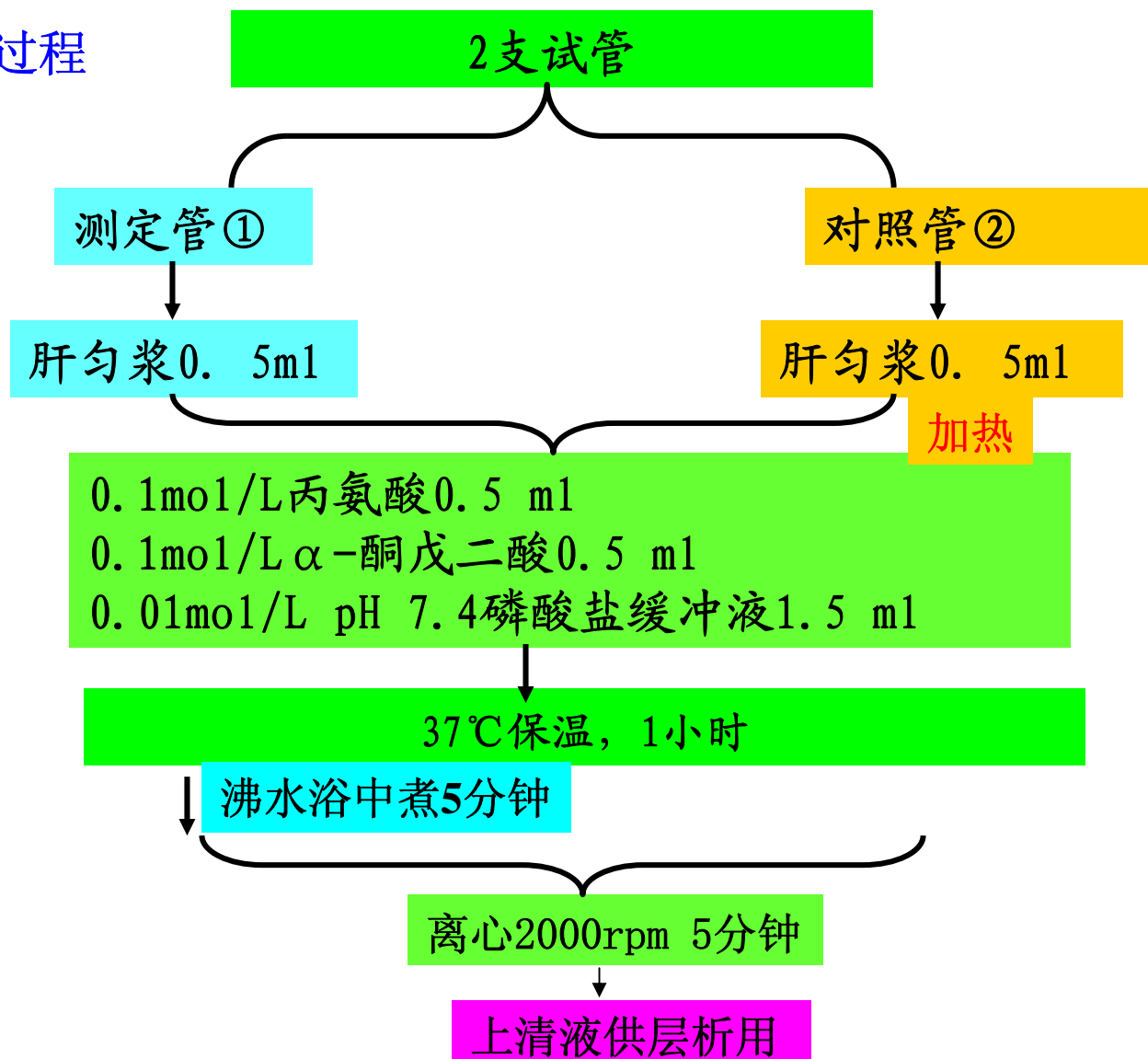
# 三、操作步骤



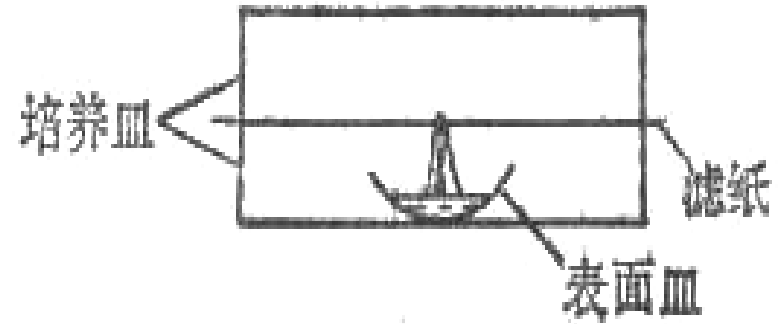
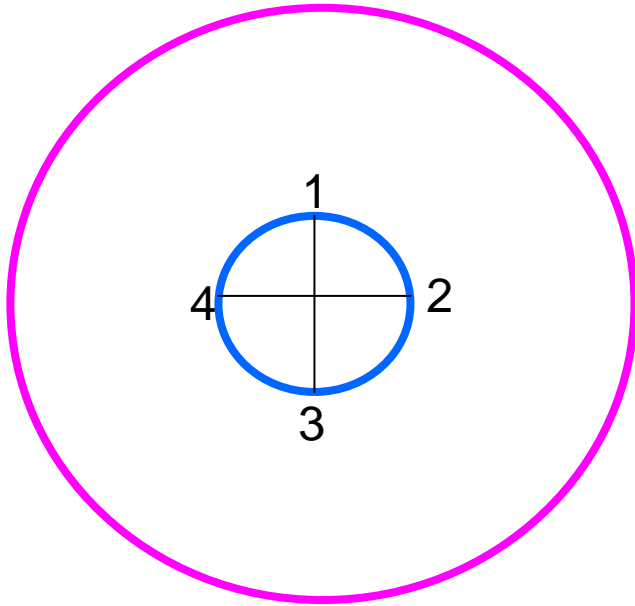
## 1. 匀浆制备

肝0.5克+0.01mol/L pH 7.4磷酸盐缓冲液2.5 ml, 研成匀浆

## 2. 酶促反应过程



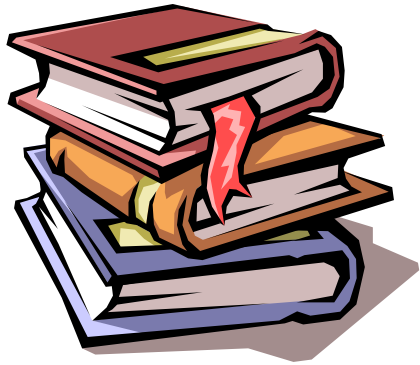
### 3. 层析



丙氨酸液2  
谷氨酸液4  
测定液1  
对照液3

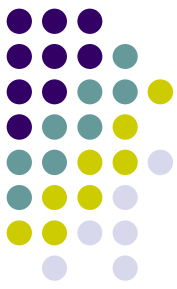
## 4. 显色

用喷雾器向上述滤纸均匀喷上0.5%茚三酮溶液，用吹风机热风吹干，可见出现同心弧状色斑，用铅笔圈下各色斑。比较各色斑的位置及颜色深浅，并算各色斑的Rf值，以此判定结果。



## 思考题

1. 谷丙转氨酶和谷草转氨酶在什么情况下发生异常变化？它们的临床意义是什么？
2. 本实验层析过程中哪一种氨基酸距离原点最远？为什么？
3. 影响Rf值的因素有哪些？





# 实验九 真核生物基因组DNA的制备

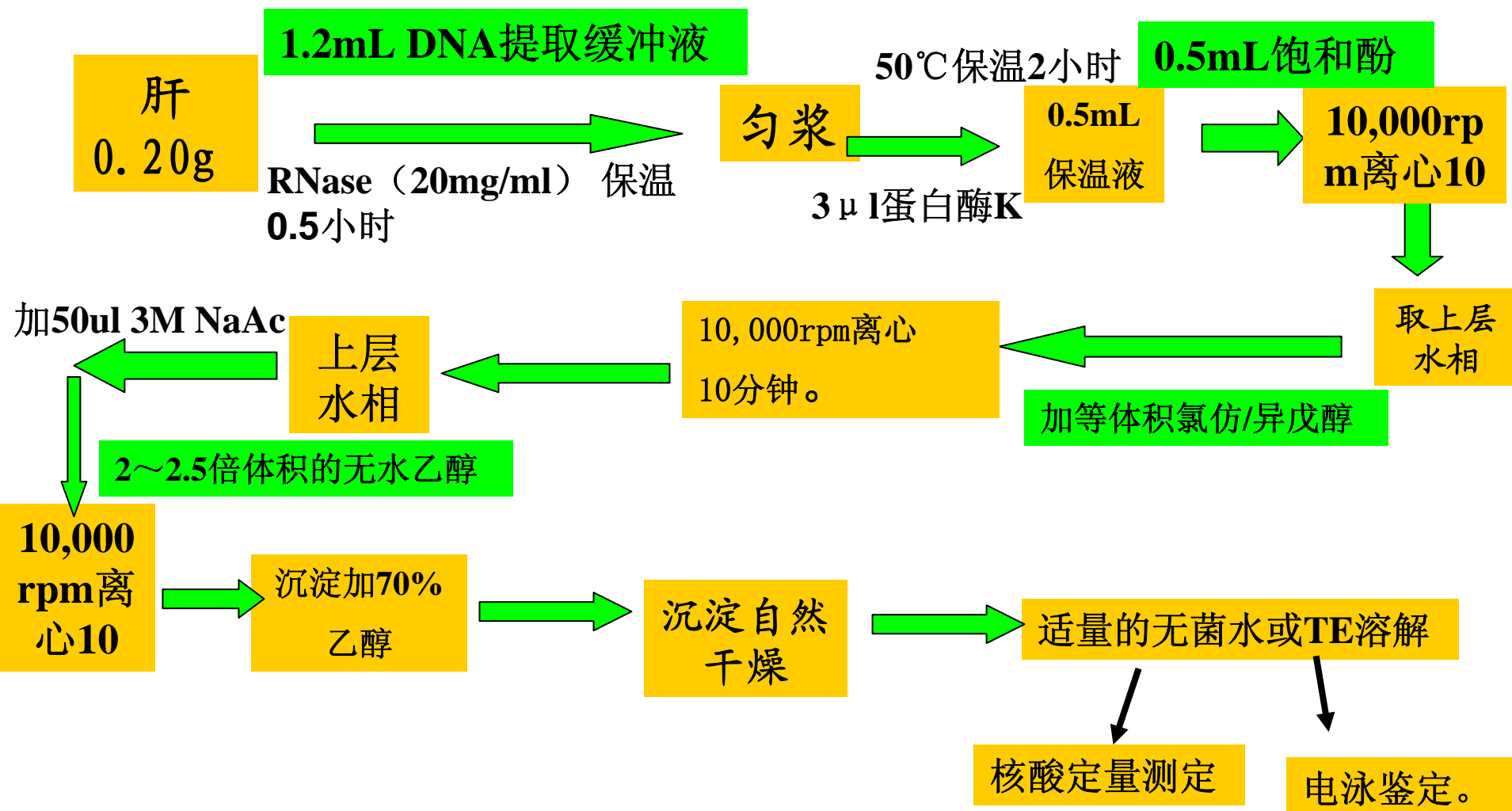
## 一、实验目的

- 学习和掌握从动物组织中分离核酸的原理和方法

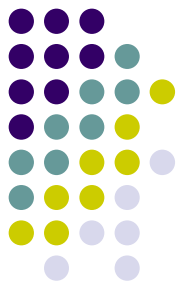
## 二、原理

- 真核生物的DNA位于细胞核内，是双链线性分子。DNA提取的主要过程是：破碎
- 细胞，去除与核酸结合的蛋白质及其它多糖、脂类等生物大分子。本实验通过蛋白酶K
- 和SDS使蛋白质变性，再用酚/氯仿除去蛋白质，用乙醇使DNA沉淀，经 $A_{260}/A_{280}$ 检
- 测DNA含量，再经琼脂糖电泳鉴定。

# 操作步骤



# 实验十 DNA与RNA含量测定



## 【基本原理】

核酸分子中含有碱基使核酸在260nm下有最大吸收。紫外吸收是嘌呤环和嘧啶环的共轭双键系统所具有的性质，含有嘌呤和嘧啶的物质，不论是核苷、核苷酸或核酸都有吸收紫外光的特性。

蛋白质由于含芳香族氨基酸，因此也能吸收紫外光，通常蛋白质在280nm波长有特异吸收。因此核酸在 $A_{260}$ 及 $A_{260}$ 、 $A_{280}$ 测定的比值( $A_{260}/A_{280}$ )可以反映样品中核酸的含量及纯度。RNA在 $A_{260}/A_{280}$ 的比值在2.0以上；DNA在 $A_{260}/A_{280}$ 的比值为1.8左右。当样品中蛋白质含量较高时比值即下降。

DNA浓度 ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ) =  $A_{260} \times 50 \mu\text{g}/\text{ml} \times$  稀释倍数

RNA浓度 ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ) =  $A_{260} \times 40 \mu\text{g}/\text{ml} \times$  稀释倍数

根据 DNA 或 RNA 浓度计算 DNA 或 RNA 总量 ( $\mu\text{g}$ ),  
即DNA或 RNA 浓度 ( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )  $\times$  总体积 ( $\mu\text{l}$ )。

# 操作步骤



1. 将样品加适量水或TE稀释。
2. 用双蒸水（或TE）做空白调零。
3. 把样品杯放入紫外分光光度计比色槽中。
4. 测 $A_{260}$  吸光值，计算出样品DNA或RNA含量。

如检测样品纯度，还要再测 $A_{280}$  值，并计算二者比例，若比例小于 1.7，说明有蛋白质或其他吸收此波长的杂质在其中，建议再用酚/氯仿抽提，继以乙醇沉淀以除去杂质。

# 实验十一 琼脂糖凝胶电泳分离DNA



## 【基本原理】

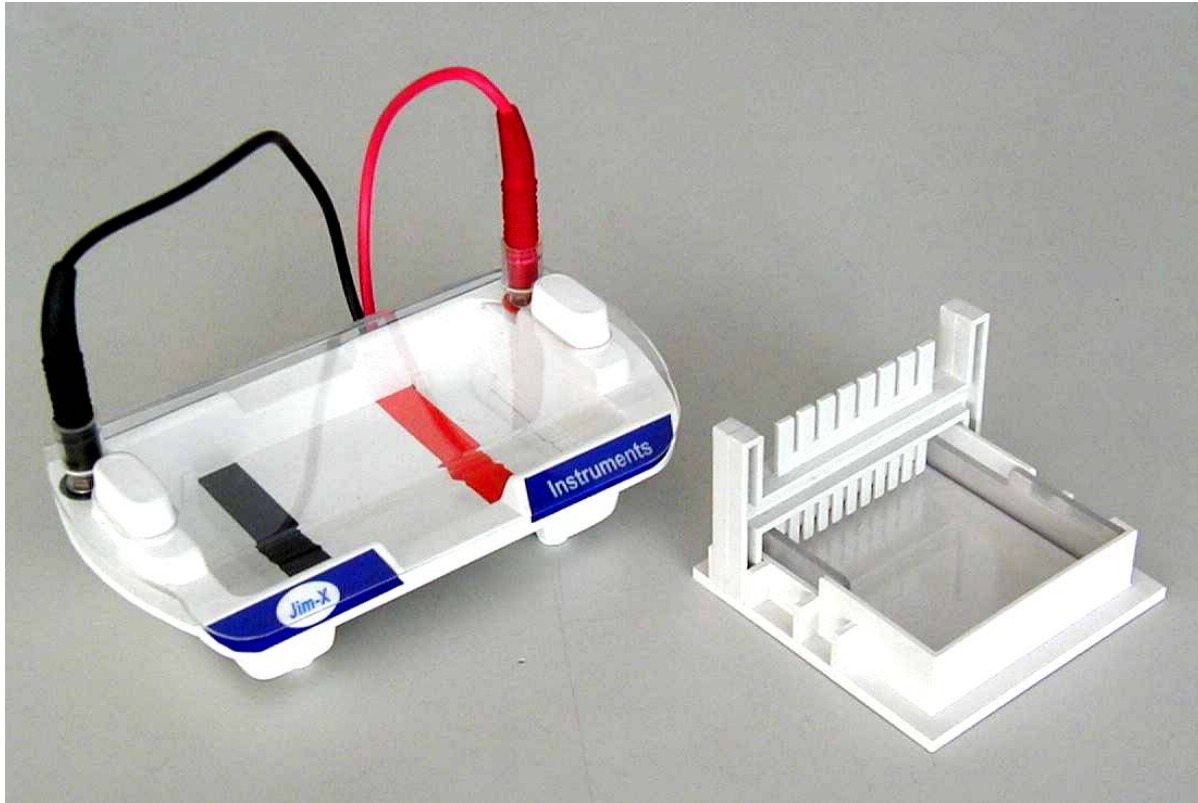
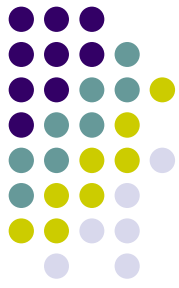
琼脂糖凝胶电泳是分离、纯化、鉴定 DNA 片段的常用方法，具有简便、快速的优点。DNA 琼脂糖凝胶电泳的原理与蛋白质的电泳原理基本相同，DNA 分子在高于其等电点的溶液中带负电荷，在电场中向正极移动。DNA 分子在电场中通过介质而泳动，除电荷效应外，凝胶介质还有分子筛效应，与分子大小及构象有关。对于线性 DNA 分子，其电场中的迁移率与其分子量的对数值成反比。在凝胶中加入少量溴化乙锭 (EB)，其分子可插入 DNA 的碱基之间，因此可在紫外灯下直接观察到 DNA 片段在凝胶上的位置，并可在紫外灯下或经凝胶成像系统观察或拍照。





## 【操作步骤】

1. 称0.2 g 琼脂糖，加20 ml电泳缓冲液（1×TAE）加热熔化。
2. 胶液冷至50℃ 时，加20 μl EB，小心混匀，缓慢倒入制胶模具中，在胶一端插上梳子。
3. 待胶凝固后，拨出梳子，将胶凝置于电泳槽中，加入1×TAE，让液面高于胶面2–3 mm。
4. 在 DNA 样品中加入 6×上样缓冲液并混匀，将DNA 样品胶凝的样品孔中。
5. 电泳槽与电源接通后，DNA 样品开始电泳。
6. 根据指示剂迁移位置，判断是否终止电泳。切断电源后，取出凝胶，用紫外透射仪或凝胶成像系统对DNA进行观察或拍照。



水平电泳槽

# 实验十二 聚合酶链反应（PCR）技术体外扩增DNA



## 基本原理

聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）是体外酶促合成特异DNA片段的一种技术。利用PCR技术可在数小时之内大量扩增目的基因或DNA片段，从而免除基因重组和分子克隆等一系列繁琐操作。由于这种方法操作简单、实用性强、灵敏度高并可自动化，因而在分子生物学、基因工程研究以及对遗传病、传染病和恶性肿瘤等基因诊断和研究中得到广泛应用。

## PCR反应的基本条件包括：

- （1）以 DNA 为模板（在RT-PCR中模板是RNA）；
- （2）以寡核苷酸为引物；
- （3）需要4种dNTP作为底物；
- （4）Taq DNA聚合酶。

# 操作步骤



1. 在**0.5 ml Ep**管中加入下列物质，并混匀。

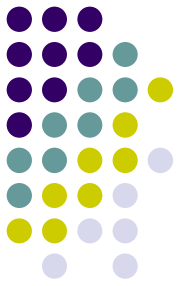
成分	50 $\mu$ l 反应总体系中
10 $\times$ PCR buffer (无 Mg <sup>+2</sup> )	5.00 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3.00 $\mu$ l
10 mM dNTP	4.00 $\mu$ l
引物1	0.50 $\mu$ l
引物2	0.50 $\mu$ l
Taq (5U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
模板 (基因组DNA < 0.1 $\mu$ g)	5.00 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	31.75 $\mu$ l

2. 将上述PCR反应混合物混匀放入PCR扩增仪中。

3. PCR循环：

<b>94 °C</b>	<b>5min</b>	<b>1循环</b>	
<b>94 °C</b>	<b>45sec</b>		
<b>55 °C</b>	<b>45sec</b>	}	<b>30个循环</b>
<b>72 °C</b>	<b>45sec</b>		
<b>72°C</b>	<b>7min</b>		<b>延伸</b>

4. **PCR产物鉴定**：取**10  $\mu$ l PCR产物**加**2  $\mu$ l 上样缓冲液**，用**1% 琼脂糖凝胶**进行电泳。



1. PCR反应的原理
2. PCR反应的体系包括哪些物质
3. PCR的影响因素有哪些