3.11.3 实验内容

目录

1. DNS 法测定蛋白质的 N 末端
2. RNA 碱基组成分析
3. 酸性磷酸酯酶动力学性质分析
4. 蛋白质的亲和层析
5. 双向电泳分离总蛋白质
6. 从鸡蛋壳膜中制备溶菌酶

具体内容

1. DNS 法测定蛋白质的 N 末端

【实验原理】末端氨基酸的确定是蛋白质结构分析的基本手段之一。本实验用的测定蛋白质 N 末端的方法是 DNS 法。DNS-Cl（1-dimethylamino naphthalene-5-sulfonyl-chloride,二甲基氨基萘磺酰氯)可以与蛋白质、肽或氨基酸在 pH10 左右的碱性条件下反应，生成 DNS-蛋白质。DNS-蛋白质经过水解后，其 N 末端的 DNS-氨基酸可以在酸性条件下被乙酸乙酯抽提出来，然后将它的层析位置与标准 DNS-氨基酸的层析图谱比较，确定蛋白质 N 末端氨基酸的种类和数量。

【实验方法】DNS 化反应后的胰岛素置 110^{0}C 烘箱中水解 12 小时，以乙酸乙酯抽提，乙酸乙酯相中即是 DNS-胰岛素末端氨基酸。聚酰胺薄膜层析，紫外灯下观察结果。

【实验材料】胰岛素

【实验课时】12 学时

【代表性实验结果】

2. RNA 碱基组成分析

【实验原理】本实验采用离子交换层析法分离四种核苷酸。这种方法是通过溶液中的离子与树脂上的离子进行连续的、竞争性的交换平衡而使混合物中各个组分分离。

【实验方法】首先水解 RNA 为单核苷酸的混合物。本实验采用 0.3N KOH，37^{0}C 保温 18 小时的条件。用聚苯乙烯—二乙烯苯磺酸型阳离子交换树脂分离水解得到的四种核苷酸（UMP、GMP、CMP 和 AMP）。

【实验材料】RNA

【实验课时】18 学时

【代表性实验结果】

3. 酸性磷酸酯酶动力学性质分析

【实验原理】酶的动力学性质分析是酶学研究的一个重要方面。生物体内的一切化学反应几乎都离不开酶的催化，酶的催化特性是由酶本身的性质决定的。要研究或应用某一种特定的酶，必须对它的性质进行分析。本实验以酸性磷酸酯酶为分析对象，测定其最适 pH、最适温度、米氏常数和抑制剂常数。

【实验方法】酸性磷酸酯酶动力学性质分析实验分四部分：（1）酸性磷酸酯酶的提取。（2）进程曲线的制作和初速度的测定。（3）米氏常数（K_m）和最大反应速度（V_m）的测定。（4）氟化钠及磷酸盐的抑制作用——抑制类型的判断和抑制常数（K_i）的测定

【实验材料】绿豆芽

【实验课时】18 学时

【代表性实验结果】

4. 蛋白质的亲和层析

【实验原理】亲和层析（affinity chromatography）是利用生物分子和相对应的分子之间亲和结合和解离性质而建立起来的层析方法。结合的双方不仅是专一的，而且结合以后可以在不丧失生物活性的基础上用物理的或化学的方法进行解离。根据这一特性，如果把具有亲和力的一对分子的某一方联接于水不溶的固相载体上作为固定相，那么另一方随着流动相流经该固体的相时，双方便亲和结合为一个整体。然后只要改变某种物理条件或化学条件使结合的双方解离，即能得到与固定相有特异亲和力的某一特定物质。

【实验方法】本实验选取对氨基苯汞乙酸盐为配基，以珠状琼脂糖凝胶为固相载体，采用亲和层析分离纯化巯基蛋白的方法对巯基酶（剑麻蛋白酶或菠萝蛋白酶）进行提纯。实验分两部分：（1）用分离纯化巯基蛋白的亲和层析法提纯巯基酶。（2）亲和层析洗脱流出液中巯基酶的活力测定。

【实验材料】巯基酶制剂

【实验课时】18 学时

【代表性实验结果】

5. 双向电泳分离总蛋白质

【实验原理】电泳是带电粒子在直流电场中移动的现象。本实验聚丙烯酰胺凝胶电泳，是一种利用人工合成的凝胶作为支持介质的区带电泳。聚丙烯酰胺凝胶是由单体丙烯酰胺和交联剂 N,N-甲叉双丙烯酰胺经过聚合交联而形成的三维空间凝胶网络，根据蛋白质等电点和分子量的不同加以分离。

【实验方法】本实验由第一向等电聚焦(IEF)电泳和第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)组成，第一向使等电点不同的蛋白质得到分离，第二向使分子量不同的蛋白质得到分离，两向结合得到蛋白质图谱。

【实验材料】大肠杆菌裂解液

【实验课时】18 学时

【代表性实验结果】

6. 从鸡蛋壳膜中制备溶菌酶

【实验原理】 溶菌酶在蛋清中含量较高，可以直接从蛋清中结晶出来。鸡蛋壳膜中的溶菌酶虽然含量较少，但由于杂蛋白也较少，有利于纯化。本实验就是以鸡蛋壳膜为原料制备溶菌酶结晶。低盐溶液处理鸡蛋壳膜，粗提溶菌酶。溶菌酶具有耐热性并且具有较高等电点，因此采用热变性与等电点沉淀相结合的方法可以除去大多数杂蛋白。聚丙烯酸是一种多聚电解质，在特定的 pH 和离子强度下它能和某些蛋白质共沉淀，而与多糖、核酸等物质则没有这种作用。溶菌酶在酸性条件下能与聚丙烯酸形成共聚物，当有钙离子存在时溶菌酶又能从凝聚物中分离出来，再选择合适的分子筛凝胶就可以使杂蛋白、溶菌酶和钙离子分开。

【实验方法】从鸡蛋壳膜中制备溶菌酶可采用多种不同的方法，本实验采用下列步骤进行分离纯化：（1）盐溶液抽提；　（2）热处理与等电点沉淀；　（3）聚丙烯酸共沉淀；　（4）分子筛层析；（5）聚乙二醇浓缩；（6）结晶。

【实验材料】新鲜碎鸡蛋壳

【实验课时】18 学时

【代表性实验结果】