

## 蛋白质的性质实验：

### 1、什么是盐溶和盐析？

低盐浓度时，蛋白质溶解度随着盐的浓度增加而增加，称盐溶。

盐析：高盐浓度时，蛋白质随着盐浓度增加溶解度逐渐变小，蛋白质分子相互聚集而发生沉淀，这种现象称盐析。

### 2、简述生物碱沉淀蛋白质的机理

在酸性条件下，蛋白质带正电，可以与生物碱试剂的酸根离子结合而产生沉淀。

### 3、简述茚三酮反应检测蛋白质的机理

茚三酮与蛋白质中的  $\alpha$ -氨基反应，生成有颜色的物质，通过检测该有色物质在固定波长的吸光值可以推算出蛋白质的含量。

### 4、双缩脲试剂是由什么构成的？

$\text{Cu}_2\text{SO}_4$  和  $\text{NaOH}$  的混合溶液

### 5、为什么脯氨酸与茚三酮反应呈黄色而不是紫红色？

因为脯氨酸的  $\alpha$ -氨基与侧链反应成环后成为  $\alpha$ -亚氨基，该  $\alpha$ -亚氨基只能与一分子的茚三酮反应，生成的有色物质为黄色的。而其他氨基酸的  $\alpha$ -氨基可以与两分子的茚三酮反应，生成的有色物质为紫色的。

### 6、蛋白质水解进行到双缩脲反应呈阴性结果，说明什么？

说明体系中不存在两个或两个以上的肽键。

### 7、重金属盐沉淀蛋白质的机理是什么？

当  $\text{pH}$  稍大于  $\text{pI}$  时，蛋白质颗粒带负电荷这样就容易与重金属离子结合成不溶

性盐而沉淀。重金属盐与带负电的羧基结合。

## 8、简述盐析的机理

由于大量中性盐的加入,使得蛋白质表面的水分子被移去与盐离子结合,破坏蛋白质的水化膜,从而使疏水基团暴露出来的。随着盐浓度的增加,蛋白质疏水表面进一步暴露,由于疏水作用蛋白质聚集而沉淀。

## 9、简述蛋白质与双缩脲反应的机理

两分子双缩脲与碱性硫酸铜作用,生成紫红色的复合物。含有两个或两个以上肽键的化合物,能发生同样的反应,肽键越多颜色越深,受蛋白质特异性影响小。

## 10、蛋白质与三氯乙酸发生的是什麼反应?为什么?

是不可逆沉淀反应。因为三氯乙酸是生物碱。在酸性条件下,蛋白质带正电,可以与生物碱试剂的酸根离子结合而产生沉淀。

## 11、通过哪个实验,可以证明蛋白质盐析反应是可逆的?请简单描述实验步骤。

通过盐溶盐析实验可以证明蛋白质盐析反应是可逆的。

向卵清蛋白加入过饱和的硫酸铵溶液后,蛋白质发生盐析反应,出现沉淀;再向沉淀中加入水,会发现沉淀又溶解掉,由此可见盐析是可逆的。

## 小麦萌发前后淀粉酶活性比较:

## 12、小麦萌发前后淀粉酶水解淀粉的温度是多少,为什么?

45 度。因为 45 度是小麦中淀粉酶的最适反应温度。

**13、小麦萌发前后淀粉酶的活性是如何测定的？**

以淀粉酶催化淀粉生成麦芽糖的速度来测定酶的活性。麦芽糖是还原性糖，能使 **3, 5-二硝基水杨酸** 还原成棕色的 **3-氨基 5-硝基水杨酸**，后者在 **500nm** 处有最大光吸收，可用分光光度法定量测定。

**14、 $\alpha$ -淀粉酶与 $\beta$ -淀粉酶在水解淀粉方式上有何不同？**

$\alpha$ -淀粉酶不耐酸，在 **pH3.6** 以下迅速钝化，而  $\beta$ -淀粉酶不耐热，在 **70℃** 处理 **15min** 则钝化，所以在反应时要保证适宜的 **pH** 和温度。

**凝胶层析法测定蛋白质分子量：**

**15、简述凝胶层析的原理。**

凝胶层析：也称凝胶过滤、分子筛层析，它是依据样品物质分子大小这一物理性质进行分离分析的方法。

凝胶层析利用了分子筛效应，即不同大小的分子在网状凝胶中，大分子走的路径短、小分子走的路径长

**16、SephadexG100 的分离范围是 4000-150000，那么下列哪些蛋白可以通过它分离开来？为什么？**

<b>A 蓝色葡聚糖 2000</b>	<b>Mr= <math>2 \times 10^6</math></b>
<b>B 牛血清清蛋白</b>	<b>Mr= <math>6.7 \times 10^4</math></b>
<b>C 卵清蛋白</b>	<b>Mr= <math>4.3 \times 10^4</math></b>
<b>D 胰凝乳蛋白酶原 A</b>	<b>Mr= <math>2.5 \times 10^4</math></b>
<b>E 细胞色素 C</b>	<b>Mr= <math>1.24 \times 10^4</math></b>
<b>F 二硝基苯丙氨酸</b>	<b>Mr= <math>2.55 \times 10^2</math></b>

**B、C、D、E、F** 可以分离开，因为他们的分子量位于 **SephadexG100** 的分离范围以内。

**17、对于一个凝胶层析柱，如果样品的分配系数  $K_d=1$  时，表明什么？**

表明样品全进入。

**18、聚丙烯酰胺凝胶中，交联度的大小对凝胶颗粒的影响有哪些？**

交联度越大，凝胶颗粒的孔径越小，反之越大。

**19、凝胶层析实验中，装柱前要在柱子中加入一定量的水或者洗脱液，目的是什么？**

起到缓冲的作用，预防凝胶加入过程中，凝胶颗粒与柱底碰撞，使其破碎。

**20、为什么核酸蛋白检测仪能够用于测定蛋白质的含量？**

核酸蛋白检测仪可以检测 **280nm** 处的吸光值，而蛋白质在 **280nm** 处有吸收。

### 乙酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白：

**21、乙酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白实验中，将薄膜的点样端放在盐桥的哪一端？（阳极还是阴极）为什么？**

阴极端，因为电泳缓冲液的 **pH** 值为 **8.6**，大于血清蛋白各个组分的等电点，使得各个蛋白均带负电，故应该向阳极移动，所有样品要防止阴极端。

**22、乙酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白实验的操作步骤是什么？（请简要回答）**

#### （一）薄膜的处理

- 1.将醋酸纤维素薄膜切成 **8×2cm** 条状（或根据需要决定薄膜的大小）。
- 2.把薄膜浸入 **pH8.6** 的巴比妥-巴比妥钠缓冲液中，浸泡约 **30min**。
- 3.待薄膜完全浸透后，用竹镊子轻轻取出，平铺在滤纸上，其上再放一张干净的滤纸，轻压，吸去多余的缓冲液。将薄膜的无光泽面向上。

#### （二）点样

- 1.用盖玻片边缘沾取血清，然后轻轻与距薄膜一端约 **1.5cm** 处垂直接触（注意是与薄膜的无光泽面解除），样品则呈直线状被涂于薄膜上，待血清渗入膜内后，移去盖玻片。
- 2.将薄膜平贴在电泳槽支架上的滤纸上，注意点样的一面朝下，薄膜中间不可出现凹面，点样端应置于负极端（见下图）。

#### （三）电泳

电流：**0.4-0.6mA/cm**；电压：**110-160v**；时间：**1.5h**

#### （四）染色和漂洗

- 1.将薄膜浸于氨基黑 10B 染色液中染色 5~10min;
- 2.取出后用漂洗液漂洗 4~5 次, 每次约 5min;
- 3.待背景无色为止, 再浸入蒸馏水中。

23、乙酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白实验中, 各种蛋白的等电点如下: 清蛋白, 4.46;  $\alpha$  1-球蛋白, 5.06;  $\beta$  -球蛋白, 5.12;  $\gamma$  -球蛋白, 6.85; 在 pH=8.6 的缓冲液中电泳, 由阳极到阴极的顺序是什么?

从阳极到阴极依次为: 清蛋白、 $\alpha$  1-球蛋白、 $\beta$  -球蛋白、 $\gamma$  -球蛋白

24、乙酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白实验主要是依据什么原理将血清中不同蛋白分离的?

各个蛋白组分的等电点和分子量不同。

25、乙酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白实验中的染色液是什么? 漂洗液的主要成分是什么?

染色液: 氨基黑 10B  
漂洗液: 醋酸和乙醇

26、进行血清蛋白分离实验中, 选用的电泳支持物是什么? 在实验之前, 需要对该支持物做怎样的处理?

醋酸纤维素薄膜; 实验前需要用缓冲液将其浸泡充分。

### 脲酶 $K_m$ 值的测定:

27、脲酶  $K_m$  值的测定的原理是什么?

脲酶催化尿素成碳酸铵, 碳酸铵在碱性溶液中与奈氏试剂作用, 产生橙黄色的碘化双汞铵, 在一定浓度范围内, 碘化双汞铵颜色深浅与脲酶催化产生的碳酸铵多少成正比, 利用分光光度法可测定出单位时间所产生碳酸氨量, 从而计算出酶促反应的速度。

在保持恒定的合适条件(时间、温度及 pH)下, 以相同浓度的脲酶催化不同浓度的脲发生水合反应, 在一定限度内, 酶促反应速度与脲浓度成正比。因此, 用酶促反应速度的倒数 ( $1/v$ ) 为纵坐标, 脲浓度的倒数 ( $1/[S]$ ) 为横坐标, 以双倒数法作图, 得一直线 (如图), 其中, 横轴截距  $= -1/K_m$ , 纵轴截距  $= 1/V_{max}$ , 由此即可求出脲酶的  $K_m$  值。

**28、测定脲酶  $K_m$  值时，采用的是什么作图法？横轴的截距是什么？纵轴的截距是什么？**

双倒数作图法；

横轴截距= $-1/K_m$ ，纵轴截距= $1/V_{max}$

**29、脲酶  $K_m$  值的测定实验中，绘制标准曲线所用到的试剂有哪些？在多大波长下用分光光度计测定吸收值？**

不同浓度的脲液、 $1/15 \text{ mol/L}$  磷酸缓冲液( $\text{pH}=7.0$ )、奈氏试剂、 $10\%$  硫酸锌、 $10\%$  酒石酸钾钠、 $0.5 \text{ mol/L NaOH}$

测定  $460\text{nm}$  处的吸光值。

**30、脲酶  $K_m$  值的测定实验中，应注意哪些不利因素对测定的影响？**

1. 本实验所用试剂均应用无氨的去离子水配制，实验室环境中也不应有氨。
2. 准确控制各管酶反应时间尽量一致。
3. 一些重金属离子、硫胺、蛋白质等可影响酶的活性，故实验前所有仪器，特别是试管必须干净，否则，奈氏试剂呈色浑浊，有干扰物质影响酶促反应。因此，试管等仪器必须用洗液浸泡，洗净，干燥后备用。
4. 奈氏试剂腐蚀性强，勿洒在试管架和实验台面上。加奈氏试剂时一定要快，且立即混匀，马上比色，否则容易浑浊，妨碍效果。本实验用的酒石酸钾钠，目的在于防止奈氏试剂浑浊以利于比色进行。

**31、脲酶  $K_m$  值的测定实验中，酒石酸钾钠的作用是什么？氢氧化钠的作用是什么？硫酸锌的作用是什么？**

酒石酸钾钠防止奈氏试剂沉淀；氢氧化钠沉淀脲酶和调节  $\text{pH}$  值；硫酸锌沉淀脲酶。

**32、脲酶  $K_m$  值的测定实验中，酶促反应速度测定选用的空白对照是什么？为什么整个实验要放在  $37$  摄氏度保温？**

空白对照是失活脲酶的反应体系； $37$  度是脲酶的最适反应温度。

### 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量：

33、考马斯亮蓝法测定蛋白质含量的原理是什么？

考马斯亮蓝在酸性溶液中呈棕红色，最大吸收峰在 **465nm**；当它与蛋白质通过范德华键结合成复合物时变为蓝色，其最大吸收峰移至 **595nm**，而且消光系数更大。在一定蛋白质浓度范围内 (**1~1000 $\mu$ g/ml**)，蛋白质—染料复合物在 **595nm** 处的光吸收与蛋白质含量成正比，故可用于蛋白质的定量测定。

34、分光光度计定量分析的依据是什么？

**Lambert-Beer 定律:  $A = \epsilon c l$**

**A:** 吸光值； **$\epsilon$ :** 消光系数；**c:** 溶液浓度；**l:** 比色池宽度

### 酵母 RNA 提取与组分鉴定：

35、在用稀碱法提取酵母 **RNA** 的实验中，先将酵母细胞用碱液裂解，裂解液离心后，将上清液倒入 **95%** 乙醇中，并用冰乙酸调 **pH** 至 **2.5**。请问为什么要调 **pH** 至 **2.5**？

**pH2.5** 是 **RNA** 的等电点，在该条件下 **RNA** 不带电，可以从溶液中沉淀下来。

36、定磷试剂的主要成分是什么？它们的作用分别是什么？

(1) **17%  $H_2SO_4$  溶液:** 使 **RNA** 中的有机磷消化成无机磷；

(2) **2.5% 钼酸铵溶液:** 无机磷与钼酸铵结合成磷钼酸铵 (黄色沉淀)，当有还原剂存在时磷钼酸铵立即转变成蓝色的还原产物—钼蓝。

(3) **10% 抗坏血酸溶液:** 还原剂。

37、用 **AgNO<sub>3</sub>** 鉴定嘌呤碱基时加入浓氨水的目的是什么？

排除磷酸银沉淀的干扰，因为磷酸银可以溶液氨水。

38、用苔黑酚鉴定 **RNA** 的什么组分，加入 **Cu<sup>2+</sup>** 或 **Fe<sup>3+</sup>** 的目的是什么？

排除 **DNA** 干扰以及催化剂的作用。

## 氨基酸的分离鉴定——纸层析法：

39、分离层析的原理是什么？

以滤纸为支持物，按氨基酸分配系数的差异进行的连续抽提过程。

40、纸层析分离氨基酸是依据混合氨基酸间的分配系数进行分离的，操作步骤包括准备滤纸、点样、扩展、显色和计算 Rf 值。

41、纸层析法分离氨基酸时，用何种方法让氨基酸显色？其原理是什么？

采用茚三酮显色；茚三酮与蛋白质中的  $\alpha$ -氨基反应，生成有颜色的物质。

42、茚三酮与氨基酸发生反应，通常显什么颜色？脯氨酸与茚三酮反应呈现什么颜色，为什么？

茚三酮与氨基酸发生反应，通常显紫色或蓝色；脯氨酸与茚三酮反应呈现黄色；因为脯氨酸的  $\alpha$ -氨基与侧链反应成环后成为  $\alpha$ -亚氨基，该  $\alpha$ -亚氨基只能与一分子的茚三酮反应，生成的有色物质为黄色的。

43、Rf 值是什么，如何计算？

Rf 值是比移值，它可以通过原点到斑点中心的距离与原点到溶剂前沿的距离的比值来计算。

44、在纸层析分离氨基酸的实验中，用到了丙氨酸、脯氨酸和苯丙氨酸，它们中谁的 Rf 值最大，谁最小？为什么？

苯丙氨酸 Rf 值最大；丙氨酸 Rf 值最小。因为苯丙氨酸的极性最小，在流动相中的溶解度最大，分配系数最大，所以 Rf 值最大；而丙氨酸的极性最大，在流动相中的溶解度最小，分配系数也最小，所以 Rf 值最小。

45、蛋白质的显色反应有哪些？（至少举例两种）

茚三酮显色和双缩脲反应。



## 酶的活性影响因素：

**46、酶的活性影响因素实验中，都做了那些影响酶活力的因素？通过什么方式确定酶的活性强弱？**

温度、pH 值、激活剂和抑制剂。

通过在不同条件下，淀粉被唾液淀粉酶水解的程度可由水解混合物遇碘呈现的颜色来判断淀粉酶的活性强弱。

**47、为什么温度会影响酶的活性？**

(1) 增加温度，增加反应速度，这是所有化学反应一个共同特点。

(2) 酶是蛋白质，温度太高，空间结构会发生改变，使酶蛋白发生变性作用，活力下降。

(3) 低温抑制酶活性。

(4) 温度系数：达到最大反应速度之前,提高温度可增加反应速度,反应温度提高  $10^{\circ}\text{C}$  ,其反应速度与原来的反应速度之比成为反应的温度系数,对许多酶来说温度系数为  $1\sim 2$ 。

**48、为什么 pH 值会影响酶的活性？**

(1) 环境过酸过碱使酶失活（酶构象改变）

(2) 影响活性部位上的有关基团的解离

(3) 影响底物有关基团的解离

**49、在激活剂和抑制剂对酶活力影响的实验中  $\text{NaCl}$ 、 $\text{CuSO}_4$  和  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  分别起什么作用？**

$\text{NaCl}$ ：激活剂

$\text{CuSO}_4$ ：抑制剂

$\text{Na}_2\text{SO}_4$ ：作为  $\text{Na}^+$  和  $\text{SO}_4^{2-}$  的对照，排除他们对酶活力的影响。

**50、请分别说出人的唾液淀粉酶和小麦种子中淀粉酶的最适温度？为什么它们的最适温度会不同？**

人的唾液淀粉酶的最适温度是  $37^{\circ}\text{C}$ ；而小麦种子中淀粉酶的最适温度为  $42^{\circ}\text{C}$ ；因为人体的温度为  $37^{\circ}\text{C}$ ，其唾液淀粉酶在这一温度下可以有效水解淀粉。而小麦种子中的淀粉酶要稍微高些，是为了使小麦在较高温度下才进行淀粉的水解，防止低温条件下的小麦萌发发生，便于小麦种子的存储。