

生命科学实验探索报告

实验名称: 血红蛋白凝胶过滤
学生姓名: 刘翰文
学生学号: 522030910109
指导教师: 曹阳
实验时间: 2024 年 12 月 25 日

1. 拍摄实验过程的照片, 分析并说明实验现象。如果实验失败请分析原因。(60 分)

要求:

- 1) 实验过程应包括: 装柱、平衡、上样、分离、收集
- 2) 每一过程最好都有对应的照片
- 3) 应文字说明现象, 并分析实验成败原因。

装柱: 在实验前已完成。注意要在注重加入 1~2cm 高的缓冲液。且主要要放入略小于层析柱内径的圆形滤纸片, 以保护凝胶的床面防止加样时凝胶被冲起。

平衡: 以恒流泵控制流速为 1 滴 1~2 s, 用磷酸缓冲液洗脱平衡 10 min。观察到注重液面不断缓慢下降。

上样: 先滴加 0.4mL 还原铁溶液, 再加入 0.7mL 缓冲液, 最后加入 0.5mL 血样。还原性铁溶液要新鲜配制, 且滴加时应注意尽可能缩短在空气中暴露的时间, 以免发生氧化。应该使液体沿层析柱壁缓缓流下, 以避免液体冲击, 导致凝胶不平。

可以观察到还原性铁溶液呈淡黄色, 血红蛋白在未分离时呈深红色。

分离: 用缓冲液进行洗脱, 控制缓冲液在约 1 滴/2s 的流速。

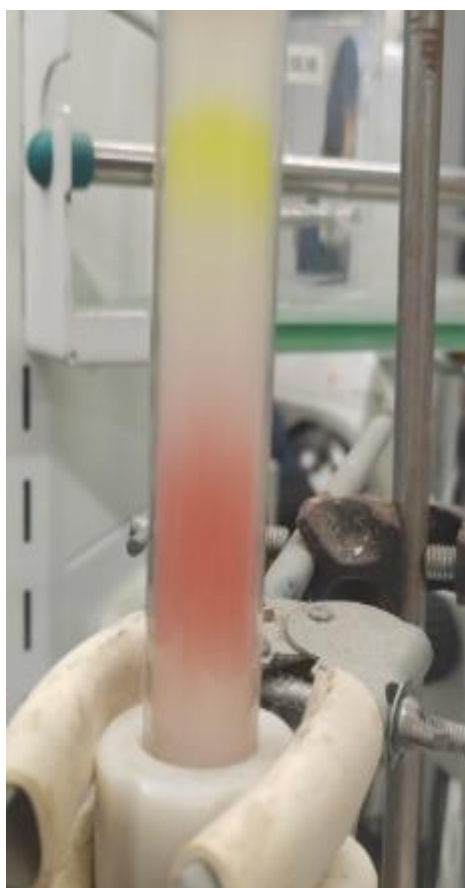
开始样品出现明显分层, 上层为黄色的铁氰化钾, 下层为深棕红色血液, 在遇到还原铁后下层变为暗红色。两层之间分离现象越来越明显, 间距变大, 两层均开始变长。在下层到达柱的下半段时, 下层有暗红色变为鲜红色。

这是由于在分离的过程中, 铁氰化钾分子较小, 可以自由出入凝胶颗粒中, 并很快在流动相和静止相之间形成动态平衡, 在凝胶柱中流速较慢较慢。血红蛋白分子较大, 难以进入凝胶颗粒的静止相, 因而流速较快, 领先于铁氰化钾。

开始深棕红色为高铁血红蛋白，碰到还原性铁溶液后被亚铁离子还原，变为暗红色，再往下与缓冲液中氧分子结合，因而变为鲜红色。

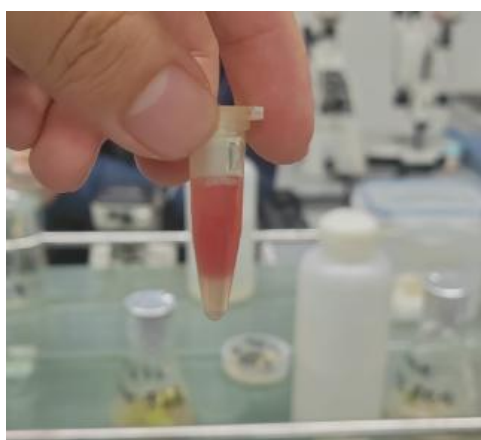


分离图片 1



分离图片 2

收集：先分离得到的血红蛋白层用黄色离心管收集，后得到的铁氰化钾层由白色离心管收集，从而使颜色呈现清晰。



收集的血红蛋白

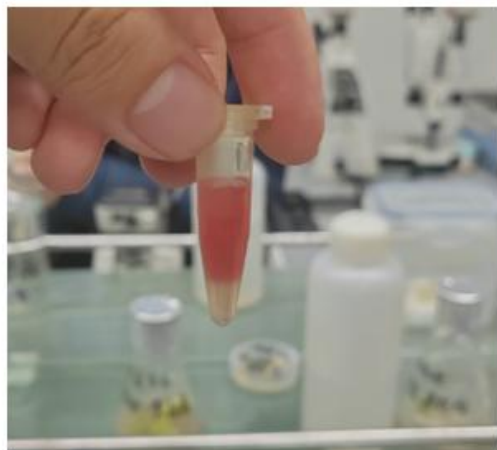


收集的铁氰化钾

2. 收集分离的血红蛋白和铁氰化钾两个样品后拍照并描述。(20 分)

要求:

- 1) 按实验要求收集两样品, 拍照。
- 2) 描述所收集样品的颜色等。



收集的血红蛋白



收集的铁氰化钾

先分离得到的血红蛋白层用黄色离心管收集, 呈鲜红色; 后得到的铁氰化钾层由白色离心管收集, 呈黄色。用与被收集液体颜色色差较大的且本身颜色较淡的离心管, 使颜色呈现清晰。

3. 结合凝胶层析的原理, 说明实验操作中的注意点。(20 分)

要求:

- 1) 说明凝胶层析的原理:
- 2) 简明扼要说明不当操作对实验结果的影响。

凝胶颗粒内部具有许多大小均一的孔洞。这些孔洞的大小决定了分子是否能够进入凝胶颗粒内部。不同大小的分子在流经凝胶层析柱时, 通过凝胶的时间长短不同。大分子无法进入凝胶的孔洞, 只能通过凝胶颗粒之间的间隙快速流出, 因而在洗脱液中首先被洗脱。而小分子能够自由进入凝胶颗粒的孔洞, 并在孔洞内部发生多次扩散和滞留, 因此它们被洗脱出来的时间较长。

注意点包括:

1. 滴加液体时流速不能太快, 且应沿柱壁加入, 否则可能冲击导致凝胶受损。
2. 层析柱子应在实验前平衡, 否则会导致分离不充分。

-
3. 层析柱胶圈不能丢失，否则系统不够密闭，可能导致柱内液体变干。
 4. 上样体积不能太大，否则会导致液体分离不充分。
 5. 平衡过程中注意恒流泵的转向，否则可能导致气体倒吸。
 6. 注意还原剂的混合液要新鲜配制，尽可能缩短在空气中暴露的时间，否则发生氧化，导致实验失败。
 7. 分离过程中应注意滴加多个样品间的时间间隔，待前一液体完全进入凝胶后在加入下一样品，以免导致混合，使分离不充分。
 8. 注意在整个实验过程中不要使液面低于凝胶表面，否则可能有气泡混入，影响液体在柱内的流动与最终生物大分子物质的分离效果。