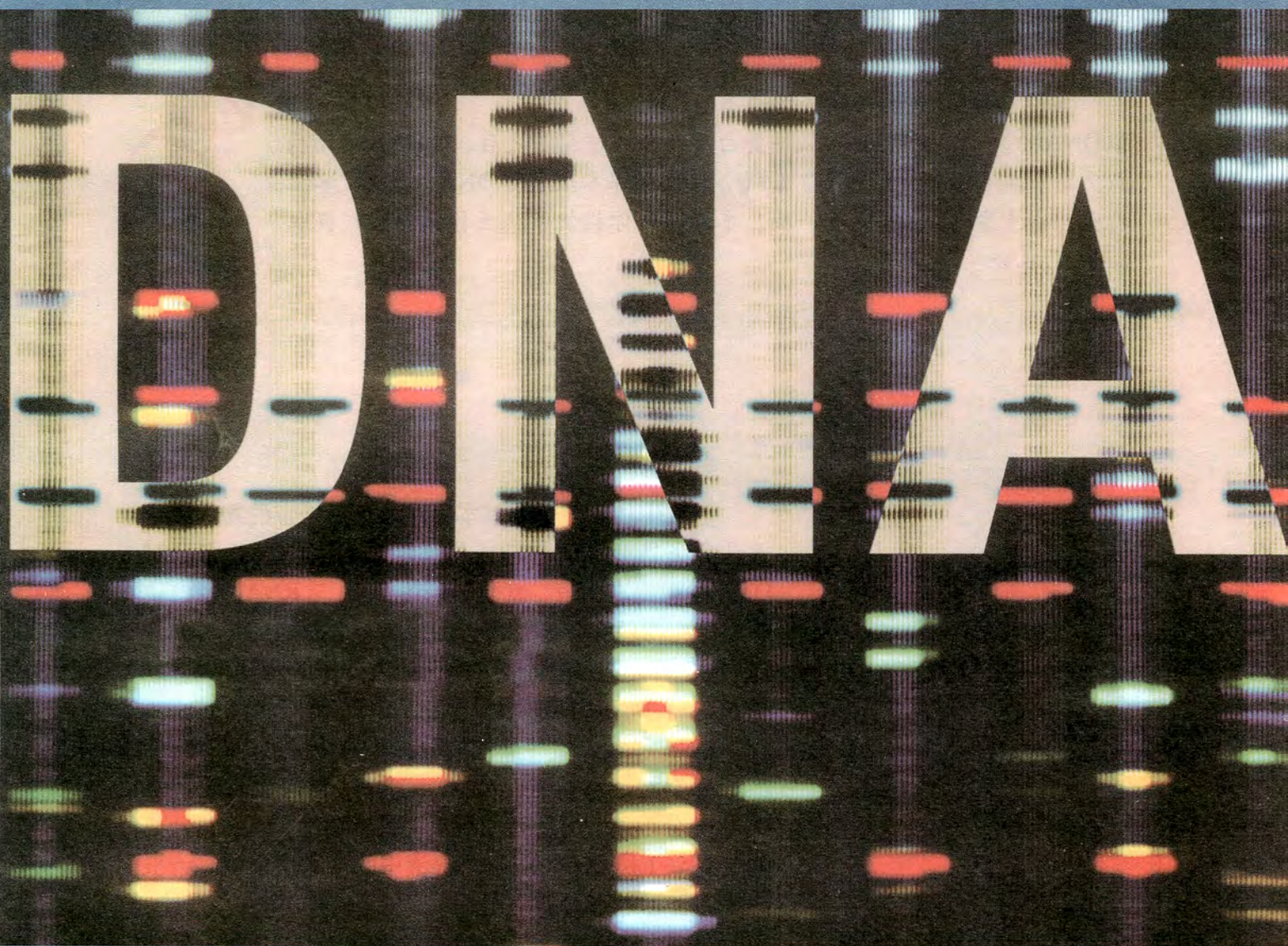


专题 5 DNA 和蛋白质技术



汇涓流而成江河，积跬步而至千里。在分子生物学领域，如果没有一项项分子生物学技术的成熟与积累，就没有分子生物学高速发展的今天。从单项技术来看，提取DNA的技术可能平淡无奇，PCR技术也只是重复地扩增某个DNA片段，分离某种蛋白质的工作难免繁琐。但是，正是通过一项项技术上的突破，人类才能完成像人类基因组计划这样恢宏庞大的工程。在本专题中，我们将从基础入手，学习有关DNA和蛋白质的一些技术，或许这就是你迈向分子生物学研究的第一步。

课题 1 DNA 的粗提取与鉴定

课题背景

当你制作DNA的双螺旋结构模型，模拟DNA的复制，绘制DNA指导蛋白质的合成过程图之后，对DNA的结构与功能一定有了不少的了解。但是，仅仅从课本上了解DNA，就像“雾里看花、水中望月”，总隔着一层。本课题为你提供了从生物体内直接提取DNA的机会。

基础知识

提取生物大分子的基本思路是选用一定的物理或化学方法分离具有不同物理或化学性质的生物大分子。对于DNA的粗提取而言，就是要利用DNA与RNA、蛋白质和脂质等在物理和化学性质方面的差异，提取DNA，去除其他成分。首先，让我们来了解这些大分子的物理化学性质。

(一) DNA的溶解性

DNA和蛋白质等其他成分在不同浓度的NaCl溶液中溶解度不同，利用这一特点，选择适当的盐浓度就能使DNA充分溶解，而使杂质沉淀，或者相反，以达到分离目的。图5-1是DNA在NaCl溶液中的溶解度曲线，请根据曲线图，思考下面的问题。

1. 在什么浓度下，DNA的溶解度最小？DNA在NaCl溶液中的溶解度是如何变化的？

2. 如何通过控制NaCl溶液的浓度使DNA在盐溶液中溶解或析出？

此外，DNA不溶于酒精溶液，但是细胞中的某些蛋白质则溶于酒精。利用这一原理，可以将DNA与蛋白质进一步地分离。

(二) DNA对酶、高温和洗涤剂的耐受性

蛋白酶能水解蛋白质，但是对DNA没有影响。大多数蛋白质不能忍受60~80℃的高温，而DNA在80℃以

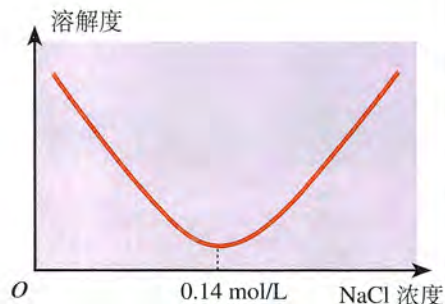


图 5-1 DNA 在 NaCl 溶液中的溶解度曲线

上才会变性。洗涤剂能够瓦解细胞膜(图5-2),但对DNA没有影响。

(三) DNA 的鉴定

在沸水浴的条件下,DNA与二苯胺反应呈现蓝色,因此,二苯胺可以作为鉴定DNA的试剂。

实验设计

(一) 实验材料的选取

什么样的实验材料适合提取DNA?原则上,凡是含有DNA的生物材料都可以考虑,但是,选用DNA含量相对较高的生物组织,成功的可能性更大。下面的生物材料适合做DNA的提取吗?为什么?你打算选用什么实验材料?你也可以同时用2~3种实验材料,最后比较哪种材料中DNA的含量更高。

鱼卵、猪肝、菜花(花椰菜)、香蕉、鸡血、哺乳动物的红细胞、猕猴桃、洋葱、豌豆、菠菜、在液体培养基中培养的大肠杆菌。

(二) 破碎细胞,获取含DNA的滤液

动物细胞的破碎比较容易,以鸡血为例,在鸡血细胞液中加入一定量的蒸馏水,同时用玻璃棒搅拌,过滤后收集滤液即可。如果实验材料是植物细胞,需要先用洗涤剂溶解细胞膜。例如,提取洋葱的DNA时,在切碎的洋葱中加入一定的洗涤剂和食盐,进行充分地搅拌和研磨,过滤后收集研磨液。

在这一步的设计中,你可以通过设置对照实验来探究生物材料与洗涤剂、食盐用量的最佳比例,看看不同的用量比对结果会产生怎样的影响;你也可以探究用不同的洗涤剂,如洗发香波、沐浴液、洗洁精来提取DNA时,会产生什么不同的效果。

(三) 去除滤液中的杂质

为了纯化提取的DNA,需要将滤液作进一步处理。下面是去除杂质的三个方案,你可以根据实际情况选用一种,或者自己设计一个方案。

方案一 利用DNA在不同浓度的NaCl溶液中溶解度的不同,通过控制NaCl溶液的浓度去除杂质。具体做法是:在滤液中加入NaCl,使NaCl溶液物质的量浓度为2 mol/L,过滤除去不溶的杂质,再调节NaCl溶液物质的量浓度为0.14 mol/L,析出DNA,过滤去除溶液中的杂质,再用物质的量浓度为2 mol/L的NaCl溶液溶解DNA。

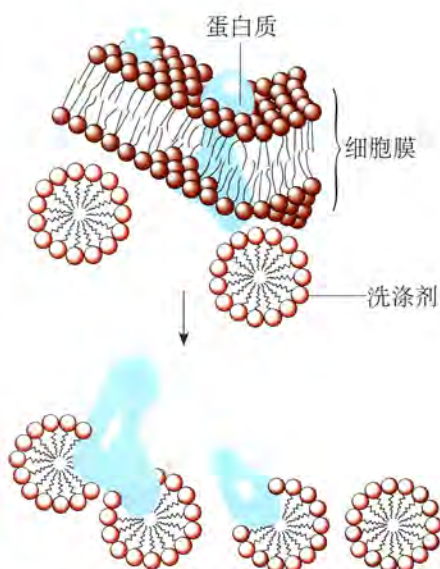


图5-2 洗涤剂瓦解细胞膜的示意图



取材时要注意安全问题,并注意保护环境,不要将珍稀濒危的生物作为实验材料。



为什么加入蒸馏水能使鸡血细胞破裂?



加入洗涤剂和食盐的作用分别是什么?



如果研磨不充分,会对实验结果产生怎样的影响?



有条件的话,可以用家用搅拌机代替手工研磨。



此步骤获得的滤液中可能含有哪些细胞成分?



为什么反复地溶解与析出DNA,能够去除杂质?



图 5-3 嫩肉粉

? 方案二与方案三的原理有什么不同?

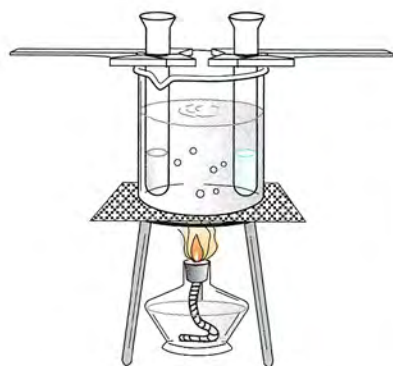


图 5-5 DNA 的鉴定

方案二 直接在滤液中加入嫩肉粉 (图 5-3), 反应 10~15 min, 嫩肉粉中的木瓜蛋白酶能够分解蛋白质。

方案三 将滤液放在 60~75 ℃ 的恒温水浴箱中保温 10~15 min, 注意严格控制温度范围。

(四) DNA 的析出与鉴定

将处理后的溶液过滤, 加入与滤液体积相等的、冷却的酒精溶液 (体积分数为 95%), 静置 2~3 min, 溶液中会出现白色丝状物, 这就是粗提取的 DNA。用玻璃棒沿一个方向搅拌, 卷起丝状物 (图 5-4), 并用滤纸吸去上面的水分。

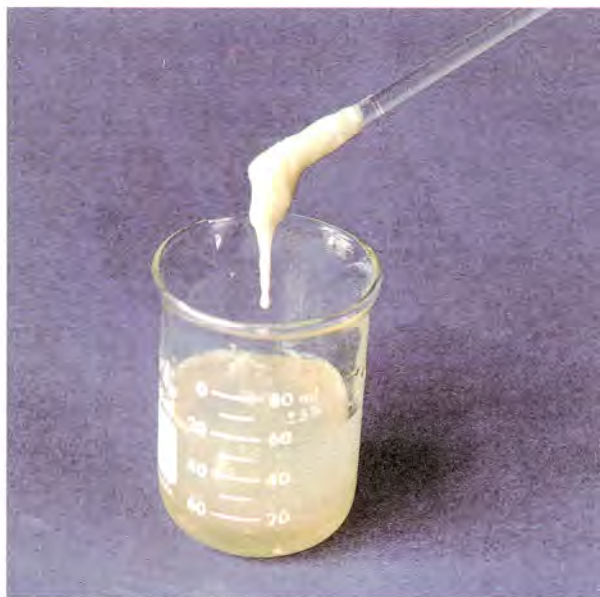


图 5-4 用冷却的酒精析出 DNA

取两支 20 mL 的试管, 各加入物质的量浓度为 2 mol/L 的 NaCl 溶液 5 mL, 将丝状物放入其中一支试管中, 用玻璃棒搅拌, 使丝状物溶解。然后, 向两支试管中各加入 4 mL 的二苯胺试剂。混合均匀后, 将试管置于沸水中加热 5 min, 待试管冷却后, 比较两支试管中溶液颜色的变化, 看看溶解有 DNA 的溶液是否变蓝 (图 5-5)。

操作提示


1. 以血液为实验材料时, 每 100 mL 血液中需要加入 3 g 柠檬酸钠, 防止血液凝固。
2. 加入洗涤剂后, 动作要轻缓、柔和, 否则容易产生大量的泡沫, 不利于后续步骤的操作。加入酒精和用玻璃棒搅拌时, 动作要轻缓, 以免加剧 DNA 分子的断裂, 导致 DNA 分子不能形成絮状沉淀。
3. 二苯胺试剂要现配现用, 否则会影响鉴定的效果。

结果分析与评价

1. 你选用了什么实验材料？你采用了怎样的方法步骤？
2. 你提取出了白色丝状物吗？用二苯胺鉴定的结果如何？
3. 你能分析出粗提取的DNA中可能含有哪些杂质吗？
4. 与其他同学提取的DNA进行比较，看看实验结果有什么不同，分析产生差异的原因。

课题延伸

本课题使用的洗涤剂是多组分的混合物，在严格的科学实验中很少使用。实验室提取高纯度的DNA时，通常使用十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）、十二烷基硫酸钠（SDS）或吐温等化学试剂。请查阅资料，了解实验室提取纯度较高的DNA的一种方法，与本课题中所使用的方法进行比较，总结两种方法的异同。

 二苯胺试剂的配制：称取1.5 g 二苯胺，溶于100 mL冰醋酸中，再加1.5 mL浓硫酸，用棕色瓶保存。临用前，在10 mL的上述溶液中再加入0.1 mL体积分数为0.2%的乙醚溶液。



练习

1. 请解释提取DNA的实验操作中主要步骤的目的。
2. 你认为从细胞中提取某种特定的蛋白质与提取DNA一样容易吗？为什么？

课题2

多聚酶链式反应扩增DNA片段

课题背景

多聚酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种体外迅速扩增 DNA 片段的技术, 它能以极少量的 DNA 为模板, 在几小时内复制出上百万份的 DNA 拷贝。这项技术有效地解决了因为样品中 DNA 含量太低而难以对样品进行分析研究的问题, 被广泛地应用于遗传疾病的诊断、刑侦破案、古生物学、基因克隆和 DNA 序列测定等各方面。在本课题中, 我们将了解 PCR 技术的基本原理, 并尝试用 PCR 技术扩增 DNA 片段。



基础知识

(一) PCR 原理

在用 PCR 技术扩增 DNA 时, DNA 的复制过程与细胞内 DNA 的复制类似, 因此, 要了解 PCR 原理, 首先要分析细胞内参与 DNA 复制的各种组成成分与反应条件。下表列出了 DNA 复制所需要的基本条件, 想一想, 如何在体外设置一个类似的 DNA 复制环境。

参与的组分	在 DNA 复制中的作用
解旋酶	打开 DNA 双链
DNA 母链	提供 DNA 复制的模板
4 种脱氧核苷酸	合成子链的原料
DNA 聚合酶	催化合成 DNA 子链
引物	使 DNA 聚合酶能够从引物的 3' 端开始连接脱氧核苷酸

① 引物是一小段 DNA 或 RNA, 它能与 DNA 母链的一段碱基序列互补配对。用于 PCR 的引物长度通常为 20~30 个核苷酸。

DNA 复制的具体过程涉及到 DNA 双链的方向。你已经知道, DNA 的两条链是反向平行的, 为了明确地表示 DNA 的方向, 通常将 DNA 的羟基 (—OH) 末端称为 3' 端, 而磷酸基团的末端称为 5' 端。DNA 聚合酶不能从头开始合成 DNA, 而只能从 3' 端延伸 DNA 链, 因此, DNA 复制需要引物。当引物与 DNA 母链通过碱基互补

配对结合后，DNA 聚合酶就能从引物的 3' 端开始延伸 DNA 链，因此 DNA 的合成方向总是从子链的 5' 端向 3' 端延伸（图 5-6）。

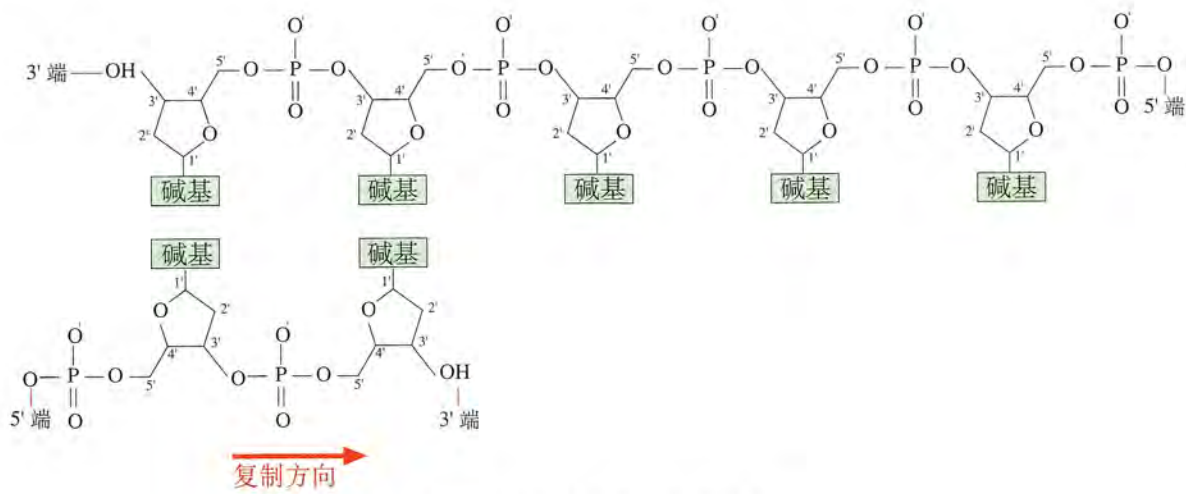


图 5-6 DNA 复制方向的示意图

在 DNA 的复制过程中，双链的解开是进行 DNA 复制的前提。如何在体外将双螺旋打开呢？这个过程可以通过控制温度来实现。在 80~100 ℃ 的温度范围内，DNA 的双螺旋结构将解体，双链分开，这个过程称为变性。当温度缓慢降低后，两条彼此分离的 DNA 链又会重新结合成双链（图 5-7）。PCR 利用了 DNA 的热变性原理，通过控制温度来控制双链的解聚与结合，现在使用的 PCR 仪实质上也是一台能够自动调控温度的仪器（图 5-8）。

高温虽然解决了如何打开 DNA 双链的问题，但是，又导致了 DNA 聚合酶失活的新问题。在解决这个新问题之前，PCR 还并非一种实用的实验方法。到 20 世纪 80 年代，耐高温的 *Taq* DNA 聚合酶的发现和应用（专题 2 课题 2），解决了上述矛盾，大大增加了 PCR 的效率，使 PCR 技术趋向自动化，而最终成为现代分子生物学实验工作的基本方法之一。

综合以上分析可以看出，PCR 反应需要在一定的缓冲溶液（参见专题 5 课题 3）中才能进行，需提供：DNA 模板，分别与两条模板链相结合的两种引物，四种脱氧核苷酸，耐热的 DNA 聚合酶，同时通过控制温度使 DNA 复制在体外反复进行。

（二）PCR 的反应过程

PCR 一般要经历三十多次循环，每次循环可以分为变性、复性和延伸三步（图 5-9）。在循环之前，常要进行一次预变性，以便增加大分子模板 DNA 彻底变性的概率。从



图 5-7 DNA 变性与复性的示意图

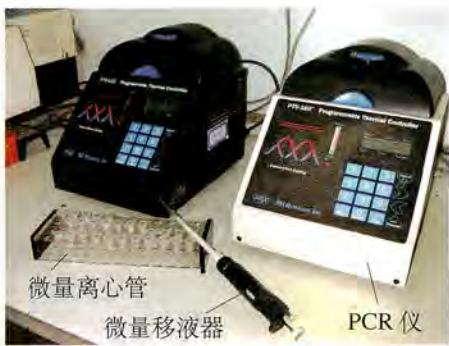


图 5-8 PCR 仪、微量移液器和微量离心管

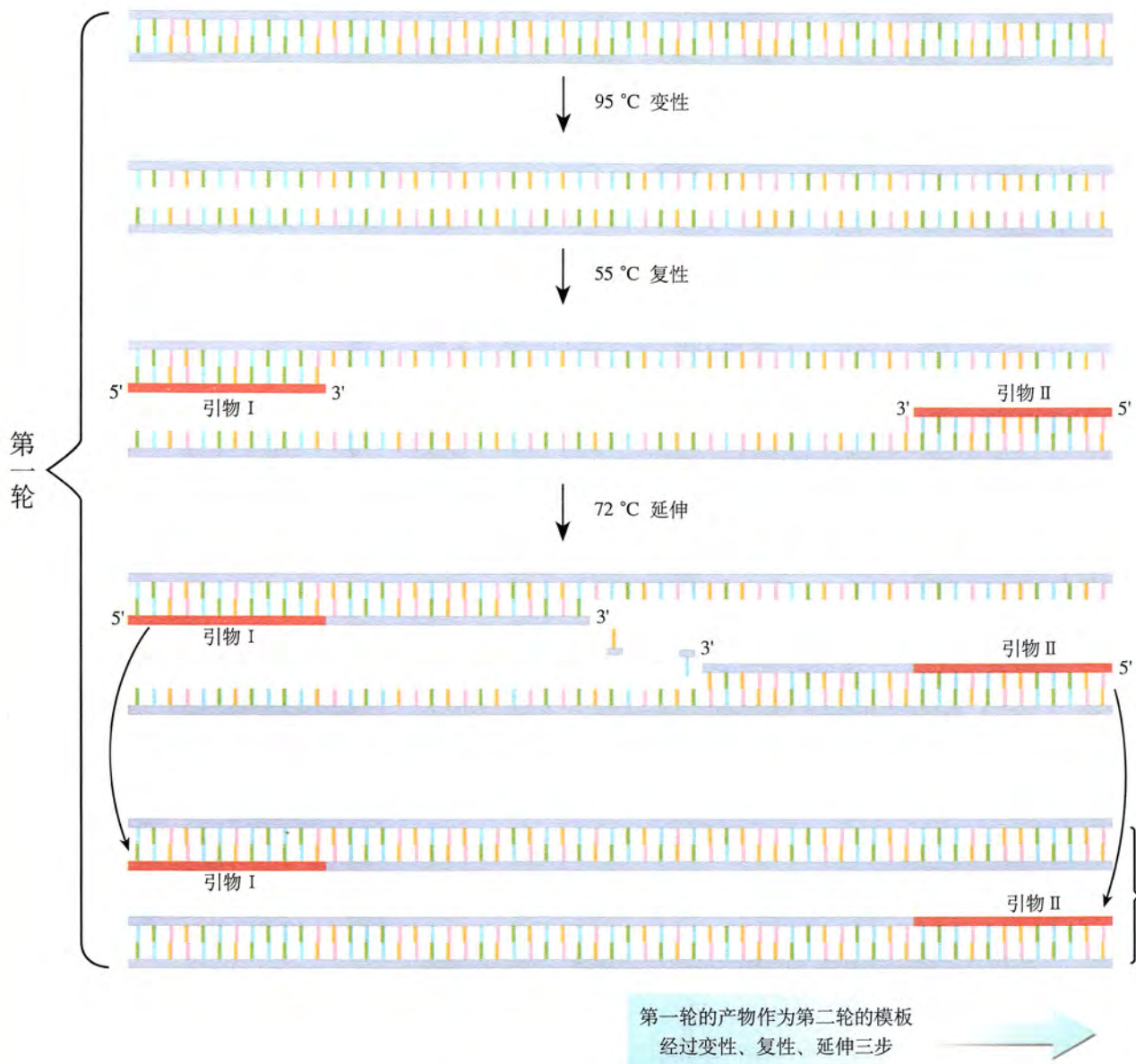
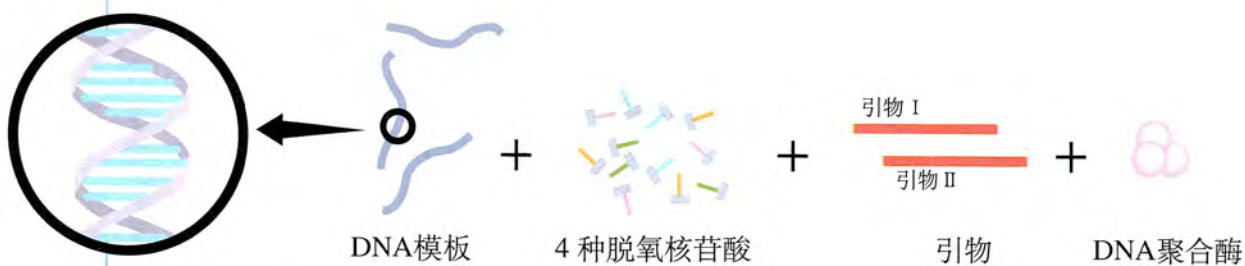
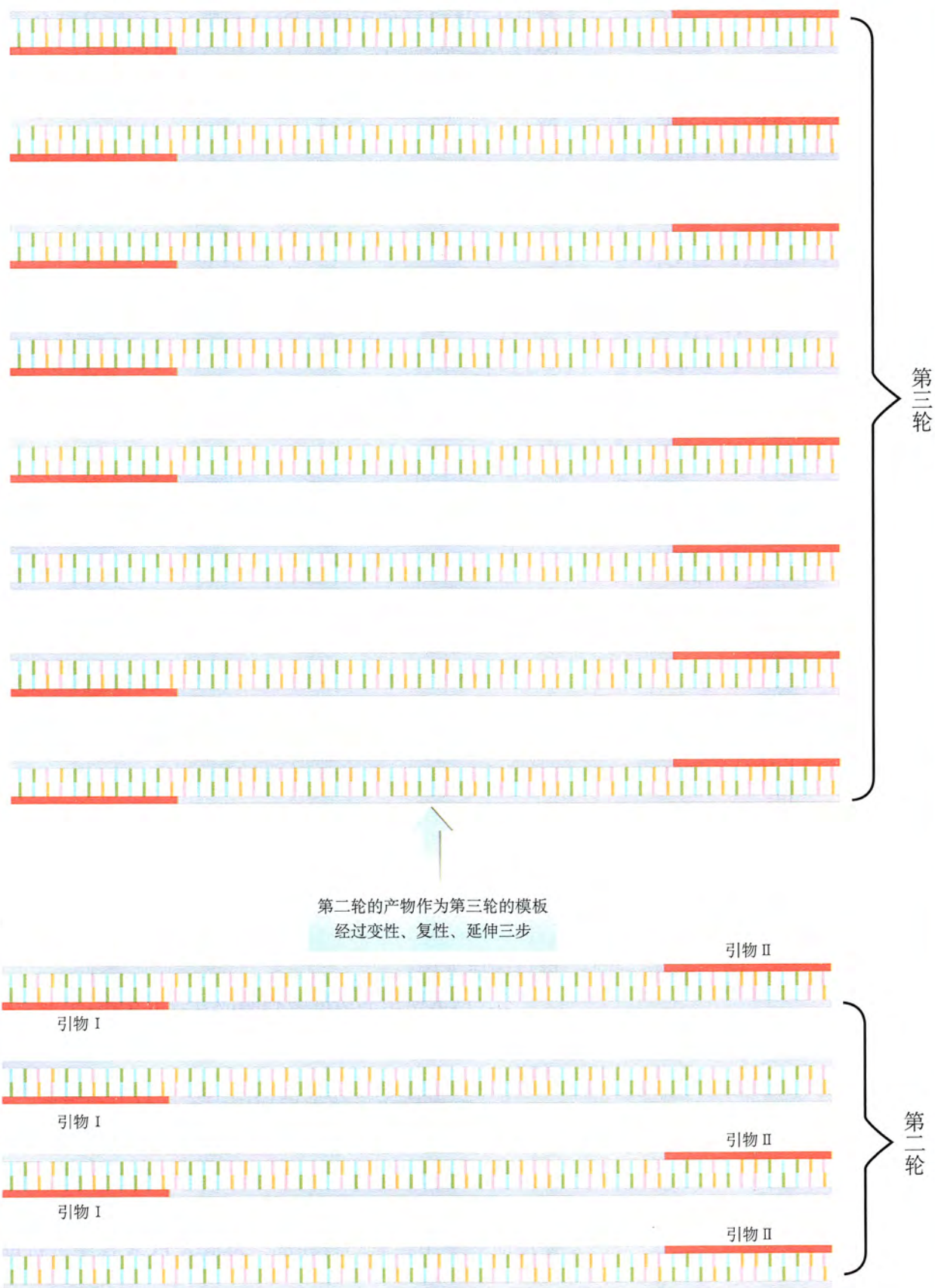


图 5-9 PCR 过程图解 (图中表示前 3 次循环)

变性 当温度上升到 90 °C 以上时，双链 DNA 解聚为单链。

复性 温度下降到 50 °C 左右，两种引物通过碱基互补配对与两条单链 DNA 结合。

延伸 温度上升到 72 °C 左右，溶液中的四种脱氧核苷酸 (A, T, C, G) 在 DNA 聚合酶的作用下，根据碱基互补配对原则合成新的 DNA 链。



- PCR 反应体系的配方**
- 10 倍浓缩的扩增缓冲液 5 μL
 - 20 mmol/L 的 4 种脱氧核苷酸的等量混合液 1 μL
 - 20 $\mu\text{mol/L}$ 的引物 I 2.5 μL
 - 20 $\mu\text{mol/L}$ 的引物 II 2.5 μL
 - H_2O 28~33 μL
 - 1~5 U/ μL 的 *Taq* DNA 聚合酶 1~2 U
 - 模板 DNA 5~10 μL
 - 总体积 50 μL
- 注：模板 DNA 的用量在 1 pg~1 mg 之间。

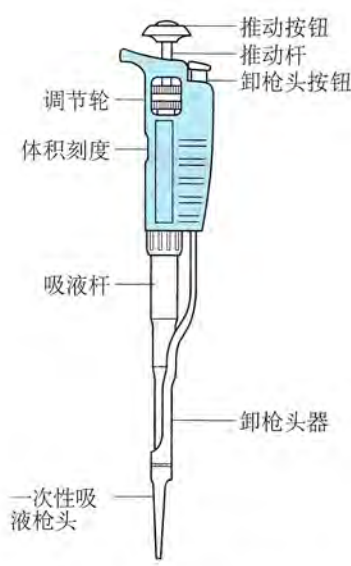


图 5-10 微量移液器

第二轮循环开始,上一次循环的产物也作为模板参与反应,并且由引物 I 延伸而成的 DNA 单链会与引物 II 结合,进行 DNA 的延伸,这样, DNA 聚合酶只能特异地复制处于两个引物之间的 DNA 序列,使这段固定长度的序列呈指数扩增。

实验操作

在 PCR 实验中,通常要用到微量离心管,它是一种薄壁塑料管(图 5-8),总容积为 0.5 mL。具体操作时,用微量移液器(图 5-10),按照旁栏的配方在微量离心管中依次加入各组分,再参照下表的设置设计好 PCR 仪的循环程序就可以了。想一想,在 PCR 反应中,如何设置对照实验?

	变性	复性	延伸
预变性	94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	——	——
30 次	94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s	55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s	72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min
最后 1 次	94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min	55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s	72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min

做 PCR 所需的实验材料可以直接从生物技术公司购买。如果没有 PCR 仪,可以设置 3 个恒温水浴锅,温度分别为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 和 72 $^{\circ}\text{C}$, 然后按照上表的要求,在 3 个水浴锅中来回转移 PCR 反应的微量离心管即可。

操作提示

- 1. 为避免外源 DNA 等因素的污染,PCR 实验中使用的微量离心管、枪头、缓冲液以及蒸馏水等在使用前必须进行高压灭菌。
- 2. PCR 所用的缓冲液和酶应分装成小份,并在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存。使用前,将所需试剂从冰箱拿出,放在冰块上缓慢融化。
- 3. 在微量离心管中添加反应成分时,每吸取一种试剂后,移液器上的枪头都必须更换。所有的成分都加入后,盖严离心管口的盖子,用手指轻轻弹击管的侧壁,使反应液混合均匀,再将微量离心管放在离心机上,离心约 10 s,使反应液集中在离心管底部,再放入 PCR 仪中进行反应。

结果分析与评价

DNA 在 260 nm 的紫外线波段有一强烈的吸收峰(图

5-11)。可以利用DNA的这一特点进行DNA含量的测定，具体方法如下。

- 1. 将样品进行50倍稀释：取2 μL PCR反应液，加入98 μL 蒸馏水。
- 2. 以蒸馏水作为空白对照，在波长260 nm处，将紫外分光光度计（图5-12）的读数调节至零。
- 3. 加入步骤1中的DNA稀释液100 μL 至比色杯中，测定260 nm处的光吸收值。
- 4. 根据下面的公式计算DNA含量。

$$\text{DNA 含量 } (\mu\text{g/mL}) = 50^* \times (\text{260 nm 的读数}) \times \text{稀释倍数}$$

通过上述方法，你能估算出DNA片段的含量比扩增前增加了多少倍吗？

课题延伸

完成本课题后，你也许会觉得PCR的原理虽然复杂，但操作却十分简单。快速、高效、灵活和易于操作正是PCR的突出优点。到目前为止，人们已从基本的PCR方法中衍生出许许多多的新方法，许多科普杂志和专著致力于介绍这些新方法。请你查阅相关资料，了解这些方法的具体应用。

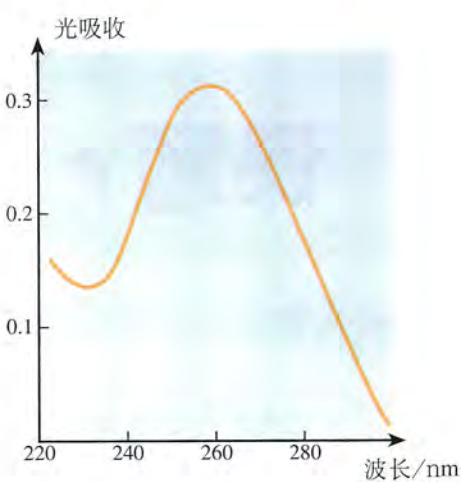


图5-11 DNA的紫外吸收光谱



图5-12 紫外分光光度计



练习

1. 请绘图表示PCR反应的前三个循环步骤。假设在PCR反应中，只有一个DNA片段作为模板，请计算在30次循环后，反应物中大约有多少个这样的DNA片段。

2. 如果要使用PCR扩增一段已知的DNA序列，你打算如何设计引物？请查阅资料，了解设计引物的方法。

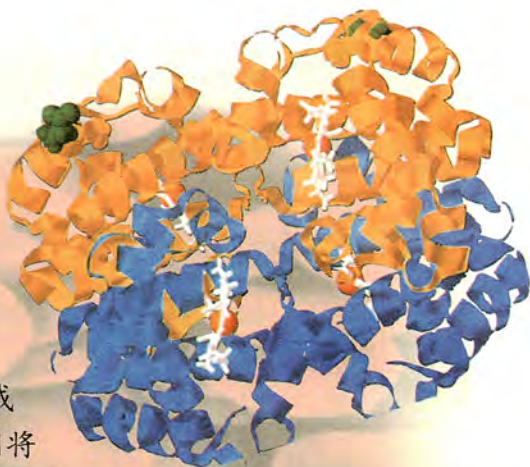
* 公式中50的含义：在标准厚度为1 cm的比色杯中，OD₂₆₀为1相当于50 μg/mL的双链DNA。

课题3 血红蛋白的提取和分离

课题背景

蛋白质是生命活动不可缺少的物质。随着人类基因组计划的进展以及多种生物基因组测序工作的完成,人类跨入了后基因组和蛋白质组时代。对蛋白质的研究与应用,首先需要获得纯度较高的蛋白质。因此,从复杂的细胞混合物中提取、分离高纯度的蛋白质是生物科学研究中经常要做的工作。

血红蛋白是人和其他脊椎动物红细胞的主要组成成分,负责血液中 O_2 和 CO_2 的运输。在本课题中,我们将以血红蛋白为实验材料,学习蛋白质提取和分离的一些基本技术。



血红蛋白分子的立体结构

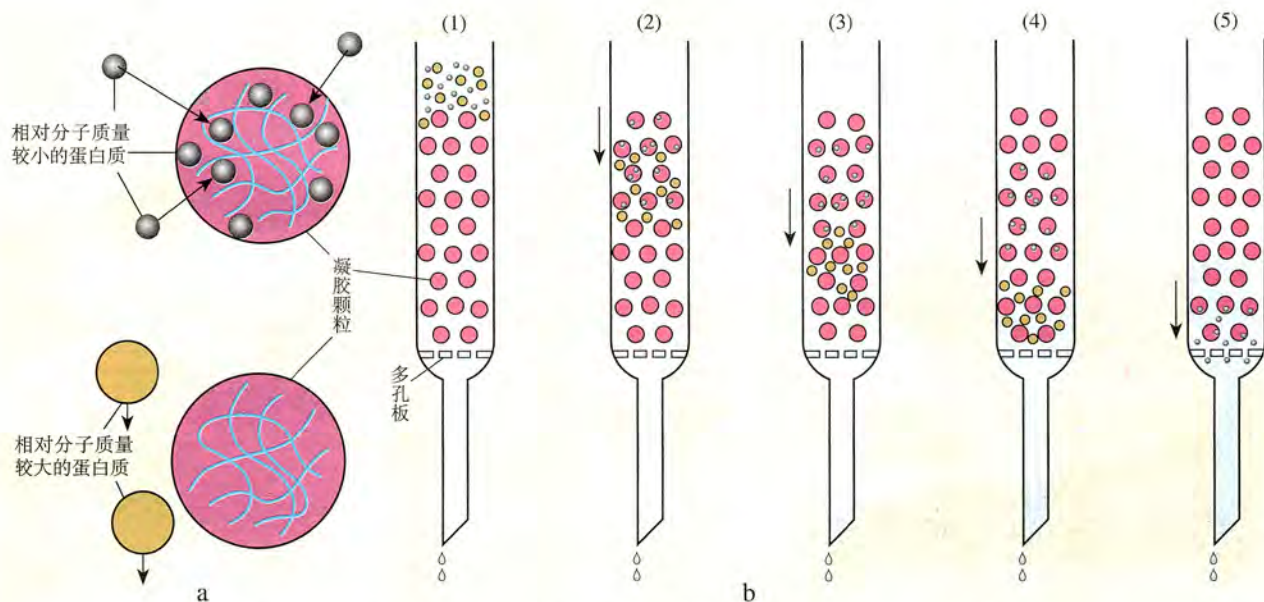
基础知识

蛋白质各种特性的差异,如分子的形状和大小、所带电荷的性质和多少、溶解度、吸附性质和对其他分子的亲和力,等等,可以用来分离不同种类的蛋白质。在本课题中,我们将学习蛋白质分离方法中的凝胶色谱法。

(一) 凝胶色谱法

凝胶色谱法也称做分配色谱法,是根据相对分子质量的大小分离蛋白质的有效方法。所用的凝胶实际上是一些微小的多孔球体,这些小球体大多数是由多糖类化合物构成的,如葡聚糖或琼脂糖。在小球体内部有许多贯穿的通道,当相对分子质量不同的蛋白质通过凝胶时,相对分子质量较小的蛋白质容易进入凝胶内部的通道,路程较长,移动速度较慢;而相对分子质量较大的蛋白质无法进入凝胶内部的通道,只能在凝胶外部移动,路程较短,移动速度较快。相对分子质量不同的蛋白质分子因此得以分离(图5-13)。

i 凝胶颗粒在色谱柱中装填得十分紧密。图5-13为了清楚地表示分离过程,有意将凝胶颗粒画得稀疏。



a. 相对分子质量较小的蛋白质由于扩散作用进入凝胶颗粒内部而被滞留；相对分子质量较大的蛋白质被排阻在凝胶颗粒外面，在颗粒之间迅速通过。

b. (1) 蛋白质混合物上柱；(2) 洗脱开始，相对分子质量较小的蛋白质扩散进入凝胶颗粒内；相对分子质量较大的蛋白质则被排阻于颗粒之外；(3) 相对分子质量较小的蛋白质被滞留，相对分子质量较大的蛋白质向下移动；(4) 相对分子质量不同的分子完全分开；(5) 相对分子质量较大的蛋白质行程较短，已从层析柱中洗脱出来，相对分子质量较小的蛋白质还在行进中。

图 5-13 凝胶色谱法分离蛋白质的原理

(二) 缓冲溶液

缓冲作用在日常生活中并不少见。例如，运动鞋的鞋底富有弹性，能够缓冲外力，减少运动员受伤的几率（图 5-14）。那么，缓冲溶液的缓冲作用体现在哪里呢？在一定范围内，缓冲溶液能够抵制外界的酸和碱对溶液 pH 的影响，维持 pH 基本不变。缓冲溶液通常由 1~2 种缓冲剂溶解于水中配制而成。调节缓冲剂的使用比例就可以制得在不同 pH 范围内使用的缓冲液。

生物体内进行的各种生物化学反应都是在一定的 pH 下进行的，为了能够在实验室条件下准确模拟生物体内的过程，就必须保持体外溶液的 pH 与体内环境中的 pH 基本一致。因此，缓冲溶液的正确配制和 pH 的准确测定，在生物化学的研究工作中有着极其重要的意义。

(三) 电泳

电泳是指带电粒子在电场的作用下发生迁移的过程。许多重要的生物大分子，如多肽、核酸等都具有可解离的基团，在一定的 pH 下，这些基团会带上正电或负电。在电场的作用下，这些带电分子会向着与其所带电荷相反的电



图 5-14 运动鞋的鞋底具有缓冲作用

极移动（图 5-15）。电泳利用了待分离样品中各种分子带电性质的差异以及分子本身的大小、形状的不同，使带电分子产生不同的迁移速度，从而实现样品中各种分子的分离。

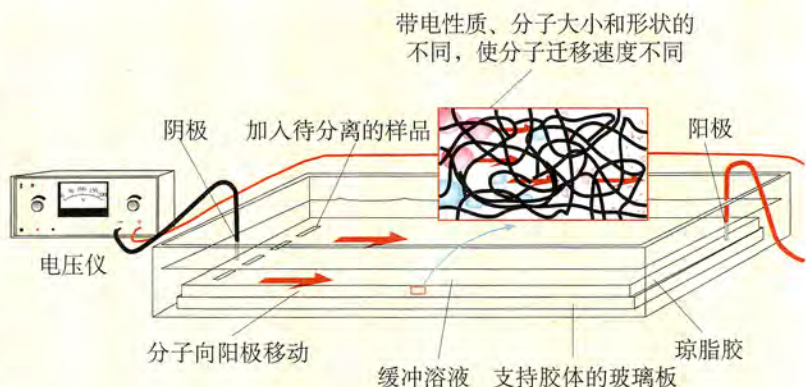


图 5-15 正在进行的电泳（左）和凝胶电泳原理示意图（右）

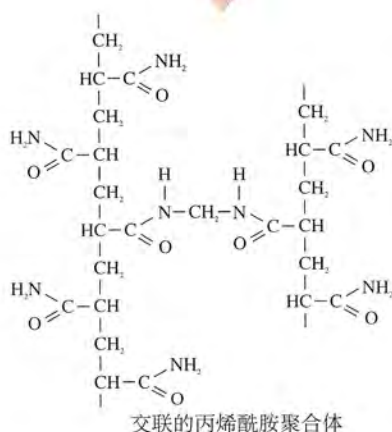
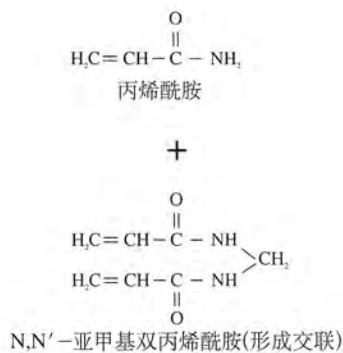


图 5-16 丙烯酰胺和交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的交联共聚反应

琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳是两种常用的电泳方法，在测定蛋白质分子量时通常使用 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳。聚丙烯酰胺凝胶是由单体丙烯酰胺和交联剂 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺在引发剂和催化剂的作用下聚合交联成的具有三维网状结构的凝胶（图 5-16）。蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶中的迁移率取决于它所带净电荷的多少以及分子的大小等因素。为了消除净电荷对迁移率的影响，可以在凝胶中加入 SDS。SDS 能使蛋白质发生完全变性。由几条肽链组成的蛋白质复合体在 SDS 的作用下会解聚成单条肽链，因此测定的结果只是单条肽链的分子量。SDS 能与各种蛋白质形成蛋白质 - SDS 复合物，SDS 所带负电荷的量大大超过了蛋白质分子原有的电荷量，因而掩盖了不同种蛋白质间的电荷差别，使电泳迁移率完全取决于分子的大小。

实验操作

蛋白质的提取和分离一般分为四步：样品处理、粗分离、纯化和纯度鉴定。每一种蛋白质的分离纯化方法因其来源和性质的不同会有很大差异。在本课题中，我们以哺乳动物红细胞为材料，学习初步分离血红蛋白的方法。

（一）样品处理及粗分离

血液由血浆和各种血细胞组成，其中红细胞最多。在红细胞的组成中，除水分以外，约 90% 是血红蛋白。血红蛋

白由四条肽链组成(图5-17),包括两条 α -肽链和两条 β -肽链。其中每条肽链环绕一个亚铁血红素基团,此基团可携带一分子氧或一分子二氧化碳。血红蛋白因含有血红素而呈现红色。本课题可以选用猪、牛、羊或其他哺乳动物的血液来分离血红蛋白。

1. 红细胞的洗涤 洗涤红细胞的目的是去除杂蛋白,以利于后续步骤的分离纯化。采集的血样要及时分离红细胞,分离时采用低速短时间离心,如500 r/min离心2 min,然后用胶头吸管吸出上层透明的黄色血浆,将下层暗红色的红细胞液体倒入烧杯,再加入五倍体积的生理盐水(质量分数为0.9%的NaCl溶液),缓慢搅拌10 min,低速短时间离心,如此重复洗涤三次,直至上清液不再呈现黄色,表明红细胞已洗涤干净。

2. 血红蛋白的释放 将洗涤好的红细胞倒入烧杯中,加蒸馏水到原血液的体积,再加40%体积的甲苯,置于磁力搅拌器上充分搅拌10 min。在蒸馏水和甲苯的作用下,红细胞破裂,释放出血红蛋白。

3. 分离血红蛋白溶液 将搅拌好的混合液转移到离心管中,以2 000 r/min的速度离心10 min后,可以明显看到试管中的溶液分为4层(图5-18)。从上往下数,第1层为无色透明的甲苯层,第2层为白色薄层固体,是脂溶性物质的沉淀层,第3层是红色透明液体,这是血红蛋白的水溶液,第4层是其他杂质的暗红色沉淀物。将试管中的液体用滤纸过滤,除去脂溶性沉淀层,于分液漏斗中静置片刻后,分出下层的红色透明液体。

4. 透析 取1 mL的血红蛋白溶液装入透析袋中,将透析袋放入盛有300 mL的物质的量浓度为20 mmol/L的磷酸缓冲液中(pH为7.0),透析12 h。

(二) 凝胶色谱操作

可以自己制作色谱柱,有条件的学校也可以直接购买商品色谱柱。

1. 凝胶色谱柱的制作 取长40 cm,内径为1.6 cm的玻璃管,两端磨平。柱底部的制作方法如下(图5-19)。首先选择适合封堵玻璃管口的橡皮塞,中间打孔,孔径大小要能够紧密插入0.5 mL的移液管。将橡皮塞上部用刀切出锅底状的凹穴,将0.5 mL的移液管头部切下5 cm长的一段,插入橡皮塞孔内,插入的玻璃管的上部不得超出橡皮塞的凹穴底面。将尼龙网剪成与橡皮塞上部一样大小的圆片,覆盖在橡皮塞的凹穴上,再用大小合适的100目的尼龙纱将橡皮塞上部包好,插到玻璃管的一端。在色谱柱



图5-17 血红蛋白的组成

为防止血液凝固,在采血容器中要预先加入抗凝血剂柠檬酸钠,比例是每100 mL血液加入3.0 g柠檬酸钠。



图5-18 离心后分层示意图

透析袋一般是用硝酸纤维素(又称玻璃纸)制成的。透析袋能使小分子自由进出,而将大分子保留在袋内。透析可以去除样品中分子量较小的杂质,或用于更换样品的缓冲液。

下端用移液管头部作出口部位，连接一细的尼龙管，并用螺旋夹控制尼龙管的打开与关闭，尼龙管的另一端放入收集色谱流出液的收集器内。柱顶部的制作只需在色谱柱的另一端插入安装了玻璃管的橡皮塞即可。

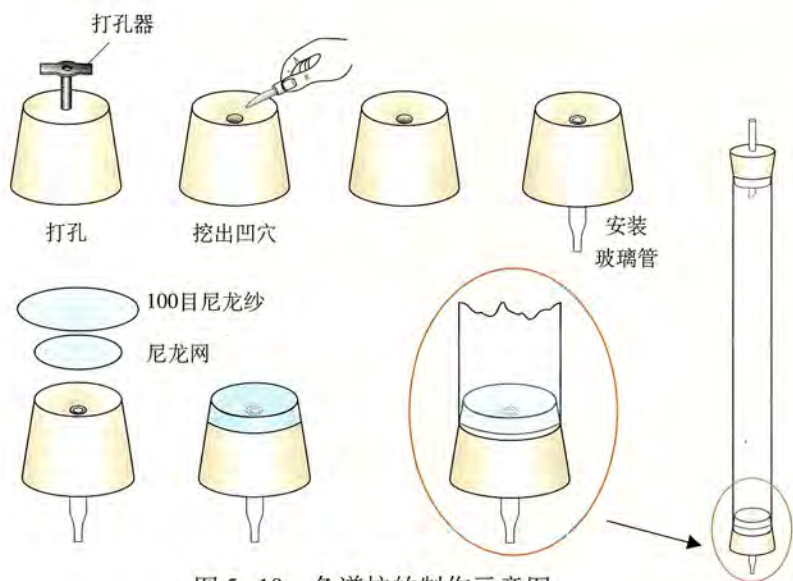


图 5-19 色谱柱的制作示意图



图 5-20 交联葡聚糖凝胶

2. 凝胶色谱柱的装填 装柱前要将色谱柱垂直固定在支架上。因为干的凝胶和用缓冲液平衡好的凝胶的体积差别很大，因此装柱前需要根据色谱柱的内体积计算所需要的凝胶量。本实验使用的是交联葡聚糖凝胶 (Sephadex G-75，图 5-20)。“G”表示凝胶的交联程度，膨胀程度及分离范围，75 表示凝胶得水值，即每克凝胶膨胀时吸水 7.5 g。凝胶用蒸馏水充分溶胀后，配成凝胶悬浮液，在与色谱柱下端连接的尼龙管打开的情况下，一次性缓慢倒入色谱柱内，装填时可轻轻敲动色谱柱，使凝胶装填均匀。注意色谱柱内不能有气泡存在，一旦发现有气泡，必须重装。装填完后，立即连接缓冲液洗脱瓶，在约 50 cm 高的操作压下(图 5-21)，用 300 mL 的物质的量浓度为 20 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH 为 7.0) 充分洗涤平衡凝胶 12 h，使凝胶装填紧密。

3. 样品的加入和洗脱 加样前，打开色谱柱下端的流出口，使柱内凝胶面上的缓冲液缓慢下降到与凝胶面平齐，关闭出口。用吸管小心地将 1 mL 透析后的样品加到色谱柱的顶端 (图 5-22)，注意不要破坏凝胶面。加样后，打开下端出口，使样品渗入凝胶床内。等样品完全进入凝胶层后，关闭下端出口。小心加入物质的量浓度为 20 mmol/L 的

磷酸缓冲液 (pH 为 7.0) 到适当高度, 连接缓冲液洗脱瓶, 打开下端出口, 进行洗脱。待红色的蛋白质接近色谱柱底端时, 用试管收集流出液, 每 5 mL 收集一管, 连续收集 (图 5-21)。

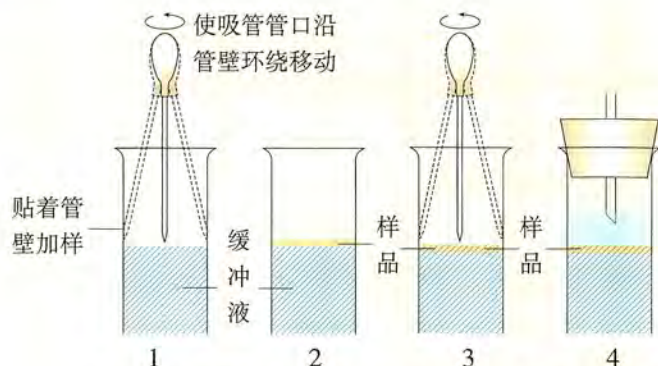


图 5-22 加样示意图 (1、2、3、4 表示先后顺序)

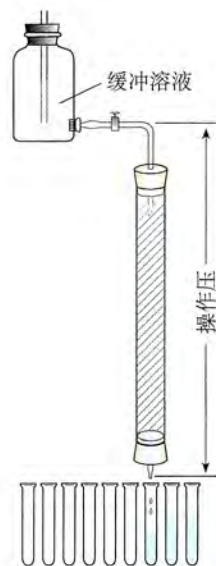


图 5-21 凝胶色谱柱的装置示意图

(三) SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳 (选做)

判断纯化的蛋白质是否达到要求, 需要进行蛋白质纯度的鉴定。在鉴定的方法中, 使用最多的是 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳。有条件的学校, 可以参考生物化学实验的有关书籍, 尝试 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳的操作。下图是聚丙烯酰胺凝胶电泳的装置及其原理示意图 (图 5-23)。

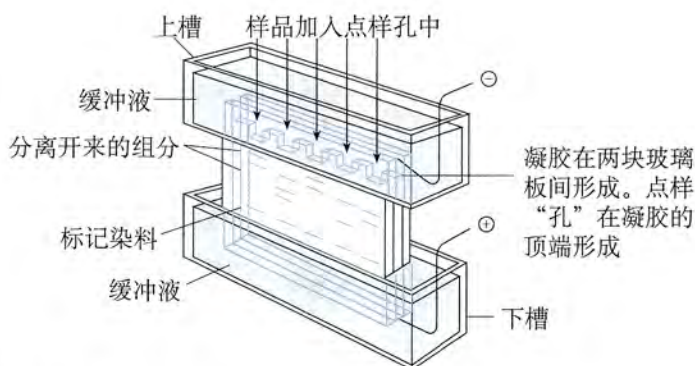
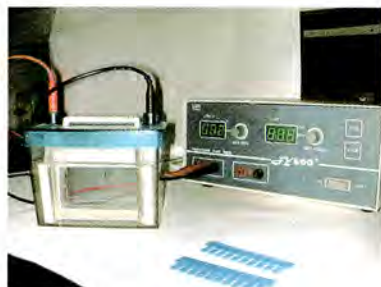


图 5-23 聚丙烯酰胺凝胶电泳装置 (左) 及其原理示意图 (右)

操作提示

1. 红细胞的洗涤 洗涤次数、离心速度与离心时间十分重要。洗涤次数过少, 无法除去血浆蛋白; 离心速度过高和时间过长会使白细胞等一同沉淀, 达不到分离的效果。有兴趣的同学可以尝试不同的洗涤次数、离心速度和时间, 探索最佳处理条件。

2. 色谱柱填料的处理 商品凝胶是干燥的颗粒, 使用前需直接放在洗脱液中膨胀。为了加速膨胀, 可以将加

你能从凝胶色谱的分离原理分析为什么凝胶的装填要紧密、均匀吗?

入洗脱液的湿凝胶用沸水浴加热,逐渐升温至接近沸腾,通常只需1~2 h。这种方法不但节约时间,而且可以除去凝胶中可能带有的微生物,排除胶粒内的空气。

3. 凝胶色谱柱的装填 在色谱柱中装填凝胶的时候要尽量紧密,以降低凝胶颗粒之间的空隙。在装填凝胶柱时,不得有气泡存在。气泡会搅乱洗脱液中蛋白质的洗脱次序,降低分离效果。在凝胶色谱操作过程中,不能发生洗脱液流干,露出凝胶颗粒的现象。一旦发生这种情况,凝胶色谱柱需要重新装填。

4. 蛋白质的分离 在蛋白质分离过程中,仔细观察红色区带在洗脱过程中的移动情况。如果红色区带均匀一致地移动,说明色谱柱制作成功。

结果分析与评价

1. 你是否完成了对血液样品的处理? 你能描述处理后的样品发生了哪些变化吗?

2. 你装填的凝胶色谱柱中是否有气泡产生? 你的色谱柱装填得成功吗? 你是如何判断的?

3. 在蛋白质的分离过程中,你能观察到红色区带的移动吗? 请描述红色区带的移动情况,并据此判断分离效果。

课题延伸

在实际工作中,蛋白质的提纯往往需要联合使用几种分离方法,才能达到要求。你能在查阅资料的基础上,了解蛋白质的其他分离方法,设计出进一步纯化血红蛋白的方案吗?



练习

1. 凝胶色谱法分离蛋白质的原理是怎样的?
2. 什么是缓冲溶液? 它的作用是什么?
3. 电泳的作用及其原理是什么?
4. 你能描述血红蛋白分离的完整过程吗?
5. 与其他真核细胞相比,红细胞有什么特点? 这一特点对你进行蛋白质的分离有什么意义?