



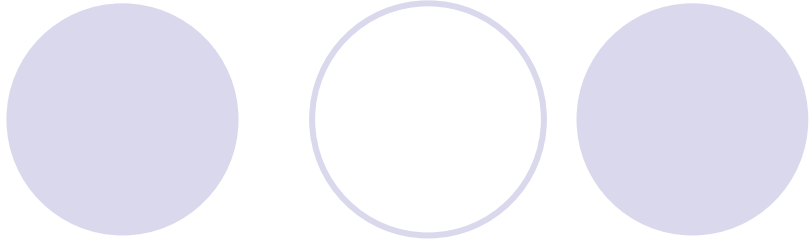
生物化学实验

Biochemical Experiment

转氨基作用



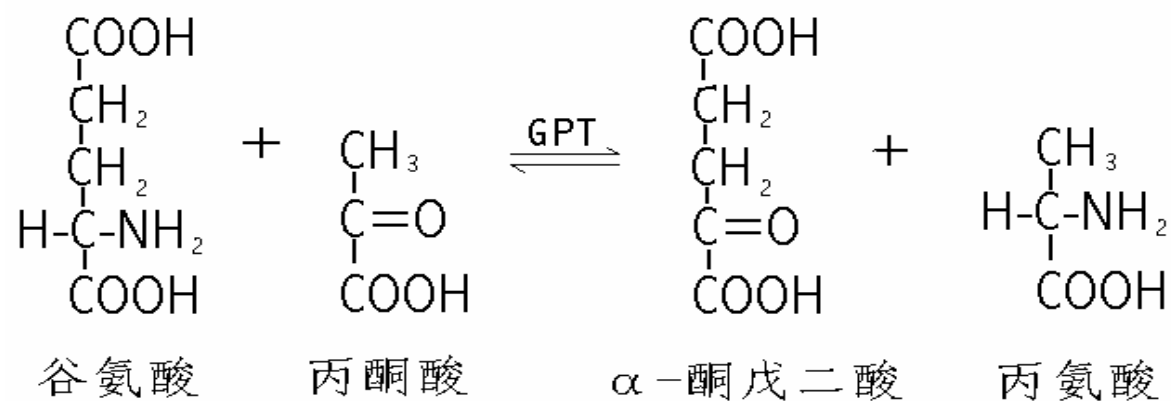
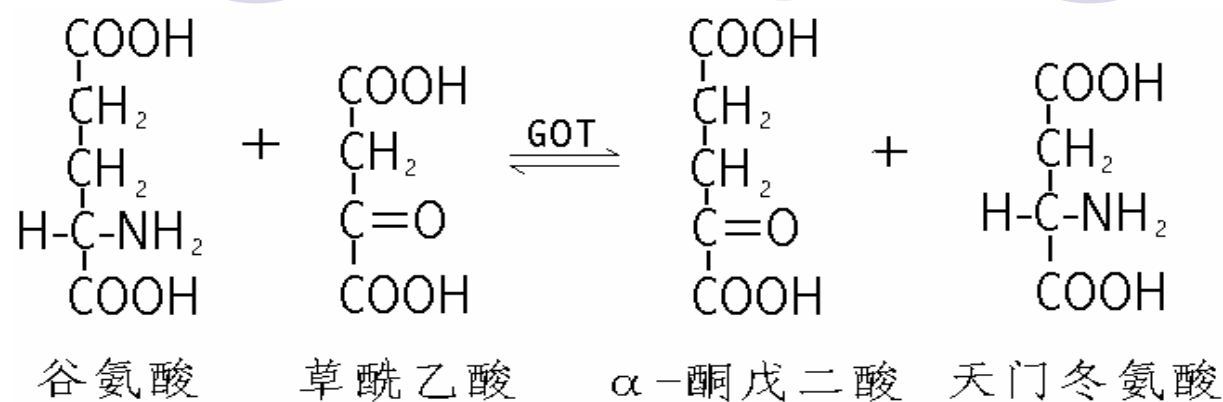
实验目的

- 
- 了解动物组织的转氨基作用,以及转氨酶在代谢以及临床诊断中的重要性
 - 掌握转氨酶测定的原理和方法
 - 了解纸层析的原理和操作技术(点样、层析、显色、鉴定)

实验原理

(一) 转氨基作用

- 氨基移换酶也称转氨酶,它能催化 α -氨基酸的氨基与 α -酮酸的 α -酮基互换,这种作用称为氨基移换作用。它在生物体内蛋白质的合成与分解等中间代谢中,在糖、脂肪、蛋白质三类物质代谢的相互联系、相互转化上,都起着很重要的作用。
- 任何一种氨基酸进行转氨作用时,都由其专一的转氨酶催化。在各种转氨酶中,以谷氨酸—草酰乙酸转氨酶(简称谷草转氨酶、GOT)及谷氨酸—丙酮酸转氨酶(简称谷丙转氨酶、GPT)活力最强。它们催化的反应如下:



转氨酶在临床诊断中的重要性

GOT和**GPT**均广泛存在于生物机体中，在正常人血清中也有少量存在。机体发生肝炎、心肌梗塞病变时，血清中转氨酶活力显著增加，在临床上转氨酶活性的测定有重要意义。

测定转氨酶活性的方法：

- 分光光度法
- 纸上层析法
- 光电比色法



(二)、层析技术

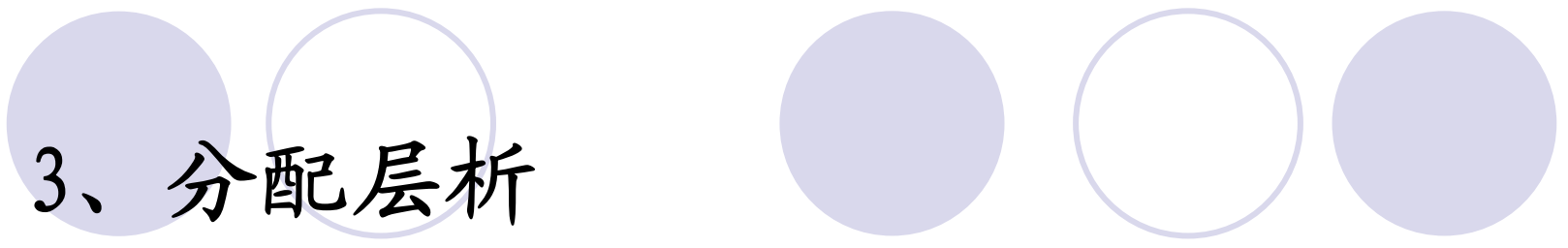
- 1903年，俄国科学家M. C. Jber首创了一种从绿叶中分离多种不同颜色色素成分的方法，命名为色谱法(Chromatography)，由于翻译和习惯的原因，又常称为层析法。
- 层析法不断发展，形式多种多样。相继出现了分配层析、离子交换层析、凝胶层析、亲和层析、吸附层析等。几乎每一种层析法都已发展成为一门独立的生化高技术，在生化领域内得到了广泛的应用。

1、层析技术原理

- 层析原理：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。

2、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



3、分配层析

- **分配系数：**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（ α ）。

$$\alpha = \frac{\text{固定相内溶质的浓度}}{\text{流动相内溶质的浓度}}$$

- 是一种连续抽提法。一种溶剂通常是被结合在固定的惰性支持物（柱、膜、纸）上的水，另外一相由流动的被水饱和的有机溶剂构成，它流过固定相。
- 如果某一混全物的各组分在这两相中的分配系数有足够的差异，它们就可以被分离。

4、纸层析

- 纸层析是最简单的液-液相分配层析。
- 纸层析以滤纸为惰性支持物，滤纸纤维上的羟基具有亲水性，吸附一层水作为固定相，有机溶剂为流动相。有机相流经固定相支持物时，与固定相之间连续抽提，使物质在两相间不断分配而得到分离。

R_f值

溶质在滤纸上的移动速度即物质被分离后在纸层析图谱上的位置是用R_f值来表示的。在一定的条件下某种物质的R_f值是常数。

$$R_f = \frac{\text{原点到层析点中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}}$$

R_f值的大小与物质的结构、性质、溶剂系统、层析滤纸的质量和层析温度等因素有关。

仪器、材料和试剂

1、实验仪器

- (1) 匀浆器。
- (2) 离心管和离心机（台式）
- (3) 恒温水浴
- (4) 毛细玻璃管
- (5) 层析滤纸
- (6) 吹风机
- (7) 培养皿
- (8) 手套

2、材料和试剂

- (1) 猪肝
- (2) 1/15mol/L磷酸缓冲液 (pH=7.4)
- (3) 丙氨酸溶液
- (4) α 酮戊二酸溶液
- (5) 0.1%碳酸氢钾溶液
- (6) 0.05%碘乙酸溶液
- (7) 15%三氯醋酸溶液
- (8) 标准丙氨酸溶液(0.1%)
- (9) 标准谷氨酸溶液(0.1%)
- (10) 0.1%水合茚三酮乙醇溶液 (现配100ml, 置于平皿中)
- (11) 水饱和酚



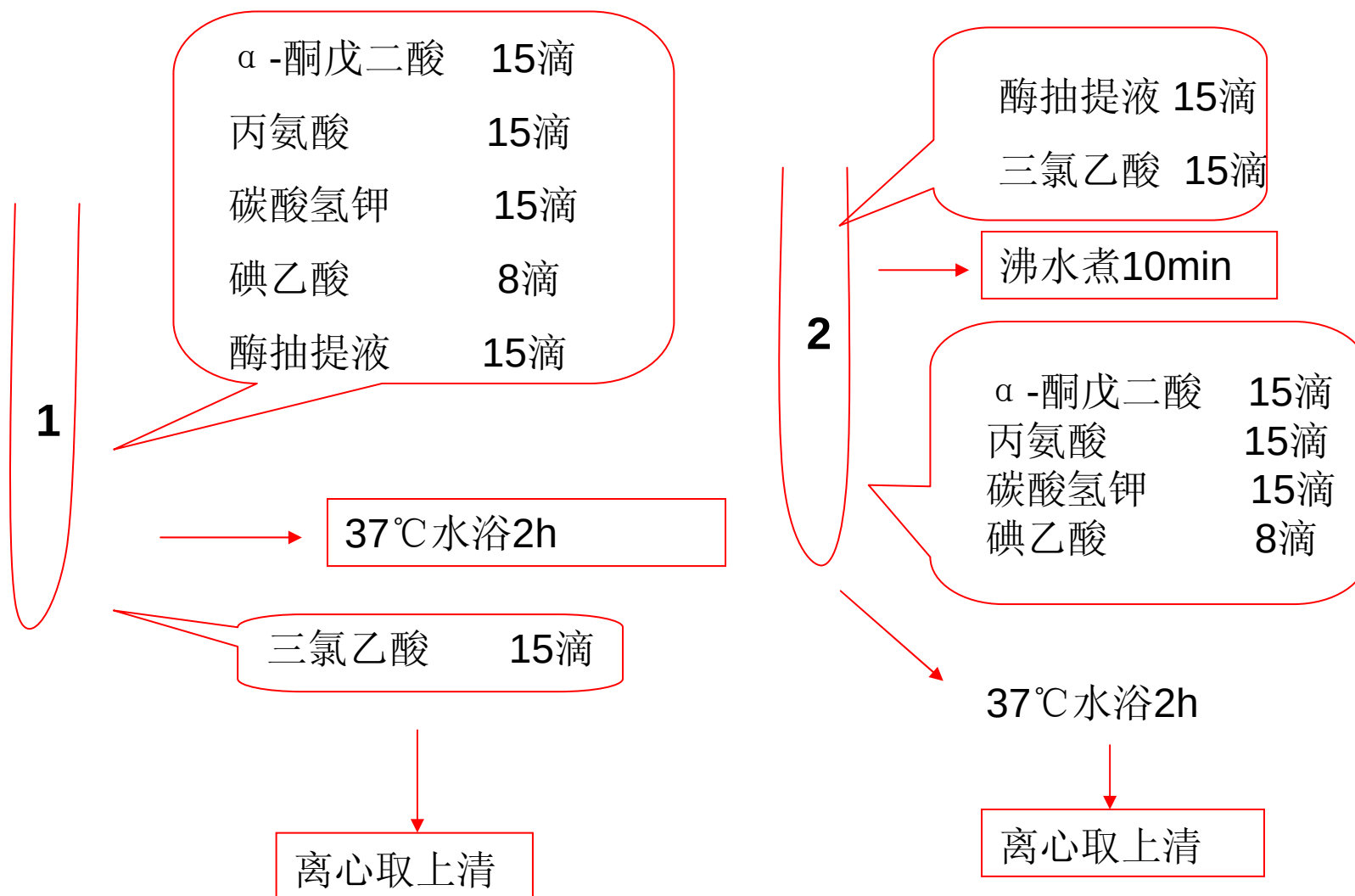
实验步骤

(一) 肝匀浆的制备

称取肝脏**2g**，剪碎放入匀浆器内，先加**1ml**预冷的磷酸缓冲液，研磨成匀浆后再加**2ml**磷酸缓冲液研磨至匀浆，倒入离心管中，**8000rpm**离心**15min**，取上清即为酶抽提液。

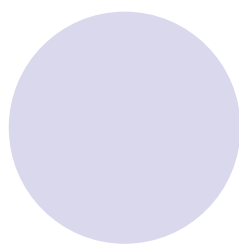
注意：冰上操作

(二) 转氨基反应

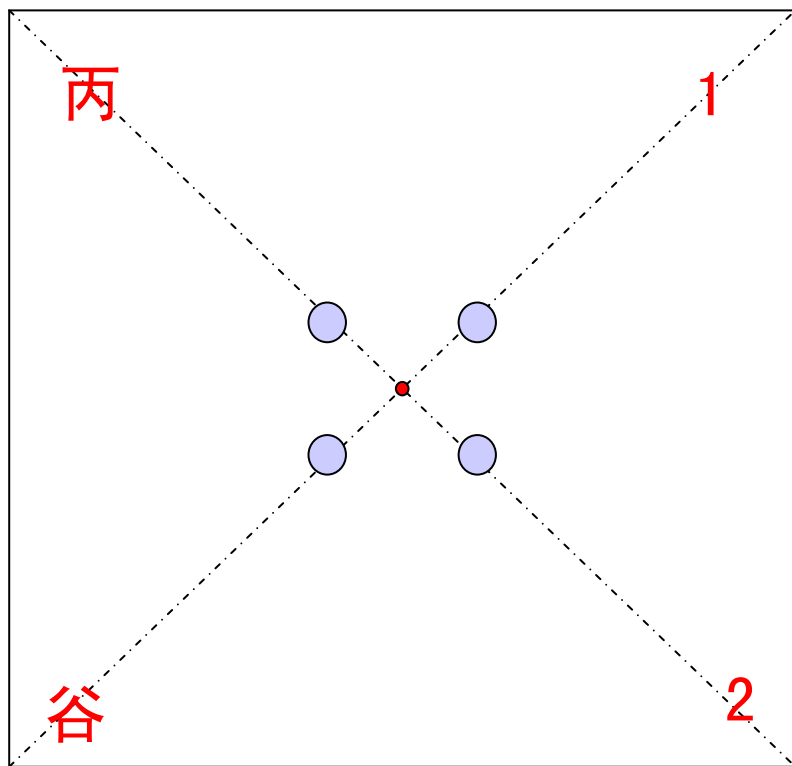
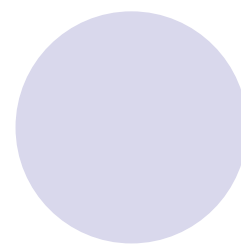
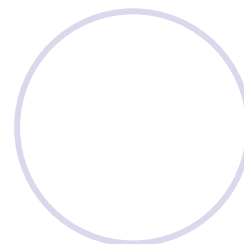
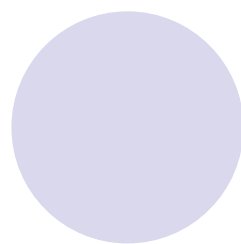


(三) 纸上层析法

- 1、戴手套取一张 $20 \times 20\text{cm}$ 滤纸，标号，做点样标记
- 2、毛细管加样：每个样品用一只毛细管。点样时，将毛细管口轻轻触到滤纸上，使每种溶液分别形成直径为 $2\text{-}3\text{mm}$ 的圆斑，每次点样后，吹风机吹干，再点下一次，重复3次，点样量应均匀相等。
- 3、展层2h：取一小培养皿，加入3ml水饱和酚，然后放入大培养皿中央。小滤纸沿纵轴捻成灯芯，穿过滤纸中心。



纸层析



滤纸条沿纵
轴捻成灯芯

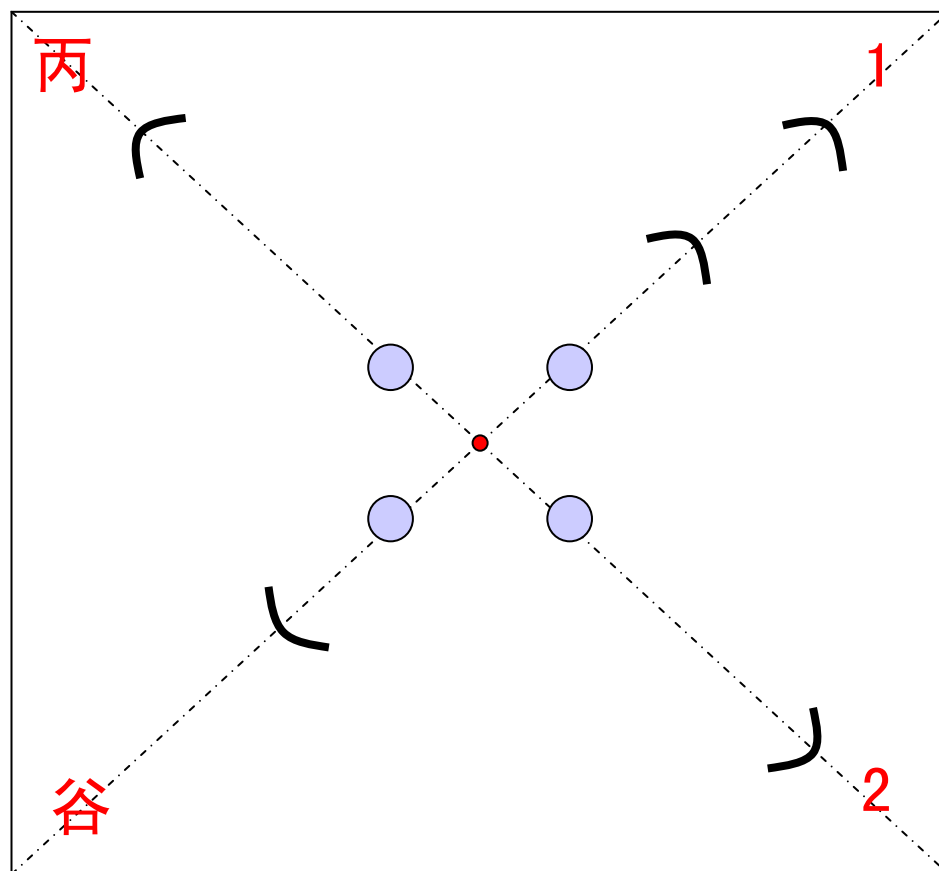


（四）茚三酮显色

- 现配0.1%茚三酮溶液100ml，置于平皿中
- 用0.1%茚三酮溶液均匀浸透，热风吹干。氨基酸和茚三酮产生兰紫色物质。
- 画出斑点位置，计算Rf值

$$Rf = \frac{\text{原点 to 层析点中心的距离}}{\text{原点 to 溶剂前沿的距离}}$$

茚三酮显色





注意事项

1. 为了防止滤纸被手上的汗液污染，应尽量在操作时带手套。
2. 重复点样时可用吹风机的冷风吹干样品，喷了茚三酮后的显色则要用热风吹干滤纸。