

# 血红蛋白综合实验的设计与实践

黄小花, 邓雅斌, 李东辉, 郑红花

(厦门大学医学院基础医学实验教学中心, 福建 厦门 361005)



**摘 要:** 为不断完善医学生物化学与分子生物学实验课程, 实现培养创新性人才的教学目标, 在本科生课程中设计以血红蛋白为实验对象, 通过蛋白提取、层析纯化、SDS-PAGE 电泳分离鉴定及血红蛋白与高铁血红蛋白分子吸收光谱的绘制等内容的医学生物化学综合性实验。教学实践结果表明: 该实验具有可行性, 学生完成情况良好; 适合本科生系统完整地学习蛋白提取、纯化、鉴定及功能的实验方法, 具有很强的综合性, 获得良好的教学效果。

**关键词:** 血红蛋白; 实验教学; 教学改革

中图分类号: G482 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1672-4305.2016.02.005

## Design and practice of comprehensive experiments based on hemoglobin

HUANG Xiao-hua, DENG Ya-bin, LI Dong-hui, ZHENG hong-hua

(Basic Medical Experimental Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** To consummate the construction of medical biochemistry experimental course and cultivate of innovative talents, this study takes the hemoglobin as experimental subject to design a set of integrated biochemical experiments, including extraction, gel chromatography purification, SDS-PAGE separation and acquirement of absorption spectra. The teaching practice results show that the designed experiments are feasible and the teaching effect is encouraging. The comprehensive experiments are suitable for the undergraduates to study the experimental methods on protein purification and identification.

**Key words:** hemoglobin; experimental teaching; teaching reform

血红蛋白(hemoglobin, Hb)是红细胞中起运输氧气作用的重要蛋白质,分子量约为62kDa,其核心基团是血红素,称为辅基。血红蛋白除运输和储存氧气外还具有调节pH值、控制一氧化氮水平、参与免疫反应、结合并运输硫化物等多种生物学功能<sup>[1-4]</sup>。

随着现代实验技术的发展与多学科的交叉融合,创新性复合型人才的培养逐渐成为研究型大学教育的发展方向。这一新形势对生物化学与分子生物学实验课程提出更高的要求。实验课程的设计必须理论与实践并重,既要联系理论课程,又要突出学生对基本实验技能的掌握、科学思维方式的训练以及观察、分析、解决问题能力的培养<sup>[5-6]</sup>。实验教学

是培养学生动手能力、严谨规范的科学态度、形成科研意识和提高综合素质的重要措施。为了让学生在本科阶段就能感受科研气氛,从而培养学生的科研意识,我们选择血红蛋白作为“主线分子”<sup>[7]</sup>,设计包括血红蛋白的提取、柱层析纯化、SDS凝胶电泳分离鉴定、血红蛋白与高铁血红蛋白分子吸收光谱的绘制比较等内容的医学生物化学综合性实验。更进一步地,积极鼓励并帮助学生结合所学的实验知识与实验技术自主地设计、开展创新性实验,深入地分析探讨实验现象,得出科学结论。通过系统的综合性实验,能很好地培养学生思考、分析和解决问题的能力,了解科学研究的过程和特点,形成科学的思维方式。

### 1 实验仪器与试剂

#### 1.1 实验仪器

台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有

基金项目:福建省科技重点项目(项目编号:2012Y0081)。

通讯作者:郑红花(1975-),女,湖北人,博士,副教授,主要研究方向为生物化学与分子生物学。

限公司);磁力搅拌器(金坛市晶玻实验厂);玻璃凝胶柱(内径1cm长40cm)、紫外检测仪、部分自动收集器(上海青浦沪西仪器厂)、无纸记录仪(厦门恩莱自动化科技有限公司);凝胶成像仪、小型垂直板电泳槽及电源(Tanon Science & Technology Co. Ltd);脱色摇床(海门其林贝尔仪器制造有限公司);T6紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

## 1.2 实验试剂

实验动物(兔)购自厦门大学实验动物中心;透析袋购自上海金穗生物科技有限公司;蛋白质相对分子质量标准购自Thermo scientific公司;葡聚糖凝胶G-75购自北京瑞达恒辉科技有限公司;肝素钠、Tris、glycine、高铁氰化钾、磷酸二氢钠、考马斯亮蓝G250等购自国药试剂有限公司;一氧化碳购自福州新航工业气体有限公司。

## 2 实验方法

### 2.1 红细胞裂解提取血红蛋白

采集兔血加抗凝剂并及时分离红细胞(1500r/min离心5min),去上层透明的黄色血浆,下层暗红色的红细胞液体倒入烧杯,加入五倍体积的生理盐水缓慢匀速搅拌使溶液体系混匀,离心(1500r/min离心5min)、去上层,重复洗涤数次,直至上清液不再呈现黄色,表明红细胞已洗涤干净;在洗涤好的红细胞中加蒸馏水至原血液的体积,再加40%体积的甲苯,置于磁力搅拌器上搅拌10min。在蒸馏水和甲苯的作用下,红细胞破裂释放出血红蛋白;将上述混合液移至离心管中,离心(5000r/min离心10min),注意观察溶液的分层,对离心管中的溶液进行过滤,除去沉淀物,滤液于分液漏斗中静置,分出下层的红色透明液体。

### 2.2 凝胶层析分离纯化血红蛋白

(1)凝胶的处理:干胶颗粒悬浮于5~10倍量洗脱液中充分溶胀,之后将极细的小颗粒倾泻除去。

(2)装柱:先关闭层析柱出水口,向柱管内加入约1/3柱容积洗脱液,将凝胶液连续倾入柱中,使其自然沉降,待凝胶沉降约2~3cm后,打开柱的出口,使凝胶继续沉集,待沉集的胶面上升至距柱顶端约5cm处时停止,关闭出水口。

(3)凝胶柱的平衡:通过2~3倍柱床容积的洗脱液使柱床稳定,在凝胶表面上放一片滤纸,以防加样时凝胶被冲起,并保持胶面上有一段液体。

(4)加样:打开柱上端的螺丝帽塞子,吸出层析柱中多余液体直至与胶面相切。沿管壁将透析后的

血红蛋白样品溶液0.5mL小心加到凝胶床面上,打开下口夹子,使样品溶液流入柱内,同时收集流出液,当样品溶液流至与胶面相切时,夹紧下口夹子。用1mL洗脱液冲洗管壁2次。最后加入3~4mL洗脱液于凝胶上,旋紧上口螺丝帽,柱进水口连通恒压瓶,柱出水口与核酸蛋白质检测仪比色池进液口相连,比色池出液口与自动部分收集器相连。

(5)洗脱:打开上、下进出口夹子,用0.1mol/L、pH7.0磷酸缓冲液,以每管3mL/10min流速洗脱,用自动部分收集器收集流出液。

(6)收集血红蛋白:收集红色最深即吸收高峰的洗脱液,即为经凝胶过滤柱层析纯化的血红蛋白<sup>[8]</sup>。

### 2.3 SDS-PAGE 凝胶电泳血红蛋白

配制5%的浓缩胶和12%的分离胶,上样后样品进入浓缩胶时的电压为80V;待样品进入分离胶后,将电压调为120V,待指示染料迁移至下沿约1cm处停止电泳;电泳完毕,将凝胶取出,考马斯亮蓝染色,摇床温和振荡,约染色1h;染色完毕后,倒去染色液,用蒸馏水漂洗数次凝胶,再加入脱色液,其间更换数次脱色液,直到凝胶的蓝色背景褪去、蛋白质条带清晰为止<sup>[9-10]</sup>。

### 2.4 血红蛋白与高铁血红蛋白分子吸收光谱的绘制

(1)氧合血红蛋白(oxyhemoglobin, HbO<sub>2</sub>)溶液:取血红蛋白溶液100μL,去离子水定容至3.0mL。

(2)碳氧血红蛋白(carboxyhemoglobin, COHb)溶液:取血红蛋白溶液100μL,去离子水定容至3.0mL,再加辛醇1滴,摇匀,用细管通入CO 2~3min,溶液呈樱桃红色。

(3)高铁血红蛋白(methemoglobin, MHb)溶液:取血红蛋白溶液100μL,去离子水定容至3.0mL,加高铁氰化钾7μL,混匀溶液呈棕色,尽可能快地进行比色测定。以蒸馏水作为空白,在波长470~680nm范围内,每隔3nm测吸光度一次。在接近吸收高峰时,每隔2nm测吸光度一次。每测一次波长,必须重新校正零点,再测吸光度。以入射光波长为横坐标,各相应的吸光度为纵坐标,分别绘制各种物质的吸收光谱曲线<sup>[11]</sup>。

## 3 实验结果与分析

本次实验是综合性、研究性的教学实验,由本科生为主体,综合一系列实验而最终获得实验结果。实验操作存在个体差异,综合全班学生完成实验情况分析,95%学生都可顺利完成实验得出比较理想

的实验结果 绝大多数同学的实验结果如下。

### 3.1 提取纯化血红蛋白层析图谱

将提取的血红蛋白,用凝胶 SephadexG-75 层析纯化,层析洗脱后有红色的洗脱峰流出,层析后得到了较纯的血红蛋白(见图1)。

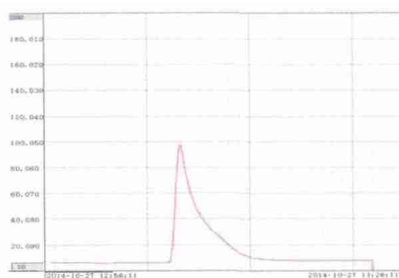


图1 血红蛋白的层析图谱

### 3.2 利用电泳图谱计算血红蛋白的相对分子质量

利用 SDS-PAGE 凝胶电泳对血红蛋白进行分离以及考马斯亮蓝 G250 染色,通过蛋白质条带观察到层析纯化的血红蛋白效果不错,并计算得到血红蛋白的相对分子量约为 62.0kDa,与理论值相符合(见图2)。

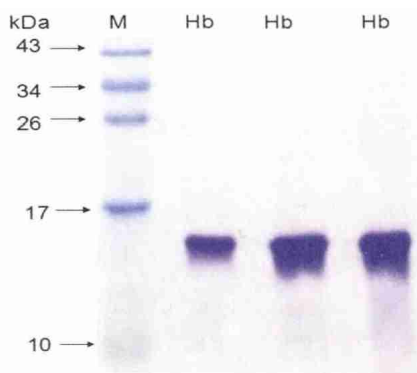


图2 纯化的血红蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

### 3.3 分光光度计绘制吸收光谱,标出吸收峰

氧合血红蛋白(红色)、碳氧血红蛋白(樱桃红色)以及高铁血红蛋白(棕色)三种物质的组成成分不同,其分子结构也不同,实验安排分别绘制各自的吸收光谱曲线。从吸收光谱曲线(图3)可知,氧合血红蛋白在 578nm、540nm,碳氧血红蛋白在 572nm、535nm,高铁血红蛋白在 630nm、578nm、540nm、500nm 处有吸收峰,与文献报道的氧合血红蛋白、碳氧血红蛋白、高铁血红蛋白吸收光谱曲线基本相同。

## 4 教学意义

从课程改革建设和本科生教学实践的结果看,此次综合性实验设计获得了良好的教学效果,表明实验教学改革是成功的。通过该综合性实验的教学探索,为课程的改革建设打下基础,使学生获得了较

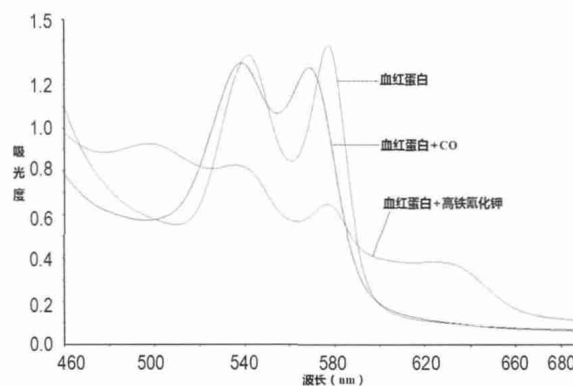


图3 血红蛋白与高铁血红蛋白的分子吸收光谱

全面的锻炼,激发了学生的学习积极性和创造性,有助于培养学生科学思维方式和团队合作精神。

### 4.1 强化理论知识,锻炼操作技能

本实验涵盖了血红蛋白的提取、层析纯化,SDS-PAGE 分离鉴定血红蛋白以及血红蛋白、高铁血红蛋白分子吸收光谱的绘制,是学习蛋白提取、纯化和鉴定的综合性实验,内容完整、层层递进,是一个很好的综合性、研究性实验。

学生通过实践上述设计的一系列实验内容,经历了一个相对完整、独立的科研实验过程,有助于树立科学思维和严谨态度、锻炼学生独立思考、培养学生的创新能力。从样品的获得到最后实验结果的分析,该实验设计包含多个基本实验,学生通过逐一完成每个实验,学习了实验基本原理与实验技术基本原理,掌握实验操作技能。既培养学生动手操作能力、科研分析和解决问题能力,也充分调动学生的主动性、积极性和创造性。

### 4.2 积累教学资源,完善课程建设

实验课应系统地讲解该课程的基本技术及其所依托的基础理论,这有利于学生从整体上认识生物化学实验和相关的技术,进而重视实验课,提高实验技能。将实验技术应用于科研,其操作性相对较强,但要使其成为实验课的教学实验,需要经过不断的摸索和改进,使之适合教学实验的特点<sup>[12-13]</sup>。本综合性实验设计内容包含离心、电泳、层析和分光光度分析法这四大生物化学基本实验技术,通过实验教学实践,为医学生物化学实验的综合性及探索性实验项目的开展提供了十分有力的依据,逐步完善课程建设。

## 5 结语

随着高等教育的发展和医学“生物化学实验”课程教学改革的逐步深入,我们看到课程建设存在的不足。不仅需要领导的支持,更需要课程组全体

教师的共同努力,合理地设置课程,既要考虑与理论课的有机结合,又要兼顾新的技术和方法,改变排课方式,保证综合性、创新性实验的开展。该综合实验适应新形势下实验教学的要求,对现有实验内容进行改革和创新,为医学“生物化学实验”课开展具有自我特色和创新的综合性、研究性实验奠定了基础。唯有经过不懈的努力和持久开拓,才能实现医学生物化学实验课程的日臻完善。

#### 参考文献(References):

- [1] Hausladen A, Grow A, Stamler J S. Irosative stress: Metabolic pathway involving the flavohemoglobin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(24): 14100-14105.
- [2] 樊廷俊,徐彬,荆昭,等. 动物血红蛋白结构与功能的研究进展[J]. 山东大学学报(理学版), 2011, 46(7): 1-5.
- [3] Antonini E, Brunori M. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands [M]. Amsterdam: North-Holland, 1971: 436.
- [4] Perutz M F, Steinrauf L K, Stockell A, et al. Chemical and crystallographic study of the two fractions of adult horse haemoglobin [J]. J Molecular Biology, 1959, 1(4-5): 402-404.
- [5] 王继红,叶芳. 医学院校生物化学与分子生物学实验教学改革[J]. 实验室研究与探索, 2011, 30(7): 288-290.

- [6] 吉爱国. 综合性实验教学模式的探讨与实践[J]. 实验室研究与探索, 2007, 26(1): 94-96.
- [7] 李东辉,黄萍,黄小花,等. 一个分子穿起一门实验—医学生物化学实验改革探索[J]. 厦门大学学报(哲学社会科学版), 2011(教学研究专辑): 64-67.
- [8] 李星,曾嵘,金春华,等. 人胎儿血红蛋白的纯化及免疫活性鉴定[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(12): 1363-1365.
- [9] 郝福英,周先碗. 生物化学与分子生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009.
- [10] 王青松,胡晓倩. 绿色荧光蛋白的原核表达和纯化及鉴定的实验设计与实践[J]. 实验技术与管理, 2014, 31(5): 38-41.
- [11] 陈正炎. 临床生物化学和生物化学检验指导[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [12] 许伟榕,程枫,沈文红,等. 生物化学与分子生物学实验教学方法改革初探[J]. 实验室研究与探索, 2010, 29(11): 125-127.
- [13] 靳溪,薛秀花,李洁,等. 实时荧光定量 PCR 技术在发育生物学实验[J]. 实验室研究与探索, 2014, 33(7): 214-217.

收稿日期: 2015-06-19

修改日期: 2015-08-28

作者简介: 黄小花(1976-),女,福建三明人,硕士,实验师,主要研究方向为生物化学与分子生物学。

(上接第15页)

### 3 结语

通过改变引发剂、乳化剂用量分组安排学生进行苯乙烯乳液聚合实验,在实验前向学生提出问题,“引发剂、乳化剂用量会对产物产生哪些影响?”引导学生从聚合机理开始思考,并强调每组实验结果对最终实验结论的重要性,让学生在实验的同时,有独立思考的过程,且有探索实验原理和调控聚合产物结构的积极性,最终通过测试手段对聚合产物的性能进行分析验证,加深学生对聚合机理及组分作用的理解和认识,实验后学生在实验报告中展开积极的讨论,均表示分组进行实验的方法既能锻炼大家实验动手的能力,又能在实验中获得更多的知识积累,教学效果良好。

#### 参考文献(References):

- [1] 潘祖仁. 高分子化学[M]. 2版,北京: 化学工业出版社, 1997.
- [2] 朱亚辉,蔡文溪,俞丽珍,等. 一例典型高分子化学实验的综合性与创新化[J]. 化工高等教育, 2012(2): 55-58.

- [3] 李君,董丙祥,刘正平,等. 对大学高分子化学实验中悬浮聚合实验的改进[J]. 高分子材料科学与工程, 2010, 26(3): 172-174.
- [4] 刘宁,李田,王小丹,等. <高分子化学实验>课程的教学探讨[J]. 高分子通报, 2011(7): 110-112.
- [5] 潘祖仁. 高分子化学[M]. 5版,北京: 化学工业出版社, 2011.
- [6] 傅和青,黄洪,陈焕钦. 引发剂及其对乳液聚合的影响[J]. 合成材料老化与应用, 2004, 33(3): 39-41.
- [7] 王竹青,葛圣松,邵谦. 乳液聚合中乳胶粒粒径大小及分布的影响因素[J]. 胶体与聚合物, 2008, 26(4): 28-31.
- [8] 孟勇,翁志学,单国荣,等. 聚硅氧烷/丙烯酸酯核/壳复合胶乳的粒径分布与成核机理[J]. 高分子学报, 2004(3): 367-371.
- [9] 张春庆,李战胜,唐萍. 高分子化学与物理实验[M]. 大连: 大连理工大学出版社, 2014.

收稿日期: 2015-06-04

修改日期: 2015-07-17

作者简介: 唐萍(1978-),女,辽宁大连人,硕士,工程师,主要从事高分子化学和物理实验教学及实验室管理工作。

信息名称: 教育部关于印发《教育部重点实验室建设与运行管理办法》和《教育部重点实验室评估规则(2015年修订)》的通知 教技[2015]3号。

——[http://www.moe.gov.cn/srcsite/A16/s3338/201509/t20150907\\_206020.htm](http://www.moe.gov.cn/srcsite/A16/s3338/201509/t20150907_206020.htm)