

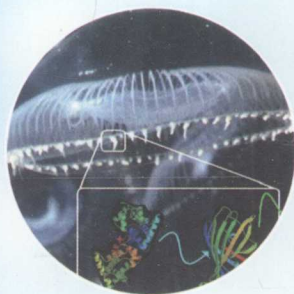
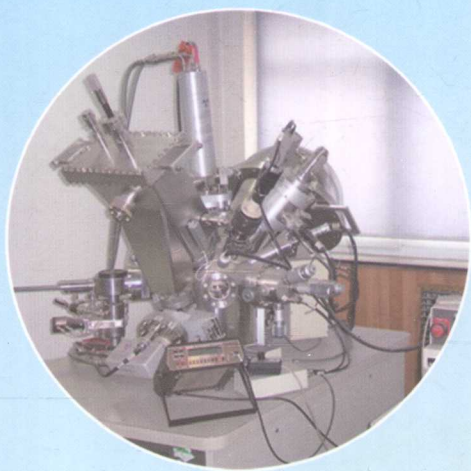


普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套教材

全国高等农林院校“十一五”规划教材

生物化学 实验技术

黄卓烈 主编



 中国农业出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套教材
全国高等农林院校“十一五”规划教材

生物化学实验技术

黄卓烈 主编

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验技术/黄卓烈主编. —北京: 中国农业出版社, 2010. 2

普通高等教育“十一五”国家级规划教材配套教材.
全国高等农林院校“十一五”规划教材

ISBN 978-7-109-14349-4

I. ①生… II. ①黄… III. ①生物化学—实验—高等学校—教材 IV. ①Q5—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 016930 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100125)

责任编辑 李国忠

北京通州皇家印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

2010 年 2 月第 1 版

2012 年 2 月北京第 2 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 18

字数: 433 千字

定价: 27.50 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

前 言

生物化学是化学与生物学的边缘学科。生物化学实验是学习生物化学的学生必修的课程。国内许多高等学校都非常重视生物化学实验课程的教学,很多学校已经将生物化学实验作为一门独立的课程来开设。在进行验证性实验教学的基础上,纷纷开出综合性实验。有条件的学校,还让学生动手设计性实验。在这种教学改革不断深入的形势下,编写一本实用的生物化学实验教材显得非常重要。本教材就是在这种形势的推动下,由多位教师共同努力编写完成的。

本教材内容分为两大部分。第一篇是生物化学实验技术概论,扼要介绍了生物化学制备的方法、生物化学分离方法和生物化学分析方法。第二篇是生物化学实验部分,其实验内容包括糖、脂类、氨基酸和蛋白质、酶、核苷酸和核酸、维生素、新陈代谢等方面的验证性实验,共有42个实验。实验内容深入浅出、可操作性较强,以便引导学生打好生物化学实验的工作基础,巩固生物化学的理论知识。在验证性实验的基础上,本教材编写了综合性实验19个,以便在开设综合性实验时选用,旨在培养学生的独立的操作能力和动手能力。由于生物化学与分子生物学密不可分,本教材还设置了基础分子生物学一章,安排了8个实验,以便在开设分子生物学实验时选用。本教材在编写中,融入了多位教师长期参加实验教学的经验。

本教材由黄卓烈主编,负责制定编写大纲,对全书进行统稿和全面修改,并负责第一章、第四章和实验十七的编写。巫光宏和何平担任本教材的副主编。巫光宏负责第二章第二节和实验四十三至实验五十六的编写。何平负责第三章和实验五十七的编写;赵赣负责实验二十至实验二十三的编写。实验十八和实验十九由黄卓烈和赵赣编写。詹福建负责第二章第一节和第九章的编写,并收集附录的内容。王玉琪负责第二章第四节、实验五十八、实验五十九及实验六十六至实验六十九的编写。赵利锋负责第八章的编写。朱国辉负责实验六十至实验六十五的编写。张东方负责第十章的编写。初志战负责第五章的编写。许可负责第六章的编写。第二章第三节由詹福建、巫光宏、何平、赵利锋、王玉

琪和朱国辉共同编写。

在编写过程中,各位作者参考了大量的文献,在主要参考文献中恕未能全部列出,在此,对原作者表示诚挚的谢忱。华南农业大学生命科学学院刘伟教授、华南农业大学基础课实验中心崔大方教授给以巨大的关心和支持。中国农业出版社高等教育教材出版中心给予了悉心指导。在此,一并表示衷心的感谢!

生物化学发展异常迅速,新的技术、新的方法不断涌现。由于编写时间仓促,加上作者水平有限,本教材难免有错误之处。诚恳希望各位专家、各位老师、各位同学提出宝贵意见。

编者

2009年10月

内 容 提 要

生物化学实验技术是生物类及相关学科学生不可缺少的课程。本书内容分为两篇。第一篇介绍生物化学实验技术概论,内容包括生物化学制备方法、生物化学分离方法和生物化学分析方法。第二篇是生物化学实验,内容包括糖类、脂类、氨基酸和蛋白质、酶、核苷酸和核酸、维生素、新陈代谢等共42个验证性实验。还根据高等学校教学改革的需要,本教材编写了综合性实验19个。这些综合性实验的开设,有利于培养学生的综合动手能力。此外,本教材还编写了基础分子生物学实验一章,包括8个实验,以便有关单位开设分子生物学实验时使用。书后还附有生化实验室常用的各种数据表格,供在使用中随时查阅。

本书内容丰富,可作为高等农林院校、高等师范院校等相关专业本科生的生物化学实验教材,也可供有关专业的研究生、高校教师 and 科技人员参考。

目 录

前言

第一篇 生物化学实验技术概论

第一章 生物化学制备方法	3
第一节 生物化学制备方法的特点	3
第二节 溶剂提取法	4
第三节 沉淀法	6
第四节 浓缩与干燥	8
第五节 超临界流体萃取	9
第六节 萃取与相分离	10
第七节 结晶	11
第二章 生物化学分离方法	13
第一节 离心技术	13
第二节 电泳技术	20
第三节 层析技术	40
第四节 膜分离技术简介	50
第三章 生物化学分析方法	52
第一节 质量分析法	52
第二节 滴定分析法	53
第三节 分光光度法	55

第二篇 生物化学实验

第四章 糖类	61
实验一 植物组织中总糖和还原糖含量的测定——3,5-二硝基水杨酸法	61
实验二 血糖的定量测定——Folin - Wu 法	64
实验三 肝糖原的提取和鉴定	66
实验四 蒽酮比色定糖法	68

实验五 粗纤维的测定——酸性洗涤剂法	71
第五章 脂类	73
实验六 植物叶片在衰老过程中过氧化脂质含量的变化	73
实验七 血清胆固醇含量的测定——磷硫铁法	74
实验八 血清甘油三酯含量的测定——乙酰丙酮显色法	76
实验九 血清中游离脂肪酸含量的测定	79
第六章 氨基酸和蛋白质	82
实验十 甲醛滴定法测定氨基酸含量	82
实验十一 双缩脲法测定蛋白质的浓度	84
实验十二 考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质的含量	86
实验十三 Folin-酚试剂法蛋白质含量测定	88
实验十四 紫外吸收法测定蛋白质含量	90
实验十五 凝胶层析法分离血红蛋白	92
实验十六 血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳	95
第七章 酶	98
实验十七 影响酶促反应速度的因素	98
实验十八 淀粉酶活力的测定	102
实验十九 过氧化氢酶活力的测定	105
实验二十 植酸酶活性的测定	108
实验二十一 多酚氧化酶活性的测定	110
实验二十二 蛋白酶活力的测定	112
实验二十三 超氧化物歧化酶的分离提取	115
第八章 核苷酸和核酸	119
实验二十四 醋酸纤维素薄膜电泳分离核苷酸	119
实验二十五 SDS 法从动物组织中提取 DNA	121
实验二十六 CTAB 法提取植物组织中的 DNA	122
实验二十七 浓盐法制备小牛胸腺 DNA	125
实验二十八 植物组织中 DNA 的制备	127
实验二十九 Trizol 法制备动物肝脏 RNA	129
实验三十 浓盐法提取酵母核糖核酸	130
实验三十一 稀碱法提取酵母核糖核酸	132
实验三十二 紫外吸收法测定核酸含量	133
实验三十三 定磷法测定核酸含量	135
实验三十四 二苯胺法测定 DNA 含量	138
实验三十五 地衣酚法测定 RNA 含量	140

第九章 维生素	143
实验三十六 维生素 A 的定性测定	143
实验三十七 维生素 B ₁ 的定性测定	144
实验三十八 维生素 B ₂ 的定性测定	146
实验三十九 维生素 C 的含量测定——2,6-二氯酚靛酚滴定法	148
第十章 新陈代谢	152
实验四十 糖酵解中间产物的鉴定	152
实验四十一 脂肪酸 β 氧化——酮体的生成和测定	154
实验四十二 转氨酶活性的测定	157
第十一章 综合性实验	160
实验四十三 植物过氧化物酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳	160
实验四十四 胃蛋白酶在水溶液和有机溶剂中的动力学测定	163
实验四十五 菠萝蛋白酶的提取、初步纯化及活性测定	169
实验四十六 Sephadex G-75 分离纯化菠萝蛋白酶	173
实验四十七 SDS-PAGE 测定纯化的菠萝蛋白酶分子质量	178
实验四十八 酵母蔗糖酶的提取及比活性的测定	183
实验四十九 离子交换柱层析技术分离纯化蔗糖酶	188
实验五十 蔗糖酶糖蛋白电泳技术	194
实验五十一 植物胰蛋白酶抑制剂的提取及活性测定	198
实验五十二 胰蛋白酶抑制剂的明胶-聚丙烯酰胺凝胶电泳	203
实验五十三 动物组织 LDH 同工酶聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳	206
实验五十四 动物组织 LDH 同工酶聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳	211
实验五十五 3-磷酸甘油脱氢酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳	214
实验五十六 等电聚焦法测定蛋白质的等电点	218
实验五十七 尼龙固定化木瓜蛋白酶	222
实验五十八 蛋白质双向凝胶电泳	225
实验五十九 Western 免疫印迹	229
实验六十 PCR 法克隆植物基因组 DNA 目的基因	232
实验六十一 植物组织基因组 RNA 的提取及检测	237
第十二章 基础分子生物学实验	241
实验六十二 质粒 DNA 的分离和纯化	241
实验六十三 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA	243
实验六十四 限制性核酸内切酶酶切 DNA	244
实验六十五 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化	245
实验六十六 目的基因的回收	247
实验六十七 DNA 分子的体外重组	249

实验六十八 菌落 PCR 法筛选阳性重组子	250
实验六十九 外源蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 检测	252

附 录

一、一般化学试剂的分级	256
二、实验室常用酸碱的相对密度和浓度	256
三、常用酸碱指示剂	257
四、常用缓冲溶液的配制方法	257
五、pH 计标准缓冲液的配制	263
六、不同温度时标准缓冲液的 pH	264
七、硫酸铵饱和度的常用表	264
八、层析法常用数据表	266
九、某些蛋白质的物理性质	270
十、常见蛋白质等电点参考值 (pH)	271
十一、化学元素的相对原子质量表	272
十二、薄层层析分离各类物质常用的展层溶剂	273
十三、各类物质常用的薄层显色剂	275
十四、离心机转子的转速与相对离心力间的换算关系	275
主要参考文献	277

第一篇

生物化学实验技术概论

第一章 生物化学制备方法

第一节 生物化学制备方法的特点

生物细胞是一个非常复杂的系统。在这个系统中包含有各种各样的有机物质。这些物质有些是大分子化合物，有些是小分子化合物。这些物质有些在细胞中含量很高，有些物质在细胞内的含量很低，有些甚至只是痕量的。生物化学研究的任务之一，就是要从细胞中把各种各样的物质提取出来，并将之分离和纯化，以便对这些物质进行详细研究，并进一步开发利用。

生物化学制备就是从生物材料中获得某一种成分的过程。研究和掌握生物化学制备技术是生物化学的重要任务。这些制备技术的迅速发展为生物化学工程和生物制药打下坚实的基础。尽管有机化学和无机化学的制备技术得到了飞速发展，但是，这些非常有用的制备技术不一定适用于生物化学。因此，在生物化学上，要发展独特的制备技术。

与化学制备技术比较起来，生物化学制备技术具有以下主要特点。

1. 可变性 由于生物体是一个活体，其化学组成非常复杂，因此在对其中某种物质进行提取和分离时，这种特定的被分离物质不是一成不变的，而是处于不断的变化中。

2. 含量变化大 在生物体内，有些化合物含量非常丰富，较容易提取和分离；但有些物质含量很低，提取分离就十分困难。例如，动物体内的某种激素、某种抗体、某种生长因子等，其含量都非常低。若要提取和分离这些物质，就必需使用大量的生物材料才能得到少量的目标产物。相反，生物体内的蛋白质含量就非常高，提取就容易得多。

3. 容易失活 生物体内的许多物质是有生物活性的，例如蛋白质、酶、核酸、激素等。这些物质在活体细胞内活性较高。但在提取分离过程中，一旦离开活体，这些物质的活性有可能下降，甚至完全失去活性。因此，在提取分离这些物质时，就必须采用温和的条件，尽量保持其生物活性。

4. 重复性差 生物物质的提取一般都在水溶液或有机溶剂中进行。在提取分离过程中，很多因素都会影响生物物质的提取。例如，温度、pH、离子强度、抑制物质、激活物质、金属离子等，都是影响生物化学制备的重要因素。为了使某种物质制备有较好的重复性，必须严格规定使用的材料、提取的方法、制备条件、使用的试剂等。尽管如此，其重复性还是很差。

5. 均一性评价方法不同 与有机或无机化学物质制备不同，生物化学物质制备的纯度要求有其独特的地方。生物化学制备的物质一般难以达到有机化学和无机化学所要求的纯度。因此，生物化学制备物质的均一性与化学上的纯度要求不能很好吻合。例如，化学上制备一种小分子有机物（如草酸钾）可以达到 100% 的纯度，但生物化学上制备一种蛋白质就很难达到 100% 的纯度。因此，生物物质的均一性评价方法与化学上有明显不同。

由于生物化学制备具有独特之处，因而在制备时必须根据被分离物质的特点、混合物的差别而设计不同的方法。可以说，生化物质制备的难度要比化学物质的制备大得多。

第二节 溶剂提取法

在生物化学物质制备中,溶剂提取法占很重要的地位。溶剂提取法就是利用溶剂的溶解能力将某种特定物质从生物细胞中转移出来的操作技术。这种技术在中药有效成分的提取等方面应用较多。从原理上来考虑,凡能够影响溶质在溶剂中的溶解度的因素都对溶剂提取法有重要影响。总的来说,制约溶剂提取法的因素有下列几种。

一、溶剂的性质

某种物质在某种溶剂中的溶解度大小直接影响溶剂的提取效率。溶质在溶剂中的溶解有下列规律。

1. 相似相溶规律 这是一个较为普遍的规律。例如,极性的物质容易溶解到极性的溶剂中,非极性物质容易溶解到非极性溶剂中。例如,单糖的分子含有较多羟基,羟基是极性的,因而单糖容易溶解在极性的水里;非极性的维生素 A 容易溶解在非极性的有机溶剂里。但是也有例外。例如,淀粉是由单糖构成的,分子中含有大量的羟基,按相似相溶规律,淀粉应该很容易溶解在水中,但实际上淀粉却难溶解在水里。

2. 酸碱物质互溶规律 酸性的物质较容易溶解在碱性溶剂中,而碱性物质也容易溶解在酸性溶剂中。

3. 介电常数对溶解度的影响 溶剂的极性大小可用介电常数表示。根据库仑定律,介电常数等于在真空中的静电力与在该介质中的静电力之比。介电常数随着在介质中分子的偶极矩的增加而增加。水是最常用的溶剂,其极性非常大,其介电常数达到 80.103。对于某种易溶于水的物质来说,溶剂的介电常数越小,就越难溶解这种物质。部分溶剂的介电常数见表 1-1。

表 1-1 部分溶剂的介电常数

溶 剂	介电常数	溶 剂	介电常数
戊烷	1.844 (20)	辛烷	1.948 (25)
己烷	1.890 (20)	环己烷	2.052 (20)
庚烷	1.924 (25)	丁醇	17.1 (25)
四氯化碳	2.238 (20)	环己酮	18.3 (20)
甲苯	2.24 (20)	异丙醇	18.3 (25)
邻二甲苯	2.266 (20)	丁酮	18.51 (25)
对二甲苯	2.270 (20)	丙酮	20.70 (25)
苯	2.283 (20)	液氨	22 (-34)
间二甲苯	2.374 (20)	乙醇	23.8 (25)
二硫化碳	2.641 (20)	丙腈	29.7 (20)
苯酚	2.94 (20)	二甘醇	31.69 (20)
三氯乙烯	3.409 (20)	1,2-丙二醇	32.0 (20)
乙醚	4.197 (20)	甲醇	33.1 (25)
氯仿	4.90 (20)	硝基苯	34.82 (25)
乙酸丁酯	5.01 (19)	硝基甲烷	35.87 (30)

(续)

溶 剂	介电常数	溶 剂	介电常数
乙酸乙酯	6.02 (20)	N,N-二甲基甲酰胺	36.71 (25)
乙酸	6.15 (20)	乙腈	37.5 (20)
1,1,1-三氯乙烷	7.53 (20)	N,N-二甲基乙酰胺	37.78 (25)
四氢呋喃	7.58 (25)	乙二醇	38.66 (20)
喹啉	8.704 (25)	甘油	42.5 (25)
二氯甲烷	9.1 (20)	二甲基亚砜	48.9 (20)
甲胺	11.41 (-10)	乙酰胺	59 (83)
吡啶	12.3 (25)	水	80.103 (20)
乙二醇	12.9 (20)	甲酰胺	111.0 (20)
环己醇	15.0 (25)	N-甲基甲酰胺	182.4 (25)

注：括号内的数字为测定该物质介电常数的温度，单位为℃。

二、离子强度

离子强度对物质的溶解度有很重要的影响。离子强度用下式表示。

$$I=0.5\sum cz^2$$

式中， I 是离子强度； c 是离子的摩尔浓度； z 是离子的价数。

离子强度对物质溶解度有很大的影响。某些物质的溶解要求较高的离子强度，离子强度越高，溶解度越大。相反，另外一些物质溶解要求较低的离子强度，若离子强度越高，这些物质越难溶解。例如，DNA 核蛋白的溶解要求较高的离子强度，而 RNA 核蛋白的溶解就要求较低的离子强度。所以在提取 DNA 时，可以根据这个规律，把 DNA 核蛋白和 RNA 核蛋白分离。

三、溶液的 pH

溶液的 pH 对生物分子的溶解度有很大的影响。生物体有很多分子是两性分子，也就是在某种 pH 条件下，这些物质分子是带正电的；在另外一些 pH 条件下，这些分子又是带负电的；而在某一特定 pH 条件下，这些物质分子是不带电的。例如，蛋白质、氨基酸、核酸、酶等都具有这样的性质。一般来说，带电荷的分子易溶解在水里；当这些物质不带电时（处于等电点时），这些物质就不溶解在水里，而容易沉淀析出。

四、温度

温度也是影响物质溶解的重要因素。一般来说，温度升高可以提高物质的溶解度，但也不能千篇一律地采用这种方法。从中草药中提取某些有效成分时，可以采用升高温度的方法，以希望获得较高的目标物质产量。但是对于另外一些生化物质来说，提取就不能采用升高温度的方法。因为若温度升高到某种程度，这些生物化学物质就会变性失活。例如，提取蛋白质、酶、核酸等，都不能高温提取。相反，要采用低温条件提取，以便保持这些物质的

生物活性。

五、去垢剂

去垢剂分子的特点是具有两性，一般称为表面活性剂。它的一端具有亲水性，另一端具有疏水性。去垢剂对其他物质具有乳化、分散和增溶作用，使一些难溶的物质变成可溶。这些物质种类较多，基本上可以分为三大类。第一大类是阳离子型，第二大类是阴离子型，第三大类是中性类型。

1. 中性类型去垢剂 中性去垢剂又称为非离子表面活性剂。目前市面上见到的中性去垢剂种类不少。例如：①聚乙二醇类，如 PEG200；②多元醇类表面活性剂，如山梨醇、司盘类和吐温类；③聚氧乙烯脂肪醇醚，如苜蓿类、平平加类等；④聚氧乙烯烷基苯酚醚，如 Igepal CO、乳化剂 OP、Triton、Pluronic 等。中性去垢剂一般不会引起蛋白质的变性作用，因而可用于蛋白质、酶等提取。例如，提取生物膜上的内在蛋白，就得先用 Triton X-100 将膜脂溶解，把内在蛋白溶解出来以后再分离纯化。中性去垢剂作用后可通过 Sephadex LH-50 柱除去；也可直接上 DEAE-Sephadex 柱层析分离目的蛋白，不必先除掉去垢剂。

2. 阴离子去垢剂 常见的阴离子去垢剂有十二烷基硫酸钠和十二烷基磺酸钠。在提取核糖核酸和去氧核糖核酸时，可用十二烷基硫酸钠促进核蛋白从细胞中溶解，将核酸释放出来，并对核酸酶有一定抑制作用。

3. 阳离子去垢剂 市面上这类去垢剂也很多，如洁尔灭、新洁尔灭、克菌定、消毒净 (TMPB)、杜灭芬等。这类去垢剂一般多用于消毒灭菌，很少用于生物化学物质的提取。

此外，还有一些天然表面活性剂，例如各种树胶（阿拉伯胶、杏胶、桃胶、果胶）、明胶、皂苷、卵磷脂、豆磷脂、琼脂、海藻酸钠、酪蛋白、胆甾醇、胆酸类、多糖类（如环糊精）等，但较少用于辅助生物化学物质的提取。

第三节 沉淀法

在生物化学物质制备中，可将目标物质沉淀出来，并以其进行浓缩和部分纯化，这是经常使用的方法。各种物质的化学性质和物理性质不同，在对其沉淀时要灵活采用相应的方法。沉淀方法有多种，包括盐析、有机溶剂沉淀、非离子多聚物沉淀等。

一、盐析法

一般来说，蛋白质或酶在低盐浓度溶液中，其溶解度随盐浓度的升高而增加，这种现象称为盐溶 (salting in)。盐溶的原因是蛋白质分子之间及分子内部的极性基团有静电引力，少量盐离子的加入可加强离子间的相互作用，因而增加了溶解度。但当盐浓度继续升高时，蛋白质和酶的溶解度就会慢慢下降，直到最后析出。这种现象称为盐析 (salting out)。这是因为盐浓度增加到一定程度时，蛋白质表面的电荷大量被中和，蛋白质分子就互相聚合而沉淀析出。

盐析使用的盐一般是中性盐。中性盐种类不少，但在生物化学物质制备中，经常用来盐

析的有氯化钠和硫酸铵,其中,硫酸铵的使用又比氯化钠多。这是因为一方面硫酸铵的溶解度较大,另一方面硫酸铵溶解时受温度变化的影响较小。在用硫酸铵进行盐析时,硫酸铵的使用量一般用其饱和溶液的百分数来表示。不同蛋白质的沉淀要求不同饱和度的硫酸铵。因此,在一定饱和度的硫酸铵溶液中,相应的蛋白质被沉淀下来,其余的蛋白质还保留在溶液中。继续加大硫酸铵的饱和度,又有相应的蛋白质沉淀下来。这样分步进行盐析,就可以将混合物中不同的蛋白质分开,从而达到既得到浓缩又得到部分纯化的效果。

1. 使用硫酸铵盐析的注意事项 使用硫酸铵进行盐析时,要注意以下几点。

①要根据当时的温度情况,查阅硫酸铵饱和溶液的对照表(见本书的附录),计算好你所要求的某一个饱和度的硫酸铵用量。在一个饱和度时相应蛋白质被沉淀后,在剩下的溶液中继续添加硫酸铵使其达到另一个饱和度时,需要添加多少硫酸铵也要认真计算好。

②加入硫酸铵时,要分次缓慢加入溶液中,边加边搅拌让其溶解,千万不能将大量的硫酸铵一次性加入。

③每次到达一个饱和度后,一般要将溶液静置 30~60 min,让相应的蛋白质慢慢沉淀,然后离心收集,以提高相应蛋白的回收率。

2. 影响盐析的因素 影响盐析的因素也很多,主要有以下几个方面。

(1) 蛋白质浓度 蛋白质浓度过高过低都不利于盐析。一般将蛋白质浓度控制在 4%~7%。

(2) 离子强度 离子强度对盐析有决定性的影响。在一般情况下,离子强度越高,蛋白质的溶解度越差。不同蛋白质沉淀有不同的离子强度的要求。要从实践中不断摸索和了解某种蛋白质在不同离子强度的溶液中的表现。

(3) pH pH 对盐析效果有影响,一般选择在蛋白质的等电点附近进行盐析,这样容易将相应的蛋白质沉淀出来。

(4) 温度 盐析时温度对被分离的蛋白质影响不大,一般可以在室温下进行。但若有些酶对温度敏感时,则可以在 4℃ 下进行,以防止盐析过程长时间操作而导致目标产品变性失活。

二、有机溶剂沉淀法

有机溶剂沉淀法也是一种重要的生物化学制备方法。一般认为,有机溶剂的作用有两点:①有机溶剂能降低溶液的电离常数和介电常数,这样就会导致蛋白质的溶解度降低;②有机溶剂能破坏蛋白质分子的水化膜,使蛋白质分子不稳定而沉淀。

在使用有机溶剂进行沉淀时,有机溶剂应该能与水混溶。使用较多的有机溶剂是乙醇、甲醇、丙酮,还有二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、乙腈和 2-甲基-2,4-戊二醇等。例如,分离核酸、糖类、核苷酸等物质时常用乙醇来作为沉淀剂。

有机溶剂沉淀法的优点有:①此方法的分辨能力比盐析法高,也就是说,蛋白质或其他溶剂只在一个比较窄的有机溶剂浓度下沉淀;②所得到沉淀物质不需要脱盐,过滤较为容易。因此,在生物化学物质的制备中应用有机溶剂沉淀法比盐析法更加广泛。

但有机溶剂沉淀法也有其缺点,那就是对具有生物活性的大分子容易引起变性失活。若操作在低温条件下进行,可以降低生物分子的变性失活比例。由于这种原因,对蛋白质和酶