

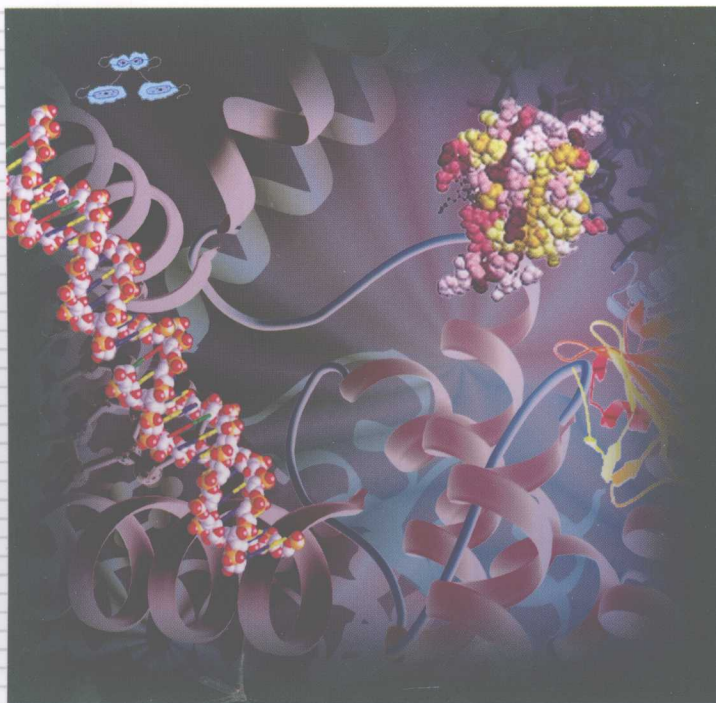
普通高等教育“十一五”规划教材

生物工程 生物技术系列

生物化学实验

(第二版)

(工科类专业适用)



董晓燕 主编



化学工业出版社

普通高等教育“十一五”规划教材

生物化学实验

(第二版)
(工科类专业适用)

董晓燕 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

本书重点介绍了适合高等院校相关工科专业学习的基础生物化学实验,并适当介绍了部分分子生物学及基因工程的常用实验内容。全书共四章,包括前言、生物化学实验的基本原理、33个生物化学实验和附录,教学实验部分包括实验的目的、原理和基本操作方法,并在各教学实验中附有思考题,以便于进一步理解实验教学内容。

本书主要适用于工科高等院校中与生物相关的非生物类专业本科生和研究生的生化实验课教材,也可作为从事生物技术科学研究和教学的科技人员和教育工作者的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验/董晓燕主编. —2版. —北京:化学工业出版社, 2008.3
普通高等教育“十一五”规划教材
ISBN 978-7-122-02264-6

I. 生… II. 董… III. 生物化学-实验-高等学校-教材 IV. Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 025883 号

责任编辑:赵玉清

装帧设计:韩飞

责任校对:蒋宇

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印刷:北京市振南印刷有限责任公司

装订:三河市宇新装订厂

720mm×1000mm 1/16 印张11 字数210千字 2008年4月北京第2版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:18.00元

版权所有 违者必究

《生物化学实验》编写人员名单

主编：董晓燕（天津大学化工学院生物工程系）

参编：（以下顺序按姓氏笔画排列）

王海鸥（河北工业大学生物工程系）

安宜，张钧（北京理工大学生物技术系）

朱勇（天津大学生物工程系）

张俊杰（河北理工大学生物技术系）

二 版 前 言

伴随生物技术的迅猛发展,从事生命科学研究的人越来越多,生物化学及分子生物学已渗透到很多学科领域。特别是许多工科院校的相关专业都开设了生物化学及分子生物学课程。作者在教学工作中发现,工科类相关专业对生物化学及生物化学实验知识要求掌握的范围与一般理科等专业相差较大,急需根据不同学习对象进行教材改革。为适应这种需求,第一版《生物化学实验》在2003年出版发行。4年来,重印多次,得到了使用学校广泛的认可和欢迎。但是,生物技术在不断发展且更新较快,为适应学科及教学发展的需要,进一步提高本书的使用和参考价值,我们对本书的部分内容进行了修改和补充,作为第二版重新出版。

第二版保留了第一版的基本内容和特色,除对文字进行全面修订外,删除了一些陈旧的实验,增加了一些新内容、新知识,具体体现在:

(1) 在第二版第二章中增加了第七节“常用的蛋白质现代分析法”,主要介绍了荧光光谱、圆二色性和核磁共振技术的基本原理,目的是为了适应新研究的发展需要(此部分内容由河北理工大学生物技术系张俊杰编写)。

(2) 删除了第一版第三章中的实验七、十一、二十、二十二、二十五和二十六。在第二版中补充了实验五、六、七、十八、十九和二十三(由北京理工大学生物技术系安宜和张钧负责编写);整合了第一版第三章中的实验十八和十九,成为新版第三章中的实验二十二,使教材更便于使用。

(3) 对第三章少数实验(实验二、八、九、十四和十六)进行了修订,此部分内容由河北工业大学化工学院生物工程系王海鸥完成;同时对附录的内容进行了删减和补充(由天津大学化工学院生物工程系朱勇完成)。

(4) 在新版第三章中增加了实验四和第四章中增加了实验七(朱勇编写),提高了教材的新颖性。

我们希望通过上述修订使新版教材更具有前瞻性和实用性。

在新版教材发行之际,我首先感谢河北理工大学的贾长虹副教授在百忙之中通读了本书稿并提出了宝贵的意见;感谢天津大学化工学院生物化工系硕士研究生陈丽君和张拓宇对书稿文字处理和实验内容确认给予的帮助;另外,感谢化学工业出版社领导、教材编辑部赵玉清编辑对本书的出版给予的大力支持,感谢天津大学“十一五”精品教材建设及各级领导多年来给予作者的支持、鼓励和教诲。最后特别感谢我的家人对我工作的长期支持。

董晓燕 2007年12月

一 版 前 言

自 20 世纪 70 年代基因工程技术诞生以来,生物化学及分子生物学发生了深刻的变化。DNA 重组技术使人们可以从分子水平上认识生命,从此生物技术得到了突飞猛进的发展,从事生命科学研究的人也越来越多,生物化学及分子生物学已渗透到很多学科领域。

近 20 年来,我国在生命科学与技术的研究也有很大的发展,特别是许多工科院校的相关专业都开设了生物化学及分子生物学课程。教育界认为,为了科学技术综合发展,需要更多的人了解生命科学,特别是作为生命科学基础的生物化学知识。在这种情况下,生物化学及生物化学实验的教学工作,面临着根据不同学习对象进行教学改革的需求。本书就是为适应这种需求而为工科院校相关专业学生编写的一本实验教材。

作者从 1992 年开始为天津大学生物化工专业硕士研究生及本科生开设“生物化学及生物化学实验”必修课以来,深感教学资料零散,没有工科专业合适的教科书,给学生掌握授课内容带来很大困难。因此,从 1995 年起,结合教学和科研工作,着手“生物化学实验”讲义的编写。同时将编写的内容用于近年本科生和研究生课教学实践,收到了良好的教学效果。最近,在与有关院校的交流中发现,他们也同感于实验教材的缺乏。因此,商议决定在原讲义内容的基础上,结合各专业的不同要求,增加了内容的系统性和完整性,形成本书的初稿。后经反复增删,完成了本书的修改工作。

本书重点收入了适合生物工程、制药工程、食品工程及其他相关轻工专业学习的生物化学实验内容。另外,为适应今后发展需要,还收入了部分分子生物学的基础实验内容。

全书共分 4 章,其中第一和二章是由董晓燕编写;第三章由朱勇(实验一、二、三、四、五、十、十二、十三、十四、十五、十六、十八、十九、二十一、二十二)、张长平(实验八、九、十七、二十三、二十四)、曹东旭(实验六、七、十一、二十、二十五、二十六)编写;第四章由朱勇(实验四、五)、张长平(实验一、二、三、六)编写;书中的附录是由朱勇和曹东旭共同整理的。最后全书的统编工作由董晓燕和朱勇负责完成。

另外,天津科技大学的吕晓玲教授在百忙中对书稿提出了宝贵的意见;化学工业出版社领导和教材编辑部高钰编辑对本书的出版给予了大力支持,在此谨向他们表示真诚的谢意。另外,借此机会,作者向各界朋友、老师、学长、同事以及天津大学各级领导多年来给予作者的支持、鼓励和教诲表示感谢。

生物化学是蓬勃发展中的学科,由于作者知识和经验有限,加之时间较短,书中错误和不足之处在所难免,敬请读者给予批评指正。

董晓燕

2002 年盛夏于天津大学

目 录

第一章 生物化学实验的基本要求	1
第一节 实验的准确性	1
一、系统误差	1
二、偶然误差	2
三、过失错误	2
第二节 实验记录及报告	2
一、实验记录	3
二、实验报告	3
第三节 实验样品的制备	4
一、动物的脏器	4
二、微生物	4
三、细胞	5
第二章 常见的实验方法及基本原理	6
第一节 透析	6
第二节 沉淀	7
一、蛋白质的特性	7
二、常用的蛋白质沉淀方法	8
第三节 层析	11
一、层析原理	11
二、几种常见的层析法	11
第四节 电泳	20
一、电泳法的基本原理	20
二、几种常用电泳法简介	22
第五节 分光光度法	25
一、基本原理	25
二、比色法	26
三、分光光度法	27
四、浊度法	28
第六节 离心	28
第七节 常用的蛋白质现代分析法	30
一、荧光分光光度法	30
二、旋光色散与圆二色性法	36
三、核磁共振波谱法	40
第三章 普通实验	48

实验一	实验的基本操作及要求	48
实验二	糖的颜色反应	52
实验三	3, 5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定还原糖	54
实验四	淀粉酶对壳聚糖降解过程的测定	57
实验五	血清胆固醇测定 (磷钼铁法)	59
实验六	植物叶片在衰老过程中过氧化脂质含量的变化	60
实验七	铜离子氧化法测定维生素 C 含量 (紫外法)	62
实验八	氨基酸的分离鉴定——纸层析法	63
实验九	DNS-Cl 法测定蛋白质 N-末端的氨基酸	65
实验十	离子交换柱层析法分离氨基酸	67
实验十一	蛋白质性质 (一)——蛋白质及氨基酸的呈色反应	69
实验十二	蛋白质性质 (二)——蛋白质的等电点测定和沉淀反应	75
实验十三	蛋白质的制备——牛奶中提取酪蛋白	80
实验十四	Folin-酚法测定血清白蛋白含量	81
实验十五	Bradford 法测定蛋白质含量	83
实验十六	紫外分光光度法测定蛋白质的含量	84
实验十七	血清蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	85
实验十八	猪脾脏 DNA 提取与二苯胺定量法	88
实验十九	酵母 RNA 提取与地衣酚显色测定法	91
实验二十	菜花 (花椰菜) 中核酸的分离与鉴定	93
实验二十一	酶的特性	96
实验二十二	多酚氧化酶的制备和化学性质及影响多酚氧化酶作用的各种因素	100
实验二十三	枯草杆菌蛋白酶的活力测定	104
实验二十四	根据底物浓度和酶反应速率之间的关系求米氏常数 K_m	107
实验二十五	DNA 琼脂糖凝胶电泳	110
实验二十六	质粒 DNA 的小量制备	112
第四章	综合实验	115
实验一	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白印迹	115
实验二	PCR 扩增目标基因片段	120
实验三	DNA 的酶切及连接技术	122
实验四	重组 DNA 质粒的转化技术	125
实验五	枯草杆菌碱性磷酸酶的制备及酶活力的测定	127
实验六	鸡卵类黏蛋白的制备及活力的测定	130
实验七	同步荧光法测定蛋白质含量	135
附录		138
学生实验室守则		138
一、常用仪器的使用		139

二、缓冲溶液	147
三、常用的硫酸铵饱和度计算表	150
四、层析法常用数据及性质表	152
五、分子生物学及基因工程常用数据	156
六、一些常用单位	164
七、常用洗液的配制方法	165
八、元素的原子量表	166

参考文献	167
------------	-----

第一章 生物化学实验的基本要求

第一节 实验的准确性

生化实验是以活的生命体为对象,对生物体内存在的主要大分子物质,如糖、脂肪、蛋白质、核酸、酶等进行定性或定量的分析测定。定性分析是确定存在物质的种类,或粗略计算物质所占的比例;而定量分析则需确定物质的精确含量。因此研究者要根据实验要求对实验结果进行分析和总结,要善于分析和判断结果的准确性,认真查找可能出现实验误差的原因,并进一步研究减少误差的办法,不断提高所得结果的准确度。

一般在实验测量过程中必然会有误差产生,但如果懂得这些误差的可能来源,多数的误差可以通过适当的处理来校正。

产生误差的原因很多,一般根据误差的性质和来源来区分。

一、系统误差

系统误差是指在测量过程中某些经常发生的原因所造成的误差。它对分析结果的影响比较稳定,常在重复实验时重复出现,使测定结果系统偏高或偏低。

1. 系统误差的来源

① 方法误差 如用滤纸称量易潮解的药品;做生物实验特别是酶的实验时没有考虑温度的影响等。

② 仪器误差 如量取液体时,按烧杯的指示线量取液体往往准确度降低,需要用量筒量取;在配置标准溶液时量筒同样不够精确,要选用等体积的容量瓶定容至刻度线;不同的天平精度差别很大,如果需要称量 100g 以上的物体,使用托盘天平即可;但如称量 1g 的样品,选用扭力天平比较方便;称量 10mg 以内的样品则必须使用感量为万分之一克的分析天平或电子天平称取。

③ 试剂误差 如试剂不纯或蒸馏水不合格,引入微量元素或对测定有干扰的杂质,就会造成一定的误差。

④ 习惯误差 如在使用移液管量取液体时,由于个人的操作手法不同,可能会存在一定的习惯误差。特别是在读数据时,目光是否平视,视线与液体弯月面是否相切,都可成为生化实验中造成较大误差的原因。

2. 系统误差的校正

① 仪器校正 在实验前对使用的砝码、容量皿或其他仪器进行校正, 对 pH 计、电接点温度计等测量仪器进行标定, 以减少误差。

② 空白试验 在任何测量实验中都应包括对照的空白实验。空白实验是指用同体积的蒸馏水或样品中的缓冲溶液代替待测溶液, 并严格按照处理待测液和标准液那样的方法处理后测得的结果。在最后计算时, 应从实验测定值中扣除空白测定值, 这样即可得到比较准确的结果。

二、偶然误差

由于难以察觉的原因或由于个人一时辨别差异, 也可能是某些不易控制的外界因素而引起的误差称为偶然误差。生物类实验常常受多方面因素的影响, 所以某些条件, 如温度、光照、气流、反应时间、反应体系等的微小变化都会引起较大的误差。特别是某些因素的作用机理目前仍不十分清楚, 所以有些实验结果重现性较差。

偶然误差初看起来似乎没有规律性, 但经过多次实验, 便可发现偶然误差遵循正态分布, 其表现为: 一是正误差和负误差出现的概率相等; 二是小误差出现的频率高, 而大误差出现的频率较低。因此解决偶然误差主要可通过进行多次平行实验, 然后取其平均值来弥补。测试的次数越多, 偶然误差的概率就越小。

三、过失错误

除了上述两种误差外, 往往还可能由于操作不认真, 观察不仔细, 没有按操作规程去操作等引起的过失错误。这对于初做生物化学实验的工作者来说是经常发生的, 如加错试剂; 在配制标准溶液时, 固体溶质未被溶解就用容量瓶定容; 在称量样品时未关升降枢就加砝码; 在做电泳时点样端位置放错; 在做抽滤实验时应留滤液却误留滤渣; 在作图时坐标轴取反以及记录和计算上的错误等。这些失误会对分析结果产生极大的影响, 致使整个实验失败。所以在实验中一定要避免这样的错误, 培养严谨和一丝不苟的科学实验作风, 养成良好的实验习惯, 减少失误的发生。

此外, 在实际工作中要根据实验目的, 设计好切实可行的实验方案, 并根据实际需要, 选择测试手段(仪器及方法)。如在做定性实验时, 称量及配置试剂可相对粗放, 即可选择台秤及量筒来称重或量取; 而在做定量实验时, 则必须使用分析天平及容量瓶来称量和定容, 以确保实验数据真实可靠。

第二节 实验记录及报告

由于生物化学实验的对象是生命体或是生物活性物质, 在实验中很容易受外界环境条件的影响, 出现实验结果的差异。因此, 在实验记录和写实验报告时,

需要实验者做到仔细、认真、实事求是，只有这样才能获得真实可靠的实验结果。

一、实验记录

在实验课前应认真预习，初步了解实验目的、实验原理，对操作方法及步骤要做到心中有数。最好有一个预习提纲，写出简要的实验步骤。

在实验中要对观察到的结果及数据及时记录。记录时要准确、客观，切忌夹杂主观因素。例如在做一些颜色反应实验时，要根据实验中出现的真实颜色记录，真实的实验记录才是今后结果分析的可靠依据，切勿根据课本中已经了解的可能出现的现象做虚假记录。应该记录清楚实验中配制溶液的过程、加样的体积、使用仪器的类型以及试剂的规格、浓度等，以便在总结实验时，查找实验失败的原因。另外，也要认真记录实验时的环境条件（如温度、湿度、光度等）及反应时间。详细的记录才能成为今后实验的参考数据。

二、实验报告

实验结束后，应及时整理和总结实验数据，写出实验报告。实验报告应包括以下内容。

1. 标题

标题应包括实验名称、实验时间、实验地点、实验组号、实验者姓名、实验室条件（如温度、湿度）等。

2. 实验目的及原理

简明扼要地阐述实验的理论依据及实验目的，明确实验操作与理论知识的联系。

3. 材料和仪器

要写清实验材料的来源、规格、浓度及配制方法；写明实验仪器的生产厂家、型号及常用指标。

4. 操作方法

描述自己的操作过程及方法，不能完全照抄书本的内容。可简明扼要地把实验步骤一步步写出，也可用工艺流程图或表格描述实验过程。实验步骤一定要写得准确明白，以便他人能够重复验证。

5. 实验结果

将实验中的现象、数据进行整理、分析，得出相应的结论。在生物化学实验中常用图表来表示实验结果，这样可使实验结果清楚明了。特别是通过对标准样品的一系列分析测定，制作标准曲线，然后通过标准曲线查出待测样品的结果。现将常用方法介绍如下。

① 列表法 将实验所得的各种数据列出表格。通常在表格的第一行和第一列标出数据的名称或单位，其余行列内只填数字。有的表格在中间或末端的一行

内还要填上反应条件,如“水浴中加热 5min”等。注意表格的表头一定要有表题。具体表格式样参见第三章。

② 作图法 图线可常常用于表示实验所得的一系列数据之间的关系及变化情况,这种方法可直观地分析实验数据,适用于实验数据较多的情况,但不易清楚地表示数据间的情况。如生化实验中用比色法测定未知样品浓度时,常常采用绘制已知标准样品浓度的工作曲线,然后在同样工作条件下测定未知样品,用所得的数据从标准工作曲线中查出未知样品的浓度。作图时,首先要在坐标纸上标出坐标轴,标明轴的名称和单位,然后在横轴和纵轴上——找出实验交点,用“×”或“·”标注上,再用直线或平滑线将各点连接起来。图线不一定经过所有实验数据点,但要求线必须尽量通过或靠近大多数数据点。个别偏离过大的点应舍弃,或重复试验进行校正。此外在图下还应标明图题和必要的图示,以防单纯看图的人对此图不知所云。(具体实例见第三章实验三或实验十五)。

6. 讨论

讨论部分是对整个实验过程、实验结果的总结、分析。对得到的正常结果和出现的异常现象进行分析,对教师提出的思考题进行思考和讨论,也可对实验设计、实验方法提出合理的改进性意见,以便教师今后能更好地安排实验。

第三节 实验样品的制备

生物化学所用的材料通常来源于动物、植物和微生物,其中包括:蛋白质、酶、核酸等高分子化合物。但由于得到的样品往往是多种物质的混合物,因此首先要对其进行预处理。

一、动物的脏器

1. 冰冻

刚宰杀牲畜的脏器要剥去脂肪和筋皮等结缔组织,若不马上进行抽提,应置 -10°C 冰箱短期保存,或 -70°C 低温冰箱储存。

2. 脱脂

脏器原料中常含有较多的脂肪,会严重影响纯化操作和制品的收率。一般脱脂的方法有:人工剥去脂肪组织;浸泡在脂溶性有机溶剂(丙酮、乙醚)中;采用快速加热(50°C)、快速冷却方法,使融化的油滴冷却凝成油块而被除去;也可利用索式提取器使油脂与水溶液分离。

二、微生物

由于微生物细胞具有繁殖快,种类多,培养方便等优点,因此它已成为制备生物大分子物质的主要宿主。将培养一段时间的细菌培养液离心,收集上清液,浓缩后即可制备胞外有效成分。若将离心沉淀的菌体破碎后亦可提取胞内有效成

分。如培养液不立即使用，可放置 4℃ 低温保存一周左右。

三、细胞

细胞是生物体结构的基本单位。细胞除具有细胞膜、细胞质、细胞核外，还有线粒体，质体等细胞器。通常要提取的物质主要分布在细胞内，所以在提取这类物质时，首先必须破碎细胞。破碎细胞的方法主要有以下几种。

1. 研磨法

将动植物组织剪碎，放入研钵中，加入一定量的缓冲溶液，用研棒用力挤压、研磨，为了提高研磨效果，可加少量石英砂或海砂来助研，直到把组织研成较细的浆液为止。此法作用温和，适用于植物和微生物细胞，适宜实验室操作。

2. 组织捣碎机法

该方法主要适用于破碎动物组织，作用比较剧烈。一般首先把组织切碎置于捣碎机中，于 8000~10000r/min 下处理 30~60s，即可将细胞完全破碎。但如提取酶液和核酸时，必须保持低温，并且捣碎时间不宜太长，以防有效成分变性。

3. 超声波法

超声波是频率高于 2000Hz 的波，由于其能量集中而强度大，振动剧烈，因而可破坏细胞器。用该法处理微生物细胞较为有效。

4. 冻融法

将细胞置低温下冰冻一段时间，然后在室温下（或 40℃ 左右）迅速融化，如此反复冻融几次，细胞可形成冰粒或在增高剩余胞液盐浓度的同时，发生肿胀、破溶。

5. 化学处理法

用脂溶性溶剂如丙酮、氯仿和甲苯等处理细胞时，可把细胞膜溶解，进而破坏整个细胞。

6. 酶法

溶菌酶具有降解细胞壁的功能，利用这一性能处理微生物细胞，可将细胞破碎。

第二章 常见的实验方法及基本原理

第一节 透 析

透析是一种膜分离方法。透析膜为半透膜，允许小分子物质透过，而截留蛋白质等大分子物质，因此，透析可用于蛋白质等生物大分子溶液的脱盐或缓冲溶液交换，是一种实验室分离纯化蛋白质等生物大分子的常用方法。

透析的一般操作过程示于图 2-1。将待分离的样品放进用半透膜制成的透析袋中，透析袋的两端打上结，并浸没于水或低离子强度的缓冲溶液（透析液）中，轻轻搅拌。在此过程中，小分子溶质在浓度差的作用下从透析袋逐渐扩散进入外部的透析液，而外部透析液中的缓冲溶液组分也可扩散进入透析袋，从而达到除去样品中小分子溶质或样品缓冲溶液交换的目的。

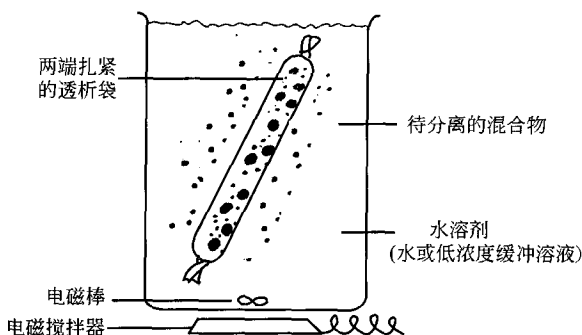


图 2-1 透析操作示意图

透析膜通常用玻璃纸、火棉胶、纤维素和聚丙烯腈等亲水性材料制成，具有一定的孔径，允许分子量较小的物质通过，而截留分子量较大的蛋白质和其他分子，将它们保留在膜内。透析膜的孔径通常用“截流相对分子质量”（或截留分子量）表示。“截流相对分子质量”是用假定的平均球蛋白的大小为基础标定的，是个标称量。如果待分离物质（如蛋白质）是线状的，那么即使其相对分子质量大于膜的截流相对分子质量，也可能透过透析膜。因此，在透析操作时最好选择截留相对分子质量远小于待保留物质相对分子质量的透析膜。

透析操作的一个重要指标是透析率,即小分子溶质的去除率。透析率取决于若干因素,如样品的浓度、溶质的相对分子质量、样品和透析液的体积、透析时间等。

在透析过程中,由于膜内外存在浓度差,透析液中的水进入膜内,使样品体积增大。因此初始样品装添量应保持在透析袋体积的一半,空出另一半,并且将空气排净。如果不留出样品体积膨胀所需要的空间,袋内压力就会不断升高,最终导致透析膜胀破或使膜孔变形,造成透析袋中蛋白质等大分子物质流失。另外,当透析操作的时间较长时,最好在低温下进行,以防待分离的生物活性物质变性失活或发生微生物污染。透析速度是与浓度相关的,为了加速透析,可用磁力搅拌器搅拌并且频繁更换透析液,这样可使样品与透析液间保持较大的浓度差,从而提高透析速度,缩短透析时间。无机盐等小分子溶质的扩散系数大,透析速度快。

第二节 沉 淀

沉淀是因环境的变化引起溶质的溶解度降低、生成固体凝聚物的现象。与结晶相比,沉淀是不定型的固体颗粒,构成成分复杂,除含有目标分子外,还夹杂共存的杂质、盐和溶剂。因此,沉淀法是一种初级分离技术。但多步沉淀操作也可制备高纯度的目标产品。

利用沉淀原理分离蛋白质是传统的分离技术之一,目前广泛应用于实验室和工业规模的生物产品的回收、浓缩和纯化。本节根据蛋白质的特性及其沉淀原理简单介绍几种常见的沉淀方法。

一、蛋白质的特性

蛋白质是两性高分子电解质,主要由疏水性和带电性各不相同的 20 种氨基酸组成。在水溶液中,多肽链中的疏水性氨基酸残基具有向内部折叠的趋势,使亲水性氨基酸残基分布在蛋白质立体结构的外表面。即使如此,一般仍有部分疏水性氨基酸残基暴露在外表面,形成疏水区。疏水性氨基酸含量高的蛋白质疏水区大、疏水性强。因此,蛋白质表面由不均匀分布的荷电基团形成的荷电区、亲水区和疏水区构成。

蛋白质的相对分子质量在 $6 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 之间,分子直径约 $1 \sim 30 \text{ nm}$,其水溶液呈胶体性质。由于在蛋白质分子周围存在与蛋白质分子紧密或疏松结合的水化层,因此使蛋白质形成稳定的胶体溶液、防止蛋白质凝聚沉淀的屏障之一。

蛋白质沉淀的另一屏障是蛋白质分子间的静电排斥作用。偏离等电点的蛋白质所带净电荷或正或负,成为带电粒子,在电解质溶液中吸引相反电荷的离子(简称反离子)。由于离子的热运动,该反离子层并非全部整齐地排列在一个面

上,而是距表面由高到低有一定的浓度分布,形成分散双电层。当双电层的电位足够大时,静电排斥作用抵御分子间的相互吸引作用(分子间力),使蛋白质溶液处于稳定状态。

因此,可通过降低蛋白质周围的水化层和双电层厚度来降低蛋白质在溶液中的稳定性,实现蛋白质的沉淀。水化层和双电层厚度与溶液性质(如电解质的种类、浓度、pH值等)密切相关,所以,蛋白质的沉淀可采用恒温条件下添加各种不同试剂的方法:加入无机盐的盐析法、加入酸碱调节溶液pH值的等电点沉淀法、加入水溶性有机溶剂的有机溶剂沉淀法等来实现。

二、常用的蛋白质沉淀方法

(一) 盐析沉淀

1. 原理

在水溶液中,蛋白质的溶解度一般在生理离子强度范围内($0.15 \sim 0.2 \text{ mol/kg}$)最大,而低于或高于此范围时溶解度均降低。蛋白质在高离子强度的溶液中发生沉淀的现象称为盐析。

目前电解质影响蛋白质溶解度的机理尚不十分清楚,有不同的理论解释。但一般认为,向蛋白质的水溶液中逐渐加入电解质时,开始阶段蛋白质的活度系数降低,并且蛋白质吸附盐离子后,带电表层使蛋白质分子间相互排斥,但蛋白质分子与水分子间的相互作用却加强,因而使蛋白质的溶解度增大,出现盐溶现象。随着离子强度的增大,蛋白质表面的双电层厚度降低,静电排斥作用减弱;同时,由于盐离子水化作用使蛋白质表面疏水区附近的水化层脱离蛋白质,暴露出疏水区域,从而增大了蛋白质表面疏水区之间的疏水相互作用,容易发生凝集,进而沉淀。所以,一般在蛋白质的溶解度与离子强度的关系曲线上存在最大值,该最大值在较低的离子强度下出现,在高于此离子强度的范围内,溶解度随离子强度的增大迅速降低。

2. 影响沉淀的主要因素

(1) 无机盐 在相同的离子强度下,不同种类的盐对蛋白质的盐析效果不同。离子半径小而带电荷较多的阴离子的盐析效果较好。例如,含高价阴离子的盐比低价盐的盐析效果好,即盐析常数大。常见阴离子的盐析作用顺序为:



阳离子的盐析作用的顺序为:



在选择盐析的无机盐时,除考虑上述各种离子的盐析效果外,对盐还有如下要求:

- ① 溶解度大,能配制高离子强度的盐溶液;
- ② 溶解度受温度影响较小;