



高等学校教材

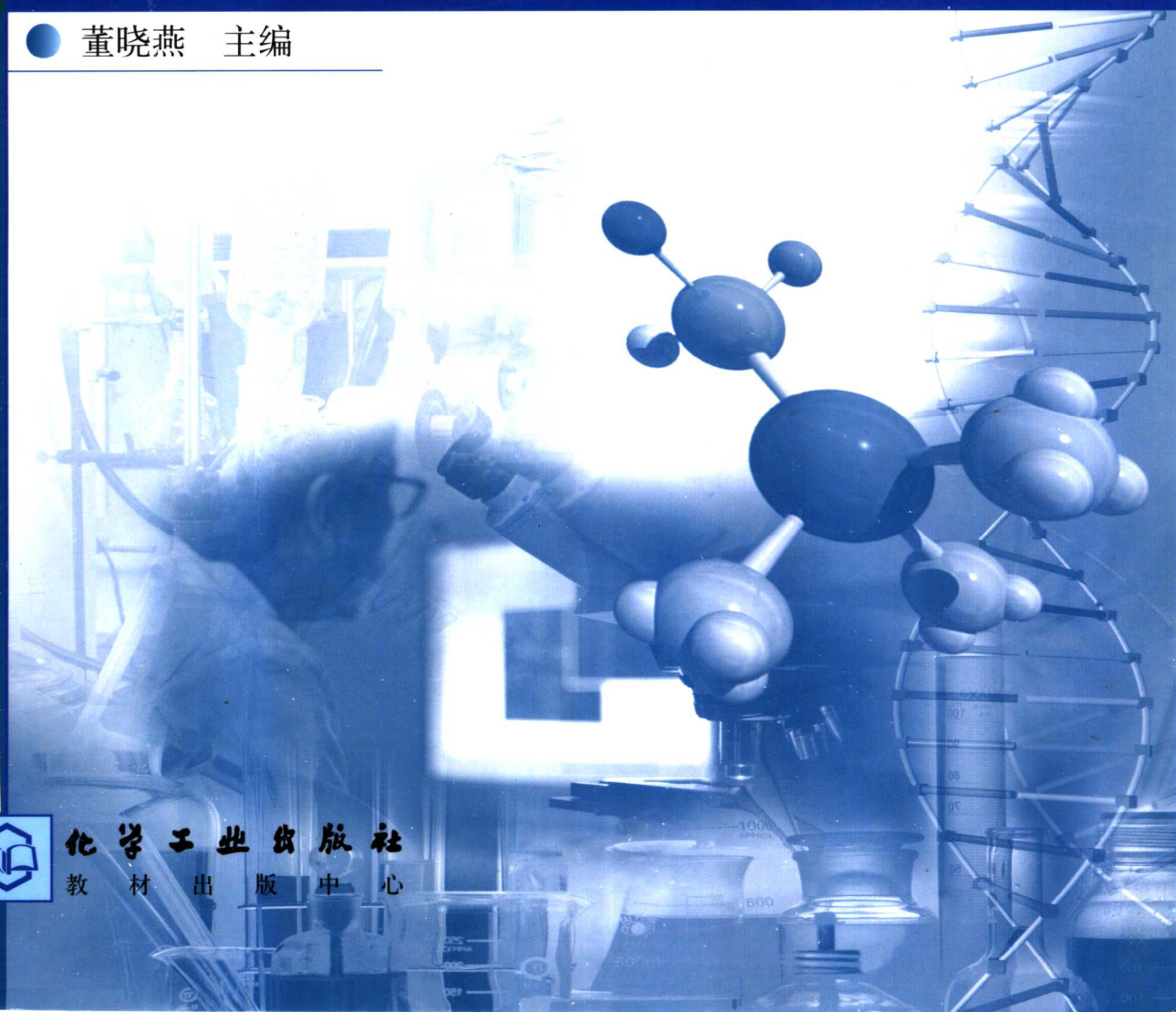
生物化学实验

(工科类专业适用)

● 董晓燕 主编



化学工业出版社
教材出版中心



高等学校教材

生物化学实验

(工科类专业适用)

董晓燕 主编

化学工业出版社

教材出版中心

·北京·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

生物化学实验/董晓燕主编. —北京: 化学工业出版社, 2002.12

高等学校教材 (工科类专业适用)

ISBN 7-5025-4285-X

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 (2002) 第 099687 号

高等学校教材

生物化学实验

(工科类专业适用)

董晓燕 主编

责任编辑: 高 钰

文字编辑: 刘志茹

责任校对: 凌亚男

封面设计: 于 兵

*

化学工业出版社
教材出版中心

出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京市管庄永胜印刷厂印刷

三河市宇新装订厂装订

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 9½ 字数 216 千字

2003 年 1 月第 1 版 2003 年 1 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-4285-X/G·1150

定 价: 16.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

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,中国在生命科学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,特别是了解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的检验,收到了良好的教学效果。最近,在与天津科技大学与河北工业大学的有关院、系的交流中发现,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。

全书共分四章,其中第一章和第二章是由董晓燕(天津大学化工学院生物工程系)编写,第三章由朱勇(天津大学化工学院生物工程系)(实验 1~5、10、12~15、16、18、19、21、22)、张长平(河北工业大学生物工程系)(实验 8、9、17、23、24)、曹东旭(天津科技大学食品科学与生物工程学院生物技术系)(实验 6、7、11、20、25、26)编写;第四章由朱勇(实验 4、5)、张长平(实验 1~3、6)编写;书中的附录是由朱勇和曹东旭共同整理的。最后全书的统稿工作由董晓燕和朱勇负责完成。

天津科技大学吕晓玲教授在百忙中对书稿提出了宝贵的意见,在此谨表示真诚的谢意。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

2003 年 1 月于天津大学

内 容 提 要

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,包括生化实验的基本原理、32个生化实验和附录,教学实验部分包括实验的目的、原理和基本操作方法,并在各教学实验后附有思考题,以便于进一步理解实验教学内容。

本书可作为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。

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、操作错误	2
第二节 实验记录及报告	2
一、实验记录	2
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	4
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、常见的蛋白质沉淀方法	7
(一) 盐析沉淀	7
(二) 等电点沉淀	9
(三) 有机溶剂沉淀	9
(四) 热沉淀	9
(五) 其他沉淀	10
第三节 层析	10
一、层析原理	10
二、几种常见的层析法	11
(一) 吸附层析	11
(二) 分配层析	12
(三) 薄层层析	13
(四) 凝胶层析	14
(五) 离子交换层析	15
(六) 高效液相色谱	16
第四节 电泳	19
一、电泳法的基本原理	19
二、几种常见电泳法	21

(一) 纸电泳	21
(二) 醋酸纤维膜电泳	21
(三) 琼脂糖电泳	21
(四) 聚丙烯酰胺凝胶电泳	22
第五节 分光光度法	24
一、基本原理	24
二、比色法	24
三、分光光度法	26
四、浊度法	26
第六节 离心	26
第三章 普通实验	29
实验一 实验的基本操作及要求	29
实验二 糖的颜色反应	32
实验三 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定还原糖	34
实验四 氨基酸的分离鉴定——纸层析法	37
实验五 DNS-Cl 法测定蛋白质 N-末端的氨基酸	39
实验六 离子交换柱层析法分离氨基酸	41
实验七 有机酸的纸上层析法	43
实验八 蛋白质性质 (一) ——蛋白质及氨基酸的呈色反应	45
实验九 蛋白质性质 (二) ——蛋白质等电点的测定和沉淀反应	51
实验十 蛋白质的制备——牛奶中提取酪蛋白	56
实验十一 总氮量的测定——微量凯氏 (Micro-Kjeldahl) 定氮法	58
实验十二 Folin-酚法测定血清白蛋白含量	62
实验十三 Bradford 法测定蛋白质的含量	63
实验十四 紫外分光光度法测定蛋白质的含量	65
实验十五 血清蛋白的醋酸纤维薄膜电泳	66
实验十六 菜花 (花椰菜) 中核酸的分离与鉴定	69
实验十七 酶的特性	71
实验十八 多酚氧化酶的制备和化学性质	75
实验十九 影响多酚氧化酶作用的各种因素	78
实验二十 碱性蛋白酶活力的测定 (福林-酚试剂法)	79
实验二十一 根据底物浓度和酶反应速度之间的关系求米氏常数 K_m	82
实验二十二 酵母 RNA 的提取及定性和定量鉴定	85
实验二十三 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	88
实验二十四 质粒 DNA 的小量制备	90
实验二十五 氨基转换反应——血清谷丙转氨酶 (SGPT) 活力的测定 (King 氏法)	92
实验二十六 肌糖原的酵解作用	94
第四章 综合实验	98

实验一	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白印迹	98
实验二	质粒 DNA 的酶切及连接技术	103
实验三	重组 DNA 质粒的转化技术	105
实验四	枯草杆菌碱性磷酸酶的制备及酶活力的测定	107
实验五	鸡卵类黏蛋白的制备及活力的测定	111
实验六	PCR 基因扩增	115
附 录		118
一、常用仪器的使用		118
(一) 称量仪器		118
(二) 分光光度计		119
(三) 离心机		121
(四) 干燥箱和恒温箱		122
(五) 电热恒温水浴		122
二、缓冲溶液		123
(一) 缓冲理论		123
(二) 常用缓冲液的配制		123
(三) pH 标定缓冲液的配制		126
三、常用的硫酸铵饱和度计算表		126
四、层析法常用数据及性质表		127
(一) 离子交换层析数据及参数		127
(二) 聚丙烯酰胺凝胶的技术数据		129
(三) 琼脂糖凝胶的技术参数		130
(四) 凝胶过滤层析介质的技术参数		130
五、分子生物学及基因工程常用数据		132
(一) 有关核酸的常用数据		132
(二) 常见限制性内切酶的酶切位点		133
(三) 酶类		135
(四) 缓冲液		136
(五) 与 DNA 凝胶电泳有关的数据		138
六、一些常用单位		139
(一) 长度单位		139
(二) 体积单位		139
(三) 质量单位		139
(四) 摩尔与摩尔浓度表示法		140
(五) 十进位数量词头及符号		140
七、元素的原子量表		140
主要参考书目		142

第一章 生物化学实验的基本要求

第一节 实验的准确性

生物化学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;而定量分析则需要确定物质的精确含量。因此分析工作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,认真查找可能出现误差的原因,并进一步研究减少误差的办法,以不断提高所得结果的准确度。

一般在实验测量过程中都会有误差产生,但在懂得这些误差的可能来源的前提下,多数的误差是可以通过适当的处理来校正的。

产生误差的原因很多,一般根据误差的性质和来源可把误差分为两类,即系统误差和偶然误差。

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;不同的天平其精度差别很大,如果需要称量 100 g 以上的物体,使用托盘天平即可,但如称量 1 g 的样品,选用扭力天平比较方便,称量 10 mg 以内的样品则必须使用感量为万分之一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 操作误差:如在使用移液管量取液体时,由于每人的操作手法不同,可能会存在一定的操作误差。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主要原因。

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有对照的空白实验。用同体积的蒸馏水或样品中的缓冲液代替待测溶液,并严格按照待测液和标准液那样的方法处理,即得到所谓

的空白溶液。在最后计算时，应从实验测得的结果中扣除从空白溶液中得到的数值，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，或是某些不易控制的外界因素而引起的误差称为偶然误差。一般生物类实验的影响因素是多方面的。常常由于某些条件，如温度、光照、气流、反应时间、反应体系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，便可发现偶然误差的分布有以下规律。一是正误差和负误差出现的几率相等；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，偶然误差的几率就越小。

三、操作错误

除了上述两种误差外，往往还有由于操作不认真，观察不仔细，没有按操作规程去操作等引起的操作错误。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钮就加砝码、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操作错误，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，并根据实际需要的准确度来选择测试手段（仪器及方法），如在做定性实验时，称量及配置试剂可相对粗些，可选择台秤及量筒来称重、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、定容，以确保实验数据真实可靠。

第二节 实验记录及报告

如前所述，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，而引起实验结果的差异。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。最好写一个预习提纲，将实验步骤简要的写出来。

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，因此切勿根据课本中已经了解的可能出现的现象做虚假记录。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、浓度都应该记录清

楚，以便在总结实验时，查找实验失败的原因。另外，实验时的环境条件（如温度、湿度、光度等）及反应时间也要认真记录，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。一份好的实验报告应包括以下内容。

1. 标题

标题应包括实验时间、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. 实验名称、实验目的

3. 实验原理

应简明扼要地阐述实验的理论指导，使未做过实验的人看后对该实验有一个初步的了解。

4. 材料和仪器

对实验材料要写清其来源及规格、浓度、配制方法和配制人。对实验仪器要写明其生产厂家、型号、生产序号等常用指标。

5. 操作方法

要描述自己的操作过程及方法，不能完全照抄实验指导书，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形式按照先后顺序表示。实验步骤一定要写得准确明白，以便他人能够重复验证。

6. 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。在生物化学实验中最常用的多以图表法来表示实验结果，这样可使实验结果清楚明了。特别在生化实验中通过对标准样品的一系列分析测定，制作图表或绘制标准曲线等，可为以后待测样品的分析提供方便的条件。如通过实验值在图表中直接查出结果。现将常用方法介绍如下。

① 列表法：通常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 5 min”等。

② 作图法：实验所得的一系列数据之间的关系及变化情况，常常可用图线表示，这样可直观地分析实验数据。图表法比较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——找出实验交叉点，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。此外在图上还应标明标题，以防单纯看图的人对此图不知所云。

7. 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

常现象以及教师提出的思考题的探讨、研究。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由动物、植物和微生物提供,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。一般脱脂的方法是人工剥去脂肪组织;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;也可利用索氏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。用培养一段时间后的微生物菌种,离心收集上清液,浓缩后即可制备胞外有效成分。若将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°C 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。通常人们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,加入一定量的缓冲液,用研杵用力挤压、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 $8\,000\sim 10\,000\text{ r/min}$ 下处理 $30\sim 60\text{ s}$,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 $2\,000\text{ Hz}$ 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，发生融胀、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见图 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。

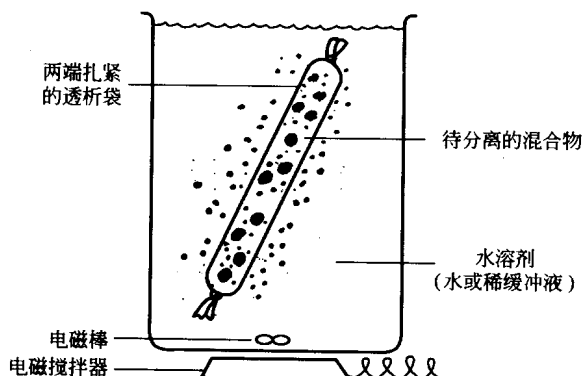


图 2-1 透析操作示意图

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，允许相对分子质量较小的物质通过，而截留相对分子质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。无机盐等小分子溶质的扩散系数大，透析速度快。较频繁地更换透析液，使样品与透析液间保持较大的浓度差，可提高透析速度，缩短透析时间。

在透析过程中，由于膜内外存在浓度差（渗透压），透析液中的水进入膜内，使样品体

积增大。因此初始样品量应装添至透析袋体积的一半，另一半是空的，并且不含空气。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，最终导致透析膜涨破或使膜孔变形，造成透析袋中的蛋白质等大分子物质流失。另外，透析操作的时间一般较长，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。透析速度是与温度相关的，因此为了加快透析的速度，可用磁力搅拌器搅拌并且频繁更换透析液。

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，沉淀是不定形的固体颗粒，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蛋白质等生物产物的回收、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的疏水区大，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 $1 \sim 30$ nm。因此，蛋白质的水溶液呈胶体性质，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，它是蛋白质形成稳定的胶体溶液，防止蛋白质凝聚和沉淀的屏障之一。

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的净电荷或正或负，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。水化层厚度和电位与溶液性质（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，如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、常见的蛋白质沉淀方法

（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（ $0.15 \sim 0.2$ mol/kg）最

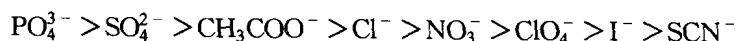
大，而低于或高于此范围时溶解度均降低。蛋白质在高离子强度的溶液中溶解度降低，发生沉淀的现象称为盐析。

目前电解质影响蛋白质溶解度的机理尚不十分清楚，存在不同的理论解释。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。

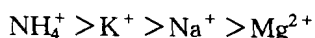
2. 影响沉淀的主要因素

(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；
- ③ 盐溶液密度不高，以便蛋白质沉淀的沉降或离心分离。

硫酸铵价格便宜、溶解度大且受温度影响很小、具有稳定蛋白质（酶）的作用，因此是最普遍使用的盐析盐。但硫酸铵有如下缺点：硫酸铵为强酸弱碱盐，水解后使溶液 pH 值降低，在高 pH 值下释放氨；硫酸铵的腐蚀性强，后处理困难；残留在食品中的少量的硫酸铵可被人味觉感知，影响食品风味；临床医疗有毒性，因此在最终产品中必须完全除去。除硫酸铵外，硫酸钠和氯化钠也常用于盐析。硫酸钠在 40℃ 以下溶解度较低，主要用于热稳定性高的胞外蛋白质的盐析。

(2) 温度和 pH 值

除盐的种类外，盐析操作的温度和 pH 值是获得理想盐析沉淀分级的重要参数。一般物质的溶解度随温度的升高而增大，但在高离子强度溶液中，升高温度有利于某些蛋白质的失水，因而温度升高，蛋白质的溶解度下降。但是，必须指出，这种现象只在离子强度较高时才出现。在低离子强度溶液或纯水中，蛋白质的溶解度在一定温度范围内一般随温度升高而增大。

在 pH 值接近蛋白质等电点的溶液中蛋白质的溶解度最小，所以调节溶液 pH 值在等电点附近有利于提高盐析效果。

因此,蛋白质的盐析沉淀操作需选择合适的 pH 值和温度,使蛋白质的溶解度较小。同时,盐析操作条件要温和,不能引起目标蛋白质的变性。所以,盐析和后续的其他沉淀法一样,需在较低温度下进行,但不像有机溶剂沉淀法那样要求严格。

盐析法的具体操作参见第四章综合实验四。

(二) 等电点沉淀

蛋白质在 pH 值为其等电点的溶液中净电荷为零,蛋白质之间静电排斥力最小,溶解度最低。利用蛋白质的这一性质进行沉淀分级的方法称为等电点沉淀法。

在上述的盐析沉淀中,一般也要结合等电点沉淀的原理,使盐析操作在等电点附近进行,降低蛋白质的溶解度。但是,利用中性盐进行盐析时,使蛋白质溶解度最低的溶液 pH 值一般略小于蛋白质的等电点。

等电点沉淀的操作条件是低离子强度; $\text{pH} \approx \text{pI}$ 。因此,等电点沉淀操作需在低离子强度下调整溶液 pH 值至等电点,或在等电点的 pH 值时利用透析等方法降低离子强度,使蛋白质沉淀。由于一般蛋白质的等电点多在偏酸性范围内,故等电点沉淀操作中,多通过加入无机酸(如盐酸、磷酸和硫酸等)调节 pH 值。

等电点沉淀法一般适用于疏水性较大的蛋白质(如酪蛋白),而对于亲水性很强的蛋白质(如明胶),由于在水中溶解度较大,在等电点的 pH 值下不易产生沉淀。所以,等电点沉淀法不如盐析沉淀法应用广泛。但该方法仍不失为有效的蛋白质初级分离手段。例如,从猪胰脏中提取胰蛋白酶原($\text{pI}=8.9$)时,可先于 pH3.0 左右进行等电点沉淀,除去共存的许多酸性蛋白质($\text{pI}=3.0$)。

与盐析法相比,等电点沉淀的优点是无需后继的脱盐操作。但是,如果沉淀操作的 pH 值过低,容易引起目标蛋白质的变性。

具体操作参见第三章实验十。

(三) 有机溶剂沉淀

向蛋白质溶液中加入丙酮或乙醇等水溶性有机溶剂,水的活度降低。随着有机溶剂浓度的增大,水对蛋白质分子表面电荷基团或亲水基团的水化程度降低,溶液的介电常数下降,蛋白质分子间的静电引力增大,从而凝聚和沉淀。同等电点沉淀一样,有机溶剂沉淀也是利用同种分子间的相互作用。因此,在低离子强度和等电点附近,沉淀易于生成,或者说所需有机溶剂的量较少。一般来说,蛋白质的相对分子质量越大,有机溶剂沉淀越容易,所需加入的有机溶剂量也越少。

有机溶剂沉淀法的优点是有机溶剂密度较低,易于沉淀分离;与盐析法相比,沉淀产品不需脱盐处理。但该方法容易引起蛋白质变性,必须在低温下进行。另外,应用有机溶剂沉淀时,所选择的有机溶剂应为与水互溶、不与蛋白质发生作用的物质。常用的有丙酮和乙醇。

具体操作参见第三章实验十。

(四) 热沉淀

在较高温度下,热稳定性差的蛋白质将发生变性沉淀。利用这一现象,可根据蛋白质间的热稳定性的差别进行蛋白质的热沉淀,分离纯化热稳定性高的目标产物。

必须指出,热沉淀是一种变性分离法,带有一定的冒险性,使用时需对目标产物和共存杂蛋白的热稳定性有充分的了解。