



全国高等农林院校“十三五”规划教材

精选了最基本的实验方法与技术  
将多种实验手段与技术及多层次的实验内容整合  
形成一个新的体系  
利于学生掌握相应的基本知识与基本技能

朱新产 高玲 主编

# 基础生物化学实验

JICHU SHENGWU HUAXUE SHIYAN

 中国农业出版社

全国高等农林院校“十三五”规划教材

# 基础生物化学实验

JICHU SHENGWU HUAXUE SHIYAN

朱新产 高玲 主编

中国农业出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

基础生物化学实验 / 朱新产, 高玲主编. —北京:  
中国农业出版社, 2016. 8

全国高等农林院校“十三五”规划教材

ISBN 978-7-109-21796-6

I. ①基… II. ①朱… ②高… 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 (2016) 第 170408 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码 100125)

责任编辑 刘 梁

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2016 年 8 月第 1 版 2016 年 8 月北京第 1 次印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 8.5

字数: 195 千字

定价: 18.50 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

## 内容简介

本书系统全面地介绍了高等农林院校基础生物化学常用实验技术与方法，是生物化学课程教学改革的配套教材。全书共分两篇，从生物分子的组成、结构、性质和功能到代谢、能量、信息及调节的生命现象研究，精选了最能代表生物化学特点的最基本的实验方法与技术，将多种实验手段和技术及多层次的实验内容整合在一起形成一个新的体系，利于学生掌握相应的基本知识与基本技能，达到培养与提高学生灵活运用所学理论知识和实验技能去发现问题、分析问题、解决问题的能力。全书共 38 个实验项目，图表近 80 幅，内容丰富，实验方法严谨可靠，可操作性强，适合作为高等农林院校农学、园艺、食品、生物工程、动物科学等专业的本、专科学生使用的实验教科书，也可作为生物学科科研人员、大学生以及生物学爱好者的参考书。

## 编 写 人 员

主 编 朱新产 高 玲

副 主 编 孙晓红 张 勇 孙 新

葛 蔚 王清吉

编写组成员 (以姓名笔画为序)

王清吉 孙 新 孙晓红

刘春英 朱新产 张 丽

张 弢 张 勇 易晓华

侯晓敏 高 玲 唐 超

梁旭清 葛 蔚

# 前言

《基础生物化学实验》是针对农林类高等院校的生物类、农学类专业编写的一本重要的专业基础课实验教材。本着宽专业、厚基础、重应用的教育宗旨，在引导学生全面掌握基础生物化学实验的基本原理和操作技能的基础上，着重培养学生的创新意识、动手能力以及分析问题和解决问题的能力，有助于学生对后续相关课程知识的学习与掌握，对学生在生物学领域的研究与知识应用起着十分重要的作用。本教材总的编写原则是：根据生物类、农学类专业对生物化学技术的需求，把学生必须掌握的基本技能和现代生物化学技术有机紧密地结合在一起，使其内容成为一个完整的、丰富的体系，同时也兼顾不同学科之间的相互交叉和相互渗透。本教材从生物化学的静态部分（包括组成、结构、性质和功能等内容）到动态部分（包括代谢、转化、能量及调节等内容），循序渐进地整合了常规的实验技术、基础实验、验证实验、综合提高实验等内容。

我们遵照全国高等农业院校农学类专业《基础生物化学教学大纲》的要求，参考不同院校主编《生物化学实验指导》以及国内外相关文献资料，结合学科研究进展和教学实践发展的需要，组织在教学第一线从事多年基础生物化学理论与实验教学、具有丰富工作经验的教师编写了《基础生物化学实验》一书。编写过程中，尽量保证实验内容的科学性、准确性、系统性和基础实用性，力求做到精练与详细相结合，知识传授与能力培养相结合。本书可作为各院校生物类、农学类专业基础生物化学实验课的教材，也可供其他专业的本科生、研究生、教师和科技工作者参考。

因基础生物化学实验的覆盖面广、涉及学科多、技术发展快，编写存在一定的难度，虽经所有编者共同努力，但由于时间仓促，加之水平有限，教材中的不妥之处在所难免，恳请读者予以批评指正。

编者

2016年6月

# 目录

前言

## 理论部分

一、基础生物化学常用实验技术 .....	1
(一) 离心技术 .....	1
(二) 沉淀分离技术 .....	3
(三) 光谱分析技术 .....	7
(四) 层析技术 .....	14
(五) 电泳技术 .....	23
二、实验数据的记录与处理 .....	25
三、实验报告的书写规范 .....	25

## 实验部分

糖类 .....	26
实验 1 血液中葡萄糖含量的测定——Folin-Wu 法 .....	26
实验 2 直链淀粉和支链淀粉的测定——双波长法 .....	28
实验 3 丙酮酸含量的测定 .....	31
实验 4 还原糖和总糖的测定 .....	32
实验 5 可溶性糖的硅胶 G 薄层层析 .....	35
实验 6 血液中乳酸的测定 .....	37
脂类 .....	39
实验 7 粗脂肪含量的测定——索氏抽提法 .....	39
实验 8 不饱和脂肪酸的反相纸层析 .....	40
实验 9 脂质的提取及薄层层析 .....	42
实验 10 血清总脂的测定 .....	43
实验 11 脂肪酸的 $\beta$ 氧化作用 .....	45
蛋白质 .....	47
实验 12 氨基酸纸层析 .....	47

实验 13 蛋白质等电点的测定 .....	49
实验 14 蛋白质含量测定 .....	50
I 考马斯亮蓝 G-250 法 (Bradford 法) .....	50
II 紫外吸收法 .....	52
实验 15 蛋白质溶液脱盐 .....	54
I 透析法 .....	54
II 凝胶过滤法 .....	55
实验 16 凝胶过滤分离血红蛋白与硫酸铜 .....	56
实验 17 聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离蛋白质 .....	59
实验 18 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白质分子质量 .....	63
实验 19 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳测定蛋白质等电点 .....	65
实验 20 细胞色素 c 的制备及测定 .....	67
实验 21 醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白 .....	70
实验 22 谷类作物种子中赖氨酸含量的测定 .....	72
核酸 .....	74
实验 23 酵母 RNA 的提取——浓盐法 .....	74
实验 24 DNA 的羟基磷灰石柱层析 .....	75
实验 25 醋酸纤维素薄膜电泳分离核苷酸 .....	77
实验 26 单核苷酸的离子交换柱层析分离 .....	79
酶 .....	80
实验 27 淀粉酶活力的测定 .....	80
实验 28 酶的基本性质 .....	83
实验 29 血清中转氨酶活性的测定 .....	87
实验 30 脂肪酶活力的测定——对硝基苯酚法 .....	89
实验 31 植物组织中过氧化氢酶活性的测定——紫外吸收连续记录法 .....	90
实验 32 脲酶 $K_m$ 值的测定 .....	92
实验 33 植物组织中过氧化物酶活力的测定 .....	95
实验 34 多酚氧化酶活力的测定 .....	96
实验 35 果实菠萝蛋白酶的动力学测定 .....	98
实验 36 乳酸脱氢酶活力的测定 .....	101
维生素 .....	103
实验 37 维生素 C 含量的测定 .....	103
I 滴定法测定维生素 C 的含量——2, 6-二氯酚靛酚滴定法 .....	103
II 紫外比色法测定维生素 C 的含量 .....	105
实验 38 维生素 B <sub>1</sub> 含量的测定 .....	106



附录 .....	109
1. 常用缓冲液的配制 .....	109
2. 硫酸铵饱和度常用表 .....	114
3. 常用层析数据 .....	115
4. 离心机转数与相对离心力的换算 .....	118
5. 常见蛋白质分子质量和等电点参考值 .....	120
参考文献 .....	123

# 理论部分

## 一、基础生物化学常用实验技术

### (一) 离心技术

离心 (centrifugation) 技术是利用离心机, 借助离心力 (centrifugal force) 分离液相非均一体系的过程。生物样品悬浮液在高速旋转下, 由于离心力作用, 悬浮的微小颗粒 (细胞器、生物大分子的沉淀等) 以一定的速度沉降, 从而得以分离, 而沉降速度取决于颗粒的质量、大小和密度等。

#### 1. 基本原理

(1) 离心力。当物质颗粒以一定角速度做圆周运动时, 受到一个向外的离心力  $F$ 。这种力的大小取决于角速度 ( $\omega$ )、旋转半径 ( $r$ ) 和粒子的质量 ( $m$ ), 方程式为:

$$F = m \cdot a = m \cdot r \cdot \omega^2 = m \cdot r \cdot \left(\frac{2\pi N}{60}\right)^2$$

式中,  $a$  为粒子旋转的加速度;  $m$  为沉降固体颗粒的有效质量;  $r$  为离心半径 (cm), 即转子中心轴到沉降颗粒之间的距离;  $N$  为离心机转速 (r/min)。

由于各种离心机转子的半径或者离心管至旋转轴中心的距离不同, 粒子在相同转速下所受离心力也不同, 因此常用相对离心力 (relative centrifugal force, RCF) 表示离心力。相对离心力是指在离心力场的作用下, 颗粒所受离心力相当于地球重力的倍数, 单位是重力加速度 ( $9.8 \text{ m/s}^2$ )。可表示如下:

$$RCF = \frac{F}{m \cdot g} = \frac{m \cdot r \cdot \omega^2}{m \cdot g} = \frac{r}{g} \cdot \left(\frac{2\pi N}{60}\right)^2$$

式中, RCF 为相对离心力, 单位以重力加速度  $g$  的倍数表示。当知道了离心机转速和转头半径后, 就很容易计算相对离心力。

(2) 沉降系数。沉降系数 (sedimentation coefficient) 是离心时, 大分子沉降速度的量度, 等于每单位离心场的沉降速度。可用下式表示:

$$S = \frac{V}{\omega^2 r}$$

式中,  $\omega$  是离心转子的角速度 (rad/s);  $r$  是到旋转中心的距离;  $V$  是沉降速度;  $S$  为沉降系数, 通常范围为 ( $1 \times 10^{-13}$ ) ~ ( $200 \times 10^{-13}$ ) s,  $10^{-13}$  这个数值命名为 1 Svedberg 单

位，以纪念离心机研究先驱 Theodor Svedberg (瑞典化学家)，简写为 S。即  $1\text{ S}=10^{-13}\text{ s}$ ，如血红蛋白的沉降系数约为  $4\times 10^{-13}\text{ s}$  或 4 S。大多数蛋白质和核酸的沉降系数为 4~40 S。

## 2. 离心机的种类与用途

离心机的种类按转速可分为常速(低速)、高速和超速三类；按用途可分为分析用、制备用和分析-制备两用三类；按对离心样品控制的温度可分为常温 and 低温(冷冻)两类。下面按离心机的转速进行简单介绍。

(1) 常速离心机。最大转速 8 000 r/min 以内，最大相对离心力在  $1\times 10^4\text{ g}$  以下，容量为几十毫升至几升，分离形式是固液沉降分离，转子有角式和外摆式，主要用于收集易沉降的大颗粒物质，如细胞、细胞碎片以及培养基残渣等固形物或粗结晶等较大的颗粒。这种离心机多为常温下操作。

(2) 高速离心机。最大转速为  $(1\times 10^4)\sim(2.5\times 10^4)\text{ r/min}$ ，最大相对离心力为  $(1\times 10^4)\sim(1\times 10^5)\text{ g}$ ，最大容量可达 3 L，分离形式也是固液沉降分离，转头配有各种角式转头、荡平式转头、区带转头、垂直转头和大容量连续流动式转头，一般都有制冷系统，以消除高速旋转转头与空气之间摩擦而产生的热量，离心室的温度可以调节和维持在  $0\sim 4\text{ }^\circ\text{C}$ ，转速、温度和时间都可以严格准确地控制。通常用于微生物菌体、细胞碎片、大细胞器、硫酸铵沉淀和免疫沉淀物等的分离纯化工作。

(3) 超速离心机。转速可达  $(2.5\times 10^4)\sim(8\times 10^4)\text{ r/min}$ ，相对离心力最大可达  $5\times 10^5\text{ g}$ ，甚至更高。离心容量由几十毫升至 2 L，分离的形式是差速沉降分离和密度梯度区带分离，离心管平衡允许的误差要小于 0.1 g。超速离心机用于分离亚细胞器、病毒、核酸、蛋白质和多糖等。超速离心机都配有温度控制系统和真空系统。当转速超过  $2\times 10^4\text{ r/min}$  时，由空气与旋转转头之间摩擦产生的热量显著增大，为此，将离心腔密封，并由真空泵系统抽成真空，温度的变化容易控制，摩擦力很小，这样才能达到所需的超高转速。

## 3. 常用离心技术

(1) 差速沉降离心法。采用不同的离心速度和离心时间，使沉降速度不同的颗粒分批分离的方法，称为差速离心(differential centrifugation)。此法一般用于分离沉降系数相差较大(大小和密度差异较大)的颗粒。操作时，采用均匀的悬浮液进行离心，首先要选择好颗粒沉降所需的离心力和离心时间。离心后，在离心管底部会得到最大和最重颗粒的沉淀，上清液在加大转速下再进行离心，又得到较大和较重颗粒的沉淀及含小和轻颗粒的上清液。如此经过多次离心，就能把液体中的不同颗粒比较好地分开。此法所得沉淀是不均一的，仍混有其他的成分，需要再悬浮和离心 2~3 次，才能得到较纯颗粒。差速离心法主要用于分离细胞器和病毒，操作简单。离心后用倾倒法即可将上清液与沉淀分开，缺点是须经多次离心，沉淀中有杂质，分离效果差，不能一次得到纯的颗粒，沉淀于管底的颗粒受挤压，有可能变性失活。

(2) 密度梯度离心法。密度梯度离心(density gradient centrifugation)是一种区带分离方法，其特点是离心管中液相介质密度是不均一的，自上而下密度逐渐增大，形成一定的梯度。梯度介质应有足够大的溶解度，来形成所需的密度，不与分离组分反应，不会引起分离组分的凝聚、变性或失活，不影响生物样品的天然结构和生物学活性。常用的梯度介质有蔗糖、甘油、氯化钠、氯化铯等。例如，蔗糖密度梯度系统，其梯度范围是：蔗糖浓度 5%~60%，密度  $1.02\sim 1.30\text{ g/cm}^3$ 。

密度梯度的制备可采用梯度混合器，也可将不同浓度的蔗糖溶液，小心地一层层加入离

心管中，越靠管底，浓度越高，形成阶梯梯度。离心前，把样品小心地铺放在预先制备好的密度梯度溶液的表面。离心后，不同大小、不同形状、有一定的沉降系数差异的颗粒在密度梯度溶液中形成若干条界面清晰的不连续区带。各区带内的颗粒较均一，分离效果较好。

#### 4. 离心操作的注意事项

离心机是生物化学实验教学和生物化学科研的重要设备，因其转速高，产生的离心力大，使用不当或缺乏定期的检修和保养，都可能引起严重事故，因此使用离心机时都必须严格遵守操作规程。

(1) 使用离心机时，必须先在天平上精密地平衡离心管和其内容物，平衡时质量之差不得超过离心机说明书上所规定的范围，不同的离心机和不同的转头有各自的允许差值，当转头只是部分装载时，离心管必须互相对称地放在转头中，以使负载均匀地分布在转头的周围。

(2) 装载溶液时，要根据离心机的具体操作说明进行，根据待离心液体的性质及体积选用适合的离心管，无盖的离心管，液体不得装得过多，以防离心时甩出，造成转头不平衡、生锈或被腐蚀。制备型超速离心机的离心管，常常要求必须将液体装满，以免离心时塑料离心管的上部凹陷变形。每次使用后，必须仔细检查转头，及时清洗、擦干，转头是离心机中须重点保护的部件，搬动时要小心，不能碰撞，避免造成伤痕，转头长时间不用时，要涂上一层上光蜡保护，严禁使用显著变形、损伤或老化的离心管。

(3) 在低于室温的温度下离心时，转头在使用前应放置在冰箱或置于离心机的转头室内预冷。

(4) 离心过程中不得随意离开，应随时观察离心机上的仪表是否正常工作，如有异常的声音应立即停机检查，及时排除故障。

### (二) 沉淀分离技术

沉淀法是溶液中溶质由液相变为固相析出的过程。沉淀法操作简单，成本低廉，不仅用于实验室中，也用于某些生产目的的制备过程中，是分离纯化生物大分子，特别是制备蛋白质和酶时最常用的方法。通过沉淀，将目的生物大分子转入固相沉淀或留在液相，而与杂质初步分离。

沉淀法是基于不同物质在溶剂中的溶解度的差异而达到分离目的。溶解度的大小与溶质和溶剂的化学性质和结构有关，溶剂组分的改变，加入某些沉淀剂或改变溶液的 pH、离子强度和极性都会使溶质的溶解度产生明显的改变。

在生物大分子制备中最常用的几种沉淀方法是：

① 中性盐沉淀（盐析法）：多用于各种蛋白质和酶的分离纯化。

② 有机溶剂沉淀：多用于蛋白质和酶、多糖、核酸以及生物小分子的分离纯化。

③ 选择性沉淀（热变性沉淀和酸碱变性沉淀）：多用于去除某些不耐热的和在一定 pH 下易变性的杂蛋白。

④ 等电点沉淀：用于氨基酸、蛋白质及其他两性物质的沉淀，但此法单独应用较少，多与其他方法结合使用。

⑤ 有机聚合物沉淀：该方法是发展较快的一种新方法，主要使用聚乙二醇（polyethylene glycol, PEG）作为沉淀剂。

#### 1. 中性盐沉淀法（盐析法）

在溶液中加入中性盐使生物大分子沉淀析出的过程称为盐析。除了蛋白质和酶以外，多

肽、多糖和核酸等都可以用盐析法进行沉淀分离，20%~40%饱和度的硫酸铵可以使很多病毒沉淀，43%饱和度的硫酸铵可以使DNA和rRNA沉淀，而tRNA保存在上清液。盐析法已有八十多年的历史，应用最广泛的领域是蛋白质，其突出的优点是：成本低廉，不需要特别昂贵的设备；操纵简单、安全；对很多生物活性物质具有稳定作用。

(1) 中性盐沉淀蛋白质的基本原理。蛋白质和酶均易溶于水，由于该分子的一COOH、 $\text{-NH}_2$ 和 $\text{-OH}$ 都是亲水基团，与极性水分子相互作用形成水化层，包围于蛋白质分子四周形成1~100 nm颗粒的亲水胶体，削弱了蛋白质分子之间的作用力，蛋白质分子表面极性基团越多，水化层越厚，蛋白质分子与溶剂分子之间的亲和力越大，因而溶解度也越大。亲水胶体在水中的稳定因素有两个：电荷和水膜。由于中性盐的亲水性大于蛋白质和酶分子的亲水性，所以加进大量中性盐后，夺走了水分子，破坏了水膜，暴露出疏水区域，同时又中和了电荷，破坏了亲水胶体，蛋白质分子即形成沉淀。

(2) 中性盐的选择。常用于盐析的中性盐是硫酸铵，它与其他常用盐类相比有十分突出的优点：分离效果好；不易引起蛋白变性；由于酶和各种蛋白质通常是在低温下稳定，因而盐析操作一般要求在低温下(0~4℃)进行，而硫酸铵溶解度大，尤其是在低温时仍有相当高的溶解度，这是其他盐类所不具备的。

(3) 盐析的操作方法。最常用的是固体硫酸铵加入法。欲从较大体积的粗提取液中沉淀蛋白质时，往往使用固体硫酸铵，加入之前要先将其研成细粉，在搅拌下缓慢、均匀、少量多次地加入，尤其当接近终点饱和度时，加入的速度更要慢一些，尽量避免局部硫酸铵浓度过大而造成不应有的蛋白质沉淀。盐析后要冰浴一段时间，待沉淀完全后再离心或过滤。在低浓度硫酸铵中盐析可采用离心分离，高浓度硫酸铵常用过滤方法，由于高浓度硫酸铵密度太大，要使蛋白质完全沉降下来需要较高的离心速度和较长的离心时间。

各种饱和度下需加固体硫酸铵的量可由附录中查出。硫酸铵浓度的表示方法是以饱和溶液的百分数表示，称为百分饱和度，而不用实际的质量或物质的量，这是由于当固体硫酸铵加到水溶液中时，会出现相当大的非线性体积变化，计算浓度相当麻烦，为了克服这一困难，研究人员经过精心测量，确定出1 L纯水达到不同浓度所需加入硫酸铵的量，以饱和浓度的百分数表示。

(4) 盐析曲线的制作。假如要分离一种新的蛋白质和酶，没有文献数据可以借鉴，则应先确定沉淀该物质的硫酸铵饱和度。具体操作方法如下：取已定量测定蛋白质或酶的活性与浓度的待分离样品溶液，冷至0~5℃，调至该蛋白质稳定的pH，分6~10次分别加进不同量的硫酸铵，第一次加硫酸铵至蛋白质溶液刚开始出现沉淀时，记下所加硫酸铵的量，这是盐析曲线的起点。继续加硫酸铵至溶液微微混浊时，静止一段时间，离心得到第一个沉淀级分，然后取上清液再加至混浊，离心得到第二个级分，如此连续可得到6~10个级分，按照每次加进硫酸铵的量，在附录中查出相应的硫酸铵饱和度。将每一级分沉淀物分别溶解在一定体积的适宜的pH缓冲液中，测定其蛋白质含量和酶活力。以每个级分的蛋白质含量和酶活力对硫酸铵饱和度作图，即可得到盐析曲线。

(5) 盐析的影响因素。

① 蛋白质的浓度：中性盐沉淀蛋白质时，溶液中蛋白质的实际浓度对分离的效果有较大的影响。通常高浓度的蛋白质用稍低的硫酸铵饱和度即可将其沉淀下来，但若蛋白质浓度过高，则易产生各种蛋白质的共沉淀作用，除杂蛋白的效果会明显下降。对低浓度的蛋白

质, 要使用更大的硫酸铵饱和度, 其共沉淀作用小, 分离纯化效果较好, 但回收率会降低。通常认为比较适中的蛋白质浓度是 2.5%~3.0%, 相当于 25~30 mg/mL。

② pH 对盐析的影响: 蛋白质所带净电荷越多, 它的溶解度就越大。改变 pH 可改变蛋白质的带电性质, 因而就改变了蛋白质的溶解度。远离等电点处溶解度大, 在等电点处溶解度小, 因此用中性盐沉淀蛋白质时, pH 常选在该蛋白质的等电点附近。

③ 温度的影响: 温度是影响溶解度的重要因素, 对于多数无机盐和小分子有机物, 温度升高溶解度加大, 但对于蛋白质、酶和多肽等生物大分子, 在高离子强度溶液中, 温度升高, 它们的溶解度反而减小。在低离子强度溶液或纯水中, 蛋白质的溶解度大多数还是随浓度升高而增加的。在一般情况下, 对蛋白质盐析的温度要求不严格, 可在室温下进行。但对于某些对温度敏感的酶, 要求在 0~4℃ 下操作, 以避免活力丧失。

## 2. 有机溶剂沉淀法

(1) 基本原理。有机溶剂对于很多蛋白质(酶)、核酸、多糖和小分子物质都能发生沉淀作用, 是较早使用的沉淀方法之一。其沉淀作用的原理主要是降低水溶液的介电常数, 溶剂的极性与其介电常数密切相关, 极性越大, 介电常数越大, 如 20℃ 时水的介电常数为 80, 而乙醇和丙酮的介电常数分别是 24 和 21.4, 因而向溶液中加入有机溶剂能降低溶液的介电常数, 减小溶剂的极性, 从而削弱了溶剂分子与蛋白质分子间的相互作用力, 增加了蛋白质分子间的相互作用, 导致蛋白质溶解度降低而沉淀。溶液介电常数的减少就意味着溶质分子异性电荷库仑引力的增加, 使带电溶质分子更易互相吸引而凝集, 从而发生沉淀。另一方面, 由于使用的有机溶剂与水互溶, 它们在溶解于水的同时从蛋白质分子四周的水化层中夺走了水分子, 破坏了蛋白质分子的水膜, 因而发生沉淀作用。

有机溶剂沉淀法的优点是: ①分辨能力比盐析法高, 即一种蛋白质或其他溶质只在一个比较窄的有机溶剂浓度范围内沉淀。②沉淀不用脱盐, 过滤比较容易(如有必要, 可用透析袋脱有机溶剂)。因而在生物化学制备中有广泛的应用。其缺点是对某些具有生物活性的大分子易引起变性失活, 操作需在低温下进行。

(2) 有机溶剂的选择和浓度的计算。用于生物化学制备的有机溶剂的选择首先是要能与水互溶。沉淀蛋白质和酶常用的是乙醇、甲醇和丙酮。沉淀核酸、糖、氨基酸和核苷酸最常用的沉淀剂是乙醇。

进行沉淀操作时, 欲使溶液达到一定的有机溶剂浓度, 需要加进的有机溶剂的浓度和体积可按式计算:

$$V = V_0 (S_2 - S_1) / (100 - S_2)$$

式中,  $V$  为需加进 100% 浓度有机溶剂的体积;  $V_0$  为原溶液体积;  $S_1$  为原溶液中有机溶剂的浓度;  $S_2$  为所要求达到的有机溶剂的浓度; 100 是指加进的有机溶剂浓度为 100%, 如所加进的有机溶剂的浓度为 95%, 上式的  $(100 - S_2)$  项应改为  $(95 - S_2)$ 。

上式的计算由于未考虑混溶后体积的变化和溶剂的挥发情况, 实际上存在一定的误差。有时为了获得沉淀而不进行分离, 可用溶液体积的倍数, 如加进一倍、二倍、三倍原溶液体积的有机溶剂, 来进行有机溶剂沉淀。

### (3) 有机溶剂沉淀的影响因素。

① 温度: 多数蛋白质在有机溶剂与水的混合液中, 溶解度随温度降低而下降。值得注意的是大多数生物大分子(如蛋白质、酶和核酸)在有机溶剂中对温度特别敏感, 温度稍高

就会引起变性，且有机溶剂与水混合时产生放热反应，因此有机溶剂必须预先冷却至较低温度，操作要在冰盐浴中进行，加入有机溶剂时必须缓慢且不断搅拌以免局部过浓。

② 样品浓度：样品浓度对有机溶剂沉淀生物大分子的影响与盐析的情况相似，低浓度样品要使用比例更大的有机溶剂进行沉淀，且样品的损失较大，即回收率低，具有生物活性的样品易产生稀释变性。但对于低浓度的样品，杂蛋白质与样品共沉淀的作用小，有利于增加分离效果。反之，对于高浓度的样品，可以节省有机溶剂，减少变性的危险，但杂蛋白质的共沉淀作用大，分离效果下降。通常，使用 5~20 mg/mL 的蛋白质初浓度为宜，可以得到较好的沉淀分离效果。

③ pH：有机溶剂沉淀适宜的 pH，要选择在样品稳定的 pH 范围内，而且尽可能选择样品溶解度最低的 pH，通常是选在等电点附近，从而提高沉淀的分辨能力。

④ 离子强度：离子强度是影响有机溶剂沉淀生物大分子的重要因素。以蛋白质为例，盐浓度太大或太小都有不利影响，通常溶液中盐浓度以不超过 5% 为宜，使用乙醇的量也以不超过原蛋白质水溶液的 2 倍体积为宜，少量的中性盐对蛋白质变性有良好的保护作用，但盐浓度过高会增加蛋白质在水中的溶解度，降低有机溶剂沉淀蛋白质的效果，通常是在低盐或低浓度缓冲液中沉淀蛋白质。

有机溶剂沉淀法经常用于蛋白质、酶、多糖和核酸等生物大分子的沉淀分离，使用时先要选择合适的有机溶剂，然后注意调整样品的浓度、温度、pH 和离子强度，使之达到最佳的分离效果。沉淀所得的固体样品，假如不是需要立即溶解进行下一步的分离，则应尽可能抽干沉淀，减少其中有机溶剂的含量，如若必要可以装入透析袋透析脱有机溶剂，以免影响样品的生物活性。

### 3. 选择性变性沉淀法

这一方法是利用蛋白质、酶和核酸等生物大分子与非目的生物大分子在物理、化学性质等方面的差异，选择一定的条件使杂蛋白质等非目的物变性沉淀而得到分离提纯，常用的选择性变性沉淀法有热变性、选择性酸碱变性和有机溶剂变性等。

(1) 热变性。利用生物大分子对热的稳定性不同，加热升高温度使某些非目的生物大分子变性沉淀而保存目的物在溶液中。此方法最为简便，不需消耗任何试剂，但分离效率较低，通常用于生物大分子的初期分离纯化。

(2) 表面活性剂和有机溶剂变性。不同蛋白质和酶等对于表面活性剂和有机溶剂的敏感性不同，在分离纯化过程中使用它们可以使那些敏感性强的杂蛋白质变性沉淀，而目的物仍留在溶液中。使用此法时通常都在冰浴或冷室中进行，以保护目的物的生物活性。

(3) 选择性酸碱变性。利用蛋白质和酶等对于溶液不同 pH 的稳定性的差异而使杂蛋白质变性沉淀，通常是在分离纯化流程中附带进行的一个分离纯化步骤。

### 4. 等电点沉淀法

等电点沉淀法是利用具有不同等电点的两性电解质，在达到电中性时溶解度最低，易发生沉淀，从而实现分离的方法。氨基酸、蛋白质、酶和核酸都是两性电解质，可以利用此法进行初步的沉淀分离。但是，由于很多蛋白质的等电点十分接近，而且带有水膜的蛋白质等生物大分子仍有一定的溶解度，不能完全沉淀析出，因此，单独使用此法分辨率较低，效果不理想，因而此法常与盐析法、有机溶剂沉淀法或其他沉淀剂一起配合使用，以提高沉淀能力和分离效果。此法主要用于在分离纯化流程中去除杂蛋白质，而不用于沉淀目的物。

## 5. 有机聚合物沉淀法

有机聚合物是 20 世纪 60 年代发展起来的一类重要的沉淀剂，最早应用于提纯免疫球蛋白和沉淀一些细菌和病毒。近年来广泛应用于核酸和酶的纯化。其中应用最多的是 PEG，它的亲水性强，溶于水和有机溶剂，对热稳定，分子质量范围广泛，在生物大分子制备中，用得较多的是相对分子质量为 6 000~20 000 的 PEG。

PEG 的沉淀效果主要与其本身的浓度和分子质量有关，同时还受离子强度、溶液 pH 和温度等因素的影响。在一定的 pH 下，盐浓度越高，所需 PEG 的浓度越低；溶液的 pH 越接近目的物的等电点，沉淀所需 PEG 的浓度越低。在一定范围内，高分子质量和浓度高的 PEG 沉淀的效率高。以上这些现象的理论解释还都仅仅是假设，未得到充分的证实，其解释主要有：①以为沉淀作用是聚合物与生物大分子发生共沉淀作用。②由于聚合物有较强的亲水性，使生物大分子脱水而发生沉淀。③聚合物与生物大分子之间以氢键相互作用形成复合物，在重力作用下形成沉淀析出。④通过空间位置排斥，使液体中生物大分子被迫挤聚在一起而发生沉淀。

本方法的优点是：操作条件温和，不易引起生物大分子变性；沉淀效率高，使用很少量的 PEG 即可以沉淀相当多的生物大分子；沉淀后有机聚合物较容易去除。

### (三) 光谱分析技术

由于每种原子都有自己的特征谱线，因此，可以根据光谱来鉴别物质和确定它的化学组成，这种方法称为光谱分析。这种方法的优点是非常灵敏而且迅速，某种元素在物质中的含量达  $10^{-10}$  g，就可以从光谱中发现它的特征谱线，因而能够把它检测出来，光谱分析在生物化学中有广泛的应用。

根据波长区域不同，光谱可分为红外光谱、可见光谱和紫外光谱；根据被测成分的形态可分为原子光谱分析与分子光谱分析，光谱分析的被测成分是原子的称为原子光谱，被测成分是分子的则称为分子光谱；根据光谱产生的方式不同，可分为发射光谱、吸收光谱和散射光谱；根据光谱表现形态不同，可分为线光谱、带光谱和连续光谱。

生物化学测定中经常应用的是吸收光谱，如可见光谱和紫外光谱，采用的技术手段是紫外可见光分光光度法，这是生物化学研究工作中必不可少的基本手段之一。目前，紫外可见光分光光度计的应用主要是在定量分析方面。

① 蛋白质分析工作中的应用。紫外可见光分光光度计在蛋白质的分析中，最主要的是做蛋白质含量检测，一般是在蛋白质的吸收峰上做吸光度测定。因为蛋白质对紫外光的主要吸收波长为 280 nm，所以采用光度测量模式，将仪器的波长调到蛋白质的最大吸收峰波长 280 nm 上，测试其吸光度大小，就可完成对蛋白质的定量检测。

② 核酸分析工作中的应用。紫外可见光分光光度计在核酸分析中的应用，主要是用来对核酸的定量检测。因为核酸的吸收峰在 260 nm，只要采用光度测量模式，将紫外可见光分光光度计的波长调到核酸的最大吸收峰 260 nm 上即可。

③ 氨基酸分析工作中的应用。紫外可见光分光光度计在氨基酸分析中的应用，主要是用来对氨基酸的定量检测。因为氨基酸对紫外光的主要吸收波长为 230 nm，所以只要采用光度测量模式，将紫外可见光分光光度计的波长调到氨基酸的最大吸收峰 230 nm 上，就可测试其吸光度大小，从而计算出氨基酸的含量。

④ 糖类分析工作中的应用。紫外可见光分光光度计在糖的分析中，主要是做定量检测。因为糖对紫外光的主要吸收波长为 218 nm，所以对糖类进行分析时，只要采用光度测量模



式，将紫外可见光分光光度计的波长调到糖的最大吸收峰 218 nm 上，就可测试其吸光度大小，从而计算出糖的含量。

⑤ 多糖分析工作中的应用。紫外可见光分光光度计在多糖的分析中，主要也是做定量检测。因为多糖对紫外光的主要吸收波长为 206 nm，所以只要采用光度测量模式，将紫外可见光分光光度计仪器的波长调到多糖的最大吸收峰 206 nm 上，就可测试其吸光度大小，从而计算出多糖的含量。但是，多糖的分析难度很大。因为在 206 nm 处的时候，光源（氘灯）的能量已经很弱，仪器光学系统的能量输出也很低，光电倍增管的灵敏度也很低，206 nm 左右的干扰也很大。所以用紫外可见光分光光度计做多糖的分析难度较大，目前许多科学家正在研究中。

这里将着重讨论紫外可见光分光光度法的基本原理及所用仪器构造，同时简要介绍其他的光谱分析方法。

### 1. 分光光度法

分光光度法 (spectrophotometry) 是利用物质所特有的吸收光谱来鉴别物质或测定其含量的一门技术。因分光光度法灵敏、精确、快速和简便，已成为生物化学研究中广泛使用的方法之一。

(1) 基本原理。物质对光的吸收具有选择性，各种不同的物质都具有各自的吸收光谱。当某单色光通过溶液时，其透射光强会减弱。因为有一部分光在溶液的表面被反射或散射，一部分光被组成此溶液的物质所吸收，只有一部分光可透过溶液。

$$\text{入射光} = \text{反射光} + \text{散射光} + \text{吸收光} + \text{透射光}$$

当入射光、摩尔消光系数和溶液的光径长度不变时，透射光是根据溶液的浓度而变化的。这是分光光度计设计的基本原理。

(2) 分光光度计。采用适当的光源、单色器（棱镜、滤光片等）和适当的光源接收器，可使溶质浓度的测定范围扩展到可见光区、紫外光区和红外光区，并提高灵敏度，可获得波长范围更窄的较纯的单色光，更符合 Beer-Lambert 定律。

由于分光光度计可在较宽的光谱范围（200~1 000 nm）内获得较纯的单色光，因此，既可用于可见光，也可用于紫外光或红外光的吸光测定。分光光度法可利用物质特有的吸收光谱曲线进行定性定量测定，测定物质既可为有色物质，也可为无色物质。

不同的物质分子结构不同，光吸收和效应不同，其吸收光谱曲线有其特殊的形状。以不同波长的单色光作为入射光，测定物质溶液的吸光度，然后以入射光的不同波长为横轴，各相应的吸光度为纵轴作图，可得该物质溶液的吸收光谱曲线。因此借助于分光光度法可测定出用化学方法不易分离的动植物组织中所含组分的不同吸收光谱曲线，用于确定组分的性质和含量。

常用的分光光度计有许多种，下面简要介绍常用的 752 型紫外可见光分光光度计的设计原理和使用方法。

752 型紫外可见光分光光度计由光源室、单色器、试样室、光电管暗盒、电子系统及数字显示器等部件组成（图 1）。752 型紫外可见光分光光度计使用光栅自准式色散系统和单光束结构光路，灵敏度更高（图 2）。

752 型紫外可见光分光光度计光谱范围 200~1 000 nm，光源由钨灯和氘灯组成，可自动切换光源，由于单色器利用平面光栅代替棱镜作为色散元件，克服了非线性色散，出射狭缝选出指定带宽的单色光通过聚光镜落在试样室被测样品中心，样品吸收后透射光经光门射向光电管