

实验三

蛋白质的沉淀

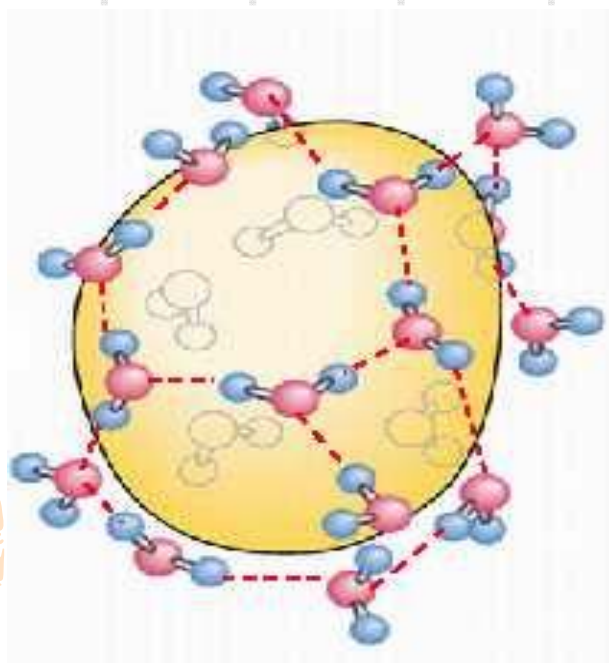


实验目的:

学习蛋白质沉淀的两种类型及各种方法



蛋白质的胶体性质

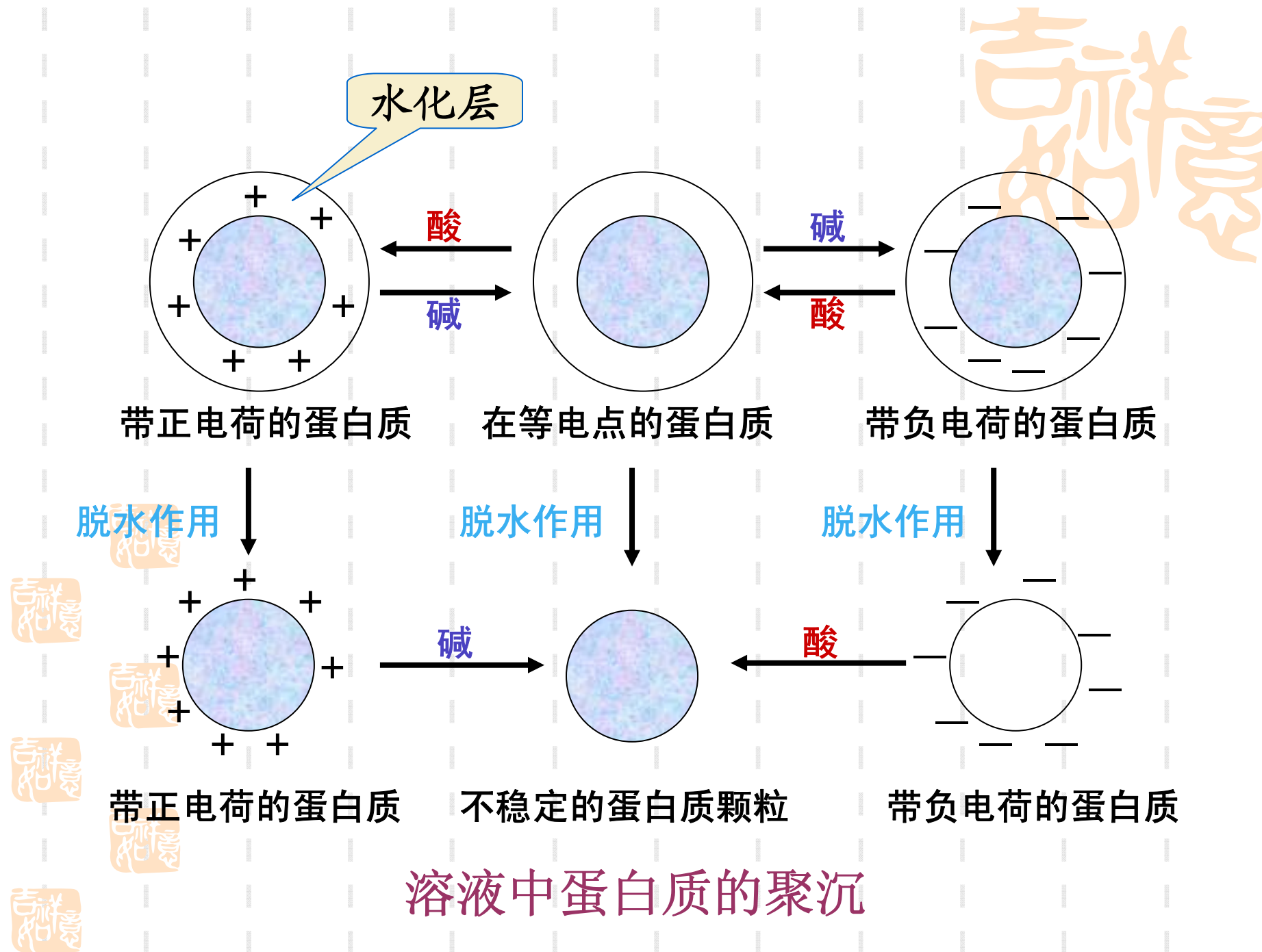


蛋白质溶液是一种亲水胶体，每克蛋白质分子能结合0.3~0.5克水。

- 蛋白质属于生物大分子之一，分子量可自1万至100万之巨，其分子的直径可达1~100nm，为胶粒范围之内。
- 真溶液(1nm) < 胶体溶液 < 悬浮液(100nm)

蛋白质的胶体特征

1. 蛋白质的分子大小属于胶体质点的范围
2. 蛋白质溶液稳定：
 - (1) 水化层：可溶性蛋白质分子表面分布着大量极性氨基酸残基，对水有很高的亲和性，通过水合作用在蛋白质颗粒外面形成一层水化层
 - (2) 双电层：分子表面上的可解离基团，在适当的pH条件下，都带有相同的净电荷，与其周围的反离子构成稳定的双电层。
3. 蛋白质溶液也和一般的胶体系统一样具有丁达尔效应、布朗运动以及不能通过半透膜等性质



蛋白质的沉淀



蛋白质在溶液中的稳定性是有条件的、相对的。在一定的物理化学因素影响下，蛋白质颗粒失去电荷，脱水，甚至变性，则以固态形式从溶液中析出，这个过程称为蛋白质的沉淀反应。



蛋白质的沉淀反应可分为以下两种类型：

一、可逆沉淀反应(不变性沉淀反应)

在发生沉淀反应时，蛋白质虽已沉淀析出，但其分子内部结构并未发生显著变化，基本上保持原有的性质，沉淀因素除去后，能再溶于原来的溶剂中。属于这一类的反应有盐析作用；在低温下，乙醇、丙酮等有机溶剂对蛋白质的短时间作用；以及利用等电点的沉淀等。

二、不可逆沉淀反应

在发生沉淀反应时，蛋白质分子内部结构、空间构型遭到破坏，失去原来的天然性质，这时蛋白质已发生变性。这种变性蛋白质的沉淀不能再溶解于原来溶剂中的作用叫作不可逆沉淀反应。重金属盐、生物碱试剂、过酸、过碱、加热、震荡、超声波，有机溶剂等都能使蛋白质发生不可逆沉淀反应。

蛋白质的沉淀

(1) 盐析法 向蛋白质溶液中加入大量的中性盐(硫酸铵、硫酸钠或氯化钠等), 使蛋白质从溶液中沉淀析出的过程。在高浓度的中性盐影响下, 蛋白质分子被盐脱去水化层, 同时蛋白质分子所带的电荷被中和, 结果蛋白质的胶体稳定性遭受破坏而沉淀析出。析出的蛋白质仍保持其天然蛋白的性质, 减低盐的浓度时, 还能溶解。

分段盐析: 球蛋白可被50%饱和度的硫酸铵溶液沉淀, 清蛋白则被饱和的硫酸铵溶液沉淀。

蛋白质的沉淀

(2) 有机溶剂沉淀法 (甲醇、乙醇或丙酮等)

①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，导致蛋白质溶解度降低而沉淀。②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周围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。

优点：分辨能力比盐析法高；缺点：是对某些具有生物活性的大分子容易引起变性失活，操作需在低温下进行。



(3) 等电点沉淀法

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。



蛋白质的沉淀

(4) 重金属盐沉淀法 当溶液pH大于等电点时，蛋白质颗粒带负电荷，这样它就容易与重金属离子(Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^{+} 等)结合成不溶性盐而沉淀。

医疗用途：误服重金属盐的病人可口服大量牛乳或豆浆等蛋白质进行解救；就是因为它能和重金属离子形成不溶性盐，然后再服用催吐剂排出体外。

蛋白质的沉淀

(5) 生物碱试剂和某些酸类沉淀法

生物碱试剂是指能引起生物碱(alkaloid)沉淀的一类试剂，如苦味酸（2，4，6—三硝基酚），钨酸和碘化钾等。

酸类指的是三氯醋酸，磺基水杨酸和硝酸等。

当溶液pH小于等电点时，蛋白质颗粒带正电荷，容易与生物碱试剂和酸类的酸根负离子发生反应生成不溶性盐而沉淀。

生物碱类（Alkaloids）及生物碱试剂

■ 生物碱类（Alkaloids）

是存在于生物体（主要为植物）中的一类含氮的碱性有机化合物，大多数有复杂的环状结构，有显著的生物活性，是中草药中重要的有效成分之一。如黄连中的小檗碱（黄连素）、麻黄中的麻黄碱、萝芙木中的利血平、喜树中的喜树碱、长春花中的长春新碱等。

■ 生物碱试剂

一些特殊试剂（常系重金属盐类或分子量较大的复盐如碘化汞钾，碘化铋钾以及特殊无机酸如硅钨酸、磷钨酸，或有机酸如苦味酸），可与生物碱作用生成不溶性盐而沉淀。

蛋白质的沉淀

(6) 加热变性沉淀法

几乎所有的蛋白质都因加热变性而凝固。原因可能是由于热变性是蛋白质天然结构解体，疏水基外露，因而破坏了水化层，同时由于蛋白质处于等电点也破坏了带电状态。

我国很早就创造了将大豆蛋白质的浓溶液加热并点入少量盐卤(含 MgCl_2)的制豆腐的方法，这是成功的应用加热变性沉淀蛋白质的一个例子。

实验操作

一、分段盐析

- ①向试管中加入3毫升卵清蛋白溶液，然后加入3毫升饱和的硫酸铵溶液，轻轻混合，静置5分钟，可以看到白色的球蛋白沉淀。
- ②向溶液中加入硫酸铵粉末至饱和，观察清蛋白沉淀的形成。
- ③透析 观察沉淀消失

实验操作



二、三氯乙酸沉淀

- ①向试管中加入3毫升卵清蛋白溶液，加入2毫升三氯乙酸观察蛋白质溶液的变化。
- ②透析 观察沉淀是否消失
- ③透析液中滴加硝酸银溶液，检测是否有氯离子析出(硝酸银与氯离子生成氯化银沉淀)
- 用白明胶代替卵清蛋白溶液重复以上操作。



白明胶 (gelatin)



为纯胶原蛋白，是将构成动物的皮、腱、骨等的胶原 (collagen) 经酸水解后再用水在60℃时抽提所得得到的一种衍生蛋白质。胶原中连接肽链间的盐键和氢键断开而出现三维网状结构。

