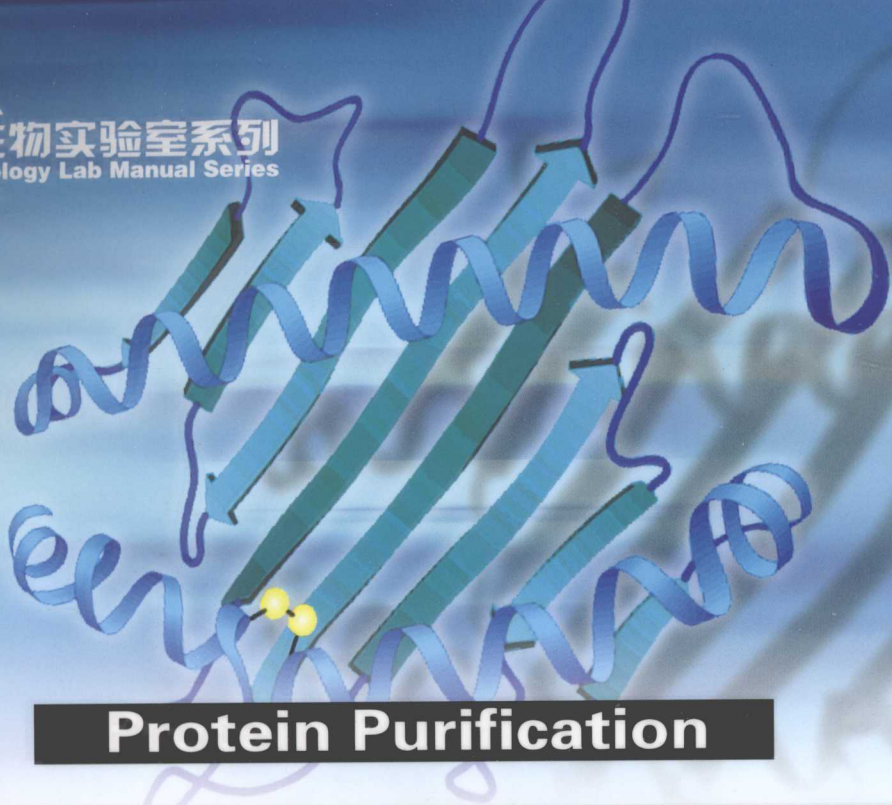




生物实验室系列
Biology Lab Manual Series



Protein Purification

Protocols and Applications

蛋白质纯化 实验方案与应用

吕宪禹 主编



化学工业出版社



Protein Purification

Protocols and Applications

蛋白质纯化 实验方案与应用



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质纯化实验方案与应用/吕宪禹主编. —北京:
化学工业出版社, 2010.5
(生物实验室系列)
ISBN 978-7-122-08006-6

I. 蛋… II. 吕… III. 蛋白质-提纯 IV. Q51

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 050613 号

责任编辑: 傅四周

义子编辑: 晋京岩

责任校对: 宋 玮

装帧设计: 关 飞

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 装: 三河市延风印装厂

720mm×1000mm 1/16 印张 13 $\frac{3}{4}$ 字数 263 千字 2010 年 6 月北京第 1 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: 58.00 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

主 编 吕宪禹

副主编 孙 蕾 陈小刚 周 浩

编写人员 (以姓氏笔画为序)

吕 喆 吕宪禹 孙 蕾 吴 迪

陈小刚 苗会娟 周 浩 周先虎

周爱玲 赵 莉 高金珉 裴朝玉

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了“生物实验室系列”图书。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每

一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列”图书的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列”图书的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社
生物·医药出版分社

前 言

在当前日益广泛的蛋白质结构和功能研究中，尤其是在从生物材料中进行多种蛋白的分离、纯化和鉴定的研究中，蛋白质样品的分析和制备技术的应用日益广泛。特别是当前分子生物学和现代医学的发展对不同生物组织中蛋白的研究日益增多，了解和掌握此类蛋白分析、分离的现代化方法，对于研究者来说显得尤为重要。

生命科学是实验性很强的科学，所以生命科学的发展对实验技术提出了更高要求。为了有助于生命科学工作者进一步了解蛋白纯化相关实验，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，我们编写了《蛋白质纯化实验方案与应用》。

本书详细介绍了材料的预处理、蛋白质的粗提、经典色谱分离、高效液相色谱、质谱、电色谱、分子印迹、电泳以及蛋白质检测的基本原理及实验设计方案。本书强调可操作性，对每一项实验技术都系统介绍其原理方法和实验过程，让读者了解到每一点成就都是建立在大量方案设计、具体步骤以及实验结果的正确处理的基础之上的。其中不仅含有经典的实验技术，还特别突出了当前实验的新理论、新技术与新发展，给蛋白质纯化专业人员以借鉴和引导作用。

本书的完成离不开南开大学生命科学学院相关实验室的老师和同学们的大力支持，同时 GE 公司提供的案例对编者启发很大，在此一并表示感谢。

由于水平所限，本书中涉及的某些特殊领域，编者未能面面俱到，同时书中错漏之处在所难免，敬请广大读者批评指正。

编者

2010 年 4 月

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 蛋白质的研究历史	1
1.2 蛋白质的理化性质和生物学特性	1
1.3 蛋白质纯化手段的历史回顾	2
1.4 纯化蛋白的应用	2
参考文献	3

第 1 部分 材料的预处理和蛋白质的粗提

第 2 章 不同来源材料的预处理	6
2.1 不同材料的预处理	6
2.1.1 植物材料的预处理	7
2.1.2 动物材料的预处理	7
2.1.3 微生物材料的预处理	8
2.2 细胞的破碎	8
2.2.1 机械法	9
2.2.2 非机械法	11
方案 2.1 超声波法提取烟草叶中的 3-磷酸甘油脱氢酶	12
方案 2.2 从猪胰脏中提取胰凝乳蛋白酶	13
方案 2.3 从大肠杆菌中提取诱导表达的 (His) ₆ -X	14
参考文献	16
第 3 章 蛋白质的沉淀	17
3.1 盐析法	17
3.2 有机溶剂沉淀法	18
3.3 等电点沉淀法	19
3.4 非离子多聚物沉淀法	19
3.5 选择性沉淀法	20
方案 3.1 用盐析法选择性沉淀蛋白质	21
方案 3.2 用有机溶剂沉淀蛋白质	22
方案 3.3 使用蛋白质排阻和拥挤剂选择性沉淀蛋白质	23
参考文献	24

第4章 蛋白质的浓缩	26
4.1 吸附法	26
4.2 超滤法	27
4.3 沉淀法	28
4.4 透析法	28
4.5 冷冻干燥法	28
4.6 双水相分离法	29
方案 4.1 用透析袋进行脱盐、浓缩和更换缓冲液	29
方案 4.2 用不对称圆盘膜超滤进行浓缩或透析	31
参考文献	32

第2部分 色谱法分离纯化蛋白质

参考文献	35
第5章 凝胶过滤色谱	36
5.1 基本原理	36
5.2 实验方案设计	37
5.2.1 凝胶介质的选择	37
5.2.2 凝胶介质的预处理	37
5.2.3 色谱柱的选择	38
5.2.4 凝胶柱的装填	38
5.2.5 样品处理和上样	38
5.2.6 洗脱和收集	39
5.2.7 色谱柱的清洗、再生与保存	39
方案 5.1 用凝胶过滤色谱更换缓冲液	39
方案 5.2 凝胶过滤色谱分离三种分子量不同的蛋白质	41
参考文献	43
第6章 离子交换色谱	44
6.1 基本原理	44
6.2 实验方案设计	46
6.2.1 离子交换介质的选择	46
6.2.2 流动相的选择	47
6.2.3 色谱柱的选择	47
6.2.4 离子交换剂预处理和装柱	47
6.2.5 加样	48
6.2.6 洗脱	48
6.2.7 洗脱组分的收集和分析	49

6.2.8 离子交换剂的再生、清洗与储存·····	49
方案 6.1 弱阴离子交换色谱和强阳离子交换色谱在分离纯化单克隆 抗体中的应用·····	49
参考文献·····	53
第 7 章 亲和色谱 ·····	54
7.1 基本原理·····	54
7.2 亲和色谱的几种类型·····	55
7.2.1 金属螯合亲和色谱·····	55
7.2.2 免疫亲和色谱·····	56
7.2.3 凝集素亲和色谱·····	56
7.3 实验方案设计·····	56
7.3.1 亲和吸附剂的选择·····	56
7.3.2 装柱·····	56
7.3.3 上样·····	57
7.3.4 吸附·····	57
7.3.5 流速和清洗·····	57
7.3.6 洗脱·····	57
7.3.7 再生和保存·····	58
方案 7.1 亲和色谱纯化抗体融合蛋白·····	58
方案 7.2 金属螯合亲和色谱分离大肠杆菌重组表达的蛋白·····	61
方案 7.3 从大肠杆菌中提取诱导表达的 GST 标签融合蛋白·····	63
参考文献·····	65
第 8 章 疏水色谱 ·····	66
8.1 基本原理·····	66
8.2 实验方案设计·····	67
8.2.1 疏水配基的选择·····	67
8.2.2 离子强度及种类·····	67
8.2.3 破坏水化作用的物质·····	68
8.2.4 温度·····	68
8.2.5 洗脱方式·····	68
8.2.6 表面活性剂·····	68
8.2.7 色谱柱使用后的处理·····	69
方案 8.1 用疏水色谱去除抗体融合蛋白样品中的多聚体·····	69
参考文献·····	72
第 9 章 分子印迹技术 ·····	73
9.1 分子印迹主要术语·····	74

9.1.1	功能单体	74
9.1.2	交联剂	74
9.1.3	溶剂和致孔剂	75
9.1.4	引发剂	75
9.1.5	适用的印迹分子	76
9.2	分子印迹的分类	76
9.2.1	共价型	76
9.2.2	非共价型	77
9.3	印迹效率的评价	77
9.3.1	保留因子	77
9.3.2	分离因子	77
9.3.3	分离度	77
9.3.4	等温吸附方程	78
9.3.5	经典孔径分布曲线	78
9.3.6	吸附曲线	78
9.3.7	其他手段	78
9.4	分子印迹技术在蛋白质分离中的展望	78
方案 9.1	溶菌酶分子印迹的制备和应用	80
方案 9.2	血红蛋白分子印迹的制备和应用	83
	参考文献	86
第 10 章	高效液相色谱法分离纯化蛋白质	88
10.1	高效液相色谱的基本原理和分类	88
10.1.1	与经典液相(柱)色谱法比较	88
10.1.2	高效液相色谱法的特点	88
10.1.3	高效液相色谱仪	89
10.1.4	高效液相色谱常用参数	90
10.1.5	高效液相色谱仪标准操作规程	92
10.2	常用流动相的极性和选择	94
10.2.1	何谓流动相	94
10.2.2	流动相的性质要求	94
10.2.3	流动相的选择	95
10.2.4	准备流动相的一般过程	95
10.2.5	卤代有机溶剂应特别注意的问题	97
10.2.6	HPLC 用水	97
10.2.7	常用流动相组分的物理特性	97
10.3	常用检测器	97

10.3.1	概述	97
10.3.2	检测器的性能指标	98
10.3.3	各类检测器	99
10.4	特异性蛋白专用柱特点和操作	106
10.4.1	固定相	106
10.4.2	色谱类型	106
10.4.3	常用键合相的表面化学结构	107
10.4.4	色谱柱	107
10.5	常见故障排除	109
10.5.1	与色谱柱相关的问题	109
10.5.2	造成色谱峰(不对称)拖尾的原因	110
10.5.3	如何解决峰形拖尾的问题	110
10.5.4	如何贮存色谱柱	111
10.5.5	谱图问题	111
10.5.6	常见故障	111
10.6	高效液相色谱在蛋白质分离纯化中的应用实例	115
10.6.1	反相色谱分离蛋白质	115
方案 10.1	肽类酶解混合物色谱过程	117
方案 10.2	蛋白质样品纯化色谱过程	118
方案 10.3	白细胞介素-2 反相高效液相色谱纯化	119
方案 10.4	水蛭素 12 肽的反相高效液相色谱纯化	120
10.6.2	疏水作用色谱	121
方案 10.5	高效疏水作用色谱分离纯化四种蛋白质纯品	125
方案 10.6	人唾液蛋白的高效疏水色谱分离纯化	126
方案 10.7	疏水作用色谱法同时纯化及复性基因重组人干扰素	127
10.6.3	高效离子交换液相色谱法纯化蛋白质分子	128
方案 10.8	高效阴离子交换液相色谱法	129
方案 10.9	高效阳离子交换液相色谱法	130
方案 10.10	高效离子交换色谱法分离皖南尖吻蝾蛇毒活性组分	131
方案 10.11	高效离子交换色谱(HPIEC)分离经 HPHIC 分离后的微粒体 P450	132
10.6.4	高效排阻液相色谱法纯化蛋白质分子	133
方案 10.12	高效体积排阻液相色谱基本操作程序	135
方案 10.13	重组人粒细胞集落刺激因子分子量测定	136
	参考文献	137

第 11 章 毛细管电色谱及其在蛋白质分离纯化中的应用	138
11.1 毛细管电色谱	138
11.2 毛细管电色谱技术历史回顾	138
11.3 毛细管电色谱基本分离模式	139
11.3.1 开管柱电色谱	139
11.3.2 填充柱电色谱	140
11.3.3 整体柱电色谱	140
11.3.4 CEC 分离模式的选择	141
11.3.5 CEC、CE 和 HPLC 的对照分析	141
11.4 毛细管电色谱在蛋白分离分析中的新技术	142
11.4.1 在线样品预浓集-毛细管电色谱联用技术	142
11.4.2 毛细管电色谱-质谱联用技术在蛋白分离分析中的应用	143
11.5 毛细管电色谱基本术语和原理	143
11.5.1 电迁移和电渗、电渗流、电动现象、焦耳热效应	143
11.5.2 保留机制和分离机理	143
11.6 毛细管电色谱仪器	144
11.6.1 毛细管电色谱仪器的基本要求	144
11.6.2 基本装置	145
11.6.3 检测系统	145
方案 11.1 离子交换电色谱纯化蛋白质的研究	146
方案 11.2 微流控芯片-多维毛细管电色谱分离牛血清白蛋白酶消解产物	150
方案 11.3 毛细管电色谱耦合飞行时间质谱分离鉴定卵清蛋白的酶解产物	153
参考文献	154
第 12 章 其他色谱分析方法简介	156
12.1 超临界流体色谱	156
12.1.1 超临界流体简介	156
12.1.2 超临界流体色谱简介	156
12.1.3 SFC 的流动相	156
12.1.4 SFC 的固定相	157
12.1.5 SFC 的检测系统	157
12.1.6 联机分析与定性	158
12.2 逆流色谱	158
12.2.1 简介	158
12.2.2 逆流色谱的特点	159
12.2.3 溶剂体系的选择和制备	159

12.2.4	CPC 的检测仪器	160
12.3	亲水色谱	160
12.3.1	简介	160
12.3.2	HILIC 的特点	160
12.3.3	HILIC 固定相	161
12.3.4	展望	162
12.4	快速色谱	162
12.4.1	简介	162
12.4.2	快速色谱原理与系统组成	162
12.4.3	与制备 HPLC 的关系	163
	参考文献	163

第 3 部分 电泳法分离纯化蛋白质

第 13 章	聚丙烯酰胺凝胶电泳	166
13.1	聚丙烯酰胺凝胶电泳常用溶液及配制	166
13.2	不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳	167
13.3	变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	167
13.4	聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳	169
13.5	小分子多肽凝胶电泳	170
13.6	非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	170
13.7	聚丙烯酰胺凝胶中蛋白的回收	170
方案 13.1	SDS 变性电泳分析牛血清白蛋白 (BSA)	171
方案 13.2	BSA 变性梯度胶电泳方案	173
方案 13.3	小分子多肽 (抗菌肽) 凝胶电泳	174
方案 13.4	非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳	175
	参考文献	177
第 14 章	聚丙烯酰胺等电聚焦	178
14.1	聚丙烯酰胺等电聚焦具有高分辨率的特点	178
14.2	等电聚焦 pH 梯度的形成	178
14.3	等电聚焦电泳板式	179
方案 14.1	HeLa 细胞裂解液等电聚焦	179
	参考文献	181
第 15 章	双向电泳	182
15.1	样品的制备	182
15.2	IPG 的选择和上样	183
15.3	第一向电泳: 等电聚焦电泳 (IEF)	183

15.4	IPG 胶条平衡	184
15.5	采用垂直系统进行第二向电泳：十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	184
方案 15.1	HeLa 细胞周期依赖性蛋白表达和修饰的分析	184
	参考文献	186

第 4 部分 蛋白质纯化效果的评价和蛋白质分析

第 16 章	蛋白质浓度、纯度及活性的分析	188
16.1	测定蛋白质浓度的方法简介	188
16.1.1	凯氏定氮法	188
16.1.2	双缩脲法	188
16.1.3	Lowry 法	189
16.1.4	紫外分光光度法	189
16.1.5	考马斯亮蓝染色法	190
16.1.6	BCA 检测法	190
16.2	测定蛋白质纯度的方法简介	190
16.2.1	电泳法	190
16.2.2	色谱法	190
16.2.3	免疫化学法	190
16.3	测定蛋白质活性的方法简介	191
方案 16.1	双缩脲法测定未知蛋白的含量	191
方案 16.2	BCA 法测定蛋白质浓度	192
方案 16.3	豆类中球蛋白的定量分析	193
方案 16.4	心肌、骨骼肌线粒体内膜 ATPase 的测定	194
方案 16.5	荧光分光光度法测定肌肉中乳酸脱氢酶的活性	195
	参考文献	196
第 17 章	蛋白质的分析及应用	197
17.1	质谱技术在蛋白质分析中的应用	197
17.2	核磁共振法在蛋白质分析中的应用	197
17.3	X 射线晶体学相关的蛋白质纯化	198
方案 17.1	白眉蝮蛇蛇毒精氨酸酯酶分离提纯及分子量的质谱测定	198
方案 17.2	肿瘤差异蛋白质的质谱定性	198
方案 17.3	果蝇蛋白质磷酸化的质谱分析	200
方案 17.4	核磁共振法研究细胞色素空间结构	202
方案 17.5	以 X 射线衍射为目的的 SARS-COV M ^{prc} 蛋白的分离纯化	202
	参考文献	203

第 1 章 绪 论

1.1 蛋白质的研究历史

蛋白质是一种复杂的有机化合物，旧称“朊”。蛋白质这一概念最早是由瑞典化学家永斯·贝采利乌斯于 1838 年提出的，但当时人们对于蛋白质在机体中的核心作用并不了解。1926 年，詹姆斯·B·萨姆纳揭示尿素酶是蛋白质，首次证明了酶是蛋白质。第一个被测序的蛋白质是胰岛素，由弗雷德里克·桑格完成，他也因此获得 1958 年度的诺贝尔化学奖。首先被解析的蛋白质结构包括血红蛋白和肌红蛋白的结构，所用方法为 X 射线晶体学；该工作由马克斯·佩鲁茨和约翰·肯德鲁于 1958 年分别完成，他们也因此获得 1962 年度的诺贝尔化学奖。

1.2 蛋白质的理化性质和生物学特性

蛋白质是由氨基酸分子呈线性排列所形成的，相邻氨基酸残基的羧基和氨基通过形成肽键连接在一起。蛋白质的氨基酸序列是由对应基因所编码的。除了遗传密码所编码的 20 种“标准”氨基酸以外，在蛋白质中，某些氨基酸残基还可以被翻译后修饰而发生化学结构的变化，从而对蛋白质进行激活或调控。多个蛋白质可以一起，往往是通过结合在一起形成稳定的蛋白质复合物，发挥某一特定功能。

与其他生物大分子（如多糖和核酸）一样，蛋白质是生物体中的必要组成成分，参与了细胞生命活动的每一个进程。酶是最常见的一类蛋白质，它们催化生物化学反应，尤其对于生物体的代谢至关重要。除了酶之外，还有许多结构性或机械性蛋白质，如肌肉中的肌动蛋白和肌球蛋白，以及细胞骨架中的微管蛋白（参与形成细胞内的支撑网络以维持细胞外形）。另外一些蛋白质则参与细胞信号传导、免疫反应、细胞黏附和细胞周期调控等。同时，蛋白质也是人们日常饮食中必需的营养物质，这是因为动物自身无法合成所有必需氨基酸；通过消化所摄入的蛋白质食物（将蛋白质降解为氨基酸），人体就可以将吸收的氨基酸用于自身的蛋白质合成。

蛋白质是由不同的 L 型 α 氨基酸所形成的线性聚合物。目前在绝大多数已鉴定的天然蛋白质中发现的氨基酸有 20 种。不过在自然界中还存在着一些特殊的氨基酸，例如在一种海洋寡毛纲小蠕虫 *Olavius algarvensis* 以及与之存在共生关系的

细菌 $\delta 1$ (该细菌属于 δ 变形菌) 中存在着高含量的硒代半胱氨酸 (Selenocysteine), 由原本为终止密码子的 UGA 编码, 以及吡咯赖氨酸 (Pyrrolysine), 由终止密码子 UAG 编码。

蛋白质是细胞中的主要功能分子。除了特定类别的 RNA, 大多数的其他生物分子都需要蛋白质来调控。蛋白质也是细胞中含量最为丰富的分子之一; 例如, 蛋白质占大肠杆菌细胞干重的一半, 而其他大分子如 DNA 和 RNA 则只分别占 3% 和 20%。在一个特定细胞或细胞类型中表达的所有蛋白被称为对应细胞的蛋白质组。

蛋白质能够在细胞中发挥多种多样的功能, 涵盖了细胞生命活动的各个方面: 发挥催化作用的酶; 参与生物体内新陈代谢的调剂作用, 如胰岛素; 一些蛋白质具有运输代谢物质的作用, 如离子泵和血红蛋白; 发挥储存作用, 如植物种子中的大量蛋白质, 就是用来萌发时的储备; 许多结构蛋白被用于细胞骨架等的形成, 如肌球蛋白; 还有免疫、细胞分化、细胞凋亡等过程中都有大量蛋白质参与。

1.3 蛋白质纯化手段的历史回顾

为了进行体外 (*in vitro*) 研究, 必须先将目的蛋白质从其他细胞组分中分离提纯出来。这一过程通常从细胞裂解开始 (对于分泌性蛋白质的提纯则不需要裂解细胞), 通过破坏细胞膜将细胞内含物释放到溶液中, 从而获得含有目的蛋白质的细胞裂解液。然后通过超速离心将细胞裂解液中膜脂和膜蛋白、细胞器、核酸以及含有可溶蛋白质的混合物。盐析法是一种较为常用的通过沉淀从裂解液中分离浓缩蛋白质的方法。基于目的蛋白质的化学性质 (如分子量、带电情况和结合活性), 可以利用不同的色谱法来进一步分离提纯蛋白质。纯化的程度可以用电泳 (已知目的蛋白质的分子量)、光谱学 (目的蛋白质具有独特的光谱学特征) 或者酶活性分析反应 (目的蛋白质具有特定的酶活性) 来衡量。

对于天然蛋白质, 可能需要一系列的纯化步骤才能获得纯度足以用于实验室应用的蛋白质。为了简化这一过程, 通常采用基因工程的手段在目的蛋白质上添加一些化学特性, 在不改变其结构和生物学活性的情况下使纯化过程更为简单。通常是将含有特定氨基酸序列的“标签”连接在目的蛋白质的 N-端或 C-端。例如, 含有连续多个组氨酸的序列, 称为组氨酸标签 (His-tag); 将含有带组氨酸标签蛋白质的裂解液流过含有镍的亲合色谱柱, 组氨酸就可以与镍螯合从而结合在柱子上, 而裂解液中其他蛋白质由于没有组氨酸标签而直接流出柱子, 从而达到分离目的。通过基因工程 (即 DNA 重组) 改造而获得的蛋白质被称为重组蛋白质。

1.4 纯化蛋白的应用

对于早期的生物化学家来说, 研究蛋白质的困难在于难以纯化大量的蛋白质以