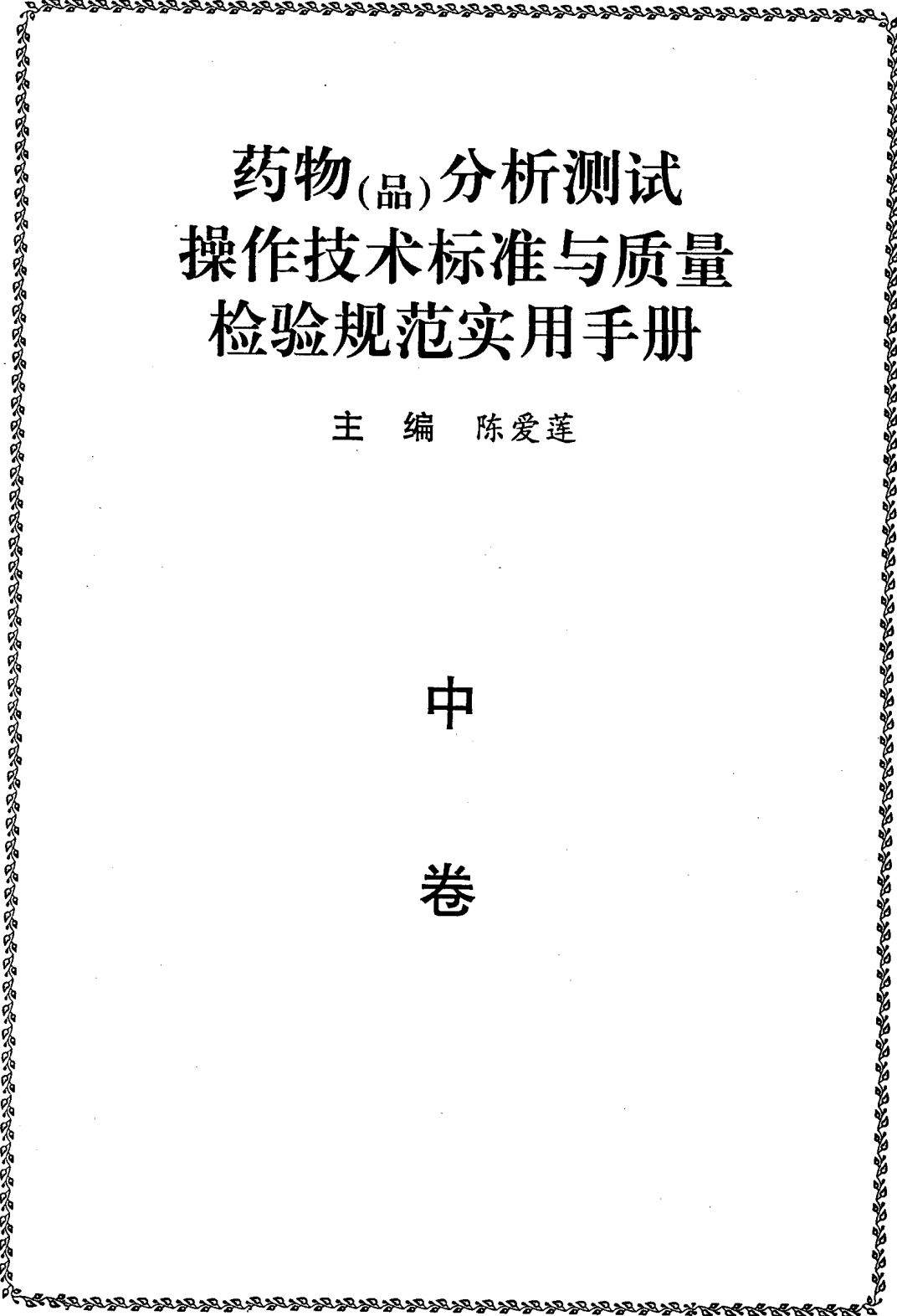


分析测试操作技术标准与 质量检验规范实用手册





药物(品)分析测试 操作技术标准与质量 检验规范实用手册

主 编 陈爱莲

中

卷

纯化,最后根据要求作成一定的制剂,包括固定化。

一、提取

提取的要求是将尽可能多的酶、尽量少的杂质从原料中引入溶液,提取包括预处理和破细胞、抽提和浓缩三个环节。破细胞对动物材料通常用绞肉机、匀浆器等,也可加砂研磨,必要时还可作成丙酮粉末。抽提一般用稀盐、稀酸或稀碱,抽提液和抽提条件的选择要根据酶的溶解性、稳定性及有利于切断酶和其他物质的联系而定。抽提液常较稀,浓缩方法有超蒸发、超过滤、胶过滤、反透析等。

二、纯化

现在采用的纯化方法都是以酶与杂蛋白在理化性质上、稳定性上的差别以及酶的生物学特性为依据而建立起来的,包括:

(1) 根据溶解度的不同,如盐析法、有机溶剂沉淀法、共沉淀法、选择性沉淀法、等电点沉淀法及双相(水溶液)分离法。

(2) 根据分子大小的差别,如胶过滤(层析)法、超过滤法及超离心法等。

(3) 根据电学、解离性质,如吸附(层析)法、离子交换层析法、电泳法以及集层析与电泳之长的聚焦层析法等。

(4) 基于酶和底物、辅助因子以及抑制剂间具有专一亲和作用的特点而建立的各种亲和分离法等。

(5) 按稳定性不同而建立的选择性热变性法、酸碱变性法和表面变性法。

值得指出的是,这些方法中往往包含两种或多种因素的同时作用。下面介绍最常用的几种方法。

(一) 盐析法

这是古老的、但目前仍广泛采用的方法。

盐析法的原理:球蛋白类在低盐浓度的溶液中,其溶解度随盐离子强度升高而增大,表现盐溶(salting in)特性。但盐浓度继续升高并超过某一上限时,其溶解度又会以不同速度下降,分别盐析(salting out)沉淀析出。盐析纯化法就是根据酶和杂蛋白在高盐浓度的溶液中溶解度差别而建立的。

为了获得好的盐析效果,应注意控制:pH、温度、盐和蛋白质浓度。最常用的盐是硫酸铵,它的最大优点是:溶解度大,即使是在低温下的溶解度范围内,几乎所蛋白质都能盐析出来。至于蛋白质浓度,它一方面能影响盐析效果的重现性,因为蛋白浓度不同,分级分离范围也往往会发生一些变动;另一方面,蛋白浓度 $<100\mu\text{g/ml}$,盐析沉淀一般很困难,有时甚至根本不能形成沉淀。在 $200\mu\text{g} \sim 1\text{mg/ml}$ 范围内,沉淀虽能生成,但时间较长;所以,蛋白质浓度最好控制在 $>1\text{mg/ml}$ 。

盐析法的优点是：安全（大多数蛋白质在高浓度盐溶液中相当稳定）、简便、重现性好。缺点是：分辨率低，纯度提高不显著，有时还需要脱盐。

盐析法的一个发展就是和层析技术相结合形成盐析层析法，即以琼脂糖等非极性物质为柱层析支持法，在高盐浓度条件下将样品中的蛋白质盐析吸附下来，然后再梯度地降低盐浓度，使酶和杂蛋白分别洗脱出来。这种技术的优点是纯化量大，重现性好，分辨率较高。

（二）有机溶剂沉淀法

此法的原理是，不同的蛋白质需要加入不同量的有机溶剂才能使它们分别从溶液中沉淀析出。有机溶剂在这个过程中主要作用是降低溶液的介电常数，因为分子间的静电引力和溶剂的介电常数成反比，加入有机溶剂，蛋白质分子间的引力增加，溶解度降低。有机溶剂的另一作用可能是部分地引起蛋白质脱水而沉淀。不过，蛋白质溶解度和有机溶剂浓度之间目前还没有一个可用的关系式。

有机溶剂沉淀法，温度是最重要的因素，因为大多数蛋白质遇到有机溶剂很不稳定，特别是温度较高（例如室温）的情况下，极易变性失效，故操作应在 0℃ 以下进行。有机溶剂也必须预先冷却到 -15 ~ -20℃，并在搅拌下缓慢加入。沉淀析出后应尽快地在低温下离心分离，获得的沉淀还应立即用冷的缓冲液溶解，以降低有机溶剂的浓度。个别酶对有机溶剂不太敏感，比较稳定，此时可在较高温度（如室温）下进行操作，以便除去较多的杂蛋白。其次应考虑的是离子和离子强度，中性盐在多数情况下能增大蛋白质的溶解度，并能减少变性影响。如果适当地添加某些中性盐，往往有助于提高分离效果。常用的有机溶剂除丙酮外，还有乙醇和甲醇等。

有机溶剂沉淀法的优点是分辨率高，溶剂容易除去。缺点是酶在有机溶剂中一般不稳定，易引起变性失效。

（三）胶过滤（层析）法

这种方法通常以柱层析的方式进行。柱中填充分子筛介质（一般是具有一定大小孔径的球状凝胶物质），然后加入待纯化样品，再用适当的溶剂或缓冲液使样品在柱中自上而下地扩展。这样，样品中的各种分子将按其分子大小表现不同的层析性态而分离。大于凝胶孔径的分子由于不能进入胶粒内部，只能沿胶粒间隙扩展，走的是一条较“直”的路，表现在较快的移动速度；反之，小于凝胶孔径的分子，由于它们能自由进出胶粒内外，按照分子热运动的规律，其运动轨迹“迂回曲折”，表现为较慢的下移速度。所以，待纯化样品通过一定长度的层析柱后，不同大小的分子都将按先后顺序依次流出，彼此分开，达到纯化目的（见 3-4-4）。由于某些分子被排阻在胶粒外，故这种层析又称为胶排阻层析（gelexclusion chromatography）。

要使胶过滤有较好的分离效果，首先应选择适当孔径的凝胶，通常用的有：葡聚糖凝胶，如 Sephadex G-，G-后面的数字为胶膨润湿吸水量的 10 倍，G-25 就表示每克凝胶能吸水 2.5ml，数字越大，说明吸水量越高，孔径也越大，更适于较大分子的分离。

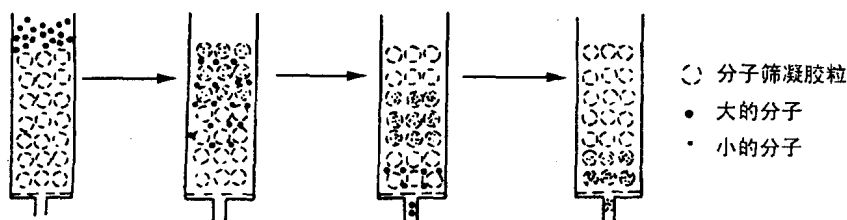


图 3-4-4 胶过滤法分离原理

离；聚丙烯酰胺凝胶：如 Bio-Gel P-，P- 后的数字乘 1000，表示可用于分离的最高分子量，即排阻的分子量。聚丙烯酰胺凝胶适合于分离的范围和葡聚糖凝胶大致相同。琼脂糖凝胶如 Sepharose 2B、4B 和 6B，它们分别表示琼脂糖含量为 2%、4% 和 6%。这类凝胶的孔径都比较大，适于较大分子量物质如病毒、细胞器和 DNA 等的分离。上述凝胶都有很高的亲水性，能在水中膨润。膨润后的胶具有一定的弹性和硬度，并有很高的化学稳定性，在盐和碱溶液中稳定，并很少非专一性吸附。

胶过滤（层析）法在酶的纯化工作中有三种类型的应用：浓缩、族分和分级分离；族分包括脱盐、更换缓冲系统以及底物和产物分离。前两种应用通常选择小孔径胶，如 Sephadex C-25，因为它们有较好的机械强度和流动特性，并足以对付分子量在 5000 以下的分子。至于分级分离，则需根据待纯化样品来选用胶，不过，如果使用低排阻极限的胶 Sephadex G75，那么，在这种情况下，所需要获得的组分可较早地流出，而且有助于提高回收率和减少稀释；同时这类胶的硬度也较好，可得到较大的流速。

至于胶粒大小，不同凝胶有各自的规格。一般随胶粒变细，分离效果也升高；但是若按层析的流速，粗粒级为好。在通常实验室工作中，族分可用中粗粗级胶粒；分级分离用细级胶粒；而超细级胶粒多用于分析性的工作。

为了获得好的分离效果凝胶用量也是很重要的因素。凝胶用量通常以床体积 V_t 表示， $V_t = V_i + V_o + V_g$ ， V_i 、 V_o 、 V_g 分别表示胶内、胶外液体积和胶粒物质体积。胶用量与样品体积 V_s 有关。一般来说，在族分应用中，胶用量以控制在样品量（ V_s ）的 3~4 倍为佳；对于分级分离，通常使用 G-75 以上的胶，这种情况下，胶的用量应为样品量的 40 倍左右。

胶过滤法特点是：不受 pH、盐和温度等的影响；操作条件温和、简便；而且无需特殊的再生处理，适于各种分子的分离。

（四）吸附交换（层析）分离法

根据的原理是在特定条件下样品中待纯化分子和杂质分子与吸附剂间的吸附能力与解吸性质的不同而达到分离、纯化。这类分离或以静态方式进行，或以层析方式进行。但不管采用什么方式，一般都包括三个基本环节：吸附、洗涤和洗脱。实际上，其中每一个环节都包含有目的蛋白质（或酶）和杂蛋白的分离，因此是一种十分有效的纯化方

法（见图 3-4-5）。

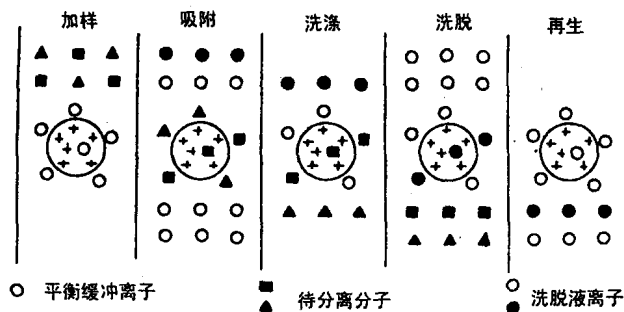


图 3-4-5 吸附交换分离法原理示意图

根据吸附机制的不同，吸附又可分三种类型：传统的物理吸附、羟基磷灰石吸附和离子交换吸附。

1. 物理吸附

传统的物理吸附剂常用的有白土、氧化铝和磷酸钙胶等。白土是具有强吸附力的一类粘土，以硅酸铝为主要成分，包括皂土、高岭土和活性白土等；氧化铝因制备方法不同有多种成品，用得更多的是 Cr 胶；磷酸钙胶可从氧化钙和磷酸三钠直接制备。

物理吸附的机制不很清楚，一般认为它是通过吸附剂分子和样品分子间的界面范德华力相互作用引起的，因而选择性不强，预见性较小，往往需要试验才能确定。这类吸附剂应用很早，但没有得到更大的发展。

物理吸附常以静态方式进行。吸附剂需要经过预先洗涤和活化处理；然后在低盐浓度、弱酸性或近中性条件下进行吸附；如果被吸附的酶不被水或其他吸附介质洗脱下来，则可将吸附了酶的吸附剂直接分散在水中或上述介质中，进行洗涤以除去杂质。物理吸附的酶一般可在弱碱性条件下洗脱下来；如果这种条件下酶仍不能洗下，那么可用离子强度更高的溶液。洗脱液量不宜过大，最好不超过吸附剂的体积。

2. 羟基磷灰石（hydroxylapatite）吸附

羟基磷灰石是一种微晶型的磷酸钙制品。其吸附原理通常认为是，晶体表面的钙离子能与蛋白质的负电性基团相互作用，而磷酸基团则能和正电性基团结合。如果在系统中有对钙亲和力更强的离子，如柠檬酸盐等存在时，羟基磷灰石对蛋白质的吸附能力就会显著下降，但其他盐如 NaCl、KCl、CaCl₂ 等，即使浓度很高，甚至在 1mo/LNaCl 中，也不会影响蛋白质的负电性基团和钙离子之间的结合。反之，这些盐可以大大降低正电性基团的作用，也就是说在高盐浓度的溶液中，羟基磷灰石可用来吸附酸性或中性蛋白，排除碱性蛋白，从而省去吸附前的脱盐透析平衡。羟基磷灰石对蛋白质的吸附容量比较高，一般吸附操作条件下可达 50g/L 床体积。

羟基磷灰石吸附通常在低离子强度、中性或弱酸性条件下进行。但应注意羟基磷灰石的等电点可能因制备方法而显著不同。羟基磷灰石吸附多采用柱层析方式；洗脱一般

借助升高磷酸缓冲液的离子强度。如果被吸附物质能完全洗脱下来,那么该吸附剂可反复使用 3~4 次;若有不可逆吸附,则可对 1mol/L EDTA pH8 透析;或用 0.1mol/L NaOH 或用 0.1mol/L HCl 洗涤。

3、离子交换吸附

这类吸附是通过蛋白质的解离基团与离子交换剂的解离基团之间的相互作用完成的。由于各种蛋白质和离子交换剂在不同条件下有相应不同的解离状态,因此选择适当的交换剂,控制交换和洗脱条件,就可能将酶和杂蛋白分离开来。

离子交换剂包括两个部分:母体和离子交换基。可用的母体包括树脂、纤维素和凝胶等。树脂具有疏水的基本骨架,易导致蛋白变性,交换容量也低,因而少用。在酶的纯化中离子交换纤维素用得较多,它是以亲水的纤维素为母体,引入相应的交换基团制成的。交换容量较大,交换速度也高;缺点是易随交换介质的 pH、离子强度的改变而发生膨胀、收缩,同时粒子较细,进行柱层析时流速小。离子交换凝胶以葡聚糖凝胶或琼脂糖凝胶为母体,导入相应的交换基团制成。它的交换容量较交换纤维素还要大,同时具有分子筛作用;和纤维素一样,缺点也是其交换容量、容积和流速易随缓冲液的 pH 和离子强度而改变。SephacroseCl、Bio-Gel 无此缺点,而且较均一。

离子交换基是交换功能的基础,其性质决定着交换剂的类型与强弱。带阳电荷解离基的交换剂在交换过程中能吸附阴离子,故称阴离子交换剂;反之,带阴电荷解离基的交换剂可吸附荷阳电的离子,称为阳离子交换剂。

为获得好的离子交换吸附结果,首先应选择适当的离子交换剂,在选择阳离子交换剂还是阴离子交换剂的问题上,要看目的酶的稳定性。如目的酶在低于其等电点 (pI) 的 pH 条件下稳定,那么可选用阳离子交换剂;如目的酶在高于其 pI 的 pH 条件下稳定,则宜采用阴离子交换剂;如目的酶在高于和低于其 pI 的 pH 条件下都稳定,那么两种交换剂都可。在选择强型交换剂还是弱型交换剂的问题上,一般规律是:如果目的酶既可应用强型交换剂,也可以应用弱型,那么应优先考虑选择弱型;如果目的酶 pI 偏向极端 pH (<6 或 >9),则一般应考虑强型交换剂,因强型交换基能在广泛的 pH 范围内保持完全解离状态;而弱型交换基的解离程度及相关的交换容量,因 pH 条件而显著不同;弱型的阳离子交换剂在 pH < 6 或弱型的阴离子交换剂在 pH > 9 时开始不带电荷,失去交换能力。磺酸基和季铵基分别构成强酸和强碱型交换基;磷酸基和仲氨、叔氨基属中强度的交换基;羟基、伯氨基等分属弱酸或弱碱型交换剂。DEAE 的 pK 值为 9.5,主要用于吸附中性和酸性蛋白;当 pH > 9 时,应选用 QAE 和 TEAE。CM 的 pK 接近 4,常用于中性和碱性蛋白;当 pH < 3 时,则最好选用 SE 或 SP。关于交换容量,有种种含义:一是总交换容量;一是实效交换容量。前者指每克干离子交换剂上有的总交换的交换基数,包括潜在的交换基;后者指特定的实验条件下实际可用于交换基数。实效交换容量和介质的 pH、离子强度以及温度等密切相关,也因蛋白质分子大小而显著不同,为获得好的分离效果,样品量最好控制在总交换容量的 $\frac{1}{4} \sim \frac{1}{3}$,体积控制于 1%~5% 床体积。要使样品中各种蛋白质分子能在交换柱上充分分离开来,必须用适宜的缓冲液进行扩展、洗涤和洗脱。洗脱有三种方式:等温平衡洗脱,阶梯洗脱,梯度洗脱,后两

种方式主要是利用 pH 改变蛋白质和交换基的解离状态,或利用盐离子竞争性地将蛋白质从交换剂上取代下来。一般地说,阶梯洗脱的分离效果优于平衡洗脱,而梯度洗脱则更好。

离子交换吸附法在应用上仅次于盐析法。它的适用面广,几乎所有蛋白都可用此法分离,同时,它 also 具有很高的分辨率。

(五) 电泳分离法

电泳分离法是根据各种蛋白质在解离、电学性质上的差异,利用它们在电场中的迁移方向与迁移速度的不同而进行纯化的一类方法。电泳法有很高的分辨率,但在实验放大的样品回收方面有一定困难,因此,目前主要用于蛋白质的分析的小规模制备。目前实验室常用的是胶电泳,它同时兼具分子筛效应,因而可达到很高的分辨率,如聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)。聚丙烯酰胺胶电泳常以不连续方式进行,也就是电泳的胶与缓冲系统都具有不连续性,故称 Disc (discontinuous) 电泳。由于这种不连续性,导致样品在电泳分离过程中被浓(压)缩成圆盘状 (disc) 薄层,从而显示出很高的分辨率。这种电泳胶由三部分组成:样品胶和成层胶 (Spacer 或称 Stack 胶),它们的孔径与缓冲介质都相同;分离胶 (Separate 胶或称 Run 胶),其孔径较小, pH 也不同于前两者。胶中的缓冲离子由易于解离、迁移率大的离子,如 Cl^- 组成,故称为先行离子电极液缓冲离子常用 Gly,在样品胶和成层胶的 pH 条件下,它的解离度很小 (1% 以下),迁移率也慢,故称为尾随离子;至于样品,它们在样品胶与成层胶中的迁移率通常介于上述两种离子之间。电泳开始后,先行离子超前流动,并在它的后面留下一低离子浓度的低电导区。这种低电导区导致高电位梯度的产生,迫使尾随离子加速泳动,在高、低电位区间构成迁移快的界面,同时样品离子被压缩于界面中形成圆盘状薄层。由于样品中各个组成成分所带的电荷不同,迁移率也各有差异,所以,这种圆盘状薄层实际上是由样品中各个组成成分相对应的亚圆盘薄层按迁移率堆叠而成的。当样品离子和尾随离子进入分离胶后,由于其间的 pH 有利于尾随离子的解离,故它的迁移率显著增大,并迅速超越样品离子,导致高的电位梯度消失,样品开始在具有均一电场的分离胶中按照解离状况接受电泳分离。又由于分离胶孔径较小,样品同时受到分子筛效应的控制,即使净电荷相同的蛋白质也能得到进一步分离,故而分辨率很高。

Disc 电泳的突出优点是具有极高的灵敏度和分辨率,因此,是一种十分理想的蛋白质分析方法。但是它在制备应用上还存在局部温度过高、分离量小、回收麻烦等缺点。

在 Disc 电泳中,蛋白质的迁移率由多种因素决定,如蛋白质的净电荷、大小、分子形状等。为了进一步提高这种电泳的分辨率,又发展了 SDS - 聚丙烯酰胺胶电泳 (SDS - PAGE) 等。SDS (十二烷基磺酸钠) 是一种阴离子去垢剂,它能与蛋白质结合,破坏蛋白质分子内部和分子间以及与其他物质间的次级键联系,使蛋白变性;由于通常每克蛋白质约能结合 1.4g SDS,从而使蛋白质所带的负电荷远超过蛋白质原有电荷数,这样就消除了不同蛋白质原有的荷电差异;再加上结合了 SDS 的蛋白质都是椭圆状,

没有大的形状差异,因此,蛋白质电泳迁移率仅取决于蛋白质的分子量。所以,SDS-聚丙烯酰胺胶电泳能用于,而且主要用于蛋白质的纯度分析和分子量测定。

另一类电泳称为等电聚焦电泳(isoelectric focusing),这是利用两性电解质载体(商品名为 Ampholine),在电场作用下能形成连续平滑的 pH 梯度,而待分离样品中各组分在电泳过程中,就按照各自的等电点聚焦到相应的 pH 梯度位置上去从而达到分离目的的一类方法。其中,Ampholine 是一种多乙烯多胺与丙烯酸通过加合反应得到的同系异构体混合物,它们具有相近的 pK 值与 pI 值。从广义来说,它是一种自由界面电泳;不过,通常进行电泳时都采用蔗糖或甘油等组成的密度梯度溶液防止对流,避免已分离的区带重又回混。等电聚焦电泳的特点是具有非常高的分辨率,等电点仅相差 0.02pH 单位的蛋白就能得到分离,并能告诉人们在待分离或分析的样品中包含哪些等电点的蛋白质,对于跟踪纯化过程中蛋白质组分的变化很有帮助。缺点是大多数蛋白质在等电点时溶解度下降,易生成沉淀。

等电聚焦电泳的一个发展就是和胶电泳相结合,即以聚丙烯酰胺胶或葡聚糖胶作为支持物进行聚焦胶电泳。其优点是分离量可以增大,且简便快速;缺点是纯化组分的回收率较差。

等电聚焦电泳的另一个发展则是和层析技术相结合形成聚焦层析。

(六) 聚焦层析(chromatofocusing)

聚焦层析是根据蛋白质的等电点差别进行层析分离的纯化方法。它不需要特殊的聚焦电泳装置,却兼具等电聚焦电泳的高分辨率和柱层析的简便性两种优点。

聚焦层析的原理是:当用特种的多缓冲液滴定和淋洗填充在层析柱中的特种多缓冲交换剂时,随着这种缓冲液的扩展,就会在层析柱中自上而下地建立起连续的 pH 梯度;将待纯化样品加入该层析柱,基中的蛋白质组分就将随多缓冲液的扩展按各自的等电点聚焦于相应的 pH 区段,并随扩展过程中 pH 梯度的逐渐下移而下降,最后分别从层析柱先后流出,达到分离纯化的目的。因此,这一方法的关键是选用适当的多缓冲交换剂和多缓冲液,以便在层析柱中建立所需要的 pH 梯度。通常选用的多缓冲交换剂和多缓冲液是商品 PBE 94 和 Polybuffer 96,它们是缓冲对。其中的 PBE 94 是阴离子交换剂,使用时先将它的一定 pH(例如 pH9)的起始缓冲液中平衡,然后装柱;Polybuffer96 的有效缓冲范围是 pH9 ~ pH6,使用时先将它调整至较低的 pH(例如 pH7),作成“极限缓冲液”,然后再用它滴定淋洗层析柱中的多缓冲交换剂。这样,由于两种缓冲因素的相互作用,就会在层析柱中自上而下地形成逐渐增大的 pH (pH7 ~ 9) 梯度。这种 pH 梯度的形成方式和以梯度混合器形成 pH 梯度的方式,在原理上完全相同。3-4-6 (A) 是聚焦层析与吸附交换层析形成 pH 梯度的比较示意图。图 3-4-6 (B) 是聚焦层析中随多缓冲液淋洗扩展时, pH 梯度改变与柱高(h)的关系示意图,曲线 1、2、3 ……n 分别描述了每加入一份多缓冲液时,上述关系的变化情况。

用聚焦层析进行蛋白质的分离过程中,一方面要在层析柱中建立 pH 梯度,同时也要使被分离的各蛋白质组分在多缓冲液扩展时能按各自的等电点分别聚焦到相应的 pH

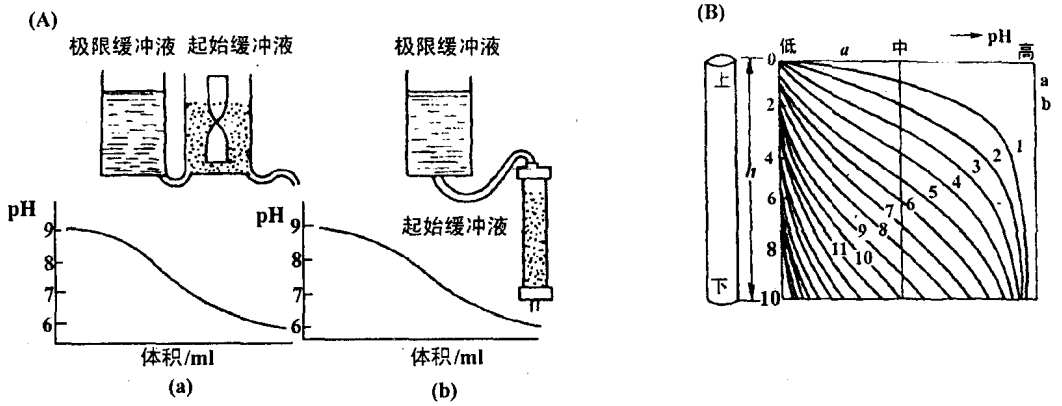


图 3-4-6 聚焦层析示意图

两种 pH 梯度形成方式 (A)

聚焦层析中 pH 梯度与层析柱高的关系 (B)

区带上。以 PBE 94 和 Polybuffer 96 构成的层析系统为例，这种柱有两个特点，一是采用的是阴离子交换剂；二是 pH 梯度自上而下逐渐增大。当样品加入层析柱后，对于其中任何一种蛋白质组分来说，只要它所在位置的 pH 低于基等电点，它将因解离而带正电，不与阴离子交换剂结合，而随多缓冲液淋洗扩展向下移动，直到所在位置的 pH 略高于其等电点，它才从带正电变为带负电荷，被离子交换剂结合而停止移动。但是多缓冲液进一步淋洗扩展时，它所在位置的 pH 又将要降低到它的等电点以下，这样它又将继续下移。如此反复进行交换结合和解吸，最后各种蛋白质组分就必然按照各自不同的等电点由高到低而先后被洗出，从而达到分离的目的。值得提到的是聚焦效应还有一个特点，就是任何蛋白质在洗出前，如果再加入另一份相同的蛋白质，这份新加入的蛋白质也将与淋洗液以相同的扩展速度而迅速聚焦到相应的蛋白聚焦带上，然后和它共同洗出。

由于构成聚焦层析系统最基本的因素是缓冲交换剂和缓冲液，为获得较好的分离效果，有一个选择适宜的多缓冲交换剂和多缓冲液。一般来说，用一种缓冲液去滴定另一种不同的缓冲液不能产生满意的线性 pH 梯度，这是由于基缓冲容量常随 pH 而改变的原故。为此，瑞典 pharmacia 公司专门生产了相应的多缓冲液和多缓冲交换剂，它们能在一定的 pH 范围内表现十分均匀的缓冲性能。作为商品的有两组：一是多缓冲交换剂 PBE 94 和多缓冲液 Polybuffer 96 和 Polybuffer 74；一是多缓冲交换剂 PBE118 和多缓冲液 Pharmalyte pH8 ~ 10.5。PBE 94 和 PBE118 都是以 Sepharose 6B 为基本骨架，通过醚键偶联了相应的基团而成的阴离子交换剂。有较好的机械性能和流速，不因 pH 的改变影响其床体积；其盐型在 pH7 时可经受起 110 ~ 120℃ 高温灭菌；在 pH3 ~ 12 时对有机溶剂稳定；应用范围分别为 pH4 ~ 9 和 pH > 9。多缓冲液 Polybuffer 和 Pharmalyte 是两性电解质性质的缓冲液，和 Ampholine 相似，也是分子量不同的多羧基多氨基系列化合物。在分

离过程中,如果待分离成分的等电点已知,那么选择的 pH 梯度范围应能使该成分在 pH 梯度的 $1/3 \sim 1/2$ 处洗出,这样,分辨率较高,时间也较经济。如果样品的等电点不清楚,那么,最好以 Polybuffer74 为最初的选择对象。因为如待分离成分的等电点高于此范围,则样品将直接流出,很易回收,便于再尝试其他范围。反之,选择的 pH 范围如高于被分离成分的等电点,则样品将结合于柱上,需用盐才能洗下。

层析是一种十分简便、有效的纯化方法,往往可达到其他物理化学分离方法所不能达到的效果,因而日益为人们所接受。

(七) 快速液相层析

这也是一种离子交换层析,它的特点是,所用的离子交换剂是单扩散型的,有大的孔径,排阻分子量达到 10^7 ; 高结合能力和小的非专一吸附;而且,颗粒的大小均一,预装柱中约有 40% 的空体积,因此有低的回压和快的流速,流速是一般离子交换层析的 25 ~ 100 倍;以及小的稀释度,洗脱峰的蛋白浓度是普通离子交换的 10 倍左右。

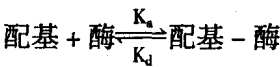
快速液相层析常用的交换剂有: Mono Q, $[-CH_2^-N^+(CH_3)_3]$, 是强阴离子型交换剂; MonoS, $[-CH_2^-SO_3^-]$, 是强阳离子型交换剂。

为了获得较好的分离效果:对于每一种交换剂、每一 pH,需使用特定的缓冲系统;缓冲液的 pK 值应尽可能接近分离的 pH;在分离时尽可能使用缓冲梯度,而不使用盐离子梯度。

(八) 亲和层析法

这是根据生物分子间某种物有的亲和力而建立的一种纯化方法。例如,酶和它的底物(包括辅助因子)、底物类似物或竞争性抑制剂等(通称为配基, Ligand)通常都具有较高的生物亲和力,能专一而可逆地形成酶-配基络合物。因此,如果将这类配基偶联固定于载体作成亲和层析吸附剂,那么,在将它和含有待纯化酶的样品混合时,它就能迅速而有选择性地使相应的酶分子从溶液中“抓”出来,达到和其他杂蛋白分离的目的,这就是亲和吸附。进而如果再设法洗涤除去吸附过程中非专一附着的杂质,则又可得一次纯化;最后还可用亲和力更强的配基,或促进层析系统的解吸条件选择地将酶从亲的吸附剂上“拉下来”,进行亲和洗脱,这样又可得到一次纯化,故而分辨率很高。

为了取得好的亲和分离效果,应考虑以下问题:载体必须是亲水的,结构疏松的,便于待纯化分子自由地与配基接触;具有大量可以和配基进行偶联反应的基团;不和杂蛋白分子产生非专一性吸附,同时还要经得起偶联、吸附、洗脱等过程各种 pH、离子强度、温度变化的考验,甚至经得起变性剂如脲、盐酸胍等的反复处理,在装柱后有好的流体力学性质。亲和层析不限于酶的纯化,也可用于抗原与抗体、核酸以及糖蛋白等的分离,故对应的配基也各种各样。一般来说,被纯化物质与配基的亲关系愈专一,分离效果无疑也愈好;但这就需要为每一种纯化物质设计和制备一种相对应的配基吸附剂,显然,这不是简便经济的办法。故实际工作中更多的是采用一些“族”专一性的配基。待纯化成分和配基间亲和力通常以解离常数 K_d 表示。



适宜的配基， K_d 应为 $10^{-8} \sim 10^{-4} \text{ mol/L}$ ；如果 K_d 太小，则酶和配基间的作用力将太强，结合太紧，解吸就会发生困难，可能需要十分激烈的条件才能将其洗下；反之， K_d 太大，则很难达到完全专一吸附的目的。为了完成载体和配基之间的偶联，常用的办法是先将载体偶联基活化。葡聚糖和琼脂糖的糖羟基可用溴化氰反应，使之形成十分活泼的亚氨碳酸盐衍生物；聚丙烯酰胺的酰氨基可通过水合肼反应将它处理成酰肼衍生物，或在此基础上再用亚硝酸处理，使之形成叠氮的衍生物。活化处理后，如果配基的偶联基团是伯氨基或芳香氨基，那么就可以直接和亚氨碳酸基或叠氮基反应，完成配基和固相载体的偶联。但是，应注意通过直接偶联方式得到的亲和吸附剂，往往由于配基和载体间距离太近，而酶的活性部位一般又都在酶分子的深部，因此待纯化酶的结合基团和配基间无洗表现亲和作用。为此，通常还需要在配基与载体间加上一段短“臂（arm）”使配基和待纯化酶的结合基团能较好地接近，以改善亲和吸附效果。和其他层析一样，实验程序包括吸附剂和制备、预处理平衡、吸附、洗涤和洗脱，以及脱盐再生等基本环节。影响吸附的因素除 pH、温度、缓冲液离子及离子强度处，还应考虑亲和吸附剂量（包括配基含量）和样品量间最适比例，蛋白浓度，柱长度与大小，流速。洗涤是为了除去非专一吸附的杂质，通常可用平衡缓冲液或其他缓冲液淋洗。洗脱在整个层析过程中是十分关键的一步。洗脱条件应能削弱酶和亲和吸附剂间的相互作用，这种条件一般应比在溶液中使酶和配基络合物解离的条件更为强烈。常用的方式包括非专一性洗脱与专一性洗脱（见表 3-4-1）。当这些方法无能为力时也可采用一些激烈的手段。例如，加脲、盐酸胍等，或在低的 pH 条件下使被吸附的酶构型发生可逆改变而解吸下来。除了变性手段外，还可从偶联方法的选择入手，例如，通过反应形成重氮键或硫酯键，这些键能分别在 $0.1 \text{ mol/L Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ （pH8.0）的处理下或在中性羟胺的处理（pH11）下迅速断裂。采用这样的偶联法，在酶被吸附后再用相应的条件进行化学断裂，那么酶就会连同配基很快地从吸附剂上释放出来。

1. 非专一性洗脱	改变温度进行洗脱 改变 pH 进行洗脱 改变离子强度进行洗脱 改变溶剂系统进行洗脱 加促溶剂 电泳解吸
2. 专一性洗脱	半抗原竞争性洗脱 抑制剂竞争性洗脱 底物类似物竞争性洗脱

值得提到的是近年来发展了一种融合蛋白亲和分离法 (fusion purification, 也称“Bioseparation”)。这种方法主要用于纯化 DNA 重组表达产物, 其关键是在构建融合基因时, 目的基因的 5'-'端或 3'-'端上要添加一段编码特殊多肽或蛋白质的 DNA, 使基表达产物带上一段纯化用的标签 (purification tap) 或亲和标签 (affinity tap 或 tail), 通过标签和相应配基的相互作用, 从而达到纯化的目的。应用此法时, 首先要选择适宜的亲和标签和制备带有相应配基的吸附剂; 融合蛋白纯化后, 接下来还必须考虑如何将目的蛋白从融合蛋白中分离出来。以葡萄球菌 A 蛋白作为融合蛋白亲和标签为例, 该蛋白能专一地和免疫球蛋白的恒定区结合; A 蛋白为标签的融合蛋白已在大肠杆菌或葡萄球菌中表达, 该表达产物可在中性 pH 条件下为 IgG-Sepharose 吸附, 而降低 pH 或添加 A 蛋白时又能将其洗脱下来, 达到纯化的目的。再以 FlagTM 为例, FlagTM 由 8 个氨基酸 NH₂'-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys 组成; 而 Asp-Asp-Asp-Lys 是肠激酶专一断裂的序列。将 FlagTM 和蛋白载体一起免疫动物, 可制成专一于 FlagTM 的单克隆抗体, 用于融合蛋白的亲和分离。纯化的产品可再用肠激酶移去标签。Flag 系统已成功地用于与 GM-CSF、与 IL-2 重组构建, 并在酶母中得到了克隆表达和分泌, 同时用亲和分离进行了纯化, 用肠激酶移除了标签。

融合蛋白亲和纯化法发展非常迅速, 并且已逐渐形成一个系统。它的优点是, 可对任何一种蛋白设计和构建相应的融合蛋白。但是关键是要同时找到一合适的断裂方法, 使目的蛋白能从融合蛋白中释放出来。

(九) 高效液相层析 (high performance liquid chromatography, HPLC)

也称高压液相层析 (high pressure liquid chromatography), 它是近年来层析技术上的的一大进展。此法最初用于非水溶剂中小分子有机化合物的分离; 但很快地发展到用于水溶性生物分子的分离; 大孔径载体的开发, 它又成了蛋白质和核酸纯化的有力工具。HPLC 实际上是胶过滤、离子交换层析、疏水层析和亲和层析等技术在应用上的一个发展新阶段, 它一方面以这些层析的原理为基础, 但又有更高的效率、更高的分辨率与更快的速度。对于柱层析来说, 载体填料的颗粒愈小, 分辨率则愈高, 但是, 这样就带来了一个相关的新问题, 即扩展 (洗脱) 液的流速也愈小。为了改善分辨率, 也同时获得高的流速, 就必须使用高压和机械性能稳定的载体填料以及相应的设备。作为 HPLC 理想的载体填料应符合下列要求: 好的机械性能, 可承受 > 1mm/s 的流速; 在广泛的 pH 范围内有稳定的化学性能; 颗粒大小为 5~50 μ m, 孔径 30~100nm; 亲水, 高容量; 球状、易填充、价廉。最初使用的载体填料是硅, 但它的表面与蛋白质等有不相容性; 以后采用单氯单烷氧硅烷进行处理使表面亲水化, 这样获得的衍生物就能很好地吸引蛋白质; 硅胶的主要缺点是在 pH>8 不稳定, 后来, 又发展了在各种 pH 中仍然稳定的衍生物, 如 Mono-Q, Mono-S 等, 它们现已广泛用于离子交换层析。HPLC 除了要有稳定、均一的载体填料外, 还要求有特殊抗压的不锈钢层析柱, 特制的注射器和输液泵。HPLC 通常用 0.4cm (直径) x 5cm 的层析柱, 流速 0.5~10ml/min, 这种情况下通常可获得好的分离效果, 如果流速控制在 0.25ml/min, 则效果更好。HPLC 的主要优点是快

速,特别是和计算机偶联,自动完成复杂的流程,一般 15min 即可完成一次层析分离。

(十) 根据稳定性差别建立的纯化方法

酶的活性以酶分子具有特定活性构象为基础,因此,在分离纯化过程中一般应避免使用过于激烈的方法与条件以防止酶的变性失效。选择性变性法则是根据酶和杂蛋白在某种条件下稳定性的差别,而采取的可一举除去大量杂蛋白的简便纯化方法。

1. 选择性热变性 (selective heat denaturation)

如果待分离的酶相当耐热,那么就可采用这一方法,即在严格控制的条件下,将酶溶液迅速加热至某一温度(如 65℃),并保温一定时间(如 10min),而后迅速冷却,这样,大量不耐热的杂蛋白就将变性析出,离心除去后,酶的比活力可能大大上升,而总活力损失可很少损失,或者根本不损失,有时还可能有所升高。例如,从酵母中分离醇脱氢酶,就可采用热变性处理法。个别酶对热特别稳定,如胰蛋白酶、胰核糖核酸酶、溶菌酶等在酸性条件下甚至可加热到 90℃ 以上而不被破坏,这一特点则更为有利。为了使选择性热变性法有更大的适用范围,还可在热处理前,加入该酶的底物、辅酶、竞争性抑制剂和保护巯基的还原剂等,以增大酶和杂蛋白的耐热性差别。在应川选择性热变性方法时,应该注意严格控制溶液的 pH 和保温时间。在样品溶液中有蛋白酶的情况下,采用此法更应特别谨慎。

2. 选择性酸碱变性法

如果在一定温度下,将酶溶液严格控制在酶的稳定 pH 范围内,用酸、碱处理一定时间,进行选择变性,同样也可达到有效纯化。但条件控制特别重要,如从麦芽中分离 β -淀粉酶,在 pH3 时,只有 α -淀粉酶失效;但在 pH3 以下,则两种淀粉酶都会失效;又如,细胞色素 c 用 2.5% 的三氯乙酸处理,可使大量杂蛋白沉淀;但是这种处理如果时间太长,细胞色素 c 也会变性。

3. 表面变性法

很早就有人利用酶溶液和惰性液体(氯仿)混合振荡,造成选择性表面变性来制备过氧化氢酶、醇脱氢酶和 α -淀粉酶等。振荡变性处理时通常分成三层:上层为未变性蛋白;第二层为乳浊状变性蛋白,下层为氯仿。这种处理时间通常不宜过长,否则将导致所有蛋白质变性。

选择性变性灵活性很大,如果发挥得当,可能极大地提高酶的纯度。成功的关键在于严格控制条件,除了所选用的主要因素外,还需注意其他因素,其中也包括蛋白浓度,蛋白浓度太低时一般不能应用此法。

三、结晶

结晶是指分子通过氢键、离子键或分子间力,规则且周期性排列的一种固体形式。由于不纯的蛋白溶液,变性的蛋白质不能形成结晶,也由于各种分子形成结晶的条件不同,因此,结晶既是一种酶是否纯净的标志,也是一种分离纯化的手段。结晶,也是利

用酶和杂蛋白在溶解度上不同而进行的一种纯化的方法,但是和其他利用溶解度降低的方法不同,它要求以极为缓慢的速度逐渐降低酶的溶解度,使酶溶液以极为缓慢的速度逐渐接近结晶的条件,才能使酶结晶析出,使之从溶解状态以特定的固体形式析出。否则,酶就可能以无定形的形式直接沉淀出来。为此,通常进行结晶时,或是通过毛细管、或是借助透析方式缓慢地加入硫酸铵等沉淀剂,待溶液呈现微弱的浑浊后,再移入某一适宜温度下静候结晶出现,也可在加入相应的试剂后,再缓慢地改变 pH 和温度,使之逐渐接近结晶条件。结晶往往需要晶核,晶核可以从酶溶液自身缓慢地形成,也可外界加入;结晶是溶质分子移向晶核,使结晶逐渐长大的过程,因此,结晶需要的时间很不相同,从几小时到几天、数月,甚至要以年计;晶核多,结晶形成虽然较快,但形成的晶体较小。为了获得纯净、粒大、收得率又高的结晶,还有两个很重要的因素应注意:①酶溶液应该达到相当的纯度 除了少数例外,不纯的溶液通常不能得到结晶,因为晶核很快地为杂质所包围掩盖,无法长成晶体。酶溶液如果很纯的话,即使未结晶,也常可观察到某些可结晶的迹象,如具有较大的密度、较高的闪烁性、较易分散、颗粒从球形趋向椭圆等。酶溶液如果一旦获得结晶,再结晶通常是很容易成功。②酶的浓度要恰到好处一般以 1%~5% 为宜,最低不宜小于 0.2%;浓度高,虽然较易结晶,但如果过于接近饱和,结果往往只能获得大量微晶,难以形成大的晶体。酶结晶形成后,摇动溶液常可看到丝状闪烁,用 100 倍以上的显微镜观察时,根据结晶的酶和结晶条件的不同,形状可能多种多样;在偏振光显微镜下,多呈现弱的双折射。

上述纯化方法中,过去多用沉淀法、吸附法、离子交换法和选择性变性等;近年来,胶过滤法、亲和层析法和聚焦层析法应用也日益广泛。至于各种方法的排列顺序,一般地说,选择性热变性由于能以很小的代价除去大量的杂蛋白,而且往往不需要引入其他物质,也不增加液体的体积,所以可以考虑放在最先进行;吸附法简便,很多情况下,吸附前不;一定要求脱盐,吸附平衡后,通常放置片刻就会澄清;用倾泻、虹吸等法除去大量母液后,即能转入小体积操作,因此亦可考虑安排在前面的步骤;结晶,由于要求酶液有相当高的纯度,它无疑应放在较后的环节。至于其他方法则要由实验确定。例如,吸附后常要用盐溶液洗脱,接着用盐析法似乎是有利的;但盐析放在太前面,大液量的脱盐又是件麻烦事;有机溶剂沉淀要求低温快速处理,如果酶液体积大,这种方法往往受到设备容量的限制,似不宜放在前面的步骤里;另一方面,如果酶已经很纯,稳定性也因之随着降低,此时再用有机溶剂处理又有变性之虞;其他如胶过滤法、聚焦层析法以及亲和分离法等应用于大体积操作目前还存在一些问题,因此常放在稍后的步骤。

以上概述了各种纯化方法的特点,但是,方法和条件的选择与效果还要根据酶活性的测定结果,即总活力与比活力来判断。总活力是指某一抽提或纯化步骤后酶的得率或回收率 (y),比活力是指某一纯化步骤后的纯化效果,即纯度的提高 (e)。

$$y = \frac{\text{某步骤后的总活力}}{\text{某步骤前的总比活力}} \quad e = \frac{\text{某步骤后的活力}}{\text{某步骤前的比活力}}$$

在抽提或纯化某步骤中,如果有多种方法或条件可供选择,那么究竟采用何者?有

人推荐下式进行权衡：

$$\log e = \log E \cdot \log y / \log Y$$

式中， e 和 y 分别表示用某种方法或某种条件进行一次纯化后获得的纯度提高与回收率；而 E 和 r 分别表示用上述方法或条件重复多次后得到的总纯度提高与总回收率，这两项是推算出来的。例如，在某一步骤中，有 A、B 两种方法或条件可供选择，用 A 法重复 n 次以后可得到 E_a 和 Y_a ；如以 E 为标准，采用 B 法时要得到同样的 E_a ，则需要重复 m 次，由此可算出相应的 Y_b ，再比较 Y_a 和 Y_b 就能做出判断。

A 法：	e_a	y_a	B 法：	e_b	y_b
	$\vdots$	$\vdots$		$\vdots$	$\vdots$
	$\vdots n$ 次	$\vdots m$ 次		$\vdots n$ 次	$\vdots m$ 次
	$\vdots$	$\vdots$		$\vdots$	$\vdots$
	E_a	Y_a		E_b	Y_b

在酶的纯化过程中，通常要将所以纯化步骤和各个步骤的测定结果列成“收支表”以便进行总结、检查和改进，见表 3-4-2。

表 8-5 酶纯化各步“收支表”

步骤	酶活力 /U·ml ⁻¹	蛋白浓度 /mg·ml ⁻¹	总体积 /ml	总活力/ U	总蛋白/ mg	比活力 /mg·ml ⁻¹	回收率 /%
...	...	...	...	...	...	...	...
...	...	...	...	...	...	...	...
...	...	...	...	...	...	...	...
...	...	...	...	...	...	...	...
...	...	...	...	...	...	...	...

纯度提高和回收率的检定能帮助我们选择纯化方法与纯化条件。但是经过一定的纯化步骤后，为了了解所获得的样品是否均一、纯净还要进行纯度检定。酶均一纯净性鉴定最简单的是电泳法，常用的有聚丙烯酰胺不连续胶电泳和聚焦胶电泳，二者都有极高的分辨率。有人认为，如果样品在聚丙烯酰胺胶电泳谱上是单一谱带，就可以看作是均一的了；但是应注意随电泳条件不同还可能出现不同的情况。聚焦胶电泳分辨率高，而且当有杂蛋白存在时，从谱带位置还可了解杂蛋白的解离性质，有利于采取进一步的纯化措施。其他还有超离心法，免疫学法等。

第三节 酶的催化作用

新陈代谢是生命的基本特征。从化学角度分析,生物体内所进行的代谢,实际上是许多化学反应的逻辑组合,表现出极高的有序性。代谢途径中的多数化学反应,如果让其在生物体外进行,反应速率极慢,几乎达到不能觉察的程度。而在细胞内,则可在极短的瞬间达到化学反应的平衡。由此,人们提出一个重要问题,生物体内究竟是什么因素的作用加快了代谢反应的速率?

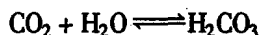
我国人民在几千年以前,就已知道生物体中存在着一种能高效加快化学反应速率的物质,并成功地运用于生产实践。1833年,Payen和Persoz从麦芽的水抽提物中,得到了一种对热不稳定的物质,它能促使淀粉水解成可溶性的糖。1835~1837年,Berzelius提出了催化作用的概念。1878年,Kühne首先把这种存在于生物体内,能加速化学反应速率的物质称为酶(enzyme)。到了20世纪,对酶的研究进入了飞速发展的时期。1913年Michaelis和Menten提出了酶促反应动力学原理——米—曼学说。1926年Sumner第一次从刀豆中提取获得脲酶结晶,并证明具有蛋白质性质。直到今天,人们已鉴定出3000多种酶,并对其中不少酶进行了分子结构与酶活性及活性调节的关系的研究。对酶研究的成果将为催化理论、催化剂的设计、药物的设计、疾病的诊断和治疗以及遗传和变异等广泛领域提供理论依据及新的思想、新的概念。

一、酶作用的特点

近代生物化学研究证明,酶是具有催化作用的蛋白质。作为催化剂,它具有一般催化剂的共同性质。但由于酶的本质是蛋白质,于是它又具有另外一些有别于非酶催化剂的特殊性质,这些性质主要表现在以下几方面:

(一) 高度的催化效率

在相同条件下,酶的存在可以使一个反应的反应速率大大加快。酶促反应与非催化反应或其他催化剂催化反应之间,尽管由于反应历程、反应条件等不同,相互比较十分困难,但仍可约略估计出一个近似值或下限。一般情况下,由酶催化的反应速率比相应的非催化反应速率快 $10^6 \sim 10^{12}$ 倍。例如二氧化碳水合反应,



在生物体内是由碳酸酐酶催化进行的。经计算,每个酶分子在1s内,可以使 10^6 个(CO_2 分子发生水合反应,比非酶反应快107倍。

酶促反应的高效率,究其根本原因是影响化学反应过程的活化能。如图3-4-7所示,在一个化学反应体系中,反应开始时,反应物(S)分子的平均能量水平较低,处于“初态”,这些S分子不可能直接转变成产物(P)。在反应过程中,只有那些具有比