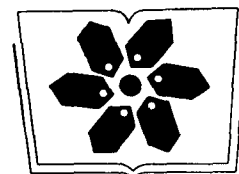


蛋白质化学 研究技术与进展

夏其昌 主编

科学出版社



中国科学院科学出版基金资助出版

蛋白质化学研究技术与进展

夏其昌 主编

科学出版社

1999

内 容 简 介

本书主要介绍当前国际上蛋白质化学研究技术的一些新进展,包括简明的基本概念、具体操作技巧和应用。对氨基酸、多肽和蛋白质的常用分离、分析和鉴定方法作了介绍,侧重在经验讨论上;对一些新技术则侧重在引导入门和进展上。全书共五编:总论、色谱、电泳、其他物化方法和蛋白质化学分析以及生物工程产品的鉴定和质控。

这些技术的引入和介绍对我国从事生化研究的科学工作者和生物工程研究工作中的一般技术人员以及大专院校有关专业的师生很有参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

蛋白质化学研究技术与进展/夏其昌主编.-北京:科学出版社,1997

ISBN 7-03-005806-2

I. 蛋… I. 夏… II. 蛋白质-生物化学-研究方法-进展 N. Q51-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(96)第 25656 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

中国科学院印刷厂 印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1997 年 10 月 第一版 开本:787×1092 1/16

1999 年 5 月 第二次印刷 印张:16 1/2

印数:1 501—3 500 字数:371 000

定价:28.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(新欣))

敬賀

王應暎教授九十华诞

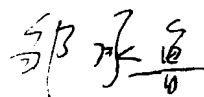
学生夏其昌

序

90年代以来,至少已经出版了5种新的结构生物学专业期刊,它们是:“J. Structural Biology”(1990),“Current Opinions, Structural Biology”(1991),“Macromolecular Structure”(1993)以及“Nature”,1994年新增加的“Structural Biology”专刊。其中特别值得注意的是已有几十年历史的“J. Structural Biology”的几次更名。该杂志创刊时的名字是“J. Ultrastructure”,主要发表用电子显微镜观察生物体精细结构的研究论文,后来随着分子生物学成为生物学的主流,1972年更名为“J. Molecular Structure Research”,1990年又改为现名,应该说该刊三次改名在一定程度上反映了生物学发展的历史动向。从上述几种主要结构生物学期刊的论文内容分析,大部分(约70%)是从蛋白质结构(主要是三维结构)分析阐明其生物学功能。此外,还有一些以蛋白质为主题的新刊物,其中最重要的是“Protein Science”和“Proteins, Structure, Function and Genetics”,这两种刊物虽然创刊时间不长,但在生物化学与分子生物学领域内的学术刊物以Impact Factor为序的排列中已经名列前茅,超过了以核酸为主题的专业刊物“Nucleic Acid Research”。这一事实说明蛋白质研究是当前生物化学与分子生物学领域内最为活跃的内容。如果说,生物大分子研究的主流在50年代是从蛋白质转向核酸,那么现在可以说又从核酸转回蛋白质了。国际性的蛋白质学会在1986年成立时曾宣称蛋白质研究的第二个黄金时代已经开始,这和近10年来学科发展的实际情况是完全符合的。

我国蛋白质研究是有基础的,至今仍为国际上所公认的第一个蛋白质变性的理论,是30年代我国科学家吴宪基于国内的工作提出的。60年代中,胰岛素的人工合成也是我国在生物化学领域内的一项重大成就。但是科学发展极为迅速,研究手段日新月异,新的研究成果不断涌现,对我国的科学研究和教学工作者来说,的确需要一本综合论述蛋白质研究最新方法的书。《蛋白质化学研究技术与进展》一书的出版满足了这一需要。为本书执笔的作者都是在有关领域内工作多年的科学家,对所论述的方法有丰富的经验,介绍了许多本人的工作体会。我相信本书的出版不仅对新进入这一领域的青年工作者是必不可少的,对于有经验的科学家也有相当的参考价值。因此乐于向读者推荐。

对于本书所包括的内容,虽然见仁见智可能有不同的看法,但由于这一领域的飞速发展,新的研究方法必将不断涌现,在一定时间内的补充修订再版将是必然的。上述这些问题,都不难在充分听取读者意见后,于再版时得到解决。



1996年9月16日

前 言

蛋白质是生命现象和分子生物学研究最基本和最重要的对象之一,因此对它的原有研究方法不断更新,新的技术也层出不尽。由于这些方法是许多实验室日常所必需的,因此我们组织在这方面富有实践经验的工作者编写。在取材原则上,原理部分尽量简单,因为读者可从许多其他专著中见到,常用技术侧重在具体操作和经验讨论上;新技术则在全面论述和发展趋势上。全书不拘一格,让作者各自尽材发挥;可成为一本必备的案头工具书。我想,读者也会赞同这种格局的。

本书的出版得到邹承鲁先生的支持和关心,祁国荣教授的鼓励和促进,在此表示感谢。

夏其昌

1996年8月

目 录

序 前言

第一编 总 论

第一章 蛋白质的表征	夏其昌 (1)
一、蛋白质的结构和纯化	(1)
二、蛋白质的定量(溶液中的蛋白质浓度)	(5)
三、蛋白质的脱盐(除盐和非共价结合的小分子)	(6)
四、纯度	(7)
五、分子量	(7)
六、等电点	(8)
七、氨基酸分析	(8)
八、蛋白质及多肽的末端分析	(9)
九、光谱	(9)
十、肽谱	(9)
第二章 蛋白质的样品准备和专一性裂解	夏其昌 (12)
一、蛋白质样品的准备	(12)
二、蛋白质的化学裂解	(13)
三、常用的蛋白水解酶酶解	(16)
四、蛋白质中存在着封闭的 N 端	(18)
五、蛋白质中的 C 端残基的测定	(19)
六、蛋白质中一些特殊肽段的检出	(20)

第二编 色 谱

第三章 氨基酸组成分析	邵晓霞 张丽华 (23)
一、氨基酸组成分析的目的	(23)
二、水解方法	(24)
三、特殊氨基酸的保护和定量	(26)
四、氨基酸组成原位分析	(27)
五、衍生方法及原理	(27)
六、测定氨基酸组成的实验步骤	(30)
七、结语	(32)
第四章 蛋白质化学中的层析技术	王克夷 (35)
一、层析的原理和分类	(35)
二、层析的基本操作过程和层析的装置	(40)
三、常用的一些层析基质	(45)

四、各类层析用于蛋白质分离的实例	(51)
第五章 高效液相色谱(HPLC)	夏其昌 (72)
一、柱	(72)
二、柱的新进展	(74)
三、泵	(76)
四、用途	(77)
五、讨论	(77)
第六章 蛋白质和多肽的氨基酸序列测定	徐来根 屠红旻 曾 嵘 (80)
一、N 端分析原理	(80)
二、N 端蛋白质序列仪	(81)
三、影响 N 端 Edman 反应裂解率的因素	(84)
四、测序前样品处理	(86)
五、手工 N 端测序	(88)
六、C 端序列分析	(91)

第三编 电 泳

第七章 聚丙烯酰胺凝胶电泳和电印迹	屠红旻 (99)
一、概述	(99)
二、操作步骤	(99)
三、几种不同凝胶电泳系统及其应用	(102)
四、电印迹	(108)
五、结束语	(110)
第八章 蛋白质等电聚焦	龚蓁蓁 (112)
一、原理	(112)
二、盘状等电聚焦(Disc IEF)	(113)
三、薄层 IEF	(116)
四、制备等电聚焦	(118)
五、等电聚焦中注意的几点	(121)
六、IEF 的优点和缺点	(122)
第九章 双相凝胶电泳	龚蓁蓁 (124)
一、引言	(124)
二、试剂、设备和储存液配制	(125)
三、实验操作	(127)
四、蛋白质固定和银染方法	(131)
五、凝胶干板的制作	(133)
第十章 毛细管电泳	屠红旻 (136)
一、基本原理	(136)
二、操作步骤及注意事项	(139)
三、毛细管电泳分离模式	(140)

四、结束语	(149)
第十一章 连续自由流电泳	夏其昌 宋金芳 (151)
一、原理	(151)
二、仪器	(153)
三、工作模式	(154)
四、CFE 在微重力下的优点	(154)
五、“纯理论”研究	(155)
六、一些影响因素	(155)
七、应用	(156)
八、结语和展望	(158)
第十二章 制备级液相等电聚焦	夏其昌 邵晓霞 (159)
一、旋转式等电聚焦	(159)
二、循环式等电聚焦	(160)
三、制备型连续流等电聚焦	(163)

第四编 其他物化方法

第十三章 质谱技术在蛋白质、多肽化学中的应用	金善炜 李一莉 (165)
一、前言	(165)
二、几种质谱技术简介	(165)
三、质谱在蛋白质结构测定中的应用	(169)
第十四章 生物分子核磁共振波谱技术	吴厚铭 (184)
一、样品要求与制备方法	(185)
二、NMR 实验数据的采集	(192)
三、残基自旋体系识别和序列归属	(198)
四、结构约束因子和特征二级结构分析	(207)
五、三维结构计算	(222)

第五编 蛋白质化学和生物工程产品的质控

第十五章 蛋白质化学分析和生物工程产品的鉴定	夏其昌 (235)
一、蛋白质含量	(235)
二、蛋白质的纯度	(236)
三、蛋白质的分子量测定	(237)
四、蛋白质的等电点测定	(239)
五、氨基酸定量分析	(239)
六、肽谱	(240)
七、质谱	(242)
八、N 端序列	(244)
九、C 端分析	(244)
十、蛋白质的二硫键分析	(245)

十一、突变点的分析	(247)
十二、原位分析和快速分析	(248)
十三、其他添加剂的问题	(248)

第一编 总 论

第一章 蛋白质的表征

夏其昌

(中国科学院上海生物化学研究所)

一、蛋白质的结构和纯化

蛋白质是一类重要的生物高分子，在英语中为“protein”，该词从希腊文转化而来，意思是“最原始的”，可见当时对蛋白质的认识已有相当的基础。

蛋白质有成千上万种，不同的蛋白质具有不同的生物功能。它是 20 种 α -氨基酸通过酰胺键(肽键)联成的长链分子，这种长链即所谓的肽链。许多蛋白质还包含有非肽链结构的其他组成成分，这种成分称为配基或辅基。

作为蛋白质组分成分的氨基酸一共有 20 种，它们的名称和结构列在表 1-1 中。为了表达蛋白质和肽结构的需要，每个氨基酸都有相应的符号表示，常用符号由氨基酸英文名的前三个字母组成。一个蛋白质有时可以由上千个氨基酸组成，为了表达的方便，又设计出单字符号。

表 1-1 存在于蛋白质中的 20 种常见氨基酸

氨基酸	英文名	三联体简称	单字简称	结 构	残基分子量	等电点
丙氨酸	Alanine	Ala	A	$\begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	71.08	6.00
精氨酸	Arginine	Arg	R	$\begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ (\text{CH}_2)_3 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{NH}_2\text{—C—NH} \end{array}$	156.19	10.76
门冬酰胺	Asparagine	Asn	N	$\begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CONH}_2 \end{array}$	114.10	

续表 1-1

氨基酸	英文名	三联体简称	单字简称	结 构	残基分子量	等电点
门冬氨酸	Aspartic acid	Asp	D	$ \begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} $	115.09	2.77
门冬酰胺 或 门冬氨酸		Asx	B			
半胱氨酸	Cysteine	Cys	C	$ \begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH}_2\text{SH} \end{array} $	103.14	5.07
谷氨酸	Glutamic acid	Glu	E	$ \begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{—COOH} \end{array} $	129.12	3.22
谷氨酰胺	Glutamine	Gln	Q	$ \begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{—CONH}_2 \end{array} $	128.13	
谷氨酸或 谷氨酰胺		Glx	Z			
甘氨酸	Glycine	Gly	G	$ \text{—NH—CH}_2\text{—CO—} $	57.05	5.97
组氨酸	Histidine	His	H	$ \begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array} $	137.14	
异亮氨酸	Isoleucine	Ile	I	$ \begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH—CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{—CH}_3 \end{array} $	113.16	6.02
亮氨酸	Leucine	Leu	L	$ \begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH—CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	113.16	5.98

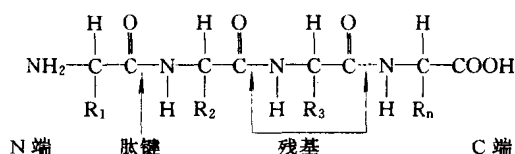
续表 1-1

氨基酸	英文名	三联体简称	单字简称	结 构	残基分子量	等电点
赖氨酸	Lysine	Lys	K	$\begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ (\text{CH}_2)_4 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	128.17	9.74
甲硫氨酸	Methionine	Met	M	$\begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{S—CH}_3 \end{array}$	131.19	5.74
苯丙氨酸	Phenylalanine	Phe	F	$\begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	147.18	5.48
脯氨酸	Proline	Pro	P	$\begin{array}{c} \text{—N—CH—CO—} \\ \\ \text{C}_4\text{H}_7 \end{array}$	97.12	6.30
丝氨酸	Serine	Ser	S	$\begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	87.08	5.68
苏氨酸	Threonine	Thr	T	$\begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	101.11	6.16
色氨酸	Tryptophan	Trp	W	$\begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N} \\ \\ \text{H} \end{array}$	186.21	5.89
酪氨酸	Tyrosine	Tyr	Y	$\begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	163.18	5.66
缬氨酸	Valine	Val	V	$\begin{array}{c} \text{—NH—CH—CO—} \\ \\ \text{CH—CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	99.13	5.96

上表列出 20 种基本氨基酸，实际上还有几百种不常见的氨基酸参与某些蛋白质的组分，可称为稀有氨基酸；另一些氨基酸出现频率要高些，如羟脯氨酸、甲基组氨酸和甲

基赖氨酸、 γ -羧基谷氨酸等，但它们是在蛋白质生物合成后转变而来的，因此不计入基本氨基酸之列。

蛋白质的化学结构是



这是一个链状的结构，经水解后，将肽键断裂，转变成一系列的氨基酸。链中相当于氨基酸的单元结构称为残基。而上述链称为肽链。肽链的氨基一端称为 N-端或氨基端，羧基一端称为 C-端或羧基端。习惯上表达时将 N-端列在左边，C-端列在右边。

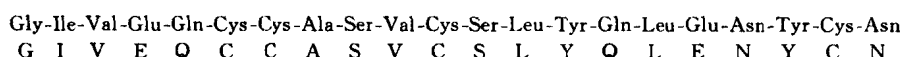
从氨基酸的结构看，半胱氨酸的侧链上有巯基(-SH)。巯基的稳定性较差，在碱性 pH 下易氧化成硫-硫键(或称二硫键)。如果一条肽链上的两个半胱氨酸的巯基形成二硫键，肽链形成链内二硫键。假如两条肽链间形成二硫键，就出现由两条肽链组成的蛋白质(像胰岛素)。蛋白质分子有两对以上的二硫键，或者是蛋白质分子有一对二硫键和一个半胱氨酸，二硫键可能有不同的联接方式，于是出现异构体。异构体的数目因半胱氨酸含量不同而异，但是在天然的蛋白质分子中没有这种异构体，只有一种联接方式。而在重组蛋白质的复性中，可能出现二硫键的错配对。

肽链由许多氨基酸通过肽键(相邻两个氨基酸脱去一分子水)联接而成。20 种氨基酸前后沿一定的排列次序形成特定的结构。当氨基酸组成及它们的排列次序和长短不同时，就形成了不同的蛋白质；或者讲，不同的蛋白质有特定的氨基酸序列，这种序列是蛋白质化学结构的最重要的内容。

蛋白质分子中还有非肽链结构的部分，有些也通过共价联接(糖基，磷酸化等)，有一些是通过非共价结合的(辅基或配基)。

几十年前就有人建议，根据蛋白质结构有不同的层次，可分别称之为蛋白质的一级结构、二级结构、三级结构及四级结构。

一级结构是指肽链中的氨基酸排列顺序(序列)，二硫键的定位也是一级结构的重要内容。下面是猪胰岛素 A 链的一级结构的两种表达形式：



蛋白质的二级结构也可称为构象单元，因为它们是蛋白质复杂的空间构象的基础。常见的构象单元有： α -螺旋； β -折叠； β -转角；无规则卷曲。一些构象单元的结构不是不可改变的，pH、温度、溶剂极性等因素可以影响单元的变化。

具有二级结构的肽链在空间走向，形成具有空间三级结构的蛋白质，如所谓球蛋白类，它们几乎都有生物功能和活性，其中有些还能进一步相互作用，形成更高层次的结构。蛋白质之所以有功能，是因为分子表面有可以进一步作用的基团，不同的蛋白质由于分子表面结构不同，可作用的基团分布和组合也不同，这种特定的结构就是各种蛋白质有不同的功能和活性的分子基础。

四级结构可以认为是一些特定三级结构的折叠肽链通过非共价键而形成的大分子体

系,也可称为亚基的装配(assembly)。装配是一个非常复杂的过程,它能使各亚基间相互调节,使蛋白质分子的功能更完善。

蛋白质的分离纯化是研究蛋白质的最基本的基础和起点。蛋白质的来源是多样的,主要来自动物、植物的各种组织和微生物,取材要采用含量丰富的器官,这有时还和季节有关。近年来还来自基因工程的方法。

抽提蛋白质的第一步是将组织粉碎,破坏细胞,以便于抽提出蛋白质;抽提液的选择也因蛋白质而异。一般用低浓度的缓冲液,有时在从肌肉抽提时也用稀碱,因肌肉中含有乳酸,最后抽提液的pH却是中性的。在提取膜蛋白或包含体内的蛋白质时,还加(非离子型)表面活性剂或变性剂以增加溶解度。在各种细胞中普遍存在各种蛋白水解酶,会导致蛋白质的降解,低温操作和加一些相应蛋白酶抑制剂(如DFP, PCMB, PMSF等)、螯合剂(EDTA等)是有益的。

将蛋白质抽提出来后,就要进一步纯化。纯化不外两方面:一是将大体积变成小体积;二是把多组分蛋白质只留下单一的蛋白质。前者有吸附法,超滤法^[1],冻干等。后者有根据蛋白质的分子形状和分子量大小、电离性质、溶解度和疏水性、生物功能专一性等,常用有各种盐析法^[2]、超离心沉降、结晶^[3]、电泳、凝胶过滤、离子交换色谱、亲和色谱等。近年来发展的FPLC和HPLC大大促进了许多蛋白质在毫克级的纯化,其量足够用于蛋白质的化学研究。一些新型无载体的液相电泳的发展,能在几十毫克到上克水平上制备蛋白质,开拓了一个新领域。精制蛋白质的技术将在本书有关章节中阐述。

二、蛋白质的定量(溶液中的蛋白质浓度)

测定蛋白质的量是研究蛋白质的最基本的一步,而对蛋白质定量方法的原理、适用范围、灵敏度和可靠性程度有一些了解是必要的。

往往一些人在送蛋白质/多肽样品进行氨基酸组成分析或进行其序列分析时,样品实际浓度和所报的浓度有很大的差异,甚至有数量级的差异,以致上样品量太少而无法分析,造成人力、时间、费用上的浪费。

更有甚者,根据一些片面数据,没有测定蛋白质浓度,光谱和定量氨基酸分析,就断言所得的样品是蛋白质。因此,蛋白质的定量看来是“小事”一桩,但却是最基本的事,如不给予重视,会在根本上出问题。

溶液中蛋白质的浓度测定方法很多,最早的经典方法是克氏定氮法,因为每一种蛋白质都有其恒定的含氮量(约14%~16%)。其方法是將一定量的蛋白质用浓硫酸消化分解,使其中的氮变成铵盐,再与浓NaOH作用,使氨气放出而被吸收于标准酸液中,用反滴定法滴定残余的酸,或用硼酸吸收后,再用标准酸直接滴定,求得该蛋白质样品中的含氮量^[4,5]。

此法虽有普遍性,但操作繁琐,目前极少有人用它。稍后应用较广泛的方法是双缩脲法、福林-酚法和紫外吸收法,近年来大多数人用考马氏亮蓝法。

采用哪一种方法较好,一般考虑是准确、操作方便、影响因素少。

1. 光吸收法

蛋白质在280nm左右有吸收高峰,这主要是由于蛋白质中的芳香族氨基酸(Trp和

Tyr)的缘故,因此可以用 280nm 光吸收值来定量溶液中的蛋白质。但是每种蛋白质中的芳香族氨基酸含量是不同的,而且有较大的差别。最简单的是采用 280nm 光吸收为 1 时等于 1mg/ml 来计算。这样简单的处理在准确性上有不足之处,但其测定迅速,用量极少,而且不消耗样品,故被广泛采用。

考虑到蛋白质样品中可能含有少量核酸类杂质,因此采用 280nm 和 260nm 光吸收以下式计算。

$$\text{蛋白质浓度(mg/ml)} = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$$

最准确的方法是用蛋白质的摩尔吸光系数计算。在蛋白质纯化后,将此纯的蛋白质对水充分透析,然后冻干或在真空干燥器中干燥,继而在 105℃ 下恒重,精确称量 1~10mg,再定量溶于一定体积中(通常为 1mg/ml),测量 280nm 下的光吸收,从而得出该蛋白质的克分子消光系数。这种方法最为方便、准确、也很微量。

2. 双缩脲法^[6]

此法是基于蛋白质之肽键 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 有双缩脲反应,在碱性溶液中与 Cu^{2+} 络合显蓝色。该法受蛋白质之特异性影响较小,适用于较大量蛋白质(毫克级)的测定。

3. 福林-酚法^[7]

灵敏度和准确性都较高,但操作较繁琐,此外,影响因素(譬如去垢剂干扰这一方法)也较多。

Smith^[8]提出一种新的 BCA 测定蛋白质的方法,灵敏度和重复性都佳,受干扰少,Pierce 公司有商品供应。

4. 考马氏亮蓝 G-250 法^[9]

适合于定量 10~100 μg ,操作简单,应用广泛。每个实验室可以方便的自行配制,又叫“home-made”试剂。

5. 氨基酸分析法

此法很准确,最接近真实值,因为其他方法都用一个已知的纯蛋白(大多用牛血清白蛋白,BSA)作一标准曲线,将待测蛋白和它相比,实际上两种蛋白质的芳香族氨基酸含量不完全一样,所以会产生系统误差。而用氨基酸分析来计算是测得该蛋白真实值,但稍偏低一点,因为蛋白质在酸水解时,Trp 被破坏,Cys 也遭受很大破坏,Ser 和 Thr 回收也在 90%左右。

上述方法的操作细节可参见《蛋白质化学研究技术》^[5]和《蛋白质和酶学研究方法》^[10]。

三、蛋白质的脱盐(除盐和非共价结合的小分子)

蛋白质溶液中的大多数盐和低分子量的物质可以对 0.1mol/L NaCl 透析而除去,然

后再对水充分透析。如果用过甲酸处理过的样品,由于缺少卤原子,所以先用其他盐或缓冲液透析,如挥发性的醋酸铵,稀的醋酸或碳酸氢铵,然后再对水透析或直接冻干。

用凝胶过滤法(Sephadex G-25 或类似的介质)和 HPLC 的凝胶柱脱盐。应用这类技术时首先要考虑蛋白质的回收,特别对少量蛋白质,尤其是碱性蛋白质,则常常因载体对蛋白质的吸附作用而导致回收差。此时的流动相一般不能用水,而推荐用 0.1N 醋酸或 0.1N 碳酸氢铵,因为可以在冻干过程中除去这些挥发性的盐。

在蛋白质纯化的最后阶段,常用挥发性溶剂(例 0.1%TFA/ACN)的反相 HPLC,则可得无盐的蛋白质样品,在我们实验室常用此法于蛋白质序列分析中净化样品。如果对某些蛋白质的回收低,建议用短柱(例 PE-ABD 公司的 RP-300 柱, 30mm×2.1mm)较为理想。

比 HPLC 更简单的方法是用 C-18 的 Sep-Pak,或用 Millipore 公司的超滤离心过滤管,但耗费较大。

如果蛋白质是用 SDS-PAGE 纯化的,则非共价结合的分子往往可以有效地除去,但又引入了 SDS 和其他一些分子(Tris, Glycine 等)。从 SDS-PAGE 电泳的凝胶中回收蛋白质的方法很多,但不全尽人意。如采用电印迹,往往很有效。因为 PVDF 膜结合蛋白质的亲和力大大高于盐、去垢剂等小分子物质,从而达到蛋白质脱盐的目的^[11,12]。

Stone 推荐用 TCA 沉淀蛋白质而脱盐,蛋白质浓度>100μg/ml(如果蛋白质浓度太低,得不到沉淀,这时可用真空离心浓缩蛋白质的方法),加总体积 1/9 的 100%TCA, TCA 最后浓度为 10%,在冰浴放置 30 分钟后离心收集沉淀物,用 100μl 冷丙酮洗两次,气流干燥^[13]。

Stone 还建议用丙酮沉淀法,1ml 以下的蛋白质对 0.05%SDS, 5mmol/L NH₄HCO₃ 充分透析,然后转移到 1.5ml Eppendorf 管中真空离心干燥;加 50μl 水;再加 450μl 1mmol/L HCl 的酸性丙酮,在-20℃放置 3 小时,离心收集沉淀,用 100μl 冷丙酮洗沉淀两次,气流干燥^[13]。

注意:如果 SDS 的量大于 0.05%,则 SDS 易与蛋白质形成共沉淀。

金属离子或辅酶往往和蛋白质结合很紧,这可将蛋白质变性后用透析法除去。

四、纯 度

蛋白质纯度的鉴定方法通常有分析电泳,如 SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、各种毛细管电泳(CE);色谱(更常用 HPLC),如基于蛋白质分子量的凝胶过滤,基于蛋白质疏水性质的反相色谱,基于蛋白质表面电荷的离子交换色谱;近年来质谱在生物大分子中的应用也很活跃,还有化学方法检蛋白质末端的均一性也是评价纯度的好方法。

这些方法是根据蛋白质的分子大小和形状,或表面电荷,或荷质比来检查纯度的。只用一种方法来检查蛋白质的纯度是不够的,至少要用两种不同机理的方法来鉴定蛋白质的纯度才比较可靠。

五、分 子 量

蛋白质的分子量是一项重要的指标,早期蛋白质分子量的测定用超离心和光散射等