

实用蛋白质制备技术

SHIYONG DANBAIZHI ZHIBEI JISHU

迟玉杰 阎 丽 编著



哈尔滨工程大学出版社

TQ93

459141

C79

实用蛋白质制备技术

迟玉杰 阎 丽 编著

江苏工业学院图书馆
藏书章

哈尔滨工程大学出版社

内 容 简 介

本书共7章,主要介绍了蛋白质的粗分离方法、蛋白质的层析分离和电泳分离技术、蛋白质结晶及其提纯过程中的定量和纯度鉴定方法。

本书可作为生物化学、生物学、医药、食品工业技术人员及有关大专院校师生的参考书。

实用蛋白质制备技术

Shiyong Danbaizhi zhibei Jishu

编著 迟玉杰 阎丽

责任编辑 张忠远

*

哈尔滨工程大学出版社出版发行
哈尔滨市南通街145号 哈工程大学11号楼
新华书店经销
东北农业大学印刷厂印刷

*

开本 787mm×1 092mm 1/32 印张 8.75 字数 196 千字
1998年11月第1版 1998年11月第1次印刷
印数:1~2 000册

ISBN 7-81007-924-7
TQ·8 定价:12.00元

前 言

蛋白质既是构成生命的结构物质,也是生命活动的主要体现者,它结构复杂、种类繁多。欲对某种蛋白质进行研究,必须先将其分离纯化。由于目的蛋白质在细胞内与许多其他蛋白质及非蛋白质物质共存,加之蛋白质易于变性,因此给蛋白质分离纯化工作带来很大困难。但随着对蛋白质、活性多肽结构与功能研究的日益重视,蛋白质制备技术也随之有了飞跃发展。国内从事对蛋白质及多肽研究的人员也愈来愈多,但与此不相适应的是,关于蛋白质研究技术的书籍很少,不能满足相关人员的需要。有鉴于此,我们利用多年从事蛋白质制备技术的知识和经验,并参阅有关文献,编成此书。希望它能成为此技术研究者的入门钥匙,也希望成为深入研究此类技术的参考书。

限于编著者水平,本书错误或不当之处定会甚多,敬请专家和读者不吝指正。

编著者

1998年9月

目 录

1	蛋白质制备技术概述	1
1.1	蛋白质制备技术的基本理论依据	1
1.2	蛋白质制备技术的基本原理	2
1.3	蛋白质制备技术的一般程序	3
2	蛋白质的粗分离技术	6
2.1	材料的选择及预处理	6
2.2	细胞破碎和提取	7
2.3	蛋白质沉淀	15
2.4	蛋白质除盐与浓缩	28
3	蛋白质层析分离技术	52
3.1	层析分离技术的一般原理	52
3.2	吸附层析技术	57
3.3	分配层析技术	64
3.4	离子交换层析技术	72
3.5	凝胶过滤层析技术	91
3.6	凝胶过滤层析的应用	103
3.7	亲和层析技术	106
3.8	高效液相层析技术	120
4	蛋白质的电泳分离技术	129
4.1	电泳的基本原理	129
4.2	电泳的类型	135

4.3	电泳的一般技术	136
4.4	醋酸纤维膜电泳	142
4.5	琼脂平板电泳	145
4.6	聚丙烯酰胺凝胶电泳	147
4.7	聚丙烯酰胺凝胶电泳的应用	165
4.8	凝胶等电聚焦技术	179
4.9	凝胶免疫电泳	187
4.10	高效毛细管电泳	194
5	蛋白质的结晶、干燥及保存	197
5.1	蛋白质的结晶	197
5.2	蛋白质的干燥	212
5.3	蛋白质的保存	220
6	蛋白质提纯过程中的定量	229
6.1	酶活力的测定	229
6.2	蛋白质含量的测定	253
7	蛋白质纯度的鉴定	262
7.1	电泳法	262
7.2	通过层析性质的检测	263
7.3	免疫化学法	263
7.4	蛋白质化学结构分析法	263
7.5	超速离心沉降分析法	264
7.6	其它方法	264
	主要参考文献	266

1 蛋白质制备技术概述

1.1 蛋白质制备技术的基本理论依据

蛋白质分子是由数十个、数百个、甚至上千个各种氨基酸通过肽键连接起来,并以各自特殊的方式组合而成的生物高分子物质。随着肽链数目、氨基酸组成及排列顺序的不同,便形成不同的蛋白质。具有完整空间构象的蛋白质分子,由于其所含氨基酸数量和空间排列方式的不同,从而使蛋白质具有不同的分子量和大小。又由于在构成蛋白质分子的二十种氨基酸中,许多氨基酸含有可解离侧链,如天冬氨酸上的 β -COOH、谷氨酸上的 γ -COOH、组氨酸上的咪唑基、半胱氨酸上的 $-SH$ 、酪氨酸上的 ϕ -OH、赖氨酸上的 ϵ -NH₂、精氨酸上的胍基,此外还有末端氨基和末端羧基。这些可解离基团在不同 pH 表现不同的解离状态,使蛋白质分子带有电荷。因为蛋白质分子由许多氨基酸组成,所以它们的带电状态也千差万别,又因为蛋白质分子具有完整的空间结构,使得蛋白质分子表面的电荷排布也各不相同。

细胞抽提液是各种生物分子的混合物,其中含有无数种蛋白质、核酸、多糖、脂类等,所以要制备某种蛋白质实际上就是从复杂的混合体系中分离出这种蛋白质。至于蛋白质纯化到什么程度,提纯的规模多大,应根据研究工作的目的和类型来决定。例如,药用蛋白质要求的纯度很高,有时要大于 99.99%,以除去给病人注射可能引起有害作用的物质。工业

用酶数量大(千克或吨),相当不纯的酶制剂常常就能应用。研究蛋白质的性质、结构与功能时,往往必须将该蛋白质纯化到均一状态。

虽然蛋白质都具有肽链结构,但在分子大小和形状、极性和电荷、溶解度和密度上仍会有所差异,有的蛋白质还有异常性质,如对热和蛋白水解酶异常稳定,因此,应用各种分辨效果好的化学和物理化学方法,可以将它们分离。

1.2 蛋白质制备技术的基本原理

蛋白质制备方法从原理上可分为几种类型:一是利用一种蛋白质相对于其它蛋白质溶解度不同的沉淀法;二是依据蛋白质在两相间分配作用不同的相分配法;三是利用蛋白质对固体载体的吸附性质不同,通过柱层析方式将它们分别洗脱下来的柱层析法;四是依据蛋白质在电场或离心场中运动速度不同的电泳法或离心法。上述提纯方法的适当结合,在多数情况下,足以获得纯化的蛋白质。

蛋白质种类很多,性质差异又很大,且处于不同的体系中,因此,很难有一个固定的程序适用于各类蛋白质的分离工作,但对任何蛋白质分离需注意的共性问题是:(1)要选择一种最好的含有目的蛋白质的材料;(2)分离步骤要尽可能少,因为提纯的每一步都不可避免地损失一部分产品,包括产品的丢失和破坏;(3)要建立一个方便灵敏的分析方法。有了分析方法才能估价每一步的提纯程度。对酶来说,通常是测定它的酶活性及其蛋白质含量;(4)尽量避免蛋白质在提纯过程中的变性。除了要求分离流程相当快速外,分离过程通常要

保持在低温(4℃)条件下进行。低温可降低细胞抽提液中蛋白水解酶的作用,也可加入蛋白酶抑制剂,以防止蛋白酶的水解作用。分离过程中还要尽量避免过度接触氧气,因为蛋白质的半胱氨酸易被氧化。加入巯基试剂(如二硫苏糖醇)能防止半胱氨酸氧化。此外,可向缓冲液中加入一定的化学试剂,如甘油、二价金属离子(Mg^{2+} 、 Ca^{2+})。金属螯合剂(如EDTA)能防止重金属离子对酶的失活作用。要避免一切过激因素(如过酸或过碱)的影响,因此要注意选择缓冲液的pH和缓冲容量。操作过程中尽可能使样品中蛋白质的浓度维持在较高水平。

1.3 蛋白质制备技术的一般程序

一般来说,蛋白质的制备包括以下过程:(1)材料的选择和预处理;(2)破碎生物组织(原料是细胞外分泌物时无需此步),并用适当的缓冲液将蛋白质提取出来;(3)用离心法将细胞的亚细胞颗粒(如核、线粒体、微粒体或核糖体)及细胞碎片与溶液分开;(4)应用盐析法或有机溶剂法将有关蛋白质组分沉淀下来;(5)进一步应用层析法或电泳法使各种蛋白质分开;(6)根据具体产品要求,在适当条件下将蛋白质形成结晶或制成冻干粉。上述过程可用图1-1表示。

以上这六阶段并非每个产品都完整地具备,也不是每一阶段都截然分开。如选择性提取包含着分离纯化,沉淀分离包含着浓缩。从发酵液中提取胞外酶,则不需破碎细胞,只要离心或过滤后除去菌体,便可直接进行分离纯化。在蛋白质制备过程中,选择分离纯化的方法和应用各种方法的先后顺

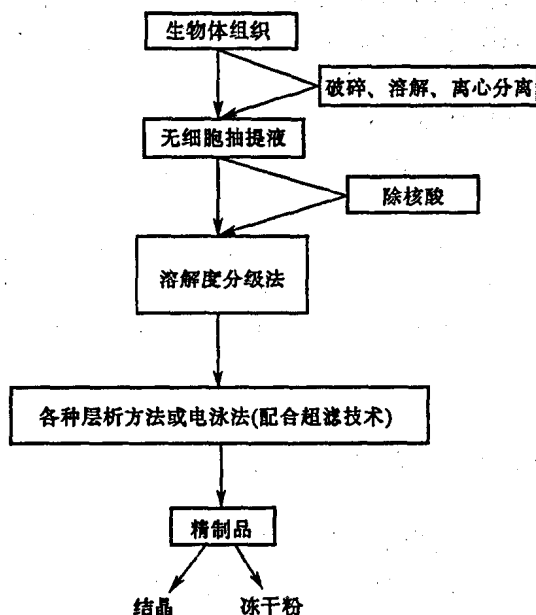


图 1-1 蛋白质分离纯化的一般程序

序也因材料与产品而异。一般地说,选择性溶解和沉淀是经常交替使用的方法,贯穿于整个制备过程中,由于沉淀方法需用较大的体积,且能把所需的蛋白质浓缩,所以往往把它用在提纯的前期;虽然凝胶过滤和一些其它柱色谱法也有类似的限制,但对溶液体积的限制,不是很严格的,因此倾向于在一系列提纯步骤的中期使用这些方法;电泳方法则用在提纯过程的末尾,因为此时混杂在目的蛋白质中的组分数很少了,并且体积也很小了。结晶方法只有产品纯化到一定程度进行,才能收到应有效果。但不论哪一阶段,使用何种方法,都必须

注意在操作过程中保持蛋白质结构的完整性,防止蛋白质降解和变性的发生。蛋白质完整而精巧的分子空间结构主要依靠氢键、盐键和范德华力的维持,为避免蛋白质活性丧失,在整个制备过程中,所选条件要十分温和,同时还需注意防止体系中重金属离子、细胞自身酶系及其它有害物质的污染。

最后值得提醒的是,提纯过程中即使很小心,蛋白质结构也要发生一定的变化。因此,提纯后的蛋白质,即使其活力基本上得以保留,它的构象也有可能不同于天然构象或完整功能的构象。

以后各章分别介绍蛋白质或酶的分离纯化技术。

2 蛋白质的粗分离技术

2.1 材料的选择及预处理

提纯蛋白质最重要的是选择适当的原材料。蛋白质来源无非是动物、植物和微生物,选什么材料主要依据实验的目的而定。从工业生产角度上考虑,注意选择含量高、来源丰富,制备工艺简单,成本低的原材料。但有时几方面不能同时具备,含量丰富而来源困难,或含量来源都理想,但分离纯化手续繁琐,反而不如含量略低些但易于获得纯品者。因此,必须根据具体情况抓住主要矛盾决定取舍。如果是为了科学实验的特殊需要,选用某一材料时,则不必全面考虑上述问题,取材只需符合实验预定目标的要求即可。

选材时,还应注意植物的季节性、微生物的生长期和动物的生理状态之间的差异。动物在饥饿时,脂类和糖类含量相对减少,有利于蛋白质的分离。微生物生长的对数期,酶含量较高,可获得高的产量。各种生物体和同一生物体不同组织细胞的蛋白质和酶的含量及分布情况,前人做了许多工作,可以借鉴和参考。

材料选定以后,通常要进行预处理。动物组织先要剔除结缔组织,脂肪组织等非活性部位;植物种子先行去壳,除脂;微生物需将菌体和发酵液分离开。如所得材料不是立即进行实验,则应冷冻保存 $-10^{\circ}\text{C} \sim -50^{\circ}\text{C}$,尤其是动物性材料尚需要深度冷冻保存。用植物材料分离蛋白质时要注意植物细胞

壁比较坚厚,要采取有效方法使其充分破碎,同时,植物组织中含有大量多酚物质,在提取过程中会被氧化成褐色产物、干扰蛋白质进一步纯化,必须防止。另外,植物细胞的液泡内含物有可能改变抽提液的 pH 值,因此,对植物组织应使用较高浓度的缓冲液作为提取液。在用微生物提取蛋白质时,由于微生物可以大规模培养,因此原料来源一般不受限制。近年来,通过基因工程技术,将某些蛋白质的基因克隆到微生物中,从而可以大量表达这些蛋白质,这对稀有珍贵蛋白质的获得有重要的实际意义。

2.2 细胞破碎和提取

2.2.1 细胞的破碎

除了提取体液、细菌胞外某些多肽激素、蛋白质、酶不需要破碎细胞外,对于细胞内及多细胞生物组织中蛋白质的分离提纯,需事先将细胞和组织破碎,使蛋白质分子充分释放到溶液中。不同生物体,或同一生物体不同的组织,其细胞破碎难易不一,使用方法也不完全相同。如动物胰脏、肝脏、脑组织一般比较柔软,用普通匀浆器磨研即可,肌肉和心脏组织较韧,需预先绞碎再作成匀浆。植物肉质组织可用一般研磨方法,含纤维较多组织则必须在高速捣碎器内破碎或加砂研磨。许多微生物均具有坚韧的细胞壁,常用自溶、冷热交替、加砂研磨、超声波和加压处理等方法,现将生物大分子制备中组织细胞破碎有关机械方法、物理方法、化学及生物化学方法分别介绍于后。

2.2.1.1 机械法

1. 高速组织捣碎机:由调速器、支架、马达、带杆刀叶、有机玻璃筒(筒口加盖)等部分组成。操作时,将材料配成稀糊状液,放置于筒内约占 1/3 体积,固定筒上盖子,将调速器拨至最慢处,开动马达后,逐步加速至所需速度。一般市售商品转速最高可达 10 000 转/分。高速组织捣碎机适用于动物内脏组织、植物肉质种子、柔嫩的叶和芽等材料的破碎。

2. 玻璃匀浆器:由一内壁经过磨砂的玻璃管和一根一端为球状(表面经过磨砂)的杆组成。操作时,先把绞碎的组织置于管内,再套入研杆用手工来回研磨,或把杆装在电动搅拌器上,用手握住玻璃管上下移动,即可将组织细胞研碎。匀浆器的内杆球体与管壁之间一般只有十分之几毫米,细胞破碎程度比高速组织捣碎机高,机械切力对生物大分子破坏较少。制造匀浆器的材料除玻璃外,也可以用不锈钢、硬质塑料等。

3. 研磨:常用的有研体和研磨机。细菌及植物材料应用较多,加入少量的石英砂效果较好。

2.2.1.2 物理法

主要通过各种物理因素的作用使组织细胞破碎的方法。应用于生物大分子制备的有:

1. 反复冻融法:把待破碎样品冷至 $-15^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$,使之冻固,然后缓慢地溶解,如此反复操作,大部分动物性的细胞及细胞内的颗粒可被破碎。

2. 冷热交替法:在细菌或病毒中提取蛋白质时可使用此法。操作时,将材料投入沸水中,在 90°C 左右维持数分钟,立即置于冰浴中使之迅速冷却,绝大部分细胞被破坏。

3. 超声波处理法:此法多用于微生物材料,处理效果与

样品浓度和使用频率有关。用大肠杆菌制备各种酶,常选用 50~100 毫克菌体/毫升的浓度,在 1kHz 至 10kHz 频率下处理 10 分钟至 15 分钟。对于其他细菌,则视具体情况而定。应用超声波处理时应注意避免溶液中气泡的存在,一些对超声波敏感的酶宜慎重使用。

4. 加压破碎法:加气压或水压达 2.068×10^7 帕~ 3.447×10^7 帕的压力时,可使 90% 以上细胞被压碎,此法多用于工业微生物酶制剂的制备。

2.2.1.3 化学及生物化学法

1. 自溶法:将待破碎新鲜生物材料存放在一定的 pH 和适当温度下,利用组织细胞中自身的酶系,使细胞内含物释放出来的方法,称为自溶法。自溶的温度,动物材料常选在 0°C ~ 4°C ,微生物材料则多在室温下进行。自溶时,需加少量防腐剂如苯、氯仿等以防止外界细菌的污染。因自溶的时间较长,不易控制,所以较少用于制备具有活性的蛋白质。

2. 溶菌酶处理:溶菌酶可用蛋清或微生物发酵方法制得,具有专一地破坏细菌细胞壁的功能。适用于多种微生物,较为常用。此外,蜗牛酶、纤维素酶也常被选为破坏细菌及植物细胞之用。

3. 表面活性剂处理法:较常用的有十二烷基磺酸钠、氯化十二烷基吡啶、去氧胆酸钠等。

表 2-1 和图 2-1 归纳了可用于破碎细胞的方法和仪器。

为了确保可溶性细胞成分全部抽提出来,应当使用类似于生理条件下的缓冲液。常用 0.02mol/L ~ 0.05mol/L 的磷酸缓冲液($\text{pH}7.0$ ~ 7.5)或 0.1mol/L Tris-HCl($\text{pH}7.5$),或

表 2-1 破碎细胞的方法

方 法	举 例	原 理
温和方法:		
细胞溶解	红细胞	渗透破碎细胞膜
酶降解	溶菌酶处理细菌	消化细胞壁
化学溶解/自溶	甲苯抽提酵母	部分化学溶解细胞壁
手动匀浆器	肝组织	迫使细胞通过窄缝撕开细胞膜
研磨	肌肉等	研磨产生的剪切力破坏细胞
较剧烈方法:		
韦林氏捣切器 (Waring 型)	大多数动物组织 和植物组织	切削作用和剪切力 破坏细胞
用磨料研磨 (砂、氧化铝)	植物组织和细菌	微小粗糙表面破坏 细胞壁
剧烈方法:		
压榨机 (french press)	细菌和植物细胞	迫使细胞在高压下通过小孔、剪切力破坏细胞
超声作用	细胞悬浮液	剪切力和空化作用破碎细胞
振动玻璃球	细胞悬浮液	与玻璃珠一起迅速振动,撕开细胞壁
研磨机 Manton-Gaulin 匀浆器	细胞悬浮液	原理与压榨机一样,可用于大规模操作

用含少量缓冲液的 0.1mol/LKCl。必要时,缓冲液中可加入 EDTA (1mmol/L-5mmol/L, 巯基乙醇 (3mmol/L~20mmol/L) 或蛋白质稳定剂等。

动物组织和器官要尽可能除去结缔组织和脂肪,切碎后放入捣碎机中。每克组织加 2~3 倍体积的冷的抽提缓冲液,匀浆几次,直至无组织块为止,然后离心倾出上清液,即得细胞抽提液。制备植物细胞抽提液时,缓冲液中加入聚乙烯吡咯啉酮(PVP),以减少褐变,因为它可吸附酚类化合物。

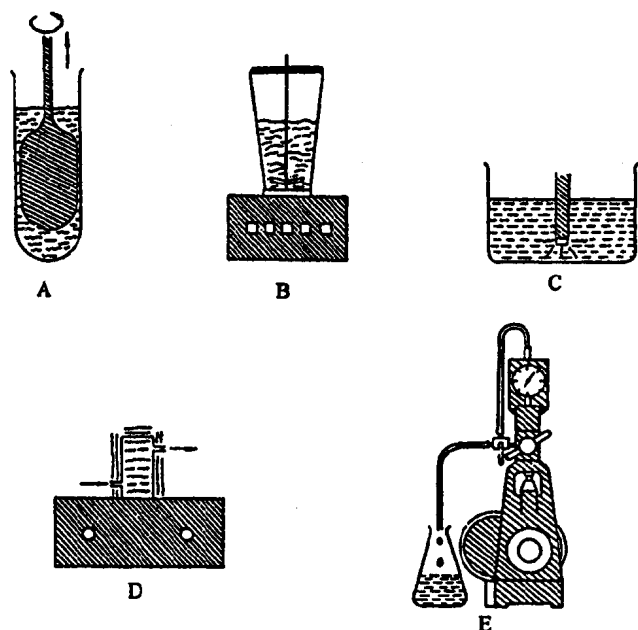


图 2-1 用于破碎细胞的仪器

A 手动或马达驱动的玻璃匀浆器材； B 高速组织捣碎机； C 超声波探头
D 振动玻璃球研磨机； E Manton Gaulin 匀浆器

2.2.2 提取

利用一种溶剂对不同物质溶解度的差异,从混合物中分离出一种或几种组分的过程,称为提取(或抽提)。被处理的混合物,无论是固体还是液体,在经过溶剂处理后,必须有一部分不溶解,而选择性地溶解被提取的部分,即其易溶部分要被溶出成为溶液,从而达到分离的目的。

提取分为两类:一是对固体的提取,被处理的材料为固