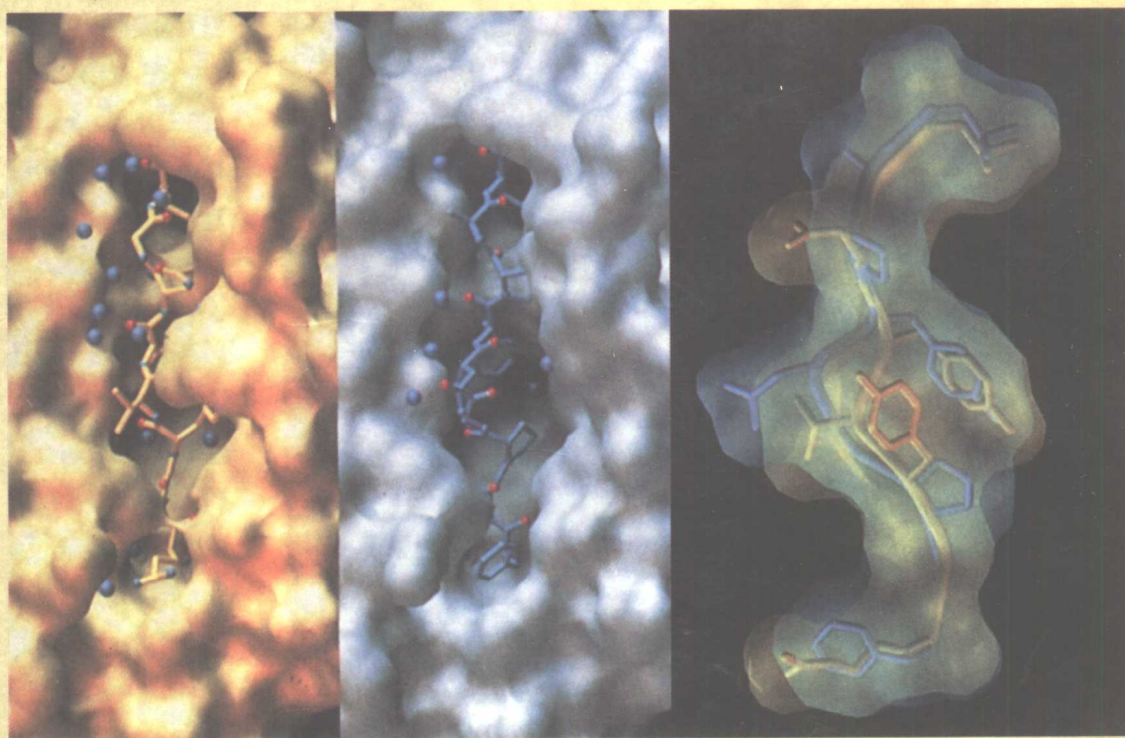


现代生物技术译丛

蛋白质结构分析: 制备、鉴定与微量测序

Protein Structure Analysis:
Preparation, Characterization and Microsequencing



〔德〕 R. M. 坎普

B. 威特曼-利伯德

〔希腊〕 T. 乔里-帕帕多普洛

科学出版社

内 容 简 介

结构生物学是生命科学领域又一个新的研究热点,飞速发展的蛋白质结构分析技术是研究蛋白质功能的基础。随着蛋白质组时代的来临,许多基因组分析留下的悬而未决的问题,可能通过直接的蛋白质的分离和鉴定而得到解决。本书涉及了这个领域最新、最灵敏的方法。这些方法和技术广泛应用于当今从事制药、生物医药和蛋白质测序的生化 and 生物工程实验室。本书由20位有经验的科学家编撰而成,内容包括蛋白质和多肽的分离、人工和自动微量测序、氨基酸组成分析、二硫键和脂类的确定、电泳和印迹技术、生物大分子的质谱光谱测定和结晶等各个环节的原理、材料、方法和操作步骤。每个实验步骤详尽,而且都经过了实际操作的验证,参考价值和可重复性非常强。

本书也可供有志于从事自然科学研究的学者参考。

R. M. Kamp, T. Choli-Papadopoulou, B. Wittmann-Liebold
Protein Structure Analysis: Preparation, Characterization and Microsequencing
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997

图字 01-98-2298

图书在版编目(CIP)数据

蛋白质结构分析:制备、鉴定与微量测序/[德]坎普(Kamp, R. M.), [希腊]T. 乔里-帕帕多普洛(T. Choli-Papadopoulou)等编著;施蕴渝等译.-北京:科学出版社,2000.3
(现代生物技术译丛)

ISBN 7-03-007648-6

I. 蛋… II. ①坎… ②施… III. ①蛋白质-结构分析 ②蛋白质-化学加工
IV. TQ937

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 23997 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717

北京双青印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

2000 年 3 月第 一 版 开本:787×1092 1/16
2000 年 3 月第一次印刷 印张:14 1/2
印数:1—3 000 字数:328 000

定价:40.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

前 言

《蛋白质结构分析：制备、鉴定与微量测序》乃是一部蛋白质和多肽结构分析的实践方法汇编。本书中，大约有 20 个作者对灵敏的蛋白质纯化与分析技术作了说明和评述。这些方法正在用于全世界各个药物和生物医学实验室或蛋白质测序单位的生化和生物医学研究中。书中各章都是由在这些领域中具有丰富经验的科学家所写，实验部分则已很好地记录、整理，因此读者们应该能够很容易地重复这些实验。本书中收录的这些方法曾经在大学课程和 1995 年 9 月 10~15 日 EMBO 在柏林举办的“蛋白质微量测序”训练班上作过演示。题目也来自于 1995 年 4 月在希腊 Halkidiki 和 Thessaloniki 召开的 FEBS 研讨会，多数作者在这些课程中都曾经是讲课人和指导者，使得这些课非常有生气和成功。各种多肽因它们的结构和功能的不同而有很大的差异，因而结构分析的策略必须是对于每一个具体蛋白质能大部分适用。书中对于实验方法成功和局限之处的讨论也是很关注的，从而使读者能够对于可能将会遇到的问题有所熟悉。

新加入到蛋白质化学领域来的青年科学家们可能会问：为什么需要再学习所有那些关于纯化和鉴定各个具体蛋白质和肽的既具有技巧性而又繁琐的操作过程呢？蛋白质基因的克隆与测序是推导出氨基酸链的最常用的一个现代化方法，因而可能并不需要直接去研究蛋白质。我们经常会听到这样一种说法：即采用分子生物学技术，我们可以做到所有这一切。可是，最近关于酵母和人类基因组项目的研究结果以及随后许多具有未知生物学功能的内含子和外显子序列的发现，使得人们不得不去探索和研究蛋白质本身。再者，10~15 年前从蛋白质研究到基因分析的这个转移，留下了许多悬而未决的问题，它们可能通过直接的蛋白质分离和鉴定而得到解决。我们强烈地劝告有志于自然科学研究的青年科学家们尽可能多学习一些蛋白质和多肽的结构分析技术，从而使得在他们研究中所碰到的问题能够通过研究所涉及的蛋白质而得到解决。

我们打算提供一个常用的蛋白质分析技术，但不可能包罗当前所用的全部。蛋白质和多肽结构的差异性是非常之大，从仅有几个氨基酸组成的很小的多肽链到超过一千个氨基酸残基以上组成的大蛋白，从非常亲水性的球状结构到可以伸展的具有高度疏水性的膜蛋白。一个单细胞含有几千个不同的蛋白质和多肽。实际上，人体中多肽的生物量大约占 17%，这些生物高分子参与了活细胞的所有基本过程，如在体液中的运输和分子的跨膜转运、信号转导、基因信息的转录和在核糖体上翻译成氨基酸序列、免疫应答的介导、蛋白质（酶）和肽（激素）在生物合成路线中的控制与调节等。至于蛋白质和多肽的结构与功能关系在从分子水平上了解生物学机制中的极其重要性那就更不用说了。

蛋白质具有复杂的结构，线性的多肽链以一定的方式形成三维的折叠，折叠方式对每种蛋白质来说是特异的、并且是单一的。这种特异性全部蕴藏在其氨基酸序列之中。

但一个线性的结构如何折叠成为高级结构在生物化学中尚是一个谜。第一，必须确定一级结构（氨基酸序列）；第二，必须找出与线性结构相关的二级结构单元（ α -螺旋、 β -片层、伸展结构、转折或卷曲）；第三，必须研究蛋白质如何折叠成为更高级的结构（三级结构）；最后，测定与其他的多肽链或其他分子间的相互作用（四级结构）。蛋白质晶体的 X-射线结构分析和蛋白质在溶液中的 NMR 研究，是测定蛋白质三级结构的强有力的工具，但要正确地解释这些结果的基础肯定还得靠氨基酸序列的知识。任何一类修饰，如磷酸化、甲基化或乙酰化，都是会增加蛋白质的特征或者改变它的性质。此外，许多蛋白质还是由各种蛋白质与 RNA 或 DNA 所组成的复合物中的一个组分，它们可能与脂或糖等连接，因此，知道氨基酸序列和三级结构，并且确定氨基酸的修饰和 S-S 键的存在虽然是很重要的，但还需要搞清是否还有配体、辅助因子和（或）其他分子与所研究的蛋白质组成复合物。最后，还必须说明形成稳定的具有全部活性的复合物的结合部位和结合力，这就是为什么测定蛋白质的结构并从分子水平上说明它的功能作用并不简单的原因所在，必须采用许多复杂的方法来研究蛋白质在生物过程中的作用。

蛋白质研究包括了物理的、物理化学的、化学的和生物学的方法。虽然在这里不可能对所有的方法都进行介绍，但我们希望我们已经收集了合适的对于初学者易于掌握的现代灵敏技术，它将会促进蛋白质的结构与功能研究。所列举的方法都相当成熟，并经过有经验的研究者证明是有用的。本书包括了对结构与功能研究在天然和变性条件下的纯化方法，介绍了用单向和双向聚丙烯酰胺凝胶对复杂的蛋白质混合物进行制备与分离的微量方法，以及高灵敏的氨基酸组成分析技术和手动与自动测序技术。此外，还介绍了数据库搜索的方法，它可以将许多蛋白质的两个序列或多个联配体（multi-alignment）进行联配。从而可以通过由 Edman 降解法得到的 N 末端和中部的部分序列来确定蛋白质。MALDI-质谱仪已经成为用质谱分析方法鉴定蛋白质和肽段的一种高度灵敏的快速分析手段，为本书介绍的蛋白质鉴定方法增添了色彩。

读者如果有什么问题，本书的作者和编者将很乐意根据读者请求给予帮助和协助。

1996 年 9 月于柏林

ROZA MARIA KAMP
THEODORA CHOLI-PAPADOPOULOU
BRIGITTE WITTMANN-LIEBOLD

参与编写成员表

THEODORA CHOLI-
PAPADOPOULOU
Aristotle University
of Thessaloniki
School of Chemistry
Laboratory of Biochemistry
54006 Thessaloniki, Greece

TSEZI EGOROV
Engelhardt Institute
of Molecular Biology
Analytical Protein Chemistry
Research Unit
ul. Vavilova
32, Moscow 117984
Russian Federation

FRANÇOIS FRANCESCHI
Max-Planck Institut
für molekulare, Genetik
Innstraße 73
14195 Berlin, Germany

THOMAS G. GIANNAKOUROS
Laboratory of Biochemistry
School of Chemistry
Aristotle University
of Thessaloniki
Thessaloniki 54006, Greece

FRANZ GODT
Technische Fachhochschule
Berlin, FB3
(Chemie und Biotechnik)
Seestraße 64
13347 Berlin, Germany

KATERINA KATSANI
Aristotle University
of Thessaloniki
School of Chemistry

Seestraße 64
13347 Berlin, Germany

ULF HELLMAN
Ludwig Institute for Cancer
Research, Box 595
75124 Uppsala, Sweden

HISASHI HIRANO
Yokohoma City University
Kihara Institute
for Biological Research
Majoka-cho 641-12
Totsuka-ku, Yokohama 244
Japan

LOTHAR JACOB
E. Merck
Abt. Bio- und
Produktionschromatographie
64271 Darmstadt, Germany

PETER JUNGBLUT
Max-Planck Institut
für Infektionsbiologie, AG
Proteinanalytik
Monbijoustraße 2
10117 Berlin, Germany

ROZA MARIA KAMP
Technische Fachhochschule
Berlin, FB3
(Chemie und Biotechnik)

YANNIS SKENDROS
Aristotle University
of Thessaloniki
School of Chemistry
Laboratory of Biochemistry
54006 Thessaloniki, Greece

Laboratory of Biochemistry
54006 Thessaloniki, Greece

REGINE KRAFT
Max-Delbrück-Centrum
für Molekulare Medizin
(MDC)
Robert-Rössle-Straße 10
13122 Berlin, Germany

KERSTIN KRAUSE
Technische Fachhochschule
Berlin, FB3
(Chemie und Biotechnik)
Seestrasse 64
13347 Berlin, Germany

D.A. KYRIAKIDIS
Aristotle University
of Thessaloniki
School of Chemistry
Laboratory of Biochemistry
54006 Thessaloniki, Greece

JOHANN SALNIKOW
Technische Universität Berlin
Institut für Biochemie
und Molekulare Biologie
Franklinstraße 29
10587 Berlin, Germany

HORST SCHÜTTE
Technische Fachhochschule
Berlin, FB3
(Chemie und Biotechnik)
Seestraße 64
13347 Berlin, Germany

ALBRECHT OTTO
Max-Delbrück-Centrum
für Molekulare Medizin
(MDC)
Robert-Rössle-Straße 10
13122 Berlin, Germany

BERND THIEDE
MDC Forschungsgruppe
Proteinchemie
Max-Delbrück-Centrum
für Molekulare Medizin
Robert-Rössle-Straße 10
13125 Berlin-Buch, Germany

DIRK VOLLENBROICH
Technische Universität Berlin
Institut für Biochemie
und Molekular Biologie
Franklinstraße 29
10587 Berlin, Germany

B. WITTMANN-LIEBOLD
Max-Delbrück-Centrum
für Molekulare Medizin
Research Group Protein
Chemistry
Robert-Rössle-Straße 10
13125 Berlin-Buch, Germany

HELMUT WOMBACHER
Technische Fachhochschule
Berlin, FB3
(Chemie und Biotechnik)
Studiengang Biotechnologie
Seestraße 64
13347 Berlin, Germany

目 录

前言

参与编写成员表

第一部分 蛋白质的分离	(1)
第 1 章 测序用蛋白质的纯化	(3)
第 2 章 蛋白质的亲和层析	(8)
第 3 章 双向水溶液系统的蛋白质纯化	(23)
第 4 章 采用非孔状硅胶珠填充的短柱作蛋白质、多肽和氨基酸的快速 HPLC 分离	(33)
第二部分 多肽的分离	(41)
第 5 章 蛋白质的酶学和化学降解	(43)
第 6 章 肽的 HPLC 分离和薄层层析 (TLC) 指纹图	(50)
第 7 章 原位降解肽的微量分离	(57)
第 8 章 采用胶内蛋白酶降解的微量测序用的肽的分离	(66)
第三部分 手工和自动微量测序	(73)
第 9 章 自动微量测序: 引言与概述	(75)
第 10 章 DABITC/PITC 法手工测定蛋白质序列	(94)
第 11 章 肽和蛋白质的固相测序	(105)
第 12 章 从聚丙烯酰胺凝胶固定到 PVDF 膜上的 N 端封闭蛋白质的序列分析 ..	(113)
第四部分 蛋白质的电泳和印迹	(123)
第 13 章 双向电泳	(125)
第 14 章 疏水膜的半干式印迹法	(148)
第五部分 氨基酸的分析	(159)
第 15 章 高灵敏度氨基酸分析	(161)
第 16 章 用 HPLC 进行 D-和 L-氨基酸定量分析	(174)
第六部分 蛋白质中的半胱氨酸残基和脂类的鉴别	(181)
第 17 章 蛋白质中半胱氨酸残基与二硫键的鉴别	(183)
第 18 章 蛋白的脂类修饰	(190)
第七部分 质谱在肽及蛋白质分析中的应用	(197)
第 19 章 质谱在肽及蛋白质测序中的应用	(199)
第 20 章 羧肽 Y 和 P 酶水解与基质辅助的激光解吸/电离质谱相结合的羧端 测序	(210)
第 21 章 生物大分子的结晶	(216)

第一部分 蛋白质的分离

第 1 章

测序用蛋白质的纯化

D. A. Kyriakidis

1.1 引言

在过去的 10 年中，蛋白质纯化的生物化学方法已经变得如此专门化和复杂化，以至对于一些初学者，如刚从大学毕业的学生或者其他领域的专家们来说，要掌握所有的微小地方和重要细节而取得成功的纯化是困难的。应当经常记住，为了纯化某一特定的蛋白质，可以有多种不同的方法，如果一种方法行不通，可以尝试另一种方法。

我将不打算讨论在这一领域中的所有的最新进展，因为已有人在其他地方对此作过很好的论述 (Harris and Angal 1989, 1990; Scopes 1994)，但对蛋白质纯化的一些基本准则将会提到，蛋白质纯化的某些最近的进展也会被讨论。

1.2 蛋白质纯化的准则

为了成功纯化一个蛋白质，需要有一个根据背景知识和下述准则建立起来的合适的策略 (Harris and Angal 1989)：

- 什么是最好的来源？

一般来说，值得在找寻蛋白质丰富来源方面花一些时间，对于来源的是否方便得到和来源的量都必须考虑。过去，在实验室中经常是从牛肝、鼠肝或者其他动物的肝脏中得到大量的蛋白质。现在，大多数生物化学家则是采用培养的细胞如细菌、酵母或哺乳动物细胞。目前，利用基因克隆的长处，所需要的蛋白质可以通过表达来大量得到，从而使得纯化方法更具有意义。

- 关于蛋白质我们已知什么？

如果一个蛋白质过去已经从不同的来源纯化得到，它的很多信息可以应用到新来源的蛋白质。例如：分子的大小、定位、等电点、疏水性及翻译后的修饰等，应该保持相同。如果蛋白质是一个酶或受体，则根据该蛋白质与底物或配体的关系可以制定出一个成功的纯化策略。

- 蛋白质需要有多纯？

蛋白质纯化的程度通常是取决于它最后的用途。如果蛋白质是供研究用的，则它

应该是非常纯的，如果蛋白质是用于工业的，部分纯化就足够了。

- 纯化蛋白的量要多少？

对于活性研究用的，只需要比较少量的活性蛋白质，而对于进行结构研究用的蛋白质来说，则需要比较大量的高纯度蛋白质。

- 蛋白质应该如何进行鉴定？

在蛋白质纯化过程中，为了进行蛋白质的追踪，必须有一个快速、重复性好而且灵敏的鉴定方法。此鉴定方法还应该是经济的，能在小体积下进行操作，而且不要求采用昂贵的仪器。

- 纯化时间应该多长？

纯化步骤应该很快，以减少活力的丧失和降解等。一般来说，蛋白质的量在纯化过程的各步中会有损失，因此应当尽量减少纯化步骤，以期获得最大的产率。

- 什么是最终花费？

对于商用蛋白质来说费用和时间非常重要。

- 如何纯化蛋白质？

为了纯化某一种蛋白质，可以有多种方法。老的方法包括用盐使蛋白质沉淀、改变抽提液的 pH、吸附、阴离子交换和凝胶过滤等技术；新方法包括有 HPLC 和 FPLC 柱、亲和吸附、免疫亲和柱以及已有综述谈到的许多其他的技术 (Harris and Angal 1989, 1990; Scopes 1994)。这些新的技术使得许多很难以纯化的蛋白质都能被纯化。因此在任何一个纯化开始之前，所有上述的问题都应该给以充分的考虑。

1.3 重组蛋白质的纯化

转化细胞中的蛋白质纯化近来已变得时髦起来，几乎与从天然来源中的蛋白质纯化同样普遍 (Harris and Angal 1990; Scopes 1994)。前一种方法包括有许多步骤，但最需要考虑的关键点有：

- 1) 特定基因的分离
- 2) 所需要蛋白的高表达 (高拷贝质粒、强启动子和诱导表达)
- 3) 从重组细胞中进行纯化的方法是否适用

在细菌宿主细胞中表达的重组蛋白一般可能是胞外蛋白、膜结合蛋白、脑内蛋白或者是包涵体形式 (Harris and Angal 1990; Scopes 1994)。重组蛋白的纯化有许多优点，因为它有可能改变蛋白质在起始抽提液中的水平。而且分离除去杂蛋白的技术也与传统纯化方法中所用的基本相同。

不幸的是，所得到的重组蛋白一般不是得到活性的形式 (Schein 1989)。高表达的真核和原核的不溶蛋白，即包涵体，像 6mol/L 尿素或 8mol/L 盐酸胍这类强的离液剂

所溶解,然后在除去变性剂的过程中或过程之后实现正确的折叠 (Marston 1986; Marston et al. 1988)。人们也可能通过直接加入亲和树脂来纯化包涵体蛋白而不需要变性和复性的步骤 (Hoess et al. 1988)。包涵体蛋白纯化时所碰到的问题有:①变性剂(尿素或胍)使用起来不太令人喜欢,而且价钱较贵。它们能够引起蛋白质结构的不可逆修饰,从而导致给除了免疫系统以外的所有其他分析数据带来一些假象。② 必须在很稀的蛋白质浓度条件进行复性,因而蛋白质需要再浓缩 (Marston 1986; van Kimmenade et al. 1988),而重浓缩这一步会由于蛋白酶的降解而导致复杂化并发生蛋白质的进一步沉淀。③ 重折叠复性会导致引起蛋白质的异构化,并造成蛋白质在保存时产生沉淀。

最近发展了一种制造融合蛋白的新技术,这一方法的优点是:① 改进了蛋白质的稳定性。② 这些性质的改善使得能够从培养抽提液中分离蛋白质。③ 加快了分离。④ 使得生物工程公司生产大量的酶或高纯度的药物能够获得应用。

如果一个蛋白质的表达水平较低或者纯化过程复杂,则应该制备融合蛋白 (Scopes 1994; Schein 1989)。一般来说是将编码蛋白的基因 DNA 与融合 DNA 在上游或下游相连,为了简化纯化步骤,用作融合蛋白的肽链部分可以采用多聚精氨酸或多聚组氨酸(在 C 端)、蛋白 A 或谷胱甘肽转移酶(GST)。因此纯化步骤可以通过离子交换柱(对多聚精氨酸)、免疫亲和柱(配基 IgG)或底物亲和层析柱(谷胱甘肽)很容易地实现。融合的部分则可以通过适当的蛋白酶降解除去(如果编码蛋白的羧末端接的是多聚精氨酸,还可以通过羧肽酶 B 降解除去)而得到天然蛋白 (Scopes 1994; Sassenfeld 1990; Enfords 1992)。

1.4 膜结合蛋白的纯化

从膜上提取蛋白有许多困难 (Harris and Angal 1989, 1990; Scopes 1994)。在多数情况下,都是采用去垢剂将疏水蛋白从其膜结构中溶解下来,然后将蛋白质稳定。去垢剂的选择通常是依据它对所需要蛋白质的提取效率来确定,但在某些情况下还要考虑到以后的纯化步骤 (Scopes 1994)。采用小体积的少量去垢剂较好,采用高的严格的胶束浓度的去垢剂如乙烷基葡萄糖苷可以改善纯化步骤,最有效的去垢剂是强离子性的硫酸盐,如十二烷基硫酸盐(SDS)和阳离子去垢剂,如十六烷基-三甲基铵溴化物。在去垢剂的存在下,纯化主要是根据蛋白质分子量的大小用凝胶电泳进行分离。

虽然许多膜蛋白必须在去垢剂存在下进行纯化,但最终可能仍需要除去去垢剂 (Buse et al. 1986)。在许多场合这将会引起蛋白质失活,但若蛋白质是用于测序的,它将不是一个问题。也可采用能够吸附去垢剂的疏水珠 (Furth 1980)。

膜蛋白可以划分为两大类,即外膜蛋白(外源膜蛋白)和内膜蛋白(内源膜蛋白)。

外膜蛋白是通过与其他蛋白或暴露的磷脂区之间的相互作用而结合在膜上。这时通过缓冲液离子条件的改变或在比较富有弹性的条件下引入一定程度的变性作用,可以使这类膜蛋白从膜上解离下来。这里应该强调,外膜蛋白结合得比较松,一旦解离下来之后,不需要去垢剂或其他溶解剂即可保持在缓冲液中,因此,这类蛋白质当其一一旦被提取出来并除去所用的去垢剂之后,即可像其他可溶性蛋白质的纯化一样进行纯化。在所有的膜的操作中,都应加入蛋白酶抑制剂,因为蛋白酶可因 EDTA 或巯基(-SH)试剂等

的存在而被活化。为了防止不可逆的蛋白变性作用,缓冲液的 pH 值应保持在 6~8 之间,而且所有的操作都必须在 0℃ 下进行。

整合的膜蛋白是与脂双层膜的疏水部分相接触。根据它们在结构上与脂双层接触的比例可分为四类。对于可溶性整合膜蛋白的纯化,需要将多肽链从其锚靠的膜上分离出来 (Harris and Angal 1990; Scopes 1994)。

— 第Ⅰ类:通过一个或两个跨膜的蛋白片段整合进膜。

— 第Ⅱ类:利用与脂肪酸或脂的共价结合。

对于这两类膜整合蛋白,脂双层仅仅是起了一个结构支持物或者是定位化和组织化的作用,属于这类蛋白的例子是许多酶类,如肽酶、酯酶和磷脂酶等。这两类蛋白与膜的分离可以采用蛋白酶或磷脂酶 C 和 D 处理来实现。用磷脂酶 C 处理时,一般将二乙酰甘油留在脂双层上;而用磷脂酶 D 处理时肌醇连接蛋白被释放出来,而将磷脂酶后面的部分留了下来 (Harris and Angal 1990; Penefsky and Tzagoloff 1971)。当用磷脂酶时需要特别注意,长时间的保温会造成膜蛋白分子内的肽链被降解。

— 第Ⅲ类:含有一个跨膜片段。第三类蛋白的全部生物活性不仅决定于两个亲水结构域,而且也决定于跨膜片段,这类蛋白包括各种受体,生长因子和 LDL 蛋白。在水相中呈球状蛋白的部分可以通过蛋白酶的水解而与分子的其他部分断开而得到。在此条件下,胞外结构域仍可能保留配基结合活性。

— 第Ⅳ类:这类蛋白跨膜好几次,整个结构中有很大大一部分是在疏水相中,作为这类蛋白的例子有转移蛋白、受体和视紫红质类蛋白。虽然蛋白酶能够从这类蛋白中切出能够溶于水相的片段,但要溶解跨膜片段则需要有机溶剂、去垢剂或离液剂。膜部分或亚细胞器可以用多种方法分离,最成功的是用密度梯度离心。

膜组成部分或亚细胞器,可用若干不同的方法分离,其中最成功的是离心,通常用密度梯度离心。其他的方法包括有机溶剂双相分配、高压自由电泳、免疫亲和层析或凝胶过滤层析 (Scopes 1994)。分离可溶形式的膜蛋白可以通过下述一种或多种处理相结合的方法来实现 (Penefsky and Tzagoloff 1971)。超声、金属螯合试剂 (1~10 mmol/L 的 EDTA, EGTA)、温和的碱处理 (pH8~11)、高离子强度 (1 mol/L NaCl)、磷脂酶处理等。膜蛋白的活性不应该丧失并应以可溶形式在溶液中保持活性。因此,发展新的去垢剂或层析树脂对于成功地纯化这类疏水蛋白是很需要的。

(陈常庆译)

参考文献

- Buse G, Steffens GJ, Steffens GCM, Meinecke K, Hensel S, Reumkens J (1986) Sequence analysis of complex membrane proteins (cytochrome c oxidase). In: B. Wittmann-Liebold et al. (eds) *Advanced methods in protein microsequence analysis*. Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp 340-351
- Enfolds SO (1992) Control of in vivo proteolysis in the production of recombinant proteins. *Trends in Biotechnol* 10: 310-315
- Furth AJ (1980) Removing unbound detergent from hydrophobic proteins. *Anal. Biochem* 109, 207-215
- Harris ELV, Angal S (1990) *Protein purification applications: a practical ap-*

- proach, IRL, Oxford
- Harris ELV, Angal S (1989) Protein purification applications: a practical approach. IRL, Oxford
- Hoess A, Arthur A K, Wanner G, Fanning E (1988) Recovery of soluble, biologically active recombinant proteins from total bacterial lysates using ion exchange resin. *Biotechnology* 6: 1214-1217
- Marston FLA, Angal S, Lowe PA, Chan M, Hill CR (1988) Scale-up of the recovery and reactivation of recombinant proteins. *Biochem Soc Tran.* 16: 112-115
- Marston FAO (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *E. coli*. *Biochemical J* 240: 1-12
- Penefsky HS, Tzagoloff A (1971) Extraction of water soluble enzymes and proteins from membranes. *Methods in Enzymol* 22: 204-219
- Sassenfeld H M (1990) Engineering protein for purification. *Trends Biotechnol* 8: 88-93
- Schein CH (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Biotechnology* 7:1141-1149
- Scopes RK (1994) Protein purification: principles and practice (3rd edn). Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 1-380
- van Kimmenade A, Bond M W, Schumacher JH, Laquoi C, Kastelein RA (1988) Expression, renaturation and purification of recombinant human interleukin 4 from *E. coli*. *Eur J Biochem* 173, 109-114

第2章

蛋白质的亲和层析

H. Wombacher, L. Jacob

2.1 背景和短评

分子间的专一性相互作用是所有生物学过程的基础。特别是蛋白质同特异结合组分之间的相互作用已经相当明确,即酶与底物、激活剂和抑制剂之间的相互作用,抗体与抗原之间的相互作用以及某些蛋白与DNA/RNA的特定区域之间或者受体与其对应的效应分子如激素和递质(transmitters)之间的相互作用。亲和层析技术即是建立在此生物特异亲和性的基础之上。固定在层析介质骨架上的结合分子称为配体,要纯化的蛋白称为反配体或目的蛋白。目的蛋白通过它表面上的生物功能位点,特异并可逆地结合在固定的配体上。因此,利用蛋白质的特异结构,亲和层析可以使大多数蛋白纯化到接近单一的组分(综述参阅 Scouten 1981; Wilcheck et al. 1984)。

2.1.1 亲和作用和配体的分类

固定在固相载体上的配体应该具有与目的蛋白能够选择性地结合并形成稳定复合物的能力。选择性地结合形成复合物的稳定性很主要地是取决于配体与蛋白质结合位点之间结合的紧密程度,但考虑到结合的特异性,起决定性作用的是弱相互作用力,即范德华作用力,其键强度与距离的7次方成反比¹⁾。由于这个理由,足够强的结合要求配体能精确地嵌合在结合位点内,此外,从动态上考虑,精确的强的结合也可以通过构象的改变来得到进一步加强,这种构象上的改变有时也称为诱导契合。在多数场合,结合常数(K_a)的范围在 $10^5 \sim 10^8 \text{ M}^{-1}$ 时,最适合用于亲和层析过程。当亲和力过低时,与目的蛋白的相互作用不强,在层析过程中拉不牢目的蛋白,结果是选择性过低。如果亲和力太高,蛋白质的洗脱需要用激烈的和苛刻的,有时甚至是变性的条件。此外,目的蛋白在柱上有很强的结合并不意味着是特异的结合,还必须考虑到在目的蛋白同层析介质之间可能存在着很强的非特异性的吸附结合力,它们可能与特异结合力之间是重叠的或者是相加的,就这个关系来说,特异结合是指局限在蛋白质表面结合位点上的那种吸附。

为了更容易理解的目的,配体被划分成单特异性的或组特异性的,它们进一步还可

1) 这里可能是指作用力,如果键强度是以能量计算,则应是距离的6次方成反比。——译者注

区分为低分子量配体或高分子量(大分子)配体。

单特异性配体

它是指这样一类配体,即只结合一个或者很小数量的蛋白质,甾体激素和酶抑制剂即属于这类配体。一个很熟悉的例子就是低分子量的生物素配体(生物素-抗生物素蛋白/链酶抗生物素蛋白的 $K_s = 10^{15} \text{ M}^{-1}$)。这个高度特异的强的结合在类似于 AFC 的生化方法中已经成为一个很有用的工具(参阅 Wilchek and Bayer 1990)。

大分子的单特异性配体

抗体-抗原结合是大分子单特异性配体及其目的蛋白的最重要的例子。抗体作为连接在层析介质上的配体,对于纯化可溶蛋白、多肽、溶解的膜蛋白,甚至病毒和细胞来说是一个很有用的工具。随着现代杂交瘤技术的出现,多克隆抗体制备能够用单克隆抗体代替(有关的实践和理论可参阅 Peters and Baumgarten 1989)。对于任何一种抗原蛋白,即使它在总的免疫原中只有非常低的浓度,都有可能得到高度特异性的抗体。选用适当的筛选方法能够得到制造所需要特异性和亲和性的抗体的杂交瘤细胞(Tijssen 1985)。当将这类抗体固定在适当的层析介质上以后,就能够纯化所需要的抗原。

组特异性配体

组特异性是指这样一类配体,像辅酶、维生素/辅因子或它们的类似物,它们可以同几种不同蛋白的共同位点相结合。组特异性配体包括 ATP 和 NAD,其靶蛋白有辅因子依赖的酶,如 NAD 和 NADP 依赖的脱氢酶。

大分子组特异性配体

凝集素和一些免疫球蛋白结合蛋白可以看成是组特异性的大分子配体,固定化的凝集素对于糖基是高度特异的。例如,伴刀豆球蛋白(ConA)是通过与 α -D-甘露吡喃糖基、 α -D-葡萄糖吡喃糖基及立体相关基团的结合来纯化某些糖蛋白,葡萄球菌蛋白 A 和链霉素蛋白 G 是抗体亲和层析中的特异配体(表 2.1)。

表 2.1 蛋白 A、蛋白 G 和果胶 EMD TA 的抗体结合特征

抗体	果胶 EMD TA	蛋白 A	蛋白 G
人 IgG1	+	+	+
人 IgG2	+	+	+
人 IgG3	+	-	+
人 IgG4	+	+	+
人 IgM	+	+	-
人 IgA	+	+	-
小鼠 IgG1	+	弱	+
小鼠 IgG2a	+	+	+
小鼠 IgG2b	+	+	+
小鼠 IgG3	+	-	+
大鼠 IgG1	+	弱	+

续表

抗体	果胶 EMD TA	蛋白 A	蛋白 G
大鼠 IgG2a	+	-	+
马 IgG	+	-	+
山羊 IgG	+	+	+
鸡 IgG	+	-	-
牛 IgG	+	弱	+
兔 IgG	+	+	+
羊 IgG	+	-	+
狗 IgG	+	+	-
猪 IgG	+	+	+
猫 IgG	+	+	-
鸡 (yolk) IgY	+	-	-
重组抗体: scFv	+	-	-

2.1.2 假生物特异性亲和作用和人工配体

一些特殊人工化合物,如蒽醌或偶氮染料,由于它们对多种不同的蛋白如脱氢酶、激酶、转移酶、还原酶等都具有亲和性,因而能够成功地用作配体以纯化这些蛋白质。在某些情况下,所谓的生物模拟相互作用被认为是由于人工配体对在各种蛋白上进化过程中保持不变的二核苷酸折叠(dinucleotide-fold)区选择性地结合的结果,虽然对其与蛋白质的相互作用还没有搞清楚,但这类亲和层析则已非常普遍(Scopes 1987)。假亲和层析,也称为假生物特异性亲和层析,是指人工配体与蛋白质特定基团之间的特异相互作用,在这个意义上来说,甚至也可以包括称为共价层析的配体,如硼酸衍生物和某些糖蛋白之间的共价结合。一般来说,假亲和层析包括了以生物模拟配体为基础的各类吸附层析。

固定化的金属离子亲和层析/亲硫吸附层析

固定化的金属离子亲和层析(IMAC)(Porath and Olin 1983; 综述可参阅 Kagedal 1989)和亲硫吸附层析(TAC)(Hutchens and Porath 1986)是假亲和层析的重要例子。TAC对于免疫球蛋白的纯化比用蛋白A作为配体的亲和层析在实用上更有长处。关于IMAC和TAC的长处及其成功的应用将在2.2中说明。

2.1.3 层析载体

作为一个亲和层析载体的基本要求(参阅 Mohr and Pommerening 1985; Narayan and Crane 1990)是:①具有亲水和中性的骨架;②好的化学、力学、生物学和热稳定性;③带有附加的功能团如-OH、-NH₂、-COOH和-CHO等,它们能通过各种化学反应进行衍生化。特别是对于蛋白质的纯化来说,最好是采用大孔载体。琼脂糖,特别是稳定的交联型琼脂糖是最常用的载体。它具有作为蛋白质亲和层析理想载体的许多特性。载体