

蛋白质和酶学研究方法

第一册

鲁子贤 主编

科学出版社

内 容 简 介

本书着重介绍生化实验室中常用的各种蛋白质和酶学研究方法,目的在于读完相应章节后即可在实验室中进行具体操作。第一册的内容主要包括制备及分析蛋白质的一部分最基本方法,例如在溶液中蛋白质浓度的测定、盐析、结晶、透析、超滤、分离、序列测定等等。可供生物化学研究人员和实验室工作者、大专院校有关专业的师生参考。

蛋白质和酶学研究方法

第 一 册

鲁子贤 主编

责任编辑 赵甘泉

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

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

*

1989 年 4 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1989 年 4 月第一次印刷 印张: 9 1/2

印数: 0001—8,240 字数: 218,000

ISBN 7-03-000885-5/Q·140

定价: 5.20 元

序 言

作为生物化学和分子生物学研究的重要对象——蛋白质,对它的研究经久不衰,研究方法不断有所创新。酶是最重要的一类蛋白质,虽有一些特殊的研究方法,但多数方法与蛋白质的是一样的。由于这些方法是生物学许多实验室日常的需要,因此我们应科学出版社之邀,组织富有实践经验的人员撰写。我们也欢迎国内有实践经验的同行来联系,参加今后各分册有关章节的撰写。

顾名思义,本书着眼于方法的应用。我们的原则是各章可大可小,在简单地阐述基本原理后,着重描述各种实验的具体操作。但是我们不希望用一种简单的模式来束缚各作者的写作风格,因此写作的模式在同一分册中并不完全一样。我们想,读者可能会欢迎这种格局的。

以往的经验是同类题目完成写作的时间很难同步。我们采用先完成先编入分册出版的方法,来克服这一困难,但各分册的内容也因此而显得零乱。我们希望有机会将本书出第二版。在那时,我们将根据方法的性质来编排分册,以利于读者使用。

《蛋白质和酶学研究方法》主编

许根俊 林其谁 鲁子贤

1988年于中国科学院
上海生物化学研究所

目 录

溶液中蛋白质浓度的测定·····	吴如丹 (1)
蛋白质的盐析法·····	虞荣华 鲁子贤 (8)
酶或蛋白质的结晶·····	吴克佐 (17)
透析·····	冯佑民 (29)
糖蛋白中糖含量的测定·····	王克夷 (37)
蛋白质的水解·····	林南琴 (40)
超滤法及其应用·····	夏其昌 (42)
离子交换层析·····	陈远聪 (53)
疏水层析·····	屈贤铭 (61)
蛋白质亲和层析技术·····	王克夷 (66)
亲和层析用于糖蛋白的分离·····	王克夷 (73)
高效液相色谱在蛋白质和酶学中的应用·····	夏其昌 (77)
Edman 降解法测定蛋白质序列·····	林南琴 (99)
4-N,N-二甲胺基偶氮苯-4'-异硫氰酸酯 (DABITC) 蛋白质微量序列分析·····	钱瑞卿 (108)
超离心分析法测定分子量·····	许秋萍 程伊洪 (116)
从蛋白质的一级结构预测二级结构·····	张 鹰 (131)

溶液中蛋白质浓度的测定

吴如丹

(中国科学院上海生物化学研究所)

溶液中蛋白质的浓度可根据它们的物理化学性质,如折射率、比重、紫外光吸收来测定;可用化学反应方法,如克氏定氮、双缩脲反应、福林-酚反应测定;也可用染色法,如氨基黑、考马斯亮蓝测定;此外还可利用荧光激发、氯胺 T、放射性同位素计数等灵敏度较高的方法^[1-4]。上述方法中,紫外吸收法、双缩脲法、福林-酚试剂法、考马斯亮蓝染色法最为常用,它们操作简单,不需要昂贵的设备。以下主要介绍这几种方法。

一、紫外吸收法

1. 280nm 光吸收法^[5,6]

由于蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键,因此蛋白质溶液在 275nm—280nm 处有一个紫外吸收高峰,在一定浓度范围内,蛋白质溶液在 280nm 的光吸收值(简写作 A_{280})与其浓度成正比,因此可作定量测定,该法测定范围为 0.1—1.0mg 蛋白质/ml 溶液。

该测定方法简单、灵敏、快速、不消耗样品,低浓度的盐类不干扰测定,因此在蛋白质和酶的生化制备中广泛应用,特别是在柱层析分离中,常利用 A_{280} 进行紫外检测,来判断蛋白质洗脱的情况。

由于不同蛋白质中酪氨酸和色氨酸的含量不同、所处的微环境也不同,因此不同蛋白质溶液在 280nm 的光吸收值也有不同。据初步统计,浓度为 1mg/ml 溶液的 1800 种蛋白质及蛋白质亚基在 280nm 的光吸收值在 0.3—3.0 之间^[7],平均值为 1.25 ± 0.51 。

(1) 测定方法 取 3 毫升蛋白质溶液,以缓冲液作为对照,用光径为 1cm 的石英比色杯,在 280nm 测光吸收值。通常以浓度为 1mg 蛋白质/ml 溶液的 A_{280} 为 1.0 作为估算。若已知该蛋白质的文献值^[7],可直接计算出样品溶液中蛋白质的浓度。

该方法适用于一般的半定量测定,也可用于纯蛋白质的定量测定。由于蛋白质的紫外吸收高峰常因 pH 值的改变而有变化,故用紫外吸收法时要注意溶液的 pH 值。

2. 280nm 和 260nm 的吸收差法^[5,8]

若样品中含有嘌呤、嘧啶等核酸类吸收紫外光的物质,在用 A_{280} 来测定蛋白质浓度时,会有较大的干扰。由于核酸在 260nm 的光吸收比 280nm 更强,因此可利用 280nm 及 260nm 的吸收差来计算蛋白质的浓度。常用下列经验公式估算:

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

(假设 1mg 蛋白质/ml 溶液的 A_{280} 为 1.0)。

3. 215nm 和 225nm 的吸收差法^[9,10]

蛋白质的肽键在 200nm—250nm 有强的紫外光吸收,其光吸收强弱在一定范围与浓度成正比,且波长越短光吸收越强,若选取 215nm 可减少干扰及光散射,用 215nm 和 225nm 光吸收差值与单一波长测定相比可减少非蛋白质成分引起的误差。因此,对稀溶液中蛋白质浓度测定可用 215nm 和 225nm 光吸收差法,常用下列经验公式:蛋白质浓度 (mg/ml) = $0.144(A_{215}-A_{225})$,测定范围为 20—100 μ g 蛋白质/ml。

该方法测定灵敏度高,且不同蛋白质之间差异较小。氯化钠、硫酸铵以及 0.1mol/L 磷酸、硼酸和 Tris 等缓冲液都无显著干扰。但是,0.1mol/L 的氢氧化钠、乙酸、柠檬酸、琥珀酸、邻苯二甲酸、巴比妥等缓冲液在 215nm 的光吸收较大,必须降至 5mmol/L 才无明显干扰。

二、双缩脲法

(一) 常量双缩脲法^[11]

蛋白质含有多个肽键,因此有双缩脲反应,在碱性溶液中蛋白质与铜离子形成紫红色化合物,可在 540nm 比色测定,其颜色深浅与蛋白质浓度成正比,而与蛋白质的分子量及氨基酸组成无关,该法测定范围为 1—10mg 蛋白质/ml。

双缩脲法最常用于需要快速的测定,硫酸铵不干扰此显色反应,使其有利于对蛋白质纯化早期步骤的测定。干扰此测定的物质有 Tris 及含氨基酸、多肽的缓冲液,以及蔗糖、甘油等。

1. 测定方法

(1) 溶液配制

蛋白质标准溶液 准确称取经真空干燥的标准蛋白质(常用牛血清白蛋白),用水配制成 10mg/ml 的溶液(可用 1mg 牛血清白蛋白/ml 的 A_{280} 为 0.66 来校正)^[6]。如果蛋白质不易溶解,可用 0.05mol/L 氢氧化钠溶液配制,也可加热或放置过夜以助溶。

双缩脲试剂 称取 1.5g 硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、6g 酒石酸钾钠 ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$),依次溶解于 500ml 水中,在搅拌下加入 300ml 10% 氢氧化钠溶液,用水稀释到 1l。通常可加入 1g 碘化钾以防止铜离子自动还原形成一价氧化铜沉淀。所用的蒸馏水应煮沸以逐出所溶解的二氧化碳,待冷却后配制。配好的双缩脲试剂应贮存于塑料瓶中(或内壁涂以石蜡的瓶中)。此试剂可长期保存,若瓶中有黑色沉淀出现则需重配。

(2) 标准曲线

在试管中分别加入 0、0.06、0.12、0.24、0.36、0.48、0.60ml 标准蛋白质溶液,用水补足到 0.60ml,然后各加 2.4ml 双缩脲试剂,混匀后在室温(20—25℃)保温 15 分钟,然后在 540nm 比色测定。以溶液中蛋白质浓度为横坐标, A_{540} 为纵坐标作标准曲线。5mg 牛血清白蛋白/ml 溶液的 A_{540} 约为 0.27。该方法标准曲线的线性及重复性较好,一般每配一次溶液作一次标准曲线即可。

取 0.6ml 未知浓度的样品同上测 A_{540} , 然后从标准曲线上查得其浓度, 注意样品浓度若超过 10mg/ml 时, 应作适当稀释。若样品中脂类等含量过高, 在 30 分钟后会有雾状沉淀产生, 故须注意控制在 30 分钟内比色完毕。

(二) 微量双缩脲法^[12]

该法显色原理与双缩脲法相同, 由于铜与蛋白质复合物的最大吸收峰在 260—280 nm, 但在此区域干扰因素及空白的吸收都很大, 而在 310—330nm 测定, 干扰因素少一些, 但仍比 540nm 测定灵敏 10 倍以上, 因此可选用 310nm 进行比色测定, 测定范围为 0.1—1.0mg 蛋白质/ml; 或用 330nm 测定, 测定范围为 0.2—2.0mg 蛋白质/ml。

干扰此测定的物质包括组氨酸、丝氨酸、苏氨酸、Tris、乙醇胺、葡萄糖、多肽、硫酸铵、尿素、去垢剂等。

1. 测定方法

(1) 溶液配制

标准蛋白质溶液 1.0 或 2.0mg 牛血清白蛋白/ml。

微量双缩脲试剂 称取 173g 柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、100g 无水碳酸钠 (Na_2CO_3) 一齐溶解于温水中, 称取 17.3g 硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶于 100ml 水中, 两者合并用水稀释至 1 升。该试剂可长期保存。出现黑色沉淀需重配。

6% 氢氧化钠溶液。

(2) 作标准曲线

在试管中分别加 0、0.15、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5ml 标准蛋白质溶液, 用水补足到 1.5ml, 加 1.5ml 6% 氢氧化钠溶液混匀, 再加 0.15ml 微量双缩脲试剂, 混匀后在室温 (20—25℃) 保温 15 分钟, 然后在 310nm 或 330nm 比色测定, 作标准曲线。1.0mg 牛血清白蛋白/ml 溶液的 A_{310} 约为 1.04, A_{330} 约为 0.67。

取 1.5ml 未知浓度的样品同上测定, 然后从标准曲线上查得其浓度。

三、福林-酚试剂法^[13]

这方法是双缩脲法的发展, 首先在碱性溶液中形成铜与蛋白质复合物, 然后这个复合物以及酪氨酸和色氨酸残基还原磷钼酸-磷钨酸试剂(福林试剂), 产生深蓝色。这个测定法比双缩脲法灵敏, 但要花费较长时间。此法也适用于酪氨酸和色氨酸的定量测定, 对那些含这两个残基与标准蛋白质差异较大的蛋白质有误差。进行测定时, 加福林试剂要特别小心, 因为福林试剂仅在酸性条件下稳定, 但上述还原反应只是在 pH10 的情况下发生, 因此当福林试剂加到碱性的铜与蛋白质溶液中必须立刻混匀, 以便在福林试剂被破坏之前, 还原反应即能发生。该法可用 750nm 比色测定, 范围为 0.03—0.3mg 蛋白质/ml; 或 500nm 比色测定, 范围为 0.05—0.5mg 蛋白质/ml。该法标准曲线线性较差, 样品浓度需按标准曲线校正。

由于福林-酚试剂法使用很广泛, 对其干扰因素了解得最多。已知的干扰因素包括

Tris、HEPES、PIPES、MOPS、MES、CAPS、TES、CHES、柠檬酸、琥珀酸、谷氨酸、组氨酸、甘氨酸、N-二(羟乙基)甘氨酸、甘氨酸甘氨酸等缓冲液;EDTA、EGTA 等螯合剂;蔗糖、甘油、氨基葡萄糖、果糖、甘露糖、鼠李糖、木糖、山梨醇等糖类;酚、二巯基苏糖醇、巯基乙醇、谷胱甘肽、半胱氨酸等还原剂;汞、锰、钴等二价金属离子;Triton、Tween、Lubrol 等去垢剂,以及乙烯、乙二醇、聚乙烯、吡咯烷酮、载体两性电解质等等。高浓度的尿素、胍、硫酸铵、硫酸钠、硝酸钠、钾盐、三氯乙酸、乙醇、乙醚、丙酮、脂类等化合物也对测定有影响^[1,2,3,4,14]。

1. 测定方法

(1) 溶液配制

标准蛋白质溶液 0.3 或 0.5mg 牛血清白蛋白/ml。

福林-酚试剂

试剂甲:由下述 3 种溶液配制:(1)称取 20g 无水碳酸钠、4g 氢氧化钠溶解于 1 升水中;(2)称取 0.2g 硫酸铜溶于 20ml 水;(3)称取 0.4g 酒石酸钾钠溶于 20ml 水。在测定的当天将这三种溶液按 100:1:1 的体积比混合,即为福林-酚试剂甲,混合后放 30 分钟后使用,混合液只能用一天。三种溶液分开可长期保存。

试剂乙(福林试剂):试剂乙市上有售,上海医学化验所生产的名为“酚试剂”。自己配制时,在 2 升的磨口回流装置内加入 100g 钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25g 钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 700ml 蒸馏水,再加 50ml 85% 磷酸及 100ml 浓盐酸,充分混匀后,以小火回流 10 小时,再加入 150g 硫酸锂(LiSO_4), 50ml 蒸馏水及数滴液体溴,然后开口继续沸腾 15 分钟,以便驱除过量的溴,冷却后定容到 1 升,过滤,溶液呈黄绿色,置于棕色试剂瓶中冰箱保存。使用时将购买的或自制的试剂乙用标准氢氧化钠溶液滴定,以酚酞为指示剂,而后用水适量稀释(约 2.3 倍),使酸度最后为 1mol/L,此为福林酚试剂乙,贮于冰箱中可长期保存。

(2) 作标准曲线

在试管中分别加入 0、0.025、0.05、0.075、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50ml 标准蛋白质溶液,用水补足到 0.50ml,加 2.5ml 当天配制的试剂甲,混匀后在室温(20—25℃)放 10 分钟,再加入 0.25ml 试剂乙,立即混匀,室温放 30 分钟,然后在 500nm 或 750nm 比色测定,作标准曲线。该法显色受时间与温度影响较大,要注意控制在同一条件下进行。0.2mg 牛血清白蛋白/ml 溶液的 A_{500} 约为 0.33, A_{750} 约为 0.56。

2. 膜蛋白质的测定与改进的福林-酚试剂法

在对膜制剂(如红细胞膜、线粒体膜等)上的蛋白质含量进行测定时,由于膜制剂不溶于水,悬浮液有光散射现象,因此不能用紫外光吸收法测定;在用去垢剂增溶膜蛋白的溶液中,有些非离子型去垢剂(如 Triton X-100)在 280nm 有强烈的光吸收^[15],也妨碍了紫外光吸收法的测定。

由于膜蛋白质的氨基酸组成与一般水溶性蛋白质差异不大,虽然非极性氨基酸所占比例略高,但色氨酸和酪氨酸残基与一般蛋白质相近,因此,用双缩脲和福林法均可直接测定膜蛋白质的浓度^[14,16,17]。对膜制剂也可先在 3% 脱氧胆酸钠溶液中放 10 分钟,使膜

溶解后再加双缩脲试剂测定^[4]。

有些生物膜样品所含的脂类较多(大于1%),或膜蛋白质的增溶溶液中去垢剂(Triton、Tween、Lubrol等)含量较高(大于0.05%),在用福林法测定时会与试剂显色或形成复合物沉淀影响测定,这时可对膜样品作下述处理:

(1) 生物膜悬浮液或增溶后的膜蛋白质溶液与等体积的0.5mol/L氢氧化钠和4%脱氧胆酸钠(或10% SDS)溶液混合后保温10分钟,使膜蛋白质充分溶解后用福林法测定,脱氧胆酸钠或SDS本身不干扰显色反应,其存在可防止复合物的形成与沉淀^[16]。

(2) 在试剂甲中加入九分之一体积的10% SDS溶液,混匀,使SDS在试剂甲中的最终浓度为1%,然后用福林法直接对膜样品测定^[14]。

(3) 若去垢剂或脂类浓度过高,可在0.5毫升蛋白质样品液中加50 μ l 1%的脱氧胆酸钠溶液混匀,再加入1ml 10%的三氯乙酸溶液,使蛋白质充分沉淀,在每分钟3000转离心5分钟或用每分钟1万转以上的Eppendorf离心机离心1分钟,吸去上清液,注意残留的溶液必须小于50 μ l,沉淀用含1% SDS的试剂甲直接溶解后测定(若不易溶解可放置数小时或适当加热促使其溶解)。这一方法还可用于稀蛋白质溶液浓缩后测定(含0.02%脱氧胆酸钠及6—15%三氯乙酸),以及溶液中有各种干扰物质时的测定。许多干扰物质经一次沉淀就可以消除干扰影响,但有些物质(如0.03mol/L Tris-盐酸、0.015%乙酰丙酮、0.015%酚类等)需二次沉淀^[2,14]。

溶液配制

10%或50%的三氯乙酸配制后可长期保存。

1%或4%脱氧胆酸钠溶液需新鲜配制或配后在冰箱中冰冻保存。若有胶状物出现应重配。

10% SDS溶液可长期保存。市售的SDS若纯度不高或溶解不好时,可用乙醇重结晶后使用。1% SDS也可配制在福林酚试剂甲(1)(即碳酸钠-氢氧化钠)溶液中长期保存。在天冷时SDS往往从溶液中结晶析出,可在温水浴中溶解后使用。

在用以上改进的福林法测定时,要注意对照及标准曲线的制作应与样品在同一条件下进行。

四、考马斯亮蓝 G-250 染色法^[1,18]

考马斯亮蓝 G-250 在酸性溶液中为棕红色,当它与蛋白质通过疏水作用结合后,变为蓝色,可在595nm比色测定。该法反应快、操作简便,消耗样品量少,但不同蛋白质之间差异较大,且标准曲线线性较差。测定范围为0.01—1.0mg 蛋白质/ml。

高浓度的Tris、EDTA、尿素、甘油、蔗糖、丙酮、硫酸铵、去垢剂对测定有干扰,缓冲液浓度过高改变测定液pH会影响显色。考马斯亮蓝染色能力很强,比色杯不洗干净会影响光吸收值,注意不可使用石英比色杯^[4]。

(一) 测定方法

(1) 溶液配制

标准蛋白质溶液 0.1或1.0mg 牛血清白蛋白/ml。

染色液 称取 100mg 考马斯亮蓝 G-250 溶解于 50ml 95% 乙醇中, 加 100ml 85% 的磷酸, 加水稀释到 1 升。该染色液可保存数月, 若不加水可长期保存, 临用前再稀释。

作标准曲线 在试管中分别加 0、6、12、24、36、48、60 μ l 标准蛋白质溶液, 用水补足到 60 μ l, 加 3ml 染色液, 混匀后在室温(20—25 $^{\circ}$ C)保温 15 分钟, 在 595nm 比色测定, 作标准曲线。该法标准曲线线性较差, 要注意校正; 且显色受时间与温度影响较大, 要注意控制在同一条件下进行。0.5mg 牛血清白蛋白/ml 溶液的 A_{595} 约为 0.50。

取 60 μ l 未知浓度的样品溶液同上测定, 然后从标准曲线上查得其浓度。

当样品中蛋白质浓度较稀时 (0.01~0.1mg/ml), 可在 3ml 染色液中加 0.3ml 样品溶液, 同时作标准曲线, 测 595nm 的光吸收值。0.05mg 牛血清白蛋白/ml 溶液的 A_{595} 约为 0.29。

附表 不同方法测蛋白质浓度的比较

方 法	测定范围 (μ g/ml)	需要样 品体积 (ml)	需要样 品 量 (μ g)	不同蛋 白质之 间差异	仪 器 设 备 及 其 他
A_{280}	100~1000	3	300~3000	大	紫外分光光度计, 测 A_{280} , 样品可回收
$A_{215-225}$	20~100	3	60~300	小	紫外分光光度计, 测 A_{215} 、 A_{225} , 样品可回收
双缩脲	1000~10000	0.6	600~6000	小	可见分光光度计, 测 A_{540}
微量 双缩脲	100~2000	1.5	150~3000	小	紫外分光光度计, 测 A_{310} 或 A_{330}
福林-酚	30~500	0.5	15~250	大	可见分光光度计, 测 A_{500} 或 A_{750}
氨基黑 _[19]	10~500	0.2	2~100	大	可见分光光度计 测 A_{620} 需过滤, 色转移
四溴酚酞 磺酸钠 _[20]	10~5000	小于 0.3	3~600	大	可见分光光度计, 测 A_{580} 需过滤, 色转移
考马斯亮蓝 R-250 _[21]	100~1000	小于0.06	6~60	小	可见分光光度计, 测 A_{590} 需过滤, 色转移
考马斯亮蓝 G-250	10~1000	0.06或 0.3	3~60	大	可见分光光度计, 测 A_{595} 需过滤, 色转移
荧光胺* _[22]	2~200	0.25	0.5~50	小	荧光分光光度计, 395nm 激发, 475nm 发射
氯胺丁 _[23]	0.07~0.7	小于 0.3	0.02~0.2	大	可见分光光度计, 测 A_{410} 小型柱凝胶过滤
丹磺酰氯* [24]	1~100	0.05	0.05~5	大	同位素放射计数器
克氏定氮* [25,26]			大于 300	小	微量克氏定氮仪全套
克氏定氮- 茚三酮 _[27]	200~1000	0.4	80~400	小	消化瓶, 可见分光光度计, 测 A_{570}

注: 除*外, 各方法均按 3ml 左右溶液比色测定计算, 比色杯光径为 1cm, 若使用 1ml 体积的比色杯可将样品及试剂的量作相应减少。

参 考 文 献

- [1] Thorne, C. J. R., *Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry*, B104, (1978) Elsevier/North-Holland.
- [2] 蔡武斌、袁厚积,《生物物质常用化学分析法》, 89 页, 1982, 科学出版社.
- [3] 张龙翔等,《生化实验方法和技术》, 164 页, 1981, 人民教育出版社.
- [4] Peterson, G. L., *Methods in Enzymology*, **91**, 95, (1983).
- [5] Warburg, O. et al., *Biochem. Z.*, **310**, 384, (1941). **303**, 40, (1939).
- [6] Layne, E., *Methods in Enzymology*, **3**, 447, (1957).
- [7] Kirschembaum, D. M., *Int. J. Protein Res.*, **3**, 109, 157, 237, 329, (1971). **4**, 63, (1972). *Int. J. Peptide Protein Res.*, **4**, 125, (1972). **5**, 49, (1973). *Anal. Biochem.*, **55**, 166. **56**, 237, (1973). **64**, 186. **68**, 465, (1975). **80**, 193. **81**, 220. **82**, 83, (1977).
- [8] Kalckar, H. M., *J. Biol. Chem.*, **196**, 461, (1947).
- [9] Waddell, W. J., *J. Lab. Clin. Med.*, **48**, 311, (1956).
- [10] Murphy, J. B. & Kies, M. W., *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 382, (1960).
- [11] Gornall, A. C. et al., *J. Biol. Chem.*, **177**, 751, (1949).
- [12] Goa, J., *J. Clin. Lab. Invest.*, **5**, 218, (1953).
- [13] Lowry, O. H. et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, (1951).
- [14] Bennett, J. P., *Techniques in Lipid and Membrane Biochemistry*, B408, (1982), Elsevier/North-Holland.
- [15] Holloway, P. W., *Anal. Biochem.*, **53**, 304, (1973).
- [16] Dunn, M. J. & Maddy, A. H., *Biochemical Analysis of Membranes*, p. 197, (1976), London Chapman and Hall.
- [17] Capaldi, R. A. and Vanderlooi, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**, 930, (1972).
- [18] Bramhall, S. et al., *Anal. Biochem.*, **31**, 146, (1969).
- [19] Nakao, T. et al., *Anal. Biochem.*, **55**, 358, (1973).
- [20] McGuire, J. et al., *Anal. Biochem.*, **83**, 75, (1977).
- [21] McKnight, G. S., *Anal. Biochem.*, **78**, 86, (1977).
- [22] Bohlen, P. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 213, (1973).
- [23] Goldberg, M. L., *Anal. Biochem.*, **51**, 240, (1973).
- [24] Schulz, R. M. & Wasserman, P. M., *Anal. Biochem.*, **77**, 25, (1977).
- [25] Chibnall, A. C. et al., *Biochem. J.*, **37**, 354, (1943).
- [26] Jacob, S. et al., *Methods of Biochemical Analysis*, **13**, 241, (1965).
- [27] Jacob, S., *Nature*, **183**, 262, (1958).

蛋白质的盐析法

虞荣华 鲁子贤

(中国科学院上海生物化学研究所)

蛋白质的溶解度因溶液中含盐的浓度变化而变化。一般的白蛋白和球状蛋白质在盐浓度高的时候,都因盐浓度的增加而溶解度降低。当盐浓度增加到某一浓度后,蛋白质就从溶液中析出。这种现象称盐析。不同的蛋白质盐析所需盐的浓度不同,因此可以利用这一性质将蛋白质分离(表1)。盐析法是纯化蛋白质最经典的方法之一,但是今天仍是实验室和工厂中纯化蛋白质的重要方法。

表1 血浆蛋白质的盐析

蛋白质	g/100ml 血浆	占血浆总蛋白质的百分率(%)	盐析时所需硫酸铵的饱和度(%)
纤维蛋白原	0.3	4	20
优球蛋白	0.2	3	33
拟球蛋白 I	1.3	17	40
拟球蛋白 II	0.5	7	46
白蛋白	5.2	69	62 70

影响蛋白质盐析行为的首先是蛋白质的性质,其次是盐的性质,溶液中盐的浓度、pH值及温度。

一、硫酸铵盐析

硫酸铵是蛋白质盐析法中最常用的盐。它有几个优点:水中的溶解度大,对绝大多数蛋白质的天然状态没有影响,价格便宜,没有大的公害问题,在饱和的硫酸铵溶液中,几乎所有的蛋白质都能沉淀析出,因此可以盐析几乎所有的蛋白质。

硫酸铵的缺点是:溶解度因溶液温度变化而有较大的变化;该试剂中含有极微量的金属元素,不易纯化。前一缺点在处理浓硫酸铵溶液时会引起一些麻烦,将样品溶液移至冷的环境(如4℃)时,硫酸铵也同时析出。后一缺点在纯化某些活力与金属离子有重要关系的蛋白质时要特别注意。另外,硫酸铵缓冲能力较差,pH较难控制。

制备蛋白质时,习惯上都以饱和度来表示它的浓度。饱和度(Satn)可以定义为:

$$\text{Satn} = \text{所用溶液的浓度} / \text{饱和溶液的浓度}$$

所以可以用小于1的数值,或百分数表示。由于硫酸铵的溶解度因温度变化而有较大变

表 2 硫酸铵饱和度的常用表
(1) 硫酸铵溶液饱和度表(0℃)

始浓度 \ 终浓度	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	向每 1 升溶液中加入固体硫酸铵的克数
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	
60									0	31	62	95	129	164	201	231	279	
65										0	31	63	97	132	168	205	244	
70											0	32	65	99	134	171	209	
75												0	32	66	101	137	174	
80													0	33	67	103	139	
85														0	34	68	105	
90															0	34	70	
95																0	35	
100																	0	

化,因此在定义 S_{atn} 的公式中,分母中实际上包含有不同温度下硫酸铵的溶解度,这样,为了使各家实验室间可相互重复,就必须指定盐析时溶液的温度。

表 2 是两种温度下的硫酸铵饱和度表。从表中不仅可找到达某一饱和度时单位体积水中所需加入的硫酸铵的量,还能找到从某一饱和度上升到更高饱和度时所需加入的硫酸铵的量。后一数值很有用,因为蛋白质纯化方法中大多数都是利用硫酸铵来分级,即先加硫酸铵至饱和度 S_1 将出现的沉淀去除后,往清液中加入硫酸铵至饱和度 S_2 ,将沉淀收集。所得沉淀常称为是 S_1-S_2 饱和度级份,个别情况下加至 S_1 后不去沉淀,继续加硫酸铵至 S_2 。此时溶液体积中包含了相当体积的沉淀,计算加固体硫酸铵的量时要扣除沉淀的体积。

加固体硫酸铵来纯化蛋白质,用%饱和度方法来计算,有下列不足之处:1. 用%饱和度来表示硫酸铵浓度不如摩尔浓度精确,因为溶液的摩尔浓度不因温度而变,但用%饱和度时即有影响;2. 在一般的文献中往往只有 20—25℃ 的%饱和度表,但是许多蛋白质的

(2) 硫酸铵溶液饱和度表 (25℃)

表 2(续)

始浓度 \ 终浓度	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	向每 1升溶 液中加 固体硫 酸铵的 克数
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767	
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694	
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619	
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583	
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546	
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522	
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506	
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469	
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431	
50										33	66	101	137	176	214	302	392	
55											33	67	103	141	179	264	353	
60												34	69	105	143	227	314	
65													34	70	107	190	275	
70														35	72	153	237	
75															36	115	193	
80																77	157	
90																	79	

注：始浓度：加固体硫酸铵前溶液的饱和度。

终浓度：加固体硫酸铵后溶液的饱和度。

沉淀往往在0℃附近；3、硫酸铵的比容被假定为常数并等于它饱和时的数值，然而，当硫酸铵的浓度从0上升到3.9mol/L时（在0℃时饱和硫酸铵溶液是3.895mol/L），比容从0.39ml到0.53ml/g，在变化着。比容是常数假设在浓硫酸铵溶液中仅仅引起小于2%的误差；然而，为得到希望的浓度而加浓硫酸铵溶液的误差可能略大（4%或更大）。

表3给出硫酸铵的重量加到一种溶液中得到所需浓度。表4给出加入3.8mol/L硫酸铵溶液的体积得到所需的浓度。表5和表6给出加入固体硫酸铵或3.8mol/L硫酸铵溶液后各自的最终体积。

操作注意点：

(1) 可以直接往蛋白质溶液中加入固体硫酸铵，但要小量地一点点加，加时要充分搅拌，避免在固体表面出现过浓的硫酸铵而将不该析出的蛋白质析出。为了减轻这一问题，可以用饱和硫酸铵溶液来分级（表7），表格给出1升溶液中应添加饱和硫酸铵溶液ml数，用以生成所需的饱和百分数。混合后体积的变化略去不计。但这种方法引入了水，将溶液稀释，经常会影响蛋白质的产率。

(2) 蛋白质盐析时要考虑到溶液的pH，将蛋白质溶液pH调至等电点附近时，使其溶解度达到最低，这时蛋白质最易析出，产率也最高。

表 3 0℃ 时,加到 1 升溶液中的硫酸镍的克数

%饱和度	终浓度		0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80	3.00	3.20	3.40	3.60	3.80	3.90
	始浓度	终浓度																					
0.0	0.00	0.00	0.00	26.7	54.0	81.9	111	140	170	202	234	267	302	338	375	413	453	495	539	585	632	682	707
5.1	0.20	0.00	0.00	0.00	27.0	54.7	83.0	112	142	173	205	238	272	308	344	383	422	464	507	552	599	649	673
10.3	0.40	0.00	0.00	0.00	27.4	55.4	85.4	114	144	176	209	243	278	314	352	391	432	475	519	566	615	639	639
15.4	0.60	0.00	0.00	0.00	27.7	56.2	87.0	116	147	179	213	247	283	321	359	400	442	486	533	581	605	605	605
20.5	0.80	0.00	0.00	0.00	28.1	57.1	88.5	118	150	183	217	252	289	328	368	409	453	499	546	570	570	570	570
25.7	1.00	0.00	0.00	0.00	28.6	58.1	90.2	122	156	190	226	264	303	343	386	430	477	512	535	535	535	535	535
30.8	1.20	0.00	0.00	0.00	29.1	59.1	91.9	125	159	194	231	270	310	351	395	441	464	464	464	464	464	464	464
35.9	1.40	0.00	0.00	0.00	30.2	61.4	93.7	127	162	199	236	276	317	360	405	428	428	428	428	428	428	428	428
41.1	1.60	0.00	0.00	0.00	30.7	62.6	95.7	130	166	203	242	282	325	369	391	391	391	391	391	391	391	391	391
46.2	1.80	0.00	0.00	0.00	31.3	63.9	97.7	133	170	208	248	290	333	355	355	355	355	355	355	355	355	355	355
51.3	2.00	0.00	0.00	0.00	32.0	65.2	99.8	136	174	213	254	297	318	318	318	318	318	318	318	318	318	318	318
56.5	2.20	0.00	0.00	0.00	32.7	66.7	102	139	178	218	260	281	281	281	281	281	281	281	281	281	281	281	281
61.6	2.40	0.00	0.00	0.00	33.4	68.2	104	142	182	224	244	244	244	244	244	244	244	244	244	244	244	244	244
66.8	2.60	0.00	0.00	0.00	34.2	69.8	107	146	187	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207	207
71.9	2.80	0.00	0.00	0.00	35.0	71.5	110	150	169	169	169	169	169	169	169	169	169	169	169	169	169	169	169
77.0	3.00	0.00	0.00	0.00	35.8	73.2	112	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132	132
82.2	3.20	0.00	0.00	0.00	36.7	75.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0	94.0
87.3	3.40	0.00	0.00	0.00	37.6	76.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1	96.1
92.4	3.60	0.00	0.00	0.00	38.1	77.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1	97.1
97.6	3.80	0.00	0.00	0.00	38.6	78.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1
100.0	3.90	0.00	0.00	0.00	39.0	79.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0

注: 始浓度: 加固体硫酸镍前溶液的摩尔浓度。
终浓度: 加固体硫酸镍后溶液的摩尔浓度。

表 4 0℃ 时,向 1 升溶液中加入 3.8mol/L 硫酸铍溶液的 ml 数

始 浓 度	终 浓 度	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80	3.00	3.20	3.40
0.00		0.00	55.3	117	185	263	351	452	570	709	875	1077	1330	1655	2088	2693	3600	5111	8134
0.20			0.00	58.4	124	197	281	377	489	621	779	972	1213	1522	1933	2508	3371	4809	7684
0.40				0.00	61.9	132	211	302	408	534	683	866	1094	1387	1777	2322	3140	4503	7228
0.60					0.00	65.9	141	227	327	446	587	760	975	1252	1620	2135	2907	4194	6768
0.80						0.00	70.5	152	246	357	490	652	855	1115	1462	1946	2673	3884	6305
1.00							0.00	75.9	164	268	393	545	735	978	1303	1756	2437	3570	5837
1.20								0.00	82.3	179	295	437	613	840	1143	1565	2199	3255	5366
1.40									0.00	89.7	197	328	492	702	981	1372	1959	2936	4891
1.60										0.00	98.7	219	369	562	819	1179	1718	2616	4412
1.80											0.00	110	247	423	657	984	1475	2294	3931
2.00												0.00	124	282	494	789	1232	1971	3447
2.20													0.00	141	330	593	988	1645	2961
2.40														0.00	165	396	742	1319	2472
2.60															0.00	198	496	991	1981
2.80																0.00	248	662	1489
3.00																	0.00	332	994
3.20																		0.00	498
3.40																			0.00

注: 终浓度: 加 3.8mol/L 硫酸铍后溶液的摩尔浓度。
始浓度: 加 3.8mol/L 硫酸铍前溶液的摩尔浓度。

表 5 0℃ 时,向 1 升溶液中加入固体硫酸铵后溶液的体积 (ml)

终浓度 始浓度	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20	1.40	1.60	1.80	2.00	2.20	2.40	2.60	2.80	3.00	3.20	3.40	3.60	3.80	3.90
0.00	1000	1010	1021	1033	1046	1060	1074	1090	1106	1123	1142	1161	1181	1203	1225	1249	1275	1301	1329	1359	1373
0.20		1000	1011	1023	1035	1049	1063	1079	1095	1112	1130	1149	1169	1191	1213	1237	1262	1288	1316	1345	1359
0.40			1000	1012	1024	1037	1052	1067	1083	1100	1118	1137	1157	1178	1200	1223	1248	1274	1301	1330	1344
0.60				1000	1012	1025	1039	1054	1070	1087	1105	1124	1143	1164	1186	1209	1233	1259	1286	1315	1329
0.80					1000	1013	1027	1042	1057	1074	1091	1110	1129	1150	1172	1194	1218	1244	1271	1299	1313
1.00						1000	1014	1028	1044	1060	1077	1096	1115	1135	1156	1179	1203	1228	1254	1282	1296
1.20							1000	1014	1030	1046	1063	1081	1100	1120	1141	1163	1187	1211	1237	1265	1278
1.40								1000	1015	1031	1048	1065	1084	1104	1125	1147	1170	1194	1220	1247	1260
1.60									1000	1016	1032	1050	1068	1088	1108	1130	1152	1176	1202	1228	1242
1.80										1000	1016	1033	1052	1071	1091	1112	1135	1158	1183	1209	1222
2.00											1000	1017	1035	1054	1073	1094	1116	1140	1164	1190	1203
2.20												1000	1018	1036	1056	1076	1098	1121	1145	1170	1183
2.40													1000	1018	1037	1058	1079	1101	1125	1150	1162
2.60														1000	1019	1039	1060	1082	1105	1129	1142
2.80															1000	1019	1040	1062	1085	1109	1121
3.00																1000	1020	1041	1064	1087	1099
3.20																	1000	1021	1043	1066	1077
3.40																		1000	1022	1044	1055
3.60																			1000	1022	1033
3.80																				1000	1011
3.90																					1000

注: 终浓度: 加固体硫酸铵后溶液的摩尔浓度。
始浓度: 加固体硫酸铵前溶液的摩尔浓度。