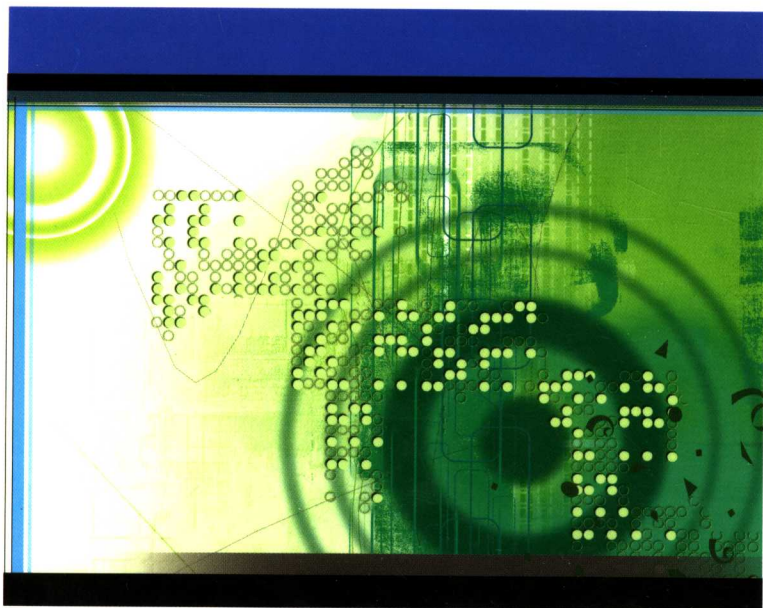


蛋白质纯化技术及应用

陆健 等编著



Chemical Industry Press



化学工业出版社

蛋白质纯化技术及应用

陆 健 等编著

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质纯化技术及应用/陆健等编著. —北京: 化学工业出版社, 2005. 6

ISBN 7-5025-7382-8

I. 蛋… II. 陆… III. 蛋白质-提纯-技术 IV. Q51

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 070811 号

蛋白质纯化技术及应用

陆 健 等编著

责任编辑: 侯玉周

文字编辑: 焦欣渝

责任校对: 边 涛

封面设计: 鲍 萌

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

大厂聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 22· 字数 402 千字

2005 年 9 月第 1 版, 2005 年 9 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-7382-8

定 价: 49.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

蛋白质是一切生命活动的主要体现者和物质基础。随着分子生物学、结构生物学、基因组学等研究的不断深入,许多学者将生命科学领域的研究焦点从基因转向蛋白质,这进一步促进了蛋白质组学和蛋白质工程研究的发展。蛋白质研究已成为当前生物化学和分子生物学领域内最为活跃的研究之一。

要研究蛋白质的结构和功能,首先要得到高纯度的具有生物学活性的目的蛋白。而蛋白质在组织或细胞中一般都是以复杂的混合物的形式存在,每种类型的细胞都含有很多不同结构和功能的蛋白质,这使蛋白质的分离纯化成为一项精细而复杂的任务。虽然通过分子生物学手段可推导出蛋白质一级结构链的氨基酸排列顺序和组成,但仍有许多问题需要通过蛋白质本身的空间结构和表达模式的研究才能得以更好的解释和完善。此外,利用蛋白质工程对蛋白质的结构进行改造,也必须先要了解蛋白质的基本结构。蛋白质的分离纯化是广大生物学、化学和医学工作者十分关心并且长期深入研究的领域,在获得高纯度目的蛋白后,才能够进行其性质的研究,从而有可能大规模生产应用,以造福人类。因此,蛋白质纯化不论是在基础理论研究、揭示生命现象的本质方面,还是在蛋白质工程、基因工程和细胞工程等产品的工业化生产方面,都是非常基础、非常重要、非常关键的。

本书全面系统而深入地介绍了蛋白质纯化理论,并且将理论和实践联系,便于读者系统了解蛋白质纯化技术理论和具体实践应用过程。书中既介绍了基本实验步骤,也介绍了综合性蛋白质纯化研究的实例。全书主要内容包括:蛋白质样品的预处理,凝胶过滤色谱,离子交换色谱,亲和色谱,共价色谱,电泳技术,特殊用途蛋白质的纯化,不同来源蛋白质的纯化,蛋白质的常用指标分析以及实验部分。

本书由陆健、周楠迪、史锋、曹钰、王栋、孔维宝编写。几位年轻老师,充分利用在国外学习、研究的时间,结合亲身研究经历,收集了很多资料,并进行了归纳整理。李胤、赵海峰、李旺军、蔡国林、冯凌蕾、刘军、王璐等参与了资料整理以及部分计算机文字处理工作,全书由陆健统稿、定稿。

由于作者水平所限,加之时间仓促,书中可能存在许多不足,真诚期待广大读者赐教。

衷心感谢化学工业出版社对本书的大力支持。

编著者

2005年4月于无锡

目 录

1 绪论	1
1.1 蛋白质纯化的意义	1
1.2 纯化蛋白质常用的方法	1
1.3 蛋白质纯化的设计	2
1.3.1 基本原则	2
1.3.2 过程优化	3
1.3.3 经济性	4
1.4 规模化蛋白质纯化	5
1.4.1 基本原则	5
1.4.2 主要操作过程	6
2 蛋白质样品的预处理	11
2.1 蛋白质样品的提取和分离	11
2.1.1 细胞的破碎	12
2.1.2 蛋白质样品的分离	15
2.2 蛋白质样品的浓缩	17
2.2.1 吸附法	18
2.2.2 超滤法	18
2.2.3 沉淀法	20
2.2.4 透析法	21
2.2.5 冷冻干燥法	21
2.2.6 双水相分离法	21
2.3 蛋白质样品的沉淀	22
2.3.1 盐析法	23
2.3.2 有机溶剂沉淀法	25
2.3.3 等电点沉淀法	26
2.3.4 聚乙二醇沉淀法	26
2.3.5 选择性沉淀法	27
2.4 蛋白质样品的透析	27
2.4.1 基本原理	27
2.4.2 应用	28
3 凝胶过滤色谱	29
3.1 概述	29

3.1.1	基本原理	29
3.1.2	凝胶的性质和种类	36
3.1.3	凝胶介质的选择	41
3.2	凝胶柱的操作	42
3.2.1	装柱	42
3.2.2	样品和缓冲液的准备	46
3.2.3	色谱条件	47
3.2.4	加样和洗脱	48
3.2.5	凝胶柱的再生及保存	49
3.3	应用	49
3.3.1	脱盐	49
3.3.2	蛋白质分离	50
3.3.3	测定蛋白质分子量	51
3.3.4	蛋白质复性的研究	51
3.3.5	其他	52
4	离子交换色谱	53
4.1	基本概念	54
4.1.1	蛋白质的电性质	55
4.1.2	离子交换理论	60
4.1.3	离子交换的分辨率	62
4.2	固定相: 离子交换剂	66
4.2.1	基本结构	66
4.2.2	功能基团和酸碱性质	67
4.2.3	离子交换剂的部分性质	68
4.2.4	离子交换剂的类型	74
4.3	流动相: 缓冲液和盐	86
4.3.1	缓冲液的类型	87
4.3.2	缓冲液的 pH 和浓度	88
4.3.3	离子对色谱行为的影响	89
4.3.4	添加剂	90
4.4	实验方案设计	91
4.4.1	离子交换剂的选择	91
4.4.2	缓冲液的选择和色谱条件的确定	94
4.4.3	色谱柱的尺寸	98

4.4.4	分批分离	99
4.5	色谱技术	100
4.5.1	离子交换剂的准备	100
4.5.2	样品的准备	102
4.5.3	加样	103
4.5.4	洗脱技术	105
4.5.5	样品的收集和处理	113
4.5.6	离子交换剂的再生、清洗、消毒和储存	114
4.6	应用实例	115
4.6.1	用 DEAE-Sepharose 色谱分离真菌纤维素酶	115
4.6.2	用 Mono S 和 Mono Q 连续色谱法从鸡肌肉组织分级分离糖酵解酶类	116
4.6.3	用 Mono Q 阴离子交换分离白血病细胞 <i>N</i> -乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的同工酶	117
4.6.4	用 Bio-Rex 70 色谱分离眼镜蛇神经毒素的六种单乙酰基衍生物	118
4.6.5	用阶段洗脱法大规模纯化人血清白蛋白和免疫球蛋白 G	119
5	亲和色谱	120
5.1	亲和吸附剂	121
5.1.1	配体和载体的选择	121
5.1.2	亲和吸附剂的制备方法	123
5.1.3	商品化基因特异性吸附剂	128
5.2	色谱技术	130
5.2.1	亲和色谱操作过程	130
5.2.2	亲和色谱的操作注意事项	132
5.2.3	亲和色谱的吸附容量与吸附效率	132
5.3	亲和色谱的特殊类型	133
5.3.1	凝集素亲和色谱	133
5.3.2	免疫亲和色谱	137
5.3.3	环氧乙烷丙烯酰胺珠亲和色谱	140
5.3.4	金属螯合亲和色谱	142
5.3.5	疏水作用色谱	144
5.4	应用	145
5.4.1	抗体和抗原的纯化	145

5.4.2	酶的纯化	145
5.4.3	糖蛋白的纯化	145
5.4.4	脂蛋白的纯化	145
6	共价色谱	146
6.1	巯基的化学性质	147
6.1.1	离子化、氧化、金属联结、烷基化	147
6.1.2	巯基-二硫化物互换反应	148
6.1.3	与活性二硫化物的反应	149
6.1.4	巯基与二硫化物的反应	150
6.2	含巯基的蛋白质	151
6.2.1	生物体中的氧化还原态	151
6.2.2	胞内与胞外的蛋白质	151
6.2.3	蛋白质巯基基团的解蔽	151
6.2.4	蛋白质二硫键的还原	152
6.2.5	巯基的引入	152
6.2.6	巯基基团的衍生化作用	152
6.3	共价色谱的凝胶	152
6.3.1	原理	152
6.3.2	凝胶的基质	153
6.3.3	凝胶的固定相	153
6.3.4	固定相活性基团的比较	153
6.3.5	凝胶固定相的引入	155
6.3.6	凝胶的取代程度和实际容量	157
6.4	色谱技术	158
6.4.1	预备	158
6.4.2	蛋白样品的结合	158
6.4.3	洗涤	159
6.4.4	还原洗脱	159
6.4.5	巯基蛋白的回收	160
6.4.6	巯基凝胶的再生	161
6.4.7	反向共价色谱	162
6.5	应用实例	162
6.5.1	从刀豆中分离脲酶	162
6.5.2	木瓜蛋白酶的纯化	163

6.5.3	共价色谱的顺序洗脱	164
6.5.4	巯基多肽的纯化	165
6.5.5	大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的可逆固定	165
6.5.6	蛋白质亚基的鉴定	166
7	电泳技术	167
7.1	概述	167
7.1.1	原理	167
7.1.2	分类	169
7.1.3	介质	170
7.1.4	电泳仪器	172
7.1.5	染色方法	173
7.2	常规聚丙烯酰胺凝胶电泳	174
7.2.1	原理	174
7.2.2	常规 PAGE 的类型	175
7.2.3	影响分离结果的外在因素	175
7.2.4	蛋白质分子量的测定	176
7.2.5	常规 PAGE 的实验方法	177
7.2.6	PAGE 的应用范围	181
7.3	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	181
7.3.1	原理	181
7.3.2	SDS-PAGE 的类型	182
7.3.3	影响分离结果的外在因素	182
7.3.4	蛋白质分子量的测定	183
7.3.5	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的实验方法	183
7.3.6	SDS-PAGE 的应用范围	184
7.4	等电聚焦	184
7.4.1	原理	185
7.4.2	载体两性电解质 pH 梯度的形成	186
7.4.3	载体两性电解质等电聚焦方法	187
7.4.4	固相 pH 梯度的介质及其 pH 梯度的形成	189
7.4.5	固相 pH 梯度等电聚焦方法	192
7.4.6	等电聚焦的应用范围	194
7.5	双向电泳	194
7.5.1	原理	194

7.5.2	双向电泳实验方法	194
7.5.3	应用	196
7.6	免疫电泳	197
7.6.1	原理	197
7.6.2	电泳方法	199
7.6.3	应用	200
7.7	蛋白质印迹	200
7.7.1	原理	200
7.7.2	试验材料的选择	201
7.7.3	蛋白质印迹试验方法	202
7.7.4	应用	203
7.8	毛细管电泳	203
8	特殊用途蛋白质的纯化	204
8.1	测序用蛋白质的纯化	204
8.1.1	测序蛋白纯化技术	205
8.1.2	多肽的制备和纯化	207
8.2	用于晶体学研究的蛋白质纯化	208
8.2.1	蛋白质结晶方法	211
8.2.2	不均一性对蛋白质结晶的影响	214
8.3	融合蛋白的纯化	218
8.3.1	融合蛋白的纯化过程	219
8.3.2	蛋白质的水解保护	225
8.3.3	常用融合技术	227
8.3.4	融合蛋白纯化实例	231
8.4	包含体的初步纯化	233
8.4.1	影响包含体形成的因素	233
8.4.2	细胞匀浆中包含体的分离	233
8.4.3	包含体的洗涤	233
8.5	膜蛋白的纯化	234
8.5.1	蛋白质的溶解性	235
8.5.2	膜蛋白的纯化	237
8.6	治疗用蛋白质的纯化	238
8.6.1	治疗用蛋白纯化的关键问题	239
8.6.2	工艺确认	242

9 不同来源蛋白质的纯化	244
9.1 微生物细胞培养蛋白质的纯化	244
9.1.1 色谱纯化方法	244
9.1.2 蛋白质离子交换纯化	245
9.2 哺乳动物细胞培养蛋白质的纯化	250
9.2.1 工艺设计	251
9.2.2 细胞分离	252
9.2.3 产品的初步回收和分离	252
9.2.4 主要纯化方法	252
9.2.5 样品纯化举例——单克隆抗体的纯化	253
9.2.6 消除污染	254
9.3 动物组织蛋白质的纯化	256
9.3.1 组织的选择	256
9.3.2 组织破碎	257
9.3.3 防止蛋白质的有害水解	257
9.3.4 亚细胞分级分离	257
9.3.5 膜蛋白的溶解	259
9.3.6 动物蛋白质纯化举例	260
9.4 植物组织蛋白质的纯化	263
9.4.1 影响植物组织蛋白质纯化的因素	263
9.4.2 材料来源	263
9.4.3 确定植物蛋白种类的直接和间接策略	267
9.4.4 样品纯化举例	268
10 蛋白质的常用指标分析	271
10.1 蛋白质的含量分析	271
10.1.1 测定蛋白质浓度的方法	271
10.1.2 紫外分光光度法	271
10.1.3 Lowry 法	274
10.1.4 二喹啉甲酸检测法	277
10.1.5 考马斯亮蓝染色法	278
10.2 蛋白质的分子量测定	281
10.2.1 SDS-PAGE 凝胶电泳法测定蛋白质的分子量	282
10.2.2 凝胶过滤色谱法测定天然蛋白质的分子量	286
10.3 蛋白质的等电点测定	288

10.3.1	蛋白质的等电点	288
10.3.2	等电聚焦技术	289
10.3.3	超薄聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦法测定蛋白质的等电点	289
10.4	蛋白质的纯度分析	294
10.4.1	纯度标准	294
10.4.2	常用的纯度检测方法	294
10.5	糖蛋白质中的糖含量分析	296
10.5.1	糖蛋白的化学分析	296
10.5.2	SDS 凝胶中的糖蛋白染色法	297
10.6	蛋白质和肽的 N 末端氨基酸测定	299
10.6.1	FDNB 法	300
10.6.2	DNS 分析法	301
10.6.3	Edman 降解法	304
10.7	蛋白质 N 末端序列分析	306
10.7.1	DNS-Edman 法	308
10.7.2	DABITC/PITC 双偶合法	309
10.8	蛋白质和肽的 C 末端分析	313
10.8.1	概述	313
10.8.2	C 末端序列分析的羧肽酶 Y 法	314
11	实验部分	317
11.1	用于蛋白质纯化的仪器 (工作站)	317
11.1.1	蛋白质纯化系统的主要部件	317
11.1.2	几种常见的蛋白质色谱系统	320
11.2	蛋白质分离纯化实例	322
11.2.1	蔗糖酶的分离纯化	322
11.2.2	转谷氨酰胺酶的分离纯化	323
11.2.3	纯化重组蛋白 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 外毒素 A	325
11.2.4	<i>E. coli</i> 中 RNA 聚合酶的提取和纯化	329
11.2.5	从 <i>E. coli</i> 中分离制备高纯度的去乙酰头孢菌素 C 合成酶	330
	参考文献	334

1 绪 论

1.1 蛋白质纯化的意义

蛋白质是包括人类在内的各种生物有机体的重要组成成分，是生命的物质基础之一。生物体的生长、发育、遗传和繁殖等一切生命活动都离不开蛋白质。机体内的某些生理活性物质，如多肽类激素、抗体、酶、核蛋白等都是蛋白质，它们对调节生理功能、维持新陈代谢起着极其重要的作用。在生命活动中蛋白质无处不在，而且不同的蛋白质有不同的结构和功能。如果生物体内的蛋白质发生不正常变化或失去，那么生命活动将会出现病变或停止。因此，研究蛋白质有着极为重要的生物学意义。

随着分子生物学、结构生物学、基因组学等研究的不断深入，人们意识到仅仅依靠基因组的序列分析来试图阐明生命活动的现象和本质是远远不够的。只有从蛋白质组学的角度对所有蛋白质的总和进行研究，才能更科学地掌握生命现象和活动规律，更完善地揭示生命的本质。由此许多学者将生命科学领域的研究焦点从基因转向蛋白质，使蛋白质成为揭示生命活动现象和分子生物学机理的重要研究对象。研究蛋白质首要的步骤是将目的蛋白从复杂的大分子混合物中分离纯化出来，得到高纯度具有生物学活性的目的物。因此，高效的纯化技术和手段是蛋白质研究的重要基础和关键之一。

1.2 纯化蛋白质常用的方法

蛋白质纯化的总体目标是设法在高效率、高得率的条件下获得高纯度、高活性和完整的目的蛋白。采用一种或一套现成的方法把任何一种蛋白质从复杂的混合体系中分离纯化出来显得比较困难，但对于任何一种蛋白质都有可能选择适当的纯化方法来获得高纯度的活性蛋白质。因此，选择科学合理的纯化方法对于分离纯化目的蛋白非常重要。

纯化方法的选择和确定要根据不同蛋白质样品的性质和具体的研究目的来决定。常用于初步提取和浓缩蛋白质的方法主要有吸附法、超滤法、沉淀法（如盐析、有机溶剂沉淀、等电点沉淀和选择性沉淀等）、透析法等。在要求高分辨率的条件下，通常采用色谱法（如凝胶过滤、离子交换、亲和色谱和共价色谱等）和电泳法（如等电聚焦、双向电泳、毛细管电泳和免疫电泳等）。这些分离纯化

方法的原理主要是基于蛋白质在溶解性、带电荷性、分子量大小或亲和特异性等方面的差异。色谱技术和电泳技术在纯化蛋白质方面的研究和应用比较广泛、深入，详细内容见书中的相关章节。

本节主要介绍蛋白质纯化设计的一些基本原则，对纯化过程的优化，以及经济性方面的考虑，同时介绍规模化纯化蛋白质所需考虑的一些原则和操作过程。

1.3 蛋白质纯化的设计

1.3.1 基本原则

1.3.1.1 原则

纯化蛋白质通常是为了获得纯蛋白质以便深入研究蛋白质的活性、结构、结构与功能之间的关系。

首先，必须了解待纯化样品中目的蛋白及主要杂质的性质，尽可能多收集有关蛋白质的来源、性质（分子大小、等电点）和稳定性（蛋白质对温度、极端pH、蛋白酶、氧和金属离子等的耐受性）等信息，这有助于设计蛋白质纯化。比如目的蛋白是糖蛋白或脂蛋白，它们就明显区别于大多数的杂蛋白；蛋白质是细胞内还是细胞外，可溶还是不可溶等都将影响到蛋白质提取方法和缓冲液组成，对于细胞外蛋白质，除去细胞可以有助于纯化过程，与膜结合的蛋白质需要用有机溶剂先溶解。

其次，纯化开始之前必须了解最终产品的用途，从而设计蛋白质纯化过程，同时要综合考虑纯化产品的质量、数量和经济性等三个方面的要求。纯化后的蛋白质纯度要多高，纯化过程中能允许损失多少活性以及纯化过程需多少时间和成本等都受到目的蛋白用途的影响。目的蛋白纯度如果要求越高，往往所需要的操作时间越长，成本越高。

最后，充分了解各分离纯化技术操作单元的大量信息也很重要，比如在细胞破碎时，需要了解包括流速、搅拌器类型、操作压力、细胞浓度和种类、产品释放的碎片和大小等；设计分析吸附色谱时，要了解包括色谱柱特征、凝胶或其他吸附剂的性能（结合能力、解离常数、流速等）。

1.3.1.2 蛋白质的纯度

对目的蛋白纯度的要求取决于纯蛋白质的用途，如果是工业化应用（在食品工业或日用化学工业），则需要大量的产品，此时纯度是次要的。如果纯蛋白质被用于研究，所需数量比较少，在酶学研究中，80%~90%的纯度就足够了，蛋白质结构研究中，纯度要在95%以上，而用于医疗的蛋白质，必须考虑到所有的杂质，对最终产物必须分析污染蛋白质、DNA和在纯化过程中的添加物。可以采取一些特别的步骤除去这些杂质，但是额外的纯化步骤虽然可以提高纯度，

却由于除掉最终的百分之几杂质比最初的纯化要困难得多,会导致收率下降,增加成本,延长了操作时间。为应用于研究而纯化蛋白质,规模小,额外的纯化步骤所需要的花费并不重要,但工业化纯化蛋白质则需要综合考虑纯化的经济性。

1.3.1.3 蛋白质活性的保持

在大多数情况下,纯化后蛋白质应尽可能保持活性,要采取尽可能少的纯化步骤以减少蛋白质变性和蛋白质水解。尽量避免比较粗放的条件(如极端pH、有机溶剂等),选用合适的缓冲液,在纯化的整个过程中,需要控制pH,以减少蛋白质变性,通常采用20~50mmol/L的缓冲液浓度。蛋白质样品的贮存温度宜在4℃或更低,如果贮存时间长或蛋白质易水解,可采用冷冻方法,用液氮、干冰或甲醇进行快速冷冻比较好,但是冷冻法对有些酶也不适用。在低温(4℃)操作,加快纯化过程而缩短操作时间,或加入蛋白酶抑制剂,都可以降低蛋白质水解程度。溶酶体是蛋白酶主要来源,尽量避免其受到破坏而释放出蛋白酶,在酶提取液中加入蔗糖或麦芽糖可降低破坏程度。然而,即使是微量蛋白酶,也能水解大量蛋白质,因此在纯化后期也要仔细操作。由于许多蛋白酶分子量^①在20000~30000之间,凝胶过滤可用于蛋白质初步纯化,以分离大多数蛋白酶污染物。选择简单、快速、高专一性的酶分析方法,可以缩短样品在纯化各步骤间的贮存时间,也可降低蛋白质水解程度。

1.3.1.4 蛋白质的数量

纯蛋白质的数量不仅仅受原材料数量的影响,还受到蛋白质纯化收率的影响。在有不同原料可供选择时,一般选用目的蛋白最稳定、含量最丰富的,同时也考虑获得原料是否容易,数量是否足够多,成本是否比较低。在纯化过程,每一步骤中都会损失蛋白质,所以纯化步骤应尽量少,以得到高蛋白质收率,但是纯化步骤的减少会降低目的蛋白的最终纯度,需要恰当选择各种纯化方法以提高蛋白质收率。

1.3.2 过程优化

蛋白质纯化的过程优化就是使蛋白质纯化后收率、纯度最高,成本最低。

在有纯化方案可供实施时,需要对纯化过程进行优化,此时已经了解了纯化过程条件和目的蛋白产品的特性。过程优化必须解决两类问题:一是在可替换的操作中作出选择(如离心或超滤等);二是设计理想的色谱顺序,以最少的步骤(一、二或三步)获得最大的产量。

每一分离纯化方法都要评估其处理样品能力、蛋白质收率和纯化成本。在纯

① 本书中“分子量”一词即指“相对分子质量”。——编辑注

化初期阶段，高处理量和低成本十分重要，而在后期高分辨率很重要。纯化分离初期要求减小样品体积，常常使用高处理量的沉淀技术，色谱中吸附法处理量最大，一般不采用凝胶过滤作为纯化初期操作步骤，因为它处理量小。使用高分辨率技术可以减少纯化步骤，也使蛋白质更纯。沉淀步骤分辨率低，而色谱法高，亲和色谱有很高分辨率。各纯化技术都有一个平均收率范围，硫酸铵沉淀法和双水相提取法的收率通常大于80%。亲和色谱法收率较低（在60%以下），且成本高，因此一般用在纯化的后期。通常先用低成本技术以除去大部分杂质，避免损坏价格高的色谱柱。

纯化技术顺序的选择上，一般先使用沉淀技术，然后依次是离子交换、亲和色谱，最后是凝胶过滤，这样，每一种技术利用了蛋白质的不同性质，沉淀技术能处理大量的高浓度蛋白质溶液，离子交换除去大部分杂蛋白以便进入价格高的亲和色谱柱，凝胶过滤用于最后纯化环节，这时处理量已不是问题。但是，这并非固定不变的纯化蛋白质的最佳方案，比如有时凝胶过滤就用作最早的分离步骤，以便获得多组分酶中的高或低分子量部分。总之，纯化方案的确定，除考虑利用蛋白质不同的特性外，步骤应尽可能少，尽量使分离产物不需进一步处理就可以直接进行下一步操作。

对所有蛋白质适用的纯化方案是不存在的，因为原料来源和各种蛋白质纯化的要求不同。可以通过试用多种方法先找出大致途径，或使用专家系统，以计算机为基础的专家系统在人工智能领域已经成了非常重要的工具，现有的人工智能可以通过相互作用的逻辑推理来找出蛋白质纯化的最理想方案。对100种纯化过程进行分析，平均分离纯化步骤是四步，总收率28%，平均每一步纯化倍数为8。

1.3.3 经济性

在实验室进行蛋白质纯化时，大多是为了进行研究，一般不太考虑成本问题，而规模化纯化蛋白质时，除了提高产量，获得更多的纯蛋白质产品，还有一个目的就是尽可能降低成本。

实验室规模和生产规模的纯化成本主要包括以下几个方面：固定资产投资（设备仪器、泵、盛液罐等）、化学材料和消耗品（塑料样品管、样品罐、无菌移液管、色谱柱等）、运行费用（包括人员工资、设备运行费用、供热空调费用等）。随规模增大，设备耗费明显增加。实验室里的设备一般有pH计，天平，磁力搅拌器，4℃冷柜或冷藏室，制冰机，低温冰柜（-4~8℃，-15~-20℃），分光光度计（205~850nm），电泳，破碎设备，带制冷（4℃）的离心机，以及柱色谱（包括分部收集器，UV监测仪及记录仪，蠕动泵和离子交换柱、亲和色谱柱、凝胶过滤柱等各种色谱柱）。有时也需要用于结构研究的氨

基酸分析仪和蛋白质测序仪等。在实验室中，为了方便，相当一部分的化学溶液被浪费，使得化学药品的支出成本与成批处理量并不成绝对正比。中试规模中，不锈钢容器和现代化的自动装置使投入有所增长，除了提纯车间，还需要办公室、仓库、实验室等。生产规模进行蛋白质纯化比较直接反应纯化过程的实际成本。

1.4 规模化蛋白质纯化

商业化的多肽和蛋白质生产至今还仅仅限于一些由微生物产生的或是从动植物组织中提取出的酶。重组 DNA 和组织培养技术的进展使得规模化生产蛋白质和多肽成为可能，其中不少产品都是和人类健康有关的，比如干扰素、抗生素和疫苗等。

规模化纯化蛋白质，目的是尽可能提高产量，并降低成本，同时也尽可能避免人为因素干扰，纯化过程还应尽可能精简。进行规模化纯化蛋白质时，已经基本了解目的蛋白、原料、生产方法、产品纯度要求和最终数量等，但是纯化过程中很多方面可能要重新评估并作出适当的改变。从实验室规模纯化蛋白质向工业化规模纯化生产蛋白质的扩大，属于工程学的范畴。工厂规模是一次性的，它必须成功。

以下介绍规模化纯化蛋白质所需遵循的原则，规模化操作过程和优化控制，以及规模化纯化中遇到的在实验室操作中可能被忽略的问题。

1.4.1 基本原则

合理设计纯化方案。在规模化纯化蛋白质过程中，主要步骤通常不超过 4~5 个：细胞分离，细胞破碎和碎片分离（仅对胞内蛋白而言），浓缩，预处理或初步分离纯化，高效分离纯化。要尽可能了解目的蛋白和杂质的物化性质，根据被分离物质不同的物理化学性质来进行纯化；尽可能早使用高选择性的步骤；尽可能早分离除去数量最多的杂质，在分离纯化的早期一般是浓缩蛋白质并除去水；最后执行特别费时间或成本很高的步骤。

选择适当的发酵系统和发酵条件。发酵过程和蛋白质分离纯化过程是相互影响的，合适的发酵将有助于发酵产品的分离及蛋白质的纯化。要严格控制、防止蛋白酶和细菌的污染。

规模化纯化蛋白质时，要保持蛋白质活性，减少蛋白质变性及失活。选择适当的操作温度（尽量在低温下进行操作）、pH 和泵，可以有效地控制蛋白质的变性。为了避免因为肽酶的作用等因素造成蛋白质降解，要保持比较低的浓度，尽量缩短操作时间。随着规模的扩大，样品溶液浓度要逐步递增，以减少对色谱过程的影响。