

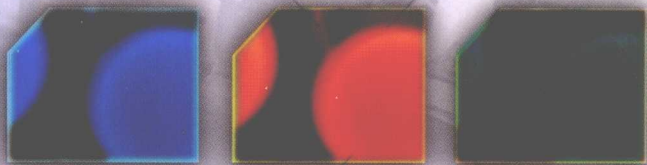
国家“十一五”重点图书出版项目
——生物医学实验技术系列丛书

DANBAIZHI FENLI

蛋白质分离 与纯化技术

YU CHUNHUA JISHU

张建社 褚武英 陈韬◎编著



国家“十一五”重点图书出版项目——
生物医学实验技术丛书

蛋白质分离与纯化技术

张建社 褚武英 陈韬 编著

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

蛋白质分离与纯化技术/张建社等编著. -北京:军事医学科学出版社,2009.9

(生物医学实验技术系列丛书)

ISBN 978-7-80245-256-5

I.蛋… II.张… III.①蛋白质—分离法(化学)②蛋白质—化学成分—提纯 IV.TQ93

中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第018866号

出版:军事医学科学出版社

地址:北京市海淀区太平路27号

邮编:100850

联系电话:发行部:(010)66931051,66931049

81858195

编辑部:(010)66931127,66931039,66931038

传真:(010)63801284

网址:<http://www.mmsp.cn>

印装:北京冶金大业印刷有限公司

发行:新华书店

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:11.75

字数:193千字

版次:2009年9月第1版

印次:2009年9月第1次

定价:25.00元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

内容提要

本书是生物医学实验技术丛书的分册之一。作者系统汇集了蛋白质分离纯化研究的成果,集传统常规技术和现代生物技术于一体,全面深入地介绍了蛋白质的基本特性、初级分离和高级分离的主要技术方法。包括:材料预处理、细胞破碎、离心分离、沉淀分离、膜过滤分离和色谱分离(如离子交换色谱、凝胶过滤色谱、分子重排色谱、高压液相色谱)等。还介绍了蛋白电泳分析和特征特性分析的技术方法,以及特殊蛋白如融合蛋白、膜蛋白的分离纯化实例。本书可供从事蛋白分离纯化的研究人员、实验人员及医学生阅读参考。

前 言

蛋白质是所有生命体的重要组成部分,是一切生命的物质基础。生命体的一切代谢活动无不与蛋白质的活动和代谢相关。一个生命个体或细胞由成千上万种不同蛋白质构成,且不同蛋白质在生命代谢过程中既有明确分工,又协同作用来完成某一生物学功能或过程。构成生命体的各类蛋白质如同组成某一机器的零部件,要从本质上揭示某一蛋白质的生物学特性和功能,如同拆装机器的零部件单一地进行分析。因此,采用综合生物技术从生命个体或者细胞中分离纯化特定蛋白质来分析其结构和生物学特性,进而了解它参与生命过程中所执行的功能,揭示某一生命现象本质有着重要的意义。随着近代分子生物学研究的纵深发展,基因或基因组水平上的研究揭示了生命遗传与控制的本质和分子基础。然而要进一步掌握其控制生命过程的功能和特性,蛋白质或蛋白质组学的研究就显得越来越重要了。

蛋白质的分离纯化是一个系统工程。要从细胞中众多的蛋白质中获取单一的目标蛋白质是一项艰巨的任务。在分离纯化过程中,其总目标是既要保证制品纯度、保持分离蛋白质的生物活性,又要力求减少分离过程中成本耗费,达到高效、低耗和优质的目的。为适应这一要求,本书广泛收集和整理了前人在蛋白质分离纯化研究的成果,集传统常规技术方法和现代生物技术于一体,较为系统而深入地介绍了蛋白质的基本特性,蛋白质的初级分离和高效分离的主要技术方法,初级分离包括了材料预处理、细胞破碎、离心分离、沉淀分离和膜过滤分离等,而高级分离主要介绍了色谱分离技术,如离子交换色谱、凝胶过滤色谱、分子重排色谱、高压液相色谱(HPLC)等。分离后的蛋白电泳分析和特征特性的分析技术方法也作为重要章节介绍。此外,还包括了特殊蛋白如融合蛋白、膜蛋白的分离纯化,以及一些重要蛋白分离纯化实例。

本书由张建社、褚武英、陈韬、唐建州、刘臻、包凌晟、周瑞雪、蒙涛编写。孟琼参与了资料的整理及文字处理工作。全书由张建社统稿、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,衷诚期待广大读者赐教。衷心感谢全国高校素质教材研究审编委员会和军事医学科学出版社对本书的大力支持。

编 者

2009年9月于长沙

目 录

第一章 绪论	(1)
1 蛋白质定义与结构	(1)
2 蛋白质的一般理化性质	(2)
3 蛋白质分离纯化的目的和意义	(5)
4 蛋白质分离纯化的基本原则和策略	(6)
5 蛋白质分离纯化的基本过程	(8)
第二章 蛋白质样品的初级分离	(13)
1 制备蛋白质的原材料的选择和预处理	(13)
2 目标蛋白质的离心分离	(16)
3 沉淀分级	(18)
4 萃取	(19)
5 吸附	(20)
6 膜分离	(21)
第三章 蛋白质高效分离——层析法	(23)
1 离子交换层析	(23)
2 层析聚焦	(31)
3 分子排阻层析	(35)
4 羟基磷灰石层析	(44)
5 亲和层析	(46)
6 高效液相色谱	(55)
7 免疫亲和层析	(62)
第四章 分离纯化蛋白质的电泳分析	(66)
1 电泳的基本原理	(66)
2 纸电泳	(67)
3 薄层电泳	(69)
4 薄膜电泳	(70)

5	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 (SDS - PAGE)	(71)
6	固相 pH 梯度 IEF - SDS 蛋白质组双向凝胶电泳分析	(75)
7	蛋白质印迹法 (Western blotting)	(84)
第五章 蛋白质定量和定性分析		(88)
1	蛋白质含量测定	(88)
2	Folin - 酚试剂法 (Lowry 法)	(90)
3	考马斯亮蓝法 (Bradford 法)	(92)
4	紫外吸收法	(95)
5	蛋白质分子量的测定	(97)
6	蛋白质纯度分析	(98)
7	糖蛋白中糖含量分析	(99)
8	蛋白质 N 末端序列分析	(102)
9	蛋白质 C 末端序列分析	(105)
第六章 纯化蛋白的浓缩、干燥和保存		(107)
1	浓缩	(107)
2	干燥	(110)
3	纯化蛋白制成品的保存	(112)
4	蛋白质和酶保存方法	(113)
第七章 不同组织蛋白质分离纯化		(115)
1	动物组织	(115)
2	植物组织	(117)
3	细菌细胞	(121)
4	真菌细胞	(124)
第八章 重组蛋白的分离与纯化		(128)
1	大肠杆菌 (<i>E. coli</i>) 表达蛋白产物	(128)
2	酵母表达系统的蛋白与纯化	(132)
3	哺乳动物培养细胞重组蛋白的表达与分离纯化	(135)
4	GST 融合蛋白的表达及分离纯化	(139)
5	His - Tag 融合蛋白的分离纯化	(142)
第九章 膜蛋白的分离		(146)
1	膜蛋白的特性	(146)
2	膜蛋白抽提	(146)
3	分离膜蛋白的基本原则	(147)

4	分离细胞膜蛋白的方法	(148)
5	分离组织膜蛋白的方法	(149)
6	分离细菌膜蛋白的方法	(149)
第十章 特殊蛋白质纯化实例		(151)
1	乳清蛋白各成分分离	(151)
2	蔗糖酶的纯化	(152)
3	辣根过氧化物酶的纯化	(152)
4	烟草含铜锌超氧化物歧化酶的纯化	(153)
5	乙醇脱氢酶的纯化	(155)
6	胞外脂酶的纯化	(156)
7	核糖核酸酶的纯化	(157)
8	β -葡萄糖苷酶的纯化	(158)
9	α -半乳糖苷酶的纯化	(158)
10	甲硫氨酸特异性氨肽酶的纯化	(159)
附件		(161)
参考文献		(176)

第 ● 章

绪 论

1 蛋白质定义与结构

蛋白质是生物体最重要的组成部分之一,它是由 α -氨基酸通过酰胺键连接而成的长链分子,这一分子的长链也被称为肽链。肽链经折叠修饰后形成特定的结构和构型,从而形成具有活性功能的蛋白质。大多数蛋白质除氨基酸外,还有其他组分,如糖类、脂类、金属类和有机子分子,这些含有其它组分的蛋白质被称为复合蛋白质。蛋白质肽链是由20种氨基酸单体随机组成的,使蛋白质肽链结构程度高度复杂化,继而肽链通过许多和 α -碳原子与肽平面链间的单链的旋转,并伴随着分子内大量原子和基团间的相互作用,折叠成为较为稳定的立体结构,且这种立体结构是多层次的,一般分为一、二、三和四级结构。蛋白质的一级结构一般是指构成蛋白质肽链的氨基酸残基的排列次序,有时也称为氨基酸残基序列。蛋白质的二、三和四级结构统称为蛋白质的高级结构。一条肽链或少数几条肽链通过共价键构成的蛋白质立体结构通常是它们的二级和三级结构。蛋白质的二级结构是蛋白质肽链骨架中局部肽链的稳定构象,即 α -螺旋和 β -折叠。在蛋白质的二级结构形成以后,肽链进一步折叠,产生三级结构。三级结构蛋白质的肽链大多形成近乎球状结构,从而使蛋白质内部变得更为紧密,内部的空间约有75%被原子所充斥。蛋白质的四级结构可以被定义为一些特定的三级结构肽链通过非共价键而形成大分子体系时的组合方式。作为蛋白质四级结构组分的肽链被称之为亚基,或亚单位,其亚基间的相互作用都是通过非共价键而维持形成的。蛋白质亚基的组成可包括同源和异源亚基,例如,HIV的蛋白酶经常是同源二聚体(homodimer);伴刀豆球蛋白A(conA)是同源四聚体(homotetramer)。由二种以上不同亚基形成的聚集体,则称为异源聚集体,一些糖蛋白激素(如绒毛膜促性腺激素,促甲状腺素)都是异源二聚

体(heterodimer),含有 α 和 β 亚基各一个。微管蛋白(tubulin)也是由一个 α 和一个 β 亚基组成,分子量为50 kDa左右,也被称为异二聚体。

2 蛋白质的一般理化性质

2.1 蛋白质的胶体性质

蛋白质是高分子化合物,分子量一般在10~1 000 kD。根据测定所知,如分子量为34.5 kD的球状蛋白,其颗粒的直径为4.3 nm。所以,蛋白质分子颗粒的直径一般在1~100 nm,在水溶液中呈胶体溶液,具有丁铎尔现象、布朗运动、不能透过半透膜、扩散速度减慢、黏度大等特征。蛋白质分子表面含有很多亲水基团,如氨基、羧基、羟基、巯基、酰胺基等,能与水分子形成水化层,从而把蛋白质分子颗粒分隔开来。此外,蛋白质在一定pH溶液中都带有相同电荷,因而使颗粒相互排斥。水化层的外围,还可有被带相反电荷的离子所包围形成双电层,这些因素都是防止蛋白质颗粒互相聚沉,促使蛋白质成为稳定胶体溶液的因素。球状蛋白质的表面多亲水基团,具有强烈的吸引水分子作用,使蛋白质分子表面常为多层水分子所包围,称水化膜,从而阻止蛋白质颗粒的相互聚集。与低分子物质比较,蛋白质分子扩散速度慢,不易透过半透膜,黏度大,在分离提纯蛋白质的过程中,可利用蛋白质的这一性质,将混有小分子杂质的蛋白质溶液放于半透膜制成的囊内,置于流动水或适宜的缓冲液中,小分子杂质则较易从囊中析出,囊内保留了较纯的蛋白质,这种方法称为透析(dialysis)。

2.2 蛋白质的两性电离和等电点

蛋白质和氨基酸一样,均是两性电解质,在溶液中可呈阳离子、阴离子或兼性离子,这取决于溶液的pH值、蛋白质游离基团的性质与数量。当蛋白质在某溶液中,带有等量的正电荷和负电荷时,此溶液的pH值即为该蛋白质的等电点(pI)。当pH偏酸时,蛋白质分子带正电荷。相反,pH偏碱,蛋白质分子带负电荷(图1-1)

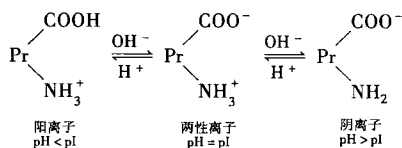


图 1-1 蛋白质的两性电离

蛋白质是由氨基酸组成的,其分子中除两端的游离氨基和羧基外,侧链中尚有一些解离基,如谷氨酸、天门冬氨酸残基中的 γ 和 β -羧基,赖氨酸残基中的 ϵ -氨基,精氨酸残基的胍基和组氨酸的咪唑基。作为带电颗粒它可以在电场中移动,移动方向取决于蛋白质分子所带的电荷。蛋白质颗粒在溶液中所带的电荷,既取决于其分子组成中碱性和酸性氨基酸的含量,又受所处溶液的pH影响。当蛋白质溶液处于某一pH时,蛋白质游离成正、负离子的趋势相等,即成为兼性离子,净电荷为0,此时溶液的pH值称为蛋白质的等电点(pI)。处于等电点的蛋白质颗粒,在电场中并不移动。蛋白质溶液的pH大于等电点,该蛋白质颗粒带负电荷,反之则带正电荷。各种蛋白质分子由于所含的碱性氨基酸和酸性氨基酸的数目不同,因而有各自的等电点。

蛋白质溶液的pH值在等电点时,蛋白质的溶解度、黏度、渗透压、膨胀性及导电能力均最小,胶体溶液呈最不稳定状态。凡碱性氨基酸含量较多的蛋白质,等电点往往偏碱,如组蛋白和精蛋白。反之,含酸性氨基酸较多的蛋白质如酪蛋白、胃蛋白酶等,其等电点往往偏酸。由于各种蛋白质的等电点不同,在同一pH值缓冲溶液中,各蛋白质所带电荷的性质和数量不同。因此,它们在同一电场中移动方向和速度均不相同。利用这一性质来进行蛋白质的分离和分析,称为蛋白质电泳分析法。

2.3 蛋白质的变性

天然蛋白质的严密结构在某些物理或化学因素作用下,其特定的空间结构被破坏,从而导致理化性质改变和生物学活性的丧失,如酶失去催化活力、激素丧失活性,称之为蛋白质的变性作用(denaturation)。变性蛋白质只有空间构象的破坏,一般认为蛋白质变性本质是次级键、二硫键的破坏,并不涉及一级结构的变化。变性蛋白质和天然蛋白质最明显的区别是溶解度降低,同时蛋白质的黏度增加、结晶性破坏、生物学活性丧失、易被蛋白酶分解。变性后的蛋白质称变性蛋白质,其特点如下:①蛋白质的亲水性、溶解度降低。在等电点的pH溶液中可发生沉淀,但仍能溶于偏酸或偏碱的溶液。②生物活性丧失,如酶的催化功能消失、蛋白质的免疫性能改变等。③变性蛋白质溶液的黏度往往增加。④变性蛋白质容易被酶消化。

能使蛋白质变性的物理因素有加热(70~100℃)、剧烈振荡,超声波、紫外线和X线照射。化学因素有强酸、强碱、尿素、去污剂、重金属盐、生物碱试剂、有机溶剂等。如果蛋白质变性仅影响三、四级结构,其变性往往是可逆的。如被盐酸变性的血红蛋白,再用碱处理可恢复其生理功能。胃蛋白

酶加热到 80 ~ 90 °C 时即失去消化蛋白质的能力,如温度慢慢下降到 37 °C 时,酶的催化能力又可恢复。这些因素都是在蛋白质分离纯化时应注意的。

2.4 蛋白质的沉淀

蛋白质分子凝聚从溶液中析出现象称为蛋白质沉淀(precipitation)。变性蛋白质一般易于沉淀,但也可不变性而使蛋白质沉淀。在一定条件下,变性的蛋白质也可不发生沉淀。蛋白质所形成的亲水胶体颗粒具有两种稳定因素,即颗粒表面的水化层和电荷。若无外加条件,不致互相凝集。然而若除掉这两个稳定因素(如调节溶液 pH 至等电点和加入脱水剂),蛋白质便容易凝集析出。如将蛋白质溶液 pH 调节到等电点,蛋白质分子呈等电状态。虽然分子间同性电荷相互排斥作用消失了,但是还有水化膜起保护作用,一般不至于发生凝聚作用。如果这时再加入某种脱水剂,除去蛋白质分子的水化膜,则蛋白质分子就会互相凝聚而析出沉淀;反之,若先使蛋白质脱水,然后再调节 pH 到等电点,也同样可使蛋白质沉淀析出。引起蛋白质沉淀的主要方法有下述几种。

(1) 盐析

在蛋白质溶液中加入大量的中性盐以破坏蛋白质的胶体稳定性而使其析出,这种方法称为盐析。常用的中性盐有硫酸铵、硫酸钠、氯化钠等。各种蛋白质盐析时所需的盐浓度及 pH 不同,故可用于对混合蛋白质组分的分离。例如用半饱和的硫酸铵可沉淀出血清中的球蛋白,而饱和硫酸铵可以使血清中的白蛋白、球蛋白都沉淀出来。盐析沉淀的蛋白质,经透析除盐,仍保证蛋白质的活性。调节蛋白质溶液的 pH 至等电点后,再用盐析法则蛋白质沉淀的效果更好。

(2) 重金属盐沉淀蛋白质

蛋白质可以与重金属离子如汞、铅、铜、银等结合成盐沉淀,沉淀的条件以 pH 稍大于等电点为宜。因为此时蛋白质分子有较多的负离子,易与重金属离子结合成盐。重金属沉淀的蛋白质常是变性的,但若在低温条件下,并控制重金属离子浓度,也可用于分离制备不变性的蛋白质。

(3) 生物碱试剂及某些酸类沉淀蛋白质

蛋白质也可与生物碱试剂(如苦味酸、钨酸、鞣酸)及某些酸(如三氯醋酸、过氯酸、硝酸)结合成不溶性的盐沉淀,沉淀的条件应当是 pH 小于等电点,这样蛋白质带正电荷易于与酸根负离子结合成盐。

(4) 有机溶剂沉淀蛋白质

可与水混合的有机溶剂,如乙醇、甲醇、丙酮等,对水的亲和力很大,能破坏蛋白质颗粒的水化膜,在等电点时使蛋白质沉淀。在常温下,有机溶剂沉淀蛋白质往往引起变性。例如乙醇消毒灭菌就是如此,但若在低温条件下,则变性进行较缓慢,可用于分离制备各种血浆蛋白质。

(5) 加热凝固

将接近于等电点附近的蛋白质溶液加热,可使蛋白质发生凝固(coagulation)而沉淀。加热首先是使蛋白质变性,有规则的肽链结构被打开呈松散状不规则的结构,分子的不对称性增加,疏水基团暴露,进而凝聚成凝胶状的蛋白块,如煮熟的鸡蛋,蛋黄和蛋清都凝固。蛋白质的变性、沉淀、凝固相互之间有很密切的关系。蛋白质变性后并不一定沉淀,变性蛋白质只在等电点附近才沉淀,沉淀的变性蛋白质也不一定凝固。例如,蛋白质被强酸、强碱变性后由于蛋白质颗粒带着大量电荷,故仍溶于强酸或强碱之中。但若将强碱和强酸溶液的 pH 调节到等电点,则变性蛋白质凝集成絮状沉淀物,若将此絮状物加热,则分子间相互盘缠而变成较为坚固的凝块。

3 蛋白质分离纯化的目的和意义

蛋白质是所有生物有机体的重要组成成分,是一切生命的物质基础。生命体的一切代谢活动包括生长、发育和繁殖等无不与蛋白质的活性和代谢相关。一个生命个体由成千上万种不同蛋白质构成,每一个蛋白质分子通过自主作用或与其他蛋白质的相互作用来执行生命过程中的某一功能。例如,肌肉的运动,它由肌球蛋白、肌动蛋白组成的肌纤维相互作用并在 ATP 酶协同作用下完成的。构成生物体的细胞包括不同种类的蛋白质,且每一种蛋白质具有不同的结构和功能。蛋白质在细胞内的适时表达、调节和蛋白质与蛋白质之间的相互反应、作用直接影响生命活动正常进行,否则生命活动将受到障碍或病变。构成生命体的各类蛋白质如同构成某一机器的零部件,要从本质上揭示某一蛋白质的结构和功能,如同拆装机器零部件一样需单一进行分析修理。因此,采用综合生物化学方法来分离某种特定蛋白质对了解和揭示某一生命现象和本质有着重要意义。

分离纯化蛋白质大致包括三个方面的应用:①作为生物药物和营养产品。例如,从血液中提取的免疫球蛋白常作为治疗和防御免疫功能失调的药物;从牛胰岛中提取的胰岛素(insulin)是用来治疗糖尿病的药物;从植物中提取的血液凝集素(lectin)可用来作为抗炎症和抗肿瘤药物等。②提纯某些蛋白酶类

或蛋白质在工业上的应用。例如,纤维素酶和糖酵解过程中的酶类常用作分解纤维和发酵生产应用。近年大量发展和生产的保健类食品,如大豆蛋白、乳铁蛋白和金属硫蛋白等均被分离提取作为营养保健品大量生产。③用于生命科学研究。要了解某一特定蛋白质的结构和功能以及理化性质,必须建立在分离纯化的单个蛋白的基础上。

综上所述,随着生命科学的纵深发展,对一个生命科学工作者而言,不仅要求掌握和了解控制蛋白质的表达发生的遗传控制机制,还要求对蛋白质个性特性包括结构、功能、理化性质以及蛋白质之间相互作用机制的深入研究。因此,掌握分离纯化蛋白质技术和方法是我们用来研究蛋白质的必备条件之一。

4 蛋白质分离纯化的基本原则和策略

蛋白质在组织和细胞中一般都是以复杂的混合形式存在,各种不同类型细胞都含有上千种不同的蛋白质。显然,要从如此混杂和众多的蛋白质中获取目的蛋白质是一项艰巨的任务。作为分离纯化的总目标应是增加制品纯度,保持分离蛋白质的生物学活性,减少分离过程中的成本消耗,达到高效、低耗和优质的目的。有鉴于此,在进行某一蛋白质分离之前,应针对以下几方面问题进行认真分析研究。

4.1 目的蛋白质来源原材料的选择

所有的生物体(包括动物、植物和微生物)含有不同种类或同一种类但含量不同的蛋白质。最大量获取目的蛋白质,正确选用原材料十分重要。纯蛋白质的数量不仅受原材料数量的影响,还受蛋白质纯化回收率的影响。在有不同原料可供选择时,宜选用蛋白质稳定、含量高、来源广、数量足和成本低为宜。例如,分离纯化纤维素酶和糖酶需从植物来源组织细胞中提取。从微生物如细菌、真菌来源提取蛋白质,往往是最为有效的途径,因为细菌和真菌细胞含有大量不同种类的蛋白质,同时它们繁殖生长速度快,周期短、成本低。这类最好的例证是目前用于分子生物学研究的大多数酶类均来自于细菌。动物组织如心脏、肝脏和肾脏等往往是动物蛋白质获取的最好和方便的材料,尤其是某类蛋白质往往在某些组织中含量最丰富。因此,动物蛋白的提取首先必须考虑其目的蛋白在组织中的含量,以便提高分离纯化的产量。此外,目标蛋白在细胞中的位置也是考虑因素之一。有些蛋白能富集于细胞的某些细胞器或组成成分,如细胞膜、线粒体或叶绿体中,

在提纯此类蛋白时,应首先考虑相应细胞器的分离提取,而后再从此类细胞器中纯化。随着生物技术的发展,目前对于细胞内天然存在的少量和微量表达的蛋白质,则采用分离其功能基因,构建基因工程菌,诱导在细菌或酵母表达系统中表达,而后采用常规分离纯化方法进行分离提纯。

4.2 目标蛋白的基本信息和生物学性质

与前所述,某一特定蛋白都具有它的独特理化性质,包括分子量、电荷性质、胶体性质、变性参数、沉淀特性和生物学活性等,这些信息是分离纯化过程中采用的方法和技术设计的基本前提。蛋白质的电荷性通常由它表面所带电荷,极性氨基酸残基或疏水性氨基酸性质决定,这也决定了该蛋白质的溶解度。蛋白质溶解度的大小,属水溶性还是有机溶性,直接影响到蛋白质的提取方法和样品提取液的组成配制。例如,与膜结合的蛋白质需要用有机溶剂先溶解。蛋白质的电荷性通常由带电荷氨基酸的残基来决定,不同蛋白质携带的静电荷不同,这是选用离子交换树脂来提纯蛋白质的基本依据。一般电荷的强弱也决定目的蛋白与树脂结合能力的大小,通过正负电荷相互作用吸附到离子交换树脂上的目的蛋白常采用不同盐溶液洗脱分离。同时,适合盐浓度的选择必须进行系列分级浓度实验而获取最佳洗脱浓度。当离子交换树脂基质为正电荷时,携带负电荷的蛋白质紧密结合到树脂基质;相反,如离子交换树脂呈负电荷时,与携带正电荷的目标蛋白结合。目的蛋白质分子大小直接影响凝胶色谱(size-exclusion chromatography)和超滤色谱(ultrafiltration)类型的选择。凝胶层析常常由一个带有不同孔径的颗粒基质组成,小分子蛋白通过小径颗粒,而大分子蛋白则由基质颗粒间隙而快速析出。常用的凝胶包括有葡聚糖凝胶、琼脂凝胶和琼脂糖聚丙烯酰胺凝胶,而目前市场上常用的凝胶层析柱主要有 Sephadex G 系列,其基质孔径 $10 \sim 200 \mu\text{m}$ 。因此,选择凝胶层析柱应根据目的蛋白质分子量的大小来决定。此外,某些目标蛋白质还具有与特定细胞成分特异结合(specific binding)的特性,例如,酶与底物、激活因子或抑制因子的结合、激素与受体的结合、抗体与抗原的结合等。根据这些性质,可选用亲和层析的方法来提纯某一目的蛋白质。

4.3 目标蛋白生物活性的保持

无论是动物蛋白还是植物蛋白,在分离纯化操作过程中,必须考虑防止

在实验过程中某些理化因素(如温度、pH 值、溶剂等)造成的蛋白质变性,以及细胞破碎后细胞内多种蛋白酶或水解酶对目的蛋白的降解作用。因此,在大多情况下,应尽量保持适宜的理化条件,尽量优化提纯的步骤,减少蛋白质变性,以保持纯化蛋白质的生物活性。蛋白质样品贮存宜在 4℃ 或更低的温度,并且分离纯化操作过程应在低温冷藏室,或有冰的环境条件下进行。分离纯化后的样品应低温(-20℃)保存。同时,加入蛋白酶抑制剂以防止蛋白质或酶分解。此外,操作过程中还应尽量减少样品从超低温(如液氮、干冰)中取出的次数,以减少超低温对蛋白质结构和构型的破坏。蛋白提取的样品制备缓冲液对目的蛋白从相应细胞器中分离及维持活性的内环境密切相关,要求选择最适 pH 值和盐离子浓度等。

4.4 根据需要选择合适的蛋白质提纯纯度和产量

分离纯化蛋白质是一种复杂而又耗费的过程,要求蛋白纯度越高,则耗费越大,产量也随之降低。目的蛋白提纯的纯度要求,主要取决于提纯的目的和用途。例如,作为研究目的抗原提取来制备抗体,则 50% 的纯度足以达到制备单克隆抗体的目的。如若要求对目的蛋白质氨基酸序列进行测定,则目的蛋白纯度应达 95%;作为医药用的某些蛋白质或酶类,则要求纯度达 95% 以上,以防止夹杂的其他蛋白质的副作用。作为食物和医药用蛋白质提纯,其实验操作条件应保持遵守 GLP (good laboratory practice) 和 GMP (good manufacturing practice) 的标准。

5 蛋白质分离纯化的基本过程

蛋白质分离纯化应在充分掌握目的蛋白质基本理化性质的基础上,充分利用同类研究工作提供的基本技术方法和参数,最大限度地优化提纯工艺流程,设计一套简易可行、低耗高效的工作方案。分离纯化蛋白质的一般程序可以分为前处理,初级分离,高效分离,产品制备和贮存以及质量检测多个步骤,而每一个步骤中包括可能采取的处理和技术方法,应尽量优化选择。现将各步骤基本内容和要点分述如下。

5.1 前处理

分离纯化某一目的蛋白,首先应把蛋白质从原来的组织或细胞中以溶

解的状态释放出来,并保持原来的天然状态,不丢失生物活性。动物材料应先剔除结缔组织和脂肪组织,种子材料应先去壳甚至去种皮,以免受杂质的污染。油料种子最好先采用低沸点的有机溶剂如乙醚等脱脂,然后根据不同的情况,选择适当的方法将组织和细胞破碎。细胞破碎的方法主要有四种:一是机械破碎。它通过机械运动产生的剪切力,使组织、细胞破碎,如捣碎法、研磨法和匀浆法。二是物理破碎。通过各种物理因素作用,使组织细胞外层结构破坏,而使细胞破碎,包括温度差破碎法、压力破碎法和超声波破碎法。三是化学破碎。通过各种化学试剂对细胞膜的作用,而使细胞破碎,主要采用有机溶剂,如甲苯、丁醇和氯仿等和表面活性剂,如 Triton - 100 和 Tween - 20。四是酶促破碎。通过细胞本身酶系或外加酶制剂的催化作用,使细胞外层结构受到破坏而达到细胞破碎,这类方法也称为自溶法和外加酶制剂法。在选择破碎方法时,应根据材料不同而进行选择。动物组织和细胞可用电动捣碎机或匀浆器破碎或超声波处理破碎。植物组织细胞由于具有纤维素、半纤维素和果胶等物质组成的细胞壁,一般需要用石英砂或玻璃粉和适当的样品提取液(或称裂解液)一起研磨的方法破碎。液氮破碎或用纤维素酶处理也能达到目的。

细胞破碎后,选择适当缓冲液把所要的蛋白质分离出来,并把细胞碎片等不溶物用离心或过滤的方法除去。离心分离除去细胞碎片和杂质是常用的方法,它是通过借助于离心机旋转而产生的离心力,使不同大小、不同密度的物质分离的技术过程。在离心分离时,要根据拟分离蛋白质以及杂质颗粒的大小、密度和特性不同,选择适当的离心机、离心方法和离心的条件。离心机根据离心速度可分为三级,即低速离心机、高速离心机和超速离心机。常速离心机又称为低速离心机,其最大转速在 8 000 r/min 以内,相对离心力(RCF)在 $1 \times 10^4 \times g$ 以下,在蛋白的分离纯化过程中,主要用于细胞、细胞碎片和培养基残渣等固形物的分离,也用于酶的结晶等较大颗粒的分离。高速离心机的最大转速为 $(1 \sim 2.5) \times 10^4$ r/min,相对离心力达到 $1 \times 10^4 \sim 10^5 \times g$,离心分离中主要用于沉淀细胞碎片和细胞器等的分离。为了防止在高速离心过程中,温度升高而造成蛋白的变性失活,有些高速离心机设有冷冻装置,即高速冷冻离心机。超速离心机的最大转速达 $(2.5 \sim 12) \times 10^4$ r/min,相对离心力可以高达 $5 \times 10^5 \times g$,甚至更高。超速离心主要用于 DNA、RNA、蛋白质等生物大分子以及细胞器、病毒等的分离纯化;样品纯度的检测,沉降系数和相对分子质量的测定等。因此,实际操作过程中应根据目的纯化蛋白的理化性质和纯度要求选择合适离心方法。表 1-1 所示为不同离心场下沉降的