

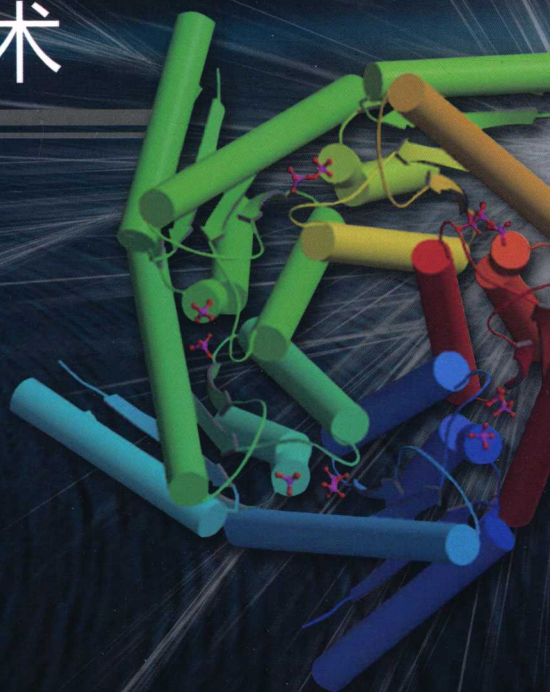
PROTEIN

PURIFICATION AND
ANALYSIS TECHNOLOGIES

蛋白质

纯化与分析技术

汪少芸 主编



中国轻工业出版社

全国百佳图书出版单位

TQ936
20131

蛋白质纯化 与分析技术

汪少芸 主编

 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质纯化与分析技术/汪少芸主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2014. 1

ISBN 978-7-5019-7439-9

I. ①蛋… II. ①汪… III. ①蛋白质-提纯-技术
IV. ①Q51

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 229126 号

责任编辑: 伊双双 张磊 责任终审: 滕炎福 封面设计: 锋尚设计
版式设计: 王超男 责任校对: 李靖 责任监印: 张可

出版发行: 中国轻工业出版社 (北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印刷: 北京君升印刷有限公司

经销: 各地新华书店

版次: 2014 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

开本: 720 × 1000 1/16 印张: 24.75

字数: 571 千字

书号: ISBN 978-7-5019-7439-9 定价: 58.00 元

邮购电话: 010-65241695 传真: 65128352

发行电话: 010-85119835 85119793 传真: 85113293

网址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社邮购联系调换

071122K1X101ZBW

前 言

随着生命科学的发展和研究的不断深入,人们意识到靠基因组的序列分析来阐明生命活动的现象和本质是远远不够的。蛋白质是揭示生命活动和分子生物学机制的重要对象,深入研究蛋白质和蛋白质组学,才能更好地把握生命现象和规律,揭示其本质。因此,生物学家现在关注更多的是各个基因组中所编码蛋白质的结构和功能,研究焦点已从基因转向蛋白质,同时也促进了蛋白质组学和蛋白质工程研究的发展。要研究蛋白质,首先要得到高纯度的、具有生物学活性的、相对稳定的目的蛋白,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,不同类型的细胞中含有不同结构和功能的蛋白质,这就使得蛋白质的分离纯化成为一项精细而复杂的任务。因此,高效的蛋白质纯化技术和分析手段是蛋白质研究的基础和关键之一。

本书以蛋白质纯化与分析技术为核心,对其基本原理及应用实例做了详细的阐述。主要内容包括:蛋白质纯化的依据与设计、蛋白质的提取技术、蛋白质的纯化技术、特征蛋白质的纯化技术,以及定量与分析检测技术。其中提取技术包括蛋白质提取的准备、蛋白质的总提取策略、不同来源蛋白质的具体提取策略;蛋白质的纯化技术包括沉淀法、透析和超滤、电泳技术和色谱技术;特征蛋白质的纯化包括抗体、膜蛋白、钙调蛋白、生物活性酶(尿激酶、激肽释放酶和植物溶菌酶)和重组蛋白包涵体的纯化;蛋白质的定量、储存与结晶包括纯化过程中的定量、提纯后的纯度标准、纯蛋白质的储存、蛋白质的冻干和结晶等内容;蛋白质的分析与检测包括氨基酸序列分析、蛋白质免疫印迹、酶联免疫吸附分析、质谱技术和肽图谱技术。

本书在介绍基本原理的基础上,重点在于描述每种方法的操作过程和应用实例。此书对所涉及的方法进展介绍得较深入细致,如对亲和色谱,除通用的亲和色谱之外,还包括染色配基体亲和色谱、凝集素亲和色谱、免疫亲和色谱、固相金属离子亲和层析和嗜硫亲和色谱等。对液相色谱,从通用的常压色谱到高效液相色谱、多维液相色谱,都有比较细致的介绍,方便不同读者的需要。本书实用性和可操作性较强,通过本书,学生和科研工作者可以很好地掌握蛋白质分子的提取和纯化技巧。如蛋白质的提取部分,本书介绍了如何分别从植物、微生物、动物等的组织中提取蛋白质,如何更换缓冲体系,如何避免蛋白酶造成的蛋白质变性等。对特征蛋白质,本书编入最经典实用的几类蛋白质实例,让读者方便寻找到有益的线索。本书通过具体地介绍各类具有代表性

的，并经多年优化的提取、纯化和鉴定技术，对每个实验均详细叙述其材料设备、试剂配制、操作程序和结果分析等，就像一个有多年实战经验的老师站在你面前。

本书适合综合性大学及农、医、师范等高校生物化学、分子生物学、生物技术、食品科学、医药卫生和相关专业的教师、实验室工作者、本科生和研究生使用，也可供相关领域科研院所的科研人员，以及企业的研发者和决策者参考使用。

参加本书编著的有福州大学生物科学与工程学院的邵彪、潘云魁、常景立、陈桂灵、宗瑜和欧阳艳华等，赵立娜、江勇和袁凤英等为蛋白质的提取部分搜索了部分参考资料，蔡茜茜、黄顺丽、陈涛涛、王文龙、户佩、洪永祥、陈秋妹、杨倩和张毓琛等也参与了本书的校对工作。在本书编著过程中，得到了本学科知名专家饶平凡教授和叶秀云教授的大力支持，这里一并表示感谢。

蛋白质纯化与分析技术随着生命科学的发展而日新月异，加之编著者水平有限，错误之处难免，恳请读者批评指正。

编者

目 录

105	一、应用	54
106	第四节 等电聚焦	57
107	一、基本原理	59
108	二、基本操作	60
109	三、应用	60
1	绪论	
1	一、蛋白质及其性质	20
4	二、蛋白质纯化的意义	25
5	三、蛋白质纯化的依据	29
9	四、蛋白质纯化的一般程序	30
12	五、蛋白质纯化方案的设计与评价	70

第一篇 蛋白质的提取

19 第一章 蛋白质提取的准备

19	第一节 概述	17
19	第二节 蛋白质提取的影响因素	17
19	一、缓冲液	17
24	二、温度	17
24	三、溶液极性和离子强度	17
25	四、金属离子	17
25	五、还原剂	17
26	六、去垢剂	17
28	七、蛋白酶抑制剂	17

31 第二章 蛋白质提取技术

31	第一节 总提取策略	38
32	一、原料的选择与处理	38
33	二、细胞的破碎	38
35	三、细胞器的分离	38
37	四、蛋白质提取时的保护性措施	38
39	五、蛋白质提取液的浓缩与保存	38
44	第二节 具体提取策略	39
44	一、动物组织中蛋白质的提取	101
49	二、植物组织中蛋白质的提取	102
53	三、细菌体重组蛋白的提取	103

水对升美祖白蛋 二第

20	去垢剂 章三第	20
25	去垢剂 章一第	25
29	去垢剂 章二第	29
30	去垢剂 一	30
70	去垢剂 二	70
17	去垢剂 三	17
17	去垢剂 四	17
17	去垢剂 五	17
17	去垢剂 章四第	17
17	去垢剂 一第	17
17	去垢剂 二	17
17	去垢剂 三	17
17	去垢剂 章二第	17
17	去垢剂 一	17
17	去垢剂 二	17
17	去垢剂 三	17
17	去垢剂 四	17
38	水对升美祖白蛋 章五第	38
38	去垢剂 章一第	38
38	去垢剂 一	38
38	去垢剂 二	38
38	去垢剂 章二第	38
38	去垢剂 一	38
39	去垢剂 二	39
101	去垢剂 三	101
102	去垢剂 章三第	102
103	去垢剂 一	103

- 54 四、真菌中蛋白质的提取
- 57 五、动物组织亚细胞中蛋白质的提取
- 59 六、植物组织亚细胞中蛋白质的提取
- 60 七、富含多酚化合物的植物组织中酶的提取

第二篇 蛋白质纯化技术

65 第三章 沉淀法

- 65 第一节 概述
- 65 第二节 沉淀法的类型
 - 65 一、盐析法
 - 70 二、有机溶剂沉淀法
 - 71 三、等电点沉淀法
 - 71 四、亲和沉淀法
 - 72 五、其他沉淀法

75 第四章 透析和超滤

- 75 第一节 透析
 - 75 一、基本原理
 - 75 二、基本操作
 - 77 三、应用
- 77 第二节 超滤
 - 77 一、基本原理
 - 77 二、超滤膜
 - 79 三、基本操作
 - 83 四、应用

84 第五章 电泳技术

- 84 第一节 概述
 - 84 一、基本原理
 - 86 二、电泳的分类
- 88 第二节 聚丙烯酰胺凝胶电泳
 - 88 一、基本原理
 - 93 二、基本操作
 - 101 三、应用
- 102 第三节 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳
 - 103 一、基本原理

103 二、基本操作

105 三、应用

106 第四节 等电聚焦

107 一、基本原理

108 二、基本操作

109 三、应用

109 第五节 双向电泳

110 一、基本原理

110 二、基本操作

114 三、应用

116 第六节 毛细管电泳

116 一、基本原理

116 二、分离模式

120 三、应用

131 第六章 色谱技术

131 第一节 分子筛色谱

131 一、基本原理

132 二、色谱柱重要参数

133 三、分子筛色谱优缺点

134 四、凝胶的类型及性质

136 五、基本操作

142 六、应用

146 第二节 离子交换色谱

146 一、基本原理

148 二、离子交换剂类型及性质

153 三、基本操作

158 四、应用

161 第三节 亲和色谱

161 一、亲和色谱基本概论

172 二、染色配基体亲和色谱

177 三、凝集素亲和色谱

183 四、免疫亲和色谱

188 五、固相金属离子亲和色谱

191 六、嗜硫亲和色谱

新合用科水... 第四... 697

... 697

... 787

... 809

新合用科... 第五... 808

... 808

... 808

新合用科... 第六... 818

... 818

新合用科... 第七... 820

... 820

... 822

新合用科... 第八... 822

... 822

... 822

新合用科... 第九... 822

... 822

... 822

新合用科... 第十... 822

... 822

... 822

新合用科... 第十一... 822

... 822

... 822

新合用科... 第十二... 822

... 822

... 822

196	第四节 疏水作用色谱	196
196	一、基本原理	196
197	二、基本操作	197
200	三、应用	200
202	第五节 反相色谱	202
202	一、基本原理	202
203	二、基本操作	203
206	三、应用	206
212	第六节 聚焦色谱	212
212	一、基本原理	212
216	二、基本操作	216
218	三、应用	218
220	第七节 灌注色谱	220
220	一、基本原理	220
222	二、灌注色谱介质	222
223	三、应用	223
225	第八节 高效液相色谱	225
225	一、基本原理	225
225	二、固定相和流动相	225
226	三、基本操作	226
228	四、应用	228
229	第九节 多维液相色谱	229
229	一、基本原理	229
230	二、基本操作	230
233	三、应用	233
236	第七章 特征蛋白质的纯化	236
236	第一节 抗体的纯化	236
236	一、抗体的结构	236
237	二、抗体粗分离的方法	237
239	三、抗体细分离的方法	239
242	第二节 膜蛋白的纯化	242
242	一、膜蛋白的结构	242
244	二、去垢剂的作用	244
245	三、膜蛋白的分离	245

248	第三节 钙调蛋白的纯化
248	一、钙调蛋白的结构
250	二、钙调蛋白的分离
251	三、钙调蛋白的检测
254	第四节 生物活性酶的纯化
254	一、尿激酶的纯化
260	二、激肽释放酶的纯化
262	三、植物溶菌酶的纯化
269	第五节 重组蛋白包涵体的纯化
269	一、重组蛋白包涵体
269	二、重组蛋白包涵体的生物学意义
270	三、重组蛋白包涵体的纯化

第三篇 蛋白质的定量与分析检测

281	第八章 蛋白质的定量、储存与结晶
281	第一节 蛋白质纯化过程中的定量
282	一、凯氏定氮法
284	二、紫外吸收法
287	三、双缩脲法
288	四、Folin - 酚试剂法 (Lowry 法)
291	五、二喹啉甲酸法 (BCA 法)
293	六、考马斯亮蓝法 (Bradford 法)
295	第二节 蛋白质提纯后的纯度标准
295	一、纯度标准
296	二、常用的纯度检测方法
299	第三节 蛋白质纯品的储存
299	一、干态储存
299	二、液态储存
300	第四节 蛋白质的冻干
300	一、基本原理
301	二、共熔点
301	三、冻干程序
304	四、冻干的后处理
305	第五节 蛋白质的结晶

305	一、基本原理
307	二、结晶的影响因素
308	三、结晶的方法
310	四、晶体的保存
311	第九章 蛋白质的分析与检测
311	第一节 氨基酸序列分析
311	一、基本原理
311	二、氨基酸序列分析程序
316	三、末端氨基酸的测定
320	四、肽链的专一性水解和肽片段的纯化
324	五、肽段的序列测定
329	六、由肽段序列建立蛋白质的一级结构
331	第二节 蛋白质免疫印迹
331	一、基本原理
332	二、印迹过程
335	三、应用实例
337	第三节 酶联免疫吸附分析
337	一、基本原理
337	二、检测类型
340	三、应用实例
344	第四节 质谱技术
344	一、基本原理
344	二、检测过程
355	三、应用实例
362	第五节 肽图谱技术
362	一、基本原理
363	二、研究方法
364	三、应用实例

缩略语表

参考文献

348	3. 蛋白质电泳	348
348	4. 蛋白质结晶	348
350	5. 蛋白质的纯化	350
351	6. 蛋白质的保存	351
354	7. 蛋白质的定量	354
360	8. 蛋白质的鉴定	360
365	9. 蛋白质的分离	365
369	10. 蛋白质的纯化	369
369	11. 蛋白质的纯化	369
370	12. 蛋白质的纯化	370
381	13. 蛋白质的纯化	381
381	14. 蛋白质的纯化	381
385	15. 蛋白质的纯化	385
384	16. 蛋白质的纯化	384
385	17. 蛋白质的纯化	385
385	18. 蛋白质的纯化	385
391	19. 蛋白质的纯化	391
393	20. 蛋白质的纯化	393
395	21. 蛋白质的纯化	395
395	22. 蛋白质的纯化	395
396	23. 蛋白质的纯化	396
399	24. 蛋白质的纯化	399
399	25. 蛋白质的纯化	399
399	26. 蛋白质的纯化	399
400	27. 蛋白质的纯化	400
400	28. 蛋白质的纯化	400
401	29. 蛋白质的纯化	401
401	30. 蛋白质的纯化	401
404	31. 蛋白质的纯化	404
405	32. 蛋白质的纯化	405

绪论

一、蛋白质及其性质

蛋白质是由氨基酸组成的一类高分子有机化合物，是人体的必需营养素。蛋白质的英文是 protein，源于希腊文的 proteios，是“头等重要”意思，表明蛋白质是生命活动中头等重要的物质。蛋白质是细胞组分中含量最为丰富、功能最多的高分子物质，在生命活动中起着各种生命功能执行者的作用，几乎没有一种生命活动能离开蛋白质，所以没有蛋白质就没有生命。蛋白质是一切生命的物质基础，这不仅是因为蛋白质是构成机体组织器官的基本成分，更重要的是蛋白质本身不断地进行合成与分解。这种合成、分解的对立统一过程，推动生命活动，调节机体正常生理功能，保证机体的生长、发育、繁殖、遗传及修补损伤的组织。根据现代的生物学观点，蛋白质和核酸是生命的主要物质基础。

人们对蛋白质重要性的认识经历了一个漫长的历程。1742 年 Beccari 将面粉团不断用水洗去淀粉，分离出面筋，实际上就是谷蛋白之一。1841 年 Liebig 发表了分析蛋白质的文章。此后 John Kjeldahl 于 1883 年发明了一种准确测定氮进而测定蛋白质含量的分析方法，至今仍被广泛应用。随后氨基酸也被发现。1902 年 E. Fischer 测定了氨基酸的化学结构，还测定了肽键的性质。大约在 1927 年，J. B. Sumner 证明了酶是一种蛋白质。此后，20 世纪 50 年代，他在描述胰岛素的氨基酸顺序时获得了一个重大发现，研究表明 DNA、RNA 和蛋白质之间存在着对应的关系。1953 年，F. Crick 和 J. Watson 描述了 DNA 的分子结构。科学家们逐渐阐明了细胞如何建造具有特定氨基酸顺序的特定蛋白质。

(一) 蛋白质的生理功能

蛋白质是细胞的重要组成成分，在生命活动中起着重要的作用。在器官、体液和其他组织中，没有两种蛋白质的生理功能是完全一样的。这些差异是由组成蛋白质的氨基酸种类、数量和结合方式不同造成的。

1. 蛋白质是构建机体组织细胞的主要原料

肌肉、神经、结缔组织、腺体、精液、皮肤、血液、毛发、角、喙等都是

以蛋白质为主要成分，起着传导、运输、支持、保护、连接、运动等多种功能。肌肉、肝、脾等组织器官的干物质含蛋白质 80% 以上。蛋白质也是乳、蛋、毛发的主要组成成分。除反刍动物外，食物蛋白质几乎是唯一可用以形成动物体蛋白质的氮来源。

2. 蛋白质是机体内功能物质的主要成分

蛋白质是构成机体组织、器官的重要成分，人体各组织、器官无一不含蛋白质。蛋白质在体内是构成多种重要生理活性物质的成分，参与物质代谢及生理功能的调控。在代谢活动中起催化作用的酶、某些起调节作用的激素、具有免疫和防御功能的抗体（免疫球蛋白）都是以蛋白质为主要成分。另外，蛋白质对维持体内的渗透压和水分的正常分布也起着重要的作用。

3. 蛋白质是组织更新、修补的主要原料

在动物的新陈代谢过程中，组织和器官蛋白质的更新、损伤组织的修补都需要蛋白质。通过同位素测定，全身蛋白质 6~7 个月可更新一半。

4. 蛋白质可供能和转化为糖、脂肪

在机体能量供应不足时，蛋白质可分解供能，维持机体的代谢活动。当摄入蛋白质过多或氨基酸不平衡时，多余的部分也可能转化成糖、脂肪或分解产热。1g 蛋白质在体内氧化供能约 $1.67 \times 10^4 \text{J}$ 。

(二) 蛋白质的分类

通常按照蛋白质的结构、形态和物理特性对其进行分类，不同分类间往往也有交错重叠的情况。一般可分为纤维蛋白、球状蛋白和结合蛋白三大类。

1. 纤维蛋白

(1) 胶原蛋白 胶原蛋白是软骨和结缔组织中的主要蛋白质，一般占哺乳动物体蛋白质总量的 30% 左右。胶原蛋白不溶于水，对动物消化酶有抗性，但在水或稀酸、稀碱中煮沸易变成可溶的、易消化的明胶。胶原蛋白含有大量的羟脯氨酸和少量羟赖氨酸，缺乏半胱氨酸、胱氨酸和色氨酸。

(2) 弹性蛋白 弹性蛋白是构成弹性组织，如腱和动脉的蛋白质，不能转变成明胶。

(3) 角蛋白 角蛋白是构成羽毛、毛发、爪、喙、蹄、角以及脑灰质、脊髓和视网膜神经的蛋白质。它们不易溶解和消化，含较多的胱氨酸(14%~15%)。粉碎的羽毛和猪毛，在 0.68~0.91MPa 蒸气压力下加热处理 1h，其消化率可提高到 70%~80%，胱氨酸含量则减少 5%~6%。

2. 球状蛋白

(1) 清蛋白 主要有卵清蛋白、血清蛋白、豆清蛋白、乳清蛋白等，溶于水，加热凝固。

(2) 球蛋白 球蛋白可用 5%~10% 的 NaCl 溶液从动植物组织中提取。

不溶或微溶于水，可溶于中性盐的稀溶液中，加热凝固。血清球蛋白、血浆纤维蛋白原、肌浆蛋白、豌豆的豆球蛋白等都属于此类蛋白质。

(3) 谷蛋白 麦谷蛋白、玉米谷蛋白、大米的米精蛋白等属于此类蛋白质。不溶于水或中性溶液，溶于稀酸或稀碱。

(4) 醇溶蛋白 玉米醇溶蛋白、小麦和黑麦的麦醇溶蛋白、大麦的大麦醇溶蛋白属于此类蛋白质。不溶于水、无水乙醇或中性溶液，溶于70%~80%的乙醇。

(5) 组蛋白 组蛋白含碱性氨基酸较多，属于碱性蛋白，溶于水。大多数组蛋白在活细胞中与核酸结合，如血红蛋白的珠蛋白和鲑鱼精子中的鲑组蛋白。

(6) 鱼精蛋白 鱼精蛋白是低分子蛋白质，含碱性氨基酸多，溶于水。如鲑鱼精子中的鲑精蛋白、鲟鱼的鲟精蛋白、鲱鱼的鲱精蛋白等。鱼精蛋白在鱼的精细胞中与核酸结合。

3. 结合蛋白

结合蛋白是蛋白质再结合一个非氨基酸的基团(辅基)，如核蛋白(脱氧核糖核蛋白、核糖体)、磷蛋白(酪蛋白、胃蛋白酶)、金属蛋白(细胞色素氧化酶、铜蓝蛋白、黄嘌呤氧化酶)、脂蛋白(卵黄蛋白、血脂蛋白)、色蛋白(血红蛋白、细胞色素C、黄素蛋白、视网膜中与视紫质结合的水溶性蛋白)及糖蛋白(γ 球蛋白、半乳糖蛋白、甘露糖蛋白、氨基糖蛋白)等。

(三) 蛋白质的理化性质

蛋白质的主要理化性质如下：

(1) 大小 蛋白质的相对分子质量一般为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 或更高。多数蛋白质含有多个亚基，有的蛋白质是多亚基复合物的一部分。

(2) 形状 蛋白质的形状有近似球状(球形)的，也有很不对称的。蛋白质溶液通过离心力作用时，或通过膜、凝胶过滤颗粒或电泳凝胶中的小孔运动时，都会受到其形状的影响。例如，考虑两种质量相同的单体蛋白质，一种是球状的，另一种是雪茄状的。在甘油梯度离心时，球状蛋白质具有较小的有效半径(斯托克斯半径)，因而通过溶液沉降时，遇到的摩擦力较小。这样，它就会沉降得较快而显得比雪茄状蛋白大。反之，在大小排阻层析时，上述斯托克斯半径较小的球状蛋白质更容易扩散入凝胶过滤填料的小孔内，较迟洗脱出来，因而显得比雪茄状蛋白质要大。

(3) 胶体性质 蛋白质由于分子质量大，在溶液中可以达到胶体质点的范围，从而具有布朗运动、光散射现象、不能透过半透膜以及吸附能力等胶体溶液的一般性质。另外，蛋白质水溶液因表面具有水化层和同性电荷而形成一种比较稳定的亲水胶体。

(4) 两性解离与等电点 蛋白质在纯水溶液中和结晶状态下都可以两性

离子的形式存在。蛋白质在溶液中的带电情况主要取决于溶液的 pH。一般来说,含酸性氨基酸较多的酸性蛋白,等电点偏低;含碱性氨基酸较多的碱性蛋白,等电点偏高。对于变性的蛋白质,可由其酸性氨基酸与碱性氨基酸的比例来判断。对于天然蛋白质,由于其 R 基团不能完全暴露在外,故不易判断。人和动物体内多数蛋白质的等电点为 5 左右,所以在生理条件下,多以负离子形式存在。

(5) 沉淀反应 蛋白质分子聚集而从溶液中析出现象,称为蛋白质的沉淀反应。蛋白质沉淀可能是变性沉淀,也可能是未变性沉淀,这取决于沉淀的方法和条件。中性盐沉淀属于不变性沉淀反应;有机溶剂、加热、重金属盐和生物碱试剂易使蛋白质发生变性沉淀反应。

(6) 紫外吸收 大部分蛋白质均含有带芳香环的苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸,这三种氨基酸在 280nm 附近有最大吸收,因此,大多数蛋白质在 280nm 附近显示强的吸收峰。

(7) 颜色反应 蛋白质是由氨基酸通过肽键构成的化合物,因此,蛋白质的颜色反应实际上是其氨基酸的一些基团以及肽键等与一些试剂所产生的化学反应,并非是蛋白质的特异反应。蛋白质的颜色反应很多,常见的有双缩脲反应、酚试剂反应(酪氨酸的酚基将福林试剂还原)、茚三酮反应和考马斯亮蓝反应(染料结合法)。

二、蛋白质纯化的意义

蛋白质是生命活动的物质基础,也是生物体内的功能性大分子。随着分子生物学、结构生物学、基因组学等研究的不断深入,人们意识到仅靠基因组的序列分析来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来研究蛋白质,才能更好地把握生命现象和规律,揭示其本质。因此,目前的研究焦点已从基因转向蛋白质,将蛋白质作为揭示生命活动现象和分子生物学机制的重要研究对象,同时也促进了蛋白质组学和蛋白质工程研究的发展。

要研究蛋白质,首先要得到高纯度的、具有生物学活性的、相对稳定的目的蛋白质,然后才能对其性质进行研究,进而才可能大规模生产应用,以造福人类。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,不同类型的细胞中含有不同结构和功能的蛋白质,这就使得蛋白质的分离纯化成为一项精细而复杂的任务。因此,高效的蛋白纯化技术和手段是蛋白质研究的基础和关键之一。

生物体内的酶、多肽类激素、抗体、膜运输蛋白和核蛋白等大多数是蛋白质,它们在催化生物体内的反应、代谢调节、免疫、物质运输和遗传控制等生

理活动方面发挥着重要的作用，维持了新陈代谢的正常进行。结构决定功能，蛋白质功能的多样性表明了其结构极为复杂且组织严密。此外，蛋白质在一定的条件下会发生结构上的改变，从而引起生物体的许多功能异常或者丧失，进而引发一系列疾病。因此，研究蛋白质结构和功能之间的关系有着极其重要的生物学意义。

纯化蛋白质的目的通常是为了获得纯品蛋白质，以便深入研究蛋白质的活性位点、活性机制、空间结构、结构与功能之间的关系，所以纯化蛋白质的意义在于：

(1) 研究生命本质的需要 从生物材料中分离制备蛋白质，研究其结构与功能，对于了解生命活动的规律，阐明生命现象的本质有重大意义。

(2) 工业生产的需要 食品、发酵、纺织、皮革等工业需要大量高活力的酶制剂，如用淀粉酶制造葡萄糖、麦芽糖、糊精以及糖浆等。

(3) 医疗的需要 许多蛋白质是安全有效的药品，如蛋白水解酶复剂作为消化药物被广泛使用尿激酶可以治疗各种血栓性疾病等。

(4) 基因工程的需要 对具有生理活性的蛋白质和酶进行基因工程改造，以提高其生理活性、酶活力和蛋白质的热稳定性等，必须首先得到纯化的蛋白质，在纯品蛋白质的基础上再进行改造，如定点突变等。

三、蛋白质纯化的依据

能从成千上万种蛋白质混合物中纯化出一种蛋白质的原因，是不同的蛋白质在物理、化学和生物学性质方面有着极大的不同，这些性质是由蛋白质氨基酸的排列序列和数目不同造成的。连接在多肽主链上的氨基酸残基可以是带正电荷或负电荷、极性的或非极性的、亲水的或疏水的，此外多肽可折叠成非常确定的二级结构（ α 螺旋、 β 折叠和各种转角）、三级结构和四级结构，形成独特的大小、形状和残基在蛋白质表面的分布状况。

蛋白质可以进行分离纯化的主要依据是蛋白质本身的理化性质，如溶解度、分子大小及形状、密度、电离性质、亲水性、配位吸附特异性、生物学功能等，详述如下。

(一) 溶解度差异

利用蛋白质溶解度的差异是分离纯化各种蛋白质常用的方法。影响蛋白质溶解度的外界因素很多，其中主要有：溶液的pH、离子强度、介电常数和温度，在同一特定外界条件下，不同的蛋白质具有不同的溶解度。适当改变外界条件，可以控制蛋白质混合物中某一成分的溶解度。

依据蛋白质溶解度差异的纯化方法有盐溶、盐析、低温有机溶剂沉淀等。

中性盐对蛋白质的溶解度有显著影响，一般在低盐浓度下随着盐浓度的升高，蛋白质的溶解度增加，此称盐溶；当盐浓度继续升高时，蛋白质的溶解度有不同程度的下降并先后析出，这种现象称为盐析。将大量盐加到蛋白质溶液中，高浓度的盐离子（如硫酸铵的 SO_4^{2-} 和 NH_4^+ ）有很强的水化力，可夺取蛋白质分子的水化层，使之“失水”，于是蛋白质胶粒凝结并沉淀析出。盐析时若溶液 pH 在蛋白质等电点则效果更好。由于各种蛋白质分子颗粒大小、亲水程度不同，故盐析所需的盐浓度也不一样，因此调节混合蛋白质溶液中的中性盐浓度可使各种蛋白质分段沉淀。

有机溶剂可用于沉淀蛋白质的原因有二：一、有机溶剂与盐溶液一样，可使蛋白质失水；二、有机溶剂的介电常数比水小，导致溶剂的极性较小。蛋白质在不同的溶剂中的溶解度有很大不同，从基本不溶（ $<10\mu\text{g}/\text{mL}$ ）至极易溶解（ $>300\text{mg}/\text{mL}$ ）不等。而同一有机溶剂引起不同蛋白沉淀的浓度也不同。故控制有机溶剂的浓度不同可分离蛋白质，常用的有机溶剂有甲醇、乙醇和丙酮等。由于有机溶剂加入水溶液中产生放热反应会引起蛋白变性。因此有机溶剂必须先在一 10°C 下预冷，并且整个操作过程都应在低温下进行，所以称为低温有机溶剂沉淀法。

（二）等电点差异

蛋白质的等电点（isoelectric point, pI ）是指使蛋白质分子所带正电荷与负电荷相等（即净电荷为零）时溶液的 pH，由蛋白质上带正、负电荷的氨基酸残基数目和滴定曲线所决定。蛋白质 pI 一般在 $4.0 \sim 10.0$ 。当 $\text{pH} > pI$ 时，蛋白质带负电荷；当 $\text{pH} < pI$ 时，蛋白质带正电荷；当 $\text{pH} = pI$ 时，蛋白质所带净电荷为零。

依据此性质，可以在蛋白质的分离纯化中用等电点沉淀法和 pH 控制。蛋白质在静电状态时颗粒之间的静电斥力最小，因而溶解度也最小，各种蛋白质的等电点有差别，可利用调节溶液的 pH 达到某一蛋白质的等电点使之沉淀。但此法很少单独使用，可与盐析法结合应用（详见第三章）。

（三）分子质量不同

蛋白质分子质量的大小各不相同，可从只含几个氨基酸的小肽（分子质量只有几百 u）至含有 10000 多个氨基酸的巨大蛋白质（分子质量超过 1000000u）不等。多数蛋白质的分子质量在 $10000 \sim 150000\text{u}$ 。有的蛋白质是多亚基复合物的一个部分，它们的分子质量就可能比较大。

依据蛋白质此性质，在蛋白质分离纯化过程中所采用的方法有透析、超滤、离心和凝胶过滤层析。

透析和超滤是利用蛋白质分子不能通过半透膜的性质，使蛋白质和其他小分子物质如无机盐、单糖、水等分开。透析是将待提纯的溶液装入半透膜的透