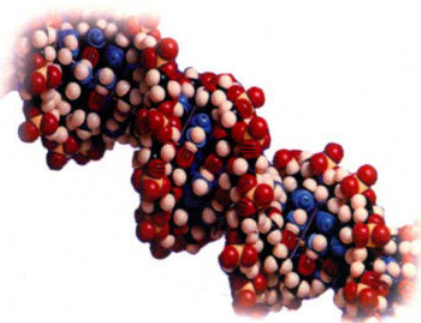




生命科学前沿及应用生物技术



生物工程下游技术 实验手册

柯德森 主编



科学出版社

生命科学前沿及应用生物技术大系·典藏版

生物工程下游技术实验手册

柯德森 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

应用生物技术大系和现代生命科学前沿系列图书分别被列为“十一五”和“十二五”国家重点图书出版规划项目。本丛书针对生命科学领域前沿重点发展方向以及应用生物技术领域的新成果、新思路、新方法和新技术,全面展示了其最新的发展动态,涵盖了基础理论和主要技术方法,呈现了新的概念与理论、技术,在更深层次上阐明了生命的本质规律,给人们提供了新的认识生命本质的手段,也为生物技术服务于人类开辟了新的途径。涉及领域包括生物医药、干细胞技术、工业微生物学、蛋白质及蛋白质组、系统生物学、合成生物学、生物材料、农业生物技术、环境生物技术、海洋生物技术、生物资源与安全等。

图书在版编目(CIP)数据

生命科学前沿及应用生物技术大系:典藏版/舒红兵等编著. —北京:科学出版社, 2016

ISBN 978-7-03-047487-2

I. ①现… II. ①舒… III. ①生命科学—研究②生物工程—研究 IV. ①Q1-0②Q819

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043876 号

责任编辑:王 静 李 悦

责任印制:张 伟 / 封面设计:刘新新

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月 第 一 版 开本:787×1092 1/16

2016 年 7 月 第一次印刷 印张:2108

字数:49 985 000

定价:8900.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《生物工程下游技术实验手册》
编委会

主 编 柯德森

副主编 江学斌 巫锦雄

参 编 田长恩 雷德柱 胡位荣

前 言

生物工程下游技术广泛地是指从工程菌或工程细胞的大规模培养到产品分离纯化、质量监测过程所涉及的所有操作单元和操作技术，其中最重要的环节就是生物物质的分离纯化技术。生物工程下游技术实验体系包括：生物反应器及大规模细胞培养技术、材料及细胞（包括菌体）的基本及高效破碎技术、固液分离技术、目标产品的精制纯化技术、目标产品的质量衡量及测定技术等。生物反应器及大规模细胞培养技术的关键包括了发酵罐的操作、动物细胞培养专用生物反应器的操作及控制、微载体培养及微囊化培养等相关内容。细胞（菌体）破碎技术包括利用机械剪切力破碎细胞的机械法细胞破碎技术，以及不需要机械剪切力的非机械法细胞破碎技术。前者包括了利用固体剪切力或液体剪切力两类破碎细胞方式，后者主要通过一些物理的、化学的或生物的方式改变细胞（菌体）膜的通透性，使内容物释放出来的技术。各种细胞破碎技术的原理不同，适用的对象及操作环境不同，使用的效果也不同，所以针对不同的材料以及破碎的目标物质的性质及含量的不同，选择不同的破碎方法是细胞破碎法成功的关键，同时成本的考虑也是细胞破碎法选择的重要依据。固液分离技术的主要手段有离心沉降法固液分离、膜过滤固液分离、双水相萃取固液分离等。目前，生物工程产品主要是具有一定活性功能的生物物质，其中蛋白质类的产品是最重要的，因此目标产品的分离纯化技术一般是指利用特定的高效手段，尽可能去除目标产品之外的所有其他杂质成分，最大限度地提高目标产品的纯度的技术。目前对蛋白质类物质的纯化而言，层析手段是最为有效的核心手段，掌握层析操作技术是对生物工程专业学生的基本要求，也是生物工程下游技术实验教学最重要的内容。一般对产品进行精制纯化过程之前都必须进行初步纯化，初步纯化技术涉及的手段包括利用有机溶剂及无机盐的分步沉淀法、等电点沉淀法、利用不同截留分子质量的超滤膜过滤法等，其目的都是尽可能地去大量杂质、减少层析的工作量、增加层析的效率，同时由于层析法是生物物质分离过程中成本产生的主要步骤，初步纯化工作的好坏可直接影响层析的效果，并大大减少层析步骤的工作量，从而有效地降低生物分离过程的成本。

生物工程是利用基因工程、细胞工程、微生物工程、蛋白质及酶工程等技术手段发现、筛选、改良、优化，并大规模生产有益于生命健康、环境保护、食品和饲料生产等领域的生物活性物质，其根本目标就是生产有经济和社会价值的生物产品，生物工程下游技术就是实现此目标的直接环节。从生物活性物质的生产

过程看，一般涉及从基因水平上的筛选、克隆和改良，从细胞水平上的大规模培养以扩大目标产物，以及将目标产物从细胞及其他物质中分离纯化出来的过程。生物物质的分离纯化过程是产品直接生产出来的过程，它不仅决定了生物产品的产量和质量，而且也是生物物质产品生产过程中成本构成的主要环节，因此，生物工程下游技术实验应该重点强调层析过程的基本理论与基本操作技能，力求让学生掌握各种层析技术的基本原理和操作要领，使他们不仅能够胜任生产过程的实际操作，而且初步具备进行研发工作的基本素质。

国务院于近期正式颁发了《促进生物产业加快发展的若干政策》，核心内容为要求引导技术、人才、资金等资源向生物产业集聚，促进生物产业的发展。这无疑表明继十大振兴产业之后，生物产业成为又一个得到国家政策重点支持的领域，迎来了它的战略机遇。按照中国生物产业发展规划三个阶段的目标：2010年前将完成第一阶段的技术积累，要求使生物技术研究开发的整体水平达到一个新的层次，论文数量达到世界前6位，专利数量进入世界前6位，生物产业总产值达到8000亿元，其中现代生物产业产值达到2000亿元以上；2015年左右完成产业崛起，生物技术研究发展整体水平跻身世界先进行列，论文和专利总数达到世界前3位或前4位，生物产业总产值达到15000亿元，其中现代生物产业产值达到8000亿元；到2020年预计达到持续发展阶段，即我国的生物技术研发水平达到先进国家水平，生物产业总产值达到3万亿元，成为国民经济的支柱产业之一。由此可见，在未来20年内，对生物工程人才的数量和质量的需求将呈现迅速增长的趋势。为了适应我国生物技术的发展规划对人才质量的要求，生物工程专业本科生应该具备更加系统的实验知识。

编 者

2010年9月10日

目 录

前言

第一部分 生物工程下游技术实验基础理论

1 生物工程下游技术概述	3
1.1 生物工程下游技术操作的对象	3
1.2 物质分离纯化的基本策略	4
1.3 生物工程下游分离基本过程	6
2 细胞破碎与固液分离技术	12
2.1 细胞破碎技术	12
2.2 固液分离技术	15
2.3 离心分离技术	16
3 膜分离技术	23
3.1 透析	23
3.2 超滤技术	25
3.3 微孔膜过滤技术	26
4 层析技术	28
4.1 层析的基本概念	28
4.2 层析法的分类	31
4.3 柱层析的基本操作	32
4.4 凝胶层析	34
4.5 离子交换层析	42
4.6 亲和层析	48
5 电泳分离技术	55
5.1 电泳基本原理	55
5.2 电泳的分类	58

第二部分 生物工程下游技术学生实验

第一章 生物工程下游技术常见仪器设备的使用	63
实验一 管式离心机在发酵菌液分离中的应用	63
实验二 连续流超高压冷冻细胞破碎机在生物工程中的应用	64

实验三	板框压滤机在发酵菌液分离中的应用	67
实验四	陶瓷微滤膜在发酵菌液浓缩中的应用	69
实验五	超滤膜在蛋白质浓缩中的应用	71
实验六	蛋白质的真空浓缩	72
实验七	真空冷冻干燥机在生物制品生产中的应用	74
实验八	蛋白质的冷冻干燥	76
实验九	喷雾干燥机在生物制品中的应用	78
第二章	细胞破碎与粗分离实验	81
实验一	酵母细胞的破碎及破碎率的测定	81
实验二	机械剪切法细胞破碎实验	82
实验三	硫酸铵分级盐析分离血清中的主要蛋白质	84
实验四	蔗糖密度梯度离心分离实验	87
实验五	青霉素的萃取与萃取率的计算	88
实验六	蛋白质的透析	90
实验七	胰凝乳蛋白酶的制备	91
实验八	牛奶中酪蛋白和乳蛋白素粗品的制备	93
第三章	层析和电泳分离分析技术实验	95
实验一	凝胶层析法测定蛋白质分子质量	95
实验二	亲和层析纯化胰蛋白酶	98
实验三	离子交换色谱分离氨基酸	106
实验四	SDS-PAGE 测定蛋白质分子质量	108
实验五	血清脂蛋白琼脂糖凝胶电泳	111
第四章	综合性设计性实验	114
实验一	血清 γ -球蛋白的分离纯化与鉴定	114
实验二	溶菌酶的制备及其性质	118
实验三	超氧化物歧化酶 SOD 的分离纯化技术	122
实验四	糖化酶的固定化及其在葡萄糖生产中的应用工艺	129

第三部分 附 录

附录一	生物工程下游技术实验室的安全及环保知识	137
附录二	常用消毒剂使用方法	146
附录三	常见的消毒剂配制表	148
附录四	常用 pH 缓冲溶液	149
附录五	一些常用酸碱指示剂	158
附录六	常用固态化合物当量浓度配制参考表	159

附录七 化学试剂纯度分级表	160
附录八 调整硫酸铵溶液饱和度计算表 (0℃)	161
附录九 调整硫酸铵溶液饱和度计算表 (25℃)	162
附录十 不同温度下饱和硫酸铵溶液的数据	163
附录十一 常见蛋白质分子质量参考表	164

第一部分 生物工程下游 技术实验基础理论

1 生物工程下游技术概述

1.1 生物工程下游技术操作的对象

生物工程下游的实验对象一般是指包含目标物质的人工培养的动植物细胞或菌体,也包括天然的动植物及微生物材料。目标物质既可以是氨基酸、多肽、蛋白质、糖类及其衍生物、脂类及其衍生物等,也可以是动植物细胞或微生物细胞本身的活体制剂。但一般情况下生物工程下游技术的分离对象多数是指具有一定功能的生物分子,主要是指蛋白质类物质。目标产物的存在形式可为菌体、胞内产物和胞外产物三类物质。常见的有如下一些物质。

(1) 氨基酸及其衍生物,主要包括天然氨基酸及其衍生物。这是一类结构简单、分子质量小、易于制备的物质,包含 60 多种。目前主要生产的品种有谷氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、精氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸和色氨酸等,其中谷氨酸的产量最大。

(2) 活性多肽类。多肽在生物体内浓度很低,但活性很强,对机体生理功能具有重要的调节作用,目前应用于临床的多肽药物已达 20 种以上。谷胱甘肽、催产素和加压素、促肾上腺皮质激素、脑肽等都是具有应用前景的生物活性多肽,来自昆虫类的抗菌多肽具有广谱的抗菌能力,同时不会引起细菌的耐药性,是未来抗生素的主要来源。

(3) 蛋白质类。是最重要的生物工程产品,也是下游技术最主要的分离对象。各种天然或重组激素,包括生长素、胰岛素、促甲状腺素、绒毛膜激素、垂体激素等,干扰素、补体及各种特异性免疫球蛋白制剂等均是下游技术的重要分离对象。针对不同的蛋白质目前开发出了各种行之有效的分离纯化手段。

(4) 酶类。酶是具有催化功能的蛋白质或核酸类生物,在医疗卫生、环境保护、能源、食品和饲料生产及添加剂领域具有重要的作用,是生物工程的主要研究对象和主要应用产品。目前通过基因重组工程生产的酶已逐渐取代通过天然材料提取的酶制剂。由于酶是一类具有生物学活性的大分子物质,容易在提取和应用过程中失活,因此针对酶的分离纯化工艺的研究是下游技术的重要领域。

(5) 核酸及其降解物质,主要包括核酸碱基及其衍生物、腺苷及其衍生物、核苷酸及其衍生物和多核苷酸等,有 60 多种。

(6) 糖类。主要包括常规的单糖、寡糖、多糖及其衍生物,近年来,功能性

低聚糖及功能性多糖在医疗卫生领域的应用日益广泛。

(7) 脂质类。脂类化学结构差异很大,生理功能广泛,主要包括磷脂类、多价不饱和脂肪酸、固醇、卟啉以及胆酸类等。

(8) 小动物制剂,包括蜂王浆、蜂胶、水蛭素等。

(9) 微生物制剂,包括活菌体、灭活菌体及其提取物制成的药物,如微生物肥料制剂、畜牧业饲料用微生物制剂、污水处理用微生物制剂等。

1.2 物质分离纯化的基本策略

生物工程下游技术的实验材料复杂,分离对象多样,因此所采用的手段也就非常繁多、繁杂,但取得好的纯化结果所可以采取的策略却是共通的。

(1) 材料的选择应该遵循容易取得、成本低廉、目标物质含量丰富、细胞容易破碎、有利于采取最简单的工艺过程的基本原则。材料最好是自然界中广泛存在的、容易养殖或种植的动植物,所需要分离的目标产品在材料中应该含量丰富。这可以通过选择不同的生物品种,选择合适的提取组织,选择适当的生长发育时期及适当的生理状态来实现。如果自然界中不存在具有上述条件的材料,还可以通过基因工程的方法改良物种,使其具有高效表达目标产物的能力,现代生物工程的主要任务就是通过基因工程的方法实现有应用价值的生物物质在物种中的高效表达。另外,所选择的材料最好成分相对简单,应尽量减少不容易被去除或容易影响目标产品的分离纯化及产品活性保持的某些杂质。

(2) 提取工艺的选择策略。根据纯化对象的特点及采用材料的性质选择提取和纯化的工艺流程,工艺选择的原则是针对性强、成本低,因此必须尽可能选择简单的提取工艺。首先,根据分离纯化的物质的类型选择相应的提取工艺,如蛋白质和多糖类物质都分别有各自的比较合适的提取工艺可以选择,不能套用。其次,具体纯化对象的性质不同也决定了工艺类型及工艺条件的不同,如蛋白质的分子质量、带电性质、对温度的敏感性、抗原性及其稳定性的不同,决定了选择破碎方法和破碎条件、层析方式、电泳方式的不同,也决定了纯化过程的温度的控制要求。在能够满足提取目标的前提下,尽可能地使用简单而且成本低的工艺过程是非常重要的,因为下游技术的目标就是生产能够被广泛应用的产品,成本的控制始终是个关键环节。

(3) 下游分离纯化工作前的准备策略。首先,必须有细致而全面的调查分析,主要是文献的查阅,工艺的选择及设计,并且必须通过充分地论证。工艺的选择和确定必须是在充分分析讨论的基础上才能实现。开始比较大规模的生产前还必须经过小规模实验,从小规模实验中验证工艺的可行性,并从高效性和成本控制方面对工艺过程进行科学的评估和改良。在此基础上应该形成正式的操作文

件,包括操作指令、操作标准、试剂配方、生产记录规范等都应该准确齐全。其次,进行正式的分離纯化前还应该准备充足的实验和生产设备。要具备生产场所及其配套设施,包括生产用水、蒸汽、压缩空气及其输送管线、空气净化设施、层流罩和超净台等;设备与器具也必须准备齐全,包括各种生物反应器(发酵罐等)、离心机、过滤器、色谱系统、各类容器、检测仪器及相关试剂等;另外,厂房和公共设施设备在生产开始前均须经过安装调试,证明其性能良好。

(4) 分离纯化过程的基本步骤及其次序。一般的生物物质分离纯化过程大致包括以下步骤:①原材料的预处理,处理的目的是将目标产物从原材料中有选择性地释放出来,同时必须确保目标产物的生物性质没有明显的变化,或虽然发生变化但在其后的步骤中可以恢复;②颗粒性杂质的去除,这就是所谓的固液分离过程,最常用的固液分离方式是离心法、过滤法,近年来,在蛋白质的分离领域采用双水相萃取法也是一种很好的选择,可以有效地降低成本,而且可以使一些无法通过离心或过滤方式达到固液分离的材料得到有效的分离;③可溶性杂质的去除和目标产物的初步纯化,通过选择性沉淀、膜过滤、选择性吸附以及萃取等技术,使与目标产物混溶的可溶性杂质大部分去除;④目标产物的精制,层析法和电泳法是精制分离阶段的最常用手段,电泳法分离精度高,特别适合较高纯度物质的制备,但电泳法容易发热造成分离对象的失活,而且上样量一般都比较小,所以不适合作为蛋白质,特别是活性蛋白质的大规模分离纯化手段。层析法是目前最常用也是最有效的生物工程下游精制纯化手段,理论上可以分离纯化绝大多数的生物物质,而且其操作条件温和,特别适合蛋白质的精制纯化过程。

(5) 生物工程下游技术的工艺放大策略及原则。生物工程下游技术工艺放大应遵循从实验到小试生产,再从小试到中试,最后达到大规模生产的次序。不应该在小规模生产尚未完备的情况下就急于大规模放大生产,由于设计缺陷这导致生产效率低下甚至失败的后果。在此过程中,中试是一个关键的阶段。进入中试放大前一般应具备以下条件:①确定并系统鉴定生物材料资源(菌种、细胞株等)的可靠性;②目标产物的收率稳定,即重复性好,质量可靠;③工艺路线和操作条件已经确定,并且已经建立了原料、制品、产品的分析检测方法;④已经进行了物料平衡预算,并且建立了“三废”的处理和监测方法;⑤确定了中试规模及所需要原材料的规格和数量;⑥建立了较完善的安全生产预警措施和方法。

1.3 生物工程下游分离基本过程

1.3.1 实验材料的预处理

为了达到理想的纯化效果,降低生产成本,材料的预处理显得尤为重要。预处理方式选择正确,可使整个下游分离过程更加顺利进行,而预处理的失当可导致分离纯化的效果低下甚至失败。针对不同的材料及不同的纯化目标,采取的材料预处理方式就有所不同。

生物材料的预处理过程一般有以下几个步骤。①动物组织和器官要先除去结缔组织、脂肪等非活性部分,然后采取适当的措施破碎组织细胞,选择适当的溶剂形成细胞悬液。②植物组织和器官要先去壳、除脂、再粉碎,选择适当的溶剂形成细胞悬液。③发酵液、细胞培养液、组织分泌液以及制成的细胞悬液等根据目标产物所处的位置不同进行相应的处理。对于微生物,应注意它的生长期,在微生物的对数生长期,酶和核酸的含量较高,可以获得高产量。

动物细胞培养的产物大多分泌在细胞的外培养液中。微生物代谢产物大多也分泌到细胞外,如大多数小分子代谢产物、细菌产生的碱性蛋白酶、霉菌产生的糖化酶等,分泌在细胞外的产物称为胞外产物。但有些目标产物存在于细胞内部,如大多数酶蛋白、类脂和部分抗生素等,称为胞内产物。随着基因工程技术的进展,许多具有重大价值的生物产品被大规模地通过重组细胞产生,如胰岛素、干扰素、白细胞介素-2等,它们的基因分别在宿主细胞(大肠杆菌或酵母细胞等)内克隆表达成为基因工程产品,其中许多基因工程产品都是胞内产物,植物细胞产物也多为胞内物质。对于胞外产物应采取措施将部分黏附在材料表面的目标产物转移到液相,然后固液分离除去悬浮颗粒(如培养基残渣、菌体、细胞或絮凝剂等),同时还应尽可能改善滤液的性状,以利于后继各步操作。对于胞内产物首先应离心收集细胞,进行细胞破碎,使目标产物溶出到液相中,再通过离心过滤,将目标产物与细胞碎片分离。预处理主要包括除去固体悬浮颗粒、杂质蛋白质、重金属离子、色素、热源和毒素等,主要的方法有凝聚和絮凝,加沉淀剂和调节pH等。

生物材料是很复杂的混合物,常常具有比较大的黏度,不同颗粒的沉降系数有时比较接近,这种情况下颗粒的直径太小,经常使后续的离心或过滤过程非常困难,通过凝聚法或絮凝法,可以很好地改善颗粒的结构,使沉淀和过滤过程能顺利地进行。

凝聚作用是在料液中加入某些电解质,特别是高价位无机离子,促使蛋白质等胶体粒子的扩散双电层结构发生变化,使其排斥电位降低,并使其水化膜被破

坏而聚集成大颗粒。常用的凝聚剂主要有铝盐、铁盐、镁盐和锌盐等高价金属盐。

絮凝作用是加入某些高分子絮凝剂，由于高分子絮凝剂长链的吸附架桥作用，使其聚集成粗大的絮凝团。絮凝剂是一种长链、线状、水溶性的高分子聚合物。如果链上带多价电荷则称为离子型絮凝剂，不带电荷为非离子型絮凝剂。它们依靠静电、氢键、范德华力等的作用，吸附到胶粒表面，由于是长链线状物，一根链可以分别吸附到不同的胶粒表面，产生架桥联结，形成粗大的絮团。絮凝剂可分为三类：第一类为人工合成的高分子聚合物，如聚丙烯酰胺类、聚丙烯酸类、聚乙烯亚胺和聚苯乙烯类衍生物等；第二类是天然高分子聚合物，如壳聚糖和葡聚糖、海藻酸钠、明胶和骨胶等；第三类是无机高分子聚合物，如聚合铝盐，聚合铁等。絮凝过程中絮凝剂的相对分子质量、盐的加量、溶液 pH、搅拌速度和时间等因素都会影响絮凝效果。实际使用过程中常将凝聚和絮凝结合起来，可大大提高效果。

加入沉淀剂，使形成复合物沉淀是一种增加过滤离心效果的重要手段，可去除蛋白质杂质及细胞碎片。在酸性溶液中，蛋白质能与一些阴离子，如三氯乙酸盐、水杨酸盐、钨酸盐、苦味酸盐、过氯酸盐等形成沉淀；在碱性溶液中，蛋白质能与一些阳离子，如 Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 等形成沉淀。发酵液或培养液中的钙、镁、铁等金属离子对后继离子交换过程有干扰，应在预处理时去除。除去钙可采用加入草酸的方法，或加入溶解度更大的草酸钠，反应生成的草酸钙沉淀还能促使蛋白质凝固，提高滤液质量。除去镁离子也可加入草酸，但由于草酸镁溶解度较大，故不能完全去除镁离子。可以加入三聚磷酸钠，使它与镁离子形成可溶性络合物而除去。用磷酸盐处理，也能大大降低钙离子和镁离子的浓度，要除去铁离子，可加入黄血盐，使其形成普鲁士蓝沉淀。

另外，适当调整 pH 可改善物料的状态，如将 pH 调整到蛋白质的等电点，有利于物料的凝聚。有些情况下可利用吸附剂来改善物料的过滤特性，如黄血盐和硫酸锌作用，生成亚铁氰化钾胶状沉淀，可吸附杂质蛋白质，生成粗大的沉淀而比较容易去除。

1.3.2 蛋白质的提取

大部分蛋白质都可溶于水、稀盐、稀酸或碱溶液，少数与脂类结合的蛋白质则溶于乙醇、丙酮、丁醇等有机溶剂中，因此，可采用不同溶剂及不同方法将材料中的目标物提取出来。稀盐和缓冲系统的水溶液对蛋白质稳定性好、溶解度大、是提取蛋白质最常用的溶剂，通常用量是原材料体积的 1~5 倍，提取时需要均匀地搅拌，以利于蛋白质的溶解。提取的温度要视有效成分性质而定。一方

面,多数蛋白质的溶解度随着温度的升高而增大,因此,温度高利于溶解,缩短提取时间。但另一方面,温度升高会使蛋白质变性失活,因此,基于这一点考虑,提取蛋白质和酶时一般采用低温(5℃以下)操作。为了避免蛋白质在提取过程中的降解,可加入蛋白水解酶抑制剂(如二异丙基氟磷酸、碘乙酸等)。一些和脂质结合比较牢固或分子中非极性侧链较多的蛋白质和酶,不溶于水、稀盐溶液、稀酸或稀碱中,可溶于乙醇、丙酮和丁醇等有机溶剂,它们具有一定的亲水性,还有较强的亲脂性,是理想的脂蛋白的提取液,但必须在低温下操作。丁醇提取法对一些与脂质结合紧密的蛋白质和酶的提取特别优越,一是因为丁醇亲脂性强,特别是溶解磷脂的能力强;二是丁醇兼具亲水性,在溶解度范围内不会引起酶的变性失活。

1.3.3 蛋白质的纯化方法

在做纯化前对自己的目标物质特性了解越多对纯化将会越有利,可以通过电泳知道目标物质和杂质的情况,此外在纯化前必须先建立可靠的活性测定的方法。如果是未知的蛋白质,通常可以利用蛋白质的溶解度、分子质量、带电性质等的差异进行分离纯化。

1.3.3.1 根据蛋白质溶解度不同的分离方法

1) 蛋白质的盐析

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,蛋白质的溶解度不同程度下降并先后析出,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。

影响盐析的因素有以下几种。

(1) 温度:除对温度敏感的蛋白质在低温(4℃)操作外,一般可在室温中进行。一般温度低蛋白质溶解度降低。但有的蛋白质(如血红蛋白、肌红蛋白、清蛋白)在较高的温度(25℃)比0℃时溶解度低,更容易盐析。

(2) pH:大多数蛋白质在等电点时在浓盐溶液中的溶解度最低。

(3) 蛋白质浓度:蛋白质浓度高时,欲分离的蛋白质常常夹杂着其他蛋白质