

第一部分 蛋白质的分离

第 1 章

测序用蛋白质的纯化

D. A. Kyriakidis

1.1 引言

在过去的 10 年中，蛋白质纯化的生物化学方法已经变得如此专门化和复杂化，以至对于一些初学者，如刚从大学毕业的学生或者其他领域的专家们来说，要掌握所有的微小地方和重要细节而取得成功的纯化是困难的。应当经常记住，为了纯化某一特定的蛋白质，可以有多种不同的方法，如果一种方法行不通，可以尝试另一种方法。

我将不打算讨论在这一领域中的所有的最新进展，因为已有人在其他地方对此作过很好的论述（Harris and Angal 1989, 1990; Scopes 1994），但对蛋白质纯化的一些基本准则将会提到，蛋白质纯化的某些最近的进展也会被讨论。

1.2 蛋白质纯化的准则

为了成功纯化一个蛋白质，需要有一个根据背景知识和下述准则建立起来的合适的策略（Harris and Angal 1989）：

- 什么是最好的来源？

一般来说，值得在找寻蛋白质丰富来源方面花一些时间，对于来源的是否方便得到和来源的量都必须考虑。过去，在实验室中经常是从牛肝、鼠肝或者其他动物的肝脏中得到大量的蛋白质。现在，大多数生物化学家则是采用培养的细胞如细菌、酵母或哺乳动物细胞。目前，利用基因克隆的长处，所需要的蛋白质可以通过表达来大量得到，从而使得纯化方法更具有意义。

- 关于蛋白质我们已知什么？

如果一个蛋白质过去已经从不同的来源纯化得到，它的很多信息可以应用到新来源的蛋白质。例如：分子的大小、定位、等电点、疏水性及翻译后的修饰等，应该保持相同。如果蛋白质是一个酶或受体，则根据该蛋白质与底物或配体的关系可以制定出一个成功的纯化策略。

- 蛋白质需要有多纯？

蛋白质纯化的程度通常是取决于它最后的用途。如果蛋白质是供研究用的，则它

应该是非常纯的，如果蛋白质是用于工业的，部分纯化就足够了。

- 纯化蛋白的量要多少？

对于活性研究用的，只需要比较少量的活性蛋白质，而对于进行结构研究用的蛋白质来说，则需要比较大量的高纯度蛋白质。

- 蛋白质应该如何进行鉴定？

在蛋白质纯化过程中，为了进行蛋白质的追踪，必须有一个快速、重复性好而且灵敏的鉴定方法。此鉴定方法还应该是经济的，能在小体积下进行操作，而且不要求采用昂贵的仪器。

- 纯化时间应该多长？

纯化步骤应该很快，以减少活力的丧失和降解等。一般来说，蛋白质的量在纯化过程的各步中会有损失，因此应当尽量减少纯化步骤，以期获得最大的产率。

- 什么是最终花费？

对于商用蛋白质来说费用和时间非常重要。

- 如何纯化蛋白质？

为了纯化某一种蛋白质，可以有多种方法。老的方法包括用盐使蛋白质沉淀、改变抽提液的 pH、吸附、阴离子交换和凝胶过滤等技术；新方法包括有 HPLC 和 FPLC 柱、亲和吸附、免疫亲和柱以及已有综述谈到的许多其他的技术（Harris and Angal 1989, 1990; Scopes 1994）。这些新的技术使得许多很难于纯化的蛋白质都能被纯化。因此在任何一个纯化开始之前，所有上述的问题都应该给以充分的考虑。

1.3 重组蛋白质的纯化

转化细胞中的蛋白质纯化近来已变得时髦起来，几乎与从天然来源中的蛋白质纯化同样普遍（Harris and Angal 1990; Scopes 1994）。前一种方法包括有许多步骤，但最需要考虑的关键点有：

- 1) 特定基因的分离
- 2) 所需要蛋白的高表达（高拷贝质粒、强启动子和诱导表达）
- 3) 从重组细胞中进行纯化的方法是否适用

在细菌宿主细胞中表达的重组蛋白一般可能是胞外蛋白、膜结合蛋白、脑内蛋白或者是包涵体形式（Harris and Angal 1990; Scopes 1994）。重组蛋白的纯化有许多优点，因为它有可能改变蛋白质在起始抽提液中的水平。而且分离除去杂蛋白的技术也与传统纯化方法中所用的基本相同。

不幸的是，所得到的重组蛋白一般不是得到活性的形式（Schein 1989）。高表达的真核和原核的不溶蛋白，即包涵体，像 6mol/L 尿素或 8mol/L 盐酸胍这类强的离液剂

所溶解，然后在除去变性剂的过程中或过程之后实现正确的折叠（Marston 1986; Marston et al. 1988）。人们也可能通过直接加入亲和树脂来纯化包涵体蛋白而不需要变性和复性的步骤（Hoess et al. 1988）。包涵体蛋白纯化时所碰到的问题有：① 变性剂（尿素或胍）使用起来不太令人喜欢，而且价钱较贵。它们能够引起蛋白质结构的不可逆修饰，从而导致给除了免疫系统以外的所有其他分析数据带来一些假象。② 必须在很稀的蛋白质浓度条件进行复性，因而蛋白质需要再浓缩（Marston 1986; van Kimmenade et al. 1988），而重浓缩这一步会由于蛋白酶的降解而导致复杂化并发生蛋白质的进一步沉淀。③ 重折叠复性会导致引起蛋白质的异构化，并造成蛋白质在保存时产生沉淀。

最近发展了一种制造融合蛋白的新技术，这一方法的优点是：① 改进了蛋白质的稳定性。② 这些性质的改善使得能够从培养抽提液中分离蛋白质。③ 加快了分离。④ 使得生物工程公司生产大量的酶或高纯度的药物能够获得应用。

如果一个蛋白质的表达水平较低或者纯化过程复杂，则应该制备融合蛋白（Scopes 1994; Schein 1989）。一般来说是将编码蛋白的基因 DNA 与融合 DNA 在上游或下游相连，为了简化纯化步骤，用作融合蛋白的肽链部分可以采用多聚精氨酸或多聚组氨酸（在 C 端）蛋白 A 或谷胱甘肽转移酶（GST）。因此纯化步骤可以通过离子交换柱（对多聚精氨酸）、免疫亲和柱（配基 IgG）或底物亲和层析柱（谷胱甘肽）很容易地实现。融合的部分则可以通过适当的蛋白酶降解除去（如果编码蛋白的羧末端接的是多聚精氨酸，还可以通过羧肽酶 B 降解除去）而得到天然蛋白（Scopes 1994; Sassenfeld 1990; Enfors 1992）。

1.4 膜结合蛋白的纯化

从膜上提取蛋白有许多困难（Harris and Angal 1989, 1990; Scopes 1994）。在多数情况下，都是采用去垢剂将疏水蛋白从其膜结构中溶解下来，然后将蛋白质稳定。去垢剂的选择通常是依据它对所需要蛋白质的提取效率来确定，但在某些情况下还要考虑到以后的纯化步骤（Scopes 1994）。采用小体积的少量去垢剂较好，采用高的严格的胶束浓度的去垢剂如乙烷基葡萄糖苷可以改善纯化步骤，最有效的去垢剂是强离子性的硫酸盐，如十二烷基硫酸盐（SDS）和阳离子去垢剂，如十六烷基-三甲基铵溴化物。在去垢剂的存在下，纯化主要是根据蛋白质分子量的大小用凝胶电泳进行分离。

虽然许多膜蛋白必须在去垢剂存在下进行纯化，但最终可能仍需要除去去垢剂（Buse et al. 1986）。在许多场合这将会引起蛋白质失活，但若蛋白质是用于测序的，它将不是一个问题。也可采用能够吸附去垢剂的疏水珠（Furth 1980）。

膜蛋白可以划分为两大类，即外膜蛋白（外源膜蛋白）和内膜蛋白（内源膜蛋白）。

外膜蛋白是通过与其他蛋白或暴露的磷脂区之间的相互作用而结合在膜上。这时通过缓冲液离子条件的改变或在比较富有弹性的条件下引入一定程度的变性作用，可以使这类膜蛋白从膜上解离下来。这里应该强调，外膜蛋白结合得比较松，一旦解离下来之后，不需要去垢剂或其他溶解剂即可保持在缓冲液中，因此，这类蛋白质当其一旦被提取出来并除去所用的去垢剂之后，即可像其他可溶性蛋白质的纯化一样进行纯化。在所有的膜的操作中，都应加入蛋白酶抑制剂，因为蛋白酶可因 EDTA 或巯基（-SH）试剂等

的存在而被活化、为了防止不可逆的蛋白变性作用，缓冲液的 pH 值应保持在 6~8 之间，而且所有的操作都必须在 0℃ 下进行。

整合的膜蛋白是与脂双层膜的疏水部分相接触。根据它们在结构上与脂双层接触的比例可分为四类。对于可溶性整合膜蛋白的纯化，需要将多肽链从其锚靠的膜上分离出来 (Harris and Angal 1990; Scopes 1994)。

— 第 I 类：通过一个或两个跨膜的蛋白片段整合进膜。

— 第 II 类：利用与脂肪酸或脂的共价结合。

对于这两类膜整合蛋白，脂双层仅仅是起了一个结构支持物或者是定位化和组织化的作用，属于这类蛋白的例子是许多酶类，如肽酶、酯酶和磷脂酶等。这两类蛋白与膜的分离可以采用蛋白酶或磷脂酶 C 和 D 处理来实现。用磷脂酶 C 处理时，一般将二乙酰甘油留在脂双层上；而用磷脂酶 D 处理时肌醇连接蛋白被释放出来，而将磷脂酶后面的部分留了下来 (Harris and Angal 1990; Penefsky and Tzagoloff 1971)。当用磷脂酶时需要特别注意，长时间的保温会造成膜蛋白分子内的肽链被降解。

— 第 III 类：含有一个跨膜片段。第三类蛋白的全部生物活性不仅决定于两个亲水结构域，而且也决定于跨膜片段，这类蛋白包括各种受体，生长因子和 LDL 蛋白。在水相中呈球状蛋白的部分可以通过蛋白酶的水解而与分子的其他部分断开而得到。在此条件下，胞外结构域仍可能保留配基结合活性。

— 第 IV 类：这类蛋白跨膜好几次，整个结构中有很大大一部分是在疏水相中，作为这类蛋白的例子有转移蛋白、受体和视紫红质类蛋白。虽然蛋白酶能够从这类蛋白中切出能够溶于水相的片段，但要溶解跨膜片段则需要有机溶剂、去垢剂或离液剂。膜部分或亚细胞器可以用多种方法分离，最成功的是用密度梯度离心。

膜组成部分或亚细胞器，可用若干不同的方法分离，其中最成功的是离心，通常用密度梯度离心。其他的方法包括有机溶剂双相分配、高压自由电泳、免疫亲和层析或凝胶过滤层析 (Scopes 1994)。分离可溶形式的膜蛋白可以通过下述一种或多种处理相结合的方法来实现 (Penefsky and Tzagoloff 1971)。超声、金属螯合试剂 (1~10 mmol/L 的 EDTA, EGTA)、温和的碱处理 (pH8~11)、高离子强度 (1 mol/L NaCl)、磷脂酶处理等。膜蛋白的活性不应该丧失并应以可溶形式在溶液中保持活性。因此，发展新的去垢剂或层析树脂对于成功地纯化这类疏水蛋白是很需要的。

(陈常庆译)

参 考 文 献

- Buse G, Steffens GJ, Steffens GCM, Meinecke K, Hensel S, Reumkens J (1986) Sequence analysis of complex membrane proteins (cytochrome c oxidase). In: B. Wittmann-Liebold et al. (eds) *Advanced methods in protein microsequence analysis*. Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp 340-351
- Enfords SO (1992) Control of in vivo proteolysis in the production of recombinant proteins. *Trends in Biotechnol* 10: 310-315
- Furth AJ (1980) Removing unbound detergent from hydrophobic proteins. *Anal. Biochem* 109, 207-215
- Harris ELV, Angal S (1990) *Protein purification applications: a practical ap-*

- proach, IRL, Oxford
- Harris ELV, Angal S(1989) Protein purification applications: a practical approach. IRL, Oxford
- Hoess A, Arthur A K, Wanner G, Fanning E (1988) Recovery of soluble, biologically active recombinant proteins from total bacterial lysates using ion exchange resin. *Biotechnology* 6: 1214-1217
- Marston FLA, Angal S, Lowe PA, Chan M, Hill CR (1988) Scale-up of the recovery and reactivation of recombinant proteins. *Biochem Soc Tran.* 16: 112-115
- Marston FAO (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *E. coli*. *Biochemical J* 240: 1-12
- Penefsky HS, Tzagoloff A (1971) Extraction of water soluble enzymes and proteins from membranes. *Methods in Enzymol* 22: 204-219
- Sassenfeld H M (1990) Engineering protein for purification. *Trends Biotechnol* 8: 88-93
- Schein CH (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Biotechnology* 7:1141-1149
- Scopes RK (1994) Protein purification: principles and practice (3rd edn). Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 1-380
- van Kimmenade A, Bond M W, Schumacher JH, Laquoi C, Kastelein RA (1988) Expression, renaturation and purification of recombinant human interleukin 4 from *E. coli*. *Eur J Biochem* 173, 109-114

第 2 章

蛋白质的亲和层析

H. Wombacher, L. Jacob

2.1 背景和短评

分子间的专一性相互作用是所有生物学过程的基础。特别是蛋白质同特异结合组分之间的相互作用已经相当明确，即酶与底物、激活剂和抑制剂之间的相互作用，抗体与抗原之间的相互作用以及某些蛋白与 DNA/RNA 的特定区域之间或者受体与其对应的效应分子如激素和递质（transmitters）之间的相互作用。亲和层析技术即是建立在此生物特异亲和性的基础之上。固定在层析介质骨架上的结合分子称为配体，要纯化的蛋白称为反配体或目的蛋白。目的蛋白通过它表面上的生物功能位点，特异并可逆地结合在固定的配体上。因此，利用蛋白质的特异结构，亲和层析可以使大多数蛋白纯化到接近单一的组分（综述参阅 Scouten 1981；Wilcheck et al. 1984）。

2.1.1 亲和作用和配体的分类

固定在固相载体上的配体应该具有与目的蛋白能够选择性地结合并形成稳定复合物的能力。选择性地结合形成复合物的稳定性很主要地是取决于配体与蛋白质结合位点之间结合的紧密程度，但考虑到结合的特异性，起决定性作用的是弱相互作用力，即范德华作用力，其键强度与距离的 7 次方成反比¹⁾。由于这个理由，足够强的结合要求配体能精确地嵌合在结合位点内，此外，从动态上考虑，精确的强的结合也可以通过构象的改变来得到进一步加强，这种构象上的改变有时也称为诱导契合。在多数场合，结合常数（ K_a ）的范围在 $10^5 \sim 10^8 \text{ M}^{-1}$ 时，最适合用于亲和层析过程。当亲和力过低时，与目的蛋白的相互作用不强，在层析过程中拉不牢目的蛋白，结果是选择性过低。如果亲和力太高，蛋白质的洗脱需要用激烈的和苛刻的，有时甚至是变性的条件。此外，目的蛋白在柱上有很强的结合并不意味着是特异的结合，还必须考虑到在目的蛋白同层析介质之间可能存在着很强的非特异性的吸附结合力，它们可能与特异结合力之间是重叠的或者是相加的，就这个关系来说，特异结合是指局限在蛋白质表面结合位点上的那种吸附。

为了更容易理解的目的，配体被划分成单特异性的或组特异性的，它们进一步还可

1) 这里可能是指作用力，如果键强度是以能量计算，则应是与距离的 6 次方成反比。——译者注

区分为低分子^小配体或高分子量（大分子）配体。

单特异性配体

它是指这样一类配体，即只结合一个或者很小数量的蛋白质，甾体激素和酶抑制剂即属于这类配体。一个很熟悉的例子就是低分子量的生物素配体（生物素-抗生物素蛋白/链酶抗生物素蛋白的 $K_d = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ）。这个高度特异的强的结合在类似于 AFC 的生化方法中已经成为一个很有用的工具（参阅 Wilchek and Bayer 1990）。

大分子的单特异性配体

抗体-抗原结合是大分子单特异性配体及其目的蛋白的最重要的例子。抗体作为连接在层析介质上的配体，对于纯化可溶蛋白、多肽、溶解的膜蛋白，甚至病毒和细胞来说是一个很有用的工具。随着现代杂交瘤技术的出现，多克隆抗体制备能够用单克隆抗体代替（有关的实践和理论可参阅 Peters and Baumgarten 1989）。对于任何一种抗原蛋白，即使它在总的免疫原中只有非常低的浓度，都有可能得到高度特异性的抗体。选用适当的筛选方法能够得到制造所需要特异性和亲和性的抗体的杂交瘤细胞（Tijssen 1985）。当将这类抗体固定在适当的层析介质上以后，就能够纯化所需要的抗原。

组特异性配体

组特异性是指这样一类配体，像辅酶、维生素/辅因子或它们的类似物，它们可以同几种不同蛋白的共同位点相结合。组特异性配体包括 ATP 和 NAD，其靶蛋白有辅因子依赖的酶，如 NAD 和 NADP 依赖的脱氢酶。

大分子组特异性配体

凝集素和一些免疫球蛋白结合蛋白可以看成是组特异性的大分子配体，固定化的凝集素对于糖基是高度特异的。例如，伴刀豆球蛋白（ConA）是通过与 α -D-甘露吡喃糖基、 α -D-葡萄糖吡喃糖基及立体相关基团的结合来纯化某些糖蛋白，葡萄球菌蛋白 A 和链霉素蛋白 G 是抗体亲和层析中的特异配体（表 2.1）。

表 2.1 蛋白 A、蛋白 G 和果胶 EMD TA 的抗体结合特征

抗体	果胶 EMD TA	蛋白 A	蛋白 G
人 IgG1	+	+	+
人 IgG2	+	+	+
人 IgG3	+	-	+
人 IgG4	+	+	+
人 IgM	+	+	-
人 IgA	+	+	-
小鼠 IgG1	+	弱	+
小鼠 IgG2a	+	+	+
小鼠 IgG2b	+	+	+
小鼠 IgG3	+	-	+
大鼠 IgG1	+	弱	+

续表

抗体	果胶 EMD TA	蛋白 A	蛋白 G
大鼠 IgG2a	+	-	+
马 IgG	+	-	+
山羊 IgG	+	+	+
鸡 IgG	+	-	-
牛 IgG	+	弱	+
兔 IgG	+	+	+
羊 IgG	+	-	+
狗 IgG	+	+	-
猪 IgG	+	+	+
猫 IgG	+	+	-
鸡 (yolk) IgY	+	-	-
重组抗体: scFv	+	-	-

2.1.2 假生物特异性亲和作用和人工配体

一些特殊人工化合物，如蒽醌或偶氮染料，由于它们对多种不同的蛋白如脱氢酶、激酶、转移酶、还原酶等都具有亲和性，因而能够成功地用作配体以纯化这些蛋白质。在某些情况下，所谓的生物模拟相互作用被认为是由于人工配体对在各种蛋白上进化过程中保持不变的二核苷酸折叠（dinucleotide-fold）区选择性地结合的结果，虽然对其与蛋白质的相互作用还没有搞清楚，但这类亲和层析则已非常普遍（Scopes 1987）。假亲和层析，也称为假生物特异性亲和层析，是指人工配体与蛋白质特定基团之间的特异相互作用，在这个意义上来说，甚至也可以包括称为共价层析的配体，如硼酸衍生物和某些糖蛋白之间的共价结合。一般来说，假亲和层析包括了以生物模拟配体为基础的各类吸附层析。

固定化的金属离子亲和层析 / 亲硫吸附层析

固定化的金属离子亲和层析（IMAC）（Porath and Olin 1983；综述可参阅 Kagedal 1989）和亲硫吸附层析（TAC）（Hutchens and Porath 1986）是假亲和层析的重要例子。TAC对于免疫球蛋白的纯化比用蛋白 A 作为配体的亲和层析在实用上更有长处。关于 IMAC 和 TAC 的长处及其成功的应用将在 2.2 中说明。

2.1.3 层析载体

作为一个亲和层析载体的基本要求（参阅 Mohr and Pommerening 1985；Narayan and Crane 1990）是：① 具有亲水和中性的骨架；② 好的化学、力学、生物学和热稳定性；

带有附加的功能团如 -OH、-NH₂、-COOH 和 -CHO 等，它们能通过各种化学反应进行衍生化。特别是对于蛋白质的纯化来说，最好是采用大孔载体。琼脂糖，特别是稳定的交联型琼脂糖是最常用的载体。它具有作为蛋白质亲和层析理想载体的许多特性。载体

的孔状性质或多或少影响扩散物质的转移。这在蛋白质的亲和层析中与目的蛋白的结合和解离的动力学性质一样，都是很重要的。以丙烯酸胺、聚乙烯、聚苯乙烯及由合适的单体形成的特定共聚体为基础的合成高分子，为发展接近理想的带有或不带有固定化所需要的活性基团的载体奠定了基础。除了好的化学和物理学稳定性以外，下面的几种载体也提供了高的大孔性质：Eupergit (Fluka, Neu-Ulm, 德国)、Spheron (Waters, Milford, MA, 美国)、TSK (Tosohas, Philadelphia, PA, 美国) 和果胶 (Merck, Darmstadt, 德国)。此外，最近已经发表了一种用羟基化高分子涂壳的新的改良乙烯苯/二乙烯苯载体。它消除了常规层析中物质转移瓶颈 (Regnier 1991)。这个载体的商品名是 POROS，可以从 PerSeptive Biosystems 公司 (Cambridge, MA, 美国) 买到。

2.1.4 固定化方法

配体在载体物质上的固定化经几个步骤完成 (方法的详细步骤参阅 Hermanson et al 1992; Carlson et al. 1995; Dean et al. 1985; Wong 1991)。

载体的活化

像 BrCN、羰基二咪唑、甲苯磺酰氯或三氟乙酰磺酰氯、双环氧乙烷、氯甲酸酯、二乙烯基砜和胍等化学试剂 (注意：有的情况下需要特别的安全保护措施) 可用来衍生载体的功能基团。使得产生的亲电基团可以同配体的亲核基团 (如 -OH, -NH₂, -SH) 反应，或者相反。而且已有好几种预先活化好的层析载体可以买到商品，特别是如果需要考虑化学和物理学稳定的大孔性质，则可以选择合成的高分子，如 Fractogel EMD Epoxy 650 或 Fractogel EMD Azlactone 650 (Merck, 德国)。高容量的活化的环氧乙烷基团或吡内酯基团，通过多点连接在线性高分子链 (被称为触角) 上而嫁接到 Fractogel 材料上，同传统的间隔链 (spacer) 技术相比，这种方法对于偶联配体的容量和柔性及蛋白质结合过程都具有一定的优越性，特别是能避免蛋白质和高分子表面之间的非专一性结合 (见 2.2)。

配体的偶联

稳定的共价连接多数都是通过配体对活化的载体材料进行亲核进攻来实现的，随后，配体被看成是被固定化的。例如，以环氧乙烷或吡内酯活化的载体材料，形成的是非常稳定的醚键和极其稳定的酯键。相反，BrCN 活化的载体材料则形成很不稳定的碳亚氨基的结合，再者，在常用的 pH 条件下还产生一种不需要的带电荷的亚氨基。

间隔手臂

若选用小分子作为配体连接在像蛋白质这样的大分子上，则建议采用所谓的间隔手臂。这是将一个两端均带有功能团的短的线状脂肪烃链先连接在载体上，并保持末端的游离功能团，它可以通过适当的化学方法与配体偶联。采用间隔分子来偶联小分子配体的主要理由是因为蛋白质与配体结合的位点往往是埋在分子内或者处在低于分子表面的口袋里。直接连接在载体上的配体不可能伸出足够的距离以接触到远离的要结合蛋白

表面的结合位点。因此非常重要的考虑不仅是被固定在载体上的配体绝对数目，而且还需要考虑到它们的可结合能力，因而配体和载体间的间隔分子（或者是在 Fractogel EMD 中所谓的触角），对于改善对目标蛋白的特异性结合，并从而提高对目标蛋白的结合容量是很有帮助的。一个适当的间隔分子也可以阻碍蛋白分子对载体材料表面的非特异性吸附

定点固定

定点固定（site-directed immobilization）是偶联过程中的一个重要问题。下面的例子即可说明这一点。十分明显，一个二价抗体，只有当抗体分子通过碳氢部分合适地结合在载体上面留下可与抗原相互作用的游离的位点，该抗体的结合潜力才能被充分显示出来。有关在远离抗原结合位点进行共价连接的合适固定的化学问题，Hermanson 等人（1992）早已做过深入的介绍。也有定点固定化是成功地先结合靶蛋白的例子，只有当细胞色素 c 恰当地定位并固定在载体上时，细胞色素 c 氧化酶才能用以细胞色素 c 作为生物功能性配体的亲和层析纯化。

残留活化基团的封闭

在进行亲和层析之前，残留在载体上的活化基团，必须加以失活，这可以通过采用过量的亲水性的低分子量化合物如乙醇胺来实现，但必须避免引入正（ NH_3^+ ）或负（ $-\text{COO}^-$ ）电荷，因为它们能够造成不需要的离子交换作用，而且这种作用与 pH 有关，而且也应当防止由于封闭试剂所引起疏水性的增加。

2.1.5 层析操作

样品制备

虽然一步纯化的步骤可能是诱人的，但预处理步骤总的来说还是具有一定的优点：

① 颗粒、细胞碎片、膜片段等的除去；② 样品浓缩及除去蛋白酶或其抑制剂。通过蛋白质沉淀或离子交换柱层析对样品进行预处理，很容易除去许多不需要的杂质。在此过程中，速度和回收率是关键的因素，一般来说，不需要有浓缩步骤。

结合步骤

目标蛋白对配体的特异性结合需要最适的 pH、缓冲液盐浓度和离子强度。但很明显，pH 能够调节目标蛋白分子也可能还包括配体分子的电荷基团，因而在结合过程（以及解吸步骤）中具有决定性的作用。

- 中等盐浓度（0.1 ~ 0.15 mol/L NaCl）能够稳定溶液中的蛋白质并防止由于离子交换所引起的非特异性相互作用。
- 去垢剂（如 Tween-20）能够用作保护添加剂以降低由于载体材料的疏水性以及固定化的化学因素和（或）间隔分链（spacer）的性质所引起的非特异性相互作用。
- 很高的盐浓度（例如高达 2 mol/L 的硫酸铵）能特异性地提高配体和靶蛋白的疏水相互作用。

- EDTA (约 10 mmol/L 左右) 用于稳定蛋白质中能够被重金属催化氧化的 -SH 基。
- 结合缓冲液组成的优化往往也是减少亲和层析中非特异性结合的关键。

柱操作

柱的大小决定于吸附剂的容量和所需要纯化蛋白质的量。一般来说, 高的容量可以用于粗的短柱, 在多数情况下, 可以采用一次性的塑料小柱 (例如从美国市场上买到的 Bio Rad 和 Pierce 的产品) 和 1 ~ 5 ml 凝胶。柱和柱顶及柱底多孔板的疏水性质 (聚苯乙烯和聚丙烯) 用 0.1% 的 Tween-20 溶液处理消除。但若靶蛋白通过低结合强度 ($K_d < 10^4 \text{ M}^{-1}$) 被滞留在柱材料上, 则可以采用较长的柱。此时, 所需要蛋白与非结合杂质的分离严格取决于柱的长度。

流速

为了使纯化蛋白能够得到尖的洗脱峰和最小稀释度与最大回收率, 则最好使用低的流速。太高的流速会降低分离效果和容量, 因为它需要长的时间来达到新的平衡。另一方面, 特别是当用可溶性的配体 / 类似物来进行竞争性洗脱时, 解离动力学可能成为速率限制步骤。对于一级反应来说, 解离速度常数同蛋白的结合强度间接相关 (即半衰期 $= \ln 2 / k - 1$)。另一方面, 载体材料的大孔性程度又会导致显著的物质转移限制, 根据靶蛋白的分子量和形状的不同而异, 为此, 在竞争试剂上柱之后, 特别是对靶蛋白在柱上结合得很紧的情况, 停止洗脱 0.5 ~ 2 小时, 有时可能会取得好的效果。总的来说, 通过亲和柱的线性流速必须进行优化以达到最大的结合容量和最佳的分离。大多数的亲和柱都是在 (或) 接近于最佳结合水平于重力流速下进行操作的, 而 HPLC 则只能用于有足够抗压能力的层析材料。此外, 大孔载体材料往往有稳定性不够的缺点, 虽然某些合成载体材料, 如 Fractogel, 具有足够的物理稳定性, 因而能够适用于较高的压力 (见 2.1.3)。

淋洗

样品吸附在柱上之后, 必须用几倍体积的起始缓冲液对柱淋洗以除去不结合的所有物质, 以静电作用吸附在柱上的非特异性结合物质, 可用稍微增加离子强度的缓冲液淋洗去掉。整个淋洗过程用紫外进行监测, 当紫外吸收达到原始的基线时, 结束淋洗。

洗脱步骤

洗脱条件的选择像决定最佳结合条件一样同等重要。一个最佳的洗脱条件可以使靶蛋白在最小的体积内达到完全的回收。一般来说, 靶蛋白的生物活性也必须保持不变。最基本的方法是用中等浓度 (0.2 ~ 1 mol/L 左右) 的可溶性配体或类似物在比较温和的解吸条件下 (例如中性 pH) 竞争性地置换结合蛋白。洗脱方法是逐步性的, 采用梯度或分步洗脱, 可是, 特别强的结合, 如生物素-抗生物素蛋白 (biotin-avidin) 复合物 ($K_d = 10^{15} \text{ M}^{-1}$) 的情况, 对于这种解吸方法是耐受性的, 在这种情况下, 除了用高浓度的可溶性配体洗脱外, 则需要 6 mol/L 盐酸胍和 pH1.5 这种比较苛刻的条件, 使得复合物能够在合理的时间内解离。原则上来说, 溶剂的组成对亲和常数有很大的影响。这对于

结合和洗脱来说都是必须加以考虑的。因此，适当改变缓冲溶液对于实现特异性的竞争性洗脱将会是有效的。事实上，在很多场合，特异性洗脱剂完全可以用所谓的非特异性洗脱液代替。当然，人们还必须在洗脱液的苛刻性和引起靶蛋白的变性危险之间进行折衷。下面列举了几种逐渐增加洗脱条件的步骤：

- 改变 pH 和（或）离子强度：例如，可以用 NaCl 梯度来洗脱，这主要是用于通过特异的静电相互作用所结合的蛋白质。
- 如果配体和靶蛋白之间主要是疏水相互作用，而且改变 pH 的结果不够有效，则需要用更激烈的条件，如加入乙二醇（到 60%）或 DMSO（到 10%）以降低水溶液的极性。其缺点是这类试剂对粘度有影响而且对多糖结构也有作用。
- 也可以采用高浓度（到 3 mol/l）的离液盐（如 KSCN 或 KI）和（或）中偏高浓度（4 ~ 6 mol/l）的变性剂（如尿素或胍盐）。这类盐能够影响 Eriksson (1989) 曾经讨论过的，遵循 Hofmeister 系列的疏水作用。
- 去垢剂也能很有效地作用于疏水结合部位，但它们只能在恰好低于临界的胶态点的浓度下使用，就这个关系上应该指出，在整个纯化过程中特别是在纯化膜蛋白的时候，采用低浓度的去垢剂是会有帮助的。去垢剂可以抑制对柱壁和柱材料的非特异性吸附，并能阻止不希望的蛋白质聚合作用。

当靶蛋白用特异性的或非特异性的或者两者兼而有之的方法洗脱下来之后，必须经过透析或者凝胶过滤以除去洗脱液，如果必要的话，还必须恢复天然构象。

柱的再生

用几倍柱体积的起始缓冲液进行再平衡，一般即足以使亲和柱再生，但一些未知的杂质往往仍结合在柱上，必须用苛刻的处理才能除去，但这会因载体材料的稳定性、配体的性质以及它与载体共价连接的方式不同而受到一定的限制。

2.2 特殊应用及其实验步骤

2.2.1 固定化金属螯合亲和层析

原 理

这种高效纯化方法的基础是共价结合在层析载体上的金属离子螯合剂能与表面含有组氨酸残基的蛋白质相互作用 (Porath et al. 1975; Sulkowski 1985)。Fractogel EMD 是选用亚氨基二乙酸作为金属螯合配体，其两个齿状螯合部分在固定化后仍保持自由状态，因而各种金属离子就能结合到静止相上，而特殊的蛋白质或肽就能通过金属离子的自由配位点结合上去。亚氨基二乙酸是以共价形式高密度地固定在连接臂（即前面讲到过的触角）上，从而保证了高度的亲水性、柔性和结合容量。触角比传统的间隔链分子优越，因为它对蛋白质的结合容量显著增加，例如，对溶菌酶的结合容量大约是 60mg/ml 铜螯合凝胶。另外，由于固定化配体的高度柔性，使金属离子更容易结合在蛋白质表面的结合位点上，有利于络合物的形成，并使蛋白十分牢固地结合在 Fractogel EMD 螯合介质上。当然，蛋白质表面组氨酸残基的结合能力，对于结合蛋白质也十分重要 (Hemdan et al. 1989)。

对肽来说， α -氨基也能起到决定性的作用，即使没有组氨酸残基存在也能起到滞留多肽的作用。也有报道认为，其他结合金属的氨基酸，如半胱氨酸和色氨酸也对蛋白质的结合有作用 (Hansen and Lindberg 1992, 1995)。

重组蛋白质

由于分子生物学的进步，已经能够将组氨酸残基插入蛋白质序列，这些修饰的蛋白质可以被认为是 IMAC 很有希望的纯化对象，能减轻一些重组蛋白纯化的工作量。在必要的时候，蛋白质的融合部分可以在纯化以后用化学或特异性的酶法切除掉。

层析条件

由于组氨酸的 pK 值关系，蛋白质在 Fractogel EMD 螯合柱上的结合，一般在中性 pH 值下进行，但真实的 pK 值可能会因蛋白质的其他邻近氨基酸残基的影响而变化很大，最多可超过 1 个 pH 单位。因此， pH 值 8 的缓冲液通常可以提高蛋白质的结合量，但有些缓冲液在此 pH 值范围内不适用，例如，含 Tris 的缓冲液会降低亲和力，因而它只用于和亲和介质相互作用十分强的蛋白质。从理论上讲，应避免在吸附步骤中使用像咪唑、组氨酸或甘氨酸等能与蛋白质 / 多肽竞争结合金属离子的物质，但它们显然很适用于洗脱步骤。蛋白质和羧基之间可能会发生一定的离子相互作用，它会阻止蛋白质与金属络合物的结合，故所有螯合柱的操作最好使用高离子强度的缓冲液，0.5 ~ 1 mol/L NaCl 就足够了，有时甚至 0.1 mol/L NaCl 可以。洗脱时可使用竞争性分子和（或）通过改变 pH 值来置换蛋白质，蛋白质从柱子上的置换一般在试剂达到一定的浓度时才发生，多数是采用咪唑的梯度。用分级梯度或线性梯度降低 pH 同样可以减少蛋白质-金属离子络合物的亲和力，从而使蛋白质解吸。

IMAC 的优点

与真正的生物专一性亲和层析相比，IMAC 这种“假”生物特异性亲和技术，操作更容易、更快速。IMAC 除了广泛的用途和较低的价格外，还具有能与高盐浓度缓冲液相匹配的优点。由于蛋白质或肽在柱上的结合不受干扰，所以从阴离子或阳离子交换介质上收集下来含有高盐浓度的组分，可以直接上金属螯合亲和柱。这样，在多数情况下，就不需要在上柱前对样品进行更换缓冲液或透析等耗时操作。另外，不同的金属离子都能够络合到柱子上，这样相同的吸附剂就能产生不同的吸附选择性。一般来讲，结合蛋白质能力最强的是铜离子，其次是镍离子，而锌离子和钴离子结合力较弱。

2.2.2 亲硫吸附层析 (TAC)

原 理

这类高效的“假”亲和层析是基于盐驱动吸附原理，将蛋白质，特别是抗体，吸附到含有砷基和硫醚基的杂脂肪族配体上的 (Porath et al. 1985)。蛋白质的吸附作用主要是通过色氨酸和苯丙氨酸残基的作用发生在抗体分子保守区中结构域上，因此，含有所谓亲硫区的蛋白质，如免疫球蛋白 (Belew et al. 1987) 和含有芳香族氨基酸残基的肽

最适于 TAC 纯化。由于白蛋白不能吸附在亲硫介质上，因而大大简化了从血清中高效分离抗体。Fractogel EMD TA 是为抗体的高效纯化而设计的，目前测试过的所有抗体都能结合到 Fractogel EMD TA 上（见表 2.1）。根据最近的研究结果（Schulze et al. 1994），采用亲硫吸附技术成功地实现了对大肠杆菌（*E. coli*）表达的重组单链抗体片段的有效纯化，用这种方法对其他在表面上带有亲硫区的蛋白质和肽的分离纯化结果也已有报道（Bischoff et al. 1994）。Fractogel EMD TA 通过触角原理克服了蛋白结合容量较低的问题。按照前面讲过的方法，触角可以高密度地携带基团特异性配体，因而对 γ -球蛋白的结合容量可达 30 mg/ml 凝胶。触角原理同样能给功能性配体分子提供一个合适的空间，从而减少蛋白质与柱的非特异性相互作用，并赋予柱子高的蛋白质结合容量。

层析条件

由于蛋白质与 Fractogel EMD TA 的结合是一个盐驱动的过程，所以必须考虑盐的类型和浓度对结合效率的影响（见 2.1.5）。硫酸铵浓度在 0.8 ~ 1.5mol/L 之间对抗体的结合能达到最佳的结果。洗脱步骤可以通过盐梯度降低很容易地进行，但在较高的硫酸铵浓度下，Fractogel EMD TA 的结合行为趋向于类似疏水作用层析中（HIC）所用的介质（Eriksson 1989）。

TAC 的优点

对于抗体的纯化来讲，TAC 纯化的最大优点是配体的高的化学稳定性，尤其是与其他生物特异性配体相比，例如，与经常使用的大分子配体蛋白 A 或蛋白 G 相比，显示了它的优点。TAC 方法的另一优点是其与标准的蛋白纯化过程十分相配。经硫酸铵沉淀或离子交换步骤后，样品中残留的盐浓度只需调节（如通过电导测定）到使靶蛋白与柱结合的盐浓度。而且，各种不同来源的抗体蛋白和各种免疫球蛋白都与亲硫吸附剂结合，而蛋白 A 或蛋白 G 的柱只能微弱地结合某些抗体，有些则根本不结合（见表 2.1）。

2.2.3 材料和方法

首先，将详细介绍用 IMAC 柱进行 Fractogel EMD 螯合纯化多肽的过程，随后介绍用 Fractogel EMD TA 进行的抗体 TAC 纯化。两种方法只需稍加修改或不作任何改变即可用于其他多肽或蛋白的分离。

设 备

层析柱可与 HPLC 或其他中等压力的系统相连接，所使用的泵要求保持精确的恒定流速。由于缓冲液中含有高浓度的盐，最好采用惰性泵系统，由于采用惰性系统，柱的使用寿命也可能延长。如果采用高盐缓冲液，不锈钢部件可能会被腐蚀，产生的金属氧化物结合在层析介质上，这可能导致分辨率和回收率的下降，而且最终将损坏层析柱。所需要的最小设备是一个梯度混合仪，一台 UV 检测器（280nm）和一个中压泵。当然，一个程序化的梯度混合系统对于条件的精确控制是十分有用的。如果使用蠕动泵，流速应该用高盐浓度缓冲液进行校正。管道应越短越好，以减少不必要的稀释作用。如果目

的蛋白不太稳定，所有步骤应在 4℃ 进行。

胶的制备

Fractogel EMD 螯合介质和 Fractogel EMD TA 胶以悬浮液形式贮存，在使用前应将其贮存溶液除去。

- 1) 振荡装有胶的容器直至获得一均匀的悬浮液。
- 2) 取适当量的胶液（8~10ml 用于装 50cm × 10cm 的柱）加入到带有玻璃滤板的漏斗内，抽滤去上清液后，用 3 倍体积的平衡缓冲液重新悬浮胶，然后抽滤去平衡液，重复操作 3 次。

装柱

层析柱应按制造商的说明小心地均匀装柱。长度 5cm，内径为 1cm 的超效柱（Merck, Darmstadt，德国）非常适用于这类层析。

- 1) 在装超效 50-10 柱之前，先用水淋洗柱子。
- 2) 按照操作手册固定柱子，包括下部的接头和上部的进液管，在固定进液管之前先用滤膜安装工具插入下部的滤膜元件（滤膜 F，20μm）。
- 3) 将滤去上清得到的湿胶 6 ml 同 6 ml 1mol/L NaCl 溶液混合，制备成一均匀的悬浮胶。
- 4) 将悬浮胶倒入一垂直固定，出口关闭的柱内，用玻璃棒引流将水倒入进液管中，以充满悬浮胶上的残留空间。
- 5) 将进液管立即与泵相连，打开柱的出口，开泵，以 5~7ml / 分钟流速输入平衡缓冲液。
- 6) 待胶在 10~15 分钟内完全装好之后，停泵，并关好柱的出口。
- 7) 倾去或吸出胶床上的上清液，取下进液管。
- 8) 用水淋洗柱的上端，去除多余的胶，使胶的表面与柱的顶端有 5~10 mm 的距离。
- 9) 用装膜工具在胶的顶部插入聚丙烯滤膜板端（滤膜 F，20μm），并用水淋洗滤膜的顶部，使滤板上部不应有残留的胶粒。
- 10) 固定上部接头，这样就压紧了整个胶床。
- 11) 用 3~5 倍床体积的平衡缓冲液平衡柱子。

所装柱的柱效可用测试层析图检测基本特征，如峰的对称性；每米柱高度的理论塔板数（N）可以通过在 1 ml / 分钟流速下进样 0.1 ml 0.3% 丙酮，并用 280 nm 下监测洗脱液得到。如果胶床缩小，松开反向螺旋并重新拧紧接头。

IMAC 的运行

神经降压素、舒缓激肽、血管紧张素、生长激素释放抑制因子和铃蟾肽等的肽混合物可作为展示例子以说明 IMPC 柱对混合物成分的有效分离（见图 2.1）。如前所述，用 Fractogel EMD 650 (S) 螯合介质填充超效柱，柱的大小为 50mm × 10mm，柱床高度 5cm。同样的条件也可用于纯化其他蛋白或多肽：

- 1) 用缓冲液 A：20 mmol/L 磷酸钠缓冲液，1mol/L NaCl (pH7.0) 平衡填充柱，以 1 ml / 分钟流速进行以下所有步骤。