

选择材料及预处理

以蛋白质和结构与功能为基础，从分子水平上认识生命现象，已经成为现代生物学发展的主要方向，研究蛋白质，首先要得到高度纯化并具有生物活性的目的物质。蛋白质的制备工作涉及物理、化学和生物等各方面知识，但基本原理不外乎两方面。一是得用混合物中几个组分分配率的差别，把它们分配到可用机械方法分离的两个或几个物相中，如盐析，有机溶剂提取，层析和结晶等；二是将混合物置于单一物相中，通过物理力场的作用使各组分分配于来同区域而达到分离目的，如电泳，超速离心，超滤等。在所有这些方法的应用中必须注意保存生物大分子的完整性，防止酸、硷、高温，剧烈机械作用而导致所提物质生物活性的丧失。蛋白质的制备一般分为以下四个阶段：选择材料和预处理，细胞的破碎及细胞器的分离，提取和纯化，浓缩、干燥和保存。

微生物、植物和动物都可做为制备蛋白质的原材料，所选用的材料主要依据实验目的来确定。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，以微生物为材料时有两种情况：（1）得用微生物菌体分泌到培养基中的代谢产物和胞外酶等；（2）利用菌体含有的生化物质，如蛋白质、核酸和胞内酶等。植物材料必须经过去壳，脱脂并注意植物品种和生长发育状况不同，其中所含生物大分子的量变化很大，另外与季节性关系密切。对动物组织，必须选择有效成份含量丰富的脏器组织为原材料，先进行绞碎、脱脂等处理。另外，对预处理好的材料，若不立即进行实验，应冷冻保存，对于易分解的生物大分子应选用新鲜材料制备。

蛋白质的分离纯化

一、蛋白质（包括酶）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，可采用不同溶剂提取分离和纯化蛋白质及酶。

（一）水溶液提取法

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，提取时需要均匀的搅拌，以利于蛋白质的溶解。提取的温度要视有效成份性质而定。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 度以下）操作。为了避免蛋白质提以过程中的降解，可加入蛋白水解酶抑制剂（如二异丙基氟磷酸，碘乙酸等）。

下面着重讨论提取液的 pH 值和盐浓度的选择。

1、pH 值

蛋白质，酶是具有等电点的两性电解质，提取液的 pH 值应选择偏离等电点两侧的 pH 范围内。用稀酸或稀碱提取时，应防止过酸或过碱而引起蛋白质可解离基团发生变化，从而导致蛋

白质构象的不可逆变化，一般来说，碱性蛋白质用偏酸性的提取液提取，而酸性蛋白质用偏碱性的提取液。

2、盐浓度

稀浓度可促进蛋白质的溶，称为盐溶作用。同时稀盐溶液因盐离子与蛋白质部分结合，具有保护蛋白质不易变性的优点，因此在提取液中加入少量 NaCl 等中性盐，一般以 0.15 摩尔/升浓度为宜。缓冲液常采用 0.02-0.05M 磷酸盐和碳酸盐等渗盐溶液。

（二）有机溶剂提取法

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，可用乙醇、丙酮和丁醇等有机溶剂，它们具的一定的亲水性，还有较强的亲脂性、是理想的提脂蛋白的提取液。但必须在低温下操作。丁醇提取法对提取一些与脂质结合紧密的蛋白质和酶特别优越，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（度为 10%，40 度为 6.6%）不会引起酶的变性失活。另外，丁醇提取法的 pH 及温度选择范围较广，也适用于动植物及微生物材料。

二、蛋白质的分离纯化

蛋白质的分离纯化方法很多，主要有：

（一）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 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。

影响盐析的因素有：（1）温度：除对温度敏感的蛋白质在低温（4 度）操作外，一般可在室温中进行。一般温度低蛋白质溶介度降低。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 度）比 0 度时溶解度低，更容易盐析。（2）pH 值：大多数蛋白质在等电点时在浓盐溶液中的溶介度最低。（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地一起沉淀出来（共沉现象）。因此在盐析前血清要加等量生理盐水稀释，使蛋白质含量在 2.5-3.0%。

蛋白质盐析常用的中性盐，主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。其中应用最多的硫酸铵，它的优点是温度系数小而溶解度大（25 度时饱和溶液为 4.1M，即 767 克/升；0 度时饱和溶解度为 3.9M，即 676 克/升），在这一溶解度范围内，许多蛋白质和酶都可以盐析

出来；另外硫酸铵分段盐析效果也比其他盐好，不易引起蛋白质变性。硫酸铵溶液的 pH 常在 4.5-5.5 之间，当用其他 pH 值进行盐析时，需用硫酸或氨水调节。

蛋白质在用盐析沉淀分离后，需要将蛋白质中的盐除去，常用的办法是透析，即把蛋白质溶液装入透析袋内（常用的是玻璃纸），用缓冲液进行透析，并不断的更换缓冲液，因透析所需时间较长，所以最好在低温中进行。此外也可用葡萄糖凝胶 G-25 或 G-50 过柱的办法除盐，所用的时间就比较短。

2、等电点沉淀法

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，可与盐析法结合用。

3、低温有机溶剂沉淀法

用与水可混溶的有机溶剂，甲醇，乙醇或丙酮，可使多数蛋白质溶解度降低并析出，此法分辨率比盐析高，但蛋白质较易变性，应在低温下进行。

（二）根据蛋白质分子大小的差别的分离方法

1、透析与超滤

透析法是利用半透膜将分子大小不同的蛋白质分开。

超滤法是利用高压或离心力，强使水和其他小的溶质分子通过半透膜，而蛋白质留在膜上，可选择不同孔径的膜截留不同分子量的蛋白质。

2、凝胶过滤法

也称分子排阻层析或分子筛层析，这是根据分子大小分离蛋白质混合物最有效的方法之一。柱中最常用的填充材料是葡萄糖凝胶（Sephadex gel）和琼脂糖凝胶（agarose gel）。

（三）根据蛋白质带电性质进行分离

蛋白质在不同 pH 环境中带电性质和电荷数量不同，可将其分开。

1、电泳法

各种蛋白质在同一 pH 条件下，因分子量和电荷数量不同而在电场中的迁移率不同而得以分开。值得重视的是等电聚焦电泳，这是利用一种两性电解质作为载体，电泳时两性电解质形成一个由正极到负极逐渐增加的 pH 梯度，当带一定电荷的蛋白质在其中泳动时，到达各自等电点的 pH 位置就停止，此法可用于分析和制备各种蛋白质。

2、离子交换层析法

离子交换剂有阳离子交换剂（如：羧甲基纤维素；CM-纤维素）和阴离子交换剂（二乙氨基乙基纤维素），当被分离的蛋白质溶液流经离子交换层析柱时，带有与离子交换剂相反电荷的蛋白质被吸附在离子交换剂上，随后用改变 pH 或离子强度办法将吸附的蛋白质洗脱下来。（详见层析技术章）

（四）根据配体特异性的分离方法—亲和色谱法

亲和层析法（**affinity chromatography**）是分离蛋白质的一种极为有效的方法，它经常只需经过一步处理即可使某种待提纯的蛋白质从很复杂的蛋白质混合物中分离出来，而且纯度很高。这种方法是根据某些蛋白质与另一种称为配体（**Ligand**）的分子能特异而非共价地结合。其基本原理：蛋白质在组织或细胞中是以复杂的混合物形式存在，每种类型的细胞都含有上千种不同的蛋白质，因此蛋白质的分离（**Separation**），提纯（**Purification**）和鉴定（**Characterization**）是生物化学中的重要的一部分，至今还没的单独或一套现成的方法能移把任何一种蛋白质从复杂的混合蛋白质中提取出来，因此往往采取几种方法联合使用。

细胞的破碎

1、高速组织捣碎：将材料配成稀糊状液，放置于筒内约 1/3 体积，盖紧筒盖，将调速器先拨至最慢处，开动开关后，逐步加速至所需速度。此法适用于动物内脏组织、植物肉质种子等。

2、玻璃匀浆器匀浆：先将剪碎的组织置于管中，再套入研杆来回研磨，上下移动，即可将细胞研碎，此法细胞破碎程度比高速组织捣碎机为高，适用于量少和动物脏器组织。

3、超声波处理法：用一定功率的超声波处理细胞悬液，使细胞急剧震荡破裂，此法多适用于微生物材料，用大肠杆菌制备各种酶，常选用 50-100 毫克菌体/毫升浓度，在 1KG 至 10KG 频率下处理 10-15 分钟，此法的缺点是在处理过程会产生大量的热，应采取相应降温措施。对超声波敏感和核酸应慎用。

4、反复冻融法：将细胞在-20 度以下冰冻，室温融解，反复几次，由于细胞内冰粒形成和剩余细胞液的盐浓度增高引起溶胀，使细胞结构破碎。

5、化学处理法：有些动物细胞，例如肿瘤细胞可采用十二烷基磺酸钠（**SDS**）、去氧胆酸钠等细胞膜破坏，细菌细胞壁较厚，可采用溶菌酶处理效果更好。

无论用哪一种方法破碎组织细胞，都会使细胞内蛋白质或核酸水解酶释放到溶液中，使大分子生物降解，导致天然物质量的减少，加入二异丙基氟磷酸（**DFP**）可以抑制或减慢自溶作用；加入碘乙酸可以抑制那些活性中心需要有巯基的蛋白水解酶的活性，加入苯甲磺酰氟化物（**PMSF**）也能清除蛋白水解酶活力，但不是全部，还可通过选择 pH、温度或离子强度等，使这些条件都要适合于目的物质的提取。

浓缩、干燥及保存

一、样品的浓缩

生物大分子在制备过程中由于过柱纯化而样品变得很稀，为了保存和鉴定的目的，往往需要进行浓缩。常用的浓缩方法的：

1、减压加温蒸发浓缩

通过降低液面压力使液体沸点降低，减压的真空度愈高，液体沸点降得愈低，蒸发愈快，此法适用于一些不耐热的生物大分子的浓缩。

2、空气流动蒸发浓缩 空气的流动可使液体加速蒸发，铺成薄层的溶液，表面不断通过空气流；或将生物大分子溶液装入透析袋内置于冷室，用电扇对准吹风，使透过膜外的溶剂不沁蒸发，而达到浓缩目的，此法浓缩速度慢，不适于大量溶液的浓缩。

3、冰冻法 生物大分子在低温结成冰，盐类及生物大分子不进入冰内而留在液相中，操作时先将待浓缩的溶液冷却使之变成固体，然后缓慢地融解，利用溶剂与溶质熔点介点的差别而达到除去大部分溶剂的目的。如蛋白质和酶的盐溶液用此法浓缩时，不含蛋白质和酶的纯冰结晶浮于液面，蛋白质和酶则集中于下层溶液中，移去上层冰块，可得蛋白质和酶的浓缩液。

4、吸收法 通过吸收剂直接收除去溶液中溶液分子使之浓缩。所用的吸收剂必需与溶液不起化学反应，对生物大分子不吸附，易与溶液分开。常用的吸收剂有聚乙二醇，聚乙稀吡咯酮、蔗糖和凝胶等，使用聚乙二醇吸收剂时，先将生物大分子溶液装入半透膜的袋里，外加聚乙二醇复盖置于 4 度下，袋内溶剂渗出即被聚乙二醇迅速吸去，聚乙二醇被水饱和后要更换新的直至达到所需要的体积。

5、超滤法 超滤法是使用一种特别的薄膜对溶液中各种溶质分子进行选择过滤的方法，不液体在一定压力下（氮气压或真空泵压）通过膜时，溶剂和小分子透过，大分子受阻保留，这是近年来发展起来的新方法，最适于生物大分子尤其是蛋白质和酶的浓缩或脱盐，并具有成本低，操作方便，条件温和，能较好地保持生物大分子的活性，回收率高等优点。应用超滤法关键在于膜的选择，不同类型和规格的膜，水的流速，分子量截止值（即大体上能被膜保留分子最小分子量值）等参数均不同，必须根据工作需要来选用。另外，超滤装置形式，溶质成份及性质、溶液浓度等都对超滤效果的一定影响。Diaflo 超滤膜的分子量截留值：

膜名称	分子量截留值	孔的大平均直径
XM - 300	300 , 000	140
XM - 200	100 , 000	55
XM - 50	50 , 000	30
PM - 30	30 , 000	22
UM - 20	20 , 000	18
PM - 10	10 , 000	15
UM - 2	1 , 000	12
UM05	500	10

用上面的超滤膜制成空心的纤维管，将很多根这样的管拢成一束，管的两端与低离子强度的缓冲液相连，使缓冲液不断地在管中流动。然后将纤维管浸入待透析的蛋白质溶液中。当缓冲液

流过纤维管时，则小分子很易透过膜而扩散，大分子则不能。这就是纤维过滤透析法，由于透析面积增大，因而使透析时间缩短 10 倍。

二、干燥

生物大分子制备得到产品，为防止变质，易于保存，常需要干燥处理，最常用的方法是冷冻干燥和真空干燥。真空干燥适用于不耐高温，易于氧化物质的干燥和保存，整个装置包括干燥器、冷凝器及真空干燥原理外，同时增加了温度因素。在相同压力下，水蒸汽压随温度下降而下降，故在低温低压下，冰很易升华为气体。操作时一般先将待干燥的液体冷冻到冰点以下使之变成固体，然后在低温低压下将溶剂变成气体而除去。此法干后的产品具有疏松、溶解度好、保持天然结构等优点，适用于各类生物大分子的干燥保存。

三、贮存

生物大分子的稳定性与保存方法的很大关系。干燥的制品一般比较稳定，在低温情况下其活性可在数日甚至数年无明显变化，贮藏要求简单，只要将干燥的样品置于干燥器内（内装有干燥剂）密封，保持 0—4 度冰箱即可，液态贮藏时应注意以下几点。

- 1、样品不能太稀，必须浓缩到一定浓度才能封装贮藏，样品太稀易使生物大分子变性。
- 2、一般需加入防腐剂和稳定剂，常用的防腐剂有甲苯、苯甲酸、氯仿、百里酚等。蛋白质和酶常用的稳定剂有硫酸铵糊、蔗糖、甘油等，如酶也可加入底物和辅酶以提高其稳定性。此外，钙、锌、硼酸等溶液对某些酶也有一定保护作用。核酸大分子一般保存在氯化钠或柠檬酸钠的标准缓冲液中。
- 3、贮藏温度要求低，大多数在 0 度左右冰箱保存，有的则要求更低，应视不同物质而定。