

蛋白纯化技术

蛋白质纯化技术工作较为复杂,从细胞中提取的蛋白质或从含有蛋白质的溶液中经过沉淀、梯度离心、盐析等方法得到的蛋白质经常含有杂质,要去除这些杂质,同时又要保持蛋白质的生物学活性。因为用以上方法获取的蛋白质常含有杂质,为了在保持蛋白质的生物学活性同时,又去除这些杂质,就要根据不同的蛋白质制定出相应的策略,采用不同的方法。这就叫做蛋白质纯化技术。蛋白质的纯化方法主要是利用不同蛋白质之间的相似性与差异,依据蛋白之间的相似性可以去除非蛋白质,再根据蛋白质的差异性将目的蛋白分离出来。

蛋白纯化原则

蛋白纯化要利用不同蛋白间内在的相似性与差异,利用各种蛋白间的相似性来除去非蛋白物质的污染,而利用各蛋白质的差异将目的蛋白从其他蛋白中纯化出来。每种蛋白间的大小、形状、电荷、疏水性、溶解度和生物学活性都会有差异,利用这些差异可将蛋白从混合物如大肠杆菌裂解物中提取出来得到重组蛋白。

蛋白的纯化大致分为粗分离阶段和精细纯化阶段二个阶段。一般蛋白纯化采用的方法为树脂法。粗分离阶段主要将目的蛋白和其他细胞成分如 DNA、RNA 等分开,由于此时样本体积大、成分杂,要求所用的树脂高容量、高流速、颗粒大、粒径分布宽,并可以迅速将蛋白与污染物分开,必要时可加入相应的保护剂(例如蛋白酶抑制剂),防止目的蛋白被降解。精细纯化阶段则需要更高的分辨率,此阶段是要把目的蛋白与那些分子量大小及理化性质接近的蛋白区分开来,要用更小的树脂颗粒以提高分辨率,常用离子交换柱和疏水柱,应用时要综合考虑树脂的选择性和柱效两个因素。选择性指树脂与目的蛋白结合的特异性,柱效则是指各蛋白成分逐个从树脂上集中洗脱的能力,洗脱峰越窄,柱效越好。仅有好的选择性,洗脱峰太宽,蛋白照样不能有效分离。

蛋白纯化方法

1.根据蛋白质溶解度不同的分离:

蛋白质的盐析法: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。

等电点沉淀法：蛋白质在静电状态时颗粒之间的静电斥力小，因而溶解度也小，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。

2.根据蛋白质分子大小的差别的分离方法

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

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有效的方法之一。柱中常用的填充材料是葡萄糖凝胶（Sephadex gel）和琼脂糖凝胶（agarose gel）。

3.根据蛋白质带电性质进行分离：

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。

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。

4.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、提纯和鉴定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。

相关产品推荐

[天然蛋白](#) [重组蛋白](#) [小分子抗原抗体](#)

Order and Inquiry

You can place an order or Inquiry through the following methods, and we will contact you

ASAP:

QQ 499854788; 82458988

Email info@biotyscience.com

Tel 010-5365 2239