

分离纯化蛋白质的目的:

- ①将蛋白质和非蛋白质杂质分离
- ②将不同的蛋白质相互分离。

分离提纯蛋白质的要求:

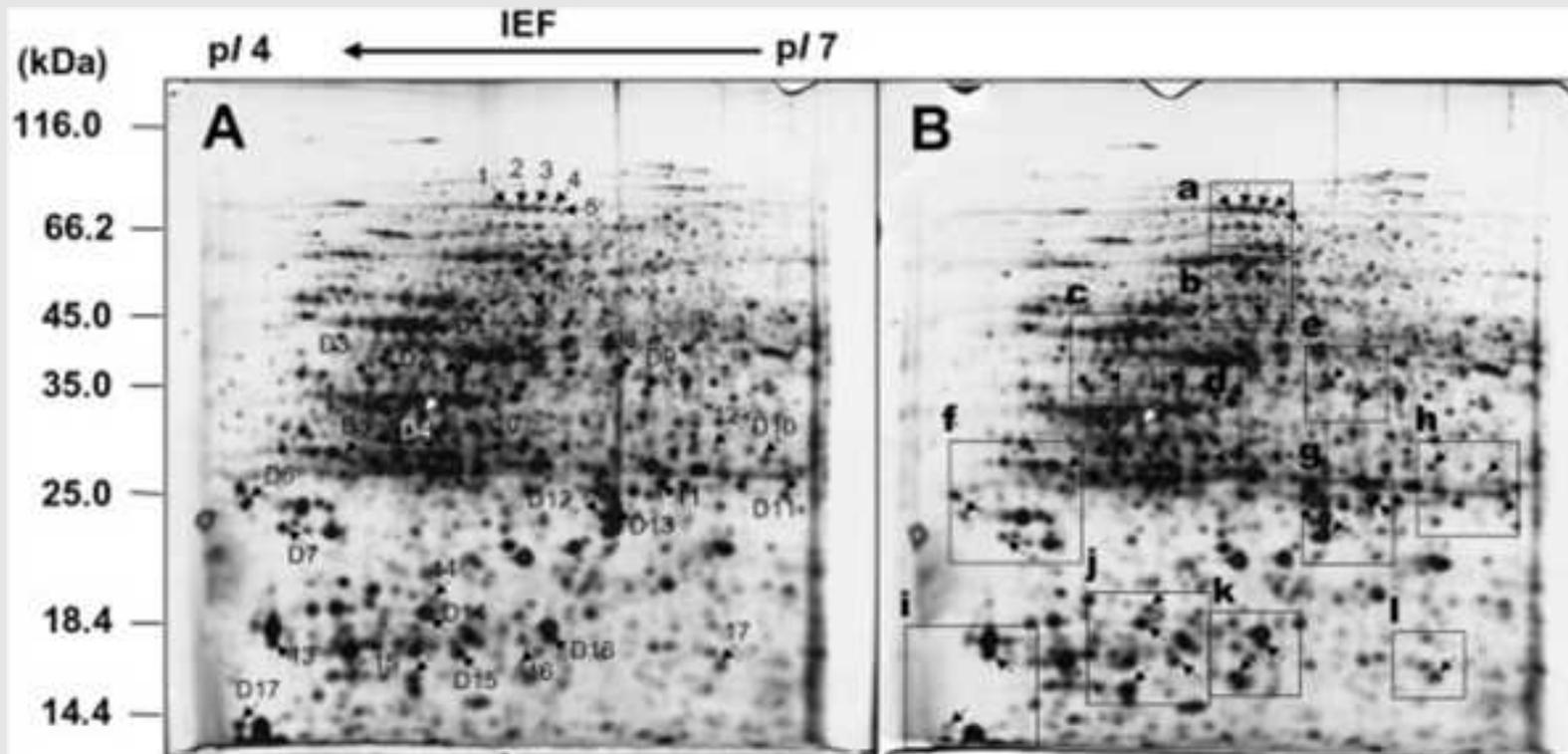
- (1) 纯度    (2) 活性
- (3) 得率    (4) 速度

## 第一节 能用作纯化依据的蛋白质性质

|          |             |           |                    |
|----------|-------------|-----------|--------------------|
| <b>1</b> | <b>大小</b>   | <b>8</b>  | <b>密度</b>          |
| <b>2</b> | <b>形状</b>   | <b>9</b>  | <b>配体结合能力</b>      |
| <b>3</b> | <b>电荷</b>   | <b>10</b> | <b>金属结合能力</b>      |
| <b>4</b> | <b>等电点</b>  | <b>11</b> | <b>可逆性缔合</b>       |
| <b>5</b> | <b>电荷分布</b> | <b>12</b> | <b>特异性序列或结构</b>    |
| <b>6</b> | <b>疏水性</b>  | <b>13</b> | <b>非寻常性质</b>       |
| <b>7</b> | <b>溶解度</b>  | <b>14</b> | <b>基因工程构建的纯化标记</b> |

# 1. 大小

蛋白质的大小各不相同，可从含几个氨基酸的小肽（几百个Da）至含10 000多个氨基酸（上百万个Da）的巨大蛋白质不等。多数蛋白质的分子量在10 000—150 000Da之间。



## 2. 形状

蛋白质形状有近似球形的，也有很不对称的。在离心、凝胶过滤或凝胶电泳过程中都会受到形状的影响。

### 3. 电荷

蛋白质的静电荷取决于氨基酸残基所带正、负电荷的总和。

一蛋白质中，若天冬氨酸和谷氨酸残基占优势，在pH7.0时带净负电荷，则称之为酸性蛋白；若赖氨酸和精氨酸残基占优势，则认为 是碱性蛋白质。

## 4. 等电点

等电点 (pI) 是蛋白质上净电荷为零时的pH值，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。

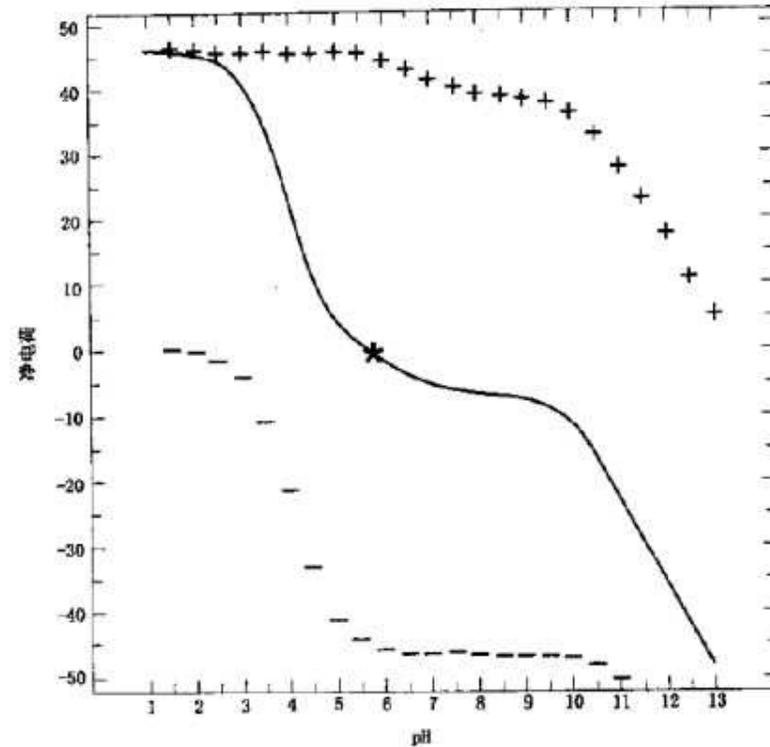


图0-2 大肠杆菌RNA聚合酶转录因子 $\sigma^{32}$ 的滴定曲线和等电点 (pI)。本图根据该蛋白的氨基酸序列，给出了它的正、负电荷基团数的理论图和作为pH的函数的净电荷。其pI值为5.78，用星号表示。荷电基团是Arg (23)、Lys (16)、His (6)、Tyr (7)、Glu (22) 和Asp (23)。本图是用遗传学计算机集团公司的序列分析软件包制作而成的。

## 5. 电荷分布

电荷的氨基酸可均匀地分布于蛋白质的表面，亦可成簇地分布，使某一区域带强的正电荷而另一区域带强负电荷。这种非随机的电荷分布可用来通过离子交换层析来分离蛋白质。

## 6. 疏水性

多数疏水性氨基酸残基藏在蛋白质的内部，但也有一些可见于表面。蛋白质表面的疏水性氨基酸残基的数目和空间分布决定了该蛋白质是否具有与疏水柱填料结合从而利用它来进行分级分离的能力。

## 7. 溶解度

蛋白质在不同溶剂中的溶解度有很大不同，从基本不溶 (<10mg/ml) 直至极易溶解 (>300 mg/ml) 不等。影响蛋白质溶解度的因素包括pH、离子强度、离子的性质、温度和溶剂的极性。蛋白质在其等电点处一般较不易溶解。

## 8. 密度

多数蛋白质的密度在1.3—1.4g/cm<sup>3</sup>之间。分级分离蛋白质时一般不用这个性质。但是，在含有大量磷酸盐（如卵黄高磷蛋白，密度为1.8）或脂质部分（如脂蛋白，密度为1.03）的蛋白质，与一般蛋白质在密度上确有不同，可用密度梯度法将它们从大部分蛋白质中分离出来。

## 9. 配体结合能力

有许多酶能相当紧地结合底物、效应分子、辅助因子和DNA模板。可利用亲和层析分离

## 10. 金属结合能力

有许多酶能与某些金属离子（如 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 和 $\text{Ni}^{2+}$ ）紧密结合。主要是其半胱氨酸或组氨酸残基可与金属离子作用，可通过金属离子螯合柱将酶固定。

## 11. 可逆性缔合

在某些溶液条件下，有一些酶能聚集成二聚体、四聚体等。如大肠杆菌RNA聚合酶在0.05mol/L NaCl溶液中形成二聚体，在0.3mol/L NaCl溶液中为单体，可利用这一性质，相继在不同条件下按大小进行分级分离。

## 12. 翻译后修饰

许多蛋白质在合成后要通过加入糖基、酰基、磷酸基团或种种其他部分来进行修饰。这些修饰提供了可用于分级分离的依据。如糖蛋白能与含有外援凝集素的柱子结合，外源凝集素是一类能牢固地与某些糖基部分结合分子。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：  
<https://d.book118.com/698020067030006055>