
第二章 蛋白质的通性、纯化和表征

主要内容

一、蛋白质的酸碱性质

二、蛋白质的胶体性质

三、蛋白质沉淀、变性

四、蛋白质分离纯化的一般原则

五、蛋白质的分离纯化方法

六、蛋白质的含量测定与纯度鉴定

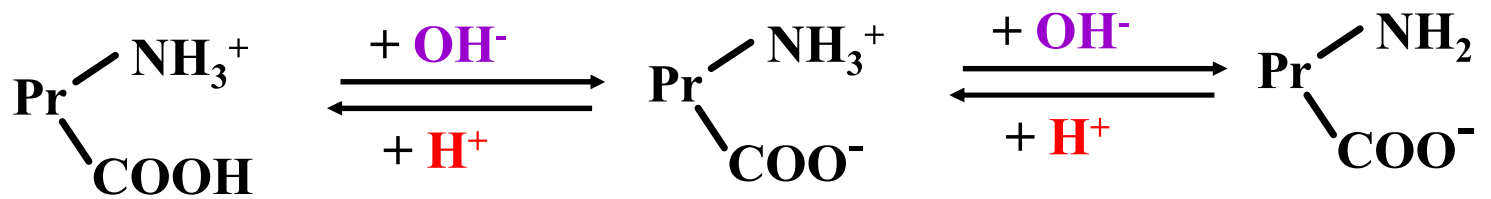
一、蛋白质的酸碱性质

■ 1、蛋白质的两性电离和等电点

蛋白质分子除两端的氨基和羧基可解离外，氨基酸残基侧链中某些基团，在一定的溶液pH条件下都可解离成带负电荷或正电荷的基团从而使蛋白质带电。

蛋白质所带电荷的性质和数量是可解离基团的种类和数目以及溶液的pH决定。

蛋白质两性解离性质和等电点



$\text{pH} < \text{pI}$

净电荷为正

$\text{pH} = \text{pI}$

净电荷=0

$\text{pH} > \text{pI}$

净电荷为负

当蛋白质溶液在某一定pH值时，使某特定蛋白质分子上所带正负电荷相等，总净电荷为零，成为两性离子，在电场中，蛋白质分子既不向阳极也不向阴极移动，此时溶液的pH值即为该蛋白质的等电点（pI）

一、蛋白质的酸碱性质

2、蛋白质的等电点和等离子点区别

当溶液中存在中性盐时，蛋白质的滴定曲线形状和等电点发生明显变化。

当没有溶液中的盐离子干扰时，蛋白质分子本身的质子供体基团解离出来的质子数与它的质子受体基团结合的质子数相等时的溶液的pH称等离子点，是每种蛋白质的特征常数。

- 每个蛋白质都有特定的等电点，与所含氨基酸的种类和数量决定。
 - 所含碱性氨基酸多，**PI**偏碱；所含酸性氨基酸多，**PI**偏酸；两者相等，**PI**中性偏酸。
 - 蛋白质在高于或低于其**pI**的溶液中为带电的颗粒，在电场中能向正极或负极移动。这种通过蛋白质在电场中泳动而达到分离各种蛋白质的技术，称为电泳
 - 在一个特定的**pH**值中，各种蛋白质等电点不同，所带电荷性质和数量也不同，分子质量和颗粒大小不同，因此它们在电场中移动的方向和速度也不同，能彼此分开。
-

电泳方法：

1、电泳和等电聚焦法：

- 普通电泳、等电聚焦、双向电泳、脉冲电泳、毛细管电泳
 - 从电泳结果分：自由界面电泳、区带电泳
 - 从装置上分：圆盘电泳（柱状）、水平板电泳、垂直板电泳。
 - 从支持物分：自由界面电泳、纸电泳（或薄膜电泳）、凝胶电泳（**PAGE**，琼脂糖胶，淀粉胶等）
-

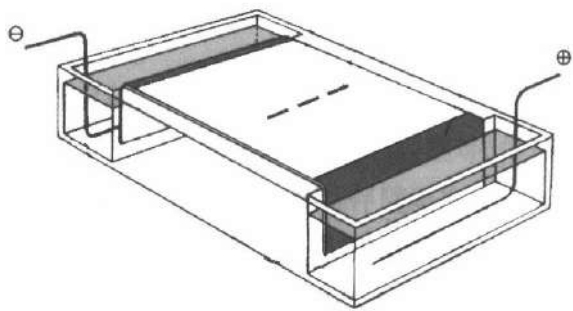
电泳技术分类

电泳支持物

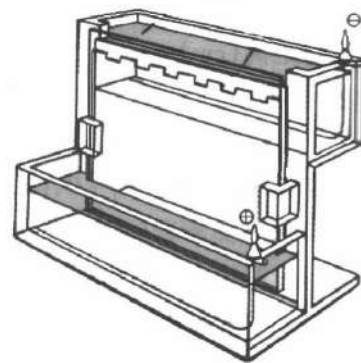
滤纸

薄膜

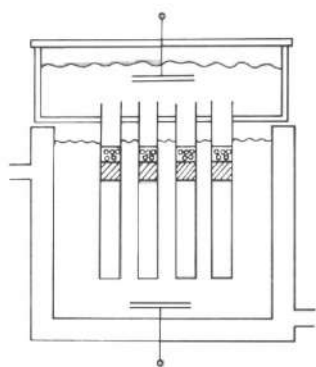
凝胶



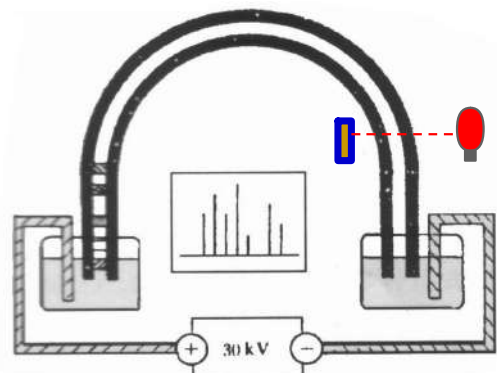
水平板电泳



垂直板电泳



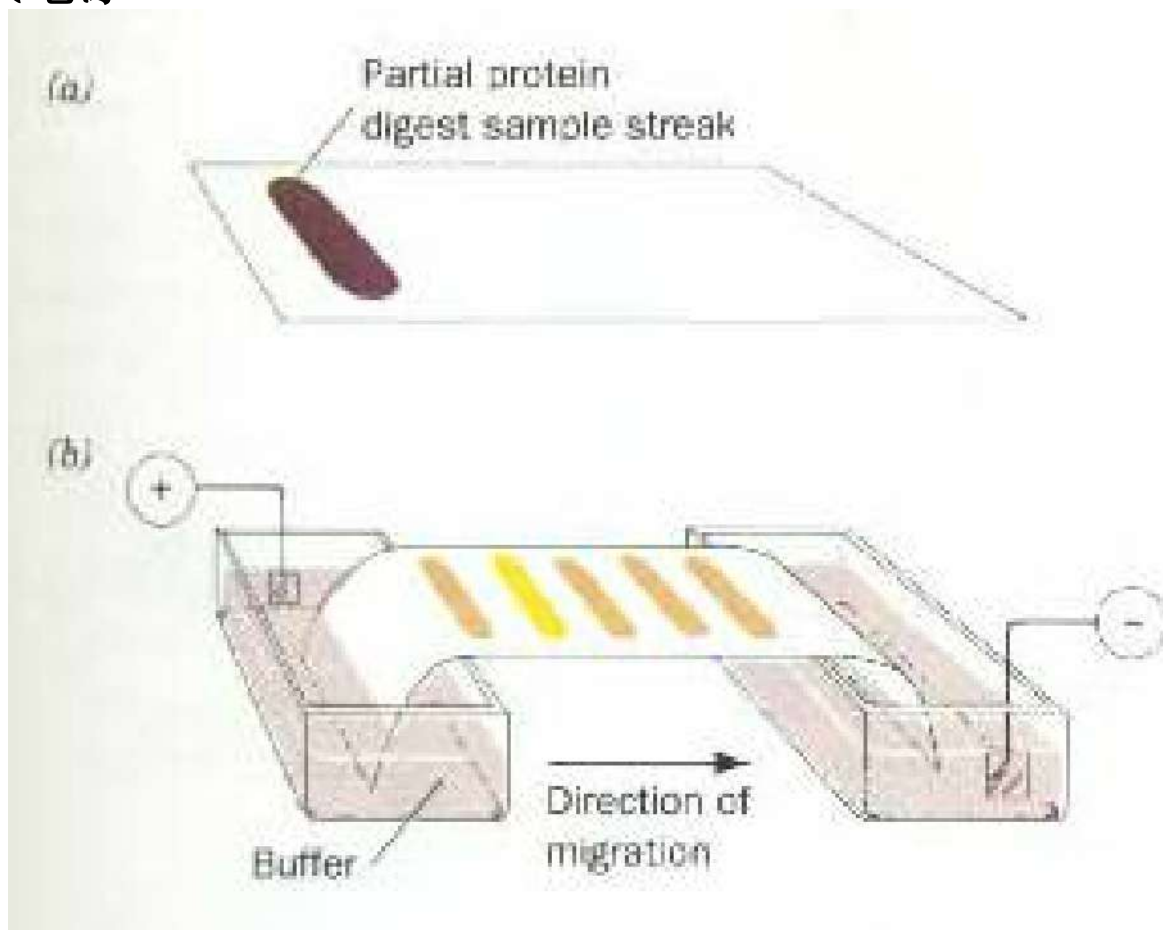
圆盘电泳

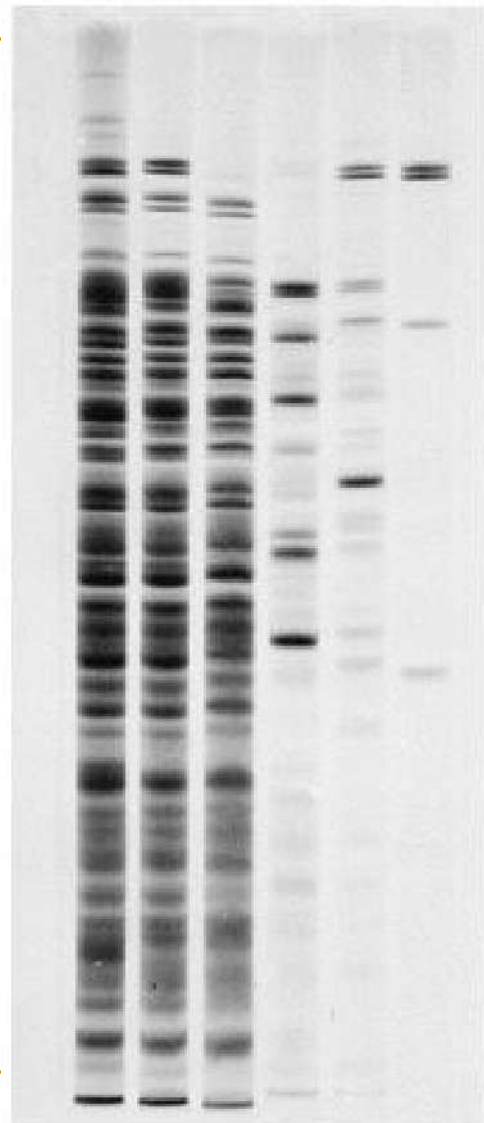
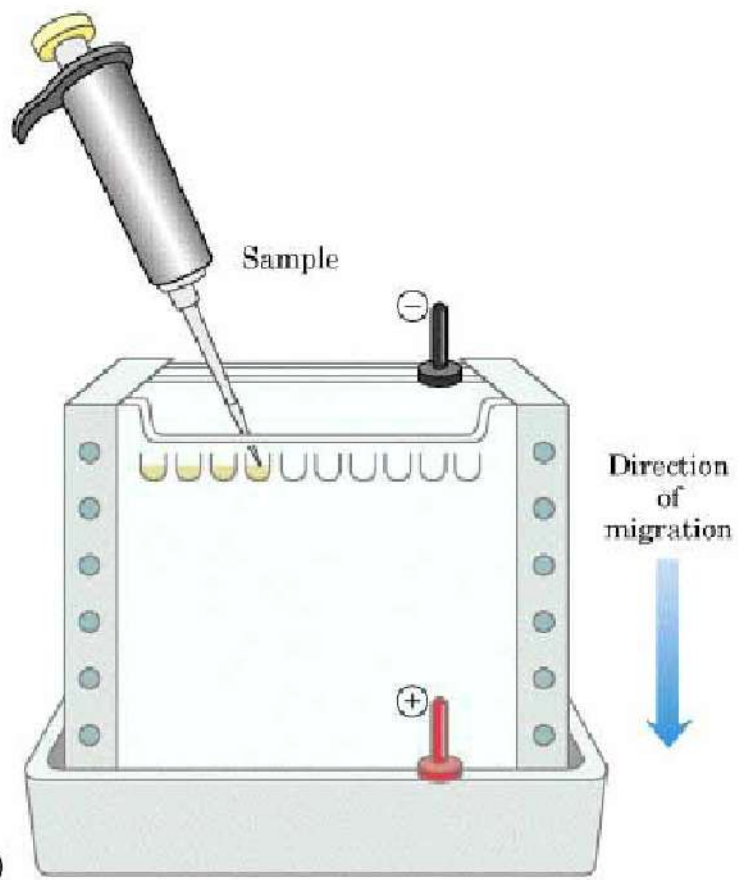
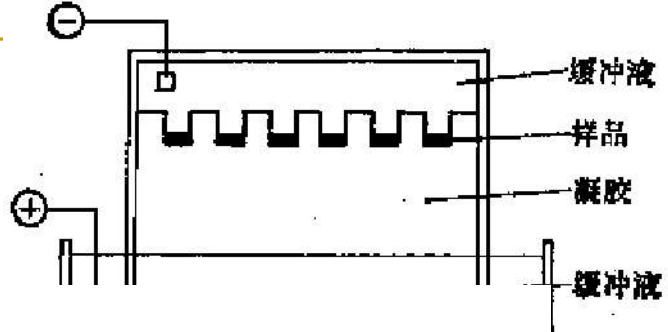


毛细管电泳



纸电泳



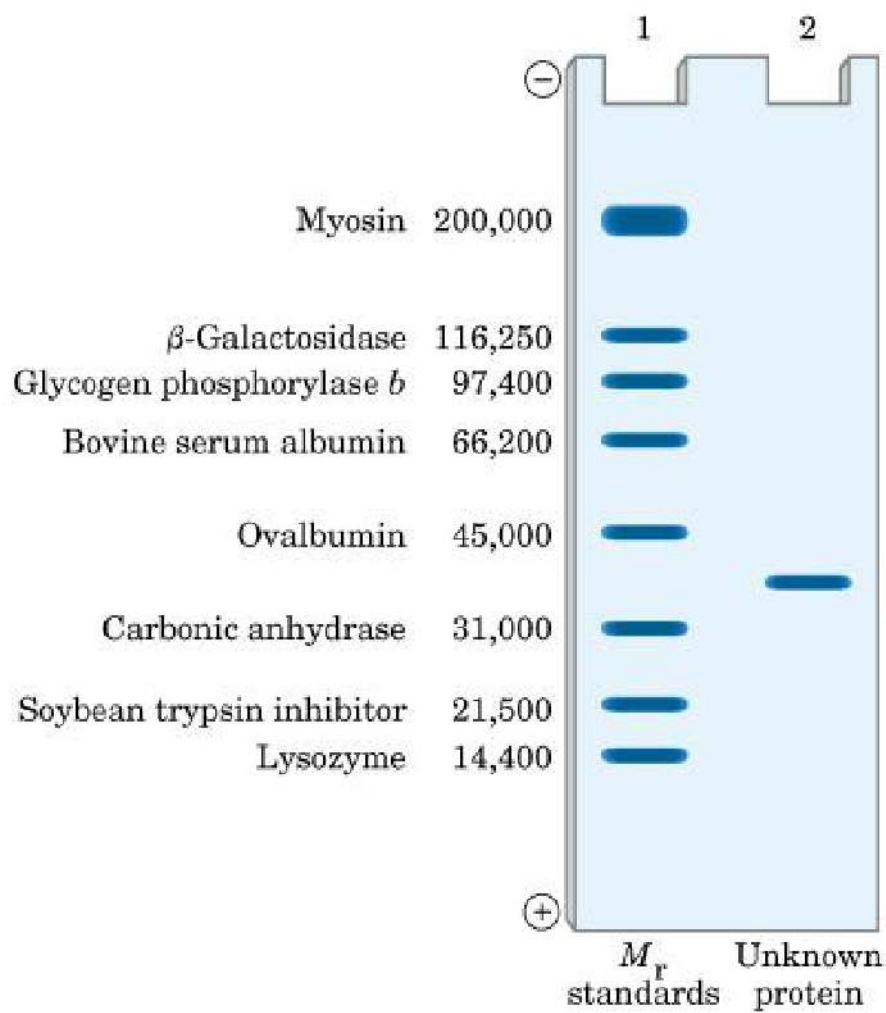


(b)

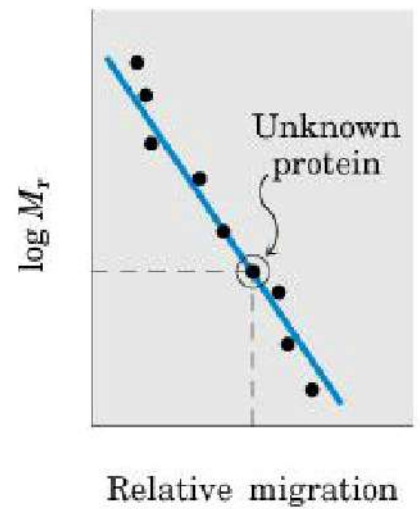
SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis



MOV: MCB4.0\SDS-PAGE



(a)



(b)

二、蛋白质的胶体性质

■ 溶质质点胶体系统保持稳定条件：

- 1、质点大小在1-100nm之间
 - 2、质点带有相同电荷，互相排斥，不易聚成大颗粒沉淀
 - 3、分散质点与溶剂形成水化层
-

* 蛋白质胶体稳定的因素

1、蛋白质属于生物大分子之一，分子量可自1万至100万之间，其分子的直径可达1~100nm，为胶粒范围之内。

2、蛋白质分子表面有亲水基团。

3、一种蛋白质在适当的pH条件下都带有相同电荷。

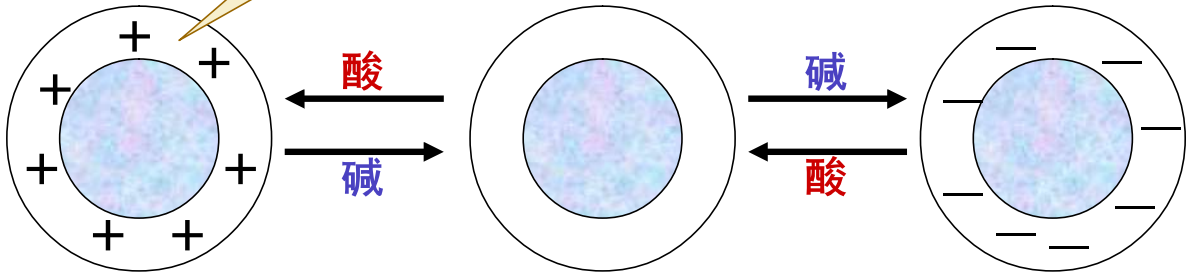


●由于蛋白质的分子量很大，它在水中能够形成胶体溶液。蛋白质溶液具有胶体溶液的典型性质，如丁达尔现象、布朗运动、不能通过半透膜等。

●由于胶体溶液中的蛋白质不能通过半透膜，因此可以应用透析法将非蛋白的小分子杂质除去。



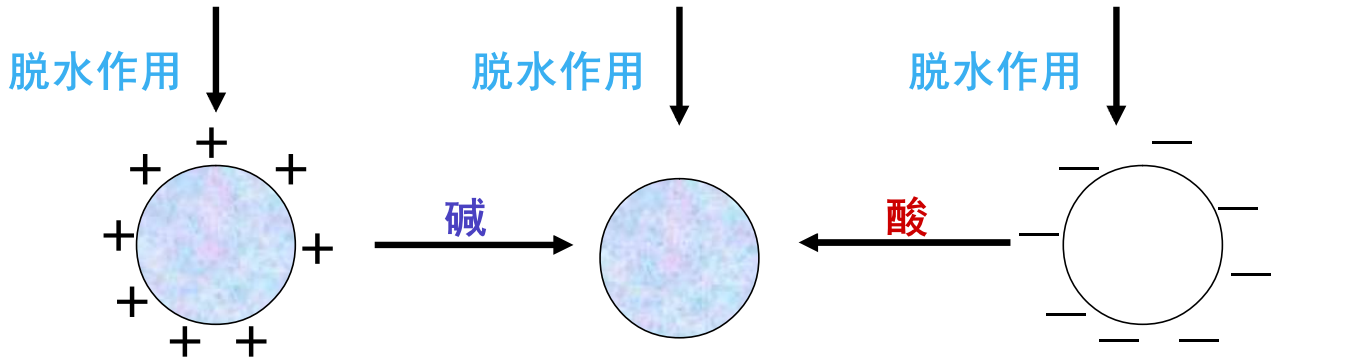
水化膜



带正电荷的蛋白质

在等电点的蛋白质

带负电荷的蛋白质



带正电荷的蛋白质

不稳定的蛋白质颗粒

带负电荷的蛋白质

溶液中蛋白质的聚沉

三. 蛋白质的沉淀作用

- 蛋白质胶体溶液的稳定性与它的分子量大小、所带的电荷和水化作用有关。
- 改变溶液的条件，将影响蛋白质的溶解性质
- 在适当的条件下，蛋白质能够从溶液中沉淀出来。

1.可逆沉淀

(1)在温和条件下，通过改变溶液的pH或电荷状况，使蛋白质从胶体溶液中沉淀分离。

(2)在沉淀过程中，结构和性质都没有发生变化，在适当的条件下，可以重新溶解形成溶液，所以这种沉淀又称为非变性沉淀。

(3)可逆沉淀是分离和纯化蛋白质的基本方法，如等电点沉淀法、盐析法和有机溶剂沉淀法等。

2.不可逆沉淀

(1)在强烈沉淀条件下，不仅破坏了蛋白质胶体溶液的稳定性，而且也破坏了蛋白质的结构和性质，产生的蛋白质沉淀不可能再重新溶解于水。

(2)由于沉淀过程发生了蛋白质的结构和性质的变化，所以又称为变性沉淀。

(3)如加热沉淀、强酸碱沉淀、重金属盐沉淀和生物碱沉淀等都属于不可逆沉淀。

选择性沉淀蛋白质的方法

①盐析法:在蛋白质溶液中加入大量的中性盐[$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 、 NaCl]，以破坏蛋白质的胶体性质，使蛋白质从溶液中沉淀析出，称为盐析。

作用机制:

中和电荷的同时破坏水化膜

盐析时，**pH**在蛋白质的等电点处效果最好。

优点：盐析沉淀蛋白质通常不会引起蛋白质的变性。



分段盐析：

半饱和硫酸铵溶液可沉淀分子量较大的血浆球蛋白，而**饱和**硫酸铵溶液可沉淀分子量较小的血浆清蛋白。因此，使用**不同浓度**的硫酸铵溶液就可将分子量不同的蛋白质进行初步分离。

选择性沉淀蛋白质的方法

- ②有机溶剂沉淀法：破坏水化膜，降低介电常数，增加带电质点间的相互作用，致使蛋白质颗粒凝聚沉淀。**PEG**、丙酮、乙醇等
 - ③重金属盐沉淀：**pH > pI**时带负电荷，与重金属离子（**Hg²⁺**、**Pb²⁺**、**Cu²⁺** 等）结成不溶性沉淀
 - ④生物碱试剂和某些酸类沉淀法：**pH**小于等电点时，蛋白质带正电荷，易与生物碱试剂和酸类的负离子生成不溶性沉淀。
 - 生物碱试剂：单宁酸、苦味酸、钨酸。
 - 酸类：三氯乙酸、磺基水杨酸。
 - ⑤加热变性沉淀。
 - ⑥等电点沉淀法。
-

四、蛋白质变性与复性

● 蛋白质各自所特有的高级结构，是表现其物理性质和化学特性以及生物学功能的基础。当天然蛋白质受到某些物理因素和化学因素的影响，使其分子内部原有的高级构象发生变化时，蛋白质的理化性质和生物学功能都随之改变或丧失，但并未导致其一级结构的变化，这种现象称为变性作用（denaturation）。

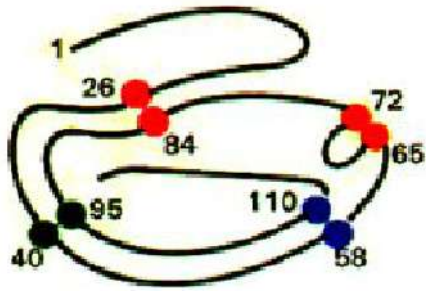
表征：生物活性丧失；物理性质（溶解度、粘度、扩散系数、光谱特性等）和化学性质（化学反应，被酶解性）改变

应用：变性灭菌、消毒；变性制食品；抗衰老.....

● 蛋白质的变性作用如果不过于剧烈，则是一种可逆过程，变性蛋白质通常在除去变性因素后，可缓慢地重新自发折叠成原来的构象，恢复原有的理化性质和生物活性，这种现象成为复性（renaturation）。



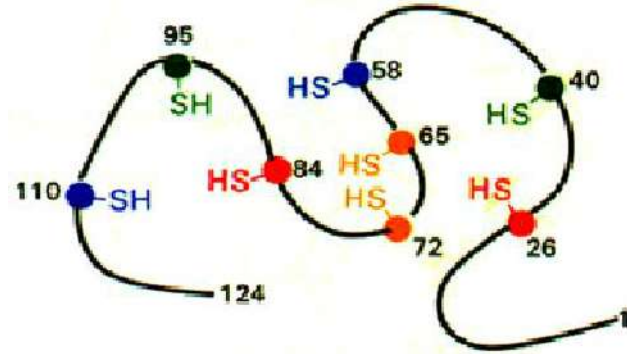
核糖核酸酶变性与复性作用



Native ribonuclease

8 M urea and β -mercaptoethanol

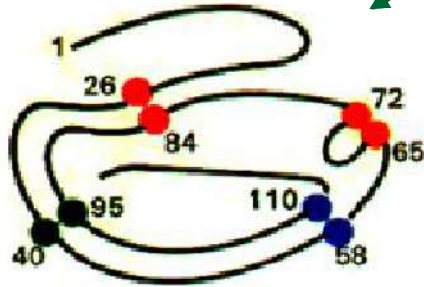
变性



Denatured reduced ribonuclease

复性

Dialysis



Native ribonuclease



- 变性的本质

—— 破坏非共价键和二硫键，不改变蛋白质的一级结构。

- 造成变性的因素

如加热、乙醇等有机溶剂、强酸、强碱、重金属离子及生物碱试剂等化学因子；加热、紫外线、X射线等物理因子。

应用：

利用变性：酒精消毒、高压灭菌、血滤液制备

防止变性：低温保存生物制品

取代变性：乳品解毒（重金属中毒解救）

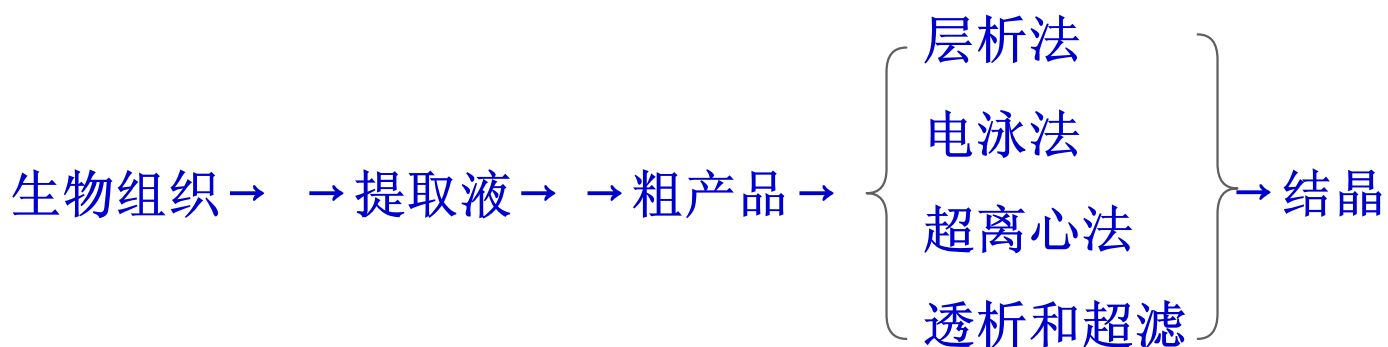
五、蛋白质的分离纯化的一般原则

制备的一般过程和原则

- 确立有效成分的测定方法
- 材料的选择和预处理
- 细胞的破碎和细胞组分分离
- 有效成分的抽提
- 有效成分的纯化和浓缩



生物大分子分离纯化的一般步骤和原则



| ← 前处理 → | ← 粗分级 → | ← 细分级 → |

- 材料选择与处理
- 细胞破碎（机械破碎、溶胀和自溶、酶解、化学处理）

- 盐析（硫酸铵盐析）
- 等电点沉淀
- 有机溶剂沉淀
- 离心

依据原理

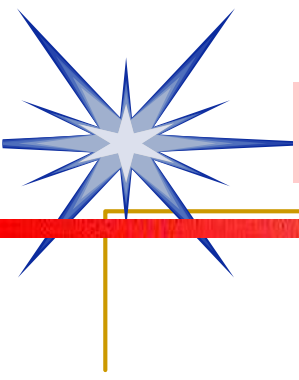
- 分子大小
- 溶解度
- 电荷性质
- 吸附性质
- 生物亲和力



注意事项

基本原则：防止生物分子变性、降解

- 1. 控制适当的pH
- 2. 控制低温
- 3. 注意提取过程中的溶液环境
- 4. 防止提纯过程中丢失一些辅助因子或亚基



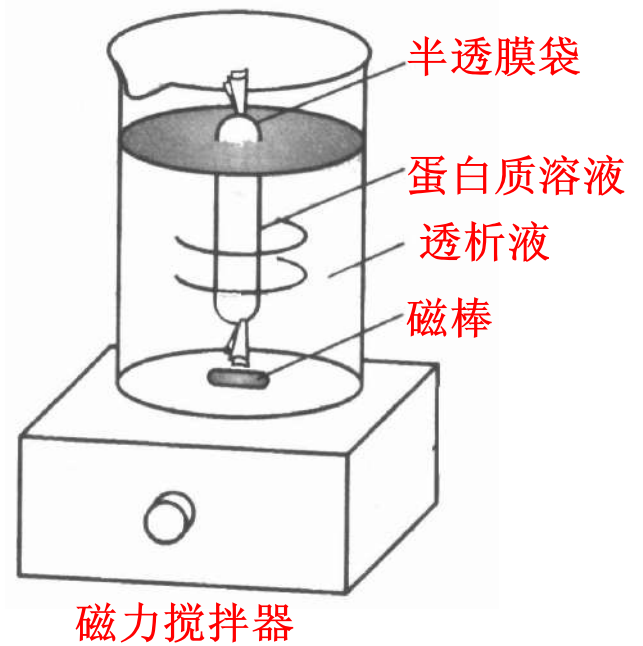
四、蛋白质的分离纯化方法

- 1、透析和超过滤
 - 2、盐溶和盐析
-

透析 (dialysis)

透析是利用蛋白质等大分子不能通过半透膜的性质，使蛋白质和其它小分子物质如无机盐单糖等分开。常用的半透膜：

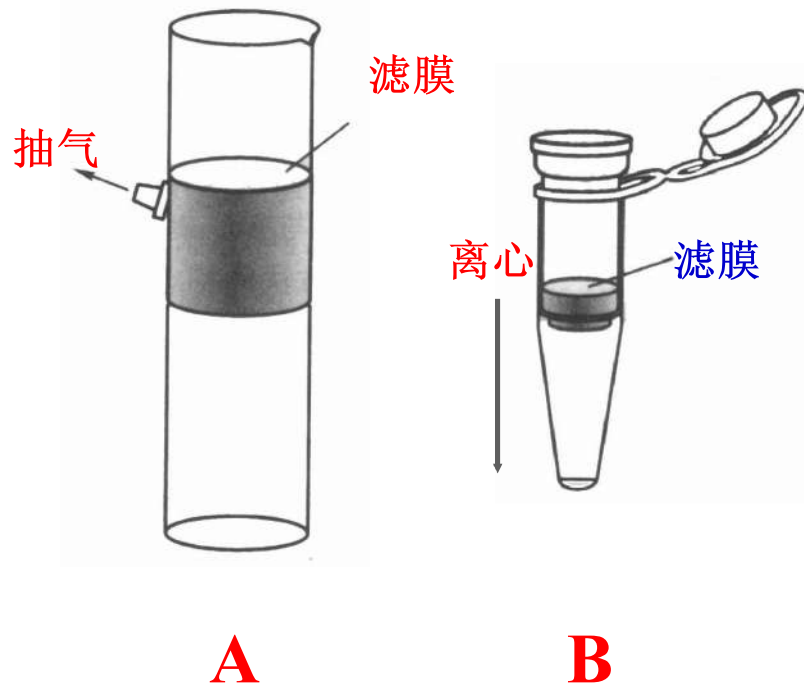
- 玻璃纸（赛璐玢纸，**cellophane paper**）
- 火绵纸（赛璐玢纸，**celloidin paper**）
- 其他改型纤维素材料



超过滤 (ultrafiltration)

利用压力、抽滤 (A) 或离心力 (B) 等多种形式，强行使水和其它小分子溶质通过半透膜，而蛋白质被截留在膜上，以达到浓缩和脱盐目的。滤膜有多种规格，可选择性的截留相对分子量不同的蛋白质。

为了避免被膜截留的蛋白质在膜表面上堆积，现常用**截向流过滤**的方法，即液体在泵驱动下沿着与膜表面相切方向流动，在膜上形成压力，使部分液体透过膜，而另一部分液体切向地流过表面将被膜截留的蛋白质分子冲走。



2、盐溶和盐析

1) . 盐溶的原理

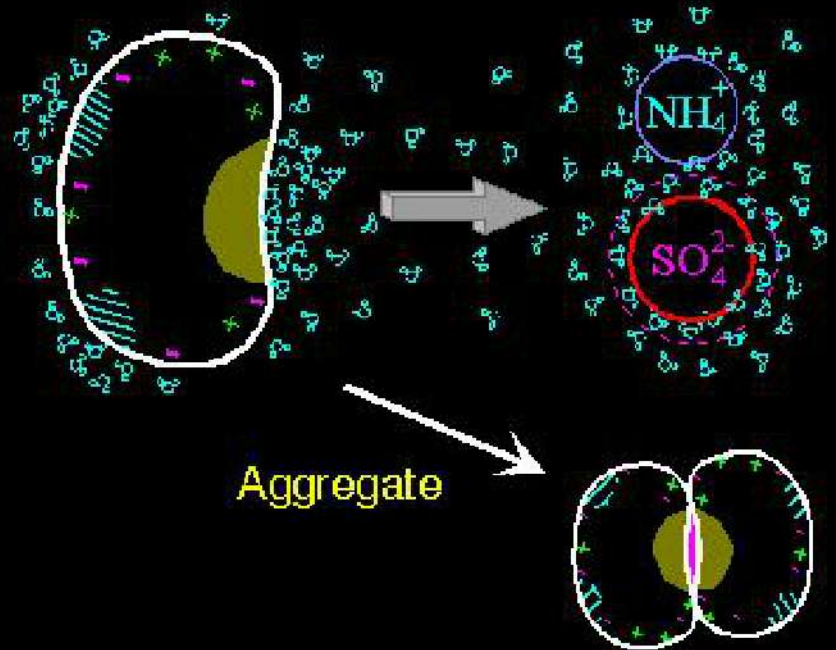
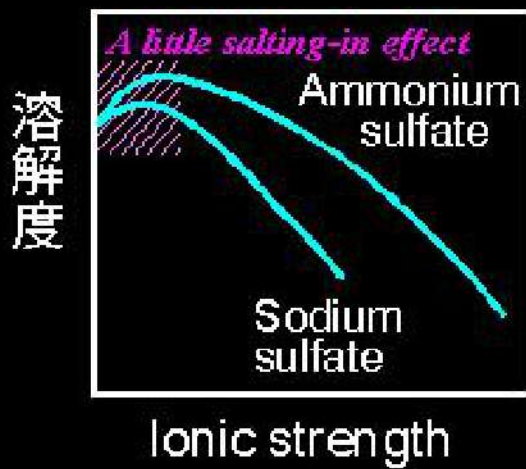
定义：低浓度时，中性盐增加蛋白质的溶解度，这种现象称为盐溶

原理：蛋白质分子吸收盐离子后，相互排斥。

2) . 盐析的原理

定义：一般在低盐浓度的情况下，蛋白质的溶解度随盐浓度的升高而增加，这种现象称为盐溶；而当盐浓度升高到一定程度后，蛋白质的溶解度又随着盐浓度的升高而降低，结果使蛋白质沉淀析出，这种现象称为盐析作用。在同一浓度的盐溶液中，不同蛋白质的溶解度不同，借此可达到彼此分离的目的。

Salting-out:



蛋白質分子表面的疏水性區域，都聚集許多水分子，當鹽類加入時，這些水分子被抽出，以便與鹽離子進行水合，暴露出來的疏水性區域相互結合，形成沉澱。

凝胶过滤

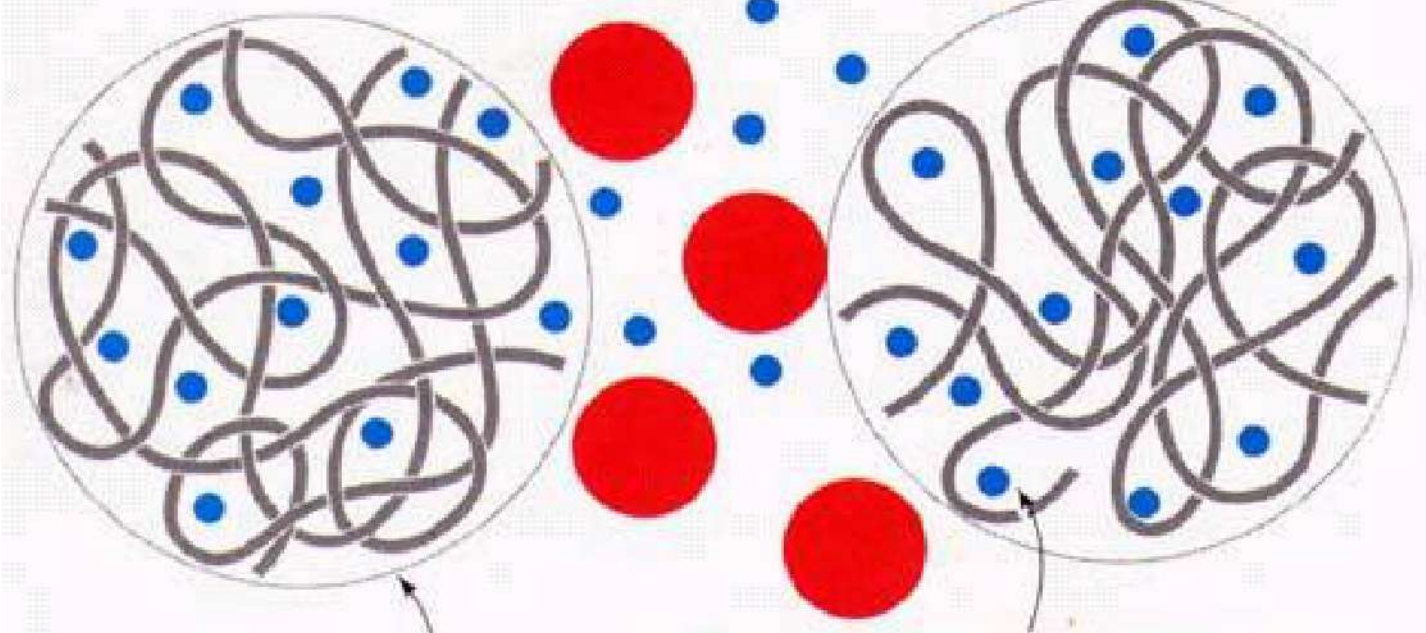
凝胶层析，又称为**凝胶过滤、分子排阻层析或分子筛层析**。是以各种凝胶为固定相，利用流动相中所含各物质的相对分子质量不同而达到物质分离的一种层析技术。其设备简单，操作方便，不需要再生处理即可反复使用，适用于不同相对分子质量的各种物质的分离，已广泛地用于生物化学、生物工程和工业、医药等领域。

一、基本原理

当含有各种组分的样品流经凝胶层析柱时，大分子物质由于分子直径大，不易进入凝胶颗粒的微孔，沿凝胶颗粒的间隙以较快的速度流过凝胶柱。而小分子物质能够进入凝胶颗粒的微孔中，向下移动的速度较慢，从而使样品中各组分按相对分子质量从大到小的顺序先后流出层析柱，而达到分离的目的。

凝胶过滤的原理

Large molecules cannot enter the beads.



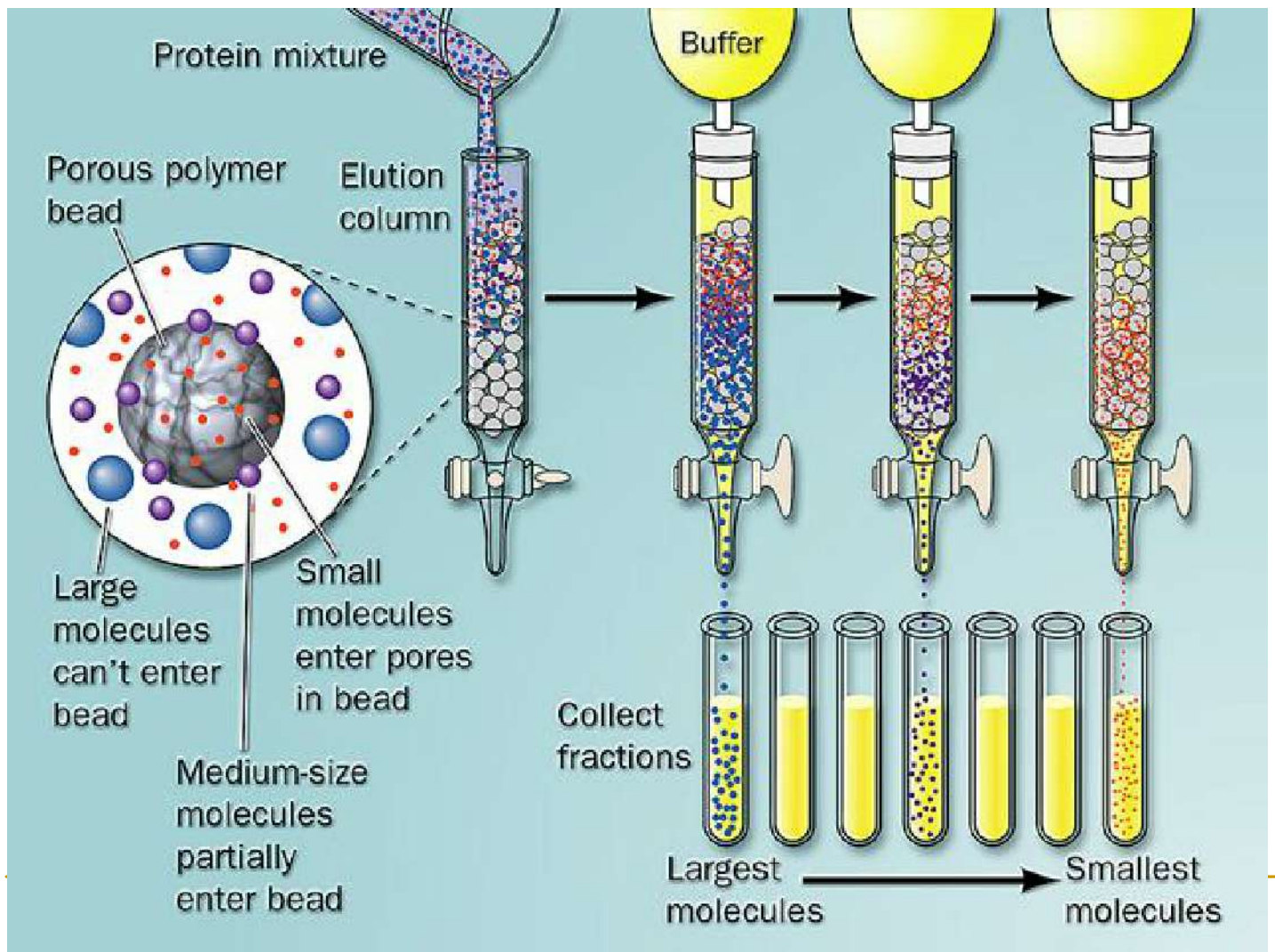
Small molecules enter the aqueous spaces within the beads.

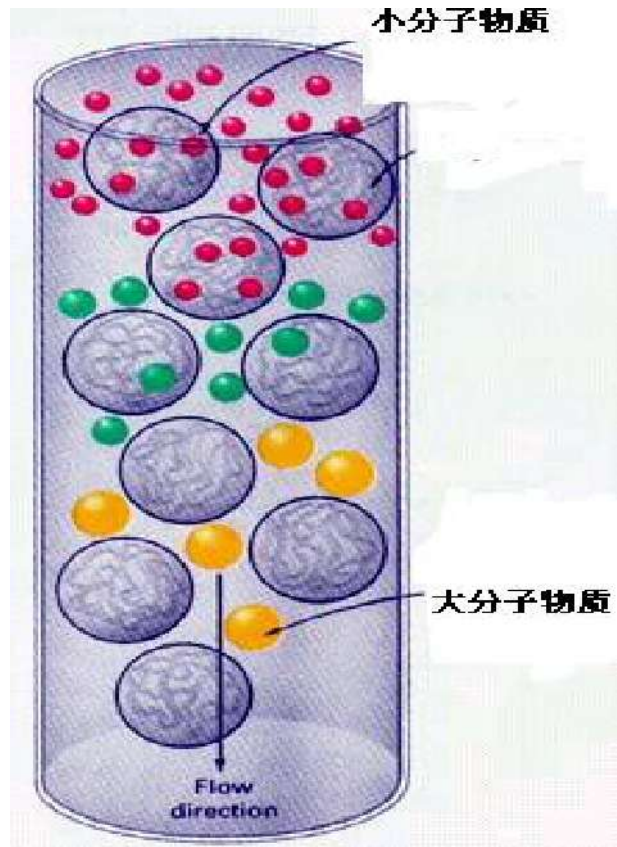
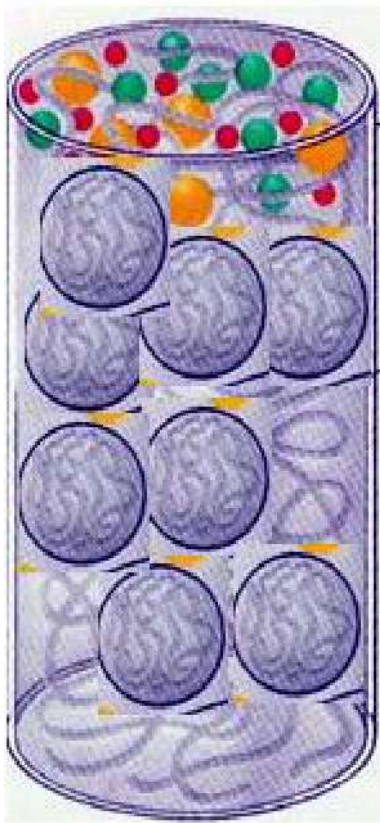
Carbohydrate polymer bead

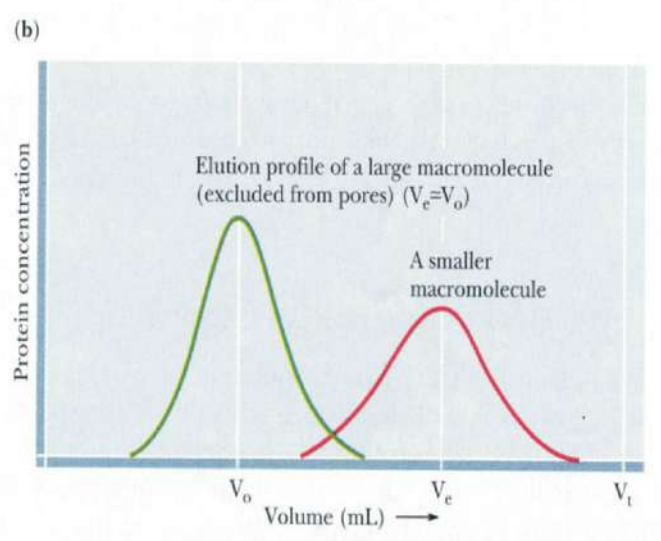
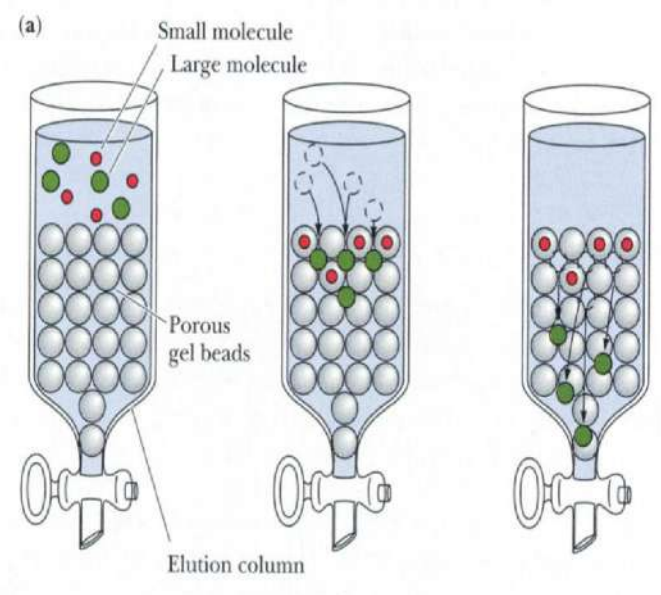
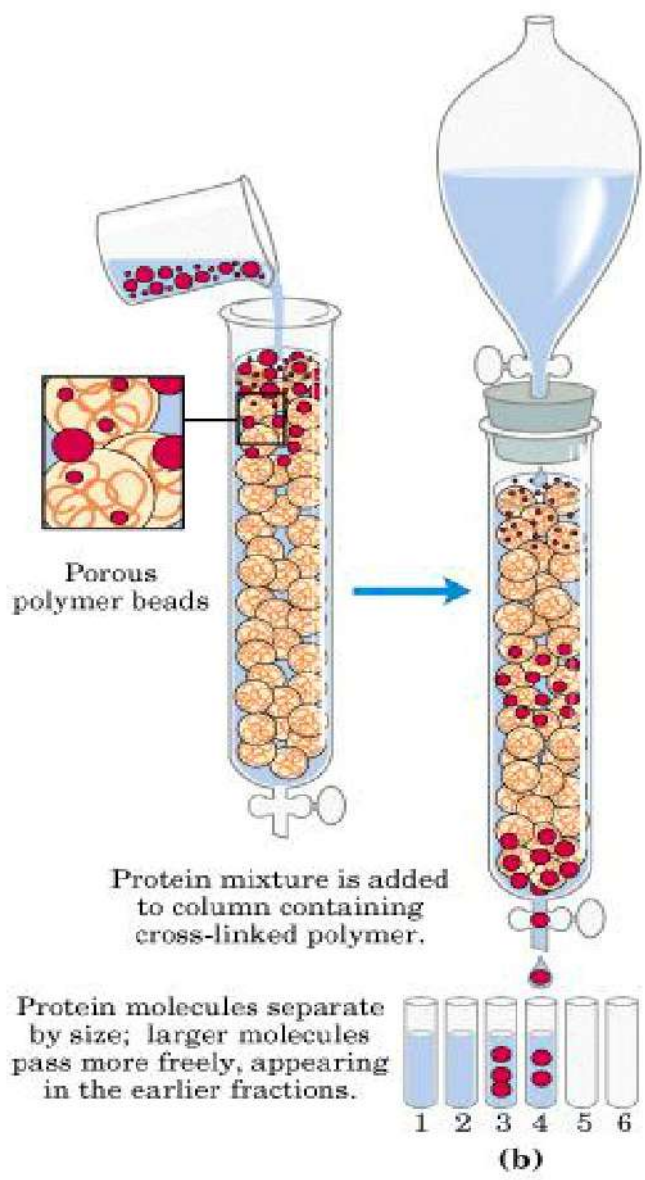
基质 葡聚糖凝胶 (sephadex)
琼脂糖凝胶 (sepharose)

应用 测定分子量
脱盐和浓缩
分离提纯生物大分子
除去热原物质



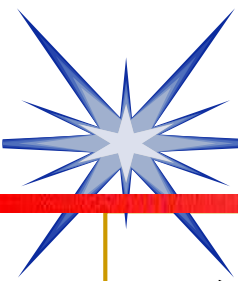






六、蛋白质的含量测定和纯度鉴定

- 1、蛋白质含量测定
 - 2、蛋白质纯度鉴定
-



1、蛋白质含量测定

1) 测定总蛋白质含量主要方法有：

凯氏定氮法、福林酚试剂方法、双缩脲法、紫外吸收法和考马斯亮蓝G-250法（Bradford法）

2) 测定蛋白质混合物中某一蛋白质的含量主要方法有：

利用具有酶或激素性质的蛋白质的反应特性

利用抗原-抗体的反应特性

蛋白质纯化程度常用某一特定蛋白质的含量（活力单位）总蛋白量（质量单位）之比表示。

福林试剂反应

酪氨酸、色氨酸的反应（还原反应）

- 福林试剂：磷钼酸-磷钨酸
- 与双缩脲法结合---**Lowry**法
 - 在碱性条件下，蛋白质与硫酸铜发生反应
 - 蛋白质-铜络合物，将福林试剂还原，产生磷钼蓝和磷钨蓝混合物
 - 灵敏度提高**100**倍

考马斯亮蓝**G-250**

本身为红色，与蛋白质反应呈蓝色

- 与蛋白的亲合力强，灵敏度高
- **1---1000**微克/毫升



2、蛋白质纯度鉴定

生物大分子制备物的均一性（即纯度）的鉴定，要求达到

一维电泳一条带

二维电泳一个点

HPLC和毛细管电泳都是一个峰

【掌握】

蛋白质的酸碱性质；蛋白质的胶体性质与蛋白质的沉淀；蛋白质的盐溶和盐析。

【熟悉】

蛋白质分离纯化的一般原则；蛋白质分离纯化方法

1. 根据分子大小不同的纯化方法
2. 利用溶解度差别的纯化方法
3. 根据电荷不同的纯化方法

【了解】

蛋白质相对分子量的测定；蛋白质的含量测定与纯度鉴定。

小节

1. 蛋白质的生物学作用：功能蛋白、结构蛋白
2. 蛋白质的组成（元素组成、化学组成）及蛋白质含量的测定
3. 二十种氨基酸的结构、分类及名称（三字缩写符、单字缩写符）
4. 氨基酸的重要理化性质：两性解离、光谱学性质、茚三酮显色、与**2,4-二硝基氟苯（DNFB）**反应、与异硫氰酸苯酯（**PITC**）的反应
5. 蛋白质的性质：大分子性质、蛋白质分子量的测定（离心法、凝胶过滤法、**SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法**）、两性解离（等电点、电泳、离子交换）、胶体性质、蛋白质沉淀（可逆沉淀、不可逆沉淀）、蛋白质变性、紫外吸收及颜色反应
6. 蛋白质的分类：按外形及组成分类