

蛋白质浓缩技术介绍及操作简介

简介

蛋白质在制备过程中，由于蛋白分离纯化过程而使得样品变得很稀，澄清后的蛋白质溶液常常需要进行浓缩，以提高蛋白质浓度，减少样品体积，这样有利于随后进一步进行蛋白质色谱纯化。

浓缩技术分类

常用的浓缩方法有吸附法、超滤法、沉淀法、透析干燥法等。每种方法都有自己的优缺点，比如吸附法选择性比较差，不能连续操作，浓缩倍数低；超滤法成本低，操作方便，条件温和，能较好的保持生物大分子活性，回收率高等；沉淀作用对样品中的蛋白质浓度要在 100mg/L 以上，并且由于相变导致收率较低；透析法浓缩需要比较长的时间，体积也受到一定限制；冷冻干燥所需时间长，收率低且在浓缩蛋白的同时也浓缩了盐。

吸附法

吸附法是指通过吸附剂直接吸收除去溶液中水分子使之浓缩。所用的吸附剂必须与溶液不起化学反应，对蛋白不吸附，易于溶液分开。吸附法是最简单快速的浓缩蛋白质溶液的方法，所需仪器简单，适用于稳定性较差的蛋白质。常用的吸附法主要有透析袋浓缩和凝胶浓缩。

超滤法

超滤法是使用一种特殊的薄膜，能够对溶液中各种溶质分子进行选择过滤。液体在一定压力作用下通过膜时，溶剂和小分子透过，大分子受阻保留。该方法最适于生物大分子尤其是蛋白质的浓缩或脱盐。应用超滤法的关键在于膜的选择，水的流速，分子量和截止值等。

沉淀法

沉淀法是早期的蛋白纯化分离方法，但现在只用于蛋白质的初步分离，然后采用色谱法进一步纯化。蛋白质分子在水溶液中离子集团相互作用，通过改变 PH 值或离子强度，加入有机溶剂或多聚物，可以促进蛋白质分子凝聚，形成蛋白质沉淀，再通过离心或过滤可以获得沉淀物，然后利用合适的缓冲液清洗，溶解沉淀物，再经过透析或凝胶过滤，除去残留的溶剂成分。

浓缩操作实验方法

透析袋浓缩

材料：

50%乙醇

10mmol/L EDTA , PH 8.0

0.05mmol/L NaHCO₃

1g/L 叠氮钠

蛋白质溶液

透析袋

透析袋夹

方法：

1. 选择合适 MWCO 的透析袋，剪下需要长度的干透析袋，只能用无粉手套触摸透析袋；
2. 用透析夹关闭透析袋的一端，把蛋白样品加入透析袋中，再关闭另一端，在透析袋里留下一定的空间，并检查每一端样品有无渗漏；
3. 将装好样品的透析袋放入装有透析缓冲液的烧杯中，确信透析袋被完全浸没，然后把烧杯放在磁力搅拌器上搅拌，整个装置放在有适当温度（通常为 4℃，以增加蛋白质稳定性）的环境中；
4. 可以通过测定透析缓冲液缓冲液的电导来检测，当透析液的电导增加慢下来时，就更换缓冲液，直到在经过 1~2h 的搅拌后电导基本保持不变为止，如果没有电导仪，至少再换一次缓冲液，间隔时间为 4~6h，若样品体积较大或透析袋大于 20mm，间隔时间可为 8~12h；
5. 从缓冲液中取出透析袋，用蒸馏水冲洗，除去夹子后将透析过的样品小心倒入容器内；
6. 通过比较透析样品和未用过的透析缓冲液的电导值，证实达到所希望的盐浓度。

如何处理新的透析袋

将减下的新的透析袋浸入蒸馏水中，用手指捏住透析袋将两层分开，先用 50%乙醇彻底冲洗透析袋里外侧（如果是蛋白方面的工作，建议不要煮透析袋，为了更彻底地除去甘油和硫，可以将透析袋浸入到 50%的乙醇中），然后在 一个 1L 的烧杯中混合 400mL 10mmol/L EDTA (PH 8.0) 和 400mL 0.05mmol/L NaHCO₃，将透析袋移入烧杯

中，用磁力搅拌器搅拌 30min；用 800mL 水替换溶液，搅拌 10min，重复一次，将透析袋移入新蒸馏水中。透析袋用完之后，4°C 保存于含 0.1% 叠氮化钠的水中，任何时候都不要让透析袋变干。

超滤浓缩

浓缩样品

1. 要浓缩的样品含盐量必须 0.3M 以上，含盐量低的样品须补加到 0.3M NaCl；
2. 在内管（附有 3KD 膜）中加入 500 μ l 样品，将内管套入外管；
3. 对称放置离心管，14520rpm（即 14000g）离心。（离心 5min 约浓缩 2 倍，10min 约 4 倍，15min 约 6 倍，20min 约 8 倍，30min 约 10 倍）；
4. 离心结束后，将内管倒置套在另一个干净的离心管呢，3880rpm 离心 min 收集浓缩后的样品。或者用移液器直接吸出内管中的样品。

浓缩管使用后的处理和保存

1. 使用完的浓缩管，立即加入 500 μ l 含 1M NaCl 的缓冲液（此缓冲液与浓缩样品的缓冲液一致），8000rpm 离心 20min；
2. 甩净内管中的盐溶液，将内管放入超纯水中浸泡 1h；
3. 内管加入超纯水 500 μ l，8000rpm 离心 5min；
4. 甩净内管中的水，加入 500 μ l 0.2M NaOH，8000rpm 离心 20min；
5. 甩净内管中的 NaOH 溶液，用超纯水再 8000rpm 离心 5min；
6. 甩净内管中的水，放入含 0.2-0.5‰ NaN₃ 的生理盐水中；
7. 外管用自来水洗净后，用超纯水冲洗干净，晾干。

