

蛋白纯化方法选择

蛋白纯化的目的是将目标蛋白质从细胞裂解液的全部组分中分离出来，同时仍保留蛋白的生物学活性及化学完整性。蛋白质的分离和提纯工作是一项艰巨而繁重的任务，需根据蛋白的特性选择合适的纯化方法来提高获得的蛋白制品的纯度。

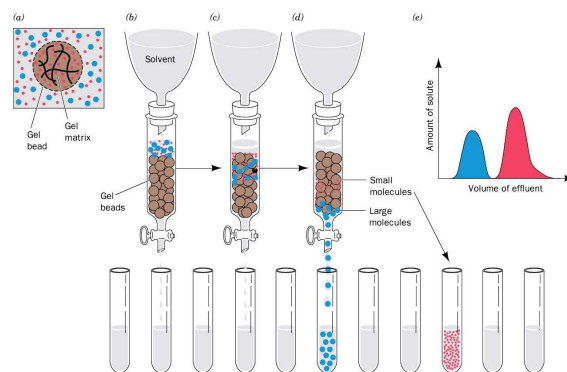
蛋白纯化方法

蛋白纯化的原理为：不同蛋白质的氨基酸序列及空间结构不同，导致其在物理、化学、生物学等性质上存在差异，利用待分离蛋白质与其它蛋白质性质上的差异，即可以设计出一套合理的蛋白纯化方案。

蛋白的纯化大致分为粗分离阶段和精细纯化阶段两个阶段。粗分离阶段主要将目的蛋白和其他细胞成分如 RNA、DNA 等分开，常用的方法为硫酸铵沉淀法。精细纯化阶段的目的是把目的蛋白与其他大小及理化性质接近的蛋白区分开来，常用的方法有：凝胶过滤层析、离子交换层析、疏水层析、亲和层析等。

凝胶过滤层析

凝胶过滤（也叫排阻层析或分子筛）是一种根据分子大小从混合物中分离蛋白质的方法。不同蛋白的形状及分子大小存在差异，在混合物通过含有填充颗粒的凝胶过滤层析柱时，由于各种蛋白的分子大小不同，扩散进入特定大小孔径颗粒内的能力也各异，大的蛋白分子会被先洗脱出来，分子越小，越晚洗脱，从而达到分离蛋白的目的。一般来说，凝胶过滤层析柱越细、越长纯化的效果越好。[凝胶过滤层析详细介绍](#)



凝胶过滤层析所能纯化的蛋白分子量范围很宽 纯化过程中也不需要能

引起蛋白变性的有机溶剂。缺点是所用树脂有轻度的亲水性，电荷密度较高的蛋白容易吸附在上面，不适宜纯化电荷密度较高的蛋白。

离子交换层析

离子交换层析是一种依据蛋白表面所带电荷量不同进行蛋白分离纯化的技术。蛋白表面通常会带有一定的电荷，电荷的氨基酸残基均匀地分布在蛋白质的表面，在一定条件下可以与阳离子交换柱或阴离子交换柱结合。这种带电分

子与固定相之间的结合作用是可逆的，在改变 pH 或者用逐渐增加离子强度的缓冲液洗脱时，离子交换剂上结合的物质可与洗脱液中的离子发生交换而被洗脱到溶液中。由于不同物质的电荷不同，其与离子交换剂的结合能力也不同，所以被洗脱到溶液中的顺序也不同，从而达到分离的效果。离子交换色谱的基本原理及实验操作

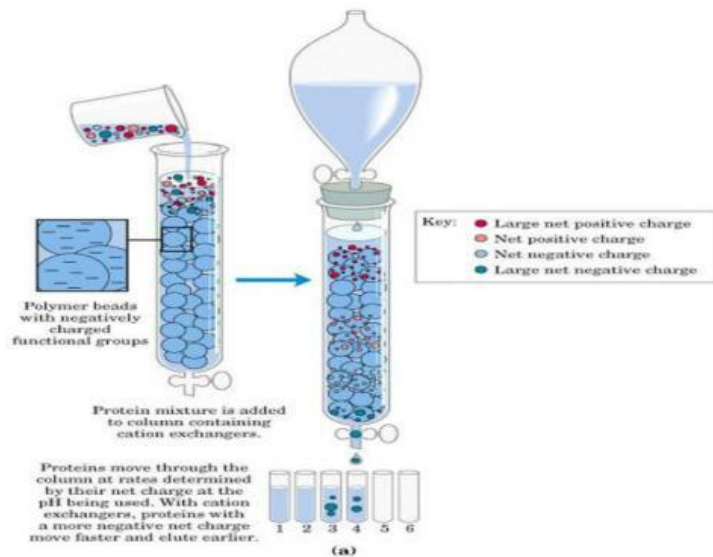
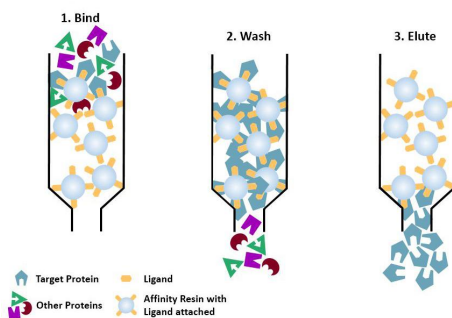


图 2：离子交换层析纯化蛋白

亲和层析



亲和层析纯化是利用生物大分子物质具有与某些相应的分子专一性可逆结合的特性进行蛋白纯化的技术。该方法

适用于从成分复杂且杂质含量远大于目标物的混合中提纯目标物，具有分离效果好、分离条件温和、结合效率高、分离速度快的优点。亲和层析技术可以利用配基与生物分子间的特异性吸附来分离蛋白，也

可以在蛋白上加入标签，利用标签与配基之间的特异性结合来纯化蛋白。

配基与生物分子之间的特异性吸附

配基：在亲和层析中起可逆结合的特异性物质称为配基。配基可以是酶的底物、抑制剂、辅因子、特异性的抗体等。

亲和层析是根据固定相的配基与生物分子之间的亲和能力不同来进行相互分离的。依据选择性的高低亲和层析可以分为基团性亲和层析及高选择性（专一性）亲和层析。基团亲和层析一种配基可以吸附多种蛋白，如以三嗪染料为

配基纯化含有糖基的一类蛋白质或糖蛋白，高选择性亲和层析一种配基只能吸附一种蛋白，如单克隆抗体对抗原的特异性的吸附。

标签纯化

利用基因工程技术在蛋白的氨基端或羧基端加入少许几个额外氨基酸，这个加入的标记可用来作为一个有效的纯化依据。[蛋白纯化标签选择](#)

GST 标签纯化：在蛋白质序列中加入谷胱甘肽 S 转移酶（GST），然后利用 Glutathione Sepharose 4B 作亲和纯化，再利用凝血酶或因子 Xa 切开。

His 标签纯化：组氨酸标记（His-tag）是最通行的标记之一，在蛋白质的氨基端加上 6~10 个组氨酸，在一般或变性条件（如 8M 尿素）下借助它能与 Ni²⁺螯合柱紧紧结合的能力，用咪唑洗脱，或将 pH 降至 5.9 使组氨酸充分质子化，不再与结合 Ni²⁺使之得以纯化。[His 标签纯化介绍](#)

疏水作用层析

疏水作用层析是利用盐-水体系中样品分子的疏水基团和层析介质的疏水配基之间疏水力的不同而进行分离的一种层析方法。该法利用了蛋白的疏水性，蛋白经变性处理或处于高盐环境下疏水残基会暴露于蛋白表面，不同蛋白疏水残基与固定相的疏水性配体之间的作用强弱不同，依次用从高至低离子强度洗脱液可将疏水作用由弱至强的组分分离。

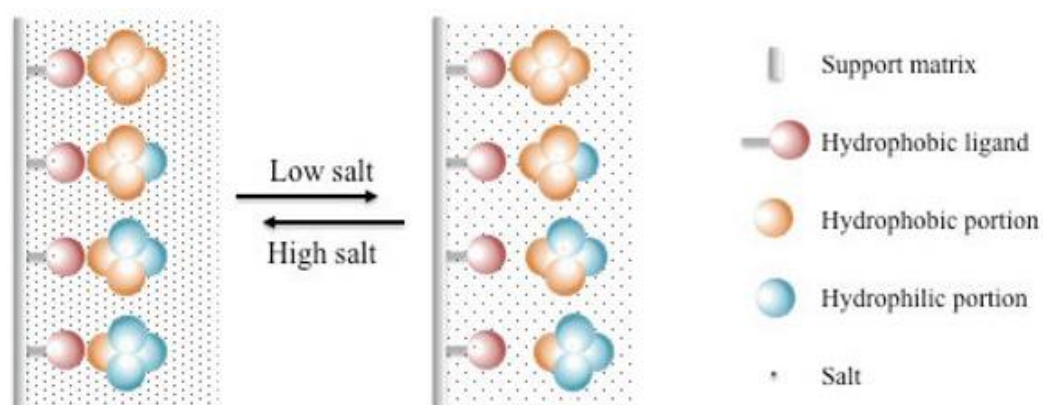


图 4：疏水作用层析纯化蛋白

疏水作用层析实验操作成本低且纯化得到的蛋白具有生物学活性，是一种通用型的分离和纯化蛋白质的方法。该实验遵循“高盐上样，低盐洗脱”的原则：高浓度盐水溶液中蛋白质在柱上保留，在低盐或水溶液中蛋白质从柱上被

洗脱，特别适用于浓硫酸铵溶液沉淀分离后的母液以及该沉淀用盐溶解后的含有目标产品的溶液直接进样到柱上，当然也适用 7mol/盐酸胍或 8mol/L 脲的大肠杆菌表达蛋白提取液直接进样到柱上，在分离的同时也进行了复性。

层析方法	凝胶过滤层析	离子交换层析	疏水层析	亲和层析
分离机制	大小	电荷	疏水性	特异性亲和
选择性	中等	高	高 - 中等	非常高
载量	低	高	高	高
纯化速度	中等 - 低	高	高	高
生物相容性	非常好	好	中等 - 好	好
目标蛋白的得率	高	高	中等 - 高	高
捕获浓缩阶段	+	+++	+++	+++
中间纯化阶段	+	+++	+++	+++
精制纯化阶段	+++	+++	+	++

表 1：常用层析方法对比

其他纯化方法

对于具有特殊性质的蛋白，可以利用特殊的方法对其进行纯化，下面就一些蛋白的特殊性质及纯化方法做一介绍。

可逆性缔合：在某些溶液条件下，有一些酶能聚合成二聚体、四聚体等，而在另一种条件下则形成单体，如相继在这两种不同的条件下按大小就可以进行分级分离。

热稳定性：大多数蛋白质加热到 95°C 时会解折叠或沉淀，利用这一性质，可容易地将一种经这样加热后仍保持其可溶性活性的蛋白质从大部分其它细胞蛋白质中分离开。

蛋白酶解稳定性：用蛋白酶处理上清液消化杂蛋白，可以纯化得到具有蛋白酶解抗性的蛋白质。

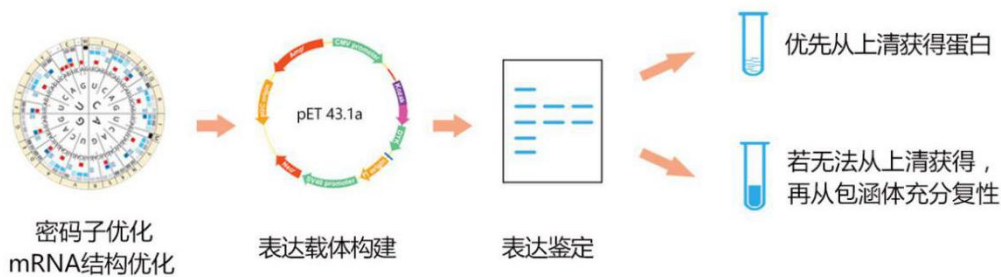
溶解度：影响蛋白质溶解度的外界因素很多，如溶液的 pH、离子强度、介电常数和温度等。在特定的外界条件下，不同的蛋白质具有不同的溶解度。适当改变外界条件，控制蛋白质混合物中某一成分的溶解度从而将其从溶液中析出。

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

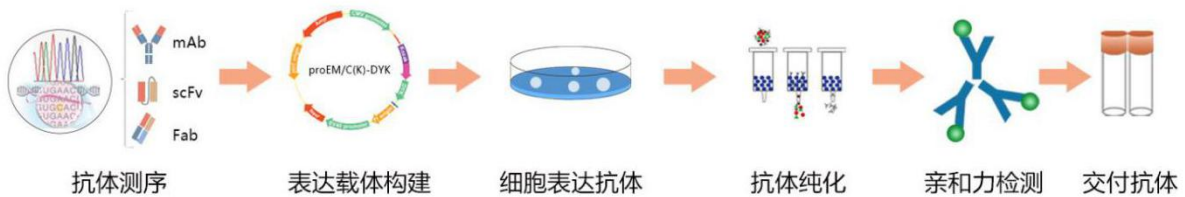
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

