

蛋白质分离纯化一般程序

分离提纯某一种蛋白质时，首先要把蛋白质从组织或细胞中释放出来并保持原来的天然状态，不丧失活性。所以要采用适当的方法将组织和细胞破碎。

常用的破碎组织细胞的方法有：

1. 机械破碎法

这种方法是利用机械力的剪切作用，使细胞破碎。常用设备有，Gd200 高通量组织研磨仪、匀浆器、研钵通等。

2. 渗透破碎法

这种方法是在低渗条件使细胞溶胀而破碎。

3. 反复冻融法

生物组织经冻结后，细胞内液结冰膨胀而使细胞胀破。这种方法简单方便，但要注意那些对温度变化敏感的蛋白质不宜采用此法。

4. 超声波法

使用超声波震荡器使细胞膜上所受张力不均而使细胞破碎。

5. 酶法

如用溶菌酶破坏微生物细胞等。

蛋白质分离纯化抽提：

通常选择适当的缓冲液溶剂把蛋白质提取出来。抽提所用缓冲液的 pH、离子强度、组成成分等条件的选择应根据欲制备的蛋白质的性质而定。如膜蛋白的抽提，抽提缓冲液中一般要加入表面活性剂(十二烷基磺酸钠、tritonX-100 等)，使膜结构破坏，利于蛋白质与膜分离。在抽提过程中，应注意温度，避免剧烈搅拌等，以防止蛋白质的变性。

蛋白质粗制品的获得：

选用适当的方法将所要的蛋白质与其它杂蛋白分离开来。比较方便的有效方法是根据蛋白质溶解度的差异进行的分离。常用的有下列几种方法：

1. 等电点沉淀法

不同蛋白质的等电点不同，可用等电点沉淀法使它们相互分离。

2. 盐析法

不同蛋白质盐析所需要的盐饱和度不同，所以可通过调节盐浓度将目的蛋白沉淀析出。被盐析沉淀下来的蛋白质仍保持其天然性质，并能再度溶解而不变性。

3. 有机溶剂沉淀法

中性有机溶剂如乙醇、丙酮，它们的介电常数比水低。能使大多数球状蛋白质在水溶液中的溶解度降低，进而从溶液中沉淀出来，因此可用来沉淀蛋白质。此外，有机溶剂会破坏蛋白质表面的水化层，促使蛋白质分子变得不稳定而析出。由于有机溶剂会使蛋白质变性，使用该法时，要注意在低温下操作，选择合适的有机溶剂浓度。