

# 第二章 蛋白质研究技术

## 第一节 蛋白质的分离纯化

## 第二节 蛋白质的鉴定

## 第三节 蛋白质的检测

## 第四节 蛋白质的结构分析

# 第一节 蛋白质的分离与纯化

一、蛋白质分离纯化的基本原则

二、蛋白质分离纯化的方法

# 一、蛋白质分离纯化的基本原则

- 1、选择丰度高、便于提前的材料
- 2、了解目的蛋白质的稳定性
- 3、探索有效的抽提法和浓缩法
- 4、建立一套层析的组合
- 5、以较好的方法贮存

# 一、蛋白质分离纯化的方法

粗提：

- ① 盐析
- ② 结晶
- ③ 有机溶剂沉淀
- ④ 等电点沉淀

精提：

- ① 离心 (**centrifugation**)
- ② 电泳 (**electrophoresis**)
- ③ 层析 (**chromatography**)

# ① 离心（centrifugation）

原理：悬液中的各种粒子（细胞，细胞器及分子）有不同的质量（**mass**）或密度（**density**），因此在离心场中有不同沉降速率。

- 不同的蛋白质分子量差别很大，但密度差别很小。蛋白质的平均密度是  $1.37 \text{ g/cm}^3$ 。除非蛋白质结合了脂或碳水化合物，蛋白质之间密度的差异不会超过 15%。
- 离心力由转子中心到蛋白质界面的距离来决定。

# 离心（centrifugation）

- ▣ 沉降系数（**sedimentation constant**）：每单位离心场的速度（**S**）。与蛋白质的密度和形状有关，也与介质的密度和粘度有关。
- ▣ 离心可用于两个方面：
  - ✎ 作为**分离技术**：从混合物中分离一种成分；
  - ✎ 作为**分析技术**：测定物质的物理性质，如分子量，密度，形状及平衡结合常数（**equilibrium binding constants**）。

# 离心 (centrifugation)

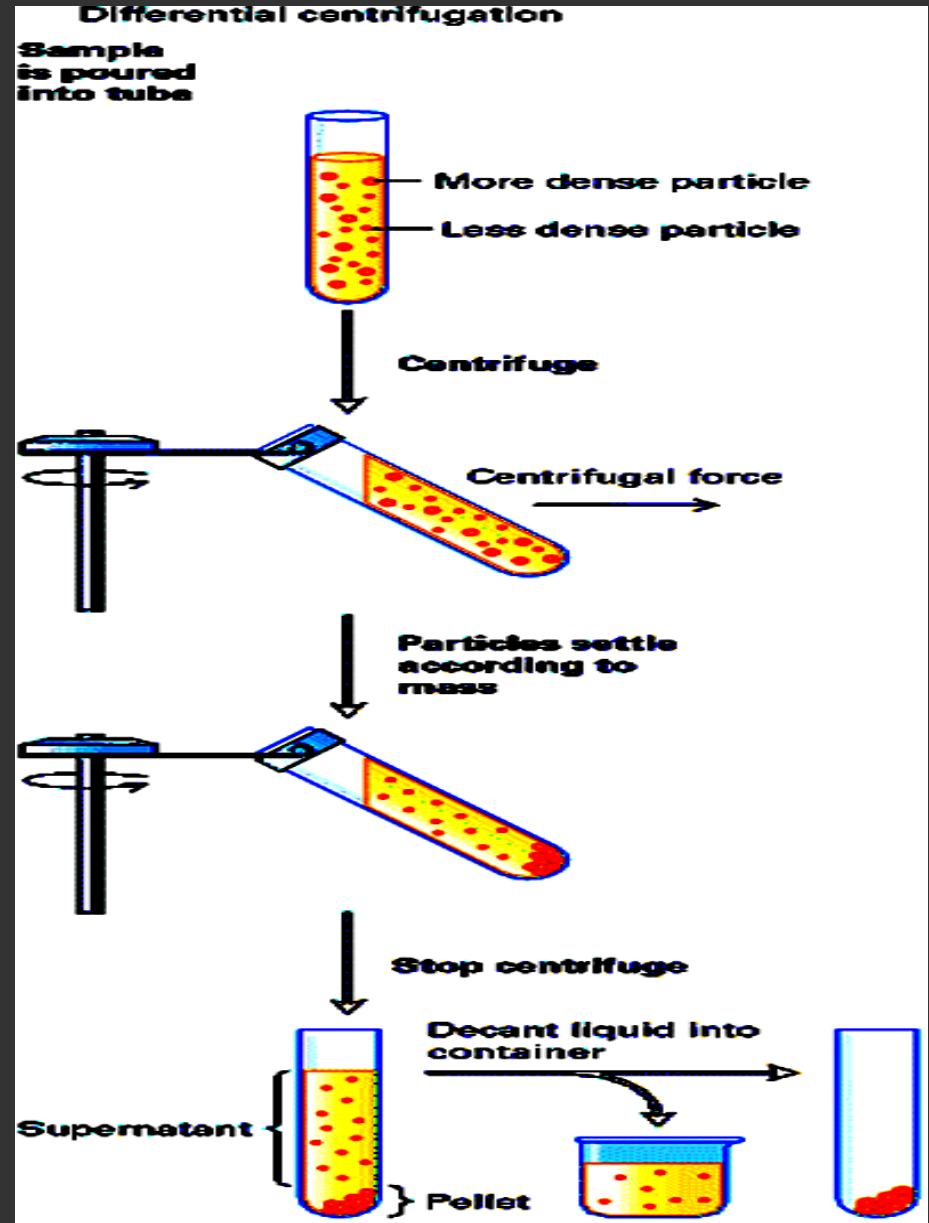
I. 差速离心 (differential centrifugation)

II. 速率区带离心 (rate-zonal centrifugation)

# I. 差速离心 (differential centrifugation)

从组织匀浆中把可溶性的蛋白质与细胞的不溶性成分分开。

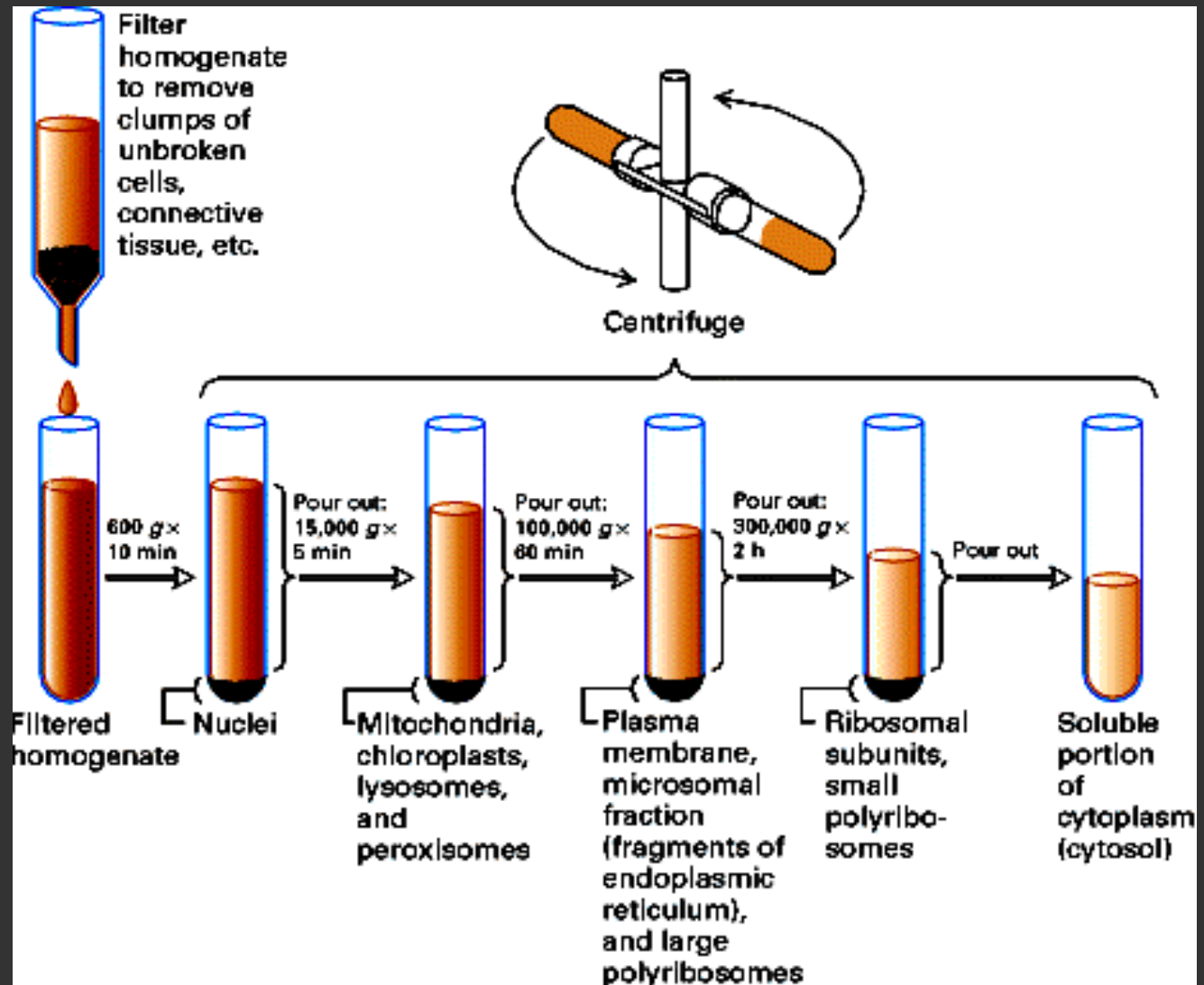
离心后，蛋白质留在上清液 (supernatant) 中，其他成分形成沉淀 (pellet)





# 差速离心 (differential centrifugation)

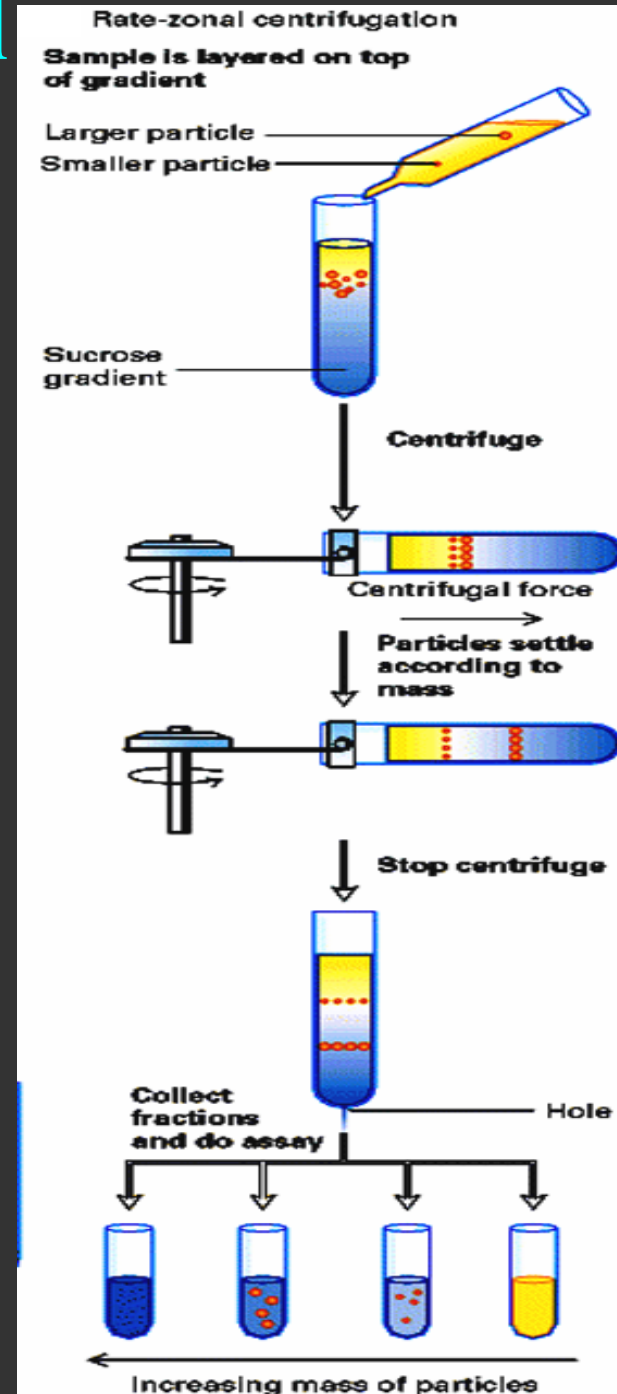
采用不同的  
速度和时间  
可以分离不  
同的细胞结  
构



速度 ↑ 时间 ↑

## II. 速率区带离心 (rate-zonal centrifugation)

- 👉 用蔗糖、甘油或氯化铯形成密度度；
- 👉 高速离心机 ( $\sim 40,000$  r/min) ；
- 👉 离心后，被分离的物质分布在相的密度区带内；
- 👉 注意：控制时间。 太短，达不到充分分离； 太长，分离物沉淀到心管底部。

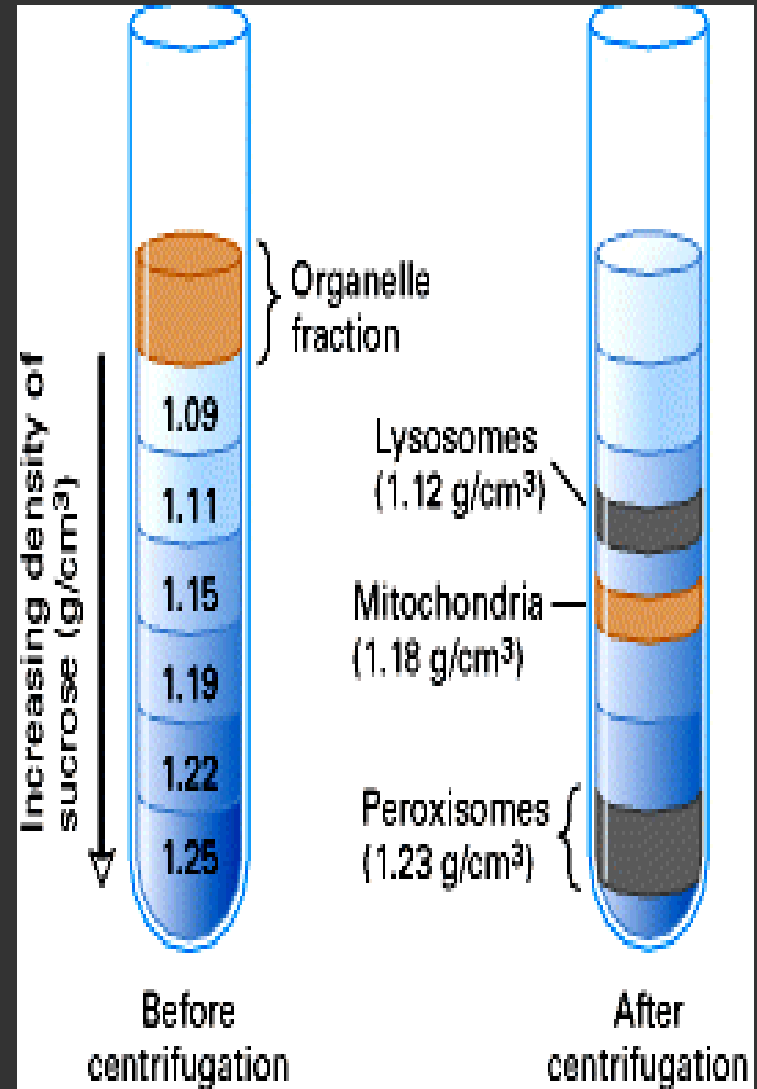


# 速率区带离心 (rate-zonal centrifugation)

不能精确测定分子量，因为蛋白质的形状差异也影响沉降率；

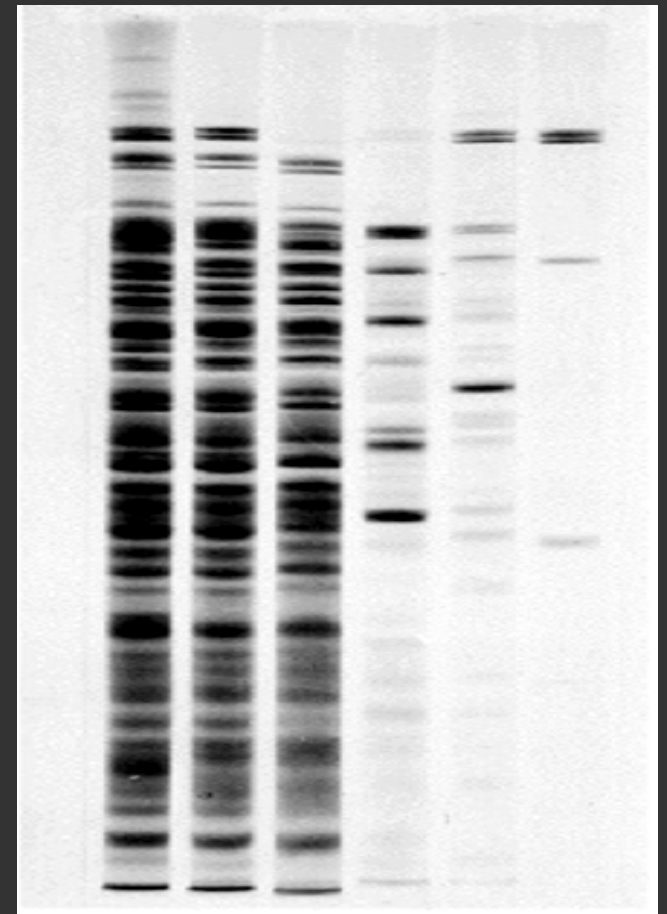
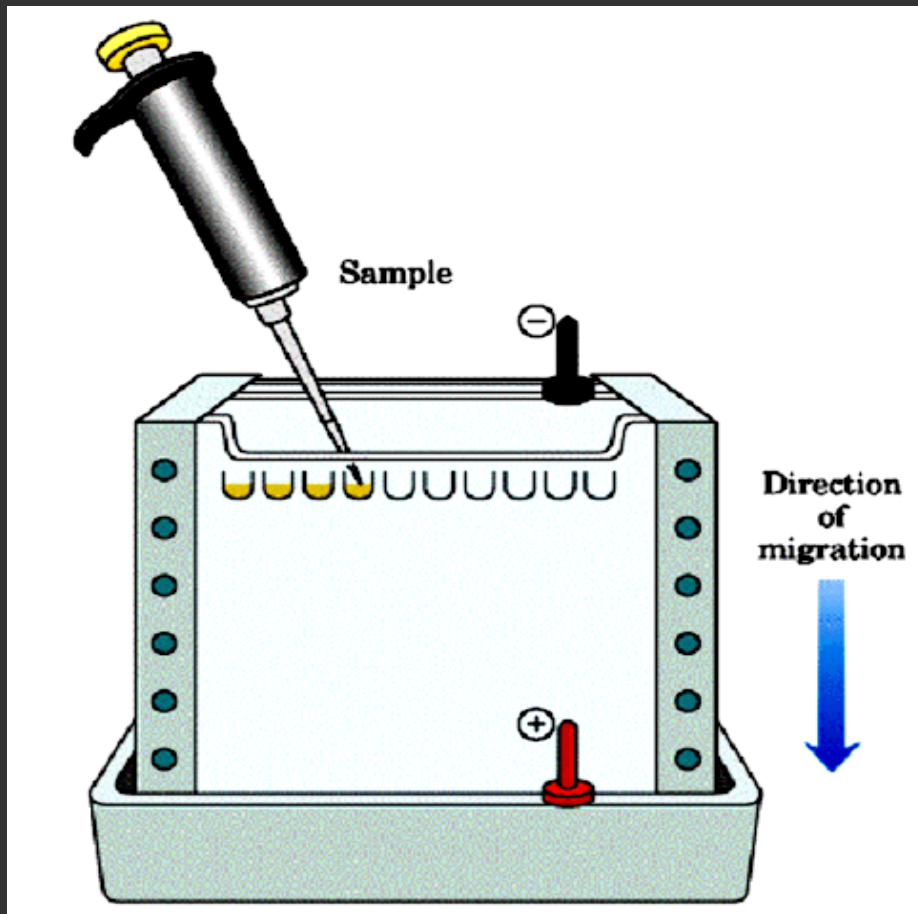
一次分离多种不同类型聚合物或颗粒的最有效方法

平衡密度梯度离心 (equilibrium density-gradient centrifugation) :  
用于分离 DNA 和细胞器



## ② 电泳 (electrophoresis)

带电颗粒在电场中的移动的速度，由电荷-质量比决定。



# 电泳 (electrophoresis)

I. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

II. 等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF)

III. 双向电泳 (two-dimensional gel electrophoresis)

IV. 脉冲电泳 (pulsed-field gel electrophoresis)

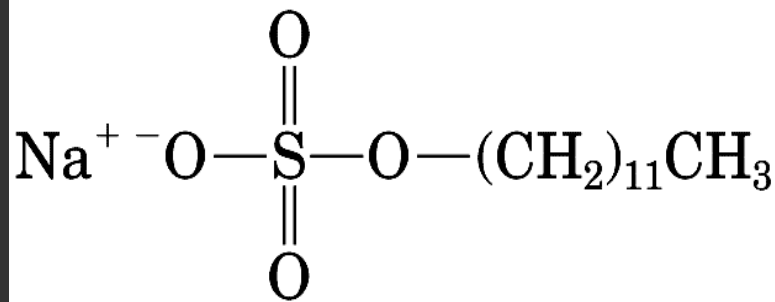
# I. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

## 凝胶

- 🔒 丙烯酰胺 (acrylamide)，甲叉双丙烯酰胺 (methylenebisacrylamide) 聚合而成；
- 🔒 凝胶孔径：选择丙烯酰胺浓度，甲叉双丙烯酰胺胶联剂的浓度；
- 🔒 凝胶有分子筛效应。

# SDS -PAGE

## SDS (sodium dodecyl sulfate)



Sodium dodecyl sulfate  
(SDS)

🔒 阴离子洗涤剂，几乎能破坏

天然蛋白质中所有的非共价键，从而使多亚基蛋白质解聚，并使多肽链呈伸展状态，消除了蛋白质形状对迁移率 (**migration rate**) 的影响；

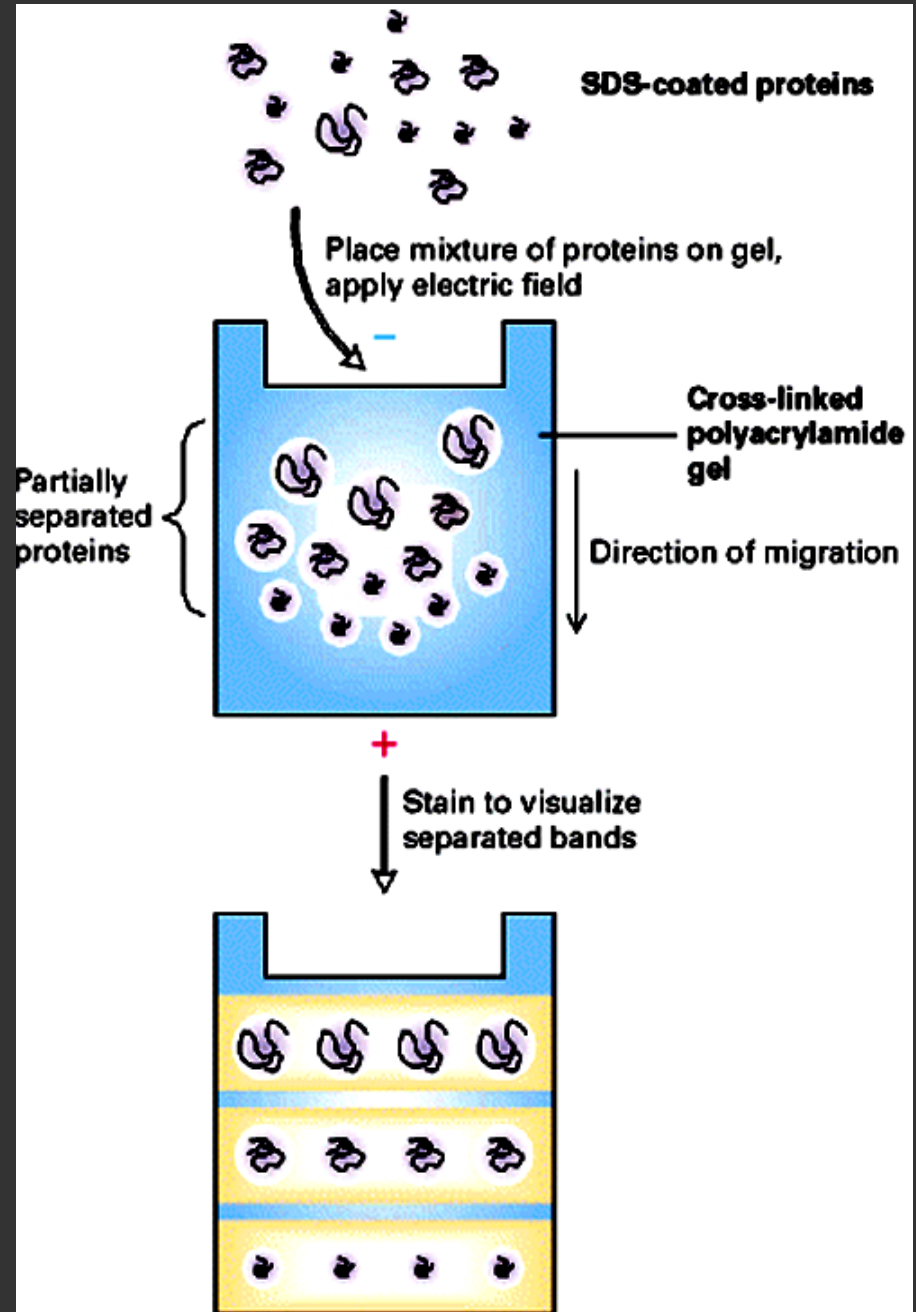
🔒 SDS 以 1:2 的比例与肽链中的氨基酸残基结合，使变性蛋白质带上大量的净负电荷，而且电荷量与蛋白质分子量 (即肽链长度) 成正比。所以**分子量成为决定蛋白质迁移率的唯一因素。**

# SDS -PAGE

🔒 SDS-PAGE 分离的蛋白质可以用 Coomassie blue 染色，也可银染（silver stain）

🔒 SDS-PAGE 能分离分子量差异小于 10% 的蛋白质

🔒 用于蛋白质纯化和分子量近似值测定





## II. 等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF)

- 🔒 在凝胶上加入一种两性电解质 (ampholyte)，电泳时会形成连续的 pH 梯度
- 🔒 电泳后，各种蛋白质停留在与其等电点 (pI) 相同的位置
- 🔒 IEF 产生三种效应：浓缩效应，分子筛效应和电荷效应
- 🔒 IEF 能分离 pI 值仅相差 0.01 的蛋白质 (即一个净电单位)

# III. 双向电泳 (two-dimensional gel electrophoresis)

分离分子量差异很小的蛋白质

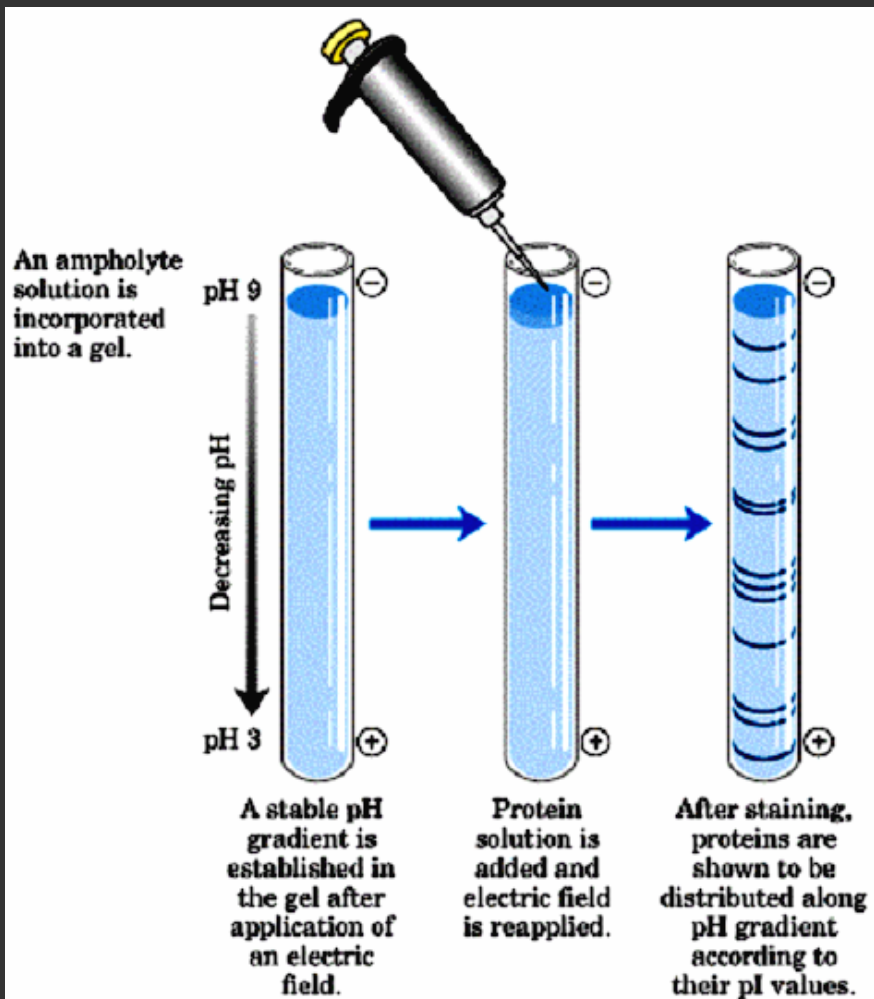
双向电泳 = **IEF** + **SDS-PAGE**

第一向：根据电荷差异用 **IEF** 分离

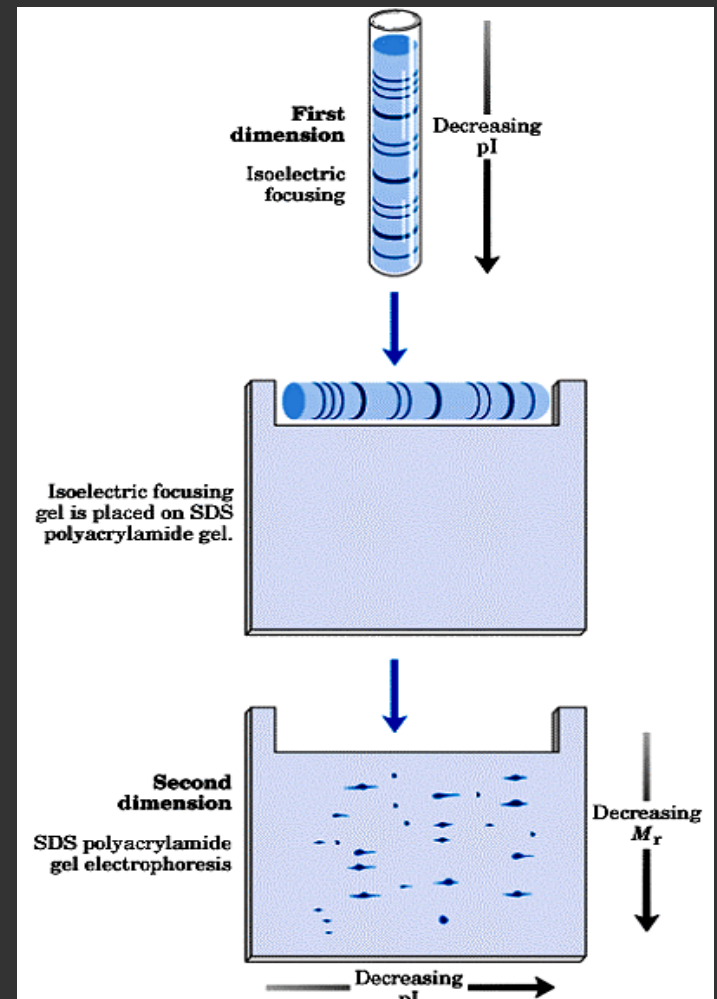
第二向：根据分子量差异用 **SDS-PAGE** 分离

# 双向电泳 (two-dimensional gel electrophoresis)

## IEF



## SDS-PAGE



# 双向电泳 (two-dimensional gel electrophoresis)

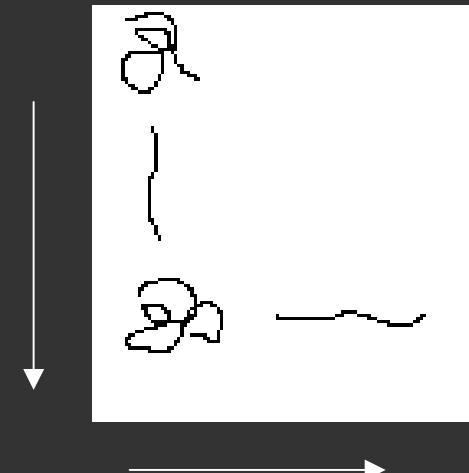


每一个点代表一条多肽链，每一条多肽链有自己的等电点和分子量。多肽链可以用染色法或放射自显影进行检测

# IV. 脉冲电泳 (pulsed-field gel electrophoresis)

🔒 用于分离大片段 DNA (20 kb~10 Mb)

🔒 在电场中，大片段 DNA 以伸展的方式进行移动



🔒 断电后，DNA 分子卷曲成不规则形状。

**DNA 从伸展到卷曲所需要的时间与其长度成正比**

🔒 然后改变电泳方向  $90^\circ$  或  $180^\circ$  再次通电如此反复进行，逐步把不同大小的 DNA 分开

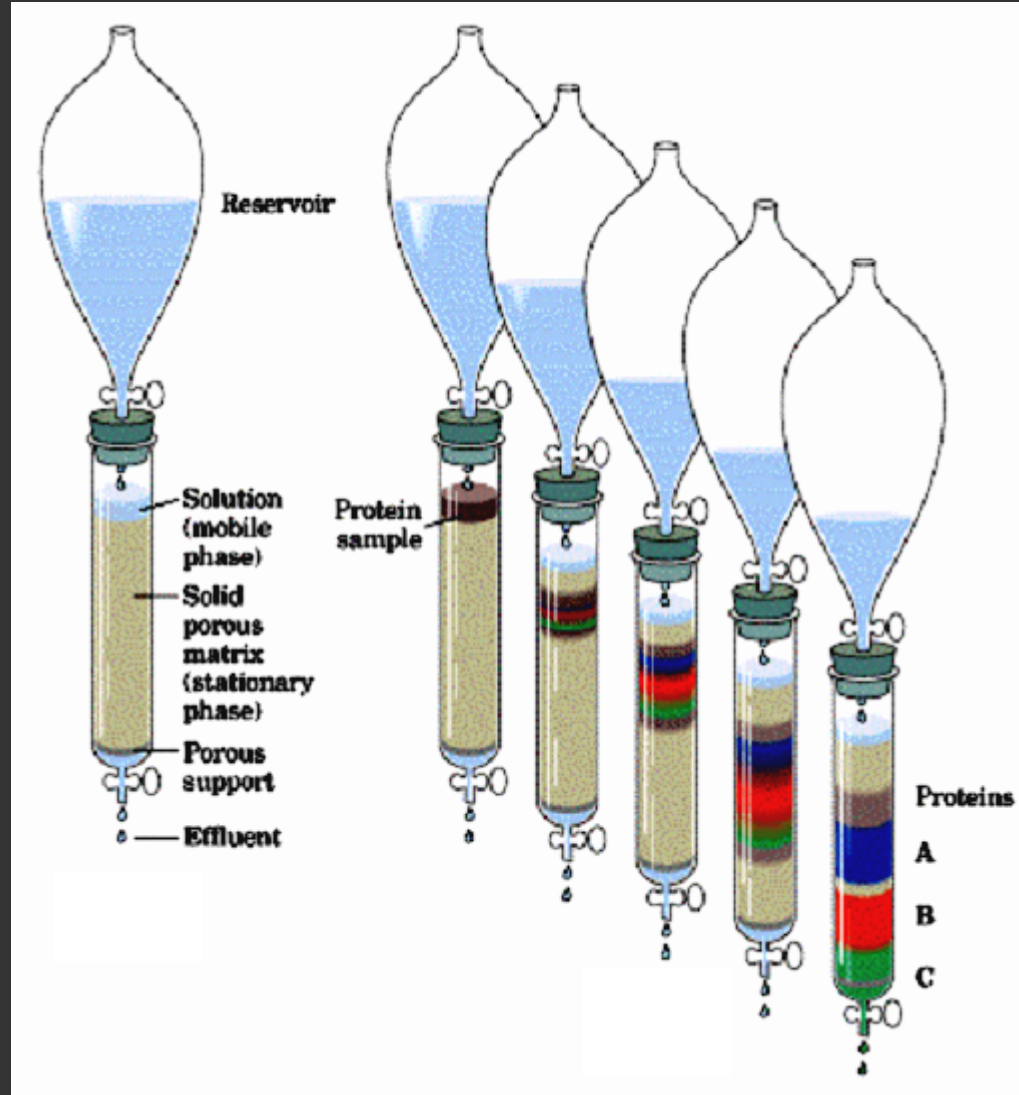
### ③ 层析 (chromatography)

原理：溶液中的分子能与固体表面进行结合及解离，但由于蛋白质在分子量、带电性和结合特异性方面的差异，与固体表面结合与解离的难易程度不一样，所以流动的速度也不一样。

固定相由圆球形小珠堆积而成。这些小珠的性质决定了可以分离哪种成分

流动相

固定相



# 层析（**chromatography**）

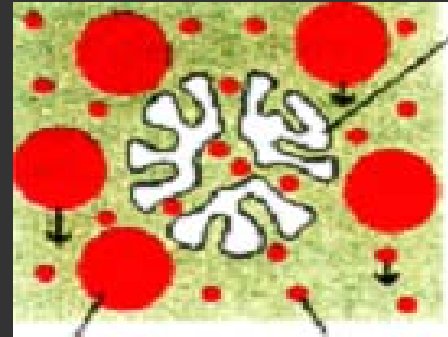
I. 凝胶过滤层析（**gel filtration chromatography**）

II. 离子交换层析（**ion-exchange chromatography**）

III. 亲和层析（**affinity chromatography**）

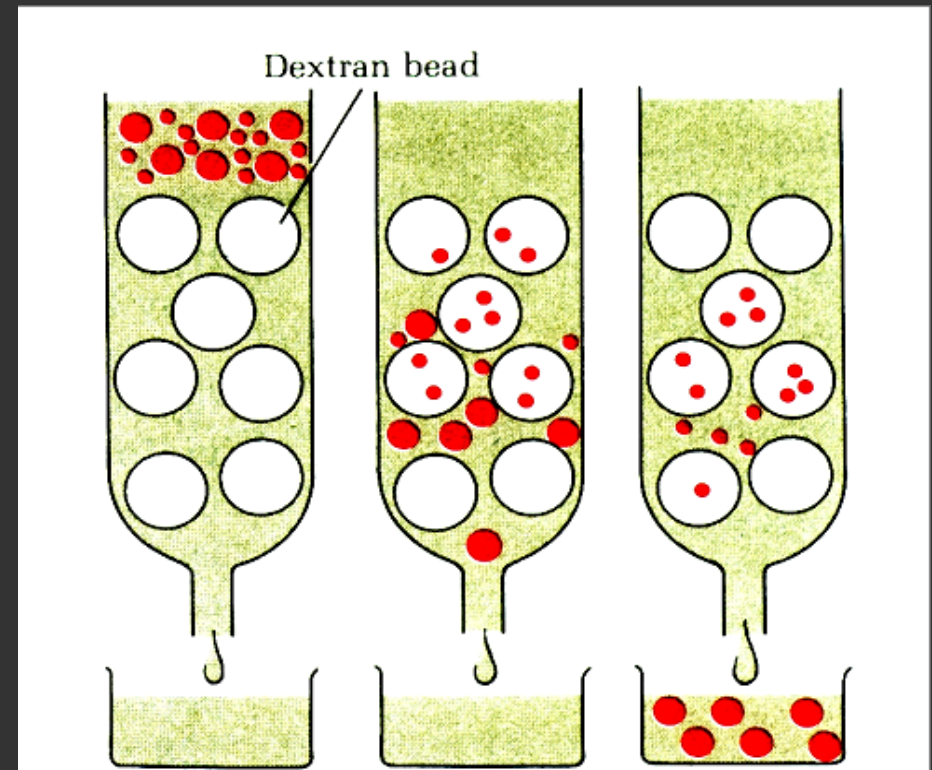
# I. 凝胶过滤层析 (gel filtration chromatography)

葡聚糖小珠



大分子 小分子

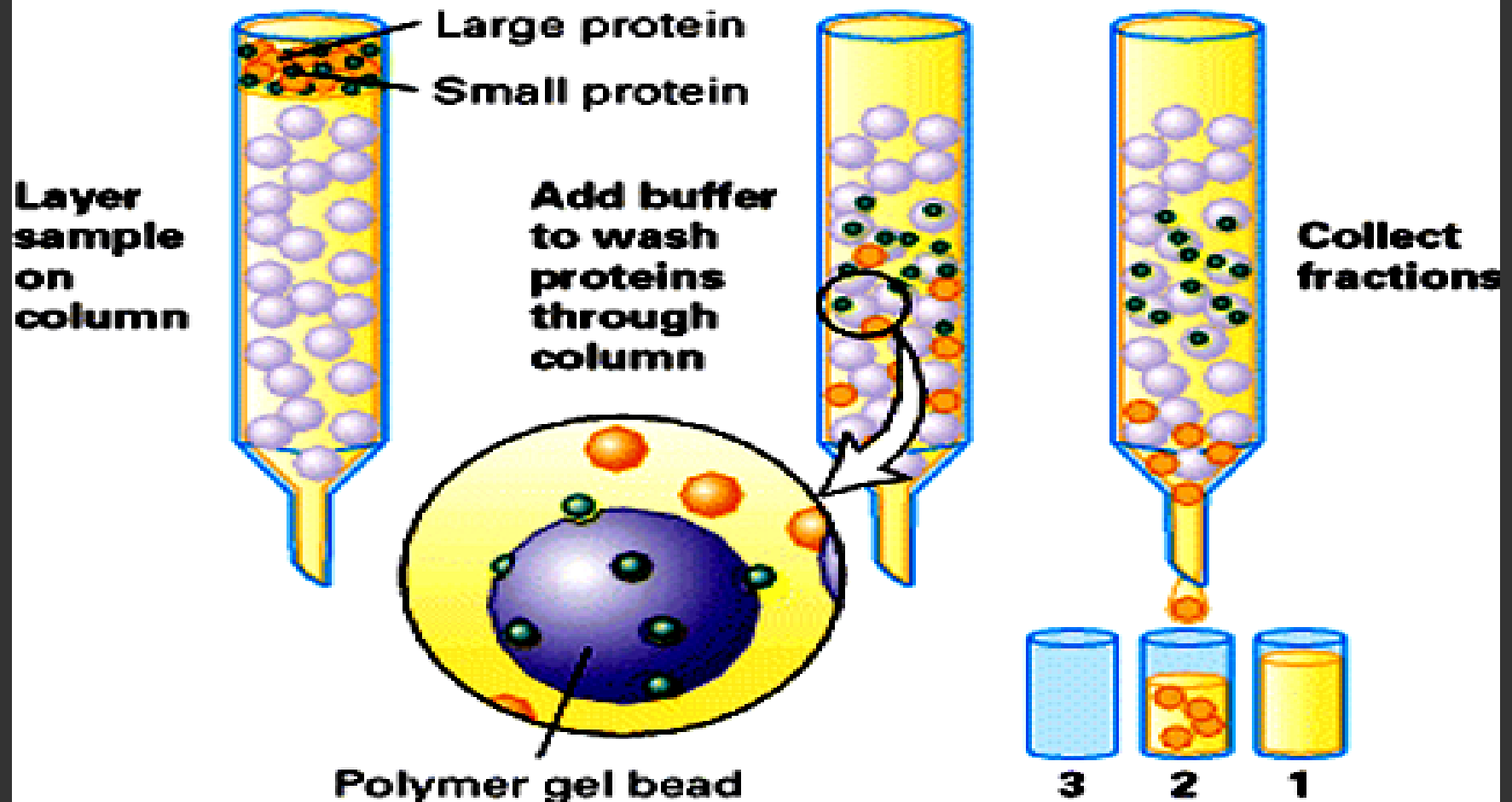
- 分离分子量有差异的蛋白质;
- 多孔小珠由聚丙烯酰胺 (polyacrylamide)、葡聚糖 (dextran) 或琼脂糖 (agarose) 组成;
- 小分子能进入小珠内部, 而大分子被排阻在外部, 因此小分子在层析柱中流动速度慢, 从而把混合物按不同分子量分开
- 可根据洗脱体积 (elution volume) 估计蛋白质分子量, 分子量 $\rightarrow$ 洗脱体积小。





# 凝胶过滤层析 (gel filtration chromatography)

## Gel filtration chromatography



# II. 离子交换层析 (ion-exchange chromatography)

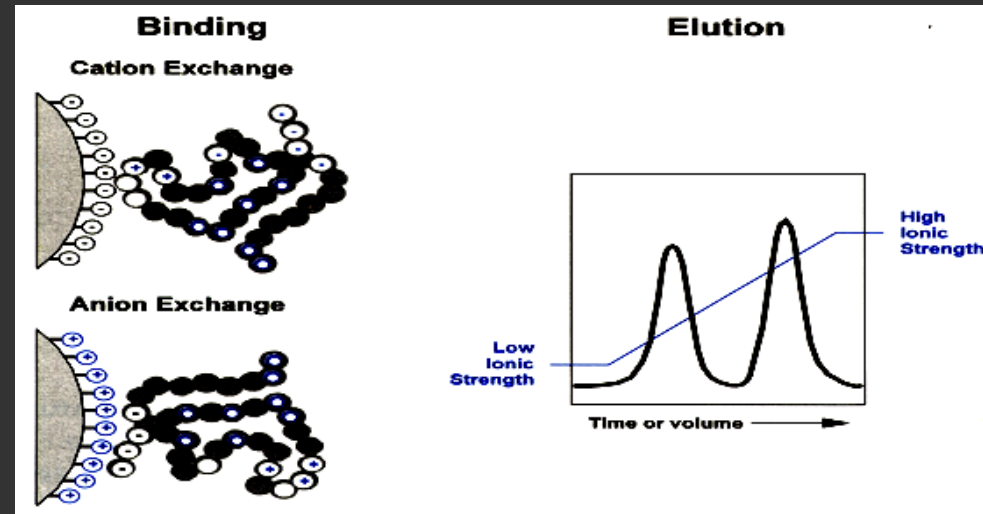
🔒 分离电荷不同的蛋白质

🔒 离子交换剂分为两种：

**离子交换树脂 (ion exchange resin)**：阳离子交换树脂 (anion exchange resin) 和阴离子交换树脂 (cation exchange resin)。

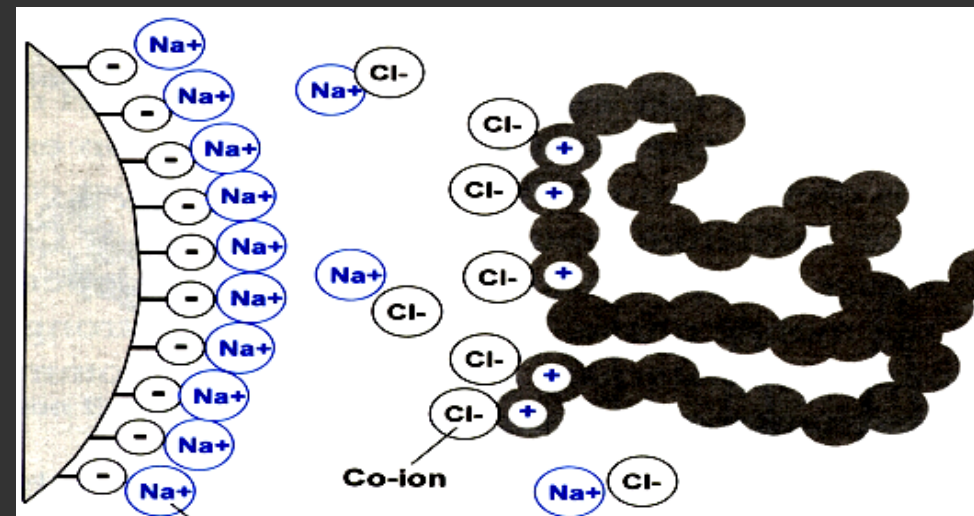
**离子交换纤维素 (ion exchange cellulose)**：如 DEAE-cellulose 和 CM-cellulose。

🔒 不同蛋白与交换剂有不同的亲和力，因而可用不同盐浓度或 pH 值的 buffers 洗脱



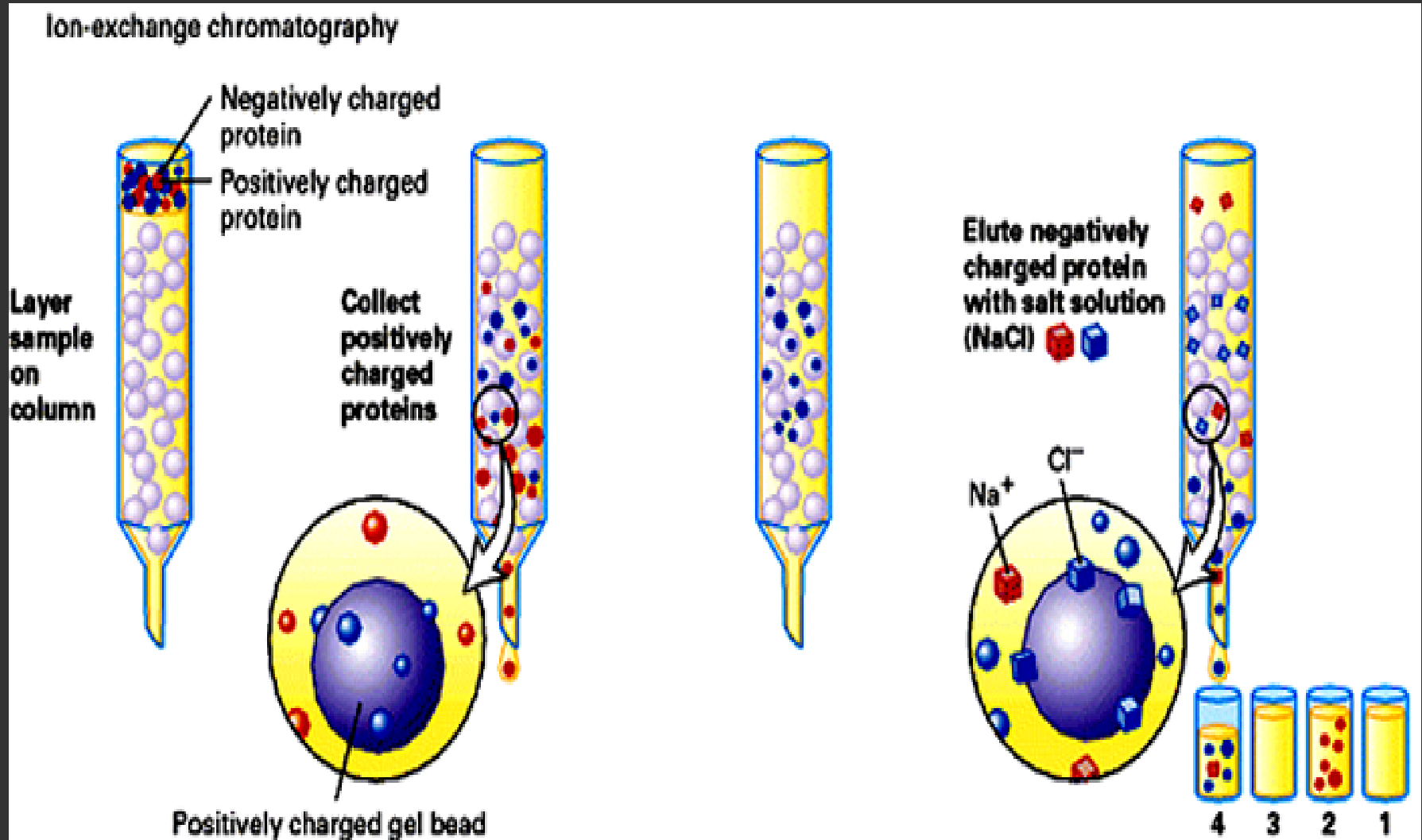
结合

洗脱曲线



洗脱示意图

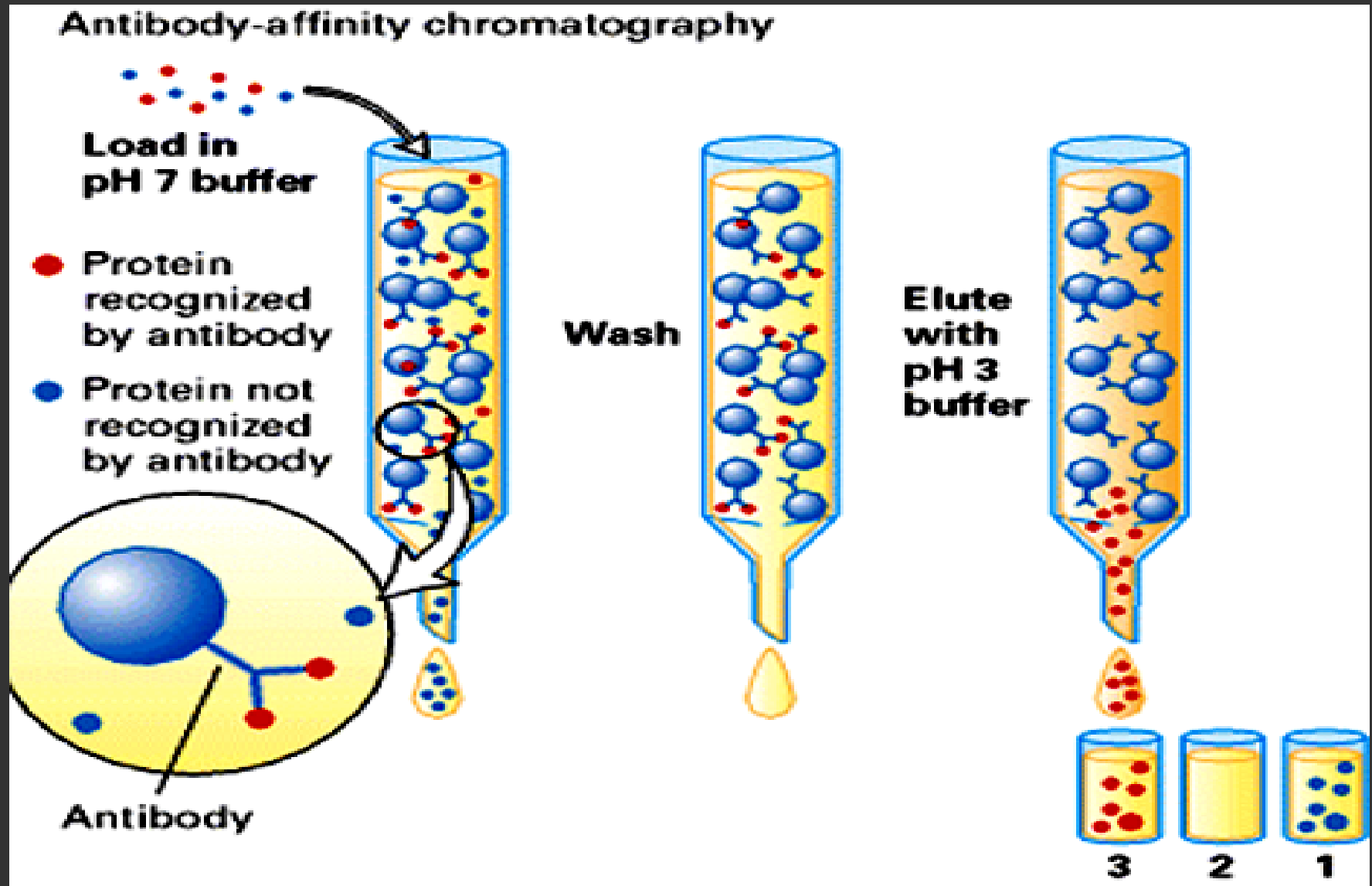
# 离子交换层析 (ion-exchange chromatography)



# III. 亲和层析 (affinity chromatography)

- 🔒 利用蛋白质与与其他分子的结合特异性
- 🔒 载体小珠与配体共价结合
- 🔒 配体可以是抑制剂、效应物、酶的辅助因子、类似底物、抗体或其他物质（如外源凝集素、金属离子等）
- 🔒 与配体特异结合的蛋白质被滞留在层析柱中，其他成分流出
- 🔒 加入过量的配体或改变盐浓度（或 pH）使结合的蛋白质流出

# 亲和层析 (affinity chromatography)

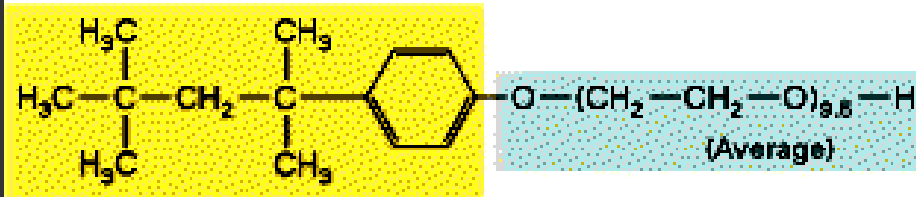


# 膜蛋白的分离

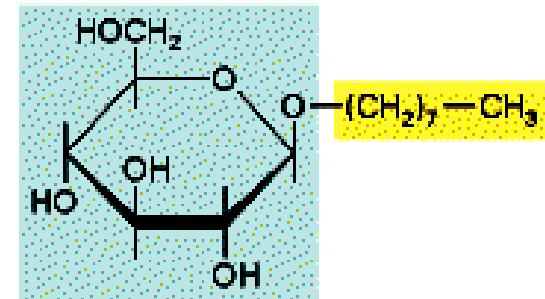
- ❏ 蛋白质从质膜中分离时，暴露出来的疏水区相互作用，引起蛋白质聚集、沉淀。
- ❏ 去污剂（**detergents**）是一种两亲分子，能嵌入到磷脂双层（**phospholipid bilayers**）中，破坏质膜。其疏水部分与烃基结合，亲水部分与水结合，因此可以增溶（**solubilization**）脂和蛋白质。
- ❏ 去污剂包括两类：
  - 非离子型**（**nonionic detergents**）如 Triton X-100、辛基葡萄糖
  - 离子型**（**ionic detergents**）如脱氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠

# 几种去污剂

## Nonionic detergents



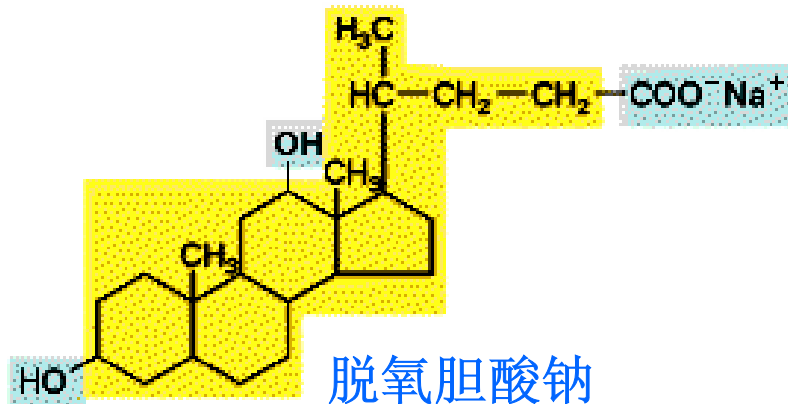
**Triton X-100**  
(polyoxyethylene(9.5)*p*-*t*-octylphenol)



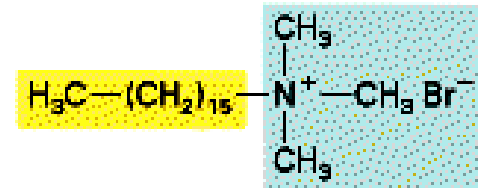
**Octylglucoside**  
(octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside)

辛基葡萄糖

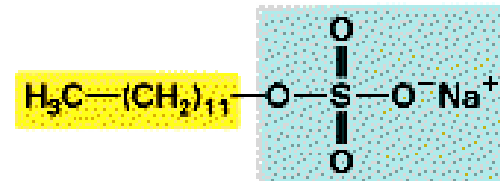
## Ionic detergents



**Sodium deoxycholate**



**Cetyltrimethylammonium bromide**

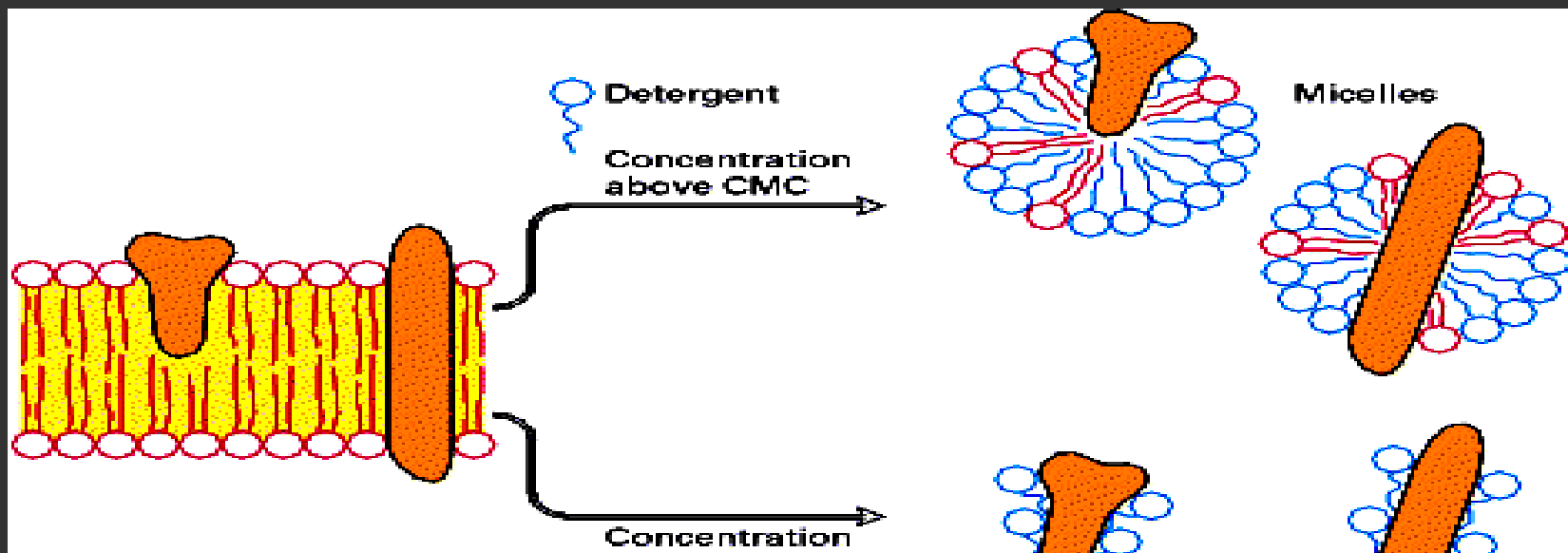


**Sodium dodecylsulfate (SDS)**

🔒 低浓度时，去污剂以游离形式存在于溶液中。随着浓度的增加，它们聚合在一起，形成微团（micelles）。

🔒 微团很小、圆球状聚集物。其亲水部分向外，疏水部分向内。

临界微团浓度（critical micelle concentration）：去污剂开始形成微团时的浓度，为去污剂的特征常数



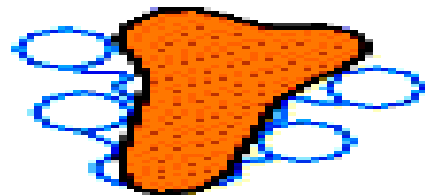


🔒 离子型去污剂除了能与膜蛋白的疏水区结合外，还能结合水溶性蛋白质的疏水核心。由于它们带电，所以能够破坏蛋白质中的盐键和氢键，使蛋白质变性。

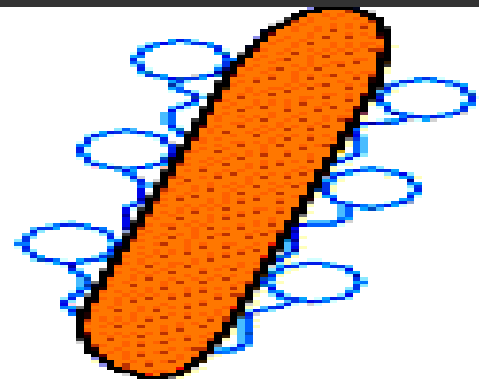
🔒 非离子型去污剂在不同的浓度有不同的作用方式

👉 浓度较高 ( $> \text{CMC}$ ) 时，与磷脂、膜蛋白一起形成微团。

👉 浓度较低 ( $< \text{CMC}$ ) 时，虽然不形成微团，但仍能与大部分膜蛋白的疏水区结合，起增溶作用。



**Dissolved but  
not forming  
micelles**



🔒 大部分膜周边蛋白（peripheral protein）通过离子键或其他弱键与特定的膜蛋白结合，因此可用高浓度的盐或能与二价阳离子（如  $\text{Ca}^{2+}$ ）结合的试剂进行分离。

🔒 大多数膜周边蛋白是可溶性的，不能用非离子型去污剂增溶。

## 第二节 蛋白质的鉴定

一、分子量测定

二、等电点测定

三、末端氨基酸残基测定

四、蛋白质分子中的糖链

五、蛋白质分子中的脂

# 一、分子量测定

I. 渗透压 (osmotic pressure)

II. 沉降平衡 (sedimentation equilibrium)

III. 凝胶过滤层析 (gel filtration chromatography)

IV. SDS-PAGE

V. 激光解吸电离飞行时间质谱 (LDI-TOF-MS)

# I. 渗透压 (osmotic pressure)

公式:  $\pi / c = RT / M + K c$

$\pi$ : 渗透压  
 $c$ : 溶质浓度  
 $R$ : 气体常数  
 $T$ : 绝对温度  
 $M$ : 分子量

- 同时测定几个不同浓度的渗透压，以  $\pi / c$  对  $c$  作图并外推到蛋白质浓度为零，得截距，从而求出  $M$ 。
- 为避免 pH 值的影响，在溶解度允许的范围內，尽量采用等电点或接近等电点的缓冲液，并增高溶液中无机盐的浓度。
- 可以测分子量在 1—10 万范围的蛋白质。
- 实验装置简单，准确度高。但不能区别溶液中蛋白质分子是否均一。

## II. 沉降平衡 (sedimentation equilibrium)

公式:

$$M = \frac{2RT \ln(c_2/c_1)}{(1-\nu \rho) \omega^2 (x_2^2 - x_1^2)}$$

$x$ : 蛋白质界面到旋转中心的距离

$c$ :  $x$  处的蛋白质浓度

$\rho$ : 溶剂的密度

$\omega$ : 角速度

$\nu$ : 蛋白质的偏微比容  
(partial specific volume)

🔒 用较低的速度离心 (8,000~20,000 r/min)

🔒 离心开始后, 颗粒发生沉降, 造成浓度梯度, 同时产生扩散作用。扩散力与离心力作用方向相反, 相互平衡

# III. 凝胶过滤层析 (gel filtration chromatography)

公式:  $\log M = K_1 - K_2 V_e$        $V_e$ : 洗脱体积

- 🔒 先测出几种标准蛋白质的  $V_e$ ，以它们的  $\log M$  对  $V_e$  作图得一直线，再测出待测样品的  $V_e$ ，即可从图中确定蛋白质的分子量。
- 🔒 样品可以是不纯的。只要它具有专一的生物活性，借助活性找出洗脱峰位置，确定它的洗脱体积就能测定它的分子量。

## IV. SDS-PAGE

公式:  $\log M = K_1 - K_2 \mu_R$

$$\mu_R \text{ (相对迁移率)} = \frac{\text{样品迁移距离}}{\text{前沿 (染料) 迁移距离}}$$

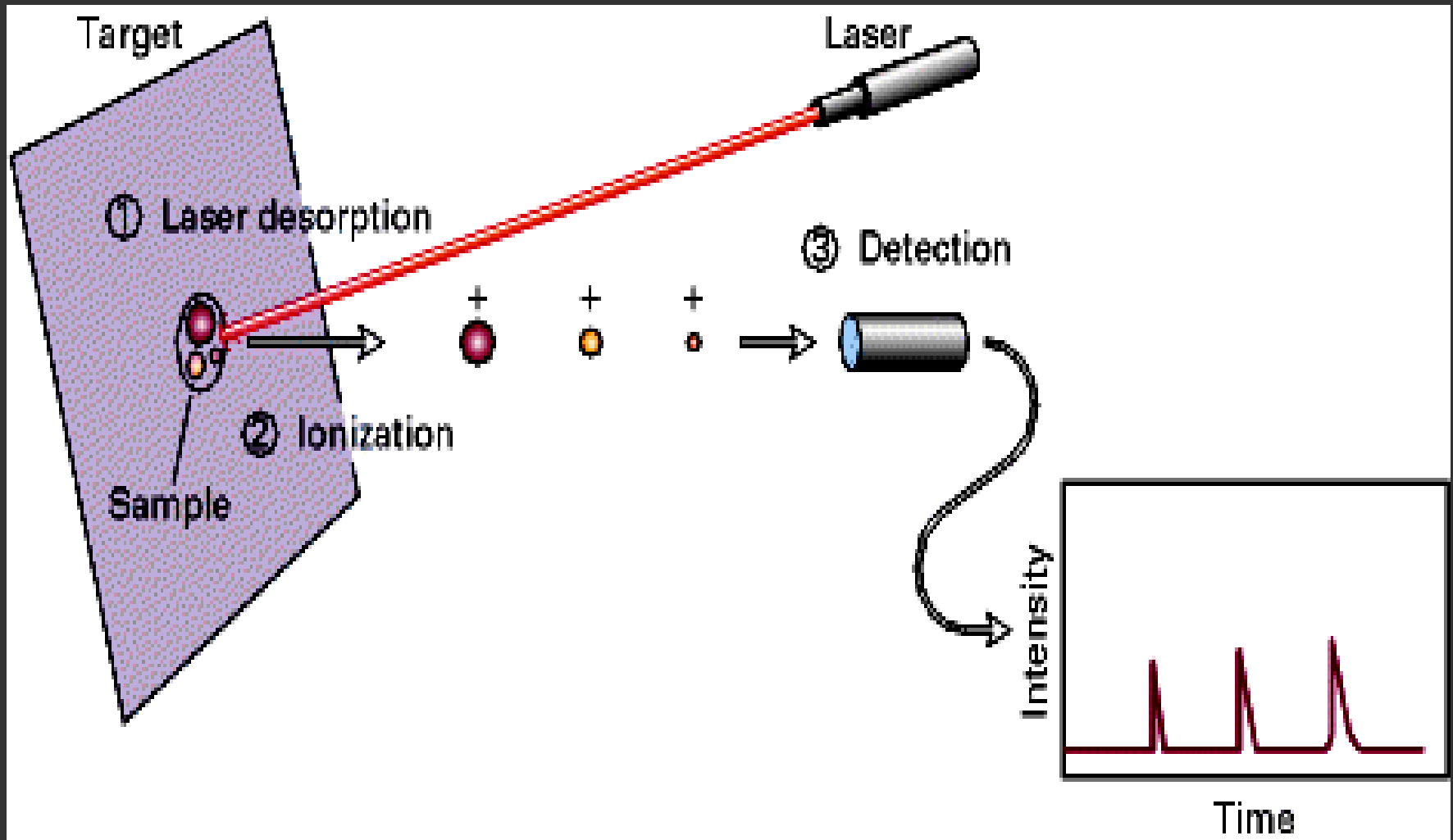
以几种标准单体蛋白质分子量的  $\log M$  对其  $\mu_R$  值作图, 根据待测样品的  $\mu_R$ , 从标准曲线上查出它的分子量



# V. 激光解吸电离飞行时间质谱 (laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, LDI-TOF-MS)

- 🔒 高度纯化的蛋白质样品与有机酸混合，在靶金属表面干燥。
- 🔒 激光发出的射线使蛋白质离子化。这些离子经过加速后，飞入自由漂移区，最后到达检测器。
- 🔒 飞行时间与分子量成反比，与电量成正比。
- 🔒 可测定  $10^{-15} \sim 2 \times 10^5$  MW 的蛋白质，误差仅为 0.0001。

# 激光解吸电离飞行时间质谱

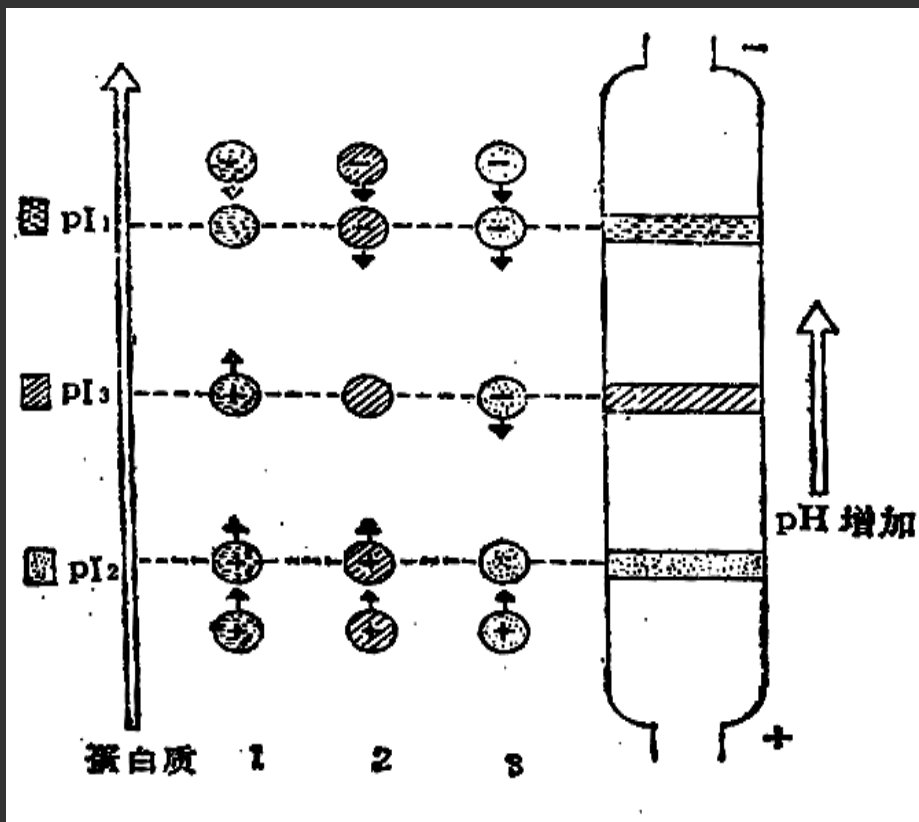


# 二、等电点测定

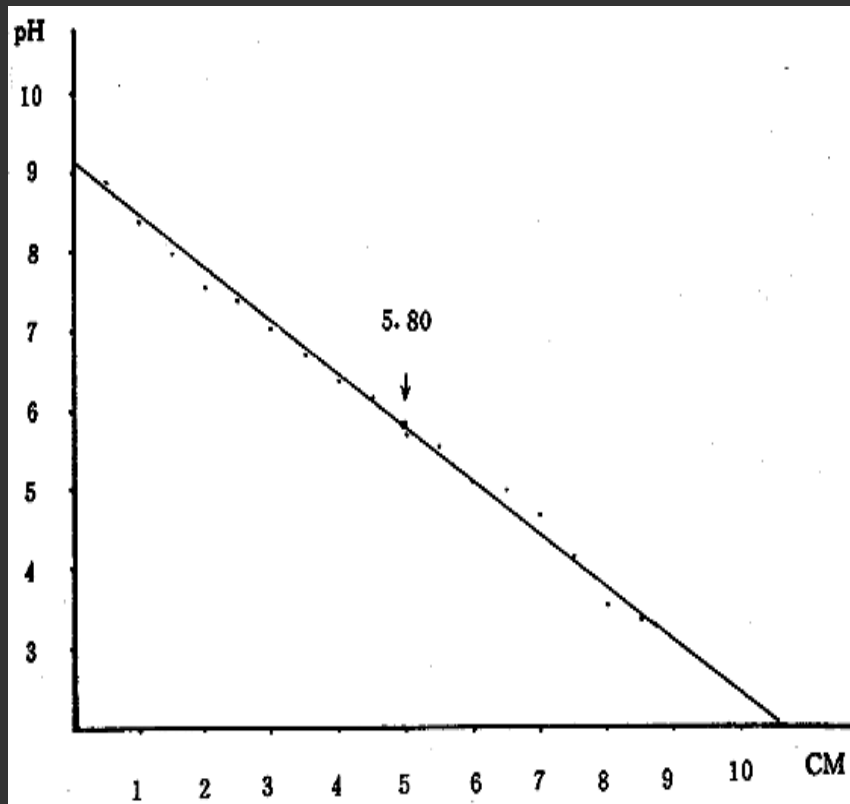
## 1. 溶解度法

## 2. 等电聚焦 (IEF)

### IEF 原理



### IEF 测 pI



## 三、末端氨基酸残基测定

用于未知蛋白质一级结构研究和基因工程表达产物的末端分析

**N-terminus** 氨基酸残基测定

**C-terminus** 氨基酸残基测定

# N-terminus 氨基酸残基测定

化学法

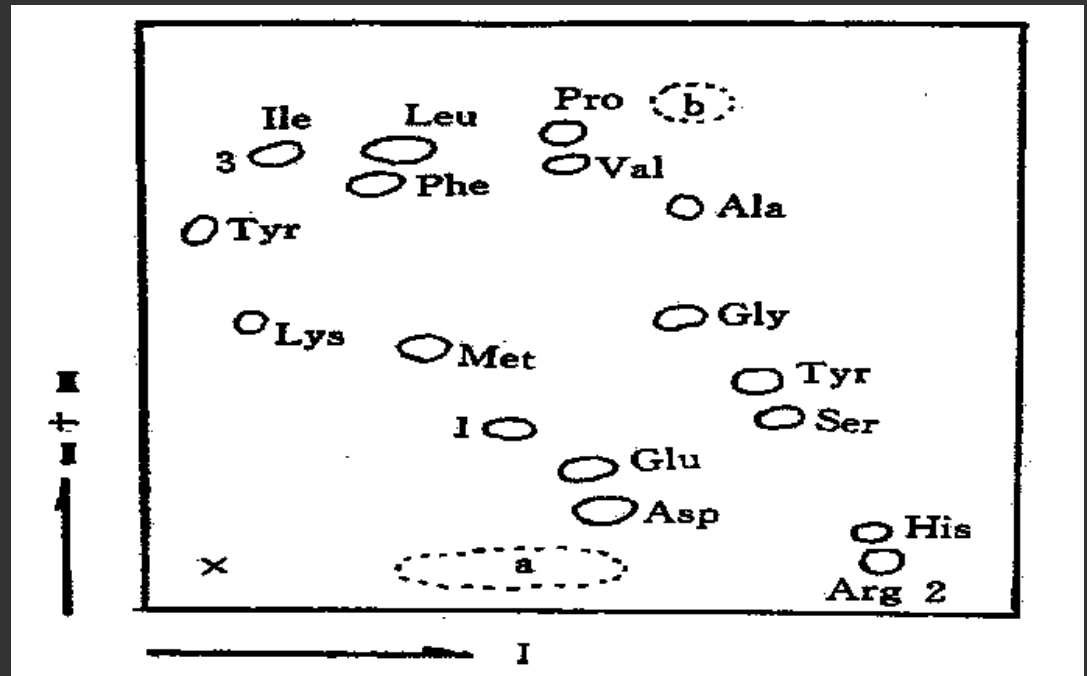
酶法

二硝基氟苯法 (DNFB)

氨肽酶法 (amino peptidase)

丹磺酰氯法 (DNS-cl)

异硫氰酸苯酯法 (PITC)



氨基酸层析图谱

# C-terminus 氨基酸残基测定

化学法

胼解法  
(hydrazinolysis)

酶法

羧肽酶法  
(carboxypeptidase)

## 四、蛋白质分子中的糖链

✧ 血球凝集反应（植物凝集素）

✧ 糖蛋白电泳（甲苯胺兰、**R**山兰、**schiff**试剂）

✧ 糖组分分析（层析、液相色谱）

# 五、蛋白质分子中的脂

苏丹黑预染、电泳



# 第三节 蛋白质的检测

一、抗体检测法

二、**Western Blotting**

三、放射性同位素 (**radioisotope**)  
标记法

# 一、抗体检测法







- ✦ 多抗（**polyclonal antibodies**，通常以抗血清的形式存在）是指不同种类抗体的混合物，能识别一个大分子抗原中的多个抗原决定簇（**epitopes**）。
- ✦ 单抗（**monoclonal antibodies**）指的是同种抗体，识别大分子抗原上的特定抗原决定簇。
- ✦ 单抗由一定数量的相同细胞产生。这些细胞来源于同一个杂交瘤细胞（**hybridoma**）。
- ✦ 抗体可以检测表面只相差一个残基的蛋白质。
- ✦ 用特殊的分析试剂能对蛋白质进行精确定量。

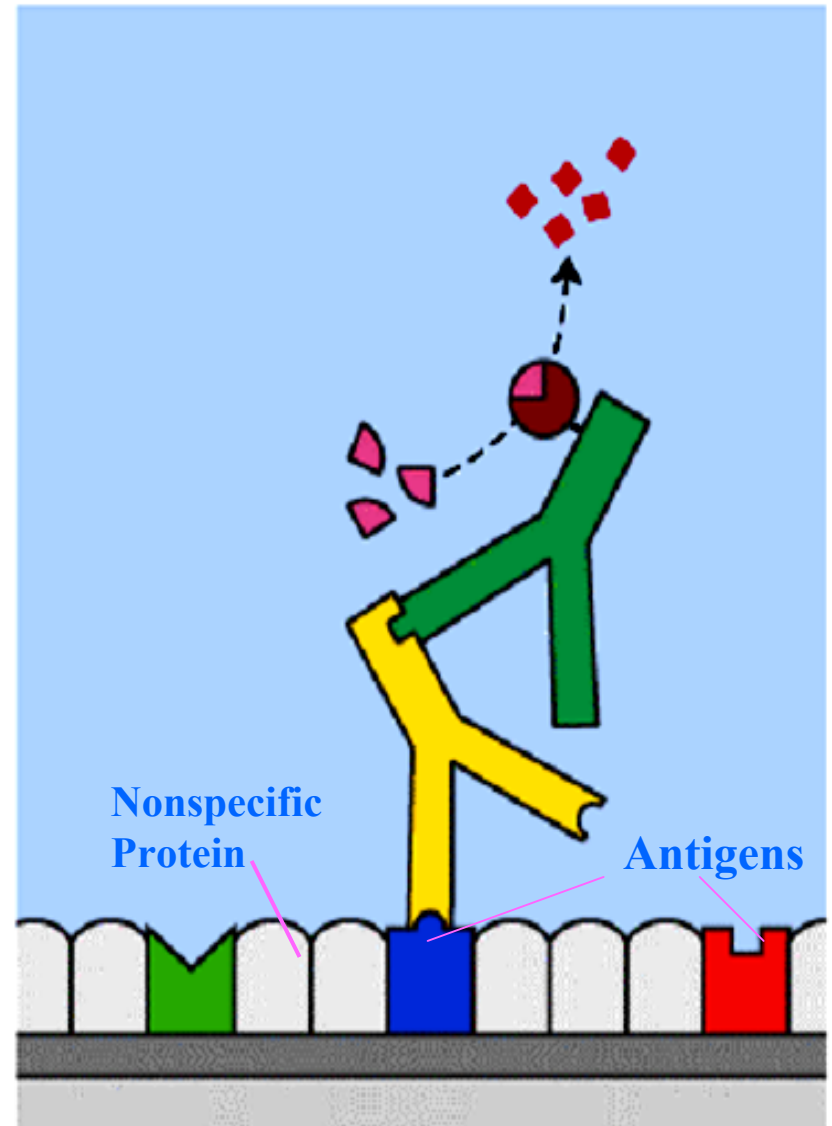
# 抗体检测法

## ELISA—enzyme-linked immunosorbent assay

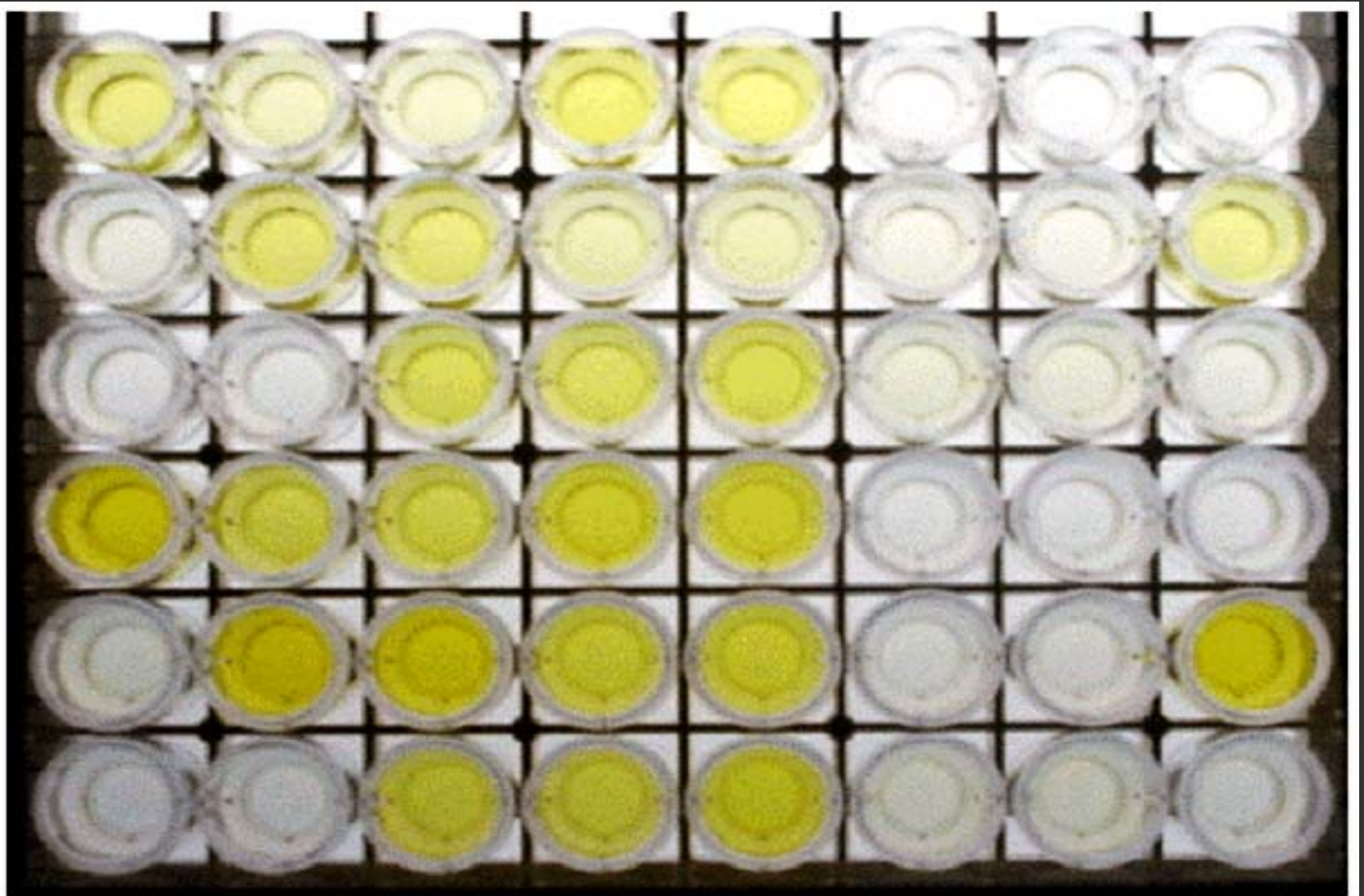
- ✦ 两级抗体：一抗（**primary antibody**）和二抗（**secondary antibody**）。一抗与特异的抗原结合，二抗与酶偶联，然后结合到一抗。
- ✦ 酶（如碱性磷酸酶，**alkaline phosphatase**）作为标记物，催化无色物质生成有色物质。
- ✦ 抗原要进行包被，使其能牢固地吸附在固相载体表面，并保持免疫活性。
- ✦ 没有吸附抗原的地方用非特异性蛋白覆盖。

# ELISA

- ① Coat surface with sample (antigens). 
- ② Block unoccupied sites with nonspecific protein. 
- ③ Incubate with primary antibody against specific antigen. 
- ④ Incubate with antibody-enzyme complex that binds primary antibody. 
- ⑤ Add substrate. 
- ⑥ Formation of colored product indicates presence of specific antigen. 



# ELISA 结果



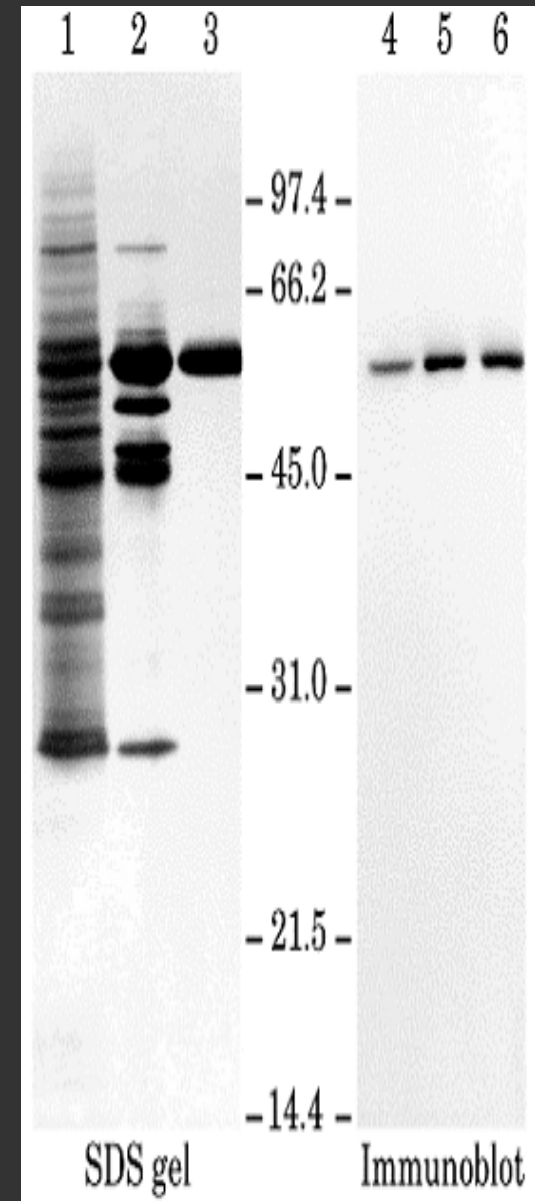
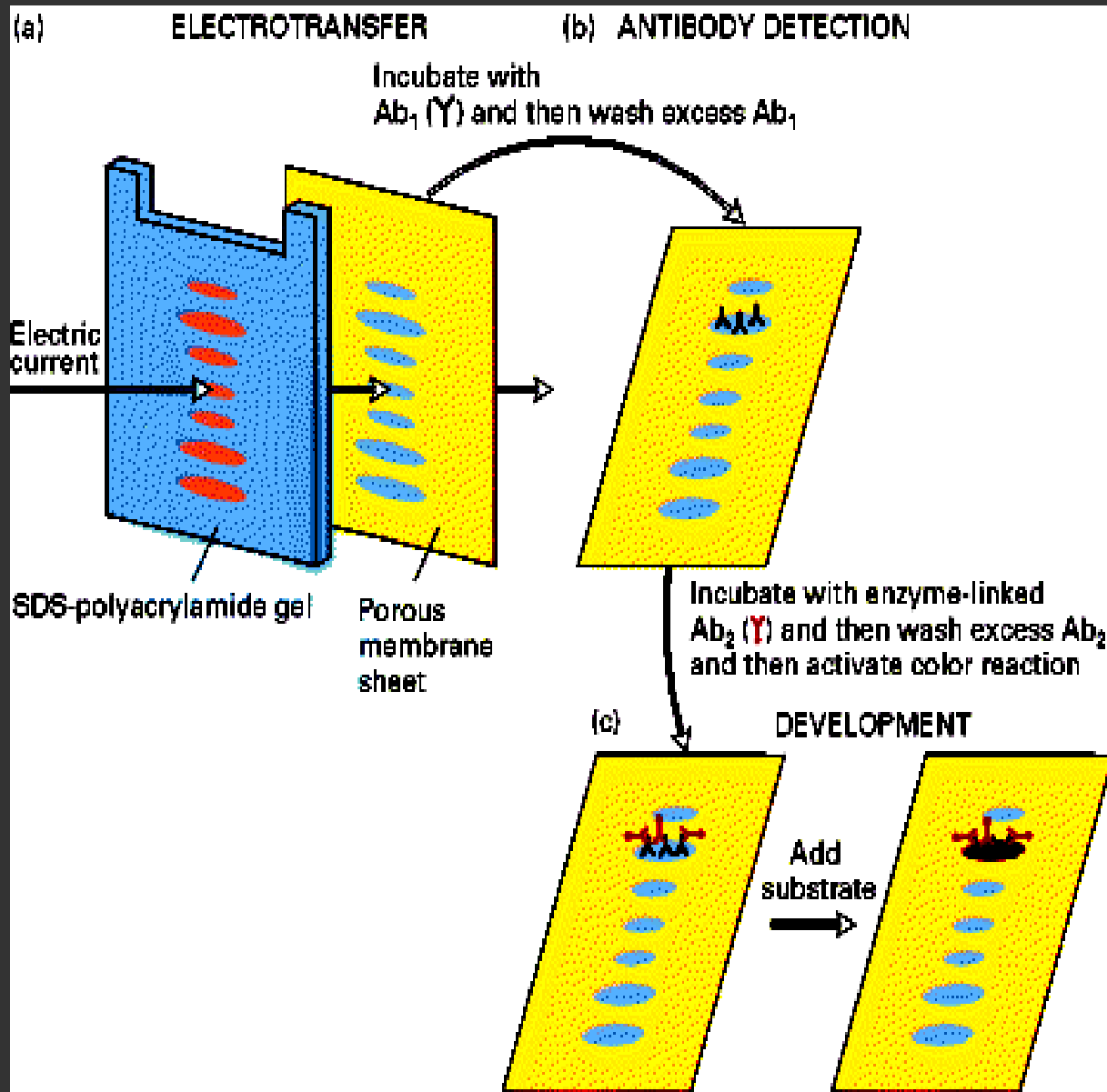
ELISA assay

## 二、Western Blotting

✦ 灵敏度高，用于检测极微量的蛋白质  
(*Find a needle in a haystack. 大海捞针*)

✦ 与 SDS-PAGE、antibody、enzyme 联合使用

# Western Blotting



# 三、放射性同位素 (**radioisotope**) 标记法

✦ 放射性同位素的掺入不影响分子的性质。

✦ 根据实验目的和放射性同位素的特征（如半衰期、放射产生的能量及能否进入细胞等），选择合适的同位素进行标记。

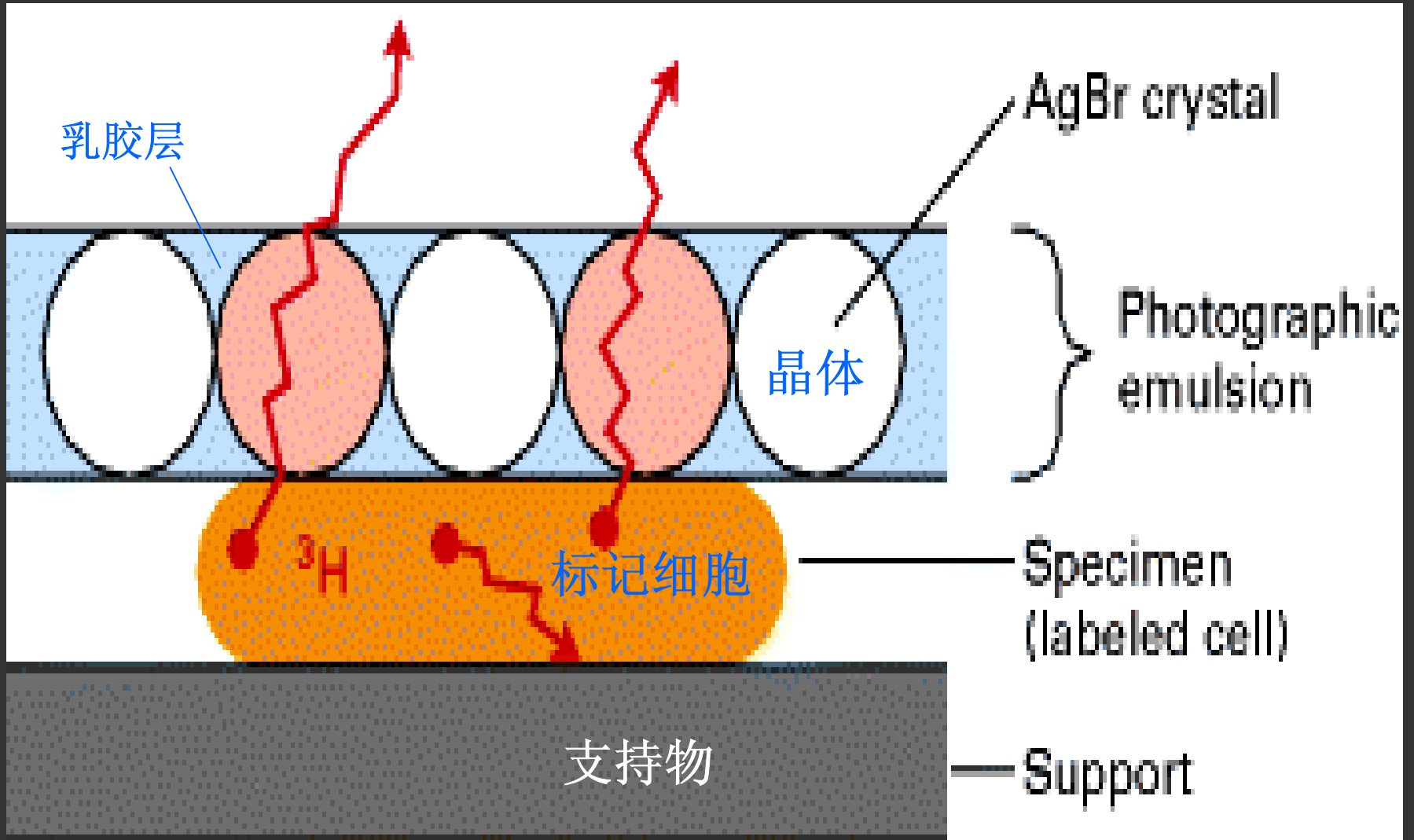
✦ 放射自显影 (**autoradiography**) 用感光材料进行感光，如 X 光胶片，液体乳胶。然后用肉眼或显微镜观察，能半定量。

✦ 放射性同位素的定量测定用计数器 (**counter**)，如盖革计数器 (**Geiger counter**)、液闪计数器 (**scintillation counter**)。

✦ 确定生物大分子在细胞内的定位及运动。



# 放射自显影



# 第四节 蛋白质的结构分析

一、蛋白质一级结构的测定

二、已知序列肽链的人工合成

三、蛋白质构象的确定

# 一、蛋白质一级结构的测定

## — Edman 降解法

✦ 试剂：异硫氰酸苯酯（PITC）

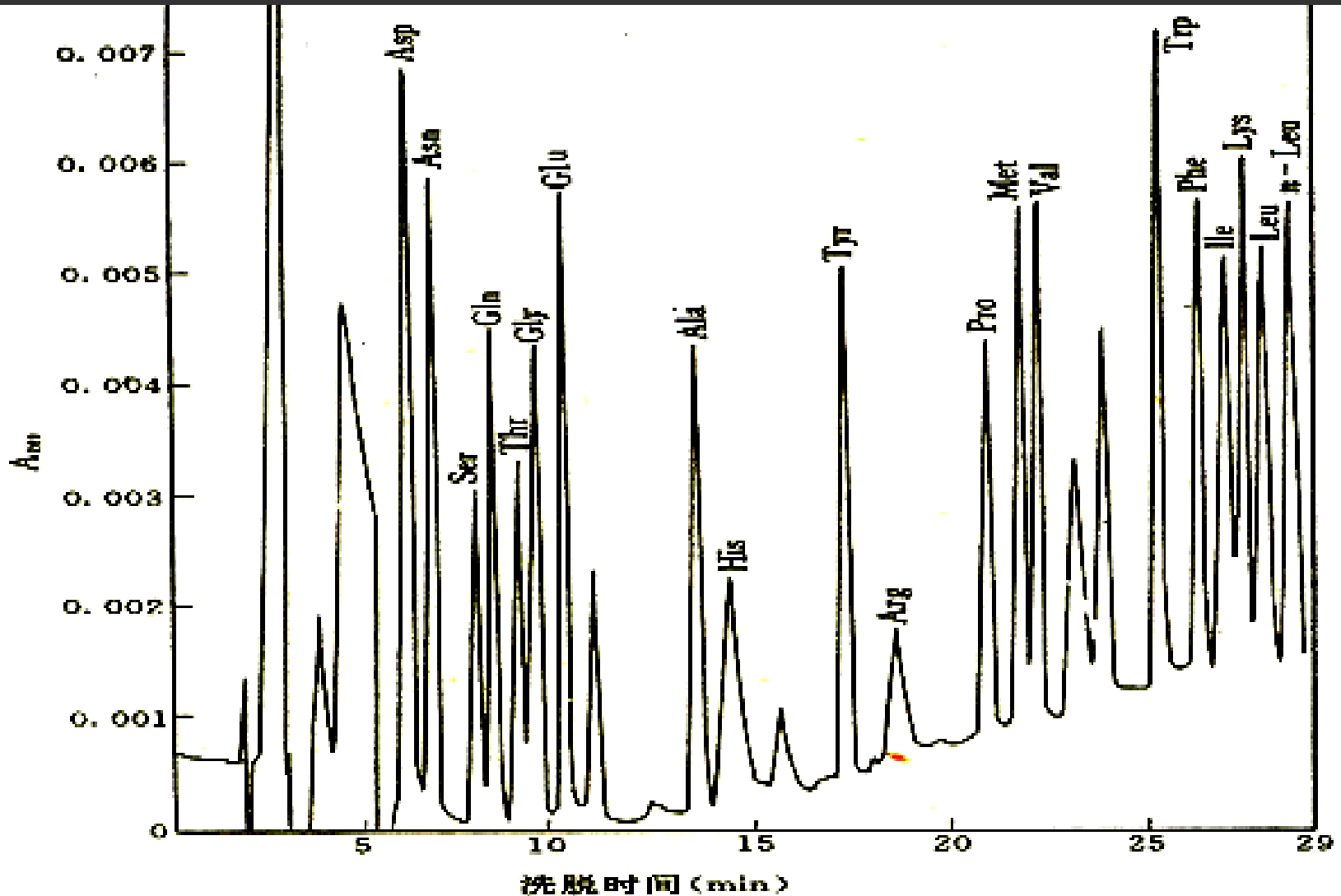
✦ 肽链 N-terminus 进行标记

✦ 标记蛋白质的水解

✦ PITC-氨基酸可用各种层析技术如高效液相色谱（HPLC）等方法进行测定



# HPLC 分析结果



## 二、已知序列肽链的人工合成

在动物体内，10~15个残基的小肽能刺激机体产生抗体。用这个抗体与全长的天然蛋白质结合，从而对蛋白质进行分离、检测及细胞内定位

合成肽有助于阐明蛋白质二级和三级结构折叠的决定因素以及各种氨基酸在蛋白质构象中的作用

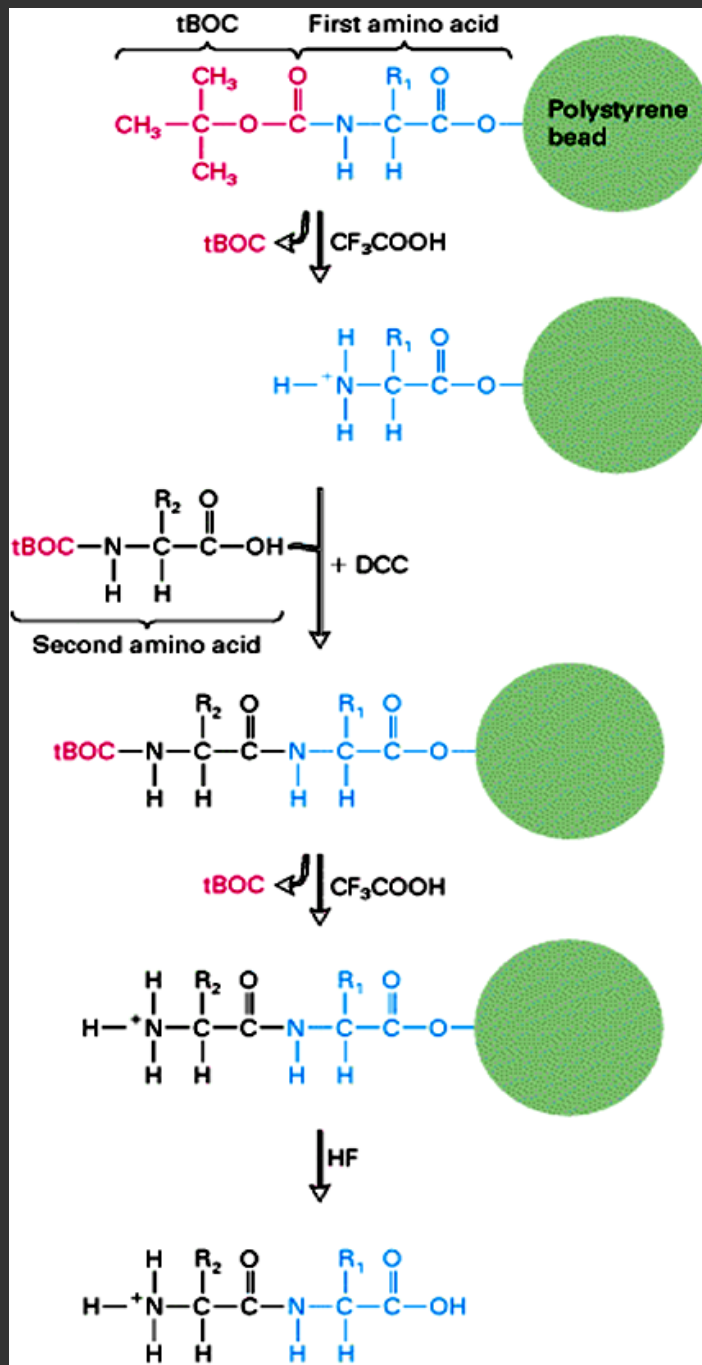
# 肽链人工合成

**tBOC:** 叔丁氧羰基，保护  
氨基酸氨基端。

**CF<sub>3</sub>COOH:** 三氟乙酸，去  
保护

**DCC:** 二环己基碳二亚胺，  
缩合剂

**HF:** 氢氟酸，把肽链从聚  
苯乙烯小珠上断裂  
下来



挂接

去保护

缩合

去保护

断裂

# 三、蛋白质构象的确定

I. X 射线结晶 (X-Ray Crystallography)

II. 冷冻电镜术 (Cryoelectron Microscopy)

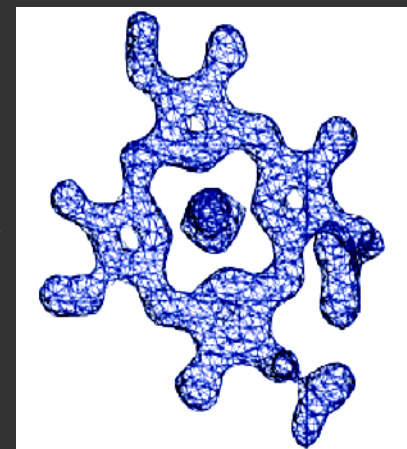
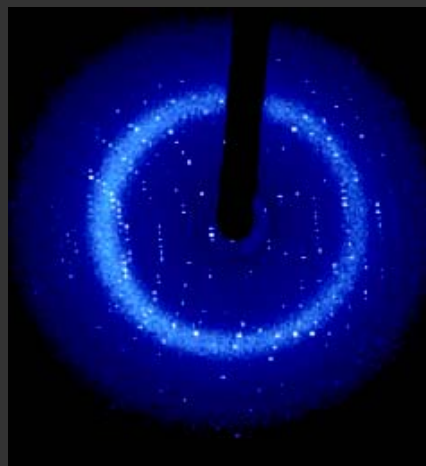
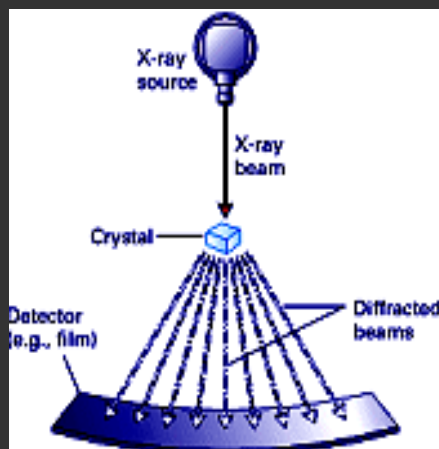
III. 核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR)



# I. X 射线结晶 (X-Ray Crystallography)

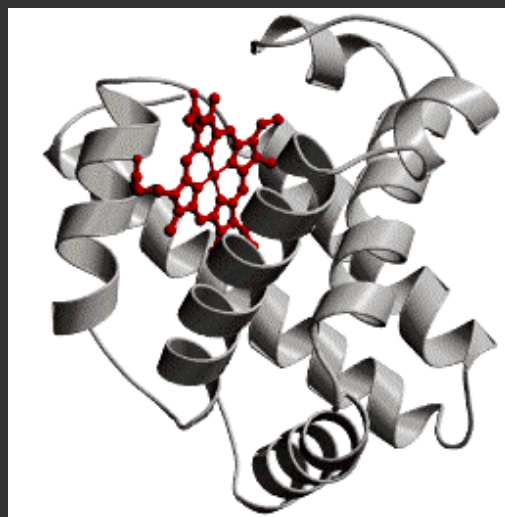
- 🔒 X 射线波长很短 (0.01 ~ 10 nm)。用于结构分析的是单色 X 射线
- 🔒 X 射线照射绕晶轴旋转的蛋白质结晶，产生许多衍射线。用照相底片等方法记录，便得到了许多衍射图
- 🔒 测定衍射图上各个衍射斑点的位置和强度及重原子在重原子衍生物中的位置，用同晶置换法解出蛋白质晶体的衍射相角
- 🔒 计算并绘制蛋白质分子的电子密度图，参照蛋白质的一级结构和二硫键信息，解出蛋白质分子的构象

# X 射线结晶 (X-Ray Crystallography)

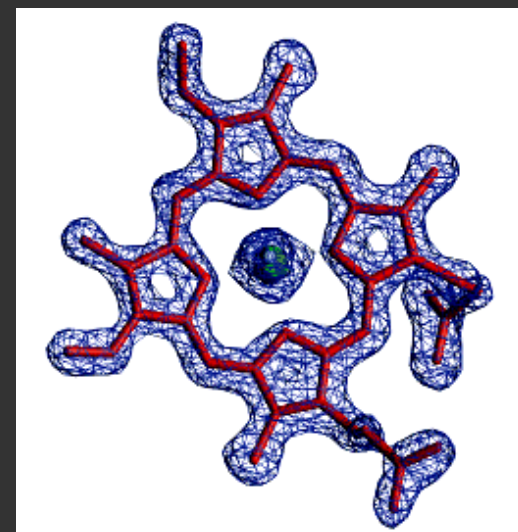


衍射相角

测定衍射斑点位置和强度



分子的构象

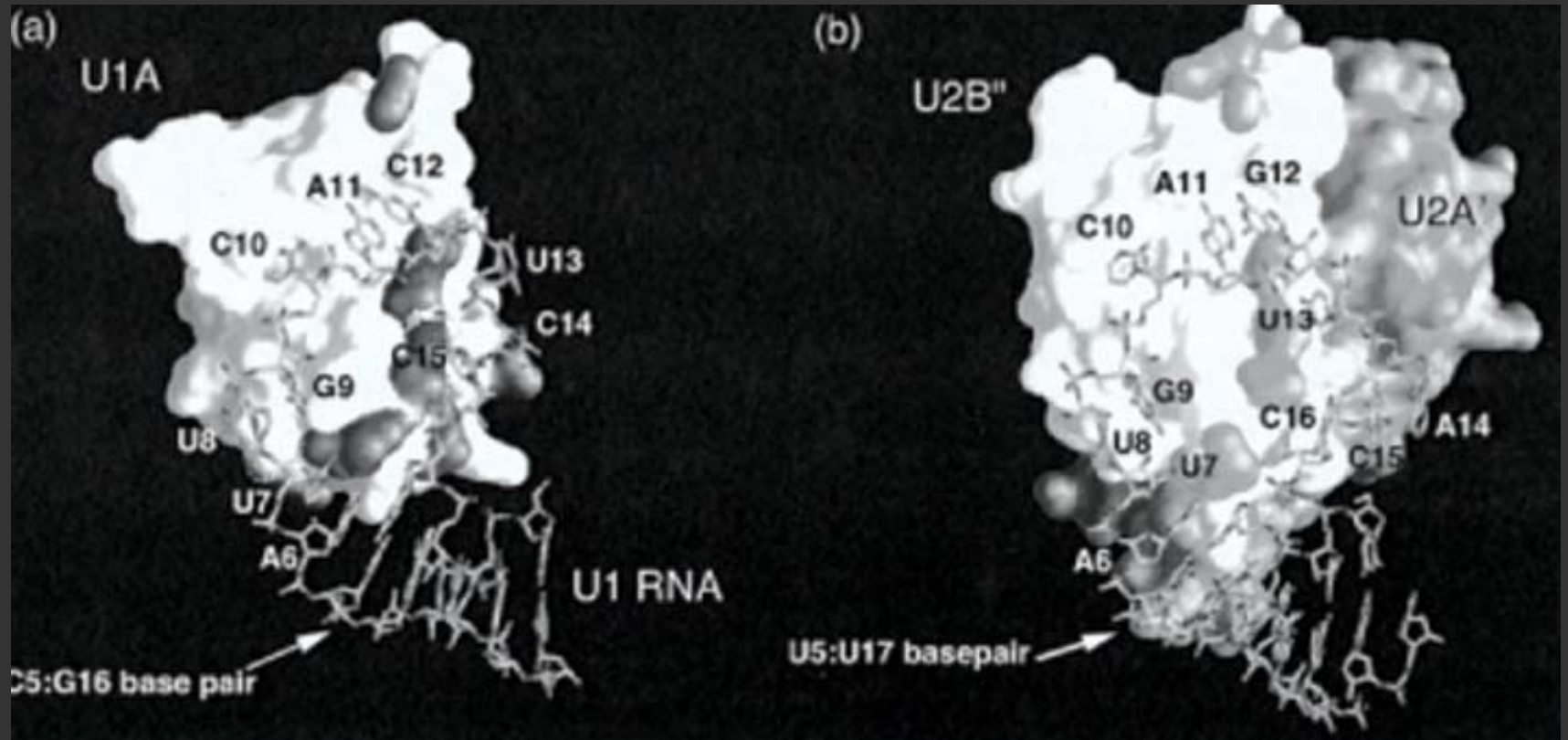


电子密度图

## II. 冷冻电镜术 (Cryoelectron Microscopy)

- 🔒 蛋白质样品**快速冷冻**以保存其结构。
- 🔒 用冷冻电镜测定蛋白质在**冷冻和水合状态**下的结构。
- 🔒 在胶片上记录图象时，用低剂量电子以防止射线破坏蛋白质结构。
- 🔒 软件分析图象并重构蛋白质三维结构。
- 🔒 产生的分子模型的质量可以与 X 射线媲美，而且比 X 射线分析节省人力和物力。

# 例一

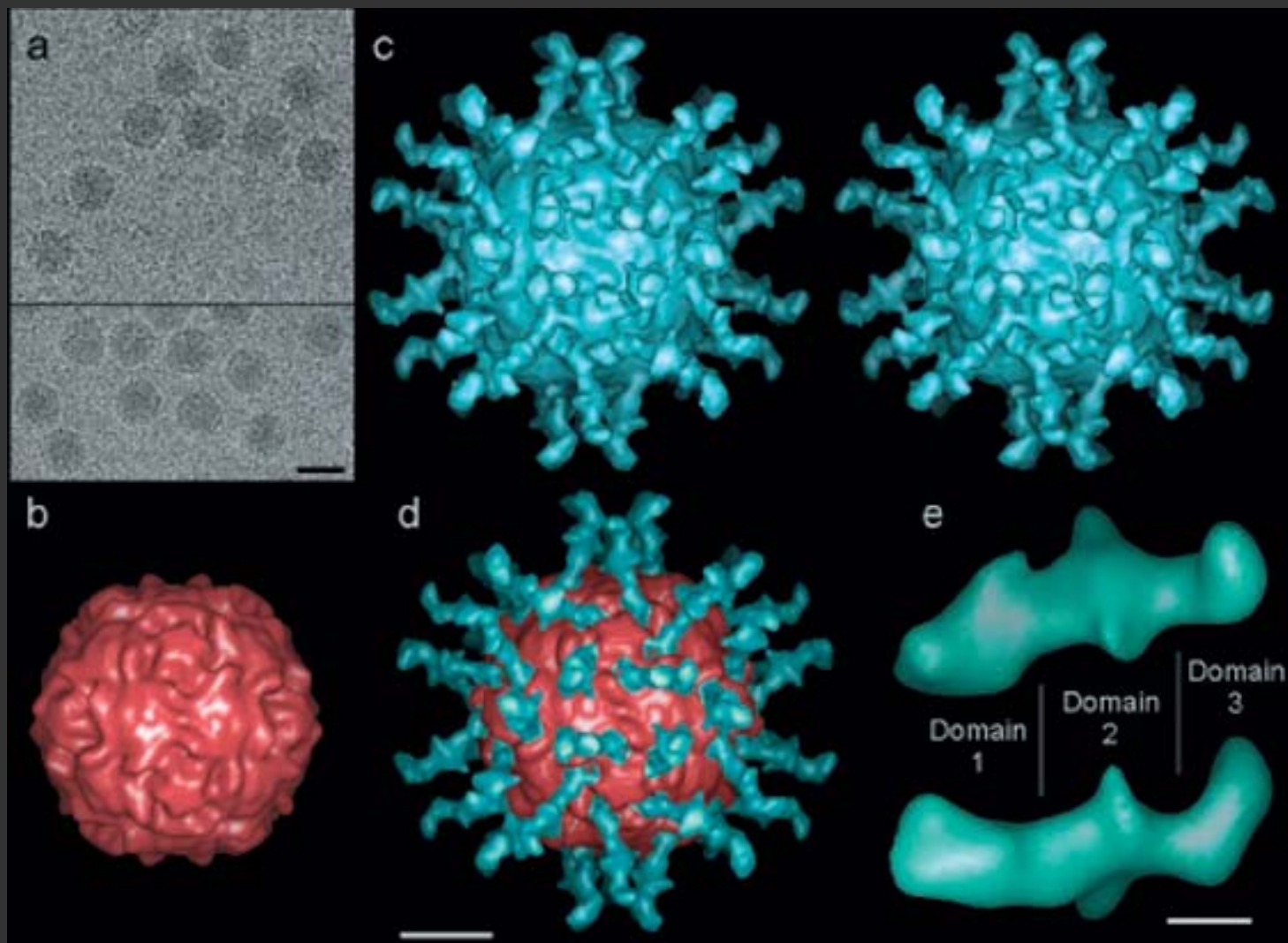


结合 RNA 的 snRNPs

# 例二

a: 没结合受体，圆形

b、c、d: 结合了受体后，有很多突起



脊髓灰质炎病毒颗粒 (poliovirus particle)

# III. 核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR)

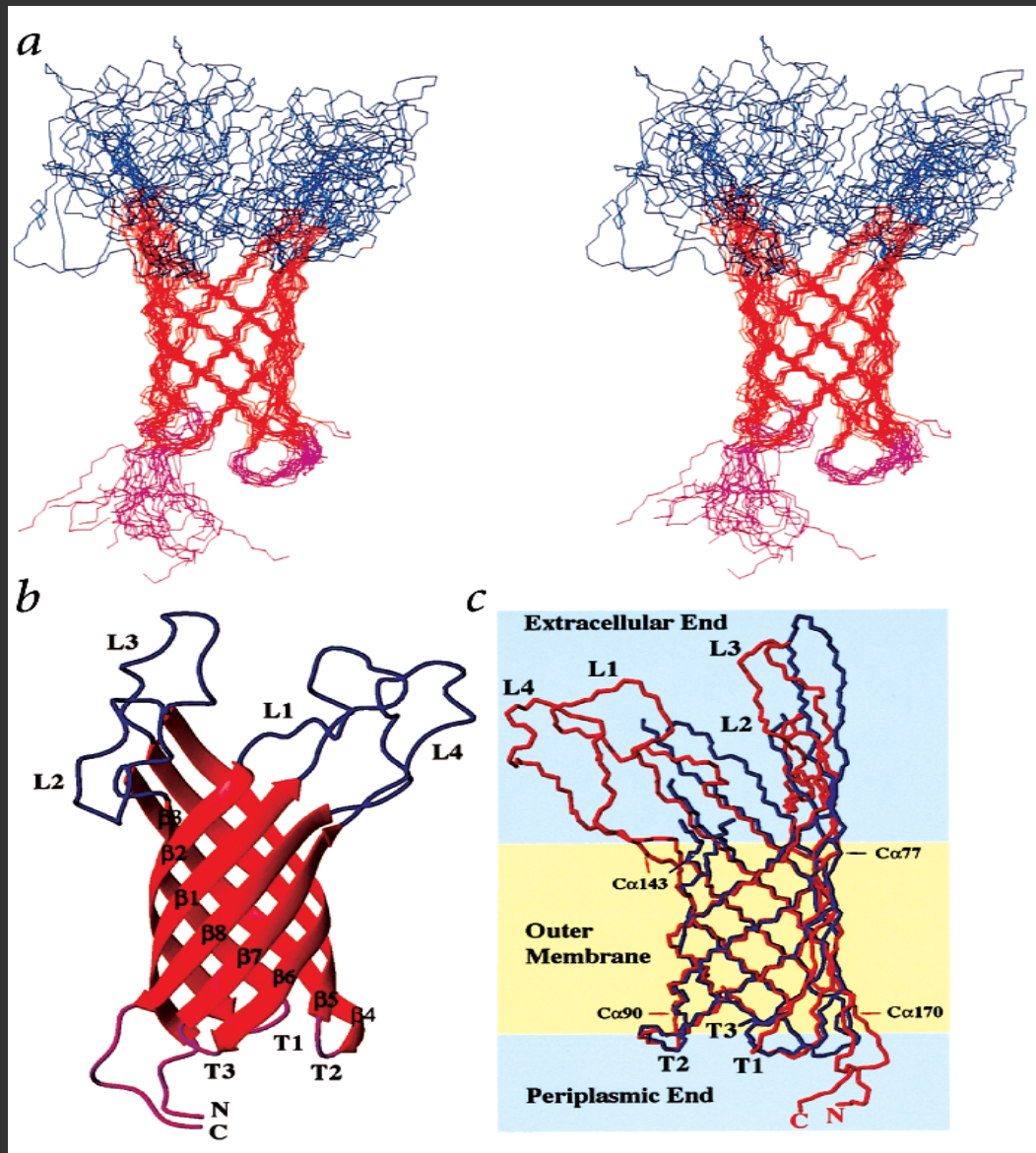
- 🔒 限于 **20 Kda** 以下的蛋白质。
- 🔒 将浓缩的蛋白质溶液放入**磁场**中，测出不同原子的**共振频率**。
- 🔒 每一个原子共振频率都受相邻原子的影响，而且离得越近，影响越大。
- 🔒 放大这种效应，就能测出氨基酸残基间的距离，用于产生蛋白质的三维结构模型。
- 🔒 也可用于蛋白质结构域分析。

# 实例

a: NMR 产生的结构

b: 带子模型

c: NMR 产生的结构与 X 射线衍射图  
(蓝色) 比较



E. coli 外膜蛋白 A 的跨膜结构域