**蛋白质下游纯化技术介绍**

一般而言，上游指基因克隆、细胞培养等目的产物表达工序，下游指从表达有目的产物的复杂的混合液中分离纯化得到符合要求的目的产物的一系列步骤。美、日、欧等发达国家生物技术产品工业化的实践证明：生物技术产品的产业化高度依赖于基因工程下游工序技术及设备的进步。  
一、纯化工艺常用衔接技术：  
1、盐析：常采用硫酸铵、硫酸钠盐析，获得的盐析沉淀物在低温冰箱(<-20℃)中可以长期保存。  
2、等电点沉淀：根据蛋白质、多肽在等电点时溶解度最小的特点进行。  
3、有机溶剂沉淀：采用冷的丙酮、乙醇沉淀蛋白质。例如人血浆蛋白的乙醇分级沉淀。  
4、透析：根据目的蛋白质、多肽的分子量，选取适宜的透析袋进行透析，可以起到更换缓冲液以及去除一些低分子杂质的目的。  
5、超滤：根据目的蛋白质、多肽的分子量，选取适宜截留分子量(MWcutoff)的超滤膜进行超滤。  
6、真空冷冻干燥：利用在低温和高真空条件下，冰不经融化为液态水而直接升华为水蒸气的原理。可以很好地浓缩样品和保存蛋白质、多肽的生物活性。  
7、变性沉淀：根据目的蛋白质、多肽对于温度或者酸碱性的耐受性，在较高的温度或者较极端的pH条件下处理样品，使杂质去除的方法。例如胸腺肽制备中使用的热变性(~80℃)去除杂蛋白。如果目的蛋白、多肽本身热稳定性、酸碱稳定性不高则不宜采用。  
8、离心沉淀：利用离心沉降力将不溶性颗粒物与溶液分离的技术，常采用高速冷冻离心机进行。  
9、脱盐：透析、超滤可用于进行脱盐，Sephadex G25、G50常用于蛋白质脱盐。  
10、过滤：澄清过滤、除菌过滤(0.22微米膜过滤)、超滤(1000~300000道尔顿)  
二、蛋白质、多肽液相色谱纯化方法简介  
chromatography,色谱，层析  
常用的液相色谱纯化方法及其原理：  
方法　　　　　 　　　分离原理 　　　　基于  
凝胶过滤(GF) 　　分子大小/形状　 分子形态  
离子交换色谱(IEX) 分子所带电荷 Asp、Glu、Lys、Arg、His等带电氨基酸  
疏水作用色谱(HIC) 表面疏水性 Trp、Phe、Ile、Leu、Tyr、Pro、Met、Val、Ala等疏水性氨基酸  
反相色谱(RPC) 　　表面疏水性 Trp、Phe、Ile、Leu、Tyr、Pro、Met、Val、Ala等疏水性氨基酸  
金属螯合色谱(IMAC) 分子与金属形成配位键 His、Trp、Cys  
亲和色谱 　　　　　特异生物识别作用 抗原-抗体，酶-底物，酶-抑制剂等  
共价结合色谱 　　　共价结合 巯基(Cys)  
1、纯化的一般目标和方法  
首先，自然来源或者重组表达的蛋白质经过一些粗提的步骤(例如：匀浆、离心、硫酸铵沉淀等)成为稳定的可以用于色谱分离的样品。  
然后进行捕获色谱(capture chromatography)，主要目标是浓缩和去除大量的容易去除的杂质，此步最关心的是流速和载量，常采用高载量、快流速凝胶。  
经过浓缩的部分纯化的样品进行中级色谱(intermediate chromatography)，目的是去除较难去除的杂质，此步最关心的是分辨率，常采用高分辨率的细颗粒凝胶。  
最后为了得到符合要求的最终产品，去除残存的杂质以及目的蛋白的多聚物或者降解片断，进行精制色谱(polishing chromatography)，常采用具有高分辨率的凝胶过滤凝胶进行凝胶过滤色谱。  
2、纯化前的准备工作  
(1)样品稳定性试验  
a、测定样品在pH 2-9的稳定性；  
b、测定样品在0-4 mol/L NaCl及0-2 mol/L 硫酸铵中的稳定性；  
c、测定样品在0-50%乙醇、甲醇中的稳定性；  
d、测定样品在4-40℃的稳定性；  
e、室温下静置过夜，测定对蛋白水解酶的稳定性。  
(2)样品预处理  
a、去除样品中颗粒物(0.45-0.22微米膜过滤或者10000 g离心15分钟)  
b、去除样品中脂类( 10000 g离心15分钟或有机溶剂抽提)  
c、去除样品中核酸(加入核酸酶消化或者使核酸沉淀)  
d、抑制样品中蛋白水解酶(加入蛋白酶抑制剂、低温下快速第一步分离或在蛋白酶缺陷宿主中表达重组蛋白)  
样品中有害杂质及去除办法：  
杂质　　　　　　 害处 　　　　　　　　预防措施  
颗粒物 　堵塞柱子，增大反压力 0.45-0.22微米膜过滤；10000g离心10-15分钟；细胞匀浆，4000-5000g离心30分钟。  
脂类　　 封闭介质配基、导致沉淀、导致非特异吸附 10000 g离心10-15分钟；若目标分子稳定，用有机溶剂抽提  
核酸　　 高粘度、封闭介质结合位点 加入核酸酶消化，或使核酸沉淀  
蛋白酶　 降解目的蛋白 加入蛋白酶抑制剂；用亲和色谱除去蛋白酶；快速进行第一步分离；低温下进行分离；在蛋白酶缺陷的宿主中表达重组蛋白  
由于不同的色谱方法的原理不同，其对样品的要求也不相同，所以必须在进行色谱之前，根据特定色谱方法的要求对样品进行进一步的处理。如下表所示：

不同色谱方法对于样品的要求：  
样品参数　　 离子交换色谱 　　　疏水作用色谱 　　　　　　凝胶过滤色谱  
样品体积 　　无限制　　　　　　　 无限制 　　　　　　　一般柱体积的1-5%  
样品量　 最大理论载量的10-20% 　最大理论载量的10-20% 　仅受到样品粘度限制  
样品粘度 　　约<50mg/ml 　　　　　约<50mg/ml 　　　　　约<50-100mg/ml  
pH值/盐浓度 同平衡缓冲液(低盐) 同平衡缓冲液(高盐) 仅受介质与样品稳定性限制  
有机溶剂 　为减少非特异吸附，可加入有机溶剂(<30%) 分离后，可用有机溶剂进行清洗 仅受介质与样品稳定性限制  
(3)样品的保存条件：  
短期储存(小于24小时)  
a、避免接近或超过样品的稳定极限防止蛋白质变性或沉淀  
b、在密闭容器中冰箱冷藏  
较长期储存(数天)  
a、b、同上  
c、加入适当的抑菌剂  
长期储存  
a、同上  
b、冰冻或者最好冻干(真空冷冻干燥)保存。  
3、对每一纯化步骤的评价相关方法的建立  
a、目的蛋白含量测定  
酶活性测定、生物活性测定、放射免疫、酶联免疫、免疫电泳、荧光。  
b、总蛋白含量测定  
紫外吸收法、Lowry法、Bradford染料结合法(考马斯亮兰G-250)等。  
c、样品复杂度检测  
HPLC(离子交换、凝胶过滤、反相)、SDS-PAGE、等电聚焦、毛细管电泳(CE)。  
4、蛋白质的来源  
(1)天然蛋白： 天然产物中的目的蛋白一般含量很少而且组分极复杂，在分离过程中须采用多个步骤才能去除各种杂质，并应在整个过程中降低蛋白水解酶的活性。  
(2)重组蛋白： 重组蛋白则目标蛋白的丰度较高。重组蛋白主要有三种表达定位：  
a、细胞质：在这种情况下，必须破坏细胞结构才能得到目的蛋白质，同时伴随着大量核酸和其它上千种宿主蛋白质的释放；在表达量较高的条件下，一般形成包涵体，包涵体含有过表达目的蛋白，且容易通过高速离心分离，但是包涵体的溶解与复性是较复杂的。  
b、外周质： 表达的蛋白质存在于细菌内膜与外膜之间，这样目的蛋白可以较少地受到蛋白酶的作用并减少了宿主蛋白的污染。  
c、分泌到培养基：这种表达一般蛋白质浓度较低，主要受到培养基中的污染。  
不同来源的蛋白质样品概述：  
来源　　 目的蛋白含量 　　复杂度 　　杂质类型 　　　　色谱前预处理  
天然 　　　低 　　　　　　复杂　　固体颗粒、酶 　去除固体颗粒与核酸，抑制蛋白酶  
重组 　　细胞质 较高 复杂 细胞碎片，宿主蛋白，核酸，蛋白酶 去除固体颗粒与核酸，抑制蛋白酶  
包涵体 很高 低，主要为目的蛋白 高速离心分离，溶解、复性  
外周质 高 中等 宿主蛋白，蛋白酶 去除固体颗粒  
分泌 低 低，主要含培养基蛋白 培养基，蛋白酶，宿主蛋白 去除固体颗粒，抑制蛋白酶