

**上海生物样本库**  
**最佳实践规范及标准操作流程**  
**文件汇编**  
**(第二版)**

2010年5月

<b>上海生物样本库</b>				
质量管理体系文件				
文件名称	蛋白质提取控制程序		编号	SOP-SC-031-01
批准人		批准日期	实施日期	

## 蛋白质提取控制程序

### 1. 目的

规定从人体组织中提取蛋白质的工作程序和技术要求。

### 2. 适用范围

适用于从人体组织中提取蛋白质(如总蛋白、细胞膜蛋白、细胞核蛋白和细胞质蛋白等)和保存蛋白质。

### 3. 定义和术语

#### 3.1 破碎

指用物理、化学、等方法来破坏细胞膜从而将胞内物质释放至周围环境的过程。

#### 3.2 提取

指用适当的溶剂和方法,将经过处理或破碎的细胞中被提取的蛋白质充分释放出来并与杂质分离的过程。

### 4. 职责

4.1 样本库实验技术员负责从不同样本中提取蛋白质。

### 5. 设备和器材

见正文内容

### 6. 正文

#### 6.1 组织蛋白的提取

##### 6.1.1 脏器组织的选择及预处理

新鲜获取的脏器组织用缓冲盐溶液洗去残留血液和污染物,迅速剥去脂肪和筋皮等结缔组织,冲洗干净。用组织剪或手术刀将组织分离成 1cm<sup>3</sup> 左右的小块。

最好选择新鲜的组织，但有些情况下，如果是以小块组织快速冰冻并且保存时间不长的话，也可选用冰冻组织。建议冰冻组织保存在 $-50^{\circ}\text{C}$ 以下，因为由于冰晶形成导致的溶媒体蛋白酶的释放可能引起蛋白的降解。对于易分解的蛋白质，应选用新鲜材料制备。

### 6.1.2 组织的破碎

人们所需的蛋白有些分泌于细胞外，用适当的溶剂可直接提取；多数存在于细胞内，游离在细胞质中或与细胞器紧密结合。而欲提取存在于细胞内的物质时，必须将细胞破碎。脏器的细胞膜较脆弱极易破损，往往在组织绞碎或提取时就破坏了。破碎的主要目标是用最快的速度得到最大程度的细胞破碎率，并能保证蛋白质的完整性。

#### A. 匀浆法

电动玻璃匀浆器常用于匀浆肝、心、肌肉等软组织的匀浆，通常以 500~1500 rpm 的速度，匀浆 3~6 次，每次 5~10 秒。

手动玻璃匀浆器常用于脑组织的匀浆，匀浆 10~20 次。

刀片式和肉切式组织匀浆器以 1000~3000 rpm 的速度，匀浆 3 次，每次 20~30 秒。次间暂停几秒。

匀浆过程应注意维持低温。玻璃匀浆器可外置冰水浴，其他匀浆容器可预冷或在冷室内进行匀浆。

#### B. 超声法

将处理的组织混悬在至少两倍体积的缓冲液内，将超声探头没入混悬液内进行超声破碎。

超声波的频率和作用时间与需要处理的靶物质的体积有关。一般输出功率 100~200W，破碎时间 1~10 分钟，一般约 2 分钟。

#### C. 液氮研磨

通常每个冻存管内放入 80mg 组织，迅速放入液氮中冻存。在冷室内将组织从液氮中取出，立即放入事先用液氮预冷的研钵中，敲碎成小块后迅速用力研磨至粉末。研磨过程中始终保持研钵内有适量液氮。研磨的程度以肉眼见组织成微细均匀的粉末即可。注意处理不同的样本时，用不同的研钵，以避免可能的交叉污染。

## 6.2 蛋白的分离和纯化

蛋白质的分离纯化方法很多，主要有：

根据蛋白质溶解度不同的分离方法

### 6.2.1 蛋白质的盐析

中性盐对蛋白质的溶解度有显著影响，一般在低盐浓度下随着盐浓度升高，蛋白质的溶解度增加，此称盐溶；当盐浓度继续升高时，蛋白质的溶解度不同程度下降并先后析出，这种现象称盐析，将大量盐加到蛋白质溶液中，高浓度的盐离子（如硫酸铵的  $\text{SO}_4$  和  $\text{NH}_4$ ）有很强水化力，可夺取蛋白质分子的水化层，使之“失水”，于是蛋白质胶粒凝结并沉淀析出。盐析时若溶液 pH 在蛋白质等电点则效果更好。由于各种蛋白质分子颗粒大小、亲水程度不同，故盐析所需的盐浓度也不一样，因此调节混合蛋白质溶液中的中性盐浓度可使各种蛋白质分段沉淀。

影响盐析的因素有：（1）温度：除对温度敏感的蛋白质在低温（4 度）操作外，一般可在室温中进行。一般温度低蛋白质溶解度降低。但有的蛋白质（如血红蛋白、肌红蛋白、清蛋白）在较高的温度（25 度）比 0 度时溶解度低，更容易盐析。（2）pH 值：大多数蛋白质在等电点时在浓盐溶液中的溶解度最低。（3）蛋白质浓度：蛋白质浓度高时，欲分离的蛋白质常常夹杂着其他蛋白质一起沉淀出来（共沉现象）。因此在盐析前血清要加等量生理盐水稀释，使蛋白质含量在 2.5-3.0%。

蛋白质盐析常用的中性盐，主要有硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。其中应用最多的硫酸铵，它的优点是温度系数小而溶解度大（25 度时饱和溶液为 4.1M，即 767 克/升；0 度时饱和溶解度为 3.9M，即 676 克/升），在这一溶解度范围内，许多蛋白质和酶都可以盐析出来；另外硫酸铵分段盐析效果也比其他盐好，不易引起蛋白质变性。硫酸铵溶液的 pH 常在 4.5-5.5 之间，当用其他 pH 值进行盐析时，需用硫酸或氨水调节。

蛋白质在用盐析沉淀分离后，需要将蛋白质中的盐除去，常用的办法是透析，即把蛋白质溶液装入透析袋内（常用的是玻璃纸），用缓冲液进行透析，并不断的更换缓冲液，因透析所需时间较长，所以最好在低温中进行。此外也可用葡萄糖凝胶 G-25 或 G-50 过柱的办法除盐，所用的时间就比较短。

### 6.2.2 等电点沉淀法

蛋白质在静电状态时颗粒之间的静电斥力最小，因而溶解度也最小，各种蛋白质的等电点有差别，可利用调节溶液的 pH 达到某一蛋白质的等电点使之沉淀，但此法很少单独使用，可与盐析法结合用。

### 6.2.3 低温有机溶剂沉淀法

用与水可混溶的有机溶剂，甲醇，乙醇或丙酮，可使多数蛋白质溶解度降低并析出，此法分辨力比盐析高，但蛋白质较易变性，应在低温下进行。

根据蛋白质分子大小的差别的分离方法

### 6.2.4 透析与超滤

透析法是利用半透膜将分子大小不同的蛋白质分开。

超滤法是利用高压或离心力，强使水和其他小的溶质分子通过半透膜，而蛋白质留在膜上，可选择不同孔径的膜截留不同分子量的蛋白质。

### 6.2.5 凝胶过滤法

也称分子排阻层析或分子筛层析，这是根据分子大小分离蛋白质混合物最有效的方法之一。柱中最常用的填充材料是葡萄糖凝胶（Sephadex gel）和琼脂糖凝胶（agarose gel）。

根据蛋白质带电性质进行分离

蛋白质在不同 pH 环境中带电性质和电荷数量不同，可将其分开。

### 6.2.6 电泳法

各种蛋白质在同一 pH 条件下，因分子量和电荷数量不同而在电场中的迁移率不同而得以分开。值得重视的是等电聚焦电泳，这是利用一种两性电解质作为载体，电泳时两性电解质形成一个由正极到负极逐渐增加的 pH 梯度，当带一定电荷的蛋白质在其中泳动时，到达各自等电点的 pH 位置就停止，此法可用于分析和制备各种蛋白质。

### 6.2.7 离子交换层析法

离子交换剂有阳离子交换剂（如：羧甲基纤维素；CM-纤维素）和阴离子交换剂（二乙氨基乙基纤维素；DEAE-纤维素），当被分离的蛋白质溶液流经离子交换层析柱时，带有与离子交换剂相反电荷的蛋白质被吸附在离子交换剂上，随后用改变 pH 或离子强度办法将吸附的蛋白质洗

脱下来。(详见层析技术章)

### 6.2.8 根据配体特异性的分离方法—亲和色谱法

亲和层析法 (affinity chromatography) 是分离蛋白质的一种极为有效的方法, 它经常只需经过一步处理即可使某种待提纯的蛋白质从很复杂的蛋白质混合物中分离出来, 而且纯度很高。这种方法是根据某些蛋白质与另一种称为配体 (Ligand) 的分子能特异而非共价地结合。其基本原理: 蛋白质在组织或细胞中是以复杂的混合物形式存在, 每种类型的细胞都含有上千种不同的蛋白质, 因此蛋白质的分离 (Separation), 提纯 (Purification) 和鉴定 (Characterization) 是生物化学中的重要的一部分, 至今还没的单独或一套现成的方法能移把任何一种蛋白质从复杂的混合蛋白质中提取出来, 因此往往采取几种方法联合使用。

### 6.3 提取方法以及影响提取的因素

蛋白质提取与制备蛋白质种类很多, 性质上的差异很大, 既或是同类蛋白质, 因选用材料不同, 使用方法差别也很大, 且又处于不同的体系中, 因此不可能有一个固定的程序适用各类蛋白质的分离。但多数分离工作中的关键部分基本手段还是共同的, 大部分蛋白质均可溶于水、稀盐、稀酸或稀碱溶液中, 少数与脂类结合的蛋白质溶于乙醇、丙酮及丁醇等有机溶剂中。因此可采用不同溶剂提取、分离及纯化蛋白质和酶。蛋白质与酶在不同溶剂中溶解度的差异, 主要取决于蛋白分子中非极性疏水基团与极性亲水基团的比例, 其次取决于这些基团的排列和偶极矩。故分子结构性质是不同蛋白质溶解差异的内因。温度、pH、离子强度等是影响蛋白质溶解度的外界条件。提取蛋白质时常根据这些内外因素综合加以利用。将细胞内蛋白质提取出来。并与其它不需要的物质分开。但动物材料中的蛋白质有些可溶性的形式存在于体液 (如血浆、消化液等) 中, 可以不必经过提取直接进行分离。蛋白质中的角蛋白、胶原及丝蛋白等不溶性蛋白质, 只需要适当的溶剂洗去可溶性的伴随物, 如脂类、糖类以及其他可溶性蛋白质, 最后剩下的就是不溶性蛋白质。这些蛋白质经细胞破碎后, 用水、稀盐酸及缓冲液等适当溶剂, 将蛋白质溶解出来, 再用离心法除去不溶物, 即得粗提取液。水适用于白蛋白类蛋白质的抽提。如果抽提物的 pH 用适当缓冲液控制时, 其稳定性及溶解度均能增加。如球蛋白类能溶于稀盐溶液中, 脂蛋白可用稀的去垢剂溶液如十二烷基硫酸钠、洋地黄皂苷 (Digitonin) 溶液或有机溶剂来抽提。其它不溶于水的蛋



白质通常用稀碱溶液抽提。

影响提取的因素主要是被提取物质在溶剂中的溶解度及由固相扩散到液相的难易程度。某一物质在某溶剂中的溶解度与该物质的分子结构及溶剂的性质有关，一般遵守“相似相溶”的原则。搅拌、减少溶剂的粘度和延长提取时间等方法可以提高被提取物的扩散速度，增强提取效果。提取的原则是“少量多次”，即对于等量的用于抽提的溶液，分多次提取比一次提取效果好得多。

一般理想的抽提溶液应具备下述条件：对有效成分溶解度大，破坏作用小；对杂质不溶解或溶解度很小；来源广泛、价格低廉、操作安全等。目标是回收尽可能多的蛋白质，并尽可能地减少其他生物材料（如脂类、纤维素、核酸等）的染。

## 7. 相关文件

无

## 8. 参考标准与文献

《分子克隆实验指南》第三版，ISBN 7-03-010338-6