



生物化学实验

生物大分子制备技术

2.3 生物大分子的提取

北京大学 王青松 胡晓倩

生物大分子的提取

- 利用一种溶剂对**不同物质溶解度的差异**，从混合物中分离出一种或几种组分的过程，称为提取（extraction），提取又称萃取或抽提。
- 生物大分子的提取是在分离纯化的前期，将经过预处理或破碎了的细胞或组织置于一定条件下或溶剂中，使被提取的生物大分子**以溶解状态充分释放到提取溶液中，并尽可能保持原来的天然状态，不丢失生物活性的过程。**

根据物质的性质选择提取方法

- 针对生物材料和目的物的性质，需要考虑目的物质的溶解性质、相对分子质量、等电点、稳定性、含量等因素，选择合适的溶剂系统和提取条件。
- 最主要的是目的物和主要杂质在溶解度方面的差异及它们的稳定性。
 - 1) 提取过程中尽量增加目的物的溶解度、尽可能降低杂质的溶解度；
 - 2) 充分重视提取过程中目的物的活性变化。

生物大分子的提取方法

- **水溶液提取**

- 蛋白质和酶的提取一般以水溶液为主。
- 稀盐溶液和缓冲液对蛋白质的稳定性好，溶解度大，是提取蛋白质和酶最常用的溶剂。

- **有机溶剂提取**

- 一些和脂类结合紧密或非极性侧链较多的蛋白质和酶难溶于水、稀盐、稀酸、稀碱中，常用一定比例的有机溶剂提取。
- 常用的有机溶剂有乙醇、丙酮、异丙醇等，这些溶剂可与水互溶，具有亲水性和亲脂性。

影响生物大分子提取的因素

盐浓度

温度

pH值

提取液的
体积

蛋白酶的
降解作用

搅拌与氧
化

盐浓度的影响

- 盐离子能减弱生物分子间的离子键和氢键的作用。稀盐溶液对蛋白质等生物大分子有助溶作用，常用于大多数生化物质的提取。
- 常用稀盐提取液：20~50 mM稀盐缓冲液或0.1~0.15 M NaCl 盐溶液。
- 为了提高提取效率，有时需要调节溶剂的极性。
 - 1) 向水溶液中加入蔗糖或甘油可使其极性降低；
 - 2) 加入NaCl、KCl、 NH_4Cl 或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 可增加溶液的极性。

温度的影响

- 多数物质的溶解度随提取温度的升高而增加。较高的温度可降低提取物的粘度，有利于分子扩散和机械搅拌。
- 温度升高，容易造成生物大分子的降解。为防止变性和降解，制备具有活性的蛋白质和酶，提取时一般在0℃~5℃的低温操作。
- 热稳定性好的蛋白质，如胰弹性蛋白酶，可在20~25℃提取。
- 一些耐热的生化成分，如多糖类，可50~90℃加热提取。

pH值的影响

- 蛋白质、酶与核酸的溶解度和稳定性与pH值有关。提取液的pH应在蛋白质和酶的稳定范围内。提取液尽量避免过酸或过碱，pH值一般应控制在4-9之间。
- 为了增加目的物的溶解度，避免在目的物的等电点附近进行提取。
 - 对酸性生物大分子的提取，常在碱性条件下进行。
 - 对碱性生物大分子的提取，常在酸性条件下进行。
 - 对两性物质的提取，则使水溶液的pH值在该两性物质的等电点附近为佳。

提取液的体积

- 增加提取液的用量，可以提高生化物质的提取率。过量的提取液会导致目的产物的浓度降低，不利于后续的分离纯化。
- 提取液用量一般为生物材料的2 ~ 5倍，可分2 ~ 3次提取。少数情况也有用10 ~ 20倍量溶剂作一次性提取。目的是节省提取时间，降低有害酶的作用。

蛋白酶的降解作用

- 生物体内自身存在的蛋白酶或核酸酶的降解作用是影响生物大分子提取成败的关键因素。
- 加入蛋白酶抑制剂可使这些水解酶失去活性，防止它们对欲提纯的蛋白质、酶及核酸的降解作用。

常用的蛋白酶抑制剂

PMSF

- 抑制丝氨酸蛋白酶（如胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶，凝血酶）和巯基蛋白酶（如木瓜蛋白酶）。

Leupeptin 亮肽素

- 抑制丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶如胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、纤溶酶和组织蛋白酶。

Aprotinin抑肽酶

- 丝氨酸蛋白酶抑制剂，抑制纤维蛋白溶酶、激肽释放酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶的高活性。不抑制凝血酶或因子X。

Pepstatin胃蛋白酶抑制剂

- 抑制天冬氨酸蛋白酶如胃蛋白酶、凝乳酶。

EDTA- Na_2

- 金属蛋白酶抑制剂。

蛋白酶抑制剂cocktail

- **蛋白酶抑制剂cocktail:**

按照优化的配比将多种蛋白酶/磷酸酶抑制剂混合，配制成蛋白酶/磷酸酶抑制剂cocktail混合物，根据抑制剂成分及作用，广泛作用于各种蛋白酶，为广谱蛋白酶抑制剂。

- 蛋白酶/磷酸酶抑制剂cocktail具有**高效、使用方便、保护更全面等优点**。在细胞、动物/植物组织、酵母或细菌的提取裂解过程中加入蛋白酶抑制剂cocktail可有效保护蛋白质。

- **使用方法:**

cocktail一般以100×或50×的储液可分装在冰箱中稳定保存，使用时按照1:100的比例加入到裂解液中(例如：1 mL裂解液中加入10 μL蛋白酶抑制剂混合物)，混匀后即可使用。

**注意：蛋白酶抑制剂cocktail有含有或不含EDTA的2种配方，
需根据实验目的选择。**

常用磷酸酶抑制剂

1) 氟化钠 (NaF)

• 酸性磷酸酶可逆抑制剂

2) 原钒酸钠 (Na_3VO_4)

• 碱性磷酸酶和酪氨酸磷酸酶可逆抑制剂

3) 甘油磷酸钠 (β -glycerophosphate)

• 丝氨酸/苏氨酸磷酸酶可逆抑制剂

4) 焦磷酸钠 ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_4$)

• 丝氨酸/苏氨酸磷酸酶不可逆抑制剂

- 磷酸酶抑制剂cocktail: 一般将上述几种磷酸酶抑制剂按一定比例混合, 配制成磷酸酶抑制剂cocktail储液 ($100\times$ 或 $50\times$), 可有效抑制蛋白提取物中的各种磷酸酶, 如丝氨酸/苏氨酸、酪氨酸、酸性及碱性磷酸酶等。

搅拌与氧化

- 搅拌能促使被提取物的溶解，一般采用**温和搅拌**为宜，如速度太快容易产生大量泡沫，增大了与空气的接触面，会引起酶等生物大分子的变性失活。
- 巯基是许多蛋白质和酶活性部位的必需基团，极易被氧化，形成分子内或分子间的二硫键，导致酶活性的丧失。
- 提取液中加入少量巯基乙醇、二硫苏糖醇(DTT)、还原型谷胱甘肽或半胱氨酸可防止巯基氧化。