



# 生物化学实验

## 生物大分子制备技术

### 2.5 生物大分子的沉淀分离

北京大学 王青松 胡晓倩

# 生物大分子的沉淀分离

- 沉淀分离是通过改变某些条件或添加某种物质，使生物大分子在溶液中的溶解度降低，从溶液中沉淀析出，而与其它杂质分子分离的过程。
- 沉淀法具有**浓缩和分离的双重作用**，在蛋白质、酶、多肽、核酸的回收和分离中广泛应用，是生化物质分离纯化中经常采用的方法。

# 常用的沉淀分离方法

1. 盐析沉淀法

2. 有机溶剂  
沉淀法

3. 等电点  
沉淀法

4. 高分子聚  
合物沉淀法

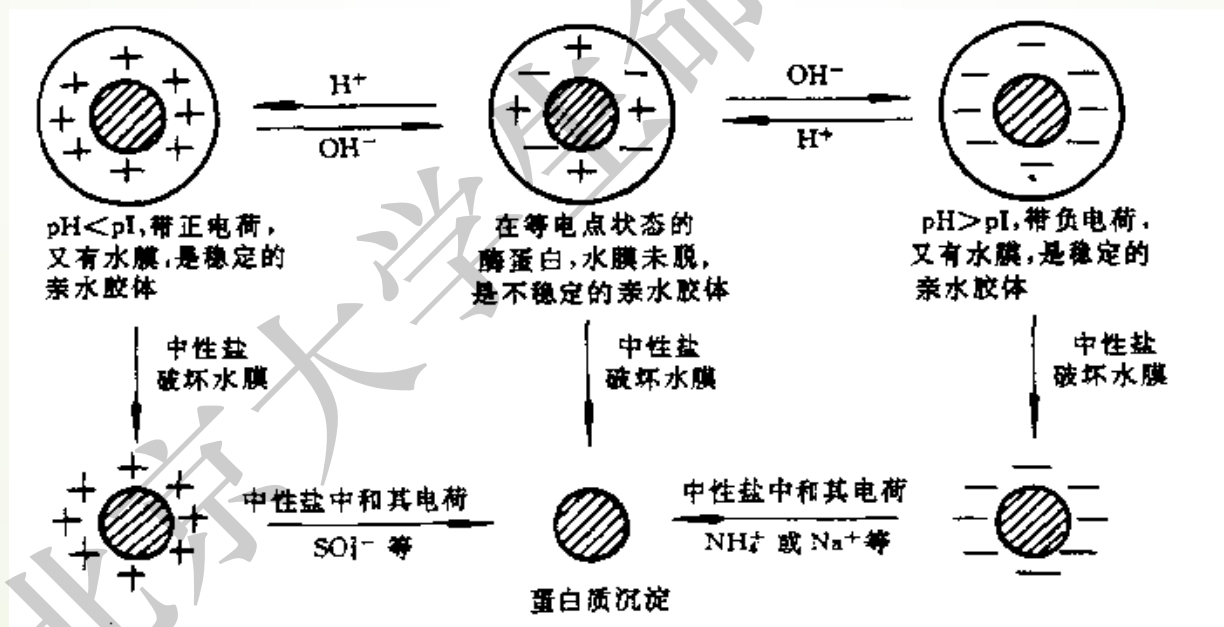
5. 选择性  
沉淀法

# 1. 盐析沉淀法

- 蛋白质在低盐浓度下的溶解度随盐浓度升高而增加（盐溶）。当盐浓度不断上升至一定数值时，蛋白质溶解度随盐浓度的升高而下降，使蛋白质从溶液中沉淀析出，这种现象称为盐析。
- 早在1859年，中性盐盐析法就被用于从血液中分离蛋白质。
- **常用中性盐：**主要是**硫酸铵**，其次是硫酸钠、氯化钠、硫酸镁、硫酸钾等。

# 盐析的原理

- 蛋白质是亲水胶体，高浓度的中性盐会破坏蛋白质的水化层，同时使蛋白质分子所带的电荷逐渐被中和，结果蛋白质的胶体稳定性遭到破坏而沉淀析出。



# 盐析的特点

- 成本低，不需要特别昂贵的设备。
- 操作简单、安全。
- 盐析是可逆的，不会引起蛋白质变性，能得到保持生物活性的蛋白质。  
在蛋白质早期的粗提阶段，常用盐析法来沉淀分离蛋白质。在蛋白质纯化的晚期，也可用于目的蛋白质样品溶液的浓缩。
- 盐析得到的蛋白质沉淀，含有大量的盐，必须用经透析、凝胶层析等方法进行脱盐处理。
- 盐析一般在室温下即可进行，适合工业化生产。

# 盐析的操作方法

- **固体法：**在大体积的粗制品溶液中逐步加入固体硫酸铵，当加到一定饱和度时，蛋白质便可沉淀出来。此法需注意加硫酸铵的速度，在搅拌过程中，少量多次缓慢加入。
- **饱和溶液法：**在蛋白质溶液中逐步加入预先调好pH的饱和硫酸铵溶液，此法比较温和，但会导致溶液体积增加，对大体积样品不适用。

## 2. 有机溶剂沉淀法

- 在生物大分子的水溶液中，加入**水溶性有机溶剂会降低水的介电常数**，导致蛋白质分子之间的静电引力增加，破坏蛋白质等生物大分子表面水化层，从而沉淀析出。
- 有机溶剂沉淀时，溶剂易于回收，样品不必透析除盐，常用于蛋白质（酶）、核酸、多糖等的分离纯化。
- **常用有机溶剂**：甲醇、乙醇、丙酮等，有机溶剂用量一般为溶液体积的2-4倍，有机溶剂的终浓度在60-80%之间。



# 影响有机溶剂沉淀的因素

## 温度

- 有机溶剂与水混合时会放出大量的热，容易引起蛋白质变性失活，整个操作须在低温下进行。

## pH值

- 分离效果受到溶液pH值的影响，需将溶液的pH调节到目的分离物质的等电点附近。

## 离子强度

- 低浓度的中性盐有利于沉淀，减少蛋白质变性，通常用10~50mM盐溶液。

## 金属离子

- 某些蛋白质可与多价阳离子（如 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ ）结合形成复合物，使蛋白质在有机溶剂中溶解度降低。

**有机溶剂沉淀析出后要尽快分离，尽量减少有机溶剂的影响。**

# 3. 等电点沉淀法

- 两性生化物质在pH处于等电点 (Isoelectric point, pI) 时, **分子表面净电荷为零**, 分子间静电排斥作用减弱, 使分子能相互聚集而沉淀下来。
- 在等电点时, 酶等大分子物质仍有一定溶解性, 导致沉淀不完全。因此等电点沉淀法经常与盐析法等其它方法一起使用, 提高沉淀能力。
- 等电点沉淀法常作为一种去杂手段, 用于沉淀除去杂蛋白及其它杂质。
- **使用该法需注意:**
  - 溶液pH不会影响到目的生化物质的稳定性;
  - 加酸或加碱调节pH的过程中, 要边搅拌边加入, 防止局部过酸过碱引起蛋白质变性失活。

## 4. 高分子聚合物沉淀法

- 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 等水溶性非离子型高分子聚合物可使蛋白质发生沉淀。这种沉淀**条件温和, 操作简单, 不易引起蛋白质变性, 而且沉淀完全。**
- 水溶性的非离子型高分子聚合物是20世纪60年代发展起来的沉淀剂, 不同分子量的聚乙二醇因**无毒, 对成品影响小,**近年来被广泛用于核酸、蛋白质和酶的分离纯化。
- **缺点:** 所得沉淀中含有大量的PEG, 需要去除。

# 5. 选择性沉淀

- **利用蛋白质对某些物理化学因素敏感性的不同**，有选择性使蛋白质变性沉淀，达到样品中杂蛋白去除和目的物分离纯化的目的。主要包括：

- **利用热稳定性**

利用蛋白质热稳定性的不同，可加热破坏某些蛋白，保留目的蛋白，达到除去杂蛋白的目的。操作前可加入蛋白酶抑制剂，避免目的蛋白质的降解。

- **利用酸碱变性**

很多蛋白质可在pH5.0以下被沉淀，利用酸碱变性可有选择除去杂蛋白。如：用2.5%的三氯乙酸TCA处理胰蛋白酶或细胞色素c的粗提液，可除去大量杂蛋白，而对所提取的蛋白质活性无影响。