

TECHNOTE 203

蛋白纯化亲和层析分离技术



Enriching Biotechnology

Telephone: +86 021 55809378

E-mail address: marketing@bio-enriching.com

一. 蛋白纯化亲和层析技术的原理:

蛋白质亲和层析技术适应于理化性质差异性较小而难分离的蛋白质，亲和层析利用固相介质中的配基与混合生物分子之间亲和能力不同而进行分离，当蛋白粗样本（混合其他杂蛋白、糖类、核酸及小分子）通过层析柱时，与配基能够特异性结合的蛋白质就会被吸附固定在层析柱中，其他的蛋白质、核酸等对配体不具有特异性的结合能力，将通过柱子洗脱下来，这种结合在一定条件下是可逆的，选用适当的洗脱液，改变缓冲液的离子强度和 pH 值或者选择更强的配体结合溶液将结合的蛋白质洗脱下来，而无亲和力的蛋白质最先流出层析柱。

蛋白纯化亲和层析的固相载体具有稳定的理化学性质，是一种含有较多化学反应基团的羟基多糖类介质，具有机械强度高，透性好，不溶于水，非特异性吸附少，多孔网状结构的特点。常用的载体有琼脂糖凝胶（如 GE 公司），其他的载体如葡聚糖凝胶，多孔硅胶，树脂，纤维素等，固相载体首先与特定的配体共价偶联形成具有化学活性的基团，即载体的活化，常见的对琼脂糖凝胶的活化有这么几种：溴化氰活化载体，即将含有氨基偶联到载体的多糖基上（但溴化氰活化需谨慎，有剧毒氰化物放出），以及环氧氯丙烷在碱性条件下活化载体，其他的载体的活化剂还有戊二醛等。配体指被特异性蛋白质大分子所识别，并与蛋白质发生亲和作用的基团，如酶的作用底物，辅酶，激素受体，抗原与抗体的结合等；

蛋白质与层析载体上的配体通过配位键（如 His-tag 与 Ni^{2+} ）、范德华力、疏水力、静电力等作用发生生物学专一性结合形成复合物。蛋白质亲和层析技术通过目标蛋白质与配体间通过特异性亲和力吸附而达到分离纯化的目的，具有生物专一性的特点，纯化效率高。

二. 蛋白纯化亲和层析的应用分类:

2.1 抗原抗体的免疫亲和层析

利用抗原与抗体之间的特异性亲和力而进行分离的方法。所需的蛋白质作为抗原，经过动物免疫后形成抗体，抗体与活化的载体上的配基结合形成具有亲和力的吸附系统，利用目标蛋白与载体上的抗体特异性结合而达到分离纯化蛋白的目的。

2.2 金属螯合配位层析

常用于分离对重金属有较强亲和力的蛋白。金属螯合通常使用亚胺二乙酸（IDA）螯合剂，它与 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 作用，形成带有多个配位基的螯合物，固定在载体上，作为配体吸附对重金属有特异结合能力的蛋白。例如利用基因工程构建带标签的蛋白 His（组氨酸）标签融合蛋白，该蛋白对 Ni^{2+} 等金属离子有高选择的特异性，因此， Ni^{2+} 等金属离子能够螯合 His 标签蛋白并吸附在固相载体上，而其他的蛋白质不能结合或者仅能微弱的结合，从而能够分离纯化目标蛋白。

2.3 酶与底物特异性层析

GST（谷胱甘肽 S 转移酶）标签融合蛋白纯化中，将谷胱甘肽 S 转移酶与重组蛋白或者多肽链融合，GST 标签融合蛋白通过谷胱甘肽 S 转移酶与固相载体上的还原型谷胱甘肽之间通过酶与底物之间的特异性结合，从而达到和其他蛋白分离的目的。

2.4 生物素和亲和素

生物素和亲和素之间具有很强的特异性的亲和力。亲和素作为配体固定在载体上，将生物大分子用生物素标记，通过亲和素特异性吸附标记的生物大分子而纯化分离目标物质。例如，生物素酰化的胰岛素与以亲和素为配体的琼脂糖结合，胰岛素被固定在琼脂糖柱子上而得到分离。

2.5 激素与受体蛋白

激素与受体蛋白具有高的亲和力，因此亲和层析是分离受体蛋白的重要方法。受体蛋白如乙酰胆碱、肾上腺素、生长激素等，都可以利用激素与受体蛋白的特异性结合而分离。

2.6 凝集素与糖蛋白

带有糖基化的蛋白可用于含有外源凝集素的亲和柱进行分离，用凝集素作为配体的亲和层析是分离糖蛋白的主要方法。

2.7 辅酶

利用辅酶对多种酶的亲和力可以对多种酶进行分离纯化。常用的辅酶有核苷酸及其衍生物，比如腺嘌呤核苷酸辅酶，AMP、ADP、ATP 等，以及各种维生素，可以用于分离各种激酶和脱氢酶。

2.8 氨基酸表面疏水性

固定化氨基酸作为配体，利用氨基酸间的疏水性质或者互补蛋白间的亲和力，可以分离纯化多种蛋白。

2.9 多核苷酸和核酸配体

Poly-A 配体能够结合各种 RNA、RNA 聚合酶以及其他的 poly-A 结合蛋白。poly-U 作为配体用于分离 mRNA、以及各种 poly-U 结合蛋白。DNA 作为配体，能够特异性结合各种 DNA 结合蛋白、DNA 聚合酶等多种酶类。

Enriching Beads®中琼脂糖磁珠专为蛋白亲和纯化而设计，相比传统层析亲和柱具有磁性分离快，操作简单且可以轻松实现高通量和大规模样品的平行处理的优势，磁性亲和技术有望是新一代的亲和工具。

Enriching Beads®对琼脂糖磁珠进行交联并活化，如已活化好的 NHS 配基（加入配体在 1 个小时即可完成偶联反应），然后完成对特异性蛋白的亲和吸附作用；还有环氧基、长臂环氧基、氨基、醛基、羧基；有接入 IDA 并螯合 Ni^{2+} 或者其他金属离子可完成 His-tag 蛋白的纯化；有偶联谷胱甘肽并可纯化 GST 融合蛋白；有共价偶联 Protein A、Protein G 可完成免疫共沉淀或者抗体纯化；有包被亲和素可纯化生物素标记的生物大分子的……