

# 实验六

## 血清 $\gamma$ -球蛋白的分离、纯化

# 一、实验目的

1. 了解盐析法分离、纯化蛋白质的原理。
2. 熟悉盐析法分离、纯化蛋白质的方法。

## 二、实验原理

### (一) 蛋白质盐析

蛋白质溶液属于胶体系统，蛋白质分子表面的亲水基团，如  $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$  以及  $-\text{CO}-\text{NH}-$  等，在水溶液中能与水分子起水化作用，使蛋白质分子表面形成一个水化膜，另一方面，蛋白质分子表面上的可解离基团，在适当的 pH 条件下，都带有相同的净电荷，与其周围的反离子构成稳定的双电层。因此蛋白质在水溶液中比较稳定而不易沉淀。

较高浓度的中性盐与水有亲和性，与蛋白质争夺水分，因而破坏蛋白质颗粒表面的水化膜。同时，由于这些盐是强电解质，离子浓度相对较高，可以大量中和蛋白质颗粒上的电荷，破坏蛋白质的双电层。这样，使蛋白质成了既不含水化膜又不带电荷的不稳定颗粒，从而容易沉淀。

血清中蛋白质一般可分为五类：清蛋白、 $\alpha 1$ -球蛋白、 $\alpha 2$ -球蛋白、 $\beta$ -球蛋白和  $\gamma$ -球蛋白。

血清中各种蛋白质所带电荷多少、颗粒大小及亲水程度都不一样，因此盐析时，所需要的盐浓度也各不相同。例如 50% 饱和度的硫酸铵能使血清中的球蛋白沉淀，而 33 %饱和的硫酸铵则使  $\gamma$ -球蛋白沉淀。可根据所要分离的蛋白质，选择不同饱和度的硫酸铵溶液进行盐析。

## (二) 浓缩

采用透析袋浓缩。将待浓缩的蛋白质溶液放入透析袋内，用绳子扎紧，然后置于烧杯中，并在透析袋周围可撒上聚乙二醇 6000(PEG6000) 或聚乙烯吡咯酮，蔗糖等，它们均具有很强的吸水能力，可将透析袋内的水分迅速吸出，达到浓缩的目的。

### 三、实验器材

How to  
use?

1. 离心机 1 台
2. 透析袋 1 个
3. 烧杯 100ml 1 个
4. 移液管
5. 胶头滴管

## 四、实验试剂

1. 小牛血清
2. PBS（磷酸盐缓冲生理盐水， pH7.2 ）
3. 饱和硫酸胺溶液（ pH7.2 ）



# 五、操作步骤

## 1. 盐析

离心管: 2ml 血清 + 2ml PBS

摇匀 ↓

饱和度  
?

缓慢加入: 4ml 饱和硫酸铵溶液 (边加边摇)

摇匀 ↓

静置 15min ; 离心 10min (3000 转 / 分钟)

How

倾弃上清液 ↓

饱和度  
?

沉淀 + 1ml PBS + 0.5ml 饱和硫酸铵 (缓慢滴加)

摇匀 ↓

静置 10min ; 离心 10min (3000 转 / 分钟)

倾弃上清液 ↓

沉淀, 即为  $\gamma$ -球蛋白

## 2. 浓缩

**蛋白质沉淀 + 1mlPBS**

沉淀完全溶解后



倒入透析袋，用绳子扎紧，置于加有蒸馏水的 **100ml** 烧杯中



**2h** 后，收集透析袋内液体



将液体放在试管中，置冰箱中保存待用

## 六、注意事项

1. 所用血清应新鲜，无沉淀及细菌滋生。
2. 盐析时，饱和硫酸铵应逐滴加入速度不能过快，一定要边滴加边搅拌，以减少局部高浓度硫酸铵所引起的共沉现象，搅拌速度不宜过快，以免产生过多泡沫，致使蛋白质变性。
3. 所添加的硫酸铵应为化学纯或更高纯度，否则夹带的杂质会使硫酸铵的浓度不准确，甚至引起蛋白质和酶的变性。添加硫酸铵后，要使其充分溶解，至少放置 30min 以上，待蛋白质沉淀完全，然后将沉淀分离。

## 七、思考题

1. 为何硫酸铵能沉淀蛋白质？
2. 第一次盐析时硫酸铵的饱和度是多少？
3. 第一次盐析时沉淀的是何种蛋白质，使沉淀溶解再次盐析的目的是什么？