Precipitation of proteins

- **目的:瞭解蛋白質的沉澱反應原理及方法與操作技術**
- 蛋白質在特定的因素作用下，他的水溶性下降，以致從溶液中析出沉澱。
- 蛋白質的沉澱可分為兩類:

（1）可逆的沉澱反應：蛋白質分子的結構尚未發生顯著變化，除去引起沉澱的因素後，蛋白質的沉澱仍能溶解於原來的溶劑中，並保持其天然性質而不變性。如大多數蛋白質的鹽析作用或低溫下用乙醇（或丙酮）短時間作用於蛋白質。

（2）不可逆的沉澱反應：蛋白質分子內部結構發生重大改變，蛋白質常變性而沉澱，不再溶於原來溶劑中。如加熱引起的蛋白質沉澱與凝固，蛋白質與重金屬離子或某些有機酸的反應

Precipitation of proteins

- **等電點沉澱:**蛋白質一般表面是帶一定的電荷的(+or-)，故形成一個水化膜，因為此結構的存在，故溶液中蛋白質很難互相接近。因此等電點沉澱方法，使蛋白質表面不帶電荷，蛋白質彼此之間就容易聚合而沉澱。
- **鹽析:**將硫酸銨、硫酸鈉或氯化鈉等加入蛋白質溶液，使蛋白質表面電荷被中和以及水化膜被破壞，導致蛋白質在水溶液中的穩定性因素去除而沉澱。各種蛋白質鹽析時所需的鹽濃度及 pH 均不同，可據此將不同的蛋白質予以分離。例如血清中的白蛋白和球蛋白（Globulin），前者可溶於pH 7.0 左右的半飽和硫酸銨溶液中，而後者在此溶液中則發生沉澱。當硫酸按溶液達到飽和時，白蛋白也隨之析出。
- **有機溶劑沉澱:**例如乙醇、丙酮，蛋白質在與有機溶劑的作用下，蛋白質表面的水合層被破壞，以利於蛋白質之間互相聚合沉澱
- **重金屬鹽沉澱:**此方法可能導致蛋白質的三維結構被破壞，故用此方法沉澱出來的蛋白質可被利用的有效性比較低。
- 為什麼要沉澱蛋白質? Ans:主要用來分離或純化蛋白質，通過選擇性沉澱方法，將蛋白質與其他無關分子分開進行研究

Reagents

1) Protein: egg albumin solution, casein
2) saturated ammonium sulfate (75 g/100 ml water)
3) solid ammonium sulfate
4) conc. H_2SO_4
5) 95% ethanol
6) acetone
7) 1.0M sodium hydroxide
8) 0.1M,and 1.0M acetate acid

Procedure

A. Precipitation by Salting Out

取4mL egg albumin solution至乾淨離心管

↓

加入4mL saturated ammonium sulfate

↓

Vortex mix ~15s，等待10mins

↓

離心

↓

沉澱物

↓

球蛋白(Globulin)

上清液

↓

加入solid ammonium sulfate直到溶液完全飽和

↓

Vortex mix ~15s，等待10mins

↓

白蛋白沉澱(Albumin)

Procedure

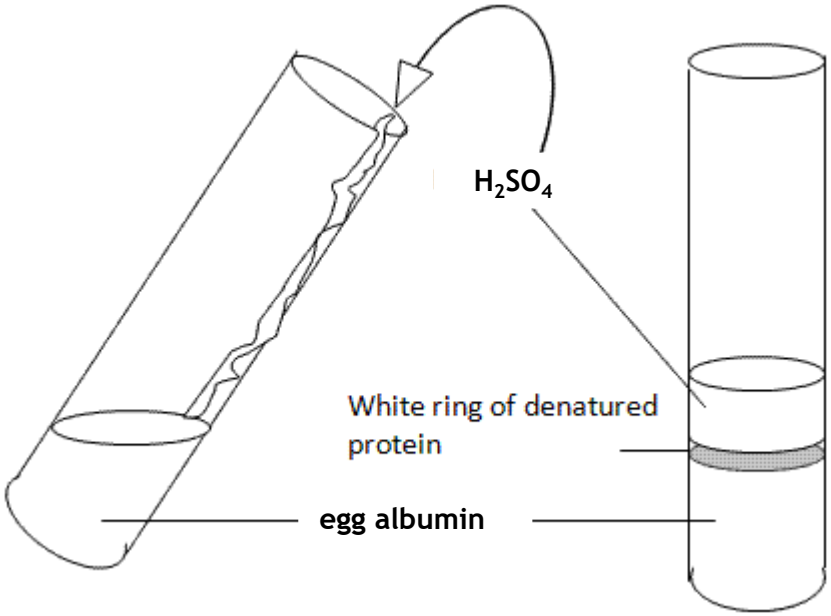
B. Precipitation by strong acid

取0.5mL egg albumin solution至乾淨試管中+2.5mL H_2O

↓ mix，

小心!緩慢加入0.5mL conc. H_2SO_4

↓



↓

拍照記錄

注意!
實驗後清
洗試管務
必小心!

Procedure

C. Precipitation by Organic solvents

分別取0.5mL egg albumin solution至2支乾淨試管中

↓

(C-1)加入1.5mL ethanol

(C-2)加入1.5ml acetone

↓

MIX

↓

觀察記錄

Procedure

D. pI precipitation

秤取0.05g pure casein置入10mL 定量瓶

↓

加入4mL H_2O(使用微量吸管)

↓

加入1mL 1M NaOH(使用微量吸管)

↓

混和均勻直到casein完全溶解

↓

加入1mL 1M醋酸溶液(使用微量吸管)

↓

加入H_2O定量到10mL

(0.5% casein in 0.1M 醋酸鈉溶液的buffer溶液)

Procedure

D. pI precipitation

取六支乾淨試管

↓

每支試管應含有4mL不同pH值的醋酸溶液(如下表)

↓

Vortex mix ~15s

↓

加入1mL 0.5% casein in 0.1M CH_3COONa (buffer)

↓

Vortex mix ~15s 混和均勻，待10分鐘後記錄結果

Tube No.	1	2	3	4	5	6
H_2O(mL)	3.9	3.5	3	2	0	2.5
0.1M CH_3COOH(mL)	0.1	0.5	1	2	4	0
1.0M CH_3COOH(mL)	0	0	0	0	0	1.5
0.5% casein in 0.1M CH_3COONa (buffer) (mL)	1	1	1	1	1	1
(+:white precipitate, ++:more white precipitate)						
Amount of ppt.						
CH_3COO^-(mmole)	0.1					
CH_3COOH(mmole)						
pH						

Results：

A. Salting Out

1. What protein is precipitated at half saturated salt concentration?

   What protein is precipitated at saturated salt concentration?

   Half saturated:_____ Saturated:_____

2. What is the salt used to precipitate the proteins?_____

B. Strong acid

1.Picture

C. Organic solvents

_____>_____

D. pI of protein

Tube No.	1	2	3	4	5	6
H_2O(mL)	3.9	3.5	3	2	0	2.5
0.1M CH_3COOH(mL)	0.1	0.5	1	2	4	0
1.0M CH_3COOH(mL)	0	0	0	0	0	1.5
0.5% casein in 0.1M CH_3COONa (buffer) (mL)	1	1	1	1	1	1
(+:white precipitate, ++:more white precipitate)						
Amount of ppt.	-					
CH_3COO^-(mmole)	0.1					
CH_3COOH (mmole)	0.01					
pH	5.74					

*Take no.1 for example: (pKa of HOAc =4.74 at 25℃)

[CH3COO-]=(0.1x1)/5 [CH3COOH]=(0.1x0.1)/5

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]} = 4.74 + \log \frac{(0.1\times1)}{(0.1\times0.1)}$$