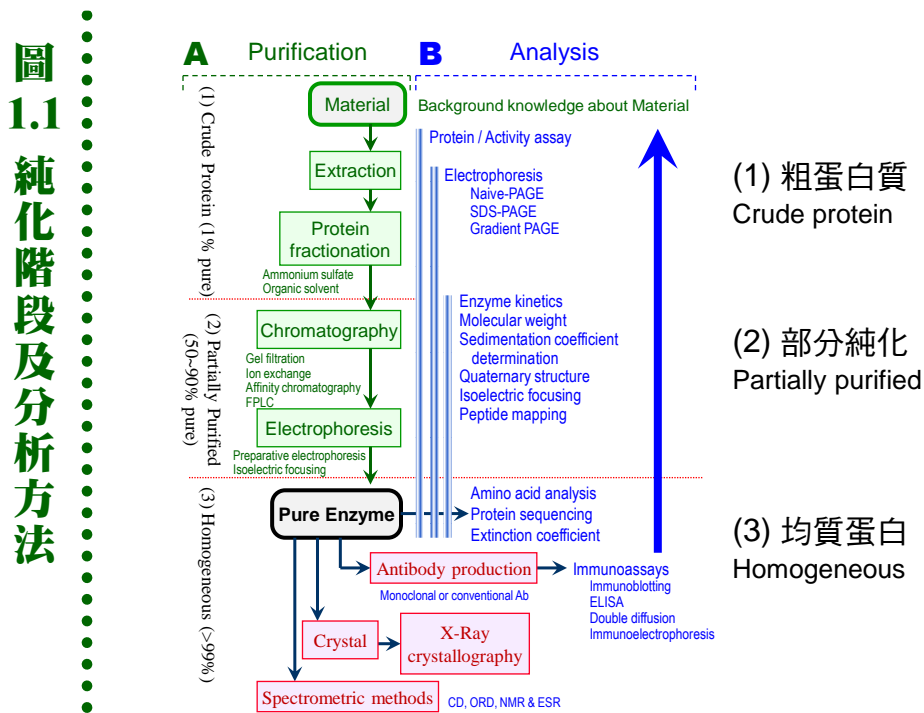


# 1 蛋白質抽取：

蛋白質的純化過程，可略分為三個階段：

- (1) 粗蛋白質 (crude protein)：由採樣開始→均質打破細胞→抽出全蛋白質，多使用鹽析沉澱法，可去除蛋白質以外的物質，並粗略地沈澱出目標蛋白質，都是利用蛋白質的基本物理化學性質，沒有什麼高科技但極為關鍵，令人深入體驗蛋白質的基本性質。
- (2) 部分純化 (partially purified)：最主要的純化階段，大多使用各種管柱層析法，乃是蛋白質純化的當家舞台，使用工具最多樣且有趣，通常都有大幅度的純化效果。
- (3) 均質蛋白 (homogeneous)：目標蛋白質更精製純化至均質，可用製備式電泳或 HPLC，通常到此階段的回收率都很低，除非有特殊需求，否則不需達到如此高純度。

每個階段使用不同純化策略，並伴隨各種分析方法去評估蛋白質的質量，以監測純化效果與回收率，最後所得到的純質蛋白質，可進行更精密的分析與應用。全貌匯整於圖 1.1。



## 1.1 如何開始？

先考慮以下諸點：

- |               |                    |                     |
|---------------|--------------------|---------------------|
| a. 要純化那一個蛋白質？ | <b>5W</b><br>What? | (全面收集好目標蛋白質的所有相關資訊) |
| b. 為何要純化此蛋白質？ | Why?               | (仔細想一想整個研究的預定目標與期望) |
| c. 由何種材料純化？   | Where?             | (要選對材料並釐清分布在細胞內的位置) |
| d. 在那一個生長期？   | When?              | (找錯生長期就很難取得足量目標蛋白質) |
| e. 如何純化目標蛋白質？ | How?               | (依據目標蛋白質的性質來設計純化流程) |

## 1.2 材料來源：

### a. 材料取得：

抽取蛋白質或酵素的材料來源，通常不外動物、植物及微生物，或用動植物的細胞或組織培養。採樣時，應考慮在那一個生長期、那一個器官或組織中，含有最高的含量。材料的採集影響實驗的成敗，遇到材料採集有困難，或者材料品質不穩定時，更是花費時間、精神。一定要控制穩定的材料來源！

### b. 材料的差異性很大：

植物細胞與動物細胞在構造上有許多差異，因此在材料的選擇上，應特別注意。植物的細胞壁相當堅硬，要用相當大的力量才能打破。其細胞內的區隔較動物細胞複雜，有很大的液泡，內藏低 pH 溶液以及蛋白酶等『有害』物質。另含有葉綠體及澱粉粒，亦是植物細胞的特徵。不同來源的材料，各有特定的採集或抽取問題，要自行嘗試解決。

### c. 材料貯藏：

材料採集後馬上進行抽取，是為上上策。但在很多情況下，材料必須冰凍貯存一段時期後，才進行抽取，則應在採集後，儘速置於  $-20^{\circ}\text{C}$ ，通常先以液態氮冰凍後貯於  $-70^{\circ}\text{C}$  冷凍櫃。冷凍冰箱的除霜循環，可能對細胞造成傷害，要特別小心。解凍越快越好，但避免局部過熱。有些蛋白質或酵素材料可乾燥起來保存，在無水狀況下，可免受蛋白酶或水分子晶體的破壞，一般可用冷凍乾燥法，或製成丙酮粉末。

## 1.3 均質及抽取：

### a. 打破細胞：

目標蛋白質若在細胞之內，則抽取的第一步，就是先打破細胞，有難有易。例如動物的紅血球，只要改變滲透壓即可脹破，但植物的癒創組織就很堅固，要用海砂用力研磨。有些實驗要收集細胞內的胞器 (organelle)，則需以溫和的方法打開細胞後，再用密度離心法分離各胞器；此步驟難度較高，要參考文獻多試幾種方法。

### b. 打破細胞的方法：

就一般材料而言，可能用到的方法列舉如下：

(1) 乾式：不用加緩衝研磨液，直接研磨成乾粉。

液態氮研磨：材料在液態氮中凍結，以研钵打碎材料後研磨成粉。

磨粉機：類似果汁機，原本用在乾磨中藥藥材成為藥粉。

球磨機 (ball mill)：以小球增加碰撞及研磨面積，多用在研磨酵母菌。

(2) 溼式：都要在低溫下研磨。

均質器：玻璃或鐵氟龍材質，是較溫和的研磨方法。

果汁機 (Waring blender)：每打一分鐘，要間歇數分鐘降溫，重複進行數次。

Polytron：高速電動研磨機，效率極高，目前最常用的均質器。

研钵：磨成細粉後的材料，再加入海砂或玻璃砂助磨；傳統而實用。

玻璃球 (glass bead)：以很細的玻璃球混在樣本中，用力振盪，可打破酵母菌。

超音波震盪 (ultrasonication)：以超音波打破細胞，多用在微生物材料。

French press：將樣本加壓快速通過細孔，以剪力破壞細胞。

c. 提高抽出率：

分泌性的蛋白質，多散佈在材料中，只要研磨均勻，大多可抽取得到。但在均質前，通常都要把材料先切成碎片 (增大表面積)，才容易進行抽取。很多情況下，要先以磨粉機或果汁機打碎，否則抽出率不會很高。材料亦可以液態氮急速冷卻，則組織變得很脆，可以磨得很細，提高抽出率，且可防止酵素活性喪失。注意有些材料不能研磨過度，以免細胞破得太碎。

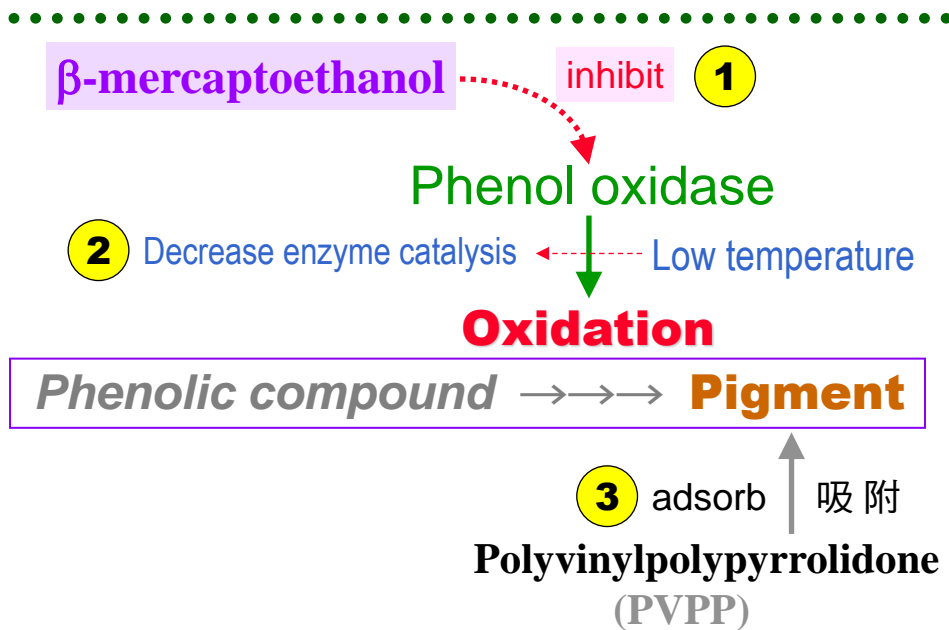
d. 抽取緩衝液：

均質用的緩衝液體積，通常加入樣本體積的兩倍量以上，以四或五倍為宜，但事先磨成粉末的，有時要加到十倍以上才能均勻懸濁之，當然抽出率會增加，但是伴隨著出來的各種雜質或干擾物質也倍增。可把緩衝液分成二或三次分批抽取，以增加抽出率。

e. 注意干擾物質：

植物材料的均質過程要特別小心，因植物細胞在打破後，會劇烈降低其 pH 值。很多植物材料有含酚化合物 phenolic compounds，在空氣中很快氧化成褐色色素，因吸附性強故難以去除。含量較少者可在緩衝液加入  $\beta$ -mercaptoethanol，降低催化其生成的酵素 phenol oxidase；量多時則以 PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) 吸附之 (圖 1.2)。植物本身所含的色素也很難去除，可能會干擾純化步驟。

**圖 1.2 植物色素之產生與去除 Remove pigments**



f. 膜上蛋白質：

有些蛋白質附著在細胞壁或細胞膜上，不能以普通水溶性緩衝液溶出，可先把材料製成丙酮粉末 (acetone powder)，再加入緩衝液時，稍具水溶性的蛋白質就會溶出；但有時須在緩衝液中，加入 界面活性劑 (detergent)，溶出嵌在細胞膜中的蛋白質。常用有 sodium

deoxycholate 或 Triton，因後者屬非離子性分子，較不影響酵素活性及純化，多使用之。

**g. 去除混濁物：**

均質後經離心分開可溶與不溶部分，離心無法分開的，再用過濾法，過濾可加助濾劑，如 矽藻土 (celite)。離心後，在上清表面可能會有一層浮皮，多為脂質，可撈掉或以紗布過濾掉。

**1.4 鹽析及沉澱法：**

鹽析沉澱法可分離出樣本中的蛋白質，因為蛋白質在水溶液中的溶解度，會因為溶液中所含鹽類濃度的改變而變化，可利用來沉澱蛋白質。其作用機制是因為蛋白質分子表面電荷的改變，或因分子表面 極性 或 非極性 區域與水分子間作用的結果。

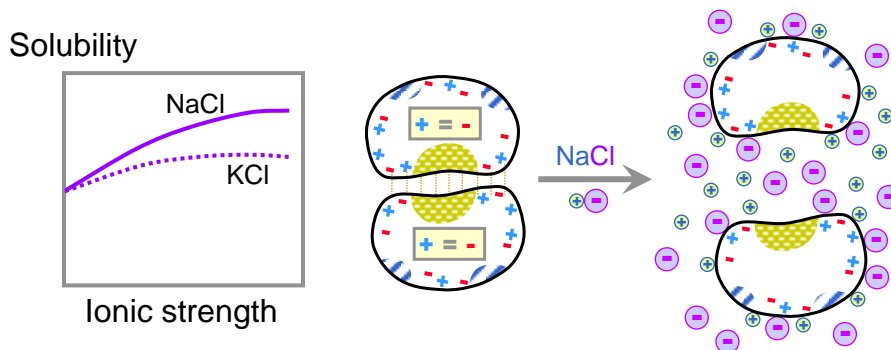
**1.4.1 鹽析分劃法：**

各種蛋白質沈澱方法的原理及應用，在下面各小節以圖解 (圖 1.3, 1.4, 1.5) 說明，並以文字說明整理在本節 (1.4) 最後面的表 1.1。

**1.4.1.1 鹽溶 (salting-in)：**

- a. 等電點 (pI) 為蛋白質電荷性質的指標，若緩衝液的 pH 調至此蛋白質的 pI，則蛋白質分子的淨電荷為零，分子間的排斥力下降，會凝聚成大粒子沉澱下來。此時若增加緩衝液的離子濃度 (如加入 NaCl)，則蛋白質的溶解度會漸漸上升，稱為鹽溶。
- b. 可能是所加入的鹽類離子包圍了蛋白質表面，與分子上的帶電基團或極性區域作用，進而增加水合效果所造成的。
- c. 利用這種蛋白質在其 pI 沉澱的特性，把蛋白質溶液調到特定 pI，就可沈澱目標酵素 (當然其他相同 pI 的蛋白質也會一起沈澱下來)。需注意有些酵素在 pI 沉澱後，就不容易溶解回來，因此使用緩衝液也盡量避開目標蛋白質的 pI，以免溶解度變差而沈澱。

**圖 1.3 鹽溶 Salting-in effect**

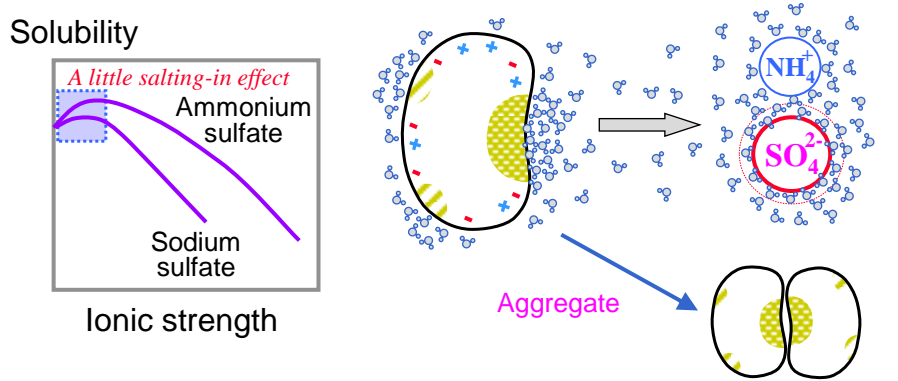


分子在其等電點時，容易互相吸引，聚合成沈澱；加入鹽離子會破壞這些吸引力，使分子散開，溶入水中。


1.4.1.2 鹽析 (salting-out) :

- a. 蛋白質分子表面上 非極性區 附近的水分子，被迫滯留在此區域附近，好像附上一層親水性薄膜，藉此把蛋白質分子溶入水中。
- b. 若外加入大量離子 (如硫酸銨)，則這些滯留的水分子會被抽出，與新加入的大量離子產生水合，因而暴露出蛋白質上的非極性區，這些蛋白質分子之間，因此必須以非極性基團互相結合，聚集成較大的沉澱粒子，稱為 鹽析。

**圖 1.4 鹽析 Salting-out effect**



蛋白質分子表面的疏水性區域，都聚集許多水分子，當鹽類加入時，這些水分子被抽出，以便與鹽離子進行水合，暴露出來的疏水性區域互相結合，形成沈澱。

 = hydrophobic

1.4.1.3 硫酸銨 (ammonium sulfate) :

- a. 硫酸銨是一中性鹽，對蛋白質有相當好的安定作用。又因為其離子容積較大，吸走水分子的能力也很強，成為有效的鹽析工具。
- b. 硫酸銨的添加是以 百分飽和度 來表示 (不是濃度百分比 w/v)，例如大部分蛋白質可在 80% 硫酸銨飽和度下沉澱。因為硫酸銨加入的體積很大，會改變最後的總體積，很難由濃度百分比來計算，因此使用百分飽和度 (% saturation) 作為沈澱蛋白質的度量。
- c. 飽和度隨溫度變化稍有差異，25°C 下的飽和濃度為 4.1 M，即每公升加入 767 克固體硫酸銨；0~100% 之間各飽和度的添加量要查表，而不是以 767 克直接乘以百分比 (%)。
- d. 各種蛋白質，因其表面的非極性區域分佈不同，可以在其特定的硫酸銨飽和濃度下沉澱，一般做為最初步的純化方法，同時也可除去其他可溶物質，如核酸、醣類等。

1.4.1.4 如何使用硫酸銨 :

- a. 硫酸銨很容易吸收空氣中的水分而結塊，因此使用前要先把硫酸銨磨碎，平鋪在烤箱內 (約 60°C) 烘過，但小心切勿過熱。
- b. 添加硫酸銨時，要在冰浴中進行，不可一次把硫酸銨全部倒入，而是以小量分多次慢慢溶入，並不時攪拌，以免造成硫酸銨局部濃度過高。待硫酸銨全部加完後，再攪拌約 10~30 min，使溶解完全平衡，然後進行離心，注意所要的目標是沉澱或上清，要弄清楚！
- c. 最後所得的沉澱溶解在最少量的緩衝液中，或直接以沉澱形式保存，均相當安定。但要小心其中所含的硫酸銨，對下一步檢定或純化是否有影響，有必要可以透析法除去之。

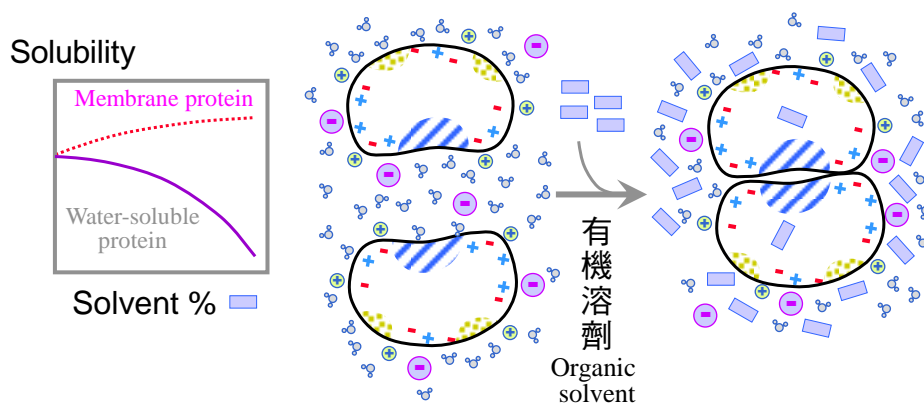


### 1.4.2 有機溶劑沉澱法：


#### 1.4.2.1 降低水活性：

若在蛋白質水溶液中加入有機溶液，如丙酮或乙醇，因為稀釋了水濃度而降低水活性，則蛋白質上親水性區域的水合度降低，開始聚集在一起，產生沉澱。也可看作有機溶劑降低溶液的介電常數，使蛋白質的溶解度降低。應當注意，有些細胞膜上的蛋白質，若本身含有很多疏水性區，則反而更容易溶入有機溶劑中。

**圖 1.5 有機溶劑沈澱 Organic solvent precipitation**



降低水活性，使溶液的介電常數下降，增加蛋白質溶質分子之間的作用力，因而聚集在一起。

 = hydrophilic

#### 1.4.2.2 使用有機溶劑：

要先把有機溶劑的溫度降至零度左右，緩緩加到蛋白質溶液中，並一邊攪拌使生沉澱。以丙酮為例，大多以 20~50% (v/v) 濃度來沉澱蛋白質，注意其中的 v/v 乃指加入前的體積比，因丙酮與水混合後，體積會稍微縮小。溶液中若有高濃度鹽類，則會影響沉澱行為，以 0.05~0.2 M 離子強度為限。

#### 1.4.2.3 沉澱收集：

此法所得到的沉澱粒子較大也較重，以重力沉降即可收得沉澱，但一般仍以離心收集，可增加回收並去除丙酮。蛋白質沉澱可涼乾，或放到布氏漏斗中，以少量乙醚洗過吹乾製成粉末，如此所得蛋白質所含有機溶液不多，通常不影響下一步驟。

### 1.4.3 其它處理法：

#### 1.4.3.1 Polyethylene glycol (PEG):

- a. PEG 是一種水溶性的高分子聚合物，分子量 4,000 以上的 PEG 可以用來沉澱蛋白質，其作用原理類似有機溶液，但使用濃度較低。
- b. 較麻煩的是 PEG 不易由蛋白質沉澱中除去 (分子量不小且無揮發性)，幸而 PEG 通常不會影響下一步純化步驟。

1.4.3.2 去除核酸及多醣：

- a. 樣本溶液中若有大量核酸，可以加 protamine sulfate 與之產生沉澱，再以離心去除之。這是利用 protamine 上的正電荷，與核酸的負電結合，聚合成較大複合物而沈澱。
- b. 碳水化合物較難完全分離，通常期望在蛋白質沉澱時，或往後的層析法能去除之。核酸與多醣都可以用專一性水解酶進行酵素分解，但價錢較昂貴。

1.4.3.3 特殊處理法：

有些較特別的酵素，具有相當特殊的性質，可利用來純化。例如 RNase 對熱非常安定，可耐到 100°C，因此可把粗酵素液加熱煮沸，除去其它蛋白質。對強酸、強鹼或有機溶劑的特殊安定性，亦可利用之。使用這些嚴苛的處理方法時，要特別小心考慮環境傷害。

**表 1.1 各種沉澱法比較 Comparison of methods**

	Salting-in 鹽溶	Salting-out 鹽析	有機溶劑沉澱
影響因素	蛋白質分子表面 帶電基團	蛋白質分子表面 非極性基團	除了 hydrophobic 以外的其他作用力
試劑	NaCl (單價離子)	硫酸銨 (兩價離子)	甲醇、丙酮等有機溶劑
發生機制	蛋白質在其 pI 下，因淨電荷為零而聚集沉澱；若加入鹽類，會阻礙其聚集而增加溶解度	硫酸銨的兩價離子，在溶液中搶走附在蛋白質表面 (非極性部分) 的水分子，使得非極性部分相互吸引而聚集沉澱	降低水活性，使溶液的介電常數下降，增加蛋白質溶質分子之間的作用力，而聚集在一起
圖	圖 1.3	圖 1.4	圖 1.5
其它說明	對較低濃度緩衝液進行透析是 salting-in 的反向過程	1) 非極性蛋白質較早沉澱下來 2) 在硫酸銨中蛋白質相當穩定	1)部分蛋白質會變性 2)有助沉澱的因素：蛋白質分子量大、緩衝液 pH 靠近 pI 3)脂溶性蛋白質的溶解度反而增加

**問題集** (每個問題不一定都有標準答案，甚至會引起很大的爭議，但這就是問題集之主要目的)

1. 純化某甘藷塊根中的蛋白質，由粗蛋白經純化 100 倍後可達到均質，活性回收率約有 50%，如何略估此蛋白質在原來的甘藷材料中，佔有多少百分比？ [1]
2. 若蛋白質分子表面幾乎沒有疏水性胺基酸，則它容不容易被 salting-out 出來？ [2]
3. 為何蛋白質變性後容易在水溶液中沉澱下來？ [2]
4. 為何硫酸銨沉澱是以百分飽和度來計量，而非以重量或體積百分比？ [3]
5. Salting-out 的相反程序是否為 salting-in？ [3]
6. 蛋白質樣本溶液使用較低離子濃度的緩衝液透析，可否視為 salting-in 的相反程序？ [3]
7. 在純化過程中，經過硫酸銨分劃後，發現比活性僅增加為 1.05 倍，則此一純化步驟有無存在必要？請解釋為何。 [2]
8. 使用有機溶劑沉澱蛋白質，比之鹽析分劃有何優缺點？ [2]
9. 能否用純水去溶解蛋白質？說明為何？ [2]
10. 用有機溶劑沉澱蛋白質時，為何要在低溫下進行？ [1]
11. 植物細胞比動物細胞要更難以處理，請問植物細胞是有那些特殊問題？ [1]
12. 植物細胞在打破之後，其抽出液很容易變成褐色，其原因何在？如何防止？ [1]
13. 用 PEG 4000 可以把蛋白質沉澱下來，但接著你如何除去這些 PEG？ [2]
14. 為何硫酸銨是一種中性鹽類，而非酸性物質？ [2]
15. 為何蛋白質在硫酸銨的沉澱中保存會比較穩定？ [3]
16. 加硫酸銨進行鹽析時，若把預定加入的硫酸銨固體一次全部倒進蛋白質溶液中，而非慢慢加入，將會發生什麼問題？ [3]
17. 硫酸銨分劃時，各分劃的酵素分佈通常是以其總活性來評量，而非使用比活性，請說明為何。 [4]
18. 用有機溶劑沉澱蛋白質時，為何會產生熱量？ [3]
19. NaCl 或 KCl 會使蛋白質在水溶液中的溶解度上升，而硫酸銨或硫酸鈉反而會使蛋白質溶解度下降，為何兩種鹽類會造成這樣的差異？ [4]
20. 通常在純化核酸時，較麻煩的干擾物質不是蛋白質，而是多醣類，很不容易完全去除之，請以化學構造的觀點說明之。 [5]
21. 蛋白酶可略分成四大類，請分別說明其作用機制如何。並請列出每一類的抑制劑。 [2]



22. 有一位研究生經常要做免疫球蛋白的簡單分離與純化，他一直在實驗桌上放了一瓶硫酸銨溶液，雖然說是水溶液，但硫酸銨固體卻因過飽合而結晶在瓶底，且結晶數量不少。每次要做硫酸銨分劃時，只要加入與樣本同體積的這種硫酸銨溶液（上清部份），就可以把抗体沉澱下來。請問他這種做法適當嗎？有何應該注意之處？ [4\*]
23. 其實平日的濾泡式咖啡，就是一種生化實驗的抽取過程。先把咖啡豆用研磨機磨成細粉，磨得太粗或太細，都會影響咖啡的風味，另外要注意的條件有：(1) 熱水的溫度、(2) 熱水的最適量、(3) 冷泡咖啡的特點、(4) 過濾的時間、(5) 濾紙摺法與濾器形狀、(6) 過濾時是否攪拌、(7) 過濾的方式（一次濾完或分次？），都有其講究與所根據的生化學原理。請以泡咖啡觀察心得，整理出在進行抽取實驗時，應該注意的事項。 [5\*]

[題目後面方括號內的數字代表該題的難易程度，3 為中等而 5 最難回答，標有 \* 為實際問題]

