

4 純化策略：

正確的純化策略極為重要，往往可以使純化達到事半功倍之效，因此事前要有極為充分的準備與規劃過程。但有時對目標酵素所知甚少，就要一步一步嘗試，像是摸著石頭過河，小心追蹤每一個步驟回收多少酵素活性？

4.1 純化步驟設計：

4.1.1 影響純化因素：

設計純化步驟時，要考慮 Recovery (高回收率), Resolution (高比活性、高純度), Speed (方便與快速), Capacity (經濟) 四個因素。

a. 高回收率：

一般指總活性的回收，最終回收率若低於 30% 就得檢討過程是否有問題。

b. 高比活性：

酵素的比活性要能夠顯著提高，最終純化成品與原始粗抽液二者間，其比活性之比值稱為純化倍率 (purification fold)。各種酵素因材料來源及含量多寡不一，純化倍率也有高低，不過就同一樣本而言，當然越高越好。

c. 高純度：

純度與活性是酵素純化的兩大目的，以達到均質酵素為最終目標；相對而言，在電泳上看不到其它雜質，即可視為均質，但也只能說是 electrophoretically pure。絕對均質的酵素幾乎是不可能，我們只能達到相對純度。

d. 方便與快速：

方法要儘量簡便，步驟勿拖太久，因為酵素活性會隨著操作時間而急速降低，尤其對較不穩定的酵素，時間是最重要因素，有時不得不犧牲其它要求。

e. 經濟：

許多試劑相當昂貴 (尤其是活性分析用藥)，大量使用時要考慮到經濟問題，因此每次操作所能處理的樣本量也是關鍵。

4.1.2 組合純化步驟：

a. 組合標準：

- (1) 已知的酵素，可先依照已發表論文的步驟進行，有問題再作改進。通常都是以 硫酸銨分劃-膠體過濾-離子交換 為骨幹，再加上其它方法，組成全部流程。
- (2) 對完全未知的酵素，亦可循此骨幹先試行純化，視其結果如何再加改進。
- (3) 不要忘記利用該酵素的特殊性質來純化，例如在其 pI 沉澱、特別的疏水性、有專一的抑制劑，或異常的熱穩定性等。

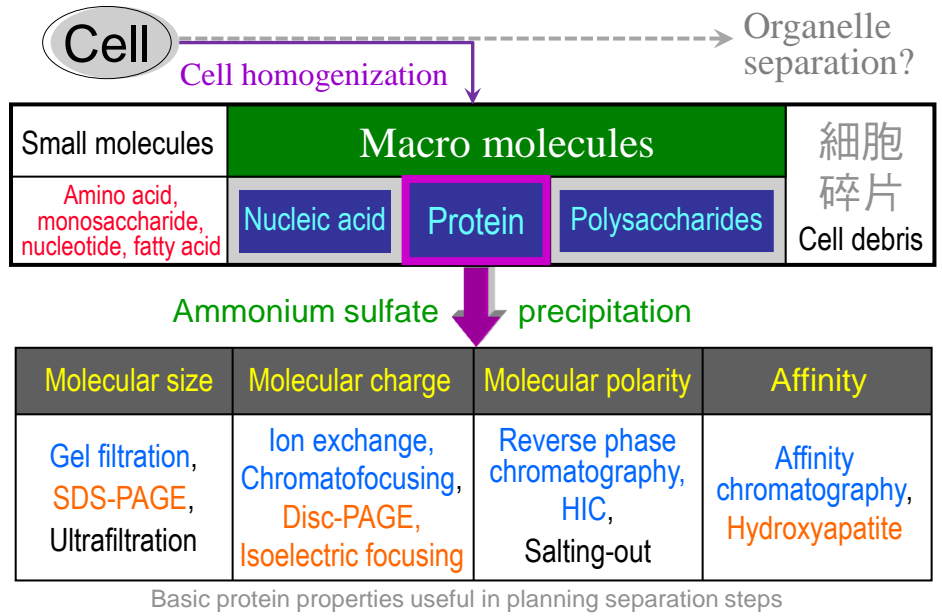
b. 純化方法分類：

- (1) 每種純化方法都是利用蛋白質分子的某種特性來分離的，圖 4.1 把所有的純化方

法，依其運用特性分類歸納，以作為設計流程時的參考。

- (2) 通常同一種純化方法不會重複使用，最好是交叉利用各種蛋白質的不同性質，來設計一連串的純化步驟。

圖 4.1 純化或分析方法原理



4.2 純化結果：

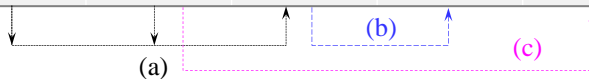
a. 純化表：

最終純化結果以 純化表 (purification table) 摘要整個過程及成效，例如表 4.1 所示。總活性除以總蛋白質質量就是 比活性 (specific activity)，請參考表 4.1 下方 (a) 的算法指引。比

表 4.1 Sucrose synthase 純化表 Purification table

From 100 g rice grain at its milky stage (乳熟期)

Purification Steps ↓	Total protein (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Purification fold (fold)	Recovery (%)
Crude extraction	1,070	9,672	9.0	1.0	100
Protamine sulfate precipitation	800	12,555	15.7	1.7	130
Ammonium sulfate (35-55% sat)	250	6,610	26.4	2.9	68
Sepharose CL-6B gel filtration	53	5,789	111.3	12.4	60
DEAE Sepharose ion exchange	8.6	2,960	344.2	38.2	31



活性逐漸增加的比數即為 純化倍數 (purification fold) (b)，而以粗抽取液所含活性為 100%，每個步驟所收到的總活性百分比，稱為 回收率 (recovery) (c)。

b. 檢討純化表：

若回收率超過 100% 時，表示粗抽取液中可能含有酵素之 抑制因子，或含有干擾活性分析的物質，經去除後酵素活性大增。若回收顯著偏低，表示此一純化步驟並不理想，應探討緩衝液、溶離液成分有無問題，或者是純化流程設計是否不良。有時候目標酵素根本沒有從材料中被有效抽取出來，一開始的收率就很低，就要檢討萃取過程。

c. 純度的要求：

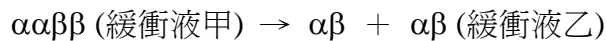
如上表所純化得到的酵素，以電泳檢定已達相當純度，應可供大多數生化學實驗需要，若有必要，可再經製備式電泳或其它方法純化。請注意並非所有的實驗都必要使用均質酵素，有很多實驗(如酵素動力學、分子量測定)都不需要完全均質的蛋白質。

應用問題 (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. 以下是某研究生甲純化酵素 A 的過程概述：

甲的最終目標，是要從植物的癒創組織中純化酵素 A。當收集得足夠量的癒創組織後，加入適量緩衝液 (1 mM Tris-HCl, pH 7.0)，以研钵進行研磨，因為怕酵素失去活性，儘快離心收集得 100 mL 上清，進行下一步驟。很快加入 50 g 硫酸銨，使達到 50% 飽和度，得上清約 40 mL；再加入 25 g 硫酸銨，使成為 75% 飽和度，離心取沉澱，這是依照前人研究報告取 50-75% 飽和度的硫酸銨沈澱。溶解在 5 mL 緩衝液後，通入 DEAE-Sephrose 管柱中，據文獻說酵素 A 可被陰離子交換介質結合。膠體已平衡在緩衝液，裝填在 1.6×60 cm 的玻璃管柱。樣本通入後，以緩衝液洗過數個管柱體積，開始拉 0~0.5 M NaCl 濃度梯度，並同時收集流出液。很奇怪，發現蛋白質幾乎都不見了，溶離圖譜也沒有明顯的蛋白質尖峰。只得重新抽取，再用硫酸銨沉澱後，改以膠體過濾法分離之，這次用 2.6×50 cm 管柱，使用 Sephadex G-50 膠體。結果出現一個大的蛋白質峰，也有酵素 A 活性，甚是高興。趕緊做 disc-PAGE 及 SDS-PAGE，結果發現膠體過濾法前後的蛋白質電泳圖譜，都差不多。算一算總活性回收量，也不到文獻報告的十分之一。請指出甲生可能造成的所有錯誤，並幫他設計一個可行的純化流程。 [4*]

2. 某蛋白質 B 在不同的緩衝液下，會有不同的四級構造 (如下式)，且這種轉變是可逆的。



(1) 請解釋此一現象發生的可能原因。

(2) 請利用這個特性，設計一個層析法來純化蛋白質 B。 [3]

3. 動物的血清白蛋白 (albumin) 經過蛋白質水解處理後，成為胺基酸混合液，可供醫療上針劑使用。但若水解不完全，可能有分子量較大的胜肽片段，打入人體後會產生抗体，相當危險。且白蛋白中經常有多醣類雜夾其中，無法被蛋白質水解酶水解，分子量很大，可能是更危險的抗原。請問有那些方法，可以有效的除去這些有害的物質，同時可大量處理，以便大量製得，供醫療上使用？ [3*]

4. 蛋白質 C 及 D 的分子量分別為 49,000 及 47,000，但是 C 分子中含有 70% α helix，在 pH 8.8 下其 helix 構造會變性而成為 random coil，但仍保持其水溶性，當 pH 調回中性時回復原態；蛋白質 D 在兩種 pH 下均為原態。請設計一個方法，可分離此二蛋白質。 [4]

5. 經過部分純化的酵素 E，在緩衝液中為清澈溶液，在水中透析三日後發現：

- a. 透析袋內有沉澱發生，離心後分別收集上清及沉澱，上清活性剩約五分之一，沉澱及外液則均無酵素活性。
- b. 上述透析袋內的上清及沉澱，測蛋白質量，總共只有原來透析前的一半。
- c. SDS-PAGE 顯示透析外液不含蛋白質，但有 Ninhydrin 反應及 280 nm 吸光。

請問：

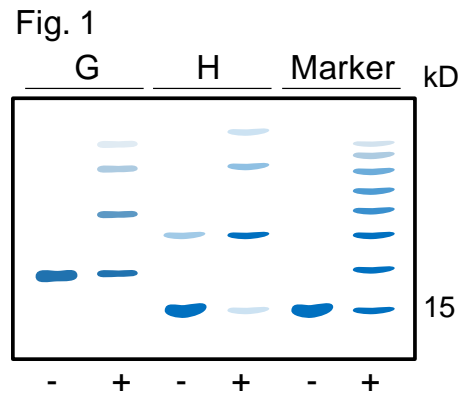
- (1) 為何會產生沉澱？
- (2) 總酵素活性為何下降許多？列出所有可能情形。
- (3) 袋內蛋白質量只剩一半，請作一假設並推測原因。
- (4) 請設計一個實驗，證明你的假設。 [4]

6. Lectin 是植物的一類特殊功能蛋白質，可與各種醣類分子產生專一性的結合。有一 lectin F，它與葡萄糖有相當專一性的結合，請問你如何以最方便的層析方法來純化之？ [3]

7. 蛋白質間可以用架橋分子連在一起，成為二元體、三元體或多元體。現有 G, H 兩蛋白質，架橋反應後以 SDS-PAGE 檢定之，得如 Fig. 1 結果。

+：蛋白質經過架橋處理 -：未經架橋處理之蛋白質
 Marker：已知之蛋白質 (分子量 15,000) 經架橋處理後，所得之各種聚合物

另以膠體過濾法測 G 及 H 的分子量，二者均為 90 kD。請由這些結果，推論 G 及 H 兩蛋白質的四級構造。 [4]



8. 酵素 I 的純化流程如下：

材料 (甘藷) 切碎

↓ 加緩衝液均質化

粗抽取步驟 (依一般方法進行)

↓ 離心

上清

↓ 0.3~0.5 飽和度硫酸銨分劃

Crude I (酵素粗抽液 Xt)

↓ 膠體過濾 (Sephrose CL-6B)

溶離得 P1, P2, P3 三尖峰 (Fig. 2)

↓ → 電泳 (Fig. 3) disc-PAGE

Peak P1 (只有 P1 有酵素活性)

↓ 離子交換 (DEAE-Sephrose)

↓ 以緩衝液洗過一個管柱體積

↓ 0~0.3 M NaCl 梯度溶離

↓ Fig 4 得 P4, P5 兩個尖峰 → Fig. 5 各分劃做 disc-PAGE

Peak P4 (只有 P4 有酵素活性)

請問：

- (1) Fig. 2 上 P3 的各分劃 (#55~65)，在電泳 Fig. 3 上幾乎都不見了，請解釋為何。
- (2) P1 本有一些雜質 (Fig. 5 中打*處)，但經過離子交換之後，在 0~0.3 M 梯度收得的各

Fig. 2 Gel filtration

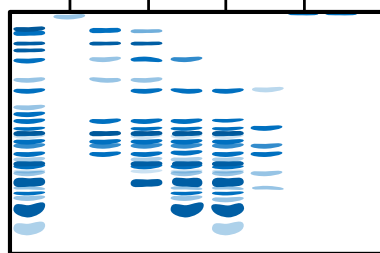
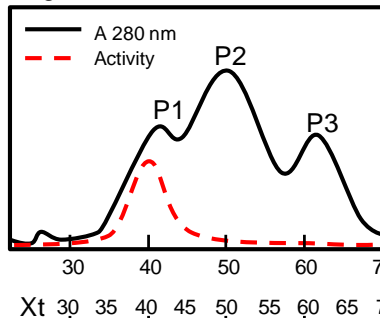


Fig. 3 Disc-PAGE (GF)

Fig. 4 Ion exchange

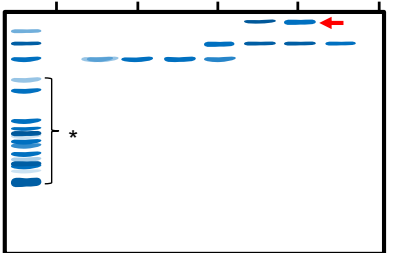
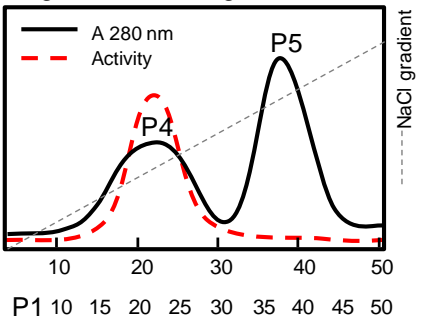


Fig. 5 Disc-PAGE (IEX)

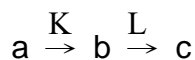
分劃，以電泳檢視時 (Fig. 5)，找不到這些色帶，它們可能在那裡？

- (3) Fig. 5 中 #35, 40 多出現一個高分子量色帶 (箭頭處)，可能是如何產生的？
- (4) 你對這樣的純化結果滿意嗎？請再改進以上的純化步驟。 [5*]

9. 某蛋白質樣本通入 DEAE-離子交換介質，以純化其中的酵素 J，樣本中原含有 50 mg 蛋白質及 100 活性單位酵素 J。以 0~0.3 M NaCl 梯度溶離得數個 280 nm 尖峰，依次標以 P1, P2, P3, P4 及 P5，分別收集之，分析均無任何酵素 J 活性。另外測得以下結果：
- a. 各蛋白質峰的蛋白質總量為 46 mg。
 - b. 當混合 P2 及 P5 後，可測得約 280 單位酵素 J 活性，其它的混合均無活性。
 - c. 當混合 P2, P4 及 P5 後，只測得 98 單位的酵素 J 活性。
 - d. 測 P5 的蛋白質含量只有 0.5 mg。

請問：P2, P4 及 P5 分別含有何種物質？ [4]

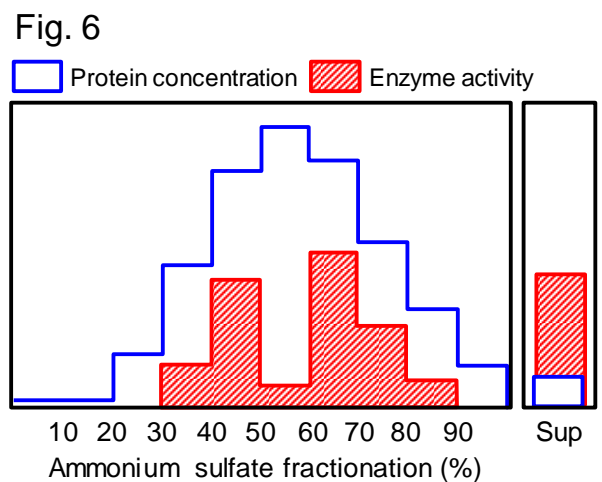
10. 某酵素 K 的活性分析方法如下，L 為其耦合反應酵素，使用 NAD⁺ 為輔酶。



在進行硫酸銨分劃後，得到 Fig. 6 的結果。

請問：

- (1) 活性分析結果有兩個 K 的活性尖峰，可能的原因為何？ (至少列出兩種假設)
- (2) 請設計實驗，分別可以證實上題假設。
- (3) 若把硫酸銨 30~80% 飽和度間的部分收集起來，再進行膠體過濾，結果 K 的活性回收率多達 250%，則那一個假設為真？
- (4) 上清蛋白質量不多，但出現相當高活性，是何原因？請設計實驗證明你的假設。 [5*]



11. M 為一相當不穩定的酵素，尤其在低 pH 下容易變性，乙、丙、丁三人以親和層析法純化之，他們的實驗設計如下：

將 M 的基質衍生物 N 耦合到某種親和擔體，洗去反應液後，把擔體裝入管柱，然後通入部分純化的 M，再用游離的 N 溶離下 M。三人的實驗條件略有不同：

所用親和擔體： 耦合緩衝液： 溶離條件：

[乙] CNBr-Sepharose Tris pH 8.0 游離型 N

[丙] Agarose-C₆-COOH 磷酸 pH 7.5 游離型 N → pH 2.05 甲酸

[丁] CNBr-Sepharose 磷酸 pH 7.5 游離型 N → pH 2.05 甲酸 → NaOH pH 12

所得結果也有相當的差異：

[乙] 發現 N 根本沒有耦合到擔體上，酵素 M 無法結合上去。

[丙] 酵素 M 很難被溶離下來，要使用 pH 2.05 的劇烈條件，才能洗下蛋白質。

[丁] 酵素 M 是被結合到擔體上了，但無論用任何 pH 均無法溶離下來。

請問：

- (1) N 分子上一定要有何種官能基團，以便三人能夠順利完成耦合反應？
- (2) 乙在實驗中所犯的毛病為何？如何改善？
- (3) 丙可能是用什麼試劑把 N 連結到 agarose 上？
- (4) 丙的實驗中何處不妥？如何改善？
- (5) 丙所溶離下來的酵素 M，容不容易得到均質？其活性如何？
- (6) 丁為何無法把 M 溶離下來？M 與丁的膠體之間可能發生什麼情況？
- (7) 三人都忽略了一個重要步驟，此步驟是什麼？應當如何進行？ [5]

12. 有 P, Q, R, S, T 五種大小分子的混合物，其性質如下表，請設計一系統方法純化之。

	分子量	Ninhydrin test	AHP test	pI
P	300	+	-	6.3
Q	350	-	+	non-polar
R	40,000	+	-	4.3
S	50,000	+	-	7.8
T	440,000	+	-	5.2

AHP = Aniline hydrogen phthalate [4]

13. 酵素 U 需要鎂離子共同維持活性，在純化過程中，膠體過濾法或離子交換法均使得 U 失去活性，請分別解釋原因；並說明如何防止之？ [3]

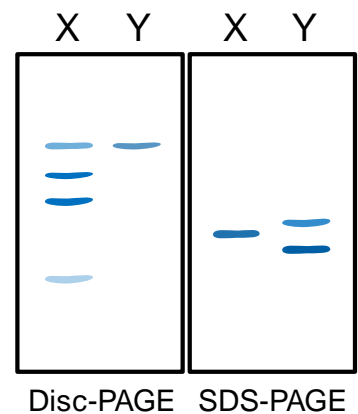
14. 有兩種蛋白質 V 與 W，其 pI 分別為 5.2 及 6.3，原態單元體之分子量分別為 32,000 及 35,000。V 在其 pI 的環境下，有 90% 的分子會發生聚合現象，成為四元體，且可溶於一般緩衝液。請設計一簡單方法，分離此二蛋白質的混合物。 [4]

15. 經純化後之蛋白質 X 及 Y，以 PAGE 電泳檢定得如 Fig. 7。

請分別討論蛋白質 X 及 Y 何者為純質？解釋為何。

(請由所得之電泳圖形說明之，並請再設計實驗證明) [5]

Fig. 7



16. 某蛋白質只知有下列性質，請設計其活性分析及純化流程。

- a. 原態分子量約 20 kD
- b. 等電點 8.0
- c. 可降解澱粉生成葡萄糖
- d. 在高溫 (95°C) 下可耐受 20 min 而活性不失
- e. 尚未誘導出其專一性抗体 [4]

17. 蛋白質 Z 的純化過程中，最後得到如 Fig. 8 及 Fig. 9 的結果，並且做了膠體過濾管柱的分子量校正 (如右 column calibration, $K_{av} = V_e - V_t / V_o - V_t$)。

請問：

- (1) 此膠體過濾管柱的 V_o 及 V_t 各為若干？
- (2) Z 的 V_e 為多少？請依此定出 Z 的原態分子量。
- (3) 請由 Fig. 9 推出 Z 分子的四級構造。
- (4) 請討論 Z 是否為純質？ [4]

Column calibration		
Standards	Mol. mass	K_{av}
S1	67,000	0.4
S2	25,000	0.7
S3	14,000	0.8

Fig. 8 Gel filtration (S-200, 2.6 x 100 cm)

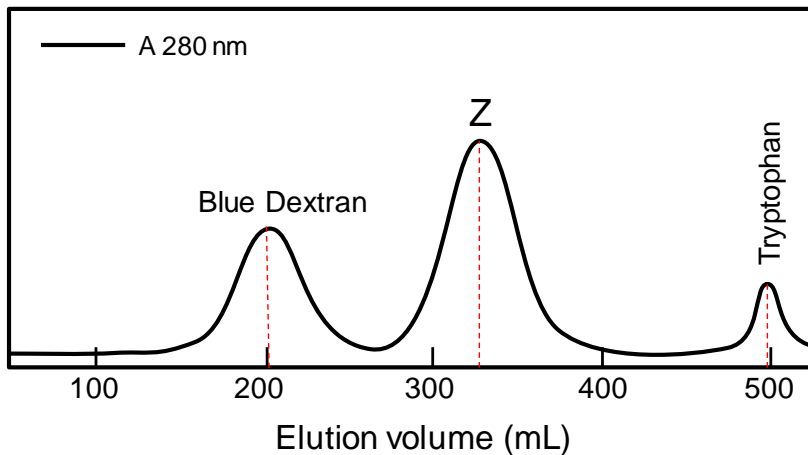
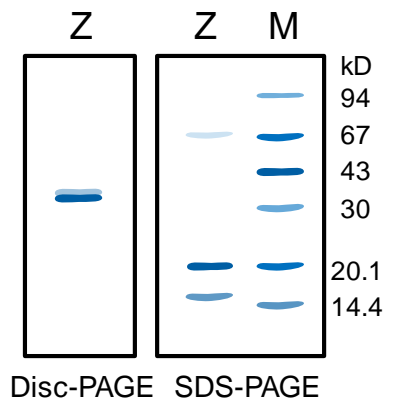


Fig. 9



18. 某粗抽取液中各種蛋白質及酵素 AA 的性質如下表，請依指示進行以下的純化步驟：

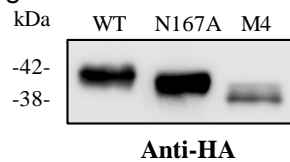
- (1) 粗抽液進行膠體過濾法 (Sephacel CL-6B)，預測並畫出層析圖譜及 SDS 電泳結果。
- (2) 取出含 AA 部份，接著進行離子交換法 (DEAE Sephacel, pH 6.5)，同上預測結果。
- (3) 若你覺得 AA 還不夠純，請自行設計進一步的純化方法，並預測其結果。

(以上 SDS-PAGE 只要做含有最高 AA 的一管即可，不需跑全部分劃) [5]

名稱	含量 (%)	分子量 (kD)			等電點 (pI)	疏水性 (%)	其它特徵
		單元體	四級構造	原態			
AA	6	60	trimer	180	5.1	40	含有 heme (Fe)
X1	10	60	dimer	120	5.5	20	含有鋅離子
X2	12	50	tetramer	200	5.0	35	glycoprotein
X3	5	90	dimer	180	5.2	90	對熱不穩定易失活
X4	8	95	dimer	190	6.8	50	
X5	10	58	dimer	116	5.4	40	含有鈣離子
X6	12	20	monomer	20	4.1	40	在 SDS 下有活性
X7	11	45	tetramer	180	4.9	35	在其 pI 會沉澱
X8	6	200	tetramer	800	4.5	30	淡褐色
X9	7	55	trimer	165	7.8	55	
X0	3	80	tetramer	320	5.5	30	glycoprotein

19. 若你在一個熱帶窮困國家的醫院裡工作，沒有任何儀器也沒有電力，只有簡單的玻璃管及小孔徑的塑膠注射針筒等器材；少數藥品之一是胃藥，這種胃藥是氫氧化鋁制酸劑，可保護胃壁，另外有一些牙科的填充骨粉。某日你發現當地有一種植物果實的抽取液可以抗癌，這種果實中大都為糖份，但含有一點點苦味物質，可能是生物鹼。你想研究何者是真正有效的成份，在這種艱難情況下，請問你如何粗略分離其中的成份？ [5]
20. 禽流感病毒 (AIV) 外殼有一種血液凝集素 (hemagglutinin, HA)，是入侵宿主細胞的關鍵分子，HA 與宿主細胞膜上的接受體結合，接著啟動一連串機制，把病毒基因送進細胞內，開始病毒的感染生活史。HA 在宿主體內被切開成為 HA1 及 HA2 兩部分才有正常功能，但仍然維持其立體構造；另外 HA 也會被醣化 (glycosylated)，可能有保護病毒的功能。以 H6N1 (2838V) 的 HA1 為例，從其胺基酸序列預測，有數個 Asn 醣化位置，若把某個醣化位置的 Asn 突變成 Ala (Fig. 10, N167A)，則 HA1 分子量下降了大約 1 kDa，而最右側 M4 分子量約 38 kDa，請問 M4 可能是什麼？可以推得什麼事實？ [4*]

Fig. 10



承上，若把 WT 的 HA1 分離出來，然後進行膠體過濾純化，則得如 Fig. 11 的色析圖譜，但是必須以 SDS-PAGE 及 Western blotting 才能看到 HA1 (Fig. 12)，請問所得到的 HA1 的分子量若干？能否推知 HA1 的分子構造？ [5*]

Fig. 11

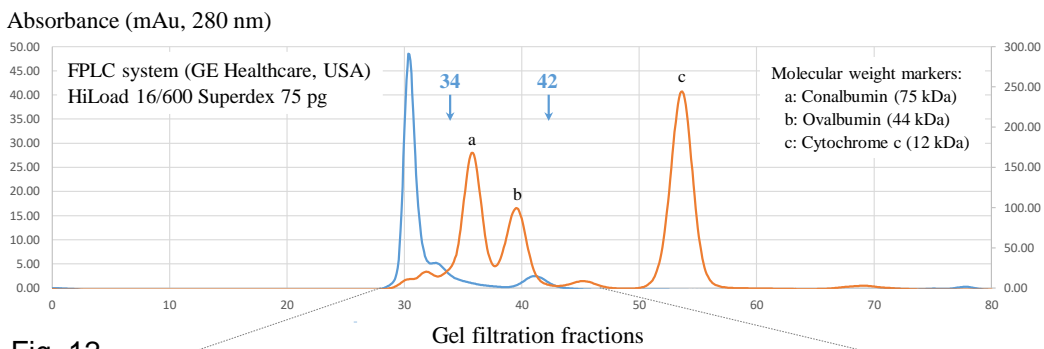
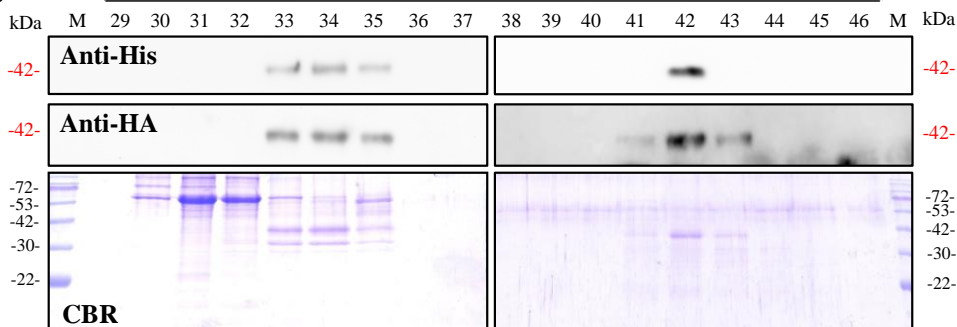


Fig. 12



21. 請解釋下列各操作時所發生現象的主要原因，若是實驗操作問題請亦提出解決方法：

例：加熱使酵素中止反應。[答] 蛋白質受熱變性，構形被破壞，失去活性。

- (a) 粗抽取液經透析後，總活性降至一半以下。 [4]
- (b) 粗抽取液經透析後，總活性增加 50%。 [3]
- (c) 硫酸銨沉澱後，找不到酵素活性。 [4]
- (d) 硫酸銨分劃後，某酵素的活性分佈在所有的各個分劃。 [5]
- (e) 有人宣稱使用 SDS-PAGE 可以測得原態蛋白質的分子量。 [5]
- (f) 蛋白質樣本在濾紙電泳上會有嚴重拖尾現象。 [4]
- (g) 有些人使用酵素的粗抽取液即可進行動力學實驗。 [4]
- (h) 已知某酵素不是醣蛋白，卻可以糖染色法 (PAS) 染上色。 [5]
- (i) 用 ultrafiltration 濃縮後的濃縮液中，發現蛋白質濃度沒有提升。 [4]
- (j) 進行甘藷粗抽液的原態電泳，經活性碘染色發現有粉紅色色帶。 [4]
- (k) 酵素經過反相層析法 (reversed phase chromatography) 後活性立刻消失。 [5]
- (l) 等電聚焦法的膠體可形成 pH 梯度。 [4]
- (m) 原態電泳時所要的蛋白質跑不下來，卻在膠體上方拖成一片。 [3]

[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]