

---

# 酵素化學實驗

---

Enzyme Biochemistry Laboratory

---



---

國立台灣大學 微生物與生化所 莊榮輝

# ■ 如何開始？

.....

先考慮以下諸點：

5W

- a. 要純化那一個蛋白質？ What ?
- b. 為何要純化此蛋白質？ Why ?
- c. 由何種材料純化？ Where, from ?
- d. 由那一個生長期？ When ?
- e. 如何純化此蛋白質？ How ?

## ■ 酵素的純化過程，約可分為三個階段：

.....

### (1) 粗蛋白 (crude protein) :

採樣 → 均質打破細胞 → 抽出全部蛋白，  
多用鹽析沉澱法。

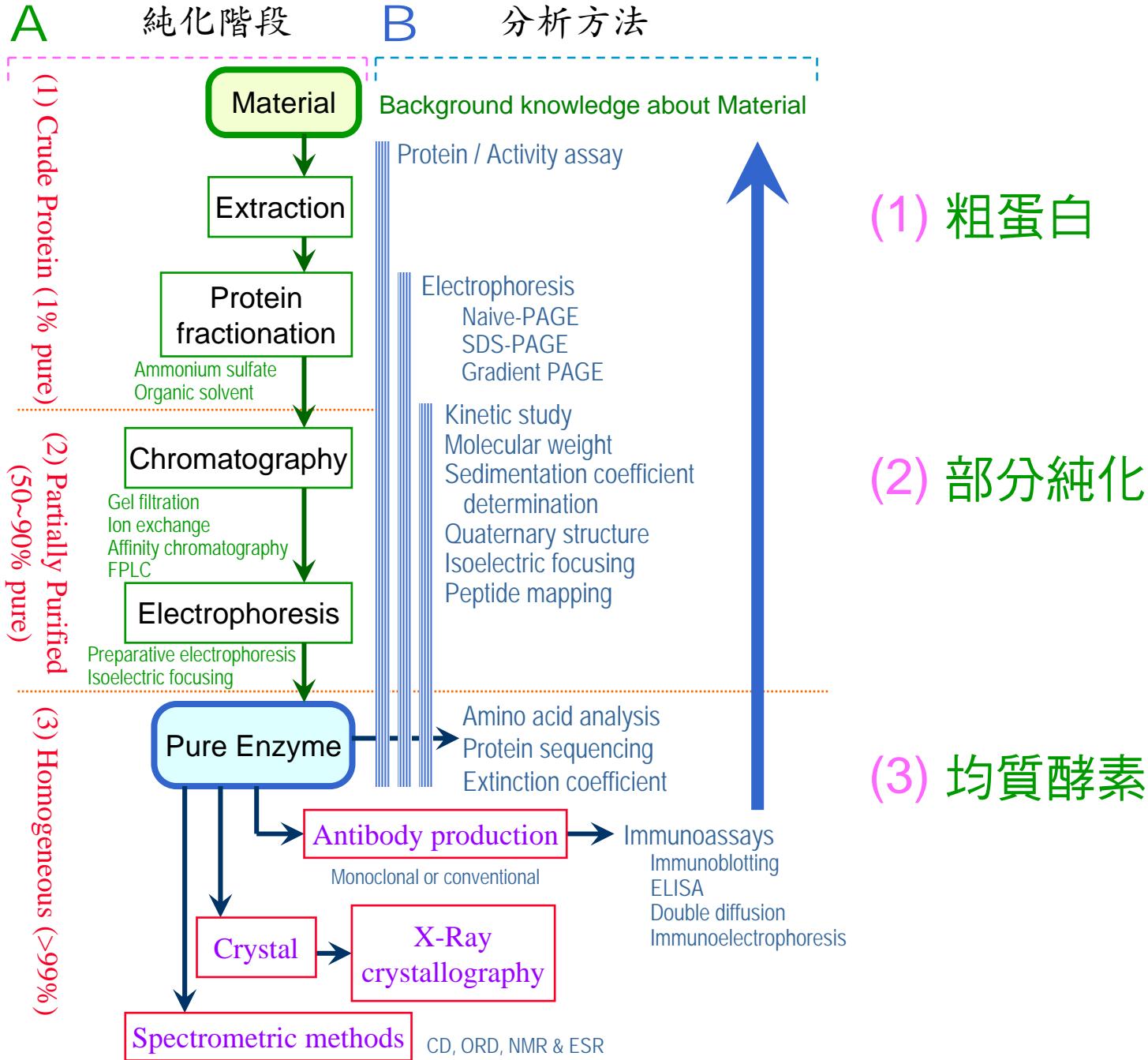
### (2) 部分純化 (partially purified) :

初步的純化，使用各種管柱層析法。

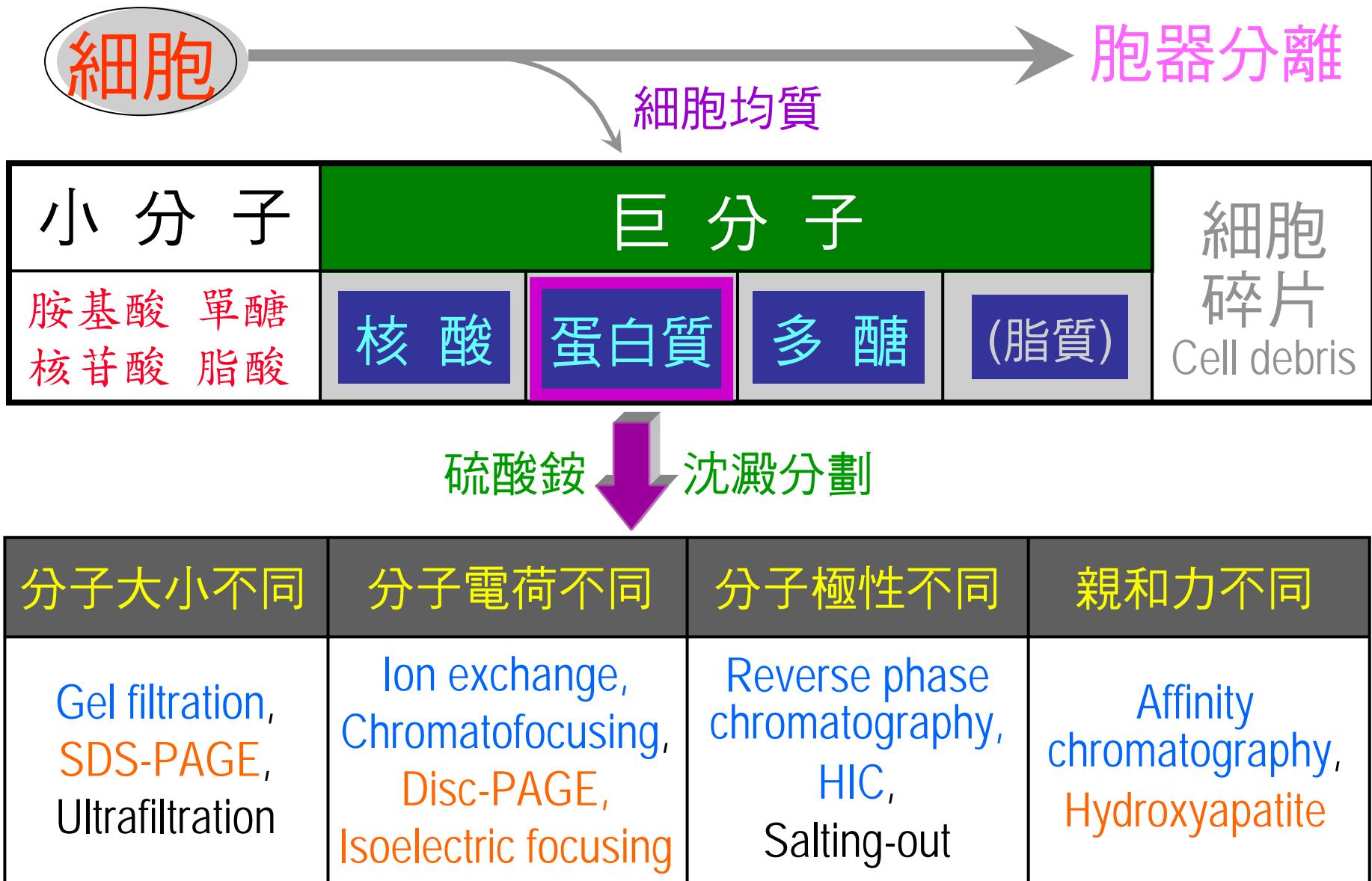
### (3) 均質酵素 (homogeneous) :

目標酵素的進一步精製純化，可用製備式電泳或 HPLC 等。

# 酵素純化階段及分析方法：



# ■ 各種純化或分析方法的原理：



# ■ 各種純化方法的應用次序：

次數

均質 沈澱

離子交換

親和層析

膠體過濾

40

30

20

10

1

2

3

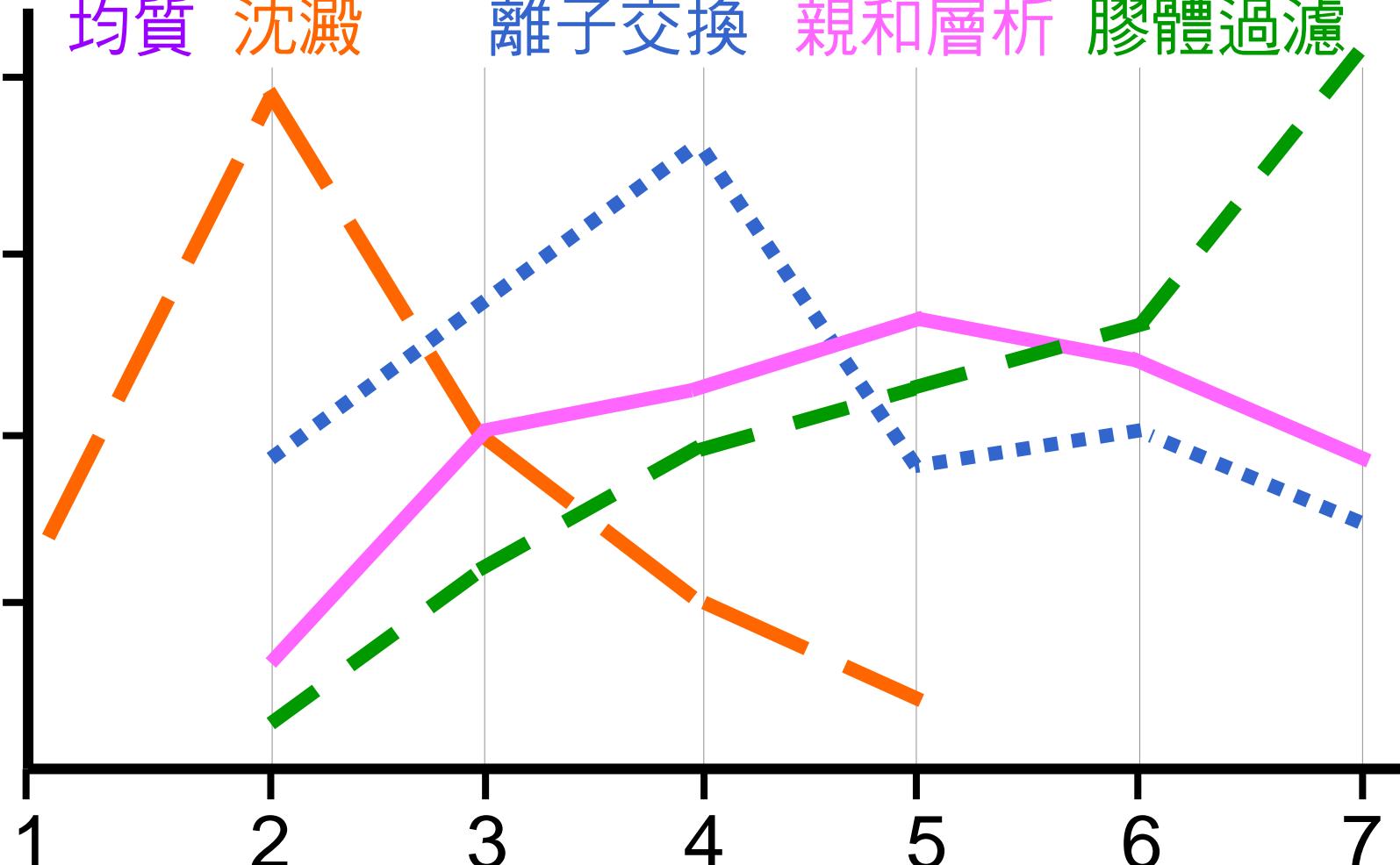
4

5

6

7

步驟

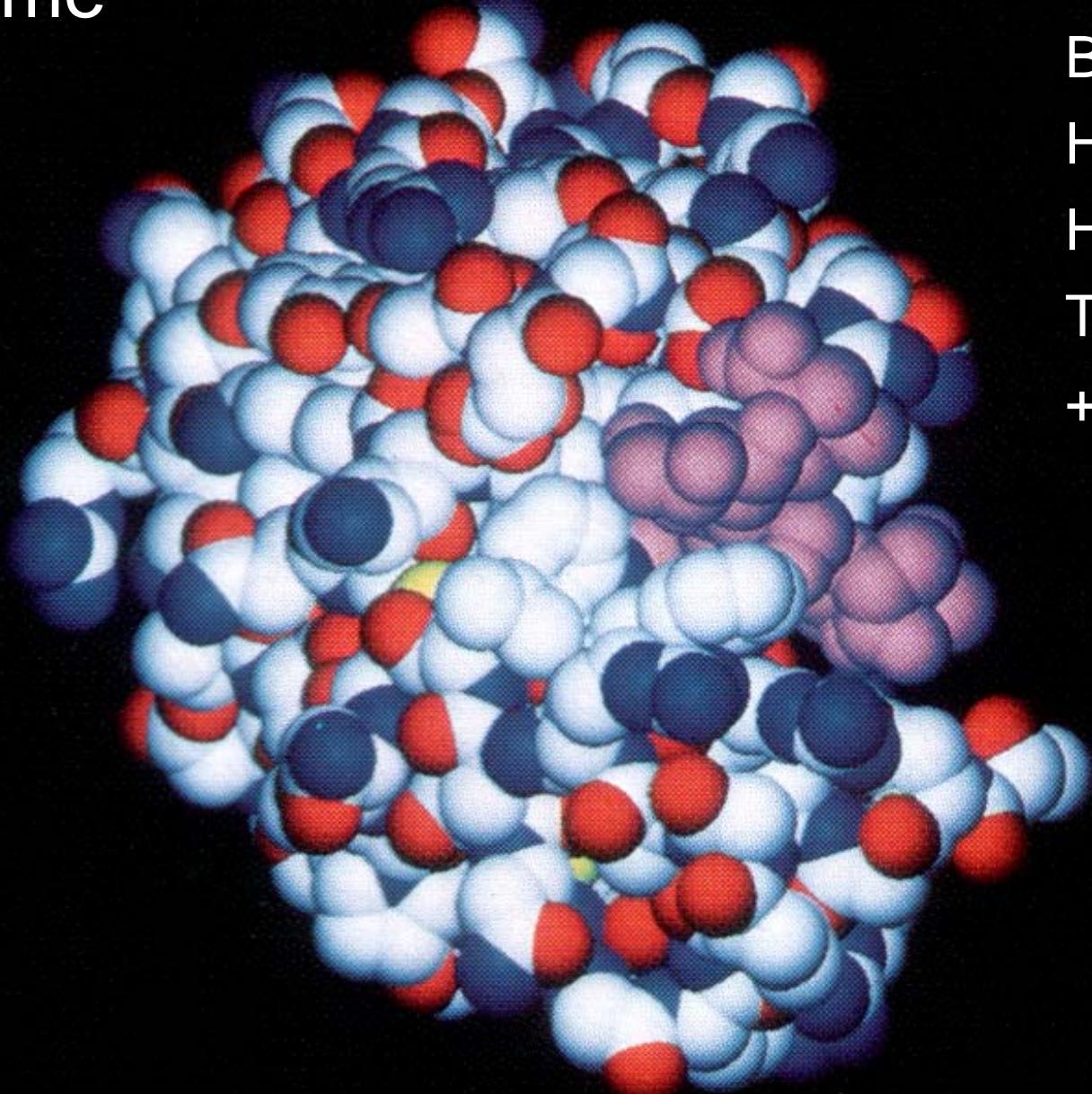


# 酵素純化方法

.....

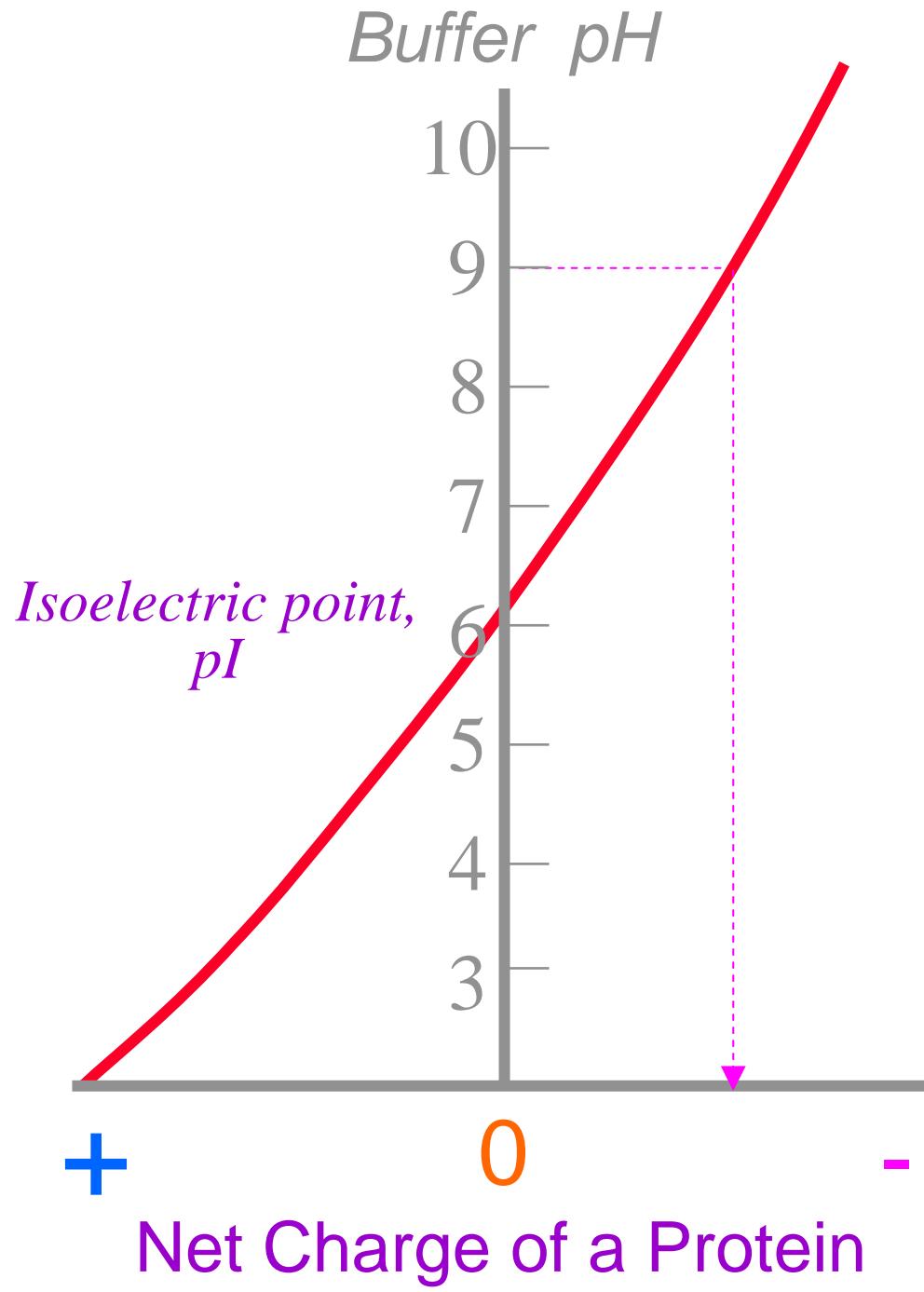
- 鹽溶鹽析      最經濟方便的純化
- 膠體過濾法      依照分子大小分離
- 離子交換法      利用分子電荷性質
- 親和層析法      最具專一性的吸著
- 純化策略      善用分子各種特性

# Lysozyme



Backbone  
Hydrophobic  
Hydrophilic  
Total  
+ substrate

環境影響分子的帶電性質：



## ■ 等電點與環境 pH 的關係：

環境

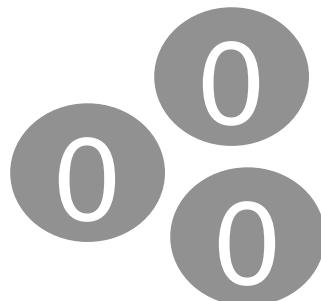
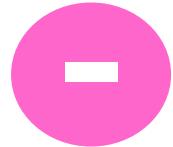
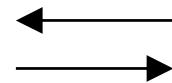
$$pH = 6$$

$$pI = 5$$

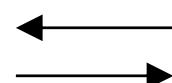
環境

$$pH = 4$$

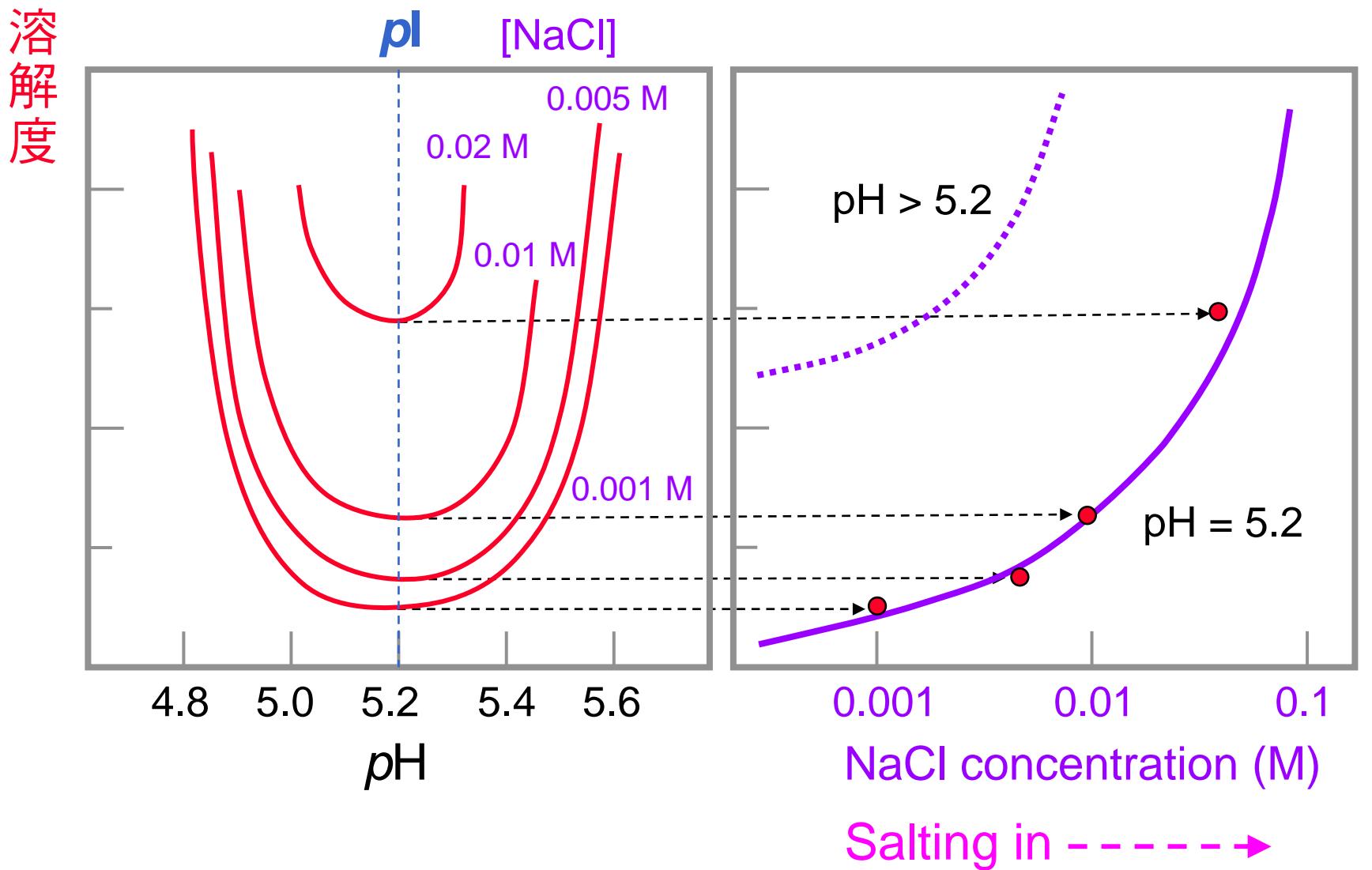
等電點



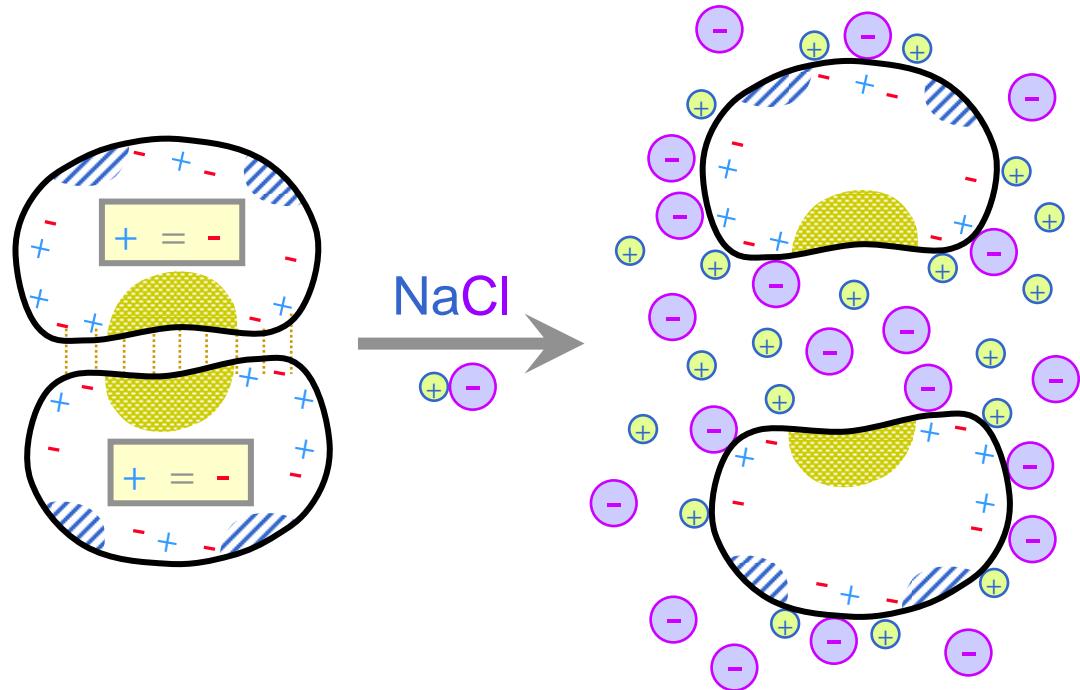
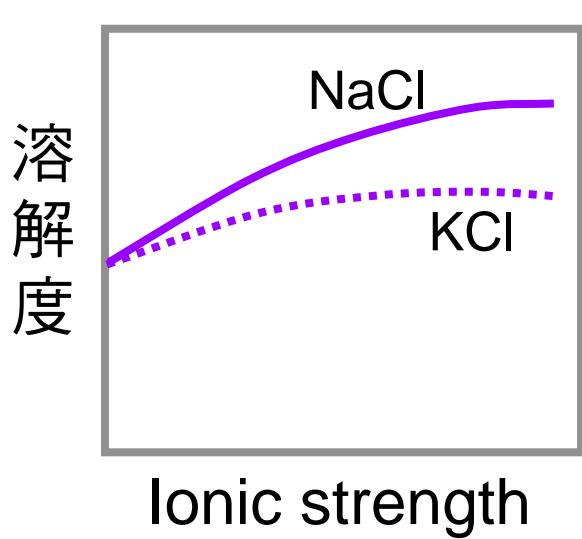
凝聚



## 提高鹽濃度會增加蛋白質的溶解度：



# 鹽溶 Salting-in :



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。

## ■ 鹽對蛋白質溶解度的影響：

.....

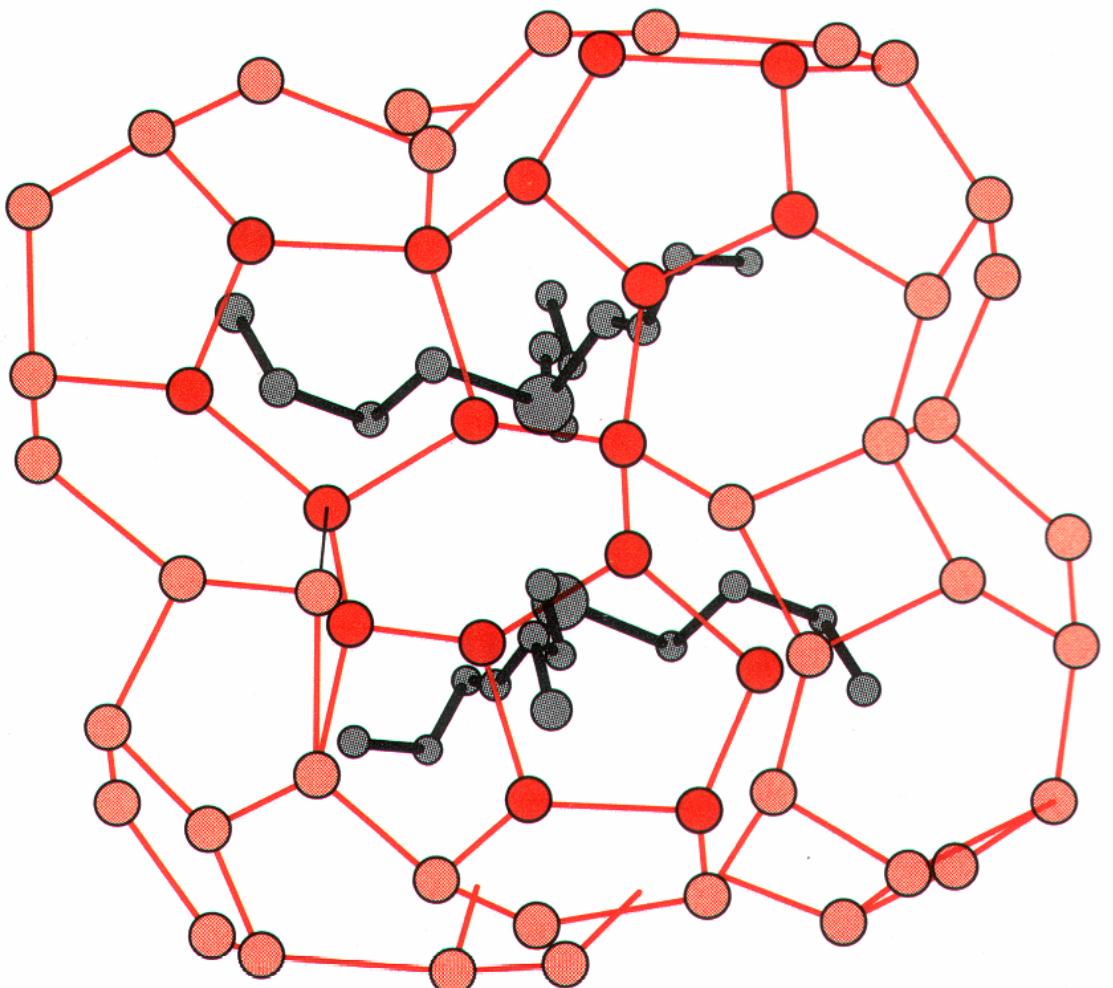
- 鹽溶 Salting-in:

加鹽使蛋白質溶入水溶液中

- 鹽析 Salting-out:

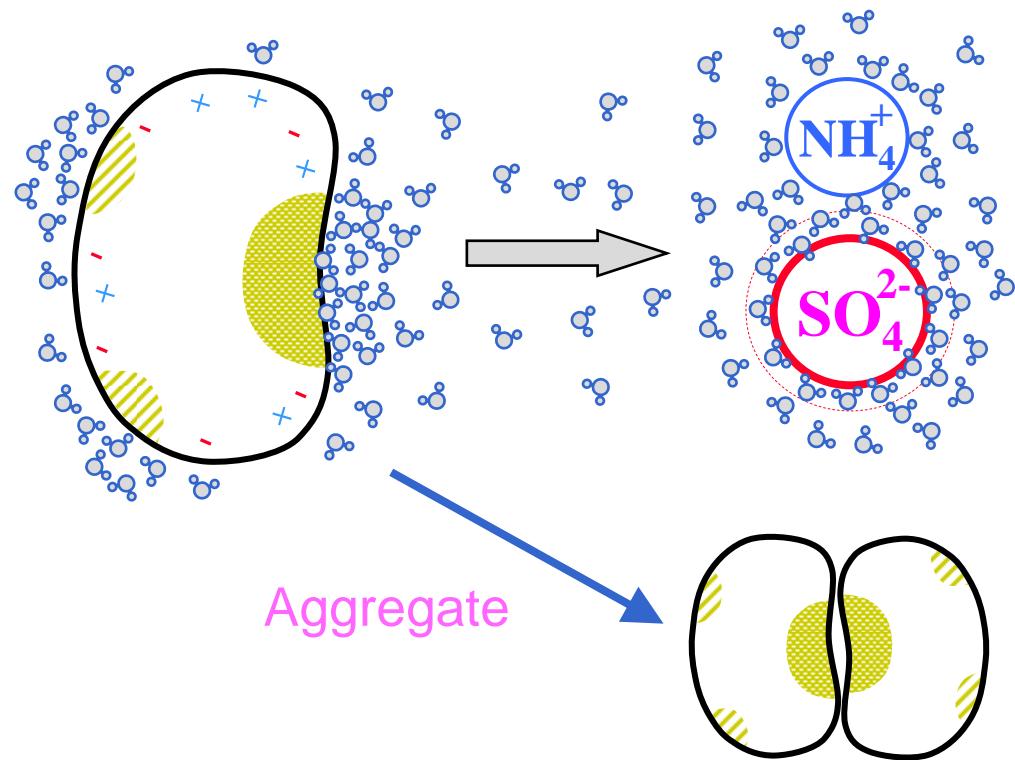
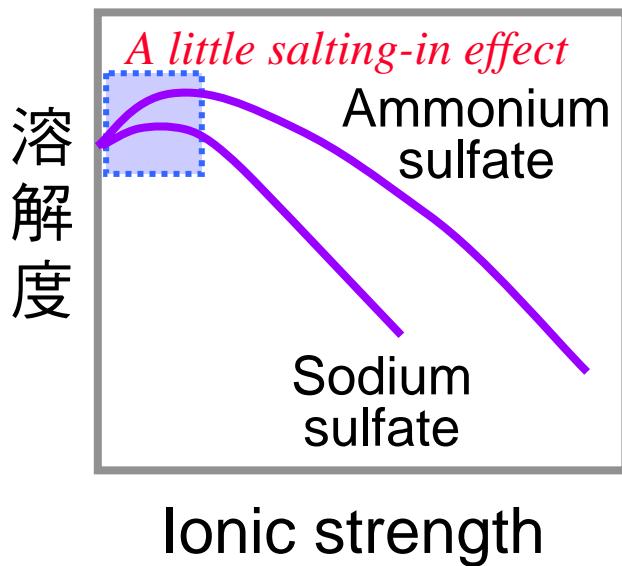
加鹽使蛋白質由水溶液中沉澱出來

## ■ 疏水性物質間的親和力：水籠 Clathrate



- 水分子會包圍在非極性分子四周，形成類似竹籠的構造，隔離非極性分子，水分子本身的流動性因此而降低。

# 鹽析 Salting-out :



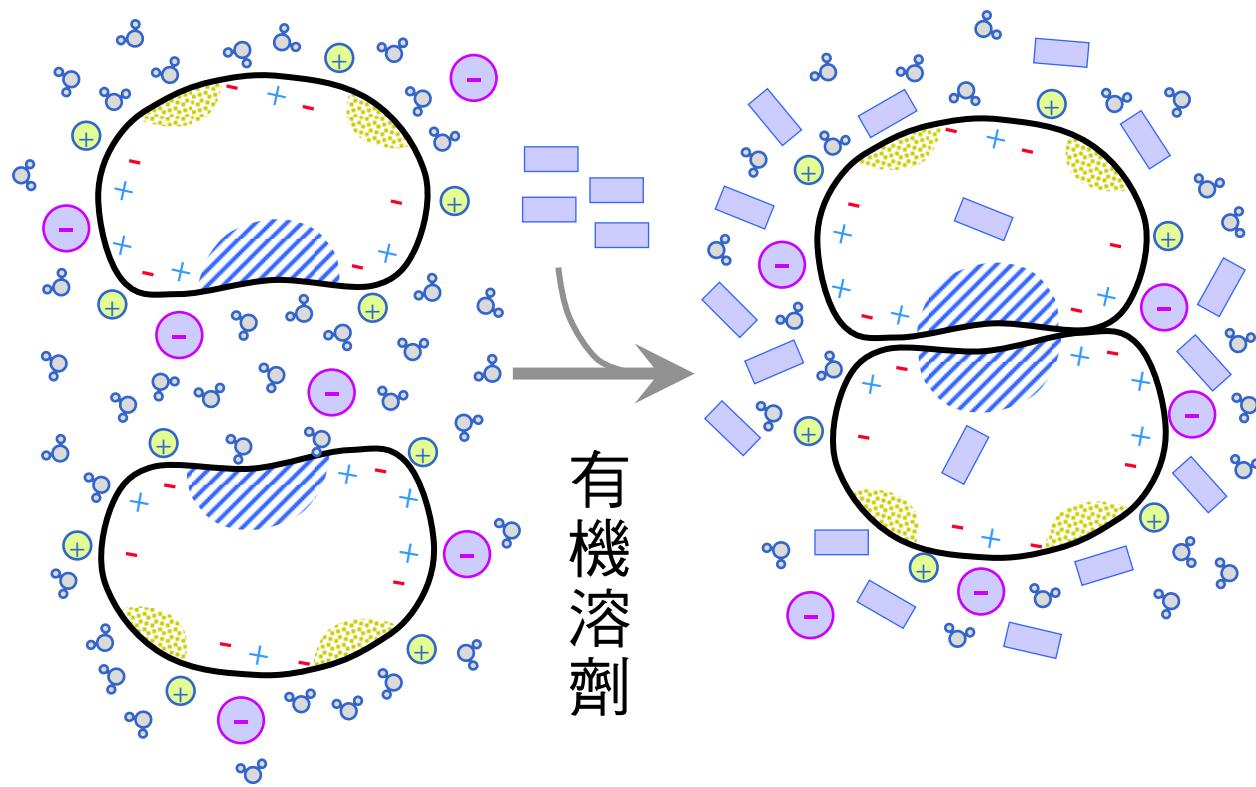
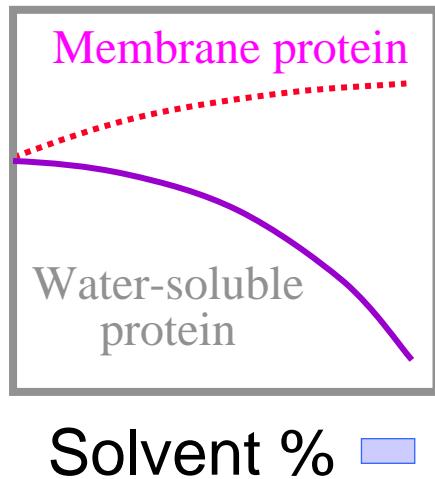
蛋白質分子表面的疏水性區域，都聚集許多水分子，當鹽類加入時，這些水分子被抽出，以便與鹽離子進行水合，暴露出來的疏水性區域互相結合，形成沈澱。



= hydrophobic

# ■ 有機溶劑沈澱法：

溶解度

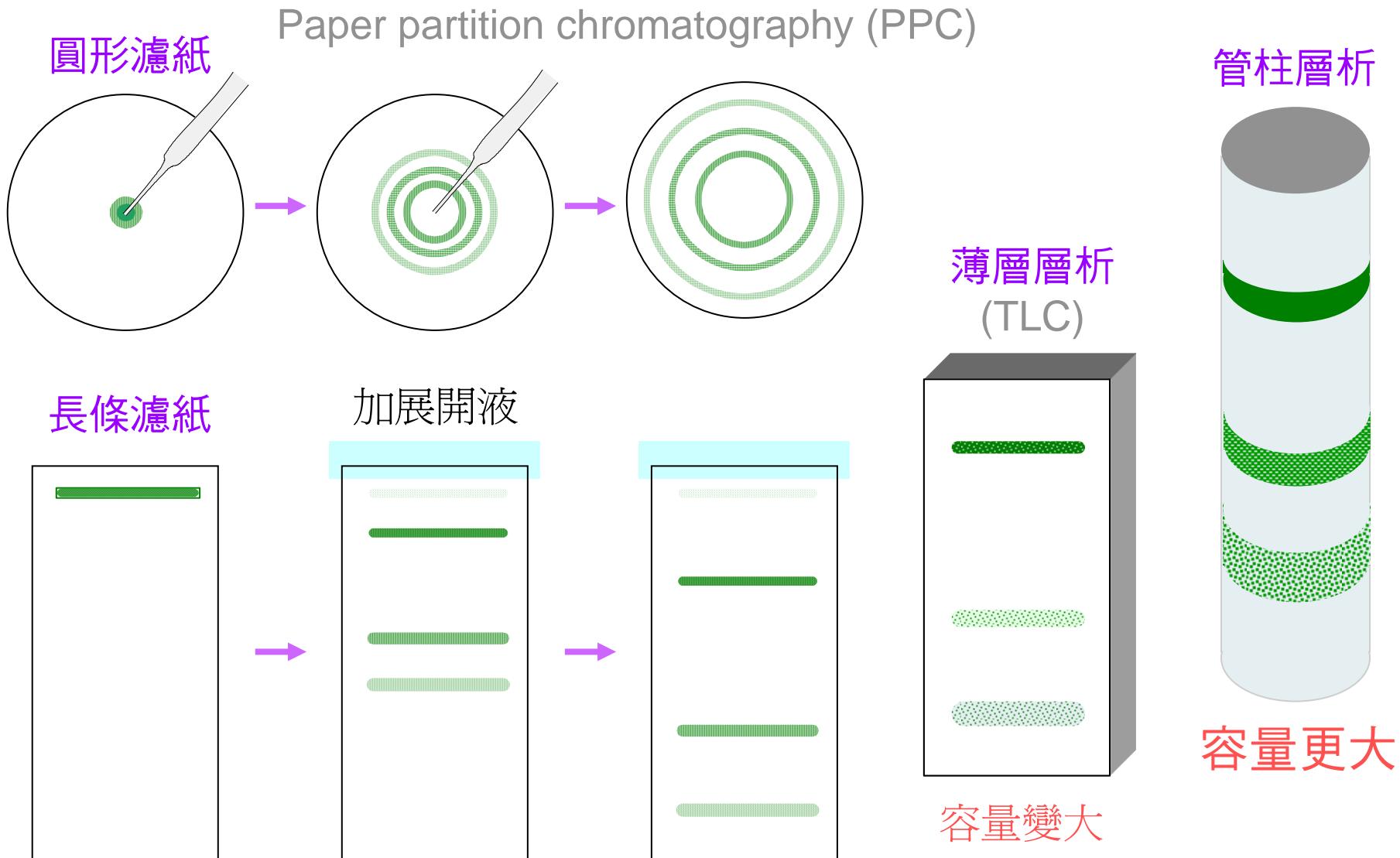


降低水活性，使溶液的介電常數下降，增加蛋白質溶質分子之間的作用力，因而聚集在一起。

= hydrophilic



# ■ 色析法的演進過程：



## ■ 色層分析法的基本機制：

.....

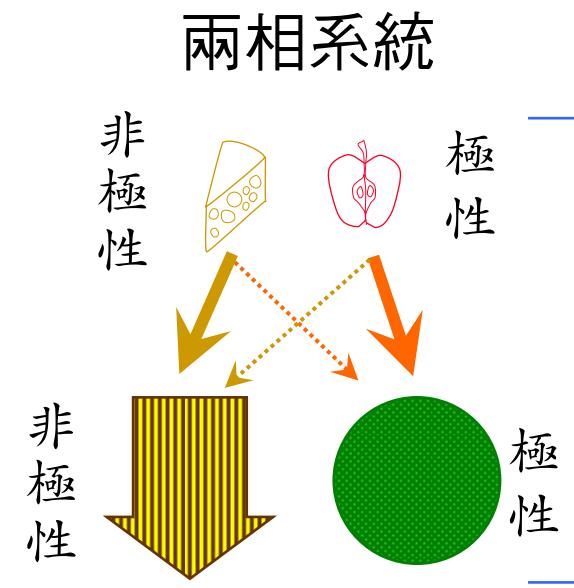
*Like*  
*Dissolves*  
*Like*

- 極性相似的兩分子間，其親和力較強。

極性 → 極性  
非極性 → 非極性

# ■ 色層分析法的基本原理：

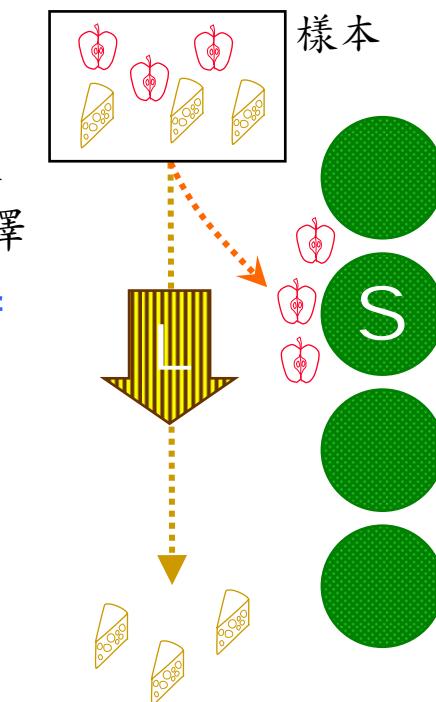
A



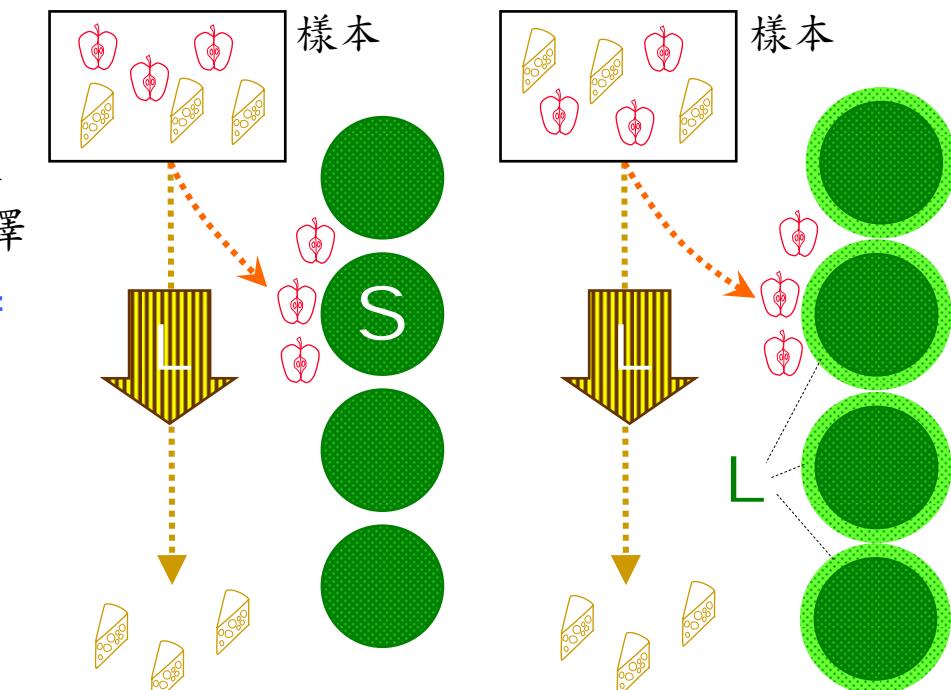
B

每次分離樣本  
都要做一次選擇

One Plate of  
Separation  
(理論板數)



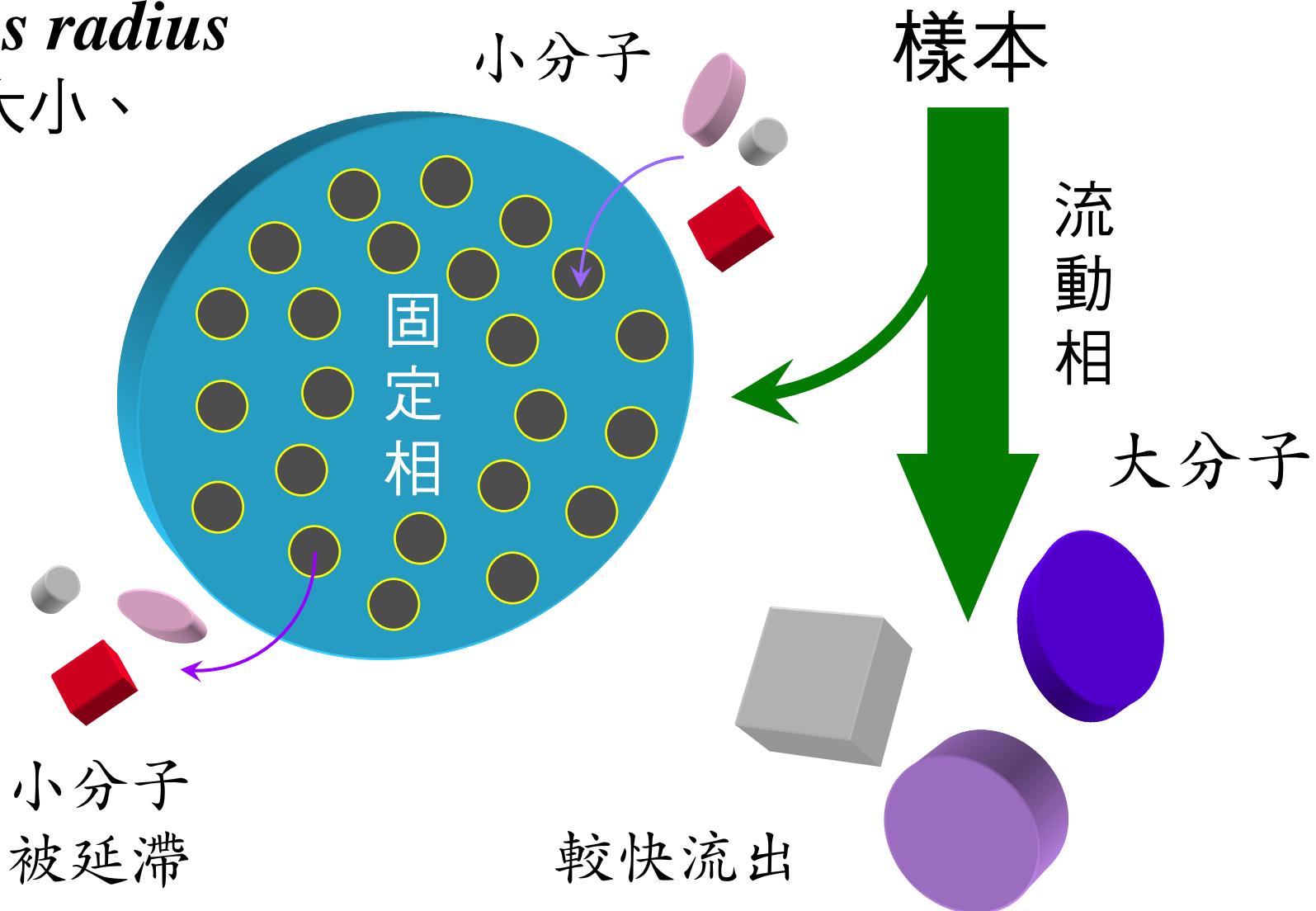
C



## ■ 膠体過濾法是一種 Partition 層析法：

*Stokes radius*

分子大小、  
形狀



各種色析膠體：

## Pharmacia

Sephadex      glucose (dextrose)

Sepharose      agarose

Sephacryl      glucose + acrylamide

Sephacel      cellulose

## FPLC

Superose, Superdex

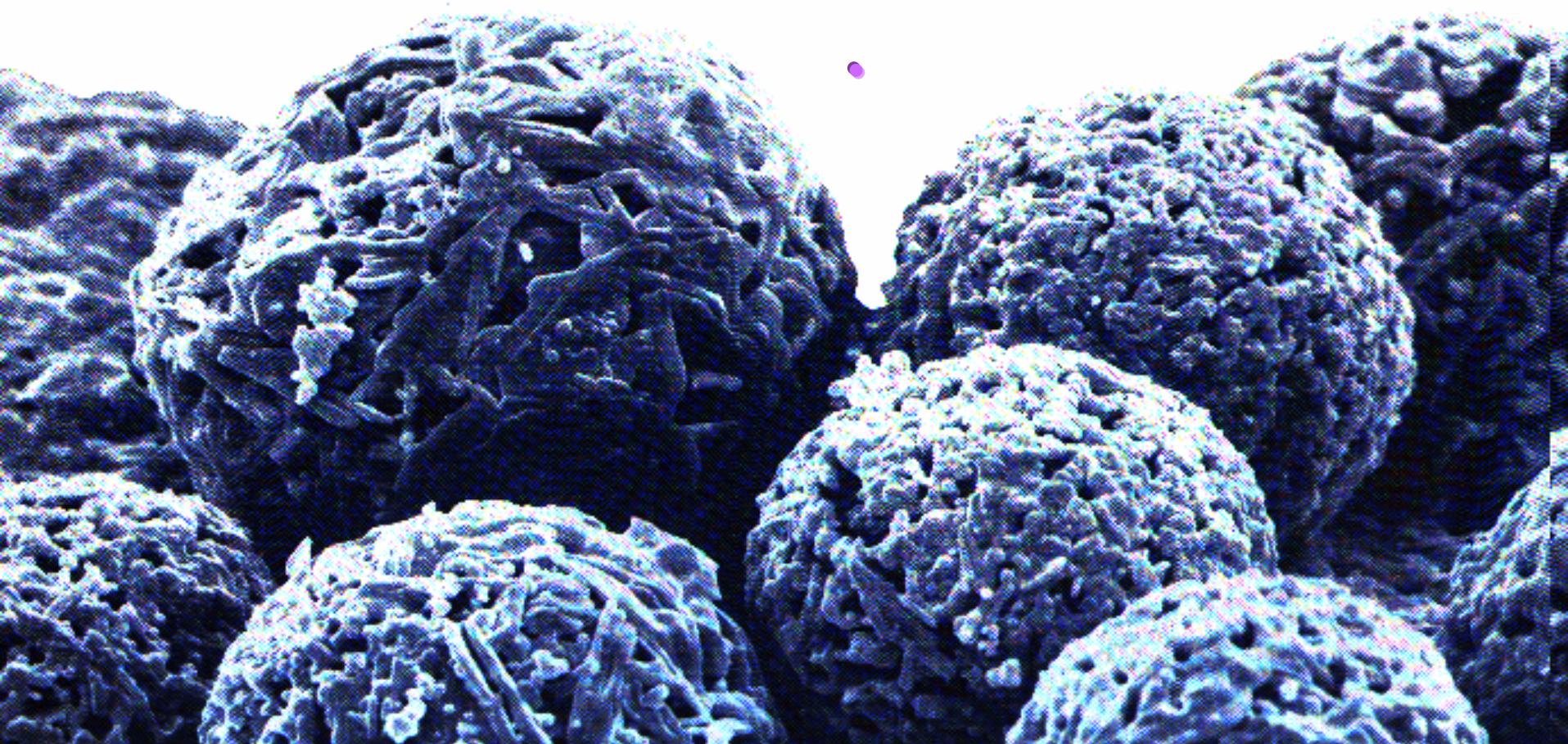
Mono Q, Mono S

## Bio-Rad

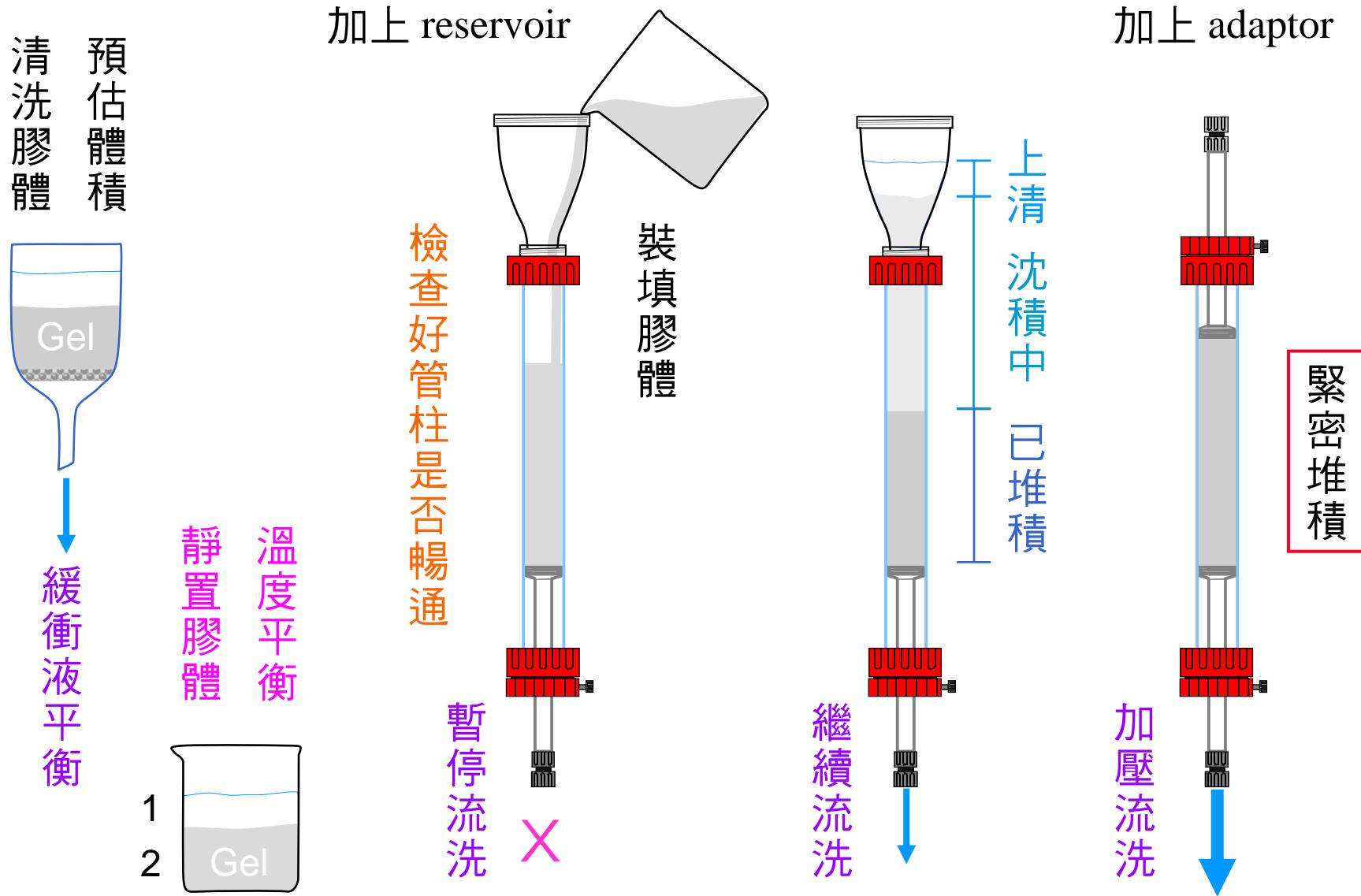
BioGel P      acrylamide

BioGel A      agarose

## ■ 膠体過濾法的膠球：

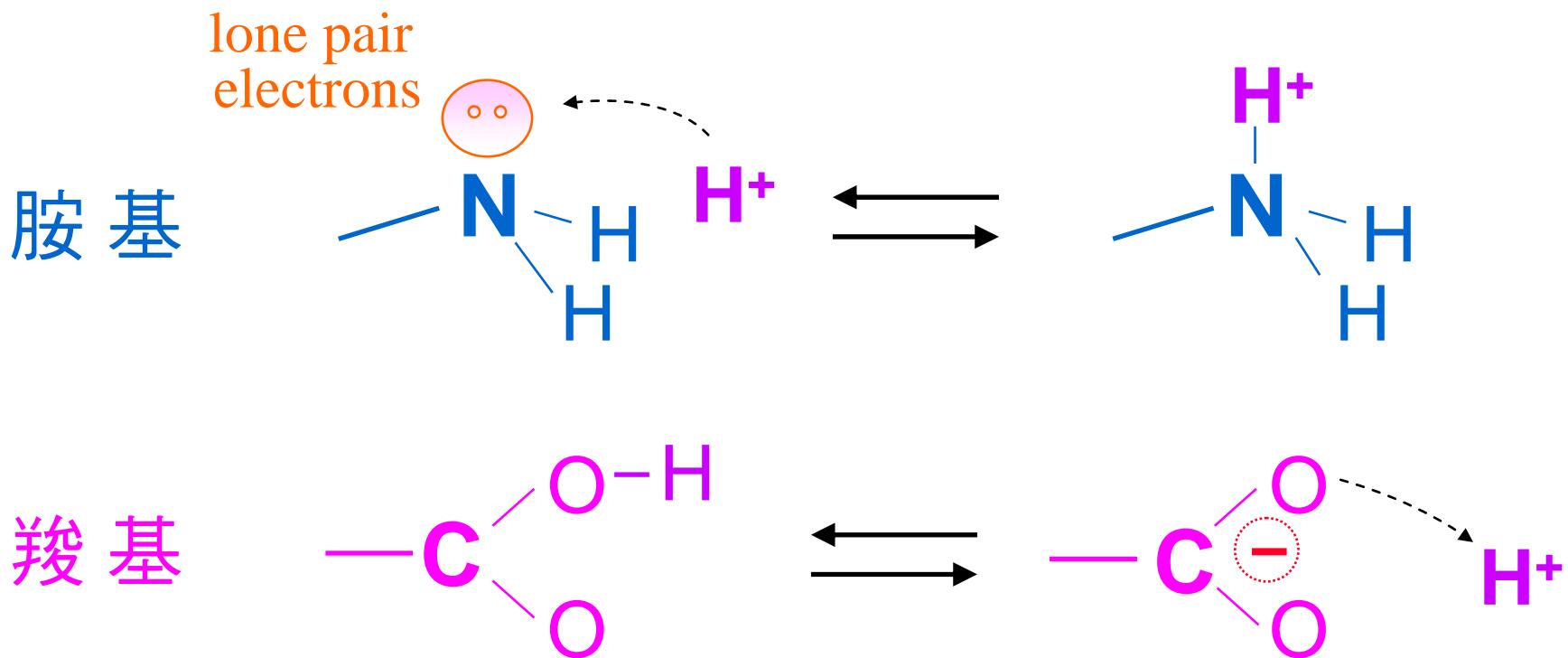


# ■ 膠柱的裝填方法：

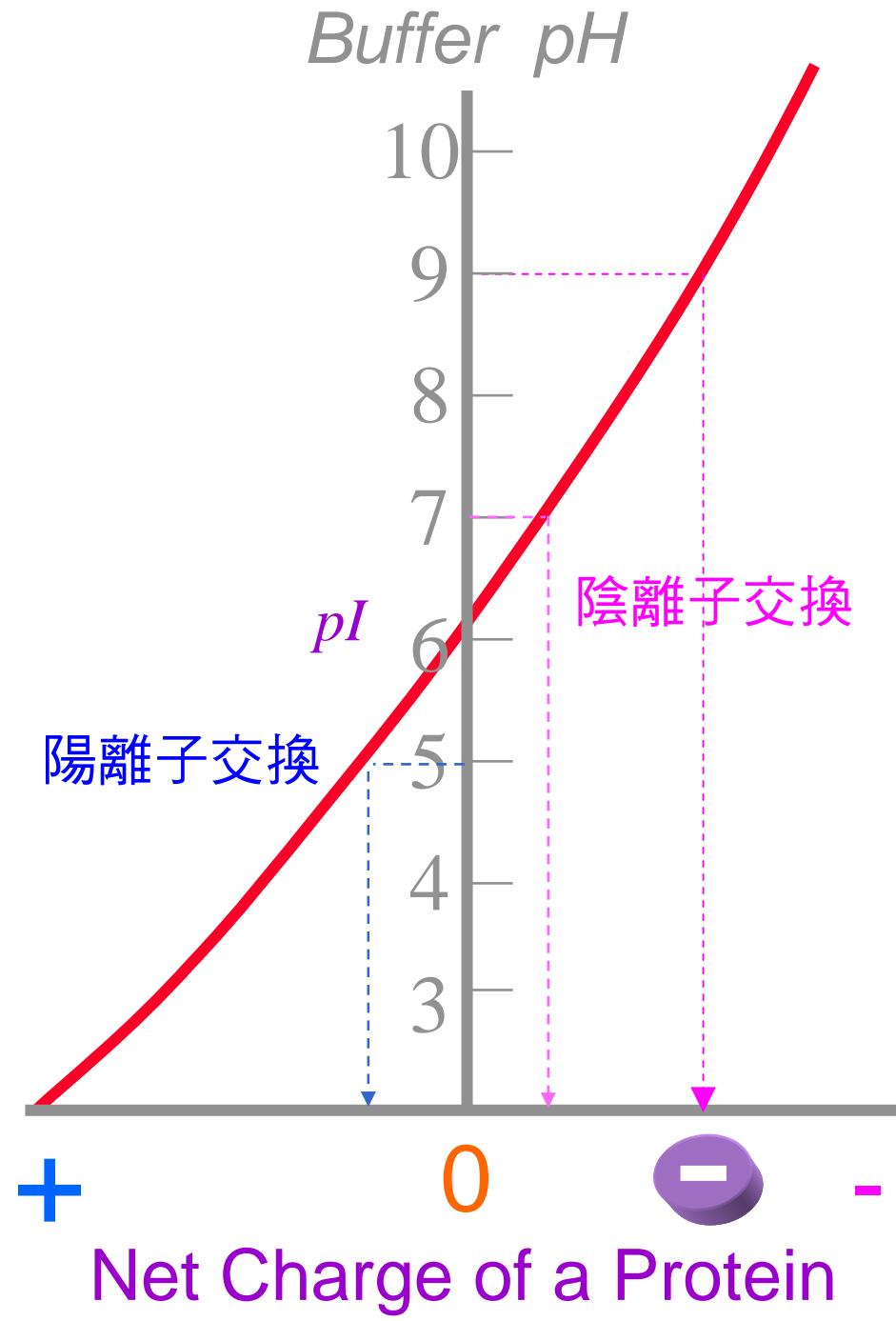


## ■ 質子可以吸著或脫離一基團：

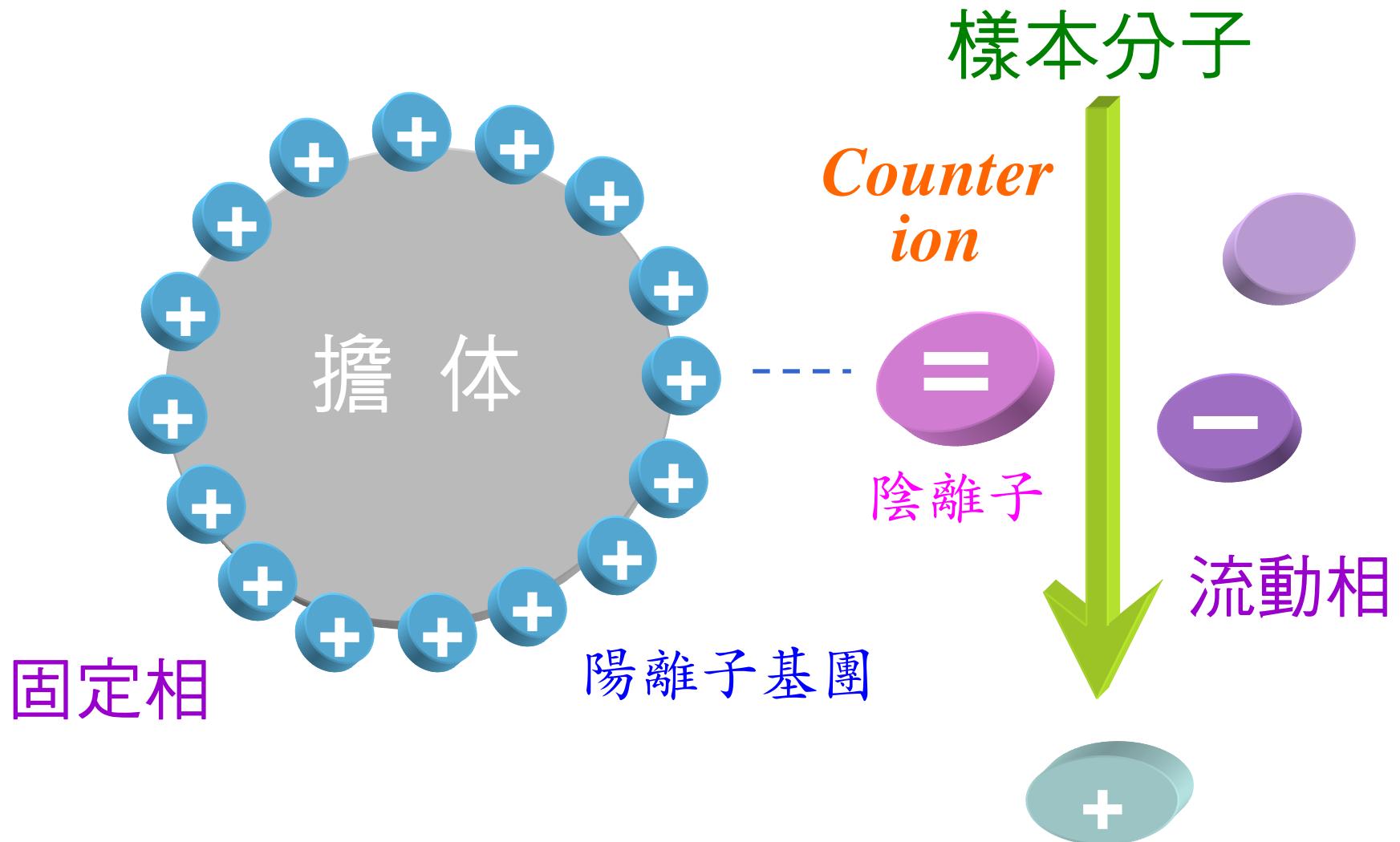
Proton：最小且最多的生物粒子，影響酸鹼度及分子帶電性質



選擇離子交換介質：



## ■ 陰離子交換法 Anion Exchange :



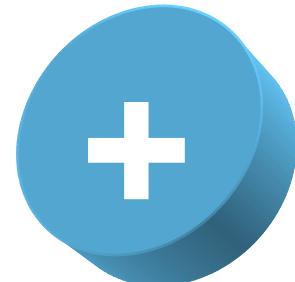
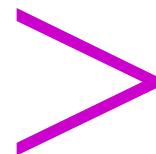
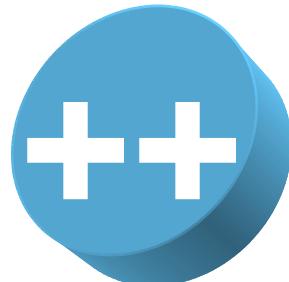
# ■ 各種離子交換介質：

陰陽強弱分類	Resin / Polystyrene	Glycan / Cellulose = X	Mono bead
Anion Exchanger	Dowex-1 Dowex-2	-NR <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Q
Cation Exchanger	Dowex-3 IR-45	-NHR <sub>2</sub> <sup>+</sup>	DEAE-X -OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHR <sub>2</sub> <sup>+</sup>
Strong	Dowex-50	-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Phospho-X -PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Weak	IRC-150	-COO <sup>-</sup>	CM-X -OCH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>

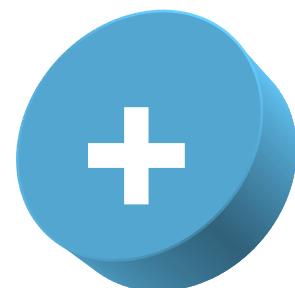
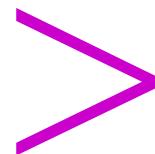
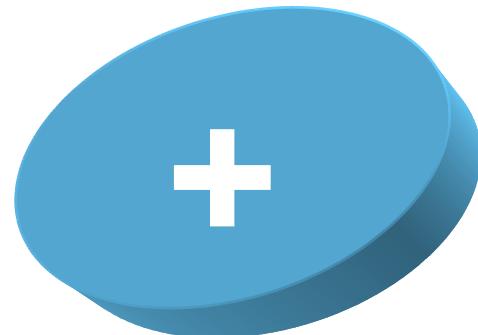
X = Sephadex, Sepharose, Sephacel or cellulose

## ■ 離子取代優先順序 Pecking Order :

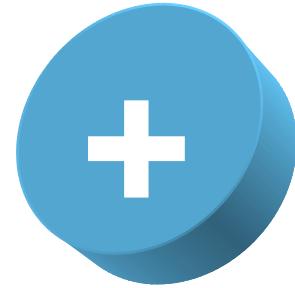
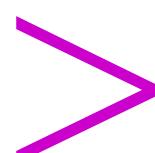
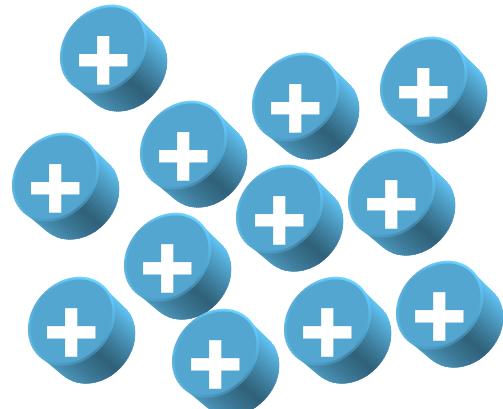
電荷高者



離子大者

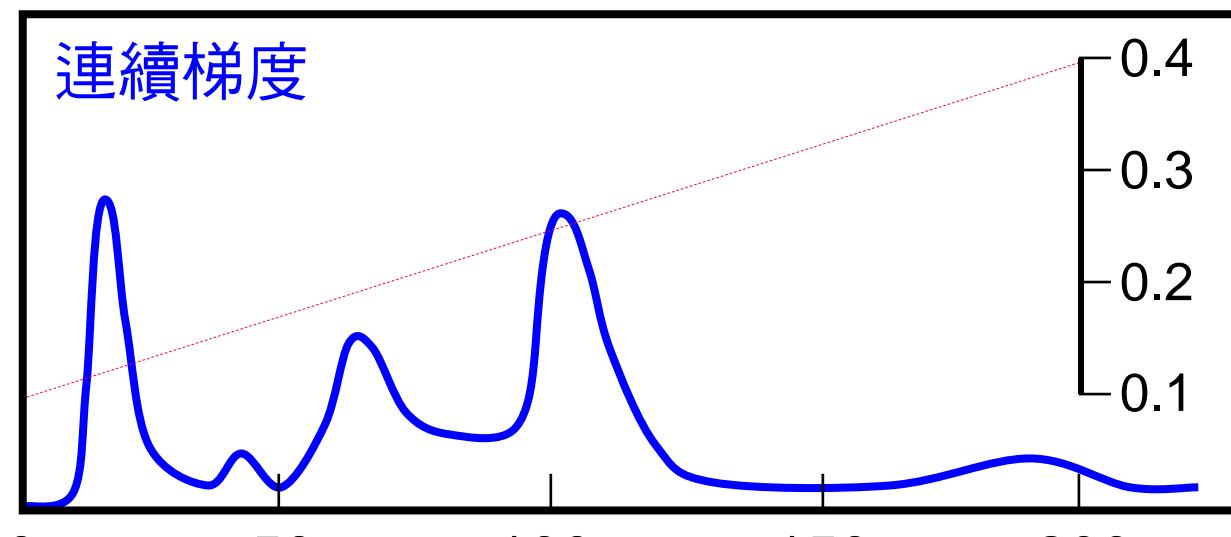


濃度大者

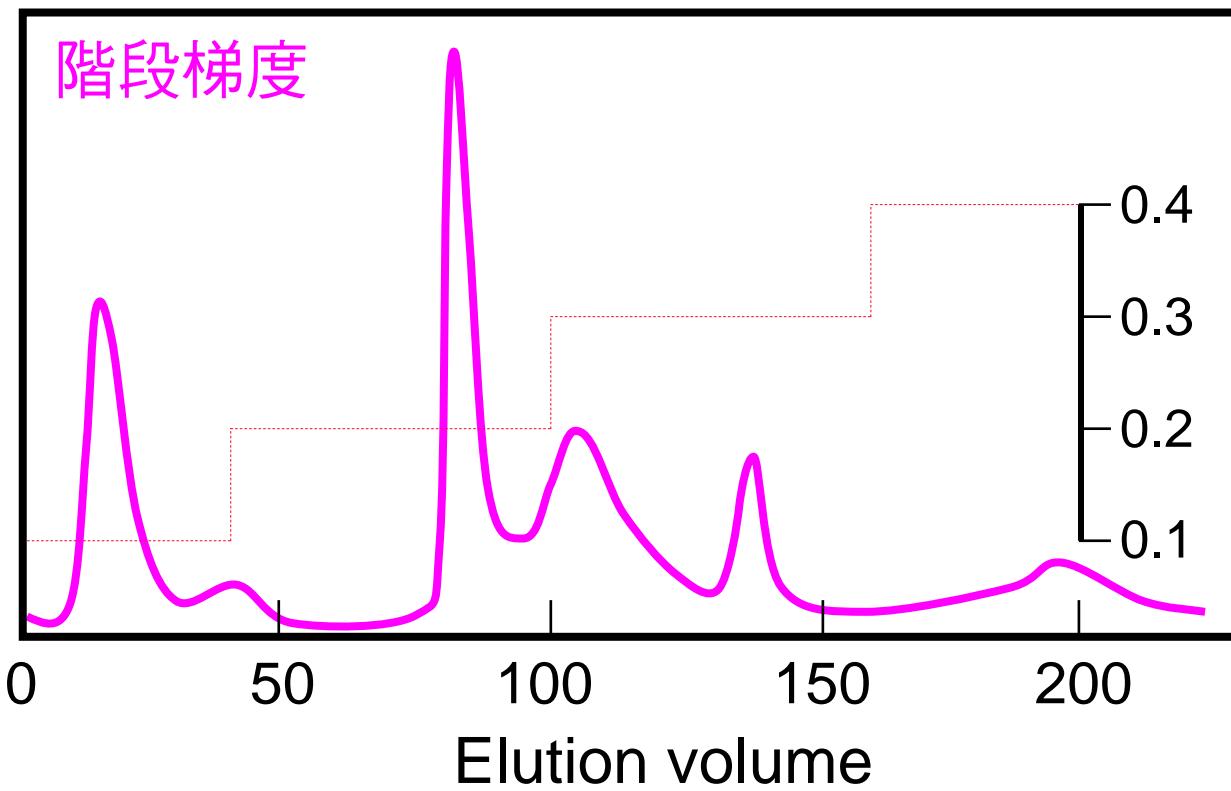


# 連續與階段梯度比較：

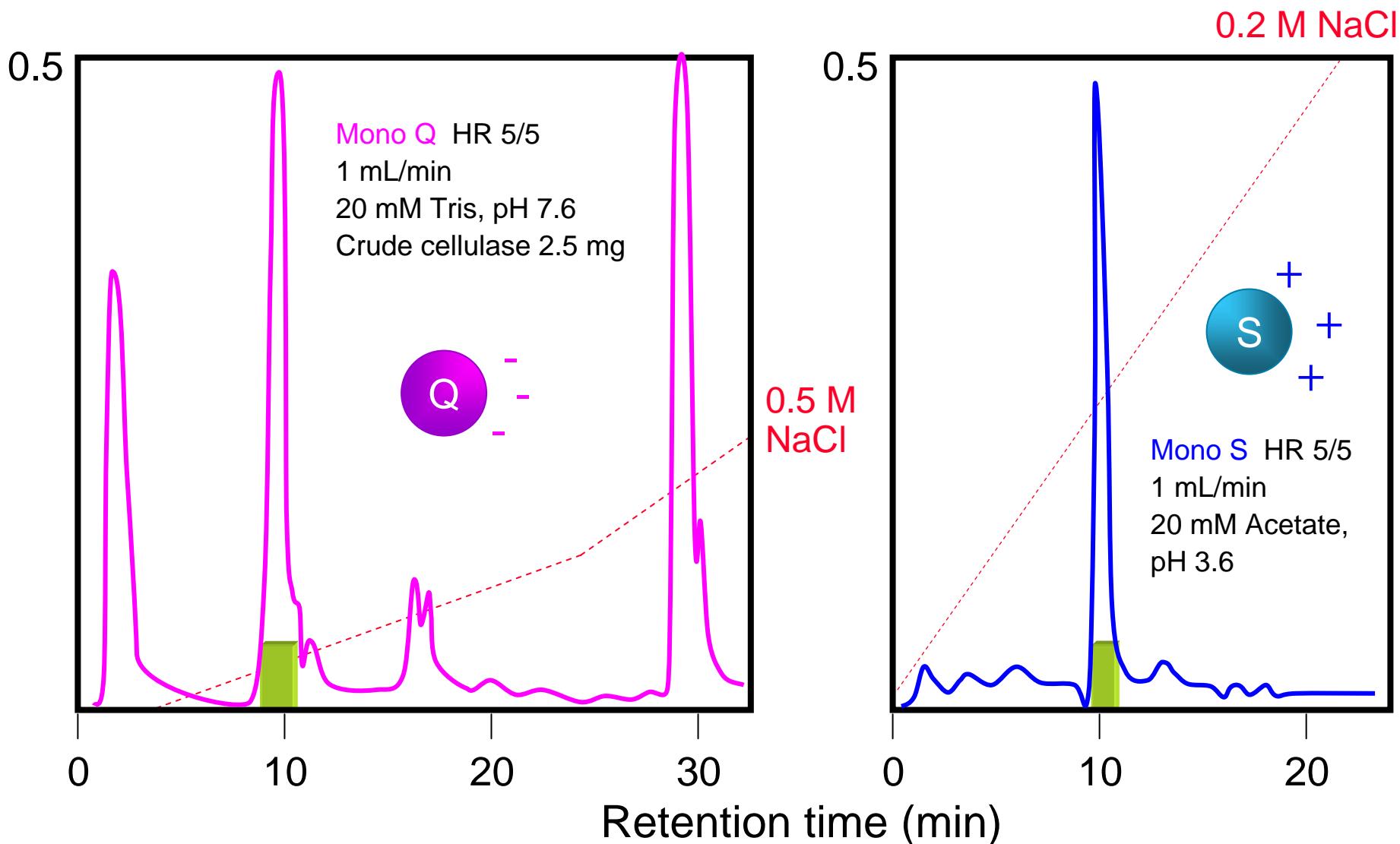
蛋白質濃度



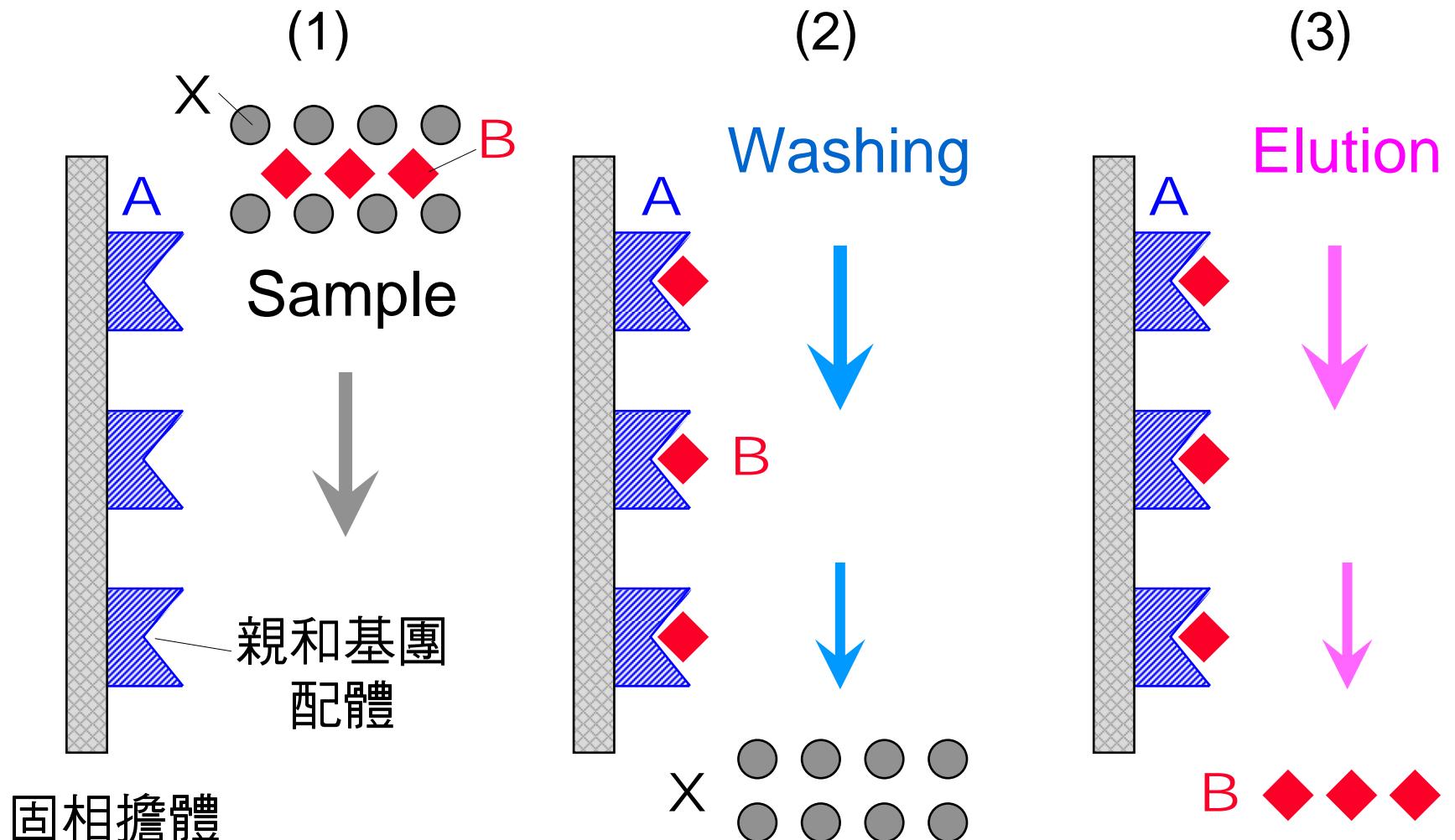
階段梯度



# 離子交換法實例：Cellulase



# ■ 親和層析法的作用機理：



# ■ 專一性結合力量的構成因素：

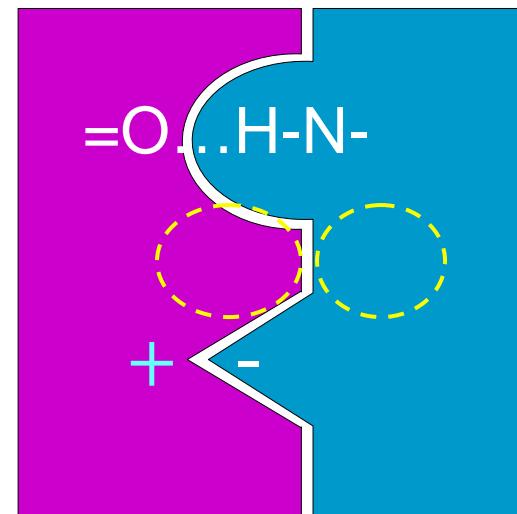
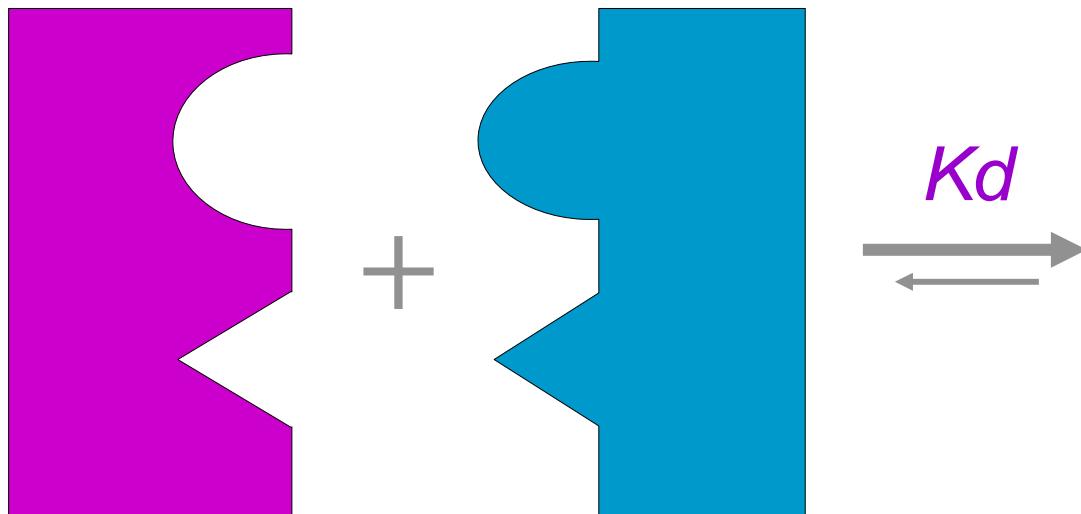
.....

## *I. Conformational Match: II. Interaction Forces:*

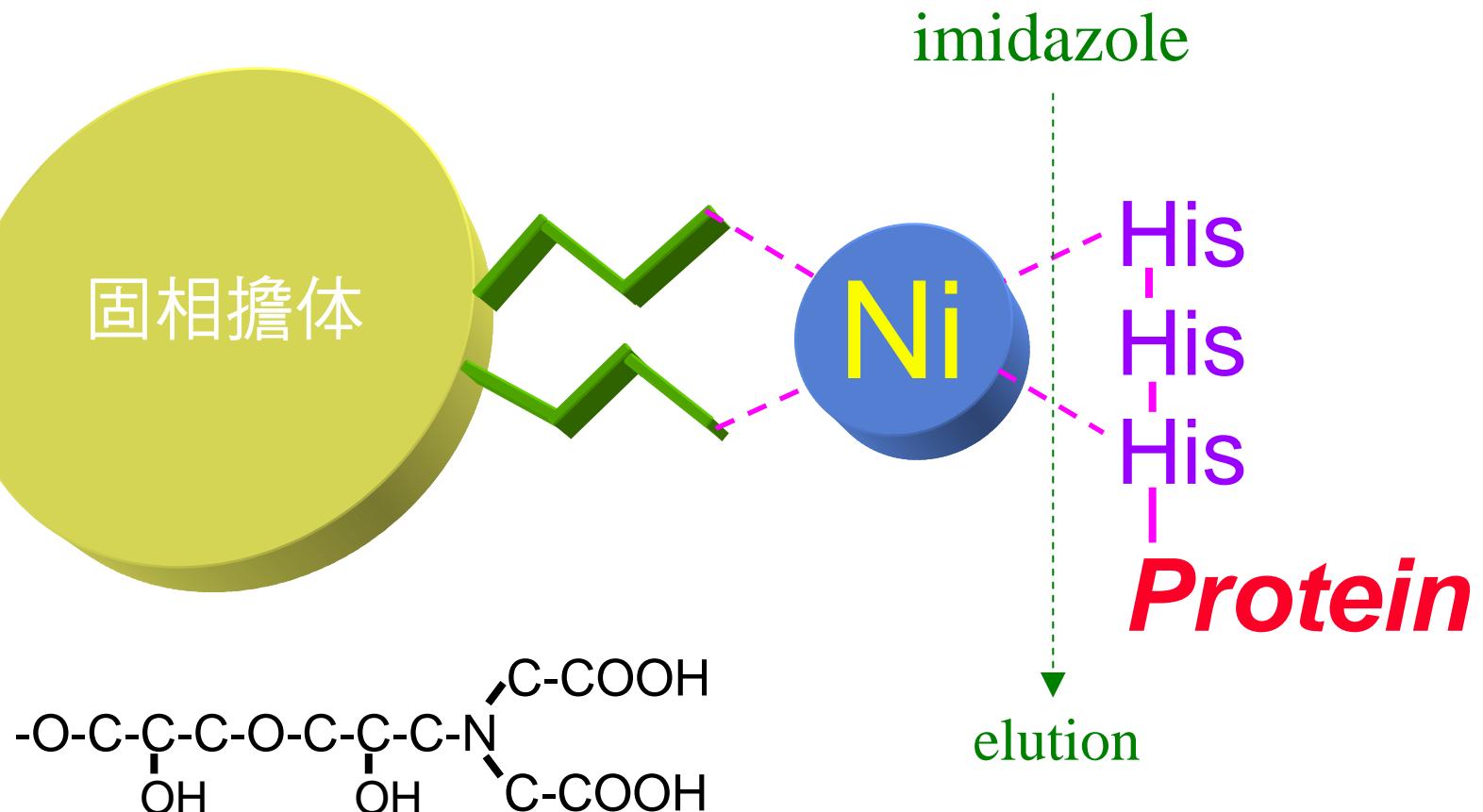
Van der waals interaction

兩分子間因構形互補所造成的  
吸引力是由凡得瓦爾力所貢獻

- (1) Hydrogen bond
- (2) Hydrophobic interaction
- (3) Electrostatic interaction
- (4) Van der waals interaction



## ■ 金屬螯合層析法：



Metal Chelate Affinity Chromatography

## ■ 組合純化步驟：



純化流程基本骨幹

硫酸銨分離

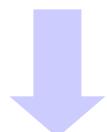
分子表面極性不同

離子交換法

分子淨電荷不同

膠體過濾法

分子量大小不同



# 蔗糖合成酵素之純化表：

抽取 100 g 水稻乳熟期穀粒

純化步驟	全蛋白質	全部活性	比活性	純化倍數	回收率
	(mg)	(U)	(U/mg)	(fold)	(%)
粗抽取液	1,070	9,672	9.0	1.0	100
魚精蛋白沈澱後 上清	800	12,555	15.7	1.7	130
硫酸銨分劃 (35-55%)	250	6,610	26.4	2.9	68
Sepharose CL-6B 膠體過濾	53	5,789	111.3	12.4	60
DEAE Sepharose 離子交換	8.6	2,960	344.2	38.2	31

