

蛋白質純化

Protein Purification



■ 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. 由那一個生长期？ When ?
- e. 如何純化此蛋白質？ How ?

■ 蛋白質純化過程有三個階段

.....

(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。

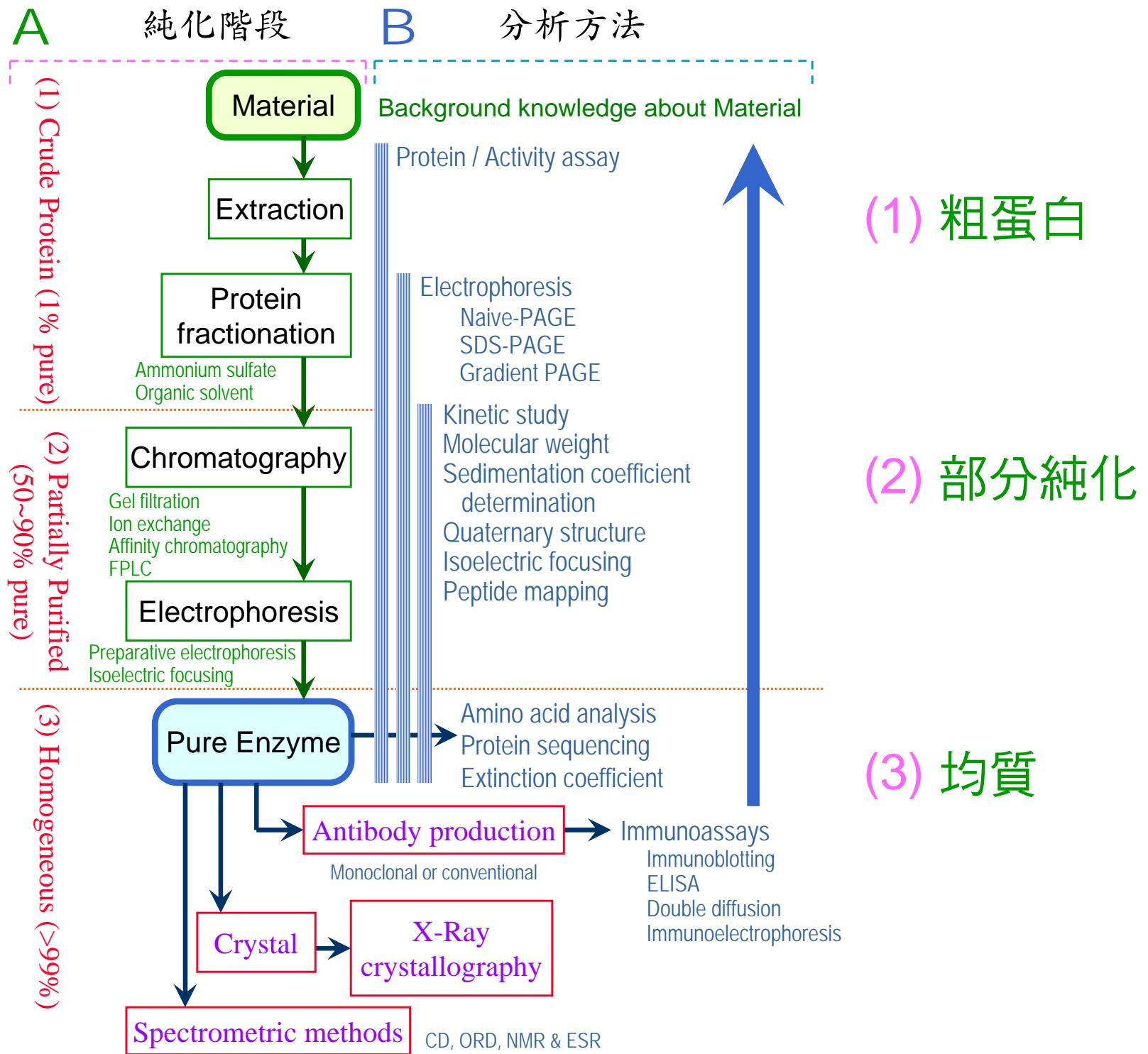
(2) 部分純化 (partially purified) :

初步的純化，使用各種管柱層析法。

(3) 均質蛋白質 (homogeneous) :

目標蛋白質的進一步精製純化，可用製備式電泳或 HPLC 等。

蛋白質純化階段及分析方法



■ 各種純化或分析方法的原理

細胞

細胞均質

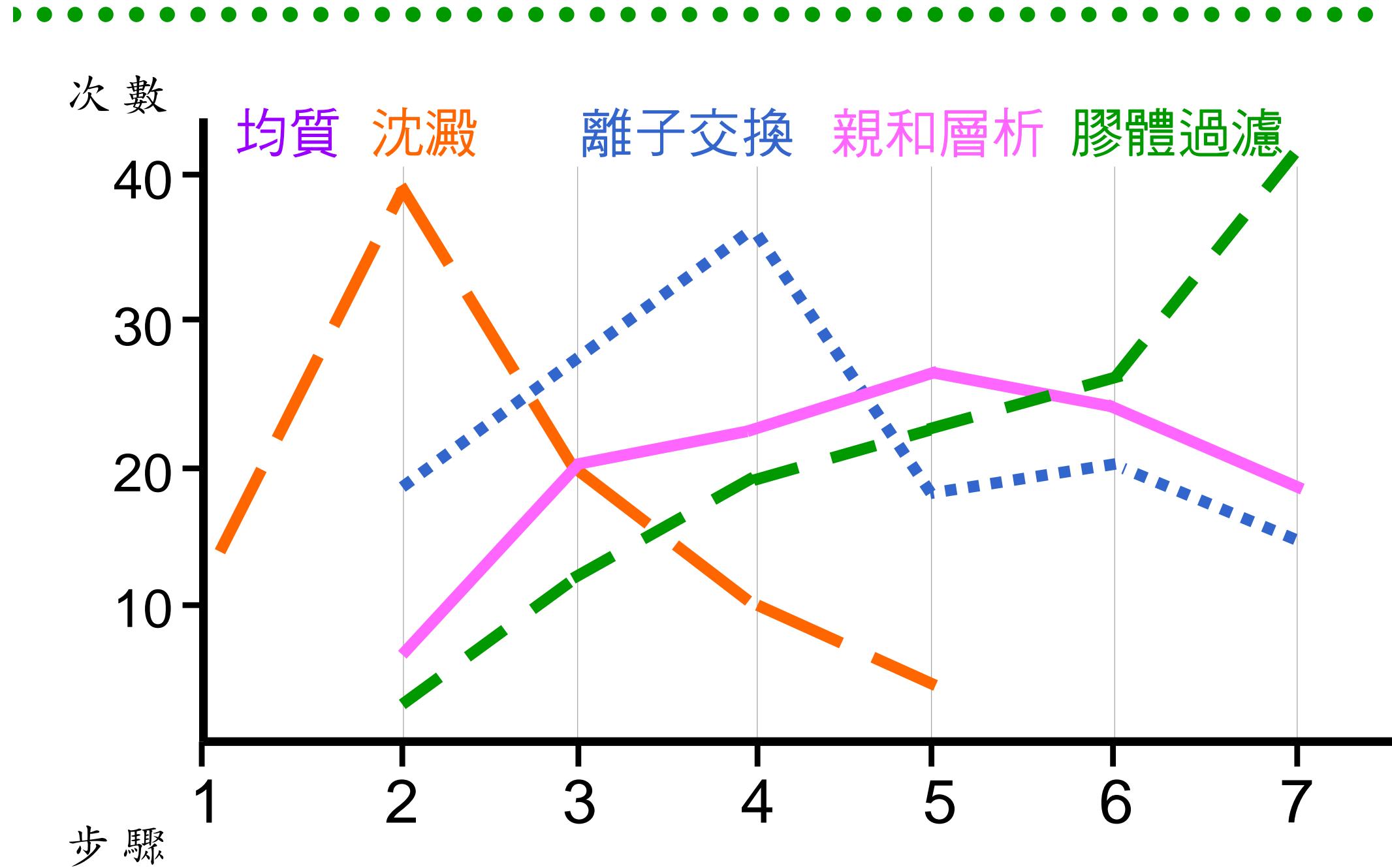
胞器分離

小分子	巨分子			細胞碎片 Cell debris
氨基酸 核苷酸	單醣 脂酸	核酸	蛋白質	多醣 (脂質)

硫酸銨 ↓ 沈澱分劃

分子大小不同	分子電荷不同	分子極性不同	親和力不同
Gel filtration, SDS-PAGE, Ultrafiltration	Ion exchange, Chromatofocusing, Disc-PAGE, Isoelectric focusing	Reverse phase chromatography, HIC, Salting-out	Affinity chromatography, Hydroxyapatite

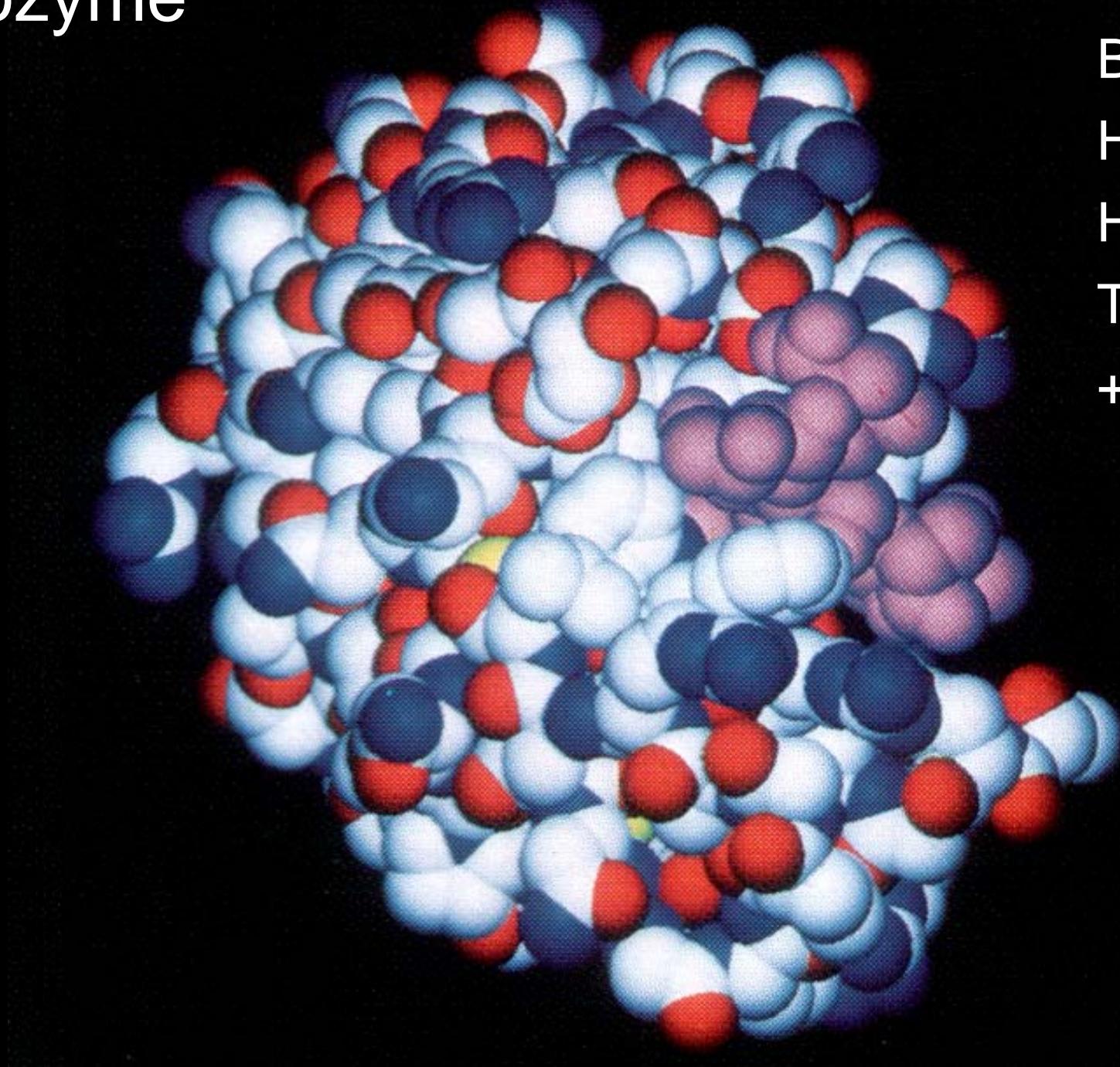
■ 各種純化方法的應用次序



蛋白質純化方法

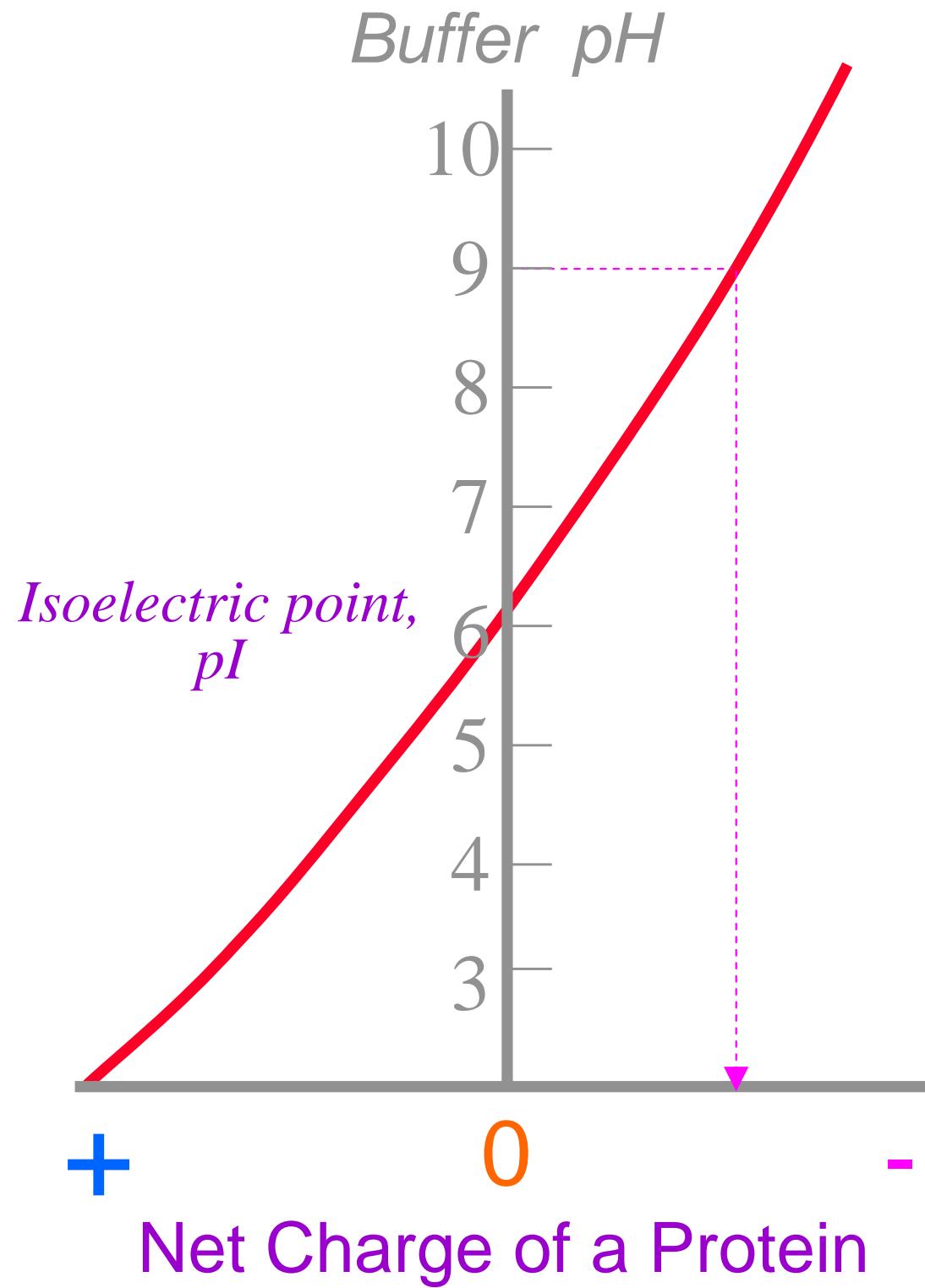
- 鹽溶鹽析 最經濟方便的純化
- 膠體過濾法 依照分子大小分離
- 離子交換法 利用分子電荷性質
- 親和層析法 最具專一性的吸著
- 純化策略 善用分子各種特性

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

.....

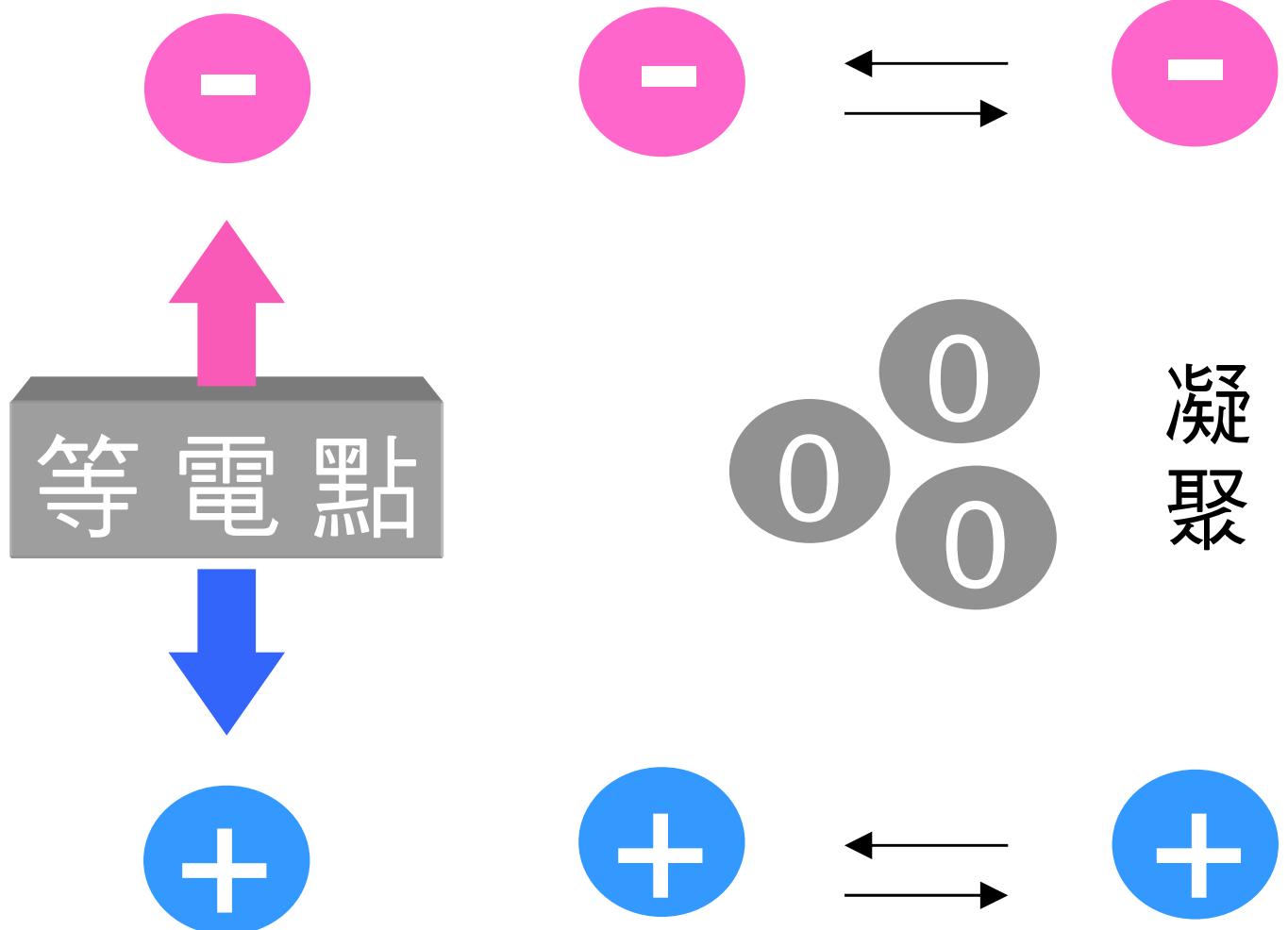
環境

$$pH = 6$$

$$pI = 5$$

環境

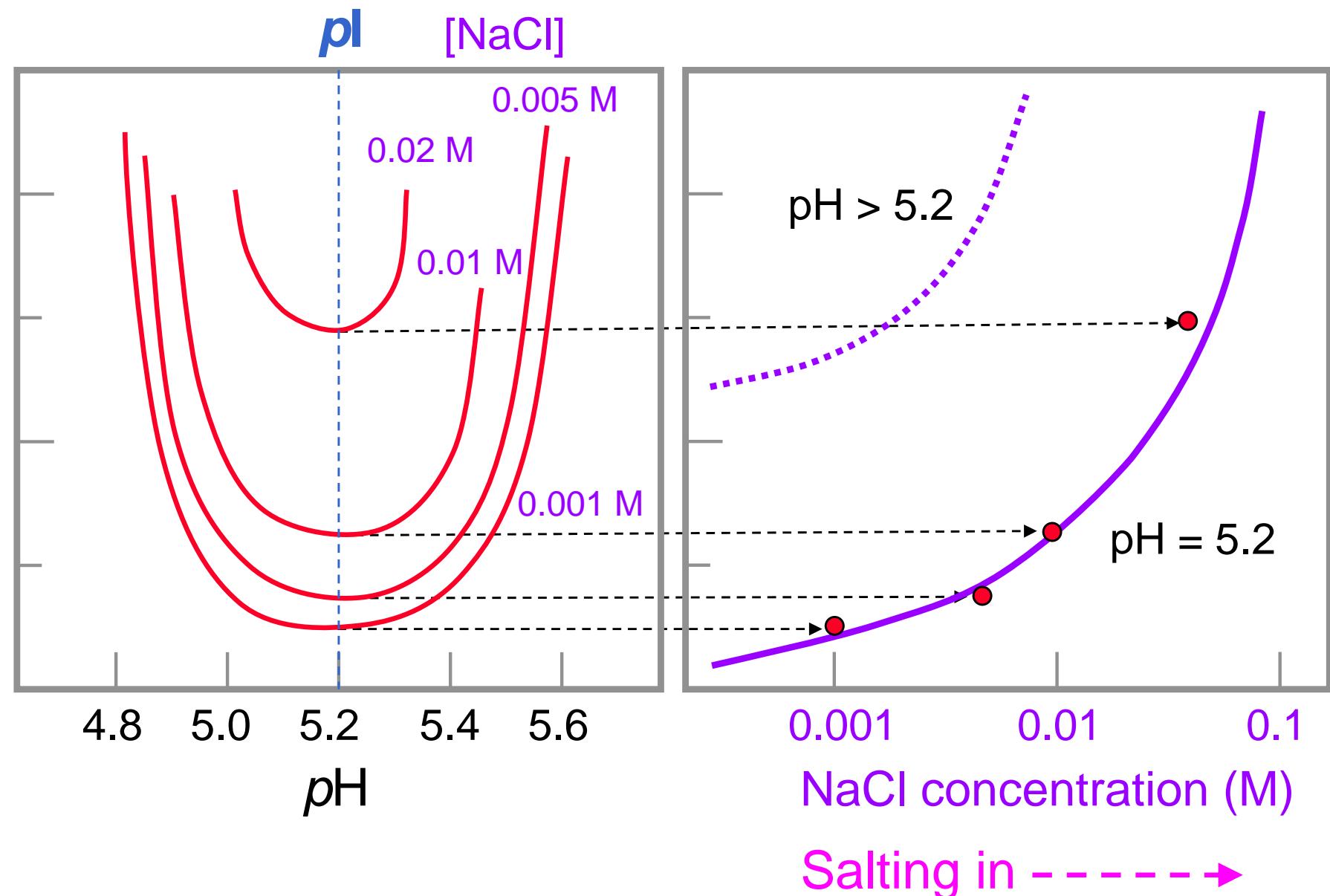
$$pH = 4$$



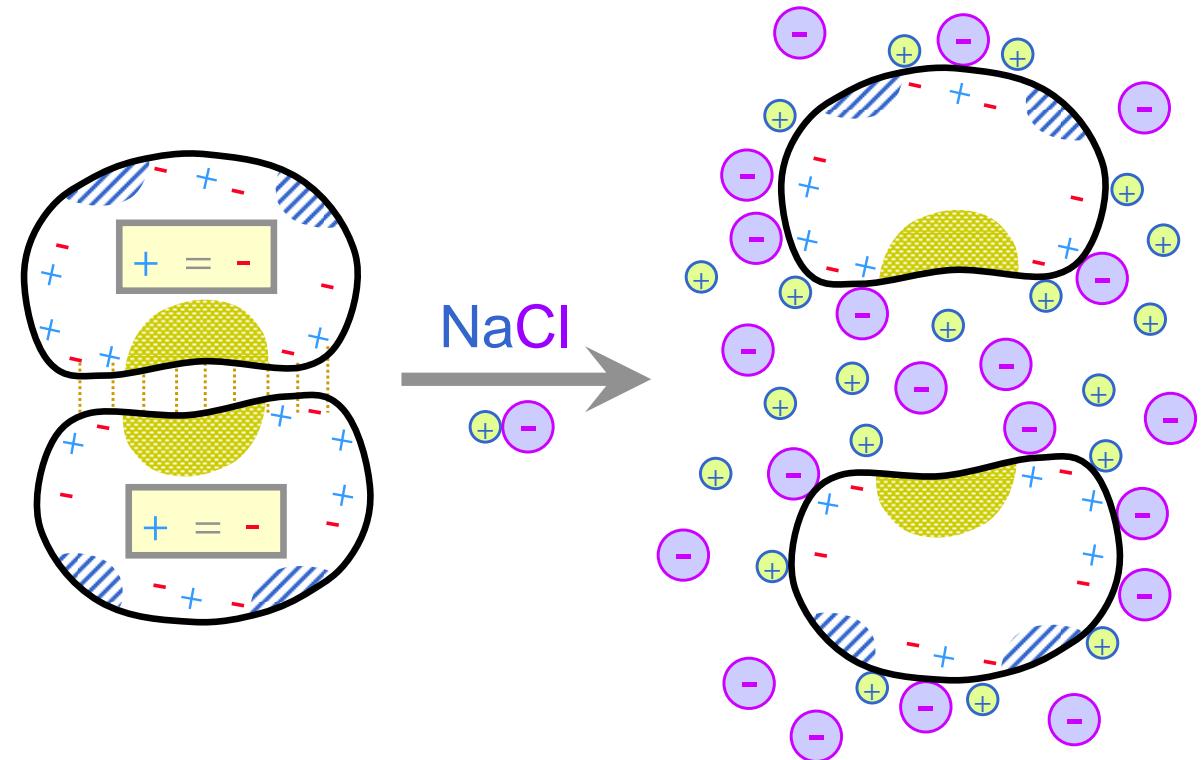
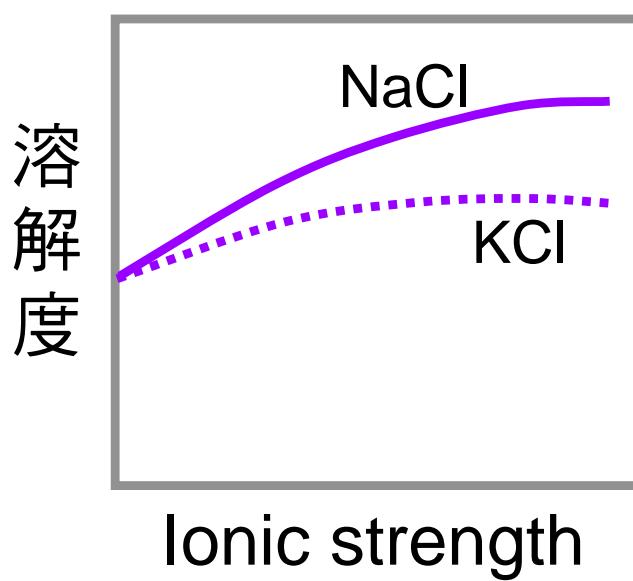
提高鹽濃度會增加蛋白質的溶解度



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

.....

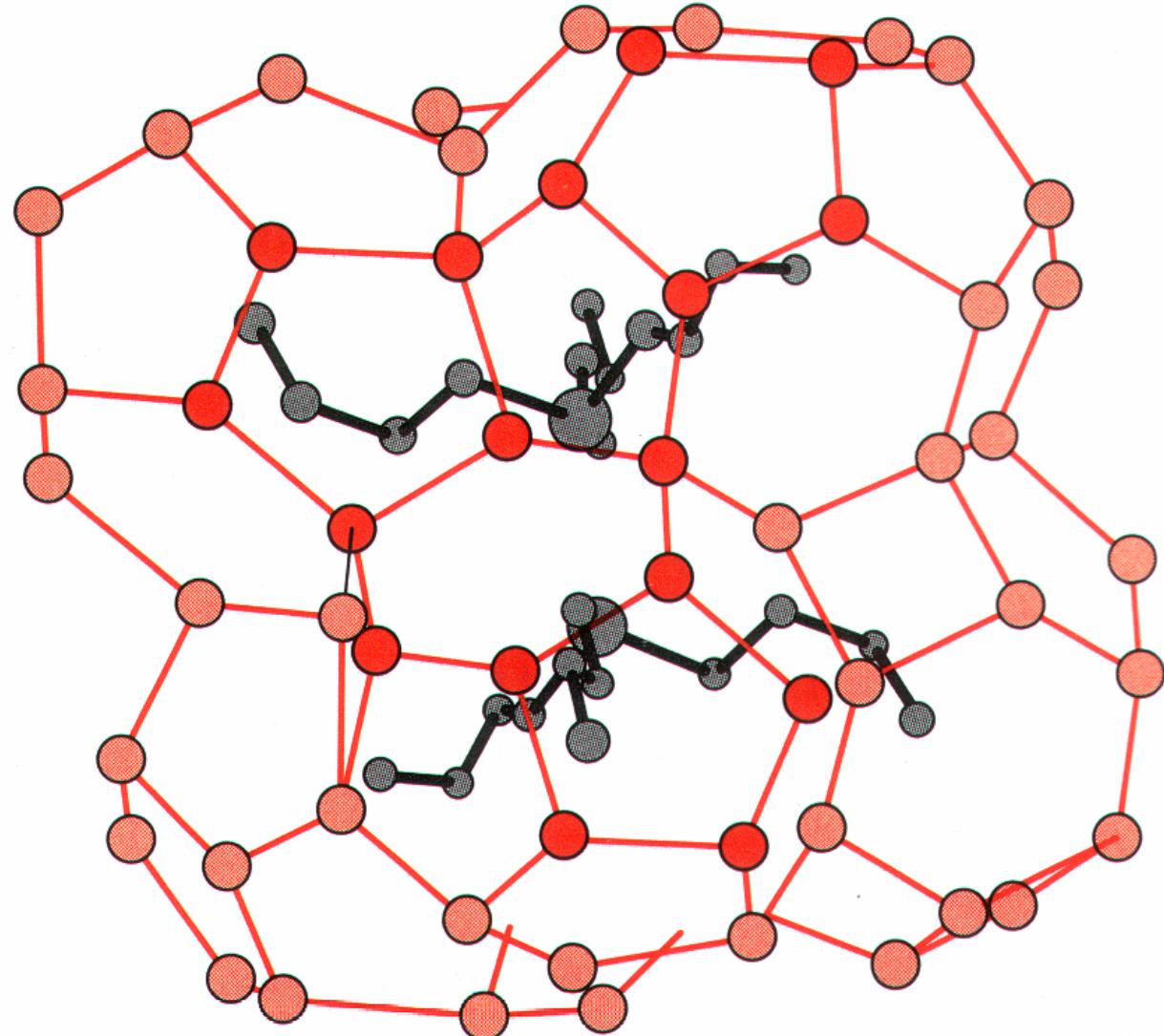
● 鹽溶 Salting-in:

加鹽使蛋白質溶入水溶液中

● 鹽析 Salting-out:

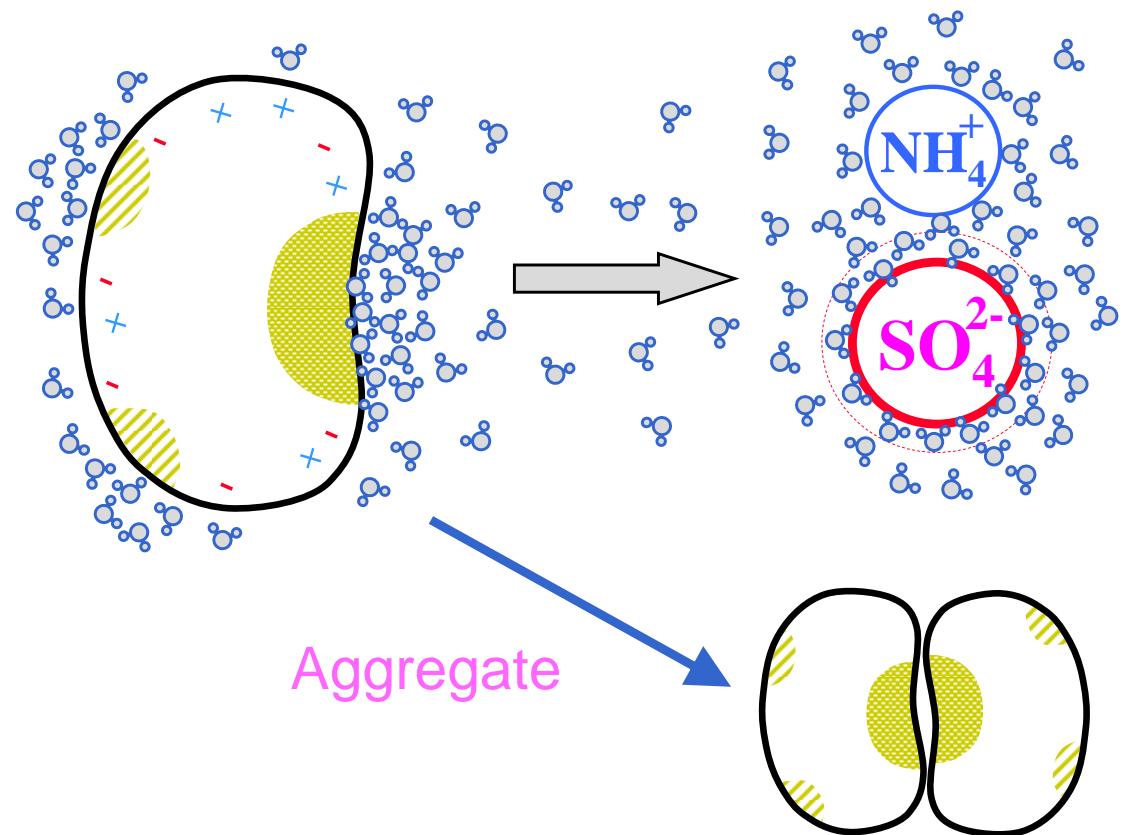
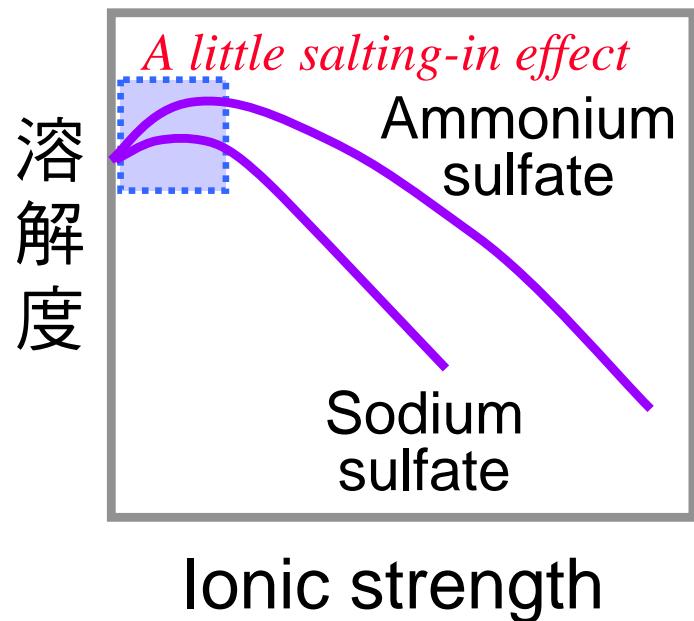
加鹽使蛋白質由水溶液中沉澱出來

■ 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

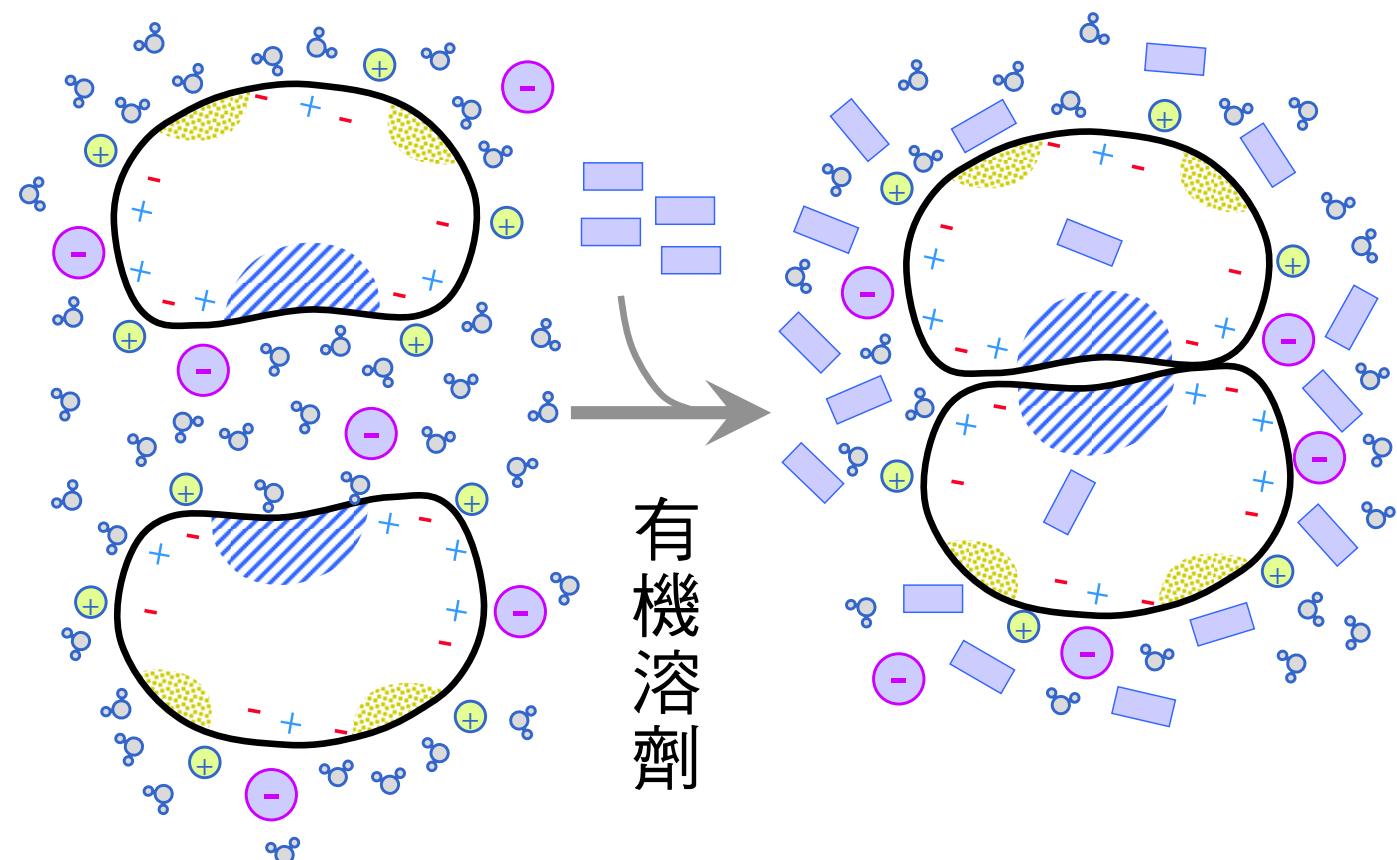
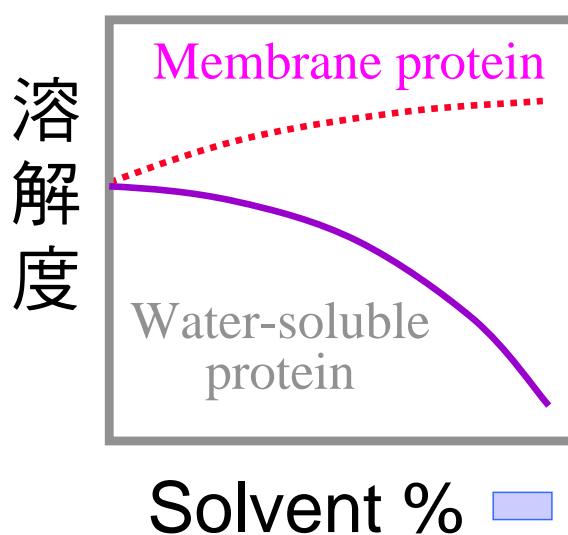


蛋白質分子表面的疏水性區域，都聚集許多水分子，當鹽類加入時，這些水分子被抽出，以便與鹽離子進行水合，暴露出來的疏水性區域互相結合，形成沈澱。



= hydrophobic

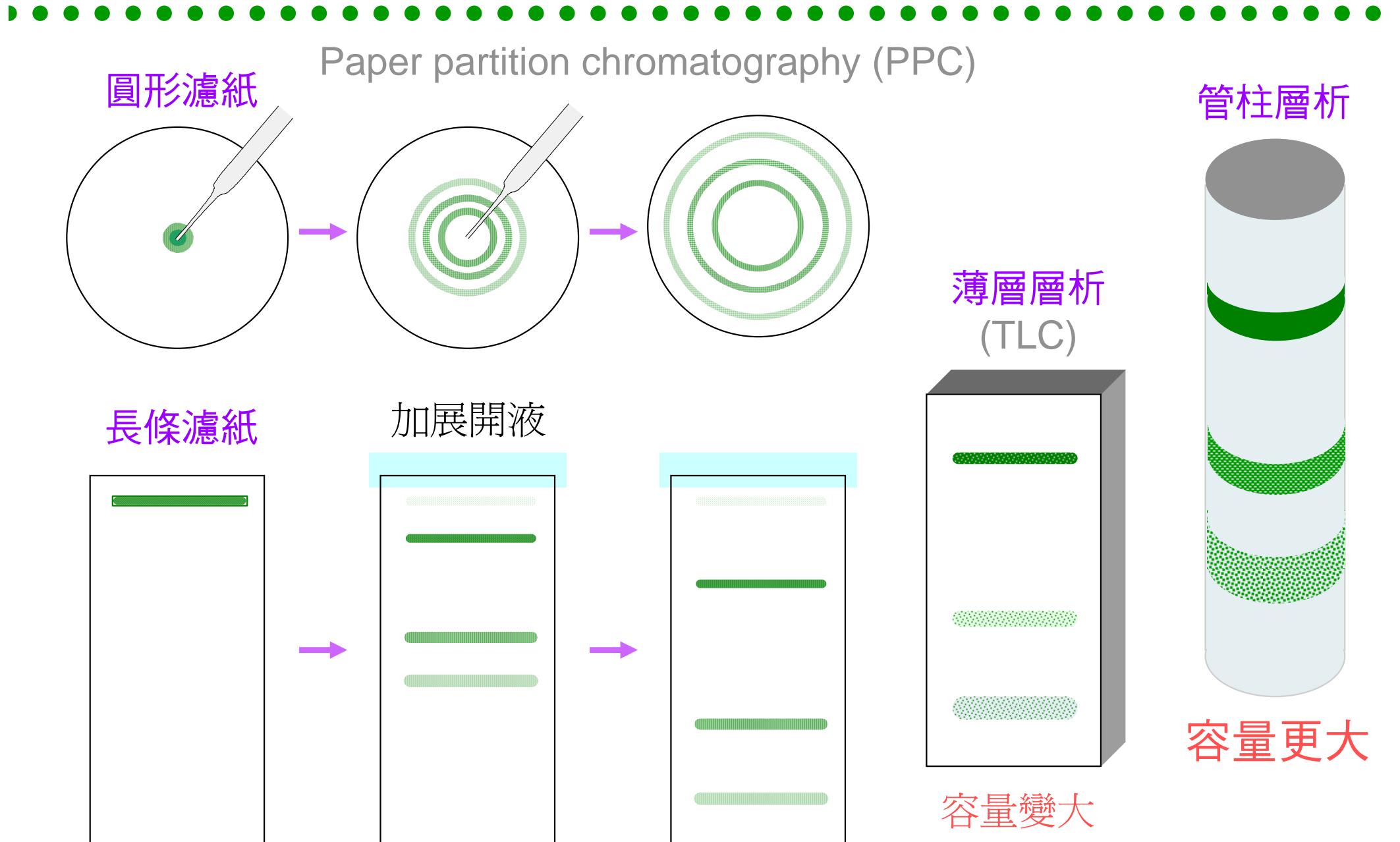
■ 有機溶劑沈澱法



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。

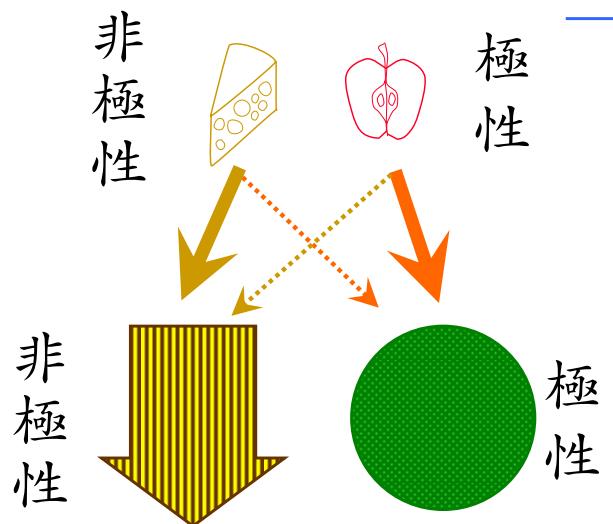
極性 → 極性

非極性 → 非極性

■ 色層分析法的基本原理

A

兩相系統



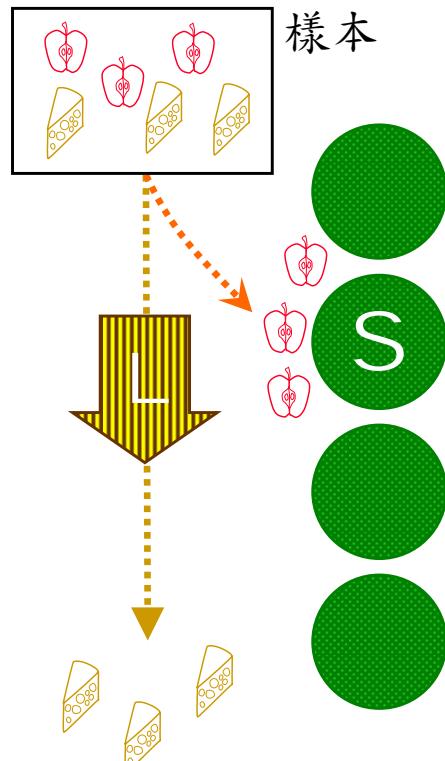
Mobile phase Stationary phase

流動相 固定相

樣本分子依其分子極性
選擇親和兩相之一

B

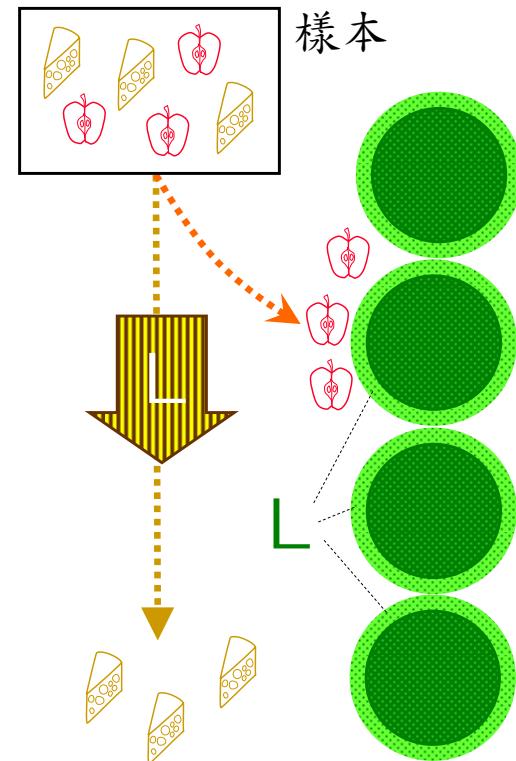
每次分離樣本
都要做一次選擇
One Plate of Separation
(理論板數)



ADSORPTION

Liquid - Solid

C



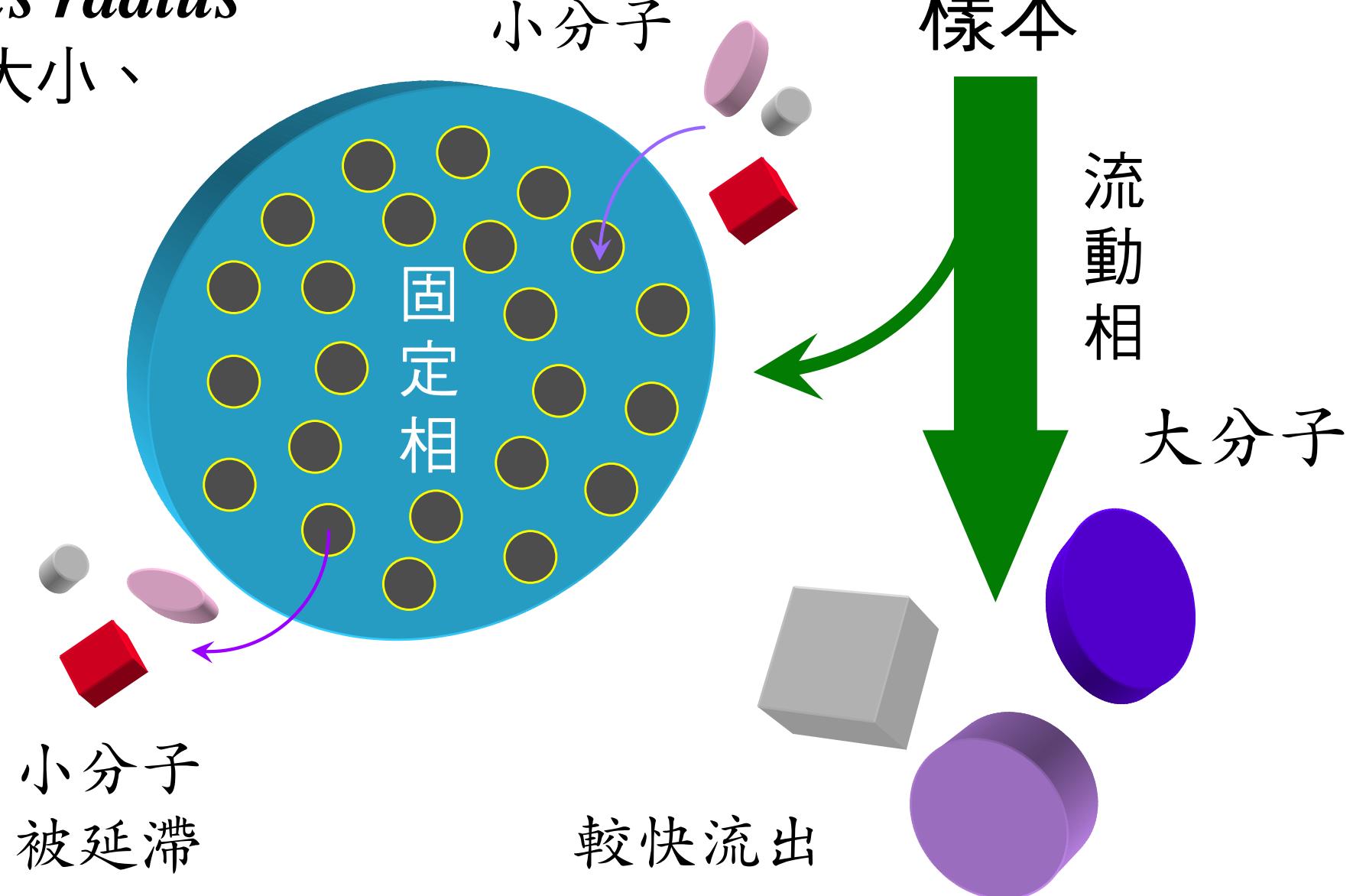
PARTITION

Liquid - Liquid

■ 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

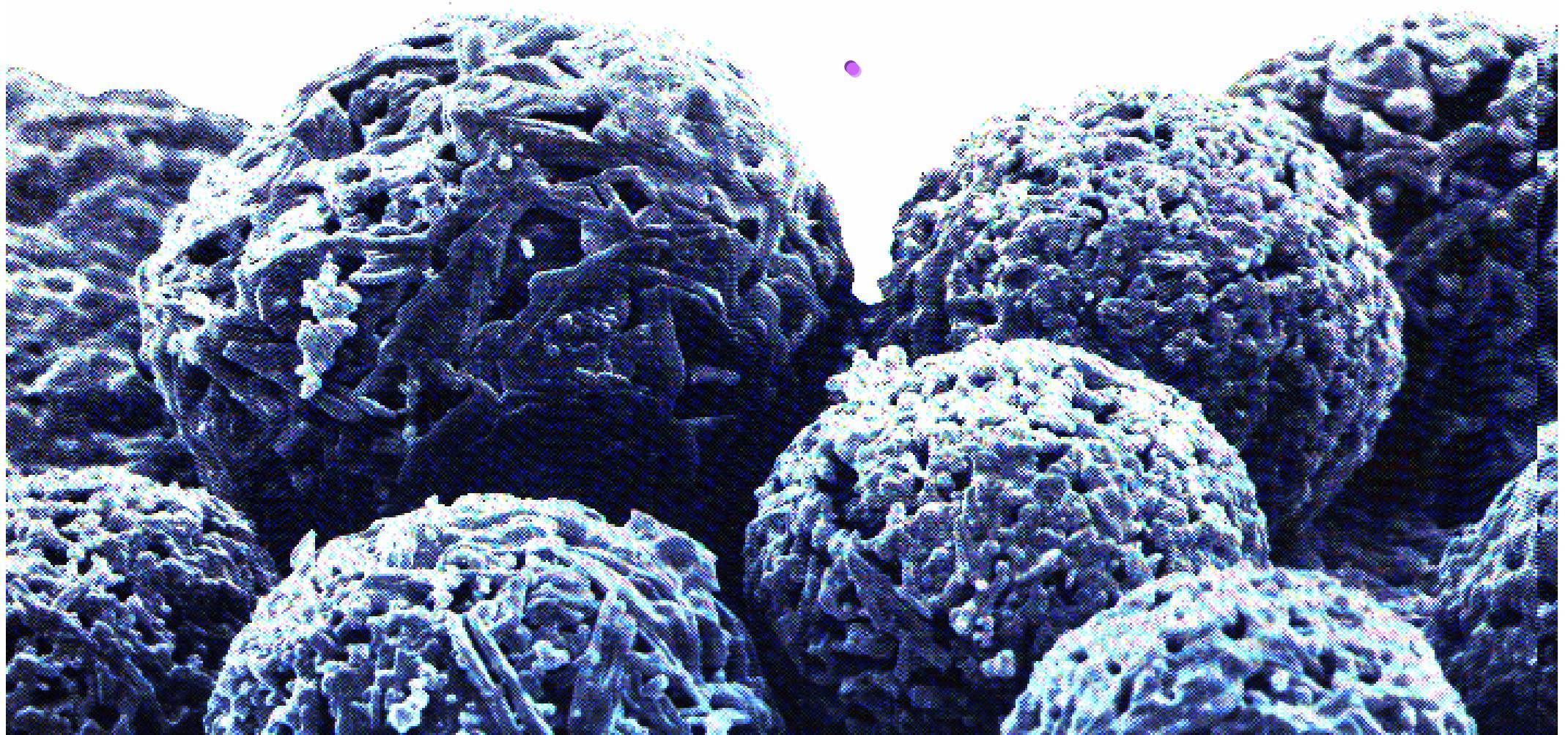
FPLC

Superose, Superdex
Mono Q, Mono S

Bio-Rad

BioGel P	acrylamide
BioGel A	agarose

■ 膠体過濾法的膠球



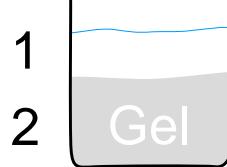
■ 膠柱的裝填方法

清洗膠體
預估體積

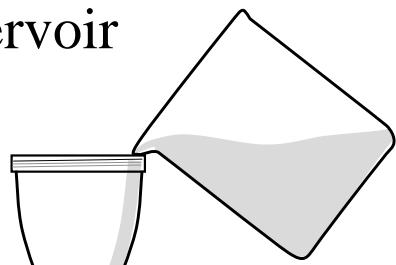


緩衝液平衡

溫度平衡
靜置膠體



加上 reservoir



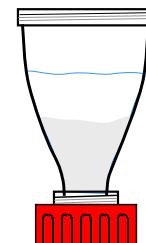
裝填膠體

檢查好管柱是否暢通

暫停流洗

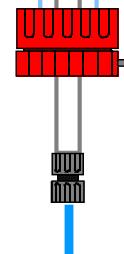


上清沈積中 已堆積

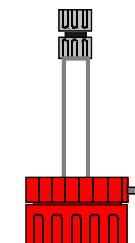


上清沈積中 已堆積

繼續流洗



加上 adaptor



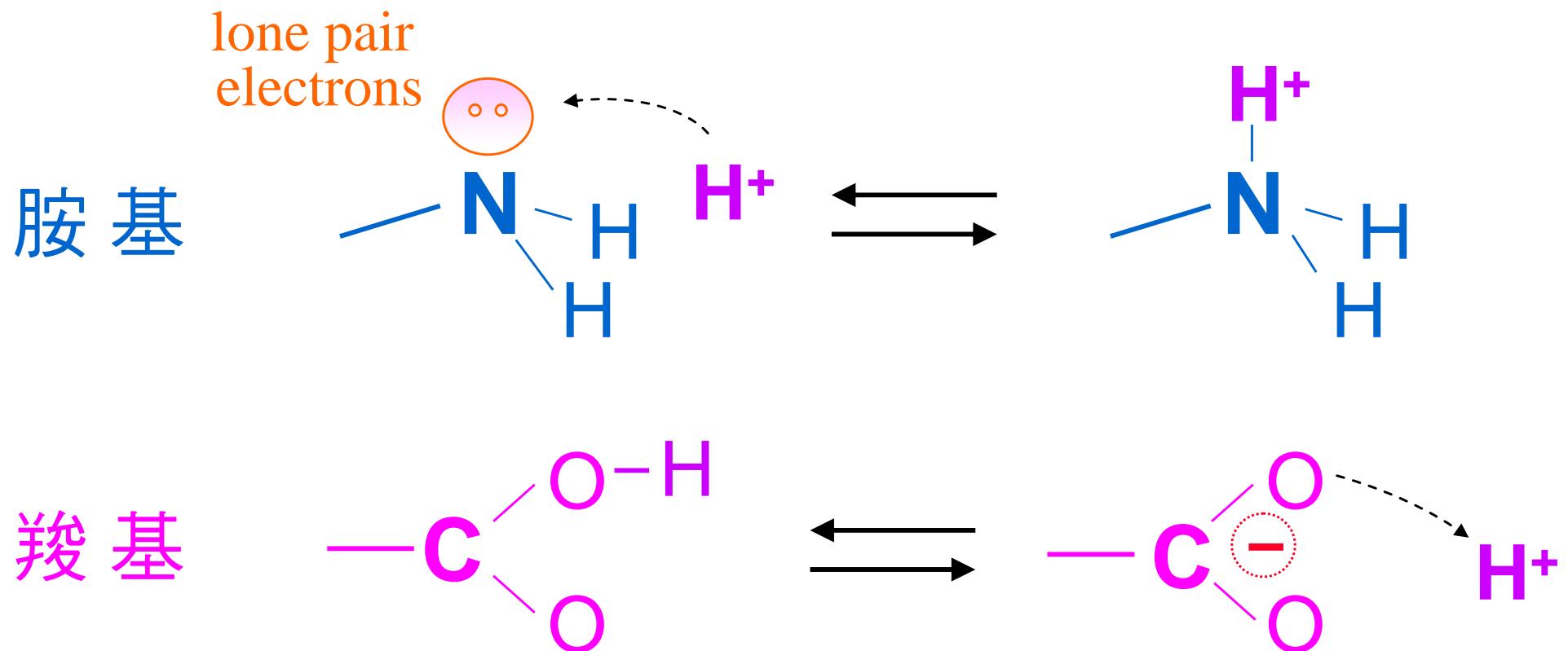
緊密堆積



■ 質子可以吸著或脫離一基團

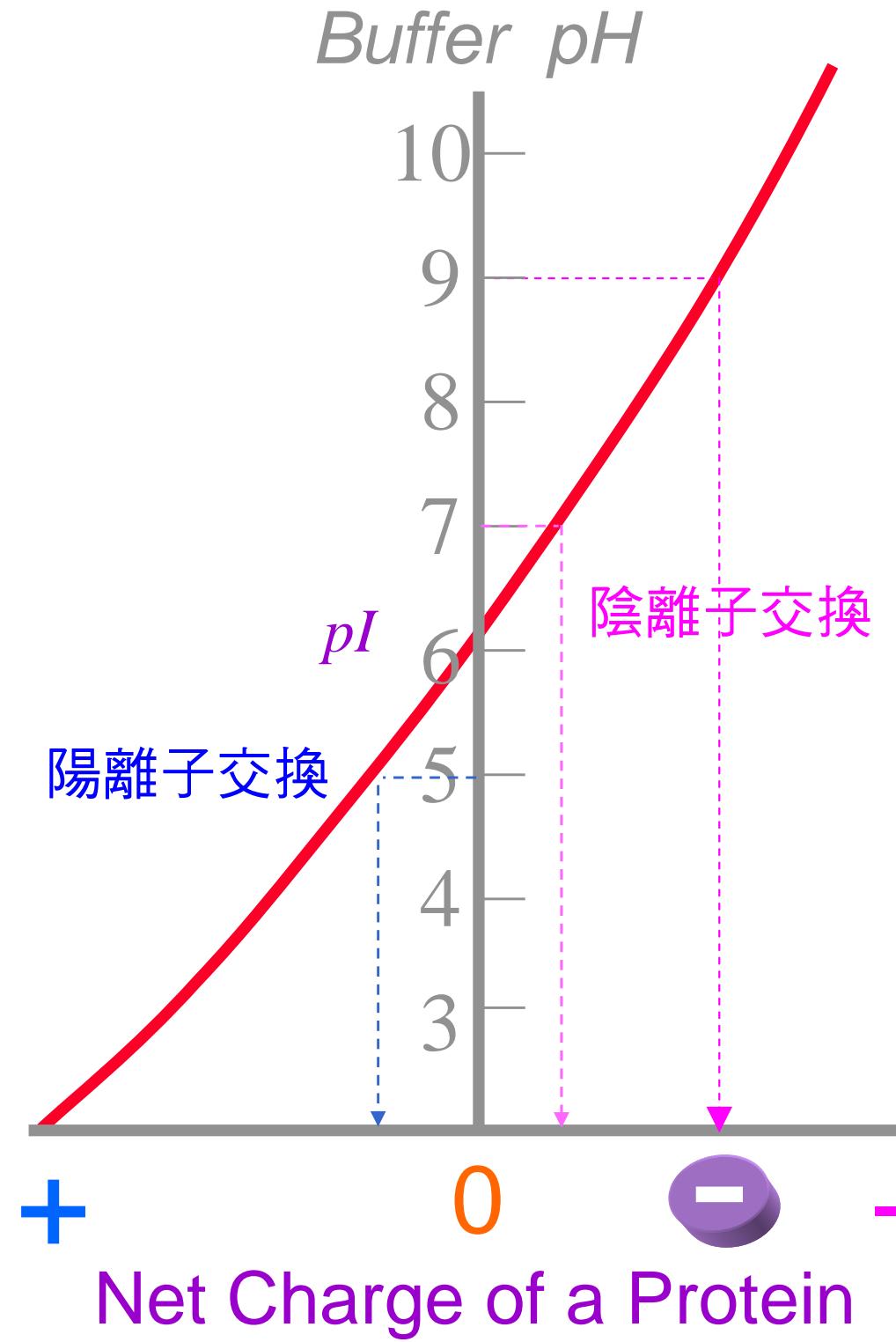
• •

Proton : 最小且最多的生物粒子，影響酸鹼度及分子帶電性質

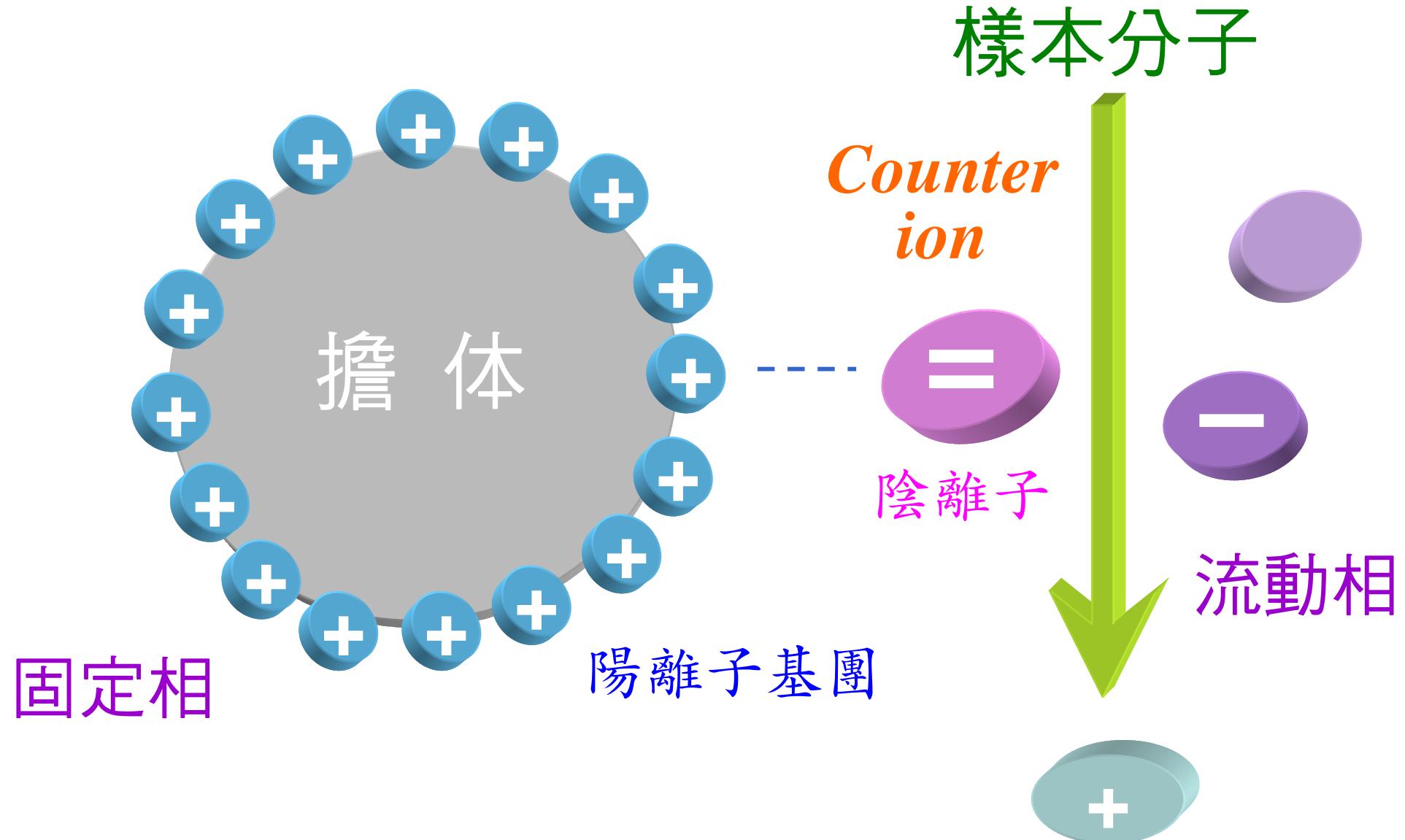




選擇離子交換介質



■ 陰離子交換法 Anion Exchange



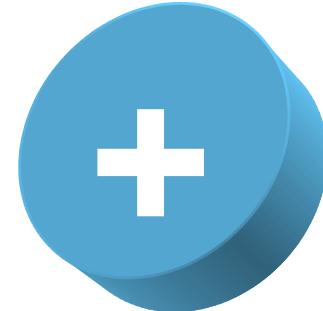
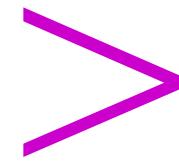
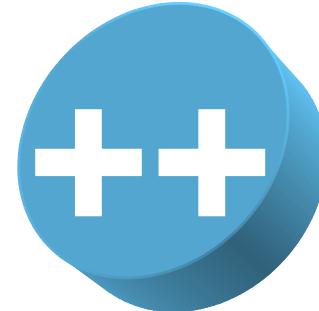
■ 各種離子交換介質

陰陽強弱分類		Resin / Polystyrene	Glycan / Cellulose = X	Mono bead
Anion Exchanger	Strong	Dowex-1 Dowex-2	$-\overset{+}{\text{NR}_3}$	TEAE-X (QAE-X)
	Weak	Dowex-3 IR-45	$-\overset{+}{\text{NHR}_2}$	DEAE-X $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\overset{+}{\text{NHR}}_2$
Cation Exchanger	Strong	Dowex-50	$-\text{SO}_3^-$	Phospho-X $-\text{PO}_4^{2-}$
	Weak	IRC-150	$-\text{COO}^-$	CM-X $-\text{OCH}_2\text{COO}^-$

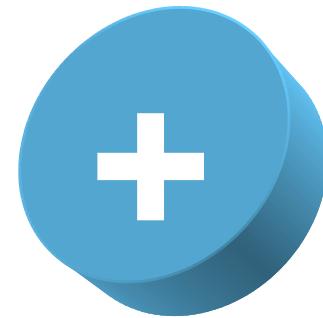
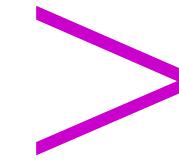
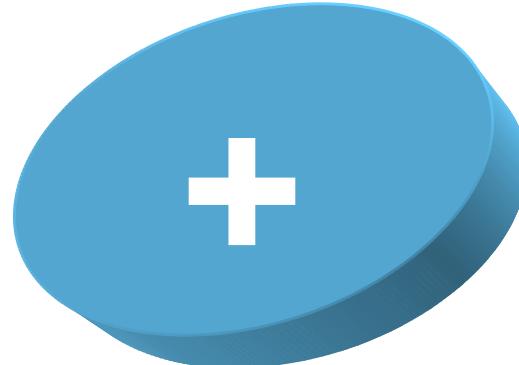
X = Sephadex, Sepharose, Sephacel or cellulose

■ 離子取代優先順序 Pecking Order

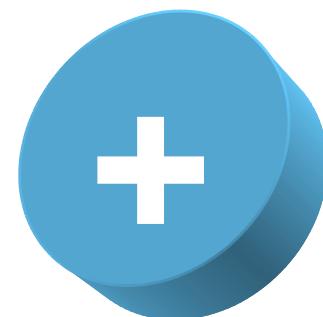
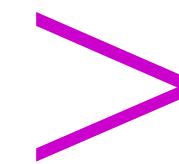
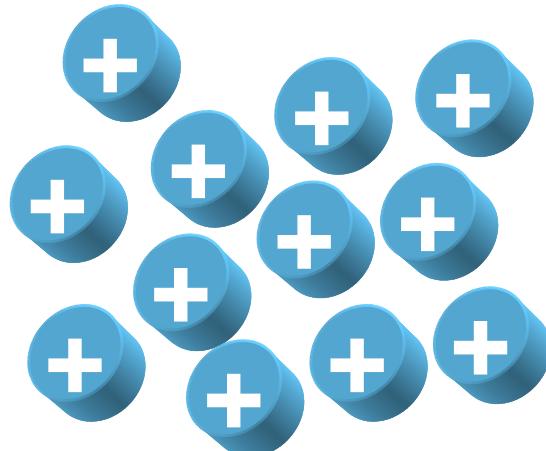
電荷高者



離子大者

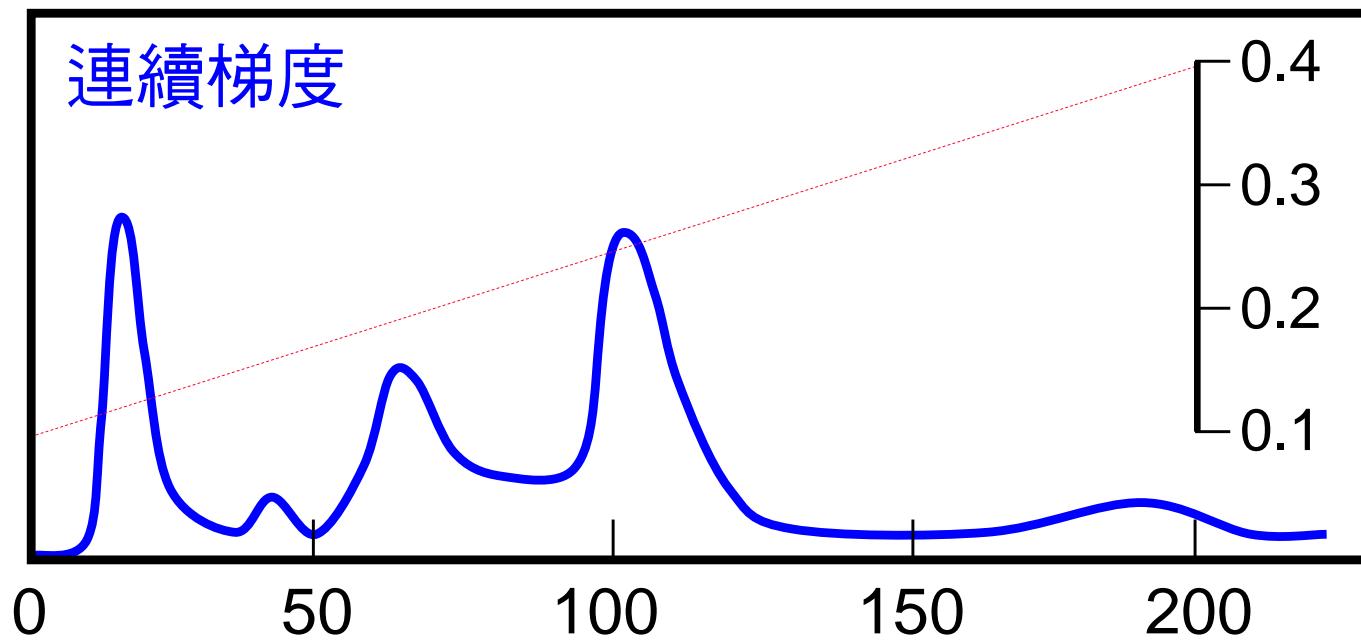


濃度大者

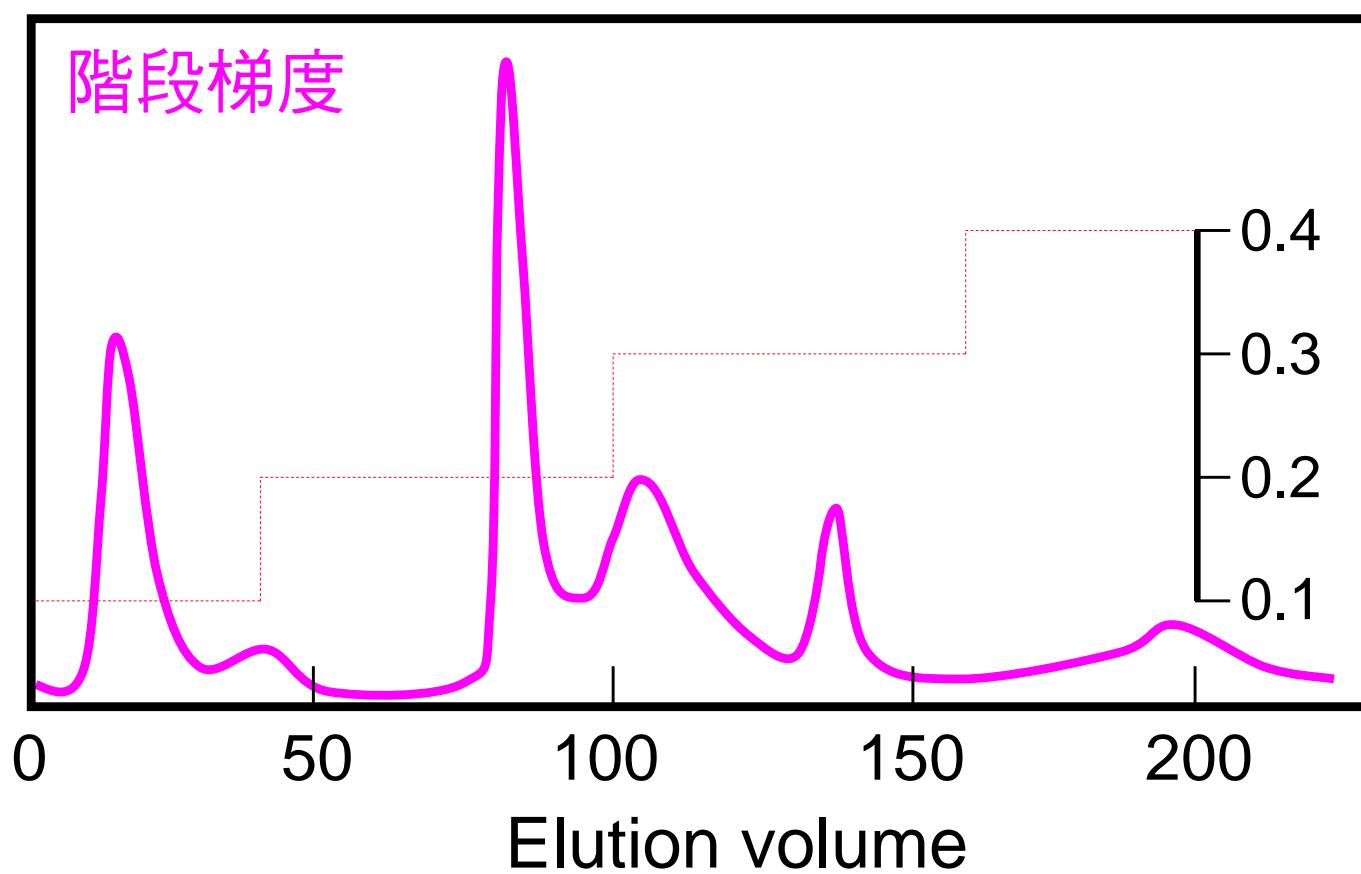


連續與階段梯度比較

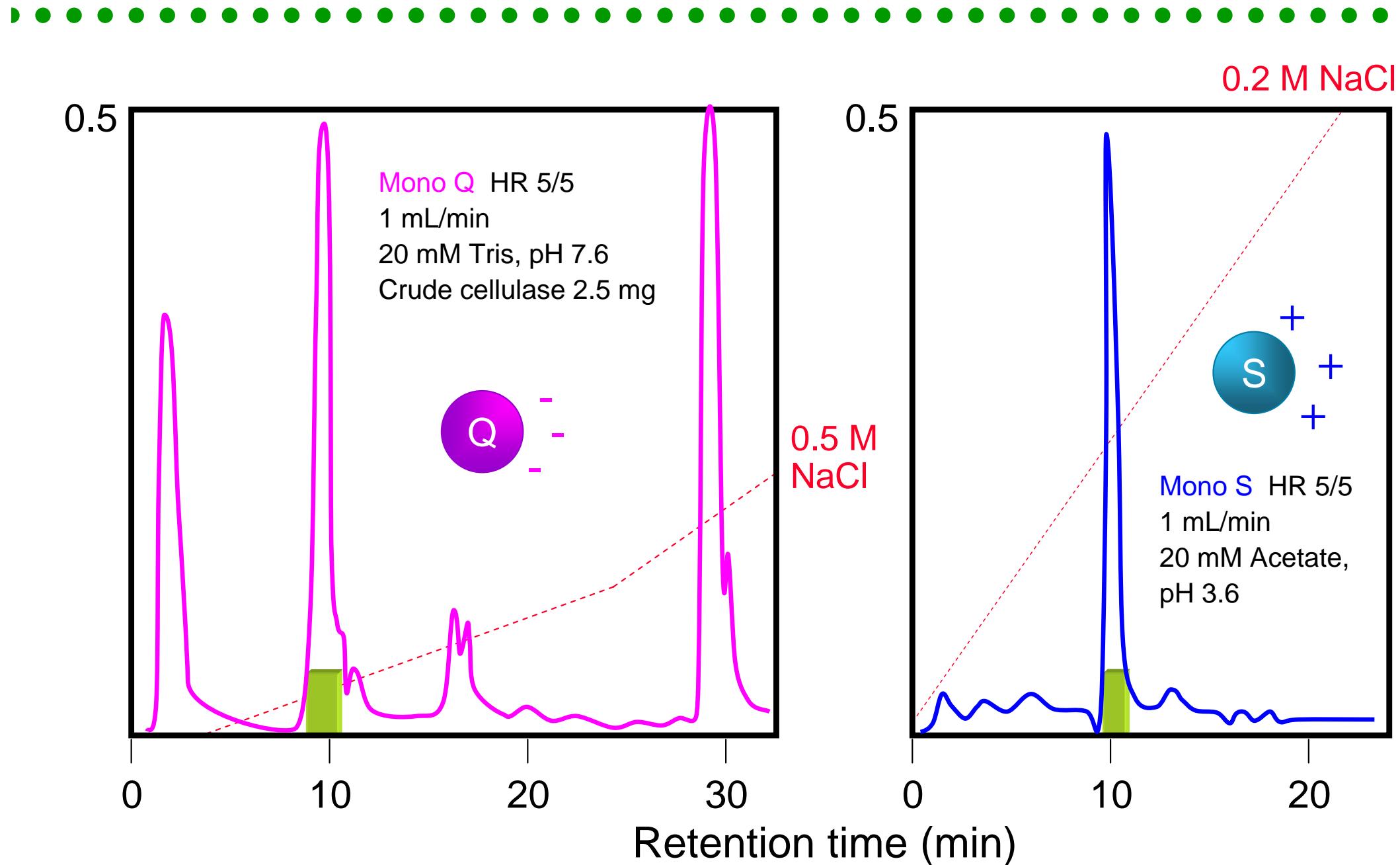
蛋白質濃度



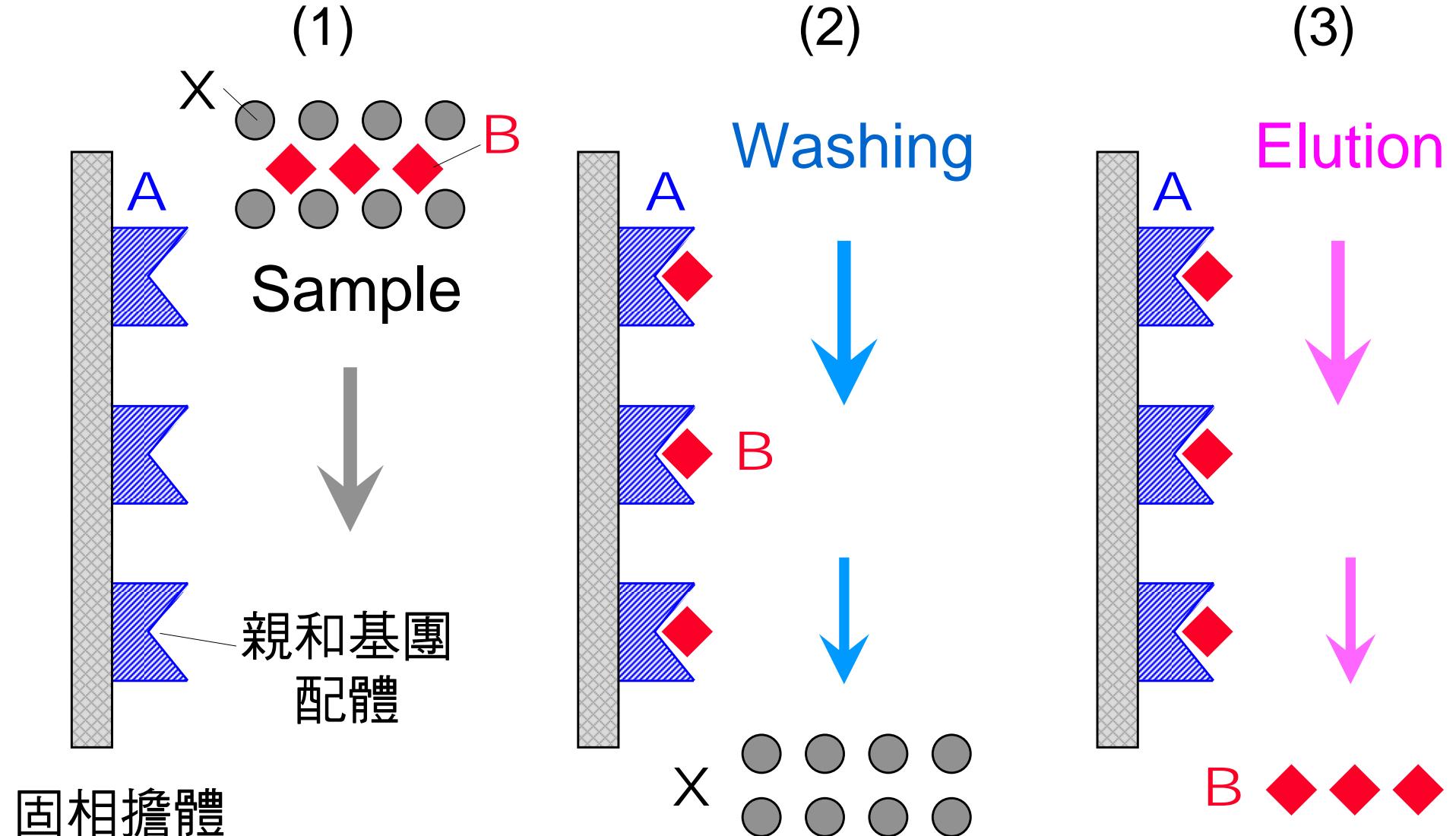
階段梯度



■ 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

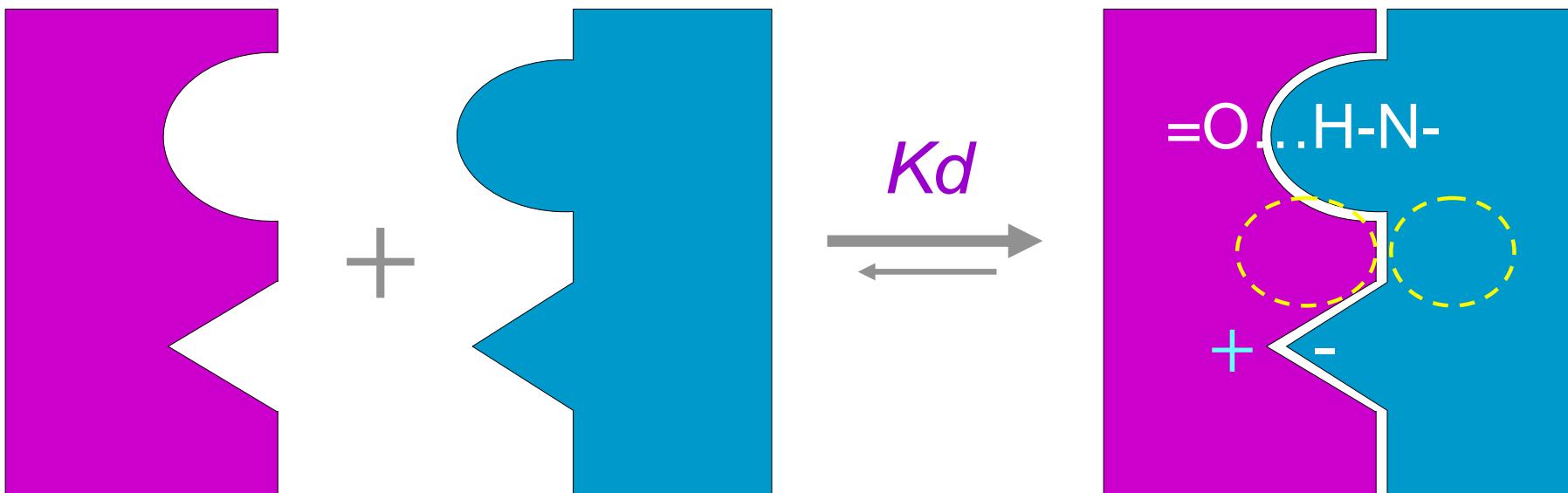
.....

I. Conformational Match: II. Interaction Forces:

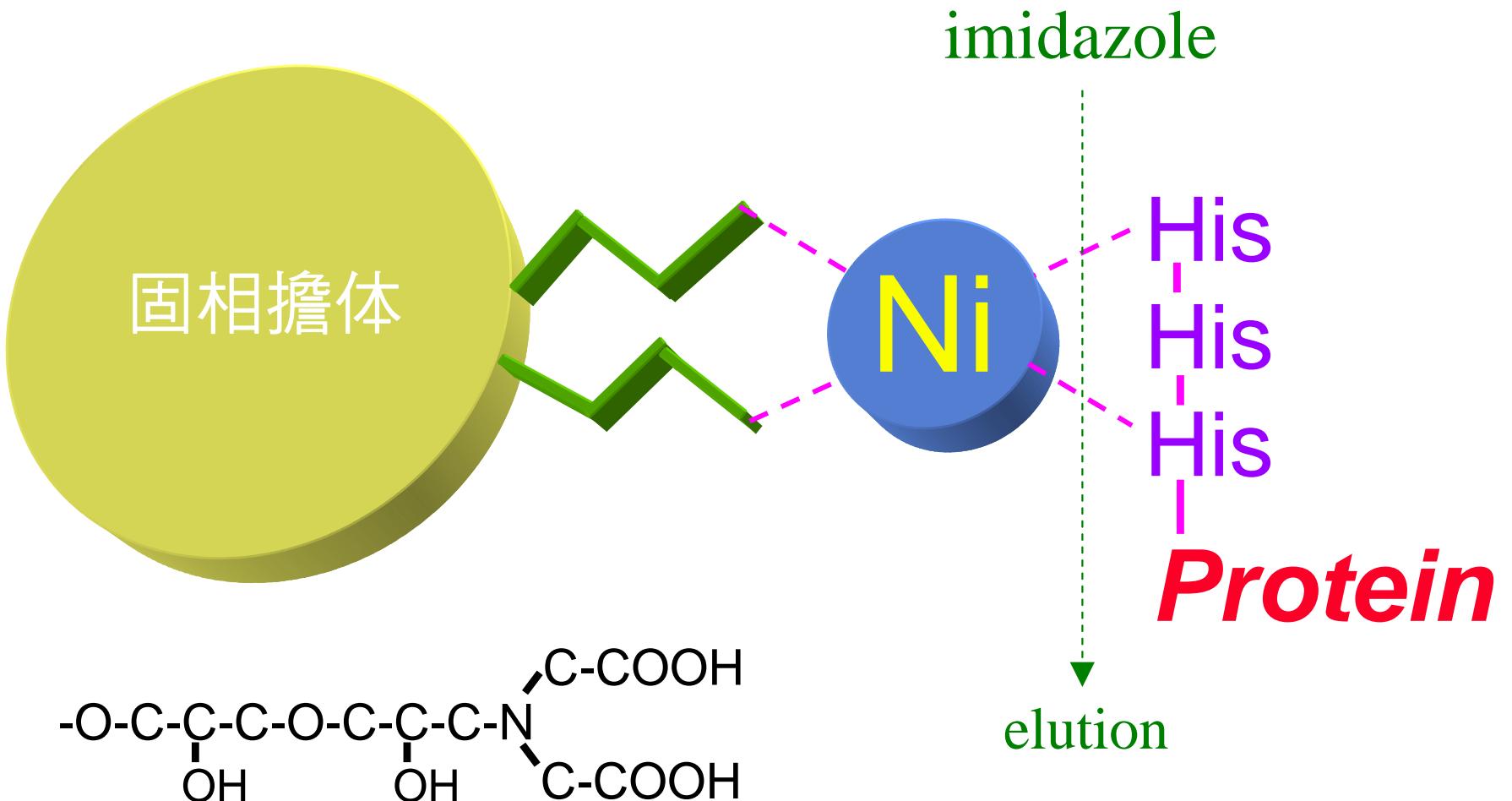
Van der waals interaction

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



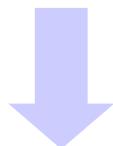
Metal Chelate Affinity Chromatography

■ 組合純化步驟

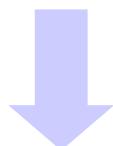
.....

純化流程基本骨幹

硫酸銨分劃



離子交換法



膠體過濾法



分子表面極性不同

分子淨電荷不同

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 (mg)	全部活性 (U)	比活性 (U/mg)	純化倍數 (fold)	回收率 (%)
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
硫酸銨分離 (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

