

## 第七章 其他層析法

### 壹、金屬螯合層析法

(壹)許多蛋白質或酵素分子上帶有金屬離子，則此蛋白質可能會吸附該金屬。

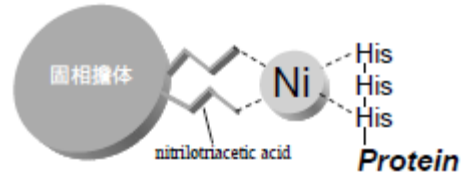


圖 3.10 一種金屬螯合層析法

(貳)若把某金屬固定到固相擔體上，則此擔體將會專一性地吸附需要此金屬的蛋白質。

(參)基因操作時，經常在表現蛋白質的端點，加上一段含有六個 His 的片段；則此表現蛋白質，可以吸附到含有鎳的吸著劑上，可以 imidazole 流洗出來 (圖 3.10)。

(肆) 這種擔體上結合有某些可與金屬產生配位鍵的基團 (如 nitrotriacetic acid)，這些基團與金屬離子結合 (如鎳離子) 後，即可成為親和吸著劑。

### 貳、疏水性層析法

(壹)作用機制：

- 一、 蛋白質分子表面有部份疏水性區域，若在一極性很強的環境中，則會被吸附在非極性的固定相擔體上；若環境的極性降低，則可被溶離出來，即為 疏水性層析法 (hydrophobic interaction chromatography, HIC)。
- 二、 HIC 沒有親和層析法那麼強的專一性，較似離子交換法，但所根據的作用力，則是非極性基團間的疏水性引力。

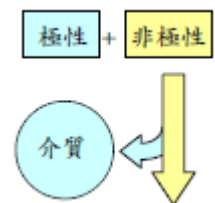
(貳) 介質種類：

- 一、 Pharmacia 有 Phenyl-及 Octyl-Sepharose 兩種介質，後者疏水性較強。
- 二、 通常樣本溶在 1 M 硫酸銨的緩衝液中通入膠體管柱；吸附上去的蛋白質，可提高緩衝液的疏水性來溶離，例如可用 ethylene glycol 的梯度溶離。

(參)反相 (reverse phase) 層析法：

一、 是 HIC 及離子交換法的綜合體，但屬一種 partition 層析；可使用離子交換 (或類似 HIC) 的介質。

二、 混合極性及非極性溶液為流動相，當流動相通入介質後，介質表面可固定其中的極性溶液 (若使用 HIC 介質則固定非極性者)，樣本分子會在此二相中進行 partition 分離。



三、 因固定相及流動相的極性剛好相反，故名 reverse phase。請參考圖 3.11。

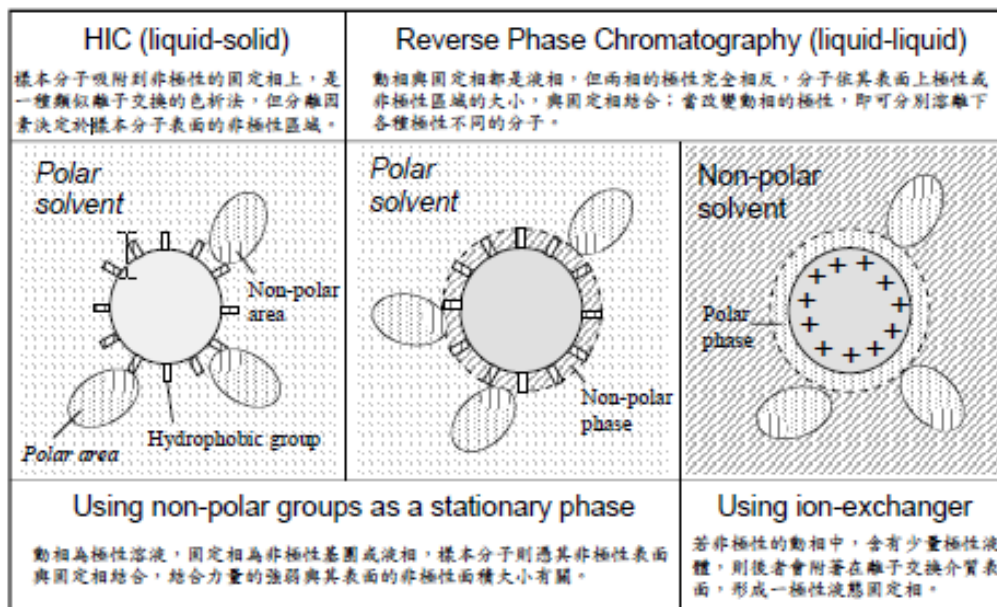


圖 3.11 疏水性及反相層析法原理

#### 肆、液相分配

##### (壹)作用機制：

- 一、在分析化學的純化方法中，使用分液漏斗在兩個液相間進行 partitioning 者，多為有機小分子；因所用液相多為有機溶劑，蛋白質不易溶於其中。
- 二、若在水溶液中加入不同的親水性聚合物，造成密度的差異，則兩個水溶液可成為兩相。依蛋白質對此兩相之親和度不同，可在此二相間進行分配 (partitioning) 而達分離效果。
- 三、可用的親水性聚合物有 polyethylene glycol (PEG), dextran, Ficoll 等。

##### (貳)親和性分配法：

若在上述的聚合物分子上接有親和性基團，以吸引專一性的目標蛋白質，則稱為 親和性分配 (affinity partitioning)。

#### 伍、HPLC 及 FPLC

HPLC 為高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography) 之意；也有說是 high pressure，因為要使用高壓推動溶離液，以加速層析過程。 FPLC 則不用高壓，但流洗速度也很快 (fast performance)，是因為所用的介質通透性極高之故。

##### (壹) 解析力增加：

通常可降低介質的 粒子大小 以增加層析法的解析力，但是粒子太小會造成流率不佳，反而使解析度下降。 HPLC 是使用 silica 或樹脂等耐壓介質，以極細的粒子 (大約 10 μm)，在高壓下緊密裝填而成。使用時要在高壓下進行，因此速度比較快，通常在一小時左右可完成。

##### (貳) 使用方式廣泛：

較早 HPLC 都用於 adsorption 型式的層析法，例如以離子交換分離各種胺基酸等小分子。近

來由於介質材料的發展，各種應用在大分子的液相層析法，均可 HPLC 的方式來進行；不但加快分析速度，也使解析度提高很多。除了上述的離子交換法外，還可用在膠體過濾法、逆相層析法或親和層析法；HPLC 及 FPLC 系統，將來有可能取代傳統的低壓慢速液相層析法。

#### (參) FPLC 系統：

為 Pharmacia 所發展的系統，可以不用很高的壓力，在一小時內完成分離；而其容量更大於 HPLC，可用在製備式純化上（樣本量可達 500 mg）。

#### (肆) Fractogel TSK：

為 Merck 所發展的介質，是一種介於傳統層析法與 HPLC 之間的層析介質，其材質為半固體的合成聚乙烯球體（或其衍生物），因構造堅固，故流率非常好，操作時間可縮短為三分之一或更短。與傳統介質一樣，可應用在膠體過濾、離子交換及親和層析等方法上，在工業化大規模操作尤其適用。

#### 陸、其它純化或分離方法 133

要大量純化酵素時，通常前面的步驟還是要使用傳統層析方法，再加上 HPLC 或 FPLC 則可以得到更純的均質蛋白質；製備式電泳及超高速離心法，也可以增加純度，但處理量較少；而超微薄膜過濾法並非純化步驟，但在純化的各階段過程中，可濃縮蛋白質並除去小分子。

#### (壹) 製備式電泳

製備式電泳通常以不含 SDS 的原態 disc-PAGE 進行，以便回收具有活性的蛋白質；蛋白質樣本要先經過部分純化，否則效果不佳，並先以分析式小電泳確定所要色帶的位置。製備式電泳的詳細操作方法，請見 B3 酵素操作方法 2.4 節。

##### 一、. 電泳用具：

商品的製備式電泳器具繁多，都相當複雜昂貴；但使用一般 8×16 cm 大小的垂直平板電泳，利用 3 mm 厚的間隔條即可進行；量小時用迷你電泳亦足夠使用。

##### 二、. 注意事項：

(一). 鑄膠：分離膠體只佔全高度一半，聚焦膠體佔四分之一，則樣本可佔其餘的四分之一（以上述大小膠體而言約有 15 mL）；不用樣本齒模，只跑一種樣本。

(二). 預跑：最好在樣本加入前，先預跑約 20 min，以除去 APS 的影響。

(三) 電泳：可在冷房進行，條件大略同一般電泳，勿使膠體過熱，勿跑太快。

(四) 定位蛋白質：方法很多，量多時可以 300 nm 波長紫外光照射，切出所呈現的色帶；否則要先切一小條膠體染色，再比對位置切出色帶。

(五) 電泳溶離：收集膠体内的蛋白質，這一步會損失不少蛋白質，要特別小心。

(貳) 超高速離心法

一. 沉降係數：

蛋白質分子在離心時，其分子量、分子密度、組成、形狀等，均會影響其沉降速率，沉降係數即用來描述此沉降性質；其單位為 S (Svedberg unit)，每一種蛋白質的沉降係數與其分子密度或分子量成正比。不同沉降係數的蛋白質，可利用超高速離心法，在密度梯度中作分離。

二、密度梯度作法：

一般有三種製作梯度的方式：

1. 在樣本溶液中直接溶入 CsCl，經離心後自動形成梯度。
2. 使用梯度製造器，在離心管內預先拉好甘油或蔗糖的梯度，加樣本後離心。
3. 在一極為熟悉的離心操作中，以上亦可以階段式 (stepwise) 梯度進行。

三、兩種離心方式：

上述 (1) 及 (2) 二者，分屬兩類不同的離心形式，列表並以圖解說明如下：

表 4.1 兩種超高速離心方式的比較：

表 4.1 兩種超高速離心方式的比較：

離心方法	Sedimentation Velocity	Sedimentation Equilibrium
同義字	Zone Centrifugation	Isopycnic Equilibration
梯度形成方式	預鑄梯度 (蔗糖、甘油) 梯度較淺，密度較低	離心時自動形成 (CsCl) 梯度陡峭，密度較高
適用樣本性質	密度相近、分子量不同者	分子量相近或密度 (S) 不同者
樣本例	蛋白質	核酸、細胞器官
離心情形	速度較低，不完全沉降，要在適當時間停止離心	完全沉降至與樣本密度相同的梯度位置，需高速、長時間

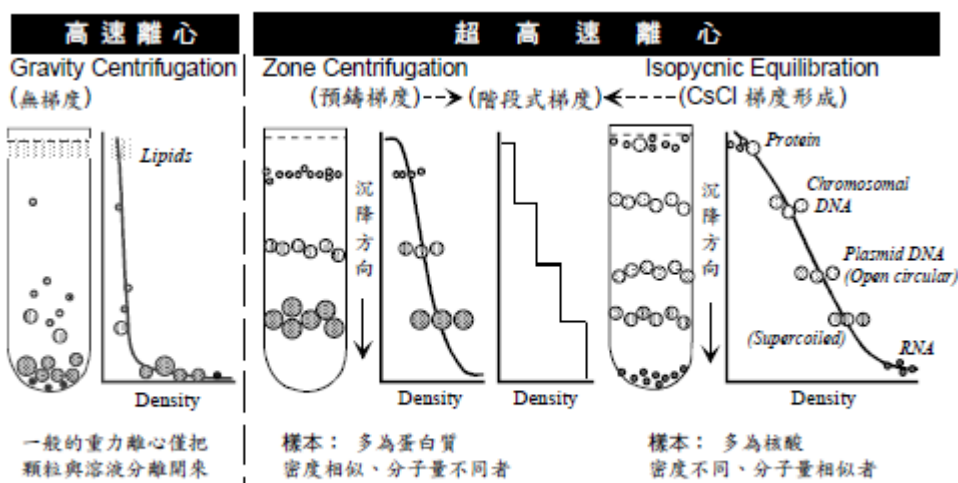


圖 4.1 高速離心與兩種超高速離心法的比較

使用不同離心陀，有不同離心方式及效果。

1. 角型 (angle rotor)：典型的離心方式，多用在大量製備時。
2. 懸籃式 (swing bucket rotor)：傳統用在密度梯度離心。
3. 垂直 (vertical rotor)：取代懸籃式，可大大縮短離心時間。
4. 區帶 (zonal rotor)：在梯度離心後，可直接分割出各區帶樣本。
5. 連續式 (continuous rotor)：可一邊離心，一邊加入或取出樣本。

#### 四、操作注意：

超高速離心因為轉速極高，離心陀構造也較複雜，操作上要非常小心，完全純熟後才進行實驗，新手要有熟練者在旁指導。操作時特別注意下列各點：

- 1 心管的平衡要準確，封管要確實，否則液體可能被抽乾。
- 2 使用懸籃式離心陀，在懸掛離心管時，要注意有沒有掛妥。
- 3 轉速切勿超過所使用離心陀的最高限，老舊者的最高限還要打折。
- 4 離心後要清理離心陀，可用水沖乾淨後晾乾；尤其使用 CsCl 者，非洗不可。
- 5 時常檢查離心艙及離心陀，注意有無腐蝕及傷痕，有者立刻請廠商檢修。

#### (參) 超微薄膜過濾法

##### 一、超微薄膜過濾技術 (ultrafiltration, UF)：

(一) 使用具有極細孔徑的薄膜，可以分離分子量不同的分子；薄膜上的小孔，只能讓某分子量以下的分子通過，此分子量稱為該薄膜的 cut-off。

(二) 其基本原理類似透析，但 UF 薄膜的孔徑則更細，而且可選擇孔徑大小。應用這種薄膜技術的方式很多，主要用在濃縮、脫鹽及無菌過濾。

(三) 另外在純水的製造上，以薄膜配合逆滲透 (reverse osmosis, RO) 所製成的管柱，可除去水中 90% 以上的離子。

##### 二、超微膜濃縮裝置：

因樣本體積的大小不同，有各種不同的微膜設計，常用者如下：

(一) 空心管 (hollow fiber)：微膜薄層鋪在堅固空心小管的內側，當樣本通過空心管時，小分子則由側面擠出，比較不會有局部過濃的問題。

(二) 多層側流板 (tangential-flow)：多層微膜疊在一起，溶液流動方向與微膜平面成平行，小分子由側向微膜擠出，無局部過濃的問題。

(三) 攪拌加壓過濾 (stirred cell)：加壓迫使分子濾過微膜，並在薄膜表面攪動，以防止局部過濃而阻塞微膜細孔。

(四) 振動濃縮子：可直接浸入含有樣本的試管中進行濃縮，微膜平敷在濃縮子表面，以振動去除局部過濃現象，沒有無效體積，故樣本損失量較低。



(五) 微膜離心管：離心管中橫置一微膜，利用離心力把小分子擠過，大分子留在上方；樣本數目多而體積少時，多採用此法。

### 三、 其它濃縮方法：

除了上述之超微薄膜系統之外，另有其他常用的濃縮方法：硫酸銨沉澱、冷凍乾燥、透析袋濃縮、電泳溶離、真空冷凍離心、氮氣吹乾等。注意其中有些方法，在濃縮後鹽濃度會提高，而使用超微薄膜則無此缺點。圖 4.2 比較各種濃縮方法的使用體積及範圍；實驗室較常用的是 Stirred cell, Centricon (Centriprep) 及 SpeedVac。

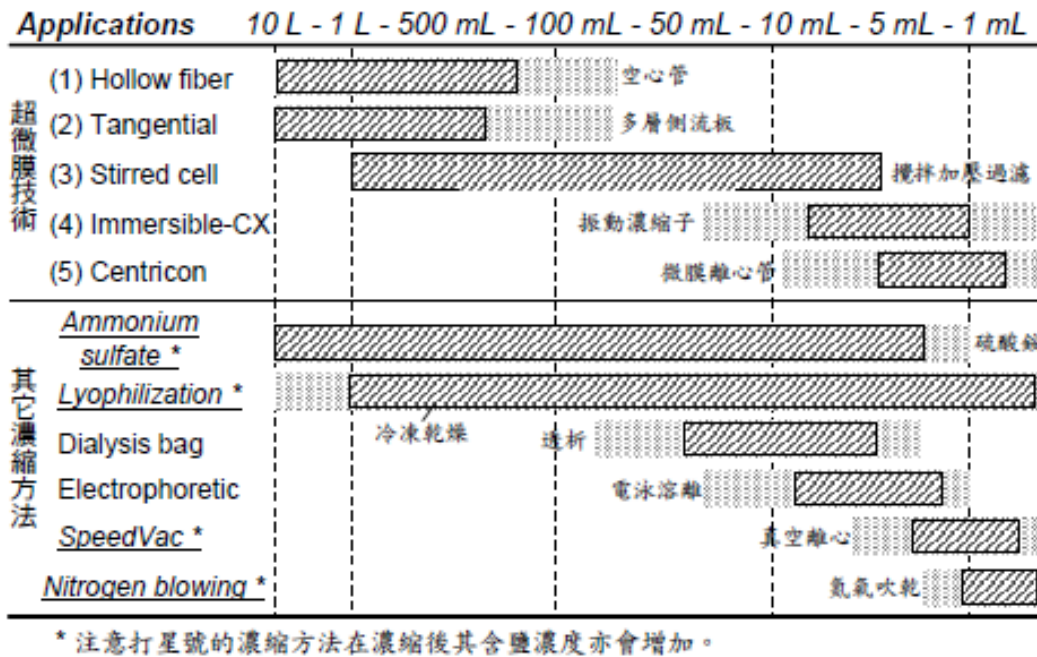


圖 4.2 各種濃縮方法的使用範圍比較

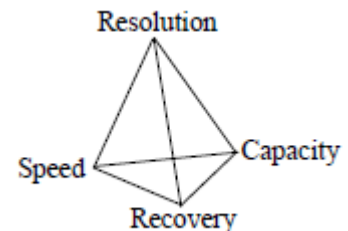
### 柒、純化策略

正確的純化策略極為重要，往往可以使純化達事半功倍之效，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，就要一步一步去試，可說是摸著石頭過河；此時，要小心追蹤每一個步驟到底回收多少酵素活性？

#### (壹)純化步驟設計

##### 一、影響純化的因素：

設計純化步驟時，需考慮下列各項要求；右圖則是 Pharmacia 操作手冊所建議的四種考慮因素。



##### (一). 高活性：

酵素的比活性要能顯著提高，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。

(二) 高回收率：

一般指總活性的回收，最終回收率低於 30% 就得檢討過程是否有大問題。

(三) 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**；但絕對均質的酵素幾乎是不可能得到，我們只能達到相對純度者。

(四). 方便與快速：

方法要盡量簡便，步驟勿拖太久，因為酵素活性可能隨著時間而急速降低；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。

(五). 經濟：許多試劑相當昂貴 (尤其是活性分析用藥)，大量使用時要考慮經濟問題。

## 二、 組合純化步驟

(一).組合標準：

1. 已知的酵素，可依照已發表的步驟進行，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，可循此骨幹先試行純化，看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，如在其 **pI** 沉澱性、特別的疏水性、有專一的抑制劑或熱穩定性等。

三、 純化方法分類：

(一) 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 5.1 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。

(二) 通常同一個純化方法不會重複使用，最好是交叉使用各種蛋白質的不同性質，來設計一連串的純化步驟。

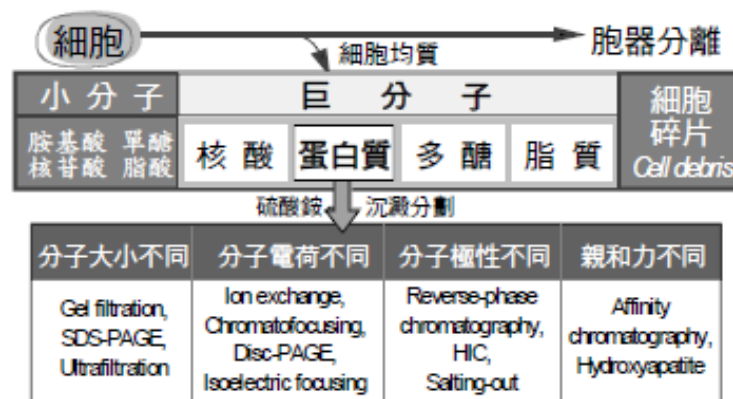


圖 5.1 各種純化及分析方法及所根據的蛋白質性質

#### 四、純化結果

##### (一) 純化表：

純化結果以 純化表 (purification table) 摘要列出整個過程及結果，例如：

表 5.1 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%
魚精蛋白沉澱後上清	800	12,555	15.7	1.7	130%
硫酸銨分劃 (35~55%)	250	6,610	26.4	2.9	68%
Sephacryl 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%

##### (二) 檢討純化表：

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。

##### (三) 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) 都不需完全均質的蛋白質。