

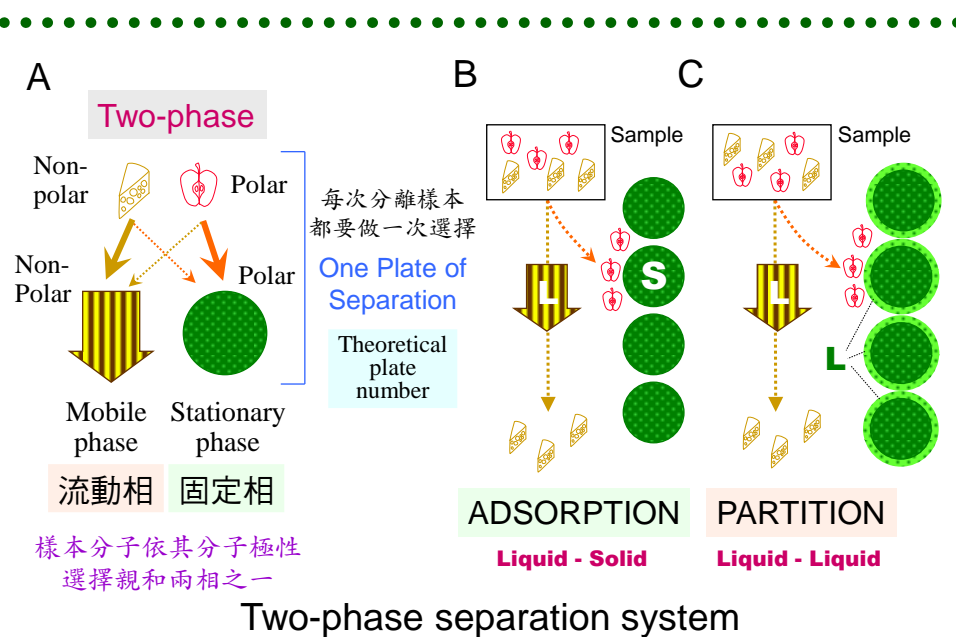
## 2 色層分析法：

### 2.1 色層分析原理：

a. 系統組成：

每種層析系統均由兩個「相 phases」組成，主要分成 固定相 (stationary phase) 及 流動相 (mobile phase)，二者各有不同的極性或非極性強度。而樣本分子因自身極性的強弱，與此二相之親和力不同：與固定相之親和力較大者，易留滯原地；與流動相之親和力大者，則易隨流動相移動，因而達到分離的效果。圖 2.1 以圖解說明此一機制。

**圖 2.1 色層分析法原理 Principle of chromatography**



b. 極性大小：

這種親和力的產生，決定於樣本或兩相物質之化學本質，是屬極性或非極性，進而遵循『Like dissolves like』的原則；即極性分子較易溶入極性的固定相或流動相，非極性分子則易溶入非極性者；因此一個樣本分子，就依其極性大小在此兩相間做選擇與分離。

c. 方式很多：

- 因為固定相或流動相可能是 固 (S)、液 (L) 或 氣 (G) 相之一，故可有多種組合方式：
- Partition chromatography: 固定相 (L) 流動相 (L) 例：PPC, TLC, 膠体過濾
  - Adsorption chromatography: 固定相 (S) 流動相 (L) 例：TLC, 離子交換
  - Gas-liquid chromatography: 固定相 (L) 流動相 (G) 例：GC

d. 常用層析方法：

**表 2.1 常用層析法 Common chromatographic methods**

	Partition	Adsorption
小分子	Paper partition chromatography (PPC)	Ion exchange TLC <sup>a)</sup> GC <sup>b)</sup>
	Thin-layer chromatography (TLC) <sup>a)</sup>	
	Gas chromatography (GC) <sup>b)</sup>	
	Reverse phase	
大分子	Gel filtration	Ion exchange Affinity chromatography Hydrophobic interaction Hydroxyapatite
	Reverse phase	

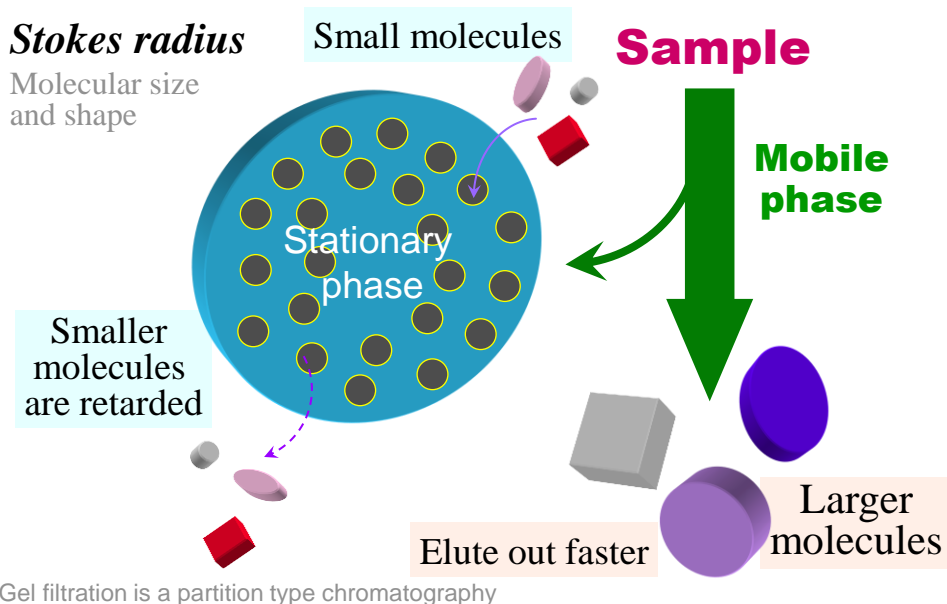
a, b) 這兩種層析法均可進行 partition 或 adsorption，取決於所用展開液之成分與比例

## 2.2 膠體過濾法：

### 2.2.1 原理概述：

膠體過濾屬 partition 層析法，流動相為溶離緩衝液，固定相為膠體孔隙內的緩衝液。溶質（樣本蛋白質）根據其分子量的大小，決定分佈在這兩相的比例。分子量大的不易進入膠球，隨流動相溶離；分子量小的，則易竄入膠球內的固定相，而被延滯流出膠柱（圖 2.2）。分子的形狀、大小均為影響因素，即與其分子半徑 (Stokes radius) 有關，與分子量不完全成正比關係，但一般視蛋白質為球形，其形狀影響暫予忽略。

**圖 2.2 膠體過濾法是一種 Partition chromatography**



Gel filtration is a partition type chromatography

### 2.2.2 膠體介質 (support, matrix) :

膠體介質是三次元的網狀小球，由長鏈聚合物交織而成，有三大類不同材質。

#### a. Dextran :

是葡萄糖組成的多醣長鏈，經過架橋修飾，成為內部有均勻孔道的小球。早期由瑞典 Pharmacia 開發的最基本產品形式有下面數類：

- (1) Sephadex G 系列：是最先推出的介質，有各種適用分子量範圍，如 G-10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200 等，數字越大，表示膠球孔徑越大，其適用的分子量就越大。要注意 G-150 以上的膠體，在高壓下會被壓垮而使流率變慢，甚至無法流通，儘量改用 Sephacryl 或 Sepharose 系列。G-25 以下者，常做為蛋白質 脫鹽 (desalting) 之用。
- (2) Sephacryl S 系列：額外使用 Bis 做架橋支持，因此比 Sephadex 有更好的耐高壓能力。有 S-200, 300, 400, 500, 1000 等不同孔徑，適用分子量大的樣本，但注意它有很高的非專一性吸附，要小心蛋白質被『吃掉』！最好用鹽濃度較高的溶離緩衝液 (0.2 M NaCl)。
- (3) Sephadex LH 系列：Sephadex 上的 OH-基團被修飾成 hydroxylpropyl 衍生物，成為 LH 系列，疏水性較大，可兼用在極性或非極性緩衝液。

#### b. Agarose :

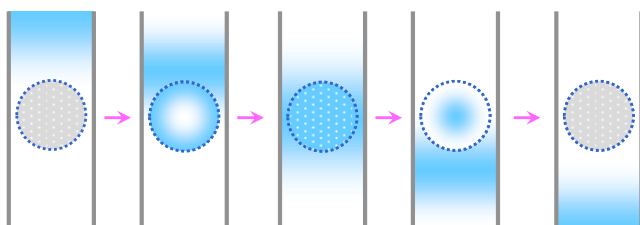
洋菜醣是由海藻抽出的直鏈聚醣，長鏈分子間以氫鍵架橋，形成三次元膠體，可以濃度來控制孔徑大小。故有些 agarose 材質的膠球，不能加高熱，否則會融成一塊膠片 (如培養用的洋菜膠)；用在分子量特別大的分子 (如核酸) 或粒子 (如病毒)。

- (1) Sepharose 及 Sepharose CL 系列：Cross Linking 系列特經架橋反應補強，可耐高壓高溫。各有 2B, 4B, 6B 三種，數字表示含膠百分比，數字越大孔徑越小，與 Sephadex 相反。
- (2) Bio-Gel A 系列：Bio-Rad 有 A-0.5M, A-1.5M, A-5M, A-15M, A-50M, A-150M，數字表示其所適用的最高分子量，以百萬為單位。

#### c. Polyacrylamide :

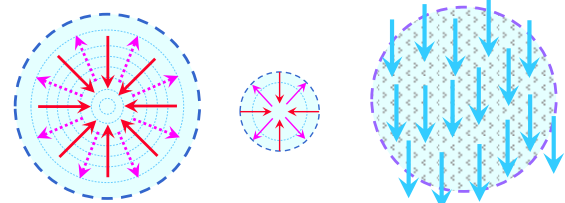
像電泳膠體一樣，由 acrylamide 聚合成固定大小孔徑，製成小球，供層析分離之用。商品為 Bio-Gel P 系列 (Bio-Rad)，有 P-2, P-4, P-6, P-10, P-30, P-60, P-100, P-150, P-200, P-300 等，最高可使用在分子量 300,000 者，高壓之下的流速亦會變慢。

圖 2.3A 溶離液擴散進出膠球 Diffuse in and out bead      圖 2.3B 溶離液對膠球的擴散或瀰散 Two types of gel



溶離液或樣本分子，由膠體粒子外圍均勻向內或外擴散。  
Sample or buffer is diffusing in and then out of the gel particle.

Diffusion → Dispersion



若膠體粒子太大，則由外圍擴散到內部的距離長，通過粒子所需要的時間拉長，降低分離效果。

Small particle size reduces the diffusion time and increases the resolution of the gel

Dispersion (瀰散) 方式的膠體因通透性佳，溶離液可直接流入膠體，不再靠擴散作用。

Dispersion type gels let the sample molecules flow directly through the gel body, and have better resolution

#### d. 膠球大小 :

膠球粒看起來都很細，但都有一定的大小，一般可分為 coarse, medium, fine, super fine 四種粗細 (grade)；越粗的膠體，流率越好，但解析力越差。因膠球外面的緩衝液是由膠球表面向內擴散，樣本蛋白質也是以相同的擴散方式進入膠球，再由中心向外擴散出來，因此膠球半徑越大，擴散距離越大，效果就越差。圖 2.3A 說明這種傳統擴散式介質的機制。

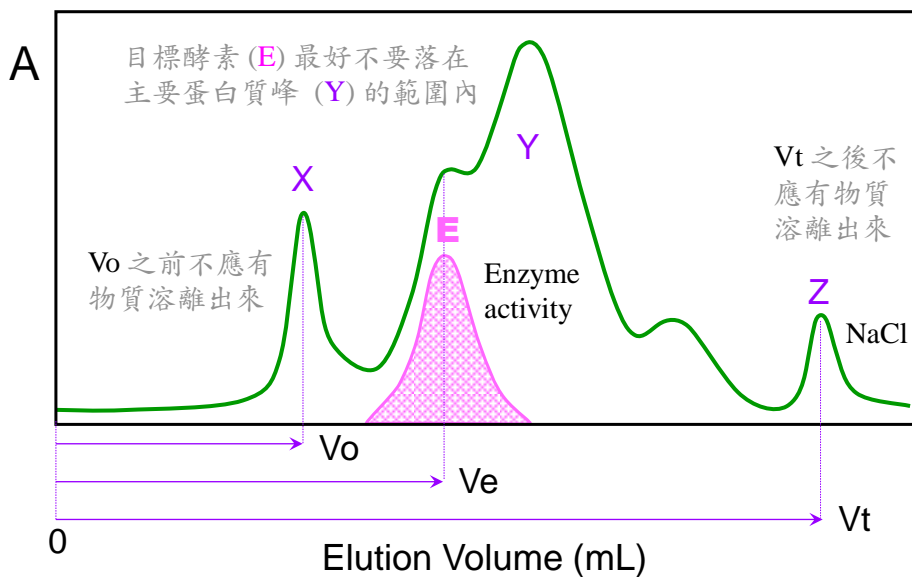
而近年來因材料科學的進步，發展出通透性特強的膠球，緩衝液可直接浸潤而進入膠球，不需經擴散作用，稱為 dispersion 瀰散式的膠體 (圖 2.3B)，效果較好且快速。

2.2.3 膠體管柱：

a. 管柱性質：

膠體過濾都以管柱方式進行，不論使用何種介質，管柱的性質大致可以如下預測 (圖 2.4)：當管柱裝填完成，若膠柱總體積為 100 mL (total volume,  $V_t$ )，則膠柱內的液相總體積約 90 mL (liquid volume,  $V_l$ )，其中流動相的體積 (即介於膠球之間的緩衝液總體積, void volume,  $V_o$ ) 約為 35 mL，樣本分子則應於 35~90 mL ( $V_e$ ) 間溶離出來。如同 TLC 的  $R_f$  值，膠體過濾也有表示樣本溶離程度的指標 ( $K_{av}$ )；樣本的  $K_{av}$  與分子量成反比，因此可用來測定分子量，現在多直接以溶離體積表示樣本溶離程度。

圖 2.4 膠體過濾的溶離圖譜 A typical chromatogram



b. 內在因素：

膠體過濾法在操作時，有些內在的問題，會影響結果的好壞：

- (1) 擴散及亂流：由於兩相都是在液相中進行，樣本在膠柱中的擴散現象相當顯著；又因液體在膠球間流動時，受重力及對流的影響，會造成亂流。擴散及亂流都會使膠體過濾的解析力大幅降低。
- (2) 管柱設計不良：經常是致命的傷害，例如無效空間 (dead volume, 見 2.3.4b) 過大、緩衝液進入膠體時流動不均、溶離液出口端的管路太長或太粗等。

c. 解決擴散及亂流：

若降低膠球粒子的大小，則可改善之；因此越細的膠球，其解析力就越佳。但膠体若太細，會造成流速下降，則要用更大的壓力進行溶離，許多膠球耐不住如此高壓。因此若補強膠体材質，以架橋來支持膠体構造，或改用矽膠質為材料，可改善流率並增加解析力，即為 HPLC 系統 (2.5)。使用上述 dispersion 式膠体，也是可行方法。

d. 膠体的選擇：

取決於所要分離蛋白質樣本的分子量大小，並且預期溶離出來的蛋白質峰，可出現在  $V_0-V_t$  區間的前半段，以降低因擴散所造成的不利影響(使目標蛋白質早些溶離出管柱)。通常分子量大於十萬可用 Sepharose CL 系列，小於五萬者用 Sephadex G-100 以下，其間則使用 Sephacryl S-200 或 300。避免使用 Sephadex G-150 或 200，因其流率不佳；其它廠牌相對應的產品，亦可使用之。

e. 管柱大小：

視所要分離樣本的體積而定，一支膠球體積為 100 mL 的管柱，可分離 1~3 mL 樣本。膠体過濾管柱以細長較妥，通常直徑為 1.6 或 2.6 cm，長度 80~100 cm，太長者擴散作用明顯。離子交換法及大量生產時的製備式管柱多使用矮胖型，以增加流率。

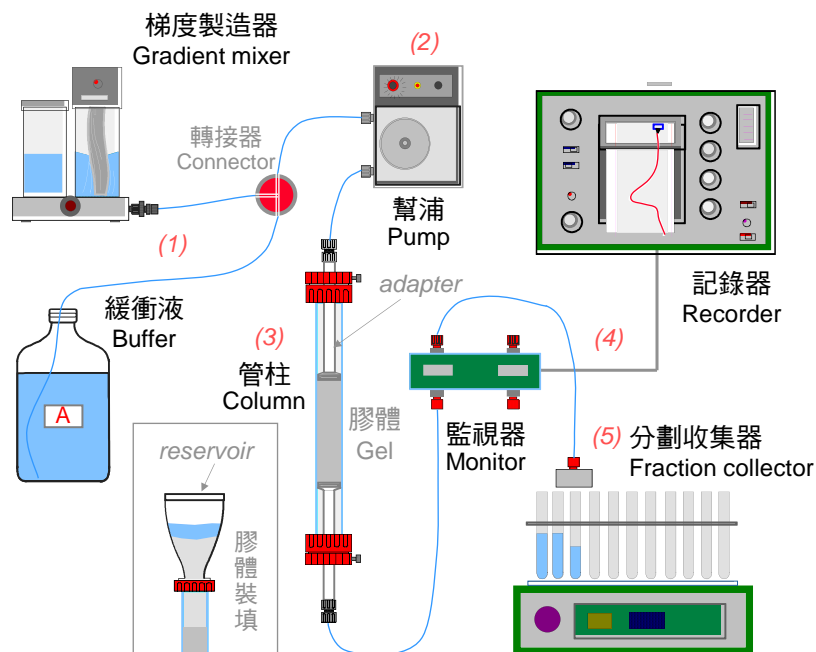
f. 管柱系統：

完善者包括下列各部分(圖 2.5)：

緩衝液 (1) → 幫浦 (2) → 管柱 (3) → 監視器 (4) → 分割收集器 (5)

其中監視器並非必需，管柱種類很多，上等備有 adaptor 可降低無效空間 (2.3.4b)，且使用很方便。通常要在冷房中操作，因此儀器的維護要更小心。取出冷房後要立刻在乾燥環境下烘乾回溫，以免潮濕造成短路或發霉。梯度製造器使用在離子交換法。

圖 2.5 液相層析管柱系統



The whole family of liquid chromatography apparatus

2.2.4 管柱操作：

a. 膠體處理：

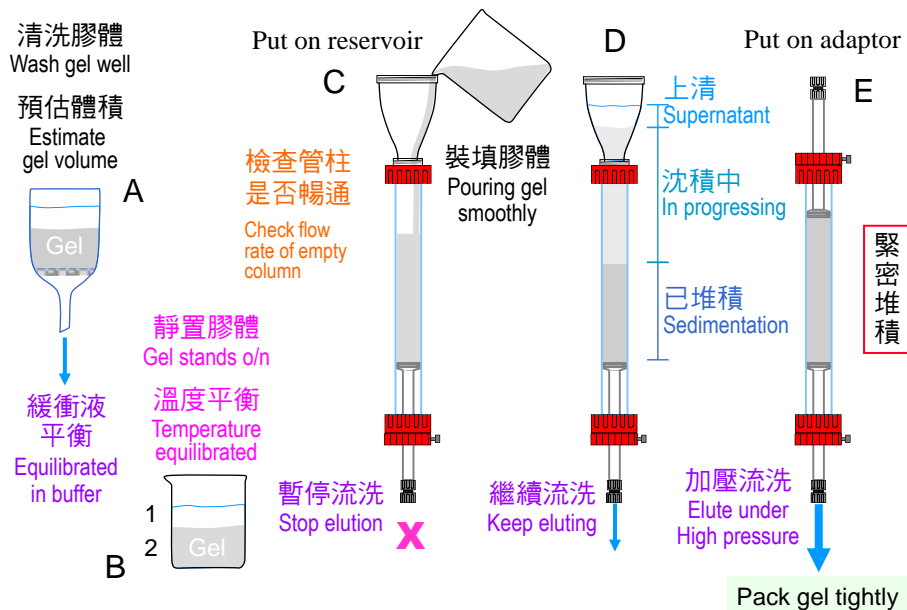
許多膠體是乾燥粉末，使用前要先行膨潤，如 Sephadex, Bio-Gel P；其餘如 Sephacryl, Sepharose (CL), Bio-Gel A 均為已膨潤者，直接在玻璃漏斗以緩衝液洗過 (圖 2.6A) 即可裝填；若有需要，可以減壓幫浦抽去氣泡。注意 Sepharose 及 Bio-Gel A 不可加熱或高壓滅菌。由管柱大小算出所需膠體的體積，再加一成，準備裝填管柱。

b. 膠體裝填：

以下是裝填膠柱的詳細步驟，最好實地觀看示範操作或教學影帶。

- (1) 洗好的膠體浸在緩衝液中，靜置過夜使之沉降，把上清部份的體積大致調為膠體體積的一半 (圖 2.6B 膠體佔三分之二)。
- (2) 先把各儀器連結好，確定可正常運作，架好管柱，注意要確實垂直地面。
- (3) 若要裝填較高的膠柱，則要裝上 reservoir，否則一次倒滿只能沉降到管柱的七成高。
- (4) 先在管柱內加一些緩衝液 (約 5 cm 高)，看能否順利流出，再關住出口。
- (5) 把上述膠體攪拌均勻，成為懸濁液，但勿產生氣泡。
- (6) 沿著管柱的管壁，慢慢倒入膠體；勿粗魯灌入，避免生成氣泡 (圖 2.6C)。
- (7) 一口氣倒完後，等約 1 min 後打開出口，膠體開始沉降。
- (8) 不久整隻管柱分成三層 (圖 2.6D)，最上為澄清的緩衝液，下層為已堆積好的膠體，顏色較白，中層為沉降中的膠體。勿使上方緩衝液乾掉。
- (9) 待膠體完全沉降後 (中間層消失)，應得到預計的膠體高度，否則要追加或挖去膠體；要添加膠體時，先把膠柱上方約 5 cm 高的膠體均勻懸濁後再加入。
- (10) 除去 reservoir，加上 adaptor，注意系統中不能有氣泡 (圖 2.6E)。這個步驟較易出問題，請仔細研究清楚所有細節，小心練習好才進行。
- (11) 連通整個系統，檢查系統的封閉性，調整幫浦流速。

圖 2.6 膠柱裝填方法 Packing column step by step



(12) 以較高的流速洗 (45 mL/h, 約 150% 流速), 以平衡完全。通常膠體裝填時的流率, 要比操作時稍高; Sephacryl 則要更高流速, 但當使用 Sephadex G-100 以上者, 只能用平常流速, 否則膠體會被壓垮。

(13) 膠體高度可能會稍微下降, 則 adaptor 要再往下壓, 以完全接觸膠面。

(14) 以正常流速 (約 30 mL/hr) 流洗數小時, 可洗過夜, 同時準備樣本。

#### c. 樣本體積:

(1) 樣本體積限定在膠柱體積的 1~3%, 可加入甘油以增加密度。

(2) 裝有 adaptor 的管柱較方便, 可用幫浦注入, 否則要直接把樣本加在膠體表面上, 先吸去膠柱上面的緩衝液後, 再小心注入樣本 (乾式); 或不吸去緩衝液, 把密度較大的樣本, 在緩衝液中直接加入, 讓它自動沉降在膠體表面 (溼式)。

(3) 樣本溶液不可有沉澱, 否則要先離心除去之, 太濃或太稀均不適宜。注入樣本應極為小心, 勿破壞膠體表面!

#### d. 溶離速度:

以直徑 1.6 或 2.6 cm 管柱而言, 通常每小時流速約 30 mL 左右, 較粗的管柱可加快, Sephadex G-150 或 G-200 要減慢, 而 Sephacryl 溶離速度可加快一倍。流出液約每 2-5 mL 收集一個分劃, 但可依情況自行增減, 最好使用分劃收集器, 讀滴數、秒速均可。要注意勿讓膠體乾掉, 也要小心收集器很容易出毛病, 沒有收到樣本而流失。

#### e. 管柱保存:

(1) 膠體管柱暫不使用時, 可在緩衝液中加  $\text{NaN}_3$  (0.01%) 流洗一次, 關好出口。

(2) 長期不用時最好取出膠體, 在玻璃漏斗中以 PBS 洗過數個體積後, 保存在  $4^\circ\text{C}$  中, 再加數滴  $\text{NaN}_3$  防菌。

(3) 若發覺膠體太髒, 可用 0.2 M NaOH 或 NaCl 先洗過, 再以緩衝液平衡; 再度取出使用時, 要注意有沒有長霉 (黑色棉絮狀小球), 膠體有無結塊。

(4) 已膨潤的膠體應貯於  $4^\circ\text{C}$ , 切勿貯藏在零下的溫度, 膠體的結構會被冰晶破壞; 乾粉或未尚未開封者, 可貯於室溫。

(5) 膠體外表看來都一樣, 一定要標示好, 以免混淆不清; 千萬不要把兩種膠體混在一起, 或者弄錯標籤, 結果都會很淒慘!

### 2.2.5 問題及解決:

#### a. 管柱裝填:

膠柱是否良好, 可跑 Blue Dextran (Pharmacia) 試之, 藍色色帶應平穩地往下移動, 色帶厚度會稍加寬, 但不該有拖尾、變斜, 甚或成為不規則亂流! 也可用手電筒在管柱後方打光, 看膠體中有無氣泡。

#### b. 溶離緩衝液:

流速太快會造成分離結果不好, 通常是色帶拉長或呈現不規則。緩衝液中的離子濃度有相當影響, 通常不能用蒸餾水來溶離。樣本分子在通入膠體後不久, 其緩衝液即被管柱中的緩衝液所取代; 若此二種緩衝液不同, 則因為離子濃度的改變, 某些蛋白質

可能會 鹽析 出來，沉澱在膠面。

c. 活性消失：

有些樣本蛋白質，需要金屬離子、輔酶、輔因子等小分子，共同達成其活性，在通過管柱後，可能被排除而失去活性。可在活性分析時補充，或在溶離緩衝液中添加。若蛋白質的回收量太低，要注意膠体有無吸附現象。

d. 使用溫度：

膠体管柱由冷房移到室溫後，會漸生成小氣泡，不能再用。反之由高溫處移至低溫處時，則無此問題。緩衝液也有同樣現象，應當注意。

e. 老舊膠柱：

管柱經長期未使用，要注意有無長霉，管柱有無乾裂 (用手電筒檢查)。使用太多次數後，膠柱最上方的表面會有沉澱或變得較髒，可稍挖去表層，再小心輕輕攪散，再讓膠体表面重新沉降平整，對結果影響不大。

### 2.3 離子交換法：

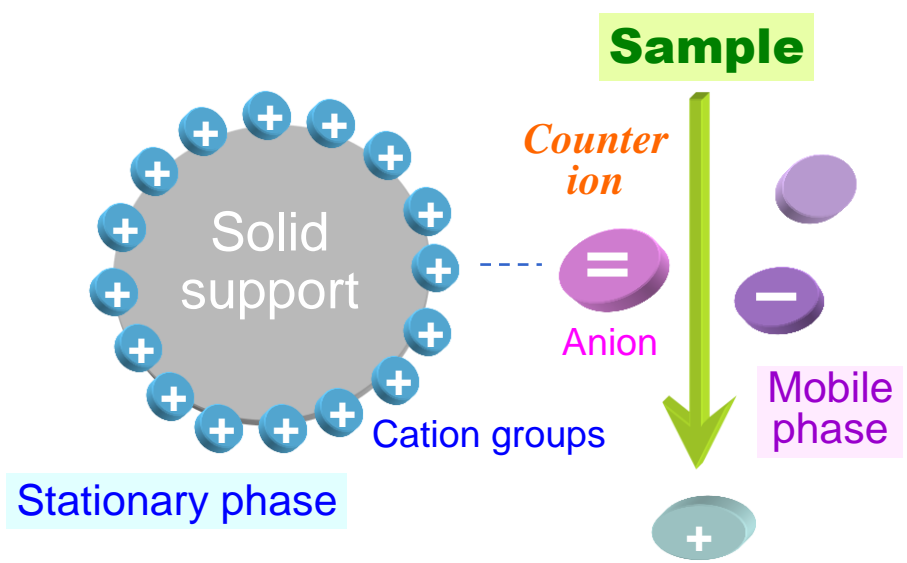
離子交換法乃是利用分子帶電性質的差異來進行分離，解析力好且具多樣性，是常見且應用極廣的純化方法。

#### 2.3.1 原理概述：

a. 離子交換法：

是一種 adsorption 層析法，流動相為溶離緩衝液，固定相為介質擔体表面的帶電基團。樣本中的各種離子，與介質表面帶電基團間的親和力強弱不同，吸附上去之後，可使用不同離子濃度的緩衝液，分別溶離出這些成分 (圖 2.7)。

**圖 2.7 陰離子交換法 Anion Exchange**



Ion exchange is an adsorption chromatography



**b. 兩大類離子交換介質：**

由介質帶電基團的不同，分為兩大類： 介質-帶電基團 (counter ion)

(1) 陽離子交換介質 (cation exchanger)： 擔體-陰離子基團 ..... 陽離子

(2) 陰離子交換介質 (anion exchanger)： 擔體-陽離子基團 ..... 陰離子

**c. 離子取代順序 pecking order：**

離子交換的進行，可視為各種 counter ions 間，對擔體介質上帶電基團的爭奪戰，離子(包括蛋白質)競爭結合到固体介質上；其競爭優勢順序如下(圖 2.8)：

(1) 帶電荷高者取代帶電荷低者。

(2) 電荷相同時，原子序(或離子體積)大者優勢。

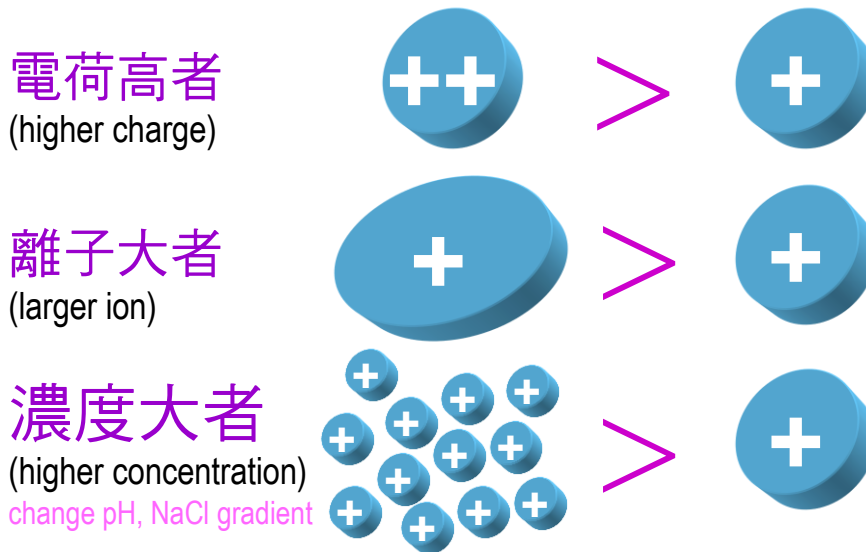
(3) 濃度 可克服以上兩種優勢，高濃度之氫離子可取代其它陽離子。

**d. 離子取代優先順序：**

陽離子：兩價陽離子 >  $\text{NH}_4^+$  >  $\text{K}^+$  >  $\text{Na}^+$  >  $\text{H}^+$  >  $\text{Li}^+$

陰離子： $\text{I}^-$  >  $\text{Br}^-$  >  $\text{Cl}^-$  >  $\text{HCO}_3^-$  >  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{OH}^-$

**圖 2.8 離子取代優先順序 Displacing order of ions**



Key properties determining the order of ion replacement

**2.3.2 離子交換介質：**

**a. 介質種類：**

(1) 離子交換介質的種類很多，歸納起來分為 陰離子 及 陽離子 兩大類；每一類又依其帶電基團的強弱，分為 強、中、弱 三種。

(2) 另外依介質的材質不同，略分為 合成樹脂 (resin) 及 聚醣 (glycan) 兩種，前者對蛋白質的純化並不適用，只可用在小分子樣本。

(3) 聚醣多使用 Sephadex, Sepharose, cellulose 等為擔體，在糖分子加上帶電基團；而

cellulose 又有做成結晶球形的 Sephacel，可增加膠柱的流率。

- (4) 因為材料科學的進步，產出了許多新的材質，更為堅硬可耐高壓，且所能吸附的樣本容量也大增。Pharmacia 推出新一代介質 Monobead，也分有陽離子 (Q) 及陰離子 (S) 兩種，都是預先裝填在管柱，直接接上 FPLC 系統使用。

**表 2.2 離子交換介質 Common ion exchange materials**

陰陽強弱		Resin / Polystyrene		Glycan / Cellulose (= X)		Mono bead
Anion Exchanger	Strong	Dowex-1 Dowex-2	$-^+NR_3$	TEAE-X (QAE-X)	$-^+NR_3$	Q
	Weak	Dowex-3 IR-45	$-^+NHR_2$	DEAE-X	$-O(CH_2)_2^+NHR_2$	
Cation Exchanger	Strong	Dowex-50	$-SO_3^-$	Phospho-X	$-PO_4$	S
	Weak	IRC-150	$-COO^-$	CM-X	$-CH_2COO$	

X = Sephadex, Sepharose, Sephacel or cellulose

**b. 選擇交換介質：**

- (1) 若已知樣本蛋白質的 pI，則先選擇所要使用緩衝液的 pH，使蛋白質帶有正 (或負) 電，而採用陽 (或陰) 離子交換介質。
- (2) 若不知樣本的 pI，則可取一系列試管各裝少量介質，在各種緩衝液 pH 下，加入適量的樣本蛋白質，然後測上清中有無酵素活性殘留，得知樣本蛋白質有無吸附上去，就可選擇適當的介質及緩衝液 pH。

**c. 一般使用：**

- (1) 通常在純化蛋白質時，都使用較弱的離子交換介質，如 DEAE (diethylethanolamine) 或 CM (carboxymethyl)；介質則用聚醣類為材料，多使用 Sepharose CL-6B 或 Sephacel，而不用體積變化很劇烈的 Sephadex，或流率較差的 cellulose。
- (2) Sepharose 本來有膠體過濾的作用，應用在離子交換時，作用並不明顯；但在分離異構酶時，因各個異構酶的分子量極為相近，避免使用之。
- (3) DEAE 型膠體使用的 pH 不能高過 9，CM 者不能低於 pH 6，否則介質會失去原先帶有的電荷。

**d. 介質容量有限：**

- (1) 離子交換介質與蛋白質的結合總量有一定的限度，稱為該交換介質的容量 (capacity)；若超過此一容量，多出的樣本會直接流出。
- (2) 交換介質的結合容量大小，受層析條件不同、蛋白質種類不同、緩衝液不同、pH

或離子濃度不同等，有很大的差異。如 DEAE-Sepharose CL-6B 每 100 mL 可結合 11 克白蛋白，但對 ferritin 只有 0.4 克。

**e. 介質表面的微環境：**

- (1) 由於交換介質的帶電性，其微視環境中的 pH，並不呈均勻的狀態。
- (2) 緊靠介質表面的 pH，要比外圍緩衝液 pH 相差一個 pH 單位左右：陰離子交換介質高一個單位，陽離子低一個單位 (稱為 Donnan effect)，可參見圖 2.9。

**f. Hydroxylapatite：**

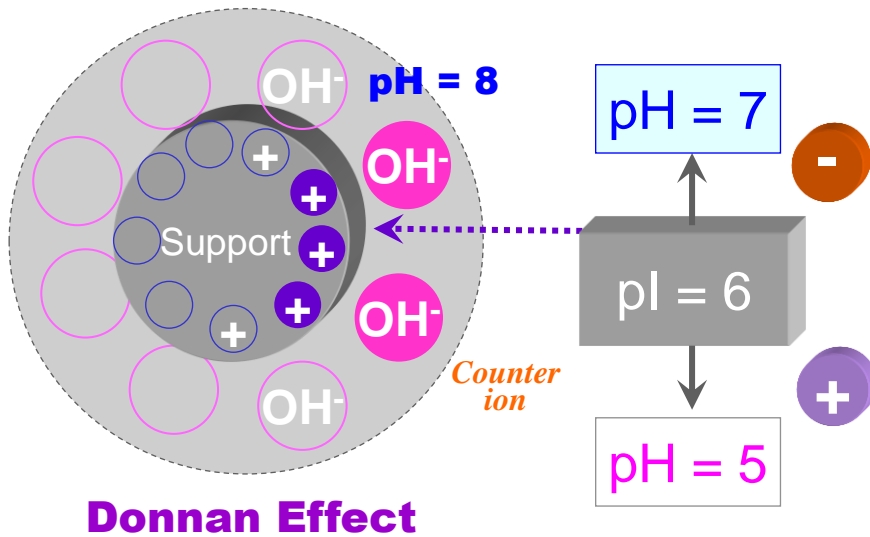
- (1) 可與 DNA 或 RNA 結合，原本用在分離單股與雙股 DNA，是一種結晶型的磷酸鈣，其作用機制不很清楚，但顯然與其帶電性質有關。
- (2) 操作法與離子交換法類似，在低離子濃度時使蛋白質結合上去，再以高濃度溶離下，但較複雜；不同的鹽類 (如 磷酸鹽, NaCl 或 CaCl<sub>2</sub>)，會有不同的溶離結果，要以實驗嘗試求得。

**2.3.3 緩衝液與層析系統：**

**a. 緩衝液種類：**

可能會影響離子交換結果，例如 DEAE 介質若使用磷酸緩衝液，則其中的磷酸離子 (帶兩個負電) 與交換介質的結合力相當強，會影響樣本蛋白質的結合。但反過來說，此時能夠結合上去的樣本蛋白質，就有相當的強度。

**圖 2.9 陰離子交換膠體的 pH 變化**



The pH change of the microenvironment surrounding the ion exchange gel particle

**b. 緩衝液 pH：**

- (1) 緩衝液的 pH 可定在樣本蛋白質 pI 的上或下一個 pH 單位 (參見圖 2.9)，使樣本分子帶有正確的電荷，能夠結合到所選用的介質上去，但又不會太強，以免難以溶離下來。

- (2) 用酸鹼度溶離時，當緩衝液的 pH 趨近樣本分子的 pI 在 0.5 pH 單位以內，蛋白質會開始溶離出來。
- (3) 所用緩衝液的離子濃度，在不影響蛋白質與介質的結合能力下，儘量採稍高的濃度，以降低非必要性的吸附，通常在 10~100 mM (NaCl) 之間。

c. 膠體 pH 要先平衡好：

決定緩衝液的 pH 與離子濃度後，交換介質要先平衡在此緩衝液中，如膠體過濾法一樣，可在玻璃漏斗中進行。為加速平衡達成，交換介質可先用 10× 濃度緩衝液浸泡沖洗，然後再用 1× 者澈底清洗替換。

d. 管柱系統：

離子交換法所用的管柱系統，其要求是比膠體過濾法嚴格，最好使用附有 adaptor 的 Pharmacia 管柱，可降低無效空間，避免梯度破壞。與膠體過濾相反，多使用矮胖型的管柱，太長並無必要。

e. 膠體裝填：

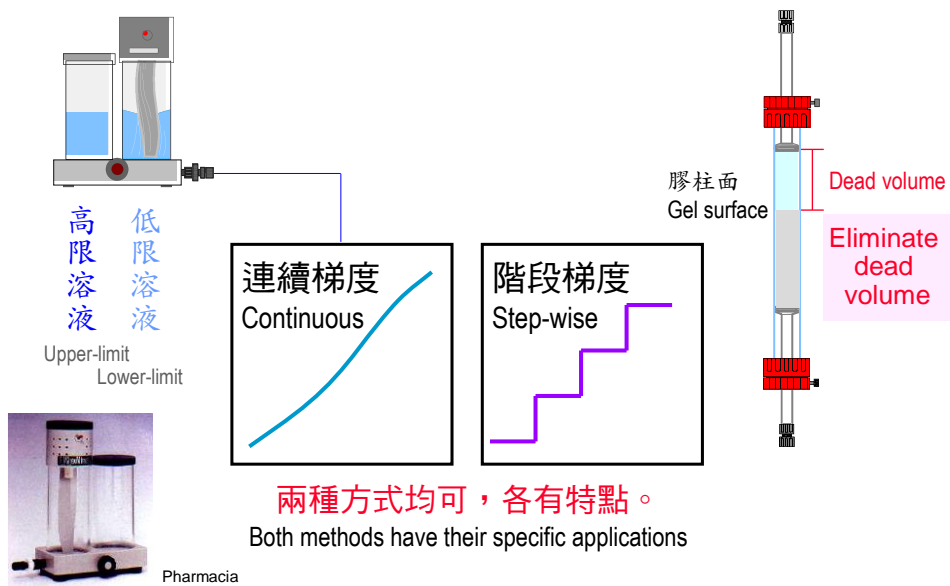
裝填方法與膠體過濾法一樣，但裝填要求反較不嚴格；裝填完成後，要以緩衝液洗過數個體積後方可使用。不能使用 Blue Dextran，用手電筒檢查有無氣泡。Sephacrose 或 Sephacel 介質可耐高流速的壓力，但流速過快可能影響解析力。

2.3.4 管柱操作方法：

a. 樣本蛋白質液：

樣本必須先溶在管柱所使用的緩衝液中，否則要先對緩衝液透析。樣本溶液的體積並無限制，因為蛋白質會結合到交換介質上，溶離下來時有濃縮效果；若目標蛋白質不會吸附到介質，而直接通過交換介質，則其條件同膠體過濾法。

圖 2.10 鹽梯度的兩種方式 Making salt gradient



b. 溶離方法：

- (1) 如圖 2.10 所示可用 pH 或 鹽 梯度，溶離方式有 連續梯度 (continuous gradient) 及 階段梯度 (stepwise gradient)。
- (2) 但 pH 的連續梯度不容易拉得好 (why?)，因此一般較少使用，可改用階段梯度或 色層焦集法 (2.3.5)，後者會在管柱內形成連續的 pH 梯度。
- (3) 由於是以濃度梯度來溶離，每次加入管柱的緩衝液都不一樣，因此在離子交換管柱中，膠體上方不能積有緩衝液層 (無效空間，如圖 2.10 右)，否則做好的梯度會在此處破壞，失去 pH 梯度的連續性，因此離子交換管柱最好能使用 adaptor。

#### c. 梯度體積：

每個梯度的體積會影響結果，通常溶離體積較大時，解析度較佳；但體積太大，會使溶離出來的蛋白質濃度變稀。而梯度的上下範圍 (如 0~0.3 M NaCl) 也要適當，範圍太寬或太窄，均會降低解析度，要以實驗試出最佳條件。

#### d. 膠體再生：

- (1) 蛋白質全部溶離出來後，交換介質要經過 再生 (regeneration) 完全後，才能再次使用。
- (2) 以 1~2 M NaCl 即可洗去雜蛋白，澈底清洗可用 0.1 M NaOH 流洗；陰離子交換介質可用 1 M 醋酸鈉 (pH 2.0) 洗 1.5 個體積，再以緩衝液平衡完全，才能再度使用。
- (3) 可測流出液的 pH 或離子濃度，是否與加入的緩衝液一樣。也可把膠體取出，在燒杯或漏斗中澈底清洗。大多數失敗是因於 再生不良！

#### e. 批次法：

離子交換法不一定要在管柱中進行，也可在燒杯中以 批次法 (batch) 吸附並溶離蛋白質，一般應用在工業上的大量純化，其效果較差，但比較方便。

### 2.3.5 色層焦集法 (chromatofocusing)：

#### a. 也是一種離子交換法：

- (1) 若必須使用 pH 梯度進行溶離，則可改用 Pharmacia 發展的色層焦集法。此法使用類似 DEAE-Sepharose 陰離子交換介質 (polyethyleneimine agarose)，並在管柱中以特殊的緩衝液 (Polybuffer) 流洗以形成 pH 梯度。
- (2) Polybuffer 含有如同 等電焦集法 (isoelectric focusing 是一種電泳方式) 所使用的 ampholyte，以較低的 pH 通入管柱，與介質上面的鹼性基團中和，由酸 (上方進入管柱處) 漸鹼 (出口處)，直接在管柱膠體形成 pH 梯度。

#### b. 作用機制：

樣本蛋白質進入色層焦集管柱後，先遇到較高 pH 環境 (介質)，通常高於其 pI 而帶負電，因此會結合到帶有正電的介質上。當 Polybuffer 開始注入管柱，降低環境 pH，使樣本分子失去負電荷而溶離下來；蛋白質便依 pI 大小順序，pI 高的先溶離出來，同時集中在其自身 pI 的地方，成為一條極細色帶，故稱為 焦集法。

#### c. 注意會產生沉澱：

有些酵素若處在其自身 pI 的環境，會發生不可逆的沉澱而失去活性，則不適用任何

以 pI 為分離基礎的純化方法。因此色層聚焦法通常較少使用，除非一定要以 pI 或 pH 梯度來作分離，否則儘量採用其他方法，目前已經很少看到。

## 2.4 親和層析法：

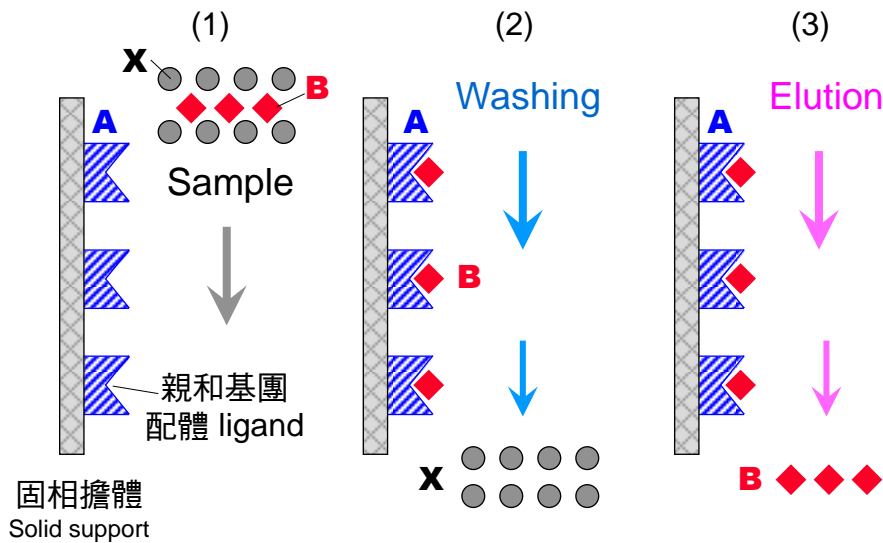
兩蛋白質分子間親和力之形成機制，請參閱生物化學 [BCbasic 的專一性結合](#)。

2.4.1 原理概述：圖 2.11 說明純化過程之原理。

### a. 固定相為親和基團：

- (1) 親和層析法的固定相為一固相擔體，上有專一性親和基團 (A)，流動相為溶離緩衝液。
- (2) 當樣本通過管柱時，與親和基團有專一性的分子 (B) 吸附到固定相上，非專一性分子 (X) 則隨流動相洗出管柱。
- (3) 留在定相上的分子 (B)，可用酸或鹼溶離，或用專一性溶離分子溶離。

**圖 2.11 親和層析法的作用機理 How it works**



### b. 親和法四項要素：請參考圖 2.12

- (1) 對所要純化的物質 (B)，需有專一性配體 ligand (A)，而 A, B 之間要有專一性的親和力，其解離常數 ( $K_d$ ) 約在  $10^{-4} \sim 10^{-8}$ 。
- (2) 配體 (A) 可方便大量取得，且能經由耦合反應接到固相擔體，成為固定相。
- (3) 擔體具有可與配體連結的基團，且非專一性吸附力低，通透性良好。
- (4) A-B 結合成的複合體 (complex)，可以方便地解離，而不傷害 A 或 B。

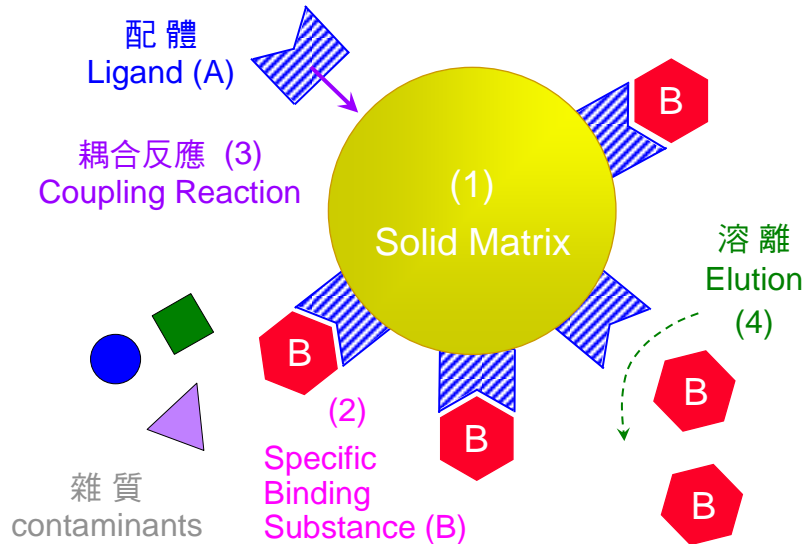
### 2.4.2 親和吸著劑：

#### a. 固相擔體：

材料種類很多，舉凡 洋菜糖 (agarose)、纖維素、玻璃砂、幾丁質、合成聚合物 均可

使用；但用在蛋白質，仍以聚糖類為最佳。以 Sepharose 為例，可自行用 CNBr 活化，使糖分子接上 -O-C≡N (cyanate ester) 基，再與配體上的胺基反應。

**圖 2.12 親和層析法的四項要素 Four essential factors**



b. 親和性介質：

**表 2.3 可與各種配體基團反應的介質**

Pharmacia

配體基團	親和性介質	反應基團	反應方式
-NH <sub>2</sub>	CNBr-activated Sepharose 4B	-C≡N	直接反應
	CH-Sepharose 4B 或其活化型	-COOH	加 EDC*
		N-OH-succinimide	直接反應
	Epoxy-activated Sepharose 6B	oxirane	直接反應
-COOH	AH-Sepharose 4B	-NH <sub>2</sub>	加 EDC*
-OH	Epoxy-activated Sepharose 6B	oxirane	直接反應
-SH	Epoxy-activated Sepharose 6B	oxirane	直接反應
	Thiopropyl-Sepharose 6B	-S-S-R	DTT 活化
	Activated Thio-Sepharose 4B	-G-S-S-R	直接反應

\* EDC = N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl

Affinity materials are designed to react with functional groups on ligands

c. 共價層析法：

使用 Thio-Sepharose 時，樣本蛋白質是以共價鍵(雙硫鍵)結合到親和介質上，然後再以 cysteine 或 mercaptoethanol 溶離下來。此法可以用來純化 papain 或如 urease 等含多個 -SH 基的蛋白質，特稱為共價層析法 (covalent chromatography)。

d. 耦合反應 (coupling) :

- (1) 介質與配體的 耦合反應 都相當簡便，介質先經緩衝液洗過後，加入配體溶液反應後，再加入填塞分子，除去介質上未完全反應的基團，裝入管柱流洗後即可使用。
- (2) 注意耦合緩衝液及樣本液中，不能含有會競爭耦合反應的分子；例如使用 CNBr 活化的 Sepharose 時，不可用 Tris 或 glycine 緩衝液 (有-NH<sub>2</sub> 基)。

e. 注意 spacer arm :

有些親和層析法使用 spacer arm 來降低配體的立體障礙，但是 spacer arm 多為六到八碳的碳氫鏈，有相當強的非極性，若表現出疏水性層析的作用 (見下節)，則可能對純化效果有正面或負面的影響。

f. 現成的親和吸著劑 :

利用以上各種介質，可自行接上有用的配體，進行親和層析法，但商品也售有很多已經接好配體的成品，使用上更方便，例舉於表 2.4。

**表 2.4 各種親和性介質及其專一性基團**

Pharmacia

配 體	親和性分子	說 明
抗体	對應之抗原	免疫吸著劑，大多自行合成
基質或抑制劑	對應之酵素	酵素的專一性結合
Protein A	部分 IgG	單株抗体純化
Con A	醣蛋白	對 α-D-葡萄糖、甘露糖基有專一性
Heparin	凝血蛋白等	Heparin Sepharose CL-6B
Chelator (NTA)-Ni <sup>2+</sup>	His-tag 表現蛋白質	(His) <sub>6</sub> 與兩價陽離子間的親和力
Oligo (dT)	mRNA	Oligo (dT)-cellulose
Cibacron-Blue	NAD(P) <sup>+</sup> 結合酵素	Blue Sepharose CL-6B
AMP 或 ADP等	同上	5'AMP-, 2', 5'ADP-Sepharose 4B
單糖及其衍生物	Lectin	用來純化 lectin

Affinity adsorbents with special affinity ligands

2.4.3 金屬螯合層析法 :

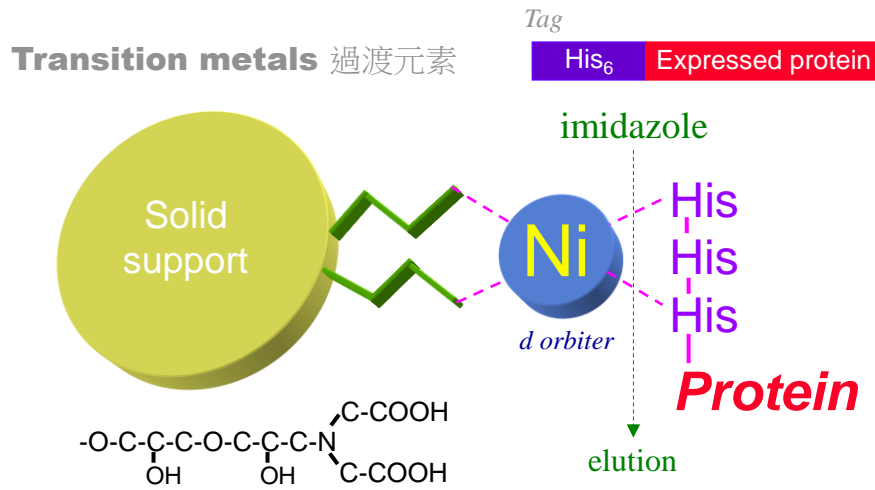
- a. 許多蛋白質或酵素分子上帶有金屬離子，則此蛋白質可能會吸附該金屬。
- b. 若把某金屬固定到固相擔體上，則此擔體會專一性地吸附需要此金屬的蛋白質。
- c. 基因操作時，經常在表現蛋白質的端點，加上一段含有六個 His 的片段；則此表現蛋白質，可以吸附到含有鎳的吸著劑上，再以 imidazole 流洗出來 (圖 2.13)。
- d. 這種擔體表面有可與金屬產生配位鍵的基團 (如 nitrilotriacetic acid, NTA)，這些基團與金屬離子結合 (如鎳離子) 後，即可成為親和吸著劑。

2.4.4 疏水性層析法 :

- a. 作用機制 :



**圖 2.13 金屬螯合層析法 Using metal-chelating affinity**



### Metal Chelate Affinity Chromatography

- (1) 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，當環境的極性逐漸降低，就可被溶離出來，是為 疏水性層析法 (hydrophobic interaction chromatography, HIC)。
- (2) HIC 沒有親和層析那麼強的專一性，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。

#### b. 介質種類：

- (1) Pharmacia 有 Phenyl-及 Octyl-Sepharose 兩種介質，後者疏水性較強。
- (2) 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 之梯度溶離。

#### c. 反相層析法 (reversed phase)：

- (1) 是 HIC 及離子交換法的綜合體，但屬於一種 partition 層析，可使用離子交換 (或類似 HIC) 的介質。
- (2) 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)，樣本分子會在此二液相中進行 partition 分離。
- (3) 因固定相及流動相的極性剛好相反，故名 reversed phase。請參考圖 2.14。

#### 2.4.5 液相分配 (partitioning)：

##### a. 作用機制：

- (1) 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，多用在有機小分子，因所用液相都是有機溶劑，蛋白質不易溶於其中。
- (2) 若在水溶液中加入不同的親水性聚合物，造成密度的差異，則這兩個水溶液可分成兩相。若依蛋白質對此兩相之親和程度不同，而在此二相間進行分配

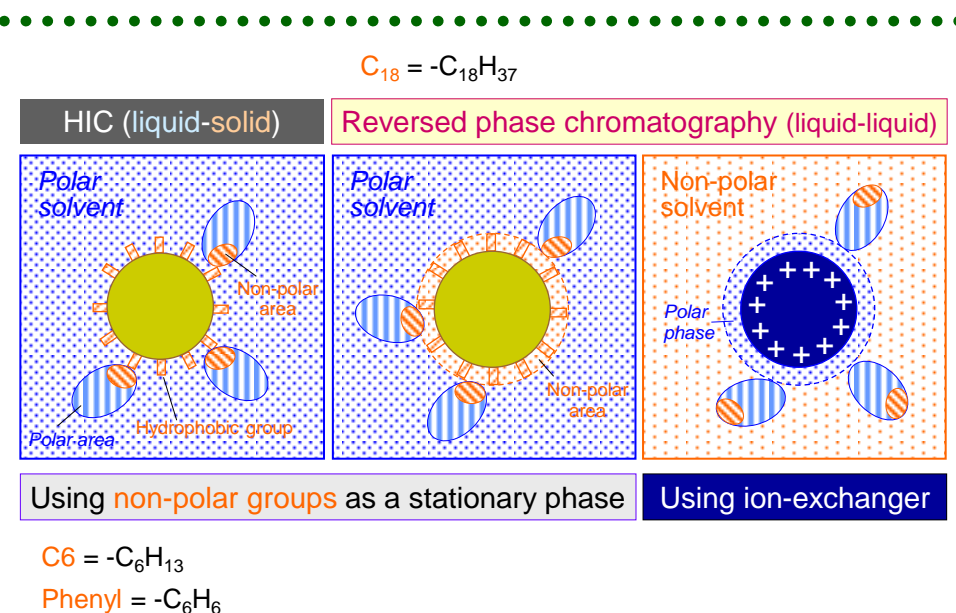
(partitioning) 則可達到分離效果。

(3) 可用的親水性聚合物有 polyethylene glycol (PEG), dextran, Ficoll 等。

b. 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)。

**圖 2.14 疏水性及反相層析法**



**2.5 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)，是因為所使用的介質通透性極佳之故。這些都是屬於『硬體』的升級，也都可以應用在膠體過濾、離子交換、親和層析、反相層析等平台，而所根據的基本原理完全相同。

a. 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，但是粒子太小造成流速太慢，反而使解析力下降。HPLC 使用 silica 或樹脂等耐壓介質，以極細的粒子 (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。

b. 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，均可用 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，有可能完全取代傳統的低

壓慢速液相層析法。

**c. FPLC 系統：**

是 Pharmacia 進一步發展的二代膠體介質與管柱體系，可以不用很高的壓力，在一小時內完成分離，而其樣本容量更大於 HPLC，可用在製備式純化上 (樣本量達 500 mg)。

**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. 層析法為何一定要有兩相系統？(一相不行嗎？三相不是更好嗎？) [1]
2. 為何濾紙層析法 (PPC) 是一種 partition (液相-液相) 層析？ [1]
3. 用 Sephadex G-25 脫鹽時，若因離子濃度改變，而致蛋白質發生沉澱，對實驗有何不利之處？ [2]
4. 通常脫鹽的 Sephadex G-25 管柱均製成可丟棄式，這種消耗有必要嗎？ [1]
5. 為何膠體過濾法是一種 partition 層析？ [1]
6. 在進行離子交換法時，為何樹脂類的介質不適用在蛋白質樣本？ [2]
7. 某蛋白質的 pI 是 4.2，若把緩衝液調到 8.5，則在此緩衝液下，應當使用那一種離子交換介質？請問在這樣的 pH 下進行離子交換層析，可能會有什麼問題？ [3]
8. 為何 pH 的連續梯度不容易拉得好？ [2]
9. 親和層析是 partition 或 adsorption 層析法？親和層析法為何需要使用固相擔體？ [3]
10. 薄層層析 (TLC) 可兼有 partition 及 adsorption 兩種層析方式，各是如何操作的？ [4]
11. 一隻直徑 2.6 cm 的管柱，長度 100 cm，想要裝填 Sepharose CL-6B 至八成的高度。現有一瓶原裝的膠體，瓶子上面標明有膠體 750 mL，靜置後膠體沉降體積約佔四分之三的高度，其餘為上清液。你當如何取用膠體，剛好可以裝填所要的膠柱。 [4\*]
12. 每年四、五月間，是研究生趕畢業的繁忙時段，冷房經常堆滿管柱，空間不敷使用。有一研究生沒有找到位置，不得已只好在室溫跑膠體過濾，為了怕在室溫停留太久，又把流速增加 20%。結果出乎意料之外，出來的蛋白質峰都比原來在冷房裡跑的還集中，活性也稍稍增加。請檢討這個現象的可能原因。 [4\*]
13. 某生以 Sephacryl S-100 膠體過濾法分離某蛋白質，在一般 PBS 緩衝液 (含 0.2 M NaCl) 下流洗，通常此蛋白質都在大約 35 管分劃處溶離出來。但經春假放假三天回來，開動實驗重新裝填管柱，緩衝液也重新配製 PBS，卻發現蛋白質居然要在 60 管才會溶離出來，酵素總活性也降到三分之一。檢討他所用的管柱大小相同，所用的分劃收集器及分劃體積也都沒變，請問發生何事？ [5\*]
14. Hydroxylapatite 是何種物質？它是如何分離開單股與雙股 DNA？ [3]
15. 有一次停電數小時之後，某生發現冷房內的管柱中，膠體都充滿了氣泡，請問是何原因？但他發現旁邊另一位同學的管柱膠體卻都沒有氣泡產生，又是為何？ [4\*]
16. 甲乙兩人同時用 DEAE 陰離子交換法純化酵素，甲生有最好的管柱 (有 adaptor)、梯度製造器、蠕動幫浦，而乙生除了有點錢買膠體、燒杯、緩衝液之外，什麼都沒有。經過一週後報告，乙生的結果卻比甲生好，活性及純度都較高，是如何辦到的？ [5\*]

17. HPLC 與 FPLC 系統有何異同？純化酵素時你會選擇何者？ [2]
18. 進行離子交換法時，我們是採用較高的鹽濃度把蛋白質溶離下來，請說明為何高鹽濃度可以把吸附在膠體上的蛋白質洗下來？ [3]
19. 進行離子交換法以鹽梯度溶離蛋白質時，若要分開兩個很相近的蛋白質峰時，有時會有下列現象發生，請說明為何： [5]
  - a. 拉連續梯度不如階段 (stepwise) 梯度
  - b. 使用較長的膠柱不如較短的
  - c. 使用較寬的鹽梯度 (0~0.5 M) 不如較窄的 (0~0.2 M)
  - d. 使用的溶離體積較小的 (如 150 mL × 2) 不如較大體積者 (如 200 mL × 2)
20. 血清蛋白質的 pI 大多在 7 以下，只有抗体 IgG 的 pI 為 8.3，請設計一離子交換程序，使用 DEAE-Sephacel，可以很快地純化 IgG。另外，IgG 的分子量約為 160,000，而另一類抗体 IgM 的分子量為其五倍多，請問你要用何種方法來純化 IgM？ [4\*]

[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]

