

### 3 其它純化方法：

大量純化酵素時，通常前面的步驟使用傳統層析方法，再加上 HPLC 或 FPLC 就可以得到相當均質的蛋白質。以下的製備式電泳及超高速離心法，也可增加純度，但處理量較少；而超微薄膜過濾並非純化步驟，但在純化的各階段過程，可濃縮蛋白質並除去小分子。

#### 3.1 製備式電泳：

製備式電泳通常以不含 SDS 的原態 disc-PAGE 進行，可回收具有活性的蛋白質；蛋白質樣本要先經部分純化，否則效果不佳，事先多以分析式電泳確定所要色帶的位置。詳細說明可參考酵素分析的電泳部分。

##### a. 電泳用具：

商品的製備式電泳器具很多，都相當複雜且昂貴，但使用一般  $8 \times 16$  cm 大小的垂直平板電泳，再利用 3 mm 厚的間隔條即可進行，量小時用迷你電泳亦足夠使用。

##### b. 操作方式：

- (1) 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（以上述大小的膠體而言約有 15 mL），不必用樣本齒模，因此只跑一種樣本。
- (2) 預跑：最好在樣本加入前，先預跑約 20 min，以除去 APS 的影響。
- (3) 電泳：可在冷房進行，條件大略同一般電泳，勿使膠體過熱，也不要跑太快。
- (4) 定位蛋白質：方法很多，蛋白質多時可以 300 nm 波長紫外光照射直接觀察，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。
- (5) 電泳溶離：以電泳收集膠體內的蛋白質，這一步會損失不少蛋白質，要特別小心。

#### 3.2 超高速離心法：

##### a. 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，在密度梯度中進行分離。

##### b. 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，經離心後可自動形成 CsCl 的濃度梯度。
- (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) 若對蛋白質性質與離心條件極為熟悉，以上亦可以階段式 (stepwise) 梯度進行。

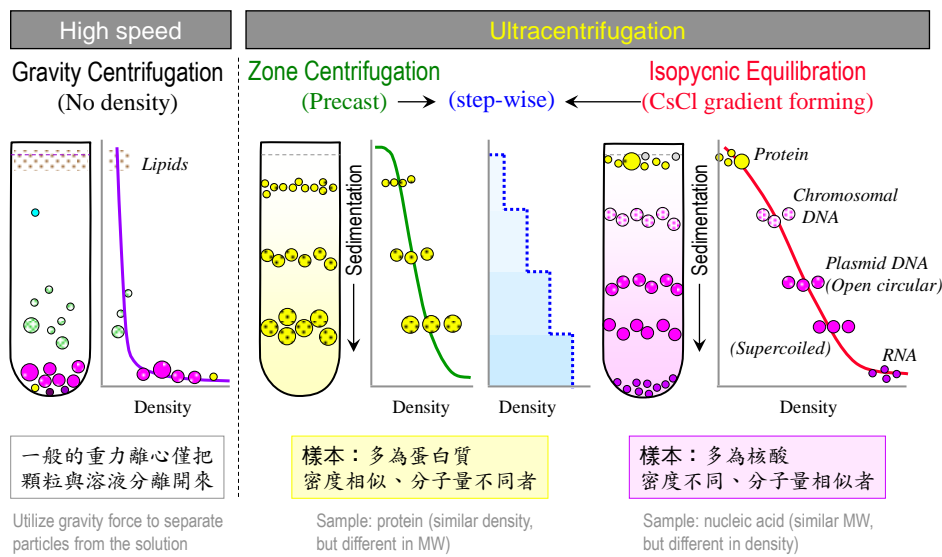
##### c. 兩種離心方式：

上述 b(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 3.1 兩種超高速離心比較 Two ultracentrifuge types**

Centrifuge	Sedimentation Velocity	Sedimentation Equilibrium
also called →	Zone Centrifugation	Isopycnic Equilibration
Gradient formation	Precast (sucrose, glycerol)	During centrifugation (CsCl)
	Shallow gradient, lower density	Steep gradient, higher density
Suitable samples	Similar density, different MW	Similar MW, different density
	Protein	Nucleic acid / cell organelle
Centrifugation conditions	Lower speed, not complete sedimented, stop at proper time	Completely sediment to where the density is equilibrated, high speed, long running time
中文名稱	區帶離心法	等密度平衡離心法

**圖 3.1 各種高速離心法比較 Comparison of centrifuges**



d. 離心陀種類：

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，離心管與地面成一角度。
- (2) 懸籃式 (swing bucket rotor)：傳統用在密度梯度離心，離心管與地面平行。
- (3) 垂直 (vertical rotor)：取代懸籃式，離心管垂直地面，可大大縮短離心時間。
- (4) 區帶 (zonal rotor)：較特殊的離心陀，整個陀內分成幾個區帶，注入梯度與樣本。
- (5) 連續式 (continuous rotor)：可一邊離心，一邊加入或取出樣本，多為工業使用。

e. 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，完全純熟後才能

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) 離心管的平衡要絕對準確，封管要確實，否則液体可能在真空中抽乾。
- (2) 使用懸籃式離心陀，在懸掛離心管時，要注意有沒有掛妥，前後方向是否正確。
- (3) 轉速切勿超過所使用離心陀的最高限，老舊離心陀的最高限還要打折。
- (4) 離心後要清理離心陀，可用水沖乾淨後晾乾，尤其使用 CsCl 者非清洗不可。
- (5) 時常檢查離心艙及離心陀，注意有無腐蝕及傷痕，有問題者立刻請廠商檢修。

### 3.3 超微薄膜過濾法：

#### a. 超微薄膜過濾技術 (ultrafiltration, UF)：

- (1) 使用具有極細孔徑的薄膜，可以分離分子量不同的分子。薄膜上細孔的大小固定，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。
- (2) 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。
- (3) 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。

#### b. 超微膜濃縮裝置：

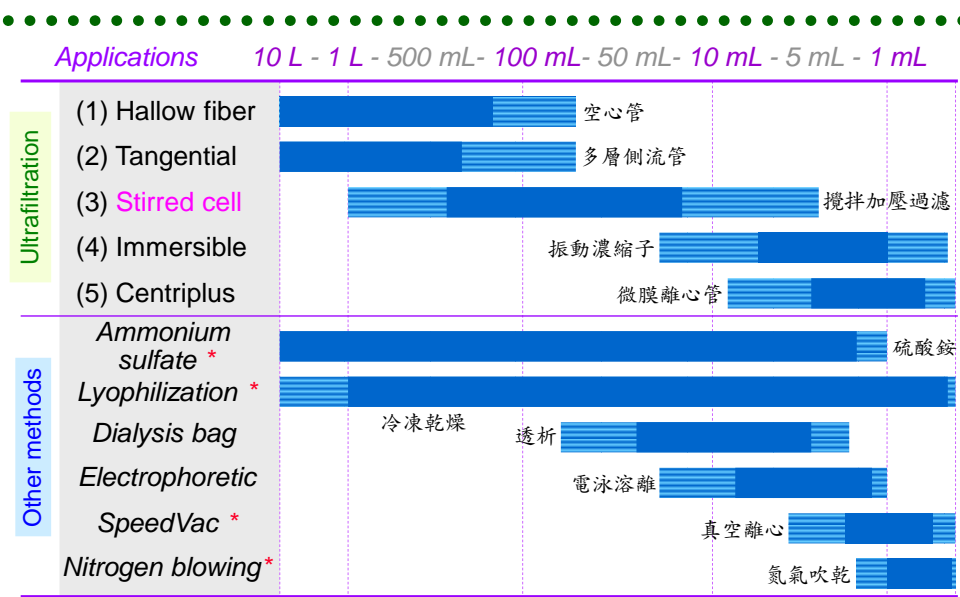
因樣本体積的大小不同，微膜有各種不同型態的設計，常用者如下：

- (1) 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，比較不會有局部濃度太高的問題。
- (2) 多層側流板 (tangential-flow)：多層微膜疊在一起，樣本溶液的流動方向與微膜平面成平行，小分子由側向微膜擠出，也較無局部過濃的問題。
- (3) 攪拌加壓過濾 (stirred cell)：加壓迫使小分子擠過微膜，大分子留在原處，並在薄膜表面攪動，以防止局部過濃而阻塞微膜細孔。
- (4) 振動濃縮子 (Immersible-CX)：濃縮子直接浸入含有樣本的試管中進行，微膜平敷在濃縮子表面，並以振動方式去除局部過濃現象，沒有無效體積，故樣本損失量較低。
- (5) 微膜離心管 (Centricon)：離心管中央安置一微膜隔離，利用離心力把小分子擠過，大分子留在原處，樣本數目多而體積少時，多採用此法。

#### c. 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、電泳溶離濃縮、真空冷凍離心、氮氣吹乾等。這些方法都很實用，但注意其中有部分在濃縮後溶液中的鹽濃度提高，可能會影響後續實驗，使用超微薄膜則無此缺點。圖 3.2 比較各種濃縮方法的適用體積範圍，一般實驗室常用的有：冷凍乾燥、stirred cell, Centricon (Centriprep) 及 SpeedVac。

**圖 3.2 各種濃縮方法的使用範圍 Useful ranges**



\* The salt concentration increases in the sample

**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. 進行製備式電泳時，明明只切出一條所要的色帶，為何再跑一次分析式電泳時 (SDS-PAGE)，結果往往令人失望，經常出現其它色帶？有那些可能原因？ [4\*]
2. 進行超高速離心時，大分子的那些因素會影響其沉降速率？ [1]
3. 為何 CsCl 可以在離心的過程中自動形成密度梯度？而蔗糖或甘油不能？ [3]
4. 進行 zone centrifugation 時，若離心過久而不適時停止，則所有的蛋白質會不會全部沉降在離心管底部？為什麼？ [4]
5. 垂直式離心是如何進行的？為何它能在短時間內達到分離效果？ [5]
6. 超微薄膜過濾與傳統過濾法有何異同？操作時的最大問題是什麼？ [4]
7. 以硫酸銨可以沉澱蛋白質下來，不但有蛋白質分割效果，也可做為濃縮的步驟；但與冷凍乾燥及真空離心等濃縮方法，有何共同的問題，會影響下一步純化步驟？ [3]
8. 某些情況下超微薄膜過濾的確對增進蛋白質的純度有所幫助，那是如何操作的？ [4]
9. 有那些純化方法是利用蛋白質的等電點不同來分離的？ [3]
10. 連續使用兩次相同的純化方法，經常無法得到有效的純化效果，請解釋原因。但在特殊情況下可連續用相同的方法，例如連續使用膠體過濾或離子交換法，請說明之。 [4]
11. 某生在進行硫酸銨分割，收集得蛋白質沉澱後，以最少量緩衝液溶之，得到 20 mL 粗抽取液。接著想進行膠體過濾，因管柱大小只能容納 10 mL 樣本，於是他用超微過濾法把樣本溶液濃縮成 10 mL 以進行下一步。請問他這樣做有無意義？會有什麼問題發生？若是你將如何處理？ [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]

