

P2 親和層析法

莊榮輝

親和層析法有點像在釣魚。釣竿是蟹殼幾丁質，釣餌是上次純化的 CHOM，用來釣胰臟抽取液中的胰蛋白酶 trypsin；這是因為 CHOM 對 trypsin 有專一性吸引力。蛋白質間的專一性吸引力，已成為最近生物化學探討的重要主題。

若 A 與 B 兩分子之間，有專一性的親和力，而我們手中已有 A；若欲由樣本混合物中，將所含的 B 分子分離出來，則最方便的方法，是先把 A 固定在一固定相 (solid phase) 上，當樣本混合物通過此固定相時，其中的 B 分子即被 A 吸附到固定相。俟洗去混合物中其它雜質後，破壞 A-B 之間的吸引力，溶離下 B，即可得到純質 B。親和層析法是很有效的純化方法，但並非任何物質均可應用此法，因為不一定能找到對它有親和力的分子。因此，進行親和層析法之第一條件為，尋找分子之間具有親和力的配對：



而其解離常數， $K_d = \frac{[A][B]}{[AB]} \sim 10^{-4}$ 至 10^{-8} ；親和力大小須適中。 [式 2]

可以用圖 P2-1 說明親和層析法的進行步驟：

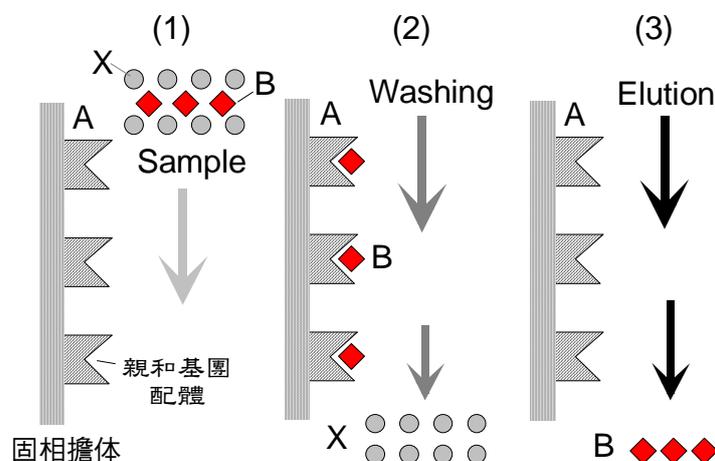


圖 P2-1 親和層析法的作用機理

- 1) 分子 A 已經被結合到固相擔體上 (斜線部份)，樣本準備通過之，其中含有所要分離的 B 分子 (◆) 以及雜質 (●)。
- 2) 當樣本通過此親和吸著劑時，只有 B 被吸著住，其餘雜質將直接流出。
- 3) 破壞 AB 分子之間的親和力，即可收穫得純質 B。

2.1 親和層析法的各項要素

要成功建立一個良好的親和層析法，必須考慮幾個重要因素，以圖 P2-2 說明之：

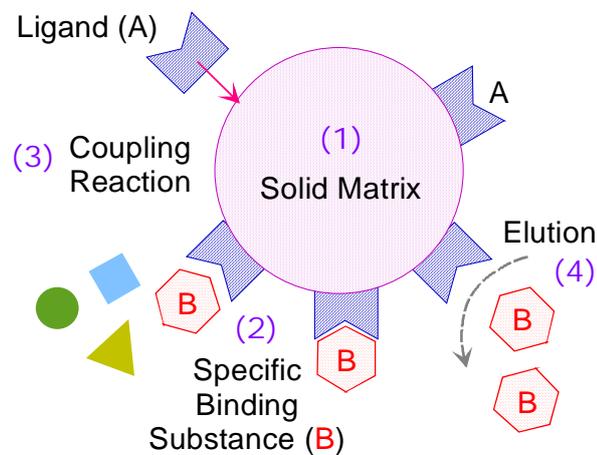


圖 P2-2 親和層析法的各項要素

2.1.1 良好的固相擔體 (solid support)

固相擔體的材質要有良好多孔性，通透性佳，構成的分子骨架本身穩定，無太大的非專一性吸附；最重要的是要具有相當活性的官能基 (functional group)，以便與其它分子鍵結。通常用作擔體的材質有：洋菜糖 (agarose)、聚丙烯醯胺 (polyacrylamide)、幾丁質 (chitin)、聚苯乙烯 (polystyrene)。

2.1.2 Ligand 及其專一性結合分子

配體 (ligand, 即鍵結在固相擔體上分子之統稱) 與其目標分子之間，要有相當強的親和力 (如上述)；例如 抗原-抗体、酵素-基質、荷爾蒙-受体 (receptor)、酵素-抑制因子 (如 trypsin 與 CHOM)。一般把較容易得到的分子做為餌，結合到固相擔體上，成為親和吸著劑 (affinity adsorbent)。

2.1.3 Ligand 與固相擔體間之的耦合反應

Ligand 與固相擔體之間，須有官能基可供鍵結反應：



常用的耦合反應如下列幾種：

- a) 以 carbodiimide 進行脫水反應，連結胺基與酸基。
- b) 以 CNBr 活化 agarose 醣分子上的醇基，可接上蛋白質的胺基。
- c) 固相接有 *N*-hydroxysuccinimide (可看作活化的酸基)，可與胺基反應。
- d) 以 glutaraldehyde (分子上有雙醛基) 為中間架橋物，可連接兩個胺基。

2.1.4 可溶離下所要分離之目標分子

可改變溶離的 pH、離子強度或其它方法；注意某些方法可能會使 ligand 或所欲純化之分子，受到不同程度的破壞。因此，所選用的親和性配對，兩者間的親和力也不能太大，否則很難把結合上去的蛋白質溶離下來。

2.1.5 實驗大綱

P2 親和層析法

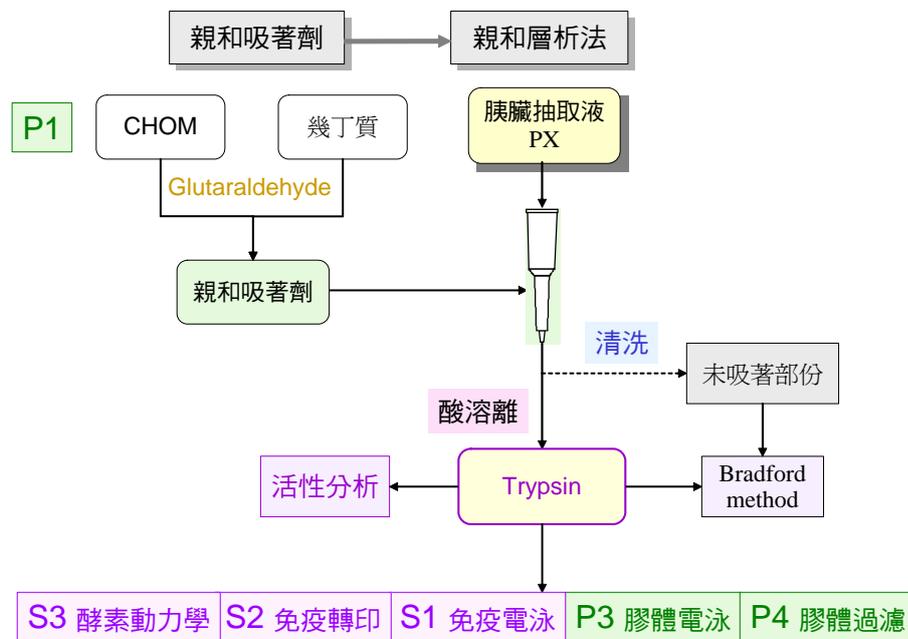


圖 P2-3 製備親和吸著劑與親和層析法流程

先做好親和吸著劑，裝入管柱後通入胰臟抽取液，再以酸溶離出所要的酵素。如此所得的到的酵素純度很高，將應用在後面的許多實驗，是個非常關鍵的步驟。

2.2 實驗操作

本實驗先製備幾丁質親和吸著劑，然後再加入胰臟抽取液，進行親和層析法。所有操作前，請檢查所有試劑及儀器，並確實瞭解其使用及操作方法。

2.2.1 儀器設備

- a) 小型塑膠管柱 (0.5×5 cm) 或用注射針筒亦可。
- b) 分割收集器 (Pharmacia 或 Gilson)：若無分割收集器，以液體高度估計體積。
- c) 小試管 20 支及試管架。
- c) ELISA 光度計 (Dynatech)。
- d) 微量滴定盤 (96-well microtiter plate)。

2.2.2 藥品試劑

- a) Chitin (幾丁質)：蟹殼曬乾，磨粉過篩後，以強酸、強鹼處理得之。
- b) CHOM (雞卵白粘多醣蛋白)：P1 實驗所純化的 CHOM 溶液。
- c) Glutaraldehyde (戊二醛 30%)：具雙官能基的連結劑。
- d) Tris-HCl 緩衝液 (0.1 M, pH 7.5)。
- f) 胰臟抽取液 (PX) 每組 8 mL：取 pancreatin 5 g 溶於 200 mL Tris-HCl 緩衝液，充分攪拌後，加入 5 g 矽藻土，並以過濾得到清澈的 PX 溶液。
- g) Coomassie Brilliant Blue G-250：蛋白質定量呈色用 (見 P1, 1.3)。
- h) 甲酸液 (0.1 M, pH 2.05)：改變 pH 以便溶離 trypsin 下來。
- i) BAPNA 合成基質液 (benzoyl-arginine *p*-nitroanilide)：可被 trypsin 水解呈黃色。
配製法：取 BAPNA 43.5 mg 加入 1 mL DMSO 懸濁均勻，等約 1 h 完全溶解，慢慢滴入 100 mL Tris (0.05 M, pH 8.2, 含 20 mM CaCl₂) 同時快速攪拌。

2.2.3 親和吸著劑之製備

- 1) 取幾丁質 2 g，盡量除去水分，置於 15 mL 塑膠離心管中。
- 2) 加入 4 mL CHOM 液，均勻懸著之 (剩下的 CHOM 請保留起來)。
- 3) 加 0.1 mL 25% glutaraldehyde，封口後混合均勻。
- 4) 在室溫反應 30~60 min，不時輕輕上下倒轉，均勻混合。
- 5) 以傾倒法用蒸餾水洗若干次，最後加適量 Tris-HCl 緩衝液懸濁之。
- 6) 裝入管柱，俟沉降後用 10 mL 緩衝液流洗，讓 Tris-HCl 慢慢通過，洗約數分鐘後備用。

2.2.4 親和層析法之操作

- 1) 如上準備好親和層析管柱，在 Tris-HCl 緩衝液平衡完全後，塞住出口，吸去吸著劑上方的液体，但勿使吸著劑乾掉。
- 2) 小心加入 8 mL 之胰臟抽取液 (PX)，不可弄亂吸著劑表面。
- 3) 打開出口，調整流速約每 4 s 一滴。
 - ◆請事先作好收集試管的準備：取 4 mL 水置入試管中，並在其液面高度做記號，然後以所收集流出液的高度，作為每一分劃的依據。
- 4) 馬上收集流出液，大約每 4 mL (或 80 滴) 收一支，約收 8 支試管；同時注意勿使吸著劑乾掉，當 PX 完全沒入吸著劑表面後，小心追加 Tris-HCl。
- 5) 收集 8 支試管後，關住出口；每支分別取樣 50 μ L，以 Bradford method 檢測蛋白質的量，到後面的試管應該已經完全洗淨，若尚未洗淨，再洗數支試管。
 - ◆若有必要，可以收集蛋白質濃度較高的幾隻試管，再通過一次親和管柱。
- 6) 再次吸去吸著劑上方之液体，改加入 0.1 M 甲酸液 (pH 2.05)，打開出口，流速降為每 8 s 一滴，馬上收集流出液，每 2 mL 收一支，收集 4 支後暫停。
- 7) 每支試管取 50 μ L 以 Bradford method 檢測蛋白質量，應在前面一兩支出現。
- 8) 同法取樣 50 μ L，在微量滴定盤上加入 200 μ L BAPNA 液，混合後稍稍加溫，樣本中若有 trypsin，則呈黃色反應；以 ELISA 光度計記下吸光值 (A_{405})。
 - ◆注意：前面所收集的 8 支試管也可以作 BAPNA 活性分析。
- 9) 吸著劑可用 0.1 M Tris-HCl 洗過後重複使用；但本次實驗完成後丟棄之。
- 10) 取呈色最深的一或兩支試管 (步驟 6 中) 置入一隻全新 15 mL 離心管，寫好組別後交出，下面實驗將以電泳檢定之 (分子量及純度)。
 - ◆若有兩隻呈色相同，可以混合後交出。

2.3 結果與報告

2.3.1 實驗結果

- a) 以條列方式，把整個實驗過程及步驟，一一寫下來，請勿直接抄襲 2.2 節。
- b) 收集所測得的吸光值作為 y 軸，並以各分劃為 x 軸，製作色析圖譜。可製作得兩條吸光曲線，一為蛋白質含量，另一為酵素活性，類似下面圖 P2-4。

2.3.2 附註說明：

- a) 親和層析法的純化效果非常好，但非萬能，有許多限制與缺點，應當注意：
 - 1) 並非所有的物質都可找到具有親和力的 ligand，也非所有的物質均能有效

地誘導出抗体。請試著舉出自然界中，所有可能的專一性配對分子。

- 2) 經常要使用強烈的條件，去溶離下所要的物質 (例如用 pH 2)，因而不免破壞物質的穩定性與活性。幸運的是，trypsin 在酸性環境下相當安定。
 - 3) 有時非專一性吸附很難避免，純化效果會打折扣；如何避免之？
- b) 圖 2-4 為親和層析法的典型溶離圖形。以本實驗為例，先洗去許多雜質，可能有些過量的酵素活性出現在後端 (*)；再用甲酸溶離 (箭頭處)，即可收得所要的 trypsin。為何甲酸可以把吸附上去的蛋白質溶離下來？
- c) 每一個分離階段的樣本，都可以收集起來，再以電泳分析其蛋白質成份。圖 P2-5 是圖 P2-4 所收得樣本的電泳結果，並以兩種不同電泳來檢視所含的蛋白質，請嘗試解釋所得電泳圖譜的意義。
- d) 我們將在下一個實驗進行各種電泳，分析本實驗所得到的純化產物。

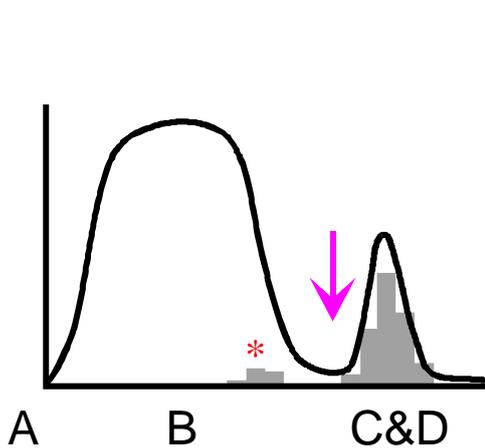


圖 P2-4 典型的親和層析圖譜

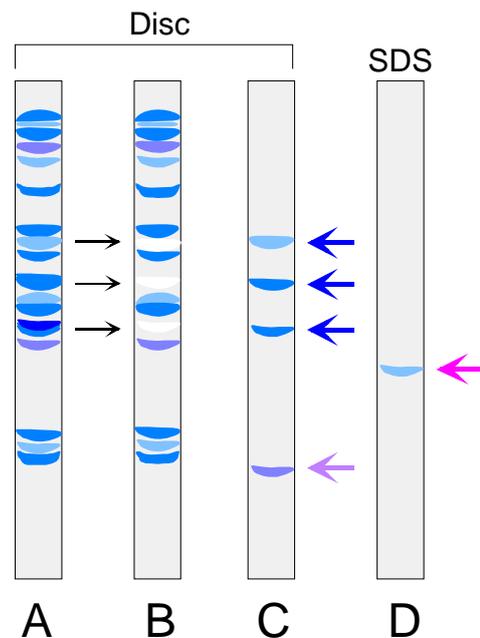


圖 P2-5 電泳分析結果

2.4 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 68, 128

蘇仲卿 張珍田 莊榮輝 (1981) 利用親和層析法分離豬胰臟蛋白質水解酵素 trypsin 和 chymotrypsin 之中間規模試驗。中國農業化學會誌。19: 218-226

Affinity chromatography - Principles and methods, Pharmacia

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.91

Scopes RK (1996) Protein purification - Principles and practice, 3rd ed, Springer-Verlag