

P4 膠體過濾法

莊榮輝

4.1 膠體過濾法原理

分子大小之不同，可用來作為分離或純化的手段，包括膠體過濾法、超微膜過濾法、超高速離心法、膠體電泳法等。其中以膠體過濾法最為常見，本實驗使用 Sephacryl S-300 作為分離介質，對大部分蛋白質樣本均適用，但要稍提高鹽濃度以克服其非專一性的吸附力。

4.1.1 色層分析法原理

膠體過濾法是色層分析法 (chromatography) 的一種，色析法廣泛被應用來分析複雜的成份，也可以純化所要的目標物質。那麼，色析法是什麼？

色析法都含有兩種相 (phase)，液相及固相就可算為兩相，例如一杯水中有一塊石頭，水是液相、石頭是固相；若問如何分開水與石頭？非常簡單，只要把水倒出，留下石頭即可。水是流動的，稱為流動相 (mobile phase)；石頭不動，稱為固定相 (stationary phase)。

這樣的兩相觀念，應用到色析法，就是看樣本中的各種分子，是比較喜歡跟著流動相走，還是喜歡留在固定相上，就可以把性質不同的分子分開。而樣本分子『極性』程度的大小，最常被用來作為兩相分離的基本依據；同時，流動相與固定相的極性也不同，通常其一偏向極性，而另一則偏非極性。樣本中的各種分子，依其極性程度，選擇留在固定相，或隨著流動相走，完全遵守『like dissolves like』的原則 (見圖 P4-1)。

4.1.2 膠體過濾是一種層析法

- 1) 膠體過濾法也是層析法的一種，因此也有兩相系統：其流動相就是注入管柱的緩衝液，緩緩把樣本帶入膠柱中；而固定相則是裝填在玻璃管柱中的膠球，這些膠球的本體有無

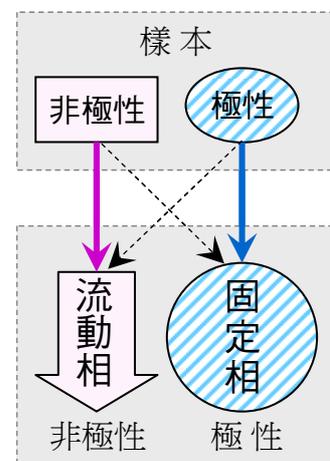


圖 P4-1 色層分析法的基本機制

數小孔洞，可以讓小分子游入其中，而排斥大分子，完全取決於樣本分子的分子量大小。

- 2) 因此，當樣本通過管柱後，分子量大者就會較快流出，而分子量較小者，就會被延滯，較慢流出；如此就可以把大小分子分開。
- 3) 其實，除了分子量之外，分子形狀也有影響。若兩個分子的分子量一樣，而一個是橢圓球形，另一為不規則形狀，則後者將會比較快流出；因為橢圓球形比較容易進入膠球的孔道中，不規則形則否。但是因為蛋白質的外型，通常大多是圓球形，因此可以只考慮分子量的因素。

4.1.3 膠球的種類

- 1) 這種具有孔道的膠球，大都是多醣類的聚合體，以控制多醣的密度，來調整所形成孔道的大小。最早出現的膠球，是葡萄糖的聚合多醣，稱為 **Sephadex**，由瑞典 **Pharmacia** 公司所出產。再來是由洋菜醣所衍生的 **Sepharose**，因為洋菜醣所組合出來的多醣骨架很堅固，以架出較大的孔道空間，因此可分離較高分子量的樣本（數百萬），比 **Sephadex** 的分離範圍（數十萬）大很多。
- 2) 這些膠球除了可作為膠體過濾之外，若在上面連結上離子基團，便可以成為離子交換介質。常見的是接上 **DEAE** 陽離子基團，成為陰離子交換介質，可用來吸引帶負電的分子；也有接上 **CM** 陰離子基團，則成為陽離子交換介質。

4.1.4 實驗大綱

P4 膠體過濾法

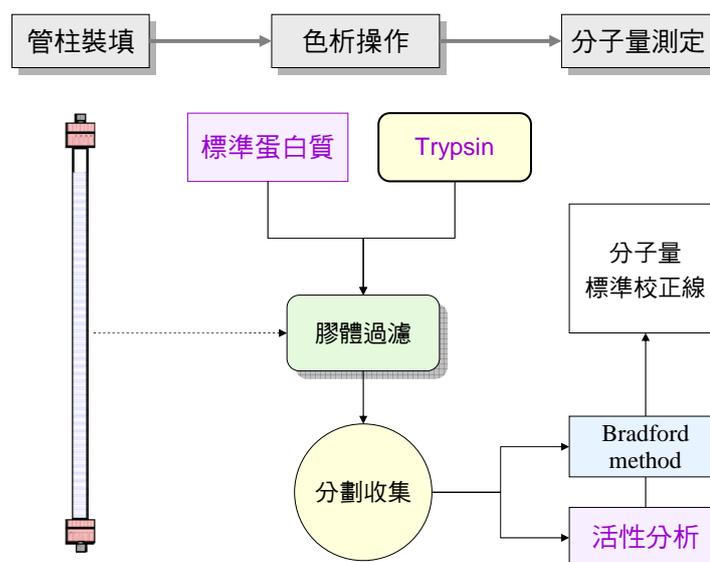


圖 P4-2 膠體過濾法操作流程

4.2 實驗方法

4.2.1 儀器用具

- a) 層析管柱 (Pharmacia C16 column, 100 cm) 最好附有 adaptor (AC16)。
- b) 蠕動幫浦 (Pharmacia peristaltic pump P-1)。
- c) 分割收集器 (fraction collector, Gilson 或 Pharmacia) 加 100 支試管。
- d) ELISA 光度計及微量低定盤。

4.2.2 藥品試劑

- a) 膠體 Sephacryl S-300 (Pharmacia)。
- b) 緩衝液 Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, 含 0.15 M NaCl。
- c) 標準分子量蛋白質 (Bio-Rad 151-1901): Thyroglobulin (670 kD); bovine gamma globulin (158 kD); chicken ovalbumin (44 kD); equine myoglobin (17 kD); vitamin B-12 (1.35 kD)。
- d) Trypsin 樣本為你在 P2 實驗純化所得者，約需 0.2~0.5 mL，視其活性而定。

4.2.3 管柱裝填

本實驗的膠體管柱，均先由助教裝填好，同學只要加入樣本即可；但以下也把膠柱的裝填方法寫出，以為將來自行裝填時參考。同學也可事先詢問助教裝填管柱的時間，以便屆時在一旁觀摩操作情形。

- 1) 預先將管柱洗淨、晾乾後備用，也要熟悉整隻管柱的拆裝方法。
- 2) 架起管柱，以水平儀調整管柱，使之與地面垂直。
- 3) 於管柱中加入約一半高度的緩衝液，測試管柱是否有漏水現象；若沒有漏水，則讓緩衝液流出，只留約 5 cm 高的緩衝液；以塞子暫時堵住下方出口。
- 4) 取出所要使用的膠體，先除去所含的 20% 酒精，並平衡在緩衝液中。
 - ◆ 若是在室溫中進行層析法，一定要等膠體的溫度完全回復室溫才可裝填。
- 5) 將所要裝填之膠體搖盪均勻，不要有未散之硬塊，也避免氣泡產生，若有氣泡產生則以超音波震盪器 (sonicator) 趕出，並以抽氣去除之。
- 6) 將上述混合均勻之膠體，以玻棒沿管壁流暢倒入管柱，並且避免使得氣泡陷在膠柱中；可在裝填後，以手電筒在膠柱後方打燈光檢查之。
- 7) 利用重力自然沈降 1~2 min 後，移去管柱下方軟管的塞子，利用流速加快沈降，注意不可使管柱上方的液相完全乾去。
- 8) 待膠體已沈降完全，用塞子止住下方軟管，並且以緩衝液加滿管柱。

- 9) 取出管柱的 adaptor 並接好軟管及蠕動幫浦管路，並使整個幫浦及軟管內，完全充滿緩衝液，不得有任何氣泡陷在裡面。
- 10) 小心將 adaptor 放入管柱內，往下推至膠面上方，檢查有無氣泡留滯在 adaptor 下面，然後鎖緊 O-ring。此時 adaptor 與膠面間有一小段充滿緩衝液的空間。
- 11) 移去管柱下方軟管的塞子，用幫浦注入緩衝液流洗兩個管柱體積。
- 12) 暫時停止幫浦輸送，用塞子止住下方軟管，放鬆幫浦使管路呈流通狀態，稍微旋開 adaptor 的 O-ring，將 adaptor 緩慢下壓，液體會從幫浦上端軟管流回去，當壓至膠面時，即旋緊 O-ring，鎖上幫浦門，移去管柱下方軟管的塞子。
- 13) 以預定流速 (80 mL/h) 之 150% 流速流洗 1~2 管柱體積。
- 14) 檢查膠面是否因高壓流洗而下降，若降低則重複步驟 12) 把 adaptor 往下壓。
 - ◆ 若有時間，將安排示範膠體的裝填方法。

4.2.4 層析操作與分子量測定

- 1) 請先測量管柱的膠體高度為多少？若管柱底面積為 2 cm^2 ，請計算出該管柱的膠體總體積為若干 mL？
- 2) 把所純化得之 trypsin 取適量加入標準蛋白質中，一起以幫浦注入管柱，膠體過濾的樣本體積約為膠體總體積的 1%；若兩者都為 0.5 mL，則總共樣本體積為 1 mL。注意樣本的溫度與膠體不可相差太多。
 - ◆ 樣本通常都由低溫處取出，其溫度可能與膠體有差異。
- 3) 在注入樣本後，以預定流速進行溶離，膠體過濾層析法即開始進行，要馬上啟動分割收集器；所有溶離物質，應在大約 1.5 倍管柱體積之內流出。
 - ◆ 注意膠體管柱絕對不能吸入氣體，因此當樣本快要吸盡時，要適時停止。
 - ◆ 流速通常為 30~80 mL/h，每分割收集 3 mL，或定滴數為 60 滴。
- 4) 通常樣本注入後，即可由幫浦自動輸液，並以分割收集器自動收集溶離液，操作者在此段時間最好經常回來巡視，以免幫浦或收集器發生故障，影響實驗進行。同時，請觀察標準蛋白質的色帶，如何逐漸分離開來。

4.3 結果與報告

4.3.1 實驗結果

- a) 若一切順利，你將收到約 90 支試管，請注意後面的幾支試管，應該出現紅色的物質 (vitamin B₁₂)，否則可能色析操作發生問題。
- b) 每支試管進行 (1) 蛋白質定量以及 (2) trypsin 活性測定，得到兩組數據。以分割管數為橫座標，蛋白質 (實線) 或活性測定 (虛線) 的吸光值為縱座標，畫出

色析圖譜的結果。實線可能有數個尖峰，而虛線應該只有一個尖峰。

- c) 辨別各標準蛋白質的尖峰，並指出其管數，另做一張標準校正線作圖：同樣以分割管數為橫座標，但以分子量為縱座標，縱座標請用幾何級數刻度。請注意也要把 vitamin B₁₂ 的分子量及管數加入作圖。
- d) 把活性曲線 (虛線) 尖峰的管數，內插到上面的標準校正線，則可求出 trypsin 活性出現尖峰的分子量。

◆ 假如兩個蛋白質的分子量幾乎相同，那能不能在膠體過濾分別出來？

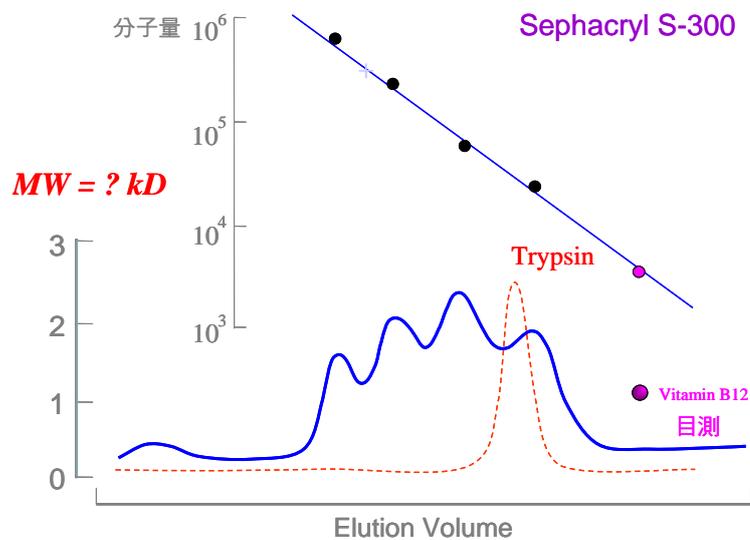


圖 P4-3 分子量標準校正線

4.3.2 複習問題

- a) 在色析過程中，標準蛋白質在管柱內的移動情形如何？色帶是否平整？
- b) 除了以膠體過濾法之外，還有那些方法可測得分子量？
- c) 若使用膠體電泳法測定分子量，與膠體過濾法有何異同？
- d) 有那些問題可能會影響膠體過濾法測量分子量的正確性？

4.4 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 119, 200

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.89-92

Scopes RK (1994) Protein purification - Principles and practice, 3rd ed, Springer-Verlag