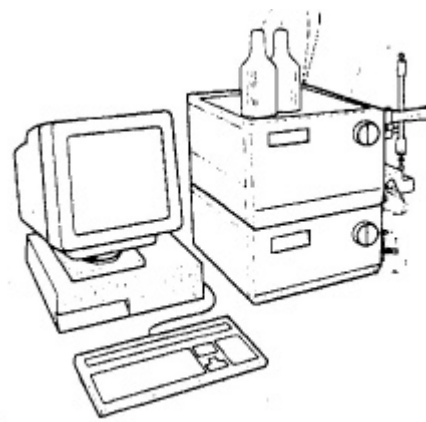


生物物理核心實驗



蛋白質純化與分析技術

作者：葉旭成、林伯彥 助教

張家靖 教授

一、實驗目的：

拜生物科技進步所賜，可以使用多種方式來產生蛋白質，但是有一些方式所產生的蛋白質純度並不那麼的高，由於此雜質的影響，會使得我們在分析蛋白質特性時產生誤差與困難，於是就需要採取純化的方式來使蛋白質分離出來。而此實驗就是使學生瞭解蛋白質的純化與分離之原理與方法，包含使用之儀器→高效能液相層析技術（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）的原理與應用，進而對蛋白質理化特性有進一步的瞭解。

二、實驗原理：

蛋白質純化所使用之原理，主要分為以下三部份：

1. 蛋白質定量：

蛋白質內之胺基酸若含有芳香基團其基團內之共價鍵結會吸收280 nm附近之紫外光。依 Beer's law及每一蛋白質所具有之extinction coefficient即可計算其濃度。

$$\text{Beer's Law} \rightarrow \log \frac{I_0}{I} = OD = e \times l \times C$$

OD = absorbance (usually at the wavelength of maximum absorption)

e = Extinction Coefficient for the substance being analyzed (usually greek epsilon)

l = path length of the cuvette (usually 1 cm)

C = Concentration (in units related to extinction coefficient, ie. 1/E), If the E is a molar extinction coefficient (cm/M), the concentration is M or moles/liter

此一吸收值與濃度之相關性在 OD 值小於 1 時呈線性關係。但當 OD 值大於 1 以上時由於電子被激發到飽和的狀態，其濃度與吸收值的關係式就非為線性關係（Fig 1）於是我們做實驗時，就需要將濃度利用背景緩衝溶液稀釋到達吸收值小於 1 的情況，濃度測量出來才會準確。

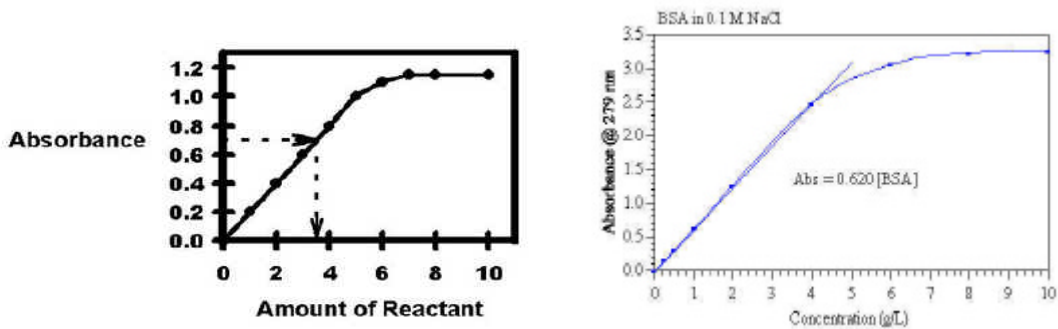


Fig 1: 吸收之 OD 值與濃度的關係圖^{註 1.2}

2. 層析蛋白質純化法:

儘管各種不同的層析法的技術及特性各有所不同，不過基本原理都是類似的。所有個層析系統都是由互不相溶的兩相組成，一個是固定相 (stationary phase)，另一個是流動相 (mobile phase)。利用混合物中各成分的物理化學性質的差異性 (如吸附力、分子形狀、大小、極性、親和力、分配係數等)，使各個成分以不同的程度的分佈於兩相之中，它們以不同的速度移動，最終它們就會彼此分開。

- (1) 在一般穩定態之下，可以得到 partition or distribution coefficient 為溶質在兩相中濃度的比值，為一常數 K_D 。

$$K_D = \frac{\text{溶質在固定相的濃度}}{\text{溶質在流動相的濃度}}$$

實驗證明，某一物質在層析系統的行為並不取決 K_D ，而是要看 effective

distribution coefficient K_{eff} ， $K_{eff} = K_D \frac{\text{固定相體積}}{\text{流動相體積}}$ 。一般差異越大，越容易

分開。不過實際上，整個層析步驟是連續的，一般來說一之正常工作的管柱會有數千次的平衡，這個平衡的次數稱為 theoretical plate，則 theoretical plate 越高，分離的就會越完全。而 theoretical plane 的計算方式為：(Fig 2)

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

W_H 為半高寬。

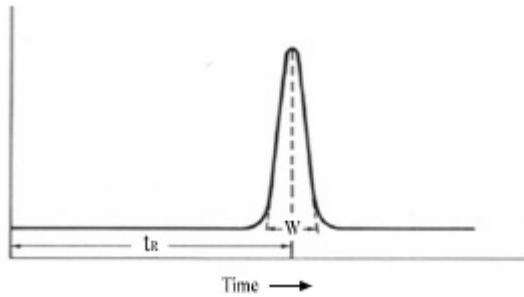


Fig 2 HPLC 的半高寬與時間圖形

(2) 分離方式有許多種類，如 Ion exchange ; Hydrophobic interaction ; Affinity ; Reversed Phase...等許多方式，本次實驗是使用 ion exchange 來分離，所以就以 ion exchange 的原理來討論與解說，同學若有興趣可以翻閱介紹 HPLC 的書籍。基本上 ion exchange 為一種使用吸附方式的層析法。它基於所要準備分離物質的陽或陰離子相對應的離子交換劑間的靜電結合，及根據物質的酸鹼性、極性等差異，通過吸附物時而將電解質容液分開，其中流動相為流動相為溶離緩衝液，固定相為介質表面的帶電基團 (Fig 3) 離子交換前的吸附能力，根據不同的電性是有不同的效果。

Anion Exchange

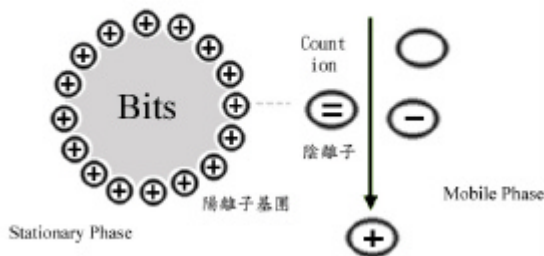


Fig 3 陰離子交換樹脂之示意圖，左右兩端分別為固定相與流動相。

- 其中
- (1) 高電荷會取代低電荷；
 - (2) 電荷相同，原子序大者較好；
 - (3) 濃度高的也可以取而代之。

而在離子交換樹脂中，我們將樹脂製成小圓粒，係用Polystyrene交織成網狀似海棉，不會溶解上帶有許多陽離子或陰離子來供交換使用，故可分成陽離子樹脂和陰離子樹脂，凡帶有較易解離的基團者，叫強離子交換劑，只有少部分能解離者，叫弱離子交換劑。陽離子交換樹脂是含有可與其附近陽離子交換，但並不改變樹脂本身的主要物理性質。交換過程中，和蛋白質的大小、

質量或形狀等並無直接相關，所以對於區分一些序列相近的蛋白質效果不是很好。固定相的材質對於純化效果佔很大因素，一般有cellulose、agarose和vinylbenzene。不同材質在不同pH條件下，也有不同的解析度，而且不同amino acid side chain和不同固定相材質也有不同的作用力。因此，在選擇固定相的材質同時，也必需對所要純化的蛋白質有一定的了解。

- (3) HPLC 為分析技術中應用最廣泛的一種層析法，層析分離過程之欲分離的成份需先溶於溶劑中，然後在高壓下注入分離管柱，樣品中的各個成份藉由移動相的帶動，滲透通過分離管柱中的固定相。各成份的移度依其平衡分佈狀態而定，有些成份和固定相之間的作用力不大，很快地被沖洗出分離管柱，而有些成份與固定相作用力較大，則較慢沖洗出來。Fig 5 為 Amersham Biosciences 公司所製造高效能液相層析儀(HPLC)，型號為 AKTAbasic 10。而 HPLC 為高效能的層析工具，利用高壓力來推動的溶液，來加速分離的效果。因為可以使孔徑變小，通常使解析度增加，與速度加快，為此實驗方法的極大優點。

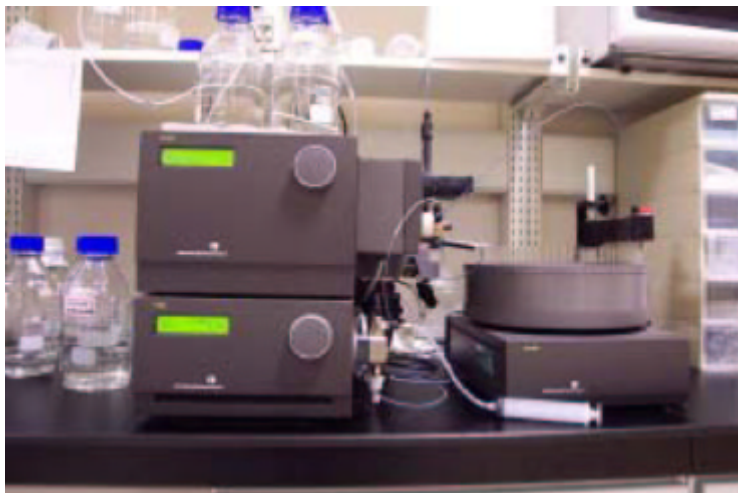


Fig 5 HPLC，分為三部分，左上 UV-900，為層析儀主要部分，包括層析管柱（外接），UV 偵測儀等，左下 P900，含有二組蠕動幫浦，以提供輸送溶液所需動力，右下為 Frac-900，收集層析出來的樣品

3. 蛋白質電泳分離法：就是將帶電顆粒在電場的作用下，使其向著與其電性作用方向相反的電極移動。

(1) 電荷來源：蛋白質是由胺基酸組成，而胺基酸本身帶有可解離的 $-NH_3^+$ 和 $-COO^-$ ，是典型的兩性電解質，在一定 pH 的條件下就會解離而帶電。若溶液的 pH 值大 pI ，則蛋白質會解離 H^+ 帶負電；反之，蛋白質會結合一部分的 H^+ 帶正電 (Fig 6)。通常所選取的溶液 pH 值會在等電位在高一個 pH 或少一個，好讓蛋白質能有明確的電性。因為泳動率 $U = \frac{v}{E} = \frac{dl}{Vt}$ ，且球形分子在電場所受之力為 $F = EQ$ 且根據 stoke 定律，一球形分子在液體中所受摩擦力 $F' = 6\pi r\eta v$ ， η 為介質的黏度， r 為分子半徑， v 為分子移動速度。當平衡時，

$$EQ = 6\pi r\eta v$$

$$v = \frac{EQ}{6\pi r\eta} ; u = \frac{v}{E} \quad \text{所以} \quad U = \frac{Q}{6\pi r\eta}$$

由上式可見泳動度與球形分子、介質黏度、顆粒所帶電荷有關。分子量者摩擦力大，泳動率小；球形分子摩擦力較小，泳動率大。

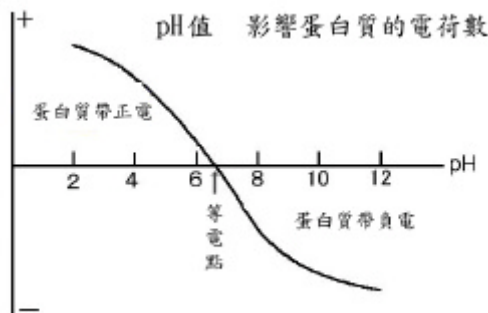


Fig 6 pH 對蛋白質電荷數的關係圖


(2) 如何讓蛋白質帶上均勻的電性呢？其中 SDS 是最主要的工具，它就像是清潔劑一樣，一邊與蛋白質結合，另一邊則跟溶液結合，而將蛋白質拉開。再加入適量的 APS，最後整條蛋白質就可以帶著均勻電性了。

三、實驗操作步驟：

1. HPLC 之樣品純化：

(1) 開啟軟體前先将儀器管路裝置好 (Fig 7)

(2) 啟動軟體 UNICORN 

- (3) 開啟後輸入登入帳號，登入後會開啟 4 個子程式：main, method editor, system control, and evaluation
- (4) 實驗流程設計
 - 4.1 點選 method editor，開新程式，選擇[Wizard]模式
 - 4.2 選擇使用層析方法（如[anion exchange]）及層析管柱
 - 4.3 設定偵測波段，如 280nm
 - 4.4 選擇注入樣品方式，選擇[manual]，並設定 sample loop 體積[5 ml]
 - 4.5 設定樣品注入後，收集溶液的體積
 - 4.6 設定開始層析（buffer B 濃度開始增加）後，收集溶液的體積
 - 4.7 設定收集 peak 的條件，依實驗狀況選擇[level]或[slope]，及收集體積
 - 4.8 設計 buffer B 濃度梯度的變化，可設計線性梯度、多區間梯度等
 - 4.9 實驗流程設計完成
 - 4.10 在控制列上點選，可將實驗流程稍做修改，以配合實驗條件，獲得更高層析效率
- (5) 樣品準備
 - 5.1 一般未知樣品需先以 0.25 μ m filter 過濾，定量。純化時，所注入濃度不可超過層析管柱所能承受範圍。
 - 5.2 實驗所使用緩衝液為 buffer A, B 均需以 0.45 μ m filter 過濾。
- (6) 將樣品以針筒注入 sample injection 中，注入時確定針筒裡無氣泡出現，樣品注入前先以去離子水和酒精清洗 sample loop 數回。幫浦運作前需先以針筒抽掉裡面空氣，再進行 pump wash 的動作，這個動作是為了防止氣泡進入 column 裡。
- (7) 將試管排在 auto fraction 的轉盤中
- (8) 開始實驗

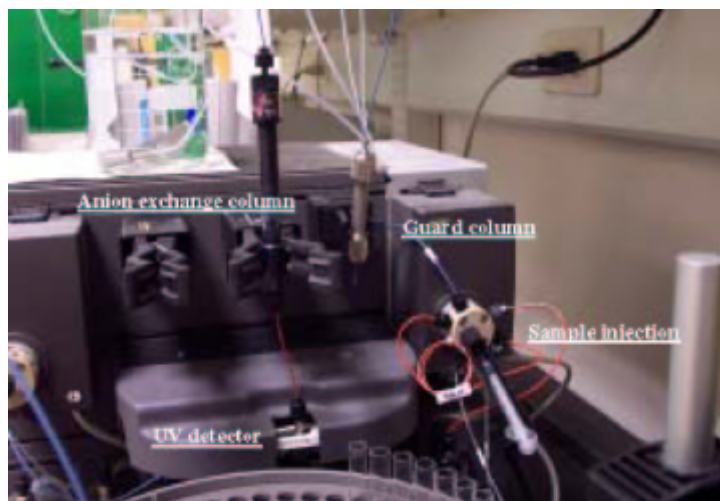


Fig 7 HPLC 側面圖，包含了 column, Sample injection, UV detector, 以及圓形的 auto fraction 四個部份。UV detector 包含了三種光以供偵測, 有 280 nm, 254 nm, 214 nm。

- 8.1 檢查所有管路、buffer是否異常，如正常，則在[system control]中按下[run]
 - 8.2 選擇實驗流程
 - 8.3 輸入實驗條件，如管柱種類，緩衝液等，做為實驗記錄。
 - 8.4 最後點選[start]開始實驗
- (9) 整個純化過程依實驗流速、層析管柱種類，時間會有不同。
- (10) 純化完成後，電腦會顯示在不同時間(或流量)時，蛋白質被層析出來，分別被收集到不同試管中，收集不同 peak 對應的試管裡的溶液。
- (11) HPLC 實驗完成後，需對儀器進行保養。

將 A,B inlet 放入過濾過的 RO 水中，column 以 20%EtOH store 起來，系統所有管路以水清洗，包括 pump wash 動作，sample loop 以清水洗數回。

2. 樣品濃縮取樣：

將收集的液體冰到-80 冰箱，等凝結後拿去做離心冷凍乾燥。冷凍的目的是直接讓 buffer 昇華，以節省速率，更可以確保 sample 不會在乾燥的過程中不會有所傷害。

3. 製作蛋白質電泳^{附錄}

- (1) 將純化出來的蛋白質作先做處理，溶入 sample buffer 中。
- (2) 連同 protein maker (稀釋 10 倍) 一起拿去用開水煮 5 分鐘，來讓蛋白質能夠分的更開些。
- (3) 將電泳組清洗裝置完成，清洗法：H₂O? 酒精? H₂O? 擦乾
- (4) 注入 Mini gel 3.2 ml 然後加水壓平後等凝固。
- (5) 等到 Mini gel 凝固後，倒出水，利用衛生紙將水吸乾
- (6) 注入 stack gel 至滿，蓋上可以產生 well 的插子。
- (7) 將備製好的蛋白質 load 進去 well
- (8) 玻璃片中的內外層 buffer 依據不同的性質放置不同的 buffer，內為正電 buffer，外為負電。但對 Mini gel 而言，running buffer 不管內外都是使用 tank buffer。
- (9) 插上電源，正負極需正確，紅對紅，黑對黑。跑 150V 約 60min，直到 band 跑到離最下面 1cm 處。
- (10) 跑完後將 gel 取出，加入染劑？Comassie Brilliant Blue，搖晃染色一個小時，染久無所謂，只是讓 gel 更加均勻而已。
- (11) 退染使用 Destain 1 buffer，先將染劑倒出後用清水沖洗，在加入一些些的 Destain 1 buffer，放入一張衛生紙來萃取退染後的染劑。搖晃退染約半小時 1 小時。記住不可超過，否則會造成所有的東西都被退染掉。
- (12) 然後再換成 Destain 2 buffer 放一整個晚上，為稀釋 10 倍的 Destain 1 buffer，目的是退染整個背景的颜色。
- (13) 最後將 gel 用玻璃紙乾燥起來保存。

四、測試結果與討論：

HPLC 是使用 column 來分離 protein，不過由於 column 的孔洞很小，所以接受的蛋白質濃度，是有一個最大限度的，如果超過則會使得整個 column 塞住，

或者是為了將樣品通過 column 需要使用極大的壓力，結果就是會使得 column 內部的樹脂破裂。所以我們需要將濃度稀釋製可接受之範圍內，一般 column 都有設定其最大濃度範圍為何。所以 UV 定量是十分重要的工作，不過在模擬此次實驗時，所使用的兩種蛋白質：Lysozyme 以及 Bovine Serum albumin (以後簡稱 BSA)，雖然並未定量，但是樣品取樣時，只是取出各約 1 mg 左右的蛋白質來混合於水溶液中，可以確定濃度沒有超過 column 所可接受的濃度，於是並沒有使用 UV 來定量。

1. 下圖為 HPLC 所顯現出來的結果。由於機器的條件，可以用來偵測的波長共有三種，通常在三兩波段都存在時，較可以確定包含蛋白質在其中。但最主要看的波段是 280 nm 的吸收值，也就是藍色的 peak。當 B buffer 的濃度漸漸增高之後（綠色的線條代表的是 B 容易的在 buffer 中的比例），也就開始使用陰離子交換之時，由於電性的不同，電性低的或者帶電濃度較低的 sample 就會 elute 出來。結果 elute 出來的藍色 peak 只有兩個，因為三種光譜所包含的吸收值都出現在 peak 中，所以可以確定這兩個應該是蛋白質沒錯。但是中間有一個小小的 peak，皆為 214nm 的吸收值，此為生態鍵的吸收，但因沒有 280nm 的吸收，所以我們暫且不考慮收取，只收取 1 與 5,6 兩管進行分析。

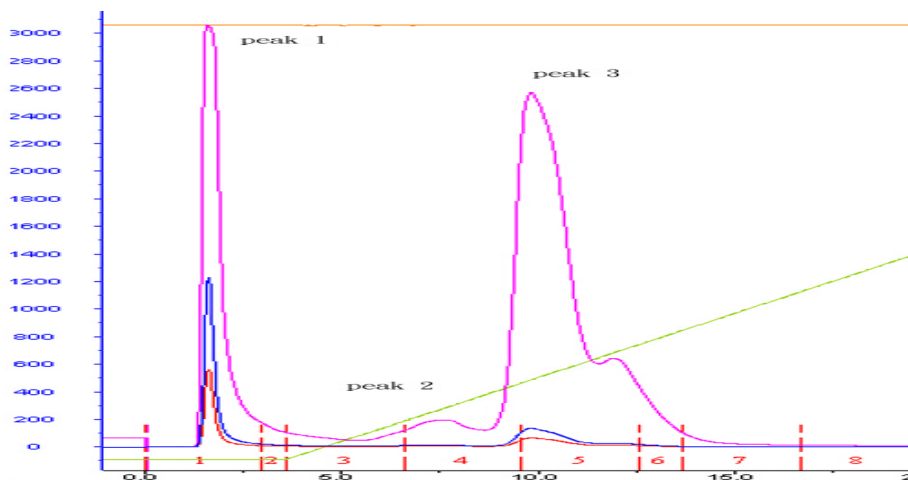


Fig 8 HPLC 實驗所展示出之結果，包含了兩個吸收峰。

2. 計算 the number of theoretical plate ,看看這 column 與所搭配的 buffer 以及控制的 flow rate 之效率。

	t_R	Wh	N
Peak 1	0.79	0.13	204.587
Peak 2	4.89	0.65	313.546

相較於標準值的數萬次而言，實在是太過於低了。此數據可供下次實驗作為改進之用途。

3. 蛋白質 gel 結果分析。

- 先將兩個 peak 所收取的 sample 冷凍乾燥後，經過蛋白質 gel 分離後所顯現的圖 (Fig 9)，結果 peak 1 相對於 marker 第七條的位置有一條 beam，peak 2 則是第二條的位置有一條 beam。

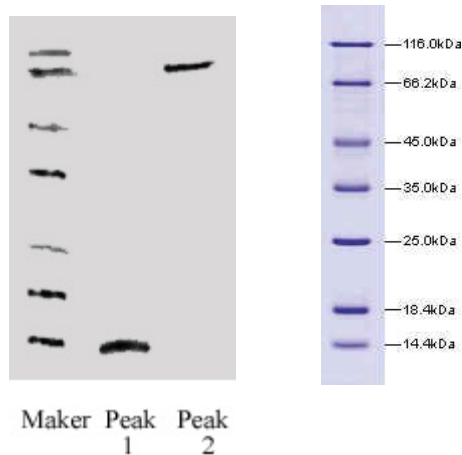


Fig 8 Protein gel 與相對應之 Marker 圖形，可以看出約 66.2 KD 與 14.4 KD 的位置有蛋白質表現出來。

- 此實驗所用的 Protein Molecular Weight Marker 為 mbi Fermentas #SM0431，是由 7 種蛋白質組成，成分請參考附錄。根據 maker 的資訊，純化出來的蛋白質維相對於 maker 的第二與第七的蛋白質，可以推斷出 66.2 與 14.1。KD 的位置有兩種蛋白質。

五、問題：

1. 為何不同的蛋白質有不同的論板數？
2. 在 anion exchange 的實驗中，先 elute 出來的蛋白質特性為何？
3. 附錄中 gel 的配方，gel 的百分比指的是什麼藥品的比例？請找出此物品之結構，並說明此物品在此實驗中所扮演的角色。
4. 承上題，比例越大或越小對蛋白質電泳實驗會產生怎樣的結果？

六、參考資料：

1. <http://www.bio.mtu.edu/campbell/bl4820/lectures/lec1/482lec1.pdf>
2. http://www.protein-solutions.com/psi_books/laboratory_reports/cell_comparison_beer_s_law_region_for_lysozyme.htm
3. 生物化學實驗原理與方法 p.3 (藝軒出版社)
4. <http://binfo.ym.edu.tw/exp/class1/protein/protein.PPT>
5. <http://www.fermentas.com/catalog/markers/marksm0431.htm>
6. http://gc.discussing.info/gs/b_theory/column_efficiency.html

附錄一 buffer 與 gel 配方

➤ Sample Buffer

	2X
0.5M Tris-Hcl (PH=6.8)	2.0 ml
10% SDS	3.2 ml
2-mercaptoethanol (10%)	0.8 ml
0.1% Bromophenul Blue (1mg)	0.32 ml
Glycerol	1.6 ml
ddH2O	0.08 ml
Total	8.0 ml

* β -Me 作用是打斷雙硫鍵，一般用 β -Me 0.8 ml 取代 DTT，因為效果較好。另外視實驗需要有時不加 β -Me 或 DTT，等 Buffer 配完後再加入 100x dilute or 1000x dilute β -Me，我們實驗常用 100x dilute β -Me。混合均勻後利用針筒過濾器來過濾，保存時放置於冷凍庫。

➤ Stain buffer

Acetic acid	100 ml
Ddwater	450 ml
Methanol	450 ml
Coomassie blue G-250	2.5 g

Methanol 可用 ethanol 代替，coomassie blue 可用 coomassie brilliant blue 代替，store at room temperature

➤ Destain solution 1

Acetic acid	100 ml
ddwater	100 ml
Methanol	450 ml

➤ Mini gel : (SDS-page)

1. Running gel

	10%	12%	15%	18%	20%
ddH2O	4.87ml	4.37ml	3.62ml	2.87ml	2.37ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
10% SDS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
40% acrylamide	2.5ml	3ml	3.75ml	4.5ml	5ml
10% APS	70 μ l	70 μ l	70 μ l	70 μ l	70 μ l
TEMED	7 μ l	7 μ l	7 μ l	7 μ l	7 μ l

2. Stacking gel

	4.75%
ddH ₂ O	2.43 ml
0.5M Tris-HCl pH 6.8	1 m
10% SDS	40μl
40% acrylamide	0.5 ml
10% APS	50μl
TEMED	5μl

3. The final tank buffer composition is 50 mM Tris.HCl pH 8.3 / 196 mM glycine / 0.1% SDS made by diluting a 10x stock solution. This goes in both top and bottom tanks.
4. Run mini gel use 150V at room temperature ~ about 60 min

附錄二 Protein Maker

Protein	Source	Molecular weight,kDa
beta-galactosidase	<i>E.coli</i>	116.0
Bovine Serum albumin	bovine plasma	66.2
Ovalbumin	chicken egg white	45.0
Lactate dehydrogenase	porcine muscle	35.0
RE <i>Bsp98I</i>	<i>E.coli</i>	25.0
beta-lactoglobulin	bovine milk	18.4
Lysozyme	chicken egg white	14.4

