

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

## 以酸鹼區域精鍊法分離蛋白質 Protein separation using pH-zone-refining

計畫類別： 個別型計畫          整合型計畫

計畫編號：NSC 89 - 2113 - M - 009 - 016 -

執行期間： 88 年 08 月 01 日至 89 年 07 月 31 日

計畫主持人：余 艇

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立交通大學應用化學系

中 華 民 國 89 年 10 月 8 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 89 - 2113 - M - 009 - 016 -

執行期限：88 年 08 月 01 日至 89 年 07 月 31 日

主持人：余 艇 國立交通大學應用化學系

## 一、中文摘要

**關鍵詞：**酸鹼區域精鍊法，逆向流層析，微胞，反微胞，蛋白質濃縮。

本研究是期望以逆向流層析最近發展出來的一種新技術-酸鹼區域精鍊法，來分離蛋白質。逆向流層析是一種液相/液相層析，它的特點是分離管柱中沒有填充固體支持物，分離所需的靜相是純粹的液體，經由重力或是向心力將其滯留於管柱中；由於靜相在管柱中的比例很高，以至於分離樣品的量很大，是一種製備型的層析，同時因為沒有固體支持物在管柱中，樣品也不會因為永久吸附而損失，很適合用於天然物的分離。

酸鹼區域精鍊法，是以分析物在不同酸鹼度之下，解離程度的改變，使得在靜相（有機相）和動相（水相）中的分配係數不同，而發生的層析現象。它的特點是，分離的容量甚至大過一般的逆向流層析，而且在層析過程中，有聚集濃縮的作用發生，以至於分離的解析度很好。不過目前這個技術還無法用於蛋白質的分離，原因是蛋白質在有機相中幾乎不溶，所以無法在靜相中有任何滯留，自然也就不能進行層析。我們原先的計畫是要調整動靜相系統，亦即加入介面活性劑，使得蛋白質也可以溶在靜相中，如此，就有機會進行酸鹼區域精鍊法。

本計畫研究之結果發現無法成功的使用反微胞來實施酸鹼精鍊法，其原因是當蛋白質進入反微胞相之後，調整酸鹼度，使得蛋白質傾向返回到水相中，雖然在熱

力學上之預測蛋白質應該回到水相，可是在動力學上的實際表現，我們卻發現其速率非常慢，以至於無法滿足層析過程中分析物在動靜相中質傳的速率，而導致嚴重拖尾現象，不能達成區域精鍊的目的。但是在實驗當中我們卻發現以反微胞相，加上使用逆向流層析可以高效率的來濃縮水中之蛋白質，因此本結案報告之內容，將改變主題成為“在逆流層析中以反微胞溶劑系統濃縮水溶液中的蛋白質分子”。

Abstract

**Keywords** : pH-zone-refining, countercurrent chromatography, micelle, reverse micelle, protein purification.

This research anticipates involving in protein separation using pH-zone-refining technique. pH-zone-refining has been developed recently as a new technique in countercurrent chromatography. (CCC). CCC is a liquid-liquid chromatography that needs no solid-state support material in the column. The stationary phases are pure liquids that are retained in the separation column using gravity or centrifugal force. The sample capacity of CCC is relatively large due to its high stationary phase ratio in the column. Accordingly, CCC has been considered a preparative chromatography. Without solid-phase packing material in the column, sample loss due to permanent adsorption would not happen. It has been proved a good separation technique for natural products.

The pH-zone-refining technique is

usually suitable only for ionizable analytes in CCC application. The partition coefficients of the analytes change along with different pH values. Separation occurs under controlled pH. The sample capacity of this technique can be even greater than the regular CCC. In addition, analytes are concentrated during elution. The band-breadth is not widened even the sample amount increases considerably; that results in good resolution and less cross-contamination between analytes. However, protein separation still cannot be carried out using this technique presently. Protein molecules can hardly be dissolved in any organic solvent, therefore no retention is expected in the stationary phase. Accordingly, separation cannot occur in the organic-aqueous system used in current pH-zone-refining methods at all. Originally we propose to modify the system by adding surfactants in the conventional organic-aqueous system. Since the solubilization of protein in the organic phase becomes possible due to micelle formation, it is conceivable to fulfill protein separation using the pH-zone-refining technique.

Unfortunately, we were unable to achieve pH-zone-refining using the reverse micelle solvent system. After protein molecules entered the micellar stationary phase, it was found that the backward process, i.e., returning to aqueous mobile phase, became very slowly. Even the pH value was adjusted to favor the solute distribution to the aqueous mobile phase thermodynamically. The solute mass transfer between the two phases was so slow that peak tailing was very phenomenal. Accordingly, we failed to carry out pH-zone refining in CCC. However, we explored that it was possible to efficiently concentrate protein molecules in aqueous solution using CCC. Therefore, we will switch our subject to “protein concentration using reverse micelle solvent system in CCC” in this report.

## 二、緣由與目的

最近幾年，逆向流層析有一種新的方法出現，稱作酸鹼區域精鍊法（pH-zone-refining）它的特性是分離樣品的量非常的大，遠超過傳統逆向流層析所可處理的量，而且因為分析物在分離過程，還會產生濃縮的效應，其層析圖譜呈區塊狀，而且帶寬遠小於一般逆向流層析相同滯留時間所應該顯現的帶寬；由於帶寬減小，所以區塊不易重疊，因而可以得到高純度的分離。由於以上的特性，酸鹼區域精鍊法已被應用於天然物的製備分離。酸鹼區域精鍊法的一個先決條件，就如同所有的層析一般，待分離物必需在動靜相中都有適當的溶解度，否則不可能產生分離。對於高極性的化合物如勝太，可以加入相對離子(counterion)，形成所謂的離子對（ion-pairing），因而降低其極性，能在動（極性）靜（低極性）相間有合理的分配係數，而進行酸鹼區域精鍊。對於蛋白質這樣大分子量的極性物質，不易形成離子對，如果要進行酸鹼區域精鍊法的分離，必需另想辦法。要將高極性物質溶於低極性的溶劑，可以使用介面活性劑，例如 sodium bis(2-ethylhexyl)sulphosuccinate (AOT)，形成反微胞，而溶於非極性溶劑中，再加上酸鹼值的調配，則可以讓蛋白質分子優遊於動靜相之間，而發生酸鹼區域精鍊的現象。酸鹼區域精鍊法分離的機制，可以用圖二來簡單說明，假設一樣品中有四個化合物，注入分離管柱中，同時一個大體積的有機酸也被注入，這四個化合物在動相（極性）和靜相（非極性）中之分配常數（partition coefficient）隨著酸鹼值而有所不同，如果滿足如圖中所示  $K_b < K_{pH} < K_a$  則分析峰 2 和 3 就會發生聚集的現象，亦即其帶寬會小於分析峰 1 和 4，即使此二者的滯留時間長過分析峰 1。當化合物 2 和 3

處在位置 1(圖 1A)時,會因為在酸性中,抓氫離子,變成非解離狀態,而較易進入非極性的靜相,亦即位置 2,進入位置 2 後,因為  $K_{pH} < K_a$ ,對靜相比較有親和力,所以在管柱中移動速度,不及那個有機酸快,等於被推進了位置 3,相當於在高酸鹼值(鹼性)的區域,在這個區域,化合物 2 和 3 會產生解離,比較溶於高極性的動相,於是進入區域 4;之後因為  $K_b < K_{pH}$ ,亦即在水相中之位移超過該有機酸,於是又進入區域 1;以上所敘述的過程,在整個沖提的期間,循環不已,本來正常發生的擴散現象,就會被壓縮而達到減小帶寬結果。而且,當樣品的量大幅增加時,只會增加分析峰的高度,而不增加帶寬,所以可以處理大量樣品,而且保持原有的解析度。

蛋白質分子的分離,是生物科技研究中,一個經常必要的過程,本研究原本期望提供一個新的方法,其特性是分離容量很大,靜相是純粹的液體,沒有固態的吸附劑,不會發生吸附而損失樣品。同時這個方法,也可以當作蛋白質純化之用,將蛋白質和其他物質分離的一種技術。

### 三、結果與討論

要能夠進行酸鹼區域精來分離蛋白質,首先要讓蛋白質能夠合理的分配於動靜兩相,在有機溶劑中加入介面活性劑之後,我們確定蛋白質可以在兩相中做合理的分配,可是實驗卻不如預期之結果。一般酸鹼精鍊法,得出的層析圖,都會呈現如長方形的塊狀圖,但是我們所得到的卻很像吸附型的層析圖,呈現拖尾的高斯圖形。經過進一步分析,確定是由於蛋白質一但進入有機微胞相中之後,要再回到水相中,其速率非常緩慢,亦即如圖(1A)中所示從第三區間回到第四區間速率極慢而造生問題,因此無法達成原先所預期蛋白質分子會在四個區間循環運動時所應該達成的聚集效應。

但是在研究此主題時,我們發現,使用逆向流層析系統,可以用來濃縮水溶液中蛋白質,因此下面我們將記錄此項結果。過去十年間,大量的文獻記載使用反微胞法萃取水中蛋白質。其過程可以由圖二說明之,首先調整水樣品之酸鹼度,使得蛋白質傾向進入微胞相中,此過程稱之為正向萃取;之後以另一酸鹼度之水溶液做反向萃取,亦即將蛋白質溶回水相,在正反向萃取過程中,就可能可以將蛋白質和其他物質分離。但是在文獻中直到目前為止,都只是研究使用不同介面活性劑來完成正反向萃取,可是並無法達到濃縮的目的,如果在萃取分離的過程中同時又可以達到濃縮的效果,相信可以拓展反微胞萃取蛋白質的應用價值。

簡單而言,我們是將有機反微胞相先注入分離管柱中,然後開始打入蛋白質水樣品,其體積可以遠大於反微胞相之體積;此時水樣品之酸鹼度要調成適合蛋白質進入反微胞相中。水樣品完全注入之後,打入一段(例如 1-10 mL)水溶液,其酸鹼度適合蛋白質會到水相,收集流出管柱的水相,測其濃度,就可以知道回收蛋白質的總量,比較原先水樣品和回收水相之體積,可以計算濃縮之比例。和文獻中批式(batch)的實驗方式相比,我們的萃取過程是連續性的,分離管柱之作用,可以想像成一系列的分液漏斗,因此萃取的效率很高,可以達成濃縮的效果。

我們試驗了數種蛋白質和胺機酸,此處只列出對蛋白質 cytochrome c 之結果,見表一,其中例如當水樣品之體積為有機反微胞相十倍時,我們所得到最好的結果為,蛋白質回收 95%,體積濃縮 25 倍,亦即 700 mL 之水樣品濃縮成為 28 mL。

### 四、計畫成果自評

我們原先是希望能達成高效能的分離,亦即所謂酸鹼區域精鍊法,不過目前暫時由於動力學上的障礙,因而無法成功,但是這個計畫本身還是值得嘗試及保留到以後,因為最近文獻出現一些研究,

可能可以突破動力學上的障礙，舉例來說，有人在微胞相中加入第二種介面活性劑（co-surfactant），發現可以增快蛋白質在兩相中的質傳速率，如果類似的研究繼續有突破的發展，我們原先所提出之構想，又有可行的一天；歷史上很多研究也是如此，往往因為相關領域的發展，而導致原先有價值卻無法成功的構想又起死回生。

此外，我們在進行原計畫時，發現另外一個應用，亦即濃縮水溶液中的蛋白質，雖然和原計畫不同，卻衍生出新的領域，這項成果，我們將會發表於國際期刊

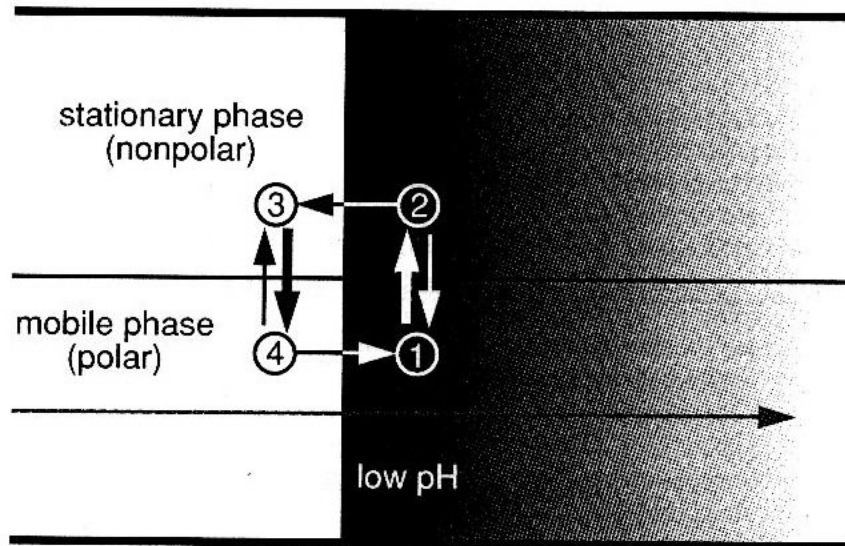
## 五、參考文獻

1. Y. Ito and W.D. Conway, "High-Speed Countercurrent Chromatography" John Wiley & Sons, Inc. (1996)
2. A. Weisz, A.L. Scher, K. Shinomiya, H.M. Fales, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 704 (1994)
3. Y. Ma, Y. Ito, *J. Chromatogr. A*, **702**, 197 (1995)
4. K.E. Goklen, T.A. Hatton, *Sep. Sci. Tech.*, **22**, 831 (1987)
5. Y. Yamada, R. Kuboi, I. Komasaawa, *Biotechnol. Prog.*, **11**, 682 (1995)
6. R. Rahaman, T.A. Hatton, *J. Phys. Chem.*, **95**, 1799 (1991)
7. F.Q. Yang, J. Quan, T.Y. Zhang, Y. Ito, *J. Chromatogr. A*, **822**, 316 (1998)
8. Luisi, P. L., "Enzymes hosted in reverse micelles in hydrocarbon solution", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **24**, 439 (1985)
9. Goklen, K. E., and Hatton, T. A., "Protein extraction using reverse micelles", *Biotech. Prog.*, **1**, 69 (1985)
10. Dekker, M., Riet, K. V. and Weijers, S. R., *Chem. Eng. J.*, **33**, B27 (1986).
11. Pires, M. J., Aires-Barros, M. R., and Cabral, J. M. S., *Biotechnol. Prog.*, **12**, 290 (1996)
12. Luisi, P.L., and Magid, L.J., *Crit. Rev. Biochem.*, **20**, 409 (1986).
13. Dekker, M., Hilhorst, R., and Laane, C., *Anal. Biochem.*, **178**, 217 (1989).
14. Leodidis, E. B., and Hatton, T. A., *J. Phys. Chem.*, **94**, 6400 (1990).
15. Leodidis, E. B., and Hatton, T. A., *J. Phys. Chem.*, **94**, 6411 (1990).
16. Pires, M. J., Martel, P., Baptista, A., Petersen, S. B., Willson, R., and Cabral, J. M. S. *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 773 (1994).
17. Göklen, K. E, and Hatton, T. A., *Sep. Sci. Technol.*, **22**, 831 (1987).

表一 Cytochrome c 萃取重量回收率及體積濃縮比

樣品體積/靜相體積	2	4	7	10
正向萃取打入的蛋白質溶液 (mg / mL)	1.65 / 140	2.70 / 280	4.17 / 490	4.74 / 700
反向萃取回收的蛋白質溶液 (mg / mL)	1.41 / 24	2.34 / 23	3.92 / 28	4.50 / 28
重量回收率 (%)	85.5	86.7	94.0	94.9
體積濃縮比率 (回收的體積 / 打入的體積)	1 / 5.8	1 / 12.2	1 / 17.5	1 / 25

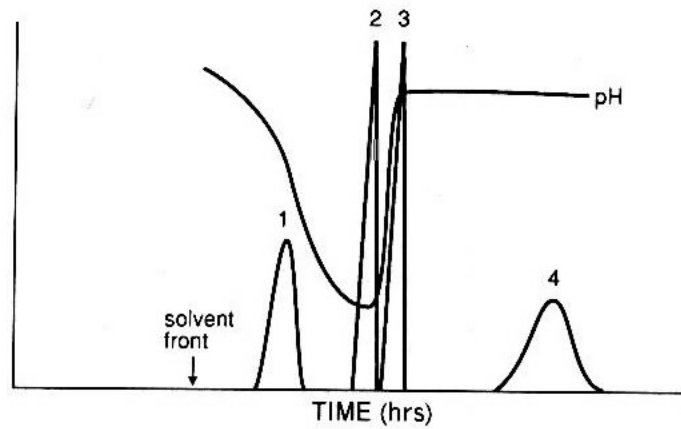
(註) 管柱內有機靜相體積皆為 70 ml。



(A)

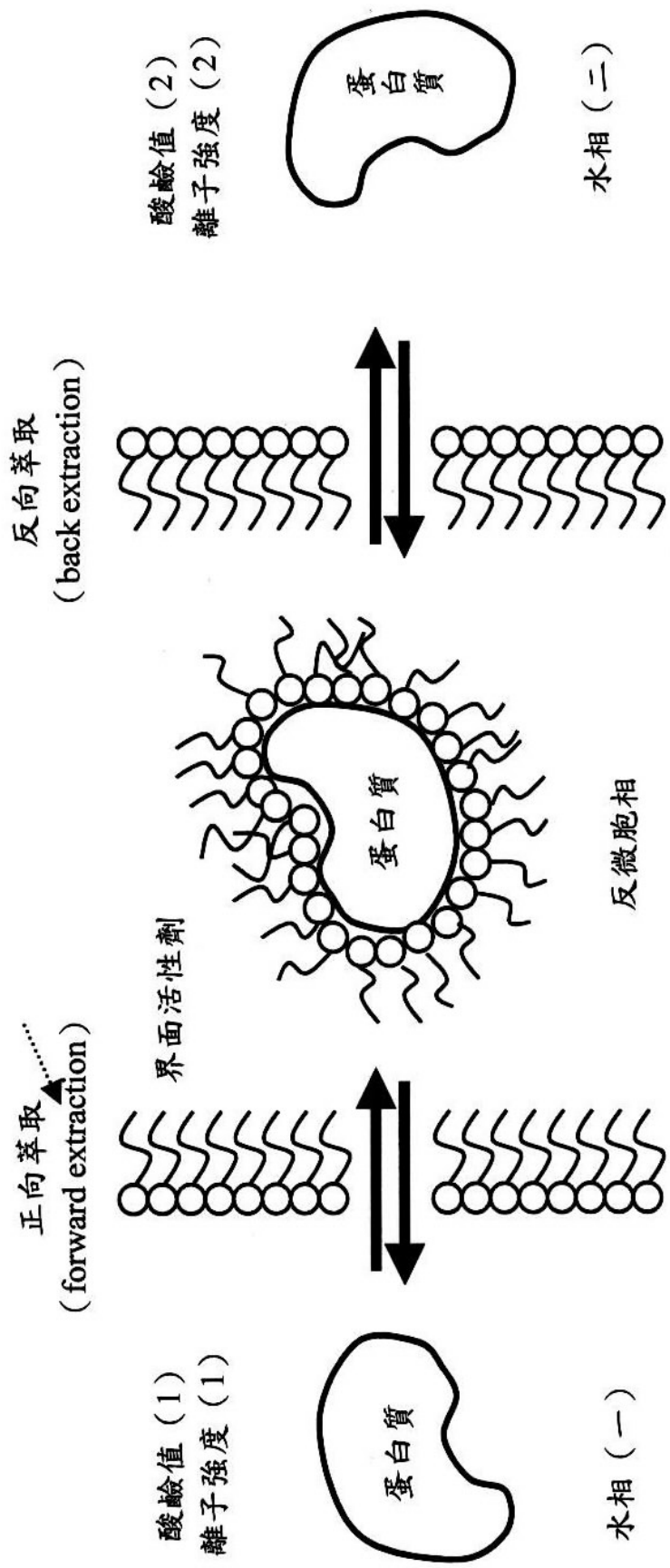
**REQUIREMENT FOR SHARP PEAK FORMATION**

$K_b < K_a < K_{pH}$	Peak 1	PARTITION COEFFICIENT ( $K = C_s/C_m$ )
$K_b \ll K_{pH} < K_a$	Peak 2	
$K_b < K_{pH} \ll K_a$	Peak 3	
$K_{pH} < K_b < K_a$	Peak 4	
		$K_{pH}$ : acid agent
		$K_a$ : sample in low pH
		$K_b$ : sample in high pH



(B)

圖一 酸鹼區域精鍊法示意圖(取自 p128, "High-speed Countercurrent Chromatography" Edited by Y. Ito and W.D. Conway, John Wiley & Sons, Inc. 1996)



圖二. 傳統反微胞萃取法示意圖