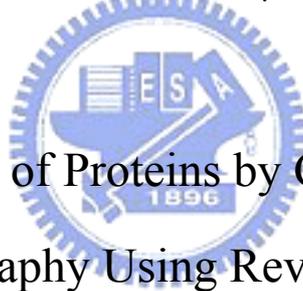


國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

於逆流層析中以反微胞製備分離蛋白質



Fractionation of Proteins by Countercurrent
Chromatography Using Reverse Micelles

研究生：沈經緯

指導教授：余艇 博士

中華民國九十四年六月

於逆流層析中以反微胞製備分離蛋白質

學生：沈經緯

指導教授：余 艇

國立交通大學應用化學所

摘要

反微胞(reverse micelle)是由界面活性劑分子在有機溶劑中形成一個奈米尺寸、含有水核的環境，在適當的 pH 值、鹽類濃度下可以控制蛋白質分子進出反微胞。利用反微胞萃取蛋白質，包含了正向萃取(forward extraction)以及反向萃取(backward extraction)兩個步驟，目前大多數的研究都是針對單一種蛋白質的純化為主。



逆流層析(countercurrent chromatography)是一種無固體靜相支持物的液相-液相層析技術，不會有固體吸附、靜相阻塞的問題，適合生物分子及天然物等複雜物質的分離。我們於逆流層析儀中使用反微胞微乳液作為靜相，逆流層析管柱容積 28 mL，使用含有 100 mM sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT)的 n-hexane 作為靜相，動相是酸鹼值以及離子強度梯度變化的緩衝溶液，動相流速 1mL/min。在 800 rpm 轉速下，靜相滯留於管柱中的量為 12 mL，分離 1 mL 含有肌紅蛋白、細胞色素 C、溶菌酶各 2 mg 的蛋白質混合溶液，以不同的 pH 值以及鹽類濃度進行梯度沖提，得到逆流層析圖並每 5mL 收集一次，經過 HPLC、MS 分析各收集管中的蛋白質含量，

可得到蛋白質相對濃度 85 % 的細胞色素 C 蛋白質溶液，有效回收率約為 64 %，在製備蛋白質方面提供一新純化研究方向。



Fractionation of Proteins by Countercurrent Chromatography Using Reverse Micelles

Student : Ching-Wei Shen

Advisor : Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

Abstract

Surfactants soluble in non-polar organic solvent form reverse micelles, which provide nano-size waterpools. By controlling pH and ionic strength, protein molecules can transfer between aqueous and reverse micelle phases. The processes for purifying proteins using reverse micelles usually include forward and back extractions in which protein molecules are transferred from one aqueous to another aqueous solution. Most researches only involve purifications for single protein.

Countercurrent chromatography (CCC) is a technique of liquid-liquid chromatography. This technique is suitable for preparative separations of biomolecules and natural products. We use a two-phase solvent system, i.e. the aqueous (mobile) and reverse micelle (stationary) phases to separate protein mixtures. The stationary phase is a 100 mM sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) – containing n-hexane solution. At 800 rpm of a high-speed CCC, the volume of the stationary phase retained in the separation coil (total volume 28 mL) is 12 mL. The mobile phase is eluted at a flow rate of 1 mL/min using pH and ionic strength gradients. Sample solutions are composed of myoglobin, cytochrome c and lysozyme. The effluent was collected every 5 mL and analyzed by HPLC and Mass spectrometer. The result in the individual protein collector showed that the recovered purity for cytochrome c was 85% while the recovery yield reached 64 %. We expect applications using

CCC with reverse micelle phase may provide a useful method for protein separations and purifications.



目錄

第一章 緒論	1
第二章 研究背景與理論	3
2.1 反微胞萃取蛋白質	3
2.1.1 界面活性劑.....	3
2.1.2 微胞與反微胞.....	3
2.1.3 反微胞萃取親水性物質的機制.....	4
2.1.4 影響蛋白質萃取的因素.....	5
2.2 逆流層析(COUNTERCURRENT CHROMATOGRAPHY)	8
2.2.1 簡介.....	8
2.2.2 逆流層析分離理論.....	8
2.1.3 逆流層析的儀器系統.....	9
2.1.4 反扭轉機構的應用.....	11
2.1.5 高速逆流層析 (HSCCC).....	12
第三章 實驗	14
3.1 試藥.....	14
3.2 實驗儀器.....	15
3.3 實驗流程.....	16
3.3.1 溶液和樣品的製備.....	16
3.3.2 HSCCC製備實驗步驟.....	17
3.3.3 HPLC分析收集液實驗步驟.....	18
第四章 結果與討論	19
4.1 收集液之分析方法	19
4.2 以高速逆流層析分離蛋白質混合物實驗結果.....	20
4.2.1 實驗一.....	20
4.2.2 實驗二.....	20
4.2.3 實驗三.....	22
第五章 結論	23
參考文獻	24

表目錄

表 2-1 (A)、界面活性劑依電荷分類	29
(B)、界面活性劑親水端基團	29
表 2-2 (A)、親水、疏水基團的HLB參數	30
(B)、不同HLB值之界面活性劑應用範圍	30
表 2-3 (A)、常用的疏水性的陰(陽)離子型界面活性劑	31
(B)、溶於水中帶正(負)電荷的染料分子	31
(C)、用陰陽離子型界面活性劑萃取帶正負電荷染料	31
表 4-1、實驗二各收集管的蛋白質濃度	32
表 4-2、實驗二各收集管中的蛋白質蛋白質相對濃度	33
表 4-3、實驗二製備蛋白質的蛋白質相對濃度以及回收率	33
表 4-6、實驗三製備蛋白質的蛋白質相對濃度以及回收率	35



圖目錄

圖 2-1、界面活性劑分子	36
圖 2-2、界面活性劑濃度和溶液的物理性質	36
圖 2-3、微胞結構	37
圖 2-4、微胞與反微胞環境示意圖	37
圖 2-5、界面活性劑、水、有機溶液三相圖	38
圖 2-6、液相-液相層析方法	38
圖 2-7、流體靜力平衡(HSES)示意圖	39
圖 2-8(A)、抽取河水的螺旋裝置示意圖	40
(B)、螺旋管柱裝置模型	40
圖 2-9、螺旋管柱中的輕重兩相移動情形	41
圖 2-10、反扭轉機構轉動系統	42
圖 2-11、高速逆流層析的旋轉機構	43
圖 2-12、IV型同步行星式逆流層析的混合在管柱內的分佈情形	44
圖 3-1、逆流層析裝置圖	45
圖 3-2、HPLC實驗裝置圖	45
圖 4-1、蛋白質在含有反微胞的逆流層析管柱中示意圖	46
圖 4-2、HPLC分析蛋白質層析圖	47
圖 4-3、以不同波長偵測分析肌紅蛋白樣品	47
圖 4-4、以ESI-MASS分析圖 4-3 中的樣品	48
圖 4-5、肌紅蛋白中的HEME分子	49
圖 4-6、實驗一的逆流層析動相組成	49
圖 4-7、實驗一的逆流層析訊號	50
圖 4-8、實驗二的逆流層析動相組成	50
圖 4-9、實驗二的逆流層析訊號	51
圖 4-10、實驗二各收集管的PH值	51
圖 4-11、HPLC分析實驗二收集管中的蛋白質含量	52
圖 4-12、實驗三 逆流層析動相組成	53

圖 4-13、實驗三 逆流層析訊號圖	53
圖 4-14、實驗三各收集管的組成	54
圖 4-15、HPLC分析實驗三收集管中的蛋白質含量	55
圖 4-16、以質譜分析實驗三的蛋白質收集液	56



第一章 緒論

構成生物體的分子中，蛋白質可說是其中最複雜的一種，它左右生物體的許多功能表現。在 1940 年代中期，我們才知道蛋白質是由許多小分子構成，這些小分子稱為「氨基酸」。之後的數十年間，陸續發現氨基酸的序列、蛋白質的各級結構及功能性質等。在蛋白質的研究中，由生物檢體、細胞或細菌培養液萃取出蛋白質的方式有很多種，像是弄碎樣品，超音波震盪、離心以及管柱層析等，目的是去除這些組織液、培養液中的雜質，這些雜質可能包含了醣類、脂質、核酸、或是其他蛋白質。為了要分離蛋白質，目前在生物工程中使用的分離方法以沉澱、鹽析，過濾和各種層析技術為主，這些方法處理量小且成本高，因此發展各種成本低廉、易於處理大量樣品的生物處理方法成為生物工程的重點研究方向之一。

本研究採用反微胞萃取法(reverse micelle extraction)¹來純化蛋白質，反微胞是以特定的界面活性劑分子溶解在有機溶劑中，親水基向內聚集而形成的一個極性、奈米尺寸的水核，若是陰離子型界面活性劑形成的反微胞，內部水核具有帶負電的基團，可吸引水中帶有正電荷的分子。藉由調整水中的pH值改變蛋白質的表面電荷，可使水溶液中的蛋白質分子萃取進入反微胞，再調控另一適當的pH值使蛋白質分子的表面電荷改變而離開反微胞回到水中，此進出反微胞的過程

便能萃取並分離蛋白質。

近十年來，關於反微胞萃取蛋白質的研究陸續被發表，美國麻省理工學院的多位著名學者成功利用sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT)反微胞萃取蛋白質²。為了改善以往反微胞萃取蛋白質的批式過程，本實驗室過去的研究方向是以界面活性劑AOT在正己烷中形成反微胞，結合高速逆流層析儀High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)，藉由逆流層析中特殊的液相-液相分佈，改變動相溶液中的酸鹼值，成功萃取並濃縮大量且稀薄的蛋白質溶液³。



在本研究中，亦是結合反微胞與逆流層析儀進行蛋白質的純化，並且將分離效果提升至三種蛋白質的製備上，我們以梯度變化的動相組成，可逐步改變蛋白質在水溶液與反微胞之間的分佈，並改良逆流層析儀上的管柱設計，不僅大幅降低了分離過程中的成本與時間，還可迅速製備分離三種蛋白質混合物(肌紅蛋白、細胞色素 C、溶菌酶)。

第二章 研究背景與理論

2.1 反微胞萃取蛋白質

2.1.1 界面活性劑

界面活性劑的結構中(圖 2-1)，分子的兩端由疏水基團(hydrophobic group)以及親水性基團(hydrophilic group)所組成，由於一端親水、一端親油的特性，可減低兩相間的界面張力。界面活性劑主要依照兩種方法分類：(1)根據親水基的帶電性，可分為陽離子型、陰離子型，兩性型與非離子型界面活性劑(表 2-1)。(2)根據界面活性劑的溶解性，為了描述界面活性劑分子的疏水親水程度，可藉由觀測各種親水以及疏水基團，區分為較為親水或較為疏水的界面活性劑，或是將其表示成 HLB 數值(hydrophile-lipophile balance)做為參考(表 2-2)，HLB 值越大，代表界面活性劑親水程度越大。

2.1.2 微胞與反微胞

(1) 微胞(Micelle)

在水溶液中，界面活性劑的疏水基團顯然是不喜歡極性的水，因此界面活性劑分子的疏水端會盡可能逃離水。當水中的界面活性劑分子濃度升高到一個程度，溶液的物理性質如表面張力、滲透壓、電導度等會發生明顯的改變(圖 2-2)，這是由於數十至數百個界面活性劑分子在水中聚集在一起，親水基朝外與水分子水合，並將疏水基包圍避免疏水基與水分子直接接觸，形成一個團狀的結構，稱為微胞(micelle)。雖然微胞通常成球形，但實際形狀與大小會隨著界面活性劑濃度與溫度而逐漸改變，形成雙層或是層狀等結構(圖 2-3)，界面

活性劑可形成微胞的濃度，稱為臨界微胞濃度 CMC (critical micelle concentration)。

(2)反微胞(Reverse micelle)

當疏水型的界面活性劑處於有機溶劑之中，也能產生類似水中微胞的聚集結構⁴，因為這個環境之中，界面活性劑的兩端與水中微胞的排列方向相反，疏水端碳鏈朝外溶於有機溶劑，親水端朝內，這種聚集結構稱為反微胞(reverse micelle)(圖 2-4，圖 2-5)。反微胞中心是一個極性高的親水環境叫做水核(water pool)，因為水核存在於有機溶劑之中，我們稱之為water in oil。

2.1.3 反微胞萃取親水性物質的機制

(1) 靜電作用力(electrostatic interactions)

離子型界面活性劑帶有正(負)電荷，利用界面活性劑聚集而成的反微胞萃取親水性物質，離子型界面活性劑和水溶液中的帶電物質之間的靜電力是重要的關鍵所在^{5,6}。譬如從反微胞有機相萃取水溶液中的帶電染料(表 2-3)，對於帶負電荷的染料分子，需採用陽離子型的界面活性劑，相反地，萃取帶正電的染料分子需要用到陰離子型的界面活性劑⁷。藉由正負電荷相互吸引的力量達萃取效果，此萃取過程中靜電力是最主要的作用力。

(2)疏水性作用力(hydrophobic interactions)

而對非離子型的界面活性劑而言，改變pH值對其萃取的效果影響不大，亦即上述所提到的靜電作用力對非離子型的界面活性劑並非

影響其萃取的主要因素，因此有些學者認為水溶性分子的疏水基與界面活性劑的疏水基之間的凡得瓦耳力是影響這一類界面活性劑的最主要因素^{8,9}。

2.1.4 影響蛋白質萃取的因素

(1) 水溶液的酸鹼值(pH)^{10,11,12,13}

蛋白質由許多氨基酸組成，是一種具有許多離子基團的帶電大分子，每一種蛋白質都有它的等電點(isoelectric point, pI)，在酸鹼值小於 pI 的環境中，蛋白質表面淨電荷為正電，相反地，在酸鹼值大於 pI 值的環境中，蛋白質表面淨電荷為負電。離子型界面活性劑的親水端帶電，於有機溶劑中形成反微胞，想要使蛋白質能被萃取進入反微胞，則蛋白質必須和反微胞帶相反電荷，產生靜電吸引力，此一萃取過程我們稱為正向萃取(forward extraction)。而當在另一個相反的 pH 環境之下，蛋白質表面淨電荷轉變成和反微胞帶相同電荷，產生靜電排斥力，蛋白質離開反微胞回到水相，此一過程我們稱為反向萃取(backward extraction)。我們可說 pH 值和萃取主要機制(靜電作用力)的關係為：pH 值直接影響蛋白質帶正電或負電、決定萃取的排斥力或吸引力。

(2) 水溶液中的離子強度(ionic strength)¹²,

水溶液中帶電粒子之間的靜電作用力，會因為溶液中的離子強度增加，造成靜電吸引或排斥力降低，稱之Debye screening effect，此效應可減低蛋白質和界面活性劑的淨電力。在一個以AOT 反微胞相萃取細胞色素蛋白(cytochrome c)的實驗中，固定水溶液的pH值，使細胞色素C蛋白和反微胞之間電荷相反，兩者之間存在靜電吸引力，

以不同的KCl離子濃度觀察萃取效果，發現在 0.1 M KCl的環境下，細胞色素C分子很容易地被反微胞萃取，而提高離子強度之後，在高達 1 M KCl情況下，細胞色素C分子無法以反微胞萃取。同時又有研究發現，若是水中的離子強度不高(濃度 < 0.1 M)，含有界面活性劑的有機相和水溶液兩相不容易分層，無法有效萃取蛋白質¹⁴，

離子強度與萃取主要作用力(靜電吸引力)的關係為：雖無法改變蛋白質電荷(也就是吸引力和排斥力)，但其濃度可調整靜電作用力大小，進而影響萃取效果。

(3)離子種類(Type of Electrolyte)

水溶液中的鹽類種類也會影響蛋白質的萃取效果，鹽類解離之後產生的離子會產生遮蔽效應(screening effect)，有文獻發現在AOT/isooctane系統下只改變離子種類¹⁵，對蛋白質的萃取效果是 $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+$ ，推測是金屬的水合離子電荷的遮蔽效果所影響，鉀離子遮蔽的效果最大導致萃取率不高。鋰離子的遮蔽效果最差，所以蛋白質的萃取效果最好。

(4)界面活性劑¹⁶

界面活性劑的選擇是非常重要的部分，目前常見用在反微胞萃取的陰離子型界面活性劑有sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT)以及di-(2-ethylhexyl)phosphoric acid (DEHPA)兩種¹⁷，AOT是屬於磺酸型陰離子界面活性劑，DEHPA則是磷酸型陰離子，除了這兩種陰離子型界面活性劑之外，尚有一些研究試圖合成不同種類的界面活性劑¹⁸，目的就是為了達到更有效、迅速、選擇性高的蛋白質萃取。

Trioctyl methyl ammonium chloride (TOMAC) 和 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)則是常用在蛋白質萃取的陽離子界面活性劑，它們都是四級銨鹽，在有機溶劑中形成帶正電荷的反微胞^{19,20}。

此外，增加界面活性劑的濃度可增加有機相萃取蛋白質的量²¹，濃度高的界面活性劑雖然有利於正向萃取，但將會使蛋白質的反向萃取相對困難，因此如何調整界面活性劑濃度，在正向-反向萃取率之間達到最佳化，也可能是設計萃取條件的參考之一。

(5)蛋白質種類²²

因為蛋白質是一種複雜的巨大分子，不同的蛋白質除了pI值、分子量不同之外，它們的表面電荷分佈也不相同。不同的pI值可造成在同樣的pH值環境下，一種蛋白質帶正電、另一種則帶負電。反微胞的水核大小有限，比較容易萃取低分子量的蛋白質，然而高分子量的蛋白質(分子量大於 100000)因為過於巨大造成萃取效果不佳²³，所以需要用到較高的界面活性劑濃度，造成有機-水兩相不容易分層。

(6)共界面活性劑(cosurfactant)和共溶劑(cosolvent)

因為反向萃取的速率緩慢，於是在反微胞系統中，在主要的界面活性劑加入非離子型界面活性劑²⁴或是共溶劑²⁵，嘗試改變反微胞的電荷分佈或是反微胞形狀，期望減低蛋白質和反微胞的電荷作用力，減低反萃取時間，所以加入這類添加物的目的是為了加強反萃取效果。另外有研究使用終結反微胞電荷的方法，在使用陰離子型界面活性劑的情況之下，加入陽離子型界面活性劑會瓦解反微胞²⁶，產生電荷

中和，蛋白質便迅速回到水相。

2.2 逆流層析(Countercurrent chromatography)

2.2.1 簡介

逆流層析^{27,28}是一種不需固體靜相支持物的液相-液相分配層析法，所用的動相、靜相皆為液體，利用重力和離心力將液態靜相滯留在管柱中，並利用樣品在動靜相中的分佈係數(partition coefficient)不同而分離，逆流層析的液態靜相不會有吸附現象，不會造成樣品流失和避免管柱阻塞而失效，能製備分離大量的樣品，適合用在天然物的製備分離。

早期的逆流層析技術為一種不連續式分液漏斗的液相萃取，我們稱此項技術為逆流分佈(Countercurrent Distribution, CCD)²⁹，但因其操作耗時且儀器複雜龐大容易損壞，Yoichiro Ito 等人對於CCD的理論基礎開始深入研究而發展出離心系統，即所謂的離心式行星螺管結構 (Coil Plant Centrifugal, CPC)。之後Ito和Conway 等人進而發展出多種不同的儀器結構。在 1981 年發展出高速逆流層析 (High-Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC)即是其中之一。

2.2.2 逆流層析分離理論^{30,31}

逆流層析分離的基礎是建立於逆流分佈 CCD(countercurrent disturbution)，CCD是一連串的萃取過程，其過程可以用圖 2-6(A)說明：若有多個連續的萃取槽，最初分析物在 L_0 中，而 U_0 、 U_1 ... U_n 和 L_1 、 L_2 ... L_n 分別為不含分析物的兩相（L代表下層液；U代表上層液）。當 U_0 和 L_0 混合後，物質在液相/液相系統中分配，達到濃度平衡時， U_0 會

萃走部份分析物，接著和 L_1 混合，完成平衡後，再依序與 L_2 、 L_3 L_n 混合；新的上層液 U_1 、 U_2 、 U_3 ...依序緊隨在 U_0 後做相同的步驟。由二項式定理計算可得知，大部份的分析物最後會集中在某幾個萃取槽中，若一開始含有兩個分配係數不同的混合物，那麼增加萃取槽的數目，就可以提高分離的解析度，然而隨著萃取次數的增加，分析物的分佈也會變得比較寬(broad)。

圖 2-6(B)，為液相-液相分配層析法，亦為 CCD 概念的延伸，分析物在無限多個萃取槽間連續進行分配，不同的物質會由於分配係數不同而產生分離的情形，此為液相層析的原始觀點。圖 2-6(C)，為我們所熟知的液相層析，藉由管柱中填充固體支持物，使液體靜相以物理性吸附或化學鍵結的方式留在固體支持物的表面。前者的缺點是因為物理性吸附性弱造成靜相易在沖提過程中溶解在動相中而減少，而後者之靜相雖不會被帶走，但是未被靜相完全覆蓋的固體支持物，則會吸附部分的分析物因而造成層析峰拖尾的現象。圖 2-6(D)，即為逆流層析法 (CCC)，其動、靜相皆為液體，在重力場、離心力場的作用下，靜相可不依靠固體支持物而滯留在管柱中。

2.1.3 逆流層析的儀器系統^{30,31}

為了能發展逆流層析成為實用的層析儀器，陸續開發出具穿流(flow-through)性質、不同管柱結構和不同力場的儀器。因此，逆流層析儀依照其分離管柱本身的轉動方式可區分為兩種：流體靜態平衡系統和流體動態平衡系統。

(1) 流體靜態平衡系統 (Hydrostatic Equilibrium System, HSES) 在 HSES 系統中，管柱的每一個部分所受力大小固定。靜相因重力場滯

留在管柱中，樣品隨著動相穿越靜相，並藉著樣品在動靜相的分配係數不同而達到分離。圖 2-7 為 HSES 的示意圖。圖 2-7(A)，所使用的靜相是事先平衡過的下層相，先使其充滿管柱後將動相（上層相）由一端緩緩注入，靜相會被動相推出直到兩相的界面到達螺管底部，此時由於重力場的作用，動相開始往上穿越靜相直到螺管頂端，如此一直重複直到分離管柱的末端，因此造成每一圈的螺管都會保留住一半的靜相。圖 2-7(B)和圖 2-7(A)相反，使用平衡過的上層相當作靜相，而下層相為動相，使動靜相在螺管中產生不同的平衡狀態。

(2) 流體動態平衡系統 (Hydrodynamic Equilibrium System, HDES)

在HDES 系統中，螺旋管柱會藉由轉動所產生的扭力及離心力將靜相滯留在管柱中，這扭力是由希臘數學家阿基米德發現，藉由轉動螺旋型的管子，可將河水取至水壩(圖2-8)，此即所謂阿基米德扭力

(Archimedes screw force)。此原理亦被應用在HDES 系統中。若螺旋管柱內存在有輕重兩相，受阿基米德扭力以及重力的作用之下，輕重兩相因為受力不均而在管柱中有不同的分佈，圖2-9 說明在重力場作用下，阿基米得扭力對旋轉中螺管的影響。圖2-9(a)先在螺管中注滿水再導入氣泡和玻璃珠，封住螺管兩端，接著將螺管緩慢旋轉，由於阿基米得扭力的作用將使氣泡與玻璃珠帶往螺管的左端，此表示不管比水輕或比水重的物質皆會向螺管的某一端移動，此端稱為螺管的頭端 (head)，而另一端則稱為尾端 (tail)。圖2-9(b)中，利用平衡過的溶

劑系統進行相同的實驗，圖2-9 (b)上圖是先將螺管注滿較輕的一相，也就是溶劑系統的上層相，而較重的一相則由尾端打入，此時較重的一相行為就像是水中的玻璃珠會往頭端移動，圖2-9(b)下圖則是先將較重的一相注滿螺管，由尾端打入較輕的一相。其行為就像是水中的氣泡。圖2-9(c)，先將螺管內填入等體積的輕重兩相，兩相會在螺管的每一圈形成分離，當螺管開始轉動，任一相多餘的量則會被推至螺管尾端。因此，當螺管達到動力學平衡，則兩相在螺管中的分佈將保持不變，使靜相維持某程度的滯留。

2.1.4 反扭轉機構的應用



由於在 DCCC 等僅使用重力場的形式中，必須降低流速防止靜相的流失，因此分離上往往要耗費數天的時間；然而在導入離心場的旋轉式儀器上，可以較易於保持靜相而使得流速得以提高，可以在數小時內完成分離。因此目前的儀器設計大多使用了旋轉結構以提供較強的離心力場。但在此系統中出現了一個重要的問題，便是如何將流體導入管以及導出管連接在旋轉的分離管上而不至發生扭轉打結現象。

1975 年，Ito, Y. 等人應用反扭轉機構來防止導管糾結^{28,32}。反扭轉機構的發展，使得逆向流層析的技術得以廣泛應用。其基本架構依照行星繞旋的模式分成三大類(圖 2-10)：本實驗所使用的高速逆向流層析

儀屬於行星軸同步式。

2.1.5 高速逆流層析 (HSCCC)

(1) 原理³³

高速逆流層析設計原理如圖 2-9 所示，中心軸呈水平方向，一螺管支持物支撐一行星齒輪 (planetary gear)，其和固定在中心軸上的太陽齒輪 (sun gear、stationary gear) 相互咬合。其運動模式為螺管支持物不僅繞著中心軸旋轉，同時自身也以相同的角速度往相同方向旋轉。螺管支持物的同步行星運動可防止流體導管因為旋轉產生的扭轉。(圖 2-11)

(2) 影響相分佈的因素

除了螺管在不同轉速下會影響兩不互溶溶劑的相分佈，此外，螺管半徑 (r) 與公轉半徑 (R) 的比值 β 值 ($\beta = r/R$)³⁴，也是影響的因素。首先將較輕的一相 (靜相) 填滿管柱，令管柱旋轉，接著打入較重的一相 (動相)，待兩相達動力學平衡後，由頻閃觀測儀可看到管柱內的相分佈情形，如圖 2-12。

在 A 位置因靠近離心力中心區域，離心力較小，阿基米得扭力帶動兩相使得動靜相劇烈混合，為混合區 (mixing zone)；而在 B 位置管柱外側因離心力較大，可蓋過阿基米得扭力使得動靜相分成一明顯界面，較輕的一相在內，較重者在外為澄清區 (settling zone)。隨著管柱公轉，在 b、c、d 位置皆有與 a 相同的情形，表示兩相在任何位置都可不斷進行混合與澄清。

(3) 溶劑系統的選擇

大部分溶劑系統含水，配合其他有機溶劑，相互飽和而為不互溶的兩相，分別為動相與靜相。其成分組合視其分離條件而決定。在高速逆流層析中，溶劑系統的選擇有幾點必須注意：(1) 樣品不會被分解和去活性 (2) 樣品有充分的溶解度 (3) 適當的分配係數 (4) 良好的靜相滯留量。

(4) 影響靜相滯留量的因素

在高速逆流層析中，液體靜相在管柱中滯留的多寡影響了分離的效果。在較高的靜相滯留量下可提高分離的解析度以及對樣品的承載量。影響靜相滯留量及分離的因素可分為下列幾點³⁵

(a) 溶劑系統：在選擇溶劑系統時必須考慮溶劑極性、對溶質的選擇性以及溶質在不同溶劑中的溶解度。一般而言，分析物在兩相間最佳化的分配係數 K 需落在 0.2~5 之間，才可達到較佳的分離效果。但在二元溶劑系統中，要落在此範圍並不容易，因此，常藉由加入第三種甚至第四種可溶於兩者溶劑以調和原先溶劑在極性或是界面張力的差異。之後，再依分離需要決定動靜相。

(b) 轉速：在較大的轉速下，可提供較高的靜相滯留量，解析度也較佳。

(c) 動相流速：較慢的動相流速，會有較佳的靜相滯留量，提高解析度，但分離時間會變長。

第三章 實驗

3.1 試藥

1.陰離子型界面活性劑

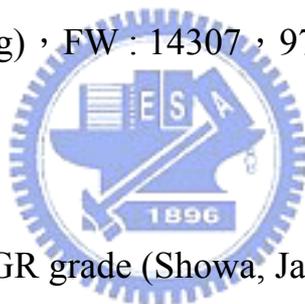
sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) ，FW : 444.6 ，purity > 99% ，(Sigma,USA)

2.蛋白質標準品

細胞色素 C (from horse heart) ，FW : 12,361 ，97 % ，(Sigma,USA)

肌紅蛋白 (form equine skeletal muscle) ，FW : 16952 ，95-100 % ，(Sigma,USA)

溶菌酶 (form chicken egg) ，FW : 14307 ，97 % ，(Sigma,USA)



3.緩衝溶液

Hydrochloric Acid, HCl, GR grade (Showa, Japan)

Potassium chloride , KCl , GR grade (Riedel-de Haën, Germany)

Potassium hydroxide , KOH , GR grade , 96.0 % ，(Showa, Japan)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane ，ACS grade ，(TEDIA,USA)

KH₂PO₄ ，GR grade ，98.0 % ，(Showa, Japan)

K₂HPO₄ ，GR grade ，99.0 % ，(Showa, Japan)

4.溶劑

n-Hexane ，HPLC/Spectro grade ，95 % ，(TEDIA,USA)

Acetone Nitrile ，HPLC/Spectro grade ，99.9 % ，(TEDIA,USA)

去離子水 ，經由 Millipore (Bedford,MA,USA)的 Milli-Q plus 處理。

3.2 實驗儀器

(1) 高速逆流層析儀

是由本實驗室經參考 Model 1000 型 HSCCC，委託國科會精密儀器中心製造。管柱是鐵氟龍(Teflon)材質，主體部分之管柱，其內徑為 1/16 英吋(1.6 公釐)，外徑為 1/8 英吋(3.2 公釐)，耐壓性為 300psi(21bar)以下，耐溫 50°C，管柱總容積大約 28 毫升，其主體如圖，而外接之導出管及導入管，其內徑為 1/32 英吋(0.8 公釐)，外徑為 1/16 英吋(1.6 公釐)，以上管線皆購自 Chemical Research Supplies(Fairbanks·Addison, IL60101, USA)。此儀器轉速可以控制在 0~1000 rpm，安置在一溫控箱中，溫控箱是由新竹盟利公司(新竹市南大路 130 號)製造，溫控誤差在正負 1 度以內。

(2) 往覆式幫浦

Series II Digital HPLC Pump，流速可由 0.01mL/min ~ 9.99 mL/min，購自 Pharma-Tech Research Company (Baltimore, Maryland, USA)。

(3) 梯度幫浦

梯度控制器 LabGrad 是由 Lab Alliance 公司製造，結合 Series III pump 最多可做四種動相組成的混合梯度，

(4) 高效能液相層析管柱

由 Polymer Laboratories 製造的 PLRP-S，300 Å，15 μm 屬於 reverse phase column，用於蛋白質的分析與定量。

(5) 線上偵測用 UV-Vis 偵測器

Shimadzu(Tokyo,Japan)SPD-10Avp 型，與個人電腦連接，個人電腦中則安裝了色層分析儀數據處理系統(訊華公司，臺北市)，此系

統可擇取實驗訊號，對流析出來的分析物做線上的偵測。

(6)酸鹼度計(pH meter)

型號為Microprocessor pH meter SP-2200，購自上泰儀器股份有限公司，其電極是使用Mettler Toledo InLab[®]422，可偵測之pH範圍 0~14。

(7)離心機

由德國 Hettich 生產，型號為 EBA20，最大轉速 6000 rpm，最大離心力為 3421 g

(8)電子天秤

Mettler Toledo AE 240

(9)ESI-Ion Trap MS

Bruker Daltonics Esuire 2000 (Leipzig, Germany)

(10)MALDI-TOF MS

Bruker Daltonics Biflex III (Leipzig, Germany)



3.3 實驗流程

3.3.1 溶液和樣品的製備

(1)高速逆流層析靜相溶液

使用含有 100 mM AOT 的 n-hexane 有機溶液做為靜相。

(2)高速逆流層析動相溶液-緩衝溶液

實驗一：

動相A₁：含有 50 mM Tris-HCl、0.1 M KCl、pH 7 緩衝溶液

動相B₁：含有 50 mM K₂HPO₄、0.1 M KCl、pH 12 緩衝溶液

實驗二：

動相A₂：含有 50mM Tris-HCl、0.2M KCl、pH 7 緩衝溶液

動相B₂：含有 50mM K₂HPO₄、0.2M KCl、pH 12 緩衝溶液

實驗三

動相A₃：含有 50mM Tris-HCl、0.2M KCl、pH 7 緩衝溶液

動相B₃：含有 50mM K₂HPO₄、0.6M KCl、pH 12 緩衝溶液

(3) 高效能液相層析動相溶液

動相 C：含有 0.1 % TFA、20 % ACN 的水溶液

動相 D：含有 0.1 % TFA、80 % ACN 的水溶液

(4) 蛋白質樣品溶液

取肌紅蛋白、細胞色素C和溶菌酶溶解在動相A₂(50 mM Tris-HCl、0.2 M KCl、pH 7 緩衝溶液)中，蛋白質濃度均為 2 mg/mL。

3.3.2 HSCCC 製備實驗步驟

實驗裝置如圖 3-1 所示



- (1) 使用往復式幫浦以流速 3mL/min 將有機靜填滿整個管柱。
- (2) 啟動高速逆流層析儀器，使其轉速達到 800 rpm。
- (3) 當轉速穩定後，梯度幫浦將動相 A 以流速 1 mL/min 打入高速逆流層析儀中。
- (4) 當有機相不再流出，表示動靜相達到平衡，打開 UV 偵測器(280 nm)，等待訊號穩定。
- (5) 注入蛋白質混合溶液 1 mL，並利用動相 A + B 在不同條件下的梯度比例。並同時紀錄層析訊號。
- (6) 每 5 分鐘收集一管。即每管中含有 5 mL 收集液。紀錄下各收集管的 pH 值。
- (7) 完成實驗後，將高速逆流層析停止轉動，以氮氣將管柱內的液體

吹出並收集，記錄有機相和水相的體積。上層有機相的體積就是靜相滯留量。

(8)以丙酮與甲醇(1:2)混合物 60 mL 沖洗管柱，再以 60 mL 去離子水清洗。最後再用氮氣吹乾管柱。

3.3.3 HPLC 分析收集液實驗步驟

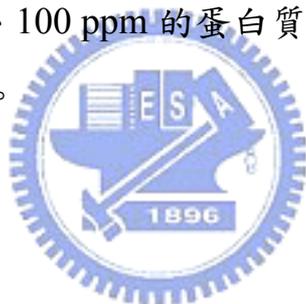
實驗裝置如圖 3-2 所示

(1)利用 Reverse phase HPLC 採用動相 C 沖提 15 分鐘

(2) 收集管以 3000 rpm 離心 5 分鐘，之後注入 20 μ L 進入 HPLC。

(3)以動相 C + D 在 20 分鐘內做梯度沖提，UV 偵測器設定在 280 nm。

(4)以濃度為 0、25、50、100 ppm 的蛋白質標準品做檢量線，定量各收集管中的蛋白質濃度。



第四章 結果與討論

4.1 收集液之分析方法

我們利用HPLC可以在20分鐘之內分析肌紅蛋白、細胞色素C以及溶菌酶 蛋白質混合物，使用的管柱是polystyrene-diviylbenzene reversed-phase HPLC column (PLRP-S)，這類的reversed-phase HPLC管柱適合應用在蛋白質的分析³⁶。我們分析蛋白質混合物以280 nm UV偵測器(圖4-2)出現4個明顯的波峰A、B、C、D，在經過和標準品比對之後，波峰A(8.1 min)為細胞色素C，波峰B(9.4 min)是溶菌酶。在分析肌紅蛋白標準品時，圖4-3，出現兩個波峰C(14.8 min)和D(16 min)，改用409 nm可見光再度偵測肌紅蛋白的結果，只存在單一訊號D'(16 min)，由此可知C物質吸收波長280 nm的紫外光，而且無法被波長409 nm的可見光所偵測，相反地D物質同時有280 nm以及409 nm的吸收。

為了更進一步確認組成物質，兩物質分別收集後以質譜鑑定(圖4-4)，波峰C(14.8 min)是肌紅蛋白分子量約為16954，而波峰D(16 min)分子量約為616，因此我們可以確定這是肌紅蛋白之中的heme分子(圖4-5)，另外研究指出有機溶劑或酸性條件下造成肌紅蛋白 和heme分離³⁷，可解釋我們實驗中，以reversed-phase HPLC分析肌紅蛋白之後會形成兩支波峰C、D的原因。所以在蛋白質定量上選用波峰A(細胞

色素C) 波峰B(肌紅蛋白)以及波峰C(肌紅蛋白 without heme)，利用 0、25、50、100 ppm四種不同濃度的蛋白質標準品做檢量線，分析各收集管中的蛋白質濃度。

4.2 以高速逆流層析分離蛋白質混合物實驗結果

4.2.1 實驗一

使用兩動相：50 mM Tris-HCl、0.1 M KCl、pH 7 緩衝溶液，以及 50 mM K_2HPO_4 、0.1 M KCl、pH 12 緩衝溶液，其餘實驗條件不改變，進行梯度沖提，動相組成如圖 4-6 所示，管柱總體積 28 mL，得到靜相滯留量大約是 10 mL，逆流層析訊號如圖 4-7 所示。

由層析圖中可見在實驗流析的前 40 分鐘，整個系統相當不穩定，因為溶液混濁而造成偵測到巨大且雜亂的訊號，注入蛋白質和動相梯度變化之後，從管柱流出的液體呈現不穩定的混濁狀態，表示逆流層析內部的相分佈遭到擾動，蛋白質的分離效果也非常不理想。我們認為是因為離子強度不夠，使得有機-水相界面不容易迅速分層而產生混濁。

4.2.2 實驗二

由於實驗一造成有機-水相界面混濁的原因，可能是因為離子強度不夠，為了解決此項缺點，我們將 KCl 濃度提高到 0.2 M，希望能解決混濁以及靜相流失的問題。動相混合比例如圖 4-8 所示

實驗二的逆流層析圖(圖 4-9)較為穩定許多，添加離子濃度可幫助有機相-水相在逆流層析中的分層，因為有機靜相能有效地滯留在管柱中而非迅速流失，增加了對於蛋白質樣品的分離能力，隨著動相 pH 值梯度改變，可明顯分辨訊號波峰，但是圖中之層析訊號圖並不能完全表示純淨的蛋白質，流析的動相分別收集 17 管，從各收集管的 pH 值(圖 4-10)，可知動相的 pH 值從 7 到 12 線性攀升。

由 HPLC 分析各收集管中的蛋白質濃度(表 4-1、圖 4-11a)以及蛋白質相對濃度(表 4-2，圖 4-11b)，由於肌紅蛋白的 pI 值約為 7，在動相 pH 7 條件下，蛋白質表面淨電荷與陰離子型界面活性劑 AOT 的電荷作用力較小，肌紅蛋白不易進入反微胞靜相。cytochrome c 和溶菌酶兩蛋白質在 pH 7 環境中，表面正電荷和 AOT 反微胞有強大的吸引力因而容易進入靜相，而與肌紅蛋白分離開來。分離出肌紅蛋白之後，再提高動相 pH 值可逐漸減低蛋白質的表面正電荷，細胞色素 C 分子從 pH 7 升高到 pH 9 的過程，表面正電荷逐漸微弱，蛋白質與反微胞的靜電吸引力逐漸減小，細胞色素 C 離開反微胞回到動相水溶液，與溶菌酶分離開來。隨著 pH 值逐漸增高至 11 左右，溶菌酶表面電荷和 AOT 反微胞的吸引力也逐步減弱，因而回到動相水溶液中。

但是蛋白質溶菌酶的回收率不高，溶菌酶的等電點 pI = 11，表面正電荷和反微胞之間有強大的電荷吸引力，即使以 pH 12 動相沖提，

溶菌酶有效回收率只有 16 % (表 4-3)，實驗中不使用更高的酸鹼值 (pH 13 or 14) 是為了避免破壞蛋白質活性，我們將嘗試在後續的實驗中更改酸鹼值之外的其他參數。

4.2.3 實驗三

為了提高溶菌酶的回收率，我們除了使用 pH 動相梯度之外，再加入 KCl 增加動相的離子強度，形成了 pH 7~12 的酸鹼梯度和 KCl 0.2~0.6M 的離子強度梯度，其動相混合比例如圖 4-12 所示，藉由 pH 值梯度逐步改變蛋白質表面電荷，離子強度的增加可減低溶液中蛋白質和反微胞的電荷作用力。

實驗三的兩動相 A₃ 和 B₃ 線性梯度沖提 (圖 4-12)，從逆流層析訊號圖可見訊號 (圖 4-13)，依序收集之後得到 20 支蛋白質收集管，量測各管中的 pH 變化 (圖 4-14a)，隨著流析時間增加，沖提收集管中的 pH 值如預期地進行梯度升高，因為兩動相線性比例混合，所以 KCl 濃度預測如 (圖 4-14b)。利用 HPLC 定量蛋白質含量 (表 4-4, 圖 4-15a) 和蛋白質相對濃度 (表 4-5, 圖 4-15b) 以及質譜鑑定蛋白質 (圖 4-16)，確認可得到蛋白質相對濃度 85 % 以上，回收率 60 % 以上的效果。

比較實驗二和實驗三的分析結果，兩實驗中的肌紅蛋白和細胞色素 C 的回收濃度和蛋白質相對濃度相差不大 (表 4-3, 表 4-6)，但溶菌酶的濃度和蛋白質相對濃度均有提升，回收率從 16 % 大幅提升到 60 %，因為兩實驗的 pH 值梯度條件相同，能大幅提升溶菌酶蛋白質的回收率是因為提高了 KCl 離子濃度，有效降低蛋白質和反微胞的靜電吸引力，使溶菌酶反萃取回水中。

第五章 結論

本實驗的主要目的，就是希望在逆流層析中找到新的動靜相系統來分離蛋白質，利用含有水核的反微胞，可使蛋白質在兩相分佈，依逆流層析中有機-水相的特殊分佈，靜相是帶電的反微胞有機相，動相是 pH 值和鹽類濃度的梯度變化，類似於 Ion exchange 的原理，藉由改變蛋白質和靜相之間的電荷作用力而分離蛋白質混合物。

雖然我們實驗中的蛋白質總回收率尚無法達到 100%，但仍然可以得到較高濃度和蛋白質相對濃度 90% 以上的蛋白質，且反微胞靜相製備相當容易而且價格低廉，只需少量的反微胞就可達到蛋白質製備分離效果。



在本實驗中只調整了動相的組成，未來還可改變反微胞組成，添加其他的萃取劑等，希望以此為基礎，嘗試從發酵液、細胞培養液等生物樣品中分離蛋白質，提供一項新的蛋白質純化方式。

參考文獻

1. M. J. Pires, M. R. Aires-Barros, and J. M. S. Cabral, "Liquid-Liquid Extraction of Proteins with Reversed Micelles." *Biotechnol. Prog.* (1996), 12, 290-301
2. Kent E. Goklen and T. Alan Hatton, "Protein Extraction Using Reverse micelles." *Biotechnol. Prog.* (1985), 1, 69-74
3. 翁基育, "於逆流層析儀中以反微胞萃取及濃縮細胞色素分子", 國立交通大學, 碩士論文, 民國93年7月。
4. Kotlarchyk, M. Huang, J. S., Chen, S.H., "Structure of AOT Reversed micelles Determined by Small-angle Neutron Scattering." *J. Phys. Chem.* (1985), 89, 4382-4386.
5. Luisi, P. L.; Magid, L. J., "Solubilization of Enzymes and Nucleic Acids in Hydrocarbon Micellar solutions." *Crit. Rev. Biochem.*(1986), 20, 409-474.
6. Hatton, T. A. "In *Surfactant-based processes*," New York, (1989), 33, 55-90.
7. P. Panditands, Basu., "Removal of Ionic Dyes from Water by Solvent Extraction Using Reverse Micelles," *Environ. Sci. Technol.* (2004), 38, 2435-2442
8. Leodidis, E. B., Hatton, T. A. "Amino Acids in AOT Reversed Micelles. Determination of Interfacial Partition Coefficients Using the Phase-Transfer Method." *J. Phys. Chem.*(1990), 94, 6400-6411.
9. Leodidis, E. B., Hatton, T. A. "Amino Acids in AOT Reversed Micelles. The Hydrophobic Effect and Hydrogen Bonding as Driving Forces for Interfacial Solubilization." *J. Phys. Chem.* (1990), 94,

6411-6420.

10. Göklen, K. E., Hatton, T. A. "Liquid liquid Extraction of Low Molecular Proteins by Selective Solubilization in Reversed Micelles." *Sep. Sci. Technol.* (1987), 22, 831-841.
11. Dekker, M. van't Riet, K. Baltussen, J. W., A. Bijsterbosh, B.H. Hilhorst, R.; Laane, C. " *In Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology.*" (1987), 2, 507-510.
12. Masahiro Goto, Yukihisa Hashimoto, Taka-aki Fujita, Tsutomu Ono, and Shintaro Furusaki," Important Parameters Affecting Efficiency of Protein Refolding by Reversed Micelles." *Biotechnol. Prog.* (2000), 16, 1079-1085
13. Wen-Yih Chen, Ya-Wen Lee, Shin-Chun Lin, and Ching-Wen Ho." Renaturation and Interaction of Ribonuclease A with AOT Surfactant in Reverse Micelles". *Biotechnol. Prog.* (2002), 18, 1443-1446
14. Göklen, K. E., Hatton, T. A. "Protein extraction using reverse micelles." *Biotechnol. Prog.* (1985), 1, 69-74.
15. Takumi Kinugasa a, Aki Kondo, "Effects of ion species in aqueous phase on protein extraction into reversed micellar solution," *Sep. Purif. Technol.* ,(2003),31,251-259
16. Carlos Regalado, Juan A. Asenjo, D. Leo Pyle," Protein extraction by reverse micelles: Studies on the recovery of horseradish peroxidase." *Biotechnol Bioeng*, (1994),44,674
17. Ziyi Hu and Erdogan Gulari. "Protein Extraction Using the Sodium Bis(2-ethylhexyl) Phosphate (NaDEHP)Reverse Micellar System." *Biotechnol Bioeng*, (1996), 50, 203-206.
18. Masahiro Goto, Tsutomu Ono, Fumiyuki Nakashio, T. Alan

- Hatton, "Design of Surfactants Suitable for Protein Extraction by Reversed Micelles." *Biotechnol Bioeng*, (1997), 54, 1
19. Wolbert, R. B. G.; Hilhorst, R.; Voskuilen, G.; Nachtegaal, H.; Dekker, M.; van't Riet, K.; Bijsterbosch, B. H. "Protein transfer from an aqueous phase into reversed micelles the effect of protein size and charge distribution." *Eur. J. Biochem.* (1989), 184, 627-633.
 20. Pires, M. J. Cabral, J. M. S. "Liquid-liquid extraction of a recombinant protein with a reverse micelle phase." *Biotechnol. Prog.* (1993), 9, 647-650.
 21. Hentsch, M.; Menoud, P.; Steiner, L.; Flaschel, E.; Renken, A. "Optimization of the surfactant (AOT) concentration in a reverse micellar extraction process." *Biotechnol. Tech.* (1992), 6, 359-364.
 22. Castro, M. J. M.; Moura, J. J. G.; Cabral, J. M. S. *In Advances in Gene Technology: Protein Engineering and Protein Production*; Oxford IRL Press: Oxford, U.K., (1988); pp 136.
 23. Ishikawa, H.; Noda, K.; Oka, T. "Kinetic Properties of Enzymes in AOT-Isooctane Reversed Micelles." *J. Ferment. Bioeng.* (1990), 6, 381-385.
 24. Dekker, M.; van't Riet, K.; Baltussen, J. W. A.; Bijsterbosch, B.H.; Hilhorst, R.; Laane, C. *In Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology*; Neijssed, O. M., van der Meer, R. R., Luyben, K.Ch. A. M., Eds.; Amsterdam, (1987); Vol. 2, pp 507-510.
 25. Sung-Sik Lee,* Bong-Kuk Lee, Jin-Sung Choi, and Jong-Pal Lee, "Effect of Alcohol Addition on Back-Extraction of BSA and 細胞色素C Using AOT Reverse Micellar System." *Bull. Korean Chem. Soc.*

(2001), 22, 897

26. Somnuk Jarudilokkul, Ludger H. Poppenborg, David C. “Stuckey Backward Extraction of Reverse Micellar Encapsulated Proteins Using a Counterionic Surfactant.” *Biotechnol Bioeng*, (1999), 62, 593-601
27. P. Foucault, “Countercurrent Chromatography.”, *Anal. Chem.* (1991), 63, 569-579.
28. Y. Ito, “Development of Countercurrent Chromatography.”, *Anal. Chem.* (1984), (56), 534-551.
29. Y. Ito, N. B. Mandava, “*Countercurrent Chromatography: Theory and Practice.*”, Marcel Dekker, Inc., New York, 1988.
30. W. D. Conway, “*Countercurrent Chromatography: Apparatus Theory and Applications.*”, VCH Publishers, Inc., 1990.
31. Y. Ito, W. D. Conway, “*High-Speed Countercurrent Chromatography*”, John Wiley & Sons, Inc. 1996.
32. Y. Ito, G. T. Bramblett, R. Bhatnagar, M. Huberman, L. Leive, L. M. Cullinane, And W. Groves, “Improves nonsynchronous flow-through coil planet centrifuge without rotating seals: Principle and application.”, *Sep. Sci. Tech.* (1983), 18, No. 1, 33-48.
33. Y. Ito, and R. L. Bowman, “Horizontal flow-through coil planet centrifuge without rotating seals.”, *Anal. Biochem.* (1977), 82, 63-68.
34. Y. Ito, J. Sandlin, and W. G. Bowers, “High-speed preparative countercurrent chromatography with a coil planet centrifuge.”, *J. Chromatogr.* (1982), 244, 247-258.
35. W. D. Conway, Y. Ito, “Resolution in Countercurrent chromatography”, *J. Liq. Chromatogr.* (1985), 8, (12), 2198-2207.
36. Nikolai Zh. Zhelev, Michael J Barratt, Louis C. Mahadevan, “Use of

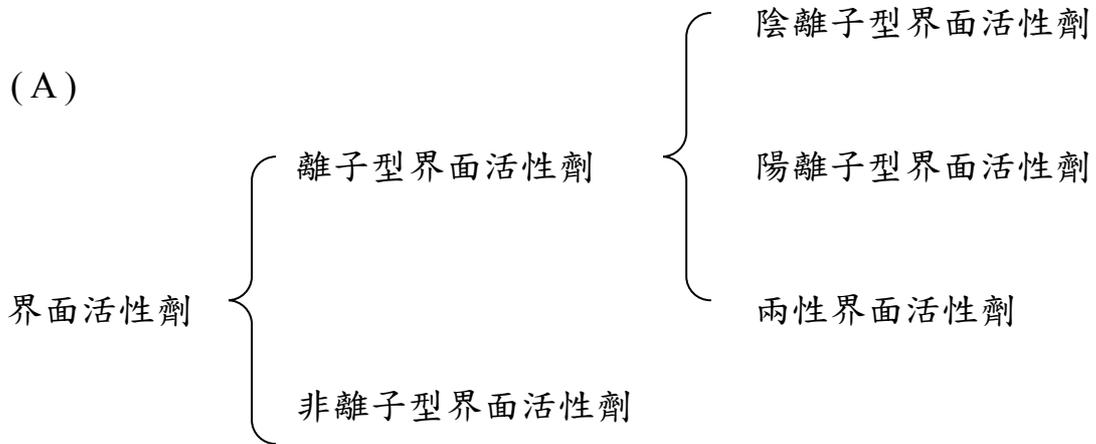
reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene column for the rapid separation and purification of acid-soluble nuclear proteins.” *J. Chromatogr. A*, (1997), 763, 65-70.

37. L. Konermann, F. I. Rosell, A. G. Mauk, and D. J. Douglas, “Acid-Induced Denaturation of 肌紅蛋白 Studied by Time-Resolved Electrospray Ionization Mass Spectrometry” *Biochemistry*, (1997), 36, 6448-6454



表 2-1 (A)、界面活性劑依電荷分類

(B)、界面活性劑親水端基團



(B)

界面活性劑	親水基
陰離子型界面活性劑 (Anionic surfactant)	脂肪酸鹽 $-\text{COONa}$ 脂肪酸鹽 $-\text{COONa}$ 磺酸鹽 $-\text{SO}_3\text{Na}$ 磷脂鹽 $-\text{OPO}_3\text{Na}$
陽離子型界面活性劑 (Cationic surfactant)	$\begin{array}{c} \text{R1} \\ \\ \text{R2}-\text{N}^+-\text{R4} \\ \\ \text{R3} \end{array} \quad \text{Cl}^-$
两性界面活性劑 (Amphoteric surfactant)	$\text{R}_3\text{N}^+-\text{CH}_2\text{COO}^-$
非離子型界面活性劑 (Nonionic surfactant)	$\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{OH}$

表 2-2 (A)、親水、疏水基團的HLB參數

(B)、不同 HLB 值之界面活性劑應用範圍.

(A)

Hydrophilic	Group number	Hydrophobic	Group number
-SO ₄ Na	38.7	-CH-	0.475
-COOK	21.1	-CH ₂ -	0.475
-COONa	19.1	-CH ₃	0.475
-SO ₃ Na	11.0	=CH-	0.475
N (tertiary amine)	9.4	-CF ₂	0.870
Ester (free)	2.0		
-COOH	2.1		
-OH (free)	1.9		
-O-	1.3		
-OH (sorbitan ring)	0.5		

(B)

HLB range	Applications
1~6	W/O 乳化劑
6~9	潤濕劑 (wetting agent)
8~18	O/W 乳化劑
13~15	洗滌劑 (Detergent)
15~18	加溶劑 (Solubilizer)

表 2-3 (A)、常用的疏水性的陰(陽)離子型界面活性劑

(B)、溶於水中帶正(負)電荷的染料分子

(C)、用陰陽離子型界面活性劑萃取帶正負電荷染料

(A)

Name	MW	Type	cmc (ppm)
hexadecyltrimethylammonium bromide	364.6	cationic	350
cetyl pyridinium chloride	358	cationic	525
sodium dodecylbenzene sulfonate	348.5	anionic	500
sodium 2-diethylhexyl sulfosuccinate	444	anionic	1110

(B)

Name	Formula	MW	type	λ_{max} (nm)
methyl orange	$C_{14}H_{14}O_3SNa$	327	anionic	510
orange G	$C_{16}H_{10}N_2O_7S_2Na_2$	452	anionic	472
eosin yellow	$C_{20}H_6O_5Br_4Na_2$	692	anionic	517
methylene blue	$C_{16}H_{18}ClN_3S$	373.5	cationic	660
malachite green	$C_{23}H_{25}N_2Cl$	365	cationic	618

(C)

Dye	surfactant	solvent	KC (mM ⁻¹)	Kd (mM)
eosin yellow	HTAB	amyl alcohol	5.06	1.54
orange G	HTAB	amyl alcohol	4.73	1.86
methylene blue	SDBS	amyl alcohol	8.62	2.29
malachite green	AOT	isooctane	1.98	2.51
methyl orange	HTAB	amyl alcohol	31.0	4.17

HTAB : hexadecyltrimethylammonium bromide

SDBS : sodium dodecylbenzene sulfonate

AOT : sodium 2-diethylhexyl sulfosuccinate

表 4-1、實驗二各收集管的蛋白質濃度

Tube Number	肌紅蛋白 (ppm)	細胞色素 C (ppm)	溶菌酶 (ppm)
1	0	0	0
2	0	0	0
3	186.0	0	0
4	55.8	0	0.2
5	6.3	6.3	0.2
6	1.3	9.0	0.2
7	1.3	25.4	1.8
8	1.6	40.6	1.6
9	3.4	51.0	1.5
10	3.4	38.8	2.6
11	0.4	26.1	2.3
12	4.9	22.3	1.7
13	28.3	3.6	26.0
14	10.1	15.9	12.3
15	0	3.9	25.2
16	0	1.2	19.5
17	0	0.4	10

表 4-2、實驗二各收集管中的蛋白質蛋白質相對濃度

Tube Number	肌紅蛋白 (%)	細胞色素 C (%)	溶菌酶 (%)
1	0	0	0
2	0	0	0
3	99.9	0	0
4	99.6	0	0.4
5	49.2	49.2	1.6
6	12.4	85.7	1.9
7	4.6	89.1	6.3
8	3.7	92.7	3.7
9	6.1	91.2	2.7
10	7.6	86.6	5.8
11	1.4	90.6	8.0
12	17.0	77.2	5.9
13	48.9	6.2	44.9
14	26.4	41.5	32.1
15	0	13.4	86.6
16	0	5.8	94.2
17	0	3.8	96.2

表 4-3、實驗二製備蛋白質的蛋白質相對濃度以及回收率

	Collector	Concentration (ppm)	Purity (%)	Recovery (%)
肌紅蛋白	3~5	82.7	97	62
細胞色素 C	6~12	30.5	88	53
溶菌酶	14~17	16.2	67	16

表 4-4、實驗三各收集管的蛋白質濃度

Tube Number	肌紅蛋白 (ppm)	細胞色素 C (ppm)	溶菌酶 (ppm)
1	0	0	0
2	25.8	0	0
3	194.2	7.1	4.9
4	50.1	19.5	5.3
5	6.7	20.7	0.2
6	3.0	23.5	0.2
7	4.6	48.5	3.4
8	2.3	59.8	0.2
9	3.0	44.0	0.2
10	2.3	16.4	1.2
11	2.3	14.5	0.2
12	3.6	11.4	1.1
13	9.1	17.9	3.0
14	7.8	12.4	11.8
15	6.9	8.8	34.3
16	3.8	3.9	91.3
17	4.1	2.2	50.9
18	0	0	38.7
19	0	0	19.2
20	0	0	7.1

表 4-5、實驗三各收集管中的蛋白質相對濃度

Tube Number	肌紅蛋白 (%)	細胞色素 C (%)	溶菌酶 (%)
1	0	0	0
2	100.0	0	0
3	94.2	3.5	2.4
4	66.9	26.0	7.1
5	24.4	74.9	0.7
6	11.3	87.9	0.8
7	8.1	86.0	6.0
8	3.8	95.9	0.3
9	6.3	93.2	0.4
10	11.4	82.7	5.9
11	13.6	85.2	1.2
12	22.5	70.8	6.7
13	30.4	59.7	9.9
14	24.5	38.6	36.9
15	13.8	17.6	68.5
16	3.9	3.9	92.2
17	7.2	3.9	88.9
18	0.1	0	99.9
19	0.2	0	99.8
20	0.6	0	99.4

表 4-6、實驗三製備蛋白質的蛋白質相對濃度以及回收率

	Collector	Concentration (ppm)	Purity (%)	Recovery (%)
肌紅蛋白	2~4	90.0	88	68
細胞色素 C	5~13	28.5	85	64
溶菌酶	15~20	40.2	89	60

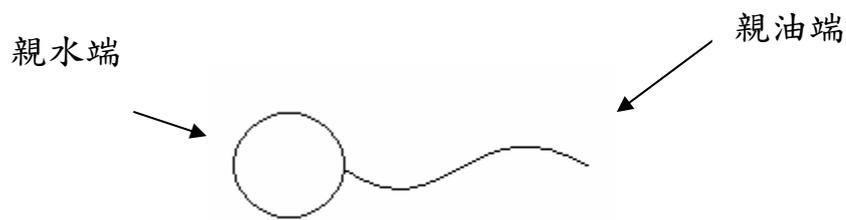


圖 2-1、界面活性劑分子

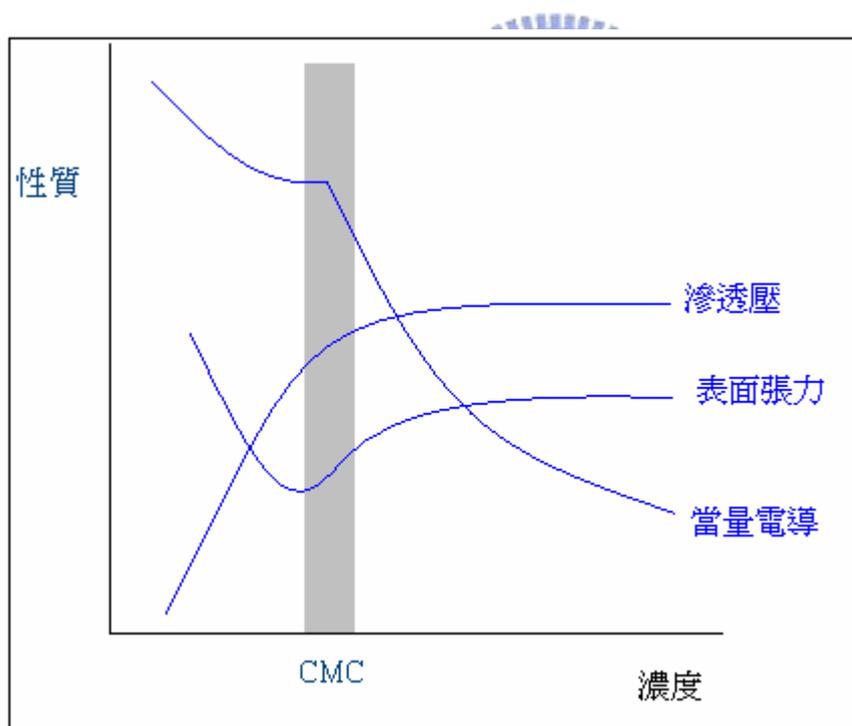


圖 2-2、界面活性劑濃度和溶液的物理性質

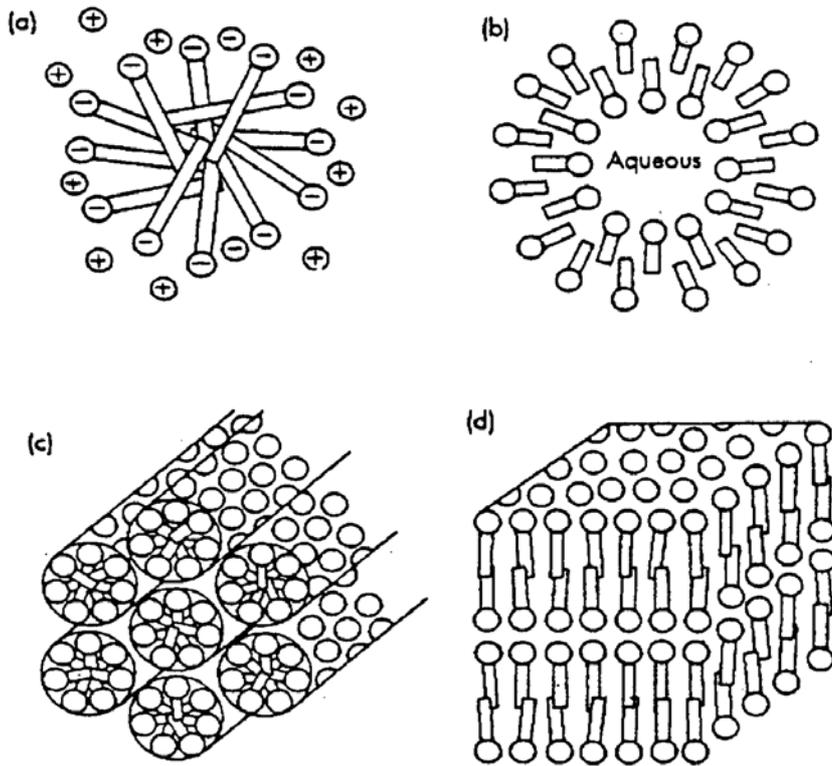


圖 2-3、微胞結構

(a)球形結構 (b)雙層結構 (c)柱狀結構 (d)層狀結構



(a)微胞

(b)反微胞

圖 2-4、微胞與反微胞環境示意圖

(a)微胞：界面活性劑親水端向外 (oil in water)

(b)反微胞：界面活性劑疏水端向外 (water in oil)

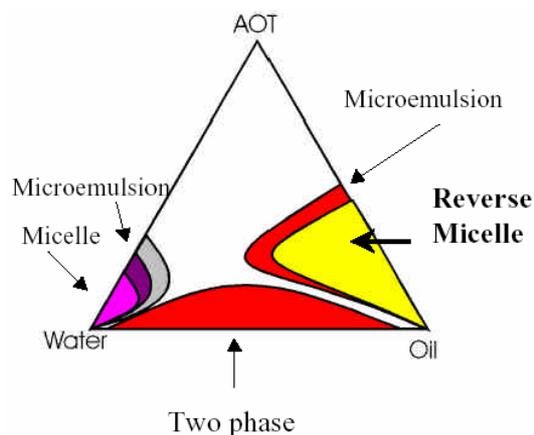


圖 2-5、界面活性劑、水、有機溶液三相圖

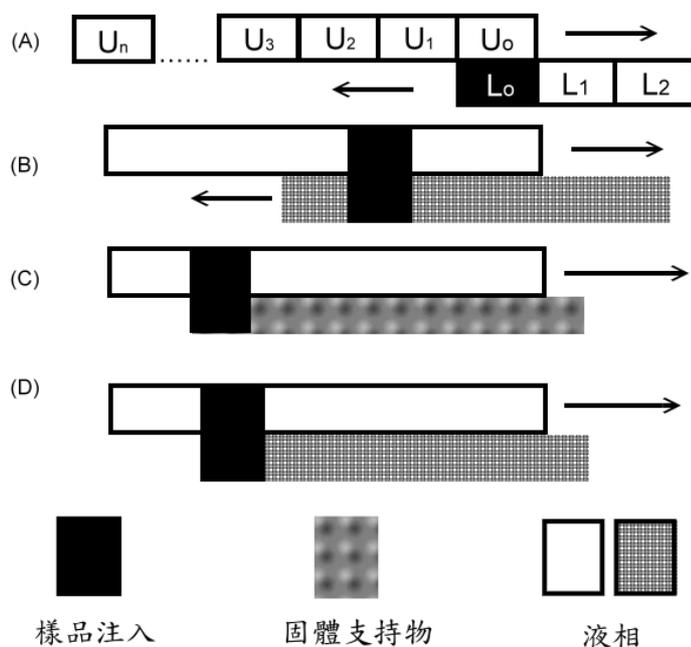
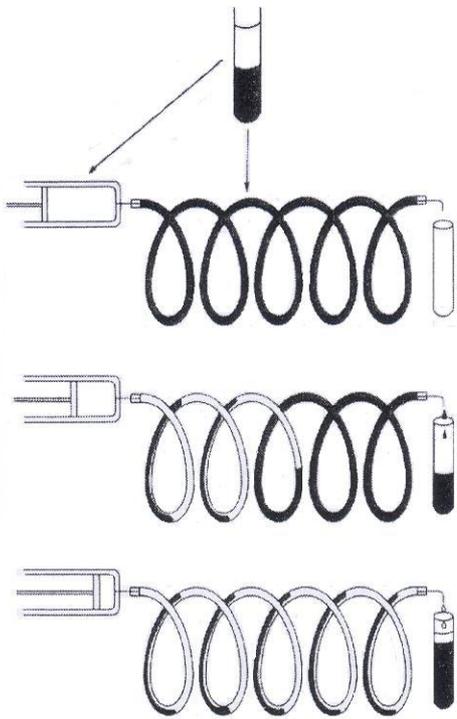


圖 2-6、液相-液相層析方法

- (A) 傳統步驟式液相萃取。
- (B) 逆流萃取 (CCE)，兩相都是動相，分別往反方向移動。
- (C) 液相-液相層析 (LLC)，靜相是以固體支持物滯留在管柱中。
- (D) 逆流層析 (CCC)，靜相滯留不需固體支持物 (Support-free)，而是以重力場、離心力場將靜相滯留在管柱中。

(A)



(B)

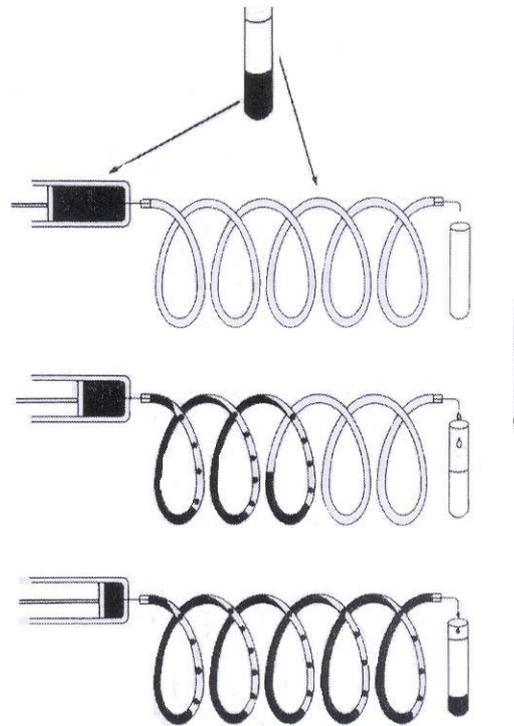


圖 2-7、流體靜力平衡(HSES)示意圖

(A) 靜相為下層相，動相為上層相

(B) 靜相為上層相，動相為下層相

(A)



(B)

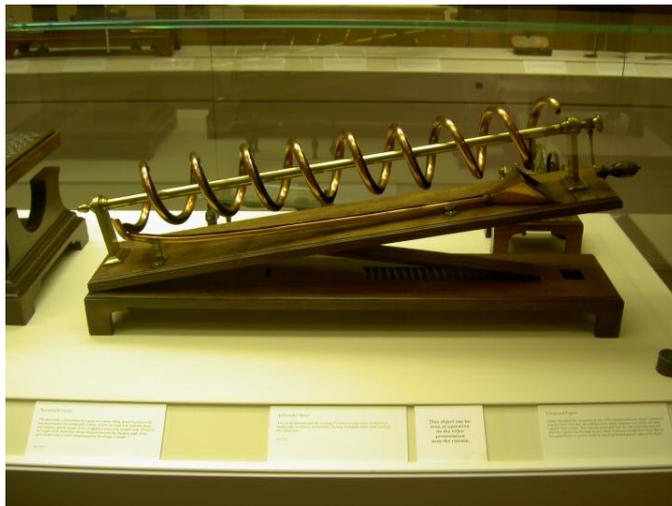


圖 2-8(A)、抽取河水的螺旋裝置示意圖

(B)、螺旋管柱裝置模型

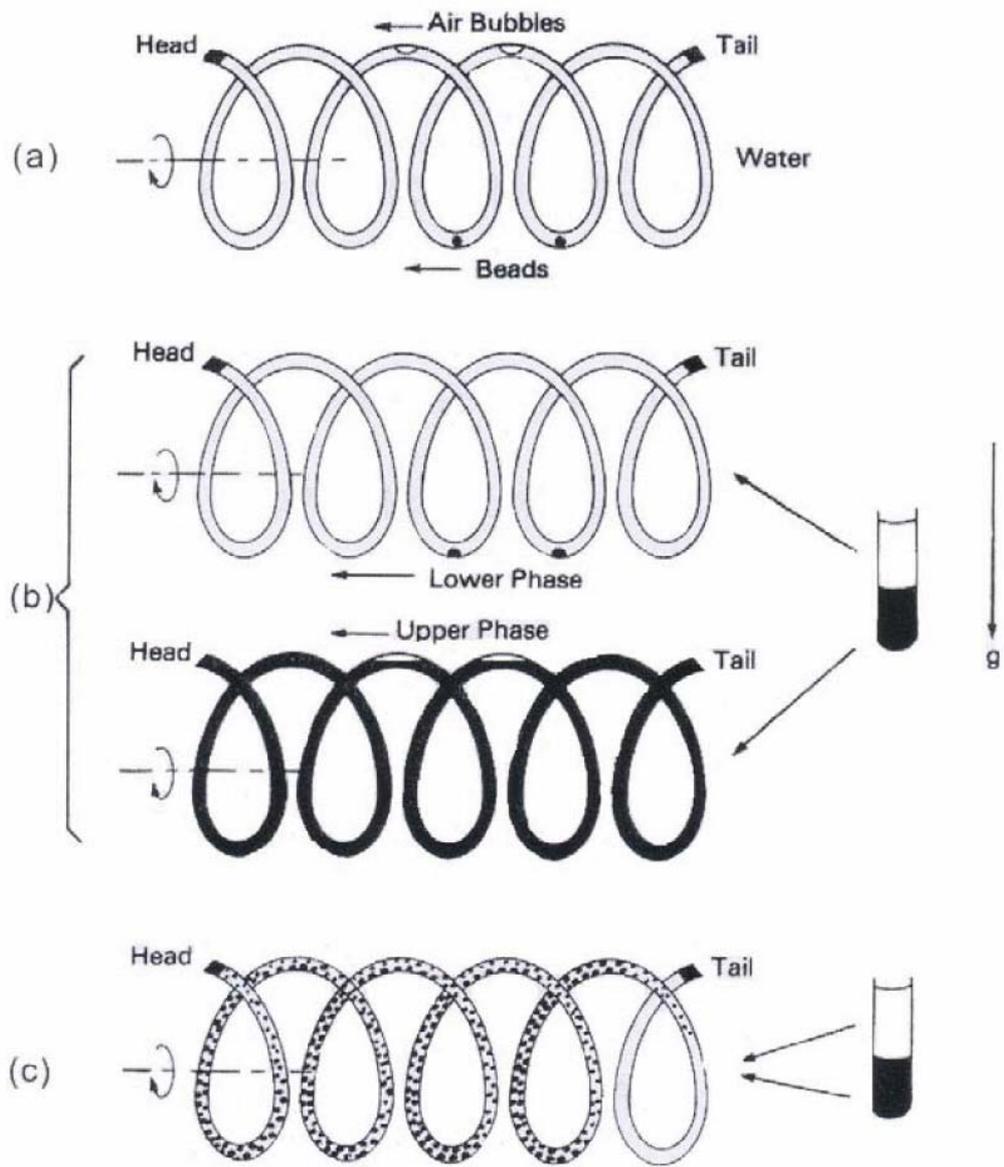


圖 2-9、螺旋管柱中的輕重兩相移動情形

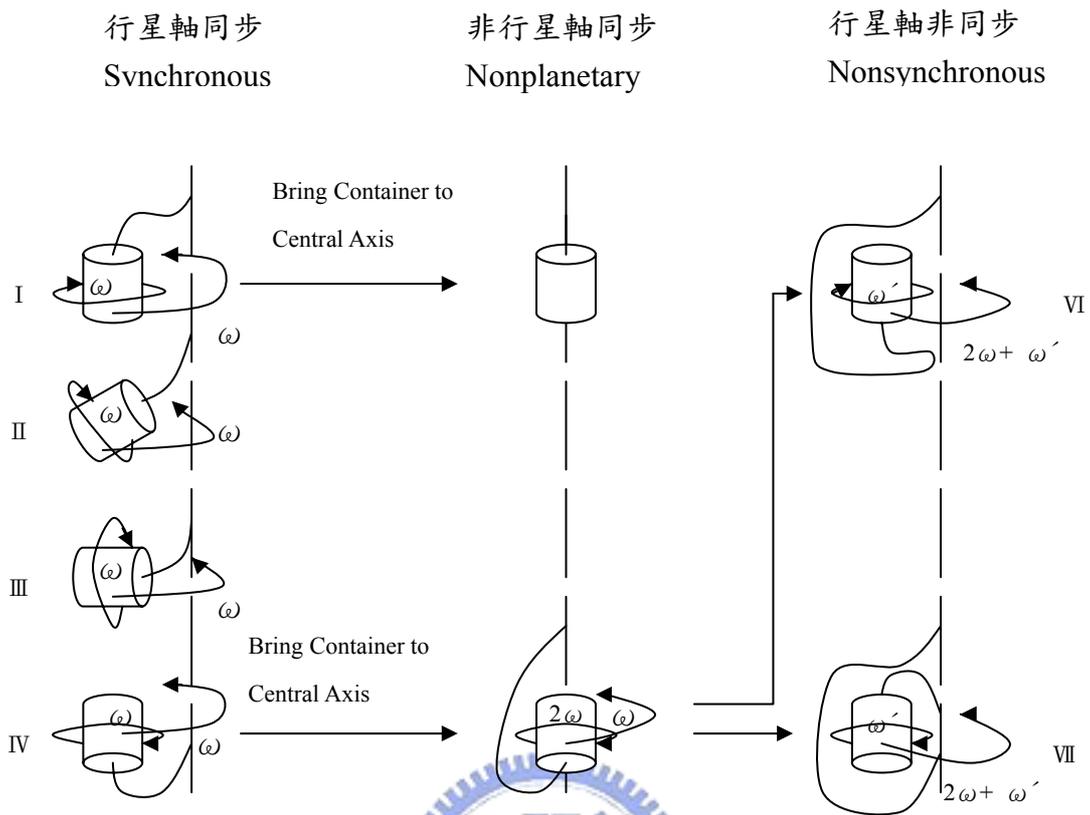


圖 2-10、反扭轉機構轉動系統

分別是行星軸同步式、非行星軸同步、行星軸非同步式等三種，再變化成七個模型

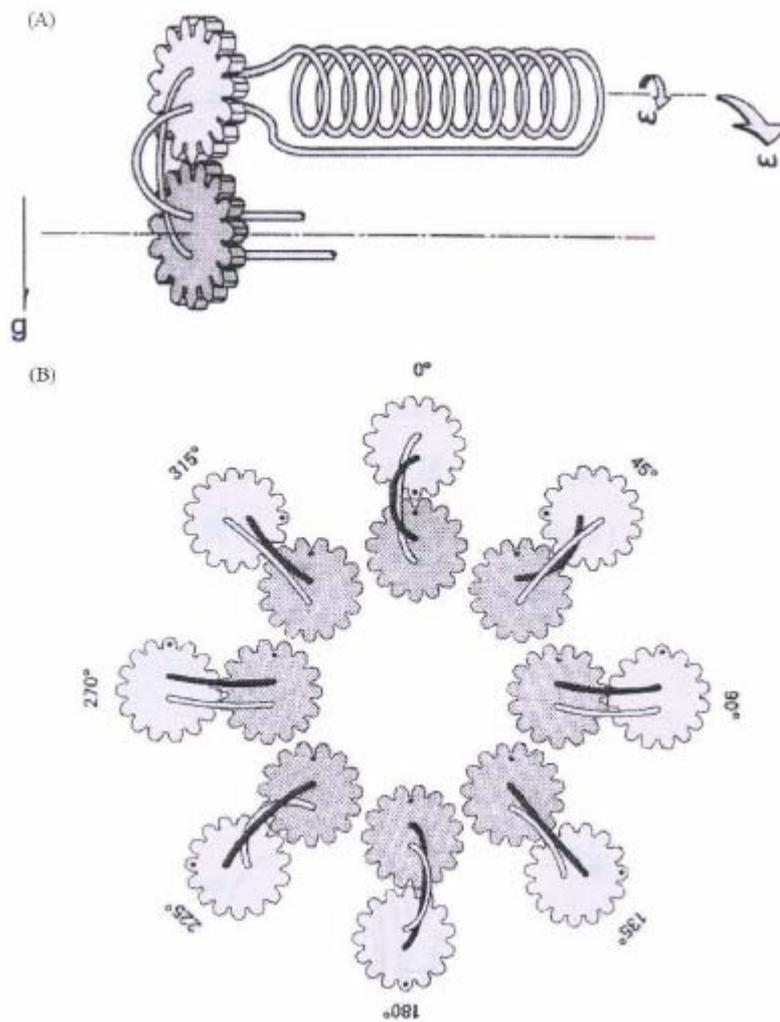


圖 2-11、高速逆流層析的旋轉機構

(A) 螺管支持物不僅以角速度 ω 繞著中心軸旋轉，同時自身也以相同的角速度往相同方向旋轉

(B) 螺管支持物的同步行星運動可防止流體導入管與導出管扭轉

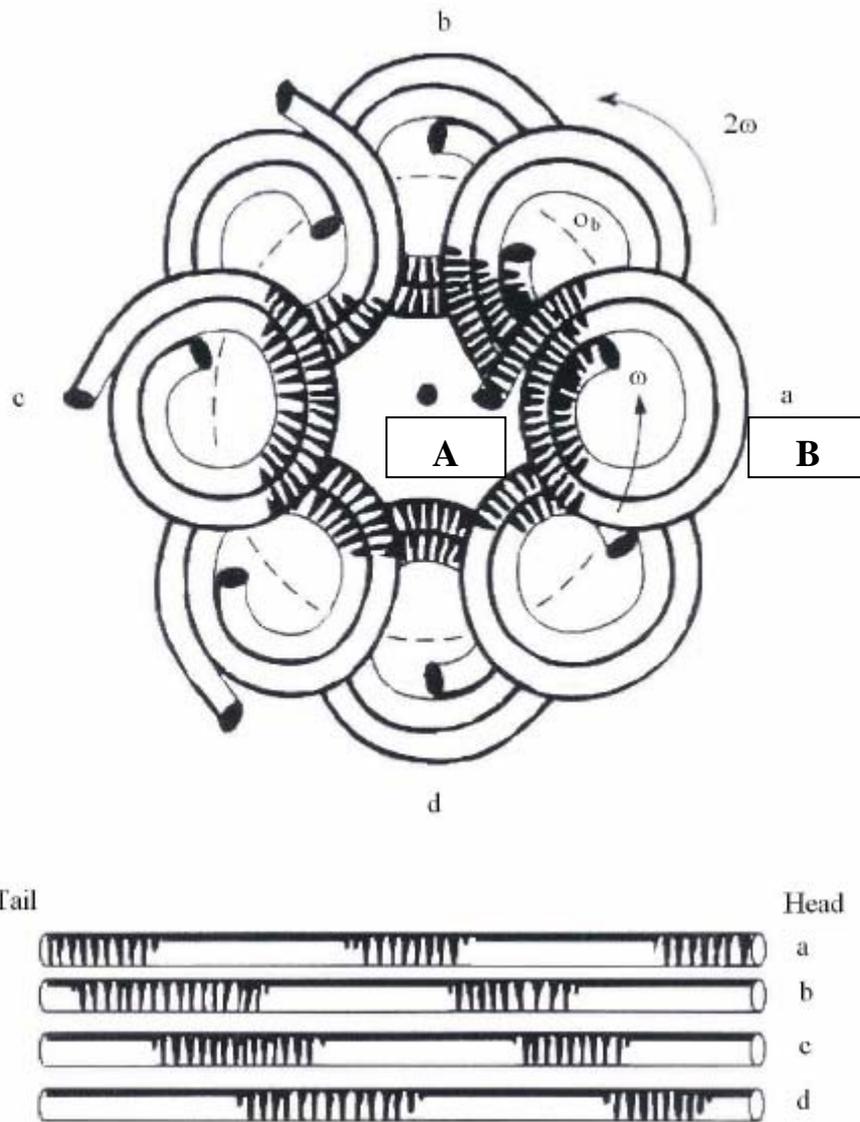


圖 2-12、IV型同步行星式逆流層析的混合在管柱內的分佈情形

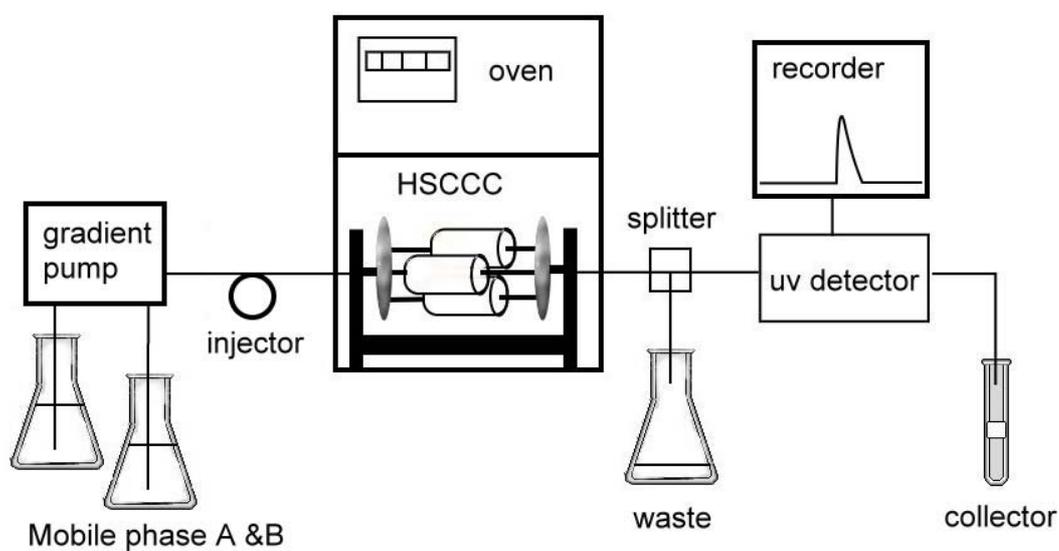


圖 3-1、逆流層析裝置圖

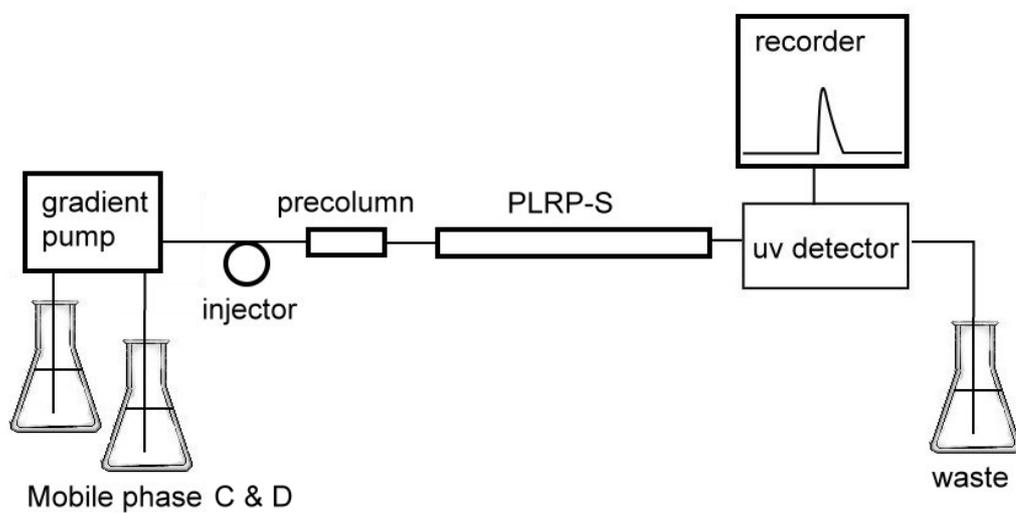
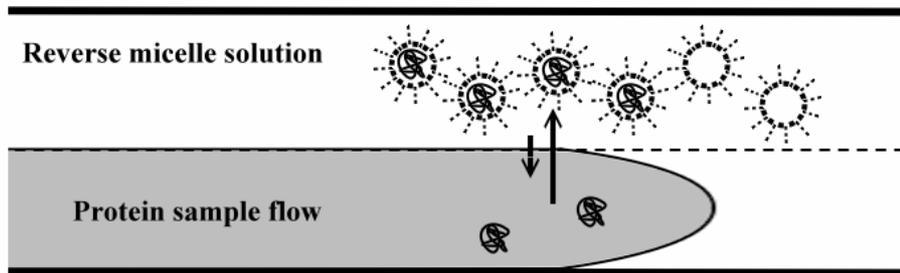


圖 3-2、HPLC 實驗裝置圖

(a)

Forward extraction



(b)

Backward extraction

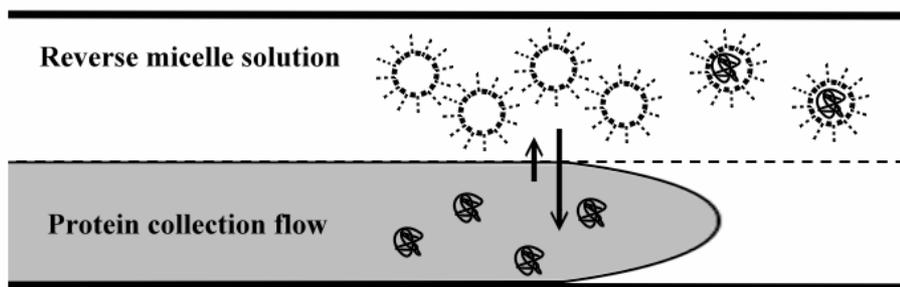


圖 4-1、蛋白質在含有反微胞的逆流層析管柱中示意圖

(a)正向萃取-蛋白質分佈偏向進入反微胞

(b)反向萃取-蛋白質分佈偏向回到水中

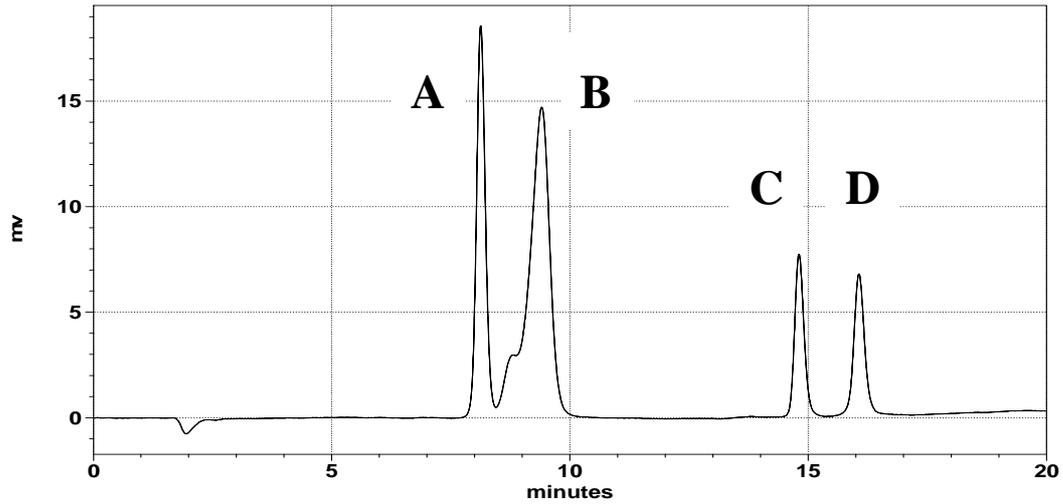


圖 4-2、HPLC 分析蛋白質層析圖

動相：20 % ACN – 80 % ACN 梯度沖提(流速：1 mL/ min)

樣品：蛋白質混合溶液 100 ppm

(A): 細胞色素 C (B): 溶菌酶 (C): 肌紅蛋白 (D): heme

UV 偵測器：280 nm

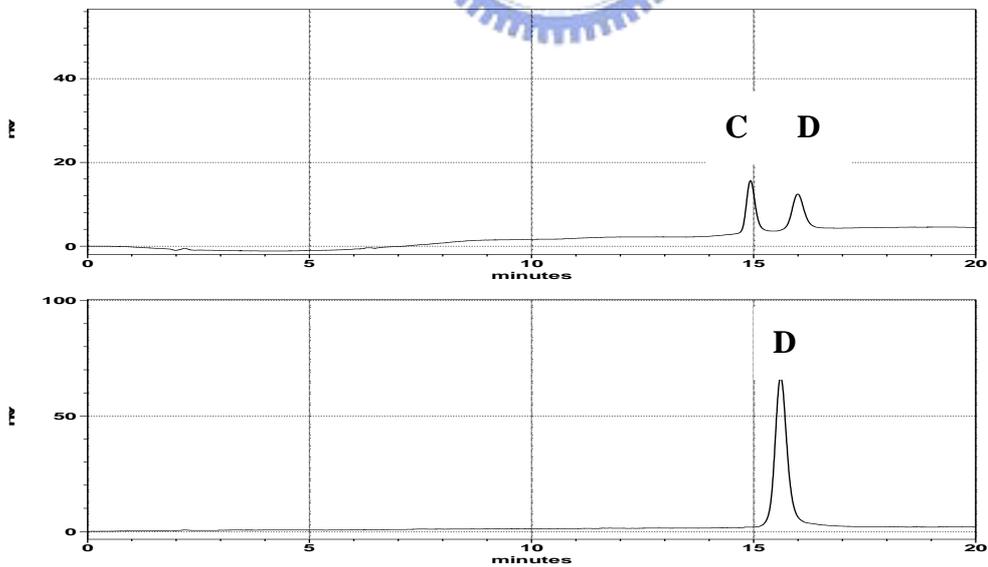


圖 4-3、以不同波長偵測分析肌紅蛋白樣品

(a)波長 280nm 得到的層析圖

(b)波長 409nm 得到的層析圖

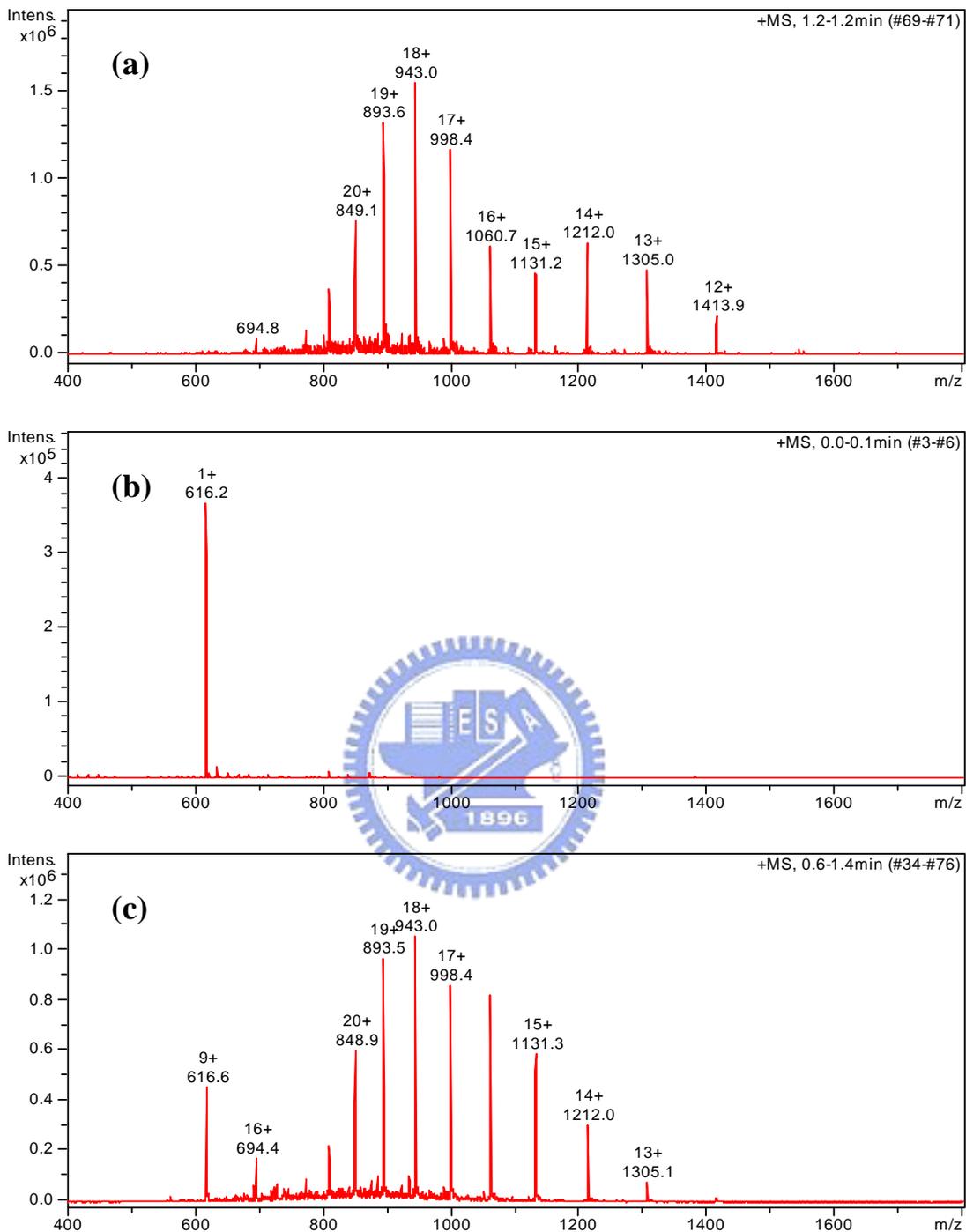


圖 4-4、以 ESI-MASS 分析圖 4-3 中的樣品

(a) 第一個波峰樣品收集液(分子量測得為 16952)

(b) 第二個波峰樣品收集液(分子量測得為 616)

(c) 未經過 HPLC 分離的肌紅蛋白樣品(同時有分子量為 16952 及 616)

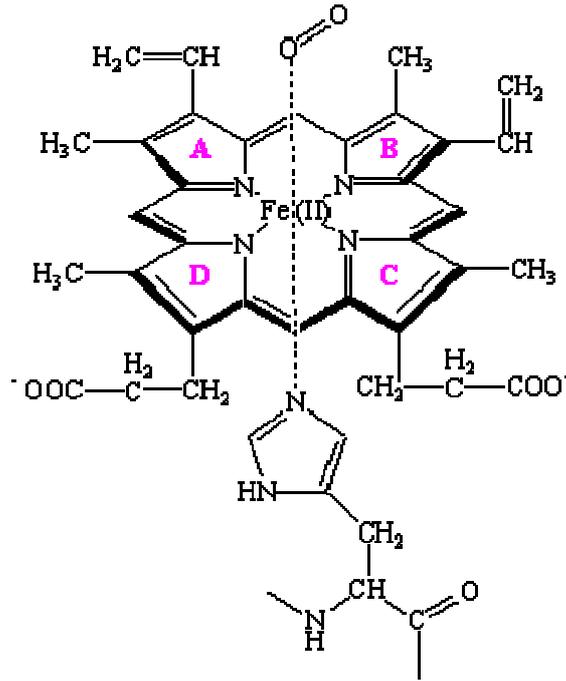


圖 4-5、肌紅蛋白中的heme分子 (MW=616)

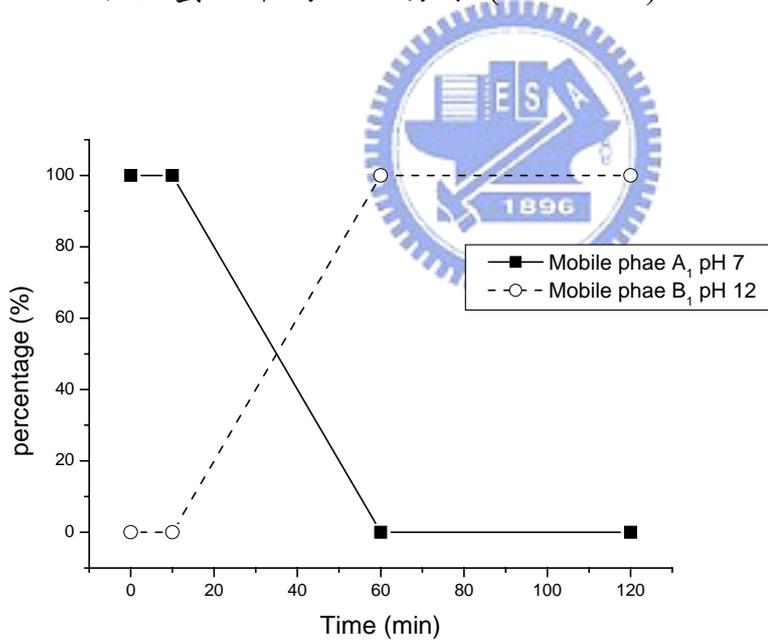


圖 4-6、實驗一的逆流層析動相組成

動相A₁：含有 50mM Tris-HCl、0.1M KCl、pH 7 緩衝溶液

動相B₁：含有 50mM K₂HPO₄、0.1M KCl、pH 12 緩衝溶液

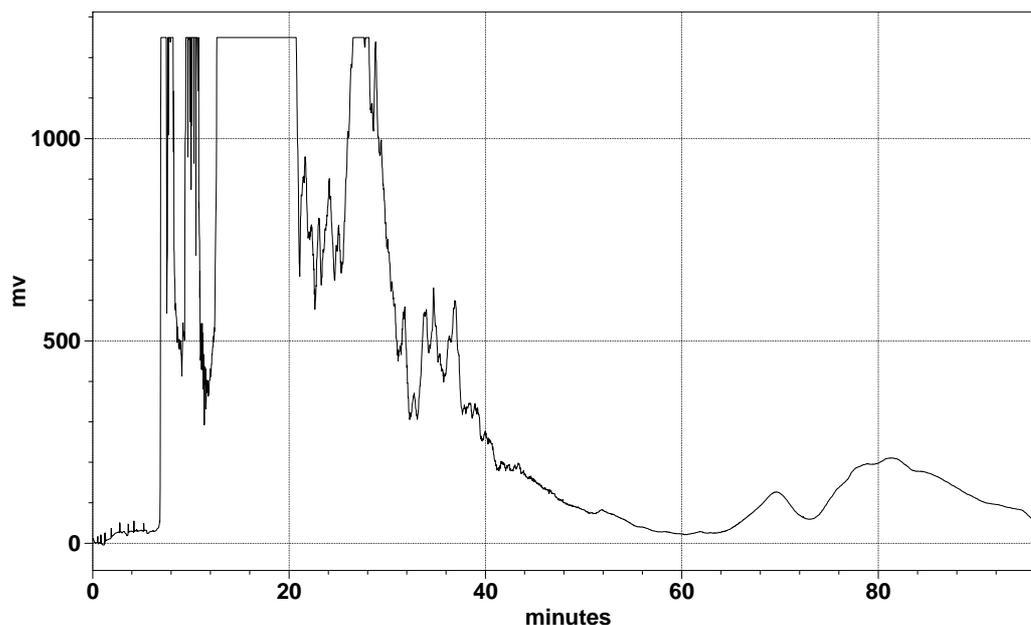


圖 4-7、實驗一的逆流層析訊號

動相組成：A₁ & B₁

動相流速 1 mL/min

UV 偵測器：280 nm

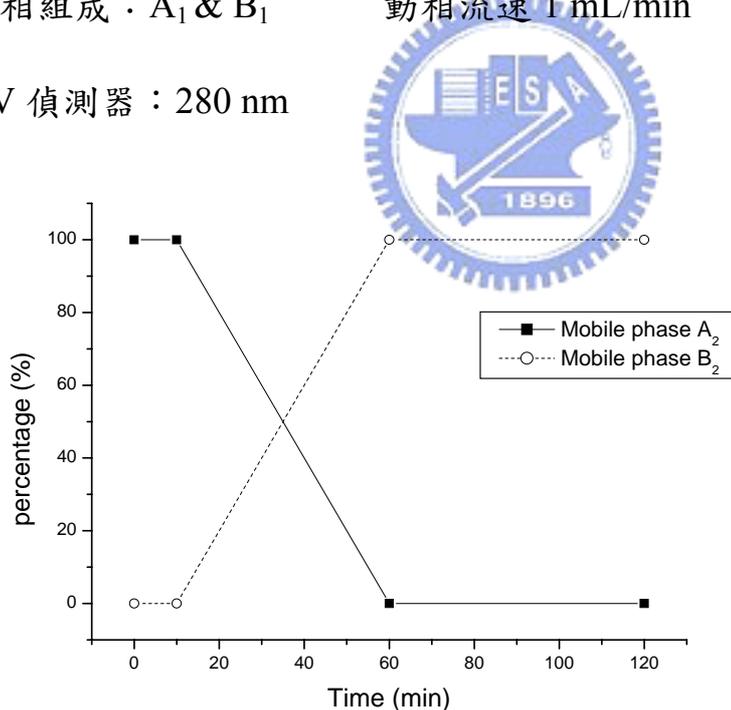


圖 4-8、實驗二的逆流層析動相組成

動相A₂：含有 50 mM Tris-HCl、0.2 M KCl、pH 7 緩衝溶液

動相B₂：含有 50 mM K₂HPO₄、0.2 M KCl、pH 12 緩衝溶液

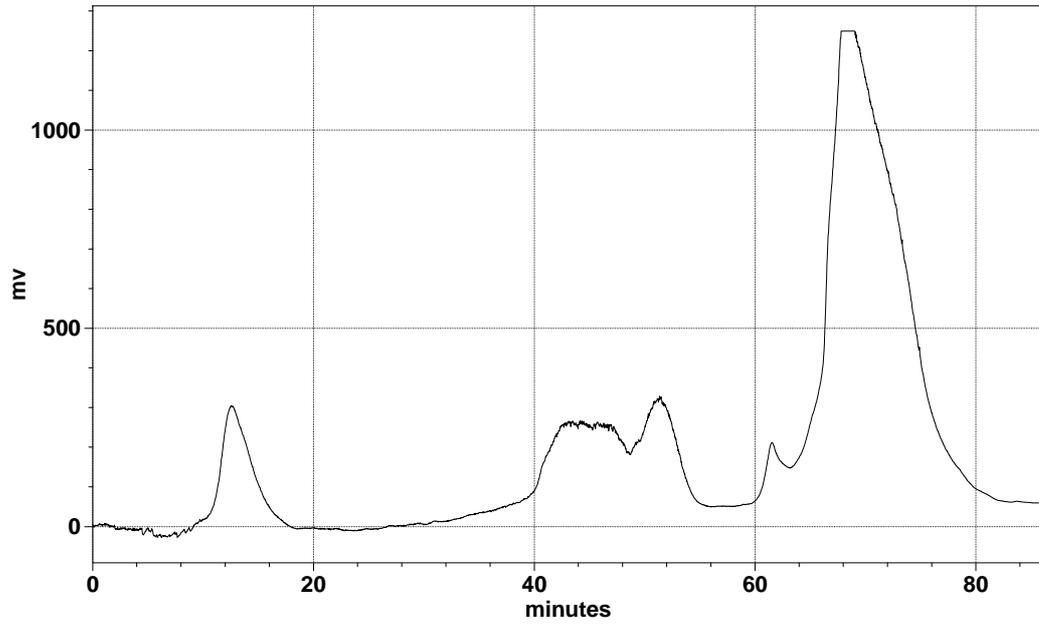


圖 4-9、實驗二的逆流層析訊號

動相組成：A₂ & B₂

動相流速 1 mL/min

UV 偵測器：280 nm

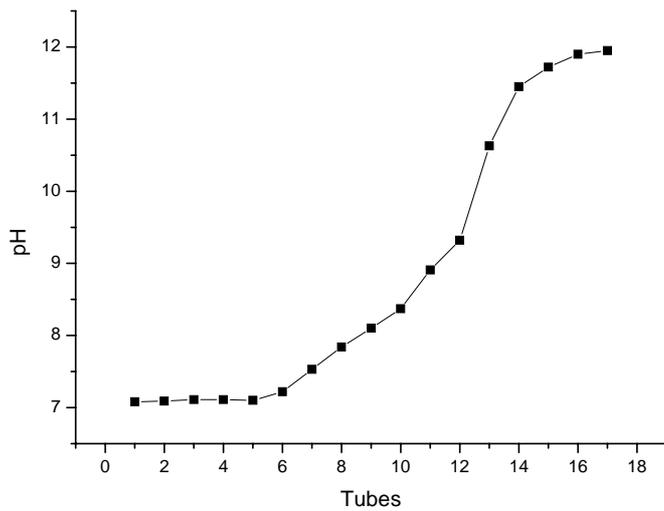


圖 4-10、實驗二各收集管的 pH 值

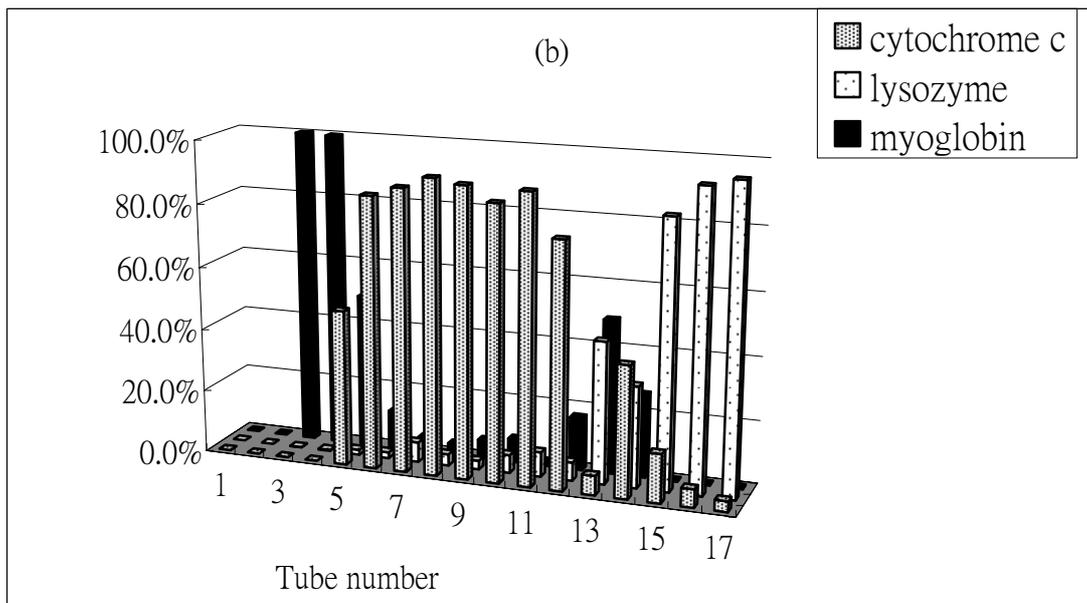
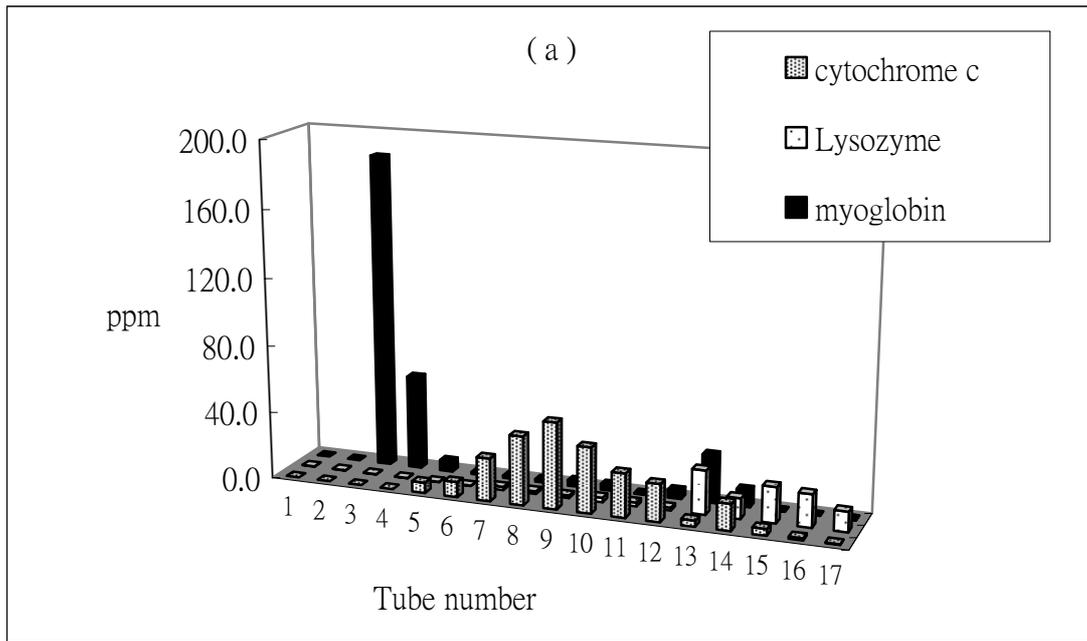


圖 4-11、HPLC 分析實驗二收集管中的蛋白質含量

(a)蛋白質的濃度(ppm)

(b)蛋白質的蛋白質相對濃度(%)

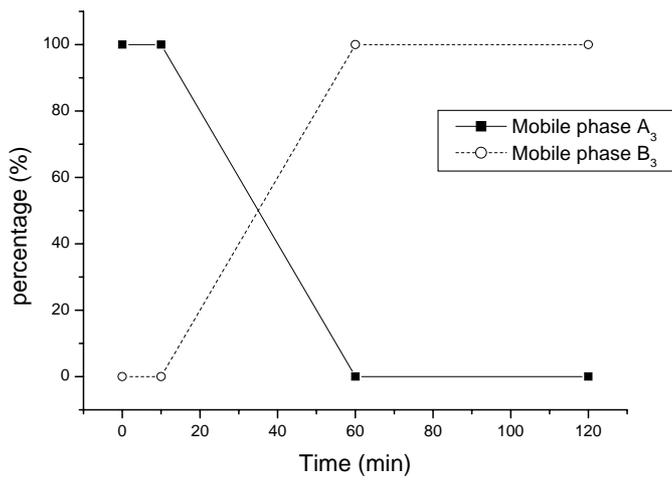


圖 4-12、實驗三 逆流層析動相組成

動相A₃：含有 50 mM Tris-HCl、0.2 M KCl、pH 7 緩衝溶液

動相B₃：含有 50 mM K₂HPO₄、0.6 M KCl、pH 12 緩衝溶液

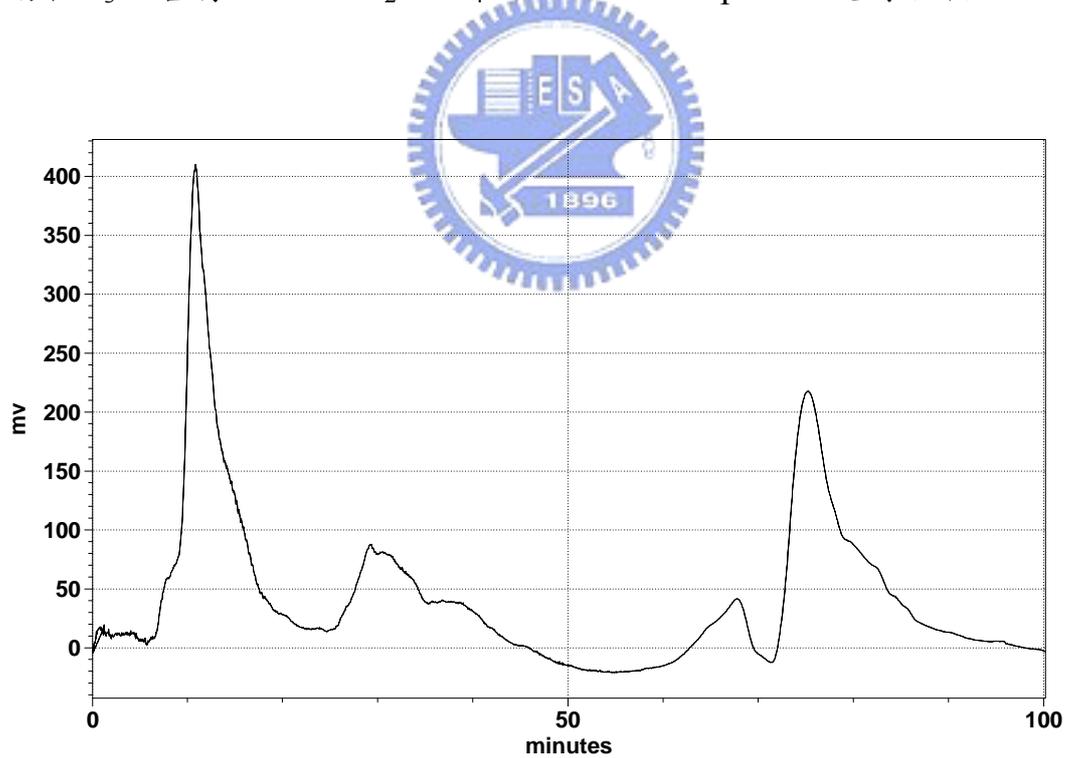
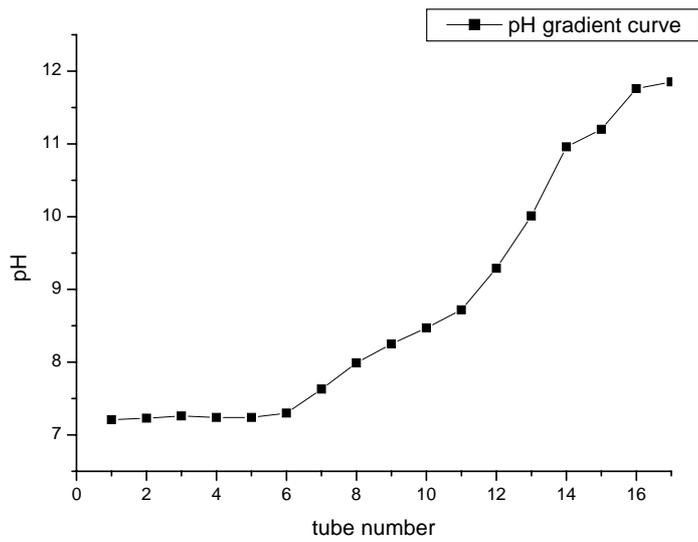


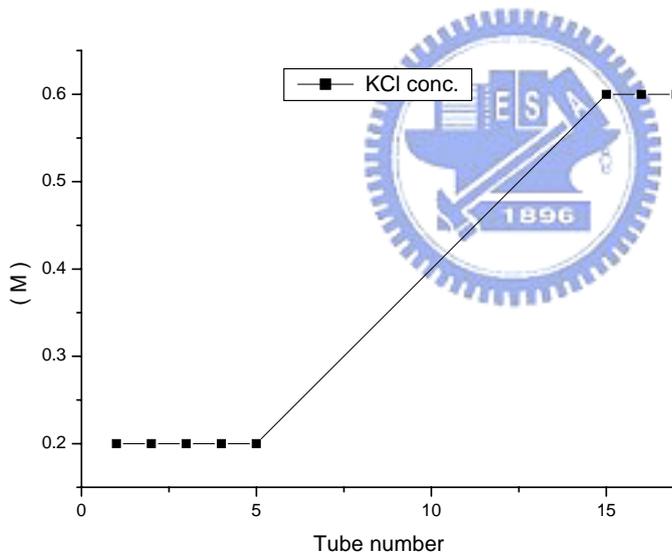
圖 4-13、實驗三 逆流層析訊號圖

動相組成：A₃ & B₃ 動相流速 1 mL/min

UV 偵測器：280 nm



(a)



(b)

圖 4-14、實驗三各收集管的組成

(a) 收集管 pH 值的變化

(b) 估算出收集管中的 KCl 濃度變化

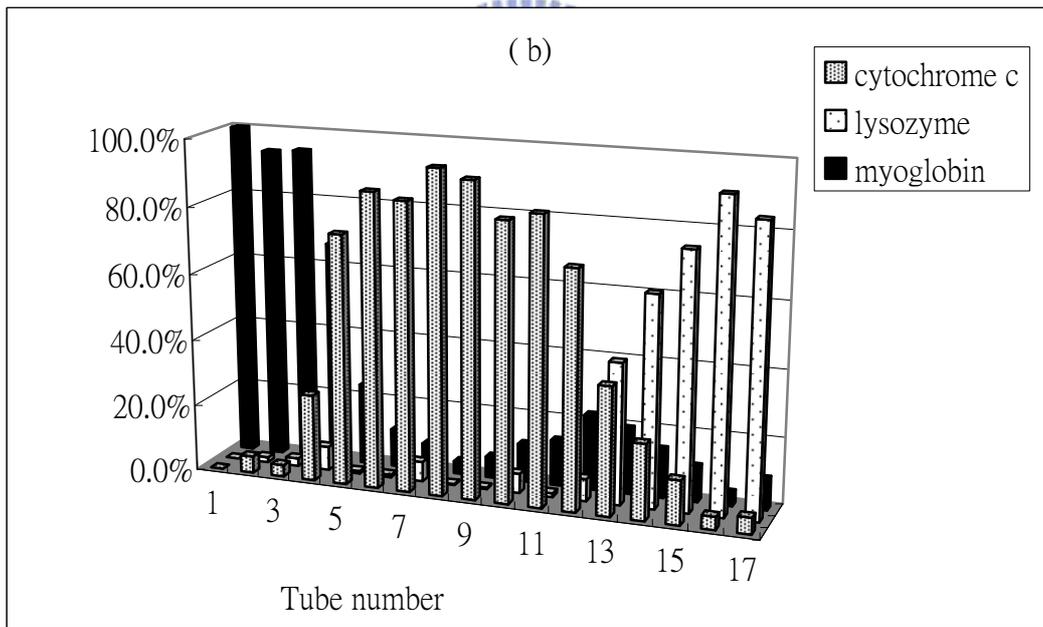
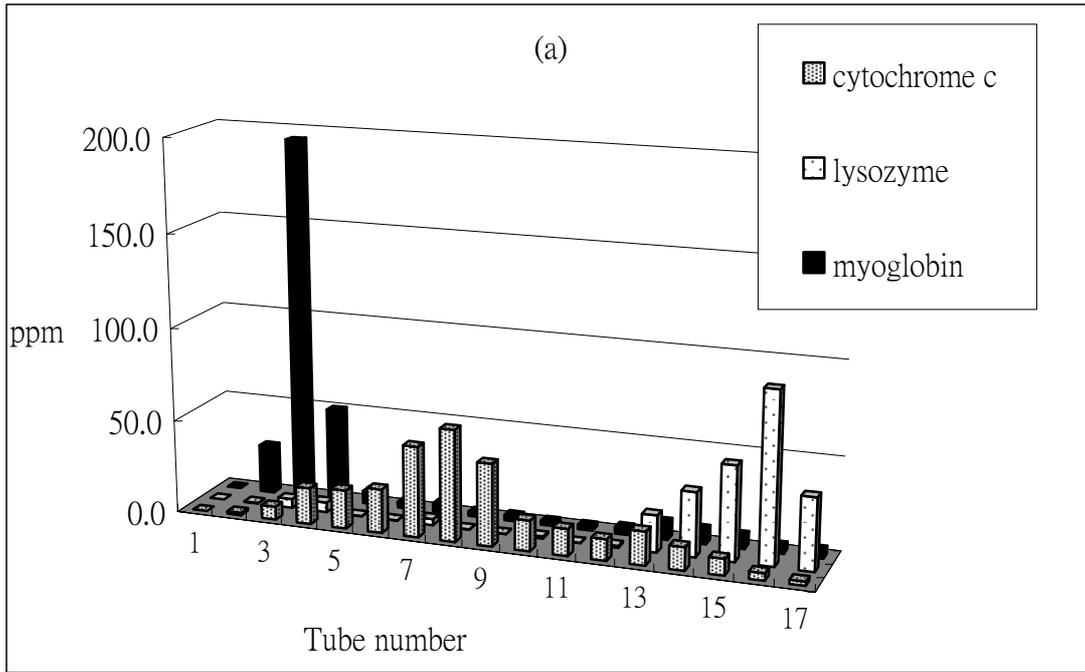


圖 4-15、HPLC 分析實驗三收集管中的蛋白質含量

(a)蛋白質的濃度(ppm)

(b)蛋白質的蛋白質相對濃度(%)

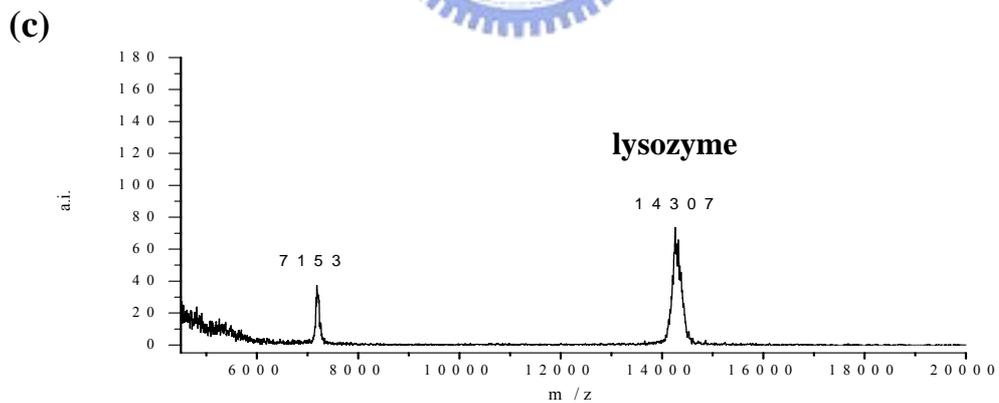
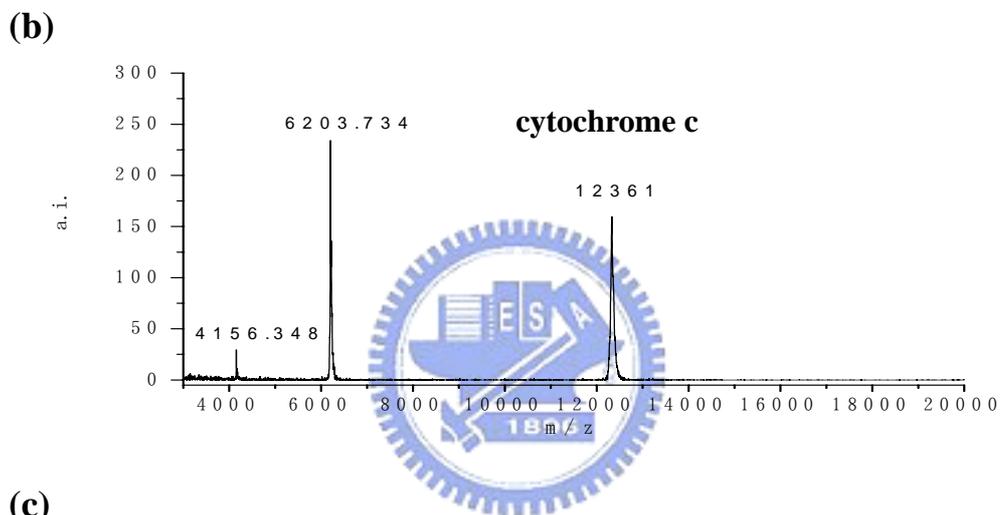
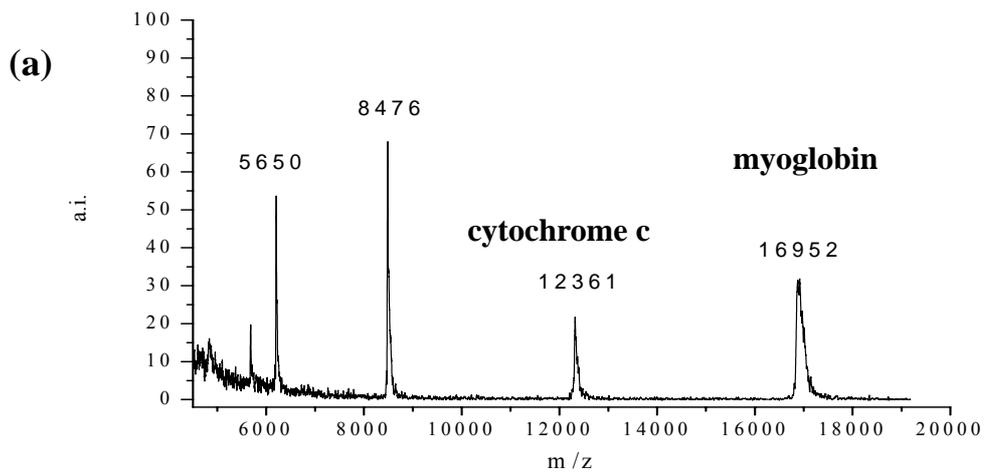


圖 4-16、以質譜分析實驗三的蛋白質收集液

(a)第 3 收集管 (myoglobin 94.2 % , MW=16952)

(b)第 9 收集管 (cytochrome c 93.2 % , MW=12361)

(c)第 16 收集管 (lysozyme 92.2 % , MW=14307)