

國立交通大學

應用化學研究所

碩士論文

於逆流層析中以具有親和性反微胞萃取蛋白質



Extraction of Lysozyme by Countercurrent

Chromatography Using Affinity-Based Reverse Micelles

研究生：陳淑嫩

指導教授：余艇 博士

中華民國九十五年九月

於逆流層析中以具有親和性反微胞萃取蛋白質  
溶菌酶

Extraction of Lysozyme by Countercurrent  
Chromatography Using Affinity-Based Reverse Micelles

研究生：陳淑嫩  
指導教授：余艇 博士

Student：Shu-mei Chen  
Advisor：Dr. Tiing Yu

國立交通大學  
應用化學研究所  
碩士論文



Submitted to Institute of Applied Chemistry  
National Chiao Tung University  
in partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of  
Master of Science  
in  
Applied Chemistry  
September 2006  
Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

中華民國九十五年九月

# 於逆流層析中以具有親和性反微胞萃取蛋白質溶菌酶

學生：陳淑嫩

指導教授：余 艇

國立交通大學應用化學所

## 摘要

逆流層析(countercurrent chromatography)是一種無固體靜相支持物之液相-液相分配層析法，常用於生物分子以及天然物的萃取以及分離。本實驗使用非離子型界面活性劑 Span 85 與藍色染料分子 Cibacron Blue F-3GA(CB)結合，形成具有親和性的界面活性劑 CB-Span 85，由於 CB 染料分子具有與  $\text{NAD}^+$  相似的結構，可與含核苷酸部位的蛋白質具有親和力，將 CB-Span 85 溶於有機溶劑形成反微胞相，可有效的提高反微胞的選擇率，可以只控制離子強度來調節蛋白質進出反微胞的效率。藉由 CB-Span 85 結合逆流層析來萃取三種蛋白質混合物(溶菌酶、牛清血蛋白、卵白蛋白)，在其反萃取時發現只有溶菌酶的存在，證明 CB-Span 85 對溶菌酶的親和力非常高。雖然溶菌酶之回收率會受到溶液中其他蛋白質之影響，本研究彰顯出此技術使用於蛋白質選擇性萃取之可行性。

# **Extraction of Lysozyme by Counter-current Chromatography Using Affinity-Based Reverse Micelles**

Student : Shu-Mei Chen

Advisor : Tiing Yu

Institute of Applied Chemistry  
National Chiao Tung University

## **Abstract**

Counter-current chromatography (CCC) is a technique of liquid-liquid chromatography which eliminates the use of solid support matrices. This method has been widely applied in extraction and separation of biomolecules and natural products. In this study, nonionic surfactant sorbitan trioleate (Span 85) was modified with Cibacron Blue F-3GA (CB) to become an affinity surfactant (CB-Span 85) and to form affinity-based reversed micelles while dissolved in hexane. Since the CB molecule possesses a specific conformation that mimics nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), it can bind strongly and specifically to a wide range of nucleotide-dependent enzymes such as dehydrogenases and kinases. Moreover, high protein transfer efficiency in the reverse micelles can be easily achieved by controlling the ionic strength of the aqueous phase. Lysozyme was selectively extracted in a mixture of lysozyme, bovine serum albumin (BSA), and albumin using CB-Span 85 in CCC. This outcome has shown that the CB-Span 85 possesses high affinity interaction with lysozyme. Although lysozyme recovery was partially hindered by other proteins in the solution, this study demonstrates the feasibility of using the technique in selective protein extraction.

## 謝誌

兩年的碩士生活轉眼間過去了，在求學過程中非常感謝余艇老師的協助與指導，使我在這兩年來獲益良多，當然也要感謝陳月枝老師與白書楨老師，在百忙之中，仍撥空前來，進行口試的審核。

而實驗室的淑慧學姊，感謝你像大姊姊一樣的照顧我，聽我訴苦，給我鼓勵，當然也要謝謝像大哥哥的大秉，時常無條件的幫助我，給我一些意見，從你們身上我學到了很多；我的麻吉”大美女”培真，陪我走過人生的低潮；心靈導師秀琴，時常跟我討論人生的道理；電腦專家凱傑、率真的霆琪、可愛的鈺評、大姆哥士宗、搞笑的阿爆、松甫、已畢業的學長姊月杏、俊竹、俊宏、許慶豐老師實驗室的阿嚕咪、冷面笑匠冷翰、阿川哥、哈比人在實驗上以及生活上的幫助。

最後要感謝我的父母，在我生病的時候，無怨無悔的照顧我，大姊淑嫻，二姊淑婷，弟弟達賢，在我背後默默支持我，為我打氣。也要感謝我的男朋友威志，謝謝你從大學以來，一路陪我到現在，分享我的喜、怒、哀、樂。最後，感謝所有人這兩年來對我相挺到底的決心，我要大聲告訴大家：你們最愛的淑嫻終於畢業了!!

# 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 反微胞萃取作用力.....	4
2.1.4 影響蛋白質萃取的因素.....	4
2.2 親和性反微胞 (AFFINITY-BASED REVERSED MICELLES).....	8
2.2.1 簡介.....	8
2.2.2 親和性反微胞系統.....	8
2.3 逆流層析(COUNTERCURRENT CHROMATOGRAPHY).....	10
2.3.1 簡介.....	10
2.3.2 逆流層析分離理論基礎.....	11
2.3.3 逆流層析的儀器系統.....	12
2.3.4 反扭轉機構的應用.....	14
2.3.5 高速逆流層析(HSCCC).....	14
第三章 實驗.....	29
3.1 試藥.....	29
3.2 實驗儀器.....	30
3.3 實驗流程.....	31
3.3.1 溶液和樣品的製備.....	31
3.3.2 HSCCC 製備分離之實驗步驟.....	32
3.3.3 HPLC 分析收集液之實驗步驟.....	33
第四章 結果與討論.....	36
4.1 收集液之分析方法.....	36
4.2 以高速逆流層析分離蛋白質混合物實驗結果.....	36
4.2.1 實驗一：不同濃度下溶菌酶之萃取.....	36
4.2.2 實驗二：相同濃度不同體積的溶菌酶與卵白蛋白混合物之萃取.....	37
4.2.3 實驗三：溶菌酶與牛血清蛋白混合物之萃取.....	38
4.2.4 實驗四：溶菌酶、牛血清蛋白和卵白蛋白混合物之萃取.....	39
第五章 結論.....	53
參考文獻.....	54

## 表目錄

表 2-1 界面活性劑親水端基團 .....	17
表 2-2 (A) 親水、疏水基團的 HLB 參數.....	18
表 2-2 (B) 不同 HLB 值之界面活性劑應用範圍.....	19
表 4-1、實驗一各收集管的溶菌酶(ly)濃度(ppm).....	40
表 4-2、實驗二各收集管中的溶菌酶濃度 (ppm) .....	41
表 4-3、實驗二各收集管卵白蛋白濃度 (ppm) .....	42
表 4-4、實驗三各收集管溶菌酶與卵白蛋白濃度 .....	43
表 4-5 實驗三各收集管溶菌酶與卵白蛋白相對百分濃度 .....	44
表 4-6、實驗四各收集管中的蛋白質濃度(ppm) .....	45
表 4-7、實驗四製備蛋白質的蛋白質回收率 .....	45



## 圖目錄

圖 2-1、界面活性劑分子 .....	20
圖 2-2、微胞結構 .....	20
圖 2-3、界面活性劑濃度和溶液的物理性質 .....	21
圖 2-4、微胞與反微胞環境示意圖 .....	21
圖 2-5、界面活性劑 Span 85 結構圖 .....	22
圖 2-6、液相-液相層析方法 .....	22
圖 2-7、流體靜力平衡 (HSES) 示意圖 .....	23
圖 2-8 (A)、抽取河水的螺旋裝置示意圖 .....	24
圖 2-8 (B)、螺旋管柱裝置模型 .....	24
圖 2-9、螺旋管柱中的輕重兩相移動情形 .....	25
圖 2-10、反扭轉機構轉動系統 .....	26
圖 2-11、高速逆流層析的旋轉機構 .....	27
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 .....	28
圖 3-1、高速逆相流層析儀實體相片 .....	34
圖 3-2、逆流層析分離裝置示意圖 .....	34
圖 3-3、HPLC 實驗裝置圖 .....	35
圖 4-1、HPLC 分析蛋白質層析圖 .....	46
圖 4-2、HPLC 分析實驗一收集液的溶菌酶(Ly)含量(mg) .....	47
圖 4-3、HPLC 分析實驗一收集液的溶菌酶占全部含量的百分比 .....	47
圖 4-4、實驗二之逆流層析訊號 .....	48
圖 4-5、實驗二溶菌酶的含量(mg) .....	49
圖 4-6、HPLC 分析實驗二收集液的溶菌酶占全部含量的百分比 .....	49
圖 4-7、實驗二卵白蛋白的含量(mg) .....	50
圖 4-8、HPLC 分析實驗二收集液的卵白蛋白占全部含量的百分比 .....	50
圖 4-9、實驗三溶菌酶(Ly)與牛血清蛋白(BSA)的含量(mg) .....	51
圖 4-10、實驗四溶菌酶(Ly)、牛血清蛋白(BSA)和卵白蛋白(AI)的含量 (mg) .....	52



## 第一章 緒論

在所有影響生物反應的物質中，蛋白質扮演著非常重要的角色，其最基本的結構單元是胺基酸。從細菌到人類，所有物種內的蛋白質都是由 20 種胺基酸所組成的。這些胺基酸的側鏈在大小、形狀、電荷、形成氫鍵之能力和化學活性都各有不相同。為了說明蛋白質的結構和功能，必須進行相當多分析鑑定實驗，其中純化是一項非常重要的步驟。純化分離蛋白質的原則是其在大小、溶解度、電性、結合親和力等特質不相同的情況下，透過特定技術可將之分離。分離蛋白質技術大致上可分為鹽溶鹽析、膠體過濾、離子交換、親和層析等等，再綜合搭配使用各種純化分離方式，以達到最大的分離效率與純度。

反微胞可以有效的萃取蛋白質<sup>1,2</sup>，此技術在過去幾年來大量的相關文獻陸續被發表。將某些界面活性劑溶解在有機溶劑中，著其親水基朝內，疏水基朝外，今聚集形成一個奈米尺度的水核中心，而由於蛋白質能溶於水相，故水核中心便可以成為讓蛋白質進入有機相中的媒介，且因為蛋白質仍處於水相環境，故能保持其生物活性。在反微胞萃取蛋白質系統中，藉由水中 pH 值的不同來改變蛋白質表面所帶電荷，可使蛋白質順利的進出反微胞，以達到萃取的效果。

本實驗室過去的研究方向是使用將離子型界面活性劑 sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate(AOT)溶在正己烷中形成反微胞的溶劑系統，結合高速逆相層析儀 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)，來進行蛋白質的分離。將三種蛋白質混合物(肌紅蛋白、細胞色素 C、溶菌酶)，利用改變 pH 值梯度變化的動相進行沖提，來產生使蛋白質在反微胞之間的分佈有所改變，成功達到分離三種蛋白質的效果<sup>3</sup>。

本研究中，將非離子型界面活性劑 Span 85 與染料分子 Cibacron Blue F-3GA(CB)結合，使形成 CB-Span 85 的化合物，由於 CB 上的配體(ligand)與溶菌酶作用之間具有作用力<sup>4</sup>，故將 CB-Span 85 溶於有機相後，便可使成為具有親和力的反微胞系統。此種系統與離子型界面活性劑 AOT 所形成的反微胞系統不同的地方是，後者利用本身帶的電荷之特性，藉著改變 pH 值使蛋白質所帶電性不同的原理，來控制蛋白質進出反微胞系統的程度，達到萃取效果；而這種對溶菌酶具親和力的反微胞溶劑系統，只會針對特定蛋白質分子進行專一性相當高的萃取行為。當數種蛋白質具相同電性時，使用離子型的界面活性劑進行反微胞萃取實驗，則蛋白質會被同時萃取，但使用具有親和力的反微胞溶劑系統來進行萃取時，便可根據分析物與 CB-Span 85 之親和力不同來將之分離，是種價格便宜、選擇率非常高且穩定的分離技術<sup>5,6,7</sup>。



## 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

界面活性劑分子其結構為兩個不同極性的基團所組成，分別為極性小的疏水基團(hydrophobic group)以及極性大的親水性基團(hydrophilic group) (圖 2-1)，可有效降低兩相界面間的表面張力。界面活性劑的分類方法主要有兩種：(1)親水基團帶電性質，根據界面活性劑溶於水時能否生成離子的情況可分為離子型與非離子型界面活性劑，其中離子型界面活性劑又可細分為陽離子型、陰離子型，兩性型界面活性劑(表 2-1)。(2)界面活性劑溶於水的難易程度：可由界面活性劑所帶的親水以及疏水基團，來區分界面活性劑為較親水性或較疏水性的，也可用 HLB 數值(hydrophile-lipophile balance)來表示，參考(表 2-2)，當 HLB 值越小，代表界面活性劑疏水程度越大。

#### 2.1.2 微胞與反微胞

##### (1) 微胞(Micelle)

由數十或數百個界面活性劑分子聚集而成，在水溶液中，微胞內的界面活性劑的親水基團朝外與水分子水合，疏水基朝內，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。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<sup>8</sup>(圖 2-2)，界面活性劑可形成微胞的最低濃度，稱為臨界微胞濃度 CMC (critical micelle concentration)。當界面活性劑分子濃度達到 CMC 值時，溶液的一些物理性質如電導度、表面張力、滲透壓等會發生明顯的改變(圖 2-3)。

## (2) 反微胞(Reverse micelle)

當界面活性劑溶於非極性的溶劑中產生聚集時<sup>9</sup>，其結構正好與水溶液中所形成的微胞相反(圖 2-4)，反微胞的親水端會朝內聚集成一個可以溶解水分子的極核中心，又稱水核(water pool)，其疏水端則分佈在反微胞的外圍。

### 2.1.3 反微胞萃取作用力

#### (1) 靜電作用力(electrostatic interactions)<sup>10</sup>

由於離子型的界面活性劑帶有電荷，故在其所形成的反微胞系統中，若欲使水溶性的分子進入有機相中，則必需讓水溶性的分子所帶電荷與界面活性劑相反;相對的如果當水溶性分子與界面活性劑帶有相同的電荷時，水溶性分子就會因為與界面活性劑電荷排斥，而從反微胞系統回到水相。藉由正負電的靜電作用力，來達到萃取的效果。

#### (2)疏水性作用力(hydrophobic interactions)<sup>11, 12</sup>

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應用在萃取上之效率的最主要因素。

### 2.1.4 影響蛋白質萃取的因素

#### (1) 水溶液中的離子強度(ionic strength)<sup>13</sup>

當水溶液中的離子強度增加時，會導致界面活性劑的極性端與

親水性分子之間的淨電作用力降低，使得反微胞水合中心的體積變小，亦是有機相溶解蛋白質的能力變小，這種在界面活性劑的親水端與蛋白質表面電荷所造成的效應稱為 Debye screening effect。溶在反微胞內水分子的多寡可用  $W_0$  表示，其定義為反微胞相中水與界面活性劑的莫耳數比( $W_0=[H_2O]/[Surfactant]$ )，當  $W_0$  值越大時，表示每個反微胞可攜帶的水分子越多，也越有能力萃取較多或較大的親水性分子。

但是，當溶液的離子強度小於某一極限時，無法形成反微胞及產生相分離現象，水相、有機相就會產生一穩定的乳化態 (microemulsion)。根據過去學者的研究<sup>14</sup>，當水溶液中的離子濃度小於 0.1M 時，含有界面活性劑的有機相與水相不容易回復澄清，形成乳化態，而萃取白質的效率不高。

## (2) 離子種類(Type of Electrolyte),

水溶液中鹽類的組成除了決定離子強度外，也會影響有機相與水相之間蛋白質的萃取。有文獻指出，改變離子種類<sup>15</sup>對於蛋白質萃取效率的影響程度為  $K^+ < Rb^+ < Cs^+ < Na^+ < Li^+$ ，其影響原因可能是金屬離子電荷形成遮蔽效應，而遮蔽效應會降低萃取效果。由上述例子中鉀離子的遮蔽效果最大，萃取效果卻最差，而鋰離子遮蔽效果最小萃取效果最好。

## (3) 水溶液的酸鹼值(pH)

水溶液中的 pH 值決定了蛋白質表面電荷。當蛋白質的總靜電荷為零時，此溶液的 pH 值稱之蛋白質的等電點(isoelectric point)，簡稱

pI 點，當溶液的 pH 與 pI 相等時，其離子淨電荷為零。當蛋白質溶在水溶液中，當其  $\text{pH} < \text{pI}$  時，則蛋白質會帶正電<sup>16,17</sup>；反之，當  $\text{pH} > \text{pI}$  時，其蛋白質帶負電。因此，在使用離子型的界面活性時，調控水溶液 pH 值是決定萃取的重要因素。當蛋白質所帶的電荷與界面活性劑親水端所帶的電荷相反時，蛋白質就會因電荷作用力而進入反微胞相，此現象我們稱之正向萃取<sup>18</sup>；反之，當蛋白質所帶的電荷與界面活性劑親水端所帶的電荷相同時，蛋白質就會因為靜電排斥而從反微胞中回到水相，此現象稱為反向萃取。但是 pH 值的調整範圍仍是受到限制的，原因是當蛋白質處於過酸或過鹼的水溶液中時，會產生變性作用(denaturation)，而造成反微胞有效回收率降低<sup>13</sup>，也導致蛋白質活性喪失。



#### (4) 界面活性劑

對於反微胞的萃取中，界面活性劑的選擇是非常重要的部分。離子型的界面活性劑與蛋白質之間有強的靜電吸引力，對於蛋白質進入反微胞系統中是一項有利的條件，目前常用在反微胞萃取系統的離子型界面活性劑有陰離子界面活性劑 sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (AOT) 以及陽離子界面活性劑 Trioctyl methyl ammonium chloride (TOMAC) 和 Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 這幾種<sup>19, 20, 21</sup>。而非離子界面活性因為靜電作用力較弱，所以改變其帶電性是影響不大的。但是有研究指出非離子型的界面活性劑對蛋白質的活性傷害較小<sup>22</sup>，因此更適用在生物分子上。

而界面活性劑的濃度增加可改變蛋白質進入有機相的程度多寡

<sup>23</sup>，當界面活性劑的濃度高時，有利於反微胞的正向萃取，但是對反向萃取卻是不利的，因此在界面活性劑濃度的調整上，必須選擇適當的濃度使正向與反向萃取效果達到最佳化。

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

傳統在反向萃取蛋白質時，大都調整 pH 值或離子強度。近幾年來有一些研究發現可用其他方式來應用在反向萃取上。例如加入一些輔助溶劑於反微胞系統中，可以使反微胞不穩定，因而迫使蛋白質從有機相回到水相中<sup>24</sup>；或者加入一些共界面活性劑<sup>25</sup>，改變反微胞的形狀，亦可增加反向萃取效率。當我們在反微胞系統中加入電性相反的界面活性劑，此時兩種界面活性劑因靜電作用而互相吸引，破壞了微胞系統，幫助提升反向萃取效率；若是加入非離子型界面活性劑做為共界面活性劑時，尚可以幫助蛋白質保持活性。

#### (6) 溫度

溫度變化對反微胞系統的物理與化學性質有相當程度的影響。當溫度越大時其可以增加界面活性劑與蛋白質之間的疏水性作用力，可提高蛋白質在有機相中的溶解力。因此溫度越大，對蛋白質的萃取越高，但蛋白質可能受到溫度的影響而變性。

#### (7) 有機溶劑的類型

反微胞的大小會受到有機溶劑類型的影響，當然也改變了反微胞水核中心的大小。因此不同溶劑系統所形成的反微胞結構，在對特定生物分子進行萃取時，其生物分子在水相與有機相之間的傳遞就有很

大的差別。

## 2.2 親和性反微胞 (Affinity-Based Reversed Micelles)

### 2.2.1 簡介

親和層析 (Affinity Chromatography)<sup>26</sup> 是利用生物分子間專一的親和力而進行分離的一種層析技術。人們很早就發現蛋白質、酶等生物大分子物質能和某些相對應的分子專一且可逆的結合，利用這種專一作用力可來分離並純化生物分子，但由於技術上的限制(沒有合適的固定配體的方法)所以並沒有廣泛的被應用。親和層析是分離純化蛋白質、酶等生物大分子最為特異而有效的層析技術，分離過程簡單、快速，具有非常高的解析度，是一項應用廣泛的生物分離技術。同時它也可以用於鑑定某些生物大分子結構和功能的研究上。

親和力指生物大分子和其配體 (ligand) 之間形成可逆結合的能力，如酵素和它的受質 (substrate)、抗體和抗原、激素和受體、RNA 和其互補的 DNA 等，親和層析就是根據這種親和力發展出來的純化方法。

### 2.2.2 親和性反微胞系統

在液相-液相萃取中，常用離子型界面活性劑形成的反微胞系統來萃取蛋白質，藉由調控 pH 值，使蛋白質表面電荷的改變，讓蛋白質能進出有機相與水相之間而達到萃取效果。然而這種類似離子交換的原理萃取方法，其缺點是選擇性不高。據文獻指出<sup>27</sup>，將具親和基的物質加入反微胞系統的有機相中，此物質可扮演類似共界面活性劑的角色，蛋白質會與其親水端(此指親和基)辨識並結合，若蛋白質與



親和基的結合常數越高，則萃取率就越大。舉例說明，1989年 J. M. Woll 等人，在 AOT/isooctane 之反微胞系統中，加入 octyl  $\beta$ -D-glucopyranside 等具有親和基的物質，不僅對蛋白質洋刀豆血球凝集素 A (concanavalin A) 有親和作用，而且蛋白質在反微胞系統中的溶解度亦隨之上升。當 octyl  $\beta$ -D-glucopyranside 濃度增加時，其萃取 concanavalin A 的效率就增加<sup>28</sup>。這種具有親和性共界面活性劑的反微胞系統中，不同親和基會針對不同的蛋白質進行萃取<sup>29,30</sup>。但是這類萃取系統，其專一性仍然不高。

另一種含親和性物質的反微胞萃取系統是，在萃取蛋白質前，將溶在有機相的界面活性劑與具有親和基的物質反應，即界面活性劑與具親和基物質二者間有某種作用力存在，再利用此界面活性劑所形成之反微胞系統來對蛋白質進行萃取行為，此系統之專一性較上述系統來得高。藍色染料 Cibacron Blue F3GA(CB)是一種多芳香環的磺化物。由於它具有和 Nicotinamide adenine dinucleotide ( $\text{NAD}^+$ ) 相似的空間結構，使之能與含核苷酸部位的蛋白質特異結合，可作為配基，所以它與各種激酶(kinase)、脫氫酶(dehydrogenase)、血清蛋白、DNA 聚合酶等物質具有親和力，常被使用於親和層析分離技術中<sup>31</sup>。而本實驗中所使用的是非離子型界面活性劑 Span 85，文獻上指出 Span 85 上帶有的 OH 基會與染料分子 CB 反應，形成 CB-Span85 的化合物<sup>9,32</sup>。將 CB-Span 85 溶於有機相中便可形成具有親和力的反微胞系統，其優點是 (1)反微胞萃取系統可使蛋白質存於水核中心，避免受到有機溶劑的破壞 (2)可保持生物活性，因為不需調控 pH 值來萃取蛋白質，可避免蛋白質在強酸或強鹼的環境下，喪失活性 (3)可分離 pI 值相近的蛋白質 (4)染料 CB 只對特定物質具有親和力，因此選擇

性高。而控制蛋白質萃取最大的因素是水溶液中離子濃度，導致親和基與蛋白質之間的作用力降低，使得蛋白質由有機相回到水相中，達到分離效果。

在本實驗中，所使用的蛋白質為溶菌酶、卵白蛋白以及牛血清蛋白。而選用的溶菌酶的目的在於在雞蛋清中溶菌酶占蛋清總蛋白的3.4%~3.5%。它由18種129個氨基酸殘基組成，具有4個S-S鍵，其分子量為14000，pI值為10.7，其最適pH值為6~7。在pH4~7、100℃處理1min不失活性，是一種穩定的鹼性蛋白質。溶菌酶在1922年由細菌學家Fleming首次發現。其具有生物相容性好，對組織無刺激、無毒性等優點。不僅能催化水解細菌壁的黏多糖，使細菌壁不溶性多糖分解，細菌內容物溢出而使細菌溶解。此外，它還可與各種誘發炎症的酸性物質結合，增強抗生素和其他藥物的療效，改善組織基質的黏多糖代謝，達到消炎、修復組織的目的。而選用卵白蛋白是為了模擬蛋清中的情況，其占蛋清的54%，其分子量為45000，pI值為4.5。而選用牛血清蛋白，其分子量為67000，pI值為4.7，其目的是因為其與CB染料也會對牛血清蛋白也有親和作用力，因此也被選用樣品之一。

## 2.3 逆流層析(Countercurrent chromatography)

### 2.3.1 簡介

逆流層析<sup>33,34</sup>是一種無固態支持物之液相-液相分配層析法，其分離的機制不同於一般液相或氣相層析使用固態支持物或吸附劑來滯留靜相，而是藉由管柱轉動下所產生的離心力及重力，將靜相滯留

在分離管柱中，並利用樣品在動靜相中的分佈係數(partition coefficient)不同而分離，由於靜相滯留的體積很大，可以分離大量樣品。此外，逆相流層析與其他液相層析比較下。其優點具有樣品回收率高、靜相與動相可互換、樣品不易變性，不會有靜相吸附的現象。

在 1944 年，Lyman Craig 發展出一不連續的逆流分佈技術 (Countercurrent Distribution, CCD)，是種不連續式分液漏斗的液相萃取技術，但因儀器龐大容易損壞且耗時的缺點，在 1970 年代，Yoichiro Ito 等人，深入研究 CCD 的理論，發展出離心式行星螺管結構 (Coil Plant Centrifugal, CPC)。之後 Ito 和 Conway 等人以 CPC 結構為基礎，發展出多種不同的儀器。在 1981 年提出結合 CCD 與 LC 優點的高速逆流層析 (High-Speed Countercurrent Chromatography, HSCCC)。

### 2.3.2 逆流層析分離理論基礎<sup>35,36</sup>

逆流層析的理論基礎是建立於逆流分佈 CCD(countercurrent disturbution)，原理說明參考 圖 2-6(A)：若有一連串的分液漏斗，分析物最初在  $L_0$  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，當達到平衡時， $U_0$  會萃取部份分析物，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  $U_0$  後做相同的混合步驟。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，則增加分液漏斗的數目，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廣。圖 2-6(B)：為液相-液相分配層析法，亦為 CCD 概念的延

伸，分析物在數個分液漏斗間連續進行分配，不同的物質會因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)：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)：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。

### 2.3.3 逆流層析的儀器系統 <sup>35,36</sup>

為了能讓逆流層析在分離工作上成為實用的層析儀器，近年來陸續開發出具穿流(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，並藉由其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，以平衡過的上層相當作靜

相，而下層相為動相。

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

在HDES 系統中，螺旋管柱藉由公轉與自轉所產生的扭力與離心力將靜相滯留在管柱中，造成在管柱中每一部分所受的方向與大小皆不斷在改變。而這扭力是希臘數學家阿基米德發現，藉由轉動螺旋型的管子，運用機械旋轉產生離心力，使水產生了速度，讓水沿著管壁上旋，再因水衝到管壁時，管壁會不斷向上產生推力，使水升到高處。當手停止搖轉它時，水管中的水會積存在每一圈的低處，不會往下流，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。圖2-9 說明在重力場作用下，阿基米德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，由於阿基米德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，輕者在上，重者在下，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，並與

動相充分混合。

### 2.3.4 反扭轉機構的應用

目前逆流層析儀大多設計使用管柱旋轉機構來提供離心場，但卻會造成流體導入管和分離管柱的連接部分易因旋轉而造成扭曲糾結的現象。早期是加裝旋轉栓(rotating seal)來解決，但是由於旋轉栓會因磨擦所產生的熱效應而磨損或造成洩漏、腐蝕、污染及造成樣品變質而影響分析果。因此，在 1975 年，Ito 等人引入免用旋轉栓的結構(反扭轉機構)<sup>33,37</sup>，在出入導管處裝置齒輪取代旋轉栓，來防止導管糾結，其優點在：(1) 在高壓系統下無洩漏之慮 (2) 可使用具腐蝕性溶劑 (3) 減少樣品污染 (4) 減少會讓樣品擴散的無效空間。而以反扭轉機制為基本架構可分成三大類：行星軸同步(synchronous)、非行星軸同步(nonsynchronous)以及行星軸非同步(nonplanetary) (如圖 2-10)；本實驗所使用的高速逆向流層析儀屬於行星軸同步。

### 2.3.5 高速逆流層析 (HSCCC)

#### (1) 原理<sup>38</sup>

高速逆流層析設計原理如圖 2-11(A)所示，中心軸呈水平方向，螺管支持物與一行星齒輪 (planetary gear)相連與中心軸上的太陽齒輪(sun gear)互相咬合，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，如圖 2-11(B)。

#### (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  $\beta$  值 ( $\beta = r/R$ )<sup>38</sup>，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<sup>39</sup>

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。對於溶劑的選擇，可分為三大類：疏水性 (lipophilic)、中間性 (intermediate)、和親水性 (hydrophilic)。當使用疏水性溶劑系統時，如正己烷/水，通常是較輕相分佈在頭端，較重相在尾端。反之，若為親水性溶劑系統，如 2-丁醇/水，其分佈正好相反。若溶劑系統性質在上述兩者之間，則由旋轉螺管之  $\beta$  值決定， $\beta$  值大者，分配情形與疏水性系統相同； $\beta$  值小者，則與親水性系統相同。在高速逆流層析中，溶劑系統的選擇有幾點必須注意：(1) 樣品在溶劑系統中有充分的溶解度 (2) 樣品不會被分解和失去活性 (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<sup>39</sup>

(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。

(d) 流析模式：當  $K$  值比較大時，其樣品較容易滯留在上層相，因此如果選用上層相來當動相，可以使樣品快速被帶出，減少層析時間；當  $K$  值較小時，就選用下層相來當動相。若選擇重相當動相較適合 head-to-tail 的流析模式，可提高靜相滯留量。



表 2-1 界面活性劑親水端基團

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)	$\begin{array}{c} \text{R1} \\   \\ \text{R2}-\text{N}^+-\text{R4} \\   \\ \text{R3} \end{array} \quad \text{Cl}^-$
兩性界面活性劑 (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)

種類	原子團	HLB 參數
親水基	$-\text{SO}_4\text{Na}$	38.7
	$-\text{COOK}$	21.1
	$-\text{COONa}$	19.1
	$-\text{SO}_3\text{Na}$	11.0
	第四級胺	9.4
	Ester (free)	2.0
	$-\text{COOH}$	2.1
	$-\text{OH}$ (free)	1.9
	$-\text{O}-$	1.3
	$-\text{OH}$ (sorbitan ring)	0.5
疏水基	$-\text{CH}-$	0.475
	$-\text{CH}_2-$	0.475
	$-\text{CH}_3$	0.475
	$=\text{CH}-$	0.475
	$-\text{CF}_2$	0.870

(B)

HLB range	Applications
1~7	W/O 乳化劑
7~15	潤濕劑 (wetting agent)
8~18	O/W 乳化劑
13~15	洗滌劑 (Detergent)
15~18	加溶劑 (Solubilizer)



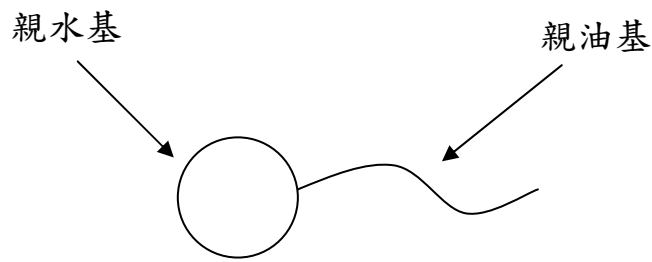


圖 2-1、界面活性劑分子

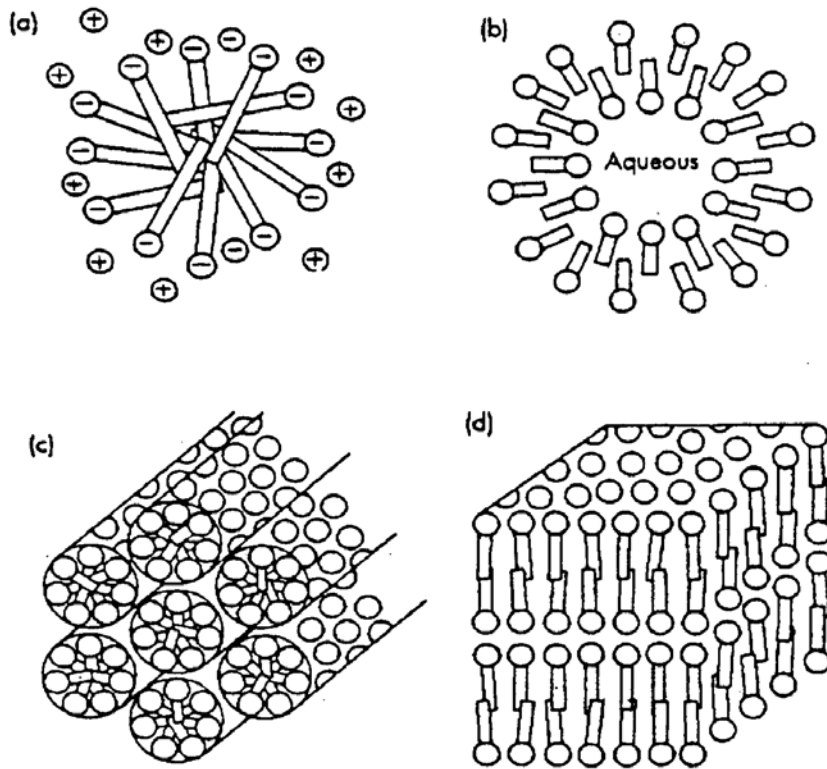


圖 2-2、微胞結構

(a)球形結構 (b)雙層結構 (c)柱狀結構 (d)層狀結構

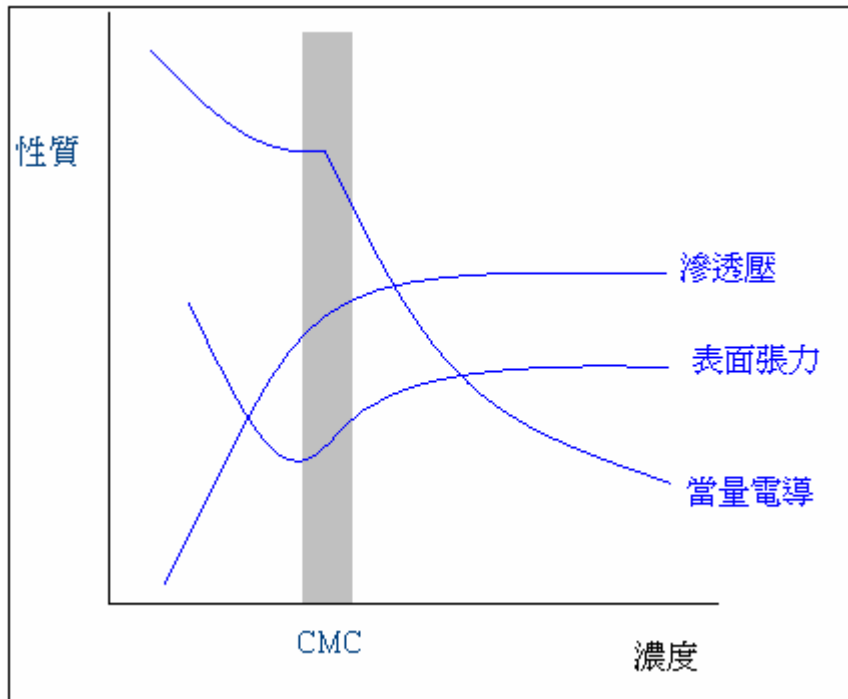


圖 2-3、界面活性劑濃度和溶液的物理性質

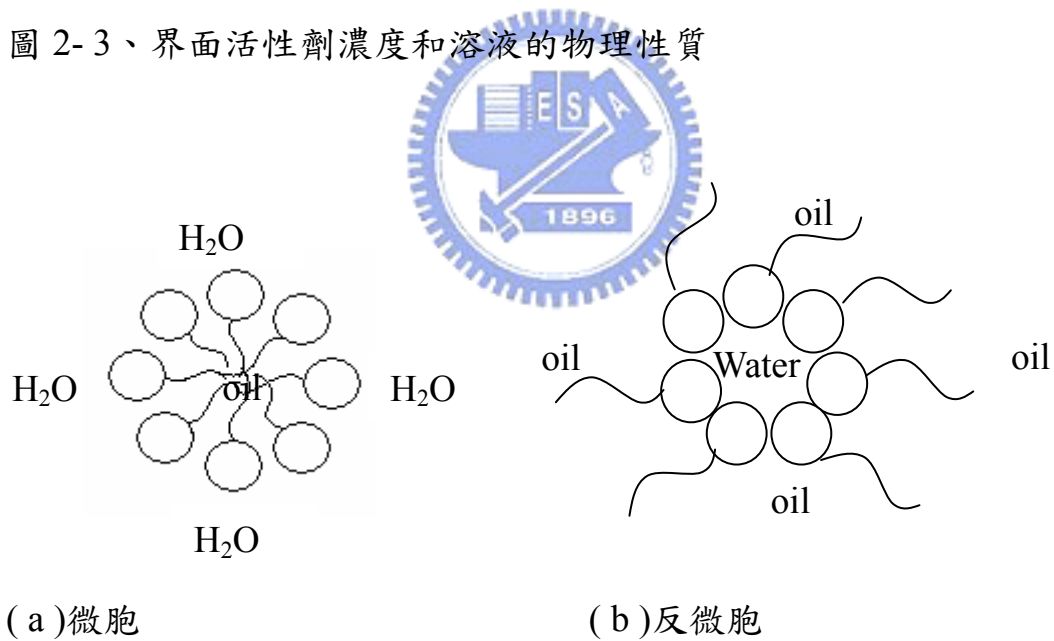


圖 2-4、微胞與反微胞環境示意圖

(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)

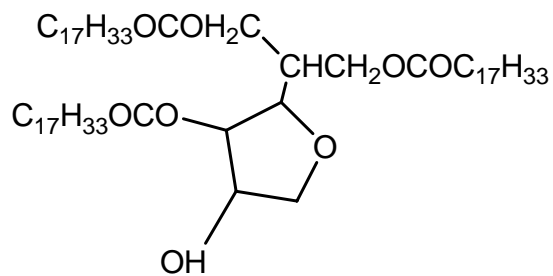


圖 2-5、界面活性劑 Span 85 結構圖

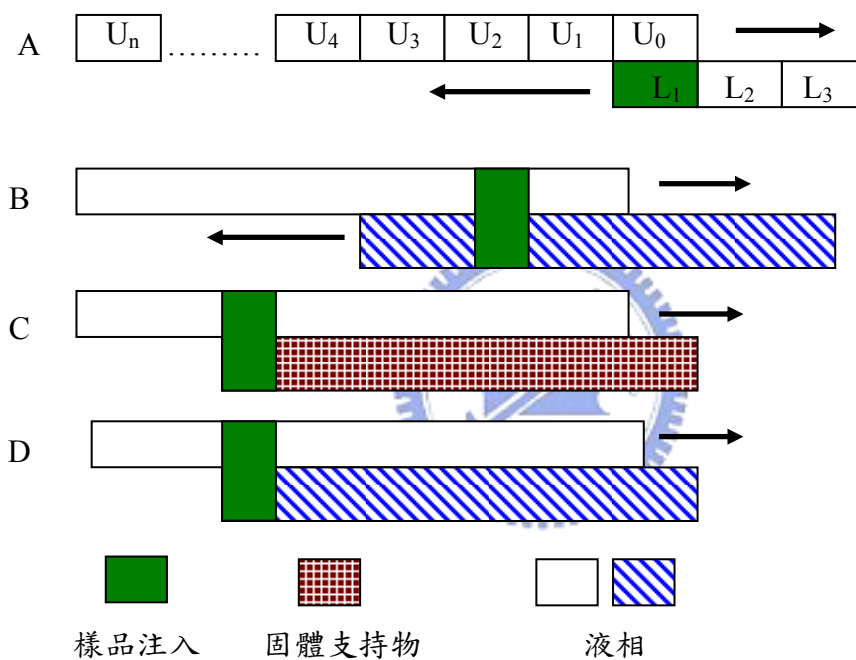
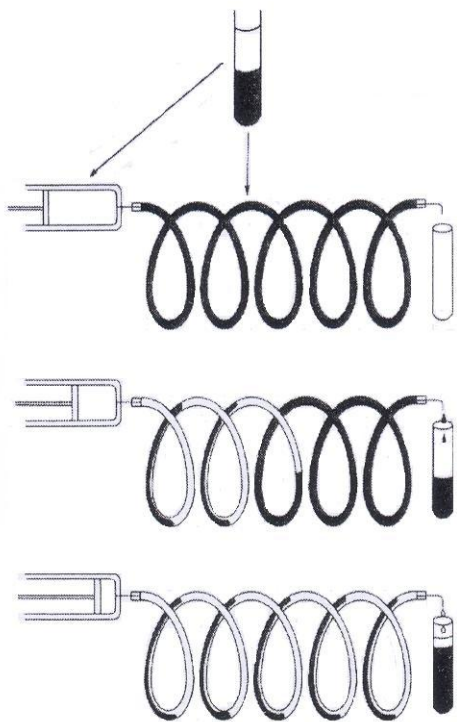


圖 2-6、液相-液相層析方法

- (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)

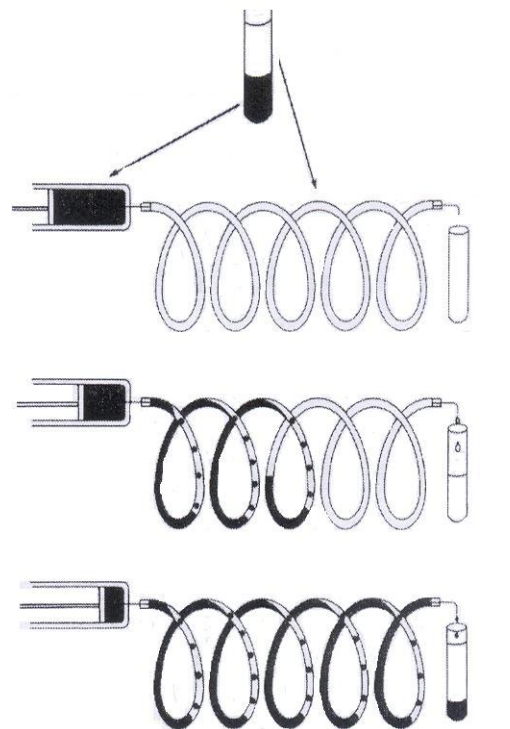
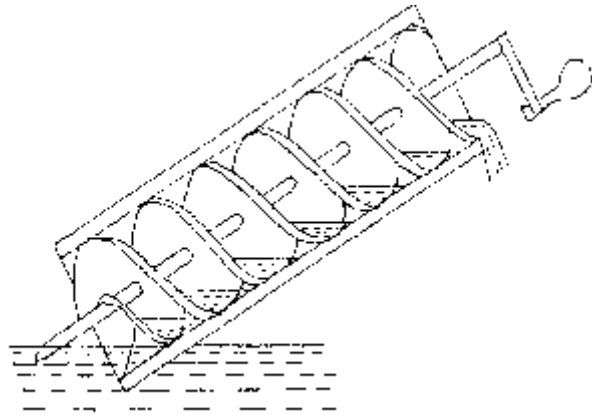


圖 2-7、流體靜力平衡 (HSES) 示意圖

(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)

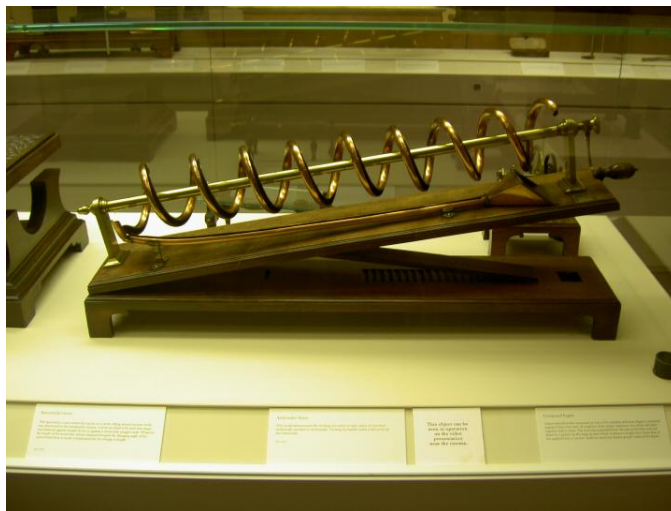


圖 2- 8 (A)、抽取河水的螺旋裝置示意圖

(B)、螺旋管柱裝置模型



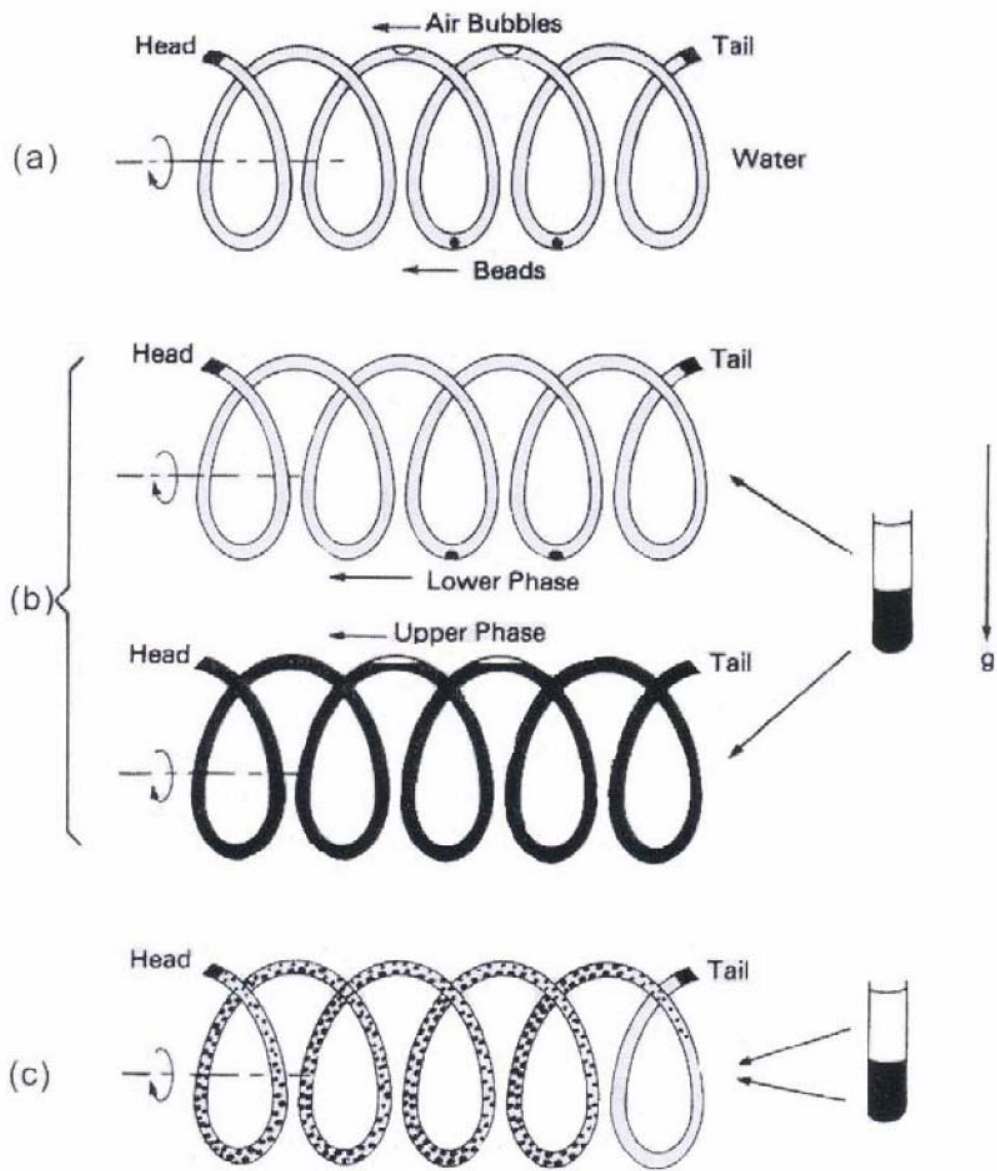


圖 2-9、螺旋管柱中的輕重兩相移動情形

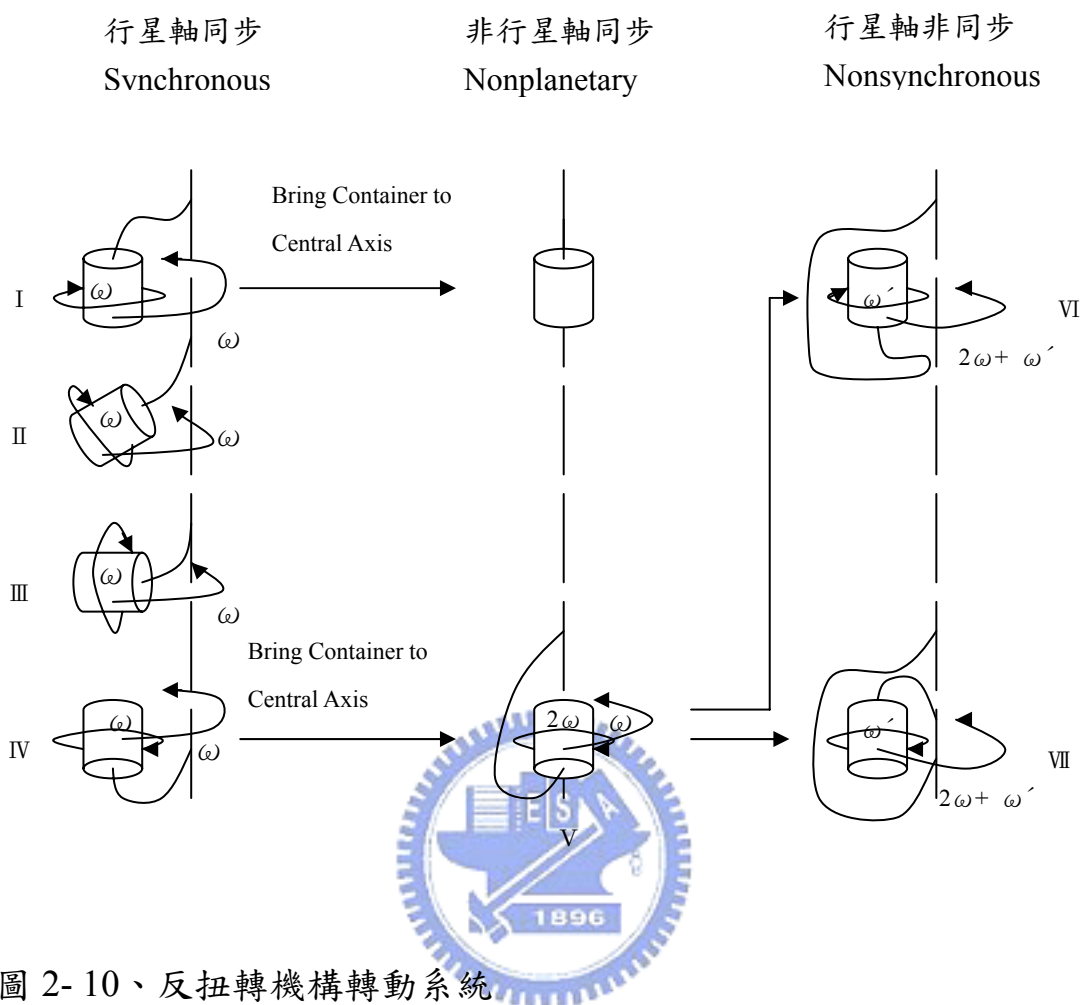


圖 2- 10、反扭轉機構轉動系統

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，再變化成七個模式

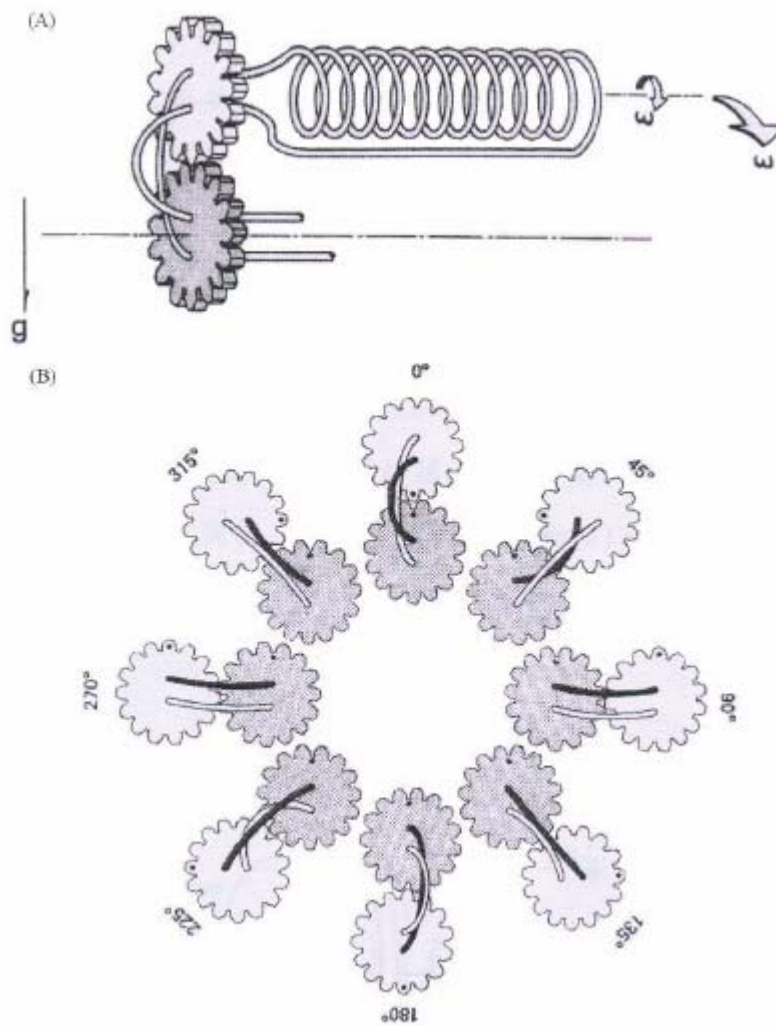


圖 2-11、高速逆流層析的旋轉機構

(A) 螺管支持物不僅以角速度  $\omega$  繞著中心軸旋轉，同時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外接流體導入管與導出管發生扭轉現象

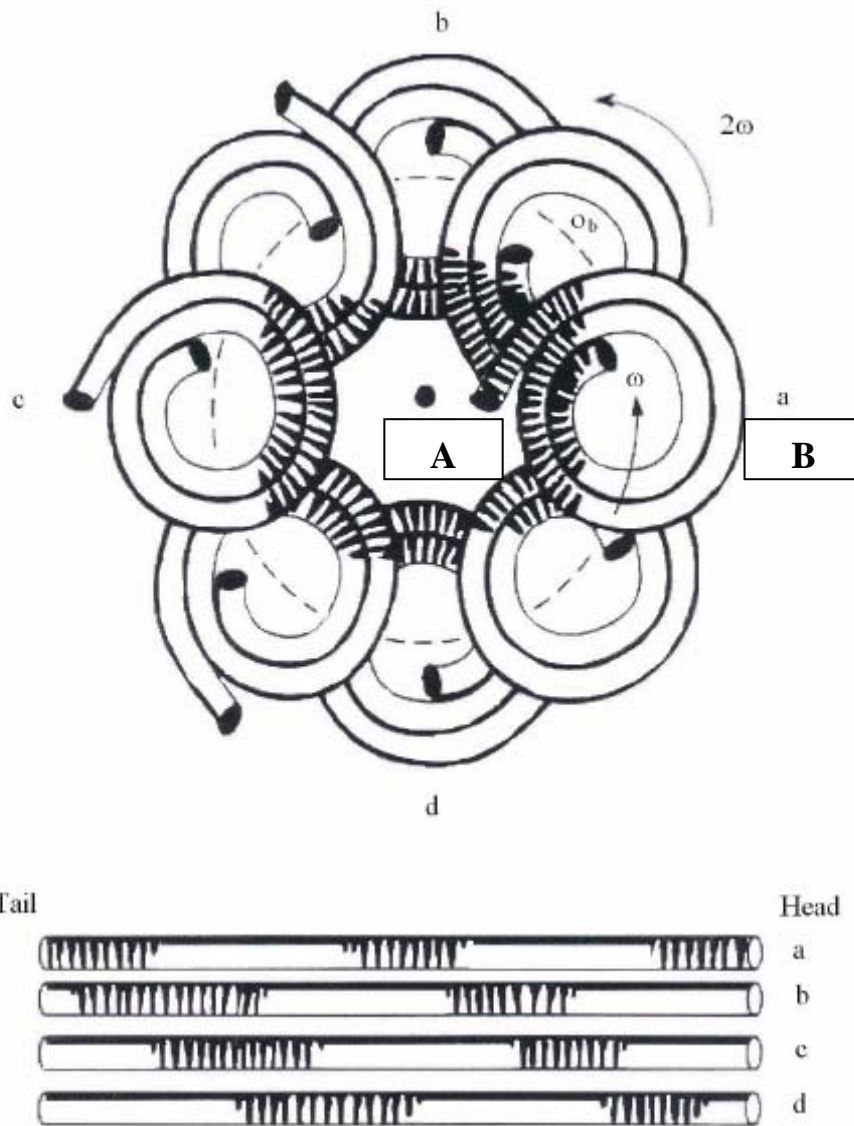


圖 2-12、IV型同步行星式逆流層析的混合在管柱內的分佈情形

## 第三章 實驗

### 3.1 試藥

#### 1. 合成 CB-Span 85 之藥品

Sorbitan trioleate (Span 85), FW : 957, purity > 99%, 購自 Sigma (Sigma Chemical Co., P.O. BoX 14508 St. Louis, MO 63178 USA)

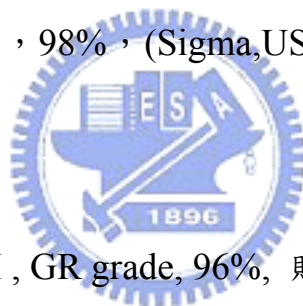
Cibacron Blue F-3GA (CB), FW : 840.09, purity > 99%, 購自 Sigma

#### 2. 蛋白質標準品

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

卵白蛋白(from chicken egg white), FW : 44287, 98%, (Sigma, USA)

牛血清蛋白, FW : 63000, 98%, (Sigma, USA)



#### 3. 緩衝溶液

Sodium hydroxide, NaOH, GR grade, 96%, 購自 Showa (昭和化學株會社, 東京)

Hydrochloric Acid, HCl, 12N, GR grade, (Showa, Japan)

Sodium chloride, NaCl, GR grade, (Showa, Japan)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, GR grade, 98%, (Showa, Japan)

#### 4. 溶劑

n-Hexane, HPLC/Spectro grade, 95%, 購自 TEDIA (Tedia Company Inc., Fairfield, Ohio, 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

為 Model CCC-1000，由 Pharma-Tech Reserch Compay 製造(Baltimore Maryland , USA)。主體部分管柱是 tefzel 材質，其外徑為 1/8 英吋(3.2 公釐)，內徑為 1/16 英吋(1.6 公釐)，耐壓性為 300 psi (21 bar)以下，耐溫 50 °C，管柱體積大約為 38 mL，其主體如圖 3-1 所示，而外接之導入管與導出管，其內外徑為 1/16 英吋(1.6 公釐)，內徑為 1/32 英吋(0.8 公釐)。以上皆購自 Chemical research Supplies (Fairbanks Addison, USA)。

### 2. 控溫裝置

高速逆流層析儀控溫範圍可在 $\pm 1$  °C內，由新竹盟利企業有限公司(新竹市南大路 130 號)製造

### 3. 往覆式幫浦

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

### 4. 梯度幫浦

梯度控制器 LabGrad 是由 Lab Alliance 公司製造，結合 Series III pump 最多可做四組動相組成的混合梯度

### 5. 高效能液相層析管柱

使用的管柱是 polystyrene-diviylbenzene reversed-phase HPLC column Vercopak Inertsil 7 octadecyl silica-3 (ODS-3)，是種常被應用在蛋白質的分析<sup>41</sup>的層析管柱(建宏層析，台北)

### 6. 線上偵測用紫外/可見光偵測器

所以用的偵測器為 BIO-RAD mode 1801 型，並接上個人電腦，在電

腦中安裝了色層分析儀數據處理系統(訊華公司，台北市)擷取實驗數據。

#### 7. 酸鹼偵測器(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 pH 範圍為 0~14。

#### 8. 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

#### 9. 電子天秤

Bruker Daltonic Esuire 2000 (Leipzig, Germany)

### 3.3 實驗流程

#### 3.3.1 溶液和樣品的製備

##### 1. 合成 CB-Span 85

分別配製 Span 85 與 CB 染料分子溶液，配製方法為：取 4 g Span 85 溶在 100 ml n-hexane 中，和 0.33 g CB 溶在 5 mL 7.5 M 的氫氧化鈉水溶液裡，將上述二溶液在水浴 40 °C 下，使用磁石加熱攪拌 15 分鐘，然後靜置 30 分鐘，將離心機調到 5500 rpm，離心 5 分鐘，將水相去除後，再使用 20 mL 離子水清洗 CB-Span 85 洗 3 次。

##### 2. 高速逆流層析靜相溶液

使用 CB-Span 85/n-hexane 做為靜相。

##### 3. 高速逆流層析動相溶液-緩衝溶液

動相 A：0.1 M NaCl, pH=7, 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 緩衝溶液

動相 B：1 M NaCl, pH=7, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 緩衝溶液



#### 4. 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

#### 5. 蛋白質樣品溶液

樣品之配製以動相 A 為溶劑

實驗一：取相同體積(5 mL)，溶菌酶濃度分別為 0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L

實驗二：溶菌酶與卵白蛋白之混合液，其濃度為 0.1 mg/L(改變樣品注入體積為 5 mL、10 mL、15 mL、20 mL)

實驗三：溶菌酶、牛血清蛋白之 5 mL 混合液，濃度皆為 0.1 mg/L

實驗四：溶菌酶、牛血清蛋白和卵白蛋白之 5 mL 混合液，濃度皆為 0.1 mg/L



### 3.3.2 HSCCC 製備分離之實驗步驟

實驗裝置如圖 3-2 所示

1. 使用往復式幫浦以流速 4 mL/min 將有機靜相填滿整個管柱。
2. 啟動高速逆流層析儀器，使其轉速達到 600 rpm。
3. 轉速穩定後，以流速 1 mL/min 之流速將動相 A 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 偵測器固定偵測波長(280 nm)，等待訊號穩定。
5. 在注入樣品時，開始啟動訊號之收集，同時每 5 分鐘於分離管柱之出口收集一管，即每管中含有 5 mL 收集液。
6. 注入樣品後 30 分鐘，將動相 A 轉換成動相 B，而注入 30 分鐘動



相 A 是為了做空白，為了容易區分蛋白質是否有滯留在靜相中。

7. 完成實驗後，將高速逆流層析停止轉動，用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。上層有機相的體積即為靜相滯留量。

8. 以 60 mL 丙酮沖洗管柱後，再以 60 mL 去離子水清洗。最後再用氮氣吹乾管柱。

### 3.3.3 HPLC 分析收集液之實驗步驟

實驗裝置如圖 3-3 所示

1. 用動相 C 沖提 Reverse phase HPLC 使平衡 10 分鐘
2. 注入 20  $\mu$ L 待測物進入 HPLC。
3. 以動相 C+D 在 15 分鐘內做梯度沖提，UV 偵測器之吸收波長設定在 280 nm。
4. 以濃度 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。

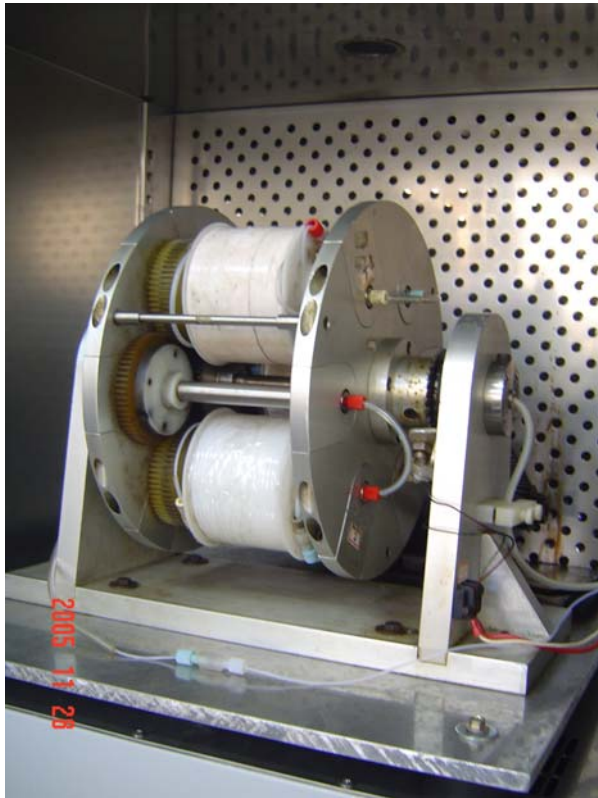


圖 3-1、高速逆流層析儀實體相片

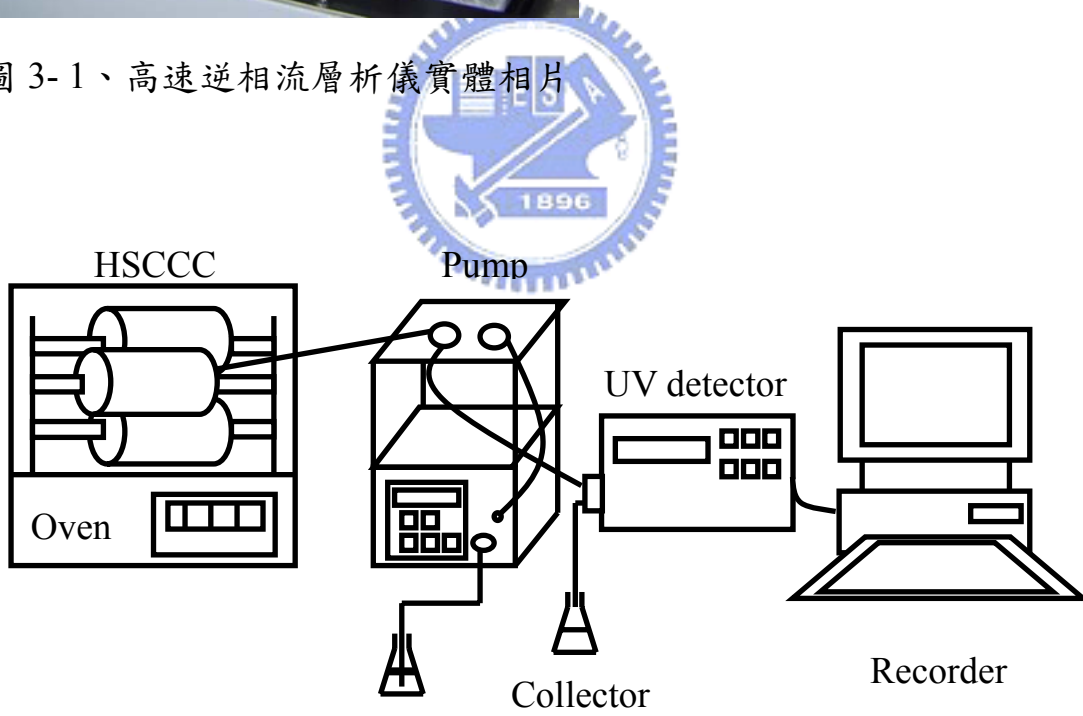


圖 3-2、逆流層析分離裝置示意圖

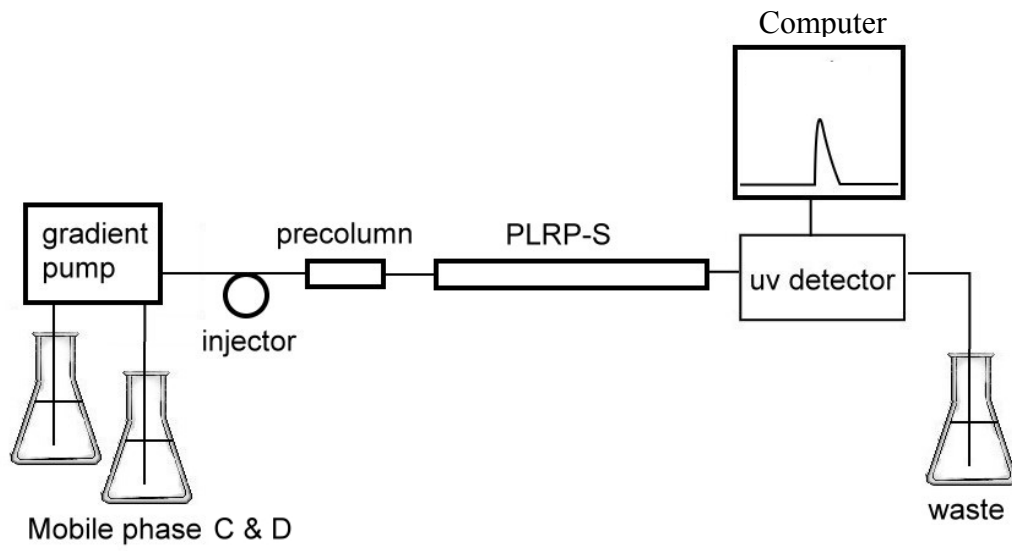


圖 3-3、HPLC 實驗裝置圖



## 第四章 結果與討論

### 4.1 收集液之分析方法

本實驗用HPLC技術來定量分析蛋白質，可以在15分鐘之內分析卵白蛋白、牛血清蛋白以及溶菌酶之蛋白質混合物。將標準樣品的蛋白質混合物打入管柱內進行分析，所得之層析圖譜如圖 4-1，在與標準品的位置做比對後可得波峰A (9.5 min)為溶菌酶，波峰B (11.2 min)是牛血清蛋白，波峰C (14.1 min)是卵白蛋白。再搭配蛋白質標準品之檢量線，來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

在本實驗中，管柱總體積 38 mL，靜相滯留量大約是 15 mL，動相體積為 23 mL，打入蛋白質樣品後，開始用 UV 偵測器記錄訊號，若靜相對蛋白質無滯留力的話，大約在 23 分鐘時於 UV 偵測器會有其訊號出現，以 5 分鐘收集一管的速度來看，在第 5 管時，會有不受滯留的蛋白質出現。而在打入蛋白質樣品後，注入 30 分鐘的動相 A，再換動相 B，即在第 11 管時，會有動相 B 的溶劑前緣(solvent front)出現(反萃)。在本論文中，所提到的回收率(recovery)為

$$\text{回收率} = \frac{\text{第11管以後收集到的蛋白質含量}}{\text{該蛋白質的原始含量}}$$

$$\text{在圖中所代表的百分比} = \frac{\text{每一管收集液中所含的蛋白質含量}}{\text{蛋白質的原始含量}}$$

#### 4.2.1 實驗一：不同濃度下溶菌酶之萃取

本次實驗中樣品為同體積 5 mL 不同濃度 0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L 的溶菌酶，其餘實驗條件如第三章所述。

由表 4-1，圖 4-2 所示，發現在萃取高濃度的溶菌酶(0.5 mg/L 以及 1 mg/L)時，第 5 管的收集液的位置就會有溶菌酶存在；而在萃取低濃度的溶菌酶時(0.1 mg/L 和 0.2 mg/L)，其出現在第 11、12 管收集液之間。將圖 4-2 數據做進一步的深入探討，在不同濃度時，收集管內所得的溶菌酶含量占全部含量的百分比，結果如圖 4-3 所示。當萃取同體積不同濃度溶菌酶時，若溶菌酶的濃度越大，其系統的回收率越差。原因可能是由於形成具有親和力反微胞 CB-Span 85 的含量不足夠萃取到高濃度的溶菌酶，因此在萃取高濃度的溶菌酶時，溶菌酶會隨著動相直接流出，因而在第 5 管收集液中會偵測到溶菌酶的存在。因此，可以增加界面活性劑 CB-Span 85 的濃度，來避免此種現象的發生。



#### 4.2.2 實驗二：相同濃度不同體積的溶菌酶與卵白蛋白混合物之萃取

為了檢驗 CB-Span 85 是一種具有特定親和性的界面活性劑，本實驗選擇卵白蛋白進行萃取實驗，卵白蛋白為食用蛋白中含量最大的蛋白質。取溶菌酶與卵白蛋白之混合液進行萃取實驗，濃度配製成 0.1 mg/L，在不同樣品體積條件下，進行萃取實驗。圖 4-4 為逆流層析的訊號圖，但圖上所顯示的波峰訊號並非直接代表二種蛋白質的分佈情形，因為在第 5 管時會有溶菌酶出現時的訊號，故將分管收集液以 HPLC 技術來做鑑定。由表 4-1，表 4-2 所示，當再加入一種蛋白質時，與只有單一樣品在相同體積相同濃度的實驗條件下，發現單一溶菌酶的回收率為 92.3%，而當萃取相同體積 0.1 mg/L 的溶菌酶與卵白蛋白混合液時，我們可以發現溶菌酶回收率降低為 72%，且在第 5 管的地方就有溶菌酶的出現，推測原因是，由於溶菌酶的 pI 點為

11，在 pH 值為 7 時，其帶正電，而卵白蛋白之 pI 點為 4，此時帶負電，當溶菌酶與 CB-Span 85 進行萃取時，雖然會受其親和力的吸引而使之進入反微胞水核中，但是由於溶菌酶與卵白蛋白之間有複雜的靜電吸引，導致溶菌酶會存在第 5 管收集液，使其萃取回收率下降。

由圖 4-5，圖 4-6 所示知，可當樣品體積增加時，其溶菌酶回收率越來越低。可能是因為當蛋白質混合溶液體積越大，即萃取蛋白質的量越多，使逆流層析中動靜相平衡不易，造成系統不穩定，因而使得溶菌酶不易與 CB-Span 85 結合，使得部分溶菌酶與卵白蛋白在第 5 管的時候出來。

由表 4-3 和圖 4-7；圖 4-8 所示，卵白蛋白被偵測到的時間都與溶劑前緣的時間一致，可見卵白蛋白並不會與 CB 染料分子作用，因而不會滯留在靜相中。



#### 4.2.3 實驗三：溶菌酶與牛血清蛋白混合物之萃取

而有文獻<sup>42</sup>指出 CB 染料分子對牛血清蛋白也有親和力，故被選為實驗三之蛋白質。此實驗利用二種蛋白質混合液(溶菌酶、牛血清蛋白)進行萃取實驗。實驗鑑定的結果如表 4-4，圖 4-9 所示，牛血清蛋白未被靜相滯留而在第 5 管收集液出現，而在第 11 管收集液中則發現只有溶菌酶的存在，亦即表示在此萃取系統中，只有溶菌酶能被滯留在靜相中，將每管收集液中所含蛋白質相對濃度用表 4-5 表示，從第 7 管之後，收集液中都只有溶菌酶的存在，而牛血清蛋白只在第 5、6 管出現，推測原因是牛血清蛋白的結構較大<sup>42</sup>，其立體障礙較溶菌酶高，故不易被萃取進入反微胞系統中，因而可達到二種蛋白質分離的效果。

#### 4.2.4 實驗四：溶菌酶、牛血清蛋白和卵白蛋白混合物之萃取

本實驗將上述所有蛋白質混合來進行萃取實驗，結果如表 4-6，圖 4-10 所示，在第 5 管收集液中發現牛血清蛋白與卵白蛋白和溶菌酶，但在第 11 管收集液中，仍然只有溶菌酶的存在，這說明了牛血清蛋白與卵白蛋白並無滯留在靜相中，所以反萃後的收集液中完全沒有此二種蛋白質之訊號，但溶菌酶之回收率仍只有 68.4%，其原因是由於受 4.2.2 所提及之靜電吸引力影響，故部分溶菌酶會隨著其蛋白質混合物被沖出，而導致回收未達百分之百。比較實驗二與實驗三的結果，可參考表 4-7，雖然溶菌酶會受其它蛋白質混合物的影響而導致自身的萃取回收率下降，但在本實驗中，CB-Span 85 對溶菌酶之親和效果仍是其它所有蛋白質遠不能及的，此亦證明具有親和力的反微胞系統是種專一性相當高的萃取系統。



表 4- 1、實驗一各收集管的溶菌酶(ly)濃度(ppm)

tube number	100ppm-ly	200ppm-ly	500ppm-ly	1000ppm-ly
1	--	--	--	--
2	--	--	--	--
3	--	--	--	--
4	--	--	--	--
5	--	--	71.69	196.48
6	--	--	53.79	67.84
7	--	--	24.77	30.56
8	--	--	4.35	27.10
9	--	--	15.95	34.01
10	4.57	5.60	26.23	35.80
11	9.07	107.09	8.23	31.61
12	68.73	51.81	239.01	181.93
13	10.56	24.95	82.46	105.38
14	2.55	6.09	37.51	60.43
15	--	--	25.91	35.11
16	--	--	6.60	9.54
recovery	92.30%	97.68%	79.94%	42.39%

--表蛋白質無法被偵測到



表 4-2、實驗二各收集管中的溶菌酶濃度 (ppm)

tube number	5ml	10ml	15ml	20ml
1	--	--	--	--
2	--	--	--	--
3	--	--	--	--
4	--	--	--	--
5	8.79	27.42	21.37	20.10
6	--	56.19	21.60	51.83
7	--	18.40	61.32	77.35
8	--	--	31.76	95.65
9	--	--	25.35	31.71
10	6.60	--	23.42	21.14
11	8.11	--	19.09	19.32
12	43.11	--	18.11	18.32
13	7.12	20.52	16.98	18.19
14	4.33	28.71	19.63	24.08
15	2.83	23.12	22.97	29.82
16	--	21.33	18.70	20.98
17	--	19.53	18.41	18.17
recovery	72.07%	56.61%	32.23%	27.81%

--表蛋白質無法被偵測到

表 4-3、實驗二各收集管卵白蛋白濃度 (ppm)

tube number	5ml	10ml	15ml	20ml
1	--	--	--	--
2	--	--	--	--
3	--	--	--	--
4	--	--	--	--
5	0.23	0.19	0.09	0.12
6	0.12	0.41	0.45	0.41
7	--	0.33	0.31	0.43
8	--	--	0.29	0.45
9	--	--	0.10	0.37
10	--	--	--	--
11	--	--	--	--
12	--	--	--	--
13	--	--	--	--
14	--	--	--	--
15	--	--	--	--
16	--	--	--	--
17	--	--	--	--
recovery	70.16%	93.52%	82.64%	88.54%

--表蛋白質無法被偵測到

表 4-4、實驗三各收集管溶菌酶與牛血清蛋白濃度

tube number	溶菌酶	牛血清蛋白
0	--	--
1	--	--
2	--	--
3	--	--
4	--	--
5	7.85	59.96
6	4.57	28.06
7	1.16	--
8	0.63	--
9	1.50	--
0	1.04	--
10	0.67	--
11	20.07	--
12	44.68	--
13	11.70	--
14	7.39	--
15	2.72	--
16	4.77	--
recovery	84.60%	88.02%

--表蛋白質無法被偵測到

表 4-5 實驗三各收集管溶菌酶與牛血清蛋白相對百分濃度

tube number	溶菌酶(%)	牛血清蛋白(%)
0	--	--
1	--	--
2	--	--
3	--	--
4	--	--
5	11.58	88.42
6	14.01	85.99
7	99.99	--
8	99.99	--
9	99.99	--
0	99.99	--
10	99.99	--
11	99.99	--
12	99.99	--
13	99.99	--
14	99.99	--
15	99.99	--
16	99.99	--

--表蛋白質無法被偵測到

表 4- 6、實驗四各收集管中的蛋白質濃度(ppm)

Tube Number	溶菌酶	牛血清蛋白	卵白蛋白
0	--	--	--
1	--	--	--
2	--	--	--
3	--	--	--
4	--	--	--
5	9.68	74.30	71.99
6	6.96	15.30	22.16
7	2.79	3.08	0.81
8	1.82	--	--
9	3.24	--	--
10	4.15	--	--
11	3.32	--	--
12	22.98	--	--
13	21.02	--	--
14	13.71	--	--
15	6.83	--	--
16	3.49	--	--
recovery	68.04%	92.68%	94.97%

--表蛋白質無法被偵測到

表 4- 7、實驗四製備蛋白質的蛋白質回收率

Recovery Collector	溶菌酶	牛血清蛋白	卵白蛋白
5~7	19.42%	92.68%	94.97%
8~10	9.22%	0%	0%
11~16	68.04%	0%	0%

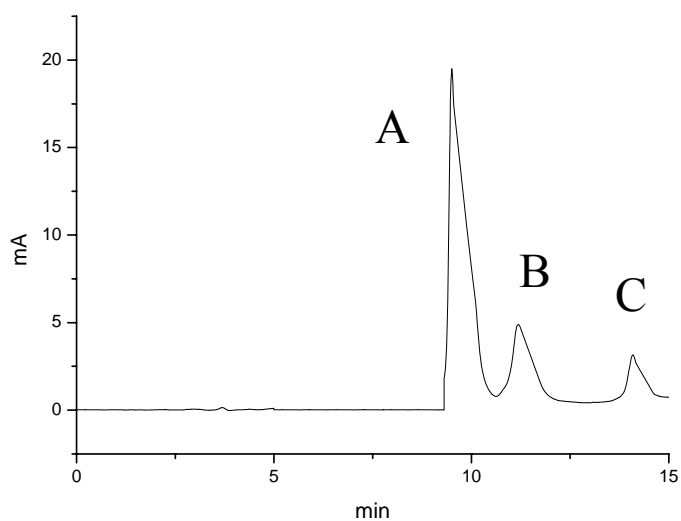


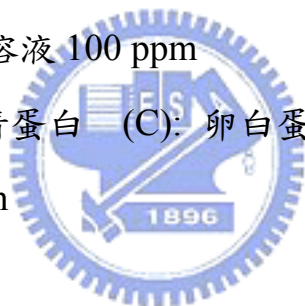
圖 4-1、HPLC 分析蛋白質層析圖

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

標準樣品：蛋白質混合溶液 100 ppm

(A):溶菌酶 (B):牛血清蛋白 (C): 卵白蛋白

UV 偵測器波長：280 nm



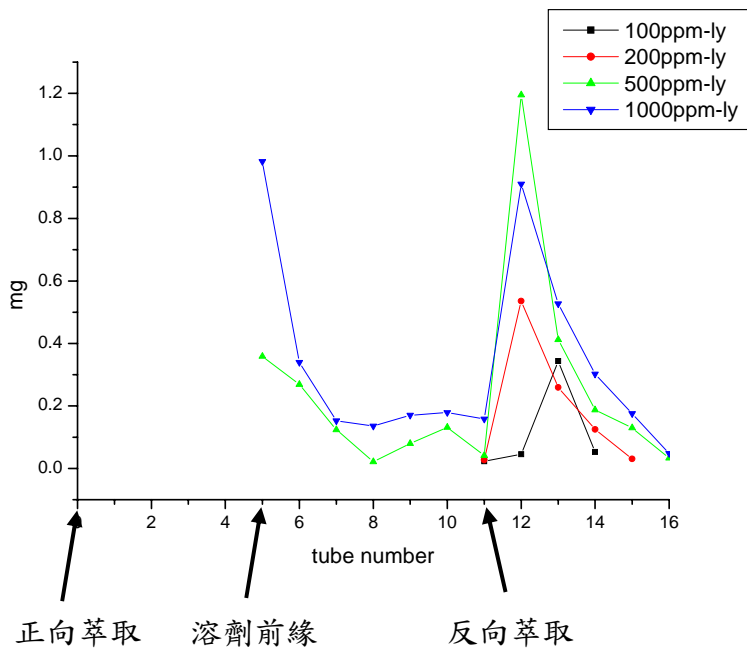


圖 4- 2、HPLC 分析實驗一收集液的溶菌酶(ly)含量(mg)

萃取 5 mL 不同濃度的溶菌酶，靜相滯留量為 15 mL，流速為 1 mL/min

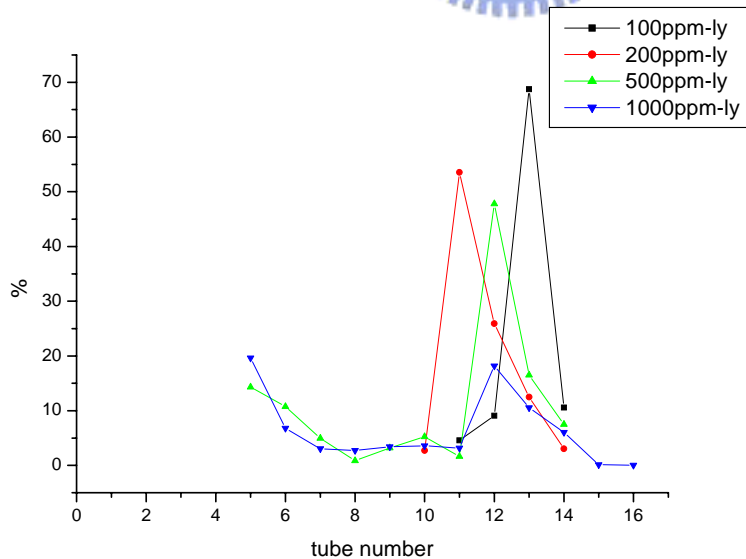


圖 4- 3、HPLC 分析實驗一收集液的溶菌酶占全部含量的百分比

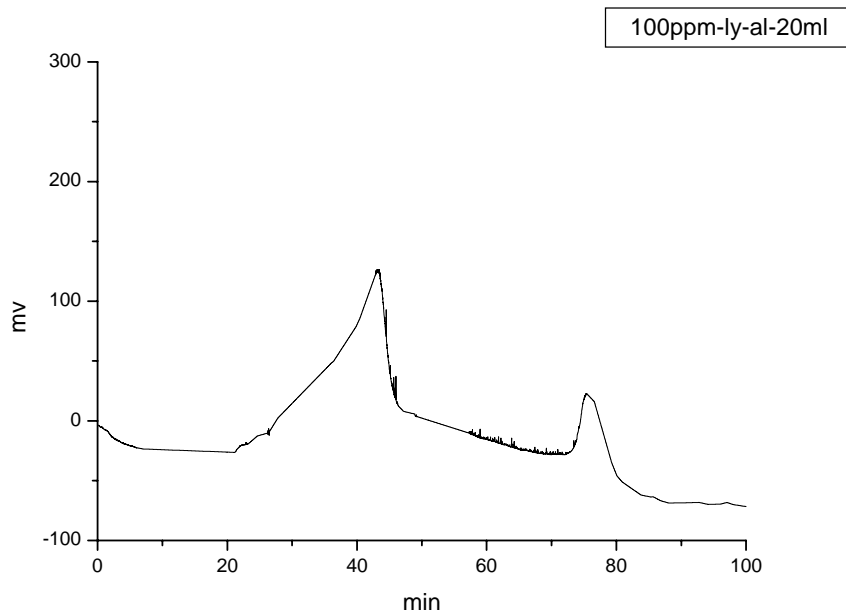


圖 4-4、實驗二之逆流層析訊號

分離管柱內體積為 38 mL，轉速為 600 rpm，流速為 1 mL/min，樣品注入時間為 0 分鐘注入，靜相滯留量為 15 mL，樣品注入量為 20 mL，樣品組成為 0.1 mg/mL 的溶菌酶與卵白蛋白混合物，動相組成為樣品注入後，使用動相 A 打 30 分鐘後，換動相 B



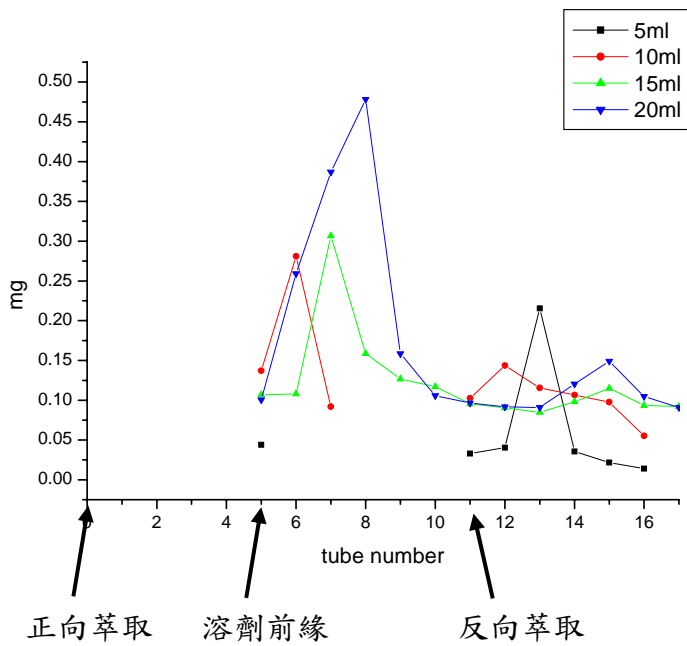


圖 4- 5、實驗二溶菌酶的含量(mg)

萃取不同體積相同濃度(100ppm)的溶菌酶與卵白蛋白混合物，靜相滯留量為 15 mL，流速為 1 mL/min

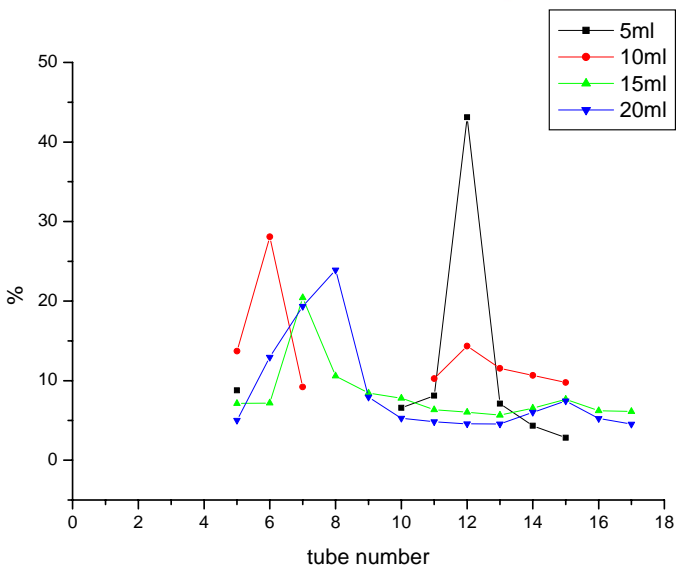


圖 4- 6、HPLC 分析實驗二收集液的溶菌酶占全部含量的百分比

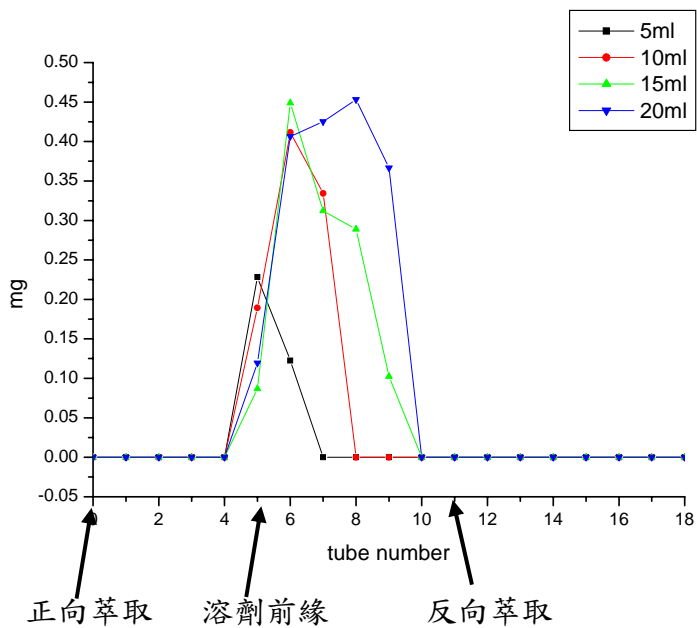


圖 4-7、實驗二卵白蛋白的含量(mg)

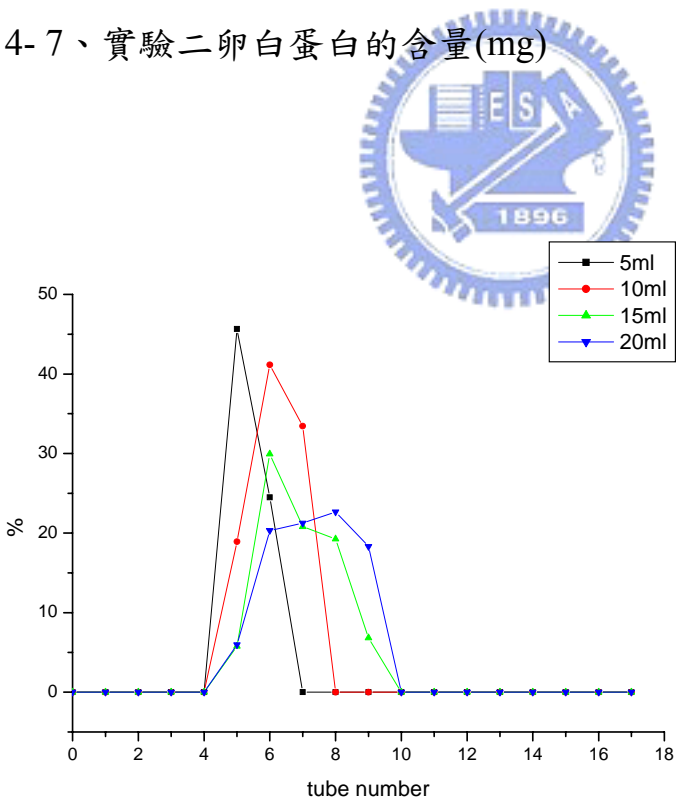


圖 4-8、HPLC 分析實驗二收集液的卵白蛋白占全部含量的百分比

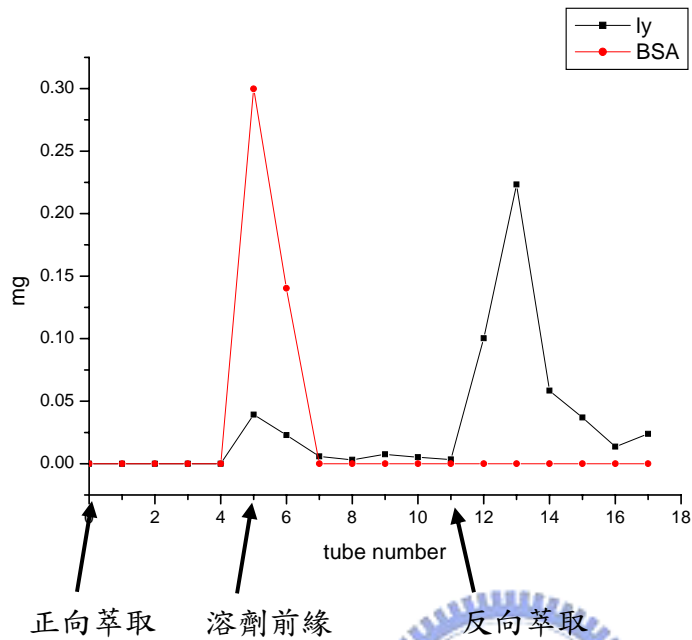


圖 4-9、實驗三溶菌酶(Ly)與牛血清蛋白(BSA)的含量(mg)

萃取 100ppm 溶菌酶與牛血清蛋白混合物 5 mL，靜相滯留量為 15 mL，  
流速為 1 mL/min

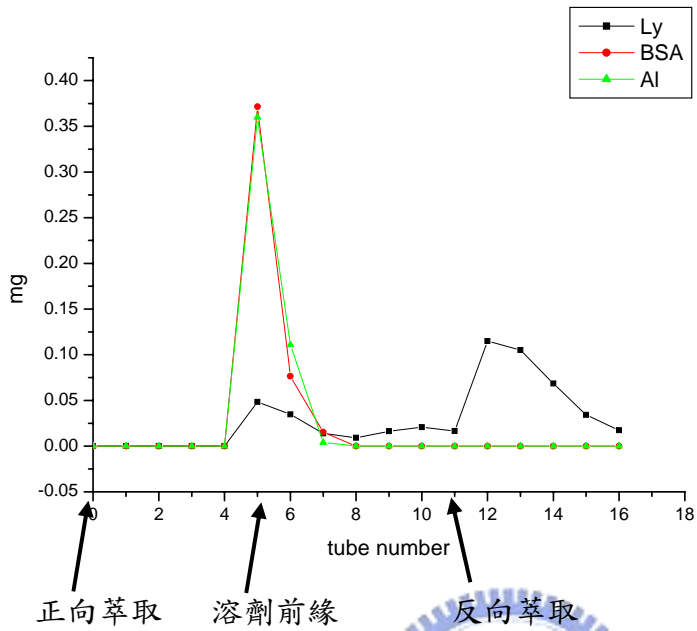


圖 4- 10、實驗四溶菌酶(Ly)、牛血清蛋白(BSA)和卵白蛋白(Al)的含量(mg)

萃取 100ppm 溶菌酶、牛血清蛋白與卵白蛋白混合物 5 mL，靜相滯留量為 15 mL，流速為 1 mL/min

## 第五章 結論

本實驗中，藉由 CB-Span 85 結合逆流層析儀來萃取蛋白質混合物。在樣品中加入卵白蛋白與溶菌酶混合液來進行萃取，發現雖然在第 5 管時，溶菌酶會受到其它蛋白質靜電作用的影響而出現，在第 11 管收集液中，仍然只有溶菌酶的存在，由於卵白蛋白不與 CB 染料分子作用，也就是對靜相沒有任何滯留力，在第 11 管的收集液，才只有溶菌酶的存在。接下來使用溶菌酶與牛血清蛋白混和物當樣品，CB 染料分子對其二者皆有親和力的影響，利用界面活性劑所形成水核中心的大小來調控蛋白質進出反微胞系統，使溶菌酶被萃取，而牛血清蛋白不被萃取進入反微胞系統中。拿溶菌酶、卵白蛋白與牛血清蛋白之混合物來進行萃取，雖然溶菌酶會受到其他蛋白質的靜電作用影響，使其回收率下降，但在 CB-Span 85 所形成的反微胞系統下，其反萃時收集液中只有溶菌酶的存在，這說明了 CB-Span 85 只對溶菌酶這種蛋白質有專一性的親和作用力。

在本實驗中，使用 CB-Span 85 結合逆流層析儀來萃取蛋白質混合物這項技術，不僅製備容易而且價格低廉，是種應用性非常高的萃取系統，接下來我們還可以使用其他種類之界面活性劑或加入其他的萃取劑，來提升萃取效率，以及放大萃取容量，使得這項技術更具實用性。我們預期具親和性的反微胞系統可以成為分離蛋白質的技術。

## 參考文獻

1. K. Naoe, K. Noda, T. Konishi, M. Kawagoe, M. Imai, "Liquid-liquid extraction of alpha-lactalbumin using reverse micellar organic solvent." *Biofactors*. (2004), 22, 347-351
2. Y. Nishii, Y. Kishi, M. Ito, Y. Morita, A. Kanoh, M. Shintani, T. Kinugasa, S. Nii, K. Takahashi, "Effect of cation species on equilibrium of reversed micellar extraction of lysozyme." *Sep. Purif. Technol.* (2004), 37, 161-167
3. 沈經緯, "於逆流層析儀中以反微胞製備分離蛋白質", 國立交通大學, 碩士論文, 民國94年6月。
4. Y. Sun, S. Ichikawa, S. Sugiura, S. Furusaki, "Affinity extraction of proteins with a reversed micellar system composed of Cibacron Blue-modified lecithin." *Biotechnol. Bioeng.* (1998), 58, 58-64
5. T. X. Zhang, H. Z. Liu, J.Y. Chen, "Investigation of affinity interaction between protein and triazine dye in reversed micelles with absorption spectra." *Chen. Colloids Surf. A* (2002), 196, 79-85
6. Y. Sun, S. Bai, L. Gu, X. D. Tong, S. Ichikawa, S. Furusaki, "Effect of hexanol as a cosolvent on partitioning and mass transfer rate of protein extraction using reversed micelles of CB-modified lecithin." *Biochem. Eng. J.* (1999), 3, 9-16
7. Y. Liu, X.Y. Dong, Y. Sun, "Characterization of reversed micelles of Cibacron Blue F-3GA modified Span 85 for protein solubilization." *J. Colloid. Interfac. Sci. Phys.* (2005), 290, 259-266
8. L. M. Prince, "Microemulsions : Theory and Practice" Ed., Academic Press, New York, 45 (1977)

9. M. Kotlarchyk, J. S. Huang, S. H. Chen, "Structure of AOT Reversed micelles Determined by Small-angle Neutron Scattering." *J. Phys. Chem.* (1985), 89, 4382-4386
10. P. L. Luisi, L. J. Magid, "Solubilization of Enzymes and Nucleic Acids in Hydrocarbon Micellar solutions." *Crit. Rev. Biochem.*(1986), 20, 409-474
11. E. B. Leodidis, T. A. Hatton, "Amino Acids in AOT Reversed Micelles. Determination of Interfacial Partition Coefficients Using the Phase-Transfer Method." *J. Phys. Chem.*(1990), 94, 6400-6411
12. E. B. Leodidis, T. A. Hatton, "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
13. M. J. Pires, M. R. Aires-Barros, J. M. S. Cabral , "Liquid-Liquid Extraction of Proteins with Reversed Micelles." *Biotechnol. Prog.* (1996), 12, 290-301
14. K. E. Göklén, T. A. Hatton, "Protein extraction using reverse micelles." *Biotechnol. Prog.* (1985), 1, 69-74
15. T. Kinugasa, A. Kondo, E. Mouri, S. Ichikawa, S. Nakagawa, Y. Nishii, K. Watanabe, H. Takeuchi "Effects of ion species in aqueous phase on protein extraction into reversed micellar solution." *Sep. Pur. Technol.* (2003), 31, 251-259
16. K. E. Göklén and T. A. Hatton, "Liquid-liquid extraction of low molecular proteins by selective solubilization in reversed micelles." *Sep. Sci. Technol.* (1987), 22, 831-841
17. K. Naoe, O. Ura, M. Hattori, M. Kawagoe and M. Imai, "Protein

- extraction using non-ionic reverse micelles of Span 60.” *J. Biochem. Eng.* (1998), 2, 113-119
18. T. Nishiki, K. Nakamura, D. Kato, “Forward and backward extraction rates of amino acid in reversed micellar extraction.” *J. Biochem. Eng.* (2000),4, 189-195
  19. M.E. Leser, Mrkocik, Luisipl, “Chemically modified proteins solubilized in AOT reverse micelles-Influence of proteins charges on intermicellar interactions.” *Chem. Phys. Lett.* (1994), 221, 205-212
  20. S. Jarudilokkul, L. H. Poppenborg, D. C Stuckey, “Backward extraction of reverse micellar encapsulated proteins using a counterionic surfactant.” *Biotechnol. Bioeng.* (1999), 62, 593-601
  21. F. C. Marhuenda-Egea, S. Piera-Velazquez, C. Cadenas, E. Cadenas, “Enzymatic activity of an extremely halophilic phosphatase from the Archaea *Halobacterium salinarum* in reversed micelles.” *J. Mol. Catal. B Enzym.* (2000), 10, 555-563
  22. K. Naoe, M. Nishino, T. Ohsa, M. Kawagoe, M. Imai, “Protein extraction using sugar ester reverse micelles.” *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (1999), 74, 221-226
  23. M. Hentsch, P. Menoud, L. Steiner, E. Flaschel, A. Penken, “Optimization of the surfactant (AOT) concentration in a reverse micellar extraction process.” *Biotechnol. Tech.* (1992), 4, 359-364
  24. S. Jarudilokkul, L. H. Poppenborg, F. Valetti, G. Gilardi, D. C. Stuckey, “Separation and purification of periplasmic cytochrome c553 using reversed micelles.” *Biotechnol. Tech.* (1999), 13, 159-163
  25. Q. L. Chang, J. Y. Chen, X. F. Zhang, N. M. Zhao, “Effect of the cosolvent type on the extraction of alpha-amylase with reversed



- micelles: Circular dichroism study.” *Enz. Microb. Technol.* (1997), 20, 87-92
26. Y. Sun, S. Bai, L. Gu, S. Furusaki, “Purification of lysozyme by affinity-based reversed micellar two-phase extraction.” *Biopro. Eng. Te.* (2000), 22, 19-22
27. M. P. Deutscher, “Guide to protein purification.” Academic Press, Inc. 1990
28. J. M. Woll, T. A. Hatton, M. L. Yarmush, “Bioaffinity separations using reversed micellar extraction.” *Biotechnol. pro.* (1989), 5, 57-62
29. B. D. Kelley, D. I. C. Wang, T. A. Hatton, “Affinity-baeed reversed micellar protein extraction: I. Principles and protein-ligand systems.” *Biotechnol. Bioeng.* (1993), 42, 1199-1208
30. B. D. Kelley, D. I. C. Wang, T. A. Hatton, “Affinity-baeed reversed micellar protein extraction: II. Effect of cosurfactant tail length.” *Biotechnol. Bioeng.* (1993), 42, 1209-1217
31. S. Zhang, Y. Sun, “Further Studies on the Contribution of Electrostatic and Hydrophobic Interactions to Protein Adsorption on Dye-Ligand Adsorbents.” *J. Biotechnol. Bioeng.* (2001), 75, 710-717
32. A. Denizli, E. Piskin, “Dye-ligand affinity systems.” *J. Biochem. Biophys. Methods.* (2001), 49, 391-416
33. Y. Ito, “Development of Countercurrent Chromatography.” *Anal. Chem.* (1984), 56, 534A-551A.
34. P. Foucault, “Countercurrent Chromatography.” *Anal. Chem.* 63, (1991) 569A-579A.
35. Y. Ito, W. D. Conway, “High-Speed Countercurrent Chromatography”, John Wiley & Sons, Inc. 1996.

36. W. D. Conway, "Countercurrent Chromatography: Apparatus Theory and Applications." VCH Publishers, Inc., 1990.
37. 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, 33-48.
38. Y. Ito, and R. L. Bowman, "Horizontal flow-through coil planet centrifuge without rotating seals." *Anal. Biochem.*, (1977) , 82, 63-68.
39. Y. Ito, J. Sandlin, W. G. Bowers, "High-speed preparative countercurrent chromatography with a coil planet centrifuge." *J. Chromatogr.*, (1982), 244, 247-258.
40. Y. Ito, "Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography." *J. Chromatogr. A*, (2005) 1065, 145-168
41. N. Z. Zhelev, M. J. Barratt , L. 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. C. A*, (1997), 763, 65-70.
42. Y. Liu, X. Y. Dong, Y. Sun, "Equilibria and kinetics of protein transfer to and from affinity-based reverse micelles of Span 85 modified with Cibacron Blue F-3GA." *Biotechnol. Bioeng.* (2006), 28, 281-288