



臺北醫學大學
TAIPEI MEDICAL UNIVERSITY

生物化學實驗報告

蛋白質的純化-膠體過濾法

組 別：第 14 組

主寫人：李品辰 b202110064

組 員：陳相瑋 b202110082

王威鈞 b202110089

日 期：2023/10/17

實驗目的：

本實驗讓我們學習使用 Sephadex G-50 進行膠體過濾法，來將不同分子大小的蛋白質分離，運用的原理為分子篩 (Molecular Sieve)，並利用 Bradford assay 與 ELISA 製作雙曲線圖 (OD_{450nm} , OD_{595nm}) 並確認蛋白質所在的管柱。最後使用 ELISA 繪製標準曲線圖以推估原蛋白質的濃度與回收率。

實驗原理：

1. 運用分子篩原理 (Molecular sieve)，依流徑長短、大小分子停留的時間不同來分開分子。
2. 運用的材料為 Sephadex G-50，名稱來自 separation Pharmacia dextran，是一種葡聚糖凝膠。^[1] Sephadex G-50 常用於凝膠過濾柱中，其中的 G 代表 Gel，而數字則代表回水率，即 Sephadex G-50 每克的 dry gel 需要 5.0 克的水。^[2]
3. 分子篩管柱層析法：如 Fig 1 所示，膠體上有孔洞可以卡住小分子，讓小分子跑進去再出來，所以花較多的時間從管柱排出，而大分子卡不進去，因此小分子會走的比大分子慢，大分子會先從管柱排出，可藉此性質分離大小不同的分子。

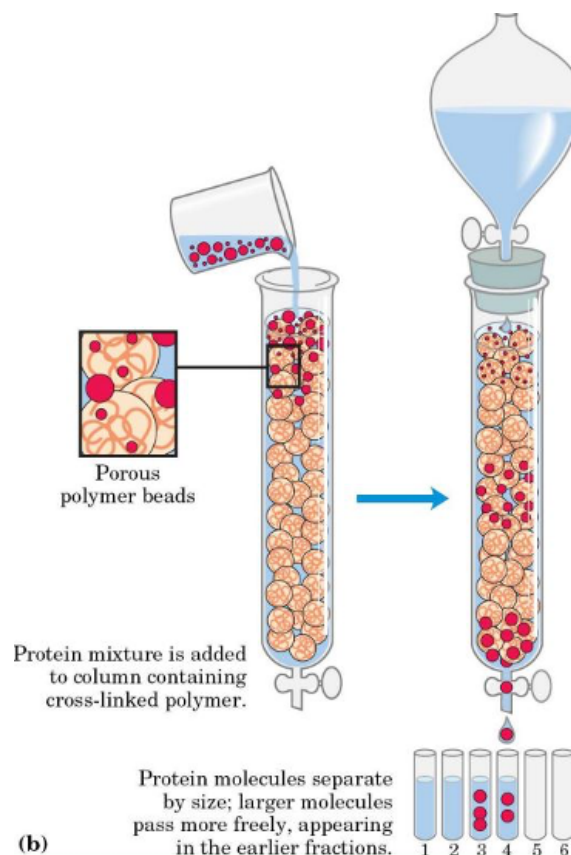


Fig 1 分子篩管柱層析法

實驗步驟：

實驗器材

1. 管柱、管柱夾
2. 水
3. 滴管
4. 1xPBS 緩衝液 (Phosphate buffered Saline)
5. Sephadex G-50 膠體懸浮液
6. Sample：BSA (bovine serum albumin，牛血清蛋白) + Methyl Orange
7. Eppendorf、Micropipette、ELISA plate
8. Bradford reagent

步驟

1. 製備管柱
 - (1) 取管柱
 - (2) 加水進管柱，確定管柱可讓緩衝液順暢通過
 - (3) 塞住管柱
 - (4) 先加入 1xPBS 緩衝液到管柱中，並維持八分滿的高度
 - (5) 加入均質的 Sephadex G-50 膠體懸浮液
 - (6) 打開管柱
 - (7) 持續加入並使其沉降至黑線位置左右
 - (8) 滴管加 PBS 緩衝液進管柱，沖散 Sephadex G-50 使之重新均勻堆疊
 - (9) 待上方緩衝液流下，直到管柱下方不再滴出緩衝液就可以塞住管柱
2. 放入 Sample
 - (1) 用 micropipette 吸取 10 μ l 的 BSA+Methyl orange(本次實驗 sample，BSA 濃度 50 μ g/ μ l)
 - (2) 將 micropipette 伸進管柱內，把 Sample 滴加在膠體正上方 (不可碰到管壁)
 - (3) 小心將緩衝液加入管柱內，需注意避免將 Sample 沖散，使緩衝液滿溢到管柱口，並形成表面張力。
3. 收集樣品
 - (1) 將 eppendorf 事先標號碼。
 - (2) 打開管柱，馬上開始收集濾出來的液體。
 - (3) 每 10 滴收集到一個 eppendorf，共收集 10 管 (每一管大約 350 μ l)。

4. 檢測收集成果並繪製雙曲線圖

- (1) 利用 micropipette，分別將收集到的 10 個 eppendorf 取各取 10 μ l，加入 100 μ l Bradford reagent，放在 eppendorf 中，在室溫中反應 3~5 分鐘，使其混合均勻。
- (2) 取 100 μ l 放入 ELISA plate，利用 OD_{595nm} 測定。此為確認大分子於何管柱流出。
- (3) 另外取 100 μ l 未跟 Bradford reagent 反應過的原樣品液，依序注入 ELISA plate，利用 OD_{450nm} 測定。此為確認小分子於何管柱流出。
- (4) 將結果繪製於 excel 檔中。

5. 測定純化出的大分子蛋白的濃度。

- (1) 取 OD_{595nm} 吸光值最高的原始管子，進行 Bradford assay。
- (2) 取八支 eppendorf，分別放入 BSA 0,2,4,6,8,10 μ l 及 A(2 μ l unknown), B(2 μ l unknown) 溶於 ddH₂O 至最終容量為 10 μ l。

管號	BSA (μ l)	ddH ₂ O(μ l)
1	0	10
2	2	8
3	4	6
4	6	4
5	8	2
6	10	0
A (2 μ l Unknown)	2	8
B (4 μ l Unknown)	4	6

- (3) 每管加入 300 μ l 的 Bradford Reagent。
- (4) 加入後，用手指輕彈 eppendorf 底部，並靜置 5 分鐘。
- (5) 自八支 eppendorf 各吸取 150 μ l 至 96 孔盤。
- (6) 放入 ELISA reader，利用 OD_{595nm} 測定。

實驗結果及討論：

結果

1. 根據 Fig 2，膠體過濾實驗中 OD_{595nm}（大分子蛋白質）的峰值發生在 Fraction 3，而 OD_{450nm}（小分子蛋白質）的峰值發生在 Fraction 6。
2. 根據 Table 2, Fig 3，得知 BSA 濃度標準曲線 $y = 0.0673x + 0.0301$, $R^2 = 0.966$ ，即可推算 Fraction 3 的濃度為 0.804 μ g/ μ l。
3. Fraction 3 的層析液約為 350 μ l，而 Sample BSA 濃度為 50 μ g/ μ l 因此 BSA 回收率為

$$\frac{0.804(\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times 350(\mu\text{l})}{50(\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times 10(\mu\text{l})} = 0.562$$

實驗數據

Table 1 膠體層析吸光值數據

fraction no.	OD _{595nm}	OD _{450nm}
1	1.695	0.241
2	1.767	0.204
3	2.399	0.183
4	0.953	0.226
5	1.284	0.673
6	1.196	0.818
7	1.196	0.229
8	1.481	0.198

Table 2 BSA 吸光值數據

BSA (mg)	OD _{595nm}	raw data
0	0	0.759
2	0.22	0.979
4	0.328	1.087
6	0.364	1.123
8	0.552	1.311
10	0.736	1.495
A(2μl unknown)	0.116	0.875
B(4μl unknown)	0.291	1.050

Table 3 BAS 吸光值回歸直線與回收率

y=a+bx	
a	0.0673
b	0.0301
R ²	0.966
A 濃度	0.638 μg/μl
B 濃度	0.969 μg/μl
平均濃度	0.804 μg/μl
回收率	0.562

實驗作圖

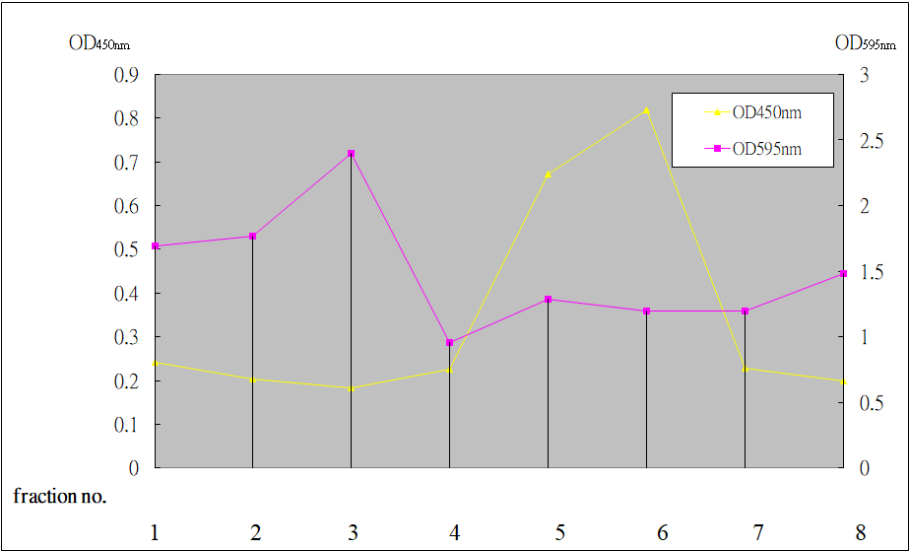


Fig 2 膠體層析吸光值雙曲線

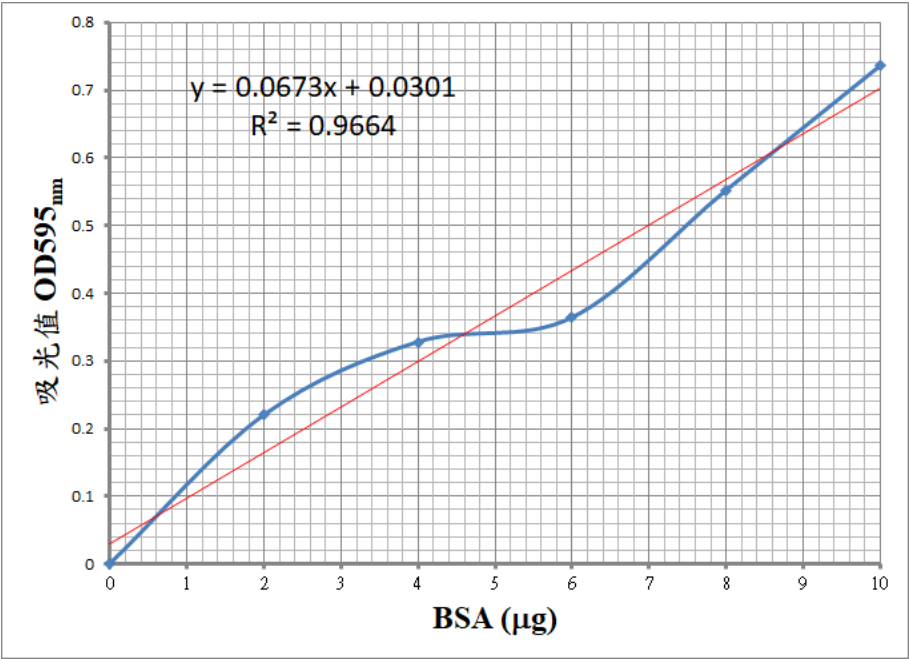


Fig 3 BSA 吸光值標準曲線

實驗討論：

1. 如 Table 1, Fig 2，第一至第八管的順序為收集蛋白質的順序，可知第三管所收集到的大分子蛋白含量最高，第五和第六管則是收集到較多的小分子蛋白，因此可得出小分子蛋白會在管柱內待得比較久的結論。
2. 老師上課有提到，兩個高峰值出現相距最好要超過兩管，才是比較好的分離，我們這次實驗大分子蛋白的峰值出現在第三管，小分子蛋白的峰值出現在第五及第六管，所以在分離方面有達到標準。
3. BSA(大分子蛋白，Fig 2中 OD_{595nm} 曲線) 雖然第三管的峰值有做出來，但第一及第二管的數值偏高，造成此情況可能的原因是流速過快所導致。
4. Methyl Orange(小分子蛋白，Fig 2中 OD_{450nm} 曲線) 峰值在第五及第六管，可能的原因為在放入 Sample 後，再加入緩衝液的力道過大，導致 Sample 有些微被沖散，因此離開管柱的時間拉長。
5. Fig 4中 E 排為第一至第八管各取 $10\mu l$ ，加入 $100\mu l$ Bradford reagent，已知 Bradford reagent 會與蛋白質結合呈現藍色。可以明顯以肉眼觀察到第三管有明顯的藍色，即第三管有最多的蛋白質。
6. Fig 4圖中 F 排為第一至第八管各取 $100\mu l$ ，可以用肉眼觀察到第五及第六管明顯有收集到橘色的小分子蛋白 (Methyl Orange)。

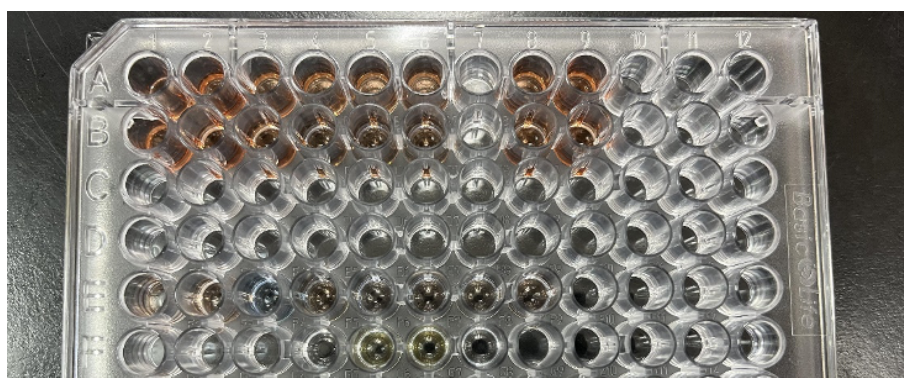


Fig 4 96 孔盤

7. 蛋白質容液黏滯力較大，容易沾在 pipette tip 上導致 eppendorf 中 BSA 的量較少，ELISA 測出來的濃度偏低。而 Table 3 中 A 管的濃度較 B 管低可能是因為 A 管的 BSA 量較少 ($2\mu l$)，受到沾在 pipette tip 的蛋白質影響較大。我們仍需要加強 pipette 的使用技巧。

延伸討論

Molecular Sieve(分子篩)

Molecular Sieve(分子篩) 是利用材料具有相似孔洞大小的特性，使小分子需要經過孔洞，所需要的時間較久，而大分子則會從孔洞旁經過，會較快經過材料，而達到分離不同大小分子的效果。IUPAC 依據孔洞直徑的大小，將材料分為：^[3]

- Microporous material (<2nm)
- Mesoporous material (2nm 50nm)
- Macroporous material(>50nm)

然而更精確地來說，分離所依據的並非是分子的 Molecular Weight，而是分子的 Hydrodynamic Radius，所以就算是相同分子量的長鏈狀及球狀分子，其在分子篩管柱層析中的表現也不會一樣，球狀分子會需要比較久的時間才會析出。^[4]

參考資料

- [1] Sephadex - wikipedia. <https://en.wikipedia.org/wiki/Sephadex>. (Accessed on 10/24/2023).
- [2] Sephadex g-50 fine 9048-71-9. <https://www.sigmaaldrich.com/TW/en/product/sigma/g5080>. (Accessed on 10/24/2023).
- [3] Molecular sieve - wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_sieve. (Accessed on 10/24/2023).
- [4] Ymc-sec mab/ymc-pack diol 分子篩層析管柱 (size exclusion chromatography, sec) /凝膠過濾層析管柱 (gel filtration chromatography, gfc) - ymc taiwan co., ltd. https://ymctaiwan.com/portfolio/ymc_sec/#1607415269821-f456a30f-6b38. (Accessed on 10/24/2023).