

## 第四章 表現蛋白質之純化與檢定

台灣大學生化科技學系 莊榮輝

表現目標基因得到蛋白質後，可以進行各種純化方法(蛋白質抽取、膠體過濾法、離子交換法、親和層析法等)，以便分離出目標蛋白質；同時並檢定其各種基本生化性質(如蛋白質定量、酵素活性分析、膠體電泳、免疫轉印等)。本章是以表現蛋白質 GUS 為例，說明其純化及檢定方法；因為各種蛋白質的性質差異很大，因此每種蛋白質都有其特定的純化或檢定條件，必須個別去找出其自身的條件。本章整體實驗流程如圖 4.1 所示。

### 4.1 蛋白質純化方法

利用蛋白質間生化特性的差異，可以分離並純化出各種蛋白質。純化蛋白質的方法主要是以色層分析法進行，但是利用蛋白質分子物理或化學特性的沈澱方法，也是相當簡單、有效而且經濟。

#### 4.1.1 蛋白質抽取

蛋白質在細菌中表現後，以反覆的冷凍-解凍方法打破細胞，再用硫酸銨把蛋白質沉澱下來，此步驟可以去除大部份核酸、多醣、脂質等雜物。

##### 儀器用具：

恆溫震盪培養箱 37°C

高速冷凍離心機及離心管(使用 20,000 rpm 離心陀)

- ◆ 使用高速離心機要注意：離心機及離心陀的溫度要預冷完全，相對位置的兩隻離心管要平衡好，離心陀轉速絕對不能超過最高速限。

液態氮及冰筒

37°C 溫水浴

##### 藥品試劑：

轉型菌株 pQG11/M15 [pREP] 單一菌落

LB/amp/kan 及 IPTG (1 M stock)

Lysis buffer (50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, pH 7.0; 0.1 M NaCl; 0.1 mM EDTA; 0.2% Triton X-100)

- ◆ 使用前添加成 10 mM β-mercaptoethanol, 25 μg/mL PMSF, 40 μg/mL lysozyme。

Buffer A-0 (50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0)

- ◆ 使用前每 1 L 添加 70 μL β-mercaptoethanol 成為 10 mM 最終濃度。

Buffer A-150: Buffer A-0 再加有 0.15 M NaCl

硫酸銨(要烘乾並以研钵磨碎)

# Protein Purification

## 各實驗進行流程圖

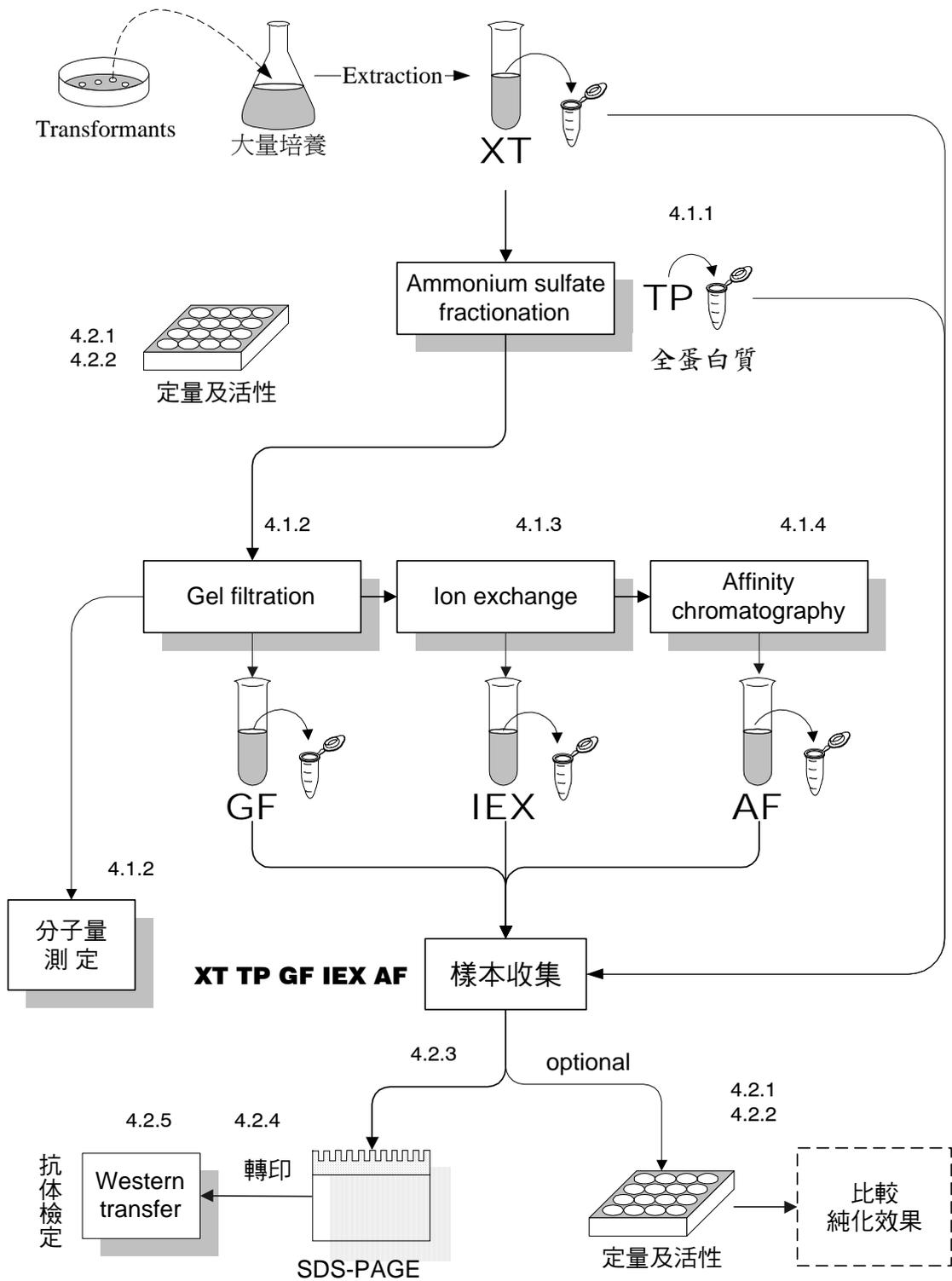


圖 4.1 蛋白質純化與檢定實驗操作的流程

## 方法步驟：

- 1) 挑取培養皿上單一菌落，培養在 15 mL 之 LB/amp/kan 液體培養基中，以 120 rpm 轉速震盪，在 37°C 下培養過夜。
- 2) 取上述菌液 6 mL 加入 300 mL 新鮮 LB/amp/kan 培養基中，以 120 rpm 37°C 培養至  $A_{600} = 0.6$  後，加入 IPTG 成為 1 mM 濃度，繼續以 120 rpm 在 37°C 震盪培養 4 h。
- 3) 將菌液倒入 50 mL 離心管 (conical tube) 中離心 10 min (5,000 rpm)。
- 4) 倒去上清，可將菌塊連同離心管置 -20°C 冰箱貯存。
- 5) 取出含菌塊之離心管置碎冰上，待菌塊溶解後，以殘存液體均勻懸濁之。再加入 10 mL lysis buffer 輕輕懸浮之。
- 6) 將菌液放在液態氮中冷凍 1 min，然後在 37°C 水浴中搖盪溶解之。如此反覆三次，儘量不要產生大量氣泡。將離心管的內容物倒入 50 mL 高速離心機的離心管內。
- 7) 離心 20 min (12,000 rpm, 4°C) 取上清共 \_\_\_\_\_ mL，稱為 粗抽取液 (XT)；預留 100  $\mu$ L 以便日後一起進行分析。
  - ◆ 此後樣本均得放置碎冰上，以低溫進行實驗。
- 8) 此上清加入 5 mL buffer A-0 混勻後倒入燒杯，置碎冰上放冷，不時攪拌並緩緩加入固體硫酸銨 \_\_\_\_\_ gm，使成為 70% 飽和度，加完後再攪拌 10 min。
  - ◆ 參照表 4.1 找出該體積所要加的固體硫酸銨，以達 70% 飽和度。
- 9) 離心 20 min (12,000 rpm, 4°C) 後小心倒去上清，取白色沈澱部份。
- 10) 沈澱加以 2 mL buffer A-150 均勻懸濁之，再以桌上型離心機去除不溶物質，(10,000 rpm, 5 min)，共得 \_\_\_\_\_ mL，稱為 全蛋白質 (TP)；預留 100  $\mu$ L，連同上述 XT 置 4°C 冷藏。
- 11) 其餘溶液部份準備進行膠體過濾層析，標示清楚後置 4°C 冷藏。

## 註解討論：

- a. 緩衝液中為何還要添加某些藥品或試劑？(例如硫酸銨, NaCl, EDTA, PMSF, Triton X-100,  $\beta$ -mercaptoethanol 等)
- b. 以下處理的意義何在：為何要冰浴、分別取沉澱或上清、冷藏或凍藏？
- c. 為何反覆冷凍-解凍可以把細菌打破？還有哪些方法可以打破菌體？
- d. 以 lysis buffer 破菌時，如何得知你的細胞確實有破裂？
- e. 在細胞打破之後，想像你的目標樣本或蛋白質，會處在何種環境？
- f. 蛋白質沈澱時為何要緩緩加入硫酸銨？若加太快會有何種後果？
- g. 若你的目標蛋白質不會被飽和硫酸銨沈澱下來，你將如何繼續實驗？這給你何種訊息？

表 4.1 百分飽和濃度硫酸銨之添加量

0°C	最終硫酸銨百分飽和濃度																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100		
加入 1 L 溶液中之固態硫酸銨克數																	
硫酸銨 起始 百分 飽和 濃度	0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	603	697	0
	20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	469	557	20
	25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	436	522	25
	30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	402	488	30
	35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	369	453	35
	40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	335	418	40
	45						0	29	59	90	123	156	190	226	302	383	45
	50							0	30	60	92	125	159	194	268	348	50
	55								0	30	61	93	127	161	235	313	55
	60									0	31	62	95	129	201	279	60
	65										0	31	63	97	168	244	65
	70											0	32	65	134	209	70
	75												0	32	101	174	75
	80													0	34	139	80
	90														0	70	90
	100															0	100

本表數據來自 *Methods in Enzymology* (1990) Vol. 182, p. 291，而該表原始資料又來自 *Data for Biochemical Research* (1969) Dawson, R.M.C. et al. (ed), 2nd edition, Oxford Univ. Press.

### 4.1.2 膠體過濾法

不同大小的蛋白質分子進入膠體過濾管柱，可依其分子量差異分離；是一種廣泛應用的partition色析法 (Pharmacia操作手冊, Gel Filtration)。

#### 儀器設備：

色析管柱 (Pharmacia C column, 1.6×100 cm)、鐵架、鐵夾及水平儀

◆ 此種管柱的底面積是 2 cm<sup>2</sup>，因此其總體積為 200 mL。

分劃收集器 (fraction collector, 需準備乾淨試管約 100 支)

◆ 收集分劃有 滴數、體積、時間 三種選擇，因為我們不使用輸液幫浦，因此只能用滴數分劃，請先定好若干滴收一個體積分劃。

濃縮用離心機 (低速 5,000 rpm)

◆ 一般細胞實驗用的離心機即可，若用高速離心機則以低速轉動，但無法蓋上離心陀的蓋子，離心過程要特別小心。

濃縮用離心管 Centriprep-30 (Amicon 4322) 請注意其使用方法

◆ Centriprep系列是利用離心力壓擠小分子，使之濾過超微薄膜上的小孔洞，是一種超微過濾法 (ultrafiltration)；Centriprep-30 可濾過 30 kD以下的分子，因此可以把水分子濾走，以達濃縮效果。

#### 藥品試劑：

膠體 Sephacryl S-300 (Pharmacia)：

- 預先以緩衝液 buffer A-150 平衡好，並且使完全沈降後的膠體體積，佔全部體積的七至八成；要先預估好膠體的使用量。
  - 膠體溫度要與操作場所的溫度一致，否則溫度變化會產生氣泡。
  - Sephacryl 系列膠體有相當大的吸附力，因此要在緩衝液加入 0.15 M 以上的 NaCl 以除去非專一性吸附。
- ◆ 一般膠體過濾法均在冷房內操作，但為方便起見，本實驗均在室溫下操作；要盡量保持室溫的恆定，否則膠體溫度的變化會造成氣泡的生成。

Buffer A-150：注意使用時的溫度要與管柱膠體的溫度一致

標準分子量組合 (Bio-Rad 151-1901)：溶於 1 mL 後每組取 0.4 mL。

含有thyroglobulin (670 kD), bovine gamma globulin (158 kD), chicken ovalbumin (44 kD), equine myoglobin (17 kD), vitamin B<sub>12</sub> (1,350)

◆ 除了上述標準分子量的各種蛋白質外，也可加入目標酵素一起進行膠體過濾，並以活性分析定出目標酵素的溶離體積。

#### 方法步驟：

##### 管柱裝填：

- 1) 以純水沖洗玻璃管柱 (以純水上下沖洗即可，嚴禁使用試管刷)；並請了解管柱的構造與拆裝方法，垂直架好管柱，以軟管連接分劃收集器，並以buffer A-150 試看管路是否通暢；可以用止血鉗或長尾文書夾夾住出口軟管，則可控制溶離的進行。注意系統的擺設要適當，不要裝置於交通要衝。



- 2) 依預估量取出 Sephadex 膠體，注意膠體的溫度與緩衝液是否已平衡；將瓶中的膠體上下震盪，使之完全懸浮，但勿產生太多氣泡。
- 3) 在管柱內加入約 10 cm 高緩衝液，然後將膠體慢慢沿著管壁倒入管柱，一直加到管柱頂端，開始流洗後膠體沈降很快。當膠體上方的液面逐漸降低時，可於頂端添加膠體，以達所要高度；膠體高度約 90 cm。
- 4) 膠體完全沈降後，小心以 buffer A-150 加滿管柱，關閉出口，裝上頂端端蓋並連通緩衝液瓶，打開出口以重力流洗。調整緩衝液瓶高度，使流速約每五~六秒一滴，並設定收集體積為 2.5 mL/tube。
- 5) 膠柱流洗約 100 mL 後，關閉出口，拆開頂端端蓋，先以滴管吸出膠體上方的溶液到剩約 1 cm 高，注意勿破壞膠體表面平整；然後打開出口，使液面下降至膠體面，再關閉出口，準備注入樣本。

樣本色析進行：

- 6) 以微量吸管或滴管吸取樣本（樣本體積不得超過膠體總體積的 3%），沿著膠體上方管壁緩慢加入，注意切勿破壞膠體的平整表面！  
（樣本確實體積 \_\_\_\_\_ mL）
- 7) 打開出口，同時開啟分劃收集器；當樣本完全沒入膠體時，關閉出口，緩緩加入與樣本相等體積的 buffer A-150，打開出口待其慢慢進入膠體中，如此重複二次。不得擾動膠體表面，造成凹陷。
- 8) 暫時關閉出口，將液面高度加滿至管柱頂端，並把頂端端蓋鎖上；然後打開出口開始溶離，調整緩衝液瓶的高度，使流速為 6 s 一滴。
- 9) 要留心觀察前面幾個分劃，確定整個系統運轉無礙，小心分劃收集器最容易出問題。管柱預計將流洗過夜，收集約 80 管。
- 10) 收集分劃試管，進行蛋白質定量分析以及 GUS 活性測定，並請作圖。  
◆ 蛋白質定量及 GUS 活性分析方法，請見下面數節 (4.2.1, 4.2.2)。
- 11) 收集 GUS 活性區，以 Centriprep-30 濃縮至 10 mL 後，加 buffer A-0 稀釋至 20 mL，再次濃縮至 \_\_\_\_\_ mL (GF)，保留 100  $\mu$ L。
- 12) 管柱請再以 buffer A-150 流洗 100 mL 後，小心放置一旁，準備以後進行分子量測定。  
◆ 在此期間，請注意不要讓管柱膠體乾掉，也要注意膠體溫度不可變化太大，否則膠體內將會產生氣泡，無法再用，必須重新裝填。

分子量測定：

- 13) 進行分子量測定前一天，請先以 buffer A-150 流洗 100 mL，並檢查膠柱內有無氣泡產生，若有嚴重的氣泡或乾裂，必須重新裝填管柱。
- 14) 取標準分子量溶液 0.4 mL，加上純質目標酵素 0.5 mL (以親和層析法所得之 AF 部份)，如上法注入管柱中，立刻開始進行膠體過濾，並收集各分劃。請依循上述所有管柱及分劃收集器的操作要點。
- 15) 收集所得的各分劃，進行蛋白質定量分析，可定出數個蛋白質尖峰，以作為分子量依據；另以目測法，決定紅色高峰的管數，則可定出 vitamin B<sub>12</sub> 的溶離管數。利用以上數據，可畫出分子量與溶離管數間的直線關係，作為分子量判定的標準校正線。

- 16) 同樣的一批分割，請進行酵素活性分析 (GUS)，則可定出酵素的溶離體積，對照上述標準校正線，則可求出酵素的分子量。

拆除管柱及保存膠體：

- 17) 若管柱長期不用，應當自管柱中取出膠體，以緩衝液清洗後，置冷藏室中保存，但絕對不要放在冷凍箱中。膠體若裝填太緊，有時可能不易取出，要有耐心地以緩衝液慢慢沖出來。
- 18) 膠體可以加 0.01%  $\text{NaN}_3$  防止霉菌生長，但使用前記得要洗去；再度使用時，請檢查膠體中有無灰黑色霉菌顆粒，若有結塊而不易打散者，也不要使用。

注解討論：

- 在裝填管柱之前，要先估計所要的膠體體積多少，如何預估？
- Sephacryl 膠體層析之操作，要緊密裝填管柱膠體，為何要如此做？
- 在實際操作裝填管柱之前，請先以空的管柱模擬整個過程。
- 何謂色層分析法？為何膠體過濾法是一種 partition 色析法？
- 本實驗班所使用到的色層分析用具，雖已經相當齊全，但離正式研究需求，仍有一點距離。以下列出一般常用的色析純化設備 (如圖 4.2)：
  - 梯度製造器 可在離子交換法時，拉出各種溶離梯度。
  - 輸液幫浦 可以穩定而有效地輸送緩衝液進入管柱。
  - 管柱 可以加裝 reservoir 以便一次完成膠體的裝填；也可在膠體裝填完成之後，在膠面上方接一 adaptor 以便消除無效空間。
  - 監視及記錄器 可同步監視管柱溶離出來的物質，且忠實記錄。
  - 分割收集器 可收集所有的溶離分割，是最不可缺的用具。

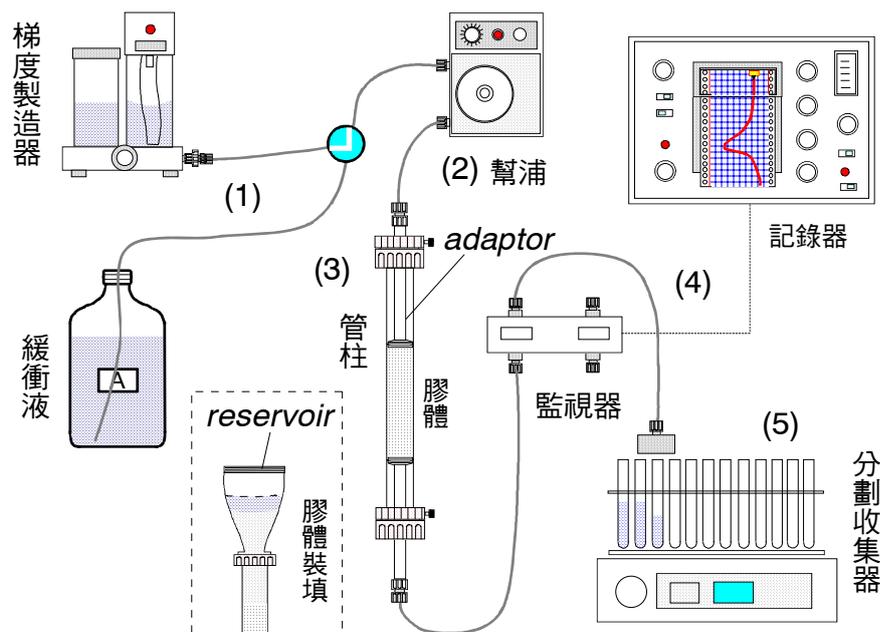


圖 4.2 色析法的全套設備及裝置

### 4.1.3 離子交換法

各種蛋白質分子上可能帶有不同的電性，經過離子交換管柱，可依其分子帶電性的差異而分離開來 (Pharmacia 操作手冊, Ion Exchange)。

#### 儀器設備：

塑膠管柱 (Bio-Rad Econo-Pac column 732-1010, 1.5×12 cm)

分割收集器 (fraction collector, 另需準備乾淨試管約 60 支)

濃縮用離心機 (低速 5,000 rpm) 及濃縮離心管 Centriplus



#### 藥品試劑：

DEAE Sephacel (膠體體積約 15 mL，預先以緩衝液 Buffer A-0 平衡好)

Buffer A-0 (如上述配法)

Buffer A-300 溶離液：Buffer A-0 加有 0.3 M NaCl

Buffer A-500 溶離液：Buffer A-0 加有 0.5 M NaCl

#### 方法步驟：

- 1) 將 Econo-Pac 管柱架好，並將三向閥及軟管等組合完成。
- 2) 震盪 DEAE Sephacel 膠體使之懸浮，小心倒入管柱中，讓膠體慢慢沈降，在沈降過程中隨時加入 buffer A-0，勿使膠體乾掉。
- 3) 待膠體沈降完全後，高度應在 15 cm 左右。膠柱以 buffer A-0 一直流洗，流速快慢可以不考慮；連接好收集器，每試管收 2.5 mL。
  - ◆ 離子交換法的膠體平衡極為重要，可測流出液的 pH 或離子濃度，看是否與 buffer A-0 相同，若不一樣則需要再流洗之。
- 4) 樣本的添加方法同上述膠體過濾法，並啟動分割收集器開始收集，當樣本全部沒入膠體後，再加入同體積 buffer A-0。以 buffer A-0 流洗 50 mL 後，去除膠體上方的緩衝液，但勿使膠體乾掉。
- 5) 然後依序以 buffer A-300, buffer A-500 溶離之，每批次流洗各 50 mL，注意更換濃度時，膠體上方勿殘存上一種溶液。
- 6) 收集所有分割，進行蛋白質定量分析以及 GUS 活性測定，結果作圖。
- 7) 收集 GUS 活性區，並以 Centriprep-30 濃縮至 \_\_\_\_\_ mL (IEX)，記得要保留 100 μL。
- 8) 離子交換膠體以 buffer A-0 洗過 50 mL 後，收起來交回。

#### 註解討論：

- a. 離子交換膠體一定要平衡在緩衝液中，如何確知膠體已平衡完全？
- b. 為何要逐漸升高鹽濃度？其作用機理為何？
- c. 蛋白質分子大多帶有電荷，此種性質是如何形成的？
- d. 在實際操作裝填管柱之前，請先在心中或紙上模擬整個實驗過程。

#### 4.1.4 親和層析法

若表現蛋白質上含有一段六個 His 的片段，而親和吸著劑膠體上接有鎳離子，此蛋白質會專一性地結合到吸著劑膠體；洗去雜質後可用 imidazole 溶離純質蛋白質 (Pharmacia 操作手冊, Affinity Chromatography)。

##### 儀器設備：

親和層析管柱 (Bio-Rad 731-1550 Poly-Prep column, 0.8×4 cm)

分劃收集器 (另需準備乾淨試管約 25 支)



##### 藥品試劑：

金屬螯合親和層析膠體 (Ni-NTA agarose, QIAGEN 30210) 1 mL

- ◆ 在洋菜膠粒上接有 nitrilotriacetic acid (NTA) 官能基，可以螯合鎳離子；使用前先以鎳離子飽和之。

Buffer B-300/0 (50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0; 0.3 M NaCl)

- ◆ 使用前才添加成 10 mM β-mercaptoethanol。

Buffer B-300/20: Buffer B-300/0 加有 20 mM imidazole

Buffer B-300/250: Buffer B-300/0 加有 250 mM imidazole

##### 方法步驟：

- 1) 親和層析膠體 1 mL 已經裝填在管柱內，成為一淡藍色膠柱。請把管柱架直在鐵架上，去除下方的填塞物，用 buffer B-300/0 流洗 20 mL 後塞住出口，準備注入樣本。
- 2) 除去膠面上方的緩衝液，並取出樣本 (IEX) 使其回到室溫，慢慢用滴管加到親和膠體上，小心勿弄亂膠體表面；讓樣本沒入膠體中，同時收集流出液每管 2.5 mL。
- 3) 待樣本全部進入膠體後，關閉出口，再慢慢加入 buffer B-300/20，打開出口收集流出液；buffer B-300/20 共流洗 30 mL。
- 4) 接著以 buffer B-300/250 流洗 30 mL，方法同上，收集各分劃。
- 5) 所有分劃均定量蛋白質並測定酵素活性，收集酵素活性最高的數個分劃，共得 \_\_\_\_\_ mL (AF)，保留 100 μL 以供分析。

##### 註解討論：

- a. 離子交換法及親和層析法操作時，當你要換用另一種溶離液時，膠體表面上能不能留有原來的緩衝液？
- b. 目標蛋白質 GUS 是如何接到親和膠體上？ 又是如何被溶離下來的？
- c. 若你發現蛋白質無法結合到 Ni-NTA 親和膠體上去，但你確定蛋白質上有 His 片段，則如何解釋之？
- d. 親和層析法的種類非常多，只要兩種物質間有專一性的親和力，就可設計以親和法來進行純化工作，請儘量舉出你所知道的各種例子。

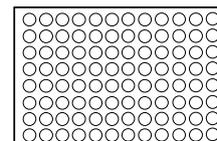
## 4.2 蛋白質檢定方法

### 4.2.1 蛋白質定量分析

Bradford 的 dye-binding method 是利用 Coomassie brilliant blue G-250 (CBG) 可與蛋白質結合而變色的特性來定量 (Bradford, 1976)；若試樣中的蛋白質量較多，則結合到蛋白質而變色的 CBG 也多，因而呈色較深。下例是以一組標準蛋白質為對象，製作一條蛋白質量與吸光度的標準校正線。

#### 儀器用具：

ELISA光度計 (Dynatech) 可在一分鐘內測完一片滴定盤  
 微量滴定盤 (microtiter plate, Nunc F96 Maxisorb 442404)  
 Micro test tubes, 大頭針或噴火槍



#### 藥品試劑：

- (a) Buffer A-0
  - (b) BSA標準品 (Bio-Rad, bovine serum albumin, 100 µg/mL)
  - (c) 未知濃度樣本 (unknown BSA, 0.8 mL, 由教師調配發給)
  - (d) Dye Reagent (Bio-Rad 500-0006) 先以水稀釋四倍備用
- ◆ 以染料 Coomassie brilliant blue G-250 配製的溶液，勿與膠體電泳染色用的 CBR-250 混淆，各有其使用上的特色，不要互用。

#### 標準品及樣本：

##### 標準品系列：

使用小試管準備一組BSA (b) 標準品的系列稀釋：

Label	BSA (b)	Buffer A-0	Final Conc.	
#5	500 µL	0 µL	100 µg/mL	混合均勻
#4	400 µL	100 µL	80 µg/mL	混合均勻
#3	300 µL	200 µL	60 µg/mL	混合均勻
#2	200 µL	300 µL	40 µg/mL	混合均勻
#1	100 µL	400 µL	20 µg/mL	混合均勻
#0	0 µL	500 µL	0 µg/mL	混合均勻

◆ 配製一定要精準，否則校正直線不會很準確；各種試劑的添加，若自稀往濃取樣，則可以不用換吸管頭。

##### 未知樣本：

再以上述 unknown BSA (c) 準備兩種未知樣本：

Label	未知樣本 (c)	Buffer A-0	Final Conc.	
X1	500 µL	0 µL	2×	混合均勻
X2	250 µL	250 µL	1/2×	混合均勻

一般樣本：

- 1) 通常由色析法所收集到的各分劃樣本，都可以直接進行蛋白質定量分析；但若其中含有某些干擾因子 (如含有Triton)，或樣本的濃度太濃，都必須將樣本稀釋後再測。
- 2) 同一樣本的若干不同稀釋濃度，所測出來的最終蛋白質濃度會有差異，通常是以稀釋度大者較為準確。

方法步驟：

- 1) 每槽先加好 50  $\mu$ L 標準品 (#0, #1 .... #5) 或未知樣本 (X1, X2)，以二重複加入 96 孔滴定盤中，如圖 4.3 所示。

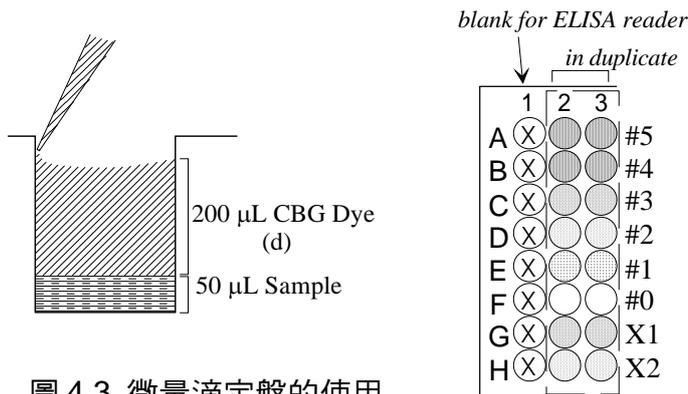


圖 4.3 微量滴定盤的使用

- 2) 每槽再加入 200  $\mu$ L Dye-Reagent (d)，在全部樣本槽加完前，不要中斷添加；同時小心避免氣泡產生。
  - ◆ 本步驟是實驗成敗的關鍵！
- 3) 輕拍滴定盤一側，使添加的各成份均勻混合，注意 Dye-Reagent 密度較大，很容易沉積在下方而分層。若還有小氣泡，小心以大頭針刺破，大量時可用噴火槍火燄燒破。
- 4) 靜置室溫 10 min。
- 5) 以ELISA reader測量 570 nm (或 595 nm) 的吸光值。

註解討論：

- a. 在作圖紙上畫出標準品的校正線，並決定未知樣本的濃度 (如圖 4.4)。
- b. 請說明本分析方法的原理，並特別以蛋白質構造來說明。
- c. 一般緩衝液或試劑中，何種添加物會影響 Bradford 法的呈色？
- d. 請列出本分析方法的各操作步驟中，哪些會影響分析的準確度？
- e. 還有哪些蛋白質的定量方法？並請比較其優劣點。

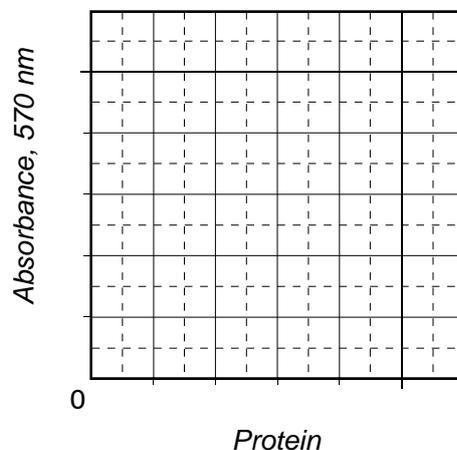
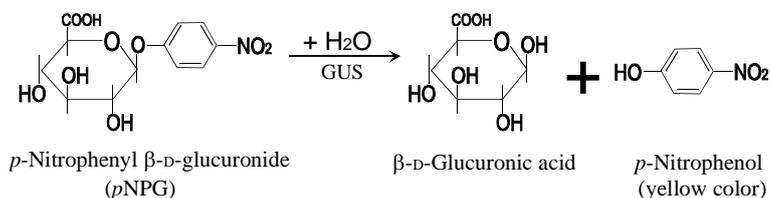


圖 4.4 繪製標準品校正線

### 4.2.2 酵素活性分析法

表現出來的酵素GUS可以水解其基質衍生物pNPG，所產生的黃色生成物p-nitrophenol，可供活性測定 (Jefferson et al, 1986)；催化反應如下式：



儀器用具：

ELISA光度計 (Dynatech)

微量滴定盤 (microtiter plate, Nunc F96 Maxisorb 442404)

藥品試劑：

基質溶液 (GUS reaction buffer)：

pNPG ( <i>p</i> -nitrophenyl $\beta$ -D-glucuronide, Sigma N-1627)	31.5 mg
溶於 Buffer A-0	100 mL

終止液 (stop buffer)：2.5 M 2-amino-2-methyl propanediol (Sigma A-9754)

方法步驟：

- 1) 吸取 20  $\mu\text{L}$  的蛋白質樣本，小心注入微量滴定盤中，避免氣泡產生。
- 2) 每一樣品槽加入 200  $\mu\text{L}$  基質液，混合均勻；可用燒熱的接種環去除氣泡。
- 3) 靜置約 1~2 min，顏色開始加深，然後加入 30  $\mu\text{L}$  終止液。反應時間的長短，要以樣本中的酵素活性大小來做調整。因為我們只測定色析法各分割的相對酵素活性，因此並不加終止液。
- 4) 以 ELISA 光度計測定波長 415 nm 之吸光值。

酵素活性單位的測定：

- a. 以上步驟，只可測定 GUS 活性的相對大小，對色析法所得到的各個分割進行偵測，相當方便，但並非酵素絕對活性單位的測定方法。
- b. 若要測定酵素的絕對活性單位，要使用最適當的酵素用量，使酵素在反應一段固定的時間後，其生成物的呈色吸光度，落在光度計的可測範圍之內；然後計算此段時間內，每分鐘所產生的吸光度增加量，轉換成生成物的莫耳數，即可求得其真正的活性單位。
- c. 因此酵素的活性單位定義為：每分鐘所能催化生成物之  $\mu\text{mole}$  數。

註解討論：

- a. 實驗之前先規畫好各樣本在滴定盤上的分佈位置，並做好標示。
- b. 以微量滴定盤進行活性測定時，能否使得每一槽的反應時間一致？
- c. 化學反應最重要的操作要點之一，是要使所加入的各種成份均勻混合，在使用微量滴定盤時，你如何使所加的液體混合均勻？

### 4.2.3 膠體電泳法

電泳的高解析力使其成為生化技術中最有效力的一門分析利器，以下簡略說明各種電泳的形式及其應用。

- a. 不連續膠體電泳 (disc-PAGE) 是以原態蛋白質進行電泳，一般用作純度檢定或活性分析，SDS-膠體電泳 (SDS-PAGE) 則用為次體分子量之測定，梯度 (gradient) 電泳則可輔助原態蛋白質分子量之決定。結合SDS及梯度兩種特性的SDS-梯度膠體電泳，其解析力最高。
- b. 電泳形式 早期使用圓柱狀膠體，演變成直立式的平板膠片 (16×18 cm)，最後改成迷你電泳膠片 (8×10 cm)，電泳時間只約一小時，而其解析力不變。現在柱狀膠體電泳只用在等電聚焦法，以進行二次元電泳；而大型平板電泳則多用在製備式電泳，一般電泳大多以迷你膠片進行之。
- c. 膠體材質 的種類很多，但用在蛋白質者則以聚丙烯醯胺 (polyacrylamide) 為主；聚丙烯醯胺電泳是蛋白質應用最廣的電泳分析方式。也有少數使用洋菜膠體 (agarose gel)，多用在測定pI較廣的異構酶酵素群。
- d. 泳動率： 在 pH 8.8 的電泳條件下，大部分 pI 小於 8.8 的分子均能往正極泳動；蛋白質的泳動率與所帶電荷成正比，而與其分子量成反比；若分子量一樣，但形狀越不規則，或體積越鬆散者，泳動率越小。
- e. 聚丙烯醯胺電泳 雖然分有原態的 disc-及變性的 SDS-PAGE 兩種，但兩者除了 SDS-PAGE 在整個系統含有 0.1% SDS 之外，其餘完全相同，且其鑄膠及電泳方法均屬大同小異。
- f. 原態 disc-PAGE 中的樣本蛋白質，因電泳系統中不含界面活性劑 SDS，其活性多能保持，可以在膠體上做活性染色。若目標酵素沒有方便的活性染色法，則可把膠體一片一片切下，做每一片膠體的活性測定。

#### 儀器用具：

迷你電泳槽 (Hoefer Mighty Small SE 250)

鑄膠器 (Hoefer SE 245 可鑄造兩片迷你膠片)

鑄膠三明治組合：(每一片膠片)

(1) 玻璃板	(8×10 cm)	小心易破裂	1 片
(2) 白色氧化鋁板		小心易破裂	1 片
(3) Spacer 間隔條	(0.75 mm)	小心易遺失	2 條
(4) Comb 樣本齒模	(0.75 mm)	小心易遺失	1 隻

電泳樣本專用微量吸管頭 (尖端較長且扁)

供電器 (可供應 200 V 電壓及 500 mA 電流者均可使用)

塑膠染色盒 (比膠片稍大且要能密蓋)

旋轉搖盪器 (rotary shaker)

看片箱 (light box)

護貝機及護貝膜 (可護貝如膠片大小者)

膠片乾燥組合：

- (1) 玻璃板(至少要比膠片大，約 12×15 cm，厚度約 3~4 mm)
- (2) 玻璃紙 (cellophane, 年糕紙，比上面玻璃板每邊多出 5 cm 以上)

以下聚丙烯醯胺膠體電泳所使用的試劑及方法乃根據 Laemmli (1970) 的方法。

**藥品試劑：**

由於鑄膠溶液非常重要且多樣，因此下面把所有電泳溶液的配置方法仔細列出，希望能在每一個實驗室成功進行電泳；但使用者一定要明白其配製的原理與各種濃度的算法，而不是只會依配方泡製而已。

**A液：丙烯醯胺液 (total 30%, cross-linking 2.6%)**

丙烯醯胺	(acrylamide, Merck 10784)	29.2 gm
Bis 架橋劑	(Sigma M-7256)	0.8 gm

---

加純水溶解至 100 mL

- ◆ A 液也有商品已經配製好溶液者，若實驗課採用 Ameresco 的 40% 溶液 (T40%, C2.6%)，配法有些變動，請特別注意。
- ◆ Bis 是 *N,N'*-methylene-bis(acrylamide) 的簡稱，可看成是兩分子 acrylamide 連在一起，作為架橋物，以便成為立體的膠體。
- ◆ 以 30°C 加熱助溶，有不溶物質須過濾去除；若丙烯醯胺品質不佳或久貯，在溶成 100 mL 後，可加一些離子交換樹脂 Dowex MR-3 攪拌，放過夜並過濾後置 4°C 保存。
- ◆ 注意 acrylamide 溶液有神經毒性！不要直接接觸，凝膠後毒性消失，但膠體無法達到百分之百凝膠，因此也要小心處理膠片。

**B液：分離膠體緩衝液 (running或separation buffer)**

Tris	(Tris base, 1.5 M)	90.8 gm
TEMED	(Sigma T-8133)	1.8 mL

---

溶入 300 mL 水，以 1 M HCl 119 mL 調 pH 到 8.8 再加水至 500 mL

- ◆ TEMED (tetramethylenediamine) 可幫助自由基傳導，是催化劑。

**C液：焦集膠體緩衝液 (stacking buffer)**

Tris	(Tris base, 0.5 M)	6.0 gm
TEMED	(Sigma T-8133)	0.4 mL

---

溶入 40 mL 水，加 1 M HCl 47 mL 調 pH 至 6.8，加水至 100 mL

**D液：電泳緩衝液 (chamber buffer)，5×溶液**

Tris	(Tris base, 0.05 M×5)	30.3 gm
甘胺酸	(glycine, 0.38 M×5)	142.6 gm

---

溶入 800 mL 水，pH 調到 8.3 後再加水至 1 L 使用時稀釋 5 倍

- ◆ 甘胺酸是電泳緩衝液的主要分子，是造成電泳樣本焦集的原因；近來多改用 boric acid (下面 F 液)，應自行試用何者為佳。

**E 液：SDS-PAGE 樣品溶液，2×溶液**

Tris	(Tris base, 125 mM×2)	3.0 gm
EDTA·2Na	(2 mM×2)	14.8 mg

SDS	(2% × 2)	4.0 gm
β-mercaptoethanol	(5% × 2, Sigma M-6250)	10.0 mL
加水 80 mL 溶之，pH 調到 6.8，再加水至		100 mL

F 液：通用電泳緩衝液，5×溶液

Tris	(Tris base, 90 mM × 5)	54.5 gm
Boric acid	(80 mM × 5)	24.8 gm
EDTA·2Na	(2.5 mM × 5)	4.7 gm

加水 800 mL 溶之，pH 調到 8.4，再加水至 1,000 mL

◆ 使用時稀釋 5 倍。本溶液在 disc-或 SDS-PAGE 均通用，後者要加 SDS 至 0.1%。

SDS 水溶液 (10%)

◆ SDS 粉末很輕，揚起來很容易吸入肺部，在肺泡溶解產生界面活性的作用，使得肺部細胞無法進行氧分子交換，非常危險。

APS 溶液 (過硫酸銨, 5%) :

APS (ammonium persulfate, Bio-Rad 161-0700)	50 mg
---	-------

溶於 1 mL 水中，使用前才配製好，隔日不可再用。

◆ APS 是自由基 (free radical) 的產生者，可誘發 acrylamide 的連鎖聚合反應，因此是整個凝膠反應的起始者。

◆ 冬天可增至 10%，夏天可減至 2%。注意 APS 固體很容易分解，應密蓋貯於乾燥皿；鑄膠無法凝結的毛病，多出自 APS 的品質不良。

追蹤染料 (tracking dye) :

Bromophenol blue (Sigma B-6896)	1 mg
---------------------------------	------

溶於 5 mL 水，再加 5 mL 甘油均勻混合。

◆ 加在樣本蛋白質中，可增加樣本密度並賦予顏色，方便目視以注入膠片的樣本槽。

染色液 (CBR 染液) :

Coomassie brilliant blue R-250 (CBR, Sigma B-0149)	1 gm
--	------

溶於 250 mL 水後，再加入 250 mL 甲醇及 50 mL 醋酸混合均勻，充分溶解 CBR，若有不溶物質，則須過濾後裝瓶密蓋。

◆ Coomassie blue 有許多種不同的相關化合物，不要取用作為蛋白質定量用的 Coomassie blue G-250 來染色，效果稍差。

脫色液 (20% 甲醇及 10% 醋酸) :

在一 1 L 量筒中，先到入 200 mL 甲醇及 100 mL 醋酸，再加水至 1 L，混合均勻後密蓋備用。

◆ 甲醇濃度可提高到 30%，則可增加脫色速度，但小心脫色過度。

標準分子量組合：

Pharmacia 有高低兩種分子量的標準蛋白質組合，專供 SDS-PAGE 使用：

高分子量組：Thyroglobulin (669kD, 330 kD), ferritin (440 kD, 220 kD, 18.5 kD), catalase (232 kD, 36 kD), albumin (67 kD)

低分子量組：Phosphorylase (94 kD), albumin (67 kD), ovalbumin (43 kD), carbonic anhydrase (30 kD), trypsin inhibitor (20 kD), lactalbumin (14.4 kD)

另外 Novel 有預先染好藍色的 SeeBlue (LC5625) 標準蛋白質組合，除了一般電泳外，更可用在轉印，檢查轉印是否成功：

**SeeBlue:** Myosin (250 kD), albumin (98 kD), glutamic dehydrogenase (64 kD), alcohol dehydrogenase (50 kD), carbonic anhydrase (36 kD), myoglobin (30 kD), lysozyme (16 kD), aprotinin (6 kD), insulin B chain (4 kD)

方法步驟：

SDS 平板膠片鑄造：

- 1) 整理出兩組玻璃片及白板鑄膠組合，先用酒精拭淨，並選擇合適的間隔條 (0.75 mm) 組合起來。  
◆ 請熟悉鑄膠三明治組合的正確組裝方式，以免灌入的膠液漏出來。
- 2) 三明治組合後直立站好，準備所要濃度的 SDS 膠體溶液如表 4.2。兩片 0.75 mm 厚的平板膠片約需 10 mL 分離膠體溶液，以及 5 mL 焦集膠體溶液。APS 液到最後才加入，未加 APS 以前可在真空中抽去溶液中的氣體。

表 4.2 配製兩片 0.75 mm 膠片所需膠體 (mL)

	分 離 膠 體							焦集膠體	
膠體百分比	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%	10%	4%	4%
A 液 (40%)	-	-	-	-	-	-	5.0	-	0.5
A 液 (30%)	3.3	5.0	6.7	8.3	10	13	-	0.66	-
B 液	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	-	-
C 液	-	-	-	-	-	-	-	1.24	1.24
10% SDS 液	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.05	0.05
純水	11.4	9.7	8.0	6.4	4.7	1.7	9.7	2.95	3.11
APS 液	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
總體積	20	20	20	20	20	20	20	5	5

◆ 上表反白部份為使用 40% A 液製備的配方。

- 3) 以上分離膠體各成份在小燒杯中混合均勻後，可直接沿著玻璃一側倒入鑄膠組合到預定高度(約八成高)，勿陷住氣泡；再輕輕加上一層isopropanol。也可使用滴管慢慢加入膠體，同樣勿注入氣泡。
- 4) 約 30 min 可凝結，以濾紙吸去 isopropanol，同法倒入焦集膠體溶液，要加到滿；儘快插入樣品槽齒模，注意不可有氣泡陷在膠體中。  
◆ 一般在凝膠完成後，膠體與所加的水層之間，會出現清楚的直線界面，但因為背景為白色，較不易觀察之。
- 5) 再度凝結後取下齒模即可使用。若不立刻使用，則把整個膠片組合用保鮮膜包好，膠面上方加一水層，勿使乾掉，在 4°C 約可放 1~2 週。

電泳方法：

- 6) 若膠片組合保存於 4°C，則要等待膠片完全回復室溫，才架到電泳槽。  
◆ 膠片一定要完全回溫，否則在進行電泳時，玻璃會因熱脹而破裂。

- 7) 取F液稀釋成一倍溶液，並加SDS成為 0.1%；先倒入下方的正極槽，注意不可有氣泡黏在膠體，然後倒入上方的負極槽。用微量針筒或微量吸管一個一個清洗樣本槽，除去殘留在槽內的膠體(刷牙)。
  - ◆ 刷牙的動作很重要，而且要徹底，否則注入樣本時，會有大麻煩。又因為白色氧化鋁板乃白色背景，不容易看出樣本槽的位置，可用 Hoefer 所附的透明樣本槽位置模板，作為指引，順便可練習樣本添加的動作。
- 8) 取蛋白質樣本溶液，加入同體積 E 液，以及適量追蹤染料 bromophenol blue，混勻後在 100°C 加熱 10 min。放冷短暫離心後即可依次以微量吸管注入樣本槽，樣本體積可自斟酌，但要記好位置及體積；通常都使用 5~15  $\mu\text{L}$ 。
  - ◆ 注入樣本時，儘量把針頭或吸管伸到樣本槽底部，但不要觸到樣本槽底的膠面，則可以使得樣本所佔的體積最小，分離效果較好。
- 9) 裝上電源蓋，以 100~150 V 進行電泳，最高可加至 200 V，視實驗的緊急程度，以及膠片發熱的情形而定。通電後兩極附近會立刻產生無數細微氣泡，是通電的特徵。
- 10) 追蹤染料很快進入膠體，開始焦集成藍色細線，並向下泳動，大約 1 h 可泳動到底邊，中止電泳，除去電源蓋。
  - ◆ 有些分子量較大的樣本，或使用濃度較高的膠片，可以等到藍色細線泳出膠體才停止。

#### 膠片染色法：

- 11) 取出膠片組合，使玻璃板向上，先除去兩側間隔條，再以扁形藥匙輕輕撬起玻璃，膠片則留在白板上。切除焦集膠體，並在分離膠片的右上方截角做記號(區別膠片的左右)。
- 12) 取染色盤(大約比膠片稍大)，倒入CBR染色液，在染色盤上方把上述白板倒翻過來，挑起膠片一角，利用重力使膠片掉落到染色缸中。
  - ◆ 若要進行蛋白質轉印，則膠片不能染色，要浸入轉印緩衝液中。
- 13) 在 CBR 中染色約 30 min，染色盤要加密蓋，置於旋轉平台慢速 50 rpm 搖盪之；要注意膠片是否完全沒入染色液中，否則會造成染色不均勻。
- 14) 染色後小心把 CBR 染劑倒回原來瓶中，整塊膠片變成藍色，先用自來水洗掉殘餘的染色液，再倒入約 20 mL 脫色液，加密蓋後再放回旋轉平台搖盪。染色脫色過程請戴手套，否則會在膠片上留下指紋。
- 15) 膠片的藍色背景漸漸脫掉，待脫色液轉成藍色後，可以換新脫色液；如此脫色數次，在一小時內應可看到蛋白質的藍色色帶出現。用過的脫色液，請回收倒在有機溶液的廢液桶中。
- 16) 待膠片背景完全透明後，染色脫色完成。倒去脫色液，改用 50% 甲醇液洗一兩次，待膠片縮至大約原來的尺寸，則可準備乾燥之。

#### 膠片乾燥法：

- 17) 把玻璃紙 cellophane 先用水浸溼，平鋪在乾燥用的玻璃片上，玻璃紙會比玻璃片大，因此四週有多出來的部份。
- 18) 把膠片平鋪在玻璃紙中央，膠片與玻璃紙間不要有任何氣泡。
  - ◆ 除了氣泡之外，若膠片沒有回復原來的大小，或者膠片的四邊有傷痕，都

很容易造成膠片乾燥後的龜裂現象。

- 19) 在膠片上再加一層浸溼的玻璃紙，也不要陷有氣泡在內；把玻璃紙多出來的部份反摺到玻璃背面，用手抹平表面水份，並用紙巾吸乾。
- 20) 把此乾片三明治組合放在桌上，次日即可得到已經乾燥好的膠片，用電風扇或冷氣機吹之，可以加快乾片速度。
  - ◆ 乾片後用指甲尖輕敲膠片，若還可以看到指甲所留下的痕跡，表示膠片並未完全乾燥，要再等候。
- 21) 待膠片完全乾燥後，以美工刀或剪刀去除多餘的玻璃紙，再加以護貝，則可永久保存之。免疫染色的轉印紙，也可以護貝保存。

#### 4.2.4 蛋白質轉印法

蛋白質經SDS-PAGE後，膠片浸入轉印緩衝液，蛋白質可被轉印到硝化纖維紙(nitrocellulose)上，先經尿素洗去SDS，並使蛋白質回復原態抗原性，可使用抗體進行免疫染色(Towbin et al, 1979)。

##### 儀器用具：

- 電泳轉印槽(Hoefer Transphor TE 52)：
  - 轉印槽(可容納 4 個轉印三明治)
  - 轉印三明治(轉印夾、方形海綿墊 2 片)
- 轉印紙：早期使用硝化纖維紙，現在多用尼龍材質者
  - Immobilon P (Millipore IPUH 000 10, 0.45 μm, PVDF 材質)
- 濾紙(Whatman #1, 3MM) 兩張，裁成比轉印紙稍大者。
- 供電器(可供 400~500 mA者)
- 方形培養皿(轉印紙清洗用)
- 旋轉搖盪器(rotary shaker)

##### 藥品試劑：

- 轉印緩衝液(Blotting buffer)：10×溶液
 

Tris	(Tris base, 25 mM×10)	60.6 gm
甘胺酸	(0.192 M×10)	288 gm
加水 1,500 mL 溶之，pH 以 HCl 調到 8.3，加水至		2,000 mL

  - ◆ 使用時取 500 mL 倒入一 5 L 桶中，加 500 mL 甲醇後，加水到 5 L，均勻攪拌之。如此配成者，含 10% 甲醇；若是轉印胜肽或是蛋白質的分子量太小，可提高到 20%。
- 甲醇(用來潤溼尼龍材質的轉印紙)
- PBST 洗液：
  - PBST 為 pH 7.0 的 PBS (phosphate buffered saline) 緩衝液，另加有 0.05% Tween-20，用來清洗轉印紙，以去除非專一性的蛋白質吸附。
- 尿素洗液(6M Urea-PBST)：
  - 尿素 180 gm 溶在 300 mL PBST 中，加溫攪拌溶解，再加 PBST 至 500 mL。

## 方法步驟：

- ◆ 全程請戴手套操作，以免污染轉印紙！
- 1) 電泳後 SDS-PAGE 膠片浸在轉印緩衝液中，洗 2~3 次，每次 10 min。
- 2) 取出轉印槽，先小心放一攪拌子在底部，再倒一半轉印緩衝液。
  - ◆ 攪拌子千萬不能丟到轉印槽內，會打破轉印槽底部的陶瓷散熱片。
- 3) 取轉印紙切成約如膠片大小，先在方形培養皿中以少許甲醇浸溼數秒鐘，再置入轉印槽中的緩衝液 10 min 後使用。另取兩張濾紙，以及兩片方形海綿墊，都放在轉印槽的緩衝液中備用。
- 4) 取出轉印夾打開平放，先墊一張方形海綿墊，舖上一張溼濾紙，小心疊上已潤溼的轉印紙，其間勿陷入氣泡；轉印紙再滴上數滴緩衝液後，小心平舖膠片上去，加蓋一層濾紙，及另一張海綿，也都不可陷入氣泡，即可把整個轉印三明治卡夾裝好。
  - ◆ 膠片疊到轉印紙時，最好一次成功，不要重作，否則蛋白質色帶可能會印上去，最後產生重疊影像。
- 5) 將轉印三明治置入已經放有一半轉印緩衝液的轉印槽中，注意有轉印紙的那一面向正極 (紅色)，膠片那面向負極 (黑色)。
- 6) 當三明治都放入轉印槽後，以轉印緩衝液蓋滿所有的三明治，小心動一動卡夾，除去附在卡夾內外的氣泡，蓋上蓋子，放到一攪拌器上，打開攪拌器開始攪拌，同時接好電源，裝置完成後放置 10 min。
- 7) 以 400 mA 開始轉印，溫度會漸漸上升，轉印 1.5 h 後中止轉印，取出轉印三明治，打開後依次取出轉印紙及膠片。
  - ◆ 上述轉印條件會使溫度上升至 70~90°C，若有冷卻系統，可把溫度控制設在 5°C；轉印槽內應該加以攪拌，以便使整個溫度分佈均勻。
- 8) 轉印後的膠片可以繼續進行 CBR 染色，看有無蛋白質殘留。若電泳時加有藍色標準蛋白質 marker (SeeBlue)，則可在轉印紙上看到藍色的色帶，確定轉印成功，並可評估轉印效率。
- 9) 轉印紙浸在約 15 mL 尿素洗液中浸洗過夜，期間換三次尿素洗液，並且要溫和搖盪之。
- 10) 若不做免疫染色，則轉印後不用尿素洗液清洗，以清水沖過後改用 amido black (1% 溶於 10% 甲酸) 染色 1 h，再以 10% 甲酸脫色，沖水後晾乾即可，但其靈敏度較低。

## 註解討論：

- a. 轉印時槽內的水溫並不均勻，液面的溫度比底部要高，電流也就不會均勻，注意轉印效果因此會有差異；最好加以攪拌使水溫均勻。
- b. 膠片及轉印紙應切角做記號，以分辨左右或正反面，免得呈色後分不清樣本的次序。
- c. 甲醇可提高至 20%，一般分子量越小，所用甲醇的含量越高；但甲醇含量太高，可能會使分子量太大者不易泳離膠體。

### 4.2.5 免疫染色法：

轉印到紙上的蛋白質抗原，可與其專一性抗體結合，再以二次抗體-酵素結合體 (2nd Ab-HRP) 或 Protein A-HRP 呈色；可在一群轉印色帶中，專一性地挑出目標蛋白質，是最有用的檢定工具 (Burnett,1981)。

#### 藥品試劑：

抗體溶液：可用傳統抗血清或單株抗體，其最適使用濃度，隨抗體效價不同而異，以下為一般適用範圍的參考，均以明膠-NET 稀釋之。

- |                  |                 |
|------------------|-----------------|
| a. 傳統抗血清：        | 1:100 到 1:1,000 |
| b. IgG (冷凍乾燥品)：  | 10~50 µg/mL     |
| c. 單株抗體 (小白鼠腹水)： | 1:200 到 1:5,000 |
| d. 單株抗體 (細胞培養液)： | 原液或 1:10        |

明膠-NET：用來稀釋抗體溶液或酵素連結體

明膠 gelatin	(Merck 4070, 0.25%)	5.0 gm
NaCl	(0.15 M)	17.5 gm
EDTA	(5 mM)	3.6 gm
Tween-20	(0.05%)	1.0 mL
Tris	(Tris base, 50 mM)	12.1 gm

加熱溶解於 1,800 mL 純水後 pH 調到 8.0，再加水到 2,000 mL

#### 酵素連結體：

可使用 2nd Ab-HRP 或 Protein A-HRP，使用濃度每家商品不同，約為 1:1,000 到 1:5,000 之間，以明膠-NET 稀釋之。

#### PBST 洗液

#### DAB 基質溶液：

DAB (diaminobenzidine, Sigma D-5637)	5 mg
--------------------------------------	------

溶於 100 mL Buffer A-0，再加 10 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，新鮮配製，避光貯存。

◆ DAB 為致癌物質，稱量時勿吸入 DAB 細塵，並小心處理秤量紙。

#### 方法步驟：

- 1) 尿素洗過夜的轉印紙再以 10 mL PBST 洗三次，每次約 10 min，均在上述方形培養皿中進行。
- 2) 轉印紙放在明膠 NET 溶液中反應，置室溫中反應 1 h。一般使用方形培養皿當容器，但亦可裝入塑膠袋中反應，較節省試劑用量。
- 3) 反應後，以 PBST 浸洗二次。
- 4) 把轉印紙放在抗體溶液中反應，置室溫反應 1 h。
- 5) 反應後以 PBST 洗三次，改用酵素連結體反應，在室溫下反應 1 h。
- 6) 以 PBST 洗四至五次，注意容器也要洗乾淨。
- 7) 加入 DAB 基質溶液約 10 mL 呈色，儘量避光，並且不時搖動呈色液。
- 8) 數分鐘內可呈色，在背景加深前倒去 DAB，以水沖過數次後晾乾。

## 註解討論：

- a. 非專一性的呈色經常會造成困擾，此問題可用尿素洗液解決，尿素可洗去 SDS，且使蛋白質或胜肽回復其構形或抗原性。
- b. DAB 呈色時，應含有一不會呈色之負對照組作為比較；當樣本含有標準分子量的組合時，其蛋白質色帶應不會呈色。

## 參考文獻：

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248~254
- Burnett WN (1981) *Anal Biochem* **112**: 195~203
- Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT ed (2005) *Current protocols in protein science* (Vol. 1) John Wiley & Sons, Inc.
- Deutscher MP ed (1990) Guide to protein purification (Methods in Enzymology, Vol. **182**) Academic Press, Inc.
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986)  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8447~8451
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680~685
- Protein Liquid Chromatography (2000) Kastner M ed, J Chromatography Library Vol **61**, Elsevier
- Scopes RK (1994) Protein purification - Principles and practice, 3rd ed, Springer-Verlag
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350~4354
- 莊榮輝 主編 (2005) 酵素化學實驗。台灣大學生化科技學系  
參考網頁：酵素純化與分析 (<http://juang.bst.ntu.edu.tw/ECX/index.htm>)

## 致謝：

感謝台大生化所張震東教授對於本章內容，以及在教學與技術上的建議及指正。

