

5 蛋白質定量：

請注意以下三點酵素與蛋白質定量的基本問題：

a. 蛋白質量與酵素活性不必成正比：

酵素是一種蛋白質，因此測定純質酵素樣本中的蛋白質量，大致可說是該酵素的含量。但須注意酵素是具有活性的分子，蛋白質含量很高的，不見得活性就高。

b. 慎選標準品：

蛋白質定量需要一已知的標準品，以求得標準曲線，一般採用白蛋白 (albumin) 或免疫球蛋白 (immunoglobulin)，使用不同的標準品所得到的結果，會有極大的差異。

c. 注意干擾因子：

樣本中的雜質或緩衝液都可能影響定量，因此檢測時濃度較高的樣本，所得結果可能會低估，而稀釋倍數較大的樣本，因所含干擾物質被稀釋，測定值比較可靠。

5.1 Biuret 法：

銅離子在鹼性溶液中，可與蛋白質胾鏈上的 carbonyl 基結合，生成紫色複合物，兩個 carbonyl 與一個銅離子結合成類似雙縮脲 (biuret) 複合體，因此若蛋白質濃度越濃，其呈色就越高。然而其精確度較差 (數 mg)，且受到樣本中硫酸銨及 Tris 干擾，但準確度較高且不受蛋白質的種類或成分之影響。後來由 biuret 法發展出更靈敏的 BCA 呈色法，利用兩分子 bicinchoninic acid 與結合在蛋白質上的銅離子反應，進一步的呈色使精確度大大提升。

5.2 Lowry 法：

也是上述 biuret 呈色法的延伸，當銅離子與胾鏈形成複合物後，可再與 Folin-Ciocalteu 試劑的 phosphomolybdic-phosphotungstate 作用產生藍色物質，蛋白質中的芳香族胺基酸也會與 Folin-Ciocalteu 試劑結合呈色，因此比 Biuret 更靈敏 (約 0.1 mg) 但反應步驟較多，也受到硫酸銨及硫醇化合物的干擾。步驟中各項試劑的混合，要特別注意均勻澈底，否則可能有大誤差。

5.3 UV 吸光法：

a. 芳香基團：

胺基酸的芳香基團在 280 nm 有吸光，蛋白質胾鏈骨架上的 carbonyl 基團在 206 nm 附近有吸光，蛋白質濃度越濃則吸光度就高。由於各種蛋白質所含芳香族胺基酸組成不一，在 280 nm 的吸光能力亦不同，可以分子消光係數 (molar extinction coefficient) 表示。

b. 分子消光係數：

一般以 E (1%, 280 nm) 來表示，大部分蛋白質在 4~15 間 (平均為 10)。若某蛋白質 E 值為 10，其溶液在 280 nm 吸光值為 1，則此蛋白質的濃度為 1 mg/mL。可以下式計算：

$$\text{吸光值} = E \times b \times c$$

(c 為蛋白質 % 濃度，即每 100 mL 所含蛋白質的克數；b 為光徑 1 cm)

c. 略估蛋白質濃度：

此法只有在蛋白質純度很高時，才能精確測定，但若將普通蛋白質的 E 值平均定為 10，則對粗抽取液的略估相當方便：在 280 nm 的吸光值為 1 時，濃度約為 1 mg/mL。

5.4 Coomassie Blue (dye binding) 法：Bradford Method

Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG) 在過氯酸溶液中呈紅棕色，但與蛋白質結合後則變成藍色，呈色可測 595 nm 波長的吸光。此法方便靈敏 (數十 μg)，且可使用微量滴定盤進行分析，降低試劑用量，方便大量樣本的操作。請注意電泳膠片染色所用的 Coomassie Brilliant Blue 是同系列的另一種 R 產物 (CBR)，顏色稍偏紅，與 CBG 用途不同。

5.5 其它方法：

有些蛋白質含有特殊的非蛋白質基團，如 peroxidase 含有 heme 基團，可測 403 nm 波長的吸光來定量之。含有特殊金屬的酵素 (如銅)，則可追蹤該金屬。

圖 5.1 各種蛋白質定量法原理

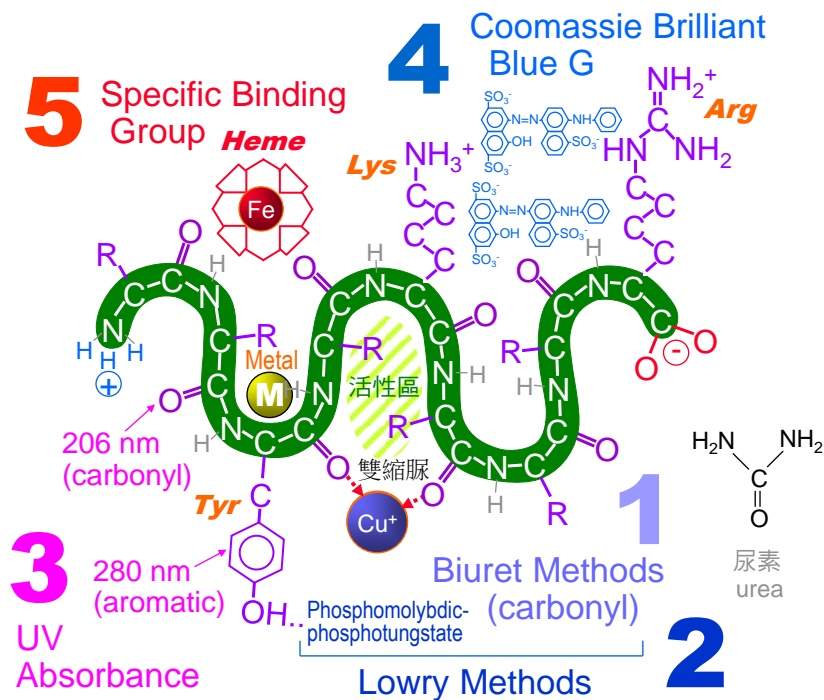


圖 5.1 說明各種蛋白質定量方法所根據的原理，目標蛋白質在中央以捲繞的綠色粗線表示，其上並標出蛋白質的脊骨 (-N-C-C-N-C-C-)，胺基酸上的幾種官能基團 (Lys, Arg, Tyr 等)，都可被用來作為定量的根據。

問題集 (每個問題不一定都有標準答案，甚至會引起很大的爭議，但這就是問題集之主要目的)

1. 寫出下面一小段胜肽的分子構造，請指出所含有的特殊化學基團，並以此說明對其立體構形所造成的影響。 [5]

Glu-Cys-Ala-Trp-Lys-Phe-Cys-Asn-Leu-Tyr-Tyr-Gly

2. 請查出各種蛋白質定量方法，並做表註明以下各項特徵或性質：[1]
定量反應的原理、靈敏度範圍、專一性、所測的波長、反應所受的干擾、優缺點
3. 某蛋白質的 $E_{1\text{mg/mL}}^{206\text{nm}} = 31$ ，當測得 206 nm 的吸光為 1.0 時，此蛋白質濃度多少？ [3]
4. 某蛋白質 X 的分子量為 10 kD，已知其分子消光係數 ($E_{1\text{mM}}^{280\text{nm}}$) 為 20，若你測得該蛋白質溶液在 280 nm 的吸光值為 1，則此溶液的蛋白質濃度應為若干 mg/mL？ [4]
5. 以 UV 吸光度定量蛋白質時，樣本的純度要很高才有意義；但另一方面來說，對於一個粗抽取液的蛋白質樣本，也可以用吸光度來測定其濃度，且通常不會偏差太多，請討論其意義如何？ [3*]
6. 請詳細說明 Coomassie Brilliant Blue 蛋白質定量的呈色原理。 [1]
7. Biuret 反應的原理如何？為何稱為 Biuret reaction？ [1]
8. 某蛋白質並無方便的活性或定量方法，但其分子含有鎘，可如何追蹤此蛋白質？ [2]
9. UV 280 nm 與 206 nm 都可用來定量蛋白質，但其所根據機理不同，請說明其優劣點。 [2]
10. 那幾種蛋白質定量法最準確，不會受到所含胺基酸組成的不同所影響？ [2]
11. 常用的 Coomassie Brilliant Blue 蛋白質定量法要以標準蛋白質做比對，定量結果會因所用標準品不同而有偏差，請問為何？如何避免之？ [3*]
12. 某非極性蛋白質需要界面活性劑 (0.1% Triton X-100) 做為溶入劑，因此所有的緩衝液都含有 Triton。在進行 Coomassie Brilliant Blue 定量蛋白質時，發現不管樣本中有無蛋白質，都呈現很高的呈色反應，請問是發生了何種問題？如何改善之？ [2*]

[題目後面方括號內的數字代表該題的難易程度，3 為中等而 5 最難回答，標有 * 為實際問題]

