

7 電泳檢定法：

7.1 電泳原理：

7.1.1 蛋白質的泳動率：

a. 泳動率：

帶電分子在電場中會被電流緩慢移動，是為泳動，其泳動程度的大小稱為泳動率 (mobility)。泳動率與分子上電荷密度成正比，而與其分子的摩擦力成反比：

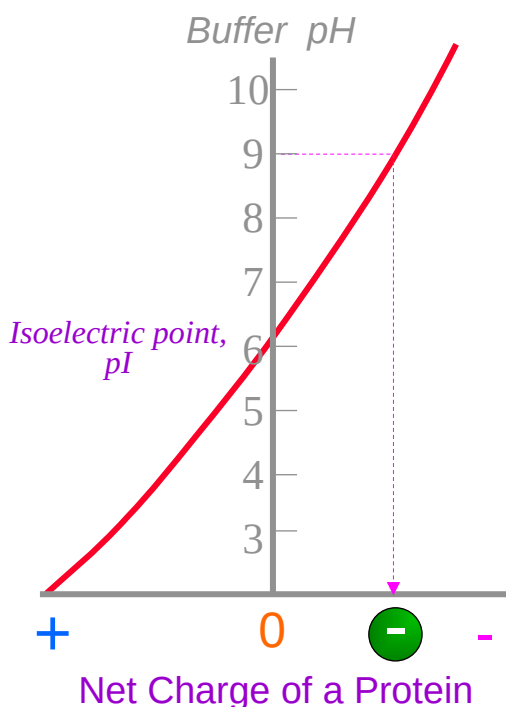
$$\text{泳動率} \sim \frac{(\text{所外加電壓 mV}) \times (\text{分子之淨電荷密度})}{\text{分子與介質間之摩擦力}}$$

上述之摩擦力，決定於此分子之大小、形狀。分子量大小者摩擦力大，泳動率小；而球形分子摩擦力較小，泳動率大。

b. 蛋白質的帶電性：

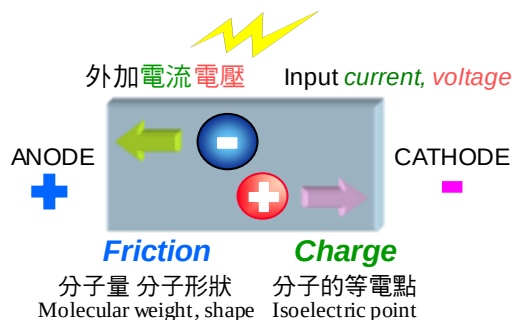
蛋白質分子所帶的淨電荷，取決於環境 pH 的高低。若環境 pH 高於其 pI，此蛋白質帶淨負電，反之帶正電；若剛好等於 pI，則淨電荷為零 (正電數目等於負電)。因此同一分子在不同 pH 環境下，可能帶有不同淨電荷 (圖 7.1)。

圖 7.1 環境影響分子的帶電性質



c. 蛋白質大多由負極向正極泳動：

在電泳系統中電子由負極流向正極，因此帶負電的分子會跑向正極，帶正電的分子往負極跑，不帶電者則不易泳動。大部分電泳系統的 pH 定在 8.3，因為大多數蛋白質的 pI 都小於 8.3，因此都帶負電往正極跑，但若蛋白質 pI = 8.3 就跑不動。



d. 條件影響泳動率的外在因素：

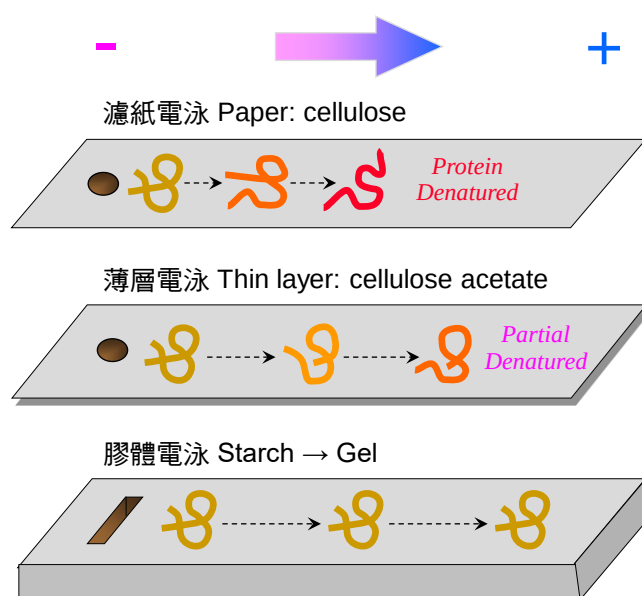
促進泳動：低膠體濃度 (孔徑大)、低濃度緩衝液、高電壓、高電流、高溫。

降低泳動：上述各點的相反條件、樣本含高濃度鹽類、樣本 pH 太高或太低。

7.1.2 電泳種類：

電泳需有一介質，作為電泳之場所 (圖 7.2)。最早是在溶液中進行，但因溶液的擴散現象大，故改用噴濕的濾紙。後來又因為濾紙與分子間的吸引力大，導致摩擦力太大而發熱嚴重，故現今都用半固態的膠體。

圖 7.2 電泳形式的演進



Historical evolution of electrophoresis design

a. 全液相電泳 (moving-boundary electrophoresis)：

如上述已甚少使用，但有些特殊的大量製備式裝置仍使用類似原理。

b. 帶狀電泳 (zone electrophoresis)：

使用固相或膠體的電泳介質，蛋白質樣本電泳後，在介質上呈現帶狀 (band 或稱色帶)，故稱之。

(1) 濾紙電泳：

濾紙纖維素的吸附性大，蛋白質很容易變性失活，因此多用在小分子樣本 (如胺基酸) 或雙向勝肽電泳 (蛋白質先經水解成勝肽片段)，可得其勝肽圖譜。

(2) 薄層電泳：

以化學方法修飾纖維素的醇基 (乙酸化) 成為粉末狀 cellulose acetate，再製成懸濁乳液塗佈在玻璃片上，形成一薄層以進行電泳，可降低對蛋白質的吸附。

(3) 膠體電泳：

組成膠體的分子長鏈間，有相當大的空間讓蛋白質泳動，並降低與蛋白質間的摩擦力，且可增大樣本體積，適用於巨分子，如核酸及蛋白質。有以下三種方式：

澱粉膠體電泳 (starch gel electrophoresis)

聚丙烯醯胺電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

洋菜糖膠體電泳 (agarose gel electrophoresis)

c. 其它電泳技術：以下技術大多會在其他各章節中說明

- (1) 等電聚焦法 (isoelectric focusing)：根據蛋白質的等電點不同來做分離。
- (2) 胜肽圖譜 (peptide mapping)：不同的蛋白質有不同的胜肽圖譜。
- (3) 蛋白質轉印 (Western blotting) → 免疫染色 (immunostaining)
- (4) 製備式電泳 (preparative electrophoresis)：可以純化高純度蛋白質。
- (5) 免疫電泳 (immunoelectrophoresis)：電泳後再以抗体與抗原反應，可產生沉澱線，也是有兩個次元 (電泳、雙向免疫擴散)。
- (6) 毛細管電泳 (capillary electrophoresis)：最新的電泳儀器，有點像 HPLC。
- (7) 脈衝場電泳 (Pulse field gel electrophoresis)：利用電場往復脈衝來分離長條巨型分子，可做大分子 DNA 甚或整條染色體之分離。

7.1.3 電泳設備及系統選擇：

- a. 電源供應器：大約 100~500V 者即可適用，但等電聚焦法則需數千伏特。
- b. 電泳槽：垂直或水平、柱狀或平板、普通 (16×20) 或最常用的 迷你型 (8×10)。
- c. 系統選擇：上面各種電泳方式，各有其適用對象，請見表 7.1 的分類。

表 7.1 各種電泳形式的選擇與用途：

型 式	鑄 膠 法	介 質	樣 品
垂 直	柱狀或平板	聚丙烯醯胺	蛋白質
水 平	平 板	洋 菜	核酸、異構酶
垂 直	垂直平板	上述二者混合	核酸 (定序用)

7.2 聚丙烯醯胺膠體電泳：

聚丙烯醯胺膠體電泳 PAGE 是最普遍的蛋白質電泳方式，以下各段分別說明 PAGE 的種類、構成與電泳原理，以及實驗操作可能遇到的問題與解決方法。

7.2.1 PAGE 種類：

a. 原態膠體電泳 (disc-PAGE) 及活性分析：

Disc-PAGE 是 PAGE 系列的最基本型式，蛋白質以原態進行電泳，因此酵素活性在電泳後得以保留，可繼續在膠片上直接做活性測定或染色。若能收集到膠體上的蛋白質，則亦可用來製備酵素。因為樣本蛋白質保持在原態下，所帶的電荷、分子大小、分子形狀等，對其泳動率均有影響，與下述 SDS-PAGE 不同。

b. SDS 膠體電泳 (SDS-PAGE) 及分子量測定：

SDS 是界面活性劑，可使蛋白質變性，並在分子表面均勻塗佈上一層負電荷，因此在

SDS-PAGE 系統中，樣本分子的泳動率，僅取決於其分子量，而與原來分子所帶的電荷無關，故 SDS-PAGE 可用來測定變性狀態下 (denatured) 蛋白質之分子量，與原態 (native) 分子量可能不一樣。

c. 梯度電泳系統：

垂直梯度電泳使用由稀到濃的漸進膠體，膠體中的孔徑由上到下逐漸變小，樣本中分子量越小的分子，就可跑得越下面，因此它可說是依分子量大小來分離的。但需注意許多 pI 大於 8.3 的蛋白質，在電泳 pH 條件下所帶的淨電荷為正，在膠體中根本不會泳動。梯度電泳也可加入 SDS，成為 梯度-SDS-PAGE，則解析度將會大大的增強，是最理想的電泳型式。但梯度的操作步驟相當繁複，因此很少在實驗室中進行。

7.2.2 PAGE 膠體組成：

7.2.2.1 膠體主要成分：以下這些成份共同組成了膠體

- 單體分子 (monomer)：丙烯醯胺 (acrylamide)， $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ 。
Acrylamide 及下面的 Bis 都有神經毒性，操作要帶手套，並避免吸入塵埃。
- 架橋分子 (bridge)：Bis [*N,N'*-methylene-bis(acrylamide)] 可看成兩個丙烯醯胺單體分子連結在一起，凝膠時可形成分叉點，以變構成膠體的立體結構。
- 游基 (free radical) 產生者：通常使用 過硫酸銨 (ammonium persulfate, APS) 或者 riboflavin (即 維生素 B₂)，注意 APS 很容易失效。
- 催化劑：TEMED (tetramethylethylenediamine) 幫助上述游基電子之傳遞。

7.2.2.2 鑄膠反應：有三種基本反應

- 游基形成：靠上述 游基產生者 生成游基，再使單體分子成為游基型式。
- 聚合反應：成為游基的單體再首尾相接，以連鎖反應形成大分子的長鏈。
- 交錯連結：若架橋分子加入上述聚合反應，則可分叉形成網狀三次元結構。

7.2.3 PAGE 系統解剖：

7.2.3.1 電泳系統的組成：PAGE 膠體的組成有點複雜，而且不是連續或均質，有其重要功能。

表 7.2 電泳膠體系統的組成部份：

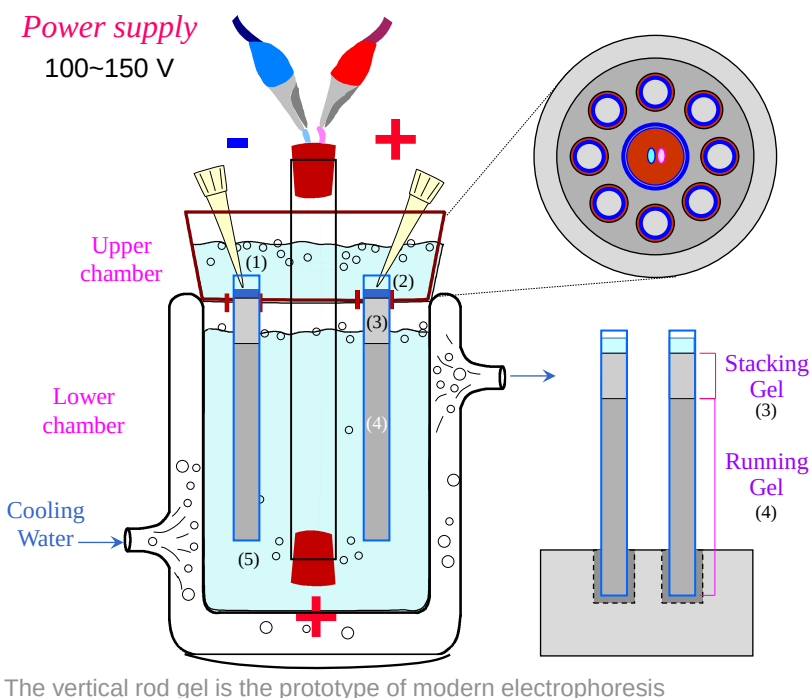
	電 泳 系 統		緩 衝 液	pH	膠體濃度
1	上層 (負極) 緩衝液		Tris-glycine	8.3	-
2	樣本溶液		Tris-glycine	8.3	-
3	膠	焦集膠體	Tris-HCl	6.9	5%
4	體	分離膠體	Tris-HCl	8.3	5~20%
5	下層 (正極) 緩衝液		Tris-glycine	8.3	-

- 只有 3, 4 兩部分是膠體，各層的緩衝液成份不盡相同，其 pH 也有點差異。注意 膠集膠體 (3) 的 pH 較低 (pH 6.9, 是 glycine 的 pI)。這些差異造成很重要的效果，

使得樣本在通過聚焦膠體時，可產生 聚焦作用，使原來體積很大的樣本溶液，聚集成一薄層 (disc)，可增加解析度。

- 以直立式柱狀電泳為例，電泳膠柱如圖 7.3 的組成，玻璃管內的下方為分離膠體 (4)，其上則為聚焦膠體 (3)。聚焦膠體上方的空間 (2)，可供灌注樣本溶液。膠柱上下兩端，分別接兩極的緩衝液槽 (1) 及 (5)，以連結電源 (注意正負方向)。
- 除了上述的柱狀電泳外，目前大多使用平板式電泳，可分為直立式或水平式。應用在蛋白質時，以直立平板式的聚丙烯醯胺膠體為最多。若用在核酸，則以水平平板式洋菜糖膠體較普遍。

圖 7.3 直立式電泳裝置



7.2.3.2 電泳的聚焦作用：

請注意下面三種分子 (如右)，在電泳的表現：

Glycine：圖中以黑點 (當環境 pH > 6.9 時，帶負電) 或白點 (當環境 pH = 6.9 時，為不帶電之 zwitterion) 表示。

氯離子：以斜線部分表示。

樣本分子：以兩種大小蛋白質為例。

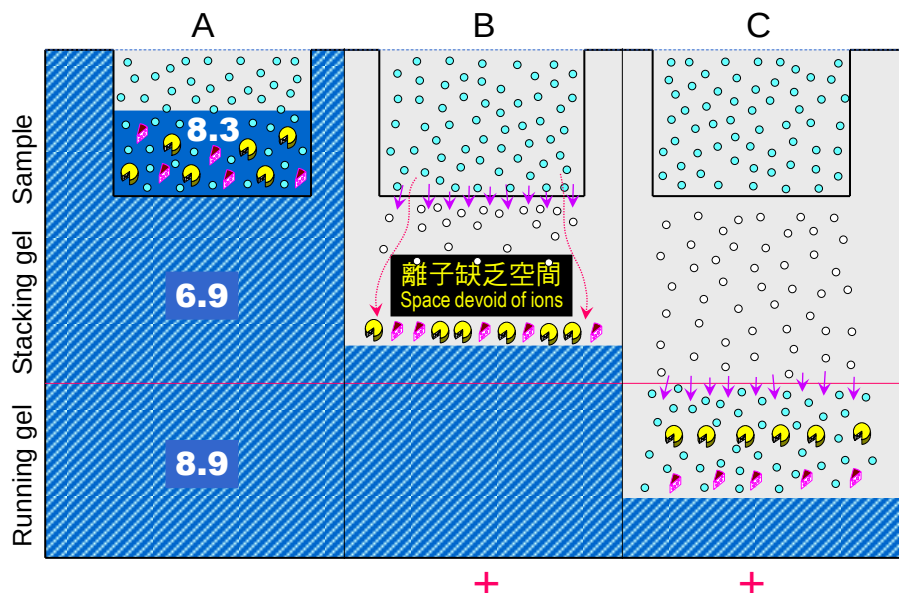
Glycine: Negative charged	●
No net charge	○
Chloride ion:	
Proteins:	Small molecule Large molecule

- 圖 7.4A：上述組成電泳的五個部分中，只有膠體的緩衝液含氯離子，而樣本溶液中則含有 Gly，沒有氯離子。
- 注意 樣本溶液-聚焦膠體-分離膠體 三段 pH 是不連續性的，其 pH 分別為 8.3-6.9-8.9，而 Gly 的 pI 恰為 6.9。
- 圖 7.4B：電泳一開始 Gly 進入聚焦膠體，立刻變成不帶電的分子 (白點)，泳動率變小，同時氯離子則很快往正極泳動，因此在氯離子與 Gly 之間有一段缺乏離子的空間，電壓變得很高。
- 然而兩電極之間，要有負離子來帶動電流，此時只得利用蛋白質來傳導。而聚焦

膠體中的孔隙較疏，於是樣本蛋白質不論分子大小，在此離子缺乏空間，全部快速往正極泳動，一直碰到氫離子的尾端而聚集成一薄層，產生濃縮效果。

- e. 圖 7.4C：Gly 還是可以慢慢通過聚焦膠體，變回負離子，離子缺乏帶瓦解，蛋白質泳動到分離膠體後，開始依其分子量、電荷等因素泳動。

圖 7.4 聚焦膠體的作用原理 How stacking effect works



7.2.3.3 兩種電泳系統比較：

表 7.3 及圖 7.5 以三個虛構的蛋白質為樣本，說明 disc-PAGE 及 SDS-PAGE 兩種電泳性質上的異同，以及電泳結果的差別 (也可參考問題集第 32 題)。

- a. 假設有三個蛋白質 X, Y, Z，原態分子量大小依次為 $X > Y > Z$ ，在一般電泳的 pH (8.3) 條件下，X 及 Y 的淨電荷為負 ($pI < 8.3$)，而 Z 的淨電荷為正 ($pI > 8.3$)。

表 7.3 三個假設蛋白質的性質比較：

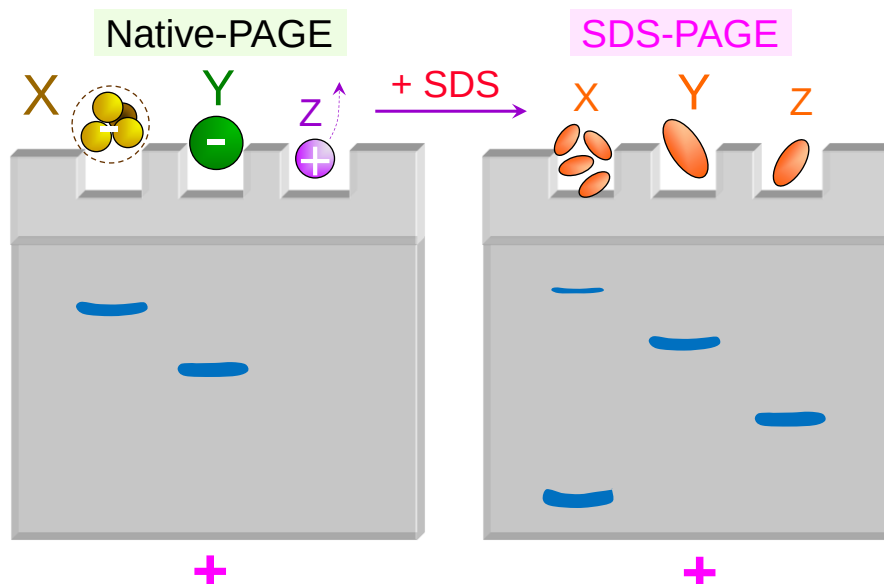
Protein	Quaternary Structure	Molecular Mass (D)	pI	Mobility	
				Native PAGE	SDS-PAGE
X	Tetramer	$(40,000) \times 4$	5.8	慢	快
Y	Monomer	88,000	5.2	快	慢
Z	Monomer	60,000	9.3	往上	中等

- b. 在 native-PAGE 只有 X, Y 會往正極跑，而 Z 卻往負極跑，在膠體中就看不到 Z。而 X 的原態分子量最大 (160 kD)，因此跑得比 Y 慢。(圖 7.5 左側膠片)
- c. 在 SDS-PAGE 系統中 X, Y, Z 先以 SDS 處理過，表面均勻地敷上一層 SDS 負電 (有相同電荷密度)，則原先的分子電荷完全被蓋掉。(圖 7.5 右側膠片)
- d. 在 SDS 膠體中進行電泳時，由於 X, Y, Z 分子表面均帶負電，所以都往正極跑。又因三者的電荷密度一樣，影響其泳動率的因素，只剩下了分子量一個因素，造成分子量小的泳動率較大，而分子量大的泳動率較小，因此 Z 跑得比 Y 快。
- e. 分子 X 的原態分子量大於 Y 或 Z，但其分子為四元體，而在 SDS-PAGE 中，此四

元體會被 SDS 分解成為單元體，其單元體分子量 (40 kD) 小於 Y 或 Z，反而表現出最快的泳動率。

- f. 在 SDS-PAGE 系統中，若 SDS 的處理條件較緩和，或樣本蛋白質較不易變性者，在電泳結果上，有可能會出現原態分子量的 X 四元體 (160 kD)。

圖 7.5 影響泳動率的因素 Molecular weight & charge



7.2.4 結果不佳時：

a. 膠體不凝結：

檢查 ammonium persulfate, TEMED, acrylamide 等試劑品質是否良好，或是 APS 濃度太稀。室溫太低亦不易凝結，要稍微加高 APS 濃度。

b. 膠體凝結不良：

當膠體成為半固体粘液狀時，檢查膠體溶液的百分比對否？是否忘了加 Bis？所用的 acrylamide 品質是否良好？

c. 下雨：

染色後若有許多垂直細線 (下雨)，可能是膠片中有小氣泡，或是樣本中有不溶物質，或所用樣本溶液中的 β -mercaptoethanol 品質不佳。若 acrylamide 溶液變質，產生固体微粒，也可能出現下雨現象。

d. 色帶扭曲：

染出的色帶形狀扭曲 (如波浪狀)，可能是蛋白質溶解度不好，或樣本中含太高的鹽類。凝膠不均勻時，也會有色帶扭曲的現象，可能是 APS 沒有溶解完全。

e. 樣本干擾物質：

色帶擴散太過，有嚴重拖尾現象或左右拉寬，可能是樣本液的 pH 不對 (一般是過酸)，或者樣本中的鹽濃度太高。

f. 溫度不均：

膠片左右兩邊泳動的速度不一時，請檢查跑得慢的那個方向，有無冷氣或風扇吹來，降低那一邊膠片的溫度。

g. 無焦集作用：

色帶太粗，似無焦集作用，檢查焦集膠體溶液的 pH 是否確實為 6.9。

h. 清理樣本槽：

有時電泳膠片的結果看起來就是不好，但找不出主因，請試著在注入樣本前，特別在每個樣本槽內，用微量針筒灌入緩衝液洗過數次 (像刷牙一樣)，因為樣本槽內可能殘留著凝膠後的化學物質，若沒有洗淨就可能造成原因不明的膠片缺陷。

7.3 其它相關技術：

7.3.1 染色及乾燥：

膠片在電泳後要進行染色，才能看到樣本蛋白質所呈現的色帶。圖 7.6 說明數種常用的蛋白質染色法機制 (圖中數字連結本文中各染色法)。

a. 一般染色法：

(1) 硝酸銀 (ammoniacal silver) 染色：

以銀氨錯離子形式與蛋白質結合，銀離子再還原成金屬銀的深褐色。其靈敏度比下述 CBR 染色法高十至百倍，但步驟較繁複。

(2) Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR) 染色：

最常用的染色法，快速而方便，靈敏度中等。利用 CBR 上的芳香基團與蛋白質的非極性區結合，以及所帶負電與蛋白質的正電基團結合。注意染色用的 Coomassie Brilliant Blue 為 R-250，不要誤用 G-250，後者用在蛋白質定量。

b. 醣蛋白：

醣蛋白 (glycoprotein) 上糖類分子的相鄰醇基 (diol)，可用過碘酸氧化成醛基後，再加入 (3) PAS (periodic acid-Schiff's) 試劑染成紅色，靈敏度比 CBR 低，請步驟很繁複。前述的醛基也可改用硝酸銀染色，後段的步驟稍有不同，靈敏度比 Schiff 試劑高。

c. 紫外線照射：

製備式電泳後，可用 UV 300 nm 照射之 (4)，蛋白質會呈現暗紫色色帶，但不靈敏。

d. KCl 沈澱法：

SDS-PAGE 中濃度較高的色帶可以用 0.3 M KCl 在 4°C 下浸泡 15 min (5)，蛋白質會呈現白色混濁，因為 SDS 遇鉀形成 KDS 溶解度下降之故，靈敏度也不佳。

e. 活性染色法：

若酵素反應會產生不溶性的有色物質，則可進行活性染色 (6)，但多數酵素須以原態 PAGE 膠片進行。可惜大部分的酵素，均無法產生有色的生成物，則可把膠片分割，橫切成單位小片 (disk)，每小片放入試管，再以一般的活性測定法，在試管中加入基

質液，分析每小片所含的酵素活性。這種固相酵素的反應，可以拉長反應時間，以提高生成物濃度，方便偵測到活性。

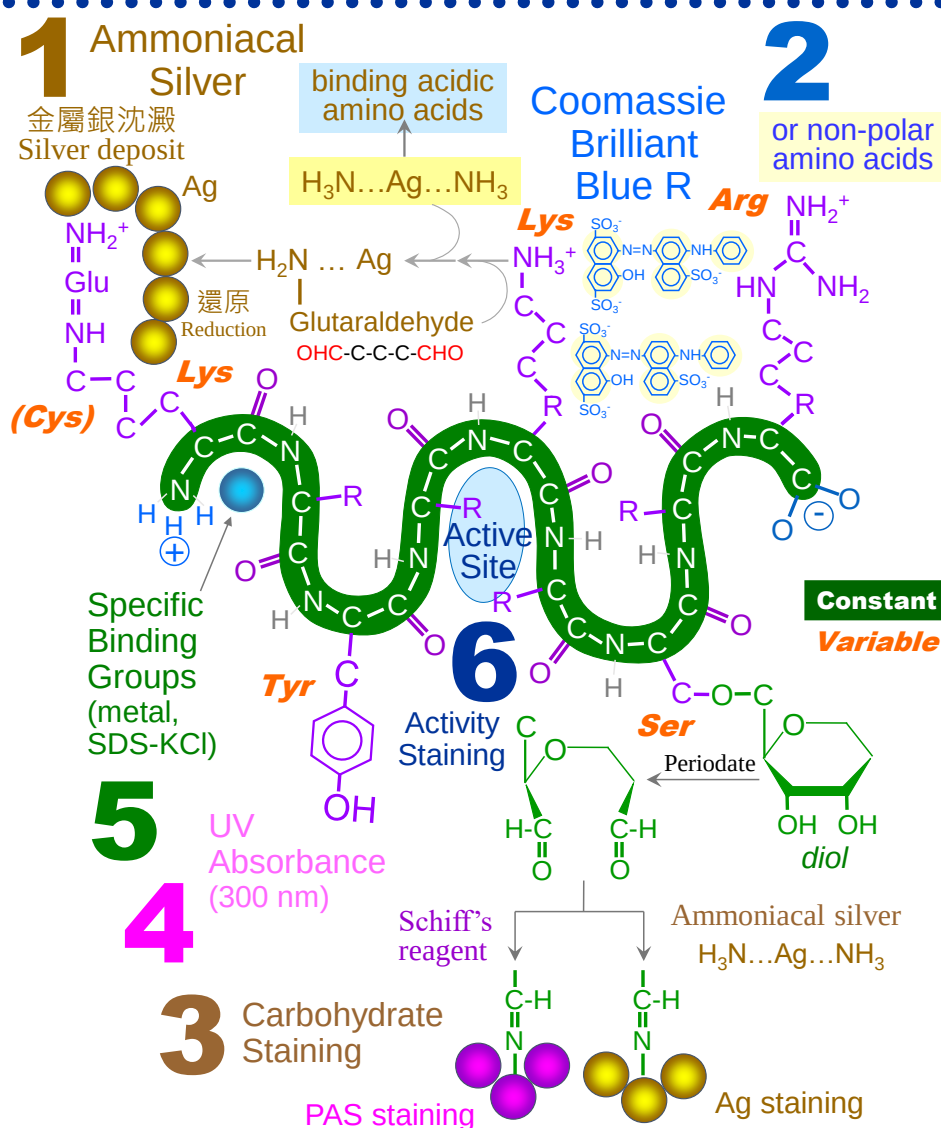
f. 放射顯像法 (autoradiography) :

可檢測樣本中的放射性物質，但要以 X 光片壓片顯影。

g. 膠片乾燥法 :

大部分的膠片均可利用 玻璃紙三明治法 進行乾燥，效果相當良好，商品的膠片乾燥機 (gel dryer) 不是必要設備。乾燥後的膠片，經過熱膠膜護貝後，可以長期保存。

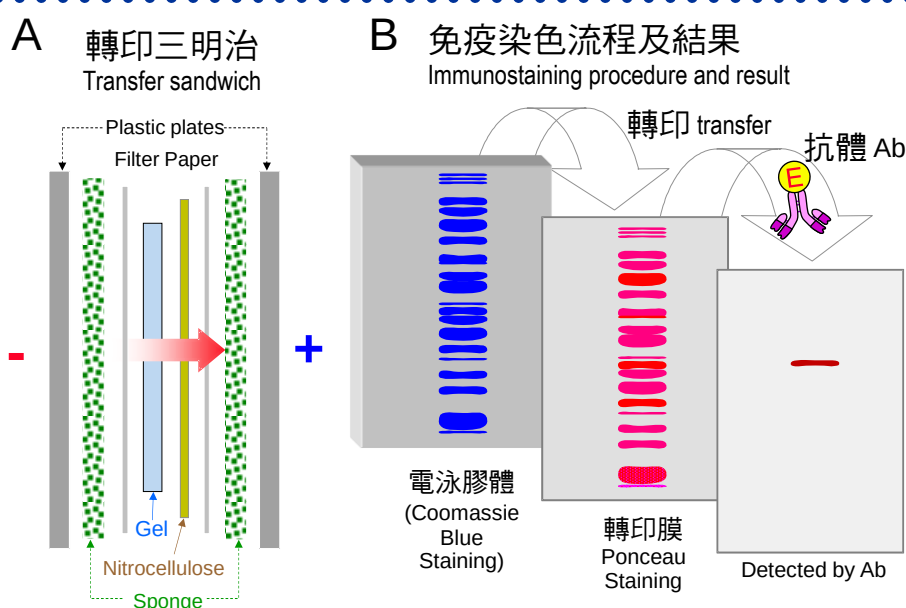
圖 7.6 各種蛋白質染色法機制 Staining methods



7.3.2 蛋白質轉印法：

- 電泳後若要對膠體上的蛋白質色帶進一步檢定，則先轉印到 硝化纖維 (nitrocellulose) 紙 (圖 7.7A 轉印三明治)，因為膠片無法直接進行操作。近年來多以 尼龍 (nylon) 取代硝化纖維紙，質地較韌、背景呈色也較低。
- 轉印到硝化纖維紙上的蛋白質，可先用 ponceau 或 amido black 染成紅色或黑色，再以免疫染色法 (immunostaining) 專一性地染出目標分子 (圖 7.7B)。
- 轉印以後的蛋白質色帶，在定位後可以剪切出來，直接進行其胺基酸定序。

圖 7.7 轉印及免疫染色 Protein transfer and staining



7.3.3 等電聚焦法 (IEF)：

Ampholyte 是一種化學物質混合物，含有各種連續 pI 的小分子。若在聚丙烯醯胺膠體內加入 ampholyte，通電後 ampholyte 會在膠體中形成連續 pH 梯度，當樣本中的蛋白質泳動至相等於其 pI 的 pH 位置時，其淨電荷變為零 ($\text{pH} = \text{pI}$)，因而聚焦於該處不動 (圖 7.8)。因此 IEF 是依樣本分子 pI 的不同來進行分離，其解析力非常好。

7.3.4 二次元電泳：

第一次元先在垂直式的柱狀膠體上做 IEF，跑完後取出膠柱，水平放到平板式 SDS-PAGE 的膠片上方，再進行第二次的電泳 (圖 7.9)。二次元電泳可分析複雜的樣本，如細胞內的全部蛋白質或勝肽圖譜，亦可轉印到硝化纖維紙後，再以抗體做免疫染色。第一次元也有人用 disc-PAGE，有其特殊分離效果，也比較方便 (參考問題集第 33 題)。近年來，因為蛋白質體學 (proteomics) 的蓬勃發展，二次元電泳成為分析蛋白質體的重要工具，用來比對複雜蛋白質體之間的變化情形。

圖 7.8 等電聚焦法的聚焦方式

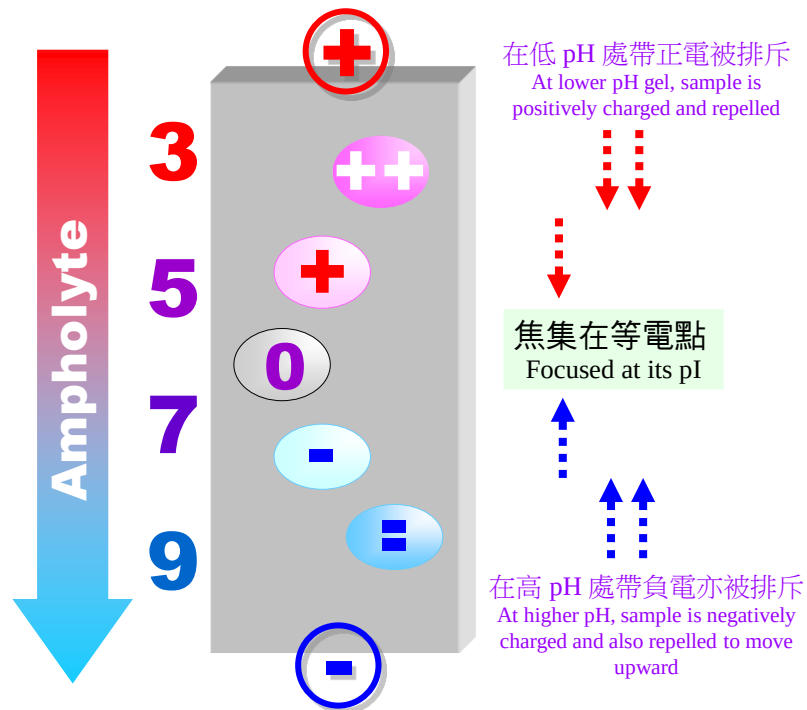
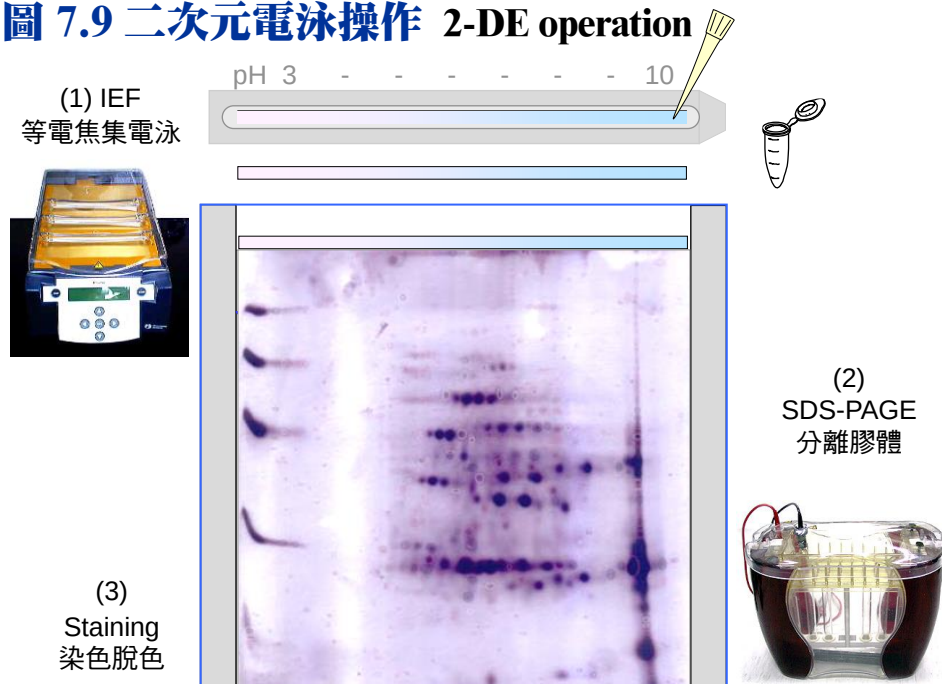


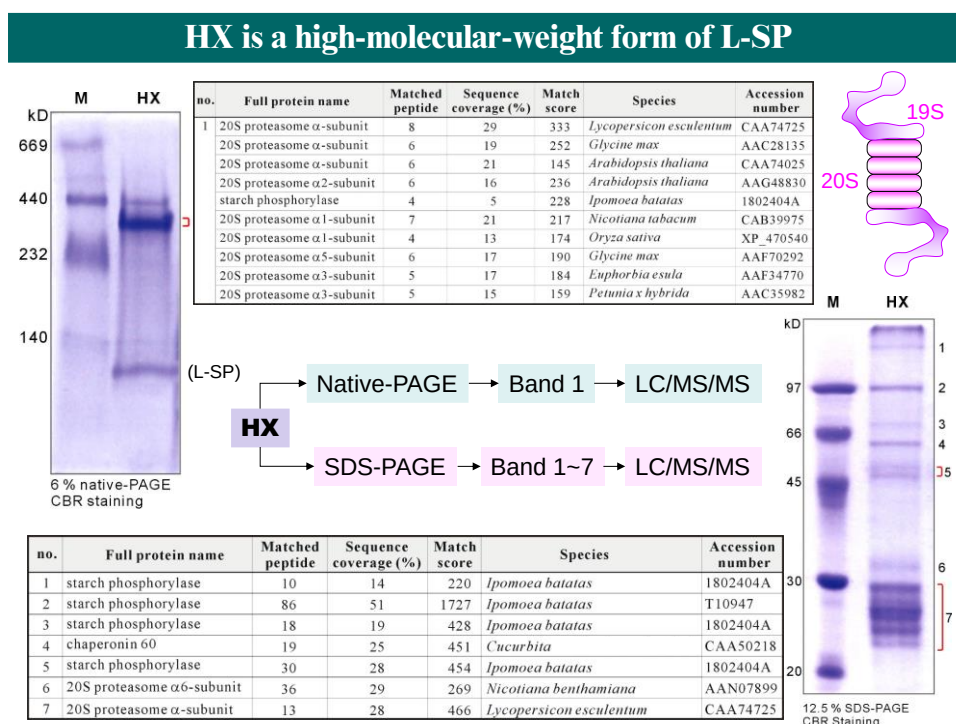
圖 7.9 二次元電泳操作 2-DE operation



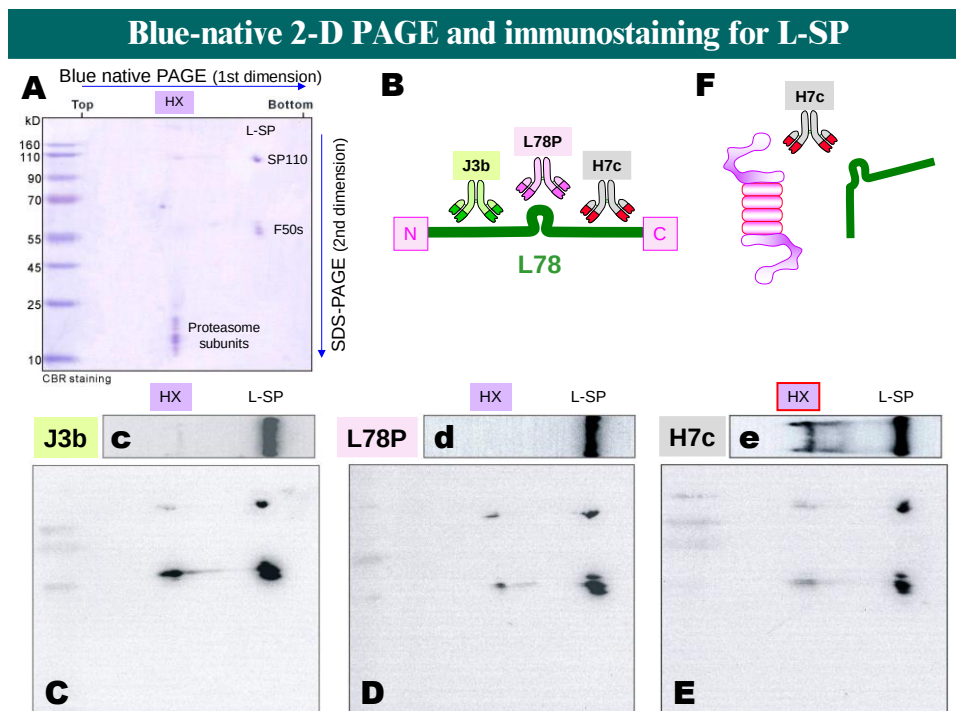
問題集 (每個問題不一定都有標準答案，甚至會引起很大的爭議，但這就是問題集之主要目的)

1. 那些外在因素影響蛋白質在膠體電泳中的泳動率？ [1]
2. 正負電極槽的緩衝液有一定使用濃度，某生不小心錯泡為十分之一濃度，會有什麼結果發生？ [3]
3. 電泳時溫度過高時，對電泳結果會有什麼影響？ [2]
4. 請詳述整個 PAGE 電泳膠體的鑄膠過程，及其凝膠機制。 [1]
5. PAGE 中有一層聚焦膠體，它是如何把樣本蛋白質聚焦成一細線的？ [2]
6. 相差一個核苷酸的兩段短核酸 DNA，有無可能用電泳分離開來？ [3]
7. 為何樣本中含有太高鹽類，或 pH 太低，均會影響電泳結果？ [2]
8. 為何蛋白質不適合使用濾紙或 TLC 作為電泳介質？ [2]
9. 原態電泳 (disc-PAGE) 中，是否所有的蛋白質樣本都會往正極跑泳動？ [1]
10. Disc-PAGE 比起 SDS-PAGE 有何優點？又有何缺點？ [2]
11. 以 SDS-PAGE 分析一具有四元體的蛋白質酵素，有無可能看到該四元體的色帶？ [3]
12. Disc-PAGE 以梯度鑄膠，可以用來分析蛋白質的原態分子量，但請問有何限制？ [4]
13. SDS-PAGE 的樣本要用 SDS, β -mercaptoethanol 及加熱處理，各有何作用？ [2]
14. 以 SDS-PAGE 可以測得蛋白質的分子量，就蛋白質本身的胺基酸組成而言，有那些因素會影響所測得分子量的準確性？ [3]
15. 若你要分析的異構酶群族具有很廣汎的 pI，例如由 4 到 11 都有，則使用 disc-PAGE 能不能看到所有的異構酶？你應當進行何種電泳才能看到所有的異構酶？ [4]
16. 進行電泳時，固定電壓、電流或電功，分別對電泳過程或結果有何影響？ [4]
17. 洋菜多在為水平式電泳，PAGE 多用在垂直式，為什麼？ [4*]
18. Acrylamide 常有不溶性的雜質，需以過濾去除，否則電泳結果會有何種問題？ [2]
19. 樣本中各種成份對電泳結果影響很大，請問下列物質或處理對電泳的影響為何？ [3]
(a) 0.5 M NaCl, (b) 0.05 M KCl, (c) 樣本 pH = 3.0, (d) 樣本蛋白質 = 10 mg/mL
20. 請說明各種呈色方法的原理：Coomassie Blue, Silver staining, PAS staining。 [1]
21. 有那些方法可以在膠片中染上蛋白質色帶的碳水化合物？原理如何？ [1]
22. 在膠體電泳後直接進行活性染色是最方便而專一性高的方法，但並非所有的酵素都可以在膠片上進行活性染色，請列出所需要的條件與限制。 [4]

23. β -澱粉酶可以 Coomassie Blue 染色，但硝酸銀反而不能染上色，請試解釋之。 [2*]
24. 硝酸銀染色完成後，可洗掉銀粒子再重新染色，要如何去掉色帶上的金屬銀？ [4]
25. 電泳後某生以 Coomassie Blue 染色脫色後發現，色帶全都分裂成水平平行的兩條色帶，好像每個色帶都有個影子。請問為何？(他用的是垂直平板式 disc-PAGE，使用 1.5 mm 厚的膠片，染色 15 min) [4*]
26. Ampholyte 是何種物質？有何用途？作用機制為何？ [2]
27. 電泳後可把蛋白質轉印到硝化纖維紙，然後有何用途？非得轉印到紙上不可嗎？ [1]
28. 蛋白質經酵素水解後，如何檢定其肽片？有那些方法可以分離這些片段？ [2]
29. 某蛋白質經純化至均質後，以 IEF 檢視其 pI，發現此蛋白質在其預測的 pI 附近拖拉成一片無法聚焦，且似有固體產生。請問發生了什麼問題？有無改善的可能？ [4*]
30. 那一種蛋白質在進行 SDS-PAGE 時，無法表現出正常的泳動率？ [3]
31. 澱粉磷解酶 L-SP 的原態分子量為 220 kD ($110 \text{ kD} \times 2$)，但是在純化過程中，經常發現有一種分子量超大的 L-SP 形式，稱之為 HX。把 HX 分別進行原態的 disc-PAGE 及變性的 SDS-PAGE，再分別收集色帶進行質譜儀分析，得到如下圖表的結果，你可以推得 HX 的組成嗎？ [4*]



32. 把上一題的 HX 收集下來，用一種特殊的二次元電泳進行分析，其整個過程與結果如下圖，請依照字母順序逐一瞭解並回答問題： [5*]



- (A) 有別於一般二次元電泳，第一次元改用原態 disc-PAGE，但第二次元仍為 SDS-PAGE，然後用 CBR 染色，可以看到 L-SP 被分成了原來單體長度的 SP110 及其降解產物 F50s，也可以看到 proteasome 的各個單體，HX 則標出其泳動位置。
- (B) 若把 L-SP 的分子分成 N 端、C 端及中央的一段 L78 片段，並且各自取得其專一性單株抗体，分別是 J3b, L78P 及 H7c 三種抗体。然後再分別對上述 (A) 的二次元電泳轉印進行免疫染色，得到 C, D, E 三張二次元染色圖譜。另外，三種抗体也對一次元原態電泳進行轉印染色，得到如 c, d, e 三張一次元染色圖譜。
- (C) 從 J3b 抗体染出來的二次元圖譜，可以看到 SP110 及 F50s，也可以在 HX 的位置看到被 SDS 解開的 SP110 及 F50s。然而有趣的是，在一次元的原態條件下，J3b 幾乎染不到 HX (c)，而 L-SP 則是正常染色。
- (D) L78P 抗体與 J3b 一樣，也不能在原態電泳上染到 HX (d)，但卻可以染到 SDS 下的兩種 L-SP 形式 (D)。
- (E) H7c 抗体則與其他兩種抗体不同，可以很清楚地染出 HX (e)。
- (F) 已知 HX 中含有 L-SP 及 proteasome，而 H7c 可以與 L-SP 結合，請推測一個三者之間的蛋白質交互作用機制，並解釋所得到的實驗結果。

[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]