

8 蛋白質科技：

蛋白質是細胞內最重要的功能性巨分子，多年來對蛋白質發展出許多研究科技，尤其是測定蛋白質分子量、分子構造與組成、微量純化與檢定等，更可產生專一性抗体作為探針，發展微流体平台等快速篩檢工具，使得新的蛋白質科技非常多樣化且具強大威力。本章可說是綜合前面各基礎操作的總結與應用，也進一步踏入探討總體蛋白質的概念。

8.1 分子量測定：

分子量是蛋白質最基本性質之一，有許多種測定法，最好採用數個方法相互佐證。

8.1.1 膠體過濾法：(參考 2.2)

a. 分子構形的影響：

膠體過濾是依分子體積的大小來進行分離，因此若兩種蛋白質的分子量完全相同，但構形較為鬆散者將提早溶離出來，會表現出比較高的分子量。

b. 標準蛋白質 (molecular weight marker)：

膠體過濾法需先用已知分子量的標準蛋白質，求出標準校正線，再以內插法求得樣本的分子量。商品供應標準分子量的蛋白質混合液，使用上較方便。標準蛋白質的使用參考 (kD)：

Thyroglobulin (669, 330), ferritin (440), catalase (232), immunoglobulin G (160), lactate dehydrogenase (140), serum albumin (67), ovalbumin (43), lactalbumin (14.4)

c. Blue Dextran 2000：

是一種藍色高分子聚醣 (分子量約 2,000 kD)，無法進入膠球孔內，會在 void volume (V_0) 溶離出來，其藍色色帶也可用來檢查管柱的裝填是否完善。Blue Dextran 對蛋白質有相當強的吸附性，不要與樣本混合在一起進行膠體過濾。溶離緩衝液的離子濃度至少要在 0.1~0.2 M 以上 (添加 NaCl)，以克服膠體介質對蛋白質的吸附力。

d. 管柱條件要保持恒定：

- (1) 以膠體過濾法測定蛋白質的分子量時，連同標準品及樣本蛋白質，前後要做數次管柱操作，在這期間管柱的操作條件要保持恆定，不宜中途重新裝填，因膠體的 V_0 等條件可能會改變。
- (2) 以 HPLC 或 FPLC 型式膠體過濾法進行分子量測定，可省去很多時間而且準確，是最佳的選擇。

8.1.2 梯度電泳法：(參考 7.2.1c)

垂直式梯度電泳是把膠體做成由上到下濃度漸增的梯度，其膠體孔徑越來越小，蛋白質分子量越小跑得越遠，因此分子量大小就成為泳動率的決定因素。梯度電泳也與膠體過濾一樣，要拿標準分子量的蛋白質做比較，才能定出樣本的分子量。

a. 原態或變性：

梯度電泳可用 disc-PAGE 或 SDS-PAGE 兩種方式，後者雖然可測定變性蛋白質的次體分子量，但若緩和樣本處理時的變性條件，則有時可能看到多元體分子。

b. 蛋白質等電點的影響：

原態的梯度 disc-PAGE 雖然是依照樣本分子量大小進行分離，但若蛋白質分子不帶淨電荷，甚或因 pI 太高而帶相反電荷，則這種梯度電泳就不適用。梯度 SDS-PAGE 則無電荷的問題，結果甚為可靠。

c. 結果判定：

以梯度 disc-PAGE 定原態分子量，對 pI 較低的蛋白質 (4~6 之間)，確實有相當高的準確度，但還要用膠體過濾法確認。進行梯度電泳時，可比一般電泳多跑一些時間，染料跑出膠體也無妨，因為蛋白質會卡在較密的膠體中，以增加解析力。在正式論文中，不要以原態膠體電泳做為檢定分子量的唯一依據。

8.1.3 其他分子量測定方法：

8.1.3.1 超高速離心法：(參考 3.2)

- a. 沉降係數：蛋白質在密度梯度的介質中進行超高速離心時，其沉降速率 (S) 與分子量、分子密度與分子形狀有關，因此可用來測定分子量。
- b. 超高速離心法也可做為一種酵素製備方法，在酵素純化方法中有詳細說明。

8.1.3.2 由胺基酸序列計算分子量：

- a. 許多蛋白質已知其核酸 (cDNA) 序列，由此可推得其胺基酸序列，以電腦計算得此胺基酸序列的分子量，即為該蛋白質的分子量。但須注意很多酵素是以多元體狀態存在，其原態分子量就會大很多，要以其他方法佐證。
- b. 注意大部分蛋白質都有轉譯後修飾 (post-translational modification)，例如醣蛋白或有其它修飾基團 (輔酶)，則實際分子量應該會大一些。反之，若有轉譯後的蛋白質裂解，則分子量又會變小一點。

8.1.3.3 質譜儀分析：

- a. 質譜儀可精確測定各種分子的質量，最近也被用來測定蛋白質的分子量，甚至可以決定其胺基酸序列，這種技術已趨成熟，可定出 30 個以上之胺基酸序列，在蛋白質體學的應用，對未知蛋白質的身分鑑定是極重要工具。
- b. MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) 是質譜分析的一種常用方式，先把未知蛋白質以蛋白酶分解成小片段胜肽，這些片段可以在 MALDI-TOF 質譜儀中分別定出其分子量，再與已知資料庫比對後，就可以推知未知蛋白質的身份 (圖 8.1)。
- c. 蛋白質仍然先用蛋白酶分解成胜肽，分離出每段胜肽後，再以另一種 EI (electron ionization) 質譜儀進一步撞擊胜肽脊骨成更小碎片，分析各碎片的質量可推得這一段胜肽的胺基酸序列，再把每段胜肽的胺基酸序列串連起來，就可以得到整個蛋白質的序列與分子量 (圖 8.2 左 de novo sequencing)。若蛋白質上面有磷酸化等修飾，也可以測得分子量之增加，因而推得磷酸化的位置 (圖 8.2 右)。

圖 8.1 質譜儀可檢定蛋白質身分

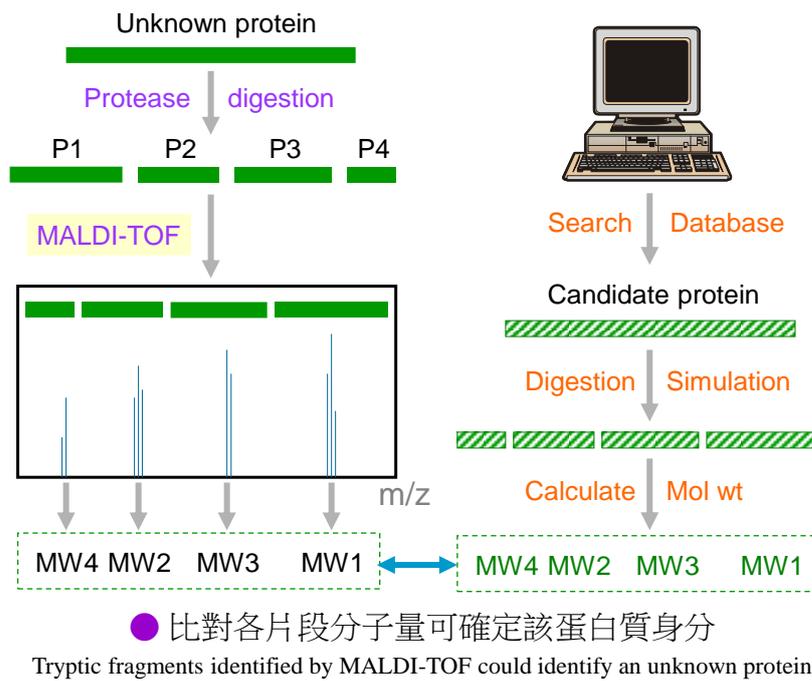
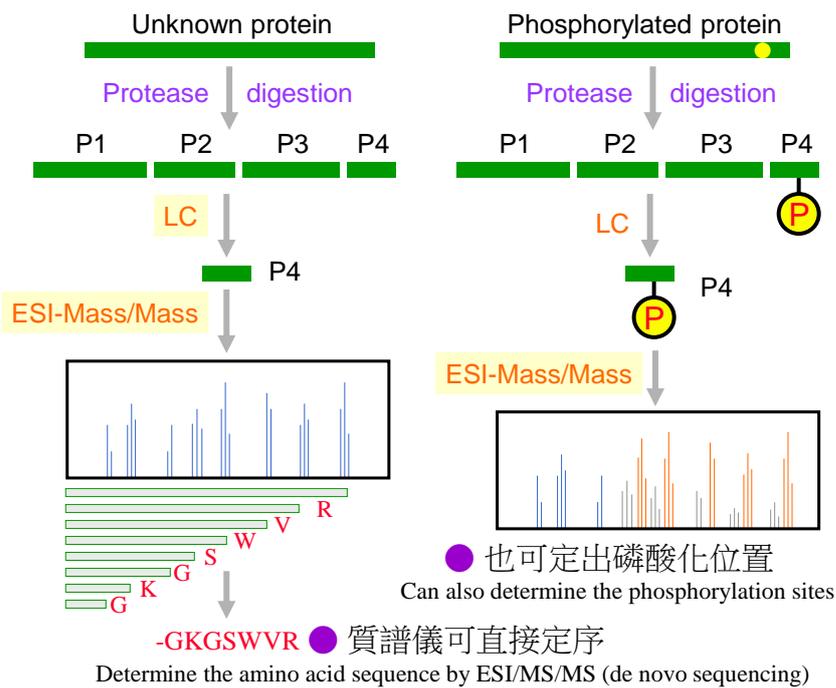


圖 8.2 以質譜儀進行蛋白質序列分析



8.2 蛋白質構造與組成：

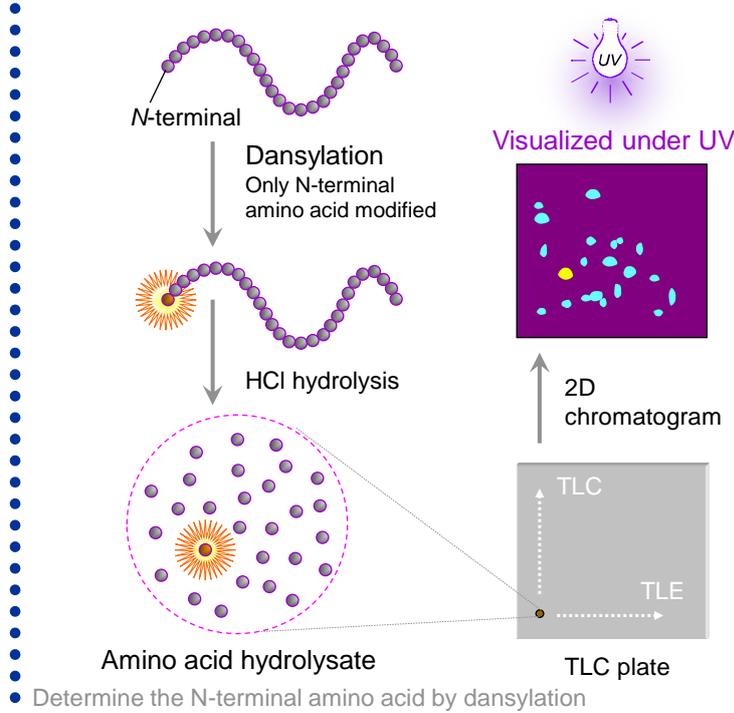
以下各種檢定方法，需要純度極高的蛋白質，最好先以一般的層析法純化後，再用製備式電泳得到均質蛋白質。其中很多反應會與胺基反應，因此樣本中不能有胺基的物質（如 Tris 或任何胺基酸），以免干擾反應。

8.2.1 N-端或 C-端胺基酸：

現在已經很少單獨測定 N-端，通常都直接去定序。

- a. 一般蛋白質都有固定的 N-端及 C-端，N-端胺基酸可使用 dansylation 標以 dansyl 基團，再以 HCl 水解蛋白質。除了 dansylation 外，尚有許多類似的反應可用來檢定 N-端胺基酸 (圖 8.3)。

圖 8.3 決定 N-端胺基酸



- b. 水解所得的游離胺基酸以 polyamide (TLC plate) 進行雙向薄層層析分離，標有 dansyl 的胺基酸在 UV 光下會發出螢光，與已知的 20 種 dansyl 胺基酸比較，即可判定胺基酸種類，亦可用 HPLC 確定胺基酸。
- c. 有些蛋白質的 N-端胺基可能經乙醯化修飾而阻礙 (blocked)，無法進行反應，尤以植物來源的蛋白質特別常見。遇此情形，可能要分出胜肽片段來定序 (避開 N-端)，或者以化學反應去除此一修飾。
- d. 有些蛋白質含有數條胜肽鏈，由雙硫鍵連接起來 (如 chymotrypsin)，因此會有數個 N-端胺基酸。則要先打斷雙硫鍵，把游離的各段胜肽分開後，再分別定序。
- e. C-端可用外切酶 carboxypeptidase 一個一個切下來，再進行胺基酸測定，由胺基酸出現的多寡順序，即可得知 C-端序列。但因這種水解反應不好控制，較不常用。

8.2.2 胺基酸組成：

- a. 蛋白質以 6 N HCl 或 4 N methanesulfonic acid 在真空 110°C 下水解 24 h，水解液以離子交換 HPLC 分開各種胺基酸，並分別測定其含量，可得知各胺基酸的百分組成。
- b. 由胺基酸百分組成的異同，即可比較兩種蛋白質的相似性，並得知蛋白質構造的性質與特徵。例如有一種鎘結合蛋白 metallothionein 含有很高量的 Cys，便是以 Cys 與鎘結合。

- c. 使用 HCl 水解蛋白質會破壞 tryptophan，並且使 glutamine 及 asparagine 失去胺基，成為 glutamic acid (合稱 Glx) 及 aspartic acid (合稱 Asx)，分析時要注意這些事實。同時，樣本及緩衝液中要避免太多胺基的物質 (如 Tris)，以免干擾 HPLC 分析。

8.2.3 胺基酸定序法：

胺基酸序列是一個蛋白質最重要且基本的資訊，除了上述質譜儀定序 (8.1.3.3) 之外，還有兩種方法可求得胺基酸序列。

8.2.3.1 cDNA 間推法：

由蛋白質基因的核苷酸序列，可推得其胺基酸序列，是目前最常用的定序方法 (reverse biochemistry)。此基因一般選殖自 cDNA 庫，在經過群殖、定序等工作，轉譯成蛋白質的胺基酸序列後，就可進行系統性的分析工作；通常以電腦程式搜尋比對，例如 GCG (Genetics Computer Group 工作站)。

比較重要或常見的分析項目如下：

a. 序列鑑定：

若為未知蛋白質，則進入蛋白質資料庫 (Protein Database Bank, PDB) 搜尋，與已知的序列比對，可得知你的蛋白質是已經被發現的，或是一個新的蛋白質。通常都可比對得類似的蛋白質序列，然後推知此未知蛋白質的可能功能。

b. 二級構造分析：

由一級胺基酸序列，可預測蛋白質的二級構造，推得生理功能上的關係。通常三級立體構造無法精確預測，除非有一個已知構造的類似蛋白質可供參考。

c. 功能序列分析：

許多特定的胺基酸片段，有特定的生理功能，稱為 signature。若能找到某些功能序列，則可推測此蛋白質的可能生理角色。例舉 signature 如：各種進入胞器的序列、PEST 降解序列、內質網回收序列 (KDEL) 等。

d. 一般性質分析：

由胺基酸序列可推出此蛋白質的等電點、分子量、抗原決定基片段、各種蛋白酶的水解點等有用資料，目前都有電腦套裝軟體可精確預測。

8.2.3.2 Edman 直接定序：

一個一個把胺基酸從 N-端切下來，然後直接定出其種類。

a. Edman 反應：

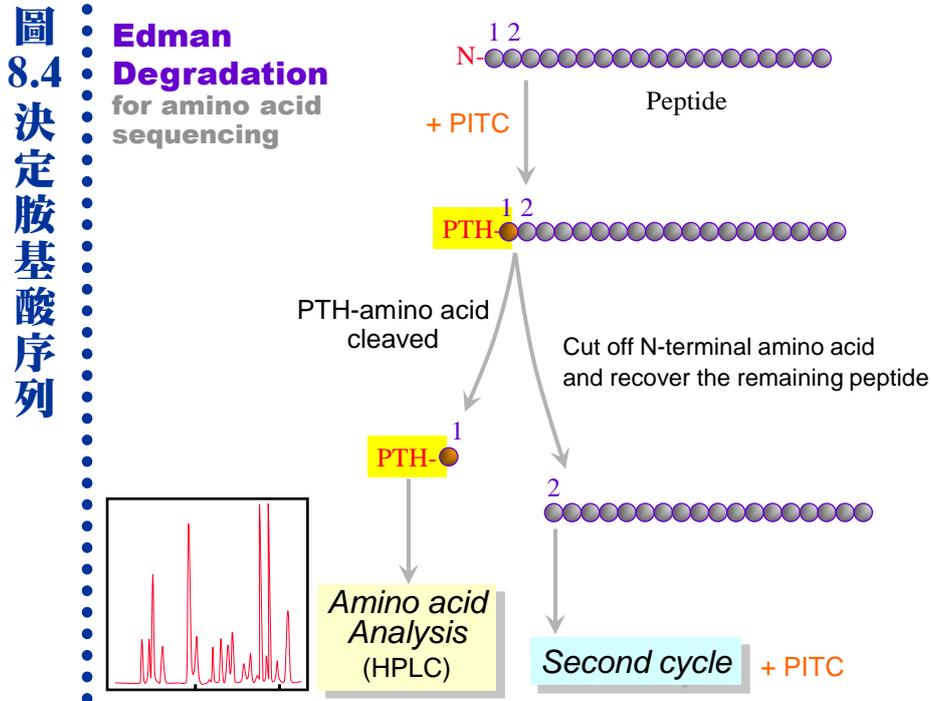
類似 dansylation 的 N-端標示反應，但是使用 PITC (phenylisothiocyanate) 在蛋白質的 N-端進行修飾反應，生成 PTH 衍生物，Edman 反應後的 N-端胺基酸可以被切下來，再以 HPLC 檢定為何種胺基酸。剩餘的蛋白質部份可以繼續第二輪 Edman 反應，通常手動可進行 10-30 個循環 (圖 8.4)，定出其胺基酸序列。

b. 自動定序：

目前都以自動定序儀進行，並且把樣本蛋白質固定在薄膜上，更為方便靈敏。可在電泳後轉印到纖維紙上，切出所要的色帶，直接上機定序。

c. 定序之前的基本資料：

- (1) 檢查蛋白質的分子量及四級構造，若有異質多元體，要先分出均質單元體。
- (2) 若有分子內或分子間 雙硫鍵 連結，應先還原之，以解開三級構造。
- (3) 有無碳水化合物、脂質等修飾物質，或具有 prosthetic group。
- (4) 分子量太大的蛋白質應先切成小片段，並分離得各胜肽片段，分別定序。



d. 直接定序的問題：

- (1) 蛋白質要先切成胜肽：

由於定序最多只能進行 50 個循環，而蛋白質通常有數百個胺基酸之多，因此長條蛋白質要先切成許多小片段，分離出各個小片段後再進行定序。

- (2) 要用兩套不同的胜肽比對：

但定出各獨立片段的序列後，無法得知各片段之先後次序關係。因此要以兩種不同專一性的蛋白酶，製作兩組不同的小片段，兩組的切點不同，以便在分別定序後互相比對重疊部份，找出兩片段的連接點（見下節）。

8.2.4 胜肽圖譜：

a. 專一性蛋白酶：

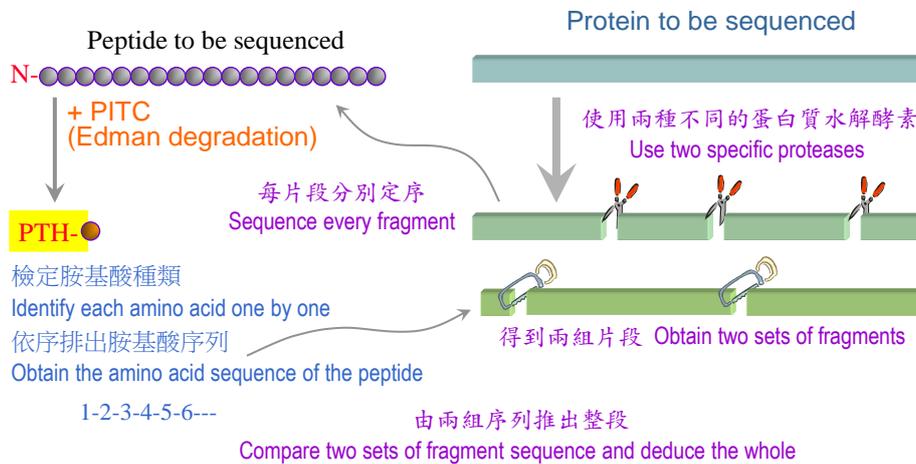
可對蛋白質的特定胺基酸進行水解，得到一群不同長短的胜肽片段。兩個不同蛋白質經同一種蛋白酶水解，所得的兩胜肽群，其肽鏈數目、各段胜肽的胺基酸組成與長短均不相同，可鑑定此二蛋白質的相似程度。反之，兩種不同專一性的蛋白酶會切在不同的胺基酸上，對同一蛋白質將得到不同的胜肽圖譜（如圖 8.5）。

b. 快速得知蛋白質部分序列：

由於細胞生物學的蓬勃發展，對未知蛋白質的探索激增，研究人員多使用胜肽定序的

方法，以快速檢定目標蛋白質的身份 (8.1.3.3)。或可定出未知蛋白質的一段胺基酸序列後，反向譯回核酸序列做為群殖所需的探針，或合成人工胜肽以進行單專一性抗体

圖 8.5 以傳統胺基酸定序法決定蛋白質序列



The traditional protein sequencing method using Edman degradation
的製備。

8.2.4.1 蛋白質專一性水解：

樣本蛋白質要先經變性處理，把三級構造的胜肽鏈解開，才能以蛋白酶水解之。

a. 專一性內切酶：例舉如下 (胺基酸切位)

Trypsin (Lys, Arg)

Chymotrypsin (Phe, Tyr, Trp)

Sa protease (Asp, Glu)

b. 化學反應法：CNBr (Met)

8.2.4.2 分離胜肽的方法：

最近由於微量定量方法的進步，以下操作除了可以分離出胜肽片段外，也可以收集分割或剪出色帶，送自動定序分析，都是很重要的分離檢定技術。

a. 電泳/層析雙向圖譜：

胜肽片段先經高電壓濾紙電泳後，轉 90 度再進行濾紙層析，則可分出各個胜肽片段，也可使用薄層層析，比較方便、快速，這是標準的方法。

b. HPLC：

利用 HPLC 的高解析力，快速分離各段胜肽，多使用反相層析管柱。

c. SDS-PAGE：

由完全水解所切得的胜肽片段，可以 SDS-PAGE 來分析；電泳後也可進行轉印，再用抗体做免疫染色。

8.2.5 其他相關方法：

8.2.5.1 分子消光係數：

若有均質的酵素，則可將已知吸光度 (280 nm) 的液体樣本，經冷凍乾燥後求其蛋白質的乾重，推得分子消光係數，以做為蛋白質定量的依據。請參考前文 5.3 節，利用分子消光係數來定量蛋白質的方法。

8.2.5.2 蛋白質立體結構：

- a. X 光繞射分析是探討蛋白質分子結構的最根本方法，但須先做出蛋白質結晶，對大分子蛋白質而言相當不易。近來多以分子選殖方法，以表現蛋白質進行結晶繞射分析，這是一門亟需專業知識與熟練技巧的研究工作。
- b. 使用溶液狀態的蛋白質進行 NMR (核磁共振) 分析，可得溶液狀態下的分子構造，但因為需要大量電腦運算，因此分子量太大者比較不容易處理。
- c. 獲知蛋白質的分子構型，並解出此構型與其生理功能間的關係，是研究酵素或蛋白質最極究之層次，能夠做到此階段的論文，通常都可以發表在最重要的期刊。其原因無他，因為所有的生理現象，均可以分子層次的化學反應或交互作用來解釋，這也是生物化學研究的根本精髓。

8.3 免疫學工具：

若能得到酵素或蛋白質的抗体，則對其相關研究有非常大的幫助，因為抗体的專一性很高，可做為專一性的探針，廣泛地應用在 ELISA、免疫沉澱或免疫轉印上。有關抗体的製備及詳細的實驗流程，請參考相關免疫學文獻 (如 Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies, A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory)，以下從實用角度，說明生產抗体及其應用的重要事項，以及常見問題之評估。

8.3.1 準備抗原：

a. 蛋白質抗原：

與免疫動物的遺傳背景離得越遠的蛋白質，其抗原性越好，都可順利得到高效價抗血清，通常植物蛋白質都是很強的抗原，而動物來源的抗原就要小心評估。

b. 小分子抗原：

分子量很小的胜肽 (在數十個胺基酸以下者)，本身無法誘生抗体，要先結合到大蛋白質分子上去 (稱為 carrier，通常用 BSA 或 KHL hemocyanin)。

c. 半抗原：

分子量極小的一些小分子 (如黃麴毒素僅有數百)，稱為 hapten (半抗原)，接到 carrier 後也可誘生抗体。

d. 人工合成胜肽抗原：

若已知某蛋白質的胺基酸序列，可以人工合成某段胜肽 (大約十幾個胺基酸)，連接到 carrier 後免疫可得抗血清。通常都先以電腦程式 (IEDB Analysis Resource) 預測抗原

性較強的胺基酸序列，選出數段進行免疫，可能有些片段不易產生高效價的抗血清。

e. 抗原的純度：

抗原純度越高越好，尤其在製備傳統抗血清時，純度不夠可能會有假結果。但製備單株抗體的抗原可不用完全均質，以方便抗原的大量製備，因為在篩選得單株抗體後，可由免疫轉印確認抗體的專一性，去除不要的單株抗體。

f. 抗原的形式：

一般蛋白質抗原都以溶液形式，加上佐劑處理成懸濁劑後進行免疫（見下小節），但也可自膠片或轉印紙上直接把色帶切割下來，研碎後加佐劑即可免疫。

8.3.2 免疫流程：

a. 標準免疫流程：

圖 8.6A 是免疫小白鼠的標準流程，在得到足量的抗原後，約需二到三個月的時間來免疫動物。注射的抗原量要適中，過量的抗原，不見得會誘生較好的抗體。最近有商品化的高效能免疫佐劑 (TiterMax)，可以在一個月內誘出抗體，並可減少免疫次數，而其效價也不差。

b. 其他免疫流程：

近來有許多快速免疫方法，例如把抗原加佐劑後，直接打入脾臟，以縮短時間或免疫次數，有些血清效價似乎不錯。不過免疫反應相當複雜，有許多科學上的未知現象，若非必要還是採用標準流程，費心思使用特殊方法，不如多考量抗原的本質。

8.3.3 抗體製備：

a. 傳統抗血清：

免疫流程或次數完成後，可試採血看效價如何，多以 ELISA 進行測試。若 ELISA 效價達 5,000 以上 (即血清稀釋 5,000 倍濃度在 ELISA 有 50% 最高呈色)，即可進行全部採血。待血液凝固後，離心取上清即得抗血清，儘量使用懸藍式離心機。

b. 腹水採集：

小鼠的全血量很少，但若誘生其腹水，則體積可增大許多。如圖 8.4A 流程中先施打 pristane 減弱小鼠免疫力，再打骨髓瘤細胞 NS-1 進其腹腔，可誘生腹水一至數毫升。腹水內多為抗體，可進一步純化出抗體。

c. 單株抗體：

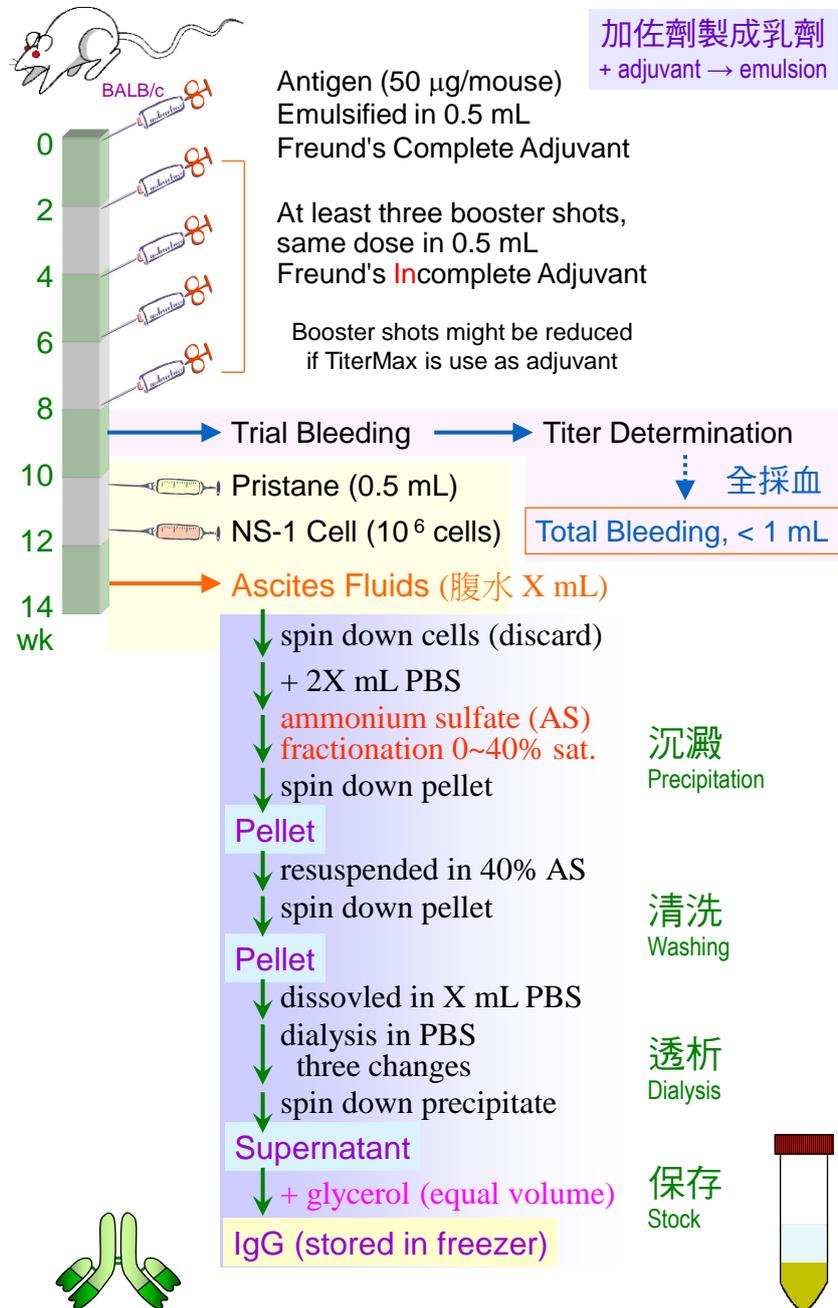
單株抗體針對單一抗原決定基有極高的專一性，是傳統抗血清所無法達致的特點，對蛋白質細微構造的分析很有用處。其製備過程相當複雜，操作順利的話，前後可能需時三個月以上，但若技術與設備均完善，要取得有用的單株抗體並非難事。

d. 免疫球蛋白：

無論是得到抗血清或腹水，應當儘快進行免疫球蛋白 (Ig) 的純化，通常只要硫酸銨沉澱即可得到相當純的免疫球蛋白 (圖 8.6B)。要注意這樣所得到的抗體，其中只有一

部份是專一性抗体，因為動物本身有許多原先就存在的抗体，除非是融合瘤細胞所產生的單株抗体。

圖 8.6 免疫流程及抗体純化 Immunization



8.3.4 抗体應用：

a. 轉印及免疫染色法：

是抗体在生化及分子生物學研究最重要的貢獻，其詳細說明請見 7.3.2 所述。

b. 免疫沉澱法：

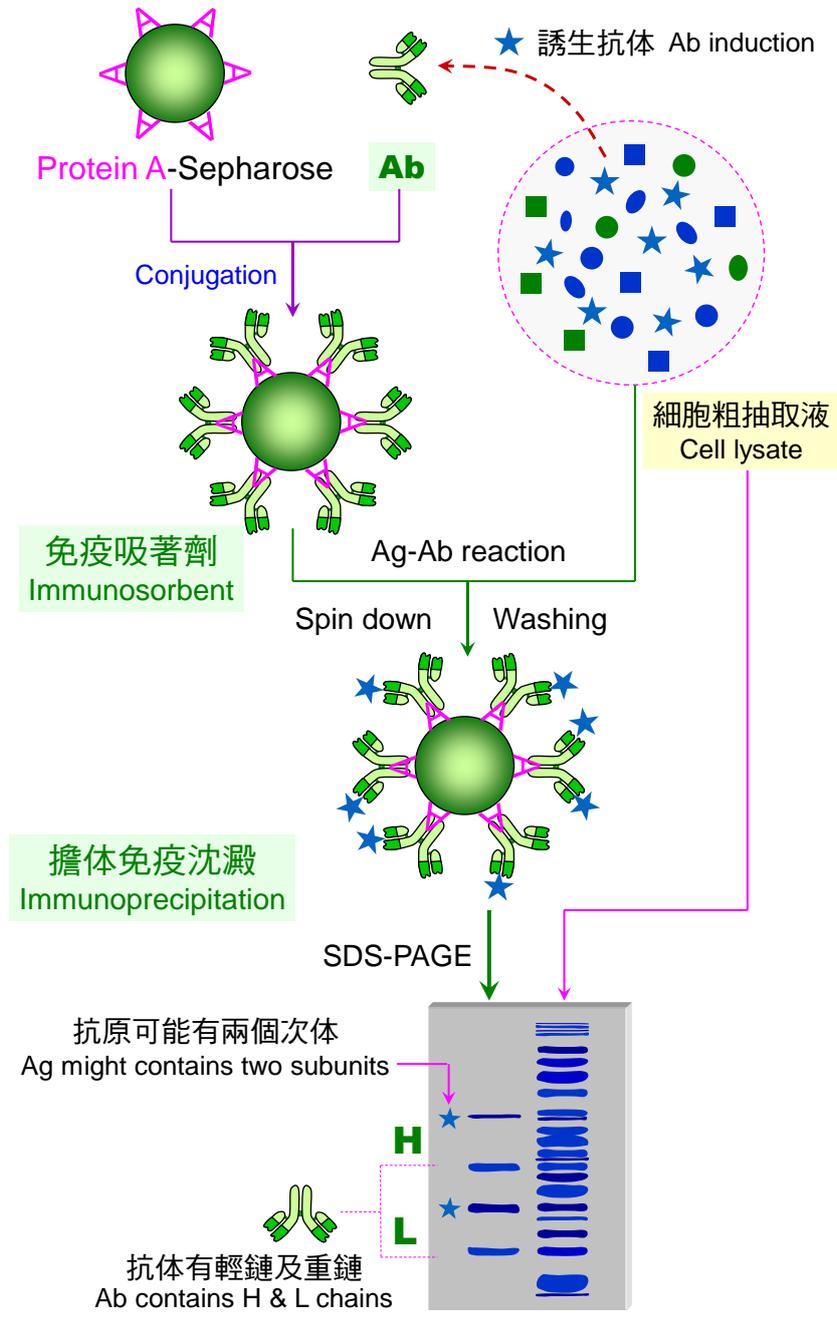
若把抗体分子接在一固相擔體上(大多使用 CNBr-Sepharose)，則可用來做為專一性

的沉澱劑，把樣本中的抗原分子專一性地沈澱下來 (圖 8.7)。

c. 親和層析法：(參考 2.4)

上述接有抗體的固相擔體，也可用管柱方式進行親和層析，以純化抗原分子，將在酵素純化方法中說明。

圖 8.7 擔體免疫沈澱流程 Immunoprecipitation



d. 雙向免疫擴散法：

相當古老的免疫學檢定法，但有其應用上的特色。利用在洋菜膠體上擴散的沈澱圖形，來檢定抗原及抗体間的專一性反應，並可鑑別兩抗原分子間構造上的差異。

e. 酵素免疫分析法 (ELISA) :

原理與免疫染色法類似，是利用抗體的專一性去偵測抗原量的多寡，並以酵素為放大信息的標示，因此有相當高的靈敏度。因為使用 ELISA plate 為固相，故操作相當方便，同時可處理大量樣本，但解析力不及電泳轉印的免疫染色法。

8.4 蛋白質新世界：

分子生物學快速發展 50 年，對核酸的瞭解累積相當基礎，而由核酸所表現的蛋白質，也重現其重要性。新的蛋白質科技，除了強化傳統的純化與檢定能力之外，引入微量科技的概念，蛋白質的分析越來越精密、靈敏且快速，所需樣本量也越來越少。同時，探索對象也由單一蛋白質進入蛋白質體，以更大格局去看整個細胞乃至生物體的活動。

8.4.1 微量科技：

雖然傳統的蛋白質分離純化技術，在初步分離或大量純化上仍然很重要，但對於少量樣本或基因群殖表現出來的蛋白質，則在純化策略之概念有相當大的改變。通常不再拘泥於一步步的純化工作，不再處處講求活性回收及純化倍數，而是一種快速達成的流程，很快鎖定所要的蛋白質，取出少量均質蛋白後便進入微量定序的檢定工作，可馬上得知該蛋白質的身分。這種強迫取分的策略，要靠以下微量純化及檢定系統的建立與發揮。雖然操作策略有變化，但蛋白質純化分析的基本原理是不會改變的。

8.4.1.1 微量純化：

其基本理念是『看得到的，就拿得到』（what you see, what you get），通常是利用電泳或 HPLC 分離，收集所要的色帶或尖峰，下面列出幾個基本方法。

a. SDS-PAGE 及轉印：(參考 7.3.2)

部分較幸運的樣本，在經過一般的電泳及轉印後，即可得到乾淨的色帶，其上下均無干擾的色帶，則可在定位後切出所要的色帶，立即送去質譜儀確定身份。

b. 二次元電泳：(參考 7.3.4)

若上述方法無法取得單一蛋白質色帶，則須以二次元電泳及轉印，分出所要的色點，切出之後再送定序。以上步驟以圖 8.8 摘錄其進行流程。

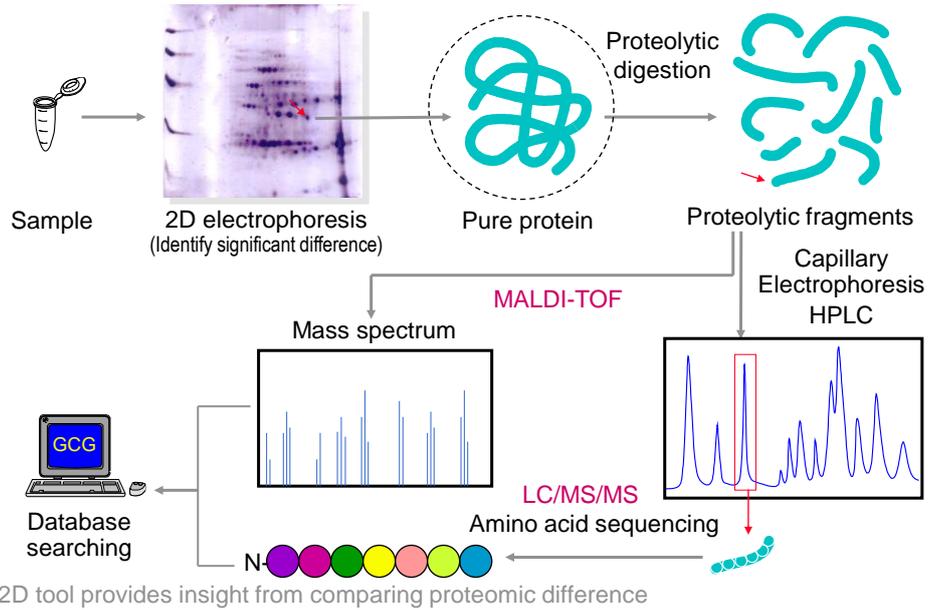
c. 膠體內水解：

有一個相當常見的困擾，就是許多蛋白質的 N-端被修飾，也就無法直接以 Edman degradation 定序。若蛋白質量夠大，則可在試管中進行去修飾的化學反應，但通常沒有足夠蛋白質。因此，可以在上述各種電泳膠片中，直接切出所要的色帶，在膠體中以蛋白酶進行水解，所得到的肽片，再經 HPLC 分離後送質譜儀進行定序，現在這樣由膠體到質譜分析的過程，都可在一貫流程中完成 (圖 8.8)。

d. 微量純化系統：

HPLC 或 FPLC 都適合做為微量分離工具，近來又有毛細管電泳或毛細管 LC，但通常在進行這些微量分離之前，都要先以傳統的分離方法進行部分純化。

圖 8.8 蛋白質體可綜觀蛋白質的消長與身分



8.4.1.2 微量分析：

拜科技發展之賜，分析儀器的靈敏度越來越高，因此所需樣本的量也越來越少，在純化上可以減少很多麻煩，但因為靈敏度高，也比較容易受雜質干擾，甚至常有受到皮膚、頭皮屑干擾的案例。常用的分析方法如下，通常都是極為昂貴的大型儀器，所幸也有很多商業服務。

a. 蛋白質定序：(參考 8.2.3)

還是以 Edman degradation 為基礎，但靈敏度可達 10~100 pmole，因此一個電泳的色帶已足夠定序。一般可定出 10-30 個胺基酸序列，此序列即可輸入電腦，以軟體如 Lasergene (DNASTAR) 搜尋相似的蛋白質，就可推定其身分。

b. 質譜儀分析：(參考 8.1.3.3)

質譜儀可以精確檢定樣本的分子量，因此蛋白質水解後的片段，可用質譜儀精確定量求得分子量，而目前以質譜儀進行肽片段的定序也不成問題，更可推出此片段上的各種修飾，例如磷酸化、醣化修飾等。通常質譜儀分析緊接在 LC 分離之後進行，寫成 LC/Mass 或 LC/Mass/Mass，看後面接著幾次質譜分析。

8.4.2 蛋白質體學：

進入 21 世紀後生物學的第一件大事，就是人體基因的核酸序列完全解碼，這是號稱 Genome Project 的浩大工程。在得到人體所有的基因序列後，第一件可以做的事，就是把這些基因所表現的蛋白質翻譯出來，可獲知一個生物的整体蛋白質體，如此被模糊稱為 proteomics 的是一個龐大資料庫，可能有無限的後效及超出想像的發展。

8.4.2.1 如何看待 proteomics?

a. 隨著生長期間、內部調控、外來因素等影響，一種生物的 genome 可以表現出許多

不同的 proteomes，因此蛋白質體是比基因體更為複雜的研究對象。

- b. 基因體似乎就是永遠在細胞核裡，然而蛋白質被表現出來之後，不但有修飾、組裝、運送等過程，也有其興衰的生命週期，因此生物細胞並沒有一個固定的蛋白質體，它永遠在變化著。
- c. 然而蛋白質體也有其相對恆定的一面，雖然各類蛋白質的構造都非常複雜多樣，但也可歸納出幾種基本構造 (module)，而這些 modules 的功能大都可以預知。構造類似的蛋白質，幾乎都擁有相同的功能，由胺基酸序列比對就可準確預測。
- d. 基因體的大小與生物的複雜度不一定成正比，例如人類的基因數目其實並不多，因此其複雜度可能來自蛋白質的修飾調控，甚或蛋白質回饋去調節基因表現。

8.4.2.2 Proteomics 就是蛋白質化學？

- a. 的確蛋白質體的微觀基礎就是傳統的蛋白質化學 protein chemistry，後者通常針對單一蛋白質進行細部的分析研究，反觀蛋白質體則擴大格局與範圍，以高產能、更快速、超微量的高端分析儀器，來檢視整個細胞或生物體的全体蛋白質，在研究態度與使用的工具上，都有很大的不同，但二者是密切相關。
- b. 蛋白質化學通常以得到整個蛋白質分子的序列為目標，而蛋白質體學反而只要部分序列，配合生物資訊學的龐大資料庫，部分序列已足以鑑定任何未知蛋白質，並由此深入探勘更多細節，由點到面的擴展研究層面。進行任何層次的研究時，切勿忘記在蛋白質化學的基礎上，配合生物資訊學這個強大的工具。
- c. 傳統蛋白質化學聚焦在少數目標蛋白質的構造功能關係，一步一步地解決問題，有如一次大戰的陣地壕溝戰。然而蛋白質體學勢必要加入系統生物學 (systems biology) 的全新陣營，聯合基因體、轉錄體、代謝體、信息傳導，以及任何已知或未知的細胞生物學體系，一起利用大資料庫、數位運算、統計分析、模擬預測等，創造出更多樣而立體的觀察系統，推到前所未有的生物運作模式。

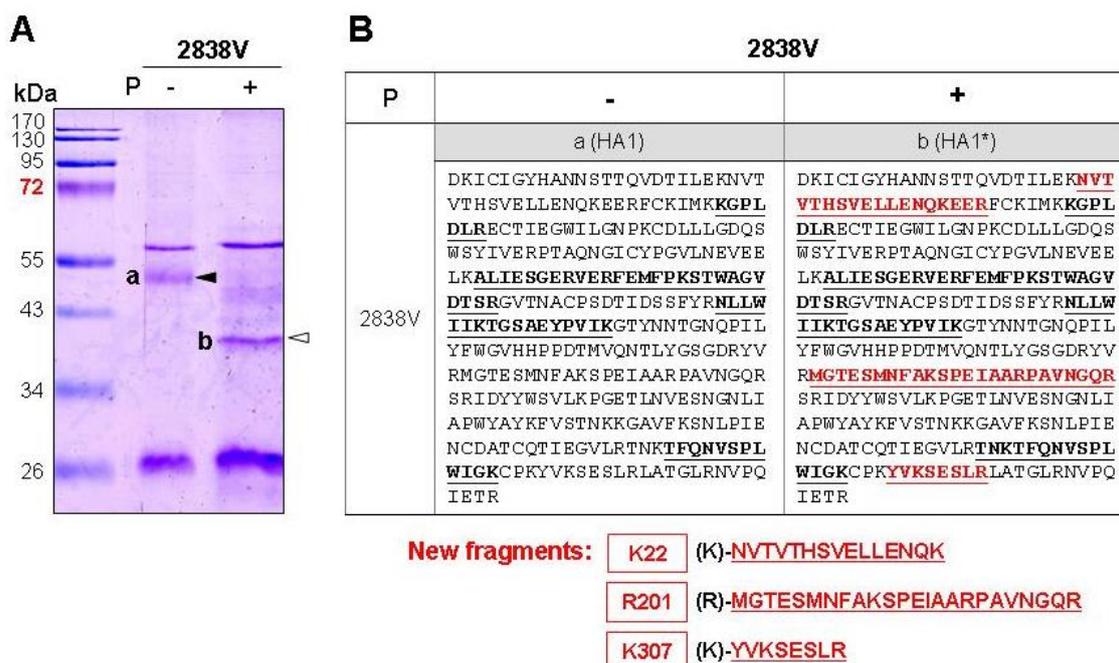
8.4.2.3 Proteomics 與代謝體：

- a. 檢查一個生物蛋白質體的所有酵素，應當可以拼湊出某細胞的代謝途徑。例如當我們看到某病原菌的蛋白質體有 hexokinase，以及其它相關的 glycolysis 酵素，則可推斷此菌有糖解作用，甚至有其下游的 TCA cycle 等。此外，信息傳導也是一個龐大網路，蛋白質體學一定會發揮重要功能。
- b. 如此可瞭解該病原菌的整體代謝與傳導，並找出其特殊弱點加以攻擊；反之也可以改變一個有益菌的代謝，使其代謝產物更能夠符合人類的需要。J. Craig Venter 在 2010 年製造人工的染色體，並且殖入黴漿菌空殼，宣稱為第一個人造細胞。
- c. 對傳統生物化學的代謝部分，應該有全新的角色與認知，雖然短期內每一條代謝路徑都不會有變化，但我們勢必得重新出發，以蛋白質體的心情解讀整體代謝，以更大格局去連結各路代謝的互動，或許就是所說的代謝體學 (metabolomics)。
- d. 人類大部分疾病幾乎都與代謝有關，也可以在基因體上找到根源，因此若能標出造成病變的基因，也就能找出造成病變的標誌蛋白質 (marker protein)，而這些病變蛋白質很多就是酵素，病變連結著酵素活性及功能的缺陷，這也是為何我們要如此重視酵素研究的主因之一。

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. 你在純化得某酵素後，經定序得到其 N-端的 15 個胺基酸序列，請問接著可以進行那些實驗？各有何目的或用途？ [2]
2. 電泳後進行蛋白質轉印，再用抗体染色後，結果： [3*]
 - a. 發現整張轉印紙一片空白，請推測可能的原因。
 - b. 發現除了標準品的藍色色帶存在之外，其餘各樣本空白一片，請推測可能原因。
3. 若你的蛋白質 N-端已被乙醯化，無法進行傳統的胺基酸定序，則你將如何定出該蛋白質的部份序列？ [2]
4. 胺基酸組成分析可得知蛋白質中各種胺基酸百分比，但 Asn 會水解成 Asp，Glu 水解成 Glu。也就是說只能測得兩者的和 (以 Asx 或 Glx 表示)，而無法直接測得 Asn 或 Gln 的量。請問你如何可以推出所測得的 Glu (Asp) 中含多少 Gln (Asn)？ [3]
5. 為什麼只有 Edman 反應能夠應用在胺基酸定序？而 dansylation 不行？ [2]
6. 質譜儀主要是根據分子片段的質量來做分析的，目前大致有兩大類分析方式，分別以 MALDI-TOF 及 ESI-Mass 為代表，兩者在分析原理及其應用上有何不同？ [2]
7. ESI-質譜儀分析可以定出蛋白質的胺基酸序列，那就要用鈍氣分子把蛋白質打碎變成更小的肽段，而每個片段之間只有一個胺基酸之差別，在比對一連串這樣的肽段之後，就可以湊出胺基酸序列。雖然在擊碎蛋白質時，蛋白質分子上每個鍵結被擊中的機率是相同的，但實際上肽鍵被擊中的機率較高，因此相對容易得到只差一個胺基酸之片段，請推測為何肽鍵比較容易被擊中？ [5]
8. 免疫化學書上提到，抗体可以與抗原結合而沉澱下來，但在生物化學之應用時，此抗体通常都要附在一固相擔體上，才能做為免疫沉澱劑。為何要如此麻煩，不直接以抗体來沉澱抗原？ [3]
9. 當群殖得某酵素的 cDNA 並已定序，但其活性分析方法極為困難，或根本不知此酵素的活性時，則在純化過程中，你有何方法可以追蹤此酵素？ [4]
10. 生產傳統抗体時，抗原純度一定要非常高，否則可能會有交叉反應，但在生產單株抗体時，反而可以用不很純的抗原去免疫。請問這要如何進行？有何先決條件？ [5]
11. 澱粉磷酸酶與 β -澱粉酶的基質都是澱粉，但兩者的催化反應不同，分子構造上也無相同之處。當使用澱粉磷酸酶為抗原製備單株抗体時，發現所得到的抗体有很多株 (約一半) 都會對 β -澱粉酶有交叉反應，反之若以 β -澱粉酶為抗原所得的抗体，也有少部份對澱粉磷酸酶會有反應。請解釋這是如何造成的？ [4]
12. 蛋白質轉印後，以免疫染色所得染色色帶的深淺，能否做為定量蛋白質的依據？請問這樣的定量方法，有無可能的失誤？如何改進其可靠性？ [4]

13. 若把短鏈胜肽 (約十多個胺基酸) 連到 carrier 上做為抗原，進行免疫後可以得到抗体，稱為 monospecific Ab。某生由其酵素 cDNA 序列轉譯的蛋白質序列上選出一段特殊序列的胜肽 (VALIWVVSAIL)，以此進行抗体製備，結果也得到了抗血清。但發現此抗血清在進行蛋白質轉印的免疫染色時，對 disc-PAGE 膠片的轉印膜無法呈色，而呈一片空白，同時對 SDS-PAGE 轉印膜，則只能看到很淡的色帶。請問發生了什麼毛病？如何解決問題？ [4*]
14. 續上一題，假設此生得到另一種完全不同的結果，SDS-PAGE 免疫轉印得到很強的呈色色帶，但對細胞的粗抽取液樣本做檢定時，對不含此一酵素的控制組，卻也有免疫呈色，請問如何解釋？ [5]
15. 續上兩題，另一位同學則以電腦軟體搜尋較強的抗原決定基，選了該蛋白質 N-端的一段序列 (MILAKKSVALV)，同樣進行抗体製備，所得抗体對細胞的粗抽取液樣本做檢定，結果在兩種 PAGE 膠片上預期分子量的位置，完全看不到呈色的色帶，但在預期分子量稍高處，隱隱發現有一很淡又很細的色帶。這又是發生了什麼問題？ [5]
16. 禽流感病毒 (AIV) 外殼有一種血液凝集素 (hemagglutinin, HA)，是入侵宿主細胞的關鍵分子，HA 與宿主細胞膜上的接受體結合，接著啟動一連串機制，把病毒基因送進細胞內，開始病毒的感染、繁殖、擴散生活史。HA 在宿主體內被切開成為 HA1 及 HA2 兩部分才有正常功能，但仍然維持其立體構造；另外 HA 也會被醣化 (glycosylated)，可能有保護病毒的功能。以 H6N1 (2838V) 的 HA1 為例，從其胺基酸序列預測有數個醣化位置，若先進行去醣化處理 (下圖 A 的 P+)，則 HA1 的分子量由 a 降到 b，再分別把 a 及 b 切出來以 trypsin 水解成片段後進行質譜儀分析，各片段序列分析結果如 B 圖，發現 b 比 a 多出三個片段，請說明這個結果的作用機制是如何進行的。 [4*]



[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]