

National Taiwan University

酵素純化與分析

Enzyme Purification and Analysis



國立臺灣大學

生化科技學系

莊榮輝 教授

2018

Enzyme Purification and Analysis

2018

Professor Rong-Huay Juang
juang@ntu.edu.tw
Department of Biochemical Science and Technology
National Taiwan University
Taipei, Taiwan 10617

0 科學研究 1

0.1 確立方向 1

- 0.1.1 找尋研究方向 1
- 0.1.2 搜尋背景資料 1
 - 0.1.2.1 如何搜尋？ 1
 - 0.1.2.2 除了搜尋期刊外，還有許多其他來源！ 1
- 0.1.3 醞釀一個題目 2
- 0.1.4 草擬研究大綱 2
- 0.1.5 確立研究題目 2

0.2 實驗日誌 3

- 0.2.1 實驗記錄的座標表尺：時間！ 3
- 0.2.2 記錄方式 3
- 0.2.3 記錄的分類命名法 3
- 0.2.4 實驗計劃 [P] 3
- 0.2.5 實驗操作 [E] 4
- 0.2.6 實驗結果 [R] 4
- 0.2.7 結果討論 [D] 5
- 0.2.8 應用心得 5

0.3 實驗報告 6

- 0.3.1 通則 6
- 0.3.2 實驗報告的結構 6
 - 0.3.2.1 Cover: Abstract and Content 7
 - 0.3.2.2 Introduction 7
 - 0.3.2.3 Materials and Methods 7
 - 0.3.2.4 Results 7
 - 0.3.2.5 Discussion 7
 - 0.3.2.6 References 7
 - 0.3.2.7 Figure and Table 7
 - 0.3.2.8 Supplement 8
- 0.3.3 文章寫法建議 8
 - 0.3.3.1 先寫下大綱骨架 8
 - 0.3.3.2 文句合邏輯且有層次感 8
 - 0.3.3.3 文章使用精練短句 8
 - 0.3.3.4 先整理結果圖表 8
- 0.3.4 編輯注意事項 9
 - 0.3.4.1 英文大小寫不可隨意 9
 - 0.3.4.2 英文空格要注意 9
 - 0.3.4.3 可使用中文名詞，但不要勉強翻譯專有名詞 9

0.3.4.4 其它細節 9

0.3.5 如何整理 One-Page Show 9

0.3.5.1 One-Page Show 原則與成效 10

0.3.5.2 整理 One-Page Show 步驟 10

問題集 11

0.4 建立實驗室 12

- 0.4.1 儀器設備 12
 - 0.4.1.1 基礎設施 12
 - 0.4.1.2 個人電腦及周邊 12
 - 0.4.1.3 冰箱與冷房 12
 - 0.4.1.4 進一步設備 12
 - 0.4.1.5 特別設備 13
- 0.4.2 儀器管理 13
- 0.4.3 小型用具 13

0.5 藥品試劑 14

- 0.5.1 適量庫存 14
- 0.5.2 貯存溫度 14
- 0.5.3 藥品純度 14
- 0.5.4 污染控制 14

0.6 個人用品 15

- 0.6.1 個人藥品 15
 - 0.6.2 立刻清理 15
 - 0.6.3 實驗記錄 15
 - 0.6.4 離開實驗室 16
 - 0.6.5 個人安全 16
- 問題集 17

1 蛋白質抽取 19

1.1 如何開始？ 19

1.2 材料來源 20

1.3 均質及抽取 20

1.4 鹽析及沉澱法 22

- 1.4.1 鹽析分劃法 22
 - 1.4.1.1 鹽溶 (salting-in) 22
 - 1.4.1.2 鹽析 (salting-out) 23
 - 1.4.1.3 硫酸銨 (ammonium sulfate) 23
 - 1.4.1.4 如何使用硫酸銨 23
- 1.4.2 有機溶劑沉澱法 24
 - 1.4.2.1 降低水活性 24
 - 1.4.2.2 使用有機溶劑 24

- 1.4.2.3 沉澱收集 24
- 1.4.3 其它處理法 24
 - 1.4.3.1 Polyethylene glycol (PEG) 24
 - 1.4.3.2 去除核酸及多醣 25
 - 1.4.3.3 特殊處理法 25
- 問題集 26

2 色層分析法 29

2.1 色層分析原理 29

2.2 膠體過濾法 30

- 2.2.1 原理概述 30
- 2.2.2 膠體介質 (support, matrix) 31
- 2.2.3 膠體管柱 32
- 2.2.4 管柱操作 34
- 2.2.5 問題及解決 35

2.3 離子交換法 36

- 2.3.1 原理概述 36
- 2.3.2 離子交換介質 37
- 2.3.3 緩衝液與層析系統 39
- 2.3.4 管柱操作方法 40
- 2.3.5 色層聚焦法 (chromatofocusing) 41

2.4 親和層析法 42

- 2.4.1 原理概述 42
- 2.4.2 親和吸著劑 42
- 2.4.3 金屬螯合層析法 44
- 2.4.4 疏水性層析法 44
- 2.4.5 液相分配 (partitioning) 45

2.5 HPLC 及 FPLC 46

問題集 48

3 其它純化方法 51

3.1 製備式電泳 51

3.2 超高速離心法 52

3.3 超微薄膜過濾法 53

問題集 55

4 純化策略 57

4.1 純化步驟設計 57

- 4.1.1 影響純化因素 57
- 4.1.2 組合純化步驟 57

4.2 純化結果 58

應用問題 60

5 蛋白質定量法 67

5.1 Biuret 法 67

5.2 Lowry 法 67

5.3 UV 吸光法 67

5.4 Coomassie Blue (dye binding) 法 : Bradford Method 68

5.5 其它方法 68

問題集 69

6 酵素活性測定 71

6.1 催化反應 71

6.2 酵素活性分析 72

- 6.2.1 酵素活性測定方法 72
- 6.2.2 中止酵素反應方法 73
- 6.2.3 連續測定法 73
- 6.2.4 澱粉磷解酶活性分析 74

6.3 維持酵素活性 75

- 6.3.1 緩衝液 75
- 6.3.2 試劑的保存 76
- 6.3.3 酵素活性之維持 76
- 6.3.4 酵素活性單位 77

問題集 79

7 電泳檢定法 81

7.1 電泳原理 81

- 7.1.1 蛋白質的泳動率 81
- 7.1.2 電泳種類 82
- 7.1.3 電泳設備及系統選擇 83

7.2 聚丙烯醯胺膠體電泳 (PAGE) 83

- 7.2.1 PAGE 種類 83
- 7.2.2 PAGE 膠體組成 84
 - 7.2.2.1 膠體主要成分 84
 - 7.2.2.2 鑄膠反應 84
- 7.2.3 PAGE 系統解剖 84
 - 7.2.3.1 電泳系統的組成 84
 - 7.2.3.2 電泳的焦集作用 85
 - 7.2.3.3 兩種電泳系統比較 86
- 7.2.4 結果不佳時 87

7.3 其它相關技術 88

- 7.3.1 染色及乾燥 88
- 7.3.2 蛋白質轉印法 90
- 7.3.3 等電聚焦法 (IEF) 90
- 7.3.4 二次元電泳 90
- 問題集 92

8 蛋白質科技 95

8.1 分子量測定 95

- 8.1.1 膠體過濾法 95
- 8.1.2 梯度電泳法 95
- 8.1.3 其他分子量測定方法 96
 - 8.1.3.1 超高速離心法 96
 - 8.1.3.2 由胺基酸序列計算分子量 96
 - 8.1.3.3 質譜儀分析 96

8.2 蛋白質構造與組成 97

- 8.2.1 N-端或 C-端胺基酸 98
- 8.2.2 胺基酸組成 98
- 8.2.3 胺基酸定序法 99
 - 8.2.3.1 cDNA 間推法 99
 - 8.2.3.2 Edman 直接定序 99
- 8.2.4 胜肽圖譜 100
 - 8.2.4.1 蛋白質專一性水解 101
 - 8.2.4.2 分離胜肽的方法 101
- 8.2.5 其他相關方法 102
 - 8.2.5.1 分子消光係數 102
 - 8.2.5.2 蛋白質立體結構 102

8.3 免疫學工具 102

- 8.3.1 準備抗原 102
- 8.3.2 免疫流程 103
- 8.3.3 抗体製備 103
- 8.3.4 抗体應用 104

8.4 蛋白質新世界 106

- 8.4.1 微量科技 106
 - 8.4.1.1 微量純化 106
 - 8.4.1.2 微量分析 107
- 8.4.2 蛋白質體學 107
 - 8.4.2.1 如何看待 proteomics? 107
 - 8.4.2.2 Proteomics 就是蛋白質化學? 108
 - 8.4.2.3 Proteomics 與代謝體 108
- 問題集 109

本講義也有網頁版
請以「EPA 2018 NTU」搜尋

0 科學研究：

科學探索相當辛苦，若非大自然的奧秘有如此強大的吸引力，將無法忍受所面對的挫折與煎熬。在進入研究工作之前，有一些基本的觀念與認知，要先確立後才能繼續走下去。

0.1 確立方向：

當你才剛開始要進入研究工作領域，無論環境或目標都尚未熟悉，要如何開始找研究題目呢？

◆科學之路：第一章 準備工作【請在上網以「[科學之路](#)」搜尋】

0.1.1 找尋研究方向：

與指導教師討論整體研究方向，並請老師提供若干 **關鍵字 (key words)**。指導教師可能有兩三個題目讓你挑選，你得選擇一或兩個有興趣的題目，不要選太多。

0.1.2 搜尋背景資料：

把所有相關文獻找出來，大部分文獻只念摘要即可，但重要論文就要全文仔細唸過，最後整理出一篇報告，說明這個題目以往的研究、過程，以及最近的發展；最好上台報告給教師及實驗室同學聽，以便進一步討論。若實驗室近年來一直在做該題目，則直接請教老師及學長，可以很快找到最新的重要論文。

0.1.2.1 如何搜尋？

- 現代的網路資料平台實在非常發達，連很專業的科學論文，都可以在 **Google** 上迅速搜尋到。在網路以關鍵字搜尋所要的研究報告很容易，但現在的問題並非找不到資料，而是找來太多資料而無從下手！
- 某些搜尋平台有進階搜尋，可以再指定重要因子，縮小搜尋範圍 (例如年代、特定作者、特定地點)，聚焦在真正有用的結果；其關鍵字的設定就很重要，用適當的關鍵字可以找到最實用的資料。
- 面對搜尋到的龐大資料，先快讀各篇論文摘要，挑出真有興趣者下載原文，重要文獻一定要通篇閱讀，整理出各家要點，找出可以切入探討的主題，這些都要花許多時間下功夫琢磨，去形塑自己的概念。
- 善用個人資料庫管理軟體，來整理你的文獻檔案，例如套裝軟體 **EndNote** 使你事半功倍，而且未來可在論文中插入文獻，並自動製做出 **Reference List**。

0.1.2.2 除了搜尋期刊外，還有許多其他來源！

- 專書與教科書：最初步的找尋對象，通常可有較淺顯而完整的說明，較常用者或許目前手邊就有。
- Review** 性期刊：**Scientific American**, **Trends** 系列期刊、**Annual Review** 系列等，可上圖書館或網路查詢。
- 一般期刊：部分期刊有 **news** 專欄或 **mini review**，簡要介紹該期的重要發現，非常有用。

- d. 操作手冊 (manual)：即所謂的食譜 (cookbook)，詳載實驗操作的 protocol (如 Methods in Enzymology 系列)。

◆研究生涯 (1) 科學期刊不是只有研究論文 [請上網以「[研究生涯](#)」搜尋]

0.1.3 醞釀一個題目：

- 通常這是最難熬的一段時間，雖然已有大概的目標，也查了一大堆文獻，但還是不明確知道要做什麼。且讓這種懸疑緊張的狀況，持續一段日子，時時思索你的問題；一有靈感就寫下來，再由此點挖掘下去。
- 漸漸地，相信你會想出一條或數條可行的方向；有些人是突然在睡夢中出現指示，也有人慢慢想出來的。要馬上記下來，因為許多好主意在事後會忘得一乾二淨。這時候可以開始經營實驗日誌。
- 這些決定，對你將來的研究工作，有很大的影響；唯有正確的洞見，才能達到正確的結果。這很像當年哥倫布航海西行，他相信地球是圓的，一直往西走將可以回到原地；而他所根據的資料，只是觀察海上歸來的帆船船桅，總是先看到最高點。
- 有時運氣也很重要，哥倫布要是不走東西向，而是走南北向，他可能陷在北極冰洋，永遠回不了葡萄牙，雖然他的理論正確；但選擇東西向卻可以用常識判斷，有趣的是常識在科學研究上，常常扮演重要角色。
- 有空多多讀科學家的傳記，或是他們寫給年輕科學家的建言 (推薦 科學之路)，這些個人觀點可能比研究論文更具有啟發性，期能漸漸培養出對科學的品味 (taste) 與格局 (scope)。因為找到核心的研究題目至為關鍵，將近一輩子投下去的努力才有意義，而重要題目通常需要慧眼來辨識與察覺，這有賴於高超的眼光、品味與格局，而非人云亦云的跟著做，況且有了優雅的科學品味，也就不會發生論文造假事件，因為後者太不優雅了。

0.1.4 草擬研究大綱：

經過上述的醞釀後，開始條舉出可能進行探討的題目，每題考慮以下三點：

- 要解決的問題是什麼？請用筆把問題寫下來，越簡短越好，但是敘述要清楚。
- 要用何種方法來解決此一問題？
- 預測可能遇到的困難、對策與備案。

0.1.5 確立研究題目：

- 與指導教師檢討上述大綱，依時間或能力決定一題或兩題，有時候必須試做一些預備實驗，投石問路。
- 研究主題要明確，有清楚的攻擊目標，切忌散漫無章，眼高手低。比較基礎的研究題目，通常難度較高，也需要較長時間與研究天分，但若完成其回報相對較大。
- 在搜尋資料時眼光要放寬廣，以便在論文的概論部份，做比較完備而嚴謹的回顧，再由其中選出最重要且合適的題目；但決定題目後，則集中力量在一個攻擊點。

0.2 實驗日誌：

從一開始就要有良好的實驗記錄習慣，實驗日誌是研究者的生命記錄，也是所有研究成果的最終依據。

◆科學之路：第二章 實驗

0.2.1 實驗記錄的座標表尺：時間！

- 以六位數字表示日期，如 990823 為 1999 年 08 月 23 日；此串數字，一百年才會重複一次。所有記錄均得載入時間，並作為記錄的名稱 (如下述 0.2.3)。
- 設計製作『週記錄表』或『月記錄表』可鳥瞰整體實驗，並作為清楚的綱要或地圖。

0.2.2 記錄方式：

- 每一記錄單元獨立成篇，以日期命名 (見 0.2.3)；記錄內容分條列舉，並以 (1), (2), (3) ... 編號標示，每一小條單獨敘述一個說明或觀察。
- 記錄內容以『日記體』為主，像說故事一樣，平鋪直敘，詳細描述每一細節，有結果則需製表或作圖；避免使用奇怪的代號，日後可能自己也忘掉代號的意義。
- 若有膠片、照片、X-ray 底片、記錄紙、轉印紙、藥品標籤等，均需小心裝在透明袋，或直接黏貼在記錄本，加以標示及說明，並在文中詳細描述。目前電腦影像處理平台非常發達，使用數位方式紀錄也很方便。
- 每頁均得標示頁碼，頁碼自始連貫至終，與下述記錄的分類命名無關。

0.2.3 記錄的分類命名法：(圖 0.1)

- 依記錄內容，分為 計劃 (P) → 操作 (E) → 結果 (R) → 討論 (D) 四類。可以 P-E-R-D 個代號說明此記錄的性質，及各記錄單元之間的相互關係，方便追蹤。
- 實驗之起點為計劃擬定，如 [990823-P1]，執行此計劃則為 [990823-P1-E1]，此實驗之結果整理為 [990823-P1-E1-R1]，對此結果之討論為 [990823-P1-E1-R1-D1]。但不一定要固守 P→E→R→D 次序，可省略任何一點。
- 若同一天有兩項實驗計劃，另寫為 [990823-P2]，其執行為 [990823-P2-E1]。
- 若兩個不相關的計劃同時在進行著，可在日期後面以字母區分，如 [990823X-P1] 及 [990823Y-P1]；每一計劃自成系統，亦可分開為兩本記錄簿。

0.2.4 實驗計劃 [P]：

針對一短程的實驗目標，進行紙上作業計劃，並設計最可行的實驗流程。

- 收集所有已知的實驗方法，仔細研讀之後，選出一或二最適當的方法為主要參考；若完全依照某實驗方法，而且已經有了操作流程與步驟，那就比較單純，先直接跟循現有的步驟。
- 整理出可行的實驗步驟，一步一步以流程條舉寫出，註明實驗條件及細節，像在寫電腦程式或電影劇本。正式操作前，要先在腦中演習一次流程。

- c. 整理出所使用的藥品清單及其配製方法，盡快找到所需藥品是否有庫存，否則提早訂購以縮短等待時間。
- d. 整理實驗所必要的儀器清單，事先檢查或洽借，並學習使用方法。請特別注意，有些儀器或實驗需要執照，且必須預先取得才能操作 (例如：基因重組實驗、放射性實驗、動物實驗)。
- e. 對可能出現問題的步驟，要事先與專家討論其注意重點，以趨吉避凶，或預想出解決方案。

◆研究生涯 (9) 規劃時間、規劃生命、豐富人生

0.2.5 實驗操作 [E]：

這是研究工作的主戰場，乃是整體成敗的關鍵時刻，更是研究發現的起點。

- a. 完全依照實驗計劃 [P1] 進行，記錄所有進行過程 [P1-E1]，小心觀察種種操作細節，寧可多記，勿省略任何可能的影響因素 (例如：離心中途打一次雷、反應顏色有點偏深等)，有點像福爾摩斯在犯罪現場的觀察記錄。
- b. 若實驗流程很複雜，建議事先在 [P1] 製作一個執行流程表，以便引導實驗之正確進行。通常在正式的記錄本之外，可另設一本實驗桌上使用的現場記錄簿，先在現場很快記下來後，再慢慢整理到正式記錄本。
- c. 假如第一次實驗操作 [P1-E1] 失敗，在檢討後若原計劃不改變，則進行的第二次操作名為 [P1-E2]。
- d. 若檢討後決定改變原計劃，則 [P1] 取消，必須重新擬定計劃，另立一新日期。

◆研究生涯 (4) 『搶救貧窮大作戰』與『電視冠軍』

0.2.6 實驗結果 [R]：

不論成功或失敗，仔細撈取事實真相均能獲益，整理出得意的結果圖表，是生命科學研究的重要核心。

- a. 就實驗所得數據，一一整理出結果。無視實驗結果之成敗，都要製成正式圖表，因為數據若不整理成圖表，就無法呈現可以理解的相貌，不能對實驗結果進行分析與思考。
- b. 對所做出來的圖表反覆進行觀察與討論，並以日記體文字記錄，描述實驗所透露出來的信息。可把實驗結果的重要圖表貼在書桌前 (或電腦銀幕的桌面)，朝思暮想，可能會有新發現，但也常導致重新繪製。
- c. 結果不佳時，特別要慎重整理與檢討，絕對不能隨手一丟了事，因為即使失敗的實驗，也要好好把結果圖表做好，從中榨出一絲線索，做為下次改善的起點。
- d. 整理圖表是一門大學問與藝術，優良的圖表通常是一篇論文的核心與亮點，平常多觀摩傑出論文上的圖表安排方式，都可引以借鏡作為設計的模範。

◆研究生涯 (3) 牛肉麵不好吃只換筷子是沒有用的

0.2.7 結果討論 [D]：

對實驗所得結果進行反思，討論衍生問題或更深層的結果，甚至察覺所得結果是否為假相。

- a. 結果與討論一向很難清楚劃分，許多論文把兩者混合在一起寫，其實有其合理性與實際成效。因此在寫結果的時候，也可以當場帶入討論，一氣呵成，那就把 [R1] 改成 [RD1] 以標明性質。
- b. 強迫自己對結果圖表，撐出最大限度的想像，儘量擠出更新的觀察與見解。不要忘記與同學或老師討論，這時能有他人的意見極有幫助，他們最好扮演『忠誠反對黨』努力批判你的結果。很多時候實驗雖然看似大成功，但要思考可能造成相同結果的假相，若確定是假相就要及早醒悟，以免誤入歧途太深。
- c. 由結果可能衍生出更多問題，需提出可能說明，並建議解決方式。對失敗的實驗，更要找出改進的方法，以作為捲土重來的支點。不要忘記跳出實驗現場，以更寬廣的角度，反覆檢討整個研究方向。若原先的 [P1] 到此為止，則另寫新的計畫，另立一個新的日期命名。
- d. 生物實驗幾乎都是經過多次失敗後，才逐漸由經驗中累積成功。面對失敗是相當艱苦的歷程，也是每個研究者都會遇到的試煉，一定要冷靜分析失敗原因，想辦法從中脫困。與其他人討論是很重要的行動，先找實驗室有經驗的學長姐，再來就是指導教師，通常都可以找到解法，然後再努力做下去。不要害怕向實驗室或學校單位以外的人請教，網路可能也有相關討論，學術界通常都很樂於分享經驗或秘方。

0.2.8 應用心得：

- a. 以日記體方式記錄，是一種自我的對談及反思，我經常在筆談記錄過程中，看到問題的答案自動跳出紙面；很可惜的是，同學們大多懶於做這種記錄與省思，一方面是非常耗費時間，另一方面則是書寫能力退化。
- b. 積極的研究生活，每天可經歷一個 P-E-R-D 循環，並由當日的結果與討論規劃次日的計畫 [P]。若短期內對問題無法得到解答，可以等一些時間再回頭細讀當時的實驗記錄，可能會有不一樣的心得。
- c. 隨時把實驗結果圖表整理出來，寄給指導老師一起討論，或在 Lab meeting 口頭報告，強烈建議可整理成一頁報告 (0.3.5 [One-Page Show](#))。當記錄篇數累積很多之後，可作一張 index 表，並註明各實驗摘要，方便查閱。
- d. 通常比較重要的研究題目都有很高的挑戰性，也就是實驗的結果經常是失敗的，因此如何面對失敗，並且由困境中奮力走出一條自己的路，對科學工作者來說，是必備的人格特質。因此在此之前，必須先確定自身是否適合走研究工作，以免將來陷入進退兩難的窘境，請參考 0.3 後面 [問題集](#) 的一些反思。
- e. 雖然市面上有很多數位式的實驗紀錄平台，很方便且更有效率，但我的實驗室目前還是規定學生使用方格紙型式的記錄本，以手寫方式如法記錄。原因無他，用筆用手寫在實體紙張，還是最原始又可靠的紀錄方式，至少在剛進入實驗室生活的前幾年，體驗這樣的基本研究儀式與精神，應該是值得的 (畢業後就管不了)。

圖 0.1 條列式的日記體紀錄 P-E-R-D

複雜的實驗流程，事先寫好詳細步驟，並在紙上演習。

No. E-138
Date 91-07-20 (±)
[910720 E-P1] 確定 SCS-ASL pathway =

① 為了確定在 SCS-ASL pathway 對 CS* 作用的專一性，必須 check SCS 及 ASL 兩個 points。原則是以 Asp 來抑制 SCS 對 CS* 的催化，以 SAICAR/AS 抑制 ASL 對 SAICAR 的催化。

② Protocol 如下，先從舊法型備 1 mL C-AIR (E-133D)：

1.0 mL
↓ 50 μL → B-M rxn
0.9 mL

0.1 mL ①	0.6 mL ②	0.2 mL ③
↓ + 12.5 mL CS*	↓ + 75 mL CS*	↓ + 25 mL CS*
↓ + 12.5 mL SCS	↓ + 75 mL SCS	↓ + 25 mL SCS
↓ + 12.5 mL ATP	↓ + 75 mL ATP	↓ + 25 mL ATP
↓ + 5 mL ASL	↓ + 75 mL H ₂ O	↓ + 25 mL Asp 0.4M
↓ + 7.5 mL H ₂ O	0.9 mL	0.3 mL
0.15 mL	⑤ 30 μL: 0.1, 3, 5 hr	⑤ 0.1, 3, 5 hr

⑤ 16:00

0.2 mL	0.2 mL	0.2 mL
↓ + H ₂ O	↓ + AS	↓ + SAICAR
↓ + ASL	↓ + ASL	↓ + ASL
⑤	⑤	⑤

各 10 μL
各 5 μL
各在 0.1/2, 1, 2 hr

TLC-25 (①, ②, ③) × (0, 1.5, 4.5, 6.5 hr)
TLC-26 (④, ⑤, ⑥) × (0, 30', 90', 120')

實驗記錄系統

P-E-R-D

本系統以日期命名，把每天的記錄，有系統的連貫起來，方便日後查閱整理。

P-E-R-D

[990823X-P1-E1-R1-D1]

年 月 日 計劃代號

日期	實驗記錄流程及經過
990823M	[990823X-P1] [990823X-P2] [990823X-P3] 無故而終
990824Tu	[990823X-P1-E1]
990825W	[990823X-P1-E1-R1] 第一次實驗完成，決定再試一次。 [990823X-P2-D1] 還沒進行實驗，就發現行不通。
990826Th	拼了！ [990823X-P1-E2] 但仍可得到一些指南。
990827F	[990823X-P1-E2-D1] → [990827X-P1] 由兩次實驗結果，決定新的計劃。
990828S	[990828X-E1] 即將開始的實驗。 [990827X-P1-E1]
990829S	[990828X-E1-R1] Thinking... [990827X-P1-E1-R] 終於有了初步的結果。
990830M	[990828X-E1-R1-D1] [990830X-R1] 有時不用做實驗也會有結果，例如經由電腦的搜尋，或者別人的論文所啟發的結論。
990831Tu	休息一天 [990830X-R1]
990901W	日期更新 [990823X-P1-E2-D2] 過一陣子再回顧以前的記錄，經常會有新的看法或結論。

實驗之

請嘗試以 P-E-R-D 系統記錄你的研究歷程，可參考 A2 實驗之路說明。

0.3 實驗報告：

0.3.1 通則：

- 實驗報告是完全根據你自己的實驗過程寫出來的，因此除了有部份引用他人文獻之外，都必須是實實在在的操作過程，以及所推得結果之完整記錄，無法重複的實驗請不要列入報告。
- 報告長短與成績並不成正比，確實而有創見的一句話，比千百行空話要有價值。科學論文不要使用口語化的文字，更不能用情緒性字眼，請以理性而客觀的態度，如實描述實驗結果，中肯地說明你的觀察與推論。
- 實驗課一組雖然有兩個人，但每個人要寫自己的實驗報告，膠片等影像結果可以用掃描或照相附上，儘可能使用電腦文書處理及科學作圖軟體呈現報告。你的實驗結果應該與同組者類似，但解釋與觀點可以不同。

◆ 研究生涯 (6) 論文打字、排版、參考文獻不能出錯

0.3.2 實驗報告的結構：

以下建議實驗報告的構造與寫法，但論文格式本無一定規格，只要寫得合理、正確、一致，均為好的研究報告。事實上隨手翻開一本科學期刊，參照裡面的論文格式，前後一致地用心寫報告，也可以有很好的成果。

0.3.2.1 Cover: Abstract and Content:

第一頁為封面、摘要與目錄，上半頁依序寫明：實驗課碼、題目、組別、作者、繳交日期等基本資料，接著在中段列出本報告的摘要文字 (Abstract 或 Summary)，務必簡要且明確，通常以 200 字為度。下半頁請整裡出一張目錄表，標出報告中各個項目之頁數，而其內容則依照下面順序。

0.3.2.2 Introduction:

首先說明目前已發表相關科學論文的進展與成果，請特別注意這個部分很容易陷入抄襲，雖然描寫完全同樣的事實，也不可直接抄錄別人文字，要用『自己的話』重新寫出來。若引用已發表文獻務必註明出處，要特別小心不要漏掉別人已經發表的研究成果。最後簡要描述本實驗的動機與目標，後面這一段很重要，務必在此呈現出整個研究的意義，期能引導讀者繼續念下去。

0.3.2.3 Materials and Methods:

請寫出你自己實際的操作步驟，記錄所進行的實驗流程與條件，而非複製講義或論文上的文字，這部份很容易被指控為抄襲。若完全依循已發表的研究方法，請加註說明出處即可，不必原文照抄一次，沒有任何意義。但如果操作步驟有修改，或者過程有特殊的觀察，則必須如實寫出來。

0.3.2.4 Results:

條理分明地寫出你的實驗結果，照實陳述觀察所得結果。實驗數據要經過整理後，並作成圖表以利判讀；不要將原始資料原封抄錄或貼在報告上 (這些要收在你的實驗記錄本裡面)。若同一實驗重複嘗試了多次實驗，請去蕪存菁，只整理出最有意義的一次結果，以免空佔篇幅且迷惑讀者，但也不要遺漏重要結果。注意必須維持單一次實驗的完整性，例如不能把兩張不同的膠片切割出來拼成一張膠片，然後推出結論；尤其實驗組與控制組必須是同一次實驗，不可把實驗組搭上另一次操作的控制組 (它們各屬不同次實驗)。

0.3.2.5 Discussion:

由結果所得到的觀察，進一步綜合分析，推導由結果所透露出來的信息。若有與事實或已知不符的現象，請仔細討論或解釋之。通常都要引用已發表的論點來比對討論，並且引伸出可能的解釋模型，此一部份最需要發揮你的專業實力。千萬不要漏掉別人的貢獻，嚴重的話被誤以為搶他人 credit，影響自己的信譽。

0.3.2.6 References:

報告中若引用他人結果，一定要列出參考文獻。參考文獻的寫法要依循規定格式，不同期刊有不同格式，請選定一種寫法，且整體文獻的格式要一致 (推薦參考使用 [Plant Physiology](#) 的格式)。如 [0.1.2.1](#) 所述，建議使用 EndNote 套裝軟體來整理參考文獻，但請注意由網路匯入的每一條文獻，其寫法未必符合格式，必須以人工一一修改才能使用，最常見的是 Title 的大小寫不一，以及期刊名稱所使用的縮寫形式不一致。

0.3.2.7 Figure and Table:

- a. 圖表一定要精確製作，正確而易懂的圖表，最有助於研究結果的判讀。圖表都要加說明文

字，優秀的圖表自己會說話，只要研讀單獨的圖表即可瞭解實驗的結果。

- b. 雖然不嚴格限定，但使用電腦軟體作圖已成為必要，SigmaPlot 最為常用。作圖的最佳範本都在現成的期刊上，多參考別人如何安排圖表內容，是最佳的學習方式，剛做好的圖也要反覆檢討修改。

0.3.2.8 Supplement:

有些次要的圖表，或者資料庫太大而不能塞進報告，可以放在 Supplement 中，附在正式報告後面。其圖表作法完全與正式圖表一樣，但也要一一編號，並在其編碼前加上一個 S 字母，例如 Supplementary Figure S1, Supplementary Table S1 等，並在本文中說明這些補充資料。最近拜電腦科技之賜，很多論文都附上分子的立體構造檔案、研究的相關影片等，都有助於對該論文的說明與理解。

0.3.3 文章寫法建議：

0.3.3.1 先寫下大綱骨架：

不知如何開動寫作？先把骨架畫出來，安排好它們之間的先後順序，再填入文字。最基本的骨架是依上述之 Introduction → Methods → Results → Discussion 流程，於每一大項下，把所要寫的內容分點條列出來，再於各點填入說明文字；說明文字要有層次，寫法如下所述。

0.3.3.2 文句含邏輯且有層次感：

文字敘述有層次感，相互連成一氣，前後邏輯通順，是為上乘。例如：先收集重點整理出 b, z, c, d, x, a, y 等單點敘述，分析其內容之相關性，再以箭頭連結成幾個大類：(1) a → b → c → d; (2) x → y → z 依此關聯性，分成 (1) 及 (2) 兩點以文字連貫描述。上述重點也可以寫在小貼紙 (Post-it) 上，再黏貼安排順序。

0.3.3.3 文章使用精練短句：

- a. 冗長的文字實在令人無法卒讀，也造成語意不清、不知所云。兩個標點符號間，最多不要超過 20 個中文字，最好保持在 10 個字左右。
- b. 寫好的文句，要再三反覆推敲，看文字是否通順，能否讓讀者輕易瞭解；若刪除某些文字後，完全不會影響文句的意義，則請去除這些文字。
- c. 避免不必要或輕浮的文字，勿使用太口語化的文句。請預留充份的時間整理報告，倉促寫出來的報告，通常不會太好。寫好的報告，請放置幾天之後，再拿出來仔細唸一次，可能會出現很多要修改的地方。

◆ 研究生涯 (12) 科學文章應使用簡明文句

0.3.3.4 先整理結果圖表：

- a. 在準備論文時，有一個比較容易下手的途徑，就是把結果的圖表先分別整理出來，然後把各圖表的先後順序串連起來，排好 Fig. 1, Fig. 2, Tab. 1, Fig. 3...等次序。當以如此方式作圖並排好次序後，你心中應該已經有相當的定見，整體的故事架構大略浮現，並找出本研究報告的主要亮點。

- b. 接著依據上述所擬的圖表系列，看圖說話寫出文字部分，再依結果寫出討論，然後才回去寫 Introduction，而 Material and Methods 可在任何時候撰寫。可把 Abstract 留在最後，一定要簡潔、精確、突顯亮點，聽過一個期刊編輯說，通常他在看一篇投稿論文的 Abstract 時，大概就知道最後會不會通過審查。
- c. 在整個實驗過程中，要同時收集所有的相關期刊文獻，至少要讀過每一篇摘要，這除了準備作為參考文獻之外，也是你寫 Introduction 或 Discussion 時的材料與論述根據。

0.3.4 編輯注意事項：

0.3.4.1 英文大小寫不可隨意：

當中文段落內夾有英文字詞時，不要隨意使用英文大寫字母。一個基本原則是，假設這些英文字詞在英文文章中，應該大寫的才使用大寫，否則維持小寫字母。不用說，英文的拼音一定要正確，換行時單字要依音節來分節，否則儘量不要斷字，遇學名則要用斜体字 (italic)。

◆ 研究生涯 (6) 論文打字、排版、參考文獻不能出錯

0.3.4.2 英文空格要注意：

夾雜中英文時，中英字詞之間一定要空半格，否則就如英文單字之間沒有空格一樣 (Canyoureadthismessage?)，根本很難讀懂；MS Word 會自動在中英文之間空格，因此就不要再空，其他應用軟體都要注意空格。數字與單位之間也要空半格 (如_5_mL_而非 5mL)，但溫度及百分比除外 (如 37°C, 100%)；英數刮號外側要空半格，但刮號內側則不空；等號及加減號的前後各要空半格，例如 1+_2=_3，不要打成 1+2=3。

0.3.4.3 可使用中文名詞，但不要勉強翻譯專有名詞：

以中文撰寫報告時，可使用中文專有名詞，但對那些尚無確定中文名稱的英文名詞，則不要硬翻成中文，請直接用英文名詞。一些公認的常用縮寫 (如 DNA, Glu) 直接用英文，但是澱粉就不必硬寫成 starch。Plant Physiology 整理出一張表，列出可以直接使用而不必定義的縮寫 ([外連 pdf](#))，其他縮寫要在文中第一次出現時，就先註明全名或定義。

0.3.4.4 其它細節：

- a. 版面平實比花俏要好，不要用太多不同的字体變化、花邊或複雜背景，以免喧賓奪主。
- b. 標題或重點可用較大的字型或 **黑体字** 突顯，主文請全部使用 **細明体** 並配合 Times New Roman 英文字型。
- c. 報告主文部分要編頁碼，但前面的封面及目錄等不編入正式頁碼，另以小寫羅馬數字 (i, ii ...) 編碼。
- d. 文章的撰寫與版面安排，是一種能力與眼光，無法在短期內達致上乘；但只要多看、多效法別人或期刊上的成品，多少也能製作出像樣的作品。

0.3.5 如何整理 One-Page Show：

很多學術會議採用 Poster 展示方式，作者可把自己的工作成果，以一面海報張貼出來，簡單而明瞭地讓參觀者獲得所要的信息。本課程每週的實驗結果，也是以此種方

式，將結果簡要整理在一張投影片中，在規定的簡短時間內，精確報告每組的結果，並提供一個現場討論的機會。

0.3.5.1 One-Page Show 原則與成效：

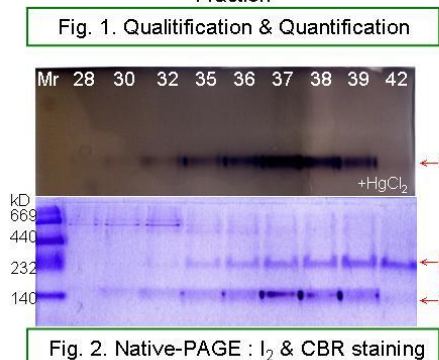
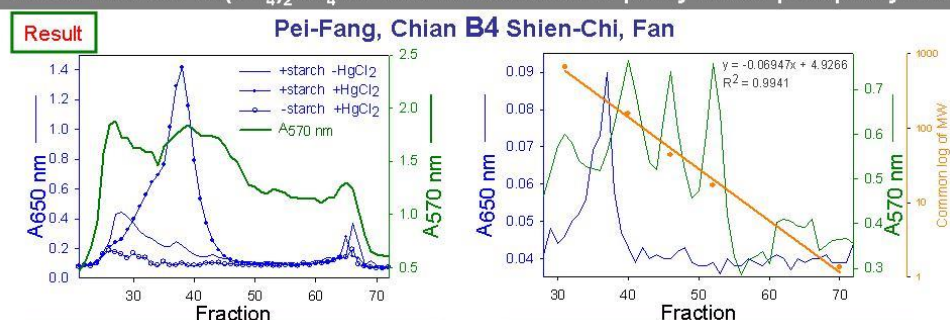
- 編輯 One-Page Show 請用 PowerPoint，請參考網頁上有關 PowerPoint 的做法。以幻燈片的格式製作：大小建議配合目前大家還在使用的投影機銀幕 (4：3 比例)、橫向、底色全白，不要加上任何底色花紋或背景，可參考酵素化學實驗課程各組 One-Page Show 報告。
- 進行研究工作時，你也可以用 One-Page Show 方式，定期向指導教授提出簡單的成果報告，共同檢討實驗的進行方向。沒有經過整理的結果，很難有效去討論與評斷。
- 幾十年來，經過無數次 One-Page Show 鍛鍊後，發現妙用無窮。首先，我們培養了學生整理資料的能力，知道什麼是重要的，什麼是可以去除的，然後把實驗的重點呈現出來。接著，讓學生在最短時間內，把自己的實驗講清楚，並且向聽眾呈現亮點。同時，在場其他同學則練習團隊討論，觀摩別人的成敗經驗、資料整理、版面編輯、現場表達，並能提出關鍵問題以進一步討論。

0.3.5.2 整理 One-Page Show 步驟：

- 所有資料限於一頁之內，因此要去蕪存菁，留下最重要者；用中英文均可，但內容以圖表為中心主軸。
- 字形要夠大才清楚，題目及標題用中黑體 (至少 14~18 號字)，內文用細明體 (最小 12~14 號字)；中文內的英文，請用一般英文字形 (Times New Roman)，不要用全形或中文字形的英數 (like this)。
- 用最上方的一或兩行，寫明題目及組別、報告者姓名，也可以加一行標題，簡要說明整體結果。

圖 0.2 One-Page Show 每週實驗成果報告

X2 Gel filtration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20~60% fractionation to purify starch phosphorylase



Discussion

- False SP activity around the 28th fraction
- True SP activity around the 38th fraction is consistent to the native-PAGE
- Detected native MW is 227.10 kDa
- How about the 28th & 66th fraction?



- d. 材料及方法可以不寫或僅大略描述，但若有創新改進或意外發現就要寫出。
- e. 直接把結果的圖表貼上，並且加上精要說明文字，讓讀者可以馬上獲得完整資訊。
- f. 若你的圖表太多，請去除不重要者，一定要在規定時間內講完；若真的都很重要，合併重整類似的圖表。
- g. 做好之後請練習試講多次，要能清楚而流暢地表達重點。報告進行時，當場把同學、助教或教師所提的問題與討論內容，忠實記錄下來。

◆ 研究生涯 (8) 演講的緊張與焦慮可以對應

◆ 酵素化學實驗 One-Page Show 報告 (臺大生技系碩士班課程) [請上網以 [ECX 2005 Gallery](#) 搜尋]

問題集

(以下的問題看來有些不太尋常，但卻極為重要，應該好好問一下自己，是否真的對科學研究有興趣，且願意無悔地投入)

其實，目前最大的問題在於，你自身是否適合從事科學研究？對於即將踏入研究生涯的人，更應該仔細思考一些原則性的問題：

- a. 誠實地反思自己對科學研究有高度興趣，或者只是繼續升學？做自己有興趣的事，而且還可以取得學位，是人生相當痛快的事，但其所需付出的代價也很高。研究工作幾乎是從失敗中慢慢湊得成功的，要有耐得住失敗的勇氣與決心，決不因為妄想快速獲取成功而背離真實。
- b. 是否有決心可把事情『實實在在』做好？科學研究是無法馬虎的，因為在整個研究過程中，會有許多陷阱與假象，只要有一點疏忽，就很容易被假象瞞騙。
- c. 檢討自己是否為固執不化的人？即使實驗結果看來非常成功，若發現有一絲破綻，馬上變成『忠誠反對黨』回頭攻擊原先的成果。越有智慧的人，越早能識破被騙的事實；愚魯之人則常固執在被欺騙的迷思中，無法自知及自拔，甚至連續被騙都不自覺。
- d. 你是否真的喜愛大自然？不但喜歡花朵的鮮豔與造型，也為其分子構造著迷。具有創造力的科學家，通常都不會侷限在一個小角落，能夠向四方伸出觸角探索。很像一隻愛玩的小貓小狗，到處抓抓爬爬，探險世界；牛頓說他只是在海邊撿貝殼。
- e. 要把自己變成一個偵探，具有深刻的觀察力，有超凡的想像力，能夠洞見事實於迷霧之中，像福爾摩斯一樣；也要是一個探險家，能夠勇敢地探索未知，對抗極為不利的環境條件，像哥倫布一樣；也要用最純真的眼光去看這個表象世界，才能真正了解根基於物理或化學原理的生物世界之本質，就像費曼一樣。

0.4 建立實驗室：

0.4.1 儀器設備：

實驗室自用小型儀器歸納為 電泳 (electrophoresis) 與 層析 (chromatography) 兩類，大型有 離心 (centrifugation) 及 測光 (spectrometry) 兩種。較大型的基本設備，建議組成區域性共同儀器室，由鄰近幾位教師共同設立，並且一起使用與維護。其它更大的貴重儀器，就要到學院級或跨校的貴重儀器室使用，若由教師個人單獨經營，通常是不切實際且空耗經費及人力，應該多支持使用 **共同儀器室**。

◆生化共同儀器室 Pub (參考臺大生技系生物化學組的共同儀器室) [上網以 [BST Pub](#) 搜尋]

0.4.1.1 基礎設施：

純水製造機、製冰機、高速冷凍離心機 (20,000 rpm)、微量離心機、電泳及轉印系統 (含供電器)、ELISA 光度計及各種層析管柱系統 (包含分割收集器)。其中電泳與層析包含很多獨立小器具，使用上較複雜。

0.4.1.2 個人電腦及周邊：

一般生物化學實驗的運作已經離不開電腦，不管是套裝軟體或網路資料庫的應用，均不可或缺。要多多利用電腦來加強自身研究工作的規劃、整理、呈現、發表。

◆研究生涯 (2) 善用電腦軟硬體提升你的能力與表現

0.4.1.3 冰箱與冷房：

- 每個冰箱都要妥善規劃貯位並指派使用人或管理人，要詳細表列冰箱內貯存之物品。同類的藥品要先分類再用小盒裝在一起 (貨櫃化)，勿零散堆積，以免臨時翻找費時，導致冰櫃失溫。注意冰箱門隨時要關好，尤其是零度以下的冰箱，若箱門沒關上而造成回溫，對藥品及冰箱都是超級災難。
- 零下的冷凍貯藏，不要使用無霜冰箱，因為定時自動除霜會造成冰箱內溫度上升，藥品可能因反復的『凍結-解凍』而失去活性。若不得已必須使用自動除霜冰箱，可把藥品裝在普利龍盒內，使溫度變化所造成的傷害降至最低，也可減輕因停電所造成的傷害。
- 許多蛋白質操作都要在低溫進行，通常使用『走入式』冷房 (cold room)，但最近漸漸改用裝有透明門扇的大冷藏室，類似便利商店裡銷售冷飲的大冰箱，也相當好用，都要注意溫度是否維持在 4°C 左右。
- 類似的實驗設備還有植物生長箱，乃至無菌操作檯、細胞培養箱等，都需要專門管理及使用知識。

0.4.1.4 進一步設備：

通常備有：超高速離心機、冷凍乾燥機、超微膜過濾、雙向電泳、等電聚焦電泳、分光光度計 (UV 及可見光)、HPLC 或 FPLC、螢光或電子顯微鏡。最近對核酸或蛋白質電泳的紀錄儀器 (如 UVP)，也因其方便性與靈敏度而變得很重要。

0.4.1.5 特別設備：

有液相閃爍計數器、原子吸收光譜分析儀、毛細管電泳等，其他進一步的貴重儀器如：蛋白質定序儀、質譜儀、影像分析系統、分子結構電腦工作站等，有些分析可以送相關廠商的收費服務平台。另外，若進行放射性實驗，則一定要在專門設立的放射性區域進行，所有操作人員也都要有相關的培訓與執照。其他需要證照的操作還有：基因重組實驗、動物實驗、人體實驗等，有關者請儘早受訓才能進行實驗。

0.4.2 儀器管理：

- a. 每件儀器應指定專人管理，負責保管零件、附件、說明書，並做初級保養，同時必須定期舉辦工作坊培訓使用者。每種儀器都應儘量使用，在五年內發揮其最大功能，因為通常十年後就無法再維修 (缺乏零件)。
- b. 光學或精密儀器，應放在有除溼機的密閉室，同時注意環境的電壓是否穩定；會發熱的器具則集中放在通風處，並且注意電容量是否足夠，以免電源過荷造成災害。
- c. 使用儀器前，要先熟悉其操作方法，注意大部分儀器在使用前都需要受訓，若有問題一定要請教管理人，使用前後必須確實登記 (登入、登出)，有任何毛病要立刻報告管理人，不可隱瞞。

0.4.3 小型用具：

- a. 每個人桌上都需要的小型用具：自動吸管 (20, 200, 1000 mL 三種)、自動吸管頭 (黃色及藍色) 及其盒子、玻璃試管及試管架、計時器、標籤紙、馬克筆、小剪刀、鑷子、滴管、藥杓 (spetulas)、天平秤量紙、保鮮膜、鋁箔紙、冰筒、手套、擦拭紙。另外還可能需要：洗瓶、濾紙、各式漏斗、ELISA plate、膠片染缸、塑膠培養皿、紗布、棉花、透析袋、透析夾。實驗室應建立小量庫存及管理系統，隨時補充物品，以保供應無缺。
- b. 實驗室應備有的公用小型機器：桌上離心機、微量離心機 (microfuge)、大小離心管、均質機 (或果汁機、磨粉機)、pH 測定計、電動天平、熱水浴、磁鐵攪拌器、蠕動式幫浦 (peristaltic pump)、試管振盪器 (Vortex)、轉動式振盪器 (rotary shaker) 等。當秤量僅數 mg 藥物時，先檢查電動天平的靈敏度是否足夠。
- c. 常用小儀器如天平、pH 測定計等應集中放在定位 (公用區)，用畢立刻清理好歸位！天平、pH 測定計及自動吸管都要經常校正。自動吸管可吸取純水在天平秤量，每 1.0 mL 水應秤得 1.0 gm，若誤差在 1% 以上，立即送修。任何儀器若疑似故障，要貼警告紙條，並通知管理員。
- d. 磨碎動植物材料時，經常用到乾冰或液態氮，都要向專業廠商預先購買，特別注意其貯存用具 (受凍裂開)，且操作時要小心避免被超低溫凍傷，一定要使用護目鏡與防凍手套。

0.5 藥品試劑：

0.5.1 適量庫存：

- a. 數十年以前的實驗室都有一個藥品櫃，收集實驗室的各種藥品，現在還是有藥品櫃，但已經不是用來做長期大量庫存之用。近年來，由於庫存管理科學的發達，以及快遞服務的密集，在實驗室裡堆積大量藥品並非理想的策略，通常都訂購較少量的藥品，足夠做一兩輪實驗即可。
- b. 雖然如此，還是要注意供應廠商的可靠性，是否能準時運送，在下一輪實驗之前，把所需要的藥品準備好。酵素或蛋白質試劑比較不容易保存，通常都不會做很大的庫存，況且留下來的試劑別人都不太敢用。

0.5.2 貯存溫度：

- a. 每種藥品有其最適當的貯存溫度，切要遵守。一般分為：室溫、4°C 及-20°C 三種，又可依其為固体、液体或高純度者，分別置放。除了常用的大宗藥品 (如 NaCl) 之外，較精密或不穩定的試劑 (如大部分酵素) 最好不要大量屯積，因為貯藏時間太久後就無法確保其品質。
- b. 剛由冰箱取出之藥品，應在充分回溫之後才能打開，並且遠離水源；使用頻繁且不耐回溫的藥品，應少量分裝 (aliquot) 後凍藏，每次取用一個分裝，可不需等待回溫就開瓶使用，用後也不再回收凍藏。

0.5.3 藥品純度：

- a. 一般依純度及用途分為數級，例如最常用的 Merck 藥廠分為：合成 (for synthesis)、特級 (extra pure)、生化用 (for biochemistry)、試藥 (pro analysis 或 GR)。各種等級的藥品，價格相差很大，應當用在適當的實驗，否則不是浪費，就是因藥品純度不佳而導致實驗失敗。
- b. 許多商品所供應的酵素，是保存在硫酸銨懸浮液中運送，可保持酵素品質之安定；但使用前要先透析，除去硫酸銨，否則在硫酸銨下分析活性可能會造成誤判。也要注意酵素的來源，及其中所含的鹽類或添加物 (如甘油或防腐劑 NaN₃)，是否會影響你的實驗。

0.5.4 污染控制：

管制性藥品一定要依照規章定時填表報告，以免觸犯相關法律。臺灣大部分學校已經建立化學污染的回收管控制度，任何化學試劑均不得直接排入水槽，必須集中後由專業人員回收處理。在實驗室內，化學藥品的原液，以及其第一次洗滌液都要倒入固定之回收桶，小心貯藏。若直接倒入水槽而被追蹤舉發，肇事的實驗室將得自行負擔鉅額罰款，嚴重者可能要負法律責任。

0.6 個人用品：個人實驗桌上應該配備的小型用具清單請見 [0.4.3 a](#)。

0.6.1 個人藥品：

個人使用的藥品，通常都是配製好的溶液，上面一定要貼上標籤，註明日期、藥品名稱、使用人姓名等，藥品名稱不可用暗號，以免日後連自己都忘掉是什麼試劑。試劑不必配製太大量，因大多數藥品經久貯後均不太穩定。常常檢查緩衝液內有無長霉！個人的藥品應集中一處固定收存，切忌到處亂放。

圖 0.3 寫好你的標籤紙 Label all your reagents



濃度 試劑名稱 酸鹼度

1 M Tris-HCl pH 7.4
JRH 990823 Mon

姓名縮寫 日期



- (1) 注意藥品對**健康**的影響
- (2) 試劑純度濃度是否**正確**
- (3) 注意試劑的**保存**與效期
- (4) 小心所含**添加物**之影響
- (5) 把試劑**分裝**成單位使用
- (6) 減少重複之**冰凍**與**解凍**

0.6.2 立刻清理：

- a. 做完實驗後一定要『**馬上**』把所用過的儀器、實驗桌、用具等整理乾淨，回復原狀。離開前要從頭回顧，檢查所有使用過的儀器或實驗桌，也許會發現重要的藥品或樣本忘了收起來，或有貴重儀器忘了關機。
- b. 玻璃用具 (如試管、燒杯、三角瓶等) 使用後，要儘量在當日清洗掉，這是最省時省力的。用清潔液浸泡時，請使用液態的洗潔精，並在一兩天內清洗掉，因為可以說是『**越泡越髒**』的！

0.6.3 實驗記錄：

實驗記錄可說是研究工作的靈魂，要忠實地把實驗過程中，所有的設計、執行、觀察、結果、討論等，依循一套方法記錄下來。一些偉大的科學研究者，都有很精彩的實驗記錄本，最有名的就是 **達文西**。雖然目前電腦工具非常發達，市面有很多數位化平台，有些實驗需要以照相或影片來記錄，建議還是以紙本書寫方式為主，並且永久保存，日後若有爭議時將是最好的證據。

◆ 見 [0.2](#) 或 [實驗日誌](#)

0.6.4 離開實驗室：

當你畢業或因任何緣故離開實驗室前，要把所有儀器、用品等整理妥當，移交給接任者，最好列出交接藥品與儀器清單。你的實驗記錄本通常必須留在原實驗室，或經實驗室主持人 (PI) 同意才能帶走。有論文發表者，要把所有原始資料 (包括圖片與文字)，燒錄成光碟片 (或拷貝在隨身碟 USB 裡) 交給實驗室主持人。

0.6.5 個人安全：↓ 必讀三遍

許多實驗室內部的災難，很多是由小型器具或消耗品釀成的，因為這些小東西較多，且易被疏忽。一定要記得，無論操作任何實驗，都要帶護目鏡 (或眼鏡)。一些實驗室內常發生的危險物件與警告如下：

危險藥物：

Acrylamide：神經毒！勿吸入其塵埃，秤量時要戴手套及口罩。

SDS：秤量時很容易飛揚，要戴口罩並小心操作，否則吸入將會溶解你的肺泡。

溶劑及瓦斯：致癌、易燃！很多有機溶劑有害健康，並小心瓦斯外洩 (在外洩現場絕對不可觸動任何開關！避免產生火花導致氣爆)。

危險儀器：

離心管：注意平衡！離心管不平衡時，內容物可能會爆開來。

離心機轉陀：注意要密蓋！離心陀蓋子若沒蓋緊，蓋子會飛出，毀掉離心機。

供電器：產生極高電壓！漏電或接觸到電極時，會被電擊休克。

潛在的危機：

玻璃器具：檢查是否有缺口或裂痕！玻璃缺口會刮傷手，裂痕在加熱時會爆開。

微波爐：加熱要先鬆開蓋子！氣密物体在微波爐中加熱時，會發生爆炸。

衣著或配件：間接造成災害！長髮、涼鞋、太寬鬆衣褲、項鍊裝飾等都很危險。

膨脹反應：小心可能爆炸！加熱、加壓或抽真空，氧化還原反應，請小心都有爆炸可能。

接太多插頭：負載過度！插頭電源有一定的負載量，勿過度使用之，插座若有過熱溶解痕跡馬上換新。

特別注意：

儘量不要用**轉接插座**，若不得已必須使用，請換成最新的安全插座，不要接太多儀器。這種插座要有**過荷自動斷電**裝置，要放在通風處並隨時可以檢查，嚴禁堆在衣物下面。在實驗室內聞到**異味** (不見得一定是燒焦味)，一定要馬上追查源頭，發掘可能的危險。

其他：

任何災變發生時不要搭電梯！

每天結束回家前要巡查一遍！

值週同學確實負責公共安全！

不要帶太多錢在身上或背包！

不要深夜單獨一人在實驗室！

(若非得如此時，一定要隨身攜帶手機，任何緊急事件直接撥打 112)

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. 請指出酵化實驗室中，有那些儀器可能具有危險性？請至少例舉三種。 [1]
2. 請指出酵化實驗室中，有那些藥品可能具有危險性？請至少例舉三種。 [1]
3. 在使用天平之前，你要注意檢查那些事項，以求得最精確的稱量結果？ [2]
4. 當沒有正規的校正儀器時，你如何利用實驗室內的工具大略檢測天平的準確度？ [3]
5. 若沒有標準 pH 溶液時，你如何利用實驗室內物品校正 pH meter？ [4]
6. 在一般普通的實驗室裡如何快速地校正自動吸管？ [3]
7. 暑假期間常因維修、工程、限電或颱風而停電，你剛準備好某植物樣本的粗抽取液，每瓶 20 mL 共有 10 瓶，暑期要在冰箱裡冷凍貯藏，等開學後再以硫酸銨沈澱所要的酵素，若要重新做一次，你要如何規劃才能使樣本安然渡過暑假？ [3*]
8. 做 ELISA 時要用一種 second Ab-HRP 的連結體試劑，這是把抗体分子與酵素 HRP 用化學鍵連在一起的呈色劑，HRP 在反應後可以呈現黃色物質，以供定量之用。某生在兩個月內持續進行 ELISA 實驗，發現實驗所得的最大吸光度，一週一週下降，由最早的 1.5 降到 0.2。已知抗体及 HRP 都是相當穩定的蛋白質，其連結體試劑都經冷凍收藏好，每個分析步驟也沒有問題，請指出可能的失誤在那裡？ [5*]
9. 某生進行高速離心，使用四隻 30 mL 離心管，把試管兩兩各自平衡得非常準確，放入 16 孔的離心陀中以 15,000 rpm 進行離心，開始後不久離心機就聲響大作，聽起來是沒有平衡好，但同組同學目睹他有做好平衡，離心管都確實成對秤過後，再移到共同儀器室去離心。請問怎麼會這樣？ [3*]
10. 某生用光度計測 280 nm 波長的吸光度，來檢測層析管柱收下來的溶離分劃液共 50 支試管，結果發現這 50 支的吸光一律都很高 (> 2.0)，超出了可測定的上限，請問可能出了什麼問題？ [3*]
11. 續上題，助教知道之後，先向某生說抱歉後，換了一支測光管給他，結果稍有改善，勉強可以看出有蛋白質峰的起伏，許多吸光值還是都在 1.5 以上，請問這又是什麼問題？如何解決？ [3]
12. 有一種酵素藥品，買來時是 1 g 瓶裝粉末，要放在 -20°C 保存。若每次你要取出 50 mg 配製酵素溶液，大約要進行十多次實驗，你應該如何處理這瓶酵素？ [2*]
13. 某生進行酵素活性分析，需要以 ATP 供應反應所需能量，他就向 Sigma 購買 ATP 並進行實驗，雖然反應的確可以順利進行，但發現試劑的價格實在很貴，直到有一天老師看到藥品的瓶子，才驚覺弄了大錯，請問出了什麼問題？ [3*]
14. 大學部的生化實驗課正在做 CBR 蛋白質定量法，用 ELISA plate 其中的兩排，第一排八個位置加入標準蛋白質的系列濃度，第二排則做四種未知樣本的二重複實驗，某生

依照流程把各種樣本都加完後，每個孔洞再各加入 100 μL 呈色液。加完第一排後，老師走過來要他暫停，說他所加的呈色液不對，某生一查果然所用的 autopipet 被調到 150 μL 的位置而非 100 μL 。當他正要修改成 100 μL 時，老師急忙叫他不要改正，繼續照流程做完。某生覺得非常疑惑：[4*]

(a) 老師怎麼知道他呈色液加錯了？

(b) 老師為何不要他修正，而是直接做下去？

(c) 某生這樣做出來的結果，還能用嗎？

15. 某實驗室新買一座大型家用無霜冷凍冰箱，有甲乙丙丁四位同學各自操作實驗，分別把相同的藥品 X 放到冷凍櫃去保存，經過一個暑假貯藏後，甲發現活性只剩 30%，乙只剩 50%，丙剩 75%，而丁則有 90%。除了暑假有一次因颱風停電數小時外，他們確定沒有人故意搗蛋。請問為何發生活性下降情形？為何四個人的活性有差別？[4]

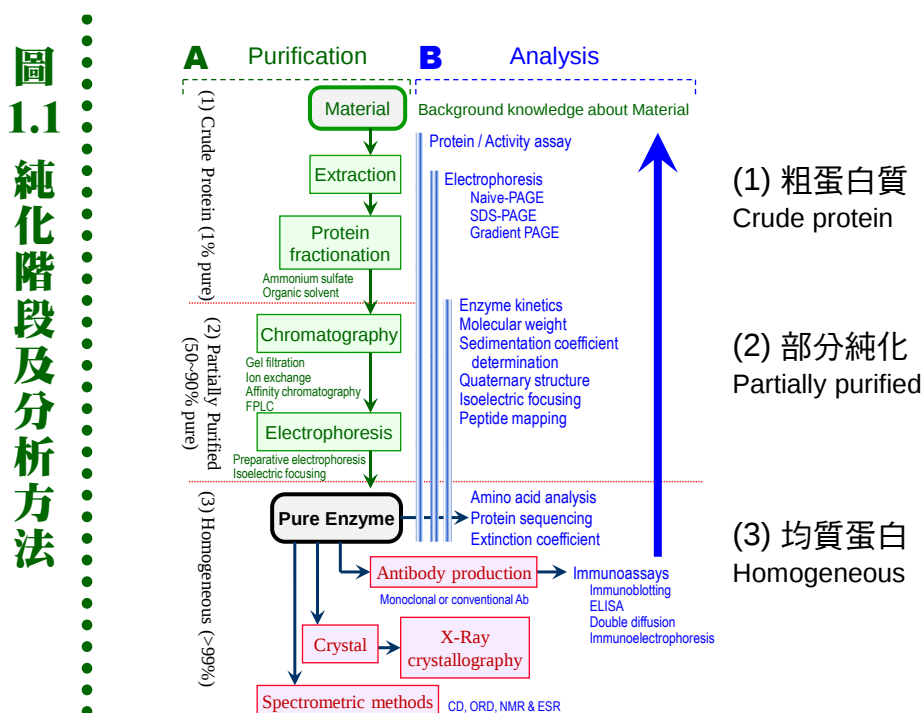
[題目後面方括號內的數字代表該題的難易程度，3 為中等而 5 最難回答，標有 * 為實際問題]

1 蛋白質抽取：

蛋白質的純化過程，可略分為三個階段：

- (1) 粗蛋白質 (crude protein)：由採樣開始→均質打破細胞→抽出全蛋白質，多使用鹽析沉澱法，可去除蛋白質以外的物質，並粗略地沈澱出目標蛋白質，都是利用蛋白質的基本物理化學性質，沒有什麼高科技但極為關鍵，令人深入體驗蛋白質的基本性質。
- (2) 部分純化 (partially purified)：最主要的純化階段，大多使用各種管柱層析法，乃是蛋白質純化的當家舞台，使用工具最多樣且有趣，通常都有大幅度的純化效果。
- (3) 均質蛋白 (homogeneous)：目標蛋白質更精製純化至均質，可用製備式電泳或 HPLC，通常到此階段的回收率都很低，除非有特殊需求，否則不需達到如此高純度。

每個階段使用不同純化策略，並伴隨各種分析方法去評估蛋白質的質量，以監測純化效果與回收率，最後所得到的純質蛋白質，可進行更精密的分析與應用。全貌匯整於圖 1.1。



1.1 如何開始？

先考慮以下諸點：

- | | | |
|---------------|--------|---------------------|
| a. 要純化那一個蛋白質？ | What? | (全面收集好目標蛋白質的所有相關資訊) |
| b. 為何要純化此蛋白質？ | Why? | (仔細想一想整個研究的預定目標與期望) |
| c. 由何種材料純化？ | Where? | (要選對材料並釐清分布在細胞內的位置) |
| d. 在那一個生長期？ | When? | (找錯生長期就很難取得足量目標蛋白質) |
| e. 如何純化目標蛋白質？ | How? | (依據目標蛋白質的性質來設計純化流程) |

1.2 材料來源：

a. 材料取得：

抽取蛋白質或酵素的材料來源，通常不外動物、植物及微生物，或用動植物的細胞或組織培養。採樣時，應考慮在那一個生長期、那一個器官或組織中，含有最高的含量。材料的採集影響實驗的成敗，遇到材料採集有困難，或者材料品質不穩定時，更是花費時間、精神。一定要控制穩定的材料來源！

b. 材料的差異性很大：

植物細胞與動物細胞在構造上有許多差異，因此在材料的選擇上，應特別注意。植物的細胞壁相當堅硬，要用相當大的力量才能打破。其細胞內的區隔較動物細胞複雜，有很大的液泡，內藏低 pH 溶液以及蛋白酶等『有害』物質。另含有葉綠體及澱粉粒，亦是植物細胞的特徵。不同來源的材料，各有特定的採集或抽取問題，要自行嘗試解決。

c. 材料貯藏：

材料採集後馬上進行抽取，是為上上策。但在很多情況下，材料必須冰凍貯存一段時期後，才進行抽取，則應在採集後，儘速置於 -20°C ，通常先以液態氮冰凍後貯於 -70°C 冷凍櫃。冷凍冰箱的除霜循環，可能對細胞造成傷害，要特別小心。解凍越快越好，但避免局部過熱。有些蛋白質或酶材料可乾燥起來保存，在無水狀況下，可免受蛋白酶或水分子晶體的破壞，一般可用冷凍乾燥法，或製成丙酮粉末。

1.3 均質及抽取：

a. 打破細胞：

目標蛋白質若在細胞之內，則抽取的第一步，就是先打破細胞，有難有易。例如動物的紅血球，只要改變滲透壓即可脹破，但植物的癒創組織就很堅固，要用海砂用力研磨。有些實驗要收集細胞內的胞器 (organelle)，則需以溫和的方法打開細胞後，再用密度離心法分離各胞器；此步驟難度較高，要參考文獻多試幾種方法。

b. 打破細胞的方法：

就一般材料而言，可能用到的方法列舉如下：

(1) 乾式：不用加緩衝研磨液，直接研磨成乾粉。

液態氮研磨：材料在液態氮中凍結，以研钵打碎材料後研磨成粉。

磨粉機：類似果汁機，原本用在乾磨中藥藥材成為藥粉。

球磨機 (ball mill)：以小球增加碰撞及研磨面積，多用在研磨酵母菌。

(2) 溼式：都要在低溫下研磨。

均質器：玻璃或鐵氟龍材質，是較溫和的研磨方法。

果汁機 (Waring blender)：每打一分鐘，要間歇數分鐘降溫，重複進行數次。

Polytron：高速電動研磨機，效率極高，目前最常用的均質器。

研钵：磨成細粉後的材料，再加入海砂或玻璃砂助磨；傳統而實用。

玻璃球 (glass bead)：以很細的玻璃球混在樣本中，用力振盪，可打破酵母菌。

超音波震盪 (ultrasonication)：以超音波打破細胞，多用在微生物材料。

French press：將樣本加壓快速通過細孔，以剪力破壞細胞。

c. 提高抽出率：

分泌性的蛋白質，多散佈在材料中，只要研磨均勻，大多可抽取得到。但在均質前，通常都要把材料先切成碎片 (增大表面積)，才容易進行抽取。很多情況下，要先以磨粉機或果汁機打碎，否則抽出率不會很高。材料亦可以液態氮急速冷卻，則組織變得很脆，可以磨得很細，提高抽出率，且可防止酵素活性喪失。注意有些材料不能研磨過度，以免細胞破得太碎。

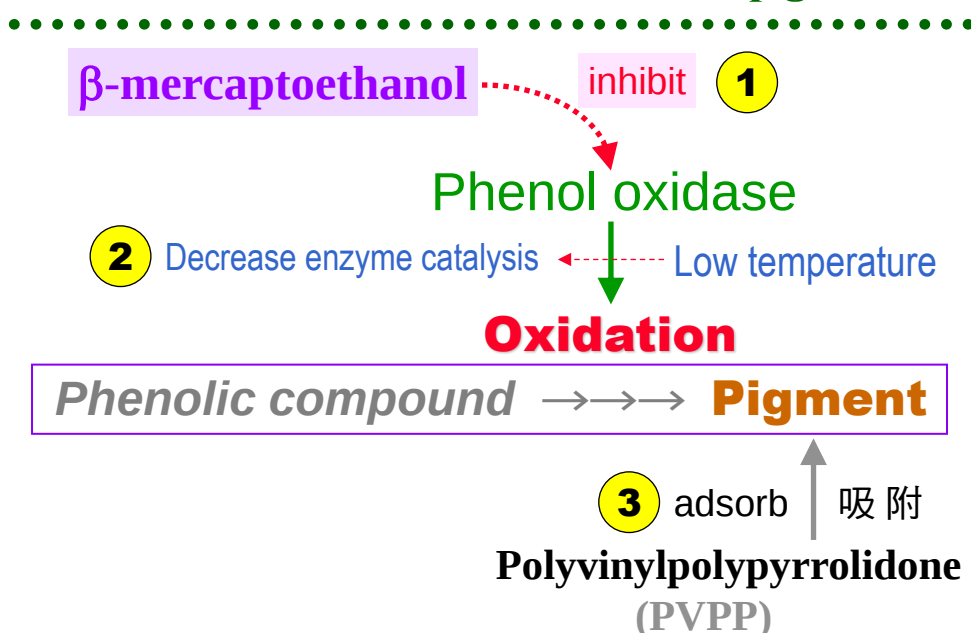
d. 抽取緩衝液：

均質用的緩衝液體積，通常加入樣本體積的兩倍量以上，以四或五倍為宜，但事先磨成粉末的，有時要加到十倍以上才能均勻懸濁之，當然抽出率會增加，但是伴隨著出來的各種雜質或干擾物質也倍增。可把緩衝液分成二或三次分批抽取，以增加抽出率。

e. 注意干擾物質：

植物材料的均質過程要特別小心，因植物細胞在打破後，會劇烈降低其 pH 值。很多植物材料有含酚化合物 phenolic compounds，在空氣中很快氧化成褐色色素，因吸附性強故難以去除。含量較少者可在緩衝液加入 β -mercaptoethanol，降低催化其生成的酵素 phenol oxidase；量多時則以 PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) 吸附之 (圖 1.2)。植物本身所含的色素也很難去除，可能會干擾純化步驟。

圖 1.2 植物色素之產生與去除 Remove pigments



f. 膜上蛋白質：

有些蛋白質附著在細胞壁或細胞膜上，不能以普通水溶性緩衝液溶出，可先把材料製成丙酮粉末 (acetone powder)，再加入緩衝液時，稍具水溶性的蛋白質就會溶出；但有時須在緩衝液中，加入 界面活性劑 (detergent)，溶出嵌在細胞膜中的蛋白質。常用有 sodium

deoxycholate 或 Triton，因後者屬非離子性分子，較不影響酵素活性及純化，多使用之。

g. 去除混濁物：

均質後經離心分開可溶與不溶部分，離心無法分開的，再用過濾法，過濾可加助濾劑，如 矽藻土 (celite)。離心後，在上清表面可能會有一層浮皮，多為脂質，可撈掉或以紗布過濾掉。

1.4 鹽析及沉澱法：

鹽析沉澱法可分離出樣本中的蛋白質，因為蛋白質在水溶液中的 溶解度，會因為溶液中所含鹽類濃度的改變而變化，可利用來沉澱蛋白質。其作用機制是因為蛋白質分子表面電荷的改變，或因分子表面 極性 或 非極性 區域與水分子間作用的結果。

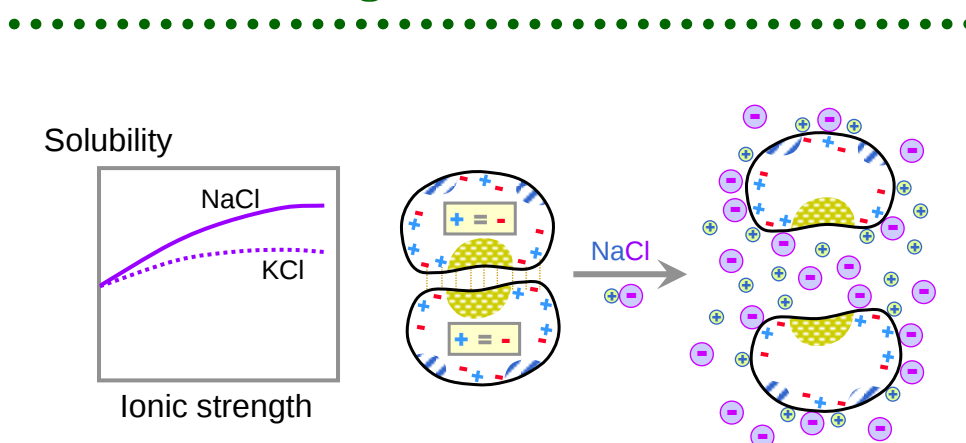
1.4.1 鹽析分劃法：

各種蛋白質沈澱方法的原理及應用，在下面各小節以圖解 (圖 1.3, 1.4, 1.5) 說明，並以文字說明整理在本節 (1.4) 最後面的表 1.1。

1.4.1.1 鹽溶 (salting-in)：

- 等電點 (pI) 為蛋白質電荷性質的指標，若緩衝液的 pH 調至此蛋白質的 pI，則蛋白質分子的淨電荷為零，分子間的排斥力下降，會凝聚成大粒子沉澱下來。此時若增加緩衝液的離子濃度 (如加入 NaCl)，則蛋白質的溶解度會漸漸上升，稱為鹽溶。
- 可能是所加入的鹽類離子包圍了蛋白質表面，與分子上的帶電基團或極性區域作用，進而增加水合效果所造成的。
- 利用這種蛋白質在其 pI 沉澱的特性，把蛋白質溶液調到特定 pI，就可沈澱目標酵素 (當然其他相同 pI 的蛋白質也會一起沈澱下來)。需注意有些酵素在 pI 沉澱後，就不容易溶解回來，因此使用緩衝液也盡量避開目標蛋白質的 pI，以免溶解度變差而沈澱。

圖 1.3 鹽溶 Salting-in effect

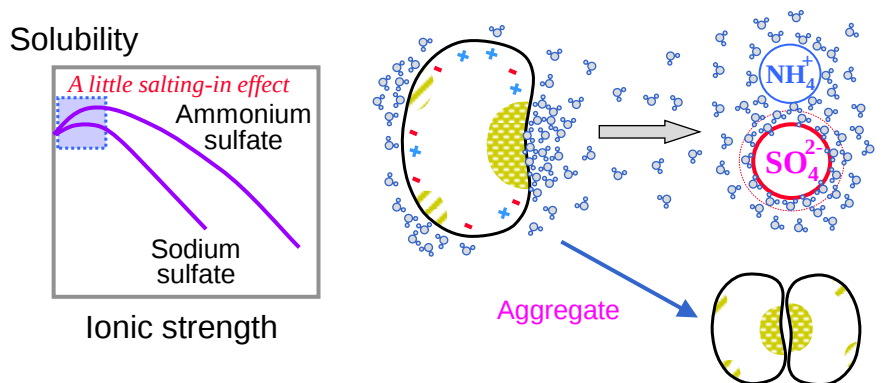


分子在其等電點時，容易互相吸引，聚合成沈澱；加入鹽離子會破壞這些吸引力，使分子散開，溶入水中。

1.4.1.2 鹽析 (salting-out) :

- 蛋白質分子表面上 非極性區 附近的水分子，被迫滯留在此區域附近，好像附上一層親水性薄膜，藉此把蛋白質分子溶入水中。
- 若外加入大量離子 (如硫酸銨)，則這些滯留的水分子會被抽出，與新加入的大量離子產生水合，因而暴露出蛋白質上的非極性區，這些蛋白質分子之間，因此必須以非極性基團互相結合，聚集成較大的沉澱粒子，稱為 鹽析。

圖 1.4 鹽析 Salting-out effect



蛋白質分子表面的疏水性區域，都聚集許多水分子，當鹽類加入時，這些水分子被抽出，以便與鹽離子進行水合，暴露出來的疏水性區域互相結合，形成沈澱。

 = hydrophobic

1.4.1.3 硫酸銨 (ammonium sulfate) :

- 硫酸銨是一中性鹽，對蛋白質有相當好的安定作用。又因為其離子容積較大，吸走水分子的能力也很強，成為有效的鹽析工具。
- 硫酸銨的添加是以 百分飽和度 來表示 (不是濃度百分比 w/v)，例如大部分蛋白質可在 80% 硫酸銨飽和度下沉澱。因為硫酸銨加入的體積很大，會改變最後的總體積，很難由濃度百分比來計算，因此使用百分飽和度 (% saturation) 作為沈澱蛋白質的度量。
- 飽和度隨溫度變化稍有差異，25°C 下的飽和濃度為 4.1 M，即每公升加入 767 克固體硫酸銨；0~100% 之間各飽和度的添加量要查表，而不是以 767 克直接乘以百分比 (%)。
- 各種蛋白質，因其表面的非極性區域分佈不同，可以在其特定的硫酸銨飽和濃度下沉澱，一般做為最初步的純化方法，同時也可除去其他可溶物質，如核酸、醣類等。

1.4.1.4 如何使用硫酸銨：

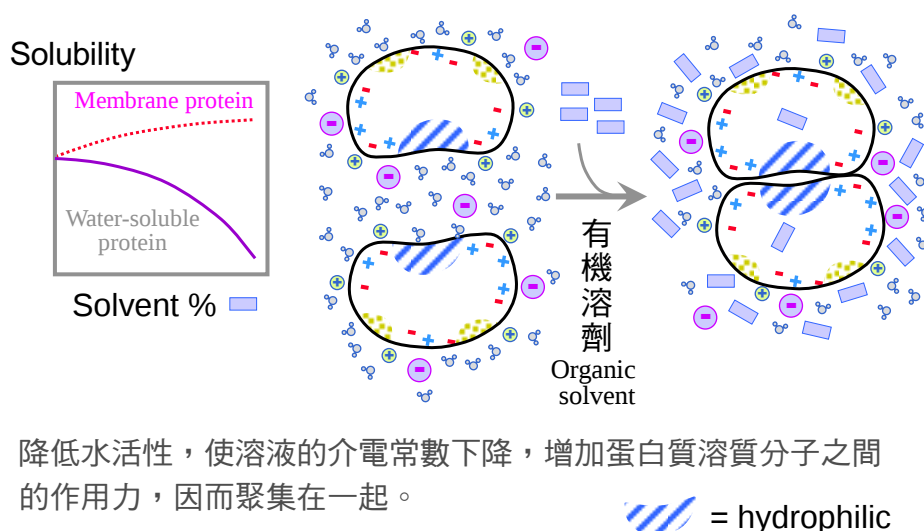
- 硫酸銨很容易吸收空氣中的水分而結塊，因此使用前要先把硫酸銨磨碎，平鋪在烤箱內 (約 60°C) 烘過，但小心切勿過熱。
- 添加硫酸銨時，要在冰浴中進行，不可一次把硫酸銨全部倒入，而是以小量分多次慢慢溶入，並不時攪拌，以免造成硫酸銨局部濃度過高。待硫酸銨全部加完後，再攪拌約 10~30 min，使溶解完全平衡，然後進行離心，注意所要的目標是沉澱或上清，要弄清楚！
- 最後所得的沉澱溶解在最少量的緩衝液中，或直接以沉澱形式保存，均相當安定。但要小心其中所含的硫酸銨，對下一步檢定或純化是否有影響，有必要可以透析法除去之。

1.4.2 有機溶劑沉澱法：

1.4.2.1 降低水活性：

若在蛋白質水溶液中加入有機溶液，如丙酮或乙醇，因為稀釋了水濃度而降低水活性，則蛋白質上親水性區域的水合度降低，開始聚集在一起，產生沉澱。也可看作有機溶劑降低溶液的介電常數，使蛋白質的溶解度降低。應當注意，有些細胞膜上的蛋白質，若本身含有很多疏水性區，則反而更容易溶入有機溶劑中。

圖 1.5 有機溶劑沈澱 Organic solvent precipitation



降低水活性，使溶液的介電常數下降，增加蛋白質溶質分子之間的作用力，因而聚集在一起。

 = hydrophilic

1.4.2.2 使用有機溶劑：

要先把有機溶劑的溫度降至零度左右，緩緩加到蛋白質溶液中，並一邊攪拌使生沉澱。以丙酮為例，大多以 20~50% (v/v) 濃度來沉澱蛋白質，注意其中的 v/v 乃指加入前的體積比，因丙酮與水混合後，體積會稍微縮小。溶液中若有高濃度鹽類，則會影響沉澱行為，以 0.05~0.2 M 離子強度為限。

1.4.2.3 沉澱收集：

此法所得到的沉澱粒子較大也較重，以重力沉降即可收得沉澱，但一般仍以離心收集，可增加回收並去除丙酮。蛋白質沉澱可涼乾，或放到布氏漏斗中，以少量乙醚洗過吹乾製成粉末，如此所得蛋白質所含有機溶液不多，通常不影響下一步驟。

1.4.3 其它處理法：

1.4.3.1 Polyethylene glycol (PEG):

- PEG 是一種水溶性的高分子聚合物，分子量 4,000 以上的 PEG 可以用來沉澱蛋白質，其作用原理類似有機溶液，但使用濃度較低。
- 較麻煩的是 PEG 不易由蛋白質沉澱中除去 (分子量不小且無揮發性)，幸而 PEG 通常不會影響下一步純化步驟。

1.4.3.2 去除核酸及多醣：

- 樣本溶液中若有大量核酸，可以加 protamine sulfate 與之產生沉澱，再以離心去除之。這是利用 protamine 上的正電荷，與核酸的負電結合，聚合成較大複合物而沈澱。
- 碳水化合物較難完全分離，通常期望在蛋白質沉澱時，或往後的層析法能去除之。核酸與多醣都可以用專一性水解酶進行酵素分解，但價錢較昂貴。

1.4.3.3 特殊處理法：

有些較特別的酵素，具有相當特殊的性質，可利用來純化。例如 RNase 對熱非常安定，可耐到 100°C，因此可把粗酵素液加熱煮沸，除去其它蛋白質。對強酸、強鹼或有機溶劑的特殊安定性，亦可利用之。使用這些嚴苛的處理方法時，要特別小心考慮環境傷害。

表 1.1 各種沉澱法比較 Comparison of methods

	Salting-in 鹽溶	Salting-out 鹽析	有機溶劑沉澱
影響因素	蛋白質分子表面 帶電基團	蛋白質分子表面 非極性基團	除了 hydrophobic 以外的其他作用力
試劑	NaCl (單價離子)	硫酸銨 (兩價離子)	甲醇、丙酮等有機溶劑
發生機制	蛋白質在其 pI 下，因淨電荷為零而聚集沉澱；若加入鹽類，會阻礙其聚集而增加溶解度	硫酸銨的兩價離子，在溶液中搶走附在蛋白質表面 (非極性部分) 的水分子，使得非極性部分相互吸引而聚集沉澱	降低水活性，使溶液的介電常數下降，增加蛋白質溶質分子之間的作用力，而聚集在一起
圖	圖 1.3	圖 1.4	圖 1.5
其它說明	對較低濃度緩衝液進行透析是 salting-in 的反向過程	1) 非極性蛋白質較早沉澱下來 2) 在硫酸銨中蛋白質相當穩定	1)部分蛋白質會變性 2)有助沉澱的因素：蛋白質分子量大、緩衝液 pH 靠近 pI 3)脂溶性蛋白質的溶解度反而增加

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. 純化某甘藷塊根中的蛋白質，由粗蛋白經純化 100 倍後可達到均質，活性回收率約有 50%，如何略估此蛋白質在原來的甘藷材料中，佔有多少百分比？ [1]
2. 若蛋白質分子表面幾乎沒有疏水性胺基酸，則它容不容易被 salting-out 出來？ [2]
3. 為何蛋白質變性後容易在水溶液中沉澱下來？ [2]
4. 為何硫酸銨沉澱是以百分飽和度來計量，而非以重量或體積百分比？ [3]
5. Salting-out 的相反程序是否為 salting-in？ [3]
6. 蛋白質樣本溶液使用較低離子濃度的緩衝液透析，可否視為 salting-in 的相反程序？ [3]
7. 在純化過程中，經過硫酸銨分劃後，發現比活性僅增加為 1.05 倍，則此一純化步驟有無存在必要？請解釋為何。 [2]
8. 使用有機溶劑沉澱蛋白質，比之鹽析分劃有何優缺點？ [2]
9. 能否用純水去溶解蛋白質？說明為何？ [2]
10. 用有機溶劑沉澱蛋白質時，為何要在低溫下進行？ [1]
11. 植物細胞比動物細胞要更難以處理，請問植物細胞是有那些特殊問題？ [1]
12. 植物細胞在打破之後，其抽出液很容易變成褐色，其原因何在？如何防止？ [1]
13. 用 PEG 4000 可以把蛋白質沉澱下來，但接著你如何除去這些 PEG？ [2]
14. 為何硫酸銨是一種中性鹽類，而非酸性物質？ [2]
15. 為何蛋白質在硫酸銨的沉澱中保存會比較穩定？ [3]
16. 加硫酸銨進行鹽析時，若把預定加入的硫酸銨固体一次全部倒進蛋白質溶液中，而非慢慢加入，將會發生什麼問題？ [3]
17. 硫酸銨分劃時，各分劃的酵素分佈通常是以其總活性來評量，而非使用比活性，請說明為何。 [4]
18. 用有機溶劑沉澱蛋白質時，為何會產生熱量？ [3]
19. NaCl 或 KCl 會使蛋白質在水溶液中的溶解度上升，而硫酸銨或硫酸鈉反而會使蛋白質溶解度下降，為何兩種鹽類會造成這樣的差異？ [4]
20. 通常在純化核酸時，較麻煩的干擾物質不是蛋白質，而是多醣類，很不容易完全去除之，請以化學構造的觀點說明之。 [5]
21. 蛋白酶可略分成四大類，請分別說明其作用機制如何。並請列出每一類的抑制劑。 [2]

22. 有一位研究生經常要做免疫球蛋白的簡單分離與純化，他一直在實驗桌上放了一瓶硫酸銨溶液，雖然說是水溶液，但硫酸銨固体卻因過飽合而結晶在瓶底，且結晶數量不少。每次要做硫酸銨分劃時，只要加入與樣本同體積的這種硫酸銨溶液（上清部份），就可以把抗体沉澱下來。請問他這種做法適當嗎？有何應該注意之處？ [4*]
23. 其實平日的濾泡式咖啡，就是一種生化實驗的抽取過程。先把咖啡豆用研磨機磨成細粉，磨得太粗或太細，都會影響咖啡的風味，另外要注意的條件有：(1) 熱水的溫度、(2) 熱水的最適量、(3) 冷泡咖啡的特點、(4) 過濾的時間、(5) 濾紙摺法與濾器形狀、(6) 過濾時是否攪拌、(7) 過濾的方式（一次濾完或分次？），都有其講究與所根據的生化學原理。請以泡咖啡觀察心得，整理出在進行抽取實驗時，應該注意的事項。[5*]

[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]

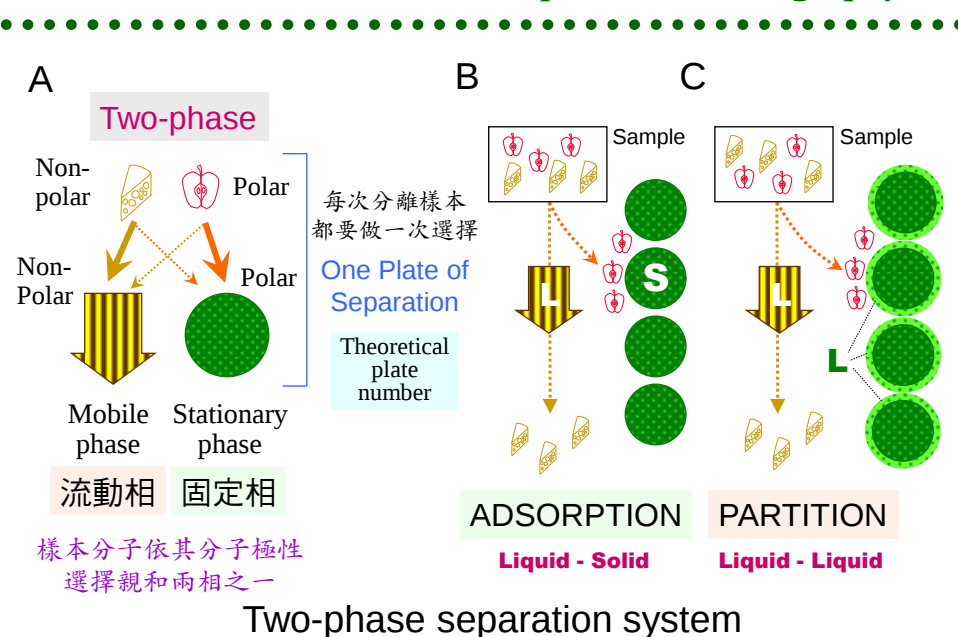
2 色層分析法：

2.1 色層分析原理：

a. 系統組成：

每種層析系統均由兩個「相 phases」組成，主要分成 固定相 (stationary phase) 及 流動相 (mobile phase)，二者各有不同的極性或非極性強度。而樣本分子因自身極性的強弱，與此二相之親和力不同：與固定相之親和力較大者，易留滯原地；與流動相之親和力大者，則易隨流動相移動，因而達到分離的效果。圖 2.1 以圖解說明此一機制。

圖 2.1 色層分析法原理 Principle of chromatography



b. 極性大小：

這種親和力的產生，決定於樣本或兩相物質之化學本質，是屬極性或非極性，進而遵循『Like dissolves like』的原則；即極性分子較易溶入極性的固定相或流動相，非極性分子則易溶入非極性者；因此一個樣本分子，就依其極性大小在此兩相間做選擇與分離。

c. 方式很多：

因為固定相或流動相可能是 固 (S)、液 (L) 或 氣 (G) 相之一，故可有多種組合方式：

Partition chromatography: 固定相 (L) 流動相 (L) 例：PPC, TLC, 膠體過濾

Adsorption chromatography: 固定相 (S) 流動相 (L) 例：TLC, 離子交換

Gas-liquid chromatography: 固定相 (L) 流動相 (G) 例：GC

d. 常用層析方法：

表 2.1 常用層析法 Common chromatographic methods

	Partition	Adsorption
小分子	Paper partition chromatography (PPC) Thin-layer chromatography (TLC) ^{a)} Gas chromatography (GC) ^{b)} Reverse phase	Ion exchange TLC ^{a)} GC ^{b)}
大分子	Gel filtration Reverse phase	Ion exchange Affinity chromatography Hydrophobic interaction Hydroxyapatite

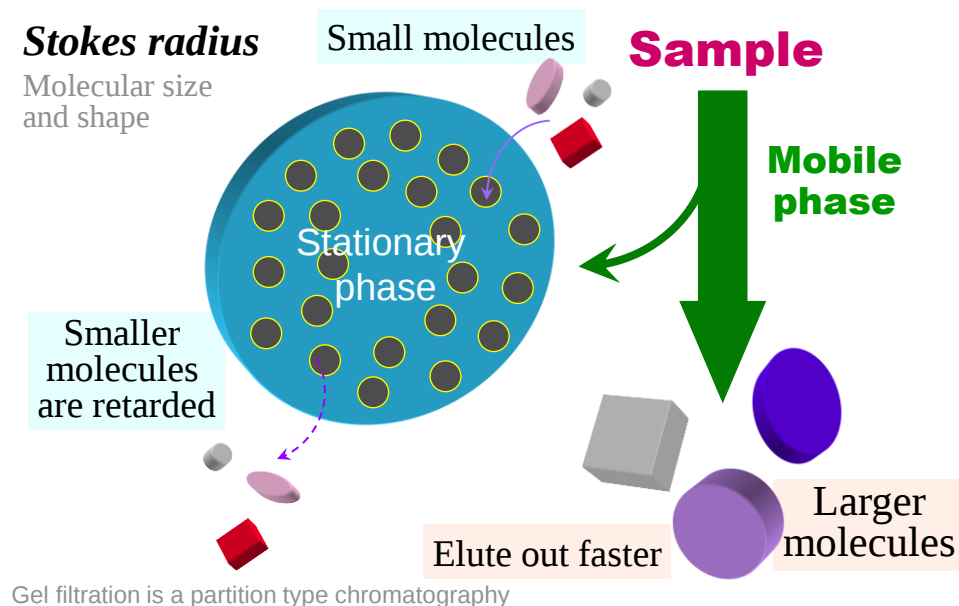
a, b) 這兩種層析法均可進行 partition 或 adsorption，取決於所用展開液的成分與比例

2.2 膠體過濾法：

2.2.1 原理概述：

膠體過濾屬 partition 層析法，流動相為溶離緩衝液，固定相為膠體孔隙內的緩衝液。溶質 (樣本蛋白質) 根據其分子量的大小，決定分佈在這兩相的比例。分子量大的不易進入膠球，隨流動相溶離；分子量小的，則易竄入膠球內的固定相，而被延滯流出膠柱 (圖 2.2)。分子的形狀、大小 均為影響因素，即與其 分子半徑 (Stokes radius) 有關，與分子量不完全成正比關係，但一般視蛋白質為球形，其形狀影響暫予忽略。

圖 2.2 膠體過濾法是一種 Partition chromatography



2.2.2 膠體介質 (support, matrix) :

膠體介質是三次元的網狀小球，由長鏈聚合物交織而成，有三大類不同材質。

a. Dextran :

是葡萄糖組成的多醣長鏈，經過架橋修飾，成為內部有均勻孔道的小球。早期由瑞典 Pharmacia 開發的最基本產品形式有下面數類：

- (1) Sephadex G 系列：是最先推出的介質，有各種適用分子量範圍，如 G-10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200 等，數字越大，表示膠球孔徑越大，其適用的分子量就越大。要注意 G-150 以上的膠體，在高壓下會被壓垮而使流率變慢，甚至無法流通，儘量改用 Sephacryl 或 Sepharose 系列。G-25 以下者，常做為蛋白質脫鹽 (desalting) 之用。
- (2) Sephacryl S 系列：額外使用 Bis 做架橋支持，因此比 Sephadex 有更好的耐高壓能力。有 S-200, 300, 400, 500, 1000 等不同孔徑，適用分子量大的樣本，但注意它有很高的非專一性吸附，要小心蛋白質被『吃掉』！最好用鹽濃度較高的溶離緩衝液 (0.2 M NaCl)。
- (3) Sephadex LH 系列：Sephadex 上的 OH-基團被修飾成 hydroxylpropyl 衍生物，成為 LH 系列，疏水性較大，可兼用在極性或非極性緩衝液。

b. Agarose :

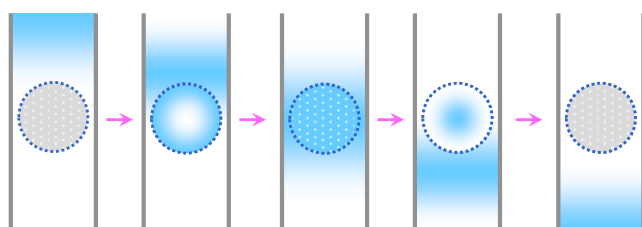
洋菜醣是由海藻抽出的直鏈聚醣，長鏈分子間以氫鍵架橋，形成三次元膠體，可以濃度來控制孔徑大小。故有些 agarose 材質的膠球，不能加高熱，否則會融成一塊膠片 (如培養用的洋菜膠)；用在分子量特別大的分子 (如核酸) 或粒子 (如病毒)。

- (1) Sepharose 及 Sepharose CL 系列：Cross Linking 系列特經架橋反應補強，可耐高壓高溫。各有 2B, 4B, 6B 三種，數字表示含膠百分比，數字越大孔徑越小，與 Sephadex 相反。
- (2) Bio-Gel A 系列：Bio-Rad 有 A-0.5M, A-1.5M, A-5M, A-15M, A-50M, A-150M，數字表示其所適用的最高分子量，以百萬為單位。

c. Polyacrylamide :

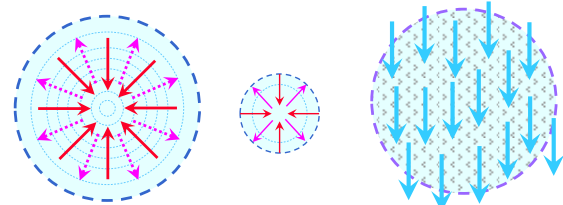
像電泳膠體一樣，由 acrylamide 聚合成固定大小孔徑，製成小球，供層析分離之用。商品為 Bio-Gel P 系列 (Bio-Rad)，有 P-2, P-4, P-6, P-10, P-30, P-60, P-100, P-150, P-200, P-300 等，最高可使用在分子量 300,000 者，高壓之下的流速亦會變慢。

圖 2.3A 溶離液擴散進出膠球 Diffuse in and out bead 圖 2.3B 溶離液對膠球的擴散或滲散 Two types of gel



溶離液或樣本分子，由膠體粒子外圍均勻向內或外擴散。
Sample or buffer is diffusing in and then out of the gel particle.

Diffusion → Dispersion



若膠體粒子太大，則由外圍擴散到內部的距離長，通過粒子所需要的時間拉長，降低分離效果。

Small particle size reduces the diffusion time and increases the resolution of the gel

Dispersion (滲散) 方式的膠體因通透性佳，溶離液可直接流入膠體，不再靠擴散作用。

Dispersion type gels let the sample molecules flow directly through the gel body, and have better resolution

d. 膠球大小：

膠球粒看起來都很細，但都有一定的大小，一般可分為 coarse, medium, fine, super fine 四種粗細 (grade)；越粗的膠體，流率越好，但解析力越差。因膠球外面的緩衝液是由膠球表面向內擴散，樣本蛋白質也是以相同的擴散方式進入膠球，再由中心向外擴散出來，因此膠球半徑越大，擴散距離越大，效果就越差。圖 2.3A 說明這種傳統擴散式介質的機制。

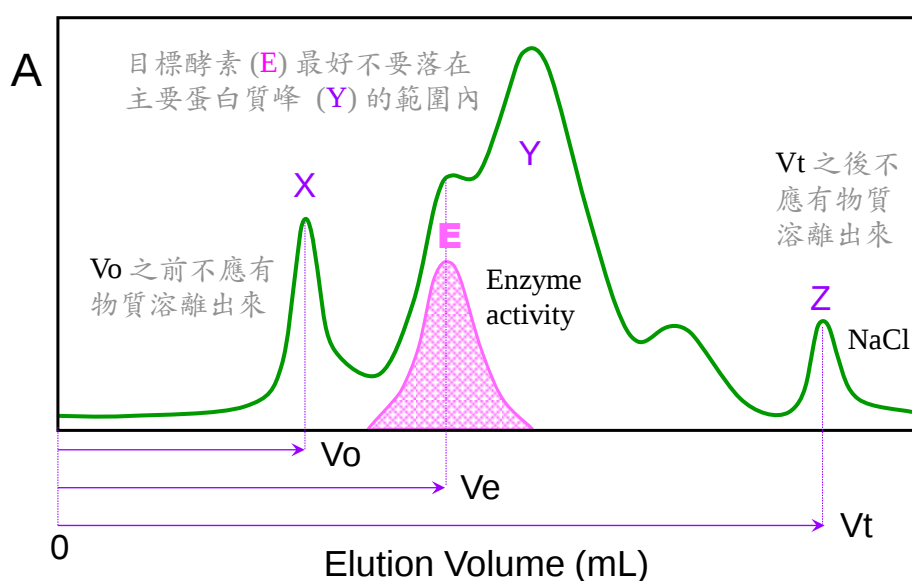
而近年來因材料科學的進步，發展出通透性特強的膠球，緩衝液可直接浸潤而進入膠球，不需經擴散作用，稱為 dispersion 瀰散式的膠體 (圖 2.3B)，效果較好且快速。

2.2.3 膠體管柱：

a. 管柱性質：

膠體過濾都以管柱方式進行，不論使用何種介質，管柱的性質大致可以如下預測 (圖 2.4)：當管柱裝填完成，若膠柱總體積為 100 mL (total volume, V_t)，則膠柱內的液相總體積約 90 mL (liquid volume, V_l)，其中流動相的體積 (即介於膠球之間的緩衝液總體積, void volume, V_o) 約為 35 mL，樣本分子則應於 35~90 mL (V_e) 間溶離出來。如同 TLC 的 R_f 值，膠體過濾也有表示樣本溶離程度的指標 (K_{av})；樣本的 K_{av} 與分子量成反比，因此可用來測定分子量，現在多直接以溶離體積表示樣本溶離程度。

圖 2.4 膠體過濾的溶離圖譜 A typical chromatogram



b. 內在因素：

膠體過濾法在操作時，有些內在的問題，會影響結果的好壞：

- (1) 擴散及亂流：由於兩相都是在液相中進行，樣本在膠柱中的擴散現象相當顯著；又因液体在膠球間流動時，受重力及對流的影響，會造成亂流。擴散及亂流都會使膠體過濾的解析力大幅降低。
- (2) 管柱設計不良：經常是致命的傷害，例如無效空間 (dead volume, 見 2.3.4b) 過大、緩衝液進入膠體時流動不均、溶離液出口端的管路太長或太粗等。

c. 解決擴散及亂流：

若降低膠球粒子的大小，則可改善之；因此越細的膠球，其解析力就越佳。但膠体若太細，會造成流速下降，則要用更大的壓力進行溶離，許多膠球耐不住如此高壓。因此若補強膠体材質，以架橋來支持膠体構造，或改用矽膠質為材料，可改善流率並增加解析力，即為 HPLC 系統 (2.5)。使用上述 dispersion 式膠体，也是可行方法。

d. 膠体的選擇：

取決於所要分離蛋白質樣本的分子量大小，並且預期溶離出來的蛋白質峰，可出現在 V_o - V_t 區間的前半段，以降低因擴散所造成的不利影響 (使目標蛋白質早些溶離出管柱)。通常分子量大於十萬可用 Sepharose CL 系列，小於五萬者用 Sephadex G-100 以下，其間則使用 Sephacryl S-200 或 300。避免使用 Sephadex G-150 或 200，因其流率不佳；其它廠牌相對應的產品，亦可使用之。

e. 管柱大小：

視所要分離樣本的體積而定，一支膠球體積為 100 mL 的管柱，可分離 1~3 mL 樣本。膠体過濾管柱以細長較妥，通常直徑為 1.6 或 2.6 cm，長度 80~100 cm，太長者擴散作用明顯。離子交換法及大量生產時的製備式管柱多使用矮胖型，以增加流率。

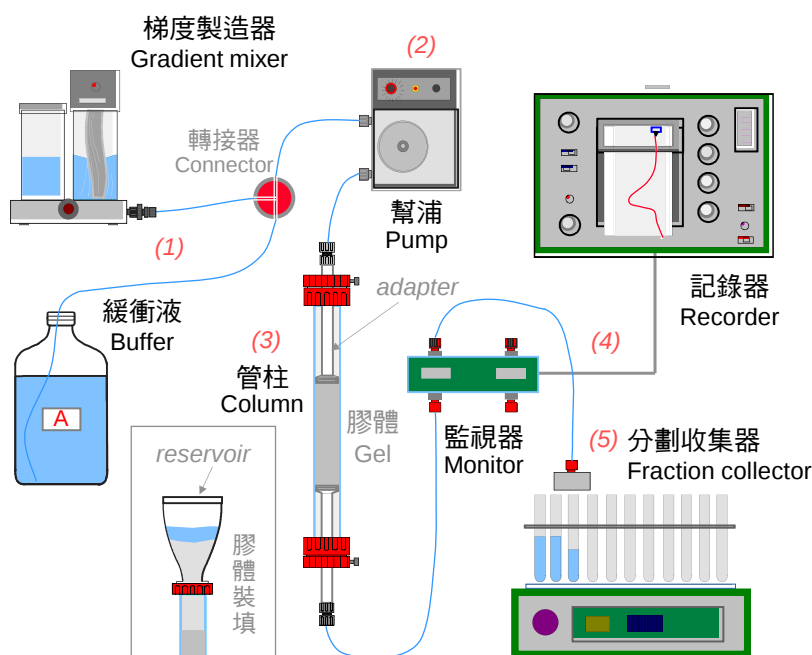
f. 管柱系統：

完善者包括下列各部分 (圖 2.5)：

緩衝液 (1) → 幫浦 (2) → 管柱 (3) → 監視器 (4) → 分割收集器 (5)

其中監視器並非必需，管柱種類很多，上等備有 adaptor 可降低無效空間 (2.3.4b)，且使用很方便。通常要在冷房中操作，因此儀器的維護要更小心。取出冷房後要立刻在乾燥環境下烘乾回溫，以免潮濕造成短路或發霉。梯度製造器使用在離子交換法。

圖 2.5 液相層析管柱系統



• The whole family of liquid chromatography apparatus

2.2.4 管柱操作：

a. 膠體處理：

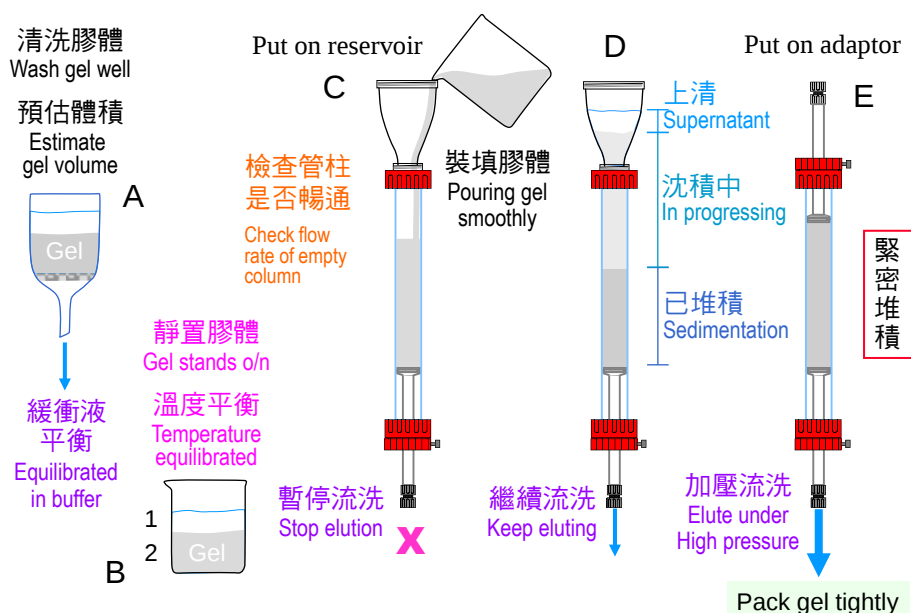
許多膠體是乾燥粉末，使用前要先行膨潤，如 Sephadex, Bio-Gel P；其餘如 Sephacryl, Sepharose (CL), Bio-Gel A 均為已膨潤者，直接在玻璃漏斗以緩衝液洗過 (圖 2.6A) 即可裝填；若有需要，可以減壓幫浦抽去氣泡。注意 Sepharose 及 Bio-Gel A 不可加熱或高壓滅菌。由管柱大小算出所需膠體的體積，再加一成，準備裝填管柱。

b. 膠體裝填：

以下是裝填膠柱的詳細步驟，最好實地觀看示範操作或教學影帶。

- (1) 洗好的膠體浸在緩衝液中，靜置過夜使之沉降，把上清部份的體積大致調為膠體體積的一半 (圖 2.6B 膠體佔三分之二)。
- (2) 先把各儀器連結好，確定可正常運作，架好管柱，注意要確實垂直地面。
- (3) 若要裝填較高的膠柱，則要裝上 reservoir，否則一次倒滿只能沉降到管柱的七成高。
- (4) 先在管柱內加一些緩衝液 (約 5 cm 高)，看能否順利流出，再關住出口。
- (5) 把上述膠體攪拌均勻，成為懸濁液，但勿產生氣泡。
- (6) 沿著管柱的管壁，慢慢倒入膠體；勿粗魯灌入，避免生成氣泡 (圖 2.6C)。
- (7) 一口氣倒完後，等約 1 min 後打開出口，膠體開始沉降。
- (8) 不久整隻管柱分成三層 (圖 2.6D)，最上為澄清的緩衝液，下層為已堆積好的膠體，顏色較白，中層為沉降中的膠體。勿使上方緩衝液乾掉。
- (9) 待膠體完全沉降後 (中間層消失)，應得到預計的膠體高度，否則要追加或挖去膠體；要添加膠體時，先把膠柱上方約 5 cm 高的膠體均勻懸濁後再加入。
- (10) 除去 reservoir，加上 adaptor，注意系統中不能有氣泡 (圖 2.6E)。這個步驟較易出問題，請仔細研究清楚所有細節，小心練習好才進行。
- (11) 連通整個系統，檢查系統的封閉性，調整幫浦流速。

圖 2.6 膠柱裝填方法 Packing column step by step



(12) 以較高的流速洗 (45 mL/h, 約 150% 流速), 以平衡完全。通常膠體裝填時的流率, 要比操作時稍高; Sephacryl 則要更高流速, 但當使用 Sephadex G-100 以上者, 只能用平常流速, 否則膠體會被壓垮。

(13) 膠體高度可能會稍微下降, 則 adaptor 要再往下壓, 以完全接觸膠面。

(14) 以正常流速 (約 30 mL/hr) 流洗數小時, 可洗過夜, 同時準備樣本。

c. 樣本體積:

(1) 樣本體積限定在膠柱體積的 1~3%, 可加入甘油以增加密度。

(2) 裝有 adaptor 的管柱較方便, 可用幫浦注入, 否則要直接把樣本加在膠體表面上, 先吸去膠柱上面的緩衝液後, 再小心注入樣本 (乾式); 或不吸去緩衝液, 把密度較大的樣本, 在緩衝液中直接加入, 讓它自動沉降在膠體表面 (溼式)。

(3) 樣本溶液不可有沉澱, 否則要先離心除去之, 太濃或太稀均不適宜。注入樣本應極為小心, 勿破壞膠體表面!

d. 溶離速度:

以直徑 1.6 或 2.6 cm 管柱而言, 通常每小時流速約 30 mL 左右, 較粗的管柱可加快, Sephadex G-150 或 G-200 要減慢, 而 Sephacryl 溶離速度可加快一倍。流出液約每 2-5 mL 收集一個分劃, 但可依情況自行增減, 最好使用分劃收集器, 讀滴數、秒速均可。要注意勿讓膠體乾掉, 也要小心收集器很容易出毛病, 沒有收到樣本而流失。

e. 管柱保存:

(1) 膠體管柱暫不使用時, 可在緩衝液中加 NaN_3 (0.01%) 流洗一次, 關好出口。

(2) 長期不用時最好取出膠體, 在玻璃漏斗中以 PBS 洗過數個體積後, 保存在 4°C 中, 再加數滴 NaN_3 防腐。

(3) 若發覺膠體太髒, 可用 0.2 M NaOH 或 NaCl 先洗過, 再以緩衝液平衡; 再度取出使用時, 要注意有沒有長霉 (黑色棉絮狀小球), 膠體有無結塊。

(4) 已膨潤的膠體應貯於 4°C, 切勿貯藏在零下的溫度, 膠體的結構會被冰晶破壞; 乾粉或未尚未開封者, 可貯於室溫。

(5) 膠體外表看來都一樣, 一定要標示好, 以免混淆不清; 千萬不要把兩種膠體混在一起, 或者弄錯標籤, 結果都會很淒慘!

2.2.5 問題及解決:

a. 管柱裝填:

膠柱是否良好, 可跑 Blue Dextran (Pharmacia) 試之, 藍色色帶應平穩地往下移動, 色帶厚度會稍加寬, 但不該有拖尾、變斜, 甚或成為不規則亂流! 也可用手電筒在管柱後方打光, 看膠體中有無氣泡。

b. 溶離緩衝液:

流速太快會造成分離結果不好, 通常是色帶拉長或呈現不規則。緩衝液中的離子濃度有相當影響, 通常不能用蒸餾水來溶離。樣本分子在通入膠體後不久, 其緩衝液即被管柱中的緩衝液所取代; 若此二種緩衝液不同, 則因為離子濃度的改變, 某些蛋白質

可能會 鹽析 出來，沉澱在膠面。

c. 活性消失：

有些樣本蛋白質，需要金屬離子、輔酶、輔因子等小分子，共同達成其活性，在通過管柱後，可能被排除而失去活性。可在活性分析時補充，或在溶離緩衝液中添加。若蛋白質的回收量太低，要注意膠体有無吸附現象。

d. 使用溫度：

膠体管柱由冷房移到室溫後，會漸生成小氣泡，不能再用。反之由高溫處移至低溫處時，則無此問題。緩衝液也有同樣現象，應當注意。

e. 老舊膠柱：

管柱經長期未使用，要注意有無長霉，管柱有無乾裂 (用手電筒檢查)。使用太多次數後，膠柱最上方的表面會有沉澱或變得較髒，可稍挖去表層，再小心輕輕攪散，再讓膠体表面重新沉降平整，對結果影響不大。

2.3 離子交換法：

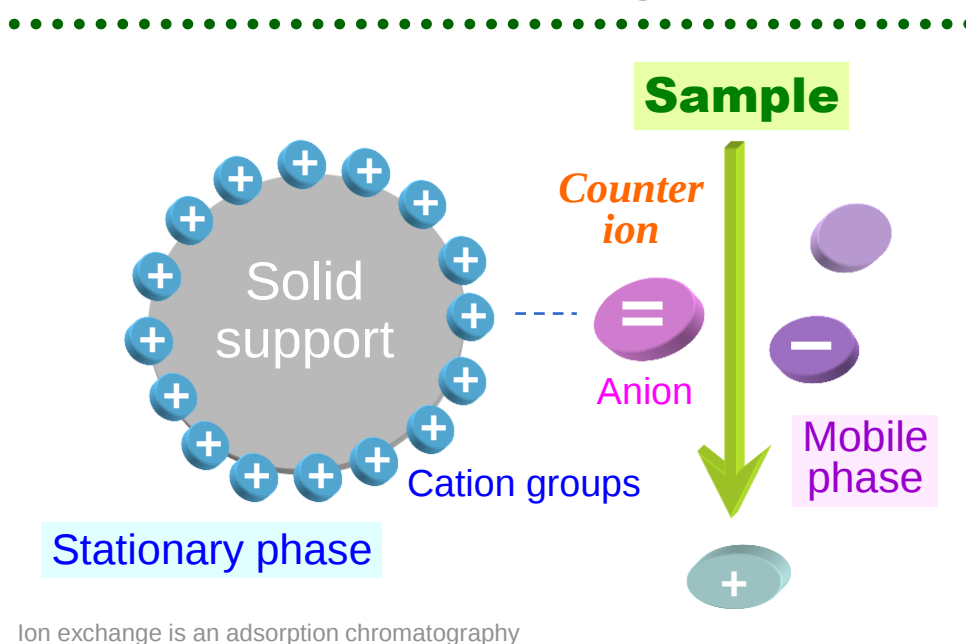
離子交換法乃是利用分子帶電性質的差異來進行分離，解析力好且具多樣性，是常見且應用極廣的純化方法。

2.3.1 原理概述：

a. 離子交換法：

是一種 adsorption 層析法，流動相為溶離緩衝液，固定相為介質擔体表面的帶電基團。樣本中的各種離子，與介質表面帶電基團間的親和力強弱不同，吸附上去之後，可使用不同離子濃度的緩衝液，分別溶離出這些成分 (圖 2.7)。

圖 2.7 陰離子交換法 Anion Exchange



b. 兩大類離子交換介質：

由介質帶電基團的不同，分為兩大類： 介質-帶電基團 (counter ion)

(1) 陽離子交換介質 (cation exchanger)： 擔體-陰離子基團 陽離子

(2) 陰離子交換介質 (anion exchanger)： 擔體-陽離子基團 陰離子

c. 離子取代順序 pecking order：

離子交換的進行，可視為各種 counter ions 間，對擔體介質上帶電基團的爭奪戰，離子(包括蛋白質)競爭結合到固体介質上；其競爭優勢順序如下(圖 2.8)：

(1) 帶電荷高者取代帶電荷低者。

(2) 電荷相同時，原子序(或離子體積)大者優勢。

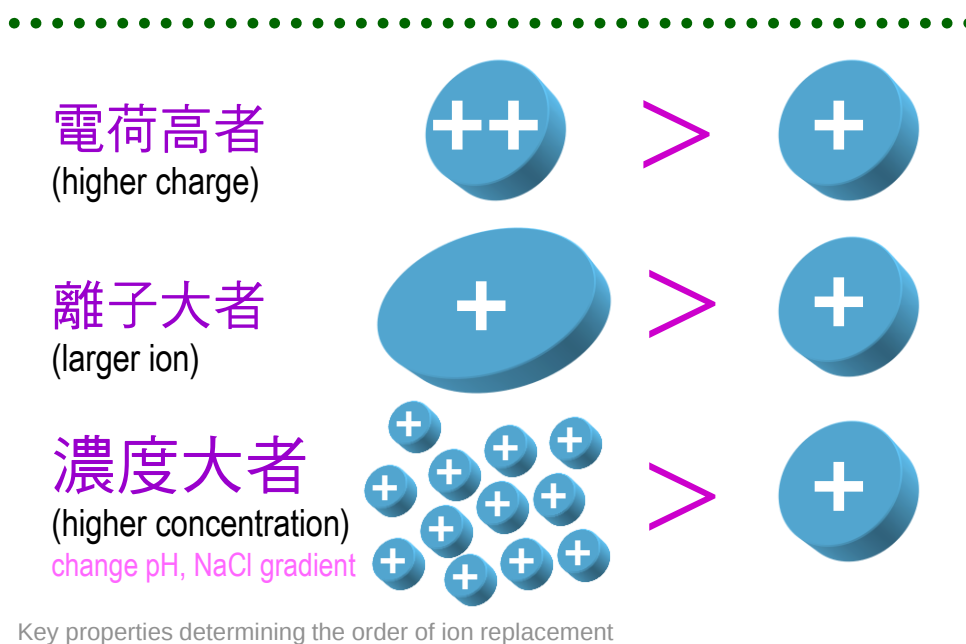
(3) 濃度 可克服以上兩種優勢，高濃度之氫離子可取代其它陽離子。

d. 離子取代優先順序：

陽離子：兩價陽離子 $> \text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$

陰離子： $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{CH}_3\text{COO}^-$, OH^-

圖 2.8 離子取代優先順序 Displacing order of ions



2.3.2 離子交換介質：

a. 介質種類：

(1) 離子交換介質的種類很多，歸納起來分為 陰離子 及 陽離子 兩大類；每一類又依其帶電基團的強弱，分為 強、中、弱 三種。

(2) 另外依介質的材質不同，略分為 合成樹脂 (resin) 及 聚醣 (glycan) 兩種，前者對蛋白質的純化並不適用，只可用在小分子樣本。

(3) 聚醣多使用 Sephadex, Sepharose, cellulose 等為擔體，在糖分子加上帶電基團；而

cellulose 又有做成結晶球形的 Sephacel，可增加膠柱的流率。

- (4) 因為材料科學的進步，產出了許多新的材質，更為堅硬可耐高壓，且所能吸附的樣本容量也大增。Pharmacia 推出新一代介質 Monobead，也分有陽離子 (Q) 及陰離子 (S) 兩種，都是預先裝填在管柱，直接接上 FPLC 系統使用。

表 2.2 離子交換介質 Common ion exchange materials

陰陽強弱		Resin / Polystyrene		Glycan / Cellulose (= X)		Mono bead
Anion Exchanger	Strong	Dowex-1	$-^+NR_3$	TEAE-X (QAE-X)	$-^+NR_3$	Q
		Dowex-2				
	Weak	Dowex-3 IR-45	$-^+NHR_2$	DEAE-X	$-O(CH_2)_2^+NHR_2$	
Cation Exchanger	Strong	Dowex-50	$-SO_3^-$	Phospho-X	$-PO_4$	S
	Weak	IRC-150	$-COO^-$	CM-X	$-CH_2COO$	

X = Sephadex, Sepharose, Sephacel or cellulose

b. 選擇交換介質：

- (1) 若已知樣本蛋白質的 pI，則先選擇所要使用緩衝液的 pH，使蛋白質帶有正 (或負) 電，而採用陽 (或陰) 離子交換介質。
- (2) 若不知樣本的 pI，則可取一系列試管各裝少量介質，在各種緩衝液 pH 下，加入適量的樣本蛋白質，然後測上清中有無酵素活性殘留，得知樣本蛋白質有無吸附上去，就可選擇適當的介質及緩衝液 pH。

c. 一般使用：

- (1) 通常在純化蛋白質時，都使用較弱的離子交換介質，如 DEAE (diethylethanolamine) 或 CM (carboxymethyl)；介質則用聚醣類為材料，多使用 Sepharose CL-6B 或 Sephacel，而不用體積變化很劇烈的 Sephadex，或流率較差的 cellulose。
- (2) Sepharose 本來有膠體過濾的作用，應用在離子交換時，作用並不明顯；但在分離異構酶時，因各個異構酶的分子量極為相近，避免使用之。
- (3) DEAE 型膠體使用的 pH 不能高過 9，CM 者不能低於 pH 6，否則介質會失去原先帶有的電荷。

d. 介質容量有限：

- (1) 離子交換介質與蛋白質的結合總量有一定的限度，稱為該交換介質的容量 (capacity)；若超過此一容量，多出的樣本會直接流出。
- (2) 交換介質的結合容量大小，受層析條件不同、蛋白質種類不同、緩衝液不同、pH

或離子濃度不同等，有很大的差異。如 DEAE-Sepharose CL-6B 每 100 mL 可結合 11 克白蛋白，但對 ferritin 只有 0.4 克。

e. 介質表面的微環境：

- (1) 由於交換介質的帶電性，其微視環境中的 pH，並不呈均勻的狀態。
- (2) 緊靠介質表面的 pH，要比外圍緩衝液 pH 相差一個 pH 單位左右：陰離子交換介質高一個單位，陽離子低一個單位 (稱為 Donnan effect)，可參見圖 2.9。

f. Hydroxylapatite：

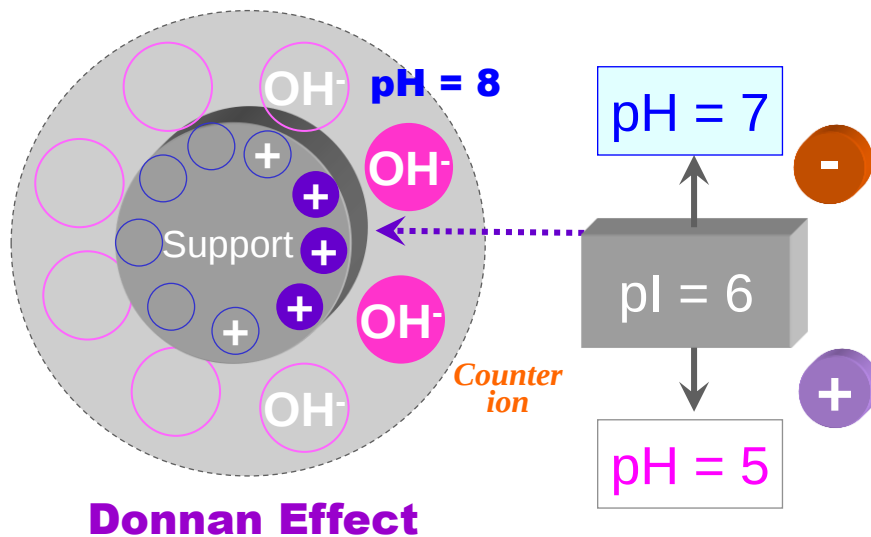
- (1) 可與 DNA 或 RNA 結合，原本用在分離單股與雙股 DNA，是一種結晶型的磷酸鈣，其作用機制不很清楚，但顯然與其帶電性質有關。
- (2) 操作法與離子交換法類似，在低離子濃度時使蛋白質結合上去，再以高濃度溶離下，但較複雜；不同的鹽類 (如 磷酸鹽, NaCl 或 CaCl_2)，會有不同的溶離結果，要以實驗嘗試求得。

2.3.3 緩衝液與層析系統：

a. 緩衝液種類：

可能會影響離子交換結果，例如 DEAE 介質若使用磷酸緩衝液，則其中的磷酸離子 (帶兩個負電) 與交換介質的結合力相當強，會影響樣本蛋白質的結合。但反過來說，此時能夠結合上去的樣本蛋白質，就有相當的強度。

圖 2.9 陰離子交換膠體的 pH 變化



The pH change of the microenvironment surrounding the ion exchange gel particle

b. 緩衝液 pH：

- (1) 緩衝液的 pH 可定在樣本蛋白質 pI 的上或下一個 pH 單位 (參見圖 2.9)，使樣本分子帶有正確的電荷，能夠結合到所選用的介質上去，但又不會太強，以免難以溶離下來。

(2) 用酸鹼度溶離時，當緩衝液的 pH 趨近樣本分子的 pI 在 0.5 pH 單位以內，蛋白質會開始溶離出來。

(3) 所用緩衝液的離子濃度，在不影響蛋白質與介質的結合能力下，儘量採稍高的濃度，以降低非必要性的吸附，通常在 10~100 mM (NaCl) 之間。

c. 膠體 pH 要先平衡好：

決定緩衝液的 pH 與離子濃度後，交換介質要先平衡在此緩衝液中，如膠體過濾法一樣，可在玻璃漏斗中進行。為加速平衡達成，交換介質可先用 10× 濃度緩衝液浸泡沖洗，然後再用 1× 者徹底清洗替換。

d. 管柱系統：

離子交換法所用的管柱系統，其要求是比膠體過濾法嚴格，最好使用附有 adaptor 的 Pharmacia 管柱，可降低無效空間，避免梯度破壞。與膠體過濾相反，多使用矮胖型的管柱，太長並無必要。

e. 膠體裝填：

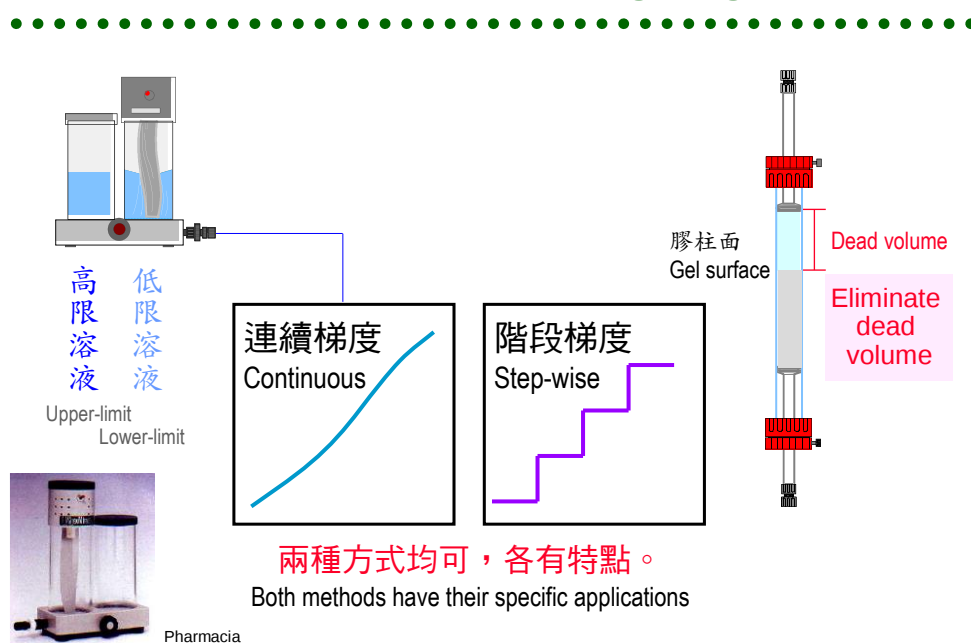
裝填方法與膠體過濾法一樣，但裝填要求反較不嚴格；裝填完成後，要以緩衝液洗過數个体積後方可使用。不能使用 Blue Dextran，用手電筒檢查有無氣泡。Sephacrose 或 Sephacel 介質可耐高流速的壓力，但流速過快可能影響解析力。

2.3.4 管柱操作方法：

a. 樣本蛋白質液：

樣本必須先溶在管柱所使用的緩衝液中，否則要先對緩衝液透析。樣本溶液的體積並無限制，因為蛋白質會結合到交換介質上，溶離下來時有濃縮效果；若目標蛋白質不會吸附到介質，而直接通過交換介質，則其條件同膠體過濾法。

圖 2.10 鹽梯度的兩種方式 Making salt gradient



b. 溶離方法：

- (1) 如圖 2.10 所示可用 pH 或 鹽 梯度，溶離方式有 連續梯度 (continuous gradient) 及 階段梯度 (stepwise gradient)。
- (2) 但 pH 的連續梯度不容易拉得好 (why?)，因此一般較少使用，可改用階段梯度或 色層焦集法 (2.3.5)，後者會在管柱內形成連續的 pH 梯度。
- (3) 由於是以濃度梯度來溶離，每次加入管柱的緩衝液都不一樣，因此在離子交換管柱中，膠體上方不能積有緩衝液層 (無效空間，如圖 2.10 右)，否則做好的梯度會在此處破壞，失去 pH 梯度的連續性，因此離子交換管柱最好能使用 adaptor。

c. 梯度體積：

每個梯度的體積會影響結果，通常溶離體積較大時，解析度較佳；但體積太大，會使溶離出來的蛋白質濃度變稀。而梯度的上下範圍 (如 0~0.3 M NaCl) 也要適當，範圍太寬或太窄，均會降低解析度，要以實驗試出最佳條件。

d. 膠體再生：

- (1) 蛋白質全部溶離出來後，交換介質要經過 再生 (regeneration) 完全後，才能再次使用。
- (2) 以 1~2 M NaCl 即可洗去雜蛋白，徹底清洗可用 0.1 M NaOH 流洗；陰離子交換介質可用 1 M 醋酸鈉 (pH 2.0) 洗 1.5 個體積，再以緩衝液平衡完全，才能再度使用。
- (3) 可測流出液的 pH 或離子濃度，是否與加入的緩衝液一樣。也可把膠體取出，在燒杯或漏斗中徹底清洗。大多數失敗是因於 再生不良！

e. 批次法：

離子交換法不一定要在管柱中進行，也可在燒杯中以 批次法 (batch) 吸附並溶離蛋白質，一般應用在工業上的大量純化，其效果較差，但比較方便。

2.3.5 色層焦集法 (chromatofocusing)：

a. 也是一種離子交換法：

- (1) 若必須使用 pH 梯度進行溶離，則可改用 Pharmacia 發展的色層焦集法。此法使用類似 DEAE-Sepharose 陰離子交換介質 (polyethyleneimine agarose)，並在管柱中以特殊的緩衝液 (Polybuffer) 流洗以形成 pH 梯度。
- (2) Polybuffer 含有如同 等電焦集法 (isoelectric focusing 是一種電泳方式) 所使用的 ampholyte，以較低的 pH 通入管柱，與介質上面的鹼性基團中和，由酸 (上方進入管柱處) 漸鹼 (出口處)，直接在管柱膠體形成 pH 梯度。

b. 作用機制：

樣本蛋白質進入色層焦集管柱後，先遇到較高 pH 環境 (介質)，通常高於其 pI 而帶負電，因此會結合到帶有正電的介質上。當 Polybuffer 開始注入管柱，降低環境 pH，使樣本分子失去負電荷而溶離下來；蛋白質便依 pI 大小順序，pI 高的先溶離出來，同時集中在其自身 pI 的地方，成為一條極細色帶，故稱為 焦集法。

c. 注意會產生沉澱：

有些酵素若處在其自身 pI 的環境，會發生不可逆的沉澱而失去活性，則不適用任何

以 pI 為分離基礎的純化方法。因此色層聚焦法通常較少使用，除非一定要以 pI 或 pH 梯度來作分離，否則儘量採用其他方法，目前已經很少看到。

2.4 親和層析法：

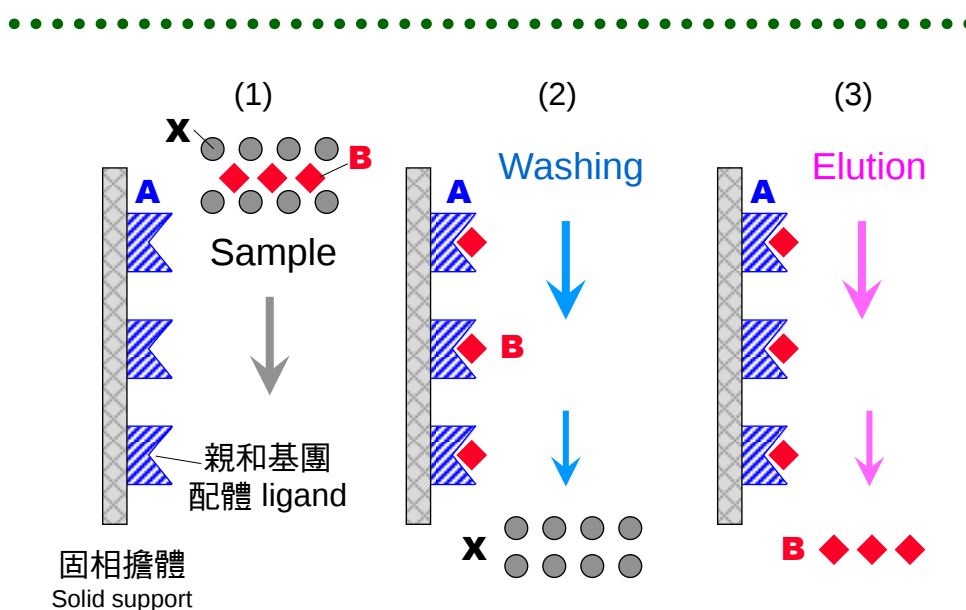
兩蛋白質分子間親和力之形成機制，請參閱生物化學 [BCbasic 的專一性結合](#)。

2.4.1 原理概述：圖 2.11 說明純化過程之原理。

a. 固定相為親和基團：

- (1) 親和層析法的固定相為一固相擔體，上有專一性親和基團 (A)，流動相為溶離緩衝液。
- (2) 當樣本通過管柱時，與親和基團有專一性的分子 (B) 吸附到固定相上，非專一性分子 (X) 則隨流動相洗出管柱。
- (3) 留在定相上的分子 (B)，可用酸或鹼溶離，或用專一性溶離分子溶離。

圖 2.11 親和層析法的作用機理 How it works



b. 親和法四項要素：請參考圖 2.12

- (1) 對所要純化的物質 (B)，需有專一性配體 ligand (A)，而 A, B 之間要有專一性的親和力，其解離常數 (K_d) 約在 $10^{-4} \sim 10^{-8}$ 。
- (2) 配體 (A) 可方便大量取得，且能經由耦合反應接到固相擔體，成為固定相。
- (3) 擔體具有可與配體連結的基團，且非專一性吸附力低，通透性良好。
- (4) A-B 結合成的複合體 (complex)，可以方便地解離，而不傷害 A 或 B。

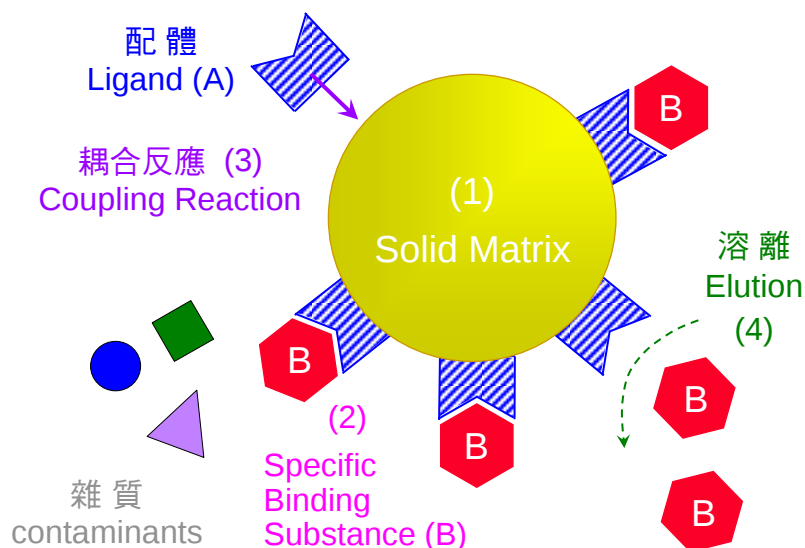
2.4.2 親和吸著劑：

a. 固相擔體：

材料種類很多，舉凡 洋菜糖 (agarose)、纖維素、玻璃砂、幾丁質、合成聚合物 均可

使用；但用在蛋白質，仍以聚糖類為最佳。以 Sepharose 為例，可自行用 CNBr 活化，使糖分子接上 $-O-C\equiv N$ (cyanate ester) 基，再與配體上的胺基反應。

圖 2.12 親和層析法的四項要素 Four essential factors



b. 親和性介質：

表 2.3 可與各種配體基團反應的介質

Pharmacia

配體基團	親和性介質	反應基團	反應方式
-NH ₂	CNBr-activated Sepharose 4B	-C≡N	直接反應
	CH-Sepharose 4B 或其活化型	-COOH	加 EDC*
		N-OH-succinimide	直接反應
	Epoxy-activated Sepharose 6B	oxirane	直接反應
-COOH	AH-Sepharose 4B	-NH ₂	加 EDC*
-OH	Epoxy-activated Sepharose 6B	oxirane	直接反應
-SH	Epoxy-activated Sepharose 6B	oxirane	直接反應
	Thiopropyl-Sepharose 6B	-S-S-R	DTT 活化
	Activated Thio-Sepharose 4B	-G-S-S-R	直接反應

* EDC = N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl

Affinity materials are designed to react with functional groups on ligands

c. 共價層析法：

使用 Thio-Sepharose 時，樣本蛋白質是以共價鍵(雙硫鍵)結合到親和介質上，然後再以 cysteine 或 mercaptoethanol 溶離下來。此法可以用來純化 papain 或如 urease 等含多個 -SH 基的蛋白質，特稱為共價層析法 (covalent chromatography)。

d. 耦合反應 (coupling) :

- (1) 介質與配體的 耦合反應 都相當簡便，介質先經緩衝液洗過後，加入配體溶液反應後，再加入填塞分子，除去介質上未完全反應的基團，裝入管柱流洗後即可使用。
- (2) 注意耦合緩衝液及樣本液中，不能含有會競爭耦合反應的分子；例如使用 CNBr 活化的 Sepharose 時，不可用 Tris 或 glycine 緩衝液 (有-NH₂ 基)。

e. 注意 spacer arm :

有些親和層析法使用 spacer arm 來降低配體的立體障礙，但是 spacer arm 多為六到八碳的碳氫鏈，有相當強的非極性，若表現出疏水性層析的作用 (見下節)，則可能對純化效果有正面或負面的影響。

f. 現成的親和吸著劑 :

利用以上各種介質，可自行接上有用的配體，進行親和層析法，但商品也售有很多已經接好配體的成品，使用上更方便，例舉於表 2.4。

表 2.4 各種親和性介質及其專一性基團

Pharmacia

配 體	親和性分子	說 明
抗体	對應之抗原	免疫吸著劑，大多自行合成
基質或抑制劑	對應之酵素	酵素的專一性結合
Protein A	部分 IgG	單株抗体純化
Con A	醣蛋白	對 α-D-葡萄糖、甘露糖基有專一性
Heparin	凝血蛋白等	Heparin Sepharose CL-6B
Chelator (NTA)-Ni ²⁺	His-tag 表現蛋白質	(His) ₆ 與兩價陽離子間的親和力
Oligo (dT)	mRNA	Oligo (dT)-cellulose
Cibacron-Blue	NAD(P) ⁺ 結合酵素	Blue Sepharose CL-6B
AMP 或 ADP 等	同上	5'AMP-, 2', 5'ADP-Sepharose 4B
單糖及其衍生物	Lectin	用來純化 lectin

Affinity adsorbents with special affinity ligands

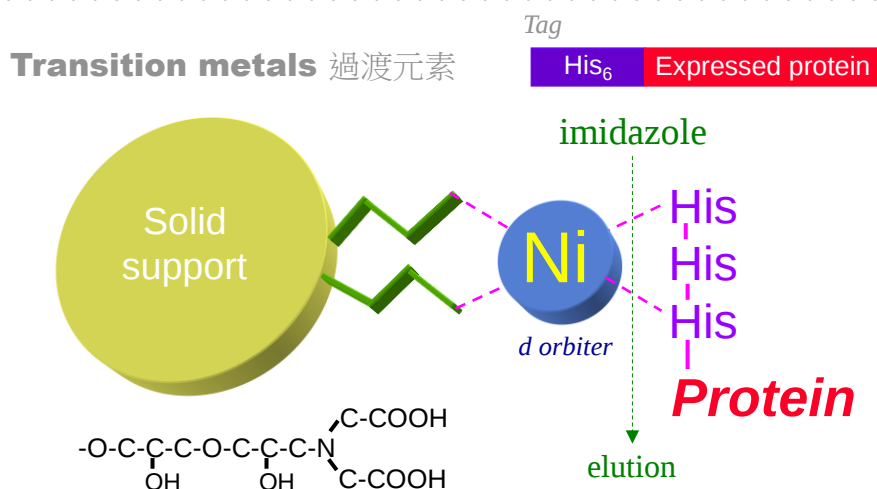
2.4.3 金屬螯合層析法 :

- a. 許多蛋白質或酵素分子上帶有金屬離子，則此蛋白質可能會吸附該金屬。
- b. 若把某金屬固定到固相擔體上，則此擔體會專一性地吸附需要此金屬的蛋白質。
- c. 基因操作時，經常在表現蛋白質的端點，加上一段含有六個 His 的片段；則此表現蛋白質，可以吸附到含有鎳的吸著劑上，再以 imidazole 流洗出來 (圖 2.13)。
- d. 這種擔體表面有可與金屬產生配位鍵的基團 (如 nitrilotriacetic acid, NTA)，這些基團與金屬離子結合 (如鎳離子) 後，即可成為親和吸著劑。

2.4.4 疏水性層析法 :

- a. 作用機制 :

圖 2.13 金屬螯合層析法 Using metal-chelating affinity



Metal Chelate Affinity Chromatography

- (1) 蛋白質分子表面有部份疏水性區域，若在一極性很強的環境中，則會被吸附在非極性的固定相擔體上，當環境的極性逐漸降低，就可被溶離出來，是為 疏水性層析法 (hydrophobic interaction chromatography, HIC)。
- (2) HIC 沒有親和層析那麼強的專一性，較似離子交換法，但所根據的作用力，則是非極性基團間的疏水性引力。

b. 介質種類：

- (1) Pharmacia 有 Phenyl-及 Octyl-Sepharose 兩種介質，後者疏水性較強。
- (2) 通常樣本溶在 1 M 硫酸銨的緩衝液中通入膠體管柱，吸附上去的蛋白質，可提高緩衝液的疏水性來溶離，例如可用 ethylene glycol 之梯度溶離。

c. 反相層析法 (reversed phase)：

- (1) 是 HIC 及離子交換法的綜合體，但屬於一種 partition 層析，可使用離子交換 (或類似 HIC) 的介質。
- (2) 混合極性及非極性溶液為流動相，當流動相通入介質後，介質表面可固定其中的極性溶液 (若使用 HIC 介質則固定非極性者)，樣本分子會在此二液相中進行 partition 分離。
- (3) 因固定相及流動相的極性剛好相反，故名 reversed phase。請參考圖 2.14。

2.4.5 液相分配 (partitioning)：

a. 作用機制：

- (1) 在分析化學的純化方法中，使用分液漏斗在兩個液相間進行 partitioning 者，多用在有機小分子，因所用液相都是有機溶劑，蛋白質不易溶於其中。
- (2) 若在水溶液中加入不同的親水性聚合物，造成密度的差異，則這兩個水溶液可分成兩相。若依蛋白質對此兩相之親和程度不同，而在此二相間進行分配

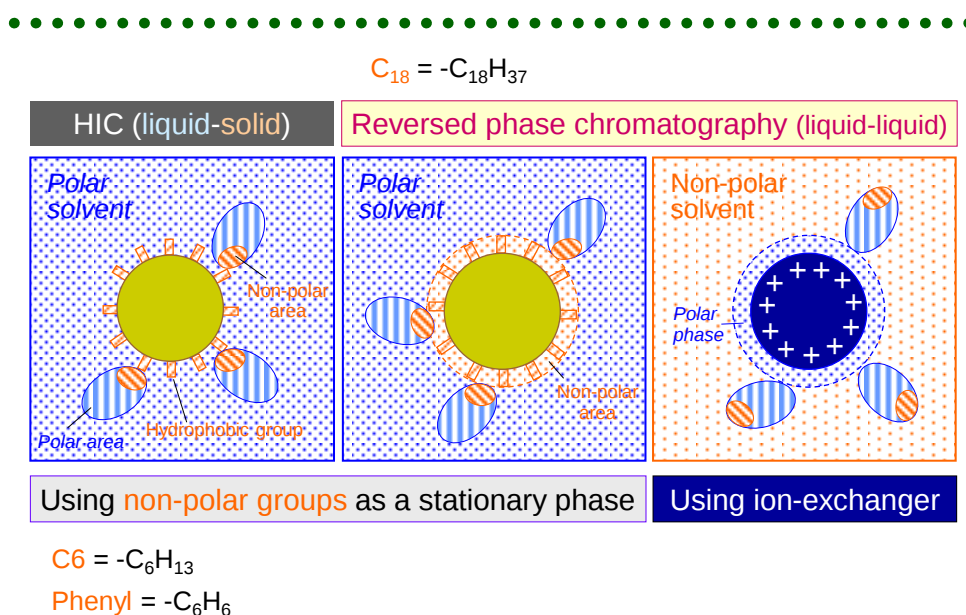
(partitioning) 則可達到分離效果。

(3) 可用的親水性聚合物有 polyethylene glycol (PEG), dextran, Ficoll 等。

b. 親和性分配法：

若在上述的聚合物分子上接有親和性基團，以吸引專一性的目標蛋白質，則稱為 親和性分配 (affinity partitioning)。

圖 2.14 疏水性及反相層析法



2.5 HPLC 及 FPLC：

HPLC 為高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography) 之意，也有說是 high pressure，因為要使用高壓推動溶離液，以加速層析過程。FPLC 則不用高壓，但流洗速度也很快 (fast performance)，是因為所使用的介質通透性極佳之故。這些都是屬於『硬體』的升級，也都可以應用在膠體過濾、離子交換、親和層析、反相層析等平台，而所根據的基本原理完全相同。

a. 解析力增加：

通常可降低介質的 粒子大小 以增加層析法的解析力，但是粒子太小造成流速太慢，反而使解析力下降。HPLC 使用 silica 或樹脂等耐壓介質，以極細的粒子 (約 10 mm)，在高壓下緊密裝填而成。使用時要在高壓下進行，因此速度比較快，通常在一小時左右可完成。

b. 使用方式廣泛：

較早 HPLC 都用於 adsorption 型式的層析法，例如以離子交換分離各種胺基酸等小分子。近來由於介質材料的發展，各種應用在大分子的液相層析法，均可用 HPLC 的方式來進行，不但加快分析速度，也使解析度提高很多。除了上述的離子交換法外，還可用在膠體過濾法、逆相層析法或親和層析法。HPLC 及 FPLC 系統，有可能完全取代傳統的低

壓慢速液相層析法。

c. FPLC 系統：

是 Pharmacia 進一步發展的二代膠體介質與管柱體系，可以不用很高的壓力，在一小時內完成分離，而其樣本容量更大於 HPLC，可用在製備式純化上 (樣本量達 500 mg)。

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. 層析法為何一定要有兩相系統？(一相不行嗎？三相不是更好嗎？) [1]
2. 為何濾紙層析法 (PPC) 是一種 partition (液相-液相) 層析？ [1]
3. 用 Sephadex G-25 脫鹽時，若因離子濃度改變，而致蛋白質發生沉澱，對實驗有何不利之處？ [2]
4. 通常脫鹽的 Sephadex G-25 管柱均製成可丟棄式，這種消耗有必要嗎？ [1]
5. 為何膠體過濾法是一種 partition 層析？ [1]
6. 在進行離子交換法時，為何樹脂類的介質不適用在蛋白質樣本？ [2]
7. 某蛋白質的 pI 是 4.2，若把緩衝液調到 8.5，則在此緩衝液下，應當使用那一種離子交換介質？請問在這樣的 pH 下進行離子交換層析，可能會有什麼問題？ [3]
8. 為何 pH 的連續梯度不容易拉得好？ [2]
9. 親和層析是 partition 或 adsorption 層析法？親和層析法為何需要使用固相擔體？ [3]
10. 薄層層析 (TLC) 可兼有 partition 及 adsorption 兩種層析方式，各是如何操作的？ [4]
11. 一隻直徑 2.6 cm 的管柱，長度 100 cm，想要裝填 Sepharose CL-6B 至八成的高度。現有一瓶原裝的膠體，瓶子上面標明有膠體 750 mL，靜置後膠體沉降體積約佔四分之三的高度，其餘為上清液。你當如何取用膠體，剛好可以裝填所要的膠柱。 [4*]
12. 每年四、五月間，是研究生趕畢業的繁忙時段，冷房經常堆滿管柱，空間不敷使用。有一研究生沒有找到位置，不得已只好在室溫跑膠體過濾，為了怕在室溫停留太久，又把流速增加 20%。結果出乎意料之外，出來的蛋白質峰都比原來在冷房裡跑的還集中，活性也稍稍增加。請檢討這個現象的可能原因。 [4*]
13. 某生以 Sephacryl S-100 膠體過濾法分離某蛋白質，在一般 PBS 緩衝液 (含 0.2 M NaCl) 下流洗，通常此蛋白質都在大約 35 管分劃處溶離出來。但經春假放假三天回來，開動實驗重新裝填管柱，緩衝液也重新配製 PBS，卻發現蛋白質居然要在 60 管才會溶離出來，酵素總活性也降到三分之一。檢討他所用的管柱大小相同，所用的分劃收集器及分劃體積也都沒變，請問發生何事？ [5*]
14. Hydroxylapatite 是何種物質？它是如何分離單股與雙股 DNA？ [3]
15. 有一次停電數小時之後，某生發現冷房內的管柱中，膠體都充滿了氣泡，請問是何原因？但他發現旁邊另一位同學的管柱膠體卻都沒有氣泡產生，又是為何？ [4*]
16. 甲乙兩人同時用 DEAE 陰離子交換法純化酵素，甲生有最好的管柱 (有 adaptor)、梯度製造器、蠕動幫浦，而乙生除了有點錢買膠體、燒杯、緩衝液之外，什麼都沒有。經過一週後報告，乙生的結果卻比甲生好，活性及純度都較高，是如何辦到的？ [5*]

17. HPLC 與 FPLC 系統有何異同？純化酵素時你會選擇何者？ [2]
18. 進行離子交換法時，我們是採用較高的鹽濃度把蛋白質溶離下來，請說明為何高鹽濃度可以把吸附在膠體上的蛋白質洗下來？ [3]
19. 進行離子交換法以鹽梯度溶離蛋白質時，若要分開兩個很相近的蛋白質峰時，有時會有下列現象發生，請說明為何： [5]
 - a. 拉連續梯度不如階段 (stepwise) 梯度
 - b. 使用較長的膠柱不如較短的
 - c. 使用較寬的鹽梯度 (0~0.5 M) 不如較窄的 (0~0.2 M)
 - d. 使用的溶離體積較小的 (如 150 mL × 2) 不如較大體積者 (如 200 mL × 2)
20. 血清蛋白質的 pI 大多在 7 以下，只有抗体 IgG 的 pI 為 8.3，請設計一離子交換程序，使用 DEAE-Sephacel，可以很快地純化 IgG。另外，IgG 的分子量約為 160,000，而另一類抗体 IgM 的分子量為其五倍多，請問你要用何種方法來純化 IgM？ [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]

3 其它純化方法：

大量純化酵素時，通常前面的步驟使用傳統層析方法，再加上 HPLC 或 FPLC 就可以得到相當均質的蛋白質。以下的製備式電泳及超高速離心法，也可增加純度，但處理量較少；而超微薄膜過濾並非純化步驟，但在純化的各階段過程，可濃縮蛋白質並除去小分子。

3.1 製備式電泳：

製備式電泳通常以不含 SDS 的原態 disc-PAGE 進行，可回收具有活性的蛋白質；蛋白質樣本要先經部分純化，否則效果不佳，事先多以分析式電泳確定所要色帶的位置。詳細說明可參考酵素分析的電泳部分。

a. 電泳用具：

商品的製備式電泳器具很多，都相當複雜且昂貴，但使用一般 8×16 cm 大小的垂直平板電泳，再利用 3 mm 厚的間隔條即可進行，量小時用迷你電泳亦足夠使用。

b. 操作方式：

- (1) 鑄膠：分離膠體只佔全高度一半，焦集膠體佔四分之一，則樣本可佔其餘的四分之一（以上述大小的膠體而言約有 15 mL），不必用樣本齒模，因此只跑一種樣本。
- (2) 預跑：最好在樣本加入前，先預跑約 20 min，以除去 APS 的影響。
- (3) 電泳：可在冷房進行，條件大略同一般電泳，勿使膠體過熱，也不要跑太快。
- (4) 定位蛋白質：方法很多，蛋白質量多時可以 300 nm 波長紫外光照射直接觀察，切出所呈現的色帶；否則要先切一小條膠體染色，再比對位置切出色帶。
- (5) 電泳溶離：以電泳收集膠體內的蛋白質，這一步會損失不少蛋白質，要特別小心。

3.2 超高速離心法：

a. 沉降係數：

蛋白質分子在離心時，其分子量、分子密度、組成、形狀等，均會影響其沉降速率，沉降係數即用來描述此沉降性質，其單位為 S (Svedberg unit)，每一種蛋白質的沉降係數與其分子密度或分子量成正比。不同沉降係數的蛋白質，可利用超高速離心法，在密度梯度中進行分離。

b. 密度梯度作法：

一般有三種製作梯度的方式：

- (1) 在樣本溶液中直接溶入 CsCl，經離心後可自動形成 CsCl 的濃度梯度。
- (2) 使用梯度製造器，在離心管內預先拉好甘油或蔗糖的梯度，加樣本後離心。
- (3) 若對蛋白質性質與離心條件極為熟悉，以上亦可以階段式 (stepwise) 梯度進行。

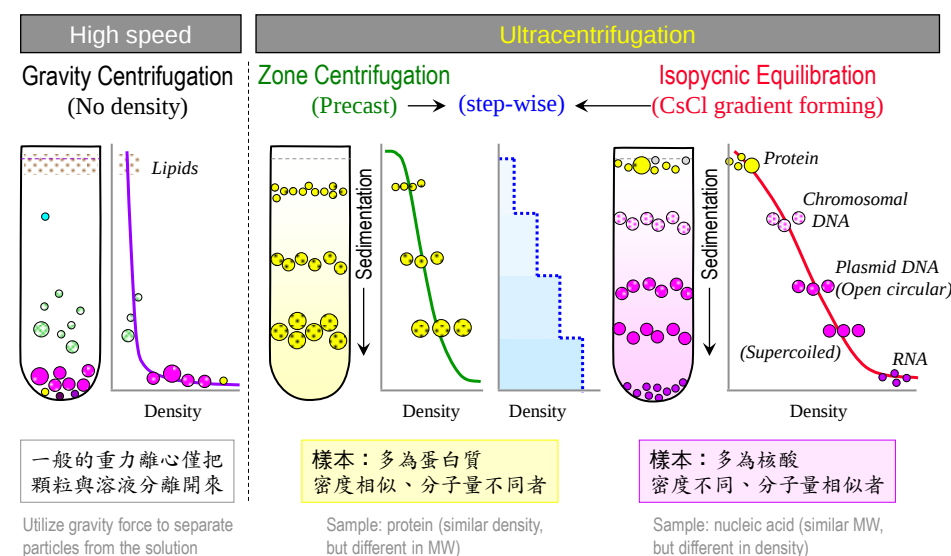
c. 兩種離心方式：

上述 b(1) 及 (2) 二者，分屬兩類不同的離心形式，列表並以圖解說明如下：

表 3.1 兩種超高速離心比較 Two ultracentrifuge types

Centrifuge	Sedimentation Velocity	Sedimentation Equilibrium
also called →	Zone Centrifugation	Isopycnic Equilibration
Gradient formation	Precast (sucrose, glycerol)	During centrifugation (CsCl)
	Shallow gradient, lower density	Steep gradient, higher density
Suitable samples	Similar density, different MW	Similar MW, different density
	Protein	Nucleic acid / cell organelle
Centrifugation conditions	Lower speed, not complete sedimented, stop at proper time	Completely sediment to where the density is equilibrated, high speed, long running time
中文名稱	區帶離心法	等密度平衡離心法

圖 3.1 各種高速離心法比較 Comparison of centrifuges



d. 離心陀種類：

使用不同離心陀，有不同離心方式及效果。

- (1) 角型 (angle rotor)：典型的離心方式，多用在大量製備時，離心管與地面成一角度。
- (2) 懸籃式 (swing bucket rotor)：傳統用在密度梯度離心，離心管與地面平行。
- (3) 垂直 (vertical rotor)：取代懸籃式，離心管垂直地面，可大大縮短離心時間。
- (4) 區帶 (zonal rotor)：較特殊的離心陀，整個陀內分成幾個區帶，注入梯度與樣本。
- (5) 連續式 (continuous rotor)：可一邊離心，一邊加入或取出樣本，多為工業使用。

e. 操作注意：

超高速離心因為轉速極高，離心陀構造也較複雜，操作上要非常小心，完全純熟後才能

進行實驗，新手要有熟練者在旁指導。操作時特別注意下列各點：

- (1) 離心管的平衡要絕對準確，封管要確實，否則液体可能在真空中抽乾。
- (2) 使用懸籃式離心陀，在懸掛離心管時，要注意有沒有掛妥，前後方向是否正確。
- (3) 轉速切勿超過所使用離心陀的最高限，老舊離心陀的最高限還要打折。
- (4) 離心後要清理離心陀，可用水沖乾淨後晾乾，尤其使用 CsCl 者非清洗不可。
- (5) 時常檢查離心艙及離心陀，注意有無腐蝕及傷痕，有問題者立刻請廠商檢修。

3.3 超微薄膜過濾法：

a. 超微薄膜過濾技術 (ultrafiltration, UF)：

- (1) 使用具有極細孔徑的薄膜，可以分離分子量不同的分子。薄膜上細孔的大小固定，只能讓某分子量以下的分子通過，此分子量稱為該薄膜的 cut-off。
- (2) 其基本原理類似透析，但 UF 薄膜的孔徑則更細，而且可選擇孔徑大小。應用這種薄膜技術的方式很多，主要用在濃縮、脫鹽及無菌過濾。
- (3) 另外在純水的製造上，以薄膜配合逆滲透 (reverse osmosis, RO) 所製成的管柱，可除去水中 90% 以上的離子。

b. 超微膜濃縮裝置：

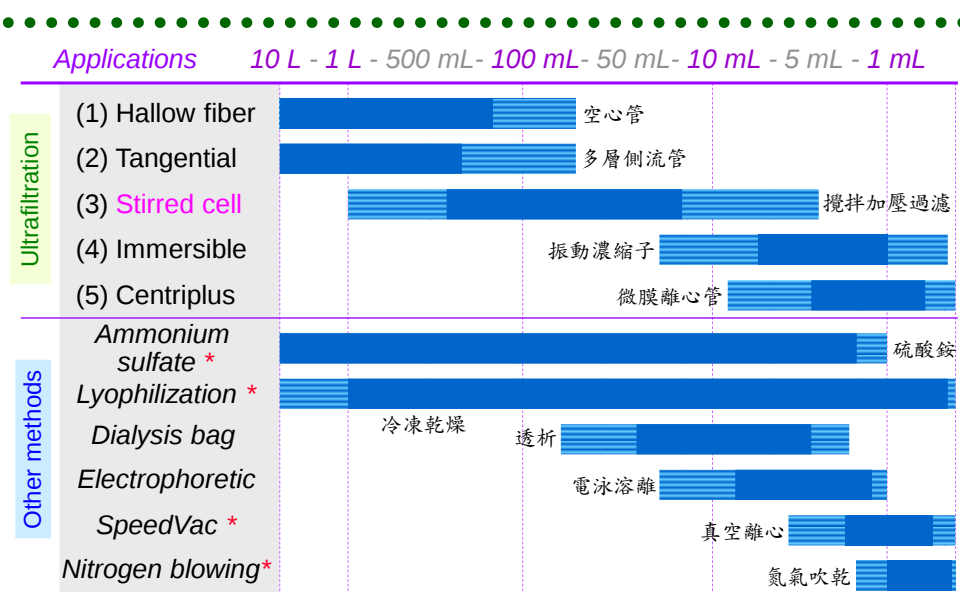
因樣本体積的大小不同，微膜有各種不同型態的設計，常用者如下：

- (1) 空心管 (hollow fiber)：微膜薄層鋪在堅固空心小管的內側，當樣本通過空心管時，小分子則由側面擠出，比較不會有局部濃度太高的問題。
- (2) 多層側流板 (tangential-flow)：多層微膜疊在一起，樣本溶液的流動方向與微膜平面成平行，小分子由側向微膜擠出，也較無局部過濃的問題。
- (3) 攪拌加壓過濾 (stirred cell)：加壓迫使小分子擠過微膜，大分子留在原處，並在薄膜表面攪動，以防止局部過濃而阻塞微膜細孔。
- (4) 振動濃縮子 (Immersible-CX)：濃縮子直接浸入含有樣本的試管中進行，微膜平敷在濃縮子表面，並以振動方式去除局部過濃現象，沒有無效體積，故樣本損失量較低。
- (5) 微膜離心管 (Centricon)：離心管中央安置一微膜隔離，利用離心力把小分子擠過，大分子留在原處，樣本數目多而體積少時，多採用此法。

c. 其它濃縮方法：

除了上述之超微薄膜系統之外，另有其他常用的濃縮方法：硫酸銨沉澱、冷凍乾燥、透析袋濃縮、電泳溶離濃縮、真空冷凍離心、氮氣吹乾等。這些方法都很實用，但注意其中有部分在濃縮後溶液中的鹽濃度提高，可能會影響後續實驗，使用超微薄膜則無此缺點。圖 3.2 比較各種濃縮方法的適用體積範圍，一般實驗室常用的有：冷凍乾燥、stirred cell, Centricon (Centriprep) 及 SpeedVac。

圖 3.2 各種濃縮方法的使用範圍 Useful ranges



* The salt concentration increases in the sample

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. 進行製備式電泳時，明明只切出一條所要的色帶，為何再跑一次分析式電泳時 (SDS-PAGE)，結果往往令人失望，經常出現其它色帶？有那些可能原因？ [4*]
2. 進行超高速離心時，大分子的那些因素會影響其沉降速率？ [1]
3. 為何 CsCl 可以在離心的過程中自動形成密度梯度？而蔗糖或甘油不能？ [3]
4. 進行 zone centrifugation 時，若離心過久而不適時停止，則所有的蛋白質會不會全部沉降在離心管底部？為什麼？ [4]
5. 垂直式離心是如何進行的？為何它能在短時間內達到分離效果？ [5]
6. 超微薄膜過濾與傳統過濾法有何異同？操作時的最大問題是什麼？ [4]
7. 以硫酸銨可以沉澱蛋白質下來，不但有蛋白質分割效果，也可做為濃縮的步驟；但與冷凍乾燥及真空離心等濃縮方法，有何共同的問題，會影響下一步純化步驟？ [3]
8. 某些情況下超微薄膜過濾的確對增進蛋白質的純度有所幫助，那是如何操作的？ [4]
9. 有那些純化方法是利用蛋白質的等電點不同來分離的？ [3]
10. 連續使用兩次相同的純化方法，經常無法得到有效的純化效果，請解釋原因。但在特殊情況下可連續用相同的方法，例如連續使用膠體過濾或離子交換法，請說明之。 [4]
11. 某生在進行硫酸銨分割，收集得蛋白質沉澱後，以最少量緩衝液溶之，得到 20 mL 粗抽取液。接著想進行膠體過濾，因管柱大小只能容納 10 mL 樣本，於是他用超微過濾法把樣本溶液濃縮成 10 mL 以進行下一步。請問他這樣做有無意義？會有什麼問題發生？若是你將如何處理？ [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]

4 純化策略：

正確的純化策略極為重要，往往可以使純化達到事半功倍之效，因此事前要有極為充分的準備與規劃過程。但有時對目標酵素所知甚少，就要一步一步嘗試，像是摸著石頭過河，小心追蹤每一個步驟回收多少酵素活性？

4.1 純化步驟設計：

4.1.1 影響純化因素：

設計純化步驟時，要考慮 Recovery (高回收率), Resolution (高比活性、高純度), Speed (方便與快速), Capacity (經濟) 四個因素。

a. 高回收率：

一般指總活性的回收，最終回收率若低於 30% 就得檢討過程是否有問題。

b. 高比活性：

酵素的比活性要能夠顯著提高，最終純化成品與原始粗抽液二者間，其比活性之比值稱為純化倍率 (purification fold)。各種酵素因材料來源及含量多寡不一，純化倍率也有高低，不過就同一樣本而言，當然越高越好。

c. 高純度：

純度與活性是酵素純化的兩大目的，以達到均質酵素為最終目標；相對而言，在電泳上看不到其它雜質，即可視為均質，但也只能說是 electrophoretically pure。絕對均質的酵素幾乎是不可能，我們只能達到相對純度。

d. 方便與快速：

方法要盡量簡便，步驟勿拖太久，因為酵素活性會隨著操作時間而急速降低，尤其對較不穩定的酵素，時間是最重要因素，有時不得不犧牲其它要求。

e. 經濟：

許多試劑相當昂貴 (尤其是活性分析用藥)，大量使用時要考慮到經濟問題，因此每次操作所能處理的樣本量也是關鍵。

4.1.2 組合純化步驟：

a. 組合標準：

- (1) 已知的酵素，可先依照已發表論文的步驟進行，有問題再作改進。通常都是以 硫酸銨分劃-膠體過濾-離子交換 為骨幹，再加上其它方法，組成全部流程。
- (2) 對完全未知的酵素，亦可循此骨幹先試行純化，視其結果如何再加改進。
- (3) 不要忘記利用該酵素的特殊性質來純化，例如在其 pI 沉澱、特別的疏水性、有專一的抑制劑，或異常的熱穩定性等。

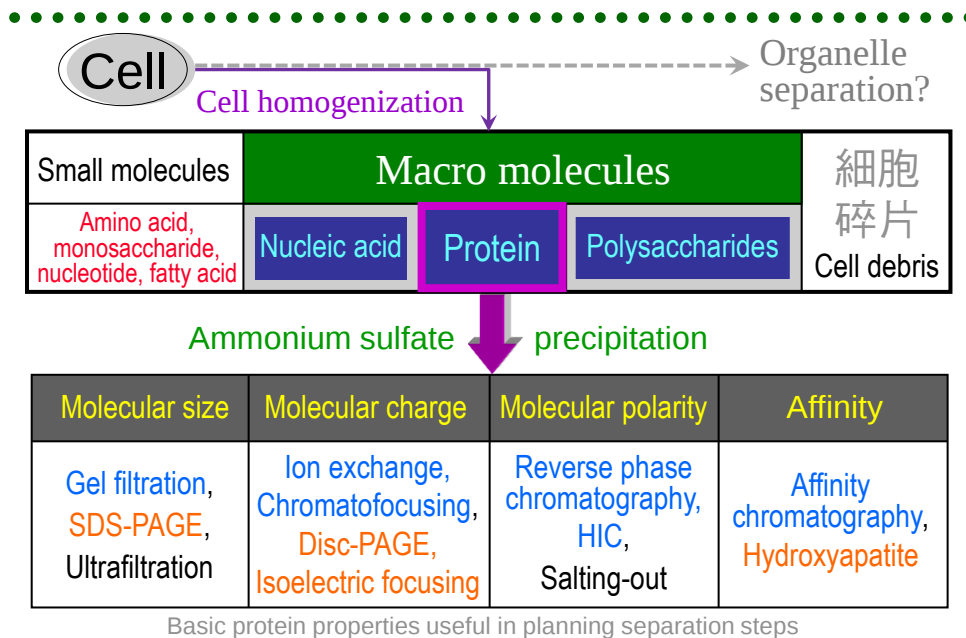
b. 純化方法分類：

- (1) 每種純化方法都是利用蛋白質分子的某種特性來分離的，圖 4.1 把所有的純化方

法，依其運用特性分類歸納，以作為設計流程時的參考。

- (2) 通常同一種純化方法不會重複使用，最好是交叉利用各種蛋白質的不同性質，來設計一連串的純化步驟。

圖 4.1 純化或分析方法原理



4.2 純化結果：

a. 純化表：

最終純化結果以 純化表 (purification table) 摘要整個過程及成效，例如表 4.1 所示。總活性除以總蛋白質質量就是 比活性 (specific activity)，請參考表 4.1 下方 (a) 的算法指引。比

表 4.1 Sucrose synthase 純化表 Purification table

From 100 g rice grain at its milky stage (乳熟期)

Purification Steps ↓	Total protein (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Purification fold (fold)	Recovery (%)
Crude extraction	1,070	9,672	9.0	1.0	100
Protamine sulfate precipitation	800	12,555	15.7	1.7	130
Ammonium sulfate (35-55% sat)	250	6,610	26.4	2.9	68
Sepharose CL-6B gel filtration	53	5,789	111.3	12.4	60
DEAE Sepharose ion exchange	8.6	2,960	344.2	38.2	31



活性逐漸增加的比數即為 純化倍數 (purification fold) (b)，而以粗抽取液所含活性為 100%，每個步驟所收到的總活性百分比，稱為 回收率 (recovery) (c)。

b. 檢討純化表：

若回收率超過 100% 時，表示粗抽取液中可能含有酵素之 抑制因子，或含有干擾活性分析的物質，經去除後酵素活性大增。若回收顯著偏低，表示此一純化步驟並不理想，應探討緩衝液、溶離液成分有無問題，或者是純化流程設計是否不良。有時候目標酵素根本沒有從材料中被有效抽取出來，一開始的收率就很低，就要檢討萃取過程。

c. 純度的要求：

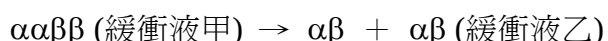
如上表所純化得到的酵素，以電泳檢定已達相當純度，應可供大多數生化學實驗需要，若有必要，可再經製備式電泳或其它方法純化。請注意並非所有的實驗都必要使用均質酵素，有很多實驗 (如酵素動力學、分子量測定) 都不需要完全均質的蛋白質。

應用問題 (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. 以下是某研究生甲純化酵素 A 的過程概述：

甲的最終目標，是要從植物的癒創組織中純化酵素 A。當收集得足夠量的癒創組織後，加入適量緩衝液 (1 mM Tris-HCl, pH 7.0)，以研钵進行研磨，因為怕酵素失去活性，儘快離心收集得 100 mL 上清，進行下一步驟。很快加入 50 g 硫酸銨，使達到 50% 飽和度，得上清約 40 mL；再加入 25 g 硫酸銨，使成為 75%飽和度，離心取沉澱，這是依照前人研究報告取 50-75% 飽和度的硫酸銨沈澱。溶解在 5 mL 緩衝液後，通入 DEAE-Sephrose 管柱中，據文獻說酵素 A 可被陰離子交換介質結合。膠體已平衡在緩衝液，裝填在 1.6×60 cm 的玻璃管柱。樣本通入後，以緩衝液洗過數個管柱體積，開始拉 0~0.5 M NaCl 濃度梯度，並同時收集流出液。很奇怪，發現蛋白質幾乎都不見了，溶離圖譜也沒有明顯的蛋白質尖峰。只得重新抽取，再用硫酸銨沉澱後，改以膠體過濾法分離之，這次用 2.6×50 cm 管柱，使用 Sephadex G-50 膠體。結果出現一個大的蛋白質峰，也有酵素 A 活性，甚是高興。趕緊做 disc-PAGE 及 SDS-PAGE，結果發現膠體過濾法前後的蛋白質電泳圖譜，都差不多。算一算總活性回收量，也不到文獻報告的十分之一。請指出甲生可能造成的所有錯誤，並幫他設計一個可行的純化流程。 [4*]

2. 某蛋白質 B 在不同的緩衝液下，會有不同的四級構造 (如下式)，且這種轉變是可逆的。



(1) 請解釋此一現象發生的可能原因。

(2) 請利用這個特性，設計一個層析法來純化蛋白質 B。 [3]

3. 動物的血清白蛋白 (albumin) 經過蛋白質水解處理後，成為胺基酸混合液，可供醫療上針劑使用。但若水解不完全，可能有分子量較大的肽片斷，打入人體後會產生抗体，相當危險。且白蛋白中經常有多醣類雜夾其中，無法被蛋白質水解酶水解，分子量很大，可能是更危險的抗原。請問有那些方法，可以有效的除去這些有害的物質，同時可大量處理，以便大量製得，供醫療上使用？ [3*]

4. 蛋白質 C 及 D 的分子量分別為 49,000 及 47,000，但是 C 分子中含有 70% α helix，在 pH 8.8 下其 helix 構造會變性而成為 random coil，但仍保持其水溶性，當 pH 調回中性時回復原態；蛋白質 D 在兩種 pH 下均為原態。請設計一個方法，可分離此二蛋白質。 [4]

5. 經過部分純化的酵素 E，在緩衝液中為清澈溶液，在水中透析三日後發現：

- 透析袋內有沉澱發生，離心後分別收集上清及沉澱，上清活性剩約五分之一，沉澱及外液則均無酵素活性。
- 上述透析袋內的上清及沉澱，測蛋白質量，總共只有原來透析前的一半。
- SDS-PAGE 顯示透析外液不含蛋白質，但有 Ninhydrin 反應及 280 nm 吸光。

請問：

- (1) 為何會產生沉澱？
- (2) 總酵素活性為何下降許多？列出所有可能情形。
- (3) 袋內蛋白質量只剩一半，請作一假設並推測原因。
- (4) 請設計一個實驗，證明你的假設。 [4]

6. Lectin 是植物的一類特殊功能蛋白質，可與各種醣類分子產生專一性的結合。有一 lectin F，它與葡萄糖有相當專一性的結合，請問你如何以最方便的層析方法來純化之？ [3]

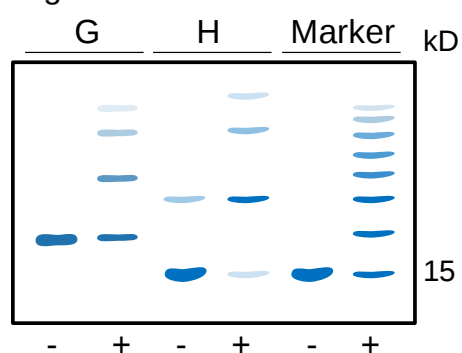
7. 蛋白質間可以用架橋分子連在一起，成為二元體、三元體或多元體。現有 G, H 兩蛋白質，架橋反應後以 SDS-PAGE 檢定之，得如 Fig. 1 結果。

+：蛋白質經過架橋處理 -：未經架橋處理之蛋白質
Marker：已知之蛋白質 (分子量 15,000) 經架橋處理後，所得之各種聚合物

另以膠體過濾法測 G 及 H 的分子量，二者均為 90 kD。

請由這些結果，推論 G 及 H 兩蛋白質的四級構造。 [4]

Fig. 1



8. 酵素 I 的純化流程如下：

材料(甘藷)切碎

↓ 加緩衝液均質化

粗抽取步驟 (依一般方法進行)

↓ 離心

上清

↓ 0.3~0.5 飽和度硫酸銨分劃

Crude I (酵素粗抽液 Xt)

↓ 膠體過濾 (Sephacrose CL-6B)

溶離得 P1, P2, P3 三尖峰 (Fig. 2)

↓ → 電泳 (Fig. 3) disc-PAGE

Peak P1 (只有 P1 有酵素活性)

↓ 離子交換 (DEAE-Sephacrose)

↓ 以緩衝液洗過一個管柱體積

↓ 0~0.3 M NaCl 梯度溶離

↓ Fig 4 得 P4, P5 兩個尖峰 → Fig. 5 各分劃做 disc-PAGE

Peak P4 (只有 P4 有酵素活性)

請問：

(1) Fig. 2 上 P3 的各分劃 (#55~65)，在電泳 Fig. 3 上幾乎都不見了，請解釋為何。

(2) P1 本有一些雜質 (Fig. 5 中打*處)，但經過離子交換之後，在 0~0.3 M 梯度收得的各

Fig. 2 Gel filtration

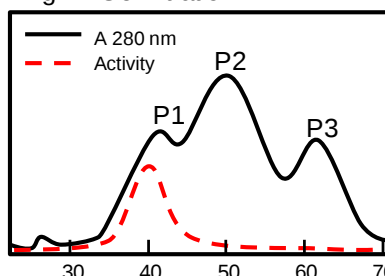


Fig. 4 Ion exchange

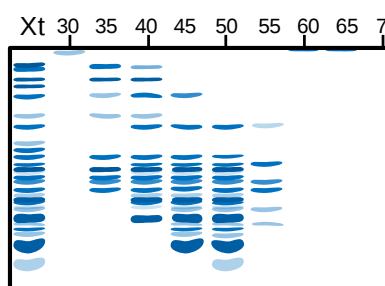
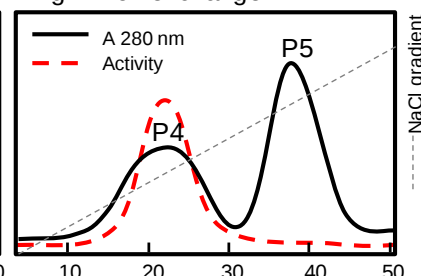


Fig. 3 Disc-PAGE (GF)

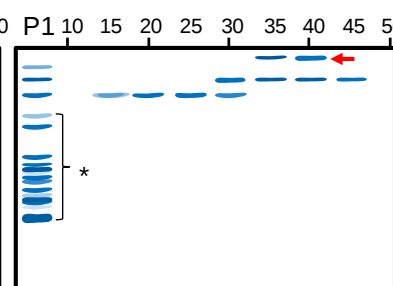


Fig. 5 Disc-PAGE (IEX)

分割，以電泳檢視時 (Fig. 5)，找不到這些色帶，它們可能在那裡？

(3) Fig. 5 中 #35, 40 多出現一個高分子量色帶 (箭頭處)，可能是如何產生的？

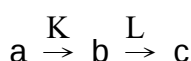
(4) 你對這樣的純化結果滿意嗎？請再改進以上的純化步驟。 [5*]

9. 某蛋白質樣本通入 DEAE-離子交換介質，以純化其中的酵素 J，樣本中原含有 50 mg 蛋白質及 100 活性單位酵素 J。以 0~0.3 M NaCl 梯度溶離得數個 280 nm 尖峰，依次標以 P1, P2, P3, P4 及 P5，分別收集之，分析均無任何酵素 J 活性。另外測得以下結果：

- 各蛋白質峰的蛋白質總量為 46 mg。
- 當混合 P2 及 P5 後，可測得約 280 單位酵素 J 活性，其它的混合均無活性。
- 當混合 P2, P4 及 P5 後，只測得 98 單位的酵素 J 活性。
- 測 P5 的蛋白質含量只有 0.5 mg。

請問：P2, P4 及 P5 分別含有何種物質？ [4]

10. 某酵素 K 的活性分析方法如下，L 為其耦合反應酵素，使用 NAD^+ 為輔酶。

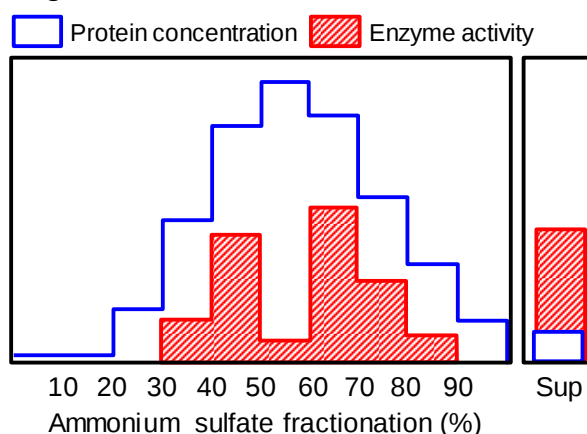


在進行硫酸銨分割後，得到 Fig. 6 的結果。

請問：

- 活性分析結果有兩個 K 的活性尖峰，可能的原因為何？ (至少列出兩種假設)
- 請設計實驗，分別可以證實上題假設。
- 若把硫酸銨 30~80% 饱和度間的部分收集起來，再進行膠體過濾，結果 K 的活性回收率多達 250%，則那一個假設為真？

Fig. 6



(4) 上清蛋白質量不多，但出現相當高活性，是何原因？請設計實驗證明你的假設。 [5*]

11. M 為一相當不穩定的酵素，尤其在低 pH 下容易變性，乙、丙、丁三人以親和層析法純化之，他們的實驗設計如下：

將 M 的基質衍生物 N 耦合到某種親和擔體，洗去反應液後，把擔體裝入管柱，然後通入部分純化的 M，再用游離的 N 溶離下 M。三人的實驗條件略有不同：

所用親和擔體： 耦合緩衝液： 溶離條件：

[乙] CNBr-Sepharose Tris pH 8.0 游離型 N

[丙] Agarose-C₆-COOH 磷酸 pH 7.5 游離型 N → pH 2.05 甲酸

[丁] CNBr-Sepharose 磷酸 pH 7.5 游離型 N → pH 2.05 甲酸 → NaOH pH 12

所得結果也有相當的差異：

[乙] 發現 N 根本沒有耦合到擔體上，酵素 M 無法結合上去。

[丙] 酵素 M 很難被溶離下來，要使用 pH 2.05 的劇烈條件，才能洗下蛋白質。

[丁] 酵素 M 是被結合到擔體上了，但無論用任何 pH 均無法溶離下來。

請問：

- (1) N 分子上一定要有何種官能基團，以便三人能夠順利完成耦合反應？
- (2) 乙在實驗中所犯的毛病為何？如何改善？
- (3) 丙可能是用什麼試劑把 N 連結到 agarose 上？
- (4) 丙的實驗中何處不妥？如何改善？
- (5) 丙所溶離下來的酵素 M，容不容易得到均質？其活性如何？
- (6) 丁為何無法把 M 溶離下來？M 與丁的膠體之間可能發生什麼情況？
- (7) 三人都忽略了一個重要步驟，此步驟是什麼？應當如何進行？ [5]

12. 有 P, Q, R, S, T 五種大小分子的混合物，其性質如下表，請設計一系統方法純化之。

	分子量	Ninhydrin test	AHP test	pI
P	300	+	-	6.3
Q	350	-	+	non-polar
R	40,000	+	-	4.3
S	50,000	+	-	7.8
T	440,000	+	-	5.2

AHP = Aniline hydrogen phthalate [4]

13. 酵素 U 需要鎂離子共同維持活性，在純化過程中，膠體過濾法或離子交換法均使得 U 失去活性，請分別解釋原因；並說明如何防止之？ [3]

14. 有兩種蛋白質 V 與 W，其 pI 分別為 5.2 及 6.3，原態單元體之分子量分別為 32,000 及 35,000。V 在其 pI 的環境下，有 90% 的分子會發生聚合現象，成為四元體，且可溶於一般緩衝液。請設計一簡單方法，分離此二蛋白質的混合物。 [4]

15. 經純化後之蛋白質 X 及 Y，以 PAGE 電泳檢定得如 Fig. 7。

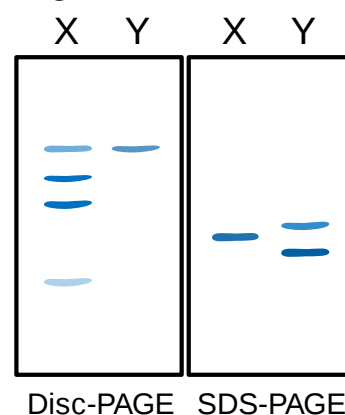
請分別討論蛋白質 X 及 Y 何者為純質？解釋為何。

(請由所得之電泳圖形說明之，並請再設計實驗證明) [5]

16. 某蛋白質只知有下列性質，請設計其活性分析及純化流程。

- a. 原態分子量約 20 kD
- b. 等電點 8.0
- c. 可降解澱粉生成葡萄糖
- d. 在高溫 (95°C) 下可耐受 20 min 而活性不失
- e. 尚未誘導出其專一性抗体 [4]

Fig. 7



Disc-PAGE SDS-PAGE

17. 蛋白質 Z 的純化過程中，最後得到如 Fig. 8 及 Fig. 9 的結果，並且做了膠體過濾管柱的分子量校正 (如右 column calibration, $K_{av} = V_e - V_t / V_o - V_t$)。

請問：

- (1) 此膠體過濾管柱的 V_o 及 V_t 各為若干？
- (2) Z 的 V_e 為多少？請依此定出 Z 的原態分子量。
- (3) 請由 Fig. 9 推出 Z 分子的四級構造。
- (4) 請討論 Z 是否為純質？ [4]

Column calibration		
Standards	Mol. mass	K_{av}
S1	67,000	0.4
S2	25,000	0.7
S3	14,000	0.8

Fig. 8 Gel filtration (S-200, 2.6 x 100 cm)

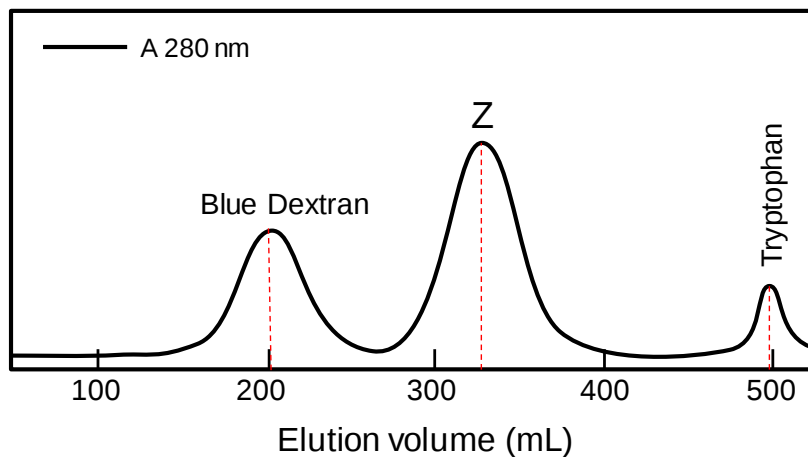
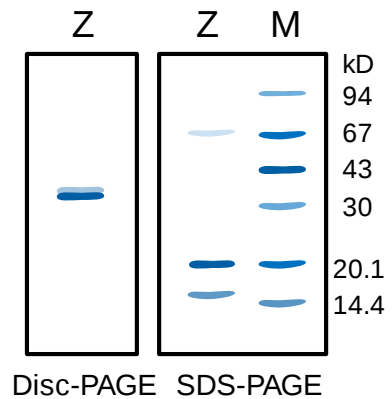


Fig. 9



18. 某粗抽取液中各種蛋白質及酵素 AA 的性質如下表，請依指示進行以下的純化步驟：

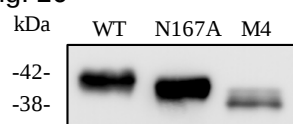
- (1) 粗抽液進行膠體過濾法 (Sephacrose CL-6B)，預測並畫出層析圖譜及 SDS 電泳結果。
- (2) 取出含 AA 部份，接著進行離子交換法 (DEAE Sephacel, pH 6.5)，同上預測結果。
- (3) 若你覺得 AA 還不夠純，請自行設計進一步的純化方法，並預測其結果。

(以上 SDS-PAGE 只要做含有最高 AA 的一管即可，不需跑全部分劃) [5]

名稱	含量 (%)	分子量 (kD)			等電點 (pI)	疏水性 (%)	其它特徵
		單元體	四級構造	原 態			
AA	6	60	trimer	180	5.1	40	含有 heme (Fe)
X1	10	60	dimer	120	5.5	20	含有鋅離子
X2	12	50	tetramer	200	5.0	35	glycoprotein
X3	5	90	dimer	180	5.2	90	對熱不穩定易失活
X4	8	95	dimer	190	6.8	50	
X5	10	58	dimer	116	5.4	40	含有鈣離子
X6	12	20	monomer	20	4.1	40	在 SDS 下有活性
X7	11	45	tetramer	180	4.9	35	在其 pI 會沉澱
X8	6	200	tetramer	800	4.5	30	淡褐色
X9	7	55	trimer	165	7.8	55	
X0	3	80	tetramer	320	5.5	30	glycoprotein

19. 若你在一個熱帶窮困國家的醫院裡工作，沒有任何儀器也沒有電力，只有簡單的玻璃管及小孔徑的塑膠注射針筒等器材；少數藥品之一是胃藥，這種胃藥是氫氧化鋁制酸劑，可保護胃壁，另外有一些牙科的填充骨粉。某日你發現當地有一種植物果實的抽取液可以抗癌，這種果實中大都為糖份，但含有一點點苦味物質，可能是生物鹼。你想研究何者是真正有效的成份，在這種艱難情況下，請問你如何粗略分離其中的成份？ [5]
20. 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 Asn 醣化位置，若把某個醣化位置的 Asn 突變成 Ala (Fig. 10, N167A)，則 HA1 分子量下降了大約 1 kDa，而最右側 M4 分子量約 38 kDa，請問 M4 可能是什麼？可以推得什麼事實？ [4*]

Fig. 10



Anti-HA

承上，若把 WT 的 HA1 分離出來，然後進行膠體過濾純化，則得如 Fig. 11 的色析圖譜，但是必須以 SDS-PAGE 及 Western blotting 才能看到 HA1 (Fig. 12)，請問所得到的 HA1 的分子量若干？能否推知 HA1 的分子構造？ [5*]

Fig. 11

Absorbance (mAu, 280 nm)

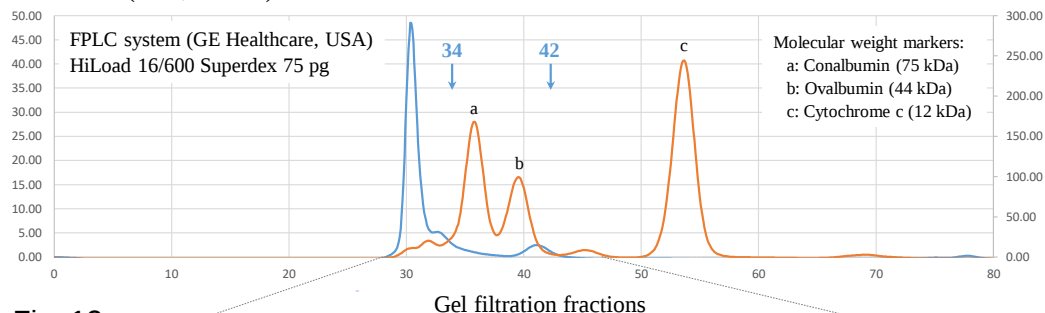
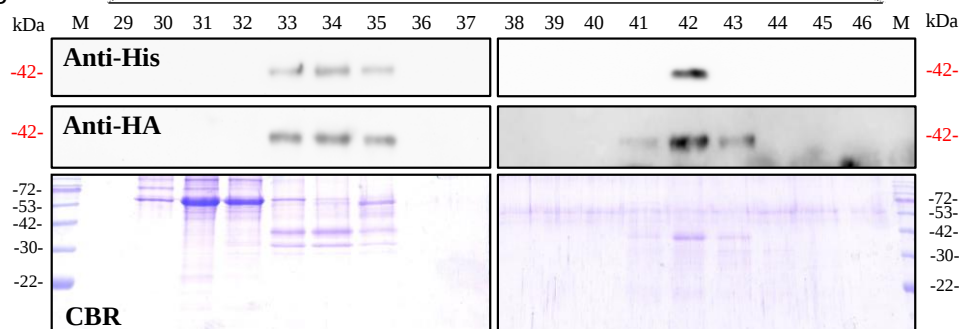


Fig. 12



21. 請解釋下列各操作時所發生現象的主要原因，若是實驗操作問題請亦提出解決方法：

例：加熱使酵素中止反應。[答] 蛋白質受熱變性，構形被破壞，失去活性。

- (a) 粗抽取液經透析後，總活性降至一半以下。 [4]
- (b) 粗抽取液經透析後，總活性增加 50%。 [3]
- (c) 硫酸銨沉澱後，找不到酵素活性。 [4]
- (d) 硫酸銨分劃後，某酵素的活性分佈在所有的各個分劃。 [5]
- (e) 有人宣稱使用 SDS-PAGE 可以測得原態蛋白質的分子量。 [5]
- (f) 蛋白質樣本在濾紙電泳上會有嚴重拖尾現象。 [4]
- (g) 有些人使用酵素的粗抽取液即可進行動力學實驗。 [4]
- (h) 已知某酵素不是醣蛋白，卻可以糖染色法 (PAS) 染上色。 [5]
- (i) 用 ultrafiltration 濃縮後的濃縮液中，發現蛋白質濃度沒有提升。 [4]
- (j) 進行甘藷粗抽液的原態電泳，經活性碘染色發現有粉紅色色帶。 [4]
- (k) 酵素經過反相層析法 (reversed phase chromatography) 後活性立刻消失。 [5]
- (l) 等電聚焦法的膠體可形成 pH 梯度。 [4]
- (m) 原態電泳時所要的蛋白質跑不下來，卻在膠體上方拖成一片。 [3]

[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]

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。

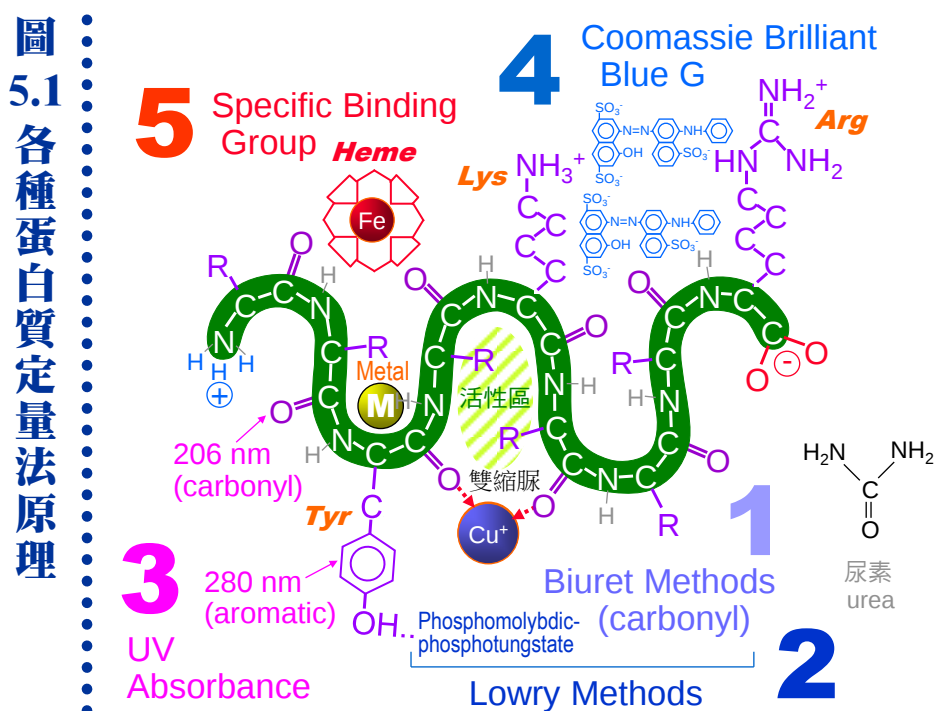


圖 5.1 說明各種蛋白質定量方法所根據的原理，目標蛋白質在中央以捲繞的綠色粗線表示，其上並標出蛋白質的脊骨 (-N-C-C-N-C-C-)，胺基酸上的幾種官能基團 (Lys, Arg, Tyr 等)，都可被用來作為定量的根據。

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]

6 酵素活性測定：

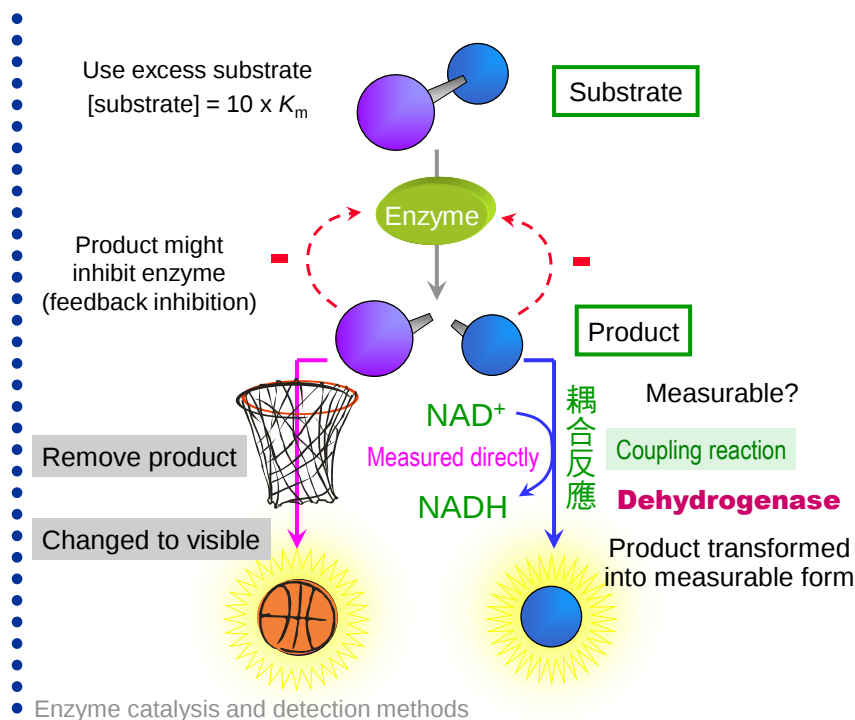
6.1 催化反應：

a. 反應設計原則：

大部分酵素反應方式，都可包括在圖 6.1 的大綱中。建立酵素活性測定步驟時，請注意以下原則：

- (1) 測定生成物的產生量，比測基質 (反應物) 的消失量，更方便且靈敏。除非不得已，儘量避免測定反應物。
- (2) 反應流程儘量簡單，太複雜的操作過程，增加工作量及成本，且容易造成失誤。
- (3) 複雜的反應，可能產生某些意外的生成物 (或 pH 改變)，回饋抑制酵素反應 (圖 6.1 中以負號表示)。
- (4) 反應條件必須有利於指定反應方向，可以移除生成物 (以籃框表示) 或連上耦合反應。
- (5) 小心樣本中有無其他酵素 (或抑制劑) 干擾，會因為消耗反應物或生成物，加強或減弱目標酵素的活性，造成假象而誤判。

圖 6.1 酵素反應及偵測方法



b. 反應基質及酵素濃度：

在試管中進行的酵素活性分析，與生物體內的酵素反應，有相當差距。為使反應達最大活性 (V_{max})，或往指定方向進行，所使用基質濃度為十倍 K_m 。反應的最適 pH、溫度、時間等條件，均需以實驗求得，尤其酵素的用量影響結果甚鉅，要事先找出最適當的使用濃度。

c. 不要忘了基本的酵素動力學：

本課程的主旨是在探討酵素的純化技術與分析方法，對於酵素的催化行為以及所衍生的基礎知識，並沒有討論很多。但是，不要忘了後者才是研究酵素的最終目的，由簡單的動力學分析，就可以得知許多酵素與其基質間的作用關係，以及酵素催化的分子機制，請務必要體會這一點提醒，也要隨時回顧基本的酵素動力學。

6.2 酵素活性分析：

酵素活性的偵測，通常是固定在一段時間 (t) 內，觀察生成物的產量 (P)。因此反應進行一定時間後需中止反應，再進行生成物的定量。而 P/t 即為此酵素的反應速率 (v_0)，也就是酵素活性。但若可以連續記錄反應過程，則有無中止反應並不重要。

6.2.1 酵素活性測定方法：

反應一段時間 (t) 後中止反應，測生成物量 (P) 即得活性 (P/t)。以下為各種測定生成物的方法，任何物理、化學甚或生物方法都可使用。

a. 直接測定生成物：

所有去氫酶均可測定 NAD^+ 與 $NADH$ 間的變化量，即為去氫酶的活性。例如酒精去氫酶催化下式之正反向反應：



反應液中 $NADH$ 在 340 nm 波長有吸光變化 (如圖 6.2)。

圖 6.2 Coenzyme NADH

$NAD^+/NADH$ 的轉換可以
耦合 340 nm 吸光度變化

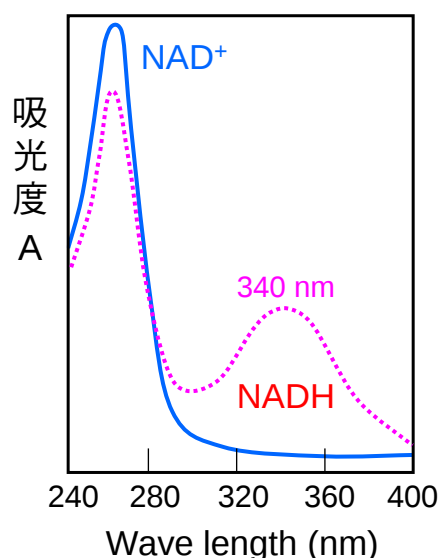


Dehydrogenase (去氫酶)

Glyceraldehyde-3-P deHase

● Dehydrogenases use $NADH$
or $NADPH$ as coenzyme

● Have similar NAD^+ Binding
domain (Convergent evolution)



b. 耦合反應法：

若生成物 (P) 無法直接測得，設法把生成物再進行耦合反應，變成可測量的產物 (Q)。很多酵素可耦合到上述去氫酶的反應，則可測 340 nm 波長變化。



c. 化學測定法：

若生成物具有化學活性，則可直接進行化學反應，例如蔗糖以轉化酶 (invertase, IT) 水解成果糖及葡萄糖，兩個單糖產物都是還原糖，可測定所生成還原糖之還原力。

d. 放射線測定法：

若基質分子中含放射性核種，酵素反應後追蹤生成物的放射線量，即可知酵素活性。麻煩的是，要分離反應物及生成物，有時不太容易，可用 HPLC、濾紙色析法 (PPC) 或離子交換法等。

e. 測壓法 (manometry)：

若生成物為氣體，則可測定氣體體積之增加量。尤其有氧氣生成時，可用 Warburg 氏呼吸計測之。

f. 電極：

有些電極可直接測定反應的變化，例如若有 pH 或氧濃度的改變，則可用 pH 計或氧電極。酵素電極把酵素固定在薄膜上進行反應，然後直接測定反應物的改變，相當方便，但多用在工業或醫療界有大量樣本時。

g. HPLC 檢定法：

若產物無法以其他任何方便的方法檢測時，最終可用 HPLC 來分析產物，但相當費時且需要較昂貴的設備。

6.2.2 中止酵素反應方法：

注意任何中止反應的方法均不得破壞生成物，或干擾儀器測定。

- (1) 最常用急速加熱 (100°C 水浴) 10 min，注意有些蛋白質 (如 RNase) 仍然無恙。
- (2) 以 3~5% TCA (三氯乙酸) 改變 pH，使酵素變性沉澱，再離心去除沉澱取上清。
- (3) 用 1% SDS 中止反應，注意 protease K 等在 SDS 下仍有活性。
- (4) 若該酵素需二價離子，則加入 EDTA 中止反應。
- (5) 若該酵素有專一性抑制劑，則可加入抑制劑。
- (6) 若使用放射性基質，可加入大量不具放射性 (cold) 的基質，看來具有放射性的生成物不再產生了，但實際上酵素反應並沒有停止。

6.2.3 連續測定法 (continuous-reaction)：

連續測定法可不用刻意中止酵素反應，但通常要使用儀器即時監控生成物。

a. 連續測定法：

若酵素反應，在其反應過程中可以一邊進行觀察，則可連續測定反應的情形，不須中止反應，上述酒精去氫酶即可連續監視 340 nm 波長的變化。若生成物無法直接觀測，也可連接某一耦合反應，把生成物轉變為容易觀察的物質。

b. 連續的耦合反應：

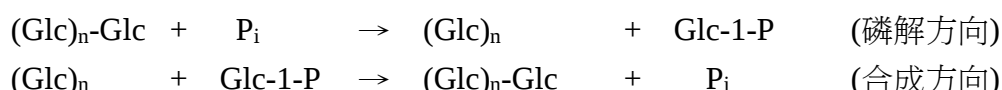
耦合反應在連續測定法應用相當多，但由於耦合反應更複雜，甚至成為一個迷你的代謝途徑。這種複雜的反應中有較多試劑與產物，許多不必要的副反應可能出現，干擾反應結果，因此要作好對照的控制組，以免有假結果出現。

6.2.4 澱粉磷解酶活性分析：

以澱粉磷解酶 (starch phosphorylase, SP; EC 2.4.1.1) 為例，說明如何以生物化學方法偵測其活性，並提醒活性分析如何受其他物質干擾而造成假象。

a. 澱粉磷解與合成：

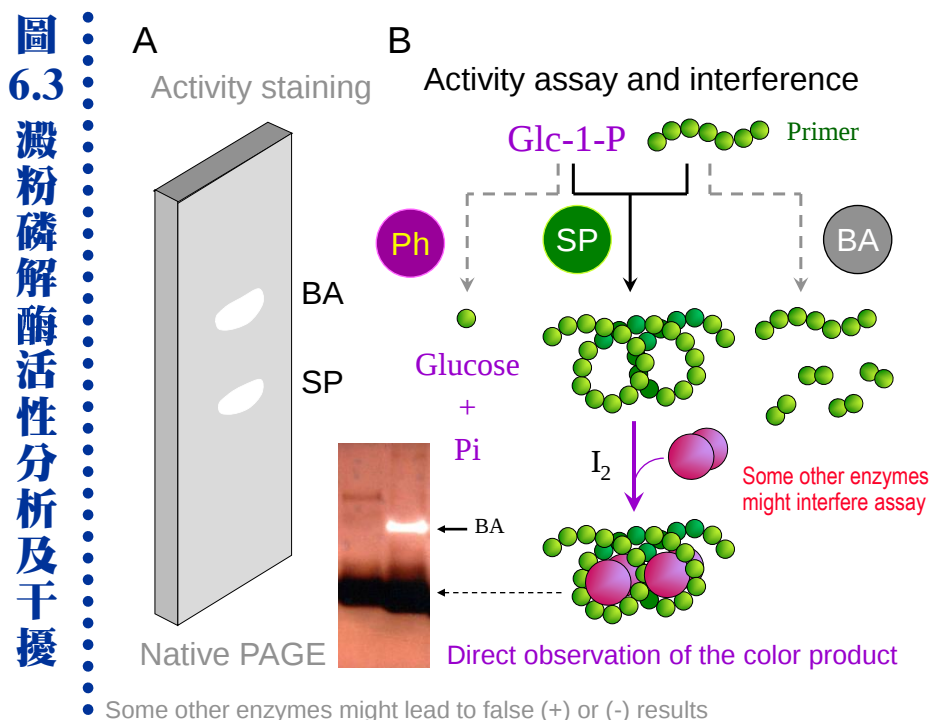
注意磷解 (加磷酸分解) 不是水解 (加水分解)，此反應為可逆 (P_i 為無機磷)：



合成方向反應可測無機磷 (P_i) 生成，而 P_i 的檢定有方便的化學呈色反應。反之，磷解方向應如何設計方便的活性分析方法？

b. 延長澱粉鏈：

澱粉磷解酶以可溶性澱粉 (Glc)_n 作為引子 (primer)，催化 $Glc-1-P$ 連接到此引子上，成為較長的直鏈澱粉 (amylose)，因此可用碘液呈色觀察。在原態電泳膠片，澱粉磷解酶活性可利用此法染色，直接在膠片上看到酵素活性 (如圖 6.3 A)。



c. 小心其它干擾物質：

澱粉磷解酶的兩種基質很容易受到其它酵素的作用：可溶性澱粉受到 β -amylase (BA) 澱粉酶快速水解，澱粉磷解酶活性會被抑制。而 $Glc-1-P$ 受 phosphatase (Ph) 磷酸酶的水解，產生游離的磷酸，會誤判為澱粉磷解酶的活性 (圖 6.3 B)。

6.3 維持酵素活性：

酵素是有活性的分子，因而可能隨時失去活性，應該考慮各種最佳的環境與條件，以便使酵素保持在最安定的狀態，其中酵素的緩衝液是最關鍵的因素。

6.3.1 緩衝液：

緩衝液可維持酵素溶液的恆定酸鹼度及離子濃度，兩者都會影響酵素的活性，請複習生物化學中緩衝液的作用原理。

a. 緩衝液有其使用範圍：

各種緩衝液都有其適用的 pH 範圍，表 6.1 列出常用的緩衝液。

表 6.1 各種常用緩衝液及其使用範圍：

緩衝液	適用 pH	使用上注意
Formate	3.0 ~ 4.5	容易揮發，可用冷凍乾燥除去
Citrate	3.0 ~ 6.2	小心會與二價金屬離子結合
Acetate	3.7 ~ 5.5	容易揮發，可用冷凍乾燥除去
◎ Phosphate	5.8 ~ 8.0	小心會與鈣離子結合沉澱，低溫下易結晶
HEPES	6.5 ~ 8.5	毒性較小，多用在細胞培養
◎ Tris	7.1 ~ 8.9	pH 受溫度影響很大，要用特殊電極
Borate	8.1 ~ 9.0	
Carbonate	9.7 ~ 10.7	小心會與金屬結合沉澱
Universal	2 ~ 12	數種不同 pH 範圍的緩衝液混合而成

◎ 兩種最常用的緩衝液，注意其使用上的特性。

b. 添加物都有作用：

經常在緩衝液中加入一些物質，以增加酵素安定以保持活性 (表 6.2)，要小心這些添加物是否影響活性分析，是否影響下一步實驗。(參考 6.3.3)

表 6.2 緩衝液常用的添加物：

添加物質	作用	一般使用濃度
NaN ₃ (sodium azide)	抑菌劑	0.01%
EDTA, EGTA	除去二價離子	0.1~1 mM
β-Mercaptoethanol	抗氧化劑	1~10 mM
Dithiothreitol (DTT or DTE)	抗氧化劑	1~5 mM
BSA (bovine serum albumin)	安定劑	0.1~10 mg/mL
Tween-20, Triton X-100	界面活性劑	0.5~0.05%
Glycerol, glucose	防凍劑	50%
Urea 尿素	變性劑	6~8 M
PMSF, TPCK, TLCK, benzamidine 等	蛋白酶抑制劑	通常微量使用

c. 溫度的影響：

緩衝液用來維持溶液恆定 pH，請注意有些緩衝液的 pH 受溫度影響很大 (如 Tris)。故

製備緩衝液時，要考慮此緩衝液將要在何種溫度下使用。

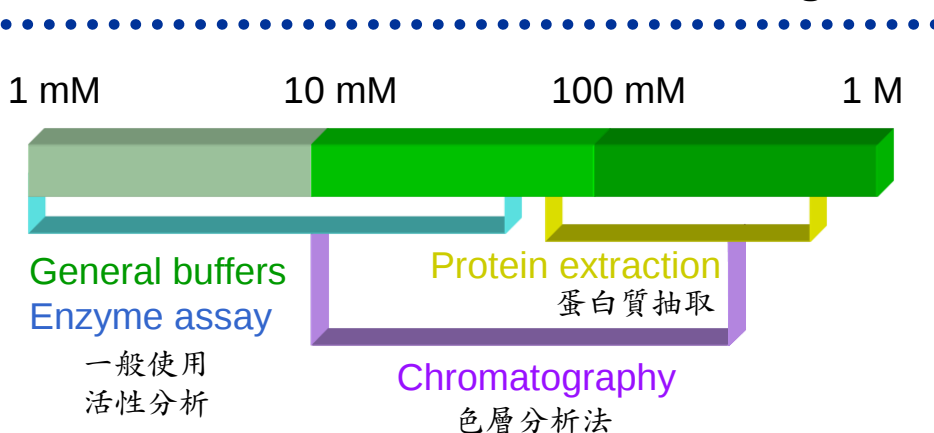
d. 濃度的影響：

改變緩衝液的濃度，可能會影響其 pH。使用不同緩衝液，酵素活性表現也會有差異，有些酵素甚至失去活性。通常若環境的 pH 變化較大，則需要使用較濃的緩衝液，圖 6.4 列出各種實驗情況下，緩衝液的使用濃度範圍。

e. Stock solution：

緩衝液可以十倍濃度貯存，高濃度可防止微生物生長，並保持每次實驗所使用藥品的穩定度與一致性。注意在稀釋後，溶液的 pH 也許會有改變，尤其是磷酸緩衝液很容易受到濃度改變而影響其 pH。

圖 6.4 緩衝液使用濃度範圍 Concentration ranges



6.3.2 試劑的保存：

試劑的適當保存非常重要，要依照廠商所指示的溫度貯存。

a. 避免潮解：

注意每當試劑由冷藏庫取出時，要等它回到室溫後才能打開，否則水氣會附在藥品的表面，進而潮解或破壞之。

b. 分裝凍藏：

常用的冷藏藥品以小量分裝 (aliquot) 後凍藏，是最好的貯藏方式，尤其是溶液狀態的生物活性試劑 (如酵素)，切勿反復凍結-解凍。有些酵素經不起凍藏，一旦結冰後再解凍，活性快速下降 (為什麼？)。例如上述澱粉磷解酶請勿凍藏，放在 4°C 即可。

c. 甘油凍藏：

於低溫 (-20°C) 貯藏的酵素溶液，若保存在 50% 甘油就不會凍結，隨時取用。但請注意所含的甘油，對下一步反應有無影響。

d. 避光防菌：

很多試劑要避光貯存，或須放在乾燥器中，避免長霉長菌。

6.3.3 酵素活性之維持：

a. 酵素的安定性不同：

酵素在細胞中合成後，有的分泌到細胞外，有的運送到細胞器官中貯存或應用。前者(分泌性酵素)因為要在細胞外的惡劣環境中生存，因此較為堅韌，不易受到破壞；反之，細胞內的酵素，都以較濃的濃度集中在保護良好的胞器內或胞膜上，一旦抽離細胞暴露在氧氣中，可能很容易失去活性。

b. 酵素失活的原因：

可歸類成如下的物理性或化學性原因。

(1) 蛋白質變性：

離開細胞的生理環境後，蛋白質可能遇到極端的 pH 條件、不適的溫度、冰凍時被冰晶破壞，或使用變性劑(如 SDS、尿素)，均會使蛋白質的構形破壞。

(2) 酵素活性區破壞：

在抽取過程中，若失去 cofactor，或者活性區的關鍵胺基酸被修飾，均可造成。最常見的影響是氧化，尤其是 cysteine 上的 -SH 基很容易被氧化。一般加入 EDTA 除去可活化氧分子的二價離子，或加入抗氧化劑以其自身氧化防止 -SH 基氧化。

(3) 蛋白酶水解：

細胞內有許多蛋白酶，細胞被打破後即釋放到酵素溶液中，很快水解酵素。可用蛋白酶的抑制劑防止之，但蛋白酶有數大類，各有不同類的抑制劑。一般使用 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 是 Ser 型蛋白酶的抑制劑，但也抑制部分其它類型者，注意 PMSF 在水溶液中很快就會降解，每次使用都要重新補充。

(4) 酵素抑制劑：

在自然界中或以人工合成，發現許多酵素有抑制劑，可以專一性地抑制酵素活性；有可逆性的，也有不可逆的，通常不可逆抑制劑的效果都很強烈。

c. 如何保持活性：

若你的酵素不太穩定，活性不易保持，請參考下列處理方式：

- (1) 儘快進行純化及各項分析，隨時保持在 4°C 或冰浴中。
- (2) 讓酵素保存在硫酸銨固体沉澱中，要比溶液狀態安定得多。
- (3) 勿讓高純度的酵素，保存在稀濃度溶液中，否則要加 BSA 當安定劑。
- (4) 勿隨意凍結或解凍酵素液，可加防凍劑(如甘油或糖類)以液態保存。
- (5) 冷凍乾燥雖可長期保存酵素，但有些酵素活性可能會因而下降。
- (6) 若容易受微生物污染，可經無菌過濾後保存(當然也會損失一些酵素)。

6.3.4 酵素活性單位：

- a. 活性單位 (activity unit, U) 是酵素活性高低的指標。一個活性單位的標準定義，是在固定溫及 pH 下，每分鐘可催化 1 μmole 基質的活性。但很多情況下，為了操作或計算的方便，直接用測定產物所得的吸光值，除以單位時間來表示活性，因此各種活性單位的定義可能不同，請特別注意。
- b. 在提到酵素活性單位時，通常有兩種意思，一是指該酵素的總活性，單位就是 unit。

另外，因為酵素本身大多為蛋白質，因此有蛋白質的質量 (mg)，而 unit/mg 就是該酵素的 比活性 (specific activity)。比活性當然越高越好，表示在比較少量的蛋白質中，擁有比較多活性，比活性高者其酵素的純度也比較好。

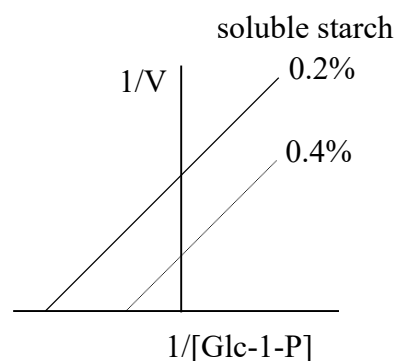
- c. 有關酵素活性及其基本背景，請複習生物化學中的酵素章節，你在大學所熟悉的基本酵素知識，在研究所或以後的任何階段，都還是完全適用。

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. 酵素活性的測定，可觀察反應物消失或者生成物生成，何者較佳？請述明理由。 [2]
2. 活性分析時通常使用大量基質，要大到多少？(有一個公認的估計) 其目的何在？ [3]
3. 在設計一個酵素活性分析方法時，應當注意那些要點，以免低估酵素活性？ [3]
4. 酵素的催化條件受環境因子影響很大，而在試管中的反應與在細胞內的催化環境，一定有很大的差異，請儘你所知舉出兩者的差別，並說明其利弊。 [3]
5. 酵素催化反應時若能把生成物除去，有何好處？如何以物理或化學方法去除之？ [3]
6. 測定酵素活性為何要中止酵素反應？何種情況下可以不必中止反應？ [3]
7. NAD^+ 如何進行其輔酶的作用？請寫出其構造式。 [1]
8. NAD^+ 為何能在 340 nm 波長的吸光有變化？ [1]
9. NADH 與 NADPH 有何不同？能否互相通用？ [2]
10. 340 nm 應當使用 UV 或者可視光的光源？ [2]
11. 若生成物無法直接偵測，則要如何進行活性分析？ [2]
12. 分析酵素活性時，雖然耦合反應與主反應一起連續著進行，但在反應動力學及實驗操作上，或者反應過程中基質及生成物的濃度上，二者有相當的差別，請檢討兩種反應的異同點。 [4]
13. 在酵素活性分析時，佐以耦合反應，有何好處？但有什麼可能的缺點？ [3]
14. 請詳究澱粉磷酸解酶 (starch phosphorylase) 的催化反應，請列出所有可能的活性分析方法。 [2]
15. 何為還原糖？為何蔗糖不是還原糖，而葡萄糖及果糖則是？ [1]
16. 請寫出轉化酶 (invertase) 的催化反應，並舉出可能的生成物偵測方法。 [2]
17. 請幫轉化酶設計一個使用放射線的活性分析方法。 [5]
18. Phytochelatase synthase (PCS) 催化以下的反應，請幫忙設計活性分析方法： [3*]
$$\gamma\text{-Glu-Cys-Gly} + \gamma\text{-Glu-Cys-Gly} \rightarrow \gamma\text{-Glu-Cys-}\gamma\text{-Glu-Cys-Gly} + \text{Gly}$$
19. 有那些試劑或處理方式可以使蛋白質變性？其原理或機制各為何？ [1]
20. 為何改變 pH 可以使得蛋白質沉澱下來？其變性的機制為何？ [2]
21. 某化學小分子上有兩個官能基，其解離常數 pK_a 分別為 4.5 及 11，請問這個小分子的等電點大約多少？這個小分子能否作為緩衝液？可以作為多少 pH 的緩衝分子？ [2]

22. 請試著默寫 Henderson-Hasselbalch 平衡式，並以此平衡式解釋，為何弱酸或弱鹼具有緩衝環境 pH 的作用？ [3]
23. EDTA 與 EGTA 有何不同？其分子構造有何特殊之處？在使用上有何差異？ [1]
24. 使用放射性試劑時，何謂 pulse-chase？在實驗上有何用途？ [3]
25. 許多酵素在冰凍後受到傷害，活性因而下降，為此經常把酵素放在含有 50% 甘油的緩衝液中，凍藏在 -20°C 中就不會結冰，可以直接取出來使用，非常方便。某生以此方式保存酵素，但每次取出來做活性分析時，分別取出 10 到 100 μL 體積，想要做一條校正直線 (酵素體積 vs 活性)，但是無論嘗試幾次，這條直線的精準度都很差，檢測點大多無法落在直線上，請幫忙找出可能的原因，並且建議改善方法。 [4*]
26. 通常要進行活性分析的樣本都要稀釋，若某酵素的稀釋度為 1:10 時，測得 2 U/mL 的活性；當稀釋為 1:50 時，活性為 0.6 U/mL；稀釋 1:1000 時，活性為 0.05 U/mL。請問你應當如何判別所得數據？如何取捨？為何有這樣的情形？ [5*]
27. 酵素的活性單位有一個公認的定義，請寫出如何定義 1 unit 活性單位。另外，活性單位也容許各自定義，且有其正當理由，請說明為何。 [3]
28. 酵素試劑通常都很貴，某生要購買酵素 X 做為實驗的標準品，發現廠商有多種形式如下，請問你如何幫他訂購最合適的種類？刮號內為美元報價。 [4]
 Type X-1: 1,000 units/1 gm (USD 10.00), Type X-2: 100 units/1 mg (USD 100.00)
 Type X-3: 1,000 units/10 gm (USD 5.00), Type X-4: 50 units/0.1 mg (USD 500.00)
29. 請由下圖澱粉磷酸酶 L-SP 的酵素動力學實驗結果，推測兩種基質 (澱粉及 Glc-1-P) 與酵素之間的交互作用關係。 [5*]

(也請解答 Pur 0 酵素實驗室問題集：7~15 題)



[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]

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：

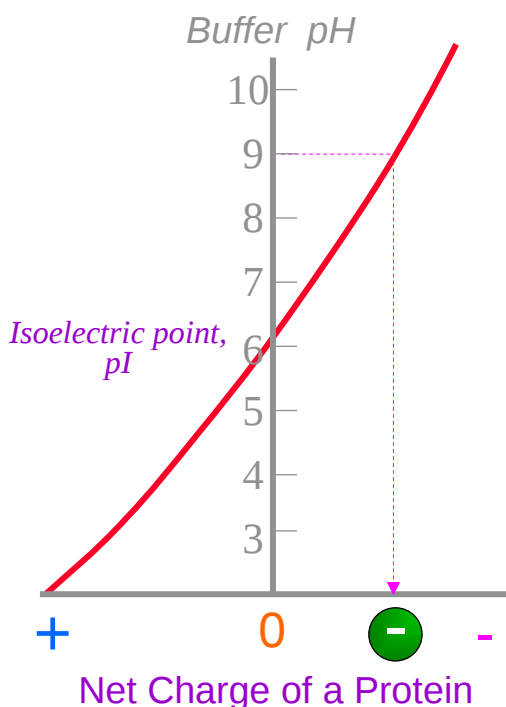
$$\text{泳動率} \sim \frac{(\text{所外加 電壓 mV}) \times (\text{分子之 淨電荷密度})}{\text{分子與介質間之 摩擦力}}$$

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：

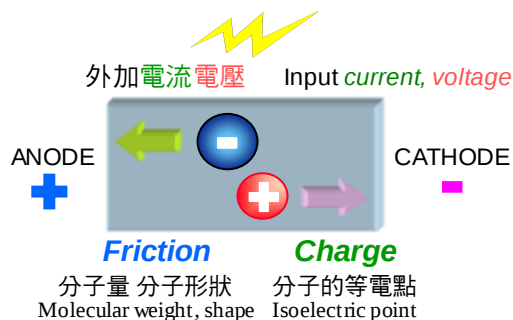
蛋白質分子所帶的淨電荷，取決於環境 pH 的高低。若環境 pH 高於其 pI，此蛋白質帶淨負電，反之帶正電；若剛好等於 pI，則淨電荷為零 (正電數目等於負電)。因此同一分子在不同 pH 環境下，可能帶有不同 淨電荷 (圖 7.1)。

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：

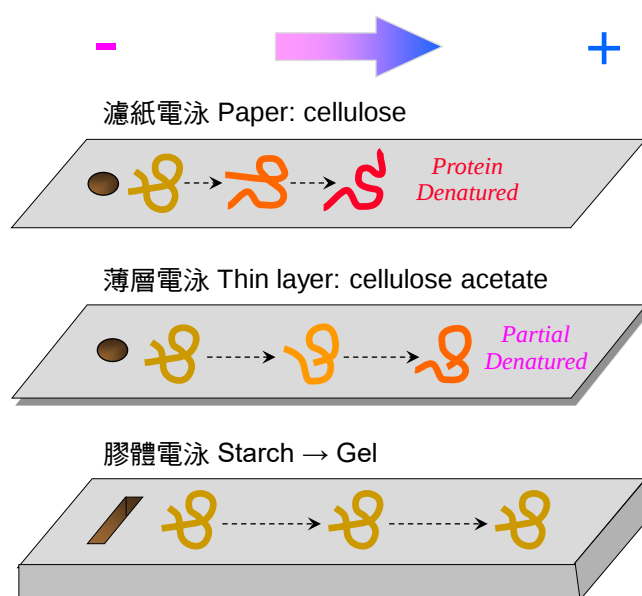
促進泳動：低膠體濃度 (孔徑大)、低濃度緩衝液、高電壓、高電流、高溫。

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：

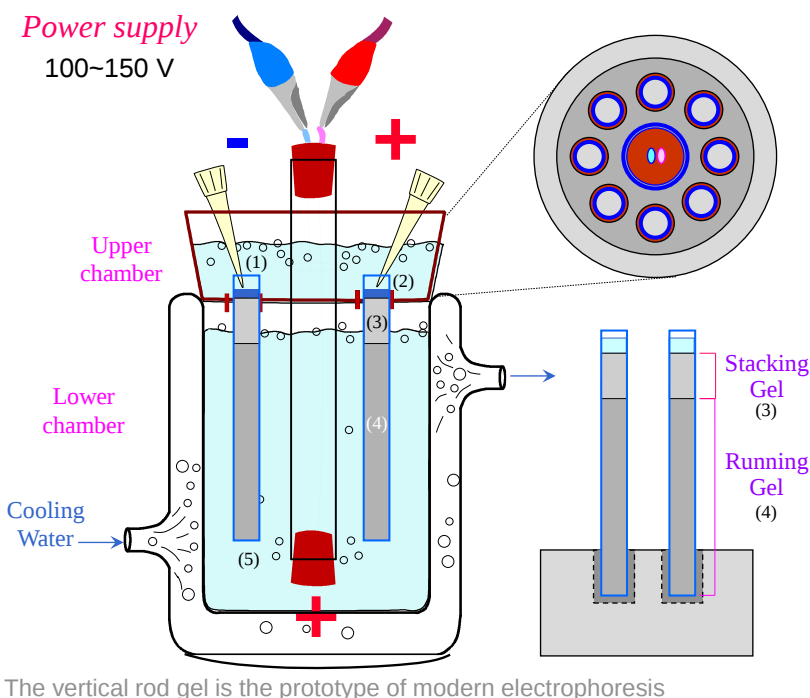
	電 泳 系 統		緩 衝 液	pH	膠體濃度
1	上層 (負極) 緩衝液		Tris-glycine	8.3	-
2	樣本溶液		Tris-glycine	8.3	-
3	膠	焦集膠體	Tris-HCl	6.9	5%
4	體	分離膠體	Tris-HCl	8.3	5~20%
5	下層 (正極) 緩衝液		Tris-glycine	8.3	-

- 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。

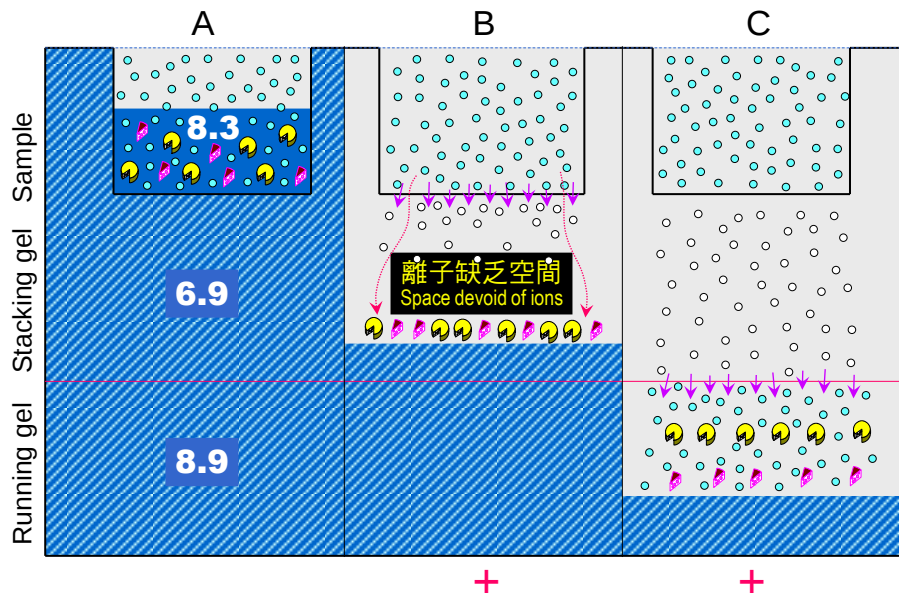
Glycine: Negative charged	●
No net charge	○
Chloride ion:	
Proteins:	Small molecule Large molecule

- 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：

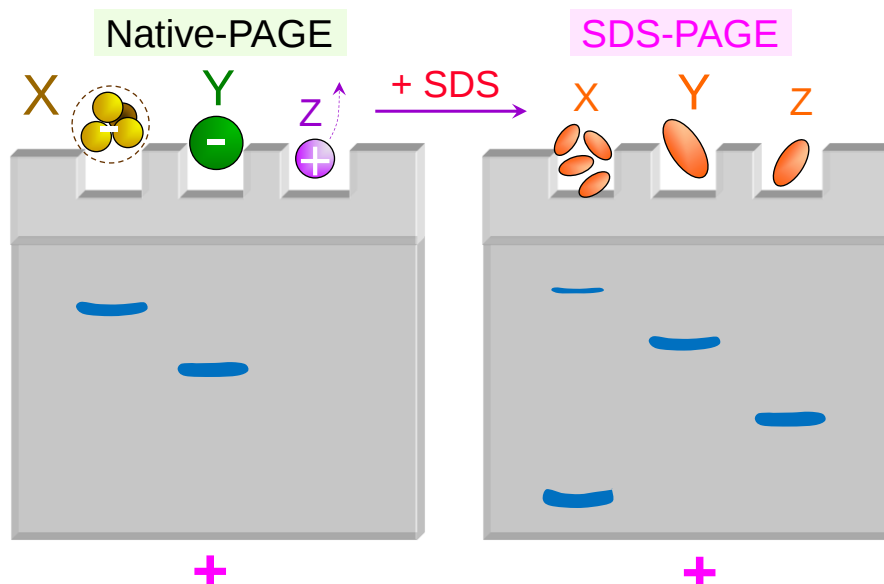
Protein	Quaternary Structure	Molecular Mass (D)	pI	Mobility	
				Native PAGE	SDS-PAGE
X	Tetramer	$(40,000) \times 4$	5.8	慢	快
Y	Monomer	88,000	5.2	快	慢
Z	Monomer	60,000	9.3	往上	中等

- 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，則可把膠片分劃，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。

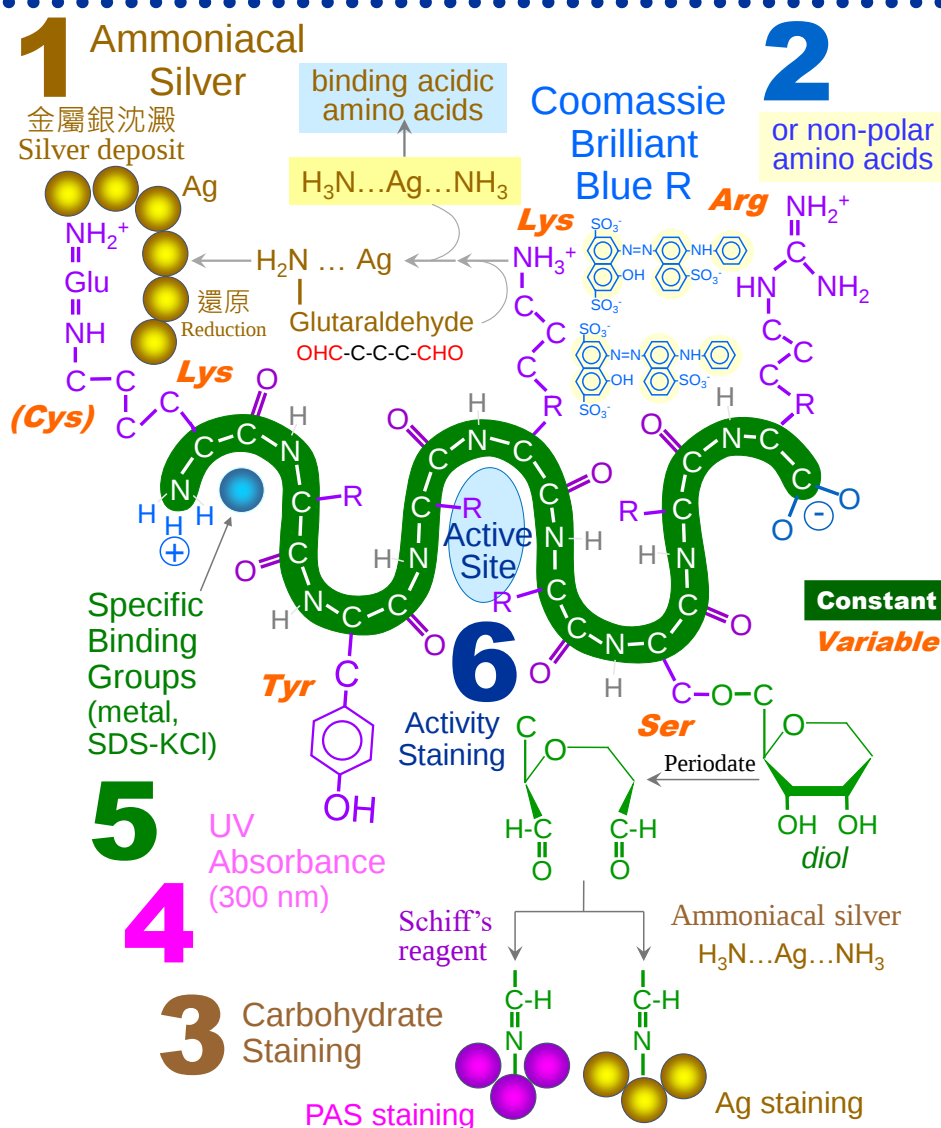
f. 放射顯像法 (autoradiography) :

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。

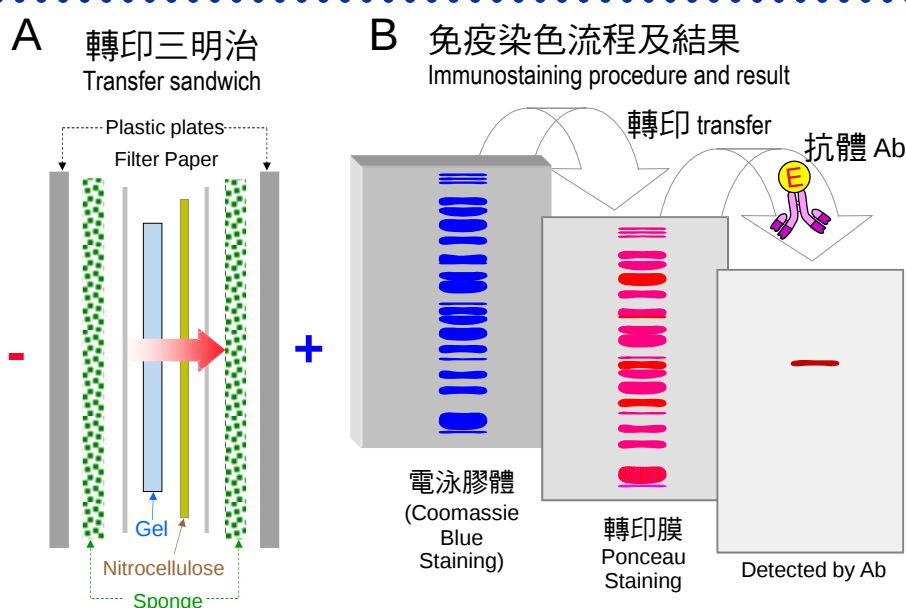
圖 7.6 各種蛋白質染色法機制 Staining methods



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，再以抗体做免疫染色。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

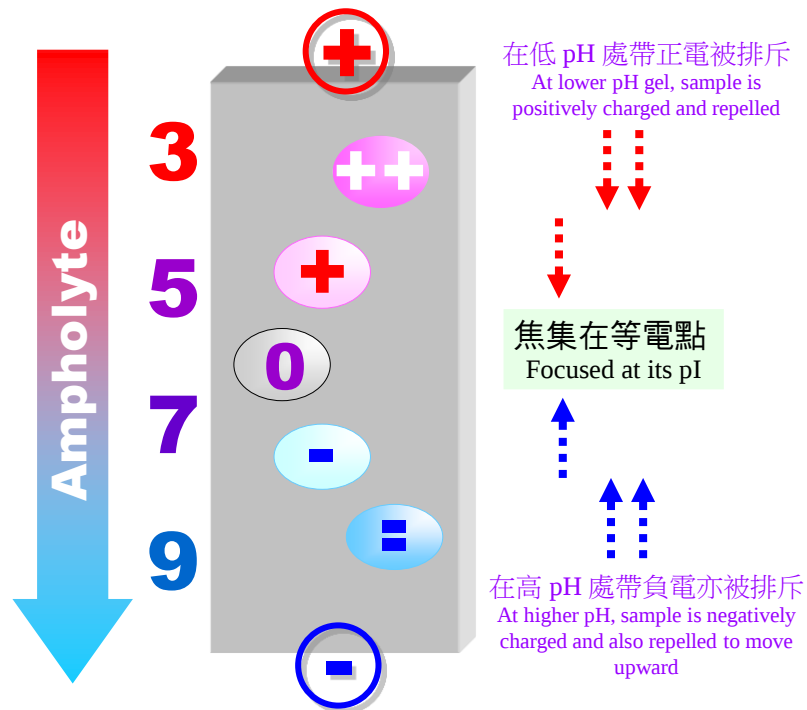
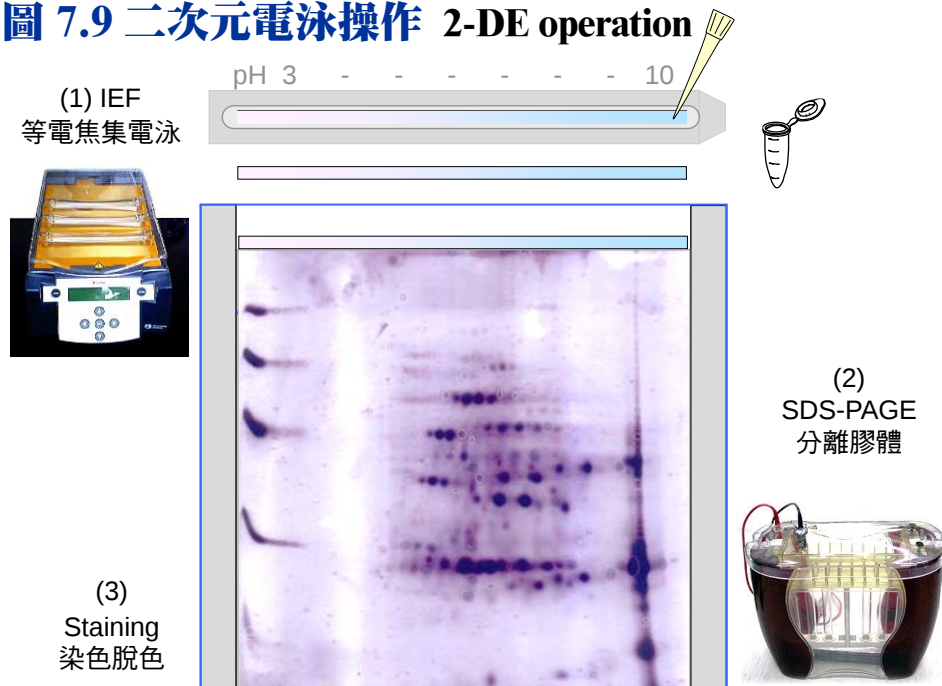


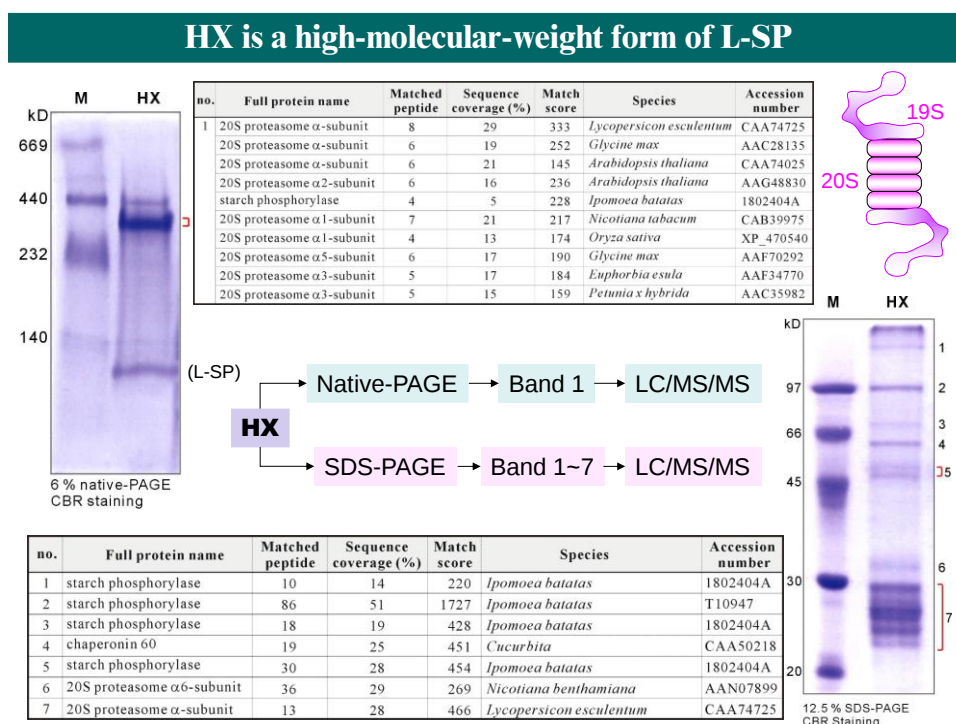
圖 7.9 二次元電泳操作 2-DE operation



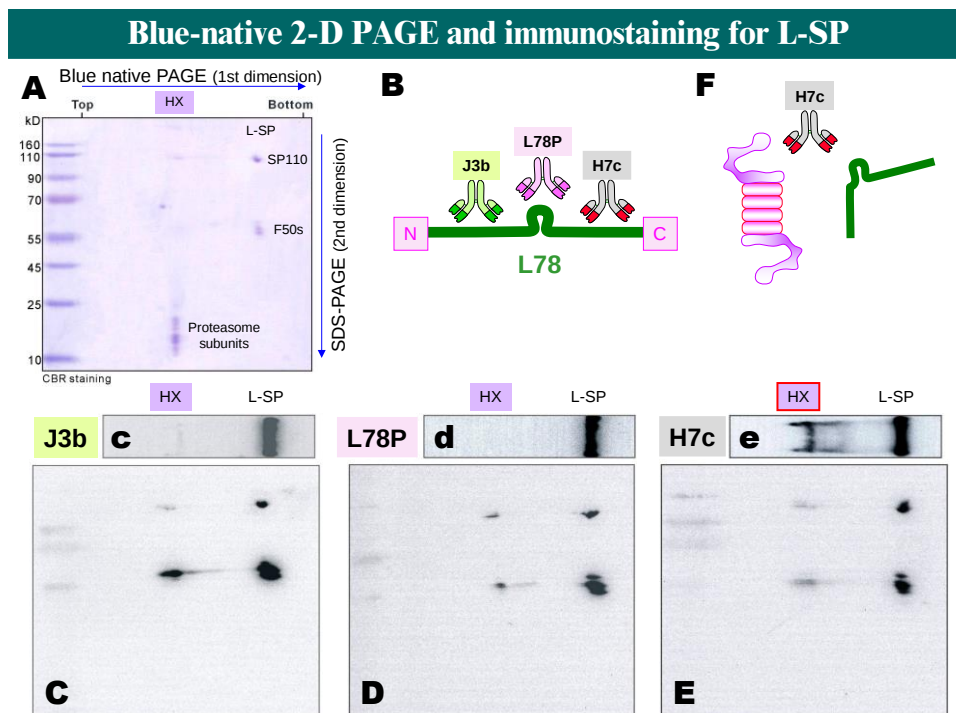
問題集 (每個問題不一定都有標準答案，甚至會引起很大的爭議，但這就是問題集之主要目的)

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 中有一層焦集膠體，它是如何把樣本蛋白質焦集成一細線的？ [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. 澱粉磷酸酶 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]

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

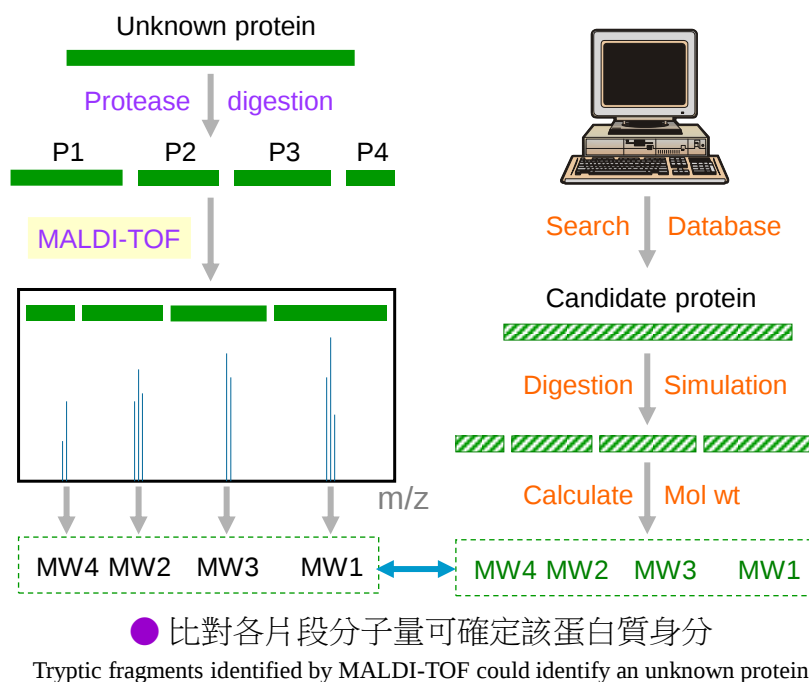
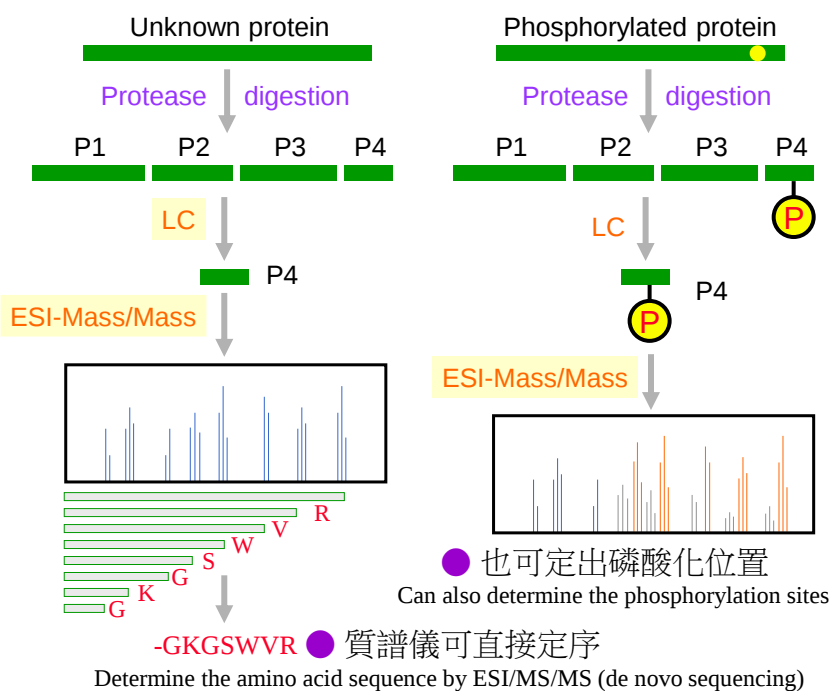


圖 8.2 以質譜儀進行蛋白質序列分析



8.2 蛋白質構造與組成：

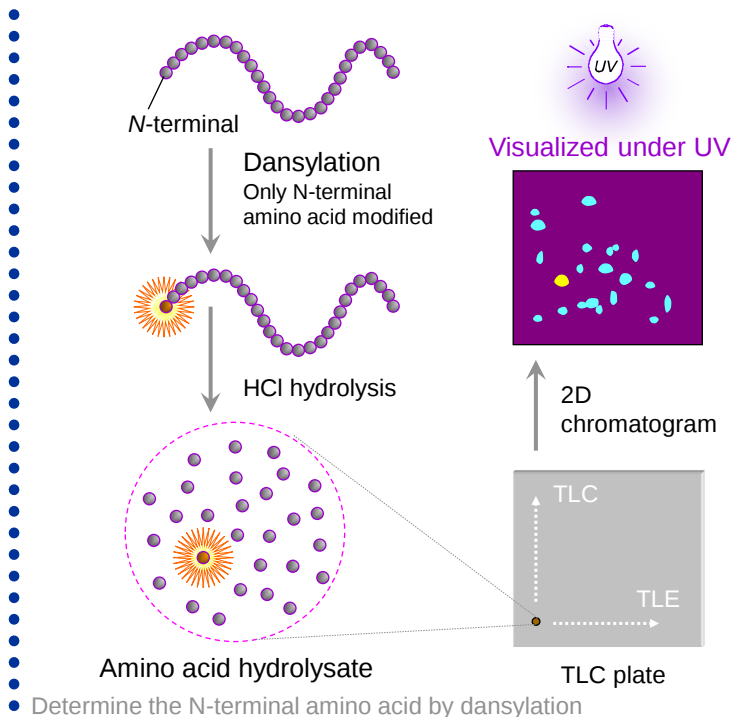
以下各種檢定方法，需要純度極高的蛋白質，最好先以一般的層析法純化後，再用製備式電泳得到均質蛋白質。其中很多反應會與胺基反應，因此樣本中不能有胺基的物質 (如 Tris 或任何胺基酸)，以免干擾反應。

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。

- 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



- 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。
- 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。
- 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。
- 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：

- 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。
- 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：

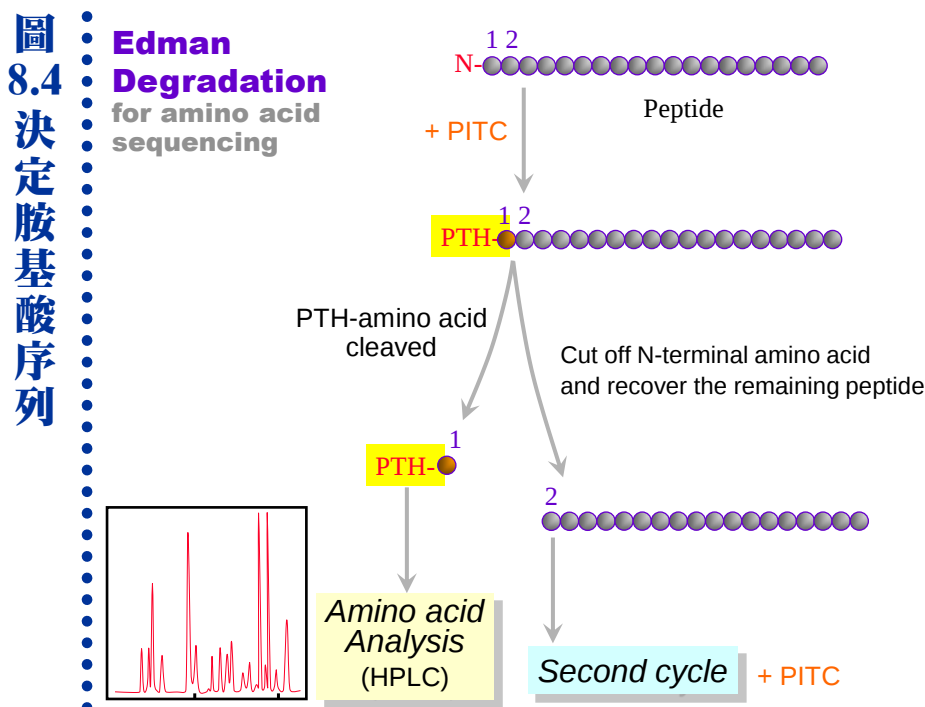
類似 dansylation 的 N-端標示反應，但是使用 PITC (phenylisothiocyanate) 在蛋白質的 N-端進行修飾反應，生成 PTH 衍生物，Edman 反應後的 N-端胺基酸可以被切下來，再以 HPLC 檢定為何種胺基酸。剩餘的蛋白質部份可以繼續第二輪 Edman 反應，通常手動可進行 10-30 個循環 (圖 8.4)，定出其胺基酸序列。

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：

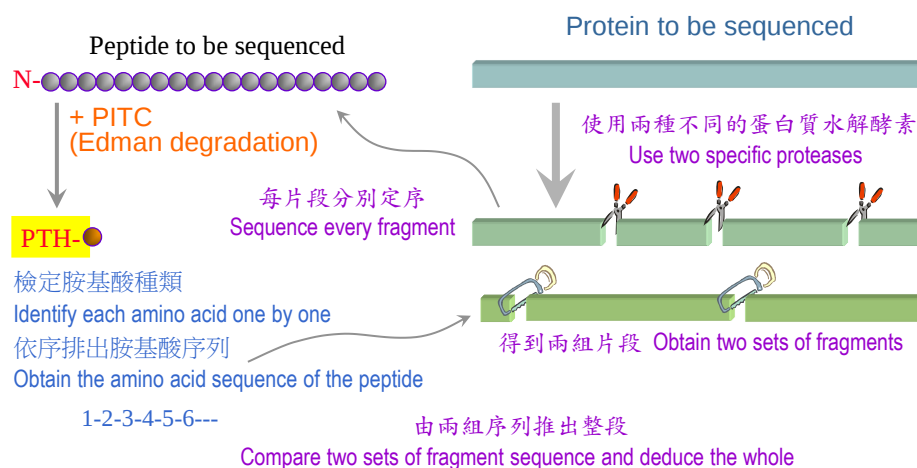
可對蛋白質的特定胺基酸進行水解，得到一群不同長短的胜肽片段。兩個不同蛋白質經同一種蛋白酶水解，所得的兩胜肽群，其肽鏈數目、各段胜肽的胺基酸組成與長短均不相同，可鑑定此二蛋白質的相似程度。反之，兩種不同專一性的蛋白酶會切在不同的胺基酸上，對同一蛋白質將得到不同的胜肽圖譜 (如圖 8.5)。

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：

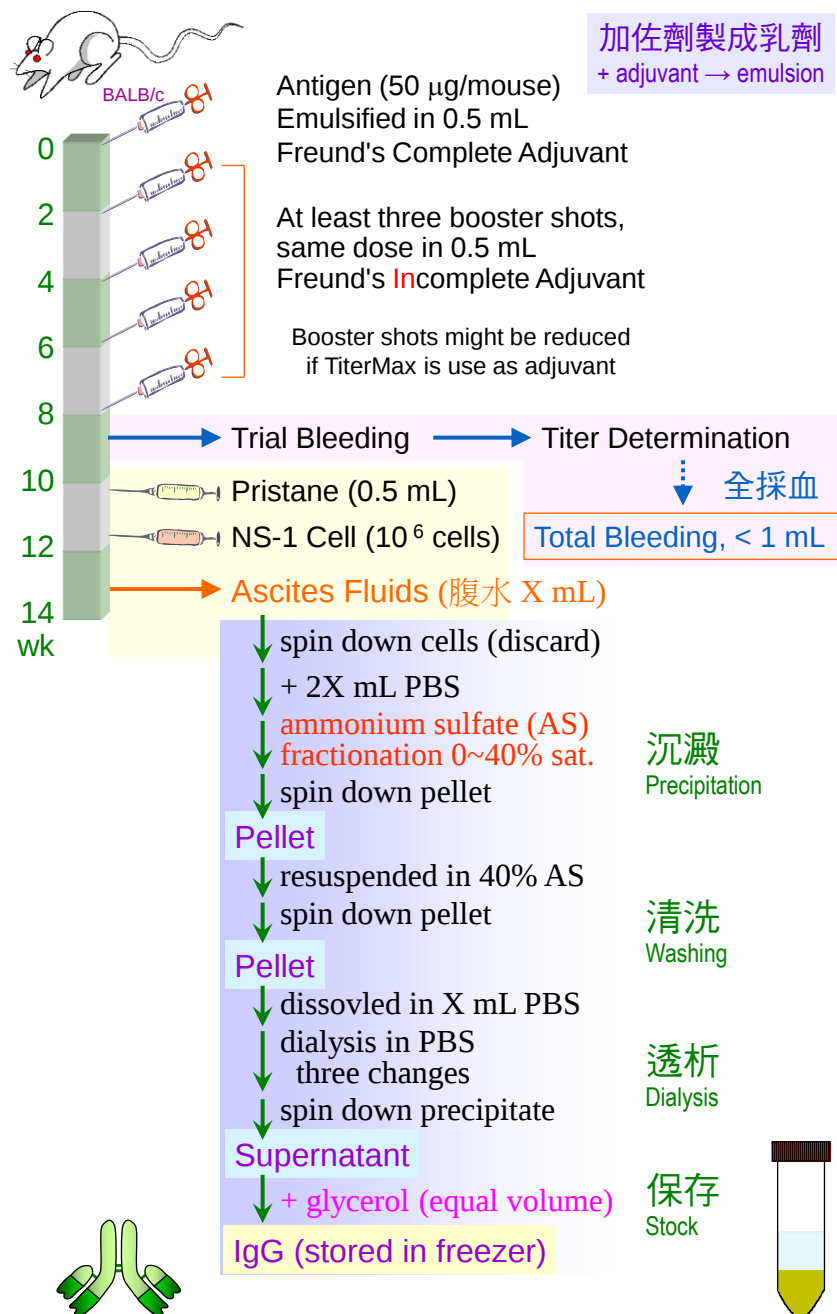
單株抗體針對單一抗原決定基有極高的專一性，是傳統抗血清所無法達致的特點，對蛋白質細微構造的分析很有用處。其製備過程相當複雜，操作順利的話，前後可能需時三個月以上，但若技術與設備均完善，要取得有用的單株抗體並非難事。

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：

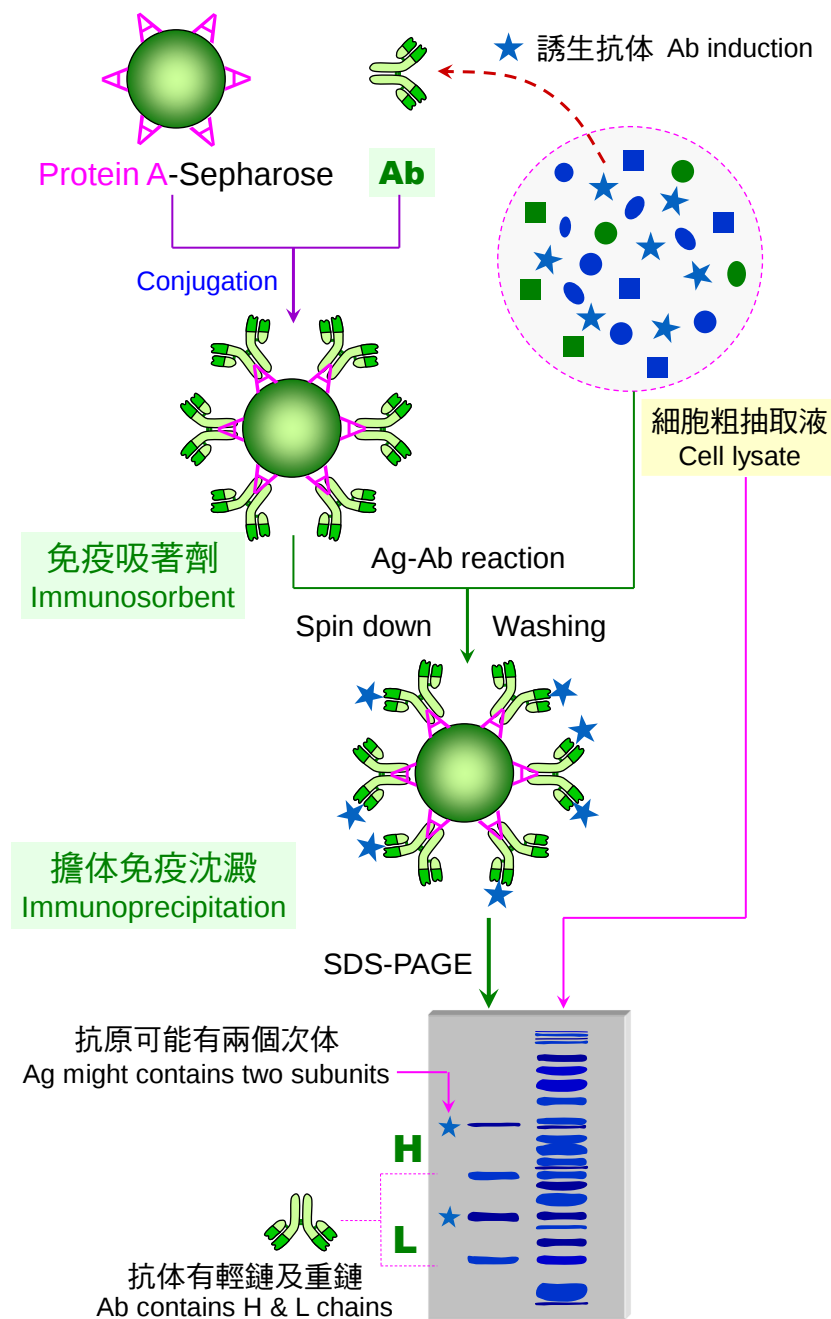
若把抗体分子接在一固相擔體上 (大多使用 CNBr-Sepharose)，則可用來做為專一性

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，而以一种快速達成的流程，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。

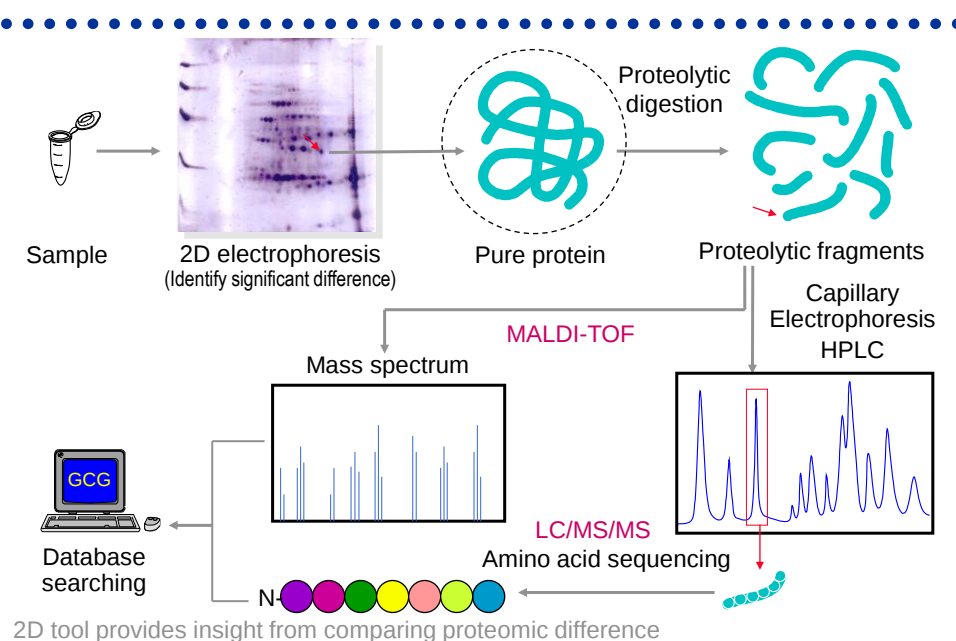
c. 膠體內水解：

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，所得到的肽段，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、醮化修飾等。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。

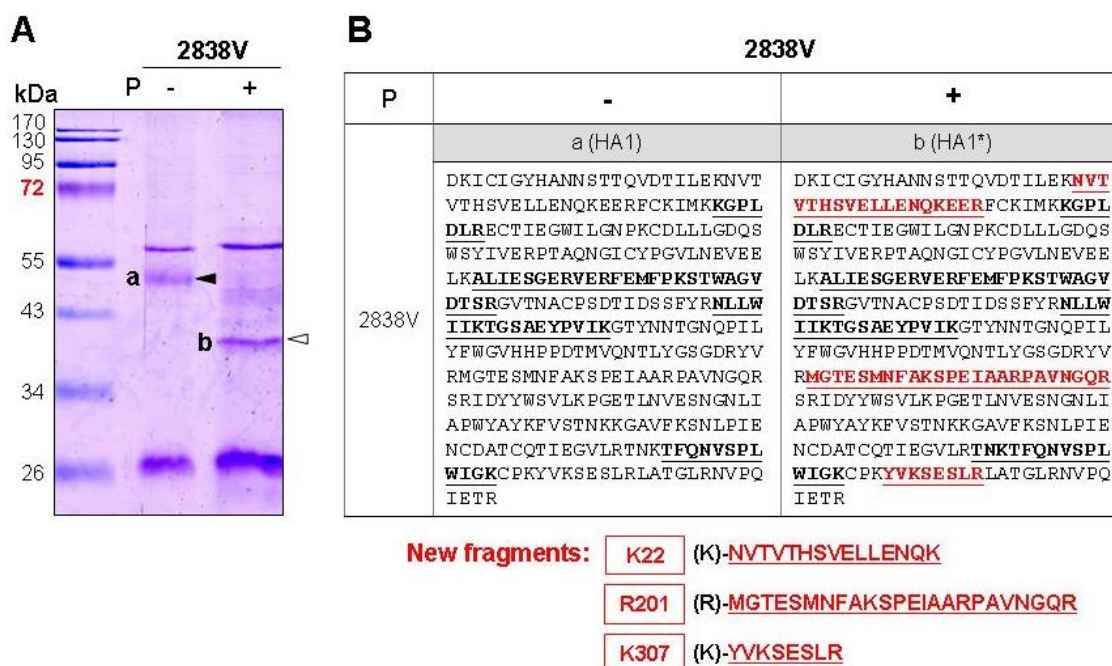
8.4.2.3 Proteomics 與代謝體：

- 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胜肽片段，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胜肽片段之後，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，但實際上胜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，請推測為何胜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]