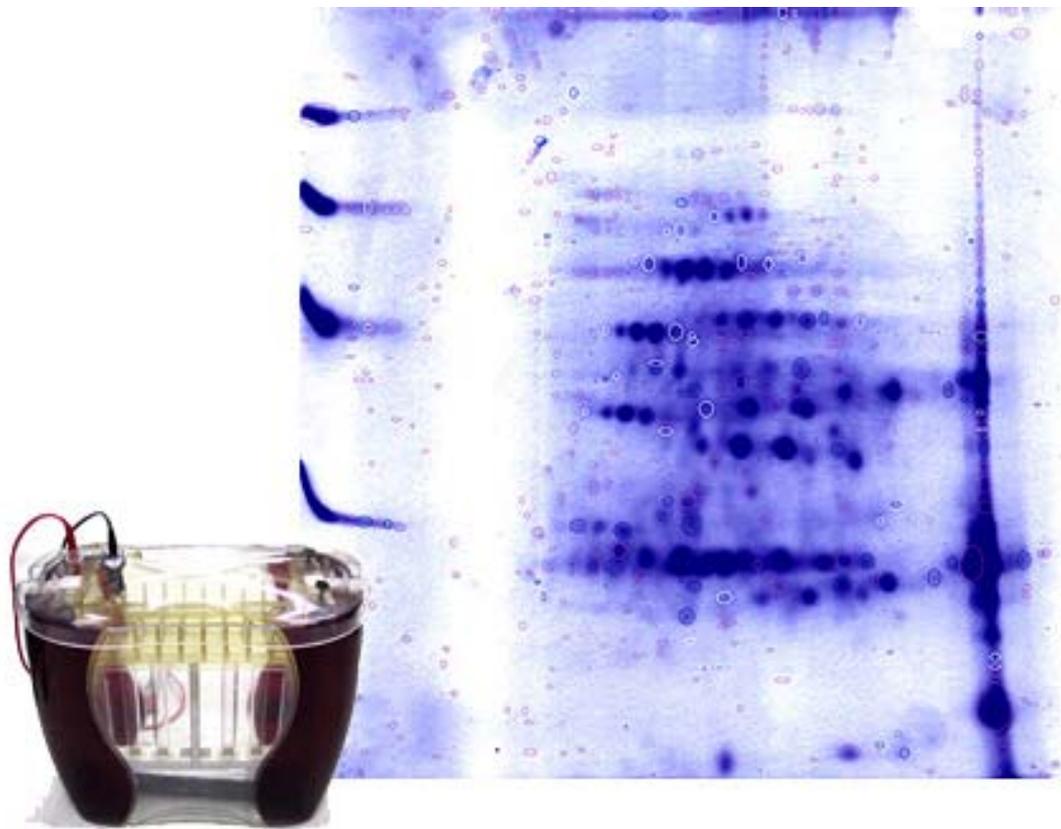


BST

蛋白質體學實驗

Tools for Proteomics 2010



2010/07/12~07/23

本講義內容版權歸各原作者所有，引用前請先洽詢許可。

課程網站：http://juang.bst.ntu.edu.tw/Protein/proteomics/2DE_protocol.htm

教師：莊榮輝^{1,2}、陳翰民³ (及其他產業界學者專家)

助教：林怡岑、賈儒珍、石琦瑞²

¹ 國立台灣大學 生命科學院 生化科技學系

² 國立台灣大學 生命科學院 微生物與生化研究所

³ 輔仁大學 生命科學系

講義目錄：

概要	1
詳細時刻表	2
流程圖	3
操作方法：	
P1 樣本製備方法	5
P2 二維電泳分析	8
P3 膠體內蛋白酶水解	10
P4 轉印及免疫染色法	12
P5 蛋白質 N-端序列決定法	15
P6 質譜儀蛋白質定序法	16
實驗背景知識： 2-DE 與樣本製備、蛋白質體學現況、資料分析	幻燈片

蛋白質體學實驗 Tools for Proteomics

負責教師：莊榮輝 (臺灣大學生技系)、陳翰民 (輔仁大學生科系)

開課地點：臺大生技系； 教室：AC2-214； 學分數：1； 人數限制：2×12

課程大綱：

許多生物的基因體已解碼完成，學界的焦點乃轉到蛋白質體分析，引為一項全面性的工具與全新的概念，驅動蛋白質化學的神速進步，而其中最關鍵的蛋白質體分析工具就是二次元電泳。本課程兼顧二次元電泳技術的實際操作與基礎理論，配合下游的分子檢定與資料分析；讓研究生確實動手操作，深植此一強大探索工具，以提升研究工作的精確度，期能促進整體生物科技之發展。

課程表

日期	時間	主 題	實驗操作	授課老師
7/12	13:30-18:30	二次元電泳：樣本製備	P1	莊榮輝
7/13	13:30-17:30	第一次元 IEF: IPGphor	P2	陳翰民
7/14	12:30 -18:00	第二次元 PAGE: SDS-PAGE	P2	莊榮輝
7/15	12:30 -18:30	膠片染色；蛋白質定序 X	P3, P6	外聘講員
7/16	13:30-17:00	報告與討論 (一)		莊榮輝
7/19	13:30-19:00	蛋白質序列決定 Y	P5	莊榮輝
7/20	13:30-18:30	電泳轉印與染色 Z	P4A	莊榮輝
7/21	12:30 -17:00	專一性抗體工具	P4B	陳翰民
7/22	13:30-17:30	資料分析與資料庫搜尋		外聘講員
7/23	13:30-17:00	報告與討論 (二)		莊榮輝

- (a) 上課地點在生技系生化實驗室，每天大約 13:30~18:00，兩週共超過 40 小時。
- (b) 每次實驗課均先講解並示範全部實驗流程，再讓學員動手操作。
- (c) 學員操作失敗者，必須重做到成功方可過關，每週五有口頭報告成果。
- (d) 學員編組方式：二人一組、四組一小班編助教一名、共三小班 24 名學員。
- (e) 學員資格：必須修過生物化學或分子生物學之相關實驗課程。
- (f) 整個課程分成三個主軸： Protocols X, Y, Z (請見 p.4 流程圖)

Protocol X: 2-DE → Coomassie Blue staining → Spot picking → LC-MS/MS

Protocol Y: 2-DE → Protein transfer → Spot picking → Edman sequencing

Protocol Z: 2-DE → Protein transfer → Immunostaining

第一週 詳細時刻表 [Week 1]

(○ = 實驗相關; X Y Z = 三大實驗主軸; ◆ = 講解; ◇ = 自由時間; 刪除線 = 時間重疊)

	時間		課程進度	說明
7/12	13:30~13:45	○	報到及分組	10 min
Mon	13:45~14:00	○	課程內容大綱及環境、儀器介紹	20 min
	14:00~14:30	◆	實驗講解 (X)	30 min
	14:30~16:30	X	樣品粗抽	2 h
	16:30~16:50	X	TCA/acetone 沉澱	20 min → 17:30
	16:50~17:30	◆	實驗講解 (X)	40 min
Late	17:30~18:30	X	樣品回收及回溶	1 h
7/13	13:30~14:00	○	迷你電泳分析粗抽液 (現成預鑄膠片)	30 min → 15:30
Tue	14:00~14:30	X	第一次元 IEF (X)	30 min → o/n
	14:30~15:30	X	鑄膠 SDS-PAGE (X)	1 h
	15:30~16:00	○	迷你電泳染色 (CBR 染色)、脫色	30 min → 17:30
	16:00~17:30	◇	專題演講 (陳翰民 Introduction to modern proteomics)	1.5 h
	17:30~18:00	○	迷你電泳乾片	30 min
7/14	12:30~13:00	X	SDS-PAGE 電泳分析 (X) 5 h	30 min → 17:30
Wed	13:30~14:00	Y	第一次元 IEF (Y)	30 min → o/n
	14:00~16:30	◆	實驗講解 (Y)	2.5 h
	16:30~17:30	X	膠片染色 (準備做 LC-MS/MS)	1 h
Late	17:00~18:00	Y	鑄膠 SDS-PAGE (Y)	1 h
7/15	12:30~13:00	Y	SDS-PAGE 電泳分析 (Y) 5 h	30 min → 17:30
Thu	13:30~15:00	◇	專題演講 (劉俊昇 生技產業與質譜應用的發展趨勢)	1.5 h
	15:00~16:30	◇	專題演講 (王淑芝 Introduction to mass spectrometry based proteomics)	1.5 h
	16:30~17:00	Y	膠片轉印 (Y)	30 min → 18:00
Late	18:00~18:30	Y	轉印膜染色脫色 (準備做 Edman 定序)	30 min
7/16	13:30~16:00	◆	各班報告及討論 (X 二次元電泳技術)	2.5 h
Fri	16:00~17:00	Y	蛋白質色點 N-端定序	1 h

請寫下注意事項：

- (1) 週三與週四請提早做實驗，週一、三、四會較晚結束。
- (2) 請當日整理好實驗報告，週五各組要報告成果 (One-Page Show)。

第二週 詳細時刻表 [Week 2]

(O = 實驗相關; X Y Z = 三大實驗主流; ◆ = 講解; ◇ = 自由時間; 刪除線 = 時間重疊)

	時間		課程進度	說明
7/19	13:30~14:00	X	LC-MS/MS 樣本處理 (1)	30 min → 17:00
Mon	14:00~15:00	Z	第一次元 IEF (Z: 7 cm strip)	30 min → o/n
	15:00~16:00	Z	鑄膠 SDS-PAGE (Z)	1 h
Late	17:00 ~ o/n	X	LC-MS/MS 樣本處理 (2)	3.5 h
7/20	13:30~14:30	Z	SDS-PAGE 電泳分析 (Z) 2 h	30 min → 16:30
Tue	14:30~16:00	X	LC-MS/MS 樣本處理 (3)	1.5 h
	16:00~16:30	O	鋅染色法 (VisPro 5 min Protein Stain)	30 min
	16:30~17:30	Z	膠片轉印 (Z)	30 min
	17:30~18:00	◆	實驗講解 (Z)	30 min
Late	18:00~18:30	Z	取出轉印膜	30 min
		X	LC-MS/MS 蛋白質樣本送出 (鎂陞)	
7/21	12:30~13:00	Z	免疫染色一次抗體及清洗	1 h + 30 min
Wed	14:00~15:30	◇	2-DE 與樣本處理 (陳翰民)	1.5 h
	15:30~16:00	Z	二次抗體及清洗	1 h + 30 min
	16:00~17:00	Z	HRP 呈色	1 h
		X	LC-MS/MS 蛋白質定序結果	無時間限制
		Y	AB 492 N-端定序結果	無時間限制
7/22	13:30~15:00	XY	資料分析 (待安排講者)	1.5 h
Thu	15:00~16:00	XY	資料庫搜尋	1 h
	16:00~17:30	◇	專題演講 (蔡沛倫 Mascot introduction and application for protein identification)	1.5 h
7/23	13:30~16:00	◆	報告及討論 (全程結果總整理)	2.5 h
Fri	16:00~17:00	O	收拾儀器用具等	1 h
			Farewell	

請寫下注意事項：

- (1) 週一、週二較晚結束，看時間容許參觀 TechComm 核心實驗室。
- (2) 請當日整理好實驗報告，週五各組要報告成果 (One-Page Show)。

[Flow-chart]

Tools for Proteomics

第一週

X

Mon

均質
沈澱
清洗
溶解

樣本製備

Tue

IPGPhor

第二次元鑄膠

第一次元
(1)

檢定粗抽樣本

迷你電泳

Y

Wed

第一次元
(2)

第二次元
(1)



Thu

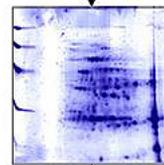
第二次元
(2)

轉印

膠片染色

Fri

蛋白質定序
Procise 492



報告及討論
(1)

第二週

Z

Mon

蛋白質定序
Procise 492

膠體內水解

第一次元
(3)

Tue

蛋白質定序
Procise 492

蛋白質定序
LC/MS/MS

第二次元
(3)

轉印

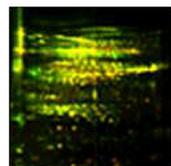
Wed

資料庫搜尋

資料庫搜尋

免疫染色

Thu



DIGE 螢光染色示範



Fri

報告及討論
(2)

P1 樣本製備方法

P1A 樣本蛋白質萃取法：

儀器用具：

- a) 竹筍樣本、燒杯 (500 mL)
- b) 果汁機、紗布
- c) 高速冷凍離心機、離心管
- d) 懸籃式離心機

試劑藥品：

Tris-HCl buffer (50 mM)：

Tris-HCl	(1 M)	25	mL
EDTA	(FW 292.2)	0.15	g
DTT 20 mM	(FW 154)	1.54	g
	[或 2-mercaptoethanol (0.07%)	0.35	mL]
Benzamidine	(FW 156.6)	78.3	mg
Leupeptin		0.5	mg
Pepstatin		0.5	mg

調 pH 到 8.0 後，加二次水到 500 mL，需新鮮配置。

TCA/acetone (10%)：

Acetone		450	mL
TCA	(100%)	50	mL
DTT	(20 mM)	1.54	g
	[或 2-mercaptoethanol (0.07%)	0.35	mL]

共 500 mL。DTT 於使用前再添加。

操作步驟：

- 1) 竹筍秤重，加入 1.5 倍 50 mM Tris-HCl 粗抽緩衝溶液 (含 1 mM EDTA, 1 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL pepstatin, 1 mM benzamidine, 20 mM DTT)，以果汁機打碎竹筍樣品，靜置 30 min 後，以四層紗布過濾，再以 8,000 rpm 離心 30 min，取上清液。
- 2) 上清以三倍體積冰冷 10% TCA/acetone 溶液 (含 0.07% 2-mercaptoethanol 或 20 mM DTT) 沈澱蛋白質，混合溶液置於 -20°C 靜置 45 min 至 1 h。
- 3) 待蛋白質沉澱後，以 3,000~3,500 rpm 離心 10 min (懸籃式離心機)，取沉澱的蛋白質，再以純 acetone 清洗沈澱三次以上，以去除過多的鹽類。

P1B 蛋白質樣本溶解方法：

儀器用具：

- 超音波震盪器
- 果汁機、37°C 保溫箱
- 微量高速離心機

試劑藥品：

Sample buffer (25 mL)：

Urea (6 M)	9	g
Thiourea (2 M)	3.8	g
Triton X-100 (0.5%)	0.125	mL

加水至 25 mL，每 mL 分裝一管，置 -20°C 存放。

使用前每管添加 10 mg DTT 及 5 μ L IPG buffer (0.5%, pH 3~11 或 4~7)。

操作步驟：

- 取 1 mg 樣本溶於 100 μ L sample buffer 中，超音波震盪 1 h，於 37°C 放置 3 h 以上，以增加溶解度。
- 若溶解不易，可以放置於冰箱過夜，再以 15,000 rpm 離心 15~20 min 後取上清液。

P1C 二次元電泳之蛋白質定量方法：

儀器用具：

- ELISA 微量滴定盤
- ELISA 光度計

試劑藥品：

Amersham Biosciences 2-D Quant Kit:

配製 Working color reagent (Reagent A : Reagent B = 100:1)，每樣本需 1 mL。

標準校正線：

以 BSA 為標準蛋白質，製作不同濃度的測試點，以畫出校正線。

[Table 1] Protein standards (BSA)

管數	1	2	3	4	5	6
BSA 標準溶液 (2 mg/mL)	0 μ L	5 μ L	10 μ L	15 μ L	20 μ L	25 μ L
蛋白質量 (μ g)	0 μ g	10 μ g	20 μ g	30 μ g	40 μ g	50 μ g

測定方法如同下述。

操作步驟：

- 1) 取樣本液 10 μL 於 Eppendorf 離心管中，加入 500 μL Precipitant solution，震盪一下，室溫下靜置 5 min。
- 2) 迅速加入 500 μL Coprecipitant solution，混合均勻，12,000 rpm 離心 5 min。
注意：離心時要將 Eppendorf 的 hinge 朝外。
- 3) 離心完之後，盡速吸出全部的上清液後丟棄（若有些許上清液殘留，則再重複離心的步驟，以完全去除上清液），保留完整沉澱。
- 4) 沉澱加入 100 μL Copper solution 後，震盪一下，再加入 400 μL 二次水，將沉澱完全溶解。
- 5) 快速加入 1 mL Working color reagent，混合均勻後，取 300 μL 注入 ELISA 微量滴定盤。
- 6) 室溫靜置 10 min，使用 490 nm 波長測吸光值。
- 7) 與蛋白質標準校正線比較，以內插法計算出樣本液的蛋白質含量。

P2 二維電泳分析

儀器用具：

- IPGphor, strip 及 holder (11 cm)
- SDS 電泳槽 (Pharmacia Ruby) 及供電器
- 微波爐

試劑藥品：

SDS 平衡 buffer：

Tris-HCl buffer (1.5 M, 最終使用濃度 50 mM)	10	mL
SDS (2%)	4	g
Glycerol (30%)	69	mL
Urea (6 M)	72	g
Bromophenol blue (0.01%)	200	μL

加水至 200 mL。

[Table 2] 2-DE SDS gel solutions

Solutions	5%	7.5%	10%	12.5%	15%
Monomer stock solution	16.7 mL	25 mL	33.3 mL	41.7 mL	50 mL
4X resolving gel buffer	25 mL				
10% SDS	1 mL				
ddH ₂ O	56.8 mL	48.5 mL	40.2 mL	31.8 mL	23.5 mL
APS 10%	500 μL				
TEMED	33 μL				
Total volume	100 mL				

Monomer stock solution (30%T, 2.6%C)：

Acrylamide (30%, FW 71.08)	60	g
<i>N,N</i> -Methylenebisacrylamide (0.8%, FW 154.17)	1.6	g

加水至 200 mL。

Resolving gel buffer (4X)：

Tris base (1.5 M, FW 121.1)	181.5	g
ddH ₂ O	750	mL

pH 調至 8.8 再加二次水至 1,000 mL。

Agarose：

Agarose	0.5	g
SDS running buffer	100	mL

將兩者混合後，在微波爐加熱溶解。

操作步驟：

第一次元

- 1) 取以 Sample buffer 溶解好的樣品 200 μL (11 cm strip holder 只能容納 200 μL)，先將樣品放入 holder 中，再輕輕放入 strip gel，確定 strip gel 下無任何氣泡，最後覆蓋上 0.8 mL cover oil，防止 strip 乾掉或 urea 結晶。
- 2) 使用 IPGphor system，先以 30 V 電壓將 strip rehydration 12 h，使 strip gel 膨潤，再進行設定的 program 如下：

[Table 3] Electrofocusing conditions

電 壓	時 間	Vh
30 V	12 h	360
500 V	1 h	500
1,000 V	1 h	1,000
8,000 V	2 h	16,000

- 3) 待 IEF 進行結束後，將 strip 以二次水清洗，以去除 cover oil，若無法立即進行 SDS 電泳分析，先將其放入 -80°C 保存。

第二次元

- 4) 若立即進行 SDS 分析，夾出 strip 放入 5 mL SDS 平衡緩衝液 (加入 50 mg DTT)，平衡約 12~15 min 後，再放入 5 mL SDS 平衡緩衝液 (加有 125 mg iodoacetamine) 平衡約 12~15 min，接著進行 SDS 電泳分析。
- 5) 將預先鑄好的 SDS 膠片從冰箱中取出，待其冷卻後再進行電泳檢測，先在膠體上層放入 SDS running buffer，使 strip 較好放入；strip 放入後檢查 strip 和 SDS 膠片中間是否有氣泡，若有氣泡必須趕走，最後吸出 running buffer 以 agarose 進行封膠並使 strip 固定。
- 6) 將 agarose 放入微波爐中溶解，吸取約 1 mL agarose 進行封膠，agarose 的溫度不可高於 60°C 。
- 7) 將上述處理好的膠體放入電泳槽，固定電壓 200 V 進行電泳約 4 h。

P3 膠體內蛋白酶水解

儀器用具：

- a) 膠片染缸及搖蕩器
- b) SpeedVac 真空離心濃縮機
- c) 37°C 保溫箱
- d) 超音波震盪器

試劑藥品：

蛋白質脫色液：(MALDI-TOF 或 LC-MS/MS)

NH ₄ HCO ₃ (0.2 N)	1.94 g
CH ₃ CN (50%)	50 g

加二次水至 100 mL。

酵素緩衝液：

NH ₄ HCO ₃ (0.2 N)	1.94 g
CaCl ₂ (0.5 mM)	5.5 mg

加二次水至 100 mL。

操作步驟：

還原：

- 1) SDS-PAGE 經 CBR 染色後，以二次水清洗二次，每次 2 h。
- 2) 將目標蛋白從膠片割下，放入離心管中，濃度需約 100 pmol。
- 3) 置於 100 μL 10 mM DDT/25 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5 緩衝溶液中，在 37°C 下反應 1 h，使雙硫鍵還原。
- 4) 10,000 rpm 離心 1 min 以去除 DTT。
- 5) 加入 100 μL 100 mM iodoacetamide (IAA)/25 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5 緩衝溶液，於室溫避光反應 1 h。
- 6) 10,000 rpm 離心 1 min 以去除 DTT。

脫色：

- 7) 加入脫色液 (25 mM NH₄HCO₃, 50% CH₃CN)，於 30°C 反應 15 min，重複兩次。
- 8) 以二次水清洗兩次，以去除 CBR，最後以 SpeedVac 抽乾。

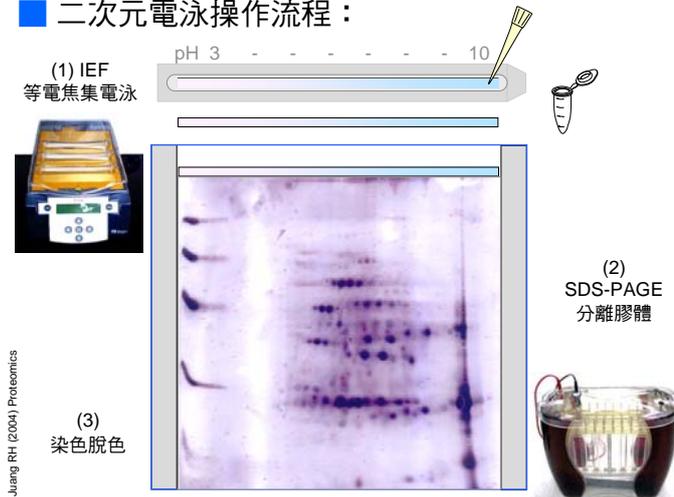
In gel digestion：

- 9) 加入含有 0.1 μg trypsin 之酵素緩衝液 10 μL (25 mM NH₄HCO₃, 0.5 mM CaCl₂)，水解反應 10 min。
- 10) 加入 100 μL 酵素緩衝液，於 37°C 下反應過夜。

萃取 peptides :

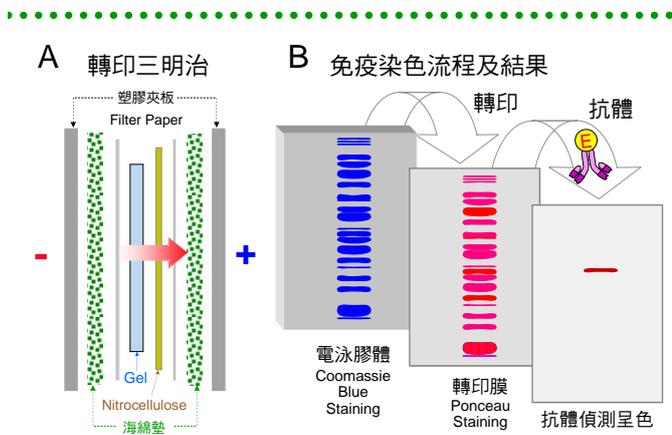
- 11) 收集萃取液於離心管，加入 200 μ L 萃取溶液 (0.1% TFA, 60% CH_3CN)。
- 12) 在 35~40°C 下超音波 30 min，收集萃取液於離心管中。
- 13) 用 SpeedVac 抽乾，最後以 20 μ L 甲酸回溶。

■ 二次元電泳操作流程 :



[Figure 1] 2-DE operation using IPGphor and Ruby

■ 轉印及免疫染色流程 :



[Figure 2] Protein transfer and immunostaining

P4 轉印及免疫染色法

P4A 蛋白質轉印法：

蛋白質電泳膠片經轉印於轉印膜表面後，可以進行免疫染色法、蛋白質 N-端序及酵素活性染色等。轉印膜 PVDF (polyvinylidene difluoride) 是一種疏水性材質，蛋白質可藉由本身的疏水性部分與其結合。

儀器用具：

電泳轉印槽 (Hoefer TE22)

轉印紙 (Millipore Immobilon, PVDF)、濾紙 (Whatman 3 mm)

電源供應器

藥品試劑：

轉印緩衝液 (blotting buffer) 1×：

CAPS	10 mM	(Sigma C-2632)	2.22 g
------	-------	----------------	--------

加水 600 mL 溶之，調整 pH 至 11 後，加甲醇 100 mL，再加水至 1,000 mL 攪拌均勻；最後含 10% 甲醇，可視需要調至 20% (若樣本分子量較小)。

(CAPS = 2-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid)

標準蛋白質組合：

預先染色之分子量標準 (GeneTeks PreBlue Orange Protein Ladder):

160, 110, 90, **70***, 55, 45, 35, 25, 15, 10 kD (* = 橘色)

操作步驟：

- 1) 將所要轉印之 SDS-PAGE 或 native-PAGE 膠片浸於轉印緩衝液 (1×) 中，平衡 20~30 min。通常 SDS-PAGE 中的蛋白質分子量較小，因此要加入 10% 的甲醇於轉印緩衝液中，以避免小分子蛋白質過度擴散或穿過轉印膜。
- 2) 轉印膜 PVDF 切割成比膠片稍大，因膠片平衡後體積會略漲。PVDF 為疏水性，必須先以 100% 甲醇短暫溼潤後，再浸入轉印緩衝液 (1×) 中備用。
- 3) 取兩張稍大的濾紙，於轉印緩衝液中浸潤備用。取出轉印卡夾，先墊一張多孔性海綿，鋪上一張濾紙，再小心鋪上膠片，勿陷入任何氣泡，鋪上轉印膜，再蓋上一層濾紙及海綿，再把整個膠片卡夾裝好。
- 4) 置入已裝有轉印緩衝液 (1×) 的轉印槽中，注意 PVDF 那面朝正極，膠片面朝負極。除去卡夾外面的氣泡，氣泡的存在將使轉印效率變差。
- 5) 以 400 mA 進行轉印，於 4°C 中轉印 60 min 後中止。取出轉印膜，浸在尿素洗液中洗 1 h 以上；尿素可洗去 SDS-PAGE 樣本蛋白質分子上的 SDS，同時可以將蛋白質分子部分恢復原態，以增加抗體確認機率。
- 6) 在電泳過程中若有 pre-stained 的標準蛋白質，可作為轉印效率的參考。

P4B 酵素免疫染色：

電泳後把蛋白質轉印至 PVDF 轉印膜上，利用專一性抗體對膜上的蛋白質抗原做專一性結合，再用二次抗體對上述抗體進行專一性的結合；因二次抗體上連結有呈色標誌酵素 (多為 horse radish peroxidase, HRP 或 alkaline phosphatase, AP)，可呈色而得以偵測。二次抗體上也可連結 biotin，再藉由 streptavidin 架橋與 biotinylated alkaline phosphatase 結合，一個 avidin 可與四個 biotin 結合；此種染色步驟稱為 ABC 系統，可達放射顯像的靈敏度，且專一性也可增強。

儀器用具：

平台震盪器

塑膠染色盤

UVP Autochemi system

藥品試劑：

明膠-NET：

Gelatin	0.25%	(Merck 4070)	2.5	g
NaCl	0.15 M	(Merck 6404)	8.75	g
EDTA·2Na	5 mM	(Merck 8418)	1.8	g
Tween 20	0.05%	(Merck 822184)	0.5	mL
Tris	50 mM	(Sigma T-1530)	6.05	g

加水 800 mL 並加熱至 gelatin 溶解，調 pH 至 8.0，再加水至 1,000 mL。

PBS (phosphate buffer saline) 5×：

NaCl	0.13 M×5	(Merck 6404)	38	g
NaH ₂ PO ₄	0.01 M×5	(Wako)	7.8	g

加水 800 mL 溶解，用 NaOH 調成 pH 7.0，加水至 1,000 mL，成為 5×PBS。

PBST (phosphate buffer saline & Tween)：

PBS 5×稀釋至 1×並加入 0.05% (v/v) Tween 20，即成為 PBST。

Urea-PBST：

Urea	6 M	(Sigma U-1250)	36	g
------	-----	----------------	----	---

加入 PBST 加熱溶解後，以 PBST 定量至 100 mL。

一次抗體：

通常要免疫大白兔或小白鼠自行製備一次抗體，一般抗體的使用濃度在 1:1,000 至 1:5,000 之間，視抗體效價而定，使用前以上述明膠-NET 稀釋之。注意每組所分到的一次抗體可能不同，請小心查詢是那一種抗體。

二次抗體連結體：

通常都可以購得上述一次抗體的二次抗體，並且連結有標誌酵素或者標誌物 (如螢光物或者 biotin)；使用濃度依照廠商建議，稀釋在明膠-NET 中。

- ◆ 注意二次抗體的種類很多，差別在其純度有高低，以及所對抗的一次抗體種類不同 (如抗 IgG, IgM, IgA 或全部)，或抗體的部位 (如抗整個抗體分子，或者只有 Fc 或 Fab 片段)，同時連結物的種類也很多；請小心檢查，以免購買不適用的二次抗體。

A + B 試劑：

A Reagent, streptavidin	(Vectastain)	10	μL
B Reagent, biotinylated alkaline phosphatase	(Vectastain)	10	μL

加入 15 mL NET 稀釋 1,500 倍，混合均勻後，室溫下先放置 30 min 後使用。

HRP 呈色劑 DAB：

Diaminobenzidine (DAB)	(Sigma D-5637)	5	mg
H ₂ O ₂	30% (Merck 7210)	10	μL

用 100 mL PBS 溶解，必須新鮮製備，不可放過夜；DAB 是致癌物質。

操作步驟：

- 1) 尿素洗過的轉印紙再以 PBST 洗三次，每次 10 min。
- 2) 加入一次抗體 (適當濃度溶於明膠-NET 中)，室溫下反應 1 h。
 - ◆ 一般抗體的使用濃度是在 1:1,000 至 1:5,000 之間，視抗體效價而定。
- 3) 以 PBST 洗 3 次，每次 10 min。
- 4) 加入二次抗體 (biotinylated 2nd Ab)，室溫下反應 1 h。二次抗體同樣也溶在明膠-NET 中，使用濃度請參考廠商說明書指定濃度。
- 5) 以 PBST 洗 3 次，每次 10 min。
- 6) 加入預先混合 30 min 之 A + B 試劑，反應 1 h。
- 7) 再以 PBS 洗過 2 次後，倒入 HRP 呈色劑 DAB，褐色色帶開始出現。
- 8) 呈色約在 10 min 內完成，應當在背景開始加深前中止呈色。
- 9) 倒去呈色液，並以蒸餾水清洗數次，取出晾乾後避光保存。
- 10) 免疫染色結果的好壞，取決於每次清洗步驟是否完全且徹底；過於隨便的清洗步驟會造成染色結果不良。

若以化學冷光呈色，則在步驟 6) 以後改用以下試劑及呈色方法：

冷光反應劑：

A Reagent, Stable peroxide solution	(Pierce)	1	mL
B Reagent, Luminol/Enhance solution	(Pierce)	1	mL

- 6) 吸取冷光反應劑 A、B 各 1 mL 混和均勻後，加入轉印紙上，置於冷光螢光攝像及顯像系統 (UVP AutoChemi system) 中，於 1~3 min 後可以得到免疫染色結果。
- 7) 免疫染色結果的好壞，取決於每次清洗步驟是否完全且徹底；過於隨便的清洗步驟會造成染色結果不良。

P5 蛋白質 N-端序列決定法

蛋白質 N-端定序的檢定採用 Edman degradation 方法，利用蛋白質自動定序儀進行胺基酸的序列分析；整個實驗系統避免使用具有胺基的物質。

儀器用具：

轉印用具及試劑如 P4，但轉印緩衝液須避免使用含有胺基的 Tris 及 glycine。

藥品試劑：

轉印緩衝液 (blotting buffer) 1×：

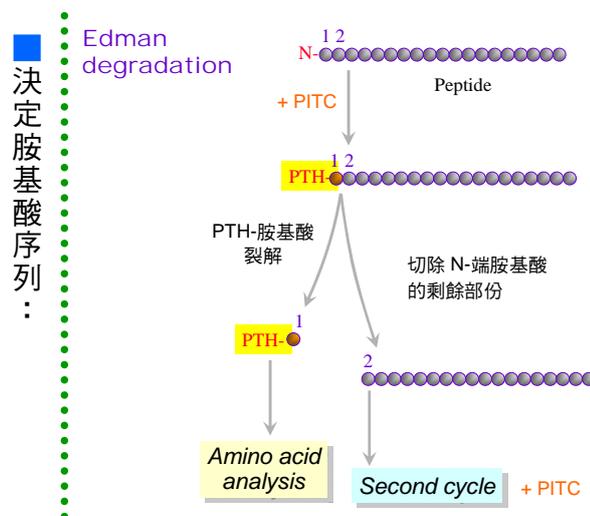
CAPS	10 mM	(Sigma C-2632)	2.22 g
------	-------	----------------	--------

加水 600 mL 溶之，調整 pH 至 11 後，加甲醇 100 mL，再加水至 1,000 mL 攪拌均勻；最後含 10% 甲醇，可視需要調至 20%。

(CAPS = 2-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid)

操作步驟：

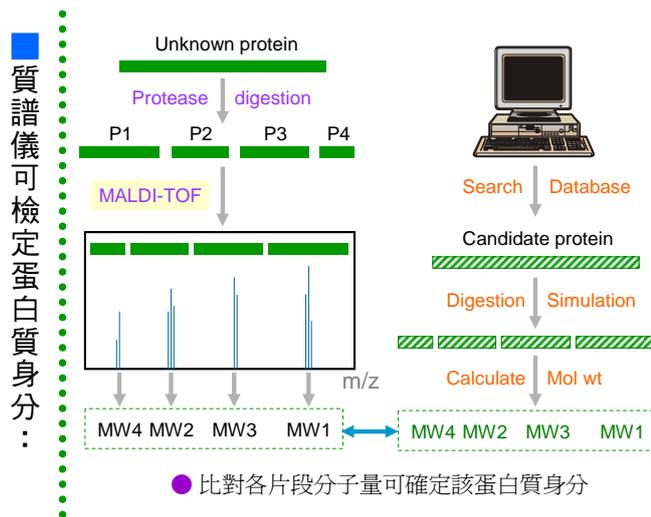
- 1) 轉印的方法與步驟如上所述，單一色帶的蛋白質含量最好有 0.1 mg 以上。
- 2) 取出轉印膜，以五分之一濃度的 Coomassie Brilliant Blue R-250 染液短暫染 1 min，或等到色帶剛出現之時，即以 50% 甲醇脫去背景顏色；若蛋白質濃度低，脫色時間需較久；若背景顏色太深，可用 100% 甲醇脫色。染色脫色後，將轉印膜放入二次水中清洗，再放入烘箱中乾燥。
- 3) 將轉印膜上的目標蛋白質色帶切下，以封口袋保存，送往儀器中心定序，目前所使用的儀器為 Applied Biosystems 的 Model 492。
- 4) 也可以把切下的轉印膜放入水解管中，加入 0.6 mL 水解液 (HCl : TFA = 4 : 1)，抽真空封口後在 140°C 水解 3 h，水解液可進行胺基酸成分分析。



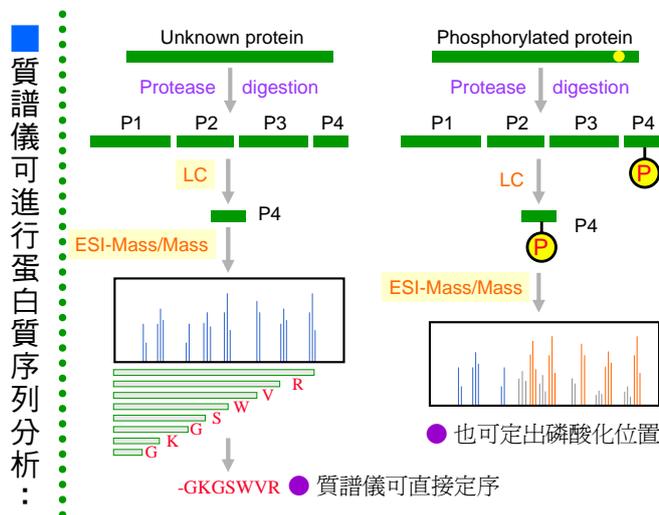
[Figure 3] Edman degradation for protein sequencing

P6 質譜儀蛋白質定序法

由二次元電泳所分離得到的未知蛋白質色點，可以直接挖出來，送到各校貴重儀器中心，或商業界服務中心，以 LC-MS/MS 質譜儀直接進行蛋白質序列的分析。若該蛋白質先經酵素水解成大小片段，則可以 MALDI-TOF 質譜儀測量各片段分子量，然後與基因體資料庫比對，可得知此未知蛋白質色點的身分。



[Figure 4] MALDI-TOF for unknown protein identification



[Figure 5] LC-MS/MS for protein sequencing and phosphorylation site determination