

P1 蛋白質分離與定量

莊榮輝

雞蛋的卵白中，含有胰蛋白酶 (trypsin) 的專一性抑制劑 – 雞卵粘多醣蛋白 (chicken ovomucoid protein, CHOM)。本實驗以丙酮沈澱 CHOM，離心取得蛋白質並乾燥後，以 Bradford method 測定其蛋白質含量。所得的 CHOM 將用在下一個實驗 P2，作為親和層析法的專一性配體，以便鈎取胰蛋白酶；並且將在膠體電泳實驗 P3 檢查其純度。鴨蛋蛋白中也有類似的黏多糖蛋白 DKOM，除了可以結合 trypsin 之外，也可與 chymotrypsin 結合，其抽取純化方法與 CHOM 相同。

1.1 背景知識

本實驗將展示：(1) 蛋白質的丙酮沈澱法、(2) 高速離心法、(3) 蛋白質脫鹽，以及 (4) Bradford 蛋白質定量法；在以上各步驟操作同時，也要學習 (5) 微量吸管的校正與其正確操作方法，以便奠定生化實驗精確定量的基石。

1.1.1 蛋白質沈澱法

在各種分離方法當中，沈澱法最常用在前面的幾個步驟，尤其有許多方便的沈澱方法，可以有效地把蛋白質自粗抽取液中分離出來。

- a) **硫酸銨沈澱法**：每個蛋白質的分子表面上，都分布有若干比例的非極性區域，會凝集許多水分子以便溶入水溶液中；若在此水溶液加入大量硫酸銨，則因為硫酸銨的高度水合能力，搶走聚集在蛋白質表面的水分子，使得蛋白質表面的非極性區域暴露出來，相互以疏水性引力結合，並成為聚合體而沈澱下來。
- b) **等電點沈澱法**：若把蛋白質溶液的 pH 調到其等電點，則此蛋白質所帶的淨電荷為零，分子間的排斥力因而下降，得以互相吸引成聚合體而沈澱。
- c) **有機溶劑沈澱法**：當蛋白質水溶液加入大量有機溶劑，水分子濃度被稀釋，蛋白質的溶解度便迅速下降，因而得以沈澱下來。但因為有機溶劑與水混合後會產生熱，容易造成蛋白質的變性，因此要在極低溫下操作。常用的有機溶劑有丙酮或甲醇，在沈澱後也常用乙醚來帶走丙酮，以加速乾燥。

- d) 另外，三氯醋酸 (trichloroacetic acid, TCA) 是很強的蛋白質變性劑，許多蛋白質遇到 TCA 都會變性沈澱，無法再恢復原態。因此，TCA 對皮膚有很強的腐蝕性，不小心接觸後要馬上沖水。通常 TCA 並不被用在純化蛋白質的步驟中，而是用來沈澱或移除大部分蛋白質。

1.1.2 高速離心法

離心是分離固態與液態最方便的方法，因此蛋白質以上述方法沈澱下來後，接著便可用高速離心法，把形成固態或半固態的蛋白質分離出來。這樣的離心都要在低溫下進行，以免離心時產生高溫，也可保持蛋白質免於變性。在生化實驗室中，高速離心機是較危險的儀器，一定要注意離心管是否正確平衡，離心轉速是否設定正確。第一次操作任何離心機時，一定要有熟練的人員在旁監督，以免發生危險。

1.1.3 蛋白質脫鹽

脫鹽是一種重要的生化操作，可以把小分子與巨分子分離開來，是生化實驗常用的步驟，通常脫鹽效果的好壞，對下一步實驗有決定性的影響。有下面幾種方法可以應用：

- 透析袋：** 是最常用的方法，透析袋有各種大小不同的網目，可以分開分子量不同的大小分子。常見的透明年糕紙，也有近似透析袋的作用；而香腸的腸衣也正是一種透析膜，可以透出水分及小分子。
- 膠體過濾法：** 可以依照分子量大小不同來進行分離，利用膠體小球內的孔道，使小分子進入而被延滯在膠球內，大分子則得以迅速流出，因而去除了鹽類，達成脫鹽的效果。
- 超微薄膜過濾：** 超微薄膜是一層具有極小孔徑的薄膜，可以區別分子的大小，小分子如鹽類可以通過微膜，大分子則被留住，因而去除鹽類；通常使用超微薄膜過濾都需加壓，以增加小分子通過的速率。

1.1.4 蛋白質定量

蛋白質定量是最基本的生化操作，方法也很多，但其原理都還是根基於蛋白質分子的基本構造。早先使用 Biuret method，是根據蛋白質骨架與銅離子結合，利用所產生的還原力呈色；而 Lowry method 是以 Biuret method 為基礎，再加上蛋白質中 Tyr 側基的呈色，使得分析更為靈敏。最近則使用染料 Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG) 的蛋白質結合試劑；當蛋白質與 CBG 結合之後，CBG 由茶色變成藍色，呈色濃淡與蛋白質量成正比，稱為 Bradford method。蛋白質的定量方法實在是太基本了，因此會重複出現在很多相關課程中。

1.1.5 使用微量吸管

微量吸管 (micropipet) 可說是生化實驗工作者最重要的貼身小型武器，良好的操作習慣必須確實養成。微量吸管絕不可掉到地面，也要經常校正 (見下段)，注意吸管與樣本頭 (tip) 之間的密合情形，以及兩段式擠壓樣本的操作方式。每個人對微量吸管的操作能力，由其所做出的蛋白質定量標準線可大略評估，操作不良者大多無法得到完美直線。

簡便校正法：

找到一台可靠的電子天平，在秤量區放一個小型塑膠秤量盤後歸零，以微量吸管吸取其最大取樣容量之純水 (如 1 mL 或 200 μ L)，小心注入秤量盤後讀取秤量值，其重量顯示應為 1.00 g 或 200 mg，誤差在 1% 以上者須送修，也有可能你的操作方法有問題。

1.1.6 實驗大綱

P1 蛋白質抽取與定量

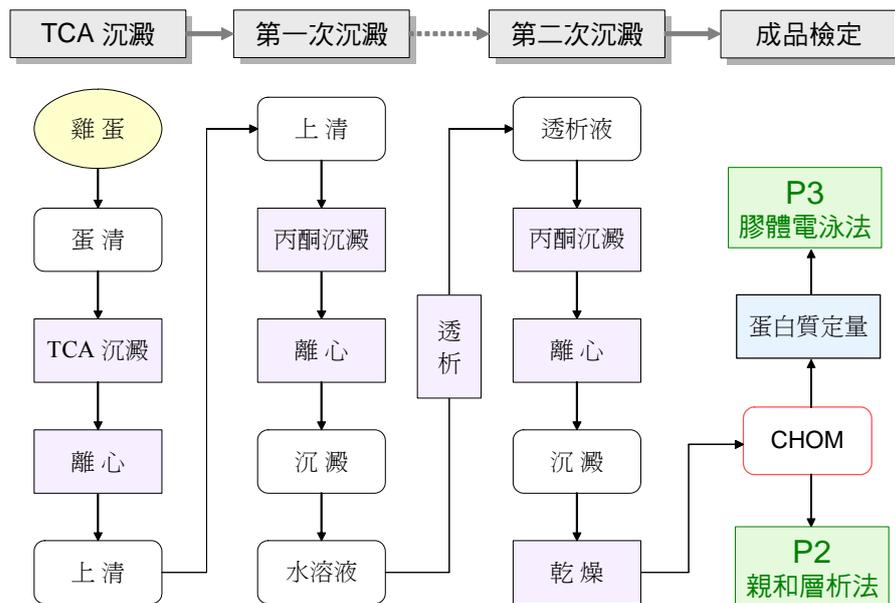


圖 P1-1 由卵白抽取 CHOM 或 DKOM 流程

第一週由卵白中抽出粗蛋白，並以丙酮沈澱，取沈澱以水溶解後，在透析袋中透析至第二週，取出溶液再次以丙酮沈澱，收集沈澱乾燥後即得成品。

1.2 以丙酮沈澱法分離 CHOM

本實驗之操作分成兩大部分：(1) CHOM 沈澱分離及 (2) Bradford 蛋白質定量法；分在兩週內操作。每次操作前，請檢查所有試劑及儀器，確實瞭解其使用原理及操作方式。雖然本文的抽取對象是 CHOM，但可完全應用在 DKOM 的純化。

1.2.1 儀器設備

- a) 燒杯 (500 mL) 若干個。
- b) 電磁攪拌器及攪拌子。
- c) 冰桶 (及碎冰)。
- d) 離心管、離心轉陀及雙皿天平。
- e) 高速冷凍離心機。
- f) 透析用大燒杯 (2 L)。
- g) 透析袋及透析夾。
- h) 其他儀器：微量天平、酸鹼度試紙。

1.2.2 藥品試劑

- a) 卵白：雞蛋 2 個可收約 50 mL 卵白。
- b) TCA-丙酮 (0.5 M TCA : 丙酮 = 1 : 2, v/v)：可把卵白中的雜質以沈澱移除。
- c) 丙酮：高濃度的冰凍丙酮可以把 CHOM 蛋白質沈澱下來。

1.2.3 操作步驟

卵白以 TCA 沈澱：

- 1) 準備雞蛋 2 個，取出卵白 50 mL，置入一個 500 mL 燒杯中。
- 2) 加入 50 mL TCA-丙酮，邊加邊攪拌，漸漸成為白色泡狀，攪拌 1 min。
 - ◆ 注意 TCA 對皮膚有腐蝕性。
- 3) 離心 10 min (6,000 g) 後取上清，加入 2 倍體積的冰凍丙酮，生成沈澱；在 4°C 下靜置 10 min。
 - ◆ 離心的時候，請排隊聽從助教的指揮，以便順利上離心機。
- 4) 儘量倒去上清，沈澱再次離心 10 min (6,000 g)，挖出沈澱溶於純水 (10 mL)，pH 大約為 4.5，然後在 4°C 下對 1 L 純水透析。
- 5) 每天換一次 4°C 純水，至少換兩次。第一週實驗先做到這一步。

以丙酮沈澱出 CHOM：

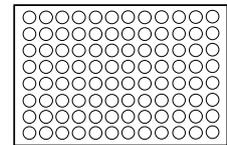
- 6) 透析後若產生沈澱，要離心 10 min (6,000 g) 去除之。
- 7) 加入 4 倍體積的冰凍丙酮，應該會產生大量沈澱，可放在 -20°C 冰箱靜置。
- 8) 高速離心 10 min (10,000 rpm) 後倒去上清，白色沈澱的表面小心以丙酮洗過數次 (可以再用少量乙醚洗過)，置排煙櫃中使沈澱稍微乾燥。
- 9) 加入 5 mL 蒸餾水輕輕震盪溶解，以一個新的 15 mL 試管裝起，標明 CHOM 及組別、日期，交給助教冷藏保管，後面的實驗要用到，首先要以 Bradford method 測量其蛋白質濃度。

1.3 以 Bradford 法定量蛋白質

Bradford dye-binding method 是利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG) 可與蛋白質結合而變色的特性來定量 (Bradford, 1976)；若試樣中的蛋白質量較多，則結合到蛋白質而變色的 CBG 也多，因而呈色較深。下例是以一組標準蛋白質為對象，製作一條蛋白質量與吸光度的標準校正線。

1.3.1 儀器用具

- a) ELISA 光度計 (Dynatech) 可在 30 s 內測完一片滴定盤。
- b) 微量滴定盤 (96-well microtiter plate) 及微量試管。



1.3.2 藥品試劑

- a) 磷酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 10 mL。
- b) BSA 標準品 (Bio-Rad, bovine serum albumin, 100 µg/mL) 2 mL。
- c) CHOM 樣本溶液：由 1.2 純化所得的 CHOM 水溶液 (未知濃度)。
- d) Dye Reagent (Bio-Rad 500-0006) 先以水稀釋四倍後備用，每組 5 mL。
 - ◆ 以染料 Coomassie Brilliant Blue G-250 配製的定量專用溶液，勿與膠體電泳染色用的 CBR-250 混淆，兩者各有其使用上的限制，不要混用。

1.3.3 樣本溶液及標準品

樣本溶液：

表 1-1 以上述 CHOM 樣本溶液 (c) 準備兩種濃度：

Label	樣本溶液 (c)	Buffer P	Final Conc.	
X1	250 µL	0 µL	? µg/mL	混合均勻
X2	125 µL	125 µL	? µg/mL	混合均勻

標準品系列：

表 1-2 使用小試管準備一組 BSA (b) 標準品的系列稀釋：

Label	BSA (b)	Buffer P	Final Conc.	
#5	250 μ L	0 μ L	100 μ g/mL	混合均勻
#4	200 μ L	50 μ L	80 μ g/mL	混合均勻
#3	150 μ L	100 μ L	60 μ g/mL	混合均勻
#2	100 μ L	150 μ L	40 μ g/mL	混合均勻
#1	50 μ L	200 μ L	20 μ g/mL	混合均勻
#0	0 μ L	250 μ L	0 μ g/mL	混合均勻

◆ 配製一定要精準，否則校正直線不會準確；各種試劑的添加，若自稀往濃取樣，則可以不用換吸管頭。請盡量節省吸管頭、微量離心管等塑膠用具。

一般樣本：

- a) 通常由 PBS 所溶解的樣本，都可直接進行蛋白質定量分析；但若其中含有某干擾因子 (如 Triton)，或樣本濃度太濃，都必須將樣本稀釋後再測。
- b) 同一樣本若使用不同的稀釋濃度，則所測出來的最終蛋白質濃度可能會有差異，通常是以稀釋度大者較為準確。

1.3.4 方法步驟

- 1) 每槽先加好 50 μ L 標準品 (#0, #1 #5) 或未知樣本 (X1, X2)，以二重複加入 96 孔滴定盤中，如圖 P1-2 所示。

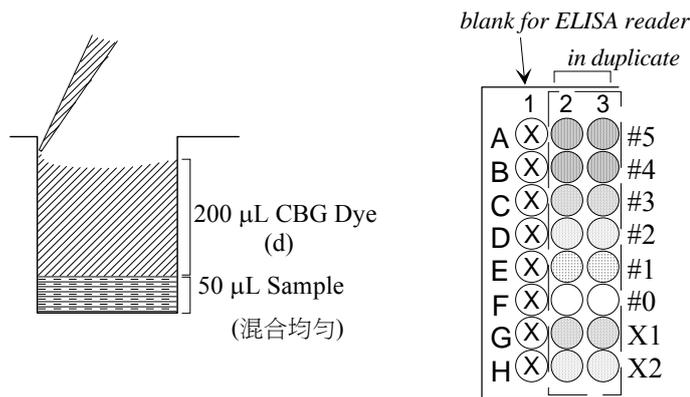


圖 P1-2 微量滴定盤的配置與使用方法

- 2) 每槽再加入 200 μ L Dye-Reagent (d)，在全部樣本槽加完前，不要中斷添加；同時小心避免氣泡產生。

◆ 本步驟是實驗成敗的關鍵！加完後必須混合均勻，否則定量不會準確。

- 3) 輕拍滴定盤一側，使添加的各成份均勻混合，注意 Dye-Reagent 密度較大，很

容易沉積在下方而分層。若還有小氣泡，小心以大頭針刺破。

4) 靜置室溫 10 min 後，以 ELISA reader 測量 570 nm (或 595 nm) 的吸光值。

1.4 結果與報告

1.4.1 蛋白質分離

- 以條列方式，把你的分離過程及步驟，照實況寫下，勿直接抄襲 1.2.3 節。
- 請說明在你操作過程中，可能的任何問題，以及所觀察的特殊現象。

1.4.2 蛋白質定量

- 在作圖紙上畫出標準品的校正線，並決定樣本溶液的濃度 (如圖 P1-3)。
- 請說明本分析方法的原理，並特別以蛋白質構造來說明。
- 一般緩衝液或試劑中，何種添加物會影響 Bradford 法的呈色？
- 請列出本分析方法的各操作步驟中，哪些會影響分析的準確度？
- 還有哪些蛋白質的定量方法？並請比較其優劣點。

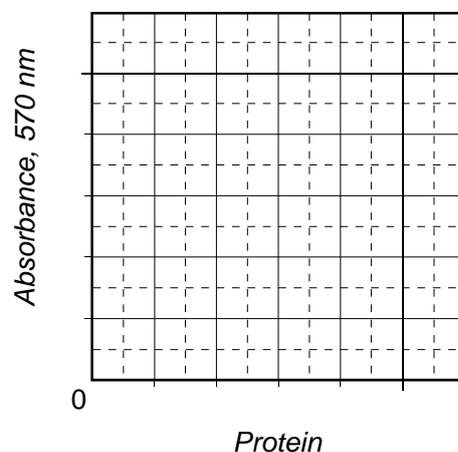


圖 P1-3 繪製標準品校正線

1.5 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 116, 140, 193

蘇仲卿 張珍田 莊榮輝 (1981) 利用親和層析法分離豬胰臟蛋白質水解酵素 trypsin 和 chymotrypsin 之中間規模試驗。中國農業化學會誌。19: 218-226

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.89

P2 親和層析法

莊榮輝

親和層析法有點像在釣魚。釣竿是蟹殼幾丁質，釣餌是上次純化的 CHOM，用來釣胰臟抽取液中的胰蛋白酶 trypsin；這是因為 CHOM 對 trypsin 有專一性吸引力。蛋白質間的專一性吸引力，已成為最近生物化學探討的重要主題。

若 A 與 B 兩分子之間，有專一性的親和力，而我們手中已有 A；若欲由樣本混合物中，將所含的 B 分子分離出來，則最方便的方法，是先把 A 固定在一固定相 (solid phase) 上，當樣本混合物通過此固定相時，其中的 B 分子即被 A 吸附到固定相。俟洗去混合物中其它雜質後，破壞 A-B 之間的吸引力，溶離下 B，即可得到純質 B。親和層析法是很有效的純化方法，但並非任何物質均可應用此法，因為不一定能找到對它有親和力的分子。因此，進行親和層析法之第一條件為，尋找分子之間具有親和力的配對：



而其解離常數， $K_d = \frac{[A][B]}{[AB]} \sim 10^{-4}$ 至 10^{-8} ；親和力大小須適中。 [式 2]

可以用圖 P2-1 說明親和層析法的進行步驟：

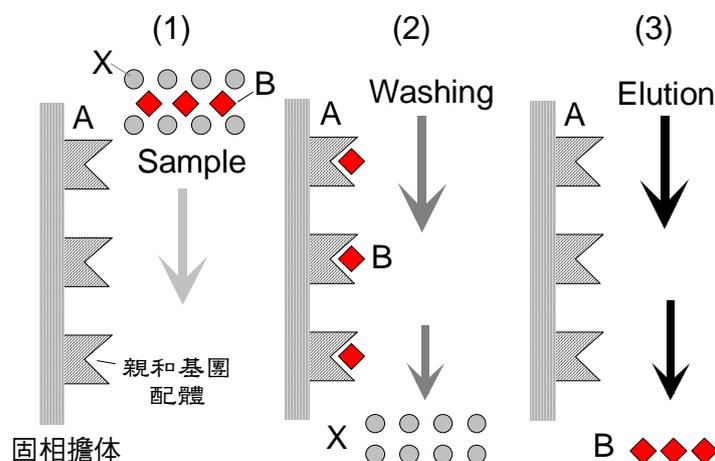


圖 P2-1 親和層析法的作用機理

- 1) 分子 A 已經被結合到固相擔體上 (斜線部份)，樣本準備通過之，其中含有所要分離的 B 分子 (◆) 以及雜質 (●)。
- 2) 當樣本通過此親和吸著劑時，只有 B 被吸著住，其餘雜質將直接流出。
- 3) 破壞 AB 分子之間的親和力，即可收穫得純質 B。

2.1 親和層析法的各項要素

要成功建立一個良好的親和層析法，必須考慮幾個重要因素，以圖 P2-2 說明之：

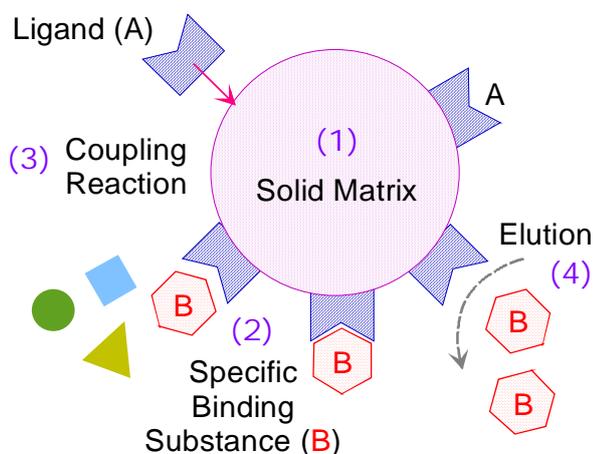


圖 P2-2 親和層析法的各項要素

2.1.1 良好的固相擔體 (solid support)

固相擔體的材質要有良好多孔性，通透性佳，構成的分子骨架本身穩定，無太大的非專一性吸附；最重要的是要具有相當活性的官能基 (functional group)，以便與其它分子鍵結。通常用作擔體的材質有：洋菜醣 (agarose)、聚丙烯醯胺 (polyacrylamide)、幾丁質 (chitin)、聚苯乙烯 (polystyrene)。

2.1.2 Ligand 及其專一性結合分子

配體 (ligand, 即鍵結在固相擔體上分子之統稱) 與其目標分子之間，要有相當強的親和力 (如上述)；例如 抗原-抗体、酵素-基質、荷爾蒙-受体 (receptor)、酵素-抑制因子 (如 trypsin 與 CHOM)。一般把較容易得到的分子做為餌，結合到固相擔體上，成為親和吸著劑 (affinity adsorbent)。

2.1.3 Ligand 與固相擔體間之的耦合反應

Ligand 與固相擔體之間，須有官能基可供鍵結反應：



常用的耦合反應如下列幾種：

- a) 以 carbodiimide 進行脫水反應，連結胺基與酸基。
- b) 以 CNBr 活化 agarose 醣分子上的醇基，可接上蛋白質的胺基。
- c) 固相接有 *N*-hydroxysuccinimide (可看作活化的酸基)，可與胺基反應。
- d) 以 glutaraldehyde (分子上有雙醛基) 為中間架橋物，可連接兩個胺基。

2.1.4 可溶離下所要分離之目標分子

可改變溶離的 pH、離子強度或其它方法；注意某些方法可能會使 ligand 或所欲純化之分子，受到不同程度的破壞。因此，所選用的親和性配對，兩者間的親和力也不能太大，否則很難把結合上去的蛋白質溶離下來。

2.1.5 實驗大綱

P2 親和層析法

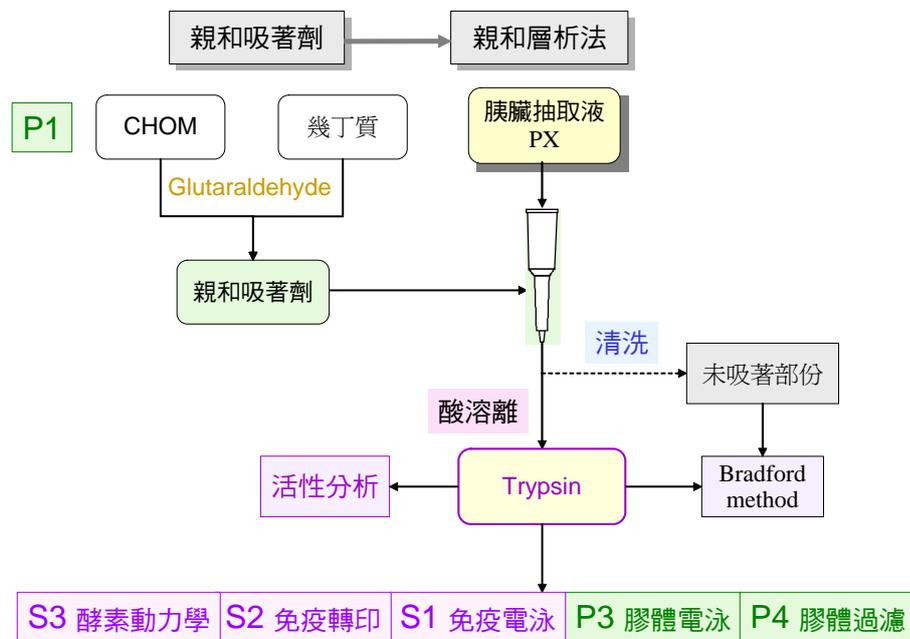


圖 P2-3 製備親和吸著劑與親和層析法流程

先做好親和吸著劑，裝入管柱後通入胰臟抽取液，再以酸溶離出所要的酵素。如此所到的酵素純度很高，將應用在後面的許多實驗，是個非常關鍵的步驟。

2.2 實驗操作

本實驗先製備幾丁質親和吸著劑，然後再加入胰臟抽取液，進行親和層析法。所有操作前，請檢查所有試劑及儀器，並確實瞭解其使用及操作方法。

2.2.1 儀器設備

- a) 小型塑膠管柱 (0.5×5 cm) 或用注射針筒亦可。
- b) 分割收集器 (Pharmacia 或 Gilson)：若無分割收集器，以液體高度估計體積。
- c) 小試管 20 支及試管架。
- c) ELISA 光度計 (Dynatech)。
- d) 微量滴定盤 (96-well microtiter plate)。

2.2.2 藥品試劑

- a) Chitin (幾丁質)：蟹殼曬乾，磨粉過篩後，以強酸、強鹼處理得之。
- b) CHOM (雞卵白粘多醣蛋白)：P1 實驗所純化的 CHOM 溶液。
- c) Glutaraldehyde (戊二醛 30%)：具雙官能基的連結劑。
- d) Tris-HCl 緩衝液 (0.1 M, pH 7.5)。
- f) 胰臟抽取液 (PX) 每組 8 mL：取 pancreatin 5 g 溶於 200 mL Tris-HCl 緩衝液，充分攪拌後，加入 5 g 矽藻土，並以過濾得到清澈的 PX 溶液。
- g) Coomassie Brilliant Blue G-250：蛋白質定量呈色用 (見 P1, 1.3)。
- h) 甲酸液 (0.1 M, pH 2.05)：改變 pH 以便溶離 trypsin 下來。
- i) BAPNA 合成基質液 (benzoyl-arginine *p*-nitroanilide)：可被 trypsin 水解呈黃色。
配製法：取 BAPNA 43.5 mg 加入 1 mL DMSO 懸濁均勻，等約 1 h 完全溶解，慢慢滴入 100 mL Tris (0.05 M, pH 8.2, 含 20 mM CaCl₂) 同時快速攪拌。

2.2.3 親和吸著劑之製備

- 1) 取幾丁質 2 g，盡量除去水分，置於 15 mL 塑膠離心管中。
- 2) 加入 4 mL CHOM 液，均勻懸著之 (剩下的 CHOM 請保留起來)。
- 3) 加 0.1 mL 25% glutaraldehyde，封口後混合均勻。
- 4) 在室溫反應 30~60 min，不時輕輕上下倒轉，均勻混合。
- 5) 以傾倒法用蒸餾水洗若干次，最後加適量 Tris-HCl 緩衝液懸濁之。
- 6) 裝入管柱，俟沉降後用 10 mL 緩衝液流洗，讓 Tris-HCl 慢慢通過，洗約數分鐘後備用。

2.2.4 親和層析法之操作

- 1) 如上準備好親和層析管柱，在 Tris-HCl 緩衝液平衡完全後，塞住出口，吸去吸著劑上方的液体，但勿使吸著劑乾掉。
- 2) 小心加入 8 mL 之胰臟抽取液 (PX)，不可弄亂吸著劑表面。
- 3) 打開出口，調整流速約每 4 s 一滴。
 - ◆請事先作好收集試管的準備：取 4 mL 水置入試管中，並在其液面高度做記號，然後以所收集流出液的高度，作為每一分劃的依據。
- 4) 馬上收集流出液，大約每 4 mL (或 80 滴) 收一支，約收 8 支試管；同時注意勿使吸著劑乾掉，當 PX 完全沒入吸著劑表面後，小心追加 Tris-HCl。
- 5) 收集 8 支試管後，關住出口；每支分別取樣 50 μ L，以 Bradford method 檢測蛋白質的量，到後面的試管應該已經完全洗淨，若尚未洗淨，再洗數支試管。
 - ◆若有必要，可以收集蛋白質濃度較高的幾隻試管，再通過一次親和管柱。
- 6) 再次吸去吸著劑上方之液体，改加入 0.1 M 甲酸液 (pH 2.05)，打開出口，流速降為每 8 s 一滴，馬上收集流出液，每 2 mL 收一支，收集 4 支後暫停。
- 7) 每支試管取 50 μ L 以 Bradford method 檢測蛋白質量，應在前面一兩支出現。
- 8) 同法取樣 50 μ L，在微量滴定盤上加入 200 μ L BAPNA 液，混合後稍稍加溫，樣本中若有 trypsin，則呈黃色反應；以 ELISA 光度計記下吸光值 (A_{405})。
 - ◆注意：前面所收集的 8 支試管也可以作 BAPNA 活性分析。
- 9) 吸著劑可用 0.1 M Tris-HCl 洗過後重複使用；但本次實驗完成後丟棄之。
- 10) 取呈色最深的一或兩支試管 (步驟 6 中) 置入一隻全新 15 mL 離心管，寫好組別後交出，下面實驗將以電泳檢定之 (分子量及純度)。
 - ◆若有兩隻呈色相同，可以混合後交出。

2.3 結果與報告

2.3.1 實驗結果

- a) 以條列方式，把整個實驗過程及步驟，一一寫下來，請勿直接抄襲 2.2 節。
- b) 收集所測得的吸光值作為 y 軸，並以各分劃為 x 軸，製作色析圖譜。可製作得兩條吸光曲線，一為蛋白質含量，另一為酵素活性，類似下面圖 P2-4。

2.3.2 附註說明：

- a) 親和層析法的純化效果非常好，但非萬能，有許多限制與缺點，應當注意：
 - 1) 並非所有的物質都可找到具有親和力的 ligand，也非所有的物質均能有效

地誘導出抗体。請試著舉出自然界中，所有可能的專一性配對分子。

- 2) 經常要使用強烈的條件，去溶離下所要的物質 (例如用 pH 2)，因而不免破壞物質的穩定性與活性。幸運的是，trypsin 在酸性環境下相當安定。
 - 3) 有時非專一性吸附很難避免，純化效果會打折扣；如何避免之？
- b) 圖 2-4 為親和層析法的典型溶離圖形。以本實驗為例，先洗去許多雜質，可能有些過量的酵素活性出現在後端 (*)；再用甲酸溶離 (箭頭處)，即可收得所要的 trypsin。為何甲酸可以把吸附上去的蛋白質溶離下來？
- c) 每一個分離階段的樣本，都可以收集起來，再以電泳分析其蛋白質成份。圖 P2-5 是圖 P2-4 所收得樣本的電泳結果，並以兩種不同電泳來檢視所含的蛋白質，請嘗試解釋所得電泳圖譜的意義。
- d) 我們將在下一個實驗進行各種電泳，分析本實驗所得到的純化產物。

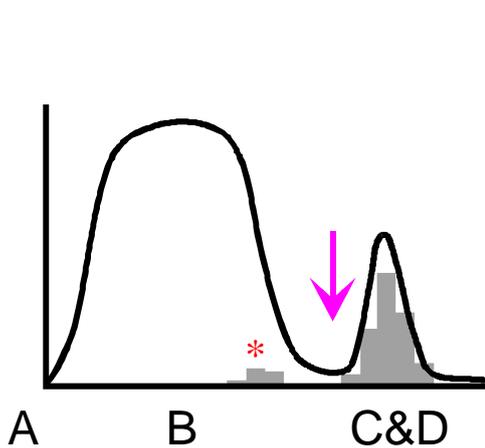


圖 P2-4 典型的親和層析圖譜

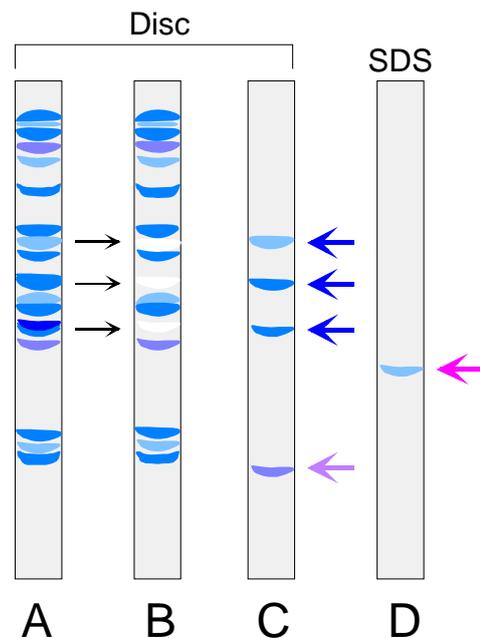


圖 P2-5 電泳分析結果

2.4 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 68, 128

蘇仲卿 張珍田 莊榮輝 (1981) 利用親和層析法分離豬胰臟蛋白質水解酵素 trypsin 和 chymotrypsin 之中間規模試驗。中國農業化學會誌。19: 218-226

Affinity chromatography - Principles and methods, Pharmacia

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.91

Scopes RK (1996) Protein purification - Principles and practice, 3rd ed, Springer-Verlag

P3 聚丙烯醯胺膠體電泳

莊榮輝

3.1 電泳原理

帶電 分子在電場中能夠移動，稱作泳動，泳動的程度稱為泳動率 (mobility)：

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

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；球形分子摩擦力較小，泳動率大。而分子在環境 pH 的影響下，可能帶不同淨電荷：

當環境 pH = 分子之 pI 時，此分子之淨電荷為零 (pI 為等電點)；

當環境 pH < 分子之 pI 時，此分子之淨電荷為正；

當環境 pH > 分子之 pI 時，此分子之淨電荷為負。

電泳系統中，電子由負極流向正極；帶負電的分子往正極跑，帶正電的分子往負極跑，不帶電者則不動。大部分電泳系統的 pH 定在 8.3，在此 pH 下凡是 pI 小於 8.3 的分子均帶負電荷，都可以往正極跑。

3.1.1 電泳的發展

電泳需有一介質，作為電泳之場所。最早是在溶液中進行，但因在溶液擴散現象嚴重，故改用固相的濾紙；但又因濾紙與分子間摩擦力太大，後來多改用半固態的膠體，如聚丙烯醯胺膠體 (polyacrylamide gel)、洋菜糖 (agarose) 或澱粉 (starch)。

蛋白質電泳以聚丙烯醯胺膠體應用最廣，其中又以膠體有無加入 SDS，分為 SDS-PAGE 及 non-denaturing PAGE (原態電泳)。SDS 為一種介面活性劑，會破壞分子構形，並在分子表面均勻塗佈一層 SDS 負電分子，蛋白質分子不論原來帶正或負電，均可往正極跑，泳動率與分子量成反比。因此 SDS-PAGE 可用來測定蛋白質的分子量，但所測得的是變性狀態 (denatured) 之分子量，與原態 (native) 分子量可能不同。不加 SDS 之 non-denaturing PAGE，則泳動率與其分子之電荷、分子大小、分子形狀等均有關係，較難預測。

3.1.2 聚丙烯醯胺膠體

- 1) 膠體組成之主要成分：聚丙烯醯胺膠體的形成，是由單體分子經聚合反應，成為高分子聚合物，並以架橋分子，交錯連結成三次元的半固體膠體。
 - a) 單體 (monomer)：丙烯醯胺 (acrylamide)， $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{CH}_2$ 。
 - b) 架橋 (bridge)：Bis, [*N, N'*-methylene-bis(acrylamide)] 可看作兩個丙烯醯胺單體分子連結在一起，可形成分叉點，以構成立體結構。
 - c) 自由基 (free radical) 產生者：過硫酸銨 (ammonium persulfate, APS) 或 riboflavin (即維生素B₂)。
 - d) 催化劑：TEMED (tetramethylenediamine) 幫助自由基電子的傳遞。
- 2) 鑄膠 (gel casting)：是一種自由基的聚合反應，大致有下列幾個反應。
 - a) 自由基形成：靠上述游基產生者自動生成游基，再引發連鎖反應。
 - b) 聚合反應：單體分子首尾相接，以連鎖反應形成大分子的長鏈。
 - c) 交錯連結：若架橋分子 Bis 加入聚合反應，則可形成網狀三次元結構。
- 3) 膠體的一些性質：構成的網狀三次元結構膠體，因為其中所含單體與架橋分子濃度的不同，而有各種不同孔隙的膠體。蛋白質分子在膠體中的泳動率，會受膠體孔隙大小的影響。在孔隙中的空間，則由緩衝液填充，除了維持 pH 外，更作為電流之傳導媒介。

3.1.3 電泳系統的解析

- 1) 以化學組成看來，電泳系統可分為五個部分：

表 P3-1 電泳系統的組成

電泳系統		緩衝液	pH	膠體濃度
1	上層 (負極) 緩衝液	Tris-Gly	8.3	無
2	樣本溶液	Tris-Gly	8.3	無
3	膠體 焦集膠體	Tris-HCl	6.9	4%
4	膠體 分離膠體	Tris-HCl	8.9	5~20%
5	下層 (正極) 緩衝液	Tris-Gly	8.3	無

只有 3, 4 兩部分是膠體；各層的緩衝液種類不盡相同，其 pH 也有點差異。注意 (3) 膠集膠體的 pH 較低 (pH 6.9, 是 Gly 的 pI)。這些差異造成一個很重要的效果：在樣本通過焦集膠體時，產生焦集作用，使原本體積相當大的樣本溶液，聚集成一薄層，可增加解析度。

- 2) 以傳統的直立式柱狀膠體電泳為例，電泳膠柱如圖 P3-1 所組成，玻璃管內的下方為分離膠體 (4)，其上則為焦集膠體 (3)。焦集膠體上方的空間 (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) 連接電源。除

柱狀電泳外尚有平板式電泳，可分直立式或水平式。應用在蛋白質時，以直立式平板式的聚丙烯醯胺膠體為多；在核酸則以水平平板式洋菜醣膠體較普遍。

3) 焦集膠體的焦集作用及其作用機理：參閱附圖 P3-2

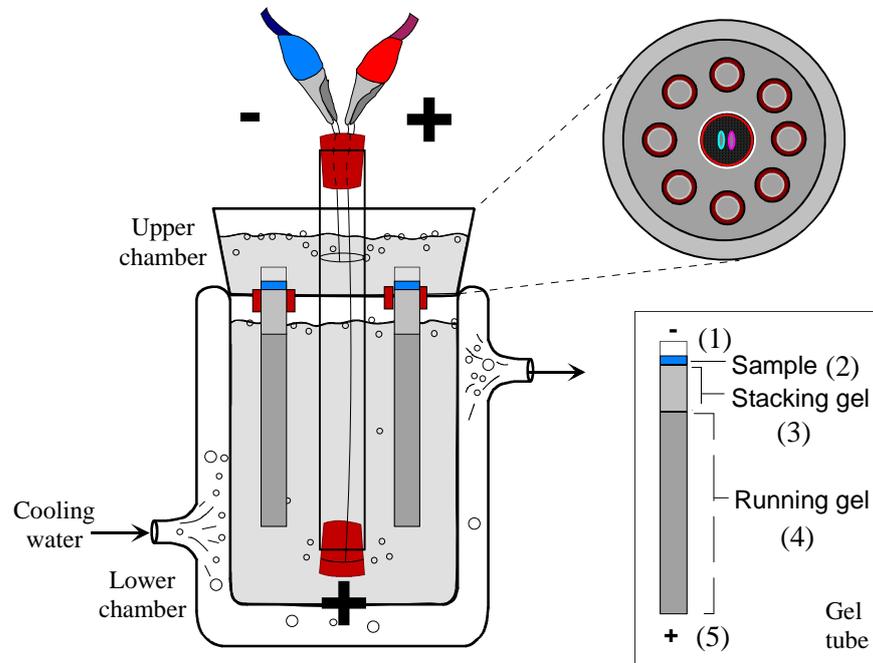


圖 P3-1 直立式柱狀電泳裝置與膠柱組成

直立式柱狀膠體電泳是最早的電泳方式之一，在玻璃管中分別注入分離膠體與焦集膠體，右下角為膠柱的組成方式。

- 樣本分子能被焦集成一薄層，注意下面三種分子，在電泳時的表現：
 - Glycine：圖中以深色圓點（當環境 pH > 6.9 時 Gly 帶負電）或白色圓點（當環境 pH = 6.9 時為不帶電之 zwitterion）表示。
 - 樣本分子（有兩種蛋白質，分別以大小兩種乳酪圖案表示）。
 - 氫離子，以斜線部分代表。
- 注意上述電泳的五個部分中，膠體的緩衝液含氫離子，沒有 Gly；然而樣本溶液中含 Gly，沒有氫離子。
- 再看 樣本溶液-焦集膠體-分離膠體 三段的 pH 是不連續的，其 pH 分別為 8.3 - 6.9 - 8.9，注意 Gly 的 pI 恰為 6.9。
- 當電泳一開始時，Gly 越入焦集膠體後，立刻變成不帶電的分子（白點），泳動率變小；同時氫離子則很快的往正極泳動，因此在氫離子與 Gly 之間有一段缺乏離子的空間，電壓很高。
- 然而兩電極之間，一定要有負離子來帶動電流，此時只有利用蛋白質分子來傳導，而焦集膠體中的孔隙又較疏，於是蛋白質分子在此離子缺乏空

間，快速往正極泳動，一直碰到氫離子的尾端，而聚集於斯，成一薄層，由側面觀之則成一細線。

- f) Gly 分子慢慢通過聚焦膠體，又變回負離子，離子缺乏空間瓦解；樣本蛋白質泳動到分離膠體，膠體為正常濃度，依其分子量、電荷等因素泳動。

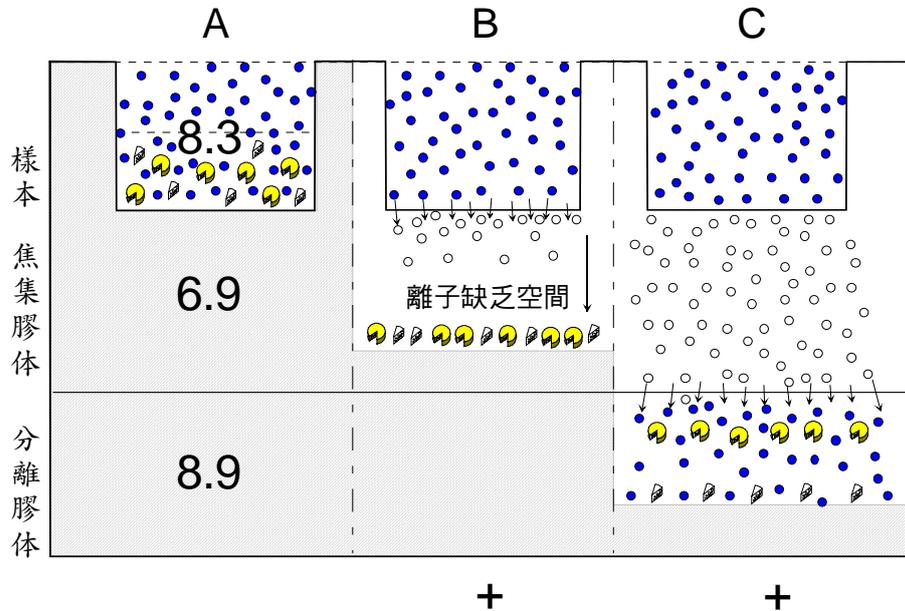


圖 P3-2 聚焦膠體的作用原理

由於不連續膠體能夠產生一段離子缺乏的空間，使得樣本分子快速泳動，並且擠在氫離子界限的尾端，因而聚焦成一條直線，產生聚焦的效果。

3.1.4 實驗大綱

P3 膠體電泳法

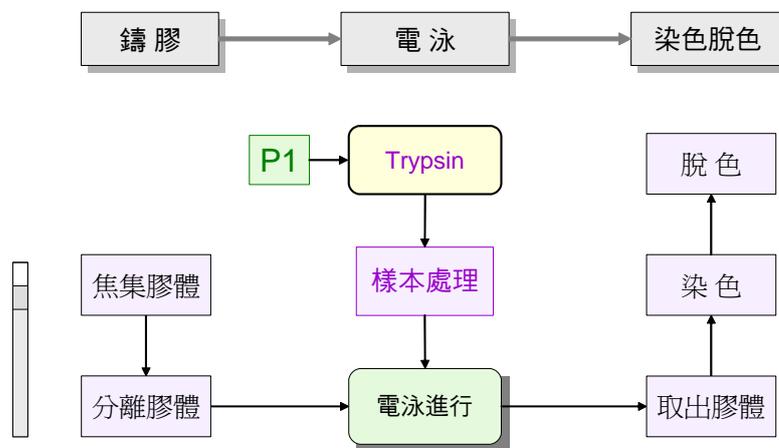


圖 P3-3 原態膠體電泳檢定的進行流程

3.2 實驗方法

兩組共同鑄造兩片平板原態電泳膠片，進行各組 trypsin 及 CHOM 的樣本分析。

3.2.1 儀器用具

- 鑄膠套件 (含電泳玻片及氧化鋁片)。
- 間隔條 (spacer, 0.75 mm) 及樣本梳 (comb, 10 well)。
- 垂直迷你電泳槽 (Hoefer SE-250 平板式垂直電泳槽)。
- 電源供應器 (Pharmacia Biotech EPS 200)。
- 微量針管 (Hamilton 80465) 或電泳樣本專用吸管頭。
- 染色脫色方盒。

3.2.2 藥品試劑

- A 液 (T 30%, C 2.6%)：**注意！本溶液有毒性！**

丙烯醯胺溶液 acrylamide	14.6 g
Bis (<i>N,N'</i> -methylene-bis-acrylamide)	0.4 g

加水至 50 mL，若難溶則稍微加熱助溶之，儲存於 4°C。

- B 液 (分離膠體緩衝液)：

Tris	18.2 g
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-ethylenediamine)	0.36 mL

用 60 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 8.8 後加水至 100 mL，儲存於 4°C。

- C 液 (聚焦膠體緩衝液)：

Tris	0.6 g
TEMED	40 μ L

用 8 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 6.8 後加水至 10 mL，儲存於 4°C。

- 通用電泳緩衝液 (5 \times)：

Tris	90 mM \times 5	54.5 g
EDTA \cdot 2Na	2.5 mM \times 5	4.7 g
Boric acid	80 mM \times 5	24.8 g

加水 800 mL 溶解，以 NaOH 調 pH 至 8.4 後，加水至 1,000 mL，室溫保存。使用前要以蒸餾水稀釋五倍。

- APS 溶液 (ammonium persulfate, 10%)：

取 0.1 g 溶於 1 mL 水，要確實溶解完全；使用前新鮮配置，過夜者不再用。

- 異丙醇。

- 追蹤染料：Bromophenol Blue (BPB) 1 mg 加 5 mL 水及 5 mL 甘油。

h) CBR 染色液: Coomassie Brilliant Blue R-250 1.5 g 加入 250 mL 水後再加 250 mL 甲醇及 50 mL 醋酸，過濾去掉不溶物，置於排煙櫃中公用。要回收。

i) 脫色液：甲醇 (20%) 及醋酸 (10%) 的水溶液，置於排煙櫃中公用。

3.2.3 鑄膠 (原態膠體)

表 P3-2 各種膠體溶液的濃度 (單位 mL)

分離膠體	7.5%	10.0%	12.5%	15.0%	聚焦膠體	4%
A 液	2.5	3.4	4.2	5.0	A 液	0.7
B 液	2.5	2.5	2.5	2.5	C 液	1.3
水	4.9	4.0	3.2	2.4	水	2.9
APS	0.1	0.1	0.1	0.1	APS	0.1
Total	10.0	10.0	10.0	10.0	Total	5.0

分離膠體每支約需 2~3 mL，故一組配製 10 mL 即可。

- 1) 將電泳玻片及氧化鋁片清洗淨後擦乾，再以玻璃清潔劑擦拭乾淨，選擇所需厚度間隔條 (spacer) 組裝於鑄膠套件，本課程由助教事先準備架好。
- 2) 依表 P3-2 所列的各溶液比例，選擇所需的分離膠體濃度，本次實驗使用 **12.5%** 膠體。配置膠體溶液時，其中 **APS 溶液必須最後加入**，**小心混合均勻**，並避免氣泡產生，然後以微量吸管小心注入鑄膠套件。
- 3) 膠體約佔玻片的 2/3 至 3/4 高度，加完後儘快在膠體液面上方小心加入 100 μ L 異丙醇 (或蒸餾水)，以壓平膠體液面。
- 4) 約 30 min 至 1 h 後 (天冷須更久)，凝膠完成，倒出上層的異丙醇。
- 5) 配製聚焦膠體溶液，先準備好所需之樣本梳 (comb)，加入溶液後立刻插入，整個過程必須在 5 min 完成，約 30 min 可完成凝膠。
- 6) 拆下膠片並清理，將多餘的凝膠去除，鑄好的膠片可置封口袋中於 4°C 保存，但要加入少量蒸餾水防止膠片乾裂，使用期限約兩週。一組使用一片。

3.2.4 電泳

- 1) 若膠片是在 4°C 中保存，須先取出回復室溫。同時將稀釋成一倍的通用電泳緩衝液，倒入電泳槽底部。然後把膠片以 45 度架到電泳槽上，避免附著氣泡；當電泳夾夾妥後，在電泳玻片組合的上方槽內，加入電泳緩衝液。電泳前，先以微量針管清洗各樣本槽，避免有凝膠不完全的殘餘物留在樣本槽內。

◆ 膠片一定要等回復室溫後才能架到電泳槽，否則玻片會因熱漲而撐破。

- 2) 取出 trypsin 樣本 20 μ L，因其中含甲酸溶液，先加入 2 μ L 1 N NaOH 中和之，然後再加 10 μ L 追蹤染料，混合均勻後備用。CHOM 取 20 μ L 只要加入 10 μ L

追蹤染料混合，不須中和。

- 3) 依圖 P3-4 配置，以微量針管小心注入樣本 (要記錄體積)，避免氣泡陷入。
 - ◆ 每個樣本槽最多容納 20 μL 樣本，trypsin 樣本較稀，儘量注入多量，而 CHOM 極濃，每槽注入 1~3 μL 即可。若有多餘的樣本槽，可注入不同濃度比較。
- 4) 蓋上電泳槽的蓋子，確認正負電極裝置正確 (由負極往正極跑)，連接上電源供應器，定電壓以 100~150 V 進行電泳，約需 1 h。
- 5) 待追蹤染料跑到底部，關掉電源，取出膠片，以解剖刀截去右上角做記號。
- 6) 膠片接著進行蛋白質染色及脫色如下小節。

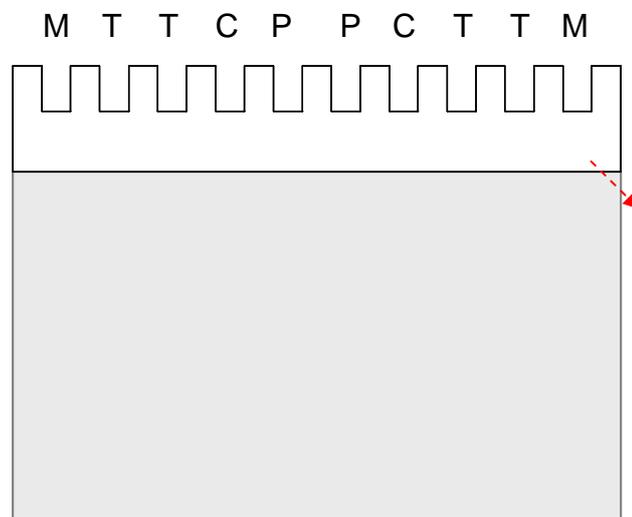


圖 P3-4 樣本的配置方式

T 為 trypsin (可能有不同來源的樣本)，C 為 CHOM，P 為胰臟抽取液，M 為標準蛋白質；左右兩半膠片可以加入不同量的樣本，以便適當呈色。跑完電泳後去除焦集膠體後，在右上角切角做記號 (箭頭虛線)，然後進行 CBR 染色。

3.2.4 染色及脫色

- 1) 將電泳膠片浸入 CBR 染色液中，染色液用量只要覆蓋過膠片即可，一定要蓋上蓋子，置於平台震盪器上搖盪 30 min。
- 2) 倒出染色液回收，膠片用自來水沖洗後加入脫色液，脫色液也一樣蓋過膠片即可；約 10 min 換第一次脫色液，然後一直定時換新到背景清澈透明為止。
- 3) 若蛋白質濃度較低，染色時間可加長 (1 h) 以增加色帶深度。
- 4) 脫色完成的膠片，可以用玻璃紙三明治乾燥之，經護貝後可永久保存。

3.3 結果與報告

3.3.1 實驗結果

- 膠體染色結果讓你目睹樣本中所含的各種蛋白質，雖然所有的蛋白質都被染成藍色，但仍依照各自分子量及帶電荷的大小不同，在其泳動率上有所差異。
- 請記錄下色帶的位置，可以掃描或照相，作為記錄及報告之用。
- 請注意可以看得到幾條色帶？其泳動率如何？
- 若有不同來源的 trypsin，則在電泳上的差異如何？

3.3.2 附註說明

- Non-denaturing PAGE 與 SDS-PAGE 的電泳機制不一樣，因此同一種樣品，在這兩種電泳的結果會完全不同；我們在 S2 免疫轉印法才會進行 SDS-PAGE。以 trypsin 實驗為例，圖 P3-5 說明此現象，注意圖中 C 與 D 之比較。討論電泳結果，並判斷所得到的 trypsin 是否純質。
- CBR 染色法可染大部分蛋白質，約可偵測數 μg 量；另有硝酸銀染色法，其靈敏度約提高一百倍；而以 Periodic acid-Schiff's (PAS) 試劑可染出醣類 (呈洋紅色)，用來偵測醣蛋白，但其靈敏度比 CBR 染色低十倍。

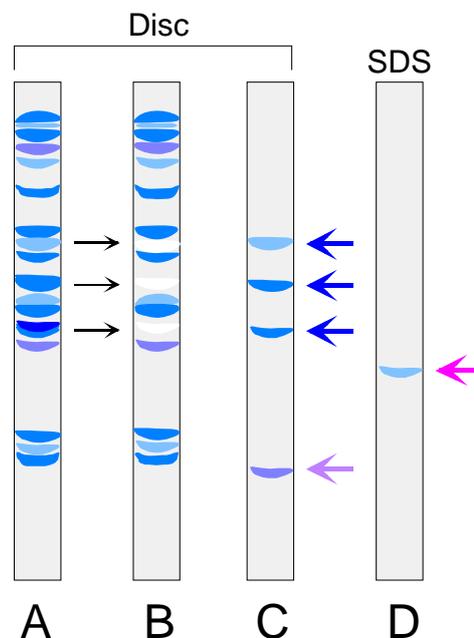


圖 P3-5 電泳分析結果

3.3.3 複習問題

- a) 決定蛋白質分子的淨電荷為正電或負電，受那些因素影響？
- b) 那些因素會影響蛋白質分子，在電場中的泳動速率？
- c) 膠體溶液的成份有那些？各有什麼作用？那一種有毒性？
- d) 聚焦膠體如何使樣品蛋白質聚焦成一薄層？
- e) 是否所有蛋白質分子均由負極向正極泳動？在什麼情況下會有例外？
- f) 電泳進行時會發熱，有無必要通冷水冷卻之？在何種情況下有此必要？
- g) 樣品中若有大量的鹽分，對電泳會有什麼影響？
- h) SDS-PAGE 與 non-denaturing PAGE 在原理與應用上，有何異同？

3.4 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 147, 205

莊榮輝、蘇仲卿 (1987) 蛋白質膠體電泳檢定法。電泳分離技術研討會論文集 頁 69-77。
曾義雄等人主編。研討會專集 (九)。國科會生物中心

Juang RH et al. (1984) Oven-drying method for polyacrylamide gel slab packed in cellophane sandwich, *Anal. Biochem.* **141**: 348-350

Nelson DL, Cox MM (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed) p.92-96

Scopes RK (1994) *Protein purification - Principles and practice*, 3rd ed, Springer-Verlag

P4 膠體過濾法

莊榮輝

4.1 膠體過濾法原理

分子大小之不同，可用來作為分離或純化的手段，包括膠體過濾法、超微膜過濾法、超高速離心法、膠體電泳法等。其中以膠體過濾法最為常見，本實驗使用 Sephacryl S-300 作為分離介質，對大部分蛋白質樣本均適用，但要稍提高鹽濃度以克服其非專一性的吸附力。

4.1.1 色層分析法原理

膠體過濾法是色層分析法 (chromatography) 的一種，色析法廣泛被應用來分析複雜的成份，也可以純化所要的目標物質。那麼，色析法是什麼？

色析法都含有兩種相 (phase)，液相及固相就可算為兩相，例如一杯水中有一塊石頭，水是液相、石頭是固相；若問如何分開水與石頭？非常簡單，只要把水倒出，留下石頭即可。水是流動的，稱為流動相 (mobile phase)；石頭不動，稱為固定相 (stationary phase)。

這樣的兩相觀念，應用到色析法，就是看樣本中的各種分子，是比較喜歡跟著流動相走，還是喜歡留在固定相上，就可以把性質不同的分子分開。而樣本分子『極性』程度的大小，最常被用來作為兩相分離的基本依據；同時，流動相與固定相的極性也不同，通常其一偏向極性，而另一則偏非極性。樣本中的各種分子，依其極性程度，選擇留在固定相，或隨著流動相走，完全遵守『like dissolves like』的原則 (見圖 P4-1)。

4.1.2 膠體過濾是一種層析法

- 1) 膠體過濾法也是層析法的一種，因此也有兩相系統：其流動相就是注入管柱的緩衝液，緩緩把樣本帶入膠柱中；而固定相則是裝填在玻璃管柱中的膠球，這些膠球的本體有無

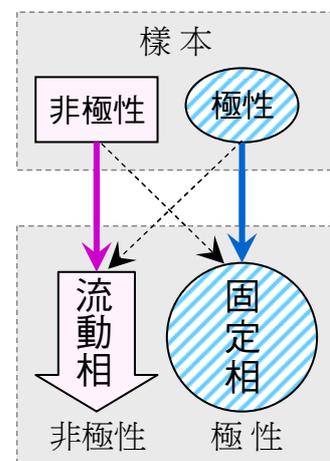


圖 P4-1 色層分析法的基本機制

數小孔洞，可以讓小分子游入其中，而排斥大分子，完全取決於樣本分子的分子量大小。

- 2) 因此，當樣本通過管柱後，分子量大者就會較快流出，而分子量較小者，就會被延滯，較慢流出；如此就可以把大小分子分開。
- 3) 其實，除了分子量之外，分子形狀也有影響。若兩個分子的分子量一樣，而一個是橢圓球形，另一為不規則形狀，則後者將會比較快流出；因為橢圓球形比較容易進入膠球的孔道中，不規則形則否。但是因為蛋白質的外型，通常大多是圓球形，因此可以只考慮分子量的因素。

4.1.3 膠球的種類

- 1) 這種具有孔道的膠球，大都是多醣類的聚合體，以控制多醣的密度，來調整所形成孔道的大小。最早出現的膠球，是葡萄糖的聚合多醣，稱為 **Sephadex**，由瑞典 **Pharmacia** 公司所出產。再來是由洋菜醣所衍生的 **Sepharose**，因為洋菜醣所組合出來的多醣骨架很堅固，以架出較大的孔道空間，因此可分離較高分子量的樣本（數百萬），比 **Sephadex** 的分離範圍（數十萬）大很多。
- 2) 這些膠球除了可作為膠體過濾之外，若在上面連結上離子基團，便可以成為離子交換介質。常見的是接上 **DEAE** 陽離子基團，成為陰離子交換介質，可用來吸引帶負電的分子；也有接上 **CM** 陰離子基團，則成為陽離子交換介質。

4.1.4 實驗大綱

P4 膠體過濾法

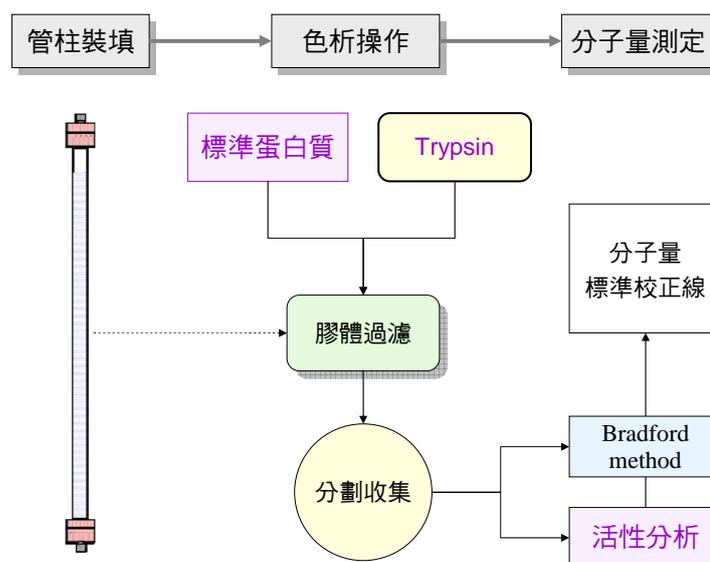


圖 P4-2 膠體過濾法操作流程

4.2 實驗方法

4.2.1 儀器用具

- a) 層析管柱 (Pharmacia C16 column, 100 cm) 最好附有 adaptor (AC16)。
- b) 蠕動幫浦 (Pharmacia peristaltic pump P-1)。
- c) 分割收集器 (fraction collector, Gilson 或 Pharmacia) 加 100 支試管。
- d) ELISA 光度計及微量低定盤。

4.2.2 藥品試劑

- a) 膠體 Sephacryl S-300 (Pharmacia)。
- b) 緩衝液 Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, 含 0.15 M NaCl。
- c) 標準分子量蛋白質 (Bio-Rad 151-1901): Thyroglobulin (670 kD); bovine gamma globulin (158 kD); chicken ovalbumin (44 kD); equine myoglobin (17 kD); vitamin B-12 (1.35 kD)。
- d) Trypsin 樣本為你在 P2 實驗純化所得者，約需 0.2~0.5 mL，視其活性而定。

4.2.3 管柱裝填

本實驗的膠體管柱，均先由助教裝填好，同學只要加入樣本即可；但以下也把膠柱的裝填方法寫出，以為將來自行裝填時參考。同學也可事先詢問助教裝填管柱的時間，以便屆時在一旁觀摩操作情形。

- 1) 預先將管柱洗淨、晾乾後備用，也要熟悉整隻管柱的拆裝方法。
- 2) 架起管柱，以水平儀調整管柱，使之與地面垂直。
- 3) 於管柱中加入約一半高度的緩衝液，測試管柱是否有漏水現象；若沒有漏水，則讓緩衝液流出，只留約 5 cm 高的緩衝液；以塞子暫時堵住下方出口。
- 4) 取出所要使用的膠體，先除去所含的 20% 酒精，並平衡在緩衝液中。
 - ◆ 若是在室溫中進行層析法，一定要等膠體的溫度完全回復室溫才可裝填。
- 5) 將所要裝填之膠體搖盪均勻，不要有未散之硬塊，也避免氣泡產生，若有氣泡產生則以超音波震盪器 (sonicator) 趕出，並以抽氣去除之。
- 6) 將上述混合均勻之膠體，以玻棒沿管壁流暢倒入管柱，並且避免使得氣泡陷在膠柱中；可在裝填後，以手電筒在膠柱後方打燈光檢查之。
- 7) 利用重力自然沈降 1~2 min 後，移去管柱下方軟管的塞子，利用流速加快沈降，注意不可使管柱上方的液相完全乾去。
- 8) 待膠體已沈降完全，用塞子止住下方軟管，並且以緩衝液加滿管柱。

- 9) 取出管柱的 adaptor 並接好軟管及蠕動幫浦管路，並使整個幫浦及軟管內，完全充滿緩衝液，不得有任何氣泡陷在裡面。
- 10) 小心將 adaptor 放入管柱內，往下推至膠面上方，檢查有無氣泡留滯在 adaptor 下面，然後鎖緊 O-ring。此時 adaptor 與膠面間有一小段充滿緩衝液的空間。
- 11) 移去管柱下方軟管的塞子，用幫浦注入緩衝液流洗兩個管柱體積。
- 12) 暫時停止幫浦輸送，用塞子止住下方軟管，放鬆幫浦使管路呈流通狀態，稍微旋開 adaptor 的 O-ring，將 adaptor 緩慢下壓，液體會從幫浦上端軟管流回去，當壓至膠面時，即旋緊 O-ring，鎖上幫浦門，移去管柱下方軟管的塞子。
- 13) 以預定流速 (60 mL/h) 之 150% 流速流洗 1~2 管柱體積。
- 14) 檢查膠面是否因高壓流洗而下降，若降低則重複步驟 12) 把 adaptor 往下壓。
 - ◆ 若有時間，將安排示範膠體的裝填方法。

4.2.4 層析操作與分子量測定

- 1) 請先測量管柱的膠體高度為多少？若管柱底面積為 2 cm^2 ，請計算出該管柱的膠體總體積為若干 mL？
- 2) 把所純化得之 trypsin 取適量加入標準蛋白質中，一起以幫浦注入管柱，膠體過濾的樣本體積約為膠體總體積的 1%；若兩者都為 0.5 mL，則總共樣本體積為 1 mL。注意樣本的溫度與膠體不可相差太多。
 - ◆ 樣本通常都由低溫處取出，其溫度可能與膠體有差異。
- 3) 在注入樣本後，以預定流速進行溶離，膠體過濾層析法即開始進行，要馬上啟動分割收集器；所有溶離物質，應在大約 1.5 倍管柱體積之內流出。
 - ◆ 注意膠體管柱絕對不能吸入氣體，因此當樣本快要吸盡時，要適時停止。
 - ◆ 流速通常為 30~60 mL/h，每分割收集 3 mL，或定滴數為 60 滴。
- 4) 通常樣本注入後，即可由幫浦自動輸液，並以分割收集器自動收集溶離液，操作者在此段時間最好經常回來巡視，以免幫浦或收集器發生故障，影響實驗進行。同時，請觀察標準蛋白質的色帶，如何逐漸分離開來。

4.3 結果與報告

4.3.1 實驗結果

- a) 若一切順利，你將收到約 90 支試管，請注意後面的幾支試管，應該出現紅色的物質 (vitamin B₁₂)，否則可能色析操作發生問題。
- b) 每支試管進行 (1) 蛋白質定量以及 (2) trypsin 活性測定，得到兩組數據。以分割管數為橫座標，蛋白質 (實線) 或活性測定 (虛線) 的吸光值為縱座標，畫出

色析圖譜的結果。實線可能有數個尖峰，而虛線應該只有一個尖峰。

- c) 辨別各標準蛋白質的尖峰，並指出其管數，另做一張標準校正線作圖：同樣以分割管數為橫座標，但以分子量為縱座標，縱座標請用幾何級數刻度。請注意也要把vitamin B₁₂的分子量及管數加入作圖。
- d) 把活性曲線 (虛線) 尖峰的管數，內插到上面的標準校正線，則可求出 trypsin 活性出現尖峰的分子量。

◆ 假如兩個蛋白質的分子量幾乎相同，那能不能在膠體過濾分別出來？

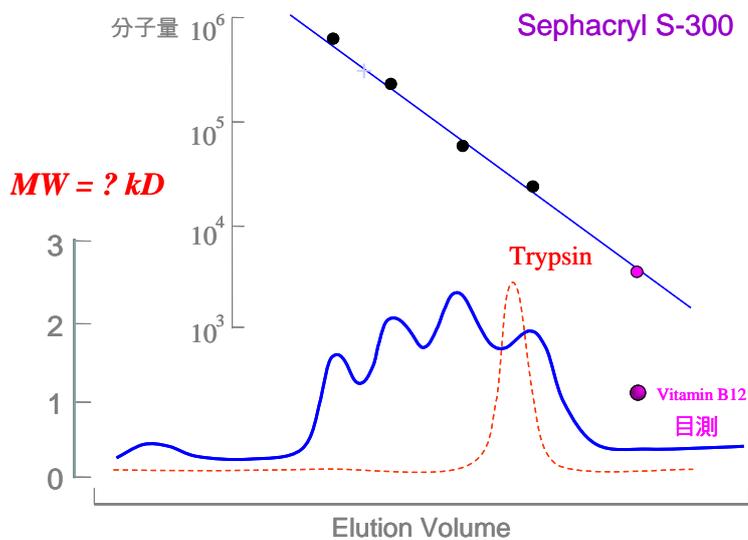


圖 P4-3 分子量標準校正線

4.3.2 複習問題

- a) 在色析過程中，標準蛋白質在管柱內的移動情形如何？色帶是否平整？
- b) 除了以膠體過濾法之外，還有那些方法可測得分子量？
- c) 若使用膠體電泳法測定分子量，與膠體過濾法有何異同？
- d) 有那些問題可能會影響膠體過濾法測量分子量的正確性？

4.4 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 119, 200

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.89-92

Scopes RK (1994) Protein purification - Principles and practice, 3rd ed, Springer-Verlag

S1 免疫電泳法

莊榮輝

抗體 是非常重要的生物化學工具，因為抗體與抗原之間有很強的專一性；而且可以針對某一特定目標抗原，產生其專一性抗體，因此應用上非常方便。

1.1 背景知識

脊椎動物體內擁有後天免疫系統，可對外來異物產生特定的 抗体，這些異物可為別種生物來源的大分子，稱之為 抗原。

1.1.1 抗體與其專一性

抗体與抗原之間的反應，有相當強的專一性 (specificity)。由 抗原甲 所誘導出來的 抗體甲，只能對 抗原甲 作用，對毫不相關的 抗原乙 沒有反應。但若某 抗原丙 的分子構造與 抗原甲 非常類似，則 抗體甲 可能與 抗原丙 有某些程度的反應，稱為 交叉反應性 (cross reactivity)。

外來蛋白質或多醣等大分子，可作為良好抗原；此分子上可被抗体確認的部位，僅有數個胺基酸或單醣，稱為 抗原決定基 (antigenic determinant) 或稱 epitope。在大分子抗原上，可能有數個抗原決定基，各誘導出專一性抗体；因此所產生的抗血清，含有對抗此大分子上，所有抗原決定基的抗体。

抗体是由淋巴球 (B 細胞) 所分泌，一個 B 細胞，只能分泌一種抗体，對抗專一性抗原。平常這些 B 細胞處於休眠狀態，當抗原入侵時，才活化起來，增生、成熟後開始分泌抗体。抗体是一種蛋白質，基本單體分子量約 160,000，分子形狀如 Y 字形 (圖 S1-1)。與抗原決定基結合的部分有兩處，此兩處的分子構造完全一樣，因此可與兩分子抗原結合。抗体分子中，有較具保守性的 C 區 (constant region)，及變異性較大的 V 區 (variable region)。C 區維持抗体分子的基本構形，V 區則造成抗体分子的多樣性，能對各種抗原產生專一性結合。

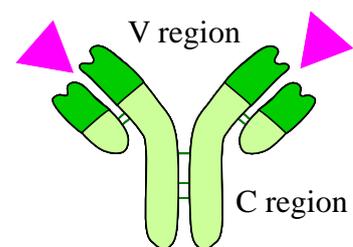


圖 S1-1 抗體分子構造有兩個相同的抗原結合區。

抗体蛋白質一般稱為免疫球蛋白 (immunoglobulins)，簡稱 Ig；可再細分為 IgG, IgM, IgA, IgE 及 IgD 等；其中 IgA 為二元體，IgM 為五元體，其餘為單元體。各種 Ig 的分子構造在其 C 區有點差異，稱為 isotypic variation。免疫動物後，一般均能產生上述各種 Ig。但不同種動物的同一類 Ig，構造上會稍有差異；例如兔子的 IgG 與山羊的 IgG 就不完全相同。若把兔子的 IgG 打入山羊內，則山羊會產生抗兔子 IgG 的抗体，這種抗体的抗体稱為 二次抗体。在同一動物體內，其所含 IgG 分子也不盡相同，有無數群族以對付無數抗原。這種多樣性的成因，是由於 V 區的變異所造成，稱為 idiotypic variation。

1.1.2 免疫電泳

一個抗体可與兩個抗原結合，而每個抗原分子上，通常不只有一個抗原決定基，又可與若干抗体結合。如此，當許多抗原與許多抗体，互相結合在一起，會造成很大的連鎖複合體，並在溶液中沉澱下來，稱為 precipitin。但抗原-抗体反應若要造成沉澱晶格，必須兩者間的莫耳比例適中；抗原或抗体，若有一方濃度太高 (或太低)，都足以破壞晶格形成。

雙向免疫擴散 (double diffusion) 可方便地在洋菜凝膠 (agar) 上，測試抗原與抗体間的沉澱反應。圖 S1-2A 簡單說明其原理，虛線代表抗原或抗體的濃度，因擴散而向四周漸減；抗原與抗體的擴散範圍會重疊，在最適當濃度之重疊處產生沉澱線。免疫電泳 則結合了雙向免疫擴散以及洋菜凝膠電泳，其作法如圖 S1-2B 所示，樣本先跑完電泳，然後再對其抗体進行免疫擴散 (注意箭頭指示方向)。

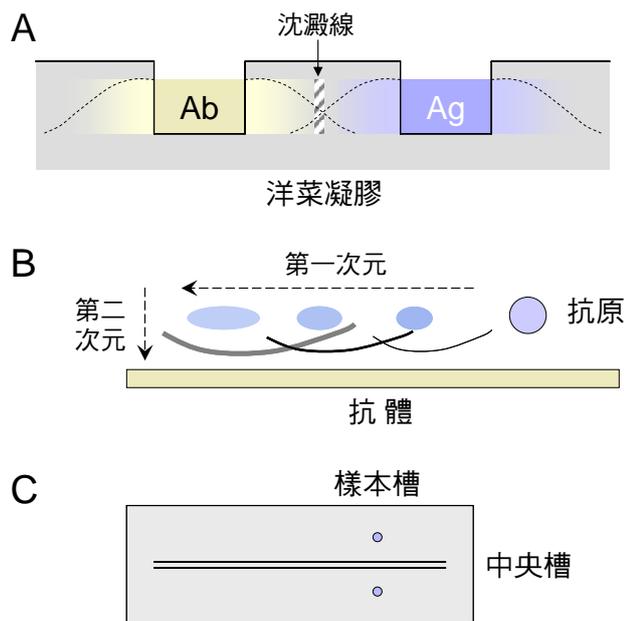


圖 S1-2 雙向免疫擴散及免疫電泳原理及設計

1.1.3 實驗大綱

S1 免疫電泳法

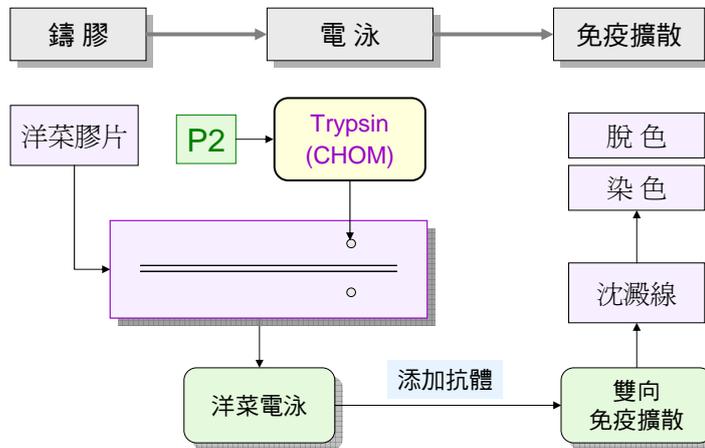


圖 S1-3 洋菜電泳與雙向免疫擴散流程

先在載玻片上鑄好洋菜膠體，並預先打好樣本槽，以便進行洋菜電泳。電泳後中央槽挖出，注入抗體，進行雙向免疫擴散。

1.2 實驗操作

本實驗所用免疫電泳膠片如圖 S1-2C，有兩個樣本槽，一個中央槽（長條形）。樣本槽分別注入 trypsin 與 胰臟抽取液；跑完電泳後，中央槽加入 小白鼠抗 trypsin 抗血清，進行雙向擴散；由沉澱線的形成，可觀察抗原與抗体間的專一性現象。

1.2.1 儀器設備

- 載玻片 (每人一片)。
- 膠片打模工具：刀片、鐵尺 (15 cm)、滴管 (吸口須平整)。
- 水平電泳槽 (Mupid)、濾紙 (當鹽橋用)。
- 塑膠培養皿 (petri-dish) 及衛生紙。

1.2.2 藥品試劑

- Barbitone 緩衝液 (0.08 M, pH 8.2)。
- 洋菜溶液 (2%) 溶於 barbitone 緩衝液，煮沸溶解後，於 60°C 水浴保溫。
- 樣本：Trypsin 或胰臟抽取液，加有追蹤染料 (BPB)，裝在 1 mL 注射針筒內。
- 抗血清：小白鼠抗 trypsin 的抗血清或腹水，1~3 倍稀釋。

1.2.3 實驗步驟：

洋菜膠片製作

- 1) 載玻片預先打底 (若時間不夠可省略)：取 0.5% 洋菜溶液約 2.5 mL，均勻塗佈在載玻片上，凝固後放到烘箱內烘乾。
- 2) 取出載玻片，水平放好，有打底的那面朝上。
- 3) 準備 2% 洋菜溶液，置 60°C 水浴保溫；同時取一支 5 mL 吸管，天氣太冷時須以電爐或吹風機加溫，以便在吸取洋菜溶液時，洋菜不致凝固在吸管内。
- 4) 以此吸管吸取 2.5~3.0 mL 洋菜溶液，儘速依圖 S1-4A 的方式把洋菜溶液均勻塗佈到載玻片上。注意要馬上以吸管尖把洋菜表面整平，若有氣泡立刻除去。洋菜膠体開始凝固時，就不要再動它。
- 5) 數分鐘後，當膠体轉成白色，表示凝結完成。
- 6) 以刀片在膠体的中央，畫兩道平行線如圖 S1-4B。引導畫線的鐵尺，要架在膠体上方，但不可觸及膠面，可在載玻片兩頭用硬幣墊高，再把鐵尺架在上面；刀刻要深及底部，兩平行線間隔不可大於 2 mm，約一個硬幣的厚度，暫時不可挖掉膠体。
- 7) 取滴管在如圖 S1-4C 的位置打洞，此二洞位置要對稱。打洞時，先握住橡皮頭，在預定位置上垂直壓下，放開橡皮頭，同時快速往上移開滴管，要注意洞內的膠体有無挖出。
- 8) 畫線及打洞時，最好先在紙上畫好實際大小的模型，把玻片放在上面進行。每人製作一片，每組挑出一片進行電泳。

洋菜膠片電泳

- 9) 四組共用一個 Mupid 電泳槽，把四片載玻片並肩放到電泳槽中，正負極槽倒入 barbitone，放好濾紙鹽橋並潤溼之，注意濾紙與膠片要貼緊 (圖 S1-4D)。
- 10) 以微量注射針筒在兩個樣本槽分別注入 trypsin 及胰臟抽取液，小心勿溢出。
- 11) 裝好電極，注意樣本由負極 (黑色) 往正極 (紅色) 跑，以 16 mA 電流進行。

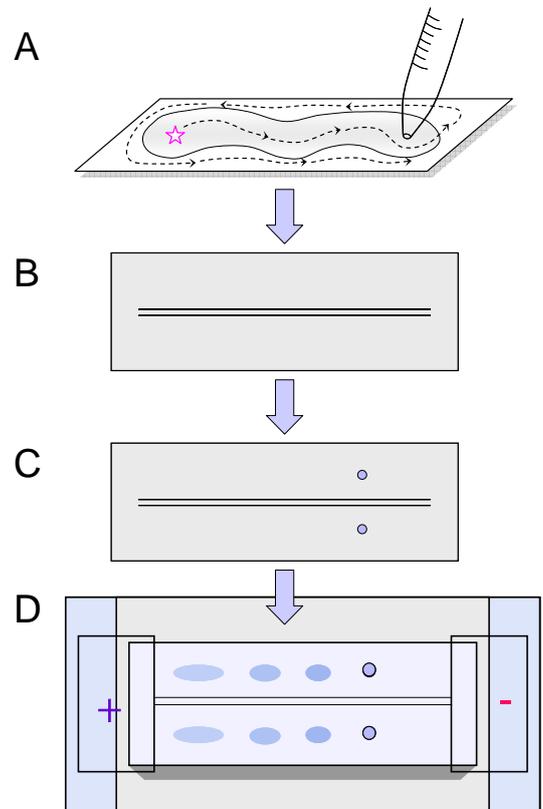


圖 S1-4 免疫電泳膠片製作

12) 樣本中有藍色染料，俟藍色點接近另一端時，終止電泳；小心取出載玻片。

◆ 注意：一定要確定電源已關，才可取出載玻片。

雙向免疫擴散

13) 取一只培養皿，鋪上一層衛生紙，以水潤溼之；把膠片上洋菜的中央槽挑空，然後將玻片置於培養皿內的衛生紙上。

14) 在中央槽內，加入 0.1 mL 小白鼠抗 trypsin 抗血清，並覆上蓋子；等到抗血清擴散進入洋菜之後，才可攜回；約一日後，可觀察到白色的沉澱線（拿出載玻片對著日光燈看）。

15) 沉澱線可染色，但要先用 PBS (生理食鹽水) 浸洗 4~5 d，每天換 1~2 次 PBS；然後以 CBR 染色液 (同膠體電泳實驗所用者) 染色 1 h，再以脫色液脫色，每天至少換一次，持續數日，直到背景呈現透明。

1.3 結果與報告

1.3.1 實驗結果

- 進行電泳前，中央槽為何不先挖空？若先挖空可能會有那些問題？
- 洋菜電泳的條件如何？與聚丙烯醯胺電泳有何不同之處？
- 若沒有用 CBR 染色，請準確畫下沈澱線的形狀；若有染色，則可拍照。
- 討論沈澱線的形成，與抗原的種類有無關係？

1.3.2 討論問題

- 抗體與其抗原之間的親和力，由那些作用力構成？
- 抗體在生化分析或純化上，有何功能或用途？
- 本實驗技術可應用在什麼方面？

1.4 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 155, 205, 217

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.174-182

Roitt I, Brostoff J, Male D (2001) Immunology (6th ed) Chap. 4, 27

S2 免疫轉印法

莊榮輝

膠體電泳 可以把蛋白質依照分子量大小分開，若膠體內的蛋白質色帶能轉印到尼龍膜，則這些蛋白質可繼續以其專一性抗體來偵測，成為更強大的解析工具。

2.1 背景知識

膠體電泳的原理與前面 P3 實驗完全一樣，而蛋白質轉印也是相同的機制，只是轉個方向，把膠片上的色帶印到尼龍膜。

2.1.1 蛋白質轉印

膠體電泳的解析力雖然很高，可以把複雜的蛋白質混合物分離開來，但是不能方便地鑑別這些色帶的身分；原因之一，是因為膠體本身易脆，不容易進一步操作，因此要先把這些色帶轉移到尼龍薄膜上，再繼續以其它方法檢定之；而最常用的方法，便是以抗體對尼龍膜上的蛋白質色帶進行免疫偵測。

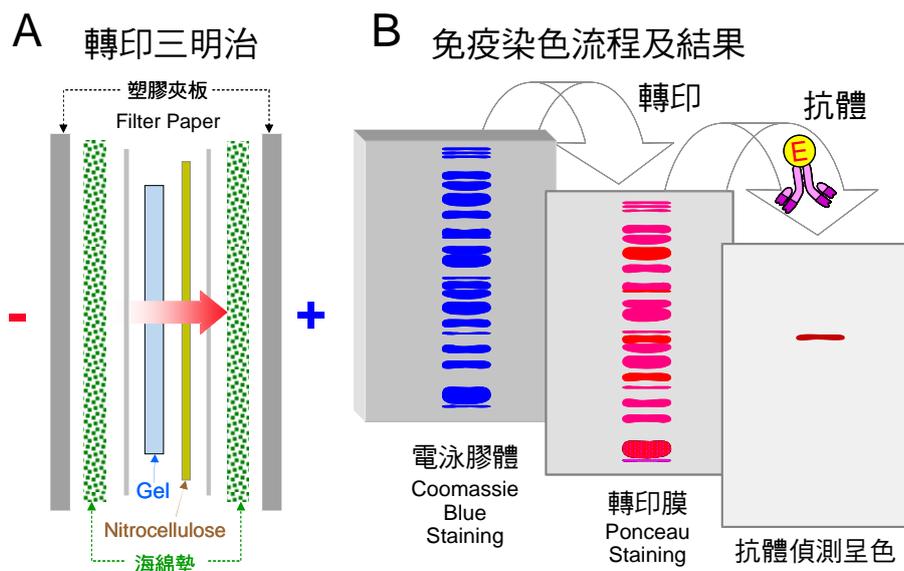


圖 S2-1 蛋白質轉印及免疫染色的原理機制

早期蛋白質轉印法是使用 硝化纖維紙 (nitrocellulose)，蛋白質可吸附在紙上的硝基，不易脫落。後來改用尼龍材質的薄膜 (如 PVDF)，上面有各種修飾基團，可強力地吸引住蛋白質，但降低非專一性的吸附，使結果更為可靠。轉印膜在轉印後的空白部份，通常都要以無關的蛋白質覆蓋起來，以免後面操作所用到的抗體等物質，吸附到轉印膜上去。通常都使用脫脂奶粉，我們則比較常用明膠，隨人喜好而定。

轉印時，要小心分子量較小的蛋白質，可能會穿過轉印膜而損失；可在轉印緩衝液中添加甲醇 (10~30%)，以增加轉印膜對蛋白質的吸附力量。反之，也有商品標榜在一次轉印後，可以同時印出十張相同的轉印膜，減少膠片消耗與轉印時間；這在蛋白質體學的應用上，有相當大的吸引力，因為同一張二次元電泳的轉印膜，可能要進行很多種不同的偵測反應，因此需要很多張相同的轉印膜。

另外，注意有些在轉印以後要分離色點，然後進行胺基酸定序，若是使用 Edman degradation 反應的定序儀，則轉印緩衝液中避免使用帶有 $-NH_2$ 基團的成份 (如 Tris, Gly)，以免干擾 Edman degradation。

有時候，可以把酵素轉印到膜上，然後直接在上面進行催化反應，若能產生不溶性的生成物，原地凝集在轉印膜上，則可做為酵素的檢定之用。例如磷酸酶 (phosphatase) 或過氧化氫酶 (peroxidase)，都可直接在轉印後呈色。當然，若使用 SDS 膠體電泳，則必須在轉印後，使酵素充分回復原態及活性。

2.1.2 免疫染色

膠體電泳的高解析力，加上抗體的高專一性，結合成為一個極為強大的分析工具。因此，一直到目前，電泳轉印加上免疫染色的流程，都是所有生物科技相關實驗室所必備。

一次抗體有時可以買到商品，但通常都極為昂貴；較不常見的抗原，則必須自行製備抗體，那就要先準備好純質抗原。抗原與佐劑 (adjuvant) 混合成乳劑後，進行動物免疫，通常使用大白兔或小白鼠。每兩週免疫一次，如此進行追加免疫約四到六次，試採血檢測血清效價，若血清稀釋 1,000 到 10,000 倍，仍然可在轉印膜上染出抗原的色帶，則免疫可謂成功，即可進行採血，製得抗血清，其中即含有所要的專一性抗體。

專一性抗體會像『巡弋飛彈』一樣，自動去找出抗原色帶，並且與此色帶緊密結合，然後再利用 二次抗體 (即第一次所用抗體的抗體，可以買到) 與上述抗體結合。圖 S2-2 說明此一設計，抗體上面標有 2 者即為二次抗體，後面連結著標誌酵素 (E)；標誌酵素多使用上述的磷酸酶或者過氧化氫酶，兩者在加入基質後，都可生成具有強烈呈色的沈澱。

使用二次抗體與酵素的連結體，雖然增多一次操作動作，但也提升了整個反應的專一性，因為多加一次專一性篩選步驟，而且自由的一次抗體效價較高。同時也較方便，因為各種一次抗體都可直接使用，然後用二次抗體與酵素連結體即可，不須各種一次抗體都得去做酵素標誌。

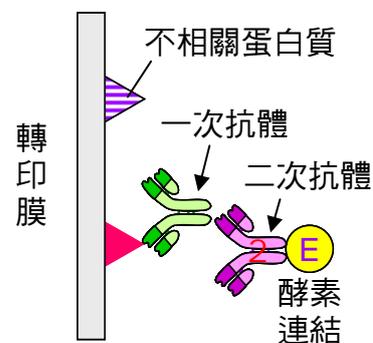


圖 S2-2 免疫染色的設計

2.1.3 實驗大綱

本實驗分成三個部份：(1) SDS-PAGE 膠體電泳、(2) 蛋白質轉印、(3) 免疫染色。樣本為前面實驗的 trypsin 及胰臟抽取液，並使用 CHOM 為負對照組，然後以抗 trypsin 的抗體為探針，進行專一性的偵測。

S2 免疫轉印法

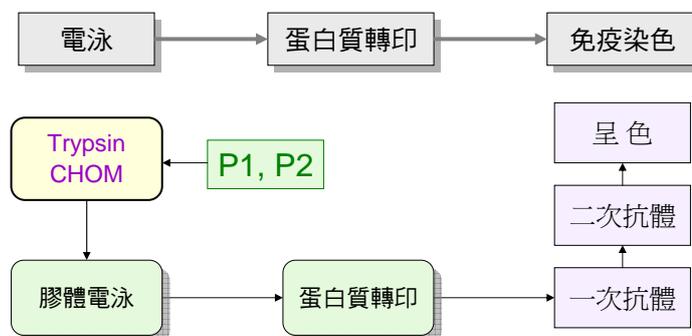


圖 S2-3 蛋白質轉印及免疫染色操作流程

2.2 膠體電泳

兩組鑄造兩片平板 SDS 電泳膠片，分別進行各組 trypsin 樣本的分析，接著並進行蛋白質轉印，則請依照下節 2.3 實驗步驟操作。

2.2.1 儀器用具

- 鑄膠套件 (含電泳玻片及氧化鋁片)。
- 間隔條 (spacer, 0.75 mm) 及樣本梳 (comb, 10 well)。
- 垂直迷你電泳槽 (Hoefer SE-250 平板式垂直電泳槽)。
- 電源供應器 (Pharmacia Biotech EPS 200)。
- 微量針管 (Hamilton 80465) 或電泳樣本專用吸管頭。
- 染色脫色方盒。

2.2.2 藥品試劑

所用藥品與原態電泳類似，但是多了 (e) SDS 及 (f) 樣本溶液，整個系統都要加入 SDS；同時有標準分子量的蛋白質 (k)，可供比對樣本的分子量。

- a) A 液 (T 30%, C 2.6%)：**注意！本溶液有毒性！**

丙烯醯胺溶液 acrylamide	14.6 g
Bis (<i>N,N'</i> -methylene-bis-acrylamide)	0.4 g

加水至 50 mL，若難溶則稍微加熱助溶之，儲存於 4°C。

- b) B 液 (分離膠體緩衝液)：

Tris	18.2 g
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-ethylenediamine)	0.36 mL

用 60 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 8.8 後加水至 100 mL，儲存於 4°C。

- c) C 液 (聚焦膠體緩衝液)：

Tris	0.6 g
TEMED	40 μ L

用 8 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 6.8 後加水至 10 mL，儲存於 4°C。

- d) 通用電泳緩衝液 (5 \times)：

Tris	90 mM \times 5	54.5 g
EDTA \cdot 2Na	2.5 mM \times 5	4.7 g
Boric acid	80 mM \times 5	24.8 g

加水 800 mL 溶解，以 NaOH 調 pH 至 8.4 後，加水至 1000 mL，室溫保存。使用前要以蒸餾水稀釋五倍，並且加 SDS 成為 0.1%。

- e) APS 溶液 (ammonium persulfate, 10%)：

取 0.1 g 溶於 1 mL 水，要確實溶解完全；使用前新鮮配置，過夜者不再用。

f) 10% SDS 水溶液。

g) 異丙醇。

h) SDS 樣本溶液 (2×)：

Tris (250 mM)	0.3 g
EDTA·2Na (4 mM)	14.9 mg
SDS (4%)	0.4 g
β-Mercaptoethanol (10%)	1 mL

加二次水 8 mL 溶解，調 pH 至 6.8 之後，再加水至 10 mL。

i) 追蹤染料：Bromophenol Blue (BPB) 1 mg 加 5 mL 水及 5 mL 甘油。

j) CBR 染色液：Coomassie Brilliant Blue R-250 1.5 g 加 250 mL 水後再加 250 mL 甲醇及 50 mL 醋酸，過濾去掉不溶物，置於排煙櫃中公用。要回收。

k) 脫色液：甲醇 (20%) 及醋酸 (10%) 的水溶液，置於排煙櫃中公用。

l) 標準蛋白質組合：

預先染色之低分子量標準 (Novex SeeBlue Pre-stained Standard)

Protein	Molecular mass (D)
Myosin	250,000
Bovine serum albumin	98,000
Glutamate dehydrogenase	64,000
Alcohol dehydrogenase	50,000
Carbonic anhydrase	36,000
Myoglobin	30,000
Lysozyme	16,000
Aprotinin	6,000
Insulin B chain	4,000

2.2.3 鑄膠 (SDS-PAGE)

表 S2-1 各種膠體溶液的濃度 (單位 mL)

分離膠體	7.5%	10.0%	12.5%	15.0%	聚焦膠體	4%
A 液	2.5	3.4	4.2	5.0	A 液	0.7
B 液	2.5	2.5	2.5	2.5	C 液	1.3
水	4.8	3.9	3.1	2.3	水	2.8
10% SDS	0.1	0.1	0.1	0.1	10% SDS	0.1
APS	0.1	0.1	0.1	0.1	APS	0.1
Total	10.0	10.0	10.0	10.0	Total	5.0

分離膠體每支約需 2~3 mL，故一組配製 10 mL 即可。

- 1) 將電泳玻片及氧化鋁片清洗淨後擦乾，再以玻璃清潔劑擦拭乾淨，選擇所需厚度間隔條 (spacer) 組裝於鑄膠套件，本課程由助教事先準備架好。
- 2) 依照表 S2-1 所列的各溶液比例，選擇所需的分離膠體濃度，本次實驗使用 12.5% 膠體。配置膠體溶液時，其中 APS 溶液必須最後加入，小心混合均勻，以避免氣泡產生，然後以微量吸管小心注入鑄膠套件。
- 3) 膠體約佔玻片的 2/3 至 3/4 高度，加完後儘快在膠體液面上方小心加入 100 μ L 異丙醇，以壓平膠體液面。
- 4) 約 30 min 至 1 h 後 (天冷須更久)，凝膠完成，倒出上層的異丙醇。
- 5) 配製焦集膠體溶液，先準備好所需之樣本梳 (comb)，加入溶液後立刻插入，整個過程必須在 5 min 完成，約 30 min 可完成凝膠。
- 6) 拆下膠片並清理，將多餘的凝膠去除，鑄好的膠片可置封口袋中於 4°C 保存，但要加入少量蒸餾水防止膠片乾裂，使用期限約兩週。一組使用一片。

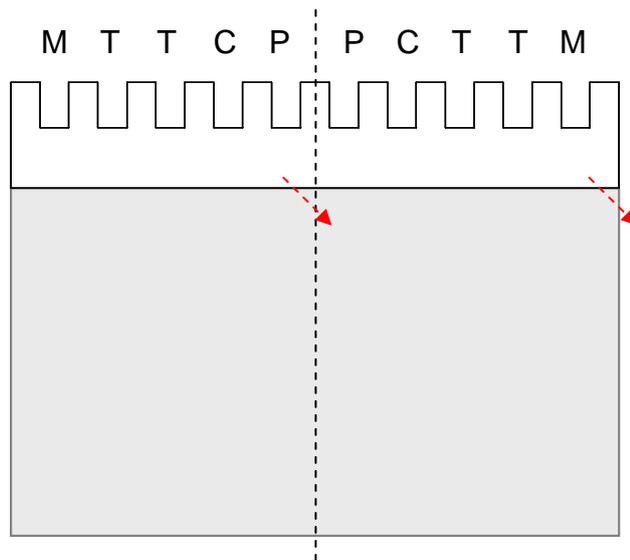


圖 S2-4 添加樣本的配置方式

T 為 trypsin (可能有不同動物來源的樣本)，C 為 CHOM，P 為胰臟抽取液，M 為標準蛋白質。跑完電泳後由中央切開，右上角各切角做記號 (箭頭虛線)；一半進行 CBR 染色，另一半則馬上進行轉印，請接續 2.3 免疫轉印法。

2.2.4 電泳

- 1) 若膠片是在 4°C 中保存，須先取出回復室溫。同時將稀釋成一倍的 SDS 通用電泳緩衝液，倒入電泳槽底部。然後把膠片以 45 度架到電泳槽上，避免附著氣泡；當電泳夾夾妥後，在電泳玻片組合的上方槽內，加入 SDS 電泳緩衝液。

- ◆ 膠片一定要等回復室溫後才能架到電泳槽，否則玻片會因熱漲而撐破。
- 2) 電泳前先以微量針管清洗各樣本槽，避免有凝膠不完全的殘餘物留在槽內。
- 3) 樣本處理：取 trypsin 樣本 20 μL ，因其中含甲酸溶液，先加入 2 μL 1 N NaOH 中和之，再加入 20 μL SDS 樣本溶液，及 20 μL 追蹤染料 BPB 均勻混合，在沸水浴煮沸 10 min 後放冷。CHOM 取 20 μL 如法處理，但不須中和。請在鑄膠的空檔時，處理好樣本。
- 4) 取適量的樣本 (約 10~15 μL)，依圖 S2-4 配置，以微量針管小心注入樣本槽，避免氣泡陷入。另外，也注入標準蛋白質 (M) 5 μL ，作為分子量之參考。
- 5) 蓋上電泳槽的蓋子，確認正負電極裝置正確 (由負極往正極跑)，連接上電源供應器，定電壓以 100~150 V 進行電泳。
- 6) 在電泳過程中，特別觀察標準蛋白質中各個色帶的泳動情形。
- 6) 待追蹤染料跑出膠片後，關掉電源，取出膠片，並將膠體平均切成兩半，各以解剖刀截去右上角做記號
- 7) 一半進行蛋白質染色，另一半馬上浸入轉印緩衝液平衡 20~30 min，繼續進行轉印，參考下節 2.3 步驟。

2.2.4 染色及脫色

- 1) 將電泳膠片浸入 CBR 染色液中，染色液用量只要覆蓋過膠片即可，一定要蓋上蓋子，置於平台震盪器上搖盪 30 min。
- 2) 倒出染色液，用自來水沖洗後加入脫色液，脫色液也一樣蓋過膠片即可；約 10 min 可換新脫色液，一直重複到背景呈現透明為止。
- 3) 若蛋白質濃度較低，染色時間可加長 (1 h) 以增加色帶深度。
- 4) 脫色完成的膠片，可以用玻璃紙三明治乾燥之，經護貝後可永久保存。

2.3 蛋白質轉印

首先以迷你平板膠體電泳對樣本蛋白質進行分離，然後轉印到尼龍膜上去。

2.3.1 儀器設備

- a) 平板迷你電泳槽 (Hoefer, Mighty Small SE-250) 及所有附件。
- b) 電泳轉印槽 (Hoefer, TE-22) 及海綿、卡夾各兩片。
- c) 電源供應器 (可達 500 mA)。
- d) 震盪器及塑膠染色方皿。

2.3.2 藥品試劑

- a) SDS-PAGE 膠體，由電泳實驗所得之一半 SDS-PAGE 膠片。
- b) 轉印膜 (Millipore Immobilon, PVDF)、甲醇少許。
- c) 濾紙 (Whatman 3 mm) 兩張。
- d) 轉印緩衝液 (blotting buffer, 10×)：

Tris	30.3 g
Glycine	144 g

加水至 800 mL，pH 調至 8.3 後，加水至 1,000 mL。SDS-PAGE 轉印時，轉印緩衝液中須加有 10% (v/v) 甲醇。

- e) PBST (PBS 加 0.05% Tween)

- f) Urea-PBST：

Urea (6 M)	36 g
------------	------

加入 PBST 加熱溶解後，以 PBST 添加至 100 mL。

2.3.3 實驗步驟：

蛋白質轉印

- 1) SDS-PAGE 電泳膠片接續 2.2 節電泳，其中一半進行 CBR 染色，另一半則保留在本實驗作為轉印之用，電泳後切半馬上浸入轉印緩衝液平衡 15 min。
- 2) 轉印膜 PVDF 要裁得比膠片稍大，因膠片平衡後體積會略膨漲。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，再把整個三明治卡夾裝好。可參考圖 S2-1 的組合。
- 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。儘量除去附在卡夾外面的氣泡，氣泡的存在將使轉印效率變差。
- 5) 於 4°C 中以 400 mA 進行轉印，轉印槽內要加以攪拌，以免溫度過高或不均，轉印 60 min 後中止。
- 6) 取出轉印膜，浸在尿素 (urea-PBST) 中過夜，次日換成 PBST，等到次週繼續免疫染色；尿素可洗去蛋白質分子上的 SDS，同時可將一部份蛋白質分子恢復成原態，以增加抗體的確認機率。
- 7) 在電泳樣本中若含有 pre-stained 標準蛋白質，則可作為轉印效率之參考。

2.4 免疫染色

轉印膜上的蛋白質繼續用抗體偵測，首先用一次抗體去結合抗原色帶，再加入二次抗體與酵素的結合體，最後抗原色帶將會被標上酵素，以酵素反應呈色之。

2.4.1 儀器設備

- a) 平台震盪器。

2.4.2 藥品試劑

- a) 明膠-NET：

Gelatin	0.25%	2.5 g
NaCl	0.15 M	8.75 g
EDTA·2Na	5 mM	1.8 g
Tween 20	0.05%	0.5 mL
Tris	50 mM	6.05 g

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

- b) 一次抗體：(小白鼠抗豬的 trypsin 抗體)

通常要免疫大白兔或小白鼠以製備一次抗體，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。

- c) 二次抗體-HRP 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 (horse radish peroxidase, HRP) 或標誌物 (如螢光物或 biotin)；其使用濃度請依照廠商建議，也稀釋在明膠-NET 中。

- d) HRP 呈色劑 DAB：

Diaminobenzidine (DAB)	5 mg
H ₂ O ₂ 30%	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。

- e) HRP 螢光呈色劑：SuperSignal West Pico Substrate (Pierce)

Luminol solution (含 enhancer)	0.5 mL
Peroxide solution	0.5 mL

上面兩種溶液以 1:1 混合後立刻使用，一整張轉印紙約需 1 mL。

2.4.3 實驗步驟：

- 1) 尿素洗過的轉印紙再以 15 mL PBST 洗兩次，每次 5 min。
- 2) 加入 15 mL 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 15 mL PBST 洗 3 次，每次約 10 min。
- 4) 加入 15 mL 二次抗體-HRP 連結體，室溫下反應 1 h。
- 5) 以 15 mL PBST 洗 3 次，每次約 10 min。
- 6) 倒入 HRP 呈色劑 DAB 15 mL，褐色色帶應很快出現。
- 7) 呈色約在 1~5 min 內完成，應當在背景開始加深前中止呈色。
- 8) 倒去呈色液，並以蒸餾水清洗數次，取出晾乾後避光保存。

◆ 若使用螢光染色劑，則上面 6) 改加入 1 mL SuperSignal 呈色劑，並在螢光掃描儀中顯像至清晰色帶出現，弱一點的色帶，可能要呈色 10 min 以上。

2.5 結果與報告

- a) 請以掃描或拍照記錄免疫染色結果，注意有幾條色帶呈現。
- b) 免疫染色圖譜請與 CBR 染色結果詳細比對。
- c) 由結果可推論所用抗體的專一性如何。

2.6 參考文獻

- 莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 155, 205, 217
- Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.180-182
- Roitt I, Brostoff J, Male D (2001) Immunology (6th ed) Chap. 4, 27

S3 酵素動力學

莊榮輝

酵素動力學 是以各種濃度的基質，添加固定量酵素進行催化，然後檢定所得到的生成物多寡，即可測定在各種不同基質濃度下，酵素的表現情形。酵素抑制劑會阻礙酵素的表現，也可由酵素動力學的行為觀察之。

3.1 背景知識

酵素與其基質之間，具有專一性的結合與催化關係，這種行為可以用動力學的方法描述之，求得此酵素的最高催化速率，以及酵素與基質間的親和力。

3.1.1 Michaelis-Menten 動力學公式

酵素轉化酶 invertase 很早就被發現，可以把蔗糖水解成葡萄糖及果糖，由於反應前後這幾種糖類的旋光度有很大改變，好像把旋光度整個轉化過去，因此稱為轉化酶。

Michaelis及Menten利用轉化酶為工具，添加不同濃度的蔗糖進行酵素的催化反應，然後觀察所產生單糖的速率如何。他們發現，當基質的量越高，轉化酶催化反應的速率就越高，最後到達飽和最高速率；他們並且把這個關係，以數學公式寫出來，稱為Michaelis-Menten公式，並由作圖推出一個常數 K_m (Michaelis-Menten常數)，可指示酵素與基質之間親和力的大小；同時，也可推得此酵素的最高催化速率 V_{max} 。請複習生物化學課程中的相關文字，試著自行寫出Michaelis-Menten公式並解釋其意義。

3.1.2 酵素抑制劑

酵素有其專一性抑制劑，其分子構形大多類似酵素的基質，酵素可以與之結合，但是無法完成正常的催化反應。

3.1.3 實驗大綱

本實驗分成幾個部份：(1) 決定最適當的酵素濃度、(2) 傳統的酵素動力學操作、(3) 決定最適當的抑制劑濃度、(4) 添加抑制劑的酵素抑制動力學。

S3 酵素動力學

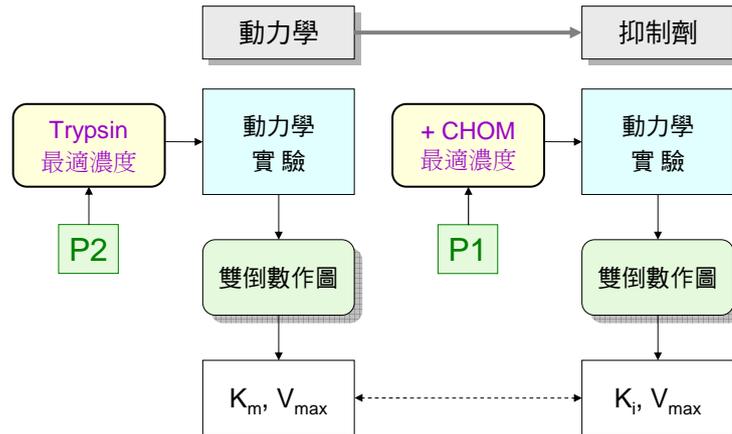


圖 S2-1 蛋白質轉印及免疫染色流程

3.2 酵素動力學

要先決定一個適當的酵素濃度，能夠產生足量的生成物以供測量，但又不會催化過度；然後固定使用此酵素濃度，加入各種不同量的基質，就可做出動力學曲線。

3.2.1 儀器設備

- a) ELISA 光度計。
- b) 微量滴定盤 (96-well microtiter plate)。

3.2.2 藥品試劑

- a) Trypsin (由實驗 P2 所製備者，或者由助教提供)。
- b) Tris 緩衝液 (0.05 M, pH 8.2, 含 20 mM CaCl₂)。
- c) BAPNA 合成基質液：可被 trypsin 水解而呈黃色。

配製法：取 BAPA 43.5 mg 加入 1 mL DMSO 懸濁均勻，等約 1 h 完全溶解，慢慢滴入 100 mL Tris 緩衝液同時快速攪拌，讓兩者混合均勻。

3.2.3 實驗步驟：

決定最適酵素濃度

- 1) 取出你所製備的 trypsin，以 Tris 緩衝液做一系列稀釋 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ...)；請加一空白組，直接以 Tris 緩衝液為樣本。
- 2) 在微量滴定盤上，每個濃度取樣 50 μL ，加入 200 μL BAPNA液，混合後反應 10 min，漸漸出現黃色，以ELISA光度計測吸光值 (A_{405})。
- 3) 取一酵素濃度，其 ELISA 吸光值最高，但又不超過 1 以上者，作為下面酵素動力學所指定的酵素濃度。

酵素動力學

- 4) 取 BAPNA 基質液，以 Tris 緩衝液作一系列稀釋 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ...)。
- 5) 在微量滴定盤上，取上面指定濃度的酵素 50 μL ，加入BAPNA不同濃度稀釋液各 200 μL ，混合後反應 10 min，同法以ELISA光度計測吸光值 (A_{405})。

3.3 酵素抑制動力學

在反應中加入抑制劑，會改變酵素的動力學行為。同樣地，先決定一個最適的抑制劑濃度，可以抑制 50% 酵素活性，然後以此濃度進行抑制劑的動力學實驗。

3.3.1 儀器設備

同上一小節。

3.3.2 藥品試劑

- a) CHOM (由實驗 P1 所製備者)。
- b) 同上一小節。

3.3.3 實驗步驟：

決定最適 CHOM 濃度

- 1) 取出你所製備的 CHOM，以 Tris 緩衝液做一系列稀釋 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ...)；請加一空白組，直接以 Tris 緩衝液為樣本。
- 2) 在微量滴定盤上，上述 CHOM 每個濃度取樣 10 μL ，加入 40 μL 指定濃度的 trypsin 溶液，混合均勻後，在室溫中靜置 10 min。
- 3) 加入 200 μL BAPNA液，混合後反應 10 min，漸漸出現黃色，以ELISA光度計測吸光值 (A_{405})。
- 4) 取一 CHOM 濃度，其 ELISA 吸光值最約為空白組吸光值的一半，作為下面酵素抑制動力學所指定的 CHOM 濃度。

酵素抑制動力學

- 5) 取 BAPNA 基質液，以 Tris 緩衝液作一系列稀釋 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ...)。
- 6) 在微量滴定盤上，取上面指定濃度酵素 40 μL ，指定濃度 CHOM 10 μL ，混合均勻後在室溫靜置 10 min。
- 7) 同樣製作不加 CHOM 的反應，CHOM 以 Tris 緩衝液取代，如法操作。
- 8) 加入 BAPNA 不同濃度稀釋液各 200 μL ，混合後反應 10 min，同法以 ELISA 光度計測吸光值 (A_{405})。

3.4 結果與報告

3.4.1 酵素動力學

- a) 由動力學實驗得到一組數據，以基質濃度的改變為 x 軸，以所測得的吸光值為 y 軸直接作圖，應可得到一條動力學曲線。
- b) 一樣的數據，改以基質濃度的倒數為 x 軸，而以吸光值的倒數為 y 軸，得到雙倒數作圖，應該可得到一條直線。
- c) 由雙倒數直線，應該可推得 trypsin 的 K_m 及 V_{max} ，請注意兩者的單位為何。

3.4.2 酵素抑制動力學

- a) 由所得到的數據，同樣做出直接作圖，以及雙倒數作圖，但各有兩條線，其依為酵素的動力學曲線，另一為抑制劑的抑制曲線。
- b) 比較兩條雙倒數動力學曲線，並推得其 K_m 及 V_{max} 。

3.5 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 76~81

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.202-213

Essential Bioinformatics for Biochemists

We are going to explore the bioinformatics resources that are available through WWW. If you are a full time student/scientist, you can access a well-organized package of GCG, which you need an account from the central facility, e.g. NHRI. The following sites are the major bioinformatic sites which can be good starting points. Please spend some time to get familiar with the tools inside these major sites.

1. European Bioinformatics Institute <http://www.ebi.ac.uk/>

A key site in Europe, near Cambridge UK. Databases, analysis tools and sequence submission.

2. ExPASy Swiss Bioinformatics Institute: <http://www.expasy.ch/> or <http://expasy.nhri.org.tw/>

SWISS-PROT, PROSITE, 2D-PAGE, Proteomics Tools etc. Key site for protein sequence/structure researchers

3. NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

US equivalent of EBI. Home of Genbank, PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>), Entrez etc

Among the various bioinformatics providers, you will be able to find tools to analyze a protein in terms of primary structure, secondary structure and tertiary structure.

1. Primary structure of protein

You can identify a protein from its N-terminal sequence information derived from your experiments. Using FASTA or BLAST, its neighbor can be found from the database. Most of such jobs can be done in the database of SwissProt. If it is an enzyme, it's good to explore the ENZYME (<http://expasy.nhri.org.tw/enzyme/>)

2. Secondary structure

Most of the secondary structure prediction methods rely on multiple sequence alignment of homologous proteins, e.g. PhD program

(<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>)

3. Tertiary structure

For those proteins that their 3D structures are available, you can view and analyze the structural detail by display software like RasMol

(<http://www.bernstein-plus-sons.com/software/rasmol/> or

<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>). Another good molecular graphic software

that can run on a PC is Swiss-Pdb viewer (<http://expasy.nhri.org.tw/spdbv/>). The principal three-dimensional structure database is PDB (protein data bank, can be

accessed through its Taiwan mirror <http://pdb.life.nthu.edu.tw/>). An excellent

structure classification can be found in SCOP (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>)

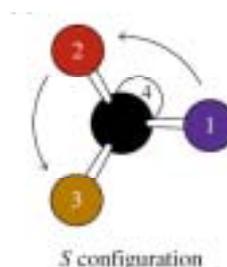
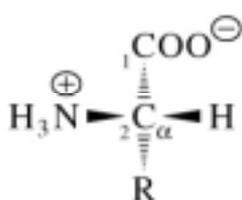
台大生化科技學系 生化實驗
分子模型建構
楊健志

In this practical, you will learn how to build a peptide model starting from atoms and amino acids. One of the most important issues in biochemistry is the structure-function relationship of proteins. The protein structures are determined experimentally by x-ray crystallography and/or NMR. For those proteins homologous to other structure-determined proteins with over 30% similarity, homology modeling can generally give pretty good model. Protein 3D structures are described by their coordinates". Molecular graphic tools help you to visualize protein structures in computer. SwissPDB Viewer is good software for molecular graphic. To fully appreciate the beauty of protein structure, you need to be able to describe each detail structure of proteins using the terms of cis and trans of peptide bond, dihedral angles of phi (ϕ) and psi (ψ), α -helix and β -sheet.

Step 1

With the alpha carbon and other atoms, build a trans peptide bond followed by making the alpha carbon to L-form. We call this a basic unit. (Please note that the basic unit is not quite an amino acid)

Hint:



RS system:

Assign a priority to each group attached to a chiral carbon based upon atomic mass priority (1 highest, 4 lowest)

- If two atoms are identical, move to the next atoms
- For double or triple bonds, count atom once for each bond (-CHO higher priority than -CH₂OH)
- Priorities (low to high): -H, -CH₃, -C₆H₅, -CH₂OH, -CHO, -COOH, -NH₂, -NHR,

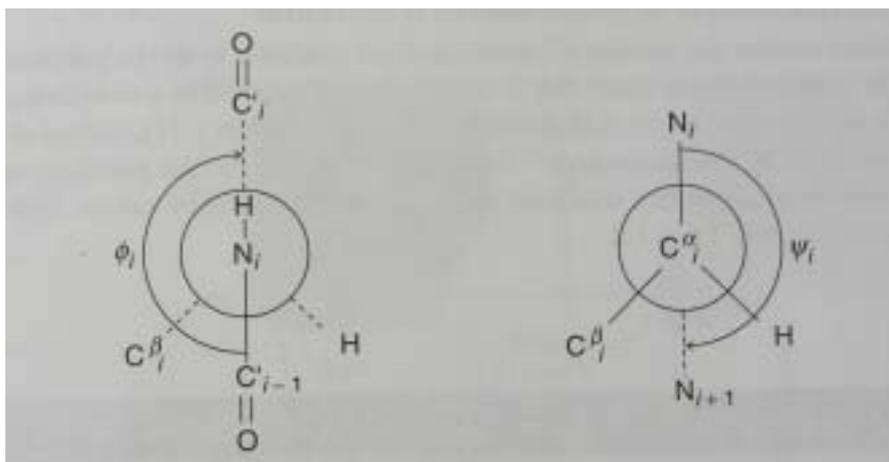
-OH, -OR, -SH

Step 2

With three L-form basic units, connect them to build a dipeptide followed by a tripeptide. Make the tripeptide to the fully extended form. It should present as $\phi = \psi = 180^\circ$

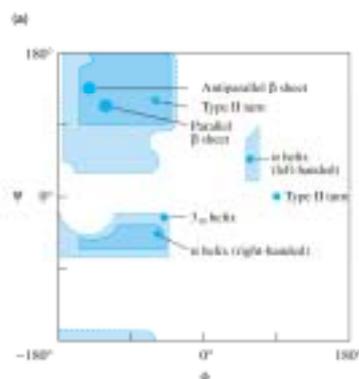
Step 3

Learn how to tell the dihedral angles.



Step 4

Make phi and psi angles for alpha helix



Step 5

Connect your tripeptide with that of your partner. Try to make the intra-chain hydrogen bond. (c=O group of residue i make H-bond with NH of residue i+4)

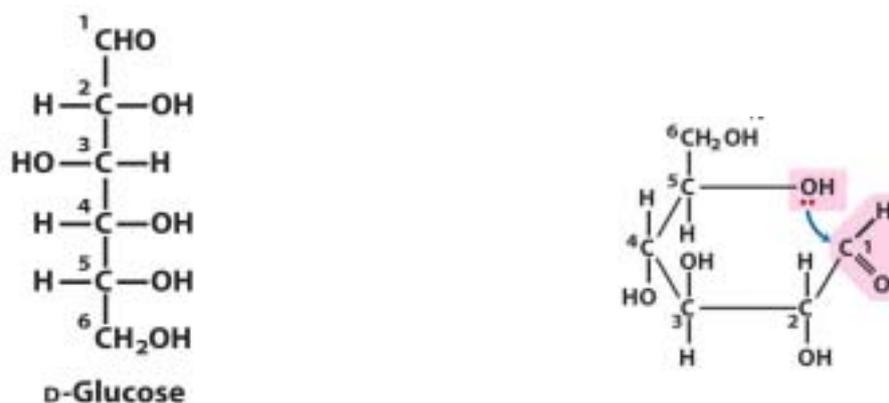
Step 6

Collect your tripeptide, now make a beta sheet.

台大生化科技學系 生化實驗
 分子模型建構—碳水化合物
 楊健志

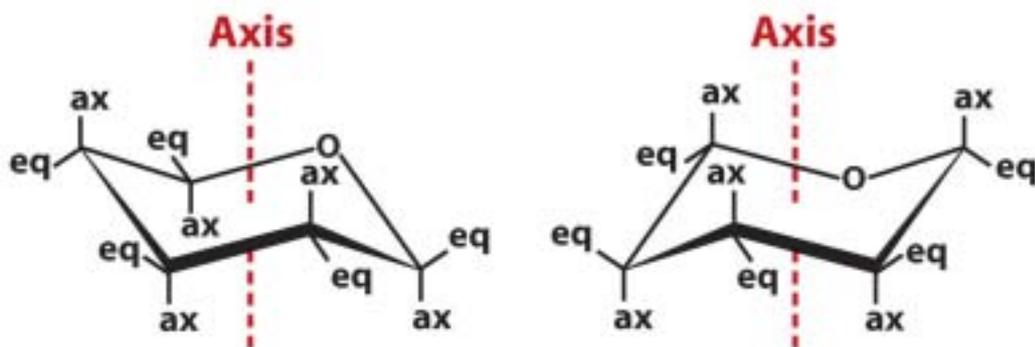
In this practical, you will learn how to build models for carbohydrate starting from monosaccharide. We will employ the plastic model available from HGS/Maruzen, Japan. **Please check the quantity for all parts are correct as listed in the box.** 請助教協助清點，離開前需由助教確認數量無誤始可離開。

Step 1. Build a glucose based on the Fischer projection shown below (P. 241, Lehninger)



Step 2. You will find that it is quite close to a ring structure. Link the C1 and C5 to form the cyclic form as above right.

Step 3. Two possible chair forms, 4C_1 or 1C_4 , exist for the pyranose. Which one is more stable? Pay attention to the positions of substituents, hydroxyl group.



Step 4 Two possible anomers are present. Try to convert between α -form and β -form.

Step 5. Make a maltose by α -1,4 linkage.

Step 6. Together with maltose made by your partner(s), make a maltotetraose, and maltohexaose. Observe the overall structure.



Step 7. Make a α -cyclodextrin. Borrow a glucose from other group, and make a β -cyclodextrin.

Step 8. Dissect the cyclodextrin to glucose units. Connect them by β -1,4 linkages. Observe the overall structure.

Step 9. Make GlcNAc and GalNAc.

台大生化科技學系 生化實驗
碳水化合物

楊健志

Part I. Oligosaccharide Analysis by Thin Layer Chromotography

β -Amylase (BA) (α -1,4-glucan maltohydrolase; EC. 3.2.1.2) catalyzes the removal of β -maltose residues sequentially from the non-reducing end of an α -1,4-glucan of variable chain length.

β -Amylase is unique among other glycohydrolases that its catalysis proceeds with a repetitive manner, or multiple-attack mechanism. With this feature, β -amylase releases maltose effectively without dissociation from the rest of starch chain. This mechanism can be demonstrated when oligosaccharides are used as substrates. For example, when a maltose is removed from maltoheptaose, the maltopentaose still bound to the active site will be the substrate rather than a free maltoheptaose. Therefore, free maltopentaose will not be seen in the reaction mixture. If β -amylase works according to a multiple-chain mechanism, then free maltopentaose will be seen in the reaction system. We can trace the presence of maltopentaose by TLC.

To monitor the oligosaccharide released from multiple attack of β -amylase, a TLC method derived from Miyake et al was employed (Miyake et al., 2002).

Materials

Maltoheptaose (G7)

TLC plate (Merck, Silica gel 60, 20*20 cm)

β -amylase (Sigma)

Development solution (H₂SO₄ (2%):ethanol =50:50)

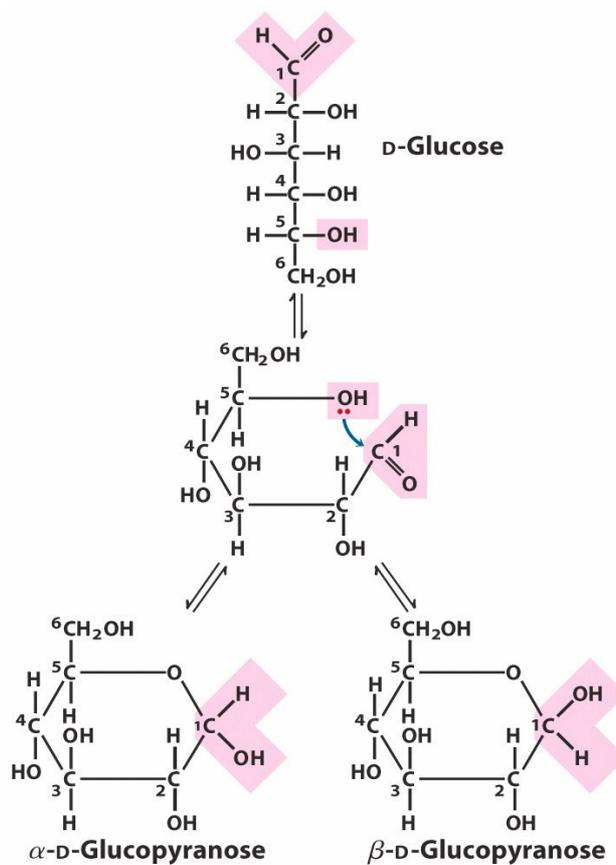
Procedures

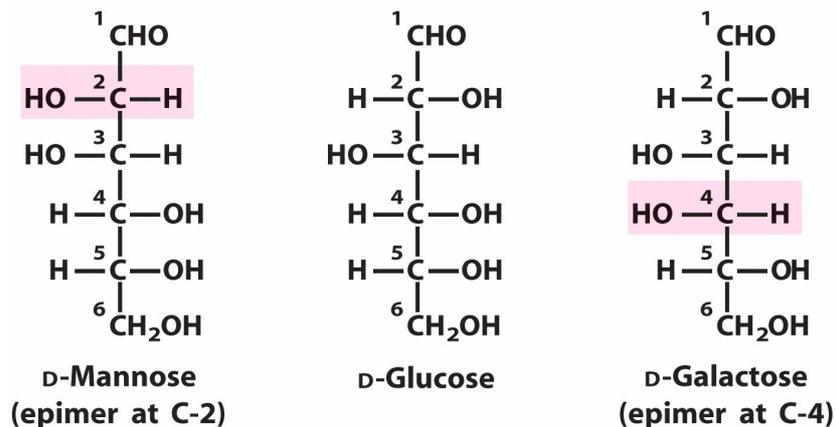
A 10 μ l mixture containing 1 μ l of maltoheptaose, 1 μ l enzyme and 8 μ l sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.4) was incubated at 37 °C for appropriate time (5, 10, 20, 30, 60 seconds, respectively). The reaction mixture (1 μ l) was then spotted on a TLC plate and developed by a solution of isopropanol:butanol:H₂O = 15:3.75:5. The spots was visualized by spraying a solution of H₂SO₄ (2%):ethanol =50:50 and followed by heating at 180 °C for a few minutes.

Part II. Carbohydrate Model Building

In this practical, you will learn how to build models for carbohydrate starting from monosaccharide. We will employ the plastic model available from HGS/Maruzen, Japan. **Please check the quantity for all parts are correct as listed in the box.** 請助教協助清點，離開前需由助教確認數量無誤始可離開。

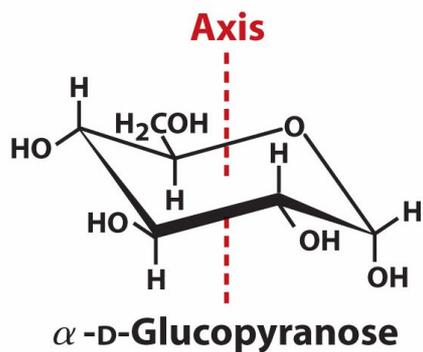
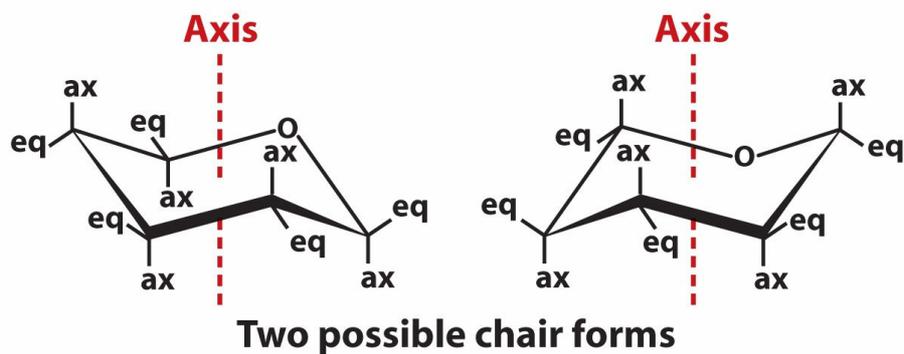
Step 1. Build a glucose based on the Fischer projection shown below (P. 241, Lehninger)





Step 2. You will find that it is quite close to a ring structure. Link the C1 and C5 to form the cyclic form as above right.

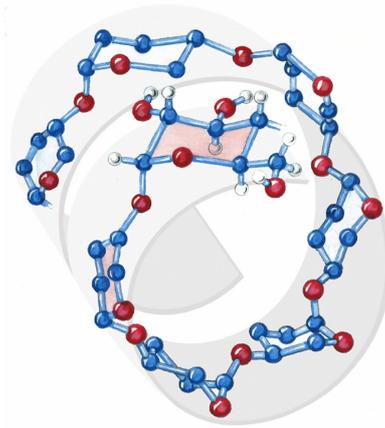
Step 3. Two possible chair forms, ${}^4\text{C}_1$ or ${}^1\text{C}_4$, exist for the pyranose. Which one is more stable? Pay attention to the positions of substituents, hydroxyl group.



Step 4 Two possible anomers are present. Try to convert between α -form and β -form.

Step 5. Make a maltose by α -1,4 linkage.

Step 6. Together with maltose made by your partner(s), make a maltotetraose, and maltohexaose. Observe the overall structure.



Step 7. Make a α -cyclodextrin. Borrow a glucose from other group, and make a β -cyclodextrin.

Step 8. Dissect the cyclodextrin to glucose units. Connect them by β -1,4 linkages. Observe the overall structure.

Step 9. Make GlcNAc and GalNAc.

N1 染色體 DNA 分離與檢定

王愛玉

DNA 是由核苷酸 (nucleotide) 聚合而成的生物巨分子，為細胞中重要的遺傳物質。本實驗是以大腸桿菌為材料，學習染色體 DNA 的抽取，繼而進行瓊脂糖膠體電泳檢定 DNA 的完整性，並以測定 UV 吸光值來定量及檢定純度。得到的 DNA 將用在 N2 中，以 polymerase chain reaction 來選殖 *lacZ* 基因片段。

1.1 背景知識

本實驗將展示：(1) 細菌染色體 DNA 的分離與純化、(2) 核酸定量法、以及 (3) 瓊脂糖膠體電泳法，這些都是在核酸操作上常用的技術，學習得這些方法及原理後，未來可應用在不同材料核酸的抽取與檢定上。

1.1.1 細菌染色體 DNA 的分離與純化

本實驗所用的方法是修改自 Marmur (1961) 所提出之方法，包括下列步驟：

- a) 破菌：以含有 lysozyme、EDTA 及 RNase 的溶液處理菌體。lysozyme 可水解細菌細胞壁中 peptidoglycan 的糖苷鍵，使得菌體無法承受滲透壓逆境而破裂；EDTA 可抑制 DNases 的活性，防止 DNA 受到 DNases 的作用；RNase 則可水解細胞中的 RNA。接著再加入 SDS 將細胞膜徹底瓦解，並使 DNases 及其它蛋白質發生變性。
- b) 去除蛋白質：加入高濃度的鹽，使結合於 DNA 上的蛋白質完全脫離 DNA，再依序以酚/氯仿/異戊醇 (phenol/chloroform/isoamyl alcohol) 及氯仿/異戊醇各萃取一次，離心後，溶液可被分離成有機液層及含有 DNA 之水溶液層，中間界面則聚集了被酚及氯仿變性的蛋白質。
- c) 分離沈澱 DNA：去除蛋白質後之 DNA 溶液，加入酒精使 DNA 沈澱，離心後之沈澱即為純化之 DNA。

1.1.2 DNA 定量法

DNA 定量的方法有很多，也各有優缺點，以下為常用的方法：

- a) 測定 260 nm 之吸光值：核酸中的鹼基可以吸收紫外光，使得 DNA 及 RNA 在 260 nm 具最大吸光值。測定核酸溶液之 A_{260} ，利用 Beer-Lambert 定律，可以求得核酸之濃度。這個方法的優點是簡單快速而且對樣品不具破壞性，然而此法對 DNA 及 RNA 並不具區別性。此外，樣品溶液若含有其它會吸收紫外光

的物質則會造成干擾。核酸樣品中最常有的其它吸光物質為蛋白質，因此除了測定 A_{260} 外，需同時測定 A_{280} ，以估計核酸溶液的純度。純化的 DNA 及 RNA 之 A_{260}/A_{280} 比值應分別接近 1.8 及 2.0，當溶液中含有蛋白質時，會造成 A_{260}/A_{280} 比值降低，在此種狀況下，以此法估計 DNA 的量是不準確的。

- b) Hoechst 33258 定量法：Hoechst 33258 為 bis-benzimidazole 螢光染劑的一種，可結合於雙股 DNA 之 minor grooves 上。Hoechst 33258 與 DNA 結合後，對 365 nm 的光有最大之吸收值，而後在 458 nm 有最大螢光釋出量。由測定螢光值，與標準曲線比對後，可得知 DNA 之濃度。此法比測定 A_{260} 方法靈敏，並且對 DNA 具專一性。然而，Hoeschst 33258 與小於 1 kb 之 DNA 結合不佳，因此在使用上受到限制；此外，此染劑主要結合於 A-T rich 區域，因此 DNA 中 A-T 的含量也會影響測定的結果。加入 Hoechst 33258 的 DNA 溶液無法再回收使用。
- c) Ethidium bromide (EtBr) 定量法：EtBr 可嵌入 DNA 或 RNA 之雙股結構中，吸收紫外光後，可釋出螢光。可在樣品中加入一定量的 EtBr 後，測定樣品在 590 nm 螢光值，與標準曲線比對，由內差法求得 DNA 含量。然而比較常用的估計法並非直接測定螢光值，而是將未知濃度樣品 DNA 與數個已知量標準 DNA 分別與 EtBr 混合後，取等體積點在保鮮膜或 agarose 膠體上，或進行膠體電泳後，以 UV 燈照射並觀察比較各樣品之亮度，找出與未知濃度 DNA 樣品亮度相當之標準 DNA，此標準 DNA 之量即可視為未知濃度 DNA 樣品之估計量。此法常用於 DNA 少而無法測定吸光值或樣品中含有大量會吸收紫外光之物質時。

1.1.3 瓊脂糖膠體電泳法

電泳不僅是分析蛋白質的利器外，也是分離、檢定核酸的重要技術，藉由電泳的結果可以得知核酸的分子量、純度、結構、與蛋白質之交互作用等等。常用的系統有聚丙烯醯胺 (polyacrylamide) 膠體電泳與瓊脂糖 (agarose) 膠體電泳兩種，前者用於分離分子量較小之核酸（例如 500 bp 以下的 DNA）或用於核苷酸定序、gel mobility shift assay 等；後者則廣泛用於較大分子之核酸分離檢定。本實驗是以一般傳統的瓊脂糖膠體電泳來檢定抽取到的 DNA 是否有 RNA 未完全去除，以及抽取過程中是否造成 DNA 被水解或斷裂。事實上，要分離大於 50 kb 之 DNA 需要用到 pulsed field gel electrophoresis (PFGE) 才能達到分離的目的。

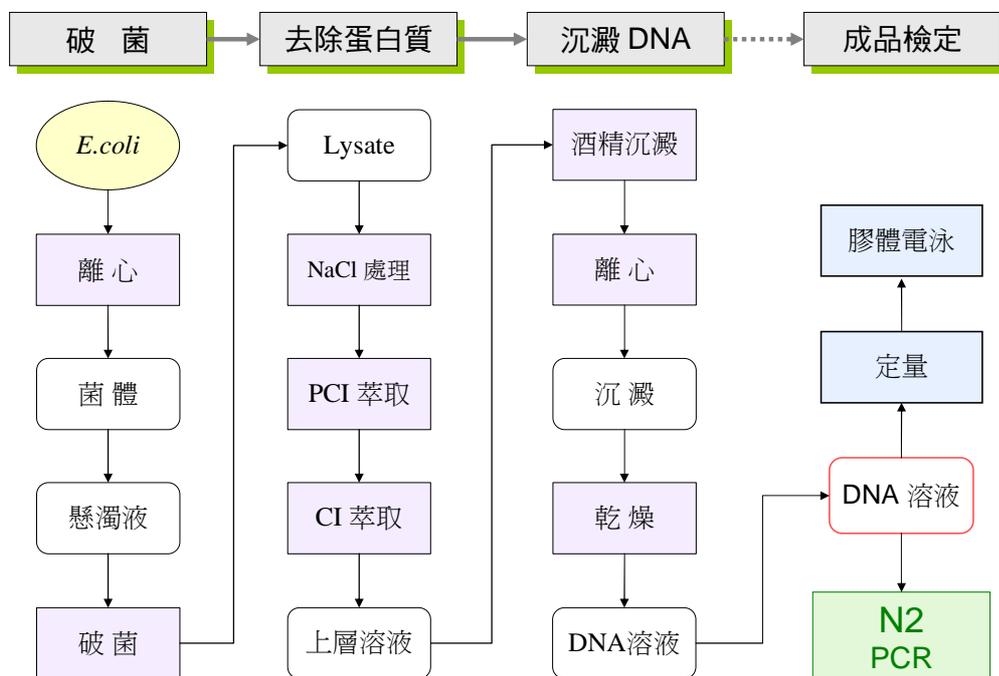
- a) 瓊脂糖：由海藻中分離的多醣，為洋菜 (agar) 中的成分之一，主鏈是由 agarobiose [D-galactose ($\beta 1 \rightarrow \alpha 4$) 3,6-anhydro-L-galactose] 聚合而成，側鏈則由 6-methyl-D-galactose 組成。瓊脂糖加熱溶解後，在水溶液中是以 random coil 的狀態存在，隨著溫度降低，兩條瓊脂糖聚醣鏈可互相形成雙股螺旋，雙股螺旋間又彼此結合形成具有孔洞的膠體結構。孔洞大小隨著 agarose 的濃度而

異，也影響了分子分離的程度，所以在進行電泳前需針對樣品中核酸的大小選擇適當的膠體濃度。

- b) 影響 DNA 在膠體中泳動的因素：DNA 在膠體中的泳動率會受到分子量及構形的影響。相同構形的 DNA，分子量越小，泳動越快；同一種 DNA 以不同構形存在時，不同構形的泳動率不同，例如，質體 DNA 之 supercoiled 形式會比 relaxed circular 形式泳動快。此外，膠體濃度、電泳緩衝液、電壓、是否存在 intercalating dye 等外在因素均會影響 DNA 的泳動率及分離情形。

1.1.4 實驗大綱

N1 染色體 DNA 分離與檢定



1.2 由大腸桿菌中分離純化染色體 DNA

1.2.1 儀器設備

- a) 微量離心機
 - ◆ 請先熟悉使用方法並注意平衡問題。
- b) 37°C 水浴鍋或培養箱
- c) 60°C 水浴鍋

1.2.2 藥品試劑：

- a) NaCl/EDTA 溶液：0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA (pH 8.0)
- b) Lysozyme：50 mg/mL，置冰浴上。
- c) RNase A: 10 mg/mL
- d) SDS 溶液：25%，溶於水中。
- e) NaCl：5 M，溶於水中。
- f) Phenol/CHCl₃/IAA 混合液：Phenol、chloroform 與 isoamyl alcohol 以體積比 25:24:1 混合，4°C 避光貯存，於通風櫥中取用。
 - ◆ 具灼傷性及毒性，請小心使用！
- g) CHCl₃/IAA 混合液：chloroform 與 isoamyl alcohol 以體積比 24:1 混合，4°C 避光貯存，於通風櫥中取用。
 - ◆ 具毒性，請小心使用！
- h) 絕對酒精（或 95% 酒精）及 70% 酒精
- i) TE-8.0：10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0。

1.2.3 操作步驟：

破菌：

- 1) 每組有兩管菌液（每管 1.5 mL），將菌液以 6000 rpm 離心 5 min。離心後，倒掉上清液，並以微量吸管吸去殘留液體，保留沈澱（菌體）部分。
- 2) 每管加入 0.25 mL NaCl/EDTA 溶液，將菌體充分懸濁後，加入 10 μL lysozyme 溶液及 20 μL RNaseA，小心混合均勻後，置於 37°C 水浴鍋或培養箱中反應 30 min。
- 3) 每管加入 20 μL 25% SDS 溶液，以試管尖小心攪拌混合均勻。將離心管蓋緊，置於 60°C 水浴鍋 10 min 後，移至裝有冷水之燒杯中，使之冷卻至室溫。

去除蛋白質：

- ◆ 步驟 4 及 5 請戴手套操作。
- 4) 每管加入 90 μL 5 M NaCl，小心混合均勻後，加入 0.4 mL Phenol/CHCl₃/IAA (PCI) 混合液。蓋緊管蓋，慢慢將離心管反覆上下搖晃 5 min。
 - ◆ 不可以劇烈震盪！
- 5) 以 10000 rpm 離心 10 min 後，小心將上層溶液吸至乾淨離心管中（注意不要吸到中間界面），再加入 0.4 mL CHCl₃/IAA (CI) 混合液，蓋緊管蓋，慢慢將離心管反覆上下搖晃 5 min，以 10000 rpm 離心 5 min。

沈澱 DNA：

- 6) 離心後，將上層溶液吸至乾淨離心管中，加入 0.8 mL 絕對酒精，小心混合

均勻，置室溫 10 min。

- 7) 以 10000 rpm 離心 10 min 後，吸去上清液，保留沈澱（沈澱即為 DNA）。每管加入 1 mL 70% 酒精，蓋緊管蓋，上下混合後，以 10000 rpm 離心 1 min。吸去上清液（小心別吸到 DNA 或把 DNA 倒掉了！），沈澱再以 70% 酒精重複清洗及離心三次。去除上清液後，將離心管置回離心機，離心 10 sec 後取出，以微量吸管儘可能吸去殘留液體。將管蓋打開，待沈澱表面乾燥後，蓋緊管蓋，標示好組別後交給助教貯存，下週請繼續步驟 8 之操作及 1.3 ~ 1.4 之實驗。
- 8) 每管加入 100 μ L TE-8.0，以吸管尖緩慢吸放溶液，使沈澱完全溶解。

1.3 定量 DNA

1.3.1 儀器設備：

- a) 分光光度計
- b) 石英測光管

1.3.2 藥品試劑：

- a) TE-8.0
- b) 1.2 純化之 DNA

1.3.3 操作步驟：

稀釋 DNA 溶液：

- 1) 緩慢吸取 20 μ L DNA 溶液至乾淨微量離心管中，加入 1 mL TE-8.0，充分混合均勻。

測定吸光值：

- 2) 光度計波長設定於 260 nm，以 TE-8.0 歸零後，測定 DNA 溶液之吸光值。
- 3) 光度計波長調整於 280 nm，以 TE-8.0 歸零後，測定 DNA 溶液之吸光值。

1.4 以瓊脂糖膠體電泳分析 DNA

1.4.1 儀器設備：

- a) 迷你電泳槽及鑄膠器 (Mupid II)
- b) UV transilluminator 及膠片影像分析系統
- c) 防護面罩

1.4.2 藥品試劑：

- a) 瓊脂糖粉末
- b) 1×TAE 電泳緩衝液：40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0。
- c) 10×追蹤染劑：0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 0.1 M EDTA, 50% glycerol
- d) Ethidium bromide (EtBr) stock solution：500 µg/mL，裝於滴瓶中，每 50 mL 膠體溶液加一滴（最終濃度為 0.5 µg/mL）
◆ EtBr 為突變劑，請小心！
- e) DNA 標準分子量：λ DNA/*Hind*III Fragments，包含 8 個片段，大小分別為 23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0, 0.56, 0.125 kb，濃度為 0.5 µg/µL，以下簡稱 λMr。

1.4.3 操作步驟：

膠片製備：

- 1) 每組製備一片 6-well 0.8% agarose gel：秤取適量 agarose 粉末後，加入 1×TAE（小片 Mupid II 膠片約需 20 mL），以微波爐加熱溶解後，置 55°C 水浴降溫。
◆ 此部分請每大組之第一小組同學統一製備四組的膠體。
◆ 鑄膠及電泳等步驟請戴手套操作。EtBr 為突變劑，請小心！
- 2) 加入 EtBr（每 50 mL 膠體溶液加一滴 stock solution），混合均勻，將膠體溶液倒入鑄膠模，插上齒模，置室溫至少 30 分鐘使凝結。

準備 DNA 樣品：

- 3) 每管染色體 DNA 各取 2 及 10 µL 兩種體積，分別置於微量離心管中（請標示清楚），各加入 1 µL 10×追蹤染劑。
- 4) 將染色體 DNA 及 λMr（已經加入追蹤染劑）置 65°C 水浴 5 ~ 10 min 後，立即移置冰浴中。

電泳：

- 5) 小心拔開齒模（0.7% 膠片較脆弱，要小心！），將膠片置於電泳槽中，倒入 1×TAE，直至溶液蓋過膠片。
- 6) 將各個 DNA 樣品加入樣品槽中，蓋上電泳槽之透明蓋。以 50 V 進行電泳，待追蹤染劑 bromophenol blue 行進至膠體三分之二處時，關閉電源，取出膠片，以 UV transilluminator box 觀察色帶位置，並記錄結果。

1.5 結果報告與討論

- ◆ 實驗報告格式請參考第 8 頁。

1.5.1 結果報告：

- a) 簡單描述你所得到的 DNA 沈澱的顏色、大小，以及溶解的狀況。

- b) 記錄 A_{260} 及 A_{280} 之值，計算原液中 DNA 濃度及 DNA 總量（請寫出算式）。並計算 A_{260}/A_{280} 之值。
- c) 列出電泳結果，每一行加入之樣品及加入的量要標示清楚。

1.5.2 問題與討論

- a) 說明在實驗操作過程中應注意的事項。
- b) 實驗過程中，是否觀察到一些特殊現象？
- c) 說明在實驗過程中你遇到的問題，並請提出可能的解決方法。
- d) 由你所得到的電泳圖譜可以說明哪些事情？
- e) 由 A_{260}/A_{280} 之值，如何評估 DNA 的純度？請就你得到的數據及電泳結果，討論你所抽取的 DNA 之質與量。
- f) 如果 DNA 溶液以 100°C 加熱 15 min 後，立即置冰浴冷卻，再測定 A_{260} ，結果會有什麼不同？
- g) 若今天要抽取的是動物細胞 DNA，我們所用的方法中，哪些步驟可能需要修改？

1.6 參考文獻：

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith, JA, Struhl K (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol.1. John Wiley & Sons, Inc. New York
- Boyer RF (1993) *Modern Experimental Biochemistry*, 2nd ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* 3: 208.
- Micklos DA, Freyer GA (2003) *DNA Science: A First Course*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Vol 1 & 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Switzer RL, Garrity LF (1999) *Experimental Biochemistry*, 3rd ed, W. H. Freeman and Company, New York.

N1 染色體 DNA 分離與檢定 實驗報告

班次：_____ 組別：_____ 姓名：_____ 學號：_____

I. 實驗目的：

(簡要列出本實驗之目的)

II. 材料與方法：

(列出主要實驗材料及主要方法)

◆ I、II 兩項敘述以一頁為限。

III. 實驗結果：

1. 分離出之 DNA 的特性：

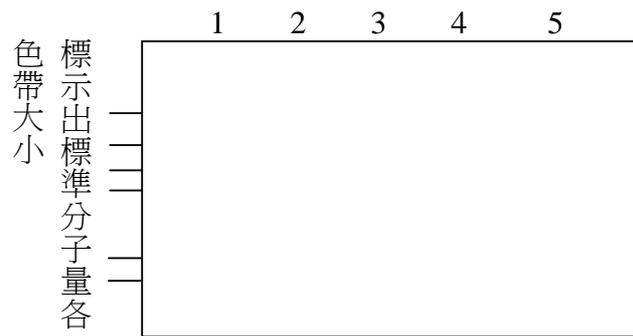
2. DNA 定量結果：

(先說明取 ? mL，加入 ? mL 什麼溶液，稀釋 ? 倍，再說明測定結果。)

3. DNA 電泳結果：

書寫範例：.....(先說明樣品的量及電泳前處理情形，電泳條件.....)...，結果如圖一第 1 行為標準 DNA 分子量 (說明色帶是否與預期相符?)，第 2~5 行則分別為.....。由電泳結果可知.....。

(在說明後插入電泳圖，圖上要標示清楚，並且要在圖下方列出圖的標題及說明)



圖一：由大腸桿菌抽取之染色體 DNA，以 0.8% agarose 膠體電泳分析之結果。
（說明每一行的樣品為何，說明要盡可能詳細）

IV. 問題與討論：

回答第 7 頁所列的問題。

N2 以聚合酶連鎖反應增殖 DNA

王愛玉

Polymerase chain reaction (PCR) 是試管中合成 DNA 的方法，可以在短短幾個小時內將目標基因大量增殖出。PCR 技術的發展使得基因的選殖與增殖無需經由生物細胞的複製系統，目前已成為分子生物學常用之方法。本實驗將以 N1 得到的大腸桿菌染色體 DNA 為材料，以 PCR 進行 β -galactosidase 基因 (*lacZ*) 的增殖，藉以體認此方法之原理及效率。

2.1 背景知識

2.1.1 DNA polymerase 與 DNA 複製

在細胞中，DNA 的複製是藉由一套複雜的酵素系統來完成，其中的主角為 DNA polymerase，此酵素負責催化核苷酸的聚合，合成與原先 DNA 具有互補序列的 DNA。原核及真核細胞中的 DNA polymerase 都不止一種，有些專司 DNA 複製，有些則參與 DNA 的修補，但在催化 DNA 合成的反應上都具有一些共同的特性：1) 需要有模版 (template) DNA 的存在；2) 需要有一段與模版 DNA 序列互補的單股 DNA 或 RNA (稱為引子，primer)，先黏合在模版 DNA 上；3) 核苷酸的聚合是由引子的 3'-OH 端開始延伸 (稱為 primer extension)，以 5'→3' 的方向進行 DNA 合成。4) 需要 Mg^{2+} 作為 cofactor。此外，許多 DNA polymerase 除了具有 polymerase 的活性外，還具有 3'→5' exonuclease 的活性，可以將聚合錯誤的核苷酸去除 (此功能稱為 proofreading)，以維持 DNA 複製的正確性。有些 polymerase 也具有 5'→3' exonuclease 的活性，用於水解引子序列或參與 DNA 修補等。

DNA 的合成也可以在試管中進行，只要提供模版 DNA、引子、核苷酸、含有 Mg^{2+} 的反應緩衝液，DNA polymerase 即可催化核苷酸聚合反應的進行。目前在分子生物研究上常用的一些實驗，例如：核苷酸定序、放射線核酸探針的合成、第二股 cDNA 的合成、雙股 DNA 末端的修補...等等，都是利用 DNA polymerase 來進行 primer extension 反應。本實驗用的 PCR 也是試管中合成 DNA 的方法，可用於 DNA 大量增殖。

2.1.2 PCR 原理及發展

在試管中進行 DNA 增殖的概念最早是由 Ghobind Khorana 等人於 1971 年提出

的：含有雙股 DNA 的溶液中，若同時有一對引子存在（引子的序列與雙股 DNA 的部分序列互補，且其量超過雙股 DNA 的量），當加熱使雙股 DNA 打開為單股後，繼而使溫度下降至適當溫度時，每一條引子將有機會黏合至與其序列互補的單股 DNA 上。此時若加入 DNA polymerase，此酵素即可進行聚合反應，原雙股 DNA 也因此可被複製為兩倍。新合成的 DNA 可繼續做為下一回合反應的模版，只要反覆經過加熱變性、降溫及添加新鮮的 DNA polymerase 進行聚合反應等步驟，就可合成出大量的 DNA。然而，在那個年代，基因序列分析、oligonucleotide 引子的合成等技術都還是艱鉅的工作，使得 Khorana 的構想無法付諸實際應用，這個構想也很快就被遺忘了。1985 年，在 Cetus Corporation 服務的 Kary Mullis 提出 PCR 方法，原理與 Khorana 所提相同，但他實際利用以化學法合成的具有 β -globin 序列的一對 oligonucleotide 引子，以及 Klenow fragment (*E. coli* DNA polymerase I 的 large fragment)，在試管中複製增殖出 β -globin 基因序列。於其時，基因選殖、序列分析、oligonucleotide 合成技術漸臻成熟，也已有不少的基因序列被訂出，因此 PCR 一被提出即蔚為風潮，尤其是三年後，Klenow fragment 被耐熱性高的 *Taq* DNA polymerase 取代，使得 PCR 反應過程中無需再反覆添加酵素，也可利用具有程式控制的溫度反應器自動進行各個反應步驟。PCR 反應包括三個基本步驟：Denaturation, annealing 及 polymeration。

- a) Denaturation：加熱至 94 或 95°C 使雙股模版 DNA 打開為單股。
- b) Annealing：溫度降至適當溫度，使引子能專一性的黏合至模版上。
- c) Polymerization：溫度提高到 70-75°C，*Taq* DNA polymerase 進行 DNA 合成。上述這三個步驟每進行一回合，就可使 DNA 量增加為 2 倍，反覆進行 n 次後，理論上 DNA 量可增為 2^n 倍。

2.1.3 PCR 反應之基本組成份

- a) 模版 DNA：隨著實驗目的不同，模版 DNA 組成亦不同。模版 DNA 可能為單純的質體 DNA，亦可能為複雜的染色體 DNA；可為雙股，亦可為單股；可為環狀，亦可為線狀 DNA。模版 DNA 可以是純化的 DNA 樣品，也可以是未經純化的 DNA 樣品，例如，噬菌體溶菌斑、細菌菌落水解液、血液...等。理論上，目標基因只要存在單一個 copy，就可以利用 PCR 進行增殖，然而實際反應中，通常會加入含 10^4 - 10^5 copies 目標基因的 DNA。溶解模版 DNA 的溶液要避免含有 EDTA。
- b) 引子：引子長度通常為 20-30 nucleotides (nt)。選擇引子序列需考慮：與目標基因序列完全互補區域應涵蓋 18-25 nt、G+C 含量應介於 40% 及 60% 間、需避免有二級結構及形成 primer dimers、引子對之 T_m 值差異需小於 5°C...等因子，目前已有許多電腦軟體可協助引子序列之設計。

- c) **Thermostable DNA polymerase**：最早用於 PCR 的熱穩定酵素為純化自 *Thermus aquaticus* 的 *Taq* DNA polymerase，目前市面上也有許多純化自不同菌種的熱穩定 DNA polymerase 可供選擇。對一般實驗而言，最常用的 PCR 酵素仍為 *Taq* DNA polymerase，然而此酵素不具有 proofreading 功能，若實驗需求高度正確性時，可選用其它具 proofreading 的熱穩定酵素，例如 *Pfu* DNA polymerase。*Taq* DNA polymerase 除了由引子 3'-端延伸合成與模版 DNA 序列互補之序列外，還會在合成 DNA 的 3'-端多加上一個 A，造成雙股 DNA 之 3'-端有突出一個核苷酸的現象。
- d) **Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs)**：在標準的 PCR 反應中，使用等量的 dATP、dGTP、dCTP 及 dTTP，每一種 dNTP 的最終濃度通常為 20-250 μM 。
- e) **反應緩衝液**：用於維持反應穩定的 pH 值。通常使用 10-50 mM Tris-HCl 緩衝液，pH 值介於 8.3-8.8 之間。
- f) **二價陽離子**：所有的熱穩定 DNA polymerase 皆需二價金屬離子（通常為 Mg^{2+} ）作為 cofactor。由於模版 DNA、引子及 dNTPs 都可與 Mg^{2+} 結合，DNA 溶液中若含有 EDTA，也會減少有效的 Mg^{2+} ，所以反應液中最適 Mg^{2+} 濃度需隨著模版 DNA 及引子對的改變而做調整。此外，相同的模版 DNA 及引子對，若每次使用的 DNA polymerase 來自不同廠商或來自不同菌種，甚或來自同一廠商但不同批次，皆須重新進行 Mg^{2+} 最適濃度的測試。
- g) **一價陽離子**：通常含有 KCl，濃度則隨使用之熱穩定 DNA polymerase 而異。適量的 KCl 可以使 DNA polymerase 的活性增加 40%-60%，但濃度提高時反而會抑制酵素活性。
- h) **其它組成分**：反應液中有時會添加 gelatin 或 BSA，以及 Tween 20 等非離子性界面活性劑來增加酵素的穩定性；或添加 dimethyl sulfoxide (DMSO)、formamide 等以幫助模版 DNA 的變性及克服二級結構的問題；或加入 tetramethylammonium chloride (TMAC) 增加引子與模版 DNA 黏合的專一性；.....。

2.1.4 反應程式設定

用於進行 PCR 反應的自動化儀器稱為 thermal cycler (溫度循環反應器)，可以設定 denaturation, annealing 及 polymerization 三個基本步驟的反應溫度及反應時間，以及這三個步驟反覆循環的次數。各種參數的設定會對 DNA 合成的專一性 (specificity)、正確性 (fidelity) 及合成的量 (yield) 有不同的影響，需仔細考慮，以下為一般通則：

- a) **Denaturation**：溫度與時間的設定需考慮模版 DNA 的 G+C 含量及長度，通常可設定在 94 或 95 $^{\circ}\text{C}$ ，時間為 30-45 sec，G+C 組成較高者，可提高溫度，但須考慮 DNA polymerase 在高溫下的半衰期 (half life)。以 *Taq* DNA polymerase 而言，在 92.5、95.0 及 97.5 $^{\circ}\text{C}$ 之半衰期分別為 130 min、40 min 及 5-6 min。

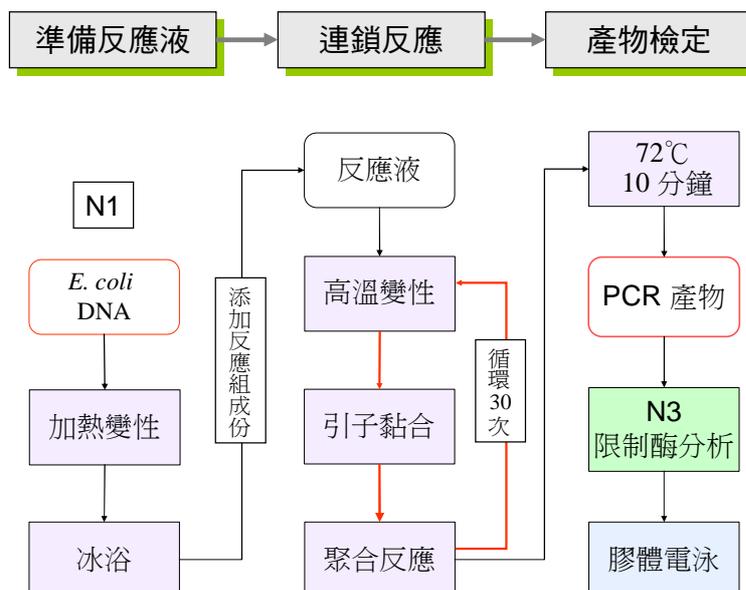
- b) Annealing : 引子與模版黏合的溫度與時間隨引子組成、長度及使用之濃度而異。
Annealing 溫度太低時，非專一性黏合的機會增加，導致 PCR 產物中會含有許多非目標基因的 DNA 片段；但若溫度太高，則引子不易黏合至模版，DNA 的合成量會很少。通常可先設定於引子之 T_m 值減 5°C ，並在這溫度上下範圍內測試最佳條件。Annealing 時間通常設定 5-30 sec，延長時間雖增加引子黏合的量，但也增加了非專一性黏合的機會。
- c) Polymerization : 反應溫度隨使用之熱穩定 DNA polymerase 而異。使用 *Taq* DNA polymerase 時，通常將反應溫度設定於 72°C （接近此酵素之最適反應溫度），在此溫度，此酵素之聚合速度約為 2000 nt/min。在設定反應時間時，需考慮目標 DNA 的長度，每 1000 bp 可設定為 1 min。
- d) Number of cycles : 視最初加入之模版 DNA 量而定，若含有 10^4 - 10^5 copies 之目標基因，約 30 cycles 即可得到大量的 PCR 產物。循環次數過多時，會造成非專一性產物量增加。

2.1.5 PCR 的應用

由於 PCR 可以由複雜的一群 DNA 中合成出特定的 DNA 片段，以及引子序列不需要與模版 DNA 完全互補等特點，使得 PCR 的應用極為廣泛，包括：基因選殖 (gene cloning)、定點突變 (site-directed mutagenesis)、核苷酸定序、親源關係、種源分析、遺傳疾病、致病病毒及細菌的檢定……等。

2.1.6 實驗大綱

N2 以聚合酶連鎖反應增殖 DNA



2.2 實驗操作— 由大腸桿菌染色體 DNA 增殖 *lacZ* 基因片段

2.2.1 儀器設備

a) Thermal cycler : Biometra Tpersonal

◆ 請先熟悉使用方法。

b) 0.2 mL 薄壁微量離心管

2.2.2 藥品試劑：

a) *E. coli* genomic DNA : N1 得到的 DNA

b) *Taq* DNA polymerase : 2.5 units/ μ L

c) Primers : P1 及 P2 , 各 20 μ M 。序列分別為：

P1: 5'-TACACCAACGTGACCTATCC-3'

P2: 5'-TACATCGGGCAAATAATATCGG-3'

d) 10 \times reaction buffer : 500 mM Tris-HCl, pH 8.8, 160 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween。

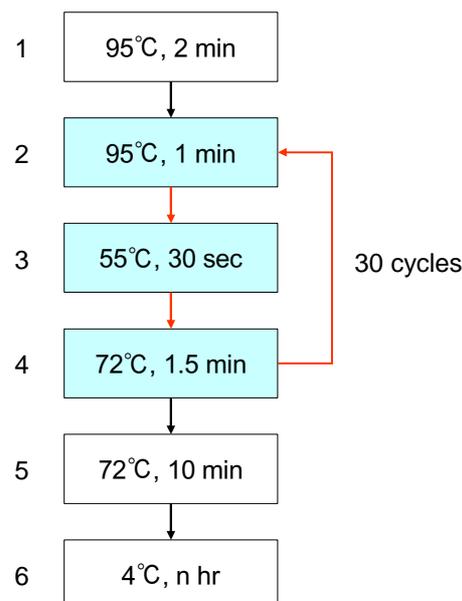
e) MgCl₂ : 50 mM

f) dNTPs : dTTP, dCTP, dATP, dGTP 之混合液，濃度各為 2.5 mM

2.2.3 操作步驟：

設定 Thermal cycler 反應程式：

1) 如下設定反應程式：



準備反應液：

- 2) N1 得到的 DNA 以無菌水調整濃度為 10 ng/ μ L。以 95°C 加熱 10 分鐘後，立即置於冰浴中。
- 3) 取 5 支 0.2 mL 離心管，分別標上 P、A、B、C、S，如下表依序添加各成分於管壁上（每加一種溶液，請更換新的 tip；吸取 1-2 μ L 請用 P2 微量吸管及白色 tips）：

反應組成份	編 號					
	P	A	B	C	S	T
Primer 1	2	2	2	2	2	0
Primer 2	2	2	2	2	2	0
10×Reaction Buf	5	5	5	5	5	5
dNTPs	8	8	8	8	8	8
	◆ 為減少誤差，上述四成分已事先混合好，請由 Pre-mix 管中吸取 17 μ L，加入 P、A、B、C 各管中。					◆ 助教提供之 T 管中，已加入上述兩成分。
MgCl ₂	2	1	2	4	x	2
dH ₂ O	30	21	20	18	22-x	24
將各管移至冰浴中，如下添加 DNA 及酵素：						
DNA	0	10	10	10	10 (由助教提供)	10
Taq DNA polymerase	1	1	1	1	1	1

註：x 加入之量由助教告知。

進行反應：

- 4) 將每管溶液混合均勻（以微量吸管吸放溶液，記得更換 tips）並緊蓋管蓋後，置於 Thermal cycler 反應槽中，啟動反應程式。
 - ◆ 注意！若 Thermal cycler 不具有上蓋加熱功能，則需在每管反應液中添加礦物油，以防溶液因高溫蒸發，繼而凝集在管蓋及管壁上

產物分析及檢定：

- 5) 進行膠體電泳分析及限制酶分析檢定，請依 N3 之方法步驟進行。

2.3 結果與報告

與 N3 實驗結果一併撰寫，但回家後請先練習下列問題：

- a) 以生物資訊課程中學到的方法，由資料庫中找出 *E. coli lacZ* 序列，並練習比對 *E. coli lacZ* 序列及此次實驗所用的兩個引子序列，找出引子在 *lacZ* 上的位置，計算出 PCR 產物之預期大小。

2.4. 參考文獻：

Erlich HA (1989) PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. M Stockton Press.

Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerase. J Mol Biol **56**: 341-361.

Micklos DA, Freyer GA (2003) DNA Science: A First Course, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Saiki RK, Gelfand, DH, Stoffel S, Scharf SJ, Mullis KB, Horn GT, Erlich, HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, , Horn GT, Mullis KB, Erlich, HA (1989) Primer-directed enzymatic amplication of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Vol 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Switzer RL, Garrity LF (1999) Experimental Biochemistry, 3rd ed, W. H. Freeman and Company, New York.

<http://highveld.com/f/findex.html> -- The World Famous PCR Jump Station

N3 DNA 之限制酶分析

王愛玉

Restriction endonuclease (限制內切酶，以下簡稱限制酶) 為一種對 DNA 序列具專一性的核酸分解酵素 (nuclease)，是分子生物及生物技術上的重要工具。在這個實驗中，我們是以細菌質體 (plasmid) DNA 為材料，來練習限制酶的使用。此外，亦將以限制酶來檢定 N2 之 PCR 產物是否為 *lacZ* 基因片段。本實驗另一個目的是藉由膠體電泳分析限制酶作用後的 DNA，學習如何由 DNA 片段在膠體中的泳動率來估計 DNA 大小，以及體認不同分子量、不同構形的 DNA 在膠體電泳的泳動差異。

3.1 背景知識

3.1.1 限制酶

- a) 限制酶的生理功能：細菌中存在一種 restriction-modification 系統，對於防禦嗜菌體 (bacteriophage) 的感染扮演關鍵角色。限制酶與 DNA methylases 是這個系統中的兩個主角，前者可以辨認 DNA 上特定的序列，並水解 phosphodiester bonds；後者則對限制酶辨認的序列進行甲基化 (methylation) 修飾，一旦序列上有甲基化修飾，限制酶即無法對其作用。DNA methylases 可對細菌染色體 DNA 上的特定序列進行甲基化修飾，保護染色體 DNA 不會受到細菌自己的限制酶水解，但入侵的噬菌體 DNA 由於不具有甲基化修飾或甲基化修飾形式不同，細菌的限制酶可將之水解，使其複製與增殖受到限制。
- b) 限制酶的種類：目前分離出之限制酶主要可分為 Type I、Type II 及 Type III 三大類。
 - 1) Type I 及 Type III：通常是由數個次單元體組成，同時具有 endonuclease 及 methylase 的活性。這兩類酵素對 phosphodiester bond 水解的位置（以下簡稱為切位）與辨識的序列不同。Type I 酵素需要 ATP 的參與，ATP 提供酵素由辨識區移動到距離 1 ~ 10kb 之處作用所需的能量；Type III 酵素則不需要 ATP 參與反應，其辨識序列與切位通常相距 100 bp 以內。
 - 2) Type II：這類酵素僅具有 endonuclease 活性，不具 methylation 的作用。大部分的 Type II 限制酶對 DNA 之切位就在辨識序列上，不需要 ATP 參與反應，但通常需要二價金屬離子 Mg^{2+} 作為 cofactor。三類限制酶中以此類最具實際應用價值。
- b) 限制酶之命名：依據其來源細菌命名，由三至四個英文字母及一個羅馬數字組成，前三個字母依序為來源細菌屬名的第一個字母及種名的前兩個字母，第四

個字母來自菌株 (strain) 名，羅馬數字則代表在同一菌種中被發現的順序。例

如，*EcoRI*: *E* = genus *Escherichia*

co = species *coli*

R = strain RY13

I = first endonuclease identified

BglII: *B* = genus *Bacillus*

gl = species *globigii*

II = second endonuclease identified

- c) **Type II 限制酶** 作用模式：限制酶水解核苷酸間的 **phosphodiester bonds** 後，使 DNA 的 5' 端帶 **phosphate group**，3' 端帶 **OH group**。如同其他酵素，限制酶對於反應基質亦具專一性，並有一定的反應機制。**Type II 限制酶** 辨認的 DNA 序列通常具對稱性（兩股由 5' 至 3' 的方向，可讀得相同序列），在辨識序列上作用的位置隨酵素而易，有些酵素切出來的 DNA 片段末段帶有單股序列 (**sticky end**)，有些酵素則由序列之對稱中心作用，將 DNA 切成具有平整末端 (**blunt end**) 的片段。

◆ 另有一群歸屬於 **Type IIS** 的限制酶，辨識序列並不具對稱性，並且切位不在辨識序列上，通常切位距辨識序列 20 bp 以內。

- d) **限制酶的應用**：限制酶的應用相當廣泛，例如重組 DNA (**recombinant DNA**) 的建構、DNA 的檢定等都可以利用限制酶來進行。

1) **重組 DNA 分子的建構**：利用適當的限制酶將兩種不同的 DNA 作用成 **sticky ends**，使彼此的 5' 與 3' 端序列互補而能黏合在一起，再用 **DNA ligase** 將缺口的 **phosphodiester bonds** 補起來；或是以限制酶將兩種 DNA 作用成 **blunt ends**，再以 **DNA ligase** 將兩種 DNA 末端接合而形成重組 DNA。

2) **DNA 的檢定**：在 DNA 上，限制酶能夠作用的位置及次數隨 DNA 序列不同而不同，有時兩種 DNA 僅存在 1 bp 的差異，但就足以造成限制酶作用結果的不同，因此可以利用限制酶作為檢定 DNA 的工具及建立 DNA 的 **physical map**（稱為限制圖譜，**restriction map**）。

3.1.2 建立 DNA 之限制圖譜

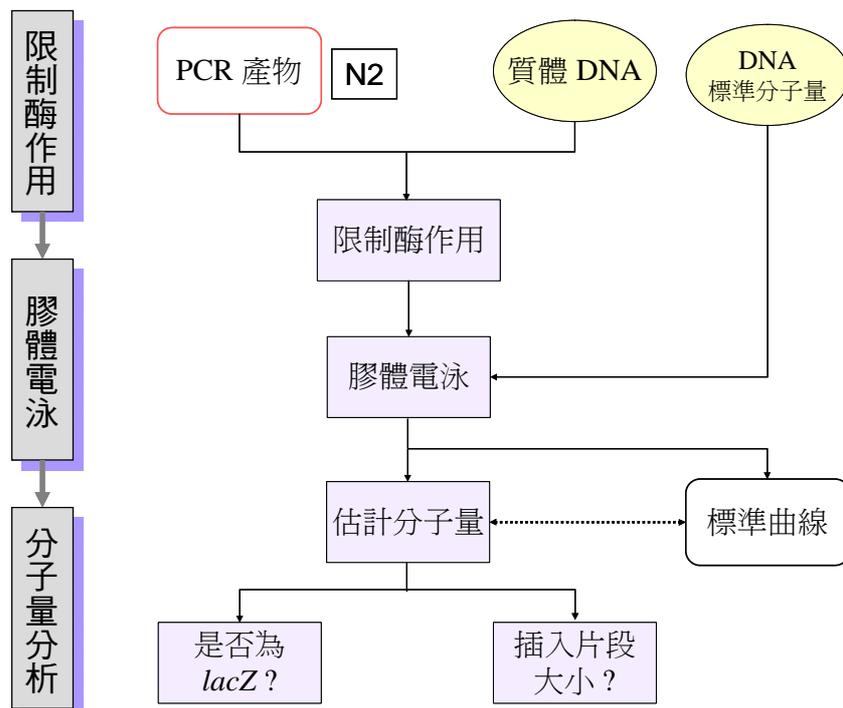
依據不同限制酶在 DNA 上作用的次數及位置而排列出之圖譜，稱為限制圖譜。建立限制圖譜通常需要經過下列步驟：

- a) **以不同限制酶作用 DNA**：除了以不同限制酶分別對 DNA 進行作用（稱為 **single digest**）外，還需要以不同組合之兩種限制酶同時對 DNA 進行反應（稱為 **double digest**），必要時，還需以兩種以上之限制酶同時進行反應。

- b) 進行膠體電泳分析：選擇適當的膠體濃度及膠體系統，將限制酶作用後的樣品以及直鏈型的 DNA 標準分子量一起進行電泳分析。
- c) 估計 DNA 片段大小：在 N1 中，我們已經知道，DNA 在膠體中的泳動率會受到分子量及構形的影響，當構形相同時，分子量愈大，泳動率愈慢。泳動率與 DNA 分子量（或 bp 數目）之 \log 值間存在線性關係，因此可將 DNA 標準分子量各片段之泳動距離對其 bp 數的 \log 值作圖，得到標準曲線後，即可由限制酶水解片段的泳動距離估算出其大小。
- d) 拼圖：將各個限制酶反應所得的 DNA 片段數目及大小進行排列組合，即可得知各限制酶在此 DNA 上作用的位置。

3.1.3 實驗大綱

N3 DNA之限制酶分析



3.2 實驗操作

3.2.1 儀器設備

- a) 微量離心機
- b) 37°C 水浴鍋或培養箱
- c) 65°C 水浴鍋
- a) 迷你電泳槽及鑄膠器 (Mupid II)
- b) UV transilluminator 及膠片影像分析系統
- c) 防護面罩

3.2.2 藥品試劑

- a) 質體 DNA : pB3bh
- b) N2 之 PCR 產物 : 取 A, B, C 三管進行反應。
- c) 限制酶 : *EcoRV* 及 *EcoRI* (BioLabs)
- d) 5×反應液 : 250 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 5 mM dithiothreitol, 5 mg/ mL bovin serum albumin, pH 7.9。
- e) 瓊脂糖粉末 : agarose, Low EEO
- f) 1×TAE 電泳緩衝液 : 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0。
- g) 10×追蹤染劑 : 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 0.1 M EDTA, 50% glycerol
- h) Ethidium bromide (EtBr) stock solution : 500 µg/mL, 裝於滴瓶中, 每 50 mL 膠體溶液加一滴 (最終濃度為 0.5 µg/mL)
- i) λ DNA/*Hind*III Fragments 標準分子量 : 包含 8 個片段, 23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0, 0.56, 0.125 Kb, 濃度為 0.5 µg/µL, 以下簡稱 λMr。
- j) 100-bp ladder 標準分子量 : 包含 100 bp ~ 2000 bp 共 12 個片段
- k) 無菌水

3.2.3 操作步驟

限制酶反應 :

- 1) 質體 pB3bh 部分 : 取 3 支微量離心管, 依下表所列體積 (以 µL 為單位) 依序加於管壁不同位置上 :

【請注意! 每次吸取限制酶時, 請換一支新的微量吸管頭以避免造成污染。】

反應組成份	編號		
	#1	#2	#3
pRSus1B	5	5	5
5×反應液	4	4	4
dH ₂ O	11	10	10
<i>EcoRI</i>	0	1	0
<i>EcoRV</i>	0	0	1

總體積為 20 μL ，短暫離心後，以 tip 輕輕混合，#1 置冰浴中，其餘各管置於 37°C 反應 1 小時。

- 2) PCR 產物部分：取 10 支乾淨微量離心管，依下表標示清楚，並依下表所列體積 (以 μL 為單位) 依序加於管壁不同位置上：

反應組成份	編號									
	P	A	B	C	S	T	#A+E	#B+E	#C+E	#S+E
PCR (P)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR (A)	-	10	-	-	-	-	10	-	-	-
PCR (B)	-	-	10	-	-	-	-	10	-	-
PCR (C)	-	-	-	10	-	-	-	-	10	-
PCR (S)	-	-	-	-	10	-	-	-	-	10
PCR (T)	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-
5×反應液	-	-	-	-	-	-	4	4	4	4
dH ₂ O	10	10	10	10	10	10	5	5	5	5
<i>EcoRV</i>	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1

總體積為 20 μL ，短暫離心後，以 tip 輕輕混合，A+E、B+E、C+E、S+E 四管置於 37°C 反應 1 小時，其餘各管暫置冰浴中。

膠片製備：

- 3) 每組製備一片 17-well 1% agarose gel (大片 Mupid II 膠片約需 40 mL)，方法請見 N1 實驗。
- ◆ 此部分請每大組之 TA 統一製備四組的膠體。
 - ◆ 鑄膠及電泳等步驟請戴手套操作。EtBr 為突變劑，請小心！

終止限制酶反應：

- 5) 各樣品 DNA 加入 2 μL 10×追蹤染劑。
- 6) 各樣品 DNA 及 λMr 置 65°C 水浴 10 分鐘後，立即置冰浴中。(注意：100-bp

ladder 標準分子量不要加熱)

電泳分析：

- 7) 小心拔開齒模，將膠片置於電泳槽中，倒入 1×TAE，直至溶液蓋過膠片。
- 6) 各個 DNA 樣品取 15 μL 注入樣品槽中，蓋上電泳槽之透明蓋。進行電泳，待追蹤染劑 bromophenol blue 行進至膠體三分之二處時，關閉電源，取出膠片，以 UV transilluminator box 觀察色帶位置，並記錄結果。

3.3 結果與報告

3.3.1 結果報告：

PCR 增殖 DNA：

- a) 說明 N2 實驗所用引子序列與 *E. coli lacZ* 序列比對結果以及寫出 PCR 產物預期大小。
- b) 以預測限制酶切位之軟體分析 *EcoRV* 在 *lacZ* 序列上作用的位置及次數，說明 *EcoRV* 是否會作用在 PCR 引子所增殖出之 DNA 片段上？
- c) 說明 PCR 反應的結果，包括 PCR 產物的大小、由電泳膠片上色帶的亮度估計 PCR 產物的量、限制酶作用的結果，以及是否符合預期等等。

質體 pRSus1B 之限制酶分析：

- d) 說明限制酶作用的結果。

3.3.2 問題與討論

- a) 說明在 PCR 操作過程及限制酶使用過程中應注意的事項。
- b) 實驗過程中，是否觀察到一些特殊現象？
- c) 說明在實驗過程中你遇到的問題，並請提出可能的解決方法。
- d) PCR 反應循環 30 次後，於 72°C 反應 10 min 之目的為何？
- e) N2 實驗理論上可得到多少量的 DNA？請討論影響產物生成量的因素。
- f) pB3bh 上有幾處 *EcoRV* 及 *EcoRI* 切位？請電泳結果估計各片段的大小。
- g) 說明質體構形對泳動率的影響。

3.4 參考文獻：

Micklos DA, Freyer GA (2003) DNA Science: A First Course, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Switzer RL, Garrity LF (1999) Experimental Biochemistry, 3rd ed, W. H. Freeman and Company, New York.

<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>

<http://www.restrictionmapper.org>

N2/N3 以 PCR 增殖 DNA 及限制酶分析 實驗報告

班次：_____ 組別：_____ 姓名：_____ 學號：_____

I. 實驗目的：

(簡要列出兩實驗之目的)

II. 材料與方法：

(列出主要實驗材料及主要方法)

◆ I、II 兩項敘述以一頁為限。

II. 實驗結果：

PCR 增殖 DNA：

a) PCR 引子序列與 *E. coli lacZ* 序列比對結果及 PCR 產物預期大小：

b) *EcoRV* 在 *lacZ* 序列上作用的位置及次數：

c) *E. coli lacZ* 基因片段增殖結果：

(說明並附上電泳圖)

質體 pB3bh 之限制酶分析：

d) 限制酶作用的結果：

(說明並附上電泳圖)

IV. 問題與討論：

回答第 6 頁所列的問題。