

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，以便釣取胰蛋白酶；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离開來，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：

- a) **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。
- b) **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。
- c) **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，也有可能是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

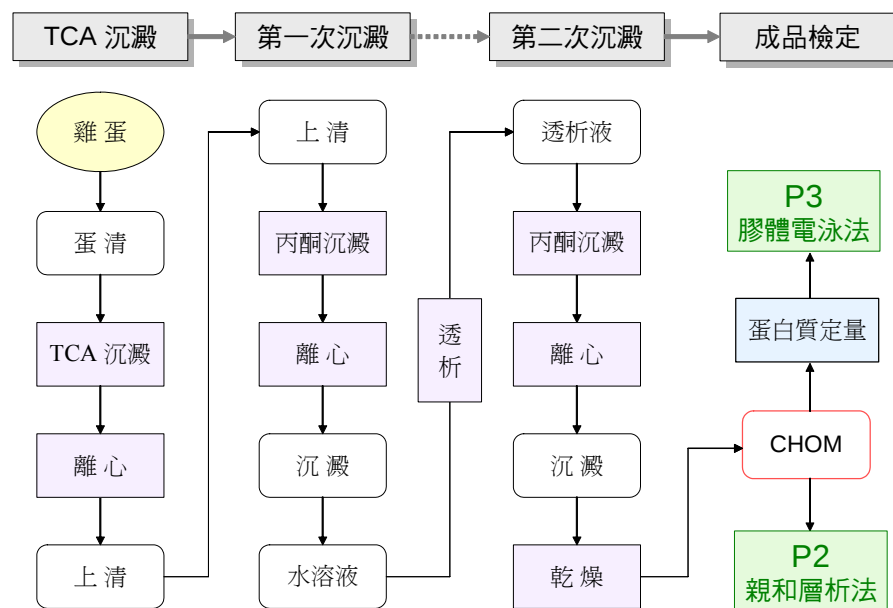


圖 P1-1 由卵白抽取 CHOM 或 DKOM 流程

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：

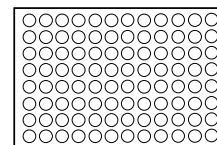
- 6) 透析後若產生沈澱，要離心 10 min (6,000 g) 去除之。
- 7) 加入 4 倍體積的冰凍丙酮，應該會產生大量沈澱，可放在 -20°C 冰箱靜置。
- 8) 高速離心 10 min (10,000 rpm) 後倒去上清，白色沈澱的表面小心以丙酮洗過數次 (可以再用少量乙醚洗過)，置排煙櫃中使沈澱稍微乾燥。
- 9) 加入 5 mL 蒸餾水輕輕震盪溶解，以一個新的 15 mL 試管裝起，標明 CHOM 及組別、日期，交給助教冷藏保管，後面的實驗要用到，首先要以 Bradford method 測量其蛋白質濃度。

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 $\mu\text{g/mL}$) 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	? $\mu\text{g/mL}$	混合均勻
X2	125 μL	125 μL	? $\mu\text{g/mL}$	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：

- 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。
- 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

- 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。

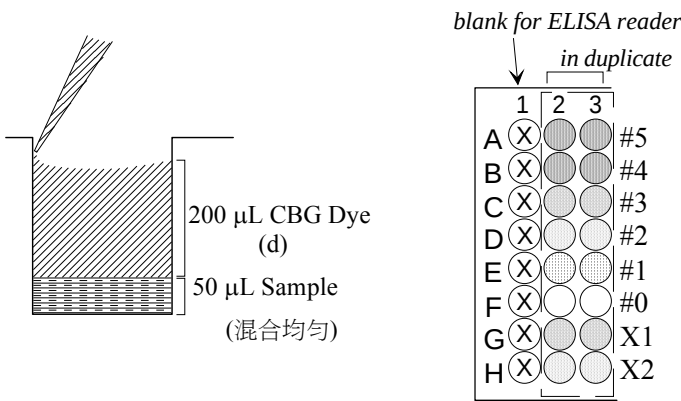


圖 P1-2 微量滴定盤的配置與使用方法

- 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。
- 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。

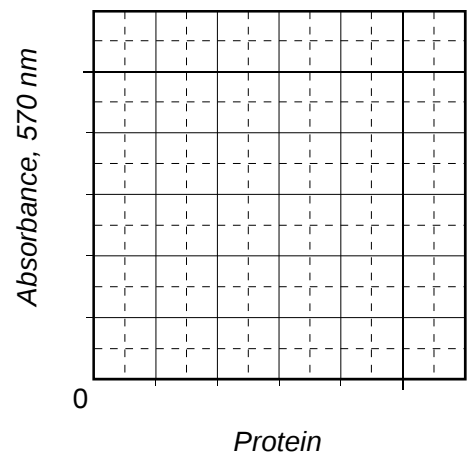


圖 P1-3 繪製標準品校正線

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