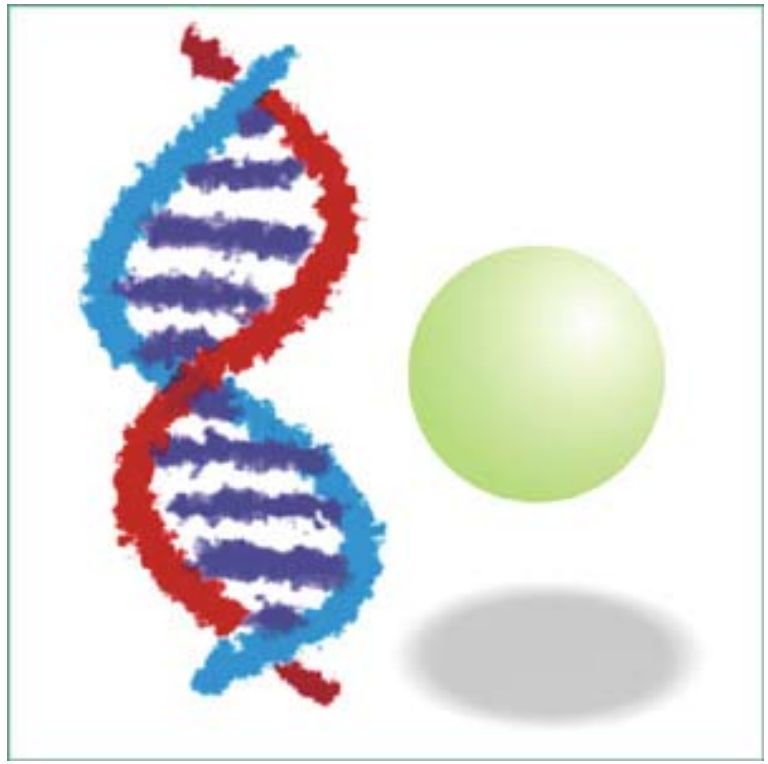
BST

生化科技系



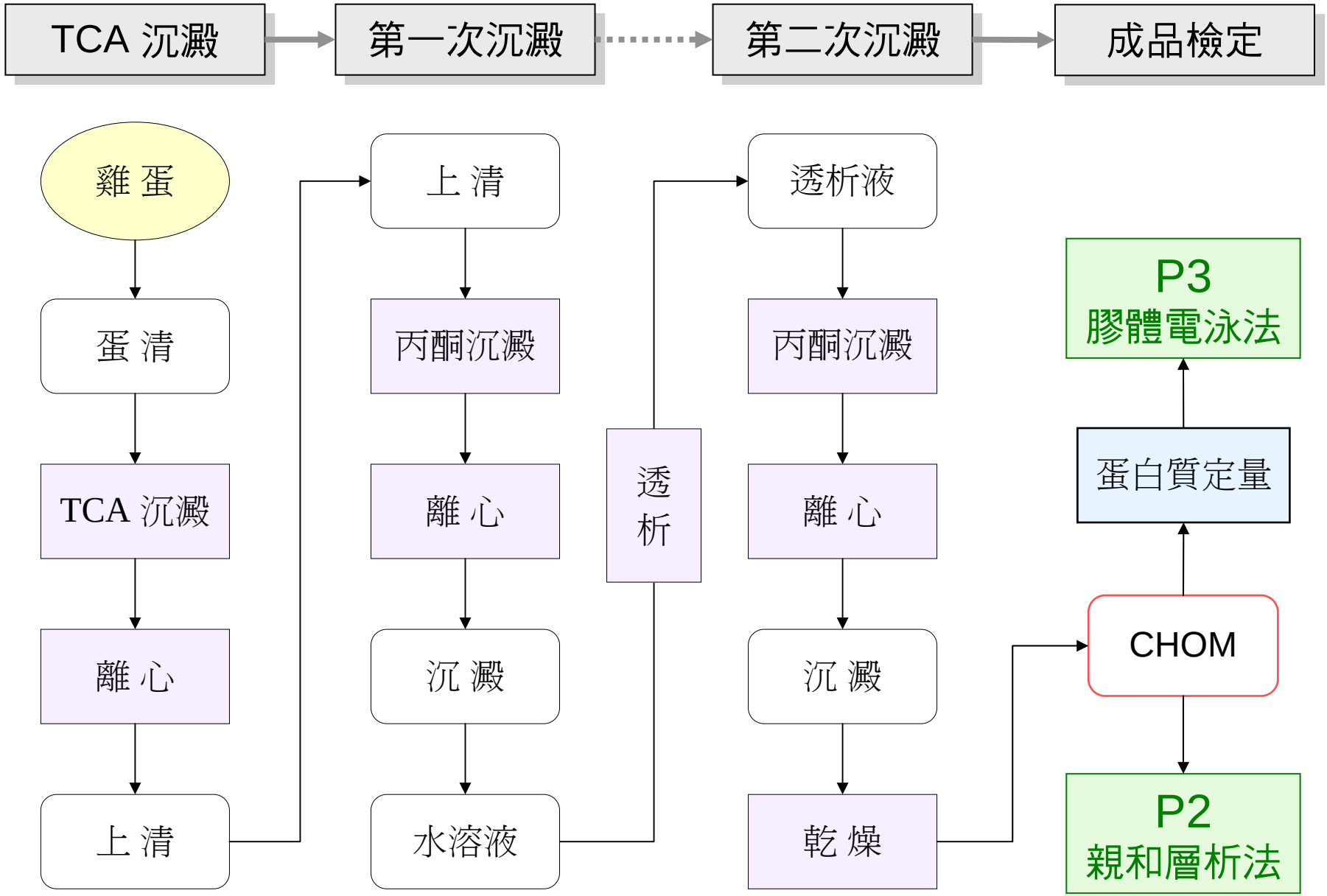
BCX

P1

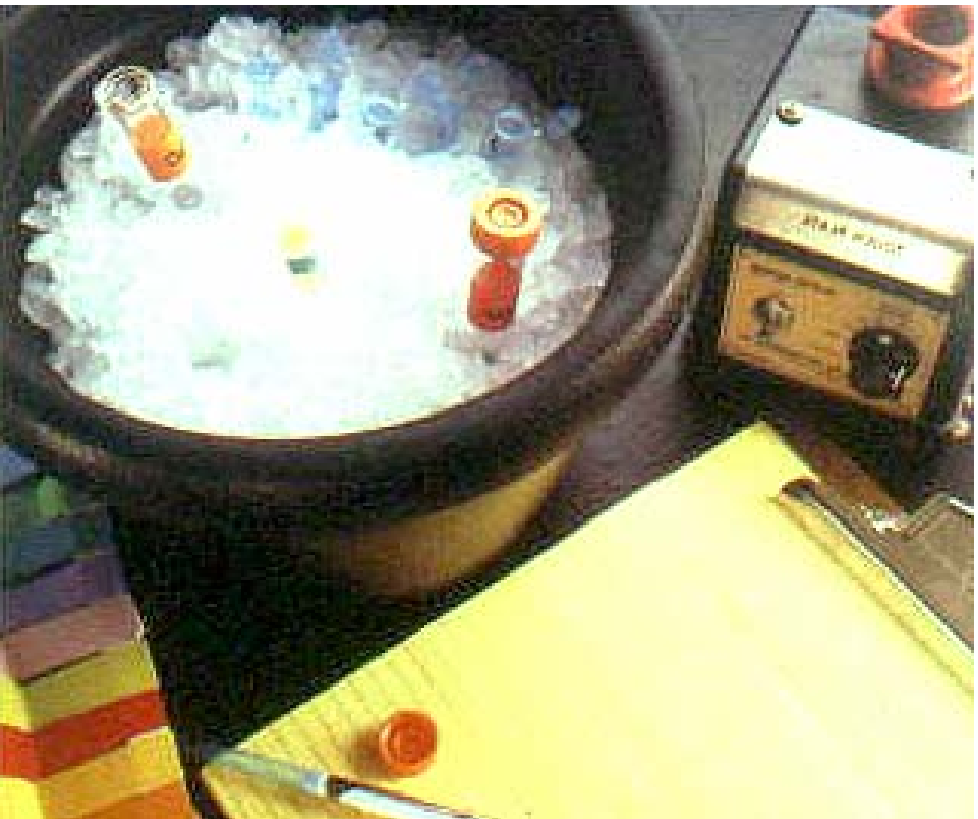
生物化學實驗

蛋白質抽取與定量

P1 蛋白質抽取與定量


TCA 沉澱
第一次沉澱
第二次沉澱
成品檢定
雞 蛋
蛋 清
TCA 沉澱
離 心
上 清
上 清
丙酮沉澱
離 心
沉 澱
水溶液
透
析
透析液
丙酮沉澱
離 心
沉 澱
乾 燥
CHOM
P3
膠體電泳法
蛋白質定量
P2
親和層析法

蛋白質抽取要點：



(1) 降低溫度

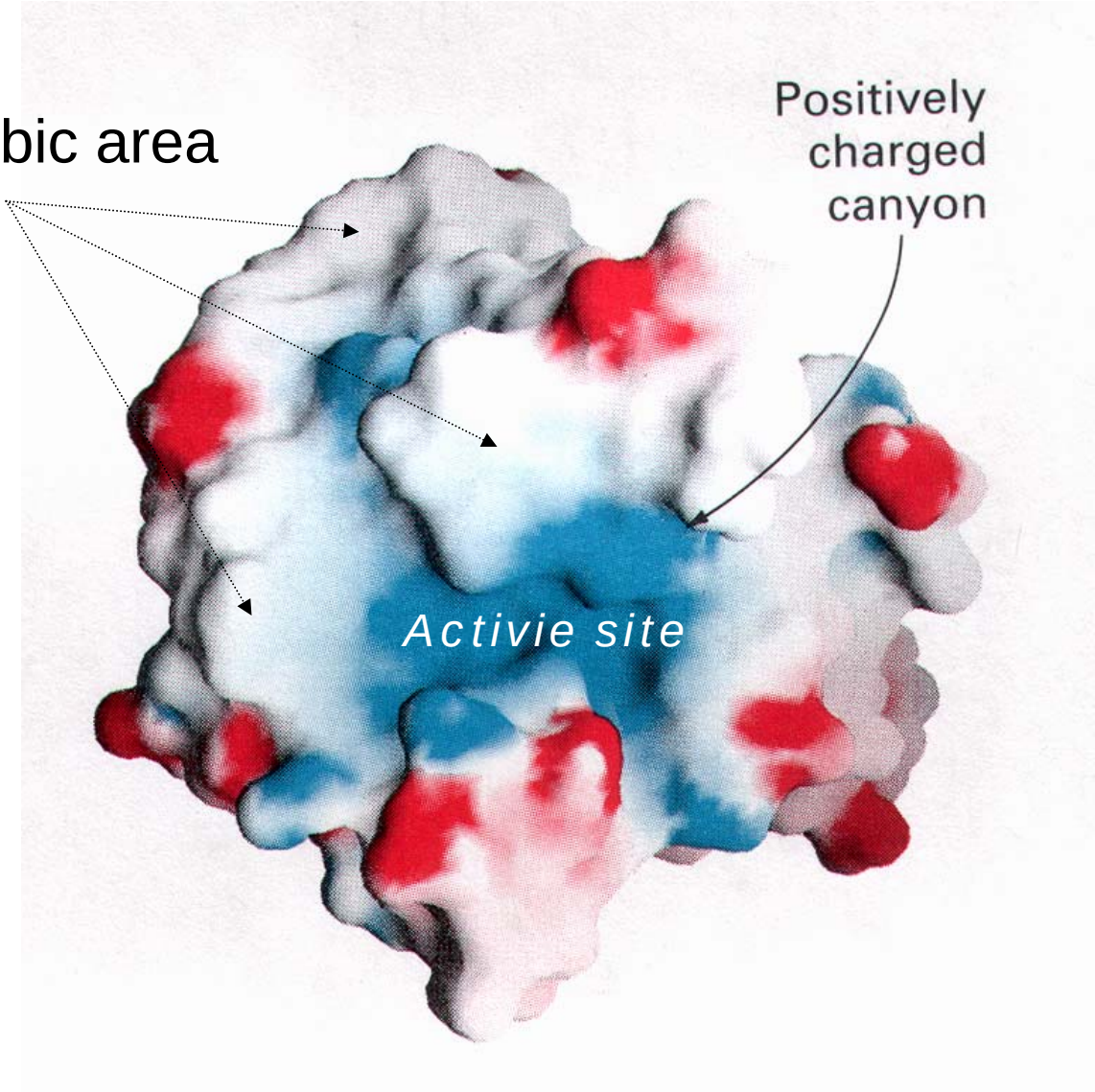
(2) 儘速純化

(3) 避免氧化

(4) 避免吸附

(5) 避免污染

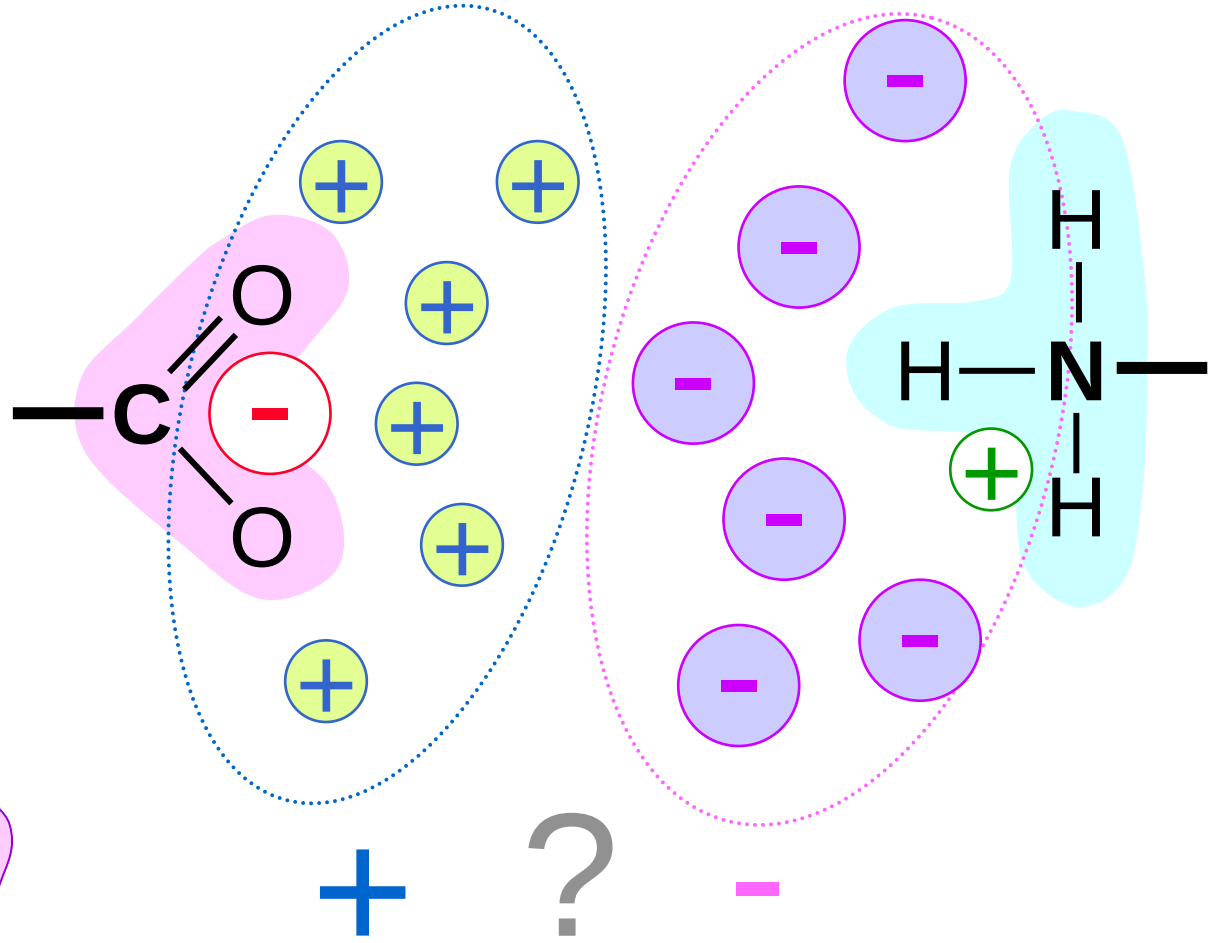
蛋白質表面的極性或非極性分布：

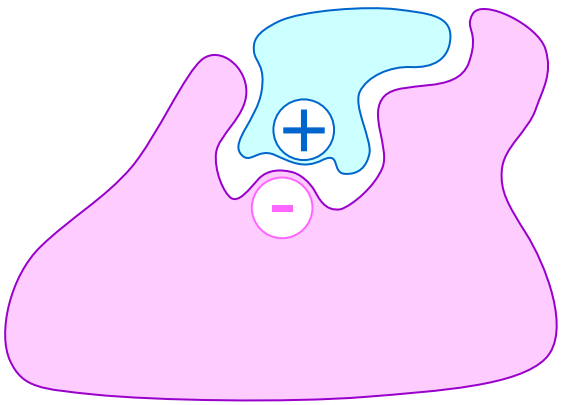


Superxoide dismutase (SOD)

Stryer L (1995) Biochemistry 4/e Fig. 21-36

離子鍵在鹽溶液中不易形成：

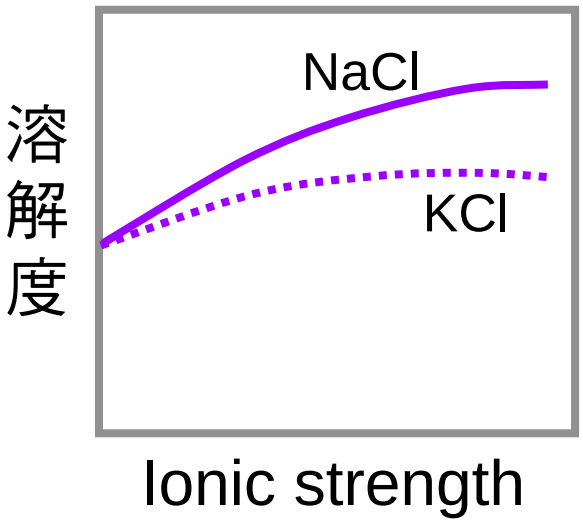


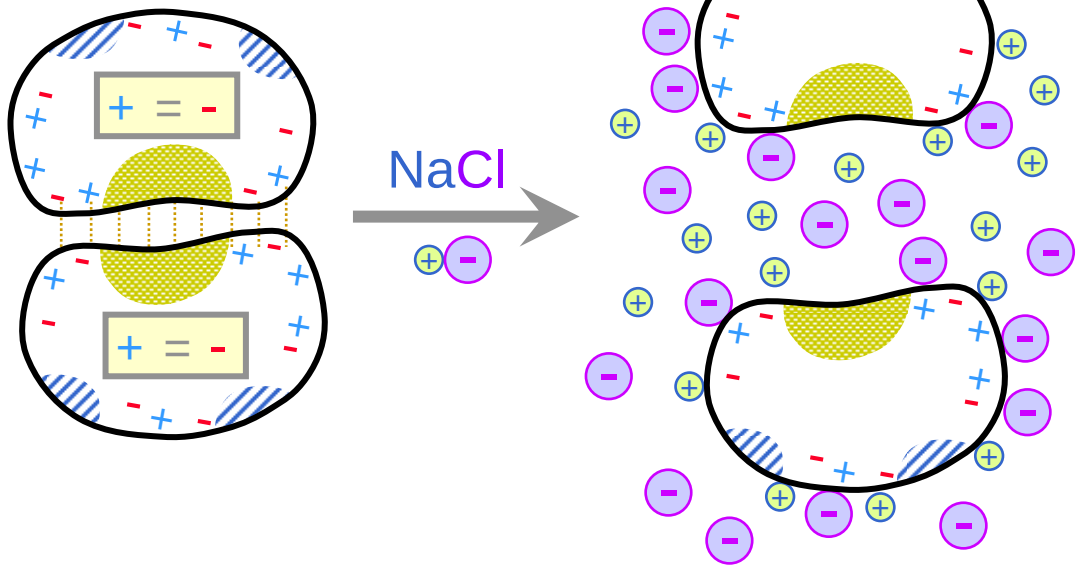


- 水中的酵素與基質還是可以生成離子鍵

Adapted from Alberts et al (2002) Molecular Biology of the Cell (4e) p.115

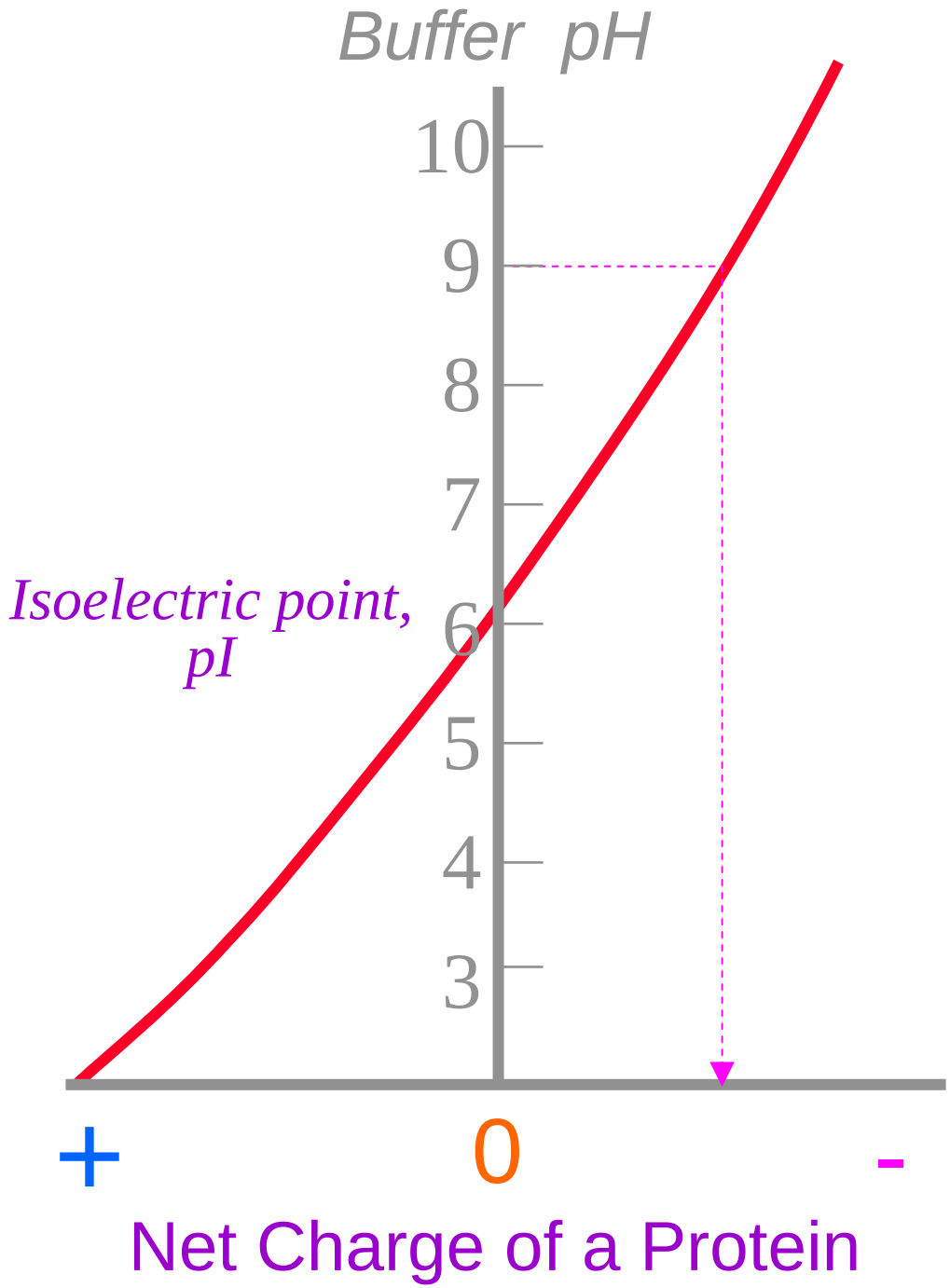
鹽溶 Salting-in ：



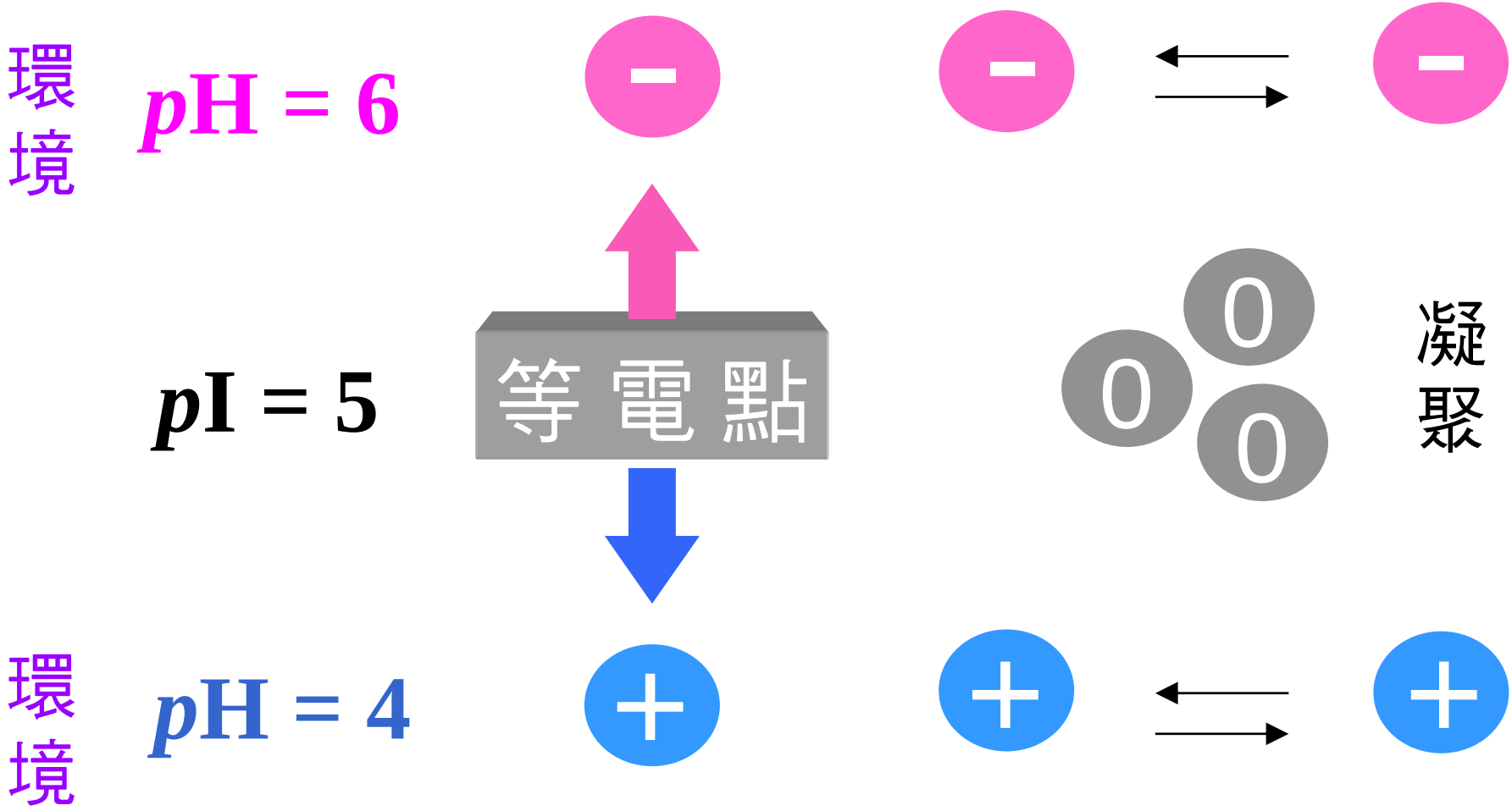


分子在其等電點時，容易互相吸引，聚合成沈澱；加入鹽離子會破壞這些吸引力，使分子散開，溶入水中。

環境影響分子的帶電性質：



等電點與環境 *p*H 的關係：



鹽對蛋白質溶解度的影響：

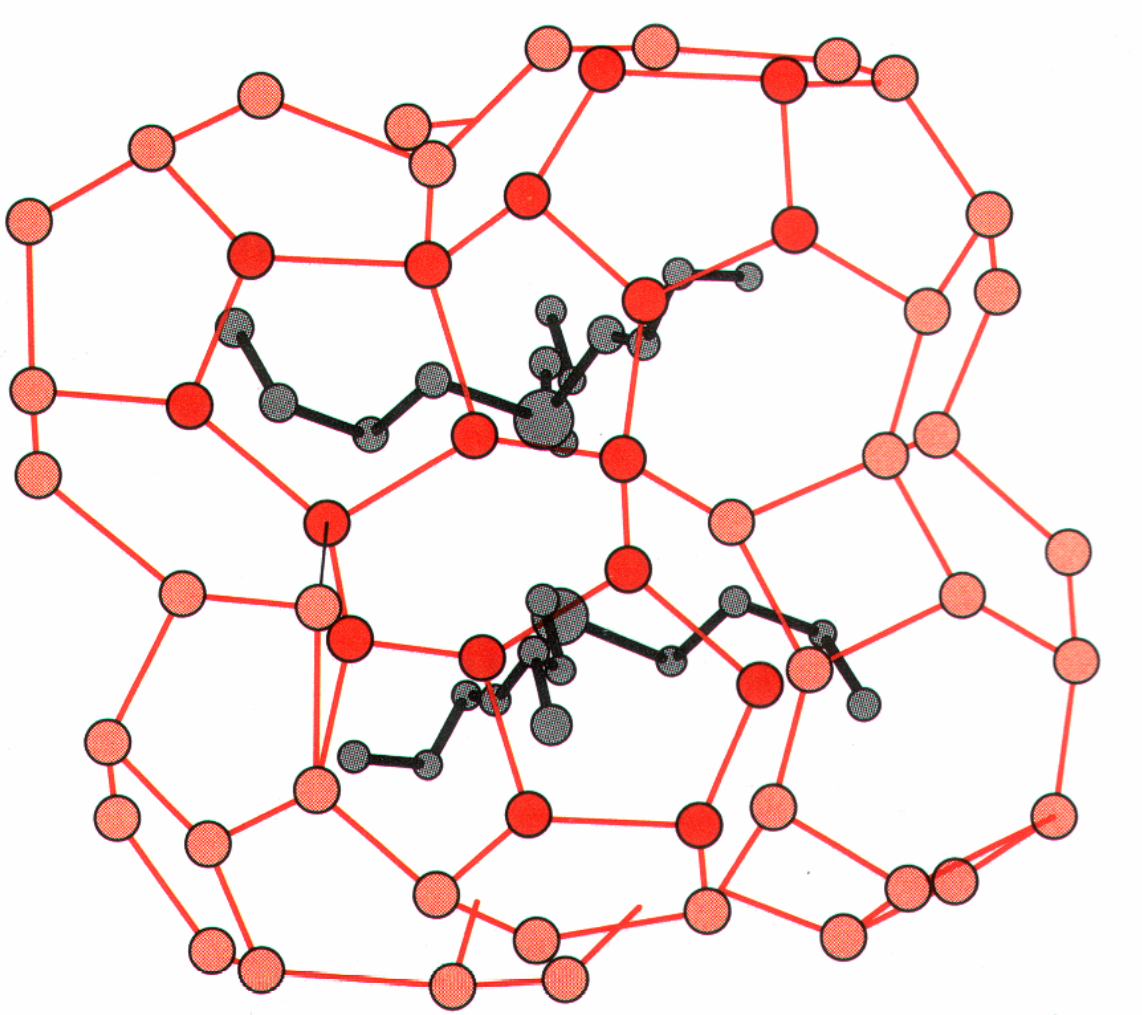
- 鹽溶 Salting-in:

  加鹽使蛋白質溶入水溶液中

- 鹽析 Salting-out:

  加鹽使蛋白質由水溶液中沉澱出來

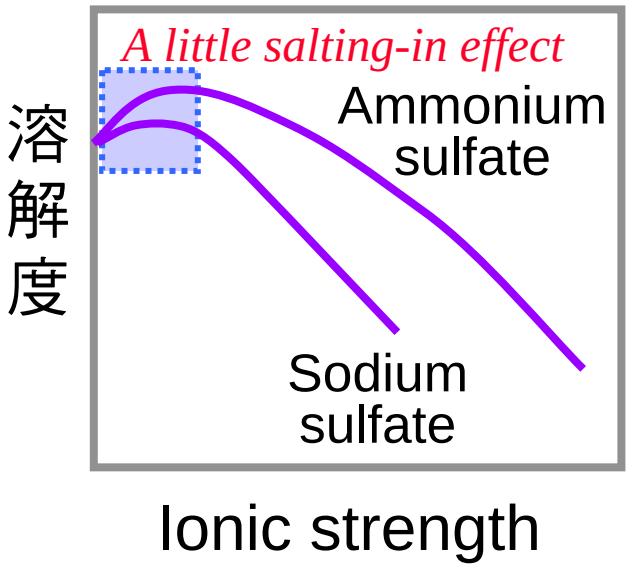
疏水性物質間的親和力： 水籠 Clathrate

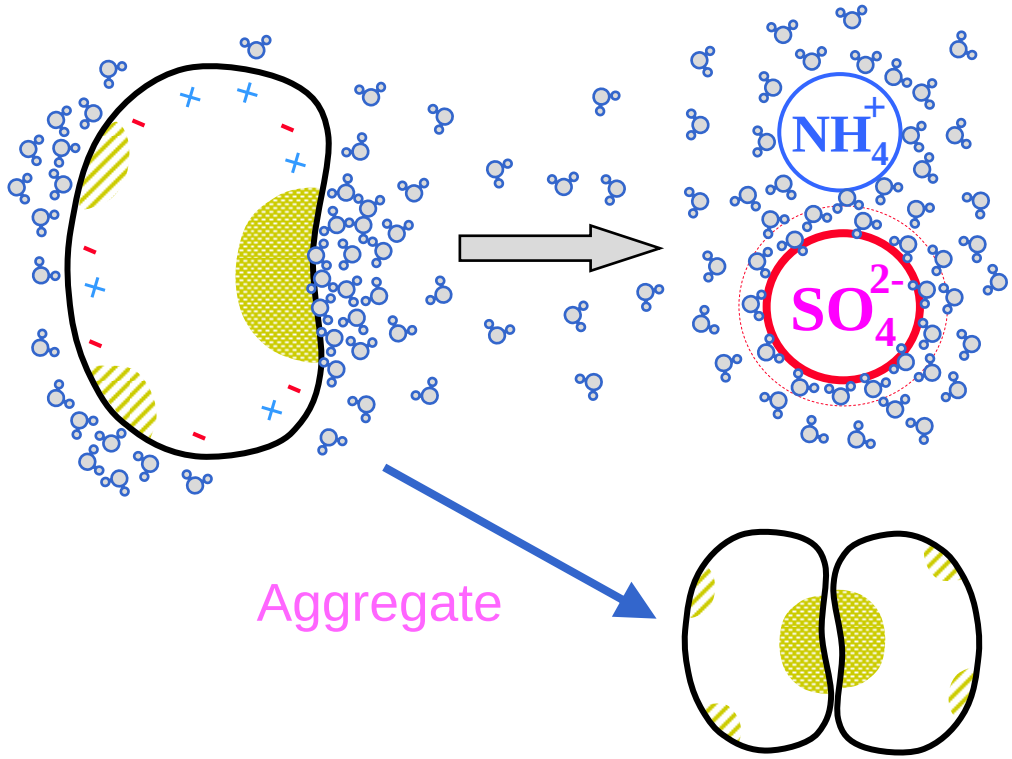


- 水分子會包圍在非極性分子四周，形成類似竹籠的構造，隔離非極性分子，水分子本身的流動性因此而降低。

Alberts et al (1994) Molecular Biology of the Cell (3e) p.49

鹽析 Salting-out ：

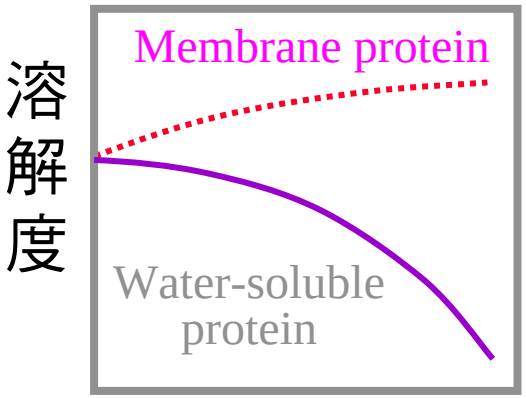


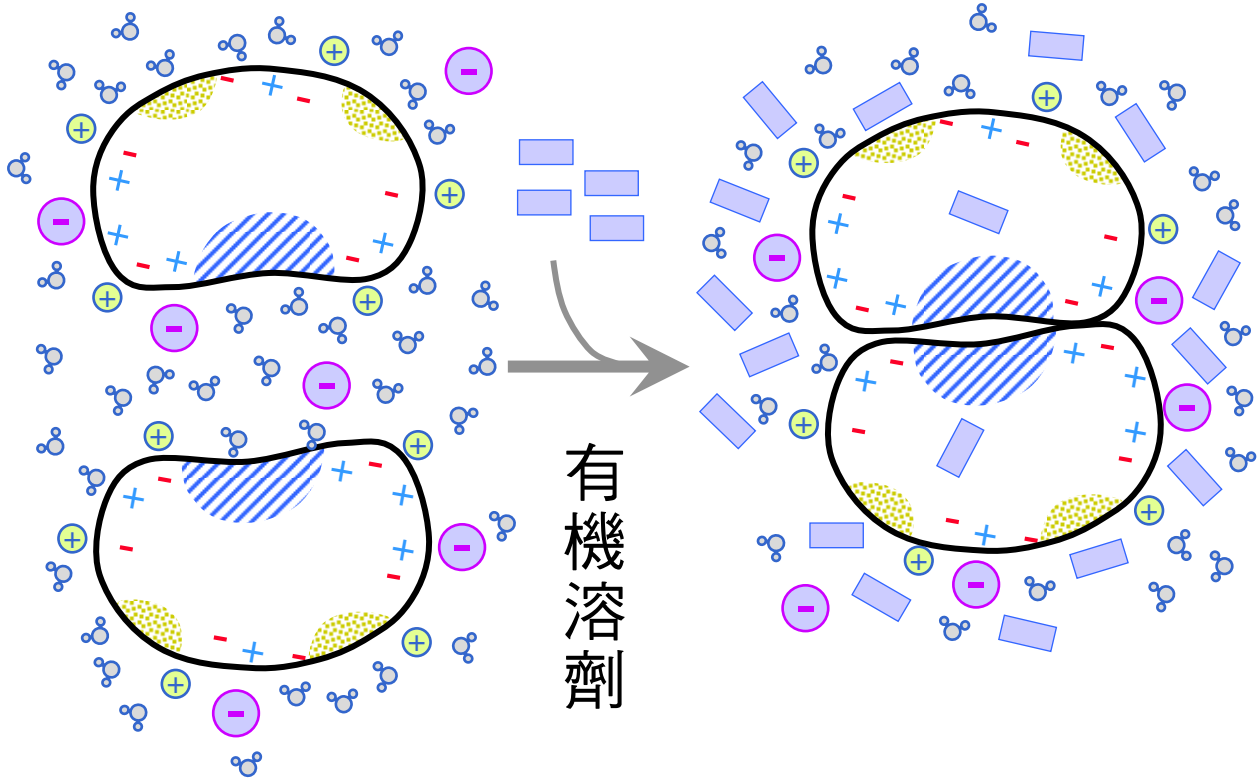


蛋白質分子表面的疏水性區域，都聚集許多水分子，當鹽類加入時，這些水分子被抽出，以便與鹽離子進行水合，暴露出來的疏水性區域互相結合，形成沈澱。

= hydrophobic

有機溶劑沈澱法：



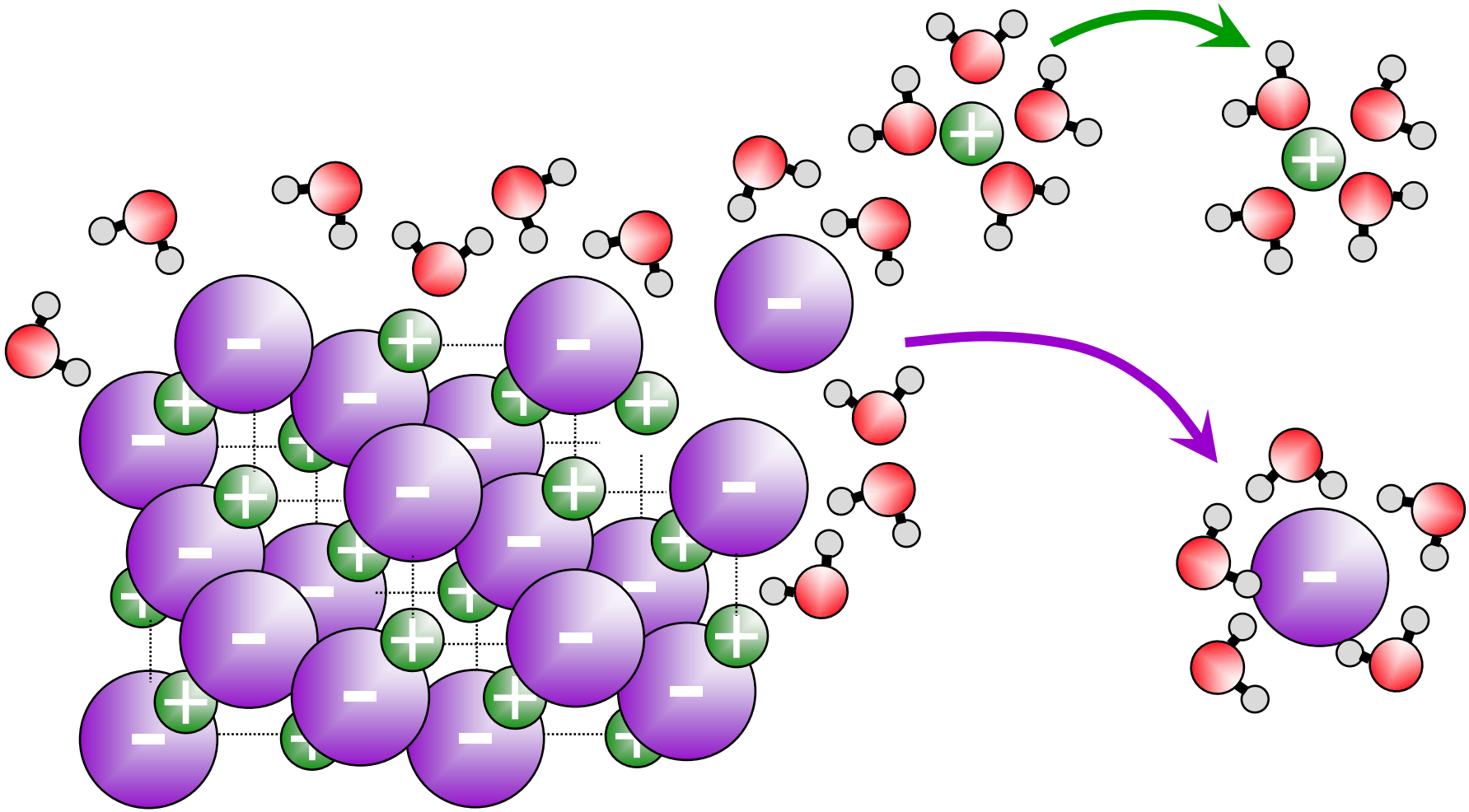


降低水活性，使溶液的介電常數下降，增加蛋白質溶質分子之間的作用力，因而聚集在一起。

= hydrophilic

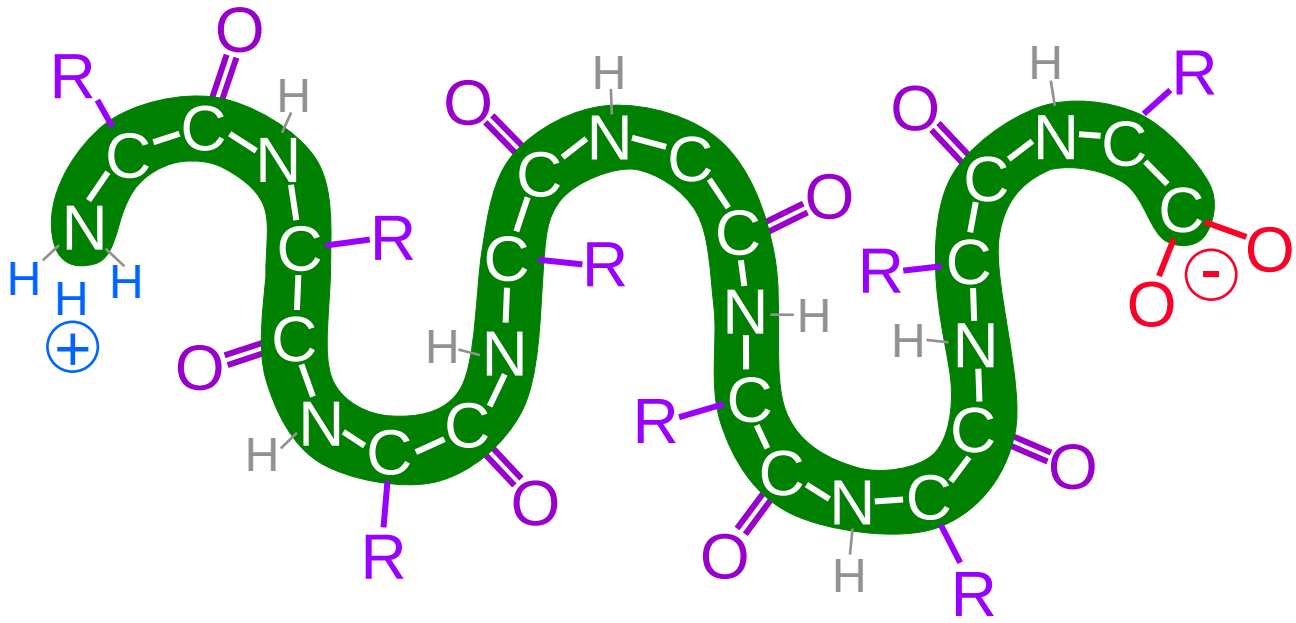
無所不在的水合作用 Hydration：

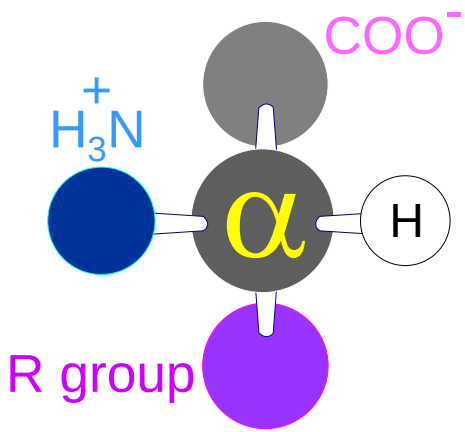
- 水分子易與極性粒子發生水合

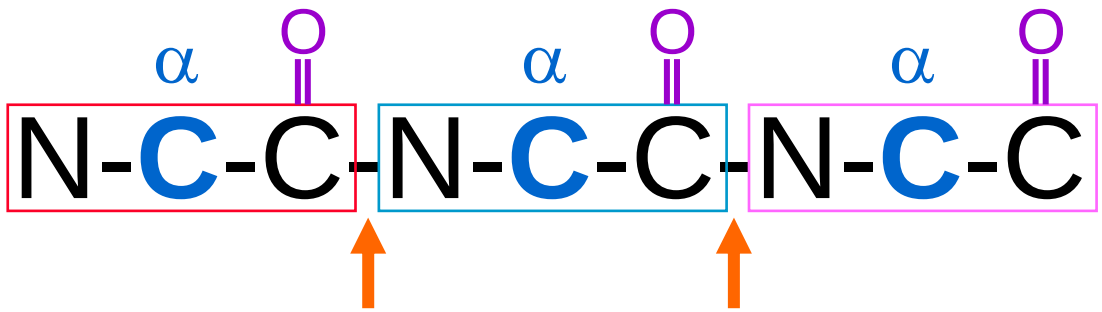


Adapted from Nelson & Cox (2000) Lehninger Principles of Biochemistry (3e) p.87

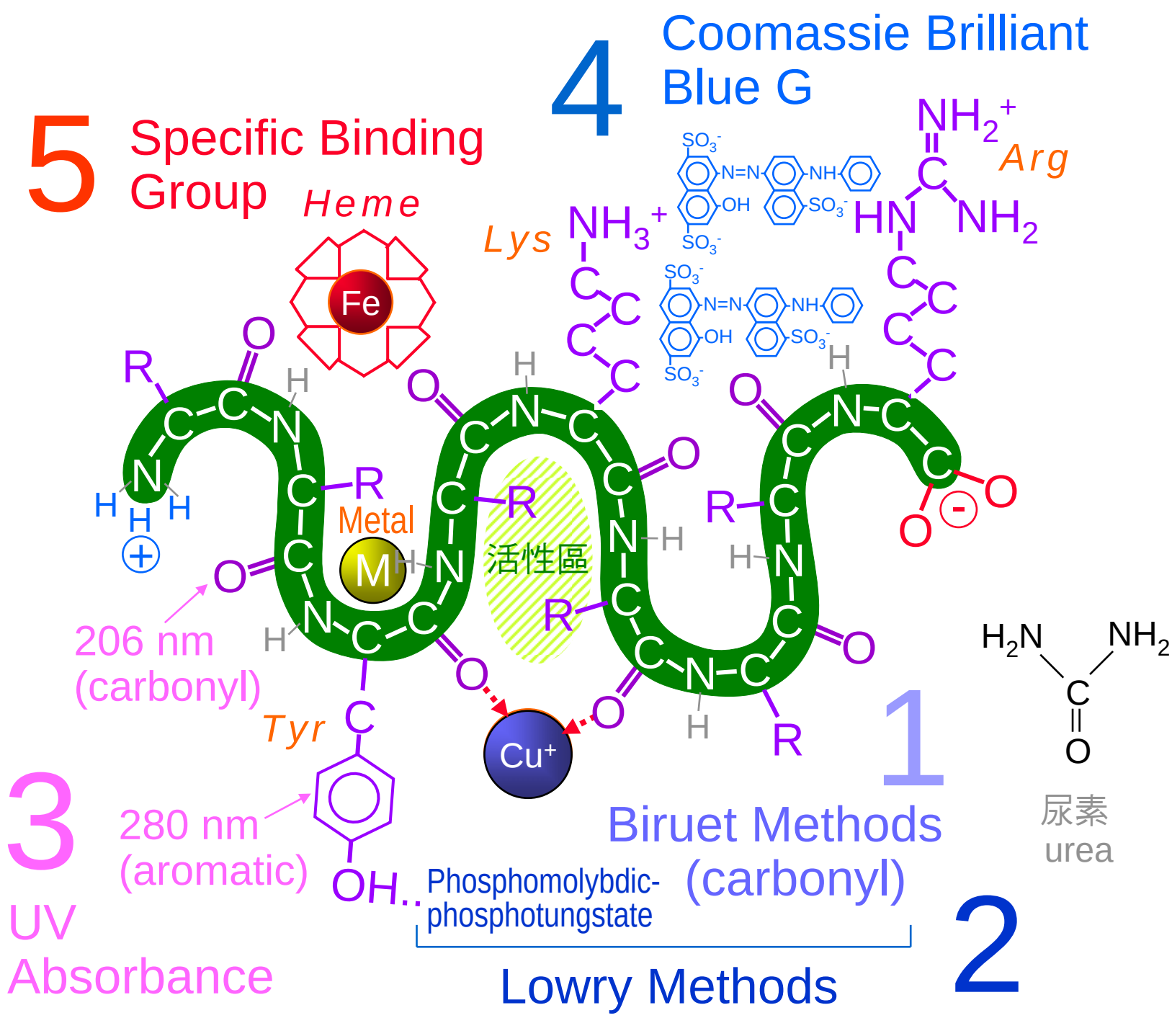
蛋白質構造的骨架：







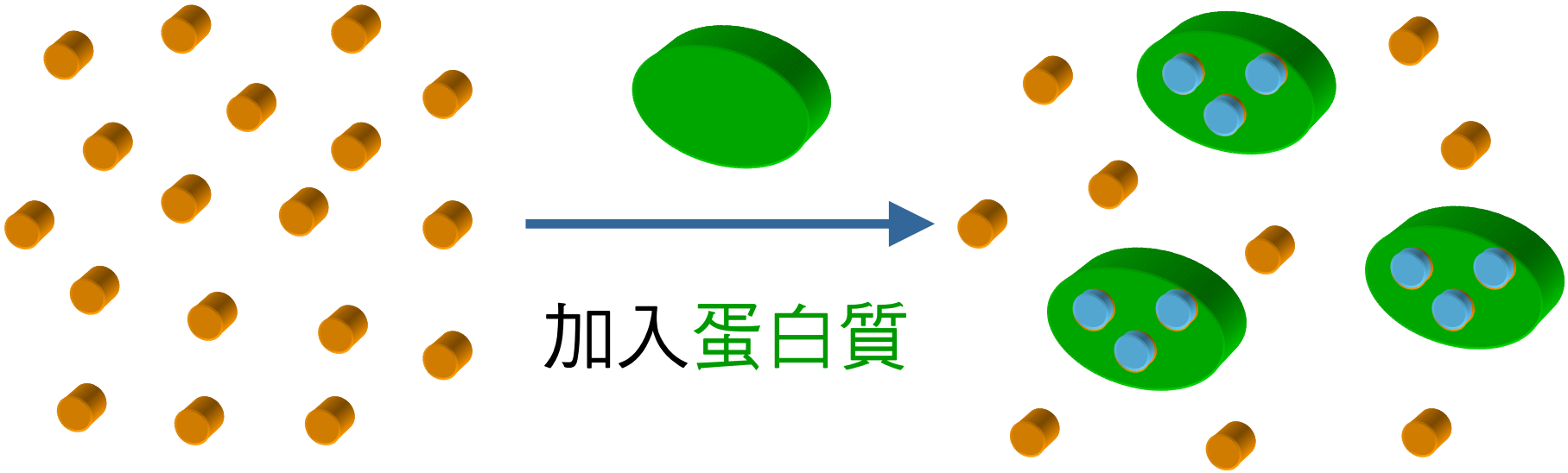
各種蛋白質定量法原理：


4
Coomassie Brilliant Blue G
5
Specific Binding Group
Heme
Fe
Lys
Arg
Metal
M
活性區
206 nm
(carbonyl)
Tyr
280 nm
(aromatic)
3
UV Absorbance
Cu+
1
Biuret Methods
(carbonyl)
尿素
urea
Phosphomolybdic-
phosphotungstate
2
Lowry Methods

Bradford Method：

Coomassie Brilliant Blue G-250

470 nm　　CBG 是一種指示劑　　595 nm



酸性環境下呈茶色

與蛋白質結合變藍色