

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

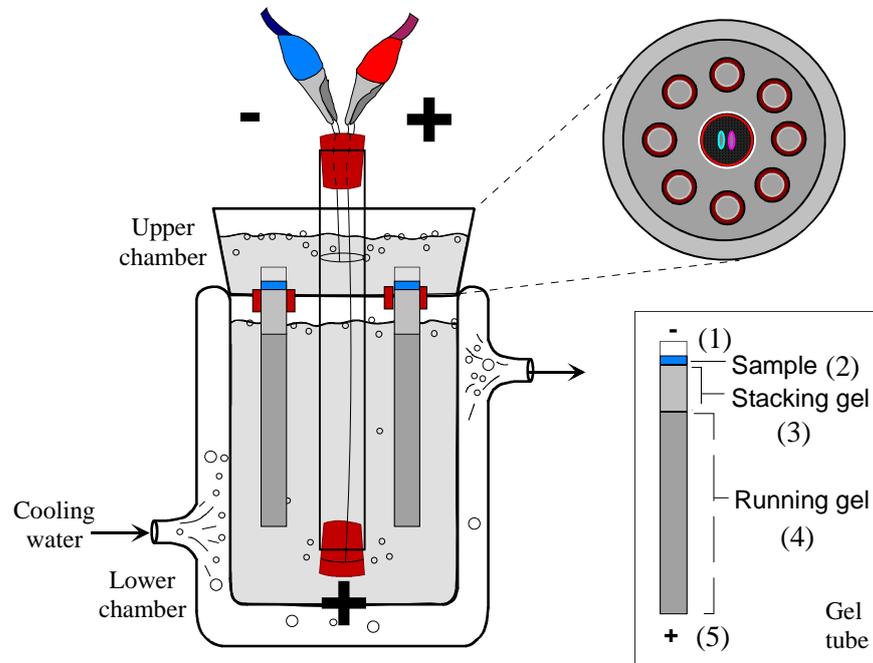


圖 P3-1 直立式柱狀電泳裝置與膠柱組成

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 $\text{pH} > 6.9$ 時 Gly 帶負電）或白色圓點（當環境 $\text{pH} = 6.9$ 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。

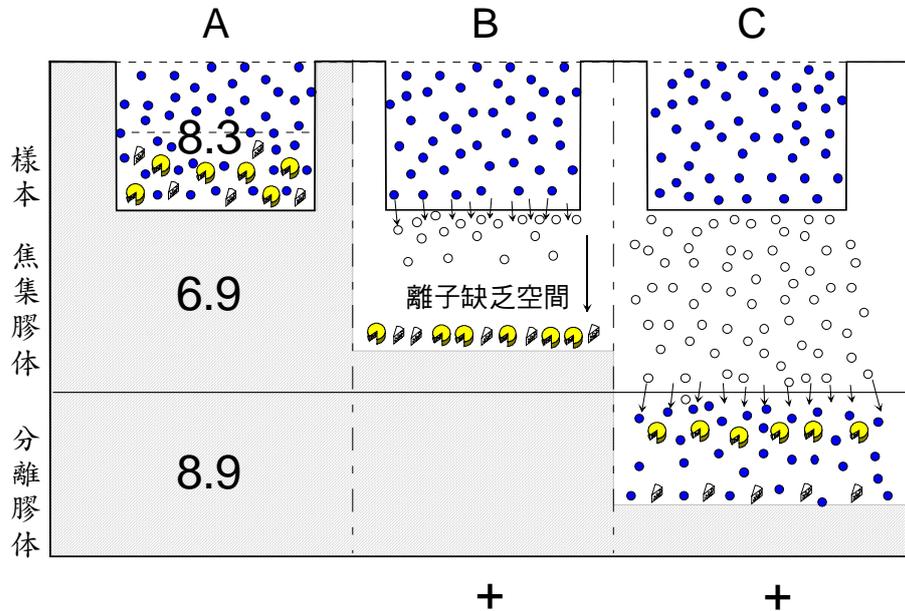


圖 P3-2 聚焦膠體的作用原理

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

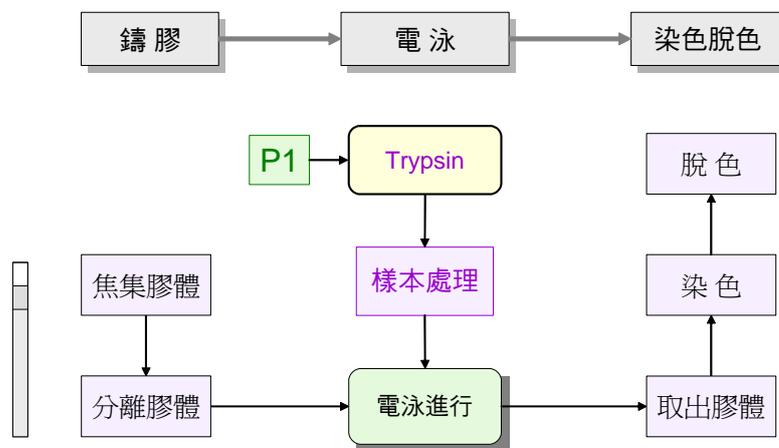


圖 P3-3 原態膠體電泳檢定的進行流程

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。

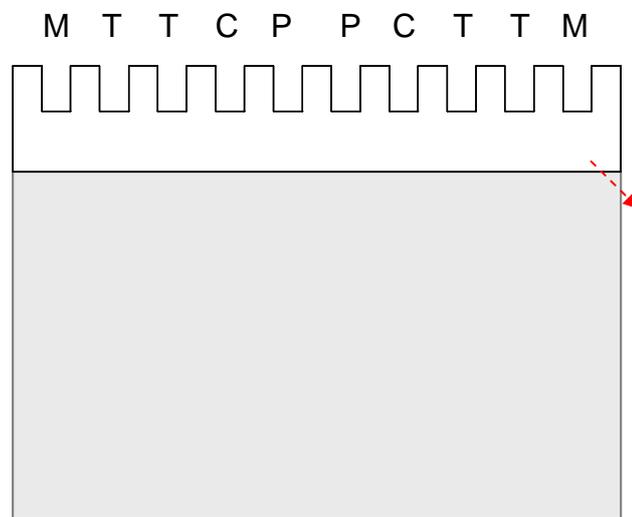


圖 P3-4 樣本的配置方式

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。

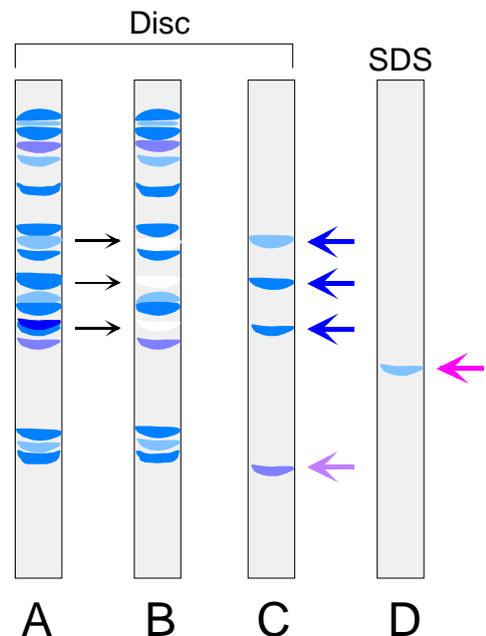


圖 P3-5 電泳分析結果

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