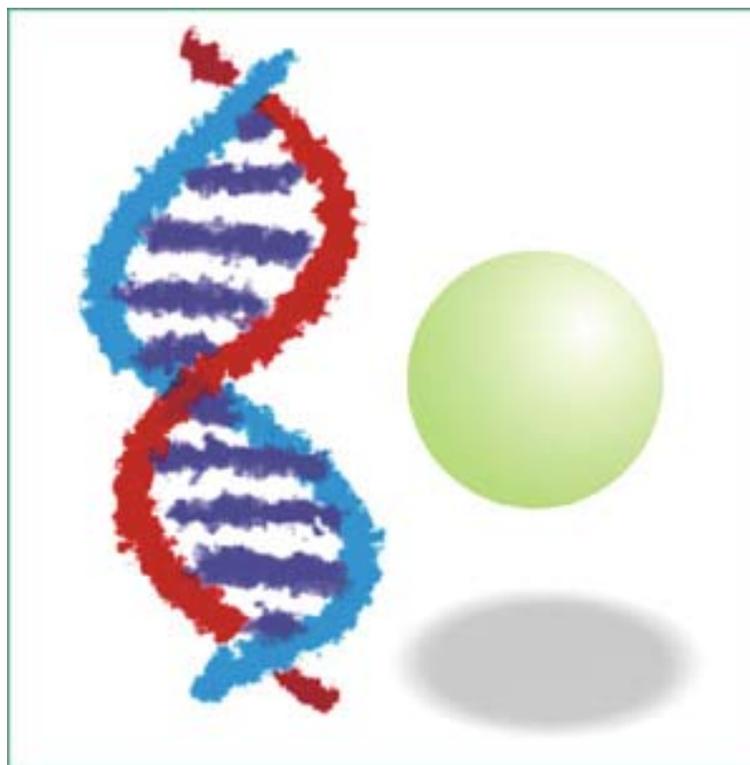




生化科技系
BST

BCX



P1

生物化學實驗

蛋白質抽取

At the Bench

A LABORATORY NAVIGATOR

UPDATED EDITION

"...a marvelously crafted, enormously useful and entertaining guide for the laboratory neophyte...a survival kit no bench worker should be without."



Kathy Barker



COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS

實驗室規則

- 1 嚴禁在實驗室內飲食、喧囂、嬉戲、聊天
- 2 操作實驗時請務必穿戴實驗衣及護目鏡
- 3 請遵守教師與助教的指示以避免發生危險
- 4 請勿自行攜入或攜出任何實驗用具、試劑
- 5 上課前請關好手機、上課中務必保持肅靜

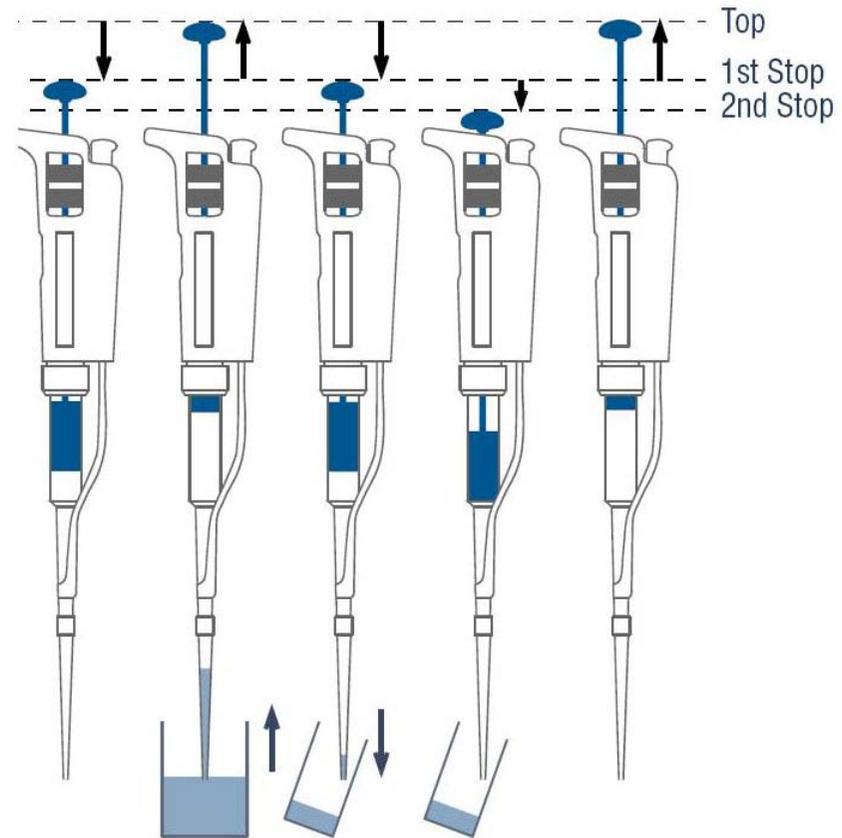
微量吸管使用要點：

General Guidelines for Good Pipetting

Example for each pipette:

P2 1 2 5 1.25 μ L	P10 0 7 5 7.5 μ L	P20 1 2 5 12.5 μ L	P100 0 7 5 75 μ L
P200 1 2 5 125 μ L	P1000 0 7 5 0.75 mL	P5000 1 2 5 1.25 mL	P10ml 0 7 5 7.5 mL

Model	Range
P2	0.2 - 2 μ L
P10	1 - 10 μ L
P20	2 - 20 μ L
P100	20 - 100 μ L
P200	50 - 200 μ L
P1000	200 - 1000 μ L
P5000	1 - 5 mL
P10ml	1 - 10 mL



★ 每日使用完後請調整至最大刻度以上

實驗大綱

可用流程图或條列文字

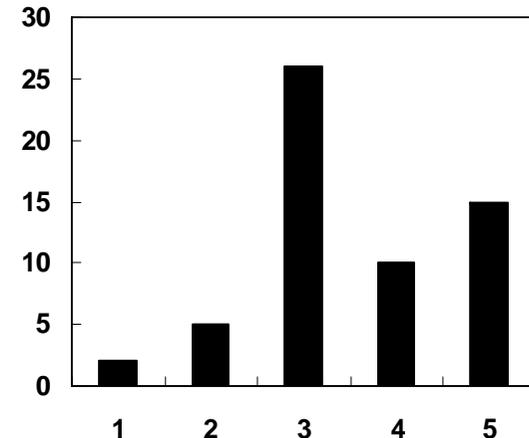
報告版面大小

Poster size

120 cm X 90 cm

表格一 小標題與說明文字

實驗步驟	蛋白質濃度 (mg/mL)
丙酮沈澱	100
透析	90
親和層析	80
濃縮	60
膠體過濾	50



圖表二 小標題與說明文字
#3具有最高Trypsin活性

結果與討論

(1)

(2)

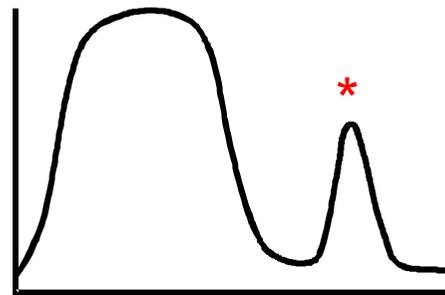
報告電子檔請寄

謝毅霖助教

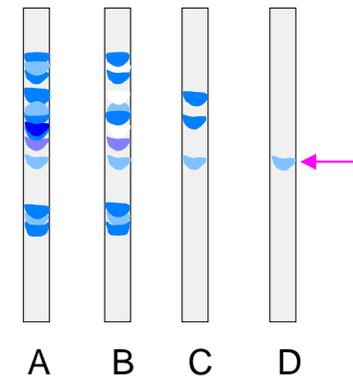
d95b47202@ntu.edu.tw

或以隨身碟

直接至AC2-510 繳交

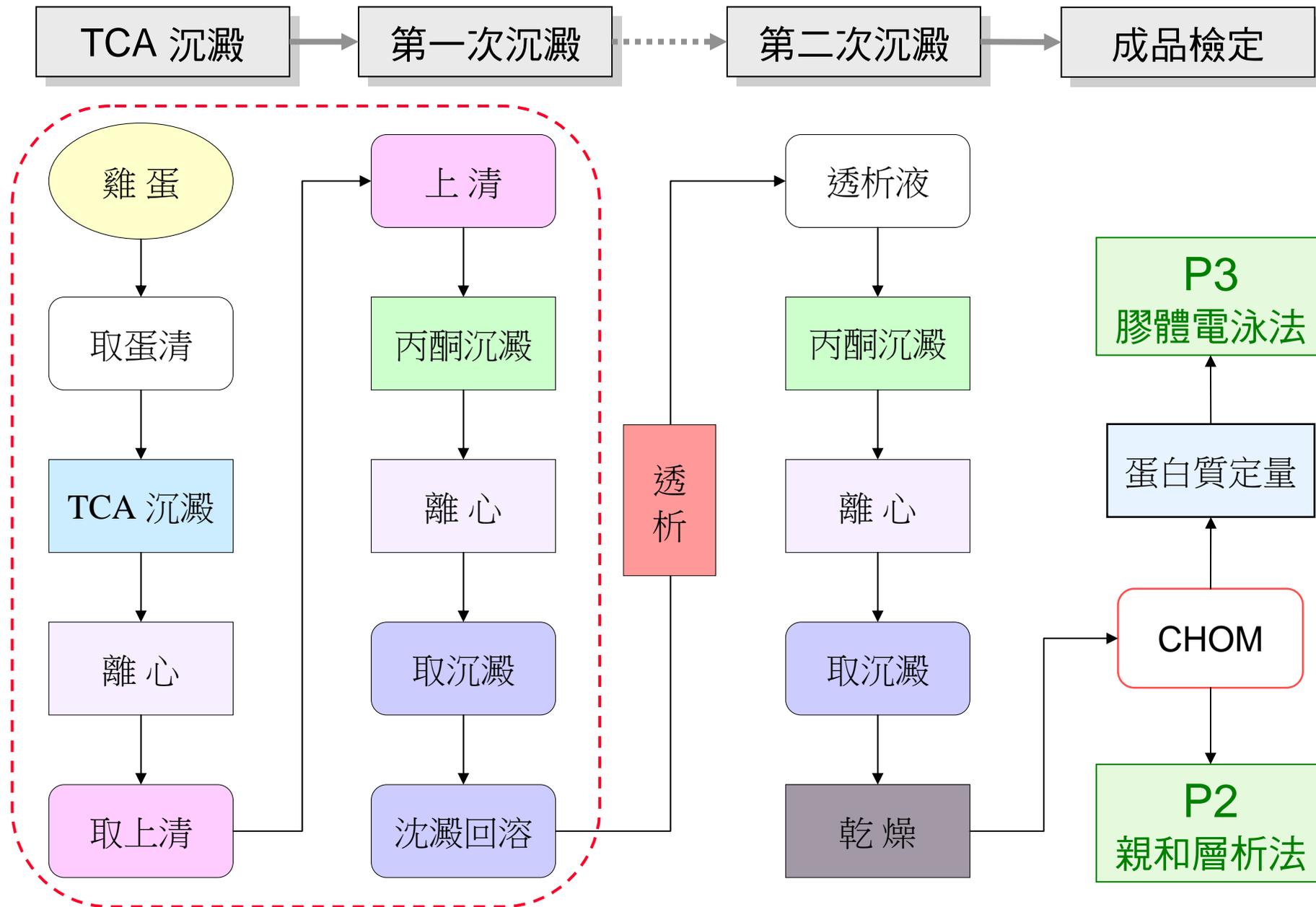


圖表一 小標題與說明文字
實線代表蛋白質濃度。
*代表吸附於管柱的Trypsin



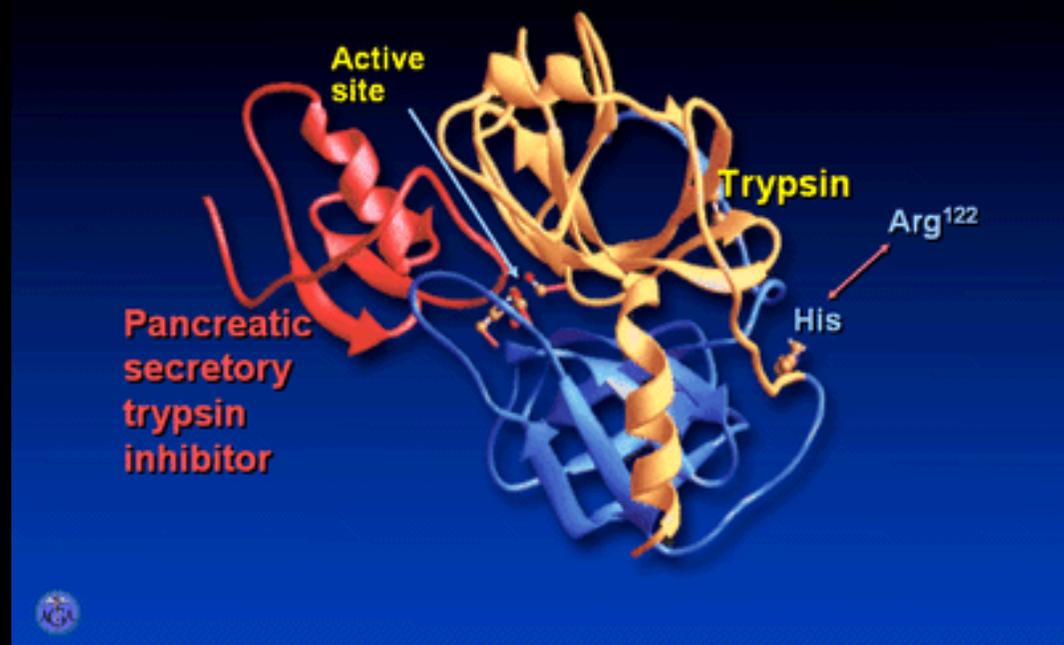
圖表三 小標題與說明文字
箭頭所指的蛋白質色帶為
Trypsin

P1 蛋白質抽取



CHOM (Trypsin inhibitor)

Trypsin



<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/jmol/trypinhib/tryp.htm>

蛋白質抽取要點：

STEP 1: 瞭解目標蛋白質的特性

水溶性



醇溶性

玉米醇溶蛋白(zein)
玉米蛋白中的主要蛋白
不溶於水且缺乏 Lysine、
Serine等必需氨基酸，
食用及營養價值低。
抽取時要加 Ethanol

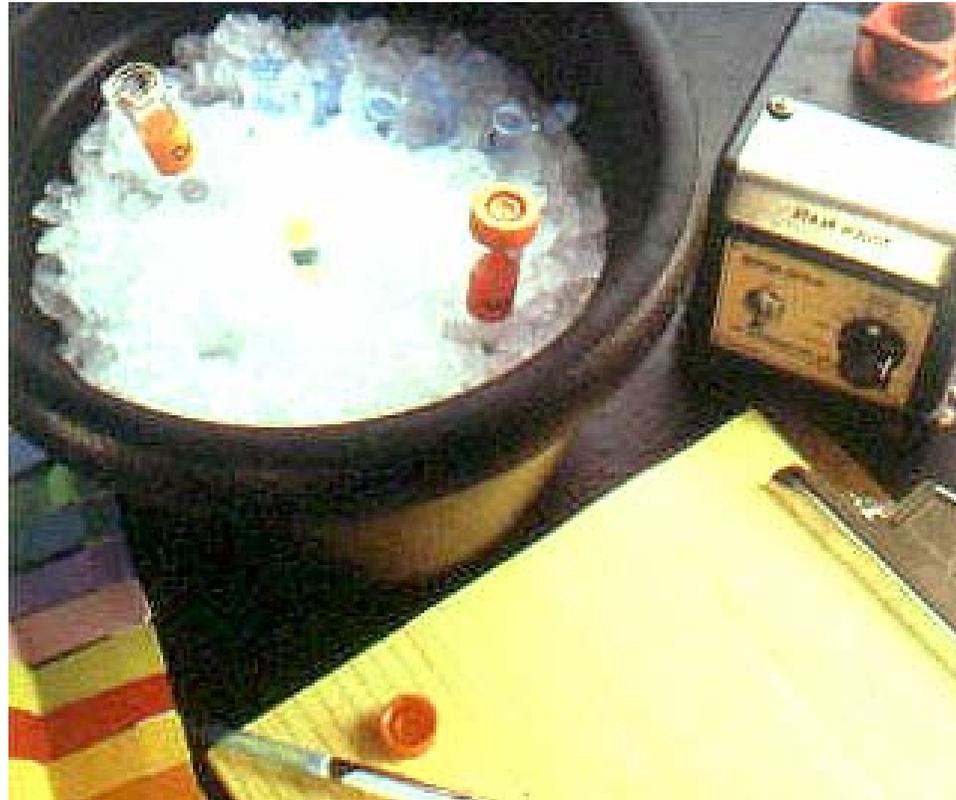
油溶性

例如：鑲嵌於細胞膜的蛋白質
抽取時要加 Detergent

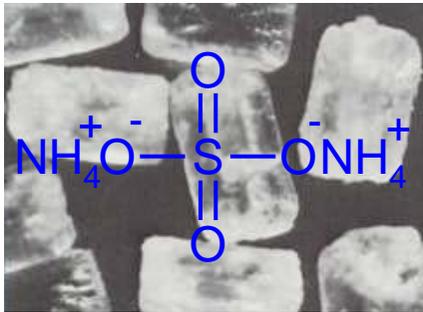


■ 蛋白質抽取操作要點：

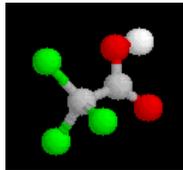
- (1) 降低溫度
- (2) 儘速純化
- (3) 避免氧化
- (4) 避免吸附
- (5) 避免污染



蛋白質沈澱法：



TCA



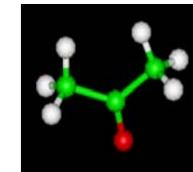
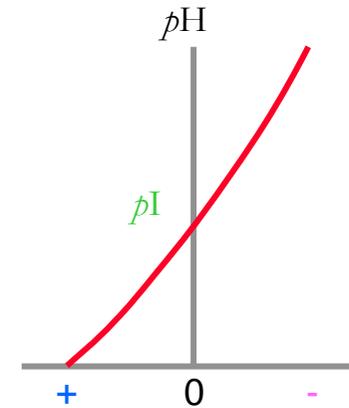
(1) 等電點沈澱法

(2) 硫酸銨沈澱法

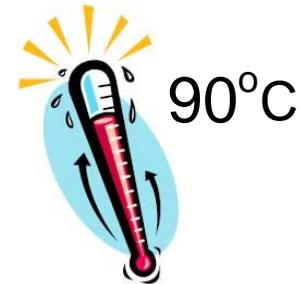
(3) 有機溶劑沈澱法

(4) 三氯醋酸沈澱法

(5) 加熱沈澱法



Acetone

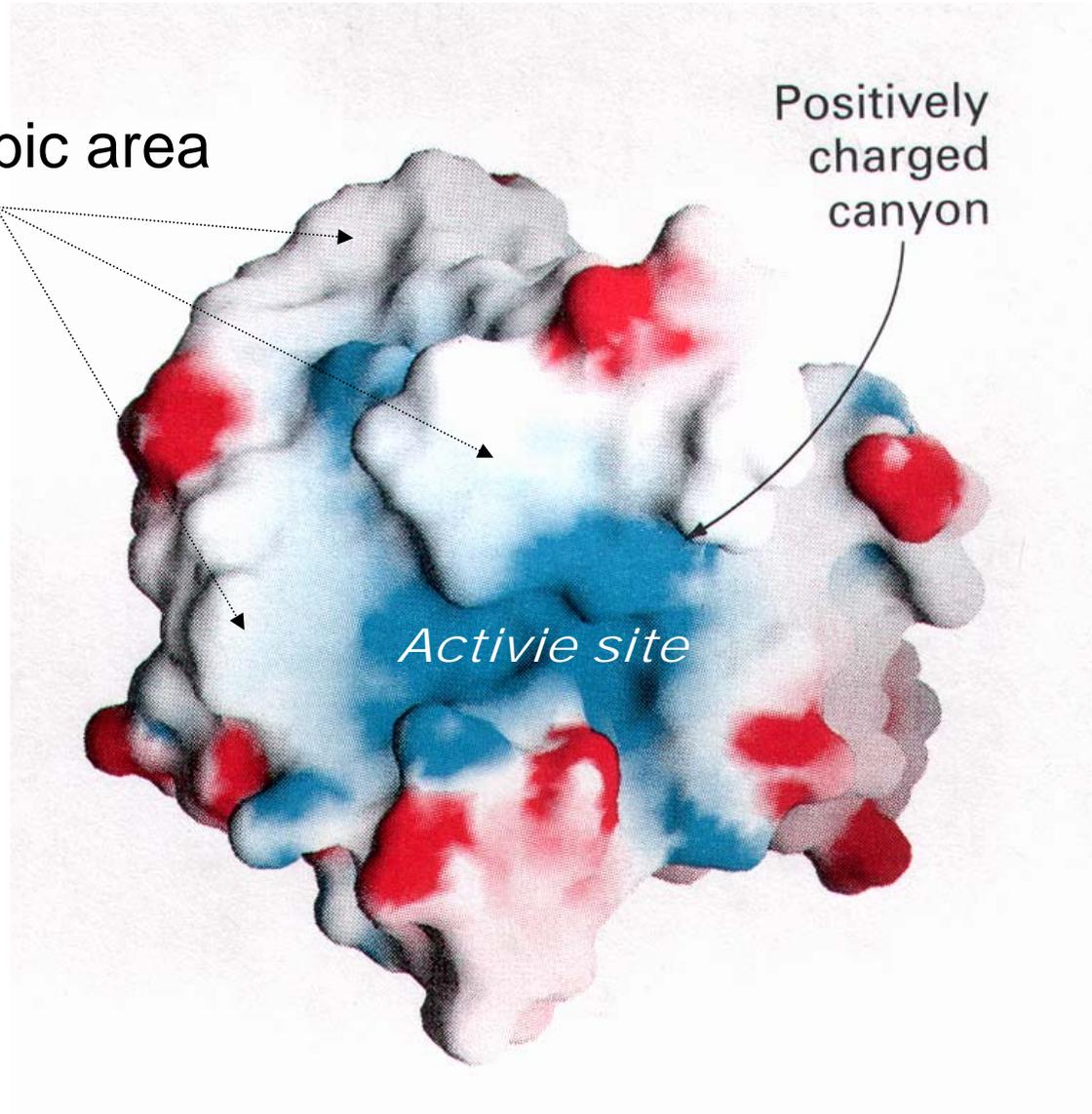


蛋白質表面的極性或非極性分布：

Hydrophobic area

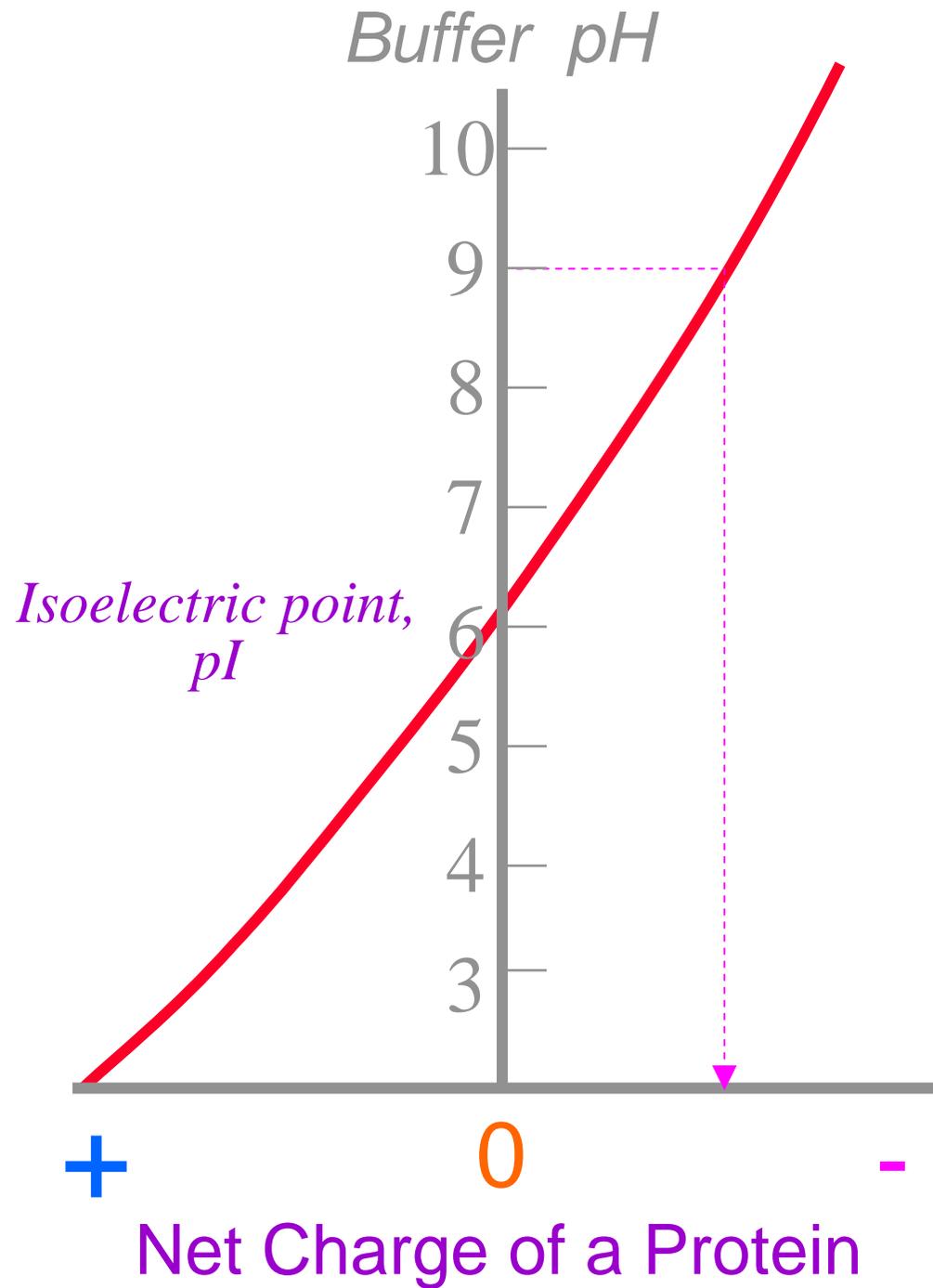
Positively charged canyon

Active site

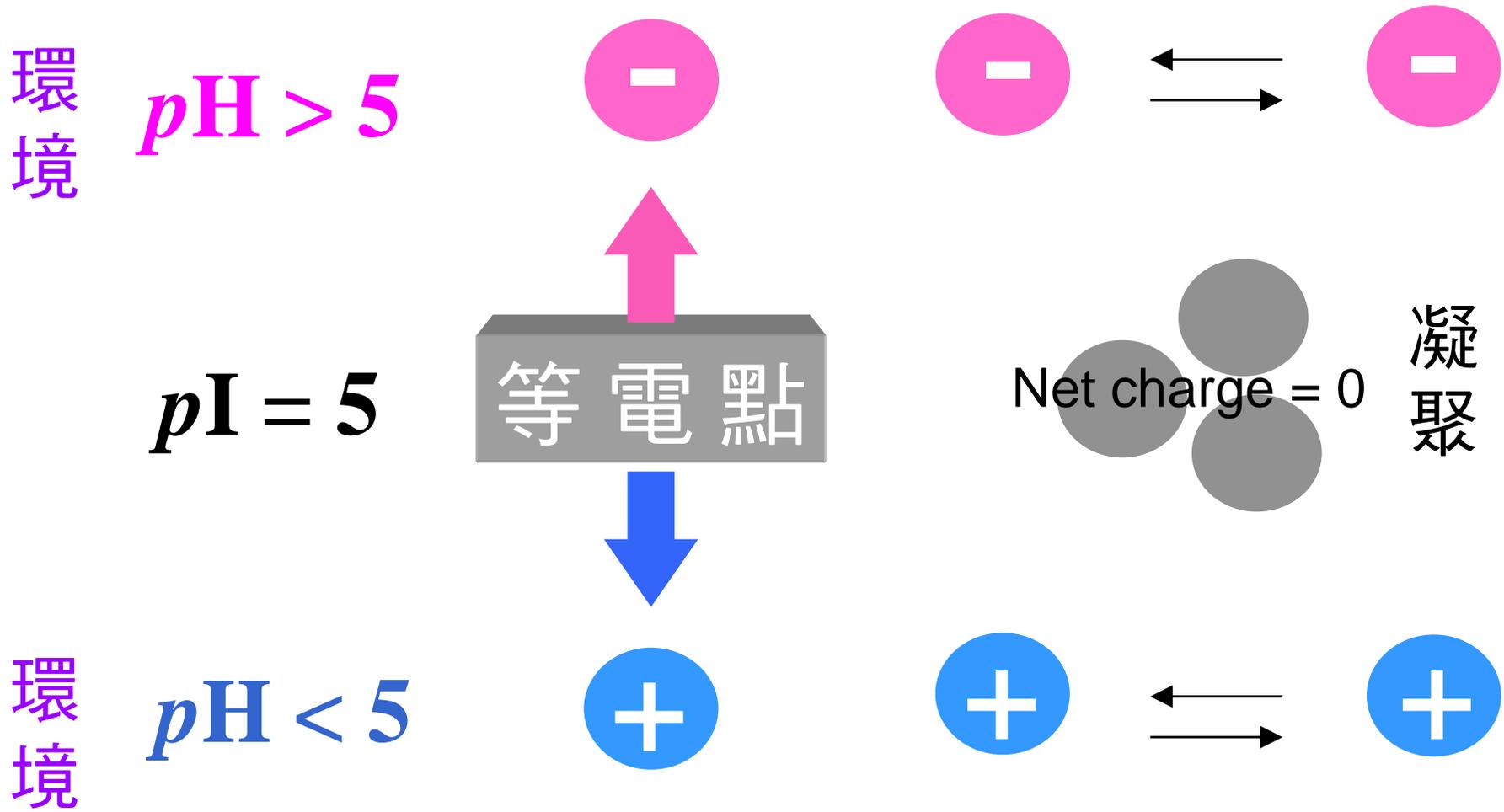


Superoxoide
dismutase
(SOD)

■ 環境影響分子的帶電性質：



■ 等電點與環境 pH 的關係：



■ 鹽對蛋白質溶解度的影響：



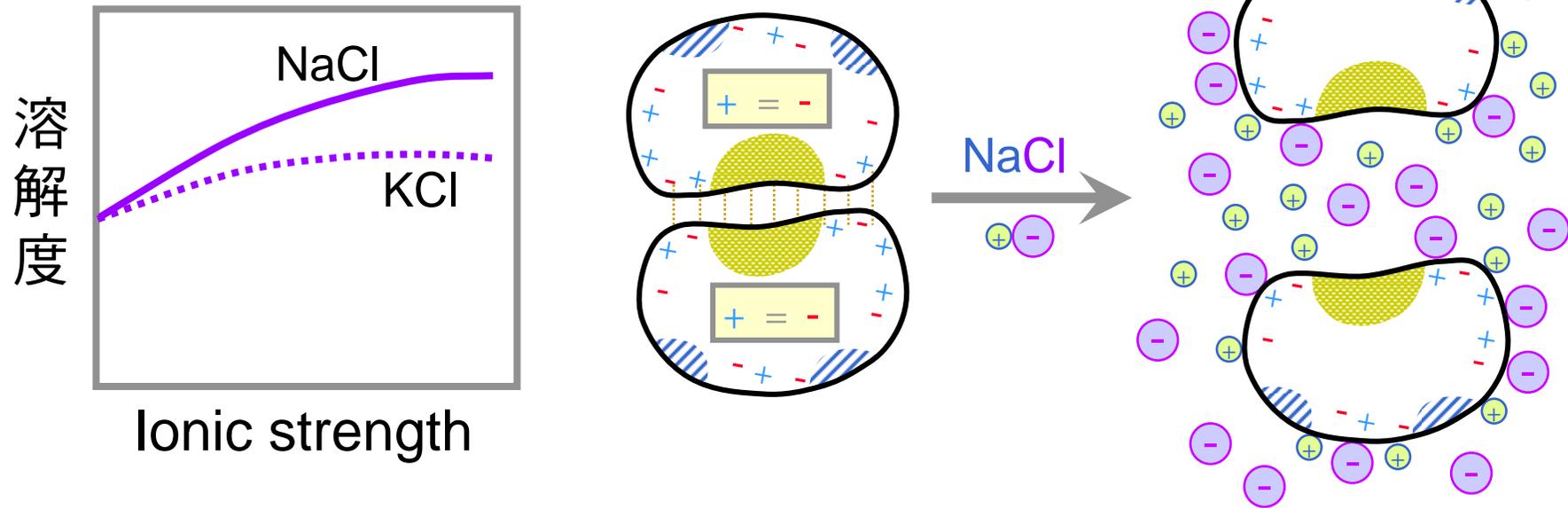
● 鹽溶 Salting-in:

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

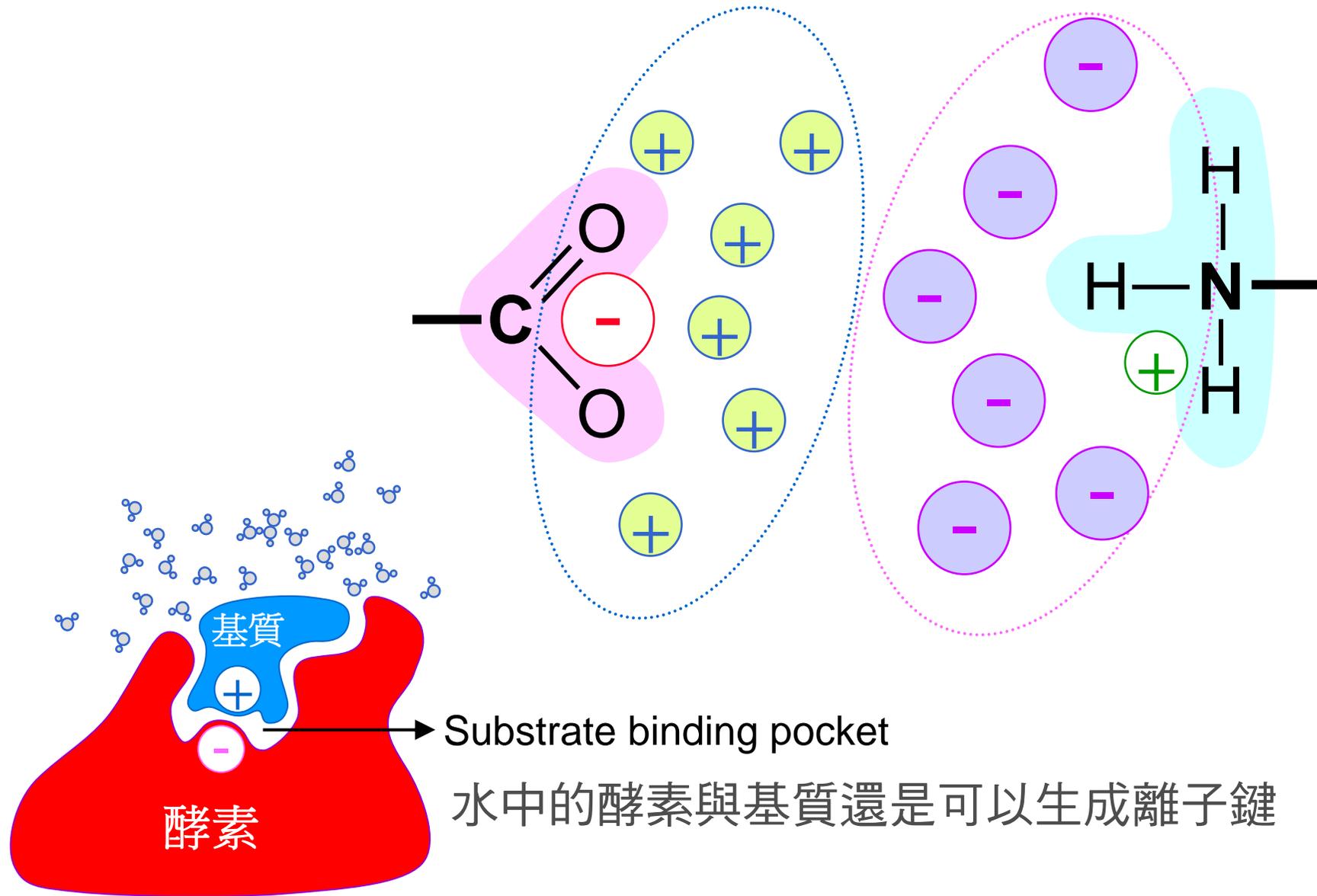
■ 鹽溶 Salting-in :



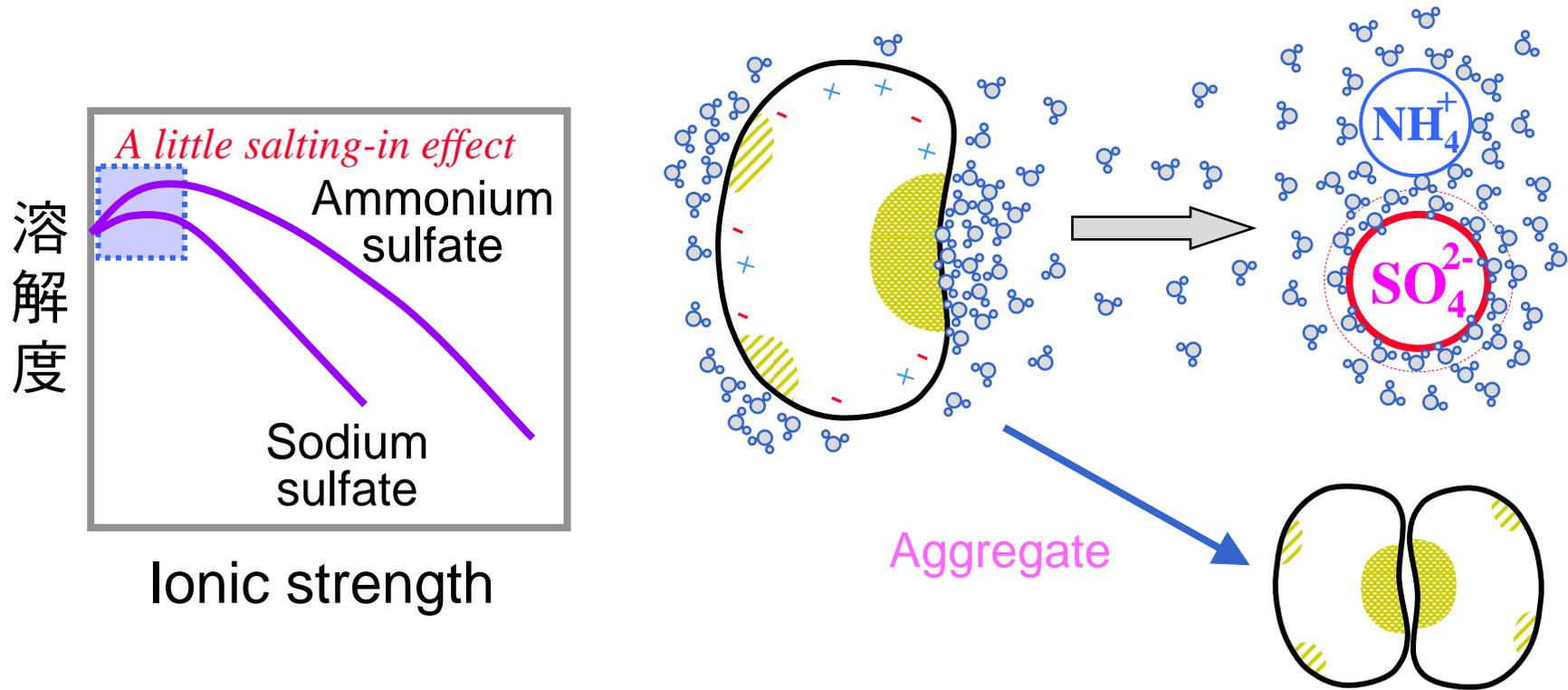
分子在其等電點時，容易互相吸引，聚合成沈澱；加入鹽離子會破壞這些吸引力，使分子散開，溶入水中。

■ 離子鍵在鹽溶液中不易形成：

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



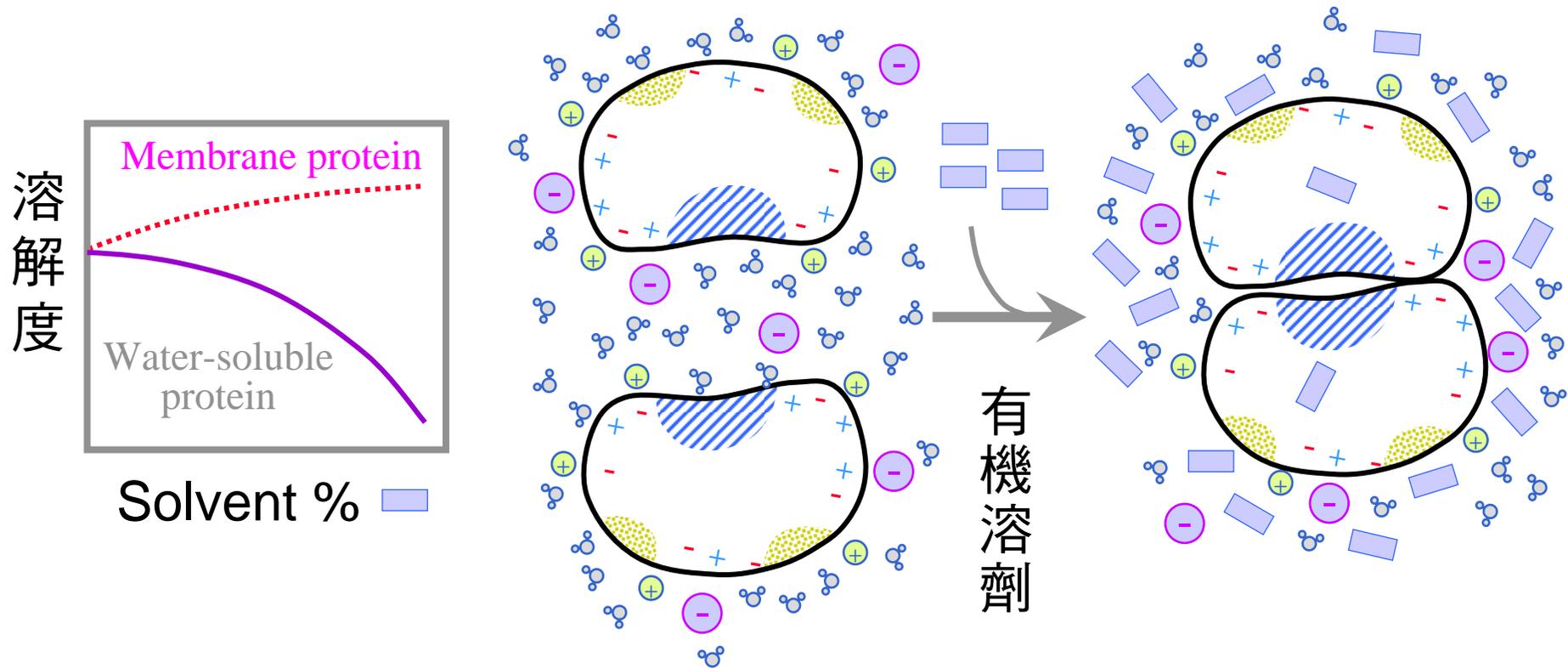
鹽析 Salting-out : 硫酸銨沈澱



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：丙酮沈澱



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

■ 極端的蛋白質沈澱法：使蛋白質變性

三氯醋酸沈澱法

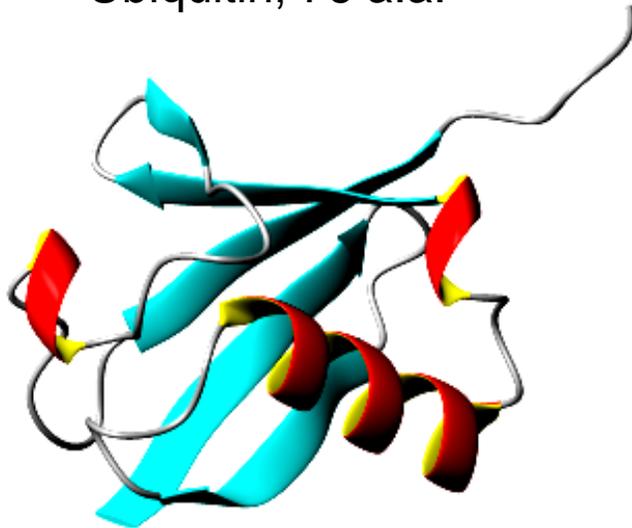
加熱沈澱法

這些方法並不常被使用於純化蛋白質的步驟中
通常是用來沈澱或移除大部分的蛋白質

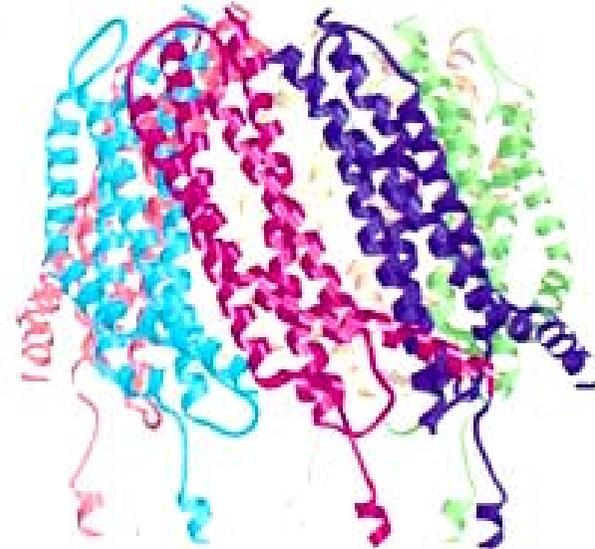
優點

若目標蛋白質並不因此而變性，反而可以得到非常好的純化效果

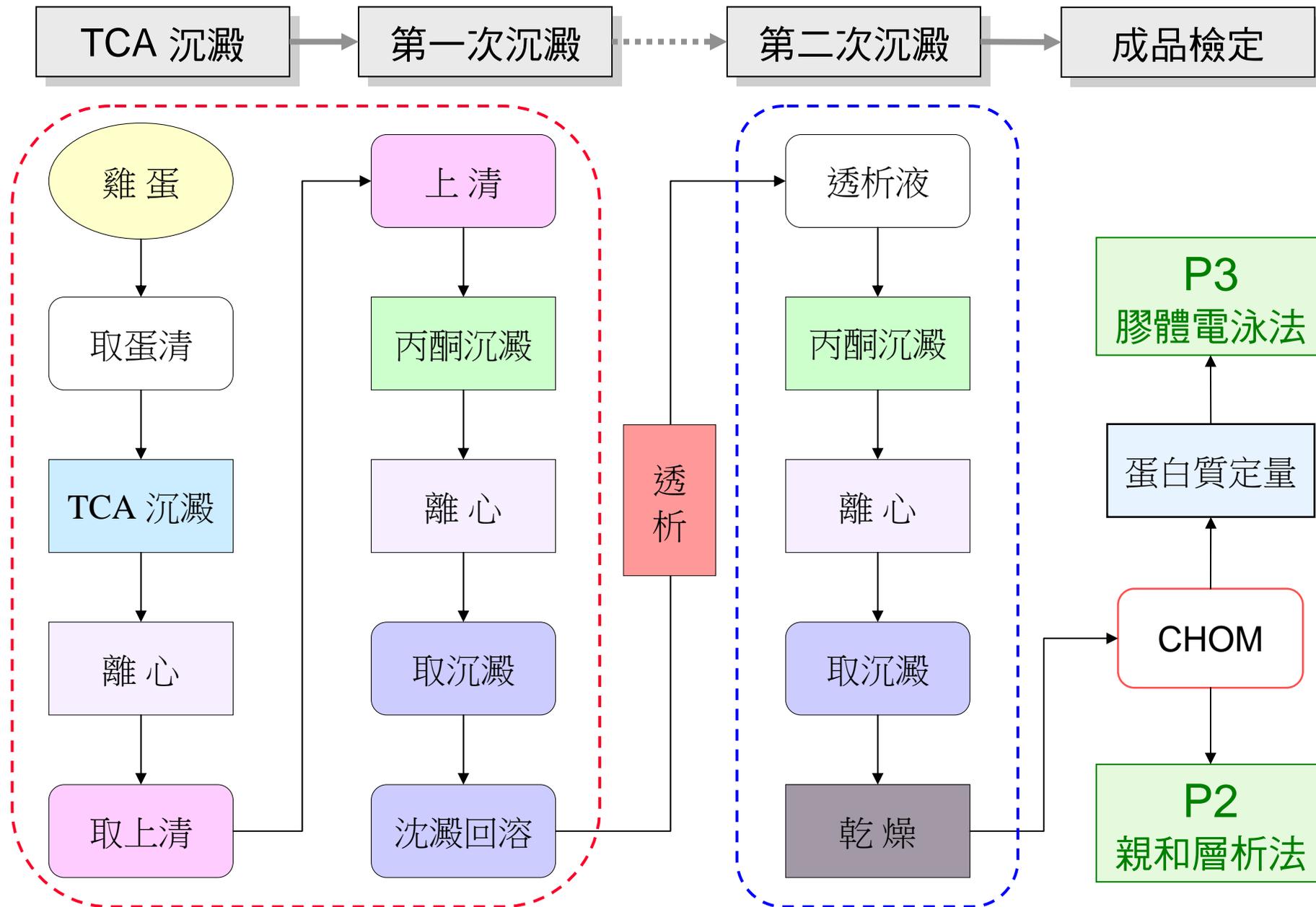
Ubiquitin, 76 a.a.



Proteasome-activating nucleotidase



P1 蛋白質抽取



■ 透析(dialysis) : desalting and exchange buffer

