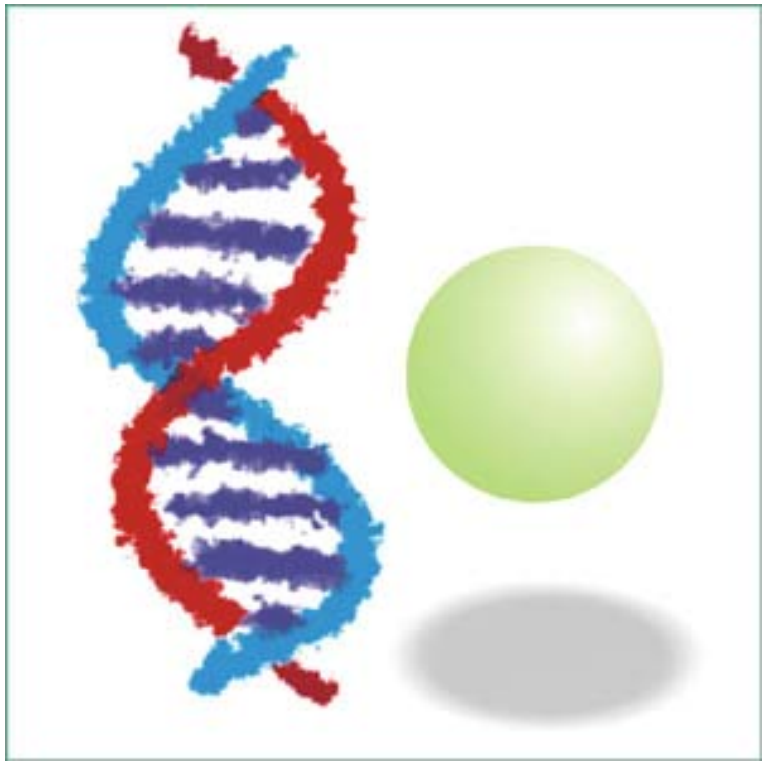
BST

生化科技系

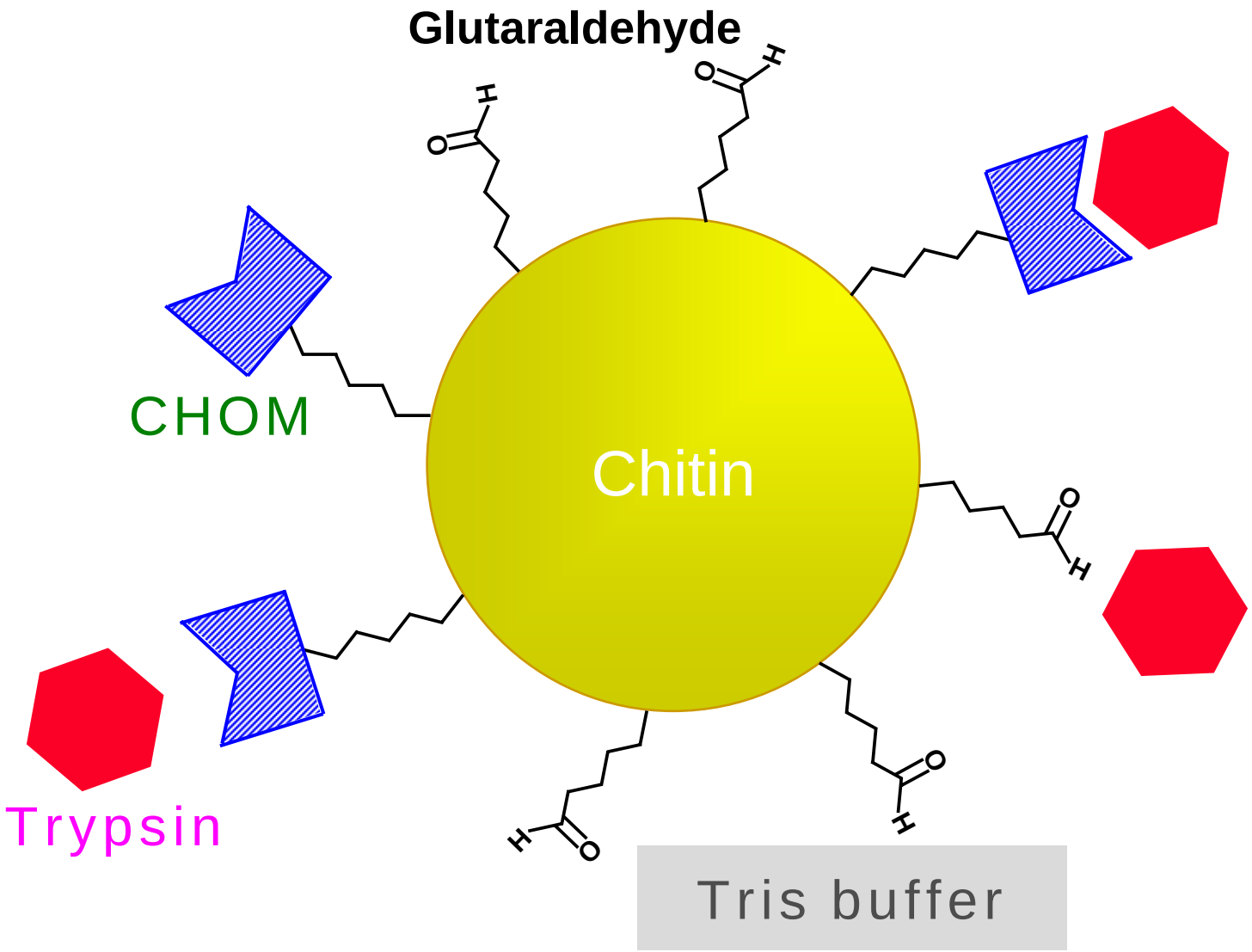


BCX

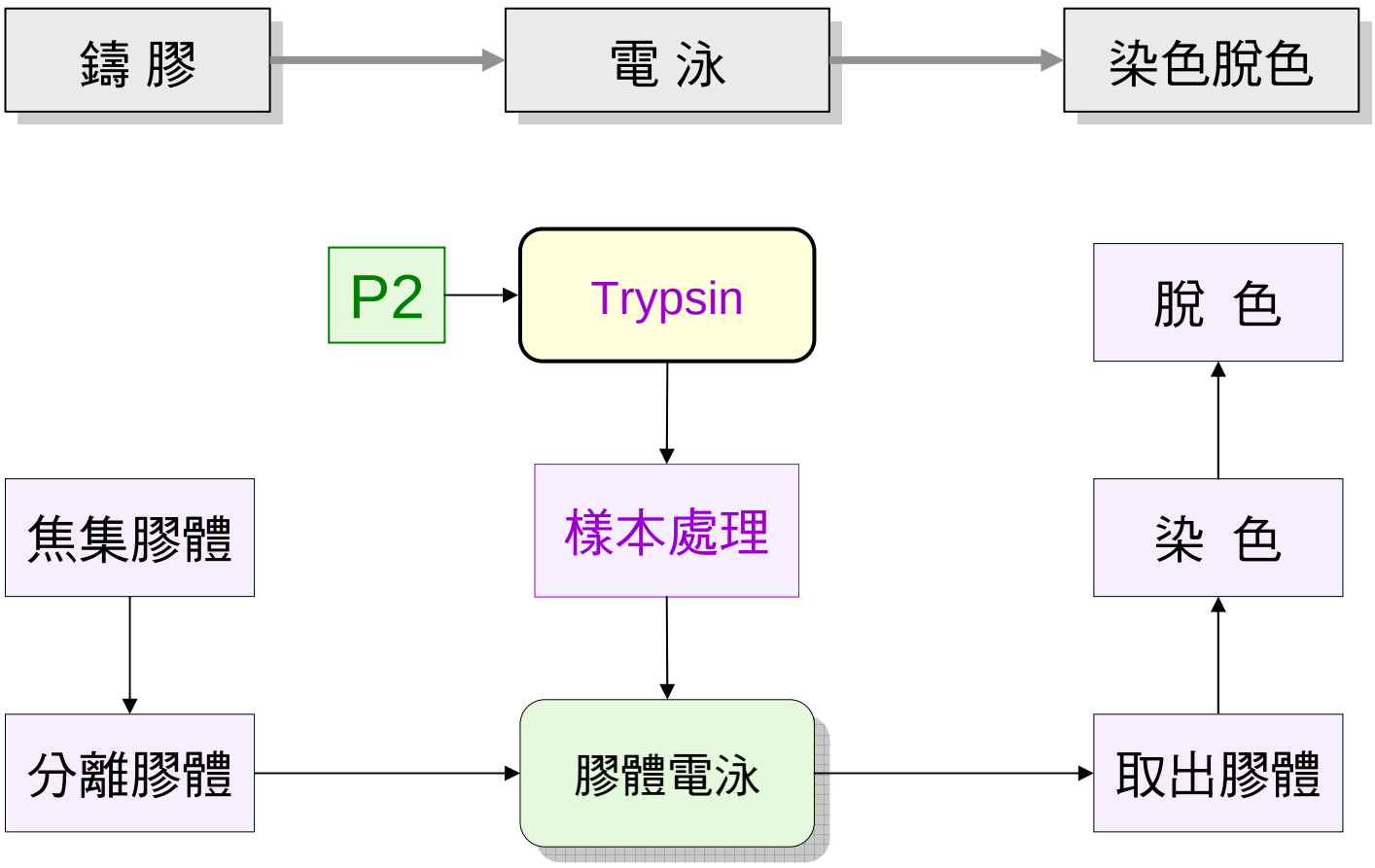
P3

生物化學實驗

膠體電泳法

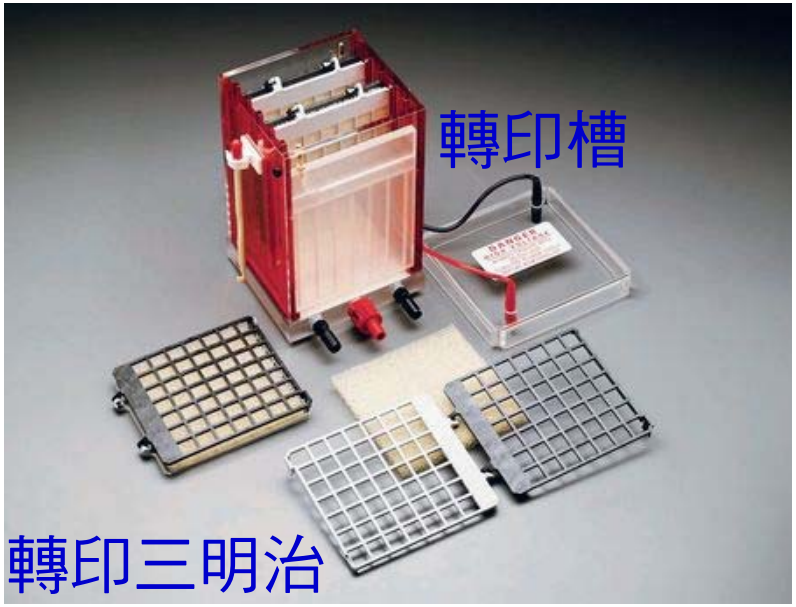

Glutaraldehyde
CHOM
Chitin
Trypsin
Tris buffer

P3 膠體電泳法



電泳槽及相關設備：

電泳槽



轉印槽

轉印三明治

鑄膠器

供電器

膠體的聚合反應：

Ammonium persulfate (free radical initiator)

$(O_4S\text{-}SO_4)^{2-} \longrightarrow 2\ SO_4^{-}$

自由基的生成者

Acrylamide (monomer)

成膠的基本單位

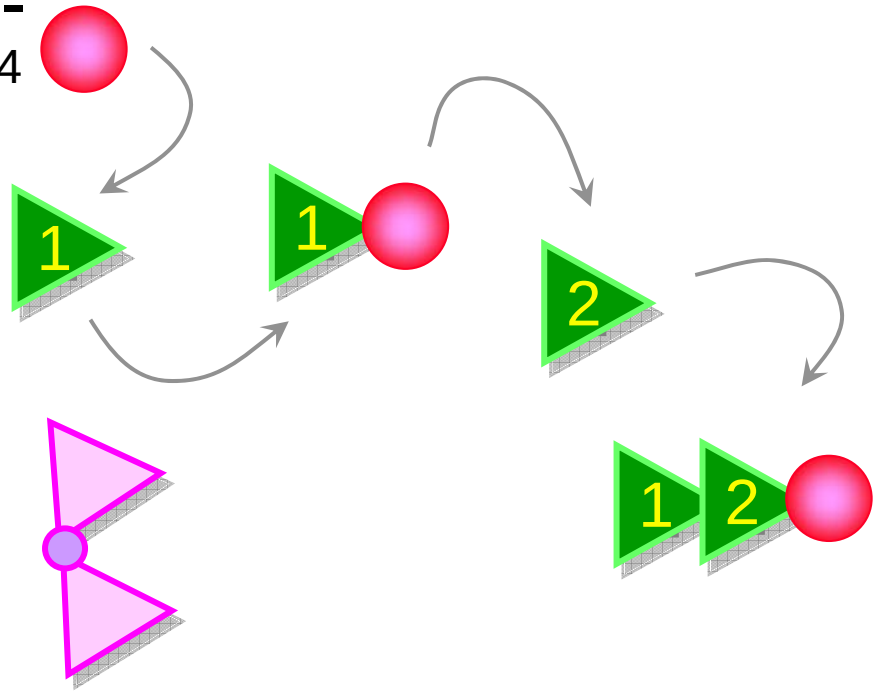
Bis(acrylamide) (bridge)

架橋使聚合產生分枝

TEMED (catalyst)

幫助傳遞自由基的催化劑

SDS (Sodium dodecyl sulfate)



$CH_2=CH\text{-}CO\text{-}NH_2$

Acrylamide 有毒性！

單體聚合反應：

鑄膠反應

聚合反應

free radical

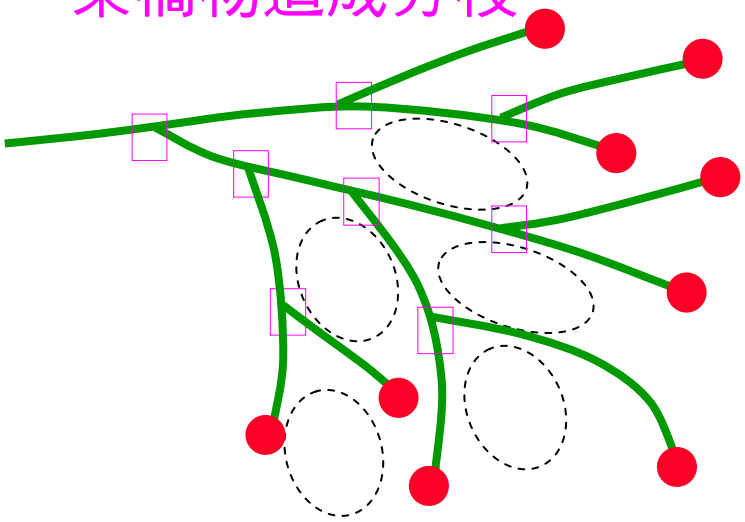
Bis

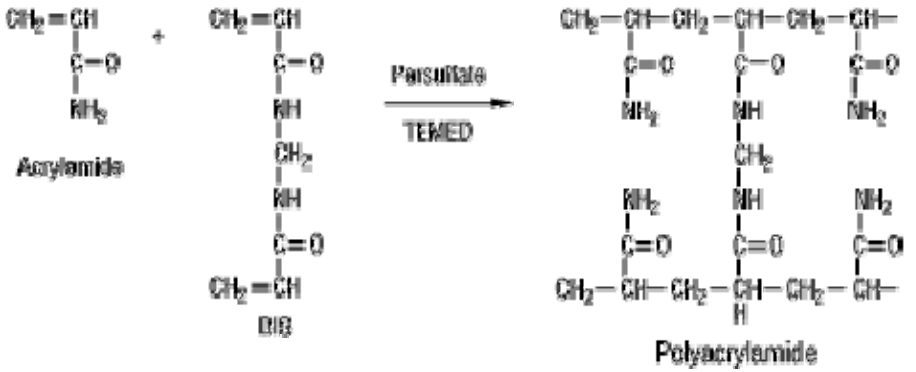
交錯連結

端點自由基
可再延續

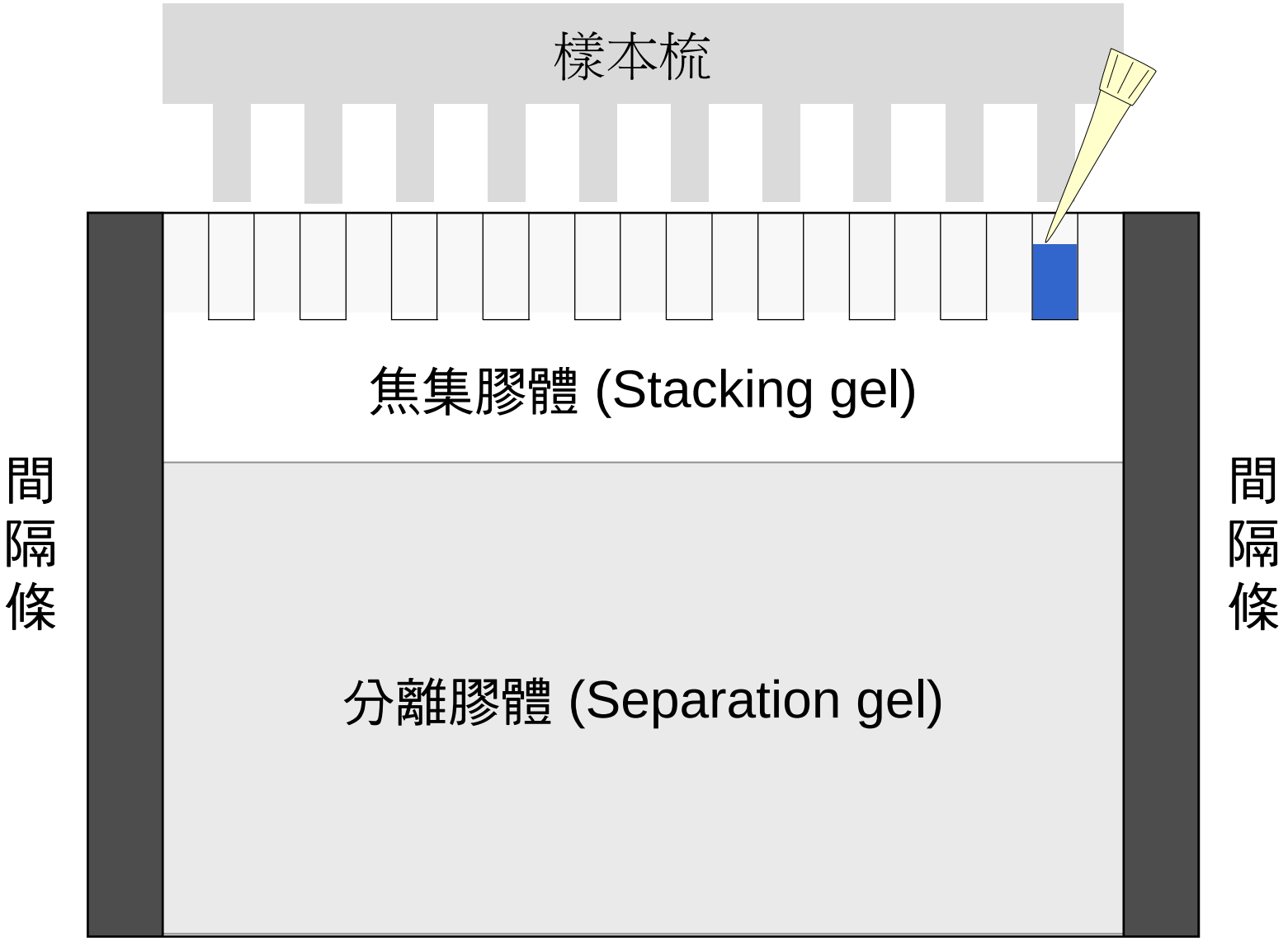
Bis

架橋物造成分枝



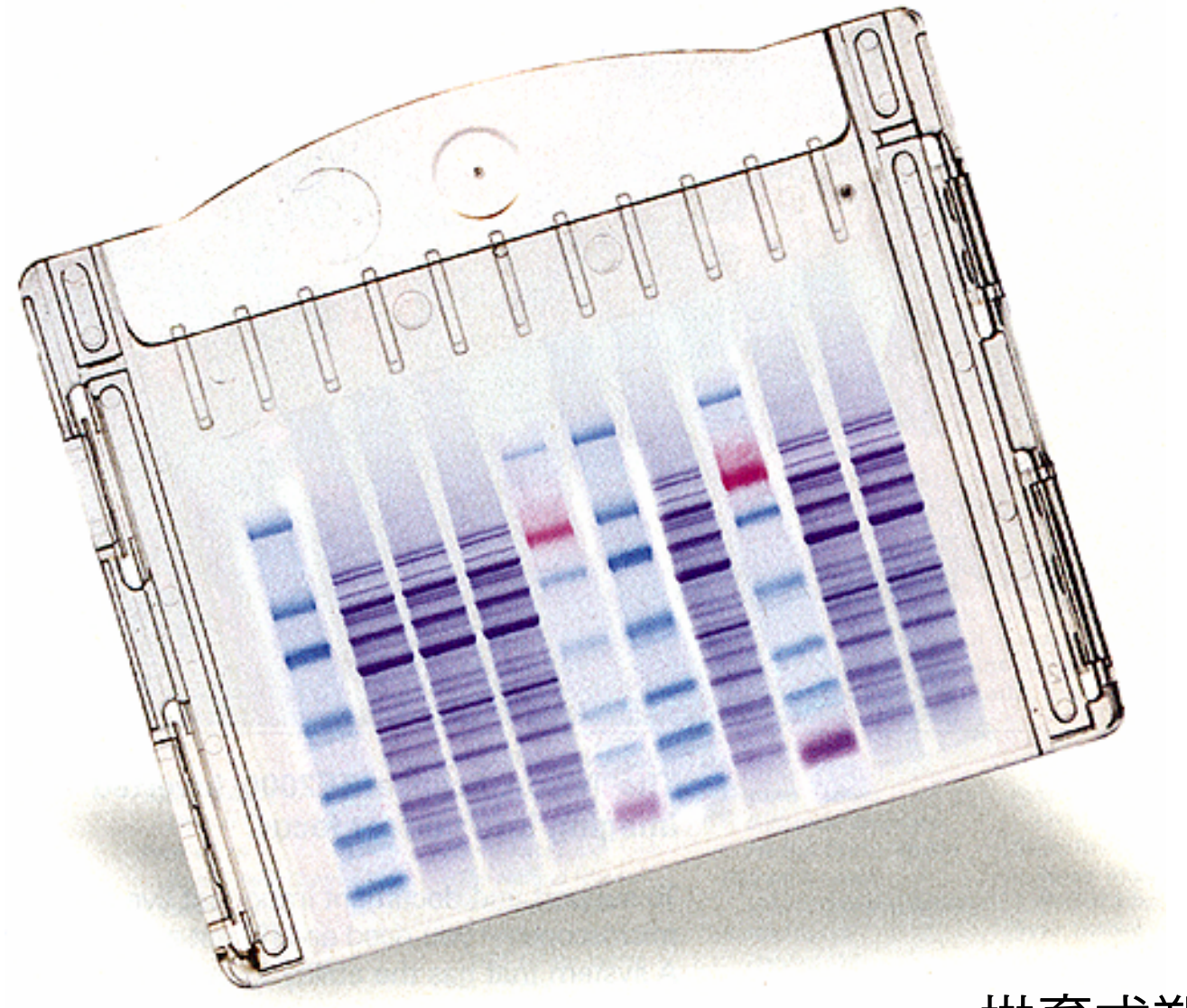


鑄膠過程與注入樣本


樣本梳
焦集膠體 (Stacking gel)
分離膠體 (Separation gel)
間隔條
間隔條
玻璃板（前）
氧化鋁板（後）

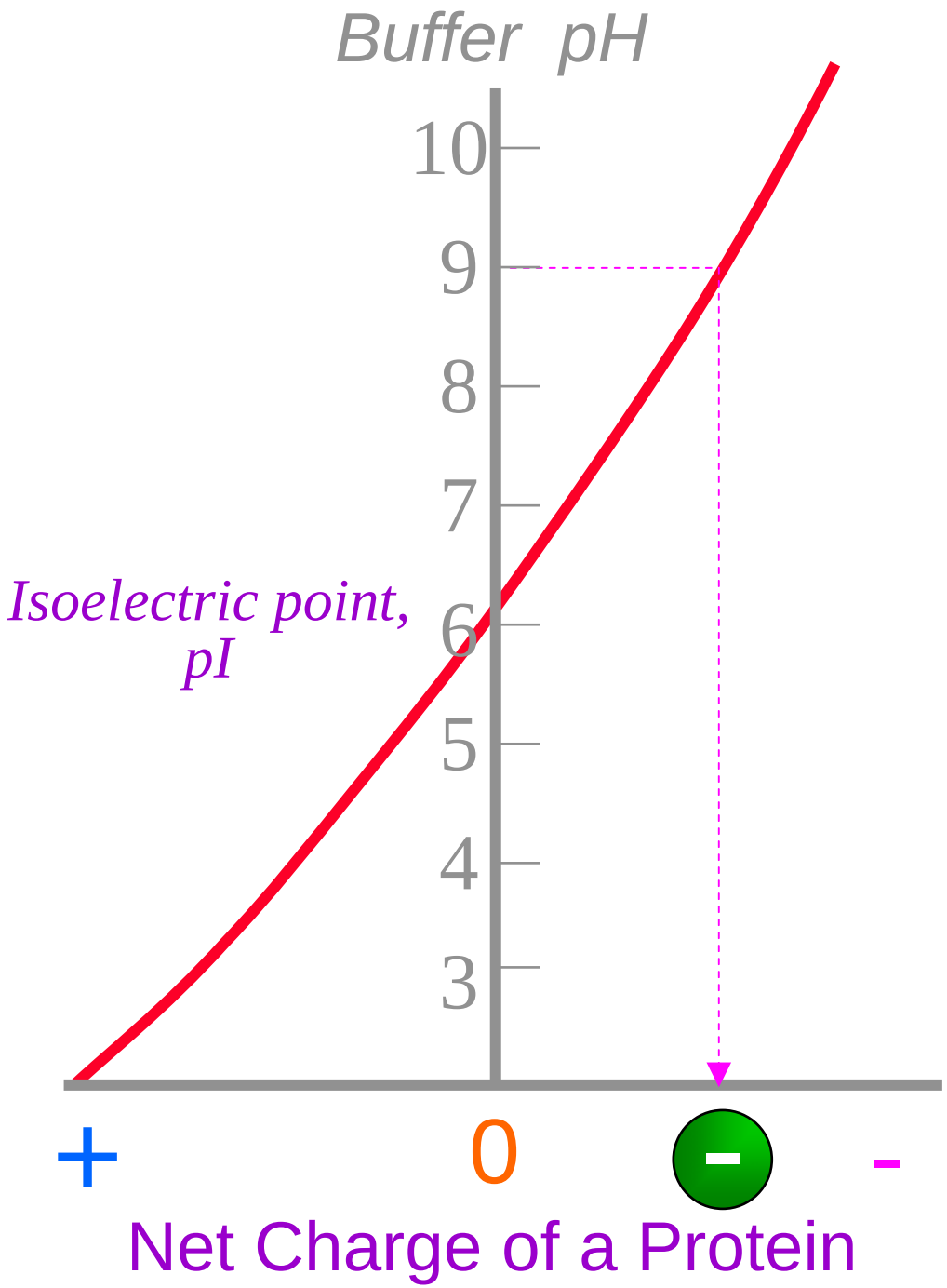
預鑄膠片

梯度或固定濃度膠體

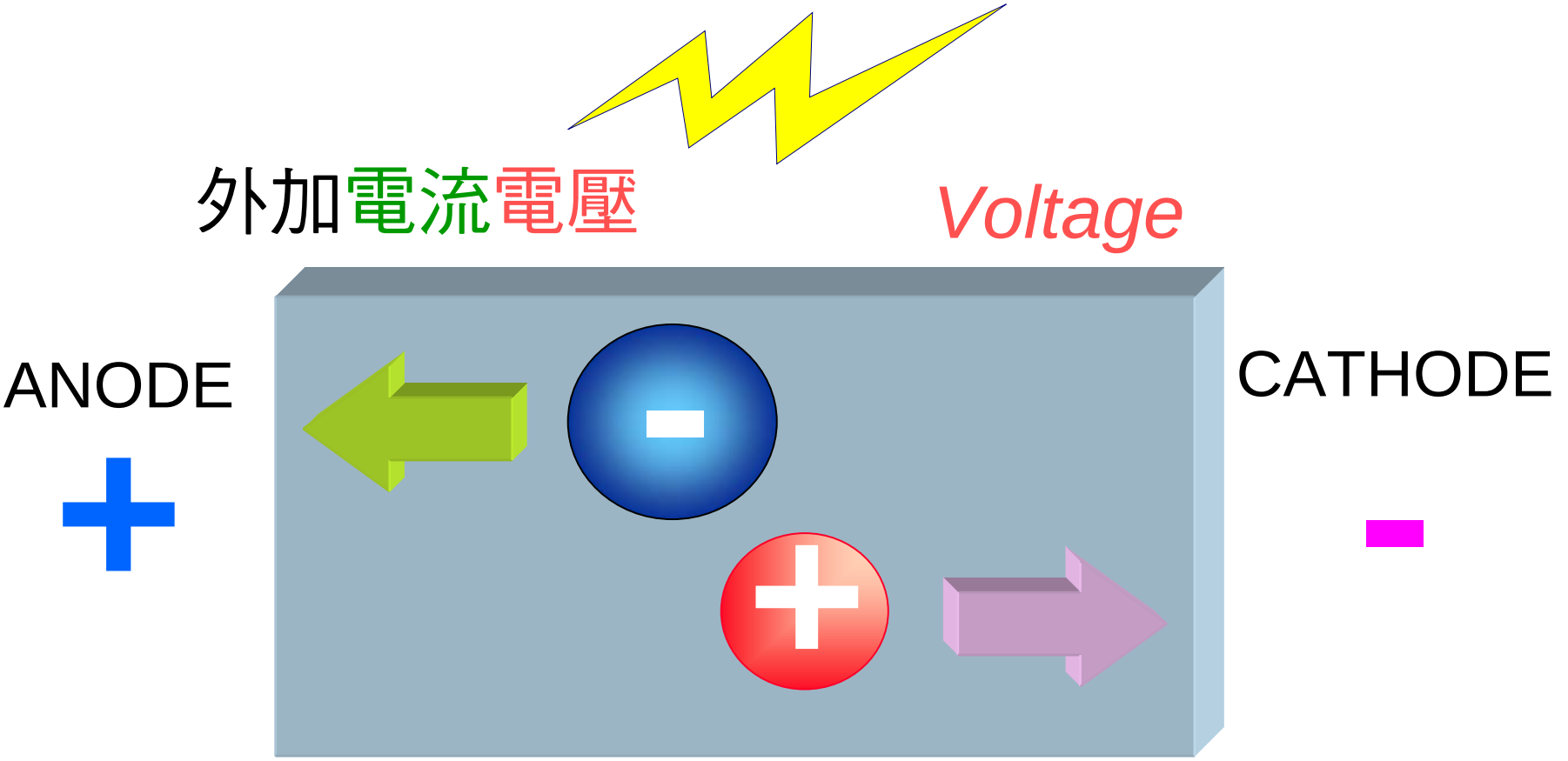


拋棄式塑膠外殼

環境影響分子的帶電性質：



■ 影響電泳泳動率的因素：



Friction ***Charge***

分子量 分子形狀　分子的等電點

電泳膠體系統的組成：

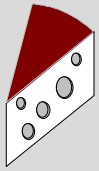
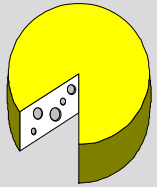
電泳系統			緩衝液	pH	膠體濃度
1	上層(負極)緩衝液		Tris-glycine	8.3	-
2	樣本溶液		Tris-glycine	8.3	-
3	膠體	焦集膠體	Tris-HCl	6.9	4~5%
4	膠體	分離膠體	Tris-HCl	8.3	6~20%
5	下層(正極)緩衝液		Tris-glycine	8.3	-

在焦集膠體中的三個主要作用角色：

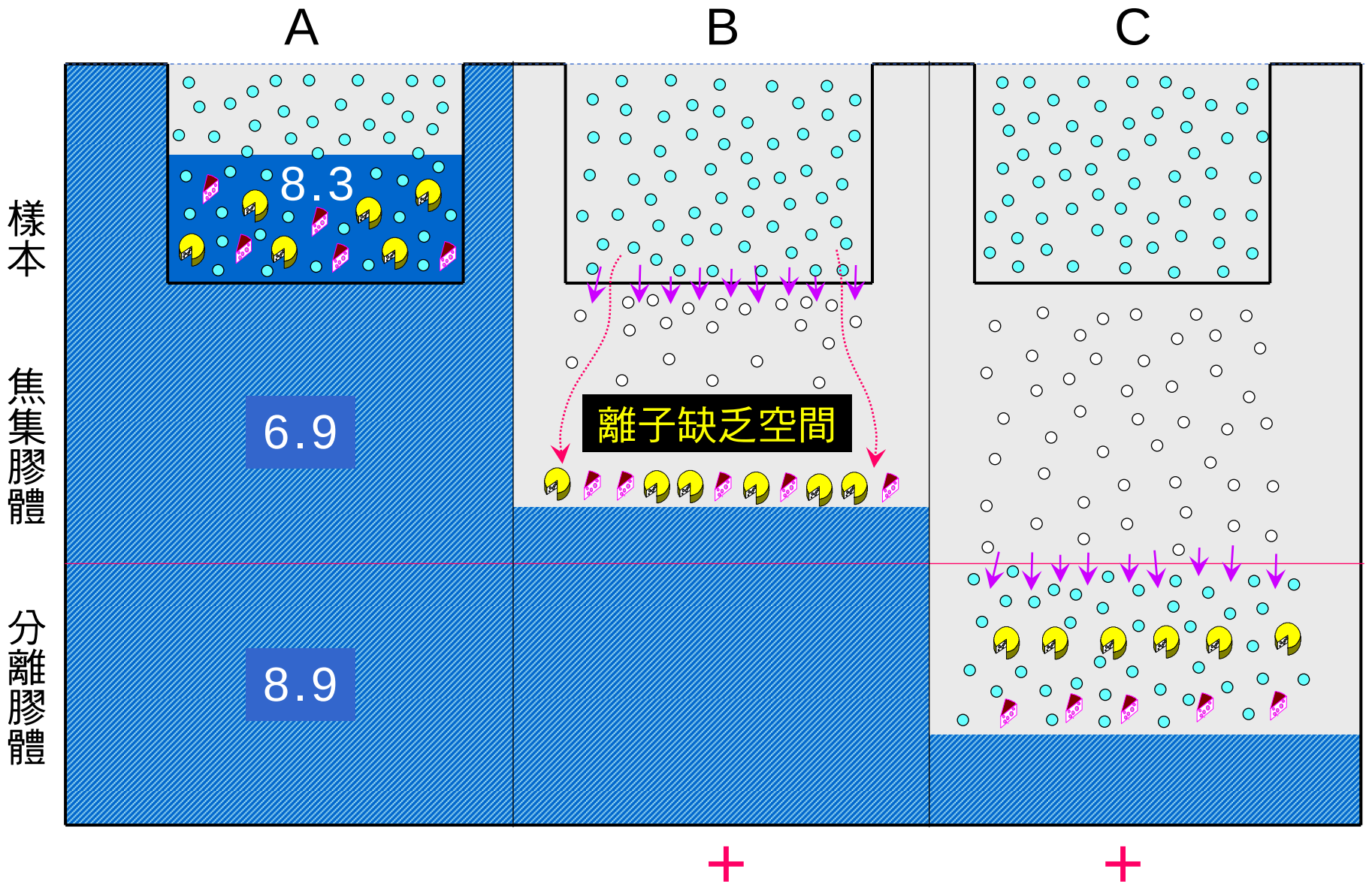
Glycine: Negative charged

No net charge

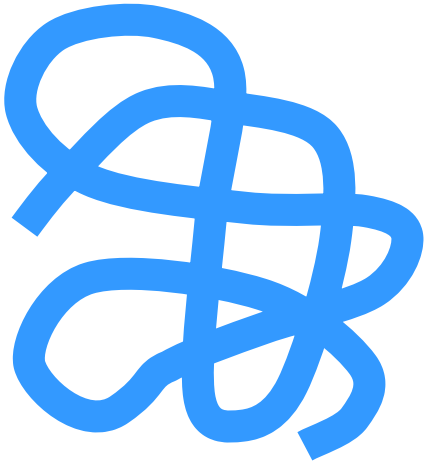
Chloride ion:

Proteins:  小分子  大分子

焦集膠體對蛋白質分子的焦集作用：

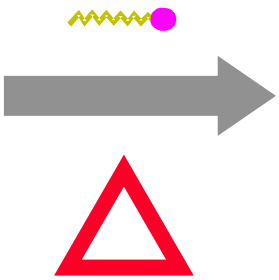


SDS 在蛋白質表面 均勻敷上 一層負電：

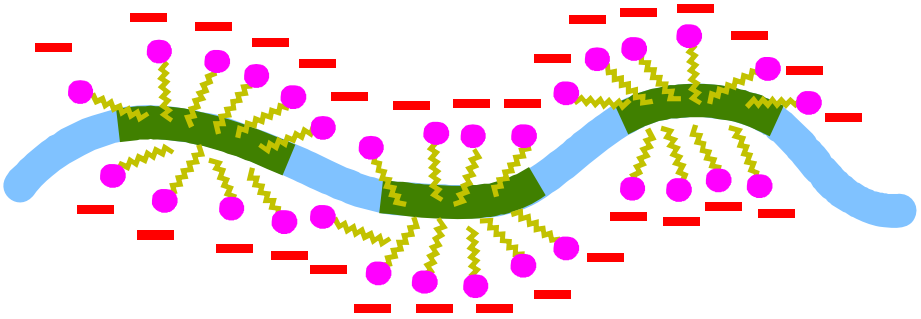


原態蛋白質

SDS



boiling

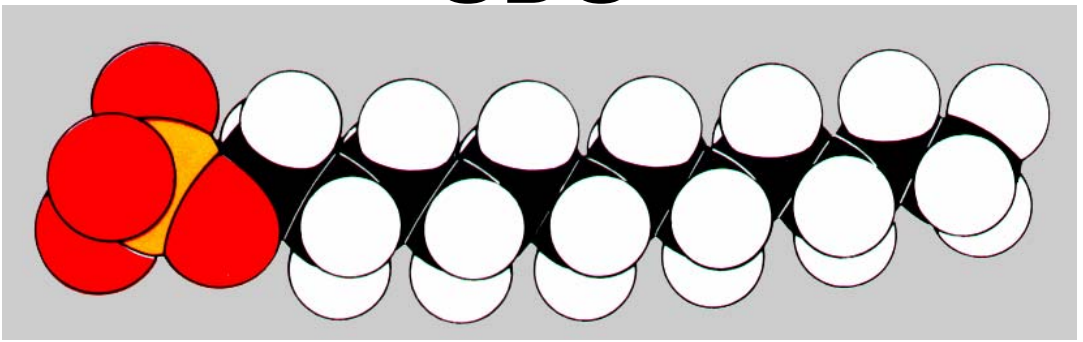


變性蛋白質成一線狀分子

並且均勻帶上一層負電荷

SDS

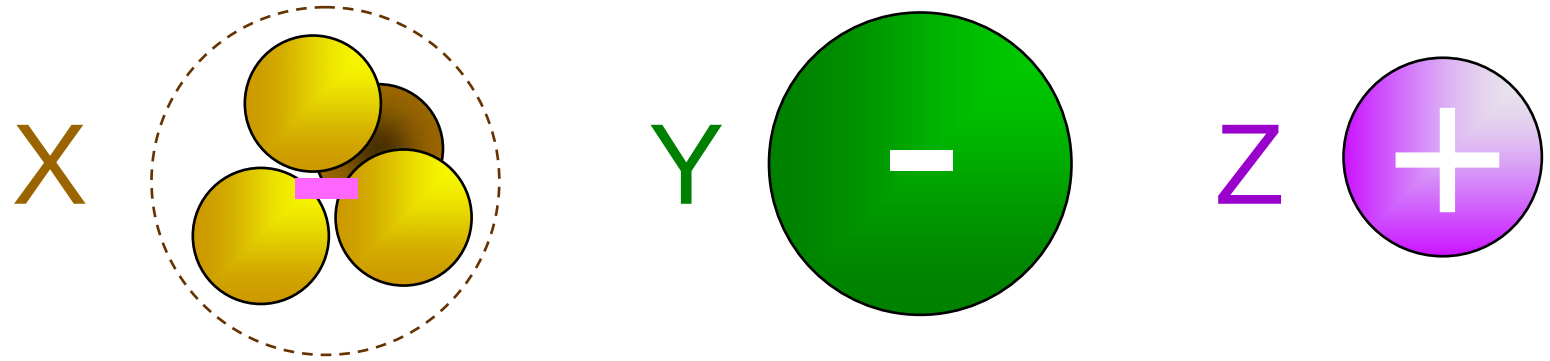
極性

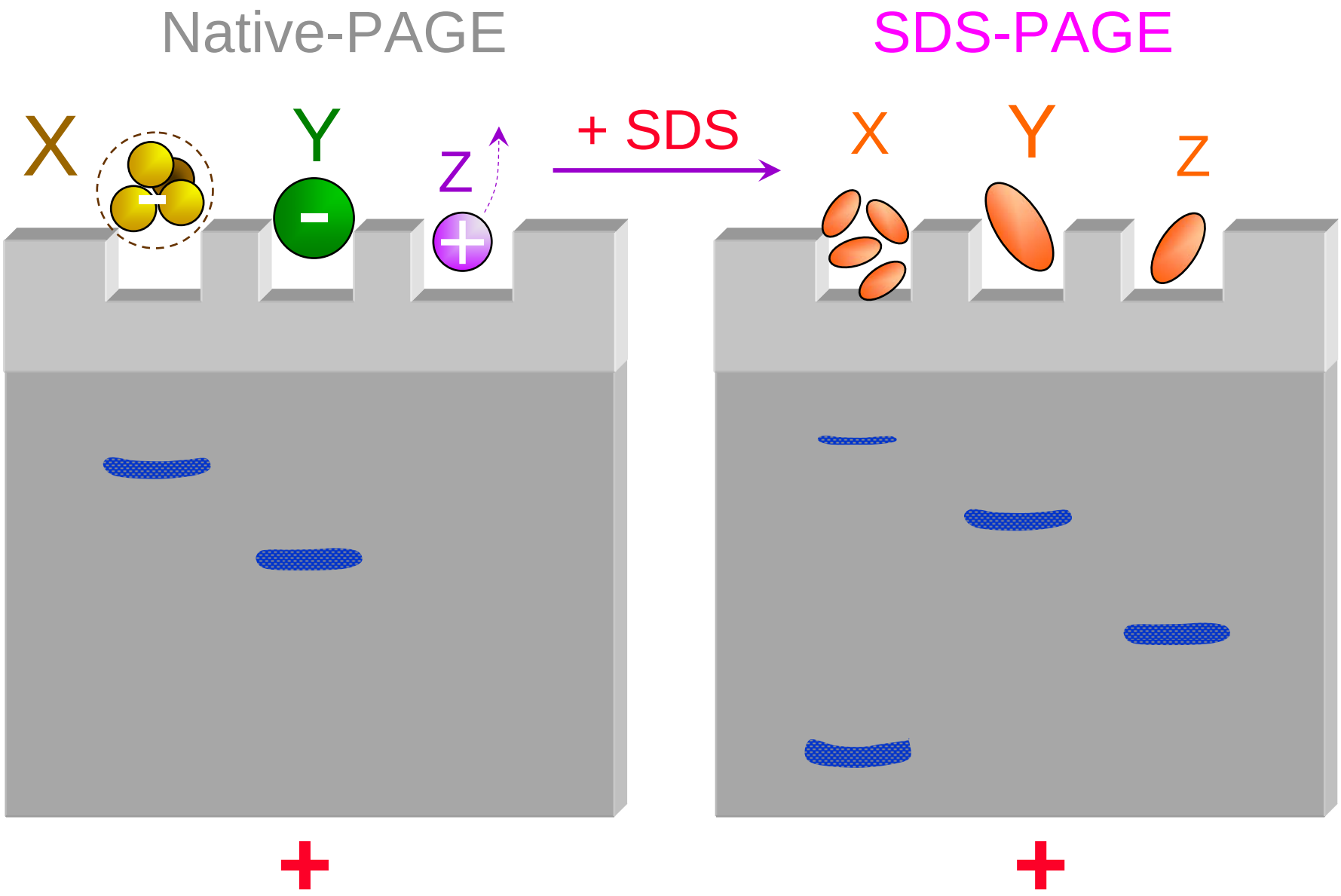


非極性

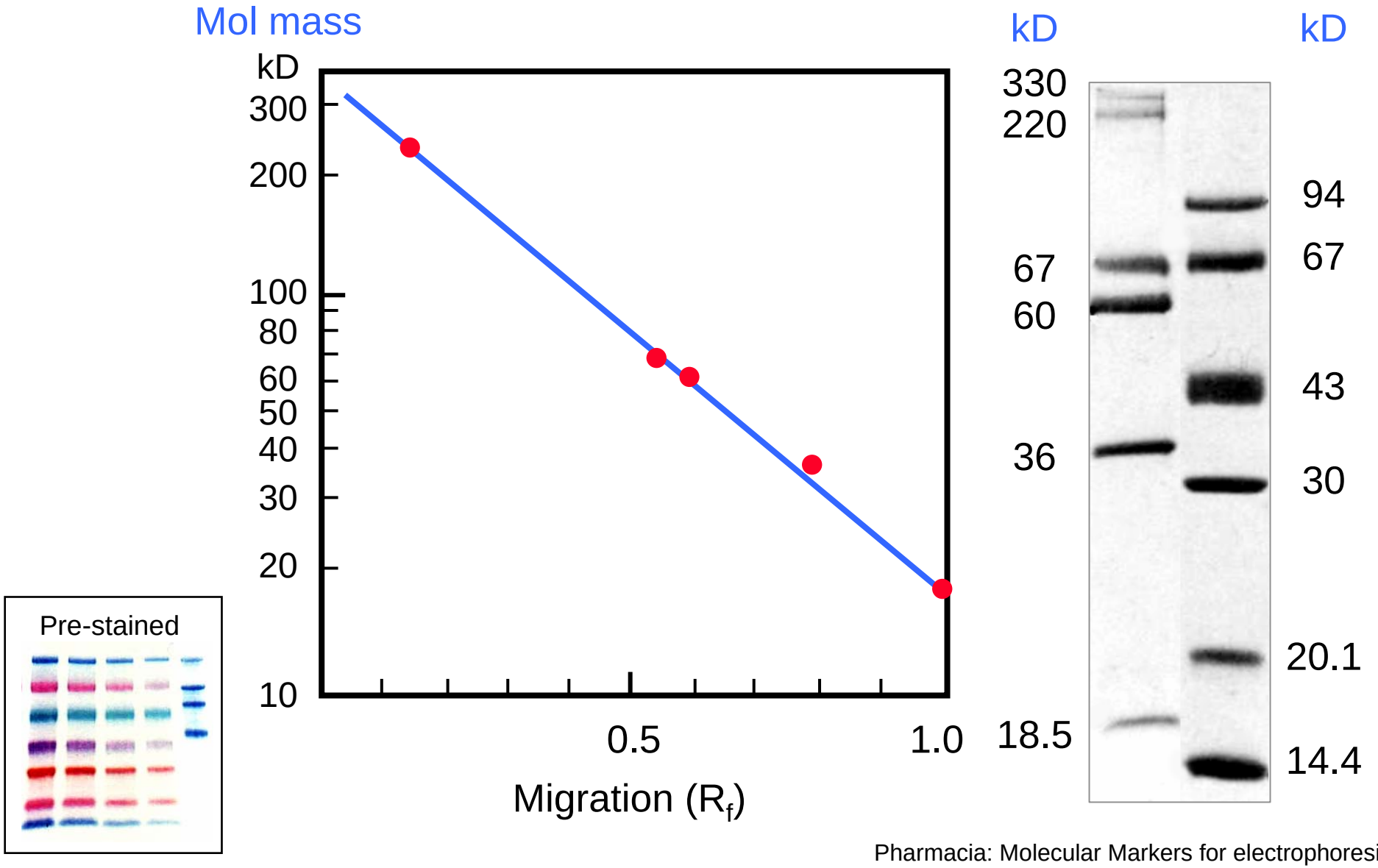
三種不同蛋白質的電泳比較：

Protein	Quaternary Structure	Molecular Weight	pI	Mobility	
				Native PAGE	SDS-PAGE
X	Tetramer	(40,000)x4	5.8	Slow	Fast
Y	Monomer	88,000	5.2	Fast	Slow
Z	Monomer	60,000	9.3	Upward	Medium




Native-PAGE
SDS-PAGE
X
Y
Z
+ SDS
X
Y
Z
+
+
分子量 及 淨電荷密度
均影響泳動率
只有 分子量 影響泳動率

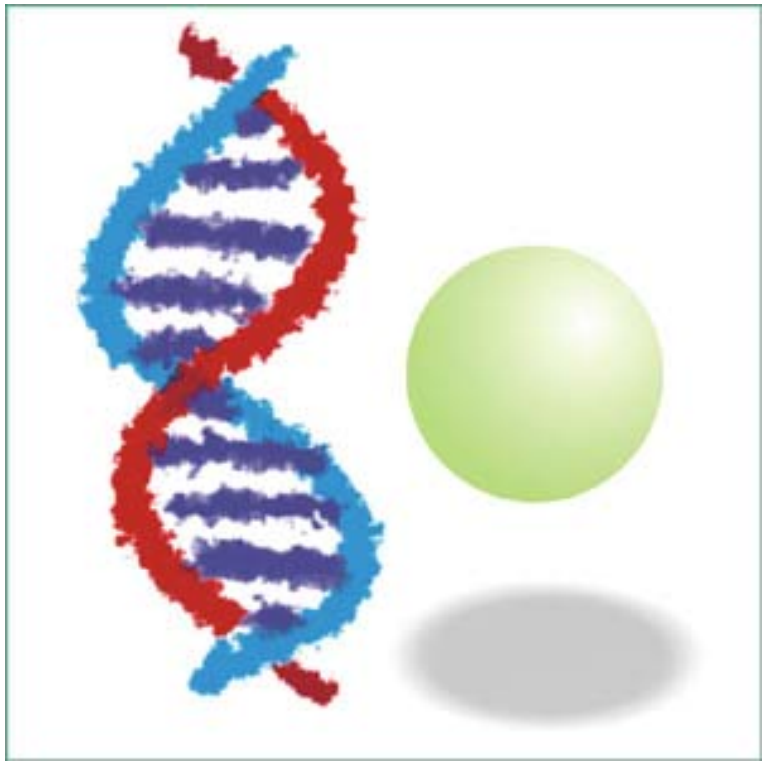
單元體分子量的測定： SDS-PAGE



Pharmacia: Molecular Markers for electrophoresis

BST

生化科技系

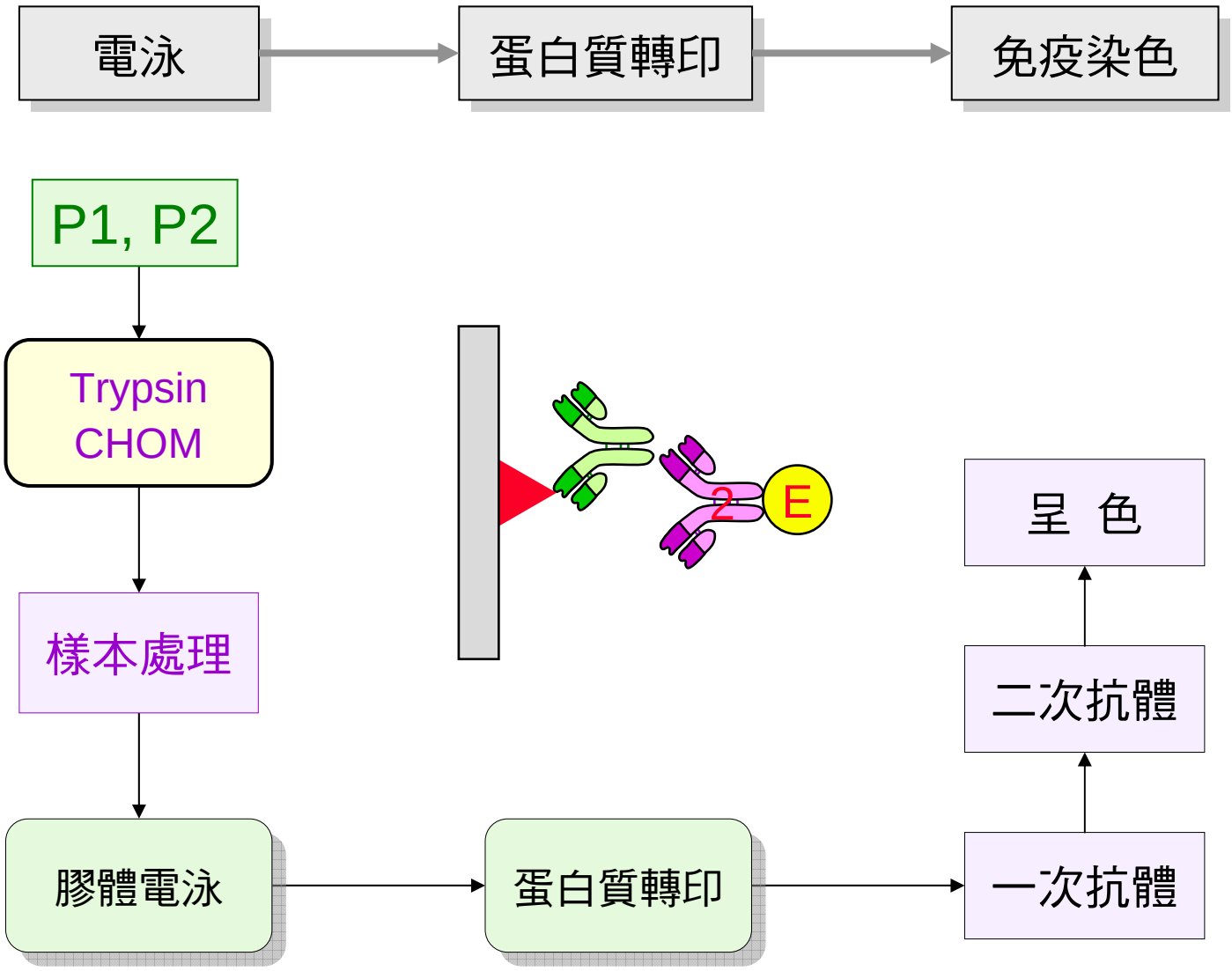


BCX S2

生物化學實驗

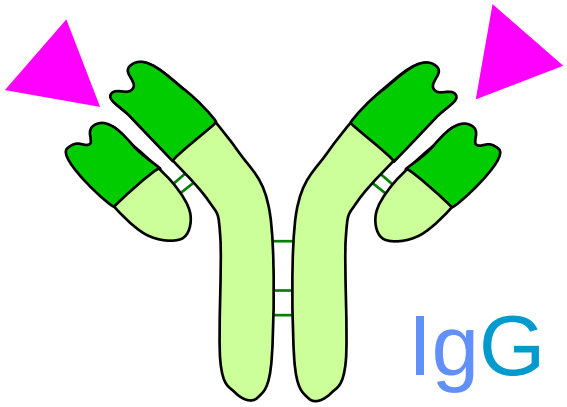
免疫轉印法

S2 免疫轉印法


電泳
蛋白質轉印
免疫染色
P1, P2
Trypsin
CHOM
樣本處理
膠體電泳
蛋白質轉印
一次抗體
二次抗體
呈 色
2
E

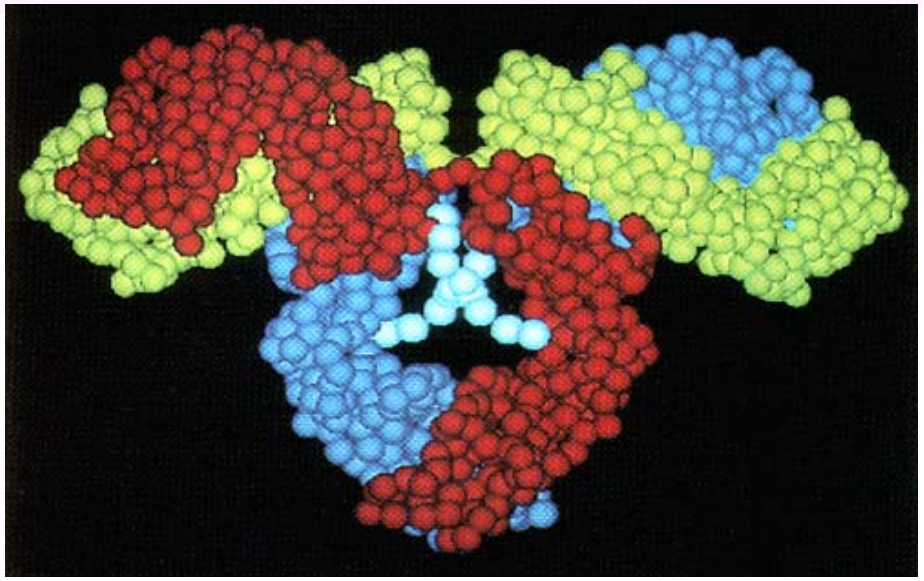
■ 抗體 是一種蛋白質

Davies et al (1977) PNAS / Roitt et al (2001) *Immunology*. p.73



IgG

Immunoglobulin



→ 抗體由四條 蛋白質 長短鍊所組成 (兩長兩短)

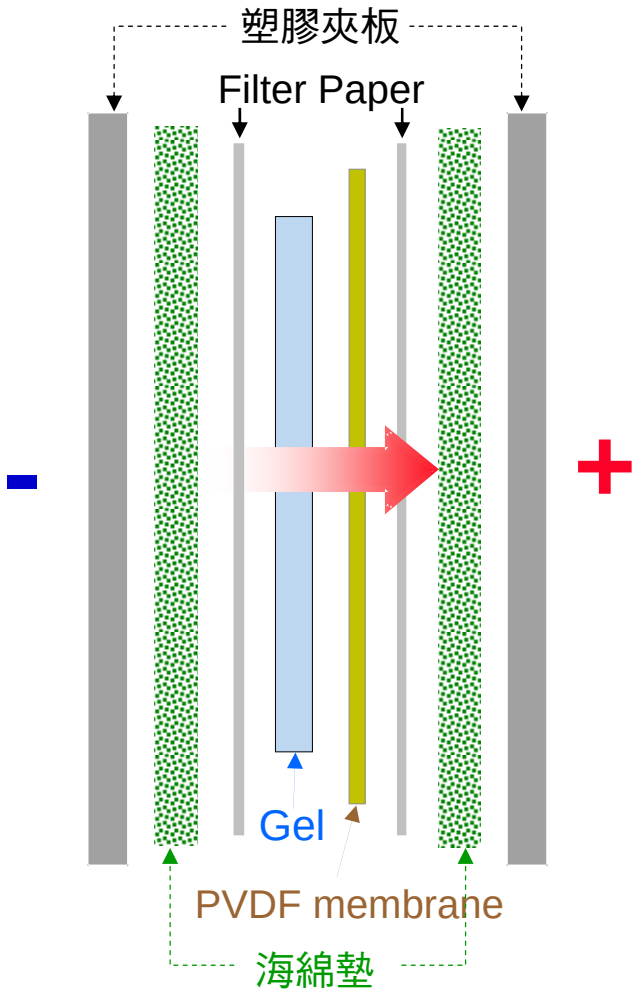
→ 抗體分子上有兩個 抗原結合區 (二者相同)

→ 抗體與抗原結合是專一性的 (lock & key)

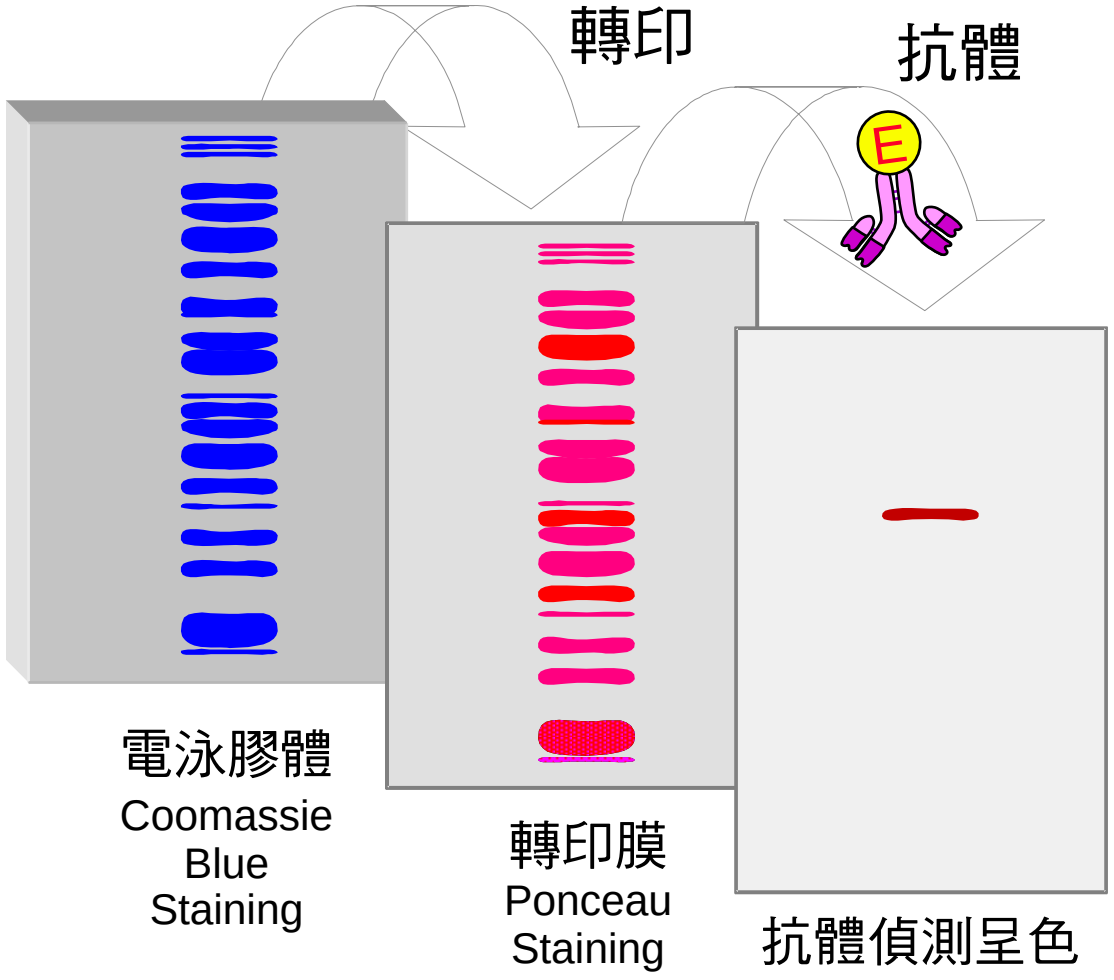
● IgG 是單一個抗體分子，另有 IgM (五元體) 及 IgA (二元體)

轉印及免疫染色流程：

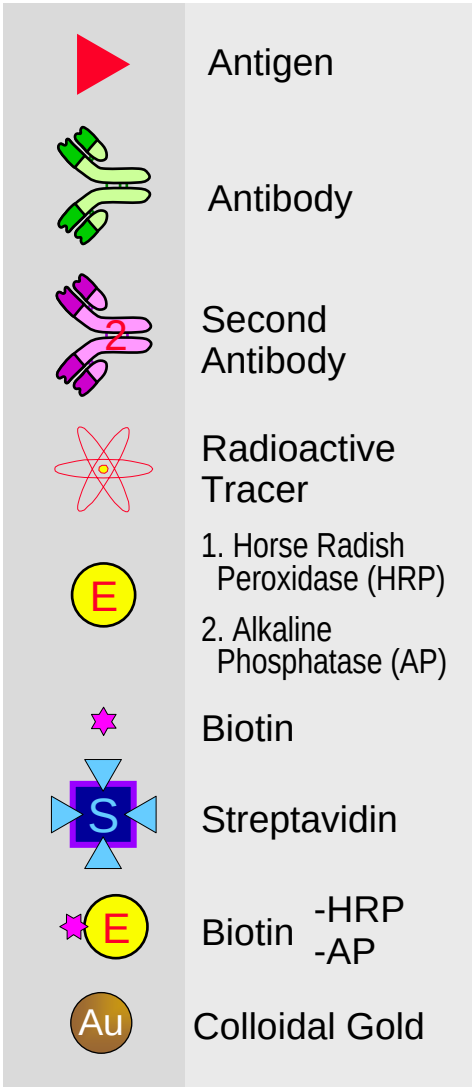
A 轉印三明治

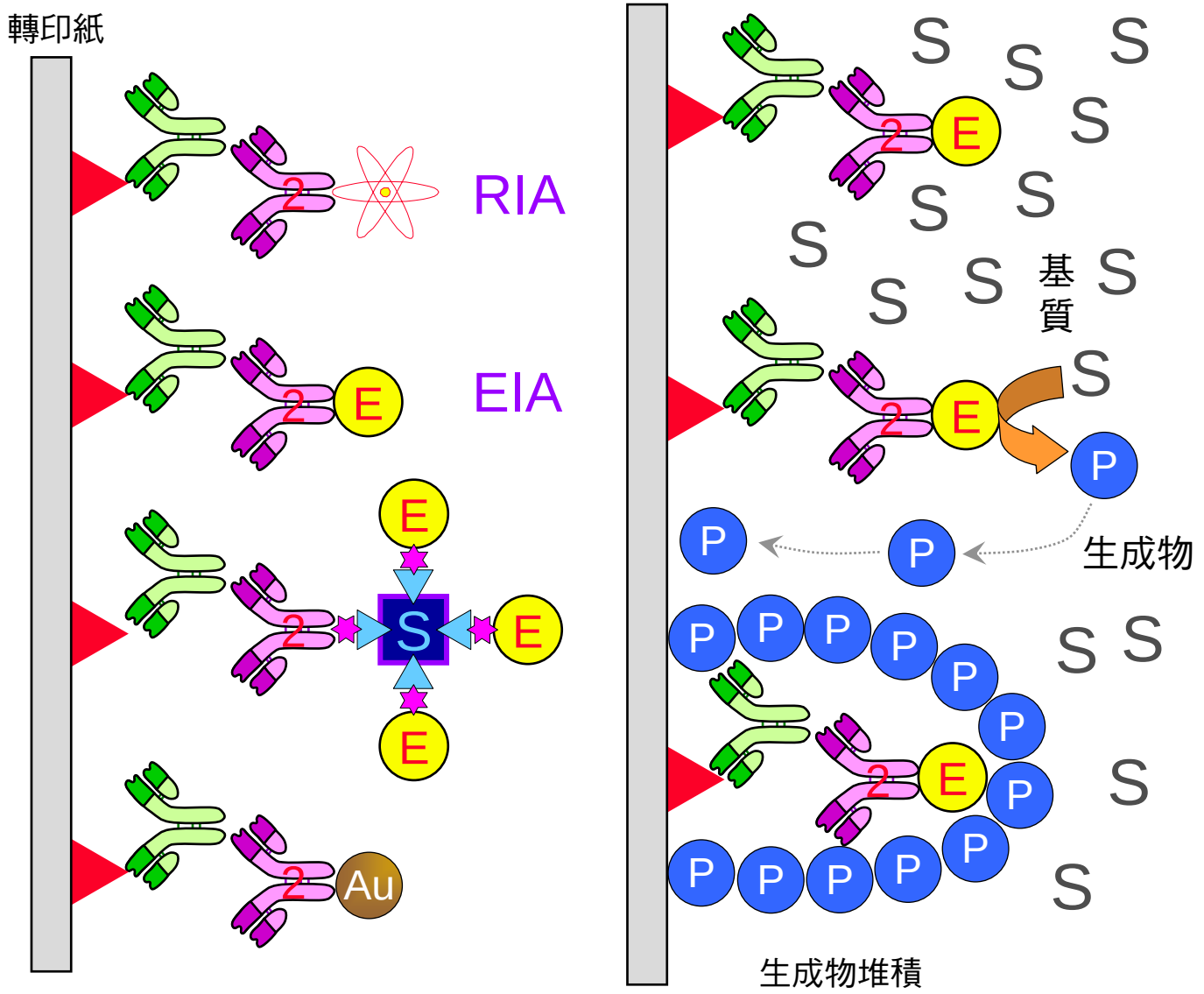


B 免疫染色流程及結果



免疫轉印的種類與呈色機制：





標誌酵素及呈色劑：

Peroxidase

Horse radish peroxidase (HRP) 山葵過氧化酶

基質： H_2O_2 + DAB (褐色) 4CN (藍色)

靈敏度： 500 pg

Phosphatase

Alkaline phosphatase (AP) 鹼性磷酸酶

基質： BCIP + NBT (藍色)

靈敏度： 100 pg

基質： AMPPD (化學螢光劑)

靈敏度： 10 pg