

# 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，以便鈎取胰蛋白酶；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離開來，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  $\mu$ 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

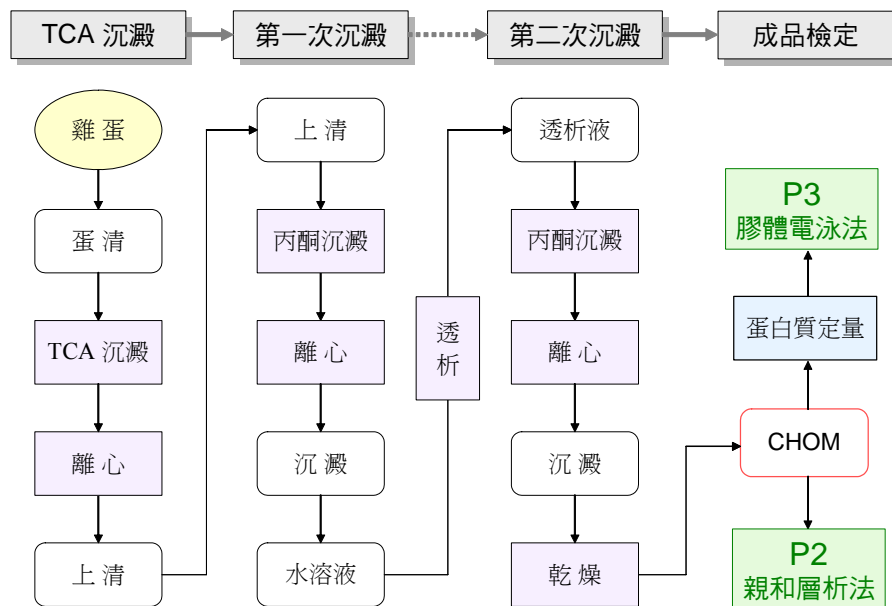


圖 P1-1 由卵白抽取 CHOM 或 DKOM 流程

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：

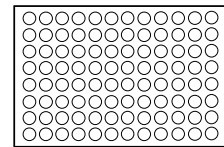
- 6) 透析後若產生沈澱，要離心 10 min (6,000 g) 去除之。
- 7) 加入 4 倍體積的冰凍丙酮，應該會產生大量沈澱，可放在 -20°C 冰箱靜置。
- 8) 高速離心 10 min (10,000 rpm) 後倒去上清，白色沈澱的表面小心以丙酮洗過數次 (可以再用少量乙醚洗過)，置排煙櫃中使沈澱稍微乾燥。
- 9) 加入 5 mL 蒸餾水輕輕震盪溶解，以一個新的 15 mL 試管裝起，標明 CHOM 及組別、日期，交給助教冷藏保管，後面的實驗要用到，首先要以 Bradford method 測量其蛋白質濃度。

### 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 µg/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	? µg/mL	混合均勻
X2	125 µL	125 µL	? µg/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 $\mu$ L	0 $\mu$ L	100 $\mu$ g/mL	混合均勻
#4	200 $\mu$ L	50 $\mu$ L	80 $\mu$ g/mL	混合均勻
#3	150 $\mu$ L	100 $\mu$ L	60 $\mu$ g/mL	混合均勻
#2	100 $\mu$ L	150 $\mu$ L	40 $\mu$ g/mL	混合均勻
#1	50 $\mu$ L	200 $\mu$ L	20 $\mu$ g/mL	混合均勻
#0	0 $\mu$ L	250 $\mu$ L	0 $\mu$ 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：

- a) 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。
- b) 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

- 1) 每槽先加好 50  $\mu$ 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。

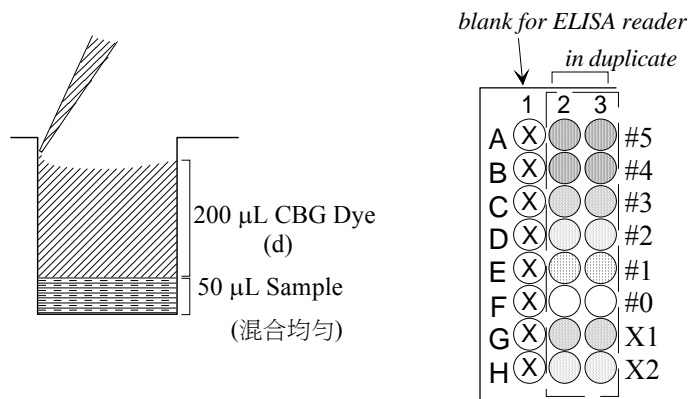


圖 P1-2 微量滴定盤的配置與使用方法

- 2) 每槽再加入 200  $\mu$ 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。

- 3) 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。

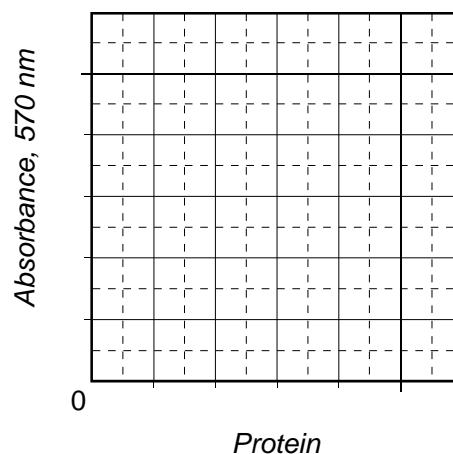


圖 P1-3 繪製標準品校正線

## 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

## P2 親和層析法

莊榮輝

親和層析法有點像在釣魚。釣竿是蟹殼幾丁質，釣餌是上次純化的 CHOM，用來釣胰臟抽取液中的胰蛋白酶 trypsin；這是因為 CHOM 對 trypsin 有專一性吸引力。蛋白質間的專一性吸引力，已成為最近生物化學探討的重要主題。

若 A 與 B 兩分子之間，有專一性的親和力，而我們手中已有 A；若欲由樣本混合物中，將所含的 B 分子分離出來，則最方便的方法，是先把 A 固定在一固定相 (solid phase) 上，當樣本混合物通過此固定相時，其中的 B 分子即被 A 吸附到固定相。俟洗去混合物中其它雜質後，破壞 A-B 之間的吸引力，溶離下 B，即可得到純質 B。親和層析法是很有效的純化方法，但並非任何物質均可應用此法，因為不一定能找到對它有親和力的分子。因此，進行親和層析法之第一條件為，尋找分子之間具有親和力的配對：



而其解離常數， $K_d = \frac{[A][B]}{[AB]} \sim 10^{-4}$  至  $10^{-8}$ ；親和力大小須適中。 [式 2]

可以用圖 P2-1 說明親和層析法的進行步驟：

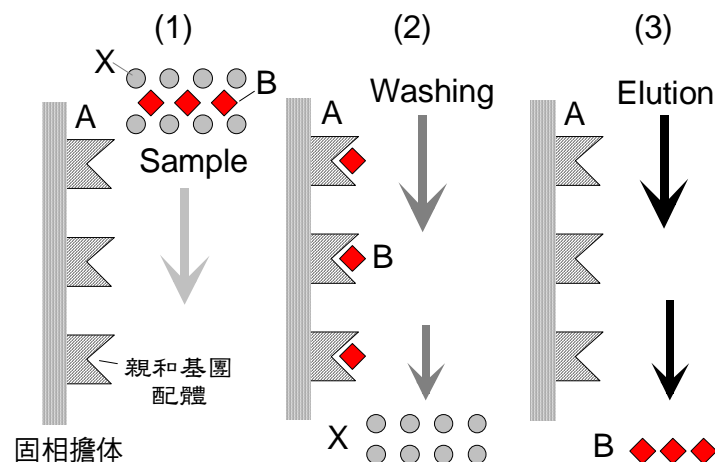


圖 P2-1 親和層析法的作用機理



- 1) 分子 A 已經被結合到固相擔體上 (斜線部份)，樣本準備通過之，其中含有所要分離的 B 分子 (◆) 以及雜質 (●)。
- 2) 當樣本通過此親和吸著劑時，只有 B 被吸著住，其餘雜質將直接流出。
- 3) 破壞 AB 分子之間的親和力，即可收穫得純質 B。

## 2.1 親和層析法的各項要素

要成功建立一個良好的親和層析法，必須考慮幾個重要因素，以圖 P2-2 說明之：

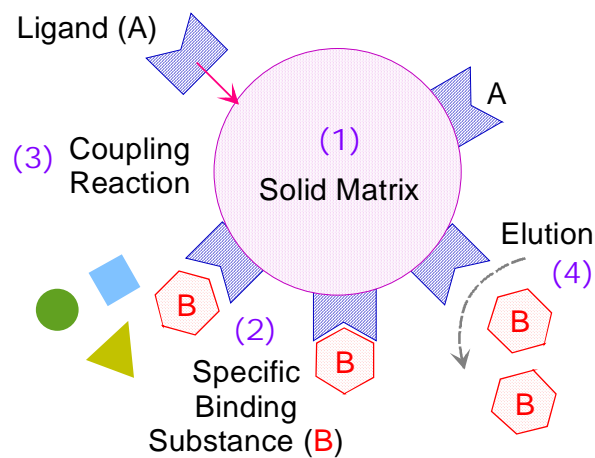


圖 P2-2 親和層析法的各項要素

### 2.1.1 良好的固相擔體 (solid support)

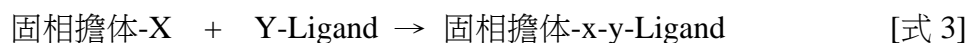
固相擔體的材質要有良好多孔性，通透性佳，構成的分子骨架本身穩定，無太大的非專一性吸附；最重要的是要具有相當活性的官能基 (functional group)，以便與其它分子鍵結。通常用作擔體的材質有：洋菜醣 (agarose)、聚丙烯醯胺 (polyacrylamide)、幾丁質 (chitin)、聚苯乙烯 (polystyrene)。

### 2.1.2 Ligand 及其專一性結合分子

配體 (ligand, 即鍵結在固相擔體上分子之統稱) 與其目標分子之間，要有相當強的親和力 (如上述)；例如 抗原-抗体、酵素-基質、荷爾蒙-受体 (receptor)、酵素-抑制因子 (如 trypsin 與 CHOM)。一般把較容易得到的分子做為餌，結合到固相擔體上，成為親和吸著劑 (affinity adsorbent)。

### 2.1.3 Ligand 與固相擔體間之的耦合反應

Ligand 與固相擔體之間，須有官能基可供鍵結反應：



常用的耦合反應如下列幾種：

- a) 以 carbodiimide 進行脫水反應，連結胺基與酸基。
- b) 以 CNBr 活化 agarose 醣分子上的醇基，可接上蛋白質的胺基。
- c) 固相接有 *N*-hydroxysuccinimide (可看作活化的酸基)，可與胺基反應。
- d) 以 glutaraldehyde (分子上有雙醛基) 為中間架橋物，可連接兩個胺基。

#### 2.1.4 可溶離下所要分離之目標分子

可改變溶離的 pH、離子強度或其它方法；注意某些方法可能會使 ligand 或所欲純化之分子，受到不同程度的破壞。因此，所選用的親和性配對，兩者間的親和力也不能太大，否則很難把結合上去的蛋白質溶離下來。

#### 2.1.5 實驗大綱

##### P2 親和層析法

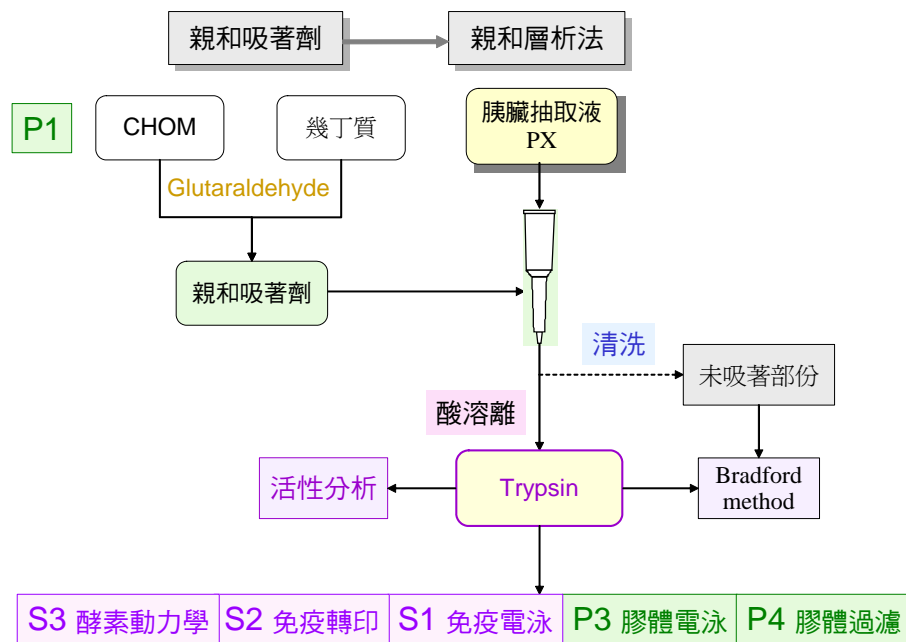


圖 P2-3 製備親和吸著劑與親和層析法流程

先做好親和吸著劑，裝入管柱後通入胰臟抽取液，再以酸溶離出所要的酵素。如此所到的酵素純度很高，將應用在後面的許多實驗，是個非常關鍵的步驟。

## 2.2 實驗操作

本實驗先製備幾丁質親和吸著劑，然後再加入胰臟抽取液，進行親和層析法。所有操作前，請檢查所有試劑及儀器，並確實瞭解其使用及操作方法。

### 2.2.1 儀器設備

- a) 小型塑膠管柱 (0.5×5 cm) 或用注射針筒亦可。
- b) 分割收集器 (Pharmacia 或 Gilson)：若無分割收集器，以液體高度估計體積。
- c) 小試管 20 支及試管架。
- c) ELISA 光度計 (Dynatech)。
- d) 微量滴定盤 (96-well microtiter plate)。

### 2.2.2 藥品試劑

- a) Chitin (幾丁質)：蟹殼曬乾，磨粉過篩後，以強酸、強鹼處理得之。
- b) CHOM (雞卵白粘多醣蛋白)：P1 實驗所純化的 CHOM 溶液。
- c) Glutaraldehyde (戊二醛 30%)：具雙官能基的連結劑。
- d) Tris-HCl 緩衝液 (0.1 M, pH 7.5)。
- f) 胰臟抽取液 (PX) 每組 8 mL：取 pancreatin 5 g 溶於 200 mL Tris-HCl 緩衝液，充分攪拌後，加入 5 g 矽藻土，並以過濾得到清澈的 PX 溶液。
- g) Coomassie Brilliant Blue G-250：蛋白質定量呈色用 (見 P1, 1.3)。
- h) 甲酸液 (0.1 M, pH 2.05)：改變 pH 以便溶離 trypsin 下來。
- i) BAPNA 合成基質液 (benzoyl-arginine *p*-nitroanilide)：可被 trypsin 水解呈黃色。  
配製法：取 BAPNA 43.5 mg 加入 1 mL DMSO 懸濁均勻，等約 1 h 完全溶解，慢慢滴入 100 mL Tris (0.05 M, pH 8.2, 含 20 mM CaCl<sub>2</sub>) 同時快速攪拌。

### 2.2.3 親和吸著劑之製備

- 1) 取幾丁質 2 g，盡量除去水分，置於 15 mL 塑膠離心管中。
- 2) 加入 4 mL CHOM 液，均勻懸著之 (剩下的 CHOM 請保留起來)。
- 3) 加 0.1 mL 25% glutaraldehyde，封口後混合均勻。
- 4) 在室溫反應 30~60 min，不時輕輕上下倒轉，均勻混合。
- 5) 以傾倒法用蒸餾水洗若干次，最後加適量 Tris-HCl 緩衝液懸濁之。
- 6) 裝入管柱，俟沉降後用 10 mL 緩衝液流洗，讓 Tris-HCl 慢慢通過，洗約數分鐘後備用。

## 2.2.4 親和層析法之操作

- 1) 如上準備好親和層析管柱，在 Tris-HCl 緩衝液平衡完全後，塞住出口，吸去吸著劑上方的液体，但勿使吸著劑乾掉。
- 2) 小心加入 8 mL 之胰臟抽取液 (PX)，不可弄亂吸著劑表面。
- 3) 打開出口，調整流速約每 4 s 一滴。
  - ◆請事先作好收集試管的準備：取 4 mL 水置入試管中，並在其液面高度做記號，然後以所收集流出液的高度，作為每一分劃的依據。
- 4) 馬上收集流出液，大約每 4 mL (或 80 滴) 收一支，約收 8 支試管；同時注意勿使吸著劑乾掉，當 PX 完全沒入吸著劑表面後，小心追加 Tris-HCl。
- 5) 收集 8 支試管後，關住出口；每支分別取樣 50  $\mu$ L，以 Bradford method 檢測蛋白質的量，到後面的試管應該已經完全洗淨，若尚未洗淨，再洗數支試管。
  - ◆若有必要，可以收集蛋白質濃度較高的幾隻試管，再通過一次親和管柱。
- 6) 再次吸去吸著劑上方之液体，改加入 0.1 M 甲酸液 (pH 2.05)，打開出口，流速降為每 8 s 一滴，馬上收集流出液，每 2 mL 收一支，收集 4 支後暫停。
- 7) 每支試管取 50  $\mu$ L 以 Bradford method 檢測蛋白質量，應在前面一兩支出現。
- 8) 同法取樣 50  $\mu$ L，在微量滴定盤上加入 200  $\mu$ L BAPNA 液，混合後稍稍加溫，樣本中若有 trypsin，則呈黃色反應；以 ELISA 光度計記下吸光值 ( $A_{405}$ )。
  - ◆注意：前面所收集的 8 支試管也可以作 BAPNA 活性分析。
- 9) 吸著劑可用 0.1 M Tris-HCl 洗過後重複使用；但本次實驗完成後丟棄之。
- 10) 取呈色最深的一或兩支試管 (步驟 6 中) 置入一隻全新 15 mL 離心管，寫好組別後交出，下面實驗將以電泳檢定之 (分子量及純度)。
  - ◆若有兩隻呈色相同，可以混合後交出。

## 2.3 結果與報告

### 2.3.1 實驗結果

- a) 以條列方式，把整個實驗過程及步驟，一一寫下來，請勿直接抄襲 2.2 節。
- b) 收集所測得的吸光值作為 y 軸，並以各分劃為 x 軸，製作色析圖譜。可製作得兩條吸光曲線，一為蛋白質含量，另一為酵素活性，類似下面圖 P2-4。

### 2.3.2 附註說明：

- a) 親和層析法的純化效果非常好，但非萬能，有許多限制與缺點，應當注意：
  - 1) 並非所有的物質都可找到具有親和力的 ligand，也非所有的物質均能有效

地誘導出抗体。請試著舉出自然界中，所有可能的專一性配對分子。

- 2) 經常要使用強烈的條件，去溶離下所要的物質 (例如用 pH 2)，因而不免破壞物質的穩定性與活性。幸運的是，trypsin 在酸性環境下相當安定。
  - 3) 有時非專一性吸附很難避免，純化效果會打折扣；如何避免之？
- b) 圖 2-4 為親和層析法的典型溶離圖形。以本實驗為例，先洗去許多雜質，可能有些過量的酵素活性出現在後端 (\*)；再用甲酸溶離 (箭頭處)，即可收得所要的 trypsin。為何甲酸可以把吸附上去的蛋白質溶離下來？
- c) 每一個分離階段的樣本，都可以收集起來，再以電泳分析其蛋白質成份。圖 P2-5 是圖 P2-4 所收得樣本的電泳結果，並以兩種不同電泳來檢視所含的蛋白質，請嘗試解釋所得電泳圖譜的意義。
- d) 我們將在下一個實驗進行各種電泳，分析本實驗所得到的純化產物。

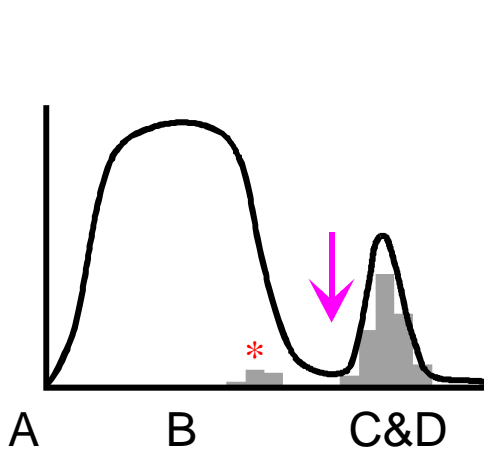


圖 P2-4 典型的親和層析圖譜

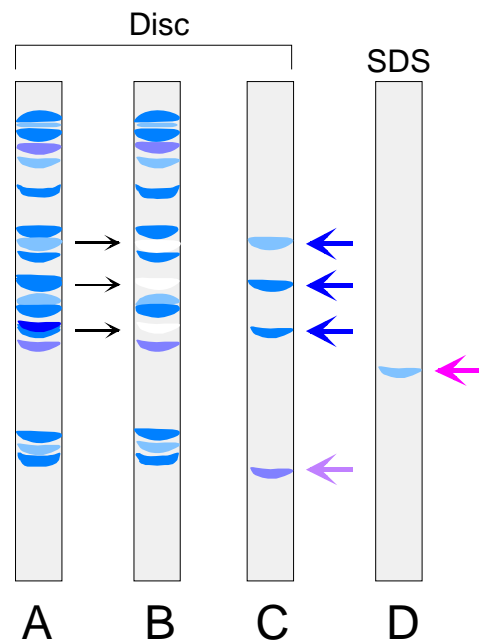


圖 P2-5 電泳分析結果

## 2.4 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 68, 128

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

Affinity chromatography - Principles and methods, Pharmacia

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.91

Scopes RK (1996) Protein purification - Principles and practice, 3rd ed, Springer-Verlag

# 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B<sub>2</sub>)。
  - 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

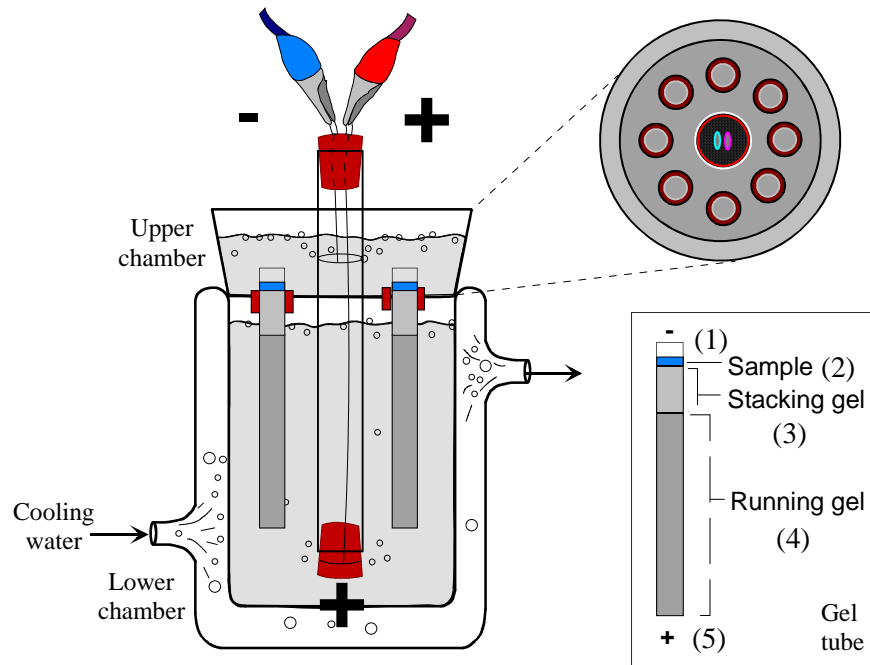


圖 P3-1 直立式柱狀電泳裝置與膠柱組成

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。

- a) 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：
  - (1) Glycine：圖中以深色圓點（當環境 pH >6.9 時 Gly 帶負電）或白色圓點（當環境 pH = 6.9 時為不帶電之 zwitterion）表示。
  - (2) 樣本分子（有兩種蛋白質，分別以大小兩種乳酪圖案表示）。
  - (3) 氫離子，以斜線部分代表。
- b) 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。
- c) 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。
- d) 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。
- e) 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 分子慢慢通過焦集膠體，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。

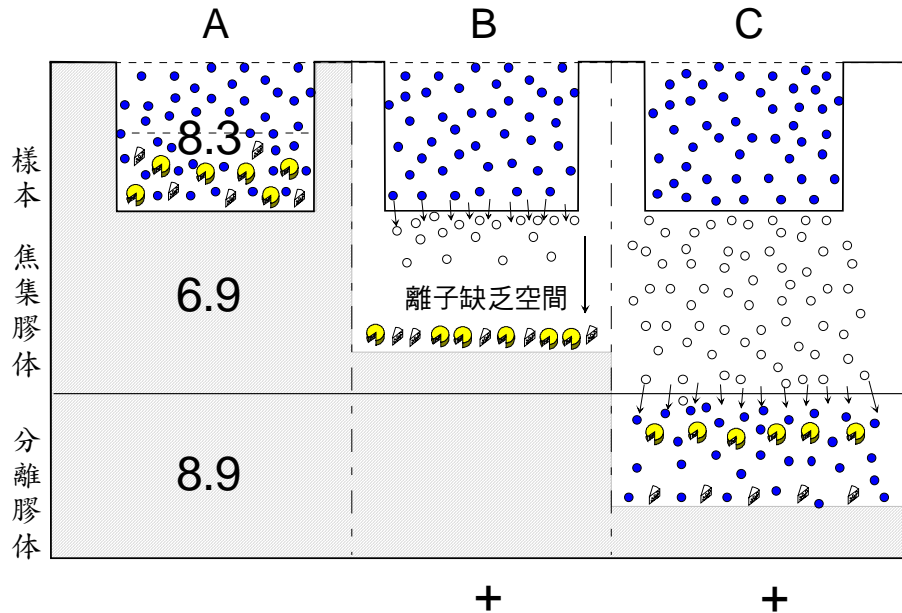


圖 P3-2 焦集膠體的作用原理

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，因而焦聚成一條直線，產生焦集的效果。

### 3.1.4 實驗大綱

#### P3 膠體電泳法

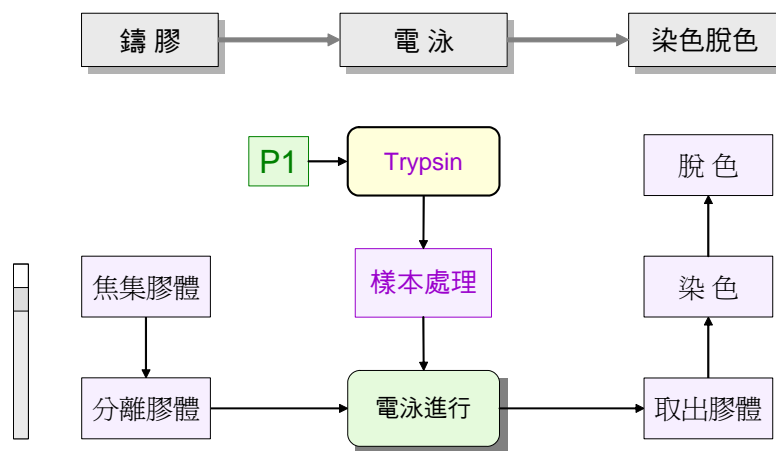


圖 P3-3 原態膠體電泳檢定的進行流程

## 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 $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L，因其中含甲酸溶液，先加入 2  $\mu$ L 1 N NaOH 中和之，然後再加 10  $\mu$ L 追蹤染料，混合均勻後備用。CHOM 取 20  $\mu$ L 只要加入 10  $\mu$ 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  $\mu\text{L}$  樣本，trypsin 樣本較稀，儘量注入多量，而 CHOM 極濃，每槽注入 1~3  $\mu\text{L}$  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。

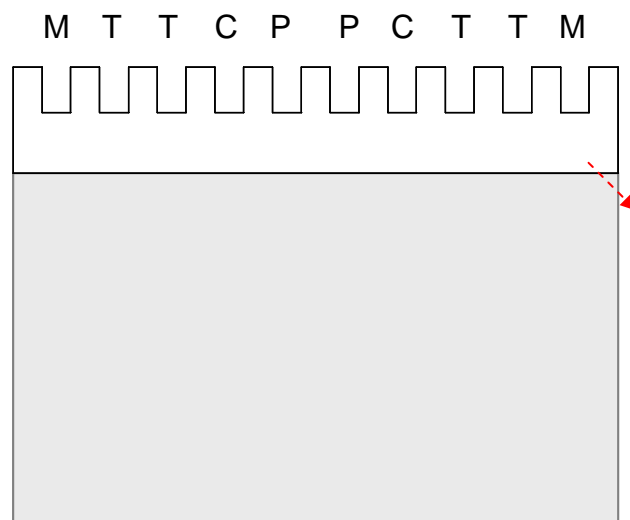


圖 P3-4 樣本的配置方式

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  $\mu\text{g}$  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。

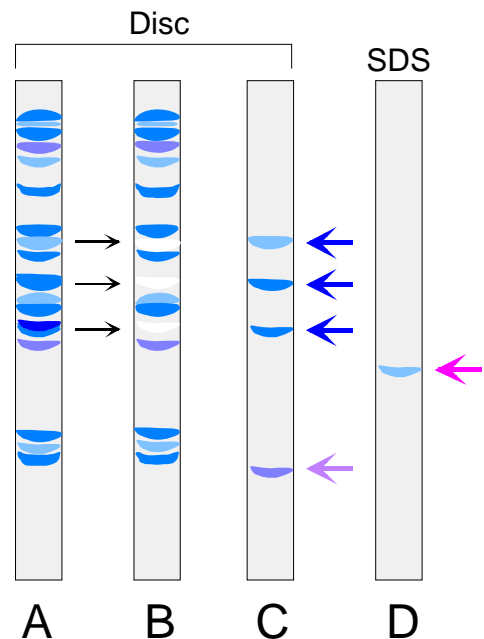


圖 P3-5 電泳分析結果

### 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

# P4 膠體過濾法

莊榮輝

## 4.1 膠體過濾法原理

分子大小之不同，可用來作為分離或純化的手段，包括膠體過濾法、超微膜過濾法、超高速離心法、膠體電泳法等。其中以膠體過濾法最為常見，本實驗使用 Sephacryl S-300 作為分離介質，對大部分蛋白質樣本均適用，但要稍提高鹽濃度以克服其非專一性的吸附力。

### 4.1.1 色層分析法原理

膠體過濾法是色層分析法 (chromatography) 的一種，色析法廣泛被應用來分析複雜的成份，也可以純化所要的目標物質。那麼，色析法是什麼？

色析法都含有兩種相 (phase)，液相及固相就可算為兩相，例如一杯水中有一塊石頭，水是液相、石頭是固相；若問如何分開水與石頭？非常簡單，只要把水倒出，留下石頭即可。水是流動的，稱為流動相 (mobile phase)；石頭不動，稱為固定相 (stationary phase)。

這樣的兩相觀念，應用到色析法，就是看樣本中的各種分子，是比較喜歡跟著流動相走，還是喜歡留在固定相上，就可以把性質不同的分子分開。而樣本分子『極性』程度的大小，最常被用來作為兩相分離的基本依據；同時，流動相與固定相的極性也不同，通常其一偏向極性，而另一則偏非極性。樣本中的各種分子，依其極性程度，選擇留在固定相，或隨著流動相走，完全遵守『like dissolves like』的原則 (見圖 P4-1)。

### 4.1.2 膠體過濾是一種層析法

- 1) 膠體過濾法也是層析法的一種，因此也有兩相系統：其流動相就是注入管柱的緩衝液，緩緩把樣本帶入膠柱中；而固定相則是裝填在玻璃管柱中的膠球，這些膠球的本體有無

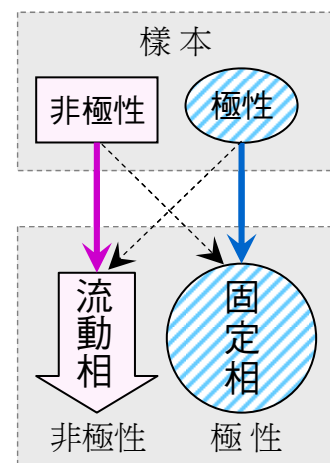


圖 P4-1 色層分析法的基本機制

數小孔洞，可以讓小分子游入其中，而排斥大分子，完全取決於樣本分子的分子量大小。

- 2) 因此，當樣本通過管柱後，分子量大者就會較快流出，而分子量較小者，就會被延滯，較慢流出；如此就可以把大小分子分開。
- 3) 其實，除了分子量之外，分子形狀也有影響。若兩個分子的分子量一樣，而一個是橢圓球形，另一為不規則形狀，則後者將會比較快流出；因為橢圓球形比較容易進入膠球的孔道中，不規則形則否。但是因為蛋白質的外型，通常大多是圓球形，因此可以只考慮分子量的因素。

#### 4.1.3 膠球的種類

- 1) 這種具有孔道的膠球，大都是多醣類的聚合體，以控制多醣的密度，來調整所形成孔道的大小。最早出現的膠球，是葡萄糖的聚合多醣，稱為 **Sephadex**，由瑞典 **Pharmacia** 公司所出產。再來是由洋菜醣所衍生的 **Sepharose**，因為洋菜醣所組合出來的多醣骨架很堅固，以架出較大的孔道空間，因此可分離較高分子量的樣本（數百萬），比 **Sephadex** 的分離範圍（數十萬）大很多。
- 2) 這些膠球除了可作為膠體過濾之外，若在上面連結上離子基團，便可以成為離子交換介質。常見的是接上 **DEAE** 陽離子基團，成為陰離子交換介質，可用來吸引帶負電的分子；也有接上 **CM** 陰離子基團，則成為陽離子交換介質。

#### 4.1.4 實驗大綱

##### P4 膠體過濾法

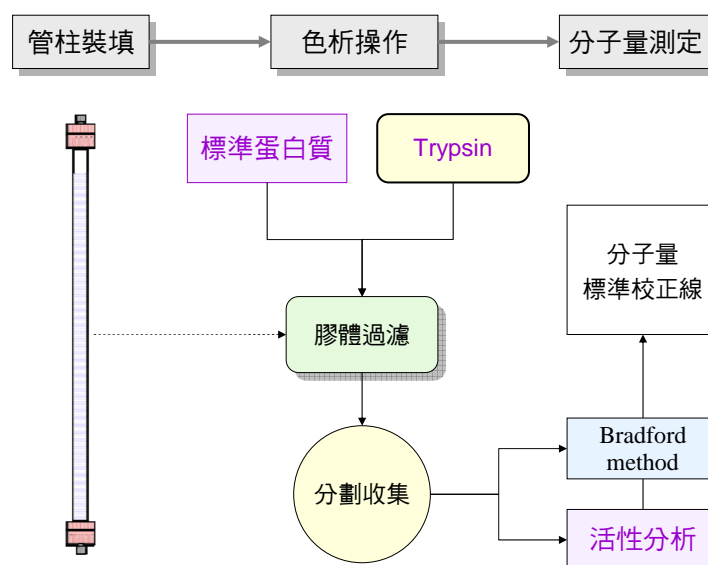


圖 P4-2 膠體過濾法操作流程



## 4.2 實驗方法

### 4.2.1 儀器用具

- a) 層析管柱 (Pharmacia C16 column, 100 cm) 最好附有 adaptor (AC16)。
- b) 蠕動幫浦 (Pharmacia peristaltic pump P-1)。
- c) 分割收集器 (fraction collector, Gilson 或 Pharmacia) 加 100 支試管。
- d) ELISA 光度計及微量低定盤。

### 4.2.2 藥品試劑

- a) 膠體 Sephacryl S-300 (Pharmacia)。
- b) 緩衝液 Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, 含 0.15 M NaCl。
- c) 標準分子量蛋白質 (Bio-Rad 151-1901): Thyroglobulin (670 kD); bovine gamma globulin (158 kD); chicken ovalbumin (44 kD); equine myoglobin (17 kD); vitamin B-12 (1.35 kD)。
- d) Trypsin 樣本為你在 P2 實驗純化所得者，約需 0.2~0.5 mL，視其活性而定。

### 4.2.3 管柱裝填

本實驗的膠體管柱，均先由助教裝填好，同學只要加入樣本即可；但以下也把膠柱的裝填方法寫出，以為將來自行裝填時參考。同學也可事先詢問助教裝填管柱的時間，以便屆時在一旁觀摩操作情形。

- 1) 預先將管柱洗淨、晾乾後備用，也要熟悉整隻管柱的拆裝方法。
- 2) 架起管柱，以水平儀調整管柱，使之與地面垂直。
- 3) 於管柱中加入約一半高度的緩衝液，測試管柱是否有漏水現象；若沒有漏水，則讓緩衝液流出，只留約 5 cm 高的緩衝液；以塞子暫時堵住下方出口。
- 4) 取出所要使用的膠體，先除去所含的 20% 酒精，並平衡在緩衝液中。
  - ◆ 若是在室溫中進行層析法，一定要等膠體的溫度完全回復室溫才可裝填。
- 5) 將所要裝填之膠體搖盪均勻，不要有未散之硬塊，也避免氣泡產生，若有氣泡產生則以超音波震盪器 (sonicator) 趕出，並以抽氣去除之。
- 6) 將上述混合均勻之膠體，以玻棒沿管壁流暢倒入管柱，並且避免使得氣泡陷在膠柱中；可在裝填後，以手電筒在膠柱後方打燈光檢查之。
- 7) 利用重力自然沈降 1~2 min 後，移去管柱下方軟管的塞子，利用流速加快沈降，注意不可使管柱上方的液相完全乾去。
- 8) 待膠體已沈降完全，用塞子止住下方軟管，並且以緩衝液加滿管柱。

- 9) 取出管柱的 adaptor 並接好軟管及蠕動幫浦管路，並使整個幫浦及軟管內，完全充滿緩衝液，不得有任何氣泡陷在裡面。
- 10) 小心將 adaptor 放入管柱內，往下推至膠面上方，檢查有無氣泡留滯在 adaptor 下面，然後鎖緊 O-ring。此時 adaptor 與膠面間有一小段充滿緩衝液的空間。
- 11) 移去管柱下方軟管的塞子，用幫浦注入緩衝液流洗兩個管柱體積。
- 12) 暫時停止幫浦輸送，用塞子止住下方軟管，放鬆幫浦使管路呈流通狀態，稍微旋開 adaptor 的 O-ring，將 adaptor 緩慢下壓，液體會從幫浦上端軟管流回去，當壓至膠面時，即旋緊 O-ring，鎖上幫浦門，移去管柱下方軟管的塞子。
- 13) 以預定流速 (60 mL/h) 之 150% 流速流洗 1~2 管柱體積。
- 14) 檢查膠面是否因高壓流洗而下降，若降低則重複步驟 12) 把 adaptor 往下壓。
  - ◆ 若有時間，將安排示範膠體的裝填方法。

#### 4.2.4 層析操作與分子量測定

- 1) 請先測量管柱的膠體高度為多少？若管柱底面積為  $2 \text{ cm}^2$ ，請計算出該管柱的膠體總體積為若干 mL？
- 2) 把所純化得之 trypsin 取適量加入標準蛋白質中，一起以幫浦注入管柱，膠體過濾的樣本體積約為膠體總體積的 1%；若兩者都為 0.5 mL，則總共樣本體積為 1 mL。注意樣本的溫度與膠體不可相差太多。
  - ◆ 樣本通常都由低溫處取出，其溫度可能與膠體有差異。
- 3) 在注入樣本後，以預定流速進行溶離，膠體過濾層析法即開始進行，要馬上啟動分割收集器；所有溶離物質，應在大約 1.5 倍管柱體積之內流出。
  - ◆ 注意膠體管柱絕對不能吸入氣體，因此當樣本快要吸盡時，要適時停止。
  - ◆ 流速通常為 30~60 mL/h，每分割收集 3 mL，或定滴數為 60 滴。
- 4) 通常樣本注入後，即可由幫浦自動輸液，並以分割收集器自動收集溶離液，操作者在此段時間最好經常回來巡視，以免幫浦或收集器發生故障，影響實驗進行。同時，請觀察標準蛋白質的色帶，如何逐漸分離開來。

### 4.3 結果與報告

#### 4.3.1 實驗結果

- a) 若一切順利，你將收到約 90 支試管，請注意後面的幾支試管，應該出現紅色的物質 (vitamin B<sub>12</sub>)，否則可能色析操作發生問題。
- b) 每支試管進行 (1) 蛋白質定量以及 (2) trypsin 活性測定，得到兩組數據。以分割管數為橫座標，蛋白質 (實線) 或活性測定 (虛線) 的吸光值為縱座標，畫出

色析圖譜的結果。實線可能有數個尖峰，而虛線應該只有一個尖峰。

- c) 辨別各標準蛋白質的尖峰，並指出其管數，另做一張標準校正線作圖：同樣以分割管數為橫座標，但以分子量為縱座標，縱座標請用幾何級數刻度。請注意也要把vitamin B<sub>12</sub>的分子量及管數加入作圖。
- d) 把活性曲線 (虛線) 尖峰的管數，內插到上面的標準校正線，則可求出 trypsin 活性出現尖峰的分子量。

◆ 假如兩個蛋白質的分子量幾乎相同，那能不能在膠體過濾分別出來？

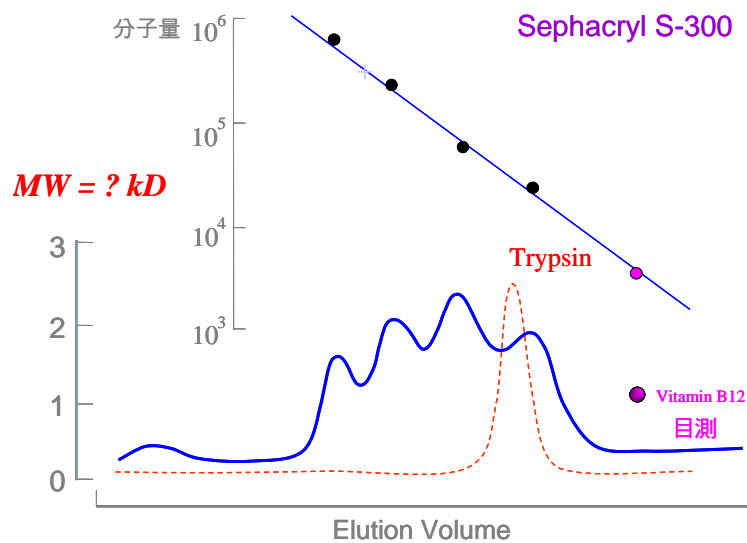


圖 P4-3 分子量標準校正線

#### 4.3.2 複習問題

- a) 在色析過程中，標準蛋白質在管柱內的移動情形如何？色帶是否平整？
- b) 除了以膠體過濾法之外，還有那些方法可測得分子量？
- c) 若使用膠體電泳法測定分子量，與膠體過濾法有何異同？
- d) 有那些問題可能會影響膠體過濾法測量分子量的正確性？

#### 4.4 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 119, 200

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.89-92

Scopes RK (1994) Protein purification - Principles and practice, 3rd ed, Springer-Verlag

# S1 免疫電泳法

莊榮輝

**抗體** 是非常重要的生物化學工具，因為抗體與抗原之間有很強的專一性；而且可以針對某一特定目標抗原，產生其專一性抗體，因此應用上非常方便。

## 1.1 背景知識

脊椎動物體內擁有後天免疫系統，可對外來異物產生特定的 抗体，這些異物可為別種生物來源的大分子，稱之為 抗原。

### 1.1.1 抗體與其專一性

抗体與抗原之間的反應，有相當強的專一性 (specificity)。由 抗原甲 所誘導出來的 抗體甲，只能對 抗原甲 作用，對毫不相關的 抗原乙 沒有反應。但若某 抗原丙 的分子構造與 抗原甲 非常類似，則 抗體甲 可能與 抗原丙 有某些程度的反應，稱為 交叉反應性 (cross reactivity)。

外來蛋白質或多醣等大分子，可作為良好抗原；此分子上可被抗体確認的部位，僅有數個胺基酸或單醣，稱為 抗原決定基 (antigenic determinant) 或稱 epitope。在大分子抗原上，可能有數個抗原決定基，各誘導出專一性抗体；因此所產生的抗血清，含有對抗此大分子上，所有抗原決定基的抗体。

抗体是由淋巴球 (B 細胞) 所分泌，一個 B 細胞，只能分泌一種抗体，對抗專一性抗原。平常這些 B 細胞處於休眠狀態，當抗原入侵時，才活化起來，增生、成熟後開始分泌抗体。抗体是一種蛋白質，基本單體分子量約 160,000，分子形狀如 Y 字形 (圖 S1-1)。與抗原決定基結合的部分有兩處，此兩處的分子構造完全一樣，因此可與兩分子抗原結合。抗体分子中，有較具保守性的 C 區 (constant region)，及變異性較大的 V 區 (variable region)。C 區維持抗体分子的基本構形，V 區則造成抗体分子的多樣性，能對各種抗原產生專一性結合。

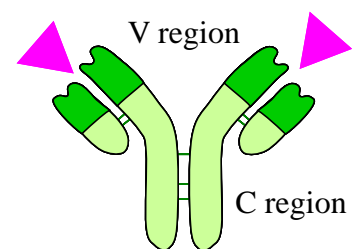


圖 S1-1 抗體分子構造有兩個相同的抗原結合區。

抗体蛋白質一般稱為免疫球蛋白 (immunoglobulins)，簡稱 Ig；可再細分為 IgG, IgM, IgA, IgE 及 IgD 等；其中 IgA 為二元體，IgM 為五元體，其餘為單元體。各種 Ig 的分子構造在其 C 區有點差異，稱為 isotypic variation。免疫動物後，一般均能產生上述各種 Ig。但不同種動物的同一類 Ig，構造上會稍有差異；例如兔子的 IgG 與山羊的 IgG 就不完全相同。若把兔子的 IgG 打入山羊內，則山羊會產生抗兔子 IgG 的抗体，這種抗体的抗体稱為 二次抗体。在同一動物體內，其所含 IgG 分子也不盡相同，有無數群族以對付無數抗原。這種多樣性的成因，是由於 V 區的變異所造成，稱為 idiotypic variation。

### 1.1.2 免疫電泳

一個抗体可與兩個抗原結合，而每個抗原分子上，通常不只有一個抗原決定基，又可與若干抗体結合。如此，當許多抗原與許多抗体，互相結合在一起，會造成很大的連鎖複合體，並在溶液中沉澱下來，稱為 precipitin。但抗原-抗体反應若要造成沉澱晶格，必須兩者間的莫耳比例適中；抗原或抗体，若有一方濃度太高 (或太低)，都足以破壞晶格形成。

雙向免疫擴散 (double diffusion) 可方便地在洋菜凝膠 (agar) 上，測試抗原與抗体間的沉澱反應。圖 S1-2A 簡單說明其原理，虛線代表抗原或抗體的濃度，因擴散而向四周漸減；抗原與抗體的擴散範圍會重疊，在最適當濃度之重疊處產生沉澱線。免疫電泳 則結合了雙向免疫擴散以及洋菜凝膠電泳，其作法如圖 S1-2B 所示，樣本先跑完電泳，然後再對其抗体進行免疫擴散 (注意箭頭指示方向)。

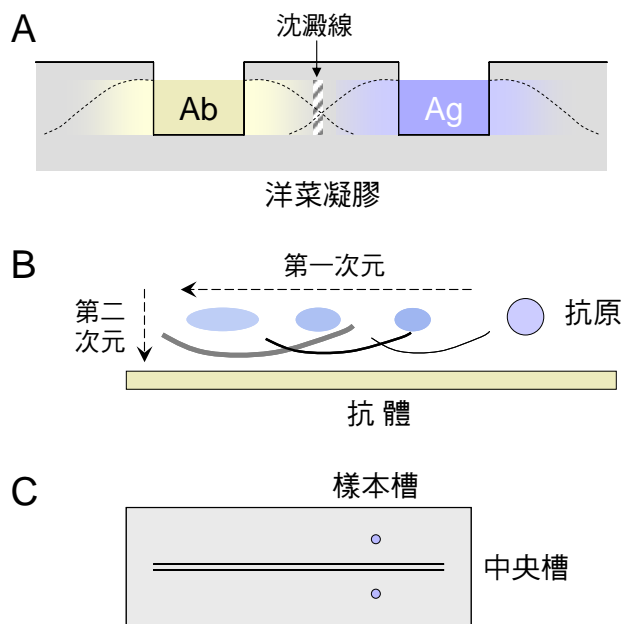


圖 S1-2 雙向免疫擴散及免疫電泳原理及設計

### 1.1.3 實驗大綱

#### S1 免疫電泳法

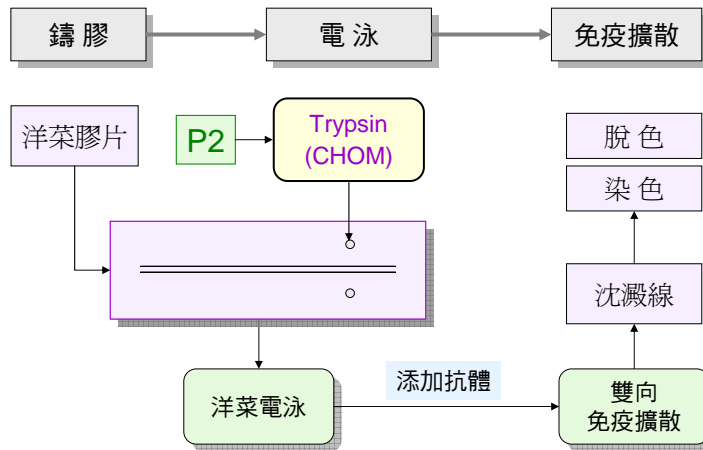


圖 S1-3 洋菜電泳與雙向免疫擴散流程

先在載玻片上鑄好洋菜膠體，並預先打好樣本槽，以便進行洋菜電泳。電泳後中央槽挖出，注入抗體，進行雙向免疫擴散。

## 1.2 實驗操作

本實驗所用免疫電泳膠片如圖 S1-2C，有兩個樣本槽，一個中央槽（長條形）。樣本槽分別注入 trypsin 與 胰臟抽取液；跑完電泳後，中央槽加入 小白鼠抗 trypsin 抗血清，進行雙向擴散；由沉澱線的形成，可觀察抗原與抗体間的專一性現象。

### 1.2.1 儀器設備

- 載玻片 (每人一片)。
- 膠片打模工具：刀片、鐵尺 (15 cm)、滴管 (吸口須平整)。
- 水平電泳槽 (Mupid)、濾紙 (當鹽橋用)。
- 塑膠培養皿 (petri-dish) 及衛生紙。

### 1.2.2 藥品試劑

- Barbitone 緩衝液 (0.08 M, pH 8.2)。
- 洋菜溶液 (2%) 溶於 barbitone 緩衝液，煮沸溶解後，於 60°C 水浴保溫。
- 樣本：Trypsin 或胰臟抽取液，加有追蹤染料 (BPB)，裝在 1 mL 注射針筒內。
- 抗血清：小白鼠抗 trypsin 的抗血清或腹水，1~3 倍稀釋。

### 1.2.3 實驗步驟：

#### 洋菜膠片製作

- 1) 載玻片預先打底 (若時間不夠可省略)：取 0.5% 洋菜溶液約 2.5 mL，均勻塗佈在載玻片上，凝固後放到烘箱內烘乾。
- 2) 取出載玻片，水平放好，有打底的那面朝上。
- 3) 準備 2% 洋菜溶液，置 60°C 水浴保溫；同時取一支 5 mL 吸管，天氣太冷時須以電爐或吹風機加溫，以便在吸取洋菜溶液時，洋菜不致凝固在吸管内。
- 4) 以此吸管吸取 2.5~3.0 mL 洋菜溶液，儘速依圖 S1-4A 的方式把洋菜溶液均勻塗佈到載玻片上。注意要馬上以吸管尖把洋菜表面整平，若有氣泡立刻除去。洋菜膠体開始凝固時，就不要再動它。
- 5) 數分鐘後，當膠体轉成白色，表示凝結完成。
- 6) 以刀片在膠体的中央，畫兩道平行線如圖 S1-4B。引導畫線的鐵尺，要架在膠体上方，但不可觸及膠面，可在載玻片兩頭用硬幣墊高，再把鐵尺架在上面；刀刻要深及底部，兩平行線間隔不可大於 2 mm，約一個硬幣的厚度，暫時不可挖掉膠体。
- 7) 取滴管在如圖 S1-4C 的位置打洞，此二洞位置要對稱。打洞時，先握住橡皮頭，在預定位置上垂直壓下，放開橡皮頭，同時快速往上移開滴管，要注意洞內的膠体有無挖出。
- 8) 畫線及打洞時，最好先在紙上畫好實際大小的模型，把玻片放在上面進行。每人製作一片，每組挑出一片進行電泳。

#### 洋菜膠片電泳

- 9) 四組共用一個 Mupid 電泳槽，把四片載玻片並肩放到電泳槽中，正負極槽倒入 barbitone，放好濾紙鹽橋並潤溼之，注意濾紙與膠片要貼緊 (圖 S1-4D)。
- 10) 以微量注射針筒在兩個樣本槽分別注入 trypsin 及胰臟抽取液，小心勿溢出。
- 11) 裝好電極，注意樣本由負極 (黑色) 往正極 (紅色) 跑，以 16 mA 電流進行。

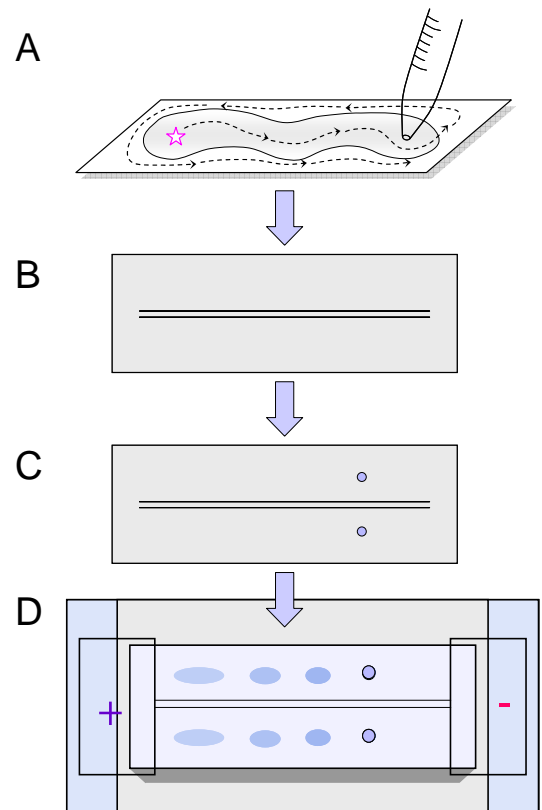


圖 S1-4 免疫電泳膠片製作

12) 樣本中有藍色染料，俟藍色點接近另一端時，終止電泳；小心取出載玻片。

◆ 注意：一定要確定電源已關，才可取出載玻片。

#### 雙向免疫擴散

13) 取一只培養皿，鋪上一層衛生紙，以水潤溼之；把膠片上洋菜的中央槽挑空，然後將玻片置於培養皿內的衛生紙上。

14) 在中央槽內，加入 0.1 mL 小白鼠抗 trypsin 抗血清，並覆上蓋子；等到抗血清擴散進入洋菜之後，才可攜回；約一日後，可觀察到白色的沉澱線（拿出載玻片對著日光燈看）。

15) 沉澱線可染色，但要先用 PBS (生理食鹽水) 浸洗 4~5 d，每天換 1~2 次 PBS；然後以 CBR 染色液 (同膠體電泳實驗所用者) 染色 1 h，再以脫色液脫色，每天至少換一次，持續數日，直到背景呈現透明。

### 1.3 結果與報告

#### 1.3.1 實驗結果

- 進行電泳前，中央槽為何不先挖空？若先挖空可能會有那些問題？
- 洋菜電泳的條件如何？與聚丙烯醯胺電泳有何不同之處？
- 若沒有用 CBR 染色，請準確畫下沈澱線的形狀；若有染色，則可拍照。
- 討論沈澱線的形成，與抗原的種類有無關係？

#### 1.3.2 討論問題

- 抗體與其抗原之間的親和力，由那些作用力構成？
- 抗體在生化分析或純化上，有何功能或用途？
- 本實驗技術可應用在什麼方面？

### 1.4 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 155, 205, 217

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.174-182

Roitt I, Brostoff J, Male D (2001) Immunology (6th ed) Chap. 4, 27



## S2 免疫轉印法

莊榮輝

**膠體電泳** 可以把蛋白質依照分子量大小分開，若膠體內的蛋白質色帶能轉印到尼龍膜，則這些蛋白質可繼續以其專一性抗體來偵測，成為更強大的解析工具。

### 2.1 背景知識

膠體電泳的原理與前面 P3 實驗完全一樣，而蛋白質轉印也是相同的機制，只是轉個方向，把膠片上的色帶印到尼龍膜。

#### 2.1.1 蛋白質轉印

膠體電泳的解析力雖然很高，可以把複雜的蛋白質混合物分離開來，但是不能方便地鑑別這些色帶的身分；原因之一，是因為膠體本身易脆，不容易進一步操作，因此要先把這些色帶轉移到尼龍薄膜上，再繼續以其它方法檢定之；而最常用的方法，便是以抗體對尼龍膜上的蛋白質色帶進行免疫偵測。

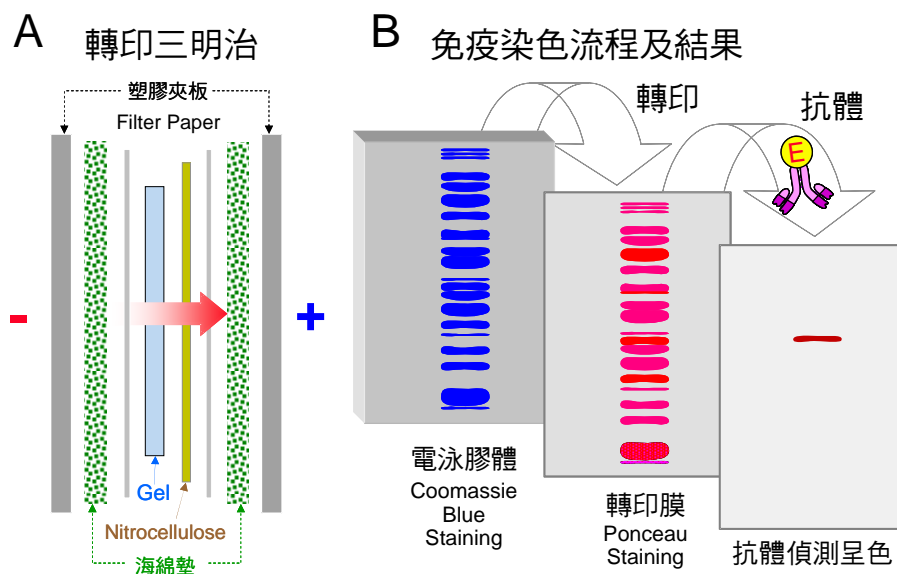


圖 S2-1 蛋白質轉印及免疫染色的原理機制

早期蛋白質轉印法是使用 硝化纖維紙 (nitrocellulose)，蛋白質可吸附在紙上的硝基，不易脫落。後來改用尼龍材質的薄膜 (如 PVDF)，上面有各種修飾基團，可強力地吸引住蛋白質，但降低非專一性的吸附，使結果更為可靠。轉印膜在轉印後的空白部份，通常都要以無關的蛋白質覆蓋起來，以免後面操作所用到的抗體等物質，吸附到轉印膜上去。通常都使用脫脂奶粉，我們則比較常用明膠，隨人喜好而定。

轉印時，要小心分子量較小的蛋白質，可能會穿過轉印膜而損失；可在轉印緩衝液中添加甲醇 (10~30%)，以增加轉印膜對蛋白質的吸附力量。反之，也有商品標榜在一次轉印後，可以同時印出十張相同的轉印膜，減少膠片消耗與轉印時間；這在蛋白質體學的應用上，有相當大的吸引力，因為同一張二次元電泳的轉印膜，可能要進行很多種不同的偵測反應，因此需要很多張相同的轉印膜。

另外，注意有些在轉印以後要分離色點，然後進行胺基酸定序，若是使用 Edman degradation 反應的定序儀，則轉印緩衝液中避免使用帶有  $-NH_2$  基團的成份 (如 Tris, Gly)，以免干擾 Edman degradation。

有時候，可以把酵素轉印到膜上，然後直接在上面進行催化反應，若能產生不溶性的生成物，原地凝集在轉印膜上，則可做為酵素的檢定之用。例如磷酸酶 (phosphatase) 或過氧化氫酶 (peroxidase)，都可直接在轉印後呈色。當然，若使用 SDS 膠體電泳，則必須在轉印後，使酵素充分回復原態及活性。

### 2.1.2 免疫染色

膠體電泳的高解析力，加上抗體的高專一性，結合成為一個極為強大的分析工具。因此，一直到目前，電泳轉印加上免疫染色的流程，都是所有生物科技相關實驗室所必備。

一次抗體有時可以買到商品，但通常都極為昂貴；較不常見的抗原，則必須自行製備抗體，那就要先準備好純質抗原。抗原與佐劑 (adjuvant) 混合成乳劑後，進行動物免疫，通常使用大白兔或小白鼠。每兩週免疫一次，如此進行追加免疫約四到六次，試採血檢測血清效價，若血清稀釋 1,000 到 10,000 倍，仍然可在轉印膜上染出抗原的色帶，則免疫可謂成功，即可進行採血，製得抗血清，其中即含有所要的專一性抗體。

專一性抗體會像『巡弋飛彈』一樣，自動去找出抗原色帶，並且與此色帶緊密結合，然後再利用 二次抗體 (即第一次所用抗體的抗體，可以買到) 與上述抗體結合。圖 S2-2 說明此一設計，抗體上面標有 2 者即為二次抗體，後面連結著標誌酵素 (E)；標誌酵素多使用上述的磷酸酶或者過氧化氫酶，兩者在加入基質後，都可生成具有強烈呈色的沈澱。

使用二次抗體與酵素的連結體，雖然增多一次操作動作，但也提升了整個反應的專一性，因為多加一次專一性篩選步驟，而且自由的一次抗體效價較高。同時也較方便，因為各種一次抗體都可直接使用，然後用二次抗體與酵素連結體即可，不須各種一次抗體都得去做酵素標誌。

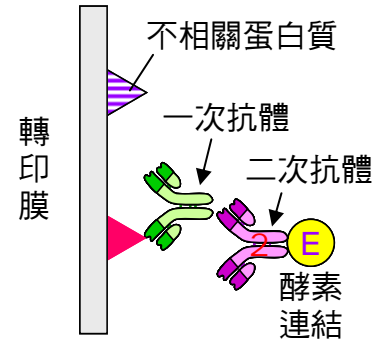


圖 S2-2 免疫染色的設計

### 2.1.3 實驗大綱

本實驗分成三個部份：(1) SDS-PAGE 膠體電泳、(2) 蛋白質轉印、(3) 免疫染色。樣本為前面實驗的 trypsin 及胰臟抽取液，並使用 CHOM 為負對照組，然後以抗 trypsin 的抗體為探針，進行專一性的偵測。

### S2 免疫轉印法

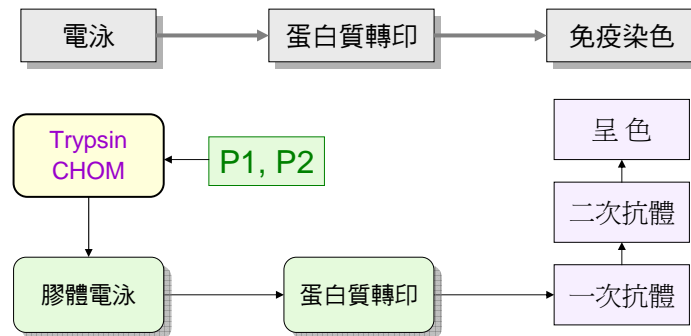


圖 S2-3 蛋白質轉印及免疫染色操作流程

## 2.2 膠體電泳

兩組鑄造兩片平板 SDS 電泳膠片，分別進行各組 trypsin 樣本的分析，接著並進行蛋白質轉印，則請依照下節 2.3 實驗步驟操作。

### 2.2.1 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。

### 2.2.2 藥品試劑

所用藥品與原態電泳類似，但是多了 (e) SDS 及 (f) 樣本溶液，整個系統都要加入 SDS；同時有標準分子量的蛋白質 (k)，可供比對樣本的分子量。

- a) 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) 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) C 液 (聚焦膠體緩衝液)：

Tris	0.6 g
TEMED	40 $\mu$ 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。

- d) 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 1000 mL，室溫保存。使用前要以蒸餾水稀釋五倍，並且加 SDS 成為 0.1%。

- e) 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。

f) 10% SDS 水溶液。

g) 異丙醇。

h) SDS 樣本溶液 (2×)：

Tris (250 mM)	0.3 g
EDTA·2Na (4 mM)	14.9 mg
SDS (4%)	0.4 g
β-Mercaptoethanol (10%)	1 mL

加二次水 8 mL 溶解，調 pH 至 6.8 之後，再加水至 10 mL。

i) 追蹤染料：Bromophenol Blue (BPB) 1 mg 加 5 mL 水及 5 mL 甘油。

j) CBR 染色液：Coomassie Brilliant Blue R-250 1.5 g 加 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。

k) 脫色液：甲醇 (20%) 及醋酸 (10%) 的水溶液，置於排煙櫃中公用。

l) 標準蛋白質組合：

預先染色之低分子量標準 (Novex SeeBlue Pre-stained Standard)

Protein	Molecular mass (D)
Myosin	250,000
Bovine serum albumin	98,000
Glutamate dehydrogenase	64,000
Alcohol dehydrogenase	50,000
Carbonic anhydrase	36,000
Myoglobin	30,000
Lysozyme	16,000
Aprotinin	6,000
Insulin B chain	4,000

### 2.2.3 鑄膠 (SDS-PAGE)

表 S2-1 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	4.8	3.9	3.1	2.3	水	2.8
10% SDS	0.1	0.1	0.1	0.1	10% SDS	0.1
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) 依照表 S2-1 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，以避免氣泡產生，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  $\mu$ L 異丙醇，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) 配製焦集膠體溶液，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。

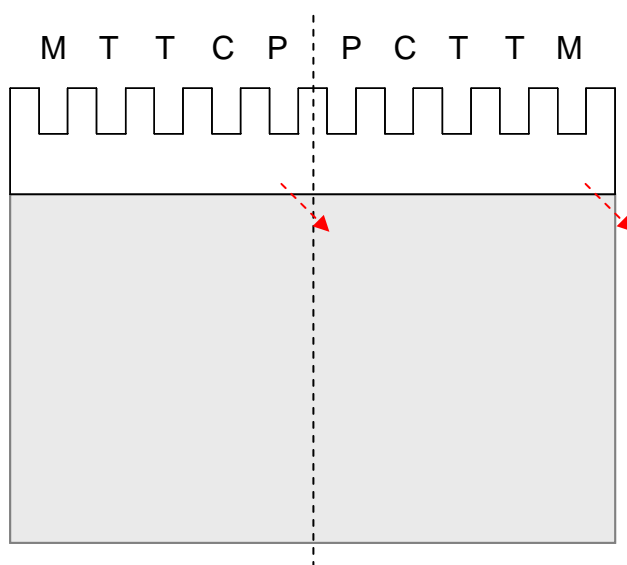


圖 S2-4 添加樣本的配置方式

T 為 trypsin (可能有不同動物來源的樣本)，C 為 CHOM，P 為胰臟抽取液，M 為標準蛋白質。跑完電泳後由中央切開，右上角各切角做記號 (箭頭虛線)；一半進行 CBR 染色，另一半則馬上進行轉印，請接續 2.3 免疫轉印法。

## 2.2.4 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 SDS 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 SDS 電泳緩衝液。

- ◆ 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) 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槽內。
- 3) 樣本處理：取 trypsin 樣本 20  $\mu\text{L}$ ，因其中含甲酸溶液，先加入 2  $\mu\text{L}$  1 N NaOH 中和之，再加入 20  $\mu\text{L}$  SDS 樣本溶液，及 20  $\mu\text{L}$  追蹤染料 BPB 均勻混合，在沸水浴煮沸 10 min 後放冷。CHOM 取 20  $\mu\text{L}$  如法處理，但不須中和。請在鑄膠的空檔時，處理好樣本。
- 4) 取適量的樣本 (約 10~15  $\mu\text{L}$ )，依圖 S2-4 配置，以微量針管小心注入樣本槽，避免氣泡陷入。另外，也注入標準蛋白質 (M) 5  $\mu\text{L}$ ，作為分子量之參考。
- 5) 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。
- 6) 在電泳過程中，特別觀察標準蛋白質中各個色帶的泳動情形。
- 6) 待追蹤染料跑出膠片後，關掉電源，取出膠片，並將膠體平均切成兩半，各以解剖刀截去右上角做記號
- 7) 一半進行蛋白質染色，另一半馬上浸入轉印緩衝液平衡 20~30 min，繼續進行轉印，參考下節 2.3 步驟。

#### 2.2.4 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，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 可換新脫色液，一直重複到背景呈現透明為止。
- 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。

### 2.3 蛋白質轉印

首先以迷你平板膠體電泳對樣本蛋白質進行分離，然後轉印到尼龍膜上去。

#### 2.3.1 儀器設備

- a) 平板迷你電泳槽 (Hoefer, Mighty Small SE-250) 及所有附件。
- b) 電泳轉印槽 (Hoefer, TE-22) 及海綿、卡夾各兩片。
- c) 電源供應器 (可達 500 mA)。
- d) 震盪器及塑膠染色方皿。

### 2.3.2 藥品試劑

- a) SDS-PAGE 膠體，由電泳實驗所得之一半 SDS-PAGE 膠片。
- b) 轉印膜 (Millipore Immobilon, PVDF)、甲醇少許。
- c) 濾紙 (Whatman 3 mm) 兩張。
- d) 轉印緩衝液 (blotting buffer, 10×)：

Tris	30.3 g
Glycine	144 g

加水至 800 mL，pH 調至 8.3 後，加水至 1,000 mL。SDS-PAGE 轉印時，轉印緩衝液中須加有 10% (v/v) 甲醇。

- e) PBST (PBS 加 0.05% Tween)

- f) Urea-PBST：

Urea (6 M)	36 g
------------	------

加入 PBST 加熱溶解後，以 PBST 添加至 100 mL。

### 2.3.3 實驗步驟：

#### 蛋白質轉印

- 1) SDS-PAGE 電泳膠片接續 2.2 節電泳，其中一半進行 CBR 染色，另一半則保留在本實驗作為轉印之用，電泳後切半馬上浸入轉印緩衝液平衡 15 min。
- 2) 轉印膜 PVDF 要裁得比膠片稍大，因膠片平衡後體積會略膨漲。PVDF 為疏水性，必須先以 100% 甲醇短暫溼潤後，再浸入轉印緩衝液 (1×) 中備用。
- 3) 取兩張稍大的濾紙，於轉印緩衝液中浸潤備用。取出轉印卡夾，先墊一張多孔性海綿，鋪上一張濾紙，再小心鋪上膠片，勿陷入任何氣泡，鋪上轉印膜，再蓋上一層濾紙及海綿，再把整個三明治卡夾裝好。可參考圖 S2-1 的組合。
- 4) 置入已裝有轉印緩衝液 (1×) 的轉印槽中，注意 PVDF 那面朝正極，膠片面朝負極。儘量除去附在卡夾外面的氣泡，氣泡的存在將使轉印效率變差。
- 5) 於 4°C 中以 400 mA 進行轉印，轉印槽內要加以攪拌，以免溫度過高或不均，轉印 60 min 後中止。
- 6) 取出轉印膜，浸在尿素 (urea-PBST) 中過夜，次日換成 PBST，等到次週繼續免疫染色；尿素可洗去蛋白質分子上的 SDS，同時可將一部份蛋白質分子恢復成原態，以增加抗體的確認機率。
- 7) 在電泳樣本中若含有 pre-stained 標準蛋白質，則可作為轉印效率之參考。



## 2.4 免疫染色

轉印膜上的蛋白質繼續用抗體偵測，首先用一次抗體去結合抗原色帶，再加入二次抗體與酵素的結合體，最後抗原色帶將會被標上酵素，以酵素反應呈色之。

### 2.4.1 儀器設備

- a) 平台震盪器。

### 2.4.2 藥品試劑

- a) 明膠-NET：

Gelatin	0.25%	2.5 g
NaCl	0.15 M	8.75 g
EDTA·2Na	5 mM	1.8 g
Tween 20	0.05%	0.5 mL
Tris	50 mM	6.05 g

加水 800 mL 並加熱至明膠溶解，調 pH 至 8.0，再加水至 1,000 mL。

- b) 一次抗體：(小白鼠抗豬的 trypsin 抗體)

通常要免疫大白兔或小白鼠以製備一次抗體，一般抗體的使用濃度在 1 : 1,000 至 1 : 5,000 之間，視抗體效價而定，使用前以上述明膠-NET 稀釋之。

- c) 二次抗體-HRP 連結體：

通常都可以購得上述一次抗體的二次抗體，並且連結有標誌酵素 (horse radish peroxidase, HRP) 或標誌物 (如螢光物或 biotin)；其使用濃度請依照廠商建議，也稀釋在明膠-NET 中。

- d) HRP 呈色劑 DAB：

Diaminobenzidine (DAB)	5 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	10 μL

用 100 mL PBS 溶解，必須新鮮製備，不可放過夜；DAB 是致癌物質。

- e) HRP 螢光呈色劑：SuperSignal West Pico Substrate (Pierce)

Luminol solution (含 enhancer)	0.5 mL
Peroxide solution	0.5 mL

上面兩種溶液以 1:1 混合後立刻使用，一整張轉印紙約需 1 mL。

### 2.4.3 實驗步驟：

- 1) 尿素洗過的轉印紙再以 15 mL PBST 洗兩次，每次 5 min。
- 2) 加入 15 mL 一次抗體 (適當濃度溶於明膠-NET 中)，室溫下反應 1 h。

◆ 一般抗體的使用濃度是在 1:1,000 至 1:5,000 之間，視抗體效價而定。

- 3) 以 15 mL PBST 洗 3 次，每次約 10 min。
- 4) 加入 15 mL 二次抗體-HRP 連結體，室溫下反應 1 h。
- 5) 以 15 mL PBST 洗 3 次，每次約 10 min。
- 6) 倒入 HRP 呈色劑 DAB 15 mL，褐色色帶應很快出現。
- 7) 呈色約在 1~5 min 內完成，應當在背景開始加深前中止呈色。
- 8) 倒去呈色液，並以蒸餾水清洗數次，取出晾乾後避光保存。

◆ 若使用螢光染色劑，則上面 6) 改加入 1 mL SuperSignal 呈色劑，並在螢光掃描儀中顯像至清晰色帶出現，弱一點的色帶，可能要呈色 10 min 以上。

## 2.5 結果與報告

- a) 請以掃描或拍照記錄免疫染色結果，注意有幾條色帶呈現。
- b) 免疫染色圖譜請與 CBR 染色結果詳細比對。
- c) 由結果可推論所用抗體的專一性如何。

## 2.6 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 155, 205, 217

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.180-182

Roitt I, Brostoff J, Male D (2001) Immunology (6th ed) Chap. 4, 27

## S3 酵素動力學

莊榮輝

**酵素動力學** 是以各種濃度的基質，添加固定量酵素進行催化，然後檢定所得到的生成物多寡，即可測定在各種不同基質濃度下，酵素的表現情形。酵素抑制劑會阻礙酵素的表現，也可由酵素動力學的行為觀察之。

### 3.1 背景知識

酵素與其基質之間，具有專一性的結合與催化關係，這種行為可以用動力學的方法描述之，求得此酵素的最高催化速率，以及酵素與基質間的親和力。

#### 3.1.1 Michaelis-Menten 動力學公式

酵素轉化酶 invertase 很早就被發現，可以把蔗糖水解成葡萄糖及果糖，由於反應前後這幾種糖類的旋光度有很大改變，好像把旋光度整個轉化過去，因此稱為轉化酶。

Michaelis及Menten利用轉化酶為工具，添加不同濃度的蔗糖進行酵素的催化反應，然後觀察所產生單糖的速率如何。他們發現，當基質的量越高，轉化酶催化反應的速率就越高，最後到達飽和最高速率；他們並且把這個關係，以數學公式寫出來，稱為Michaelis-Menten公式，並由作圖推出一個常數 $K_m$  (Michaelis-Menten常數)，可指示酵素與基質之間親和力的大小；同時，也可推得此酵素的最高催化速率 $V_{max}$ 。請複習生物化學課程中的相關文字，試著自行寫出Michaelis-Menten公式並解釋其意義。

#### 3.1.2 酵素抑制劑

酵素有其專一性抑制劑，其分子構形大多類似酵素的基質，酵素可以與之結合，但是無法完成正常的催化反應。

### 3.1.3 實驗大綱

本實驗分成幾個部份：(1) 決定最適當的酵素濃度、(2) 傳統的酵素動力學操作、(3) 決定最適當的抑制劑濃度、(4) 添加抑制劑的酵素抑制動力學。

#### S3 酵素動力學

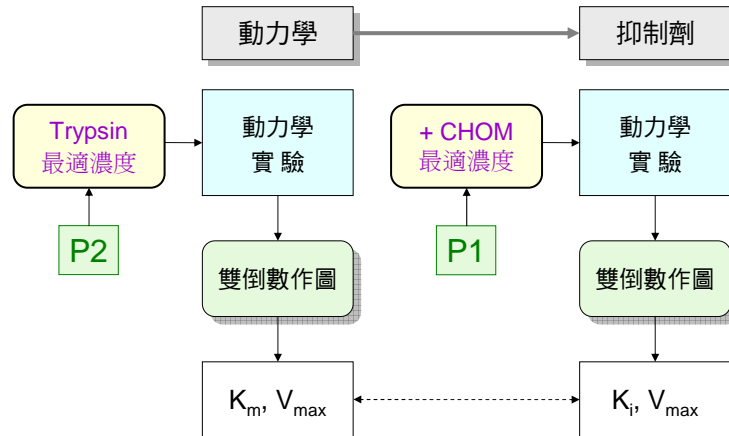


圖 S2-1 蛋白質轉印及免疫染色流程

## 3.2 酵素動力學

要先決定一個適當的酵素濃度，能夠產生足量的生成物以供測量，但又不會催化過度；然後固定使用此酵素濃度，加入各種不同量的基質，就可做出動力學曲線。

### 3.2.1 儀器設備

- a) ELISA 光度計。
- b) 微量滴定盤 (96-well microtiter plate)。

### 3.2.2 藥品試劑

- a) Trypsin (由實驗 P2 所製備者，或者由助教提供)。
- b) Tris 緩衝液 (0.05 M, pH 8.2, 含 20 mM CaCl<sub>2</sub>)。
- c) BAPNA 合成基質液：可被 trypsin 水解而呈黃色。

配製法：取 BAPA 43.5 mg 加入 1 mL DMSO 懸濁均勻，等約 1 h 完全溶解，慢慢滴入 100 mL Tris 緩衝液同時快速攪拌，讓兩者混合均勻。

### 3.2.3 實驗步驟：

#### 決定最適酵素濃度

- 1) 取出你所製備的 trypsin，以 Tris 緩衝液做一系列稀釋 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ...)；請加一空白組，直接以 Tris 緩衝液為樣本。
- 2) 在微量滴定盤上，每個濃度取樣 50  $\mu\text{L}$ ，加入 200  $\mu\text{L}$  BAPNA液，混合後反應 10 min，漸漸出現黃色，以ELISA光度計測吸光值 ( $A_{405}$ )。
- 3) 取一酵素濃度，其 ELISA 吸光值最高，但又不超過 1 以上者，作為下面酵素動力學所指定的酵素濃度。

#### 酵素動力學

- 4) 取 BAPNA 基質液，以 Tris 緩衝液作一系列稀釋 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ...)。
- 5) 在微量滴定盤上，取上面指定濃度的酵素 50  $\mu\text{L}$ ，加入BAPNA不同濃度稀釋液各 200  $\mu\text{L}$ ，混合後反應 10 min，同法以ELISA光度計測吸光值 ( $A_{405}$ )。

### 3.3 酵素抑制動力學

在反應中加入抑制劑，會改變酵素的動力學行為。同樣地，先決定一個最適的抑制劑濃度，可以抑制 50% 酵素活性，然後以此濃度進行抑制劑的動力學實驗。

#### 3.3.1 儀器設備

同上一小節。

#### 3.3.2 藥品試劑

- a) CHOM (由實驗 P1 所製備者)。
- b) 同上一小節。

#### 3.3.3 實驗步驟：

##### 決定最適 CHOM 濃度

- 1) 取出你所製備的 CHOM，以 Tris 緩衝液做一系列稀釋 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ...)；請加一空白組，直接以 Tris 緩衝液為樣本。
- 2) 在微量滴定盤上，上述 CHOM 每個濃度取樣 10  $\mu\text{L}$ ，加入 40  $\mu\text{L}$  指定濃度的 trypsin 溶液，混合均勻後，在室溫中靜置 10 min。
- 3) 加入 200  $\mu\text{L}$  BAPNA液，混合後反應 10 min，漸漸出現黃色，以ELISA光度計測吸光值 ( $A_{405}$ )。
- 4) 取一 CHOM 濃度，其 ELISA 吸光值最約為空白組吸光值的一半，作為下面酵素抑制動力學所指定的 CHOM 濃度。

### 酵素抑制動力學

- 5) 取 BAPNA 基質液，以 Tris 緩衝液作一系列稀釋 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ... )。
- 6) 在微量滴定盤上，取上面指定濃度酵素 40  $\mu\text{L}$ ，指定濃度 CHOM 10  $\mu\text{L}$ ，混合均勻後在室溫靜置 10 min。
- 7) 同樣製作不加 CHOM 的反應，CHOM 以 Tris 緩衝液取代，如法操作。
- 8) 加入 BAPNA 不同濃度稀釋液各 200  $\mu\text{L}$ ，混合後反應 10 min，同法以 ELISA 光度計測吸光值 ( $A_{405}$ )。

## 3.4 結果與報告

### 3.4.1 酵素動力學

- a) 由動力學實驗得到一組數據，以基質濃度的改變為 x 軸，以所測得的吸光值為 y 軸直接作圖，應可得到一條動力學曲線。
- b) 一樣的數據，改以基質濃度的倒數為 x 軸，而以吸光值的倒數為 y 軸，得到雙倒數作圖，應該可得到一條直線。
- c) 由雙倒數直線，應該可推得 trypsin 的  $K_m$  及  $V_{max}$ ，請注意兩者的單位為何。

### 3.4.2 酵素抑制動力學

- a) 由所得到的數據，同樣做出直接作圖，以及雙倒數作圖，但各有兩條線，其依為酵素的動力學曲線，另一為抑制劑的抑制曲線。
- b) 比較兩條雙倒數動力學曲線，並推得其  $K_m$  及  $V_{max}$ 。

## 3.5 參考文獻

莊榮輝 主編 (2000) 酵素化學實驗。台灣大學農化系。頁 76~81

Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed) p.202-213