

B

參 考 講 義



參考講義：

- B1 生物化學基礎
- B2 酵素純化與分析
- B3 酵素操作方法
- B4 相關研究計畫

B1

生物化學基礎

細胞與分子

胺基酸

蛋白質

酵 素

B1 生物化學基礎一章的內容，是台大生化科技學系生物化學課程之部分講義，其範圍從開始的概論、細胞與分子，經胺基酸與蛋白質，以及酵素部分。因為此一系列的生化背景，與本實驗課程有相當重要的關係，因此特別收納作為同學複習或查詢之用。若有必要，也可以在上課期間旁聽該段課程，同時解答各章節後面的練習題，則將有更清楚的整體概念；生物化學基礎的上課時間，固定在上學期的前半段。

細胞與分子

1 生命源起 51

組合式宇宙粒子 分子演化 原始細胞

2 細胞的生物化學 52

2.1 原核細胞 52

2.2 古生菌 52

2.3 真核細胞 52

細胞核 內質網 高爾基氏體 微體 細胞骨架系統 細胞膜 粒線體
葉綠體 造粉體 其他

3 細胞分子 54

3.1 水與 pH 54

3.2 細胞的組成分子 54

3.3 分子間的作用力 55

離子鍵 氫鍵 疏水性引力 凡得瓦爾力

問題集 56

胺基酸

1 胺基酸基本構造 57

2 胺基酸分類 57

☐ 二十種胺基酸的分類及性質 58

☐ 胺基酸分類模擬地下鐵道地圖 59

3 胜肽 59

4 胺基酸的離子性質 60

4.1 解離度 60

質子搶奪 Ampholyte 質子解離

☐ 各種胺基酸的解離基團及其 pK_a 60

4.2 等電點 60

☐ 弱酸如何作為緩衝分子？ 61

問題集 62

標有 ☐ 號者為重要圖表

□ 胺基酸與蛋白質的故事 (漫畫) 64

蛋白質

1 蛋白質構造 65

1.1 一級構造 65

1.2 二級構造 65

1.2.1 二級構造相當規律 65

α 螺旋 β 長帶 其它螺旋構造

1.2.2 連結性二級構造 66

Turn 轉折 不規則形

1.3 三級構造 66

1.3.1 三級構造的組成力量 66

1.3.2 三級構造的立體構成 67

1.3.3 三級構造的修飾 67

1.4 四級構造 67

2 蛋白質性質 68

2.1 變性及復性 68

2.2 蛋白質構形是活動的 68

2.3 蛋白質的專一性結合 68

構形互補 二級鍵吸引力

□ 蛋白質間的專一性結合力量是如何構成的？

3 蛋白質研究技術 69

3.1 蛋白質純化技術 69

硫酸銨分割法 膠體過濾法 離子交換法 親和層析法

3.2 蛋白質性質與構造檢定 69

蛋白質定量法 分子量測定法 等電點 胺基酸組成 蛋白質立體構造
質譜分析

3.3 胺基酸序列決定法 70

3.3.1 傳統胺基酸定序法 70

3.3.2 cDNA 定序 70

問題集 71

酵 素

- 1 酵素的命名 73
- 2 酵素的構成 74
 - 2.1 全酶 74
 - 2.2 輔酶 74
 - 2.2.1 輔助因子 74
 - 2.2.2 輔酶的作用 74
 - 2.2.3 輔助因子範例 75
 - 2.2.4 輔酶與 ribozyme 75
- 3 酵素動力學 76
 - 3.1 酵素催化反應 76
 - 3.2 酵素動力學 76
 - 3.2.1 基本概念 76
 - 酵素動力學大綱 77
 - 3.2.2 Michaelis-Menten 公式的推演 78
 - 3.2.3 Michaelis-Menten 公式的意義 78
 - 3.2.4 $V_{\max}$ 及 K_m 的測定與意義 79
 - 3.2.4.1 $V_{\max}$ 及 K_m 測定法 79
 - 直接作圖法 雙倒數作圖法 Eadie-Hofstee 作圖法
 - 3.2.4.2 K_m 的意義 79
 - 3.2.4.3 $V_{\max}$ 的意義 80
 - 3.2.4.4 酵素活性定義 80
 - 3.3 雙基質反應 81
- 4 酵素的抑制 82
 - 4.1 酵素的抑制方式 82
 - 4.2 不可逆的抑制 82
 - 三種酵素抑制機制 83
- 5 酵素的催化機制 84
 - 5.1 酵素活性區 84
 - 5.2 協同式催化機制 84
 - Carboxypeptidase A 催化機制 84
 - 5.3 順序式催化機制 85
 - 5.4 酵素的專一性 86
 - 5.4.1 專一性結合區 86

5.4.2 專一性結合力量	86
5.4.3 立體專一性	86
6 酵素活性的調節	87
□ 酵素活性調節機制	87
6.1 蛋白質裂解	87
6.1.1 胰原或前驅體	87
6.1.2 蛋白酶	88
6.1.3 Ubiquitin-proteasome 降解路徑	88
6.2 磷酸化	89
6.3 非共價結合之信息傳導分子	89
6.3.1 cAMP	89
6.3.2 Calmodulin 攏鈣素	89
6.3.3 信息傳導路徑	89
6.4 異位酶	90
6.4.1 Aspartate transcarbamoylase (ATCase)	90
□ 異位酶的 S 型曲線調控	91
6.4.2 異位酶的作用模型	91
7 細胞代謝與酵素調控	92
7.1 細胞代謝途徑	92
7.1.1 代謝調控原則	92
7.1.2 異化代謝途徑鳥瞰	92
7.1.3 糖類中心代謝途徑	92
7.2 代謝途徑中酵素的調控	93
7.2.1 基因表現的調控	93
7.2.2 酵素活性調節	93
7.2.3 激素調控	93
7.2.4 細胞空間的效用	94
7.3 研究酵素及代謝的材料	94
8 酵素在生物技術上的應用	95
8.1 酵素免疫分析法 (ELISA)	95
8.2 固定化酵素及酵素電極	95
8.3 蛋白質工程及人造酵素	95
8.4 Proteome 蛋白質體	96
8.4.1 Genome project 基因體計畫	96
8.4.2 Proteome 蛋白質體	96
問題集	97

細胞與分子

Cell and Molecule

細胞是生命的單位，所有生物皆由細胞構成，探討生命現象可由研究細胞開始。最近數十年來注重分子層次的研究，特別是蛋白質、核酸、酵素等巨分子，是分子生物學的主流。生物依其複雜性，可分為單細胞與多細胞生物，後者由許多細胞共同組成個體，這些細胞各司不同功能以維個體生存，稱為分化；分化是細胞演化的重要關卡。就單一細胞來看，有較原始簡單的原核細胞 (prokaryote)，及較複雜的真核細胞 (eukaryote)。

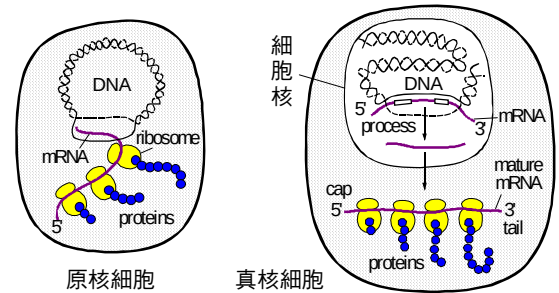


圖 1 原核細胞與真核細胞的比較

1 生命源起：

a. 組合式宇宙粒子：

宇宙誕生後所生成的基本粒子，先組合成各種大小的元素，許多原子再組合成簡單的有機小分子。這些小分子在地球演化初期的巨大能量催化下，可生成胺基酸或核苷酸等小分子單位，後者再聚合成為生命基礎的巨分子。

b. 分子演化：

巨分子中以核酸分子最為奇特，發展出複製自身分子的機制，並且可能有催化此複製機制的功能。而蛋白質因為其分子外形的多樣性，可能有更好的催化效果，並可經由核酸分子上的信息指導進行合成，因此蛋白質與核酸演變成為一組可以繁衍自身的共生聚合體。

c. 原始細胞：

上述核酸與蛋白質的共生，在原始地球的資源漸漸不足後，再獲取一脂質薄膜包住此聚合體，以確保原料物質的掌控，以及分子自身的有效複製，成為原始的細胞形式。此一原始生命形態，具有完整且獨立的生命單位，可吸取外界的養料分子，並經由複製分裂而繁衍。

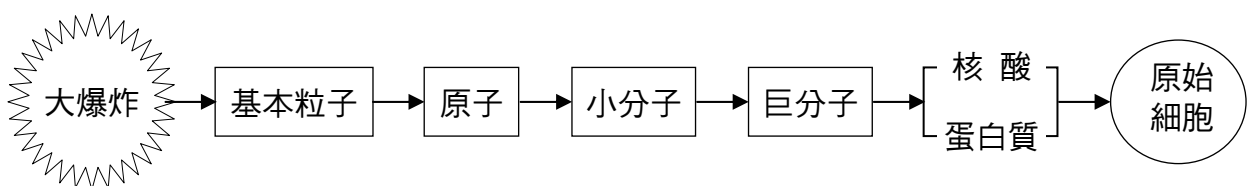


圖 2 由大爆炸到原始細胞的產生

2 細胞的生物化學：

以生物化學的觀點，複習細胞的重要活動。最近生命科學的大趨勢，是以分子層次的觀察，研究細胞乃至於器官或生物整體的生理現象，稱為 **molecular cell biology**。

2.1 原核細胞：

原核細胞的代表 **大腸菌 (*E. coli*)**，構造較為簡單，是分子生物學的主要研究對象。

a. **細胞壁 (cell wall)** 由 **肽聚糖 (peptidoglycan)** 構成，結構堅固，其功能有：

(1) 保護細胞； (2) 細胞內外物質及訊息的交通； (3) 抗原性及 (噬菌體) 接受體。

b. **鞭毛 (flagella)** 使細菌運動，而 **纖毛 (pili)** 為細菌交配時的管道。

c. **細胞膜 (cell membrane)** 控制細胞內外的選擇性交通，膜蛋白有重要功能。

d. **細胞質 (cytoplasm)** 散佈著各種分子，主要是可溶性酵素、核糖體 (ribosome)。

e. **核區 (nuclear region)** 不是真正的細胞核，散佈著遺傳物質 **DNA**，細菌通常有一或數條 **DNA** 分子；細胞質中有環狀的質體 **DNA**，是基因群質的主要載體。

2.2 古生菌 (archaebacteria)：

是一種介於原核與真核細胞間的細菌。古生菌與已知的原核細胞，在生化性質上有相當差異；喜生長在極端的條件，極類似地球演化的早期狀態；可分為三大類：

1) **Methanogens**： 甲烷菌極度厭氧，利用二氧化碳及氫氣產生甲烷。

2) **Halophiles**： 嗜鹽菌，生長在如死海的高鹽濃度區。

3) **Thermacidophiles**： 嗜酸熱菌，生長在火山口及溫泉帶，可耐酸至 pH 2。

2.3 真核細胞：

原核細胞與真核細胞的最大差異，在於後者有許多 **胞器 (cellular organelles)**，構造複雜；而最顯著的一個胞器，就是 **細胞核 (nucleus)**，原核細胞無細胞核。

a. **細胞核：**

由雙層核膜包圍著，膜上有 **核孔**，核內有 **核仁 (nucleolus)**，核仁含大量 **RNA**，其餘的 **核質 (nucleoplasm)** 部分則散佈著 **染色質 (chromatin)**，染色質含遺傳物質 **DNA**，在細胞分裂前，染色質會凝集成 **染色體 (chromosome)**。細胞核可能是由細胞外膜向內皺縮，包住染色體後形成球狀所造成。

b. **內質網 (endoplasmic reticulum, ER)：**

是細胞蛋白質的合成及輸送系統，依外形分為 **RER (rough ER)** 及 **SER (smooth ER)**；**RER** 在其膜上附著顆粒狀的 **核糖體 (ribosome)**，蛋白質合成後可通過內質網膜分泌到細胞外；不分泌到胞外的蛋白質，則由游離散佈在細胞質中的核糖體來製造。**SER** 表面光滑，沒有核糖體附著，可能與脂質的合成有關。

c. **高爾基氏體 (Golgi body)：** 是細胞內蛋白質的 **集散地** 與 **加工場**。

- a. 由內質網輸送來的蛋白質集中於此，分類後大部分分泌出細胞外。
- b. 不分泌出細胞的蛋白質，則集中後包裝成小球體，即為 微體 (microbodies)。
- c. 醣蛋白 (glycoprotein) 等在此修飾加上醣類。
- d. 微體 (microbodies)： 有很多種，都含某種劇烈的酵素，有特定的生化功能。
 - (1) Lysosomes (溶酶體) 含有 溶菌酶 (lysozyme) 等多種水解酵素，以消化外來蛋白質、核酸、醣類等分子。植物細胞內的對等胞器為液泡，其體積都很大。
 - (2) Peroxisomes 含有 觸酶 (catalase)，把有害細胞的 H_2O_2 分解成水。
 - (3) Glyoxosomes 可把脂質轉化成醣類，也是植物特有胞器的一種。
- e. 細胞骨架系統 (cytoskeleton elements)：

由許多小管所交錯構成，用以支持細胞，並行 細胞運動、胞內運輸 及 細胞分裂。
- f. 細胞膜 (cell membrane)： 真核細胞最外層胞膜上附有許多蛋白質，有複雜的功能。
 - (1) 細胞間 辨認 的特異性標記，如免疫學的各種 T 細胞上都有不同標記。
 - (2) 荷爾蒙 受體，與其配體分子接觸後，可引發細胞內一連串信息傳導反應。
 - (3) 細胞內外離子的 輸送幫浦，也都是由蛋白質所組成。
- g. 粒線體 (mitochondria)： 是細胞產生能量的地方。
 - (1) 由雙層膜組成，內層向細胞內伸展，皺褶成為 瘠 (cristae)。瘠上有顆粒密佈，是藉 呼吸鏈 進行 能量代謝 的地方，可生成 ATP。
 - (2) 粒線體有自己的 DNA，也可以合成蛋白質，是細胞內的 自治區；可能是可以行呼吸作用的原核細胞，侵入早期的真核細胞後，留在宿主細胞中共生。
- h. 葉綠體 (chloroplast) 與 造粉體 (amyloplast)：
 - (1) 葉綠體進行光合作用捕捉太陽光能，與細胞壁、液泡及造粉體都是植物特有胞器。葉綠體是地球生物圈最關鍵的一環，缺少葉綠體將導致所有生物滅亡。
 - (2) 造粉體含有大量澱粉粒，與葉綠體都屬 胞質體 (plastid)，二者是 同源器官，都是由相同的前體 (proplastid) 演變來，有的還可互相轉變。
 - (3) 胞質體也都有自己的 DNA，可能是早期的原核光合菌，進入真核細胞後產生的共生系統。粒線體與胞質體這兩種共生胞器，都與能量的代謝有關。
- i. 其它：
 - (1) 細胞外套 (cell coat) 只有部份動物細胞才有，會表現 抗原性； 癌細胞的細胞外套成分可以改變，以逃避免疫系統。
 - (2) 微粒體 (microsome) 是細胞打碎後，內質網破片形成的人為小球，並非胞器。
 - (3) 病毒 無法歸類入任何一類生物，卻能在細胞中寄生繁衍；因病毒在各種細胞、甚至物種間游走，夾帶部分染色體片段，可能對演化有所影響。對人體而言，病毒可刺激免疫系統，也許不全都是負面的影響。

3 細胞分子：

構成生物細胞的大部份分子都帶有電荷，有帶正電荷、有帶負電。許多分子上同時帶有正電及負電基團，具有兩性 (amphoteric) 性質；則視其正、負電荷數目的多寡，決定淨電荷之正或負。而環境 H^+ 濃度 (pH) 的變化，會影響分子淨電荷的正負 (圖 3)。這種分子的帶電性質，及其因環境的變化，是探討分子構造功能的重要因素。

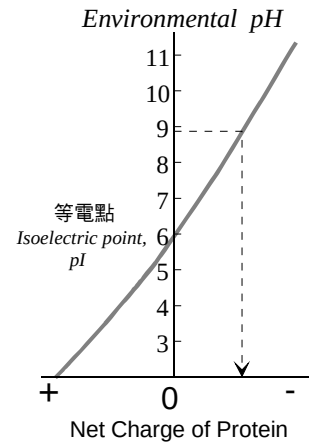


圖 3 環境 pH 的影響

3.1 水與 pH：

- 生物體內最多的分子是水，水雖然是有 H_2O 的分子式，但實際上大部分水分子是以離子形態 (如下兩式)，或其他更複雜的構造存在 (水分子組成的冰晶格)。

$$H_2O \rightarrow H^+ + OH^- \quad \text{或} \quad H_2O + H^+ \rightarrow H_3O^+$$
- 細胞內 H^+ 的濃度，對維護生物體內的正常生理活性非常重要，其實用的尺度即為 pH。任何生物體內或試管中的生化反應，必須保持恆定的 pH，因為環境 pH 會影響溶液中分子的帶電情形，進而影響其生化反應。
- 各種生化溶液，均需維持其 pH 的恆定，是為緩衝作用 (buffering)；緩衝液是因為其中含有緩衝分子，當溶液系統的 pH 改變時 (即其 H^+ 濃度改變)，緩衝分子可吸收或放出 H^+ ，如此可以調節溶液中的游離 H^+ 濃度，因而保持 pH 恆定。
- 水因為其分子的高度偶極化，因此有很高的介電常數 (dielectric constant)，會促進極性溶質分子溶入水中，稱為水合 (hydration)。只要是在水溶液中進行的反應，水合作用的影響即不可忽視。

3.2 細胞的組成分子：

生物體內許多重要的巨分子，都是由單位小分子所組成。古典生化注重上述分子的化學反應以及生理代謝，近代生化則以核酸、蛋白質及酵素為研究中心，現代則深入分子生物學層次，探討基因及其調節機制。

- 生物分子依其大小，可分為小分子及巨分子 (macromolecule)，巨分子是由小分子的單元體 (monomer) 為堆積單位，一個個接起來。例如蛋白質是由胺基酸所組成的。
- 常見的小分子有胺基酸、單醣、脂質、核苷酸等，都是體內分子的運輸形式；而大分子有蛋白質、多醣、核酸等，是功能、構造或貯藏形式。另有許多具有生物活性的小分子，如輔酶及維生素，其中以水含量最多，作用也最廣泛。
- 巨分子的序列是極為重要的，核酸的序列藏著遺傳信息，蛋白質的序列是取決於核酸的序列，而蛋白質的序列決定其構造與生理功能。因此，在巨分子的世界裡，序列幾乎決定一切；『自私的基因』一書指出，生物的繁衍只是在傳遞其所含的那段核酸 (gene)，甚或只是要傳遞核酸上面的序列信息而已 (meme)。

3.3 分子間的作用力：

分子與分子之間，或者同一分子裡面，有多種非共價的作用力存在，可使得分子間相吸的是引力，互相排斥的為斥力。這些微弱作用力是構成 分子構形 (conformation) 及分子間 親和力 (affinity) 的主要因素，統稱為 二級鍵 (secondary bonds)。

- 離子鍵 (electrostatic bond)** 是正電荷與負電荷之間的吸引力，容易被水合破壞。
- 氫鍵 (hydrogen bond)** 是分子中的氫原子，因其 陰電性 太弱，原子核裸露出來，而帶有正電荷，與帶負電荷的氧原子 (或氮原子) 之間，所生成的引力。
- 疏水性引力 (hydrophobic bond)：** 非極性分子具疏水性，兩個疏水性分子，因受環境極性水環境的排斥，其分子間會生成 非極性-非極性 的疏水性引力；水溶液中的巨分子，其疏水性引力多發生在分子內部。
- 凡得瓦爾力 (van der Waals bond)：** 非極性或極性很弱的分子表面，其原子受到鄰近分子上面原子的影響 (吸引或排斥)，會產生局部且短暫的偶極，因而有微弱的引力，是為凡得瓦爾力。兩個原子的距離要適中，以求得最大的凡得瓦爾力，稱為該原子的 凡得瓦爾半徑。兩分子之間因 構形互補 所生成的專一性吸引力，主要是由許多凡得瓦爾力所共同構成的。

圖 4 以基本的原子軌道的觀點，整理從原子組成簡單有機分子的過程。

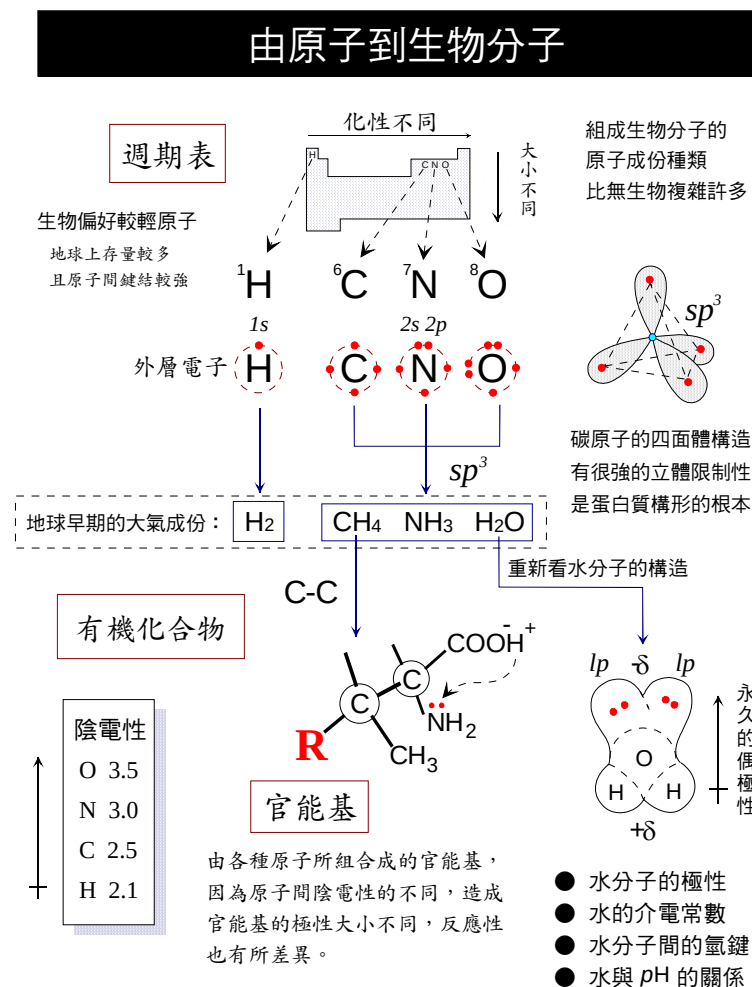


圖 4 由原子到有機分子的組合

問題集 (以下題目都沒有標準答案，許多甚至會引起很大的爭議，這樣就達到問題集之目的了)

1. Stanley Miller 把一些簡單的小分子放在一真空容器中，給予能量反應一週後，可以生成哪些物質？
2. 以演化觀點說明細胞內粒線體的來源。
3. 請舉出五種生化的構造或分子，其中含有氫鍵。 例如：蛋白質的 α helix
4. 分子的極性是如何產生的？ 為何極性分子只喜歡與極性分子結合？
5. 為何水分子有很強的極性？ 為何水分子有很強的介電常數？
6. 真核細胞 (eukaryotic cell) 與原核細胞 (prokaryotic cell) 有何相異之處？
7. 為何細胞內的分子多由較輕的原子所構成？
8. 二級鍵雖然分成四種，但事實上有相同的基本性質，請以電子的角度說明之。
9. 有機物幾乎是碳原子的天下，為何大自然會選擇碳？ 請從週期表的行與列討論。
10. 何為陰電性？ 陰電性是如何造成的？ 陰電性對分子的性質有何影響？
11. 假如正如 Dawkins 『自私的基因』一書所言，生物只是在傳遞其細胞內的那段基因，甚至只是在傳遞基因的序列而已 (meme 的概念)，則生物的存在有何意義？
12. 一般相信地球演化之初為一 RNA 世界，請提出三個可能的證據。
13. 細胞內的各種巨分子歸納來說，有哪三種功能？ 請各舉例說明。
14. 為何強酸或強鹼不能作為緩衝分子？
15. 分子的 兩性 amphoteric 性質是什麼？ 請列舉兩性分子說明之。
16. 為何生物細胞內的巨分子，一定要由單位小分子聚集而成，而不直接合成該巨分子？
17. 若真有外星生物，以分子層次來看，與地球生物差異有多少？ 會不會也用 A, T, C, G？
18. 是非選擇題 (答案寫在□內，是→○、非→×)

1) 那些胞器具有雙層胞膜？

☐ 細胞核 ☐ 葉綠體 ☐ 粒線體 ☐ 造粉體 ☐ 微體 (microbody)

2) 在演化上是外來的胞器：

☐ 細胞核 ☐ 葉綠體 ☐ 粒線體 ☐ 質體 ☐ 微小體 (microsome)

3) 有關氫鍵的性質描述：

☐ 氫鍵可在室溫中穩定鍵結 ☐ 氫鍵要有氫原子居中架橋 ☐ 非極性基團間也可生成氫鍵 ☐ 氫鍵的形成方向性並不重要 ☐ 氫鍵可看成微弱的耦極作用

4) 有關二級鍵的性質描述：

☐ 二級鍵的強度都很弱 ☐ 凡得瓦爾力是最強的二級鍵 ☐ 離子鍵在水溶液中不易形成 ☐ 二級鍵造就了兩蛋白質分子間的專一性吸引力

胺基酸

Amino Acid

胺基酸是構成蛋白質的基本單位，蛋白質是生物體內最重要的活性分子，其中擔任催化生理代謝反應的酵素，更是近代生物化學的研究中心。二十種性質各異的胺基酸，連接組成多樣的蛋白質，且賦予蛋白質特定的分子構形，使蛋白質分子能夠具有生化活性。

1 胺基酸基本構造：

胺基酸種類很多，但有共同的基本構造；先畫一個十字，如下述方法在四端加上四個化學基團即可。圖 1 為其基本構造，注意單醣也有類似的基本架構。

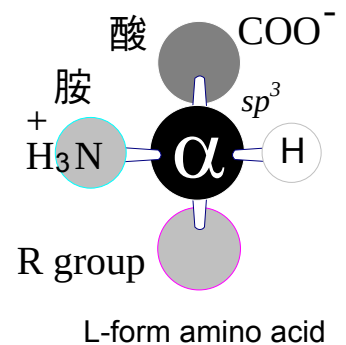


圖 1 胺基酸的基本構造

- 分子構造的中心為一碳原子，稱為 α 碳 (α carbon)。
- 接在 α 碳上，有一個 胺基 及一個 酸基 (故名胺基酸)。
- 另有一氫原子及一基團 (R) 接在 α 碳上 (碳為 sp^3 軌道)。
- α 碳接了四個不同的基團，為 不對稱碳，有 光學異構物 (D/L)。通常細胞的代謝只使用 L 型胺基酸，但有些細菌細胞壁或抗生素上，有 D 型胺基酸。
- 隨 R 基團的不同，各胺基酸的性質互有差異，組成二十種胺基酸 (見下頁表 1)。
 - ◆ 碳原子的 sp^3 軌道，是整個蛋白質構造化學的根本，請探討其組成及立體構型。
 - ◆ 辨別一個胺基酸時，請先抓出 α 碳，再以此為中心辨認胺基、酸基及 R 基團。當胺基酸組成蛋白質後，胺基與酸基都用來鍵結，連有 R 基團者即為 α 碳。

2 胺基酸分類：

胺基酸由其 R 基團的化學構造不同，可分為數大類。

- 胺基酸的基團形形色色，有大有小、有直鏈有環狀、有正有負也有不帶電。右頁表中列出蛋白質中所用的二十種胺基酸，是以 R 基團的化學構造來分組。
- R 基團也可以其極性大小來分類，代表它們親水性的強弱；可把胺基酸分為 極性 及 非極性 兩大類，極性者又分為 酸性、中性、鹼性 三類。
- 胺基酸本身的性質，以及所組成蛋白質分子的功能與性質，均決定於 R 基團的本質；這點在講解蛋白質的構造時，將發揮盡致。
 - ◆ 把二十種胺基酸的構造多寫幾次，注意 R 基團的極性、大小與其特殊官能基。

表 1 二十種胺基酸的分類及性質：

分 類	名 稱		縮寫		R =	說 明 ⁽¹⁾
唯一對稱胺基酸	甘胺酸	Glycine	Gly	G	-H (構造最簡單)	P/N
含飽和碳氫基團	丙胺酸	Alanine	Ala	A	-CH ₃	N
	纈胺酸	Valine	Val	V	-C(C)-C	N*
	白胺酸	Leucine	Leu	L	-C-C(C)-C	N*
	異白胺酸	Isoleucine	Ile	I	-C(C)-C-C	N*
含芳香基團	苯丙胺酸	Phenylalanine	Phe	F	-C-[C ₆ H ₅]	N*
	酪胺酸	Tyrosine	Tyr	Y	-C-[C ₆ H ₄]-OH	P
	色胺酸	Tryptophan	Trp	W	-C-[indole]	N*
	組胺酸	Histidine	His	H	-C-[imidazole]	P*
含額外酸基 (及其醯胺)	天冬胺酸	Aspartic acid	Asp	D	-C-COOH	P
	天冬醯胺酸	(Asparagine)	Asn	N	-C-CONH ₂	P
	麩胺酸	Glutamic acid	Glu	E	-C-C-COOH	P
	麩醯胺酸	(Glutamine)	Gln	Q	-C-C-CONH ₂	P
含額外胺基	離胺酸	Lysine	Lys	K	-C-C-C-C-NH ₂	P*
	精胺酸	Arginine	Arg	R	-C-C-C-[guanidine]	P*
含有醇基	絲胺酸	Serine	Ser	S	-C-OH	P
	蘇胺酸	Threonine	Thr	T	-C(OH)-C	P*
	OH-脯胺酸	Hydroxy Pro				P
含有硫	甲基胺酸	Methionine	Met	M	-C-C-S-C	N*
	胱胺酸	Cysteine	Cys	C	-C-SH	P
	雙胱胺酸 ⁽³⁾	Cystine			-C-S-S-C- 雙硫鍵	Cys-Cys ⁽²⁾
環狀的亞胺酸	脯胺酸 ⁽³⁾	Proline	Pro	P	(imino acid)	N

(1) 打有 * 者是必需胺基酸，須由外界攝取； N, non-polar; P, polar 極性。

(2) 兩分子胱胺酸 (Cys) 以 雙硫鍵 連成二元體。

(3) 這兩個胺基酸對蛋白質的立體構造有很大的影響。

◆ 圖 2 是特地設計用來說明各胺基酸的構造關係，不是代謝途徑，請特別注意。圖中把各種胺基酸依其 R 基團的性質不同分類，並安排在模擬台北市地下鐵的地圖上，其中 Ala 是台北總站，因為其他的胺基酸都可由此畫出來。中央線即為忠孝東路線，由飽和碳氫鏈的胺基酸所組成，與忠孝東路的商業機能有類比關係。

胺基酸分類模擬地下鐵道地圖

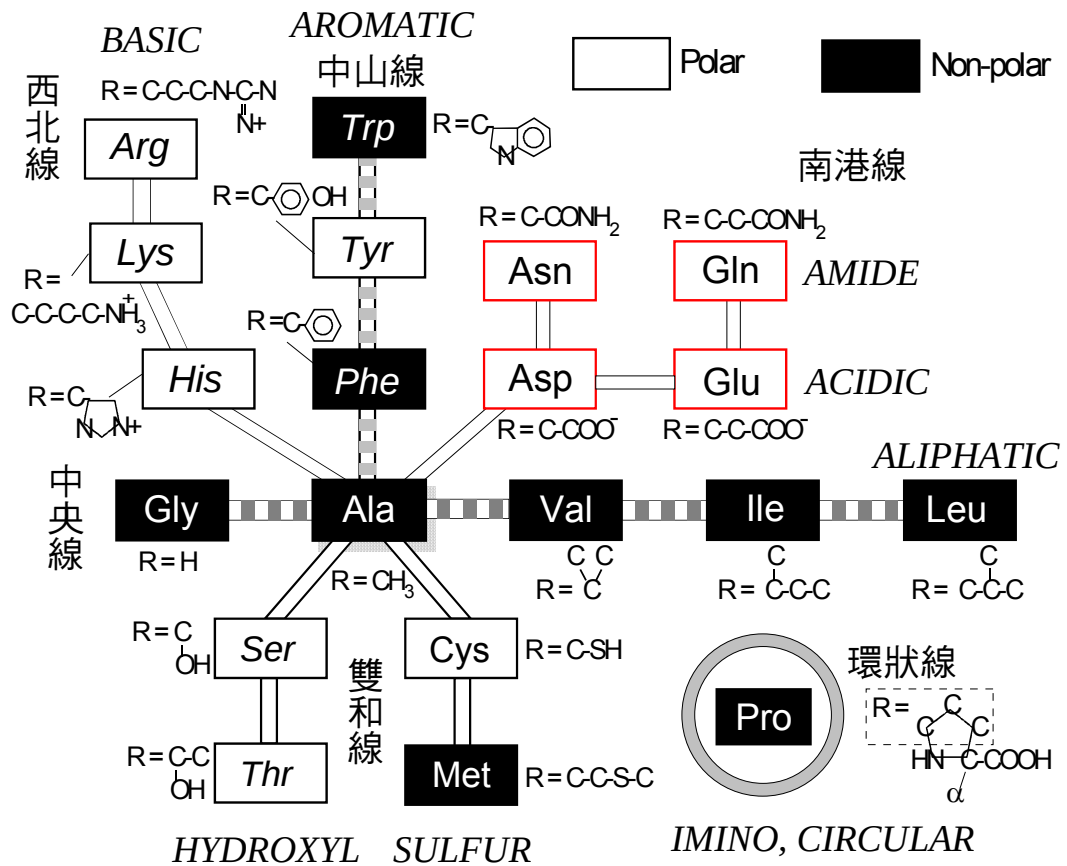


圖 2 各種胺基酸的分類

3 胜肽：

胜肽是較短的蛋白質，許多胜肽有重要的生物功能或活性。

- 胜鍵 (peptide bond)** 是由一個胺基酸的酸基，與次一胺基酸的胺基，行 脫水縮合反應 而成的 C-N 鍵，具有雙鍵的性質，與相鄰總共六個原子在同一平面上，因此 C-N 鍵不能自由轉動；胜鍵是構成蛋白質架構的基本單位，非常重要，請注意研究其立體構成。
◆ 練習畫出胜鍵的化學構造，注意胜鍵平面上各原子的相對位置，不要弄錯。
- 兩個胺基酸以胜鍵連成的二元體，稱之為 雙胜 (dipeptide)，三個胺基酸則以兩個胜鍵連成 三胜 (tripeptide)，許多胺基酸連成 多胜 (polypeptide)；再大的胜肽即為蛋白質。
- 某些胺基酸或胜肽具有較特殊的生理活性，如 味素 (Glu)、腦啡以及部份 荷爾蒙 等。

4 胺基酸的離子性質：

胺基酸多以離子狀態存在，且經常同時帶有正電及負電基團。

4.1 解離度 (pK_a)：

質子是化學層次最小的粒子，很容易由一極性基團解離出來，在水溶液中無所不在；其解離難易可以解離度 (pK_a) 表示之，水的 pK_a 在 6~7 之間。

a. 質子搶奪：

氫原子若與陰電性大的原子 (如酸基 $-\text{COOH}$ 中的氧原子) 共價，則其電子易遭搶奪而使質子裸露 ($-\text{COO}^-\text{H}^+$)，進而解離成 H^+ 。質子又易受帶有高電子密度的基團 (如 $-\text{NH}_2$) 所吸引，使後者成為一帶有正電的基團 ($-\text{NH}_3^+$)。

b. Ampholyte：

胺基酸的酸基易解離出質子 (成為帶負電基團 $-\text{COO}^-$)，而其胺基又會接受一質子 (成為 $-\text{NH}_3^+$)。如此一分子同時帶有正電與負電者，稱為ampholyte。

c. 質子解離：

解離程度決定於該水溶液的pH與分子上解離基團 pK_a 的高低。 pK_a 值的大小，顯示一個官能基容不容易放出 H^+ ，越小的越容易放出。圖 3 列出各種胺基酸的解離基團及其 pK_a ，請注意各種基團在不同的pH下解離。當環境的pH 等於某基團的 pK_a 時，該基團恰有一半數目的分子解離 ($\text{pH} = pK_a + \log ([A^-]/[HA])$)，請見圖 4 說明。

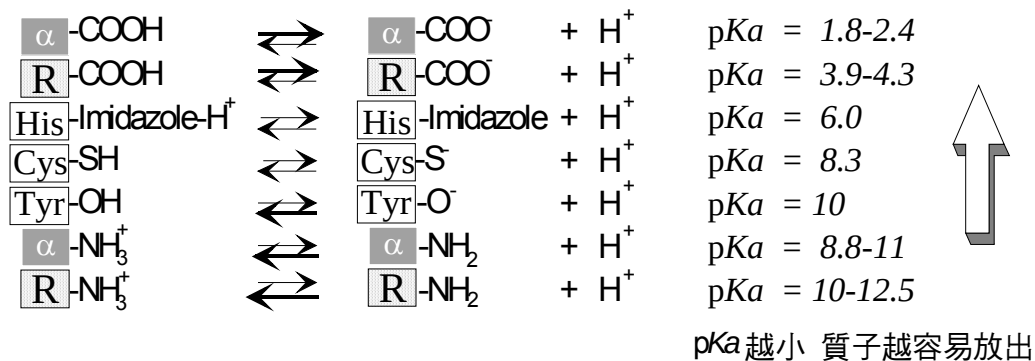


圖 3 各種胺基酸基團的解離及其 pK_a

4.2 等電點 (pI)：

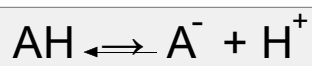
等電點是所有細胞分子帶電性質的重要指標。

- 胺基酸 α 碳上的胺基及酸基各有一帶電基團，故有二 pK_a ，分別界定胺基及酸基的解離pH。此二 pK_a 平均值即為該胺基酸的pI (等電點)，即 $(pK_{a1} + pK_{a2}) \div 2 = pI$ 。
- 若環境的 pH 等於某胺基酸的 pI，則此胺基酸的 淨電荷 為零；因為在此 pH 下，剛好有一正電基團及一負電基團。Ampholytes 中淨電荷為零者，其正、負電基團數目

相等，特稱為 Zwitterion。

- c. 胺基酸的淨電荷是正是負，受環境的 pH 所控制；環境 pH > pI 帶負電，反之則帶正電。上一章圖 3 即說明此一影響，同時請注意環境的 pH 離該分子的 pI 越遠，則其所帶之正或負淨電荷越大。
- d. 某些胺基酸的R基團，有額外的帶電基團 (例如Lys另有一胺基)，則可有三個pKa；即每個可解離出H⁺或可吸收H⁺的官能基，都有一個pKa。這三個pKa中，有兩個pKa的胺基酸帶一個淨正電或淨負電，則這兩個pKa值的平均即為其pI。
- ◆ 練習畫出帶電胺基酸的pKa滴定曲線，並觀察其電荷改變情形。
- e. 多肽在某 pH 下的淨電荷，是所組成的胺基酸各基團所帶正、負電荷的總和。例如一條十胜所含的十個胺基酸 (AELKVGRRDV) 中，若有五個胺基酸為非極性，三個帶正電基團，兩個帶負電，則此十胜在中性 pH 下的淨電荷為一個正電荷。

弱酸如何做為緩衝分子？



例如 乙酸
 $CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$

◎ K_a 是平衡後兩邊的濃度比：

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]} = \frac{1}{10^5} \quad (pK_a = 5)$$

◎ K_a 平衡式做數學轉換：

- 一、兩邊取 log
- 二、移項取出 [H⁺]
- 三、定義 p 為 -log (pH = -log[H⁺])

H-H
公式

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

已解離
未解離

pH = 常數 pKa ? ... 當 [A⁻] = [AH], log 1 = 0

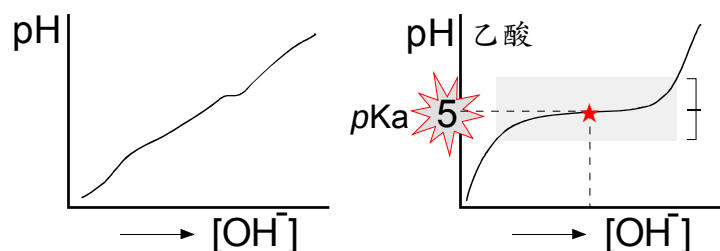


圖 4 以乙酸為例說明緩衝分子如何在其 pKa 發揮作用

乙酸根會吸收或放出一個質子，可以用解離常數 K_a 描述之；對 K_a 進行數學轉換可得 Henderson-Hasselbalch 公式，此式描述當 [A⁻] 等於 [AH] 時，環境的 pH 恰等於乙酸的 pKa (= 5)，有最大的緩衝效果。

問題集 (以下題目都沒有標準答案，許多甚至會引起很大的爭議，這樣就達到問題集之目的了)

1. 請畫出一個胜肽鍵 peptide bond 的構造，並以點線標出 peptide 平面。
2. 為何胜肽鍵平面不能自由轉動？
3. Histidine有三個可以解離的基團，其 pK_a 分別是 1.8, 6.0 及 9.2，請問其 pI 多少？
4. 同上題，Histidine 能否用來作為中性 pH 的緩衝液之用？並請解釋為何。
5. 請依括號內的指示寫出下列各胺基酸有何特點或用途：

Glutamate (食品) Serine (轉譯後修飾) Tryptophan (藥品) Cysteine (蛋白質三級構造)
Proline (蛋白質二級構造)

6. 以下兩段胜肽有何異同之處？並請問二者的滴定曲線會不會一樣？為什麼？

Ser-Glu-Gly-His-Ala Gly-His-Ala-Glu-Ser

7. 請判斷並說明下列各題的真偽：
 - a. 胺基酸的 α 碳都是不對稱碳。
 - b. 下列胺基酸的 R 基團為非極性者：Ala, Val, Ile, Leu。
 - c. 下列胺基酸的 R 基團都帶有正電荷：Asp, Lys。
 - d. 下列胺基酸的 R 基團帶有硫原子或氧原子：Cys, Ser, Thr, Met。
 - e. 兩個胺基酸可以氫鍵連成雙胜。
 - f. 蛋白質分子是活動的，因兩為個胜肽平面之間可自由轉動。
 - g. 胺基酸分子所帶的電荷不會改變。
 - h. 胺基酸可作為緩衝液是因為其基團官能基是一種強酸。
 - i. 胺基酸在其等電點時沒有帶任何電荷在分子上。
 - j. His上imidazole pK_a 為 6.0，因此可作為細胞內的緩衝物質。

8. 寫出含有硫原子的胺基酸：(英文全名) 1_____ 2_____

寫出含有芳香基團的胺基酸： 1_____ 2_____ 3_____

寫出含有醇基的胺基酸： 1_____ 2_____ 3_____

寫出含飽和碳氫鏈的胺基酸： 1_____ 2_____ 3_____

寫出側鏈基團帶有 $-COOH$ 的兩種胺基酸： 1_____ 2_____

9. 細胞的各種分子構造中，那些構造或分子含有氫鍵？例如： α helix, 請再回答三個。
那些構造或分子含有疏水鍵？例如：細胞膜 請再回答兩個。

10. 有一段 peptide 序列如下： Glu-Phe-Lys-His-Ile-Arg-Val

在 $pH = 1$ 時其淨電荷為 ____；在 $pH = 7$ 時淨電荷為 ____； $pH = 11$ 時淨電荷為 ____

11. 請不要看書或講義，畫出上題胜肽的分子構造。(請先畫出胜肽骨架，再填上 R 基團)

12. 是非選擇題 (答案寫在□內，是→○、非→×)

1) 在中性 pH 溶液中，那些胺基酸可做為此 pH 的緩衝分子？

☐ Val ☐ His ☐ Glu ☐ Trp

2) 在 pH 2 溶液中，那些胺基酸可做為此 pH 的緩衝分子？

☐ Val ☐ His ☐ Glu ☐ Trp

3) 下列何者為兩性 (amphoteric) 化合物？

☐ 胺基酸 ☐ 水分子 ☐ 蛋白質 ☐ DNA ☐ 葡萄糖

4) 有關 pK_a 的性質描述：

☐ 解離常數 pK_a 是一平衡常數 ☐ pK_a 越高 質子越容易解離 ☐ $pK_a = 2$ 的基團在中性溶液下將會帶負電荷 ☐ 分子所帶的電荷固定不變

5) 下述碳原子何者為不對稱碳？

☐ CH_4 ☐ glutamic acid 的 α 碳 ☐ 甘胺酸的COOH ☐ 甘胺酸的 α 碳

6) 有關胜肽鍵的性質描述：

☐ 其前後八個原子成一平面 ☐ 胜肽鍵有 π 電子共振 ☐ 胜肽鍵可以自由轉動
☐ 胜肽鍵是經加水反應生成的

13. 寫出三個具生理功能的胜肽： 1_____ 2_____ 3_____

14. 當一個分子上的正電荷數目等於負電荷，此種離子狀態稱之為_____；而此時的 pH 則為此分子之_____。

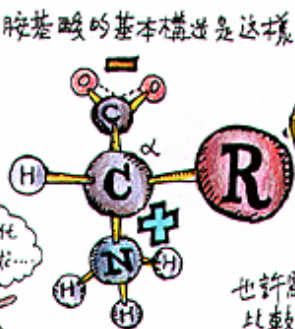
15. 若某一弱酸的解離常數 pK_a 為 5，若此弱酸被用來作為緩衝液分子，其適用範圍多少？

16. 胺基酸是以代謝路徑一個一個合成出來的，而蛋白質是以 DNA 為信息經由 RNA，把胺基酸連接起來轉譯而得；則胜肽是如何合成出來的？

胺基酸與蛋白质的故事

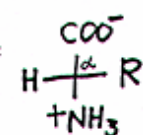
May. 1985.
JUANG

1. 胺基酸的基本構造是這樣的：



假如生化像撞球...

也許寫成這樣比較易懂：



我還是不懂

R group 構造決定胺基酸的特性，共有二十多種常見胺基酸。由 R group 分子的性質，可分為 Polar 與 Non-polar，其中 Polar 者又可分為 Basic, Neutral 及 Acidic。

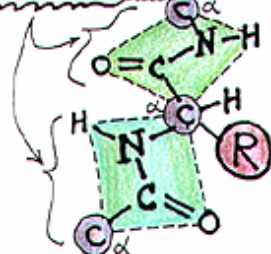
下面這張表是他們家族的系統表：(已有幾億年的歷史)

	Acidic	Neutral	Basic
Polar	Asp Glu	Asn, Gln Cys, Thr, Ser Tyr	Lys His Arg
Non-Polar		Ala Val, Ile, Leu, Phe, Pro, Met, Thr	

發辣!

2. 兩個胺基酸以 "Peptide bond" 結合形成肽。

Peptide bond 的平面是不能扭曲的，像這樣：



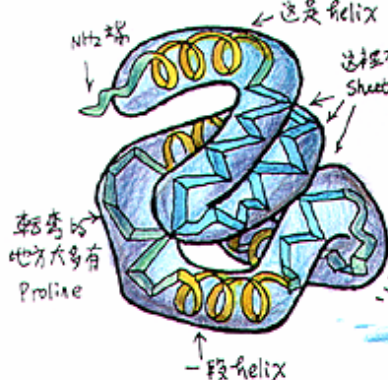
這兩個平面又因為 R group 的關係，只能在一定範圍的角度內活動。所以當許多胺基酸連成一長串時：

因為↑的關係，含自動捲曲成一定的構造 (Secondary structure)，大略說來有：Helix 或 Sheet 兩種形式

3. 二級構造再捲曲成三級構造：

然後可能有四級構造：

再來沒有了。不過最後的構造如何，早就決定在一級構造上胺基酸的次序，也就是決定於 R group 為何！所以 R group 很重要，但是... 不要忘了胺基酸次序是決定於 mRNA，mRNA 又決定於 DNA。所以你知道誰是真正的大老闆了吧！

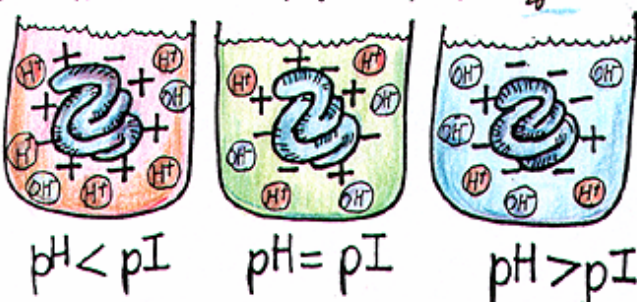


像個！
像最怕蛇！

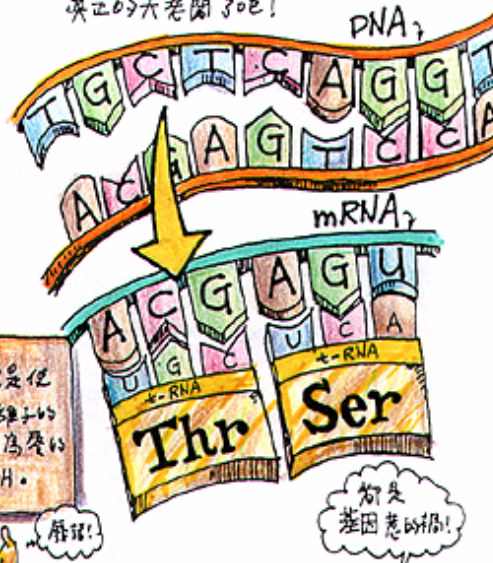


4. 有一個很重要的概念，就是胺基酸或蛋白质的淨電荷是正是負，完全決定於環境的 pH！

若環境的 pH > pI，則其淨電荷為負。
若環境的 pH = pI，則其淨電荷為零。
若環境的 pH < pI，則其淨電荷為正。



pI 就是使分子或離子的淨電荷為零的那個 pH。



都是基因惹的禍！

蛋白質

Protein

蛋白質具有各種催化及生理機能，是細胞的主要工作機器，其功能乃源自蛋白質分子所具有的特定構形及其催化活性；此種構形的形成，又因於組成蛋白質的胺基酸排列次序。各種長短的蛋白質有不同的胺基酸組成與排列，造就了多樣而多功的蛋白質繽紛世界。

1 蛋白質構造：

探究蛋白質構造可由胺基酸序列開始，循序依其複雜度分成四個層次。

1.1 一級構造：

像其它巨分子一樣，蛋白質鏈也是由小分子單位一個一個連接成的。

- a. 蛋白質的長條胺基酸序列，是為其 一級構造 (primary structure)。此一級構造的一端為N-端 (-NH₂)，另一端為C-端 (-COOH)，而以H₂N-**C**-[N-**C**-C]_x-N-**C**-COOH為骨架，其中黑體字**C**代表各胺基酸單位的 α 碳。

◆ 請練習畫出一長條胜肽的骨架，並任意加上各種胺基酸的基團。

- b. 一級構造是蛋白質最終 構形 的根本，各級構造的訊息都決定於胺基酸序列；而胺基酸序列是根據 DNA 的核苷酸序列轉譯而來，故最終信息是存留於細胞核的核酸。
- c. 探討一級構造主要在分析該蛋白質之 胺基酸序列，近來胺基酸序列多由該蛋白質的 cDNA 經分子群殖 (cloning) 篩選出，再經核酸定序後轉譯成胺基酸而來。
- d. 除了構造之外，一段固定的胺基酸序列可能有某種特定的生理功能，稱之為 signal peptide (信息序列)，同一 signal 可以在許多不同的蛋白質分子上重複出現。例如蛋白質在 C-端若有 Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) 的序列，則會被回收到內質網去。

1.2 二級構造：

蛋白質長鏈捲繞成堅固而規則的二級構造，是其構形的基礎單位。

1.2.1 二級構造相當規律：

胜鍵 的雙鍵性質形成 胜鍵平面；又因兩 α 碳上的 R 基團與前後相鄰基團的引力或斥力，使得兩相鄰胜鍵平面間的轉動，限制在一定角度範圍，而造成規律的兩種主要構形：α 螺旋 (α helix)、β 長帶 (β sheet)，是為 二級構造 (secondary structure)，它們的主要構成力量都是 氫鍵。氫鍵在細胞內的角色不但重要，而且分佈非常廣泛。

◆ 請練習畫出一個胜鍵，標出胜鍵平面以及上面的各個原子。

a. α 螺旋：每 3.6 個胺基酸捲繞一圈，成為右手旋的螺旋構造，遇 Pro 則中止；由相鄰兩胜鍵平面所夾的角度，可以預測 α 螺旋或其它二級構造的生成 (Ramachandran Plot)。分子內氫鍵可在螺旋骨架間加上支架，更使得 α 螺旋成為圓筒狀，有堅固的構形，也是三級構造的組成單位之一。肌紅蛋白由八段長短不等的 α 螺旋所組成。

b. β 長帶：像彩帶般的構形，多由數條彩帶組合而成，相鄰彩帶之間以氫鍵接合，編成一片堅固的盾形平面。依相鄰彩帶的 N→C 方向關係，可分為同向 (parallel) 及逆向 (antiparallel) 兩大類。 β 長帶多由 R 基團較小的胺基酸 (如 Ala, Gly, Ser) 組成。

◆ 請練習畫出上述的各種二級構造，注意其立體構形及氫鍵位置。

c. 其它螺旋構造：除了 α 螺旋外，蛋白質也可以其它方式摺疊成螺旋構造，但每一單位螺旋的胺基酸數目不同。當連續有數個 Pro (如 PVPAPIPP) 時，會捲成稱為 polyproline 的螺旋，每三個胺基酸轉一圈，橫切面是一個正三角形。

1.2.2 連結性二級構造：

a. Turn 轉折：連接 α 螺旋或 β 長帶時，胜肽鏈需做劇烈的轉折，以接近 180 度的方式折返，這些轉折點通稱為 turns；其中 β turn 由四個胺基酸組成 (多含有 Gly)； γ turn 則由三個胺基酸組成，且由一個 Pro 造成主要轉折。Turns 多分佈在蛋白質的表面，也很容易誘生抗體。

b. 不規則形：除上述構造外，尚有構形不規則的連結片段，稱為不規則形；而在蛋白質分子兩個端點附近的胜肽，活動性較大，形狀經常變化，則為任意形 (random coil)。

1.3 三級構造：

大部分蛋白質的三級構造捲繞成球狀 (globular)，已是有特定構形的活性分子。

1.3.1 三級構造的組成力量：

a. 分子內各部分的二級構造再相互組合，構成完整球形的三級構造 (tertiary structure)；其構成的作用力有離子鍵、氫鍵、疏水鍵、金屬離子等作用力；其中疏水鍵對水溶性蛋白質三級構造之穩定性，貢獻最大。

b. 水溶性蛋白質的核心緊密，多由疏水性胺基酸組成。由於疏水性胺基酸為外界水環境所排斥，可以穩定地包埋在分子內部，維持蛋白質的完整三級構造。

c. 蛋白質分子內兩個 Cys 上的 -SH 可經氧化而成雙硫鍵 (-S-S-)，雙硫鍵可加強蛋白質的立體構造。在細胞中，雙硫鍵的形成可能需要靠酵素的催化。

1.3.2 三級構造的立體構成：

- a. 某些二級構造經常會聚在一起，例如 $\alpha\alpha\alpha\alpha$, $\beta\alpha\beta$ 或 $\alpha_8\beta_8$ 筒狀構造等，都可自形成一小區域，稱為 domain (功能區塊)，若干 domains 再組成一完整蛋白質的三級構造。小的蛋白質通常只有一個 domain，較大蛋白質則含有兩個以上 domains。經常重複出現的 domain，可能有特定功用，可視為一種二級構造的 motif (再現單位)。
- b. 建構蛋白質最終立體構形的藍圖，其資訊是貯藏在一級構造的胺基酸序列中；因此某些蛋白質 (例如 RNase) 在 變性 後，仍然可以回復原來的 原態 立體構形 (native)，稱為 復性。
- c. 但並非所有的變性蛋白質都可如 RNase 般復性回原態分子，細胞內有一類巨大分子稱為 chaperonin，可以幫助蛋白質正確地摺疊成原態分子。
- d. 若已知某蛋白質的胺基酸序列，則可以電腦運算預知某段是 α 螺旋、 β 長帶或是轉折等二級構造，相當準確。但更複雜的三級立體構造，目前則較不容易預測準確。

1.3.3 三級構造的修飾：

- a. 很多蛋白質的三級構造，即為獨立而具有活性的分子；但有些則要再加上 輔酶、輔因子 (如金屬離子) 或 輔基 (prosthetic group, 例如 肌紅蛋白 中的 heme)；有些則要再修飾以糖分子成為 醣蛋白 (glycoprotein)；脂蛋白 (lipoprotein) 要連接脂質；更有的要再與其它相同或不同的蛋白質分子結合，形成四級構造 (如 血紅蛋白)。
- b. 有些蛋白質的胺基酸鏈要先經過切斷或刪除某段胜肽後，才能有活性 (如 胰島素)。胰島素是由一條基因轉譯出來的，切成三段後，其中兩段以雙硫鍵結合成具活性的三級構造，並非四級構造；這是蛋白質活性的調控方式之一。

1.4 四級構造：

蛋白質再聚合成四級構造，可調節控制其功能，或組成巨大構造分子。

- a. 若數個相同或不同的三級構造分子，再結合成一較大的複合體，才能進行完整的活性功能，則稱為 四級構造 (quaternary structure)。構成四級構造的每一單位分子，稱為 次體 (subunit)；通常各次體之間無共價結合，而以二級鍵為主要結合力量。
- b. 若四級構造的任一次體與受質結合之後，會誘導增強其它次體與受質之結合能力，而加速反應，則稱為 正協同作用 (positive cooperativity)，反之則為 負協同作用。四級構造在 調控 蛋白質的活性上非常重要，許多酵素是重要的例子，但典型具四級構造且有複雜調控機制的血紅蛋白並非酵素。
- c. 許多病毒的蛋白質外殼，具有規律而巨大的四級構造組成。

2 蛋白質性質：

蛋白質要有正確的分子構形，才能有效執行其生理功能；構形或許是分子演化的基本驅策力，因為即使胺基酸序列不十分相似，同功能的蛋白質也可能有相同的構形 (各種生物的血紅蛋白即為一例)。

2.1 變性及復性：

某些條件會破壞蛋白質分子的各級構造，稱之為 變性 (denaturation)，例如 加熱、pH 太高或太低、尿素、界面活性劑、劇烈震盪 等。變性的蛋白質大多會失去活性，當變性條件除去後，有些蛋白質會回復原來構形，並具原有活性，稱之為 復性。

2.2 蛋白質構形是活動的：

蛋白質分子上的各部份結構並非固定不動，而是有相當的彈性與運動。尤其 domain 與 domain 之間，或者酵素催化區的開闔，都有相當大的活動幅度。這種活動會隨著溫度升高而上升，對蛋白質或酵素的活性及其調控有很大的影響。

2.3 蛋白質的專一性結合：

在酵素的催化及細胞生理功能上，扮演重要角色。蛋白質與蛋白質之間，或與其它分子間，經常有專一性的結合，其構成力量如下：

- a. 構形互補 (conformational match)：兩分子間的結合表面，其形狀互補，像拼圖積木。
- b. 二級鍵吸引力 (interaction forces)：兩分子之結合面上，對應胺基酸間的吸引力量，由二級鍵構成。圖 1 是一假想圖例，說明某酵素與其抑制因子間，如何進行專一性的結合。

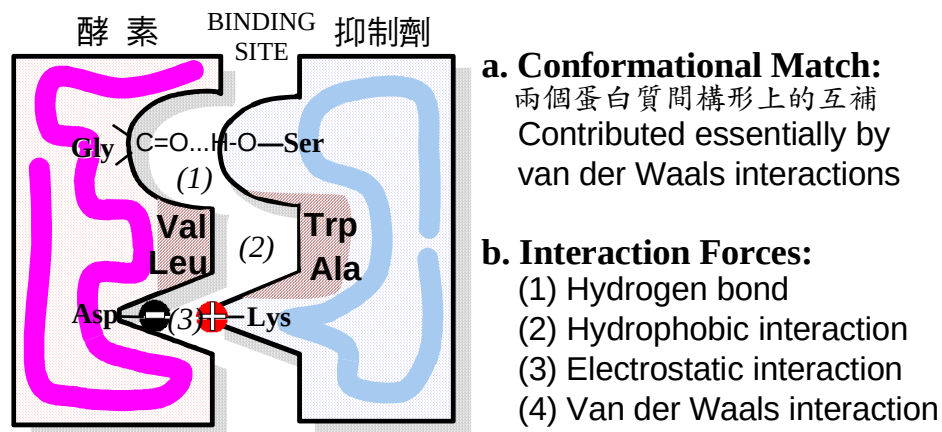


圖 1 蛋白質分子間的專一性結合力量是如何構成的？

3 蛋白質研究技術：

研究蛋白質通常要先純化得均質蛋白質，然後檢定其分子量、次體組成及等電點，最終則要定出蛋白質之胺基酸序列，或其立體三次元分子構造。

3.1 蛋白質純化技術：

利用蛋白質分子量不同、表面帶電性或極性區域大小等性質差異，可分離純化之。通常以能夠純化出大量均質蛋白質為目標，但最近的純化觀念已稍有改變，以二次元電泳或加上轉印，直接挖出單一點的蛋白質，即可馬上付諸分析。

- a. **硫酸銨分劃法：** 在蛋白質的水溶液中加入硫酸銨鹽類，會使蛋白質因疏水性區域相吸引而聚集沉澱出來，稱為 **鹽析 (salting out)**；鹽析大略地純化出蛋白質，並可以除去核酸、醣類或脂質等物質。
- b. **膠體過濾法 (gel filtration)：** 依蛋白質分子量的大小不同，先後分離出來。
- c. **離子交換法 (ion exchange)：** 各種蛋白質的帶電性強弱不同，與離子交換介質間吸引力的大小會有差異，可以此進行分離。蛋白質的帶電性，會因環境的 pH 不同而有改變。
- d. **親和層析法 (affinity chromatography)：** 利用分子間專一的親和性來吸引純化某蛋白質，最為直接；但並非所有蛋白質都能夠找到專一性的吸著劑。

3.2 蛋白質性質與構造檢定：

- a. **蛋白質定量法：** 染料 Coomassie Blue 與蛋白質結合後，會由褐色變為藍色；由反應前後藍色吸光度的改變，與已知蛋白質的標準曲線比較，即可推知樣本中蛋白質的濃度；一般稱之為 **Bradford method**。
- b. **分子量測定法：** 可利用 **膠體過濾法**、**超高速離心法 (ultracentrifugation)**、或 **膠體電泳法 (gel electrophoresis)** 來測定蛋白質的原態分子量；**SDS 膠體電泳**則可測定次體分子量。電泳同時可以檢定蛋白質的純度如何，是解析力極佳的分析工具。
- c. **等電點 (pI)：** **等電聚焦法 (isoelectric focusing)** 極類似膠體電泳，但可測得蛋白質的等電點。等電點是蛋白質帶電性質的重要指標，當環境的 pH 等於其等電點時，此蛋白質的淨電荷為零；大於其等電點時，淨電荷為負，反之則為正電荷。
- d. **胺基酸組成：** 蛋白質以鹽酸水解成游離胺基酸，再以分析各種胺基酸之含量。
- e. **蛋白質立體構造：** 以 **X 光繞射法**分析蛋白質結晶，可計算出其分子的細微立體構造；近來也流行應用 **核磁共振法 (nmr)** 測定水溶液中蛋白質的立體構造。
- f. **質譜分析：** 目前的質譜儀分析技術，已經能夠處理分子量較大的蛋白質，則可以定出蛋白質的精確分子量；甚至可以檢查該蛋白質所產生的各個片段，推出其胺基酸序列。

3.3 胺基酸序列決定法：

胺基酸的序列是一個蛋白質的最根本資料，只要定出其胺基酸序列，就可以推出相當多的生化性質。

3.3.1 傳統胺基酸定序法：

傳統的胺基酸定序方法，是直接檢定胜肽鏈上的胺基酸種類，如圖 2 的說明：

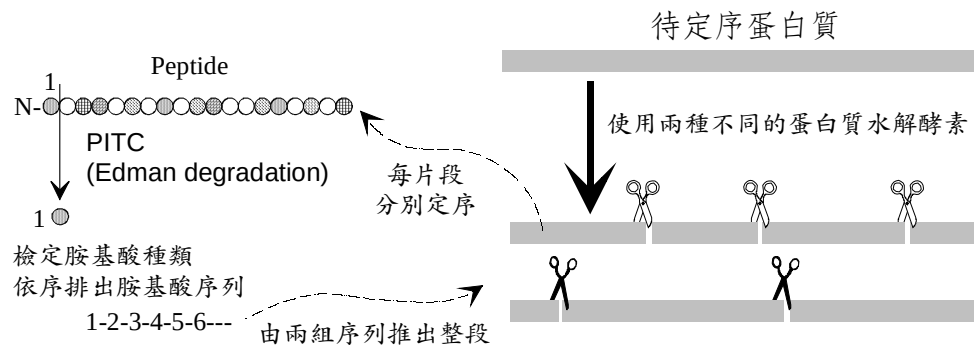


圖 2 蛋白質的胺基酸定序策略及 Edman degradation

PITC (phenylisothiocyanate) 對蛋白質的 N-端胺基酸進行修飾，產生 PTH-胺基酸，並由 N-端掉落，可經由 HPLC 檢定是何種胺基酸。

- 許多化學反應 (如 Edman degradation) 可由蛋白質的 N-端開始，依序一次切下一個胺基酸，再檢定每輪切下的胺基酸為何，即可推得此蛋白質的胺基酸次序。
- 若蛋白質太長，則無法有效定序後面的胺基酸序列；要先用 蛋白質水解酶 把目標蛋白質切成小段，各小段分別定序，然後再組合成長鏈。
- 為了排列上述各小段胜肽的先後次序，要使用兩種不同的蛋白質水解酶，得到兩套不同長短的胜肽，分別定序後，比較各片段重疊部分，即可判斷先後次序。

3.3.2 cDNA 定序：

以基因操作方法，選殖出目標酵素的 cDNA，並將其核酸序列定出，則可推出所對應的胺基酸序列；目前大都採用此種方法，比較方便。

3.3.3 以質譜儀定序：

質譜儀是利用分子的質量大小來檢定樣本，因此可以精確測出某分子的質量。若把蛋白質在質譜儀中撞擊，產生一群具有各種不同長短的片段，每一片段都剛好少一個胺基酸，然後用質譜儀一一測出這些片段的分子量，由所得各種片段分子量的差別，就可推出相差胺基酸的種類，乃至整段胺基酸的序列。

問題集 (以下題目都沒有標準答案，許多甚至會引起很大的爭議，這樣就達到問題集之目的了)

1. 血紅蛋白 (hemoglobin) 為四元體而肌紅蛋白 (myoglobin) 為單元體，請就兩者分子構造上的差異，說明其生理功能。
2. 請問有哪些方法可以定出蛋白質或勝肽的胺基酸序列？
3. 現在 DNA 操作技術很成熟，可以把蛋白質上的某胺基酸換成別種胺基酸。若有一個蛋白質，其分子上的某個 Leu 被換成 Val，並且某個 Lys 被換成 Arg，請問對這個蛋白質的活性影響大不大？
4. 疏水鍵 hydrophobic interaction 對蛋白質的構造有何重要貢獻？
5. 鎌形血球 sickle cell 是如何造成的？有沒有補救或醫治的方法？
6. 構成蛋白質各級構造的各种鍵結力量中，有哪些是共價鍵？
7. 尿素 urea 可以破壞蛋白質的構造，請解釋可能的原因。
8. 蛋白質為何需要以若干個三級構造的單元體組成一個更複雜的四級構造？
9. 氫鍵是構成蛋白質二級構造的主要力量，三級構造的組成也含有氫鍵，請問這兩類氫鍵有何不同之處？
10. 有一段蛋白質的部分胺基酸序列如下，請寫出這段蛋白質構造可能的特徵。

-LVRILNRILFFLWKTLTR-

11. 蛋白質構造中的 domain 是什麼？有何重要的功用？
12. 請判斷並說明下列各題的真偽：
 - a. 構成 α 螺旋及 β 長帶的主要力量都是氫鍵。
 - b. 氫鍵一定要以氫原子居中架橋。
 - c. 構成三級構造的主要力量是氫鍵、疏水鍵、雙硫鍵、離子鍵。
 - d. 構成四級構造的力量是雙硫鍵。
 - e. 蛋白質四級構造的存在，只是為了數個蛋白質分子可以聚集在一起。
 - f. Sanger 發明了 DNA 定序方法；而 Pauling 發現 double helix。
 - g. 每種蛋白質都有其特定構形，而構形是根基於其一級胺基酸序列。
 - h. 蛋白質的三級立體構造完全可以由一級構造推算得之。
 - i. 解讀蛋白質的胺基酸序列，可得知序列與分子功能間的對應關係。
 - j. 不規則 (irregular) 構造多在分子兩端，沒有固定形狀，有很大自由度。
 - k. 所有具有功能性的蛋白質都是由一條完整胺基酸長鏈所構成的。
 - l. 蛋白質長鏈上的 α 螺旋構造遇到 Pro 就會中止。
 - m. 各種生物血紅蛋白 (hemoglobin) 的胺基酸序列同質性很高，因此其構形很相似，都

保有相同的運氧功能。

- n. 水溶性蛋白質的疏水性胺基酸大都在分子的裡面，故分子內部不可有親水性胺基酸，以防分子變性。
- o. 二級鍵的力量太弱，很難對分子間的專一性吸引力做出實質的貢獻。
- p. Domain 可重複出現在不同分子構造，這是在基因層次已安排好的。
- q. 所有蛋白質在變性後，都可因變性原因的去除，而恢復原態，稱為復性。
- r. 加熱煮沸可以使蛋白質完全變性，包括雙硫鍵的斷裂。
- s. 尿素 (urea) 可致蛋白質變性的原因是破壞 α 螺旋的氫鍵。
- t. 一條 pI 為 5.2 的蛋白質，在細胞內可帶淨負電荷。

13. 是非選擇題 (答案寫在□內，是→○、非→×)

1) 有關 α helix 的性質：

- ☐ 我們可以由胺基酸的序列預測 α helix 的形成 ☐ 是由 Watson 及 Crick 所發現 ☐
- 最常見的 α_{13} helix 是每 13 個胺基酸轉一圈 ☐ α helix 遇到 Pro 則中止

2) 蛋白質二級構造的成因：

- ☐ 胜肽鍵是平面構造 ☐ 胜肽鍵前後 R 基團的大小限制 ☐ 胜肽鍵的氫鍵吸引力
- ☐ 胜肽鍵前後 R 基團的電荷限制

3) 有關蛋白質四級構造的性質：

- ☐ 有些蛋白質沒有四級構造 ☐ 四級構造是以共價鍵連結的 ☐ 有四級構造的蛋白質都具有調節作用 ☐ 血紅蛋白是同質四元體

4) 蛋白質的胺基酸序列：

- ☐ 可決定最後蛋白質的構形 ☐ 可由 DNA 的任何一股譯出 ☐ 並不能顯示兩相關蛋白質間的演化關係之遠近

14. 構成蛋白質三級構造的力量： 1_____ 2_____ 3_____

15. 請寫出六個以上使蛋白質變性的方法。

16. 請說明以下人名： Sanger Anfinsen Pauling Edman Kendrew & Perutz 李卓皓

17. 鑲在細胞膜上的許多蛋白質，其構造都有相當的相似性，多數由若干條 α helix 來回穿梭細胞膜而組成的。請問為何多採用 α helix？

18. 在生物體內，兩個細胞之間經常要進行訊息的傳遞，例如兩個神經細胞之間，是以神經傳導物質做為神經衝動的傳遞媒介。除此之外，兩個細胞可以利用蛋白質做為細胞間連絡的傳遞物質；其信息的傳遞，是由一個細胞傳到另一個特定的目標細胞。而此等細胞之間，可能距離相當遠 (例如由腦部傳到胰臟)，也可能有直接的接觸 (如免疫細胞間的辨認)；請就蛋白質構造上的特性，說明這兩種具有專一性的細胞信息傳遞及接收方式，是如何達成的？

酵 素

Enzyme

Enzyme 一字源自希臘文，原意為 “in yeast”；描述在酵母菌中，含有某種神奇的催化活力，可以把糖轉變為酒精，故名為酵素。Sumner 在 1926 年首先結晶出尿素酶 (urease)，並證實酵素為一種蛋白質。一般而言，酵素具有下列特性：

- 酵素可催化生化反應，增加其反應速率，是最有效率的催化劑。
- 酵素種類非常多，每一種都能催化所賦與的專一性反應，其它的酵素不易干擾；不過，可能會有酵素間的協同或抑制作用。
- 酵素的催化反應是可調節的，反應可受許多因子影響而加快或減緩。
- 通常酵素為蛋白質，但部份 RNA 也具專一性的催化能力 (ribozyme)。

總之，生物體藉著種種酵素的催化作用與調節，才能有效地完成他所需要的許多生理活動。若細胞內的酵素活動受到抑制或干擾，整個生物體就可能出現異狀。

1 酵素的命名：

酵素的命名，有一定規則可循。

- 最初酵素命名並無法定的規則，但大都附有 -in 或 -zyme 等字尾，例如 trypsin, renin 及 lysozyme 等；後來漸以該酵素催化的反應加上 -ase 字尾為名，再冠上此反應的反應物，如 histidine decarboxylase (反應物 + 反應 -ase)。
- 1965 年命名系統化，把所有酵素依催化反應分成六大類，以四組數字名之 (IUBMB 系統)；例如 histidine carboxylase 為 EC 4.1.1.22：

Main Class：	4	Lyases	分裂 C-C, C-O, C-N 鍵
Subclass：	4.1	C-C lyase	分裂 C-C 鍵
Sub-subclass：	4.1.1	Carboxylase	分裂 C-COO 鍵
序列號碼：	22	第 22 個 4.1.1	分裂組胺酸的 C-COO 鍵

- IUBMB 系統所分的六個 Main Classes：

(1) Oxidoreductase	氧化還原酶	電子或質子轉移
(2) Transferase	轉移酶	官能基團的轉移
(3) Hydrolase	水解酶	加水或脫水分子
(4) Lyase	裂解酶	共價鍵生成或裂解
(5) Isomerase	異構酶	同一分子內基團之轉移
(6) Ligase	連接酶	消耗 ATP 生成分子間新鍵

2 酵素的構成：

酵素主要由蛋白質所構成，不過許多酵素還需加上其它物質；有些 RNA 也具有催化的能力，在分子演化上可能是最早出現在地球上的巨分子。

2.1 全酶：

全酶是具有完整分子構造及催化能力的酵素。

- a. 一般酵素由蛋白質構成，但某些酵素為 醣蛋白 或 脂蛋白，有些還要加上 輔助因子 (cofactor, coenzyme)，才成為功能完全的酵素 (全酶 holoenzyme)；若全酶失去了輔助因子，剩下的部份稱為 apoenzyme：



- b. 全酶 分子可能只含一條多肽，也可能含有數條多肽，並以 雙硫鍵 連接在一起 (如 chymotrypsin)；有的可由數個相同或不同的 次體 (subunit) 組成。肝糖磷解酶 為同質二元體 (dimer)；而 血紅蛋白 (hemoglobin) 是 $\alpha_2\beta_2$ 的四元體形式，但並非酵素。多元體蛋白質可能具有 異位調節 功能 (allosteric effect)，即任何一個次體改變，會影響其它各個次體的活性。

2.2 輔酶：

一些非蛋白質的小分子會加入酵素構造中，以幫助催化反應進行。因為二十種胺基酸的官能基中，具有強荷電性者不到五個，而酵素活性區經常需要較強的官能基來引發催化反應，部份酵素因此納入蛋白質以外的輔助因子參與其構造，作為催化的重要反應基團。

2.2.1 輔助因子：

包含金屬離子以及小分子的有機物質 (輔酶)。

- a. 金屬離子：如 Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , K^{+} ，以離子鍵結合在 His, Cys, Glu 等胺基酸；細胞多使用較輕的金屬，重金屬多有害處。
- b. 有機小分子：分子構造稍複雜而多樣，通稱為 輔酶 (coenzyme)，在哺乳類中多由維生素代謝而來，無法自行合成；如 維生素 B 群、葉酸 (folic acid)、菸鹼酸 (niacin)。

2.2.2 輔酶的作用：

輔酶的構造與其功能極為重要，請注意每一種輔酶的特定作用機制。

- a. 加入酵素分子，誘使 改變其立體構形，而使得酵素與基質的結合更有利於反應。
- b. 輔酶可作為另一基質來參與反應，但反應後輔酶構造不變。通常輔酶作為某 特定基團的轉移，可供給或接受基團 (如 $-\text{CH}_3$, $-\text{CO}_2$, $-\text{NH}_2$) 或者電子，這類輔酶最是常見。

- c. 提供一個強力的反應基團，吸引基質快速參加反應；例如維生素B₁ (thiamine)，有許多維生素都是輔酶。

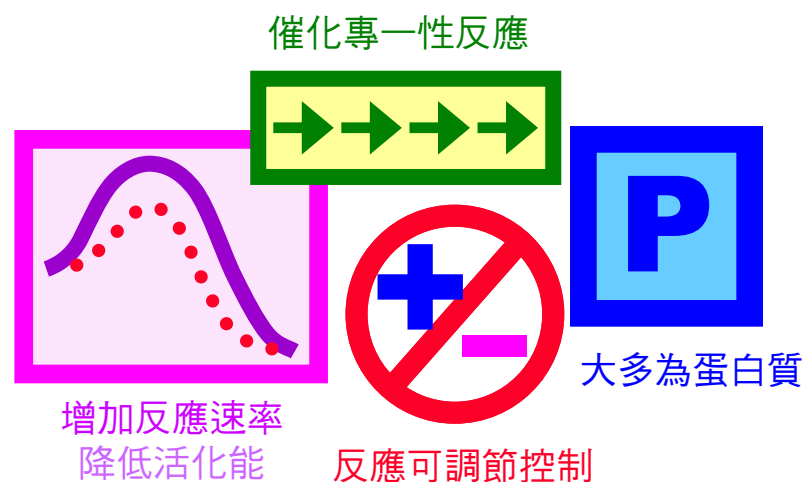
2.2.3 輔助因子範例：

◆ 請自行參考課本，研習以下各類酵素及輔酶的作用及構造。

- 各種去氫酶 (dehydrogenase) 以輔酶NAD⁺/NADH轉運 氫負離子 (hydride, H⁻)；要研究alcohol dehydrogenase以及glyceraldehyde-3-P dehydrogenase的作用模式，同時也請瞭解NAD⁺/NADH及氫負離子的構造。
- Carboxypeptidase 分子需要一個鋅離子維持分子構形 (induced fit)，同時也參與催化反應，可以抓住基質胜肽，並活化水分子。
- Glutamate transaminase 使用輔酶 pyridoxal phosphate 轉運胺基。
- Catalase分子上有一Fe²⁺ 作為電子暫存區，可以把H₂O₂還原成水分子；而血紅蛋白也有Fe²⁺，因此可有類似的催化作用，但效率低很多，因為其鐵離子氧化成Fe³⁺後無法很快轉變回來。

2.2.4 輔酶與 ribozyme：

- 輔酶的構造透露了遠古 RNA 分子的催化秘密：許多輔酶的構造中都有核苷酸參與，可能是用來與遠古催化性 RNA 分子結合，以幫助 RNA 的催化反應；因為ribozyme 雖然有分子構形，但缺乏催化所需的強烈官能基團，有如今日的蛋白質酵素與其輔酶一般。
- 因為ribozyme 具有催化能力，本身又帶有遺傳訊息，加上輔酶的幫助，相信地球上最早出現的巨分子，可能是 RNA；同時我們可以推測出，最早的催化性蛋白質是如何產生的。



酵素印象：反應速率、專一性、可調節、蛋白質

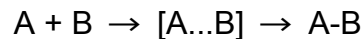
3 酵素動力學：

以動力學說明酵素對基質分子的催化行為。

3.1 酵素催化反應：

酵素提供基質一個穩定的空間，有利於穩定其過渡狀態，並快速轉變成為生成物。

a. 反應物 (A, B) 轉變成生成物 (A-B) 途中，有過渡狀態 [A...B] 生成：



b. 過渡狀態 (transition state) 的位能較高，其生成需要耗費能量，稱為 活化能 (activation energy, E_{act})；經由酵素的催化，可降低反應活化能，使反應速率加快，但不影響反應的平衡方向。

c. 一些過渡狀態的類似物 (analog) 會卡住酵素活性區，但無法完成反應，即成為抑制劑。這種過渡狀態的類似物可做為抗原，免疫動物後所產生的抗體，可能有類似酵素的催化作用，但催化速率較低，稱為 abzyme。

d. 酵素降低活化能的機制有以下幾點，都是因於活性區的特殊立體構造：

- (1) 酵素活性區專一性地與基質結合，提供最適的空間排列，以便穩定過渡狀態。
- (2) 活性區通常為一凹陷口袋，隔開外界的水環境，減低水分子的干擾。
- (3) 活性區附近的某些胺基酸可提供活性官能基 (通常帶有電荷) 直接參與反應。
- (4) 很多酵素含有輔酶或輔因子，輔助反應 (見上節)。

◆ 次頁圖 1 的 **酵素動力學大綱** 是以流程方式，列出酵素動力學的主要探討項目；當研讀動力學部分時，請隨時依章節號碼參閱本圖。(圖中酵素的漫畫造型取自Gonick, L. & Wheelis, M. 所著*The Cartoon Guide to Genetics*, 有中譯版)

3.2 酵素動力學：

動力學是如何進行的？ 改變基質濃度，再看酵素如何活動。

3.2.1 基本概念：

酵素動力學的形成，是根基於『過渡狀態濃度恆定』的概念。早在 1913 年，Michaelis 及 Menten 就以 轉化酶 (invertase) 系統為研究對象，發現有關酵素與基質反應的一些行為模式，他們提出：

a. **Steady state 理論**：酵素催化時，基質先與酵素結合，生成過渡狀態，再轉變成產物；而酵素與基質的結合是可逆的 ($E + S \rightleftharpoons ES$)；而當反應達 穩定狀態 (steady state) 時，其中的 [ES] 濃度不變 (因為 ES 生成量等於其消失量)。

- b. 酵素行為的數學描述：反應速率 (v) 與酵素或基質的關係，可以數學式表示；在固定的酵素量下，反應速率 v 與基質濃度 $[S]$ 成雙曲線關係 (但只有雙曲線一股)，可用公式表之，即 Michaelis-Menten (M-M) 動力學公式。

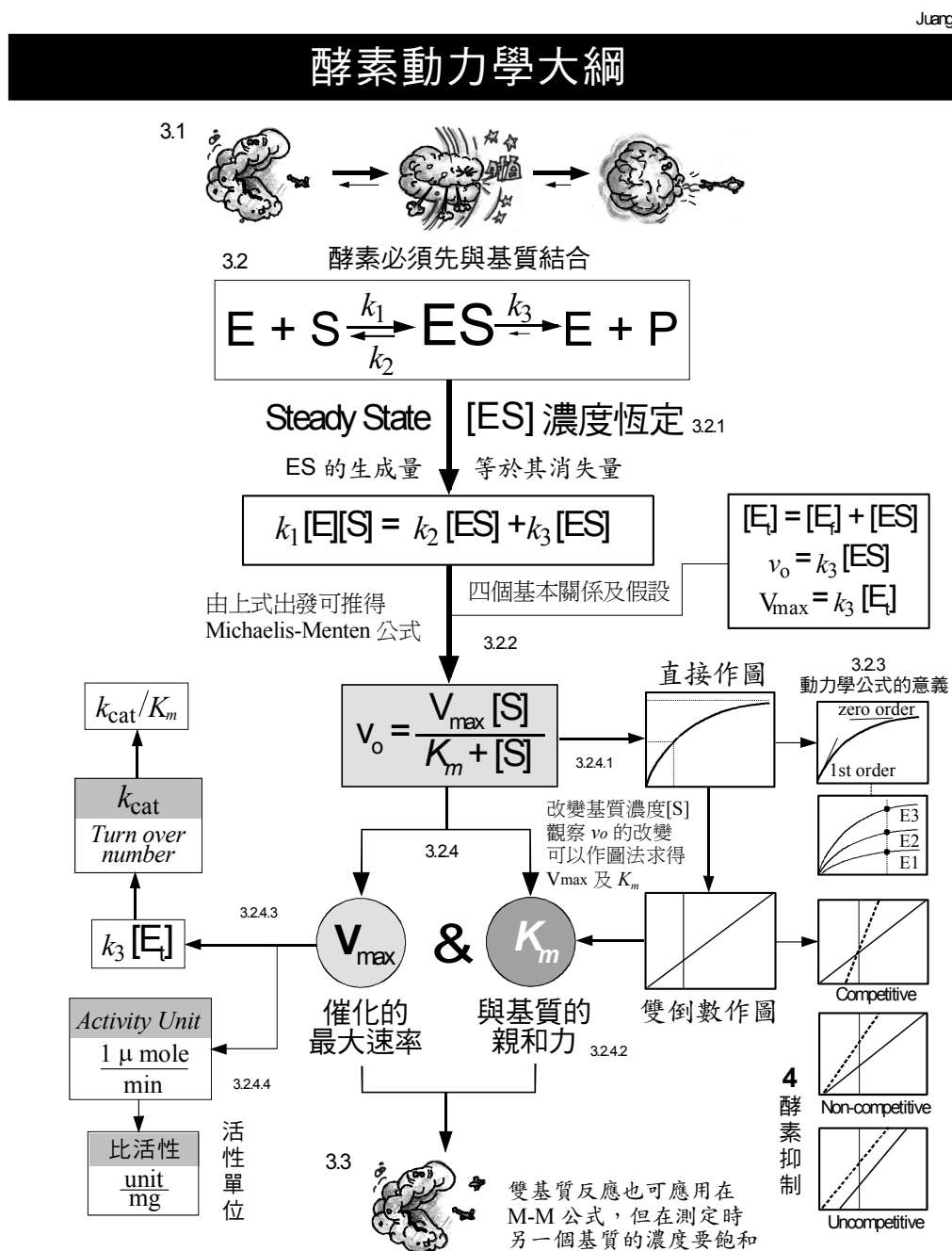


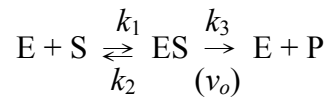
圖 1 酵素動力學公式的推演及其應用

酵素漫畫造型取自 Gonick, L. & Wheelis, M. *The Cartoon Guide to Genetics*.

3.2.2 Michaelis-Menten 公式的推演：

由四個基本設定開始，可一步一步推得 M-M 動力學公式。

a. 酵素E與基質S反應如下，各步驟反應速率由常數 k_1, k_2, k_3 表示：



b. 導 M-M 公式前的四個基本關係及假設：

(1) 因 [ES] 不變，故 ES 的消耗量等於生成量：

$$k_2 [ES] + k_3 [ES] = k_1 [E][S] \quad (I)$$

(2) 總酵素濃度 $[E_t] =$ 單獨存在者 $[E_f] +$ 酵素基質複合體 $[ES]$ (II)

(3) 反應初速 (v_o) 是由後半分解反應 (k_3) 所決定： $v_o = k_3 [ES]$ (III)

(4) 最大反應速率 (V_{max}) 是假設所有酵素均轉變成 $[ES]$ ，

$$\text{故上式可改寫為：} \quad V_{max} = k_3 [E_t] \quad (IV)$$

c. 基於上述條件，可推 M-M 公式如下：

(1) 整理 (I) 可得： $(k_2 + k_3) [ES] = k_1 [E][S]$ 移出 [ES]

$$\text{故 } [ES] = \frac{k_1}{k_2 + k_3} [E][S]; \text{ 另設 } \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m \text{ 則 } [ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad \text{定義 } K_m$$

$$(2) \text{ 由 (III) 得 } [ES] = \frac{v_o}{k_3}, \text{ 故 } \frac{v_o}{k_3} = \frac{[E][S]}{K_m} \text{ 即 } v_o = \frac{k_3 [E][S]}{K_m} \quad (V) \quad \text{由 } [ES] \text{ 導入 } v_o$$

(3) 由 (II) 得 $[E_f] = [E_t] - [ES]$ ，而 $[E_f]$ 可視為 $[E]$ ，故： 分解 [E]

$[E] = [E_t] - [ES]$ 代入 (V) 得：

$$v_o = \frac{k_3 ([E_t] - [ES])[S]}{K_m} = \frac{k_3 [E_t][S] - k_3 [ES][S]}{K_m}$$

(4) 把 (III) $v_o = k_3 [ES]$ 及 (IV) $V_{max} = k_3 [E_t]$ 代入得：

轉換得
 V_{max} 及 v_o

$$v_o = \frac{V_{max} [S] - v_o [S]}{K_m} \rightarrow v_o K_m = V_{max} [S] - v_o [S] \quad \text{移項}$$

$$\rightarrow v_o K_m + v_o [S] = V_{max} [S] \quad (VI)$$

提出 v_o

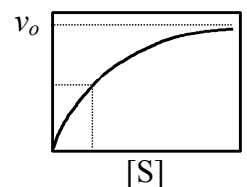
整理 (VI) 集中 v_o 即得 M-M 公式：

$$v_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

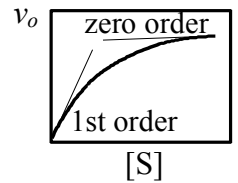
3.2.3 Michaelis-Menten 公式的意義：

M-M 公式可以求得 V_{max} 及 K_m ，求得 V_{max} 及 K_m 有何意義？

a. M-M 公式是雙曲線公式。若固定酵素量，改變其基質量 $[S]$ ，



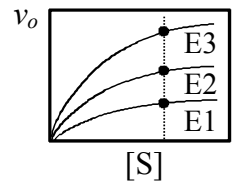
則可得到不同的反應初速 v_o ，再以 $[S]$ 為x軸， v_o 為y軸作圖，可得到一股雙曲線，其漸近點為 $V_{\max}$ 。



- b. 低濃度 $[S]$ 時反應速率 v_o 與 $[S]$ 成正比，即 $v_o \sim [S]^1$ ，是為 一級反應 (first order reaction)；當 $[S]$ 增大， v_o 接近漸近線時， v_o 的改變很小，不受 $[S]$ 變化的影響，即 $v_o \sim [S]^0$ ，稱為 零級反應 (zero order)。

- c. 若基質量 $[S]$ 也固定，則 M-M 公式變為：

$$v_o = \frac{V_{\max} (\text{常數 } [S])}{(\text{常數 } K_m) + (\text{常數 } [S])} \sim V_{\max} (\text{常數})$$



由 (IV) $V_{\max} = k_3 [E_t]$ ，故 $v_o \sim [E_t]$ ，即反應速率與酵素量成正比。

- d. 事實上 $ES \rightarrow E + P$ 的反應為可逆，但此逆反應可忽略，因M-M公式的測定，是反應初期所測的反應初速 (v_o)，此時生成物 $[P]$ 的濃度很低，逆反應幾乎無從發生。

◆ 練習以紙筆自行推演 M-M 公式及上述各種情況下的變化。

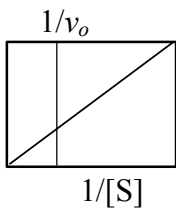
3.2.4 $V_{\max}$ 及 K_m 的測定與意義：

$V_{\max}$ 及 K_m 是每一個酵素極重要的性質指標，可以顯示其催化特性。

3.2.4.1 $V_{\max}$ 及 K_m 測定法：

步驟相當單純，但隨著各種酵素活性測定方法的難易有別。動力學實驗的基本資料，為在一系列 $[S]$ 濃度下所測得的反應初速 (v_o)，依法作圖即可求出 $V_{\max}$ 及 K_m 。有以下數種作圖求法：

- a. 直接作圖法：是最基本的數據作圖。以 $[S]$ 為橫軸 v_o 為縱軸，所得漸近線的最高處為 $V_{\max}$ ， K_m 為 50% $V_{\max}$ 時的 $[S]$ 。



- b. Lineweaver-Burk雙倒數作圖法：是最常用的作圖方式；因直接作圖法只能以漸近估計求得 $V_{\max}$ ，若x及y軸分別改為 $1/[S]$ 及 $1/v_o$ ，則可作出一條直線來，由x軸上的交點求出 $1/K_m$ ，由y軸交點求出 $1/V_{\max}$ 。

◆ 循一實例練習畫出動力學測定的直接作圖及其雙倒數作圖。並請注意 $V_{\max}$ 及 K_m 的單位是什麼，為何會得到此種單位？

- c. Eadie-Hofstee作圖法：雙倒數圖的直線，在接近y軸處，打點太密，求得直線稍有困難。若分別以 $v_o/[S]$ 及 v_o 為x, y軸，亦可畫出直線，且各點的分佈較平均。

3.2.4.2 K_m 的意義：

K_m 是酵素與基質間親和力的指標， K_m 越大親和力越小。

- a. 當反應速率為 50% $V_{\max}$ 時， $v_o = \frac{1}{2} V_{\max}$ ，代入M-M公式，則得：

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}, \text{ 整理得 } K_m = [S] \text{ (只在 } v_o = \frac{1}{2}V_{\max} \text{ 條件下)}$$

因此 K_m 的意義表示，要達到一半最高催化速率時 $[S]$ 所需濃度。

- b. 若酵素的 K_m 越低，則表示它要接近 $V_{\max}$ 所需的基質濃度越低。若某一酵素具有數種基質，各有不同的 K_m ，則 K_m 越低的基質，表示它與酵素的親和力越大，催化反應愈容易進行。 K_m 與 $[S]$ 一樣是濃度單位 (mM或 μM)。
- c. 某酵素的 K_m 值可看成在一般細胞內，該酵素基質的大約濃度。

3.2.4.3 $V_{\max}$ 的意義：

請確實瞭解 $V_{\max} = k_3 [E_t]$ 的意義 (公式IV)。

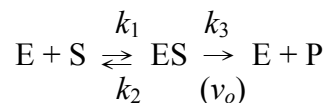
- a. 在足夠的基質濃度下，一定量的酵素所能催化的最高反應速率，即為其 $V_{\max}$ ；要讓一個酵素達致其 $V_{\max}$ ，就要把基質量調至最高濃度。在比較不同酵素的 $V_{\max}$ 活性時，注意要以同樣莫耳數的酵素分子為基準。
- b. 單位時間內每莫耳酵素所能催化的基質數 (莫耳數)，稱為turn over number或molecular activity，一般酵素約在 0.1~10,000 間 (每秒)，有大有小不等。這是當基質量極大於 K_m 時 ($[S] \gg K_m$)，反應推向右邊， $E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P$ ，其 k_3 成為決定因素，即為turn over number，特標記為 k_{cat} 。
- c. 當基質量遠小於 K_m 時 ($K_m \gg [S]$ 則 $[E_t] = [E]$ 而 $K_m + [S] = K_m$)，則可以由M-M公式導得：

$$v_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} = \frac{k_3 [E_t][S]}{K_m + [S]} = \frac{k_3 [E][S]}{K_m} = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} [E][S]$$

反應速率成為 second order，由 $[E]$ 及 $[S]$ 兩項因素決定之。

而 k_{cat}/K_m 常數的大小則為重要指標，同時顯示酵素的催化效率及專一性。

- d. 瞭解上述的 K_m 與 $V_{\max}$ 後，重新回顧最早的酵素與基質反應式：



若把此式分成兩半，前半是 $E + S \rightarrow ES$ 由 k_1 與 k_2 主導；後半 $ES \rightarrow E + P$ 由 k_3 主導。則顯然 $V_{\max}$ 是後半反應決定 (記得 $V_{\max} = k_3 [E_t]$)，而 K_m 則大體上由前半反應所定。因此整個酵素反應，是由這兩半反應所共同組成，前半以 K_m 來決定酵素與基質的親和度，後半反應以生成物的產生來決定最高反應速率。注意 K_m 的定義是 $(k_2 + k_3) \div k_1$ ，故後半反應還是對 K_m 有影響。

3.2.4.4 酵素活性定義：

有兩種表示酵素活性的方式，請注意其定義不同，不要混淆。

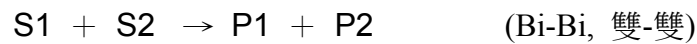
- a. 活性單位：酵素活性的表示方法通常使用 活性單位 (unit)；即酵素每分鐘若催化 1 μmole 基質的活性，即定義為 1 單位活性；注意同一種酵素可能

會有不同定義方式的活性單位。

- b. 比活性：每單位重量蛋白質 (mg) 中所含的酵素活性 (unit)，稱為 比活性 (specific activity, unit/mg)；因酵素為活性分子，有時會失去活性，雖然蛋白質仍在，但比活性會下降。

3.3 雙基質反應：

- a. 上述 $S \rightarrow P$ 催化反應，只有一種基質及一種生成物，稱為 Uni-Uni 反應。但事實上大多數酵素反應，有一個以上的基質，也可能有數個生成物，為多基質反應。例如：



- b. 雙基質反應仍可適用於 M-M 公式，但兩種基質的 K_m 要分別測定；測 $S1$ 的時候，反應中的 $S2$ 濃度要飽和 (使 $S2$ 成為非主導因子)，反之亦然。

- c. Bi-Bi 反應中基質 ($S1, S2$) 及生成物 ($P1, P2$) 的進出次序有數種情形：

- (1) **Random**：基質進入活性區並沒有一定次序，但兩個基質都要結合到酵素後，才會開始進行反應。
- (2) **Ordered sequential**：基質依固定次序進入，然後生成物再依序出來。
- (3) **Ordered ping-pong**：依 [$S1$ 進, $P1$ 出; $S2$ 進, $P2$ 出] 次序，像是兩個 Uni-Uni 組成的；也像是打乒乓球一樣地一來一往。



4 酵素的抑制：

酵素活性的抑制，也是一個重要的調控方式。

4.1 酵素的抑制方式：

- 以抑制劑與酵素結合而導致抑制作用，這種結合是可逆或不可逆反應都有。
- 很多生理或藥理上的作用，都是源自於抑制劑對酵素的作用，而使酵素的活性降低，或者完全失去活性。如消炎的磺胺藥，即是一種細菌酵素基質 (PABA) 的類似物，可抑制細菌葉酸的合成。
- 抑制劑與酵素產生非共價性結合，然後可以阻礙基質進入酵素活性區，或者改變酵素構形而使其失活。
- 抑制酵素的機制，依抑制劑 [I] 與酵素 [E] 的結合方式，可以分成三種：

Competitive, non-competitive 及 uncompetitive (請見下頁圖 2 整理)；由抑制劑對酵素動力學曲線所造成的影響，即可得知是何種抑制方式。

4.2 不可逆的抑制：

不可逆性抑制劑會對酵素活性區上的主要胺基酸做 共價性修飾，因此酵素活性通常被嚴重破壞，便無上述三種動力學抑制方式。

- 青黴素 (penicillin) 喬裝成基質，可與細菌的一種酵素發生不可逆的結合，此酵素乃細菌細胞壁生合成的重要酵素，細菌無法正常生成細胞壁而死亡。有點像是分子版的『木馬屠城記』。
- 重金屬： Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} 及砷化物等重金屬，非專一性地與 [E] 或 [ES] 結合，取代原來酵素所需的金屬，而使酵素失去活性。
- 化學修飾劑：某些化合物可以專一性地修飾特定胺基酸，除了可做為專一性抑制劑外，也可用來檢定酵素活性區中，具有催化反應的胺基酸為何者 (表 1)。

表 1 若干蛋白酶的抑制劑及其作用機制：

抑制劑	全 名	作用基團	目標酵素例
PCMB	<i>p</i> -chloro-mercuribenzoate	Cys -SH	papain
DIFP	diisopropyl-fluorophosphat	Ser -OH	Ser proteases
TPCK	tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone	Ser -OH	chymotrypsin
TLCK	tosyl-L-lysine chloromethyl ketone	Ser -OH	trypsin

◆ 日本真理教所用的沙林毒氣 (Sarin) 是一類似 DIFP 的抑制劑。

- d. 蛋白酶及其抑制劑：蛋白酶廣泛存在於細胞中，有其專一性抑制劑可控制其生理活性，二者互相拮抗形成調節控制網。目前極被重視的 HIV 蛋白酶及其人工抑制劑，在醫藥研究上有很大的作用及影響。

◆ 有關蛋白酶的分類，請見 6.1.2 一節。

三種酵素抑制機制

	▶ Competitive	□ Non-competitive	◻ Uncompetitive
圖解			
抑制機制及說明	$\begin{array}{l} E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P \\ + \\ I \\ \Downarrow \\ EI \end{array}$	$\begin{array}{l} E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P \\ + \\ I \\ \Downarrow \\ EI + S \rightleftharpoons IES \end{array}$	$\begin{array}{l} E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P \\ + \\ I \\ \Downarrow \\ IES \end{array}$
	[I] 只與自由的 [E] 結合，會與 [S] 競爭； [S] ↑ 可克服 [I] 的抑制。	[I] 可與自由的 [E] 或已佔據有 [S] 的 [ES] 結合。 [S] ↑ 不能克服 [I] 的抑制。	[I] 只能與 [ES] 結合， [S] ↑ 反而有利 [I] 的抑制。
直接作圖			
	$V_{\max}$ 不變； K_m 變大	$V_{\max}$ 變小； K_m 不變	$V_{\max}$ 及 K_m 均變小
雙倒數作圖			

圖 2 各種酵素抑制反應的機制及其動力學行為

5 酵素的催化機制：

酵素的催化機制可以化學反應逐步推得，與分子的構造也有相當大的關係。

5.1 酵素活性區 (active site)：

催化反應都在活性區內進行，活性區可提供有利催化的環境。

a. **活性區：** 是酵素與其基質 (或輔酶) 的結合區域，並在此進行催化反應。 活性區通常是一凹陷的袋狀構造，水分子不易進入袋中。 活性區內的胺基酸，只有那些具反應性基團 (reactive group) 者，才直接參與催化反應；但各種胺基酸都有可能參與結合基質。

b. 酵素催化的 **化學機制**，通常是以下面三種基本方式進行反應：

(1) **Bond strain：** 基質結合到酵素後，酵素的構形扭曲使基質分子內某共價鍵受力斷裂。

(2) **Acid-base：** 利用活性區內胺基酸基團或輔酶，可以放出或接受質子 (或電子) 的特性，對基質進行質子或電子的轉送。

(3) **Orientation：** 活性區可提供基質適當的排列空間，使有利於反應進行。

以上三種方式或可同時發生，為 **協同式 (concerted set)**；亦可先後依序發生，稱 **順序式 (sequential mechanism)**。 以下兩個重要例子都是蛋白酶。

5.2 協同式催化機制：

以 carboxypeptidase A (CPA, 羧肽酶) 為模型酵素說明之 (圖 3)。

a. CPA 的分子量 34 kD，含 307 個胺基酸，有一雙硫鍵，及一個鋅離子，是一種金屬蛋白酶。 CPA 可由胜肽的 C-端，依序切下外側胺基酸 (外切酶)，當胺基酸的 R 基團為非極性者，較有利反應進行；而 carboxypeptidase B (CPB) 只切 C-端為 Lys 或 Arg 者，二者專一性不同。

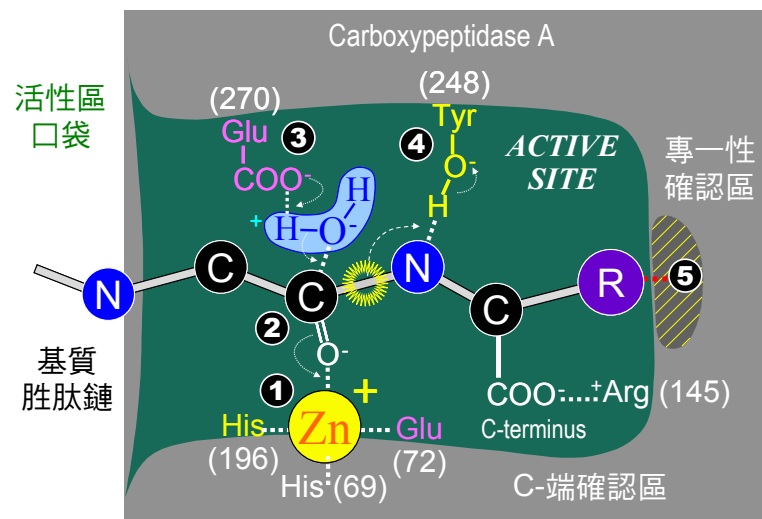


圖 3 Carboxypeptidase A 的催化機制

b. CPA 的詳細催化機制如圖 3 所示，並加說明於下：

- ① Zn^{2+} 離子乃重要輔助因子，可吸住基質胜肽鍵上的carbonyl基，增強其極性，使
- ②碳帶正電。
- ③ Glu270 吸住水分子，放出 OH^- 攻擊 C^+ ②，產生新的C-OH鍵。
- ④ Tyr248-OH 上的質子，與氮 lone pair 電子產生新鍵，原來的胜鍵斷裂。
- ⑤ 附近的胺基酸與基質 C-端的 R 基團，有專一性的結合，以辨別基質的極性；同時 Arg145 與基質 C-端的 $-\text{COOH}$ 結合，確定基質蛋白質是以 C-端進入活性區。

5.3 順序式催化機制：

以 chymotrypsin (CT, 胰凝乳蛋白酶) 為代表，請找出課本的相關圖片。

- a. 分子構造：CT 的分子量為 25 kD，含三條胜肽，由兩個雙硫鍵連接，是轉譯後修飾的產物；剛轉譯出來的完整胜肽鏈沒有活性，要在接近 N-端的 Arg15 與 Ile16 之間先斷開後，CT 才能活化。
- b. 催化活性：CT 可水解胜肽鏈上面的芳香族胺基酸 (Tyr, Phe, Trp) 或 Met (具較大非極性基團者)，切開這些胺基酸 C-側的胜鍵，是一種 內切酶。
- c. 活性區：CT大部分的極性胺基酸都露在分子外表，只有三個在活性區內，對催化反應扮重要角色 (Ser195, His57, Asp102)。三者以『電荷接力』形成高反應性Ser，其 Ser195-OH基上的 H^+ 被鄰近的His57 吸收，生成具有高反應性的 $-\text{O}^-$ 。

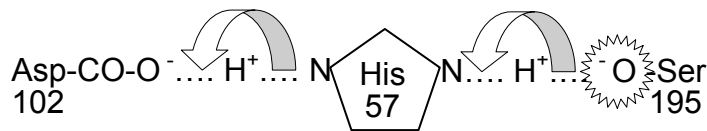


圖 4 Ser 蛋白酶催化區上由三個胺基酸所構成的電荷接力

- d. 催化機制：Ser上的高反應性 $-\text{O}^-$ 會攻擊基質胜肽上的carbonyl碳 (帶微正電)，形成新的C-O鍵 (acylation步驟)，同時斷開基質的胜鍵，先釋出一段C-側的胜肽；然後加水分解，破壞此C-O鍵 (deacylation步驟)，釋出另一段N-側胜肽。以上兩個步驟，依次順序發生。
- e. 穩定過渡狀態：除了 catalytic triad 可以有效催化之外，活性區也可以穩定催化反應的中間過渡狀態；過渡狀態有相當高的負電荷，因此以活性區附近的 Gly193 及 Ser195 本身的 $-\text{N-H}$ 與之產生氫鍵而中和之。
- f. Ser 蛋白酶家族：這種以 Ser 為催化主力的蛋白酶很多，統稱為 serine 型蛋白酶；除了 chymotrypsin 外，尚有許多如 trypsin (胰蛋白酶)、elastase (彈性蛋白酶)。它們的催化機制相似，立體構形相當類似，且都有 [Ser-His-Asp] 接力形式的催化機構。但對基質的專一性不同，trypsin 的基質為鹼性胺基酸 (Lys, Arg)，elastase 則只切 R 基團較小且不帶電荷者。

5.4 酵素的專一性：

酵素只與特定的基質結合，有很高的專一性，這是酵素重要特性之一。

5.4.1 專一性結合區：

大部份酵素的活性區即有專一性辨識與結合基質能力，但 CT 另有一基質的辨識區位在其活性區附近。

- 上述各 Ser 型蛋白酶的活性區除了有 [Ser-His-Asp] 催化中心外，附近還有一個袋狀的基質結合區，可以辨別基質的種類 (驗明正身)，以便與正確的基質胺基酸結合。
- 這種專一性結合是靠結合區上胺基酸 R 基團的 形狀、大小、極性 或 電荷 等性質的契合，以 二級鍵 結合。例如 chymotrypsin 的結合區中多含非極性的胺基酸，故只能與非極性的芳香族胺基酸結合，催化這類胺基酸的水解。改變結合區的重要胺基酸，可改變專一性 (*Science*, 1992, 255: 1249)。

5.4.2 專一性結合力量：

有兩大類構成因素，一是形狀的互補，另一是吸引力量。

- 分子間 構形互補：有如『鎖頭與鑰匙 lock & key』在形狀上的契合；而蛋白質分子有彈性，與基質結合可誘生更契合的構形，稱為 induced fit。因構形互補而吸引的主要力量來自 凡得瓦爾力，如圖 5 中 A 與 B 之間的契合。
- 酵素與基質間會產生 吸引力量，是由兩者間的若干二級鍵所共同組成。

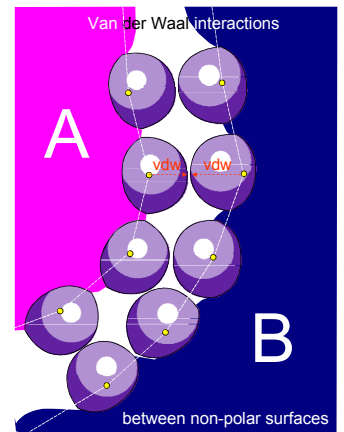
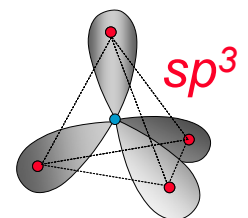


圖 5 兩分子間構形互補

5.4.3 立體專一性：

酵素分子如何辨認立體異構物？碳原子的原子軌道是根本原因。

- 酵素可辨認基質的 立體不對稱性，只能對某一種立體異構物有催化反應 (如 L 或 D 型胺基酸之一)，而生成物也只有對應立體異構物之一。
- 如圖 6 把基質分子中不對稱碳 (sp^3) 四個鍵結中的一點 (A) 固定，再以酵素的專一性結合面接觸並確認 B-C-D 三點，就能分辨另一異構物的差異 (可能是 B-D-C) 而排斥之 (從 A 點往下看即可分出差異，如圖 7)。



碳原子的四面體構造有很強的立體限制性是蛋白質構形的根本

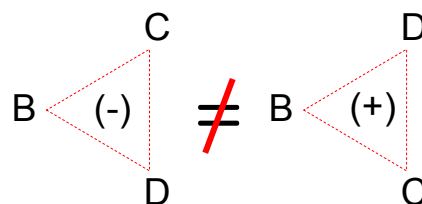


圖 7 不對稱碳鍵結排列的差異

圖 6 碳原子四面體

6 酵素活性的調節：

酵素活性的調節，對細胞生理是極為重要的，因為細胞並不定期望某酵素一直保持在活性狀態。對酵素分子的共價或非共價性修飾，其調節活性的效果最為直接而迅速；有些是可逆反應，也有部分是不可逆。以下面四種方式，加上抑制劑的使用，細胞就可以自由控制酵素活性的高低。

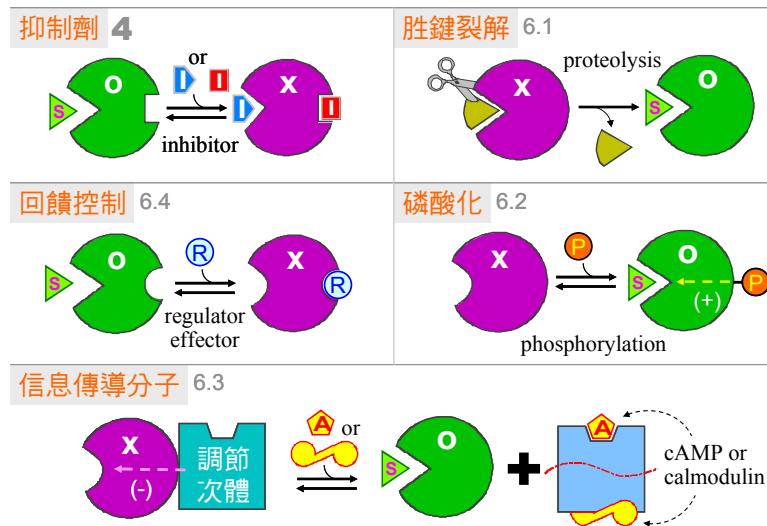


圖 8 酵素活性的調節控制方式 (上面的數字代表各說明章節)

6.1 蛋白質裂解：

不只是酵素，很多蛋白質都是利用降解來調節其活性或功能。

6.1.1 酶原或前驅體：

以蛋白質的裂解來調節酵素活性，該酵素在裂解後得以活化；也可以把完成任務後的蛋白質分解掉，以免繼續進行著生理作用。

- a. 許多酵素 (或蛋白質) 剛由 mRNA 轉譯成蛋白質時，分子量較大而不具活性，稱為 酶原 (zymogen)；在蛋白質則稱 前驅體 (precursor)。酶原或前驅體再經蛋白酶切開，或除去部分胜肽，才能成為具有活性的分子。請研究下面數例，注意胰島素及腦啡是荷爾蒙而非酵素，而打有 * 號者乃表示具有活性者：

(1) 凝血酶：Prothrombin $\rightarrow$ Thrombin* $\rightarrow$ (凝血反應)

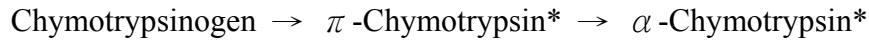
凝血 對生物體是一件很嚴重的事，血液不能在血管內任意凝固。因此細胞對誘發凝血的過程，控制得非常嚴格，是以一種『梯瀑 cascade』的方式，把一個信息漸次放大；而在放大過程中有許多管制點，可避免因假警報誤導致凝血。上面的凝血酶生成是最後一步，凝血酶可立即誘發凝血。

(2) 胰島素：Preproinsulin $\rightarrow$ Proinsulin $\rightarrow$ Insulin*

轉譯出來的 preproinsulin 在分子摺疊好以後，要切除 N-端的一段胜肽成為 proinsulin，然後再切除中央的一段 C 胜肽後，才會有活性。

(3) 腦啡：先合成一長條八元體的前驅體，再以一種類似 trypsin 的蛋白酶裂解成單位腦啡，因此其產生也受到蛋白酶的控制。

- b. 許多破壞性強的酵素 (如蛋白酶) 先以酶原形式合成出來，以免在到達作用目標前破壞其它蛋白質；或以胞器或細胞膜隔離，稱 區隔化 (compartmentation)。



Chymotrypsinogen分子的斷裂會使其構形改變，露出新的N-端Ile16，這個新的 $-\text{NH}_3^+$ 會吸引Asp194的酸基，進而固定隔壁的Ser195，使其就定位，並因此打開專一性結合區，轉變成為活性型。

- c. 這種酶原裂解的活化方式是不可逆的，因為被切掉的片段無法接回；因此細胞以 抑制劑 (inhibitor) 來控制此類酵素。Trypsin 及其抑制劑為一範例，trypsin 被切開活化之後，只能用其專一性抑制劑去控制。

6.1.2 蛋白酶：

越來越多的研究發現，蛋白酶在細胞內具有重要的生理功能。

- a. 依催化機制可分成四類：(1) 金屬蛋白酶 (2) Serine 蛋白酶 (3) Cysteine (或 thio) 蛋白酶 (4) Aspartyl (或 acid) 蛋白酶。
- b. 同一族的蛋白酶序列都有類似的胺基酸序列及構形，尤其在活性區的保守性胺基酸幾乎不會改變 (如 Ser 蛋白酶的 catalytic triad); 但其它序列則因 趨異演化 而衍生出許多具有不同專一性的蛋白酶；構造完全無關的 acetylcholinesterase，則因 趨同演化 而具有類似 catalytic triad 的 ester 水解能力。
- c. 類似核酸的 intron 與 exon，蛋白質也有自我剪接的現象，稱 intein 與 extein，是轉譯後的修飾作用；但此現象並不是很普遍。

6.1.3 Ubiquitin-Proteasome 降解路徑：

細胞內蛋白質的降解，可能是一種調節性的生理作用；最近發現很多蛋白質，都要先標上 ubiquitin 後，才以 proteasome 來進行降解。

- a. Ubiquitin (泛素)：

廣泛分布在動植物細胞中，同質性高而分子量小，可以連到目標蛋白質分子的 Lys 胺基，作為被降解的標記 (ubiquitination)。目標蛋白質的胺基酸序列上，通常在近 N-端有一定信號序列 (destruction box)。

- b. Proteasome (蛋白酶體)：

是由很多較小單位分子所組成的巨大分子，主體看來像是四個甜甜圈疊在一起，中央的孔洞可以容納目標蛋白質，並將其分解成胜肽片段；目標蛋白質大都要先標有 ubiquitin，水解後 ubiquitin 可以回收再次使用。

6.2 磷酸化 (phosphorylation) :

磷酸化是非常廣泛且多功能的蛋白質修飾方式，在信息傳導上極為重要；越來越多的重要生理現象，被發現是與蛋白質的磷酸化或去磷酸化有關。而肝糖磷解酶 (glycogen phosphorylase, GP) 是磷酸化調控活性的典型例子，請仔細研究之。

- 蛋白質分子上某些胺基酸，如 Ser, Thr, Tyr (或 His) 的 -OH 基 (His 為 imidazole 基團) 會被蛋白質激酶 (protein kinase) 修飾，在其分子加上磷酸而致活化，此磷酸可再被蛋白質磷酸酶 (protein phosphatase) 去掉而失活；但亦有許多相反的例子。
- 蛋白質經磷酸化加上一個強負電基團，影響附近胜肽鏈的排列，造成蛋白質構形改變，而使活性升高或降低。除了磷酸化之外，蛋白質也可以接上核苷酸達到活化。
- 最近發現有些磷酸化蛋白質也會進入上述 ubiquitin-proteasome 路徑，引發該蛋白質的降解，以達調節目的。

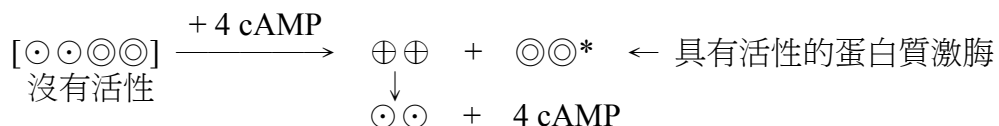
6.3 非共價結合之信息傳導分子：

主要代表分子是 cAMP 及 calmodulin，都是信息傳導途徑的重要媒介，與上述的磷酸化反應共同合作，組成有效的細胞調節網路。

6.3.1 cAMP :

蛋白質激酶之活性受到 cAMP 調節，原不具活性的激酶與 cAMP 結合後，會釋出活化型的蛋白質激酶。下圖說明蛋白質激酶的活化方式。

(⊙ catalytic subunit; ⊙ regulatory subunit; ⊕ = ⊙ + cAMP)



6.3.2 Calmodulin (攜鈣素) :

當細胞內的鈣離子濃度改變時，會誘導許多生理反應，而 calmodulin 即為細胞內鈣濃度的感應與作用分子；它的分子 (17 kD) 上有四個鈣離子結合位置，與鈣結合後會誘導其分子構形的改變，可與目標蛋白質結合，調節後者的活性。

6.3.3 信息傳導路徑：

當荷爾蒙或細胞激素等胞外信息分子到達目標細胞，與胞膜上的專一性受體結合後，就會引發該細胞的一連串反應，把胞外信息帶入細胞內，以啟動所要的生理反應。細胞內的這些反應，相當複雜而有效，統稱為信息傳導；由上面所述的磷酸化及 cAMP 等小分子為主軸，加上目標酵素的活化，可分成幾個層次，各層次由許多模組所構成。

下面整理出這幾個層次，並且舉出一個對應例。

Signal → Receptor → Transducer → Effector enzyme → Effector → Effect
對應的分子如下例：

Glucagon → Receptor → G-protein → Adenylate cyclase → cAMP → Kinase

這種傳導途徑有兩個特點，是細胞生理極為重要的手段：

a. 放大作用 (amplification)：

上述一層一層的傳導過程中，有些是酵素 (如 cyclase, kiase)；而一個酵素分子若經活化，代表著將有大量的基質會被催化成生成物，而生成物會再傳導給下一步反應，信息因此而被放大。這種方式，非常像真空管的電流放大作用，也是上述 cascade 梯瀑式放大的一種。

b. 彈性模組 (flexibility)：

信息傳導的每一步代表一個層次，而每個層次可由各種模組所組成，因此可以有不同彈性組合，以因應不同細胞的種種需要。

6.4 異位酶 (allosteric enzyme)：

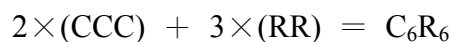
有些酵素的活性，會被它下游的產物所調節，是為 迴饋控制 (feedback) 現象；這類酵素的分子上，除了有活性區可與其基質結合外，還有可與其下游產物結合的位置，稱為 調節區 (regulatory site)，這種酵素則稱為 異位酶。

6.4.1 Aspartate transcarbamoylase (ATCase)：

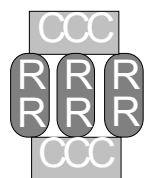
ATCase 是典型的異位酶。

a. 迴饋控制：ATCase 催化 aspartate 與 carbamoyl-P 連結成 carbamoyl aspartate 的反應，後者經代謝後生成 CTP；CTP 則回頭與 ATCase 上的 調節區 結合，反而抑制 ATCase 的活性 (負迴饋)。由於 ATCase 是這個反應鏈的起始酵素，控制 ATCase 即可控制整條代謝路徑。

b. 四級構造：ATCase 是由兩組 催化次體 (catalytic subunit, CCC) 以及三組 調節次體 (regulatory subunits, RR) 組成；每組催化次體由三條蛋白質組成 (C, 34 kD)，每組調節次體由兩條蛋白質組成 (R, 17 kD)：



每調節次體有一 效應物結合區，每催化次體有一 基質結合區。



c. S型曲線：ATCase的動力學結果顯示，以 v_o 對基質 [Asp] 濃度直接作圖，可得一S型曲線 (sigmoidal curve)，而非典型的M-M單股雙曲線 (見圖 9)。這是 合作式 (cooperative) 的 協力現象，表示基質與酵素之任何一個次體結合後，可誘導改變酵素的分子構形，促進其它次體與基質間的結合能力 (positive homotropic effect)。

- d. 分子開關：此S曲線有一轉折點，基質在達到這個基質濃度後，酵素反應速率急速上升。可以將此轉折點看做酵素對其環境基質濃度的感應點，當基質濃度低於轉折點時酵素不太活動；而達到轉折點時，酵素便很快起動達到 $V_{\max}$ (圖 9 下圖誇張為虛線，以突顯此轉折點)。
- e. 協力現象：若反應加入CTP，則圖 9 上圖的S型曲線下移 (但 $V_{\max}$ 不變)，表示CTP會降低ATCase的活性 (negative heterotropic)；而ATP則反可增強ATCase活性 (positive heterotropic)，但原S型曲線則變成一般的M-M雙曲線，協力現象消失。
- f. 效應物：ATP 與 CTP 均可影響此異位酶的活性，二者都是其代謝上的相關產物，稱為效應物 (effector)；兩者在構造上與基質 Asp 均不相像，故並非活性區的競爭者，而是結合在分子的其他位置 (異位調節區)，結合後會影響酵素的分子構形，使酵素與基質的親和力下降，因而降低活性；而 ATP 與 CTP 乃互相競爭此一調節區。

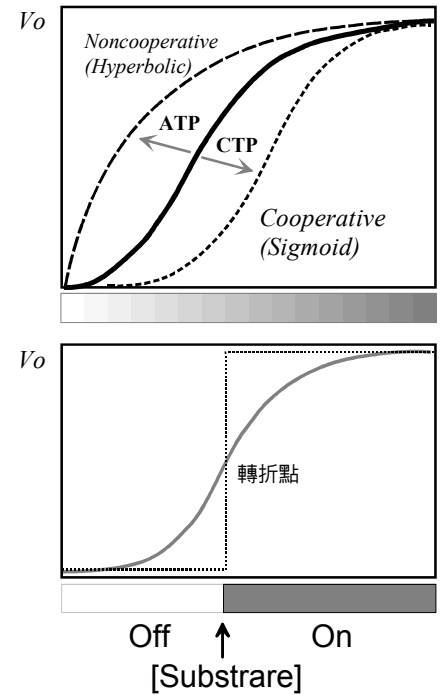


圖 9 異位酶的動力學表現

6.4.2 異位酶的作用模型：

當異位酶受到效應物的影響時，其分子可能會有不同的反應行為。

- a. 異位作用：基質 (或效應物) 與異位酶的一個次體結合後，會使原來的 T (tense) 型次體，變成較易接受基質的 R (relaxed) 型，然後繼續影響其他次體的結合能力，有兩種方式：
- (1) **Concerted 協同式**：酵素分子的每個次體，在結合前後一起呈現 T 或 R 型，保持對稱性；若酵素為二元體，則為 RR 或 TT，而無 RT 型。效應物的結合也是同樣情形，抑制劑會使酵素固定在 TT 型，活化劑使成為 RR 型；此二者同時都失去協力現象。
 - (2) **Sequential 順序式**：酵素的每個次體各自與基質 (或效應物) 結合後，個別由 T 型轉成 R 型，並不影響其他次體的構形 (仍為 T 型)，但對其他次體與基質的親和力，可能有正或負影響。依基質加入順序，分子構形變化為 TT→RT→RR。
- b. 兩種效應方式：基質與異位酶的結合，通常是協同式；一個次體與基質結合後，誘導所有次體都轉成 R 型，使其他次體的活性區更易接受基質。如此影響其他次體上同種結合區者 (活性區→活性區) 稱 homotropic (同質效應)。而效應物與異位酶的結合多為順序式，且會影響其他次體與基質的結合能力；此種不同種結合區之間相互影響 (調節區→活性區) 則稱 heterotropic (異質效應)。

7 細胞代謝與酵素調控：

酵素與細胞代謝極為密切，因為所有的代謝路徑，全是由酵素與其基質所組成的；此外，還要加上對酵素活性的調節控制，以便使得細胞正常運作。近來基因體學與蛋白質體學的蓬勃發展，使得細胞代謝與調控方面的研究，有了全新的角度與工具。

7.1 細胞代謝途徑：

細胞經同化作用合成所需分子，由異化代謝消耗分子、取得能量，全由酵素所控制。

7.1.1 代謝調控原則：

控制酵素即可控制代謝路徑，控制代謝的大原則如下各點。

- 一個基因一個酵素：**細胞的代謝途徑極為複雜，但並非細胞所有的代謝路徑都在進行；而進行中的每一步代謝，都由某一種酵素負責催化反應。
- 速率決定步驟：**因此控制該酵素的活性或生合成量，即可控制該步驟反應的快慢；若此反應為某一系列代謝路徑的速率決定步驟 (rate-limiting step)，則可控制這整條代謝途徑。
- 可逆或不可逆：**大部份酵素反應是可逆的，有時為了使反應保持在某一方向，則成為不可逆反應；不可逆反應大多與消耗 ATP 的反應耦合。
- 代謝路徑可互通：**許多代謝路徑間若有共同的中間物，則可互通，也可能有旁支或小路相連；因此若某條重要路徑失效，細胞通常不會立刻死亡，而會互補保持一種動態的穩定狀況。

7.1.2 異化代謝途徑鳥瞰：

以生物分子而言，異化代謝路徑可分成三個層次，有計畫地把巨分子逐步分解，最後得到能量；其中最主要的是一條糖解作用 (glycolysis)。

- Stage 1:** 巨分子 (蛋白質、多糖、脂質) 消化成單元小分子 (胺基酸、單糖、脂肪酸)，可說就是消化作用。
- Stage 2:** 單元小分子再分解成更小的 acetyl CoA，初步得到一部份的能量。
- Stage 3:** Acetyl CoA經過氧化磷酸化反應得到大量能量，分解成CO₂及水。

7.1.3 糖類中心代謝途徑：

由糖解作用到氧化磷酸化反應，是細胞最主要的一條代謝大道；學習細胞的代謝途徑，可以此為中心，其它各類大小分子的代謝都可匯入此中心。

- 糖解作用：**把葡萄糖分解成 pyruvate → acetyl CoA (代謝分子的焦點)。
- 檸檬酸循環：**在粒線體中把acetyl CoA再分解成CO₂，產生NADH。
- 氧化磷酸化反應：**NADH轉換成ATP並生成水。

7.2 代謝途徑中酵素的調控：

細胞如何控制代謝途徑上的各種酵素？可以針對酵素本身進行修飾，或者控制其基因的表現。而荷爾蒙或細胞激素，是在細胞間傳遞長短程控制指令的信息分子。

7.2.1 基因表現的調控：

酵素在不同細胞內的表現量可能不同，同一細胞內的各種酵素量也不同。

- a. 酵素的 生合成 受到其基因的控制 (DNA→mRNA→protein)，因此基因的開或關，或其表現程度，會影響該酵素在細胞內的量，進而影響該酵素所控制的代謝反應，是為 基因表現 (gene expression)。一個表現中的基因，應該有大量 mRNA 轉錄出來，但有大量 mRNA 卻不一定產生大量酵素。
- b. 一條代謝路徑的起始基質，可能誘導關鍵酵素基因的表現，稱為 induction；此代謝的最終產物，也可能抑制酵素表現，稱為 repression。基因操縱子 (operon) 即是一例，乳糖能夠去除 repressor 與 *lac operon* 之結合，而使基因開動。

7.2.2 酵素活性調節：

已在上一節詳述，再整理成共價及非共價修飾兩大類。是針對酵素分子所進行蛋白質層次的修飾調控，與上述之基因調控方式不同。

a. 非共價修飾：

使用 cAMP 或正負回饋的 效應物 等方式，以非共價方式修飾酵素活性，此多為可逆性的調控。勿把異位酶與上述操縱子的調控方式混為一談，兩者都可被基質活化，但前者是修飾酵素本身，而後者是影響基因的表現。

b. 共價修飾：

以磷酸化或蛋白質水解的方式，來增強或降低酵素活性。多為 cascade (梯瀑) 式的連鎖代謝反應，cascade 連鎖反應會放大 (amplify) 某條代謝路徑的活性。除了正向的以生合成增加酵素量之外，蛋白質的降解也是一項重要的調控方式，並以蛋白酶或 ubiquitin 配合 proteasome 進行降解，以除去此酵素。

7.2.3 激素調控：

細胞與細胞之間如何傳遞信息？這是一個極有趣而且重要的問題。

- a. 賀爾蒙 (如 insulin) 傳遞長程生理指令，經由血液傳送並與目標細胞接觸，結合到細胞膜上的接受器 (receptor)，可引發一系列的信息傳導反應，把『啟動』的指令傳入細胞內，藉著蛋白質激酶或磷酸酶等，活化某些關鍵酵素，開始進行該細胞所預設的功能 (如分解肝糖)，以應身體所需。
- b. 細胞激素 則多在免疫細胞之間傳遞短程的信息，可刺激局部的細胞增生；也是利用信息傳導路徑，來啟動細胞內的各種生理功能。

7.2.4 細胞空間的效用：

利用酵素或基質在空間上的隔離或聚集，是一有效控制方法。

- a. **胞器隔離：**真核細胞內有許多隔間 (compartmentation)，形成其胞器的隔離空間；在胞器內可聚集較濃的特定酵素及基質，以便有效進行催化反應，或避免有害的副作用。例如葡萄糖中心代謝途徑中，檸檬酸循環及氧化磷酸化反應是在粒線體中進行的。
- b. **酵素複合體：**幾個連續反應的酵素，可組合在一起成為複合體；則某酵素的生成物，可馬上被下一個酵素用為反應物，降低擴散碰撞所需時間。例如葡萄糖中心代謝途徑中的 pyruvate dehydrogenase (催化 pyruvate $\rightarrow$ acetyl CoA) 是由三種酵素組成的複合體。
- c. **膜上酵素群：**一群連續反應的酵素，也可以一起附在細胞膜上，除了可加速反應速率外，其作用也可能與細胞膜有關。例如葡萄糖中心代謝途徑中，氧化磷酸化反應酵素群是附在粒線體的內層膜上，並利用膜內外的質子濃度差異來產生 ATP。

7.3 研究酵素及代謝的材料：

酵素材料的來源或取得，依其不同目的可有數個層次。

- a. 通常我們必需純化出均質酵素 (homogeneous enzyme)，以針對某一特定酵素進行研究，因此蛋白質純化技術在生化研究上極為重要，請複習這些純化及檢定方法。
 - b. 但複雜的生化反應，並非單一的純質酵素所能達成，因此可分離出某種特定細胞，或者將細胞打破所得到的溶胞液 (cell-free lysate)，以作為研究酵素或代謝反應的材料。動物細胞大多可以建立細胞培養株，某些植物也可以癒創組織 (callus) 培養細胞。若研究需要利用特定的胞器 (organelle)，則可由細胞的溶胞液經超高速離心法取得。
 - c. 有時需要以整個生物體 (whole organism)，或其部份器官 (organ) 來進行實驗，以便觀察巨觀的反應。反應可能相當複雜，因此以放射線物質或用專一性抗體來追蹤是較清楚的方法。
 - d. 不論何種層次的研究，都要注意目標酵素是在那一個生長時期，或是那一種器官內表現的。例如：抽取檸檬酸循環的某些酵素，可以先分離出粒線體來。
 - e. 生物化學研究大多是以分離純化的酵素來進行研究，要小心求證所獲得的結果，是否確實為自然的生理現象，而非僅是試管中的假象。一切觀察均得回歸整體性的細胞生理，否則難有重大意義。
- ◆ 有關酵素純化與分析方法，在生物化學實驗課程中，應該已有部分的基本操作；若要有更詳盡的技術引導，請參考研究所課程的『酵素化學實驗』。

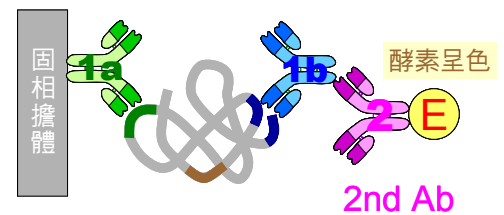
8 酵素在生物技術上的應用：

酵素在現代生物技術的研究或應用上，是一個非常重要的範疇。雖然基因群殖等分子生物的研究蓬勃，但基因表現的產物仍是蛋白質或酵素；另外，在基因操作所應用到的核酸剪接工具，幾乎全部是酵素。以下列舉部份目前生物技術研究常見的一些應用，以及最近的重要發展。

8.1 酵素免疫分析法 (ELISA)：

目前最大的生物技術產業之一。抗體可用來偵測其專一性抗原，而將抗體連接以酵素，可做為追蹤或定量的標幟；通常把免疫試劑之一的抗體固定在固定相 (solid phase)，以利沖洗分離，稱為 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)。其應用的方式很多，下面是稱為 三明治法 的反應方式，是最直接的方法，可用來偵測樣本中的抗原量；其中抗原 (★) 為待檢樣品，須為多價抗原。

固定相 — 抗體 1 (兔)...[抗原 (★)]...抗體 2 (羊)...[二次抗體 (豬抗羊)-酵素]



8.2 固定化酵素及酵素電極：

酵素經固定後有許多好處。

- a. 用物理或化學方法把酵素固定到固相擔體上，比一般使用的溶態酵素有以下優點：
 - (1) 酵素可回收重複使用，較為經濟，而且不會污染樣本。
 - (2) 酵素的穩定性提高，可能較耐熱或極端的 pH。
 - (3) 固相與液相的分離方便，使用上速度快而分離完全，有助於自動化。
 - (4) 許多酵素是附在細胞膜上，固定化酵素可模擬細胞內酵素的實際環境。
- b. 利用上述酵素的固定化，把酵素固定在半透性薄膜上，連接到電極，偵測反應進行的結果 (例如 pH 的改變)，可作為酵素反應的自動化偵測工具。

圖 10 ELISA 三明治法

8.3 蛋白質工程及人造酵素：

以基因重組或其它方法，可以大量生產某種酵素，也能改變酵素的催化特性。

a. 分子群殖 molecular cloning：

cDNA 包含完整的蛋白質轉譯訊息，若把某蛋白的 cDNA 插在表現載體中 (如某質體)，則宿主可能表現此段轉殖基因，而生合成此蛋白質。若在此 DNA 接上另一種已知的酵素基因 (如 luciferase 或 GUS)，則表現出來的蛋白質是二者的連結體，稱為

融合蛋白質 (fusion protein)；而此酵素的活性可做為追蹤之用，稱為 reporter。

b. 蛋白質工程：

若能改變酵素活性區的胺基酸，則可能改變酵素的活性，或是其專一性。通常先研究並預測改變其活性區某胺基酸後，可能引起的變化；再以 人工定點突變 (site-directed mutagenesis) 改變某核苷酸，然後以分子群殖操作表現該突變蛋白質。

c. 人造酵素：

酵素的活性區通常包含數個極性胺基酸，若在人造的分子骨架上，模仿活性區的幾何位置，接上這些胺基酸，則可能得到具有催化作用的人造分子。

d. Abzyme (催化性抗體)：

若能得知酵素催化反應過程中，其基質轉換為產物的 過渡狀態 物質，以此物質或其類似物作為抗原進行免疫，則所得到的抗體，可能具有催化能力。但其催化效率，遠不及自然酵素，通常只有千分之一的效果。最主要原因在於酵素的催化區是一凹陷口袋，可隔離外界干擾，提供最佳環境穩定過渡狀態；而 abzyme 的結合區較淺，無法十分有效地隔離並穩定過渡狀態 (*Nature* 1996, 383: 23-24)。

8.4 Proteome 蛋白質體：

分子生物學革新了整個生物學的觀念，也將會改變生物化學中酵素的研究方法。

8.4.1 Genome project 基因體計畫：

二十一世紀的大事之一，是人類將可解讀出自身染色體內所有DNA的序列，此一大計畫即為 人類基因體計畫 (Human Genome Project)，由發現DNA雙螺旋的 J.D. Watson 主導。其他一些重要動植物或微生物，目前有很多也已解讀完成，例如水稻、小鼠、果蠅、線蟲等。

8.4.2 Proteomics 蛋白質體學：

- 一旦解出某種生物的染色體DNA序列，接著有許多工作可以進行，其中最有趣的是可以馬上把這些序列翻成將表現出來的蛋白質，如此我們就可以得知某生物細胞內可能含有的全體蛋白質，稱之為 蛋白質體 (proteome)。
- 這種研究方式，與傳統的生物化學或生理學有相當不同，要靠龐大的資料庫，與演算能力強大的電腦軟體，是 生物資訊學 (bioinformatics) 的主要特點。
- 生物細胞內的蛋白質體，有一大部份是酵素，由細胞所含有的酵素種類，即可導出該細胞可能有的代謝途徑；由這些代謝途徑，就可推測該細胞是如何運作。如此研究整體細胞的代謝路徑，可以叫做 代謝體學 (metabolomics)；若加上基因體、蛋白質體的觀念，與其分子層次工具，一起來看整體生物，甚至多個生物體之間的關係，則衍生出一個新的學門 系統生物學 (systems biology)。

問題集 (以下題目都沒有標準答案，許多甚至會引起很大的爭議，這樣就達到問題集之目的了)

1. Hemoglobin並非酵素，但為何也會有部份裂解雙氧水 H_2O_2 的作用？
2. 為何 RNA 可能具有催化的能力？
3. Carboxypeptidase A 分子的活性區需要一個 Zn 離子，請問此金屬離子有何作用？
4. 寫出下列各輔酶所能轉移的基團： ATP, Coenzyme A, NADPH, Thiamine
5. 釀酒的時候，為何要把酒甕封起來？
6. Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase 含有兩個 domains，請說明它們各有何種作用？
7. 有些酵素經過磷酸化後反而失去活性，請問其機制或原因何在？
8. 酵素活性區的構形與下列三者何者較能互補？ 請說明為何？

基質 生成物 過渡狀態

9. 請寫出 Michaelis-Menten 公式，並說明其意義。
10. 說明為何 k_3 就是turnover number？
11. 檢討一個酵素的催化活性，採用 k_{cat}/k_m 有何好處？
12. 寫出下列各種酵素抑制劑的作用機制：
 - a) Penicillin
 - b) Sarin
 - c) Sulfa drug
 - d) Heavy metal
13. 為何 chymotrypsinogen 分子要先經過裂解後，才會變成活性型？
14. Chymotrypsin 如何穩定所催化基質的中間過渡狀態？
15. Chymotrypsin 的 His57 對其催化機制有何貢獻？
16. 已知 DPF (diisopropyl phosphofluoridate) 是 Ser protease 的專一性抑制劑，請問如何證明 DPF 是攻擊酵素的活性區？
17. 大部份的 proteases 似乎都有相類似的水解機制，請說明此一核心機制。
18. 許多 proteases 的抑制劑本身都是蛋白質，請問為何這種蛋白質抑制劑不會被 protease 所水解，反而能夠抑制之？
19. 請任舉四種細胞生理上的現象，都是因於蛋白質裂解所造成的結果？

例如： Enkephalin 腦啡分子的生成
20. 如何以 非共價鍵 方式來調節肝醣磷解酶的活性？
21. 請問為何 異位酶 (allosteric enzyme) 的動力學作圖可得到一條 S 型曲線？ 並說明此 S 型曲線有何意義。
22. 許多生理反應都以 梯瀑式 cascade 方式進行，請問會產生何種重大的效應？
23. 為何維持正確的酸鹼度 pH，對某些酵素的活性非常重要？ 有無酵素不受 pH 影響？

24. 請寫出四種以上的蛋白質性質差異，可利用來作為蛋白質純化的依據。

例如： 分子量的大小不同

25. 抗體與其抗原極類似酵素及基質，有很強的專一性，但並無酵素的催化作用；而catalytic antibody (或abzyme) 為特別設計所產生的抗體，可使抗體具有催化的性質。 有一反應如： $A + B \rightarrow A-B$ ，而你要設計並生產能催化此反應的抗體 (A與B均為小分子)。

a) 你將以何種分子為抗原？ 詳細說明原因。 (hint: 為何酵素具有催化能力？)

b) 在進行免疫時，應當注意那些事項？

26. 請判斷並說明下列各題的真偽：

- 1) 酵素都是由蛋白質所構成的。
- 2) 金屬離子在酵素分子中，只有幫助維持構形，不直接參與催化反應。
- 3) $V_{\max}$ 大，表示此酵素與基質的親和力越大。
- 4) 酵素分子中的胺基酸，可直接參與催化反應的，都是一些極性不太強的胺基酸。
- 5) K_m 的單位是 濃度/時間。
- 6) 抑制劑 (inhibitor) 與 負效應物 (negative effector) 都可影響酵素活性，其差別在於後者一定是細胞的代謝產物，前者不然。
- 7) 分析酵素活性時，基質濃度不能太高 (差不多是 K_m 的程度即可)，以免干擾反應。
- 8) $k_3 = k_{\text{cat}} = \text{turnover number}$
- 9) K_m 可看成 $[ES]$ 的生成速率常數。
- 10) Ser proteases都有由Asp-His-Ser組成的triad，可產生一具高反應性的 $-O^-$ 基。
- 11) 一般酵素的活性區與專一性辨認區都不在同一位置，以便增加專一性。
- 12) 兩個蛋白質間的專一性結合，其構形的互補是重要條件之一，乃因於凡得瓦爾鍵。
- 13) 酵素的活性區多為一凹陷口袋，是因為要隔離掉影響催化反應的干擾因子。
- 14) 酵素的抑制劑對人類都有害，在環境或醫藥使用上應完全避免之。
- 15) 與磷酸化一樣，AMP 對肝糖磷解酶的調控，也是改變該酵素的分子構形。
- 16) 蛋白質激酶 (protein kinase) 的催化反應本身都是可逆的，因此蛋白質的磷酸化可以其逆反應來去除之。
- 17) 酵素只能增加其催化反應的反應速率。
- 18) 多元體酵素的的存在是為了調控作用。
- 19) 只要所含的二十種基本胺基酸基團，蛋白質就可以充份發揮酵素的催化機制。
- 20) 酵素催化反應進行的過程中，酵素與基質或產物之間，都不能有共價鍵生成，這才能稱為催化。
- 21) 所有具有完整功能的酵素都是由一條完整胺基酸長鏈所構成的。

- 22) 若某酵素的動力學試驗得到一 S 型曲線，表示此酵素為多元體的四級構造。
- 23) 很多生物都含有血紅蛋白 (hemoglobin)，其胺基酸序列同質性很高，因此其構形相似，都保有相同的運氧功能。
- 24) 水溶性蛋白質的疏水性胺基酸大都在分子的裡面，故酵素分子內部不可以有親水性胺基酸，以防止分子變性。
- 25) 剛轉譯出來的完整 chymotrypsin，其催化活性很低，是因為無法穩定過渡狀態。
- 26) 蛋白酶催化過程中，所形成過渡狀態有過多正電荷，要用氧原子上的電子中和之。
- 27) 尿素 (urea) 可導致酵素變性的原因是破壞 α 螺旋的氫鍵。
- 28) 基因的開關可以控制其蛋白質產物的表現，因此一但某基因被大量轉錄成 mRNA 後，即可預測下游蛋白質將會大增。
- 29) 以下配對都是因為專一性吸引力所造成： 抗原-抗體、荷爾蒙-受體、酵素-輔酶。
- 30) RNA 可以形成分子構形，而 DNA 則無；這是因為 DNA 為雙股螺旋所致。
- 31) RNA 可以形成分子構形，而 DNA 則無；是因為 RNA 可形成 非 Watson-Crick 配對。
- 32) 為何酵素的反應速率要看 k_3 ？ ($v_o = k_3 [ES]$) 是因為 k_1 太大、而 k_2 太小。
- 33) Steady state 理論是說，酵素在一定時間內會達到一平衡穩定的反應速率。
- 34) 青黴素是一種 serine protease 的抑制劑。
- 35) 磺胺藥是細菌代謝途徑的可逆型競爭性抑制劑，因此只能抑菌不能殺菌。
- 36) 電泳及離子交換法都是利用蛋白質分子極性的不同來進行分離純化的。
- 37) 葡萄糖要經磷酸化後才進入糖解代謝途，是因為要防止葡萄糖分子跑掉，因為磷酸化後的分子不易通過細胞膜。
- 38) 以誘生抗體所製備得的 abzyme，可催化所指定的反應，其效率更高於傳統酵素。
- 39) 同一 domain 可重複出現在不同酵素分子上，這是在基因層次已安排好的。
- 40) Carboxypeptidase A 是一種外切酶，可切除蛋白質 C-端的非極性胺基酸，它可以與 α -COOH 結合來辨識是否為 C-端。

27. 是非選擇題 (答案寫在□內，是→○、非→×)

1) 酵素催化反應具有那些特性？

- ☐ 可降低反應的活化能 ☐ 可以改變反應的平衡方向 ☐ 反應前後酵素化性沒有改變 ☐ 其催化速率是可以被改變的

2) RNA 為何會有特定構形？

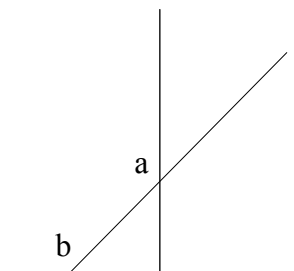
- ☐ RNA 為單股長鏈分子 ☐ RNA 有 Watson-Crick pairing ☐ RNA 有非 W-C 的 pairing ☐ 氫鍵是主要貢獻力量 ☐ RNA 分子中有核糖的 2'-OH

3) 以下分子何者為酵素？

- ☐ Insulin ☐ Trypsin ☐ Fibrin ☐ Hemoglobin ☐ Calmodulin

- 4) 有額外反應性基團的胺基酸：
☐ Val ☐ His ☐ Glu ☐ Pro
- 5) NADH 分子中含有那些構造？
☐ 去氧核糖 ☐ 磷酸 ☐ Adenine ☐ Hydride ☐ Nicotinamide
- 6) 輔酶的作用或性質為：
☐ 穩定酵素構形 ☐ 參與反應基團的轉移 ☐ 很多含有去氧核糖核苷部份
☐ 可提供一強力反應基團
- 7) 有關 K_m 的敘述何者為真？
☐ K_m 的單位是mM/sec ☐ $K_m = k_2 \div (k_1 + k_3)$ ☐ K_m 越大表示對基質結合力強
☐ K_m 隨著酵素的濃度變化而變 ☐ K_m 與ES的生成無關
- 8) 有關 k_{cat} 的敘述何者為真？
☐ k_{cat} 的單位是 sec^{-1} ☐ k_{cat} 就是 k_3 ☐ k_{cat} 隨著酵素的濃度變化而變 ☐ k_{cat} 與ES的生成無關
- 9) 可構成兩個分子間的專一性吸引力的力量有那些：
☐ 氫鍵 ☐ 疏水鍵 ☐ 雙硫鍵 ☐ 凡得瓦爾力 ☐ 離子鍵 ☐ 分子間構形互補
- 10) 何者為 Ser protease 家族？
☐ Subtilisin ☐ 凝血因子 VIII ☐ Acetylcholinesterase ☐ Elastase ☐ Thrombin
- 11) 何者為酵素的不可逆抑制劑？
☐ Penicillin ☐ PCMB ☐ DFP ☐ EDTA ☐ 磺胺藥 ☐ cAMP
- 12) 改變下列那個胺基酸後會影響 chymotrypsin 的活性：
☐ Asp102 ☐ His57 ☐ Ser14 ☐ Ile16 ☐ C-terminal
- 13) 有關立體專一性何者為真？
☐ 碳原子的 sp^3 軌道是主因 ☐ 自然界中多使用L-胺基酸 ☐ 單糖分子並無立體異構物
☐ 酵素可分辨基質立體異構物
- 14) 有關肝糖磷解酶的調節方式：
☐ 可經磷酸化使酵素活性上升 ☐ cAMP 是 (+) 異位調節因子 ☐ ATP 是其競爭性抑制劑
☐ 磷酸化會使其構形改變
- 15) 有關異位酶的作用方式：
☐ 可能受其上游代謝物所抑制 ☐ 其動力學行為呈一S型曲線 ☐ 其 effector 的作用區即活性區
☐ 異位酶不一定要有四級構造
28. 酵素動力學可以下式開始： $E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P$ ，請以公式或文字，說明由此式所衍生出來的四個基本觀察。
29. 胜肽鏈上可被 trypsin 專一性水解的胺基酸有哪兩種？

30. 請舉出六種以上可以使酵素失去活性的方法。
31. 請寫出蛋白質上可被磷酸化的胺基酸種類，及其被磷酸化位置。
32. 右圖為某酵素的雙倒數動力學作圖，請依指示回答問題：



- a) 請標示橫座標及縱座標及其單位。
- b) 標明圖中 a 及 b 點各為何？
- c) 若有一競爭性抑制劑 X，請在圖中畫出可能的抑制情形。

33. 依下列性質，請各至少出一種方法可以純化酵素：

- a) 依分子大小不同 _____
- b) 依分子電荷不同 _____
- c) 依分子極性不同 _____

34. 請簡單解釋以下名詞： Abzyme, Metabolomics, Ribozyme, Proteasome, Specific activity

35. 異位酶是否一定要具有四級構造？請詳細說明。

36. 為何輔酶多屬維生素？

37. 以人工定點突變可以改變酵素的重要胺基酸，進而改變酵素的催會特性，但是通常改變出來的新酵素，活性都較原來的酵素差，請問為何如此？若果真如此，則此種定點突變修改酵素的方法，有何實際用途？

38. 生物細胞中，許多生理功能有『放大 amplification』的作用，例如信息傳導中的關鍵酵素 (cyclase, kinase)，請再舉出數例。

39. 同上題，但並非屬生物細胞，而是人為的實驗方法中，有哪些是具有放大功能的？

40. 單醣分子可以說是一種多醇醛，在一條碳鏈上連接以醇基，並在一端接有一醛基 (如葡萄糖)。在生物細胞內，以此種分子作為能量的貯存與攜帶；而地球把更多的能量藏在如汽油等的飽和碳氫化合物內 (如己烷)。事實上後者含有更高的能量，是較好的能量貯藏分子。請問細胞為何使用糖類分子，而非飽和碳氫化合物？請以單醣的分子構造與特徵，說明其原因。

B2

酵素純化與分析

酵素純化方法

酵素分析方法

問題集

B2 酵素純化與分析一章，是本實驗課程的理論基礎，專門說明各種實驗技術的原理。其內容也在每日的講習課中，以幻燈片一一敘述；期望同學們除了能夠順利操作各種實驗外，也能真正明白其中的生物化學背景知識。本章附有大量練習題，請自行依上課進度練習解題，則必能有更大的學習效益。

酵素純化方法

- 1 酵素純化實驗室 109
 - 1.1 儀器 109
 - 1.2 小型器具及消耗品 110
 - 1.3 藥品 110
 - 1.4 個人用品 111
- 2 蛋白質抽取 112
 - 2.1 如何開始？ 112
 - 2.2 材料來源 112
 - 2.3 均質及抽取 113
 - 2.4 鹽析及沉澱法 114
 - 2.4.1 鹽析分劃法 114
 - 2.4.2 有機溶劑沉澱法 116
 - 2.4.3 其它處理法 116
- 3 色層分析法 118
 - 3.1 色層分析法原理 118
 - 3.2 膠體過濾法 119
 - 3.2.1 原理概述 119
 - 3.2.2 膠體介質 119
 - 3.2.3 膠體管柱 120
 - 3.2.4 管柱操作 122
 - 3.2.5 問題及解決 123
 - 3.3 離子交換法 124
 - 3.3.1 原理概述 124
 - 3.3.2 離子交換介質 124
 - 3.3.3 緩衝液與層析系統 126
 - 3.3.4 管柱操作方法 127
 - 3.3.5 色層焦集法 128
 - 3.4 親和層析法 128
 - 3.4.1 原理概述 128
 - 3.4.2 親和吸著劑 129
 - 3.4.3 金屬螯合層析法 130
 - 3.4.4 疏水性層析法 130
 - 3.4.5 液相分配 131

- 3.5 HPLC 及 FPLC 131
- 4 其它純化或分離方法 133
 - 4.1 製備式電泳 133
 - 4.2 超高速離心法 133
 - 4.3 超微薄膜過濾法 135
- 5 純化策略 137
 - 5.1 純化步驟設計 137
 - 5.1.1 影響純化的因素 137
 - 5.1.2 組合純化步驟 137
 - 5.2 純化結果 138

酵素分析方法

- 1 蛋白質定量法 139
 - 1.1 Biuret 法 139
 - 1.2 Lowry 法 139
 - 1.3 UV 吸光法 139
 - 1.4 Coomassie Blue (dye binding) 法 140
 - 1.5 其它方法 140
- 2 酵素活性測定法 141
 - 2.1 催化反應 141
 - 2.2 酵素活性分析 141
 - 2.2.1 酵素活性測定方法 141
 - 2.2.2 中止酵素反應方法 142
 - 2.2.3 連續測定法 143
 - 2.2.4 澱粉磷解酶活性分析 143
 - 2.3 維持酵素活性 144
 - 2.3.1 緩衝液 144
 - 2.3.2 試劑的保存 145
 - 2.3.3 酵素活性之維持 145
 - 2.3.4 酵素活性單位 146
- 3 電泳檢定法 147
 - 3.1 電泳原理 147

- 3.1.1 蛋白質的泳動率 147
 - 3.1.2 電泳的種類 147
 - 3.1.3 電泳設備及系統選擇 148
- 3.2 聚丙烯醯胺膠體電泳 149
 - 3.2.1 PAGE 種類 149
 - 3.2.2 PAGE 膠體的組成 149
 - 3.2.2.1 膠體主要成分 149
 - 3.2.2.2 鑄膠反應 149
 - 3.2.3 PAGE 系統解剖 150
 - 3.2.3.1 電泳系統的組成 150
 - 3.2.3.2 電泳的焦集作用 150
 - 3.2.3.3 兩種電泳系統比較 151
 - 3.2.4 結果不佳時 152
- 3.3 其它相關技術 153
 - 3.3.1 染色及乾燥 153
 - 3.3.2 等電聚焦法 (IEF) 155
 - 3.3.3 二次元電泳 155
 - 3.3.4 蛋白質轉印法 155
- 4 分子量決定法 156
 - 4.1 膠體過濾法 156
 - 4.2 梯度電泳法 156
 - 4.3 其他分子量測定方法 157
 - 4.3.1 超高速離心法 157
 - 4.3.2 由胺基酸序列計算分子量 157
 - 4.3.3 質譜儀分析 157
- 5 蛋白質構造與組成分析 158
 - 5.1 N-端或 C-端胺基酸決定 158
 - 5.2 胺基酸組成分析 158
 - 5.3 胺基酸定序法 159
 - 5.3.1 cDNA 間推法 159
 - 5.3.2 Edman 直接定序法 159
 - 5.4 胜肽圖譜 160
 - 5.4.1 蛋白質的專一性水解 161
 - 5.4.2 檢定胜肽群的方法 161
 - 5.5 其他相關方法 161
 - 5.5.1 分子消光係數 161
 - 5.5.2 蛋白質分子結構分析 161

- 6 免疫學工具的利用 162
 - 6.1 抗原製備 162
 - 6.2 免疫流程 163
 - 6.3 抗体製備 163
 - 6.4 抗体的應用 164
- 7 蛋白質科技 165
 - 7.1 蛋白質科技的範疇 165
 - 7.2 蛋白質的微量分離及檢定 166
 - 7.2.1 微量分離技術 166
 - 7.2.2 微量分析技術 167
 - 7.3 蛋白質體研究 167
 - 7.3.1 由 proteome 推出該生物的代謝途徑 167
 - 7.3.2 從 proteome 找出疾病的病變蛋白質 168

問題集

- 蛋白質基本性質 169
- 酵素純化方法 170
 - 實驗室操作 170
 - 蛋白質抽取 171
 - 色層分析法 172
 - 其它純化方法 174
- 酵素分析方法 175
 - 蛋白質定量法 175
 - 酵素活性測定 175
 - 活性分析操作 176
 - 電泳檢定法 178
- 蛋白質檢定 179
- 應用問題 181

酵素純化方法

Enzyme Purification

純化酵素前要把儀器及用具建立好，並熟悉所有的基本操作方法，以免事倍功半；最主要的純化工具為液相色層分析法，有很多種操作方式，以便應用在各種不同的蛋白質樣本。

1 酵素純化實驗室：

實驗室的設備與經營管理，在有形或無形中，影響實驗的品質或其成敗甚鉅。

1.1 儀器：

a. 基本設備：

小型儀器可歸納成 電泳 與 層析 兩大類，大型儀器主要有 離心機 及 光度計 兩類。

- (1) 基本設備有：純水製造系統、製冰機、高速冷凍離心機 (20,000 rpm)、微量離心機、電泳及轉印系統 (包含供電器)、ELISA 光度計，及各種層析管柱系統 (包含分劃收集器)。其中電泳與層析包含很多獨立的小型器具，使用上較複雜。
- (2) 個人電腦及周邊：今日的實驗室已經離不開電腦，不管是套裝軟體或者網路的應用，都不可缺乏。
- (3) 進一步的設備有：超高速離心機、冷凍乾燥機、超微膜過濾系統、雙向電泳、等電聚焦電泳系統、分光光度計 (UV 及可見光)、HPLC 或 FPLC。
- (4) 特別的設備有：液相閃爍計數器、原子吸收光譜分析儀、毛細管電泳，其他貴重儀器如：蛋白質定序儀、質譜儀、影像分析系統、分子結構電腦工作站。

b. 儀器管理及使用：

- (1) 每件儀器應指定專人管理，負責保管零附件、說明書，並做初級保養。儀器若不能正常使用，並發揮其最大服務功能，則其設置純為枉然。
- (2) 光學或精密儀器，應放在有除溼機的密閉室；發熱的器具應當集中放在通風良好處，並且注意電容量是否足夠，以免過荷造成災害。
- (3) 使用儀器前，要先熟悉操作法；有問題必請教管理人，使用前後應登記 (登入、登出)，有任何毛病要立刻反映，不可隱瞞。

c. 冰箱：

- (1) 應妥善規劃貯位，詳細表列內藏物品；藥品分類用小盒裝在一起 (貨櫃化)，勿零散堆積，以免臨時翻找費時，導致冰櫃失溫。

- (2) 零下的冷凍櫃，勿使用無霜冰箱；因為定時除霜裝置會造成冰箱內溫度上升，藥品可能會因反復『凍結-解凍』而失去活性；若不得已使用自動除霜冰箱，可裝在普利龍盒子內，使藥品傷害降至最低，也可減輕停電所造成的傷害。
- (3) 時時注意冰箱門一定要關好，尤其是零度以下的冰箱，若因門不閉緊而造成回溫，對藥品及冰箱都是大災難。

1.2 小型器具及消耗品：

a. 常用小型器具：

均質機或果汁機、磨粉機、pH 測定計、天平、水浴、冰筒、自動吸管 (20, 200, 1000 μL 三種)、磁鐵攪拌機、試管振盪器、試管架、滴管。

b. 公用器具：

應集中放在定位，用畢立刻清理歸位！自動吸管應經常校正，可吸取純水在天平秤之，每 1.0 mL 水應秤得 1.0 gm，若誤差在 3% 以上，立即送修。

c. 常用消耗品：

自動吸管頭 (黃色及藍色)、微量離心管 (microfuge tube)、大小離心管、濾紙、紗布、棉花、手套、擦拭紙、透析袋、保鮮膜、鋁箔紙及玻璃試管等。

1.3 藥品：

a. 貯存溫度：

- (1) 每種藥品有其最適當的貯存溫度，切要遵守；一般分為：室溫、4°C 及 -20°C 三種，又可依其為固体、液体或高純度者，分別置放。
- (2) 除了常用的大宗藥品 (如 NaCl)，較精密或不穩定的試劑 (如大部分酵素) 最好不要大量屯積，因為貯藏時間太久無法控制其品質。

b. 分裝凍藏藥品：

- (1) 由冰箱取出之藥品，應在充分回溫之後，才能開罐。
- (2) 使用極度頻繁的藥品，應分裝後凍藏 (aliquot)，每次取用一個分裝，可不用等待回溫，但用後也不再收回凍藏。

c. 藥品純度：

一般依純度及用途分為數級，如和光分為：化學用、一級、特級，Merck 藥品則分為：合成 (for synthesis)、特純 (extra pure)、生化用 (for biochemistry)、試藥 (pro analysis 或 GR)。各種等級的藥品，應當用在適當的實驗，否則不是浪費，就是因藥品純度不佳而致實驗失敗。

d. 注意添加物：

許多商品所供應的酵素，是保存在硫酸銨懸浮液中，可較為安定；但使用前要先透析，除去硫酸銨；否則在硫酸銨下分析活性，會造成誤判。也要注意酵素的來源，及其所含的鹽類，會不會影響你的實驗。

1.4 個人用品：

a. 個人藥品：

所有藥品一定要加標籤（圖 1.1），註明 日期、藥品名稱、使用人姓名 等，藥品名稱勿用暗號，以免日後連自己都忘掉是何試劑。試劑勿配製過量，因大多數的藥品在久貯後均不穩定；要檢查緩衝液內有無長霉！每個人的藥品應集中一處固定收存，切忌到處存放。

濃度	名稱	pH
1 M	Tris-HCl	pH 8.0
Juang	990608	
姓名縮寫		日期

圖 1.1 藥品試劑標籤

b. 立刻清洗：

玻璃用具（如試管、燒杯、三角瓶等）使用後，請儘量在當日清洗掉，這是最省時省力的。用清潔液浸泡時，不要用洗衣的肥皂粉，要使用液態的洗潔精，並應在兩日內清洗掉，因為可以說是『越泡越髒』的！

c. 做完實驗後：

一定要把所用過的 儀器、實驗桌、用具 等整理乾淨，回復原狀。離開前要從頭回顧，檢查所有使用過的儀器或實驗桌，也許會發現重要的藥品或樣本忘了收起來，或貴重的儀器忘了關機。

2 蛋白質抽取：

酵素的純化過程，約可分為三個階段：

- (1) 粗蛋白質 (crude protein)：採樣 → 均質打破細胞 → 抽出全蛋白，多使用鹽析沉澱法；可以粗略去除蛋白質以外的物質。
- (2) 部分純化 (partially purified)：初步的純化，使用各種管柱層析法。
- (3) 均質酵素 (homogeneous)：目標酵素的進一步精製純化，可用製備式電泳或 HPLC。

圖 2.1 列出其相關的純化及分析方法。

2.1 如何開始？

先考慮以下諸點：

5W

- a. 要純化那一個蛋白質？ What?
- b. 為何要純化此蛋白質？ Why?
- c. 由何種材料純化？ Where?
- d. 由那一個生長期？ When?
- e. 如何純化此蛋白質？ How?

2.2 材料來源：

a. 材料取得：

抽取酵素的材料來源，通常不外動物、植物及微生物，或可用動植物的細胞或組織培養。採樣時，應考慮在那一個生長期、在那一個器官或組織中，有最高的酵素含量。材料的採集會大大影響實驗的成敗，遇到材料採集有困難，或者材料品質不穩定時，更是花費時間、精神。一定要控制穩定的材料來源！

b. 材料的差異性很大：

植物細胞比起動物細胞，構造上有許多差異，在材料的選擇上，應特別注意。植物的細胞壁相當堅硬，要用相當大的力量去打破。其細胞內的區隔較動物細胞複雜，有很大的液泡，內藏低 pH 的溶液以及蛋白質等『有害』物質。另含有葉綠體及澱粉粒，亦是植物細胞的特徵。不同來源的材料，各有特定的採集或抽取問題，大多需要自行嘗試解決。

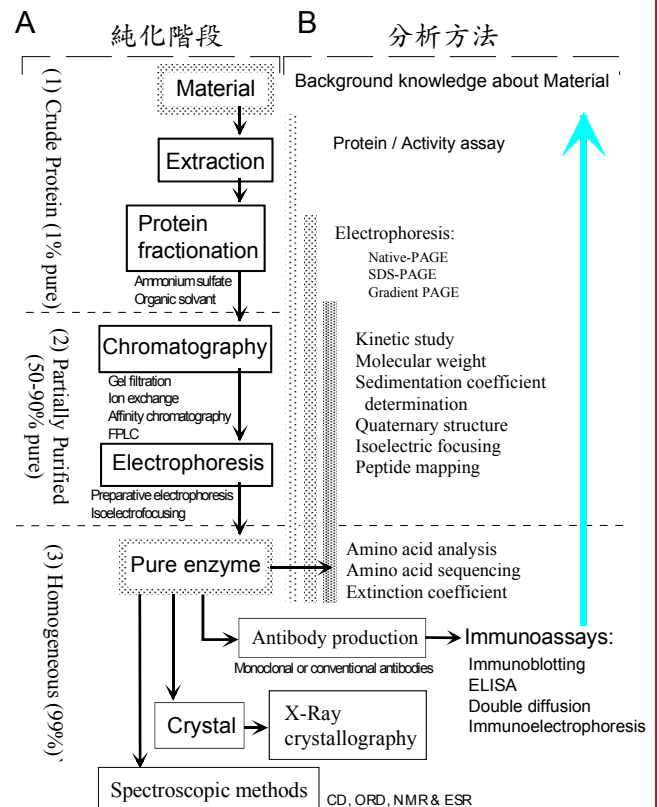


圖 2.1 酵素純化階段與各種分析方法

目標材料之選擇：

- 何種生物來源？
動物、植物、微生物
- 何種組織？
根莖葉花果或組織培養
- 何種胞器？
細胞核、液泡、葉綠體
- 胞內或胞外酵素？
- 水溶性或脂溶性？

c. 材料貯藏：

材料採集後馬上進行抽取，是為上上策；但很多情況下，材料必須冰凍貯存一段時期後，才進行抽取；則應在採集後，儘速置於零下 20℃，若能先以液態氮冰凍後貯於 -70℃ 則更佳。冰箱的除霜循環，可能對細胞造成傷害，要特別小心。解凍時要越快越好，但避免局部過熱。有些酵素材料可乾燥起來保存，在無水狀況下，酵素可免受蛋白酶或水分子晶體的破壞；一般用冷凍乾燥法，或製成丙酮粉末。

2.3 均質及抽取：

a. 打破細胞：

目標酵素若在細胞之內，則抽取的第一步驟，就是先打破細胞，有難有易。例如動物的紅血球，只要改變滲透壓即可脹破，但植物的癒創組織就很堅固，要用海砂用力研磨。有些實驗要使用細胞內的胞器 (organelle) 進行，則需以較溫和的方法打開細胞後，再用密度離心法分離各胞器；此步驟難度較高，要參考文獻多試方法。

b. 打破細胞的方法：

就一般材料而言，可能用到的方法列舉如下：

(1) 乾式：不用加緩衝研磨液，直接研磨成乾粉。

液態氮研磨：材料在液態氮中凍結，以研钵打碎材料後研磨成粉。

磨粉機：類似果汁機，原本使用在乾磨中藥藥材。

球磨機 (ball mill)：以小球增加研磨面積，多用在研磨酵母菌粉。

(2) 溼式：都要在低溫下研磨。

均質器：玻璃或鐵氟龍材質，是較溫和的研磨方法。

果汁機 (Waring blender)：每打一分鐘，要間歇數分鐘降溫，重複進行數次。

Polytron：高速電動研磨機，效率極高，目前最常用的均質器。

研钵：磨成細粉後的材料，再加入海砂或玻璃砂助磨；傳統而實用。

玻璃球 (glass bead)：以很細的玻璃球混在樣本中，用力振盪，可打破酵母菌。

超音波震盪 (ultrasonication)：以超音波打破細胞，多用在微生物材料。

French press：將樣本加壓快速通過細孔，以剪力破壞細胞。

c. 提高抽出率：

分泌性的酵素，多散佈在材料中，只要研磨均勻，大多可抽取得到。但在均質前，通常都要把材料先切成碎片 (增大表面積)，才容易進行抽取。很多情況下，要先以磨粉機或果汁機打碎，否則抽出率不會很高。材料亦可以液態氮急速冷卻，則組織變得很脆，可以磨得很細，提高抽出率，且可防止酵素活性喪失。注意有些材料不能研磨過度，以免細胞破得太碎。

d. 抽取緩衝液：

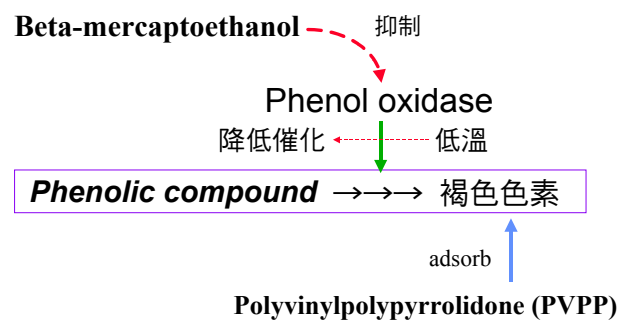
均質用的緩衝液體積，通常加入樣本體積的兩倍量以上，以四或五倍為宜，但事先磨成粉末的，有時要加到十倍以上才能均勻懸濁之。可把緩衝液分成二或三次分批抽取，可增加抽出率。

e. 注意干擾物質：

植物材料的均質過程要特別小心，因植物細胞在打破後，會劇烈降低其 pH 值。很多植物材料有含酚化合物 phenolic compounds，在空氣中很快氧化成褐色色素，因吸附性強故難以去除。含量較少者可在緩衝液加入 β -mercaptoethanol，降低催化其生成的酵素 phenol oxidase；量多時則以 PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) 吸附之 (圖 2.2)。植物本身所含的色素也很難去除，可能會干擾純化步驟。

植物材料的特殊問題：

- 細胞壁：較難打破
- 葉綠體：特有的酵素
- 液泡：有許多干擾物質
- 蛋白酶 (proteases)
- 多酚化合物 (polyphenols)
 - Alkaloid 生物鹼
 - Flavanoids 類黃酮
 - Tannins 單寧



f. 膜上蛋白質：

有些酵素附著在細胞壁或細胞膜上，不能以普通緩衝液溶出。則可先把材料製成 丙酮粉末 (acetone powder)，再加入緩衝液時，稍具水溶性的蛋白質就會溶出；但有時須在緩衝液中，加入 界面活性劑 (detergent)，溶出嵌在細胞膜中的蛋白質。常用的有 sodium deoxycholate 或 Triton，因後者屬非離子性分子，較不影響酵素活性及純化步驟，多使用之。

圖 2.2 多酚化合物的生成與防止

g. 去除混濁物：

均質後可以離心分開可溶與不溶部分，離心不易分開的，可再用過濾法；過濾時可加助濾劑，如 矽藻土 (celite)。離心後，在上清表面可能會有一層浮皮，多為脂質，可撈掉或以紗布過濾掉。

2.4 鹽析及沉澱法：

鹽析沉澱法可分離出樣本中的蛋白質。蛋白質在水溶液中的 溶解度，會因溶液中其它鹽類濃度的改變而增減，可利用來沉澱蛋白質。其原理是因於蛋白質分子表面電荷的改變，或者分子上 極性 或 非極性 區域與水分子間作用結果。

2.4.1 鹽析分劃法：

各種蛋白質沈澱方法的原理及應用，在以下各節以圖解 (圖 2.3, 2.4, 2.5) 說明之，並整理在最後的表 2.1。

a. 鹽溶 (salting in) :

(1) 等電點 (pI) 為蛋白質電荷性質的指標，若緩衝液的 pH 調至此蛋白質的 pI，則蛋白質分子的淨電荷為零，分子間的排斥力下降，凝聚成大粒子沉澱下來。此時若增加緩衝液的離子濃度 (如加入 NaCl)，則蛋白質的溶解度會漸漸上升，稱為鹽溶。

(2) 可能是鹽類離子包圍蛋白質表面，與分子上的帶電基團或極性區域作用，進而增加水合效果所造成的。

(3) 利用前者在蛋白質 pI 沉澱的特性，可純化該酵素，但需注意有些酵素在其 pI 沉澱後，不容易再溶解。

Salting-in:

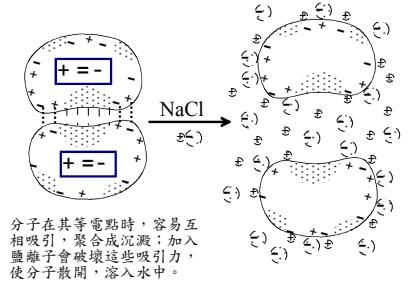
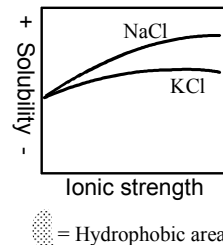


圖 2.3 鹽溶 salting in 方法的原理圖解

b. 鹽析 (salting out) :

(1) 蛋白質分子表面上非極性區域附近的水分子，被迫滯留在此區域附近，以便藉此把蛋白質分子溶入水中。

(2) 若外加入大量離子 (如硫酸銨)，則這些滯留的水分子會被抽出，與新加入的離子產生水合，因而暴露出蛋白質上的非極性區；蛋白質分子間，因此得以非極性基團互相結合，造成大的沉澱粒子，稱為鹽析。

Salting-out:

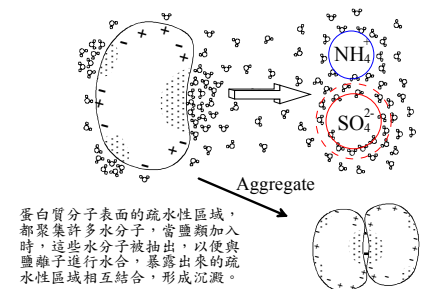
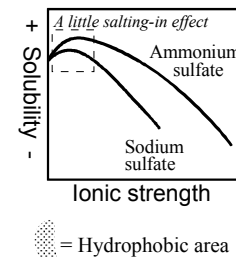


圖 2.4 鹽析 salting out 方法的原理圖解

c. 硫酸銨 (ammonium sulfate) :

(1) 硫酸銨是一中性鹽，對蛋白質有相當好的安定作用。又因為其離子容積較大，吸走水分子的能力也大，成為有效的鹽析工具。

(2) 通常硫酸銨的添加以百分飽和度來表示 (不是濃度百分比)，例如大部分蛋白質可在 80% 硫酸銨飽和度下沉澱。因為硫酸銨加入的體積很大，會改變最後的總體積，很難由濃度百分比來計算，因此使用百分飽和度作為沈澱蛋白質的度量。

(3) 飽和度隨溫度變化稍有差異，25°C 下的飽和濃度為 4.1 M，即每公升加入 767 克固体硫酸銨；0~100% 之間各飽和度的添加量要查表，而不是以 767 克直接乘以其百分比值 (%)。

(4) 各種蛋白質，因其表面的非極性區域分佈不同，各在其特定的硫酸銨飽和濃度下沉澱，一般做為初步的純化。

d. 如何使用硫酸銨：

- (1) 硫酸銨容易吸收空氣中的水分而結塊，因此使用前最好先把硫酸銨磨碎，平鋪在烤箱 (約 60°C) 內烘過，切勿過熱。
- (2) 添加硫酸銨時，要在冰浴中進行，不可一次把硫酸銨倒入，而以小量分多次慢慢溶入，並不時攪拌，以免造成局部濃度過高。硫酸銨全加完後，再攪拌約 10~30 min，使溶解完全平衡，然後進行離心，注意所要的是沉澱或上清，要弄清楚！
- (3) 最後所得的沉澱溶解在最少量的緩衝液中，或者以沉澱形式保存，均相當安定；但要記得其中所含的硫酸銨，是否對下一步檢定或純化有影響，可以透析法除去之。

2.4.2 有機溶劑沉澱法：

a. 降低水活性：

若在蛋白質溶液中加入有機溶液，如丙酮或乙醇，因稀釋水濃度而降低水活性，則蛋白質上親水性區域的水合度降低，開始聚集在一起，產生沉澱。

也可看作有機溶劑降低溶液的介電常數，使蛋白質的溶解度降低。應當注意，有些細胞膜上的蛋白質，本身含有很多疏水性區，在有機溶劑中反而易溶。

Organic Solvent Precipitation:

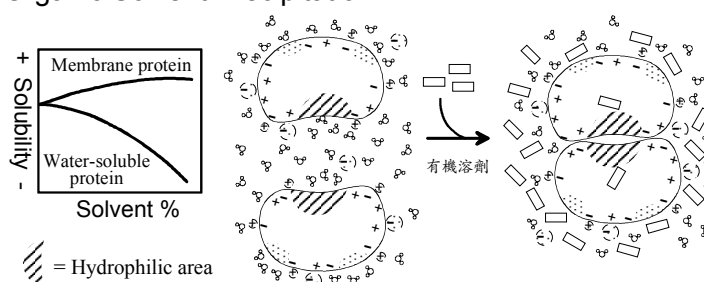


圖 2.5 有機溶劑沈澱法的原理圖解

b. 使用有機溶劑：

要先把溫度降至零度左右，緩緩加到蛋白質溶液中，並一邊攪拌使生沉澱。以丙酮為例，大多以 20~50% (v/v) 濃度來沉澱蛋白質；注意其中的 v/v 乃指加入前的體積；因丙酮與水混合後，體積會稍微縮小。溶液中若有高濃度鹽類，則會影響沉澱行為，以 0.05~0.2 M 離子強度為限度。

c. 沉澱收集：

此法所得的沉澱粒子較大，以重力沉降即可收得沉澱，但一般仍以離心收集，以增加回收，並可去除丙酮。蛋白質沉澱可涼乾，或在布氏漏斗中以少量乙醚洗過製成粉末；所得沉澱中的有機溶液並不多，通常並不影響下一步驟。

2.4.3 其它處理法：

a. Polyethylene glycol (PEG):

- (1) PEG 是一種水溶性的高分子聚合物，分子量 4,000 以上的 PEG 可以用來沉澱蛋白質，其作用原理類似有機溶液，但使用濃度較低。
- (2) 較麻煩的是 PEG 不易由蛋白質沉澱中除去，幸而 PEG 通常並不影響下一步純化步驟。

b. 去除核酸及多醣：

- (1) 樣本溶液中若有大量核酸，可以加 **protamine sulfate** 與之產生沉澱，再以離心去除之。
- (2) 碳水化合物較難完全去掉，通常期望在蛋白質沉澱時，或往後的層析法能去除。二者都可以用對應的水解作酵素分解，但價錢昂貴。

c. 特殊處理：

有些較特別的酵素，具有特殊性質，可利用在純化上。例如 **RNase** 對熱非常安定，可耐得 100℃，因此可把粗酵素液加熱煮沸，除去其它蛋白質。對強酸、強鹼或有機溶劑的特殊安定性，亦可利用之。不過使用這些嚴苛的處理方法時，要特別小心控制好其正確條件。

表 2.1 各種鹽析及沉澱法的比較：

	Salting in 鹽溶	Salting out 鹽析	有機溶劑沉澱
影響因素	蛋白質分子表面的帶電基團	蛋白質分子表面的非極性基團	除了 hydrophobic 之外的其他作用力
試劑	NaCl (單價離子)	硫酸銨 (兩價離子)	甲醇、丙酮等有機溶劑
發生機制	蛋白質在其 pI 下，因淨電荷為零而聚集沉澱；若加入鹽類，會阻礙其聚集而增加溶解度。	硫酸銨的兩價離子，在溶液中搶走附在蛋白質表面 (非極性部分) 的水分子，使得非極性部分相互吸引而聚集沉澱。	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，而聚集在一起。
圖	圖 2.3	圖 2.4	圖 2.5
其它說明	對較低濃度緩衝液進行透析是 salting in 的反向過程。	1) 非極性蛋白質較早沉澱下來。 2) 在硫酸銨中蛋白質相當穩定。	1) 部分蛋白質會變性。 2) 有助沉澱的因素：蛋白質分子量大、緩衝液 pH 靠近 pI。 3) 脂溶性蛋白質的溶解度反而增加。

3 色層分析法：

3.1 色層分析法原理：

a. 系統組成：

層析系統的兩個主要組成為 固定相 (stationary phase) 及 流動相 (mobile phase)，二者各有不同的極性或非極性強度；樣本分子因其自身極性的強弱，與此二相之親和力不同。與固定相親和力大者，易留滯原地；與流動相親和力大者，易隨流動相移動，因而達成分離的目的。圖 3.1 以圖解說明此一機制。

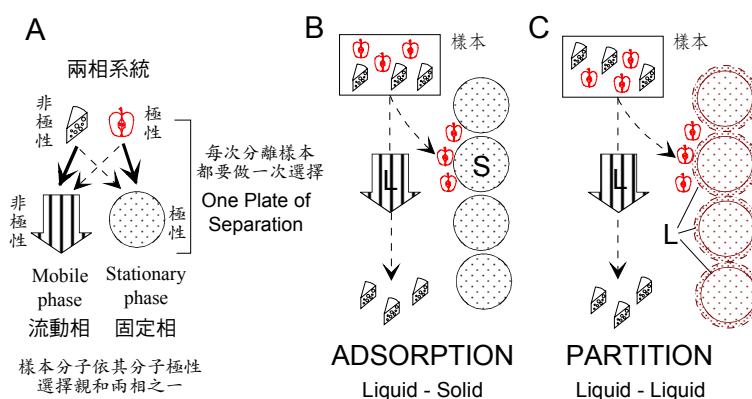


圖 3.1 色層分析方法的基本原理圖解

b. 極性大小：

這種親和力的產生，決定於樣本或兩相物質之化學本質，是屬極性或非極性，而遵循『Like dissolves like』的原則；即極性分子易溶入極性的固定相或流動相，非極性分子則易溶入非極性者；一個樣本分子，則依其極性大小在此兩相間做選擇。

c. 方式很多：

因固定相或流動相可能是 固 (S)、液 (L) 或 氣 (G) 相之一，故有多種方式：

Partition chromatography: 固定相 (L) 流動相 (L) 例：PPC, TLC, 膠體過濾

Adsorption chromatography: 固定相 (S) 流動相 (L) 例：TLC, 離子交換

Gas-liquid chromatography: 固定相 (L) 流動相 (G) 例：GC

d. 常用的層析方法：

表 3.1 各種大小分子的色析法應用：

適用於	Partition	Adsorption
小 分 子	Paper partition chromatography	離子交換法
	Thin-layer chromatography	Thin-layer chromatography
	反相層析法, GC	GC
大 分 子	膠體過濾法	離子交換法
	反相層析法	親和層析法
		疏水性層析法 (HIC)

◆ 我們只討論大分子的層析法

3.2 膠體過濾法：

3.2.1 原理概述：

膠體過濾屬 *partition* 層析法，流動相為溶離緩衝液，固定相為膠體孔隙內的緩衝液。溶質（樣本蛋白質）根據其分子量的大小，決定分佈在這兩相的比例。分子量大的不易進入膠球，隨流動相溶離；分子量小的，則易竄入膠球內的固定相，而被延滯流出膠柱（圖 3.2）。分子的形狀、大小均為影響因素，即與其分子半徑 (Stokes radius) 有關，與分子量不完全成正比關係；但一般均視蛋白質為球形，故其形狀較無影響力。

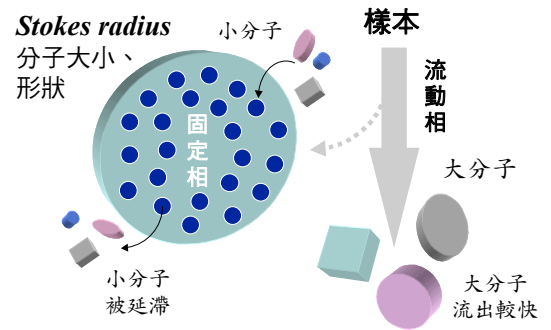


圖 3.2 膠體過濾法的原理

3.2.2 膠體介質 (support, matrix)：

膠體介質是三次元的網狀小球，由長鏈聚合物交織而成，有三大類不同材質。

a. Dextran：

是葡萄糖組成的多醣長鏈，經過架橋修飾，成為內部有均勻孔道的小球。由 Pharmacia (瑞典) 開發的產品有下面數種：

- (1) Sephadex G 系列：是最早推出的介質，有各種適用分子量範圍，如 G-10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200 等，數字越大，表示膠球孔徑越大，其適用的分子量就越大。注意 G-150 以上的膠體，在高壓下會被壓垮而使流率變慢，甚至無法流通，應改用 Sephacryl 或 Sepharose 系列。G-25 以下者，可為蛋白質脫鹽 (desalting) 用。
- (2) Sephacryl S 系列：額外使用 Bis 做架橋支持，因此比 Sephadex 有更好的耐高壓能力。有 S-200, 300, 400, 500, 1000 等不同孔徑，適用分子量大的樣本，但注意它有很高的非專一性吸附，要小心蛋白質被『吃掉』！最好用鹽濃度較高的溶離緩衝液 (0.2 M NaCl)。
- (3) Sephadex LH 系列：Sephadex 上的 OH-基團被修飾成 hydroxylpropyl 衍生物，成為 LH 系列，疏水性較大，可兼用在極性或非極性緩衝液。

b. Agarose：

洋菜醣是由海藻抽出的直鏈聚醣，長鏈分子間以氫鍵架橋，形成三次元膠體，可以濃度來控制孔徑大小。故有些 agarose 材質的膠球，不能加高熱，否則會融成一塊膠片 (如培養用的洋菜膠)；用在分子量特大的分子 (如核酸) 或粒子 (如病毒)。

- (1) Sepharose 及 Sepharose CL 系列：CL 系列特經架橋反應補強，可耐高壓高溫。各有 2B, 4B, 6B 三種，數字表示含膠百分比，數字越大孔徑越小，與 Sephadex 相反。

(2) Bio-Gel A 系列：Bio-Rad 有 A-0.5M, A-1.5M, A-5M, A-15M, A-50M, A-150M，數字表示其所適用的最高分子量，以百萬為單位。

c. Polyacrylamide：

像電泳膠體一樣，有固定大小的孔徑，經製成小球，供層析分離之用。商品為 Bio-Gel P 系列 (Bio-Rad)，有 P-2, P-4, P-6, P-10, P-30, P-60, P-100, P-150, P-200, P-300 等，最高可使用在分子量 300,000 者，高壓之下的流速亦會變慢。

d. 膠球大小：

- (1) 膠球粒有一定大小，一般可分為 coarse, medium, fine, super fine 四種粗細 (grade)；越粗的膠體，流率越好，但解析力越差。因膠球外面的緩衝液是由膠球表面向內擴散，樣本蛋白質也是以擴散方式進入膠球，再由中心向外擴散出來，因此膠球半徑越大，擴散距離越大，效果越差。
- (2) 下圖 3.2 說明這種傳統擴散式介質的機制。而近年來因材料科學的進步，發展出通透性特強的膠球，緩衝液可直接浸潤而進入膠球，不需經擴散作用，是為 dispersion 彌散式的膠體，效果較好且快速。

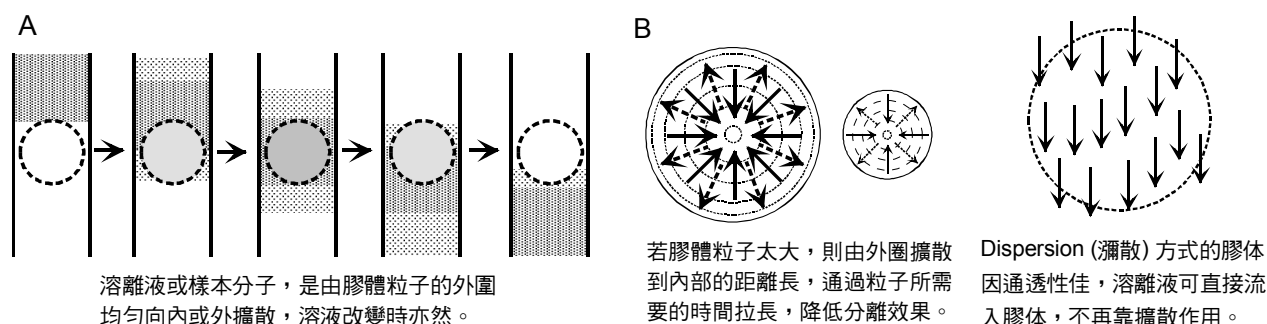


圖 3.3 溶離液是以擴散方式進出膠體

3.2.3 膠體管柱：

a. 管柱性質：

膠體過濾都以管柱方式進行，不論使用何種介質，管柱的性質大致可以預測 (圖 3.4)：當管柱裝填完成，若膠柱總體積為 100 mL (total volume, V_t)，則膠柱內液相總體積約 90 mL (liquid volume, V_l)，其中流動相的體積 (即介於膠球之間的緩衝液總體積, void volume, V_o) 約為 35 mL，樣本分子則應於 35~90 mL (V_e) 間溶離出來。如同 TLC 的 R_f 值，膠體過濾也有表示樣本溶離程度的指標 (K_{av})；樣本的 K_{av} 與分子量成反比，因此可用來作分子量的測定。現在多直接以溶離體積表示樣本溶離程度。

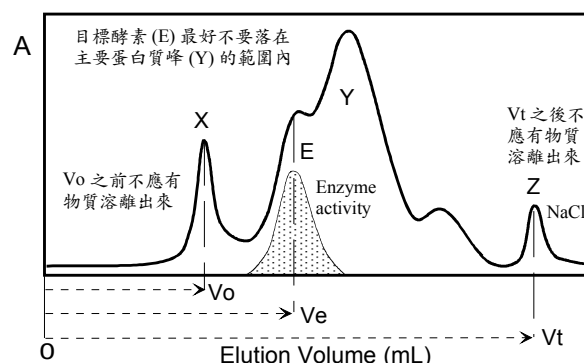


圖 3.4 膠體過濾法的典型溶離圖譜

b. 內在因素：

膠體過濾法在操作時，有些內在的問題，會影響結果的好壞：

- (1) 擴散及亂流：由於是在液相中進行，樣本在膠柱中的擴散現象相當顯著；又因液体在膠球間流動時，受重力及對流的影響，會造成亂流。擴散及亂流都會使膠體過濾的解析力降低甚多。
- (2) 管柱設計不良：經常是致命的傷害，例如無效空間 (dead volume) 過大、緩衝液進入膠體時流動不均、溶離液出口端的管路太長或太粗等。

c. 解決擴散及亂流：

若降低膠球粒子的大小，則可改善之；因此越細的膠球，其解析力就越佳。但膠體若太細，會造成流速下降，則要用更大的壓力進行溶離，許多膠體耐不住如此高壓。因此若補強膠體材質，以架橋來支持膠體構造，或改用矽膠質為材料，可改善流率並增加解析力，即成為 HPLC 系統。使用上述的 dispersion 式膠體，也是解決方法。

d. 膠體的選擇：

取決於所要分離蛋白質樣本分子量的大小，並且預期溶離出來的蛋白質峰，可出現在 V_o - V_t 區間的前半段，以降低因擴散所造成的不利影響 (使目標蛋白質早些溶離出管柱)。通常分子量大於十萬可用 Sepharose CL 系列，小於五萬者用 Sephadex G-100 以下，其間則使用 Sephacryl S-200 或 300。避免使用 Sephadex G-150 或 200，因其流率不佳；其它廠牌相對應的產品，亦可使用之。

e. 管柱大小：

視所要分離樣本的體積而定，一支膠體體積為 100 mL 的管柱，可分離 1~3 mL 樣本。膠體過濾管柱以細長較妥，通常直徑為 1.6 或 2.6 cm，長度 80~100 cm，太長者擴散作用明顯。大量生產時，製備式管柱多使用矮胖型，以增加流率。

f. 管柱系統：

完善者包括下列各部分 (圖 3.5)：

緩衝液 (1) → 幫浦 (2) → 管柱 (3)
→ 監視器 (4) → 分割收集器 (5)

其中監視器並非必需，管柱種類很多，上等備有 adaptor 可降低無效空間，且使用上方便許多。通常要在冷房中操作，因此儀器的維護要更小心；取出冷房後要立刻在乾燥環境下烘乾回溫，以免潮濕造成短路或發霉。梯度製造器使用在離子交換。

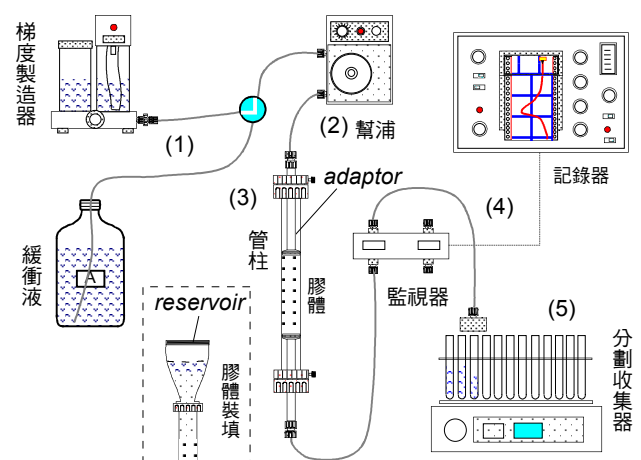


圖 3.5 液相層析管柱系統

3.2.4 管柱操作：

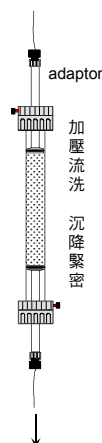
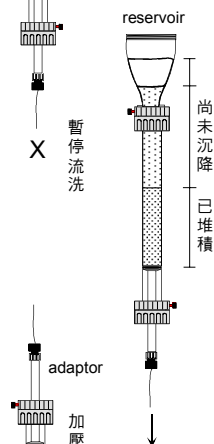
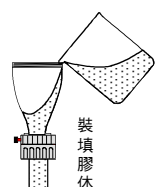
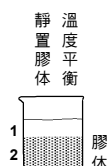
a. 膠體處理：



許多膠體是乾燥粉末，使用前要先行膨潤，如 Sephadex, Bio-Gel P；其餘如 Sephacryl, Sepharose (CL), Bio-Gel A 均為已膨潤者，直接在玻璃漏斗以緩衝液洗過即可裝填；若有需要，可以減壓幫浦抽去氣泡。注意 Sepharose 及 Bio-Gel A 不可加熱或高壓滅菌。由管柱大小算出所需膠體的體積，再加一成。

b. 膠體裝填：

以下是裝填膠柱的詳細步驟，最好實地觀看示範操作或錄影帶。



- (1) 洗好的膠體浸在緩衝液中，靜置過夜使之沉降，把上清部份的體積調為膠體體積的一半 (左圖 膠體佔三分之二)。
- (2) 先把各儀器連結好，確定可正常運作，架好管柱，注意要確實垂直地面。
- (3) 若要裝填較高的膠柱，則要裝上 reservoir，否則最多只能裝填七成高管柱。
- (4) 先在管柱內加一些緩衝液 (約 5 cm 高)，看能否順利流出，關住出口。
- (5) 把上述膠體攪拌均勻，成為懸濁液，但勿產生氣泡。
- (6) 沿著管柱的管壁，慢慢倒入膠體；勿粗魯灌入，以免生成氣泡 (左圖)。
- (7) 一口氣倒完後，等約 1 min 後打開出口，膠體開始沉降。
- (8) 不久整隻管柱分成三層 (左圖)，最上為澄清的緩衝液，下層為已堆積好的膠體，顏色較白，中層為尚未沉降的膠體。勿使上方緩衝液層乾掉。
- (9) 膠體完全沉降後，應得到預計的膠體高度，否則要追加或挖去膠體；要添加膠體時，先把膠柱上方約 5 cm 高的膠體均勻懸濁後再加入。
- (10) 除去 reservoir，加上 adaptor，注意系統中不能有任何氣泡 (左圖)。這個步驟較易出問題，請仔細研究清楚所有細節，小心練習好才進行。
- (11) 連通整個系統，檢查系統的封閉性，調整幫浦流速。
- (12) 以較高的流速洗 (45 mL/h, 約 150% 流速)，以平衡完全。通常膠體裝填時的流率，要比操作時稍高；Sephacryl 則要更高流速，但當使用 Sephadex G-100 以上者，只能用平常流速，否則膠體會被壓垮。
- (13) 膠體面可能會下降，adaptor 要再往下壓，以完全接觸膠面。
- (14) 以正常流速 (約 30 mL/hr) 流洗數小時，可洗過夜，同時準備樣本。

c. 樣本體積：

- (1) 體積限定在膠柱體積的 1~3%，可加甘油增加密度。
- (2) 有 adaptor 的管柱較方便，可用幫浦注入，否則要直接把樣本加在膠體表面上。吸去上方緩衝液後，小心注入 (乾式)；或不吸去緩衝液，把密度較大的樣本，在緩衝液中直接加入，讓它自動沉降在膠體表面 (溼式)。
- (3) 樣本溶液不可有沉澱，否則要先離心除去之，太濃或太稀均不適宜。注

入樣本應極為小心，勿破壞膠体表面！

d. 溶離速度：

以直徑 1.6 或 2.6 cm 管柱而言，通常每小時流速約 30 mL 左右，較粗的管柱可加快，Sephadex G-150 或 G-200 要減慢，而 Sephacryl 溶離速度可加快一倍。收集約定在每 2-5 mL 一分割，但可依情況自行增減，最好使用分割收集器，讀滴數、秒速均可；要注意勿讓膠体乾掉，也要小心收集器很容易出毛病。

e. 管柱保存：

- (1) 膠体暫不使用時，可在緩衝液中加 NaN_3 (0.01%) 流洗一次，關好出口。
- (2) 長期不用時最好取出膠体，在玻璃漏斗中以 PBS 洗過數個體積後，保存在 4°C 中，再加數滴 NaN_3 防菌。
- (3) 若發覺膠体太髒，可用 0.2 M NaOH 或 NaCl 先洗過，再以緩衝液平衡；再度取出使用時，要注意有沒有長霉 (黑色棉絮狀小球)，膠体有無結塊。
- (4) 已膨潤的膠体應貯於 4°C ，但切勿貯藏在零下的溫度，膠体結構會破壞掉；乾粉或未尚未開封者，可貯於室溫。
- (5) 膠体外表看來都一樣，一定要標示好，以免混淆不清；千萬不要把兩種膠体混在一起，結果會很淒慘！

3.2.5 問題及解決：

a. 管柱裝填：

膠柱是否良好，可跑 Blue Dextran (Pharmacia) 試之，藍色色帶應平穩地往下移動，色帶厚度會稍加寬，但不該有拖尾、變斜，甚或成為不規則亂流！也可用手電筒在管柱後方打光，看膠体中有無氣泡。

b. 溶離緩衝液：

流速太快會造成分離結果不好，通常是色帶拉長或呈現不規則。緩衝液中的離子濃度有相當影響，通常不能使用蒸餾水來溶離。樣本分子在通入膠体後不久，其緩衝液即被管柱中的緩衝液所取代；若此二種緩衝液不同，則因離子濃度的改變，某些蛋白質可能會鹽析出來，沉澱在膠面。

c. 活性消失：

有些樣本蛋白質，需要金屬離子、輔酶、輔因子等小分子，共同達成其活性，在通過管柱後，可能被排除而失去活性。可在活性分析時補充，或可在溶離緩衝液中添加。若回收量太低，注意膠体有無吸附現象。

d. 使用溫度：

膠体管柱由冷房移到室溫後，會漸生成小氣泡，不能再用。由高溫處移至低溫處時，則無此問題。緩衝液也有同樣現象，應當注意。

e. 老舊膠柱：

管柱經長期未使用，要注意有無長霉，管柱有無乾裂 (用手電筒檢查)。使用太多次數後，膠柱最上方的表面會有沉澱或變得較髒，可稍挖去表層，再小心輕輕攪拌，使膠体表面重新沉降平整，對結果影響不大。

3.3 離子交換法：

離子交換法乃利用分子的帶電性質進行分離，解析力好且具多樣性，是重要而應用極廣的純化方法。

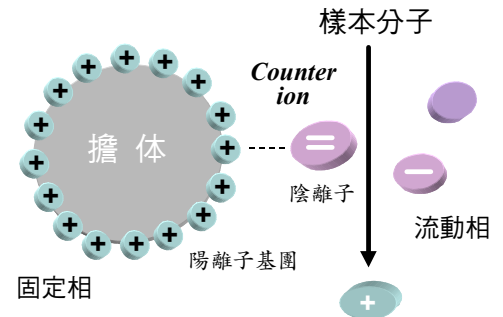


圖 3.6 離子交換法原理

3.3.1 原理概述：

a. 離子交換法：

是一種 adsorption 層析法，流動相為溶離緩衝液，固定相為介質擔体表面的帶電基團。樣本中各種離子，與介質表面帶電基團間的親和力強弱不同，吸附上去之後，可使用不同離子濃度的緩衝液，分別溶離出這些成分 (圖 3.6)。

b. 兩大類離子交換介質：

由介質帶電基團的不同，可分為兩大類：介質-帶電基團 (counter ion)

1) 陽離子交換介質 (cation exchanger)：擔体-陰離子基團 陽離子

2) 陰離子交換介質 (anion exchanger)：擔体-陽離子基團 陰離子

c. Pecking order：

離子交換的進行，可視為各種 counter ions 間，對擔体介質上帶電基團的爭奪戰，離子 (包括蛋白質) 競爭著佔到固体介質上；其競爭優勢順序如下 (圖 3.7)：

(1) 帶電荷高者取代帶電荷低者。

(2) 電荷相同時，原子序 (或離子体積) 大者優勢。

(3) 濃度 可克服以上兩種優勢，高濃度氫離子可取代其它陽離子。

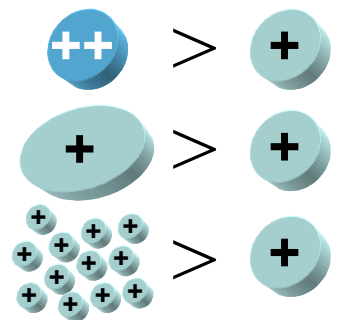


圖 3.7 離子取代順序

d. 離子取代優先順序例：

陽離子：兩價陽離子 > NH_4^+ > K^+ > Na^+ > H^+ > Li^+

陰離子： I^- > Br^- > Cl^- > HCO_3^- > CH_3COO^- , OH^-

3.3.2 離子交換介質：

a. 介質種類：

(1) 離子交換介質的種類很多，歸納起來分為 陰離子 及 陽離子 兩大類；每一類又依其帶電基團的強弱，分為 強、中、弱 三種。

- (2) 另外依介質的材質不同，略分為 合成樹脂 (resin) 及 聚醣 (glycan) 兩種，前者對蛋白質的純化並不適用，只用在小分子樣本的分離上。
- (3) 聚醣多使用 Sephadex, Sepharose, cellulose 等為擔體，在糖分子加上帶電基團；而 cellulose 又有做成結晶球形的 Sephacel，可增加膠柱的流率。

表 3.2 各種離子交換介質

陰陽強弱分類		Resin / Polystyrene		Glycan / Cellulose (= X)	
Anion Exchanger	Strong	Dowex-1 Dowex-2	$^+ \text{NR}_3$	TEAE-X (QAE-X)	$^+ \text{NR}_3$
	Weak	Dowex-3 IR-45	$^+ \text{NHR}_2$	DEAE-X	$^+ \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHR}_2$
Cation Exchanger	Strong	Dowex-50	$^- \text{SO}_3$	Phospho-X	$^- \text{PO}_4$
	Weak	IRC-150	$^- \text{COO}^-$	CM-X	$^- \text{CH}_2\text{COO}^-$

X = Sephadex, Sepharose, Sephacel or cellulose

b. 選擇交換介質：

- (1) 若已知樣本蛋白質的 pI，則先選擇適當緩衝液的 pH，使蛋白質帶有正 (或負) 電，而採用陽 (或陰) 離子交換介質。
- (2) 若尚不知樣本的 pI 時，則可用試管裝少量介質，在各種緩衝液 pH 下，加入樣本蛋白質，然後測上清中有無酵素活性，即得知樣本蛋白質有無吸附上去，可選得適當的介質及緩衝液 pH。

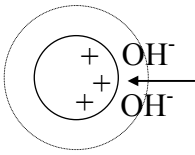
c. 一般使用：

- (1) 通常在純化蛋白質時，都使用較弱的離子交換介質，如 DEAE 或 CM；介質則用聚醣類為材料，多使用 Sepharose CL-6B 或 Sephacel，而不用體積變化太劇烈的 Sephadex，或流率較差的 cellulose。
- (2) Sepharose 本來有膠體過濾的作用，應用在離子交換時，作用並不明顯；但在分離異構酶時，因各個異構酶的分子量相近，不要使用。
- (3) DEAE 型膠體使用的 pH 不能高過 9，CM 者不能低於 pH 6，否則介質會失去原先帶有的電荷。

d. 介質容量有限：

- (1) 離子交換介質與蛋白質的結合量有一定限度，稱為該交換介質的 容量 (capacity)；若超過此一容量，多出的樣本會直接流出。
- (2) 交換介質的結合容量大小，受層析條件不同、蛋白質種類不同、緩衝液不同、pH 或離子濃度不同等，有很大的差異。如 DEAE-Sepharose CL-6B 每 100 mL 可結合 11 克白蛋白，但對 ferritin 只有 0.4 克。

e. 介質表面的微環境：



- (1) 由於交換介質的帶電性，其微視環境中的 pH，並不成為一均勻的狀態。
- (2) 緊靠近介質表面的 pH，要比外圍緩衝液的 pH 相差一個 pH 單位左右：陰離子交換介質高一個單位，陽離子者低一個單位 (稱為 Donnan effect)。

f. Hydroxylapatite：

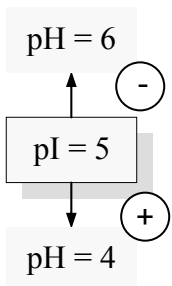
- (1) 可與 DNA 或 RNA 結合，原本用在分離單股與雙股 DNA，是一種結晶型的磷酸鈣，其作用機制不很清楚，但顯然與其帶電性質有關。
- (2) 操作法與離子交換法類似，在低離子濃度時使蛋白質結合上去，再以高濃度溶離下，但較複雜；不同的鹽類 (如 磷酸鹽, NaCl 或 CaCl_2)，會有不同的溶離結果，要以實驗嘗試求得。

3.3.3 緩衝液與層析系統：

a. 緩衝液種類：

可能會影響離子交換結果，例如 DEAE 介質若使用磷酸緩衝液，則其中的磷酸根離子 (帶兩個負電) 與交換介質的結合力相當強，會影響樣本蛋白質的結合。但反過來說，此時能夠結合上去的離子，一定有相當的強度。

b. 緩衝液的 pH：



- (1) 可定在樣本蛋白質 pI 的上或下一個 pH 單位，使樣本分子帶有正確電荷，能夠結合到所選用的介質上去，但又不會太強，以免難以溶離下來。
- (2) 用酸鹼度溶離時，當緩衝液的 pH 趨近樣本分子的 pI 在 0.5 pH 單位以內，蛋白質會開始溶離出來。
- (3) 所用緩衝液的離子濃度，在不影響蛋白質與介質的結合能力下，儘量採稍高的濃度，以降低非必要性的吸附，通常在 10~100 mM (NaCl) 之間。

c. 膠體 pH 要平衡好：

決定緩衝液的 pH 與離子濃度後，交換介質要先平衡在此緩衝液中，如膠體過濾法一樣，可在玻璃漏斗中進行。為加速平衡達成，交換介質可先用 10× 濃度緩衝液浸泡沖洗，然後再用 1× 者徹底洗過。

d. 管柱系統：

離子交換法所用的管柱系統，其要求比膠體過濾法嚴格，最好使用附有 adaptor 的 Pharmacia 管柱 (K 或 C column)，可降低無效空間，避免梯度破壞。與膠體過濾相反，多使用矮胖型的管柱，太長並無必要。

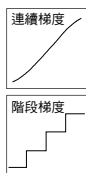
e. 膠體裝填：

裝填方法與膠體過濾法一樣，但要求反較不嚴格；裝填完成後，要以緩衝液洗過數個體積後方可使用。不能使用 Blue Dextran，只用手電筒檢查有無氣泡。Sephacel 或 Sepharose 介質可耐高流速的壓力，但流速過快可能影響解析力。

3.3.4 管柱操作方法：

a. 樣本蛋白質液：

樣本必須平衡在管柱所使用的緩衝液中，否則要先對緩衝液透析。樣本溶液的體積並無限制，因蛋白質會結合到交換介質上，溶離下來時有濃縮效果；若目標蛋白質不吸附到介質，而直接通過交換介質，則其條件同膠體過濾法。

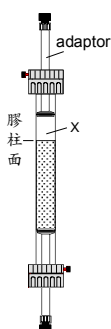


b. 溶離方法：

(1) 可用 pH 或 鹽 梯度；溶離方式有 連續梯度 (continuous gradient) 及 階段梯度 (stepwise gradient)。

(2) 但 pH 的連續梯度不容易拉得好，因此一般較少使用，可改用階段梯度，或 色層聚焦法。

(3) 由於是以濃度的梯度來溶離，因此在離子交換管柱中，膠體上方不能積有緩衝液層 (無效空間，如左圖 X 所指)，否則做好的梯度會在此處破壞，失去梯度的連續性；因此離子交換管柱最好能使用 adaptor。



c. 梯度體積：

會影響結果，通常溶離體積較大時，解析度較佳；但體積太大時，會使溶離出來的蛋白質濃度變稀。而梯度的上下範圍 (如 0~0.3 M NaCl) 也要適當，範圍太寬或太窄，均會降低解析度；都要以實驗試出最佳條件。

d. 膠體再生：

(1) 蛋白質全部溶離出來後，交換介質要經過 再生 (regeneration) 後，才能再次使用。

(2) 以 1~2 M NaCl 即可洗去雜蛋白，徹底清洗可用 0.1 M NaOH 流洗；陰離子交換介質可用 1 M 醋酸鈉 (pH 3.0) 洗 1.5 個體積；再以緩衝液平衡完全，才能再度使用。

(3) 可測流出液的 pH 或離子濃度，是否與加入的緩衝液一樣。也可把膠體取出，在燒杯或漏斗中徹底清洗。大多數失敗是因於 再生不良！

e. 批次法：

離子交換法不一定要在管柱中進行，也可在燒杯中以 批次法 (batch) 吸附並溶離蛋白質，一般應用在工業上的大量純化，其效果較差。

3.3.5 色層聚焦法 (chromatofocusing)：

a. 也是一種離子交換法：

(1) 若非使用 pH 梯度進行溶離不可，則可改用 Pharmacia 發展的色層聚焦法。此法使用類似 DEAE-Sepharose 的陰離子交換介質 (polyethyleneimine agarose)，在管柱中以特殊的緩衝液 (Polybuffer) 流洗以形成 pH 梯度。

(2) Polybuffer 中含有如同 等電聚焦法 所使用的 ampholyte，以較低的 pH 通入

管柱，與介質上面的鹼性基團中和，由酸（上方進入管柱處）漸鹼（出口處），直接在管柱中形成 pH 梯度。

b. 作用機制：

樣本蛋白質進入色層聚焦管柱後，先遇到較高 pH 環境（介質），通常高於其 pI 而帶負電，因此會結合到介質上。當 Polybuffer 開始注入管柱，降低環境 pH，使樣本分子失去負電荷而溶離下來；蛋白質便依 pI 大小順序，pI 高的先溶離出來；同時會集中在其 pI 的地方，成為一條極細色帶，故稱為聚焦法。

c. 注意發生沉澱：

有些酵素若處在其 pI 的環境，會發生不可逆的沉澱而失去活性，則不適用以 pI 為分離基礎的純化方法。一般較少使用色層聚焦法，除非一定要以 pI 或 pH 梯度來作分離，否則儘量採用其他方法。

3.4 親和層析法：

兩蛋白質分子間親和力之形成機制，請參閱 B1 生物化學 p.68 及 p.86。

3.4.1 原理概述：圖 3.8 說明此純化過程之原理。

a. 固定相為親和基團：

- (1) 親和層析法的固定相為一固相擔體，上有專一性親和基團 (A)，流動相為溶離緩衝液。
- (2) 當樣本通過管柱時，與親和基團有專一性的分子 (B) 結合到固定相上，非專一性分子 (X) 則隨流動相洗出管柱。

- (3) 留在定相上的分子 (B)，可用酸或鹼溶離，或用專一性游離分子溶離。

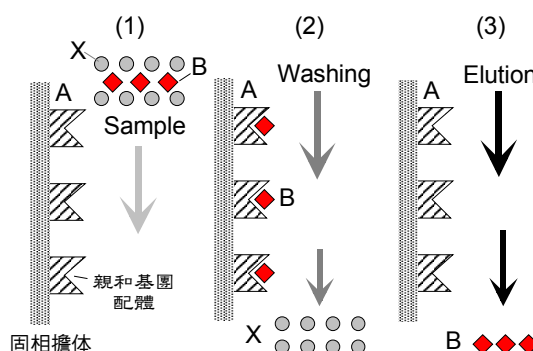


圖 3.8 親和層析法的作用機制

b. 親和法四項要素：請參考圖 3.9

- (1) 對所要純化的物質 (B)，需有專一性配體 ligand (A)，而 A, B 之間要有專一性的親和力，其解離常數 (K_d) 約在 $10^{-4} \sim 10^{-8}$ 。
- (2) 配體 (A) 能方便而大量取得，且能經由耦合反應接到固相擔體上，成為固定相。
- (3) 擔體具有可與配體連結的基團，且非專一性吸附力低，通透性良好。
- (4) A-B 結合成的複合體 (complex)，可以方便地解離，而不傷害 A 或 B。

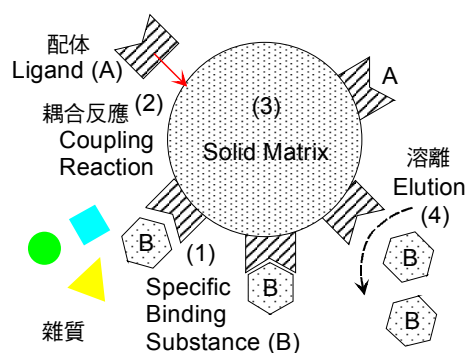


圖 3.9 親和層析法的各項要素

3.4.2 親和吸著劑：

a. 固相擔體：

材料種類很多，舉凡 洋菜糖 (agarose)、纖維素、玻璃砂、幾丁質、合成聚合物 均可使用；但用在蛋白質，仍以聚糖類為最佳。以 Sepharose 為例，可自行用 CNBr 活化，使糖分子接上 $-O-C\equiv N$ (cyanate ester) 基，再與配體上的胺基反應。

b. 親和性介質：

表 3.3 可與各種配體基團反應的介質 (Pharmacia)：

配體基團	親 和 性 介 質	反應基團	反應方式
-NH ₂	CNBr-activated Sepharose 4B	-C≡N	直接反應
	CH-Sepharose 4B 或其活化型	-COOH	加 EDC*
		N-OH-succinimide	直接反應
-COOH	Epoxy-activated Sepharose 6B	oxirane	直接反應
	AH-Sepharose 4B	-NH ₂	加 EDC*
-OH	Epoxy-activated Sepharose 6B	oxirane	直接反應
	Epoxy-activated Sepharose 6B	oxirane	直接反應
-SH	Thiopropyl-Sepharose 6B	-S-S-R	DTT 活化
	Activated Thio-Sepharose 4B	-G-S-S-R	直接反應

* EDC = *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl

c. 共價層析法：

使用 Thio-Sepharose 時，樣本蛋白質以 共價鍵 (雙硫鍵) 結合到親和介質上，然後再以 cysteine 或 mercaptoethanol 溶離下來；此法可以用來純化 papain 或如 urease 等含 -SH 基的蛋白質，特稱為 共價層析法 (covalent chromatography)。

d. 耦合反應：

- (1) 介質與配體的 耦合反應 都相當簡便，介質先經緩衝液洗過後，加入配體溶液反應後，再加入填塞分子，除去介質上未完全反應的基團，裝入管柱流洗後即可使用。
- (2) 注意耦合緩衝液及樣本液中，不能含有會競爭耦合反應的分子；例如使用 CNBr 活化的 Sepharose 時，不可用 Tris 或 glycine 緩衝液 (有 -NH₂ 基)。

e. 注意 spacer arm：

有些親和層析法使用 spacer arm 來降低配體的立體障礙，但是 spacer arm 多為六到八碳的碳氫鏈，有相當強的非極性，若表現出疏水性層析的作用 (見下節)，則可能對純化效果有正或負面的影響。

f. 現成的親和吸著劑：

利用以上各種介質，可自行接上有用的配體，進行親和層析法；但商品售有很多已經接好配體的成品，使用上更方便，例舉於表 3.4。

表 3.4 各種親和性介質及其專一性基團：

配 体	親和性分子	說 明
抗体	對應之抗原	免疫吸著劑，大多自行合成
基質或抑制劑	對應之酵素	酵素的專一性結合
Protein A	部分 IgG	單株抗体純化
Con A	醣蛋白	對 α -D-葡萄糖、甘露糖基有專一性
Heparin	凝血蛋白等	Heparin Sepharose CL-6B
Oligo (dT)	mRNA	Oligo (dT)-cellulose
Cibacron-Blue	NAD(P) ⁺ 結合酵素	Blue Sepharose CL-6B
AMP 或 ADP 等	同上	5'AMP-, 2', 5'ADP-Sepharose 4B
單糖及其衍生物	Lectin	用來純化 lectin

3.4.3 金屬螯合層析法：

- a. 許多蛋白質或酵素分子上帶有金屬離子，則此蛋白質可能會吸附該金屬。
- b. 若把某金屬固定到固相擔體上，則此擔體將會專一性地吸附需要此金屬的蛋白質。

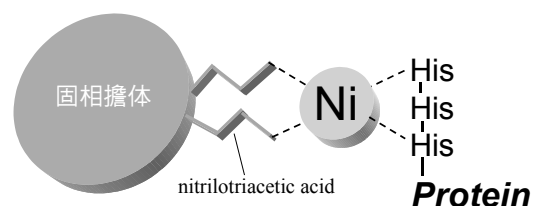


圖 3.10 一種金屬螯合層析法

- c. 基因操作時，經常在表現蛋白質的端點，加上一段含有六個 His 的片段；則此表現蛋白質，可以吸附到含有鎳的吸著劑上，可以 imidazole 流洗出來 (圖 3.10)。
- d. 這種擔體上結合有某些可與金屬產生配位鍵的基團 (如 nitrilotriacetic acid)，這些基團與金屬離子結合 (如鎳離子) 後，即可成為親和吸著劑。

3.4.4 疏水性層析法：

a. 作用機制：

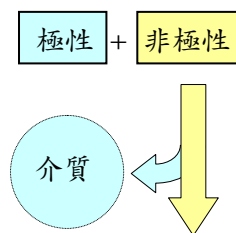
- (1) 蛋白質分子表面有部份疏水性區域，若在一極性很強的環境中，則會被吸附在非極性的固定相擔體上；若環境的極性降低，則可被溶離出來，即為疏水性層析法 (hydrophobic interaction chromatography, HIC)。
- (2) HIC 沒有親和層析法那麼強的專一性，較似離子交換法，但所根據的作用力，則是非極性基團間的疏水性引力。

b. 介質種類：

- (1) Pharmacia 有 Phenyl-及 Octyl-Sepharose 兩種介質，後者疏水性較強。
- (2) 通常樣本溶在 1 M 硫酸銨的緩衝液中通入膠體管柱；吸附上去的蛋白質，可提高緩衝液的疏水性來溶離，例如可用 ethylene glycol 的梯度溶離。

c. 反相 (reverse phase) 層析法：

- (1) 是 HIC 及離子交換法的綜合體，但屬一種 partition 層析；可使用離子交換 (或類似 HIC) 的介質。



(2) 混合極性及非極性溶液為流動相，當流動相通入介質後，介質表面可固定其中的極性溶液 (若使用 HIC 介質則固定非極性者)，樣本分子會在此二相中進行 partition 分離。

(3) 因固定相及流動相的極性剛好相反，故名 reverse phase。請參考圖 3.11。

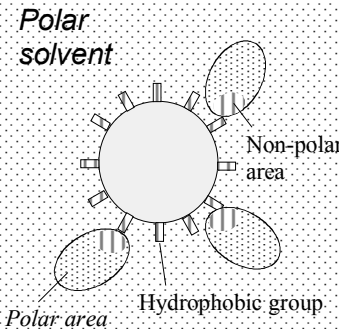
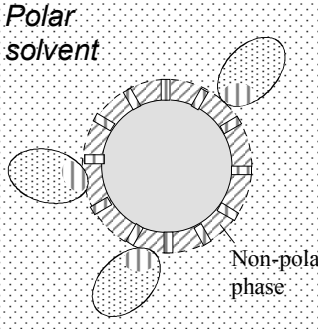
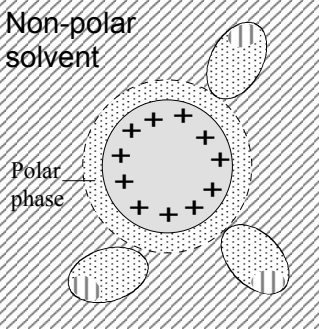
HIC (liquid-solid)	Reverse Phase Chromatography (liquid-liquid)	
樣本分子吸附到非極性的固定相上，是一種類似離子交換的色析法，但分離因素決定於樣本分子表面的非極性區域。	動相與固定相都是液相，但兩相的極性完全相反，分子依其表面上極性或非極性區域的大小，與固定相結合；當改變動相的極性，即可分別溶離下各種極性不同的分子。	
		
Using non-polar groups as a stationary phase 動相為極性溶液，固定相為非極性基團或液相，樣本分子則憑其非極性表面與固定相結合，結合力量的強弱與其表面的非極性面積大小有關。	Using ion-exchanger 若非極性的動相中，含有少量極性液體，則後者會附著在離子交換介質表面，形成一極性液態固定相。	

圖 3.11 疏水性及反相層析法原理

3.4.5 液相分配 (partitioning)：

a. 作用機制：

- (1) 在分析化學的純化方法中，使用分液漏斗在兩個液相間進行 partitioning 者，多為有機小分子；因所用液相多為有機溶劑，蛋白質不易溶於其中。
- (2) 若在水溶液中加入不同的親水性聚合物，造成密度的差異，則兩個水溶液可成為兩相。依蛋白質對此兩相之親和度不同，可在此二相間進行分配 (partitioning) 而達分離效果。
- (3) 可用的親水性聚合物有 polyethylene glycol (PEG), dextran, Ficoll 等。

b. 親和性分配法：

若在上述的聚合物分子上接有親和性基團，以吸引專一性的目標蛋白質，則稱為親和性分配 (affinity partitioning)。

3.5 HPLC 及 FPLC：

HPLC 為高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography) 之意；也有說是 high pressure，因為要使用高壓推動溶離液，以加速層析過程。FPLC 則不用高壓，但流洗速度也很快 (fast performance)，是因為所用的介質通透性極高之故。

a. 解析力增加：

通常可降低介質的 粒子大小 以增加層析法的解析力，但是粒子太小會造成流率不佳，反而使解析度下降。HPLC 是使用 silica 或樹脂等耐壓介質，以極細的粒子 (大約 10 μ m)，在高壓下緊密裝填而成。使用時要在高壓下進行，因此速度比較快，通常在一小時左右可完成。

b. 使用方式廣泛：

較早 HPLC 都用於 adsorption 型式的層析法，例如以離子交換分離各種胺基酸等小分子。近來由於介質材料的發展，各種應用在大分子的液相層析法，均可 HPLC 的方式來進行；不但加快分析速度，也使解析度提高很多。除了上述的離子交換法外，還可用在膠體過濾法、逆相層析法或親和層析法；HPLC 及 FPLC 系統，將來有可能取代傳統的低壓慢速液相層析法。

c. FPLC 系統：

為 Pharmacia 所發展的系統，可以不用很高的壓力，在一小時內完成分離；而其容量更大於 HPLC，可用在製備式純化上 (樣本量可達 500 mg)。

d. Fractogel TSK：

為 Merck 所發展的介質，是一種介於傳統層析法與 HPLC 之間的層析介質，其材質為半固體的 合成聚乙烯 球體 (或其衍生物)，因構造堅固，故流率非常好，操作時間可縮短為三分之一或更短。與傳統介質一樣，可應用在膠體過濾、離子交換及親和層析等方法上，在工業化大規模操作尤其適用。

4 其它純化或分離方法：

要大量純化酵素時，通常前面的步驟還是要使用傳統層析方法，再加上 HPLC 或 FPLC 則可以得到更純的均質蛋白質；製備式電泳及超高速離心法，也可以增加純度，但處理量較少；而超微薄膜過濾法並非純化步驟，但在純化的各階段過程中，可濃縮蛋白質並除去小分子。

4.1 製備式電泳：

製備式電泳通常以不含 SDS 的原態 disc-PAGE 進行，以便回收具有活性的蛋白質；蛋白質樣本要先經過部分純化，否則效果不佳，並先以分析式小電泳確定所要色帶的位置。製備式電泳的詳細操作方法，請見 B3 酵素操作方法 2.4 節。

a. 電泳用具：

商品的製備式電泳器具繁多，都相當複雜昂貴；但使用一般 8×16 cm 大小的垂直平板電泳，利用 3 mm 厚的間隔條即可進行；量小時用迷你電泳亦足夠使用。

b. 注意事項：

- (1) 鑄膠：分離膠體只佔全高度一半，焦集膠體佔四分之一，則樣本可佔其餘的四分之一（以上述大小膠體而言約有 15 mL）；不用樣本齒模，只跑一種樣本。
- (2) 預跑：最好在樣本加入前，先預跑約 20 min，以除去 APS 的影響。
- (3) 電泳：可在冷房進行，條件大略同一般電泳，勿使膠體過熱，勿跑太快。
- (4) 定位蛋白質：方法很多，量多時可以 300 nm 波長紫外光照射，切出所呈現的色帶；否則要先切一小條膠體染色，再比對位置切出色帶。
- (5) 電泳溶離：收集膠體內的蛋白質，這一步會損失不少蛋白質，要特別小心。

4.2 超高速離心法：

a. 沉降係數：

蛋白質分子在離心時，其分子量、分子密度、組成、形狀等，均會影響其沉降速率，沉降係數即用來描述此沉降性質；其單位為 S (Svedberg unit)，每一種蛋白質的沉降係數與其分子密度或分子量成正比。不同沉降係數的蛋白質，可利用超高速離心法，在密度梯度中作分離。

b. 密度梯度作法：

一般有三種製作梯度的方式：

- (1) 在樣本溶液中直接溶入 CsCl，經離心後自動形成梯度。

- (2) 使用梯度製造器，在離心管內預先拉好甘油或蔗糖的梯度，加樣本後離心。
- (3) 在一極為熟悉的離心操作中，以上亦可以 階段式 (stepwise) 梯度進行。

c. 兩種離心方式：

上述 (1) 及 (2) 二者，分屬兩類不同的離心形式，列表並以圖解說明如下：

表 4.1 兩種超高速離心方式的比較：

離心方法	Sedimentation Velocity	Sedimentation Equilibrium
同義字	Zone Centrifugation	Isopycnic Equilibration
梯度形成方式	預鑄梯度 (蔗糖、甘油) 梯度較淺，密度較低	離心時自動形成 (CsCl) 梯度陡峭，密度較高
適用樣本性質	密度相近、分子量不同者	分子量相近或密度 (S) 不同者
樣本例	蛋白質	核酸、細胞器官
離心情形	速度較低，不完全沉降，要在適當時間停止離心	完全沉降至與樣本密度相同的梯度位置，需高速、長時間

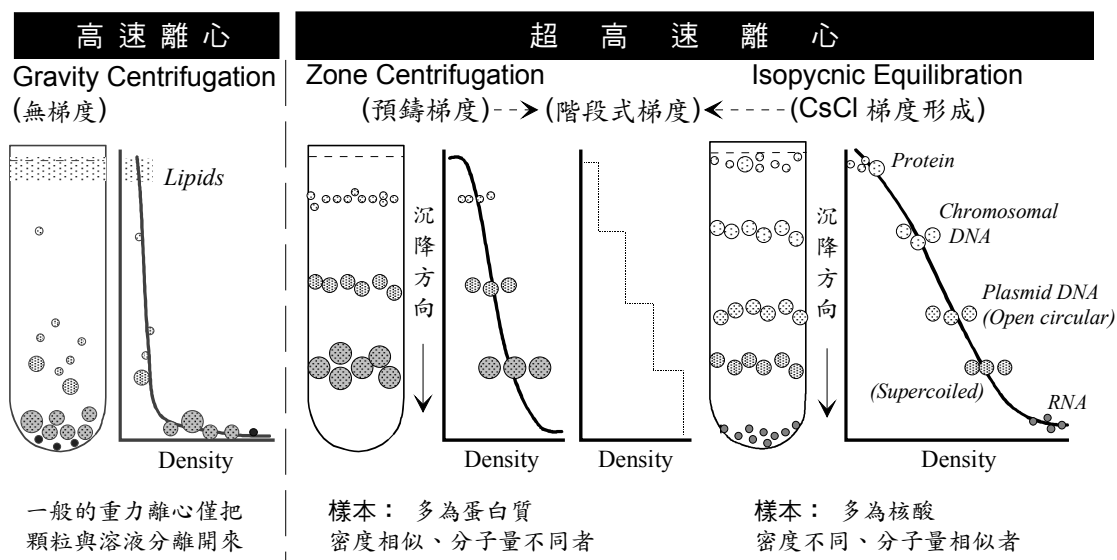


圖 4.1 高速離心與兩種超高速離心法的比較

d. 離心陀種類：

使用不同離心陀，有不同離心方式及效果。

- (1) 角型 (angle rotor)：典型的離心方式，多用在大量製備時。
- (2) 懸籃式 (swing bucket rotor)：傳統用在密度梯度離心。
- (3) 垂直 (vertical rotor)：取代懸籃式，可大大縮短離心時間。
- (4) 區帶 (zonal rotor)：在梯度離心後，可直接分割出各區帶樣本。
- (5) 連續式 (continuous rotor)：可一邊離心，一邊加入或取出樣本。

e. 操作注意：

超高速離心因為轉速極高，離心陀構造也較複雜，操作上要非常小心，完全純熟後才進行實驗，新手要有熟練者在旁指導。操作時特別注意下列各點：

- (1) 離心管的平衡要準確，封管要確實，否則液体可能被抽乾。
- (2) 使用懸籃式離心陀，在懸掛離心管時，要注意有沒有掛妥。
- (3) 轉速切勿超過所使用離心陀的最高限，老舊者的最高限還要打折。
- (4) 離心後要清理離心陀，可用水沖乾淨後晾乾；尤其使用 CsCl 者，非洗不可。
- (5) 時常檢查離心艙及離心陀，注意有無腐蝕及傷痕，有者立刻請廠商檢修。

4.3 超微薄膜過濾法：

a. 超微薄膜過濾技術 (ultrafiltration, UF)：

- (1) 使用具有極細孔徑的薄膜，可以分離分子量不同的分子；薄膜上的小孔，只能讓某分子量以下的分子通過，此分子量稱為該薄膜的 cut-off。
- (2) 其基本原理類似透析，但 UF 薄膜的孔徑則更細，而且可選擇孔徑大小。應用這種薄膜技術的方式很多，主要用在濃縮、脫鹽及無菌過濾。
- (3) 另外在純水的製造上，以薄膜配合逆滲透 (reverse osmosis, RO) 所製成的管柱，可除去水中 90% 以上的離子。

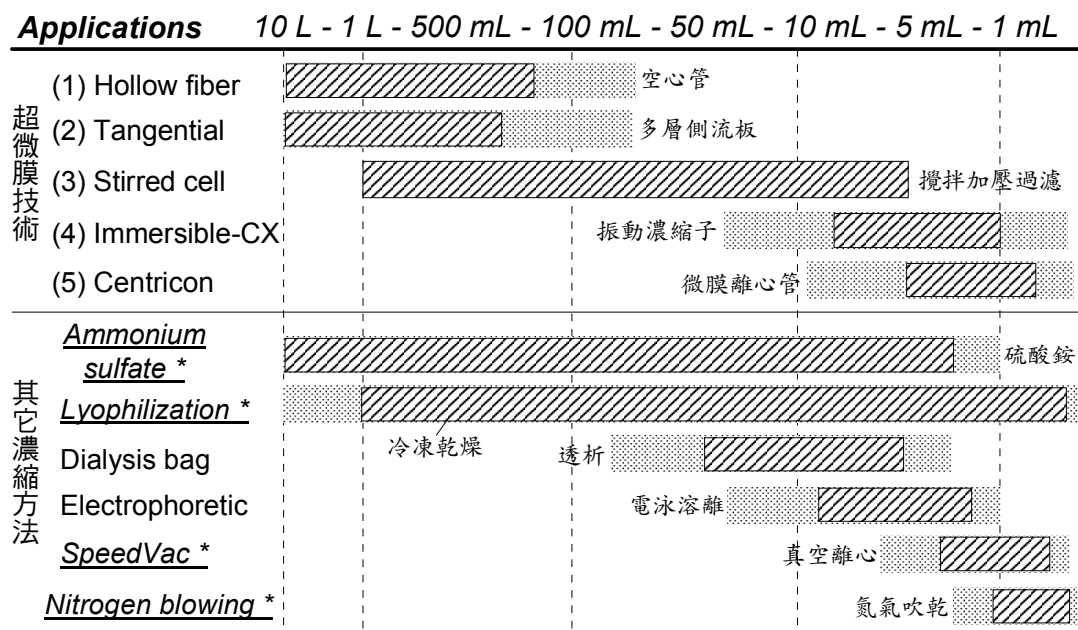
b. 超微膜濃縮裝置：

因樣本体積的大小不同，有各種不同的微膜設計，常用者如下：

- (1) 空心管 (hollow fiber)：微膜薄層鋪在堅固空心小管的內側，當樣本通過空心管時，小分子則由側面擠出，比較不會有局部過濃的問題。
- (2) 多層側流板 (tangential-flow)：多層微膜疊在一起，溶液流動方向與微膜平面成平行，小分子由側向微膜擠出，無局部過濃的問題。
- (3) 攪拌加壓過濾 (stirred cell)：加壓迫使分子濾過微膜，並在薄膜表面攪動，以防止局部過濃而阻塞微膜細孔。
- (4) 振動濃縮子：可直接浸入含有樣本的試管中進行濃縮，微膜平敷在濃縮子表面，以振動去除局部過濃現象，沒有無效體積，故樣本損失量較低。
- (5) 微膜離心管：離心管中橫置一微膜，利用離心力把小分子擠過，大分子留在上方；樣本數目多而體積少時，多採用此法。

c. 其它濃縮方法：

除了上述之超微薄膜系統之外，另有其他常用的濃縮方法：硫酸銨沉澱、冷凍乾燥、透析袋濃縮、電泳溶離、真空冷凍離心、氮氣吹乾等。注意其中有些方法，在濃縮後鹽濃度會提高，而使用超微薄膜則無此缺點。圖 4.2 比較各種濃縮方法的使用體積及範圍；實驗室較常用的是 Stirred cell, Centricon (Centriprep) 及 SpeedVac。



* 注意打星號的濃縮方法在濃縮後其含鹽濃度亦會增加。

圖 4.2 各種濃縮方法的使用範圍比較

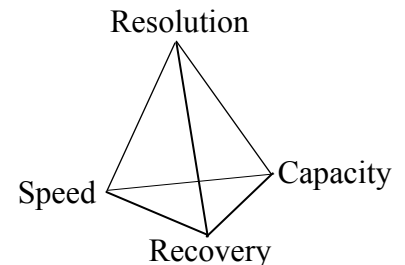
5 純化策略：

正確的純化策略極為重要，往往可以使純化達事半功倍之效，因此事前要有極為充分的準備與規劃過程。 但有時對目標酵素所知甚少，就要一步一步去試，可說是摸著石頭過河；此時，要小心追蹤每一個步驟到底回收多少酵素活性？

5.1 純化步驟設計：

5.1.1 影響純化的因素：

設計純化步驟時，需考慮下列各項要求；右圖則是 Pharmacia 操作手冊所建議的四種考慮因素。



a. 高活性：

酵素的比活性要能顯著提高，純化成品與原始粗抽液二者間，其比活性之比值稱為 純化倍率 (purification fold)；各種酵素因材料來源及含量多寡不一，純化倍率也有高低；不過就同一樣本而言，當然越高越好。

b. 高回收率：

一般指總活性的回收，最終回收率低於 30% 就得檢討過程是否有大問題。

c. 高純度：

純度 與 活性 是酵素純化的兩大目的，以達到均質酵素為最終目標；相對而言，在電泳上看不到其它雜質，即可視為均質，但也只能說是 electrophoretically pure；但絕對均質的酵素幾乎是不可能得到，我們只能達到相對純度者。

d. 方便與快速：

方法要儘量簡便，步驟勿拖太久，因為酵素活性可能隨著時間而急速降低；對較不穩定的酵素，時間是最重要因素，有時不得不犧牲其它要求。

e. 經濟：

許多試劑相當昂貴 (尤其是活性分析用藥)，大量使用時要考慮經濟問題。

5.1.2 組合純化步驟：

a. 組合標準：

- (1) 已知的酵素，可依照已發表的步驟進行，有問題再作改進。 通常都是以 硫酸銨分劃-膠體過濾-離子交換 為骨幹，再加上其它方法，組成全部流程。
- (2) 對完全未知的酵素，可循此骨幹先試行純化，看其結果如何再加改進。
- (3) 不要忘記利用該酵素的特殊性質來純化，如在其 pI 沉澱性、特別的疏水性、有專一的抑制劑或熱穩定性等。

b. 純化方法分類：

- (1) 每種純化方法都是利用蛋白質分子的某種特性來分離的，圖 5.1 把所有的純化方法，依其運用特性分類歸納，以作為設計流程時的參考。
- (2) 通常同一個純化方法不會重複使用，最好是交叉使用各種蛋白質的不同性質，來設計一連串的純化步驟。



圖 5.1 各種純化及分析方法及所根據的蛋白質性質

5.2 純化結果：

a. 純化表：

純化結果以 純化表 (purification table) 摘要列出整個過程及結果，例如：

表 5.1 蔗糖合成酵素之純化表：抽取 100 g 水稻乳熟期穀粒。

純化步驟	全蛋白質 (mg)	全部活性 (U)	比活性 (U/mg)	純化倍數 (fold)	回收率
粗抽取液	1,070	9,672	9.0	1.0	100%
魚精蛋白沉澱後上清	800	12,555	15.7	1.7	130%
硫酸銨分劃 (35~55%)	250	6,610	26.4	2.9	68%
Sepharose CL-6B 膠體過濾	53	5,789	111.3	12.4	60%
DEAE Sepharose 離子交換	8.6	2,960	344.2	38.2	31%

b. 檢討純化表：

回收率超過 100% 時，表示粗抽取液中可能含有酵素之 抑制因子，或含有干擾活性分析的物質，經去除後酵素活性大增。若回收顯著偏低，表示此一純化步驟並不理想，應探討緩衝液、溶離液成分有無問題，或者是純化流程設計是否不良。

c. 純度的要求：

如上表所純化得到的酵素，以電泳檢定已達相當純度，應可供大多數實驗需要；若有必要，可再經製備式電泳或其它方法純化。請注意並非所有的實驗都必要使用均質酵素，有很多實驗 (如酵素動力學、分子量測定) 都不需完全均質的蛋白質。

酵素分析方法

Enzyme Analysis

研究酵素的第一件工作，就是建立定量方法；其一為蛋白質定量，另一為酵素活性測定。而所有分析方法中，電泳工具最不可缺，加上以抗体為探針的免疫轉印，則更為靈敏精準。

1 蛋白質定量法： 請注意以下三點蛋白質定量的基本問題。

a. 蛋白質量與酵素活性不一定成正比：

酵素是一種蛋白質，因此測定純質酵素樣本中的蛋白質量，大致可以說是該酵素的含量。但須注意酵素是具有活性的分子，蛋白質含量很高的，不見得活性就高。

b. 慎選標準品：

蛋白質定量需要一已知的標準品，以求得標準曲線；一般採用 白蛋白 (albumin) 或 免疫球蛋白 (immunoglobulin)，使用不同的標準品所得到的結果，會有相當大的差異。

c. 注意干擾因子：

樣本中的雜質或緩衝液可能會影響測定，因此濃度較高的樣本，所得結果可能會錯估；通常稀釋倍數較大的樣本，其所含干擾物質少，測定值比較可靠。

1.1 Biuret 法：

銅離子在鹼性溶液中，會與蛋白質胾鏈上的 carbonyl 基結合，生成紫色的複合物；兩個 carbonyl 與一個銅離子結合成類似 biuret 的複合体。其精確度較差 (數 mg)，且會受樣本中硫酸銨及 Tris 的干擾，但準確度較高，不受蛋白質的種類影響。由 Biuret 法更發展出較靈敏的 BCA (bicinchoninic acid) 呈色劑，使精確度大大提升。

1.2 Lowry 法：

是上述 biuret 法的延伸，當銅離子與胾鏈形成複合物後，可再與 Folin-Ciocalteu 試劑的 phosphomolybdic-phosphotungstate 作用產生藍色物質，更為靈敏 (約 0.1 mg)，但較麻煩，也會受硫酸銨及硫醇化合物的干擾。步驟中各項試劑的混合，要特別注意均勻澈底，否則會有大誤差。

1.3 UV 吸光法：

a. 胺基酸的芳香基團在 280 nm 有吸光，蛋白質胾鏈骨架上的基團在 200 nm 附近有吸光。由於各種蛋白質所含芳香族胺基酸組成不一，它們在 280 nm 的吸光能力亦不

同，可以 分子消光係數 (molar extinction coefficient) 來表示。

- b. 一般以 E (1%, 280 nm) 來表示，大部分蛋白質在 4~15 間 (平均為 10)。若某蛋白質的 E 值為 10，其溶液在 280 nm 吸光值為 1，則此蛋白質溶液的濃度為 1 mg/mL。可以下式計算：
- $$\text{吸光值} = E \times b \times c$$

(c 為蛋白質 % 濃度，即每 100 mL 所含蛋白質的克數；b 為光徑 1 cm)

- c. 此法只有在蛋白質純度很高時，才能精確測定；但若將蛋白質的 E 值大概定為 10，則對粗抽取液的略估相當方便：在 280 nm 的吸光值為 1 時，濃度約為 1 mg/mL。

1.4 Coomassie Blue (dye binding) 法： Bradford Method

Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG) 在過氯酸溶液中呈紅棕色，但與蛋白質結合後則變成藍色，呈色可測 595 nm 波長的吸光。此法方便靈敏 (數十 μg)，且可使用微量滴定盤進行分析，降低試劑用量，方便大量樣本的操作。

1.5 其它方法：

有些蛋白質含有特殊的 非蛋白質基團，如 peroxidase 含有 heme 基團，可測 403 nm 波長的吸光來定量之。含特殊金屬的酵素 (如銅)，則可追蹤該金屬。

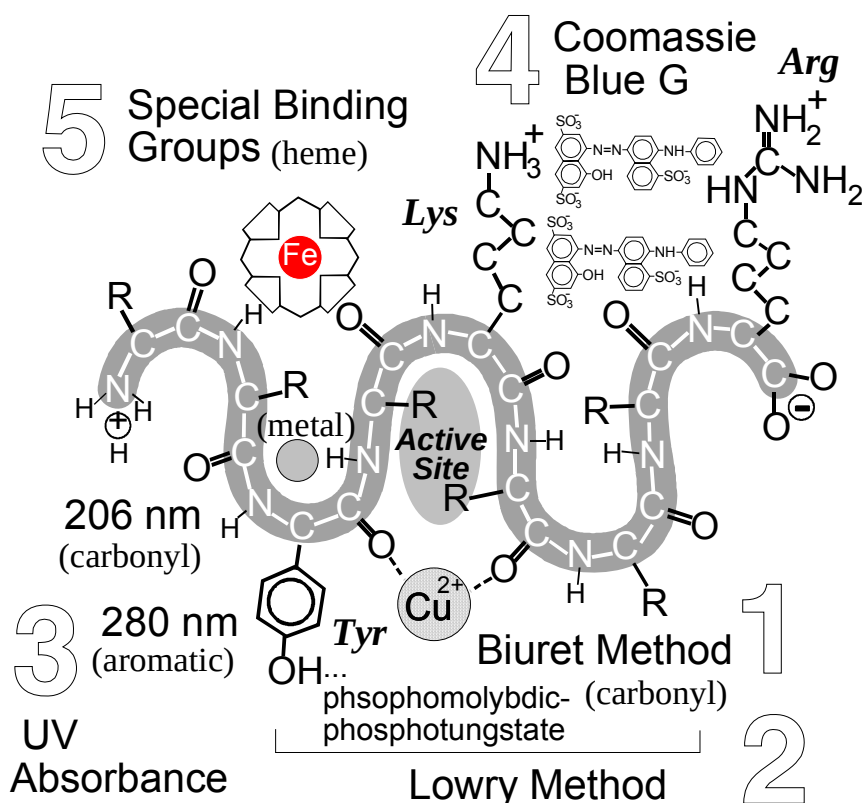


圖 1.1 各種蛋白質定量方法所依據的原理

目標蛋白質在中央以捲繞的粗線表示，其上並標出蛋白質的脊骨 (-N-C-C-N-C-C-)，連同胺基酸上的各種官能基團 (Lys, Arg, Tyr 等)，都可被利用來作為定量之用。

2 酵素活性測定法：

2.1 催化反應：

a. 反應設計原則：

大部分酵素反應方式，都可包括在圖 2.1 的大綱中；建立酵素活性測定步驟時，請注意以下原則：

- (1) 測定生成物的產生量，比測基質 (反應物) 的消失量，更方便且靈敏；儘量避免測定生成物。
- (2) 反應流程儘量簡單，太複雜的操作過程，增加工作量及成本，且容易造成失誤。
- (3) 複雜的反應，可能產生某些意外的生成物 (或 pH 改變)，回饋抑制酵素反應 (以負號表示)。
- (4) 反應條件要有利於指定反應方向的進行，可以移除生成物 (以籃框表示)，或接上耦合反應。
- (5) 小心樣本中有無其他酵素 (或抑制劑) 干擾，會因為消耗反應物或生成物，而加強或減弱目標酵素的活性，造成假象。

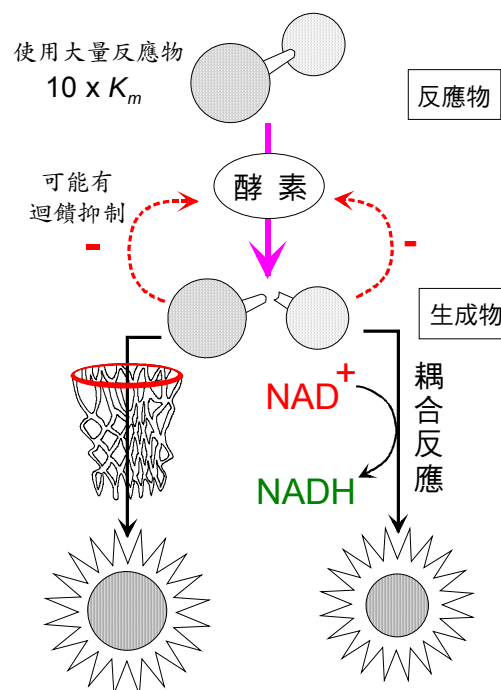


圖 2.1 酵素活性分析及偵測原則

b. 反應基質及酵素濃度：

在試管中進行的酵素活性分析，與在生物體內的酵素反應，有相當的差距；為使反應達最大活性 (V_{max})，或往指定方向進行，所使用基質濃度為十倍 K_m 。反應的最適 pH、溫度、時間等條件，均需以實驗求得；尤其酵素的用量影響結果甚鉅，要事先找出最適當的使用濃度。

2.2 酵素活性分析：

酵素活性的偵測，通常是固定在一段時間 (t) 內，觀察生成物的產量 (P)。因此反應進行一定時間後需中止反應，再進行生成物的定量。而 P/t 即為此酵素的反應速率 (v_o)，也就是酵素活性。但若可連續記錄反應過程，則有無中止反應並不重要。

2.2.1 酵素活性測定方法：

反應一段時間 (t) 後中止反應，測生成物量 (P) 即得活性 (P/t)。以下為各種測定生成物的方法，任何物理、化學甚或生物方法都可使用。

a. 直接測定生成物：

所有去氫酶均可測定 NAD^+ 與 $NADH$ 間的變化量，即為去氫酶的活性；例如 酒

精去氫酶 催化下式之正反向反應：



反應液中 NADH 在 340 nm 波長有吸光變化 (如圖 2.2)。

b. 耦合反應法：

若生成物 (P) 無法直接測得，設法把生成物再進行耦合反應，變成可測量的產物 (Q)；很多酵素可耦合到上述去氫酶的反應，則可測 340 nm 波長變化。

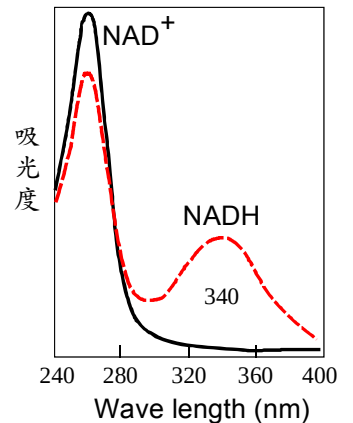
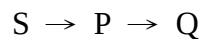
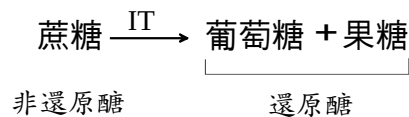


圖 2.2 NADH 吸光光譜

c. 化學測定法：

若生成物具有化學活性，則可直接進行化學反應；例如蔗糖以 轉化酶 (invertase, IT) 水解成果糖及葡萄糖，可測定生成物還原糖的還原力。



d. 放射線測定法：

若基質分子中含放射性核種，酵素反應後追蹤生成物的放射線量，即可知酵素活性。麻煩的是，要分離反應物及生成物，有時不太容易；可用 HPLC、濾紙色析法 (PPC) 或離子交換法等。

e. 測壓法 (manometry)：

若生成物為氣體，則可測定氣體體積之增加量；尤其有氧氣生成時，可用 Warburg 氏呼吸計測之。

f. 電極：

有些電極可直接測定反應的變化；例如若有 pH 或氧濃度的改變，則可用 pH 計或氧電極。酵素電極把酵素固定在薄膜上進行反應，然後直接測定反應物的改變，相當方便；但多用在工業或醫療界有大量樣本待檢測者。

g. HPLC 檢定法：

若產物無法以其他任何方便的方法檢測時，最終可用 HPLC 來分析產物，但相當費時。

2.2.2 中止酵素反應方法：

注意任何中止反應的方法均不得破壞生成物，或干擾儀器測定。

- 用 3~5% TCA (三氯乙酸) 改變 pH，使酵素變性沉澱，再離心去除沉澱取上清。
- 急速加熱 (100°C 水浴) 10 min，注意有些蛋白質 (如 RNase) 仍然無恙。

- c. 用 1% SDS 中止反應，注意 protease K 等在 SDS 下仍有活性。
- d. 若該酵素需二價離子，則加入 EDTA 中止反應。
- e. 若該酵素具有專一性抑制劑，則可加入抑制劑。
- f. 若使用放射性基質，可加入大量不具放射性 (cold) 的基質，看來放射性的生成物不再產生，但酵素反應實際上並沒有停止。

2.2.3 連續測定法 (continuous-reaction)：

連續測定法可不用刻意中止酵素反應，但通常要使用儀器同步監控生成物。

a. 連續測定法：

若酵素反應，在其催化過程中可以一邊進行觀察，則可連續測定反應的情形，不須中止反應，上述 酒精去氫酶 即可連續監視 340 nm 波長的變化。若生成物無法直接觀測，則可接續一耦合反應，把生成物轉變為容易觀察的物質。

b. 連續的耦合反應：

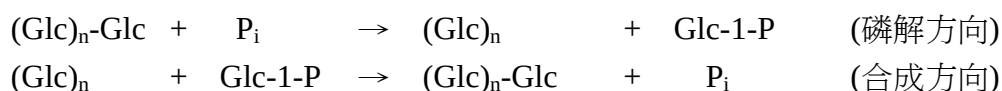
耦合反應在連續測定法應用相當多，但由於耦合反應更複雜，甚至成為一個迷你的代謝途徑；這種複雜的反應中有較多試劑與產物，許多不必要的副反應可能出現，干擾反應結果；要作好對照的控制組，以免有假結果出現。

2.2.4 澱粉磷解酶活性分析：

以澱粉磷解酶為範例，說明如何以生物化學方法偵測到其活性。

a. 澱粉磷解方向：

注意磷解不是水解，此反應為可逆 (P_i 為無機磷)：



合成方向反應可測無機磷 (P_i) 生成，而 P_i 的檢定有方便的化學呈色反應。反之，磷解方向應如何設計方便的活性分析方法？

b. 延長澱粉鏈：

澱粉磷解酶以可溶性澱粉作為引子 (primer)，催化 Glc-1-P 連接到引子上，成為較長的直鏈澱粉 (amylose)，可用碘液呈色觀察。在原態電泳膠片，澱粉磷解酶活性可用此法染色，直接在膠片上看到酵素活性 (如圖 2.3 A)。

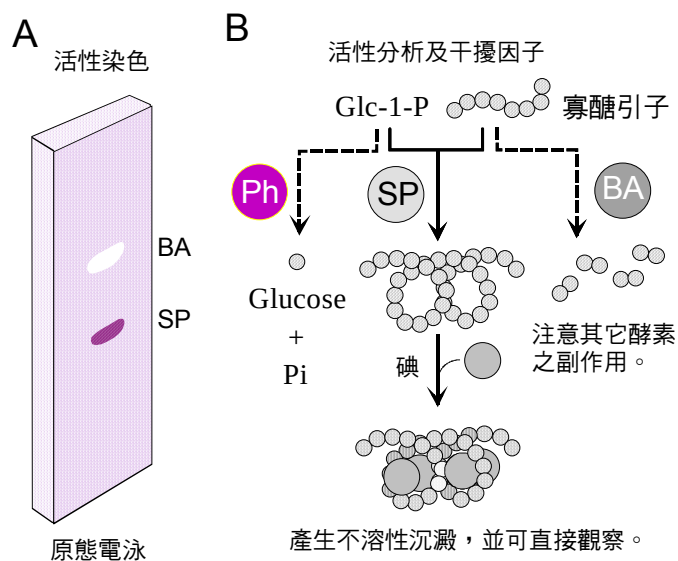


圖 2.3 澱粉磷解酶的活性分析及干擾因子

c. 小心其它干擾物質：

澱粉磷解酶的兩種基質很容易受到其它酵素的作用：可溶性澱粉受到 β -amylase (BA) 澱粉酶快速水解，澱粉磷解酶活性被抑制；Glc-1-P 受 phosphatase (Ph) 磷酸酶的水解，產生游離的磷酸，會誤判為澱粉磷解酶的活性 (圖 2.3 B)。

(請注意磷解與水解是完全不同的反應。)

2.3 維持酵素活性：

酵素是有活性的分子，而可能隨時失去活性；應該考慮各種最佳的環境與條件，以便使酵素保持在最安定的狀態。酵素的緩衝液是最關鍵的因素。

2.3.1 緩衝液：

緩衝液可維持溶液的恆定酸鹼度及離子濃度，兩者都會影響酵素的活性。

a. 緩衝液有其使用範圍：

各種緩衝液都有其適用的 pH 範圍，表 2.1 列出常用的緩衝液。

表 2.1 各種常用緩衝液及其使用範圍：

	緩衝液	適用 pH	使用上注意
	Formate	3.0 ~ 4.5	容易揮發，可用冷凍乾燥除去。
	Citrate	3.0 ~ 6.2	小心會與二價金屬離子結合。
	Acetate	3.7 ~ 5.5	容易揮發，可用冷凍乾燥除去。
◎	Phosphate	5.8 ~ 8.0	小心會與鈣離子結合沉澱，低溫下易結晶。
	HEPES	6.5 ~ 8.5	毒性較小，多用在細胞培養。
◎	Tris	7.1 ~ 8.9	pH 受溫度影響很大，要用特殊電極。
	Borate	8.1 ~ 9.0	
	Carbonate	9.7 ~ 10.7	小心會與金屬結合沉澱。
	Universal	2 ~ 12	數種不同 pH 範圍的緩衝液混合而成。

◎ 兩種最常用的緩衝液，小心其使用上的特性。

b. 添加物都有作用：

經常在緩衝液中加入一些物質，以增加酵素安定或保持活性 (表 2.2)。

表 2.2 緩衝液各種添加物質的作用及其使用濃度：

添加物質	作用	一般使用濃度
NaN ₃ (sodium azide)	抑菌劑	0.01%
EDTA, EGTA	除去二價離子	0.1~1 mM
β -Mercaptoethanol	抗氧化劑	1~10 mM
Dithiothreitol (DTT or DTE)	抗氧化劑	1~5 mM
BSA (bovine serum albumin)	安定劑	0.1~10 mg/mL
Tween-20, Triton X-100	界面活性劑	0.5~0.05%

Glycerol, glucose	防凍劑	50%
Urea 尿素	變性劑	6~8 M
PMSF, TPCK, TLCK, benzamidine 等	蛋白酶抑制劑	通常微量使用

c. 溫度的影響：

緩衝液用來維持溶液恆定的 pH，但需注意有些緩衝液的 pH 受溫度影響很大 (如 Tris)；故製備緩衝液時，要考慮此緩衝液將要在什麼溫度下使用。

d. 濃度的影響：

改變緩衝液的濃度，對其 pH 可能有影響。緩衝液的種類不同，酵素活性的表現也會有差異，有些酵素甚至失去活性。圖 2.4 列出各種不同實驗情況下，緩衝液的使用濃度範圍。

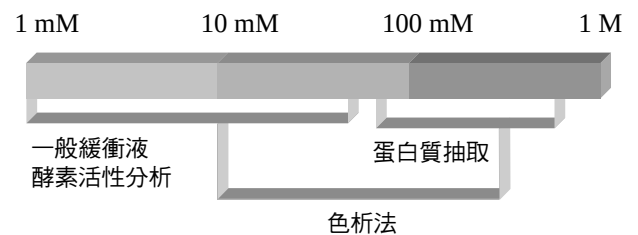


圖 2.4 緩衝液使用濃度的大概範圍

e. Stock solution：

緩衝液可以十倍濃度貯存，高濃度可防止微生物生長，並保持每次實驗所使用藥品的穩定度。注意在稀釋後，溶液的 pH 也許會改變一些，尤其是磷酸緩衝液很容易受到濃度改變所影響。

2.3.2 試劑的保存：

試劑的適當保存非常重要，要依照廠商所指示的溫度貯存。

- 避免潮解：** 注意每當試劑由冷藏庫取出時，要等它回到室溫後才能打開，否則水氣會附在藥品的表面，進而潮解或破壞之。
- 分裝凍藏：** 常用的冷藏藥品以小量分裝 (aliquot) 後凍藏，是最好的貯藏方式，尤其是溶液狀態的生物活性試劑 (如酵素)，切勿反復凍結-解凍。
◆ 有些酵素經不起凍藏，一旦結冰後再解凍，活性快速下降。例如本實驗課所純化的澱粉磷解酶請勿凍藏，放在 4℃ 即可。
- 甘油凍藏：** 於低溫 (-20℃) 貯藏的酵素溶液，若保存在 50% 甘油就不會凍結，隨時取用；但須注意所含的甘油，對下一步反應有無影響。
- 避光防菌：** 很多試劑要避光貯存，或須放在乾燥器中，避免長霉長菌。

2.3.3 酵素活性之維持：

a. 酵素的安定性不同：

酵素在細胞中合成後，有的分泌到細胞外，有的運送到細胞器官中貯存或應用。前者 (分泌性酵素) 因為要在細胞外的惡劣環境中生存，因此較為堅韌，不易受到破壞；反之，細胞內的酵素，都以較濃的濃度集中在保護良好的胞器內或胞膜上，一但抽離細胞暴露在氧氣中，可能很容易失去活性。

b. 酵素失活的原因：可歸類成如下的物理性或化學性原因。

(1) 蛋白質變性：

離開細胞的生理環境後，蛋白質可能遇到極端的 pH 條件、不適的溫度或變性劑 (如 SDS 或尿素)，均會使蛋白質的構形破壞。

(2) 酵素活性區破壞：

在抽取過程中，若失去 cofactor，或者活性區的關鍵胺基酸被修飾，均可造成。最常見的影響是氧化，尤其是 cysteine 上的 -SH 基很容易被氧化。一般加入 EDTA 除去可活化氧分子的二價離子；或加入抗氧化劑，以自身氧化防止 -SH 基氧化。

(3) 蛋白酶水解：

細胞內有許多蛋白酶，細胞被打破後即釋放到酵素溶液中，很快水解酵素。可用蛋白酶的抑制劑防止之，但蛋白酶有數大類，各有不同類的抑制劑；一般使用 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 是 Ser 型蛋白酶的抑制劑，但也抑制部分其它類型者；PMSF 在水溶液中很快就會降解。

(4) 酵素抑制劑：

在自然界中或以人工合成，發現許多酵素有抑制劑，可以專一性地抑制酵素活性；有可逆性的，也有不可逆的，通常不可逆抑制劑的效果都很強烈。

c. 如何保持活性：

若酵素不太穩定，活性不易保持，請參考下列處理方式：

- (1) 儘快進行純化及各項分析，隨時保持在 4°C 或冰浴中。
- (2) 讓酵素保存在硫酸銨固體沉澱中，要比溶液狀態安定得多。
- (3) 勿讓高純度的酵素，保存在稀濃度溶液中，否則要加 BSA 當安定劑。
- (4) 勿隨意凍結或解凍酵素液，可加防凍劑 (如甘油或醣類) 以液態保存。
- (5) 冷凍乾燥雖可長期保存酵素，但有些酵素活性可能會因而下降。
- (6) 若容易受微生物污染，可經無菌過濾後保存 (當然也會損失一些酵素)。

2.3.4 酵素活性單位：

活性單位 (activity unit) 是酵素活性高低的指標。一個活性單位的定義，是在固定溫及 pH 下，每分鐘可催化 1 μmole 基質的活性。但很多情況下，為了操作或計算的方便，直接用測定產物所得的吸光值，除以單位時間來表示活性，因此活性單位的定義可能不同。有關酵素活性及其基本背景，請複習生物化學中的酵素章節；你在大學所念到的酵素知識，在研究所還是完全適用。

3 電泳檢定法：

3.1 電泳原理：

3.1.1 蛋白質的泳動率：

a. 泳動率：

帶電分子在電場中會被電流移動，是為 泳動；其泳動的大小程度稱為 泳動率 (mobility)。泳動率與分子上 電荷密度 成正比，而與其分子 摩擦力 成反比：

$$\text{泳動率} \sim \frac{(\text{所外加 電壓 mV}) \times (\text{分子之 淨電荷密度})}{\text{分子與介質間之 摩擦力}}$$

上述之摩擦力，決定於此分子之 大小、形狀。分子量大小者摩擦力大，泳動率小；球形分子摩擦力較小，泳動率大。

b. 蛋白質的帶電性：

蛋白質分子上的淨電荷，取決於環境 pH 高低；若環境 pH 高於其 pI，此蛋白質帶淨負電，反之帶淨正電；若剛好等於其 pI，淨電荷為零 (正電數目等於負電)。同一分子在不同 pH 環境下，可能帶不同 淨電荷 (圖 3.1)。

c. 蛋白質由負極向正極泳動：

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，不帶電者則不易泳動。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，可以往正極跑。

d. 外在條件影響泳動率的因素：

促進泳動：低膠體濃度 (孔徑大)、低濃度緩衝液、高電壓、高電流、高溫。

降低泳動：上述各點的相反條件、樣本含高濃度鹽類、樣本 pH 太高或太低。

3.1.2 電泳的種類：

電泳需有一介質，作為電泳之場所 (圖 3.2)。最早是在溶液中進行，但因溶液的擴散現象大，故改用噴濕的濾紙；但又因濾紙與分子間的吸引力大，導致摩擦力太大而發熱，故現今多改用半固態的膠體。

a. 全液相電泳 (moving-boundary electrophoresis)：

如上述已甚少使用，但有些特殊的製備式裝置仍使用類似原理。

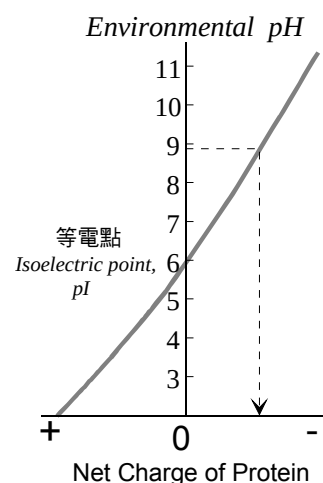
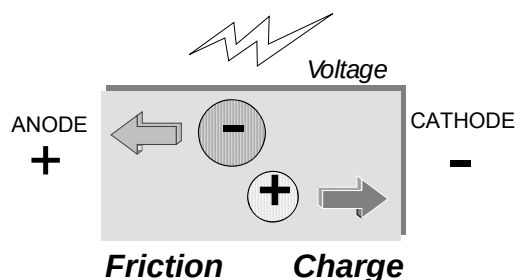


圖 3.1 環境 pH 的影響

b. 帶狀電泳 (zone electrophoresis) :

因使用固相的電泳介質，蛋白質樣本電泳後在介質上呈現帶狀 (band)，故稱之。

(1) 濾紙電泳：

濾紙吸附性大，蛋白質很容易變性失活；因此多用在小分子樣本 (如胺基酸) 或雙向勝肽電泳 (蛋白質已水解成勝肽片段)。

(2) 薄層電泳：

以化學方法修飾纖維素的醇基 (乙酸化) 成為 cellulose acetate，可降低對蛋白質的吸附，也可塗佈成薄層進行電泳 (thin-layer electrophoresis, TLE)。

(3) 膠體電泳：

組成膠體的分子長鏈間，有相當大的空間，可降低與蛋白質間的摩擦力，且可增大樣本體積，適用於巨分子電泳，如核酸及蛋白質。

澱粉膠體電泳 (starch gel electrophoresis)

聚丙烯醯胺電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

洋菜糖膠體電泳 (agarose gel electrophoresis)

c. 其它電泳技術： 以下技術大多會在其他各章節中說明

(1) 等電聚焦法 (isoelectric focusing)： 根據蛋白質的等電點不同來做分離。

(2) 勝肽圖譜 (peptide mapping)： 不同的蛋白質有不同的勝肽圖譜。

(3) 蛋白質轉印 (Western blotting) → 免疫染色 (immunostaining)

(4) 製備式電泳 (preparative electrophoresis)： 可以純化高純度蛋白質。

(5) 免疫電泳 (immunoelectrophoresis)： 電泳後再以抗体與抗原反應，可產生沉澱線，也是有兩個次元。

(6) 毛細管電泳 (capillary electrophoresis)： 最新的電泳儀器，有點像 HPLC。

(7) Pulse field gel electrophoresis： 可做大分子 DNA 甚或染色体之分離。

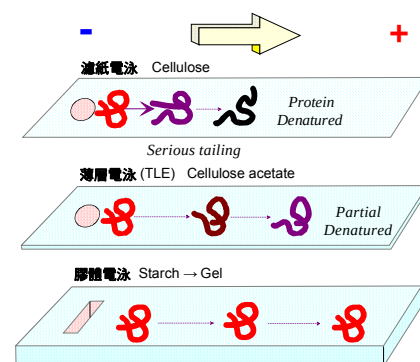


圖 3.2 帶狀電泳的演進

3.1.3 電泳設備及系統選擇：

a. 電源供應器： 大約 100~500V 者即可適用，但等電聚焦法則需數千伏特。

b. 電泳槽： 垂直或水平、柱狀或平板、普通 (16×20) 或 迷你型 (8×10)。

c. 系統選擇：

表 3.1 各種電泳形式的選擇與用途：

型 式	鑄 膠 法	介 質	樣 品
垂 直	柱狀或平板	聚丙烯醯胺	蛋白質
水 平	平 板	洋 菜	核酸、異構酶
垂 直	垂直平板	上述二者混合	核酸 (定序用)

3.2 聚丙烯醯胺膠體電泳：

聚丙烯醯胺膠體電泳 PAGE 是最普遍的蛋白質電泳方式，以下各段分別說明 PAGE 的種類、構成與電泳原理；及實驗操作可能遇到的問題與解決方法。

3.2.1 PAGE 種類：

a. 原態膠體電泳 (disc-PAGE) 及活性分析：

Disc-PAGE 是 PAGE 系列的最基本型式，蛋白質以原態進行電泳，因此酵素活性在電泳後得以保持，可在膠片上直接做活性測定或染色；若能收集到膠體上的蛋白質，則亦可用來製備酵素。因為樣本蛋白質保持在原態下，所帶的電荷、分子大小、分子形狀等，對其泳動率均有影響，與下述 SDS-PAGE 不同。

b. SDS 膠體電泳 (SDS-PAGE) 及分子量測定：

SDS 是界面活性劑，可使蛋白質變性，並在分子表面均勻佈上一層負電荷。因此在 SDS-PAGE 系統中，樣本分子的泳動率，僅取決於其分子量，而與原來分子所帶的電荷無關，故 SDS-PAGE 可用來測定變性狀態 (denatured) 蛋白質之分子量，與原態 (native) 分子量可能不一樣。

c. 梯度電泳系統：

梯度電泳使用由稀到濃的梯度膠體，膠體中的孔徑由上到下逐漸變小，樣本中分子量越小的分子，就可跑得越下面，因此它可說是依分子量大小來分離的。但需注意許多 pI 大於 8.3 的蛋白質，在電泳 pH 條件下所帶的淨電荷為正，在膠體中根本不會往下跑。梯度電泳也可加入 SDS，成為 梯度-SDS-PAGE，則解析度將會大大的增強，是最理想的電泳型式。

3.2.2 PAGE 膠體的組成：

3.2.2.1 膠體主要成分： 以下這些成份共同組成了膠體

a. 單體分子 (monomer)： 丙烯醯胺 (acrylamide)， $H_2C=CH-CO-NH_2$ 。

◆ Acrylamide 及下面的 Bis 都有神經毒性，要帶手套，並避免吸入塵埃。

b. 架橋分子 (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. 游基 (free radical) 產生者： 通常使用 過硫酸銨 (ammonium persulfate, APS) 或者 riboflavin (即 維生素 B_2)。

d. 催化劑： TEMED (tetramethylethylenediamine) 幫助游基電子的傳遞。

3.2.2.2 鑄膠反應： 有三種基本反應

a. 游基形成： 靠上述 游基產生者 生成游基，再使單體分子成為游基型式。

b. 聚合反應： 游基單體可首尾相接，以連鎖反應形成大分子的長鏈。

c. 交錯連結：若架橋分子加入聚合反應，則形成網狀三次元結構。

3.2.3 PAGE 系統解剖：

3.2.3.1 電泳系統的組成：

表 3.2 電泳膠體系統的各組成部份：

	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 焦集膠體	Tris-HCl	6.9	5%
4	體 分離膠體	Tris-HCl	8.3	5~20%
5	下層 (正極) 緩衝液	Tris-glycine	8.3	-

a. 只有 3, 4 兩部分是膠體；各層的緩衝液成份不盡相同，其 pH 也有點差異。注意膠集膠體 (3) 的 pH 較低 (pH 6.9, 是 glycine 的 pI)。這些差異會造成很重要的效果：在樣本通過焦集膠體時，可產生 焦集作用，使原來體積很大的樣本溶液，聚集成一薄層 (disc)，可增加解析度。

b. 以直立式柱狀電泳為例，電泳膠柱如圖 3.3 的組成，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)，接通電源 (注意正負方向)。

c. 除了上述的柱狀電泳外，尚有平板式電泳，可分直立式或水平式。應用在蛋白質時，以直立平板式的聚丙烯醯胺膠體為最多；而在核酸，則以水平平板式洋菜醣膠體較普遍。

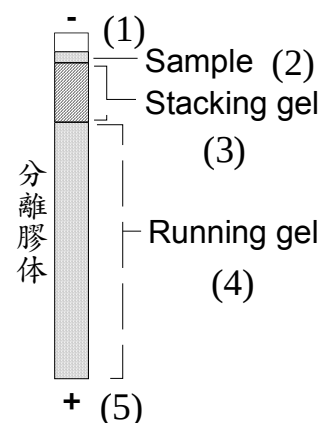


圖 3.3 電泳膠柱組成

3.2.3.2 電泳的焦集作用：

請注意下面三種分子 (如圖 3.4)，在電泳時的表現：

Glycine： 圖中以黑點 (當環境 pH > 6.9 時，帶負電) 或白點 (當環境 pH = 6.9 時，不帶電之 zwitterion) 表示。

氯離子： 以斜線部分表示。

樣本分子： 以兩種大小蛋白質為例。

a. 圖 3.5A：上述組成電泳的五個部分中，只有膠體的緩衝液含氯離子；而樣本溶液中則含有 Gly，沒有氯離子。

b. 注意 樣本溶液-焦集膠體-分離膠體 三段的 pH 是不連續性的，其 pH 分別為 8.3-6.9-8.9，而 Gly 的 pI 恰為 6.9。

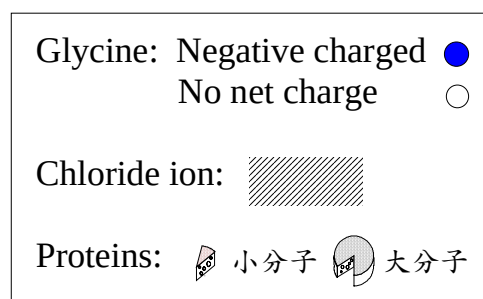


圖 3.4 焦集膠體中的三個主角

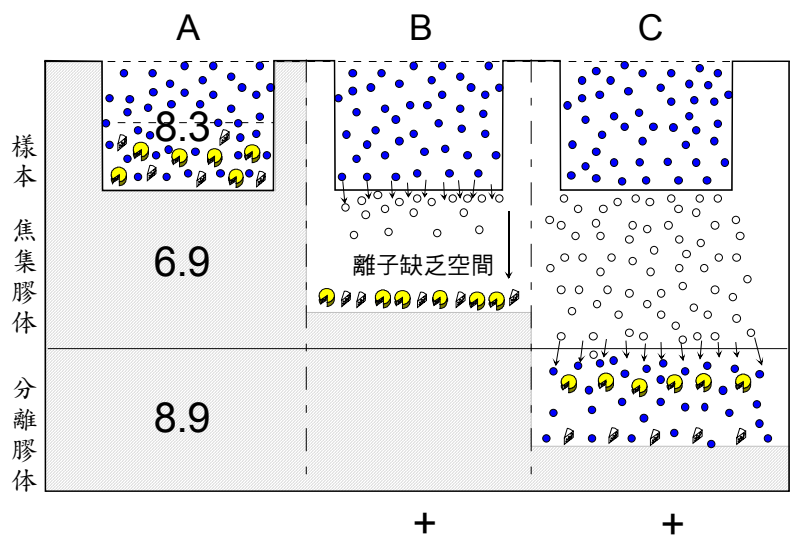


圖 3.5 焦集膠體對蛋白質分子的焦集作用

- c. 圖 3.5B：電泳一開始 Gly 進入焦集膠体，立刻變成不帶電的分子 (白點)，泳動率變小；同時氯離子則很快的往正極泳動，因此在氯離子與 Gly 之間有一段缺乏離子的空間，電壓變得很高。
- d. 然而兩電極之間，要有負離子來帶動電流，此時只得利用蛋白質來傳導。而焦集膠体中的孔隙較疏，於是樣本分子不論大小，在此離子缺乏空間，全部快速往正極泳動，一直碰到氯離子的尾端聚集成一薄層。
- e. 圖 3.5C：Gly 慢慢通過焦集膠体，變回負離子，離子缺乏帶瓦解；蛋白質泳動到分離膠体，開始依其分子量、電荷等因素泳動。

3.2.3.3 兩種電泳系統比較：

圖 3.6 以三個虛構的蛋白質為樣本，說明 disc-PAGE 及 SDS-PAGE 兩種電泳性質上的異同，以及電泳結果的差別。

- a. 假設有三個蛋白質 X, Y, Z，原態分子量大小依次為 $X > Y > Z$ ，在一般電泳的 pH (8.3) 條件下，X 及 Y 的淨電荷為負 ($pI < 8.3$)，而 Z 的淨電荷為正 ($pI > 8.3$)。

表 3.3 三個假設蛋白質的性質比較：

Protein	Quaternary Structure	Molecular Mass (D)	pI	Mobility	
				Native PAGE	SDS-PAGE
X	Tetramer	$(40,000) \times 4$	5.8	慢	快
Y	Monomer	88,000	5.2	快	慢
Z	Monomer	60,000	9.3	往上	中等

- b. 在 native-PAGE 只有 X, Y 會往正極跑，而 Z 卻往負極跑，在膠体中也就看不到 Z；而 X 的分子量最大 (160 kD)，因此跑得比 Y 慢。
- c. 在 SDS-PAGE 系統中 X, Y, Z 以 SDS 處理過，表面均勻地敷上一層 SDS 負電 (有相同電荷密度)，則原先的分子電荷完全被蓋掉。

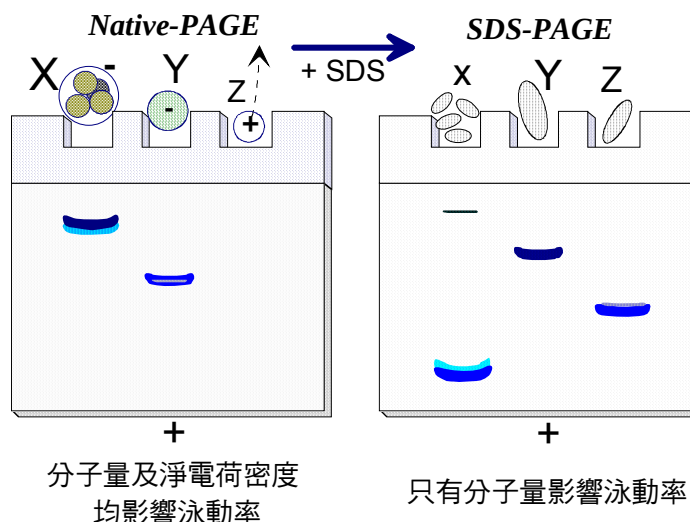


圖 3.6 Disc-PAGE 與 SDS-PAGE 的比較

- d. 在 SDS 膠體中進行電泳時，由於 X, Y, Z 分子表面均帶負電，所以都往正極跑。又因三者的電荷密度一樣，影響其泳動率的因素，只剩下了分子量一端；分子量小的泳動率大，分子量大的泳動率小，因此 Z 跑得比 Y 快。
- e. 分子 X 的原態分子量小於 Y 或 Z，但其分子為四元體，而在 SDS-PAGE 中，此四元體會被 SDS 分解成為單元體，此單元體的分子量 (40 kD) 小於 Y 或 Z，因此表現出最快的泳動率。
- f. 在 SDS-PAGE 系統中，若 SDS 的處理條件較緩和，或樣本蛋白質較不易變性者，在電泳結果上，可能會出現原態分子量的 X 四元體 (160 kD)。

3.2.4 結果不佳時：

a. 膠體不凝結：

檢查 ammonium persulfate, TEMED, acrylamide 等試劑品質是否良好，或是 APS 濃度太稀。室溫太低亦不易凝結，要稍加高 APS 的濃度。

b. 膠體凝結不良：

成為半固體粘液狀時，檢查膠體溶液的百分比對否？是否忘了加 Bis？所用的 acrylamide 品質是否良好？

c. 下雨：

染色後有許多垂直細線（下雨），可能是膠片中有小氣泡，或是樣本中有不溶物質，或所用樣本溶液中的 β -mercaptoethanol 品質不佳；acrylamide 溶液變質產生固體微粒後，也可能有下雨現象。

d. 色帶扭曲：

染出的色帶形狀扭曲（如波浪狀），可能是蛋白質溶解度不好，或樣本中含太高的鹽類。凝膠不均勻時，也會有色帶扭曲的現象，可能是 APS 沒有溶解完全。

e. 樣本干擾物質：

色帶擴散太過，有嚴重拖尾現象，或左右拉寬，可能是樣本液的 pH 不對 (一般是過酸)，或者樣本中的鹽濃度太高。

f. 溫度不均：

膠片左右兩邊泳動的速度不一時，請檢查跑得慢的那個方向，有無冷氣或風扇吹來，降低一邊膠片的溫度。

g. 無焦集作用：

色帶太粗，似無焦集作用，檢查焦集膠體溶液的 pH 是否確實為 6.9。

h. 樣本槽要清理：

有時電泳膠片結果看起來就是不好，但找不出主因；請特別在注入樣本前，每個樣本槽內用微量針筒灌入緩衝液洗過數次 (刷牙)，因為槽內的凝膠殘留物質若沒有洗淨，可能會造成看來原因不明的缺陷。

3.3 其它相關技術：

3.3.1 染色及乾燥：

膠片在電泳後要進行染色，才能看到樣本蛋白質所呈現的色帶。圖 3.7 說明數種常用的蛋白質染色法機制 (圖中數字代表下面各項染色法)。

a. 一般染色法：

(1) 硝酸銀 (ammoniacal silver) 染色：

以銀氨錯離子形式與蛋白質結合，銀離子再還原成金屬銀的深褐色。其靈敏度比下述 CBR 染色法高十至百倍，但步驟較繁複。

(2) Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBR) 染色：

最常用的染色法，快速而方便，靈敏度中等。利用 CBR 上的芳香基團與蛋白質的非極性區結合，以及所帶負電與蛋白質的正電基團結合。注意染色用的 Coomassie Blue 為 R-250，不要誤用 G-250，後者用在蛋白質定量。

b. 醣蛋白：

醣蛋白 (glycoprotein) 上的相鄰醇基，可用過碘酸氧化成醛基後，再以 (3) PAS (periodic acid-Schiff's) 試劑染成紅色，靈敏度比 CBR 低，步驟較繁複。這些醛基也可用硝酸銀染上色，步驟稍不同，靈敏度比 Schiff 試劑高。

c. 紫外線照射：

製備式電泳後，可以用 UV 300 nm 照射之 (4)，蛋白質會呈現暗紫色色帶。

d. KCl 沈澱法：

SDS-PAGE 中濃度較高的色帶可以用 0.3 M KCl 在 4°C 下浸泡 15 min (5)，蛋白質會呈現白色混濁，因為 SDS 遇鉀形成 KDS 溶解度下降之故。

e. 活性染色法：

若酵素反應會產生有色物質，則可進行 活性染色 (6)，但多數酵素須以原態 PAGE 膠片進行。可惜大部分的酵素，均無法產生有色的生成物；則或可把膠片分割，橫切成單位小片 (disk)，再以一般的活性測定法，在試管中加入基質液，分析每一小片中所含的酵素活性。這種固相酵素的反應，可以拉長反應時間，以提高生成物濃度，方便偵測。

f. 放射顯像法 (autoradiography)：

可檢測樣本中的放射性物質，但要以 X 光片壓片顯影。

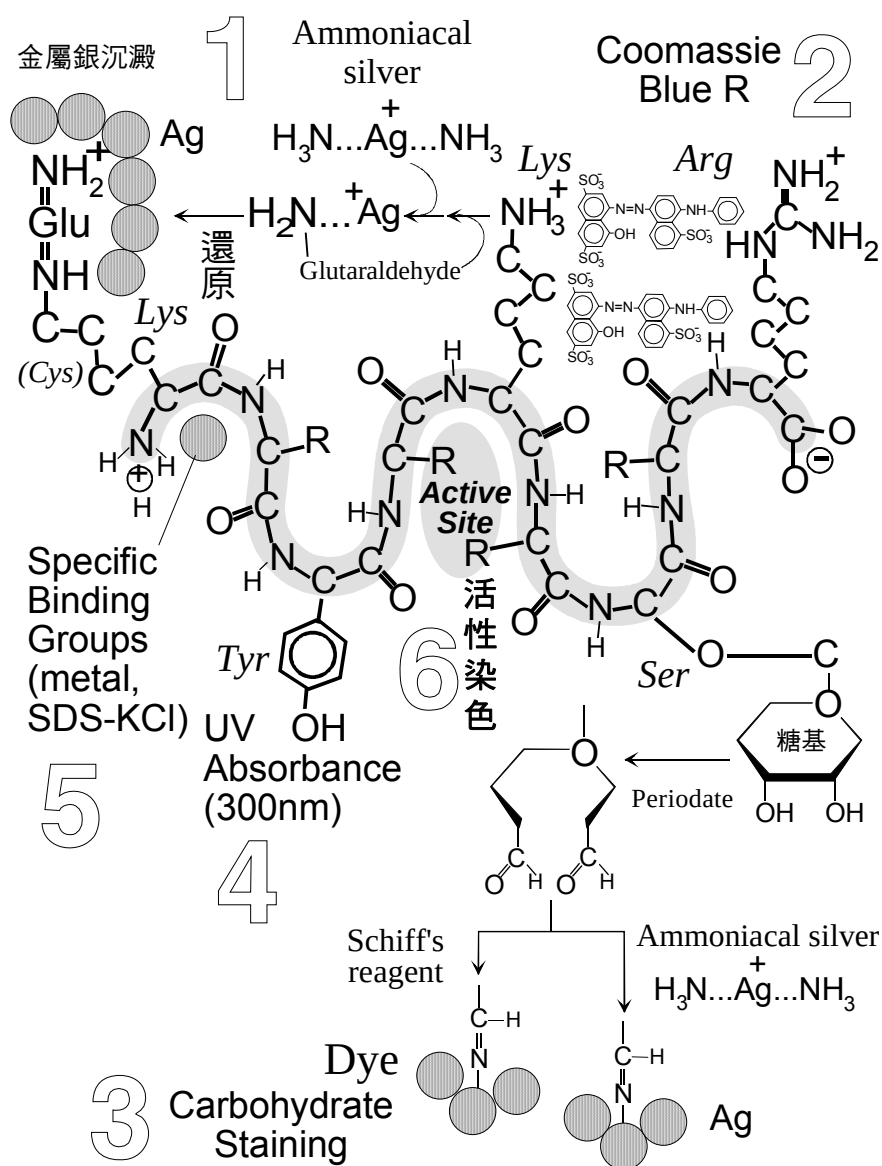


圖 3.7 各種蛋白質膠片染色方法的原理

g. 膠片乾燥法：

大部分的膠片均可利用 玻璃紙三明治法 進行乾燥，效果相當良好，詳細步驟請參閱莊榮輝博士論文 p.72~74；商品的膠片乾燥機 (gel dryer) 不是必要。乾燥好的膠片，可用掃描機 (scanner) 掃描，再以記錄器畫出色帶的位置及高度，與標準品比較則可定量。乾燥後的膠片，再經過熱膠膜護貝後可以長期保存。

3.3.2 等電聚焦法 (IEF)：

Ampholyte 是一種混合物，含有各種連續 pI 的小分子。若在聚丙烯醯胺膠體內加入 ampholyte，通電後 ampholyte 會在膠體中形成一 pH 梯度；當樣本中的蛋白質泳動至相等於其 pI 的 pH 位置時，其淨電荷會變為零 ($\text{pH} = \text{pI}$)，因而聚焦於該處不動。因此 IEF 是依樣本分子 pI 的不同來作分離，其解析度非常好。

3.3.3 二次元電泳：

第一次元先在垂直式柱狀膠體上做 IEF，跑完後取出膠柱，水平放到平板式 SDS-PAGE 的膠片上方，再進行第二次的電泳。二次元電泳可分析成分複雜的樣本，如細胞內的全部蛋白質或肽圖譜；亦可轉印到硝化纖維紙後，再以抗體做免疫染色。第一次元也有人用 disc-PAGE，有其分離效果，亦較方便。

3.3.4 蛋白質轉印法：

- 電泳後若要再對膠體上的蛋白質色帶，做進一步的檢定，則須先轉印到 硝化纖維 (nitrocellulose) 紙 (圖 3.8A 轉印三明治)，因膠片無法直接進行操作。近來多以 尼龍 (nylon) 取代硝化纖維紙，質地較韌、背景呈色低。
- 轉印到硝化纖維紙上的蛋白質，可用 ponceau 或 amido black 染成紅色或黑色；再以 免疫染色法 (immunostaining) 專一性地染出目標分子 (圖 3.8B)。
- 轉印以後的蛋白質色帶，在定位後可以切出來，直接進行胺基酸定序。

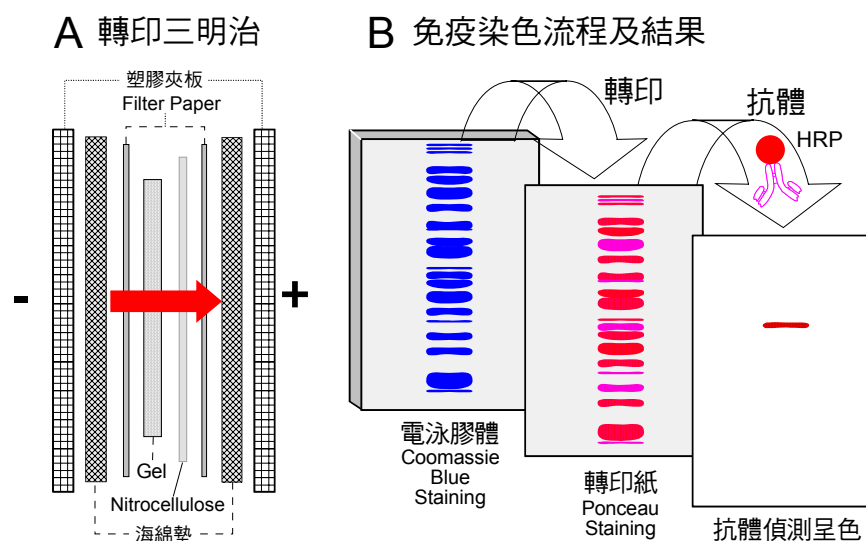


圖 3.8 電泳轉印及免疫染色流程

4 分子量決定法：

分子量是蛋白質的重要性質之一，有許多種測定法，最好用數個方法相互佐證。

4.1 膠體過濾法：

a. 分子構形的影響：

膠體過濾法是依 分子體積 的大小來進行分離，因此若兩種蛋白質的分子量相同，構形較為鬆散者將會提早溶離出來，表現出較高的分子量。

b. 標準蛋白質 (molecular weight marker)：

膠體過濾法需先用已知分子量的標準蛋白質進行層析，求出標準校正線，再以內插法求得樣本的分子量。近來商品供應有標準分子量的蛋白質混合液，使用上較方便。標準蛋白質的取用參考 (kD)：

Thyroglobulin (669, 330); ferritin (440); catalase (232); immunoglobulin G (160); lactate dehydrogenase (140); serum albumin (67); ovalbumin (43); lactalbumin (14.4)

c. 特殊樣本的偵測：

若樣本或標準品蛋白質，能以專一性的活性分析來定位，或有特殊波長的吸光 (如 peroxidase 在 405 nm 有 heme 吸光)，則更方便而確實。

d. Blue Dextran 2000：

是一種藍色高分子聚醣 (分子量約 2,000 kD)，無法進入膠體孔內，會在 void volume (V_0) 溶離出來；其藍色可用來檢查管柱的裝填是否完善。Blue Dextran 對蛋白質有相當強的吸附性，不要與樣本混合在一起進行膠體過濾。溶離緩衝的液離子濃度要保持在 0.1~0.2 M (添加 NaCl)，以克服膠體介質對蛋白質的吸附力。

e. 管柱條件要保持恒定：

- (1) 以膠體過濾法測定蛋白質的分子量時，連同標準品及樣本蛋白質，前後要做數次管柱操作。在這期間管柱的操作條件要保持恆定，不宜中途重新裝填，因膠體的 V_0 可能會改變。
- (2) 以 HPLC 或 FPLC 型的膠體過濾法進行分子量測定，可省去很多時間，而且準確，是最佳的選擇。

4.2 梯度電泳法：

a. 原態或變性：

梯度電泳又可分為 disc-PAGE 及 SDS-PAGE。SDS-PAGE 雖然是測定變性蛋白質的次體分子量，但若緩和樣本處理時的變性條件，則亦有可能看到多元體分子。

b. 樣本等電點的影響：

原態梯度電泳雖然是依樣本分子量的差異來進行分離，但若蛋白質分子不帶淨電荷，甚或因 pI 太高而帶相反電荷，則梯度 disc-PAGE 法並不適用。梯度 SDS-PAGE 則無電荷上的問題，結果較為可靠。

c. 標準蛋白質 (marker)：

梯度電泳也跟膠體過濾一樣，要與標準分子量的蛋白質比較，才能定出樣本的分子量。但因電泳的解析力較佳，故可把所有的標準蛋白質混合起來，一起進行電泳，在同一塊膠片上比較。

d. 結果判定：

我們以梯度 disc-PAGE 定原態分子量，對 pI 較低的蛋白質 (4~6 之間)，確實有相當高的準確度，但最好再用膠體過濾法確認。進行梯度電泳時，要比一般電泳多跑一些時間，染料跑出去也無妨，因為蛋白質會卡在較密的膠體中，更增加解析力。但在正式論文中，請不要以膠體電泳法做為檢定分子量的唯一依據，也避免把標準分子量標在膠片上，以免引起爭議。

4.3 其他分子量測定方法：**4.3.1 超高速離心法：**

a. 沉降係數：巨分子在密度梯度的介質中進行超高速離心時，其沉降速率 (S) 與分子量、分子密度與分子形狀有關，因此可用來測定分子量。

b. 超高速離心法也可做為一種酵素製備方法，在酵素純化方法中有詳細說明。

4.3.2 由胺基酸序列計算分子量：

a. 許多蛋白質已可得知其核酸 (cDNA) 序列，由此可推得其胺基酸序列，以電腦計算得此胺基酸序列的分子量，即為該蛋白質的分子量。

b. 注意若此蛋白質為醣蛋白，或有其它修飾基團 (輔酶)，則實際分子量應該會更大些；但若有轉譯後修飾 (post-translational modification)，則分子量又會小些。

4.3.3 質譜儀分析：

質譜儀可偵測各種不同大小質量的分子，故可以用來測定蛋白質的分子量；對較短的蛋白質甚至可以決定其胺基酸的序列，後者仍在開發階段，漸趨成熟。

5 蛋白質構造與組成分析：

以下的檢定方法，需要純度極高的蛋白質，因此最好在一般的層析法純化後，再以製備式電泳得到均質蛋白質。其中很多反應會與胺基反應，因此樣本中不能含有具胺基的物質 (如 Tris 或其它胺基酸)，以免干擾反應。

5.1 N-端或 C-端胺基酸決定：

現在已經很少只是測定 N-端，通常都直接去定序。

- 一般蛋白質都有固定的 N-端及 C-端，N-端胺基酸可使用 dansylation 標以 dansyl 基團，再以 HCl 水解蛋白質。除了 dansylation 之外，尚有許多類似的反應可用來檢定 N-端胺基酸 (圖 5.1)。
- 水解所得的游離胺基酸以 polyamide (TLC plate) 進行雙向薄層層析分離，標有 dansyl 的胺基酸在 UV 光下會發出螢光，與已知的 20 種 dansyl 胺基酸比較，即可推判；亦可用 HPLC 分離胺基酸。
- 有些蛋白質的 N-端胺基可能經乙醯化修飾而阻礙 (blocked)，無法進行反應，尤以植物來源的蛋白質為甚；遇此情形，可能要分出胜肽片段來定序，或者以化學反應去除此一修飾。
- 有些蛋白質含有數條胜肽鏈，由雙硫鍵連接起來 (如 chymotrypsin)，因此會有數個 N-端胺基酸。則要先打斷雙硫鍵，把游離的各段胜肽分開後，再行定序。
- C-端可用外切酶 carboxypeptidase 一個一個切下來，再進行胺基酸測定，由胺基酸出現的多寡順序，即可得知 C-端序列；但因水解反應不好控制，較不常用。

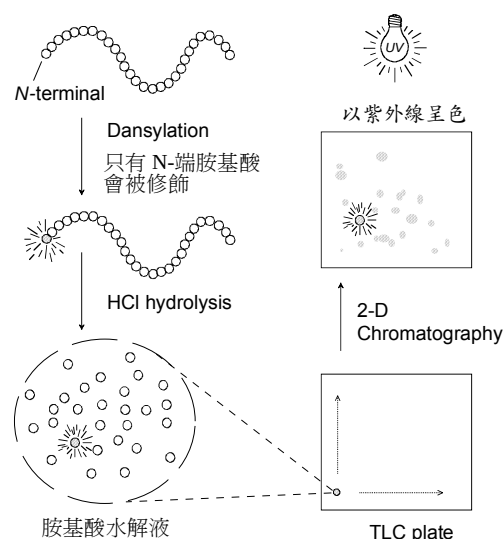


圖 5.1 以 dansylation 檢定 N-端

5.2 胺基酸組成分析：

- 蛋白質以 6 N HCl 或 4 N methanesulfonic acid 在真空 110°C 下水解 24 h，水解液以離子交換 HPLC 分開各種胺基酸並分別測定其含量，可得知各胺基酸的百分組成。
- 由胺基酸百分組成的異同，即可比較兩種蛋白質的相似性，並得知蛋白質構造的性質與特徵。例如有一種鎘結合蛋白 metallothionein 含有很高量的 Cys，便是以 Cys 與鎘結合。
- 使用 HCl 水解蛋白質會破壞 tryptophan，並且使 glutamine 及 asparagine 失去胺基，成為 glutamic acid (合稱 Glx) 及 aspartic acid (合稱 Asx)，分析時要注意這些事實。同時，樣本及緩衝液中要避免太多胺基的物質 (如 Tris)，以免干擾 HPLC 分析。

5.3 胺基酸定序法：

胺基酸序列是一個蛋白質最重要而基本的資訊，有兩種方法可求得胺基酸序列。

5.3.1 cDNA 間推法：

由蛋白質基因的核苷酸序列，可推得其胺基酸序列，是目前最常用的定序方法 (reverse biochemistry)。此基因一般選殖自 cDNA 庫，在經過群殖、定序等工作，轉譯成蛋白質的胺基酸序列後，就可進行系統性的分析工作；通常以電腦程式搜尋比對，例如 GCG (工作站)。比較重要或常見的分析項目如下：

a. 序列鑑定：

若為未知蛋白質，則進入蛋白質資料庫 (SWISSPRO) 搜尋，與已知的序列比對；可得知你的蛋白質是已經被發現的，或是一個新的蛋白質。通常都可比對得類似的蛋白質序列，則可推知此未知蛋白質的可能功能。

b. 二級構造分析：

由一級胺基酸序列，可預測其二級構造，推得構造與生理功能上的關係。通常三級立體構造無法精確預測，除非有一個已知構造的類似蛋白質可供參考。

c. 功能序列分析：

許多特定的胺基酸片段，有特定的生理功能，稱為 **signature**。若能找到某些功能序列，可推測此蛋白質的可能生理角色。例舉 **signature** 如：各種進入胞器序列、PEST 降解序列、內質網回收序列 (KDEL) 等。

d. 一般性質分析：

由胺基酸序列可推出此蛋白質的等電點、分子量、抗原決定基片段、各種蛋白酶的水解點等有用資料。

5.3.2 Edman 直接定序法：

一個一個把胺基酸切下來直接定出其種類。

a. Edman 反應：

類似 dansylation 的 N-端標示反應，但是使用 PITC (phenylisothiocyanate) 在蛋白質的 N-端進行修飾反應，生成 PTH 衍生物；Edman 反應後的 N-端胺基酸可以被切下來，以 HPLC 檢定為何種胺基酸。剩餘的蛋白質部份可以繼續第二輪 Edman 反應，通常可進行二、三十個循環 (圖 5.2)。

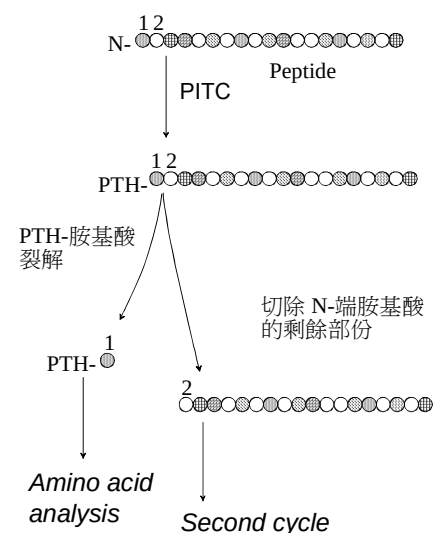


圖 5.2 Edman degradation

b. 自動定序：

目前都以自動定序儀進行，並且把樣本蛋白質固定在薄膜上，更為方便靈敏。可在電泳後轉印到纖維紙上，切出所要的色帶，直接上機定序。

c. 定序之前的基本資料：

- (1) 檢查蛋白質的分子量及四級構造，若有異質多元體，要先分出均質單元體。
- (2) 若有分子內或分子間 雙硫鍵 連結，應先還原之，以解開三級構造。
- (3) 有無碳水化合物、脂質等修飾物質，或具有 prosthetic group。
- (4) 分子量太大的蛋白質應如何切成小片段，並分離得各肽段，分別定序。

d. 直接定序的問題：

(1) 蛋白質要先切成肽：

由於定序只能進行二、三十個循環，而蛋白質通常有數百個胺基酸之多，因此長條蛋白質要先切成許多小片段，分離出各個小片段後再進行定序。

(2) 要用兩套肽比對：

但定出各獨立片段的序列後，無法得知各片段之先後次序關係。因此要以兩種不同專一性的蛋白酶，製作兩組不同的小片段，兩組的切點不同，以便在分別定序後互相比對重疊部份，找出兩片段的連接點 (見下節)。

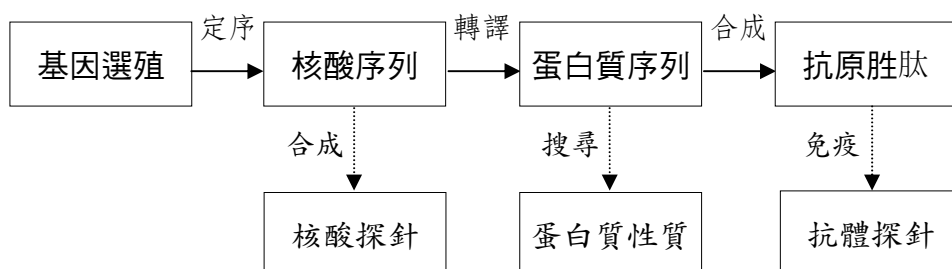
5.4 肽圖譜：

a. 專一性蛋白酶：

可對蛋白質的特定胺基酸進行水解，得到一群不同長短的肽段。兩個不同蛋白質經同一蛋白酶水解，所得的兩肽群，其肽鏈數目、各段肽的胺基酸組成與長短均不相同，可鑑定此二蛋白質的相似程度。反之，不同專一性的蛋白酶會切在不同的胺基酸上，對同一蛋白質會切出不同的肽圖譜 (如下圖 5.3)。

b. 快速得知蛋白質的部分序列：

由於細胞生物學的蓬勃發展，對未知蛋白質的探索激增，研究人員多使用肽定序的方法，快速檢定目標蛋白質的身份；或可定出未知蛋白質的一段胺基酸序列，反譯為核酸序列做為群殖的探針；或合成人工肽進行單專一性抗體的製備。以下的流程可作為一般的例子：



5.4.1 蛋白質的專一性水解：

樣本蛋白質要先經變性處理，把胜肽鍵解開，才能以蛋白酶水解之。

a. 專一性內切酶： 例舉如下

Trypsin (Lys, Arg);

Chymotrypsin (Phe, Tyr, Trp);

Sa protease (Asp, Glu)

b. 化學反應法： CNBr (Met)

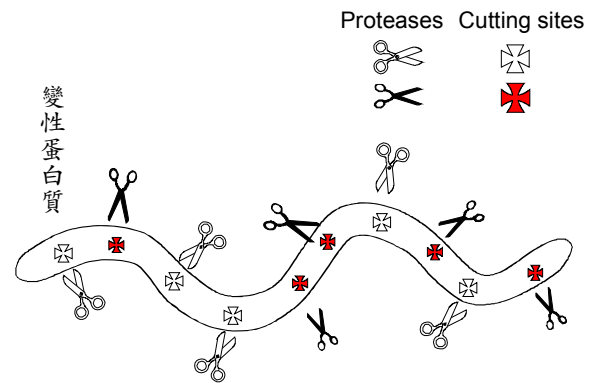


圖 5.3 以兩種蛋白酶水解同一蛋白質

5.4.2 檢定胜肽群的方法：

最近由於微量定量方法的進步，以下方法除了可以分離出胜肽片段外，也可以收集各分割或剪出色帶，送自動定序分析，是很重要的分離檢定技術。

a. 電泳/層析雙向圖譜：

胜肽片段先經高電壓濾紙電泳後，轉 90 度再進行濾紙層析，則可分出各個胜肽片段；也可使用薄層層析，比較方便、快速；這是標準的方法。

b. HPLC：

利用 HPLC 的高解析力，快速分離各段胜肽，多使用反相層析管柱。

c. SDS-PAGE：

由完全水解所切得的胜肽片段，可以 SDS-PAGE 來分析；電泳後也可進行轉印，再用抗体做免疫染色。

5.5 其他相關方法：

5.5.1 分子消光係數：

若有均質的酵素，則可將已知吸光度 (280 nm) 的液体樣本，經冷凍乾燥後求其蛋白質的乾重，推得分子消光係數，以做為蛋白質定量的依據。請參考前文 1.3 節，利用分子消光係數來定量蛋白質的方法。

5.5.2 蛋白質分子結構分析：

a. X 光繞射分析是探討蛋白質分子結構的最根本方法，但須先做出蛋白質結晶，對大分子蛋白質而言相當不易。近來多以分子選殖方法，以表現蛋白質進行結晶繞射分析。

b. 使用溶液狀態的蛋白質進行 NMR (核磁共振) 分析，可得溶液狀態的分子構造。但因為需要大量電腦運算，分子量過大者不易處理。

6 免疫學工具的利用：

若能得到酵素的抗体，則對此酵素的研究將有非常大的幫助，因為抗体的專一性很高，可做為專一性的探針，廣泛地應用在 ELISA、免疫沉澱或免疫轉印上。有關抗体的製備及詳細的實驗流程，請參考相關的免疫學文獻 (如 Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies, A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory)，或參閱莊榮輝博士論文的實驗方法第三章；以下以實用角度，說明生產抗体及其應用的注意事項，及常見問題的評估。

6.1 抗原製備：

a. 蛋白質抗原：

與免疫動物的遺傳背景離得越遠的蛋白質，其抗原性越好，都可順利地得到高效價抗血清；通常植物蛋白質都是很強的抗原。

b. 小分子抗原：

分子量很小的胜肽 (在數千左右者)，本身無法誘生抗体，要先結合到大蛋白質分子 (稱為 carrier，通常用 BSA 或 KHL hemocyanin) 上去。

c. 半抗原：

分子量極小的一些小分子 (如黃麴毒素僅有數百)，稱為 hapten (半抗原)，接到 carrier 後也可誘生抗体。

d. 人工合成胜肽抗原：

若已知某蛋白質的胺基酸序列，可以人工合成某段胜肽 (大約十幾個胺基酸)，連接到 carrier 後免疫可得抗血清。通常都先以電腦程式 (PC/GENE) 預測抗原性較強的胺基酸序列，選出數段進行免疫，因為可能有些片段不易產生高效價的抗血清。

e. 抗原的純度：

抗原純度越高越好，尤其在製備傳統抗血清時，純度不夠可能會有假結果。但製備單株抗体的抗原可不用完全均質，以方便抗原的大量製備；因為在篩選得單株抗体後，可由免疫轉印確認抗体的專一性，去除不對的單株抗体。

f. 抗原的形式：

一般蛋白質抗原都以溶液形式處理，但也可自膠片或轉印紙上直接把色帶切割下來，研碎後加佐劑即可免疫。

6.2 免疫流程：

a. 標準免疫流程：

圖 6.1A 是免疫小白鼠的標準流程，在得到可用的抗原後，約需二到三個月的時間來免疫動物。注射的抗原量要適中，過量的抗原，不見得會誘生較好的抗体。最近有商品化的高效能免疫佐劑 (TiterMax)，可以在一個月內誘出抗體，並可減少免疫次數，而其效價也不差。

b. 其他免疫流程：

近來有許多快速免疫方法，例如把抗原加佐劑後，直接打入脾臟，以縮短時間或免疫次數；有些血清效價似乎不錯。不過免疫反應相當複雜，仍有許多科學上的未知現象，若非必要還是採用標準流程。

6.3 抗体製備：

a. 傳統抗血清：

免疫時間或次數完成後，可試採血看效價如何，多以 ELISA 進行測試。若 ELISA 效價達 5,000 以上 (即血清稀釋 5,000 倍濃度在 ELISA 有 50% 最高呈色)，即可進行全部採血。待血液凝固後，離心取上清即得抗血清；儘量使用懸藍式離心機。

b. 腹水採集：

小鼠的全血量很少，但若誘生其腹水，則體積可增大許多。如圖 6.1A 流程中先施打 pristane 減弱小鼠免疫力，再打骨髓癌細胞 NS-1 進其腹腔，可誘生腹水一至數毫升。腹水內多為抗体，可進一步純化。

c. 單株抗体：

單株抗体針對單一個抗原決定基具有極高的專一性，是傳統抗血清所無法達致的特點，對蛋白質細微構造的分析很有用處。其製備過程相當複雜，操作順利的話，前後可能需時三個月以上；但若技術與設備均完善，要取得有用的單株抗体並非難事。

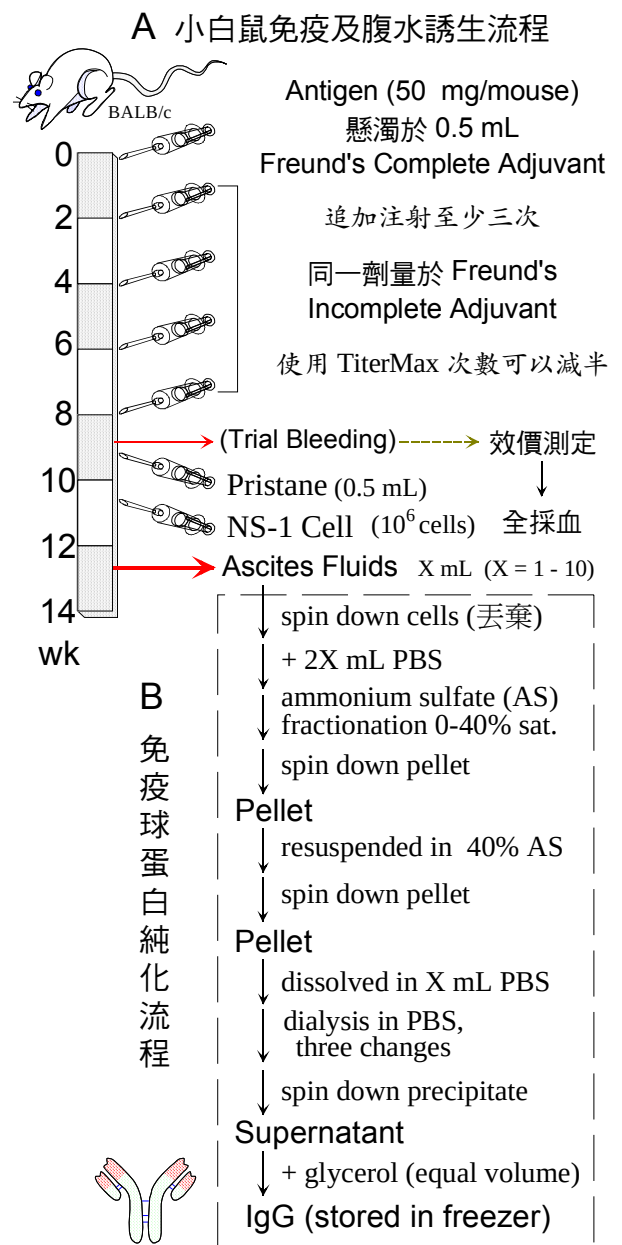


圖 6.1 免疫及抗体純化流程

d. 免疫球蛋白：

無論是得到抗血清或腹水，應當儘快進行免疫球蛋白 (Ig) 的純化，通常只要硫酸銨沉澱即可得到相當純的球蛋白 (圖 6.1B)。要注意這樣所得到的抗体，其中只有一部分是專一性的抗体，因為動物本身有許多原先就存在的抗体。

6.4 抗体的應用：

a. 轉印及免疫染色法：

是抗体在生化及分子生物學研究上，最重要的貢獻。其詳細說明，請見前文所述。

b. 免疫沉澱法：

若把抗体分子接在一固相擔體上 (大多使用 CNBr-Sephrose)，則可用來做為專一性的沉澱劑，把樣本中的抗原分子專一性地沈澱下來 (參閱圖 6.2)。

c. 親和層析法：

上述接有抗体的固相擔體，也可用管柱方式進行親和層析，以純化抗原分子，將在酵素純化方法中說明。

d. 雙向免疫擴散法：

是古老的免疫學檢定方法，但仍有其應用上的特點；可以檢定抗原及抗体間的專一性反應，並可鑑別兩個抗原分子之間的差異性程度。

e. 酵素免疫分析法 (ELISA)：

原理與免疫染色法類似，是利用抗体的專一性去偵測抗原量的多寡，並以酵素為放大信息的標示，因此有相當高的靈敏度；因為使用固相擔體，故操作較為方便，同時可處理大量樣本，但解析力不及電泳轉印的免疫染色法。

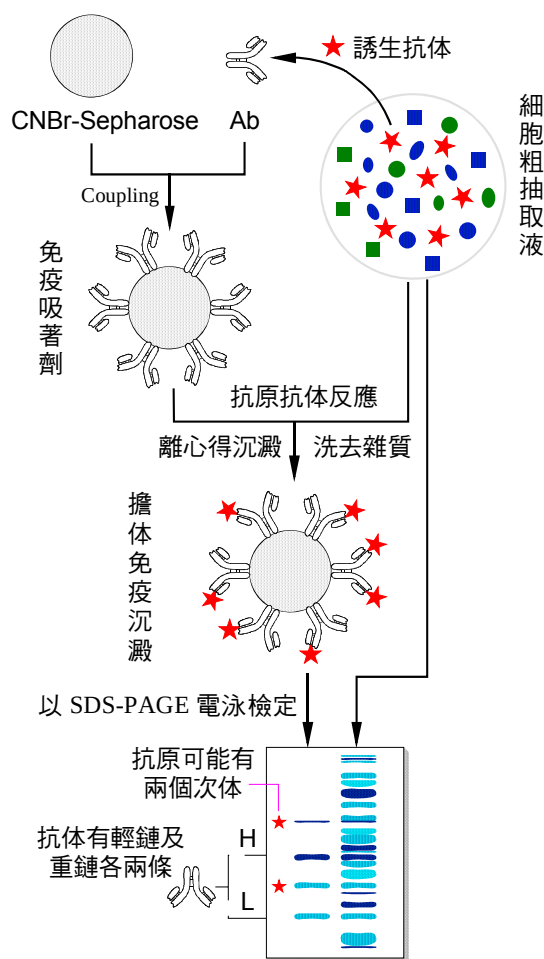


圖 6.2 擔體免疫沈澱的原理及應用

7 蛋白質科技：

分子生物學快速發展五十年後，對核酸的瞭解已經累積有相當的結果，由核酸所表現得到的蛋白質，也逐漸重新顯現其重要性。新的蛋白質科技，除了加強其原有的純化與檢定能力之外，更深入探索蛋白質的分子構造，解讀其分子作用機制及細胞生理功能；不論在操作的技術方面，或者研究者的觀念及其探索目標，都有相當大的改變。

7.1 蛋白質科技的範疇：

生物技術是利用生物體產生對人類醫學或農業有用的物質，其發展是循著 Central Dogma 主軸進行，而 Central Dogma 的最終產物就是蛋白質。因此，發展生物技術的兩大基石，一為以核酸為主幹的分子生物學，另一則為蛋白質科技。

- (1) 蛋白質科技的範疇很廣，但若以生物技術的角度來看，可以將其規劃成 基礎技術、構造與功能 及 蛋白質工程 等三部份，每一部份又各由兩類主要內容組成，圖 7.1 列出整個蛋白質科技的架構。
- (2) 圖 7.1 也列出台灣大學在 2000 年所開設的相關課程，分成講習及實驗兩種，有的已經開設，有的即將開課，有的正籌設中；其他學校應可以找到對等課程。

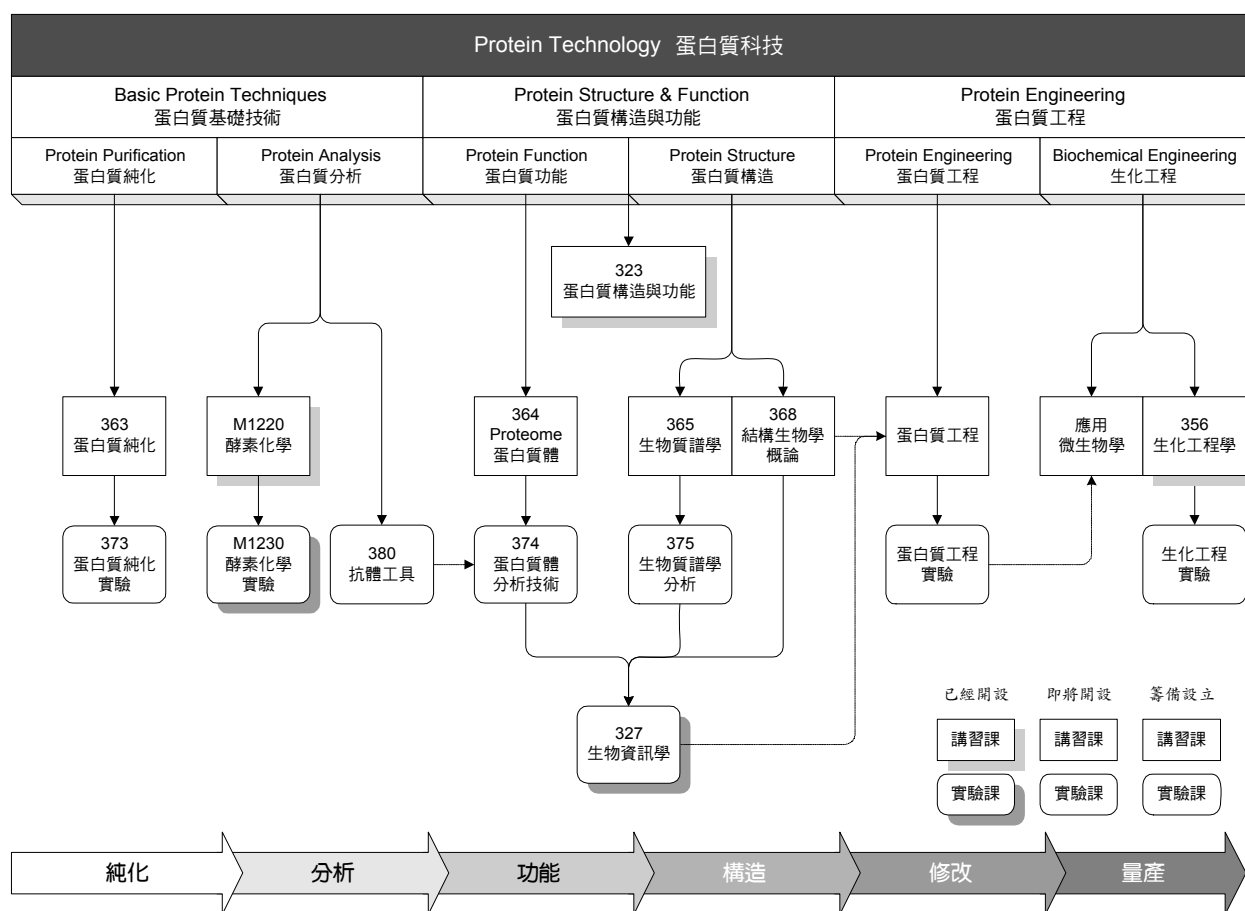


圖 7.1 蛋白質科技的範疇及相關學科

- (3) 這些課程可以連結起來，成為 純化→分析→功能→構造→修改→量產 的流程，組成有關蛋白質的整套科技。由基因重組或細胞培養技術所得到的蛋白質，可以在任一適當地點，插入本蛋白質流程。

7.2 蛋白質的微量分離及檢定：

雖然傳統的蛋白質分離純化技術，在初步分離或大量純化上仍然很重要，但對於少量樣本或基因群殖表現出來的蛋白質，則在純化策略的概念上有相當大的改變。通常不再拘泥於一步步的純化工作，不再處處講求活性回收及純化倍數；而以一種快速達成的流程，很快找到所要的蛋白質，取出少量均質蛋白後便進入微量定序的檢定工作，可馬上得知該蛋白質的身分。這種強迫取分策略，要靠以下數種微量分離及微量檢定系統的建立及發揮。雖然策略改變，但蛋白質純化或分析的基本原理是不會改變的。

7.2.1 微量分離技術：

其基本理念是『看得到的，就拿得到』（what you see, what you get），通常是利用電泳或 HPLC 分離，收集所要的色帶或尖峰；下面列出幾個基本方法，圖 7.2 把這些方法以流程圖串連起來。

(1) SDS-PAGE 及轉印：

部分幸運的樣本，在經過電泳及轉印後，即可得到乾淨的色帶，其上下均無干擾的色帶。則可在定位後切出所要的色帶，立即送去定序。

(2) 二次元電泳：

若上述方法均無法取得單一蛋白質色帶，則須以二次元電泳及轉印，分出所要的色點，切出之後再送定序。

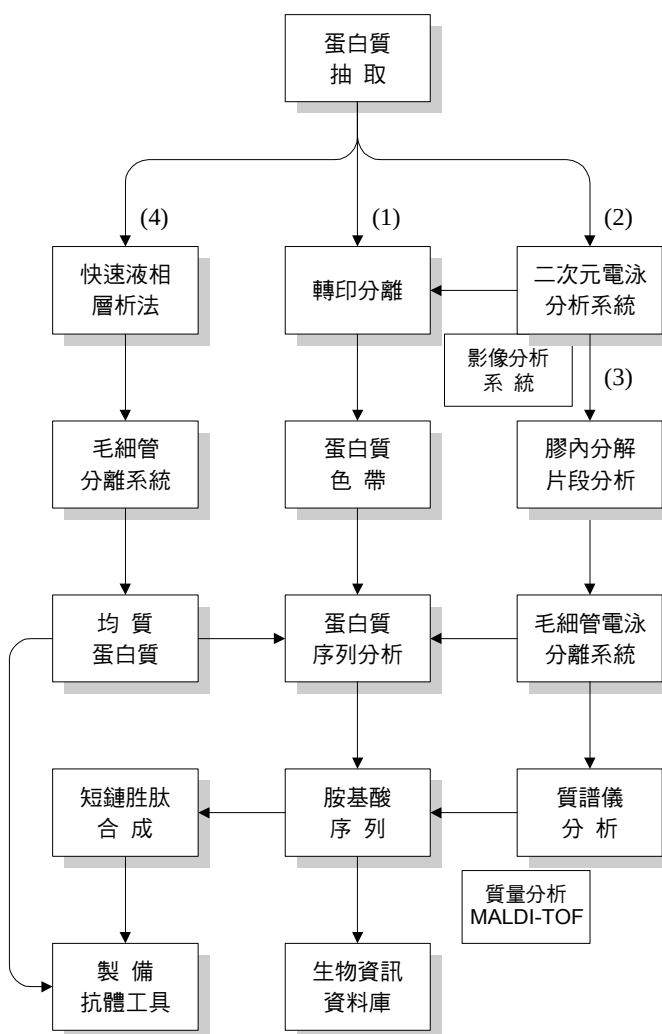


圖 7.2 蛋白質快速純化與微量分析流程圖

(3) 膠體內水解：

很不幸地，有許多蛋白質的 N-端被修飾，也就無法直接定序。若蛋白質夠大，則可以在試管中進行去修飾的化學反應，但通常沒有足夠量的蛋白質。因此，可以在上述的兩種電泳膠片上，直接切出所要的色帶，在膠體中以蛋白酶進行水解；所得到的肽片，再以 HPLC 分離後以質譜儀進行定序。

(4) 微量分離系統：

HPLC 或 FPLC 都適合做為微量分離工具，近來又有毛細管電泳或毛細管 LC；但通常在進行這些微量分離之前，都要先以傳統的分離方法進行部分純化。

7.2.2 微量分析技術：

靠科技發展之賜，分析儀器的靈敏度越來越高，因此所需樣本的量也越來越少，在純化上可以減少很多麻煩；但因為靈敏度高，因此也比較容易受雜質干擾。常用的分析方法如下，通常都是極為昂貴的大型儀器。

(1) 蛋白質定序：

還是以 Edman degradation 為基礎，但靈敏度可達 10~100 pmole，因此一個電泳的色帶已足夠定序。一般可定出十多個至四十個胺基酸的序列，此序列即可輸入電腦，以軟體如 PC/GENE 搜尋相似的蛋白質，以推定其身分。

(2) 質譜儀分析：

質譜儀可以精確檢定樣本的分子量，因此蛋白質水解後的片段，可用質譜儀精確定量；也可推出此片段上的各種修飾，例如磷酸化、醯化修飾等。通常質譜儀分析緊接在 LC 分離之後進行，稱為 LC/Mass。

7.3 蛋白質體研究：

進入新世紀後，生物學上的第一件大事，將是人體基因的核酸序列將完全被解出，這是號稱 Genomic Project 的浩大工程；得到人體所有基因的序列後，第一件可以做的事，就是把這些基因所表現的蛋白質翻譯出來，可得知一個生物的整個蛋白質體，稱為 proteome。Proteome 也是一個龐大資料庫，可能有下列的作用或發展。

7.3.1 由 proteome 推出該生物的代謝途徑：

- (1) 檢查一個生物 proteome 內的所有蛋白質，應當可以拼湊出其細胞的代謝途徑；例如當我們發現某病原菌的 proteome 中有 hexokinase，以及其它所有的 glycolysis 酵素，則當可推斷此菌有糖解作用，甚至有其下游的 TCA cycle 等。
- (2) 如此可以瞭解該病原菌整體代謝，並找出其弱點加以攻擊。也可以改變一個有用菌的代謝，使其代謝產物更能夠符合人類的需要。

- (3) 因此，對傳統生物化學的代謝部分，將會有全新的角色與詮釋；我們應該以此新的角度，重新去認識代謝途徑。

7.3.2 從 proteome 找出疾病的病變蛋白質：

- (1) 大部分的人類疾病，幾乎都可以在基因上找到根源，因此若能夠在標出造成病變基因的位置，也就能夠找出造成病變的蛋白質 (marker protein)。
- (2) 清楚瞭解病變蛋白質後，可能推出該疾病的致病機制，即可發展該疾病的檢測方法，甚或治療該疾病的方法。

Blackstock WP, Weir MP (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotech* 17: 121~127

問題集

以下各部份的大小問題，有的是實驗的重要原理或背景知識，有的是在進行實驗時，常見到的問題；我們盡力收集了有關蛋白質純化及分析的種種疑難雜症，其中很多是你可能會碰到的。若能全部解答過一次，預知實驗可能遇到的難關，以及種種潛在的危機，則實際在進行研究工作時，將會比較得心應手，有如預先打過預防針一樣。其中很多問題並沒有一定的標準答案，因此鼓勵同學組成討論小組一起解題，先各自做好答案，再聚在一起核對並討論正確答案；解答問題時，請儘量撐開自己的想像力，想出所有可能的答案。

蛋白質基本性質：

1. 兩蛋白質分子間的微弱作用力稱之為二級鍵的有那些？
2. 把NaCl固体溶入水中，其 ΔG 小於零，但巨觀為一吸熱反應，解釋為何？
3. 為何分子內含有較多親水性胺基酸的蛋白質，在水環境中會相對的較不安定？
4. Domain 的形成，對生物在分子演化上有何優點？
5. 分子間的專一性吸引力由那些力量與因素構成？
6. 列表說明蛋白質分子的各級構造，及其組成及鍵結力量。
7. 以一個接近球形的蛋白質為例，請以想像畫出一個酵素蛋白質分子的大概形狀，並在其分子表面畫上各種可能的物理或化學特徵 (如正負電荷、非極性區、活性區等)。
8. 酵素與其基質之間的結合，有很強的專一性，請以生物化學觀點說明二者之間為何能有如此強的結合力量？有那些方法可以有效地破壞這種專一性的結合力？請至少寫出五種方法。
9. 上生化課時，不斷提到胺基酸基團的重要性，請寫出在生化上受到胺基酸基團性質所影響的現象、性質或構造，至少十種。如蛋白質 pI 是由其所含胺基酸帶電性所決定。
10. 由蛋白質的一級構造就可以推定其三級立體構造嗎？請分別以正、反兩方說明之。
11. 為何蛋白質的構形 (conformation) 對其生理活性非常重要？
12. SP 分子是由兩條 110 kD 的次體所組成，當分子中央的 L78 被切開後，在 SDS-PAGE 上可看到它成為一群分子量約在 50 kD 的片段；但在 disc-PAGE 上卻仍保持約 200 kD 的分子量，而且經活性染色仍有相當高的酵素活性。說明 SP 分子如何能有上述現象。
13. 以酵素催化反應的中間過渡狀態分子去免疫動物，製備並篩選單株抗體，即獲得可以催化此反應的抗體 abzyme；請說明這個過程的原理。

14. Abzyme 的催化活性一般都不高，與真正的酵素催化還差一段距離。請比較二者的異同，並解釋為何有如此差異。
15. 氫鍵在分子構造與功能上十分重要，以蛋白質或酵素為主体對象，請列出十種構造或分子行為，與氫鍵有重要關係。例如蛋白質的 α helix 構造中是以氫鍵做為主要構成力量。
16. Hemoglobin 的例子告訴我們，為了正確的生理功能，維持蛋白質分子的構形比較重要，還是維持其中的胺基酸序列的保守性比較重要？
17. 酵素的活性區 (active site) 是酵素與其基質結合，並且催化反應產生生成物的地方，請問活性區與酵素的其它部位，到底有何不同或者特殊的地方，使得活性區能有這些奇妙的催化作用？
18. 蛋白質分子是由胺基酸分子所連接而成的巨分子，並且捲繞成固定的構形，以便發生特定的生理功能。二十種胺基酸的 α -基團對酵素的催化作用有極大貢獻，這些基團的電荷有正有負，有長有短，有大有小，有極性有非極性。雖然如此，為何有些酵素還需要輔酶的幫助？
19. 為何 RNA 可以有類似酵素的催化作用，而 DNA 則沒有這種能力？
20. 由分子選殖所得到的 cDNA 序列，可以推出某酵素的胺基酸序列，也因此可以算出該酵素可能的分子量；但在實際推算時，經常發現實際的分子量不符，有過大者、也有過小者。請分別舉出分子量變大或變小的可能原因。

酵素純化方法：

實驗室操作：

1. 請指出酵化實驗室中，有那些 儀器 可能具有危險性？請至少例舉三種。
2. 請指出酵化實驗室中，有那些 藥品 可能具有危險性？請至少例舉三種。
3. 在使用天平之前，你要注意那些事項，以求得最精確的稱量結果？
4. 沒有正規的校正儀器時，你如何利用實驗室內的工具大略檢測天平的準確度？
5. 若沒有標準 pH 溶液時，你如何利用實驗室內的物品校正 pH meter？
6. 如何很快地校正自動吸管？
7. 台大在暑假期間常常因限電或颱風而停電，你好不容易把你的實驗材料準備好，是十瓶裝有 20 mL 蛋白質溶液的粗抽取液，你將如何使你的樣本在台大安然度過暑假？
8. 做 ELISA 時要用一種 second Ab-HRP 的連結體試劑，是把抗体分子與酵素 HRP 用化學鍵連在一起的呈色劑，HRP 在反應後可以呈現黃色物質，可供定量之用。某生在兩個

月內持續進行 ELISA 實驗，發現實驗所得的最大吸光度，一週一週下降，由最早的 1.2 降到 0.2。已知抗体及 HRP 都是相當穩定的蛋白質，分析的各個步驟也沒有問題，請指出可能的失誤在那裡？

9. 某生進行高速離心時，使用四隻 30 mL 的離心管，把試管兩兩各自平衡得非常準確，才放入離心陀中進行離心。但開始不久離心機就聲響大作，顯然是沒有平衡好。請問怎麼會這樣？
10. 某生用光度計測 280 nm 波長的吸光，以檢測層析管柱的溶離分劃共 50 支試管，結果發現 50 支的吸光一律都很高，超出了可測定的上限，請問出了那些可能的問題？
11. 續上題，老師知道之後，換了一支測光管給他，結果稍有改善，勉強可以看出有蛋白質峰起伏，但吸光還是都在 1.5 以上，請問又是什麼問題？
12. 有一種酵素藥品，買來時是 1 g 瓶裝粉末，要放在 -20°C 保存。若你每次要使用 50 mg 做實驗，大約要進行十多次實驗，則你將如何處理這瓶酵素？
13. 某實驗室新買一無霜冰箱，有甲乙丙丁四位同學分別把他們的藥品 X 放到冷凍櫃去保存，經過一個暑假的貯藏後，甲發現活性只剩 30%，乙只剩 50%，丙剩 75%，而丁則有 90%。除了暑假有一次因颱風停電數小時外，他們確定沒有人故意搗蛋。請問為何活性會下降？且為何會有這種差別情形？

蛋白質抽取：

1. 某甘藷塊根蛋白質由粗蛋白經純化 100 倍後達到均質，活性回收率約有 50%，則此蛋白質在原甘藷材料中約佔多少百分比？
2. 若蛋白質分子表面幾乎沒有疏水性胺基酸，則它容不容易 salting out 出來？
3. 為何蛋白質變性後容易沉澱下來？
4. 為何硫酸銨沉澱是以百分飽和度來計量，而非重量或體積百分比？
5. Salting out 的相反程序是否為 salting in？
6. 樣本以較低離子濃度的緩衝液透析，可否視為 salting in 的相反程序？
7. 在純化過程中，經過硫酸銨分劃後，發現比活性僅增加為 1.1 倍，則此一純化步驟有無存在必要？請解釋為何。
8. 使用有機溶劑沉澱蛋白質，比之鹽析分劃有何優缺點？
9. 能否用純水去溶解蛋白質？說明為何？
10. 用有機溶劑沉澱蛋白質時，為何要在低溫下進行？
11. 植物細胞比動物細胞要難以處理，請問植物細胞有那些特有問題？

12. 植物細胞在打破之後，其抽出液很容易變成褐色，其原因何在？如何防止？
13. 用 PEG 4000 可以把蛋白質沉澱下來，但接著你如何除去這些 PEG？
14. 為何硫酸銨是一種中性鹽類？
15. 為何蛋白質在硫酸銨的沉澱中比較穩定？
16. 加硫酸銨進行鹽析時，若把預定加入的硫酸銨固体一次倒進蛋白質溶液中，會發生什麼問題？
17. 硫酸銨分劃時，各分劃的酵素分佈應當是以其總活性來評量，而非使用比活性，請說明為何。
18. 用有機溶劑沉澱蛋白質時，為何會產生熱量？
19. NaCl 或 KCl 會使蛋白質在水溶液中的溶解度上升，而硫酸銨或硫酸鈉反而會使蛋白質溶解度下降，為何兩種鹽類會造成這樣的差異？
20. 通常在純化核酸時，較麻煩的干擾物質不是蛋白質，而是多醣類，很不容易完全去除之，請以化學構造的觀點說明之。
21. 蛋白酶可略分成四大類，請分別說明其作用機制如何。並請列出每一類的抑制劑。
22. 有一位研究生經常要做免疫球蛋白的簡單分離與純化，他一直在實驗桌上放了一瓶硫酸銨溶液，雖然說是水溶液，但硫酸銨固体卻因過飽合而結晶在瓶底，且結晶數量不少。每次他要做硫酸銨分劃時，只要加入與樣本同體積的這種硫酸銨溶液 (上清部份)，就可以把抗体沉澱下來。請問他這種做法適當嗎？有何應該注意之處？

色層分析法：

1. 層析法為何一定要有兩相系統？(一相不行嗎？三相不是更好嗎？)
2. 為何濾紙層析法 (PPC) 是一種 partition (液相-液相) 層析？
3. 用 Sephadex G-25 脫鹽時，若因離子濃度改變，而致蛋白質發生沉澱，對實驗有何不利之處？
4. 通常脫鹽的 Sephadex G-25 管柱均製成可丟棄式，這種消耗有必要嗎？
5. 為何膠體過濾法是一種 partition 層析？
6. 在進行離子交換法時，為何樹脂類的介質不適用在蛋白質樣本？
7. 某蛋白質的 pI 是 4.2，若把緩衝液調到 8.5，則在此緩衝液下，應當使用那一種離子交換介質？請問在這樣的 pH 下進行離子交換層析，可能會有什麼問題？
8. 為何 pH 的連續梯度不容易拉得好？

9. 親和層析法是 partition 或 adsorption 層析？ 親和層析法為何要使用固相擔體？
10. 薄層層析 (TLC) 可有 partition 及 adsorption 兩種層析方式，各是如何操作的？
11. 一隻直徑 2.6 cm 的管柱，長度 100 cm，想要裝填 Sepharose CL-6B 至八成的高度。 現有一瓶原裝的膠體，瓶子上面標明有膠體 750 mL，靜置後膠體沉降體積約佔四分之三的高度，其餘為上清液。 你當如何取用膠體，剛好可以裝填所要的膠柱。
12. 每年四、五月間，是研究生趕畢業的繁忙時段，冷房經常堆滿管柱，空間不敷使用。 有一研究生沒有找到位置，不得已只好在室溫下跑膠體過濾，為了怕在室溫停留太久，又把流速增加 20%。 結果出乎意料之外，出來的蛋白質峰都比原來在冷房裡跑的還集中，活性也稍稍增加。 請解釋這個現象的可能原因。
13. 某生以 Sephacryl S-100 膠體過濾法分離某蛋白質，通常此蛋白質都在大約 35 管分割的地方溶離出來。 但經春假放假三天回來，開動工作重新裝填管柱，各種緩衝液也重配；卻發現蛋白質居然要在 60 管才會溶離出來，酵素總活性也降到三分之一。 檢討他所用的管柱大小相同，所用的分割收集器及分割體積也都沒變，請問毛病可能出在那裡？
14. Hydroxyapatite 是何種物質？ 它是如何分離單股與雙股 DNA？
15. 有一次停電數小時之後，某生發現冷房內的管柱中，膠體都充滿了氣泡，請問是何原因？ 但他發現旁邊另一位同學的管柱膠體卻都沒有氣泡產生，又是為何？
16. 甲乙兩人同時要用 DEAE 型式的陰離子交換法純化酵素，甲生有最好的管柱（有 adaptor）、梯度製造器、蠕動幫浦，而乙生除了有點錢買膠體及簡單的藥品或用具之外，什麼都沒有。 經過一週後，在結果報告上，乙生的結果卻遠比甲生要好，活性及純度都較高，他是如何辦到的？
17. HPLC 與 FPLC 系統有何異同？
18. 進行離子交換法時，我們是採用較高的鹽濃度把蛋白質溶離下來，請說明為何高鹽濃度可以把吸附在膠體上的蛋白質洗下來？
19. 進行離子交換法以鹽梯度溶離蛋白質時，若要分開兩個很相近的蛋白質峰時，有時會有下列現象發生，請說明為何：
 - a. 拉連續梯度不如階段 (stepwise) 梯度
 - b. 使用較長的膠柱不如較短的
 - c. 使用較寬的鹽梯度 (0~0.5 M) 不如較窄的 (0~0.2 M)
 - d. 使用的溶離體積較小的 (如 150 mL×2) 不如較大體積者 (如 200 mL×2)
20. 血清蛋白質的 pI 大多在 7 以下，只有抗体 IgG 的 pI 為 8.3，請設計一離子交換程序，使用 DEAE-Sephacel，可以很快地純化 IgG。 另外，IgG 的分子量約為 160,000，而另一類抗体 IgM 的分子量為其五倍多，請問你要用何種方法來純化 IgM？

其它純化方法：

1. 進行製備式電泳時，明明只切出一條所要的色帶，為何再跑一次分析式電泳時 (SDS-PAGE)，往往會出現其它的色帶？有那些可能的情形？
2. 進行超高速離心時，大分子的那些因素會影響其沉降速率？
3. 為何 CsCl 可以在離心的過程中自動形成密度梯度？而蔗糖或甘油不能？
4. 進行 zone centrifugation 時，若離心過久而不適時停止，則所有的蛋白質會不會全部沉降在離心管底部？為什麼？
5. 垂直式離心是如何進行的？為何它能在短時間內達到分離效果？
6. 超微薄膜過濾與傳統過濾法有何不同？超微薄膜過濾操作時的最大問題是什麼？
7. 以硫酸銨可以沉澱蛋白質下來，不但有蛋白質分劃效果，也可做為濃縮的步驟；但與冷凍乾燥及真空離心等濃縮方法，有何共同的問題，會影響下一步純化步驟？
8. 某些情況下超微薄膜過濾的確對增進蛋白質的純度有所幫助，那是如何操作的？
9. 連續使用兩次相同的純化方法，經常無法得到高效率的純化效果，請解釋原因。
10. 某生在進行硫酸銨分劃，收集得蛋白質沉澱後，以最少量緩衝液溶之，得到 20 mL 粗抽取液。接著想進行膠體過濾，因管柱大小只能容納 10 mL 樣本，於是他用超微過濾法把樣本溶液濃縮成 10 mL，以進行下一步。請問他這樣做有無意義？有什麼問題發生？若是你將如何處理？
11. 有那些純化方法是利用蛋白質的等電點不同來分離的？

酵素分析方法：

蛋白質定量法：

1. 請寫出下面一小段胜肽的分子構造，並指出有何特殊化學基團可供蛋白質檢定之用。

Glu-Cys-Ala-Trp-Lys-Phe-Cys-Asn-Leu-Tyr-Tyr-Gly

2. 請查出各種蛋白質定量方法，並做表註明以下各項特徵或性質：

定量反應的原理、靈敏度範圍、專一性、所測的波長、反應所受的干擾、優缺點

3. 某蛋白質的 $E_{1\text{ mg/mL}}^{205\text{ nm}} = 31$ ，當測得 $A_{205} = 1.0$ 時，此蛋白質濃度多少？
4. 某蛋白質X的分子量為 10 kD，已知其分子消光係數 ($E_{1\text{ mM}}^{280\text{ nm}}$) 為 20，若你測得該蛋白質溶液在 280 nm 的吸光值為 1，則此溶液的蛋白質濃度應為若干mg/mL？
5. 以 UV 吸光度定量蛋白質時，樣本的純度要很高才有意義；但另一方面來說，對於一個粗抽取液的蛋白質樣本，也可以用吸光度來測定其濃度，且通常不會偏差太多，請討論其意義如何？
6. 請詳究 Coomassie Blue 蛋白質定量的呈色原理。
7. Biuret反應的原理如何？為何稱為 Biuret reaction？
8. 有一蛋白質並無方便的活性或定量方法，但其分子含有鎘，則你如何追蹤此蛋白質？
9. UV 280 nm 與 205 nm 都可用來定量蛋白質，但其所根據機理不同，請說明其優劣點。
10. 那幾種蛋白質定量法最準確，不會受到所含胺基酸組成的不同所影響？
11. 常用的 Coomassie Blue 定量法要以標準蛋白質來做比對，定量結果會因所用標準品不同而有偏差，請問為何？如何避免之？
12. 某非極性蛋白質需要用界面活性劑 (0.1% Triton X-100) 來做溶入劑，因此所有的緩衝液都含有 Triton。在進行 Coomassie Blue 定量蛋白質時，發現不管樣本中有無此蛋白質，都呈現很高的呈色反應，請問是發生了何種問題？如何改善之？

酵素活性測定：

1. 酵素活性的測定，可觀察反應物消失或者生成物生成，何者較佳？請述明理由。
2. 活性分析時通常都使用大量基質，量要大到多少 (有一個公認的估計)？其目的何在？
3. 在設計一個酵素活性分析方法時，應當注意那些要點，以免低估酵素活性？
4. 酵素的催化反應條件受環境因子影響很大，而在試管中的反應與在細胞內的催化環境，一定有很大的差異，請儘你所知舉出兩者的差別，並說明其利弊。

5. 酵素催化反應時若能把生成物除去，有何好處？如何以物理或化學方法除去生成物？
6. 測定酵素活性為何要中止酵素反應？何種情況下可以不必中止反應？
7. NAD^+ 如何進行其輔酶的作用？請寫出其構造式。
8. NAD^+ 為何能在 340 nm 波長的吸光有變化？
9. NADH 與 NADPH 有何不同？能否互相通用？
10. 340 nm 應當使用 UV 或者可視光的光源？
11. 若生成物無法直接偵測，則要如何進行活性分析？
12. 分析酵素活性時，雖然耦合反應與主反應一起連續著進行，但在反應動力學及實驗操作上，或者反應過程中基質及生成物的濃度上，二者有相當的差別，請檢討兩種反應的異同點。
13. 在酵素活性分析時，佐以耦合反應，有何好處？但有什麼可能的缺點？
14. 請詳究澱粉磷酸解酶 (starch phosphorylase) 的催化反應，列出所有可能的活性分析方法。
15. 何為還原醣？為何蔗糖不是還原糖，而葡萄糖及果糖則是？
16. 請寫出轉化酶 (invertase) 的催化反應，並舉出可能的生成物偵測方法。
17. 請幫轉化酶設計一個使用放射線的活性分析方法。
18. 某酵素催化基質 AH ，產生反應物 B 及 H^+ ，請問最方便的活性分析法為何？
19. Phytochelatase synthase (PCS) 催化以下的反應，請幫忙設計活性分析方法：
$$\gamma\text{-Glu-Cys-Gly} + \gamma\text{-Glu-Cys-Gly} \rightarrow \gamma\text{-Glu-Cys-g-Glu-Cys-Gly} + \text{Gly}$$
20. 有那些試劑或處理方式可以使蛋白質變性？其原理或機制各為何？
21. 為何改變 pH 可以使得蛋白質沉澱下來？其變性的機制為何？
22. EDTA 與 EGTA 有何不同？在使用上有何差異？
23. 使用放射性試劑時，何謂 pulse-chase？在實驗上有何用途？
24. 通常要進行活性分析的樣本都要稀釋，若某酵素的稀釋度為 1:10 時，測得 2 U/mL 的活性；當稀釋為 1:50 時，活性為 0.6 U/mL；稀釋 1:1000 時，活性為 0.05 U/mL。請問你應當如何判別所得數據？如何取捨？為何有這樣的情形？

活性分析操作：

1. 酵素活性分析時，為何需要使用緩衝液？
2. 為何各種緩衝液有其適用的最佳 pH 使用範圍？
3. 進行粗抽取時，要使用較高或較低濃度的緩衝液？解釋為何。

4. 甘胺酸也可做為緩衝液，使用在 pH 2 或 11 兩種極端的 pH，請就其分子構造解釋之。
5. 最常用的緩衝液為 Tris 及磷酸鹽，使用時當注意那些問題？
6. 有一含金屬酵素，其最佳反應 pH 在 3.8，若使用 citrate 緩衝液 (pH 4.0, 0.1 M) 則偵測不到活性，請問原因何在？
7. Bicarbonate (NaHCO_3) 或 carbonate (Na_2CO_3) 都可使用為緩衝液，但應注意何事？
8. 細胞一旦打破，酵素即暴露於大氣中，其分子將受到氧化及其它作用的攻擊，可能受到的化學反應有那些？蛋白質分子上的那些構造會被破壞或修改？
9. 緩衝液可以配成 5 或 10 倍的 stock，某生如此泡了 10 倍的磷酸鈉 (pH 7.0, 2 M) 放在冷房備用，但使用若干次後，漸漸發現 pH 不太準確，測量其濃度發現降低甚多！到冷房仔細檢查該緩衝液，才發現原因，請問發生了何事？
10. 做 ELISA 實驗時，經常用到一種抗体與標幟酵素的連結體，是利用 glutaraldehyde 把抗体與 peroxidase 連結在一起。若把它的溶液貯藏在 -20°C ，每次使用時取出解凍再小心放回冰凍，如此做了約十次，發現每次實驗結果的吸光值越來越低，請問為何？
11. 有那些物理力量可以破壞蛋白質的構形，而致酵素失活？請至少舉出三種方法。
12. 請說明：a. 分子內氫鍵 b. 疏水性胺基酸 對蛋白質構形安定性的影響。
13. 緩衝液經常添加很多物質，有不同的功能與用途，請依用途分類搜集各種添加劑。
14. 貯藏蛋白質時，都盡量保存在高濃度下，有何好處？
15. 粗抽酵素時，經常有大量蛋白酶釋出，你將如何處置以便把其破壞降至最低？
16. 尿素為何能使蛋白質變性？請說明其機理。
17. 蛋白質變性後，是否都能復性 (renaturation)？需不需要有外加的助力？
18. 那些緩衝液不適合與金屬離子共用？會有什麼缺點？
19. PMSF 原液很不穩定，要以很濃的濃度保存在冷凍箱中；一但加入緩衝液中，會在二十分鐘內失去效用。這樣我們在緩衝液中加入 PMSF 有沒有用呢？請說明原因。
20. 使用分光光度計的 cuvette 時，應當注意何事？
21. 環境的 pH 如何影響蛋白質的帶電性質？
22. 為何緩衝液中要加入抗氧化劑？可加入那些物質作為抗氧化劑？
23. 蛋白酶通常會使酵素水解而失去活性，但也有反而提高酵素活性的例子，請舉出數例。
24. 溶解核酸時 DNA 通常要溶在 TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4)，但 RNA 只要用水即可溶解。請問 DNA 若溶在純水中，會發生什麼問題，而 RNA 為何不會有此問題？

電泳檢定法：

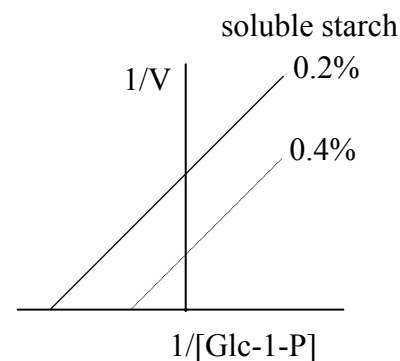
1. 那些外在因素影響蛋白質在膠體電泳中的泳動率？
2. 正負電極槽的緩衝液有一定使用濃度，某生不小心錯泡為十分之一濃度，會有什麼結果發生？
3. 電泳時溫度過高時，對電泳結果會有什麼影響？
4. 請詳述整個 PAGE 電泳膠體的鑄膠過程，及其凝膠機制。
5. PAGE 中有一層焦集膠體，它是如何把樣本蛋白質焦集成一細線的？
6. 相差一個核苷酸的兩段短核酸 DNA，有無可能用電泳分離開來？
7. 為何樣本中含有太高鹽類，或 pH 太低，均會影響電泳結果？
8. 為何蛋白質不適合使用濾紙或 TLC 作為電泳介質？
9. 原態電泳 (disc-PAGE) 中，是否所有的蛋白質樣本都會往正極跑泳動？
10. Disc-PAGE 比起 SDS-PAGE 有何優點？又有何缺點？
11. 以 SDS-PAGE 分析一具有四元體的蛋白質酵素，有無可能看到該四元體的色帶？
12. Disc-PAGE 以梯度鑄膠，可以用來分析蛋白質的原態分子量，但請問有何限制？
13. SDS-PAGE 的樣本要用 SDS, β -mercaptoethanol 及加熱處理，各有何作用？
14. 以 SDS-PAGE 可以測得蛋白質的分子量，就蛋白質本身的胺基酸組成而言，有那些因素會影響所測得分子量的準確性？
15. 若你要分析的異構酶群族具有很廣汎的 pI，例如由 4 到 11 都有，則使用 disc-PAGE 能不能看到所有的異構酶？你應當進行何種電泳才能看到所有的異構酶？
16. 進行電泳時，固定電壓、電流或電功，分別對電泳過程或結果有何影響？
17. 洋菜多在為水平式電泳，PAGE 多用在垂直式，為什麼？
18. Acrylamide 常有不溶性的雜質，需經過濾去除，否則電泳結果會有何種缺陷？
19. 樣本中各種成份對電泳的結果影響很大，請問下列物質或處理對電泳結果的影響為何？
a. 0.5 M NaCl, b. 0.05 M KCl, c. 樣本 pH = 3.0, d. 樣本蛋白質 = 10 mg/mL
20. 在開動或關閉供電器 (power supply) 時，有一個重要檢查習慣為何？有何重大影響？
21. 請說明各種呈色方法的原理：Coomassie Blue, Silver staining, PAS staining。
22. 在膠體電泳後直接進行活性染色是最方便而專一性高的方法，但並非所有的酵素都可以在膠片上進行活性染色，請列出所需要的條件與限制。
23. 有那些方法可以在膠片中染上蛋白質色帶的碳水化合物？原理如何？
24. β -澱粉酶可以在 Coomassie Blue 中染色，但硝酸銀反而不能染上色，請試解釋此現象。

25. 硝酸銀染色完成後，可以洗掉銀粒子，再重新染色；你如何去掉色帶上的金屬銀？
26. 電泳後某生以 Coomassie Blue 染色脫色後發現，色帶全都分裂成水平平行的兩條色帶，好像每個色帶都有個影子。請問為何？（他用的是垂直平板式 disc-PAGE，使用 1.5 mm 厚的膠片，染色 15 min）
27. Ampholyte 是何種物質？有何用途？作用機制為何？
28. 電泳後可再把蛋白質轉印到硝化纖維紙上，然後有何用途？非得轉印到紙上不可嗎？
29. 蛋白質經酵素水解後，那些方法可以檢定其肽片段？那些方法可以分離這些片段？
30. 某蛋白質經純化至均質後，以 IEF 檢視其 pI，發現此蛋白質在其預測的 pI 附近拖拉成一片，無法聚焦，且似有固體產生的樣子。請問發生了什麼問題？有無改善的可能？
31. 那一種蛋白質在進行 SDS-PAGE 時，無法表現出正常的泳動率？

蛋白質檢定：

1. 你在純化得某酵素後，經定序得到其 N-端的 15 個胺基酸序列，請問接著可以進行那些實驗？各有何目的或用途？
2. 請列表整理出所有決定分子量的方法，並比較其優缺點。
3. 電泳後進行蛋白質轉印，再用抗體染色後，結果：
 - a. 發現除了標準品的藍色色帶存在之外，其餘各樣本空白一片，請問可能的原因。
 - b. 發現連標準品也都空白一片，請問可能的原因。
4. 若你的蛋白質 N-端已被乙醯化，無法進行胺基酸定序，則你將如何定出該蛋白質的部份序列？
5. 胺基酸組成分析可得知蛋白質中各種胺基酸百分比，但 Asn 會水解成 Asp，Glu 水解成 Glu；也就是說只能測得兩者的和（以 Asx 或 Glx 表示），而無法直接測得 Asn 或 Gln 的量。請問你如何可以推出所測得的 Glu (Asp) 中含多少 Gln (Asn)？
6. 為什麼只有 Edman 反應能夠應用在胺基酸定序？而 dansylation 不行？
7. 免疫學書上提到，抗體可以與抗原結合而沉澱下來；但在生化應用時，此抗體都要附在一固相擔體上，才能做為免疫沉澱劑。為何要如此麻煩，不能直接以抗體沉澱抗原？
8. 當群殖得某酵素的 cDNA 並已定序，但其活性分析方法極為困難，或根本不知此酵素的活性時，則在純化過程中，你有何方法可以追蹤此酵素？
9. 生產傳統抗體時，抗原純度一定要非常高，否則可能會有交叉反應；但在生產單株抗體時，反而可以用不很純的抗原去免疫動物。請問這是如何進行的？有何先決條件？

10. 澱粉磷酸解酶與 β -澱粉酶的基質都是澱粉，但兩者的催化反應不同，分子構造上也無相同之處。當使用澱粉磷酸解酶為抗原製備單株抗体時，發現所得到的抗体有很多株（約一半）都會對 β -澱粉酶有交叉反應；反之以 β -澱粉酶為抗原所得的抗体，也有少部份對澱粉磷酸解酶會有反應。請問這是如何造成的？
11. 蛋白質轉印後，以免疫染色所得色帶的深淺，可以做為定量的依據。請問這樣的定量方法，有無可能的缺失？如何改進或注意之？
12. 最近流行使用短鏈胜肽（約十多個胺基酸）連到 carrier 上做為抗原，進行免疫後可以得到抗体，稱為 monospecific Ab。某生由其酵素 cDNA 序列轉譯的蛋白質序列上選出一段胜肽 (VALIWVVSAIL)，以此進行抗体製備，結果也得到了抗体。但發現此抗体在進行蛋白質轉印的免疫染色時，對 disc-PAGE 膠片的轉印膜無法呈色，呈一片空白；對 SDS-PAGE 轉印膜則只能看到很淡的色帶。請問發生了什麼毛病？如何解決問題？
13. 假設此生得到另一種完全不同的結果，免疫轉印得到很強的呈色色帶，但對細胞的粗抽取液樣本做檢定時，對不含此一酵素的控制組，卻也有免疫呈色，請問如何解釋？
14. 續上題，另一位同學則以電腦軟體搜尋較強的抗原決定基，選了該蛋白質 N-端的一段序列 (MILAKKSVALV)，同樣進行抗体製備；所得抗体對細胞的粗抽取液樣本做檢定，結果在兩種 PAGE 膠片上預期的分子量處，看不到呈色色帶，但在預期分子量稍高處，隱隱發現有一很淡又很細的色帶。這又是發生了什麼問題？
15. 請由右圖澱粉磷酸解酶動力學結果，解釋基質（澱粉及 Glc-1-P）與酵素間作用的關係。

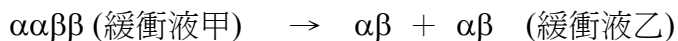


應用問題：

1. 以下是某研究生甲純化酵素 A 的過程概述：

甲的最終目標，是要從植物的癒創組織中純化酵素 A。當收集得足夠量的癒創組織後，加入適量緩衝液 (1 mM Tris-HCl, pH 7.0)，以研钵進行研磨，因為怕酵素失去活性，儘快離心收集得 50 mL 上清，進行下一步驟。很快加入 25 g 硫酸銨，使達到 50%飽和度，得上清約 40 mL；再加入 10 g 硫酸銨，使成為 75%飽和度，離心取沉澱。溶解在 5 mL 緩衝液後，通入 DEAE-Sephadex 管柱中，據文獻說酵素 A 可被陰離子交換介質結合。膠體已平衡在緩衝液，裝填在 1.6×60 cm 的玻璃管柱。樣本通入後，以緩衝液洗過數個管柱體積，開始拉 0~0.5 M NaCl 濃度梯度，並同時收集。很奇怪，發現蛋白質幾乎都損失光了，溶離圖譜也沒有明顯的蛋白質尖峰。只得重新抽取，再用硫酸銨沉澱後，改以膠體過濾法分離之，這次用 2.6×50 cm 管柱，使用 Sephadex G-50 膠體。結果出現一個大的蛋白質峰，也有酵素 A 活性，甚是高興。趕緊做 disc-PAGE 及 SDS-PAGE，結果發現膠體過濾法前後的蛋白質圖譜，都差不多。算一算總活性回收量，也不到文獻報告的十分之一。請指出甲所犯的所有錯誤，並幫甲設計一個可行的純化流程。

2. 某蛋白質 B 在不同的緩衝液下，會有不同的四級構造 (如下式)，且這種轉變是可逆的。



(1) 請解釋此一現象發生的可能原因。

(2) 請利用這個特性，設計一方法來純化蛋白質 B。

3. 動物的血清白蛋白 (albumin) 經過蛋白質水解處理後，成為胺基酸混合液，可供醫療上針劑使用。但若水解不完全，可能有分子量較大的胜肽片段，打入人體後會產生抗体，相當危險。而且白蛋白中經常有多醣類雜夾其中，無法被蛋白質水解酶水解，分子量很大，可能是更危險的抗原。請問有那些方法，可以有效的除去這些有害的物質，同時可大量處理，以便大量製得，供醫療上使用？

4. 蛋白質 C 及 D 的分子量分別為 49,000 及 47,000，但是 C 分子中含有 70% α helix，在 pH 8.8 下其 helix 構造會變性而成為 random coil，但仍保持其水溶性，當 pH 調回中性時回復原態；蛋白質 D 在兩種 pH 下均為原態。設計一個方法，可分離此二蛋白質。

5. 部分純化的酵素 E，在緩衝液中為清澈溶液，在水中透析三日後發現：

- 透析袋內有沉澱發生，離心後分別收集上清及沉澱，上清活性剩約五分之一，沉澱及外液則均無酵素活性。
- 上述透析袋內的上清及沉澱，測蛋白質量，總共只有原來透析前的一半。
- SDS-PAGE 顯示透析外液不含蛋白質，但有 ninhydrin 反應及 280 nm 吸光。

請問：

- 為何會產生沉澱？
- 總酵素活性為何下降許多？列出所有可能情形。
- 袋內蛋白質量只剩一半，請作一假設，說明原因。
- 請設計一實驗，證明你的假設。

6. Lectin 是植物的一類特殊功能蛋白質，可與各種醣類分子產生專一性的結合。有一 lectin F，它與葡萄糖有相當專一性的結合，請問你如何以最簡單的色析方法來純化之？

7. 蛋白質間可以用架橋分子連在一起，成為二元體、三元體或多元體。現有 G, H 兩蛋白質，架橋反應後以 SDS-PAGE 檢定之，得如 Fig. 1 結果。

+：蛋白質經過架橋處理； -：未經架橋處理之蛋白質

M：已知之蛋白質 (分子量 15,000) 經架橋處理後，所得之各種聚合物。

另以膠體過濾法測 G 及 H 的分子量，二者均為 120,000。

請由這些結果，推論 G 及 H 兩蛋白質的四級構造。

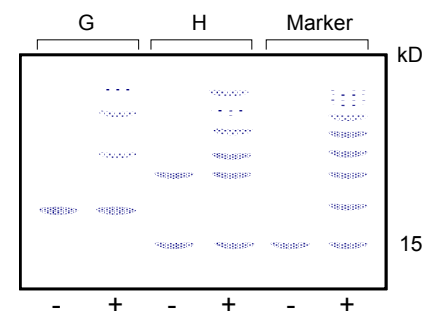


Fig. 1

8. 某蛋白質樣本通入 DEAE-離子交換介質，以純化其中的酵素 I，樣本中原含有 50 mg 蛋白質及 100 活性單位酵素 I。以 0~0.3 M NaCl 梯度溶離得數個 280 nm 尖峰，依次標以 P1, P2, P3, P4 及 P5，分別收集之，分析均無任何酵素 I 活性。另外測得以下結果：

- 各蛋白質峰的蛋白質總量為 46 mg。
- 當混合 P2 及 P5 後，可測得約 280 單位酵素 I 活性，其它的混合均無活性。
- 當混合 P2, P4 及 P5 後，只測得 98 單位的酵素 I 活性。
- 測 P5 的蛋白質含量只有 0.5 mg。

請問 P2, P4 及 P5 分別含有何種物質？

9. 酵素 J 的純化流程如下：

材料 (甘藷) 切碎

↓ 加緩衝液均質化

(粗抽取步驟，依一般方法進行)

↓ 離心

上清

↓ 0.3~0.5 飽和度硫酸銨分劃

Crude J (酵素粗抽液 Xt)

↓ 膠體過濾 (Sephrose CL-6B)

溶離得 P1, P2, P3 三尖峰 (Fig. 2)

↓ → 電泳 (Fig. 3) disc-PAGE

Peak P1 (只有 P1 有酵素活性)

↓ 離子交換 (DEAE-Sephrose)

↓ 以緩衝液洗過一個管柱體積

↓ 0~0.3 M NaCl 梯度溶離

↓ Fig 4 得 P4, P5 兩個尖峰 → Fig. 5 各分劃做 disc-PAGE

Peak P4 (只有 P4 有酵素活性)

請參考各圖結果，回答下列問題：

- (1) Fig. 2 上 P3 的各分劃 (#55~65)，在電泳 Fig. 3 上都不見了，請解釋為何。
- (2) P1 本有一些雜質 (Fig. 5 中打*處)，但經過離子交換之後，在 0~0.3 M 梯度收得的各分劃，以電泳檢示時 (Fig. 5)，找不到這些色帶，它們可能在那裡？
- (3) Fig. 5 中 #35, 40 多出現一個高分子量色帶 (箭頭處)，可能是如何產生的？
- (4) 你對這樣的純化結果滿意嗎？請再改進以上的純化步驟。

10. 某酵素K的活性分析方法如下，L為其耦合反應酵素，使用 NAD^+ 為輔酶。

在進行硫酸銨分劃後，得到 Fig. 6 的結果，請回答以下問題：

- (1) 活性分析結果有兩個 K 的活性尖峰，可能的原因為何？(至少列出兩種假設)
- (2) 請設計實驗，分別可以證實上題假設。
- (3) 若把硫酸銨 30~80% 飽和度間的部分收集起來，再進行膠體過濾，結果 K 的活性回收率多達 250%，則那一個假設為真？

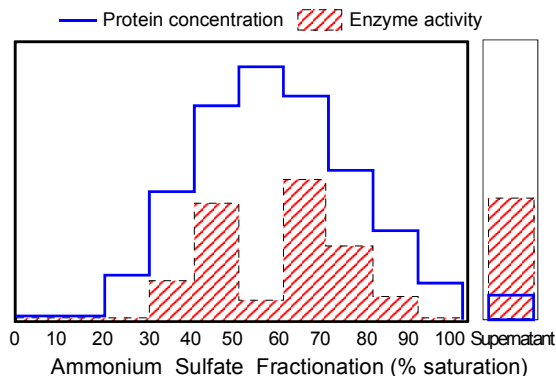
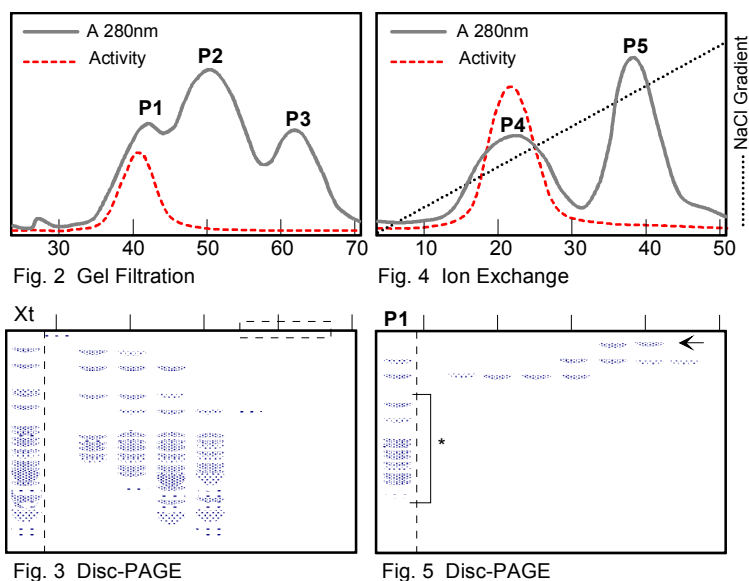


Fig. 6

(4) 上清蛋白質量不多，但出現相當高的活性，是何原因？請設計實驗證明你的假設。

11. M 為一相當不穩定的酵素，尤其在低 pH 下易變性，甲、乙、丙三人以親和層析法純化之，他們的實驗設計如下：

將 M 的基質衍生物 N 耦合到某種親和擔體，洗去反應液後，把擔體裝入管柱，然後通入部分純化的 M，再用游離的 N 溶離下 M。三人的實驗條件略有不同：

所用親和擔體： 耦合緩衝液： 溶離條件：

[甲] CNBr-Sepharose Tris pH 8.0 游離型 N

[乙] Agarose-C₆-COOH 磷酸 pH 7.5 游離型 N → pH 2.05 甲酸

[丙] CNBr-Sepharose 磷酸 pH 7.5 游離型 N → pH 2.05 甲酸 → NaOH pH 12

所得結果也有相當的差異：

[甲] 發現 N 根本沒有耦合到擔體上，酵素 M 無法結合上去。

[乙] 酵素 M 很難溶離下來，要使用 pH 2.05 的劇烈條件，才能洗下蛋白質。

[丙] 酵素 M 是被結合到擔體上了，但無論用何種方法均溶離不下來。

請問：

- (1) N 分子上一定要有何種官能基團，以便三人能夠順利完成耦合反應？
- (2) 甲在實驗中所犯的毛病為何？如何改善？
- (3) 乙可能是用什麼試劑把 N 連結到 agarose 上？
- (4) 乙的實驗中何處不妥？如何改善？
- (5) 乙所溶離下來的酵素 M，容不容易得到均質？為什麼？
- (6) 乙雖然得到了 M，但因 M 為不穩定酵素，可能會有什麼問題？
- (7) 丙為何無法把 M 溶離下來？耦合反應時可能疏忽了什麼步驟？如何證明你的想法？

12. 有 P, Q, R, S, T 五種大小分子的混合物，其性質如下表，請設計一系統方法純化之。

	分子量	Ninhydrin test	AHP test	pI
P	300	+	-	6.3
Q	350	-	+	non-polar
R	40,000	+	-	4.3
S	50,000	+	-	7.8
T	440,000	+	-	5.2

AHP = Aniline hydrogen phthalate

13. 酵素 U 需要鎂離子共同維持活性，在純化過程中，膠體過濾法或離子交換法均使得 U 失去活性，請分別解釋原因；並說明如何防止之？
14. 有兩種蛋白質 V 與 W，其 pI 分別為 5.2 及 6.3，原態單元體之分子量分別為 32,000 及 35,000。V 在其 pI 的環境下，有 90% 的分子會發生聚合現象，成為四元體，且可溶於一般緩衝液。請設計一簡單方法，分離此二蛋白質的混合物。

15. 經純化後之蛋白質 X 及 Y，以 PAGE 電泳檢定得如 (Fig. 7)。

請分別討論蛋白質 X 及 Y 何者為純質？解釋為何。

(請由所得之電泳圖形說明之，並請再設計實驗證明)

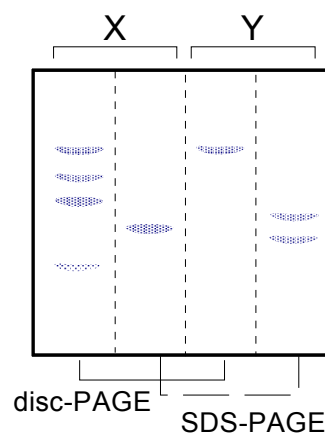


Fig. 7

16. 蛋白質 Z 的純化過程中，最後得到如 Fig. 8 及 Fig. 9 的結果，並且做了膠體過濾管柱的分子量校正 (如左下)。請回答：

- (1) 此膠體過濾管柱的 V_0 為若干？
- (2) 請定出 Z 的原態分子量。
- (3) 請描述 Z 分子的四級構造。
- (4) 請討論 Z 是否為純質？

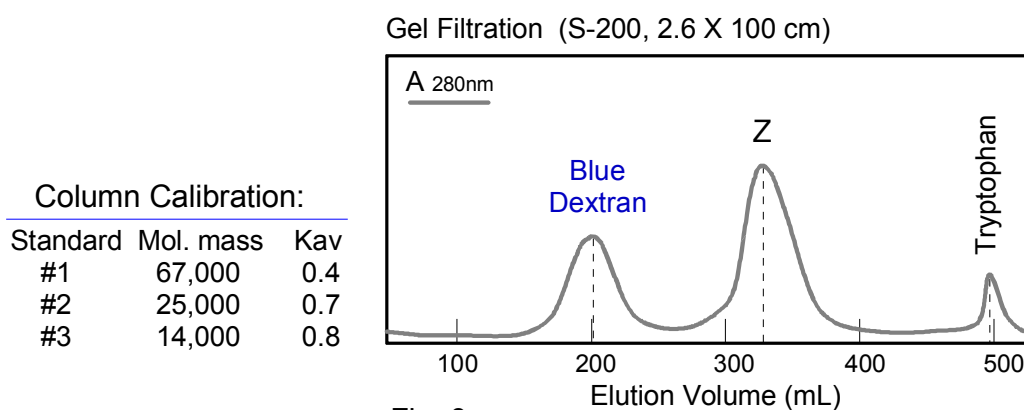


Fig. 8

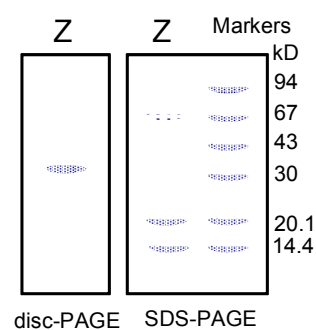


Fig. 9

17. 某蛋白質 AA 只知有下列性質，請設計一流程純化之。
- 原態分子量約 20 kD
 - 等電點 8.0
 - 可催化生成葡萄糖
 - 在高溫 (95°C) 下可耐受 20 min 而活性不失
 - 尚未誘導出其專一性抗體
18. 若你在一個熱帶窮困國家的醫院裡，沒有任何儀器，也沒有電力，只有簡單的玻璃管及小孔徑的塑膠注射針管等器材；唯一的藥品是胃散，這種胃散是氫氧化鋁吸著劑，可保護胃壁。有一天你發現當地有一種植物果實的抽取液可以抗癌，這種果汁中大都為糖份，但含有一點點苦味物質，可能是生物鹼。你想研究何種成份是真正有效的，在這種艱難情況下，請問你如何可以大概地分離其中的成份？
19. 某粗抽取液中各種蛋白質及酵素 BB 的性質如下表，請依指示進行以下的純化步驟：
- 將粗抽液進行膠體過濾法 (Sephacrose CL-6B)，預測並畫出色析圖譜及 SDS 電泳分析結果。
 - 取出含 BB 部份，接著進行離子交換法 (DEAE Sephacel, pH 6.5)，同上預測結果。
 - 若你覺得 BB 還不夠純，請自行設計進一步的純化方法，並預測其結果。

(以上的 SDS-PAGE 只要做含有最高 BB 的一管即可，不需跑全部分劃)

名稱	含量 (%)	分子量 (kD)			等電點 (pI)	疏水性 (%)	其它特徵
		單元體	四級構造	原 態			
BB	6	60	trimer	180	5.1	40	含有 heme (Fe)
X1	10	60	dimer	120	5.5	20	含有鋅離子
X2	12	50	tetramer	200	5.0	35	glycoprotein
X3	5	90	dimer	180	5.2	90	對熱不穩定易失活
X4	8	95	dimer	190	6.8	50	
X5	10	58	dimer	116	5.4	40	含有鈣離子
X6	12	20	monomer	20	4.1	40	在 SDS 下有活性
X7	11	45	tetramer	180	4.9	35	在其 pI 會沉澱
X8	6	200	tetramer	800	4.5	30	淡褐色
X9	7	55	trimer	165	7.8	55	
X0	3	80	tetramer	320	5.5	30	glycoprotein

20. 請解釋下列各操作時所發生現象的主要原因，若是問題請亦提出解決方法：

例： 加熱使酵素中止反應： [答] 蛋白質受熱變性，構形被破壞，失去活性。

- (1) 粗抽取液經透析後，總活性降至一半以下。
- (2) 粗抽取液經透析後，總活性增加 50%。
- (3) 硫酸銨沉澱後，找不到酵素活性。
- (4) 硫酸銨分劃後，某酵素的活性分佈在所有的各個分劃。
- (5) 有人宣稱使用 SDS-PAGE 可以測得原態蛋白質的分子量。
- (6) 蛋白質樣本在濾紙電泳上會有嚴重拖尾現象。
- (7) 有些人使用酵素的粗抽取液即可進行動力學實驗。
- (8) 已知某酵素不是醣蛋白，卻可以糖染色法 (PAS) 染上色。
- (9) 用 ultrafiltration 濃縮後的濃縮液中，發現根本沒有濃縮效果。
- (10) 進行甘藷粗抽液的原態電泳，經活性碘染色發現有粉紅色色帶。
- (11) 酵素經過反相層析法 (reverse phase chromatography) 後，活性立刻消失。
- (12) 等電聚焦法膠體可形成 pH 梯度。
- (13) 原態電泳時，所要的蛋白質跑不下來，在膠體上方拖成一片。

B3

酵素操作方法

- 1 基本分析方法
- 2 澱粉磷酸解酶純化方法
- 3 電泳檢定法
- 4 蛋白質電泳轉印及相關應用

B3 酵素操作方法的內容，大部分取自陳翰民博士論文(1997)中的方法一章，並加修改以便適合本課程之用。同學可以參考操作方法內的各種實驗技術，但若有必要也可以更動之。

酵素操作方法

- 1 基本分析方法 193
 - 1.1 蛋白質定量法 193
 - 1.1.1 Bradford 定量法 193
 - 1.1.2 BCA 定量法 194
 - 1.2 澱粉磷解酶活性分析 195
 - 1.3 澱粉磷解酶動力學分析 196
- 2 澱粉磷解酶純化方法 199
 - 2.1 粗抽取及硫酸銨分劃 199
 - 表 2.1 各百分飽和濃度硫酸銨添加量 200
 - 2.2 膠體過濾法 200
 - 2.3 離子交換法 202
 - 2.4 製備式電泳與電泳溶離 203
- 3 電泳檢定法 205
 - 3.1 不連續膠體電泳 (native-PAGE) 205
 - 表 3.1 常用 native-PAGE 膠體溶液 206
 - 3.2 SDS 膠體電泳 207
 - 表 3.2 常用 SDS-PAGE 膠體溶液 208
 - 3.3 梯度膠體電泳 209
 - 3.4 等電聚焦法 210
 - 3.5 膠體染色法 212
 - 3.5.1 Coomassie Brilliant Blue R (CBR) 染色法 212
 - 3.5.2 硝酸銀染色法 212
 - 3.5.3 醣蛋白質染色法 (過碘酸-硝酸銀法) 214
 - 3.5.4 澱粉磷解酶活性染色法 215
 - 3.6 膠片乾燥法 216
- 4 蛋白質電泳轉印及相關應用 217
 - 4.1 蛋白質電泳轉印法 217
 - 4.2 酵素免疫染色 218
 - 4.3 蛋白質 N-端序列決定法 220

1 基本分析方法：

酵素化學實驗中，兩種最基本的分析方法，就是蛋白質定量，以及該酵素的專一性催化反應。本實驗課程從頭到尾都要用到這兩種分析方法，請自琢磨出精準的定量技術。

1.1 蛋白質定量法：

以 96 孔的微量滴定盤，進行蛋白質的定量；有以下兩種常用的方法。

1.1.1 Bradford 定量法：

Bradford 法是利用蛋白質與 Coomassie Brilliant Blue G-250 結合呈色來定量。

儀器：

37°C 恆溫箱

ELISA 光度計 (Dynatech MR 5000)

ELISA 96 槽微量滴定盤 (Nunc 442404)

試劑用具：

Coomassie Blue dye (1/4×, Bio-Rad 500-0006) 以 Tris 稀釋四倍 7 mL

50 mM Tris buffer, pH 7.4 (Buffer A) 4 mL

蛋白質標準品 (bovine serum albumin, BSA, 100 µg/mL) 1.5 mL

未知樣本 (含未知濃度的蛋白質) 0.8 mL

大頭針或噴火槍

微量滴定盤 (microtiter plate, Nunc 442404) 在盤面上編好樣本位置 (圖 1.1)

先準備一組系列 BSA 標準品：

Label	BSA (µL)	Buffer A (µL)	最終濃度 (µg/mL)	操作注意
#5	500	0	100	混合均勻
#4	400	100	80	混合均勻
#3	300	200	60	混合均勻
#2	200	300	40	混合均勻
#1	100	400	20	混合均勻
#0	0	500	0	混合均勻

並以未知樣本準備數種濃度的未知樣本 (X1, X2 ...)

blank for ELISA reader

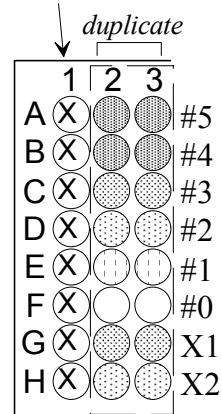


圖 1.1 安排微量滴定盤

方法：

(1) 每槽取 50 µL 標準品 (#0, #1 #5) 或未知樣本 (X1, X2)，以二重複加入 96 孔微量滴定盤中。

- (2) 每槽再加 200 μL dye ($1/4\times$)，在全部樣本槽加完前，不要中斷添加；整個操作時間不要拖太久，同時小心避免氣泡產生。

◆ 本步驟是實驗成敗的關鍵！

- (3) 輕拍滴定盤的一側，使添加的各成份均勻混合，注意 Dye Reagent 因密度較大，很容易沉積在下方。

圖 1.2 顯示這三個連續動作 (1)→(2)→(3)。

◆ 這時若還有氣泡，小心用大頭針刺破，大量時可用火燄燒破之。

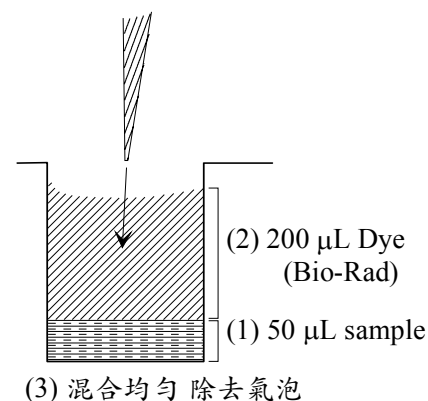


圖 1.2 樣本添加步驟

- (4) 靜置室溫 10 min。
- (5) 以 ELISA reader 測 570 nm (或 595 nm) 吸光。
- (6) 作圖畫出標準校正線，並決定未知樣本的濃度。

1.1.2 BCA 定量法：

BCA (bicinchoninic acid) 法是利用蛋白質對兩價銅離子 (Cu^{2+}) 進行還原，所生成的 Cu^+ 可以 BCA 專一性地呈色而定量。

儀器：

儀器用具同上

試劑用具：

一般緩衝液同上，另需下列物品：

BCA reagent kit (Pierce 23225)：包含 Reagent A (BCA) 及 Reagent B (CuSO_4)

事先將 Reagent A 和 Reagent B 以 50：1 比例均勻混合，每盤要 20 mL。

BSA 標準品 (BSA 2 mg/mL)：

以 Tris 稀釋成一系列濃度：2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 $\mu\text{g/mL}$

方法：

- (1) 在一微量滴定盤上，各標準品每濃度取 20 μL 以二重複加入預定槽內。
- (2) 每槽加 200 μL 上述之混合 Reagent，全部樣本槽加完前不要中斷。
- ◆ 所有操作之注意要點同上。
- (3) 輕拍滴定盤的一側，使添加的各個成份均勻混合。
- (4) 靜置 37°C 反應 10 min。
- (5) 以 ELISA reader 測 562 nm (或 570 nm) 吸光。
- (6) 作圖畫出標準校正線，並決定未知樣本的濃度。

1.2 澱粉磷解酶活性分析：

澱粉磷解酶催化澱粉磷解之可逆反應，本實驗測量其澱粉合成方向所產生之磷酸，磷酸標準曲線之線性範圍在 0.5~5 mM 間，再現性良好。

儀器：

同上節

試劑：

醋酸緩衝液 (0.2 M, pH 5.5)：

CH ₃ COONa	(RDH 32319)	13.37 g
CH ₃ COOH	(RDH 33209)	2.13 mL

加水至 1,000 mL 置於 4℃ 保存。

可溶性澱粉 (1.2%)：

Soluble starch	(Sigma S-2630 或 Nakalai 321-22)	1.2 g
----------------	---------------------------------	-------

取 1.2 g 可溶性澱粉先以 50 mL 水懸濁之，以微波爐短暫加熱 30 s，俟完全溶解後放冷，再加水至 100 mL，置室溫儲存，若有發霉則須丟棄。

Glc-1-P (32 mM)：

α-D-Glucose-1-phosphate	(Sigma G-7000)	0.98 g
-------------------------	----------------	--------

加水至 100 mL 置於 4℃ 保存。

◆ Glc-1-P 會因儲存過久而裂解出磷酸，使用期限為三週左右；不可加熱。

磷酸呈色劑 (ferro-sulfate molybdate)：

Ammonium molybdate	(Sigma A-7302)	0.4 g
H ₂ SO ₄ (6 N, 硫酸原液為 36 N)	(Merck)	6.8 mL
H ₂ O	(Milli-Q)	33.2 mL
FeSO ₄ ·7H ₂ O	(Sigma F-7002)	2 g

將 ammonium molybdate 以 6 N 硫酸溶解，加 Milli-Q 水完全溶解後，再加入 FeSO₄·7H₂O 避光下混合均勻；使用前新鮮配置。

◆ 使用前新鮮配製。溶液應為淡褐色，若變質則呈現藍色。

磷酸標準溶液 (20 mM)：

取 0.38 g 磷酸鈉 (Na₃PO₄, Sigma S-1001) 溶於 50 mL Milli-Q 水，保存於室溫。

方法：

- (1) 將醋酸緩衝液、可溶性澱粉及 Glc-1-P 以體積比 1:1:1 混合，當作反應基質液。
- (2) 取適當濃度之酵素液 10~20 μL，加入 ELISA 盤中之各槽，並加入 75 μL 反應基質液，於 37℃ 反應 10~20 min，各槽要固定相同的反應時間。
- (3) 迅速加入 200 μL 呈色劑，於 5 min 內以 ELISA 光度計測 650 nm 的吸光值。

(4) 結果以磷酸濃度表示者，則將上述的吸光值帶入磷酸標準回歸曲線，換算得磷酸濃度。

磷酸標準曲線作法：

- (1) 將磷酸標準溶液 (20 mM) 稀釋為 15, 10, 5, 2.5, 1, 0 mM 系列，每濃度 200 μL 。
- (2) 將上述系列稀釋之磷酸標準溶液與 1.2% soluble starch 及醋酸緩衝液，以體積比 1:1:1 混合均勻，每管有 600 μL 。
- (3) 上述混合後的磷酸標準溶液各 75 μL ，再加入 10 μL 的 H_2O 共得 85 μL ，依濃度低至濃度高的順序，加入ELISA plate中，製作二重複。
- (4) 加入呈色劑 200 μL 後，測 650 nm 吸光讀值，選取讀值小於 1.5 之結果平均。
- (5) 以磷酸濃度為 x 軸，650 nm 吸光值為 y 軸，製作標準曲線，並迴歸求斜率。

$$y = \text{ ______ } x + \text{ ______ } \quad \text{式 (I)}$$

磷酸濃度 mM	0	1	2.5	5	10	15	20
A_{650} (1)							
A_{650} (2)							
Average							

1.3 澱粉磷解酶動力學分析：

澱粉磷解酶的催化反應乃一雙基質反應，因此在探討酵素對基質的親合度 (K_m) 及反應速率 ($V_{\max}$) 時，必須固定其中一種基質濃度 (如澱粉)，改變目標基質的濃度 (如 Glc-1-P)，利用Lineweaver-Burk雙倒數作圖，求出對此基質之 K_m 及 $V_{\max}$ 。

儀器試劑：

同上節

方法：

酵素動力學基本操作：

- (1) 取適當濃度的酵素液 10 μL ，加入 ELISA plate 中。
- (2) 加入基質液與醋酸緩衝液的混合液 (Glc-1-P：soluble starch：acetate buffer = 25 μL ：25 μL ：25 μL) 共 75 μL ，立刻置於 37°C 恆溫培養箱，反應 20 min。
- (3) 加入呈色劑 200 μL 中止反應並呈色，於 1 min 內以 ELISA 光度計測量 650 nm 的吸光值；吸光值在 1.5 內迴歸呈線性。
- (4) 每槽反應所需時間須精確控制相同。

最適酵素濃度：

- (1) 取酵素液做系列稀釋，可做 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 等，視酵素濃度而定。
- (2) 依上述基本操作流程，做二重複實驗，測量上面不同稀釋的酵素在作用 20 min 後，產生 650 nm 吸光值的變化。
- (3) 選取吸光值最接近 1.5 者，即為最適稀釋濃度。

稀釋比例	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200
A ₆₅₀ (1)						
A ₆₅₀ (2)						

SP 對 soluble starch 結合能力 (固定 Glc-1-P 濃度)：

- (1) 將 1.2% soluble starch 系列稀釋成 0.8%, 0.6%, 0.4%, 0.2%, 0.1% 及 0% (blank) 共計七種濃度，每個濃度需 200 μL 。
- (2) 取 500 μL Glc-1-P (32 mM) 與 500 μL 醋酸緩衝液混合均勻。
- (3) 取上述最適濃度之酵素液 10 μL ，加入 ELISA plate 中 7 槽 $\times$ 2 排，共計 14 槽。
- (4) 依濃度由低至高的順序，將各濃度的 soluble starch 各 25 μL ，加入 ELISA plate 中，製作二重複。
- (5) 加入步驟 (2) 所述之混合液 50 μL ，立刻置於 37°C 恆溫培養箱，反應 20 min 後呈色，方法如基本操作流程。
- (6) 所得之吸光值代入上面方程式 (I) 可得磷酸濃度^a。
- (7) 酵素反應速率定義^b為每分鐘的Pi生成量 (μmole)。因此磷酸濃度 (A mM) 可換算為反應速率公式如下：

$$\begin{aligned}
 \text{反應速率} &= A \text{ mM} \times 25 \mu\text{L} / 20 \text{ min} \\
 &= A \times 10^{-3} \text{ M} \times 25 \mu\text{L} / 20 \text{ min} \\
 &= 25 A \times 10^{-3} \mu\text{mole} / 20 \text{ min} \\
 &= 1.25 A \times 10^{-3} \mu\text{mole} / \text{min} \quad \text{式 (II)}
 \end{aligned}$$

- (8) 以soluble starch濃度之倒數為x軸 (1/%)^c，反應速率倒數為y軸 (min/ μmole)^d 作圖，迴歸可得一直線。其x截距為 $-1/K_m$ ^e，y截距為 $1/V_{\max}$ ^f。

Starch (%)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.2
A ₆₅₀ (1)							
A ₆₅₀ (2)							
Average (A)							
Pi (mM) ^a	-						
V= $\mu\text{mole}/\text{min}$ ^b	-						

Starch (%)	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.2
x軸 (1/%) ^c	-						
y軸 (min/μmole) ^d	-						

$$-1/K_m^e = \underline{\hspace{2cm}}, \quad K_m = \underline{\hspace{2cm}}; \quad 1/V_{\max}^f = \underline{\hspace{2cm}}, \quad V_{\max} = \underline{\hspace{2cm}}$$

SP 對 Glc-1-P 結合能力 (固定 soluble starch 濃度)：

- (1) 將 32 mM Glc-1-P 做系列稀釋成 16, 12, 8, 4, 2 及 0 (blank) 共計 7 種濃度，每個濃度須 200 μL。
- (2) 取 500 μL soluble starch (1.2%) 與 500 μL 醋酸緩衝液混合均勻。
- (3) 取上述最適濃度之酵素液 10 μL，加入 ELISA plate 中 7 槽 × 2 排共計 14 槽。
- (4) 依濃度低至濃度高的順序，將各種濃度的 Glc-1-P 各 25 μL，加入 ELISA plate 中，製作二重複。
- (5) 加入步驟 (2) 所述之混合液 50 μL，立刻置於 37°C 恆溫培養箱，反應 20 min。呈色方法如基本操作流程。
- (6) 所得之吸光值代入方程式 (I) 可得磷酸濃度^g。
- (7) 代入 (II) 之公式，換算反應速率^h。
- (8) 以 Glc-1-P 濃度之倒數為 x 軸 (1/mM)ⁱ，反應速率之倒數為 y 軸 (min/μmole)^j 作圖，迴歸可得一直線。其 x 截距為 $-1/K_m^k$ ，y 截距為 $1/V_{\max}^l$ 。

Glc-1-P (mM)	0	2	4	8	12	16	32
A ₆₅₀ (1)							
A ₆₅₀ (2)							
Average (A)							
Pi (mM) ^g	-						
V=μmole/min ^h	-						

Glc-1-P (mM)	0	2	4	8	12	16	32
x軸 (1/mM) ⁱ	-						
y軸 (min/μmole) ^j	-						

$$-1/K_m^k = \underline{\hspace{2cm}}, \quad K_m = \underline{\hspace{2cm}}; \quad 1/V_{\max}^l = \underline{\hspace{2cm}}, \quad V_{\max} = \underline{\hspace{2cm}}$$

2 澱粉磷解酶純化方法：

澱粉磷解酶的純化方法，主要依循張長泉在 1987 所發表論文之步驟 (Agric. Biol. Chem. 51: 187-195)。材料甘藷 (*Ipomoea batatas*) 為台農 57 號成熟新鮮塊根，購自一般市場；台農 57 號是在民國 49 年利用台農 27 號甘藷為母本，與 Nancy Hall 為父本雜交育成。一般的純化過程，通常是先以硫酸銨分劃出蛋白質，再以膠體過濾或離子交換層析法分離；也可進一步使用製備式電泳，直接割出所要的蛋白質色帶。

2.1 粗抽取及硫酸銨分劃：

儀器：

製簽用具、果汁機 (均質機)、紗布
高速冷凍離心機
透析袋、攪拌器

試劑：

緩衝液 A：(5×stock)

Tris	50 mM×5	(BDH 103157P)	30.3 g
------	---------	---------------	--------

加水 800 mL 溶解，以 6 N HCl 調整 pH 成為 7.4 後，加水至 1 L。使用時加水稀釋 5 倍，並加入 β -mercaptoethanol (Sigma) 使其最終濃度為 1 mM。

(Tris = Tris[hydroxymethyl]methylamine, 其 pH 受溫度的影響很大)

緩衝液 B：

緩衝液 A 再加入 1% (w/v) polyvinylpolypyrrolidone, PVPP (Sigma P-6755)。

緩衝液 C：

緩衝液 A 再加入 NaCl 成為 0.15 M 濃度。

硫酸銨 (ammonium sulfate)：

硫酸銨 (Merck 101211) 於烘乾去除水分後，直接使用於蛋白質鹽析法。

方法：

- (1) 取新鮮甘藷塊根，洗淨後去皮，製簽後約重 100 g，加入 150 mL 冰冷緩衝液 B，使用果汁機在 4°C 下均質，高速攪拌 1 min，停止冷卻 1 min，重複 5 次。
- (2) 均質液以四層紗布過濾，取濾液離心 30 min (Hitachi RPR-12, 8,000 rpm)；收集上清液即得粗抽取液 (XT)，測量其體積，記得要留 0.1 mL 做為樣本。
◆ 各種離心機之性能各有不同，請自行調整適當的時間及轉速。
- (3) 取上清液於冰浴下緩緩加入硫酸銨，並不時攪拌，達到所要的飽和度 (如 20%)，

所加的重量要查表 (表 2.1)；繼續攪拌平衡 10 min 後，離心 30 min 同上。

- (4) 收集沈澱，溶在最少體積的緩衝液 A，並測量其最終體積若干。同時測量上清液體積，繼續以硫酸銨沈澱之，加到下一個飽和濃度 (如 40%)。
- (5) 如此重複收集各分劃，共有五個沈澱，如上述分別以緩衝液 A 溶解後，分置於五個透析袋中，對緩衝液 C 透析過夜；次日同上離心 30 min 後取上清液。
- (6) 分析活性後，取總活性最高的一個或數個分劃，集中得到粗抽蛋白質 (AS)。

表 2.1 各百分飽和濃度硫酸銨添加量

0℃		最終硫酸銨百分飽和濃度															
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
		加入 1 L 溶液中之固態硫酸銨克數															
硫酸銨起始百分飽和濃度	0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	603	697	0
	20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	469	557	20
	25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	436	522	25
	30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	402	488	30
	35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	369	453	35
	40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	335	418	40
	45						0	29	59	90	123	156	190	226	302	383	45
	50							0	30	60	92	125	159	194	268	348	50
	55								0	30	61	93	127	161	235	313	55
	60									0	31	62	95	129	201	279	60
	65										0	31	63	97	168	244	65
70											0	32	65	134	209	70	
75												0	32	101	174	75	
80													0	34	139	80	
90														0	70	90	
100															0	100	

本表數據來自 *Methods in Enzymology* (1990) Vol. 182, p. 291，而該表原始資料又來自 *Data for Biochemical Research* (1969) Dawson, R.M.C. et al. (ed), 2nd edition, Oxford Univ. Press.

若你要把 100 mL 的粗抽取液以 20% 硫酸銨飽和度沈澱蛋白質，則以上表可查出 0% 到 20% 的飽和度要 106 g 硫酸銨 (每升)，因此要加入 10.6 g 硫酸銨。離心取得沈澱後，上清要重新量體積，因為上清體積一定會比 100 mL 要大 (為什麼？)；然後再根據此一體積，繼續進行下一步驟分劃 (如 20~40% 飽和度)。請注意不同溫度的添加量不一樣，要另外查該溫度下的添加表。

2.2 膠體過濾法：

膠體過濾法是依據樣本分子的大小差異來進行分離的，本實驗使用 Sephacryl S-300 作為分離介質，對大部分的蛋白質均適用，但要提高鹽濃度以克服其吸附力。

儀器：

層析管柱 (Pharmacia C16 column, 100 cm) 最好附有 adaptor (AC16)

蠕動幫浦 (Pharmacia peristaltic pump P-1)

分割收集器 (fraction collector, Gilson 或 Pharmacia)

細胞離心機, Centriplus (Amicon)

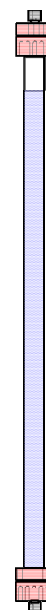
試劑：

Sephacryl S-300 (Pharmacia 17-0599-01)

緩衝液 C (緩衝液 A 再加有 0.15 M NaCl)

方法：**管柱裝填：**

- (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 C，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 C；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 C 中；膠體的處理方法，請參閱講義 B2 酵素純化方法 3.2.4。
 - ◆ 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，檢查有無氣泡留滞在 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 C 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 緩慢往下壓，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，並移去管柱下方軟管的塞子。



(13) 緩衝液 C 以預定流速之 150% 流速 (約 45 mL/h) 流洗膠體；一般而言，膠體過濾膠體流洗 1~2 管柱體積，其它膠體約 3~5 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。

層析操作：

(1) 取樣本以幫浦注入管柱，膠體過濾法的樣本體積約為膠體體積的 3% 以內；注意樣本的溫度與膠體不能相差太多。

◆ 樣本體積不能太大，因此要先以 Centriplus 離心濃縮之；使用後之 Centriplus 要保存在 20% 酒精中，下次使用前要先洗去酒精。

(2) 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。

(3) 收集所得的樣本可進行蛋白質定量及活性分析，收集具有高活性的蛋白質峰，保存部分樣本後，進行下一個純化步驟。

原態分子量測定：

(1) 膠體過濾管柱可做為原態分子量測定之用，但須以標準蛋白質做好校正曲線。

◆ 標準蛋白質 (Bio-Rad 151-1901): Thyroglobulin (670); bovine gamma globulin (158); chicken ovalbumin (44); equine myoglobin (17); vitamin B-12 (1.35) kD

(2) 同時也要把純質的目標酵素加入標準蛋白質中，一起進行膠體過濾。

◆ 經過蛋白質沈澱步驟純化後的澱粉磷解酶含有大量雜質，通常無法做為目標酵素樣本，因此須由助教供應較為純質的澱粉磷解酶。

(3) 跑完膠體過濾後，測定蛋白質以找出各標準蛋白質峰，並測定酵素活性峰，決定目標酵素的溶離位置，以內插求出澱粉磷解酶的分子量。

2.3 離子交換法：

DEAE (diethylaminoethyl) 是一種陰離子交換基團，通常也使用聚醣類為固相介質。

儀器：

層析管柱 (Pharmacia C26×40) 需附有 adaptor (AC26)

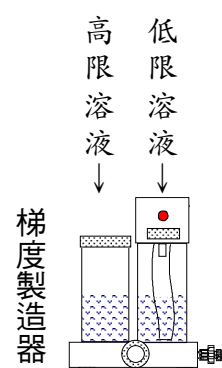
蠕動幫浦 (Pharmacia peristaltic pump P-1)

分割收集器 (fraction collector, Gilson 或 Pharmacia)

梯度製造器 (Pharmacia gradient mixer MX-1)

試劑：

DEAE Sephacel (Pharmacia 17-0500-01)



緩衝液 A、緩衝液 C、固体 NaCl

方法：

(1) DEAE Sephacel 的裝填方法大致同膠體過濾法，裝填於較為粗短的管柱中 (C26 × 40)，膠體體積約為 50 mL，並以緩衝液 C 流洗，使平衡至 pH 為 7.4。

◆ DEAE 膠體最好在管柱外先以緩衝液 C 徹底平衡好，再生一定要完全！

(2) 將來自膠體過濾的樣本，注入管柱之後，以緩衝液 C 流洗兩個管柱體積，此時不應有蛋白質流洗出；但流出液也應加以收集，以免因失誤而損失。

(3) 在緩衝液 A 中加入 NaCl 使其濃度達 0.5 M，成為高限流洗液；而緩衝液 C 中已具有 0.15 M NaCl，為低限流洗液。

(4) 在梯度製造器的兩端，各加入高低限鹽溶液 250 mL，與幫浦連線，進行梯度流洗，同時也啟動分割收集器，每 5 mL 收集一管。

◆ 注意低限溶液是加在靠近管柱那一邊，添加時兩邊暫時不要流通。

(5) 待梯度製造器中的溶液用盡，加入 100 mL 高限流洗液，洗出殘餘蛋白質。

(6) 收集 L-SP 活性區，濃縮後以便繼續進行純化步驟。

沒有梯度製造器時：

(1) 梯度製造器相當昂貴，若無法購置，也可使用階段式梯度；每次用一個鹽濃度流洗一個管柱體積，漸漸提高濃度，如 0.2 M → 0.3 M → 0.4 M → 0.5 M。

◆ 各種濃度的溶離液是用緩衝液 A 加上適量 NaCl 配置而得。

(2) 階段式梯度的效果，不見得比連續式梯度差，有時反而會有較佳分離效果。

(3) 自己製作一個梯度製造器也非難事，用兩個適當大小的塑膠針筒，及一個小型攪拌子即可作成；製作的詳細方法與圖示，可參閱莊榮輝博士論文 p. 65。

2.4 製備式電泳與電泳溶離：

利用原態膠體電泳可直接分離得蛋白質，並以電泳溶離回收該蛋白質。雖然電泳解析力高，可快速分離所要的蛋白質，然而使用時仍有一些限制：(1) 要能確認目標蛋白質在膠體上的位置，可使用活性染色 (如 SP)；(2) 樣本濃度太低者不宜使用，因膠體溶離的回收過程會造成大量損失；(3) 很多蛋白質在原態電泳有拖尾現象，不易定位回收 (如醣蛋白)。

儀器：

電泳設備 (Hoefler SE-250 平板式垂直電泳槽)

間隔條 1.5 mm (不使用樣本梳，或使用製備用樣本梳)

溶離設備 (Little Blue Tank 電泳濃縮器 ISCO Model 1750) 附有 4 個溶離槽
解剖刀 (Feather No. 23)

試劑：

電泳膠體溶液的配置及鑄膠方法詳見 3.1 節
澱粉磷解酶的膠體活性染色試劑詳見 3.5.4 節
電泳溶離液 stock：0.2 M Tris-acetate (pH 8.6)

方法：

電泳及切割膠片：

- (1) 用 SE-250 鑄膠器以 1.5 mm 間隔條鑄造 6% native-PAGE；如圖 2.1 所示，其分離膠體只佔全高度一半，焦集膠體佔四分之一，則樣本佔其餘四分之一；不用樣本梳，只跑一種樣本。
- (2) 經色析法純化所得 L-SP 樣本，先以限外過濾 (Centriplus YM-30) 濃縮至 3 mL，再加入適量追蹤染料小心注入樣本槽，樣本槽約可容納 15 mL。
- (3) 於 4°C 冷房中進行，以定電壓 150V 進行電泳約 1 h。
- (4) 待染料跑出膠片外，停止電源拆開裝置。
- (5) 拆開膠片組合，用解剖刀在膠片左右兩側各切下一條膠體 (寬 0.2 cm) 進行活性染色以確定 L-SP 活性位置 (圖 2.2)。

電泳溶離：

- (1) 配置電泳溶離液 (0.01 M Tris-acetate)，置冷藏櫃中預冷。
- (2) 按照溶離器 Little Blue Tank 的使用說明書，將溶離小槽裝置妥當，檢查有無漏水；在樣本小槽及溶離大槽各倒入 0.01 M 電泳溶離液。
- (3) 將切割下的 L-SP 活性膠體切成 0.5×0.5 cm 的小塊，放入樣本小槽中，開始電泳溶離；應在冷藏櫃中進行溶離。
- (4) 以等電流方式溶離 (10 mA)，一次溶離約 2 h，取樣時暫時停止電流。
- (5) 將塑膠吸管前端套上 Tycon tube (可避免刺破樣本小槽內的透析膜)，伸入樣本小槽中，小心吸取靠近正極一側底部 100~200 μ L 的溶液；連續收集約 3~5 次可回收大部分在膠體中的 L-SP。取樣後，要小心回復原狀，繼續電泳溶離。
- (6) 將溶離小槽中的膠體取一小塊進行活性染色，若無 L-SP 活性則可停止溶離。

◆ 電泳溶離時不可過熱，以免使酵素失活；也可能因溶離或收集不當而失去酵素。電泳溶離槽的詳細構造，可參閱莊榮輝博士論文 p. 59。



圖 2.1 製備式電泳膠片的鑄膠

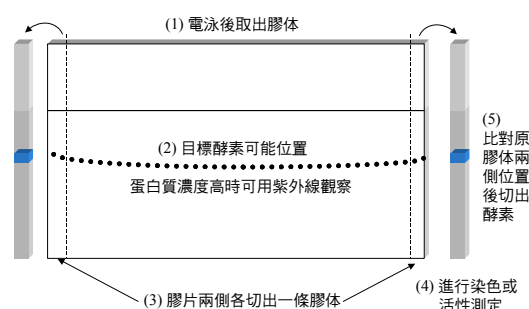


圖 2.2 如何切出製備式電泳的色帶

3 電泳檢定法：

較常使用的電泳方法簡述如下：不連續膠體電泳 (disc-PAGE 或 native-PAGE) 一般用於檢定純度或活性分析，SDS-膠體電泳 (SDS-PAGE) 則用於蛋白質次單元體分子量的檢定，梯度 (gradient) 膠體電泳則是以膠體濃度的連續梯度鑄膠，可以使電泳解析力大為提高。現在多以迷你平板直立式電泳，進行分析用途的電泳。

3.1 不連續膠體電泳 (native-PAGE)：

不連續膠體電泳是最基本的聚丙烯醯胺電泳形式，在分離膠體 pH 8.8 的電泳條件下，大部分 pI 小於 8.8 的蛋白質分子均能往正極移動，因此分子的泳動率則與樣本的電荷密度 (負電荷數/分子量) 成正比。因膠體不含 SDS，故酵素活性多能保持，可以在膠體上做酵素活性染色，也可用於大量樣本的純化，即製備式電泳。

儀器：

鑄膠套件 (含電泳玻片及氧化鋁片)
 間隔條 (spacer, 0.75 mm)
 樣本梳 (comb, 10 well)
 垂直電泳槽 (Hoefer SE-250 平板式垂直迷你電泳槽)
 電源供應器 (ISCO-453 或 Pharmacia Biotech EPS 200)
 微量針管 (Hamilton 80465) 或電泳樣本專用吸管頭

試劑：

A 液 (T 30%, C 2.6%)：

丙烯醯胺溶液 acrylamide	(Merck 10784)	14.6	g
Bis	(Bio-Rad 161-0201)	0.4	g

加水至 50 mL，若難溶則稍微加熱助溶之，儲存於 4℃。

(Bis = *N,N'*-Methylene-bis-acrylamide)

B 液 (分離膠體緩衝液)：

Tris	(Sigma T-1503)	18.2	g
TEMED	(Sigma T-8133)	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℃。

(TEMED = *N,N,N',N'*-Tetramethyl-ethylenediamine)

C 液 (焦集膠體緩衝液)：

Tris	(Sigma T-1503)	0.6	g
TEMED	(Sigma T-8133)	40	μL

用 8 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 6.8 後加水至 10 mL，儲存於 4℃。

通用電泳緩衝液 (5×)：

Tris	90 mM×5	(Sigma T-1503)	54.5	g
EDTA·2Na	2.5 mM×5	(Sigma E-4884)	4.7	g
Boric acid	80 mM×5	(Sigma B-0394)	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。

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。

追蹤染料 (tracking dye)：

取 bromophenol blue 約 1 mg 溶於 5 mL 通用電泳緩衝液，加 5 mL 甘油混勻。

高分子量標準蛋白質組合 (Pharmacia HMW electrophoresis calibration kit)：

Protein:	分子量 (Da)
Thyroglobulin	669,000
Ferritin	440,000
Catalase	232,000
Lactate dehydrogenase	140,000
Bovine serum albumin	67,000

◆ 注意：以 native-PAGE 測定的分子量，只能做為參考，不能做為唯一證據。

方法：

鑄膠：

- (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，選擇所需厚度的間隔條 (spacer) 將其組裝於鑄膠套件中。
- (2) 依照表 3.1 所列的各溶液比例，選擇所需的分離膠體濃度；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，然後緩緩倒入裝置好的鑄膠套件中。若你不知要用多少濃度的膠體，先試 7.5% 者。

表 3.1 常用 native-PAGE 膠體溶液 (單位 mL)

膠體溶液	分離膠體溶液						焦集膠體
	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%	4%
A	1.65	2.5	3.3	4.15	5.0	6.7	0.66
B	2.5						-
C	-						1.24
H ₂ O	5.8	4.95	4.15	3.3	2.45	0.75	3.0
APS	0.05						0.1
總體積	10						5.0

- (3) 膠體高度約佔玻片的 2/3 至 3/4 高，加完後儘快在各膠體液面上方小心加入 100 μ 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) 配置聚焦膠體溶液，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) 拆卸鑄膠套件，將多餘的凝膠去除，鑄好的膠片置於封口袋中放在 4°C 保存，並加入少量蒸餾水防止膠片乾裂，使用期限約為一週。

電泳：

- (1) 先取出膠片回溫，將稀釋成一倍的通用電泳緩衝液，倒入電泳槽的底部。接著把膠片以 45 度架到電泳槽上，避免氣泡產生；當電泳夾夾妥後，在電泳玻片組合的上方，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) 取適量的樣本 (約 10~15 μL)，加入 1/4 體積之追蹤染料，混合均勻後以微量針管小心的注入膠體中的樣本槽，並避免氣泡的產生。
 - ◆ 加入的樣本要事先定量，以便算出加入若干量的蛋白質。
- (3) 高分子量的標準蛋白質約需 4~8 μL ，作為蛋白質分子量的參考；但在 disc-PAGE 中，分子量的測定並不可靠，因此應避免用來決定分子量。
- (4) 將電泳槽上部蓋子蓋上，確認正負極裝置正確 (蛋白質由負極往正極跑)，連接上電源供應器，定電壓以 100~150 V 進行電泳，若膠片需做活性染色，則必須在 4°C 冷房中進行電泳。
- (5) 待追蹤染料跑出膠片後，關掉電源，取出膠片中的膠體，以解剖刀截角做記號，準備進行染色。

3.2 SDS 膠體電泳：

SDS-PAGE 是在電泳系統中，利用界面活性劑 SDS (sodium dodecyl sulfate) 附在蛋白質疏水區表面，由 SDS 本身所帶之負電荷引導泳動。由於蛋白本身所帶電荷遠小於附著之 SDS 分子，因此蛋白質本身的電荷對泳動率沒有影響，泳動率只決定於蛋白質分子量，故 SDS 電泳適合測定蛋白質的分子量。在樣本處理過程中，利用加熱破壞蛋白質的三級及四級結構，使其分子內部的疏水區暴露而與 SDS 結合；加入還原劑可破壞蛋白質分子內的雙硫鍵，常用還原劑有 β -mercaptoethanol 或 dithiothreitol。因此 SDS-PAGE 廣泛地應用於蛋白質次單元體分子量的決定。

儀器：

同上節之不連續膠體電泳

試劑：

除了上節所使用的藥品外，還需配置以下的藥品：

SDS 膠體電泳樣本溶液 (SDS-PAGE sample buffer) 2×：

Tris	125 mM×2	(Sigma T-1503)	0.3	g
EDTA·2Na	2 mM×2	(Sigma E-4884)	14.9	mg
SDS	2%×2	(Nakalai 316-07)	0.4	g
β-mercaptoethanol	5%×2	(Sigma M-6250)	1	mL

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

10% SDS 溶液：

取 1 g SDS 溶於 10 mL 二次水；SDS 極易揚起，注意勿吸入，以免造成傷害。

SDS 電泳緩衝液 (1×)：

配置同通用電泳緩衝液，但在稀釋時加入 SDS 使成為 0.1 % SDS。

低分子量標準蛋白質組合 (Pharmacia LMW electrophoresis calibration kit)：

Protein:	分子量 (Da)
Phosphorylase b	94,000
Bovine serum albumin	67,000
Ovabumin	43,000
Carbonic anhydrase	30,000
Trypsin inhibitor	20,000
α-Lactalbumin	14,000

或可用 Novex SeeBlue Pre-stained standards (見 p. 217)，其蛋白質色帶呈藍色。

方法：

鑄膠：

(1) 方法同上節不連續膠體電泳，只是在膠體溶液中多加了 1% 的 SDS；膠體的濃度配方如下表 3.2，10 mL 約足夠鑄造兩片膠片。

表 3.2 常用 SDS-PAGE 膠體溶液 (單位 mL)

膠體溶液	分離膠體溶液						焦集膠體
	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%	
A	1.65	2.5	3.3	4.15	5.0	6.7	0.66
B	2.5						-
C	-						1.24
10% SDS	0.1						0.05
H ₂ O	5.7	4.85	4.05	3.2	2.35	0.65	2.95
APS	0.05						0.1
總體積	10						5.0

電泳：

- (1) 先取出膠片回溫，將稀釋成一倍的 SDS 電泳緩衝液，倒入電泳槽的底部。接著把膠片以 45 度角放入，可避免氣泡的產生，當電泳夾夾妥後，在電泳玻片的上方，加入電泳緩衝液。同樣也要清洗每個樣本槽。
- (2) 取適量的樣本 (約 5~10 μL)，加入同體積之樣本緩衝液 (sample buffer) 再加入 2 μL 追蹤染料，混合均勻後於 100°C 中煮 5 min，待冷卻後離心 30 sec，以微量針管小心的注入膠體中的樣本槽，並避免氣泡的產生。
- (3) 低分子量標準蛋白質約需 4~8 μL ，作為蛋白質分子量參考的依據。
- (4) 將電泳槽上部的蓋子蓋上，確認正負極裝置正確，連接上電源供應器，定電壓以 100~150 V 進行電泳。
- (5) 待追蹤染料跑出膠片外，關掉電源，取出膠片中的膠體，以解剖刀截角做記號，準備進行染色。

3.3 梯度膠體電泳：

梯度電泳的分離膠體濃度成為一連續梯度，由低至高 (由上而下)，可使電泳的解析力增強。在 disc-PAGE 中，蛋白質分子的泳動率除了受到分子量影響外，分子本身的電荷也有影響，因此無法單用 disc-PAGE 來決定原態蛋白質的分子量；但若以梯度膠體進行電泳，則分子帶電性對泳動率的影響減小，就可做為檢定蛋白質原態分子量的參考。在 SDS-PAGE 中製造梯度，則其解析力亦大幅提高，分子量差異極小 (< 1,000 Da) 的次單元體亦有可能分離，故梯度膠體亦為決定蛋白質分子量之利器。但因其製備過程較為麻煩，因此並不被用來作為一般分析。

儀器：

電泳器具同上節之不連續膠體電泳，另須以下儀器用具：

五片裝鑄膠套件 (Hoefer SE-275 含電泳玻片、氧化鋁片、樣本梳、間隔條各四套)

迷你梯度製造器 (ISCO, 高低限各 30 mL)

蠕動幫浦 (Pharmacia P-1)、止血鉗

試劑：

同上節鑄膠所需樣本，另準備：

50% glycerol (其中含少量 bromophenol blue)

方法：

- (1) 將電泳玻片及氧化鋁片清洗淨後擦乾，以矽化液或玻璃清潔劑擦是乾淨，選擇所需厚度的間隔條 (spacer) 將其組裝於鑄膠套件中。電泳玻片表面的清潔於否對

鑄膠結果有決定性的影響，而鑄膠套件中的三角形填塞橡皮必須移走。

- (2) 將梯度製造器與幫浦連線，而幫浦再與鑄膠套件連線，梯度製造器的兩槽中的連通管以止血箝夾住，準備開始鑄膠。
- (3) 先決定梯度的範圍，選擇所需的分離膠體濃度，配置高限及低限膠體溶液，其中 APS 溶液必須最後加入，小心混合均勻，避免氣泡產生，徐徐倒入梯度製造器的兩槽中。通常在高限濃度的膠體溶液中，加入少量 bromophenol blue，則形成的藍色梯度有助辨識梯度製造是否良好。
- (4) 打開梯度製造器前槽的攪拌器，將止血箝移開，同時打開幫浦，使膠體溶液流往鑄膠套組，整個過程在 3 min 完成。
- (5) 在膠體被抽乾的同時，加入 50% 甘油，以便將鑄膠套組中的膠體溶液推到正確高度，當甘油到達玻片時立即停止幫浦；藍色的 bromophenol blue 可幫助辨識。此步驟需注意不可有氣泡跑入整個管路中，否則會破壞梯度形成。
- (6) 膠體高度約玻片的 2/3 至 3/4 高，加完後在各膠片組合中加入 100 μ L 異丙醇，壓平膠體液面。
- (7) 焦集膠體的鑄造過程同前節所述；或可省去焦集膠體，直接在分離膠體灌好後，把樣本梳插上，但分離膠體就要灌高一點。

3.4 等電聚焦法：

等電聚焦法是根據蛋白質的 pI 進行分離。當樣本蛋白質在含有 ampholyte 的聚丙烯醯胺中泳動時，ampholyte 會自動形成一 pH 梯度；當蛋白質的 pI 低於環境 pH 時，其淨電荷為負，因此會往正極泳動；而當環境 pH 與此蛋白質 pI 相同時，淨電荷變為零而不泳動，且焦集在膠體中。與已知 pI 的標準蛋白質樣本比較，即可得知此樣本蛋白質的 pI。以下所述方法，是在直立式平板電泳系統 (Novex) 進行的，若要進行二次元電泳，則須使用柱狀膠體，Hoefer SE-250 另配備有此種套組。

儀器：

預鑄膠體套組 (Novex IEF gel pH 3-10)

電泳槽 (Novex Xcell II 平板式垂直迷你電泳槽)

電源供應器

試劑：

負極緩衝液 (cathode buffer) 10 $\times$ ：

Arginine (free base)	(Sigma A-5006)	3.5	g
Lysine (free base)	(Sigma L-5501)	2.9	g
用 80 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 10.2 後加水至 100 mL，儲存於 4 $^{\circ}$ C。			

正極緩衝液 (anode buffer) 50×：

Phosphoric acid (85%)	4.7	g
-----------------------	-----	---

用 80 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 2.4 後加水至 100 mL，儲存於 4℃。

樣本緩衝液 (2×)：

負極緩衝液 (10×)	2	mL
Glycerol (Wako)	3	mL

加入少量 bromophenol blue，加水至 10 mL。

固定液 (5×)：

Sulphosalicylic acid (Wako)	3.46	g
Trichloroacetic acid (Wako)	11.46	g

加水至 100 mL 溶解。

標準 pI 蛋白質組合 (Pharmacia broad pI calibration kit)：

Protein	pI
Trypsinogen	9.30
Lentil lectin-basic band	8.65
Lentil lectin-middle band	8.45
Lentil lectin-acidic band	8.15
Myoglobin-basic band	7.35
Myoglobin-acidic band	6.85
Human carbonic anhydrase B	6.55
Bovine carbonic anhydrase B	5.85
β-Lactoglobulin A	5.20
Soybean trypsin inhibitor	4.55
Amyloglucosidase	3.50

方法：

- (1) 將樣本與樣本緩衝液以 1:1 混合，通常樣本中的鹽濃度在 10~20 mM 間最適合，若鹽濃度太高則會影響電泳的結果。
- (2) 將 10× 的負極緩衝液稀釋至 1×，並確定正確的 pH 值。利用超音波震盪抽氣以去除氣泡，以減少在電泳過程中出現的二氧化碳，在電泳槽的上槽加入適當量的緩衝液。
- (3) 將 50× 的正極緩衝液稀釋至 1×，確定 pH 值正確後加入電泳槽的下槽。
- (4) 小心注入已混合均勻的樣本。
- (5) 依照下面的條件，進行電泳：

100 V (1 h) → 200 V (1 h) → 500 V (30 min)

- (6) 電泳完畢後，打開膠體卡匣，將膠體浸入固定液中 30 min 固定蛋白質，並洗去

ampholyte，若 ampholyte 未洗淨會造成膠體染色背景過深。

(7) 以所要的染色方法對膠體進行染色。

3.5 膠體染色法：

3.5.1 Coomassie Brilliant Blue R (CBR) 染色法：

CBR染色法是利用藍色CBR分子上的芳香苯環，與蛋白質的疏水區結合；同時其亞硫酸基團 ($-\text{SO}_3^{2-}$) 與蛋白質的正電荷結合，可使蛋白質染出藍色色帶。是非常方便的蛋白質染色法，但其靈敏度不高，每個色帶至少要有數十 μg 以上的蛋白質才染得清楚。

儀器：

平台震盪器

染色缸（最好用玻璃製品，Corning 廚具的長方形玻璃缸極為合用）

試劑：

CBR 染色液：

Coomassie Brilliant Blue R-250	(Sigma B-0419)	0.75 g
--------------------------------	----------------	--------

用 250 mL 甲醇溶解後，再加入 250 mL 二次水及 50 mL 醋酸。

CBR 脫色液：

10% 醋酸與 20% 甲醇的水溶液。

方法：

- (1) 將電泳完畢的膠體浸入 CBR 染色液中，染色液用量只要蓋過膠片即可；置於平台震盪器上搖盪 30 min。
- (2) 倒出染色液，用自來水沖洗後倒入脫色液，脫色液蓋過膠片即可。於染色缸中放入一塊吸水紙，可加速脫色過程。
- (3) 若蛋白質濃度較低，則染色時間可加長 (1 h) 以增加色帶深度。
- (4) 若膠體表面有不溶的 CBR 染料沈積，可以用 50% 甲醇洗去。

3.5.2 硝酸銀染色法：

硝酸銀染色是一種靈敏度極高的蛋白質染色法，靈敏度可達CBR染色的百倍以上。蛋白質分子上的酸基 (COO^-) 會與銀銨錯離子結合，而銀離子在酸性環境中被還原為金屬銀，可使蛋白質色帶呈現深棕至黑色。本染色法增加了還原液甲，藉由其中的戊二醛 (glutaraldehyde) 與蛋白質分子上的胺基 (Lys或Arg) 耦合，而增加銀離子的結合基團，使得靈敏度更增。硝酸銀染色的成敗決定於所使用的藥品品質，試劑的製備必須使用Milli-Q或同等級的水。

儀器：

平台震盪器、玻璃染色缸

試劑：**還原液甲：**

Glutaraldehyde (25%)	(Merck)	4	mL
Sodium thiosulfate	(Sigma S-7143)	0.8	g
用二次水定量至 100 mL。			

還原液乙：

Citric acid (0.5% 水溶液)	(Wako 特級)	1	mL
甲醛	(Wako 特級)	0.1	mL
甲醇	(Wako 特級)	15	mL
用二次水定量至 100 mL。			

硝酸銀液：

NaOH (0.36% 水溶液)	(Merck)	21	mL
氨水	(Merck GR)	1.4	mL
H ₂ O	(Milli-Q)	73.6	mL
硝酸銀	(Wako 特級)	0.8	g

將硝酸銀溶於 4 mL 二次水，緩慢滴入 NaOH、氨水與二次水的混合液中，邊滴入邊搖盪，確定沒有混濁生成，全量滴入完成後應呈現澄清，若有混濁現象則在以氨水滴定至澄清。

反應中止液：

Citric acid (0.5% 水溶液)	(Wako)	10	mL
Ethylenediamine	(Wako)	0.1	mL
用二次水定量至 100 mL。			

矽化液：

Dichlorodimethylsilane 5% (Fluka) 的氯仿溶液。

◆ 注意矽化液揮發性強且具毒性，要帶手套在排煙櫃中操作。

方法：

- (1) 先將玻璃染缸表面做矽化，目的是防止硝酸銀液反應後，膠片黏在缸上，造成取出時膠片破裂。
◆ 矽化需戴雙層手套，因矽化物及氯仿具有毒性且會溶解手套。
- (2) 電泳後，膠片放至玻璃染缸中，以 50% 甲醇洗三次，每次至少 10 min。
◆ 經 CBR 染色過的膠片，若有些色帶無法出現，可在脫色完畢後，接到此一步驟進行硝酸銀染色，以利進一步觀察。
- (3) 倒去甲醇，用水洗三次，每次 10 min。
- (4) 加入還原液甲，反應 1 h。

- (5) 倒去還原液甲，用水洗 3~5 次，每次 10 min。
- (6) 加入硝酸銀溶液，反應 10 min。
- (7) 倒去硝酸銀液，用水洗 3~5 次，每次 10 min。
- (8) 加入還原液乙，開始呈色，在背景顏色未加深前倒去還原液乙。
- (9) 用水洗過膠片後，馬上加入反應中止液，約 1 h 後，可進行膠片乾燥。
- (10) 若染色後背景顏色過深，可以利用硫代硫酸鈉溶液或者定影液洗過夜，則可重新染色。

3.5.3 醣蛋白質染色法 (過碘酸-硝酸銀法)：

硝酸銀染色是一種靈敏度極高的蛋白質染色法，而且也可以用來染蛋白質分子上的醣類。醣類的雙醇基 (diol) 可用過碘酸氧化為醛基 (-CHO)，因而可與銀鉍錯離子結合；此染色法可以檢定蛋白質是否為醣蛋白，靈敏度比 Schiff 法高。但由於蛋白質本身也會呈色，因此在染色過程中，必須在同一片膠體上加有 positive control (使用 glycoprotein, IgG) 與 negative control (如 BSA)，在 negative control 尚未呈色前，所染得的色帶才是醣蛋白。

儀器及試劑：

儀器及硝酸銀等試劑同上節，另需下列各藥品：

固定液 A：

10% 醋酸 (Wako) 及 25% 異丙醇 (Merck) 的混合溶液。

固定液 B：

7.5% 醋酸 (Wako) 溶液。

過碘酸溶液：

Periodic acid	(Sigma P-7875)	0.2	g
用二次水定量至 100 mL。			

還原液乙：

Citric acid (0.5%)	(Wako)	1	mL
甲醛	(Wako)	0.1	mL
甲醇	(Wako)	15	mL
用二次水定量至 100 mL。			

方法：

- (1) 先將染缸表面做矽化處理，目的是防止硝酸銀液反應後，膠片黏在缸上，容易造成取出時膠片破裂。
- (2) 電泳後，膠片放至玻璃缸中，以固定液 A 固定過夜。
- (3) 隔日改以固定液 B 浸泡 30 min。
- (4) 倒去固定液 B，加入過碘酸溶液於 4°C 反應 1 h。

- (5) 倒去過碘酸溶液，用水洗 3~5 次，整個過程共 3 h。
- (6) 加入硝酸銀溶液，反應 10 min。
- (7) 倒去硝酸銀液，用水洗 3~5 次，每次 10 min。
- (8) 加入還原液乙開始呈色，觀察 negative control 的蛋白質是否呈色，在其未呈色前倒去還原液乙。
- (9) 用水洗過膠片後，馬上加入反應中止液，約 1 h 後，可進行膠片乾燥。
- (10) 若染色後背景顏色過深，可以利用硫代硫酸鈉溶液或者定影液洗過夜，則可重新染色。

3.5.4 澱粉磷解酶活性染色法：

原態電泳後的膠片若浸入含有酵素基質的反應液中，則待酵素反應呈色後，可得知酵素泳動率以及其活性強弱；但酵素所生成的產物必須是水不溶性，才能在膠片中聚集呈色。澱粉磷解酶在含有 Glc-1-P 的環境下，可進行葡聚糖的延長反應，產生不可溶的直鏈澱粉，然後以碘液使澱粉染上紅棕至深紫色。此法偵測磷解酶的活性極為靈敏，但會受雜夾在樣本中 β -amylase 的干擾。

儀器：

平台震盪器、恆溫箱 (37°C)

試劑：

MES 緩衝液 (0.04 M, pH 5.9)：

MES (2[N-morpholino] ethanesulfonic acid) (Sigma M-8250)	1.56 g
以 KOH 調整 pH 至 5.9 後，加水至 200 mL 置於 4°C 保存。	

Glc-1-P (32 mM)：

Glucose-1-phosphate	(Sigma G-6895)	0.98 g
加水至 100 mL，置於 4°C 保存，Glc-1-P 會因儲存過久而裂解出磷酸，使用期限為三週左右。		

可溶性澱粉 (1.2%)：

可溶性澱粉	(Sigma S-2630 或 Nakalai 321-22)	1.2 g
取 1.2 g 可溶性澱粉先以少量熱水溶解，再加水至 100 mL，置室溫儲存。使用前若有不溶物則再加熱溶解之，放冷後才能加入 Glc-1-P。		

碘液呈色劑：

Iodine	(Wako)	0.45 g
KI	(Nakalai 296-25)	2.83 g
加水至 200 mL。		

方法：

- (1) 將原態電泳完畢的膠體置於基質液中，其中 MES : Glc-1-P : soluble starch = 2:1:1 (體積比)；基質液用量只要蓋過膠片即可。

- (2) 於 37°C 中反應適當的時間，1~2 μg 的 SP 在含有醣引子下，反應 2 h 可染出清楚色帶，不含醣引子則約需 18~24 h。
- (3) 反應完成後，可以看到白色的澱粉色帶出現。倒去基質液，以蒸餾水清洗膠片數次，加入碘液蓋過膠片以呈色，並且震盪使呈色均勻。
- (4) 此時可看見碘呈色色帶：含有澱粉引子的膠片，其背景顏色較深；可在蒸餾水中清洗，以洗去多餘的可溶性澱粉基質；若色帶因碘昇華而消失，可以再加入碘液重染一次。
- (5) 若樣本中含有澱粉酶 (如 β -amylase)，則在含澱粉的膠片上出現反白色帶，會影響澱粉酶的呈色。為了避免這種影響，在電泳完畢後，可將膠片先浸於 100 μM HgCl_2 溶液中 3~5 min 後洗去，以抑制澱粉酶的活性。

3.6 膠片乾燥法：

利用玻璃紙 (賽路芬 cellophane) 的半透膜特性，電泳膠片中的水分及甲醇在三明治組合中會滲透而蒸發，使得膠片被壓乾且壓平於兩張玻璃紙中，可以長久保存。膠片乾燥後亦可做同位素放射顯像，或者色帶濃度掃描。

用具：

玻璃板、玻璃紙、文書夾

方法：

- (1) 在玻璃板上鋪平第一張溼潤的玻璃紙，玻璃紙的四邊要略大於玻璃板，四邊折下，避免玻璃紙與玻璃板中有任何的氣泡產生。
- (2) 將染色完畢之膠片置於上述步驟之玻璃紙上。
- (3) 將另外一張玻璃紙浸溼，小心鋪蓋於膠片上，避免任何氣泡產生，玻璃紙的四邊要略大於玻璃板約 1~2 cm，將第二層的玻璃紙四邊反摺到玻璃板背面。
- (4) 以文書夾夾住四角，置於室溫或 37°C 烘箱中乾燥。
- (5) 檢查膠片是否完全乾燥，可以利用指甲在膠片上輕敲，乾燥完全的膠片不會留下任何指甲痕跡；可將膠片剪下，以護貝膠膜護貝後保存。

4 蛋白質電泳轉印及相關應用：

蛋白質電泳膠片經轉印於轉印膜表面後，可以進行免疫染色法、蛋白質 N-端序及酵素活性染色等。轉印膜 PVDF (polyvinylidene difluoride) 是一種疏水性材質，蛋白質可藉由本身的疏水性部分與其結合。

4.1 蛋白質電泳轉印法：

儀器：

電泳轉印槽 (Hoefer TE22)

轉印紙 (Millipore Immobilon, PVDF)、濾紙 (Whatman 3 mm)

電源供應器

試劑：

轉印緩衝液 (blotting buffer) 10×：

Tris	(Sigma T-1530)	30.3	g
Glycine	(Sigma G-7126)	144	g

加水至 800 mL，pH 調至 8.3 後，加水至 1,000 mL。原態膠體 (native-PAGE) 的轉印緩衝液稀釋十倍後直接使用；SDS-PAGE 轉印時，則轉印緩衝液中含有 10% (v/v) 甲醇。

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 (Da)
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

方法：

- (1) 將所要轉印之 SDS-PAGE 或 native-PAGE 膠片浸於轉印緩衝液 (1×) 中，平衡 20~30 min。通常 SDS-PAGE 中的蛋白質分子量較小，因此要加入 10% 的甲醇於轉印緩衝液中，以避免小分子蛋白質過度擴散或穿過轉印膜。

- (2) 轉印膜 PVDF 切割成比膠片稍大，因膠片平衡後體積會略漲。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，再把整個膠片卡夾裝好。
- (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。除去卡夾外面的氣泡，氣泡的存在將使轉印效率變差。
- (5) 以 400 mA 進行轉印，於 4°C 中轉印 60 min 後中止。取出轉印膜，浸在尿素洗液中洗 1 h 以上；尿素可洗去 SDS-PAGE 樣本蛋白質分子上的 SDS，同時可以將蛋白質分子部分恢復原態，以增加抗體確認機率。
- (6) 在電泳過程中若有 pre-stained 的標準蛋白質，可作為轉印效率的參考。

4.2 酵素免疫染色：

電泳後把蛋白質轉印至 PVDF 轉印膜上，利用專一性抗體對膜上的蛋白質抗原做專一性結合，再用二次抗體對上述抗體進行專一性的結合；而因二次抗體上連結有呈色用的標誌酵素 (多用 horse radish peroxidase, HRP 或 alkaline phosphatase, AP)，可呈色而得以偵測。二次抗體上也可連結 biotin，再藉由 streptavidin 架橋與 biotinylated alkaline phosphatase 結合，一個 avidin 可與四個 biotin 結合；這種免疫染色步驟可達放射性顯像的靈敏度，且其專一性也可增強。

儀器：

平台震盪器、塑膠染色盤

試劑：

明膠-NET：

Gelatin	0.25%	(Merck 4070)	2.5	g
NaCl	0.15 M	(Merck 6404)	8.75	g
EDTA·2Na	5 mM	(Merck 8418)	1.8	g
Tween 20	0.05%	(Merck 822184)	0.5	mL
Tris	50 mM	(Sigma T-1530)	6.05	g

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

PBS (phosphate buffer saline) 5×：

NaCl	0.13 M×5	(Merck 6404)	38	g
NaH ₂ PO ₄	0.01 M×5	(Wako)	7.8	g

加水 800 mL 溶解，用 NaOH 調成 pH 7.0，加水至 1,000 mL，成為 5×PBS。

PBST (phosphate buffer saline & Tween) :

PBS 5×稀釋至 1×並加入 0.05% (v/v) Tween 20，即成為 PBST。

Urea-PBST :

Urea	6 M	(Sigma U-1250)	36	g
------	-----	----------------	----	---

加入 PBST 加熱溶解後，以 PBST 定量至 100 mL。

一次抗體：

通常要免疫大白兔或小白鼠自行製備一次抗體，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。抗體的製備方法，請參見 B2 酵素分析方法 6 免疫學工具的利用。

二次抗體連結體：

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或者標誌物 (如螢光物或者 biotin)；其使用濃度請依照廠商建議，也稀釋在明膠-NET 中。

◆ 注意二次抗體的種類很多，差別在其純度有高低，以及所對抗的一次抗體種類不同 (如抗 IgG, IgM, IgA 或全部)，或抗體的部位 (如抗整個抗體分子，或者只有 Fc 或 Fab 片段)，同時連結物的種類也很多；請小心以免購買不適用的二次抗體。

AP 緩衝液 (alkaline phosphatase buffer) 5× :

Tris	100 mM×5	(Sigma T-1530)	6.05	g
NaCl	100 mM×5	(Merck 6404)	2.92	g
MgCl ₂	10 mM×5	(Sigma M-8266)	0.475	g

加入水至 80 mL 後，以 NaOH 調至 pH 9.5 後，加水定量至 100 mL。使用前要稀釋成 1×濃度。

A+B 試劑：

A Reagent, streptavidin	(Vectastain)	10	μL
B Reagent, biotinylated alkaline phosphatase (Vectastain)		10	μL

加入 15 mL NET 稀釋 1,500 倍，混合均勻後，室溫下先放置 30 min 後使用。

NBT 試劑：

Nitro blue tetrazolium	(Sigma N-6876)	0.5	g
------------------------	----------------	-----	---

溶於 70% DMF (dimethylformamide) 10 mL。

BCIP 試劑：

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate	(Sigma B-0274)	0.5	g
--------------------------------------	----------------	-----	---

溶於 100% DMF 10 mL。

AP 呈色劑 (BCIP + NBT) :

BCIP 試劑	33	μL
NBT 試劑	66	μL

呈色前新鮮配置，溶於 10 mL (1×) AP 緩衝液中。

◆ 注意若是使用 HRP 為標誌酵素，則需使用不同的呈色劑：

HRP 呈色劑 DAB：

Diaminobenzidine (DAB)	(Sigma D-5637)	5	mg
H ₂ O ₂	30% (Merck 7210)	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。

方法：

- (1) 尿素洗過的轉印紙再以 PBST 洗三次，每次 10 min。
- (2) 加入一次抗體 (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 PBST 洗 3 次，每次 10 min。
- (4) 加入二次抗體 (biotinylated 2nd Ab)，室溫下反應 1 h。二次抗體同樣也溶在明膠-NET 中，使用濃度請參考廠商說明書指定濃度。
- (5) 以 PBST 洗 3 次，每次 10 min。
- (6) 加入預先混合 30 min 之 A+B 試劑，反應 1 h。
- (7) 以 PBST 洗 2 次，每次 10 min。
- (8) 以 AP 緩衝液洗 2 次，每次 10 min。
- (9) 加入 AP 呈色劑呈色，可在 5~30 min 內得到紫黑色色帶，若天冷可置於 37°C 烘箱增快反應；在背景顏色尚未變深前，倒去呈色劑，以蒸餾水清洗數次。
- (10) 將呈色完成的 PVDF 膜，浸入 100% 甲醇 1 min，可避免呈色基質殘留，而造成 PVDF 背景顏色加深的困擾。
- (11) 免疫染色結果的好壞，取決於每次清洗步驟是否完全且徹底；過於隨便的清洗步驟會造成染色結果不良。

若使用 HRP 為標誌酵素並使用 DAB 呈色劑：

- 與前面 (1)~(5) 的步驟相同，但步驟 (4) 中的二次抗體使用 HRP 的連結體。
- (6) 再以 PBS 洗過 2 次後，倒入 HRP 呈色劑 DAB，褐色色帶開始出現。
 - (7) 呈色約在 10 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 HRP 為標誌酵素並以化學螢光呈色：

- 與前面 (1)~(5) 的步驟相同，但步驟 (4) 中的二次抗體使用 HRP 的連結體。
- (6) 再以 PBS 洗過 2 次後，倒入化學冷光呈色劑，並立即在掃描器照相。
◆ 化學冷光呈色劑有很多種廠牌與形式，請依照廠商的指示操作。

- ◆ 每種掃描器都有其特定的使用範圍與操作方法，請熟悉後再行使用。
- ◆ 化學冷光呈色法的靈敏度極高，可達 DAB 的十倍以上。

4.3 蛋白質 N-端序列決定法：

蛋白質 N-端定序的檢定採用 Edman degradation 方法，利用蛋白質自動定序儀進行胺基酸的序列分析；整個實驗系統避免使用具有胺基的物質。

儀器及試劑：

轉印用具及試劑如上節，但轉印緩衝液須避免使用含有胺基的 Tris 及 glycine。

轉印緩衝液 (blotting buffer) 1 ×：

CAPS	10 mM	(Sigma C-2632)	2.22 g
------	-------	----------------	--------

加水 600 mL 溶之，調整 pH 至 11 後，加甲醇 100 mL，再加水至 1,000 mL 攪拌均勻；最後含 10% 甲醇，可視需要調至 20%。

(CAPS = 2-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid)

方法：

- (1) 轉印的方法與步驟如上所述，單一色帶的蛋白質含量最好有 0.1 mg 以上。
- (2) 取出轉印膜，以五分之一濃度的 Coomassie Brilliant Blue R-250 染液短暫染 1 min，或等到色帶剛出現之時，即以 50% 甲醇脫去背景顏色；若蛋白質濃度低，脫色時間需較久；若背景顏色太深，可用 100% 甲醇脫色。染色脫色後，將轉印膜放入二次水中清洗，再放入烘箱中乾燥。
- (3) 將轉印膜上的目標蛋白質色帶切下，以封口袋保存，送往儀器中心定序，所使用的儀器通常為 Applied Biosystems 的 Model 473 A。
- (4) 也可以把切下的轉印膜放入水解管中，加入 0.6 mL 水解液 (HCl : TFA = 4 : 1)，抽真空封口後在 140°C 水解 3 h，水解液可進行胺基酸成分分析。

B4

相關研究計畫

國科會研究計畫

甘藷澱粉磷解酶激酶之純化與性質檢定

甘藷澱粉磷解酶激酶之純化與性質檢定

中文摘要

澱粉磷解酶 (starch phosphorylase, SP) 一般認為是植物分解其貯藏性多醣的重要酵素，其蛋白質是由兩個 110 kD 次體所組成的二元體，原態分子量為 220 kD。與動物的同源酵素 肝糖磷解酶 (glycogen phosphorylase, GP) 比較，SP 分子的中央多出一段由 78 個胺基酸組成的 α 螺旋 (L78)；L78 可能是由 intron 演變而來，剛好插入 SP 與基質結合區的正中位置，阻礙了澱粉與酵素之結合，可能因此而降低活性。在研究 SP 的過程中，發現 SP 分子非常容易斷裂，成為一群分子量約為 50 kD 的片段 (F50)；推測可能是在 L78 上的 PEST site 上斷開。但 SP 分子在斷開後，仍保有其完整的四級構造，且其催化活性與基質的親和力都有增加。已知動物細胞內的 GP 有很複雜的酵素調節作用，如磷酸化、異位酶調節等，但 SP 分子構造上則缺乏這些特徵；我們推測 L78 的存在，及其易受水解的特性，很可能是植物細胞用來調節 SP 活性的一種機制。以電腦程式 PC/GENE 搜尋 L78 上的胺基酸序列，發現有很強的磷酸化位址，經單株抗體檢定確有磷酸化 Ser，而以放射性 ATP 標示，也發現 SP 分子可以被接上放射性磷；另外在 L78 的 C-端側發現有 Pro-rich 序列，可能與 SH3 domain 有專一性結合，而 SH3 是信息傳導的重要聯結分子。我們也發現 SP 可以在沒有引子的存在下，使用 Glc-1-P 合成長達數千葡萄糖單位的直鏈澱粉。因此，我們擬由 SP 的磷酸化，以及 SP 可能參加的信息傳導網路，推知植物細胞中澱粉顆粒生合成的誘導，與其細胞層次的調節控制是如何發生。由於我們已確知 SP 會受到磷酸化，因此甘藷塊根中一定有可以進行磷酸化的激酶存在。因此，本年度計畫將要接著完成下面三項工作：(1) 純化此 SP 激酶並檢定其生物化學的基本性質；(2) SP 的磷酸化是否確實與信息傳導有關；(3) 製備 SP 激酶的抗體以作為檢定的方便工具。

研究計畫之背景及目的

一、本計畫之研究背景：

動物的肝糖磷解酶有極為複雜的調控機制：

以貯藏性多醣類為基質的磷解酶 (phosphorylase)，是生物體內重要的醣類代謝酵素 (Fletterick and Madsen, 1980)。尤其在動物細胞中，肝糖磷解酶 (glycogen phosphorylase, GP) 影響動物體內血醣濃度的高低，有極複雜的酵素調節及控制系統，數十年來被研究得很透澈，有關的重要結論例如：

- a. GP 可經磷酸化，由不具活性的 b 型轉變為活性 a 型；反之則由去磷酸反應，變為不具活性的 b 型。磷酸化的位置在 Ser 14。
- b. GP 有許多 allosteric effectors，如 caffeine 及葡萄糖均為抑制性影響；而 AMP 則為 activator。都可誘導蛋白質分子構形的改變，造成抑制或活化效果。
- c. 肝糖磷解酶對基質有一結合位置，距活性區 30 埃，方便與肝糖結合，GP 的細部分子構造已經由 X 光繞射分析解出 (Acharya et al., 1991; Johnson and Barford., 1990)。

植物的澱粉磷解酶很容易降解但仍保持其原態四級構造：

對等於動物的 GP，澱粉磷解酶 (starch phosphorylase, SP) 則被認為是植物分解其貯藏性多醣的重要酵素 (Steup, 1988)，本研究群體已從甘藷塊根中純化此酵素 (Chang et al., 1987)，群殖得到其 cDNA 及 genomic DNA 並且定序完成 (Lin et al., 1991)。一般的生化研究，則檢定 SP 的蛋白質四級構造，是由兩個 110 kD 次體組成的二元體，故原態分子量為 220 kD (Chang et al., 1987)。在研究 SP 的過程，發現 SP 分子非常容易降解，可在 SDS-PAGE 得到一群分子量約 50 kD 的片段 (F50)，推測可能是 SP 在分子的中央裂解所得 (Chiang et al., 1991)；而 SP 分子雖然斷裂，但仍然可維持其三、四級構造，而具有原來的催化活性。我們也對 SP 製備得單株抗體多株，發現不同的單株抗體會與不同的 SP 片段結合，在判定分子的斷裂點及其他研究工作上極為有用 (Chern et al., 1990)。Brisson 等也檢定馬鈴薯 SP 的基因表現，發現其 SP 可能也受到轉譯後之調節 (St-Pierre et al., 1996)。

澱粉磷解酶分子中央多出一段由 78 個胺基酸組成的多肽：

日本大阪大學的福井等人 (Nakano and Fukui, 1986)，群殖馬鈴薯 SP cDNA，並由其胺基酸一級構造預測 SP 分子的三次元結構。與 GP 比較後發現，SP 與 GP 的立體構造相當相似，但在分子的正中央，多出一個 78 胺基酸的 α 螺旋環 (L78)。此環位置剛好切入上述 GP 的多醣結合區，且突出分子表面，造成了 SP 對澱粉結合的障礙。此外 GP 所有的磷酸化、allosteric effect 等作用，在 SP 上均不存在；

二、本計畫之研究動機：

澱粉磷解酶也有複雜的調控機制？

基於以上背景，我們對 SP 的蛋白質構造與酵素功能間的關係非常有興趣，並提出一個假說。認為 SP 並非完全沒有調節機制，它可能先以類似 脢原 的方式存在，此時酵素分子因為有 L78 的立體障礙，對澱粉的結合力很低；當 L78 被蛋白酶切開之後，活性才提高起來。而斷開後的 SP，仍可維持原來的分子構形，並不散開，且因與基質的結合力大增，造成活性的升高。尤其在與 GP 的胺基酸或核苷酸序列比較後，發現 L78 可能是由早先的 intron 演變而來的 (Camirand et al., 1990)，更給這個機制之存在源由，提供有趣的說明。

上一期三年計畫已獲致相當的結果：

為了證實此一假說，我們在前一期的三年計畫，探討有關的生化學研究，果然發現澱粉磷解酶分子斷裂時，其最高催化速率 $V_{\max}$ 漸漸升高，同時與澱粉的親和力 $1/K_m$ 也上升。第二年進一步探討，發現這種降解現象可能因於 SP 分子的降解，同時也推衍出分子上的規律斷裂點，以及可能的降解順序。另外，當我們檢視 L78 上的胺基酸序列時發現，除了已知的 PEST 序列外，還有許多非常獨特的 signature 序列及二級構造，且有很強的磷酸化 Ser，推測可能與細胞內的信息傳導有關 (請見圖一)。第三年則進一步檢討這種降解作用的可能生理功能，發現 SP 可能主導澱粉引子 (primer) 的合成；目前已用放射線標示法追蹤，單獨以放射性 Glc-1-P 為基質，初步證明 SP 可合成新的多糖引子，其上標有放射性磷。到此似乎給了 SP 的生理角色一個極重要定位，此前學界對 SP 的真正生理作用並無定論。至於 L78 的存在或其降解，是否與澱粉引子的產生能力有關，則尚待探究。

未來的計畫將探討澱粉磷解酶的信息傳導及其分子生理：

由以上觀察，使我們瞭解到澱粉磷解酶的分子，並非無緣無故多出一段 L78 胜肽，它可能做為調節 SP 的催化或反應方向的感應點。最近 Huber 等人 (Huber et al., 1996) 的工作成果顯示，植物酵素 (nitrate reductase) 也有很強的磷酸化反應，而此磷酸化反應是一種相當複雜的酵素調節機制 (Verslues et al., 1996)。我們發現 SP 可能有類似的調控機制，而其最終的影響，推測是控制植物澱粉的堆積。

因此我們的研究計畫，將以植物細胞內的信息傳導為主軸，以 SP 為主要研究對象，看植物如何起動其澱粉的合成。目前第一個關鍵性的工作，是察看澱粉磷解酶到底有沒有被磷酸化。今年正進行中的計畫，我們以甘藷的抽出物，加以放射性 ATP 標示 SP，發現 SP 確可接上放射性磷；另外，使用抗磷酸化 -Ser 或 -Thr 的單株抗體，也可以對甘藷中原來存在的 SP 產生正反應的染色。這些正面結果，使得我們有極大的信心完成本研究計畫 (Chen et al., 2002)。

三、相關參考文獻：

- Acharya KR, Stuart DI, Varvill KM, Johnson LN (1991) *Glycogen phosphorylase b: Description of the protein structure*. World Scientific, Singapore
- Baeuerle PA (1998) I κ B-NF- κ B structures: At the interface of inflammation control. *Cell* **95**: 729-731
- Camirand A, St-Pierre B, Marineau C, Brisson N (1990) Occurrence of a copia-like transposable element in one of the introns of the potato starch phosphorylase gene. *Mol Gen Gene* **224**: 33-39
- Chang TC, Lee SC, Su JC (1987) Sweet potato starch phosphorylase - Purification and characterization. *Agric Biol Chem* **51**: 187-195
- Chen HM, Chang SC, Wu CC, Cuo TS, Wu JS, Juang RH (2002) The catalytic behavior of L-form starch phosphorylase from sweet potato roots is regulated by proteolysis. *Physiol. Plant.* **114**(4): 506-515.
- Chern MS, Mo YC, Juang RH, Su JC (1990) Probing the protein structure of sweet potato starch phosphorylase with monoclonal antibodies. *J Chinese Biochem Society* **19**: 55-64
- Chiang CL, Lu YL, Juang RH, Lee PD, Su JC (1991) Native and degraded forms of sweet potato starch phosphorylase. *Agric Biol Chem* **55**: 641-646
- Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT ed. (1997) *Current protocols in protein science*. John Wiley & Sons, Inc.
- Fletterick RJ, Madsen NB (1980) The structures and related functions of phosphorylase. *Annu Rev Biochem* **49**: 31-61
- Hardie DG ed. (1993) Protein phosphorylation. *A Practical Approach Series*. IRL Press.
- Hochstrasser M (1996) Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* **84**: 813-815
- Huber CS, Bachmann M, Huber JL (1996) Post-translational regulation of nitrate reductase activity: A role for Ca²⁺ and 14-3-3 proteins. *Trends Plant Sci* **1**: 432-438
- Johnson LN, Barford D (1990) Glycogen phosphorylase. *J Biol Chem* **265**: 2409-2412
- Lin CT, Yeh KW, Lee PD, Su JC (1991) Primary structure of sweet potato starch phosphorylase deduced from its cDNA sequence. *Plant Physiol* **95**: 1250-1253
- Mori H, Tanizawa K, Fukui T (1991) Potato tuber type H phosphorylase isoenzyme. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a full-length cDNA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**: 18446-18453
- Mori H, Tanizawa K, Fukui T (1993) A chimeric alpha-glucan phosphorylase of plant type L and H isozymes: Functional role of 78-residue insertion in type L isozyme. *J Biol Chem* **268**: 5574-5581
- Nakano K, Fukui T (1986) The complete amino acid sequence of potato alpha-glucan phosphorylase. *J Biol Chem* **261**: 8230-8236
- Pan SM, Chang TC, Juang RH, Su JC (1988) Starch phosphorylase inhibitor is beta-amylase. *Plant Physiol* **88**: 1154-1156
- Smith RD, Walker JC (1996) Plant protein phosphatases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 101-125
- St-Pierre B, Bertrand C, Camirand A, Cappadocia M, Brisson N (1996) The starch phosphorylase gene is subjected to different modes of regulation in starch-containing tissues of potato. *Plant Mol Biol* **30**: 1087-1098
- Steup M (1988) Starch degradation. In: Preiss J (ed) *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise*. pp. 255-296. Academic Press
- Verslues PE, Braun DM, Garcia MXU, Stone JM (1996) Protein phosphorylation: Examining the plant CPU. *Trends Plant Sci* **1**: 289-291
- Zhang S, Klissig DF (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* **9**: 809-824