

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 鹽析分離法 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 膠体介質 119
 - 3.2.3 膠体管柱 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 膠体的組成	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 等電焦集法 (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 膠体過濾法	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 檢定勝肽群的方法	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 抗體製備 163
- 6.4 抗體的應用 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

純化酵素前要先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、等電焦集電泳系統、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。

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。

濃度	名稱	pH
1 M	Tris-HCl	pH 8.0
Juang	990608	

圖 1.1 藥品試劑標籤

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。

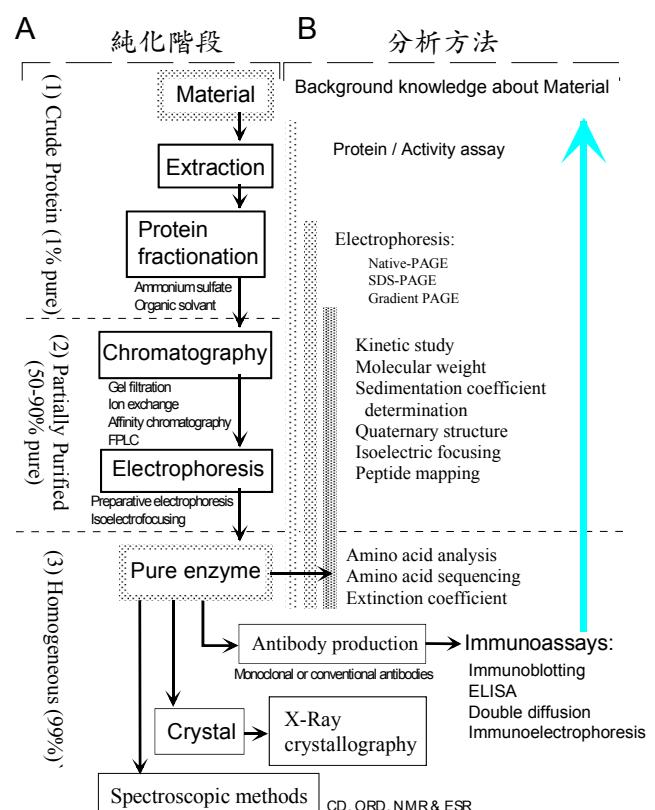


圖 2.1 酵素純化階段與各種分析方法

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°C，若能先以液態氮冰凍後貯於 -70°C 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体的破壞；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，以研砵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) 濕式：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。

研砵：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。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：

均質用的緩衝液体積，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。

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。

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 砂藻土 (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。

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

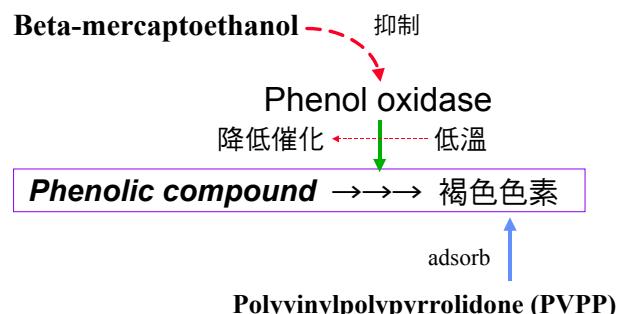


圖 2.2 多酚化合物的生成與防止

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:

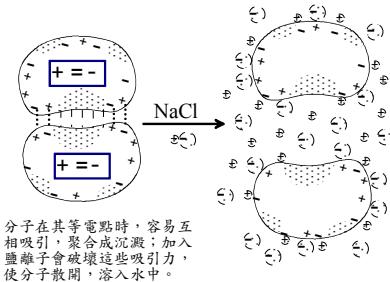
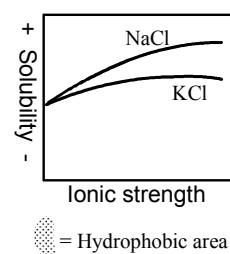


圖 2.3 鹽溶 salting in 方法的原理圖解

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:

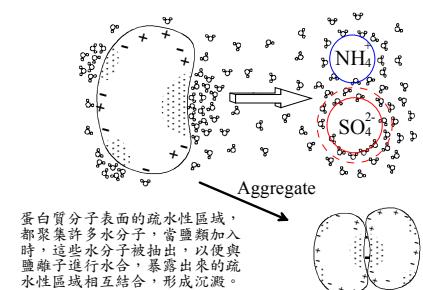
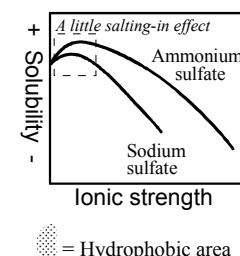


圖 2.4 鹽析 salting out 方法的原理圖解

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) 饰度隨溫度變化稍有差異，25°C 下的飾度為 4.1 M，即每公升加入 767 克固体硫酸銨；0~100% 之間各飾度的添加量要查表，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。

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。

Organic Solvent Precipitation:

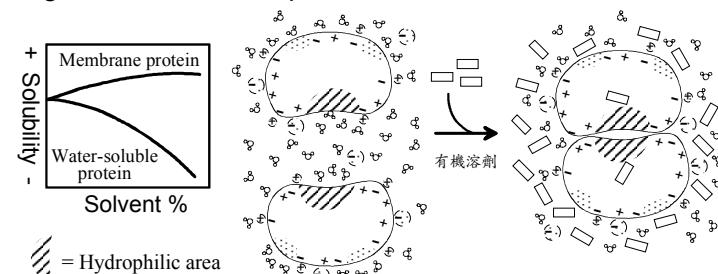


圖 2.5 有機溶劑沈澱法的原理圖解

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°C ，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。

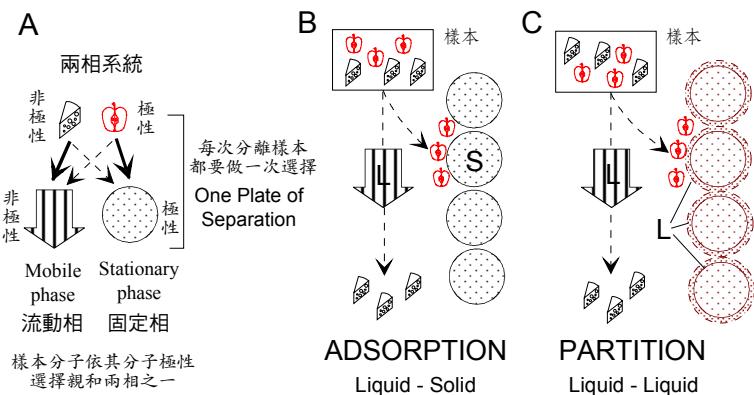


圖 3.1 色層分析方法的基本原理圖解

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 Thin-layer chromatography 反相層析法, GC	離子交換法 Thin-layer chromatography GC
大 分 子	膠體過濾法 反相層析法	離子交換法 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，固定相為膠体孔隙內的緩衝液。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。

3.2.2 膠体介質 (support, matrix) :

膠体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 以上的膠体，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，形成三次元膠体，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。

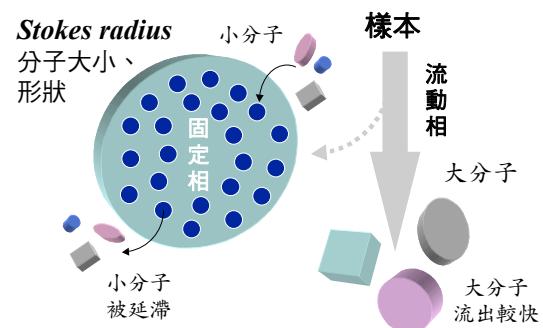


圖 3.2 膠體過濾法的原理

(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)；越粗的膠体，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 濾散式的膠体，效果較好且快速。

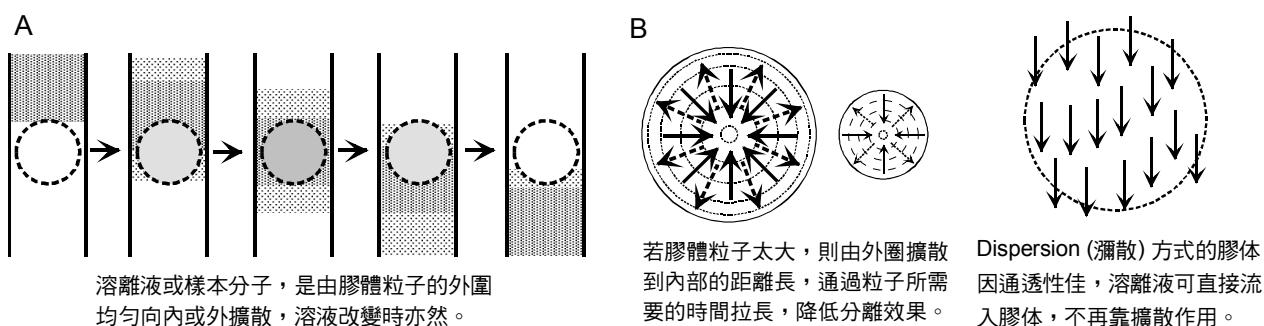


圖 3.3 溶離液是以擴散方式進出膠體

3.2.3 膠体管柱：

a. 管柱性質：

膠体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，膠体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。

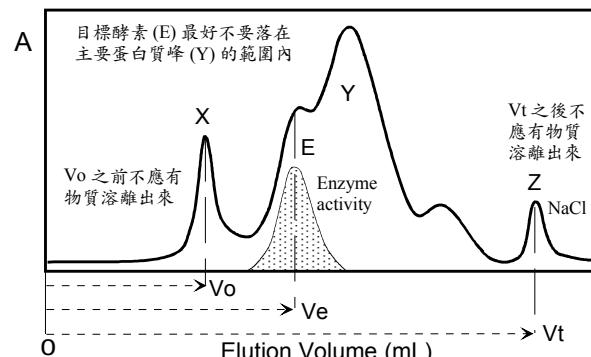


圖 3.4 膠體過濾法的典型溶離圖譜

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。但膠体若太細，會造成流速下降，則要用更大的壓力進行溶離，許多膠体耐不住如此高壓。因此若補強膠体材質，以架橋來支持膠体構造，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. 膠体的選擇：

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，一支膠体體積為 100 mL 的管柱，可分離 1~3 mL 樣本。膠体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。

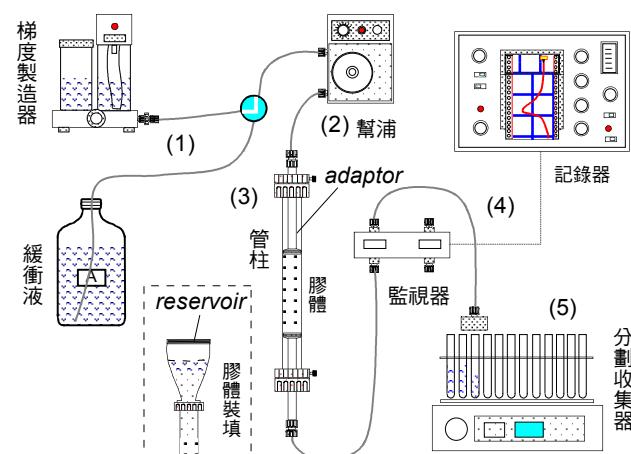


圖 3.5 液相層析管柱系統

3.2.4 管柱操作：

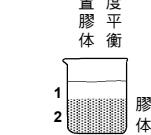
a. 膠体處理：



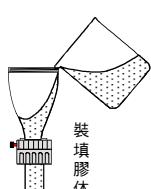
許多膠体是乾燥粉末，使用前要先行膨潤，如 Sephadex, Bio-Gel P；其餘如 Sephacryl, Sepharose (CL), Bio-Gel A 均為已膨潤者，直接在玻璃漏斗以緩衝液洗過即可裝填；若有需要，可以減壓幫浦抽去氣泡。注意 Sepharose 及 Bio-Gel A 不可加熱或高壓滅菌。由管柱大小算出所需膠体的體積，再加一成。

b. 膠体裝填：

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) 洗好的膠体浸在緩衝液中，靜置過夜使之沉降，把上清部份的體積調為膠体體積的一半 (左圖 膠体佔三分之二)。



(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。

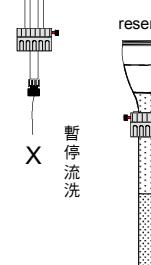
(5) 把上述膠体攪拌均勻，成為懸濁液，但勿產生氣泡。

(6) 沿著管柱的管壁，慢慢倒入膠体；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，膠体開始沉降。

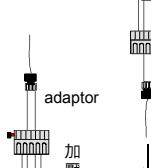
(8) 不久整隻管柱分成三層 (左圖)，最上為澄清的緩衝液，下層為已堆積好的膠体，顏色較白，中層為尚未沉降的膠体。勿使上方緩衝液層乾掉。

(9) 膠体完全沉降後，應得到預計的膠体高度，否則要追加或挖去膠体；要添加膠体時，先把膠柱上方約 5 cm 高的膠体均勻懸濁後再加入。



(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。

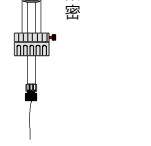
(11) 連通整個系統，檢查系統的封閉性，調整幫浦流速。



(12) 以較高的流速洗 (45 mL/h, 約 150% 流速)，以平衡完全。通常膠体裝填時的流率，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，否則膠体會被壓垮。



(13) 膠体面可能會下降，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) 体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体表面上。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，讓它自動沉降在膠体表面 (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，最好使用分劃收集器，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NaN₃ (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NaN₃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。

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，固定相為介質擔體表面的帶電基團。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)： 擔體-陰離子基團 陽離子
- 2) 陰離子交換介質 (anion exchanger)： 擔體-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，對擔體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(或離子體積)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。

d. 離子取代優先順序例：

陽離子： $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$

陰離子： $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{OH}^-$

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。

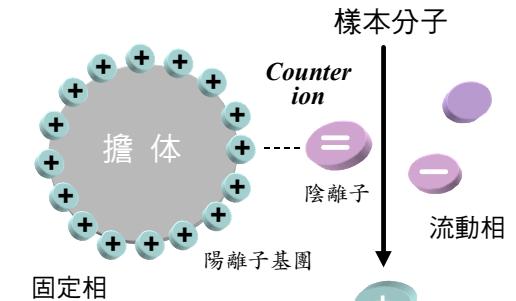


圖 3.6 離子交換法原理

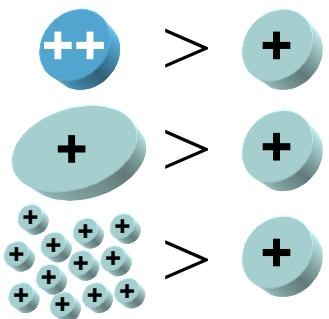


圖 3.7 離子取代順序

- (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	$^+NR_3$	TEAE-X (QAE-X)	$-NR_3^+$
	Weak	Dowex-3 IR-45	$^+NHR_2$	DEAE-X	$-OCH_2CH_2NHR_2^+$
Cation Exchanger	Strong	Dowex-50	$-SO_3^-$	Phospho-X	$-PO_4^{2-}$
	Weak	IRC-150	$-COO^-$	CM-X	$-CH_2COO^-$

X = Sephadex, Sepharose, Sephacel or cellulose

b. 選擇交換介質：

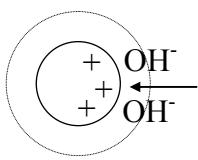
- (1) 若已知樣本蛋白質的 pI，則先選擇適當緩衝液的 pH，使蛋白質帶有正 (或負) 電，而採用陽 (或陰) 離子交換介質。
- (2) 若尚不知樣本的 pI 時，則可用試管裝少量介質，在各種緩衝液 pH 下，加入樣本蛋白質，然後測上清中有無酵素活性，即得知樣本蛋白質有無吸附上去，可選得適當的介質及緩衝液 pH。

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 :

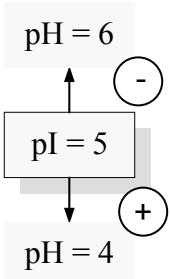
- (1) 可與 DNA 或 RNA 結合，原本用在分離單股與雙股 DNA，是一種結晶型的磷酸鈣，其作用機制不很清楚，但顯然與其帶電性質有關。
- (2) 操作法與離子交換法類似，在低離子濃度時使蛋白質結合上去，再以高濃度溶離下，但較複雜；不同的鹽類 (如 磷酸鹽, NaCl或CaCl₂)，會有不同的溶離結果，要以實驗嘗試求得。

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. 膠体 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，如膠体過濾法一樣，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×者澈底洗過。

d. 管柱系統：

離子交換法所用的管柱系統，其要求比膠体過濾法嚴格，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。與膠体過濾相反，多使用矮胖型的管柱，太長並無必要。

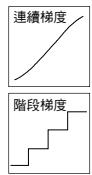
e. 膠体裝填：

裝填方法與膠体過濾法一樣，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。 Sepharose 或 Sephadex 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，則其條件同膠体過濾法。

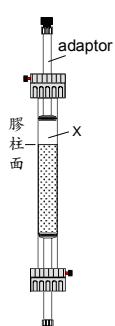


b. 溶離方法：

(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 色層焦集法。

(3) 由於是以濃度的梯度來溶離，因此在離子交換管柱中，膠体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. 膠体再生：

(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，澈底清洗可用 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。也可把膠体取出，在燒杯或漏斗中澈底清洗。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 色層焦集法 (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 發展的色層焦集法。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 等電焦集法 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焦集管柱後，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，故稱為焦集法。

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。一般較少使用色層焦集法，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。

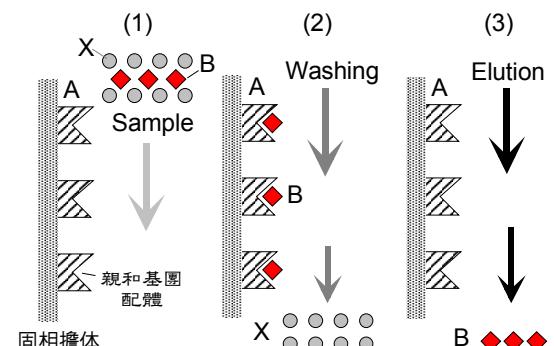


圖 3.8 親和層析法的作用機理

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。

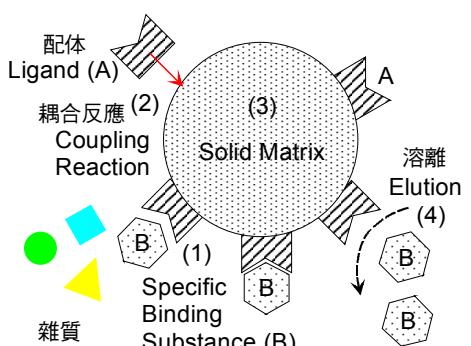


圖 3.9 親和層析法的各項要素

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，再與配體上的氨基反應。

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
	CNBr-activated Sepharose 4B	$-C\equiv N$	直接反應
$-NH_2$	CH-Sepharose 4B 或其活化型	$-COOH$	加 EDC*
		N-OH-succinimide	直接反應
	Epoxy-activated Sepharose 6B	oxirane	直接反應
$-COOH$	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 $-NH_2$ 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。
- 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体管柱；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。

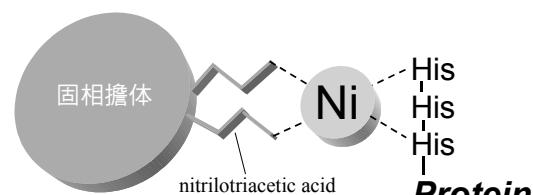
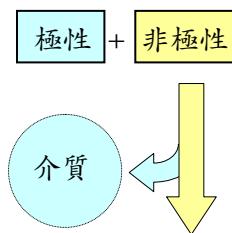


圖 3.10 一種金屬螯合層析法

(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 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。		
 Polar solvent Non-polar area Hydrophobic group Polar area	Polar solvent Non-polar phase	Non-polar solvent Polar phase
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 mm)，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，其材質為半固体的 合成聚乙烯 球体(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 $8 \times 16\text{ cm}$ 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 (以上述大小膠体而言約有 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，勿使膠体過熱，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体染色，再比對位置切出色帶。
- (5) 電泳溶離： 收集膠体內的蛋白質，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

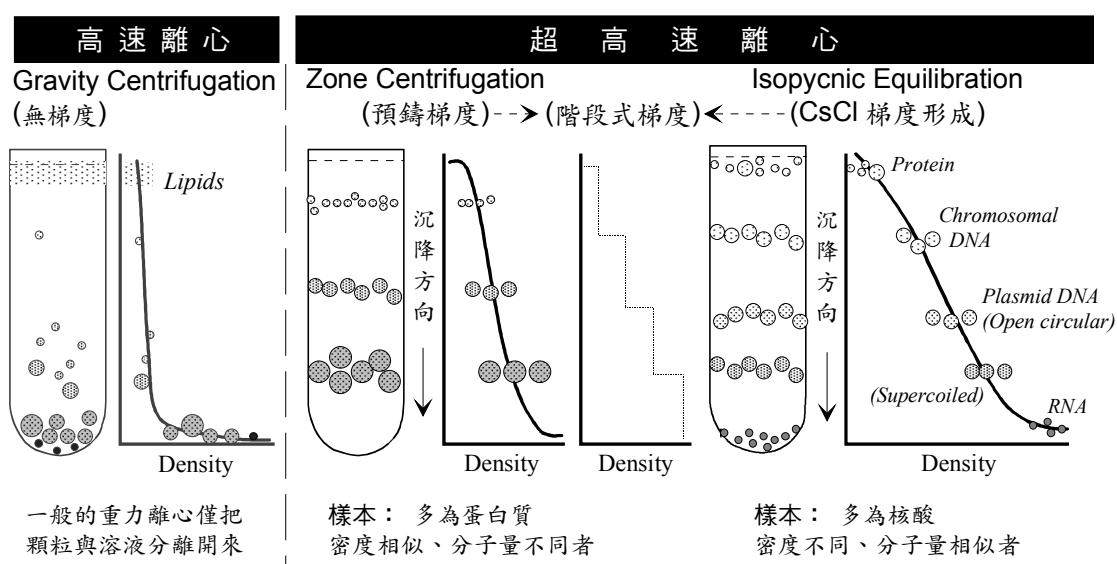


圖 4.1 高速離心與兩種超高速離心法的比較

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。

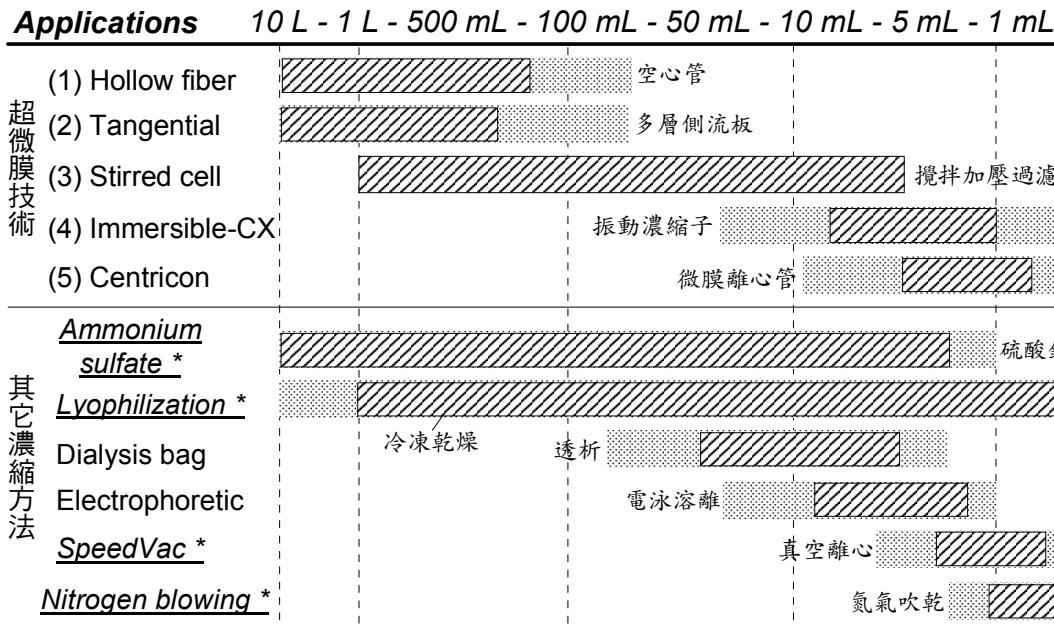
b. 超微膜濃縮裝置：

因樣本體積的大小不同，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

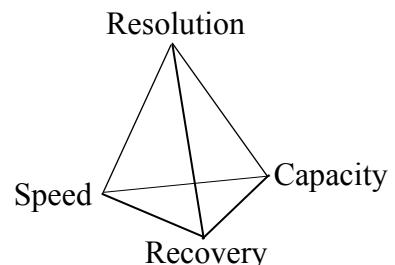
5 純化策略：

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 硫酸銨分離-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。

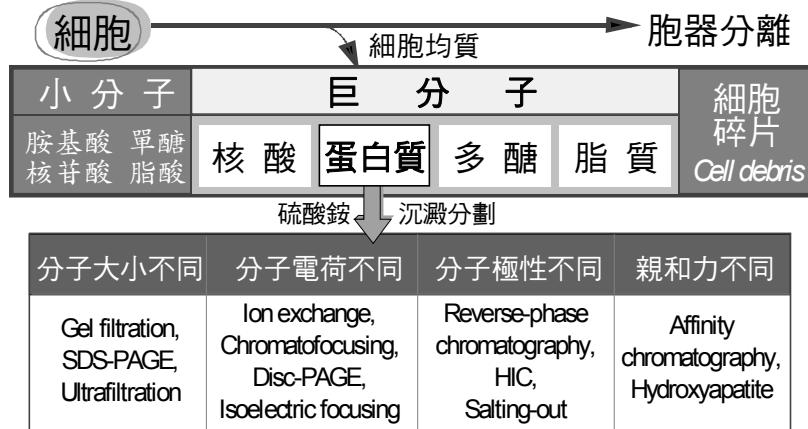


圖 5.1 各種純化及分析方法及所根據的蛋白質性質

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%
硫酸銨分離 (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，會與蛋白質勝鏈上的 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 的複合體。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，當銅離子與勝鏈形成複合物後，可再與 Folin-Ciocalteau 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. 肽基酸的芳香基團在 280 nm 有吸光，蛋白質勝鏈骨架上的基團在 200 nm 附近有吸光。由於各種蛋白質所含芳香族肽基酸組成不一，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 (如鎘)，則可追蹤該金屬。

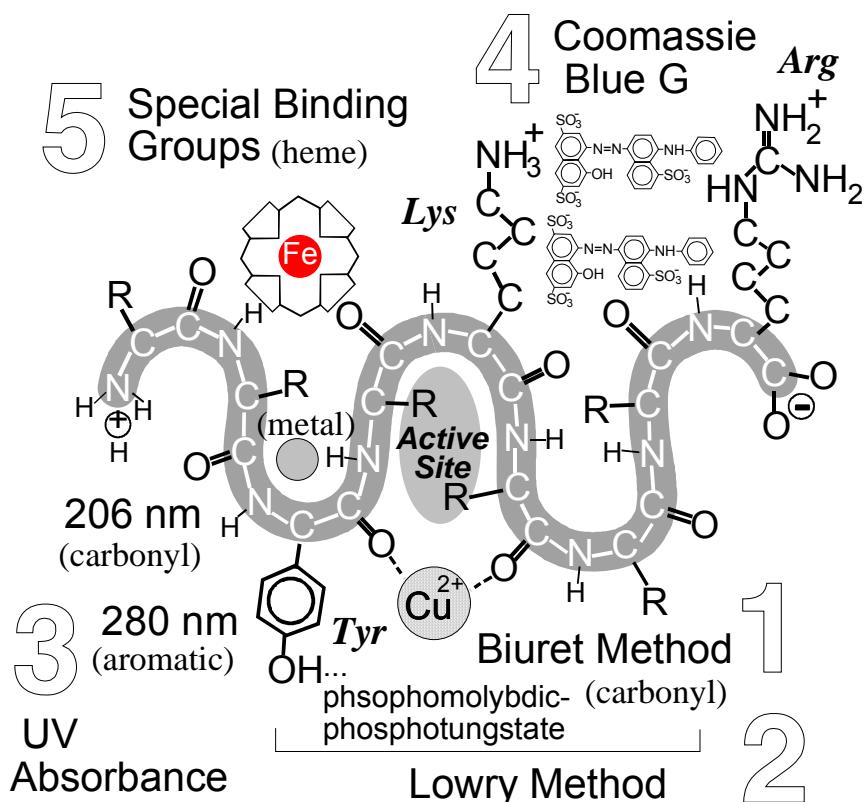


圖 1.1 各種蛋白質定量方法所依據的原理

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）的消耗量，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 變改），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。

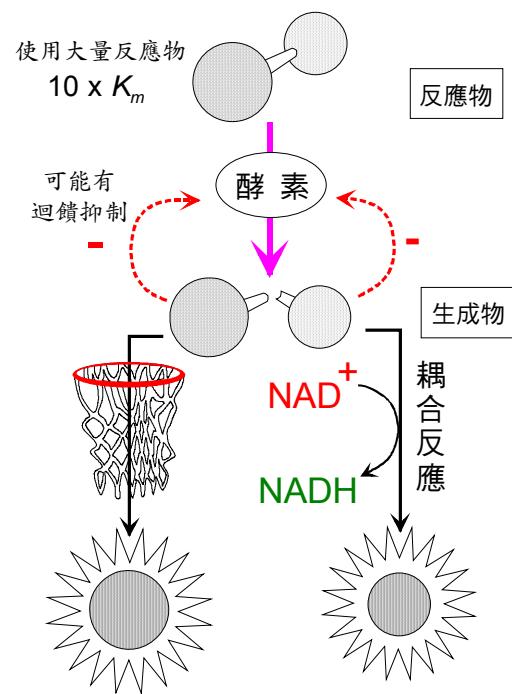


圖 2.1 酵素活性分析及偵測原則

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_0)，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。



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，要分離開反應物及生成物，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。

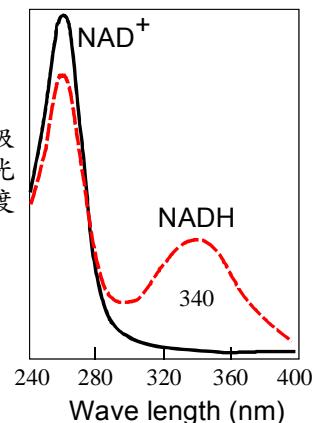


圖 2.2 NADH 吸光光譜

- 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：

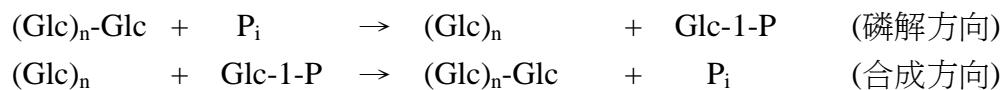
耦合反應在連續測定法應用相當多，但由於耦合反應更複雜，甚至成為一個迷你的代謝途徑；這種複雜的反應中有較多試劑與產物，許多不必要的副反應可能出現，干擾反應結果；要作好對照的控制組，以免有假結果出現。

2.2.4 濕粉磷解酶活性分析：

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. 濕粉磷解方向：

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)。

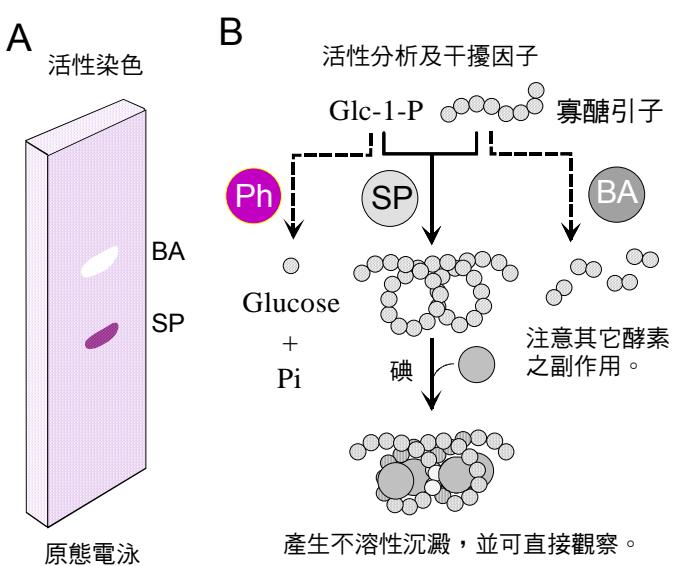


圖 2.3 澱粉磷解酶的活性分析及干擾因子

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。

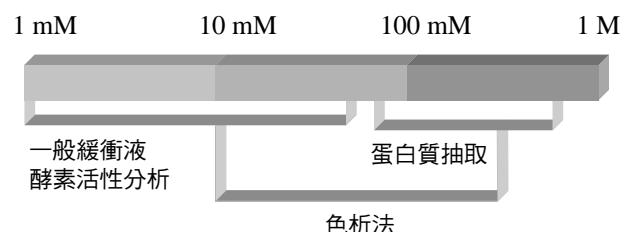


圖 2.4 緩衝液使用濃度的大概範圍

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。

- a. 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。
- b. 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°C 即可。
- c. 甘油凍藏： 於低溫 (-20°C) 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。
- d. 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，一旦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体沉澱中，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（如甘油或糖類）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。

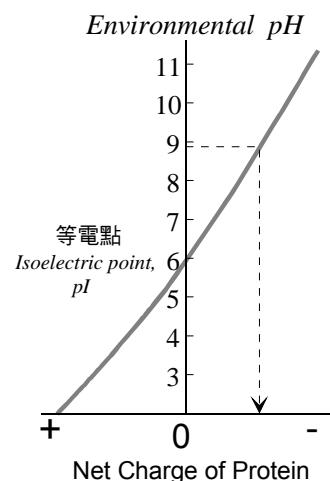
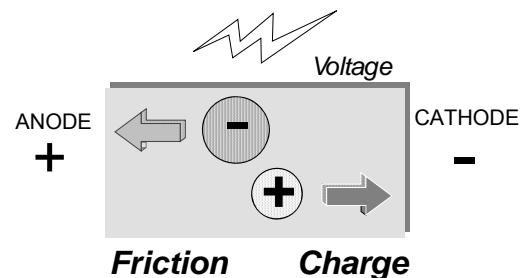


圖 3.1 環境 pH 的影響

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：

組成膠体的分子長鏈間，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。

澱粉膠体電泳 (starch gel electrophoresis)

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

洋菜糖膠体電泳 (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) 等電焦集法 (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 (immuno-electrophoresis)：電泳後再以抗體與抗原反應，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 甚或染色體之分離。

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，但等電焦集法則需數千伏特。

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 膩 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)

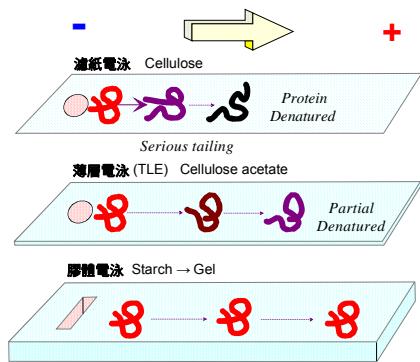


圖 3.2 帶狀電泳的演進

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；若能收集到膠体上的蛋白質，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体，膠体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，在膠体中根本不會往下跑。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 膠体的組成：

3.2.2.1 膠体主要成分：以下這些成份共同組成了膠体

a. 單體分子 (monomer)：丙烯醯胺 (acrylamide)， $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ 。

◆ 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B₂)。

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

- a. 只有 3, 4 兩部分是膠体；各層的緩衝液成份不盡相同，其 pH 也有點差異。注意膠集膠体 (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：在樣本通過焦集膠体時，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体 (4)，其上則為焦集膠体 (3)。焦集膠体上方的空間 (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体為最多；而在核酸，則以水平平板式洋菜醣膠体較普遍。

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 $\text{pH} > 6.9$ 時，帶負電) 或白點 (當環境 $\text{pH} = 6.9$ 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，只有膠体的緩衝液含氯離子；而樣本溶液中則含有 Gly，沒有氯離子。

b. 注意 樣本溶液-焦集膠体-分離膠体 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。

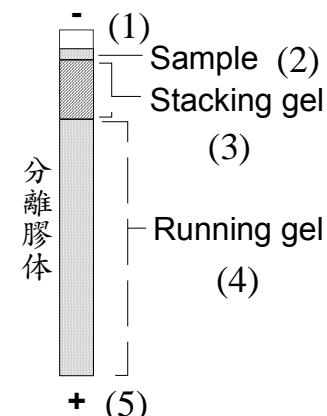


圖 3.3 電泳膠柱組成

Glycine: Negative charged ●
No net charge ○

Chloride ion: //

Proteins: 小分子 (Small protein) 大分子 (Large protein)

圖 3.4 焦集膠體中的三個主角

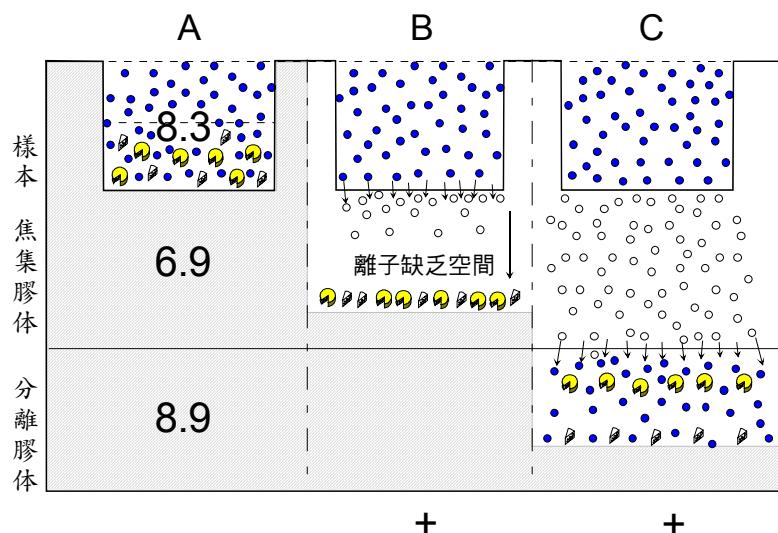


圖 3.5 焦集膠體對蛋白質分子的焦集作用

- 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 却往負極跑，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。

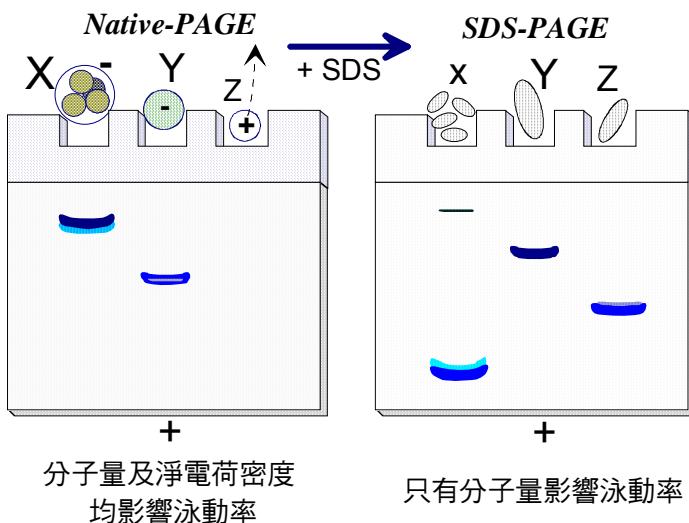


圖 3.6 Disc-PAGE 與 SDS-PAGE 的比較

- 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 的原態分子量大於 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. 膠体不凝結：

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. 膠体凝結不良：

成為半固体粘液狀時，檢查膠体溶液的百分比對否？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 溶液變質產生固体微粒後，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，檢查焦集膠体溶液的 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；則或可把膠片分劃，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。

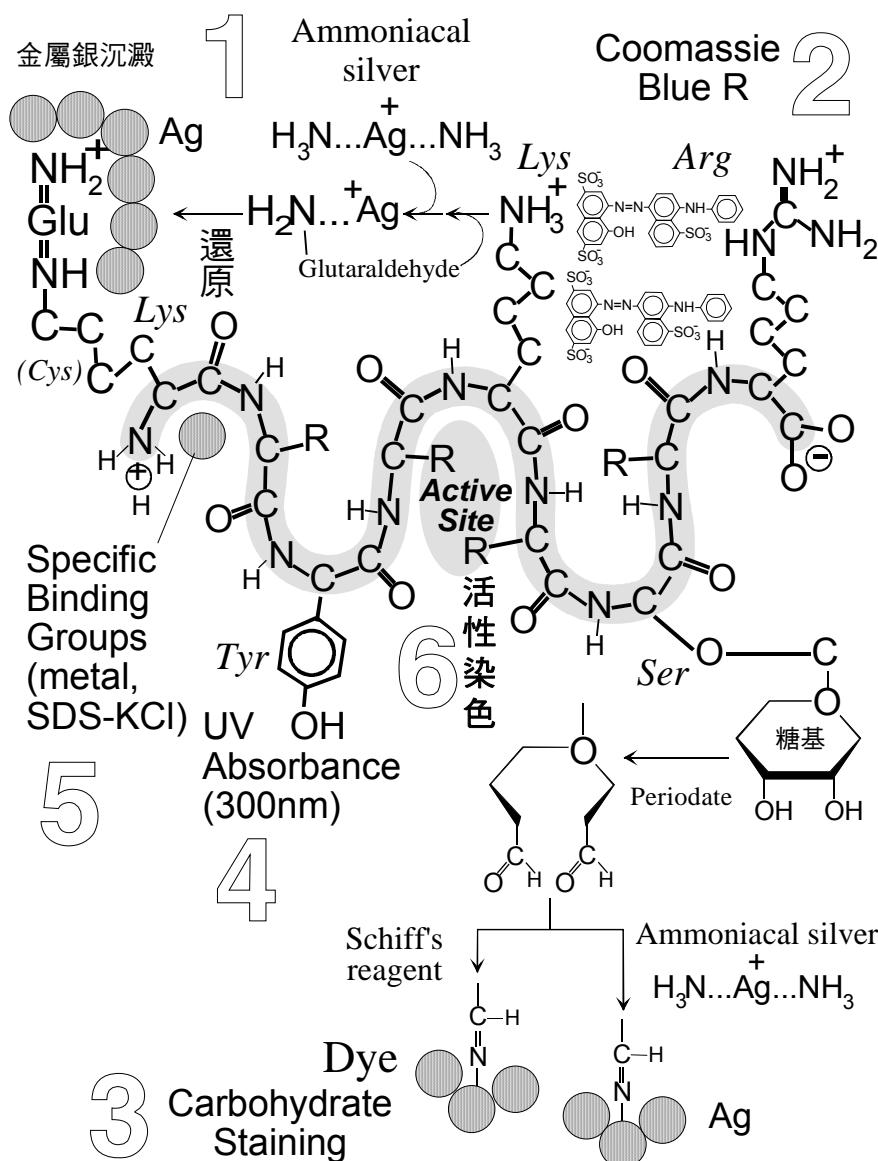


圖 3.7 各種蛋白質膠片染色方法的原理

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，可用掃瞄機 (scanner) 掃瞄，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 等電焦集法 (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 ($pH = pI$)，因而焦集於該處不動。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体上做 IEF，跑完後取出膠柱，水平放到平板式 SDS-PAGE 的膠片上方，再進行第二次元的電泳。 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勝肽圖譜；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：

- 電泳後若要再對膠体上的蛋白質色帶，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。

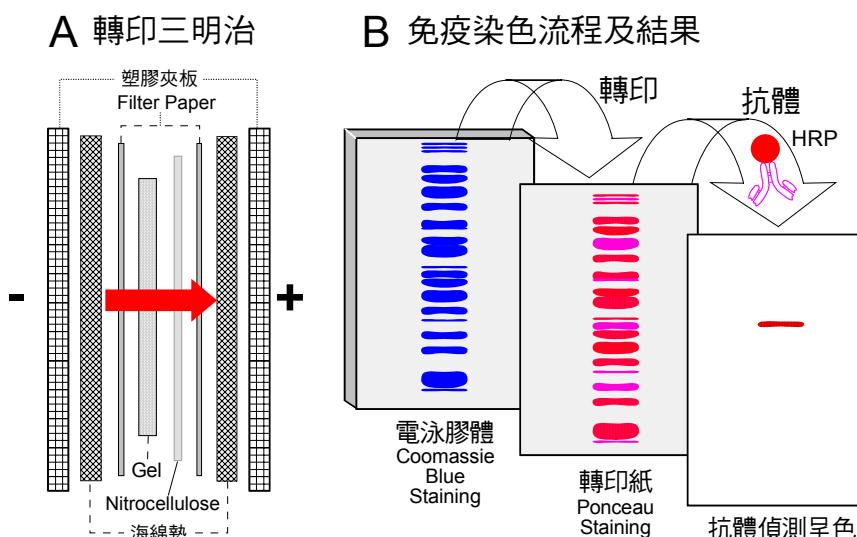


圖 3.8 電泳轉印及免疫染色流程

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 膠体過濾法：

a. 分子構形的影響：

膠体過濾法是依 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)：

膠体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)，無法進入膠体孔內，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体過濾。溶離緩衝的液離子濃度要保持在 0.1~0.2 M (添加NaCl)，以克服膠体介質對蛋白質的吸附力。

e. 管柱條件要保持恆定：

- (1) 以膠体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，因膠体的 V_0 可能會改變。
- (2) 以 HPLC 或 FPLC 型的膠体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)：

梯度電泳也跟膠体過濾一樣，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，但最好再用膠体過濾法確認。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体中，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：

- 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。
- 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：

- 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。
- 注意若此蛋白質為糖蛋白，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，可能要分出勝肽片段來定序，或者以化學反應去除此一修飾。
- 有些蛋白質含有數條勝肽鏈，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，把游離的各段勝肽分開後，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。

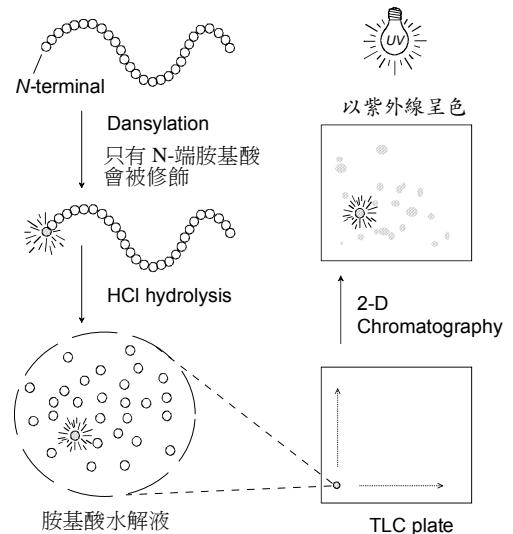


圖 5.1 以 dansylation 檢定 N-端

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 肽基酸定序法：

肽基酸序列是一個蛋白質最重要而基本的資訊，有兩種方法可求得肽基酸序列。

5.3.1 cDNA 間推法：

由蛋白質基因的核苷酸序列，可推得其肽基酸序列，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，轉譯成蛋白質的肽基酸序列後，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：

由一級肽基酸序列，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：

許多特定的肽基酸片段，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：

由肽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：

一個一個把肽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-端肽基酸可以被切下來，以 HPLC 檢定為何種肽基酸。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)。

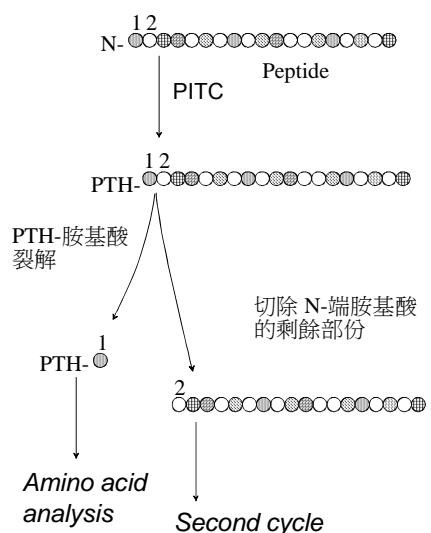


圖 5.2 Edman degradation

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，並分離得各勝肽片段，分別定序。

d. 直接定序的問題：

(1) 蛋白質要先切成勝肽：

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) 要用兩套勝肽比對：

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）。

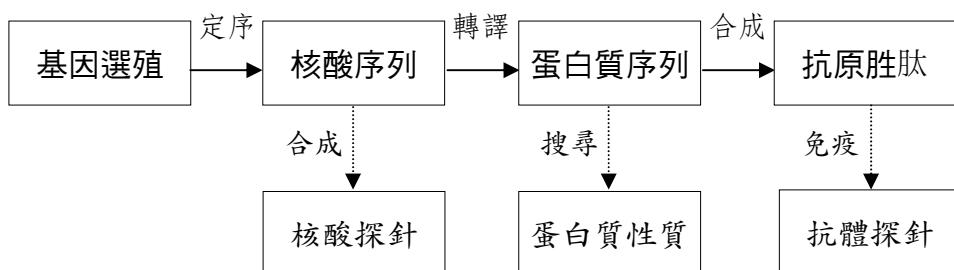
5.4 勝肽圖譜：

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勝肽片段。兩個不同蛋白質經同一蛋白酶水解，所得的兩勝肽群，其肽鏈數目、各段勝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勝肽圖譜（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，研究人員多使用勝肽定序的方法，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；或合成人工勝肽進行單專一性抗体的製備。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，把勝肽鍵解開，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)

5.4.2 檢定勝肽群的方法：

最近由於微量定量方法的進步，以下方法除了可以分離出勝肽片段外，也可以收集各分離或剪出色帶，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：

勝肽片段先經高電壓濾紙電泳後，轉 90 度再進行濾紙層析，則可分出各個勝肽片段；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，快速分離各段勝肽，多使用反相層析管柱。

c. SDS-PAGE：

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

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，以作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。

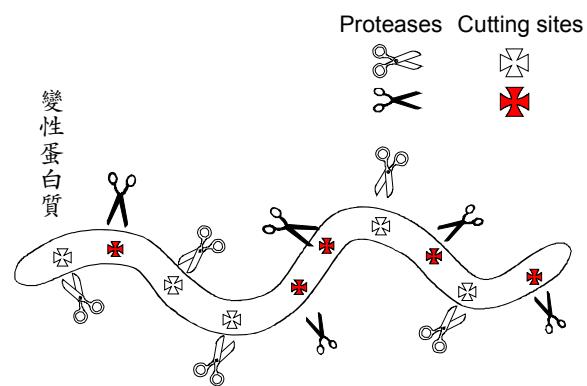


圖 5.3 以兩種蛋白酶水解同一蛋白質

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：

分子量很小的勝肽 (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. 人工合成勝肽抗原：

若已知某蛋白質的胺基酸序列，可以人工合成某段勝肽 (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 抗體製備：

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。腹水內多為抗體，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體並非難事。

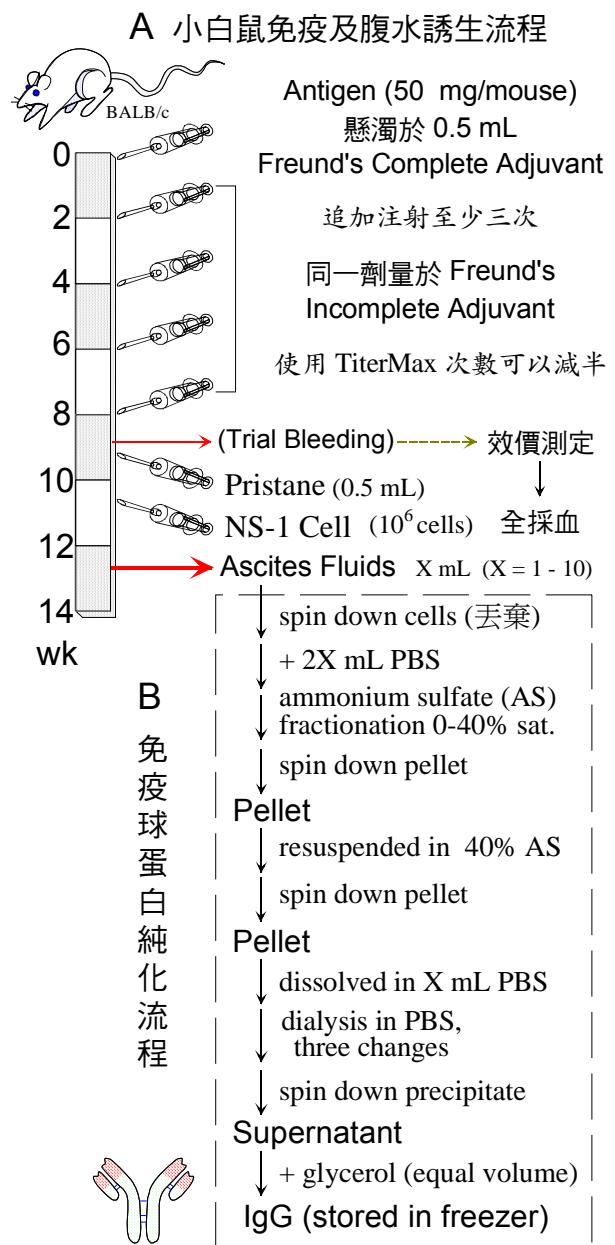


圖 6.1 免疫及抗體純化流程

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，其中只有一部份是專一性的抗体，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. 免疫沈澱法：

若把 antibody 分子接在一固相擔體上 (大多使用 CNBr-Sepharose)，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。

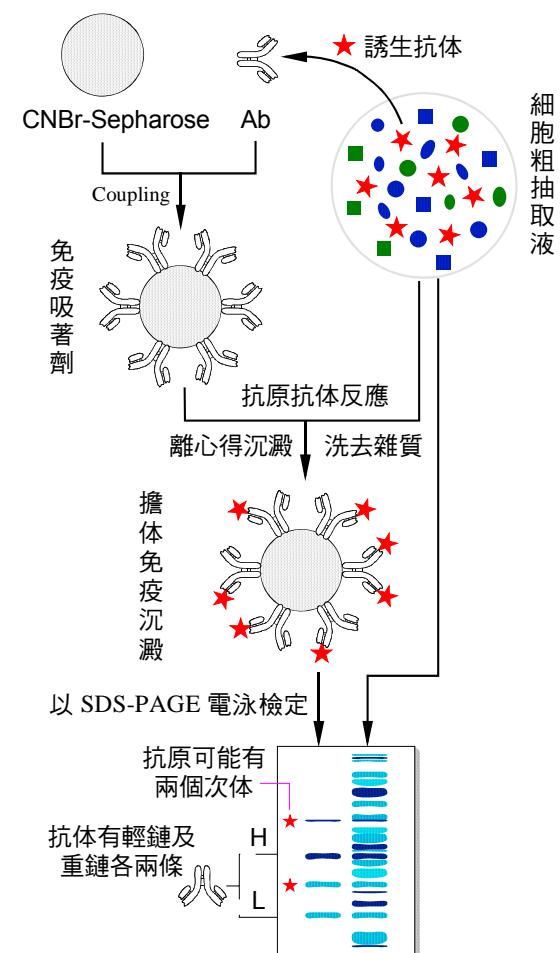


圖 6.2 擔體免疫沈澱的原理及應用

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。

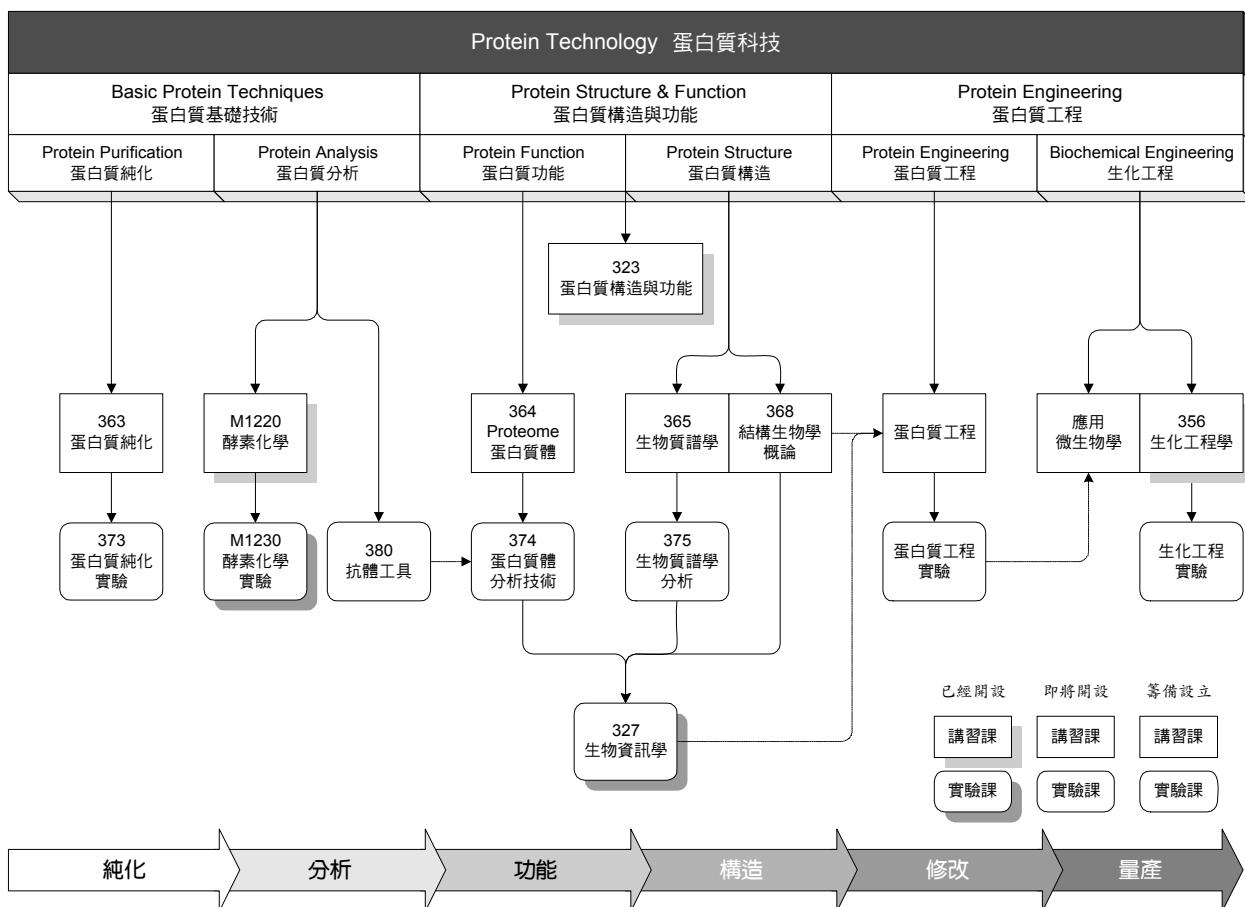


圖 7.1 蛋白質科技的範疇及相關學科

(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。

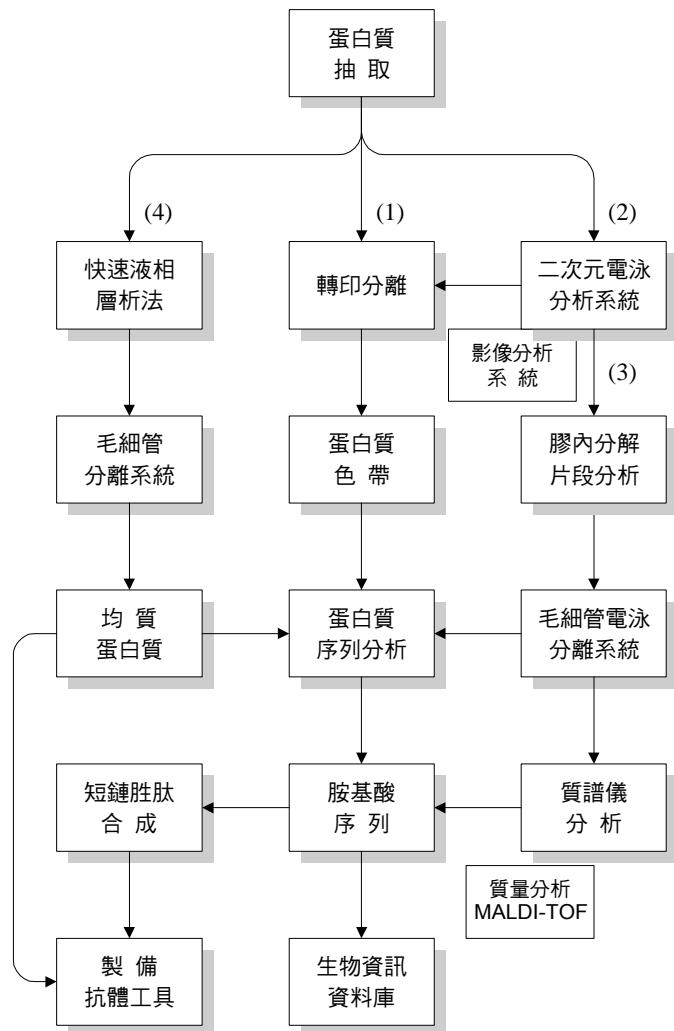


圖 7.2 蛋白質快速純化與微量分析流程圖

(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。若蛋白質量夠大，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；所得到的肽片段，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、糖化修飾等。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，可能有下述的作用或發展。

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 酶素，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. 氢鍵在分子構造與功能上十分重要，以蛋白質或酵素為主體對象，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. 繼上題，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。 現有一瓶原裝的膠体，瓶子上面標明有膠体 750 mL，靜置後膠体沉降體積約佔四分之三的高度，其餘為上清液。 你當如何取用膠体，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体過濾，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 Sephadex G-100 膠體過濾法分離某蛋白質，通常此蛋白質都在大約 35 管分劃的地方溶離出來。 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，所用的分劃收集器及分劃體積也都沒變，請問毛病可能出在那裡？
14. Hydroxyapatite 是何種物質？ 它是如何分離開單股與雙股 DNA？
15. 有一次停電數小時之後，某生發現冷房內的管柱中，膠体都充滿了氣泡，請問是何原因？ 但他發現旁邊另一位同學的管柱膠体卻都沒有氣泡產生，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体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. 酶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. 測定酶素活性為何要中止酶素反應？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. 分析酶素活性時，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. Phytochelatin 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. 酶素活性分析時，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 antibody 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，都儘量保存在高濃度下，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：

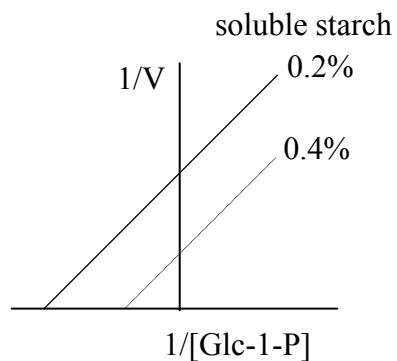
1. 那些外在因素影響蛋白質在膠体電泳中的泳動率？
2. 正負電極槽的緩衝液有一定使用濃度，某生不小心錯泡為十分之一濃度，會有什麼結果發生？
3. 電泳時溫度過高時，對電泳結果會有什麼影響？
4. 請詳述整個 PAGE 電泳膠体的鑄膠過程，及其凝膠機制。
5. PAGE 中有一層焦集膠体，它是如何把樣本蛋白質焦集成一細線的？
6. 相差一個核苷酸的兩段短核酸 DNA，有無可能用電泳分離開來？
7. 為何樣本中含有太高鹽類，或 pH 太低，均會影響電泳結果？
8. 為何蛋白質不適合使用濾紙或 TLC 作為電泳介質？
9. 原態電泳 (disc-PAGE) 中，是否所有的蛋白質樣本都會往正極跑泳動？
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泛的 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. 在膠体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勝肽片段？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，無法焦集，且似有固体產生的樣子。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. 最近流行使用短鏈勝肽（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勝肽 (VALIWVVVSAIL)，以此進行抗體製備，結果也得到了抗体。但發現此抗體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. 繼上題，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)，同樣進行抗體製備；所得抗體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。

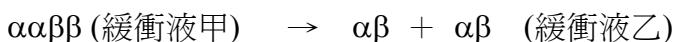


應用問題：

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)，以研砵進行研磨，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勝肽片段，打入人体後會產生抗体，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：

- (1) 為何會產生沉澱？
- (2) 總酵素活性為何下降許多？列出所有可能情形。
- (3) 袋內蛋白質量只剩一半，請作一假設，說明原因。
- (4) 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。

另以膠体過濾法測 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。

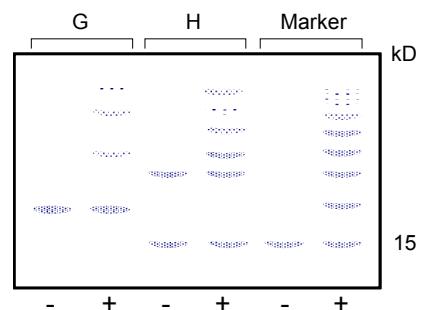


Fig. 1

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 (Sephadex 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-Sephadex)

↓ 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。

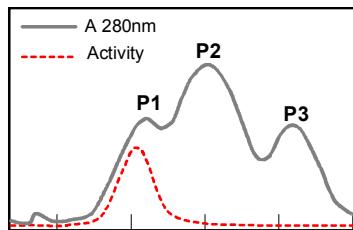


Fig. 2 Gel Filtration

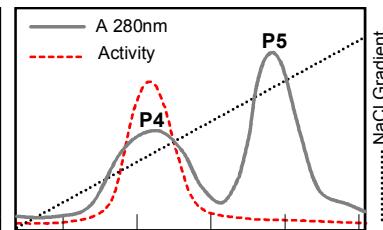


Fig. 4 Ion Exchange

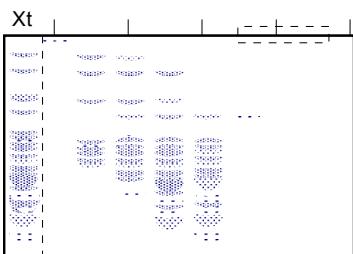


Fig. 3 Disc-PAGE

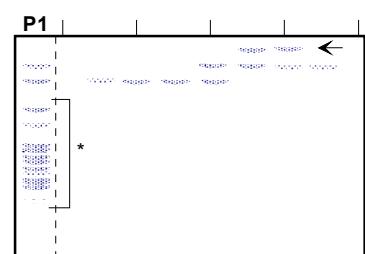


Fig. 5 Disc-PAGE

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，分別可以證實上述假設。

(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？

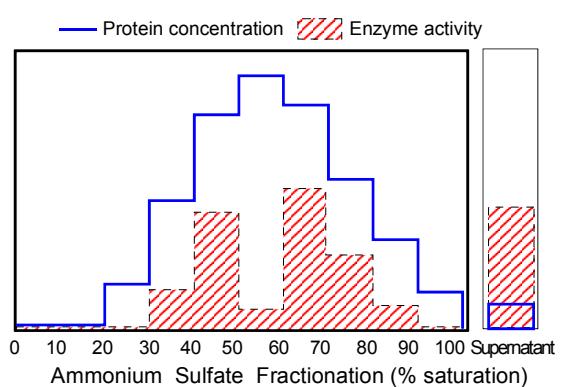


Fig. 6

(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	pl
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. 酶素 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)

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？

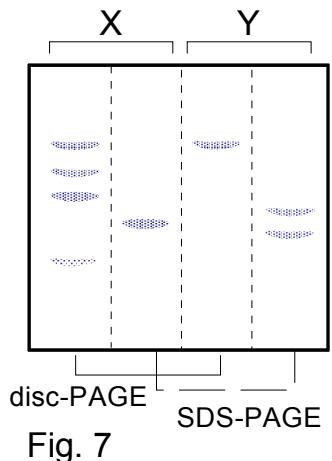


Fig. 7

Column Calibration:

Standard	Mol. mass	Kav
#1	67,000	0.4
#2	25,000	0.7
#3	14,000	0.8

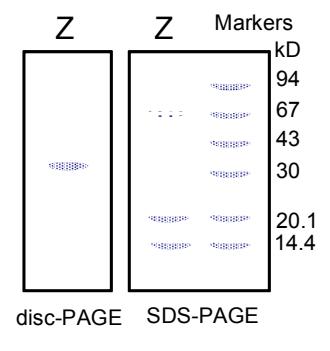
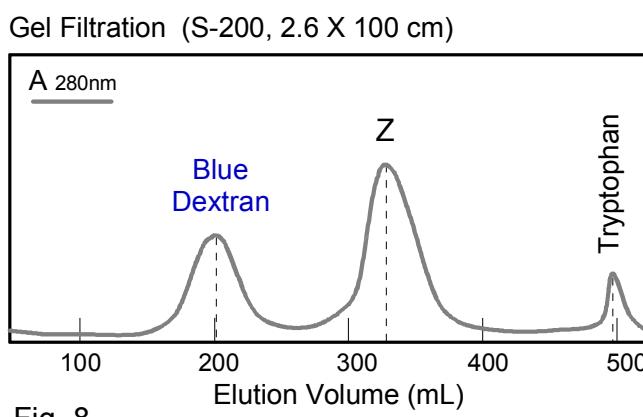


Fig. 9

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 (Sephadex 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 Sephadex, 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
(pl) | 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) 等電焦集法膠體可形成 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。

