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，會與蛋白質胜鏈上的 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，當銅離子與胜鏈形成複合物後，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. 胺基酸的芳香基團在 280 nm 有吸光，蛋白質胜鏈骨架上的基團在 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：　　吸光值 ＝ E × b × 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。

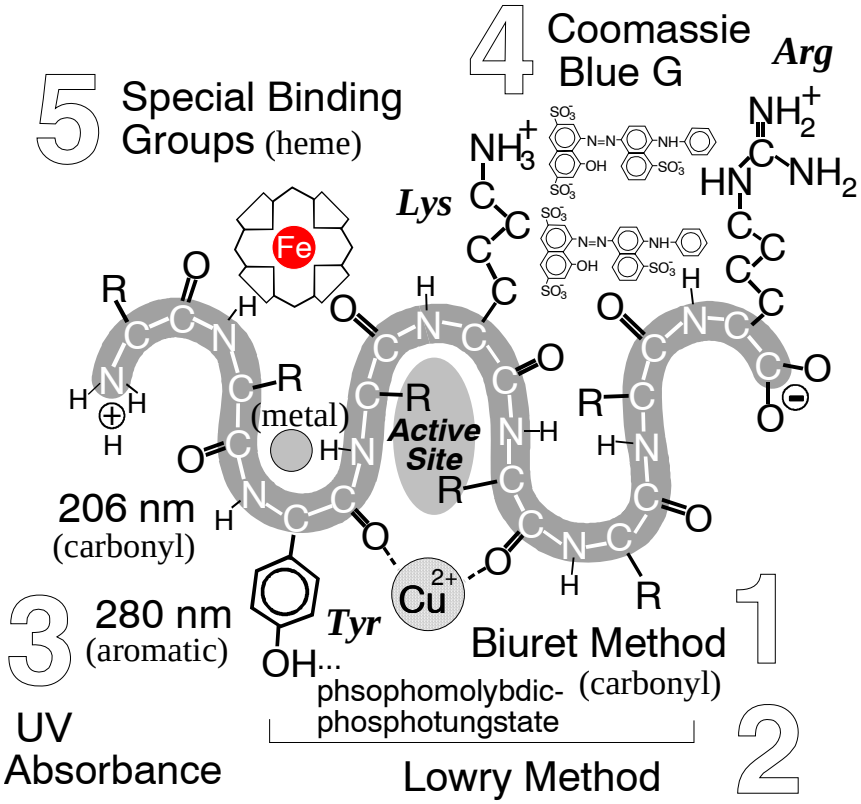


圖 1.1 各種蛋白質定量方法所依據的原理

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。

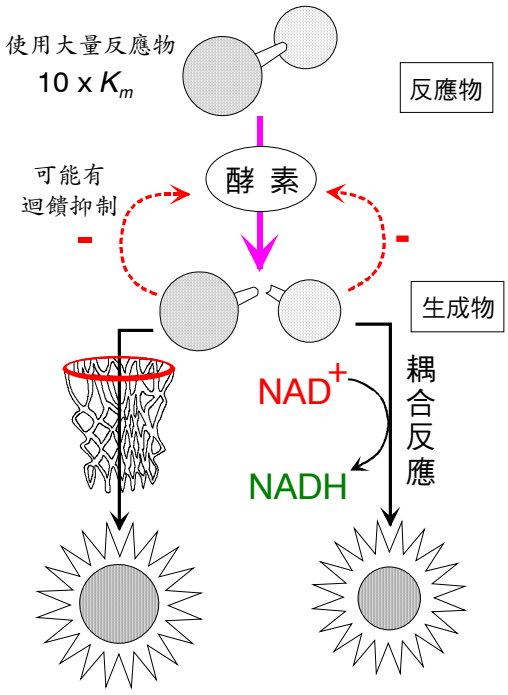


圖 2.1 酵素活性分析及偵測原則

b. 反應基質及酵素濃度：

在試管中進行的酵素活性分析，與在生物体內的酵素反應，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：

$$\text{Ethanol} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Acetaldehyde} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

反應液中 NADH 在 340 nm 波長有吸光變化 (如圖 2.2)。

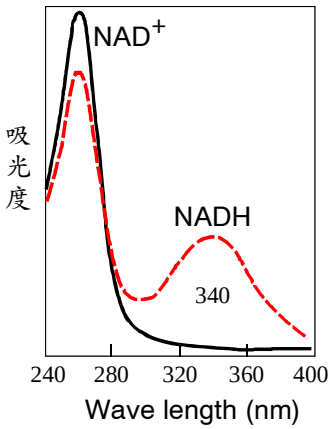


圖 2.2 NADH 吸光光譜

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。

$$S \rightarrow P \rightarrow Q$$

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。

$$\text{蔗糖} \xrightarrow{\text{IT}} \underbrace{\text{葡萄糖} + \text{果糖}}_{\text{還原醣}}$$

非還原醣

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)：

若生成物為氣体，則可測定氣体体積之增加量；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。

a. 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。

b. 急速加熱 (100℃ 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)：

$(Glc)_n$-Glc + P_i → $(Glc)_n$ + Glc-1-P (磷解方向)

$(Glc)_n$ + Glc-1-P → $(Glc)_n$-Glc + P_i (合成方向)

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)。

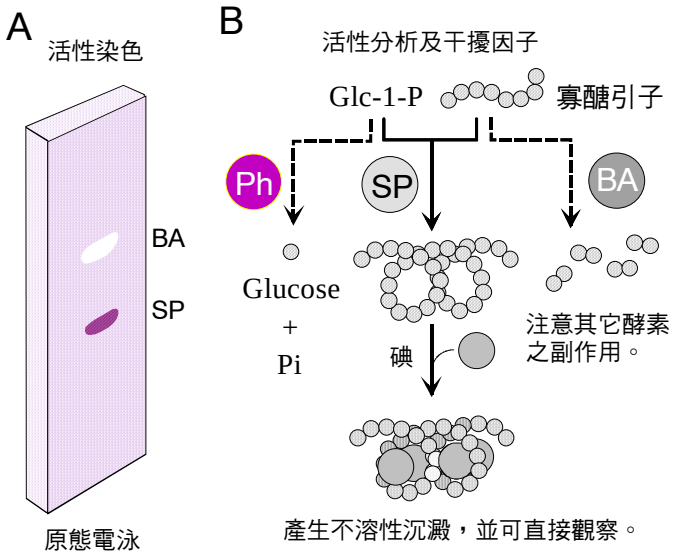


圖 2.3 澱粉磷解酶的活性分析及干擾因子

c. 小心其它干擾物質：

澱粉磷解脢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) 澱粉脢快速水解，澱粉磷解脢活性被抑制；Glc-1-P 受 phosphatase (Ph) 磷酸脢的水解，產生游離的磷酸，會誤判為澱粉磷解脢的活性 (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	蛋白胨抑制劑	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。

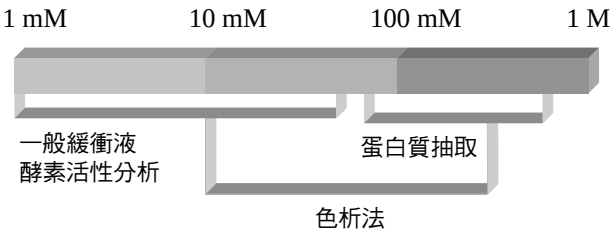


圖 2.4 緩衝液使用濃度的大概範圍

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胨請勿凍藏，放在 4℃即可。

c. 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。

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) **蛋白胨水解：**

細胞內有許多蛋白胨，細胞被打破後即釋放到酵素溶液中，很快水解酵素。可用蛋白胨的抑制劑防止之，但蛋白胨有數大類，各有不同類的抑制劑；一般使用 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 是 Ser 型蛋白胨的抑制劑，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℃ 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。

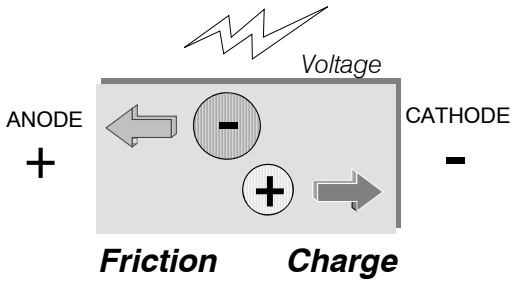
(5) 冷凍乾燥雖可長期保存酵素，但有些酵素活性可能會因而下降。

(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。

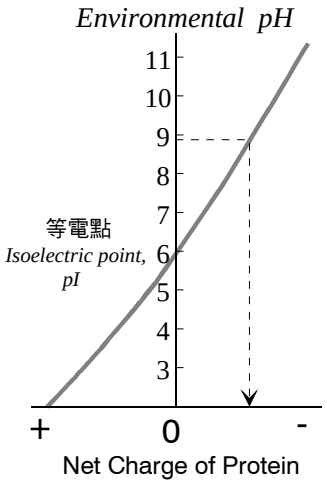


圖 3.1 環境 pH 的影響

d. 外在條件影響泳動率的因素：

促進泳動： 低膠体濃度 (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体。

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。

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。

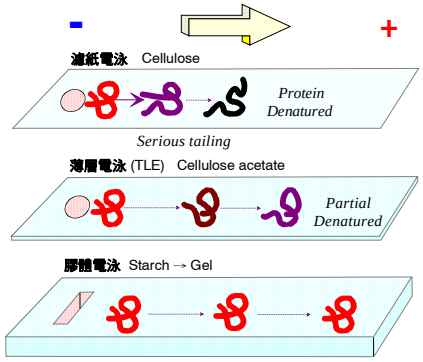


圖 3.2 帶狀電泳的演進

(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) 或雙向胜肽電泳 (蛋白質已水解成胜肽片段)。

(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) 膠体電泳：

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，且可增大樣本体積，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) 胜肽圖譜 (peptide mapping)： 不同的蛋白質有不同的胜肽圖譜。

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

(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 (capilliary 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。

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 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、異構胺
垂 直	垂直平板	上述二者混合	核酸 (定序用)

3.2 聚丙烯醯胺膠体電泳：

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. 原態膠体電泳 (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 膠体電泳 (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. 單体分子 (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体分子連結在一起，可形成分叉點，以構成立体結構。

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，再使單体分子成為游基型式。

b. 聚合反應： 游基單体可首尾相接，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 電泳膠体系統的各組成部份：

	電 泳 系 統		緩 衝 液	pH	膠体濃度
1	上層 (負極) 緩衝液		Tris-glycine	8.3	-
2	樣本溶液		Tris-glycine	8.3	-
3	膠	焦集膠体	Tris-HCl	6.9	5%
4	体	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，使原來体積很大的樣本溶液，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。

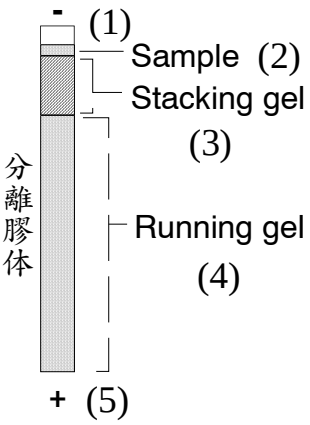


圖 3.3 電泳膠柱組成

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。

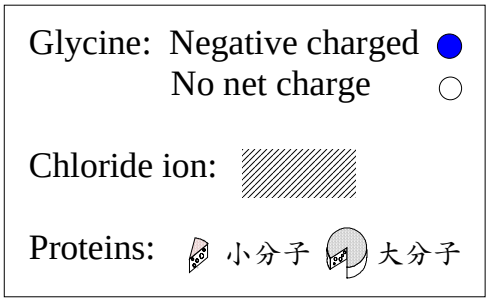


圖 3.4 焦集膠體中的三個主角

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。

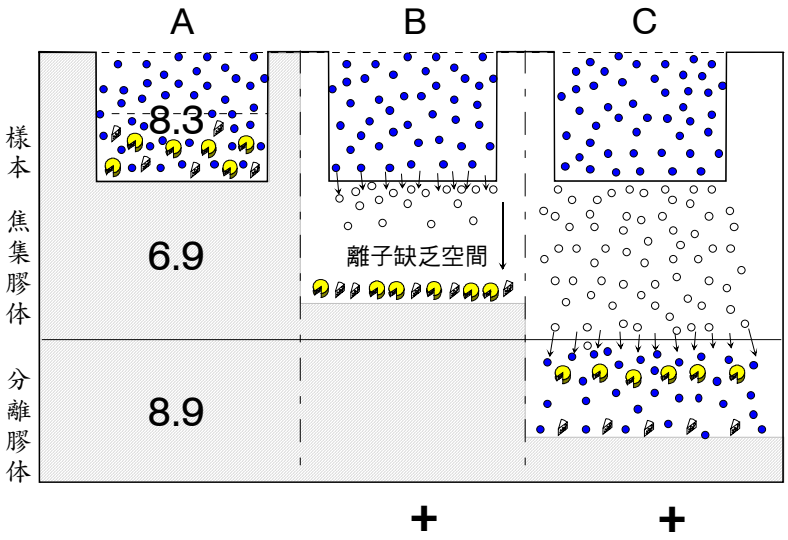


圖 3.5 焦集膠體對蛋白質分子的焦集作用

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)×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。

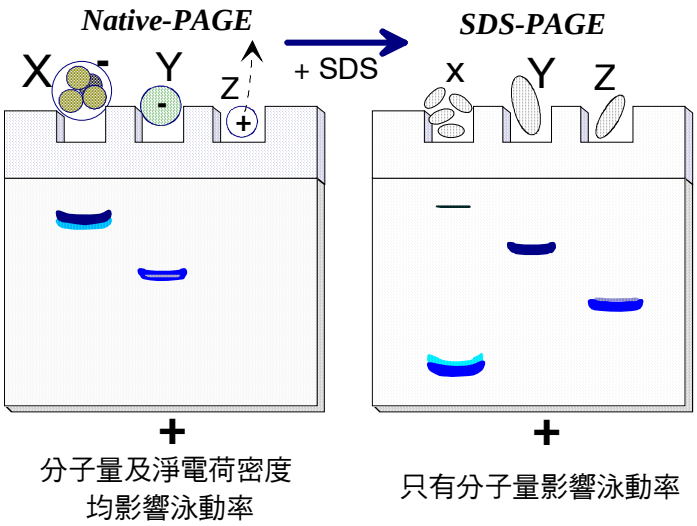


圖 3.6 Disc-PAGE 與 SDS-PAGE 的比較

d. 在 SDS 膠体中進行電泳時，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，但其分子為四元体，而在 SDS-PAGE 中，此四元体會被 SDS 分解成為單元体，此單元体的分子量 (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 四元体 (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℃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。

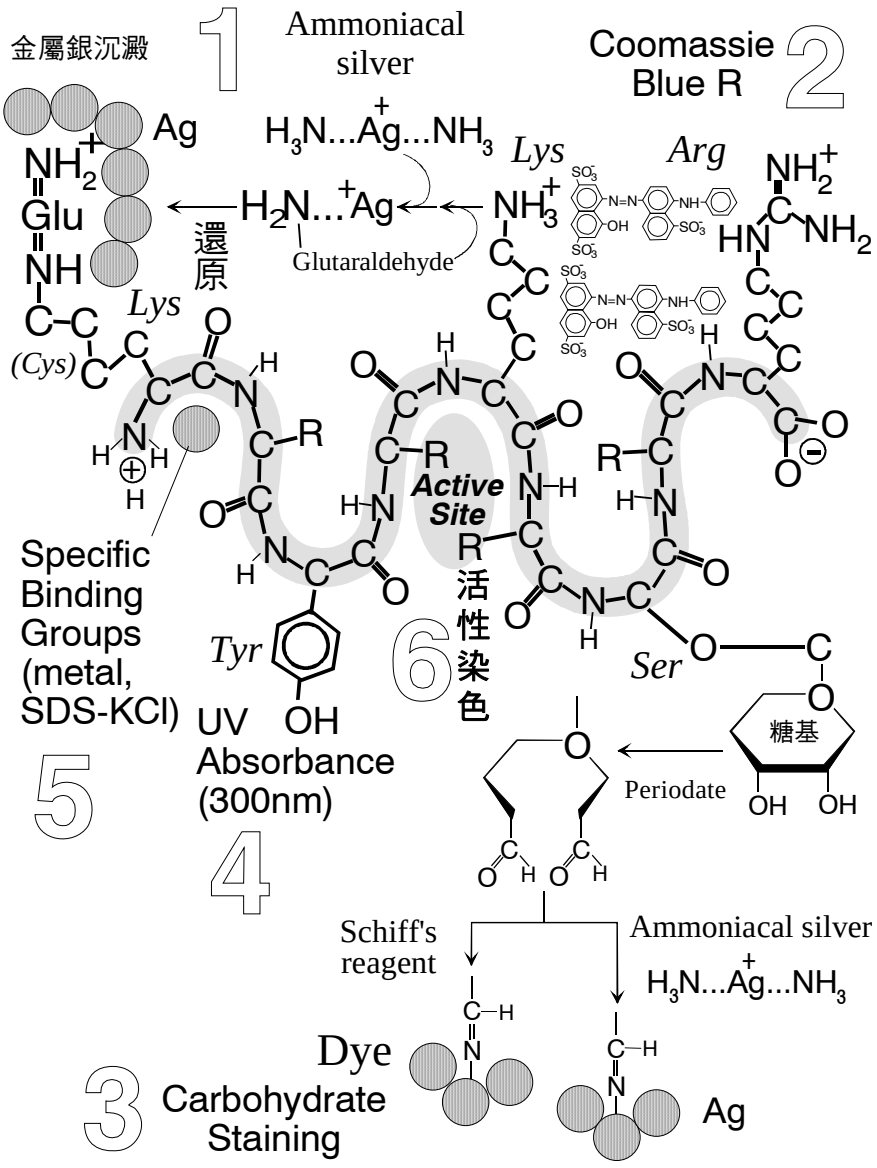


圖 3.7 各種蛋白質膠片染色方法的原理

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。 若在聚丙烯醯胺膠体內加入 ampholyte，通電後 ampholyte 會在膠体中形成一 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胜肽圖譜；亦可轉印到硝化纖維紙後，再以抗体做免疫染色。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：

a. 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。

b. 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)。

c. 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。

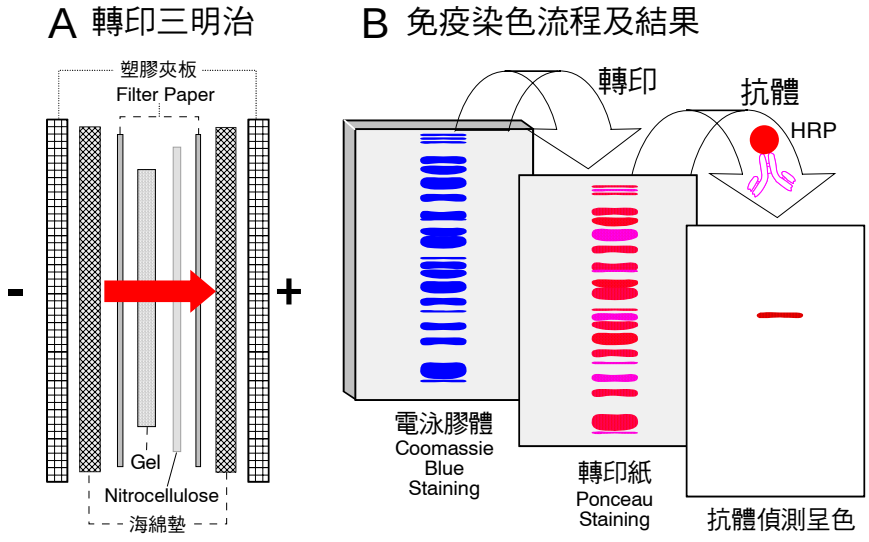


圖 3.8 電泳轉印及免疫染色流程

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 分子体積 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_o) 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. **管柱條件要保持恒定：**

(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_o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体分子量，但若緩和樣本處理時的變性條件，則亦有可能看到多元体分子。

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：

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；但須注意很多酵素是以多元體狀態存在，其原態分子量就會大很多。

b. 注意若此蛋白質有 **轉譯後修飾** (post-translational modification)，例如是醣蛋白，或有其它修飾基團 (輔脢)，則實際分子量應該會大些；但若有轉譯後的蛋白質裂解，則分子量又會小些。

4.3.3 質譜儀分析：

質譜儀可偵測不同質量的分子，也被利用來測定蛋白質片段的分子量；甚至可以決定胺基酸序列，這種技術近來已趨成熟，一般可定出三十個以上之序列，在蛋白質體學的分析上，對決定未知蛋白質的身分有重要貢獻。

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。

a. 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)。

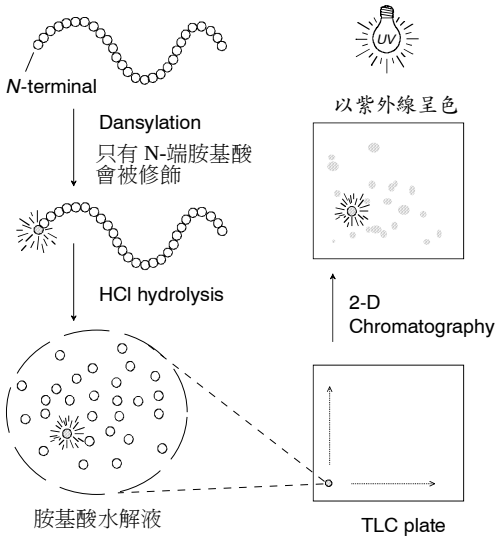


圖 5.1 以 dansylation 檢定 N-端

b. 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。

c. 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。

d. 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。

e. C-端可用外切胺 carboxylpeptidase 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。

5.2 胺基酸組成分析：

a. 蛋白質以 6 N HCl或 4 N methanesulfonic acid在真空 110℃ 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。

b. 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。

c. 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。通常三級立体構造無法精確預測，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、各種蛋白胨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)。

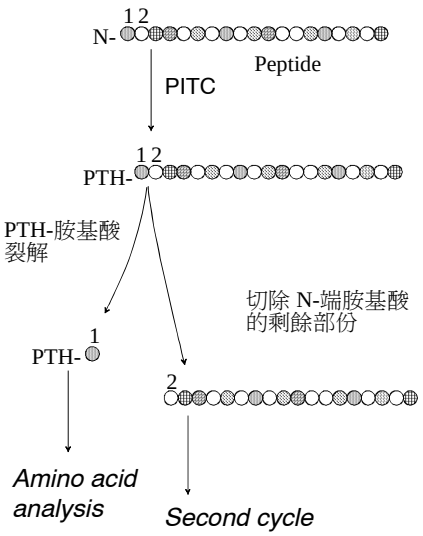


圖 5.2 Edman degradation

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，若有異質多元体，要先分出均質單元体。

(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，並分離得各胜肽片段，分別定序。

d. **直接定序的問題：**

(1) **蛋白質要先切成胜肽：**

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) **要用兩套胜肽比對：**

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胨，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)。

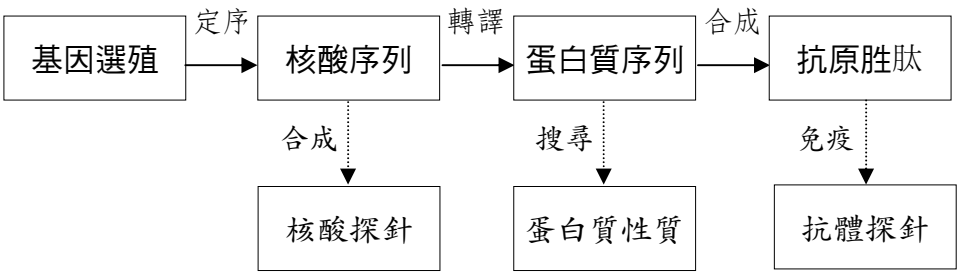
5.4 胜肽圖譜：

a. **專一性蛋白胨：**

可對蛋白質的特定胺基酸進行水解，得到一群不同長短的胜肽片段。兩個不同蛋白質經同一蛋白胨水解，所得的兩胜肽群，其肽鏈數目、各段胜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，不同專一性的蛋白胨會切在不同的胺基酸上，對同一蛋白質會切出不同的胜肽圖譜 (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，研究人員多使用胜肽定序的方法，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；或合成人工胜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，把胜肽鍵解開，才能以蛋白脢水解之。

a. 專一性內切脢： 例舉如下

Trypsin (Lys, Arg);

Chymotrypsin (Phe, Tyr, Trp);

Sa protease (Asp, Glu)

b. 化學反應法： CNBr (Met)

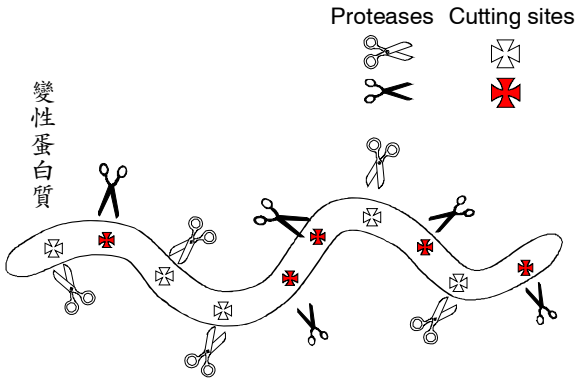


圖 5.3 以兩種蛋白脢水解同一蛋白質

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，也可以收集各分劃或剪出色帶，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。

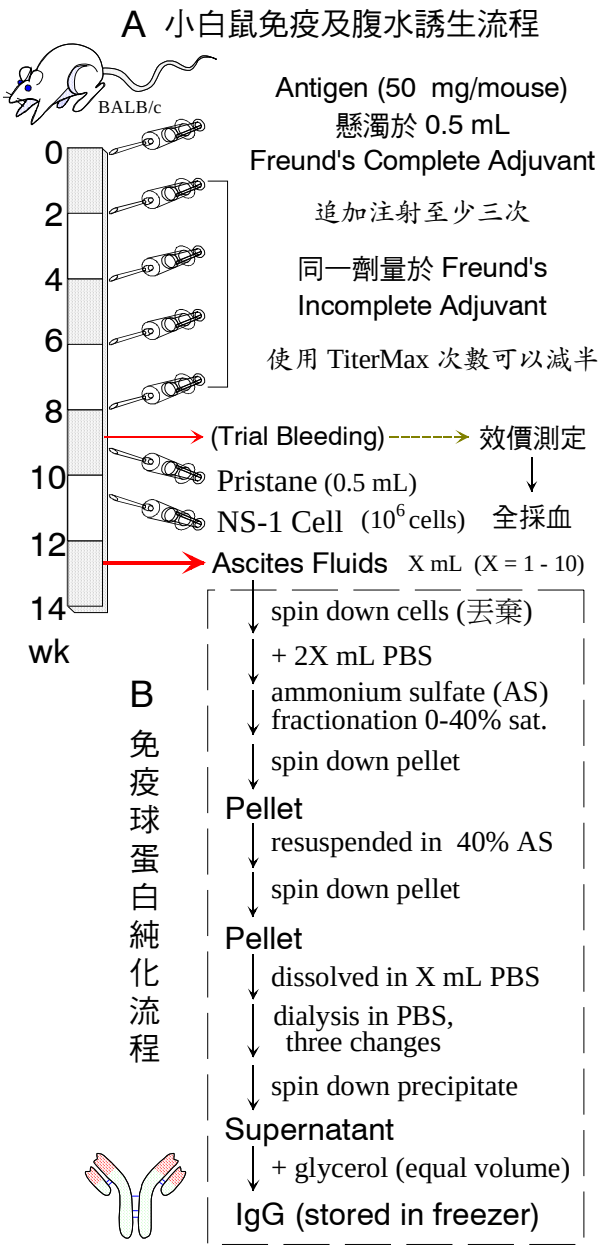


圖 6.1 免疫及抗體純化流程

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，則体積可增大許多。 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體並非難事。

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. 免疫沉澱法：

若把抗体分子接在一固相擔体上 (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体，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；因為使用固相擔体，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。

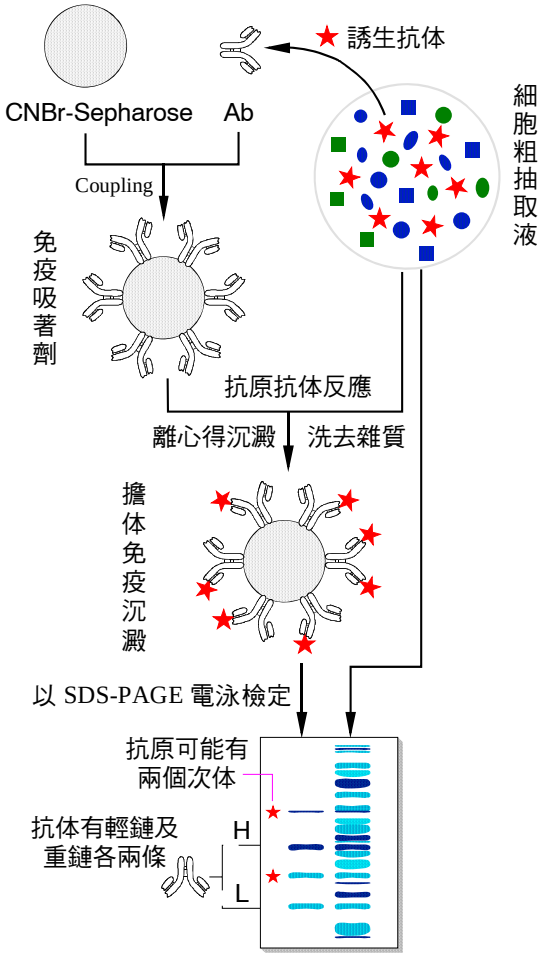


圖 6.2 擔體免疫沈澱的原理及應用

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。

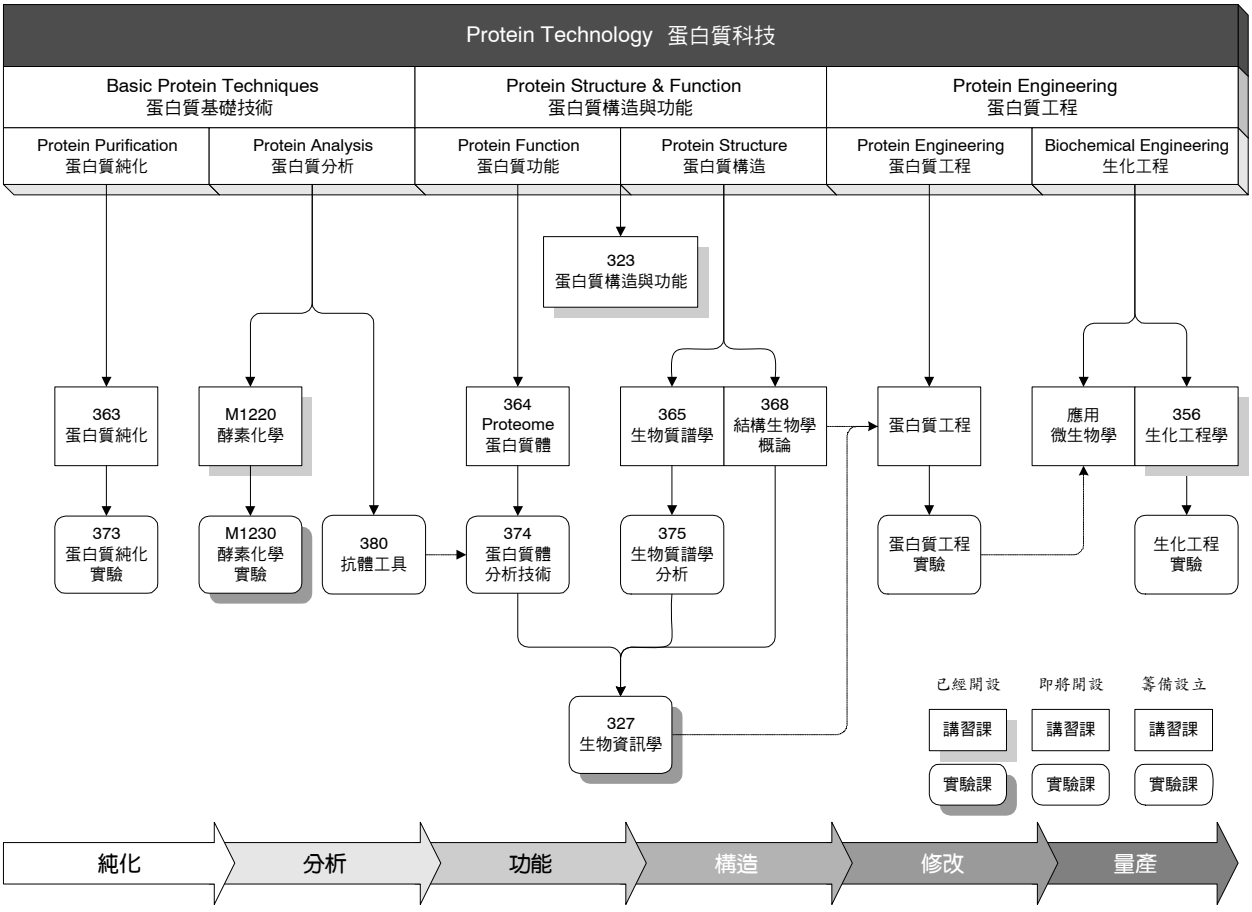


圖 7.1 蛋白質科技的範疇及相關學科

(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。

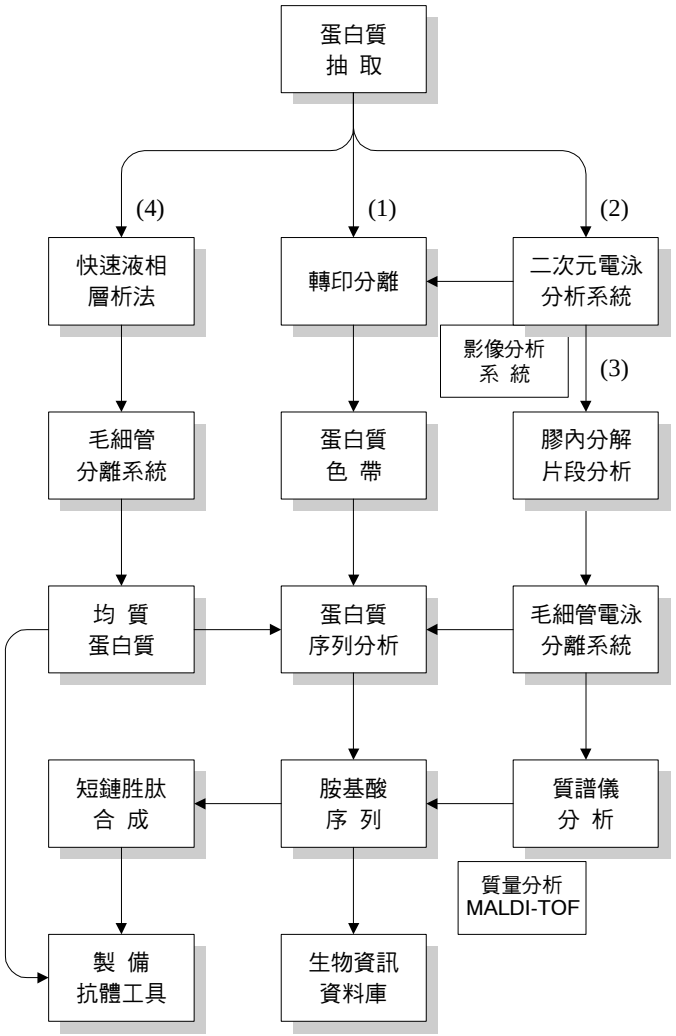


圖 7.2 蛋白質快速純化與微量分析流程圖

(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，在膠體中以蛋白胨進行水解；所得到的胜肽片段，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、醣化修飾等。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 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