

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

14. Abzyme 的催化活性一般都不高，與真正的酵素催化還差一段距離。請比較二者的異同，並解釋為何有如此差異。
15. 氫鍵在分子構造與功能上十分重要，以蛋白質或酵素為主体對象，請列出十種構造或分子行為，與氫鍵有重要關係。例如蛋白質的  $\alpha$  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  $\alpha$ -基團對酵素的催化作用有極大貢獻，這些基團的電荷有正有負，有長有短，有大有小，有極性有非極性。雖然如此，為何有些酵素還需要輔酶的幫助？
19. 為何 RNA 可以有類似酵素的催化作用，而 DNA 則沒有這種能力？
20. 由分子選殖所得到的 cDNA 序列，可以推出某酵素的胺基酸序列，也因此可以算出該酵素可能的分子量；但在實際推算時，經常發現實際的分子量不符，有過大者、也有過小者。請分別舉出分子量變大或變小的可能原因。

## 酵素純化方法：

### 實驗室操作：

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

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

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

### 蛋白質抽取：

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

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

### 色層分析法：

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

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

### 其它純化方法：

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

## 酵素分析方法：

### 蛋白質定量法：

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

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

2. 請查出各種蛋白質定量方法，並做表註明以下各項特徵或性質：

定量反應的原理、靈敏度範圍、專一性、所測的波長、反應所受的干擾、優缺點

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

### 酵素活性測定：

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

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

### 活性分析操作：

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



4. 甘胺酸也可做為緩衝液，使用在 pH 2 或 11 兩種極端的 pH，請就其分子構造解釋之。
5. 最常用的緩衝液為 Tris 及磷酸鹽，使用時當注意那些問題？
6. 有一含金屬酵素，其最佳反應 pH 在 3.8，若使用 citrate 緩衝液 (pH 4.0, 0.1 M) 則偵測不到活性，請問原因何在？
7. Bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) 或 carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 都可使用為緩衝液，但應注意何事？
8. 細胞一旦打破，酵素即暴露於大氣中，其分子將受到氧化及其它作用的攻擊，可能受到的化學反應有那些？蛋白質分子上的那些構造會被破壞或修改？
9. 緩衝液可以配成 5 或 10 倍的 stock，某生如此泡了 10 倍的磷酸鈉 (pH 7.0, 2 M) 放在冷房備用，但使用若干次後，漸漸發現 pH 不太準確，測量其濃度發現降低甚多！到冷房仔細檢查該緩衝液，才發現原因，請問發生了何事？
10. 做 ELISA 實驗時，經常用到一種抗体與標幟酵素的連結體，是利用 glutaraldehyde 把抗体與 peroxidase 連結在一起。若把它的溶液貯藏在  $-20^\circ\text{C}$ ，每次使用時取出解凍再小心放回冰凍，如此做了約十次，發現每次實驗結果的吸光值越來越低，請問為何？
11. 有那些物理力量可以破壞蛋白質的構形，而致酵素失活？請至少舉出三種方法。
12. 請說明：a. 分子內氫鍵 b. 疏水性胺基酸 對蛋白質構形安定性的影響。
13. 緩衝液經常添加很多物質，有不同的功能與用途，請依用途分類搜集各種添加劑。
14. 貯藏蛋白質時，都盡量保存在高濃度下，有何好處？
15. 粗抽酵素時，經常有大量蛋白酶釋出，你將如何處置以便把其破壞降至最低？
16. 尿素為何能使蛋白質變性？請說明其機理。
17. 蛋白質變性後，是否都能復性 (renaturation)？需不需要有外加的助力？
18. 那些緩衝液不適合與金屬離子共用？會有什麼缺點？
19. PMSF 原液很不穩定，要以很濃的濃度保存在冷凍箱中；一但加入緩衝液中，會在二十分鐘內失去效用。這樣我們在緩衝液中加入 PMSF 有沒有用呢？請說明原因。
20. 使用分光光度計的 cuvette 時，應當注意何事？
21. 環境的 pH 如何影響蛋白質的帶電性質？
22. 為何緩衝液中要加入抗氧化劑？可加入那些物質作為抗氧化劑？
23. 蛋白酶通常會使酵素水解而失去活性，但也有反而提高酵素活性的例子，請舉出數例。
24. 溶解核酸時 DNA 通常要溶在 TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4)，但 RNA 只要用水即可溶解。請問 DNA 若溶在純水中，會發生什麼問題，而 RNA 為何不會有此問題？

## 電泳檢定法：

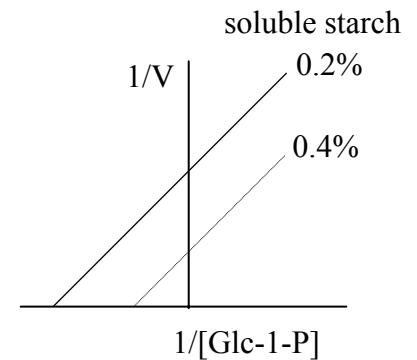
1. 那些外在因素影響蛋白質在膠體電泳中的泳動率？
2. 正負電極槽的緩衝液有一定使用濃度，某生不小心錯泡為十分之一濃度，會有什麼結果發生？
3. 電泳時溫度過高時，對電泳結果會有什麼影響？
4. 請詳述整個 PAGE 電泳膠體的鑄膠過程，及其凝膠機制。
5. PAGE 中有一層焦集膠體，它是如何把樣本蛋白質焦集成一細線的？
6. 相差一個核苷酸的兩段短核酸 DNA，有無可能用電泳分離開來？
7. 為何樣本中含有太高鹽類，或 pH 太低，均會影響電泳結果？
8. 為何蛋白質不適合使用濾紙或 TLC 作為電泳介質？
9. 原態電泳 (disc-PAGE) 中，是否所有的蛋白質樣本都會往正極跑泳動？
10. Disc-PAGE 比起 SDS-PAGE 有何優點？又有何缺點？
11. 以 SDS-PAGE 分析一具有四元體的蛋白質酵素，有無可能看到該四元體的色帶？
12. Disc-PAGE 以梯度鑄膠，可以用來分析蛋白質的原態分子量，但請問有何限制？
13. SDS-PAGE 的樣本要用 SDS,  $\beta$ -mercaptoethanol 及加熱處理，各有何作用？
14. 以 SDS-PAGE 可以測得蛋白質的分子量，就蛋白質本身的胺基酸組成而言，有那些因素會影響所測得分子量的準確性？
15. 若你要分析的異構酶群族具有很廣汎的 pI，例如由 4 到 11 都有，則使用 disc-PAGE 能不能看到所有的異構酶？你應當進行何種電泳才能看到所有的異構酶？
16. 進行電泳時，固定電壓、電流或電功，分別對電泳過程或結果有何影響？
17. 洋菜多在為水平式電泳，PAGE 多用在垂直式，為什麼？
18. Acrylamide 常有不溶性的雜質，需經過濾去除，否則電泳結果會有何種缺陷？
19. 樣本中各種成份對電泳的結果影響很大，請問下列物質或處理對電泳結果的影響為何？  
a. 0.5 M NaCl,    b. 0.05 M KCl,    c. 樣本 pH = 3.0,    d. 樣本蛋白質 = 10 mg/mL
20. 在開動或關閉供電器 (power supply) 時，有一個重要檢查習慣為何？有何重大影響？
21. 請說明各種呈色方法的原理：Coomassie Blue, Silver staining, PAS staining。
22. 在膠體電泳後直接進行活性染色是最方便而專一性高的方法，但並非所有的酵素都可以在膠片上進行活性染色，請列出所需要的條件與限制。
23. 有那些方法可以在膠片中染上蛋白質色帶的碳水化合物？原理如何？
24.  $\beta$ -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胜肽片段？那些方法可以分離這些片段？
30. 某蛋白質經純化至均質後，以 IEF 檢視其 pI，發現此蛋白質在其預測的 pI 附近拖拉成一片，無法聚焦，且似有固體產生的樣子。請問發生了什麼問題？有無改善的可能？
31. 那一種蛋白質在進行 SDS-PAGE 時，無法表現出正常的泳動率？

### 蛋白質檢定：

1. 你在純化得某酵素後，經定序得到其 N-端的 15 個胺基酸序列，請問接著可以進行那些實驗？各有何目的或用途？
2. 請列表整理出所有決定分子量的方法，並比較其優缺點。
3. 電泳後進行蛋白質轉印，再用抗体染色後，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，抗体可以與抗原結合而沉澱下來；但在生化應用時，此抗体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，不能直接以抗体沉澱抗原？
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. 生產傳統抗体時，抗原純度一定要非常高，否則可能會有交叉反應；但在生產單株抗体時，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  $\beta$ -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  $\beta$ -澱粉酶有交叉反應；反之以  $\beta$ -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. 最近流行使用短鏈胜肽 (約十多個胺基酸) 連到 carrier 上做為抗原，進行免疫後可以得到抗体，稱為 monospecific Ab。某生由其酵素 cDNA 序列轉譯的蛋白質序列上選出一段胜肽 (VALIWVVSAIL)，以此進行抗体製備，結果也得到了抗体。但發現此抗体在進行蛋白質轉印的免疫染色時，對 disc-PAGE 膠片的轉印膜無法呈色，呈一片空白；對 SDS-PAGE 轉印膜則只能看到很淡的色帶。請問發生了什麼毛病？如何解決問題？
13. 假設此生得到另一種完全不同的結果，免疫轉印得到很強的呈色色帶，但對細胞的粗抽取液樣本做檢定時，對不含此一酵素的控制組，卻也有免疫呈色，請問如何解釋？
14. 續上題，另一位同學則以電腦軟體搜尋較強的抗原決定基，選了該蛋白質 N-端的一段序列 (MILAKKSVALV)，同樣進行抗体製備；所得抗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。

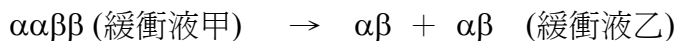


## 應用問題：

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

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



- (1) 請解釋此一現象發生的可能原因。
- (2) 請利用這個特性，設計一方法來純化蛋白質 B。

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

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

5. 部分純化的酵素 E，在緩衝液中為清澈溶液，在水中透析三日後發現：
- 透析袋內有沉澱發生，離心後分別收集上清及沉澱，上清活性剩約五分之一，沉澱及外液則均無酵素活性。
  - 上述透析袋內的上清及沉澱，測蛋白質量，總共只有原來透析前的一半。
  - SDS-PAGE 顯示透析外液不含蛋白質，但有 ninhydrin 反應及 280 nm 吸光。

請問：

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

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

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

+：蛋白質經過架橋處理； -：未經架橋處理之蛋白質  
M：已知之蛋白質 (分子量 15,000) 經架橋處理後，所得之各種聚合物。

另以膠體過濾法測 G 及 H 的分子量，二者均為 120,000。

請由這些結果，推論 G 及 H 兩蛋白質的四級構造。

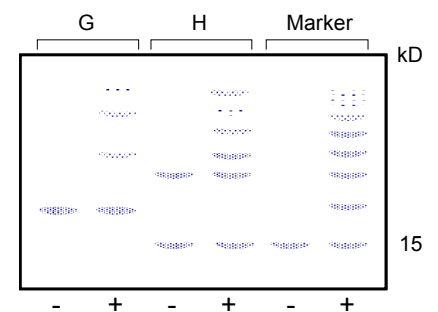


Fig. 1

8. 某蛋白質樣本通入 DEAE-離子交換介質，以純化其中的酵素 I，樣本中原含有 50 mg 蛋白質及 100 活性單位酵素 I。以 0~0.3 M NaCl 梯度溶離得數個 280 nm 尖峰，依次標以 P1, P2, P3, P4 及 P5，分別收集之，分析均無任何酵素 I 活性。另外測得以下結果：
- 各蛋白質峰的蛋白質總量為 46 mg。
  - 當混合 P2 及 P5 後，可測得約 280 單位酵素 I 活性，其它的混合均無活性。
  - 當混合 P2, P4 及 P5 後，只測得 98 單位的酵素 I 活性。
  - 測 P5 的蛋白質含量只有 0.5 mg。

請問 P2, P4 及 P5 分別含有何種物質？

9. 酵素 J 的純化流程如下：

材料 (甘藷) 切碎

↓ 加緩衝液均質化

(粗抽取步驟，依一般方法進行)

↓ 離心

上清

↓ 0.3~0.5 飽和度硫酸銨分劃

Crude J (酵素粗抽液 Xt)

↓ 膠體過濾 (Sephrose CL-6B)

溶離得 P1, P2, P3 三尖峰 (Fig. 2)

↓ → 電泳 (Fig. 3) disc-PAGE

Peak P1 (只有 P1 有酵素活性)

↓ 離子交換 (DEAE-Sephrose)

↓ 以緩衝液洗過一個管柱體積

↓ 0~0.3 M NaCl 梯度溶離

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

Peak P4 (只有 P4 有酵素活性)

請參考各圖結果，回答下列問題：

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

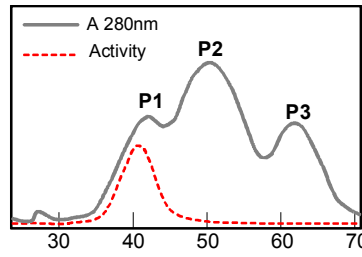


Fig. 2 Gel Filtration

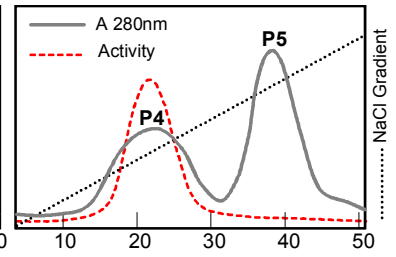


Fig. 4 Ion Exchange

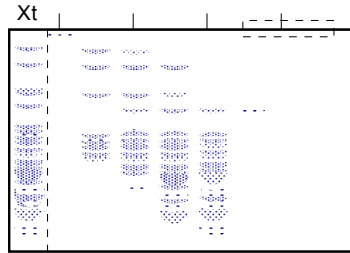


Fig. 3 Disc-PAGE

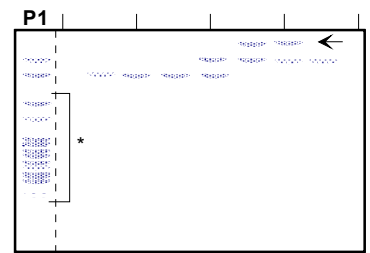


Fig. 5 Disc-PAGE

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<sup>+</sup>為輔酶。



在進行硫酸銨分劃後，得到 Fig. 6 的結果，請回答以下問題：

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

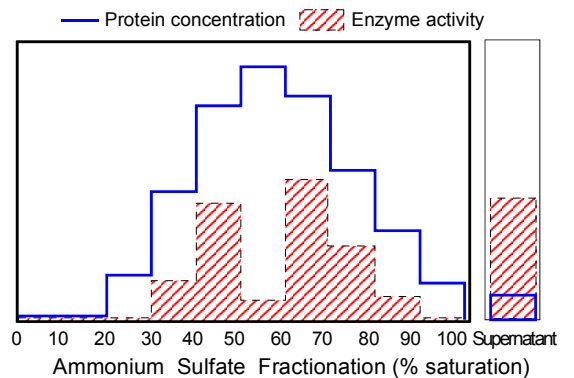


Fig. 6

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

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

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

所用親和擔體： 耦合緩衝液： 溶離條件：

[甲] CNBr-Sephrose Tris pH 8.0 游離型 N

[乙] Agarose-C<sub>6</sub>-COOH 磷酸 pH 7.5 游離型 N → pH 2.05 甲酸

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

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

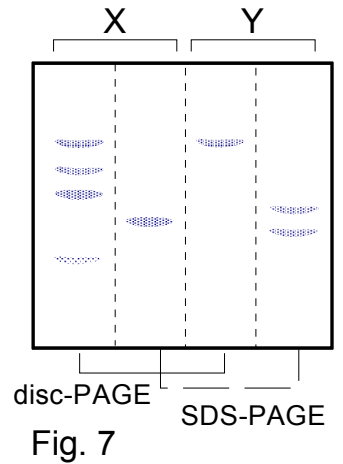
	分子量	Ninhydrin test	AHP test	pI
P	300	+	-	6.3
Q	350	-	+	non-polar
R	40,000	+	-	4.3
S	50,000	+	-	7.8
T	440,000	+	-	5.2

AHP = Aniline hydrogen phthalate

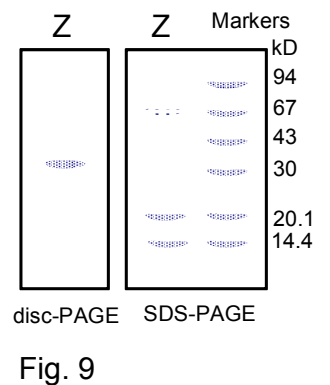
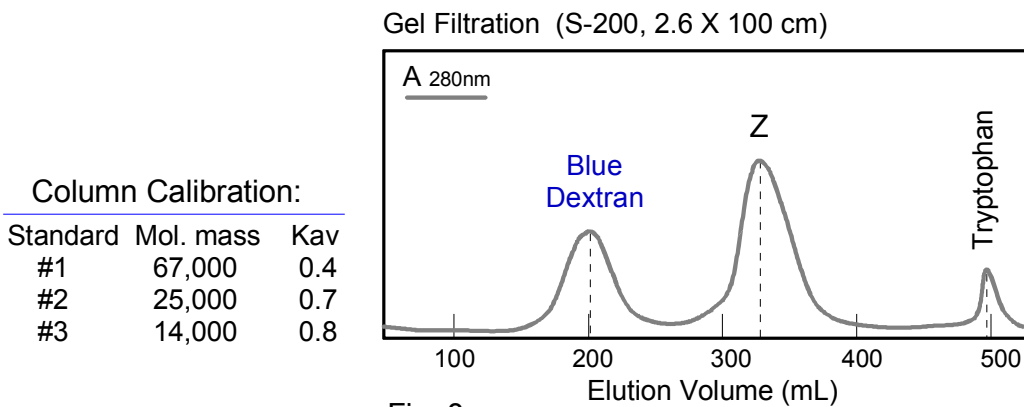


13. 酵素 U 需要鎂離子共同維持活性，在純化過程中，膠體過濾法或離子交換法均使得 U 失去活性，請分別解釋原因；並說明如何防止之？
14. 有兩種蛋白質 V 與 W，其 pI 分別為 5.2 及 6.3，原態單元體之分子量分別為 32,000 及 35,000。V 在其 pI 的環境下，有 90% 的分子會發生聚合現象，成為四元體，且可溶於一般緩衝液。請設計一簡單方法，分離此二蛋白質的混合物。

15. 經純化後之蛋白質 X 及 Y，以 PAGE 電泳檢定得如 (Fig. 7)。  
請分別討論蛋白質 X 及 Y 何者為純質？解釋為何。  
(請由所得之電泳圖形說明之，並請再設計實驗證明)



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？



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 (Sephacel CL-6B)，預測並畫出色析圖譜及 SDS 電泳分析結果。
  - 取出含 BB 部份，接著進行離子交換法 (DEAE Sephacel, pH 6.5)，同上預測結果。
  - 若你覺得 BB 還不夠純，請自行設計進一步的純化方法，並預測其結果。

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

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

20. 請解釋下列各操作時所發生現象的主要原因，若是問題請亦提出解決方法：

例：加熱使酵素中止反應：[答] 蛋白質受熱變性，構形被破壞，失去活性。

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

