

B3

酵素操作方法

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

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

酵素操作方法

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

1 基本分析方法：

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

1.1 蛋白質定量法：

以 96 孔的微量滴定盤，進行蛋白質的定量；有以下兩種常用的方法。

1.1.1 Bradford 定量法：

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

儀器：

37°C 恆溫箱

ELISA 光度計 (Dynatech MR 5000)

ELISA 96 槽微量滴定盤 (Nunc 442404)

試劑用具：

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

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

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

未知樣本 (含未知濃度的蛋白質) 0.8 mL

大頭針或噴火槍

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

先準備一組系列 BSA 標準品：

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

並以未知樣本準備數種濃度的未知樣本 (X1, X2 ...)

blank for ELISA reader

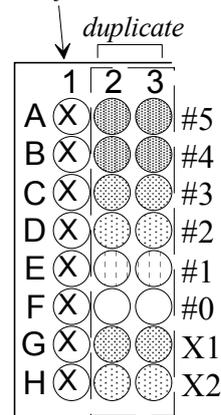


圖 1.1 安排微量滴定盤

方法：

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

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

◆ 本步驟是實驗成敗的關鍵！

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

圖 1.2 顯示這三個連續動作 (1)→(2)→(3)。

◆ 這時若還有氣泡，小心用大頭針刺破，大量時可用火燄燒破之。

(4) 靜置室溫 10 min。

(5) 以 ELISA reader 測 570 nm (或 595 nm) 吸光。

(6) 作圖畫出標準校正線，並決定未知樣本的濃度。

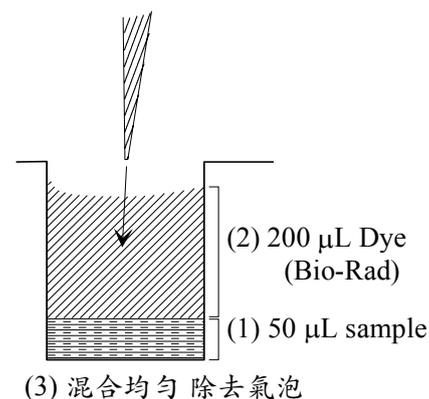


圖 1.2 樣本添加步驟

1.1.2 BCA 定量法：

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

儀器：

儀器用具同上

試劑用具：

一般緩衝液同上，另需下列物品：

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

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

BSA 標準品 (BSA 2 mg/mL)：

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

方法：

(1) 在一微量滴定盤上，各標準品每濃度取 20 μL 以二重複加入預定槽內。

(2) 每槽加 200 μL 上述之混合 Reagent，全部樣本槽加完前不要中斷。

◆ 所有操作之注意要點同上。

(3) 輕拍滴定盤的一側，使添加的各個成份均勻混合。

(4) 靜置 37°C 反應 10 min。

(5) 以 ELISA reader 測 562 nm (或 570 nm) 吸光。

(6) 作圖畫出標準校正線，並決定未知樣本的濃度。

1.2 澱粉磷解酶活性分析：

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

儀器：

同上節

試劑：

醋酸緩衝液 (0.2 M, pH 5.5)：

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

加水至 1,000 mL 置於 4°C 保存。

可溶性澱粉 (1.2%)：

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

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

Glc-1-P (32 mM)：

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

加水至 100 mL 置於 4°C 保存。

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

磷酸呈色劑 (ferro-sulfate molybdate)：

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

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

◆ 使用前新鮮配製。溶液應為淡褐色，若變質則呈現藍色。

磷酸標準溶液 (20 mM)：

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

方法：

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

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

磷酸標準曲線作法：

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

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

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

1.3 澱粉磷解酶動力學分析：

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

儀器試劑：

同上節

方法：

酵素動力學基本操作：

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

最適酵素濃度：

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 澱粉磷解酶純化方法：

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

2.1 粗抽取及硫酸銨分割：

儀器：

製簽用具、果汁機 (均質機)、紗布
 高速冷凍離心機
 透析袋、攪拌器

試劑：

緩衝液 A：(5×stock)

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

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

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

緩衝液 B：

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

緩衝液 C：

緩衝液 A 再加入 NaCl 成為 0.15 M 濃度。

硫酸銨 (ammonium sulfate)：

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

方法：

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

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

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

表 2.1 各百分飽和濃度硫酸銨添加量

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

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

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

2.2 膠體過濾法：

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

儀器：

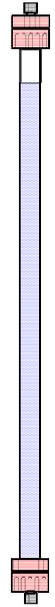
- 層析管柱 (Pharmacia C16 column, 100 cm) 最好附有 adaptor (AC16)
- 蠕動幫浦 (Pharmacia peristaltic pump P-1)
- 分割收集器 (fraction collector, Gilson 或 Pharmacia)
- 細胞離心機, Centriplus (Amicon)

試劑：

- Sephacryl S-300 (Pharmacia 17-0599-01)
- 緩衝液 C (緩衝液 A 再加有 0.15 M NaCl)

方法：**管柱裝填：**

- (1) 預先將管柱洗淨、晾乾後備用，也要熟悉整隻管柱的拆裝方法。
- (2) 架起管柱，以水平儀調整管柱，使之與地面垂直。
- (3) 於管柱中加入約一半高度的緩衝液 C，測試管柱是否有漏水現象；若沒有漏水，則讓緩衝液流出，只留約 5 cm 高的緩衝液 C；以塞子暫時堵住下方出口。
- (4) 取出所要使用的膠體，先除去所含的 20% 酒精，並平衡在緩衝液 C 中；膠體的處理方法，請參閱講義 B2 酵素純化方法 3.2.4。
 - ◆ 若是在室溫中進行層析法，一定要等膠體的溫度完全回復室溫才可裝填。
- (5) 將所要裝填之膠體搖盪均勻，不要有未散之硬塊，也避免氣泡產生，若有氣泡產生則以超音波震盪器 (sonicator) 趕出，並以抽氣去除之。
- (6) 將上述混合均勻之膠體，以玻棒沿管壁流暢倒入管柱，並且避免使得氣泡陷在膠柱中；可在裝填後，以手電筒在膠柱後方打燈光檢查之。
- (7) 利用重力自然沈降 1~2 min 後，移去管柱下方軟管的塞子，利用流速加快沈降，注意不可使管柱上方的液相完全乾去。
- (8) 待膠體已沈降完全，用塞子止住下方軟管，並且以緩衝液加滿管柱。
- (9) 取出管柱的 adaptor 並接好軟管及蠕動幫浦管路，並使整個幫浦及軟管內，完全充滿緩衝液，不得有任何氣泡陷在裡面。
- (10) 小心將 adaptor 放入管柱內，往下推至膠面上方，檢查有無氣泡留滯在 adaptor 下面，然後鎖緊 O-ring。此時 adaptor 與膠面間有一小段充滿緩衝液的空間。
- (11) 移去管柱下方軟管的塞子，用幫浦注入緩衝液 C 流洗兩個管柱體積。
- (12) 暫時停止幫浦輸送，用塞子止住下方軟管，放鬆幫浦使管路呈流通狀態，稍微旋開 adaptor 的 O-ring，將 adaptor 緩慢往下壓，液體會從幫浦上端軟管流回去，當壓至膠面時，即旋緊 O-ring，鎖上幫浦門，並移去管柱下方軟管的塞子。



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

(14) 檢查膠面是否因高壓流洗而下降，若降低則重複步驟 (12) 把 adaptor 往下壓。

層析操作：

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

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

(2) 在注入樣本後，以預定流速進行溶離，膠體過濾層析法即開始進行，要馬上啟動分割收集器；所有溶離物質，應在大約 1.5 倍管柱體積之內流出。

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

原態分子量測定：

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

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

(2) 同時也要把純質的目標酵素加入標準蛋白質中，一起進行膠體過濾。

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

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

2.3 離子交換法：

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

儀器：

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

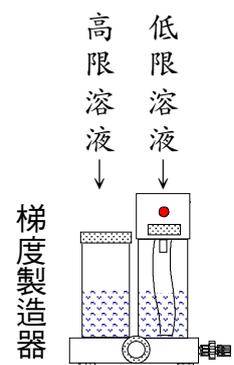
蠕動幫浦 (Pharmacia peristaltic pump P-1)

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

梯度製造器 (Pharmacia gradient mixer MX-1)

試劑：

DEAE Sephacel (Pharmacia 17-0500-01)



緩衝液 A、緩衝液 C、固体 NaCl

方法：

- (1) DEAE Sephacel 的裝填方法大致同膠體過濾法，裝填於較為粗短的管柱中 (C26 × 40)，膠體體積約為 50 mL，並以緩衝液 C 流洗，使平衡至 pH 為 7.4。
 - ◆ DEAE 膠體最好在管柱外先以緩衝液 C 徹底平衡好，再生一定要完全！
- (2) 將來自膠體過濾的樣本，注入管柱之後，以緩衝液 C 流洗兩個管柱體積，此時不應有蛋白質流洗出；但流出液也應加以收集，以免因失誤而損失。
- (3) 在緩衝液 A 中加入 NaCl 使其濃度達 0.5 M，成為高限流洗液；而緩衝液 C 中已具有 0.15 M NaCl，為低限流洗液。
- (4) 在梯度製造器的兩端，各加入高低限鹽溶液 250 mL，與幫浦連線，進行梯度流洗，同時也啟動分割收集器，每 5 mL 收集一管。
 - ◆ 注意低限溶液是加在靠近管柱那一邊，添加時兩邊暫時不要流通。
- (5) 待梯度製造器中的溶液用盡，加入 100 mL 高限流洗液，洗出殘餘蛋白質。
- (6) 收集 L-SP 活性區，濃縮後以便繼續進行純化步驟。

沒有梯度製造器時：

- (1) 梯度製造器相當昂貴，若無法購置，也可使用階段式梯度；每次用一個鹽濃度流洗一個管柱體積，漸漸提高濃度，如 0.2 M → 0.3 M → 0.4 M → 0.5 M。
 - ◆ 各種濃度的溶離液是用緩衝液 A 加上適量 NaCl 配置而得。
- (2) 階段式梯度的效果，不見得比連續式梯度差，有時反而會有較佳分離效果。
- (3) 自己製作一個梯度製造器也非難事，用兩個適當大小的塑膠針筒，及一個小型攪拌子即可作成；製作的詳細方法與圖示，可參閱莊榮輝博士論文 p. 65。

2.4 製備式電泳與電泳溶離：

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

儀器：

電泳設備 (Hoefler SE-250 平板式垂直電泳槽)

間隔條 1.5 mm (不使用樣本梳，或使用製備用樣本梳)

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

試劑：

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

方法：

電泳及切割膠片：

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

電泳溶離：

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

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



圖 2.1 製備式電泳膠片的鑄膠

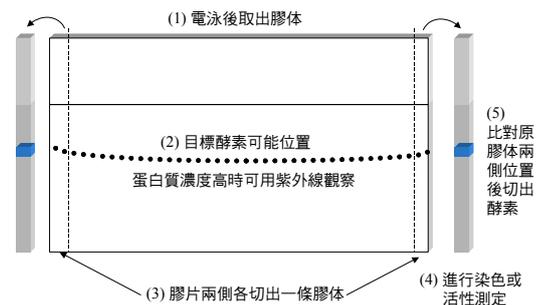


圖 2.2 如何切出製備式電泳的色帶

3 電泳檢定法：

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

3.1 不連續膠體電泳 (native-PAGE)：

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

儀器：

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

試劑：

A 液 (T 30%, C 2.6%)：

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

加水至 50 mL，若難溶則稍微加熱助溶之，儲存於 4°C。

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

B 液 (分離膠體緩衝液)：

Tris	(Sigma T-1503)	18.2	g
TEMED	(Sigma T-8133)	0.36	mL

用 60 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 8.8 後加水至 100 mL，儲存於 4°C。

(TEMED = *N,N,N',N'*-Tetramethyl-ethylenediamine)

C 液 (聚焦膠體緩衝液)：

Tris	(Sigma T-1503)	0.6	g
TEMED	(Sigma T-8133)	40	μL

用 8 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 6.8 後加水至 10 mL，儲存於 4°C。

通用電泳緩衝液 (5×) :

Tris	90 mM×5	(Sigma T-1503)	54.5 g
EDTA·2Na	2.5 mM×5	(Sigma E-4884)	4.7 g
Boric acid	80 mM×5	(Sigma B-0394)	24.8 g

加水 800 mL 溶解，以 NaOH 調 pH 至 8.4 後，加水至 1000 mL，室溫保存。使用前要以蒸餾水稀釋五倍。

APS 溶液 (ammonium persulfate, 10%) :

取 0.1 g 溶於 1 mL 水，要確實溶解完全；使用前新鮮配置，過夜者不再用。

追蹤染料 (tracking dye) :

取 bromophenol blue 約 1 mg 溶於 5 mL 通用電泳緩衝液，加 5 mL 甘油混勻。

高分子量標準蛋白質組合 (Pharmacia HMW electrophoresis calibration kit) :

Protein:	分子量 (Da)
Thyroglobulin	669,000
Ferritin	440,000
Catalase	232,000
Lactate dehydrogenase	140,000
Bovine serum albumin	67,000

◆ 注意：以 native-PAGE 測定的分子量，只能做為參考，不能做為唯一證據。

方法：

鑄膠：

- (1) 將電泳玻片及氧化鋁片清洗淨後擦乾，再以玻璃清潔劑擦拭乾淨，選擇所需厚度的間隔條 (spacer) 將其組裝於鑄膠套件中。
- (2) 依照表 3.1 所列的各溶液比例，選擇所需的分離膠體濃度；配置膠體溶液時，其中 APS 溶液必須最後加入，小心混合均勻，以避免氣泡產生，然後緩緩倒入裝置好的鑄膠套件中。若你不知要用多少濃度的膠體，先試 7.5% 者。

表 3.1 常用 native-PAGE 膠體溶液 (單位 mL)

膠體溶液	分離膠體溶液						聚焦膠體
	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%	4%
A	1.65	2.5	3.3	4.15	5.0	6.7	0.66
B	2.5						-
C	-						1.24
H ₂ O	5.8	4.95	4.15	3.3	2.45	0.75	3.0
APS	0.05						0.1
總體積	10						5.0

- (3) 膠體高度約佔玻片的 2/3 至 3/4 高，加完後儘快在各膠體液面上方小心加入 100 μ L 異丙醇，以壓平膠體液面。

- (4) 約 30 min 至 1 h 後 (天冷須更久)，凝膠完成，倒出上層的異丙醇。
- (5) 配置聚焦膠體溶液，先準備好所需之樣本梳 (comb)，加入溶液後立刻插入，整個過程必須在 5 min 完成，約 30 min 可完成凝膠。
- (6) 拆卸鑄膠套件，將多餘的凝膠去除，鑄好的膠片置於封口袋中放在 4°C 保存，並加入少量蒸餾水防止膠片乾裂，使用期限約為一週。

電泳：

- (1) 先取出膠片回溫，將稀釋成一倍的通用電泳緩衝液，倒入電泳槽的底部。接著把膠片以 45 度架到電泳槽上，避免氣泡產生；當電泳夾夾妥後，在電泳玻片組合的上方，加入電泳緩衝液。電泳前，先以微量針管清洗各樣本槽，避免有凝膠不完全的殘餘物留在樣本槽內。
 - ◆ 膠片一定要等回復室溫後才能架到電泳槽，否則玻片會因熱漲而撐破。
- (2) 取適量的樣本 (約 10~15 μL)，加入 1/4 體積之追蹤染料，混合均勻後以微量針管小心的注入膠體中的樣本槽，並避免氣泡的產生。
 - ◆ 加入的樣本要事先定量，以便算出加入若干量的蛋白質。
- (3) 高分子量的標準蛋白質約需 4~8 μL ，作為蛋白質分子量的參考；但在 disc-PAGE 中，分子量的測定並不可靠，因此應避免用來決定分子量。
- (4) 將電泳槽上部蓋子蓋上，確認正負極裝置正確 (蛋白質由負極往正極跑)，連接上電源供應器，定電壓以 100~150 V 進行電泳，若膠片需做活性染色，則必須在 4°C 冷房中進行電泳。
- (5) 待追蹤染料跑出膠片後，關掉電源，取出膠片中的膠體，以解剖刀截角做記號，準備進行染色。

3.2 SDS 膠體電泳：

SDS-PAGE 是在電泳系統中，利用界面活性劑 SDS (sodium dodecyl sulfate) 附在蛋白質疏水區表面，由 SDS 本身所帶之負電荷引導泳動。由於蛋白本身所帶電荷遠小於附著之 SDS 分子，因此蛋白質本身的電荷對泳動率沒有影響，泳動率只決定於蛋白質分子量，故 SDS 電泳適合測定蛋白質的分子量。在樣本處理過程中，利用加熱破壞蛋白質的三級及四級結構，使其分子內部的疏水區暴露而與 SDS 結合；加入還原劑可破壞蛋白質分子內的雙硫鍵，常用還原劑有 β -mercaptoethanol 或 dithiothreitol。因此 SDS-PAGE 廣泛地應用於蛋白質次單元體分子量的決定。

儀器：

同上節之不連續膠體電泳

試劑：

除了上節所使用的藥品外，還需配置以下的藥品：

SDS 膠體電泳樣本溶液 (SDS-PAGE sample buffer) 2×：

Tris	125 mM×2	(Sigma T-1503)	0.3	g
EDTA·2Na	2 mM×2	(Sigma E-4884)	14.9	mg
SDS	2%×2	(Nakalai 316-07)	0.4	g
β-mercaptoethanol	5%×2	(Sigma M-6250)	1	mL

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

10% SDS 溶液：

取 1 g SDS 溶於 10 mL 二次水；SDS 極易揚起，注意勿吸入，以免造成傷害。

SDS 電泳緩衝液 (1×)：

配置同通用電泳緩衝液，但在稀釋時加入 SDS 使成為 0.1 % SDS。

低分子量標準蛋白質組合 (Pharmacia LMW electrophoresis calibration kit)：

Protein:	分子量 (Da)
Phosphorylase b	94,000
Bovine serum albumin	67,000
Ovabumin	43,000
Carbonic anhydrase	30,000
Trypsin inhibitor	20,000
α-Lactalbumin	14,000

或可用 Novex SeeBlue Pre-stained standards (見 p. 217)，其蛋白質色帶呈藍色。

方法：

鑄膠：

(1) 方法同上節不連續膠體電泳，只是在膠體溶液中多加了 1% 的 SDS；膠體的濃度配方如下表 3.2，10 mL 約足夠鑄造兩片膠片。

表 3.2 常用 SDS-PAGE 膠體溶液 (單位 mL)

膠體溶液	分離膠體溶液						焦集膠體
	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%	
A	1.65	2.5	3.3	4.15	5.0	6.7	0.66
B	2.5						-
C	-						1.24
10% SDS	0.1						0.05
H ₂ O	5.7	4.85	4.05	3.2	2.35	0.65	2.95
APS	0.05						0.1
總體積	10						5.0

電泳：

- (1) 先取出膠片回溫，將稀釋成一倍的 SDS 電泳緩衝液，倒入電泳槽的底部。接著把膠片以 45 度角放入，可避免氣泡的產生，當電泳夾夾妥後，在電泳玻片的上方，加入電泳緩衝液。同樣也要清洗每個樣本槽。
- (2) 取適量的樣本 (約 5~10 μL)，加入同體積之樣本緩衝液 (sample buffer) 再加入 2 μL 追蹤染料，混合均勻後於 100°C 中煮 5 min，待冷卻後離心 30 sec，以微量針管小心的注入膠體中的樣本槽，並避免氣泡的產生。
- (3) 低分子量標準蛋白質約需 4~8 μL ，作為蛋白質分子量參考的依據。
- (4) 將電泳槽上部的蓋子蓋上，確認正負極裝置正確，連接上電源供應器，定電壓以 100~150 V 進行電泳。
- (5) 待追蹤染料跑出膠片外，關掉電源，取出膠片中的膠體，以解剖刀截角做記號，準備進行染色。

3.3 梯度膠體電泳：

梯度電泳的分離膠體濃度成為一連續梯度，由低至高 (由上而下)，可使電泳的解析力增強。在 disc-PAGE 中，蛋白質分子的泳動率除了受到分子量影響外，分子本身的電荷也有影響，因此無法單用 disc-PAGE 來決定原態蛋白質的分子量；但若以梯度膠體進行電泳，則分子帶電性對泳動率的影響減小，就可做為檢定蛋白質原態分子量的參考。在 SDS-PAGE 中製造梯度，則其解析力亦大幅提高，分子量差異極小 (< 1,000 Da) 的次單元體亦有可能分離，故梯度膠體亦為決定蛋白質分子量之利器。但因其製備過程較為麻煩，因此並不被用來作為一般分析。

儀器：

電泳器具同上節之不連續膠體電泳，另須以下儀器用具：

五片裝鑄膠套件 (Hofer SE-275 含電泳玻片、氧化鋁片、樣本梳、間隔條各四套)

迷你梯度製造器 (ISCO, 高低限各 30 mL)

蠕動幫浦 (Pharmacia P-1)、止血鉗

試劑：

同上節鑄膠所需樣本，另準備：

50% glycerol (其中含少量 bromophenol blue)

方法：

- (1) 將電泳玻片及氧化鋁片清洗淨後擦乾，以矽化液或玻璃清潔劑擦是乾淨，選擇所需厚度的間隔條 (spacer) 將其組裝於鑄膠套件中。電泳玻片表面的清潔於否對

鑄膠結果有決定性的影響，而鑄膠套件中的三角形填塞橡皮必須移走。

- (2) 將梯度製造器與幫浦連線，而幫浦再與鑄膠套件連線，梯度製造器的兩槽中的連通管以止血箝夾住，準備開始鑄膠。
- (3) 先決定梯度的範圍，選擇所需的分離膠體濃度，配置高限及低限膠體溶液，其中 APS 溶液必須最後加入，小心混合均勻，避免氣泡產生，徐徐倒入梯度製造器的兩槽中。通常在高限濃度的膠體溶液中，加入少量 bromophenol blue，則形成的藍色梯度有助辨識梯度製造是否良好。
- (4) 打開梯度製造器前槽的攪拌器，將止血箝移開，同時打開幫浦，使膠體溶液流向鑄膠套組，整個過程在 3 min 完成。
- (5) 在膠體被抽乾的同時，加入 50% 甘油，以便將鑄膠套組中的膠體溶液推到正確高度，當甘油到達玻片時立即停止幫浦；藍色的 bromophenol blue 可幫助辨識。此步驟需注意不可有氣泡跑入整個管路中，否則會破壞梯度形成。
- (6) 膠體高度約玻片的 2/3 至 3/4 高，加完後在各膠片組合中加入 100 μ L 異丙醇，壓平膠體液面。
- (7) 聚焦膠體的鑄造過程同前節所述；或可省去聚焦膠體，直接在分離膠體灌好後，把樣本梳插上，但分離膠體就要灌高一點。

3.4 等電聚焦法：

等電聚焦法是根據蛋白質的 pI 進行分離。當樣本蛋白質在含有 ampholyte 的聚丙烯醯胺中泳動時，ampholyte 會自動形成一 pH 梯度；當蛋白質的 pI 低於環境 pH 時，其淨電荷為負，因此會往正極泳動；而當環境 pH 與此蛋白質 pI 相同時，淨電荷變為零而不泳動，且聚焦在膠體中。與已知 pI 的標準蛋白質樣本比較，即可得知此樣本蛋白質的 pI。以下所述方法，是在直立式平板電泳系統 (Novex) 進行的，若要進行二次元電泳，則須使用柱狀膠體，Hoefler SE-250 另配備有此種套組。

儀器：

預鑄膠體套組 (Novex IEF gel pH 3-10)

電泳槽 (Novex Xcell II 平板式垂直迷你電泳槽)

電源供應器

試劑：

負極緩衝液 (cathode buffer) 10 \times ：

Arginine (free base)	(Sigma A-5006)	3.5 g
Lysine (free base)	(Sigma L-5501)	2.9 g

用 80 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 10.2 後加水至 100 mL，儲存於 4 $^{\circ}$ C。

正極緩衝液 (anode buffer) 50× :

Phosphoric acid (85%)	4.7 g
-----------------------	-------

用 80 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 2.4 後加水至 100 mL，儲存於 4°C。

樣本緩衝液 (2×) :

負極緩衝液 (10×)	2 mL
Glycerol (Wako)	3 mL

加入少量 bromophenol blue，加水至 10 mL。

固定液 (5×) :

Sulphosalicylic acid (Wako)	3.46 g
Trichloroacetic acid (Wako)	11.46 g

加水至 100 mL 溶解。

標準 pI 蛋白質組合 (Pharmacia broad pI calibration kit) :

Protein	pI
Trypsinogen	9.30
Lentil lectin-basic band	8.65
Lentil lectin-middle band	8.45
Lentil lectin-acidic band	8.15
Myoglobin-basic band	7.35
Myoglobin-acidic band	6.85
Human carbonic anhydrase B	6.55
Bovine carbonic anhydrase B	5.85
β-Lactoglobulin A	5.20
Soybean trypsin inhibitor	4.55
Amyloglucosidase	3.50

方法 :

- (1) 將樣本與樣本緩衝液以 1:1 混合，通常樣本中的鹽濃度在 10~20 mM 間最適合，若鹽濃度太高則會影響電泳的結果。
- (2) 將 10× 的負極緩衝液稀釋至 1×，並確定正確的 pH 值。利用超音波震盪抽氣以去除氣泡，以減少在電泳過程中出現的二氧化碳，在電泳槽的上槽加入適當量的緩衝液。
- (3) 將 50× 的正極緩衝液稀釋至 1×，確定 pH 值正確後加入電泳槽的下槽。
- (4) 小心注入已混合均勻的樣本。
- (5) 依照下面的條件，進行電泳：

100 V (1 h) → 200 V (1 h) → 500 V (30 min)

- (6) 電泳完畢後，打開膠體卡匣，將膠體浸入固定液中 30 min 固定蛋白質，並洗去

ampholyte，若 ampholyte 未洗淨會造成膠體染色背景過深。

(7) 以所要的染色方法對膠體進行染色。

3.5 膠體染色法：

3.5.1 Coomassie Brilliant Blue R (CBR) 染色法：

CBR染色法是利用藍色CBR分子上的芳香苯環，與蛋白質的疏水區結合；同時其亞硫酸基團 ($-\text{SO}_3^{2-}$) 與蛋白質的正電荷結合，可使蛋白質染出藍色色帶。是非常方便的蛋白質染色法，但其靈敏度不高，每個色帶至少要有數十 μg 以上的蛋白質才染得清楚。

儀器：

平台震盪器

染色缸 (最好用玻璃製品，Corning 廚具的長方形玻璃缸極為合用)

試劑：

CBR 染色液：

Coomassie Brilliant Blue R-250	(Sigma B-0419)	0.75 g
用 250 mL 甲醇溶解後，再加入 250 mL 二次水及 50 mL 醋酸。		

CBR 脫色液：

10% 醋酸與 20% 甲醇的水溶液。

方法：

- (1) 將電泳完畢的膠體浸入 CBR 染色液中，染色液用量只要蓋過膠片即可；置於平台震盪器上搖盪 30 min。
- (2) 倒出染色液，用自來水沖洗後倒入脫色液，脫色液蓋過膠片即可。於染色缸中放入一塊吸水紙，可加速脫色過程。
- (3) 若蛋白質濃度較低，則染色時間可加長 (1 h) 以增加色帶深度。
- (4) 若膠體表面有不溶的 CBR 染料沈積，可以用 50% 甲醇洗去。

3.5.2 硝酸銀染色法：

硝酸銀染色是一種靈敏度極高的蛋白質染色法，靈敏度可達CBR染色的百倍以上。蛋白質分子上的酸基 (COO^-) 會與銀銨錯離子結合，而銀離子在酸性環境中被還原為金屬銀，可使蛋白質色帶呈現深棕至黑色。本染色法增加了還原液甲，藉由其中的戊二醛 (glutaraldehyde) 與蛋白質分子上的胺基 (Lys或Arg) 耦合，而增加銀離子的結合基團，使得靈敏度更增。硝酸銀染色的成敗決定於所使用的藥品品質，試劑的製備必須使用Milli-Q或同等級的水。

儀器：

平台震盪器、玻璃染色缸

試劑：

還原液甲：

Glutaraldehyde (25%)	(Merck)	4	mL
Sodium thiosulfate	(Sigma S-7143)	0.8	g
用二次水定量至 100 mL。			

還原液乙：

Citric acid (0.5% 水溶液)	(Wako 特級)	1	mL
甲醛	(Wako 特級)	0.1	mL
甲醇	(Wako 特級)	15	mL
用二次水定量至 100 mL。			

硝酸銀液：

NaOH (0.36% 水溶液)	(Merck)	21	mL
氨水	(Merck GR)	1.4	mL
H ₂ O	(Milli-Q)	73.6	mL
硝酸銀	(Wako 特級)	0.8	g

將硝酸銀溶於 4 mL 二次水，緩慢滴入 NaOH、氨水與二次水的混合液中，邊滴入邊搖盪，確定沒有混濁生成，全量滴入完成後應呈現澄清，若有混濁現象則在以氨水滴定至澄清。

反應中止液：

Citric acid (0.5% 水溶液)	(Wako)	10	mL
Ethylenediamine	(Wako)	0.1	mL
用二次水定量至 100 mL。			

矽化液：

Dichlorodimethylsilane 5% (Fluka) 的氯仿溶液。

◆ 注意矽化液揮發性強且具毒性，要帶手套在排煙櫃中操作。

方法：

- (1) 先將玻璃染缸表面做矽化，目的是防止硝酸銀液反應後，膠片黏在缸上，造成取出時膠片破裂。
 - ◆ 矽化需戴雙層手套，因矽化物及氯仿具有毒性且會溶解手套。
- (2) 電泳後，膠片放至玻璃染缸中，以 50% 甲醇洗三次，每次至少 10 min。
 - ◆ 經 CBR 染色過的膠片，若有些色帶無法出現，可在脫色完畢後，接到此一步驟進行硝酸銀染色，以利進一步觀察。
- (3) 倒去甲醇，用水洗三次，每次 10 min。
- (4) 加入還原液甲，反應 1 h。

- (5) 倒去還原液甲，用水洗 3~5 次，每次 10 min。
- (6) 加入硝酸銀溶液，反應 10 min。
- (7) 倒去硝酸銀液，用水洗 3~5 次，每次 10 min。
- (8) 加入還原液乙，開始呈色，在背景顏色未加深前倒去還原液乙。
- (9) 用水洗過膠片後，馬上加入反應中止液，約 1 h 後，可進行膠片乾燥。
- (10) 若染色後背景顏色過深，可以利用硫代硫酸鈉溶液或者定影液洗過夜，則可重新染色。

3.5.3 醣蛋白質染色法 (過碘酸-硝酸銀法)：

硝酸銀染色是一種靈敏度極高的蛋白質染色法，而且也可以用來染蛋白質分子上的醣類。醣類的雙醇基 (diol) 可用過碘酸氧化為醛基 (-CHO)，因而可與銀銨錯離子結合；此染色法可以檢定蛋白質是否為醣蛋白，靈敏度比 Schiff 法高。但由於蛋白質本身也會呈色，因此在染色過程中，必須在同一片膠體上加有 positive control (使用 glycoprotein, IgG) 與 negative control (如 BSA)，在 negative control 尚未呈色前，所染得的色帶才是醣蛋白。

儀器及試劑：

儀器及硝酸銀等試劑同上節，另需下列各藥品：

固定液 A：

10% 醋酸 (Wako) 及 25% 異丙醇 (Merck) 的混合溶液。

固定液 B：

7.5% 醋酸 (Wako) 溶液。

過碘酸溶液：

Periodic acid	(Sigma P-7875)	0.2	g
用二次水定量至 100 mL。			

還原液乙：

Citric acid (0.5%)	(Wako)	1	mL
甲醛	(Wako)	0.1	mL
甲醇	(Wako)	15	mL
用二次水定量至 100 mL。			

方法：

- (1) 先將染缸表面做矽化處理，目的是防止硝酸銀液反應後，膠片黏在缸上，容易造成取出時膠片破裂。
- (2) 電泳後，膠片放至玻璃缸中，以固定液 A 固定過夜。
- (3) 隔日改以固定液 B 浸泡 30 min。
- (4) 倒去固定液 B，加入過碘酸溶液於 4°C 反應 1 h。

- (5) 倒去過碘酸溶液，用水洗 3~5 次，整個過程共 3 h。
- (6) 加入硝酸銀溶液，反應 10 min。
- (7) 倒去硝酸銀液，用水洗 3~5 次，每次 10 min。
- (8) 加入還原液乙開始呈色，觀察 negative control 的蛋白質是否呈色，在其未呈色前倒去還原液乙。
- (9) 用水洗過膠片後，馬上加入反應中止液，約 1 h 後，可進行膠片乾燥。
- (10) 若染色後背景顏色過深，可以利用硫代硫酸鈉溶液或者定影液洗過夜，則可重新染色。

3.5.4 澱粉磷解酶活性染色法：

原態電泳後的膠片若浸入含有酵素基質的反應液中，則待酵素反應呈色後，可得知酵素泳動率以及其活性強弱；但酵素所生成的產物必須是水不溶性，才能在膠片中聚集呈色。澱粉磷解酶在含有 Glc-1-P 的環境下，可進行葡聚糖的延長反應，產生不可溶的直鏈澱粉，然後以碘液使澱粉染上紅棕至深紫色。此法偵測磷解酶的活性極為靈敏，但會受雜夾在樣本中 β -amylase 的干擾。

儀器：

平台震盪器、恆溫箱 (37°C)

試劑：

MES 緩衝液 (0.04 M, pH 5.9)：

MES (2[<i>N</i> -morpholino] ethanesulfonic acid) (Sigma M-8250)	1.56 g
---	--------

以 KOH 調整 pH 至 5.9 後，加水至 200 mL 置於 4°C 保存。

Glc-1-P (32 mM)：

Glucose-1-phosphate (Sigma G-6895)	0.98 g
------------------------------------	--------

加水至 100 mL，置於 4°C 保存，Glc-1-P 會因儲存過久而裂解出磷酸，使用期限為三週左右。

可溶性澱粉 (1.2%)：

可溶性澱粉 (Sigma S-2630 或 Nakalai 321-22)	1.2 g
---------------------------------------	-------

取 1.2 g 可溶性澱粉先以少量熱水溶解，再加水至 100 mL，置室溫儲存。使用前若有不溶物則再加熱溶解之，放冷後才能加入 Glc-1-P。

碘液呈色劑：

Iodine (Wako)	0.45 g
---------------	--------

KI (Nakalai 296-25)	2.83 g
---------------------	--------

加水至 200 mL。

方法：

- (1) 將原態電泳完畢的膠體置於基質液中，其中 MES : Glc-1-P : soluble starch = 2:1:1 (體積比)；基質液用量只要蓋過膠片即可。

- (2) 於 37°C 中反應適當的時間，1~2 μg 的 SP 在含有醣引子下，反應 2 h 可染出清楚色帶，不含醣引子則約需 18~24 h。
- (3) 反應完成後，可以看到白色的澱粉色帶出現。倒去基質液，以蒸餾水清洗膠片數次，加入碘液蓋過膠片以呈色，並且震盪使呈色均勻。
- (4) 此時可看見碘呈色色帶：含有澱粉引子的膠片，其背景顏色較深；可在蒸餾水中清洗，以洗去多餘的可溶性澱粉基質；若色帶因碘昇華而消失，可以再加入碘液重染一次。
- (5) 若樣本中含有澱粉酶 (如 β -amylase)，則在含澱粉的膠片上出現反白色帶，會影響澱粉酶的呈色。為了避免這種影響，在電泳完畢後，可將膠片先浸於 100 μM HgCl_2 溶液中 3~5 min 後洗去，以抑制澱粉酶的活性。

3.6 膠片乾燥法：

利用玻璃紙 (賽路芬 cellophane) 的半透膜特性，電泳膠片中的水分及甲醇在三明治組合中會滲透而蒸發，使得膠片被壓乾且壓平於兩張玻璃紙中，可以長久保存。膠片乾燥後亦可做同位素放射顯像，或者色帶濃度掃描。

用具：

玻璃板、玻璃紙、文書夾

方法：

- (1) 在玻璃板上鋪平第一張溼潤的玻璃紙，玻璃紙的四邊要略大於玻璃板，四邊折下，避免玻璃紙與玻璃板中有任何的氣泡產生。
- (2) 將染色完畢之膠片置於上述步驟之玻璃紙上。
- (3) 將另外一張玻璃紙浸溼，小心鋪蓋於膠片上，避免任何氣泡產生，玻璃紙的四邊要略大於玻璃板約 1~2 cm，將第二層的玻璃紙四邊反摺到玻璃板背面。
- (4) 以文書夾夾住四角，置於室溫或 37°C 烘箱中乾燥。
- (5) 檢查膠片是否完全乾燥，可以利用指甲在膠片上輕敲，乾燥完全的膠片不會留下任何指甲痕跡；可將膠片剪下，以護貝膠膜護貝後保存。

4 蛋白質電泳轉印及相關應用：

蛋白質電泳膠片經轉印於轉印膜表面後，可以進行免疫染色法、蛋白質 N-端序及酵素活性染色等。轉印膜 PVDF (polyvinylidene difluoride) 是一種疏水性材質，蛋白質可藉由本身的疏水性部分與其結合。

4.1 蛋白質電泳轉印法：

儀器：

電泳轉印槽 (Hoefer TE22)
轉印紙 (Millipore Immobilon, PVDF)、濾紙 (Whatman 3 mm)
電源供應器

試劑：

轉印緩衝液 (blotting buffer) 10×：

Tris	(Sigma T-1530)	30.3	g
Glycine	(Sigma G-7126)	144	g

加水至 800 mL，pH 調至 8.3 後，加水至 1,000 mL。原態膠體 (native-PAGE) 的轉印緩衝液稀釋十倍後直接使用；SDS-PAGE 轉印時，則轉印緩衝液中含有 10% (v/v) 甲醇。

標準蛋白質組合：

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

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

方法：

(1) 將所要轉印之 SDS-PAGE 或 native-PAGE 膠片浸於轉印緩衝液 (1×) 中，平衡 20~30 min。通常 SDS-PAGE 中的蛋白質分子量較小，因此要加入 10% 的甲醇於轉印緩衝液中，以避免小分子蛋白質過度擴散或穿過轉印膜。

- (2) 轉印膜 PVDF 切割成比膠片稍大，因膠片平衡後體積會略漲。PVDF 為疏水性，必須先以 100% 甲醇短暫溼潤後，再浸入轉印緩衝液 (1×) 中備用。
- (3) 取兩張稍大的濾紙，於轉印緩衝液中浸潤備用。取出轉印卡夾，先墊一張多孔性海綿，鋪上一張濾紙，再小心鋪上膠片，勿陷入任何氣泡，鋪上轉印膜，再蓋上一層濾紙及海綿，再把整個膠片卡夾裝好。
- (4) 置入已裝有轉印緩衝液 (1×) 的轉印槽中，注意 PVDF 那面朝正極，膠片面朝負極。除去卡夾外面的氣泡，氣泡的存在將使轉印效率變差。
- (5) 以 400 mA 進行轉印，於 4°C 中轉印 60 min 後中止。取出轉印膜，浸在尿素洗液中洗 1 h 以上；尿素可洗去 SDS-PAGE 樣本蛋白質分子上的 SDS，同時可以將蛋白質分子部分恢復原態，以增加抗體確認機率。
- (6) 在電泳過程中若有 pre-stained 的標準蛋白質，可作為轉印效率的參考。

4.2 酵素免疫染色：

電泳後把蛋白質轉印至 PVDF 轉印膜上，利用專一性抗體對膜上的蛋白質抗原做專一性結合，再用二次抗體對上述抗體進行專一性的結合；而因二次抗體上連結有呈色用的標誌酵素 (多用 horse radish peroxidase, HRP 或 alkaline phosphatase, AP)，可呈色而得以偵測。二次抗體上也可連結 biotin，再藉由 streptavidin 架橋與 biotinylated alkaline phosphatase 結合，一個 avidin 可與四個 biotin 結合；這種免疫染色步驟可達放射性顯像的靈敏度，且其專一性也可增強。

儀器：

平台震盪器、塑膠染色盤

試劑：

明膠-NET：

Gelatin	0.25%	(Merck 4070)	2.5 g
NaCl	0.15 M	(Merck 6404)	8.75 g
EDTA·2Na	5 mM	(Merck 8418)	1.8 g
Tween 20	0.05%	(Merck 822184)	0.5 mL
Tris	50 mM	(Sigma T-1530)	6.05 g

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

PBS (phosphate buffer saline) 5×：

NaCl	0.13 M×5	(Merck 6404)	38 g
NaH ₂ PO ₄	0.01 M×5	(Wako)	7.8 g

加水 800 mL 溶解，用 NaOH 調成 pH 7.0，加水至 1,000 mL，成為 5×PBS。

PBST (phosphate buffer saline & Tween) :

PBS 5× 稀釋至 1× 並加入 0.05% (v/v) Tween 20，即成為 PBST。

Urea-PBST :

Urea	6 M	(Sigma U-1250)	36	g
------	-----	----------------	----	---

加入 PBST 加熱溶解後，以 PBST 定量至 100 mL。

一次抗體：

通常要免疫大白兔或小白鼠自行製備一次抗體，一般抗體的使用濃度在 1:1,000 至 1:5,000 之間，視抗體效價而定，使用前以上述明膠-NET 稀釋之。抗體的製備方法，請參見 B2 酵素分析方法 6 免疫學工具的利用。

二次抗體連結體：

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

- ◆ 注意二次抗體的種類很多，差別在其純度有高低，以及所對抗的一次抗體種類不同 (如抗 IgG, IgM, IgA 或全部)，或抗體的部位 (如抗整個抗體分子，或者只有 Fc 或 Fab 片段)，同時連結物的種類也很多；請小心以免購買不適用的二次抗體。

AP 緩衝液 (alkaline phosphatase buffer) 5× :

Tris	100 mM×5	(Sigma T-1530)	6.05	g
NaCl	100 mM×5	(Merck 6404)	2.92	g
MgCl ₂	10 mM×5	(Sigma M-8266)	0.475	g

加入水至 80 mL 後，以 NaOH 調至 pH 9.5 後，加水定量至 100 mL。使用前要稀釋成 1× 濃度。

A+B 試劑：

A Reagent, streptavidin	(Vectastain)	10	μL
B Reagent, biotinylated alkaline phosphatase (Vectastain)		10	μL

加入 15 mL NET 稀釋 1,500 倍，混合均勻後，室溫下先放置 30 min 後使用。

NBT 試劑：

Nitro blue tetrazolium	(Sigma N-6876)	0.5	g
------------------------	----------------	-----	---

溶於 70% DMF (dimethylformamide) 10 mL。

BCIP 試劑：

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate	(Sigma B-0274)	0.5	g
--------------------------------------	----------------	-----	---

溶於 100% DMF 10 mL。

AP 呈色劑 (BCIP + NBT)：

BCIP 試劑	33	μL
NBT 試劑	66	μL

呈色前新鮮配置，溶於 10 mL (1×) AP 緩衝液中。

◆ 注意若是使用 HRP 為標誌酵素，則需使用不同的呈色劑：

HRP 呈色劑 DAB：

Diaminobenzidine (DAB)	(Sigma D-5637)	5	mg
H ₂ O ₂	30% (Merck 7210)	10	μL

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

方法：

- (1) 尿素洗過的轉印紙再以 PBST 洗三次，每次 10 min。
- (2) 加入一次抗體 (適當濃度溶於明膠-NET 中)，室溫下反應 1 h。
◆ 一般抗體的使用濃度是在 1:1,000 至 1:5,000 之間，視抗體效價而定。
- (3) 以 PBST 洗 3 次，每次 10 min。
- (4) 加入二次抗體 (biotinylated 2nd Ab)，室溫下反應 1 h。二次抗體同樣也溶在明膠-NET 中，使用濃度請參考廠商說明書指定濃度。
- (5) 以 PBST 洗 3 次，每次 10 min。
- (6) 加入預先混合 30 min 之 A+B 試劑，反應 1 h。
- (7) 以 PBST 洗 2 次，每次 10 min。
- (8) 以 AP 緩衝液洗 2 次，每次 10 min。
- (9) 加入 AP 呈色劑呈色，可在 5~30 min 內得到紫黑色色帶，若天冷可置於 37°C 烘箱增快反應；在背景顏色尚未變深前，倒去呈色劑，以蒸餾水清洗數次。
- (10) 將呈色完成的 PVDF 膜，浸入 100% 甲醇 1 min，可避免呈色基質殘留，而造成 PVDF 背景顏色加深的困擾。
- (11) 免疫染色結果的好壞，取決於每次清洗步驟是否完全且徹底；過於隨便的清洗步驟會造成染色結果不良。

若使用 HRP 為標誌酵素並使用 DAB 呈色劑：

- 與前面 (1)~(5) 的步驟相同，但步驟 (4) 中的二次抗體使用 HRP 的連結體。
- (6) 再以 PBS 洗過 2 次後，倒入 HRP 呈色劑 DAB，褐色色帶開始出現。
 - (7) 呈色約在 10 min 內完成，應當在背景開始加深前中止呈色。
 - (8) 倒去呈色液，並以蒸餾水清洗數次，取出晾乾後避光保存。

若使用 HRP 為標誌酵素並以化學螢光呈色：

- 與前面 (1)~(5) 的步驟相同，但步驟 (4) 中的二次抗體使用 HRP 的連結體。
- (6) 再以 PBS 洗過 2 次後，倒入化學冷光呈色劑，並立即在掃描器照相。
◆ 化學冷光呈色劑有很多種廠牌與形式，請依照廠商的指示操作。

- ◆ 每種掃描器都有其特定的使用範圍與操作方法，請熟悉後再行使用。
- ◆ 化學冷光呈色法的靈敏度極高，可達 DAB 的十倍以上。

4.3 蛋白質 N-端序列決定法：

蛋白質 N-端定序的檢定採用 Edman degradation 方法，利用蛋白質自動定序儀進行胺基酸的序列分析；整個實驗系統避免使用具有胺基的物質。

儀器及試劑：

轉印用具及試劑如上節，但轉印緩衝液須避免使用含有胺基的 Tris 及 glycine。

轉印緩衝液 (blotting buffer) 1×：

CAPS	10 mM	(Sigma C-2632)	2.22 g
------	-------	----------------	--------

加水 600 mL 溶之，調整 pH 至 11 後，加甲醇 100 mL，再加水至 1,000 mL 攪拌均勻；最後含 10% 甲醇，可視需要調至 20%。

(CAPS = 2-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid)

方法：

- (1) 轉印的方法與步驟如上所述，單一色帶的蛋白質含量最好有 0.1 mg 以上。
- (2) 取出轉印膜，以五分之一濃度的 Coomassie Brilliant Blue R-250 染液短暫染 1 min，或等到色帶剛出現之時，即以 50% 甲醇脫去背景顏色；若蛋白質濃度低，脫色時間需較久；若背景顏色太深，可用 100% 甲醇脫色。染色脫色後，將轉印膜放入二次水中清洗，再放入烘箱中乾燥。
- (3) 將轉印膜上的目標蛋白質色帶切下，以封口袋保存，送往儀器中心定序，所使用的儀器通常為 Applied Biosystems 的 Model 473 A。
- (4) 也可以把切下的轉印膜放入水解管中，加入 0.6 mL 水解液 (HCl : TFA = 4 : 1)，抽真空封口後在 140°C 水解 3 h，水解液可進行胺基酸成分分析。

