

第二單元：分析蛋白質常用技術 Protein Analysis

- 2.1 蛋白質的組成與多樣性 Protein composition and diversity
- 2.2 純化蛋白質常用技術-1: 樣品來源與初步分離 Protein sources and crude separation
- 2.3 純化蛋白質常用技術-2: 管柱層析 Column chromatography
- 2.4 純化蛋白質常用技術-3: 蛋白質電泳 Gel electrophoresis
- 2.5 純化蛋白質常用技術-4: 蛋白質體學 Proteomics
- 2.6 純化蛋白質常用技術-5: 蛋白質定序 Protein sequencing

學習目標：

1. 熟悉純化蛋白質常用的技術及原理。
2. 瞭解各種技術使用的時機及限制。
 - (a) 分析用: 了解樣品中組成成分特性，如分子量、電性等，僅需少量樣品就夠。
 - (b) 製備用: 分離後的成分須個別收集，以便進行後續的實驗或分析，樣品量大。

天堂筆記：

1. Protein compositions:

- Soluble proteins vs Membrane proteins
- Monomeric proteins vs Multimeric protein
- Average molecular weight (M_r) of an amino acid: 110 dalton

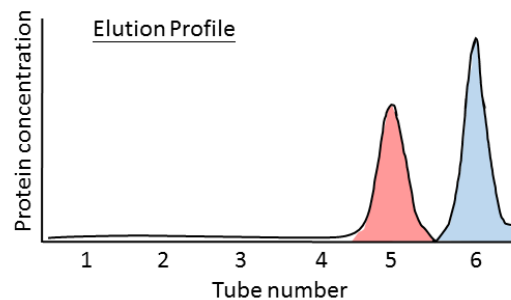
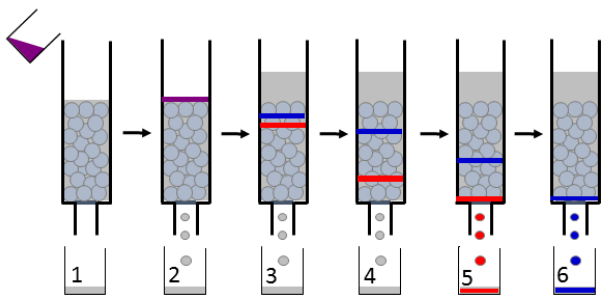
for 20 a.a.
average $M_r \sim 138$
the smaller a.a. predominate in most proteins
average M_r of an a.a. in a protein
= $110(128-18)$

Amino acid	M_r	percentage in proteins %
Gly	75	7.2
Ala	89	7.8
Val	117	6.6
Leu	133	9.1
Ile	133	5.3
Met	149	2.3
Phe	165	3.9
Tyr	181	3.2
Trp	204	1.4
Ser	105	6.8
Pro	115	5.2
Thr	119	5.9
Cys	121	1.9
Asp	133	4.3
Gln	146	4.2
Asn	146	5.9
His	155	2.3
Arg	174	5.1
Lys	183	5.3

2. Techniques often used in protein purification

- Salting out 鹽析 (ammonium sulphate precipitation, $(NH_4)_2SO_4$ 硫酸銨鹽沉澱)
 - ✓ 溶液中鹽的濃度增加，使蛋白質溶解度下降而沉澱析出。
- Dialysis 透析
 - ✓ 透析膜兩邊分子的濃度梯度差，使小分子由高濃度處穿過透析膜往低濃度處擴散。
- Column chromatography 管柱層析 (preparative or analytical use)
 - ◇ Stationary phase (固定相: 指管柱內填充的基質、珠珠等)
 - ◇ Mobile phase (流動相: 指液態的樣品、緩衝溶液)

由于蛋白质大小，带电性和亲和力的不同



◇ Ion exchange (離子交換) chromatography (示意動畫)

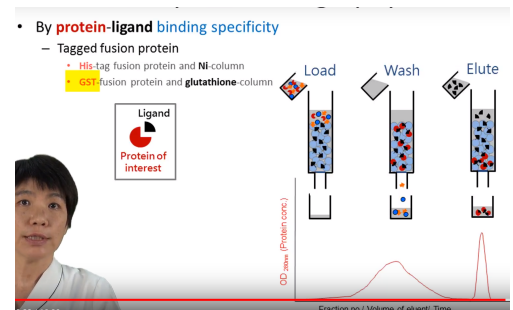
- Anion exchanger 陰離子交換樹脂
- Cation exchanger 陽離子交換樹脂

Q: 那么如何将结合在柱上的蛋白质洗脱下来呢? a. 改变缓冲溶液PH, 让蛋白质带电量改变。 b. 增加NaCl的浓度, 即提高溶液中阴阳离子的浓度, 和柱竞争与蛋白质的结合, 达到洗脱作用

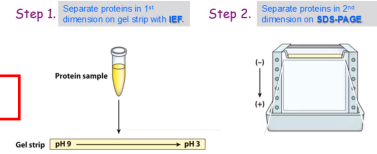
◇ Gel filtration 膠體過濾 (size exclusion, or molecular sieve) chromatography

◇ Affinity (親和力) chromatography

His tag 和二价阳离子结合 Ni column
GST-fusion 和 glutathione-column



- Gel electrophoresis 膠體電泳 (analytical use)
 - ◇ SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
 - SDS: negatively charged detergent that denatures protein
 - Separate proteins according to their molecular weight
 - ◇ IEF (isoelectric focusing 等電聚焦電泳)
 - Separate proteins according to their pI
 - ◇ 2-dimension electrophoresis, 2D electrophoresis (二維電泳)
 - First dimension : IEF
 - Second dimension : SDS-PAGE
- Functional assay:
 - ◇ Activity (unit, e.g. mole/min)
 - ◇ Specific Activity 比活性 (unit/mg; e.g. mole/min/mg)



3. Proteomics

- Proteome 蛋白質體: Proteomics 蛋白質體學
- Genome 基因體: Genomics 基因體學

4. Primary structure (一級結構): amino acid sequence 胺基酸序列(covalent structure)

- Protein sequencing 蛋白質定序:
 - Determined by Edman degradation:
 - Acid hydrolysis
 - N-terminal labeling
 - N-terminal labeling and removal :
 - ✓ Reagent for N-terminal labeling free α -amino group of a peptide:
 - Sanger reagent (1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, FDNB)
 - Edman reagent (phenylisothiocyanate, PITC)
 - ✓ Protease or chemical cleavage sites:

Treatment	Cleavage points
Trypsin	Lys, Arg (C)
Chymotrypsin	Phe, Trp, Tyr (C)
Pepsin	Phe, Trp, Tyr (N)
Cyanogen bromide (CNBr)	Met (C)
 - Determined by Mass spectrometry (質譜儀)
 - Deduced from DNA sequence

魔咒關鍵詞：

Salting out

Dialysis

Column chromatography

Gel filtration (size exclusion, or molecular sieve) chromatography

Ion exchange chromatography

Anion exchanger vs Cation exchanger

Affinity chromatography

Electrophoresis:

SDS-PAGE vs Isoelectric focusing (IEF)

2D electrophoresis

Proteome; Proteomic

Protein sequencing

Edman degradation

魔法參考書目:

1. 台大莊榮輝教授教學網頁: <http://juang.bst.ntu.edu.tw/BCbasics/index.htm>
2. Lehninger Principles of Biochemistry (2013), 6th ed, David L. Nelson, and Michael M. Cox, Freeman and Company, New York.
3. Principles of Biochemistry (2013) 4th ed. Voet, Voet, and Pratt. Wiley.
4. Biochemistry, a short course. (2015) John L. Tymoczko, Jeremy M. Berg, Lubert Stryer (3rd ed) W.H. Freeman & Company.

魔法練習題:

1. 鹽析-在蛋白質溶液中加入硫酸銨鹽，為什麼會使有些蛋白質沉澱?
2. 透析-是利用透析膜內外甚麼差異? 使得透析膜內樣品中的鹽濃度下降。
3. 膠體過濾管柱層析(gel filtration, or size exclusion, or molecular sieve)可以依照蛋白質的何種特性將它們分離?
4. 離子交換(ion exchange)管柱層析可以依照蛋白質的何種特性將它們分離?
5. SDS-PAGE 電泳依照蛋白質的何種特性將它們在膠體上分離? 在生物化學實驗室中可以有哪些應用?
6. 等電聚焦(IEF)電泳依照蛋白質的何種特性將它們在膠體上分離?
7. 「蛋白質體 Proteome」的定義是甚麼?
8. 純化蛋白質時，鹽析過後的樣品中含有下列蛋白質:

Protein	Molecular mass (M_r)	pI
A.	42,000	4.8
B.	66,500	4.7
C.	16,700	7.0
D.	34,500	1.0
E.	120,000	11.0

- 1) 如果使用膠體過濾管柱層析，各蛋白質流出管柱的順序為何?
- 2) 如果使用離子交換管柱層析，在 pH=7 的緩衝溶液中將樣品加入含有陽離子交換樹脂之管柱，哪些蛋白質會與陽離子交換樹脂結合而留在管柱內?
- 3) 如果這些蛋白質都是由一條肽鏈組成的，以 SDS-PAGE 電泳分析時，出現在膠片由上而下的順序為何?