

Protein 定量

簡介:

一般常用的蛋白質定量分析方法，是利用試劑與蛋白質作用並產生顏色變化，其變化程度與蛋白質濃度有線性相關，所以可利用分光光度計測量特定波長下的吸光值 (OD)，即可推測蛋白質的濃度。

材料:

dd H₂O

albumin, bovine serum, fraction V, Approx.99%(SIGMA)

Bio-Rad protein assay(Bio-Rad)

方法:

配製標準品Prepare standard-(採用連續稀釋的方式)

BSA(ug/ul)	2000	1000	500	250	125	0
2mg/ul BSA (Unit: λ)	10	10	10	10	10	0
ddH ₂ O(Unit: λ)	0	10	10	10	10	10

→配製 2mg/ul 的 BSA

→及 Bio-Rad protein assay reagent (以 1 原液 dye:4 ddH₂O 新鮮配製)

→取 200 λ 稀釋過後的 dye 放入 96-well plate

→再取 5 λ 標準品&樣品放入 96-well plate

→使用 ELISA reader 震盪

→等待 5 min(避光)

→測 OD₅₉₅ (Use excel 算出線性和多項式的結果.serum 正常範圍為 69-89ug/ul)

注意事項:

- 血清或血漿樣品稀釋 200 倍的方法如下:

先標示微量離心管，分為 2 管，第一管先加 10 λ ddH₂O，第二管加 990 λ ddH₂O；

然後第一管再加 10 λ 樣品，用 pipetman 混合後取 10 λ 進第二管，第一管再補 990 λ ddH₂O

- BSA 配法如下:

1g/10ml BSA(即 100mg/ul),分裝 1ml/管分裝 100 λ /管，儲存在-20°C，要用時取 10 λ +490 λ ddH₂O (即 dilu 成 2mg/ul)，用過後寫上日期，存放 4°C，超過 10 天即可丟棄

- BSA 取出時，在 37°C 快速解凍(約 30 秒)，取完再放在冰上(4°C)

- 每次操作後將標準品 Curve 存檔，每次都拿出來比較，即可看出 BSA 有無失去活性或污染等

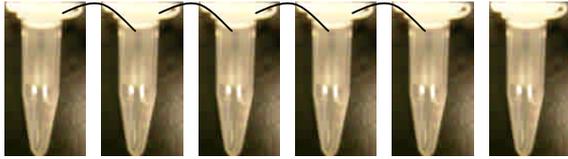
- 注意 pipetman 使用方法.直進直出.深入不超過 2mm

- 96-well plate 的清洗如下:

使用 75%酒精噴灑於 96-well plate 至無顏色殘留，然後用 R.O 清洗,再至烘箱烘乾

圖解:

圖一、standard 連續稀釋法



2000 1000 500 250 125 0 (ug/ml)

步驟:

- 第 2~第 6 管每管先加 ddH₂O 10ul
- 再從 mix 均勻的第 1 管(stock)取 10ul 加入第 2 管
- 第 2 管 mix 均勻後再取 10ul 加入第 3 管
- 以此類推到第 5 管
- 要使用時在每管取 5ul 加入 dye 中

圖二、pipetman 使用方法



←直進直出.tip 深入不超過 2mm.不碰觸管壁

2-D Electrophoresis

1D 部分

一.細胞株(cell line)

→樣品(sample)定量

【傳統作法】

→假設需 100ug 蛋白質樣品，則取 400ug +10% TCA/Acetone(1:9)於微量離心管(400→100ug，損失 75%)

→置於-20°C、至少 45min

→離心(4°C、13500rpm、20min)

→用 pipetman 吸出上清液

→加 1ml acetone(內含 3.1mg DTT)用 pipetman 混合並盡量打散細胞，離心(4°C、13500rpm、5min)

後用 pipetman 吸出上清液,總共 3 次、以洗去殘餘的 TCA

→使用 EYELA 凍結乾燥機 (FDU-1200) ，-50°C、7min，使蛋白質沉澱物乾燥

→加 270ul rehydration buffer(pH3-10 or 4-7)

→置於超音波震盪機內(power sonic 405，Core lab.內) 30min(操作過程保持低溫)、使蛋白質沉澱物回溶，存放 4°C，overnight(16 小時)

→離心(13500rpm、120min)

→取 250ul 進 strip holder(13 cm)，放入 strip(pH3-10 or 4-7)，去除氣泡後加 cover fluid 0.6ml，蓋上上蓋 (18 cm 為 275 λ、load cover fluid 0.8ml)

【Clean up kit (GE)處理】

→樣品>100ul or >100ug 時，可用以下方法，若<100ul or <100ug 請參考原廠資料

→先將 KIT 內附的 wash buffer 放再-20°C 至少一小時

→樣品(~2X10⁶cells) 加 lysis buffer(PRO-PREP) 400ul 定量後約可得 1.5ug/ul(total 約 400~600ug)

→若 1.5ug/ul 取 200ul 至 1.5ml 微量離心管(Eppendorf) (定量後會損失 35%，所以 300ug 定量後約剩 100ug)

→加 3 倍 precipitant 即 600ul 至 1.5ml 微量離心管

→放在冰上等待 15 分鐘

→再加 3 倍 co- precipitant 即 600ul 至 1.5ml 微量離心管

→Vortex 混合均勻後離心 8000g, 10 分

→快速移除上清液

→再離心 8000g, 1 分，盡量吸乾上清液

→再加 3-4 倍沉澱物大小的 co- precipitant

→離心 8000g, 5 分，移除上清液

→加二次水蓋過沉澱物，用 pipette 打散沉澱物並且 vortex 10 秒

→加 1ml wash buffer 及 5ul wash additive

→將微量離心管置於-20°C 冰箱 30 分，且每 10 分鐘拿出來 vortex 30 秒

→離心 8000g, 10 分

→移除上清液，打開上蓋自然風乾 5 分，避免太乾

→加 rehydration buffer (不加 Bromophenol blue，怕影響定量背景值)100ul 回溶

- 再定量一次確定有 100ug protein,並補 rehydration buffer 至 250ul
- 取 250ul 進 strip holder(13 cm)，放入 strip(pH3-10 or 4-7)，去除氣泡後加 cover fluid 0.6ml，蓋上上蓋 (18 cm 為 275 λ 、load cover fluid 0.8ml)
- IEF 條件:(會隨樣品條件而調整) rehydration 20 $^{\circ}$ c 1hr

Serum	Step1	Step2	Step3	Step4	Step5	Step6
Or	30v	500v	1000v	4000v	6000v	8000v
plasma	12hr	1hr	1:20hr	0.5hr	0.5hr	32000vhr
Cell	Step1	Step2	Step3(Grd)	Step4(Grd)	Step5	Step6
Line	30v	500v	1000v	8000v	8000v	30v
	12hr	1hr	1hr	3hr	24000vhr	5hr

◎ 若不馬上做 2D，可直接將 Strip 密封後冰在-20 $^{\circ}$ c 暫存 1 個禮拜

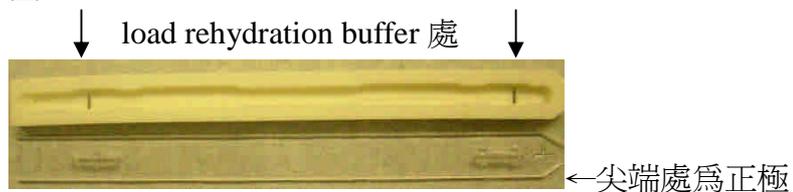
二.血清(serum) or 血漿(plasma)

- 樣品(sample)定量，假設需 210 μ g 蛋白質樣品
- 樣品離心(14000rpm、1min)後取 3 μ l(假設濃度為 70 μ g/ μ l) +267 μ l RehydrationBuffer(R.B)，總共 270 μ l 混和均勻
- 取 250 λ 進 strip holder(13 cm)，放入 strip(pH3-10 or 4-7)，去除氣泡，load cover fluid 0.6ml (18 cm 為 275 λ 、load cover fluid 0.8ml)

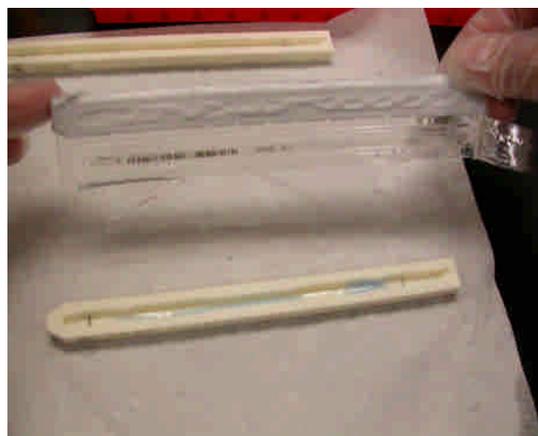
Rehydration buffer	Final conc.	amount
Urea(FW60.6)	8M	12g
CHAPS	2%	0.5g
DTT(使用前在加)	100mM(40mM)	6.2mg/ml(2.8)
IPG buffer	0.5%	125 μ l
Bromophenol blue	0.002%	25 μ l
DD H ₂ O		To 25ml

圖解:

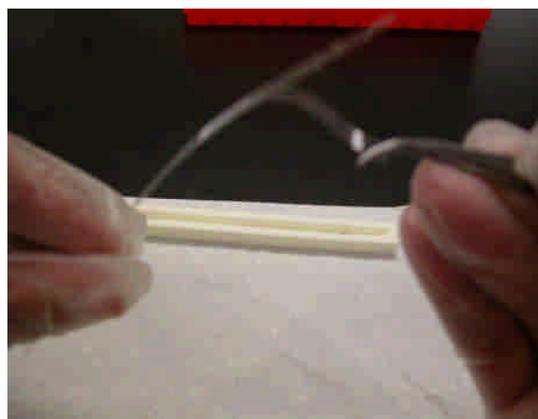
圖三、Holder



← 在 loading rehydration buffer 時.應避免氣泡的產生



← 從-20°C 取出 strip.10 分鐘內使用為佳



← 撕開底層膠面.不可用手碰觸膠面



←將 strip 小心放入 holder.避免氣泡產生.並使 rehydration buffer 均勻附上 strip



←完成圖



←取 0.6ml cover fluid 均勻 load 在 strip 上方.
避免 rehydration buffer 揮發形成結晶



←注意正負極.蓋上蓋子



←用 kimwipes 將溢出的 oil 擦拭乾淨

圖四、IEF



←垂直放入 IEF



←尖端為正極.朝上方放置

2D 部分

簡介:

SDS-PAGE 是目前常用於分析蛋白質的工具，其具有操作簡單與高解析度的優點。因為 SDS-PAGE 是屬於 denature gel，所以我們可以利用其特性，將蛋白質複體中各種不同的蛋白質分離。

二維電泳可以藉由蛋白質的等電點與分子量差異將蛋白質分離；二維電泳具有高的解析度，一片電泳片可同時觀察數百個點是其優點，所以二維電泳常被應用於分析細胞內蛋白質層面的變化。目前我們可以結合二維電泳高解析度與質譜儀的靈敏度，達到快速鑑定電泳片上蛋白質的目的。

→注梯度膠片(用 isopropanol or 75%酒精壓線)

SDS-PAGE	10% (二片膠 80ml)	12%
DD H ₂ O	38ml (如用 30% Acrylamide/Bis,取 32.1ml)	26.8
40%Acrylamide/Bis	20ml (30%取 26.6ml)	32
Tris(1.5M pH8.8)	20ml	20
10%SDS	0.8ml	0.8
10%APS	0.4ml	0.4
TEMED	26.4ul	40

SDS Equilibration buffer	Final conc.	amount	備註
Tris-Cl , pH8.8(1.0M solution)	50mM	10.0ml	1.5M → 6.67ml
Urea (Fw60.06)	6M	72.07g	
Glycerol (87%v/v)	30%	69ml	99% → 60.6ml
SDS (FW288.38)	2%	4.0g	10%SDS → 40ml
Bromophenol blue	trace		
DD H ₂ O		To 200ml	

◎凝膠後，以 ddH₂O 將 SDS-PAGE rinse.再以塑膠 drop 滴入 running buffer 防乾燥

→將 IPG Strip 取出，使用 ddH₂O 沖洗表面

→放入 10ml SDS equilibration buffer +0.1g DTT(每個 strip 只需 7.5ml)

→Shaker 平衡 15min

→改裝至 10ml SDS equilibration buffer +0.25g IAA

→Shaker 平衡 15min

→取出 strip 放至 SDS-PAGE 上

→取 3 λ Marker(Fermentas 11-170KDa，儲存於-20^oc)於濾紙(Bio-Rad)上，然後置於 SDS-PAGE 上方

→加 0.5% Agarose sealing sol.、固定 Strip 與 SDS-PAGE 的位置(避免反覆加熱、分裝 1ml/管，儲存於 4℃)

→置於電泳槽，加入 1x running buffer

→電源供應器條件:(4°C)

◎如需 O/N.每片不超過 3mA

Step1	Step2
8mA/片	20mA/片
15min	5-6hr

0.5% Agarose sealing sol.	
SDS electrophoresis buffer (=1x running buffer)	100ml
Standard Agarose(LAMDA)	0.5g
Bromophenol blue	trace
◎避免 overheating	

10x running buffer	
tris	30g(0.025M)
Glycine	144g(0.192M)
SDS	10g(1%)
ddH ₂ O	to 1L

Bromophenol blue stock sol.(1%)	
Bromophenol blue	100mg(1%)
Tris-base	60mg(50mM)
DD H ₂ O	to 10ml

圖解:

圖五、配製 SDS-PAGE



←架膠台.用 DDH₂O test.確定不外漏方可使用



←配製 SDS-PAGE.使用 PIPETING AID or 20ml 針筒緩慢注入



←用酒精壓線並去除氣泡

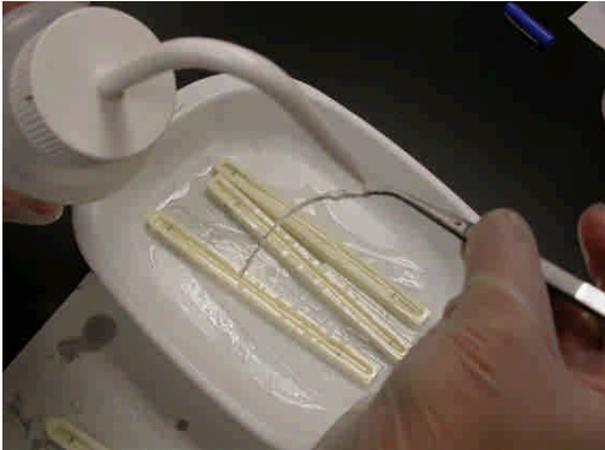
圖六、IEF→2D→銀染→掃描過程



←將跑完 IEF 的 holder 取出,表面先用 ddH₂O 沖洗



←用夾子小心取出



←再用 DDH₂O 沖洗一次



←用夾子夾到 10ml 的 costar stripette.兩端用 parafilm 封住

(管內加 SDS equilibration buffer)



←先將 SDS equilibration buffer 倒一點到 SDS-PAGE.再將 Strip 放入 SDS-PAGE.倒掉 SDS equilibration buffer 後.放入 Marker 紙片.最後加 Agarose(37°C)封住 strip 及紙片

銀染部份

簡介:

銀染在蛋白質電泳分析中是相當常用的染色方式，一般而言其靈敏度比 Coomassie Blue 染色高出約十至數百倍。

Step	sol. (250ml/2 片)	time
Fixation	ethanol 95%,105ml Acetic acid,25ml Make up to 250ml with ddH ₂ O	30min
Sensitizing	ethanol 95%,79ml Sodium thiosulfate(Na ₂ S ₂ O ₃)(1M→3.16ml) Sodium acetate,17g Make up to 250ml with ddH ₂ O	30min
Washing	ddH ₂ O	3x5min
Silver reaction	silver nitrate,0.625g Formaldehyde 37%,0.1ml Make up to 250ml with ddH ₂ O	20min
Washing	ddH ₂ O	2x1min
Developin	sodium carbonate(Na ₂ CO ₃),6.25g Formaldehyde 37%,0.05ml Make up to 250ml with ddH ₂ O	4min
Stopping	EDTA,3.65g Make up to 250ml with ddH ₂ O	10min or o/n
Washing	ddH ₂ O	2x1min

→可使用 Hoefer processor plus™(Amersham)或使用染缸

- ◎ 在 run 的時候時間可調整
- ◎ step 及吸取或排出的量也可自行調整

→scanning(Amersham)

→使用 Image Master5.0 or 6.0(Amersham)比對分析

簡介:

當完成二維電泳後，最重要的工作是找出有差異的蛋白質點，當電泳片上蛋白質的數目太多時，如果只是用肉眼判斷是無法達到準確定量的目的，因此市面上已發展出數種影像分析軟體，本實驗採用 Image Master™ 2D Platinum Software(version 5.0 or6.0)比對軟體。

圖解：
圖六、

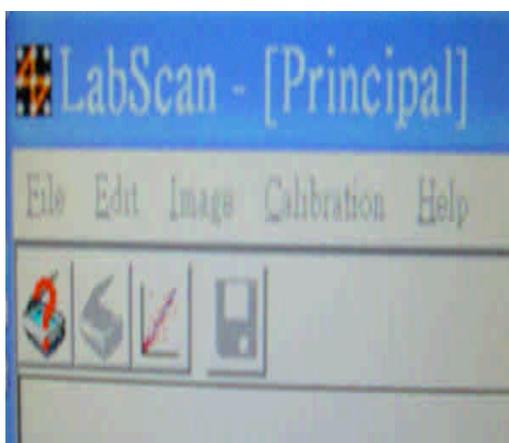


←跑完 SDS-PAGE 後將 gel 放入此自動銀染的機器(也可用染缸)

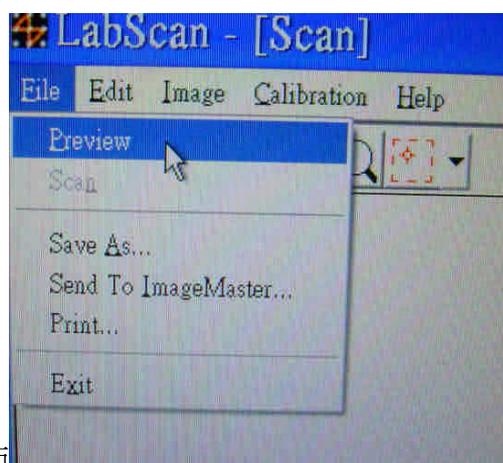


←銀染完將 SDS-PAGE scan

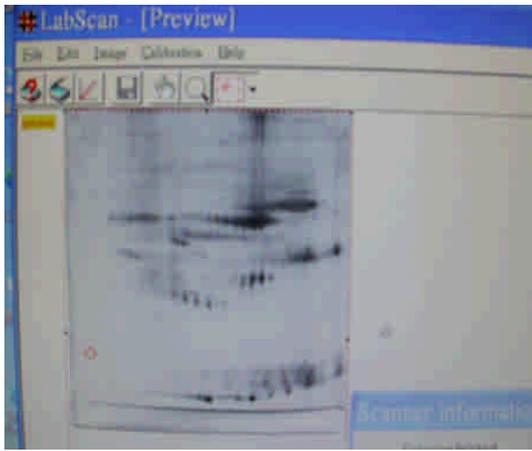
圖七、scan 簡易流程



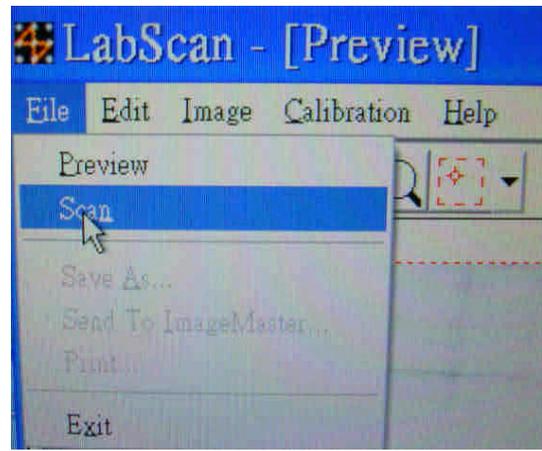
←進入軟體的主畫面



步驟 2



步驟 3



步驟 4

In-gel digestion

簡介：

位於電泳片(SDS-PAGE)中的蛋白質並無法直接利用質譜分析，其主要原因有二：1.完整的蛋白質並不容易由電泳片中萃取出來，若是不經過初步的水解，由電泳片中萃取出來的蛋白質量會很少。2.質譜儀雖然可以提供蛋白質分子量的資訊，但因為蛋白質分子不管在細胞中或是在純化的過程中常會被修飾(modification)，所以只憑藉分子量並無法正確分析出是何種蛋白質，所以利用具序列專一性的蛋白酶進行水解反應，電泳片中的蛋白質經蛋白酶水解後，會有不同的蛋白質片段生成，所以經由質譜儀分析這些片段的組合，即可快速的鑑定出蛋白質的種類。

試劑配製 Reagent preparation:

1. 0.1gK₃Fe(CN)₆+0.16g Na₂S₂O₃/10ml ddH₂O
2. 50mM NH₄HCO₃→0.188g/45ml ddH₂O
3. 25mM NH₄HCO₃→ 20ml ddH₂O +20ml 50mM NH₄HCO₃(Ammonium bicarbonate , minimum99%)
4. 100% ACN
5. trypsin(20ng/ul)→加 0.1% TFA 1ml 回溶
6. 1% TFA
7. Matrix →1.5~1.8mg/ml+80%ACN+0.5~1%TFA(800ul 100%ACN+199ul Q H₂O+0.5ul 99.5%TFA /1ml)
8. 50mM NH₄HCO₃/100%ACN(3:2)

procedure	Coomassive blue	Silver stain	Ruby stain	Volume/time
Wash	ddH ₂ O			200ul/5minx3
Destain	50mM NH ₄ HCO ₃ / 100% ACN(3:2)	0.1gK ₃ Fe(CN) ₆ + 0.16g Na ₂ S ₂ O ₃ /10ml ddH ₂ O	25mM Na ₂ CO ₃ / 100% ACN(3:2)	200ul/15min
Wash	50mM NH ₄ HCO ₃ /100% ACN(3:2)			200ul/5minx3
Shrink	100% ACN			200ul/10min
Dry	Vacuum centrifuge			10min
Trypsin	Add trypsin on gel(20ng/ml)			3ul
	Wait on ice			60min
	Add 25mM NH ₄ HCO ₃ on gel			200ul/1min
	Deplete all sol. In epp			
	Add 25mM NH ₄ HCO ₃ on gel			3ul
Incubate	37°C overnight or 56°C 2hr			
Extraction	1% TFA/100% ACN Sonify Recover the supernatant(移至另一管) ◎(也可重覆此步驟並將上清液集中收集)			2ul 10min(4°C)
Mass spectrometric Peptide analysis	Peptide(使用 0.1%TFA 或 ddH ₂ O 稀釋 10 倍)及樣品各取 0.5ul 點於 anchor chip 600/384 風乾後再點 matrix 0.2ul(二重複)			

→Onto MALDI-TOF MS targets and measurement

→Mascot(NCBI or Swissprot、150-200ppm)

簡介:

近年來質譜儀對蛋白質化學(protein chemistry)而言，可以說是非常重要的工具(Mann *et al.*, 2001)。在此選用MALDI-TOF進行蛋白質分析，所謂基質輔助-雷射-脫附/離子化[MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization)]對質譜儀來說，可視為一種提供離子源(Ion source)的方式，其做法是將待分析之樣品(萃取液內含質量不同之多勝肽鏈片段)與基質(Matrix)做混合，最常用的基質是 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid或是DHB (dihydrobenzoic acid, 能帶來較高之靈敏度。將不同的混合液均勻點至金屬盤(Mass target plate)之樣品槽中，待溶劑揮發後混合物在金屬盤上產生結晶，再用選定波長的雷射光束，例如nitrogen lasers 打擊結晶，雷射光束脈衝(pulse)時間約是100 ns至500 ns，當雷射光束打擊到基質時，透過基質可將一些能量傳給大小不一的多勝肽鏈片段，藉此過程，質子化之多勝肽鏈片段就會氣化而從金屬片上脫附出來，質子化之多勝肽鏈片段經由電場加速(acceleration field = 30,000 V)便飛入TOF質譜儀(Time-of-flight mass spectrum)中做分析。

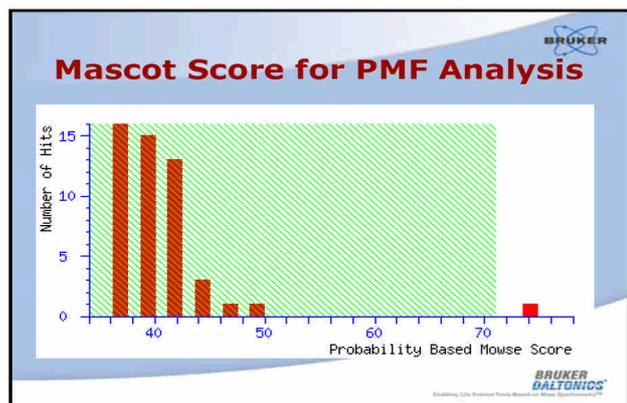
因為每一個不同的蛋白質可切割出不同質量的多勝肽鏈片段，所以不同的蛋白質就會有屬於自己的分析圖譜，與資料庫比對後可以分析出未知的蛋白質。

圖解:

圖八、in-gel digestion



圖九、Mascot score for PMF analysis



→落在綠色區塊外.表示有差異性.及格分數約為 51 分以上