

中華民國第 58 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 化學科

050206

近朱者赤，近墨者黑 - 水溶性（小）分子結合
誘導蛋白質（巨）分子疏水性下降

學校名稱：新北市私立康橋高級中學

作者： 高二 林孟澤 高二 陳子涵 高二 陳亮瑋	指導老師： 田代蕨 余承翰
---	-----------------------------

關鍵詞：疏水性作用力、蛋白質、小分子

摘要

以蛋白質的親水性和疏水性為基礎，以電泳來觀察結果。起初，我們試著找出最佳的蛋白質觀察濃度，發現使用的蛋白質本身已經具有雙硫鍵，利用蛋白質會附著在 PVDF(聚偏二氟乙烯)膜上的特性，我們嘗試去除可以打斷雙硫鍵的 DTT(二硫蘇糖醇)分子。利用 SDS(十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳)把蛋白質從 PVDF 上取下時，我們觀察到可以利用疏水性強度來競爭蛋白質的結合。我們轉向利用不同碳數來分類蛋白質，使蛋白質和含碳基質利用疏水性作用力保持在弱結合的狀態，此處我們用 4 碳和 8 碳漂珠來當代表，再利用水溶性小分子和特定蛋白質結合，結合後的小分子蛋白質共體和含碳基質的作用力下降，共體就會溶離釋出。此實驗對於尋找會和特定糖類結合的蛋白能有效的提供資訊。

壹、研究動機

癌症，究竟奪走了多少無辜的人民的生命？身邊的親友一個個離開了我們，但我們卻也束手無策。近年來，癌症是個令大眾產生著無限畏懼的疾病，能找出高機率治好癌症的方法也一直是現今醫學院及科學家所在追求的。根據台灣癌症登記報告，在 2014 年每 5 分鐘有 1 人罹癌症，而癌症也是台灣現今的第一大死因。

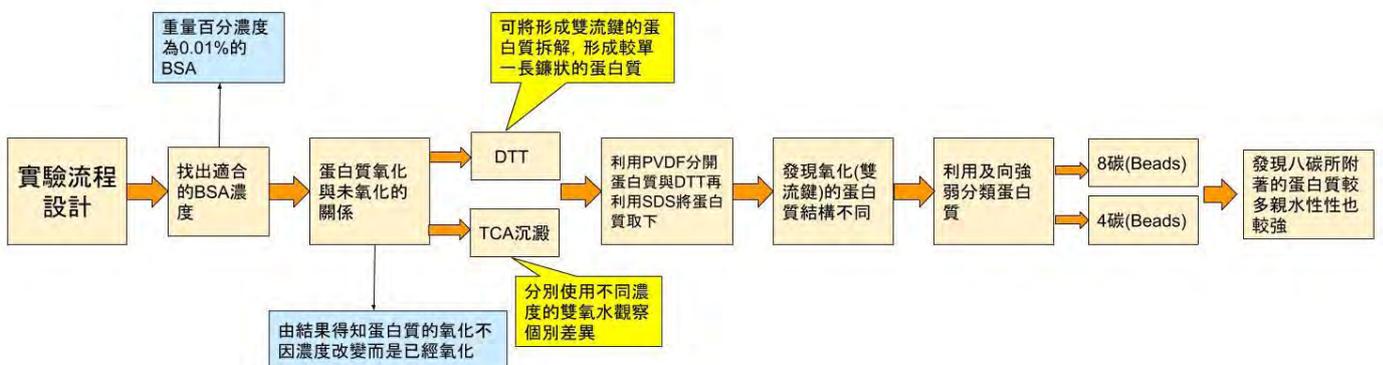
癌症是一種因蛋白質變異造成的疾病，透過現今的技術癌症雖仍無法百分之百根治，只能藉由化療及手術割除腫瘤兩種方法醫治，但是，一年一年的過去，藉著科技醫療的進步我們發現氧化效果與癌症的發生有關，之後，科學家漸漸開始發現可以利用化學分子極性及非極性這個特性去搶走蛋白質的部分分子從而破壞癌細胞上蛋白質分子，治癒癌症，因此我們想探討氧化、極性強弱與與蛋白質細胞的關係。

起初，我們是在中央研究院的資料庫閱讀到產生癌細胞原因的相關文章，當時覺得很好奇，產生了好奇心，並想知道原因，一探究竟找出極性強度與蛋白質結合強弱之間的關係，因此決定著手進行這個實驗，來探討是否極性的強弱會影響蛋白質的結合及分離，及觀察其反應的效果。

貳、研究目的

- 1、 找出 BSA(牛血清蛋白)適合跑電泳的濃度
- 2、 觀察氧化的蛋白質及未氧化的蛋白質跑電泳後的之差異
- 3、 比較與 DTT 結合及無結合的蛋白質電泳效果
- 4、 利用四碳漂珠觀察極性強度與蛋白質結合的效果
- 5、 觀察四碳漂珠及八碳漂珠與蛋白質的結合，探討極性強度與碳數多寡之間的關聯
- 6、 改良實驗，省略清洗漂珠的步驟，更清楚觀察八碳漂珠及四碳漂珠之極性的強弱與蛋白質結合之間有何關聯

參、實驗流程設計

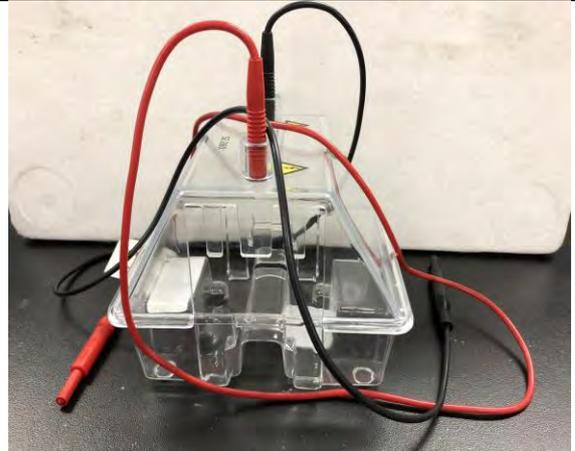


肆、研究藥品與器材

1、實驗儀器



(圖一)直流電源裝置



(圖二)電泳裝置



(圖三)膠台



(圖四)搖機台



(圖五)離心機



(圖六)管柱



(圖七)微量離心管



(圖八) 內濾式微量滴管



(圖九)內濾式微量滴管尖

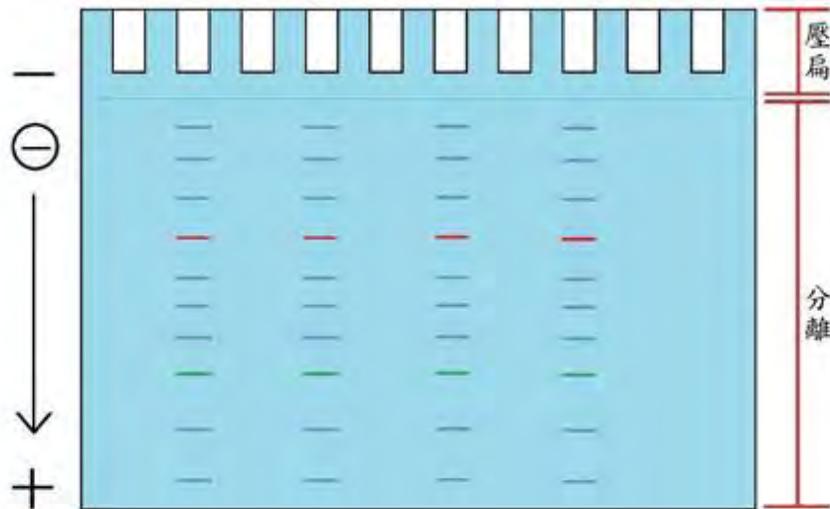


(圖十)塑膠盒

伍、研究過程與方法

1、SDS-PAGE 實驗步驟

- (1) 架設做膠台：將兩片玻璃四邊對齊，以免漏膠
- (2) 製作下膠
 1. 取 25% 丙烯酰胺 (AA) 4.5ml 加入 50ml 的無菌離心管
 2. 加入凝膠緩衝液 (Gel buffer 4x) 4.5ml
 3. 加入 30% 甘油 (Glycero) 4.5ml
 4. 加入四甲基乙二胺 (Tetramethylethylenediamine 簡寫：TEMED) 25 μ L
 5. 加入聚苯乙烯或二甲基丙西酸 (AP) 20 μ L
 6. 利用內濾式微量滴管取出溶液再將此溶液加入膠台中，等待 20~30 分鐘
- (3) 製作上膠
 1. 取 5% 丙烯酰胺 (AA) 1.5ml 加入無菌離心管中
 2. 加入凝膠緩衝液 (Gel buffer 4x) 1.5ml
 3. 加入 30% 甘油 (Glycero) 1.5ml
 4. 加入四甲基乙二胺 (Tetramethylethylenediamine 簡寫：TEMED) 15 μ L
 5. 加入聚苯乙烯或二甲基丙西酸 (AP) 10 μ L
 6. 利用內濾式微量滴管取出溶液再將此溶液把已加入下膠的膠台加滿
 7. 將齒梳插入膠台等 20~30 分鐘膠凝
- (4) 配置染劑
 1. 將冷卻的膠體架設到電泳槽
 2. 將蛋白質滴入染劑槽
- (5) 開始電泳過程
 1. 直流電流裝置設定為 168V / 200 mA / 45 min



(圖十一) 蛋白質由負極游向正極

2、處理漂珠 (beads) 及蛋白質

(1) 洗漂珠

1. 將裝漂珠的小瓶子上下搖晃，使瓶內 4C 漂珠與酒精均勻混合，以取等量酒精及漂珠
2. 吸取 200ul 的漂珠放置微量離心管 (Eppendorf)，再放置離心機中離心，使漂珠及酒精分離，並吸取上層 100uL 酒精
3. 此時微量離心管裡只有 100uL 的漂珠，將 100uL 三羥甲基氨基甲烷乙二胺四乙酸緩衝液 (TE Buffer) 加進微量離心管，上下搖晃微量離心管使溶液混合，再放置離心機中離心，並吸取上層 100uL 溶液
4. 上述動作 3. 再重複動作兩次，達到清洗漂珠三次的效果，最後剩 100uL 漂珠在微量離心管內

(2) 蛋白質（海拉細胞萃取蛋白）及漂珠結合

1. 將蛋白質加進已有剩 100uL 漂珠的微量離心管
2. 放在可慢轉 360 度之機器上慢轉 30 分鐘
3. 放置離心機中離心，取 100uL 上層溶液 -A（沒與漂珠結合的代表是非四碳蛋白質）

(3) 洗掉還在漂珠上沒結合的蛋白質

1. 加 100uL 三羥甲基氨基甲烷乙二胺四乙酸緩衝液（TE Buffer）至放有已與蛋白質結合之漂珠的微量離心管，上下搖晃混合，離心，吸取上層 100uL 溶液 -B（稀釋一）
2. 重複動作，吸取 100ul 上層溶液 -C（稀釋二）
3. 重複動作，吸取 100ul 上層溶液 -D（稀釋三），此時微量離心管內剩 100ul 漂珠

(4) 使原先與漂珠結合的蛋白質與漂珠分離

1. 將 100ul 樣品緩衝溶液（Sample Buffer）加入微量離心管，並置於 65C 的熱水內煮 10 分鐘
2. 離心，取 100ul 上清液-E

(5) 取 100uL 純蛋白質做對照組-F

(6) 取 A, B, C, D, E 各 100 uL 並分別加進 100 uL 的樣品緩衝溶液 (Sample Buffer) 使蛋白質顯色

3、處理漂珠 (beads) 及蛋白質（PVDF 與雙氧水實驗）

(1) 蛋白質氧化後接上 PVDF 後上清液的部分：

1. 先取出 10%BSA(牛血清白蛋白)尿素溶液 100 μ L 加入微量離心管中
2. 再將溶液加入處理完成的 PVDF
3. 利用內濾式微量滴管取出上清液讓入至另一個空的微量離心管中
4. 再加不同濃度的雙氧水 100 μ L 入裝著上清液的微量離心管中得到實驗組(共五組)

10M	1M	100mM	10mM	1mM
-----	----	-------	------	-----

5. 最後加入樣品緩衝液(Sample Buffer)100 μ L 與蛋白質結合並藉由跑膠得到結果

- (2) 蛋白質接上 PVDF 後上清液的部分：
1. 先取出 1%BSA(牛血清白蛋白)溶液 100 μ L 加入微量離心管中
 2. 再將溶液加入處理完成的 PVDF
 3. 利用內濾式微量滴管取出上清液讓入另一個空的微量離心管中
 4. 再加 100 μ L 的純水入裝著上清液的微量離心管中得到對照組
 5. 最後加入樣品緩衝液(Sample Buffer)100 μ L 與蛋白質結合並藉由跑膠得到結果

- (3) 蛋白質接上 PVDF 後再從 PVDF 上取下的部分：
1. 先取出 1%BSA(牛血清白蛋白)溶液 100 μ L 加入微量離心管中
 2. 再將溶液加入處理完成的 PVDF
 3. 把上清液取出留下 PVDF 和黏在其上的蛋白質
 4. 再加入不同濃度的雙氧水 100 μ L 入原微量離心管中得到實驗組(共五組)

10M	1M	100mM	10mM	1mM
-----	----	-------	------	-----

5. 最後加入樣品緩衝液(Sample Buffer)100 μ L 將 PVDF 上的蛋白質扯下並藉由跑膠得到結果
- (4) 蛋白質接上 PVDF 後取下的部分：
1. 先取出 1%BSA(牛血清白蛋白)溶液 100 μ L 加入微量離心管中
 2. 再將溶液加入處理完成的 PVDF
 3. 利用內濾式微量滴管取出上清液讓入另一個空的微量離心管中
 4. 再加 100 μ L 的純水入原微量離心管中得到對照組
 5. 最後加入樣品緩衝液(Sample Buffer)100 μ L 將 PVDF 上的蛋白質扯下並藉由跑膠得到結果
- (5) 未經 TCA 沈澱但未經氧化的蛋白質：
1. 先取出 10%BSA(牛血清白蛋白)尿素溶液 100 μ L 加入微量離心管中
 2. 再將溶液加入處理完成的 PVDF
 3. 再加 100 μ L 的純水得到對照組
 4. 最後加入樣品緩衝液(Sample Buffer)100 μ L 將 PVDF 上的蛋白質扯下並藉由跑膠得到結果
- (6) 未經 TCA 沈澱且經氧化的蛋白質：
1. 先取出 10%BSA 尿素溶液 100 μ L 加入微量離心管中
 2. 再將溶液加入處理完成的 PVDF
 3. 再加入 10M 的雙氧水 100 μ L 得到對照組
 4. 最後加入樣品緩衝液(Sample Buffer)100 μ L 將 PVDF 上的蛋白質扯下並藉由跑膠得到結果
- (7) 經 TCA 沈澱但未經氧化的蛋白質
1. 先取出 10%BSA 200 μ L 尿素加入微量離心管中
 2. 加入 100%TCA(Trichloroacetic acid)100 μ L 將蛋白質分離出來
 3. 再加入丙酮將蛋白質沈澱至底部
 4. 使用離心機將蛋白質甩置底部以便取得分離出來的蛋白質

5. 將分離出來的蛋白質家 8M 尿素(Urea)800 μ L 靜待至蛋白質融入尿素中
6. 再將溶液加入處理完成的 PVDF
7. 加入 10M 的雙氧水 100 μ L 氧化蛋白質得到實驗組
8. 最後加入樣品緩衝液(Sample Buffer)100 μ L 將 PVDF 上的蛋白質扯下並藉由跑膠得到結果

(8) 經 TCA 沈澱且經氧化的蛋白質：

1. 先取出 10%BSA200 μ L 尿素加入微量離心管中
2. 加入 100%TCA100 μ L 將蛋白質分離出來
3. 再加入丙酮將蛋白質沈澱至底部
4. 使用離心機將蛋白質用錐底部以便取得分離出來的蛋白質
5. 將分離出來的蛋白質家 8M 尿素(Urea)800 μ L 靜待至蛋白質融入尿素中
6. 再將溶液加入處理完成的 PVDF
7. 加入 10M 的純水得到對照組
8. 最後加入樣品緩衝液(Sample Buffer)100 μ L 將 PVDF 上的蛋白質扯下並藉由跑膠得到結果

4、銀染配置

(1) Sensitizing

1. 取硫代硫酸鈉 (Sodium Thiosulphate) 0.3 g
2. 取乙醇 (ethanol) 3ml
3. 取醋酸鈉 (Sodium Acetate) 15.3 g
4. 加水至 100ml

(2) 銀染 (Silver Reaction)

1. 取硝酸銀 (Silver Nitrate) 2.5 g
2. 加水至 100ml

(3) 成色 (Developing)

1. 取碳酸鈉 (Sodium Carbonate) 2.5 g
2. 加水至 100ml

(4) 停止 (Stopping)

1. 取乙酸 (Acetic Acid) 2ml
2. 加水至 50ml

5、銀染步驟

(1) 清洗-1 (Washing)

1. 將純水加至塑膠盒裡且蓋過膠體
2. 放在搖機台上搖 5 分鐘
3. 將純水倒出
4. 重複以上動作兩次

(2) Sensitizing

1. 加 500 μ L 戊二醛 (Glutaraldehyde) 至 Sensitizing 溶液
2. 將 Sensitizing 溶液加進塑膠盒裡且蓋過膠體
3. 放在搖機台上搖 30 分鐘

(3) 清洗-2

1. 將純水加至塑膠盒裡且蓋過膠體
2. 放在搖機台上搖 5 分鐘
3. 將純水倒出
4. 重複以上動作兩次
- (4) 銀染 (避光)
 1. 加 500uL 甲醛 (Formaldehyde) 至 100ml Sensitizing 溶液
 2. 將 Sensitizing 溶液加進塑膠盒裡且蓋過膠體
 3. 用鋁箔指包覆住塑膠盒放在搖機台上搖 20 分鐘
- (5) 清洗-3
 1. 將純水加至塑膠盒裡且蓋過膠體
 2. 放在搖機台上搖 1 分鐘
 3. 將純水倒出
 4. 重複以上動作一次
- (6) 成色
 1. 加 60uL 甲醛 (Formaldehyde) 至 100ml Developing 溶液
 2. 將 Developing 溶液加進塑膠盒裡且蓋過膠體
 3. 手輕輕前後搖晃塑膠盒觀察教體的成色變化
- (7) 停止
 1. 將 Stopping 溶液加進塑膠盒裡且蓋過膠體
 2. 放在搖機台上搖 5 分鐘
- (8) 清洗-4
 1. 將純水加至塑膠盒裡且蓋過膠體
 2. 放在搖機台上搖 20 分鐘
 3. 將純水倒出
 4. 重複以上動作一次

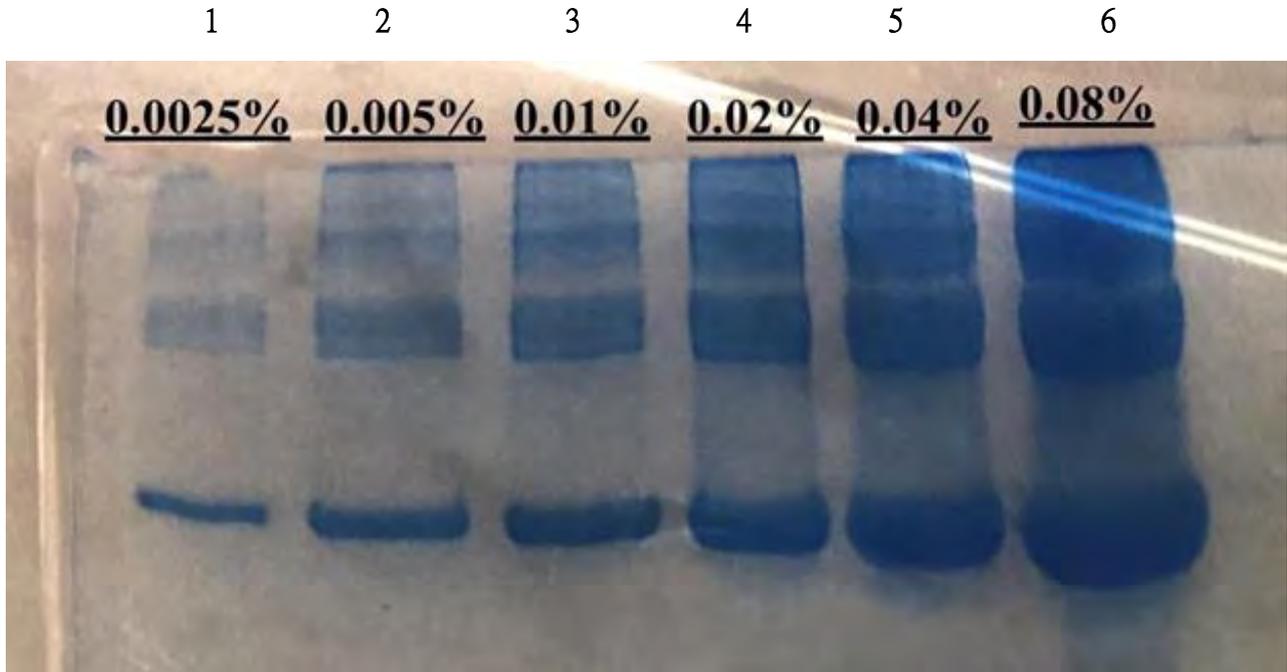
6、CBB 染色 Coomassie Brilliant Blue

- (1) 調製固定液(Fixing solution)
 - 1.先取出甲醇 50ml 加入燒杯中
 - 2.再加入冰醋酸 10ml
 - 3.接著加入純水 40ml
- (2) 調製染色溶液(Staining solution)
 - 1.先取出 Coomassie Brilliant Blue R-250 0.1 克加入燒杯中
 - 2.加入甲醇 50ml
 - 3.加入乙酸 10ml
 - 4.再加入純水 40ml
- (3) 調製脫色液(Destaining solution)
 - 1.先取出甲醇 40ml 加入燒杯中
 - 2.加入乙酸 10ml
 - 3.加入純水 50ml
- (4) 調製儲存液(Storage solution)
 - 1.先取出乙酸 5ml 加入燒杯中
 - 2.加入純水 95ml
- (5) 染色步驟(所有加入液體的動作家到覆蓋膠體後即可)

- 1.先將泡完的膠體泡入固定液並放置在搖搖機上搖液約 1 小時
- 2.把固定液完全倒出並加入純水在重新放入置在搖搖機上搖 3~5 分鐘
- 3.把純水全部倒出後加入染色液放入搖搖機搖 20 分鐘
- 4.把染色液到出後加入脫色液再放入搖搖機搖到背景顏色消失
- 5.把脫色液完全倒出並加入純水在重新放入置在搖搖機上搖 3~5 分鐘
- 6.把純水到出後加入儲存液即可儲存膠體

陸、研究結果和討論

1、 實驗一：研究最適合跑膠的 BSA 濃度



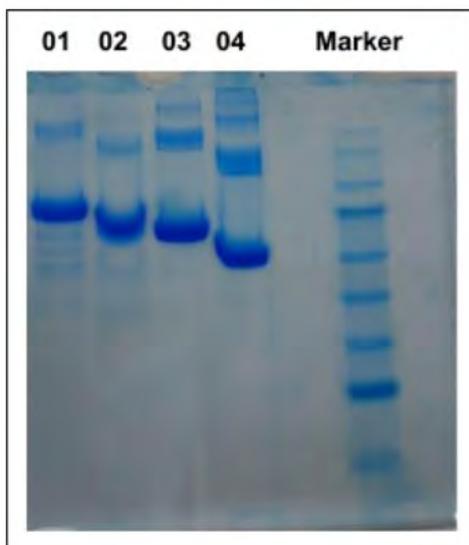
(圖十二)

01	0.08%BSA
02	0.04%BSA
03	0.02%BSA
04	0.01%BSA
05	0.005%BSA
06	0.0025%BSA

- 實驗結果:

從圖十二中，觀察膠體的顯色可以發現 0.08%BSA 已經太濃了，無法清楚看出蛋白質的分層，而 0.005%~0.01%是最佳的濃度，可以看出分層。

3、實驗三：加入 DTT 可以將蛋白質拉直，將雙硫鍵切斷，然後進一步確認蛋白質的氧化情況。

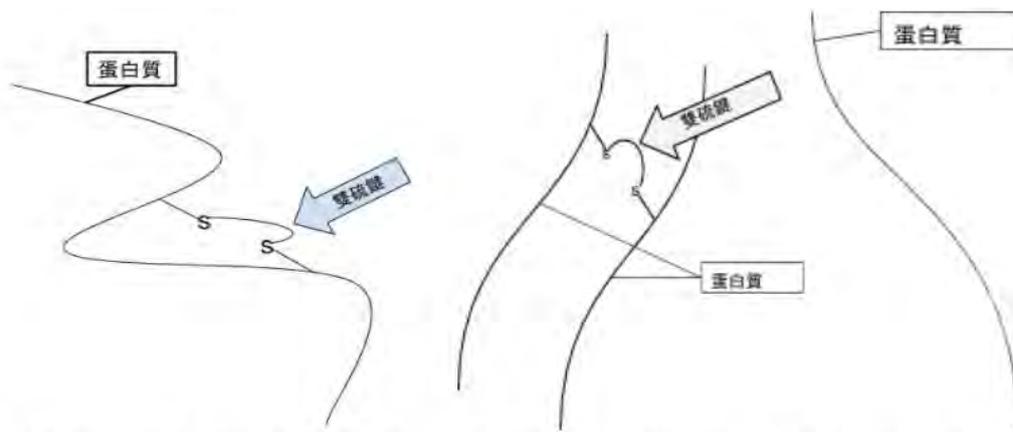


(圖十四)

01	10 μ g BSA 經 DTT 處理過但不含 DTT，再進行氧化
02	10 μ g BSA 未經 DTT 處理直接氧化
03	10 μ g HIC 經 DTT 處理過但不含 DTT，再進行氧化
04	10 μ g HIC 未經 DTT 處理直接氧化
Marker	

- 實驗結果：

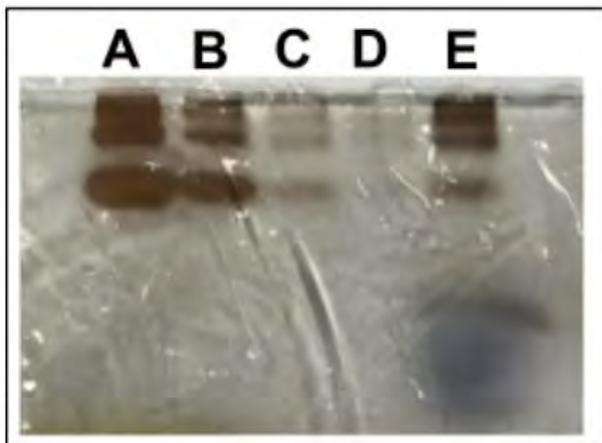
圖十四中，可以觀察到有加 DTT 的蛋白質結構比較不適合跑膠，而以氧化的蛋白質結構比較。上網查資料後，我們發現我們可以利用 SDS 將蛋白質從 PVDF 上取下來，將蛋白質附著 PVDF 上，接著把 DTT 給洗掉，使用 PVDF 的原因除可以使他與蛋白質連接在一起，同時也可以確保蛋白質不會互相連接。



DTT可以將上圖蛋白質自己或蛋白質之間的雙硫鍵給切斷，把蛋白質拉直

(圖十五)

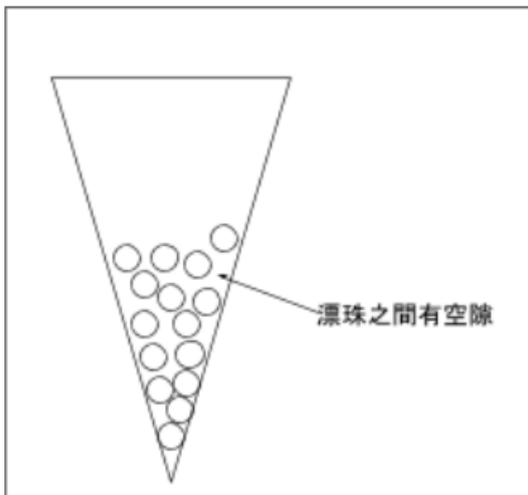
- 4、實驗四：在實驗三我們發現 SDS 因極性較 PVDF 大，所以可以將原先在 PVDF 上結合的蛋白質搶下，因此延伸出這個實驗來探討極性的強度（碳數的多寡）之間的關係。我們利用四碳 (4C) 的漂珠過濾蛋白質（海拉細胞萃取蛋白），觀察其所過濾後的蛋白質的電泳結果。



A	未與四碳漂珠結合的蛋白質檢體
B	第一次清洗漂珠 (4C)
C	第二次清洗漂珠 (4C)
D	第三次清洗漂珠 (4C)
E	與四碳漂珠結合的蛋白質檢體 (SDS)

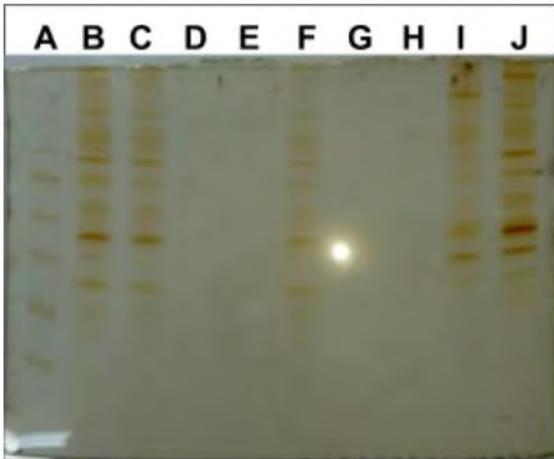
(圖十六)

- 實驗結果：圖十五當中，我們可以由清洗漂珠的步驟觀察到因為漂珠與漂珠之間有空隙所以就算洗了一次漂珠之間的空隙仍會有蛋白質存留（參考圖十七），因此在第一次到第三次清洗漂珠的過程所取上清液皆可看到仍有些許蛋白質，只是清洗次數越多剩餘蛋白質量就越少，但在使用 SDS 去洗漂珠後，可以發現洗出很多蛋白質，也證明了 SDS 搶蛋白質的能力比 PVDF 強許多。

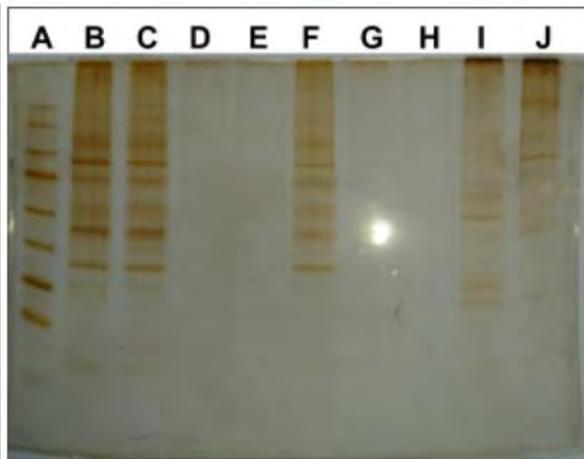


(圖十七) 漂珠之間的空隙可能還會有蛋白質殘留

實驗五：分別以四碳 (4C) 與八碳 (8C) 的漂珠做為代表，過濾蛋白質，觀察不同蛋白質與不同碳數的漂珠結合力，以探討極性的強弱對蛋白質與分子結合效果的影響。



(圖十八)



(圖十九)

A	Marker	F	未與八碳漂珠結合的蛋白質檢體
B	海拉細胞萃取蛋白(未經處理的蛋白質檢體)	G	第一次清洗漂珠 (8C)
C	未與四碳漂珠結合的蛋白質檢體	H	第二次清洗漂珠 (8C)
D	第一次清洗漂珠 (4C)	I	與四碳漂珠結合的蛋白質檢體 (SDS)
E	第二次清洗漂珠 (4C)	J	與八碳漂珠結合的蛋白質檢體 (SDS)

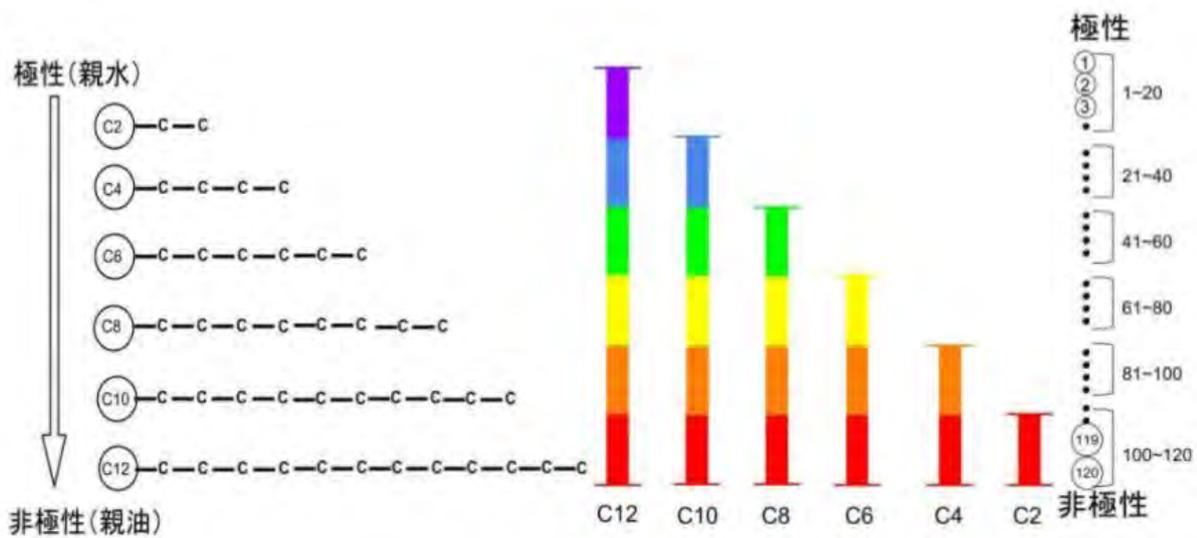
● 實驗結果：

在這個實驗我們觀察到了在 I 及 J 行與八碳漂珠結合的蛋白質檢體濃度明顯比四碳漂珠還多，可見能與八碳漂珠結合的蛋白質種類更多，說明八碳漂珠的極性較四碳漂珠要更強才可以與較多蛋白質結合。因為在此實驗我們是利用 chromatography (管柱層析法) 這個清洗技

術，在這個類似針管（Column）的下方有個可以防止漂珠流出的膜，因此可以使漂珠之間清洗得更乾淨（參考圖二十）。我們發現到清洗過後的漂珠電泳效果並不明顯，因此在下一次實驗將此條件捨去。圖二十一及圖二十二為我們整理的總結圖，左邊由較親水的 C2 到較疏水性的 C12，最右邊的為蛋白質 120 種極性排名，中間的長條圖為 C 可吸引的蛋白種類，可以看出碳數越高的 C12 可以疏水性最高可以吸引最多種蛋白質。



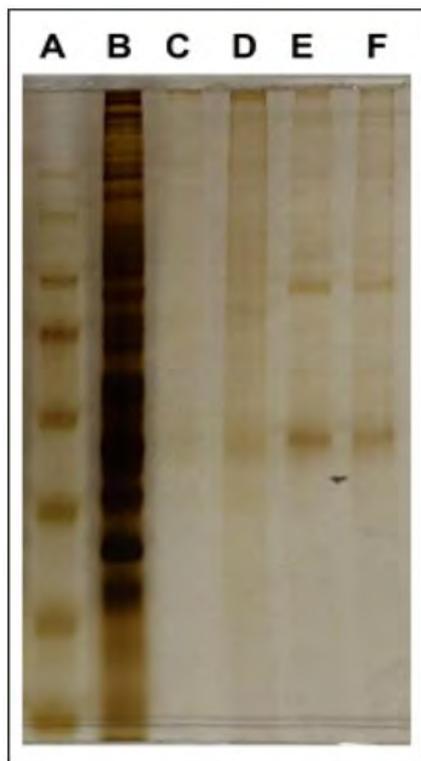
(圖二十)
針管 Column



(圖二十一)

(圖二十二)

5、 實驗六：利用四碳 (4C) 與八碳 (8C) 的漂珠過濾蛋白質，觀察其所過濾後的蛋白質的電泳結果



A	Marker
B	HIC(未經處理的蛋白質檢體)
C	未與四碳漂珠結合的蛋白質檢體
D	與四碳漂珠結合的蛋白質檢體 (SDS)
E	未與八碳漂珠結合的蛋白質檢體
F	與八碳漂珠結合的蛋白質檢體 (SDS)

(圖二十三)

● 實驗結果：

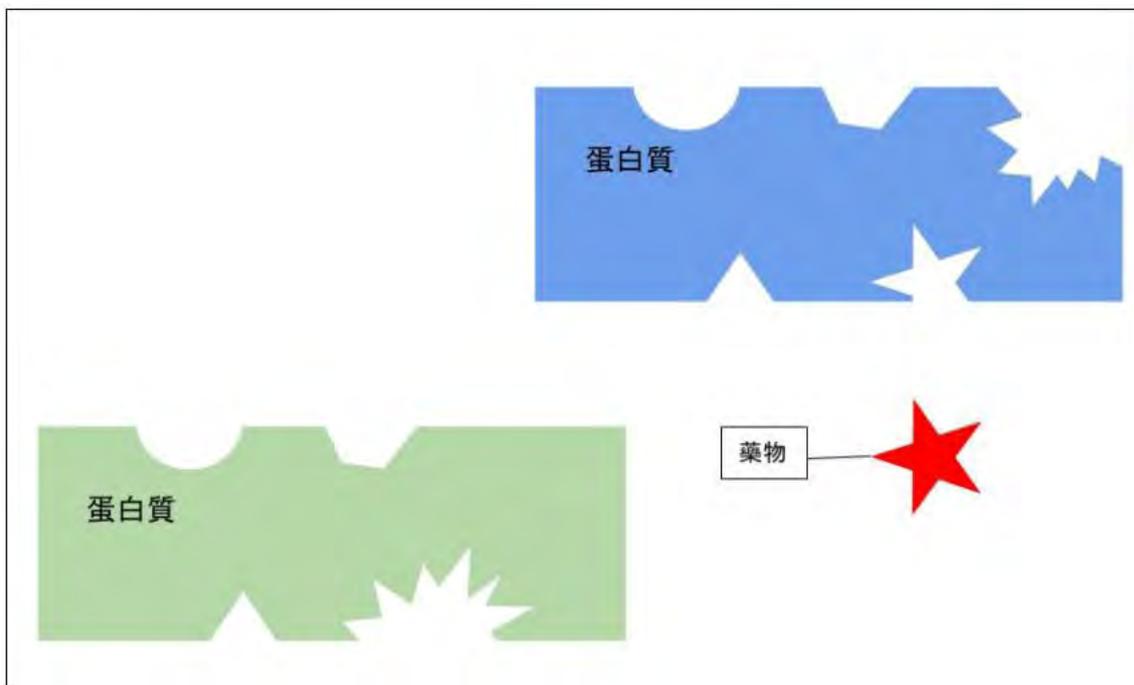
在此實驗我們發現使未與四碳漂珠結合的蛋白質檢體與八碳漂珠產生結合，發現除去已與四碳漂珠結合的蛋白質仍有些許蛋白質與八碳漂珠結合，因此發現八碳漂珠的極性較強，能結合到的蛋白質也不同。

柒、結論

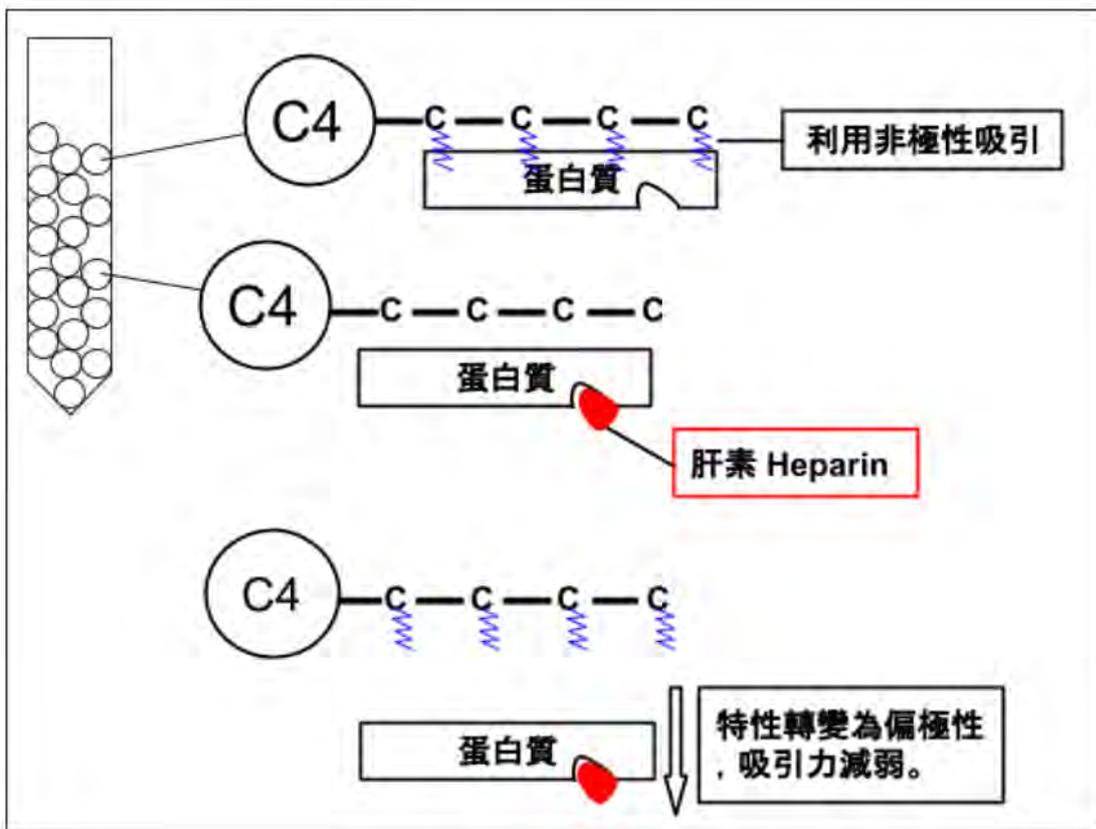
- 一、最佳的蛋白質檢體濃度為 0.05%~0.001%
- 二、有雙硫鍵蛋白質的體積較原來的蛋白質結構不同泳動率較低
- 三、碳數越多的漂珠極性越強可以與較多蛋白質結合

捌、未來展望

由此可得蛋白質之性與非極性的差異，我們可以加以利用這個特性將不同的蛋白質區分開來，同時可利用肝素可以改變其極性之特性，將蛋白質做出一個更細微的分類，因此可以確認是哪一個蛋白質，而在實際應用上可以將有毒細胞內的蛋白質與其他蛋白分離，甚至可以誘導藥物攻擊特定細胞，如下圖()，藥物可以針對藍色的蛋白質反應，而下圖()是我們的假想圖，肝素(Heparin)是一種抗凝血劑，具有專一性，會與部分蛋白質結合，假設有水溶性血漿蛋白的極性剛好可以吸在(C4)上，與肝素結合後極性變弱了，導致無法與(C4)結合而溶回水中，由此可以得知，不能與肝素結合的蛋白就會待在(C4)上，能與肝素結合的蛋白質就會溶回水中，就可以找到能與肝素的蛋白質有哪些，如果我們能以肝素的原理為基礎做出一種藥丸，就能讓藥丸鎖定特定的蛋白質為目標並反應。



(圖二十四)

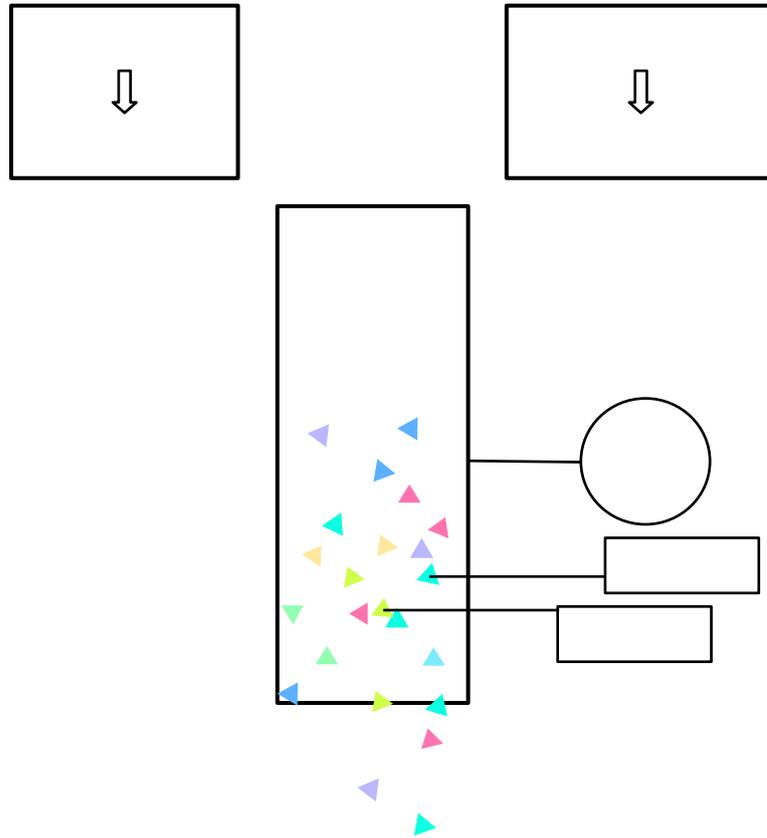


(圖二十五)

玖、參考資料及其他

- 疏水性層析法 (hydrophobic interaction chromatography, HIC)

<http://juang.bst.ntu.edu.tw/ECX/Pur3.htm>



(圖二十六)

管中所含的是 C 12 因為可吸附大多的蛋白質，因此裡用蛋白質附著於碳的特性利用水的極性能力及酒精的非極性特性洗出不同極性的蛋白質，先加入 1% 的水加上 99% 的酒精，在加入 2% 的水和 98% 的酒精，以此類推，直到加入的酒精為 1% 水為 99%。在

此過程中，被不同濃度的酒精水溶液洗出的物質，代表著不同的極性的蛋白質，因此可以利用此方法區分出不同的蛋白質。

玖、附錄

一、藥品



(圖二十七) 樣品緩衝液(Sample Buffer)



(圖二十八) 20%PVDF 酒精溶液



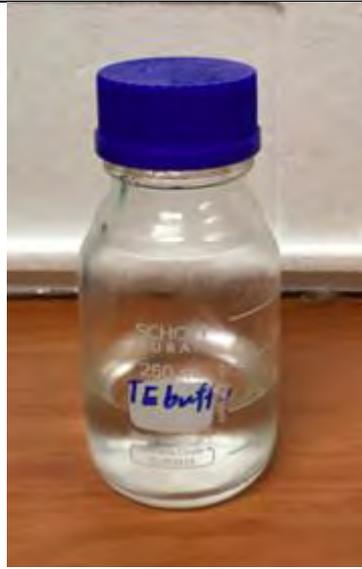
(圖二十九)8M 尿素



(圖三十)磷酸鹽緩衝液



(圖三十一) BSA



(圖三十二) TE 緩衝液



Cathode

Anode

(圖三十三) 緩衝液 (Cathode、Anode)



(圖三十四) 漂珠 (四碳和八碳)



(圖三十五) TEMED



(圖三十六) AA (15%及 25%)



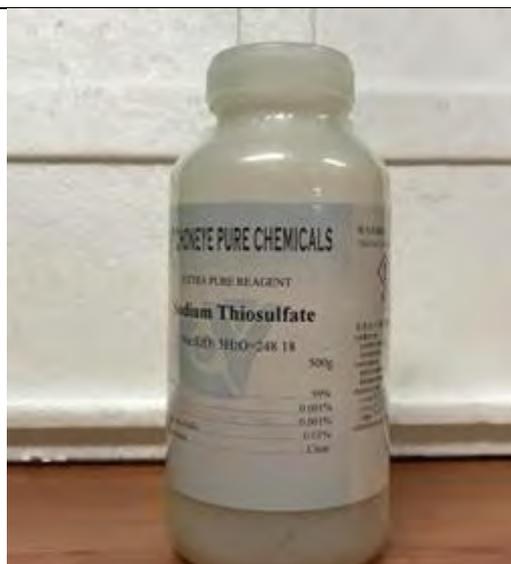
(圖三十七) Gel Buffer



(圖三十八) AP



(圖三十九) 海拉細胞萃取蛋白
(HeLa lysate)



(圖四十) 硫代硫酸鈉



(圖四十一) 福馬林 Formaldehyde



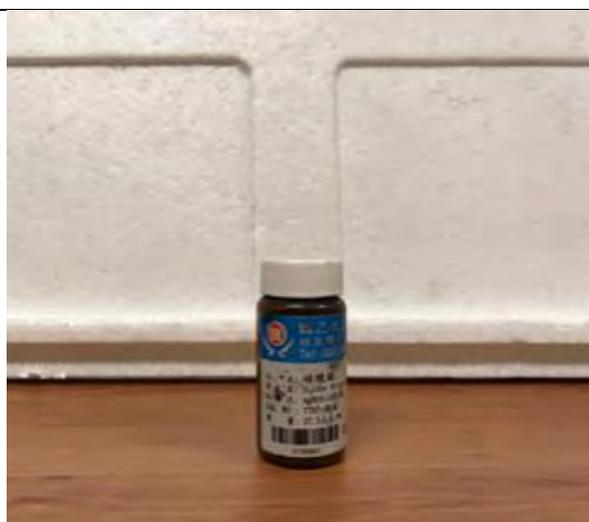
(圖四十二) 戊二醛 Glutaraldehyde



(圖四十三) 冰醋酸



(圖四十四) 乙醇



(圖四十五) 硝酸銀



(圖四十六) 醋酸鈉



(圖四十七) 碳酸鈉



(圖四十八) 純水

【評語】 050206

在生化研究上會使用 SDS-PAGE 電泳來分離不同的蛋白質，乃因其電荷、雙硫鍵等性質不同，所以才會用 SDS 來將電荷中和，並破壞蛋白質的二級和三級結構，並加入 β -巯基乙醇(類似 DTT) 的強還原劑把雙硫鍵破壞，以利蛋白質的分離。因此本篇研究的 BSA 在氧化或有加 DTT 的電泳上位置不一樣，似乎可以預期的。另外有提出利用不同疏水性管柱及肝素結合的方法來分離蛋白，建議先使用傳統的 Heprin(肝素)的結合管柱，再佐以具疏水性的某種單一管柱來分離蛋白，來比較用本研究提出的分離蛋白方法是否有進步性。另外，也可使用癌症及一般細胞株為材料，來比較其中蛋白質是否經過本研究使用的分離程序後二者細胞中蛋白表現量有所不同，以實證及突顯本研究之價值。

壹、摘要

- 一、以蛋白質的親水性和疏水性為研究基礎，利用電泳觀察蛋白質來呈現結果。
- 二、希望先找出最佳的蛋白質觀察濃度，發現蛋白質本身已經具有雙硫鍵的生成。
- 三、利用蛋白質可以憑藉疏水性作用力附著在巨分子化合物聚偏二氟乙烯 (PVDF) 上的特性去除可以打斷雙硫鍵的水溶性二硫蘇糖醇 (DTT)。
- 四、利用十二烷基硫酸鈉 (SDS) 將蛋白質從 PVDF 上萃取下來時，觀察到可以利用疏水性強度來競爭蛋白質的結合。
- 五、利用不同碳數的漂珠 (beads) 來分類蛋白質，使蛋白質和漂珠保持在弱結合狀態上。
- 六、肝素結合蛋白質使整體疏水性下降導致整體從弱結合漂珠上溶離釋出。

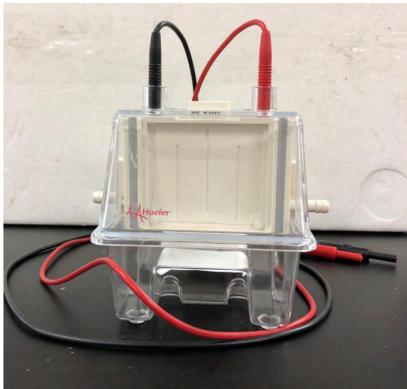
貳、動機

氧化壓力是導致癌症發生的一個重要原因。細胞內蛋白質遭遇到氧化壓力後，會改變蛋白質的特性，使蛋白質對細胞產生毒性，長期累積細胞傷害後，造成癌症的生成。因此我們想要設計實驗來觀察蛋白質的氧化還原狀態。

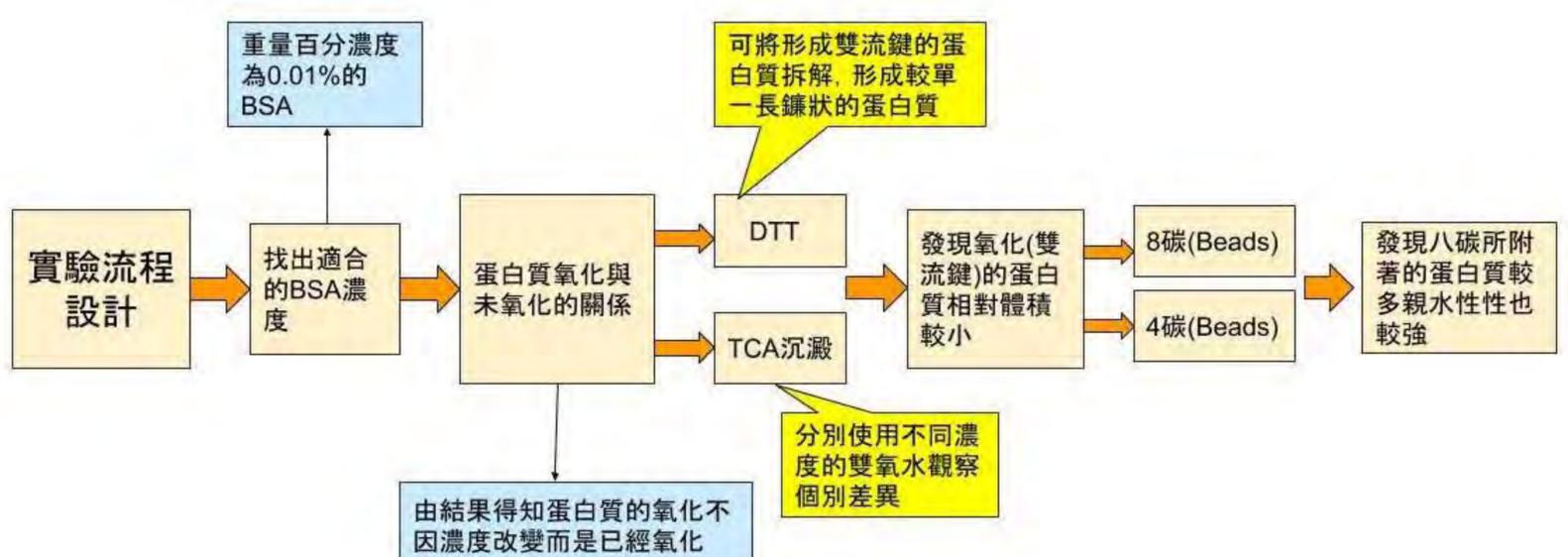
參、目的

- 一、探討哪種濃度的蛋白質檢體 (BSA, bovine serum albumin) 跑電泳所呈現的結果最適合用於實驗觀察。
- 二、比較有氧化的蛋白質及未氧化的蛋白質之間的差異。
- 三、比較與 DTT 處理前後蛋白質的電泳效果的差異。
- 四、利用帶有四碳漂珠 (4C beads) 觀察蛋白質結合的效果和模式。
- 五、觀察 4C beads 及 8C beads 與分類蛋白質特性，探討疏水性強度與蛋白質結合的情形。
- 六、利用水溶性肝素和特定蛋白質結合，觀察結合後的小分子蛋白質共體特性。

肆、研究藥品與器材

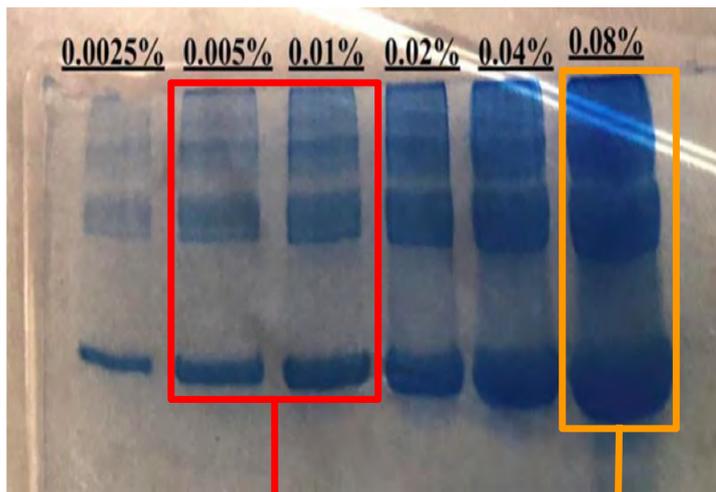
		
(圖一) 直流電源裝置	(圖二) 電泳裝置	(圖三) 搖機台
		
(圖四) 20% PVDF 酒精溶液	(圖五) 漂珠 (Beads)	(圖六) 海拉細胞萃取蛋白 (HeLa cell lysate)

伍、研究過程



陸、研究方法與結果

實驗一：研究最適合跑膠的 BSA 濃度。

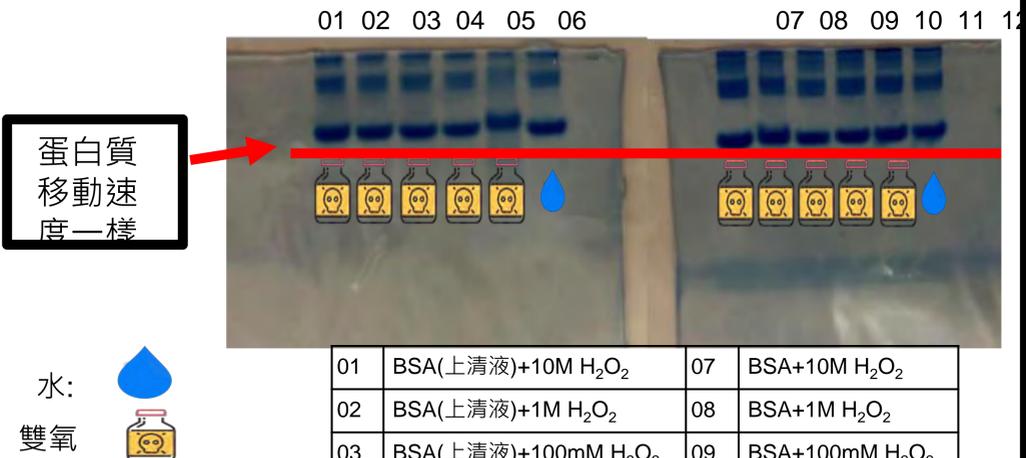


最有利的觀察

顏色過深

結果：0.005%~0.01% 是最佳的濃度

實驗二：雙氧水可以將蛋白質氧化，並將結構中的硫接在一起，形成雙硫鍵。此實驗是想要比較蛋白質有無氧化的電泳結果。



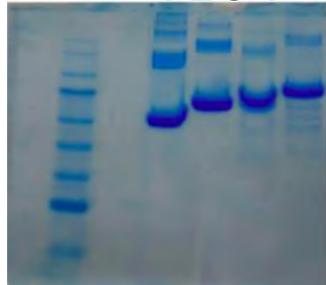
水：
雙氧

01	BSA(上清液)+10M H ₂ O ₂	07	BSA+10M H ₂ O ₂
02	BSA(上清液)+1M H ₂ O ₂	08	BSA+1M H ₂ O ₂
03	BSA(上清液)+100mM H ₂ O ₂	09	BSA+100mM H ₂ O ₂
04	BSA(上清液)+10mM H ₂ O ₂	10	BSA+10mM H ₂ O ₂
05	BSA(上清液)+1mM H ₂ O ₂	11	BSA+1mM H ₂ O ₂
06	BSA(上清液)+ddH ₂ O	12	BSA+ddH ₂ O

結果：此處氧水不影響蛋白質結構

實驗三：加入 DTT 可以將蛋白質雙硫鍵切斷，然後進一步確認蛋白質的氧化情況

Marker 1 2 3 4

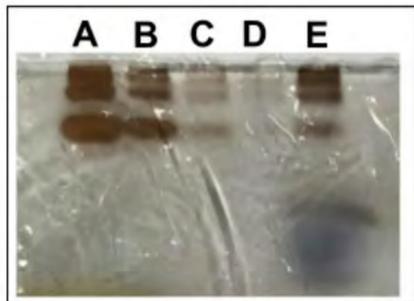


Marker	
01	BSA 未經 DTT 處理
02	BSA 經 DTT 處理
03	第二種蛋白未經 DTT 處理
04	第二種蛋白經 DTT 處理

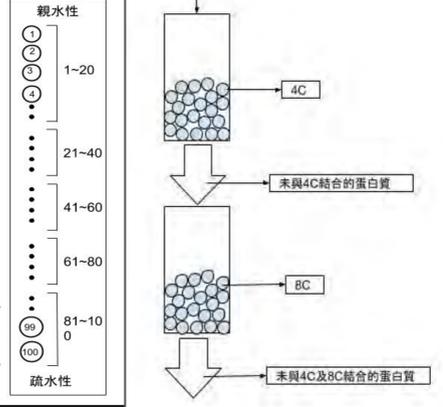
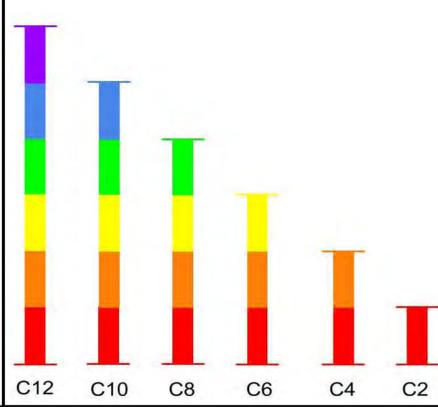
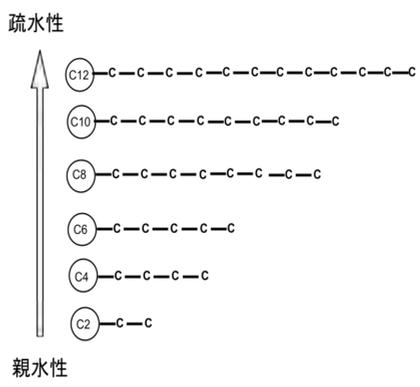


結果：有加 DTT 的蛋白質結構被打開，使蛋白質在膠體結構中進行泳動率下降，經過氧化的蛋白質摺疊性較強，泳動率較快。

實驗四：在實驗過程中我們發現 SDS 因疏水性較 PVDF 強，所以可以將原先在 PVDF 上結合的蛋白質競爭下來。因此，設計實驗探討疏水性基質與蛋白質結合的關係。我們首先觀察四碳 (4C) 的 beads 結合蛋白質的情形，利用電泳呈現結果。

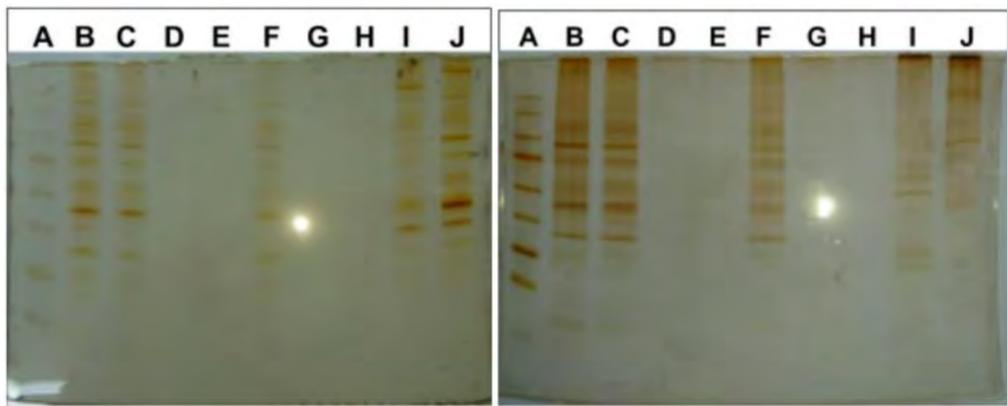


A	未與四碳漂珠結合的蛋白質檢體
B	第一次清洗漂珠 (4C)
C	第二次清洗漂珠 (4C)
D	第三次清洗漂珠 (4C)
E	與四碳漂珠結合的蛋白質檢體 (SDS)



結果：證明了 SDS 疏水性強因此可以搶下與四碳 beads 結合的蛋白質。

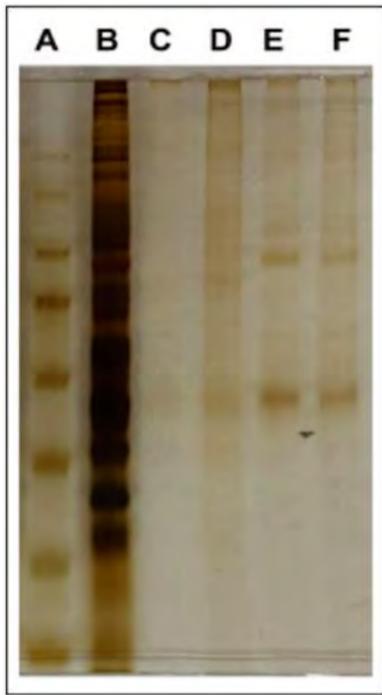
實驗五：利用四碳 (4C) 與八碳 (8C) 的 beads 過濾蛋白質，觀察其所過濾後的蛋白質的電泳結果。



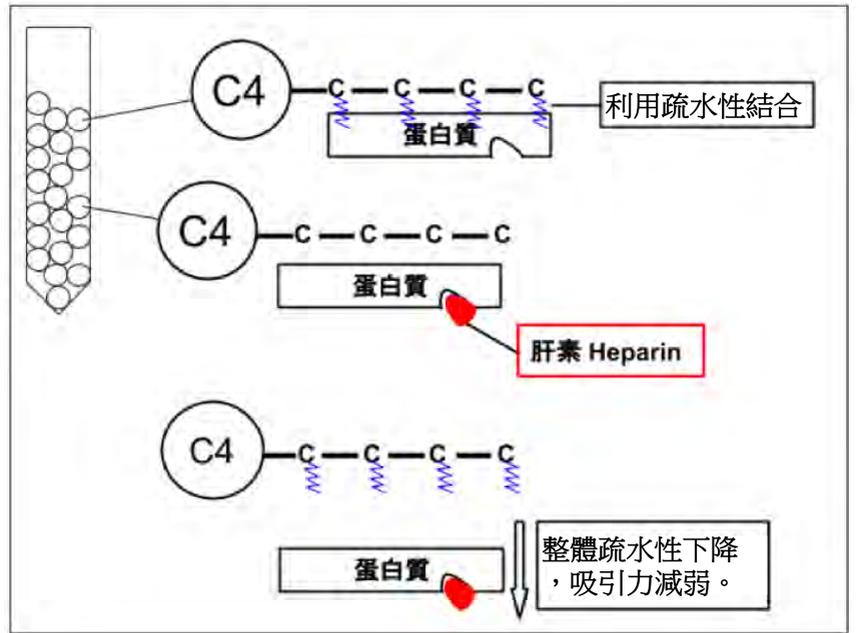
A	Marker	F	未與八碳漂珠結合的蛋白質檢體
B	海拉細胞萃取蛋白(未經處理的蛋白質檢體)	G	第一次清洗漂珠 (8C)
C	未與四碳漂珠結合的蛋白質檢體	H	第二次清洗漂珠 (8C)
D	第一次清洗漂珠 (4C)	I	與四碳漂珠結合的蛋白質檢體 (SDS)
E	第二次清洗漂珠 (4C)	J	與八碳漂珠結合的蛋白質檢體 (SDS)

結果：八碳 beads 和四碳 beads 結合的蛋白質樣式明顯不同，可以用 SDS 溶離出。

實驗六：利用水溶性肝素處理四碳 beads 或八碳 beads 來改變會與肝素結合的蛋白質的疏水性。



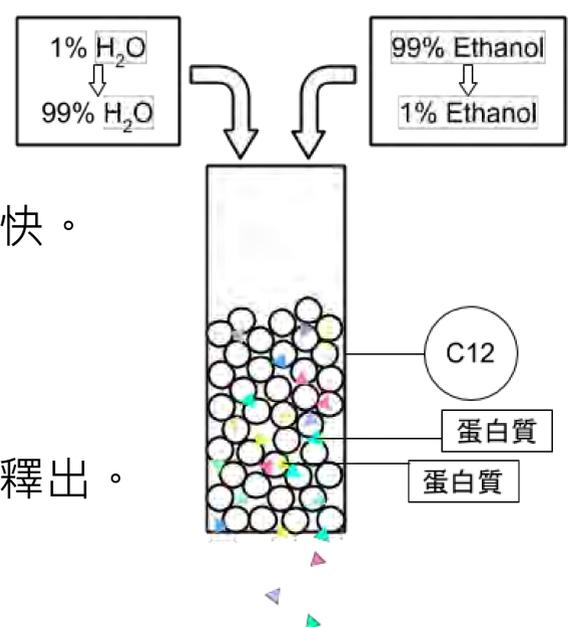
A	Marker
B	HIC (未經處理的蛋白質檢體)
C	Heparin 4C elution 1
D	Heparin 4C elution 2
E	Heparin 8C elution 1
F	Heparin 8C elution 2



結果：肝素可以從四碳 beads 或八碳 beads 上溶離出結合蛋白。

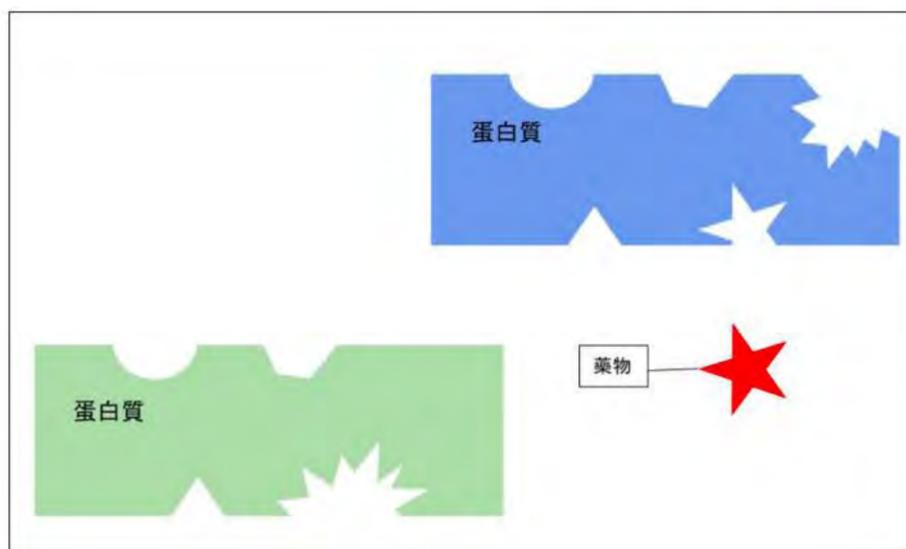
柒、結論

- 一、最佳的蛋白質檢體濃度為 0.005%~0.01%。
- 二、有雙硫鍵蛋白質的泳動率較無雙硫鍵形成的蛋白質快。
- 三、利用疏水性強弱可以競爭相對應的結合強度。
- 四、不同碳數的 beads 的結合蛋白質種類有差異。
- 五、肝素結合蛋白質可使整體疏水性下降從漂珠上溶離釋出。



捌、未來展望

- 一、利用水溶性高的藥物，從弱結合的漂珠上溶離出藥物的目標蛋白。
- 二、利用實驗結果替水溶性高的醣類找到其結合蛋白。



玖、參考資料

- 一、疏水性層析法 (hydrophobic interaction chromatography, HIC)

<http://juang.bst.ntu.edu.tw/ECX/Pur3.htm>

- 二、中華民國第 55 屆中小學科學展覽會國中組 化學科
分子天堂路

作者：楊心美、徐浚璋、林亮宇 指導老師：田代蕙、余承翰

- 三、中華民國第 56 屆中小學科學展覽會高中組 化學科
蛋白質現形記

作者：王名呈、晏德心 指導老師：田代蕙、余承翰