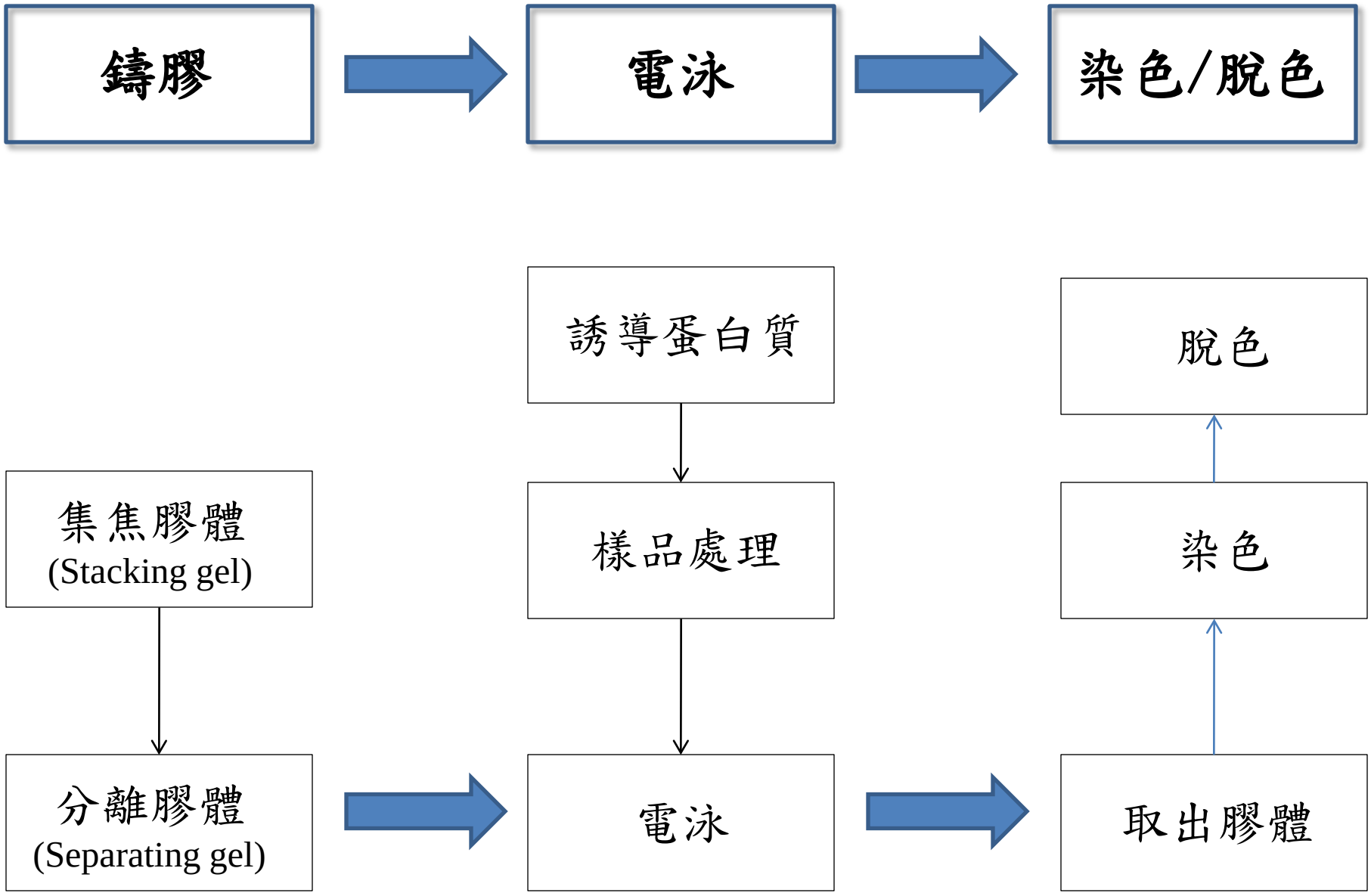
蛋白質電泳原理


鑄膠
電泳
染色/脫色
誘導蛋白質
脫色
集焦膠體
(Stacking gel)
樣品處理
染色
分離膠體
(Separating gel)
電泳
取出膠體

蛋白質電泳原理

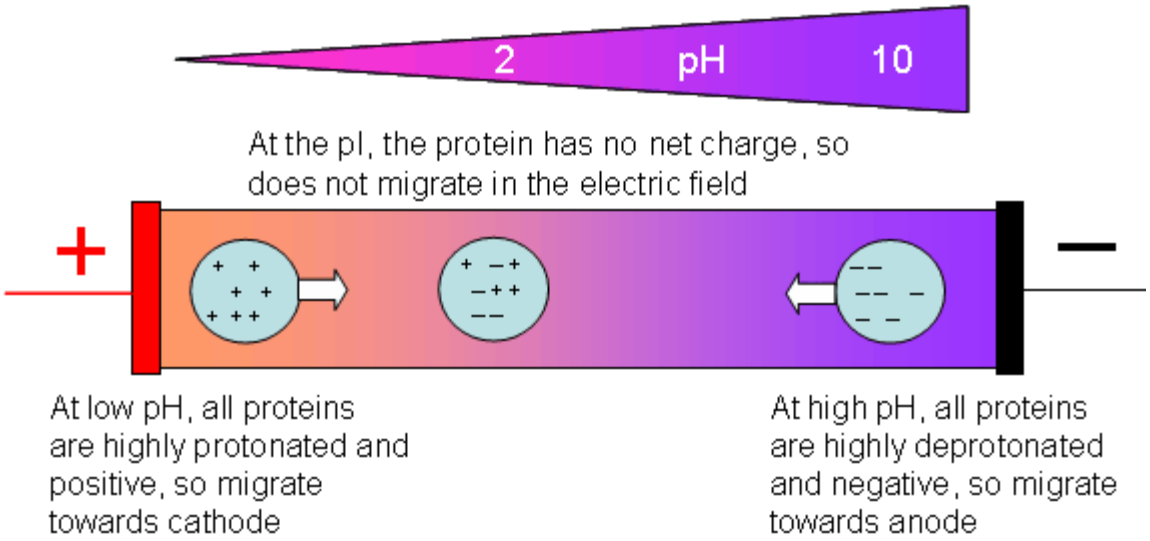
- 帶電 分子在電場中能夠移動，稱作泳動 (electrophoresis)。
- 泳動的程度稱為泳動率 (mobility)：

$$\text{泳動率} \sim \frac{(\text{所外加電壓 mV}) \times (\text{分子之淨電荷})}{\text{分子與介質間之摩擦力}}$$

- 摩擦力:
  - 由蛋白質分子之大小、形狀決定。
    - 分子量大者摩擦力大，泳動率小；
    - 球形分子摩擦力較小，泳動率大。

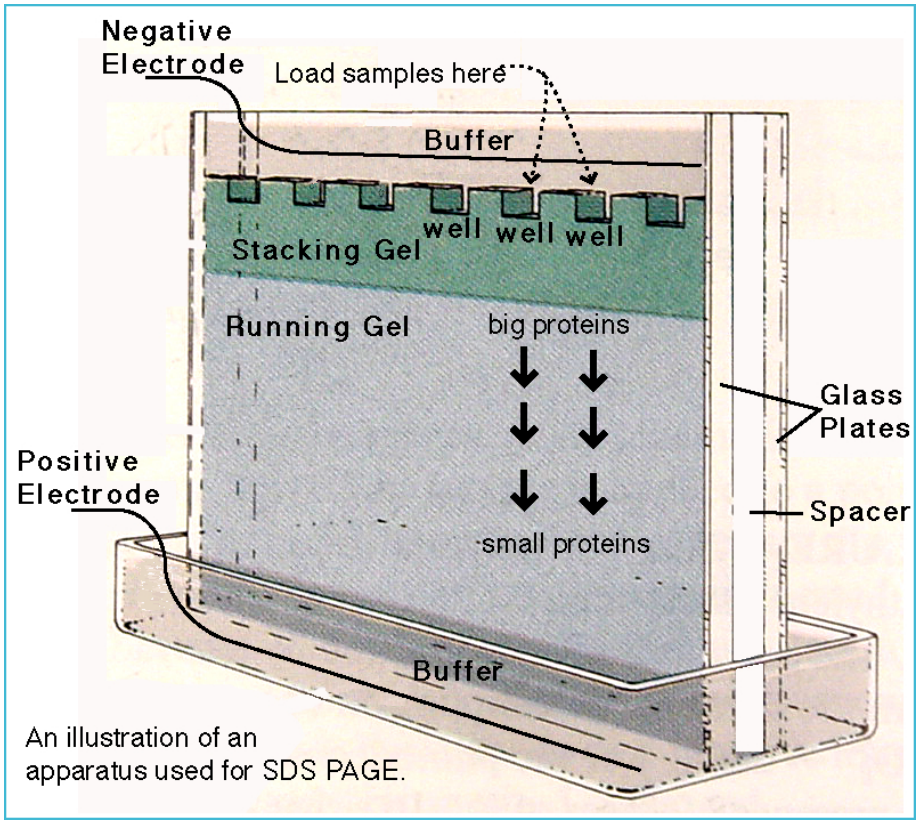
靜電荷與泳動率

- 靜電荷:
  - 由環境之pH值決定。與等電位點(pI)有關。
    - 當環境pH = 分子之pI時，此分子之淨電荷為(0)；
    - 當環境pH < 分子之pI時，此分子之淨電荷為(+)；
    - 當環境pH > 分子之pI時，此分子之淨電荷為(-)。
      - 大部分電泳系統的pH定在8.3，因此蛋白質→往正極移動



鑄膠(gel-casting)

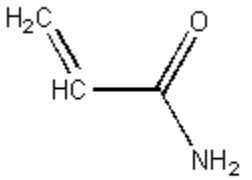
- Stacking (Focusing) gel
  - 集膠膠體
  - 靠近負極(-)
  - Focuses proteins within a narrow band
- Separating (Running) gel
  - 分離膠體
  - 靠近正極 (+)
  - Separates proteins according to M.W.



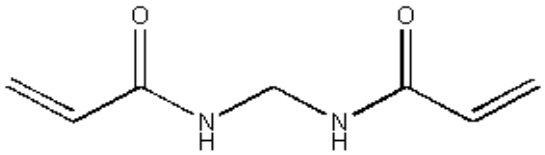
An illustration of an apparatus used for SDS PAGE.

膠體組成成份

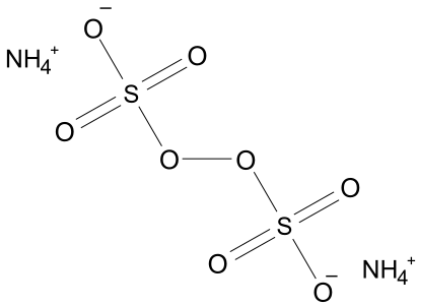
- 單體分子(monomer)
  - Acrylamide (丙烯醯胺; CH2＝CH－CO－NH2)
- 架橋分子(bridging molecule)
  - N,N’-methylene-bis(acrylamide) (雙丙烯醯胺; $C_7H_{10}N_2O_2$)
- 自由基產生者(free-radical generator)
  - Ammonium persulfate (APS) or Riboflavin (Vit. B2)
- 催化劑(catalyst)
  - TEMED (Tetramethylenediamine)
  - 協助自由基傳遞

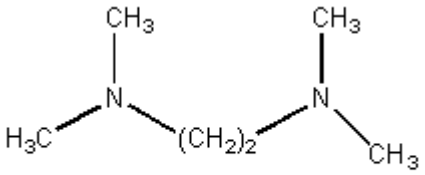


Acrylamide

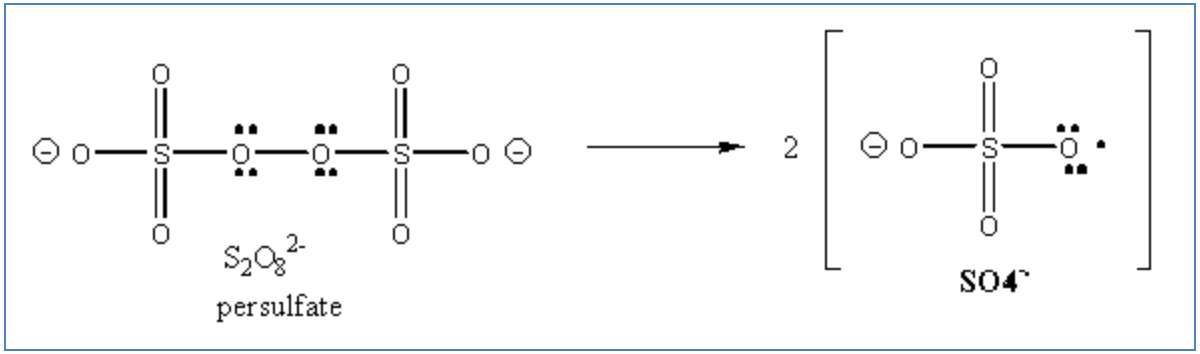


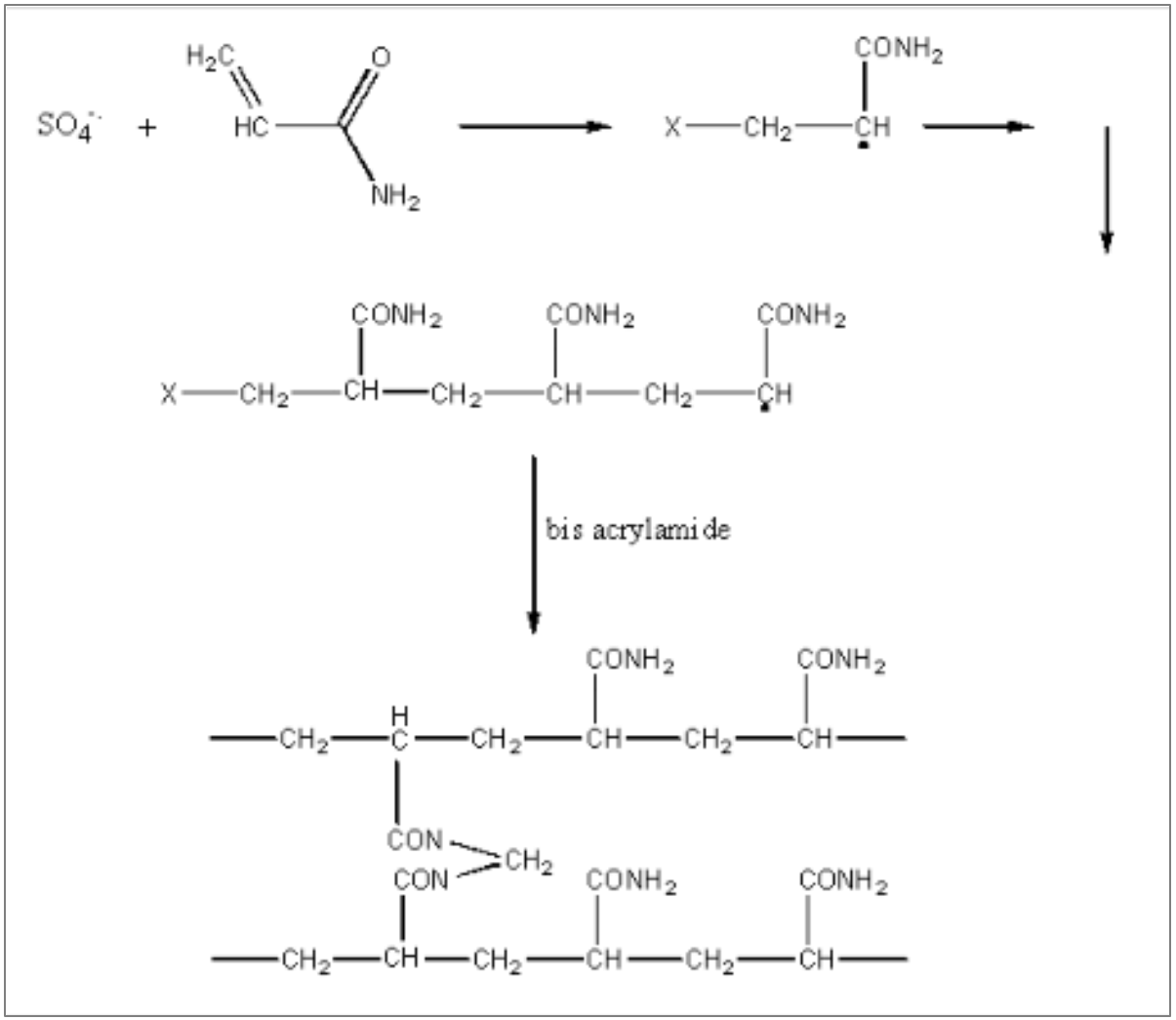
N,N'-methylene-bis(acrylamide)

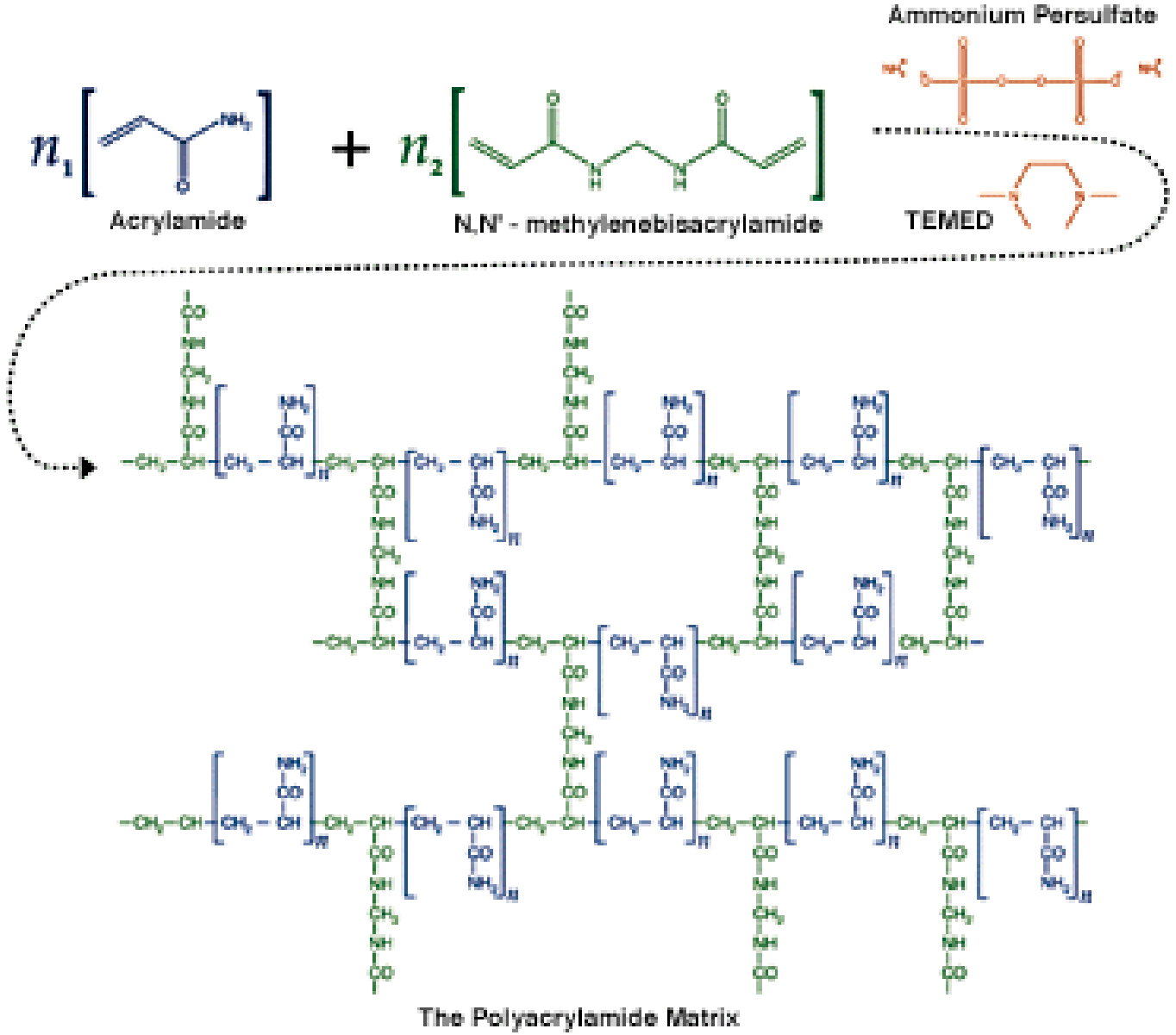


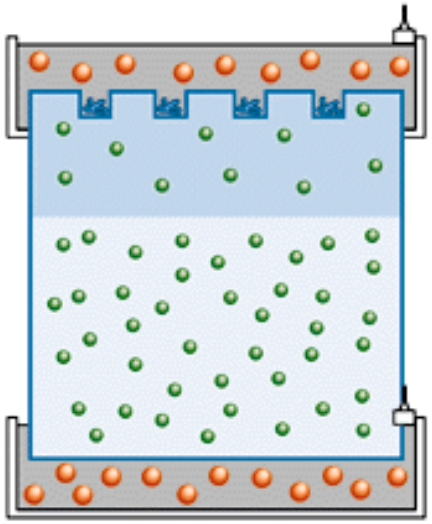


Tetramethylenediamine
(TEMED)


$S_2O_8^{2-}$
persulfate
2
SO4`


$SO_4^{\cdot-}$
+
H_2C
HC
O
NH_2
$CONH_2$
X
CH_2
CH
bis acrylamide
CON
CH_2


Ammonium Persulfate
Acrylamide
N,N' - methylenebisacrylamide
TEMED
The Polyacrylamide Matrix



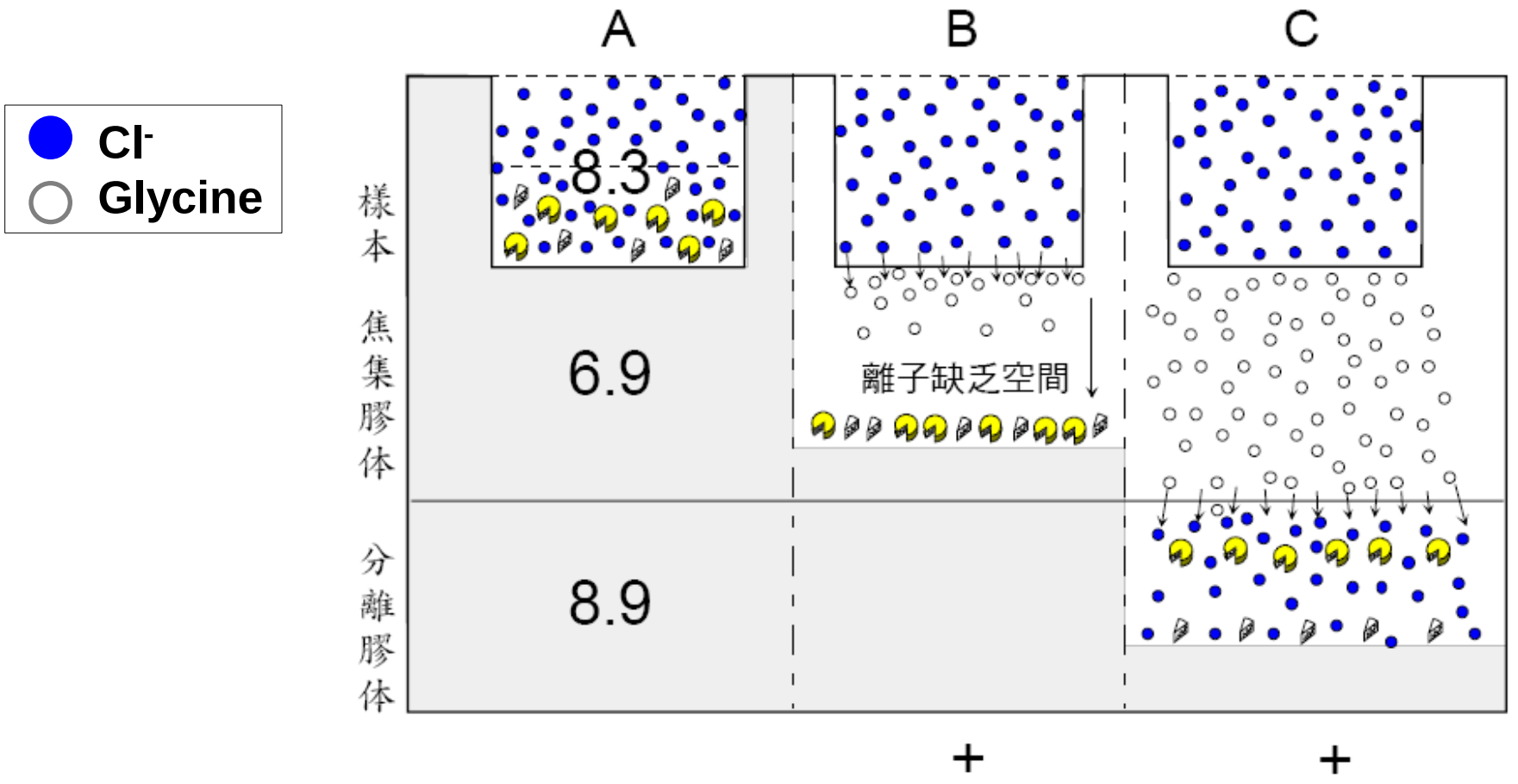
不連續電泳(Discontinuous electrophoresis)

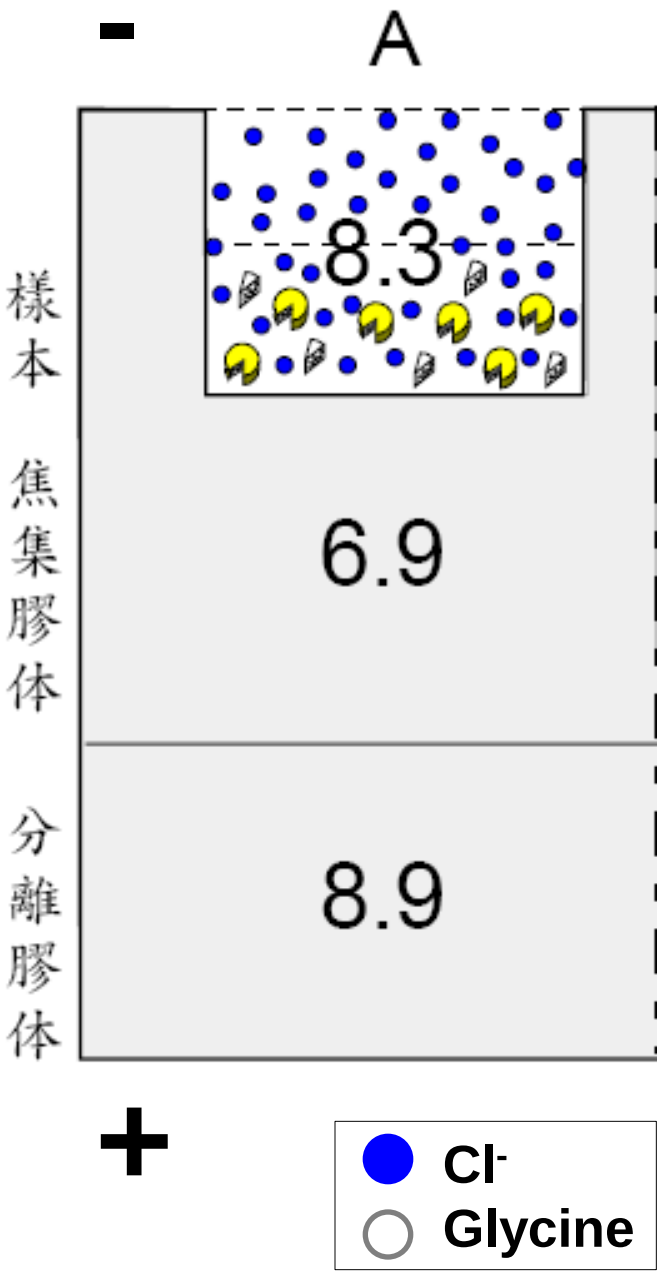
- 緩衝溶液的pH值為不連續性
- (top) 8.3 → 6.9 → 8.9 → 8.3 (bottom)

pI of Glycine = 6.9

電泳系統			緩衝溶液	pH	膠體濃度
1	(-)極緩衝溶液 (上層)		Tris-HCl (Gly.)	8.3	--
2	樣本溶液		Tris-**Gly** (no HCl)	8.3	--
3	膠體	集焦膠體	Tris-HCl (no Gly.)	**6.9**	4%
4		分離膠體	Tris-HCl (no Gly.)	8.9	5-20%
5	(+)極緩衝溶液 (下層)		Tris-HCl (Gly.)	8.3	--

電泳過程解析





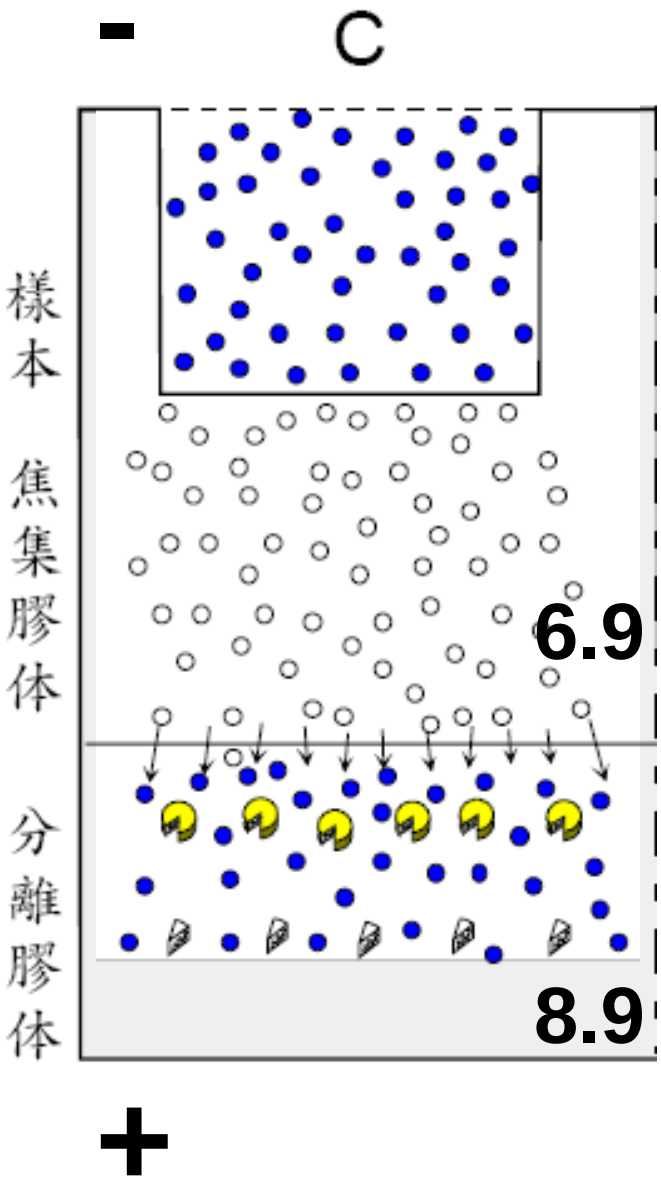
樣本

焦集膠体

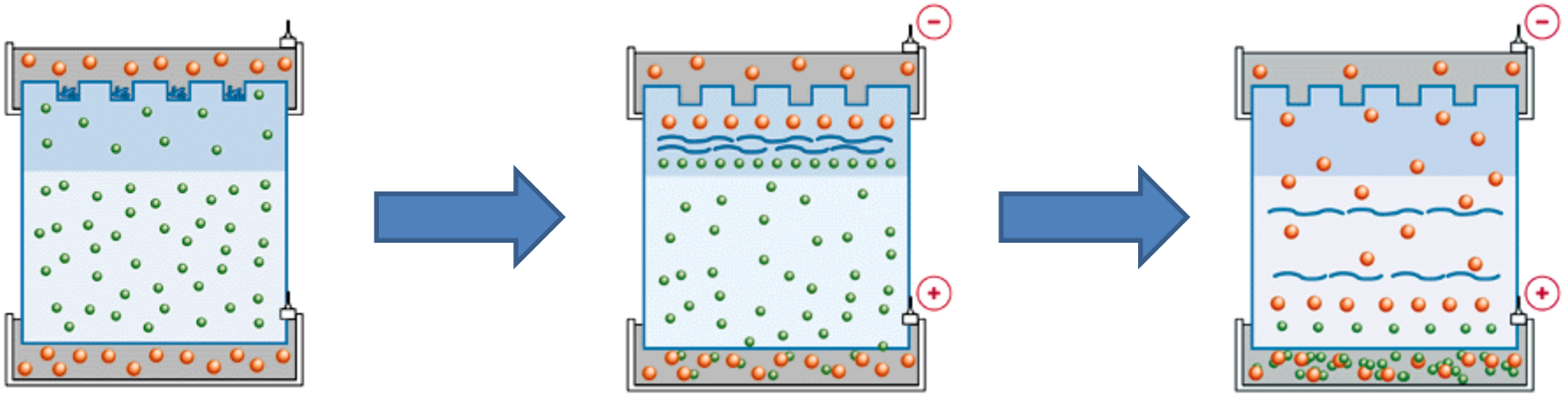
分離膠体

1. 膠體的緩衝液: 含Cl^- 離子; 無Gly
2. 樣品的緩衝液: 無Cl^- 離子; 含Gly
3. Glycine的等電位點(pI)值為 6.9
   - pH > 6.9時, Gly帶(-)電荷
     → 往(+)極移動

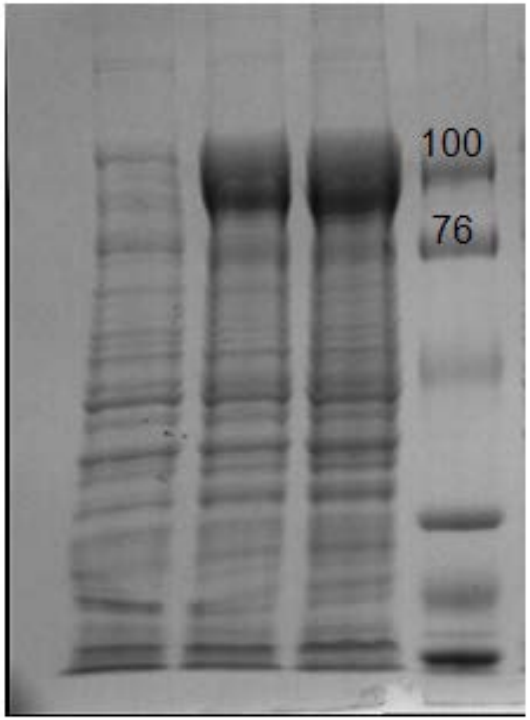
1. 電泳初開始時，Gly進入焦集膠體後，立刻變成不帶電的的分子(白點)，故泳動率變小。
2. 而此時氯離子(Cl^-)則很快的往正極泳動，因此在氯離子與Gly之間有一段缺乏離子的空間，電壓很高。
3. 然而兩電極之間，一定要有負離子來帶動電流，此時只有利用蛋白質分子來傳導，於是蛋白質分子在此離子缺乏空間，快速往正極泳動。
4. 直到蛋白質分子碰到氯離子的尾端，而聚集於斯，成一薄層，由側面觀之則成一細線。



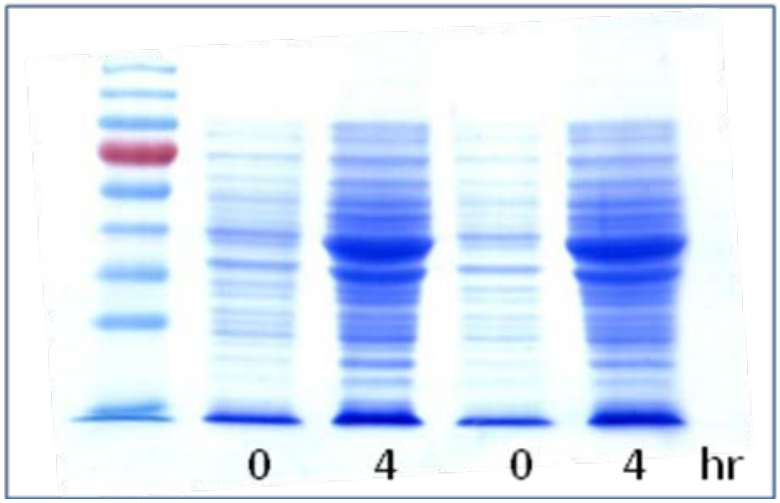
1. 此時Gly分子慢慢通過焦集膠体，又變回負離子，離子缺乏空間瓦解。
2. 樣本蛋白質泳動到分離膠体(pH=8.9)，膠体為正常濃度。由此即依其分子量、電荷等因素泳動。



pET43.1a-ECCD23



pMal-p2x-ECCD23



參考資料

- 台大莊榮輝教授:聚丙烯醯胺膠体電泳
- http://en.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE
- http://www.nationaldiagnostics.com