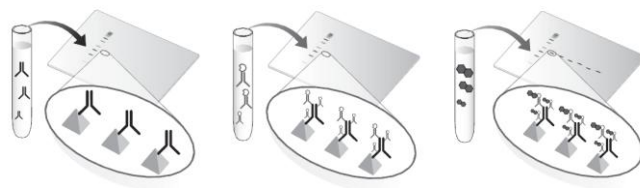


蛋白質圖譜與西方墨點法

Protein Profiler & Western Blot



實驗目標: 利用 **SDS-PAGE** 電泳圖譜和西方墨點法，檢測魚肉食品中是否真的含有魚肉。

實驗前資料:

蛋白質是什麼?

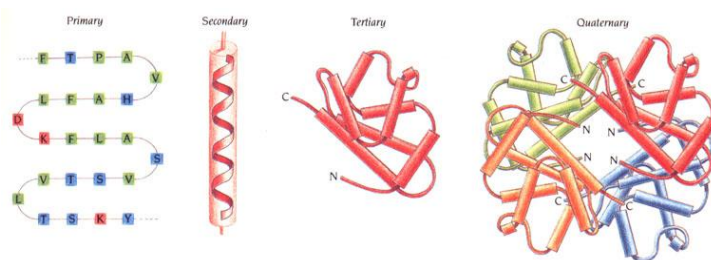
蛋白質是一種複雜的有機大分子化合物。隨著近代物理、化學的不斷發展，越來越多的蛋白質獲得了純的結晶。根據元素分析，除了有碳、氫、氧，通常還有少量的氮和硫。部分蛋白質還含有其他一些元素，主要是磷、鐵、銅、碘、鋅和鉬等等。這些元素在蛋白質組成中占的比例是：碳約占 50%、氫約占 7%、氧約占 23%、氮約占 16%、硫約占 0-3%和其他微量元素。蛋白質是生命最基本的組成部分之一，是生物化學的主要研究對象之一

蛋白質的結構?

蛋白質是由胺基酸通過肽鍵有序連接而形成的多肽鏈。**蛋白質的基本單位是胺基酸**，胺基酸的氨基和羧基縮合失水後形成肽鍵，由三個或三個以上胺基酸殘基組成的肽稱為多肽形成多肽鏈。

蛋白質的分子結構可劃分為四級：

- * 一級結構：組成多肽鏈的線性胺基酸序列。
- * 二級結構：依靠不同肽鍵的 **C=O** 和 **N-H** 基團間的氫鍵形成的穩定結構。
- * 三級結構：由一條多肽鏈的不同胺基酸側鏈間的相互作用形成的穩定結構。
- * 四級結構：由不同多肽鏈亞基間相互作用形成具有功能的蛋白質分子。



蛋白質的性質?

構成細胞骨架和動物大部分結構的纖維物質也是蛋白質：膠原和角蛋白組成了皮膚，毛髮和軟骨；**肌肉大部分也是由蛋白質組成。**

蛋白質對於它周圍的環境十分挑剔。它們僅在一個很小的 **pH** 範圍內並且含有少量電解質的溶液中保持他們的活性或天然狀態，許多蛋白質不能存在於蒸餾水中。**蛋白質失去了它的天然狀態就稱為變性。**變性的蛋白質通常除了隨機卷曲以外沒有其他的二級結構。處於天然狀態的蛋白質通常都是摺疊的。

蛋白質的功能?

催化	蛋白質的一個重要功能就是作為生物催化劑，酶
調劑	一些蛋白質對生物體內的新陳代謝具有調劑作用，例如，胰島素
運輸	一些蛋白質具有運輸代謝物質的作用，例如，離子通道
儲存	種子中的大量蛋白質，就是用來萌發時的儲備
運動	例如肌肉蛋白
結構	比如毛髮，等等
其他	比如防禦，進攻等等。例如人類的免疫過程中有大量蛋白質參與

工作紙一

你有聽過黑心食品嗎？

頭髮豉油 鞋底花膠

內地造假創意無限

17/08/2008

內地黑心食品層出不窮，輕則以劣質食材魚目混珠，重則以不能入口的工業原料加工醃製而成，嚴重影響消費者健康。近幾年，傳媒多次揭發內地大大小小的黑心食品製作工場，更愈揭愈多，無不令人膽戰心驚。

近年內地被揭製造假食物	
食物	製假材料和方法
髮菜	以粟米鬚和駱駝毛染色加工製成
豉油	將人類毛髮以氨基酸液酸解，再加入鹽、色素和香精製成
花膠	用魷魚、皮鞋底的生膠，加上雙氧水和硫磺醃製
乳鴿	將老鼠炸熟後，斬件供食用
菜脯	廢紙加鹽、色素製成
雞蛋	將苯甲酸鈉、氯化鈣和纖維素等化學物質混合製成
臭豆腐	將豆腐以大便、潲水和化工染料硫酸亞鐵泡醃而成
牛油	以包裝材料用的石蠟製作而成
味精	利用化肥尿素提煉而成
煉奶	以爛皮鞋和皮腰帶提煉出人造蛋白，作為製煉奶的原料
酒	以工業用甲醇製造
榨菜	以狗糞來醃製
豬紅	用豬血和牛血，加上糞尿內臟混和製造

在眾多黑心食物之中，最惡名昭彰的可說是「頭髮豉油」。內地不法商人竟覬準人體毛髮含有高蛋白質，於是利用人體毛髮混合黃豆煮製，酸解毛髮中的氨基酸，之後再加入鹽和色素，有關工場在被搗破之前，曾經一個月內生產出逾千噸的「頭髮豉油」。

黑心食物不單會食壞肚，有些更會食死人。深圳曾有無良商人，為求令饅頭雪白，竟在製作過程中加入工業原料硫磺。本港亦曾經有酒樓，購入貴價花膠，經浸泡後始發現花膠是由皮鞋底冒充而成，令人哭笑不得。

即使成本低的食物，造假情況亦不絕於耳。只售一元八塊的雞蛋、皮蛋亦成不法分子造假對象。蛋殼、蛋白、蛋黃無一是真，均由碳酸鈣、石膏、樹脂等化學物質混合製成，煮熟後與真雞蛋無異。不法商人甚至可調節蛋黃的顏色，造出假皮蛋和鹹蛋，假食品無日無之，不少內地網民譏諷無良商人，對造假食品的創意無限。

思考題

1) 在以前，你有聽過關於黑心食物的新聞嗎？

2) 你曾經有接觸，購買，甚至是食用過黑心食物嗎？

3) 你認為為什麼會有人製造黑心食物？

4) 你認為黑心食物對人體會帶來什麼影響？

5) 除了表上的黑心食物，你還聽過有其它的黑心食物嗎？

6) 有什麼方法可以判斷食品是不是黑心？

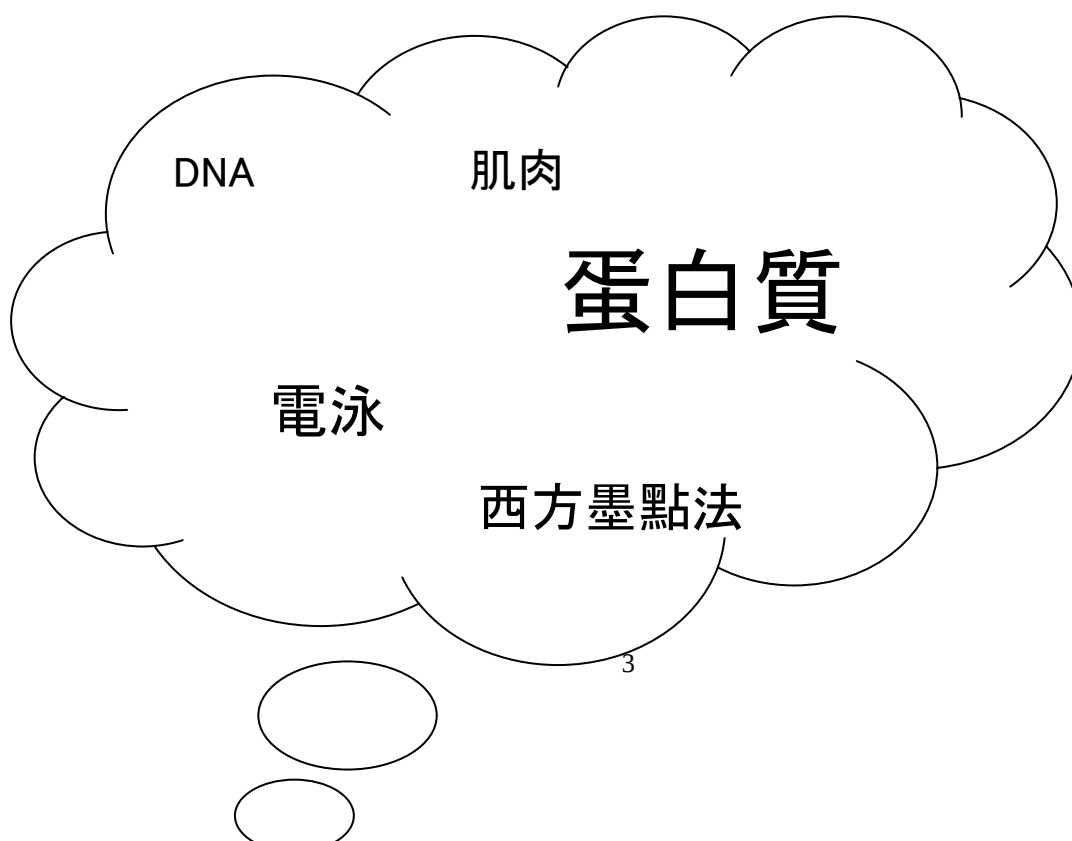
工作紙二

白飯魚都有假?



假設你是一名食品化驗室的員工，你手上有圖中的”白飯魚”的樣本，你會如何分辨圖中的”白飯魚”是否真的白飯魚，內裡是否含有魚肉？

試從以下的 KEYWORDS 中，思考如何用科學化的方法來解決這個問題，在一星期後進行堂上討論。（可善用網上資源），和為下週的實驗堂準備 10 克魚肉製品(如魚旦，魚肉腸，鯪魚肉)

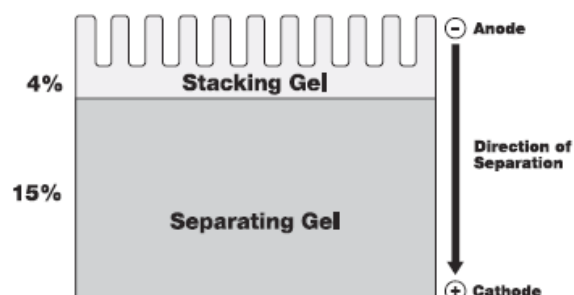


實驗原理

SDS—PAGE 電泳的基本原理

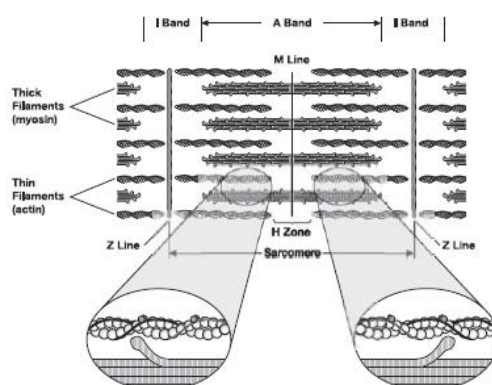
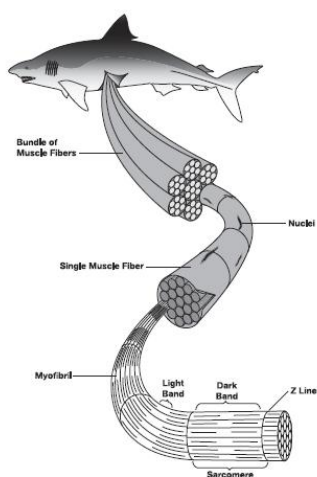
SDS-PAGE（十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳）(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 是目前最常用的分離蛋白質的電泳技術，是在聚丙烯醯胺凝膠系統中引進 SDS，**SDS 能斷裂分子內和分子間氫鍵，破壞蛋白質的二級和三級結構，強還原劑能使半胱氨酸之間的二硫鍵斷裂**，蛋白質在一定濃度的含有強還原劑的 **SDS 溶液**中，與 **SDS 分子按比例結合**，形成帶負電荷的 SDS-蛋白質複合物，這種複合物由於結合大量的 SDS，使蛋白質喪失了原有的電荷狀態形成僅保持原有分子大小為特徵的負離子團塊，從而降低或消除了各種蛋白質分子之間天然的電荷差異，由於 SDS 與蛋白質的結合是按重量成比例的，因此在進行電泳時，**蛋白質分子的遷移速度取決於分子大小**。若將已知分子量的標準蛋白質的遷移率對分子量對數作圖，可獲得一條標準曲線，未知蛋白質在相同條件下進行電泳，根據它電泳遷移率即可在標準曲線上求得分子量。

聚丙烯醯胺凝膠電泳(polyacrylamide gel electrophoresis)(PAGE)利用了兩層的聚丙烯醯胺凝膠。上層是 4%聚丙烯醯胺的**積層膠(stack gel)**，而下層是 15%聚丙烯醯胺的**分離層膠(resolving/separating gel)**。這種設計可以讓所有蛋白質樣本在同一時間進行電泳分離。由於每一個孔道中所加入的樣本容量都可能有所不同，使得樣本條帶有些較闊、有些較窄，最後不能同時進入凝膠進行泳動。所以，低濃度的積層膠可以讓所有蛋白質以較快速度泳動，而且層積在積層膠和分離層膠之間的交界，使得所有蛋白質樣本可以濃縮成較窄的條帶，然後同時進入濃度較高的分離層膠進行泳動。

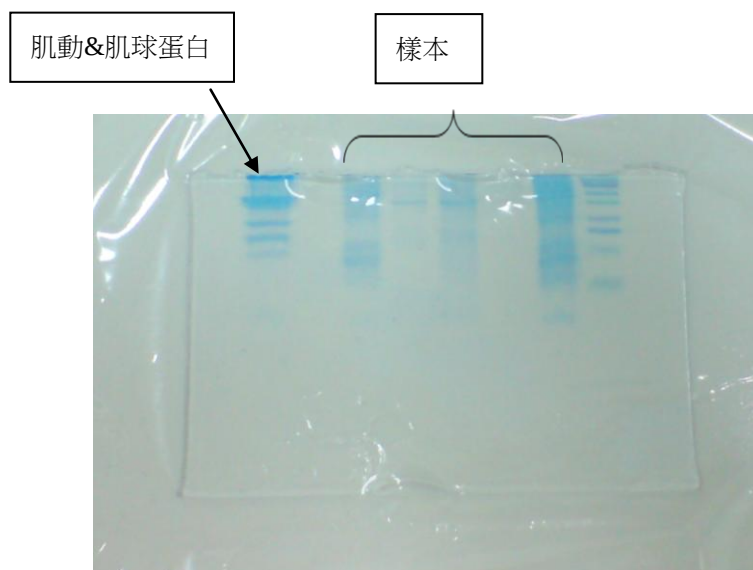


肌動蛋白(Actin)和肌球蛋白(Myosin)

在魚的肌肉中，均存在了肌動蛋白(Actin)和肌球蛋白(Myosin)，本實驗就是根據提取魚肉食品中的蛋白質，然後與以知的魚肌動和肌球蛋白樣本進行 SDS-PAGE 電泳，然後進行圖譜分析，嘗試判斷魚肉食品中是否真的含有魚肉。



分析結果



如果樣本蛋白質條帶的位置和肌動&肌球蛋白的吻合，則代表樣本含有魚類肌肉。

實驗試劑:

Laemmli sample buffer with DTT(Dithiothreitol)(Laemmli 樣本緩衝液與二硫蘇糖醇) [LSB], 600ul	1 支
Actin & myosin standard(肌動與肌球蛋白標準樣本)[AM], 17.5ul	1 支
Precision Plus Protein Kaleidoscope prestained protein standard(已染色的蛋白質標尺)[Std], 12ul	1 支
15%, 10-well, Ready Gel precast gel(已裝備的聚丙烯醯胺凝膠)	1 塊
1x Tris-glycine-SDS running bufferTris-(甘氨酸-SDS 電泳緩衝液) [TGS], 500ml	1 支
Bio-Safe Coomassie stain for proteins(考馬斯蛋白質染料), 100ml	1 支

實驗步驟:**[食物蛋白質提取]**

1. 根據魚肉樣品分別標記 2 支有蓋的 1.5ml 的小管及同時分別標記 2 支螺旋小管。
2. 往 1.5ml 小管裡加入 250ul Laemmli 緩衝液。
3. 將魚肉樣本切成約 $0.25 \times 0.25 \times 0.25 \text{cm}^3$ (■) 的小塊, 並放於 1.5ml 小管中, 蓋好蓋子。
4. 手指輕彈小管 15 次, 讓魚肉在緩衝液中充分搖動。
5. 室溫培養 5 分鐘。
6. 小心轉移緩衝液到螺旋小管, 不要把魚肉都吸走。
7. 於 95°C 水浴加熱 5 分鐘。

**[蛋白質圖譜分析]**

[以下實驗需要 2 組人共用 2 塊凝膠]

1. 將魚肉樣品、actin 和 myosin 標準品於 95°C 恒溫水浴 2-5min.
2. 按以下排列加入樣本:

	凝膠 1	凝膠 2	
孔位置	加樣量	加樣量	樣品
1 & 2	空白	空白	空白
3	5ul	5ul	蛋白質質量標準(Std)
4	10ul	5ul	魚肉樣品 1 (第一組)
5	10ul	5ul	魚肉樣品 2 (第一組)
6	10ul	5ul	魚肉樣品 3 (第二組)
7	10ul	5ul	魚肉樣品 4 (第二組)
8	10ul	5ul	Actin、myosin 標準品(AM)
9&10	空白	空白	空白

3. 在 200V 電壓下電泳 30min.
4. 電泳完畢後, 將凝膠 1 取下, 並放到染色盤用自來水沖洗. (若時間允許下, 沖洗凝膠 3 次, 每次 5 分鐘).

* 凝膠 1 繼續步驟 5; 凝膠 2 則進行西方墨點法.

5. 染色: 將水倒去後, 將 Bio-Safe Coomassie blue(考馬斯亮藍) 50ml 傾注入染色盤中, 輕搖至少一小時, 以取得好的染色效果.
6. 脫色: 染色後, 倒掉染料, 注入大量的清水過夜脫色. (必須至少更換水一次).

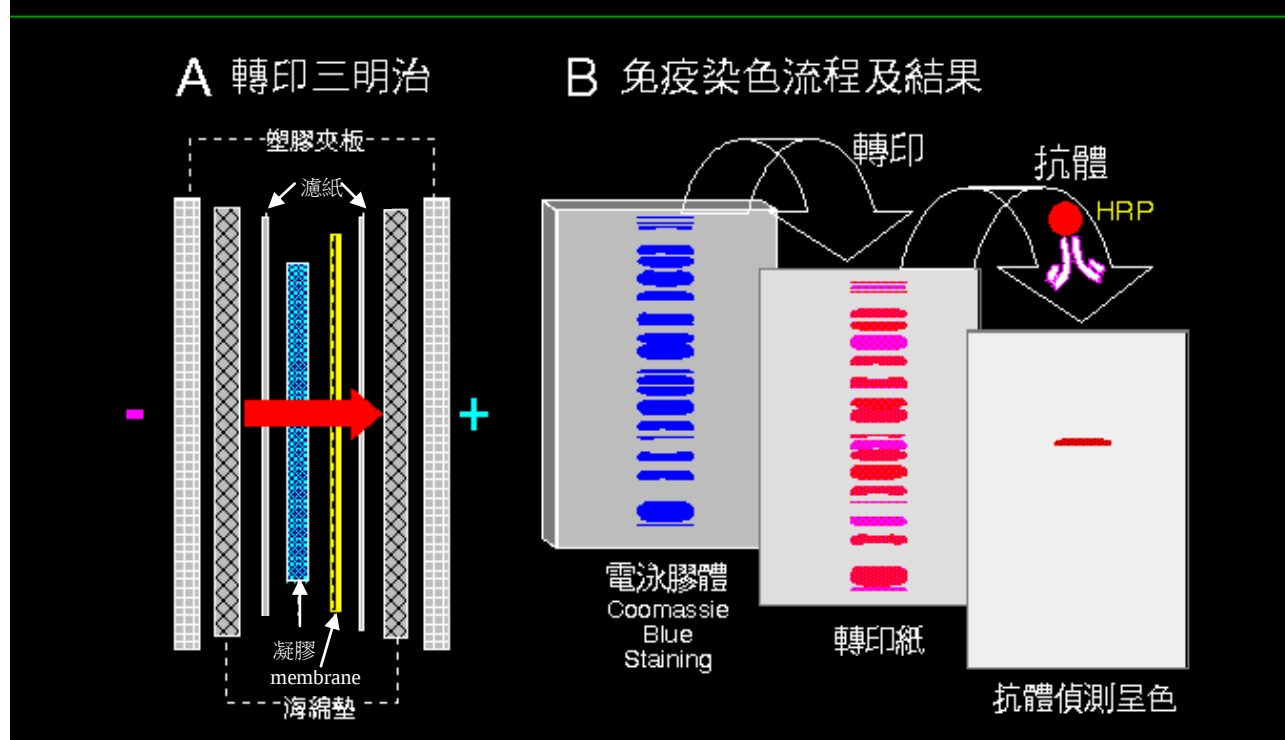


實驗原理

Western Blot(西方墨點法)是將蛋白質轉移到膜(membrane)上，然後利用抗體進行檢測。對已知表達蛋白，可用相應抗體作為一抗進行檢測，

電泳後的蛋白質由於凝膠上的孔隙比較密，比較難用其他物質(如抗體)來做更進一步的標定，若將凝膠上的蛋白質轉印至膜(membrane)上，再以第一、第二級抗體跟膜上的蛋白質做專一性的結合，最後利用抗體上攜帶的特殊標示物顯示出該蛋白質的存在。

■ 轉印及免疫染色流程：

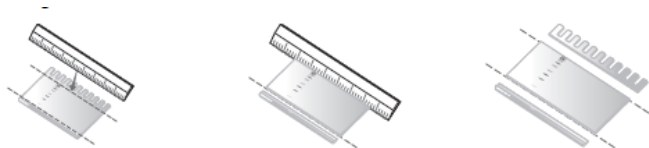


實驗試劑:

Blotting buffer – 1x Tris-glycine with 20% ethanol(轉印緩衝液), 100ml	1 支
Blocker – 5% dry blocker in wash buffer(阻斷劑), 25ml	1 支
Wash buffer – 1xPBS with 0.025% Tween20 (清洗緩衝液), 250ml	1 支
Ready-to-use primary antibody (anti-myosin antibody) (抗肌球蛋白的第一抗體)[PA], 10ml	1 塊
Ready-to-use secondary antibody-(第二抗體) [SA], 10ml	1 支
HRP color detection substrate (HRP 顯色底物), 10ml	1 支

實驗步驟:**[蛋白質轉印]**

- 1) 用間尺把凝膠的頭和尾截去



- 2) 把凝膠放置於盛有盒子中，加入轉印緩衝液(blotting buffer)(需要蓋過凝膠)，置於搖床上 15 分鐘



搖床速度:中

- 3) 把凝膠轉到膜上,需注意每層之間避免氣泡



[免疫染色]

1. 將膜浸泡在 25ml 的阻斷劑中(blocking solution)中, 室溫搖動 15 分鐘.



2. 倒掉 blocking solution, 換入一抗(primary antibody)10ml, 在搖床上搖動 10 分鐘



搖床速度:高

3. 用 50ml 清洗緩衝液(Wash buffer)快速清洗膜後倒掉.
4. 加入 50ml 清洗緩衝液, 中速搖動 3 分鐘.



搖床速度:中

5. 將清洗液倒掉後, 加入二抗 (secondary antibody)10ml, 將搖床速度調至快速, 搖動 5 分鐘.



搖床速度:高

6. 加入 50ml 清洗緩衝液進行快速清洗後, 將液體倒掉.
7. 加入 50ml 清洗緩衝液, 中速搖動 3 分鐘.



搖床速度:中

8. 倒走清洗緩衝液後, 換入 10ml HRP 顯色底物. 不斷搖動, 直至能看見條紋



如果樣本的位置出現任何有色條紋, 則代表樣本含有魚類肌肉.