

(4044) 等電聚焦電泳分析法

本章係提供生物技術產品分析之等電聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 之指導原則及流程。

一、一般原理

等電聚焦是基於蛋白質等電點不同而將蛋白質分離之電泳方法。此分離法是在含兩性電解質 (ampholytes) 之聚丙烯醯胺膠體或瓊脂糖膠體中所進行，於電場作用下，兩性電解質在膠體中移動形成 pH 梯度。有時會以含有固定化 pH 梯度 (immobilized pH gradient) 之膠體，這種膠體於製備過程中需要在特定之區域中加入弱酸及弱鹼。當蛋白質到達與其等電點 (isoelectric point, pI) 一致之 pH 區域時，因電荷被中和而停止移動。根據選擇之兩性電解質混合物之不同，可以形成不同 pH 範圍之梯度。

二、理論方面

當蛋白質到達其等電點位置時，其淨電荷為零，於電場作用下不會在膠體基質中移動，但仍可藉由擴散作用移動。pH 梯度強制蛋白質停留在其等電點並使之濃縮，這種濃縮效應稱之為 "聚焦"。增加電壓或減少進樣量可提高區帶之分離程度。由於產熱必須及時消散，施加之電壓必須有所限制。以恆溫循環器有效控制冷卻盤及使用較薄之膠體可防止膠體升溫以得到銳利之聚焦區帶。分離效果可由最小等電點差 (ΔpI) 來決定，可根據下式計算分離兩個相鄰區帶所需要之最小等電點差：

$$\Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}}$$

公式中 D 為蛋白質之擴散係數； dpH/dx 為 pH 梯度；E 為電場強度 (V/cm)； $-d\mu/dpH$ 為溶質在等電點附近 pH 值之移動能力變化量。對於一特定蛋白質，D 及 $-d\mu/dpH$ 為不可改變的值，因此以較窄的 pH 範圍及增加電場強度可以改善分離效果。

採用兩性電解質膠體載體進行等電聚焦得到之蛋白質區帶，具有相當好的解析度。以固定化之 pH 梯度或許可得到更好的解析度，此類固定化 pH 梯度之膠體中，類似兩性電解質之緩衝物質透過共聚合固定於膠體基質。兩性電解質膠體可解析等電點差異 pH 值 0.02 之蛋白質，而固定化 pH 梯度膠體甚至可解析等電點差異大約 pH 值 0.001 之蛋白質。

三、實際操作方面

從操作之觀點來看，特別要注意檢品之特性及製備。檢品含鹽將可能帶來問題，因此盡可能以去離子水或 2% 之兩性電解質溶液製備檢品，必要時應進行透析或膠體過濾處理。薄層聚丙烯醯胺膠體完成聚焦所需之時間可以如下方法：將有色之蛋白質檢品

(如：血紅素) 加至膠體表面不同位置，然後施加電場，當所有位置之檢品之聚焦帶移動至同一位置，即表示已達穩定狀態。有些實驗流程，其完成聚焦之時間，為檢品加至膠體後到達穩定狀態所消耗之時間。

利用與合適之標準品製備及等電聚焦校正用蛋白質進行比較，等電聚焦可做為檢品之鑑定分析方法。等電聚焦可用以作為限量檢測方法 (limit test)，即將檢品區帶之密度與標準品區帶之密度進行主觀比較。如以光密度測定計或類似設備對光密度值進行測定，透過測定區帶中蛋白質之相對濃度並進行方法學驗證，則可將等電聚焦應用於定量檢測。

四、設備

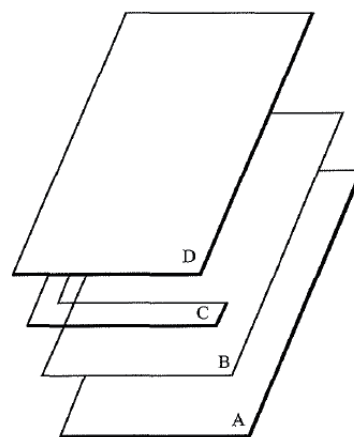
等電聚焦之設備由一可輸出恆定電壓、電流及功率之可調式裝置所組成。2500 伏特被認為是在特定操作條件下最適合之電壓。建議使用功率可達到 30 瓦特之穩壓電源。此設備另包括一個硬質塑膠製成之等電聚焦槽，內含由適當材質製成之冷卻板以支撐膠體；帶有鉑電極之塑膠上蓋，其電極透過以陽極及陰極電解質溶液浸潤過並具有合適寬度、長度及厚度之紙芯與膠體連接。

五、聚丙烯醯胺膠體等電聚焦：詳細方法

除正文另有規定外，一般在厚聚丙烯醯胺平板膠體上，進行等電聚焦操作均採用下面詳細說明之測定方法。

(1) 膠體製備

- ① 模具：包含一玻璃板 (A)，其上可供放置聚酯膜 (polyester film) (B)，聚酯膜可便於膠體處理；一或多個墊片 (spacer) (C)；第二片玻璃板 (D)；及用於各個部件固定之鉗夾 (見圖一)。



圖一 模具

- ② 7.5% 聚丙烯醯胺膠體：將丙烯醯胺 29.1 g 及亞甲基雙丙烯醯胺 (methylenebisacrylamide) 0.9 g 溶於水 100 mL 中。取此溶液 2.5 倍體積加入藥典正文所規定之兩性電解質混合物，加水稀釋到 10 倍體積。小心混勻，去除溶液中氣體。

③ 模具之準備：將聚酯膜置於下方玻璃上，放上墊片，再覆蓋第二塊玻璃板，以夾子夾緊固定。使用前，將混合物置於磁力攪拌器上，加入 0.25 倍體積之 100 g/L 過硫酸銨鹽 (ammonium persulfate) 及 0.25 倍體積之丁二胺 (tetramethylenediamine; TEMED)，混合後立即注滿模具之兩層玻璃板之間隙。

④ 等電聚焦聚丙烯醯胺膠體之固定液：將磺基水楊酸 35 g (sulfosalicylic acid) 及三氯乙酸 (trichloroacetic acid) 100 g 加入水 1000 mL 中後混合。

⑤ 考馬氏 (Coomassie) 染色液及退染液：使用聚丙烯醯胺膠體電泳法 (通則 OOOO) 之相同溶液。

(2) 操作流程

拆卸模具，利用聚酯膜將膠體轉移至一經過冷卻及以些許 mL 適當液體潤濕之支撐物上，小心避免產生氣泡。依照各品項正文之說明，配製測試檢品溶液及對照品溶液。點樣前，將 10 mm×5 mm 大小之紙條置於膠體上，以預先配製好之測試檢品溶液及對照品溶液浸潤，另使用已知等電點之蛋白質作為 pH 標記以校正膠體。如膠體上有用於放置樣本之預鑄孔，則不需浸潤紙條。剪出兩條與膠體長度相同之紙條，分別用電解質溶液浸潤：酸性溶液置於陽極端，鹼性溶液置於陰極端。陽極及陰極溶液之成分於各品項正文中有具體說明。將浸潤過之紙芯分別置於距膠體邊界數 mm 處，對齊蓋板以使電極與紙芯接觸 (對應於陽極及陰極)，依正文描述，施予電壓進行等電聚焦。當標準蛋白質之混合物停止移動時關閉電源，使用鑷子移去點樣紙條及兩個電極紙芯，將膠體浸入等電聚焦聚丙烯醯胺膠體固定液中，室溫下輕微搖晃 30 分鐘。倒去溶液，加入退染液 200 mL，再搖晃一個小時。倒去溶液，加入考馬氏染色液作用 30 分鐘。於退染液中經由被動擴散使膠體退色，直到區帶清晰可見。於電泳圖中確定區帶之位置及強度。

(3) 操作流程之變化 (須進行方法確效)

採用不同於上述詳細步驟之替代方法時，必須經過驗證。這些調整包括使用商品化之預鑄膠體及商品化之染色及退染之試劑套組、使用固定化之 pH 梯度、使用膠體條，以及使用不同尺寸之鑄膠片匣，包括超薄膠體 (0.2 mm)。點樣方法之調整包括使用不同檢品體積或使用點樣遮片或非紙芯進行點樣。電泳條件之調整包括根據膠體及儀器之大小改變電場強度、使用固定之遷移時間而非主觀判斷區帶停止移動所需之時間、採用預聚焦步驟、使用自動化儀器，以及使用瓊脂糖膠體。

(4) 等電聚焦流程之確效

當使用上述替代之操作流程時，必須進行方法確

效。下述標準可用以驗證分離能力：形成符合預期之穩定 pH 梯度特性，例如可用已知等電點之有顏色 pH 標記物來進行評估；與化學參考品之電泳圖譜進行比較；及其他正文所描述之確效標準。

六、一般方法之特殊調整

針對特定分析物可能需要對上述之一般方法作調整，於正文中有詳細描述。這些調整可能包括在膠體中添加尿素 (3M 濃度通常就能維持溶液中之蛋白質良好，而濃度最高可使用到 8M)。一些蛋白質會於其等電點處發生沉澱，此時可在膠體中加入尿素以防止蛋白質沉澱。如使用尿素，必須使用新鮮配製之溶液以防止蛋白質氨基甲酰化 (carbamylation)。其他調整包括改變染色方法、使用膠體添加劑例如非離子清潔劑 (例如辛烷基葡萄糖苷; octylglucoside) 或兩性清潔劑 (例如 CHAPS 或 CHAPSO)，以及在檢品中加入兩性電解質以防止蛋白質聚集或沉澱。

注意事項

- ① 雖檢品可置於膠體之任何位置，但為使蛋白質避開極端之 pH 環境，檢品不應加在接近電極處。方法開發時，分析人員可嘗試將蛋白質置於三處 (如：膠體中間及兩端)。把蛋白質加在膠體相對兩端所得到之電泳圖譜，可能不完全相同。
- ② 當膠體聚焦之時間太長，pH 梯度會隨著時間減弱，便可能出現所謂陰極偏移現象 (cathodic drift)。雖其成因尚未被完全了解，然電滲現象 (electroendosmosis) 及二氧化碳之吸收可能導致陰極偏移。陰極偏移現象可觀察到已聚焦之蛋白質往陰極末端移動。可嘗試以固定化 pH 梯度解決此問題。
- ③ 進行聚焦時，對膠床 (膠之支撐物) 進行有效冷卻 (大約 4°) 非常重要。等電聚焦時使用高電場強度，可能導致過熱而影響聚焦品質。