

綠色螢光蛋白質純化實驗

(Green Fluorescent Protein Purification kit)

一、 介紹

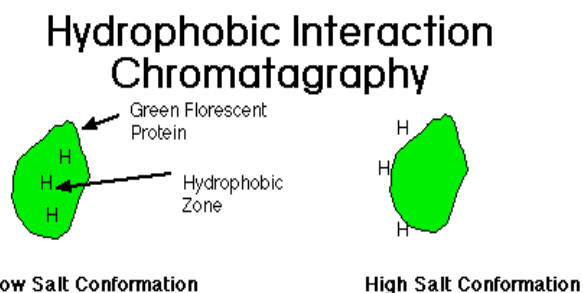
在生物技術產業化過程中，當通過研究發現有用的蛋白質後，便希望得到這個蛋白質。而在不同的生物體往往產生大量的不同種類的蛋白質，如何純化所需的蛋白質是現代生物技術面臨的重要課題。層析是目前生物產業用於蛋白質純化的最通用的手段。本實驗通過層析的方法純化綠色螢光蛋白，由於該蛋白質在紫外下發綠色螢光，學生可監測整個層析的過程。

二、 實驗基本原理

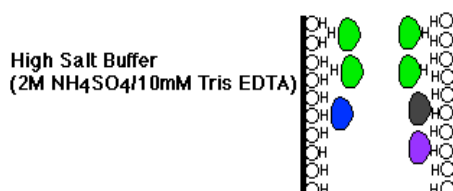
在成功轉化了綠色螢光蛋白基因的細菌中，通過溶菌酶（Lysozyme）的作用和低溫過程，可將細菌表達的不同蛋白裂解在溶液中。

利用不同蛋白與疏水柱結合程度不同，用層析的方法將綠色螢光蛋白與其他蛋白分離開。

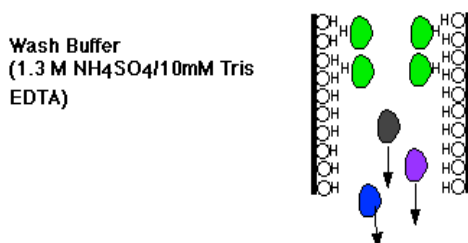
在高鹽濃度下，蛋白的疏水端露在外。而在低鹽濃度下，蛋白的親水端在外，而疏水端藏在裏面。



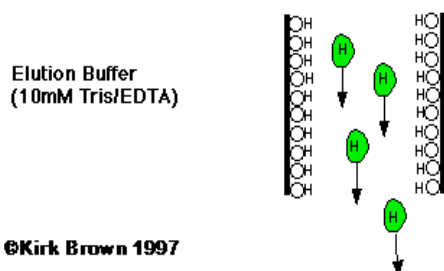
在高鹽濃度下，蛋白的疏水端露在外。蛋白結合在柱子上。



經洗脫液洗滌後，綠色螢光蛋白由於疏水性能強，仍結合在柱子上，而其他蛋白由於疏水性能弱，被洗脫。



用 TE 溶液（鹽濃度低），可將結合在柱子上的綠色螢光蛋白溶解，並用收集管收集。



©Kirk Brown 1997

三、 實驗步驟：

1)

1. 用紫外燈檢查在 LB/amp/ara 板上的菌落，應該會發出綠色螢光。
2. 用吸液管吸取 250 ul 的 TE 溶液加入小管中。
3. 使用接種環分別從平板中挑取單個菌落（單克隆），加在盛有 TE 溶液的小管中（轉動接種環數次，使菌落能溶於溶液中）。
4. 加一滴溶菌酶消化細菌的細胞壁，用手指輕彈使反應充分。並加以冷凍，使細菌破裂。

2)

1. 用手溫使小管解凍，離心 10 分鐘，分離不能溶解的碎片。
2. 在離心的時間裏，將純化柱的帽和尾打開，使其中的液體流乾（約 3 到 5 分鐘）。
3. 加入 2 ml 平衡緩衝液(EBF)使純化柱平衡。在約還剩 1 ml 平衡緩衝液時加上柱“尾”備用。
4. 離心結束後，用紫外燈檢測，應該發現上清發出綠色螢光。將上清用吸液管吸出至另一乾淨小管中。
5. 用吸液管在上清中加入 250 ul 上樣結合緩衝液(BBF)。

3)

1. 將三根試管分別標記上 1、2、3。先選用 1 號收集管。打開柱的尾部，使剩餘的平衡緩衝液流至液面與柱內填料面相切。
2. 此時使用一根新的吸液管，沿純化柱的內壁緩緩加入混合均勻的樣品液 250 ul（發綠色螢光的上清和結合緩衝液的混合液），同時用紫外燈監測。觀察綠色螢光蛋白在與純化柱的結合。
3. 換用 2 號收集管，加入 250 ul 清洗緩衝液(WBF)，洗去未結合的雜質，同時用紫外燈觀測。注意記錄所看到的螢光處於什麼位置。
4. 用 750 ul 的 TE 緩衝液將綠色螢光蛋白從純化柱上洗脫，同時用紫外燈觀測，見有綠色螢光蛋白下來的時候，換用 3 號收集管收集純化好的綠色螢光蛋白。
5. 在紫外燈的激發下觀察 3 根試管中所收集物質的差異。

6. 思考題

1. 請解釋以下儀器，試劑在實驗中的用途：

- a) 紫外 (UV) 燈、b) 培養箱、c) 冰浴、d) 溶菌酶

2. 請解釋為什麼在這兩管培養液中都有綠色螢光蛋白的表達？

3. 請觀察每個純化實驗步驟中何處有綠色螢光，為什麼？

		是否觀察到綠色螢光蛋白	解釋原因
2.1 離心後	上清		
	沉澱		
3.1 離心後	上清		
	沉澱		
4.2 上樣後	柱子上		
	管 1 內		
4.2 洗滌後	柱子上		
	管 2 內		
4.3 加入 TE 後	柱子上		
	管 3 內		

4. 解釋以下試劑的作用，並按鹽濃度的高低排列？

- a) 平衡緩衝液 (Equilibration Buffer)
 b) 接合溶液 (Binding Buffer)
 c) 洗滌液 (Wash Buffer)
 d) 洗脫液 (TE Buffer)