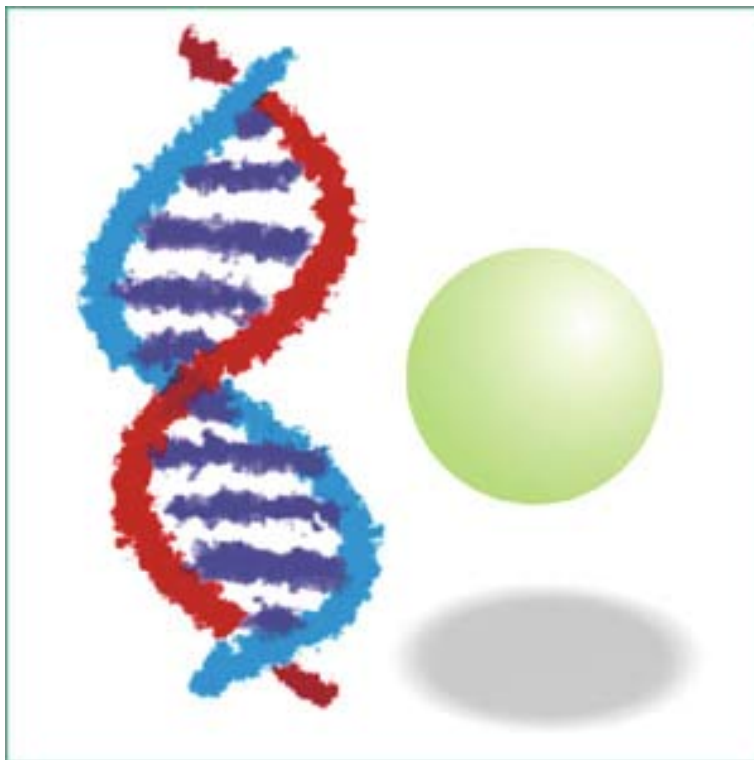




生化科技系
BST

BCX

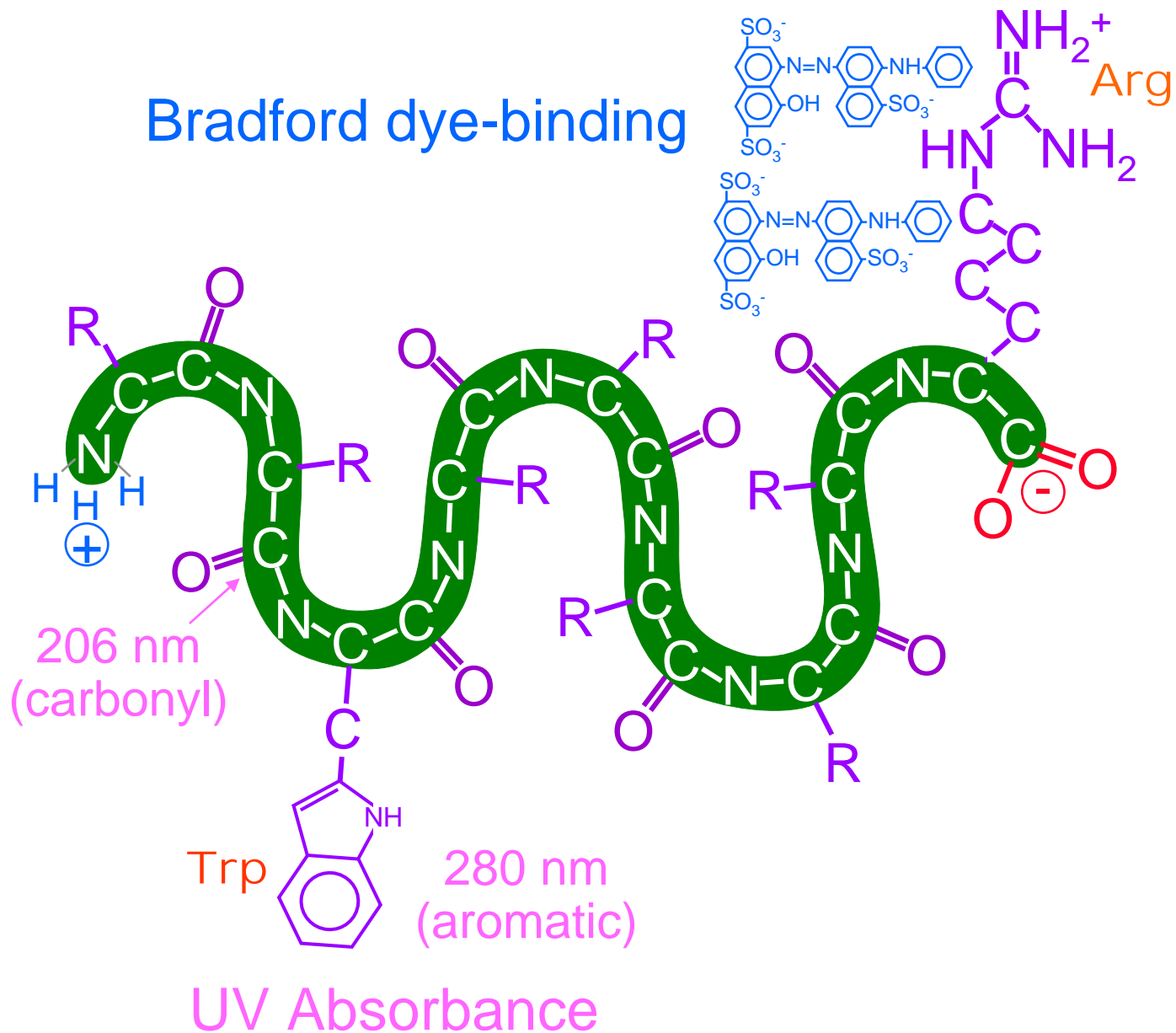


P2

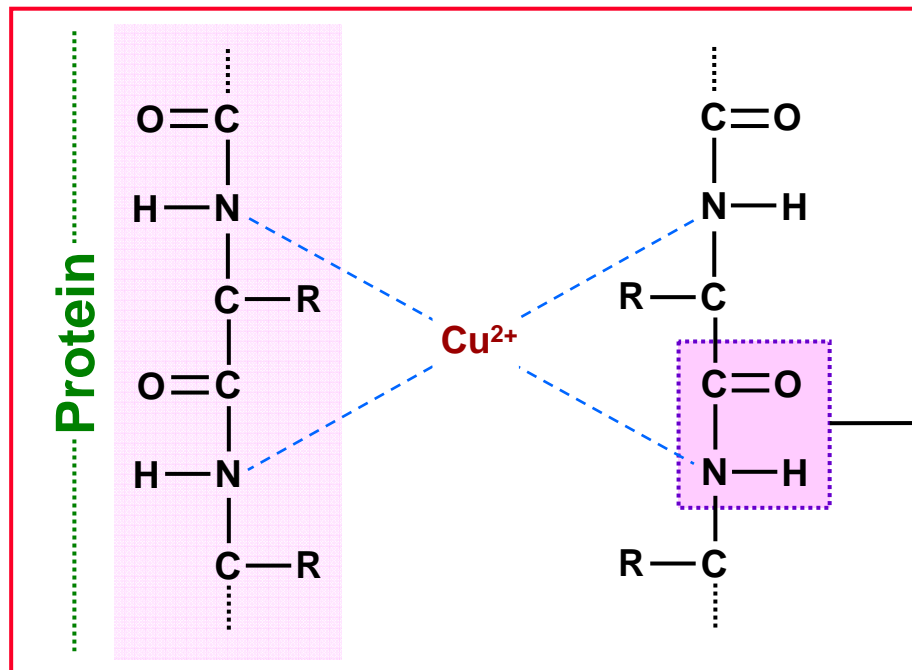
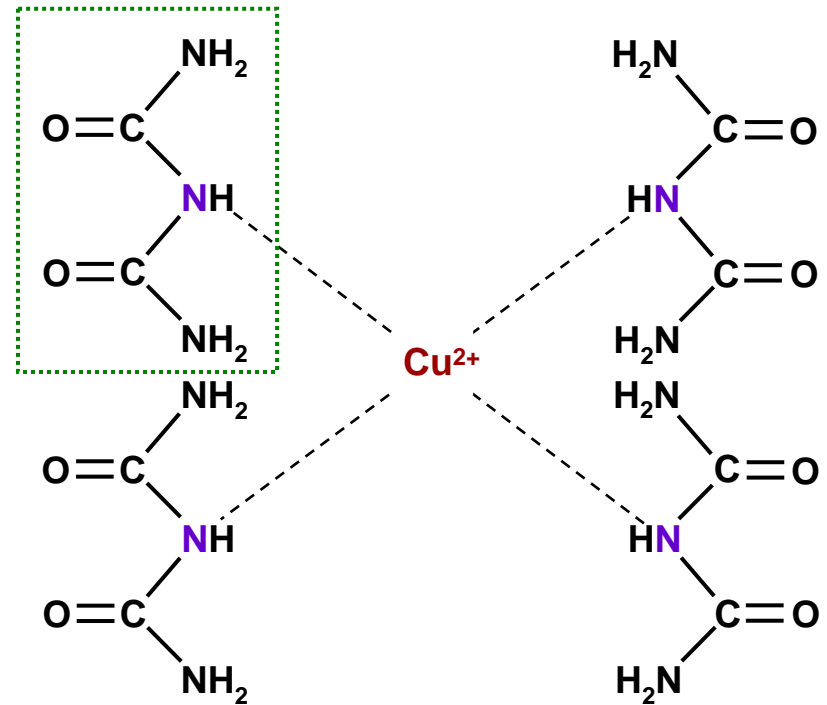
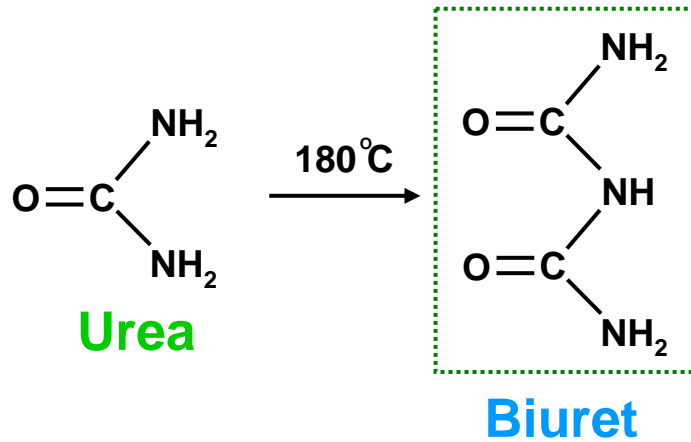
生物化學實驗

親和層析法

■ 各種蛋白質定量法原理：



蛋白質定量法：Biuret method



Peptide bond

■ 蛋白質定量法：

Biuret method 加強版

■ Lowry method (Folin-phenol 試劑法)

反應前半為Biuret Method。二價銅離子在鹼性溶液中，會與蛋白質 peptide bonds 上的 nitrogen 結合，並還原為一價銅離子。一價銅離子與Tyr、Trp或Cys會使 Folin reagent 內的 phosphomolybdic-phosphotungstic acid (磷鉬酸與磷鎢酸) 還原為藍色，並在波長 660 nm 有很強的吸光。此法比紫外光吸收法靈敏 10-20 倍，較 Biuret method 靈敏 10-100 倍。

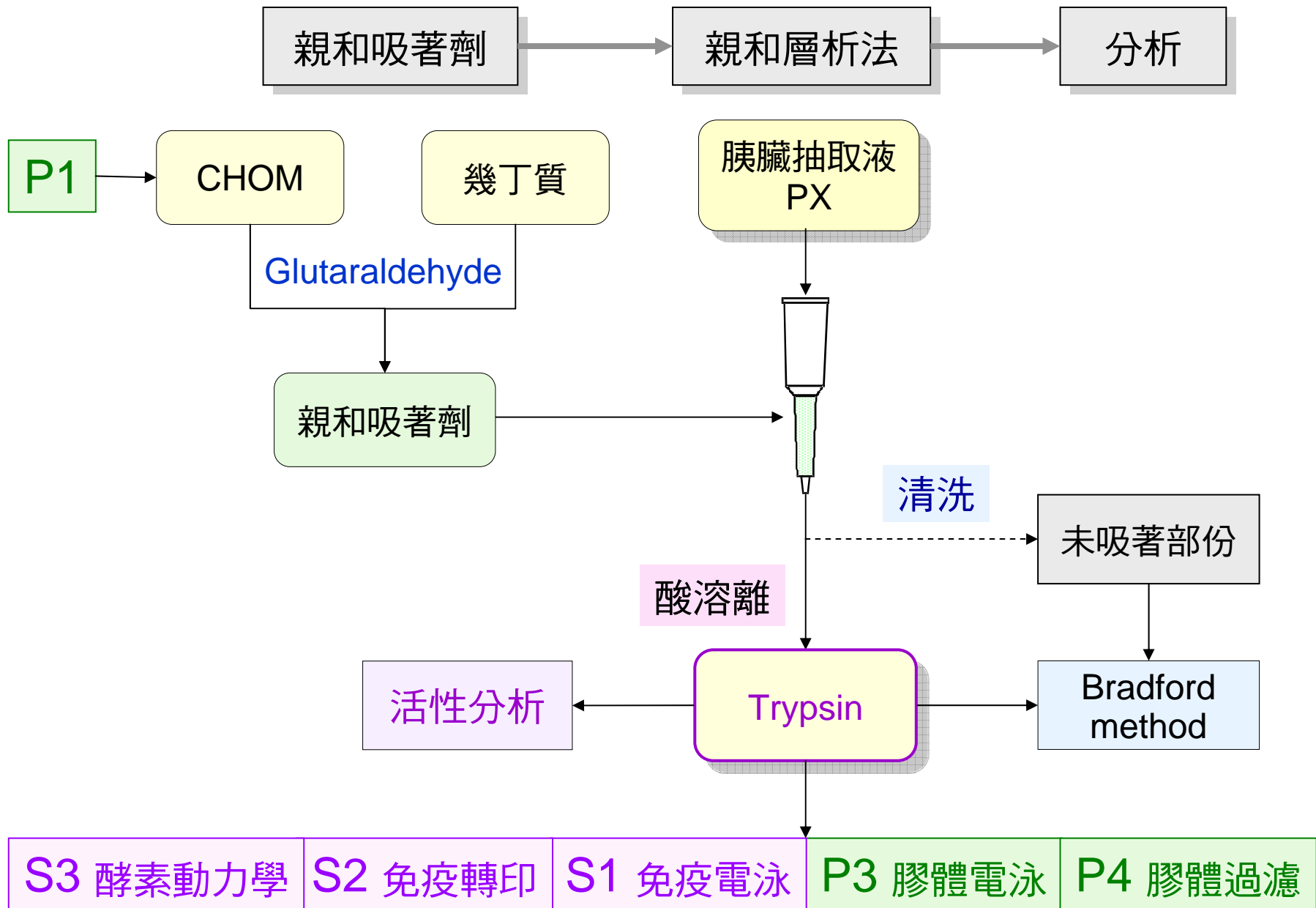
Lowry et al. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

■ Bicinchoninic acid (BCA) protein assay

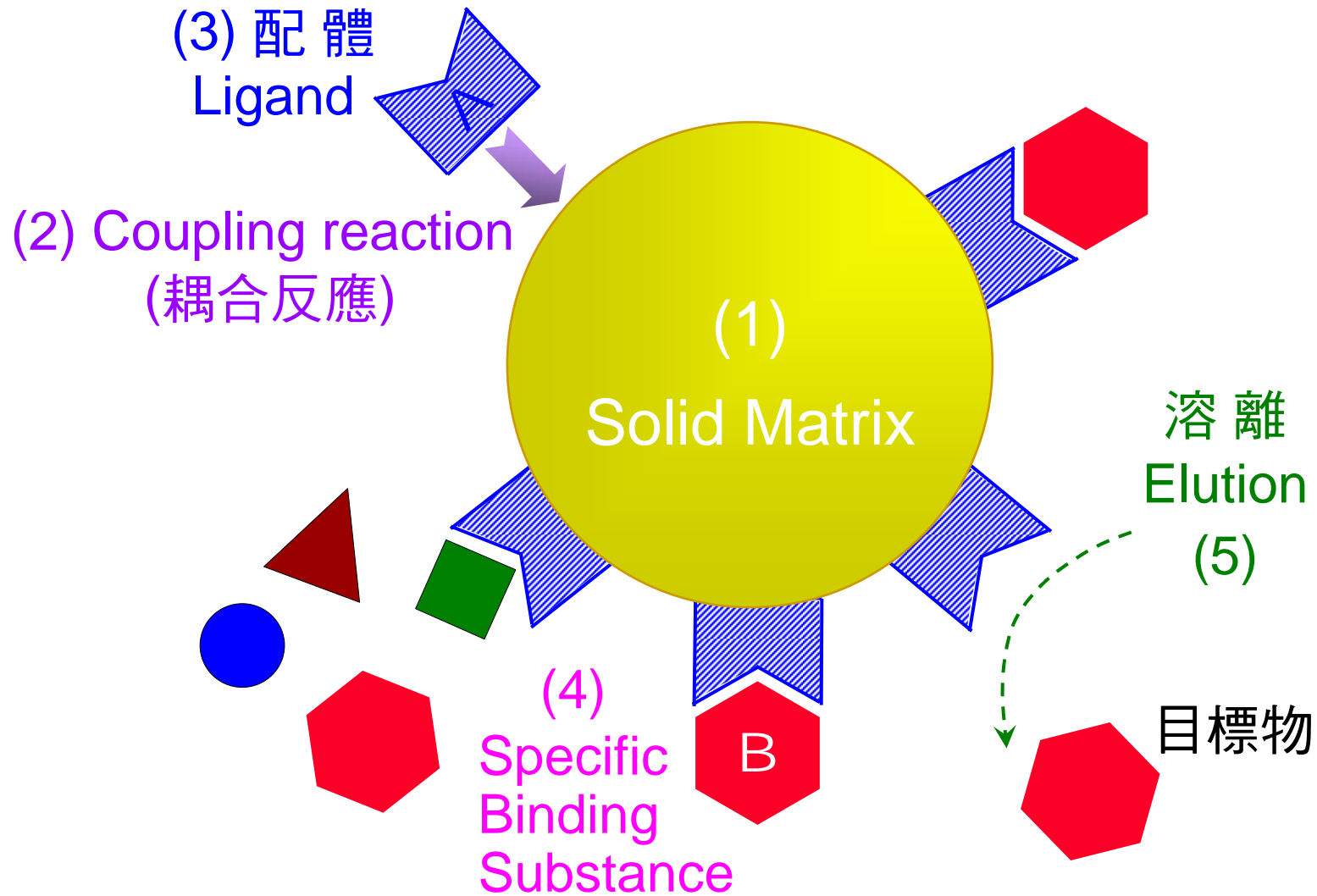
亦是 Biuret 法的延伸。在鹼性溶液中，蛋白質使銅離子由二價還原成一價後，進一步的以 BCA 與一價銅離子結合產生很深的紫色，在波長 562 nm 有很強的吸光。本法的優點在於鹼性溶液中 BCA 比 Folin reagent 穩定，並且只需一個操作步驟。

Smith et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85

P2 親和層析法

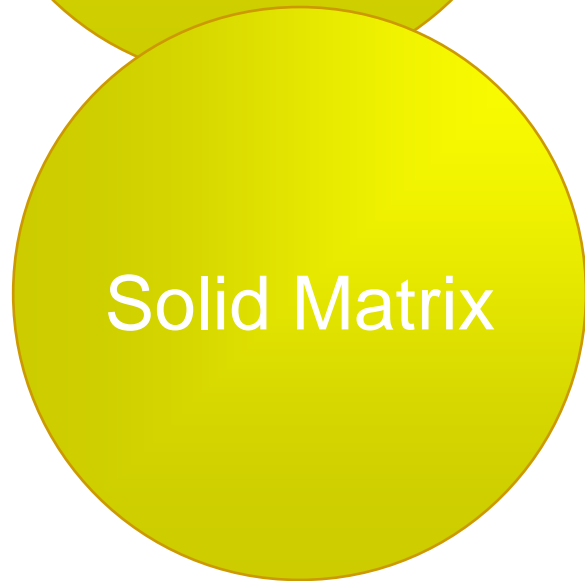
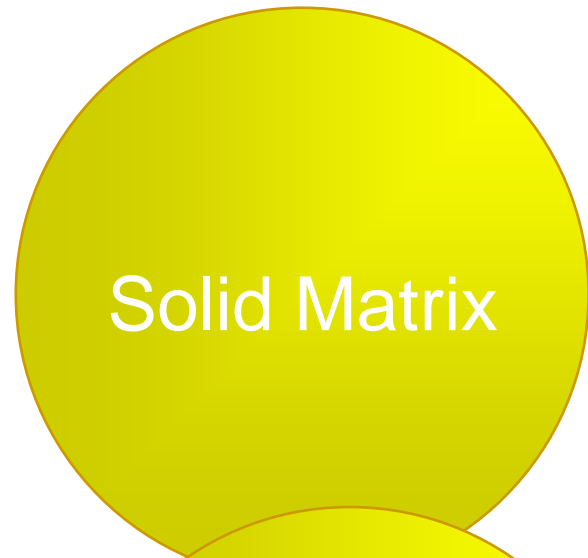


■ 親和層析法的幾項要素：



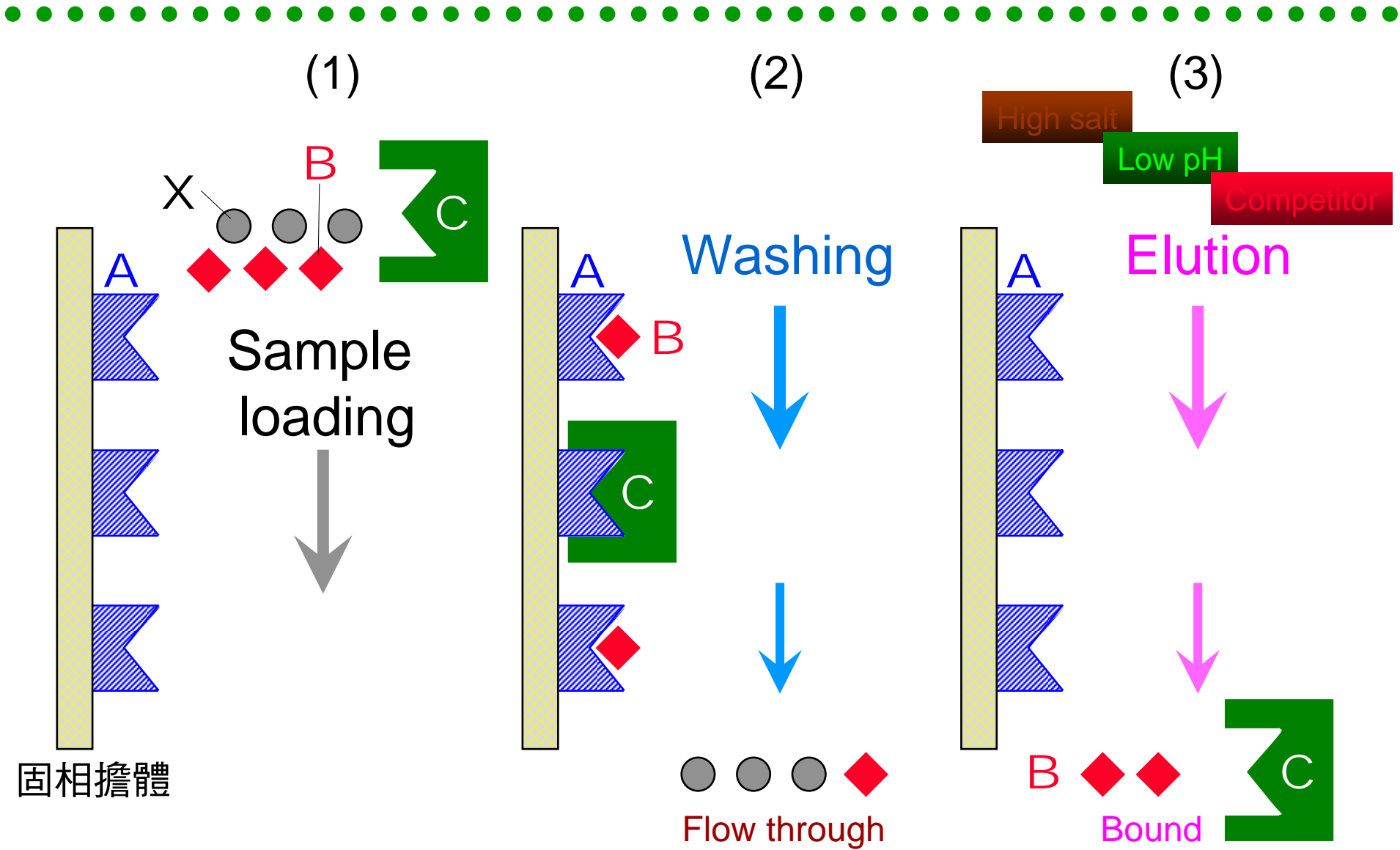
■ 固相擔體之選擇：

2

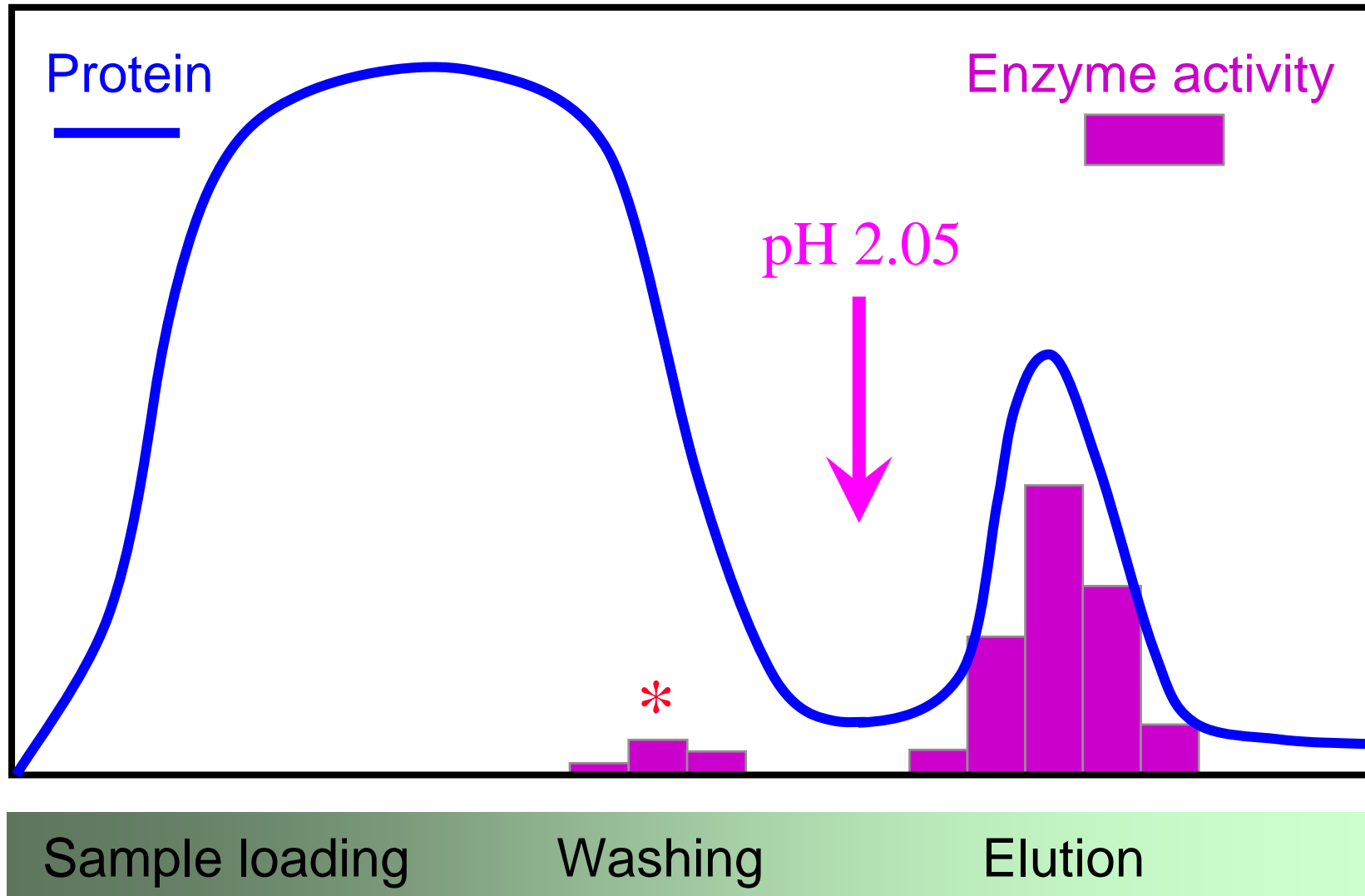


- 最好是均一的球狀顆粒並具有多孔網狀結構，製成的管柱才能有較佳的流速。
- 具有足夠的化學基團，經活化後能與大量的 ligand 結合。
- 物理及化學性質穩定，不因各種 pH 值、離子濃度、溫度或界面活性劑而改變其結構。
- 沒有或極少非專一性的結合 (如：離子交換或疏水性之結合)。

■ 親和層析法的作用機理：

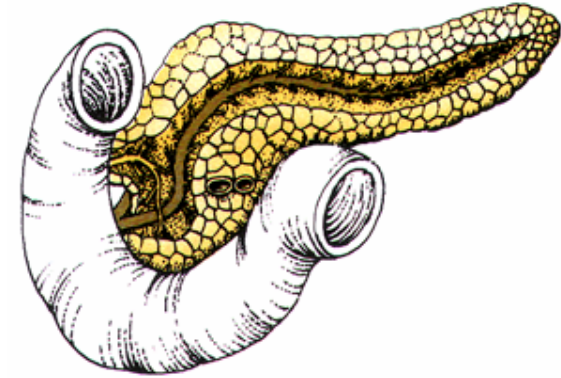
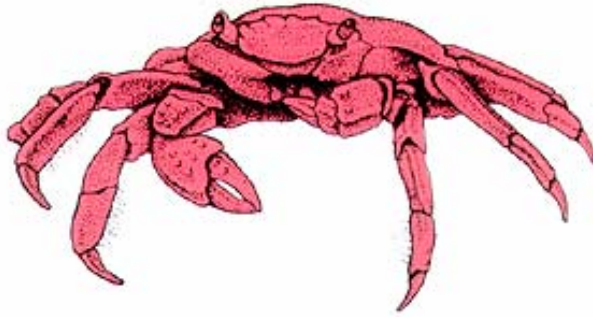


■ 典型的親和層析操作：

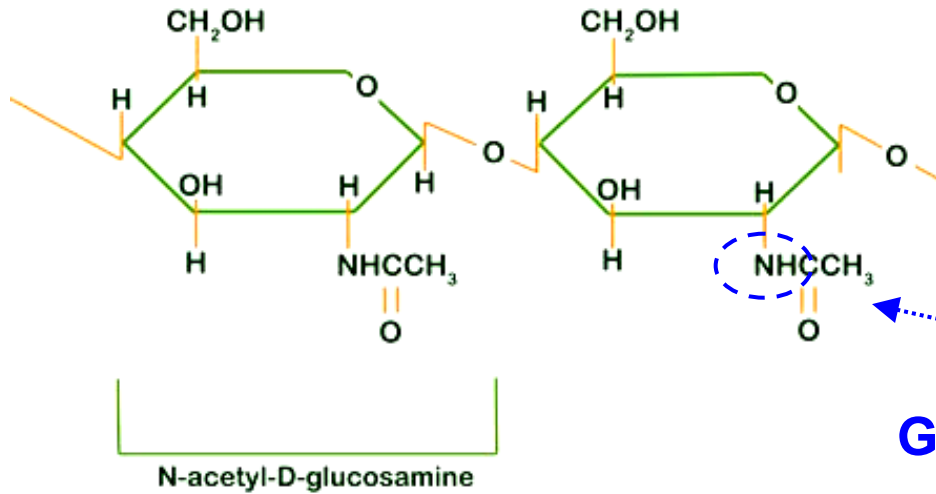


■ 親和層析法實例的原始材料：

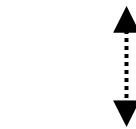
5



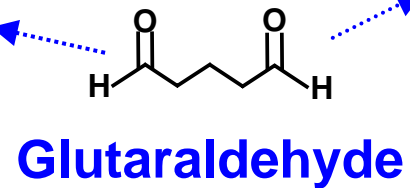
Chitin



Trypsin



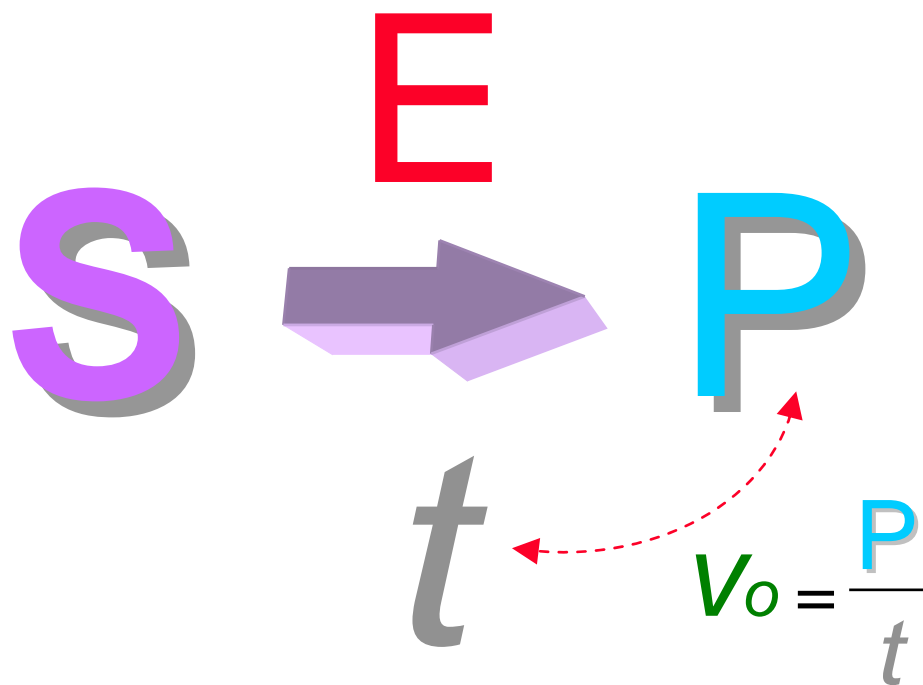
CHOM



■ 酵素活性的測定：

酵素量要適中

基質
要過量



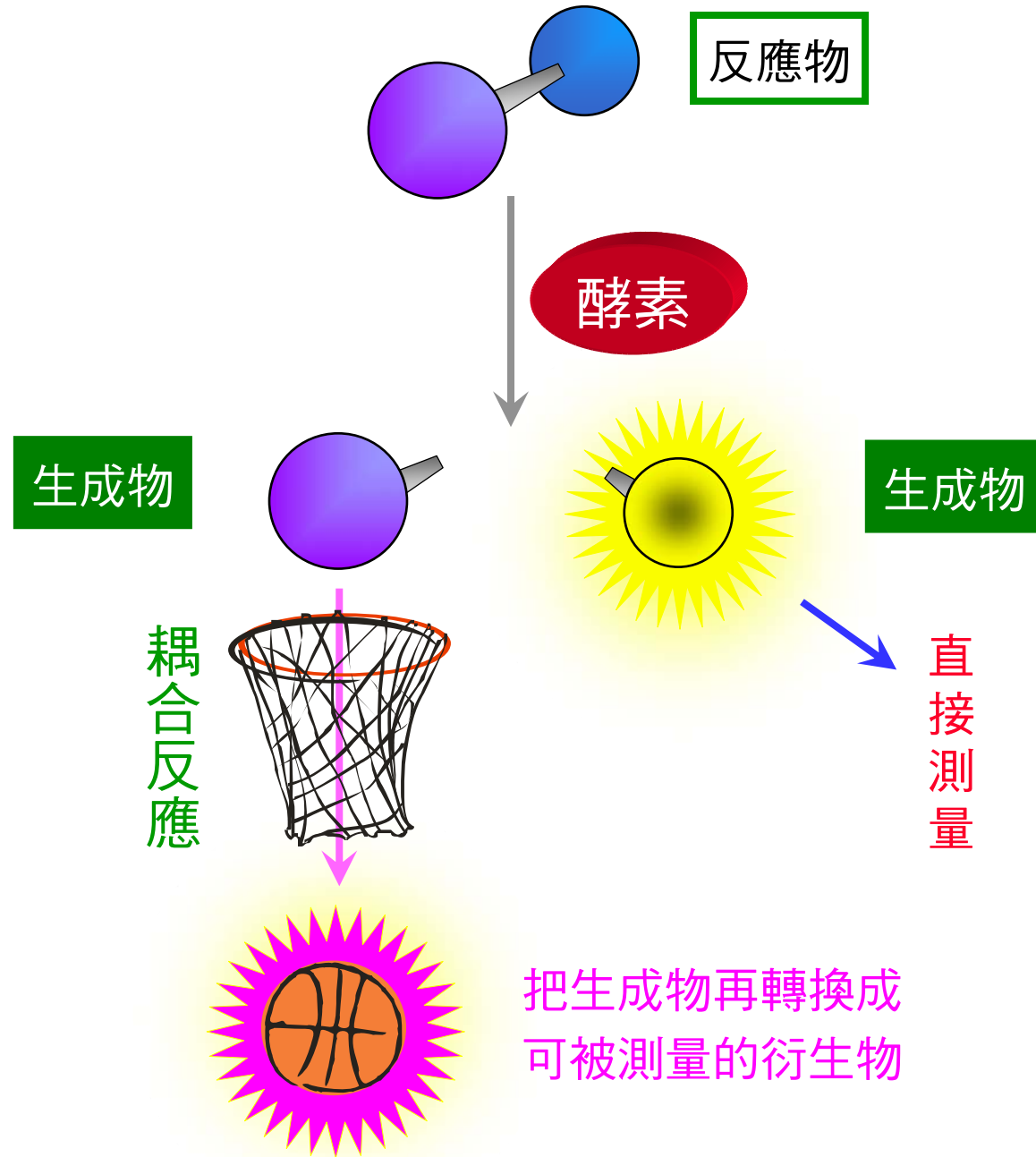
生成物
要能測得

酸鹼度

反應時間恰當

溫度

■ 酵素反應及偵測方法：



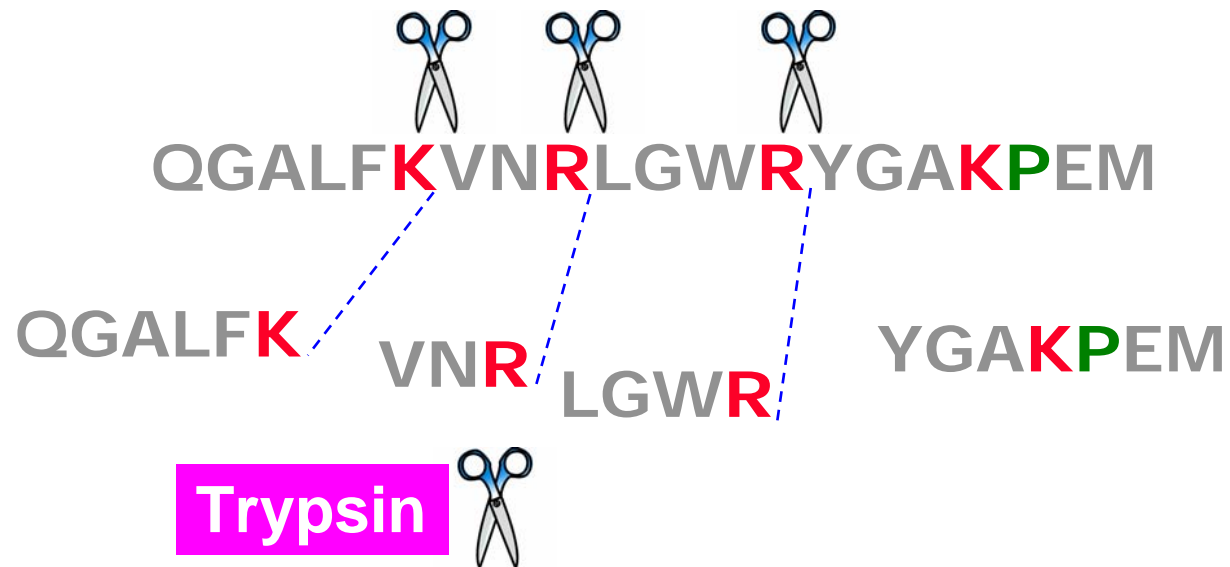
Trypsin (EC 3.4.21.4)

8

分子量：23.3 kD (porcine)

分類：Serine protease

作用方式：Endopeptidase



基質：benzoyl-arginine p-nitroanilide (BAPNA)

測定：A 405 nm

■ The Beer's Law (Beer-Lambert Law) :

9

$$A = \epsilon b c$$

OD: optical density

%T: transmittance

$$OD = \log \frac{1}{T}$$

A_λ = the absorbance at wavelength λ

A: absorbance (no units)

ϵ : molar absorptivity ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

b: the path length of the sample (cm)

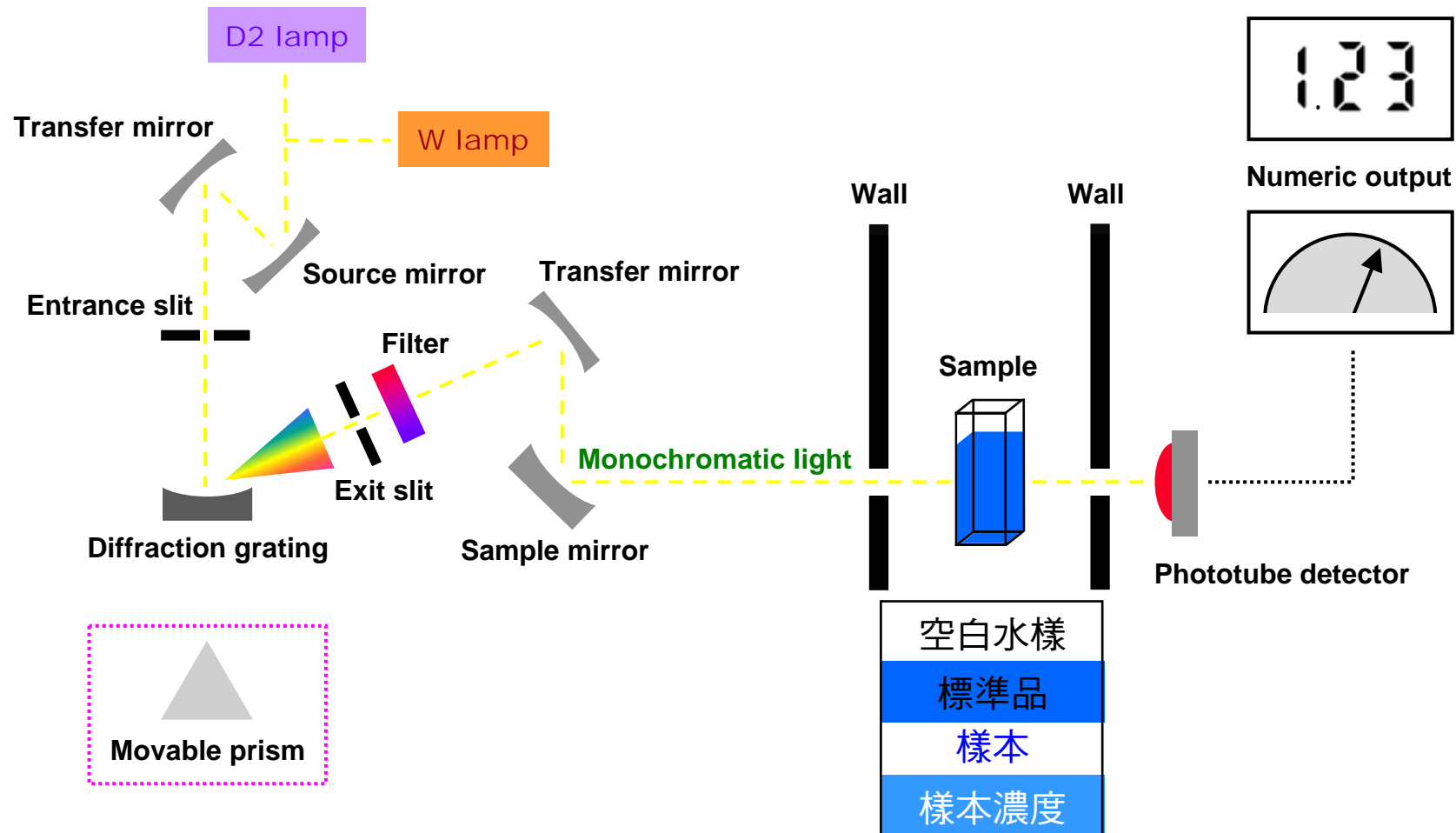
C: the concentration of the sample (mol L^{-1})

$$T = P/P_0$$

■ 分光光度計 Spectrophotometer :

10

可見光或紫外光 → 聚焦 → 分光 → 選擇波長 → 單一且特定波長之光線 → 樣品 → 光電管 → 訊號

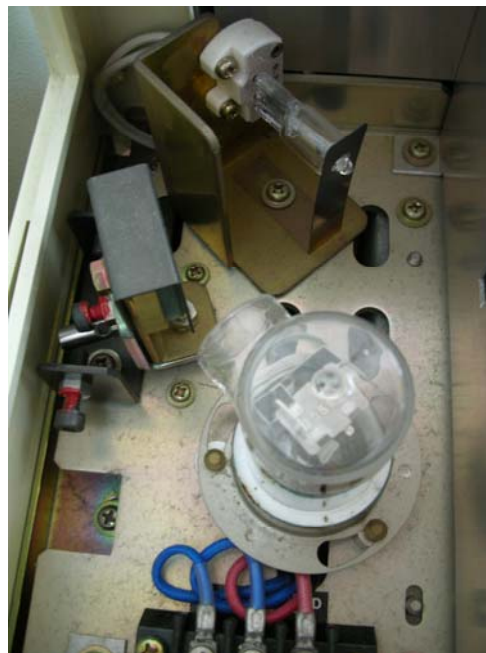


■ 分光光度計 : Light sources

11

D2 Lamp
Deuterium Lamp

氘燈

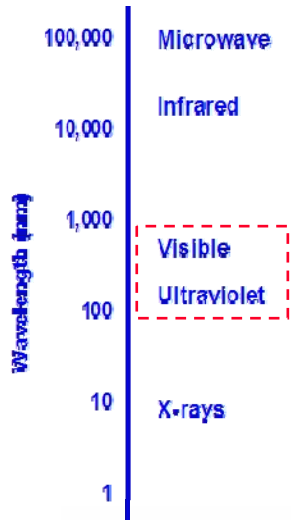


W Lamp
Tungsten Lamp

鎢絲燈



Cuvette (比色管) :



指示線



UV: 180~350

Visible: 340~1000



200~2500 nm



230~2500 nm



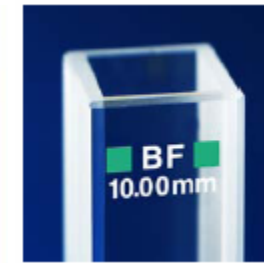
200~2500 nm



320~2500 nm



360~2500 nm



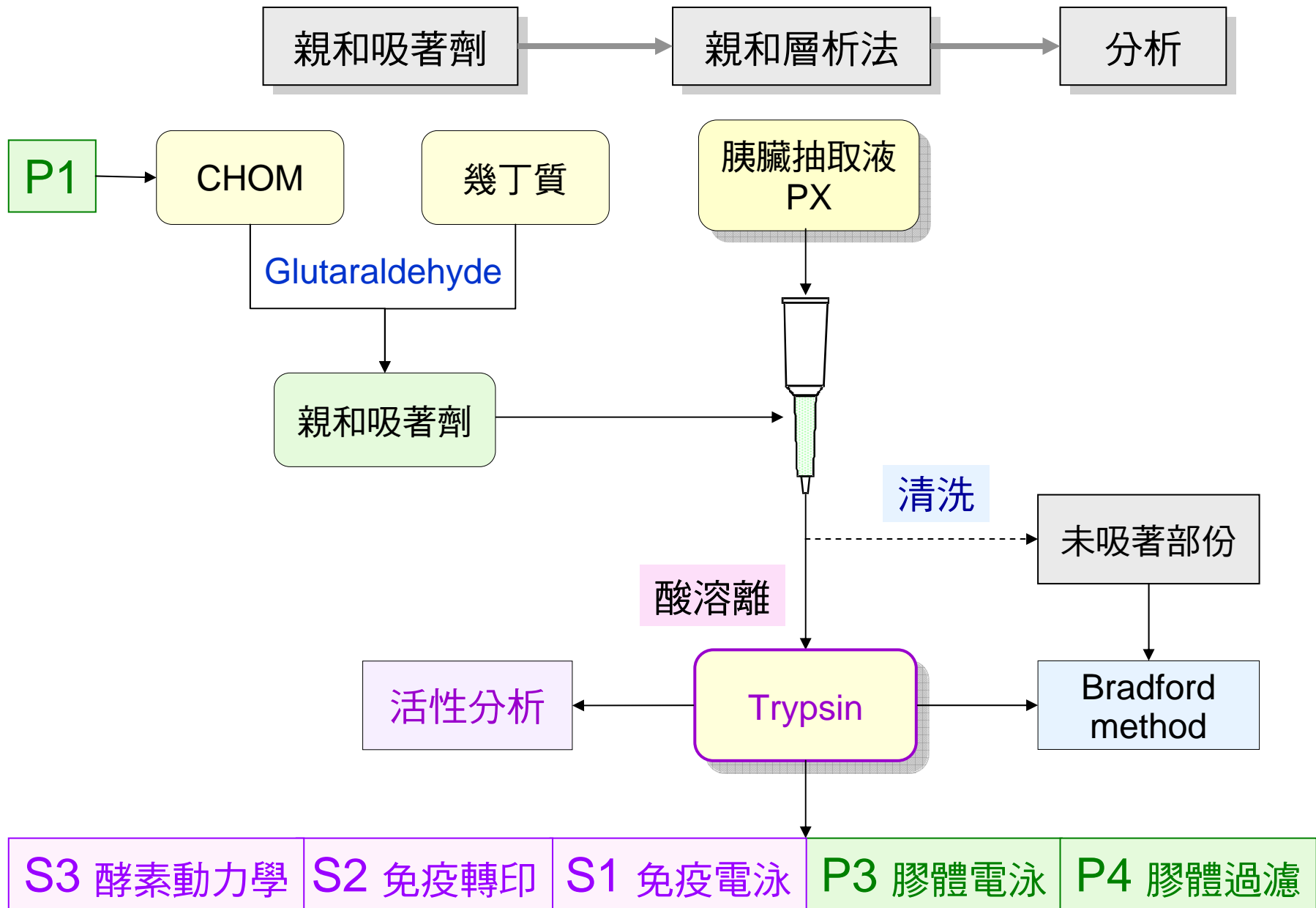
330~2500 nm

Quartz

Optical glass

如果要測量的物質是在紫外光的範圍內，則比色管的材質要用特殊的石英玻璃，而不能用一般的玻璃或普通的塑膠材質。因為一般的玻璃或塑膠會吸收紫外光。

P2 親和層析法



2.2.3 親和吸著劑之製備

- 1) 取幾丁質 2 g，盡量除去水分，置於 15 mL 塑膠離心管中。
- 2) 加入 4 mL CHOM 液，均勻懸著之 (剩下的 CHOM 請保留起來)。
- 3) 加 0.1 mL 25% glutaraldehyde，封口後混合均勻。
- 4) 在室溫反應 30~60 min，不時輕輕上下倒轉，均勻混合。
- 5) 以傾倒法用蒸餾水洗若干次，最後加適量 Tris-HCl 緩衝液懸濁之。
- 6) 裝入管柱，俟沉降後用 10 mL 緩衝液流洗，讓 Tris-HCl 慢慢通過，洗約數分鐘後備用。



Blocking



Quench