

B2

# 酵素純化與分析

酵素純化方法

酵素分析方法

問題集

B2 酵素純化與分析一章，是本實驗課程的理論基礎，專門說明各種實驗技術的原理。其內容也在每日的講習課中，以幻燈片一一敘述；期望同學們除了能夠順利操作各種實驗外，也能真正明白其中的生物化學背景知識。本章附有大量練習題，請自行依上課進度練習解題，則必能有更大的學習效益。

## 酵素純化方法

- 1 酵素純化實驗室 109
  - 1.1 儀器 109
  - 1.2 小型器具及消耗品 110
  - 1.3 藥品 110
  - 1.4 個人用品 111
- 2 蛋白質抽取 112
  - 2.1 如何開始？ 112
  - 2.2 材料來源 112
  - 2.3 均質及抽取 113
  - 2.4 鹽析及沉澱法 114
    - 2.4.1 鹽析分劃法 114
    - 2.4.2 有機溶劑沉澱法 116
    - 2.4.3 其它處理法 116
- 3 色層分析法 118
  - 3.1 色層分析法原理 118
  - 3.2 膠體過濾法 119
    - 3.2.1 原理概述 119
    - 3.2.2 膠體介質 119
    - 3.2.3 膠體管柱 120
    - 3.2.4 管柱操作 122
    - 3.2.5 問題及解決 123
  - 3.3 離子交換法 124
    - 3.3.1 原理概述 124
    - 3.3.2 離子交換介質 124
    - 3.3.3 緩衝液與層析系統 126
    - 3.3.4 管柱操作方法 127
    - 3.3.5 色層焦集法 128
  - 3.4 親和層析法 128
    - 3.4.1 原理概述 128
    - 3.4.2 親和吸著劑 129
    - 3.4.3 金屬螯合層析法 130
    - 3.4.4 疏水性層析法 130
    - 3.4.5 液相分配 131

- 3.5 HPLC 及 FPLC 131
- 4 其它純化或分離方法 133
  - 4.1 製備式電泳 133
  - 4.2 超高速離心法 133
  - 4.3 超微薄膜過濾法 135
- 5 純化策略 137
  - 5.1 純化步驟設計 137
    - 5.1.1 影響純化的因素 137
    - 5.1.2 組合純化步驟 137
  - 5.2 純化結果 138

## 酵素分析方法

- 1 蛋白質定量法 139
  - 1.1 Biuret 法 139
  - 1.2 Lowry 法 139
  - 1.3 UV 吸光法 139
  - 1.4 Coomassie Blue (dye binding) 法 140
  - 1.5 其它方法 140
- 2 酵素活性測定法 141
  - 2.1 催化反應 141
  - 2.2 酵素活性分析 141
    - 2.2.1 酵素活性測定方法 141
    - 2.2.2 中止酵素反應方法 142
    - 2.2.3 連續測定法 143
    - 2.2.4 澱粉磷解酶活性分析 143
  - 2.3 維持酵素活性 144
    - 2.3.1 緩衝液 144
    - 2.3.2 試劑的保存 145
    - 2.3.3 酵素活性之維持 145
    - 2.3.4 酵素活性單位 146
- 3 電泳檢定法 147
  - 3.1 電泳原理 147

- 3.1.1 蛋白質的泳動率 147
- 3.1.2 電泳的種類 147
- 3.1.3 電泳設備及系統選擇 148
- 3.2 聚丙烯醯胺膠體電泳 149
  - 3.2.1 PAGE 種類 149
  - 3.2.2 PAGE 膠體的組成 149
    - 3.2.2.1 膠體主要成分 149
    - 3.2.2.2 鑄膠反應 149
  - 3.2.3 PAGE 系統解剖 150
    - 3.2.3.1 電泳系統的組成 150
    - 3.2.3.2 電泳的焦集作用 150
    - 3.2.3.3 兩種電泳系統比較 151
  - 3.2.4 結果不佳時 152
- 3.3 其它相關技術 153
  - 3.3.1 染色及乾燥 153
  - 3.3.2 等電聚焦法 (IEF) 155
  - 3.3.3 二次元電泳 155
  - 3.3.4 蛋白質轉印法 155
- 4 分子量決定法 156
  - 4.1 膠體過濾法 156
  - 4.2 梯度電泳法 156
  - 4.3 其他分子量測定方法 157
    - 4.3.1 超高速離心法 157
    - 4.3.2 由胺基酸序列計算分子量 157
    - 4.3.3 質譜儀分析 157
- 5 蛋白質構造與組成分析 158
  - 5.1 N-端或 C-端胺基酸決定 158
  - 5.2 胺基酸組成分析 158
  - 5.3 胺基酸定序法 159
    - 5.3.1 cDNA 間推法 159
    - 5.3.2 Edman 直接定序法 159
  - 5.4 胜肽圖譜 160
    - 5.4.1 蛋白質的專一性水解 161
    - 5.4.2 檢定胜肽群的方法 161
  - 5.5 其他相關方法 161
    - 5.5.1 分子消光係數 161
    - 5.5.2 蛋白質分子結構分析 161

- 6 免疫學工具的利用 162
  - 6.1 抗原製備 162
  - 6.2 免疫流程 163
  - 6.3 抗体製備 163
  - 6.4 抗体的應用 164
  
- 7 蛋白質科技 165
  - 7.1 蛋白質科技的範疇 165
  - 7.2 蛋白質的微量分離及檢定 166
    - 7.2.1 微量分離技術 166
    - 7.2.2 微量分析技術 167
  - 7.3 蛋白質體研究 167
    - 7.3.1 由 proteome 推出該生物的代謝途徑 167
    - 7.3.2 從 proteome 找出疾病的病變蛋白質 168

## 問題集

- 蛋白質基本性質 169
  
- 酵素純化方法 170
  - 實驗室操作 170
  - 蛋白質抽取 171
  - 色層分析法 172
  - 其它純化方法 174
  
- 酵素分析方法 175
  - 蛋白質定量法 175
  - 酵素活性測定 175
  - 活性分析操作 176
  - 電泳檢定法 178
  
- 蛋白質檢定 179
  
- 應用問題 181