

澱粉磷解酶純化與分析



酵素化學實驗

Enzyme Biochemistry
Laboratory



國立台灣大學

生化科技學系 微生物與生化所

生物化學研究室

2005

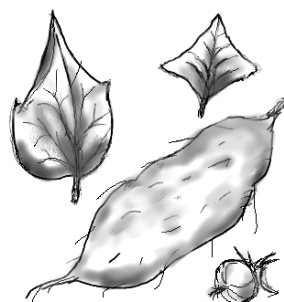
酵素化學實驗

Enzyme Biochemistry
Laboratory

酵素操作入門

酵素化學實驗

Enzyme Biochemistry
Laboratory



主編

莊榮輝

合編

吳建興 陳翰民 張世宗 林士民 劉育志

國立台灣大學

生化科技學系 微生物與生化所 生物化學研究室

2005

ISBN: 957-97409-5-X 平裝

本手冊之實驗內容乃專為教學需要所設計，雖然大部分的操作技術均相當可靠，但有些純化步驟，可能不適合直接做為研究工作之用，引用之時請特別小心。雖經努力校對與試做，相信謬失之處難免，無論大小錯誤，敬請不吝指正。

酵素化學實驗 Enzyme Biochemistry Laboratory

第一版 2000 年 1 月

網路版 2005 年 4 月 局部修訂成網路 pdf 版

保留版權
請勿翻印
二〇〇五

本網路版所有資料歡迎校內外人士列印參考，
但所有內容不得變貌轉製或有商業利益行為。

國立台灣大學 National Taiwan University

生化科技學系 Department of Biochemical Science and Technology (**BST**)

微生物與生化所 Institute of Microbiology and Biochemistry (**mbc**)

台北市羅斯福路四段 1 號 台大生技系 AC2-520

主編者： 莊榮輝 juang@ntu.edu.tw; Tel: (02)2363-1704

Editor: Rong-Huay Juang

合編者： 吳建興 陳翰民 張世宗 林士民 劉育志

Coeditors: Jiann-Shing Wu, Han-Min Chen, Shih-Chung Chang, Shyh-Mirn Lin, Yu-Chih Liu

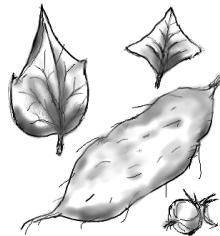
感謝歷年擔任過本課程助教的同學們

課程網頁： <http://juang.bst.ntu.edu.tw/M1230/index.htm>

上課網頁： <http://juang.bst.ntu.edu.tw/ECX/Summer.htm>

酵素化學實驗

Enzyme Biochemistry
Laboratory



實驗單元： X, Y, Z

實驗方法分成三類以交織成課程主體

基本資料： A

基本實驗室行事規則及研究方向建議

參考講義： B

各種實驗方法的詳細步驟及背景說明

參考附件： C

學生入門手冊及可能用到的參考資料

標題名稱	內容說明	頁數
目錄	XYZ 加 ABC	vi
引言	新世紀的大事	viii
編排與使用方法	剖析本手冊的組織架構	x

XYZ

X	實驗單元	Experimental Units	1
X0	實驗進行通則	所有實驗操作的共同守則	3
X1	粗抽與分割	由甘藷塊根抽取出蛋白質	5
X2	膠體過濾法	依據分子量的純化方法	7
X3	離子交換法	分離效果極佳的色析法	9
X4	製備式電泳	以電泳製備近乎純質的蛋白質	11
X5	轉印及定序	轉印後的蛋白質可以定出序列	13
X6	酵素動力學	看酵素與基質的作用機制	15
Y	分析方法	Analytical Methods	17
Y1	蛋白質定量法	列表指出如何由本手冊中找到 Y1~Y6 的實際操作方法	19
Y2	酵素活性分析法		
Y3	原態電泳及活性染色		
Y4	SDS 膠體電泳		
Y5	轉印及免疫呈色法		
Y6	酵素動力學測定		
Z	基本操作	Basic Techniques	21
Z1	自動吸管	所有研究人員的貼身輕型武器	24
Z2	天平及酸鹼度計	配製藥品試劑的最基本工具	25
Z3	離心機	分離操作時最常用的儀器	26
Z4	光度計及 ELISA 計	測吸光度是最基本的分析方法	28
Z5	透析及濃縮	微孔薄膜技術的簡單應用	29
Z6	電腦及軟體	是最不可或缺的輔助工具	30



A B C

A B C			
A 基本資料 Basic Information			31
A1	實驗室規則	瞭解並且遵守實驗室的規定	33
A2	實驗之路	如何開始你的研究生涯？	35
A3	如何撰寫實驗報告	寫好實驗報告的方法	39
B 參考講義 Background Materials			43
B1	生物化學基礎	酵素化學的生物化學基礎	45
B2	酵素純化與分析	實驗技術的背景及原理	103
B3	酵素操作方法	實地的操作技術流程	189
B4	相關研究計畫	國科會計畫之摘要與背景資料	223
C 參考附件 Reference Attachments			229
C1	入門手冊	課程安排及分組	232
		實驗室配置圖	234
		儀器及各組組產表	236
		每週值日工作表	237
		如何開始？	238
C2	教師備忘錄	教學活動記要	240
		助教行事備忘	245
		所有儀器試劑清單	246
C3	甘藷 L-SP 相關學位論文	已經有許多研究論文可供參考	250
C4	甘藷 L-SP 胺基酸序列	胺基酸序列是酵素分子的根本	251
C5	參考書目	參考其他相關的純化技術書籍	252
Index			
I	索引	英中對照索引	253

引言

其實這是個 Game

電腦科技的發達，使得電動玩具日新月異，其創新與多樣性實在令人眼花撩亂。在過關遊戲中，玩家要使盡各種方法，發揮自己最大的極限，去破解看似無解的謎題，或者打倒未知的妖魔鬼怪。科學研究有時跟電動玩具的過關流程很像，只是換了個場景，而你的勝敗則是關係著個人前途。

在設計一個酵素化學的實驗課時，發現一步一步的純化過程，與電動玩具的一關一關很像，而且經常是失敗後就進不了下一關。於是，我們就完成了這個由『六關』組成的酵素化學遊樂場，也邀請即將要進入酵素研究的玩家，進來一遊。因此，這個課程其實可以看成是一個 Game，過了這六關後，你就修成了酵素化學的實驗課。

既然是 Game，那就不能太簡單，也不能太單調無趣。因此，在實驗課進行的過程中，遊戲者不能太相信他所看到的，或他所做出來的結果；因為 Game 會騙他，可能以不同的變貌來誤導他走向迷途。他也要用所知的各種技巧，去對付肉眼看不到的對象－澱粉磷解酶，想辦法把它生擒過來，而且不能有其他雜物魚目混珠。

研究工作也是個 Game

無論你是做基因重組，或是傳統分類，研究工作其實也是個 Game。只是這個 Game 完成後，你可以拿到學位，有人可以將玩 Game 的心得與結果寫出來發表，更有國科會給你獎助金。因此，聽起來好像不賴，又有玩的又有拿，名利雙收。但最重要的是，你要對你的 Game 有興趣，要能與它耐心地周旋，或智慧地把真理誘出來。

據我所知，大多數玩電動玩具的人，都不是為了名利，多半只是好玩。很多人只是想揭開下一道門後面是什麼，有沒有更令人料想不到的發現。科學研究的極致，應當也是如此，純粹是為了解答那些未知的問題。為了這樣單純的一個目的，研究者可以千辛萬苦地做實驗，可以廢寢忘食地思考問題；外人看來極為無聊或無意義的事，其實是一種極為刺激及冒險的內在奮鬥與追求。

新世紀的蛋白質

分子生物學及基因操作風靡了過去五十年，兩者在基礎研究及應用科技上，都有其極度吸引人的地方，的確值得這半世紀的瘋狂與追逐。當人們漸漸認識基因之後，也深刻瞭解到基因終究是要以蛋白質的形式表現出來，而且基因的調節、複製與表現，也都要細胞內其它蛋白質的幫忙。這個色彩繽紛的生物世界，一大部分是由蛋白質所組成；生物體內在的基因雖然很重要，但其所表現出來的外在蛋白質，卻更為多采多姿。組成核酸的核苷酸只有 A, T, C, G 四種，而胺基酸卻有二十個，因此每一種蛋白質都有其獨特的分子構形，造就了蛋白質的生物活性與構造功能。

二十一世紀初期，人類將首度得知其自身細胞內所有基因的序列，可以貯藏在一片光碟之內。人類從來沒有如此偉大過，也從未感覺到如此渺小；人們能否因此而領悟到生命的意義，是個哲學問題。但 Central Dogma 清楚告訴我們，DNA 可以轉錄為 RNA，RNA 得以轉譯成蛋白質，因此我們將可以得知人類的總體蛋白質 proteome；分析比對蛋白質的序列，可以推測大部分蛋白質的功能，我們得以拼湊出許多從未發現的代謝途徑。由這一片核酸光碟，也許得以建構一個虛擬細胞，且可能與實境不會相差太遠。

繽紛的蛋白質世界

核酸與蛋白質在分子上的微觀差異，居然也反映在巨觀的研究方法上。因為任一種 DNA 的構形都相差不多，只有其分子上的核苷酸序列不同；因此其純化、分析等方法都不會差太多。反之，每一種蛋白質都有其獨特的分子構形、等電點、極性性質等，因此要用許多不同的方法去處理。若參觀過許多專門進行分子選殖實驗室，會發現所用的儀器或方法大致相同；但翻閱一本蛋白質純化與檢定的書，會驚於所用方法與儀器之多樣性與複雜性。

因此，當同學們埋首於純化或分析實驗時，請不要忘了酵素的蛋白質特性，以及深藏在蛋白質分子間的各種美妙性質。每一種操作或技巧，都有其根基於蛋白質基本性質的原理。當你忙於操作實驗時，可以停下來想一想，我在加的是什麼？加下去會有什麼反應？反應的原理是什麼？甚至於把自己縮小進入試管，悠遊於微小的分子世界，想像一下澱粉是如何被合成的，蛋白質是如何進行催化作用。

一切都決定於你自己。

2000 年

編排與使用方法

整個課程就是 XYZ 加 ABC

我們常把基礎的事物稱為 ABC，因此本課程把相關的基本資料，編成了 ABC 三大部分。而實際要進行實驗操作的部分，也因其性質的不同，整理成為 XYZ 三大類。同學們可依循 XYZ 的設計或指示進行實驗，同時由 ABC 取得你所需要的背景知識或者操作範例。由目錄可以很清楚地看出這兩大範疇的內容。

以 ABC 建立背景基礎

A 的內容包含三項最基本的資料。A1 規定你在實驗室中應當如何行為，以免造成困擾或危險。A2 假設你剛要進入研究工作，提供一些對新手的建議，包括如何確定研究方向、如何寫實驗記錄；並且再度提醒你是否真的對研究工作有興趣，否則應當早一點轉行，以免浪費你的時間、國家的金錢。A3 提出撰寫實驗報告的方法，若能遵循一些基本要點，應該可以寫出像樣的報告來。

B 部分收集了與酵素有關的基本講義及操作方法。B1 是生物化學課程最前面的一部份，從大爆炸到細胞與分子，經由胺基酸及蛋白質，最後引出酵素的根本性質與機制，以便讓同學回顧最基礎的生物化學。B2 則是對本課程所有的純化與分析技術，說明其基本原理與機制，因為實驗不應只是會操作自動吸管而已。B3 是食譜般的操作手冊，把重要的操作方法，一步一步寫出來；同學可以選出適當的方法，做為你實驗操作的參考。B4 是向國科會所提有關澱粉磷解酶的研究計畫，摘錄其中的摘要及背景知識，以便讓同學瞭解為何要進行澱粉磷解酶的研究。

C 則是其他可能需要的附件，以協助實驗的進行。C1 是專供新同學很快進入情況的入門手冊，我們的講習課會從這一部份開始，循序把同學導入酵素化學實驗的世界。C2 是提供給教師或助教的備忘錄，把一些教學心得或經驗條列出來，並且附上本實驗課開班所需儀器物品的清單。另外，本系有關澱粉磷解酶的學位論文目錄，或者澱粉磷解酶的胺基酸序列，都可能對本實驗的進行具有參考價值。

以 XYZ 編織整個實驗

XYZ的內容雖然都是實驗操作，但其性質卻大有差異。X是本課程所要進行六個實驗(X1~X6)的大動脈，是一週一步的純化過程。但在每一週的純化操作後，都要進行各種分析工作，這些分析方法即編成Y1~Y6。因此，X與Y有點類似X軸與Y軸，或者地球的經與緯，相互交織出整體的面來。但是，在能流暢地進行純化與分析實驗之前，必須先學會正確地操作一些最基本的儀器或用具，我們整理出Z1~Z6六項基本操作，將在前兩天的講習中學習完成。

在所編列的各實驗單元中，我們使用了大量的流程圖。其目的除了要讓同學們熟悉流程圖的作用之外，也希望同學能實地應用流程圖在自己的研究計畫；因為流程圖是一種清楚、方便而且具有邏輯層次的思考方式，可以讓你的計畫過程更具有條理，是經營研究工作很重要的工具。

要如何面對本課程？

『全力投入』是完成本課程最基本的條件，若仍有塵事未了，最好暫時不要進入本課程；而且通常這類課程都不是必修。至少在上課期間的六到八週，同學可能要付出相當多的時間與精力，以便達到本課程所規定的目標。雖然有教師引導，也有助教在旁相助，但是本課程特別強調的是，學生必須自己完成所有的操作。

有此決心者，請準備三本記錄本；其一為實驗的記錄，內有方格者最好，其寫法請參見A2實驗之路所述；另一為講習課的筆記，記錄上課所引發的種種思考；最後為一本為解題專用筆記，用來回答B2講義所附的問題集。建立並且經營好自己的筆記系統，將是順利完成本課程，以及你未來的研究之路，所必要的一件大事。

一旦進入本課程，往後的五到六週間，將有一連串的功課待完成：

先參加一週講習，完成基本操作Z，準備開始進入實驗流程X1。

每週至少進行兩整天實驗，其餘時間要整理結果，並且預習下週實驗。

每天上午9:00準時上課，徹底瞭解實驗的基本原理，每週三要準備小考。

第二週起，每週三下午2:00，準備參加並且報告One-Page Show。

待X6結束一週後，進行總測驗。

總測驗後一週內，準時交出總報告。

