

X

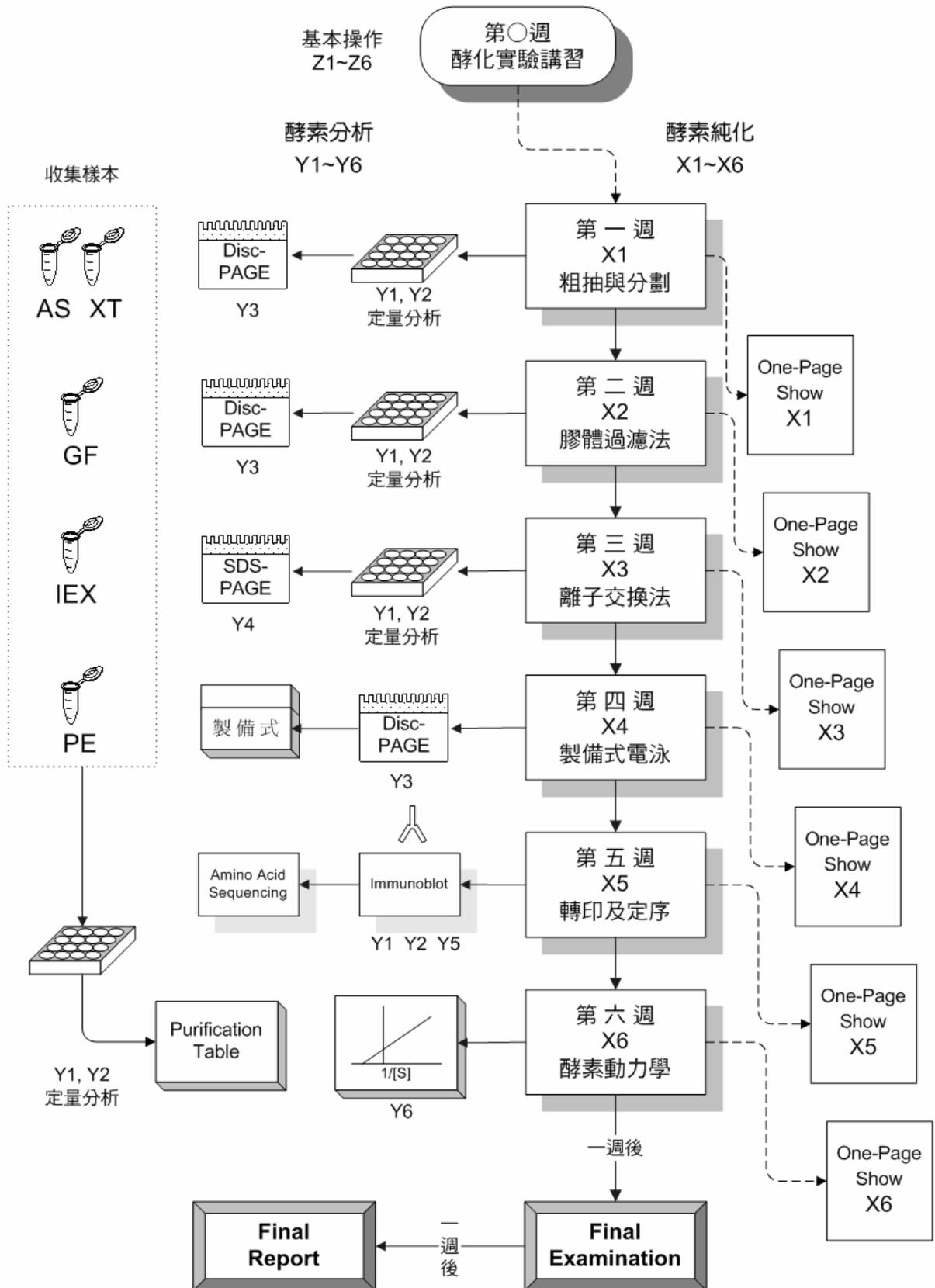
實驗單元



實驗單元：

- X0 實驗進行通則
- X1 粗抽與分割
- X2 膠體過濾法
- X3 離子交換法
- X4 製備式電泳
- X5 轉印及定序
- X6 酵素動力學

酵素化學實驗進度流程表



X0 實驗進行通則

共有六個實驗單元 (X1~X6)，每個單元是一種純化或檢定操作，每次所得到的產物，要收集並進行各種分析 (Y1~Y6)；各單元的進行，都遵循以下通則進行，請仔細閱讀：

實驗操作前 - 做好預習準備：

1. 詳細研究每單元的操作指示與流程 (見以下 X1 至 X6)，研讀各種參考講義 (如 B3) 或參考附件；充分的預習，是實驗成功的必要條件；教師將嚴格檢查預習記錄本。
2. 擬定你自己的實驗操作步驟流程，預習每一操作細節，有不懂的一定要問清楚。此操作流程類似大一普化實驗的工作記錄紙，預先把將要記錄的空格畫出來。可以參照 A2 實驗之路 建議的方法，擬定你的工作計劃。請不要完全抄襲 B3 的操作步驟！
3. 與教師或同學、助教討論應注意的操作重點，並問清材料、藥品的位置與情況。
4. 注意有無停電或停水等通告，若有狀況發生要事先做好預防準備。

實驗操作時 - 按步就班進行：

1. 預先把所有藥品及用具準備好，需要預約的材料或儀器，請先登記或預訂。早一天把所有的緩衝液或試劑準備好，不熟的儀器要先學會使用法。
2. 在操作前，清理所要使用的桌面，整理藥品與儀器，拋開所有雜務。在正式開動前，再看一次實驗流程。
3. 依照所擬的步驟，一步步小心執行，錯誤發生時要小心評估其嚴重性。
4. 在操作記錄本上詳細記下每一步驟進行的細節，尤其注意有無意外發現或失誤。
5. 使用儀器時，若有任何問題或誤用，請立刻向教師報告，以免延誤。若有臨時停電或停水狀況，視當場狀況決定是要繼續進行，或者另外重新開始。
6. 實驗進行時，若在儀器或用具的使用上與他組有衝突，請互相協調禮讓。
7. 每天早上十點，準時開始進行實驗，教師將隨時到場觀察各組實驗進行情形。

實驗操作後 - 收拾好準時完成：

1. 每階段實驗的收成品，請用微量試管吸取 0.1 mL 冷藏起來，以便最後一起分析。
2. 請在規定時間內完成實驗，並收拾所有用過的儀器及藥品，準備移交給下一組。
3. 用過的桌面或用具，一定要保持乾淨整齊，不得雜亂無章，否則會影響成績。
4. 請立刻整理數據，把結果繪成圖表，準備在次週 One-Page Show 報告。
5. 報告請多用原創性資料或結果，引用他人文章或看法時，一定要註明出處。
6. 並不禁止同學參考往年同學留下的實驗報告，但應該效其精華而自行模擬體會，不要一味照抄；且一旦發現抄襲，將會遭退件。

Crude Extraction and Ammonium Sulfate Fractionation

X1

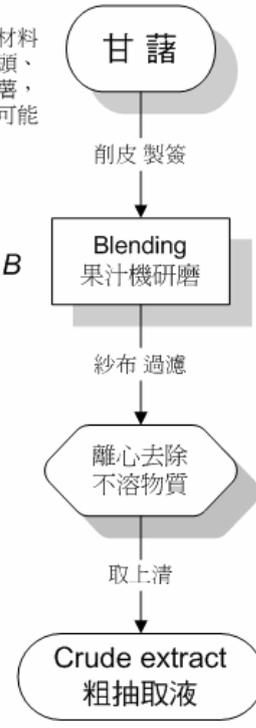
D 1

D 2

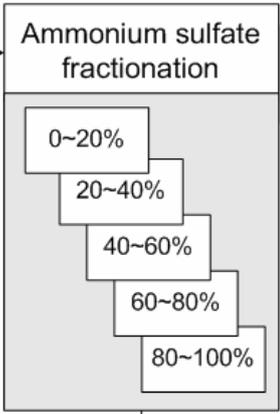
D 3

可使用其它材料如玉米、芋頭、甜菜、馬鈴薯，但純化條件可能有變化。

Buffer B



XT 每一純化步驟請測定總體積並保留 0.1 mL 做為分析樣本



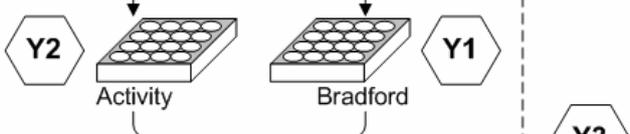
每 20% 飽和度硫酸銨做一分割，把蛋白質分批沉澱出來。

各分割離心 收集沉澱

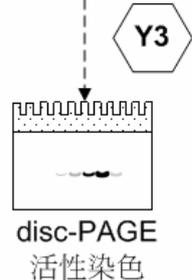
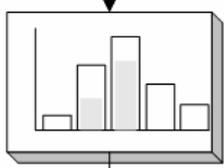
溶於少量緩衝液



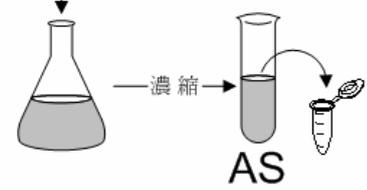
定量分析



作圖 硫酸銨分割之活性分佈



收集活性區部份



1 2 3 4 5 6

X1 粗抽與分劃

由植物材料開始，經緩衝液抽取得到粗抽取液，再以硫酸銨分劃收得蛋白質。

實驗步驟摘要：

1. 請先把整個實驗的步驟寫成流程，並整理出兩張表：藥品試劑及儀器用具，本實驗要使用離心機、果汁機及冰浴等，要先確實準備妥當。
2. 取約 100 克甘藷，依照澱粉磷解酶的純化方法，進行粗酵素的抽取。注意本實驗所抽得的粗酵素 (XT)，即為以後各實驗的起始材料。XT 共 _____ mL。
3. 以硫酸銨分劃沉澱蛋白質，每百分之二十飽和濃度收集一次，共有五個分劃。
4. 這五個分劃分別溶於最少量的緩衝液，然後對 1×緩衝液 A 透析過夜，離心去沈澱後測量每個分劃的體積，並進行各項分析工作。
5. 分析檢定的項目包括：蛋白質定量 (Y1) 及酵素活性分析 (Y2)；並以電泳及其活性染色檢定磷解酶活性位置 (Y3)。此一步驟的結果，將會得到極重要的指引。
6. 依活性分析或電泳結果，取含酵素較高的分劃，合併後置 4°C 保存；請注意澱粉磷解酶不耐凍結，請勿放在零下的冷凍櫃中。AS 共 _____ mL。
7. 你自己所有的藥品或樣本，一定要寫明：樣本名稱、日期、你的姓名。
8. 本實驗的成品，將在下面的各實驗中用到，若失敗的話將影響到你的實驗進度。

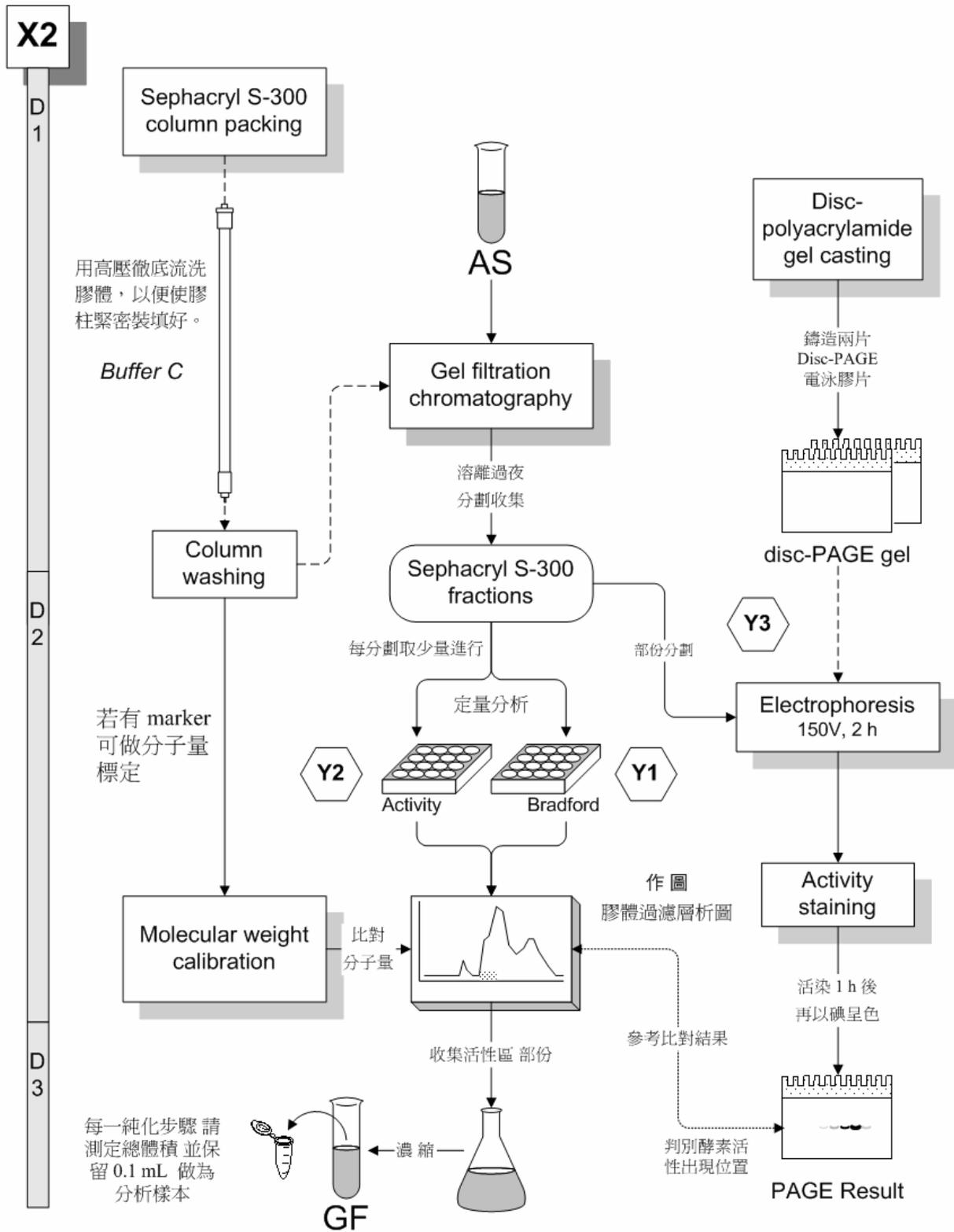
預期結果：

1. 五個分劃各有不同的蛋白質含量及活性，請以硫酸銨百分比為橫軸作圖。
2. 請注意那一個分劃含有最高的酵素活性，並且蛋白質含量較少。
3. 請把硫酸銨各分劃的活性分析與電泳與結果比較，兩者有無對應或相悖之處？
4. 請仔細檢討你的結果，可能會有許多不合理的部分，若察覺結果可能有問題，一定要提出合理的解釋及解決方法，不要輕易放過任何嫌疑點，否則將來怕有大患。

問題與檢討：

1. 硫酸銨的作用原理是什麼？能否不用硫酸銨沈澱？
2. 何謂比活性？硫酸銨分劃後應當以比活性來選取所要分劃，或是以總活性來選取？
3. 經過本實驗後，發現所要酵素的比活性都沒有增加，則本實驗有沒有必要進行？
4. 添加硫酸銨時，前面幾個分劃要加得比較慢，但後面的分劃可以加快，為什麼？
5. 若你的五個分劃的酵素活性全都不見了，且活性分析法沒有問題，則你的酵素到底在那裡？如何去找尋？
6. 本實驗的設計，故意安排有一個很大的陷阱，請找出此一陷阱為何？

Gel Filtration Chromatography



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6

X2 膠体過濾法

由硫酸銨沈澱所得到的粗蛋白質，再經膠体過濾法把不同分子量的蛋白質分離開來。

實驗步驟摘要：

1. 同上次實驗，請先把整個實驗的步驟寫好摘要，整理出兩張表：藥品試劑及儀器用具，並請事先清點所有的儀器、管柱及膠体，熟悉其用法及特性。
2. 裝填一支 Sephacryl S-300 管柱備用。以層析法純化蛋白質，本來應在冷藏箱內操作，但因為冷藏箱空間不足，全部改在室溫下進行（夏天時晚上請勿關冷氣）。
3. 取出上次所抽得粗酵素之一 (AS)，若有沉澱要先離心去除之。
4. 取適量粗酵素進行膠体過濾分離，流洗液分劃收集之，準備進行分析檢定工作。
5. 分析檢定的項目：所有的分劃均進行蛋白質定量 (Y1) 及酵素活性分析 (Y2)；取部份具有蛋白質或酵素活性的分劃，以 disc-PAGE 電泳檢定之 (Y3)。
6. 依活性分析結果作圖，參考電泳活性染色結果，收集活性較高而雜質較少的分劃，準備進行下一步驟的離子交換法 (X3)。GF 共 _____ mL。
7. 第二天同一管柱要跑標準分子量蛋白質，請在標準分子量樣品中加入 0.3 mL GF。
8. 實驗完成後，請把膠体取出放回瓶子，連同管柱、儀器等用品，移交或收存起來。
9. 因本操作是在室溫下進行，實驗前後儘量把所有樣本儘快在低溫下貯存。

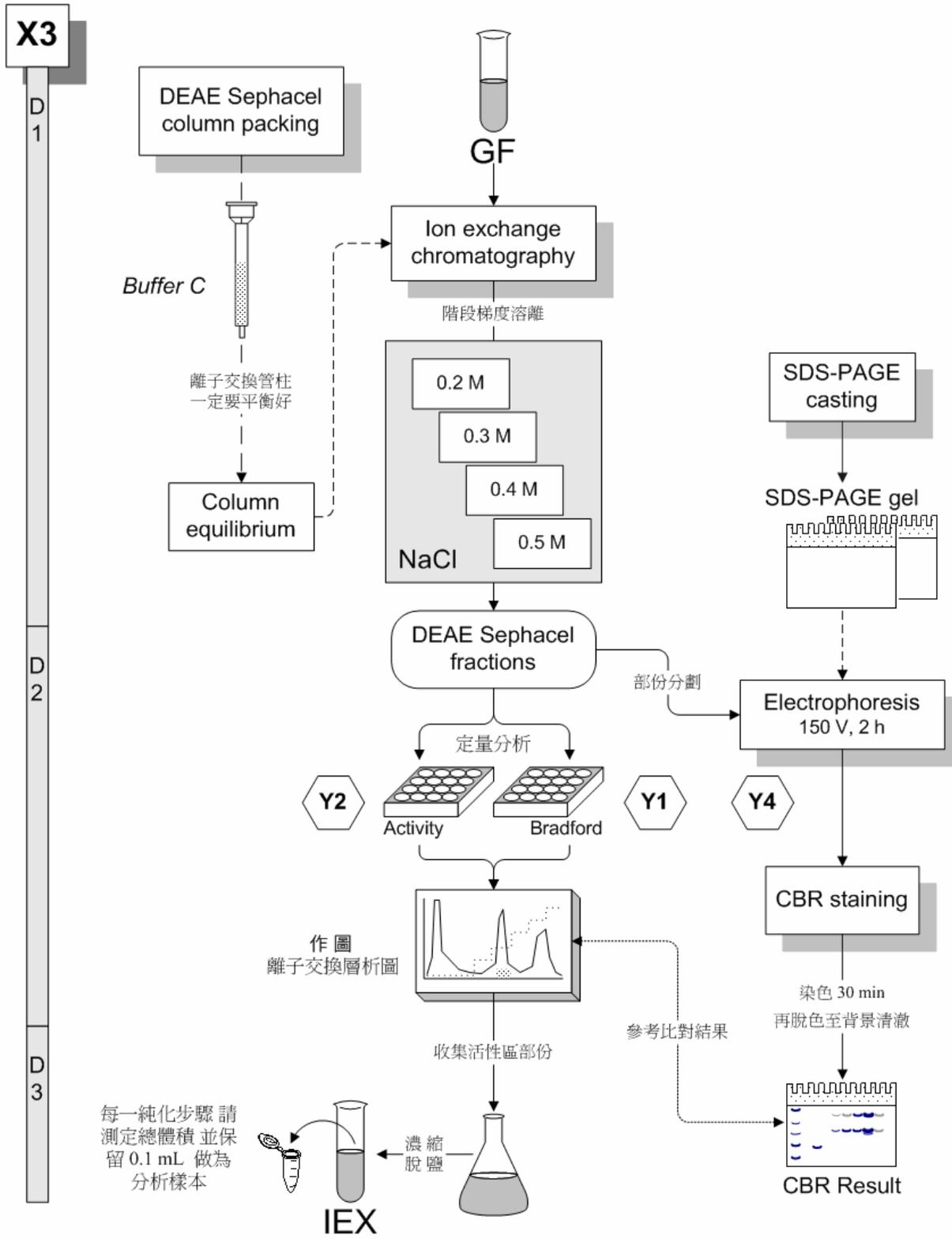
預期結果：

1. 作圖得到數個蛋白質峰及數個活性峰，收集較強的活性峰，其他的部份即為雜質。但請注意，由活性分析所得到的結果，可能會造成誤判而失去酵素！
2. 把畫出膠体過濾管柱的標準分子量校正線，並推出澱粉磷解酶的分子量為多少。
3. 由電泳所得結果，與膠体過濾前的樣本比較，可以判斷純化的效果如何。

問題與檢討：

1. 膠体過濾法的原理及其分離原理為何？
2. 管柱裝填不良及分劃收集器沒有裝置妥善，是較常見的問題，請預先防範之。
3. 由硫酸銨到膠体過濾的純化過程，你的酵素活性回收多少？比活性有無增加？
4. 若把你經過膠体過濾法所得到的純化樣本，再通過一次膠体過濾，則對純化效果有無意義？有沒有例外情形？
5. 本實驗並沒有在冷房中進行，可能會有何種影響？如何增加實驗的可靠性？
6. 本實驗的設計，也安排有一個更大的陷阱，請找出此一陷阱為何。
7. 上述問題可能也會影響到分子量的測定，請小心討論之。

Ion Exchange Chromatography



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6

X3 離子交換法

離子交換法可以把帶有不同電荷密度的蛋白質分離開來。

實驗步驟摘要：

1. 同上次實驗，請先把整個實驗的步驟寫好摘要，整理出兩張表：藥品試劑及儀器用具，並請清點所有的儀器、簡易塑膠管柱及膠體，熟悉其用法及特性。
2. 裝填一支 DEAE Sephacel 管柱備用，請注意離子交換膠體一定要在緩衝液中平衡完全。以層析法分離酵素本應在冷藏箱內操作，本次也因冷房空間不足，改在室溫下進行（夏天時晚上請勿關冷氣機）。在收得樣本後，儘速保持在低溫下貯藏。
3. 取出上次膠體過濾法所抽得的酵素 (GF)，檢查有無沉澱，有的話要先離心去除之。
4. 把樣本注入管柱，並通以緩衝液流洗之，馬上開始分劃收集流洗液；俟洗過兩個管柱體積後，準備以鹽梯度流洗出酵素。有兩種方法：連續梯度或階段梯度。
5. 兩種梯度均拉 0.2 到 0.5 M NaCl 的梯度（階梯梯度以 0.1 M 為一階），然後再以 0.5 M NaCl 流洗一個管柱體積。收起所有梯度分劃，準備進行分析工作。
6. 分析項目：所有的分劃均進行蛋白質定量 (Y1) 及酵素活性分析 (Y2)；然後選取部份具有蛋白質或酵素活性的分劃，以 SDS-PAGE 電泳檢定之 (Y4)。
7. 依分析所得作圖結果，參考電泳結果，取活性較高的分劃收集起來，保存在 4°C，準備進行製備式電泳 (X4)。IEX 共 _____ mL。
8. 實驗完成後，請把膠體取出，在玻璃淬砂漏斗中，以緩衝液清洗膠體至平衡，放回瓶子裡，連同管柱、儀器等用品，準備移交或收藏。使用至此階段，各組濃縮所用的器具 (Centriplus) 要小心檢查是否有破洞，同時濃縮後不要馬上把廢液倒掉。

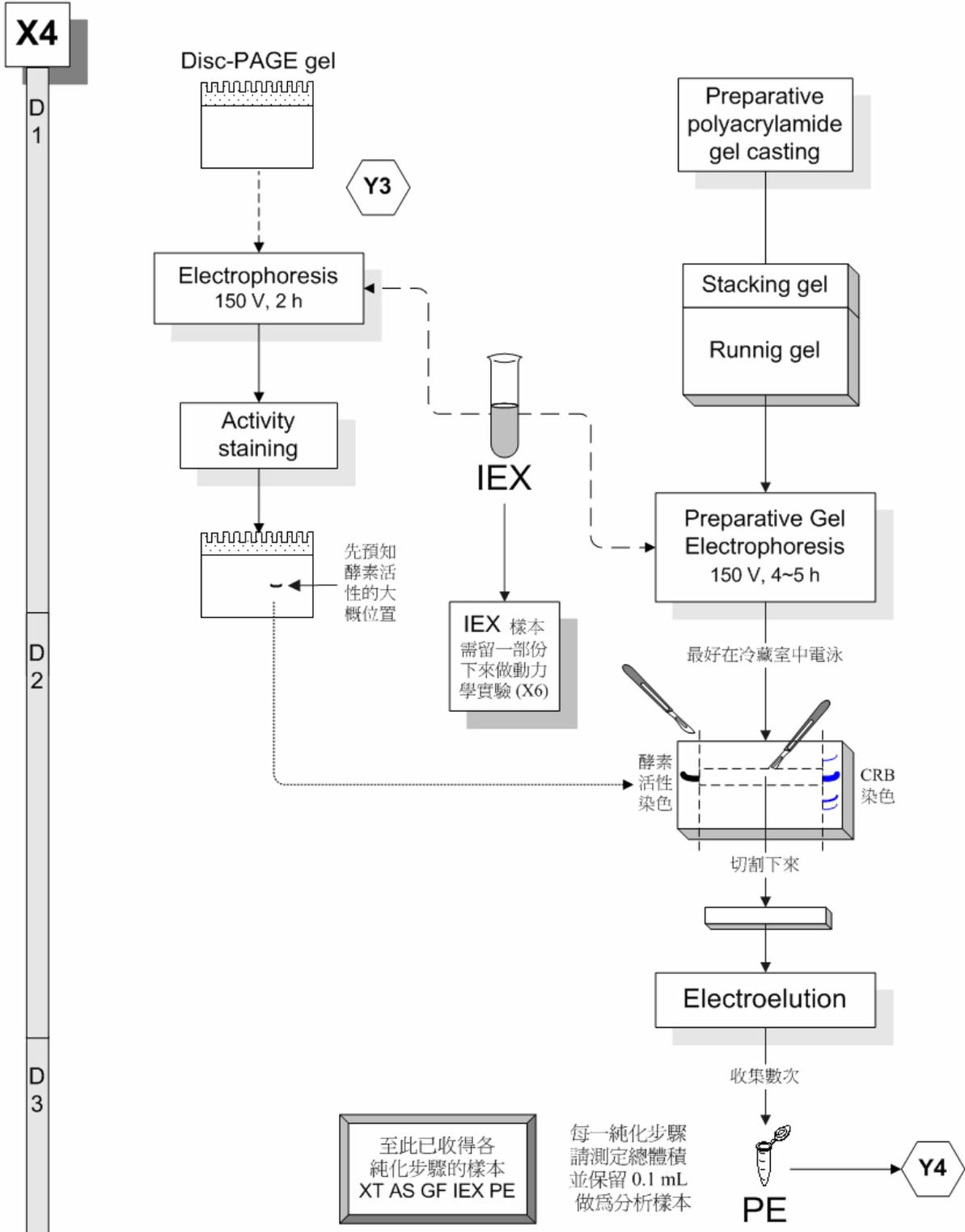
預期結果：

1. 作圖得到數個蛋白質尖峰及一兩個活性峰，收集較強的活性峰。
2. 由電泳所得結果，與離子交換前的樣本比較，你應該可以判斷純化的效果如何。
3. 以上各個純化澱粉磷解酶的過程中，以活性分析法可能得到許多活性峰，這些活性峰是否都是磷解酶？如何判定真假？

問題與檢討：

1. 離子交換法的原理及其分離原理為何？
2. 離子交換膠體沒有平衡或再生完全，是失敗的主因，請小心此點。
3. 硫酸銨-膠體過濾-離子交換純化過程中，酵素活性回收多少？比活性有無增加？
4. 三週來的純化過程中，一路伴隨著正或負的假象 (artifact)，對目標酵素的選取會造成誤判，請一一指出。

Preparative Gel Electrophoresis



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6

X4 製備式電泳

製備式電泳法可以在電泳上把各種蛋白質分開，直接切出色帶並且純化出來。

實驗步驟摘要：

1. 同上次實驗，請先把整個實驗的步驟寫好摘要，整理出兩張表：藥品試劑及儀器用具，並請清點所有的儀器、大小型電泳槽及供電器，熟悉其用法及特性。
2. 依參考講義所述的製備膠体型式，進行製備式電泳，電泳槽可以改用迷你電泳槽，但使用最厚的間隔條 (1.5 mm)。
3. 電泳要在指定的冷藏箱內操作，請注意冷藏箱內的秩序與整潔，儘量避免打開箱門。
4. 樣本使用上次離子交換法所純化得的酵素 (IEX)，若有必要則再經超微過濾膜濃縮；直接使用 X1 的備份粗抽取液為樣本時，效果會很差。
5. 在跑製備式電泳之前，應先跑一次迷你式 disc-PAGE 電泳 (Y3)，同時做蛋白質及活性染色，以便事先確定澱粉磷解酶的位置。
6. 依所計畫的步驟進行電泳，俟追蹤染劑跑出膠體後，在膠體兩側各切出一條垂直膠片，並以活性染色定位之；若同時有數條色帶出現而無法確定，則分別切下來溶離，溶離出來之後才進行確認。PE 共收得 _____ mL。
7. 以電泳溶離器把蛋白質溶出膠體，約兩小時可收一次，共收約四次。此一步驟最容易損失蛋白質，與收取溶離液的技術有關，要小心練習之。
8. 電泳溶離出來的蛋白質進行檢定：蛋白質定量 (Y1) 及酵素活性分析 (Y2)，然後以 SDS-PAGE 電泳 (Y4) 檢定其純度。
9. 製備式電泳所得到的酵素，將要作為下個實驗的材料，因此請小心收拾；若怕在製備式電泳出錯而影響動力學測定，請留下一些 IEX 備用。
10. 實驗完成後，請清點並清理所有電泳及溶離用具，準備移交或收藏起來。

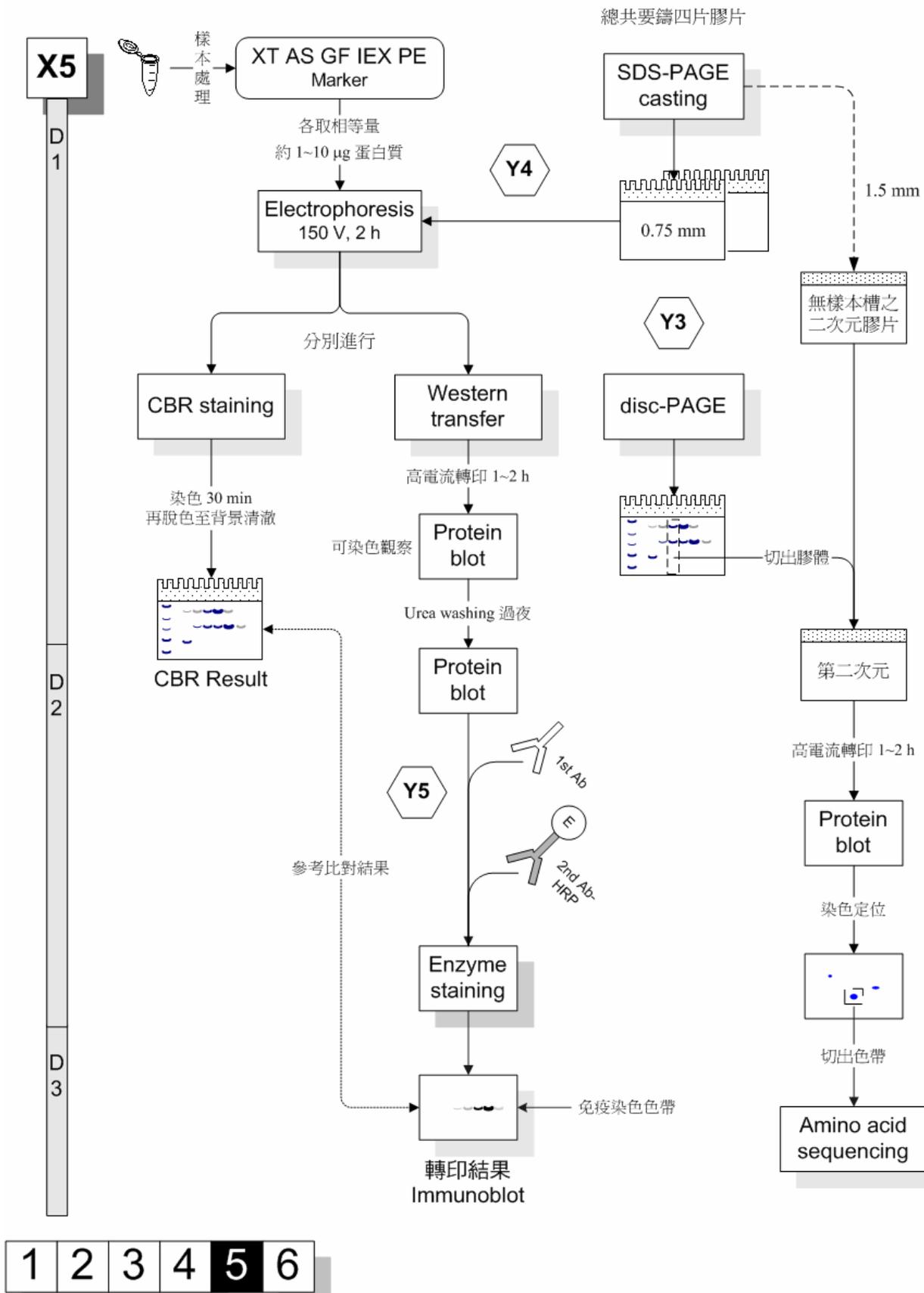
預期結果：

1. 由最後的 SDS-PAGE 結果，你可以看出所純化出來的酵素純度如何。
2. 若你是由粗抽取液直接進行製備式電泳，則效果可能很差，會有較多雜質。
3. 由切下來的膠體中，溶離出所要的蛋白質，有時會損失很多，如何避免之？

問題與檢討：

1. SDS-PAGE 與 disc-PAGE 兩種膠體電泳，在原理、機制及其應用上，有何異同？
2. 製備式電泳的回收率一般都很低，是何緣故？如何避免或改進之？
3. 製備式電泳所切下含有酵素的膠塊，可以直接應用到何種實驗，而不須先經溶離？

Western Transfer & Amino Acid Sequencing



X5 轉印及定序

抗體可以很精準地結合到目標蛋白質；電泳的強大解析力加上抗體的專一性，使得免疫轉印成為最有力的分析工具之一。

實驗步驟摘要：

1. 同上次實驗，請先把整個實驗的步驟寫好摘要，整理出兩張表：藥品試劑及儀器用具，並請注意轉印槽、免疫試劑的使用法。
2. 基本操作方法請看參考講義的實驗方法，但請整理出你自己的操作流程；另外你可能需要加強有關免疫化學方面的基本知識。
3. 請先把留下來的五種樣本 (XT, AS, GF, IEX, PE) 進行蛋白質定量，以便依據所得的蛋白質濃度，決定電泳樣本的使用量；每個樣本均定量使用 1~10 μg 蛋白質。
4. 小心安排電泳片上的各個樣本 (XT, AS, GF, IEX, PE) 以及 marker 的位置，以便進行 SDS-PAGE，然後轉印到硝化纖維紙上，再以抗體染色。另外準備一片沒有樣本槽的 SDS-PAGE 膠片，以便次日進行二次元電泳。
5. 二次元電泳的第一次元跑 disc-PAGE，切出所要色帶，浸入 SDS 電泳緩衝液 30 min 後，塞入第二次元的 SDS-PAGE 膠片，電泳後進行轉印，轉印紙經快速染色定位所要的蛋白質，剪出色帶後送胺基酸自動定序分析。
 - ◆ 二次元電泳跑得較佳，且能夠切得清楚色帶者，才得送胺基酸定序。
6. 完成後請清點並清理所有用具，移交或收存，要特別注意免疫試劑的保存方法。

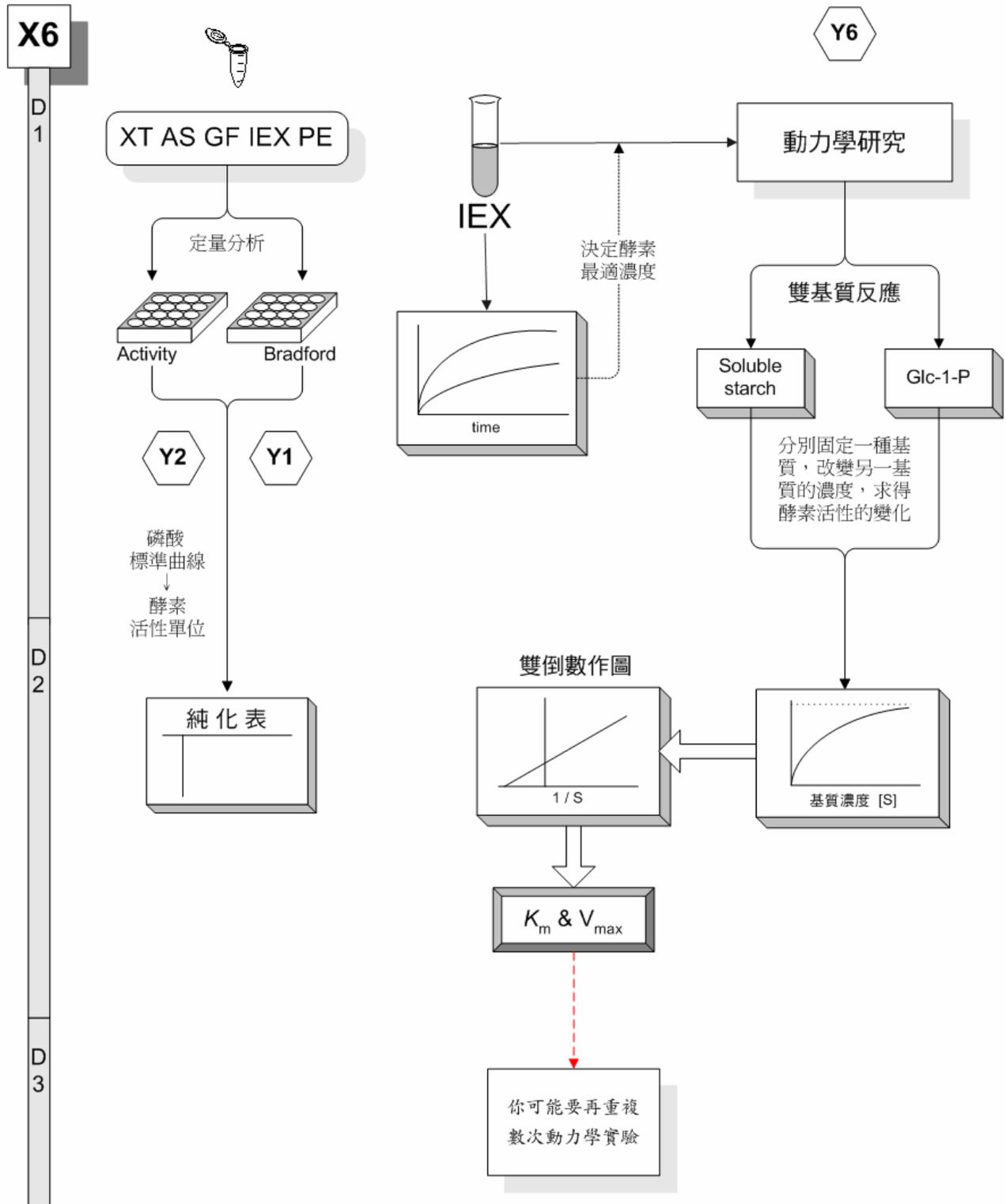
預期結果：

1. 『硫酸銨-膠體過濾-離子交換法-製備式電泳』這一連串純化過程中，你的酵素活性回收有多少？比活性有無隨著增加？那一種分離方法效果最佳？
2. 免疫轉印後，你可以在轉印紙上看到幾條呈色色帶？那應該是什麼物質？
3. 定序可能要費數週時間，若樣本太雜、太稀，也可能無法成功定序；請把定序結果及搜尋的討論，寫在最後的實驗報告中。
4. 請注意澱粉磷解酶的分子特性 (蛋白質降解) 與所觀察到的結果，有何關聯？

問題與檢討：

1. 免疫轉印操作過程中，若有任何一步失誤，很容易得到一片空白的結果，特此警告。因此建議在實驗之前，詳細做好紙上作業，多與同學們或教師討論操作過程。
2. 為了切得到所要的目標蛋白質色點，一定要用二次元電泳嗎？
3. 得到胺基酸序列後，你可以進行哪些研究工作？可獲得何種訊息？

Enzyme Kinetics & Purification Table



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6

X6 酵素動力學

酵素動力學是以改變基質濃度，或加入抑制劑等效應物，來觀察酵素反應速率的變化，藉以瞭解酵素與基質的關係，以及酵素的 V_{max} 。

實驗步驟摘要：

1. 請先把實驗的各個項目及詳細步驟寫好摘要，並整理出兩張表：藥品試劑及儀器用具。本實驗全都在做酵素活性的分析，再以作圖整理數據，求得動力學結果。
2. 本實驗的基本操作雖然只是酵素活性分析法，但重要的是有關酵素動力學的基本概念，如何求出Michaelis-Menten常數 (K_m) 及 V_{max} ，以及它們所代表的意義。
3. 以合成方向而言，澱粉磷解酶有兩個基質 (葡聚糖及Glc-1-P)，可分別測定兩者的動力學常數；若葡聚糖濃度飽和，改變Glc-1-P濃度，可測得酵素對Glc-1-P的 K_m 。
4. 活性分析所得到的原始數據是吸光值，並非酵素的活性單位，故在上述的實驗中，必須同時做一條吸光值與磷酸濃度的關係直線，以便把吸光值轉換成活性單位。
5. 使用純化的 PE 或者 IEX 樣本；在進行動力學測定以前，必須先決定一個最適當的酵素量，使活性測定所得的吸光值落在 1 - 1.5 之間 (為何要如此?)。
6. 另外把所收集到的五個樣本 (XT, AS, GF, IEX, PE)，分別進行蛋白質及酵素活性測定，以便整理出純化表。在測定各樣本時，要注意各樣本的稀釋度要一致，且所得吸光值也不能太高或太低，以便得到較可靠的結果。

預期結果：

1. 以Glc-1-P的 K_m 測定為例，若酵素濃度適中，依 [Glc-1-P] 改變可得到一組數據 (吸光值)；以 [Glc-1-P] 為橫座標，吸光值為縱座標，可得一曲線；再化為雙倒數座標，則成為一直線，進而求得 K_m 及 V_{max} 。作圖時請注意兩個座標軸的單位。
2. 由動力學結果可以得知酵素對基質的催化行為，但其解讀也要極為小心，以免誤判。最好多複習相關的生化基本知識，多看一些例子，才能有所心得。
3. 純化表 可看出整個純化步驟的效果如何，通常是比較其純化倍數、活性回收率及所得酵素的比活性大小；這些都是從所測得的蛋白質量、活性單位及總體積等基本資料所算出來的。

問題與檢討：

1. 若酵素或基質的濃度不適當，則雙倒數作圖很難畫出直線，故動力學實驗之前就要先決定適當的酵素濃度。
2. β -澱粉酶是澱粉磷解酶的抑制劑，你可以用它來做動力學的抑制曲線 (如何做?)。
3. 由純化表看來，是否有那些純化步驟沒有什麼效果，但能否因而除去這一步驟？

