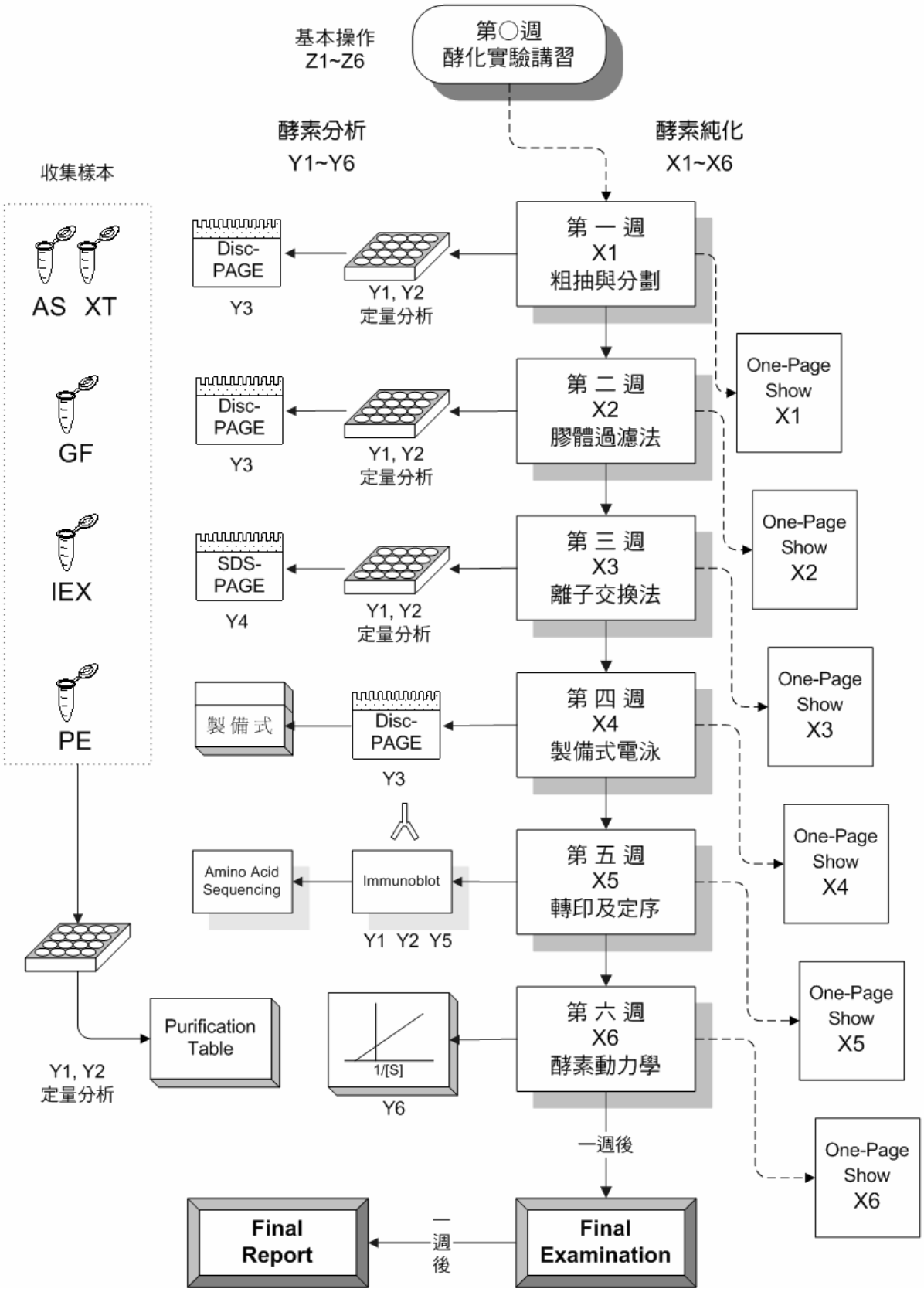
X

實 驗 單 元

實驗單元：

X0　實驗進行通則
X1　粗抽與分劃
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。

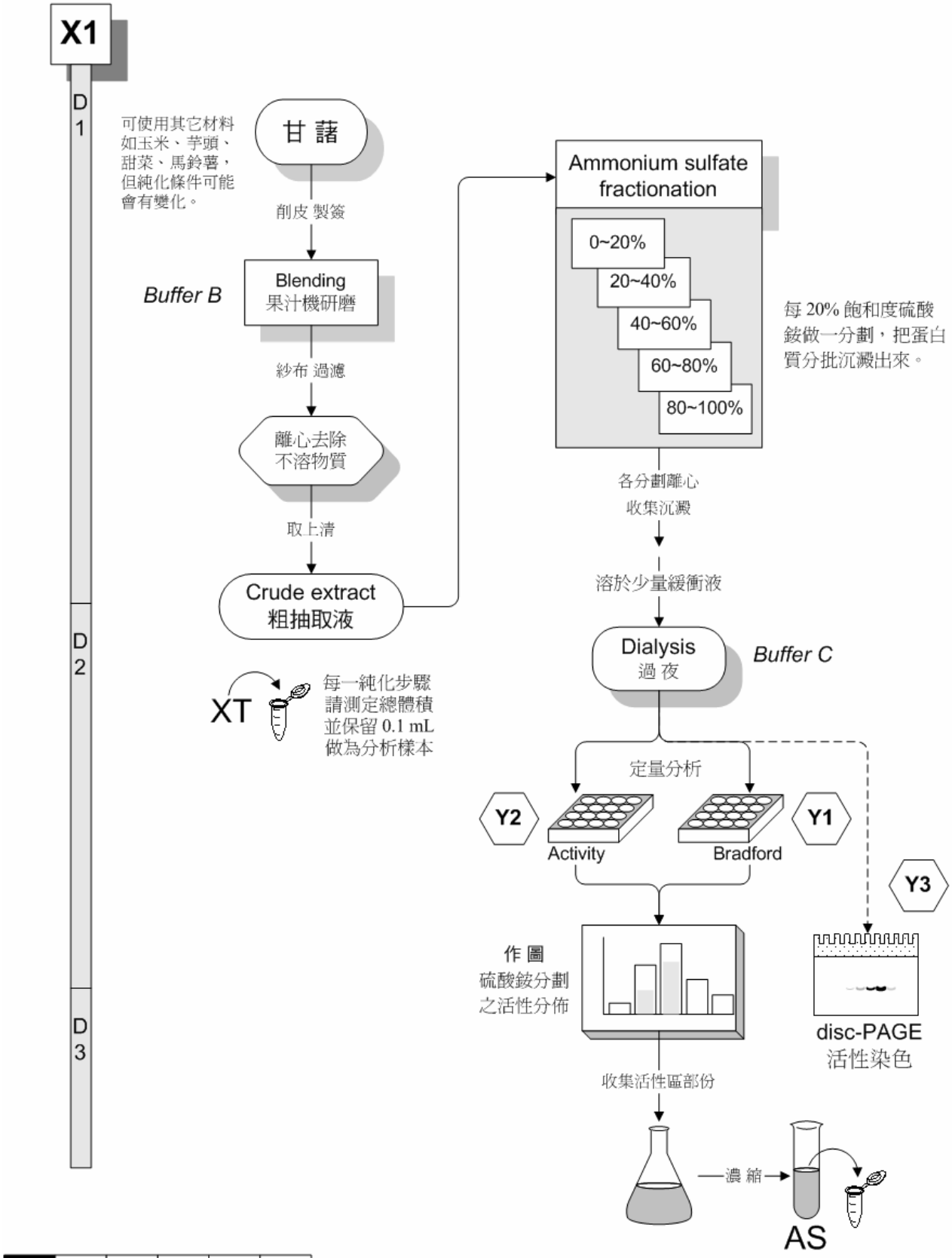
實驗操作時 - 按步就班進行：

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，不要一昧照抄；且一旦發現抄襲，將會遭退件。

Crude Extraction and Ammonium Sulfate Fractionation



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，依照澱粉磷解脢的純化方法，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体積，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脢活性位置 (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℃ 保存；請注意澱粉磷解脢不耐凍結，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。

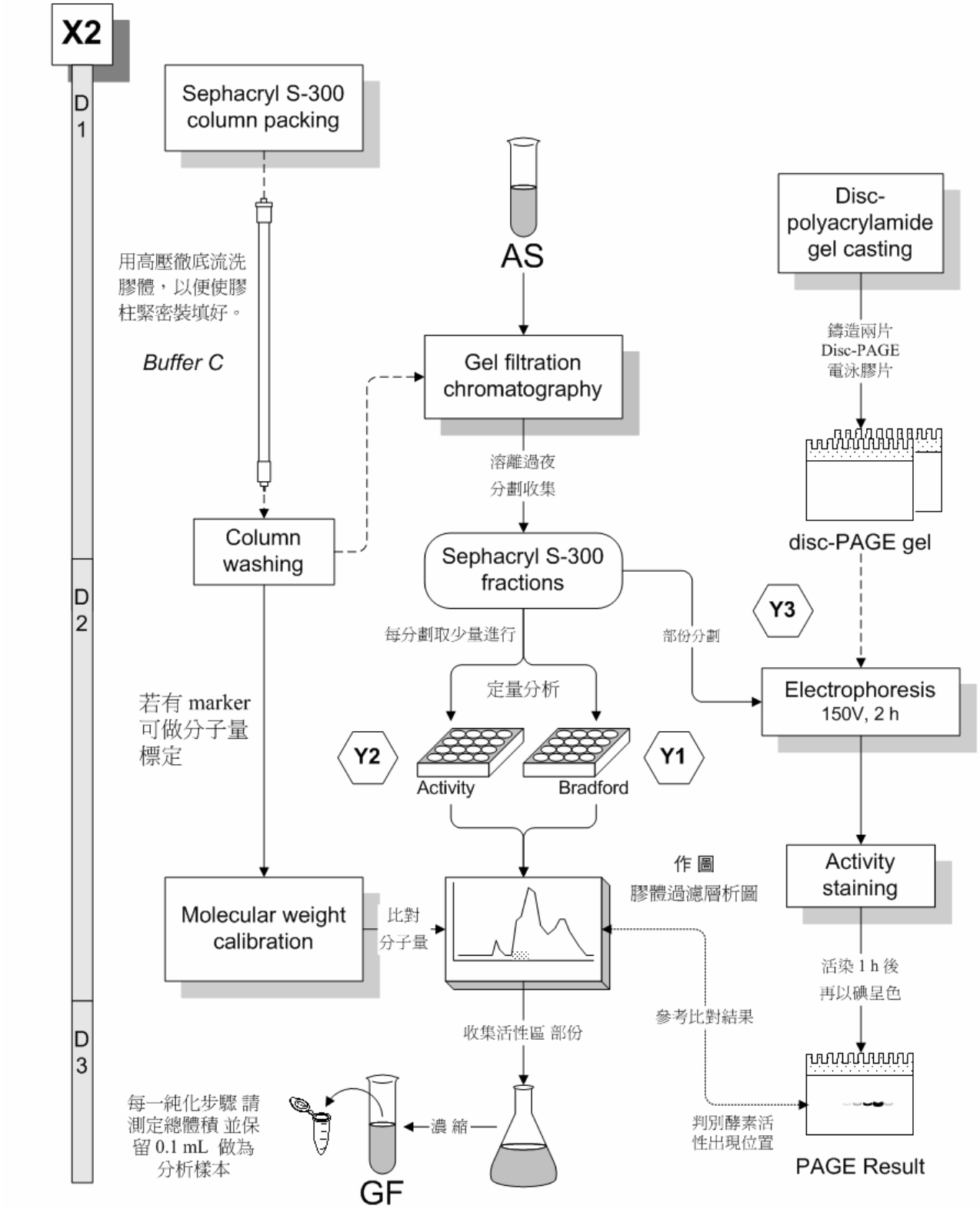
預期結果：

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地方，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



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。

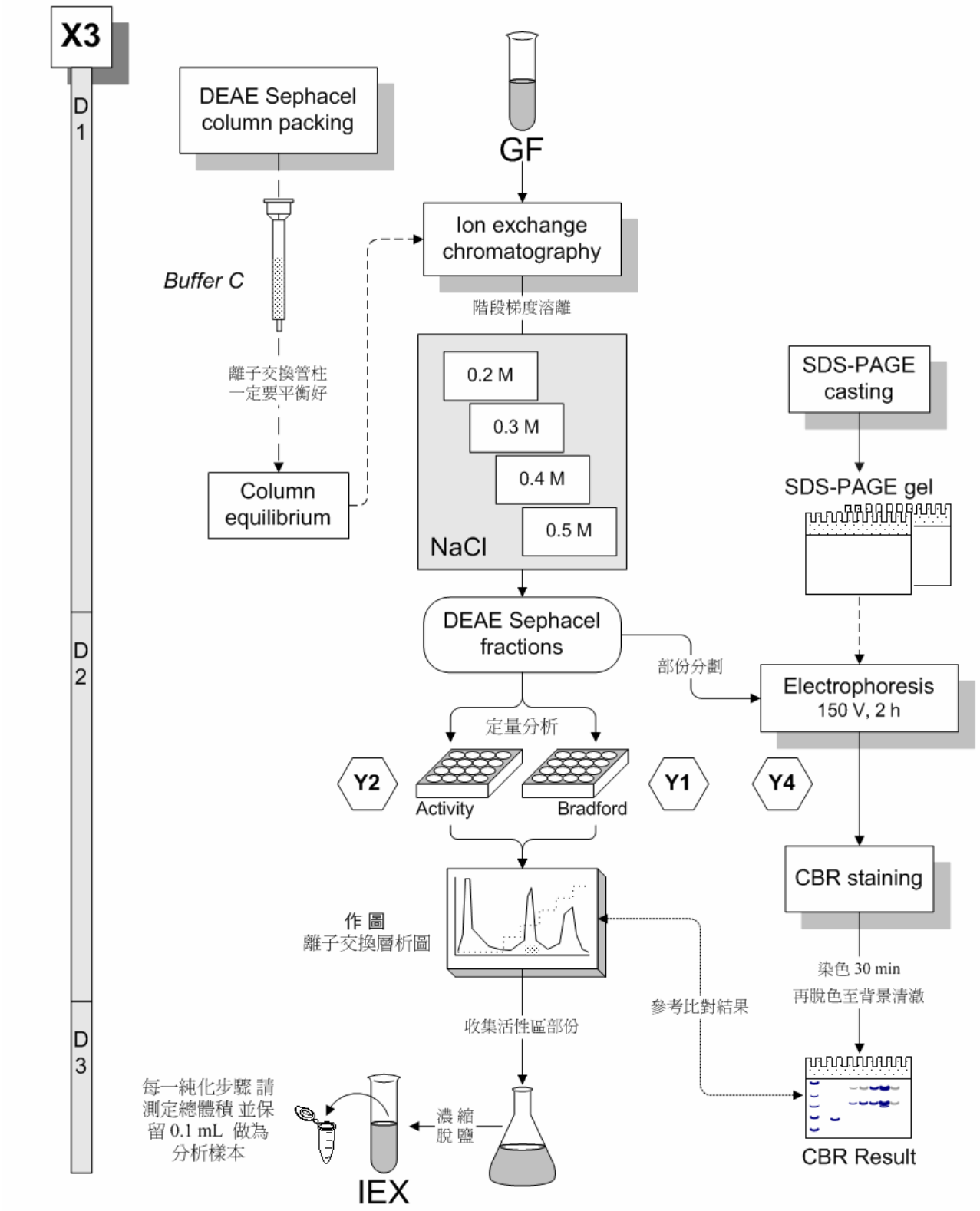
預期結果：

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. 把畫出膠體過濾管柱的標準分子量校正線，並推出澱粉磷解脢的分子量為多少。
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



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、簡易塑膠管柱及膠体，熟悉其用法及特性。
2. 裝填一支 DEAE Sephacel 管柱備用，請注意離子交換膠体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. 取出上次膠体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；俟洗過兩個管柱体積後，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 流洗一個管柱体積。 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℃，準備進行製備式電泳 (X4)。 IEX 共 _____ mL。
8. 實驗完成後，請把膠体取出，在玻璃淬砂漏斗中，以緩衝液清洗膠体至平衡，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。

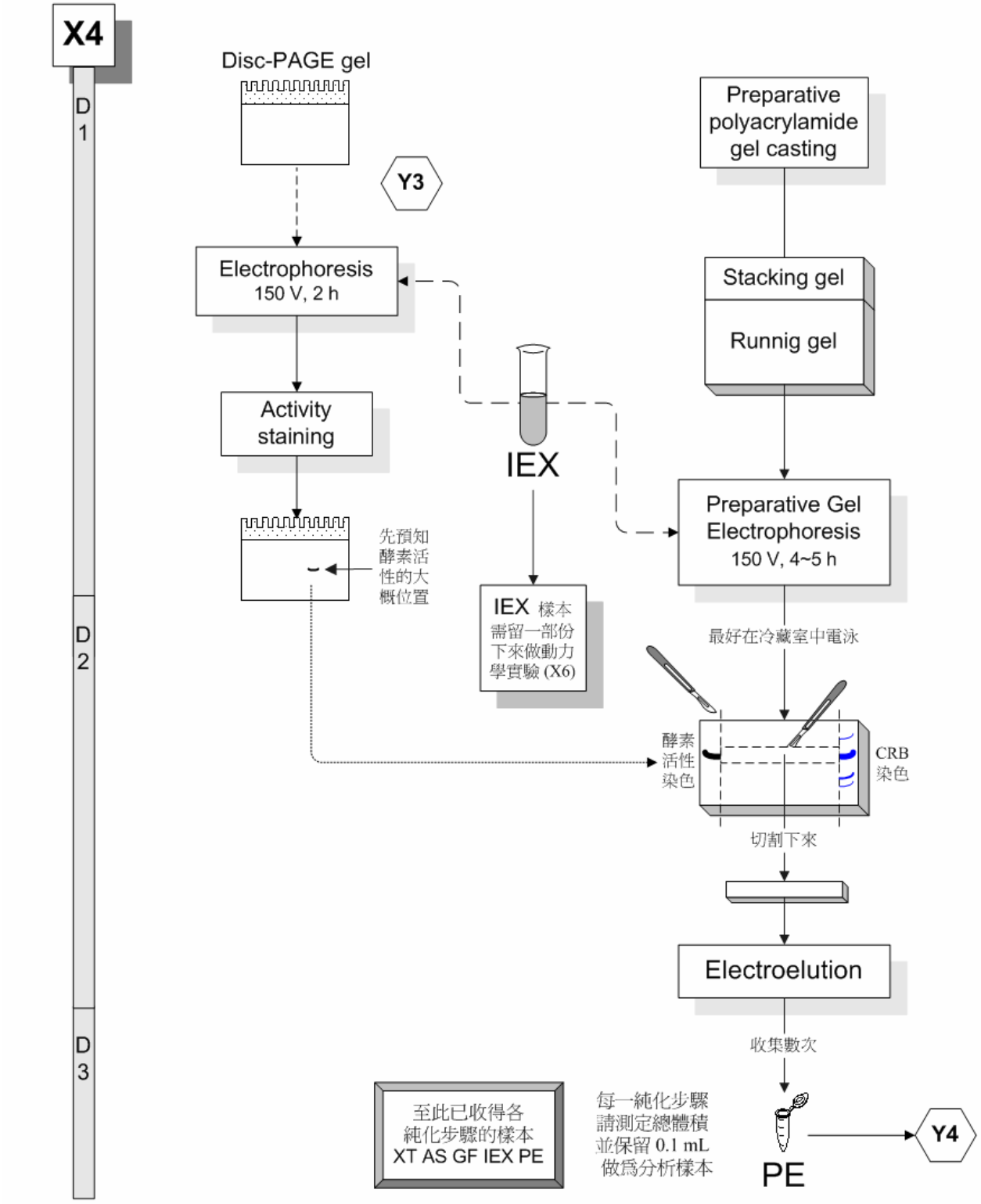
預期結果：

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脢的過程中，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脢？ 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. 離子交換膠体沒有平衡或再生完全，是失敗的主因，請小心此點。
3. 硫酸銨-膠体過濾-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



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脢的位置。
6. 依所計畫的步驟進行電泳，俟追蹤染劑跑出膠体後，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体，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。

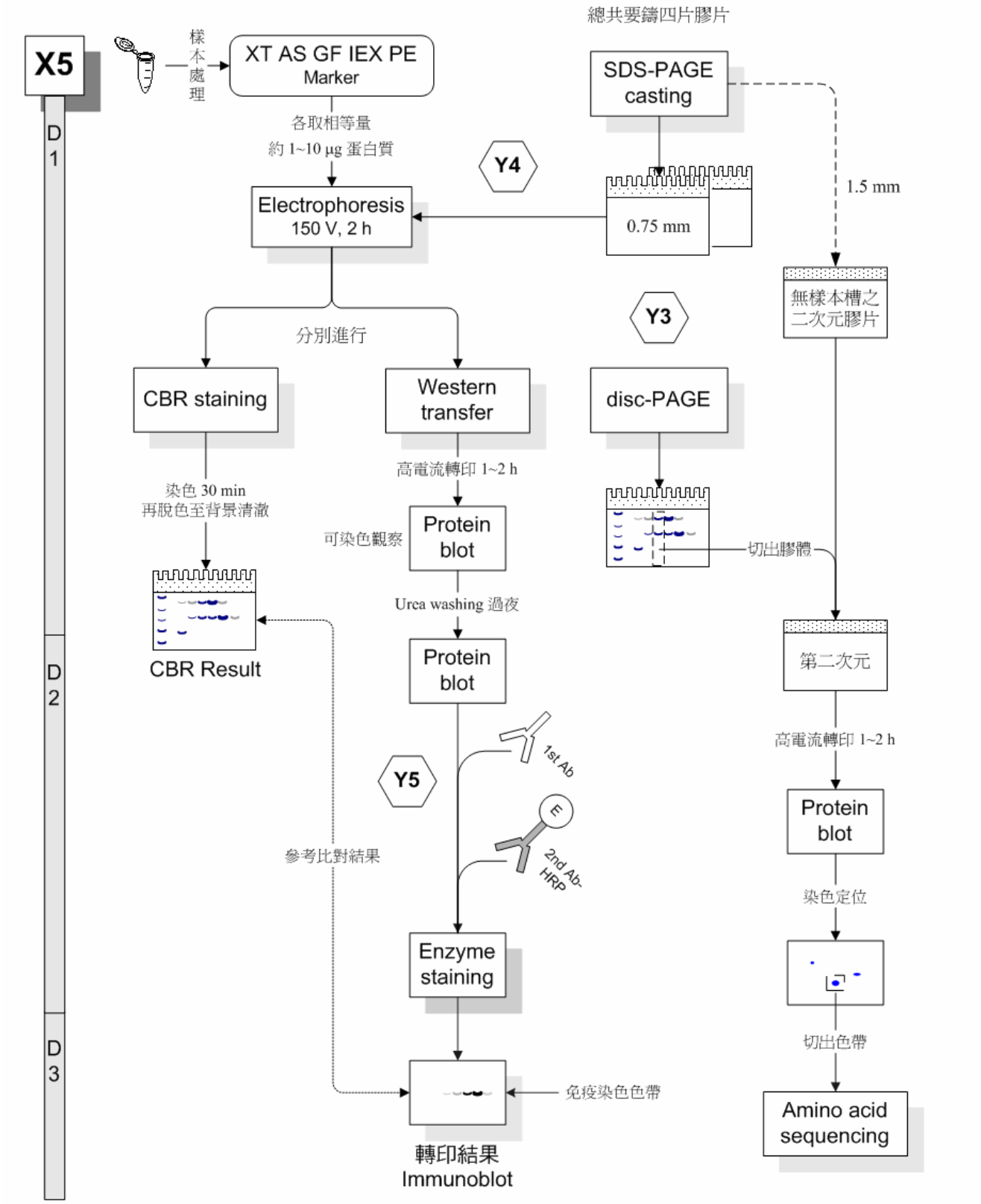
預期結果：

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. 由切下來的膠体中，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 兩種膠体電泳，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。

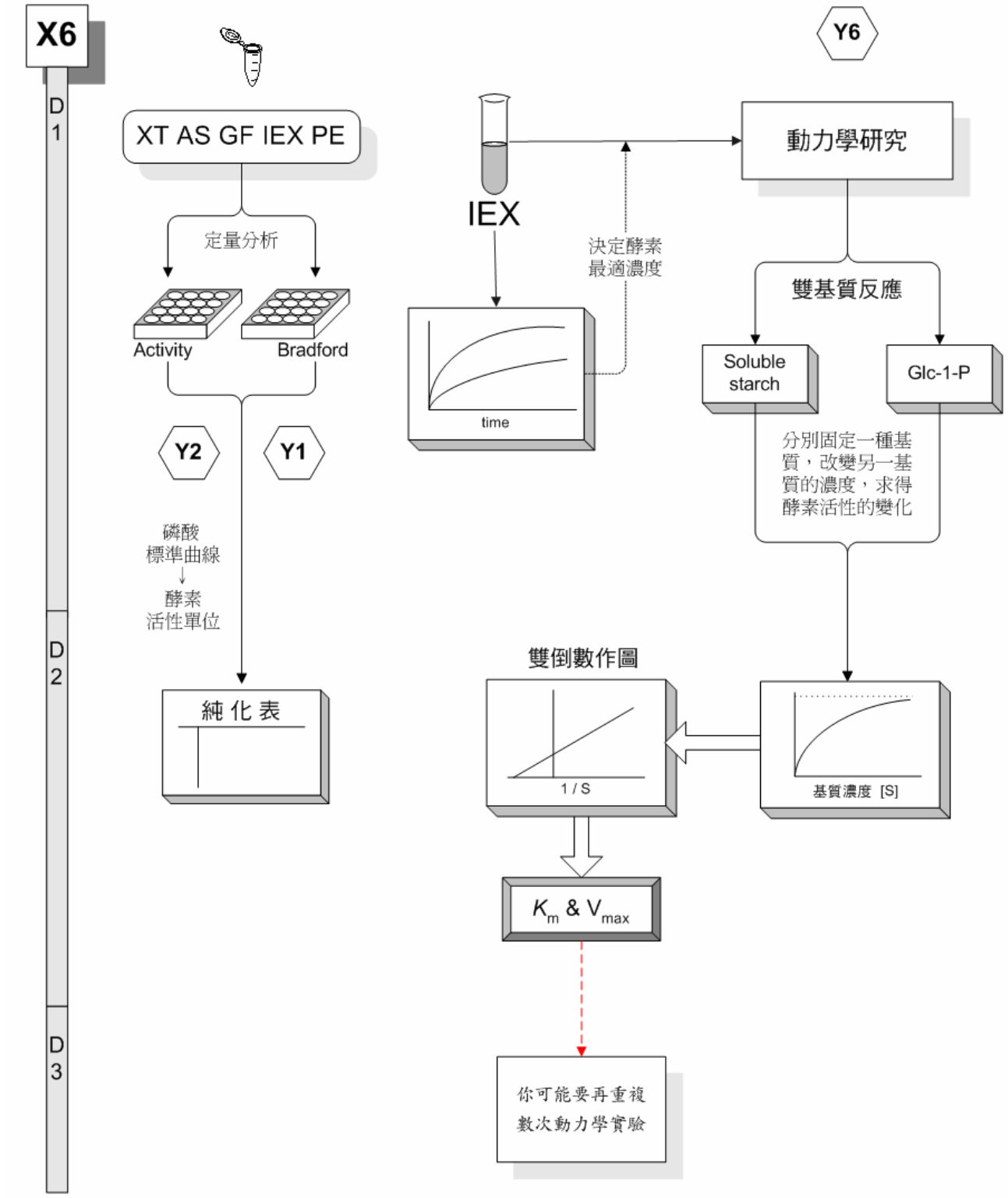
預期結果：

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. 請注意澱粉磷解脢的分子特性 (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



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，以及酵素的最大反應速率。

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，澱粉磷解脢有兩個基質 (葡聚醣及Glc-1-P)，可分別測定兩者的動力學常數；若葡聚醣濃度飽和，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-澱粉脢是澱粉磷解脢的抑制劑，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？

Y

分 析 方 法

分析方法：

Y1　蛋白質定量法
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

Y 分析方法

本實驗共需用到六種基本分析方法 (Y1~Y6)，其詳細內容請見參考講義 B3； 下表把這些分析方法在 B3 的出現章節及頁數標出，請參考其中所寫的方法與步驟。 在草擬實驗計畫時，請不要完全抄襲這些方法，而是應該依照你的需要，重新組合後寫出你自己的實驗步驟。

各種分析方法的參考出處：

分 析 方 法	B3 章節	名稱	頁 數
Y1 蛋白質定量法	1.1	蛋白質定量法	193
Y2 酵素活性分析法	1.2	澱粉磷解脢活性分析	195
Y3 原態電泳及活性染色	3.1	不連續膠體電泳 (native-PAGE)	205
	3.5.4	澱粉磷解脢活性染色法	215
Y4 SDS 膠體電泳	3.2	SDS 膠體電泳	207
Y5 轉印及免疫呈色法	4.1	蛋白質電泳轉印法	217
	4.2	酵素免疫染色	218
Y6 酵素動力學測定	1.3	澱粉磷解脢動力學分析	196

以上各種分析方法的基本原理，在參考講義 B2 中有詳細說明，請自行閱讀之；同時也會在實驗課上課期間，每天的講習課程中講述其原理。

Z

基 本 操 作

基本操作：

Z1　自動吸管
Z2　天平及酸鹼度計
Z3　離心機
Z4　光度計及 ELISA 計
Z5　透析及濃縮
Z6　電腦及軟體

Z 基本操作

本實驗課程排有六種最基本的實驗操作 (Z1~Z6)，是所有純化與分析方法的基石；因此在正式進行純化流程之前，先在第〇週前兩天的講習課程內，完成這些基本操作訓練。其目的是要養成正確的操作習慣，以便在未來的各週實驗中，能夠有效地執行複雜的實驗。基本操作訓練分成六項，每項依序輪流進行，請注意每一操作單元的目標。

基本操作的訓練目標及地點：

基本操作		目標	地點
Z1	自動吸管	正確使用自動吸管 自動吸管的校正與維護 對 μL 及 mL 微量體積的感覺	實驗桌
Z2	天平及酸鹼度計	正確使用天平及 pH 計 天平及 pH 計的校正方法 使用天平及 pH 計的習慣及禮儀	準備室
Z3	離心機	正確使用高速離心機 安全問題 (一定要平衡好) 使用離心機的習慣及禮儀	離心機
Z4	光度計及 ELISA 計	正確使用光度計的方法 正確使用 ELISA reader 各種光度計的校正方法	光度計
Z5	透析及濃縮	透析膜處理法 透析袋使用方法 超微膜離心濃縮法	細胞離心機
Z6	電腦及軟體	重要軟體介紹 (MS Word, SigmaPlot) 網路使用 (Reference Manager) 電腦使用方法及規則	電腦室

基本操作訓練方式建議：

1. 在第〇週的基本訓練中，將上述 Z1-Z6 分成兩天訓練；通常第一天 Z1, Z3, Z5，第二天 Z2, Z4, Z6；Z1 與 Z2 必須安排在不同日，因為兩者都要用到天平。
2. 每天的三項操作訓練設立為三站，由三位助教分別擔任各站主持人；同學分成三組，輪流到每一站聽取講解；每站的講解時間為 20 min，時間一到馬上移動到下站。
3. 如此輪完三站的講解後解散，但同學必須到每一站去接受操作檢定，操作正確無誤者過關，由主持助教簽名，完成當天的三項科目後才能離去。
4. 助教請就各項操作的注意要點監督，若同學操作不夠正確，必須排隊重來一次，並在旁觀看其他同學操作，一直到完全正確為止。

Z1 自動吸管

自動吸管 (autopipet) 是所有實驗最基本的配備，有如步兵的步槍一樣，若一支步槍的射擊校正不夠準確，就打不到目標。 請一定要先小心校正你的自動吸管，以免往後整個實驗過程的取量都有問題。

儀器用具：

自動吸管 Pipetman P-20, P-200, P-1000, P-5000 各一支

各種容量的吸管頭 (tip)： 黃色 (20, 200 μL), 藍色 (1000 μL), 無色 (5 mL),

天平 (9.999) 及秤量船 (要多借用幾台天平，以免同學久候)

純水及燒杯

操作項目：

1. 要試用過每一種大小的自動吸管。
2. 用自動吸管吸取定量的水到天平上秤量，看體積與重量間的關係。
3. 拆開自動吸管，熟悉內部構造；裝回去以後，再次確定取量是否精確。

注意事項：

1. 當吸管接上 tip 後，一定要確定有緊密接上，否則取量會不準。
2. 吸取溶液時，一定要小心吸上或放出，速度太快就會吸入空氣。
3. 用 1 mL 以上的自動吸管時，在吸取溶液後 tip 尖端不要馬上離開液面；尤其在吸取密度或黏滯度很高的液體時，尤其要等候更長久的時間 (3~5 s)。
4. 要練習一看到 tip 內液體的高度，即可猜出有若干體積。
5. 吸有液體的自動吸管，不得放下平躺或倒置，溶液會流入吸管中。
6. 拆開自動吸管後，小心其中各個零件，不要遺失或沾上灰塵；內部不可塗抹凡士林。
7. 若自動吸管本體不小心吸入液體，要馬上拆開清理後擦乾。
8. 千萬不可把自動吸管掉到地上！ 自動吸管不可用火烤！

問題檢討：

1. 如何發現你的 tip 並沒有裝得很緊密？
2. 如何確定你的自動吸管是準確的？
3. 儘量節省 tip，當你吸取同一溶液的系列濃度時，需不需要每次都換 tip？
4. 某生匆匆取了一支自動吸管，轉到刻度 50 後，急忙吸取 50 μL，可能有何差錯？
5. 你如何以自動吸管取用 0.5 mL 50% 甘油？

Z2 天平及酸鹼度計

天平及酸鹼度計都是實驗室中常用且重要的儀器；像自動吸管一樣，若沒有操作或校正好，所有的實驗將都會有問題。 Tris 可以作為良好的緩衝液分子，Sigma 售有 Tris 的 acid 及 base 兩種形態，以不同的重量比例混合，可配製出不同 pH 的溶液；本操作將指定一個 pH，讓同學查表秤取兩種 Tris，配製出來的溶液，可用酸鹼度計測量其 pH 是否正確。 另外，測量 Tris 的 pH 需使用特定的酸鹼度計，其酸鹼度探針 (probe) 上的透膜可以耐 Tris。

儀器用具：

天平 (9.999) 及秤量船 (最好能借到五台天平，以免同學久候)
酸鹼度計及標準酸鹼度溶液 (使用耐 Tris 的探針，兩台即可)
Tris HCl 及 Tris base (Sigma 各種 pH 的 Tris 緩衝液配製表)
純水及燒杯
攪拌器及攪拌子

操作項目：

1. 校正電動天平。
2. 校正酸鹼度計。
3. 配製 100 mL Tris 緩衝液 (50 mM, pH 由助教指定)。

注意事項：

1. 使用前先檢查天平的位置是否水平，可能的話還要校正天平。
2. 小心酸鹼度計的探針很容易被打破，也不能長久暴露於空氣中。
3. Tris 緩衝液的 pH 受溫度影響很大，要注意當日的室溫如何。
4. 使用天平及酸鹼度計最容易弄髒實驗桌，使用後桌面一定要清理乾淨。
5. 許多有害的物質，在秤量時要注意勿吸入肺部。也小心處理使用後的秤量紙，要小心輕輕包好後，才置入垃圾桶中；毒劇藥的用紙不能隨便丟到垃圾桶中。

問題檢討：

1. 若你所配製出來 Tris 緩衝液的 pH 不對，可能有哪些地方出了問題？
2. 為何校正酸鹼度計要使用兩種標準 pH 液？ 而且其中一個必須是 pH 7.0？
3. 為什麼有些緩衝液在室溫或空氣中久置後，酸鹼度會改變？
4. 如何經由觀察即可得知某一台天平或酸鹼度計準不準確？

Z3 離心機

離心機是實驗室極常見的分離工具，通常依其使用目的可分成數種：低速離心機、高速冷凍離心機、超高速真空離心機等；低速又有細胞離心機，以及常見的微量離心機等。使用離心機首重安全，因為離心力失控可能造成很大的破壞；因此要注意離心管是否有平衡，離心轉速是否超過極限，離心陀是否有腐蝕或過荷。

儀器用具：

高速冷凍離心機

離心陀及離心管

微量離心機 (microfuge)

懸臂式粗天平

操作項目：

1. 平衡離心管。
2. 離心機操作方法。
3. 離心機及離心陀的保養方法。

注意事項：

1. 通常離心機都會有登記表，請在使用前確實登記 (使用者、轉陀、轉速、時間)。
2. 離心管一定要平衡好，放入離心陀時也要注意位置平衡。絕對不要超過離心機或離心陀的最高限轉速。
3. 一定要在達到預設轉速後，才能離開離心機；若有任何異狀，要立刻停機。
4. 通常聽聲音即可得知離心狀況是否正常，也可注意離心機的震動情形。
5. 使用硫酸銨等高鹽溶液樣本後，一定要把離心陀洗乾淨，也要清理離心機轉艙。
6. 超高速離心機則因轉速極高，也更加複雜，需要另外的專門訓練才可使用。

問題檢討：

1. 高速以上的離心機為何要冷凍或者抽真空？
2. 你已經很小心地把兩隻樣本離心管平衡好，但開動離心機後，還是發生不平衡狀況，停機後取出再秤一次，發現兩隻離心管還是平衡的；請問為何會發生不平衡？
3. 離心陀一般分成懸籃式 (swing bucket) 及角型 (angular) 兩大類，使用上有何差別？
4. 一般論文中記載的離心條件，有人記錄轉速 (如 8,000 rpm)，有人記錄離心重力 (如 10,000*g*)；二者有何不同？ 何者較為適當？

以下用日立 20PR-5 機型為範例，詳細說明離心機的操作步驟。

使用步驟：

1. 設定使用溫度 (通常為 4℃) 後，先把離心陀放入離心艙中，注意離心陀要卡好軸心；關上艙門，離心艙的溫度開始下降，預冷時間要充足。
2. 把樣本裝入適當的離心管，雙雙用天平平衡重量，蓋上離心管蓋子並旋緊。
   - ◆ 注意離心管只裝七成滿，雖然加有蓋子，但也可能因離心力太強而外洩。
   - ◆ 大部分離心管都附有蓋子，注意離心管的蓋子也要一起平衡。
   - ◆ 離心管通常都會放在碎冰上，注意取出平衡時，要把碎冰的液體擦拭乾淨。
   - ◆ 落單的離心管要用另一隻裝有清水的離心管平衡。
3. 把平衡好的離心管對稱地放入離心陀中，蓋上離心陀的蓋子，注意有無旋緊。
   - ◆ 若離心陀的蓋子沒旋緊，離心時會掉出來，造成很大的傷害！
4. 關上離心機艙門，在儀表板上調好所要的轉速與時間 (例如 8,000 rpm, 30 min)。
   - ◆ 注意所用轉速絕對不能超過離心陀的限定，最高轉速通常寫在離心陀上面，例如 RPR20 的最高轉速為 20,000 rpm，但若離心機太老舊，必須往下調降。
   - ◆ 轉速與時間設定儘量不要太高，例如能使用 7,000 rpm 者就不要用 8,000 rpm。
5. 確定所有步驟無誤後，按 Start 鈕開動，離心機漸漸加速，此時要密切監控。
   - ◆ 有些老式的時間轉鈕，設定 5 min 以下時，要先轉過 10 min 再轉回 5 min。
   - ◆ 按 Start 的按鈕時，按住時間不能太短，請持續按約一兩秒鐘後才鬆開。
   - ◆ 開始加速的時候最危險，若發現聲音不對，或產生大震動，請立刻按 Stop。
6. 等到離心達到所要的轉速後，確定一切正常才可離去。
7. 完成離心時，要等離心陀完全靜止後，才能打開艙門；請儘快取出離心管，先觀察離心是否完全，以及沈澱的位置，儘速把上清倒出，小心不要把沈澱弄混濁。
   - ◆ 不管所要的是上清或沈澱，請取用乾淨的燒杯收集上清，以免有失誤。
   - ◆ 傾倒上清要很小心，以免把沈澱一起倒出來；若不慎混在一起，就要重來一次。
   - ◆ 若離心管有漏，要找出原因，並且立刻清理離心陀或離心艙。
8. 在兩次離心之間的空檔，不需取出離心陀，但蓋上艙門，勿讓熱空氣流入離心艙。
9. 全部使用完畢後，取出離心陀清理，可以用自來水沖洗，並且倒放晾乾之。離心艙門要打開，等結冰融化後，再稍加擦拭及清理，若有液體漏出，要用清水洗之。也要回頭檢查平衡離心管的天平以及桌面，很容易弄髒，要仔細清理乾淨才離開。

Z4 光度計及 ELISA 計

光度計是實驗室最基本的測量儀器，通常以光源區分為可視光及紫外線兩種，機型有簡單的，也有很複雜的形式；另可分為使用測光管的傳統機型，以及近年來流行使用微量滴定盤的 ELISA 光度計，後者一般只能讀可視光，只有少數貴重機型可以讀紫外光。

儀器用具：

普通光度計及測光管 (cuvette)

ELISA 光度計 (Dynatech 或其他廠牌)

微量滴定盤 (microtiter plate)

操作項目：

1. 普通光度計的使用及校正方法。
2. 測光管的維護及保養。
3. 微量滴定盤的使用。
4. ELISA 光度計的使用方法。

注意事項：

1. 通常光度計都有登記表，請在使用前確實登記 (使用者、波長、樣本、時間)。
2. 光度計最忌忽開忽關，供應電源不穩，或者不使用而長時間開著燈泡；回家前應當檢查光度計是否已經關掉，並且把光度計清潔乾淨。
3. 使用紫外光時，測光管一定要用石英材質者，其他材質者無法透光；同時，測有色物質的溶液時，要避免使用石英測光管。
4. 新型光度計都有複雜的電腦系統，不會使用者經常會搞得當機，請先請問他人。
5. 微量滴定盤的底部請保持乾淨，且滴定槽內不能有氣泡，以免干擾測光。
6. 每次測吸光前，要注意使用的波長對不對，空白組是否有做好。

問題檢討：

1. 請描述光度計的測光原理，樣本的吸光度大小與樣本的哪些性質有關？
2. 蛋白質、核酸在多少波長會有吸光？ 為何它們會吸光？
3. 有些反應的生成物會有顏色，就可以利用微量滴定盤進行測定；但若此反應過程要加熱，而微量滴定盤無法耐熱，則如何使用 ELISA 光度計來測光？
4. 光度計可靠的吸光值範圍多少？ 若超過最高可靠值，應當如何處理？

Z5 透析及濃縮

透析與濃縮也是極為基本而且重要的實驗步驟。兩者都是利用薄膜的通透性，來區別分子大小，而達到透析或濃縮的目的。本實驗課程則使用最傳統的透析袋進行透析，另以離心式的薄膜濃縮器進行濃縮，主要是因為其方便性，且可供多數樣本同時進行。

儀器用具：

透析膜 (前處理方法如下)：

1. 戴手套把透析膜剪成適當長度，浸在蒸餾水中 15 min 泡軟。
2. 浸入 10 mM sodium bicarbonate 中，並加熱至 80℃，一邊攪拌至少 30 min。
3. 換到 10 mM Na_2·EDTA中浸泡 30 min，以新鮮的EDTA同樣方法處理三次。
4. 再用 80℃蒸餾水洗 30 min，然後換到 20% 酒精中，放在 4℃冰箱中保存。

透析夾、攪拌子、攪拌器及 5 L 塑膠燒杯 (裝蒸餾水 4 L)

細胞離心機 (懸藍式 3,000 rpm)

離心濃縮管 (Centriplus, Amicon)

樣本：Blue Dextran + FMN (濃度不拘，看得到顏色即可，每人約 10 mL)

操作項目：

1. 綁一個透析袋，裝約 5 mL 樣本，使其浮於大燒杯內的水面上，透析過夜。
2. 觀察 Centriplus 的構造與其濃縮的原理，注意所要收集的部位為何。
3. 試以離心濃縮管處理 5 mL 樣本；注意控制好離心速度，一般離心機都不超過 3,000 rpm，而離心時間不用太久，看到顏色變化即可。

注意事項：

1. 取出透析袋要先用蒸餾水清洗乾淨，綁透析袋前要先試裝蒸餾水，看透析袋有沒有蛀孔，會不會有水噴出。 綁透析袋不要太用力拉扯，否則透析袋可能會裂開。
2. 一般透析至少要 3 h，至少要換兩次透析液 (100~1000 倍樣本體積) 才能完全。
3. 注意離心濃縮管的離心轉速不能太快，否則薄膜很容易破裂。
4. 每次離心濃縮後，暫時不要丟掉外濾液 (filtrate)，收集起來以防薄膜破裂流失。

問題檢討：

1. 記下透析與薄膜濃縮的結果比較，樣本的顏色有無變化？
2. 透析後常常發現透析袋內產生大量沈澱，是何原因？
3. 如何察覺或檢定你的離心濃縮管有無破裂？

Z6 電腦及軟體

電腦是極為強大的工具，如運用得當，可使你的研究或做事能力倍增；下面列出一些常用的軟體及其應用時機，請自行學習使用。資訊網路則是另一個世界，在資訊的獲取上非常重要，千萬不可忽視。

儀器用具：

個人電腦及印表機

網路連線

電腦套裝軟體 (如下表)

	Package	Company	實驗上用途	未來用途
★	Word	*Microsoft*	撰寫實驗報告	撰寫論文主體
★	SigmaPlot	*SPSS*	製作結果圖表	撰寫論文： 製作圖表
★	Reference Manager	*RIS*	整理資料庫	撰寫論文： 參考文獻
★	PowerPoint	*Microsoft*	實驗成果報告	報告論文製作幻燈片
★	序列分析軟體 *	(網路)	蛋白質序列分析	巨分子序列分析
●	CorelDRAW	*Corel*	製作流程圖及繪圖	撰寫論文： 製作流程圖
●	Visio	*Microsoft*	製作實驗流程圖	撰寫論文： 製作流程圖
●	Access	*Microsoft*	整理所有實驗用具	個人資料庫建立
	Excel	*Microsoft*	數據整理與作圖	科學作圖儘量用 SigmaPlot
	Project	*Microsoft*	規劃實驗課程進度	專案管理
	Organizer	*Lotus*	排定每日實驗進度	個人日常生活行程管理

★一定要純熟使用 ●推薦使用

* 網路上的基因或蛋白質資料庫，以及序列分析軟體很多，例如GCG (Genetics Computer Group) 巨分子序列分析，可由國家衛生研究院網站 (http://bioinfo.nhri.org.tw/) 進入，正式使用GCG需申請使用者帳戶。

操作項目：

1. 啟動電腦，嘗試進入以上各套裝軟體，並進行簡單操作及應用。
2. 進入本校計算機中心網路及圖書館資料庫，試著找尋一些資料庫 (如 PubMed)。
3. 練習好幾個指定的基本操作，然後在上課期間自行熟悉使用各種進階操作。

注意事項：

1. 禁止在公用電腦灌入任何軟體，也不要更動電腦上的任何設定，務必確實遵守。
2. 禁止從網路下載任何軟體及執行檔，若發現有中毒現象，請立即通報管理員。
3. 使用頻率高的軟體，各實驗室應當自行採購原版軟體，大部分軟體都有教育版。