

國立臺灣海洋大學食品科學系

# 生物化學實驗課程

授課老師：龔瑞林 老師  
陳泰源 老師



週	課程內容
1	實驗室守則、評分方式、操作組規定、紀錄簿
2	檢出法1—材料之還原糖定量
3	檢出法2—材料之膽固醇定量
4	蛋白質1—材料option、硫銨分劃、透析濃縮
5	蛋白質2—Bradford定量分析
6	蛋白質3— Polyacrylamide gel 製備
7	蛋白質4—SDS-PAGE, CBR染色法
8	酵素動力學1—Lysozyme-substrate option
9	酵素動力學2— $\alpha$ -amylase-substrate option
10	酵素動力學3— $\alpha$ -amylase-substrate-inhibitor
11	資料整理 / 報告準備
12	One page oral presentation

# 評量方式

- ◎ 出席率 25%
- ◎ 實驗報告 40%
- ◎ One page show 35%

# 實驗室規則

- ◎ 實驗報告每人一份、每三週交一次、實驗組別3-4人為一組。
- ◎ 上課 10 分鐘內不到者為遲到，20 分鐘以內無故不到者為曠課。
- ◎ 無故曠課，該堂總成績扣5分且不予補作實驗。
- ◎ 入實驗室請穿著**實驗衣**及**包鞋**，禁止穿著拖鞋及涼鞋進入。
- ◎ 嚴禁攜帶食物及飲料進入實驗室。

- ◎ 實驗室**禁止嬉鬧**。
- ◎ 儀器及配件有故障者立即向小助教報告。正常操作損壞者免責，誠實報備且知錯者視情況減責。未當場報備者，如事後發現故意隱匿情事，將負照價賠償之責。
- ◎ 實驗結束後整理桌面及收拾儀器好後，請值日組檢查才可離開實驗室，值日組需協助小助教將儀器歸位、關閉電源及門窗等等。
- ◎ 實驗室內未使用到之儀器請勿碰觸以維安全。

# One-Page Show 說明

- ◎ 每位同學簡報三分鐘，強調結果特色重點。圖片請自行掃描或拍攝，用 JPG 檔案格式。
- ◎ 每人只能用一張power point，請自行刪減編輯，提出最重要之結果。
- ◎ 圖表請說明，文字務必精簡，只寫出結果重點。
- ◎ 最後可加上『結果摘要』，整體說明結果。
- ◎ 依照上面格式貼上結果圖表，圖表須編號，如圖一、圖二、表一等。

生物化學實驗 組別

姓名

學號

結果圖表

圖表一 說明文字

結果圖表

圖表二 說明文字

結果圖表

圖表三 說明文字

結論

(1)

(2)

(3)

# 澱粉酶於酶催化反應中之抑制現象

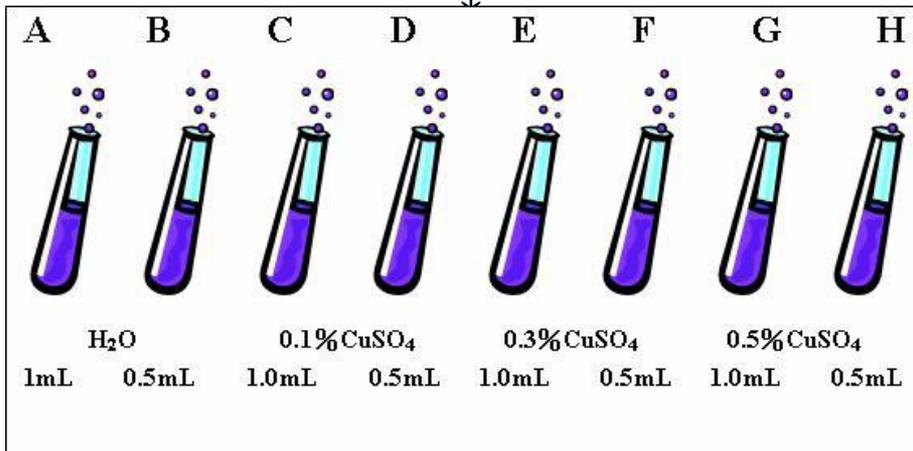
林xx B99999999

## ◎ 實驗原理：

利用水解不同階段澱粉與碘有不同顏色反應定性觀察硫酸銅在澱粉酶催化反應中之抑制現象。

## ◎ 實驗步驟：

各管先加入0.5% 澱粉 1mL



各管加  $\alpha$ -amylase 1.0mL  
並水浴 37°C，15min

各管滴碘液1滴，觀察顏色

## ◎ 實驗結果：

	現象
A	沒有變化
B	沒有變化
C	有些微變淺藍色
D	有些微變淺藍色，但比C深
E	有藍色的絲狀沉澱物產生
F	從E→H，
G	沉澱物越來越多
H	藍色也越來越深

## ◎ 討論：

溶液中的藍色為澱粉及 $\alpha$ -amylase遇碘所呈現的顏色；而絲狀物所呈現的藍色為CuSO<sub>4</sub>抑制 $\alpha$ -amylase所呈現Cu<sup>2+</sup>的藍色。

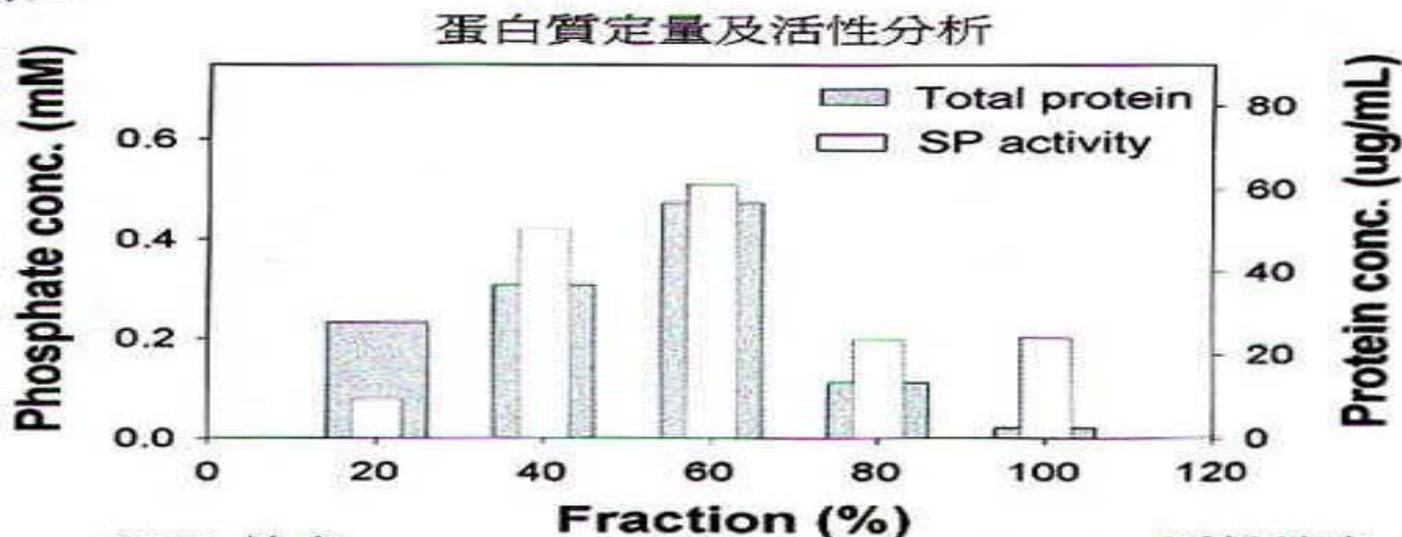
# 甘藷澱粉磷解酶的粗抽與硫酸銨分劃

抽取：以果汁機攪打破壞細胞，共得粗抽液 194 mL。

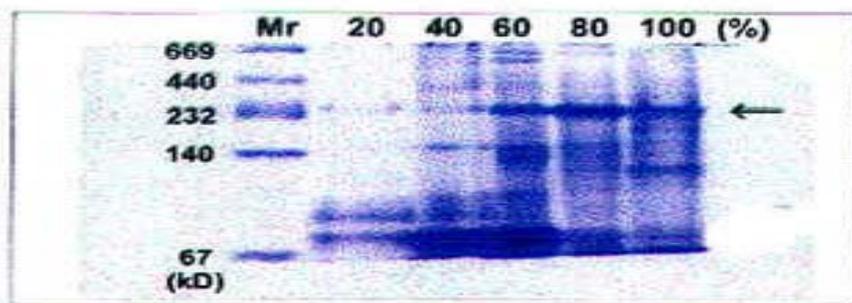
分劃：硫酸銨鹽析法，得 20%~100% 共五個分劃。

分析：各分劃進行蛋白質定量及活性分析，並以原態電泳膠片進行 CBR 染色及活性染色。

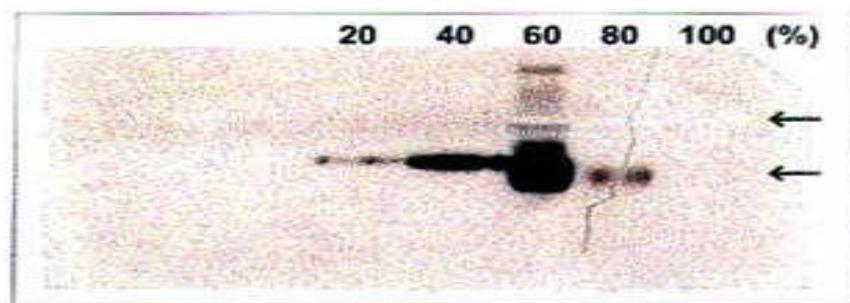
結果：



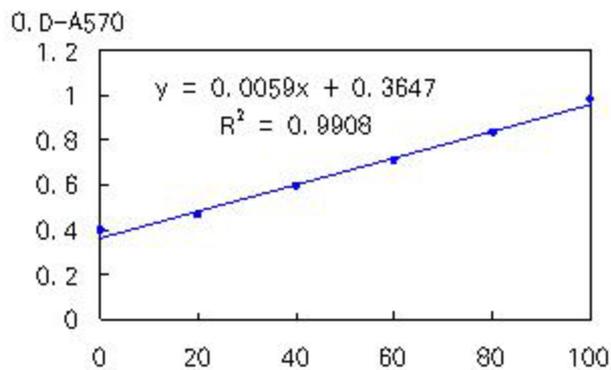
CBR 染色



活性染色

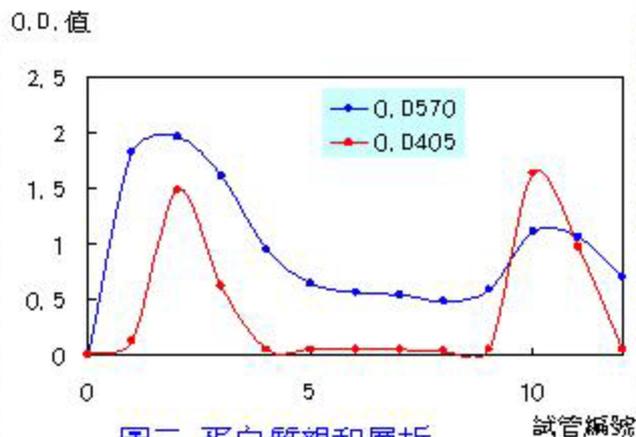


- 結論：
- (1) 蛋白質多在 40%~60% 硫酸銨飽和度沉澱下來。
  - (2) 酵素活性亦多集中在 40%~60% 硫酸銨飽和度分劃。
  - (3) 所以決定保留 40%~60% 飽和度之分劃。



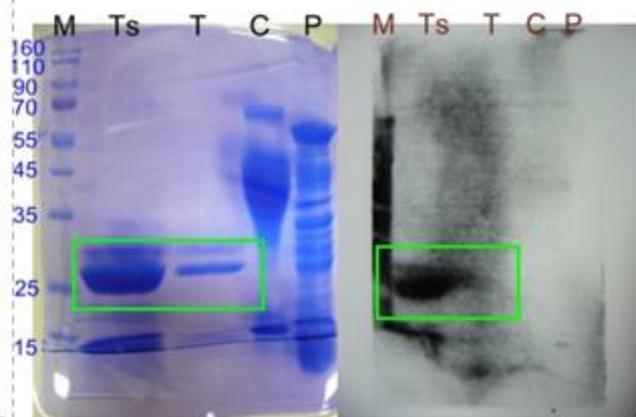
圖一 蛋白質定量標定曲線 BSA濃度(ug/ml)

sample 稀釋25倍 → O.D. (570) = 0.464  
 代回標定曲線 → CHOM濃度 419.49(ug/ml)

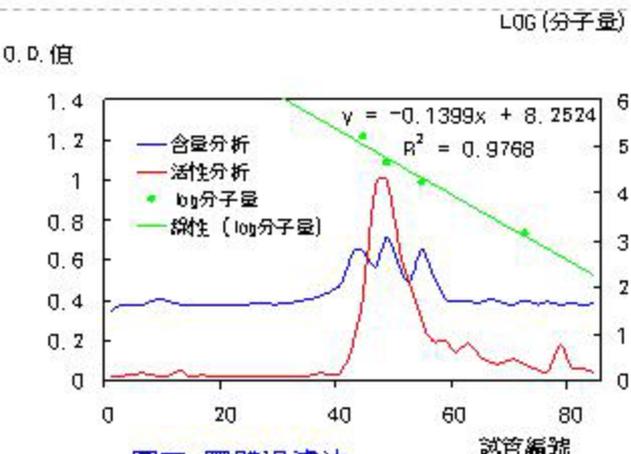


圖二 蛋白質親和層析

	peak1	peak2
Blue 蛋白質量	雜質多	Trypsin被甲酸洗下
Red trypsin活性	Trypsin 過量	Trypsin 活性高

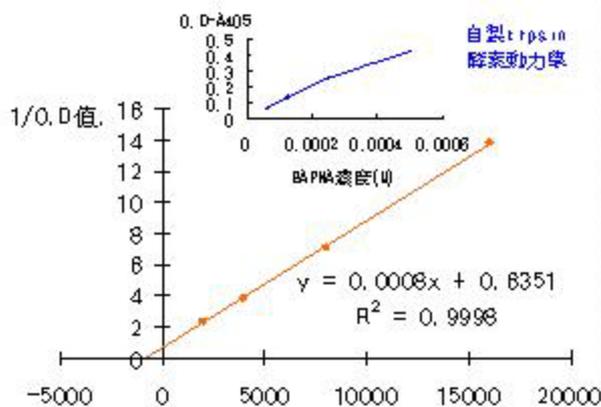


圖三 比較SDS-PAGE(左)與冷光呈色(右)  
 SDS電泳：在25KD左右處Ts, T, P皆出現色帶  
 → trypsin存在  
 冷光呈色：僅Ts轉印成功



圖四 膠體過濾法

Red peak：第50管測到trypsin活性  
 Blue peak 2：代表trypsin  
 → 推出分子量44.00(KD)



圖五 酵素動力學雙倒數作圖 BAPNA濃度倒數(1/M)

$V_{max} = 1.575 > 0.4$  → 稀釋濃度太稀  
 $K_m = 0.001260(M)$  → 其實未達 $K_m$

## 結果摘要

- 根據圖二red peak 1, trypsin大量析出可能的原因：
  - 收集流速過快 → trypsin來不及結合CHOM
  - trypsin量遠大於其ligand(CHOM)量
- 根據圖二可知CHOM和trypsin間有專一性結合。
- 圖三以電泳測trypsin分子量約25KD  
 圖四以膠體過濾法測得分子量44KD  
 trypsin理論值23.9KD  
 → 電泳法測得trypsin分子量較準確
- 根據圖五,  $V_{max}$ 和 $1/2 V_{max}$ 皆大於曲線最大值 → 實際上實驗未達 $K_m$ , 故以雙倒數做圖推算 $V_{max}$ 和 $K_m$ 準確性不高。

# 實驗報告格式

- ◎ 實驗原理
- ◎ 實驗材料及器材
- ◎ 實驗步驟
- ◎ 實驗結果
- ◎ 問題與討論
- ◎ 補充資料
- ◎ 資料出處