

第二章 酵素定量及活性分析

壹、蛋白質定量法

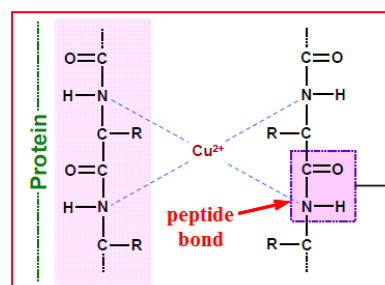
★酵素是一種蛋白質，因此測定純質酵素樣本中的蛋白質量，大致可以說是該酵素的含量。但須注意酵素是具有活性的分子，蛋白質含量很高的，不見得活性就高。

★慎選標準品：

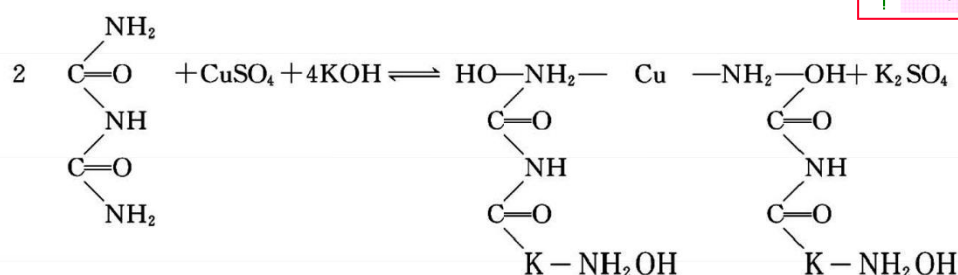
蛋白質定量需要一已知的標準品，以求得標準曲線；一般採用白蛋白 (albumin)或免疫球蛋白 (immunoglobulin)，使用不同的標準品所得到的結果，會有相當大的差異。

★注意干擾因子：

樣本中的雜質或緩衝液可能會影響測定，因此濃度較高的樣本，所得結果可能會錯估；通常稀釋倍數較大的樣本，其所含干擾物質少，測定值比較可靠。



(壹)Biuret 胜肽蛋白質測定



雙縮脲

雙縮脲銅鉀氫氧化物

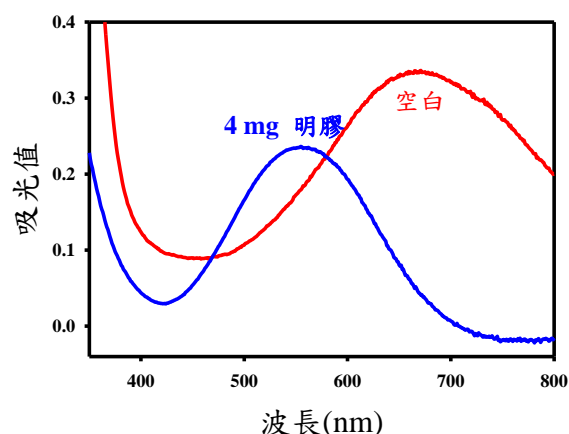
含有兩個以上胜肽鍵化合物與硫酸銅鹼性溶液會產生雙縮脲反應產生紅色物質於 540nm，因原藥劑藍色，故混合成紫色物質。

銅離子在鹼性溶液中，會與蛋白質胜鏈上的carbonyl基結合，生成紫色的複合物，於 540nm 檢測其吸光。兩個carbonyl與一個銅離子結合成類似biuret的複合体。其精確度較差(數mg)，且會受樣本中硫酸銨及Tris的干擾，但準確度較高，不受蛋白質的種類影響。由Biuret法更發展出較靈敏的BCA (bicinchoninic acid) 呈色劑，使精確度大大提升。

一、Biuret試劑:

加入3 g 硫酸銅copper sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 及 9 g酒石酸鉀鈉 (sodium potassium tartarate) 於 500 mL 水中

+300mL 10% (w/v) NaOH+ 5 g 碘化鉀(potassium iodide)加水定容至1公升



二、蛋白質標準品(牛血清白蛋白BSA或酪蛋白10 mg/mL)

秤取酪蛋白1克於80毫升RO水中，放入水浴中煮沸15分鐘，溶解后冷却，定容至100mL，保存於冰箱內，濃度為10 mg/mL。

備註

1. 酪蛋白無法直接溶於水中，會有沉澱現象
2. 酪蛋白標準品可分裝成10瓶，每次使用5毫升，其餘冷凍保存

三、實驗方法

1. 標準蛋白(BSA或酪蛋白)或樣品溶液1毫升加Biuret試劑3毫升
2. 震盪混合後，室溫下靜止30分鐘後測定(或37°C 10分後測定)
3. 檢測540 nm吸光值
4. 帶入標準曲線換算蛋白質或胜肽含量

備註

- (1)使用碘化鉀目的為抑制銅離子還原
- (2)試劑保存於褐色塑膠瓶暗處，可放幾個月，若有紅棕或黑色沉澱則藥品失效

蛋白質(mL)*	RO水	蛋白質含量(mg)	Biuret試劑(mL)	540 nm吸光值
0	1	0	3	
0.1	0.9	1	3	
0.2	0.8	2	3	
0.3	0.7	3	3	
0.4	0.6	4	3	
0.5	0.5	5	3	
樣品1毫升**			3	

* BSA或酪蛋白 10 mg/mL **樣品檢測吸光值太高須加水稀釋

實驗一：魚鱗膠原蛋白萃取實驗

第一組：殺菌釜121°C加熱萃取

取0.5克剪碎吳郭魚鱗溶於10毫升水中(螺旋試管蓋緊)，經殺菌釜121°C加熱15、30、45、60分鐘萃取其中的膠原蛋白(或明膠)，試計算其萃取率(=明膠含量/魚鱗用量)?

第二組：90°C加熱萃取

取0.5克剪碎吳郭魚鱗溶於10毫升水中(螺旋試管蓋緊)，經90°C加熱30、60、90、120分鐘萃取其中的膠原蛋白(或明膠)，試計算其萃取率(=明膠含量/魚鱗用量)?

第三組：酸加熱萃取

取0.5克剪碎吳郭魚鱗溶於10毫升清醋(約4.5%醋酸)，經50°C加熱15、30、45、60分鐘萃取其中的膠原蛋白(或明膠)，試計算其萃取率(=明膠含量/魚鱗用量)?

解題

首先以Biuret法製作明膠的標準曲線，萃取液離心後定溶至10毫升，取1毫升萃取液經Biuret反應，帶入公式計算其中明膠含量。

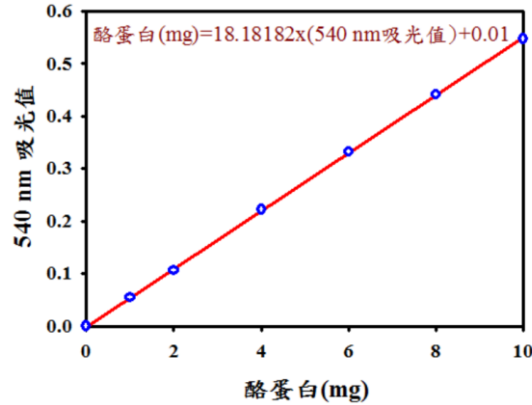
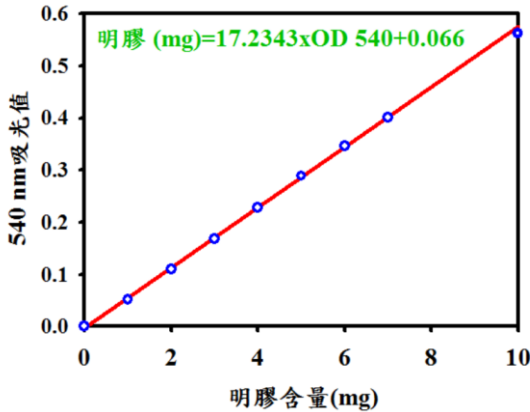
明膠的標準曲線

取1克市售明膠溶於100毫升RO水中，於70°C保溫30分鐘，溶解後可得10 mg/mL分裝成10瓶，每次使用10毫升，其餘冷凍保存。冷凍樣品需保溫溶解後才可使用

蛋白質(mL)*	RO水	蛋白質含量(mg)	Biuret試劑(mL)	540 nm吸光值
0	1	0	3	
0.1	0.9	1	3	
0.2	0.8	2	3	

0.4	0.6	4	3	
0.6	0.4	6	3	
0.8	0.2	8	3	
1.0	0	10	3	

* 明膠10 mg/mL **樣品檢測吸光值太高(超過1.5)須加水稀釋

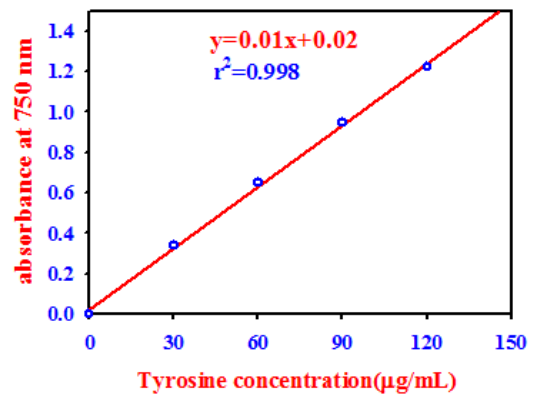


(貳)Lowry 法

一、原理:

是上述 biuret 法的延伸，當銅離子與胍鏈形成複合物後，可再與 Folin-Ciocalteu 試劑的 phosphomolybdic-phosphotungstate 作用產生藍色物質，更為靈敏(約 0.1 mg)，但較麻煩，也會受硫酸銨及硫醇化合物的干擾。步驟中各項試劑的混合，要特別注意均勻澈底，否則會有大誤差。

蛋白質或胍肽在鹼性環境下，酒石酸鈉-銅鹽溶液會與胍肽鍵形成 Cu^{2+} 梔子紅色複合物，該複合物在鹼性條件下再與 Folin-phenol 試劑作用形成藍色複合物，複合物的顏色強度會與蛋白質中的芳香族官能基成正比，可在 750nm 下測得吸光值。將數值帶入已知標準曲線，可求得待測樣品之蛋白質或胍肽含量。



二、實驗藥品

- 1.Reagent A: 2% Na_2CO_3 -0.1N NaOH
- 2.Reagent B: 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 1%酒石酸鈉
- 3.Reagent C: A 50mL + B 1mL 混合
- 4.ReagentD: Folin-Ciocalteu reagent

三、實驗方法

樣品溶液 0.5mL 加入 2.5mL Reagent C，混合後室溫下靜置 10min，緊接著加入 0.25mL Reagent D，混合後靜置 30min，在 750nm 下測得吸光值，對照標準曲線以換算樣品中酪胺酸含量並求得蛋白質或胍肽含量。 Tyrosine 標準曲線

(參)UV 吸光法

胺基酸如苯丙胺酸(Phenylalanine, λ_{max} 260 nm)、色胺酸(Tryptophan, λ_{max} 278nm)、酪胺酸(Tyrosine, λ_{max} 275nm)的芳香基團在 280 nm 有吸光，蛋白質胍鏈(CO-NH)骨架上的基團在 210 nm 附近有吸光。由於各種蛋白質所含芳香族胺基酸組成不一，它們在 280 nm 的吸光能

力亦不同，一般以分子消光係數 (molar extinction coefficient) E 來表示，大部分蛋白質在 4~15 間 (平均為 10)。若某蛋白質的 E 值為 10，其溶液在 280 nm 吸光值為 1，吸光值 = $E \times b \times c$ $1=10 \times 1 \times c$ ，故 $c=0.1\%$ ，亦即蛋白質溶液的濃度為 1 mg/mL (E 為分子消光係數， c 為蛋白質 % 濃度，即每 100 mL 所含蛋白質的克數； b 為光徑 1 cm)

此法只有在蛋白質純度很高時，才能精確測定；但若將蛋白質的 E 值大概定為 10，則對粗抽取液的略估相當方便：在 280 nm 的吸光值為 1 時，濃度約為 1 mg/mL。

(肆)Coomassie Blue (dye binding)法，又稱為Bradford Protein Assay

Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBG) 在過氯酸溶液中呈紅棕色，但與蛋白質結合後則變成藍色，呈色可測 595 nm 波長的吸光。此法方便靈敏 (數十 μg)，且可使用微量滴定盤進行分析，降低試劑用量，方便大量樣本的操作。

Coomassie brilliant blue G-250 (CBG) 在過氯酸溶液中呈紅棕色，但與蛋白質結合後則變成藍色，當愈多蛋白質和 CBG 染劑結合時會使藍色愈深，所以蛋白質的量和顏色深淺呈現正比的關係。一旦結合後 CBG 的最大吸光位置會移到 595 nm(原來在 470 nm)。因此只要偵測 595 nm 處 CBG 的吸光強度就可以定量出蛋白質的濃度。

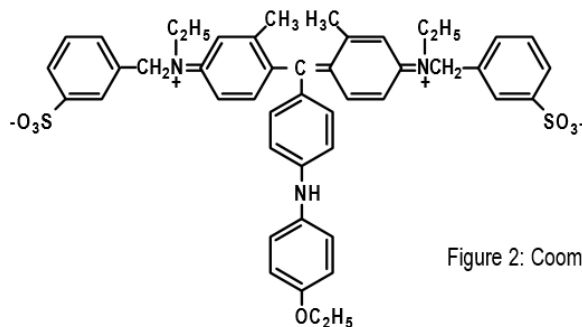


Figure 2: Coomassie Brilliant Blue G-250

Bradford Protein Assay

一、自行配置試藥

(一)Bradford reagent (Dye)

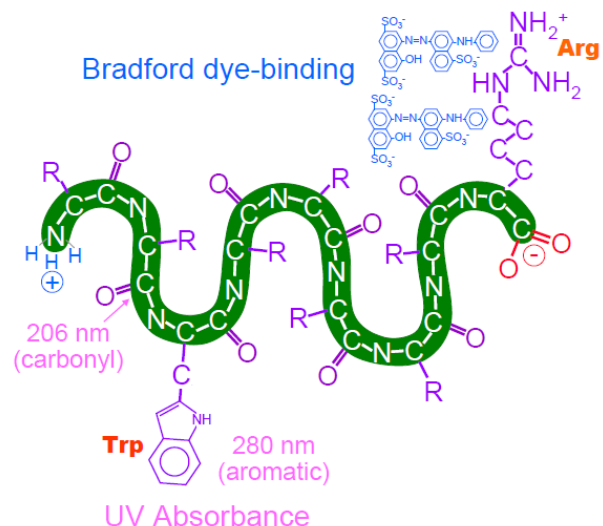
取0.05克Coomassie Brilliant Blue G-250於 50 ml 95%乙醇+100 ml 85%磷酸 (H_3PO_4)。將上述酸液加入850毫升水中(勿將水加入酸中)。以1號濾紙過濾之，貯放於褐色瓶冷藏保存。貯存中若有沉澱需過濾後再使用。

(二)標準檢測方法 (10-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ protein)

1. 樣品或標準品30 μl + Bradford reagent 1.5毫升
2. 室溫下放置5分鐘後測定595nm吸光(1小時內測完)
3. 勿用石英cell測定，否則石英玻璃會很難洗
4. 空白試驗以水代替樣品

(三)微量法(1-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ protein)

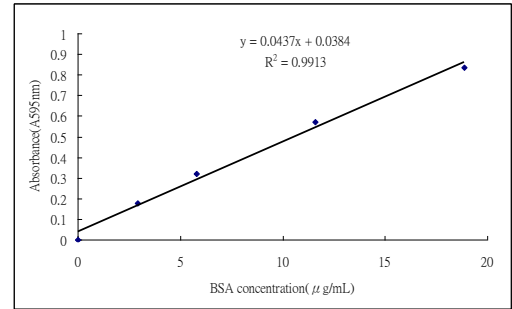
1. 樣品或標準品0.1 mL+ Bradford reagent 1毫升
2. 室溫下放5分鐘後測595nm吸光(1小時內測完)
3. 勿用石英cell測定，否則石英玻璃會很難洗



4. 空白試驗以水代替樣品

二、市售Bio-Rad試劑 (微量法) 0-20 $\mu\text{g/mL}$

以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)製作標準曲線。取標準品(濃度為 $0.145\mu\text{g/mL}$)為：0、20 μL 、40 μL 、80 μL 、130 μL 分別加入800 μL 、780 μL 、760 μL 、720 μL 、650 μL 的蒸餾水，再加入200 μL Dye reagent (Bio-Rad)混合均勻，靜置5分鐘後測定波長595 nm之吸光值，製作標準曲線，得一方程式 $y = 0.0437x + 0.0384$ ， $R^2 = 0.9913$ (附圖)。



BSA製作標準曲線(微量法)

取800 μL 經適當稀釋之未知濃度樣品加入200 μL protein assay reagent混合均勻，靜置5分鐘後測定波長595 nm之吸光值，對照標準曲線以換算樣品中蛋白質濃度。

三、Bradford 的 dye-binding method 之 ELISA 光度計法 (大量法或稱標準法) 20-140 $\mu\text{g/mL}$

(一)藥品試劑：

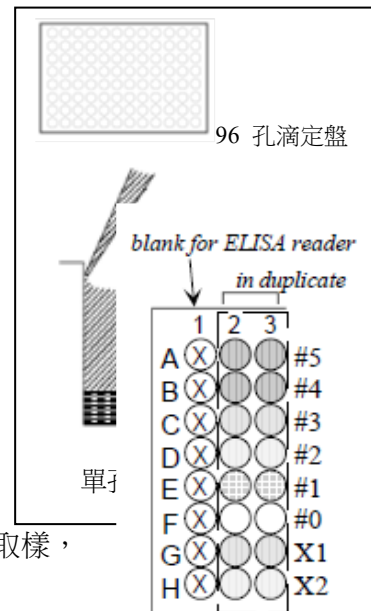
- (1) Buffer
- (2) BSA 標準品(Bio-Rad, bovine serum albumin, 100 $\mu\text{g/mL}$)
- (3) 未知濃度樣本(unknown BSA, 0.8 mL, 由教師調配發給)
- (4) Dye Reagent (Bio-Rad 500-0006) 先以水稀釋五倍備用

◆ 以染料 Coomassie brilliant blue G-250 配製的溶液，勿與膠體電泳染色用的 CB R-250 混淆，各有其使用上的特色，不要互用。

(二)標準品系列：

使用小試管準備一組BSA標準品及未知樣品的系列稀釋：

Label	BSA (μL)	Buffer (μL)	Final Conc. $\mu\text{g/mL}$
#5	500	0	100
#4	400	100	80
#3	300	200	60
#2	200	300	40
#1	100	400	20
#0	0	500	0
	未知樣本(μL)	Buffer (μL)	
X1	500	0	原液
X2	250	250	稀釋2倍



◆ 配製精準，校正直線才會準確；各種試劑的添加，若自稀往濃取樣，以不用換吸管頭。

則可

(三)方法步驟：

1. 每槽先加好 50 μL 標準品(#0, #1 #5) 或未知樣本 (X1, X2)，以二重複加入 96 孔滴定盤中，如圖所示。
2. 每槽再加入 200 μL Dye-Reagent 混合均勻，在全部樣本槽加完前，不要中斷添加；同時小心避免氣泡產生。

◆ 本步驟是實驗成敗的關鍵！

- 輕拍滴定盤一側，使添加的各成份均勻混合，注意 Dye-Reagent 密度較大，很容易沉積在下方而分層。若還有小氣泡，小心以大頭針刺破，大量時可用噴火槍火燄燒破。
- 靜置室溫 10 min。
- 以 ELISA reader 測量 595 nm (或 570nm) 的吸光值。

◆標準方法為 1 毫升樣品+4 毫升稀釋 5 倍的 Dye-Reagent 反應，蛋白質線性範圍 20-140 μ g/mL

(伍)蛋白質濃度分析法bicinchoninic acid (BCA)

蛋白質濃度的 bicinchoninic acid (BCA) 分析可由 **Pierce 公司**購得套組使用，但價格頗高。Stoscheck (1990) 建議以 BCA 分析取代傳統的 Lowry 方法分析蛋白，主要的原因是 BCA 法只需一步反應，且試劑於鹼性條件下較安定。BCA 於鹼性條件下可還原雙價的銅離子(Cu^{2+})成為單價的亞銅離子(Cu^+)，再由兩分子的 BCA 螯合亞銅離子，產物呈藍紫色。

方法一 (一般標準分析，主要取材自 current protocol)

試藥:

Reagent A	1 g 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline, disodium salt (Na_2 BCA; Pierce or Sigma; 26 mM final); 2 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (sodium carbonate 0.16 M final); 160 mg disodium sodium tartrate (7 mM final); 0.4 g NaOH (0.1 M final); 0.95 g NaHCO_3 (0.11 M final) brought to 100 ml with distilled water. Adjust the pH to 11.3 +/- 0.2 with 10 M NaOH. (於室溫下安定) p.s. <i>Only the disodium salt of Na_2BCA is soluble at neutral pH; the free acid is not readily soluble, even in alkali.</i>
Reagent B	0.4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (16 mM final) in 10 ml distilled water. (於室溫)
Standard working solution (SWR)	Mix 100 volumes reagent A with 2 volumes reagent B. (應為light apple-green color，於室溫下可保存一星期)

步驟:

- 準備蛋白質樣本，含蛋白質量約 0.1 – 1 mg/mL
- 混合 SWR 標準工作溶液, Reagent A 與 Reagent B 混合比例 50:1
- 將 SWR 標準工作溶液 1 mL 加入 20 μ L sample 混合均勻，於 37 °C 下放 30 min (根據 current protocol, SWR:sample 之體積比亦可為 20:1, 體積根據測量吸光值時使用之 cuvettes 決定)
- 冷卻 sample, 測定 562 nm 之吸光值 (色澤於 1 h 內安定)

方法二：微量分析 (micro assay)

試藥:

Reagent A	8 gm sodium carbonate monohydrate, 1.6 gm sodium tartrate, with distilled water. Adjust the pH to 11.25 with 10 M NaOH
Reagent B	4 gm BCA in 100 ml distilled water.
Reagent C	0.4 gm cupric sulfate (5 x hydrated) in 10 ml water.
Working solution	Mix 1 volume reagent C with 25 volumes reagent B, then add 26 volumes reagent A to the C/B mixture. 1x C + 25x B + 26x A (順序不宜錯誤)

步驟:

1. 準備蛋白質樣本，含蛋白質量約 0.2 – 50 ug/ mL，體積約 500 uL
2. 混合 WR 工作溶液，先加 Reagent C 與 Reagent B，再加 Reagent A 混合比例 1:25:26 (C:B:A)
3. 將 WR 工作溶液 500 uL 與蛋白質樣本 500 uL 混合，於 60 oC 下放置 60 min
4. 冷卻 sample，測定 562 nm 之吸光值 (色澤於 1 h 內安定)

定量:

以標準濃度之蛋白 (例如 BSA, albumin 0.1 – 2 mg/mL) 用同法製作標準曲線，用標準曲線決定 sample 之蛋白濃度。

注意:

不同蛋白的還原能力可能與標準蛋白不同，故所得值可能略有誤差。另外 incubation 越久靈敏度越好，但若反應之色澤太深，宜提早結束 incubation。室溫下 incubation 亦可，但重複間變異提高而靈敏度下降。

注意: 此 Protocol 與 Pierce 之 BCA assay kit 略有不同，使用時請明鑑!

The BCA assay for total protein is somewhat variable: it has differing sensitivities in response to incubation time, incubation temperature, standard protein used for calibration, and other factors (Smith et al., 1985). Certain classes of compounds such as reducing sugars and ammonium ions interfere with the assay, sometimes severely. However, if interfering compounds are eliminated (e.g., by dialysis; see Support Protocol 2), the BCA assay has a good combination of sensitivity and simplicity, and it has some advantages over the Lowry technique (see Background Information).

Reference

Stoscheck, CM. 1990. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 182: 50-69.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.

STEP 1.

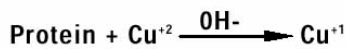


Figure 4: Proteins react with alkaline copper II to produce copper I. BCA then reacts with copper I to form an intense purple color at 562 nm.

STEP 2.

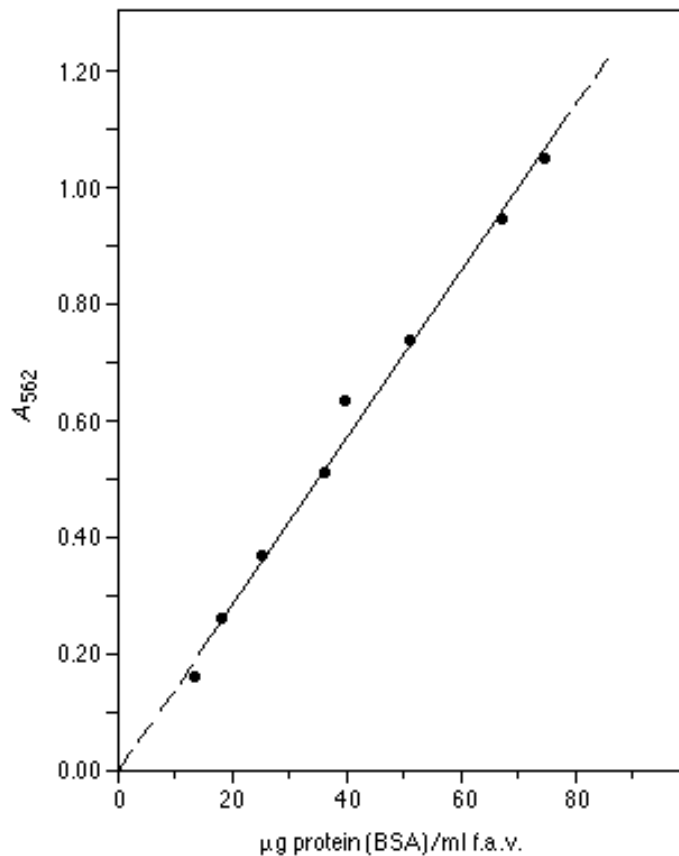
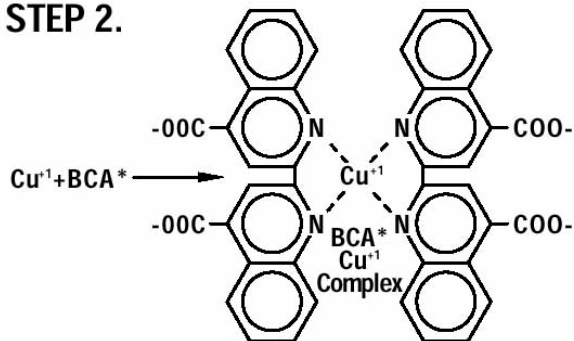


Figure 3.4.3 shows a calibration plot prepared using BSA as the protein standard and a 2.1-ml final assay volume (f.a.v.). The slope of the plot is a measure of the sensitivity of the assay. The slopes of plots such as Figure 3.4.3 are also related to the absorption coefficients of the colored complexes. The units attached to the slope must take into account the extent of dilution and be consistent with the protocol used to develop the colored complexes. The value of the slope can be used to compare the different methods— e.g., Smith et al. (1985) compared the BCA and Lowry methods using BSA as calibrating protein. For the BCA method, the slope was 1.5×10^{-2} to $2.6 \times 10^{-2} A_{562} (\text{ug protein/ml f.a.v.})^{-1} \text{ cm}^{-1}$; for the Lowry method, the slope was 1.6 to $2.3 \times 10^{-2} A_{750} (\text{ug protein/ml f.a.v.})^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

INSTRUCTIONS

Pierce BCA Protein Assay Kit

23225 23227 1296.11

Number	Description
23225	Pierce BCA Protein Assay Kit, sufficient reagents for 500 test-tube or 5000 microplate assays
23227	Pierce BCA Protein Assay Kit, sufficient reagents for 250 test-tube or 2500 microplate assays

Kit Contents:

BCA Reagent A, 1000mL (in Product No. 23225) or 500mL (in Product No. 23227), containing sodium carbonate, sodium bicarbonate, **bicinchoninic acid** and sodium tartrate in 0.1M sodium hydroxide

BCA Reagent B, 25mL, containing 4% cupric sulfate

Albumin Standard Ampules, **2mg/mL**, 10 X 1 mL ampules, containing bovine serum albumin (BSA) at 2mg/mL in 0.9% saline and 0.05% sodium azide

Storage: Upon receipt store at room temperature. Product shipped at ambient temperature.

Note: If either Reagent A or Reagent B precipitates upon shipping in cold weather or during long-term storage, dissolve precipitates by gently warming and stirring solution. Discard any kit reagent that shows discoloration or evidence of microbial contamination.

Table of Contents

Introduction	1
Preparation of Standards and Working Reagent (required for both assay procedures).....	2
Test Tube Procedure (Sample to WR ratio = 1:20)	3
Microplate Procedure (Sample to WR ratio = 1:8)	3
Troubleshooting.....	4
Related Thermo Scientific Products	5
Additional Information	6
References	8

Introduction

The Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay is a detergent-compatible formulation based on **bicinchoninic acid (BCA)** for the colorimetric detection and quantitation of total protein. This method combines the well-known reduction of Cu^{+2} to Cu^{+1} by protein in an alkaline medium (**the biuret reaction**) with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous cation (Cu^{+1}) using a unique reagent containing bicinchoninic acid. The purple-colored reaction product of this assay is formed by the chelation of two molecules of BCA with one cuprous ion. This water-soluble complex exhibits a strong absorbance at 562nm that is nearly linear with increasing protein concentrations over a broad working range (20-2000 $\mu\text{g/mL}$). The BCA method is not a true end-point method; that is, the final color continues to develop. However, following incubation, the rate of continued color development is sufficiently slow to allow large numbers of samples to be assayed together.

The macromolecular structure of protein, the number of peptide bonds and the presence of four particular amino acids (cysteine, cystine, tryptophan and tyrosine) are reported to be responsible for color formation with BCA. Studies with di-, tri- and tetrapeptides suggest that the extent of color formation caused by more than the mere sum of individual color-producing functional groups. Accordingly, protein concentrations generally are determined and reported with reference to standards of a common protein such as bovine serum albumin (BSA). A series of dilutions of known concentration are prepared from the protein and assayed alongside the unknown(s) before the concentration of each unknown is determined based on the standard curve. If precise quantitation of an unknown protein is required, it is advisable to select a protein standard that is similar in quality to the unknown; for example, a bovine gamma globulin (BGG) standard (see Related Thermo Scientific Products) may be used when assaying immunoglobulin samples.

Two assay procedures are presented. Of these, the Test Tube Procedure requires a larger volume (0.1mL) of protein sample; however, because it uses a sample to working reagent ratio of 1:20 (v/v), the effect of interfering substances is minimized. The Microplate Procedure affords the sample handling ease of a microplate and requires a smaller volume (10-25 μL) of protein sample; however, because the sample to working reagent ratio is

1:8 (v/v), it offers less flexibility in overcoming interfering substance concentrations and obtaining low levels of detection.

Note: For peptide sample concentration measurements, use the Thermo Scientific™ Pierce™ Quantitative Fluorometric Peptide Assay or the Pierce™ Quantitative Colorimetric Peptide Assay (see Related Thermo Scientific Products)

Preparation of Standards and Working Reagent (required for both assay procedures)

A. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Use Table 1 as a guide to prepare a set of protein standards. Dilute the contents of one Albumin Standard (BSA) ampule into several clean vials, preferably using the same diluent as the sample(s). Each 1mL ampule of **2mg/mL Albumin Standard** is sufficient to prepare a set of diluted standards for either working range suggested in Table 1. There will be sufficient volume for three replications of each diluted standard.

Table 1. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Dilution Scheme for Standard Test Tube Protocol and Microplate Procedure (Working Range = 20-2,000µg/mL)			
<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u> (µL)	<u>Volume and Source of BSA</u> (µL)	<u>Final BSA Concentration</u> (µg/mL)
A	0	300 of Stock	2000
B	125	375 of Stock	1500
C	325	325 of Stock	1000
D	175	175 of vial B dilution	750
E	325	325 of vial C dilution	500
F	325	325 of vial E dilution	250
G	325	325 of vial F dilution	125
H	400	100 of vial G dilution	25
I	400	0	0 = Blank

Dilution Scheme for Enhanced Test Tube Protocol (Working Range = 5–250µg/mL)			
<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u> (µL)	<u>Volume and Source of BSA</u> (µL)	<u>Final BSA Concentration</u> (µg/mL)
A	700	100 of Stock	250
B	400	400 of vial A dilution	125
C	450	300 of vial B dilution	50
D	400	400 of vial C dilution	25
E	400	100 of vial D dilution	5
F	400	0	0 = Blank

B. Preparation of the BCA Working Reagent (WR)

- Use the following formula to determine the total volume of WR required:

$$(\# \text{ standards} + \# \text{ unknowns}) \times (\# \text{ replicates}) \times (\text{volume of WR per sample}) = \text{total volume WR required} \quad \text{Example:}$$

for the standard test-tube procedure with 3 unknowns and 2 replicates of each sample:

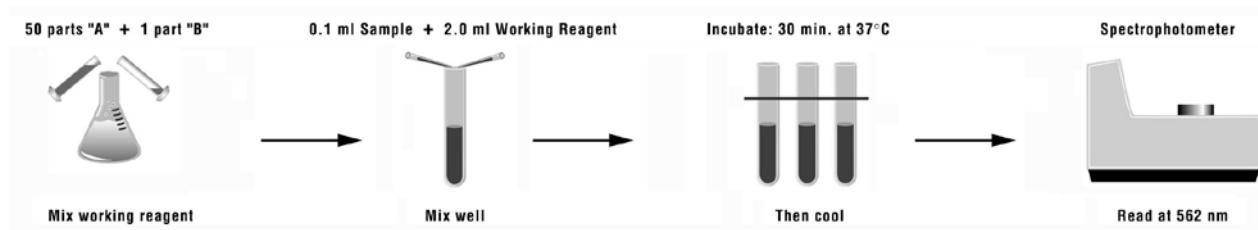
$$(9 \text{ standards} + 3 \text{ unknowns}) \times (2 \text{ replicates}) \times (2\text{mL}) = 48\text{mL WR required}$$

Note: 2.0mL of the WR is required for each sample in the test-tube procedure, while only 200µL of WR reagent is required for each sample in the microplate procedure.

- Prepare WR by mixing 50 parts of BCA Reagent A with 1 part of BCA Reagent B (50:1, Reagent A:B).** For the above example, combine 50mL of Reagent A with 1mL of Reagent B.

Note: When Reagent B is first added to Reagent A, turbidity is observed that quickly disappears upon mixing to yield a clear, green WR. Prepare sufficient volume of WR based on the number of samples to be assayed. The WR is stable for several days when stored in a closed container at room temperature (RT).

Procedure Summary (Test-tube Procedure, **Standard Protocol**)



Test-tube Procedure (Sample to WR ratio = 1:20)

1. Pipette 0.1 mL of each standard and unknown sample replicate into an appropriately labeled test tube.
2. Add 2.0 mL of the WR to each tube and mix well.
3. Cover and incubate tubes at selected temperature and time:
 - Standard Protocol:** 37°C for 30 minutes (working range = 20-2000 µg/mL)
 - RT Protocol:** RT for 2 hours (working range = 20-2000 µg/mL)
 - Enhanced Protocol:** 60°C for 30 minutes (working range = 5-250 µg/mL)

Notes:

- Increasing the incubation time or temperature increases the net 562nm absorbance for each test and decreases both the minimum detection level of the reagent and the working range of the protocol.
 - Use a water bath to heat tubes for either Standard (37°C incubation) or Enhanced (60°C incubation) Protocol. Using a forced-air incubator can introduce significant error in color development because of uneven heat transfer.
5. Cool all tubes to RT.
 6. With the spectrophotometer set to 562nm, zero the instrument on a cuvette filled only with water. Subsequently, measure the absorbance of all the samples within 10 minutes.
 - Note:** Because the BCA assay does not reach a true end point, color development will continue even after cooling to RT. However, because the rate of color development is low at RT, no significant error will be introduced if the 562nm absorbance measurements of all tubes are made within 10 minutes of each other.
 7. Subtract the average 562nm absorbance measurement of the Blank standard replicates from the 562nm absorbance measurement of all other individual standard and unknown sample replicates.
 8. Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 562nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in µg/mL. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

Microplate Procedure (Sample to WR ratio = 1:8)

1. Pipette 25 µL of each standard or unknown sample replicate into a microplate well (working range = 20-2000 µg/mL) (e.g., Thermo Scientific™ Pierce™ 96-Well Plates, Product No. 15041).
 - Note:** If sample size is limited, 10 µL of each unknown sample and standard can be used (sample to WR ratio = 1:20). However, the working range of the assay in this case will be limited to 125-2000 µg/mL.
2. Add 200 µL of the WR to each well and mix plate thoroughly on a plate shaker for 30 seconds.
3. Cover plate and incubate at 37°C for 30 minutes.
4. Cool plate to RT. Measure the absorbance at or near 562nm on a plate reader.

Notes:

Wavelengths from 540-590nm have been used successfully with this method. Because plate readers use a shorter light path length than cuvette spectrophotometers, the Microplate Procedure requires a greater sample to WR ratio to obtain the same sensitivity as the standard Test Tube Procedure. If higher 562nm measurements are desired, increase the incubation time to 2 hours.

Increasing the incubation time or ratio of sample volume to WR increases the net 562nm measurement for each well and lowers both the minimum detection level of the reagent and the working range of the assay. As long as all standards and unknowns are treated identically, such modifications may be useful.

5. Subtract the average 562nm absorbance measurement of the Blank standard replicates from the 562nm measurements of all other individual standard and unknown sample replicates.
6. Prepare a standard curve by plotting the average Blank-corrected 562nm measurement for each BSA standard vs. its concentration in $\mu\text{g/mL}$. Use the standard curve to determine the protein concentration of each unknown sample.

Note: If using curve-fitting algorithms associated with a microplate reader, a four-parameter (quadratic) or best-fit curve will provide more accurate results than a purely linear fit. If plotting results by hand, a point-to-point curve is preferable to a linear fit to the standard points.

Troubleshooting

Problem	Possible Cause	Solution
No color in any tubes	Sample contains a copper chelating agent	Dialyze, desalt or dilute sample Increase copper concentration in working reagent (e.g., use 50:2, Reagent A:B) Remove interfering substances from sample using Product No. 23215
Blank absorbance is OK, but standards and samples show less color than expected	Strong acid or alkaline buffer, alters working reagent pH	Dialyze, desalt, or dilute sample
	Color measured at the wrong wavelength	Measure the absorbance at 562nm
Color of samples appears darker than expected	Protein concentration is too high	Dilute sample
	Sample contains lipids or lipoproteins	Add 2% SDS to the sample to eliminate interference from lipids ³ Remove interfering substances from sample using Product No. 23215
All tubes (including blank) are dark purple	Buffer contains a reducing agent	Dialyze or dilute sample
	Buffer contains a thiol	Remove interfering substances from sample using Product No. 23215
	Buffer contains biogenic amines (catecholamines)	
Need to measure color at a different wavelength	Spectrophotometer or plate reader does not have 562nm filter	Color may be measure at any wavelength between 540nm and 590nm, although the slope of standard curve and overall assay sensitivity will be reduced

A. Interfering substances

Certain substances are known to interfere with the BCA assay including those with reducing potential, chelating agents, and strong acids or bases. Because they are known to interfere with protein estimation at even minute concentrations, avoid the following substances as components of the sample buffer:

Ascorbic acid	EGTA	Iron	Impure sucrose
Catecholamines	Impure glycerol	Lipids	Tryptophan
Creatinine	Hydrogen peroxide	Melibiose	Tyrosine
Cysteine	Hydrazides	Phenol Red	Uric acid

Other substances interfere to a lesser extent with protein estimation using the BCA assay, and these have only minor (tolerable) effects below a certain concentration in the original sample. Maximum compatible concentrations for many substances in the Standard Test Tube Protocol are listed in Table 2 (see last page of Instructions). Substances were compatible at the indicated concentration in the Standard Test Tube Protocol if the error in protein concentration estimation caused by the presence of the substance was less than or equal to 10%. The substances were tested using WR prepared immediately before each experiment. Blank-corrected 562nm absorbance measurements (for a $1000\mu\text{g/mL}$ BSA standard + substance) were compared to the net 562nm measurements of the same standard prepared in 0.9% saline. Maximum compatible concentrations will be lower in the Microplate Procedure where the sample to WR ratio is 1:8 (v/v). Furthermore, it is possible to have a substance additive affect such that even though a

single component is present at a concentration below its listed compatibility, a sample buffer containing a combination of substances could interfere with the assay.

B. Strategies for eliminating or minimizing the effects of interfering substances

The effects of interfering substances in the Pierce BCA Protein Assay may be eliminated or overcome by one of several methods.

- Remove the interfering substance by dialysis or gel filtration.
- Dilute the sample until the substance no longer interferes. This strategy is effective only if the starting protein concentration is sufficient to remain in the working range of the assay upon dilution.
- Precipitate the proteins in the sample with acetone or trichloroacetic acid (TCA). The liquid containing the substance that interfered is discarded and the protein pellet is easily solubilized in ultrapure water or directly in the alkaline BCA WR. A protocol detailing this procedure is available from our website. Alternatively, Product No. 23215 may be used (see Related Thermo Scientific Products).
- Increase the amount of copper in the WR (prepare WR as 50:2 or 50:3, Reagent A:B), which may eliminate interference by copper-chelating agents.

Note: For greatest accuracy, the protein standards must be treated identically to the sample(s).

Note: The Thermo Scientific™ Pierce™ Detergent Compatible Bradford Assay Kit (Product No. 23246) is an alternative related product compatible with a wide range of detergents.

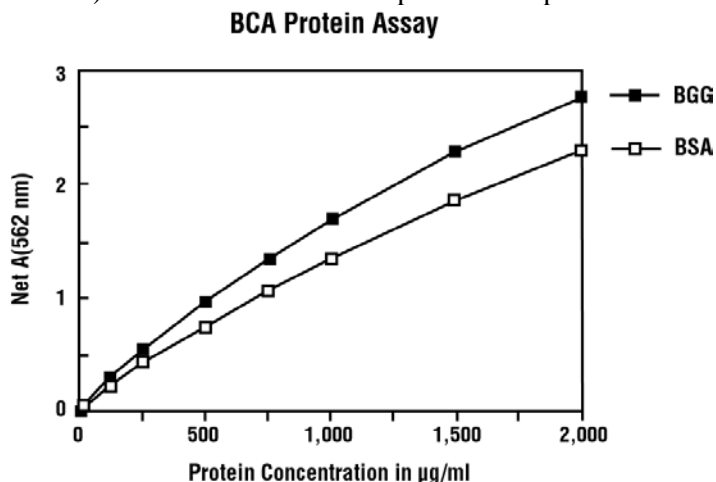


Figure 1. Typical color response curves for BSA and BGG using the Standard Test Tube Protocol (37°C/30-minute incubation).

(陸)胺基酸分析

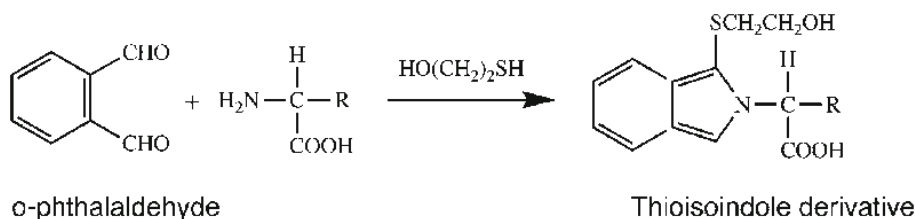
樣品以 6N 鹽酸在真空下 110°C 分解 24 小時後，以 HPLC 分析胺基酸組成。

一、HPLC 分析

SELECTED REAGENTS FOR PRE-COLUMN DERIVATIZATION OF AMINO ACIDS

Reagent	Abbrev.	Detect.	$\lambda_{\text{abs(ex.)}}$	λ_{em}	Separation	Refs.
<i>o</i> -Phthalaldehyde	OPA	UV-FI	340/260	455	RP, MEKC	[13,52]
Phenylisothiocyanate	PTH/PTC	UV	254		RP, MEKC, CEC	[11,53-57]
4,4- <i>N,N</i> -Dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate	DABTH/DABITC	Vis	463		RP	[6]
5-Dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl chloride	DNS	UV-FI	360/254	570	RP, MEKC	[58-60]
4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride	Dabsyl	Vis	420		RP	[61]
9-Fluorenylmethyl chloroformate	Fmoc	FI	265	315, 630	RP, MEKC	[62-64]
Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde	NDA	FI	462	490	RP, MEKC, CEC	[42,43,47,65,66]
Fluorescamine	-	UV-FI	280/390	475	RP, CE	[67,68]
Fluorescein isothiocyanate	FTH/FITC	FI	490	519	RP, MEKC	[69-71]
3-(<i>p</i> -Carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde	CBQ	FI	466	544	MEKC	[72]
3-(4-Carboxybenzoyl)-2-quinolinecarboxyaldehyde	CBQCA	FI	450	550	MEKC	[73]
3-(4-Tetraazolbenzoyl)-2-quinolinecarboxyaldehyde	TBQCA	Vis-FI	488/465	550	MEKC	[74]
1-Methoxycarbonylindolizine-3,5-dicarbaldehyde	IDA	Vis-FI	416/280	482	RP, CE, MEKC	[75,76]
2-(9-Anthryl)ethyl chloroformate	AEOC	UV-FI	366/256	402	RP, MEKC	[77,78]
6-Aminoquinolyl- <i>N</i> -hydroxy-succinimidyl carbamate	AQC	FI	250	400	RP, MEKC	[79,80]
Carbazole- <i>N</i> -(2-methyl)acetyl chloride	CMA-Cl	FI	335	360	RP	[81]
Acridone- <i>N</i> -acetyl chloride	ARC-Cl	FI	404	430	RP	[82]
Carbazole-9-acetyl chloride	CRA-Cl	FI	335	360	RP	[82,83]
Carbazole-9-propionyl chloride	CRP-Cl	FI	340	365	RP	[82]
Tetramethylrhodamine isothiocyanate	TRITC	FI	540	567	MEKC	[84]
2,4-Dinitrofluorobenzene	DNP	UV	254		CE	[85]
9-Isothiocyanatoacridine	-	UV	280		RP	[86]
Benzylisothiocyanate	BZITC	UV	246/238		RP	[87]

(一)OPA(O-phthalaldehyde)呈色法



OPA 在鹼性環境下，與胺基酸經 β -mercaptoethanol 作用的一級胺基(NH₂)反應，形成 1-alkylthio-2-alkylisoindole(AAI)化合物，在波長 340nm 下具有強的吸光值，吸光值越高表示樣品所含胺基越多。

1. OPA 試劑及衍生化反應

(1) stock solution 配製

取 0.05 克 OPA 溶於 5 毫升甲醇中可配製得 stock solution (10 mg OPA/mL)，於 4-6°C 避光儲存可放 4 週。

(2) working solution 配製

取 0.45 毫升 OPA stock solution+25 μ L 3-mercaptopropionic acid (或 β -Mercaptoethanol)

+4 mL 150 mM sodium borate (pH 10.0)可得 OPA working solution (1 mg OPA/mL)，於 4-6°C 避光儲存可放 2 週。

(3) 樣品衍生化反應

取 50 μ L 樣品或胺基酸標準品(以 RO 水溶解，0.5~60.0 mg/L，先以 20mg/L 試)+250 μ L OPA working solution 於室溫下靜止反應 1 分鐘，以 0.22 μ 濾膜過濾後進行 HPLC 分析。

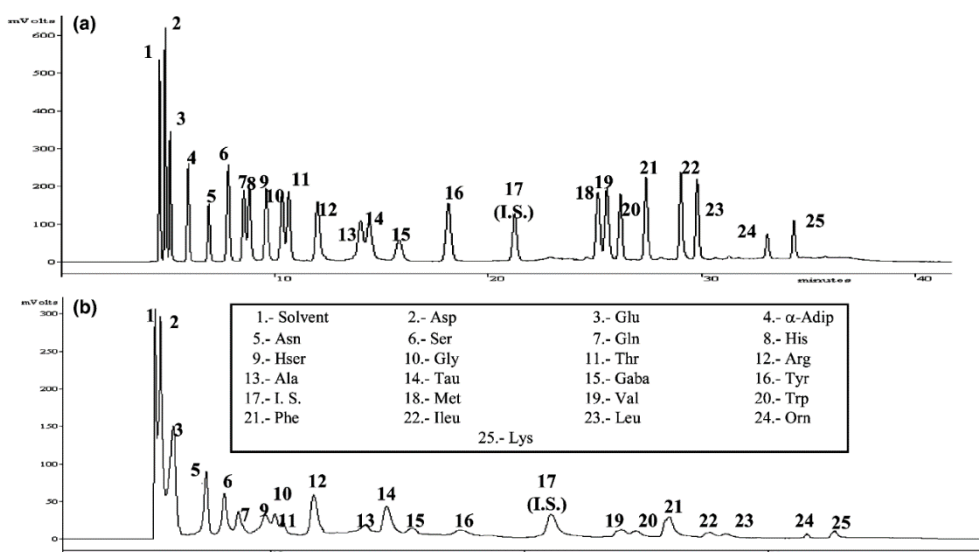
* glycine, GABA, β -alanine, histidine, ornithine and lysine 的 OPA 衍生物較不安定。

2. HPLC 分析

(1) 配方 1

Mobile phase A: 磷酸鈉 buffer (10 mM, pH 7.2): methanol:tetrahydrofuran (80:19:1)

Mobile phase B: 磷酸鈉 buffer (10 mM, pH 7.2): methanol (20:80).



ODS 管柱(150 x 4.0 mm)流速 1mL/min (a)胺基酸標準品(b)樣品

梯度程式

100% A 0% B 4 min, 0–15% B in 6 min,
 15% B isocratically for 5 min, 15–30% B 5 min,
 30–40% B 4 min, 40–80% B 12 min.
 wavelengths of excitation 340 nm, emission 426 nm.

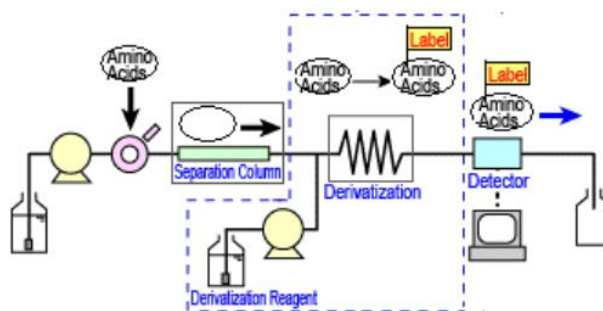
(2) 配方 2 (修改自配方 1) ODS 管柱(250 x 4.0 mm)流速 1mL/min

Mobile phase A: 1% tetrahydrofuran, 99% phosphate buffer (10 mM, pH 7.2).

Mobile phase B: methanol wavelengths of excitation 340 nm, emission 426 nm.

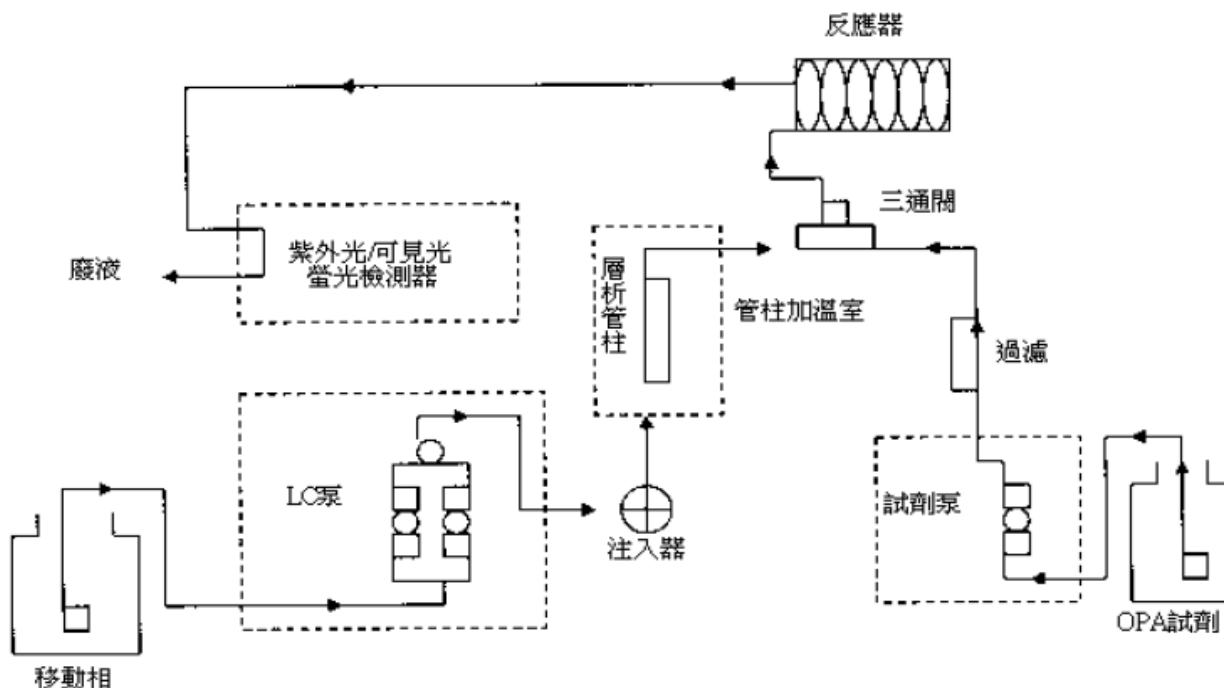
Time	Solvent A(%)	Solvent B(%)
0	85	15
5	80	15
15	70	30
20	70	30
25	55	45
30	50	50
45	15	85
50	10	90
51	0	100
56	0	100
57	85	15
60	85	15

Shimadzu Post-column Amino Acid Analysis System



Detection Principle

After amino acids are separated by cation exchange chromatography, aqueous sodium hypochlorite solution (to convert analytes to primary amines) and OPA/N-acetylcysteine reagent are added to the eluent, the resulting fluorescent derivatives are detected.



HPLC/層析管柱後置反應系統-加溫反應一段式流程

Analysis Example

Two models are available - a "Na" model, capable of rapidly analyzing amino acids hydrolyzed from protein, and a "Li" model, capable of separating naturally-occurring free amino acids. The chromatograms displayed below show the separation of a standard solution of hydrolyzed protein amino acids containing 17 components, measured using the "Na" model and the "Li" model results from analyzing soy sauce diluted by factor 200, respectively.

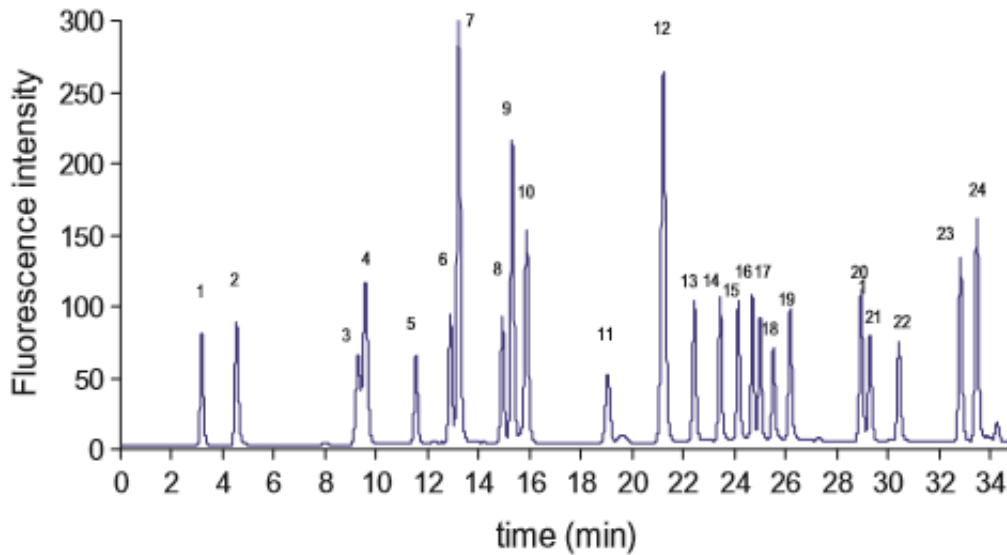
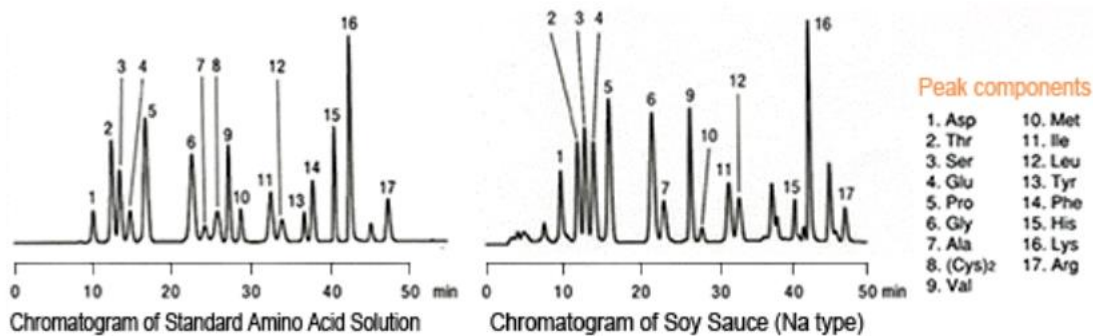


Fig. 1. Chromatogram 2 mg/l standard solution. 1 – Aspartic acid, 2 – glutamic acid, 3 – serine, 4 – asparagine 5 – glutamine, 6 – threonine, 7 – glycine, 8 – arginine, 9 – alanine, 10 – GABA, 11 – tryosine, 12 – ethanolamine, 13 – valine, 14 – methionine, 15 – phenylalanine, 16 – histamine, 17 – isoleucine, 18 – lysine, 19 – leucine, 20 – tyramine, 21 – putrescine, 22 – cadaverine, 23 – isoamylamine, 24 – phenylethylamine, and R = reagent.



(二) Waters AccQ-Tag 氨基酸分析

色谱柱 AccQ-TagTM 柱 (3.9 mm×150 mm, 4 μm); 柱温: 37 °C; 检测波长: 248 nm; 进样量: 5 μL; 流速: 1.0 mL/min。 流动相 A: 取乙酸钠 (三水合乙酸钠) 19.04 g, 加 1000 mL 水溶解, 用体积分数 50% 的磷酸溶液调至 pH 5.2, 加入 EDTA 工作液 (100 mg EDTA 加水至 100 mL) 1.0 mL, 加入 2.37 mL (1.72 g) 三乙胺, 用体积分数 50% 的磷酸溶液调至 pH 4.95, 0.45 μm 滤膜滤过并脱气 20 s, 即可; 流动相 B: 乙腈; 流动相 C: 超纯水; 按表 1 进行梯度洗脱。表 1 梯度洗脱表(略)

门冬氨酸(Asp)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、盐酸组氨酸(His·HCl·H₂O)、盐酸精氨酸(Arg·HCl)、苏氨酸(Thr)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、甲硫氨酸(Met)、盐酸赖氨酸(Lys·HCl)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)、色氨酸(Trp)对照品均为中国药品生物制品检定所提供(批号: 624—200104), 质量分数均为 100.0%。6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基甲酸酯(简称 AQC)、AQC 稀释液和硼酸盐缓冲液(pH8.8)均为 WATERS 公司提供。复方氨基酸注射液(18AA-V)(规格: 500 mL:16.12 g;批号: 0604281、0603285, 广东利泰药业有限公司提供;批号: 051101, 广东庆发药业有限公司提供), 乙腈(色谱纯), 其他试剂均为分析纯。

Waters AccQ-Tag 流动相配制 (A 液)

稀磷酸: 取 100ml 浓磷酸加水到 100ml 高纯水中;

EDTA 溶液: 称取 100mg EDTA 二钠盐, 加 100ml MilliQ 水, 超声振荡使其溶解;

流动相 A (140mM 乙酸钠, 17mM 三乙胺, 稀磷酸调节 pH=5.02):

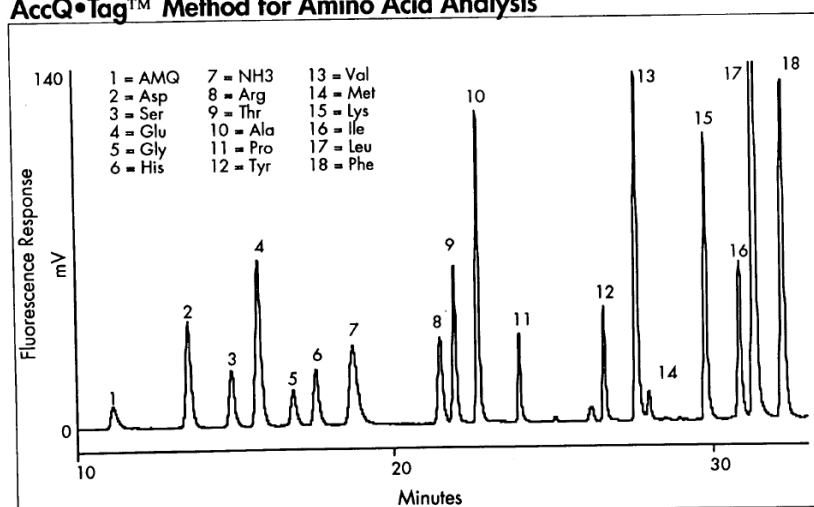
1. 称 19.04g 三水乙酸钠;
2. 加 1000ml MilliQ 水, 搅拌溶解;
3. 用稀磷酸将 pH 调至 5.2;
4. 加入 1ml EDTA 溶液;
5. 加入 0.1g 叠代化钠(主要防止流动相中长霉菌);
6. 加入 2.37ml 三乙胺(约 1.72g);
7. 用稀磷酸调节 pH 至 5.02;
8. 用水溶性过滤器过滤, 备用。

这个流动相 A 配制的关键点是最初的 pH=5.02, 这个会影响氨基酸的分离效果, 所以楼主的 pH 计需要计量校验合格、每次配制流动相时需要用标准缓冲液校正 pH 计, 配制的流动相需要含有 17 中氨基酸的标准品溶液衍生化, 测试一下分离效果确保同商品化销售的流动相 A 的效果一致, 如果分离度不佳, 适当调节 pH 值。

出现这种情况的原因是楼主调的 pH=5.02 严格上讲并不完全等于 Waters 公司销售的流动相 A 的 pH=5.02, 这个分离对流动相的 pH 控制是十分苛刻的!

waters 在用于 HPLC 的 AccQ.Tag 使用手册上描述稀释液 B 是 100% 纯乙腈

Analysis of Hydrolyzed Bovine Serum Albumin Using Waters AccQ•Tag™ Method for Amino Acid Analysis



Analysis of derivatized protein hydrolysate samples is simple and accurate with Waters new AccQ•Tag Method.

Conditions:

Column: Waters AccQ•Tag Column, 3.9 mm X150 mm

Column Temperature: 37°C

Mobile Phase: A ternary gradient elution profile using
Eluent A: AccQ•Tag Eluent A
Eluent B: Acetonitrile
Eluent C: MilliQ® water

Flow Rate: 1.0 ml/min

Detection: 470 Scanning
Fluorescence Detector (5µl flow cell)

EX: 250nm
EM: 395nm
Filter: 0.5
Gain: 100

Injection volume: 5µl

Sample: AQC-Derivatized Bovine Serum Albumin Hydrolysate, 1.3µg hydrolyzed, 5% analyzed.

二、GC 分析

方法一(Journal of Chromatography A, 915 (2001) 199–207)

1-10 mg 標準品或樣品溶液放於 1 毫升可密閉之樣品瓶中，以氮氣吹乾

(標準品直接使用固體樣品，胺基酸線性範圍 10–100µg)

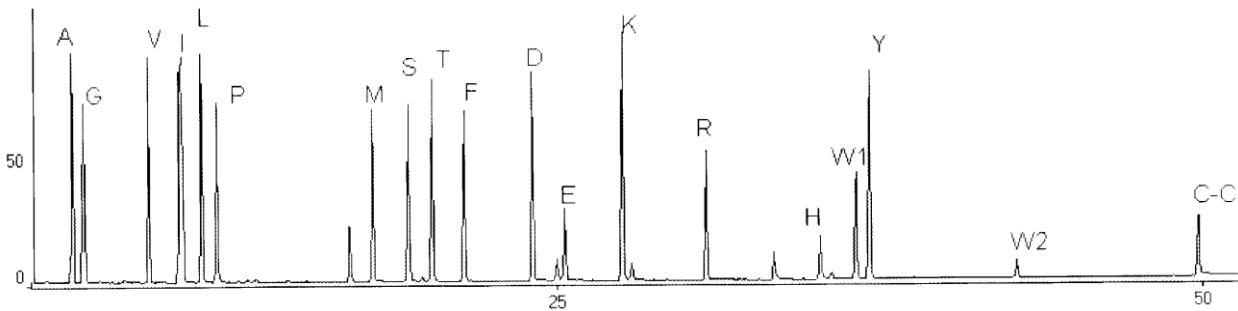
+30 µl N,N-tert.-butyl(dimethylsilyl)trifluoroacetamide (MTBSTFA) (為 Pierce 產品)

+10 µl Dimethylformamide(DMF)或 acetonitrile

70°C 加熱 30 min→冷卻後直接取 1µl 注入 GC 管柱(DB-1 30 mx0.53 mm)分析

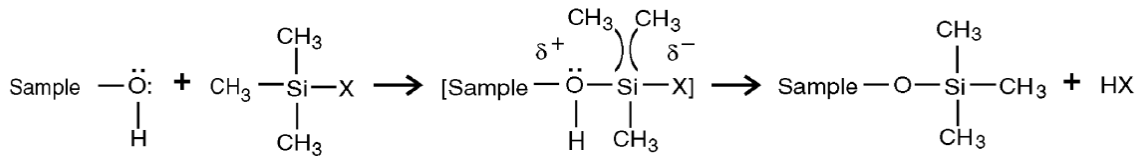
split mode (1:100) was programmed at 3°C/min from 120 to 300°C

injector 290°C detector 300°C



W1, W2 are two tert.-butyldimethylsilyl derivatives of tryptophan

Alanine (A) Glycine (G) Valine (V) Isoleucine (I) Leucine (L) Proline (P) Methionine (M) Serine (S) Threonine (T) Phenylalanine (F) Aspartic acid (D) Glutamic acid (E) Lysine (K) Arginine (R) Histidine (H) Tyrosine (Y) Tryptophan (W) Cystine (C-C)

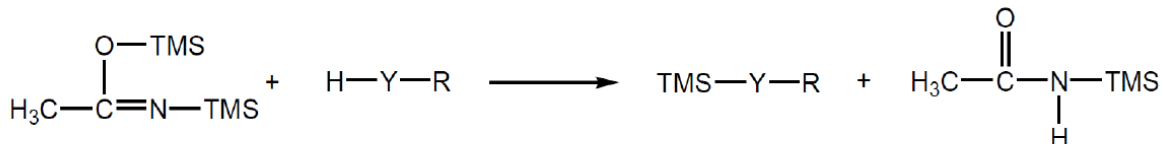


Equation 10: General reaction mechanism for the formation of trialkylsilyl derivatives for trimethylchlorosilane, X = Cl



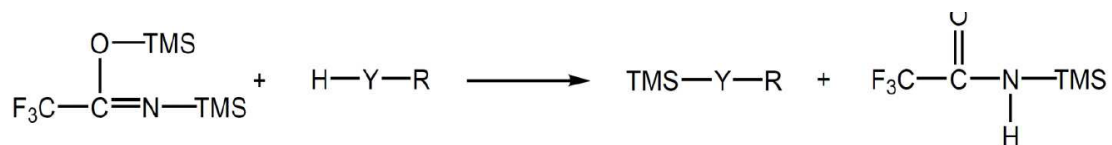
Equation 19: Silylation reaction using N-methyl-N-t-butyl dimethylsilyl trifluoroacetamide (MTBSTFA) reagent: Y = O, S, NH, NR', COO, R, R' = Alk, Ar.

以上為 N,N-tert.-butyl(dimethylsilyl)trifluoroacetamide (MTBSTFA) 衍生化反應



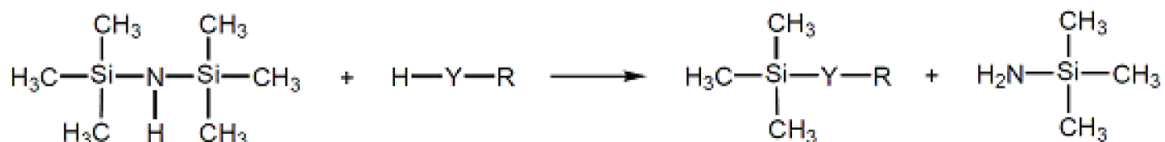
Equation 11: Equation showing the by-product which is trimethylsilyl -acetamide from Bis(trimethylsilyl)-acetamide silylation reagent: TMS = Si(CH₃)₃, Y = O, S, NH, NR', COO, R, R' = Alk, Ar.

以上為 Bis(trimethylsilyl)-acetamide (BSA) 衍生化反應



Equation 12: Silylation reaction using N, N-bis(trimethyl-silyl)trifluoro-acetamide: TMS = Si(CH₃)₃, Y = O, S, NH, NR', COO, R, R' = Alk, Ar.

以上為 Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) 衍生化反應



Equation 15: Silylation reaction using Hexamethyldisilzane (HMDS): Y = O, S, NH, NR', COO, R, R' = Alk, Ar.

以上為 Hexamethyldisilzane (HMDS) 衍生化反應

方法二 (Analytical Biochemistry 259, 203–211 (1998))

1-10 mg 標準品或樣品溶液放於 1 毫升可密閉之樣品瓶中，以氮氣吹乾

(標準品直接使用固體樣品，胺基酸線性範圍 10–100 μg)

+100 μl N,N-tert.-butyl(dimethylsilyl)trifluoroacetamide (MTBSTFA) (為 Aldrich 產品)

+600 μl Dimethylformamide(DMF)或 acetonitrile

50°C 超音波加熱 60 min (或 70°C 加熱 30 min 或微波加熱處理 700W、3 分鐘)

冷卻後直接取 1 μl 注入 GC 管柱(DB-1 30 mx0.53 mm)分析

split mode (1:100)。初溫 60°C、2 分鐘，以 20°C/min 升溫至 150°C 再以 6°C/min 升溫至 300°C 保持 20 分鐘。injector 270°C detector 300°C

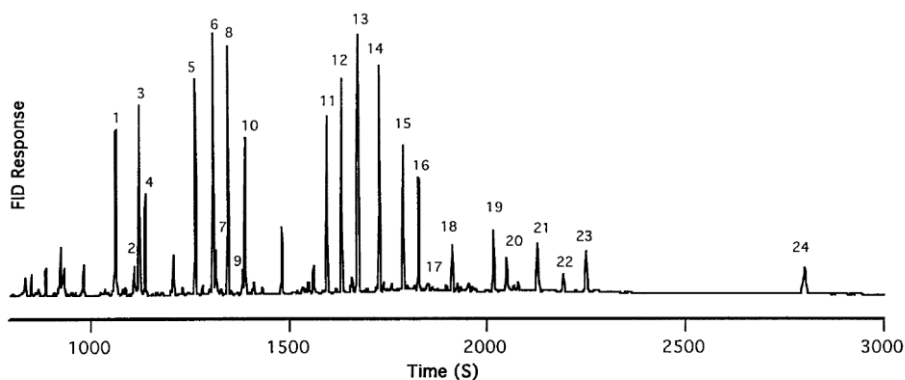
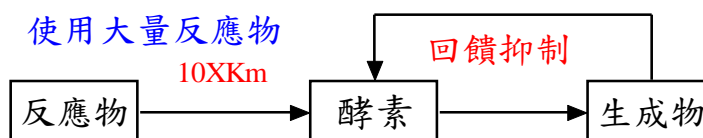


FIG. 2. An example chromatogram obtained from a standard solution containing a mixture of compounds at 45 μmol. (1) Lactate, (2) pyruvate, (3) alanine, (4) glycine, (5) valine, (6) leucine, (7) oxalate, (8) isoleucine, (9) malate, (10) proline, (11) methionine, (12) serine, (13) threonine, (14) phenylalanine, (15) asparagine, (16) hydroproline, (17) cysteine, (18) ornithine, (19) lysine, (20) glutamine, (21) arginine, (22) ascorbate, (23) histidine, (24) tryptophan. Other conditions as described in the legend to Fig. 1.

貳、酵素活性測定法

(壹)催化反應

一、反應設計原則



1. 測定生成物的產生量，比測基質(反應物) 的消失量，更方便且靈敏。
2. 反應流程儘量簡單，太複雜的操作過程，增加工作量及成本，且容易造成失誤。
3. 複雜的反應可能產生意外的生成物或 pH 改變，回饋抑制酵素反應(以負號表示)。
4. 反應條件要有利於指定反應方向的進行，可以移除生成物(以藍框表示)或接上耦合反應。
5. 小心樣本中有無其他酵素(或抑制劑) 干擾，會因為消耗反應物或生成物，而加強或減弱目標酵素的活性，造成假象。

二、反應基質及酵素濃度：

在試管中進行的酵素活性分析，與在生物體內的酵素反應，有相當的差距；為使反應達最大活性(Vmax)，或往指定方向進行，所使用基質濃度為十倍 Km。反應的最適 pH、溫度、時間等條件，均需以實驗求得；尤其酵素的用量影響結果甚鉅，要事先找出最適當的使用濃度。

(貳)酵素活性分析

一、酵素活性測定方法

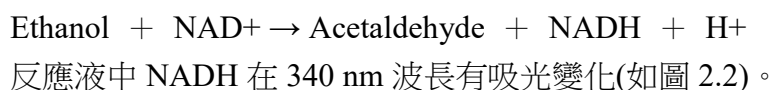
酵素活性的偵測，通常是固定在一段時間 (t) 內，觀察生成物 的產量(P)。因此反應進行一定時間後需中止反應，再進行生成物的定量。而 P/t 即為此酵素的反應速率 (vo)，也就是酵素活性。但若可連續記錄反應過程，則有無中止反應並不重要。

(一)酵素活性測定方法：

反應一段時間 (t) 後中止反應，測生成物量(P) 即得活性 (P/t)。以下為各種測定生成物的方法，任何物理、化學甚或生物方法都可使用。

1. 直接測定生成物：

所有去氫酶均可測定 NAD⁺ 與 NADH 間的變化量，即為去氫酶的活性；例如 酒精去氫酶催化下式之正反向反應：



2. 耦合反應法：

若生成物 (P) 無法直接測得，設法把生成物再進行耦合反應，變成可測量的產物(Q)；很多酵素可耦合到上述去氫酶的反應，則可測 340 nm 波長變化。

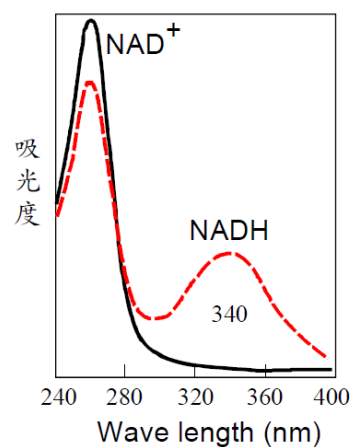
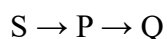


圖 2.2 NADH 吸光光譜

3. 化學測定法：

若生成物具有化學活性，則可直接進行化學反應；例如蔗糖以轉化酶 (invertase, IT) 水解成果糖及葡萄糖，可測定生成物還原糖的還原力。

4. 放射線測定法：

若基質分子中含放射性核種，酵素反應後追蹤生成物的放射線量，即可知酵素活性。麻煩的是，要分離反應物及生成物，有時不太容易；可用 HPLC、濾紙色析法(PPC) 或離子交換法等。

5. 測壓法(manometry)：

若生成物為氣體，則可測定氣體體積之增加量；尤其有氧氣生成時，可用 Warburg 氏呼吸計測之。

6. 電極：

有些電極可直接測定反應的變化；例如若有 pH 或氧濃度的改變，則可用 pH 計或氧電極。酵素電極把酵素固定在薄膜上進行反應，然後直接測定反應物的改變，相當方便；但多用在工業或醫療界有大量樣本待檢測者。

7. HPLC 檢定法：

若產物無法以其他任何方便的方法檢測時，最終可用 HPLC 來分析產物，但較費時。

(二)中止酵素反應方法

注意任何中止反應的方法均不得破壞生成物，或干擾儀器測定。

1. 用 3~5% TCA (三氯乙酸) 改變 pH，使酵素變性沉澱，再離心去除沉澱取上清。
2. 急速加熱(100°C 水浴) 10 min，注意有些蛋白質(如 RNase) 仍然無恙。
3. 用 1% SDS 中止反應，注意 protease K 等在 SDS 下仍有活性。
4. 若該酵素需二價離子，則加入 EDTA 中止反應。
5. 若該酵素有專一性抑制劑，則可加入抑制劑。
6. 若使用放射性基質，可加入大量不具放射性(cold) 的基質，看來放射性的生成物不再產生，但酵素反應實際上並沒有停止。

(三)連續測定法

連續測定法可不用刻意中止酵素反應，但通常要使用儀器同步監控生成物。

1. 連續測定法：

若酵素反應，在其催化過程中可以一邊進行觀察，則可連續測定反應的情形，不須中止反應，上述酒精去氫酶 即可連續監視 340 nm 波長的變化。若生成物無法直接觀測，則可接續一耦合反應，把生成物轉變為容易觀察的物質。

2. 連續的耦合反應：

耦合反應在連續測定法應用相當多，但由於耦合反應更複雜，甚至成為一個迷你的代謝途徑；這種複雜的反應中有較多試劑與產物，許多不必要的副反應可能出現，干擾反應結

果；要作好對照的控制組，以免有假結果出現。

3. 蛋白酶活性分析

三、維持酵素活性

酵素是有活性的分子，而可能隨時失去活性；應該考慮各種最佳的環境與條件，以便使酵素保持在最安定的狀態。酵素的緩衝液是最關鍵的因素。

(一)緩衝液

緩衝液可維持溶液的恆定酸鹼度及離子濃度，兩者都會影響酵素的活性。

1. 緩衝液有其使用範圍：

各種緩衝液都有其適用的 pH 範圍，表 2.1 列出常用的緩衝液。

表 2.1 各種常用緩衝液及其使用範圍

緩衝液	適用pH	使用上注意
Formate	3.0 ~ 4.5	容易揮發，可用冷凍乾燥除去。
Citrate	3.0 ~ 6.2	小心會與二價金屬離子結合。
Acetate	3.7 ~ 5.5	容易揮發，可用冷凍乾燥除去。
◎ Phosphate	5.8 ~ 8.0	小心會與鈣離子結合沉澱，低溫下易結晶。
HEPES	6.5 ~ 8.5	毒性較小，多用在細胞培養。
Tris	7.1 ~ 8.9	pH 受溫度影響很大，要用特殊電極。
Borate	8.1 ~ 9.0	
Carbonate	9.7 ~ 10.7	小心會與金屬結合沉澱。
Universal	2 ~ 12	數種不同 pH 範圍的緩衝液混合而成。

◎ 兩種最常用的緩衝液，小心其使用上的特性

2. 添加物都有作用：

經常在緩衝液中加入一些物質，以增加酵素安定或保持活性 (表 2.2)。

表 2.2 緩衝液各種添加物質的作用及其使用濃度

添加物質	作用	一般使用濃度
NaN ₃ (sodium azide)	抑菌劑	0.01%
EDTA, EGTA	除去二價離子	0.1~1 mM
β-Mercaptoethanol	抗氧化劑	1~10 mM
Dithiothreitol (DTT or DTE)	抗氧化劑	1~5 mM
BSA (bovine serum albumin)	安定劑	0.1~10 mg/mL
Tween-20, Triton X-100	界面活性劑	0.5~0.05%
Glycerol, glucose	防凍劑	50%
Urea 尿素	變性劑	6~8 M
PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride) 苯甲基磺醯氟, TPCK (tosyl -L-	PMSF為絲氨酸蛋白酶 抑制劑(可抑制trypsin, chymotrypsin,	通常微量使用

phenylalanine chloromethyl ketone), TLCK (Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride), benzamidine等	thrombin and papain TPCK chymotrypsin 抑制劑.也抑制部分 cysteine proteases such as caspase, papain, bromelain or ficin. 無法抑制 trypsin或zymogens TLCK為trypsin或 trypsin-like抑制劑
--	--

3. 溫度的影響：

緩衝液用來維持溶液恆定的 pH，但需注意有些緩衝液的 pH 受溫度影響很大(如 Tris)；故製備緩衝液時，要考慮此緩衝液將要在什麼溫度下使用。

4. 濃度的影響：

改變緩衝液的濃度對其 pH 可能有影響。緩衝液的種類不同，酵素活性的表現也會有差異，有些酵素甚至失去活性。圖 2.4 為各種不同實驗情況下，緩衝液的使用濃度範圍。

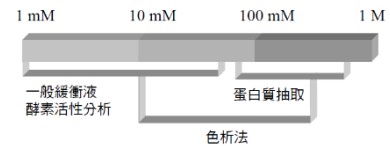


圖 2.4 緩衝液使用濃度的大概範圍

5. Stock solution：

緩衝液可以十倍濃度貯存，高濃度可防止微生物生長，並保持每次實驗所使用藥品的穩定度。注意在稀釋後，溶液的 pH 也許會改變一些，尤其是磷酸緩衝液很容易受到濃度改變所影響。

(二)試劑的保存

試劑的適當保存非常重要，要依照廠商所指示的溫度貯存。

1. 避免潮解：注意每當試劑由冷藏庫取出時，要等它回到室溫後才能打開，否則水氣會附在藥品的表面，進而潮解或破壞之。
2. 分裝凍藏：常用的冷藏藥品以小量分裝 (aliquot) 後凍藏，是最好的貯藏方式，尤其是溶液狀態的生物活性試劑(如酵素)，切勿反復凍結-解凍。
 - ◆ 有些酵素經不起凍藏，一旦結冰後再解凍，活性快速下降。例如本實驗課所純化的澱粉磷解酶請勿凍藏，放在 4°C 即可。
3. 甘油凍藏：於低溫 (-20°C) 貯藏的酵素溶液，若保存在 50% 甘油就不會凍結，隨時取用；但須注意所含的甘油，對下一步反應有無影響。
4. 避光防菌：很多試劑要避光貯存，或須放在乾燥器中，避免長霉長菌。

(三)酵素活性之維持

1. 酵素的安定性不同：

酵素在細胞中合成後，有的分泌到細胞外，有的運送到細胞器官中貯存或應用。前者(分泌性酵素)因為要在細胞外的惡劣環境中生存，因此較為堅韌，不易受到破壞；反之，細胞內的酵素，都以較濃的濃度集中在保護良好的胞器內或胞膜上，一但抽離細胞暴

露在氧氣中，可能很容易失去活性。

2. 酵素失活的原因：可歸類成如下的物理性或化學性原因。

(1) 蛋白質變性：

離開細胞的生理環境後，蛋白質可能遇到極端的 pH 條件、不適的溫度或變性劑(如 SDS 或尿素)，均會使蛋白質的構形破壞。

(2) 酵素活性區破壞：

在抽取過程中，若失去 cofactor，或者活性區的關鍵胺基酸被修飾，均可造成。最常見的影響是氧化，尤其是 cysteine 上的-SH 基很容易被氧化。一般加入 EDTA 除去可活化氧分子的二價離子；或加入抗氧化劑，以自身氧化防止-SH 基氧化。

(3) 蛋白酶水解：

細胞內有許多蛋白酶，細胞被打破後即釋放到酵素溶液中，很快水解酵素。可用蛋白酶的抑制劑防止之，但蛋白酶有數大類，各有不同類的抑制劑；一般使用 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 是 Ser 型蛋白酶的抑制劑，但也抑制部分其它類型者；PMSF 在水溶液中很快就會降解。

(4) 酵素抑制劑：

在自然界中或以人工合成，發現許多酵素有抑制劑，可以專一性地抑制酵素活性；有可逆性的，也有不可逆的，通常不可逆抑制劑的效果都很強烈。

3. 如何保持活性：

若酵素不太穩定，活性不易保持，請參考下列處理方式：

- (1) 儘快進行純化及各項分析，隨時保持在 4°C 或冰浴中。
- (2) 讓酵素保存在硫酸銨固體沉澱中，要比溶液狀態安定得多。
- (3) 勿讓高純度的酵素，保存在稀濃度溶液中，否則要加 BSA 當安定劑。
- (4) 勿隨意凍結或解凍酵素液，可加防凍劑(如甘油或醣類) 以液態保存。
- (5) 冷凍乾燥雖可長期保存酵素，但有些酵素活性可能會因而下降。
- (6) 若容易受微生物污染，可經無菌過濾後保存(當然也會損失一些酵素)。

(四) 酵素活性單位

1. 國際單位

活性單位 (activity unit) 是酵素活性高低的指標。一個活性單位的定義，是在固定溫及 pH 下，每分鐘可催化 1 μmole 基質的活性。

2. 任意單位

但很多情況下，為了操作或計算的方便，直接用測定產物所得的吸光值，除以單位時間來表示活性(任意單位)，因此活性單位的定義可能不同。

(參) 酵素活性分析實例

一、蛋白酶活性測定(Lowry method)

(一) 酪蛋白(casein)為基質

1. 原理:

蛋白質在鹼性環境下，酒石酸鈉-銅鹽溶液會與肽鍵形成 Cu^{2+} 離子紅色複合物，該複合物在鹼性條件下再與 Folin-phenol 試劑作用形成藍色複合物，複合物的顏色強度會與蛋白質中的芳香族官能基成正比，可在 750nm 下測得吸光值。將數值帶入已知標準曲線，可求得待測樣品之蛋白酶活性含量，使用自定義蛋白酶活性單位。

2. 實驗藥品

- (1) Reagent A: 2% Na_2CO_3 -0.1N NaOH (2) Reagent B: 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 1% 酒石酸鈉
(3) Reagent C: A 50mL + B 1 mL 混合 (4) Reagent D: Folin-Ciocalteu reagent

3. 蛋白酶萃取

新鮮魚內臟 10-20 克 → 洗淨 → 以 3-5 倍體積 RO 水 → 於冰浴下均質機打碎 2 分鐘 → 15000 rpm 離心 20 分鐘 → 取上清液 → 透析後為粗酵素液 → 檢測蛋白質含量及酵素活性
此外，檢測粗酵素的最適溫度、pH、反應時間、酵素用量

粗酵素液加入不同飽和度硫酸銨進行分割，分成 0-30、30-70、70% 以上

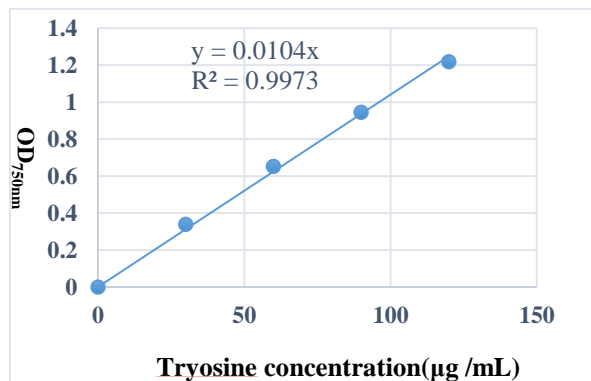
檢測不同分割的蛋白質含量及酵素活性

蛋白質含量使用 Dye-binding 方法檢測

4. 實驗方法

取 0.75mL 磷酸緩衝液 + 0.25mL 2.5% 酪蛋白溶液(先煮沸 15 分鐘才會溶) + 50 μ L 酵素液 → 混合均勻後培養於 35 $^{\circ}\text{C}$ 、15min → 加入 0.5 毫升 16% TCA 終止反應，室溫下靜置 30min → 離心後取 0.5mL 上清液 → 加入 2.5mL Reagent C，混合後室溫下靜置 10min → 加入 0.25mL Reagent D，混合後靜置 30min → 在 750nm 下測得吸光值 → 對照標準曲線以換算樣品中酪氨酸含量並求得粗蛋白酶活性為 100U。

* 酵素活性單位定義: 1U = 1 μ g tyrosine/hr-mL



Tyrosine 之標準曲線

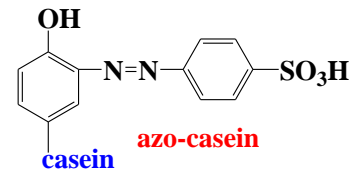
Stage	Volume (mL)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
粗酵素液	100	10000.0	20.0	500	1.0	100.0
0-30%	10	1000	4	200	0.4	10
30-70%	10	8000	10	800	1.6	80
70-100%	10	100	2	50	0.1	1

(二)Azo-casein為基質

1. 原理：

Azo-casein 是一種經過化學修飾之蛋白質，是用來做為分析蛋白酶活性之受質 (substrate)，其製備方法為將酪蛋白(casein)與磺胺基(sulfanilamide group)共價鍵結。Sulfanilic acid 與 NaNO_2 反應活化後，再與酪蛋白胺基酸側鏈之phenolic group 進行偶氮結合 (diazo coupling) 反應而形成azo-casein (右圖)。

Azo-casein 經由蛋白酶分解而釋出游離態的磺胺基至溶液中，再利用trichloroacetic acid (TCA)溶液將多餘azo-casein 以及酵素蛋白質沈澱，則上清液之顏色隨著釋出磺胺基之多寡，呈現無色至橘紅色，作為蛋白酶分解之程度。



2. 實驗方法

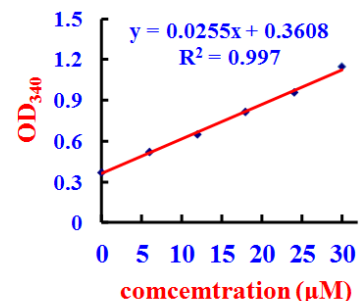
取0.4 mL 0.2% azo-casein solution(溶於25mM之Tris buffer pH 8)，加入0.2 mL 酵素液於試管中混合均勻，對照組先加TCA 終止反應，於45°C下反應2 小時。反應終了立即加入0.2 mL 10% TCA solution 以沈降蛋白質，放於室溫下靜置10 分鐘，接著離心(4°C, 15000 rpm, 15min)，取上清液0.5 mL 加0.5 mL 0.2 M NaOH 均勻混合，測定420 nm 吸光值。

酵素活性單位(unit)定義：以每毫升酵素液吸光度增加0.01定義為一個酵素活性單位(1 U/mL = 0.01 OD)。

二、角蛋白分解酶 (keratinase) 活性測定：

1.O- phthaldehyde, OPA 呈色法：

秤取 20 mg 的羽毛加入 4 mL 的 glycine 50 mM 緩衝溶液(利用 NaOH 調整 pH 為 10)再加入 1 mL 適當稀釋過的酵素液，於 60°C 水浴中反應 1 小時反應終了時立即加入 4 mL 之 5% TCA solution 以沈降蛋白質並放於室溫下靜置 30 分鐘，以 Toyo 1 號濾紙將粗的羽毛過濾掉，接著離心 (4°C, 1000 rpm, 10 分鐘)，獲得之上清液即為角蛋白分解酶酵素液 (Ramnani and Gupta, 2004)。



Serine standard curve.

取經適當稀釋之角蛋白分解酶酵素液 50µL，加入 2 mL 之 OPA 混合試劑 (OPA 混合試劑：100 mM sodium tetraborate 25 mL、20% sodium dodecyl sulfate、o-phthaldehyde 40 mg 溶於 1 mL methanol、β-mercaptoethanol 100 µL、混和後加水定容至 50 mL)，於室溫下靜置 2 分鐘，測定 340 nm 吸光值，以 serine 製作標準曲線，得一直線方程式。

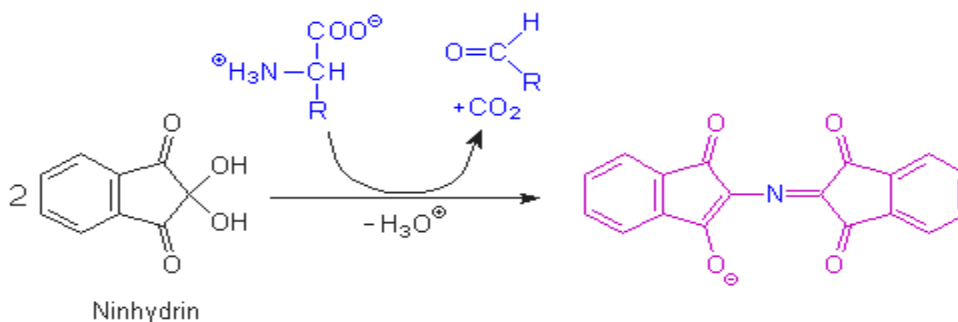
$y = 0.0255x + 0.3608$, $R^2 = 0.997$ (右圖)；在 60°C 下反應 1 小時使吸光值增加 1，定義為 1 個活性單位(Jones and Gilligan, 1983)。

2. Keratin Azure 分析方法(Hanel et al., 1991)：

秤取 4 mg 之 keratin azure 加入 1 mL 的磷酸緩衝溶液(50mM, pH8.0)，再加入 500µL 粗酵素液；混合均勻後放於 60°C 水浴中反應 1 小時，反應終了立即吸取上層液測定 595 nm，使吸光值增加 0.01 定義為一個活性單位(U/mL)。

3. 茚三酮(Ninhydrin) 呈色法(Moore and Stein, 1954) :

取適當稀釋之樣品 2 mL，加入 1 mL 之 ninhydrin 試劑於水浴中加熱 15 分鐘，冰水冷卻 10 分鐘後；於 570 nm 測定其吸光值，由標準品(serine)所得之標準減量線換算成胺基酸含量。



三、市售消化酵素蛋白酶活性測定(OPA method)

(一)GDU(gelatin digestion unit) 明膠為基質

1. 明膠溶液 (5%) 50 毫升

以 0.1M 醋酸緩衝液(pH4.5) 配置 5%明膠，於 60°C 下保溫 30 分鐘即可溶解

2. 酵素製備

市售消化酵素粉末 1.0 克+RO 水 10 毫升攪拌 30 分鐘，
離心 15000 rpm 10 min，上清液為粗酵素液 (100 mg/mL)

3. OPA 試劑

取 25 mL 0.1 M (pH 10.0) sodium tetra borate (Na₂B₄O₇)、2.5 mL 20 % w/w Sodium dodecyl sulfate (SDS)、1 mL OPA (40 mg O-phthalaldehyde 溶於 1 mL 100% methanol)、100 μL β-Mercaptoethanol，混合後以去離子水定容至 50 mL 並於棕色瓶

4.標準曲線

配置 200 μg/mL 甘氨酸(Glycine)溶液，以下列方式備製六個標準溶液，取 25 μL 標準溶液與 1mL 之 OPA 試劑反應製備標準曲線

Glycine (μg)	0	20	40	60	80	100
200 μg/mL Glycine	0 mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
RO 水	0.5 mL	0.4	0.3	0.2	0.1	0

5.實驗步驟

1 毫升明膠溶液+0.1 毫升酵素→45°C 反應 20 分鐘

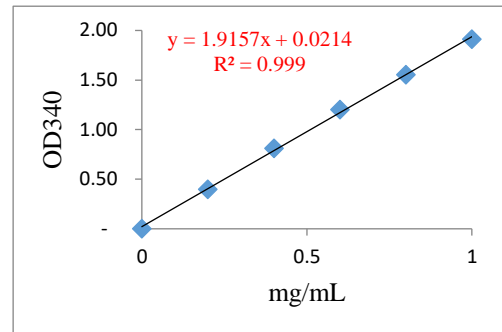
→加入 0.5 毫升 16%TCA 終止反應，室溫下靜置 30min→離心後取 25 μL 上清液加入 1mL 之 OPA 試劑，均勻混合並靜置反應 2 分鐘後，以分光光度計測波長 340nm 下之吸光值，並將吸光值帶入 OPA 標準檢量線以換算樣品中甘氨酸含量並求得蛋白酶活性。

空白試驗事先加 TCA

GDU(gelatin digestion unit) 活性如下:

順暢酵素 463.9、優菌酵素 556.7

GDU(gelatin digestion unit)=1 mg amino nitrogen
release at 45°C、pH4.5 for 20 mins.



(二) CDU (casein digestion unit): 酪蛋白(casein)為基質

1. 酪蛋白溶液 (0.6%) 50 毫升

以 0.1M 磷酸緩衝液(pH 7) 配置 0.6%酪蛋白溶液，於 95°C 下保溫 10 分鐘即可溶解

2. 酵素製備

市售消化酵素粉末 1.0 克+RO 水 10 毫升攪拌 30 分鐘，

離心 15000 rpm 10 min，上清液為粗酵素液 (50 mg/mL)

3. Lowry 試劑

(1)Reagent A: 2% Na₂CO₃-0.1N NaOH

(2)Reagent B: 0.5% CuSO₄-5H₂O - 1%酒石酸鈉

(2)Reagent C: A 50mL + B 1 mL 混合

(4)Reagent D: Folin-Ciocalteu reagent

4.標準曲線

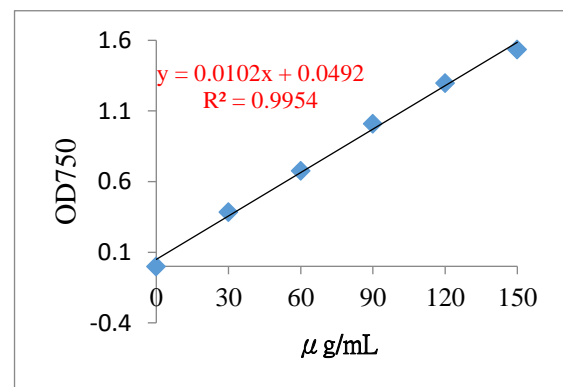
以 5%TCA 配置 300 µg/mL 酪氨酸(Tyrosine)溶液，以下列方式備製六個標準溶液，取 0.5 毫升標準溶液與 Lowry 試劑反應製備標準曲線

Tyrosine (µg)	0	30	60	90	120	150
5%TCA	0.5 mL	0.4	0.3	0.2	0.1	0
300 µg/mL Tyrosine	0 mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

5.實驗方法

1 毫升酪蛋白溶液+0.2 毫升酵素→37°C 反應 10 分鐘→加入 0.5 毫升 16%TCA 終止反應，室溫下靜置 30min→離心後取 0.5mL 上清液→加入 2.5mL Reagent C，混合後室溫下靜置 10min→加入 0.25mL Reagent D，混合後靜置 30min→在 750nm 下測得吸光值→對照標準曲線以換算樣品中酪氨酸含量並求得蛋白酶活性。

空白試驗事先加 TCA

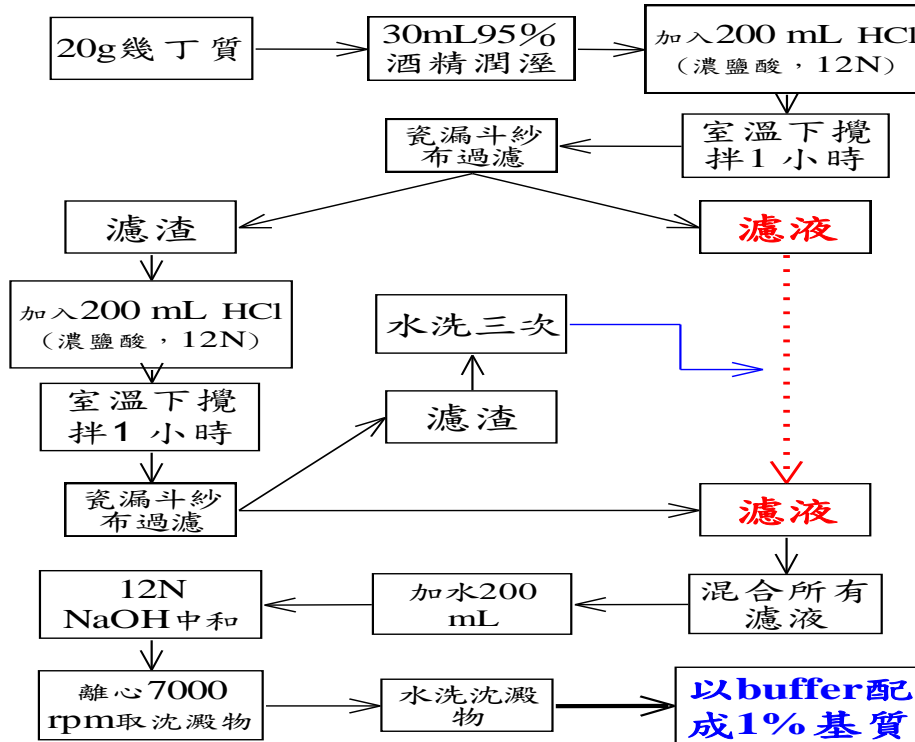


每克酵素(CDU/g)活性如下

順暢酵素 827.9 優菌酵素 1,468.3

CDU (casein digestion unit)= 1 µg Tyrosine release/min (at 37°C、pH 7.0)

四、幾丁質酵素(chitinase)分析



(一)DNS 試劑

A: 60%酒石酸鉀鈉溶液

B: 0.96% 3,5-dinitrosalicylic acid, 3.07% NaOH

等體積 A:B=1:1 混合即可使用(需避光)

(二)酵素活性測定

0.2 mL 酵素+0.1 mL 2%膠狀幾丁質(溶於水中)+0.1 mL 0.1M buffer

→37°C 1h→+0.4 mL DNS 試劑→95°C 10 min →離心 10,000 rpm 10 min

→ 測 540 nm 吸光

五、脂解酶(Lipase)測定

(一)試藥配置

1. olive oil emulsion (10%)

5 % gum arabic(in H₂O) 10 mL+ olive oil 1 mL

→均質後備用

2.Rhodamine 6G (0.01%)

20 mg Rhodamine 6G+ 0.2 M KH₂PO₄ 20 mL

→以 NaOH 調 pH=11→放入分液漏斗中 →+200 mL 苯萃取之

→取苯層放於暗色瓶中(放幾顆 NaOH 在內, 有效期限 2 星期)

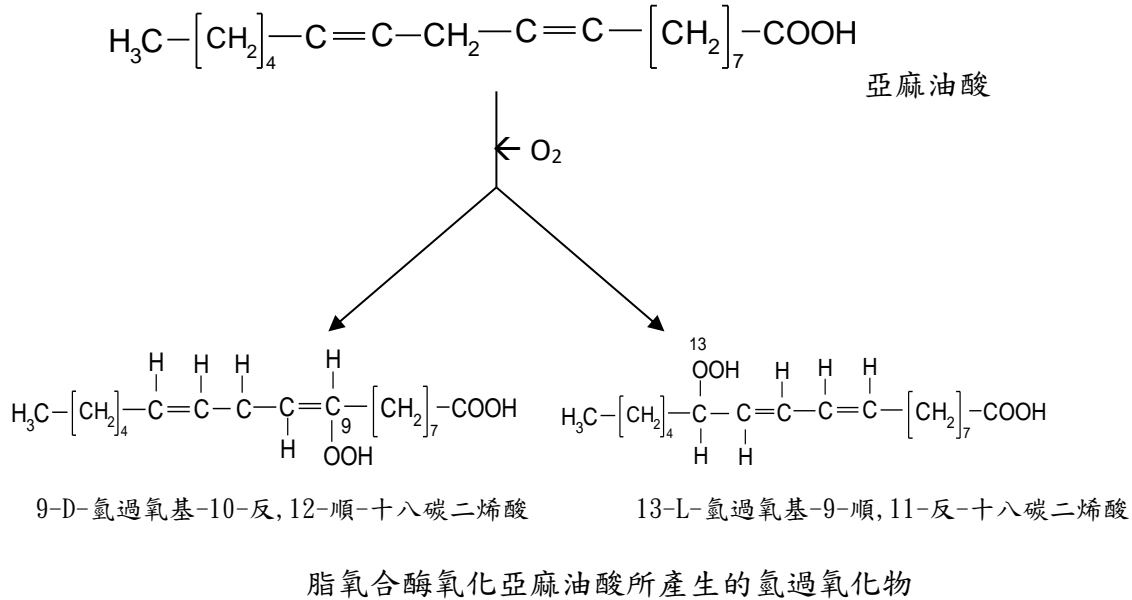
→使用時以苯稀釋 2 倍再用(稀釋後不安定應盡快用完)

(二)實驗方法

0.4 mL buffer+ 0.5 mL olive oil emulsion +0.1 mL enzyme soln.

→ 37°C 30 min → 2 mL toluene 抽取 free fatty acid
 → 3000 rpm 10 min 離心 → 取 1 mL toluene 部分
 → +1.5 mL Rhodamine 6G → 室溫下 20 分 ~ 3 小時 → 515 nm

六、脂氧合酶活性(lipoxygenase, LOX)測定



(一)共軛二烯活性測定

使用 50mM K-P buffer (pH6.3, 含 tween-20 0.001%) 取 0.98ml 再加入脂氧合酶 0.01ml 再和 0.01ml 20mM 亞麻油酸(C18:2)產生反應, 震盪反應後在放入分光光度計在 λ234nm 下測活性之變化。

(二)測量 β-胡蘿蔔素的共氧化(Co-oxidation of β-Carotene)

1. β-carotene 製備 (每日新鮮配製)

β-carotene 1mg 溶於 2 mL chloroform+40μL Tween 80 混合溶解
 → 減壓下去除 chloroform(或氮氣吹乾) → 溶於 10 mL 0.25 % EDTA 溶液 → 備用

2. 實驗方法

18:2 (0.05 M) 取 10 μL + β-carotene 35μL + buffer 0.935 mL + LOX 20μL
 → 測量 456 nm 降低情形

(三)硫酸氰鐵法

0.395 mL 磷酸緩衝液 0.1 M pH 7.5 (含 0.01% Tween 20, 大約 1 滴)
 +0.1 mL enzyme + 0.05 mL 18:2 (in ethanol, 20 mM) → 35°C 10 min
 → 3 mL 0.6 % HCl (in ethanol) → +0.02 M FeCl₂ 0.05 mL
 → +30% NH₄SCN 0.05 mL → 20 min 後測 475 nm

(四)LMB 法 參考：Anal. Biochem. 201, 375-380 (1992)

1. LMB (N-benzoyl-leucomethylene blue) reagent 配製

5 mg LMB 溶於 8 mL DMF (dimethylformamide)+5.5 mg hemoglobin (bovine)
以 KP-buffer (0.05M, pH 5, 含 1.4% triton X-100)定容至 100 mL→有效期限 1 星期

2. 實驗方法

Enzyme 0.2 mL + buffer 0.29 mL +18:2 (in ethanol, 20 mM) 10 μ L

→室溫下反應 5~10 分鐘→+LMB reagent 1.0 mL→5 min 後測定 660 nm 吸光值

七、多酚酶(polyphenol oxidase, PPO) 活性測定

1.分光光度計

酵素抽出液 0.1 毫升+0.9 mL 3.8 mM L-DOPA (MW: 197.2)
(in 25 mM 鈉磷酸 buffer pH 6.8, 新鮮配製)

→測量 475 nm for 3 min PPO 活性為每分鐘 475 nm 吸光值的增加情形

2. ELISA 方法

酵素抽出液 0.02 mL +0.18 mL 3.8 mM L-DOPA
(in 25 mM 鈉磷酸 buffer pH 6.8, 新鮮配製)

→測量 490 nm for 3 min PPO 活性為每分鐘 490 nm 吸光值的增加情形

八、澱粉酶(amylase)萃取及部分純化

(一)澱粉酶(amylase)萃取

新鮮地瓜(麥芽或口水)10-20 克→洗淨→以 5 倍體積 RO 水

→於冰浴下均質機打碎 2 分鐘→15000 rpm 離心 20 分鐘→取上清液→透析後為粗酵素液

→檢測蛋白質含量及酵素活性。此外，檢測粗酵素的最適溫度、pH、反應時間、酵素用量

粗酵素液加入不同飽和度硫酸銨進行分割，分成 0-30、30-70、70%以上

檢測不同分割的蛋白質含量及酵素活性。蛋白質含量使用 Dye-binding 方法檢測

(二)澱粉酶活性測定

取 0.75mL 磷酸緩衝液+0.25mL 10 % 可溶性澱粉(先煮沸 10 分鐘才會溶)+50 μ L 酵素液

→混合均勻後培養於 45 $^{\circ}$ C、60min→沸水浴 10 秒終止反應

→離心後取 0.5mL 上清液→加入 0.25 mL DNS 藥劑反應

→於 100 $^{\circ}$ C 水浴加熱 10 min 後置於冷水浴冷卻→加入 0.75 ml 蒸餾水

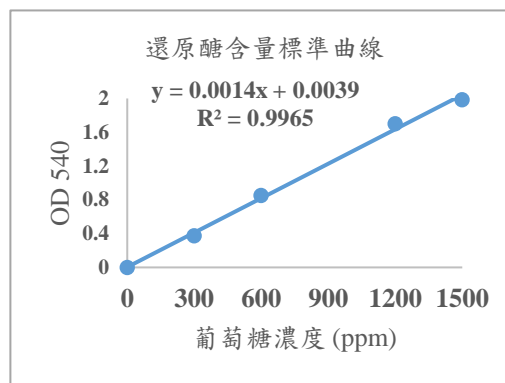
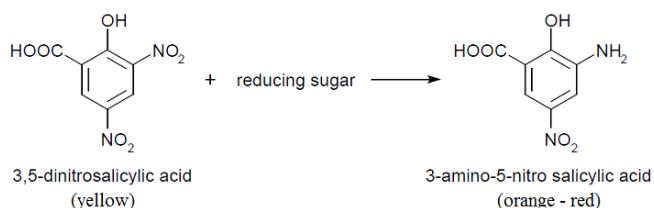
→於 540 nm 測定其吸光值，再將吸光值代入標準檢量線後，即可換算出還原糖含量。

*酵素活性單位定義:1U=1 μ g glucose/hr-mL

(三) 還原糖含量之測定 (DNS 法)

1. 原理：

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 試劑的反應是利用 DNS 其具有還原力的特性，使碳水化合物在具有游離或游離趨勢之醛基或酮基，便會在鹼性環境下具有還原的能力而進行反應，並於波長 540 nm 下測定其吸光值。以葡萄糖製作標準檢量線，來定量樣品中還原糖的含量。



2. 實驗試劑：

- (1) 0.1 g 3,5-dinitrosalicylic acid
- (2) 3 g 酒石酸鉀鈉(Potassium sodium tartrate)
- (3) 2 mL 之 2N NaOH

將上述藥品溶於 10 ml 蒸餾水中並加熱使其溶解，最後保存於褐色瓶中。

3. 實驗步驟：

將樣品溶液經過適當稀釋後取 0.5 ml 加入 0.25 ml DNS 呈色劑，於 100°C 水浴加熱 10 min 後置於冷水浴冷卻，加入 0.75 ml 蒸餾水，於 540 nm 測定其吸光值，再將吸光值代入標準檢量線後，即可換算出還原糖含量。

地瓜最適溫度 50-60°C，pH 5-6

九、消化酵素澱粉酶(α -amylase)活性測定

(一) Dextrinizing unit (DU) 檢測反應物之減少量

Amylase (DU) “Dextrinizing unit” -- One FCC alpha-amylase Dextrinizing Unit (DU) is defined as the quantity of alpha-amylase that will dextrinize soluble starch in the presence of an excess of beta-amylase at the rate of one gram per hour at 30°C. The assay is based on the time required for an alpha-amylase to hydrolyze a limit dextrin substrate to a defined blue value. The degree of hydrolysis is determined by comparing the blue value of the hydrolyzed limit dextrin substrate with that of a color standard.

0.4mL KP-buffer (0.1 M pH 6.9) + 0.2 mL starch (2 mg/mL, in boiling water 10 min then cooling) + 0.2mL Enzyme \rightarrow 50°C (or 37°C)、10 min \rightarrow 0.2mL 1N HCl 終止反應

\rightarrow +1.0 mL iodine solution (5mM iodine+ 5mM KI) \rightarrow 測 580 nm (有沉澱時，離心後再測)

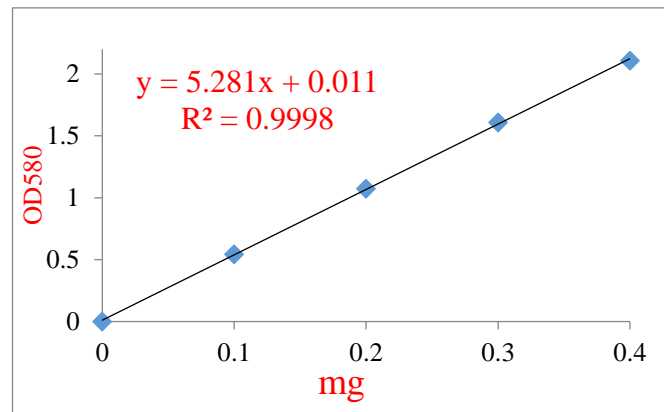
Standard curve (0-0.4 mg)

Starch (mg)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	
starch (2 mg/mL)	0 μ L	50 μ L	100 μ L	150 μ L	200 μ L	
KP-buffer (μ L)	800 μ L	750 μ L	700 μ L	650 μ L	600 μ L	

0.8 mL Standard solution + 0.2mL 1N HCl + 1.0 mL iodine solution (5mM iodine+ 5mM KI)

→ 測 580 nm

One Dextrinizing unit (DU)= 1mg starch reduce/min-g



澱粉的標準曲線

(二) α -Amylase unit (U) by DNS method 檢測產物之增加量

1.DNS 試劑：

- (1) 0.1 g 3,5-dinitrosalicylic acid
- (2) 3 g 酒石酸鉀鈉(Potassium sodium tartrate)
- (3) 2 mL 之 2N NaOH

將上述藥品溶於 10 ml 蒸餾水中並加熱使其溶解，最後保存於褐色瓶中。

2.實驗步驟

0.4mL KP-buffer (0.1 M pH 6.9) +0.2 mL starch (5 mg/mL, in boiling water 10 min then cooling) +0.2mL Enzyme→50°C (or 37°C)、10 min→ 0.2mL 1N HCl 終止反應

取 0.5mL 適當稀釋樣品→加入 0.25 mL DNS 藥劑反應

→於 100°C 水浴加熱 10 min 後置於冷水浴冷卻→加入 0.75 ml 蒸餾水(有混濁時需離心)

→於 540 nm 測定其吸光值，再將吸光值代入標準檢量線後，即可換算出還原糖含量。

*酵素活性單位定義:1U= liberate 1.0 mg of maltose from starch /min (at pH 6.9 at 50°C)

1U= liberate 1.0 μ mole of maltose from starch /min (at pH 6.9 at 50°C)

3.標準曲線：0-1.5 mg

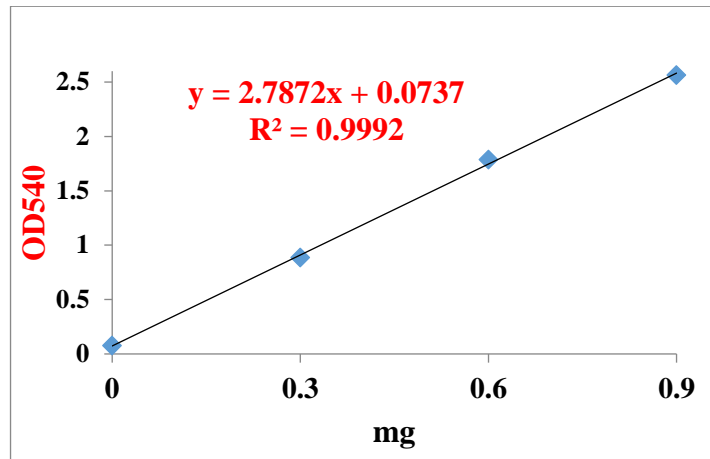
Maltose: 0.3% (3.0 mg/mL)

Maltose (mg)	0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5
Maltose (μ mole)	0	0.877	1.754	2.632	3.509	4.386
Maltose (0.3%)	0 mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
KP-buffer 水	0.5 mL	0.4	0.3	0.2	0.1	0

上述標準品 0.5mL→加入 0.25 mL DNS 藥劑反應

→於 100°C 水浴加熱 10 min 後置於冷水浴冷卻→加入 0.75 ml 蒸餾水(有混濁時需離心)

→於 540 nm 測定其吸光值 (有沉澱時，離心後再測)



Maltose 的標準曲線

每克酵素的 α -Amylase 活性(U)如下

順暢酵素 1.7 優菌酵素 24.8

1U= liberate 1.0 mg of maltose from starch per min at 50°C and pH 6.9

每克酵素粉末的澱粉酶活性(DU)如下:

順暢酵素 0.2 優菌酵素 149.3

One Dextrinizing unit (DU)= 1mg starch reduce/min-g