



臺北醫學大學
TAIPEI MEDICAL UNIVERSITY

生物化學實驗報告

蛋白質定量分析

組 別：第 14 組

主寫人：王威鈞 b202110089

組 員：陳相瑋 b202110082

李品辰 b202110064

日 期：2023/09/10

實驗目的：

本實驗目的為使用 ELISA 分光光度計建立蛋白質濃度標準曲線，並測量未知蛋白質溶液濃度。預期蛋白質吸光值與蛋白質濃度呈線性，可根據已知濃度蛋白質溶液吸光值建立的迴歸直線與未知蛋白質溶液吸光值回推其濃度。

實驗步驟：

1. 實驗材料準備

- (1) BSA 胎牛血清蛋白，濃度為 1 mg/ml，以 1.5ml eppendorf 裝取 35 μ l
- (2) Bradford reagent，以離心管裝取 2.5ml
- (3) ddH₂O，以 1.5ml eppendorf 裝取 40ml
- (4) 再取八支 1.5ml eppendorf，其中六支標上組別 1~6，剩下兩支標示 A、B
- (5) unknown 待測溶液
- (6) 96 孔盤，注意不要接觸盤底
- (7) ELISA reader
- (8) 微量吸管 P2、P200、P1000 及 tip 將 1~6 及 A、B eppendorf 至於 rack 中，按照下表加入 BSA 及 ddH₂O。注意吸取微量體積時，tip 不可沒入液面太深，避免取量誤差。

2. 將 1~6 及 A、B eppendorf 置於 rack 中，按照下表加入 BSA 及 ddH₂O。**注意**吸取微量體積時，tip 不可沒入液面太深，避免取量誤差。

管號	BSA (μ l)	ddH ₂ O(μ l)
1	0	10
2	2	8
3	4	6
4	6	4
5	8	2
6	10	0
A	5	5
B	10	0

3. 將 Bradford reagent 吸取 300 μ l 加入 1~6 及 A、B eppendorf。注意加入時不要碰到樣品，如此可重複使用 tip。
4. 加入後，手指輕彈 eppendorf 底部，並靜置 5 分鐘。
5. 5 分鐘後，自 1~6 及 A、B eppendorf 吸取 150 μ l 樣品至 96 孔盤。
6. 96 孔盤放入 ELISA reader，待機器讀取後，紀錄讀值。

實驗結果及討論：

結果:

Table 1: BAS 吸光值回歸直線與未知 BSA 濃度

y=a+bx	第一次	第二次	第三次
a	0.0334	0.0238	0.0300
b	0.0232	0.0224	0.0750
R ²	0.889	0.916	0.797
A(mg/ml)	0.823	0.966	0.918
B(mg/ml)	0.799	0.884	0.867
平均	0.811	0.925	0.892

實驗數據:

Table 2: 三次實驗實驗吸光值數據

BSA (mg)	第一次		第二次		第三次	
	OD _{595nm}	raw data	OD _{595nm}	raw data	OD _{595nm}	raw data
0	0	0.122	0	0.119	0	0.731
2	0.107	0.229	0.091	0.21	0.116	0.847
4	0.12	0.242	0.102	0.221	0.29	1.021
6	0.199	0.321	0.177	0.296	0.799	1.53
8	0.244	0.366	0.229	0.348	0.517	1.248
10	0.227	0.349	0.216	0.335	0.707	1.438
A(5μl unknown)	0.144	0.266	0.132	0.251	0.374	1.105
B(10μl unknown)	0.249	0.371	0.222	0.341	0.68	1.411

實驗作圖：

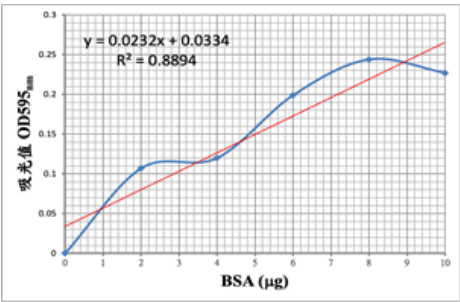


Fig 1: 第一次實驗迴歸直線

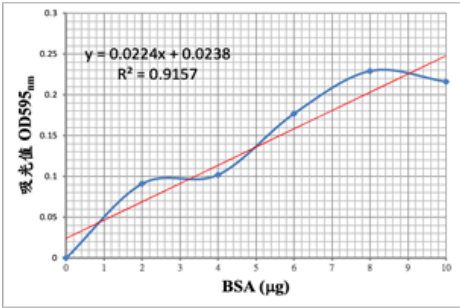


Fig 2: 第二次實驗迴歸直線

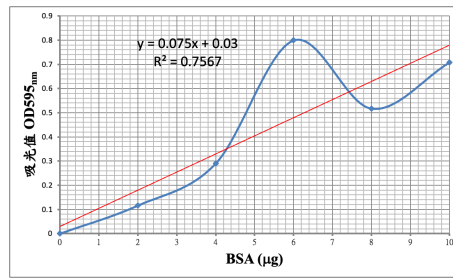


Fig 3: 第三次實驗迴歸直線

實驗討論：

1. 如果實驗上有誤差，可能造成的原因為何？
 - (1) 操作微量吸管技術不佳，在吸取 2~10μl 時，可能將 tip 插入液面太深，使 tip 外部沾取過多樣品，使得後續濃度出現誤差。
 - (2) 機器量測問題，老師有提到我們使用的機器在過往觀察中有個傾向是會在第 6 個樣品的吸光值會降低。
 - (3) 染色時間問題，我們組一共做出兩個 R 平方值，使用同一台機器在不同時間讀取，推測，如果染劑應該能與蛋白質維持一段時間穩定結合，那也有可能是染劑老化，品質較差。
2. 如何減少本次實驗所造成的誤差與錯誤？

在其他組有做出 R 平方值高達 0.98 的情況下，我認為最主要還是自己操作微量吸管的技巧要再更加精進。
3. 與本次實驗相關的其他方法或研究。

參考資料：

如果有使用到任何參考資料，請列出來源及出處。

*You can also write the report in English if you want/need to.