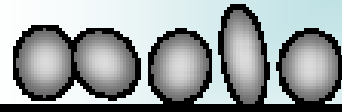
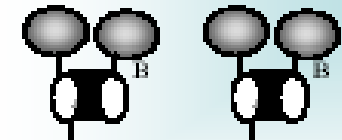


實驗八 固定化技術

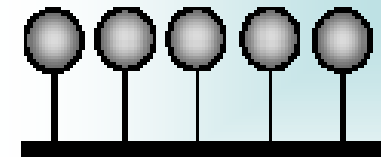
Immobilization Methods



Adsorption

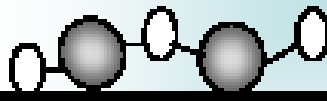


Biological binding

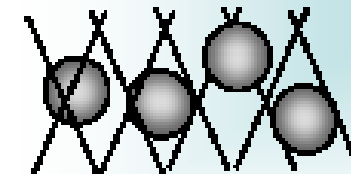


Covalent binding

**Immobilization
of
Bio-elements**



Cross-linking



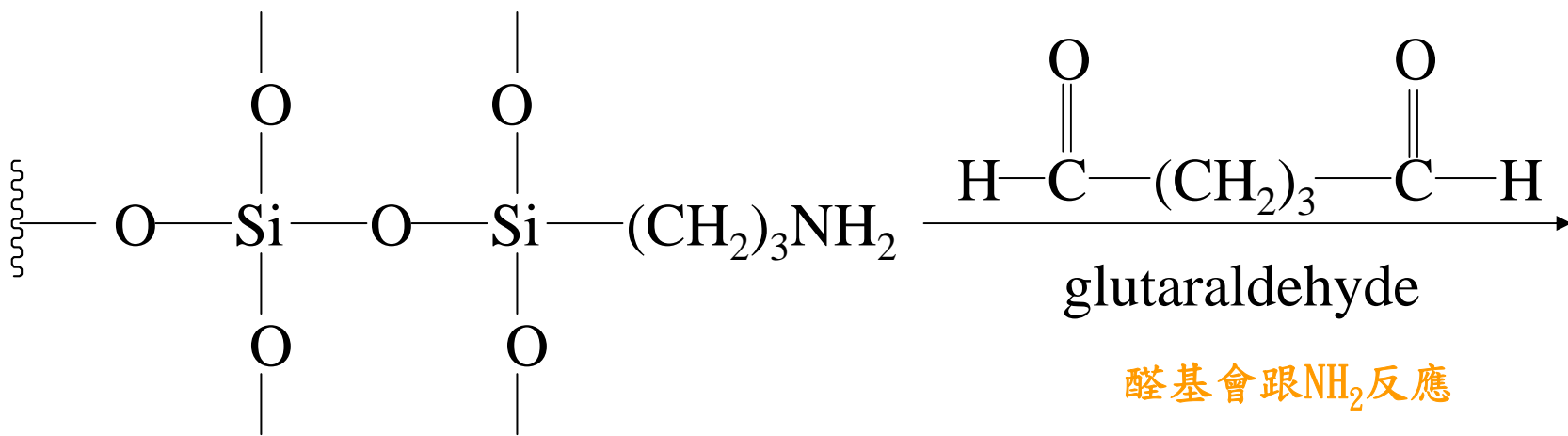
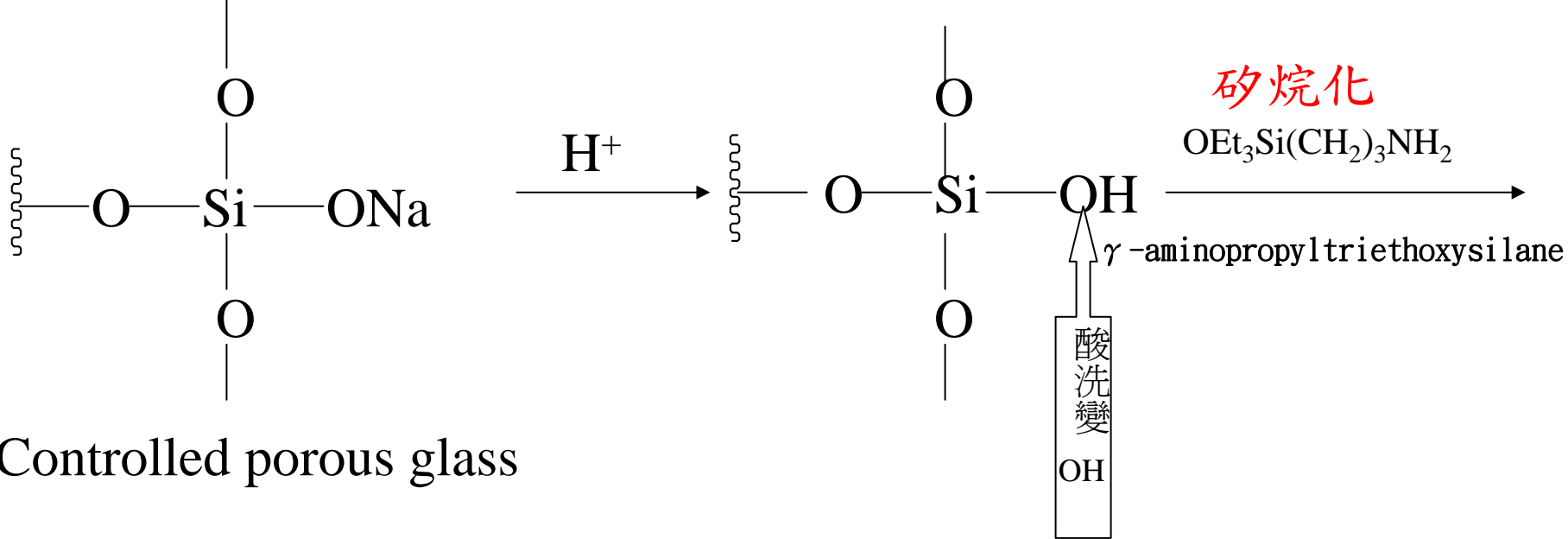
Entrapment

共價鍵結法

將生物辨識元件以共價鍵接合於固體支持物上或轉換元件表面, 這種方法**結合能力很強**

簡單來說先活化固體支持物或轉換元件表面上的官能基, 使官能基與生物辨識元件表面特定之官能基結合

雖然此法所固定的酵素較不易脫落, 但此種作用力易受酸鹼度, 離子強度, 溫度等環境因素影響。



固定化機制流程

限入法

某些高分子單體形成聚合物之時，同時加入酵素，當聚合物於電極表面凝結成薄膜時，酵素也包埋於高分子中，由於酵素基團較大，故被限制於內而無法自由移動，以達到固定的目的，同時由於待測物較小，可以自由進出此修飾與酵素進行反應；此法的聚合反應是高分子本身的特性，與酵素無關，故適用於大多數的酵素，而且酵素不易流失。

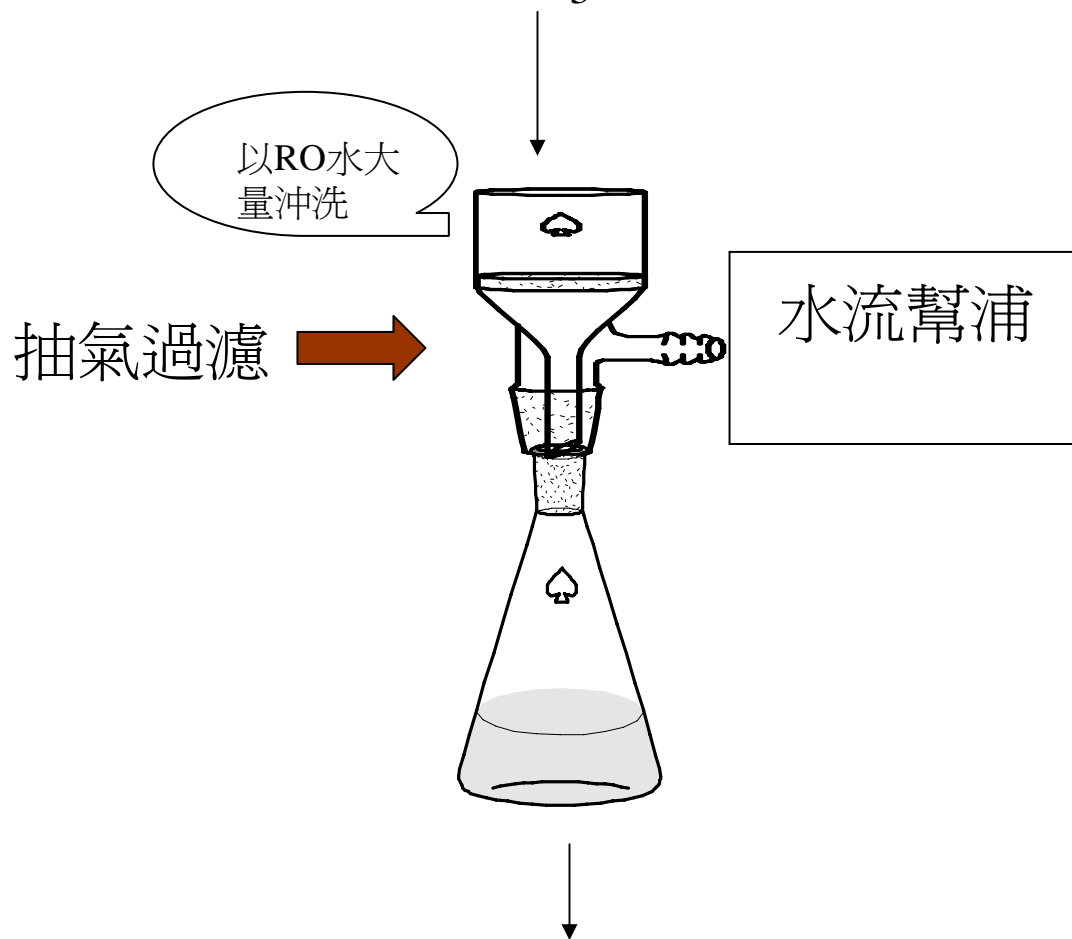
➔ 本實驗使用共價結合方法將葡萄糖氧化酵素固定於矽烷化之CPG, 固定葡萄糖氧化酵素將使用於後來之生物感測器實驗

➔ 限入法利用alginate在鈣離子溶液產生交聯結合成三度空間之網狀結構, 將酵母菌限入網狀結構中產生固定作用

實驗步驟:

CPG酸洗

CPG加入5% HNO_3 (80~90°C), 酸洗 1hr



至於95 °C烘箱內烘乾

CPG矽烷化

取1g酸洗過之CPG+18ml RO水+2ml γ -aminopropyltriethoxysilane(10%, v/v)

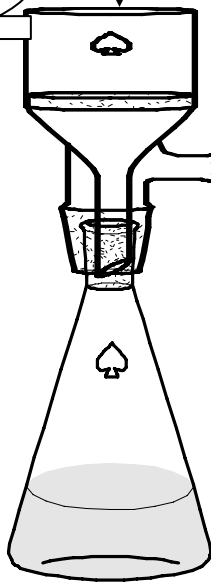
↓
用6N HCl中和, 調pH 3~4

↓
置於75 °C之熱水浴中2hr

以RO水大量沖洗

水流幫浦

抽氣過濾





置於115 °C烘箱內4hr

p.s上述的都已經準備好了

葡萄糖氧化酵素固定

精秤矽烷化之CPG 0.005g



加入1ml 2.5% glutaraldehyde

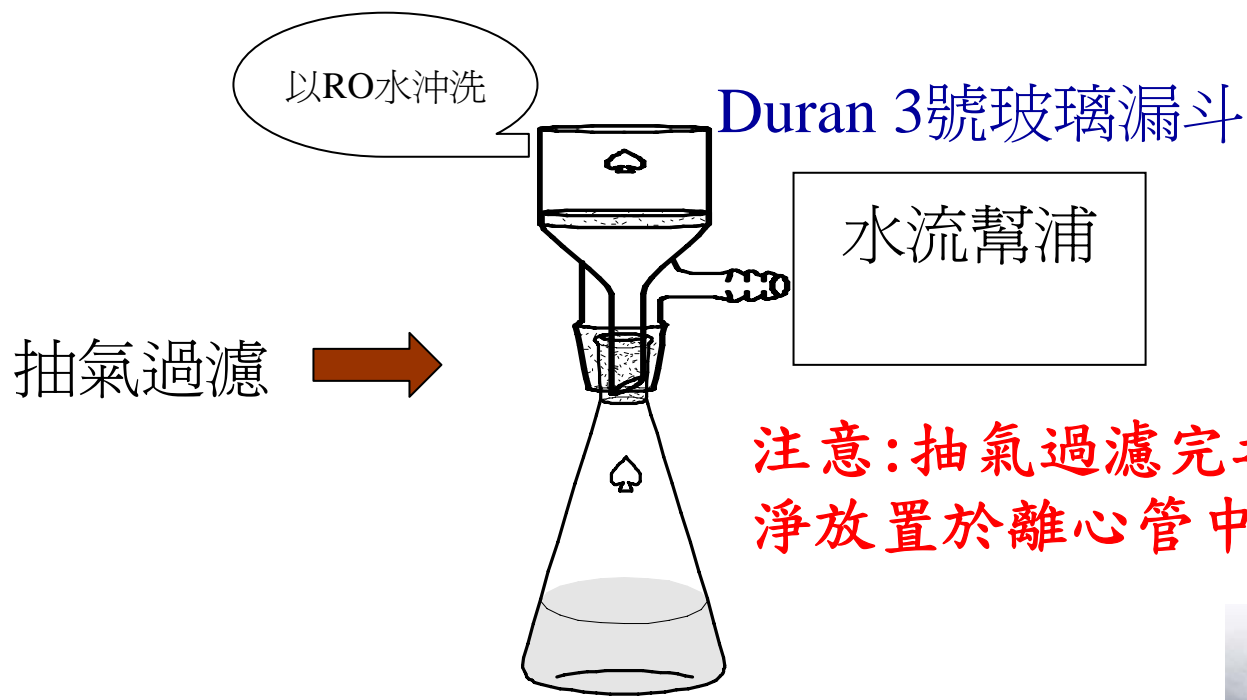


蓋緊,於室溫反應40min



顏色變為紫紅色或黃褐色





注意:抽氣過濾完之CPG需刮乾淨放置於離心管中

加入1 ml 葡萄糖氧化酵素溶液

蓋緊,先劇烈搖均勻,於室溫反應2hr



限入法固定酵母菌

➡ 稱0.1g sodium alginate溶於5ml R.O 於燒杯中



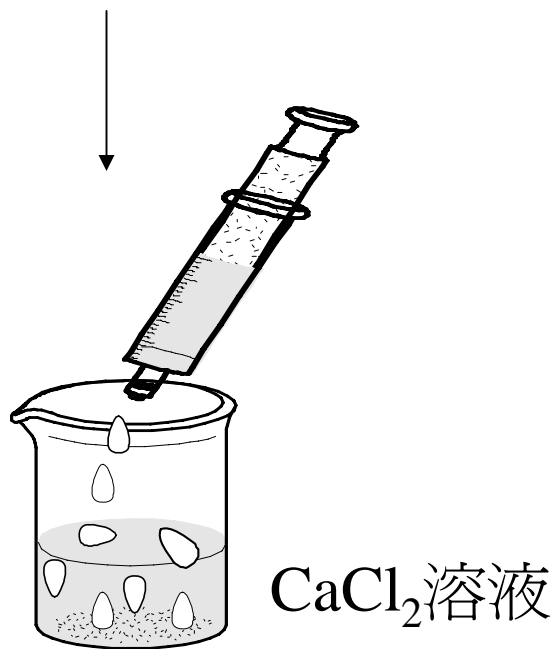
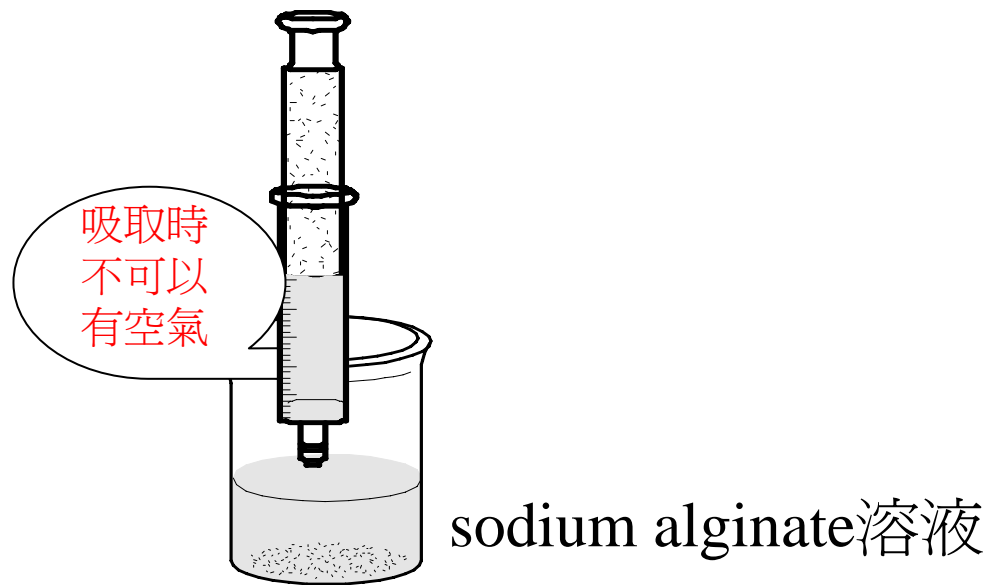
將0.2g傑克豆(Jack beam meal)溶入sodium alginate
溶液,攪拌兩分鐘

➡ 取0.6~0.7gCaCl₂溶於30 ml R.O於燒杯中(0.2M CaCl₂溶液)

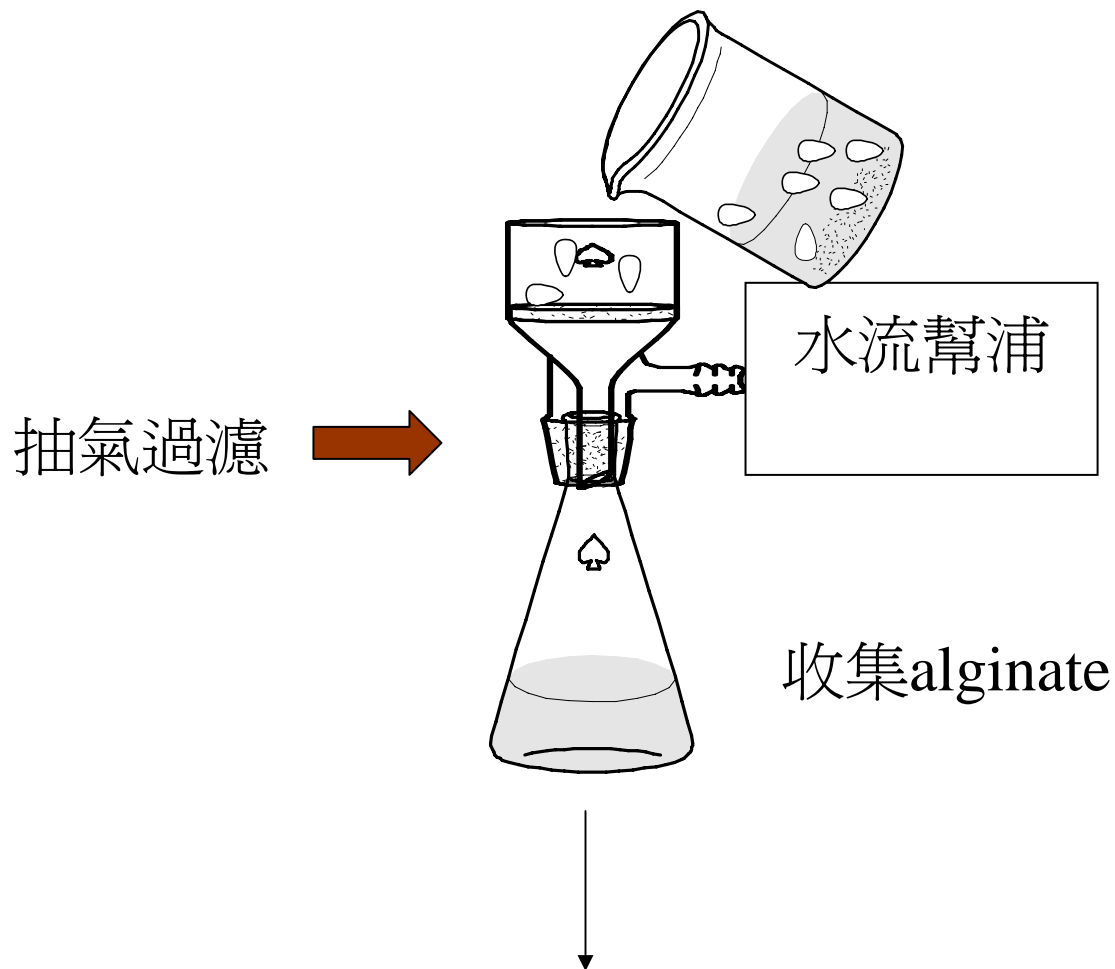


將上述傑克豆sodium alginate溶液吸入注射針筒中

(切記在吸取時不可以有空氣在裡頭)



Alginate bead 製作步驟



將收集的alginate溶於20ml 0.05M pH7磷酸鈉緩衝溶液
，於4 °C下存放以備下次使用