

國立臺灣大學工學院化學工程學系

碩士論文

Department of Chemical Engineering

College of Engineering


National Taiwan University

Master Thesis

探討鋅離子及銅離子對於與阿茲海默症 N-端突變家族

性遺傳相關乙型類澱粉胜肽之鍵結性質

Investigating the binding properties of  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  to  
beta-amyloid peptide with familial N-terminal mutations



廖宜凡

Yi-Fan Liao

指導教授：王勝仕 博士

Advisor: Sheng-Shih Wang, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

## 誌謝

兩年的時間轉瞬即逝，初進研究所時一無所知的我，如今能夠完成此篇論文，背後有太多值得感謝的人。首先最感謝的就是 王勝仕教授，若非教授的幫助我也不會有這個機會在中研院這個首屈一指的研究機構學習，對我的報告及論文寫作技巧的指導更是讓我受用不盡。

再來中研院的 陳韻如老師是我的另一個恩人，在這兩年的期間除了實驗技巧及工作態度等各方面指導外，更給予我許多的幫助與包容，並且一再的給我鼓勵，能夠遇見老師是我的福氣。

感謝陽明大學 林達顯教授、陽明大學 楊定一教授、中央研究院 陳佩燁老師百忙中抽空擔任口試委員，給予許多寶貴的意見使我了解不足之處及努力的方向。

也感謝台大實驗室學長冠男、文興、學姐攸怡，同學三毛、賴賴這兩年間的陪伴，這段期間裡每個人都給予我許多的幫助及支持，並且也替單調的研究生生活增添許多活力。

另外更要感謝中研院實驗室的宜鴻、育仁、天偉、士傑、榮傑、裕勝、曾二、明哲、軍宇學長及 Winny、昱君、微微學姐的幫助，在我實驗中遭遇到困難時所有人總是不吝給予建議及幫助。特別是宜鴻、育仁及天偉學長在這兩年中指導了我許多實驗方面的知識及技巧讓我獲益良多。

最後要感謝我的父母及好友們，在這段期間他們給予我的支持使我能心無旁騖的專注在研究上，若是將來能有任何成就都歸功於所有人的幫助，謹將此論文獻給所有我生命中的貴人。

## 摘要

目前阿茲海默症的研究中指出， $\beta$ -類澱粉蛋白( $\beta$ -amyloid peptide)是造成阿茲海默症最主要的致病原因，類澱粉前驅蛋白(amyloid precursor protein, APP)經由兩種蛋白酵素水解以後產生  $\beta$ -類澱粉蛋白，而此種蛋白會在腦中造成不正常聚集(aggregation)，形成具有神經毒性(neurotoxicity)的腦部斑塊(plaque)，進一步造成神經細胞受損，此種學說稱之為類澱粉蛋白致病假說(amyloid cascade hypothesis)。

依照發生時間的不同，阿茲海默症又可被分為家族性(familial)及偶發性(sporadic)兩種，前者往往是因為遺傳突變基因導致早發性(early-onset)阿茲海默症的發生，且研究發現此類型患者其  $\beta$ -類澱粉蛋白聚集之機制往往與其他人有顯著的不同。

此外，對阿茲海默症患者的腦部研究後發現，在其斑塊中鋅、銅、鐵、鋁等金屬離子也發生堆積的現象，因此金屬離子被懷疑可能是誘導  $\beta$ -類澱粉蛋白產生聚集的可能因素之一。

本實驗為研究鋅、銅離子與原生型、及各種突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白之間作用力，以試著找出金屬離子與  $\beta$ -類澱粉蛋白之鍵結結構(coordination)，首先試著生產與純化  $^{15}\text{N}$  標記的原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白以進行  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC 之實驗，然而由於 TEV 蛋白酶之切割產率過差，且最後 HPLC 之純化無法將帶有 histag 之融合蛋白有效分離，此實驗流程有待進一步之研究與改良，若假設蛋白酶之切割率為 100%則約可獲得 0.4mg/L 之產率。

接下來試著以金屬離子對原生型及突變型的合成胜肽(synthetic peptide)進行滴定，並以各種光學法及 ITC 來比較其差異性。自身螢光的結果中顯示，在與鋅離子結合時，H6A 及 H6R 兩種突變型與其他的突變型有明顯的差異。Bis-ANS 螢光結果則可發現，當銅離子與  $\beta$ -類澱粉蛋白結合時，疏水性裸露區域減少，鋅離子與  $\beta$ -類澱粉蛋白結合時疏水性裸露區域則增加，可見鋅、銅離子與  $\beta$ -類澱粉蛋白之結合機制必定有所不同。而 H6A、H6R 與鋅離子結合之 Bis-ANS 光譜也可發現與其他類型蛋白有所不同。圓二色光譜之研究發現， $\beta$ -類澱粉蛋白單體在利用氫氧化鈉去摺疊法製備時其二級結構為不規則形(random coil)，在對鋅、銅離子滴定时未有發現顯著的二級結構變化。

本研究中也利用各種不同之結合公式擬合(fitting)自身螢光之滴定結果來探討金屬離子與不同  $\beta$ -類澱粉蛋白之解離係數，同時也將利用 ITC 滴定之結果以與其比較。最後發現整體結合公式(total binding equation)最能充分描述我們在自身螢光滴定實驗下所獲得的結果，原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白與銅、鋅離子之解離常數分別為 3.86、4.26 $\mu$ M，與 ITC 之結果 3.79、4.27 $\mu$ M 幾乎完全相同。

由本研究之結果發現，H<sub>6</sub>之突變型滴定曲線與其他類型相比確有較大之差異存在，然而是否代表其鍵結機構不同於其他類型，仍有待進一步查證。我們認為，若能完成光誘導交聯法及二維異核化學位移相關光譜之結果必能更進一步確認實驗之結果。

關鍵字： $\beta$ -類澱粉蛋白、金屬離子、光譜法、滴定曲線



## Abstract

The previous studies show that  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ), the product from amyloid precursor protein (APP) cut by two secretase sequentially, is the major cause of Alzheimer's disease (AD). Misfolding of this peptide can lead to the formation of neurotoxic plaque in human brain, causing the neuron damaged. This hypothesis is called the amyloid cascade hypothesis.

According to the different times of onset, AD can be categorized into two types: familial and sporadic forms. For the familial type, the early onset of AD is attributed to the gene mutation. Also, it has been reported that the aggregation mechanism of familial Alzheimer's disease (FAD) is different from others.

In addition, the accumulation of  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , and  $Al^{3+}$  is observed when investigating AD patient's brain tissue, implying that metal ion may be one of the factors that induces the aggregation of  $A\beta$ .

In our study, we investigated the interaction between  $Zn^{2+}$  or  $Cu^{2+}$  and WT or mutants, and tried to understand the binding coordination between them. First, we expressed and purified  $^{15}N$  labeled  $A\beta_{40}$  WT and mutants for  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC experiments. Assuming that the cutting efficiency of the TEV protease is 100%, the yield of  $^{15}N$  labeled  $A\beta$  is estimated to be around 0.4 mg/L. We concluded that, due to the poor cutting efficiency of our TEV protease, we were not able to successfully separate fusion protein from pure protein using HPLC. Further improvement of our experimental conditions and procedures is needed.

Next, we tried to titrate the wild type and mutation form of synthetic  $A\beta$  with metal ions and examine the differences using spectrometry and ITC. When interacting with zinc ion, our intrinsic fluorescence and bis-ANS fluorescence results showed that the binding behaviors of H6A and H6R peptides were significantly different from others. Also, we found in our bis-ANS fluorescence results that the hydrophobic exposure area was found to decrease upon binding with copper ion, whereas opposite trend was detected in the case of zinc ion, evidently suggesting that the binding actions of  $A\beta$  with copper ion and zinc ion are different. In addition, our CD data indicated that  $A\beta$  monomer from NaOH preparation exist mainly in random coil structure and its secondary structure was not considerably influenced by the addition of metal ions.

Furthermore, apart from fitting the intrinsic fluorescence data against different model equations to estimate the magnitudes of dissociation constant between A $\beta$  and metal ions, we also compared these estimated values of dissociation constant with the ones obtained from ITC experiment. We found that the total binding equation can best fit our results. The dissociation constant of A $\beta$  with copper and zinc ions were determined to be 3.86 and 4.26  $\mu$ M, respectively, which are very close to the values, 3.79 and 4.27 $\mu$ M, obtained from ITC measurements.

In summary, our study showed that, while H<sub>6</sub> mutants have significantly different titration behavior from others, further confirmation is still needed to verify whether the coordination is different or not. We think performing the photo-induced cross-linking of unmodified proteins along with heteronuclear single quantum coherence spectroscopy can certainly aid in better understanding the underlying binding mechanism(s).

Key words:  $\beta$ -amyloid, metal ions, spectrometry, titration curve



## 目錄

誌謝 .....	I
摘要 .....	II
Abstract.....	IV
目錄 .....	VI
表目錄 .....	X
圖目錄 .....	XI
第一章 緒論 .....	1
第二章 文獻回顧 .....	2
2-1 神經退化性疾病(neurodegenerative disease).....	2
2-1-1 類澱粉症(Amyloidosis).....	2
2-1-2 阿茲海默症 .....	4
2-1-3 類澱粉前驅蛋白(amyloid precursor protein , APP)與 $\beta$ -類澱粉蛋白 之形成 .....	5
2-1-4 類澱粉蛋白致病假說(amyloid cascade hypothesis) 與 $\beta$ -類澱粉蛋白 之聚集 .....	7
2-1-5 家族性阿茲海默症(Familial alzheimer's disease).....	9
2-1-6 金屬離子對阿茲海默症之影響 .....	12
2-2 蛋白質檢測方法簡介與原理 .....	16
2-2-1 自身螢光光譜 .....	16
2-2-2 Bis-ANS 螢光光譜 .....	18
2-2-3 圓二色光譜 .....	19
2-2-4 恆溫滴定量熱儀 .....	21
2-2-5 核磁共振圖譜 .....	22
2-2-6 蛋白質膠體電泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE).....	23
2-2-7 蛋白質免疫轉漬法(immunoblotting) .....	24
2-2-8 蛋白質定量法 .....	25
2-2-9 光誘導交聯法(photo-induced cross-linking of unmodified proteins,	

PICUP).....	27
第三章 研究動機.....	28
第四章 實驗裝置、藥品與步驟.....	29
4-1 實驗儀器.....	29
4-2 實驗藥品.....	30
4-3 實驗步驟.....	32
4-3-1 溶液配製.....	32
4-3-1-1 HEPES buffer 配製.....	32
4-3-1-2 Tris buffer 配製.....	32
4-3-1-3 金屬離子溶液配製.....	32
4-3-1-4 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液配製.....	32
4-3-1-5 LB broth 配製.....	33
4-3-1-6 M9 broth 配製.....	33
4-3-1-7 Lysis buffer 配製.....	33
4-3-1-8 TBST 溶液配製.....	33
4-3-1-9 Transfer buffer 配製.....	34
4-3-1-10 Tricine-SDS-PAGE buffer 配製.....	34
4-3-1-11 FPLC buffer 配製.....	35
4-3-1-12 HPLC buffer 配製.....	35
4-3-2 以自身螢光觀察金屬離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白及其突變種之鍵結關係.....	36
4-3-3 以 Bis-ANS 螢光觀察金屬離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白及其突變種之鍵結關係.....	36
4-3-4 以圓偏極光觀察金屬離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白及其突變種之鍵結關係.....	37
4-3-5 以恆溫滴定量熱儀觀察金屬離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白及其突變種之鍵結關係.....	37
4-3-6 以二維異核化學位移相關光譜觀察金屬離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白及其突變種之鍵結關係.....	37
4-3-6-1 pET14b-A $\beta$ <sub>40</sub> 質體抽取.....	37



4-3-6-2 以定點突變(site-directed mutagenesis)獲得突變型 pET14b-A $\beta$ <sub>40</sub> 表現型菌株.....	38
4-3-6-3 含有 <sup>15</sup> N 標記之原生型/突變型重組 A $\beta$ <sub>40</sub> 蛋白的表現及純化 .....	39
4-3-6-4 以 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)進行蛋白質成份分析 .....	41
4-3-6-5 以免疫轉漬法(immunoblot)分析蛋白質之成分 .....	42
4-3-6-6 以 Bradford assay 定量蛋白質濃度 .....	43
4-3-7 以光誘導交聯法檢驗蛋白質形成寡體差異性 .....	44
4-3-8 以自動滴定儀進行去摺疊及再折疊實驗 .....	44
第五章 實驗結果與討論 .....	45
5-1 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液配製 .....	45
5-2 鋅、銅離子對原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體滴定之自身螢光光譜 .....	48
5-3 鋅、銅離子對原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體滴定之 Bis-ANS 光譜 .....	59
5-4 鋅、銅離子對原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體滴定之圓二色光譜 .....	66
5-5 不同方法獲得之滴定曲線比較與自身螢光滴定曲線之 fitting .....	69
5-6 以恆溫滴定量熱儀測量鋅、銅離子與原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白之結合常數 .....	86
5-7 <sup>15</sup> N labeled 原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白之表現與純化 .....	102
5-7-1 藉由定點突變獲得突變型 pET14b-A $\beta$ <sub>40</sub> 質體 .....	102
5-7-2 <sup>15</sup> N labeled 原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白之表現與純化 .....	103
第六章 結論與建議 .....	108
6-1 <sup>15</sup> N- A $\beta$ <sub>40</sub> 之生產與純化 .....	108
6-2 以光譜法檢測原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬之結合關係 .....	109
6-3 以恆溫滴定量熱儀檢測原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬之結合關係 .....	110
6-4 建議及未來展望 .....	110
附錄 .....	111
附錄 A 利用 Quick Change Primer Design Program 設計引子 .....	111
附錄 B 以自動滴定儀進行去摺疊與再折疊實驗 .....	113

附錄 C TEV-A $\beta_{40}$ -pET14b 質體之序列 .....	117
附錄 D 自身螢光滴定曲線與 Total binding fitting 曲線 .....	118
附錄 E 縮寫表 .....	130
參考文獻 .....	131



## 表目錄

表 2-1-1、類澱粉症與致病蛋白一覽表 .....	3
表 2-1-2、類澱粉前驅蛋白之基因突變與形成之蛋白質序列 .....	10
表 2-1-3、突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白支鏈性質變化 .....	11
表 2-1-4、 $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬離子配位結構文獻整理 .....	14
表 2-1-5、 $\beta$ -類澱粉蛋白與銅離子結合常數估算文獻整理 .....	14
表 2-1-6、 $\beta$ -類澱粉蛋白與鋅離子結合常數估算文獻整理 .....	15
表 2-2-1、芳香族胺基酸之螢光特徵 .....	18
表 2-2-2、芳香族胺基酸在不同環境下螢光特徵 .....	18
表 2-2-3、蛋白質二級結構之原二色光譜特徵峰 .....	20
表 2-2-4、蛋白質定量方法與性質 .....	26
表 5-1-1、以 Beer's law 推估配製之 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液濃度 .....	46
表 5-1-2、以 Bradford assay 與光譜法進行蛋白質定量之比較 .....	46
表 5-5-1、以 one-site specific binding equation 對自身螢光滴定曲線 fitting 之結果 .....	72
表 5-5-2、以 total binding equation 對自身螢光滴定曲線 fitting 之結果 .....	72
表 5-5-3、以 single-site depletion binding equation 對自身螢光滴定曲線 fitting 之結果 .....	72
表 5-6-1、銅離子對原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白以 ITC 滴定所獲得之熱力學參數 .....	87
表 5-6-2、鋅離子對原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白以 ITC 滴定所獲得之熱力學參數 .....	87
表 5-6-3、以 ITC 及自身螢光所量測之解離常數比較 .....	88
表 5-7-1、定點突變所使用之引子序列 .....	102
表 5-7-2、各突變型基因序列之比對結果 .....	102
表 A-1、Quick Change Primer Design Program 結果 .....	112

## 圖目錄

圖 2-1-2、APP 代謝之兩種不同途徑示意圖 .....	6
圖 2-1-3、 $\beta$ -類澱粉蛋白之序列與 $\beta$ -sheet 結構.....	8
圖 2-1-4、 $\beta$ -類澱粉蛋白聚集示意圖 .....	8
圖 2-1-5、類澱粉蛋白致病假說示意圖 .....	9
圖 2-1-6、已發現類澱粉前驅蛋白序列上之各種突變型 .....	11
圖 2-1-7、 $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬結合之可能結構示意圖 .....	16
圖 2-2-1、Bis-ANS 在不同比例(乙醇：水)溶劑中螢光強度變化.....	19
圖 2-2-2、Bis-ANS 之分子結構圖.....	19
圖 2-2-3、蛋白質二級結構之圓二色光譜特徵 .....	20
圖 2-2-4、恆溫滴定量熱儀之構造示意圖 .....	21
圖 2-2-5、SDS-PAGE 原理示意圖 .....	24
圖 2-2-7、光誘導交聯法之原理示意圖 .....	27
圖 5-1-1、原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液 DU800 吸收光譜.....	47
圖 5-1-2、利用牛血清蛋白為標準品所獲得之 Bradford assay 校正曲線.....	47
圖 5-2-1、銅離子對緩衝溶液滴定曲線 .....	50
圖 5-2-2、鋅離子對緩衝溶液滴定曲線 .....	51
圖 5-2-3、原生型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液濃度改變對自身螢光強度影響測試.....	52
圖 5-2-4、原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以銅離子滴定之自身螢光光譜 .....	53
圖 5-2-5、原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以鋅離子滴定之自身螢光光譜 .....	54
圖 5-2-6、原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液銅離子滴定前後自身螢光改變之 比例.....	55
圖 5-2-7、原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液鋅離子滴定前後自身螢光改變之 比例 .....	56
圖 5-2-8、原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以自身螢光測定之銅離子滴定曲 線 .....	57

圖 5-2-9、原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以自身螢光測定之鋅離子滴定曲線 .....	58
圖 5-3-1、原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以銅離子滴定之 Bis-ANS 光譜 .....	60
圖 5-3-2、原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以鋅離子滴定之 Bis-ANS 光譜 .....	61
圖 5-3-3、原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液銅離子滴定前後 Bis-ANS 螢光改變之比例 .....	62
圖 5-3-4、原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液銅離子滴定前後 Bis-ANS 螢光改變之比例 .....	63
圖 5-3-5、原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以 Bis-ANS 螢光測定之銅離子滴定曲線 .....	64
圖 5-3-6、原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以 Bis-ANS 螢光測定之鋅離子滴定曲線 .....	65
圖 5-4-1、以銅離子對原生型 $\beta$ -類澱粉蛋白滴定之圓二色光譜 .....	67
圖 5-4-2、以圓二色光譜獲得之鋅、銅離子對原生型 $\beta$ -類澱粉蛋白之滴定曲線 ..	68
圖 5-5-1、以不同光譜法得到之銅離子對原生型 $\beta$ -類澱粉蛋白滴定曲線比較 .....	74
圖 5-5-2、以不同光譜法得到之鋅離子對原生型 $\beta$ -類澱粉蛋白滴定曲線比較 .....	75
圖 5-5-3、以不同光譜法得到之銅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 D7A 滴定曲線比較 .....	76
圖 5-5-4、以不同光譜法得到之鋅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 D7A 滴定曲線比較 .....	77
圖 5-5-5、以不同光譜法得到之銅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 D7H 滴定曲線比較 .....	78
圖 5-5-6、以不同光譜法得到之鋅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 D7H 滴定曲線比較 .....	79
圖 5-5-7、以不同光譜法得到之銅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 D7N 滴定曲線比較 .....	80
圖 5-5-8、以不同光譜法得到之鋅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 D7N 滴定曲線比較 .....	81
圖 5-5-9、以不同光譜法得到之銅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 H6A 滴定曲線比較 .....	

.....	82
圖 5-5-10、以不同光譜法得到之鋅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 H6A 滴定曲線比較	82
.....	83
圖 5-5-11、以不同光譜法得到之銅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 H6R 滴定曲線比較	83
.....	84
圖 5-5-12、以不同光譜法得到之鋅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 H6R 滴定曲線比較	84
.....	85
圖 5-6-1、銅離子對原生型 $\beta$ -類澱粉蛋白之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。	90
圖 5-6-2、鋅離子對原生型 $\beta$ -類澱粉蛋白之 ITC 滴定曲線(左)。以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。	91
圖 5-6-4、鋅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 D7A 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。	93
圖 5-6-5、銅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 D7H 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。	94
圖 5-6-6、鋅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 D7H 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。	95
圖 5-6-7、銅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 D7N 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。	96
圖 5-6-8、鋅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 D7N 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。	97
圖 5-6-9、銅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 H6A 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。	98
圖 5-6-10、鋅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 H6A 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。	99
圖 5-6-11、銅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 H6R 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。	100
圖 5-6-12、銅離子對突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白 H6R 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。	101
圖 5-7-1、 <i>E. coli</i> BL21(DE3*)在 M9 中	104

圖 5-7-2、以鎳親和管柱純化之融合蛋白 SDS-PAGE .....	105
圖 5-7-3、原生型 A $\beta$ <sub>40</sub> 之 HPLC 層析圖 .....	106
圖 5-7-4、以 Dot blotting 分析 HPLC 純化之產物 .....	106
圖 5-7-5、以 SDS-PAGE 分析之 HPLC 各時間產物 .....	107
圖 B-1、自動滴定裝置設定示意圖 .....	114
圖 B-2、去折疊實驗光譜 .....	114
圖 B-3、再折疊實驗光譜 .....	115
圖 B-4、以 GdnHCl 進行之 RNaseA 滴定曲線(4ml cuvette).....	115
圖 B-5、以 GdnHCl 進行之 RNaseA 滴定曲線(0.7ml cuvette).....	116
圖 B-6、文獻之滴定曲線 .....	116
圖 C-1、TEV-A $\beta$ <sub>40</sub> -pET14b 質體之序列 .....	117
圖 D-1、以 total binding equation fitting 之銅離子與 A $\beta$ <sub>40</sub> WT 滴定曲線(上)及 residue(下).....	118
圖 D-2、以 total binding equation fitting 之鋅離子與 A $\beta$ <sub>40</sub> WT 滴定曲線(上)及 residue(下).....	119
圖 D-3、以 total binding equation fitting 之銅離子與 A $\beta$ <sub>40</sub> D7A 滴定曲線(上)及 residue(下).....	120
圖 D-4、以 total binding equation fitting 之鋅離子與 A $\beta$ <sub>40</sub> D7A 滴定曲線(上)及 residue(下).....	121
圖 D-5、以 total binding equation fitting 之銅離子與 A $\beta$ <sub>40</sub> D7H 滴定曲線(上)及 residue(下).....	122
圖 D-6、以 total binding equation fitting 之鋅離子與 A $\beta$ <sub>40</sub> D7H 滴定曲線(上)及 residue(下).....	123
圖 D-7、以 total binding equation fitting 之銅離子與 A $\beta$ <sub>40</sub> D7N 滴定曲線(上)及 residue(下).....	124
圖 D-8、以 total binding equation fitting 之鋅離子與 A $\beta$ <sub>40</sub> D7N 滴定曲線(上)及 residue(下).....	125
圖 D-9、以 total binding equation fitting 之銅離子與 A $\beta$ <sub>40</sub> H6A 滴定曲線(上)及 residue(下).....	126
圖 D-10、以 total binding equation fitting 之鋅離子與 A $\beta$ <sub>40</sub> H6A 滴定曲線(上)及	

residue(下).....	127
圖 D-11、以 total binding equation fitting 之銅離子與 $A\beta_{40}$ H6R 滴定曲線(上)及 residue(下).....	128
圖 D-12、以 total binding equation fitting 之鋅離子與 $A\beta_{40}$ H6R 滴定曲線(上)及 residue(下).....	129





## 第一章 緒論

蛋白質是人體正常功能運行不可或缺的一部分，然而其異常的結構改變卻也可能造成疾病的發生；其中一類蛋白被稱為類澱粉蛋白(amyloid protein)，此種蛋白容易形成  $\beta$ -sheet 的結構並且發生自行堆疊，在阿茲海默症(Alzheimer's Disease)的患者腦中便發現有此類型蛋白(A $\beta$ )的堆積，被認為是造成阿茲海默症的可能原因。

阿茲海默症是一種神經退化性疾病(neurodegenerative disease)，也是失智症最常見的成因，通常發生在年齡六十五歲以上年長者，然而其中一部分與家族遺傳相關的患者在三十到六十歲之間就有可能發病，此類型患者被稱為早發的(early onset)家族性阿茲海默症(familial Alzheimer's disease, FAD)。

已知有三種染色體基因突變與家族性阿茲海默症有關，分別是 Presenilin 1, Presenilin 2 及類澱粉前驅蛋白(Amyloid Precursor Protein, APP)，其中 APP 經由  $\beta$ -secretase 及  $\gamma$ -secretase 兩種酵素依序剪切後形成  $\beta$ -類澱粉蛋白，因此部分 APP 上的突變使其產生突變型式的  $\beta$ -類澱粉蛋白，一些證據顯示此結果影響早發性阿茲海默症的發生。

在阿茲海默疾病患者類澱粉蛋白聚集形成的腦部斑塊(plaque)中，被發現有不正常的金屬離子—特別是銅離子及鋅離子的大量堆積，被認為是影響類澱粉蛋白  $\beta$  聚集的可能因素之一。

許多研究指出，這些金屬離子會與  $\beta$ -類澱粉蛋白形成錯合物，大多研究結果皆顯示金屬與  $\beta$ -類澱粉蛋白的結合與位在第六、十三、及十四位置帶正電的組胺酸(histidine)有關，然而真正之鍵結機制及結構仍然未有定論。

於此論文處我們針對原態(native)及突變型(mutant)的類澱粉蛋白  $\beta_{40}$  (H6R、D7H、D7N、H6A、D7A)與鋅、銅離子的結合關係進行探討。藉由自發性螢光光譜、Bis-ANS 螢光光譜、圓二色光譜(Circular Dichroism, CD)、核磁共振譜(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)以及恆溫熱滴定儀(Isothermal Titration Calorimetry, ITC)，試著了解這些胺基酸的改變與金屬結合的關聯，進一步幫助阿茲海默症治療藥物的設計。

## 第二章 文獻回顧

### 2-1 神經退化性疾病(neurodegenerative disease)

神經退化性疾病泛指因神經元(neurons)的結構或功能喪失甚至死亡所造成的疾病。神經元為構成腦部及脊髓(spinal cord)的重要成分，且不易再生，一旦受損將對人體造成永久性的傷害。依照外顯症狀，神經退化性疾病可分為造成運動問題的運動失調症(ataxia)及造成記憶問題的失智症(dementia)<sup>1</sup>。

#### 2-1-1 類澱粉症(Amyloidosis)

部分神經退化性疾病與不正常摺疊的蛋白質(misfolded proteins)有關，蛋白質在體內合成的過程中有時會發生錯誤摺疊(misfolding)而造成蛋白質構形(conformation)改變，通常體內的蛋白酶(protease)會將這些蛋白質分解(digest)，然而類澱粉蛋白通常會形成具有 $\beta$ -曲折平面( $\beta$ -pleated sheets)的構型，此種構形具有疏水性(hydrophobic)的特質，使蛋白酶無法作用，進一步造成類澱粉蛋白的不正常聚集(aggregation)與沉積(deposition)，最後導致細胞的死亡<sup>2,3</sup>。

此沉積現象可能是全身性(systemic)也可能是局部性(organ-specific)的發生，大部分的類澱粉症具有遺傳性，肇因於前驅蛋白(precursor protein)基因的突變。

直到2010年為止已發現至少三十種以上澱粉症與相關之蛋白，如 $\alpha$ -synuclein、 $\beta$ -amyloid、 $\beta_2$ -microglobulin、Insulin等，各種類澱粉蛋白及相關疾病列於表2-1-1中。

表 2-1-1、類澱粉症與致病蛋白一覽表

類澱粉症名稱	致病蛋白
神經退化性疾病(neurodegenerative disease)	
Alzheimer's disease	Amyloid- $\beta$ peptide
Parkinson's disease	$\alpha$ -synuclein
Huntington's disease	Huntingtin with polyQ expansion
Amyotrophic lateral sclerosis	Superoxide dismutase 1
Spinocerebellar ataxias	Ataxins with polyQ expansion
Spinocerebellar ataxia 17	TATA box-binding protein with polyQ expansion
Spinal and bulbar muscular atrophy	Androgen receptor with polyQ expansion
Hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy	Atrophin-1 with polyQ expansion
Familial British dementia	ABri
Familial Danish dementia	ADan
非神經全身性疾病(Non-neuropathic systematic amyloidoses)	
AL amyloidosis	Immunoglobulin light chains or fragments
AA amyloidosis	Fragments of serum amyloid A protein
Senile systemic amyloidosis	Wild-type transthyretin
Familial amyloidotic polyneuropathy	Mutants of transthyretin
Hemodialysis-related amyloidosis	$\beta$ 2-Microglobulin
Finnish hereditary amyloidosis	Fragments of gelsolin mutants
Lysozyme amyloidosis	Mutants of lysozyme
Fibrinogen amyloidosis	Variants of fibrinogen $\alpha$ -chain
Icelandic hereditary cerebral amyloid angiopathy	Mutant of cystatin C

表 2-1-1、類澱粉症與致病蛋白一覽表(續)

非神經局部性疾病(Non-neuropathic localized diseases)	
Medullary carcinoma of the thyroid	Calcitonin
Type II diabetes	Amylin (islet amyloid polypeptide, IAPP)
Atrial amyloidosis	Atrial natriuretic factor
Hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis	Mutants of amyloid-b peptide
Pituitary prolactinoma	Prolactin
Injection-localized amyloidosis	Insulin
Aortic medial amyloidosis	Medin
Hereditary lattice corneal dystrophy	Mainly C-terminal fragments of kerato-epithelin
Corneal amyloidosis associated with trichiasis	Lactoferrin
Cataract	$\gamma$ -Crystallins
Pulmonary alveolar proteinosis	Lung surfactant protein C
Inclusion-body myositis	Amyloid-b peptide
Cutaneous lichen amyloidosis	Keratins

#### 2-1-2 阿茲海默症

阿茲海默症(Alzheimer's disease, AD)是由德國病理學家 Alois Alzheimer 發現並以其命名。一般好發於 65 歲以上年長者，約占失智症病例的 60%~80%。

此疾病會導致患者的記憶力喪失、邏輯能力衰退及判斷力的失去，並且症狀隨著時間不斷惡化，最終導致死亡，目前仍未發現任何治療方法。

美國有超過 500 萬人罹患阿茲海默症，每年花費在阿茲海默症患者的醫療照護費用高達 1000 億美元，平均每位患者一生所需耗費之照護經費約達 17 萬美元，隨著人口老化的趨勢可以預見罹患此疾病的人數將不斷增長，因此尋求預防與治療此疾病的方法是刻不容緩的議題。

阿茲海默症的病理特徵包含大腦皮質(cerebral cortex)及部分皮質下神經元(neurons)及突觸(synapses)的損失，進而造成腦組織萎縮。此外患者的腦部可發現由 $\beta$ -類澱粉蛋白聚集成類澱粉纖維斑塊(amyloid plaque)沉積與過度磷酸化(hyperphosphorylated)之 tau 蛋白聚集成神經纖維糾結(neurofibrillary tangles)，此二者皆被認為是阿茲海默症的可能致病因素<sup>4,5</sup>。

### 2-1-3 類澱粉前驅蛋白(amyloid precursor protein, APP)與 $\beta$ -類澱粉蛋白之形成

$\beta$ -類澱粉蛋白是由類澱粉前驅蛋白代謝形成，類澱粉前驅蛋白為一種穿膜蛋白(transmembrane protein)，因其部分胺基酸序列位於細胞膜內，另一部分則暴露在細胞膜外。

此蛋白質因 mRNA 的 alternative splicing 造成五種不同的蛋白質異構物(isoform)，分別為 APP593、APP695、APP714、APP751 及 APP770，其中又以 APP695 及 APP751 在人類腦部出現最多。此蛋白在人體的功能眾說紛紜，目前已知其可與金屬結合(鋅、銅)，APP751 及 APP770 具有 Kunitz 蛋白酶抑制，並具有神經營養(neurotrophyl)與吸附區域等等，但其真正主要功能至今仍無人知曉。

類澱粉前驅蛋白會受  $\alpha$ -secretase、 $\beta$ -secretase、及  $\gamma$ -secretase 三種不同的蛋白酶分解，因而產生兩個不同的代謝路徑。

第一種代謝途徑中， $\alpha$ -secretase 將類澱粉前驅蛋白切成可溶性的 N 端 APPs $\alpha$  及 C 端 APP-CTF $\alpha$ ，其中 APPs $\alpha$  被認為具有保護神經的作用，而留在細胞膜上的 APP-CTF $\alpha$  則接著被  $\gamma$ -secretase 切成 N-端的可溶 p3 片段及接在膜上的 C 端 AICD (APP intracellular domain)，AICD 被認為是一種與細胞核訊息傳遞有關的蛋白質。

在產生  $\beta$ -類澱粉蛋白的途徑中， $\beta$ -secretase 先將類澱粉前驅蛋白切成可溶性的 N 端 APPs $\beta$  及 C 端 APP-CTF $\beta$ ，緊接著  $\gamma$ -secretase 將 APP-CTF $\beta$  切成  $\beta$ -類澱粉蛋白與 AICD 兩個部分。

$\alpha$ -secretase 與  $\beta$ -secretase 在這個代謝的過程中處於競爭的狀態，因此不少學者亦致力於如何增加  $\alpha$ -secretase 的效率以減少  $\beta$ -類澱粉蛋白的產生<sup>6</sup>。

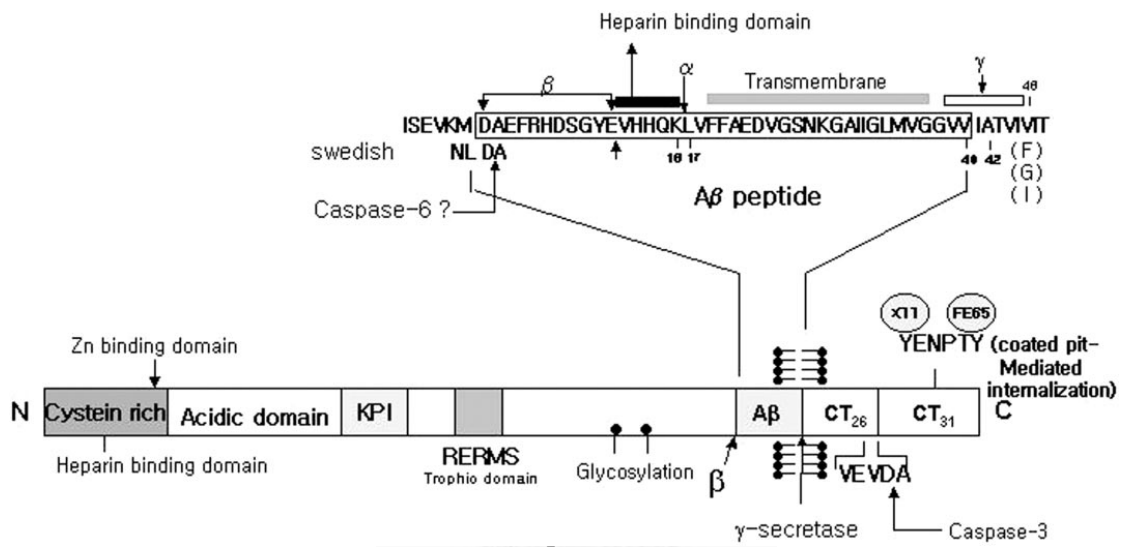


圖 2-1-1、APP 之結構與各區域之功能<sup>7</sup>

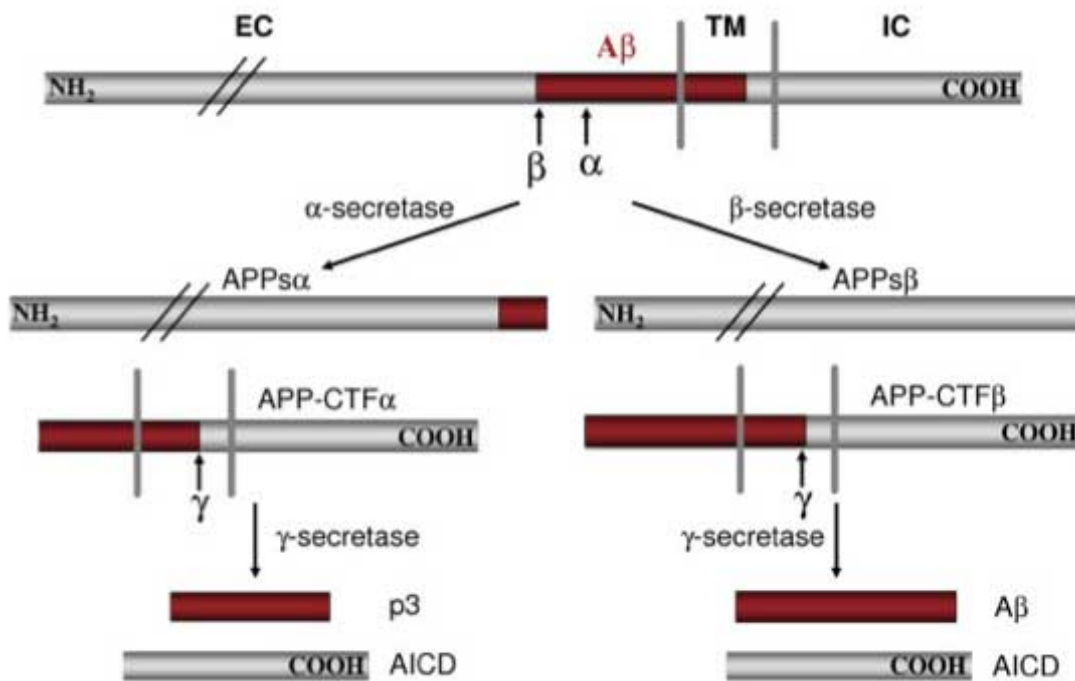


圖 2-1-2、APP 代謝之兩種不同途徑示意圖<sup>8</sup>

#### 2-1-4 類澱粉蛋白致病假說(amyloid cascade hypothesis) 與 $\beta$ -類澱粉蛋白之聚集

如 2-1-2 所述，在阿茲海默患者腦部中，可以發現被大量神經纖維糾結包圍的類澱粉纖維斑塊，以及顯著的神經細胞損失，然而究竟何者才是最初的致病因素，一直以來仍是極具爭議性的問題。

1991 年 John A. Hardy 和 Gerald A. Higgins 在 science 上發表了著名的類澱粉蛋白致病假說<sup>9</sup>，他們認為  $\beta$ -類澱粉蛋白的形成與聚集是阿茲海默症的起始因素，並直接導致了之後的神經纖維糾結、細胞死亡及失智症。而許多其他因素皆有可能啟始  $\beta$ -類澱粉蛋白的沉積，並間接導致阿茲海默症的發生。

如 2-1-4 所述， $\beta$ -類澱粉蛋白由類澱粉前驅蛋白代謝形成，隨 C 端長度不同可形成  $A\beta_{38-42}$  之不同形式。大部分的  $A\beta$  皆以  $A\beta_{40}$  的形式存在，然而  $A\beta_{42}$  較容易聚集與纖維化，為構成腦部斑塊的最主要成分，可見儘管只是數個胺基酸的差異也會對其性質造成極大影響。目前也有許多研究試著以斑塊中  $A\beta_{40}$  與  $A\beta_{42}$  的比例做為阿茲海默症診斷的依據<sup>10,11</sup>。

$\beta$ -類澱粉蛋白的單體(monomer)在溶液中呈現隨機狀之構形，然而在聚集的過程中轉變成為  $\beta$ -sheet 之構形。並經由數個單體的結合形成寡體(oligomer)，此過程稱為成核反應，需要較長的時間，一旦形成之後將快速結合形成纖維(fibril)並沉澱。目前研究證據指出，類澱粉蛋白形成的斑塊可能並不是造成細胞死亡的主要原因而是結果，反而是  $\beta$ -類澱粉蛋白形成之可溶性寡體被發現對細胞具有較高毒性，可能是真正導致細胞死亡的元兇<sup>12,13</sup>。

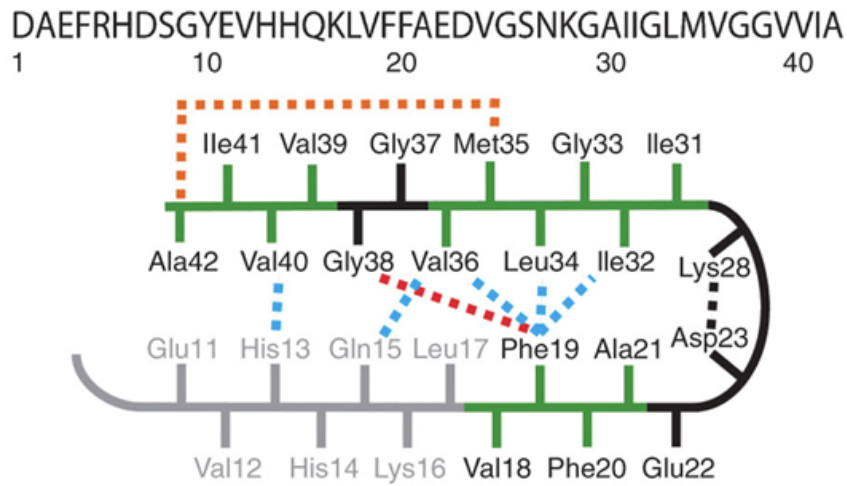


圖 2-1-3、 $\beta$ -類澱粉蛋白之序列與  $\beta$ -sheet 結構

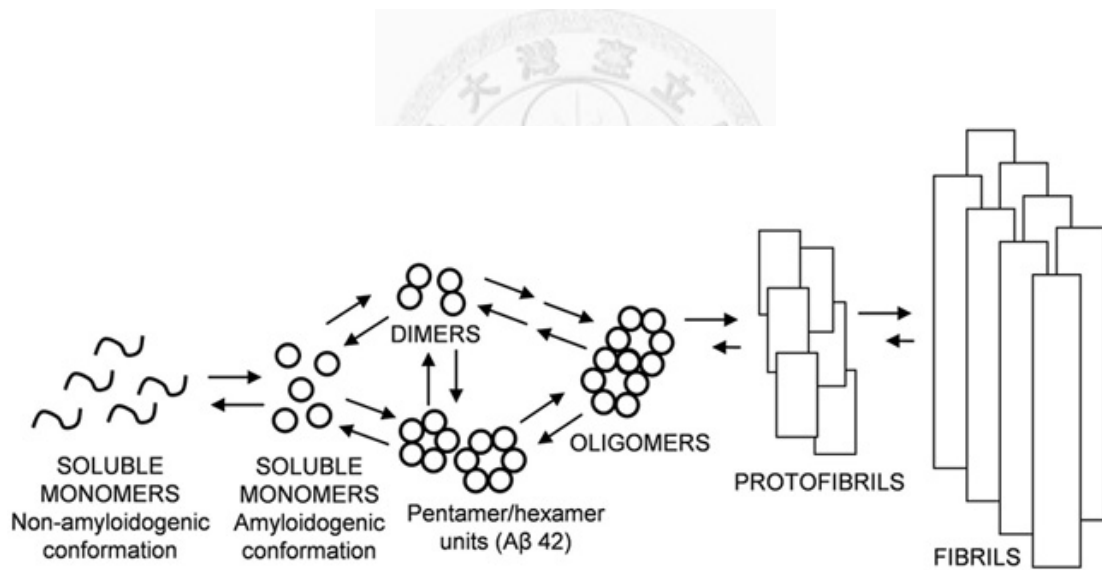


圖 2-1-4、 $\beta$ -類澱粉蛋白聚集示意圖<sup>14</sup>



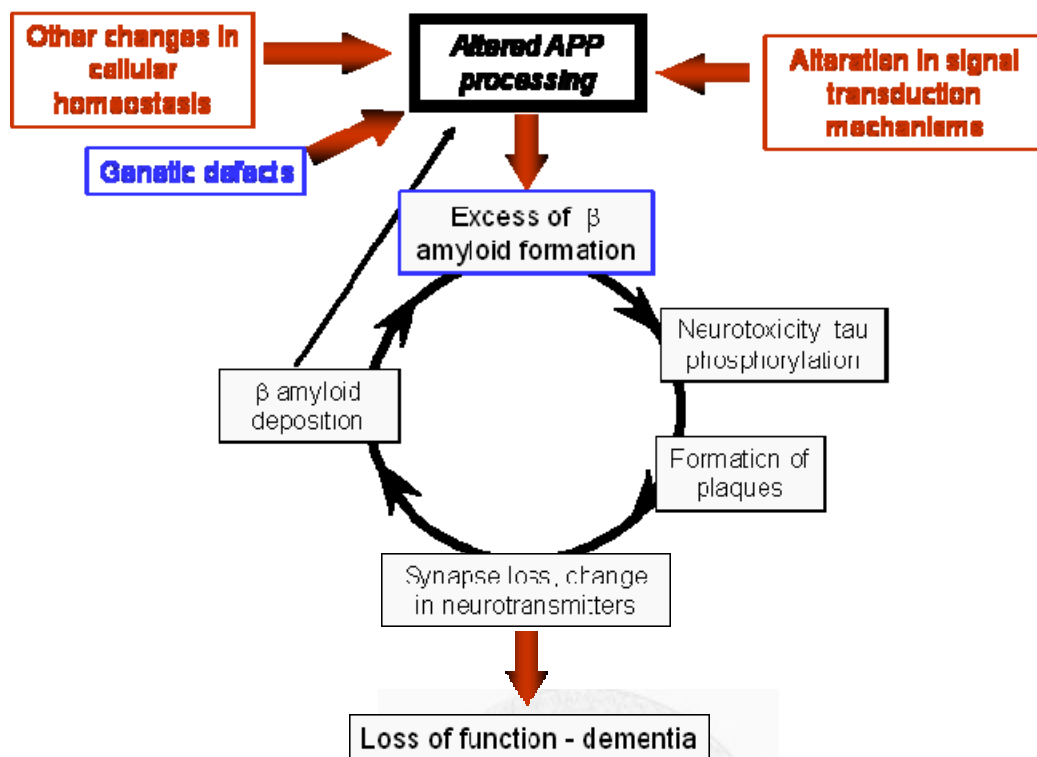


圖 2-1-5、類澱粉蛋白致病假說示意圖<sup>16</sup>

### 2-1-5 家族性阿茲海默症(Familial alzheimer's disease)

一般主要發生在六十五歲以上患者的稱為偶發性(sporadic)阿茲海默症，然而有部分的患者因為 Presenilin1、Presenilin2、或類澱粉前驅蛋白之基因突變 (mutation)，這些基因的突變會影響  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三種酵素的活性，影響 APP 的代謝途徑，導致家族遺傳性的阿茲海默症發生，此類型患者通常發病年齡較早，因此又稱為早發性(early onset)阿茲海默症。

表 2-1-2 為類澱粉前驅蛋白上之各種突變型，其名稱是由發現該病例之地點而決定。目前已發現的所有早發性突變基因可以在 Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database<sup>17</sup> 之網站找到。

其中在類澱粉前驅蛋白上之突變如果正好在  $\beta$ -類澱粉蛋白的序列上就會產生突變型的  $\beta$ -類澱粉蛋白，這些突變型的蛋白往往會有不同的聚集機制甚至結構進而導致阿茲海默症的發生。表 2-1-3 為突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白之整理。

表 2-1-2、類澱粉前驅蛋白之基因突變與形成之蛋白質序列

突變型	APP 序列	形成 A $\beta$ 序列	造成影響
Swedish	K670N M671L	-	顯著增加 $\beta$ -類澱粉蛋白之產生 <sup>18</sup>
English	H677R	H6R	加速 $\beta$ -類澱粉蛋白纖維形成 <sup>19,20</sup>
Japanese-Tottori	D678N	D7N	加速 $\beta$ -類澱粉蛋白纖維形成 <sup>19-21</sup>
Taiwanese	D678H	D7H	增加 $\beta$ -類澱粉蛋白寡體形成 <sup>22</sup>
Flemish	A692G	A21G	抑制 $\beta$ -secretase 作用 <sup>23</sup>
Dutch	E693Q	E22Q	加速 $\beta$ -類澱粉蛋白聚集 <sup>23,24</sup>
Italian	E693K	E22K	抑制蛋白酶降解 <sup>25</sup>
Arctic	E693G	E22G	抑制蛋白酶降解 <sup>25,26</sup>
Iowa	D694N	D23N	加速 $\beta$ -類澱粉蛋白聚集 <sup>27</sup>
French	V715M	-	造成 truncated form $\beta$ -類澱粉蛋白 <sup>28</sup>
German	V715A	-	A $\beta$ <sub>42</sub> /A $\beta$ <sub>40</sub> 比例升高 <sup>29</sup>
Florida	I716V	-	影響 $\gamma$ -secretase 作用 <sup>30,31</sup>
London	V717I	-	影響 $\gamma$ -secretase 作用 <sup>31</sup>
Indiana	V717G V717F	-	影響 $\gamma$ -secretase 作用 <sup>32</sup>
Australian	L723P	-	增加 $\beta$ -類澱粉蛋白之產生 <sup>33</sup>

表 2-1-3、突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白支鏈性質變化

突變型	胺基酸變化	支鏈性質變化
English	H6R	鹼性→更鹼，較大支鏈造成立體障礙 (stereo hinderance)
Japanese-Tottori	D7N	酸性→中性
Taiwanese	D7H	酸性→鹼性
Flemish	A21G	疏水→疏水，支鏈較小
Dutch	E22Q	酸性→中性
Italian	E22K	酸性→鹼性
Arctic	E22G	酸性→疏水
Iowa	D23N	酸性→親水

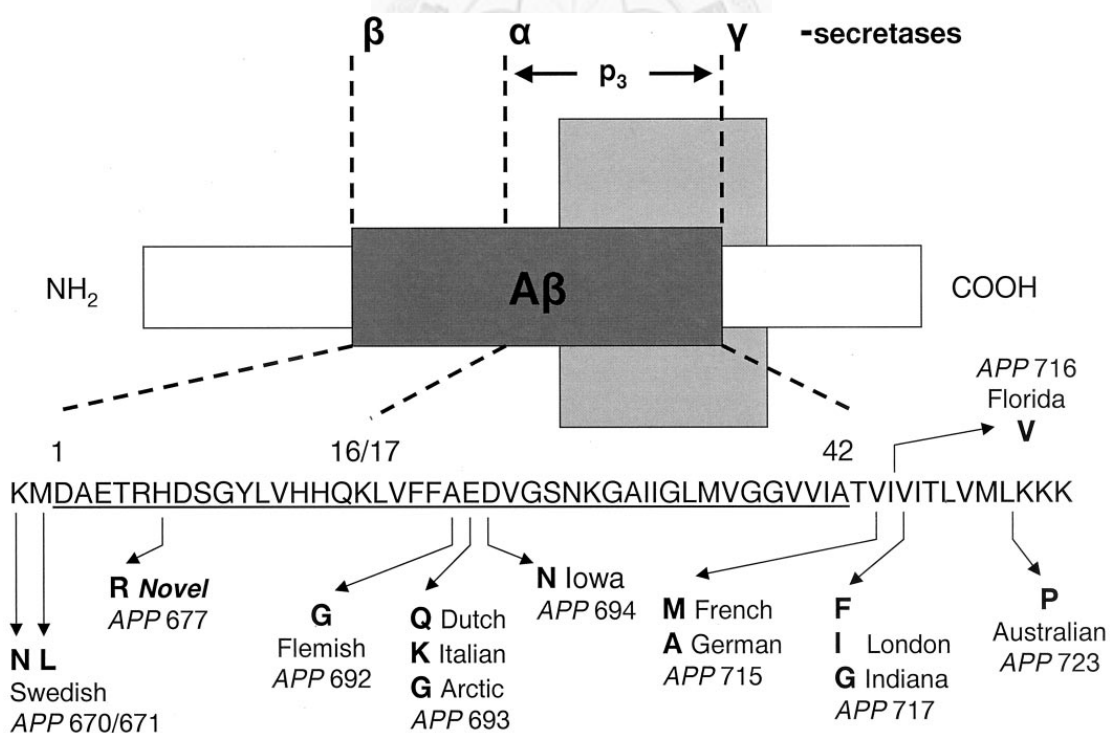


圖 2-1-6、已發現類澱粉前驅蛋白序列上之各種突變型<sup>34</sup>

## 2-1-6 金屬離子對阿茲海默症之影響

在腦部之中有許多反應需要金屬離子參與，相較於其他器官，腦部擁有較多的鋅、銅、鐵等過度金屬離子存在，長久以來腦中已發展出成熟的機制來保持這些金屬離子在腦中的恆定(homeostasis)。

然而在阿茲海默症患者的腦中，因為某種不明的機制此種恆定被破壞，導致異常高濃度的金屬離子存在<sup>35</sup>，可知金屬離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白之中必然存在某些關聯性，為了發展有效的療法，必須先瞭解金屬與蛋白間的交互作用及鍵結結構。目前研究指出，鋅、銅、鐵、鋁四種離子與阿茲海默症有密切的關係，一般認為這些金屬離子在阿茲海默症中扮演著加速 $\beta$ -類澱粉蛋白的聚集<sup>36-39</sup>以及產生活性自由基(reactive oxygen species, ROS)兩種角色，就算只是小於 $\mu\text{M}$ 濃度的金屬離子也被發現可幫助 $\beta$ -類澱粉蛋白的聚集。

銅離子在腦部斑塊中濃度高達 $\sim 400\mu\text{M}$ ，遠高於正常值 $0.2\sim 1.7\mu\text{M}$ <sup>35</sup>，研究指出此金屬堆積現象源自銅離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白之鍵結，部分實驗結果顯示此結合關係會顯著的加速 $\beta$ -類澱粉蛋白的聚集現象，此結果目前仍眾說紛紜，依照不同實驗條件(pH值、鹽類、銅離子濃度)也有人認為得到銅離子會抑制聚集現象發生。多數研究相信銅離子會促進不定形(amorphous)的聚集物產生，但也減少類澱粉纖維的產生。此外銅離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白的結合可使二價銅離子還原成一價亞銅離子，並產生具有高度毒性的自由基，為導致腦神經細胞死亡的原因之一<sup>40</sup>。

鋅離子在腦部斑塊中同樣有大於正常值的濃度( $\sim 1\text{mM}$ <sup>35</sup>)，研究發現鋅離子可以誘導 $\beta$ -類澱粉蛋白快速的形成沉積。 $\beta$ -類澱粉蛋白與鋅結合，在繼續聚集前形成暫態的穩定錯合物，之後造成較不定形的聚集產生。與銅離子相比，鋅離子被認為具有保護神經的作用，因其與銅離子 $\beta$ -類澱粉蛋白之結合關係會互相競爭，以達到減少自由基的結果。

為了瞭解金屬與 $\beta$ -類澱粉蛋白的關聯並且進一步設計治療方法，金屬離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白的配位(coordination)結構研究是十分重要的，目前已經利用許多不同技術研究，如核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)圖譜、電子順磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)圖譜、圓二色光圖譜(circular dichroism, CD)及質譜儀(mass spectrometry, MS)等等。雖詳細的結構仍未有定論，然可以確定的

是，各種實驗證據皆顯示  $\beta$ -類澱粉蛋白上的三個組胺酸(histidine)：H6, H13, H14 與 N 端蛋白質與金屬離子鍵結有密不可分的關係<sup>41</sup>。

研究認為  $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬的鍵結位置在 1~16 個胺基酸<sup>42-44</sup>，因此部分研究選用  $A\beta_{1-16}$  來進行此種實驗，因為此  $\beta$ -類澱粉蛋白片段不會發生聚集影響實驗。 $A\beta_{1-28}$  也被廣泛的使用於研究之中，此片段包含了金屬離子結合區間，並且可以在溫和的環境下緩慢的發生聚集，因此在進行相關實驗時蛋白質的選擇是必須先考量的問題。表 2-1-4 至 2-1-6 為與金屬離子結合相關的文獻整理。

儘管金屬離子對阿茲海默症真正的影響仍無人知曉，已有許多研究設計可進入血腦屏障(blood brain barrier, BBB)的小分子金屬螯合劑(chelator)<sup>45</sup>，試圖以回復腦中金屬離子濃度恆定的方式達到延緩或治療阿茲海默症的目的，其中部分藥品如 clioquinol 已進入第二階段的試驗，說明了此理論確實有治療阿茲海默症的潛力，但為了能夠真正找出此世紀絕症解藥，更多研究仍等待進行。



表 2-1-4、 $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬離子配位結構文獻整理<sup>46-54</sup>

實驗方法	$\beta$ -類澱粉蛋白	金屬離子	與配位相關之胺基酸
X-Ray absorption	A $\beta$ <sub>40</sub>	Cu/Zn	Tyr, His
EPR, ESEEM	A $\beta$ <sub>13-21</sub>	Cu	His13, His14
EPR	A $\beta$ <sub>16</sub> , A $\beta$ <sub>40</sub>	Cu	-
EPR	A $\beta$ <sub>16</sub>	Cu	Asp1, His6, His13, His14
ESEEM	A $\beta$ <sub>16</sub>	Cu	His13, His14
EPR, CD, NMR	A $\beta$ <sub>16</sub> , H6R, D7N	Cu	Asp1, Ala2, Glu3, Phe4, His6, His13, His14
NMR	A $\beta$ <sub>16</sub>	Zn	Asp1, His6, Tyr10, His13, His14

表 2-1-5、 $\beta$ -類澱粉蛋白與銅離子結合常數估算文獻整理<sup>43,47,55-64</sup>

實驗方法	$\beta$ -類澱粉蛋白	緩衝溶液	解離常數(nM)
Potentiometry	A $\beta$ <sub>16,28</sub>		0.21/0.024
Tyrosine fluorescence	A $\beta$ <sub>40,42</sub>	10mM Tris	1600-2000
Tyrosine fluorescence	A $\beta$ <sub>16,28</sub>	Gly(His)	100
Tyrosine fluorescence	A $\beta$ <sub>16,28,40</sub>	100mM Tris	11000-47000
Tyrosine fluorescence	A $\beta$ <sub>16</sub>	Gly(His)	10-100
Tyrosine fluorescence	A $\beta$ <sub>16,28</sub>	Gly(His)	~100
Tyrosine fluorescence	A $\beta$ <sub>40</sub>	50mM PO <sup>4-</sup>	8000
Tyrosine fluorescence	A $\beta$ <sub>40</sub>	10mM HEPES	2500

表 2-1-5、 $\beta$ -類澱粉蛋白與銅離子結合常數估算文獻整(續)

Tyrosine fluorescence	A $\beta_{40}$	20/50/100mM Tris	1200/3800/30000
ITC	A $\beta_{16,28}$	50mM Hepes	100
ITC	A $\beta_{16,40}$	Gly	0.4
NMR	A $\beta_{40}$	5mM PO <sup>4-</sup>	16000

表 2-1-6、 $\beta$ -類澱粉蛋白與鋅離子結合常數估算文獻整理<sup>43,47,50-56</sup>

實驗方法	$\beta$ -類澱粉蛋白	緩衝溶液	解離常數(nM)
Tyrosine fluorescence	A $\beta_{40,42}$	10mM Tris	300000/57000
Tyrosine fluorescence	A $\beta_{40}$	10/100mM Tris	60000/184000
Tyrosine fluorescence	A $\beta_{40}$	20mM Hepes	65000
Tyrosine fluorescence	A $\beta_{16,40,42}$	100mM Tris	1000-10000
ITC	A $\beta_{16,28,40}$	Hepes/Tris	22000/10000/7000

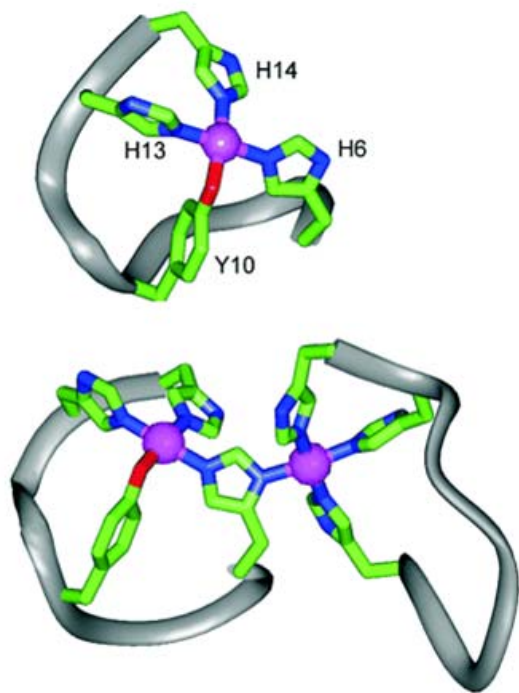


圖 2-1-7、 $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬結合之可能結構示意圖<sup>65</sup>

## 2-2 蛋白質檢測方法簡介與原理

### 2-2-1 自身螢光光譜

形成蛋白質的氨基酸裡，其中三種胺基酸帶有苯環，分別是：色胺酸 (Typtophan)、酪胺酸 (Tyrosine)、苯丙胺酸 (Phenylalanine)，因其苯環的結構，在特定波長的激發光下可使其產生螢光，此現象稱為蛋白質的自身螢光 (Intrinsic fluorescence)。

如表 2-2-1 所示，這三種胺基酸各自有不同的螢光特徵，一個蛋白質所發出的螢光為其包含的所有芳香族胺基酸螢光之總和，一般使用 280nm 或 295nm 的激發光來誘導自身螢光產生。

色胺酸的螢光是三者裡最強的，且其螢光強度、最大螢光發生波長皆與溶劑有很大相關性，當色胺酸附近的溶劑極性下降，可觀測到螢光藍移及強度上升的現象。與位於蛋白質表面的色胺酸相比，包覆在蛋白質疏水性區間者波長可以產生多達 10~20nm 的偏移。但其螢光會受到周圍酸性胺基酸 (天冬胺酸 (Aspartic acid)、麩胺酸 (Glutamic acid)) 之影響產生淬滅 (quenching) 現象。



酪胺酸在 280nm 處的激發光之下會產生特定的放射光譜，與色胺酸相比其強度較弱，但由於通常大量存在蛋白質中，對整體螢光的貢獻也很大，容易被周遭的色胺酸因能量轉移影響產生淬滅現象。

苯丙胺酸的結構由苯環及一個甲基構成，其螢光強度極弱，只有在色胺酸及酪胺酸不存在的情況下才有可能觀察到其螢光的產生。

當胺基酸組成蛋白質時，其螢光強度將明顯下降，如表 2-2-2。藉由自身螢光的觀察可推論蛋白質中胺基酸周遭環境的改變，當蛋白質由原態轉變為去折疊態時，因結構不同，螢光強度可能會有變強或變弱的現象，藉由此變化可用來觀測蛋白質摺疊狀態的改變。

在  $\beta$ -類澱粉蛋白中，有一個酪胺酸及三個苯丙胺酸存在，因此本實驗中使用 280nm 激發光波長，可偵測到酪胺酸在 300nm 處之螢光，並藉由其螢光強度變化來檢測其摺疊狀態改變。



表 2-2-1、芳香族胺基酸之螢光特徵<sup>66</sup>

	半衰期(ns)	吸收光		螢光	
		波長(nm)	吸收率	波長(nm)	量子數
色胺酸	2.6	280	5600	348	0.20
酪胺酸	3.6	274	1400	303	0.14
苯丙胺酸	6.4	257	200	282	0.04

表 2-2-2、芳香族胺基酸在不同環境下螢光特徵<sup>66</sup>

	溶劑	胺基酸		蛋白質	
		波長(nm)	量子數	波長(nm)	量子數
色胺酸	DMSO(非極性)	340	0.81	333	0.67
色胺酸	水	340	0.19	333	0.02
酪胺酸	DMSO	306	0.27	309	0.06
酪胺酸	水	303	0.21	-	-
苯丙胺酸	DMSO	282	0.02	284	0.006

### 2-2-2 Bis-ANS 螢光光譜

Bis-ANS(4,4'-Bis (1-anilino-naphthalene 8-sulfonate))是一種疏水性螢光探針，這個雙極性(amphiphilic)分子在暴露在水中的面積增加時其螢光強度會有顯著的降低。此螢光染劑(fluorescence dye)可與待分析蛋白以靜電力及疏水性作用力結合，用來檢測蛋白質摺疊狀態。

蛋白質由原態進入部分折疊態以至去折疊態的過程，其原本在內部的疏水性區域逐漸暴露，增加與 Bis-ANS 的結合程度，便可觀測到顯著的螢光強度上升。

本實驗中藉由  $\beta$ -類澱粉蛋白與 bis-ANS 混合，以 440nm 之波長激發可偵測到 bis-ANS 在 485nm 所激發螢光，並由此變化檢測蛋白質摺疊狀態與疏水性裸露區域變化。

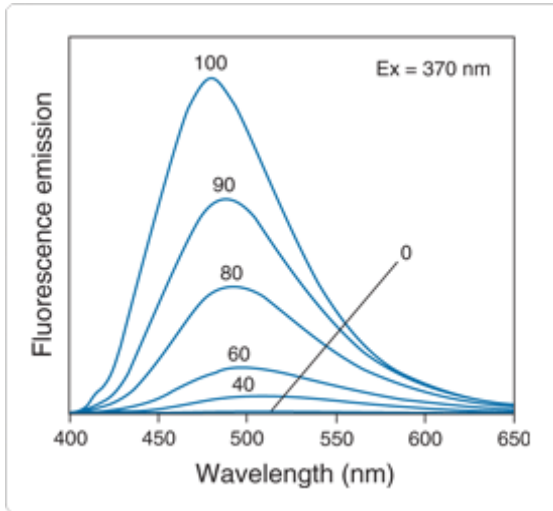


圖 2-2-1、Bis-ANS 在不同比例(乙醇：水)溶劑中螢光強度變化<sup>67</sup>

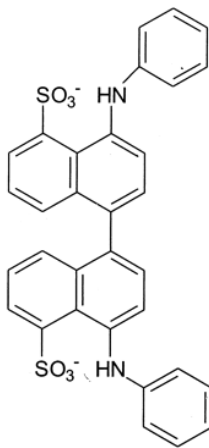


圖 2-2-2、Bis-ANS 之分子結構圖<sup>68</sup>

### 2-2-3 圓二色光譜

一般的光源屬於無方向性(isotropic)的形式，然而利用光柵來過濾將可得到具有特定方向性的偏極(polarized)光。在圓二色光譜中，利用左旋及右旋的偏極光通過具有鏡像性(optical property)的光學活性物，因其對左旋、右旋光之吸光係數不

同，會產生橢圓偏極光(elliptically polarized light)，此結果便為圓二色光譜，而具有鏡像結構的蛋白質分子便可藉由分析此光譜來獲得其二級、三級結構及構形變化。

在蛋白質結構分析中，遠紫外光區域(far-UV region, 180~250nm)及近紫外光區域(near-UV region, 250~350nm)分別可以用來測試蛋白質的二級、三級結構。此處我們以觀測蛋白質二級結構變化做為摺疊狀態改變的指標。

表 2-2-3、蛋白質二級結構之原二色光譜特徵峰

	負峰	正峰
$\alpha$ -helix	222、208	192
$\beta$ -sheet	216	195
Random coil	200	220
$\beta$ -turn	180-190(強)220-230(弱)	205
Polypro II helix	190	210-230(弱)

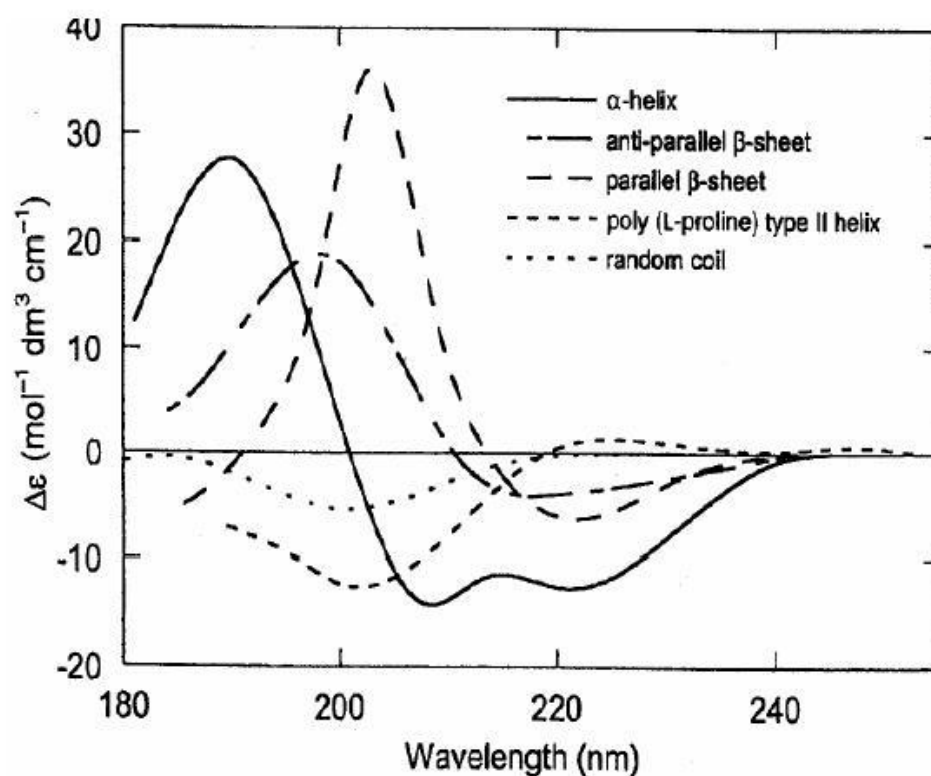


圖 2-2-3、蛋白質二級結構之圓二色光譜特徵<sup>69</sup>

#### 2-2-4 恆溫滴定量熱儀

恆溫低定量熱儀(isothermal titration calorimetry, ITC)可以用來檢測兩種分子間的結合常數( $K_a$ )、結合係數( $n$ )以及熱焓改變量( $\Delta H$ )，並且藉由  $\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S$  的關係式可進一步算出反應的 Gibbs 自由能及亂度。

其構造如圖 2-2-5 所示為，藉由建立一個絕熱(adiabatic)的系統，並對參考槽(reference cell)及樣品槽(sample cell)提供一參考功率(reference power)使其保持在恆溫狀態，之後將配體(ligand)逐次滴定入樣品槽使其與受體結合(receptor)，並調整功率使其與參考槽保持相同溫度，記錄並將其積分後即為反應熱焓改變量，與滴定之配體濃度結合計算後即可得到結合常數及結合係數。

本實驗中我們分別以鋅、銅離子對原生型及突變型之  $\beta$ -類澱粉蛋白進行滴定，以比較  $\beta$ -類澱粉蛋白序列中胺基酸突變對金屬離子結合能力之影響，並試著由結果推論其鍵結結構(binding coordination)。

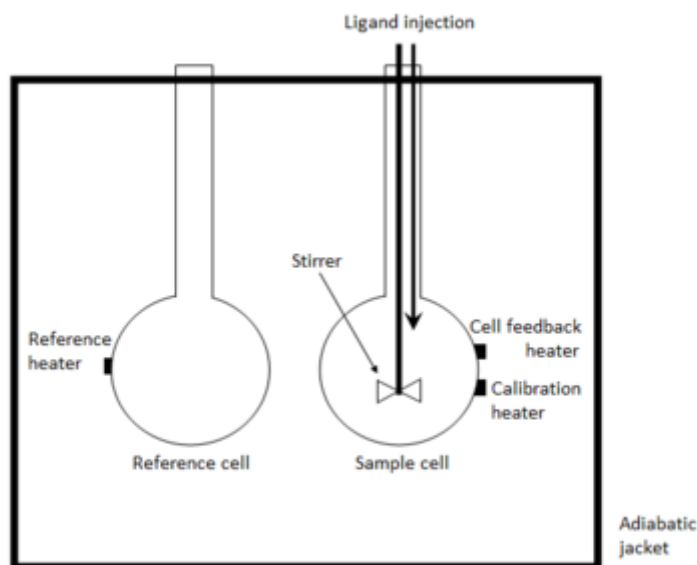


圖 2-2-4、恆溫滴定量熱儀之構造示意圖

## 2-2-5 核磁共振圖譜

核磁共振的原理源自於原子核的自旋角動量在外加磁場下的進動 (precession)。原子核如電子一般具有自旋角動量 (spin angular momentum)，其大小由原子核的自旋量子數 (spin quantum number) 決定，具有奇數質子或奇數中子者，自旋量子數為半整數 ( $n+0.5$ )，具有奇數質子與中子者，自旋量子數為整數 ( $n$ )，具有偶數質量數者則為 0。

原子核在自旋時，所帶的電荷會形成與自旋角動量成正比的磁矩 (magnetic moment)，若將原子置於外加磁場中，由於磁矩方向不同，原子核磁矩會繞外磁場方向旋轉，此現在即為進動。原子核進動之頻率由本身性質及外加磁場頻率決定，在固定強度磁場下，某一特定原子的進動頻率恆為定值。

原子核進動能量與磁場、磁矩夾角有關，根據量子力學，磁矩與外加磁場之夾角並非連續，只能在特定磁量子數形成能階 (energy level)，只有在外加射場的頻率與原子核進動頻率相同時能量才可被有效吸收而發生能階躍遷，觀測此現象即為核磁共振圖譜之原理。

對單一原子而言，如前面所述，所吸收的外加射場應為一特定值，然而在一個分子中，感受到的外加射場強度會因周遭電子雲密度不同而發生改變，因此可利用此差異來分析有機分子中不同位置的原子核，並且觀察在不同情況下原子核發生之化學位移。

除一般的 1D-NMR 圖譜以外，如二維異核化學位移相關光譜 (Heteronuclear Single Quantum Correlation, HSQC) 之 2D-NMR 技術也被發展來獲得更高靈敏度的訊號，以分辨一維圖譜中無法解析的訊號。此方法利用  $^1\text{H}$  及  $^{13}\text{C}$  或  $^{15}\text{N}$  兩種訊號之疊合增加訊號之解析能力。<sup>70</sup>

本實驗中藉由使用含  $^{15}\text{N}$  之培養基自行純化重組  $\beta$ -類澱粉蛋白及其突變型，以  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC 分析  $\beta$ -類澱粉蛋白在與金屬結合前後發生之化學位移，以推論與金屬結合結構相關之胺基酸。

## 2-2-6 蛋白質膠體電泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

帶電粒子在電場的作用下，向電性相反的電極移動，此現象稱為電泳(electrophoresis)。最早的電泳在濾紙上進行，但蛋白質容易因發熱及拖尾發生變性，而後又改良使用 cellulose acetate 進行薄層電泳，但仍不適用於大分子。直到使用澱粉之後，電泳開始廣泛用於蛋白質分析。

近幾年來，隨技術發展成熟，膠體電泳成為電泳的主要方式，膠體的成分分為洋菜膠與聚丙烯醯胺(polyacrylamide)兩種系統，前者主要用於水平方向之核酸電泳，後者則用來進行垂直方向蛋白質電泳。

蛋白質分子的泳動率受到分子量以及蛋白質電性影響，因此電泳可分成 Native-PAGE 及 SDS-PAGE 兩種，一般較常使用後者。其差別為蛋白質樣品經過加熱處理，並加入 DTT 或 2-mercaptoethanol 打斷雙硫鍵，使蛋白質失活(denaturation)，並加入介面活性劑 SDS(sodium dodecyl sulfate)使其均勻吸附在蛋白質上成為帶負電的直線狀分子。被 SDS 處理過後的蛋白質，其本身電性的影響被消除，所有蛋白質均帶負電向正極移動，泳動率只會受到分子量大小的影響。

蛋白質電泳膠體的成分包含：acrylamide、bis-acrylamide、APS(ammonium persulfate)、TEMED 及 SDS，膠體形成的原理是利用 acrylamide 單體，以 APS 為起始劑，TEMED 為催化劑進行的自由基聚合反應，bis-acrylamide 的添加則是為了形成交橋效應，使聚合鏈形成分歧以影響蛋白質在其中的泳動率，當 bis-acrylamide 的濃度越高，形成的膠體孔隙越大，適合較大的蛋白質分子分離。

膠體製作時通常分為上下兩層，上層稱為聚焦膠體，下層稱為分離膠體，因上下兩層膠體濃度，緩衝溶液 pH 值不同，蛋白質在經過兩層邊界時會聚集成一條細線後再行分開，增加電泳的解析度。

依照電泳使用的緩衝溶液不同，又可分為 glycine-SDS-PAGE 與 tricine-SDS-PAGE 兩種，後者對於小分子蛋白質的解析能力較高，但價格較為昂貴。兩種製膠配方在文獻中皆有詳細的介紹<sup>71,72</sup>。

電泳完成後一般使用 Coomassie blue R-250 與蛋白質中精胺酸(Arginine)、離胺酸(Lysine)部分進行非共價鍵結合以呈色，並與 commercial protein ladder 比較以得到蛋白質分子量。

## PROTEIN GEL ELECTROPHORESIS METHOD

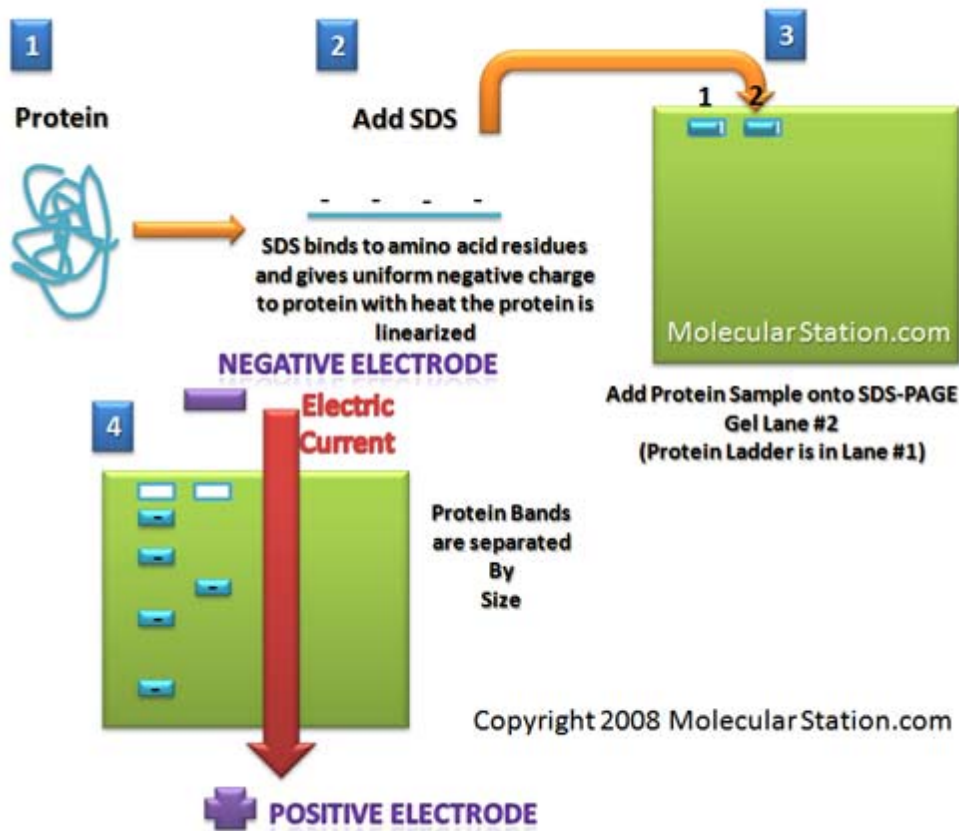


圖 2-2-5、SDS-PAGE 原理示意圖<sup>73</sup>

### 2-2-7 蛋白質免疫轉漬法(immunoblotting)

蛋白質免疫轉漬法，又稱西方墨點法(western blot)。相對於偵測 DNA 的南方墨點法(southern blot)及偵測 RNA 的北方墨點法(northern blot)而命名。

SDS-PAGE 雖可將分子量不同的蛋白質分離，但無法確認目標蛋白之成分，因此可將免疫轉漬法與 SDS-PAGE 結合以確認蛋白質之成分，並可藉由高度專一性的抗體獲得比 SDS-PAGE 更高的敏銳度。

其方法為利用橫向電泳，將經過 SDS-PAGE 處理後之膠片中蛋白質轉移到固相載體（例如硝酸纖維素薄膜）上，此載體以非共價鍵的方式吸附蛋白質並保持其活性。接著以與目標蛋白專一性結合的一級抗體(primary antibody)浸泡薄膜使其充分結合，再以辨識一級抗體之二級抗體(secondary antibody)結合，最後將能夠發出訊號的探子(probe)與二級抗體結合，即可得到高專一性、高敏銳度之信號。<sup>74</sup>



本實驗中使用 6E10 做為(與  $\beta$ -類澱粉蛋白 1-16 胺基酸結合)原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白之一級抗體, 4G8 做為(與  $\beta$ -類澱粉蛋白 17-24 胺基酸結合)為突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白之二級抗體。並以 Goat anti mouse 為二級抗體, 之後以可發出磷光(luminescence)之 ECL 試劑做為探子, 在底片上曝光成像。

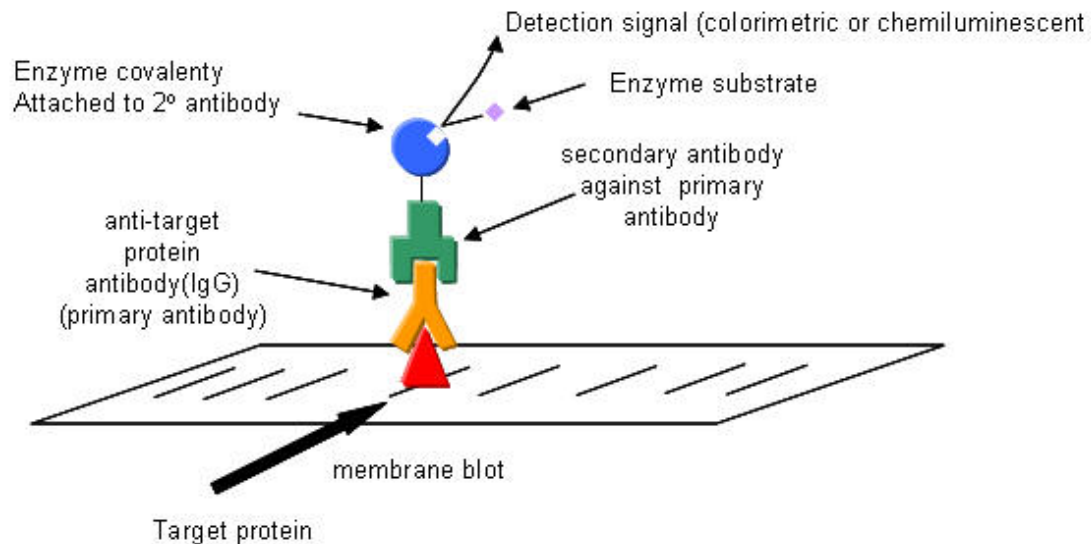


圖 2-2-6、蛋白質轉漬法原理示意圖<sup>75</sup>

### 2-2-8 蛋白質定量法

蛋白質的定量方法主要可分為以下數種：

- (1) Biuret Method<sup>76</sup>：銅離子與蛋白質骨架上的兩個 C=O 基團結合，會還原使其成為紅橙色。
- (2) Lowry Method<sup>77</sup>：以磷鉬酸與磷鎢酸對蛋白質上酪胺酸及色胺酸吸附呈色(藍色)。
- (3) Smith Method or Bicinchoninic acid assay (BCA)<sup>78</sup>：與 Biuret Method 相似，蛋白質將銅離子還原後，加入 Bicinchoninic acid 與 Cu<sup>+</sup>螯合形成在 562nm 處有很強吸光性的錯合物。
- (4) UV absorbance：利用蛋白質骨架上 C=O 對 206 nm 之吸收或酪胺酸對 280 nm 之吸收度來進行定量，一般來說 206nm 之定量較為精準，但因此波長光源較不易獲得，且容易受空氣中氧氣及二氧化碳干擾，一般仍以 280nm 進行測量。

(5) Bradford Method<sup>79</sup>：利用 Coomassie Blue G-250 染劑<sup>80</sup>與蛋白質之精胺酸 (arginine)、離胺酸(Lysine)結合後會變成藍色，蛋白質越多，以 595nm 吸光值進行測量。

(6) Special properties：許多蛋白質含有特殊的金屬 (如 Cd)、基團 (如 heme) 等，都有特定的分析方法。

無論使用何種方法，一般都是利用已知濃度的牛血清蛋白(bovine serum albumin)做校正線，藉由 Beer's law 將與待測蛋白吸光度轉換為濃度來推估待測蛋白的量，依照待測蛋白不同，適合的定量方法也隨之改變。常用的定量方法與性質整理如表 2-2-4。

表 2-2-4、蛋白質定量方法與性質

方法	吸收光波長 (nm)	特徵
Biuret Method	450	訊號較微弱，準確度高但精確度較低。
Lowry Method	750	與蛋白質上色胺酸及酪胺酸有關，歷史上被使用次數最高的定量法。
Smith Method	562	與 Lowry method 相比，靈敏度較高且不同蛋白質間差異性較低。
UV absorbance	206	最為精確之方法，但容易受氧氣及二氧化碳干擾。
UV absorbance	280	與蛋白質上酪胺酸有關，不需添加試劑，最為方便但較不精確。
Bradford Method	595	快速，準確度高，但會受到 SDS 等界面活性劑影響。

### 2-2-9 光誘導交聯法(photo-induced cross-linking of unmodified proteins, PICUP)<sup>81</sup>

光誘導交聯法為一個用來檢驗蛋白質間交互作用形成寡體的方法，其原理為利用 Ru(II)離子在 APS 催化下，形成具有極強氧化力的 Ru(III)離子，會吸引附近的蛋白質基團所帶電子形成自由基(free radical)，而鄰近的具反應性基團(如 Histidine、Tyrosine、Methionine)會以自由基以共價鍵結合發生交聯(cross-linking)，以形成寡體的形式，再進一步用 SDS-PAGE、Western blot 等分析方法檢驗其形成的分子結構。

此處我們比較原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白質在不同鋅、銅離子濃度下之結果，以觀察金屬離子是否對類澱粉蛋白聚集之結構產生影響。

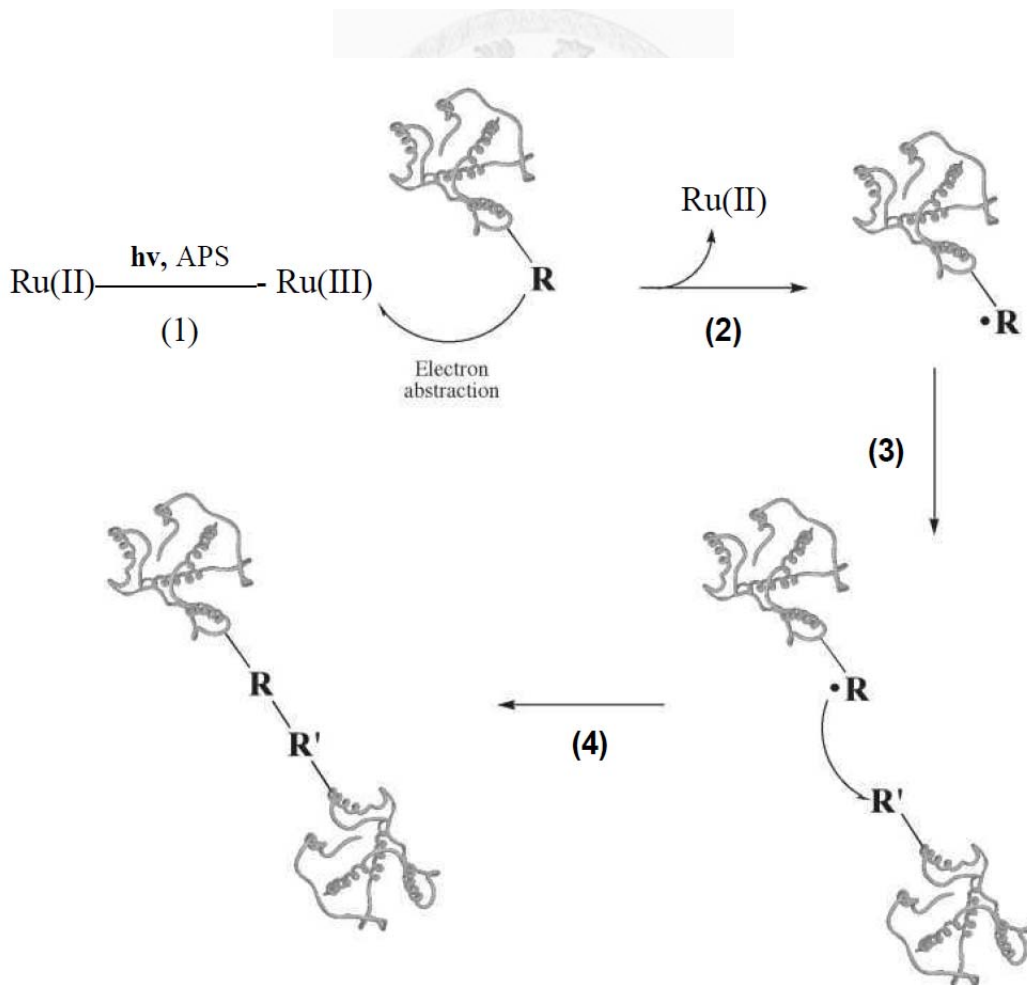


圖 2-2-7、光誘導交聯法之原理示意圖<sup>81</sup>

### 第三章 研究動機

現代社會中，隨著科技不斷進步，卻也引發了部分文明病的產生，已開發國家所面臨的最大問題，往往就是少子化及醫療進步所造成的人口老化。而退化性疾病如阿茲海默症伴隨著人口老化越來越嚴重，此類型疾病不僅對患者造成傷害，周遭親人更需耗費大量人力、資源進行後續醫療照護。目前估計光在美國就有超過五百一十萬的患者，而這個數字在 2050 年之前估計將會成長到一千九百萬人。直到目前為止此疾病尚未發現任何治癒的方法，因此尋求此疾病解藥是個刻不容緩的議題。

目前對阿茲海默症的主流研究發現，此疾病在腦中有  $\beta$ -類澱粉蛋白斑塊聚集、神經纖維糾結之 tau 蛋白，雖然沒有辦法證實這些是否是致病原因，抑或是所造成的結果，但眾多的研究報告發現，這兩者皆對神經細胞具有毒性，因此若是阻止其形成機制便可能抑制阿茲海默症病情的惡化。

其中  $\beta$ -類澱粉蛋白被最多人認為是阿茲海默症的灶因，研究指出，患者腦內的  $\beta$ -類澱粉蛋白遠較正常人來的多，且會在人體內自行堆疊成具有毒性的寡體以至纖維，此外有部分因基因突變導致早發性阿茲海默症患者，也發現其  $\beta$ -類澱粉蛋白之聚集現象與其他患者有不一樣的機制，更增加其為致病原因的可能。

目前已有許多針對  $\beta$ -類澱粉蛋白的療法，例如試圖清除已形成的蛋白，或是由上游阻止其生成，像是增加  $\alpha$ -secretase 的活性與  $\beta$ -secretase 競爭，金屬離子鋅、銅、鐵在腦中的堆積也被發現與  $\beta$ -類澱粉蛋白聚集有關，因此金屬螯合劑的使用也被認為是避免腦部斑塊聚集可能的方法。

此處我們對原生型及數種突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬離子之結合關係進行探討，利用諸如自身螢光、bis-ANS 光譜、圓二色光譜、核磁共振譜以及恆溫滴定量熱儀進行檢驗，試圖找出  $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬離子結合之可能機制，以期對此疾病藥物設計能有進一步的突破及貢獻。

#### 第四章 實驗裝置、藥品與步驟

##### 4-1 實驗儀器

中文名稱	廠商	型號
蛋白質分光測定儀	eppendorf	BioPhotometer
螢光分光光譜儀	Horiba Jobin Yvon	FluroMax-3
圓偏極光分光光譜儀	Jasco	J-815
微量分光光度計	J&H	ND-1000
紫外光光譜儀	BeckManCoulter	DU800
快速蛋白質液相層析儀	GE	AKTA UPC-900
高效能液相層析儀	Hitachi	Lachrom Elite
超微量恆溫滴定量熱儀	Microcal	ITC <sub>200</sub>
酸鹼度測定儀	DENVER	UB-10
低溫高速離心機	Thermo	Legend Micro 17-R
大容量高效能高速離心機	BeckManCoulter	Aranti J-20 XP
震盪器	Fine-votex	FINEPCR
超音波震盪器	BRANSON	3510
乾浴槽	BasicLife	BL3001
低溫震盪培養箱	YIH DER	LM570-R
可調式微量吸管	Eppendorf	
電泳槽	Bio-Rad	Mini protean tetra system
自動分注器	Hamilton	Microlab500
快速高壓滅菌器	Tomin	TM-329
微量盤分析儀	Molecular Devices	SpectraMax-M5
電磁加熱攪拌器	LMS	HTS-1003
真空冷凍乾燥機	PANCHUM	FD-1240-85H
聚合酶連鎖反應器	eppendorf	Autorisierter thermocycler
高壓微流細胞粉碎機	Microfluidics	M-110L

全自動洗片機	Kodak	Medical X-ray processor
微量電子天平	METTLER TOLEDO	AX105
電子天平	METTLER TOLEDO	PB3002-S
4°C 冰箱	DEI	DEI-635
-20°C 冷凍櫃	SANYO	MDF-U730
-80°C 冷凍櫃	Thermo	Forma700

#### 4-2 實驗藥品

4G8 antibody	CHEMICON
6E10 antibody	COVANCE
Ampicillin sodium salt	Calbiochem
Ammonium persulfate (APS)	Bio-Rad
Acetic acid	Merck
Acetonitrile	Lab-scan
Ammonium chloride ( <sup>15</sup> N labeled)	Cambridge Isotope Laboratories
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma
4,4'-bis(1-anilino-8-naphthalene sulfonate) [Bis-ANS]	Sigma
Coomassie brilliant Blue G250	J.T.Baker
Copper(II) chloride	Riedel-de Haen
DNaseI	Sigma
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Merck
Electrochemiluminescence (ECL) kit	PerkinElmer
Ethanol	Merck
Glycine	J.T.Baker
Glycerol	J.T.Baker
D-Glucose	Merck
Goat anti mouse IgG antibody	invitrogen
Hydrochloric acid	Merck
HEPES free acid	Merck
Isopropylthio-β-galactoside (IPTG)	amresco

Imidazole	Merck
Luria-Bertani (LB) broth, miller	Protech
Mercaptoethanol	Sigma
Magnesium sulfate • 7H <sub>2</sub> O	Merck
Methanol	友和
Protease inhibitor	Roche
Potassium dihydrogen phosphate	Merck
RNaseA	Roche
Sodium dihydrogen phosphate anhydrous	Merck
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	amresco
Sodium chloride	Protech
Sodium hydroxide	Merck
Sodium azide	ACROS
TFA(Trifluoroacetic acid)	Sigma
Tween-20	Merck
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Merck
Tricine	Sigma
Tris	Bioman
Tris(2,2'-Bipyridyl)Ruthenium(II)Chloride, Hexahydrate (Rubpy)	Aldrich
Urea	Protech
Zinc chloride	Riedel-de Haen
Synthetic amyloid beta protein (A $\beta$ <sub>40</sub> Wild type, D7H, D7N, D7A, H6A, H6R)	余惠敏博士實驗室協助合成
TEV-protease	楊安綏博士實驗室提供

### 4-3 實驗步驟

#### 4-3-1 溶液配製

##### 4-3-1-1 HEPES buffer 配製

1. 以 ddH<sub>2</sub>O 配置含有 150mM NaCl 之 25mM HEPES 緩衝溶液。
2. 以 1M HCl 及 1M NaOH 將其 pH 調整至 7.4。
3. 以 0.22 $\mu$ m 之 filter 過濾後儲存於室溫。

##### 4-3-1-2 Tris buffer 配製

1. 以 ddH<sub>2</sub>O 配置含有 10mM Tris 緩衝溶液。
2. 以 1M HCl 及 1M NaOH 將其 pH 調整至 7.4。
3. 以 0.22 $\mu$ m 之 filter 過濾後儲存於室溫。

##### 4-3-1-3 金屬離子溶液配製

1. 將 ZnCl<sub>2</sub>/CuCl<sub>2</sub> 溶解於上述緩衝溶液中分別配製成 0.8M 之鋅離子、銅離子溶液。
2. 加入 3.2M 之 glycine 以避免溶液產生 Zn(OH)<sub>2</sub>/Cu(OH)<sub>2</sub> 沉澱。
3. 以 0.22 $\mu$ m filter 過濾後儲存於室溫。

##### 4-3-1-4 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液配製

1. 將原生型/突變型之重組/合成  $\beta$ -類澱粉蛋白以每 0.1mg/100ul 之比例溶解於 20mM NaOH 溶液中使其去摺疊(unfolding)。
2. 將其置於冰浴中以超音波震盪 5 分鐘以幫助溶解並避免沉澱。
3. 將去摺疊之  $\beta$ -類澱粉蛋白移入 4 倍體積之緩衝溶液以達到再摺疊(refolding)之目的。
4. 將再折疊之  $\beta$ -類澱粉蛋白以 17000g 於 4°C 之下離心 30 分鐘以去除已聚集之蛋白質。
5. 移除沉澱，上清液部分即為可溶性蛋白質單體。
6. 以 DU800 吸光儀測量 280nm 吸光值，並以 Beer's law 決定蛋白質濃度



( $A = \epsilon \cdot L \cdot C$ ,  $\epsilon_{280} = 1280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $L = 1 \text{ cm}$ )。

7. 將蛋白質保存在冰上直到使用，未用完之蛋白質保存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 中，並在使用前重複步驟4~6以確保濃度之正確。

#### 4-3-1-5 LB broth 配製

1. 取 25g 之 LB 粉末，加入 ddH<sub>2</sub>O 至 1L。
2. 以滅菌釜滅菌並置於  $4^{\circ}\text{C}$  保存。
3. 使用前加入 50 $\mu\text{g/ml}$  ampicillin 抗生素。

#### 4-3-1-6 M9 broth 配製

1. 將 6.78g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、3.0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5g NaCl、1.0g NH<sub>4</sub>Cl (<sup>15</sup>N labeled)以 200ml ddH<sub>2</sub>O 溶解。
2. 另取 800ml ddH<sub>2</sub>O 與前述溶液分別滅菌後置於  $4^{\circ}\text{C}$  保存。
3. 使用前將前述溶液混合，並加入 1M CaCl<sub>2</sub> 100 $\mu\text{l}$ 、1M MgSO<sub>4</sub> 2ml、20% Glucose 20ml 及 50 $\mu\text{g/ml}$  ampicillin。

#### 4-3-1-7 Lysis buffer 配製

1. 取足量之 Tris 以 ddH<sub>2</sub>O 配置成 20mM 濃度。
2. 加入 150mM 之 NaCl。
3. 將 pH 值調整至 8.0。
4. 以 0.22 $\mu\text{m}$  filter 過濾後儲存於  $4^{\circ}\text{C}$ 。

#### 4-3-1-8 TBST 溶液配製

1. 取 16g NaCl、4.844g Tris。
2. 加入 dd H<sub>2</sub>O 至 2L。
3. 加入 50 $\mu\text{l}$  Tween-20。
4. 將 pH 值調整至 7.6。
5. 以 0.22 $\mu\text{m}$  filter 過濾後儲存於  $4^{\circ}\text{C}$ 。

#### 4-3-1-9 Transfer buffer 配製

1. 取 28.8g Glycine 與 6.06g Tris。
2. 加入 200ml methanol。
3. 加 ddH<sub>2</sub>O 至 2L。
4. 以 0.22 $\mu$ m filter 過濾後儲存於 4°C。

#### 4-3-1-10 Tricine-SDS-PAGE buffer 配製

##### 4-3-1-10-1 cathode buffer 配製

1. 取 Tris 及 Tricine 以 ddH<sub>2</sub>O 調整至 0.1M。
2. 加入 0.1% SDS。
3. 將 pH 值調整至 8.25。
4. 以 0.22 $\mu$ m filter 過濾後儲存於室溫。

##### 4-3-1-10-2 anode buffer 配製

1. 以 ddH<sub>2</sub>O 配製 0.1M Tris。
2. 加入 HCl 至 0.0225M。
3. 將 pH 值調整至 8.25。
4. 以 0.22 $\mu$ m filter 過濾後儲存於室溫。

##### 4-3-1-10-3 3x gel buffer 配製。

1. 以 ddH<sub>2</sub>O 配製 3M Tris。
2. 加入 0.3% SDS、1M HCl。
3. 調整 pH 至 8.45。
4. 以 0.22 $\mu$ m filter 過濾後儲存於室溫。

##### 4-3-1-10-4 4x reducing sample buffer 配製

1. 配製 150mM Tris。
2. 將 pH 值調整至 7.0
3. 加入 12% SDS、6% mercaptoethanol、30% glycerol 及 0.05% coomassie blue G-250。

4. 儲存於室溫。

#### 4-3-1-10-5 Coomassie blue 染劑配製

1. 取 2.5g Coomassie brilliant Blue G250。
2. 加入 500ml Methanol 及 100ml acetic acid。
3. 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1L。
4. 儲存於室溫。

#### 4-3-1-10-6 Destaining buffer 配製

1. 將 250ml ethanol 與 70 ml acetic acid 混合。
2. 加水至 1L。
3. 儲存於室溫。

#### 4-3-1-11 FPLC buffer 配製

##### 4-3-1-11-1 Running buffer 配製

1. 以 ddH<sub>2</sub>O 配製 20mM Tris。
2. 加入 150mM NaCl、5M urea。
3. 將 pH 值調整至 8.0。
4. 以 0.22μm filter 過濾後儲存於 4°C。



##### 4-3-1-11-2 Elution buffer 配製

1. 以 ddH<sub>2</sub>O 配製 20mM Tris。
2. 加入 150mM NaCl、5M urea。
3. 加入 500mM imidazole。
4. 將 pH 值調整至 8.0。
5. 以 0.22μm filter 過濾後儲存於 4°C。

#### 4-3-1-12 HPLC buffer 配製

##### 4-3-1-12-1 Buffer A 配製

1. ddH<sub>2</sub>O 配製 20% acetonitrile。
2. 加入 0.05%TFA。

3. 以 0.22 $\mu$ m filter 過濾。
4. 除氣後儲存於室溫。

#### 4-3-1-12-2 Buffer B 配製

1. ddH<sub>2</sub>O 配製 90% acetonitrile。
2. 加入 0.05%TFA。
3. 以 0.22 $\mu$ m filter 過濾。
4. 除氣後儲存於室溫。

#### 4-3-2 以自身螢光觀察金屬離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白及其突變種之鍵結關係

1. 將含有原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液，以 25mM HEPES 緩衝溶液將濃度調整至 25 $\mu$ M。
2. 取 80 $\mu$ l 的蛋白單體溶液放入光徑 1cm 之 cuvette，盡量避免氣泡產生影響結果。
3. 使用 FluroMax-3 以 270nm 為激發光波長，並收取 290~360nm 波長之螢光。
4. 加入銅離子並確保其充分混合後測量其螢光值。
5. 重複步驟 4 以獲得不同金屬離子濃度下的螢光值。
6. 改用鋅離子並重複步驟 4~5。
7. 改用其他突變型蛋白，重複步驟 3~6。

#### 4-3-3 以 Bis-ANS 螢光觀察金屬離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白及其突變種之鍵結關係

1. 將含有原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液，以 25mM HEPES 緩衝溶液將濃度調整至 25 $\mu$ M。
2. 在蛋白單體溶液及金屬溶液中添加 5 $\mu$ M 的 bis-ANS 染劑。
3. 取 80 $\mu$ l 的蛋白單體溶液放入光徑 1cm 之 cuvette，盡量避免氣泡產生影響結果。
4. 使用 FluroMax-3 以 400nm 為激發光波長，並收取 450~550nm 波長之螢光。
5. 加入銅離子並確保其充分混合後測量其螢光值。
6. 重複步驟 4 以獲得不同金屬離子濃度下的螢光值。
7. 改用鋅離子並重複步驟 4~5。
8. 改用其他突變型蛋白，重複步驟 4~6。

#### 4-3-4 以圓偏極光觀察金屬離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白及其突變種之鍵結關係

1. 將含有原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液，以 10mM Tris 緩衝溶液將濃度調整至 25 $\mu$ M。
2. 取 80 $\mu$ l 的蛋白單體溶液放入光徑 1cm 之 cuvette，盡量避免氣泡產生影響結果。
3. 使用 Jasco J-815 掃描 180~250nm 圓二色光譜。
4. 加入銅離子並確保其充分混合後測量圓二色光譜。
5. 重複步驟 4 以獲得不同金屬離子濃度下的螢光值。
6. 改用鋅離子並重複步驟 4~5。
7. 改用其他突變型蛋白，重複步驟 3~6。

#### 4-3-5 以恆溫滴定量熱儀觀察金屬離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白及其突變種之鍵結關係

1. 將含有原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液，以 25mM HEPES 緩衝溶液將濃度調整至 60 $\mu$ M。
2. 將蛋白溶液及金屬離子溶液除氣(degas)以避免干擾實驗結果。
3. 將 700 $\mu$ M 之銅離子 60 $\mu$ l 裝載入儀器之 syringe。
4. 將 300 $\mu$ l 之蛋白溶液裝載入儀器樣品槽，並避免產生氣泡。
5. 設定儀器參數(每次加入 1.5 $\mu$ l 金屬離子溶液，轉速 1000rpm，溫度 25 $^{\circ}$ C)後開始實驗。

#### 4-3-6 以二維異核化學位移相關光譜觀察金屬離子與 $\beta$ -類澱粉蛋白及其突變種之鍵結關係

##### 4-3-6-1 pET14b-A $\beta$ <sub>40</sub> 質體抽取

1. 利用 genomics company 之 mini plasmid kit 抽取 E.Coli DH5 $\alpha$  中之實驗室其他學長先前建立的 pET14b-A $\beta$ <sub>40</sub> 質體。
2. 將保存在 -80 $^{\circ}$ C 中之 pET14b-A $\beta$ <sub>40</sub> DH5 $\alpha$  取少許塗盤在含有 50 $\mu$ g/ml ampicilin

抗生素的 agarose plate 上並在培養箱中 37°C 隔夜培養。

3. 取出長出的單一菌株(single colony)放入 5ml LB broth，並以 37°C, 200rpm 振盪在培養箱中隔夜培養。
4. 將菌液放入離心管中以 14,000g 離心 1 分鐘，並去除上清液。
5. 加入 200µl 的 P1 buffer 並混合均勻以去除菌體內去氧核糖核酸酶(DNAse)活性。
6. 加入 200µl 之 P2 buffer 並充分混合將菌體裂解，並使 DNA 失活成單股。
7. 加入 300µl 之 P3 buffer 混合均勻使 DNA 重新恢復活性，並使質體以外大分子 DNA 沉澱。
8. 以 14,000g 離心 10 分鐘並將沉澱去除。
9. 將上清液放入 GP column 中並以 14,000g 離心 1 分鐘將質體留在濾膜上。
10. 依序加入 500µl PD/PW buffer 並以 14,000g 離心 1 分鐘以洗去多餘雜質。
11. 靜置於室溫五分鐘讓 PW buffer 中之乙醇揮發以避免影響後續實驗。
12. 加入 100µl 之 ddH<sub>2</sub>O 靜置 5 分鐘溶解質體。
13. 以 14,000g 離心兩分鐘將溶解之質體收集於離心管。
14. 取出 1µl 質體溶液以 nano-drop 測量其濃度。

4-3-6-2 以定點突變(site-directed mutagenesis)獲得突變型 pET14b-Aβ<sub>40</sub> 表現型菌株

1. 利用 Agilent Technologies company 的 Quick Change Primer Design Program 網頁功能設計各突變型之適當正/反引子(sense/anti-sense primer)，詳見附錄 A。
2. 向 genomics company 訂購設計之引子。
3. 將先前抽取之原生型質體稀釋至 10ng/ml。
4. 混合 1µl dNTP<sub>mix</sub>、2µl sense/anti-sense primer、3µl plasmid、5µl pfuUltraII reaction buffer、36µl ddH<sub>2</sub>O 以及 1µl 去氧核糖核酸聚合酶。
5. 以聚合鏈反應器進行鏈聚合反應(polymerase chain reaction)。
6. 加入 1µl DpnI 酵素在 37°C 下反應 1 小時以去除原生型質體留下突變後質體。
7. 取出 1.5µl 反應後之質體，與 20µl DH5α 勝任細胞(competent cell)混合。
8. 在 42°C 中加熱 45 秒進行熱刺激(heat shock)以幫助細胞轉殖(transform)。
9. 加入 200µl LB Broth 並以培養箱 37°C 培養 1 小時以幫助細胞恢復(recover)。
10. 取出 100µl 菌液將其塗盤在含有 50µg/ml ampicillin 之 agarose plate 上並在培養

箱中 37°C 隔夜培養以篩選成功轉殖菌株。

11. 將篩選之單一菌株以 5ml LB 隔夜培養後送 genomics company 進行定序以確認得到正確基因，並加入 50% glycerol 保存在 -80°C。
12. 更換不同突變型所需引子，重複步驟 4~10 以獲得所有突變型之質體。
13. 以 3-3-6-1 步驟抽取各突變型之質體。
14. 重複步驟 8~11 並改用 BL21(DE3\*) 之勝任細胞，以獲得含有各突變型質體之表現型菌種。

#### 4-3-6-3 含有 <sup>15</sup>N 標記之原生型/突變型重組 Aβ40 蛋白的表現及純化

1. 將 4-3-6-2 中所得之原生型/突變型 BL21(DE3\*) 菌株塗盤於含有 50μg/ml ampicillin 之 agarose plate 上，37°C 隔夜培養。
2. 選取單一菌株，加入 50ml LB broth，以 37°C，200rpm 震盪培養箱隔夜培養。
3. 取出 1ml 菌液以 BioPhotometer 測量 600nm 吸光值以決定菌量。
4. 將足量菌液移入 1L 新鮮 LB 使其 600nm 吸光值等於 0.02。
5. 以 37°C，200rpm 震盪培養至 600nm 吸光值到達 0.8。
6. 將菌液移入離心瓶，以 8000g 在 4°C 下離心 30 分鐘。
7. 去除上清液，並以少量 ddH<sub>2</sub>O 清洗菌體。
8. 將菌體移入 1L M9 broth，並以震盪機使其均勻懸浮。
9. 以 37°C，200rpm 震盪培養 30 分鐘以幫助菌體恢復。
10. 加入 0.5mM IPTG 誘導(induction)菌體表現(expression)目標蛋白。
11. 以 37°C，200rpm 隔夜培養。
12. 以 4°C，8000g 離心 30 分鐘。
13. 去除上清液，並加入 50ml 之 lysis buffer。
14. 以震盪機使其均勻懸浮。
15. 加入 1M DTT。
16. 使用 microfluidizer 打破菌體。
17. 以 4°C，15000g 離心 30 分鐘，去除上清液。
18. 加入 20ml lysis buffer, 1mM DTT、50mM MgCl<sub>2</sub>、0.02mg DNaseI 及足量 protease inhibitor，以攪拌子室溫下攪拌一小時。
19. 以 4°C，15000g 離心 30 分鐘，去除上清液。

20. 加入含有 5M urea 之 Lysis buffer 5ml，4°C 下攪拌一小時。
21. 以 4°C，15000g 離心 30 分鐘，去除殘餘細胞碎片。
22. 將上清液以 0.22µm filter 過濾後，以 FPLC 進行純化並收集純化之蛋白質。
23. 以 SDS-PAGE 確認目標蛋白之位置。
24. 收集含有目標蛋白之溶液，加入 lysis buffer 以 20kDa cut-off 之 Centricon 透析並濃縮目標蛋白。
25. 以 Bradford assay 測試濃縮後蛋白濃度。
26. 加入足量 TEV-protease 及 1mM DTT，與目標蛋白均勻混合，4°C 下隔夜反應以除去目標蛋白上之 His-tag。
27. 將反應後溶液以 0.22µm filter 過濾，以超音震盪除氣(degas)後使用 reverse phase 之 HPLC 純化。
28. 以離心管蒐集純化之蛋白質，以液態氮冷卻後凍乾。
29. 秤重並儲存於-20°C，並以 Tricine-SDS-PAGE、免疫轉漬法確認目標蛋白質之位置及純度。

#### 4-3-6-3-1 以 His-trap 管柱與 FPLC 與進行蛋白質純化

1. 將兩個 5ml His-trap 之管柱串連並與 FPLC 系統連結。
2. 待純化蛋白質以 Superloop 注入 FPLC 中。
3. 以 4% washing buffer 洗去管柱上非專一性結合蛋白。
4. 將 washing buffer 濃度逐漸提高以沖提目標蛋白。
5. 以 fraction collector 收集，並以 SDS-PAGE 分析以確認產物所在位置與純度。

#### 4-3-6-3-2 以 reverse phase 管柱與 HPLC 進行蛋白質純化

1. 將 Jupiter 之 reverse phase 管柱與 HPLC 系統連結。
2. 將待純化蛋白注入 HPLC 中。
3. 將 Buffer B 之濃度由 0%逐漸提高至 100%以將待分析物分離。
4. 以 Fraction collector 收集並以 SDS-PAGE 分析以確認產物所在位置與純度。



#### 4-3-6-4 以 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)進行蛋白質成份分析

##### 4-3-6-4-1 製作 Tris 膠片

1. 以 1.5M pH 8.8 Tris buffer 混合 10% SDS 及 12.5% acryamide 製作下層膠片溶液。
2. 以 0.5M pH 6.8 Tris buffer 混合 10% SDS 及 4% acryamide 製作上層膠片溶液。
3. 架設 Bio-Rad 膠台。
4. 將下層溶液與足量 APS 及 TEMED 混和後注入膠台，靜置半小時待其凝膠。
5. 將上層溶液與足量 APS 及 TEMED 混和後注入膠台，插入齒梳並靜置半小時待其凝膠。
6. 將膠片以保鮮膜包覆並保存於 4°C 冰箱以保持濕潤直至使用。

##### 4-3-6-4-2 製作 Tricine 膠片

1. 分別以 gel buffer 混和 acrylamide 製作 4%、10%、16%之上中下層溶液。
2. 架設 Bio-Rad 膠台。
3. 將下層溶液與足量 APS 及 TEMED 混和後注入膠台，靜置半小時待其凝膠。
4. 將中層溶液與足量 APS 及 TEMED 混和後注入膠台，靜置半小時待其凝膠。
5. 將上層溶液與足量 APS 及 TEMED 混和後注入膠台，插入齒梳並靜置半小時待其凝膠。
6. 將膠片以保鮮膜包覆並保存於 4°C 冰箱以保持濕潤直至使用。

##### 4-3-6-4-3 以直流電源供應器進行 Tris-SDS-PAGE

1. 將待分析蛋白以 ddH<sub>2</sub>O 溶解，並與 sample buffer 混合。
2. 取 20μl 樣品並將其注入 3-3-6-4-1 中製作膠片。
3. 將 1.5μl commercial marker 注入膠片，以標記待分析蛋白分子量。
4. 將電泳槽內外層倒滿 running buffer。
5. 以 90 伏特之固定電壓進行電泳 30 分鐘。
6. 以 120 伏特之固定電壓進行電泳直到 Marker 接近底部。
7. 將膠片取出並以 Commassie blue 染色 15 分鐘。
8. 以 ddH<sub>2</sub>O 洗去多餘染劑。
9. 以 Destain buffer 去染直到背景呈透明。

#### 4-3-6-4-4 以直流電源供應器進行 Tricine-SDS-PAGE

1. 將待分析蛋白以 ddH<sub>2</sub>O 溶解，並與 sample buffer 混合。
2. 取 20 $\mu$ l 樣品並將其注入 3-3-6-4-2 中製作膠片。
3. 將 1.5 $\mu$ l commercial marker 注入膠片，以標記待分析蛋白分子量。
4. 將 cathode、anode buffer 分別倒入電泳槽內外層。
5. 以 90 伏特之固定電壓進行電泳 30 分鐘。
6. 以 15 毫安培之固定電流進行電泳直到 Marker 接近底部。
7. 將膠片取出並以 Coomassie blue 染色 15 分鐘。
8. 以 ddH<sub>2</sub>O 洗去多餘染劑。
9. 以 Destain buffer 去染直到背景呈透明。

#### 4-3-6-5 以免疫轉漬法(immunoblot)分析蛋白質之成分

##### 4-3-6-5-1 以 dot-blotting 進行蛋白質成份分析

1. 裁剪並將硝化纖維(nitrocellulose, NC)薄膜上標記分隔成 3.5cm X 3.5cm 之區間。
2. 將待分析物以 ddH<sub>2</sub>O 溶解，取 1.5 $\mu$ l 滴在 NC membrane 各區間之中心。
3. 避光並靜置半小時以確認產物充分附著於薄膜上。
4. 將 10%的奶粉溶解在 TBST 溶液中。
5. 將 NC membrane 浸泡在上述溶液半小時以封閉(blocking)薄膜上未結合的位置。
6. 將 6E10 抗體以 1:10000 比例稀釋在 5% TBST Milk 中。
7. 將 NC membrane 浸泡在上述溶液中一小時並震盪，使 6E10 抗體與薄膜上 A $\beta$  蛋白結合。
8. 以 TBST 清洗 NC membrane 以洗去多餘之未結合 6E10 抗體。
9. 將 Goat anti mouse 抗體以 1:10000 比例稀釋在 5% TBST Milk 中。
10. 將 NC membrane 浸泡在上述溶液中一小時並震盪，使 GM 抗體與薄膜上 6E10 抗體結合。
11. 以 TBST 清洗 NC membrane 以洗去多餘之未結合 GM 抗體。
12. 將 ECL kit 中 500 $\mu$ l enhance luminor reagent 與 500 $\mu$ l oxidizing reagent 混合後均勻滴在薄膜上使其與 GM 抗體結合。
13. 將底片暴露在薄膜上 5 分鐘成像，並以自動洗片機顯影。

#### 4-3-6-5-2 以 western-blot 進行蛋白質成分分析

1. 重複 4-3-6-4-4 中步驟 1~6。
2. 裁剪 6cm x 10cm 之 PVDF(Polyvinylidene difluoride) membrane，並以甲醇浸泡以活化(activate)。
3. 將電泳後膠片與 PVDF membrane 重疊，放入電泳槽，並加入 transfer buffer 與冷卻劑。
4. 以 250 毫安培，30 分鐘進行橫向電泳，將膠片蛋白質上之蛋白質轉移(transfer)到 PVDF 薄膜上。
5. 將 10%的奶粉溶解在 TBST 溶液中。
6. 將 PVDF membrane 浸泡在上述溶液半小時以封閉(blocking)薄膜上未結合的位置。
7. 將 6E10(或 4G8)抗體以 1:10000 比例稀釋在 5% TBST Milk 中。
8. 將 PVDF membrane 浸泡在上述溶液中一小時並震盪，使 6E10 抗體與薄膜上 A $\beta$  蛋白結合。
9. 以 TBST 清洗 PVDF membrane 以洗去多餘之未結合 6E10 抗體。
10. 將 Goat anti mouse 抗體以 1:10000 比例稀釋在 5% TBST Milk 中。
11. 將 PVDF membrane 浸泡在上述溶液中一小時並震盪，使 GM 抗體與薄膜上 6E10 抗體結合。
12. 以 TBST 清洗 PVDF membrane 以洗去多餘之未結合 GM 抗體。
13. 將 ECL kit 中 500 $\mu$ l enhance luminor reagent 與 500 $\mu$ l oxidizing reagent 混合後取均勻滴在薄膜上使其與 GM 抗體結合。
14. 將底片暴露在薄膜上 5 分鐘成像，並以自動洗片機顯影。

#### 4-3-6-6 以 Bradford assay 定量蛋白質濃度

1. 在 96 孔盤中分別以 ddH<sub>2</sub>O 配製 3、6、9、12、15 $\mu$ g/ml 濃度之 BSA。
2. 加入 40 $\mu$ l 之 commercial protein assay dye。
3. 將待測蛋白稀釋成不同濃度並加入 40 $\mu$ l protein assay dye。
4. 以微量盤分析儀測量 595nm 之吸光值。
5. 以 BSA 標準品做檢量線，估算待測蛋白濃度。

#### 4-3-7 以光誘導交聯法檢驗蛋白質形成寡體差異性

1. 將 25 $\mu$ M 原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液與不同濃度之金屬離子混合。
2. 在避光情況下取 18 $\mu$ l 加入 1 $\mu$ M 之 Tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II) hexahydrate (Ru(bpy)) 1 $\mu$ l。
3. 加入 1 $\mu$ l 10mM APS。
4. 以 LED 燈照射 30 秒使其反應交聯。
5. 反應完成之蛋白質以 4-3-6-5-2 步驟進行 western blot 以確認其成分。
6. 改為突變型蛋白並重複步驟 1-5。

#### 4-3-8 以自動滴定儀進行去摺疊及再折疊實驗

1. 將溶解於 130mM Tris 緩衝溶液之 0.3mg/ml 去氧核糖核酸酶 A 溶液 600 $\mu$ l 放入 1cm 光徑 700 $\mu$ l 之 micro cuvette.
2. 將去活性劑(尿素/胍鹽酸)與去氧核糖核酸酶 A 混合至與 cuvette 相同濃度。
3. 將含有去氧核糖核酸酶 A 之去活性劑裝載入自動分注器之管柱 A，並去除管中多餘氣泡避免影響實驗。
4. 將 cuvette 放入螢光光度儀。
5. 將與管柱 A、B 連結之注入管放入 cuvette 約至液面下 2cm 處，並緊靠邊緣避免影響光徑。
6. 將滴定體積、混合體積、次數，激發光波長及吸收光波長設定完成後開始實驗。

## 第五章 實驗結果與討論

### 5-1 $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液配製

為獲得  $\beta$ -類澱粉蛋白之單體，避免其發生聚集，使用 20mM 的 NaOH 溶液將粉末狀  $\beta$ -類澱粉蛋白溶解使其去摺疊，超音波震盪五分鐘後以含有 150mM NaCl 之 25mM HEPES 緩衝溶液(pH 7.6) 再摺疊，以低溫高速離心機離心去除已沉澱之蛋白，再以 DU800 測量其 250~450nm 吸收波長光譜決定蛋白質單體濃度。在進行圓二色光譜實驗時，由於 HEPES 緩衝溶液以及鹽的存在會妨礙訊號讀取，因此緩衝溶液改以 10mM Tris(pH 7.6)取代。

如圖 5-1-1 所示，原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白皆表現出相似之吸收光譜，然而由於秤量重量誤差，同樣重量之  $\beta$ -類澱粉蛋白所配置成的單體濃度有顯著的不同；此外由於溶液中仍含有少量聚集形式之蛋白質，造成溶液之濁度上升，會影響真實濃度之推算，因此在以 Beer's law 推算濃度時，將各  $\beta$ -類澱粉蛋白之 280nm 吸光值先扣除 293nm 處基準線(baseline)之吸光值，以增加推得濃度之準確性。其中 D7A、D7H 及 H6R 三種蛋白質有明顯較高之基準線，可推測此三種突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白產生聚集之速率相對較快。

為確保濃度量測之精確性，每次配製之  $\beta$ -類澱粉蛋白皆離心並重新測量濃度，實驗過程中皆存放在冰上冷卻以避免聚集現象發生，未使用完之溶液保存在 4°C 並且不存放超過三天。

為確保蛋白質濃度定量之正確性，除使用 Tyrosine 螢光以外也試著以 Bradford assay 測試相同濃度之蛋白質，以比較不同方法定量之一致性。在 Bradford assay 中我們以牛血清蛋白(BSA)為標準品，在 96 孔盤中分別配置成 3、6、9、12、15 $\mu$ g/ml 之不同濃度，與足量之 assay dye 混合以後以 Elisa reader 測量 595nm 之吸光值，利用其獲得之吸光值對濃度做成一校正曲線，再將待測樣品稀釋足夠倍數後與同樣濃度 assay dye 混合，測量吸光值並利用內插法代入校正曲線得到相對應之濃度。圖 5-1-2 為利用 BSA 所得到之校正線。比較表 5-1-2 之 Bradford assay 與光譜法定量結果，發現同樣利用 DU800 定量並調整成 60 $\mu$ M 之  $\beta$ -類澱粉蛋白，利用 Bradford

測量所得到之濃度約略皆只有一半之大小，可見使用不同定量方法得到之濃度差不盡相同，中間差異可能來自操作過程中體積誤差等等。儘管其獲得之濃度並不完全相同但不同蛋白間差異並不大，由於 Bradford assay 為定量整體蛋白濃度易受雜質影響，且光譜法之定量較 Bradford assay 來的迅速，因此之後仍以光譜法之濃度定量為基準。

表 5-1-1、以 Beer's law 推估配製之  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液濃度

$\beta$ -類澱粉蛋白	280nm-293nm 吸光值	推估濃度( $\mu$ M)	再摺疊率(%)*
WT	0.0602	47.0	50.88
H6A	0.1233	96.3	104.24
H6R	0.192	150.0	162.38
D7A	0.0571	44.6	48.28
D7H	0.0643	50.2	54.34
D7N	0.0735	57.4	62.14

\*再摺疊率是由 DU800 推得濃度除以理論上該重量蛋白質完全溶解之濃度，由於重量秤量之精確性問題導致其有大於 100% 的情況發生。

表 5-1-2、以 Bradford assay 與光譜法進行蛋白質定量之比較

$\beta$ -類澱粉蛋白	Bradford 定量濃度( $\mu$ M)	DU800 定量濃度( $\mu$ M)
H6A	22.8	60
H6R	27.9	60
D7A	38.7	60
D7H	29.8	60
D7N	23.2	60

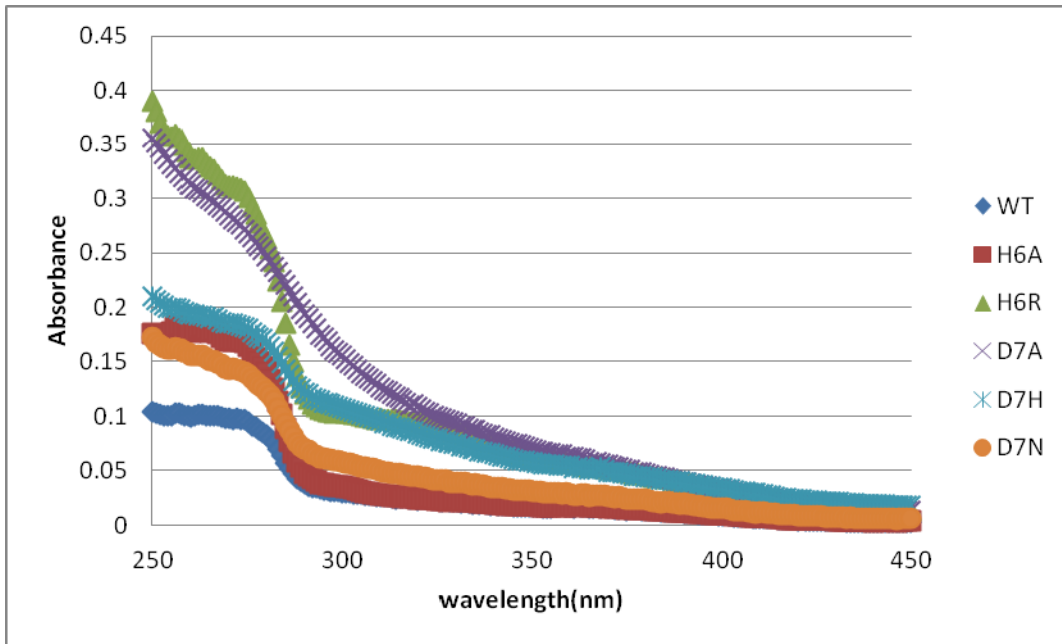


圖 5-1-1、原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液 DU800 吸收光譜。每組溶液皆取 0.2mg 之蛋白質以 200 $\mu$ l 20mM NaOH 溶解後以 800 $\mu$ M HEPES 緩衝溶液再折疊，取 80 $\mu$ l 以 1cm 光徑 cuvette 測量 250~450nm 之吸光值，已扣除 HEPES 緩衝溶液之空白曲線(blank curve)。

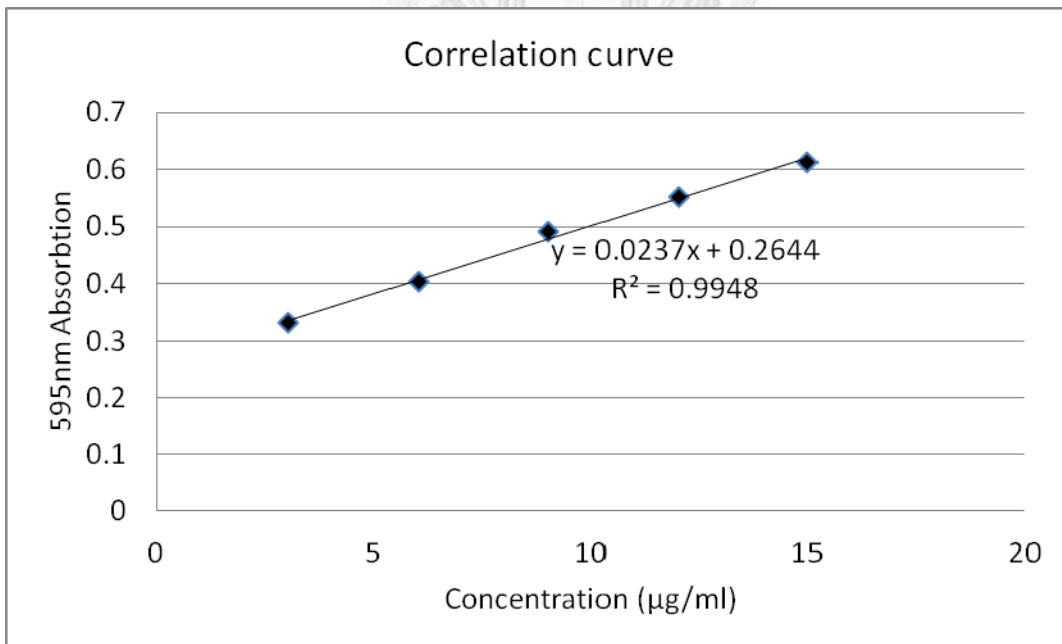


圖 5-1-2、利用牛血清蛋白為標準品所獲得之 Bradford assay 校正曲線。在透明 96 孔盤中分別加入 3、6、9、12、15 $\mu\text{g/ml}$  之 BSA，並與 40 $\mu$ l Bradford assay dye 混合，每個孔之最終體積為 200 $\mu$ l，混合均勻並避免氣泡產生影響吸光值。

## 5-2 鋅、銅離子對原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體滴定之自身螢光光譜

為減少緩衝溶液差異造成之實驗誤差，金屬離子溶液皆以與配製蛋白單體溶液相同批次之緩衝溶液配製。由於鋅、銅離子皆可與溶液中之氫氧根離子反應形成沉澱，此現象會造成濃度導致的實驗誤差，因此參考文獻在金屬離子中加入四倍濃度之甘胺酸(Glycine)分子與之形成微弱結合之錯合物<sup>60</sup>。此結合為非共價性之結合，很容易就可以將金屬離子釋放出來，因此仍可將此狀態之金屬離子當作自由離子。圖 5-2-1、5-2-2 中利用金屬離子與甘胺酸對緩衝溶液之滴定實驗，證明金屬離子與甘胺酸濃度變化不會對自身螢光強度產生顯著的影響。

在滴定過程中，為確保金屬離子與蛋白溶液充分混合，須小心的以微量吸管緩慢的重複吸取 5~10 次，若是此過程中產生氣泡會造成螢光讀值顯著的變化，因此須減壓抽氣去除氣泡後再進行測量，為提升實驗之精確性，每一組實驗皆以同一批次配製之蛋白單體溶液進行至少三重覆實驗。每一組螢光讀值皆重複讀取三次後取其平均值，以降低擾動所造成的隨機誤差。滴定過程中由於體積增加，蛋白質之濃度會些許下降，此體積增加藉由調整金屬離子溶液(stock solution)之濃度以控制在 10%之內，如圖 5-2-3 中所示，藉由緩衝溶液對  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液滴定確認此濃度變化所造成的螢光讀值變化小於 10%，因此可將其忽略。

圖 5-2-4 為 25 $\mu$ M 原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白之自身螢光光譜及加入 200 $\mu$ M 銅離子之自身螢光光譜，可發現加入銅離子的情況下各組蛋白之自身螢光皆有明顯的淬滅(quenching)現象。至於不同蛋白間的訊號強度差異可能來自於蛋白本身性質、製備過程中操作誤差或是儀器本身訊號擾動產生差異，其大小差異皆在一個數量級內屬於可接受範圍。圖 5-2-5 則是 25 $\mu$ M 原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白之自身螢光光譜及加入 200 $\mu$ M 鋅離子之自身螢光光譜，與銅離子相較，鋅離子同樣使其訊號發生淬滅現象，但其效果不如銅離子來的明顯。將滴定前(0 $\mu$ M)與滴定後(200 $\mu$ M)之 305nm 訊號相除可得到圖 5-2-6 及圖 5-2-7 之金屬離子滴定造成的螢光強度改變量，加入銅離子時 D7A 及 D7H 兩者變化明顯大於其他組，而加入鋅離子時則沒有顯著差異，並且整體改變量皆較銅離子來的小。



將各組重複實驗之數據平均後，選取不同金屬濃度下之 305nm 螢光讀值，並且透過下列正規化公式將其正規化後得到銅離子及鋅離子之滴定曲線圖 5-2-8 及 5-2-9。

正規化公式：

$$\frac{\text{Data} - \text{minimum signal}}{\text{Maximum signal} - \text{minimum signal}}$$

圖 5-2-8 可發現，加入銅離子時 WT、D7N、H6A 三組所得到之滴定曲線較為接近，D7A、D7H、H6R 三組則可觀察到不同的結合關係。圖 5-2-9 中則發現，H6A 及 H6R 兩組與鋅離子之結合不同於其他組，可推測在與鋅離子結合的情況下 Histidine<sub>6</sub> 具有舉足輕重的關係。



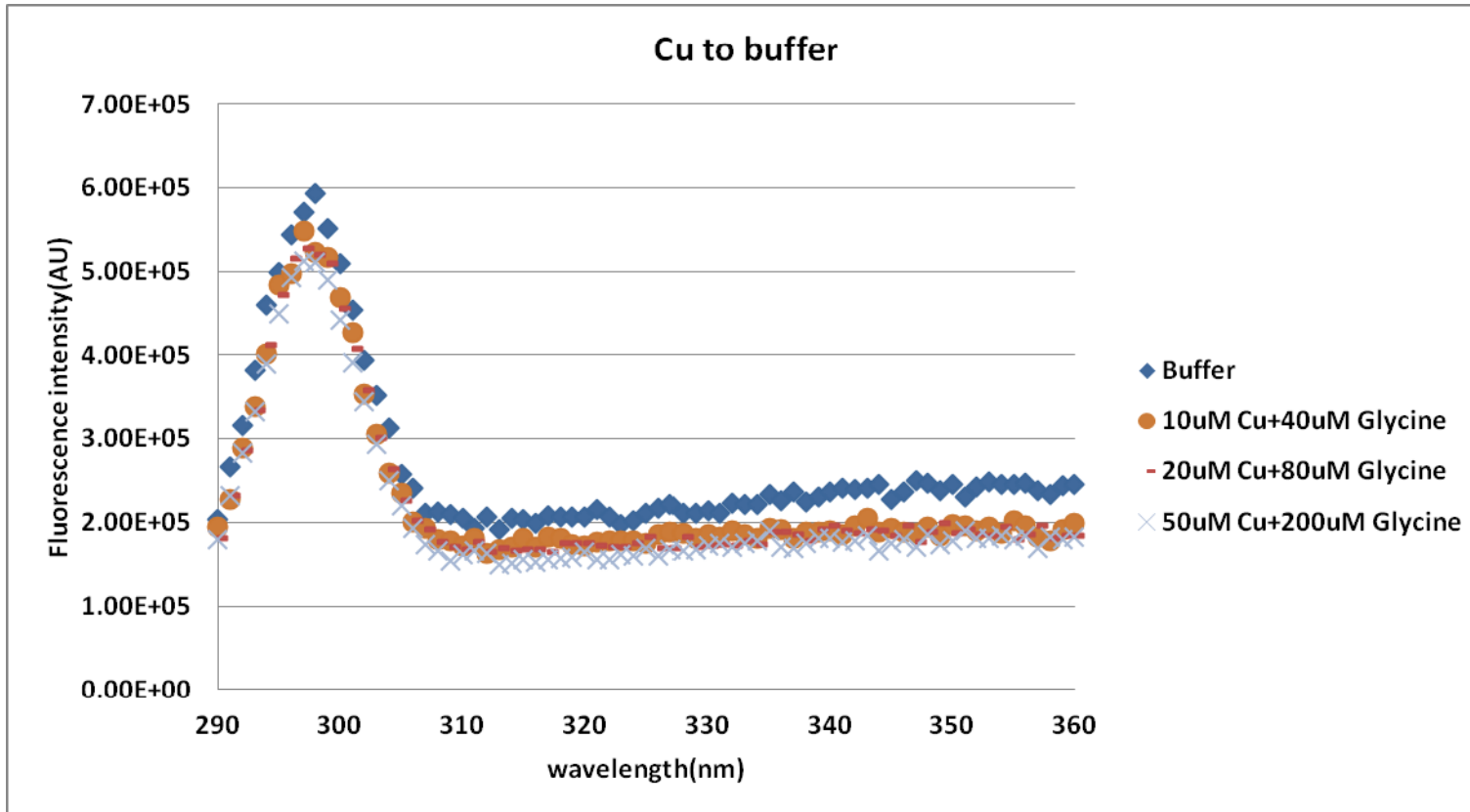


圖 5-2-1、銅離子對緩衝溶液滴定曲線。銅離子與甘胺酸預先以 1:4 之比例混合以避免形成沉澱物。

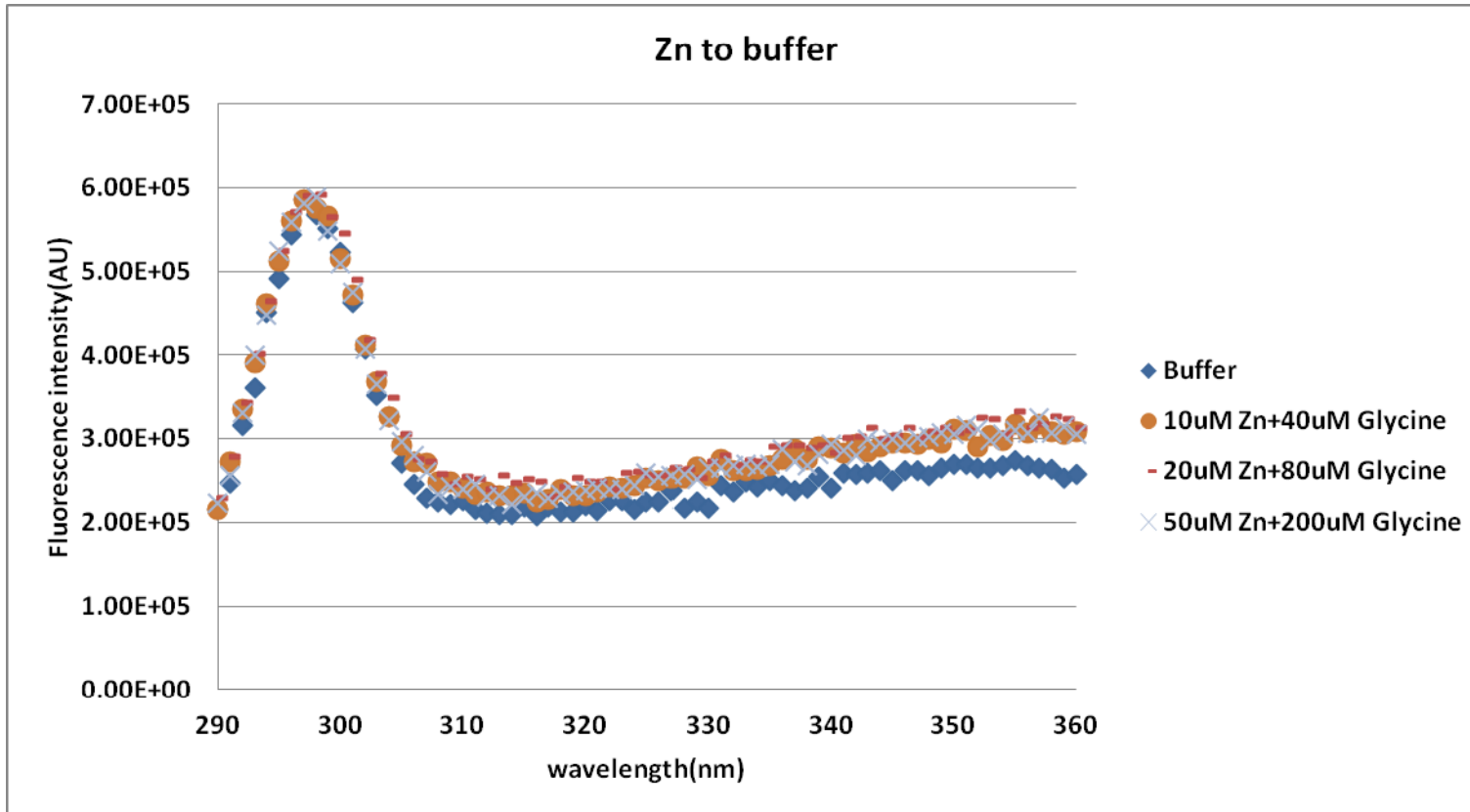


圖 5-2-2、鋅離子對緩衝溶液滴定曲線。鋅離子與甘胺酸預先以 1:4 之比例混合以避免形成沉澱物。

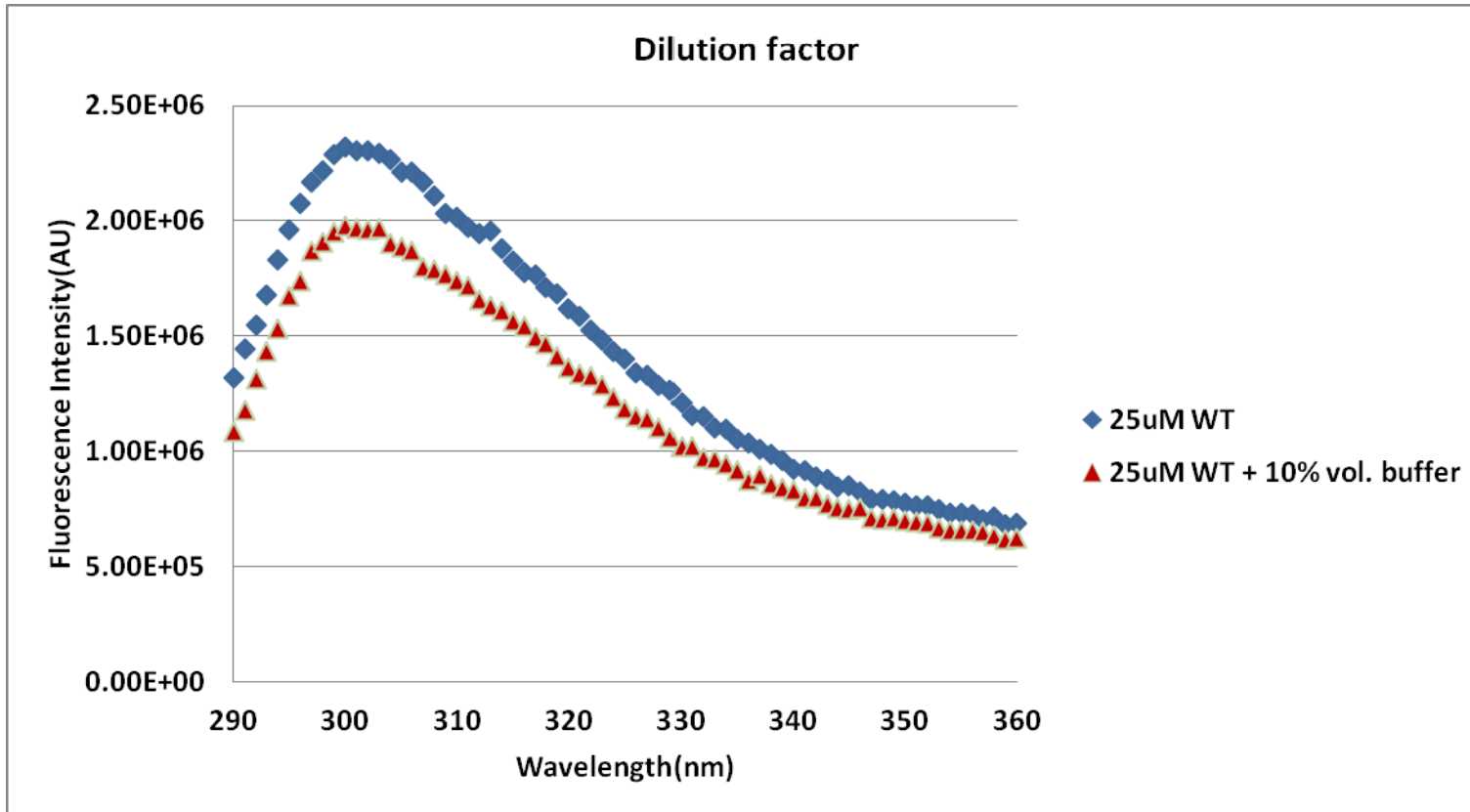


圖 5-2-3、原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液濃度改變對自身螢光強度影響測試。比較 25 $\mu$ M 下及加入 10% 體積之緩衝溶液下自身螢光強度變化。

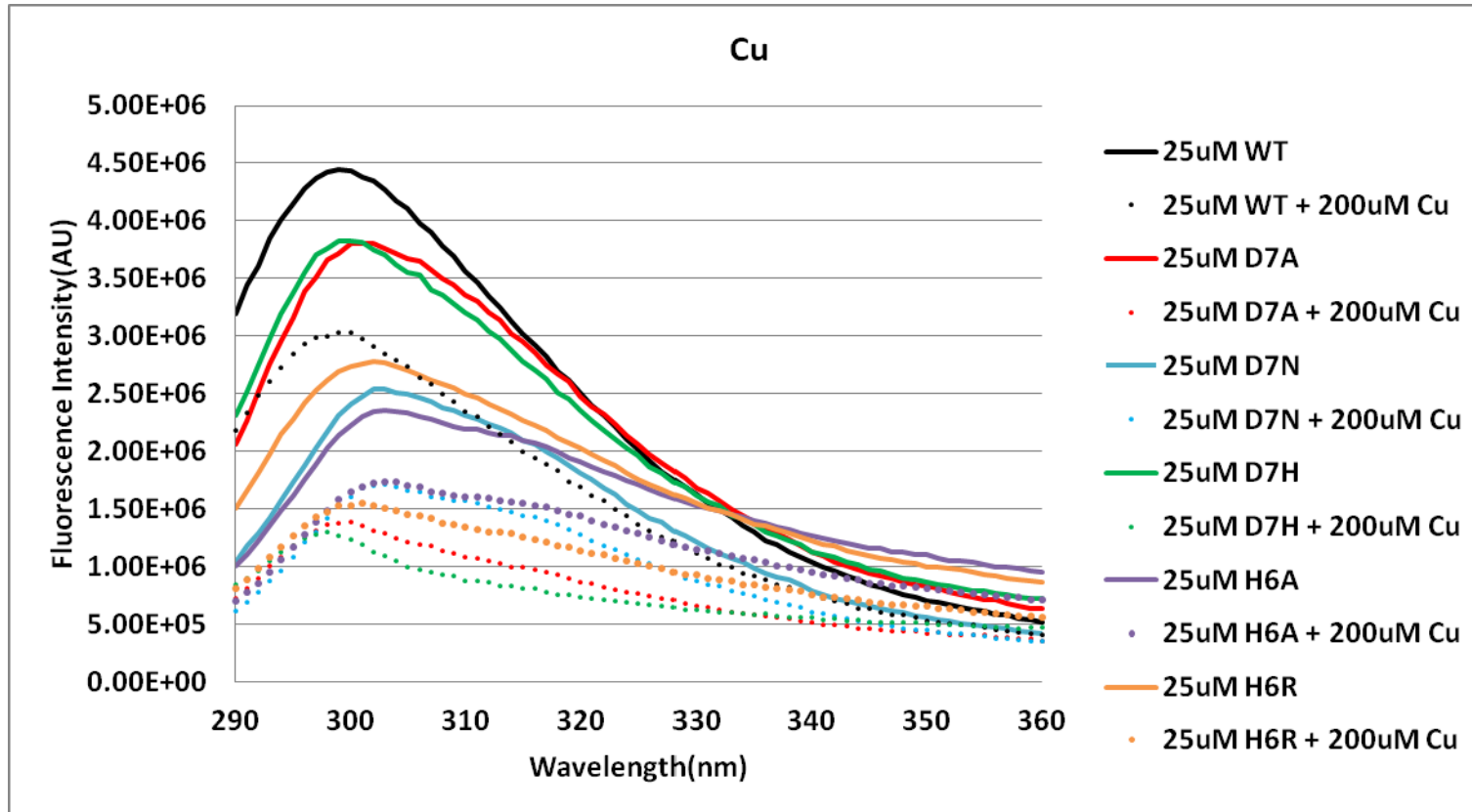


圖 5-2-4、原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以銅離子滴定之自身螢光光譜。以 270nm 為激發光，讀取 290~360nm 螢光讀值，實心線條分別為 25 $\mu$ M 原生型、H6A、H6R、D7A、D7H、D7N  $\beta$ -類澱粉蛋白之光譜，虛線分別為 25 $\mu$ M 原生型、H6A、H6R、D7A、D7H、D7N  $\beta$ -類澱粉蛋白加入 200 $\mu$ M 銅離子之光譜。

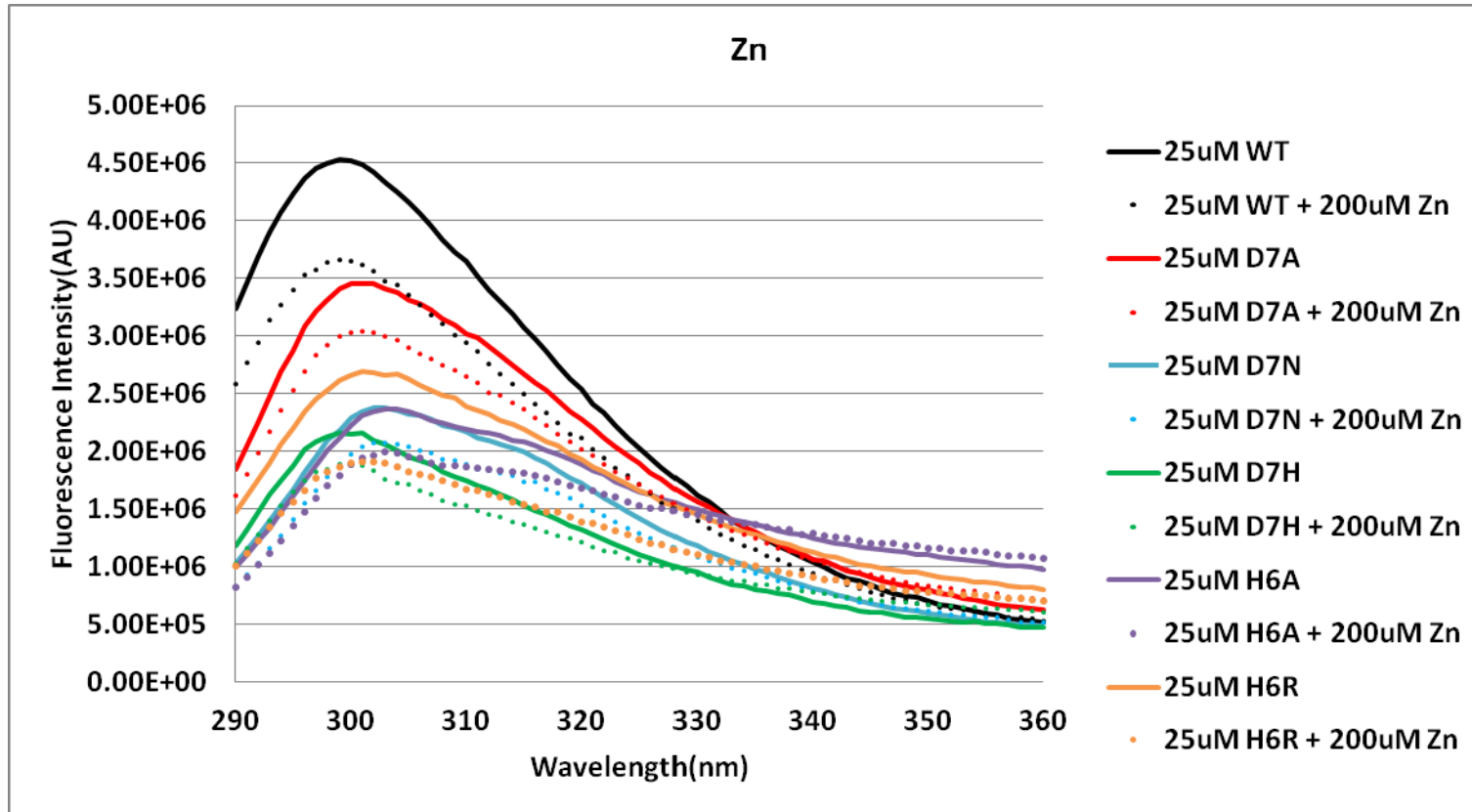


圖 5-2-5、原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以鋅離子滴定之自身螢光光譜。以 270nm 為激發光，讀取 290~360nm 螢光讀值，實心線條分別為 25 $\mu$ M 原生型、H6A、H6R、D7A、D7H、D7N  $\beta$ -類澱粉蛋白之光譜，虛線分別為 25 $\mu$ M 原生型、H6A、H6R、D7A、D7H、D7N  $\beta$ -類澱粉蛋白加入 200 $\mu$ M 鋅離子之光譜。

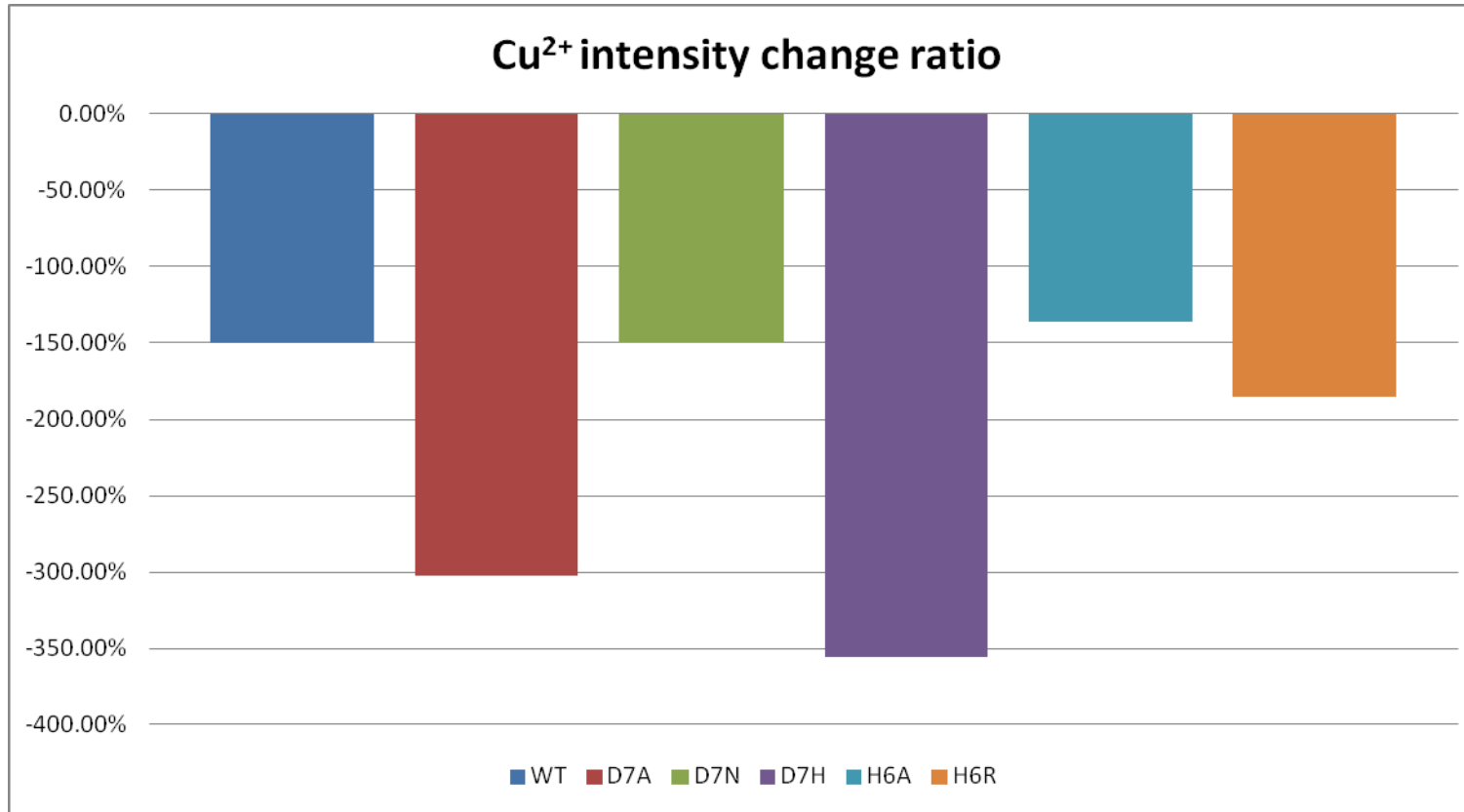


圖 5-2-6、原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液銅離子滴定前後自身螢光改變之比例。將 200 $\mu$ M 銅離子下之 305nm 螢光訊號除以 0 $\mu$ M 下之 305nm 螢光訊號。

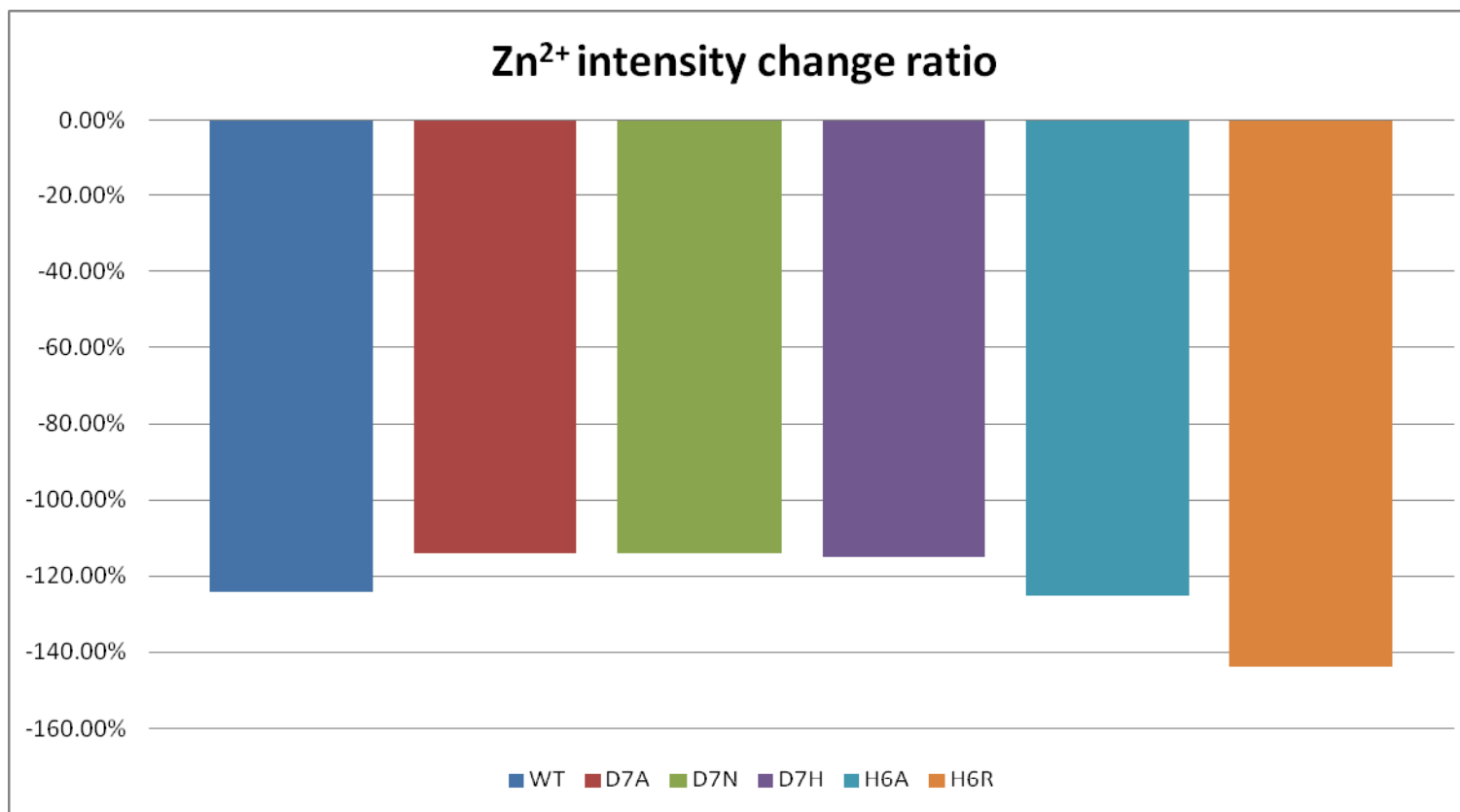


圖 5-2-7、原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液鋅離子滴定前後自身螢光改變之比例。將 200 $\mu$ M 鋅離子下之 305nm 螢光訊號除以 0 $\mu$ M 下之 305nm 螢光訊號。



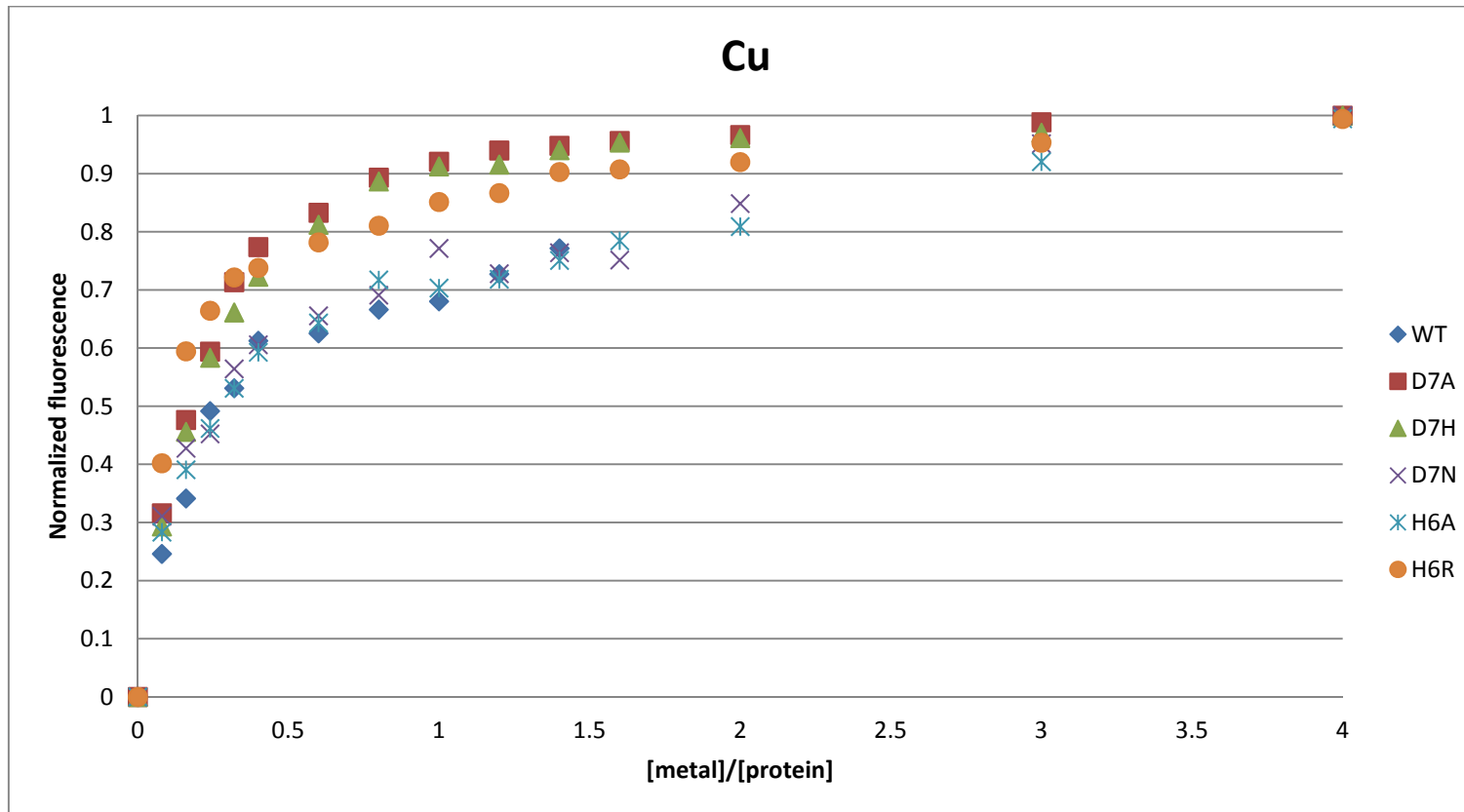


圖 5-2-8、原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以自身螢光測定之銅離子滴定曲線。各組資料皆為三重複以上實驗平均值，選取 305nm 波長經正規化處理作圖。

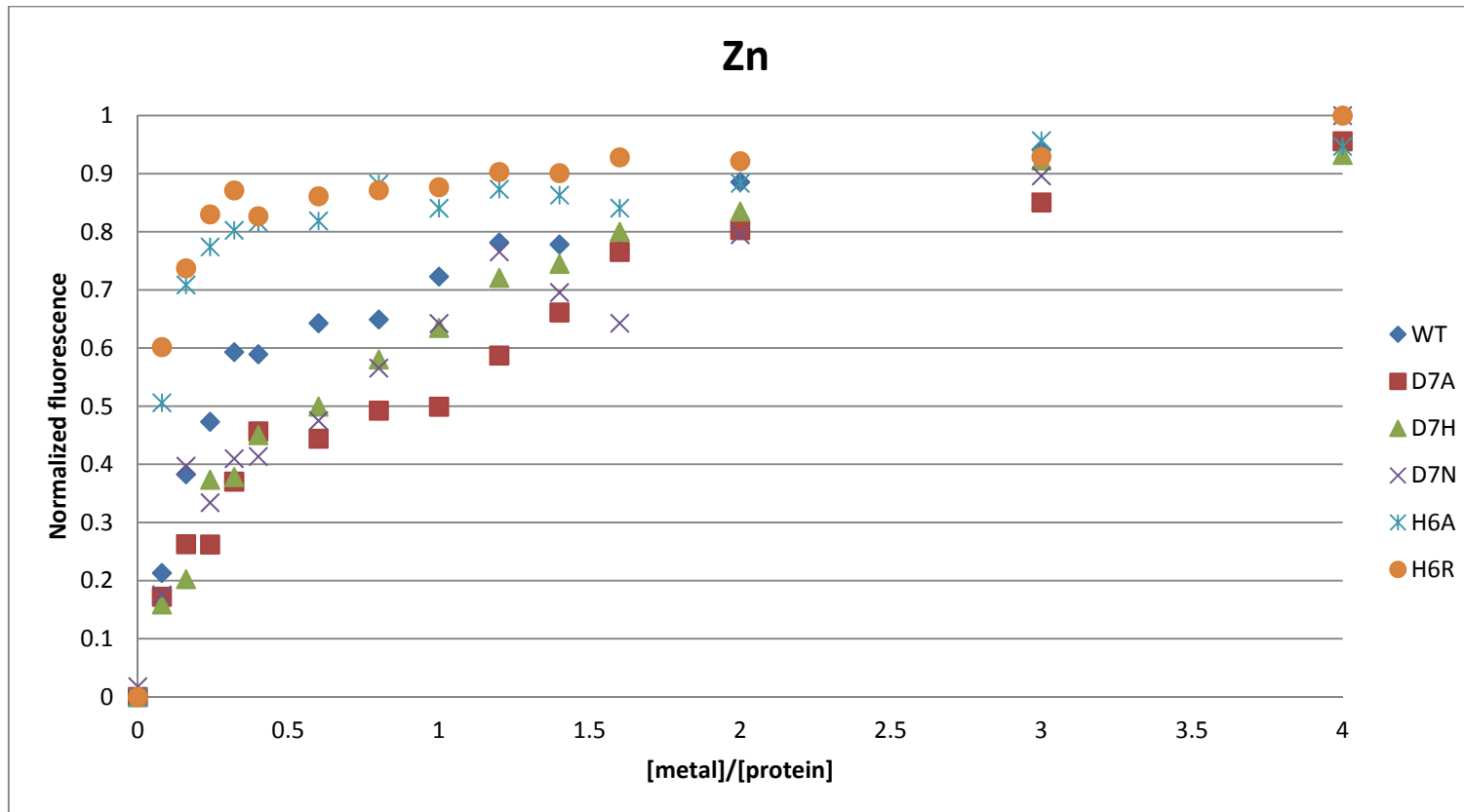


圖 5-2-9、原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以自身螢光測定之鋅離子滴定曲線。各組資料皆為三重複以上實驗平均值，選取 305nm 波長經正規化處理作圖。

### 5-3 鋅、銅離子對原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體滴定之 Bis-ANS 光譜

除了自身螢光以外，疏水性螢光染劑 Bis-ANS 也被用來檢驗  $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬離子的結合關係，為了避免 Bis-ANS 與溶液中其他分子結合影響實驗結果，實驗中僅使用極低濃度的 Bis-ANS(5 $\mu$ M) ，並且在  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液與金屬離子溶液內皆預先加入等濃度 Bis-ANS，使其濃度在滴定過程中保持恆定避免影響螢光強弱。

加入銅離子 Bis-ANS 之螢光圖譜如圖 5-3-1，可發現加入銅離子時 Bis-ANS 之螢光也會發生淬滅的現象，意味著加入銅離子時將會使  $\beta$ -類澱粉蛋白疏水性區域裸露減少，可見銅離子確有促進  $\beta$ -類澱粉蛋白聚集之可能。圖 5-3-2 中則可發現，加入鋅離子時，WT、D7A、D7H、D7N、H6R 之訊號皆上升，代表鋅離子的影響與銅離子相反，將促使  $\beta$ -類澱粉蛋白之疏水性區域裸露增加。比較其訊號改變大小如圖 5-3-3 及圖 5-3-4，加入銅離子時 WT 與 D7H 有較大的訊號改變，加入鋅離子則為 WT、D7N、D7H 變化最為明顯。

將 500nm 之訊號經前述正規化處理後得到圖 5-3-5 及圖 5-3-6 的滴定曲線，觀察可發現，銅離子的加入對原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白影響之差異不大。但在加入鋅離子時，除了訊號強度增加而非減少之外，值得特別注意的是，H6A 及 H6R 兩組，在鋅離子存在的情況下表現之行為明顯與其他  $\beta$ -類澱粉蛋白不同，H6A 沒有顯著的訊號改變發生，H6R 則可觀察到先下降後上升的情況，雖然此結果也再次告訴我們 Histidine<sub>6</sub> 對  $\beta$ -類澱粉蛋白與鋅離子之結合有很大的影響。

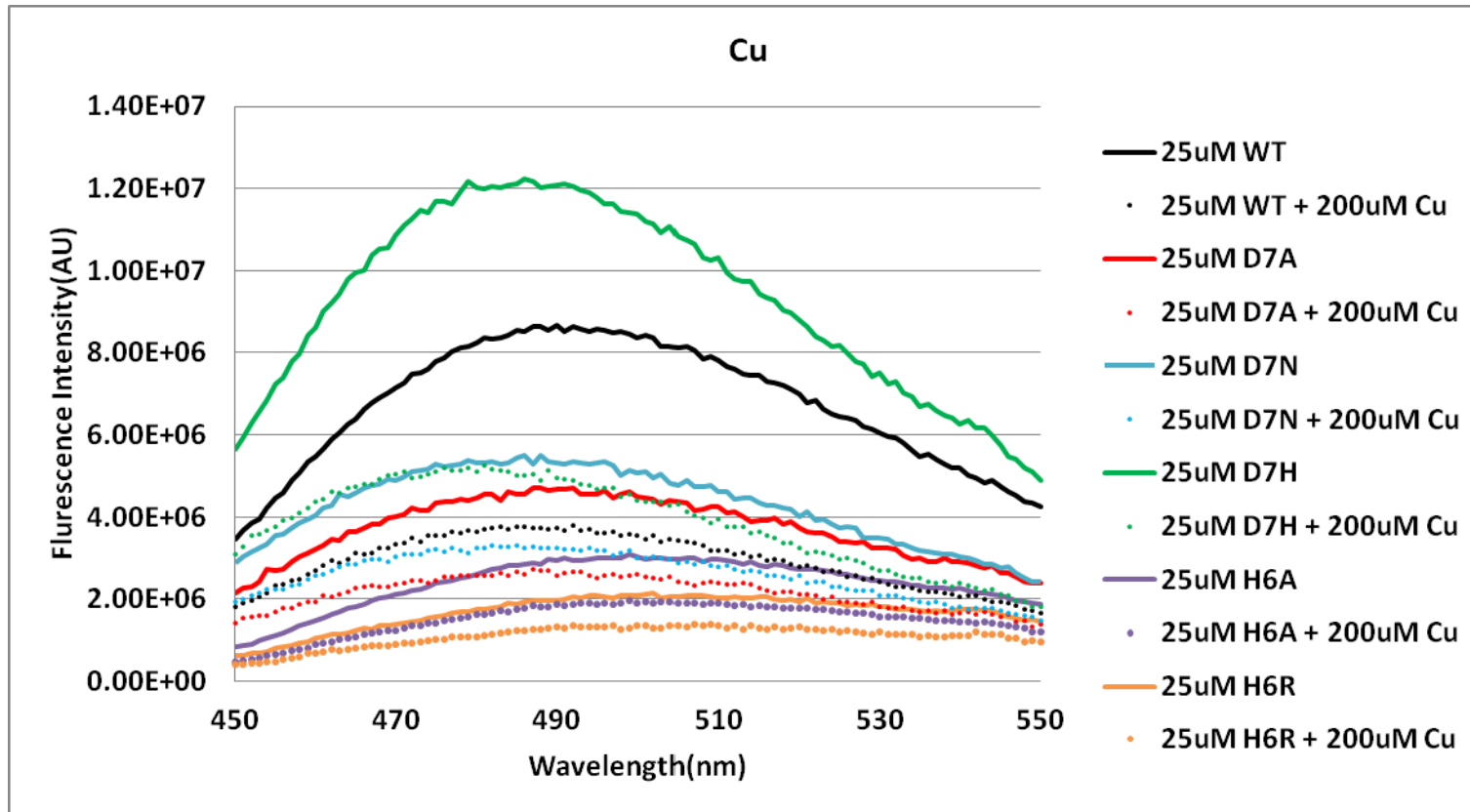


圖 5-3-1、原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以銅離子滴定之 Bis-ANS 光譜。以 400nm 為激發光，讀取 450~550nm 螢光讀值，Bis-ANS 濃度為 5 $\mu$ M，實心線條分別為 25 $\mu$ M 原生型、H6A、H6R、D7A、D7H、D7N  $\beta$ -類澱粉蛋白之光譜，虛線分別為 25 $\mu$ M 原生型、H6A、H6R、D7A、D7H、D7N  $\beta$ -類澱粉蛋白加入 200 $\mu$ M 銅離子之光譜。

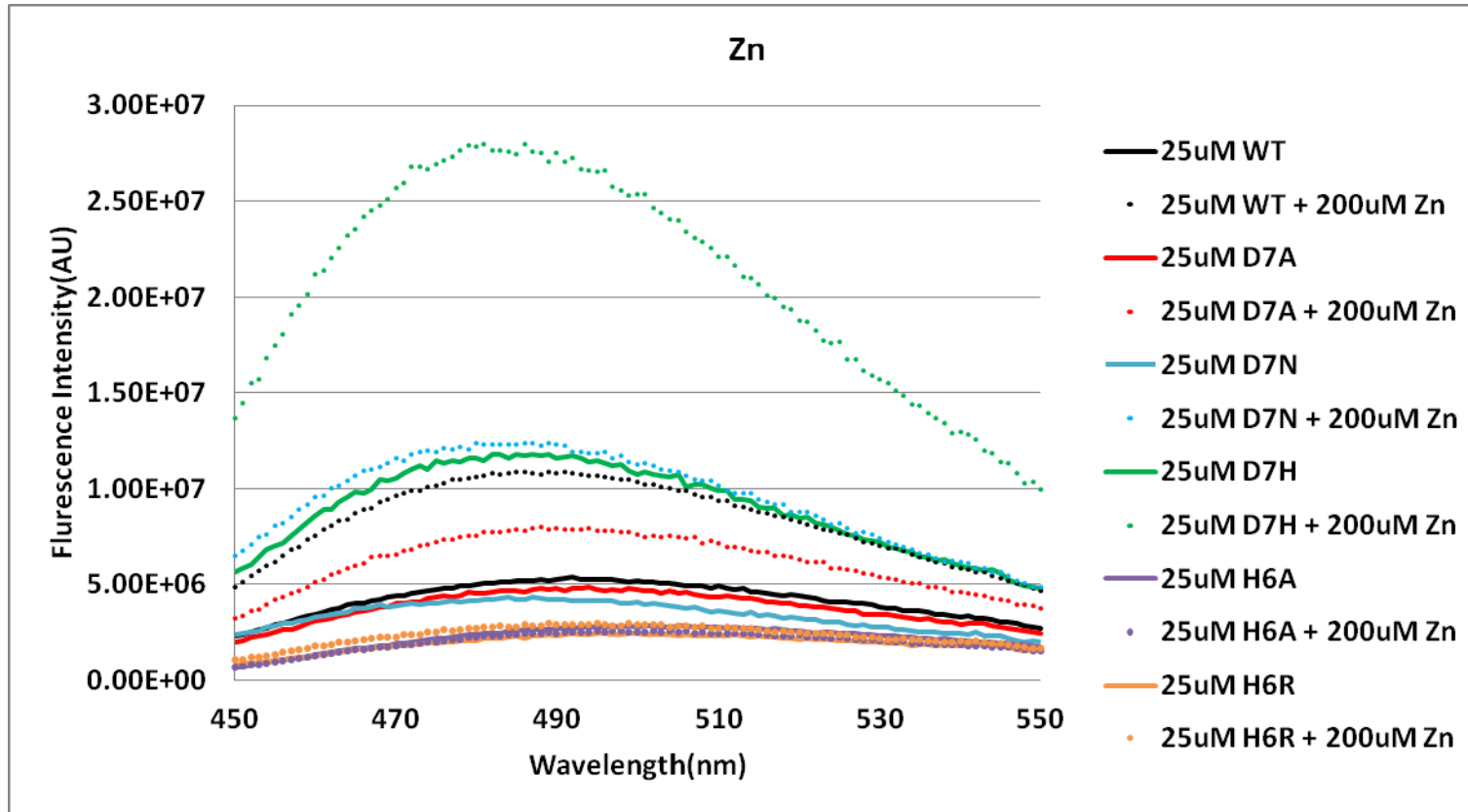


圖 5-3-2、原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以鋅離子滴定之 Bis-ANS 光譜。以 400nm 為激發光，讀取 450~550nm 螢光讀值，Bis-ANS 濃度為 5 $\mu$ M，實心線條分別為 25 $\mu$ M 原生型、H6A、H6R、D7A、D7H、D7N  $\beta$ -類澱粉蛋白之光譜，虛線分別為 25 $\mu$ M 原生型、H6A、H6R、D7A、D7H、D7N  $\beta$ -類澱粉蛋白加入 200 $\mu$ M 鋅離子之光譜。

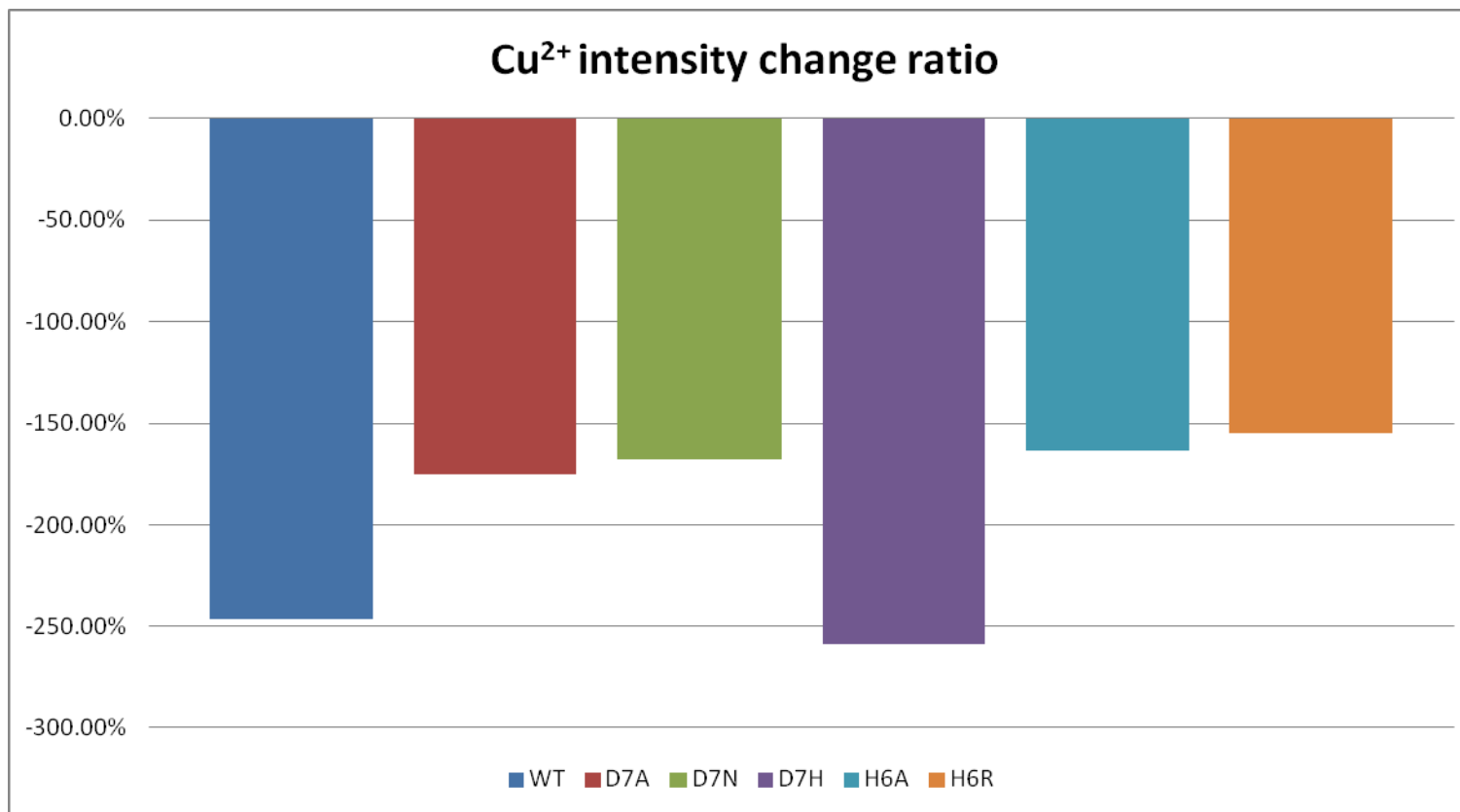


圖 5-3-3、原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液銅離子滴定前後 Bis-ANS 螢光改變之比例。將 200 $\mu$ M 銅離子下之 500nm 螢光訊號除以 0 $\mu$ M 下之 500nm 螢光訊號。

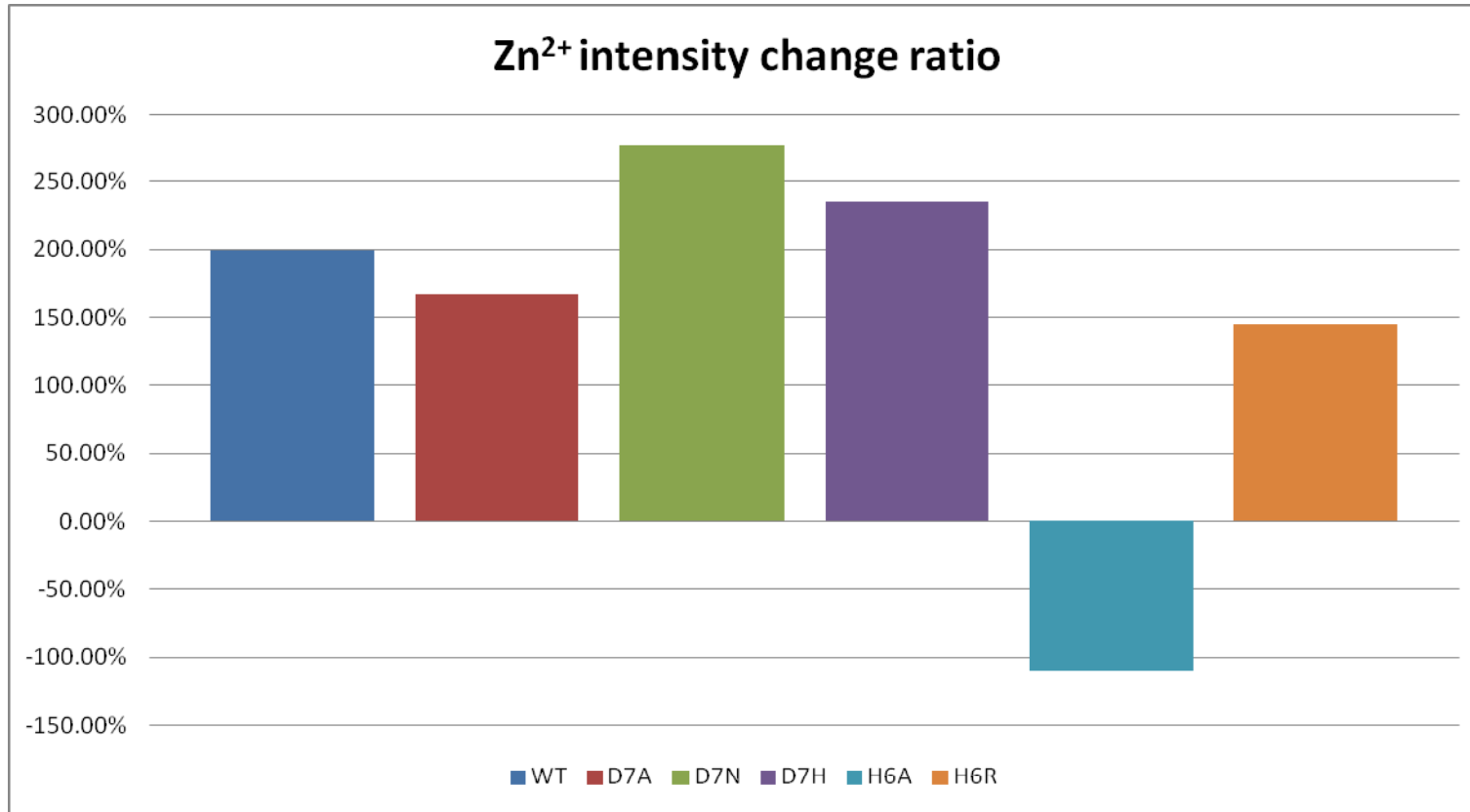


圖 5-3-4、原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液銅離子滴定前後 Bis-ANS 螢光改變之比例。將 200 $\mu$ M 鋅離子下之 500nm 螢光訊號除以 0 $\mu$ M 下之 500nm 螢光訊號。

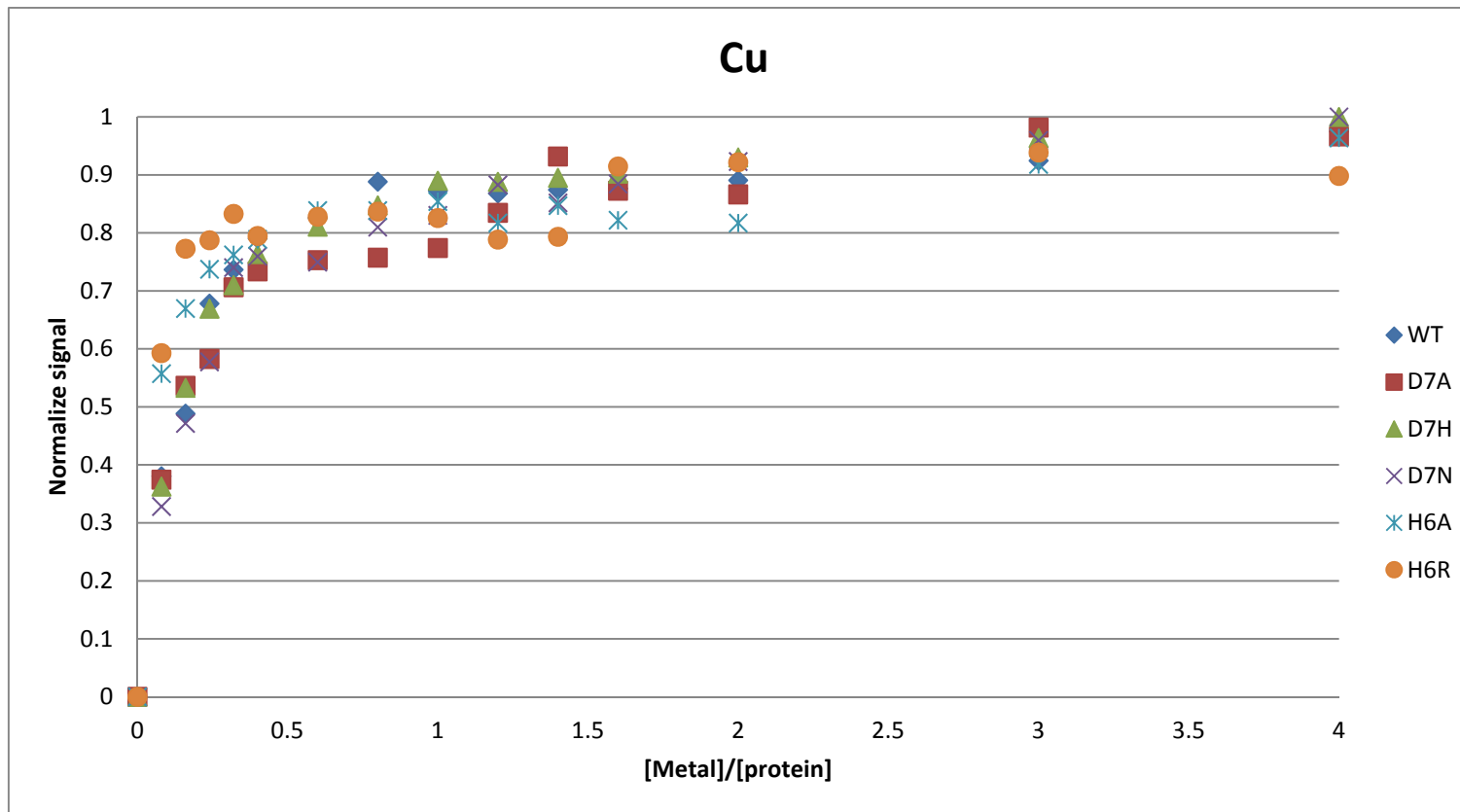


圖 5-3-5、原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以 Bis-ANS 螢光測定之銅離子滴定曲線。各組資料皆為三重複以上實驗平均值，選取 500nm 波長經正規化處理作圖。



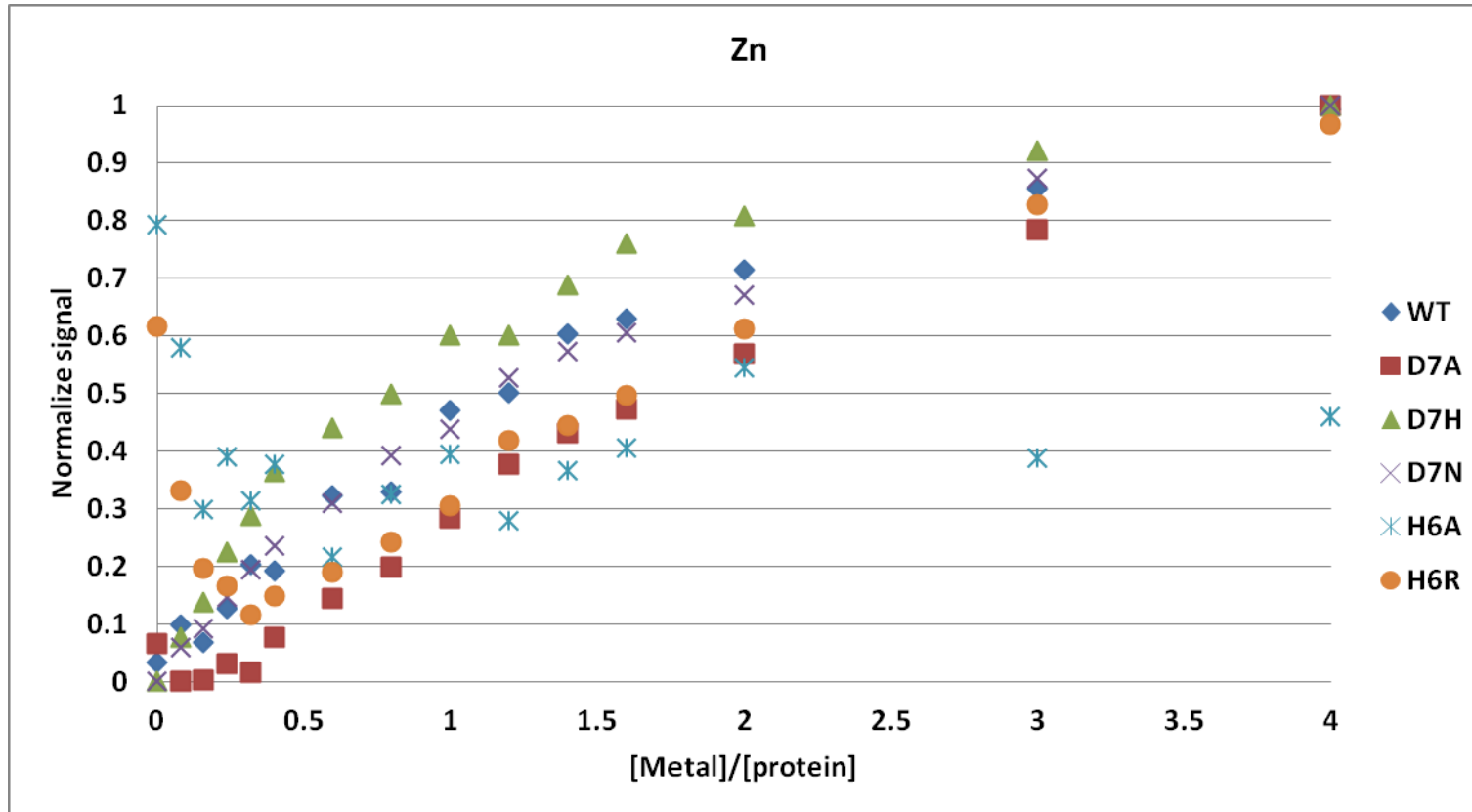


圖 5-3-6、原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體溶液以 Bis-ANS 螢光測定之鋅離子滴定曲線。各組資料皆為三重複以上實驗平均值，選取 500nm 波長經正規化處理作圖。

#### 5-4 鋅、銅離子對原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白單體滴定之圓二色光譜

圓二色光譜所測定為蛋白質之二級結構變化，此處先以原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白進行測試。圖 5-4-1 為利用 NaOH 法所獲得之原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白單體對銅離子滴定之曲線，可發現以此方法獲得之  $\beta$ -類澱粉蛋白單體傾向 random coil 的二級結構，在滴定銅離子時雖可發現光譜之變化但二級結構仍未有顯著變化。

觀察圖 5-4-1 發現 220nm 附近不同濃度下之 CD 訊號差異較為明顯，因此試著以 time course 測量 220nm 之 CD 訊號 120 秒，重複量測三組後取平均，並將不同金屬離子下之 CD 訊號正規化處理完成滴定曲線。圖 5-4-2 為鋅、銅離子滴定原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白之結果，觀察其滴定曲線未能有顯著的狀態變化。可推測在此實驗條件下  $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬離子結合的過程中並沒有顯著的二級結構變化，因此不適合用來當作檢測其結合狀態之探子(probe)。



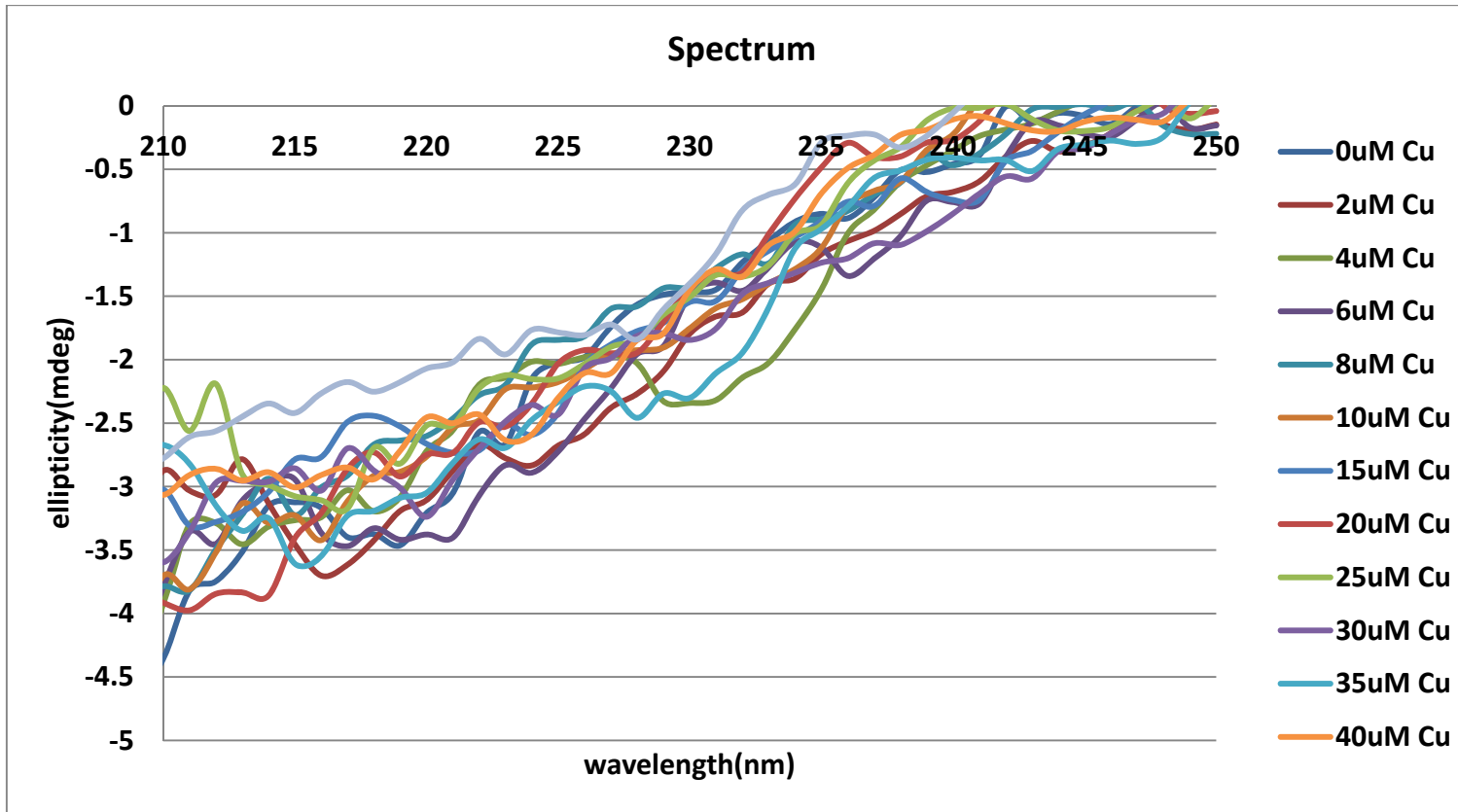


圖 5-4-1、以銅離子對原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白滴定之圓二色光譜。 $\beta$ -類澱粉蛋白之濃度為  $25\mu\text{M}$ ，重複量測  $180\sim 250\text{nm}$  之光譜並平均

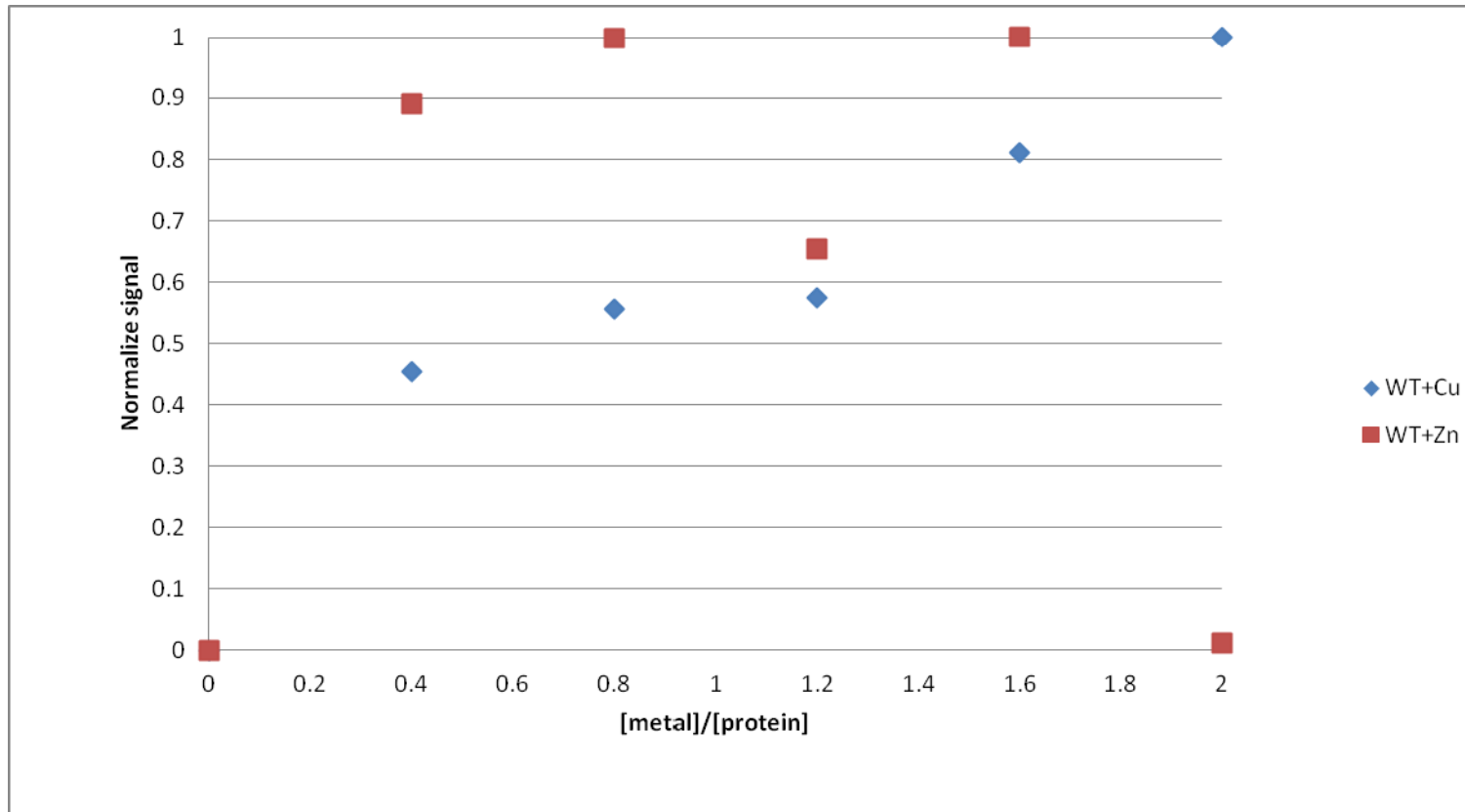


圖 5-4-2、以圓二色光譜獲得之鋅、銅離子對原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白之滴定曲線。原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白之濃度為  $25\mu\text{M}$ ，以 1 秒間隔測量 220nm 之 CD 訊號 120 秒，並重複三次後平均，正規化後作滴定曲線。

## 5-5 不同方法獲得之滴定曲線比較與自身螢光滴定曲線之 fitting

前述 5-2~5-4 的部分，分別使用 Intrinsic fluorescence、Bis-ANS fluorescence、及 Circular dichroism 三種光譜法來檢驗原生型及突變型之  $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬結合的關係，將其正規化之訊號做比較如圖 5-5-1~5-5-12。比較發現，以不同光譜法所獲得之滴定曲線雖不相同，然而差異並不大，大致上可看出相同趨勢，圖 5-5-10 及圖 5-5-12 中鋅離子對 H6A、H6R 突變型可能因蛋白質本身性質改變造成 Bis-ANS 之訊號異常。

於此，我們試著將變化較為一致 intrinsic fluorescence 結果，利用 Origin 軟體以不同的方程式 fitting，以試著解釋各種不同  $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬結合之可能機制。

One-site specific binding equation :

$$Y = \frac{B_{\max} * X}{K_d + X}$$

此方程式中  $B_{\max}$  代表結合位置(binding site)的濃度、而  $K_d$  為 50%結合發生時之濃度，同時也是反應之解離常數。使用此方程式時假設所有的金屬離子一旦加入溶液中皆與蛋白質結合，沒有自由離子(free ion)的存在。表 5-5-1 為其結果，可以發現在以此模組(model)解釋時，各種  $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬離子所 fitting 之結果  $R^2$  皆在 0.9 以上。而所有情況下之  $B_{\max}$  皆約略等於 1，由此推測所使用的突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白可能並未造成顯著的結果關係變化。

在解離常數方面，與銅離子結合之情況下  $WT > H6A > D7N > D7H > D7A > H6R$ ，與鋅離子結合之情況  $D7A > D7H > D7N > WT > H6A > H6R$ 。比較同一種  $\beta$ -類澱粉蛋白與鋅銅離子之結合關係可發現，WT 與銅、鋅之解離常數差異並不大，然而 D7A、D7H、D7N 三個 D<sub>7</sub> 位置之突變型，其與鋅離子反應之解離常數皆大於銅離子；相反的，H6A、H6R 兩個 H<sub>6</sub> 位置之突變型，與鋅離子作用之解離常數皆小於銅離子。由此現象可以得到兩個推論： $\beta$ -類澱粉蛋白與鋅、銅離子兩者以不同的機制結合，因此在不同的突變型情況下會有不同的變化趨勢。並且在鋅離子結

合的情況下，D<sub>7</sub>位置突變型與H<sub>6</sub>位置突變型有明顯的差異，可見與突變之胺基酸種類相比，突變的位置對金屬結合能力有更顯著的影響。

儘管由此方程式得到之 fitting 結果 R<sup>2</sup> 極高，然而觀察發現在高濃度的情況下，此 fitting 之 residue 與金屬離子有明顯的線性關係，表示除了 specific binding 外在此反應中可能也有 nonspecific binding 之存在。因此我們也使用同時考慮兩者之 total binding equation 來進行 fitting。

Total binding equation :

$$Y = \frac{B_{\max} * X}{K_d + X} + NS * X$$

此方程式中的兩項分別代表 specific binding 與 nonspecific binding 的影響，後項中 NS 為 nonspecific binding constant，與金屬離子之濃度呈線性關係。利用此方程式 fitting 所得到的結果如表 5-5-2，考慮 nonspecific binding 的情況下所得到的 R<sup>2</sup> 較前者來的更高。比較此方程式 fitting 之 B<sub>max</sub> 時，各種 β-類澱粉蛋白之間數值並不相同，但除 D7A 以外，同一種類之 β-類澱粉蛋白在與鋅、銅離子結合時之 B<sub>max</sub> 相近。解離常數方面，與銅離子結合時 D7H > D7A > WT > H6A > D7N > H6R，與前述之值相比僅有 D7A 及 D7H 有顯著之差異，然而此二者所得到的 nonspecific binding constant 之值為負，並不合理，不適用此公式 fitting。與鋅離子結合情況 D7H > D7A > D7N > WT > H6R > H6A，與前述結果雖略有變化，但同樣可以發現 H<sub>6</sub> 之突變型有明顯差異，此外 D7H 之突變型與鋅離子的解離常數相對於其他 β-類澱粉蛋白有最顯著的差異。

以上二公式皆假設溶液中沒有自由離子的存在，理論上只有在低濃度 ([metal]/[protein]<1) 的情況下適用，所有加入的離子皆與 β-類澱粉蛋白結合，然而由於本實驗中溶液中加入甘胺酸與金屬離子結合，因此在高濃度的情況下仍可視為沒有自由離子的存在，而此種甘胺酸與金屬離子的結合關係便可能反應在 nonspecific binding 的部分。

為與先前發表的結果進行比較<sup>83</sup>，故嘗試以該 paper 中使用的 single-site

depletion binding equation 來做 fitting。

Single-site depletion binding equation：

$$Y = \frac{1}{2P_t} \left[ (K_d + L_t + P_t) - \sqrt{(K_d + L_t + P_t)^2 - 4P_tL_t} \right]$$

此公式中  $P_t$  為蛋白質濃度， $L_t$  則是金屬離子的濃度，與前述二式的差異在於此處將自由離子的效應同時考慮在內。表 5-5-3 為 fitting 之結果，可發現以此公式 fitting 並不合適，H6A 及 H6R 甚至有完全無法 fitting 的情況發生。該篇論文中得到原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白對銅與鋅結合之解離常數分別為 4.9 及 12 $\mu$ M，此處則為 2.26 及 2.86 $\mu$ M，然而由於本實驗中相較該 paper 添加了甘胺酸與金屬離子結合，因此可能較適合使用 total binding equation 來描述結合之情形。以該式 fitting 獲得的原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白解離常數(3.86、4.26 $\mu$ M)也與該 paper 中數值較為接近。

以 total binding fitting 之曲線載於附錄 D 中。



表 5-5-1、以 one-site specific binding equation 對自身螢光滴定曲線 fitting 之結果

	Cu			Zn		
	B <sub>max</sub>	K <sub>d</sub> ( $\mu$ M)	R <sup>2</sup>	B <sub>max</sub>	K <sub>d</sub> ( $\mu$ M)	R <sup>2</sup>
WT	0.97	7.29	0.961	0.98	7.03	0.968
D7A	1.06	4.37	0.995	1.06	18.7	0.949
D7H	1.06	4.89	0.997	1.08	15.09	0.989
D7N	0.95	5.89	0.955	1.02	13.27	0.927
H6A	0.94	6.32	0.962	0.92	1.42	0.983
H6R	0.97	2.88	0.991	0.95	1.11	0.987

表 5-5-2、以 total binding equation 對自身螢光滴定曲線 fitting 之結果

	Cu				Zn			
	B <sub>max</sub>	K <sub>d</sub> ( $\mu$ M)	NS	R <sup>2</sup>	B <sub>max</sub>	K <sub>d</sub> ( $\mu$ M)	NS	R <sup>2</sup>
WT	0.73	3.86	3074	0.989	0.78	4.26	2571	0.985
D7A	1.13	4.95	-844	0.997	0.60	6.85	4145	0.967
D7H	1.13	5.53	-848	0.997	0.98	12.9	911	0.989
D7N	0.72	3.00	3071	0.989	0.61	4.68	4271	0.959
H6A	0.73	3.40	2886	0.995	0.89	1.24	598	0.984
H6R	0.90	2.31	1142	0.997	0.91	1.28	733	0.990

表 5-5-3、以 single-site depletion binding equation 對自身螢光滴定曲線 fitting 之結果

	Cu		Zn	
	K <sub>d</sub> ( $\mu$ M)	R <sup>2</sup>	K <sub>d</sub> ( $\mu$ M)	R <sup>2</sup>
WT	2.26	0.674	1.86	0.675
D7A	0.02	0.452	7.05	0.894
D7H	0.04	0.547	3.95	0.930
D7N	1.86	0.570	4.79	0.821
H6A	1.40	0.613	-	-
H6R	-	-	-	-





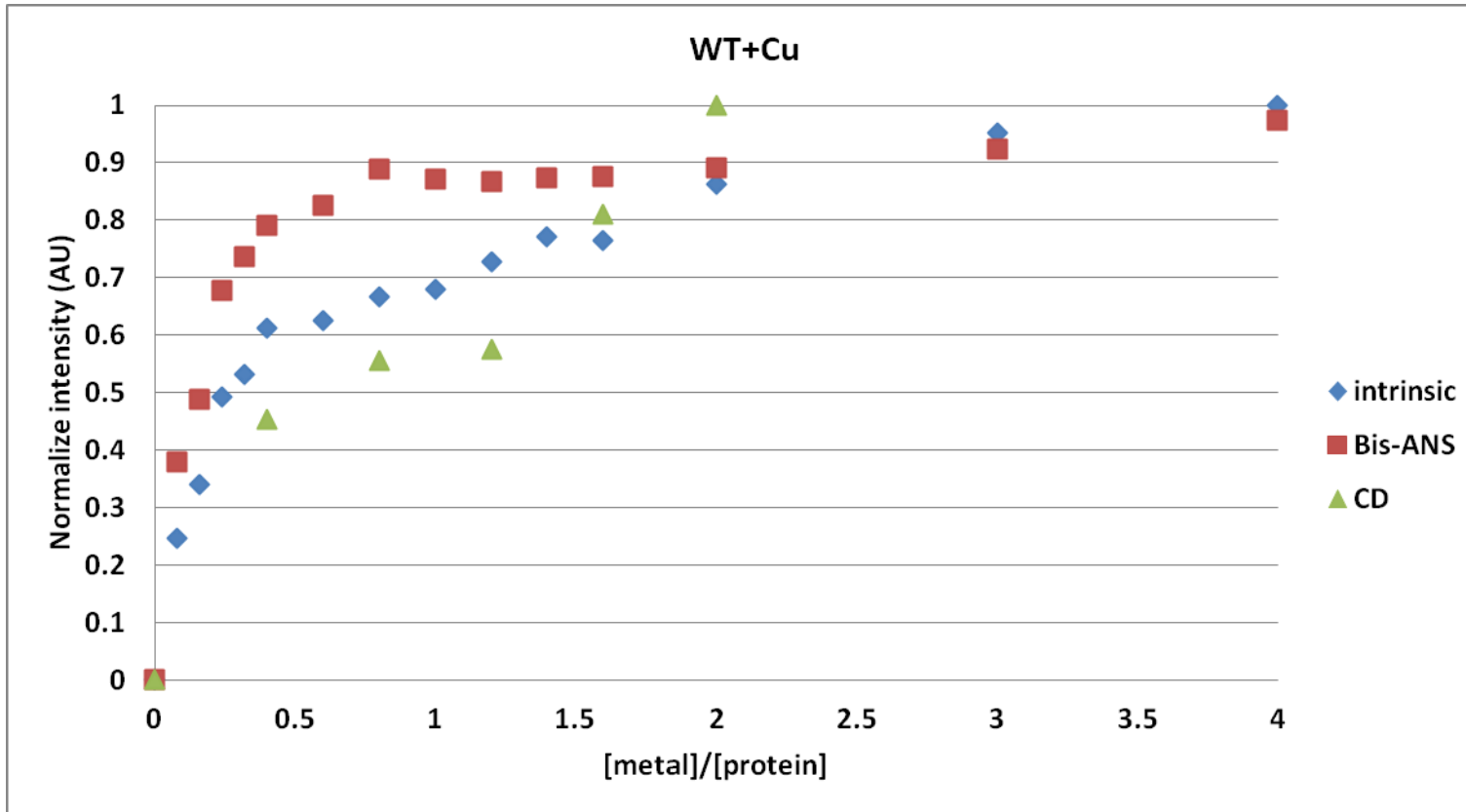


圖 5-5-1、以不同光譜法得到之銅離子對原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白滴定曲線比較。

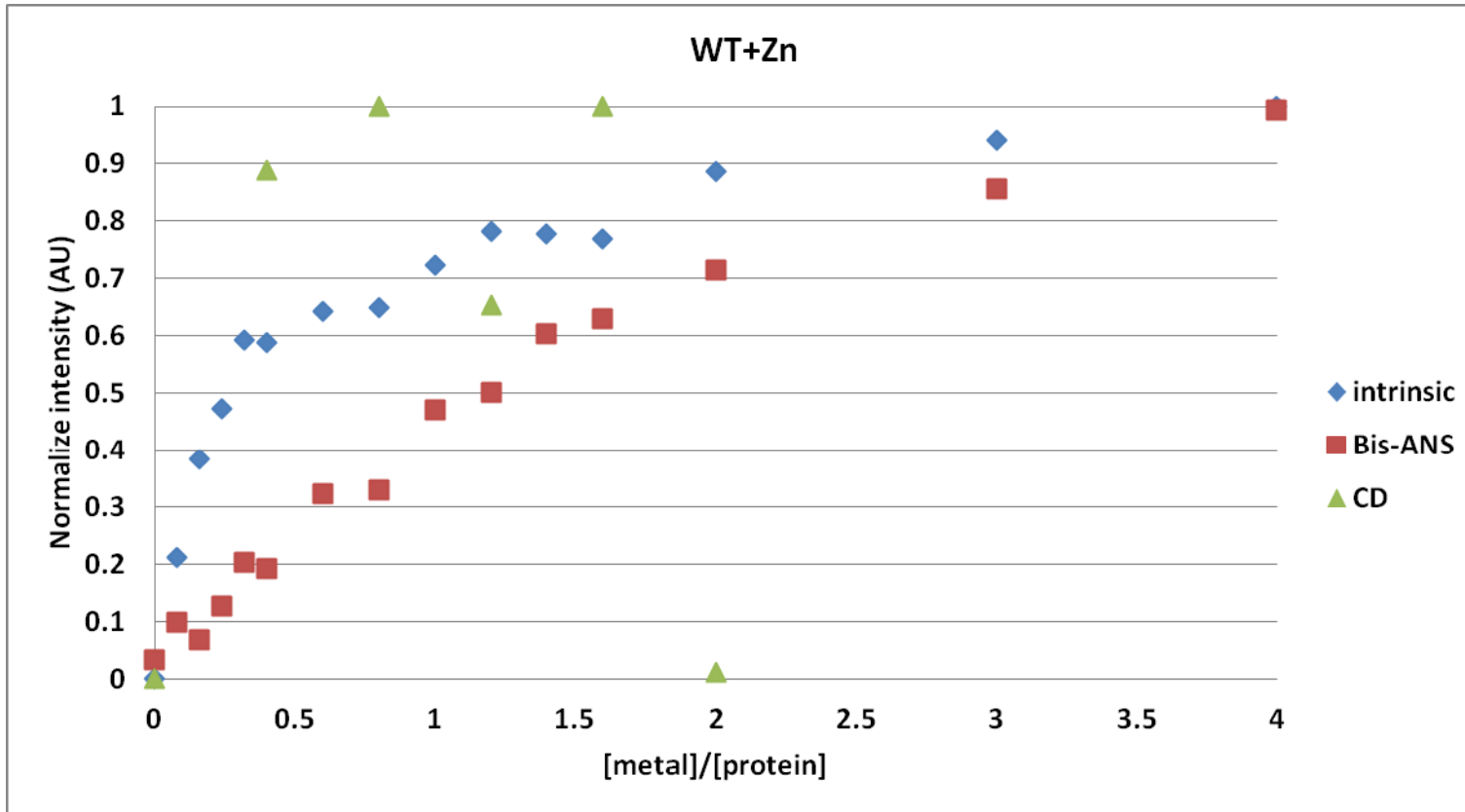


圖 5-5-2、以不同光譜法得到之鋅離子對原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白滴定曲線比較。

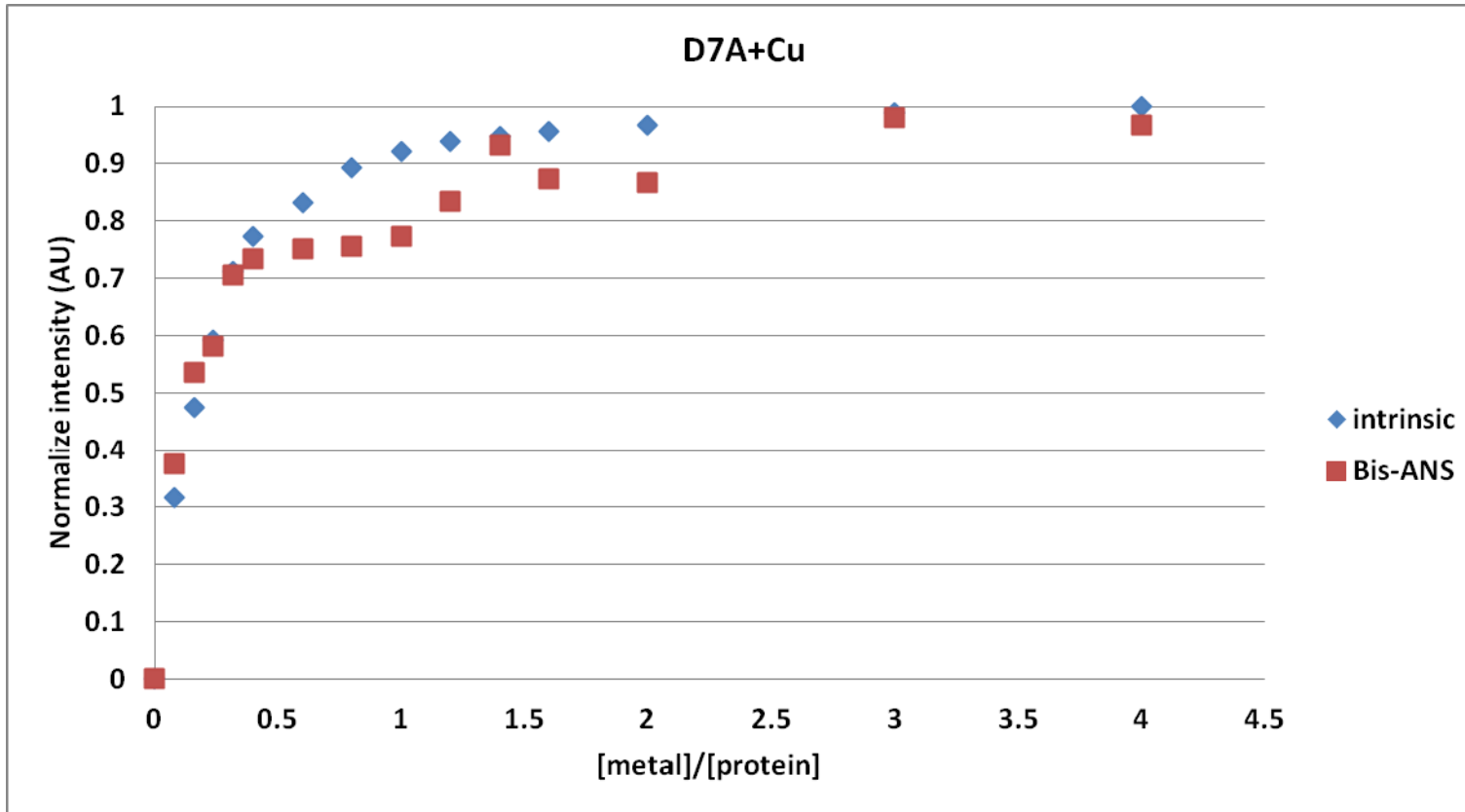


圖 5-5-3、以不同光譜法得到之銅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 D7A 滴定曲線比較。

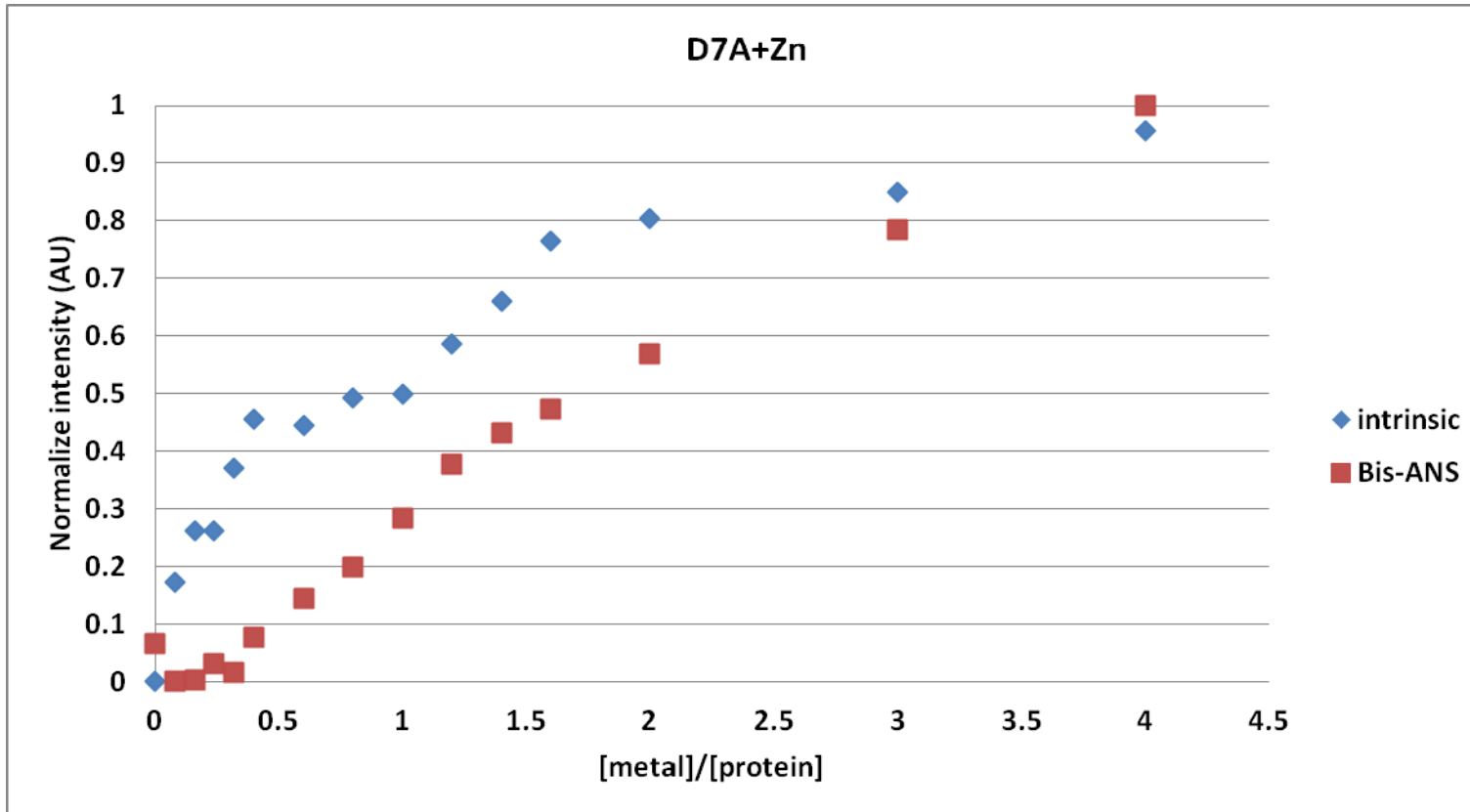


圖 5-5-4、以不同光譜法得到之鋅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 D7A 滴定曲線比較。

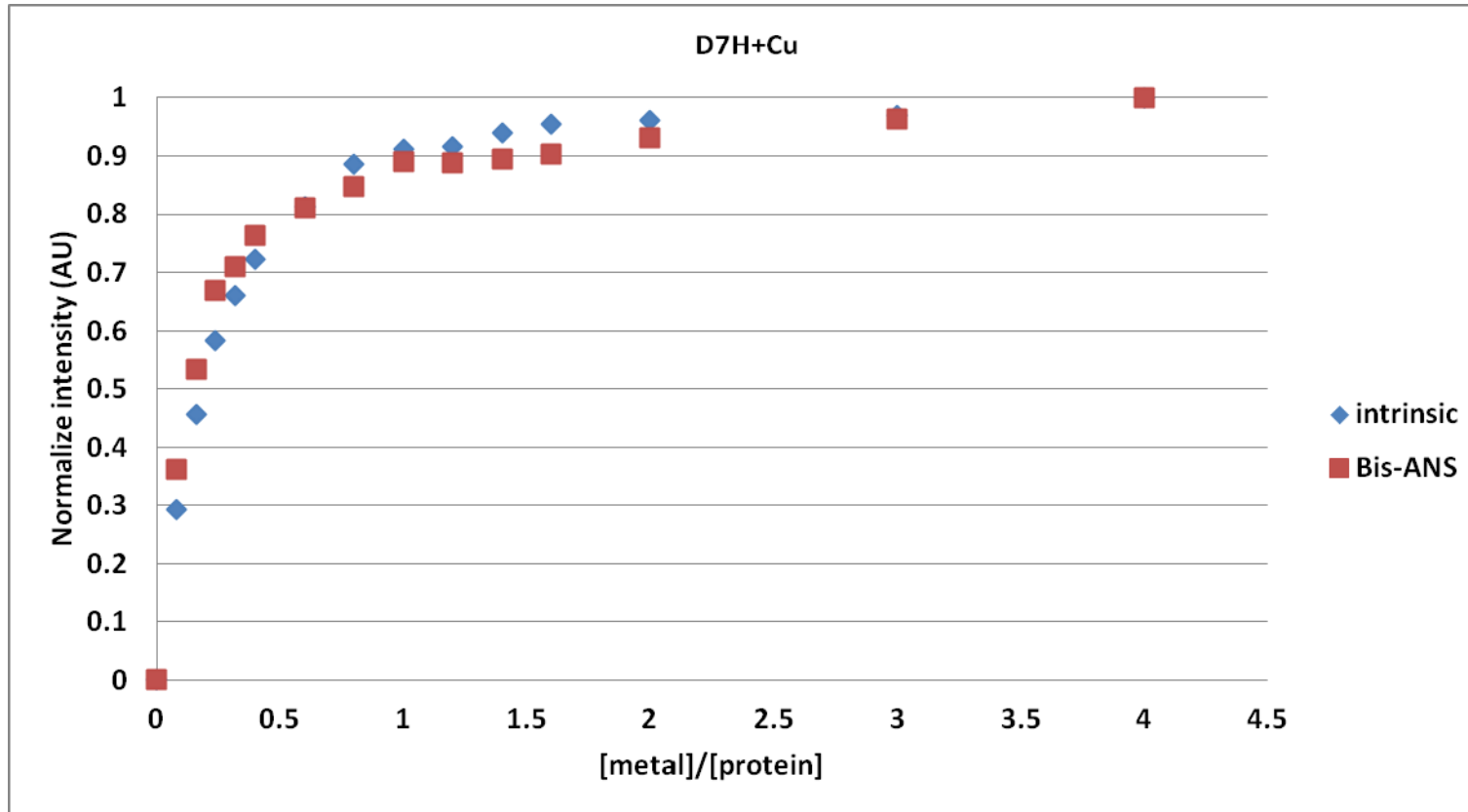


圖 5-5-5、以不同光譜法得到之銅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 D7H 滴定曲線比較。

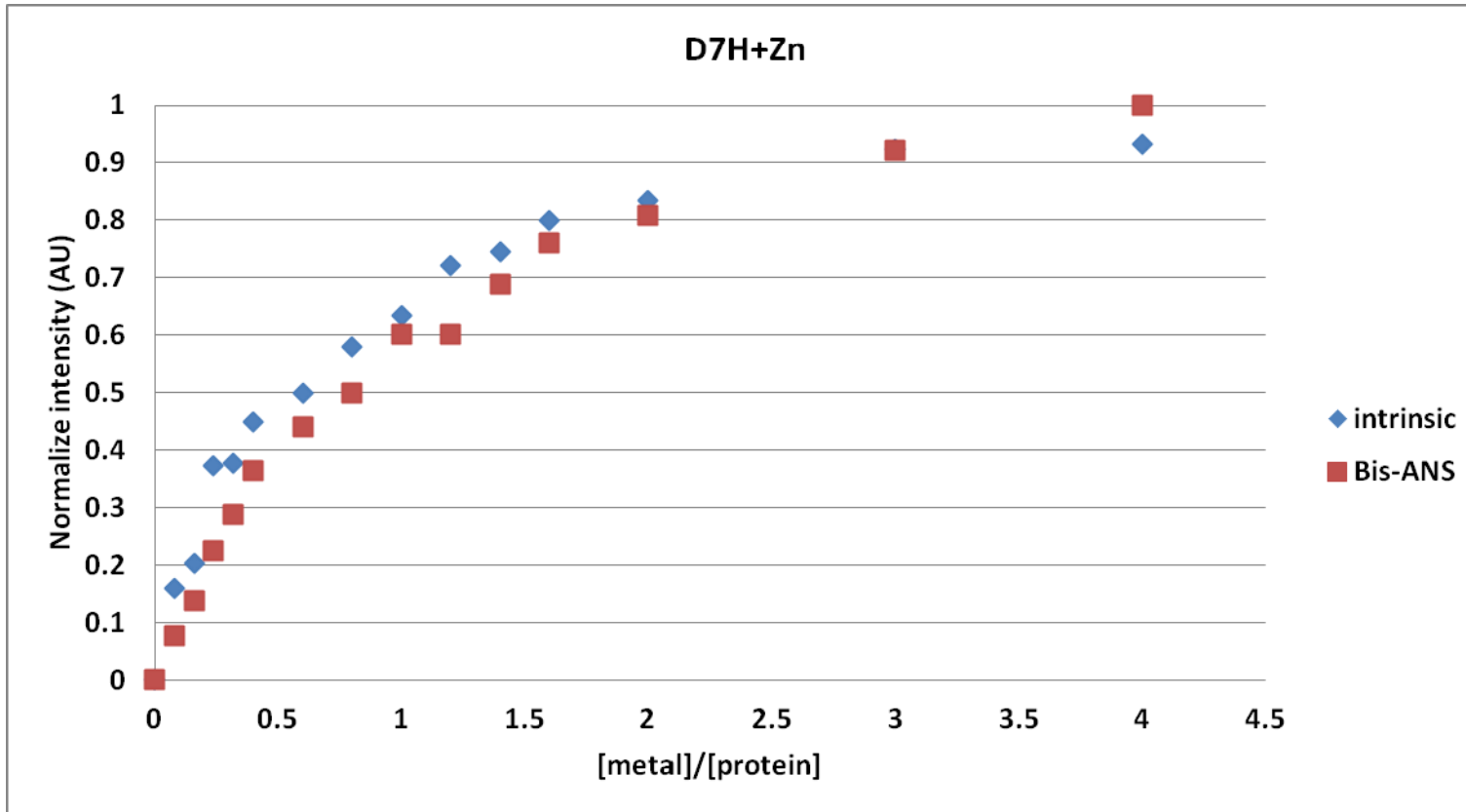


圖 5-5-6、以不同光譜法得到之鋅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 D7H 滴定曲線比較。

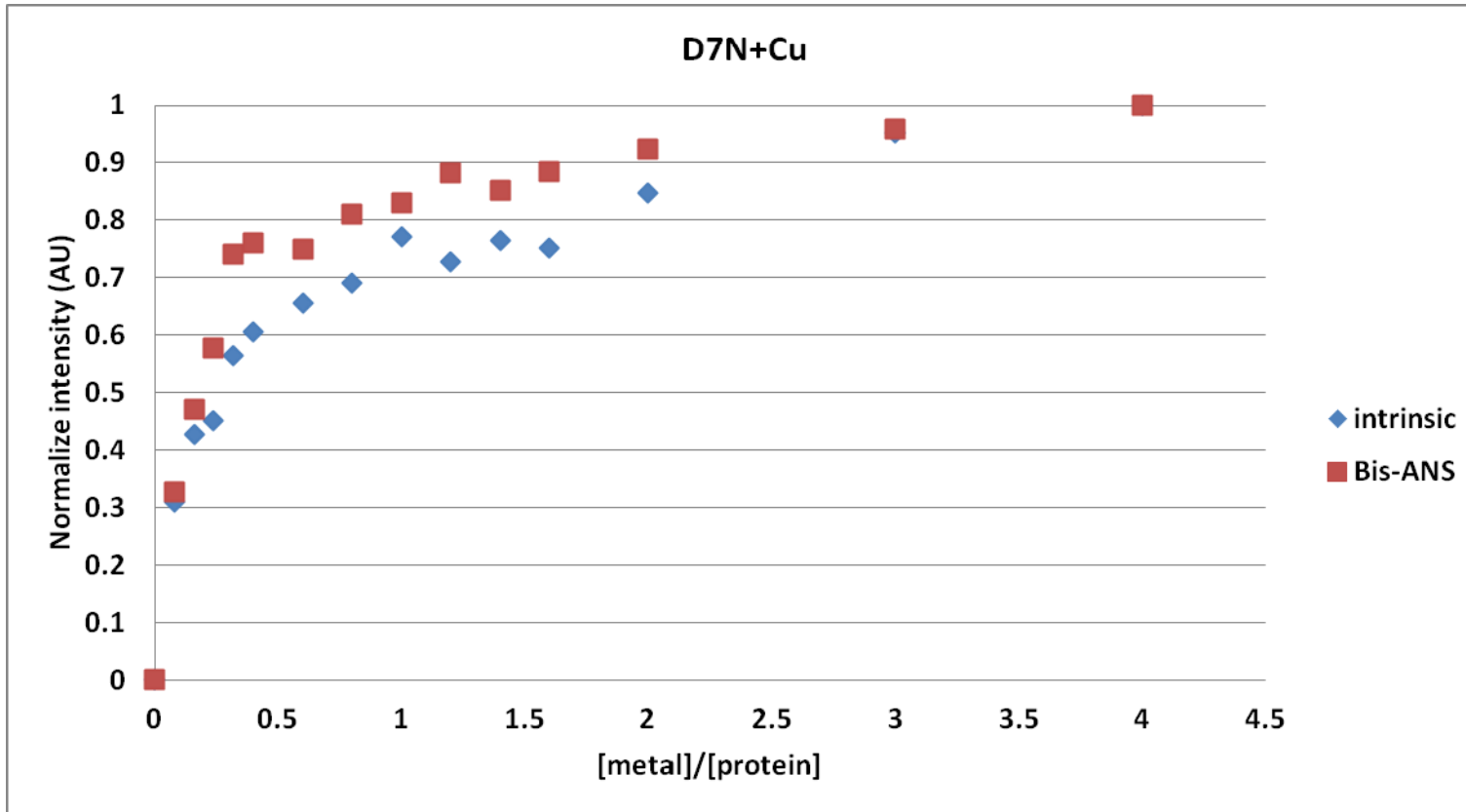


圖 5-5-7、以不同光譜法得到之銅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 D7N 滴定曲線比較。



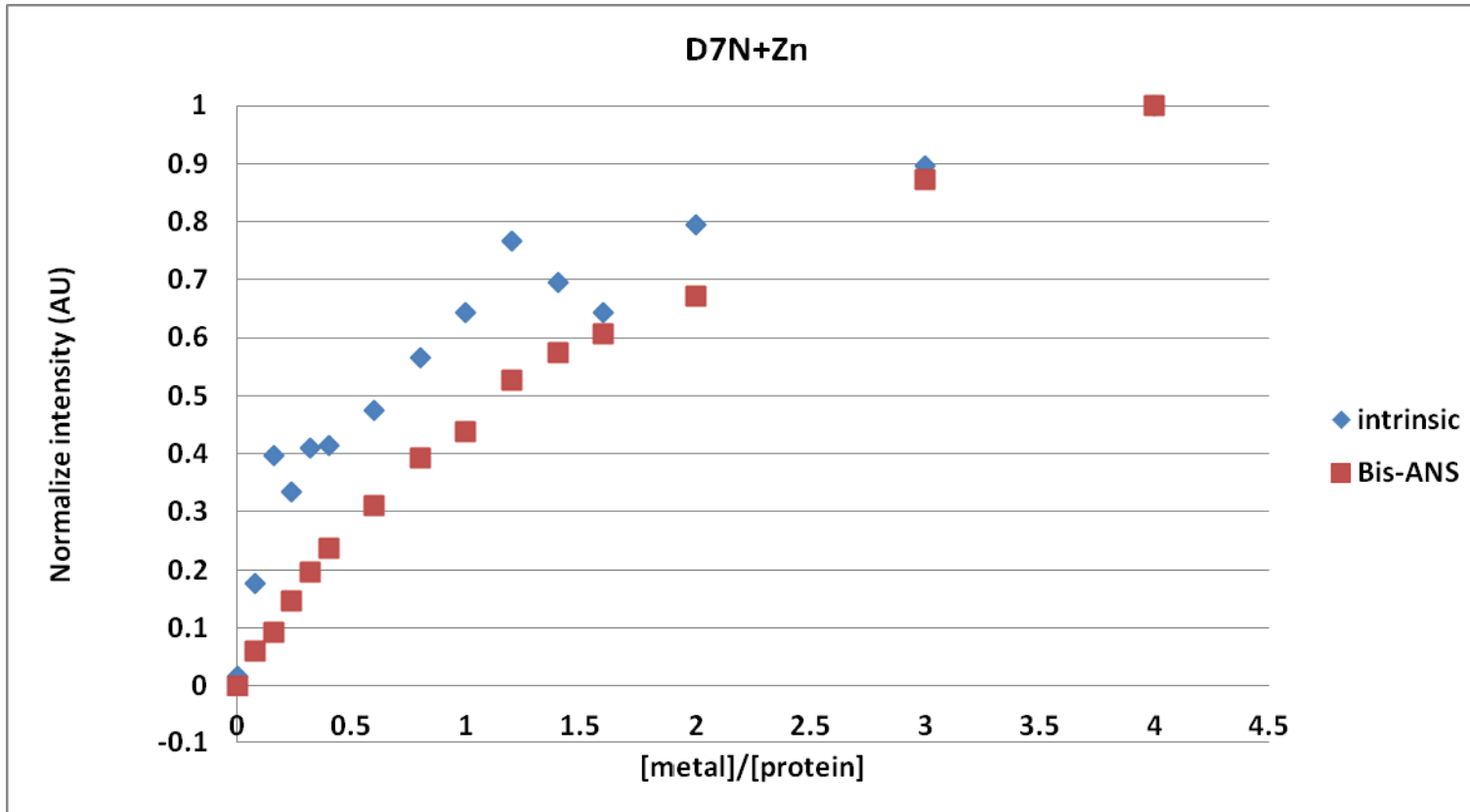


圖 5-5-8、以不同光譜法得到之鋅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 D7N 滴定曲線比較。

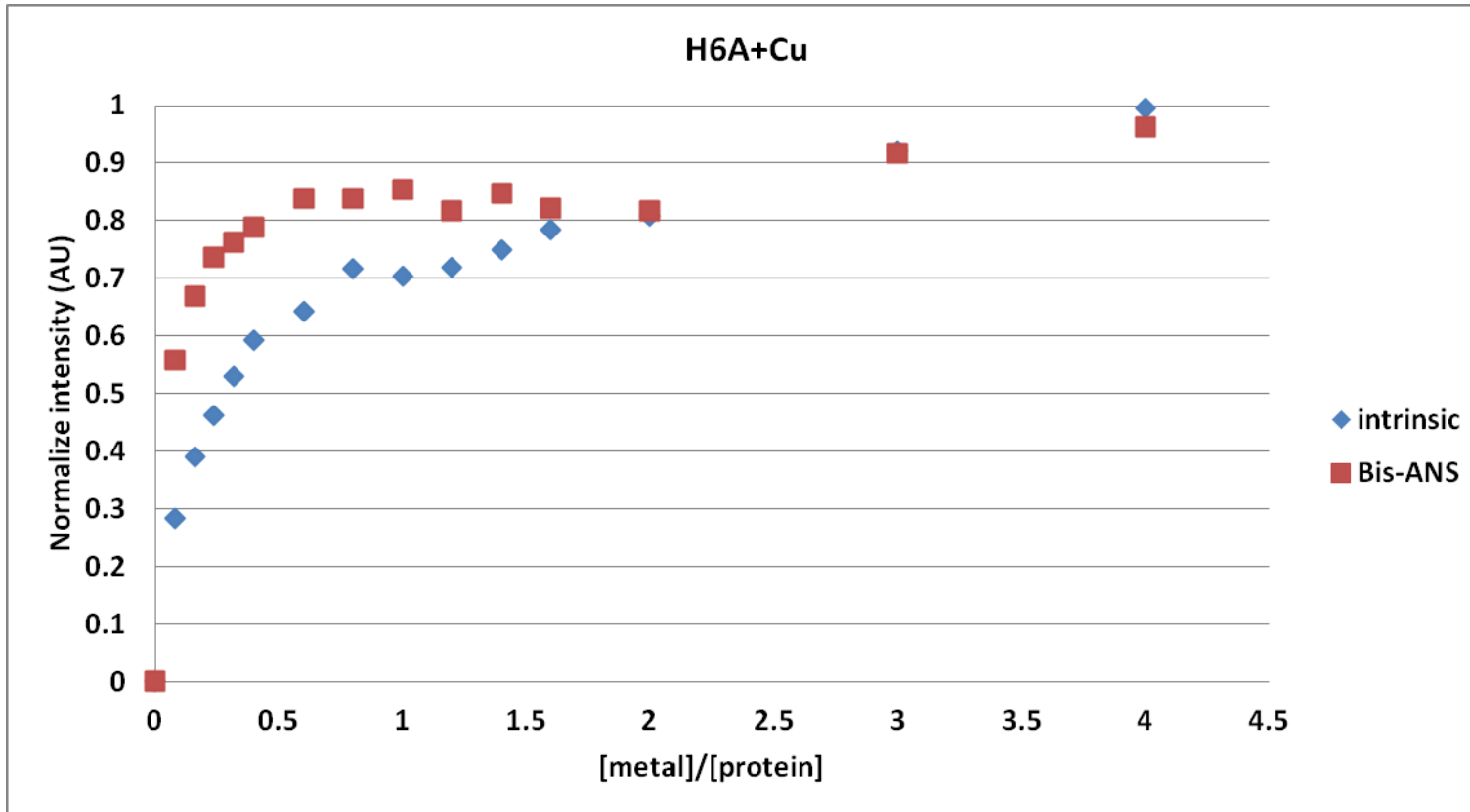


圖 5-5-9、以不同光譜法得到之銅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 H6A 滴定曲線比較。

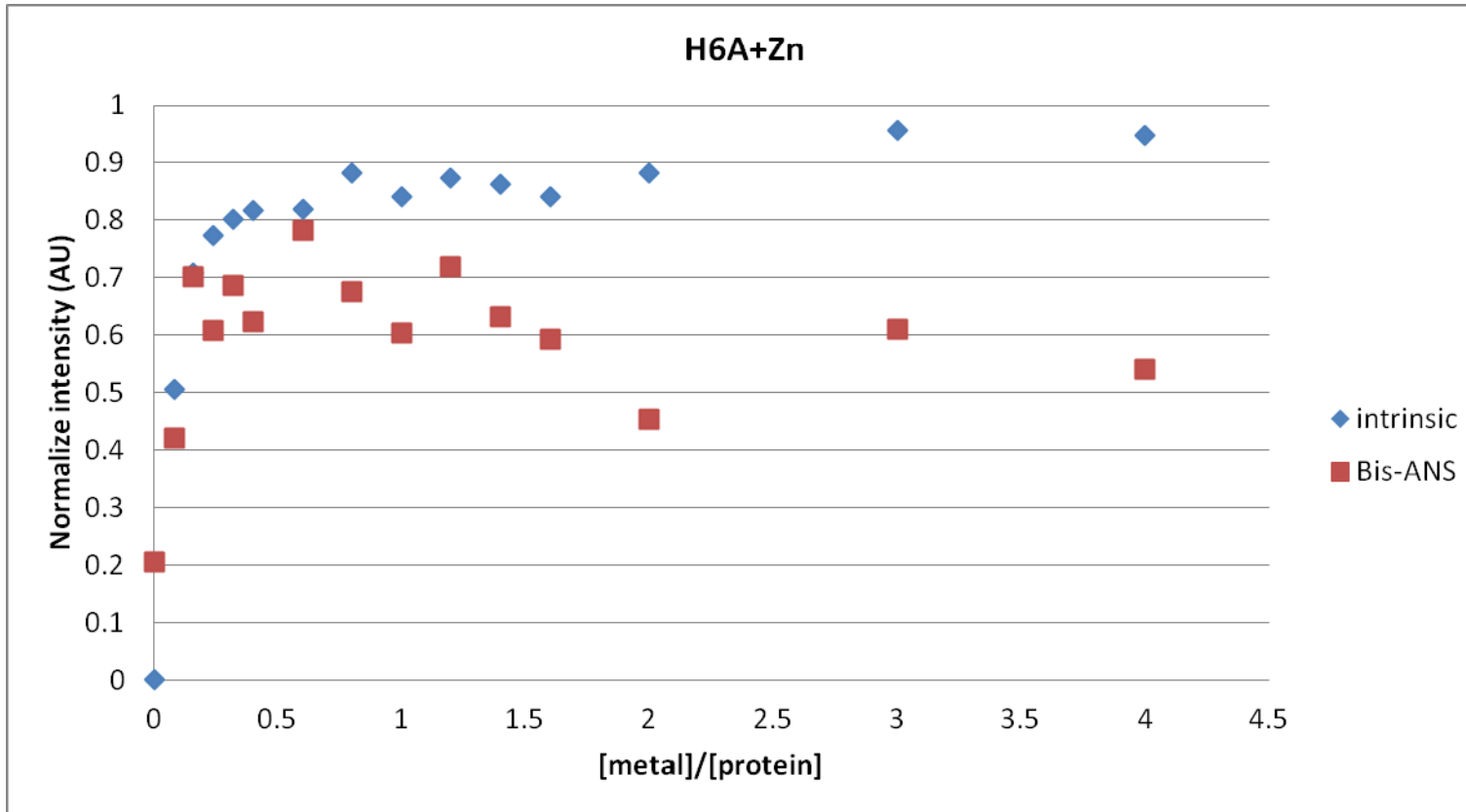


圖 5-5-10、以不同光譜法得到之鋅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 H6A 滴定曲線比較。

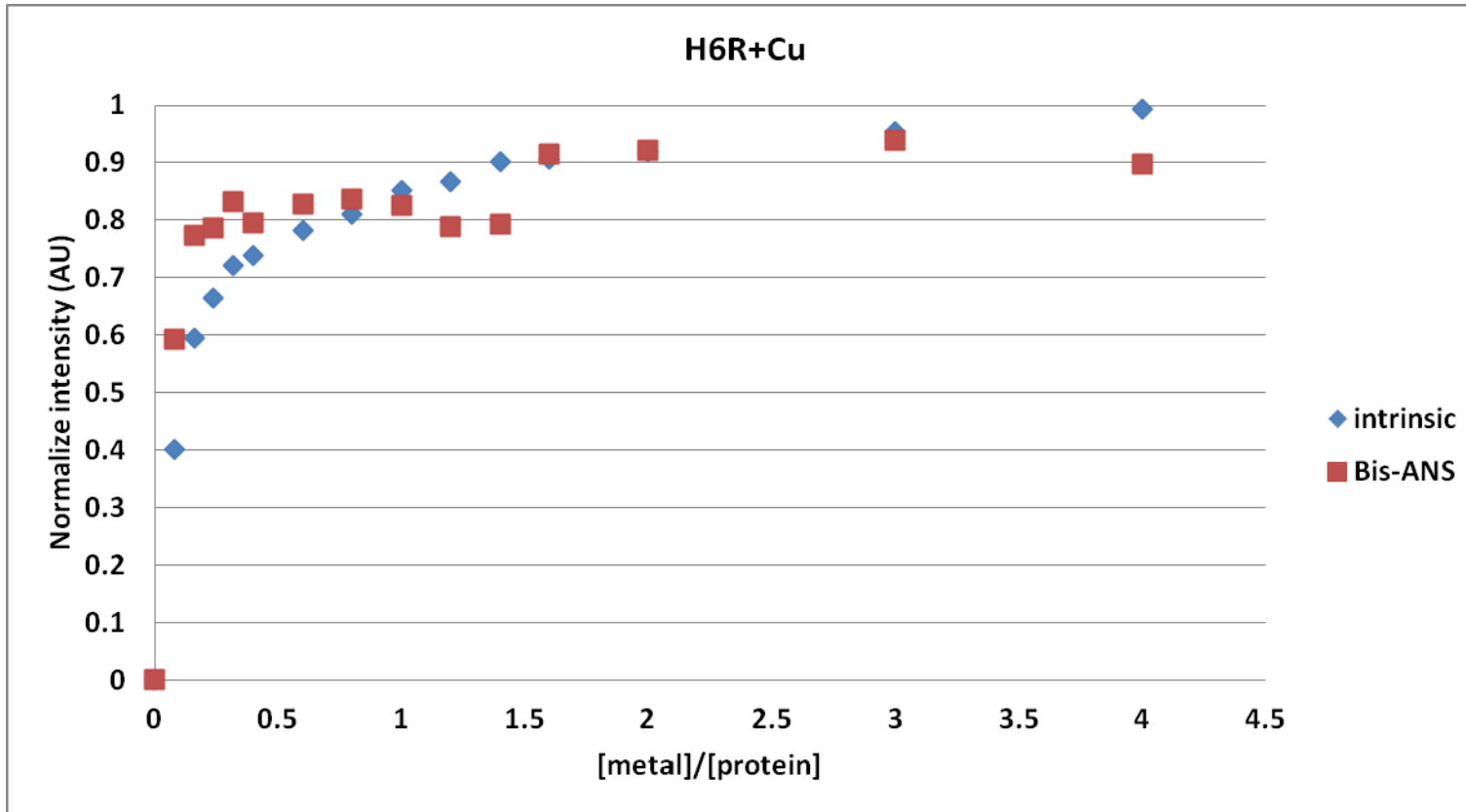


圖 5-5-11、以不同光譜法得到之銅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 H6R 滴定曲線比較。

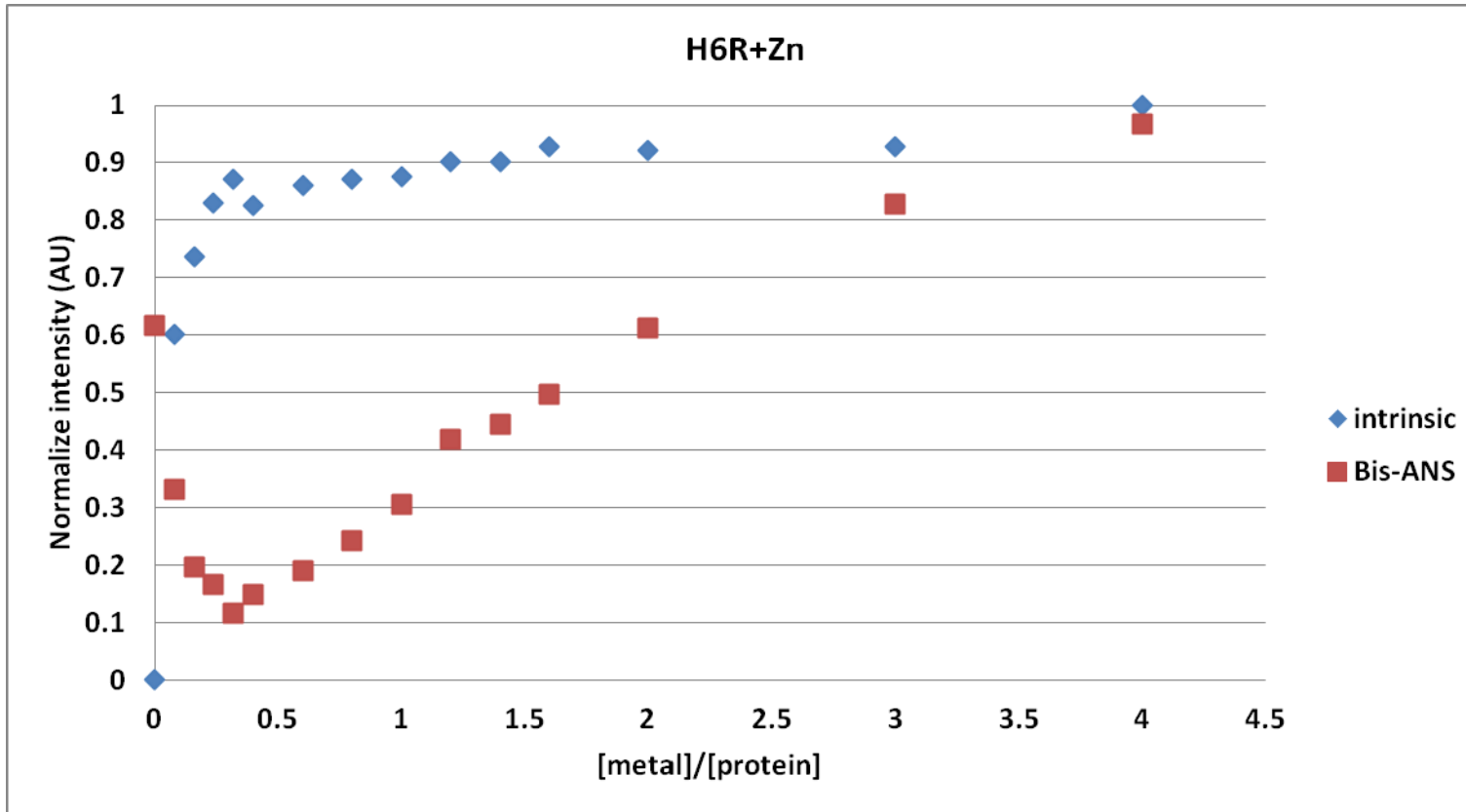


圖 5-5-12、以不同光譜法得到之鋅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 H6R 滴定曲線比較。

## 5-6 以恆溫滴定量熱儀測量鋅、銅離子與原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白之結合常數

恆溫滴定量熱儀也是一種測量分子結合關係之方法，其靈敏性十分高，然而卻也因此容易受背景雜訊影響，例如緩衝溶液之濃度、pH 值在滴定過程中若有變化往往會顯示在結果中，便可能將真正結合的訊號掩蓋，因此在操作的過程中保持條件固定是十分重要的<sup>86</sup>。

參考先前文獻，我們使用 60 $\mu$ M 的  $\beta$ -類澱粉蛋白，在 25 $^{\circ}$ C 下以 1mM 之金屬離子滴定，經過嘗試後所設定的條件為每次滴定 1.5 $\mu$ l，以 1000rpm 之速度混合，在此條件之下可得到明顯的訊號。

將原始數據以時間對功率變化做圖，經由內建的 Origin 程式將每個滴定造成的峰值面積積分以後便可得到滴定造成的熱焓變化( $\Delta H$ )，再藉由一開始設定的濃度及滴定體積將結果轉換為莫爾比例(metal/protein)對熱焓變化做圖。最後利用內建之 single-site binding 之公式<sup>82</sup> fitting 便可得到 stoichiometry number、association constant、enthalpy、及 entropy 等熱力學參數。

Single-site binding equation :

$$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[ 1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left( 1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right]$$

圖 5-6-1 到圖 5-6-12 分別為原生型及五種突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白對鋅、銅離子滴定之 ITC 滴定曲線，比較不同  $\beta$ -類澱粉蛋白在滴定時之熱量變化可發現，D7A、H6A、及 H6R 三者所放出的熱量遠小於其他三種  $\beta$ -類澱粉蛋白，可推論 D7A、H6A、H6R 三種突變會導致  $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬結合能力之降低。

表 5-6-1、5-6-2 為各原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白對銅、鋅離子滴定所得之熱力學參數整理與比較。由表可發現各蛋白之 stoichiometry number 大約位於 0~1 之間，但並無法看出其與金屬結合之真正比例，其中 D7A、H6A、H6R 三者與銅離子結合時有較小的 n 值，特別是 H6A、H6R 之值變化最大，可推論 H6 之位

置對銅離子之鍵結機制有顯著關係。至於結合常數則大致上在差不多的數量級，未有發現明顯差異。反應放熱以 D7N 最高、D7A 最低，但大致上仍差別不明顯。值得注意的是，entropy 之變化只有 D7A 為正值。其餘皆為負值。當自由能為負時表示為自發反應(spontaneous reaction)，而熱力學定律中 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ，意即影響一個反應由 enthalpy 及 entropy 兩個因素來決定，而此二者分別代表氫鍵作用力及疏水性作用力，因此可推論 D7A 與金屬離子之結合中疏水性作用力相對其他突變型蛋白來的重要。

將此處所得到之結合常數倒數，即可獲得解離常數，表 5-6-3 中將此處獲得之解離常數與前面自身螢光所獲得之解離常數做比較。其中原生型以兩種方式得到之解離常數幾乎完全相同，而 D7N、H6A、H6R 三組則有較大之差異性。

表 5-6-1、銅離子對原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白以 ITC 滴定所獲得之熱力學參數

A $\beta$	n	K <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> )	$\Delta H_o$ (cal/mol)	$\Delta S_o$ (cal/mol $^{\circ}$ C)	$\Delta G^o$ (cal/mol)
WT	0.684	2.64e5	-2.789e4	-68.6	-7447.2
D7A	0.307	4.51e5	-5.780e3	6.48	-7711.04
D7H	0.759	1.82e5	-2.662e4	-65.2	-6892.4
D7N	0.668	7.05e4	-3.096e4	-81.6	-6643.2
H6A	0.0171	6.38e4	-7.3e4	-223	-6546
H6R	0.119	5.51e4	-2.723e4	-69.6	-6489.2

表 5-6-2、鋅離子對原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白以 ITC 滴定所獲得之熱力學參數

A $\beta$	n	K <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> )	$\Delta H_o$ (cal/mol)	$\Delta S_o$ (cal/mol $^{\circ}$ C)	$\Delta G_o$ (cal/mol)
WT	0.772	2.34e5	-4.119e4	-114	-7218
D7A	0.877	4.41e4	-6.165e3	0.574	-6336.05
D7H	0.590	5.17e4	-5.65e4	-151	-6652
D7N	0.370	2.52e4	-8.644e4	-270	-5980
H6A	0.466	1.43e4	-2.975e4	-80.7	-9748.6
H6R	0.884	2.28e4	-1.143e4	-18.4	-5946.8

表 5-6-3、以 ITC 及自身螢光所量測之解離常數比較

Cu			Zn		
A $\beta$	K <sub>d,ITC</sub> ( $\mu$ M)	K <sub>d,Intrinsic</sub> ( $\mu$ M)	A $\beta$	K <sub>d,ITC</sub> ( $\mu$ M)	K <sub>d,Intrinsic</sub> ( $\mu$ M)
WT	3.79	3.86	WT	4.27	4.26
D7A	2.22	4.95	D7A	22.68	6.85
D7H	5.49	5.53	D7H	19.34	12.9
D7N	14.18	3.00	D7N	39.68	4.68
H6A	15.67	3.40	H6A	69.93	1.24
H6R	18.15	2.31	H6R	43.85	1.28







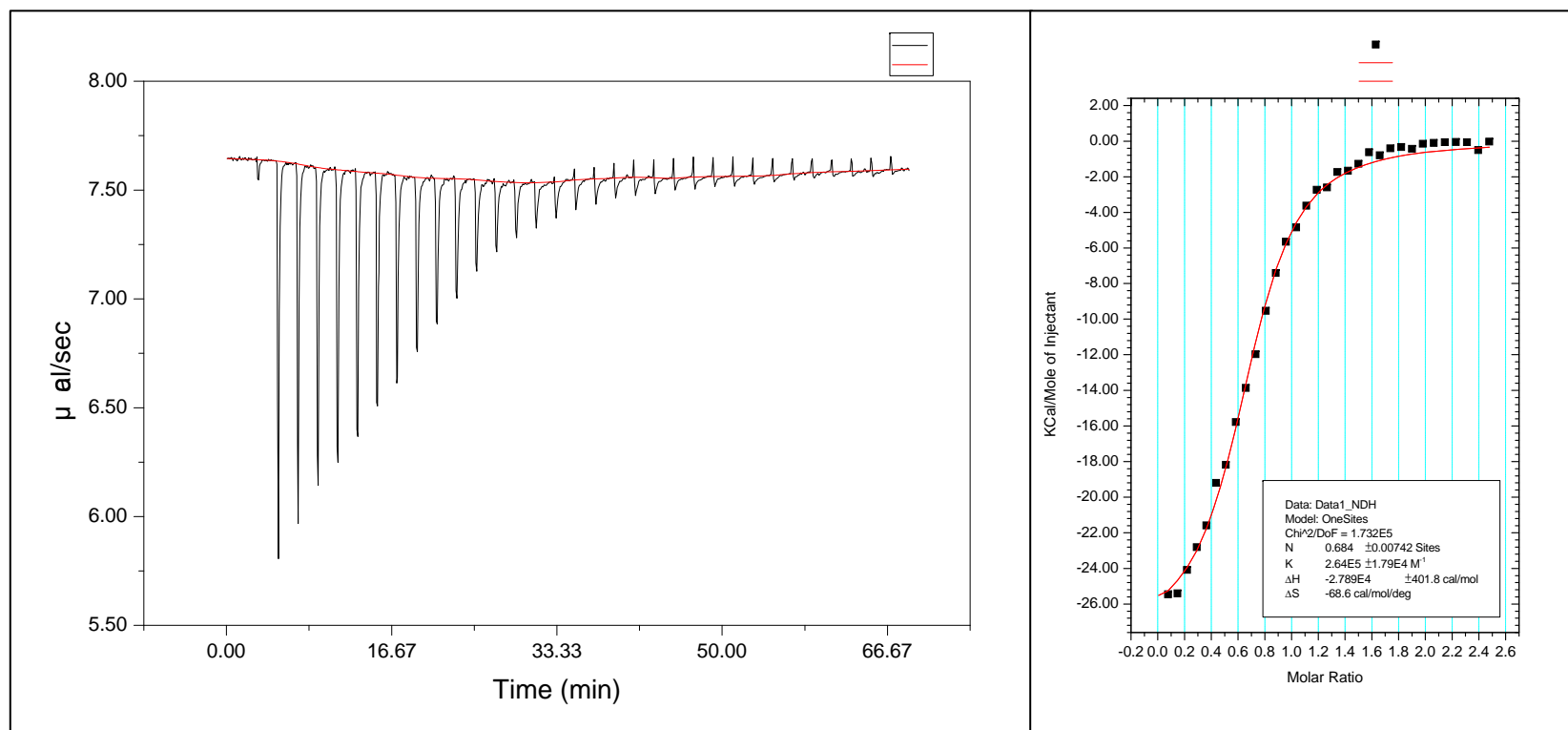


圖 5-6-1、銅離子對原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。

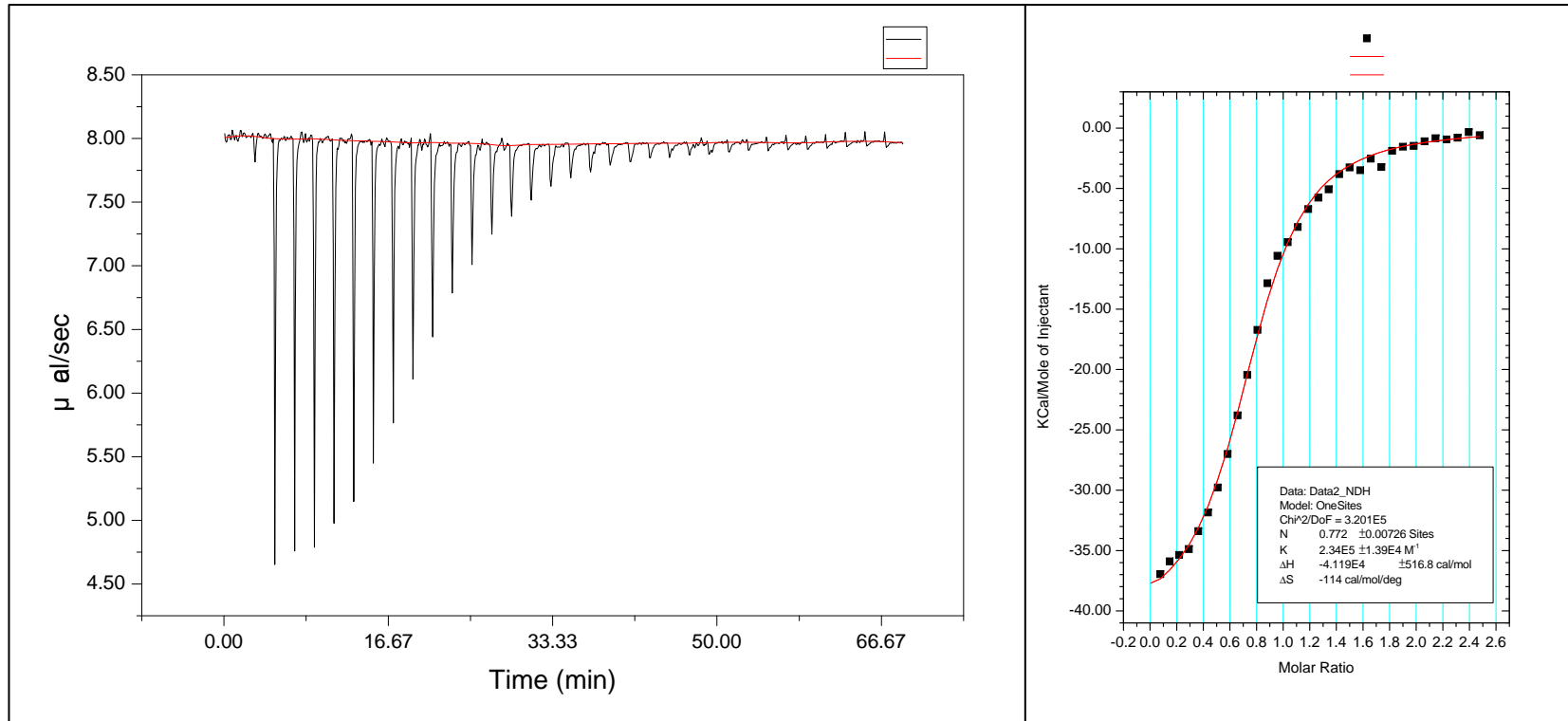


圖 5-6-2、鋅離子對原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白之 ITC 滴定曲線(左)。以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。

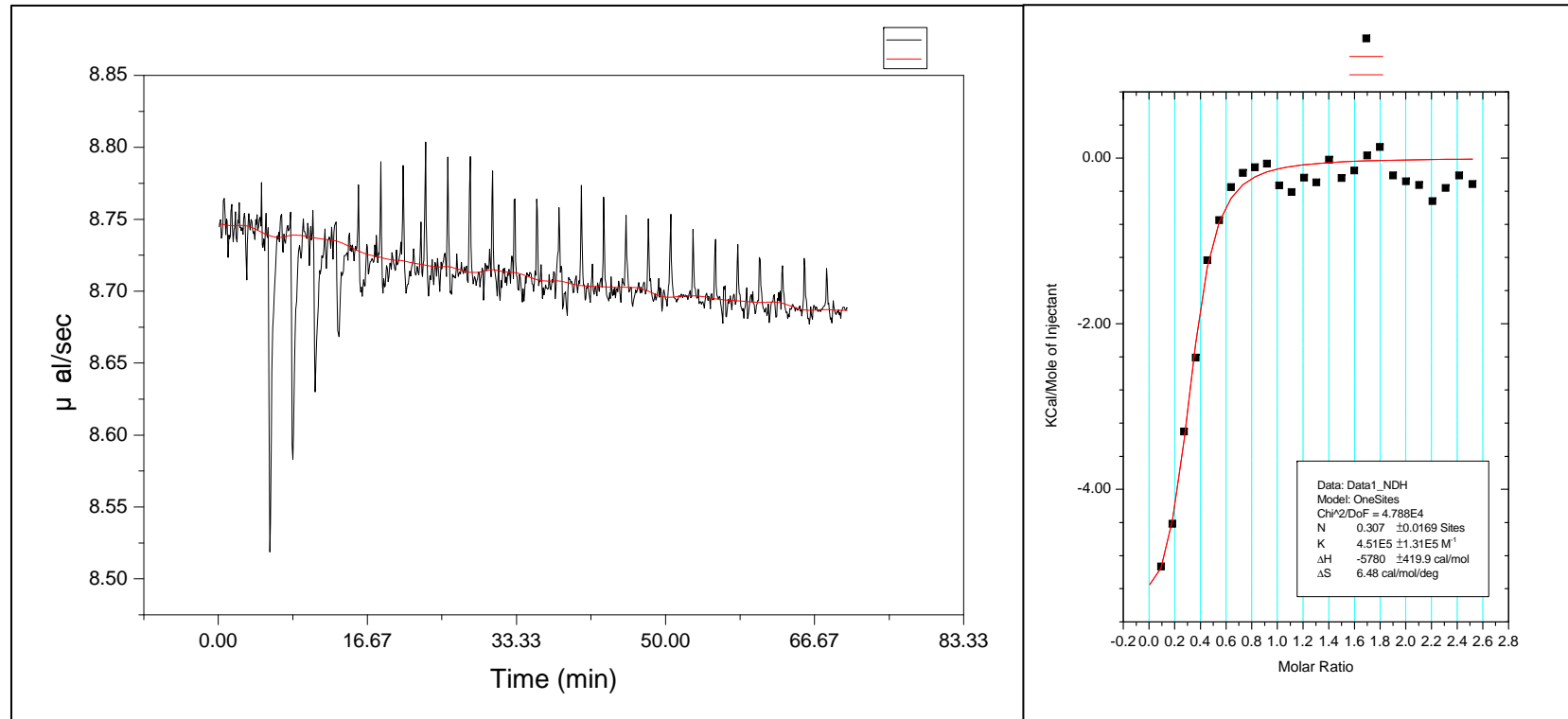


圖 5-6-3、銅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 D7A 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。

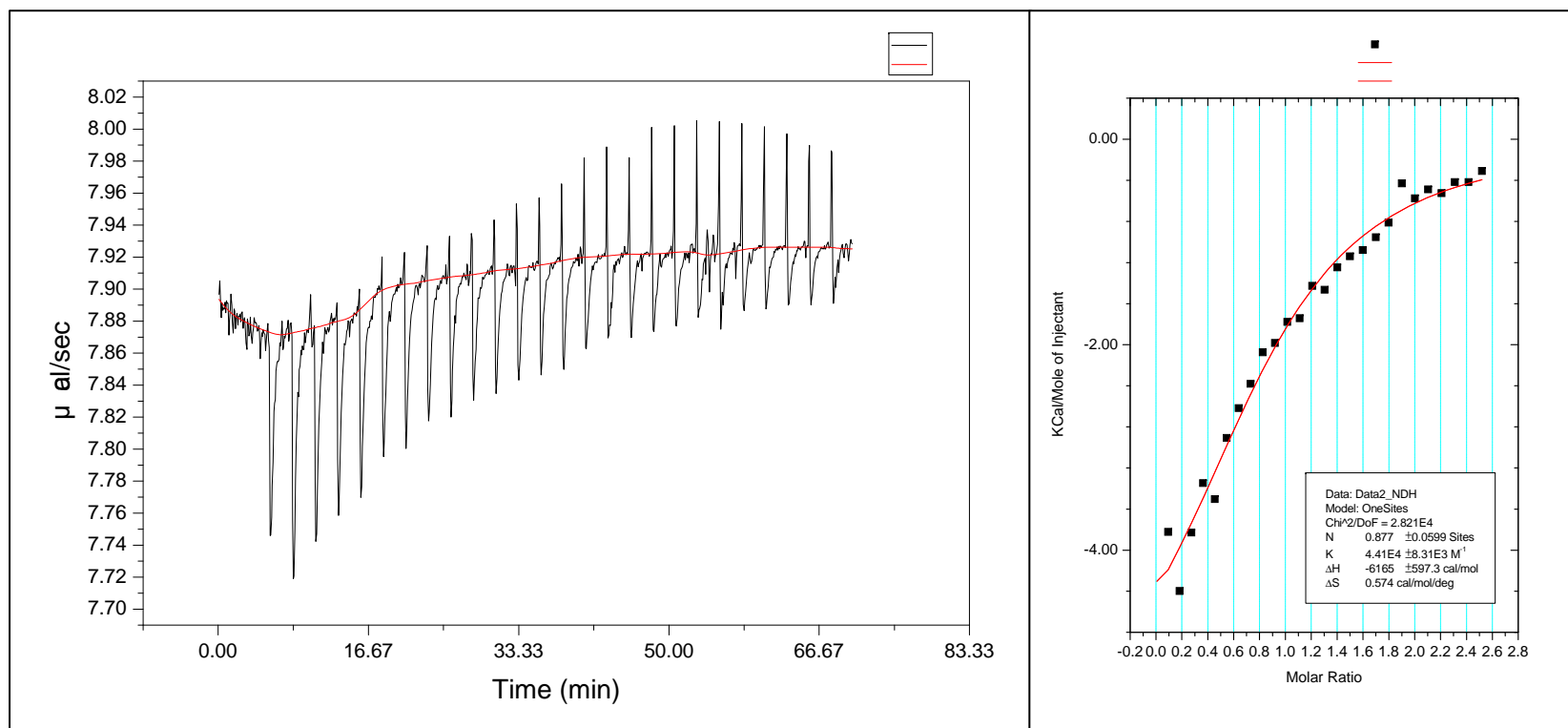


圖 5-6-4、鋅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 D7A 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。

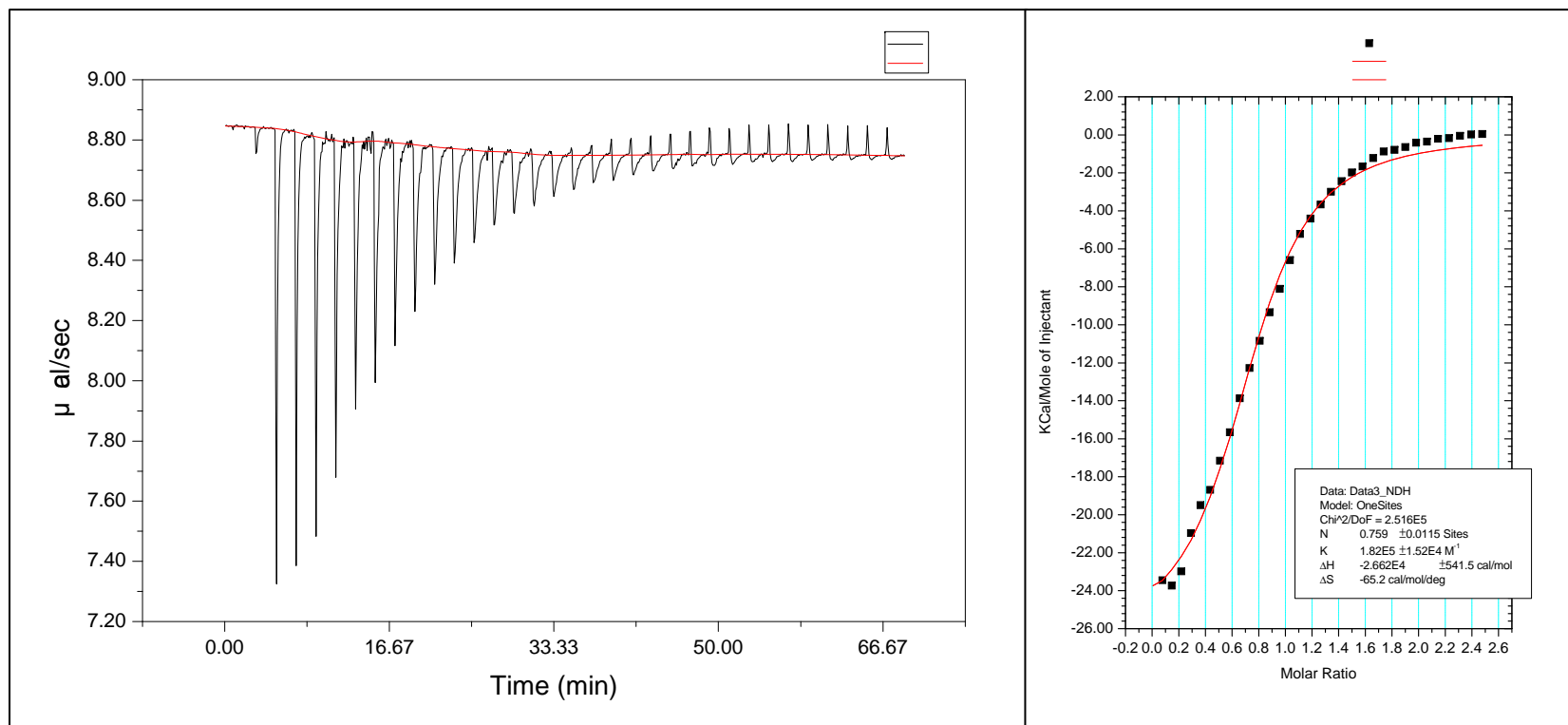


圖 5-6-5、銅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 D7H 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。

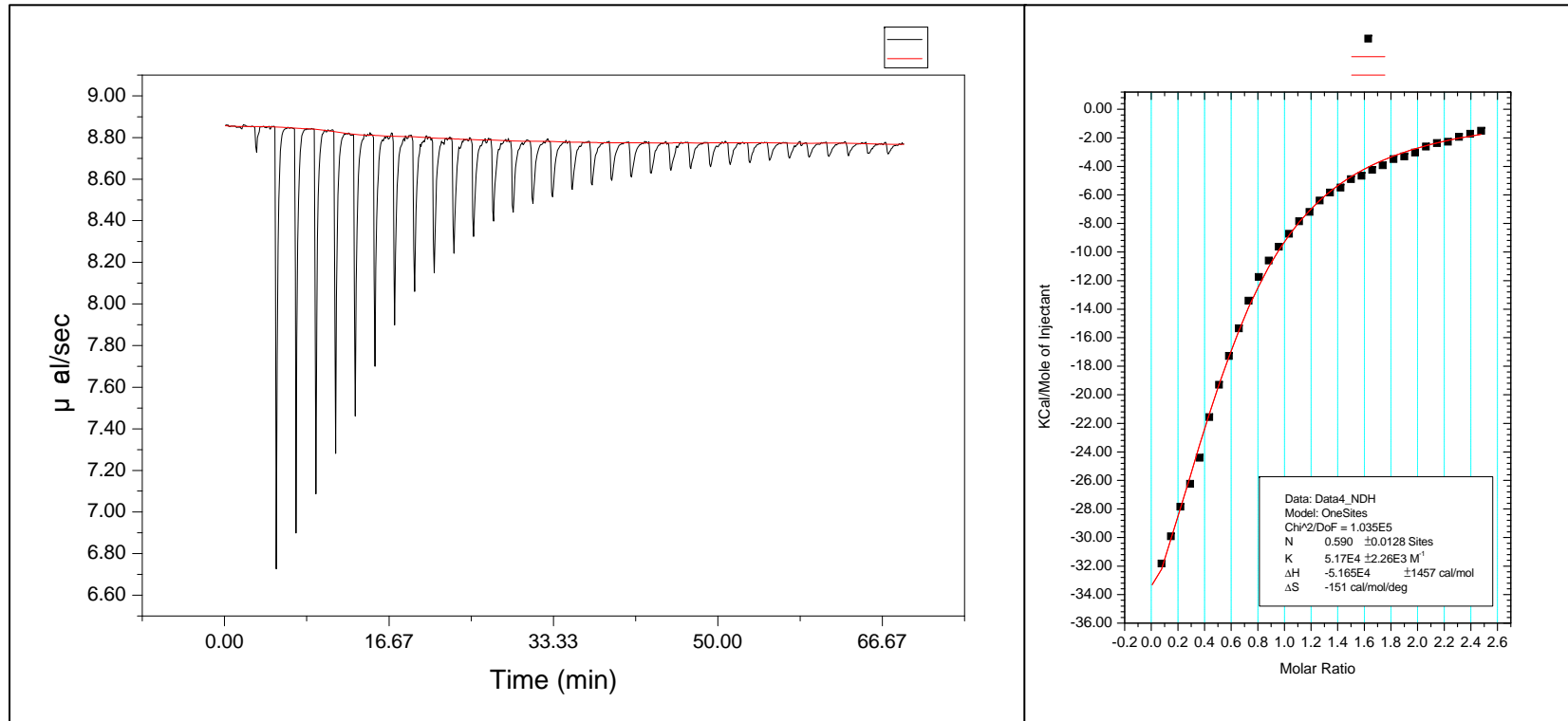


圖 5-6-6、鋅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 D7H 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。

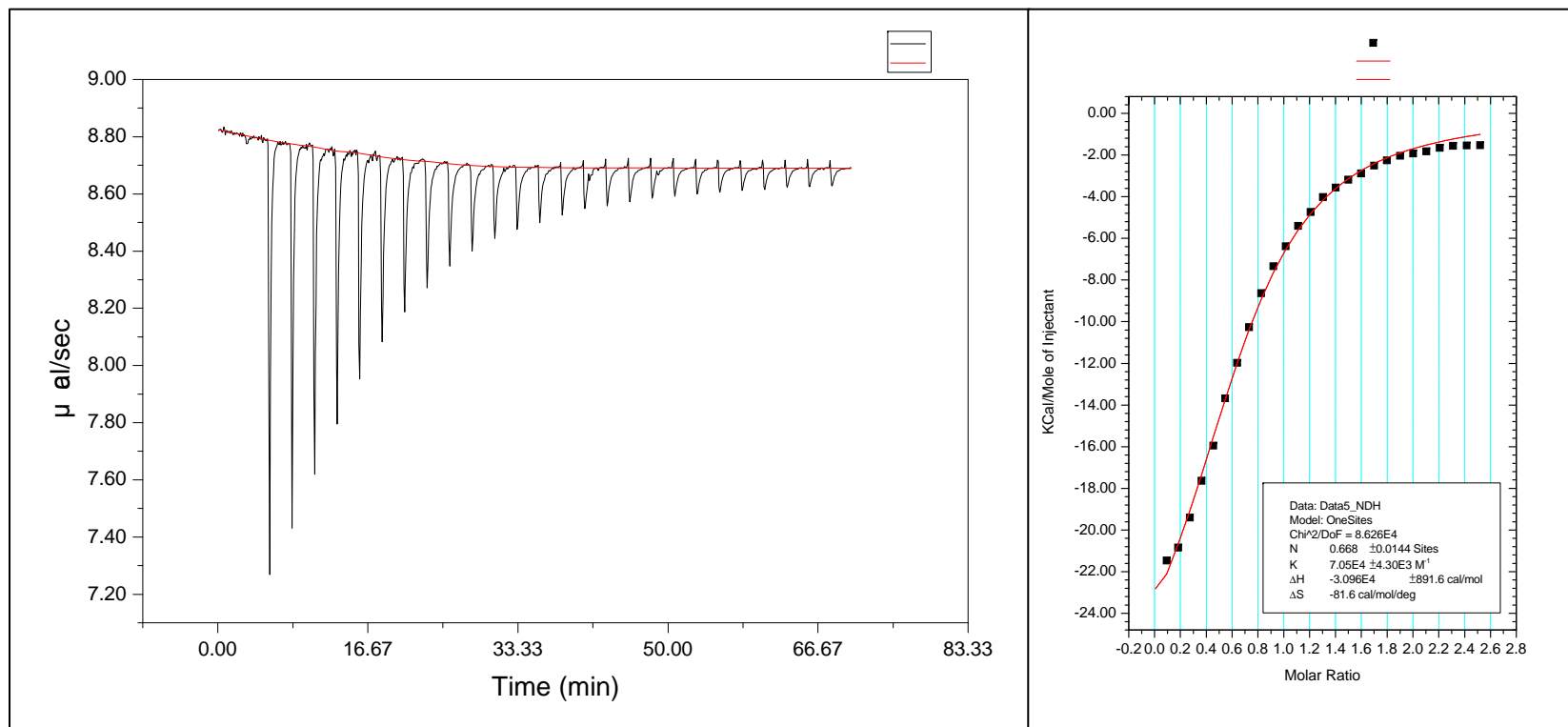


圖 5-6-7、銅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 D7N 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。



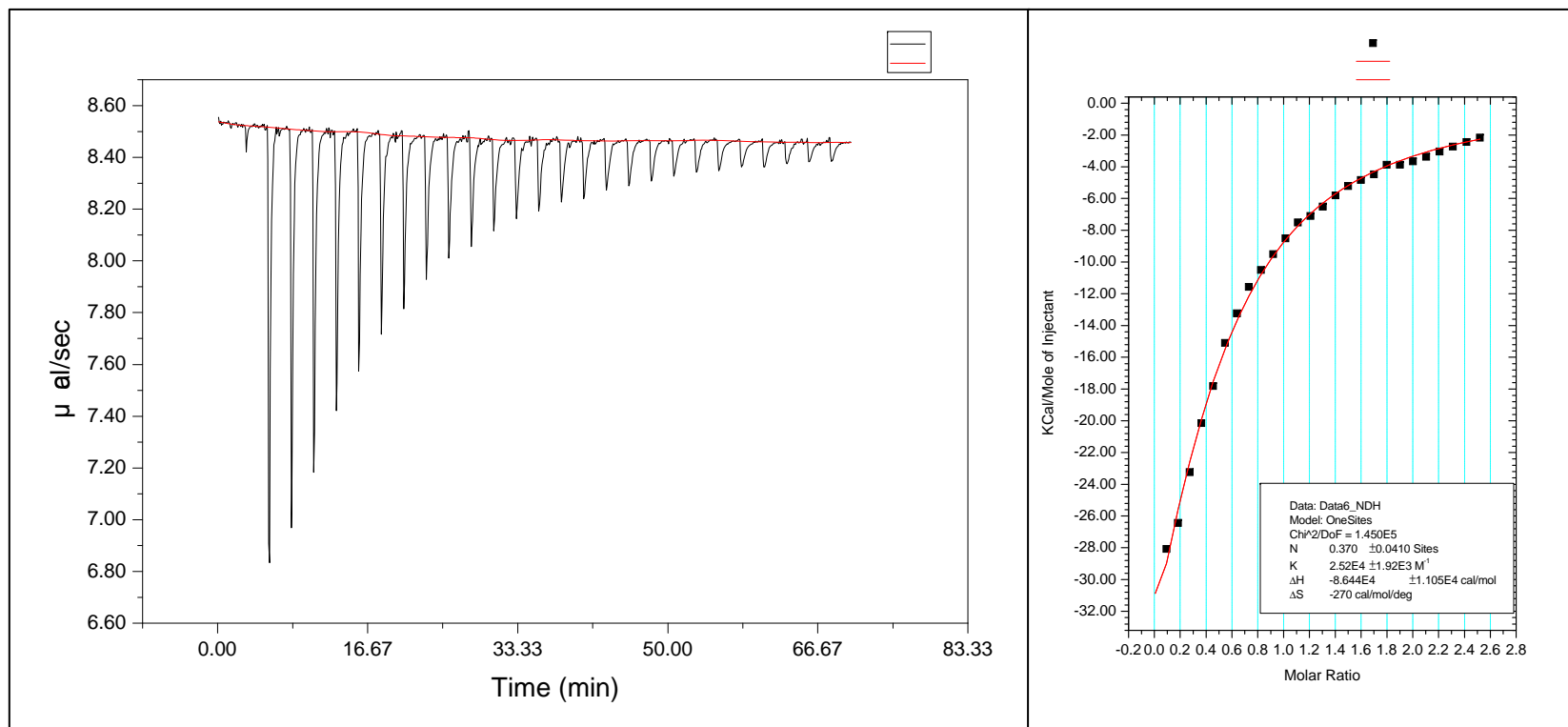


圖 5-6-8、鋅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 D7N 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。

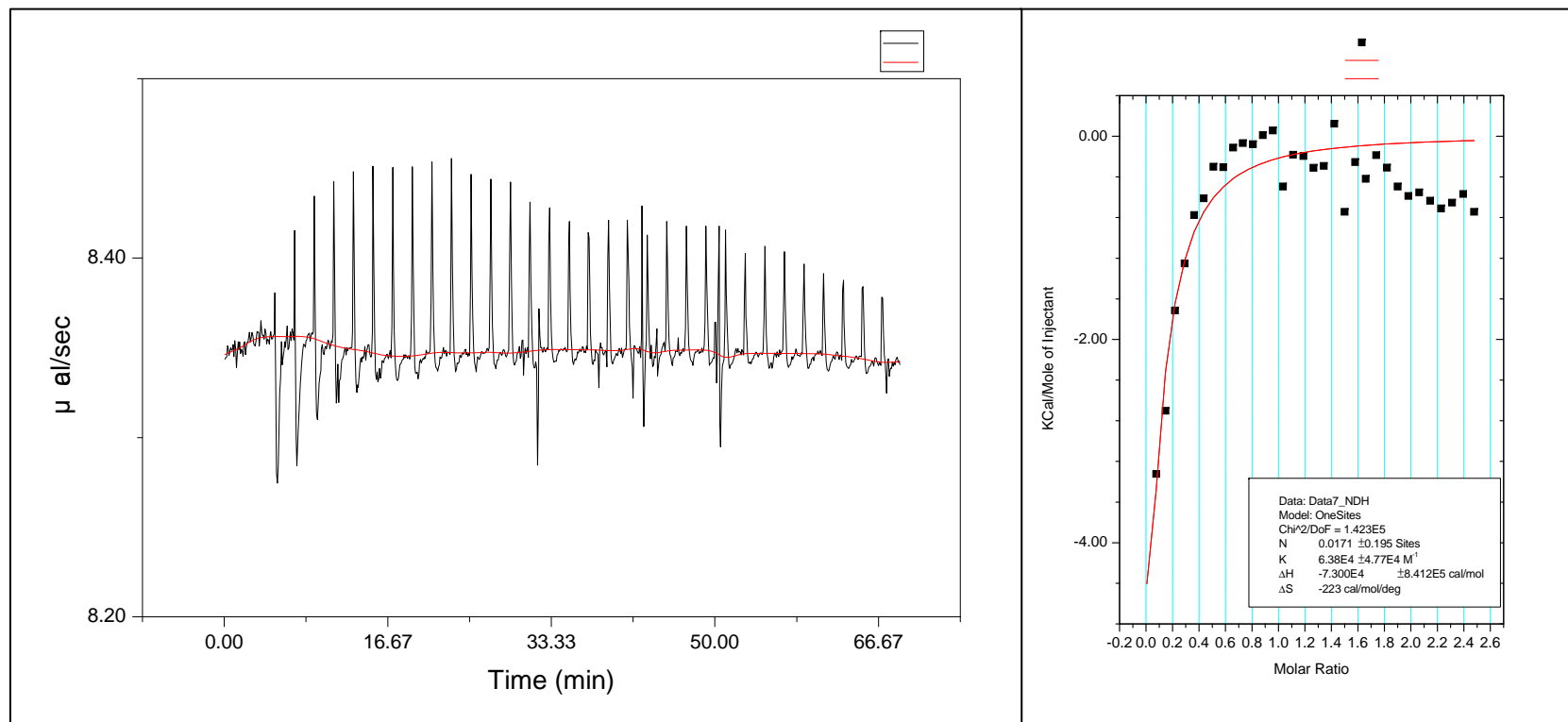


圖 5-6-9、銅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 H6A 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。

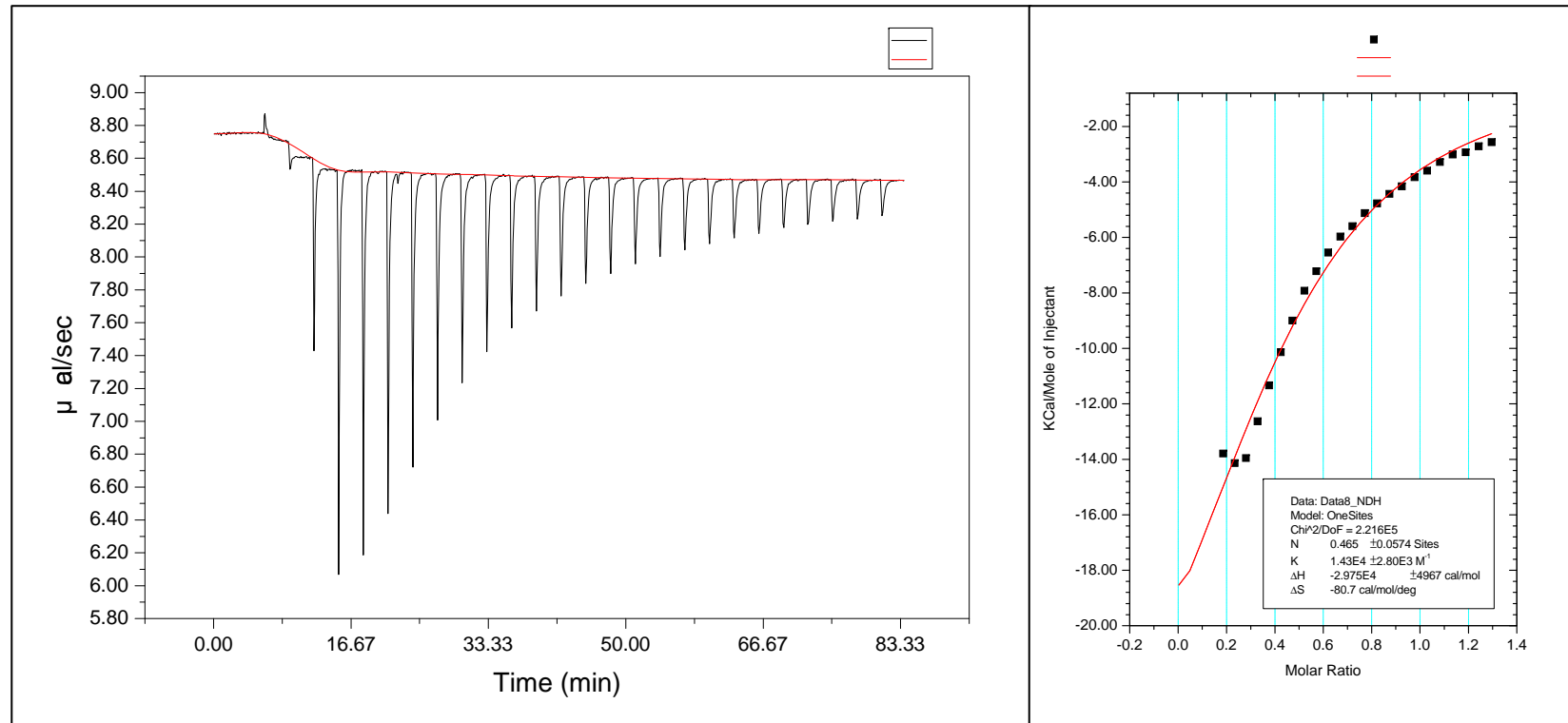


圖 5-6-10、鋅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 H6A 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。

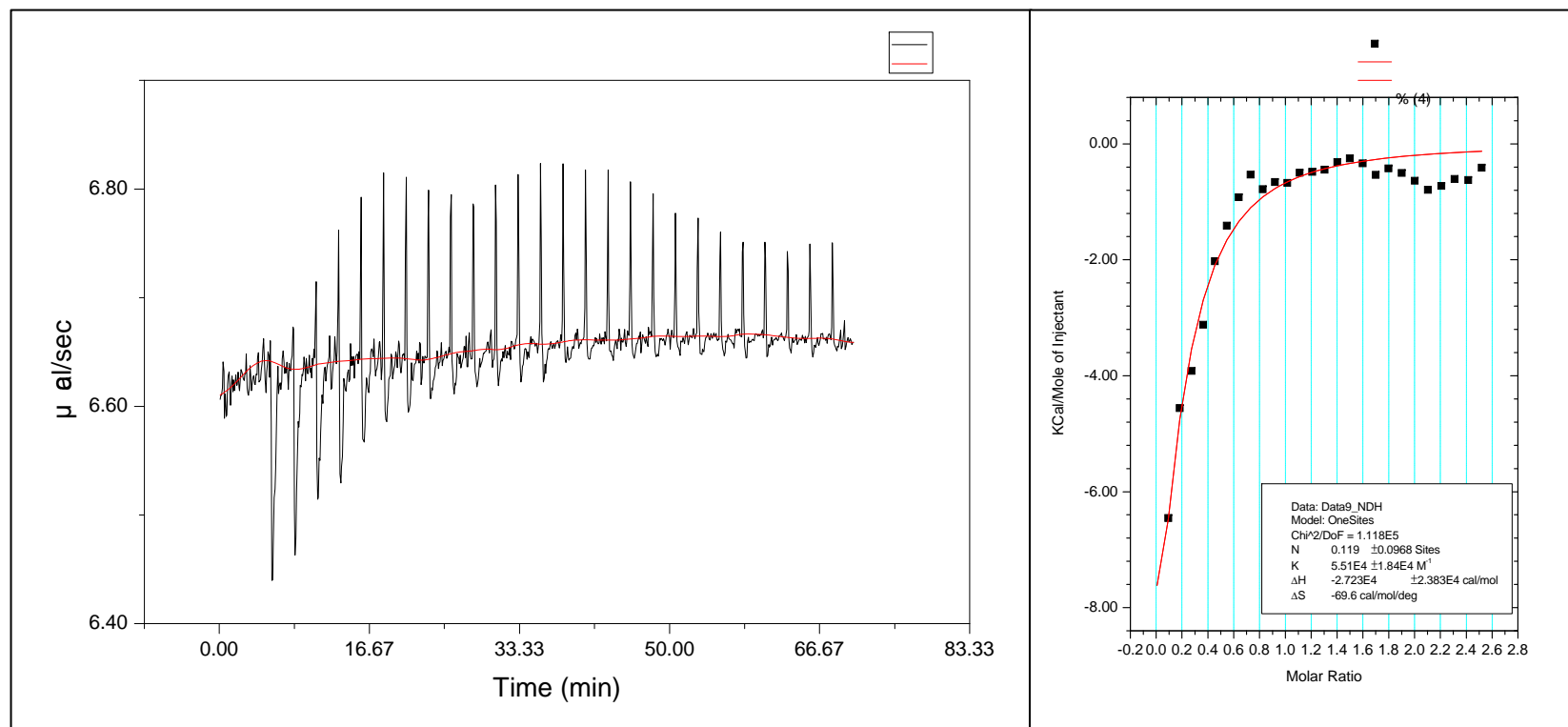


圖 5-6-11、銅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 H6R 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。

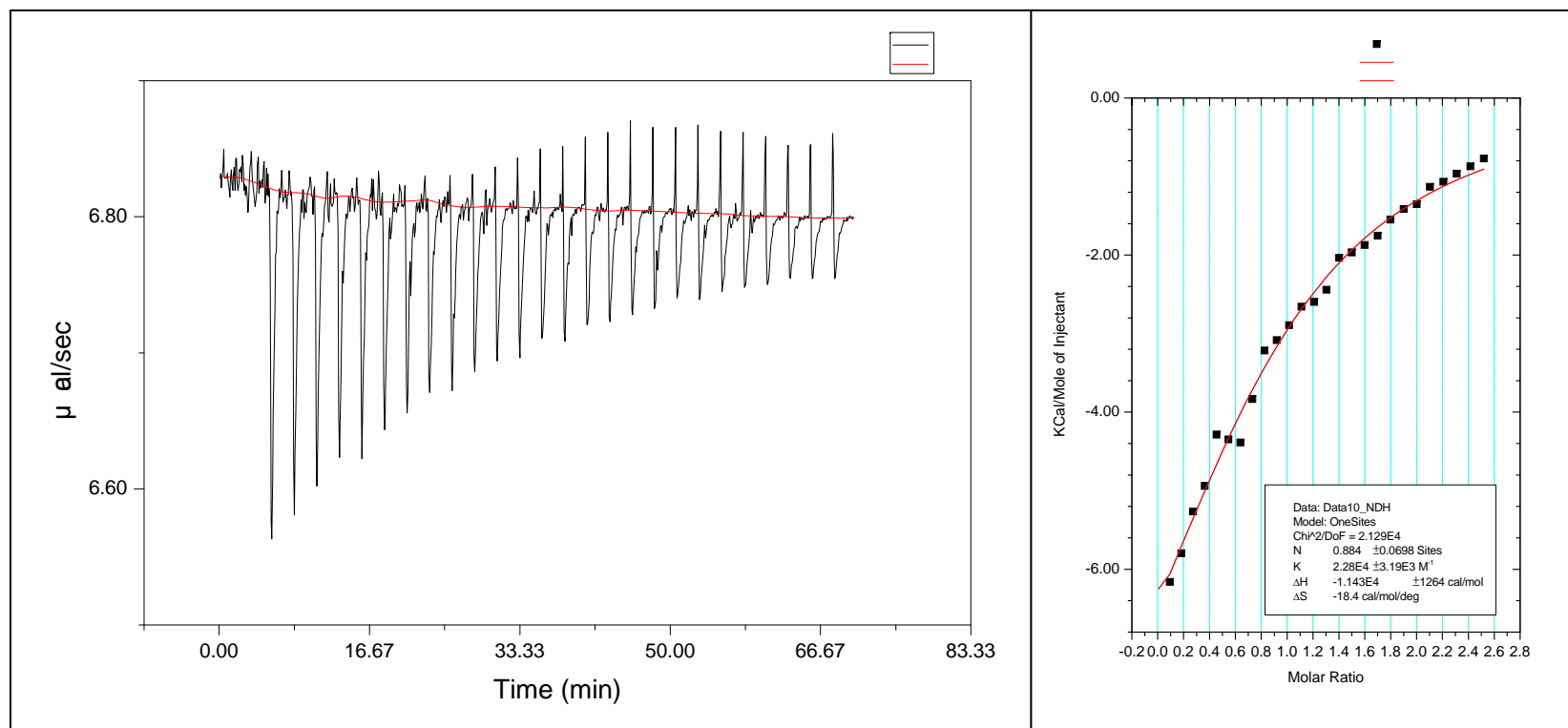


圖 5-6-12、銅離子對突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白 H6R 之 ITC 滴定曲線(左)；以 one-site binding model fitting 之滴定曲線及其參數(右)。

## 5-7 <sup>15</sup>N labeled 原生型及突變型 β-類澱粉蛋白之表現與純化

### 5-7-1 藉由定點突變獲得突變型 pET14b-Aβ<sub>40</sub> 質體

利用本實驗室先前建立之原生型 pET14b-Aβ<sub>40</sub> 質體，以及自行設計向基龍米克斯(Genomics)公司訂購之引子進行定點突變。其原理為利用引子設計與原先序列不同的 DNA 片段，與原本的質體混和進行 PCR，則引子會形成一圈完整的突變型質體。由於原先的質體會被載體(此處指大腸桿菌)修飾帶有甲基，新形成的質體則無，因此利用可辨識甲基進行反應的 DpnI 蛋白酶可將未經突變的質體破壞，最後再將突變型質體轉殖入載體(*E.coli*-DH5α)中，由基龍米克斯公司定序後利用 NCBI 網站之 Blast 功能比較以確認所獲得的突變型質體序列之正確性。

表 5-7-1、定點突變所使用之引子序列

突變型	正向引子	反向引子	熔點溫度
D7A	5'-gatgcagaattccgacatgcctcagga tatgaagttcat-3'	5'-atgaacttcatatcctgaggcatgtcgg aattctgcatc-3'	78.45°C
D7H	5'-aagatgcagaattccgacatcactcag gatatgaagttc-3'	5'-gaacttcatatcctgagtgatgtcggaa ttctgcatctt-3'	78.45°C
D7N	5'-caagatgcagaattccgacataactca ggatatgaagttca-3'	5'-tgaacttcatatcctgagttatgtcggaa ttctgcatcttg-3'	78.60°C
H6A	5'-gtattccaagatgcagaattccgagct gactcaggatagaag-3'	5'-cttcatatcctgagtcagctcggaaattct gcatcttgaaatac-3'	78.39°C
H6R	5'-caagatgcagaattccgacgtgactca ggatatgaagtt-3'	5'-aacttcatatcctgagtcacgtcggaaatt ctgcatcttg-3'	78.45°C

表 5-7-2、各突變型基因序列之比對結果

突變型	序列比對
D7A	GCTCGAGAACCTGTATTTCCAAGATGCAGAATTCCGACATG <b>CC</b> TCAGGATATGAAGTTCA       GCTCGAGAACCTGTATTTCCAAGATGCAGAATTCCGACATGCCTCAGGATATGAAGTTCA

D7H	GCTCGAGAACCTGTATTTCCAAGATGCAGAATTCCGACATCACTCAGGATATGAAGTTCA       GCTCGAGAACCTGTATTTCCAAGATGCAGAATTCCGACATCACTCAGGATATGAAGTTCA
D7N	GCTCGAGAACCTGTATTTCCAAGATGCAGAATTCCGACATAACTCAGGATATGAAGTTCA       GCTCGAGAACCTGTATTTCCAAGATGCAGAATTCCGACATAACTCAGGATATGAAGTTCA
H6A	GCTCGAGAACCTGTATTTCCAAGATGCAGAATTCCGAGCTGACTCAGGATATGAAGTTCA       GCTCGAGAACCTGTATTTCCAAGATGCAGAATTCCGAGCTGACTCAGGATATGAAGTTCA
H6R	GCTCGAGAACCTGTATTTCCAAGATGCAGAATTCCGACGTGACTCAGGATATGAAGTTCA       GCTCGAGAACCTGTATTTCCAAGATGCAGAATTCCGACGTGACTCAGGATATGAAGTTCA

### 5-7-2 <sup>15</sup>N labeled 原生型及突變型 β-類澱粉蛋白之表現與純化

確認質體之序列正確後，以 plasmid extraction kit 將質體取出，並重新轉殖入表現型的菌株 *E.coli*-BL21(DE3\*)，因其製造目標蛋白的能力較 DH5α 來的更加優越，可增加目標蛋白之產率。

在表現 <sup>15</sup>N labeled 之蛋白時其 <sup>15</sup>N 來源為 M9 培養液中的 <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl，因 M9 培養液之養分來源僅為細胞最低生常需求，菌株在其中生長效率較差，因此我們先以 LB 培養液進行培養，直到 OD<sub>600</sub> 到達 0.8 之菌量濃度時再將菌體離心，並轉移到 M9 培養液，接著在 M9 培養液中培養半個小時以避免菌體中有殘餘太多來自 LB 之 N<sup>14</sup> 影響實驗結果，並且也可避免菌體因環境變化造成之生長不佳情形。接著加入 0.5mM IPTG 以誘導菌體開始生產目標蛋白，並進行表現等級測試 (expression level test) 以找出最佳的誘導時間。圖 5-7-1 為表現等級測試的結果。

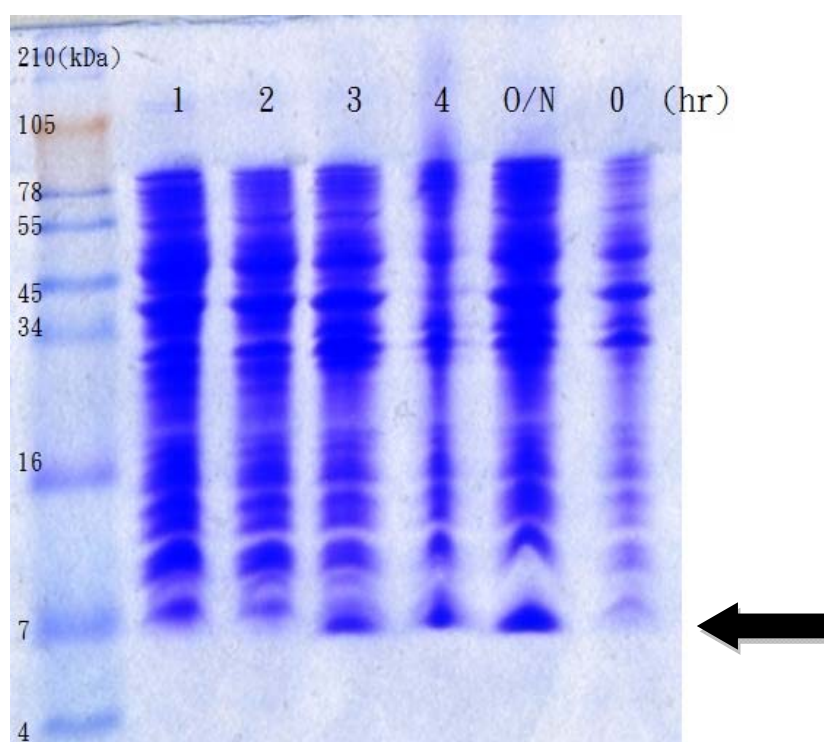


圖 5-7-1、*E. coli* BL21(DE3\*)在 M9 中  $^{15}\text{N}$ -His-A $\beta_{40}$  之表現等級測試。箭頭所指處為融合蛋白所在位置。所使用的膠片為 13.3%之 Tricine gel。

所表現之 His-A $\beta_{40}$  分子量約為 7kDa，也就是箭頭所指處，可發現經過誘導後隔夜培養所表現的融合(fusion protein)蛋白量最多，因此之後的蛋白質表現皆使用此誘導時間。

此處所獲得之融合蛋白實際上結構為 Histag-TEV cutting site-A $\beta_{40}$ (參見附錄 C)，表現時存在菌體之 inclusion body 之中。將隔夜誘導的菌體離心並秤重之後，利用 microfluidizer 先將菌體打破，再以低溫高速離心分離並去除上清液。接著使用 8M 的尿素以溶解融合蛋白。由於融合蛋白上有 Histag 的存在，可與鎳親和管柱結合，達到與其他蛋白分離之目的。一開始先使用含有 100mM imidazole 之緩衝溶液以洗去管柱上非專一性結合蛋白，以增加獲得之融合蛋白純度，接著將 imidazole 之濃度逐漸提升至 500mM 以沖堤(elution)出與管柱結合之融合蛋白。



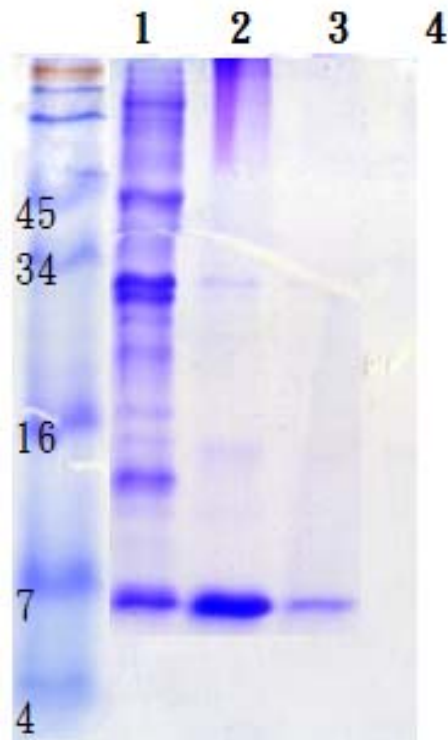


圖 5-7-2、以鎳親和管柱純化之融合蛋白 SDS-PAGE。 Lane 1 為 Flow-Through，Lane 2、Lane 3 為洗下之融合蛋白(共 16ml)，Lane 4 則為濃度提升至 500mM imidazole 時之液體，所使用的膠片為 13.3% Tricine gel。

由圖 5-7-2 之 SDS-PAGE 結果可發現，大部分之融合蛋白皆被分離並沖提出來，僅有部分殘留於 Flow-Through 中，並且未有殘餘在管柱上之蛋白。接下來利用中央研究院楊安綏老師實驗室提供之 TEV 蛋白酶可與 TEV 切位反應將 A $\beta$ <sub>40</sub> 與 his-tag 分開，然而由於先前純化之緩衝溶液中含有 5M 之尿素，會影響 TEV 蛋白酶之活性，因此先使用 3kDa cut-off 之 Centricon 透析並置換為不含尿素之緩衝溶液。接著利用 Bradford assay 確認所含之融合蛋白濃度(~0.23mg/ml)，並以 50:1 之體積比例將融合蛋白與 TEV 蛋白酶混合，置於 4°C 隔夜以等待其切割完成。

反應後之混合溶液再以高效能液相層析儀(HPLC)進一步純化，其結果如圖 5-7-3。將不同時間點收集的產物進行 SDS-PAGE 後利用 6E10 抗體進行 Dot blotting 測試 A $\beta$ <sub>40</sub> 所在之位置。如圖 5-7-4。結果發現 18~27 分鐘皆有 6E10 之訊號。將這些時間點之產物蒐集並進行 SDS-PAGE 以確認其分子量，如圖 5-7-5。最後由圖 5-7-5 發現，Dot blotting 所得到之訊號大多皆為未切割之融合蛋白，僅有少量之切割完成之 A $\beta$ <sub>40</sub> 存在第 30~31 分鐘處，此次純化並未成功分離 <sup>15</sup>N- A $\beta$ <sub>40</sub>。

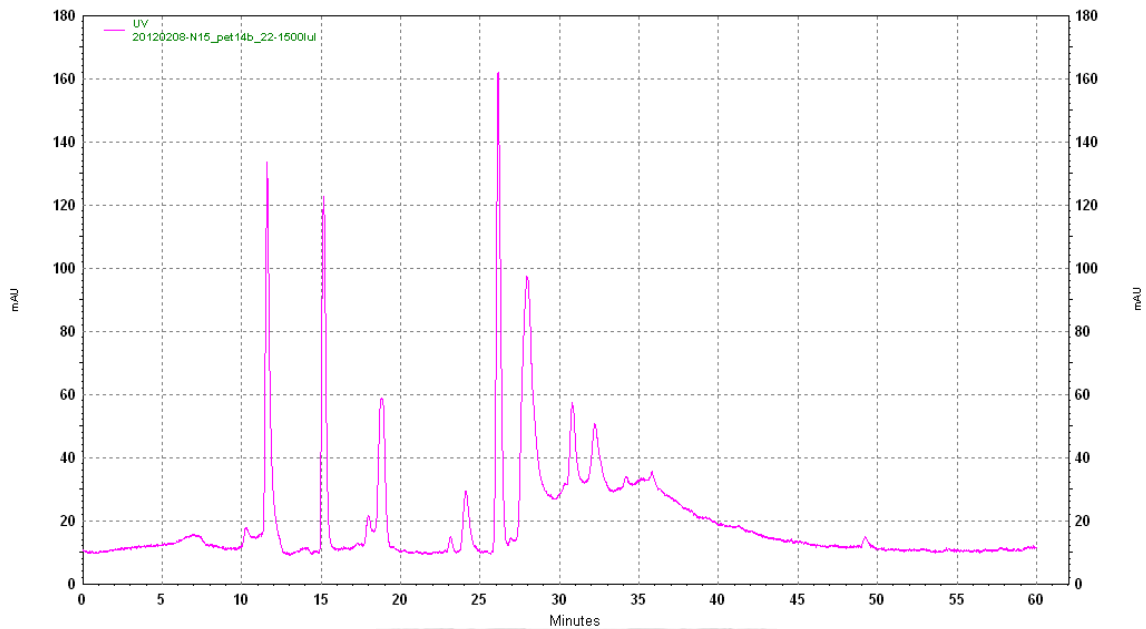


圖 5-7-3、原生型  $A\beta_{40}$  之 HPLC 層析圖。其中~31 分鐘處之吸收峰為  $A\beta_{40}$ 。

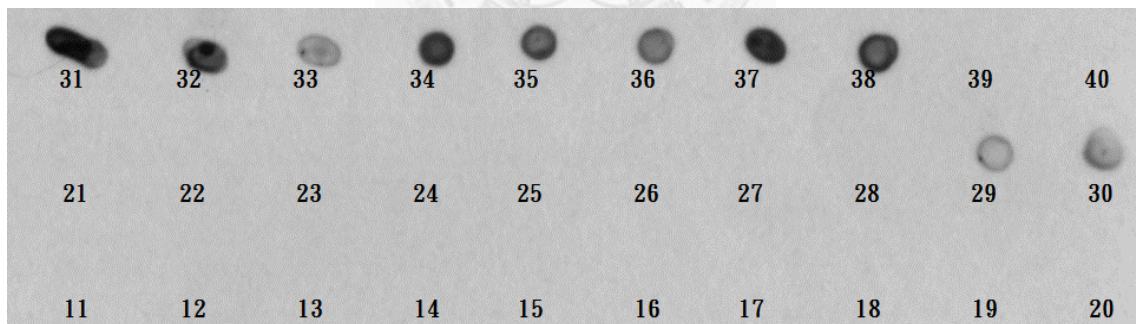


圖 5-7-4、以 Dot blotting 分析 HPLC 純化之產物。一級抗體為 6E10，二級抗體為 Goat anti-mouse，底片曝光 5 分鐘。

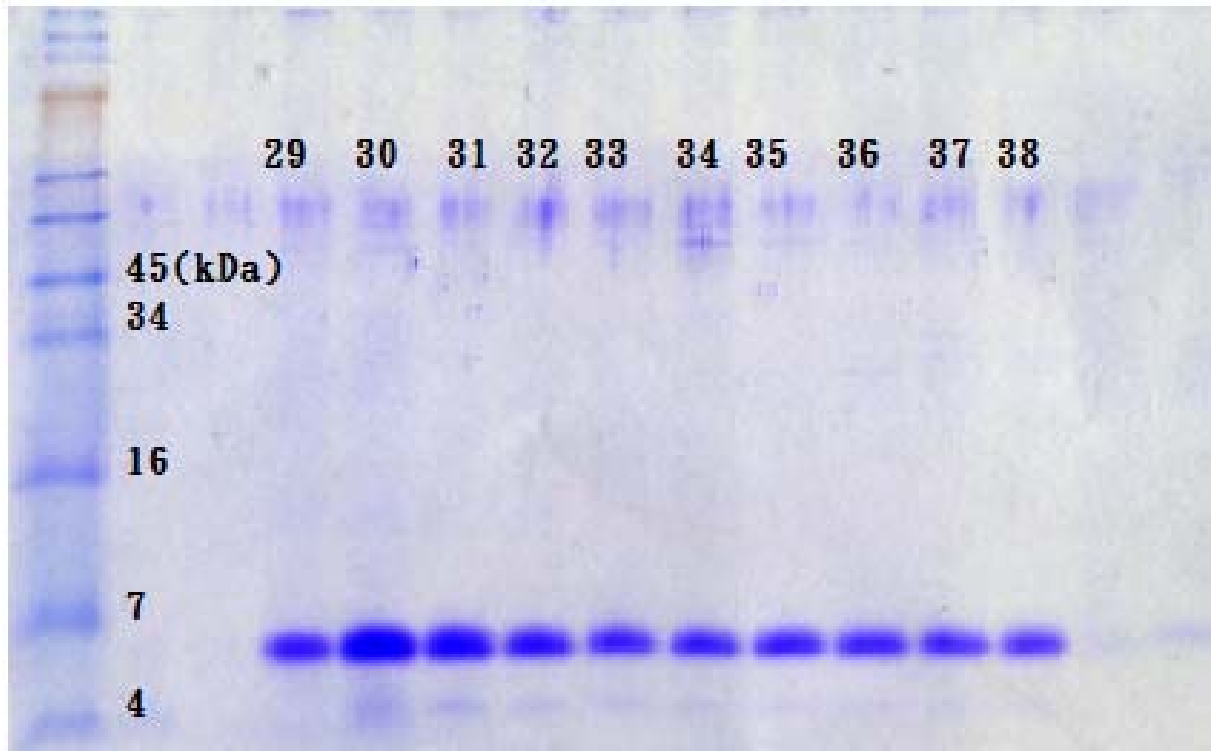


圖 5-7-5、以 SDS-PAGE 分析之 HPLC 各時間產物。所使用之膠體為 13.3% 之 Tricine gel。



## 第六章 結論與建議

### 6-1 $^{15}\text{N}$ - $\text{A}\beta_{40}$ 之生產與純化

為進行  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  之 HSQC 實驗，必須要能夠先生產並純化  $^{15}\text{N}$ -  $\text{A}\beta_{40}$ ，本此純化流程中可發現，以 1L 的 M9 培養液可成功獲得~0.6mg 之融合蛋白，若能達到 100% 之 TEV 蛋白酶切割率則可獲得~0.4mg 之  $\text{A}\beta_{40}$ ，然而此次純化中遭遇到兩個問題，分別是 TEV 蛋白酶之切割率極低，以及 HPLC 無法將融合蛋白與  $\text{A}\beta_{40}$  分離。

由同樣以 TEV 蛋白酶切割並純化  $\text{A}\beta$  之先前文獻<sup>83</sup>中發現，4°C 隔夜應為充分之反應時間及反應溫度，本次純化切割率過低的問題應是由於所添加的 TEV 蛋白酶不足量，無法與獲得之融合蛋白完全反應，因此應先進行蛋白酶與融合蛋白之混合比例測試，以確認能夠充分反應之 TEV 蛋白酶與融合蛋白比例。

而 HPLC 無法將融合蛋白與  $\text{A}\beta_{40}$  分離之問題，可藉由再次以鎳親和管柱純化以將  $\text{A}\beta_{40}$  與未切割之融合蛋白與切割下之 His-tag 部分分離。再次以 HPLC 純化應可預期得到高純度之  $\text{A}\beta_{40}$ 。

此外為提升純化之產率，在各個步驟皆應避免產物的損失，如透析置換緩衝溶液的步驟，應避免將融合蛋白溶液之濃度提升太多，以避免形成沉澱而造成損失。在進行 TEV 蛋白酶之切割時，可使用攪拌子以確認蛋白酶與融合蛋白充分混合，提升剪切之成功率。之後在進行其他突變型  $\text{A}\beta_{40}$  之純化時也應重新測試如表現等級、蛋白酶添加比例等純化條件，以獲得最大可能之產率。

## 6-2 以光譜法檢測原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬之結合關係

此處我們嘗試使用自身螢光、Bis-ANS 螢光、及圓二色光譜三種光譜法來分析原生型與突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白與鋅、銅離子的結合關係。其中自身螢光及 Bis-ANS 螢光皆使用 HEPES 為緩衝溶液，然而圓二色光譜中由於 HEPES 緩衝溶液會對圓二色光譜產生干擾，無法獲得 220nm 以下之光譜，因此改用 Tris 為緩衝溶液。此實驗條件的不一致性可能直接影響到結果，因此須重新考慮實驗條件之設計。

在實驗進行的部分，為獲得準確之實驗數據，各組實驗皆重複進行三次以上，然而由於  $\beta$ -類澱粉蛋白、緩衝溶液、金屬離子等藥品用量過大，有時會發生藥品用盡須重新配置的情形，雖然理論上每次配置之藥品之條件皆應相同，但為減少實驗過程中人為誤差，應一次配置大量藥品以避免此種情況發生。且各實驗皆應在短時間內完成，避免藥品放置過久而變性。

由自身螢光及 Bis-ANS 螢光所獲得之結果，發現 H6A、H6R 兩種突變型與鋅離子結合時有不同於其他突變型之表現，此結果與先前文獻<sup>54</sup>中以 EPR 實驗得到之結果相近，His6 之胺基酸取代造成結合性質有顯著之差異，但取代為 H6A 或是 H6R 所造成的影響並不明顯。

比較不同公式後發現，由 Total binding equation 所 fitting 之結果最能充分描述  $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬離子的結合關係，相較於先前文獻<sup>84</sup>中之原生型  $\beta$ -類澱粉蛋白對銅、鋅離子之解離常數分別為 4.9、及 12 $\mu$ M，此處獲得之結果為 3.86、及 4.26 $\mu$ M，其中差異可能來自於使用的緩衝溶液不同，以及甘胺酸的添加與否。比較突變型與原生型之  $\beta$ -類澱粉蛋白解離常數後並未發現顯著之差異。然而 D7 位置之突變型與銅離子結合之解離常數皆小於與鋅離子解離常數，與原生型情況相同。H6 位置之突變型與銅離子之解離常數卻大於與鋅離子解離常數。此實驗結果可得到兩個結論， $\beta$ -類澱粉蛋白與鋅、銅離子結合之方法必定有所差異，Bis-ANS 光譜中相反的結果也印證了此結果。另外 H6 位置一旦發生改變，其性質便有顯著變化，可見此位置之胺基酸與金屬離子結合之結構有很大的相關性。

### 6-3 以恆溫滴定量熱儀檢測原生型及突變型 $\beta$ -類澱粉蛋白與金屬之結合關係

此處所使用的儀器為 ITC200，所搜尋到的相關文獻皆是使用 VP-ITC 來進行實驗，此二者之最大差異在於所使用之試劑體積，ITC 200 僅為 VP-ITC 之二十分之一，雖可節省藥品之用量，但實驗誤差所造成的影響相對之下將更為明顯，在控制條件時要更加小心。在操作儀器過程中環境溫差將會影響實驗結果，因此在操作時需避免周遭環境變化。

此處獲得之金屬離子與原生型及突變型  $\beta$ -類澱粉蛋白之計量數(stoichiometric number)皆在 0~1 之間。然而所得結果並無法確定金屬與  $\beta$ -類澱粉蛋白之鍵結關係為 1:1 或是 2:1 結合，試著重複實驗並嘗試以不同方式定量蛋白質濃度或許可以確認此結果。

比較各種  $\beta$ -類澱粉蛋白之間解離常數發現幾乎所有突變型之解離常數皆大於原生型一個數量級以上，此結果為先前自身螢光之結果所未發現，有待重複實驗以確認此現象。

此外 fitting 結果觀察到 D7A 之突變型其與金屬離子之作用力相對於其他突變型來說顯得重要。若假定 H6 為金屬離子結合之位置，D7 之位置與其相鄰，並且將親水性的胺基酸取代為疏水性的胺基酸，是否因此導致疏水性作用在此有較大的影響，有待進一步的查證。

### 6-4 建議及未來展望

本實驗中針對不同類型之  $\beta$ -類澱粉蛋白與銅、鋅離子之結合做比較，儘管未能成功地發現確切的結合結構(binding coordination)，仍有許多值得探究之數據結果。之後若是能完成光誘導交聯法及二維異核化學位移相關光譜之結果必能夠對此結合關係有更深入的了解，也希望能藉此研究對治療阿茲海默症的藥物設計有進一步的貢獻。

## 附錄

### 附錄 A 利用 Quick Change Primer Design Program 設計引子

1. 首先連結到 <https://www.genomics.agilent.com/>，註冊並登入網站。
2. 選取 Applications→Mutagenesis，並點選 Quick Change Primer Design Program。
3. 選取所使用的 Site-directed mutagenesis kit 名稱，此處以 QuickChangeII 為例。
4. 將所使用之 DNA template 序列以 FASTA 格式貼上在表格處。
5. 點選 Upload 上傳 DNA 序列。
6. 上傳完成後頁面會自動更新並顯示各個位置之 DNA 序列。
7. 選擇要進行 Change、Delete、或是 insert DNA 序列，此處我們要進行的是突變因此選擇 Change。
8. 勾選要進行突變之 DNA 位置，並選取所要變更的 DNA 序列，例如要將腺嘌呤(A)突變成胞嘧啶 (C)，則勾選所要突變位置後在 site 1 的下拉式選單中選取 C。
9. 按下 Design Primer，程式就會自行設計所需的正、反向引子。
10. 此處以 D7A 為例，結果如下頁所示。

表 A-1、Quick Change Primer Design Program 結果

Primer sequences:

Primer Name	Primer Sequence (5' to 3')
D13A	5'-gatgcagaattccgacatgcctcaggatatgaagttcat-3'
D13A_antisense	5'-atgaacttcatatcctgaggcatgctggaattctgcatc-3'

Oligonucleotide information:

Primer Name	Length (nt.)	Tm	Duplex Energy at 68°C	Energy Cost of Mismatches
D13A	39	78.45°C	-44.91 kcal/mole	3.2%
D13A_antisense	39	78.45°C	-46.45 kcal/mole	1.2%

Primer-template duplexes:

Primer Name	Primer-Template Duplex
D13A	<p>5'-gatgcagaattccgacatgcctcaggatatgaagttcat-3'</p> <p>     </p> <p>gttctacgtcttaaggctgtactgagtcctataacttcaagtagta</p>
D13A_antisense	<p>caagatgcagaattccgacatgactcaggatatgaagttcatcat</p> <p>     </p> <p>3'-ctacgtcttaaggctgtacggagtcctataacttcaagta-5'</p>



## 附錄 B 以自動滴定儀進行去摺疊與再折疊實驗

為達到快速、精準的目的，嘗試以自動滴定儀 Microlab<sub>500</sub> 搭配 螢光光譜儀 Fluormax-3 進行自動化蛋白質摺疊與去摺疊實驗。首先選取已被廣泛用來進行蛋白質去折疊實驗之核糖核酸酶 A(RNaseA, Roche, 70297724)進行測試，並選用 130mM Tris-HCl, pH7 做為緩衝溶液，以及胍鹽酸(GdnHCl)做為去活性劑。先將 RNaseA 以 1mg/ml 的濃度溶解於緩衝溶液。再分別將其以 0.05mg/ml 濃度加入緩衝溶液及 8M 胍鹽酸至以配製原態(Native stage)及去折疊態(Unfolded stage)之溶液。

### 去摺疊實驗操作：

先將 0.05mg/ml RNaseA 溶液 1.5ml 置於 1cm 光徑 4ml quartz cuvette 或取 0.6ml 放入 0.7ml quartz cuvette，接著放入 Fluormax-3 (Horiba Jobin Yvon)。將含有 0.05mg/ml RNaseA 之 8M 胍鹽酸填充於自動滴定儀之管柱 A。再將連結管柱 A、B 之軟管插入 cuvette 至液面下約 2 公分深度(緊靠邊緣避免影響光徑)。最後在程式中輸入預先計算完成的胍鹽酸添加劑量，系統即會自行經由管柱 A 進行胍鹽酸的添加，以及螢光讀值之測量，並經由管柱 B 重複吸取確保 cuvette 中濃度均勻。

### 再摺疊實驗操作：

將管柱 A 以 ddH<sub>2</sub>O 清洗並乾燥，將 0.05mg/ml RNaseA 添充於管柱 A，改以原態之蛋白質對去折疊態蛋白質進行滴定，重新輸入參數後開始實驗。

下圖 B-2、圖 B-3 為去折疊、再折疊實驗以 280nm 為激發光並收集 300~400nm 之放射光譜。將最低胍鹽酸濃度之 308nm 螢光值調整為 0，最高濃度之值調整為 1，標準化可得到滴定曲線如圖 B-4。圖 B-6 則是文獻中得到之 RNaseA 滴定曲線 (Bigelow, C.C. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 12935-12938)，可看到圖 B-4 中去折疊與再折疊曲線幾乎完全重合，且與圖 B-6 相近，證實此設置是可行之做法，唯所需蛋白質樣品耗費過多，因此進一步使用 0.7ml cuvette 進行實驗，以降低樣品需求量。

圖 B-5 為使用 0.7ml cuvette 進行之自動滴定結果，與圖 B-4 相較，此設定下隨機誤差對結果產生之影響較大。但去折疊與再折疊曲線仍幾近重合，且與圖 B-6 相近，證實此自動滴定裝置之設置為可行之實驗方法。

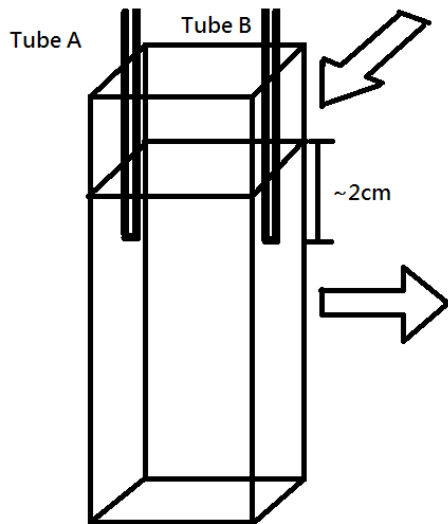


圖 B-1、自動滴定裝置設定示意圖

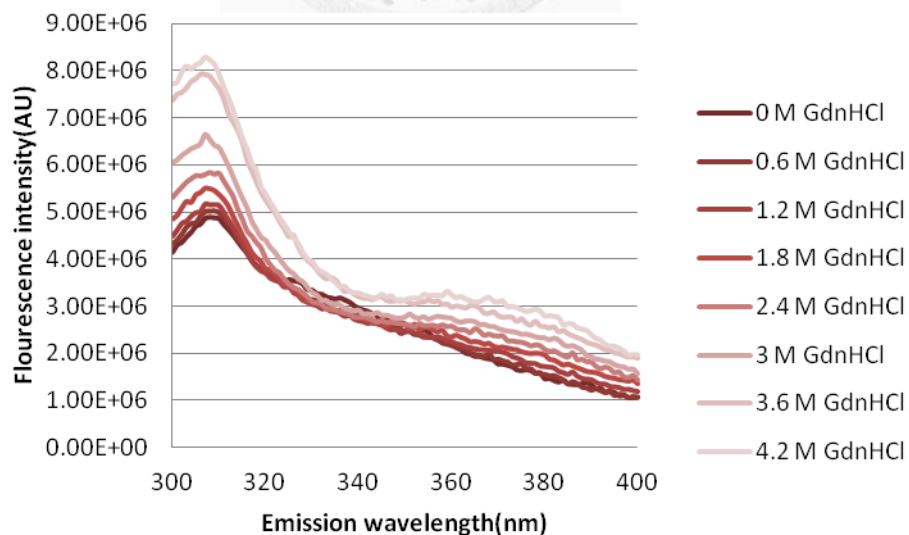


圖 B-2、去折疊實驗光譜

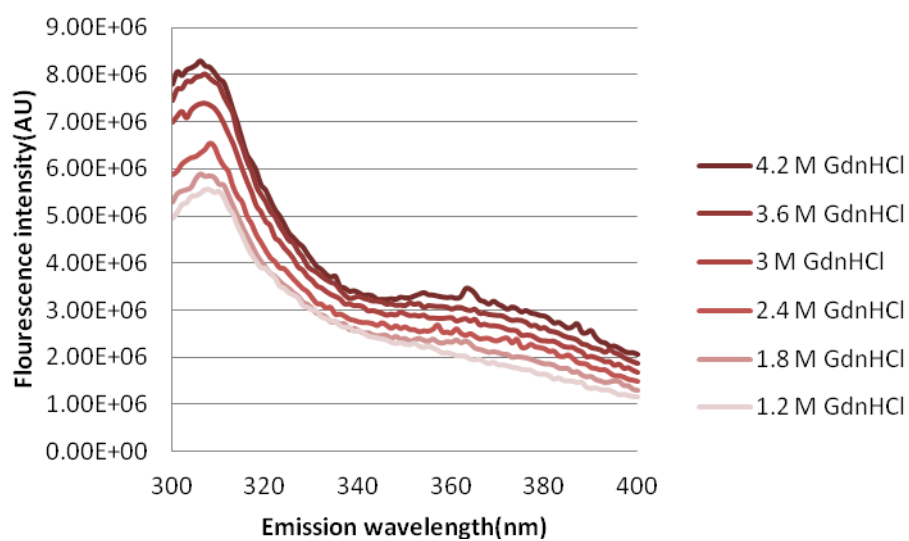


圖 B-3、再折疊實驗光譜

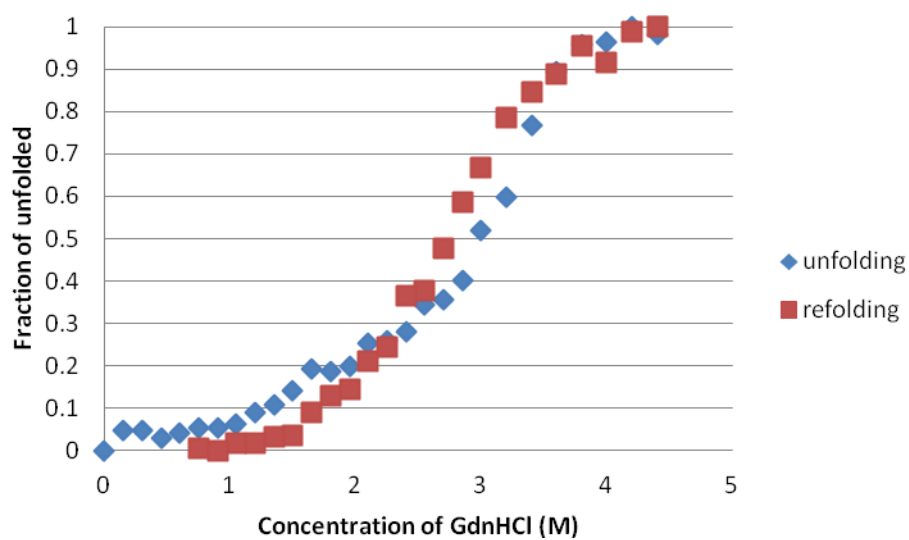


圖 B-4、以 GdnHCl 進行之 RNaseA 滴定曲線(4ml cuvette)

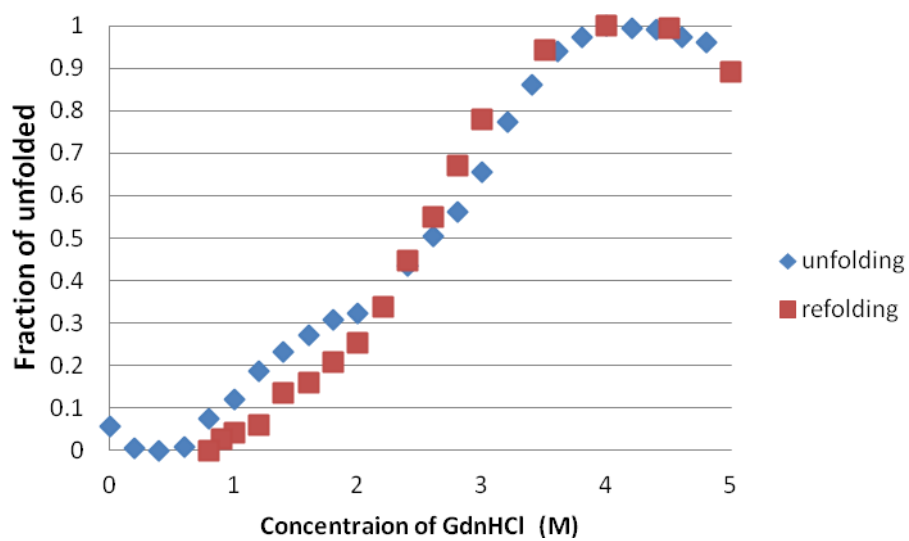


圖 B-5、以 GdnHCl 進行之 RNaseA 滴定曲線(0.7ml cuvette)

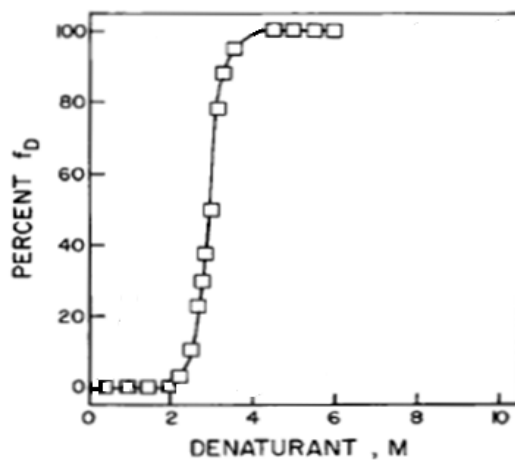


圖 B-6、文獻之滴定曲線

附錄 C TEV-A $\beta_{40}$ -pET14b 質體之序列

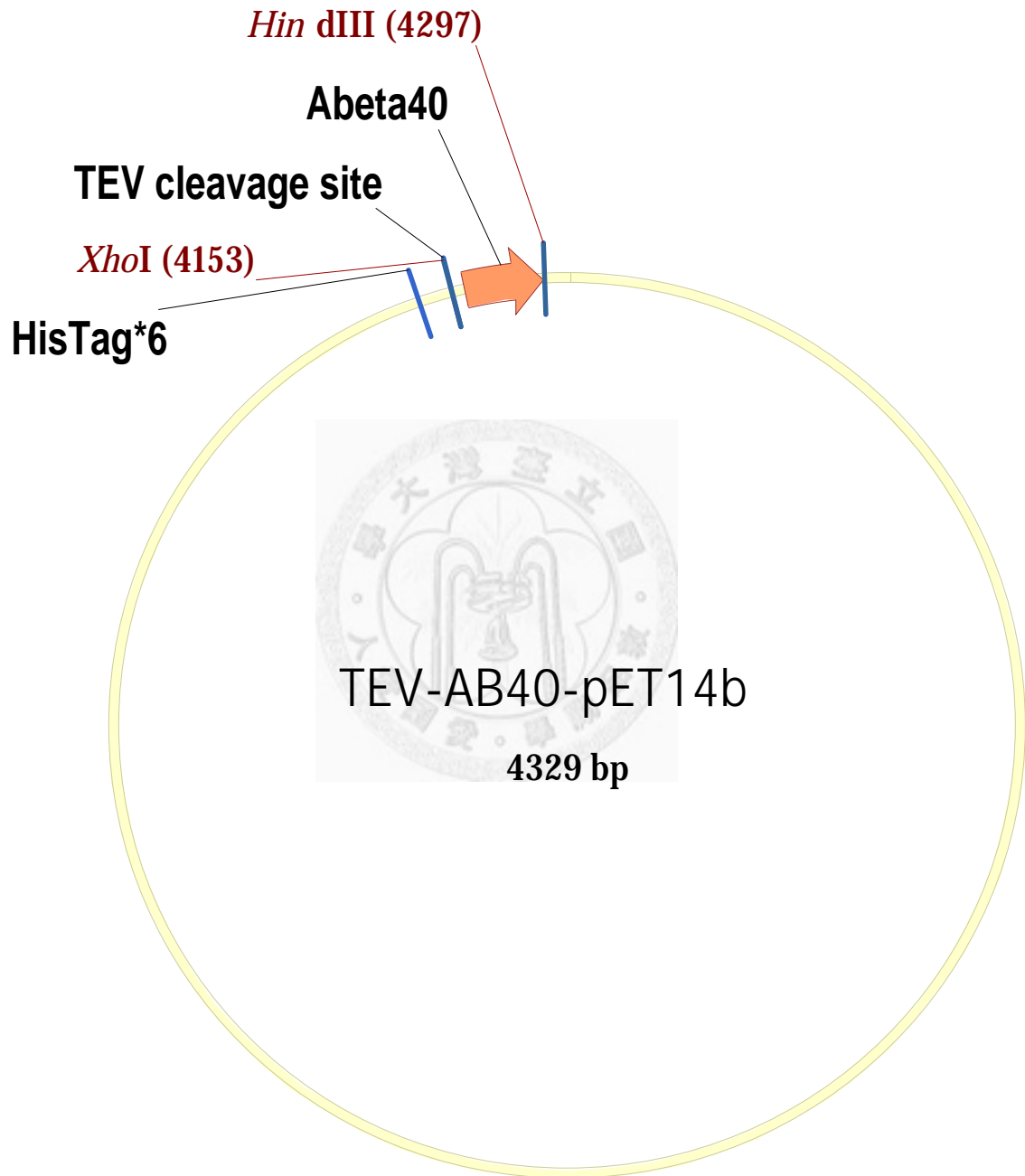


圖 C-1、TEV-A $\beta_{40}$ -pET14b 質體之序列

附錄 D 自身螢光滴定曲線與 Total binding fitting 曲線

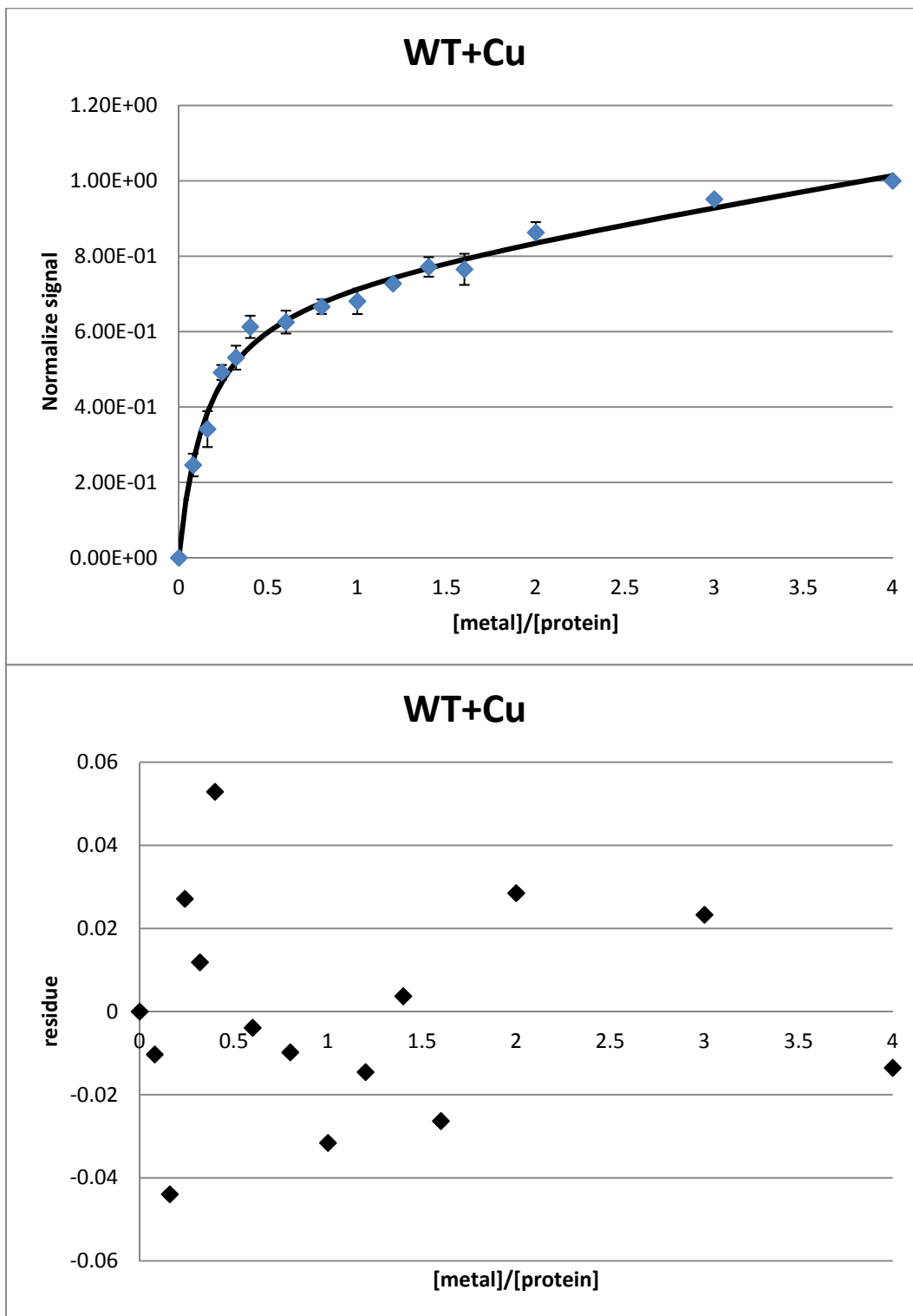


圖 D-1、以 total binding equation fitting 之銅離子與  $A\beta_{40}$  WT 滴定曲線(上)及 residue(下)

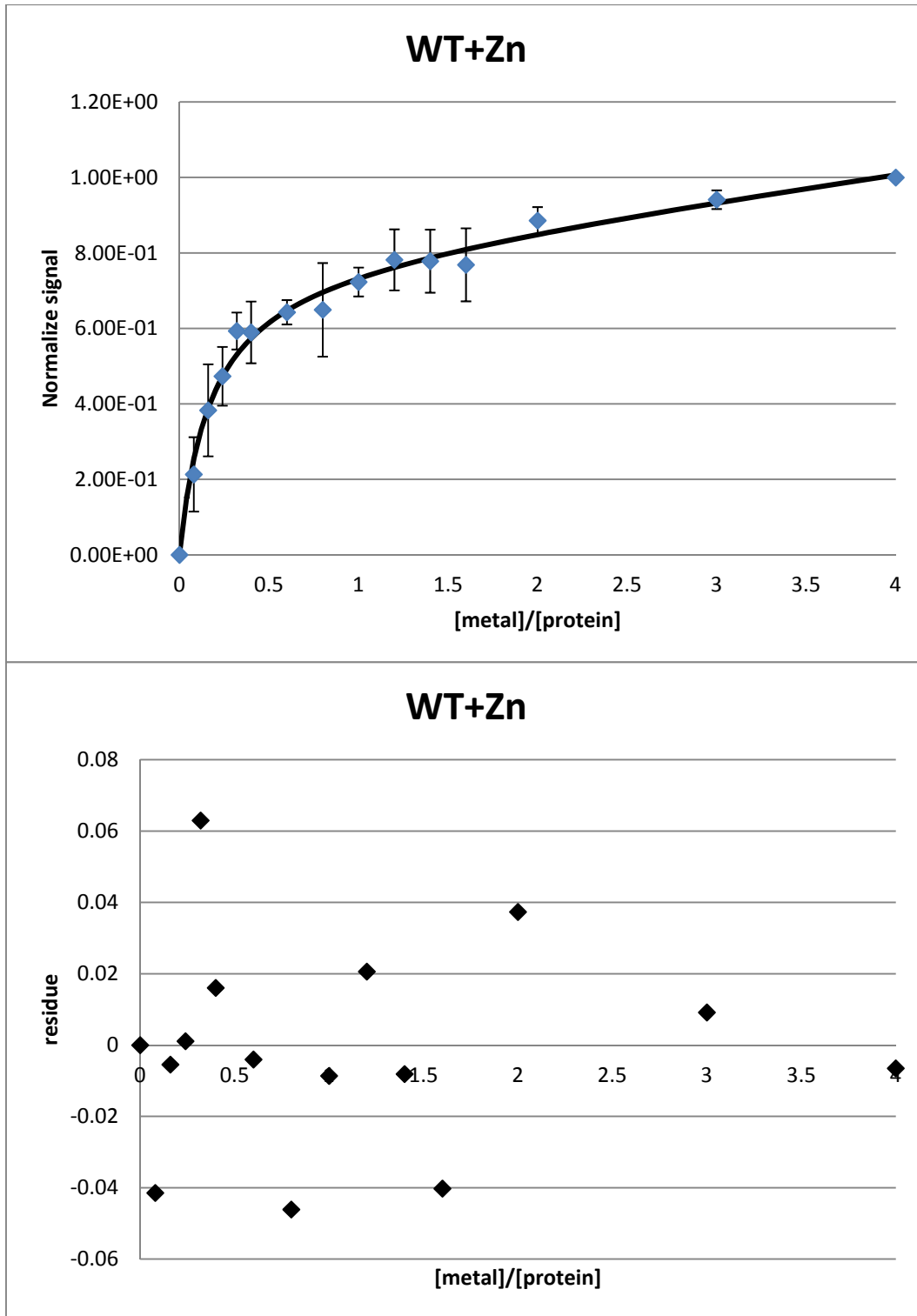


圖 D-2、以 total binding equation fitting 之鋅離子與 A $\beta$ <sub>40</sub> WT 滴定曲線(上)及 residue(下)

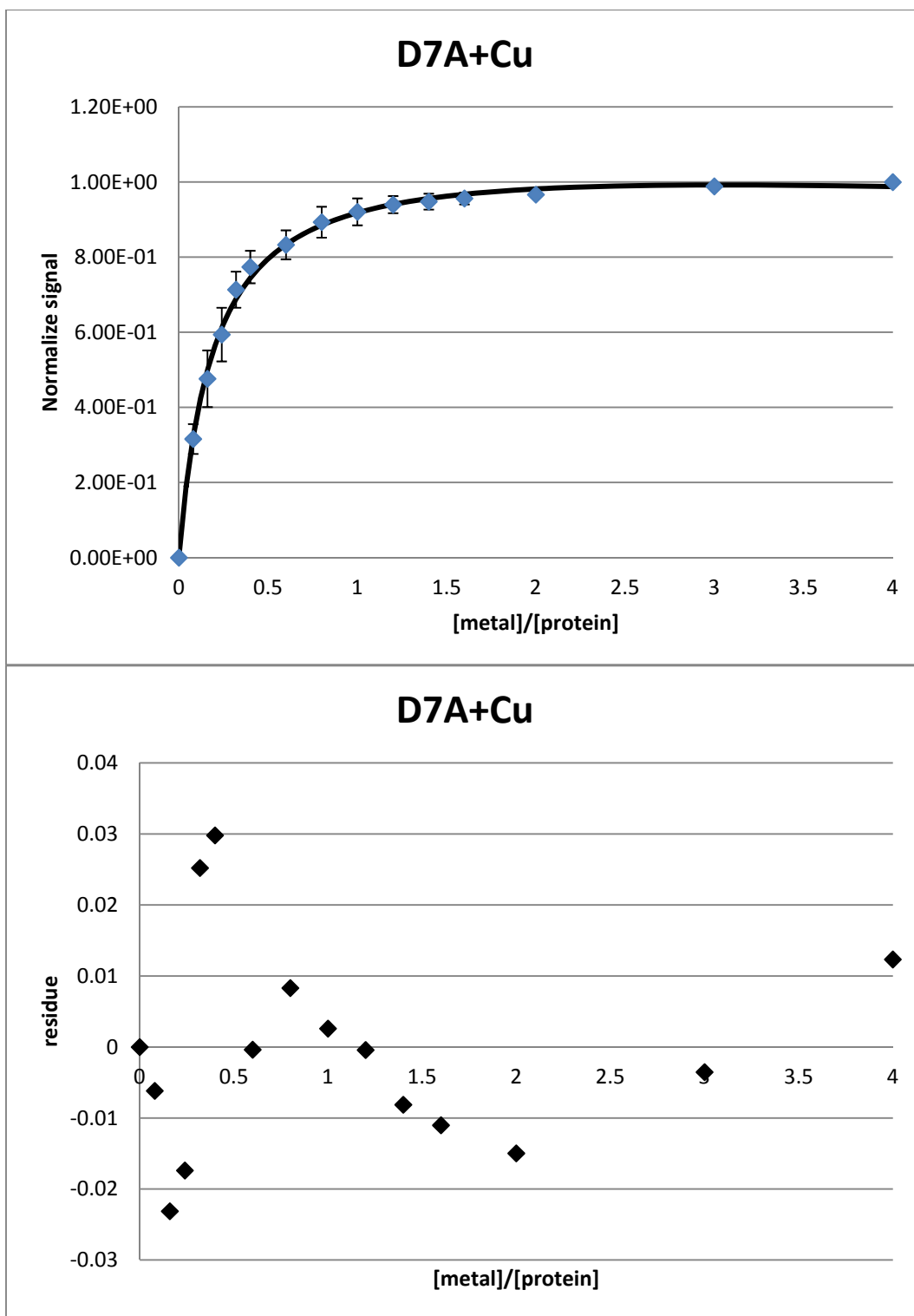


圖 D-3、以 total binding equation fitting 之銅離子與  $A\beta_{40}$  D7A 滴定曲線(上)及 residue(下)



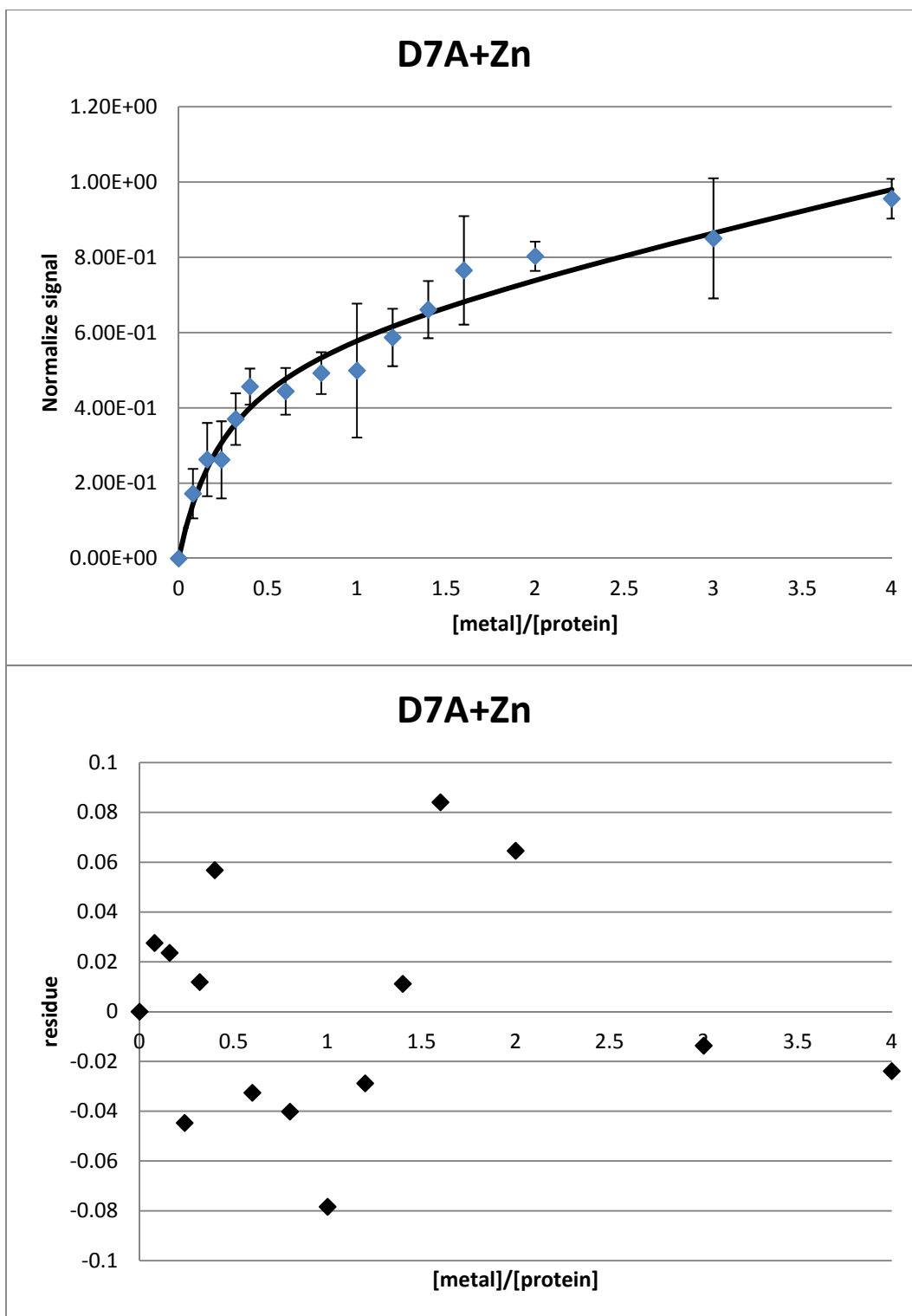


圖 D-4、以 total binding equation fitting 之鋅離子與 A $\beta$ <sub>40</sub> D7A 滴定曲線(上)及 residue(下)

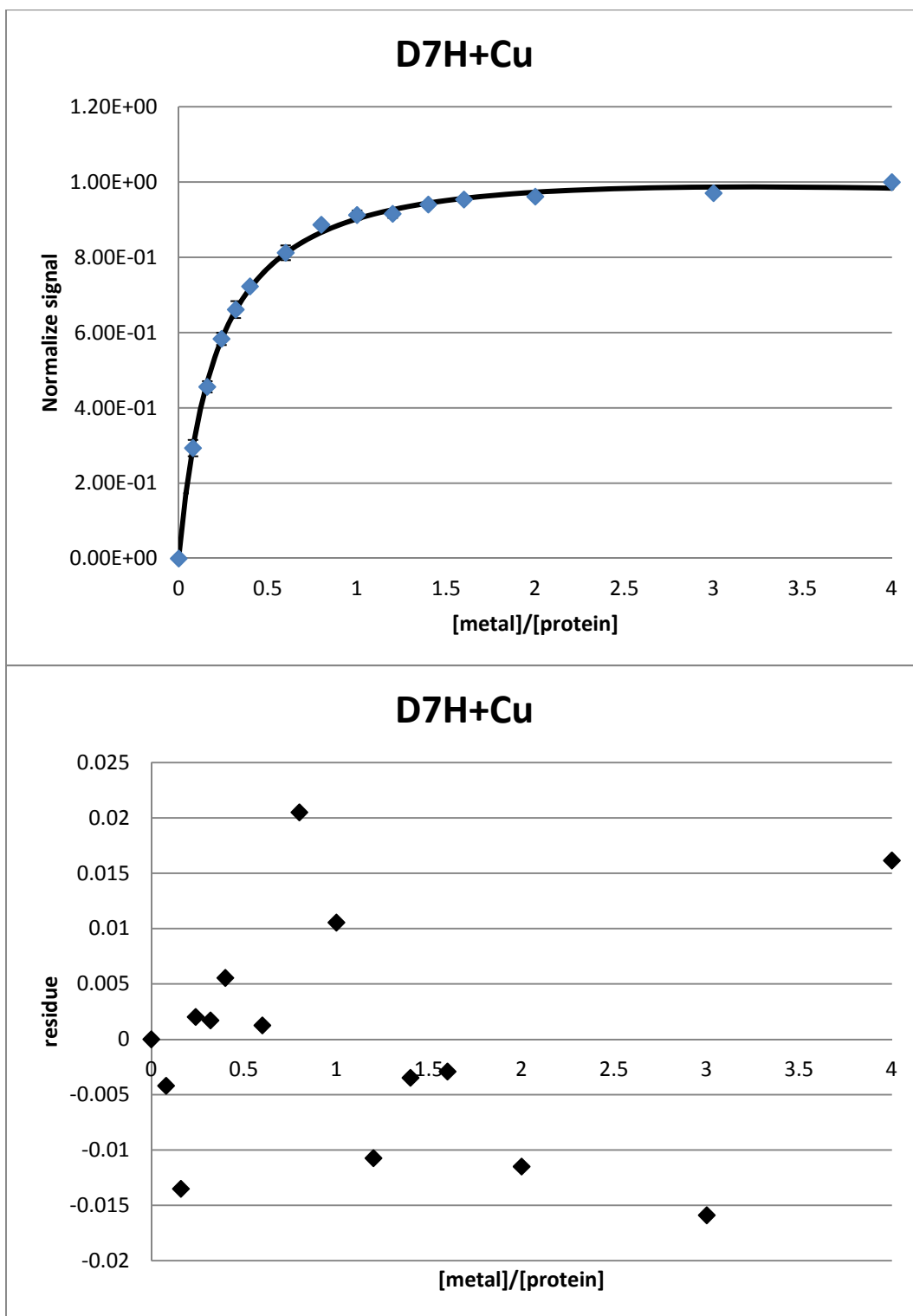


圖 D-5、以 total binding equation fitting 之銅離子與  $A\beta_{40}$  D7H 滴定曲線(上)及 residue(下)

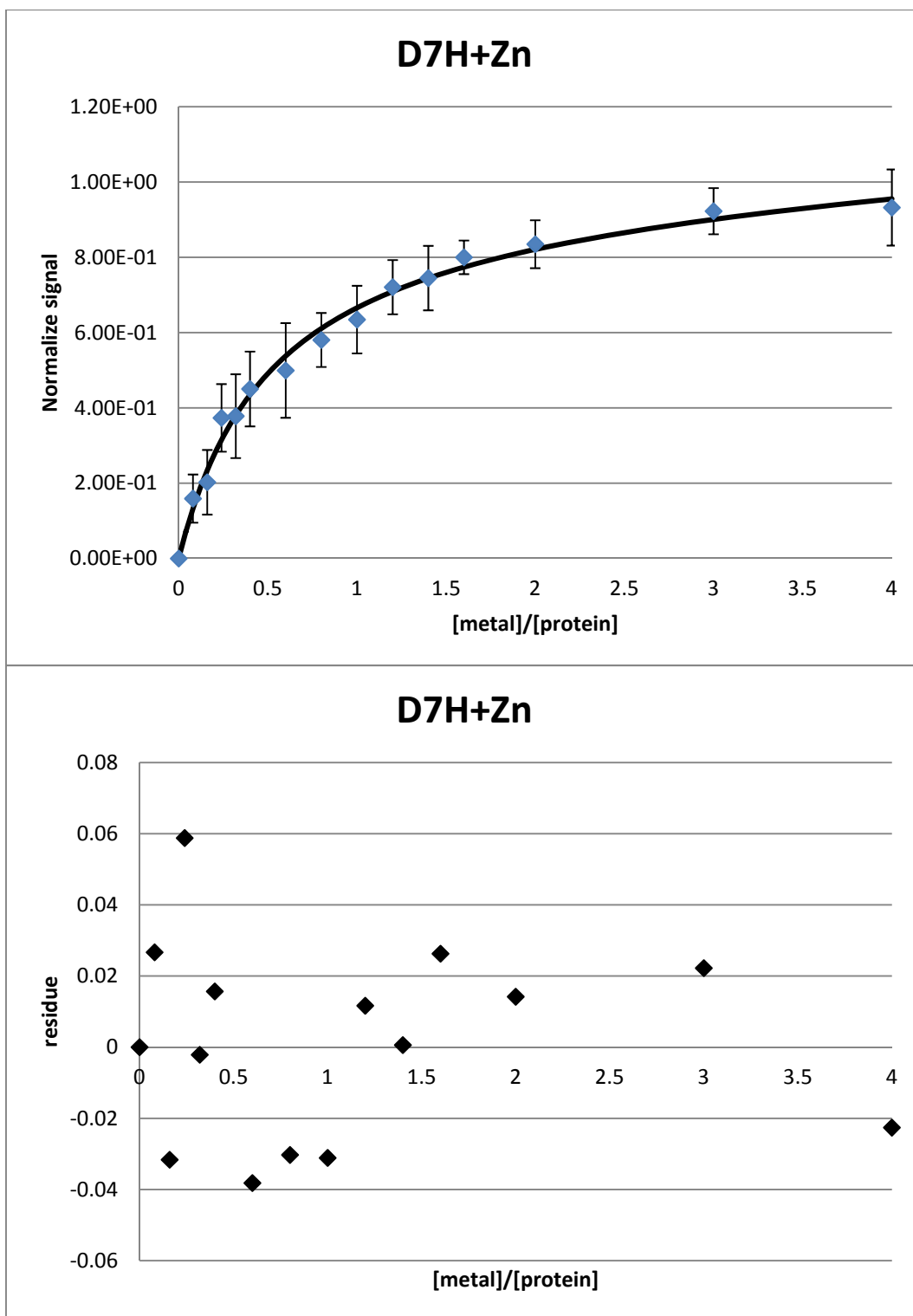


圖 D-6、以 total binding equation fitting 之鋅離子與  $A\beta_{40}$  D7H 滴定曲線(上)及 residue(下)

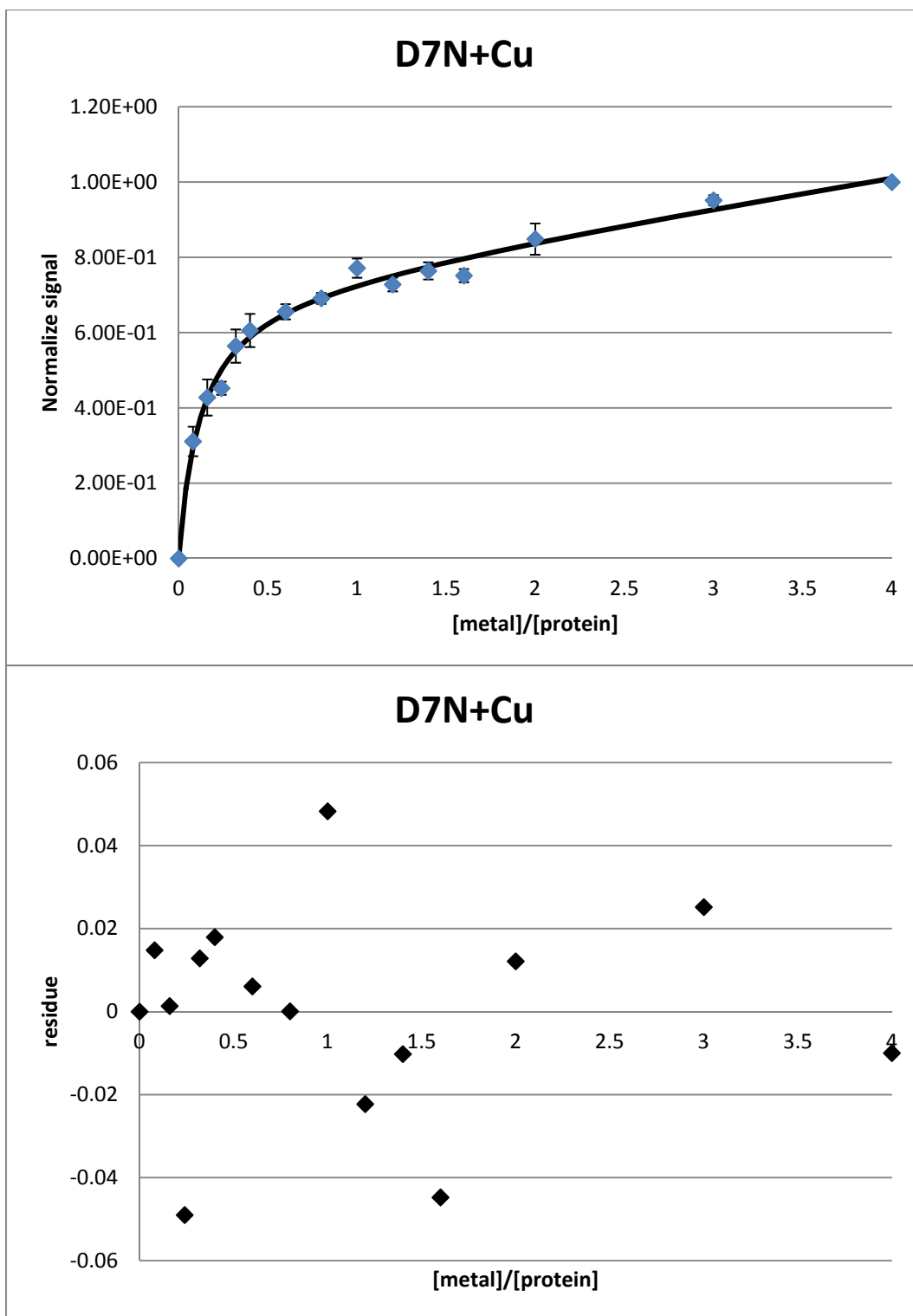


圖 D-7、以 total binding equation fitting 之銅離子與  $A\beta_{40}$  D7N 滴定曲線(上)及 residue(下)

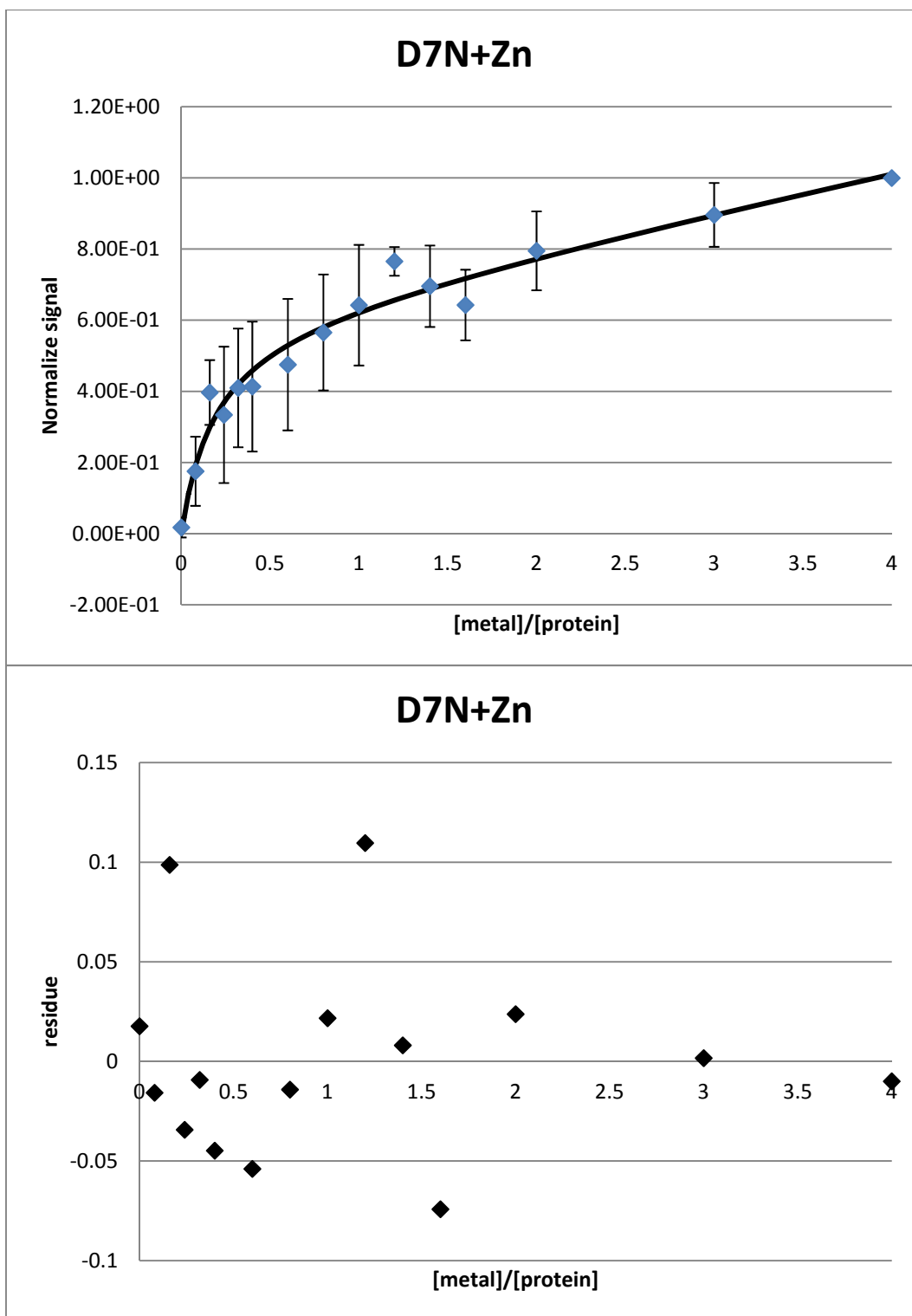


圖 D-8、以 total binding equation fitting 之鋅離子與  $A\beta_{40}$  D7N 滴定曲線(上)及 residue(下)

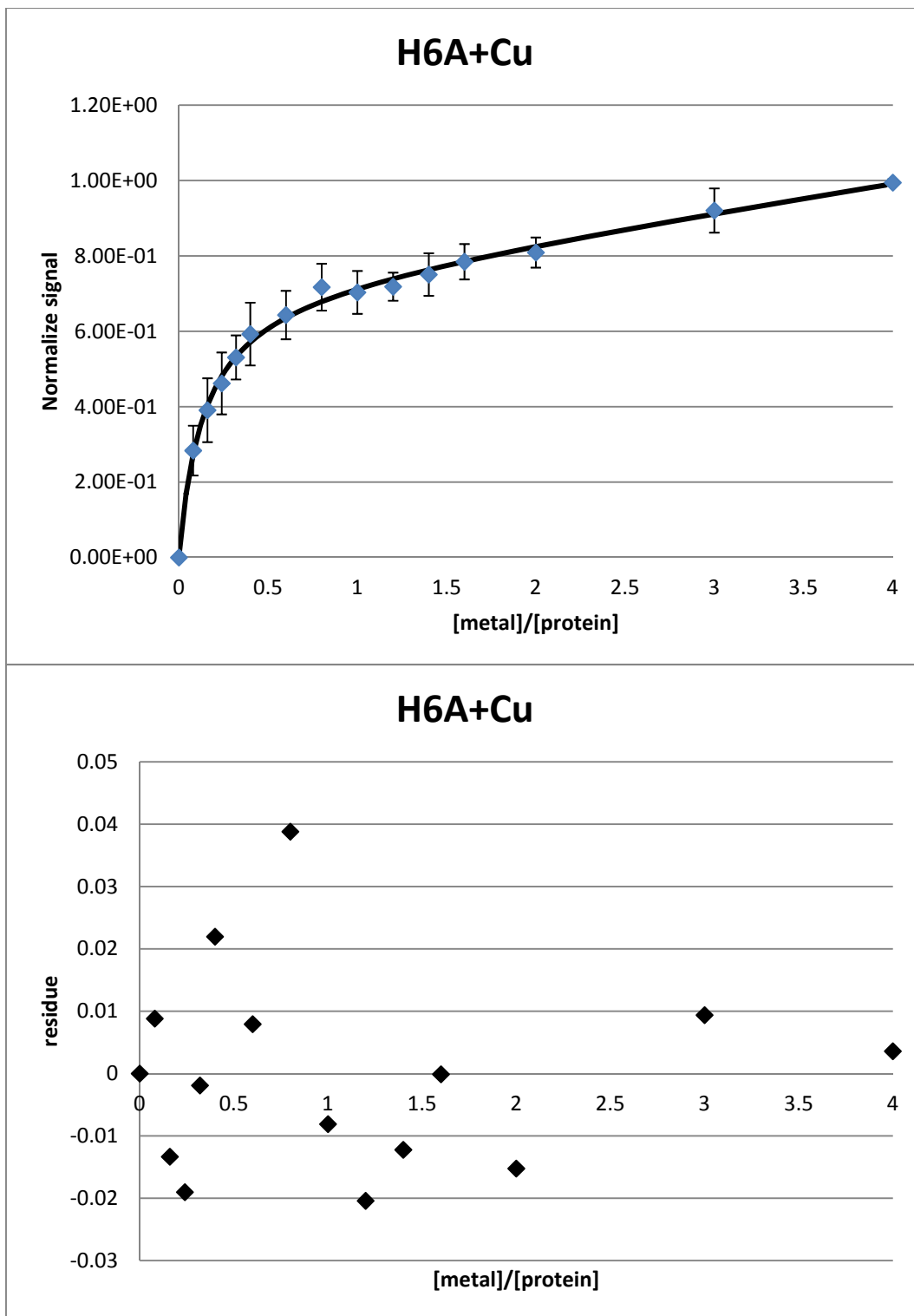


圖 D-9、以 total binding equation fitting 之銅離子與  $A\beta_{40}$  H6A 滴定曲線(上)及 residue(下)

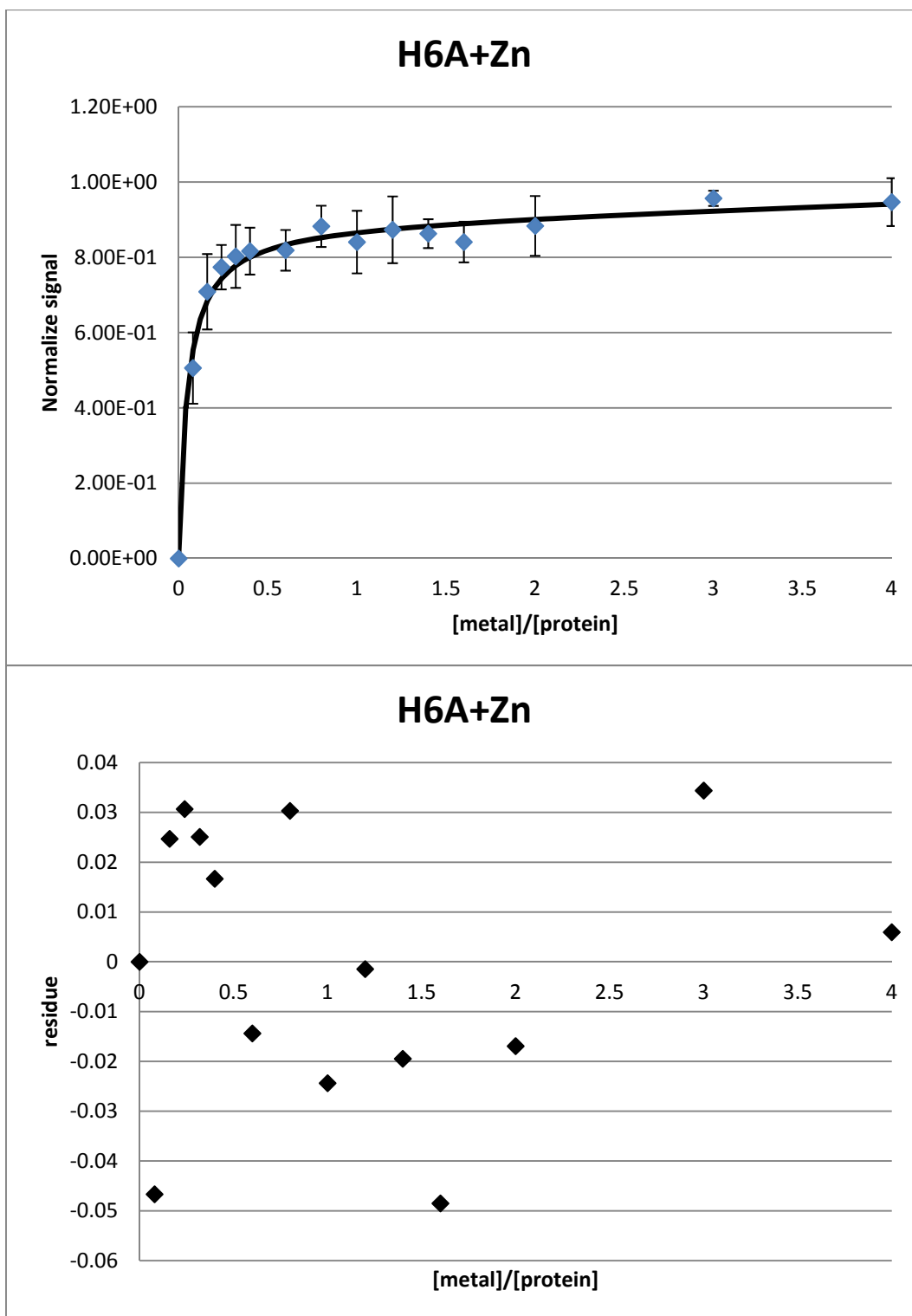


圖 D-10、以 total binding equation fitting 之鋅離子與  $A\beta_{40}$  H6A 滴定曲線(上)及 residue(下)

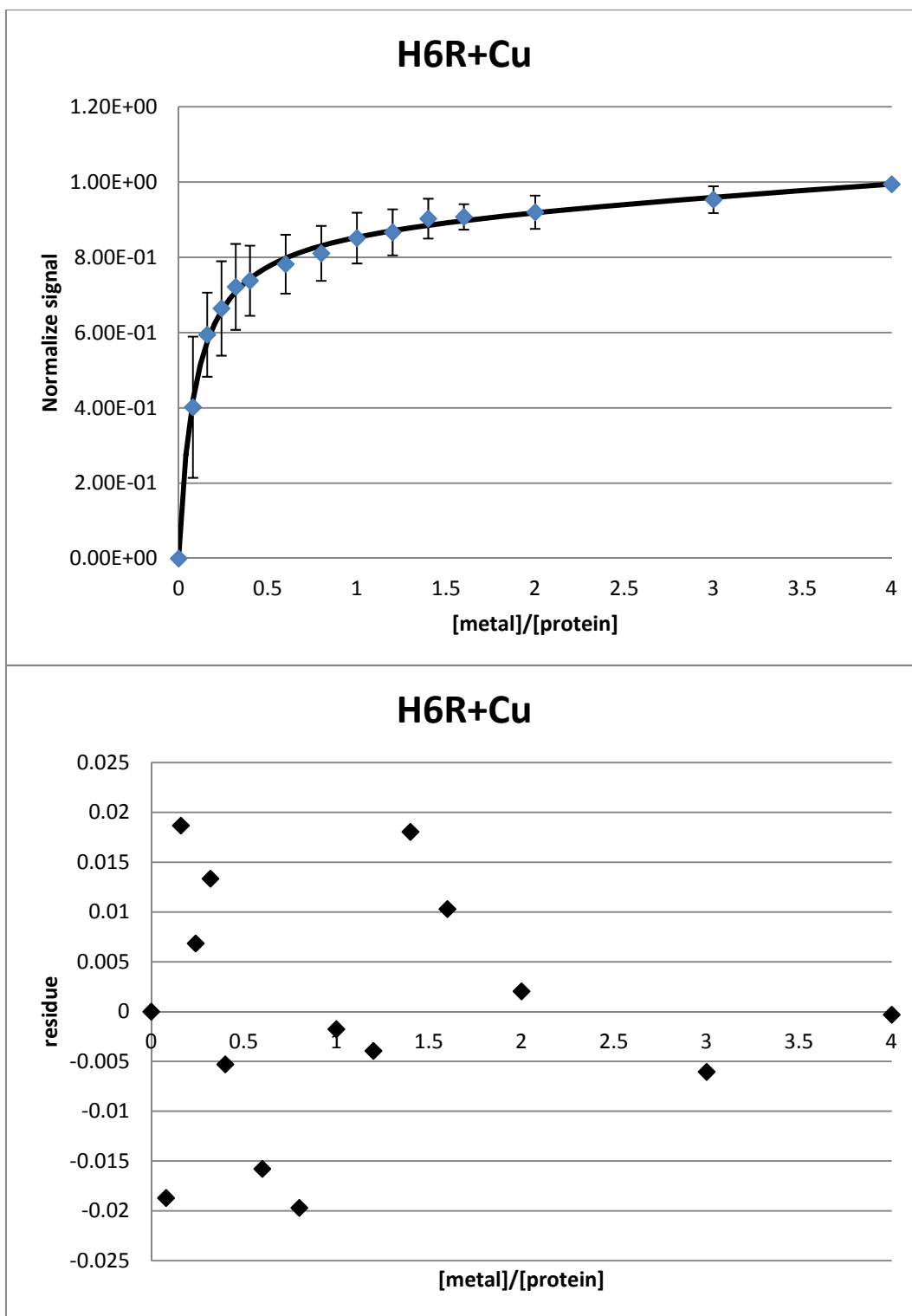


圖 D-11、以 total binding equation fitting 之銅離子與  $A\beta_{40}$  H6R 滴定曲線(上)及 residue(下)



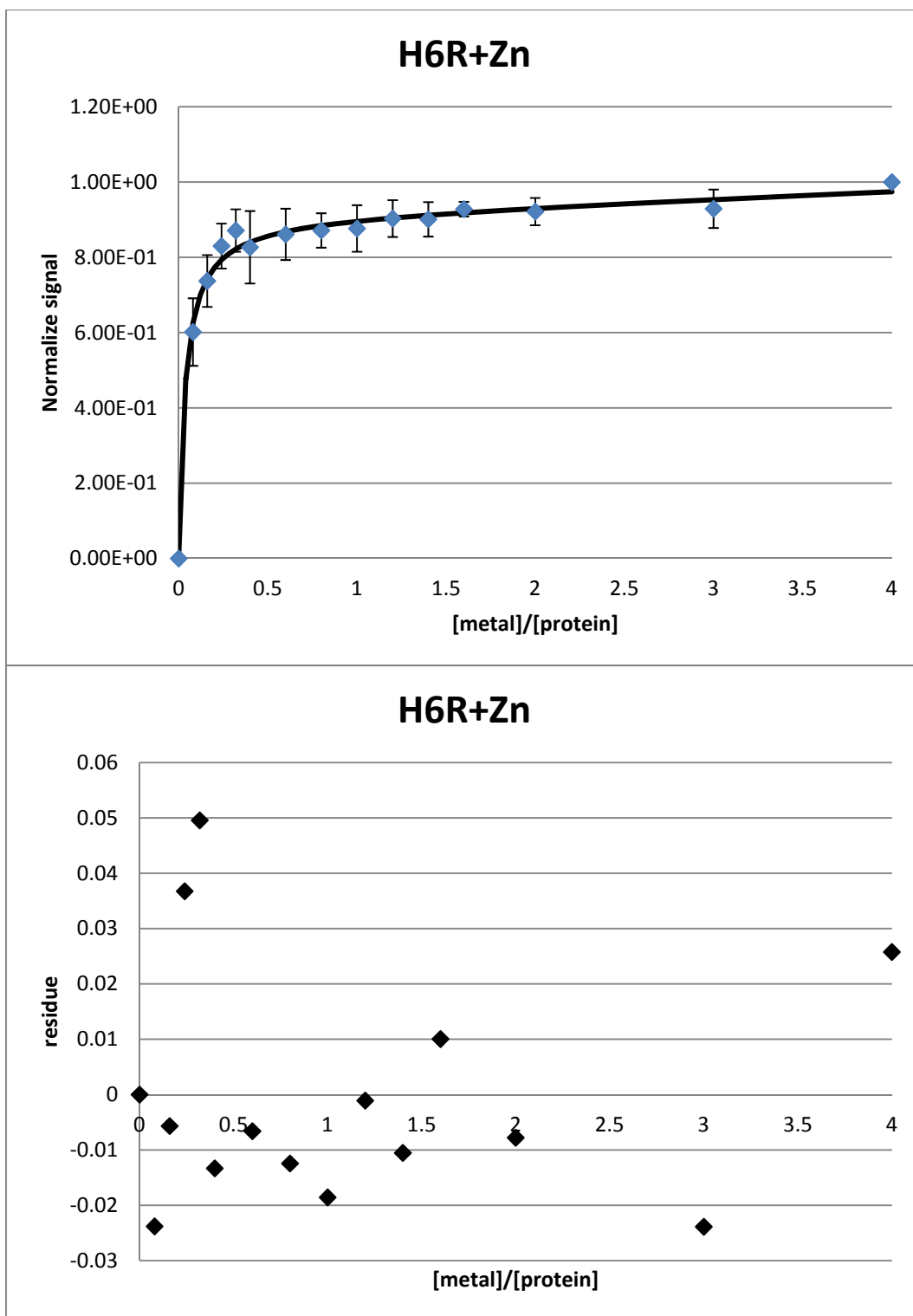


圖 D-12、以 total binding equation fitting 之鋅離子與  $A\beta_{40}$  H6R 滴定曲線(上)及 residue(下)

附錄 E 縮寫表

全名	縮寫
Amyloid precursor protein	APP
1,4 Dithiothreitol	DTT
4,4'-bis(1-anilino-8-naphthalene sulfonate)	Bis-ANS
Ammonium persulfate	APS
Amyloid beta	A $\beta$
Bicinchoninic acid assay	BCA
blood brain barrier	BBB
Bovine serum albumin	BSA
Circular Dichroism	CD
Electrochemiluminescence	ECL
electron paramagnetic resonance	EPR
familial Alzheimer's disease	FAD
Fast protein liquid chromatography	FPLC
Heteronuclear Single Quantum Correlation	HSQC
High-performance liquid chromatography	HPLC
Isopropylthio- $\beta$ -galactoside	IPTG
Isothermal Titration Calorimetry	ITC
Luria-Bertani broth	LB broth
mass spectrometry	MS
Nuclear Magnetic Resonance	NMR
photo-induced cross-linking of unmodified proteins	PICUP
reactive oxygen species	ROS
Sodium dodecyl sulfate	SDS
Tetramethylethylenediamine	TEMED
Trifluoroacetic acid	TFA

## 參考文獻

- 1 Ross, C. A. & Poirier, M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine* **10 Suppl**, S10-17, doi:10.1038/nm1066 (2004).
- 2 Sipe, J. D. *et al.* Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* **17**, 101-104, doi:10.3109/13506129.2010.526812 (2010).
- 3 Pettersson-Kastberg, J. *et al.* Can misfolded proteins be beneficial? The HAMLET case. *Annals of medicine* **41**, 162-176, doi:10.1080/07853890802502614 (2009).
- 4 Berchtold, N. C. & Cotman, C. W. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiology of aging* **19**, 173-189 (1998).
- 5 Tiraboschi, P., Hansen, L. A., Thal, L. J. & Corey-Bloom, J. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology* **62**, 1984-1989 (2004).
- 6 Thinakaran, G. & Koo, E. H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *The Journal of biological chemistry* **283**, 29615-29619, doi:10.1074/jbc.R800019200 (2008).
- 7 Suh, Y. H. & Checler, F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacological reviews* **54**, 469-525 (2002).
- 8 Zheng, H. & Koo, E. H. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular neurodegeneration* **1**, 5, doi:10.1186/1750-1326-1-5 (2006).
- 9 Hardy, J. A. & Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184-185 (1992).
- 10 Prabhulkar, S., Piatyszek, R., Cirrito, J. R., Wu, Z. Z. & Li, C. Z. Microbiosensor for Alzheimer's disease diagnostics: detection of amyloid beta biomarkers. *Journal of neurochemistry*, doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07709.x (2012).
- 11 Al-Ayadhi, L. Y., Ben Bacha, A. G., Kotb, M. & El-Ansary, A. K. A novel study on amyloid beta peptide 40, 42 and 40/42 ratio in Saudi autistics. *Behavioral and brain functions : BBF* **8**, 4, doi:10.1186/1744-9081-8-4 (2012).
- 12 Ahmed, M. *et al.* Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nature structural & molecular biology* **17**, 561-567, doi:10.1038/nsmb.1799 (2010).
- 13 Sakono, M. & Zako, T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *The FEBS journal* **277**, 1348-1358, doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x (2010).
- 14 Brorsson, A. C. *et al.* Methods and models in neurodegenerative and systemic protein aggregation diseases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **15**, 373-396 (2010).
- 15 From molecular mechanisms toward the cure of systemic amyloidoses. Abstracts of the XII International Symposium on Amyloidosis. April 18-21, 2010. Rome, Italy. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* **17 Suppl 1**, 38-207, doi:10.3109/13506121003737385 (2010).

- 16 Laboratory of neurobiology and neuropharmacology of aging and  
neurodegenerative diseases.
- 17 Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database.
- 18 Reaume, A. G. *et al.* Enhanced amyloidogenic processing of the beta-amyloid  
precursor protein in gene-targeted mice bearing the Swedish familial  
Alzheimer's disease mutations and a "humanized" Abeta sequence. *The Journal  
of biological chemistry* **271**, 23380-23388 (1996).
- 19 Hori, Y. *et al.* The Tottori (D7N) and English (H6R) familial Alzheimer disease  
mutations accelerate Abeta fibril formation without increasing protofibril  
formation. *The Journal of biological chemistry* **282**, 4916-4923,  
doi:10.1074/jbc.M608220200 (2007).
- 20 Ono, K., Condrón, M. M. & Teplow, D. B. Effects of the English (H6R) and  
Tottori (D7N) familial Alzheimer disease mutations on amyloid beta-protein  
assembly and toxicity. *The Journal of biological chemistry* **285**, 23186-23197,  
doi:10.1074/jbc.M109.086496 (2010).
- 21 Wakutani, Y. *et al.* Novel amyloid precursor protein gene missense mutation  
(D678N) in probable familial Alzheimer's disease. *Journal of neurology,  
neurosurgery, and psychiatry* **75**, 1039-1042 (2004).
- 22 Chen, W. T. *et al.* Amyloid-beta (Abeta) D7H mutation increases oligomeric  
Abeta42 and alters properties of Abeta-zinc/copper assemblies. *PloS one* **7**,  
e35807, doi:10.1371/journal.pone.0035807 (2012).
- 23 De Jonghe, C. *et al.* Flemish and Dutch mutations in amyloid beta precursor  
protein have different effects on amyloid beta secretion. *Neurobiology of disease*  
**5**, 281-286, doi:10.1006/nbdi.1998.0202 (1998).
- 24 Levy, E., Prelli, F. & Frangione, B. Studies on the first described Alzheimer's  
disease amyloid beta mutant, the Dutch variant. *Journal of Alzheimer's disease :  
JAD* **9**, 329-339 (2006).
- 25 Tsubuki, S., Takaki, Y. & Saido, T. C. Dutch, Flemish, Italian, and Arctic  
mutations of APP and resistance of Abeta to physiologically relevant proteolytic  
degradation. *Lancet* **361**, 1957-1958 (2003).
- 26 Lord, A. *et al.* The Arctic Alzheimer mutation facilitates early intraneuronal  
Abeta aggregation and senile plaque formation in transgenic mice. *Neurobiology  
of aging* **27**, 67-77, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.12.007 (2006).
- 27 Van Nostrand, W. E., Melchor, J. P., Cho, H. S., Greenberg, S. M. & Rebeck, G.  
W. Pathogenic effects of D23N Iowa mutant amyloid beta -protein. *The Journal  
of biological chemistry* **276**, 32860-32866, doi:10.1074/jbc.M104135200 (2001).
- 28 Ancolio, K. *et al.* Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor  
protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation  
responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proceedings of the  
National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 4119-4124  
(1999).
- 29 Cruts, M. *et al.* Novel APP mutation V715A associated with presenile  
Alzheimer's disease in a German family. *Journal of neurology* **250**, 1374-1375,  
doi:10.1007/s00415-003-0182-5 (2003).
- 30 Eckman, C. B. *et al.* A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V)  
increases the relative proportion of A beta 42(43). *Human molecular genetics* **6**,  
2087-2089 (1997).
- 31 Hardy, J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends in  
neurosciences* **20**, 154-159 (1997).

- 32 Roher, A. E. *et al.* The human amyloid-beta precursor protein770 mutation V717F generates peptides longer than amyloid-beta-(40-42) and flocculent amyloid aggregates. *The Journal of biological chemistry* **279**, 5829-5836, doi:10.1074/jbc.M311380200 (2004).
- 33 Kwok, J. B. *et al.* Novel Leu723Pro amyloid precursor protein mutation increases amyloid beta42(43) peptide levels and induces apoptosis. *Annals of neurology* **47**, 249-253 (2000).
- 34 Janssen, J. C. *et al.* Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families. *Neurology* **60**, 235-239 (2003).
- 35 Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L. & Markesbery, W. R. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of the neurological sciences* **158**, 47-52 (1998).
- 36 Bush, A. I., Masters, C. L. & Tanzi, R. E. Copper, beta-amyloid, and Alzheimer's disease: tapping a sensitive connection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 11193-11194, doi:10.1073/pnas.2135061100 (2003).
- 37 Kowalik-Jankowska, T., Ruta-Dolejsz, M., Wisniewska, K., Lankiewicz, L. & Kozlowski, H. Possible involvement of copper(II) in Alzheimer disease. *Environmental health perspectives* **110 Suppl 5**, 869-870 (2002).
- 38 Mantyh, P. W. *et al.* Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. *Journal of neurochemistry* **61**, 1171-1174 (1993).
- 39 Esler, W. P. *et al.* Zinc-induced aggregation of human and rat beta-amyloid peptides in vitro. *Journal of neurochemistry* **66**, 723-732 (1996).
- 40 Schrag, M., Mueller, C., Oyoyo, U., Smith, M. A. & Kirsch, W. M. Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: a quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Progress in neurobiology* **94**, 296-306, doi:10.1016/j.pneurobio.2011.05.001 (2011).
- 41 Maynard, C. J., Bush, A. I., Masters, C. L., Cappai, R. & Li, Q. X. Metals and amyloid-beta in Alzheimer's disease. *International journal of experimental pathology* **86**, 147-159, doi:10.1111/j.0959-9673.2005.00434.x (2005).
- 42 Azimi, S. & Rauk, A. On the involvement of copper binding to the N-terminus of the amyloid Beta Peptide of Alzheimer's disease: a computational study on model systems. *International journal of Alzheimer's disease* **2011**, 539762, doi:10.4061/2011/539762 (2011).
- 43 Karr, J. W., Akintoye, H., Kaupp, L. J. & Szalai, V. A. N-Terminal deletions modify the Cu<sup>2+</sup> binding site in amyloid-beta. *Biochemistry* **44**, 5478-5487, doi:10.1021/bi047611e (2005).
- 44 Minicozzi, V. *et al.* Identifying the minimal copper- and zinc-binding site sequence in amyloid-beta peptides. *The Journal of biological chemistry* **283**, 10784-10792, doi:10.1074/jbc.M707109200 (2008).
- 45 Budimir, A. Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. *Acta Pharm* **61**, 1-14, doi:10.2478/v10007-011-0006-6 (2011).
- 46 Stellato, F. *et al.* Metal binding in amyloid beta-peptides shows intra- and inter-peptide coordination modes. *European biophysics journal : EBJ* **35**, 340-351, doi:10.1007/s00249-005-0041-7 (2006).
- 47 Dong, J. *et al.* Engineering metal ion coordination to regulate amyloid fibril assembly and toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 13313-13318, doi:10.1073/pnas.0702669104 (2007).

- 48 Karr, J. W. & Szalai, V. A. Cu(II) binding to monomeric, oligomeric, and fibrillar forms of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide. *Biochemistry* **47**, 5006-5016, doi:10.1021/bi702423h (2008).
- 49 Drew, S. C., Noble, C. J., Masters, C. L., Hanson, G. R. & Barnham, K. J. Pleomorphic copper coordination by Alzheimer's disease amyloid-beta peptide. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 1195-1207, doi:10.1021/ja808073b (2009).
- 50 Chen, Y. R. *et al.* The effect of Aβ conformation on the metal affinity and aggregation mechanism studied by circular dichroism spectroscopy. *Journal of biochemistry* **139**, 733-740, doi:10.1093/jb/mvj083 (2006).
- 51 Tougu, V., Tiiman, A. & Palumaa, P. Interactions of Zn(II) and Cu(II) ions with Alzheimer's amyloid-beta peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity. *Metallomics : integrated biometal science* **3**, 250-261, doi:10.1039/c0mt00073f (2011).
- 52 Shin, B. K. & Saxena, S. Substantial contribution of the two imidazole rings of the His13-His14 dyad to Cu(II) binding in amyloid-beta(1-16) at physiological pH and its significance. *The journal of physical chemistry. A* **115**, 9590-9602, doi:10.1021/jp200379m (2011).
- 53 Alies, B. *et al.* pH-Dependent Cu(II) coordination to amyloid-beta peptide: impact of sequence alterations, including the H6R and D7N familial mutations. *Inorganic chemistry* **50**, 11192-11201, doi:10.1021/ic201739n (2011).
- 54 Furlan, S. & La Penna, G. Modeling of the Zn<sup>2+</sup> binding in the 1-16 region of the amyloid beta peptide involved in Alzheimer's disease. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **11**, 6468-6481, doi:10.1039/b822771c (2009).
- 55 Kowalik-Jankowska, T., Ruta, M., Wisniewska, K. & Lankiewicz, L. Coordination abilities of the 1-16 and 1-28 fragments of beta-amyloid peptide towards copper(II) ions: a combined potentiometric and spectroscopic study. *Journal of inorganic biochemistry* **95**, 270-282 (2003).
- 56 Garzon-Rodriguez, W., Yatsimirsky, A. K. & Glabe, C. G. Binding of Zn(II), Cu(II), and Fe(II) ions to Alzheimer's A beta peptide studied by fluorescence. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **9**, 2243-2248 (1999).
- 57 Ma, Q. F. *et al.* Characterization of copper binding to the peptide amyloid-beta(1-16) associated with Alzheimer's disease. *Biopolymers* **83**, 20-31, doi:10.1002/bip.20523 (2006).
- 58 Guilloureau, L. *et al.* Structural and thermodynamical properties of CuII amyloid-beta16/28 complexes associated with Alzheimer's disease. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **11**, 1024-1038, doi:10.1007/s00775-006-0154-1 (2006).
- 59 Raman, B. *et al.* Metal ion-dependent effects of clioquinol on the fibril growth of an amyloid {beta} peptide. *The Journal of biological chemistry* **280**, 16157-16162, doi:10.1074/jbc.M500309200 (2005).
- 60 Danielsson, J., Pierattelli, R., Banci, L. & Graslund, A. High-resolution NMR studies of the zinc-binding site of the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *The FEBS journal* **274**, 46-59, doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05563.x (2007).
- 61 Tougu, V., Karafin, A. & Palumaa, P. Binding of zinc(II) and copper(II) to the full-length Alzheimer's amyloid-beta peptide. *Journal of neurochemistry* **104**, 1249-1259, doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05061.x (2008).
- 62 Hatcher, L. Q., Hong, L., Bush, W. D., Carducci, T. & Simon, J. D. Quantification of the binding constant of copper(II) to the amyloid-beta peptide.

- The journal of physical chemistry. B* **112**, 8160-8164, doi:10.1021/jp710806s (2008).
- 63 Hou, L. & Zagorski, M. G. NMR reveals anomalous copper(II) binding to the amyloid Abeta peptide of Alzheimer's disease. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 9260-9261, doi:10.1021/ja046032u (2006).
- 64 Talmard, C., Bouzan, A. & Faller, P. Zinc binding to amyloid-beta: isothermal titration calorimetry and Zn competition experiments with Zn sensors. *Biochemistry* **46**, 13658-13666, doi:10.1021/bi701355j (2007).
- 65 Curtain, C. C. *et al.* Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *The Journal of biological chemistry* **276**, 20466-20473, doi:10.1074/jbc.M100175200 (2001).
- 66 Intrinsic fluorescence.
- 67 Semisotnov, G. V. *et al.* Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers* **31**, 119-128, doi:10.1002/bip.360310111 (1991).
- 68 Cordeiro, Y., Lima, L. M., Gomes, M. P., Foguel, D. & Silva, J. L. Modulation of prion protein oligomerization, aggregation, and beta-sheet conversion by 4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-sulfonate (bis-ANS). *The Journal of biological chemistry* **279**, 5346-5352, doi:10.1074/jbc.M312262200 (2004).
- 69 Circular dichroism.
- 70 Kay, L. E., Keifer, P. & Saarinen, T. Pure Absorption Gradient Enhanced Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy with Improved Sensitivity. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 10663-10665 (1992).
- 71 Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- 72 Schagger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* **1**, 16-22, doi:10.1038/nprot.2006.4 (2006).
- 73 SDS-PAGE.
- 74 Burnette, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* **112**, 195-203 (1981).
- 75 Western.
- 76 Pelley, J. W., Garner, C. W. & Little, G. H. A simple rapid biuret method for the estimation of protein in samples containing thiols. *Analytical biochemistry* **86**, 341-343 (1978).
- 77 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**, 265-275 (1951).
- 78 Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* **150**, 76-85 (1985).
- 79 Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254 (1976).
- 80 Tal, M., Silberstein, A. & Nusser, E. Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *The Journal of biological chemistry* **260**, 9976-9980 (1985).

- 81 Vollers, S. S., Teplow, D. B. & Bitan, G. Determination of Peptide oligomerization state using rapid photochemical crosslinking. *Methods Mol Biol* **299**, 11-18 (2005).
- 82 ITC data analysis.
- 83 Finder, V. H., Vodopivec, I., Nitsch, R. M. & Glockshuber, R. The recombinant amyloid-beta peptide Abeta1-42 aggregates faster and is more neurotoxic than synthetic Abeta1-42. *Journal of molecular biology* **396**, 9-18, doi:10.1016/j.jmb.2009.12.016 (2010).
- 84 Chen, W. T., Liao, Y. H., Yu, H. M., Cheng, I. H. & Chen, Y. R. Distinct effects of Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, and Al<sup>3+</sup> on amyloid-beta stability, oligomerization, and aggregation: amyloid-beta destabilization promotes annular protofibril formation. *The Journal of biological chemistry* **286**, 9646-9656, doi:10.1074/jbc.M110.177246 (2011).

