

國立臺灣大學生命科學院微生物與生化學研究所

碩士論文

Institute of Microbiology and Biochemistry

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

甘藷塊根 L 型澱粉磷解酶不需醣引子

合成醣前體之活性催化機制

The Catalytic Mechanism of Primer-independent  
Glucan Precursor-Synthesizing Activity of L-Form Starch  
Phosphorylase from Sweet Potato Roots

林之儀

Chih-yi Lin

指導教授：莊榮輝 博士

Advisor: Rong-Huay Juang, Ph.D.

中華民國九十八年六月

June, 2009



# 目錄

目錄 .....	I
中文摘要 .....	III
Abstract .....	IV
第一章 緒論 .....	1
1.1 $\alpha$ 型葡聚糖磷解酶 .....	1
1.1.1 澱粉磷解酶 .....	1
1.1.2 植物澱粉磷解酶與動物肝糖磷解酶之比較 .....	2
1.1.3 植物 L 型澱粉磷解酶及 H 型澱粉磷解酶之比較 .....	2
1.2 澱粉代謝 .....	7
1.2.1 澱粉 .....	7
1.2.2 澱粉之代謝途徑 .....	7
1.3 L 型澱粉磷解酶之生理角色 .....	11
1.3.1 磷解澱粉 .....	11
1.3.2 合成澱粉 .....	11
1.3.3 不需糖引子合成直鏈糖之活性 .....	12
1.3.4 H 型澱粉磷解酶之生理角色 .....	14
1.4 實驗室目前相關研究進度 .....	16
1.5 研究動機 .....	17
第二章 材料與方法 .....	21
2.1 基本分析法 .....	21
2.1.1 Bradford 定量法 .....	21
2.1.2 酵素活性分析 (不含糖引子) .....	22
2.1.3 酵素活性分析 (添加糖引子) .....	23
2.2 澱粉磷解酶純化法 .....	25
2.2.1 粗抽取及硫酸銨分劃 .....	25
2.2.2 離子交換法 .....	27
2.2.3 疏水性層析法 .....	28
2.2.4 膠體過濾法 .....	29
2.3 電泳檢定法 .....	31
2.3.1 原態膠體電泳 .....	31

2.3.2 SDS 膠體電泳 .....	34
2.3.3 膠片染色法 .....	36
2.3.3.1 Coomassie Brilliant Blue R (CBR) 染色法 .....	36
2.3.3.2 澱粉磷解酶活性染色法 .....	36
2.3.4 膠片乾燥及護貝 .....	38
2.4 醣類分析法 .....	40
2.4.1 高效能液相層析法 .....	40
2.4.2 高效能陰離子交換層析法 .....	41
第三章 結果與討論 .....	43
3.1 酵素之製備 .....	43
3.1.1 甘藷塊根 L 型澱粉磷解酶製備 .....	43
3.1.2 甘藷塊根 H 型澱粉磷解酶製備 .....	44
3.2 L-SP 合成直鏈醣之模式 .....	50
3.2.1 L-SP 不需醣引子合成醣前體活性 .....	50
3.2.2 以 HPLC 測定 L-SP 利用不同短鏈醣合成直鏈醣之情形 .....	50
3.2.3 以 HPAEC-PAD 分析三相反應之產物 .....	55
3.2.4 Glc-1-P 的異構物對 L-SP 不需醣引子合成直鏈醣活性之影響 ....	60
3.3 L-SP 與 H-SP 生化特性之異同 .....	63
3.3.1 H-SP 不需醣引子合成直鏈醣活性 .....	63
第四章 結論 .....	66
參考文獻 .....	68
問答錄 .....	72

# 中文摘要

L 型澱粉磷解酶 (L-SP) 為存在於高等植物造粉體之澱粉代謝酵素，同時具有磷解澱粉以及合成澱粉雙方向之活性。在 *in vitro* 可以利用基質 Glc-1-P 於不含醣引子 (primer-independent, PI) 或者是含醣引子 (primer-dependent) 之情況下進行直鏈醣合成。使用 HPAEC (high performance anion exchange chromatograph) 分析發現，L-SP 的 PI 反應之速率決定步驟為將兩個單醣合成雙醣，而當 Glc-1-P 合成雙醣或寡醣後，反應即進入快速延長時期，此時磷酸釋放以及直鏈醣生成速率皆大幅上升。此外，本論文發現在 L-SP 上與 Glc-1-P 結合的兩個區域，其中之一對於基質辨認之專一性較高，僅能與 Glc-1-P 結合 (在活性區上)；另一個結合區可能在 L-SP 之特殊插入序列 L78 上，可接受不同的基質，故可與 Glc-1-P 以外之六碳醣磷酸結合。利用 L-SP 之同功酶 H-SP 進行不含醣引子之合成反應，發現其不具 PI 之活性。由上述結果推論，L-SP 之催化機制應該是由 PLP (pyridoxal phosphate) 結合區上之 Glc-1-P 先裂解生成碳陽離子後，再去攻擊與 L78 結合之第二個 Glc-1-P 的非還原端，形成  $\alpha$ -1,4 鍵結；然後繼續由 PLP 結合下一個 Glc-1-P 與 L78 上的直鏈醣鍵結，進行醣鏈之延長。

關鍵詞：澱粉磷解酶、澱粉代謝、不含醣引子合成、Glc-1-P、HPAEC-PAD、PLP

# Abstract

L-Form starch phosphorylase (L-SP) is a plastidial  $\alpha$ -glucan phosphorylase in higher plants which catalyzes reversible reactions of starch synthesis and degradation. *In vitro*, the enzyme might synthesize linear glucan in the absence of a primer (primer-independent activity, PI activity). By analyzing glucan products with HPAEC (high performance anion exchange chromatograph), we found that the rate-determining step in the PI activity was the formation of disaccharide from two molecules of Glc-1-P. The reaction went into rapid elongation phase after disaccharides or oligosaccharides were produced. At this stage, the rate of the phosphate releasing and linear glucan synthesizing increased exponentially. In each cycle of catalytic reaction, one Glc-1-P bound to the active site on L-SP with high affinity which was then reacted with the other molecule of Glc-1-P on L78, the insertion region on L-SP. The basic amino acids on L78 could bind with Glc-1-P or short glucan to serve as the second substrate binding site. It was postulated that the catalytic mechanism for L-SP might follow these steps: The Glc-1-P anchored to PLP (pyridoxal phosphate) in binding site and was cleaved into carbocation, then attacked the nonreducing end of the second Glc-1-P or glucan on L78, forming  $\alpha$ -1,4 linkage, and one Glc moiety was added. The PLP then bound next Glc-1-P to initiate the second cycle. Interestingly, H-SP, an isozyme of SP having no L78 insertion, showed no PI activity.

Key words: starch phosphorylase, starch synthesis, primer-independent, PI, Glc-1-P, HPAEC-PAD, PLP

# 第一章 緒論

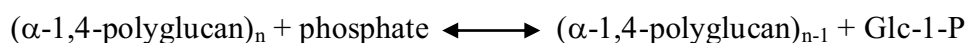
澱粉磷解酶發現的五十年以降，科學家將其歸類為磷解澱粉的酵素之一，但近期有越來越多的證據顯示：澱粉磷解酶可能在澱粉的合成上扮演重要的角色。本章將介紹存在於植物中的澱粉磷解酶，目前已知的生理角色及調控機制，並簡介本實驗室至今的研究成果，及本篇論文的研究動機。

## 1.1 $\alpha$ 型葡聚糖磷解酶

$\alpha$  型葡聚糖磷解酶 ( $\alpha$ -glucan phosphorylase) 能夠催化葡聚糖上  $\alpha$ -1,4 糖苷鍵 ( $\alpha$ -1,4 glycoside linkage) 之雙向磷解及合成反應，並以許多不同的形式存在於動物、植物及微生物中 (Mori et al., 1993)。存在於動物中的  $\alpha$  型葡聚糖磷解酶稱為肝糖磷解酶 (glycogen phosphorylase)，植物中稱為澱粉磷解酶 (starch phosphorylase, SP)，而微生物中的  $\alpha$  型葡聚糖磷解酶則稱為麥芽糊精磷解酶 (maltodextrin phosphorylase)。

### 1.1.1 澱粉磷解酶

澱粉磷解酶 (EC 2.4.1.1; starch phosphorylase, SP,  $\alpha$ -glucan phosphorylase;  $\alpha$ -1,4 glucan : *o*-phosphate  $\alpha$ -D-glucosyltransferase) 最早從馬鈴薯塊莖及豌豆的粗抽液中發現 (Hanes, 1940, 1940)，進行可逆磷解反應的催化，反應式如下：



SP 廣泛的發現於高等植物體內，原態分子以同質二元體 (homodimer) 或是四元體 (homotetramer) 的形式存在 (Preiss et al., 1980; da Mota RV, 2002)。在馬鈴薯葉內的研究中，發現 SP 亦存在異質二元體 (heterodimer) (Albrecht et al., 1998)。

高等植物 SP 的同功酶有兩種，由其對於葡聚糖親和性之差異，可分為 L

型及 H 型 (Fukui, 1983; Fukui T, 1987)。在馬鈴薯塊莖中，L 型同功酶之含量遠超過 H 型同功酶的含量 (Gerbrandy et al., 1975)。但在菠菜葉中則差異不大 (Okita et al., 1979; Steup and Latzko, 1979)。

### 1.1.2 植物澱粉磷解酶與動物肝醣磷解酶之比較

存在動物中的肝醣磷解酶 (glycogen phosphorylase, GP) 是從蛙肌中發現此酵素 (Cori and Cori, 1936)。可由不活化態的 phosphorylase b 轉變成活化態的 phosphorylase a，將肝醣 (glycogen) 磷解釋放出一個 Glc-1-P，接著進行醣解反應。而 phosphorylase b 能受到異位調控，被 AMP 活化，以及被 ATP 和 Glc-6-P 抑制。此外，在神經反應或者是賀爾蒙的刺激下，會經由肝醣磷解酶激酶 (glycogen phosphorylase kinase) 在其 N 端序列 (KRKQISVR) 的 Ser14 上進行磷酸化，而改變構形成為活化態的 phosphorylase a。而其去磷酸化反應，則由肝醣磷解酶磷酸酶 (glycogen phosphorylase phosphatase) 將 phosphorylase a 轉變成 phosphorylase b (Johnson, 1992)。

GP 及 SP 此兩種磷解酶，在胺基酸組成、分子量及各種保守性序列皆十分相似。但 SP 始終以活化態存在於植物體內，並沒有異位調控機制 (Gold et al., 1971; Nelson and Pan, 1995)。將 L-SP 的序列與兔肌 GP 的序列比對 (圖 1.1)，並以 GP 結構模擬 L-SP 之蛋白質構形 (圖 1.2)，發現相較於 GP，L-SP 在蛋白質中央多出一段大約 78 個胺基酸的序列，並且突出於澱粉結合區外部，形成一個 loop，因此稱做 L78 (圖 1.3 (a), (b))。雖然 L-SP 的 N 端位置不具有被磷酸化的保守序列，在其獨特的 L78 上的 Ser 527 卻會受到磷酸化修飾 (楊光華, 2005)，如圖 1.3 (c)，但此磷酸化修飾並不會影響 L-SP 之活性 (曾光靖, 2005)，其所造成生化性質的影響仍是未知。

### 1.1.3 植物 L 型澱粉磷解酶及 H 型澱粉磷解酶之比較

L 型澱粉磷解酶 (L-form starch phosphorylase, L-SP) 及 H 型澱粉磷解酶 (H-form starch phosphorylase, H-SP) 為存在於植物中的兩種同功酶。L-SP 的次單元體分子量大約為 110 kDa，H-SP 則大約為 90 kDa。L-SP 較 H-SP 多出一



段約 78 個胺基酸的序列，如圖 1.1 及圖 1.3 (d)，除了此 78 個胺基酸序列外，L-SP 與 H-SP 序列的相似度達到 63% (Mori et al., 1991)。且 L-SP 為胞質體型磷解酶 (plastidial phosphorylase)，存在於菠菜葉綠體、馬鈴薯塊莖及玉米中；H-SP 則為細胞質型磷解酶 (cytosolic phosphorylase)，存在於菠菜非葉綠體組織、馬鈴薯塊莖及豆類中 (Fukui, 1983)。

在基質專一性方面，L-SP 對於寡糖有很高的親和力，也能夠利用直鏈澱粉及支鏈澱粉，但對於肝醣的親和力較低。而 H-SP 則對於分支多醣有很高的親和力，如肝醣或是支鏈澱粉，相較於 L-SP 而言，其對於麥芽糊精 (maltodextrin) 的親和性則很低 (Steup, 1988; Joerg, 2004)。

前人研究發現，在水稻胚乳中，Pho1 (L-SP) 的轉錄程度 (transcript level) 是 Pho2 (H-SP) 的六倍以上，但在水稻葉片中，Pho2 的表現量則為 Pho1 的十倍，若比較組織中 *OsPHO* 基因轉錄 mRNA 含量，可以發現 *OsPHOH* 在葉片中的 mRNA 含量遠大於在胚乳中，而 *OsPHOL* 則是較傾向於胚乳中轉錄 (Ohdan et al., 2005)。



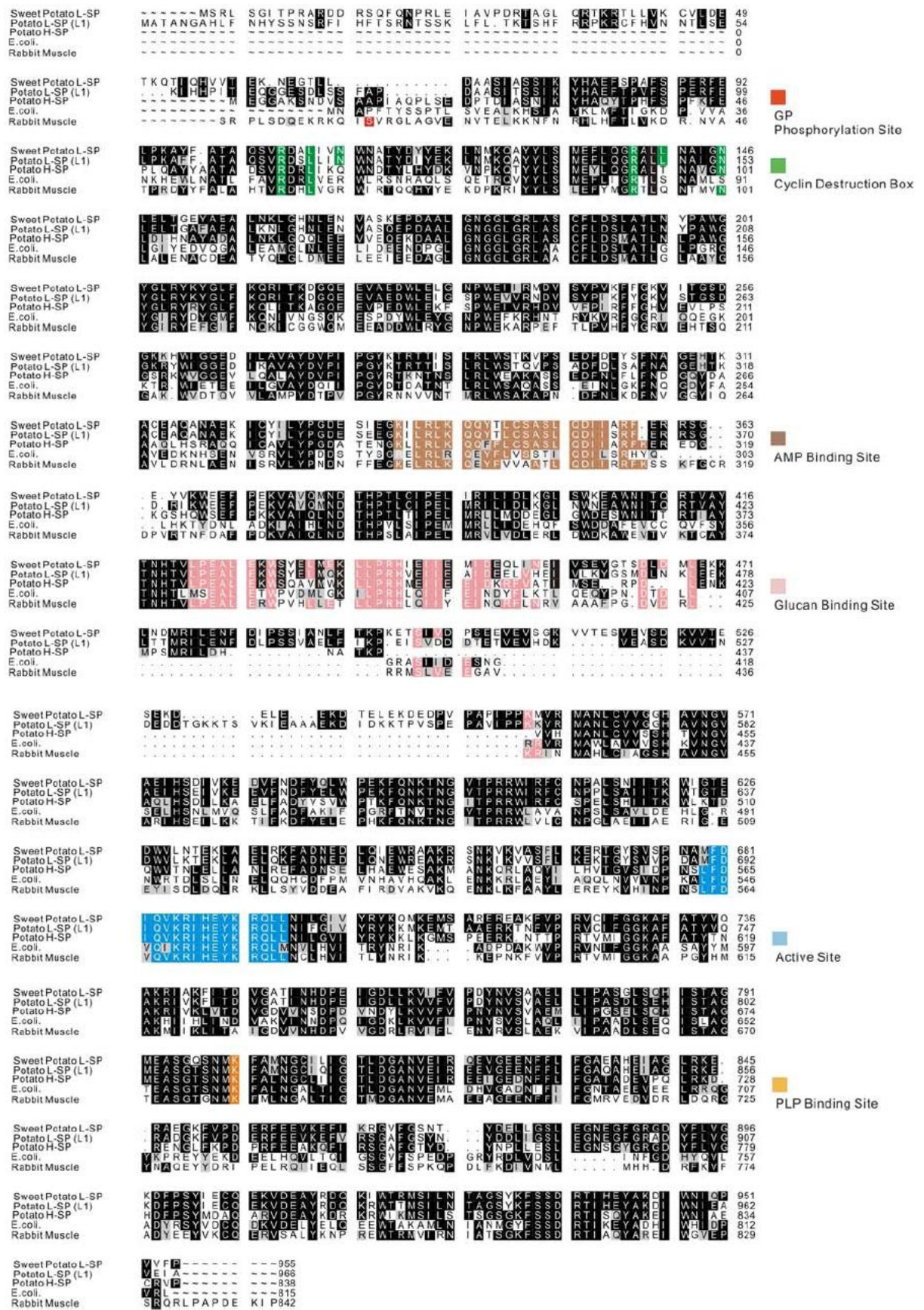


圖 1.1 幾種磷解酶胺基酸序列的比較 (楊光華, 2005)

Fig. 1.1 Multiple alignment of phosphorylase from different sources

(a) Glycogen phosphorylase from rabbit muscle

(b) Starch phosphorylase from sweet potato root

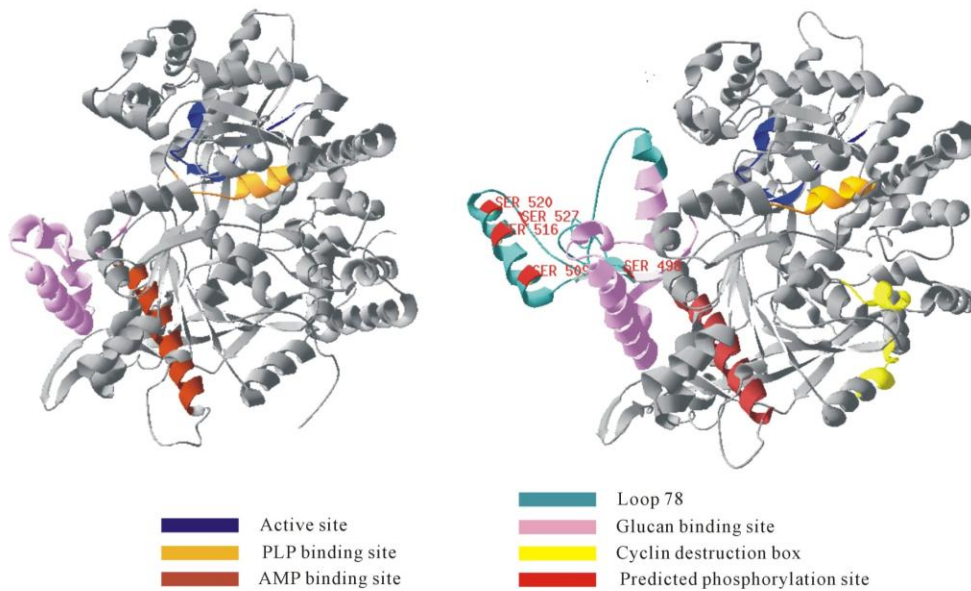


圖 1.2 套用兔肌 GP 模擬甘藷塊根 L-SP 的構形

Fig. 1.2 Structural comparisons between glycogen phosphorylase from rabbit muscle and L-form starch phosphorylase from sweet potato root

(a) 兔肌 GP 結構；(b) 甘藷塊根 L-SP 的預測模型 (楊光華, 2005)

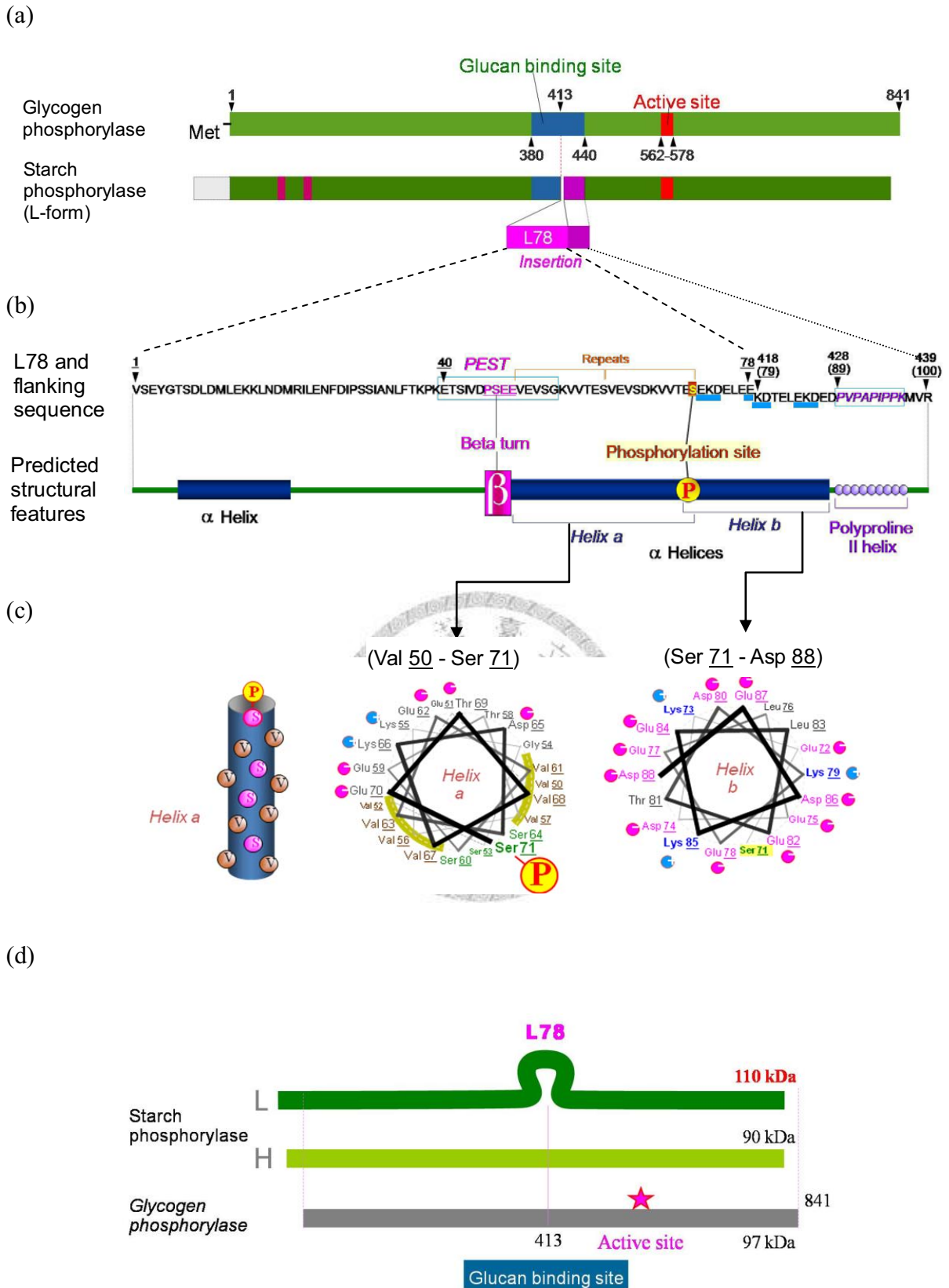


圖 1.3 L-SP 分子序列之特異性

Fig. 1.3 The structural features of L-SP sequences

(a) 肝醣磷解酶與 L-SP 胺基酸序列比較；(b) L78 及其鄰近序列的特殊構造；(c) L78 上螺旋狀序列之二級結構圖 (陳翰民, 1997)；(d) L-SP, H-SP 及 GP 序列比較



## 1.2 澱粉代謝

### 1.2.1 澱粉

澱粉是高等植物主要儲藏能量之形式，典型的澱粉粒中包含兩種葡聚糖：直鏈澱粉 (amylose) 及支鏈澱粉 (amylopectin)，直鏈澱粉只有  $\alpha$ -1,4 鍵結，支鏈澱粉則具有  $\alpha$ -1,4 及  $\alpha$ -1,6 鍵結。直鏈澱粉在澱粉中的含量大約為 30%，而支鏈澱粉則是 70%，為澱粉粒的主要組成。支鏈澱粉會形成串狀結構 (clusters)，其中兩條分支互相纏繞形成一條雙股螺旋結構，雙股螺旋處形成排列整齊的結晶層，再由結晶層及非結晶層形成澱粉粒中的半結晶區域 (semi-crystalline zone) (Smith et al., 1997)，如圖 1.6 (a)。

### 1.2.2 澱粉之代謝途徑

澱粉之生合成及降解的路徑是十分複雜且精密的，並且由最合適的酵素來執行。澱粉合成絕大多數皆在質體內 (plastid)，在葉綠體 (chloroplast) 中，其在白天所產生的暫存性澱粉 (transitory starch)，會在夜晚時候被分解。然而造粉體 (amyloplast) 內則是長期儲存著大量的儲存性碳水化合物，稱為儲藏性澱粉 (reserve starch) (Smith, 1999; Ball and Morell, 2003; Smith et al., 2003; Tetlow et al., 2004; Stensballe et al., 2008)。

目前所知參與澱粉合成之主要酵素有 ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase), starch synthase (SS), starch-branching enzyme (SBE) 及 debranching enzyme (DBE)，其中 AGPase 在澱粉之生合成上位於主要的調節步驟 (Nelson and Pan, 1995; Smith et al., 1997)，如圖 1.5 (a)。

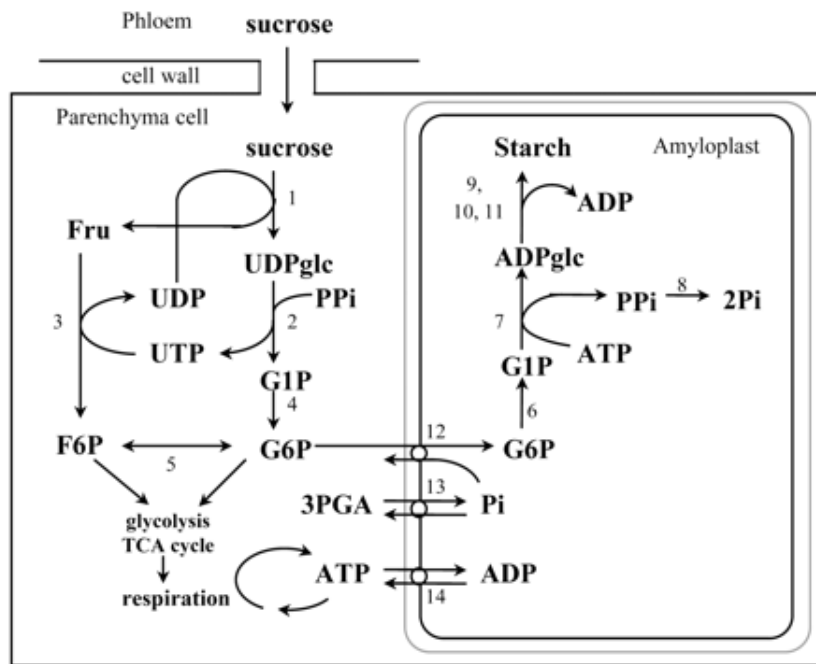
而參與澱粉分解的酵素有  $\alpha$ -amylase (AA),  $\beta$ -amylase (BA), starch phosphorylase (Tetlow et al., 2004), disproportionating enzyme (DPE, D enzyme), debranching enzyme (DBE),  $\alpha$ -glucan water dikinase (GWD), phosphoglucan water dikinase (PWD) 及 maltose transporter (MEX) 等八種酵素。澱粉之合成以 SS 的路徑進行，而分解則有由 BA 進行水解及由 SP 磷解兩種方式 (Smith et al.,

2005)，如圖 1.5 (b)。

支鏈澱粉的合成在過去已經有很詳盡的研究，Ball 等提出了 preamylopectin trimming model (Ball et al., 1996)，直接指出 DBE 也有參與澱粉之合成。他們發現在突變的米與玉米胚乳 (*su1*) 中缺乏 DBE 的活性，其不會形成支鏈澱粉，而是會形成植物肝糖 (phytglycogen)，並且在萊氏衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) (Mouille et al., 1996) 及阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中發現了缺乏 DBE 以及植物肝糖累積的突變種 (Zeeman et al., 1998)。而他們認為在澱粉顆粒表面，由 SS 及 SBE 所合成高度分支的澱粉結構，會交由 DBE 進行修整 (trim) 後產生短鏈基質，供給 SS 繼續進行醣鏈之延長 (Smith, 1999)，如圖 1.6 (b)。而近期發現，負責澱粉分解的酵素 DPE (Colleoni et al., 1999; Ball and Morell, 2003) 以及 SP (Schupp and Ziegler, 2004; Dauvillee et al., 2006) 亦有可能參與澱粉之合成反應。



(a)



(b)

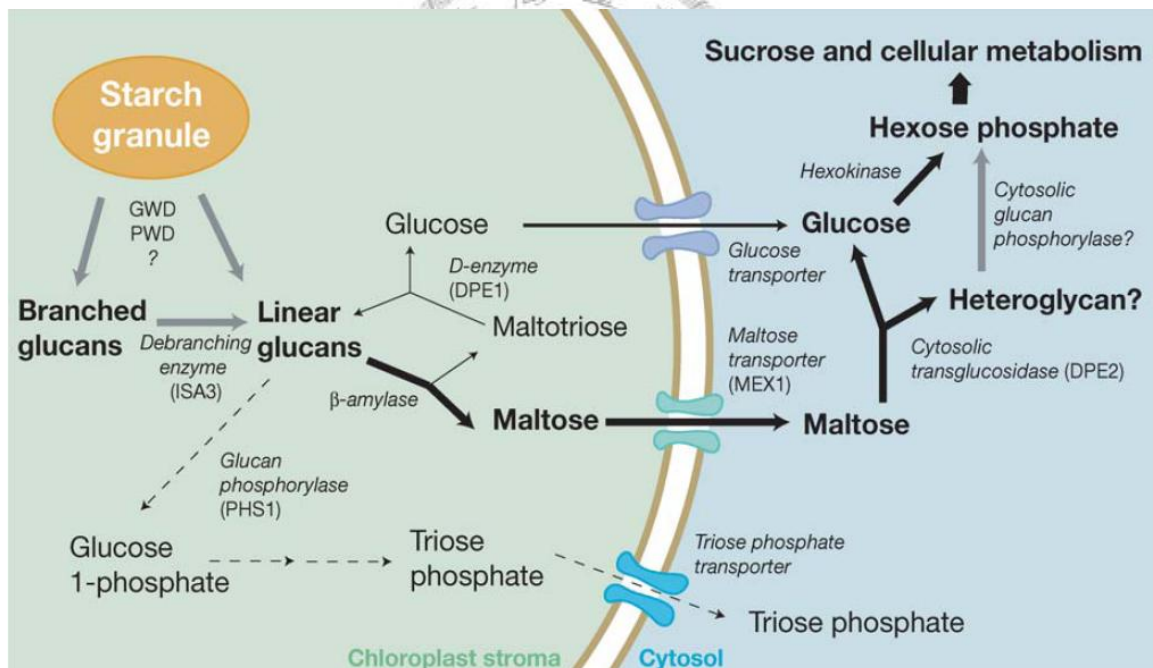
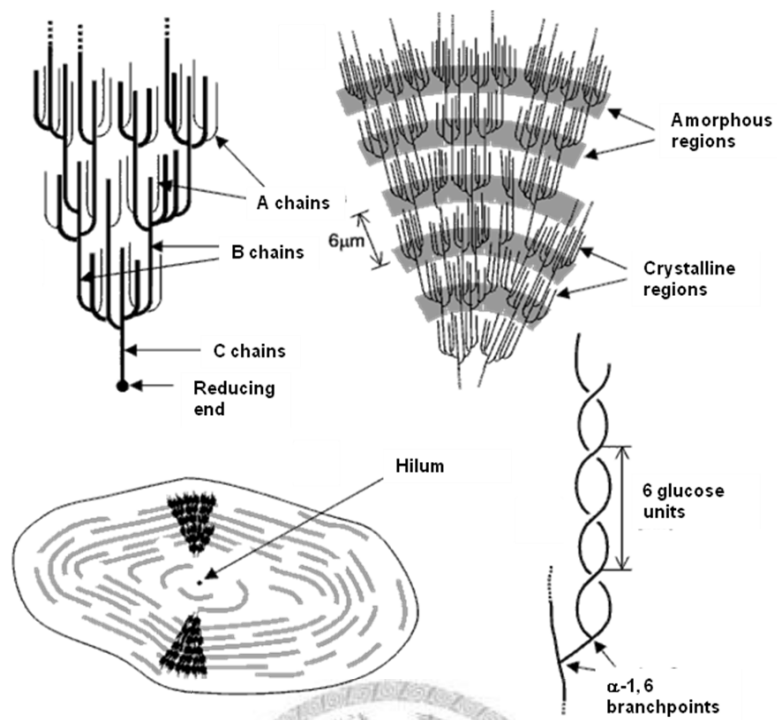


圖 1.4 澱粉之合成及降解途徑

Fig. 1.4 The metabolic pathway of Starch

(a) 從蔗糖至澱粉之合成路徑及胞器位置 (1, Sucrose synthase; 2, UDP-Glc pyrophosphorylase; 3, fructokinase; 4, cytosolic phosphoglucomutase; 5, phosphoglucoisomerase; 6, plastidic phosphoglucomutase; 7, ADP-Glc pyrophosphorylase; 8, alkaline pyrophosphatase; 9, granule-bound starch synthase; 10, soluble starch synthase; 11, branching enzyme; 12, hexose phosphate translocator; 13, triose phosphate translocator; 14, adenylate translocator. TCA, tricarboxylic acid) (Axel, 2002) ; (b) 澱粉降解路徑 (Smith et al., 2005)

(a)



(b)

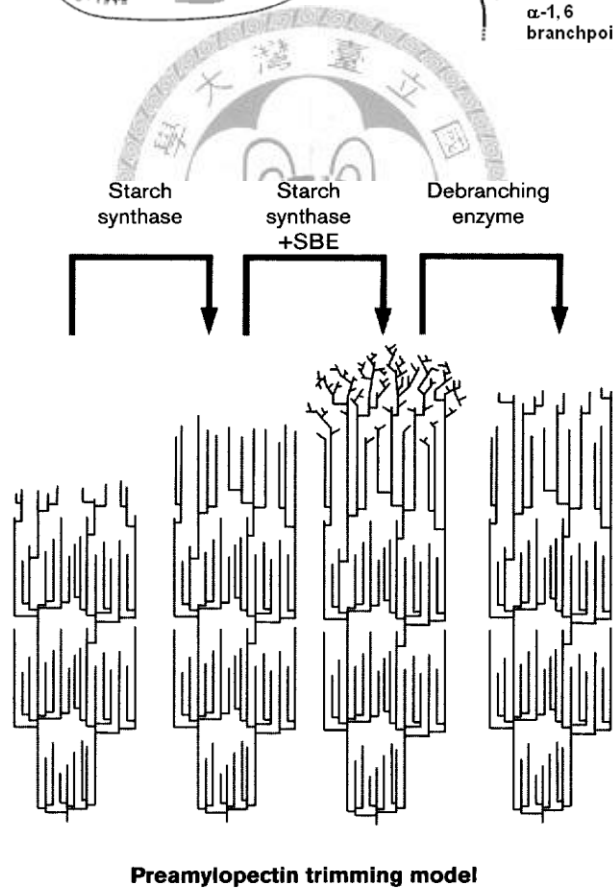


圖 1.5 澱粉之結構及合成模式

Fig. 1.5 The structure of starch granule and preamylopectin trimming model

(a) 澱粉粒構造 (Smith et al., 1997) ; (b) 支鏈澱粉之修整模式 (Smith, 1999)



### 1.3 L 型澱粉磷解酶之生理角色

在植物體中，L-SP 存在於進行澱粉合成的造粉體內，並且在水稻胚乳 (Hikaru, 2008) 及玉米胚乳 (Yu, 2001) 中，皆位於造粉體的基質，與已知負責澱粉生合成的酵素如澱粉合成酶 (starch synthase I, SSI) 相同。L-SP 同時具有合成以及磷解方向的活性，早期研究認為其主要與磷解澱粉有關，近期亦有發現其可能參與澱粉的合成，但 L-SP 真正的生理功能仍有待釐清。

#### 1.3.1 磷解澱粉

雖然 L-SP 在植物組織中可以執行合成及降解澱粉的功能，但在生化數據上則認為其在非光合作用組織中，較適合進行澱粉磷解的角色。在大多數細胞內，六碳醣磷酸 (hexosephosphate) 之生理濃度遠較 L-SP 的  $K_m$  值來得低 (Steup, 1988)，而在玉米胚乳、玉米種仁的造粉體 (Liu and Shannon, 1981)、菠菜葉綠體 (Wirtz et al., 1980) 以及刺槐木的皮層細胞 (Ewart et al., 1954) 中，磷酸與 Glc-1-P 的濃度比，皆遠大於 SP 的平衡常數。表示在這些器官中，SP 不易進行澱粉之合成，而較偏向於磷解方向的反應。

#### 1.3.2 合成澱粉

前人研究指出，L-SP 之酵素活性及蛋白質含量會隨著馬鈴薯塊根的澱粉生成而同步增加 (Kossmann et al., 1991)。而在萊氏衣藻中，包含兩種胞質體型澱粉磷解酶：PhoA 及 PhoB，此兩種胞質體型磷解酶形成同質二元體以行使功能，PhoA 包含兩個 91 kDa 的次單元，而 PhoB 包含兩個 110 kDa 的次單元。其中 PhoB 對於 ADP-glucose 的抑制非常敏感，且對於 malto-oligosaccharides 有較低的親和性；PhoA 則類似高等植物的胞質體型磷解酶，稍微受到 ADP-glucose 的抑制，並且對於未分支的 malto-oligosaccharides 親和性佳。而 PhoB 是由 *STA4* 基因編碼而成，在 *STA4* 基因上的突變造成儲存性澱粉的大量減少，並且累積了形狀不正常的澱粉粒，其中包含改變支鏈澱粉結構及直鏈澱粉含量變高。顯示 PhoB 參與了藻類中之澱粉合成 (Dauvillee et al., 2006)。

### 1.3.3 不需醣引子合成直鏈醣之活性

早期對於 L-SP 不需醣引子合成直鏈醣之活性的研究，是發現在玉米中的 L-SP 可以在不外加醣引子的環境中，利用 Glc-1-P 合成醣類 (Tsai and Nelson, 1968)。在水稻中，Pho1 大量存在於發育中的胚乳，但只會少量與澱粉結合。Pho1 (L-SP) 缺失的突變種，在成熟種子的大小及澱粉含量上都有很大的差異，會出現皺縮的現象，並且造成較小的澱粉粒累積，改變支鏈澱粉結構，以及嚴重減少了澱粉含量，而此種表型於低溫情況下特別嚴重。

缺少 Pho1 的突變種中，其他與澱粉生成有關的酵素 (DBE isozymes, BE isoforms, SS isoforms, AGPase) 活性亦不會受到影響，表示其可能不會與這些酵素形成複合體。其短鏈醣 (degree of polymerization, DP  $\leq$  11) 之比例較野生種 (wild type) 高，而介於 DP 為 13 至 21 之間的醣鏈比例則較野生種為低。若使用 MOS (malto-oligosaccharides) 做為引子進行醣鏈延長反應時，相較於 SSIIa，Pho1 具有能夠合成更長直鏈醣之能力，SSIIa 則在 DP  $\geq$  10 以上就幾乎沒有合成活性。因此在澱粉合成的初始步驟中，Pho1 極有可能合成直鏈葡聚醣來作為 BE 的基質，以形成支鏈葡聚醣。

此外，即使在很低的 Glc-1-P 生理濃度 (0.2 mM) 下，並且 Pi 之濃度超過 Glc-1-P 的五十倍，Pho1 仍保存將近 6% 之合成活性，表示在利於磷解的環境中，Pho1 仍會優先進行合成反應。而在種子發育早期，Pho1 之轉錄程度更較 AGPase 為高 (Ohdan et al., 2005)。在馬鈴薯塊莖中，Pho1 的基因表現在澱粉累積組織中亦為最大值 (Mori et al., 1991)。此現象顯示 Pho1 不僅參與了高等植物中，非光合作用的儲藏組織之澱粉合成反應，更有可能藉由合成並延長醣引子 (glucan primer) 的功能，參與了合成葡聚醣的初始步驟。

但是在低溫情況下 (20°C) 種子會出現皺縮現象的突變種，在 30°C 時，其在種子內的澱粉累積則恢復正常狀況，其推測此種受到溫度調節的情形，是因為一個未經證明的因子 X 所造成，而 X 因子能夠代替 Pho1 的功能，但其含量或者是活性會在低溫狀況下大量減少，而 Pho1 則不會受到溫度影響所致。Pho1 在澱粉合成中可能的位置如圖 1.6 所示 (Hikaru, 2008)。

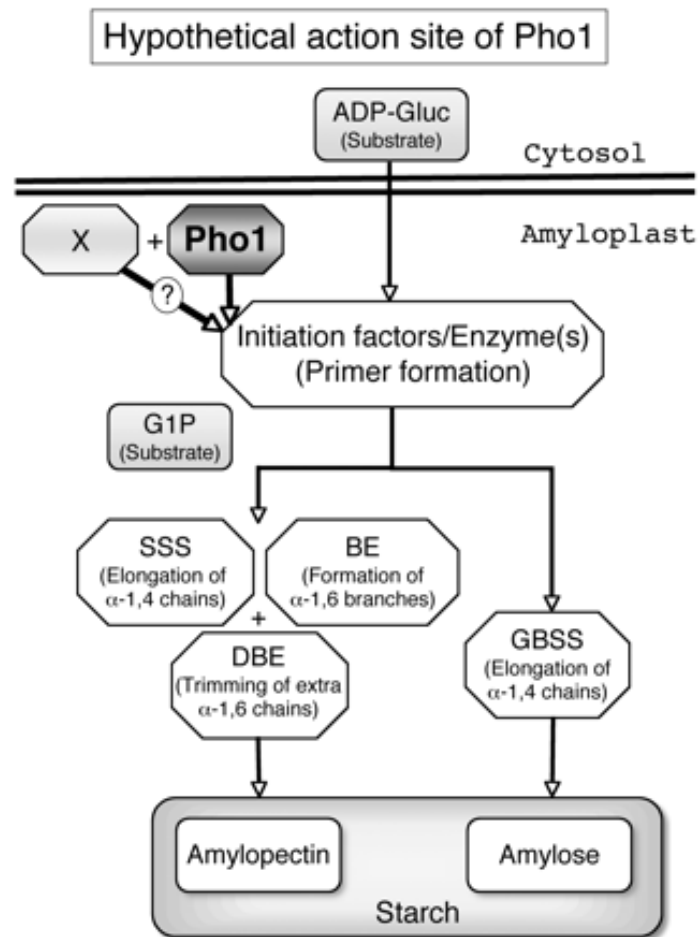


圖 1.6 澱粉磷酸酶在澱粉生合成中所扮演的可能角色

Fig. 1.6 Model representing the possible role of Pho1 in starch biosynthesis in the rice endosperm

Pho1 可能為澱粉初始合成之重要角色之一，進行延長初始醣引子至一定長度後，使 SSs 能夠進行下一步的延長。(Hikaru, 2008)

#### 1.3.4 H 型澱粉磷解酶之生理角色

H-SP 為一種細胞質型澱粉磷解酶，相較於 L-SP，其對於支鏈聚醣具有很高的親和力，如肝醣以及支鏈澱粉，但對於麥芽糊精的親和力則很低。前人發現，在植物的許多器官內，皆可純化出一種可溶性的多醣類，其會選擇性地與 H-SP 有很強的交互作用 (Yang and Steup, 1990)。在磷酸根或是 Glc-1-P 存在下，H-SP 會使用此種多醣類作為葡萄糖基的捐獻者 (donor) 或是接受者 (acceptor) 進行雙向催化反應。將此多醣類水解後，發現其組成以阿拉伯糖 (arabinose)、半乳糖 (galactose) 以及葡萄糖 (glucose) 為主，此多醣類即為雜多醣 (soluble heteroglycan, SHG) (Fettke et al., 2004; Joerg, 2004)。

葉綠體中的暫存性澱粉，會在夜晚時被 BA 以及 DPE1 降解成葡萄糖以及麥芽糖 (maltose) (Lao et al., 1999; Critchley et al., 2001; Scheidig et al., 2002)。而澱粉降解時，葡萄糖以及麥芽糖也是主要被運送到細胞質內的形式 (Servaites and Geiger, 2002; Ritte, 2003; Weise et al., 2004)。在阿拉伯芥中，AtPHS2 (H-SP) 以及 disproportionating enzyme (DPE2) 的突變種，皆會造成麥芽糖的大量累積。此外，近期發現雜多醣，對於 H-SP 及 DPE2 都是很好的基質，因此認為其可能參與了暫存性澱粉的降解途徑 (Yang and Steup, 1990; Fettke et al., 2004; Fettke et al., 2005; Fettke et al., 2005; Yan, 2006)。

H-SP 與 DPE2 皆會進行將葡萄糖基加到 SHG 上或者從 SHG 上取得葡萄糖基之雙向反應。DPE2 會使用麥芽糖做為捐獻者，將一個葡萄糖加入 SHG，產生葡萄糖，或者是利用 SHG 上之葡萄糖基及葡萄糖合成麥芽糖。而 H-SP 則是會使用 Glc-1-P 做為捐獻者，將一個葡萄糖加到 SHG 上，或者是催化 SHG 及磷酸獲得一個 Glc-1-P，如圖 1.7，表示 H-SP 參與了細胞質中葡萄糖轉換成蔗糖 (sucrose) 之代謝反應 (Fettke et al., 2008)。

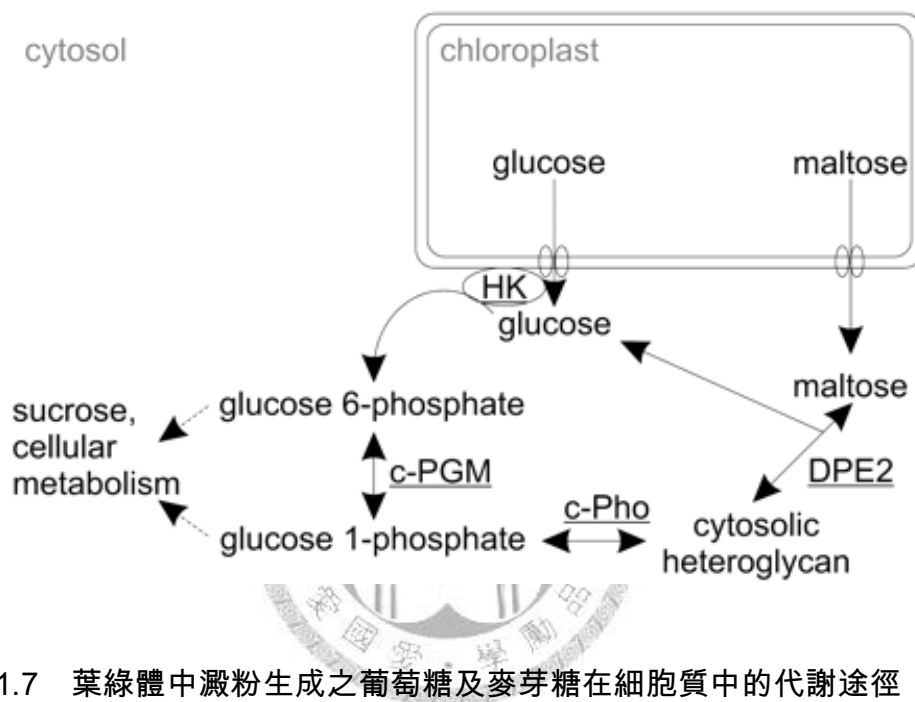


圖 1.7 葉綠體中澱粉生成之葡萄糖及麥芽糖在細胞質中的代謝途徑

Fig. 1.7 Proposed cytosolic metabolism of starch-derived Glc and maltose following their export from the chloroplast

由葉綠體送出的葡萄糖及麥芽糖會被 DPE2 及 H-SP (c-Pho) 利用，將醱基加到 SHG 上，並且也會進行逆向反應。(Joerg, 2004)

## 1.4 實驗室目前相關研究進度

本實驗室對於 L-SP 之分子機制探討，已有十多年的歷史。陳翰民 (1997) 發現 L-SP 可以在不含醣引子 (primer independent, PI) 的環境中合成直鏈醣，可能是澱粉合成最初期的醣前體，並且會藉由 L78 的修飾而改變基質的親和力。在 L78 降解之後，L-SP 對於可溶性澱粉的親和力增加，對 Glc-1-P 的親和力降低。並且發現 L-SP 在相同基質不同時間之催化反應，呈現三個不同催化速率的時期，稱為三相催化反應。

楊光華於 2005 年發現 L-SP 會受到 L 型澱粉磷解酶激酶 (LSK) 的磷酸化修飾，卻會加速 L-SP 中央 L78 的降解。曾光靖 (2005) 發現此磷酸化修飾不會影響到酵素活性。表示 L-SP 的磷酸化並非使其改變構形以提高對基質之親和力，而是藉由磷酸化來引發專一性移除阻礙葡聚醣結合區的 L78 序列 (楊光華, 2005)。並且得到了 L78 完全斷裂的 L-SP，稱為 L-SP\*，經過酵素動力學實驗，發現不含醣引子合成直鏈醣的活性消失，而對澱粉的親和力卻提高了一倍以上，因此推測 L78 是催化 PI 合成直鏈醣的活性區。

王維德 (2006) 將不同 L78 降解程度的 L-SP 進行實驗，發現完整的 L-SP 及 L78 部分斷裂之 L-SP 都可使用麥芽寡醣進行直鏈醣的合成，但若 L78 完全斷裂，則無法使用麥芽糖及麥芽三醣。並提出 L-SP PI 合成直鏈醣之速率決定步驟為從兩個單醣 Glc-1-P 合成雙醣麥芽糖。此外，其使用外加 PLP 抑制了 L-SP 合成直鏈醣的形成，證實了 L-SP 合成直鏈醣的反應有 PLP 的參與，位於 Glc-1-P 的結合區之一。王宏祥 (2007) 利用葡萄糖~麥芽糖 (glucose~maltopentaose) 模擬反應中逐漸延長之直鏈寡醣，進行酵素動力學實驗。發現 L-SP 在外加麥芽四醣 (maltotetraose) 以上之直鏈短醣時，具有最高的催化效率。而 L78 斷裂之 L-SP，在外加 L78 之後，可以恢復其 PI 活性。並且使用分子模型，預測出 L78 上有兩個結合口袋，周圍繞著三組 Glu 及 Lys，其中一組和 NDPG PPase (NDP-Glc pyrophosphorylases: ADPG PPase, TDPG PPase, CDPG PPase) 與 Glc-1-P 產生交互作用的兩個胺基酸位置相同，顯示 L78 可能為 PI 活性提供 Glc-1-P 的另一個結合區。

綜合以上結果，本實驗室對於 L-SP PI 活性機制產生了一個假說，認為 L-SP 上存在著兩個 Glc-1-P 結合區，一個為 PLP 結合區，稱為 A site，另一個則為位於 L78 上的 Lys 結合區，稱為 B site，如圖 1.8。而 A site 的 PLP 首先會造成與其結合的 Glc-1-P 上的磷酸根裂解，生成碳陽離子 (carbocation)，而在 PLP 上的磷酸 ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) 則會吸引與 B site 結合的 Glc-1-P 其 C4 位置的 OH 基，使其成為帶負電的醇鹽 (alkoxide)，接著帶有碳陽離子的葡萄糖會去攻擊 C4 上的  $\text{O}^-$  位置，形成一個  $\alpha$ -1,4 鍵結。而完成了由兩個 Glc-1-P 合成一個雙糖的反應，如圖 1.9。

## 1.5 研究動機

L-SP 在植物體內所扮演的角色目前仍是無法確知，其同時具有合成以及磷解方向之活性，雖然普遍認為其為磷解醣類之酵素，但其在含有高濃度 Pi 的情況下仍具有合成活性。此外，L-SP 分子間所插入的 L78 序列，是  $\alpha$  型葡聚醣磷解酶中所特有的，本實驗室在先前的實驗中亦證明了其與合成方向的反應有關。

承繼前人之研究成果，已知 L-SP 可以在 PI 的環境下，利用 Glc-1-P 當作基質，進行合成反應，且其催化反應隨著時間，會呈現三相變化。本論文即想要討論在 L-SP 進行三相催化反應時，其醣產物鏈長之變化，使用 HPLC (high-performance liquid chromatography) 及 HPAEC 測定所合成之醣類產物，觀察在不同時期鏈長之延長情形。並且使用 Glc-1-P 的異構物進行反應，探討不同位置的修飾對於酵素活性之影響。

此外，同樣存在在植物中的兩種同功酶 L-SP 與 H-SP，其是否在催化機制上有不同的性質，或者是在不同的位置具有類似的功能。進行 H-SP PI 活性之酵素動力學實驗，以及不同時間觀察其是否具有三相催化反應。希望能藉由以上的實驗結果，推得 L-SP PI 反應之酵素機制。



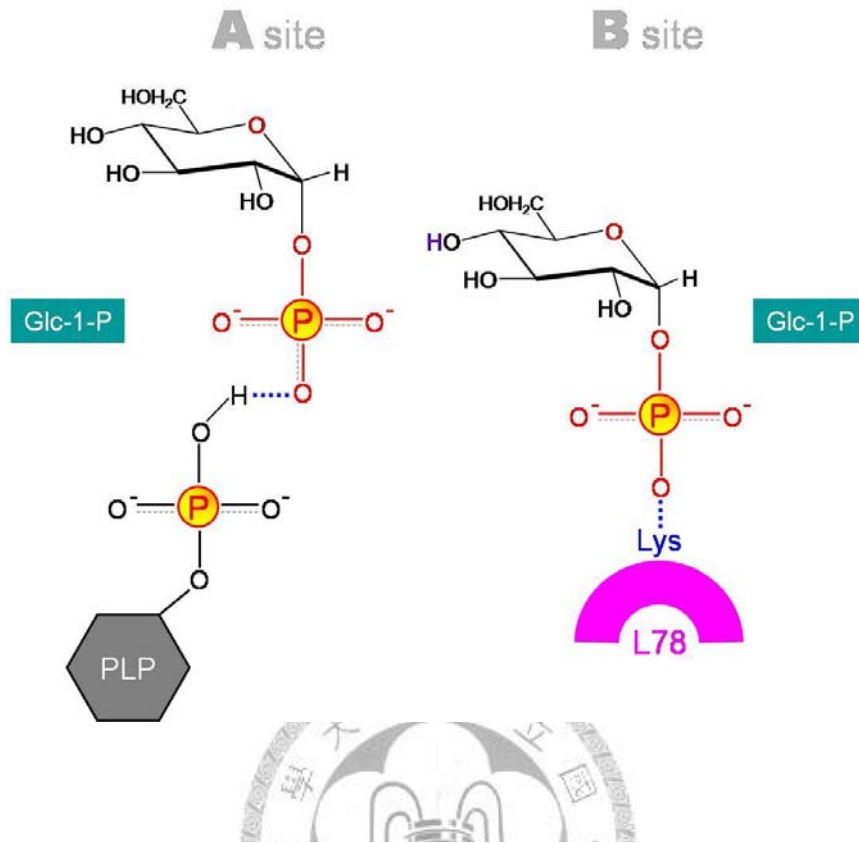
圖 1.8 L-SP 不含醣引子合成直鏈醣反應之酵素活性區

Fig. 1.8 The active site of PI activity of L-SP

圖為 L-SP 之預測分子模型，A site 為 PLP 結合區，B site 則為 L78 上的 Lys 結合區。



(a)



(b)

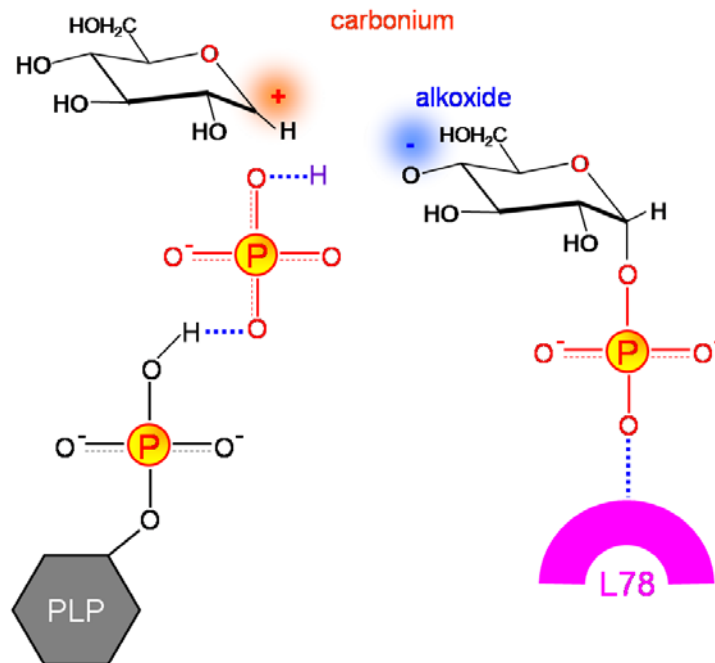


圖 1.9 L-SP 不含糖引子合成直鏈糖之反應機制

Fig. 1.9 Catalytic mechanism of PI amylose synthesis of L-SP

(a) Glc-1-P 與活性區結合情形；(b) 預測兩個位置上的 Glc-1-P 所生成之中間產物。

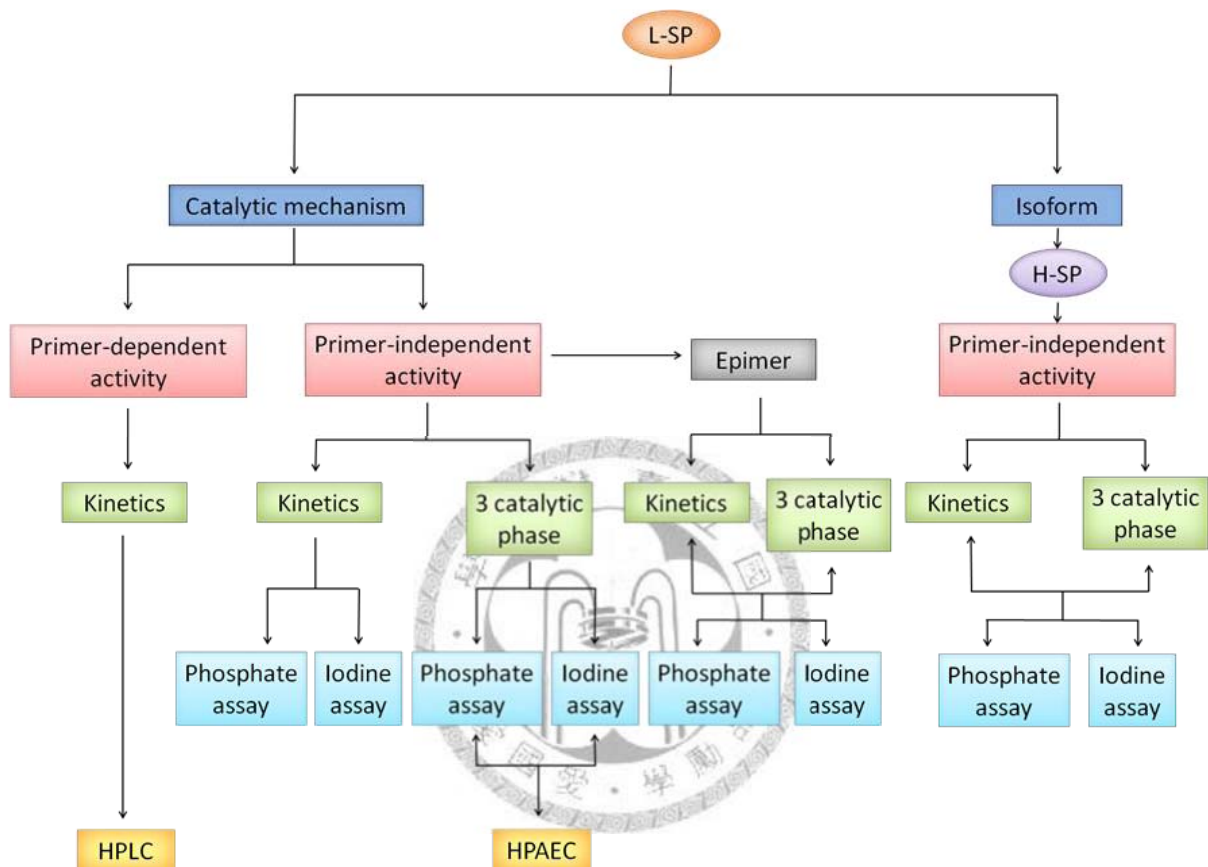


圖 1.10 本論文各探討主題之實驗流程

Fig. 1.10 The flow chart of the experiments in this study

## 第二章 材料與方法

本實驗選用台農 57 號甘藷做為材料，取直徑大約 5 公分、新鮮的甘藷塊根，純化後獲得 L 型澱粉磷解酶，再對其生化性質進行分析探討。甘藷 (*Ipomoea batatas* Lam., sweet potato) 為旋花科 (Convolvulaceae) 植物，產地為熱帶美洲，於 17 世紀由福建傳入台灣，為一年生草本植物，是世界各地主要的糧食作物。台農 57 號是由嘉義農業試驗分所，使用日據時代即有的台農 27 號為母本，美國的南瑞苕 (Nacy-hall) 為父本，於 1955 年選育成功。其塊根表皮棕黃色，肉色橙黃，塊根紡錘形，為台灣首次育成之黃心番薯品種。

### 2.1 基本分析法

於本節中介紹蛋白質定量法及酵素之活性分析。

#### 2.1.1 Bradford 定量法

Bradford 的 dye-binding method 是利用蛋白質與 Coomassie brilliant blue G-250 (CBG) 結合而變色的特性來定量；若試樣中的蛋白質量較多，則結合到蛋白質而變色的 CBG 也多，因而呈色較深。

#### 儀器：

37°C 恆溫箱

ELISA 光度計 (Dynatech Laboratories MRX)

ELISA 96 槽微量滴定盤 (Nunc 442404)

#### 藥品試劑：

Bio-Rad Protein assay dye reagent concentrate 5× (Bio-Rad 500-0006)

牛血清白蛋白標準品 (bovine serum albumin, BSA, Bio-Rad 500-0007)

#### 方法步驟：

- (1) 準備 BSA 系列稀釋之標準品。
- (2) 每槽取 20  $\mu$ L 標準品及適當稀釋之樣本，加入 96 孔微量滴定盤中。

- (3) 每槽再加 200  $\mu\text{L}$  dye (1/5 $\times$ )，使各成份均勻混合，並避免氣泡產生。
- (4) 靜置室溫 10 min。
- (5) 以 ELISA reader 讀取 595 nm 吸光值。
- (6) 以標準品之濃度與吸光值作圖，畫出標準校正線，並決定未知樣本的濃度。

### 2.1.2 酵素活性分析 (不含醣引子)

使用澱粉磷解酶，並以 Glc-1-P 做為基質，進行不含醣引子合成直鏈醣之反應，測定其所產生之磷酸及葡聚醣，分別以磷酸呈色劑以及碘液測定之。

#### 儀器：

同上節

#### 藥品試劑：

醋酸緩衝液 (0.2 M, pH 5.5)：

$\text{CH}_3\text{COONa}$	(RDH 32319)	13.37 g
$\text{CH}_3\text{COOH}$	(RDH 33209)	2.13 mL

加水至 1,000 mL 置於 4°C 保存。

Glc-1-P (60 mM)：

$\alpha\text{-D-Glucose-1-phosphate}$	(Sigma G-7000)	0.98 g
---------------------------------------	----------------	--------

加水至 100 mL 置於 4°C 保存。

- ◆ Glc-1-P 會因儲存過久而裂解出磷酸，使用期限為三週左右；不可加熱。

磷酸呈色劑 (ferro-sulfate molybdate)：

Ammonium molybdate	(Sigma A-7302)	2.0 g
$\text{H}_2\text{SO}_4$ (6 N, 硫酸原液為 36 N)	(Merck)	34.0 mL
$\text{H}_2\text{O}$ (Milli-Q)		166.0 mL
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	(Sigma F-7002)	10.0 g

將 ammonium molybdate 以 6 N 硫酸溶解，加 Milli-Q 水完全溶解後，再加入  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  避光下混合均勻；使用前新鮮配置。

- ◆ 使用前新鮮配製。溶液應為淡褐色，若變質則呈現藍色。

碘液呈色劑

Iodine	(Wako)	0.15 g
KI	(Nakalai 296-25)	2.80 g

避光下加入二次水待完全溶解後，定量至 1,000 mL。

#### 方法步驟：

- (1) 每槽取 20  $\mu\text{L}$  之樣本，加入 96 孔微量滴定盤中，再加入 80  $\mu\text{L}$  Glc-1-P。

- (2) 由於 Glc-1-P 會自行裂解，可以緩衝液加入基質液作為空白對照組。
- (3) 於 37°C 反應特定時間。
- (4) 每槽加入 200  $\mu$ L 呈色劑，並於 1 min 內以 ELISA reader 讀取 650 nm 吸光值。

### 2.1.3 酵素活性分析 (添加醣引子)

使用 L 型澱粉磷解酶之基質澱粉及 Glc-1-P，以及 H 型澱粉磷解酶之基質肝醣及 Glc-1-P，進行可逆反應，並測其合成方向之產物磷酸及葡聚醣。

#### 儀器：

同上節

#### 藥品試劑：

醋酸緩衝液 (0.2 M, pH 5.5)：

CH <sub>3</sub> COONa	(RDH 32319)	13.37 g
CH <sub>3</sub> COOH	(RDH 33209)	2.13 mL

加水至 1,000 mL 置於 4°C 保存。

可溶性澱粉 (1.2%)：

Soluble starch	(Sigma S-2630 或 Nakalai 321-22)	1.2 g
----------------	---------------------------------	-------

取 1.2 g 可溶性澱粉先以 50 mL 水懸濁之，以微波爐短暫加熱 30 s，俟完全溶解後放冷，再加水至 100 mL，置 4°C 保存，若有發霉則須丟棄。

肝醣 (0.2%)：

Glycogen	(Type II, oyster, Sigma G-8751)	20 mg
----------	---------------------------------	-------

先溶於少量純水中，待完全溶解後定量至 10 mL，保存於 4°C。

Glc-1-P (32 mM)：

$\alpha$ -D-Glucose-1-phosphate	(Sigma G-7000)	0.98 g
---------------------------------	----------------	--------

加水至 100 mL 置於 4°C 保存。

- ◆ Glc-1-P 會因儲存過久而裂解出磷酸，使用期限為三週左右；不可加熱。

磷酸呈色劑 (ferro-sulfate molybdate)：

Ammonium molybdate	(Sigma A-7302)	2.0 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(6 N, 硫酸原液為 36 N) (Merck)	34.0 mL
H <sub>2</sub> O	(Milli-Q)	166.0 mL
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	(Sigma F-7002)	10.0 g

將 ammonium molybdate 以 6 N 硫酸溶解，加 Milli-Q 水完全溶解後，再加入 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 避光下混合均勻；使用前新鮮配置。

碘液呈色劑 (L-SP 及酵素動力學實驗)

Iodine	(Wako)	0.15 g
KI	(Nakalai 296-25)	2.80 g

避光下加入二次水待完全溶解後，定量至 1,000 mL。

碘液呈色劑 (H-SP)

Iodine	(Wako)	0.23 g
KI	(Nakalai 296-25)	4.15 g

避光下加入二次水待完全溶解後，定量至 250 mL。

方法步驟：

L-SP 測定：

- (1) 將醋酸緩衝液：可溶性澱粉：Glc-1-P = 1:1:1 混合，當作反應基質液。
- (2) 每槽取 20  $\mu$ L 之樣本，加入 96 孔微量滴定盤中，再加入 80  $\mu$ L 基質液。
- (3) 於 37°C 反應 15min。
- (4) 每槽加入 200  $\mu$ L 呈色劑，並於 1 min 內以 ELISA reader 讀取 650 nm 吸光值。

H-SP 測定：

- (1) 將肝糖：Glc-1-P = 1:1 混合，當作反應基質液。
- (2) 每槽取 100  $\mu$ L 之樣本，加入 96 孔微量滴定盤中，再加入 100  $\mu$ L 基質液。
- (3) 於 37°C 反應 2 h。
- (4) 每槽加入 80  $\mu$ L 磷酸呈色劑，並於 1 min 內以 ELISA reader 讀取 650 nm 吸光值。
- (5) 若以碘液呈色，則在相同反應後，加入 80  $\mu$ L 碘液呈色劑，並於 1 min 內以 ELISA reader 讀取 570 nm 吸光值。

## 2.2 澱粉磷解酶純化法

本論文使用甘藷塊根純化 L 型澱粉磷解酶及 H 型澱粉磷解酶。純化步驟詳述於結果與討論。

### 2.2.1 粗抽取及硫酸銨分劃

將甘藷粗抽取後，加入不同濃度硫酸銨使其沉澱，達到分離蛋白質的效果。硫酸銨是中性鹽，對蛋白質有安定作用，蛋白質會因非極性區域分布的差異，在特定的硫酸銨飽和濃度下沉澱。純化的流程皆應在冰冷的環境下進行。

#### 儀器：

製簽用具

果汁機 (貴夫人)

高速冷凍離心機 (Beckman Avanti J-25)

透析膜 (三光 UC36-32-100, 12,000-14,000 MWCO)

#### 藥品試劑：

緩衝液 A (20 ×)：

Tris	(50 mM×20, BDH 103157P)	121.14 g
------	-------------------------	----------

加水 700 mL 溶解，以 HCl 調 pH 至 7.4，再定量至 1,000 mL。置於 4°C 保存。

使用前加水稀釋 20 倍，再次校準 pH 值，並加入  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma, 原液為 14.3 M) 使其最終濃度為 1 mM。

◆ Tris：Tris(hydroxymethyl)methylamine，其 pH 值易受溫度影響。

緩衝液 B：

緩衝液 A (1 ×) 加入 1% polyvinylpolypyrrolidone (PVPP, Sigma)。

緩衝液 C：

緩衝液 A 再加入 0.15 M NaCl (Bioshop)。

硫酸銨 (Ammonium sulfate, Merck 101211)：

藥品研磨烘乾後使用。

#### 方法步驟：

- (1) 取約 500 g 新鮮甘藷塊根，洗淨去皮後切丁，加入約 500 mL 冰冷緩衝液 B 中，使用果汁機於 4°C 下均質。高速攪拌 30 s，停止 1 min，重複 5 次。
- (2) 均質液以高速離心機離心 30 min (Beckman JLA-16.25, 12,000 rpm)。
- (3) 取上清液於冰浴中緩緩加入硫酸銨，至所需之飽和度，並不時攪拌，L-SP 取 25%~45%硫酸銨飽和濃度，H-SP 取 0%~50%硫酸銨飽和濃度。參考表 2.1。

- (4) 攪拌平衡 30 min，高速離心 20 min。
- (5) 取所需分劃之沉澱，以最少體積之緩衝液 A 回溶。
- (6) 置於透析袋中，於 5 L 緩衝液 C 中透析過夜。
- (7) 取出樣本離心 30 min 後，取得上清液，進行下一步驟純化。

表 2.1 硫酸銨分劃表 (Modified from *Methods of Enzymology*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1968, p.76)

4°C	硫酸銨最後%濃度																	
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
	加入固態硫酸銨於 1 L 溶液中之克數																	
	0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
硫酸銨 起始 % 濃度	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
	35							31	63	64	129	164	200	238	278	319	411	506
	40								31	63	97	132	168	205	245	275	375	469
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
	50										33	66	101	137	176	214	302	392
	55											33	67	103	141	179	264	353
	60												34	69	105	143	227	314
	65													34	70	107	190	275
	70														35	72	153	237
	75															36	115	198
	80																77	157
	90																	79



## 2.2.2 離子交換法

本實驗使用 DEAE Sephacel，DEAE (diethylaminoethyl) 是一種陰離子交換基團，使用氯離子做為 counter ion。

### 儀器：

層析管柱 (Pharmacia AC26/40 column)  
蠕動幫浦 (Pharmacia peristaltic pump P-1)  
分劃收集器 (fraction collector, Gilson 或 Pharmacia)  
梯度製造器 (Pharmacia gradient mixer MX-1)

### 藥品試劑：

膠體 (DEAE Sephacel)  
低限緩衝液：50mM Tris-Cl 加入 0.15 mM NaCl，pH 7.4 (即為緩衝液 C)  
高限緩衝液：50mM Tris-Cl 加入 0.5 mM NaCl，pH 7.4

### 方法步驟：

#### 管柱裝填：

- (1) 將膠體以緩衝液 C 平衡過夜。
- (2) 架起管柱，以水平儀調整管柱，使之與地面垂直。
- (3) 於管柱中加入緩衝液 C，若沒有漏水，則讓緩衝液流出，只留約 5 cm 高的緩衝液 C；以塞子暫時堵住下方出口。
- (4) 將膠體混合均勻，以玻棒沿管壁流暢倒入管柱，並且避免使得氣泡陷在膠柱中。
- (5) 利用重力自然沈降 1~2 min 後，打開出口，利用流速加快沈降，注意不可使管柱上方的液相完全乾去。
- (6) 待膠體已沈降完全，用塞子止住下方軟管，並且以緩衝液加滿管柱。
- (7) 取出管柱的 adaptor 並接好軟管及蠕動幫浦管路，並使整個幫浦及軟管內，完全充滿緩衝液，不得有任何氣泡陷在裡面。
- (8) 小心將 adaptor 放入管柱內，往下推至膠面上方，檢查有無氣泡留滯在 adaptor 下面，然後鎖緊 O-ring。此時 adaptor 與膠面間有一小段充滿緩衝液的空間。
- (9) 移去管柱下方軟管的塞子，用幫浦注入緩衝液 C 流洗兩個管柱體積。緩衝液 C 以預定流速之 150% 流速流洗膠體，流洗兩個管柱體積，DEAE Sephacel 流速最高可至 60 mL/hr。
- (10) 暫時停止幫浦輸送，用塞子止住下方軟管，放鬆幫浦使管路呈流通狀態，稍微旋開 adaptor 的 O-ring，將 adaptor 緩慢往下壓，液體會從幫浦上端軟管流回去，當壓至膠面時，即旋緊 O-ring，鎖上幫浦門，並移去管柱下方軟管的塞子。

### 層析操作：

- (1) 流洗膠體至 pH 值與緩衝液相同即為平衡，並固定流速為 45 mL/hr。
- (2) 將離心後之樣本注入管柱後，以低限緩衝液流洗 4~5 個管柱體積，並以分劃收集器收集，每管收集 4 mL。
- (3) 將高限及低限溶液各 200 mL，分別加入梯度製造器兩端，接上幫浦進行梯度流洗。
  - ◆ 低限溶液置於攪拌槽。
- (4) 待溶液流盡後，停止幫浦及分劃收集器。
- (5) 進行蛋白質定量及定性，以及電泳之後，收集所需蛋白質，進行下一步驟純化。

### 2.2.3 疏水性層析法

此法是利用蛋白質表面疏水性區域，在極性很強的環境下，被吸附在非極性的固定相擔體上。當環境之極性降低，則可被流洗出來。

#### 儀器：

層析管柱 (Pharmacia AC 16/20 column)  
蠕動幫浦 (Pharmacia peristaltic pump P-1)  
分劃收集器 (Gilson 或 Bio-Rad)  
梯度製造器 (Pharmacia gradient mixer, MX-1)

#### 藥品試劑：

膠體 (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow)

#### L-SP：

高限緩衝液：50 mM Tris-Cl 加入 0.5 M Ammonium Sulfate (Merck 101211)

低限緩衝液：50 mM Tris-Cl

#### H-SP：

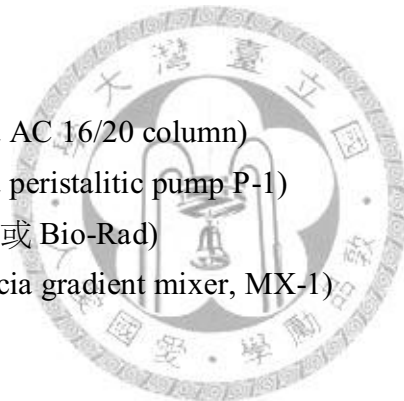
高限緩衝液：20 mM MES (Sigma M-8250) 加入 5% Ammonium Sulfate (Merck 101211)，以 KOH 調 pH 值至 6.0。

低限緩衝液：20 mM MES, pH 6.0。

#### 方法步驟：

#### L-SP：

- (1) 裝填 20 mL 膠體於管柱中，並以高限緩衝液流洗過夜。



- (2) 樣本加入硫酸銨粉末或 1 M 硫酸銨溶液，使最終濃度為 0.5 M 硫酸銨溶液，攪拌平衡，若有沉澱則離心去除。
- (3) 注入樣本後，流洗 3 個管柱體積，流速為 45 mL/hr，並開啓分劃收集器，每管收集 4 mL。
- (4) 分別將高限及低限緩衝液各 100 mL 加入梯度製造器，接上幫浦進行梯度流洗。
- (5) 梯度流洗完畢後，再以 100 mL 低限緩衝液流洗。
- (6) 收集所需分劃，進行下一步純化。

H-SP：

- (1) 裝填 20 mL 膠體於管柱中，並以高限緩衝液流洗過夜。
- (2) 樣本加入硫酸銨粉末或 1 M 硫酸銨溶液，使最終濃度為 0.5 M 硫酸銨溶液，攪拌平衡，若有沉澱則離心去除。
- (3) 注入樣本後，流洗 3 個管柱體積，流速為 45 mL/hr，並開啓分劃收集器，每管收集 4 mL。
- (4) 分別將高限及低限緩衝液各 100 mL 加入梯度製造器，接上幫浦進行梯度流洗。
- (5) 梯度流洗完畢後，再以 100 mL 低限緩衝液流洗，後再以 Q 水將蛋白質完全洗出。
- (6) 收集所需分劃，進行下一步純化。

#### 2.2.4 膠體過濾法

膠體過濾屬 partition 層析法，樣本蛋白質的分子量與形狀大小為決定溶離速度之影響因子。

**儀器：**

層析管柱 (Pharmacia AC16/100 column)  
蠕動幫浦 (Pharmacia peristaltic pump P-1)  
分劃收集器 (fraction collector, Gilson 或 Pharmacia)

**藥品試劑：**

Sephacryl S-300 (Pharmacia 17-0599-01)  
緩衝液 C

**方法步驟：**

- (1) 裝填 500 mL 膠體於管柱中，流洗約兩個管柱體積。
- (2) 樣本體積約為膠體體積的 3% 以內，注入樣本後，立即啓動分劃收集器，以 45 mL/hr 流洗，每管收集 3 mL，所有溶離物質，應在大約 1.5 倍管柱體積之

內流出。

- (3) 收集所得的樣本進行蛋白質定量及活性分析，收集具有高活性的蛋白質峰，濃縮蛋白質至 1 mg/mL 以上。



## 2.3 電泳檢定法

電泳的高解析力使其成為生化技術中最有效力的一門分析利器，蛋白質使用聚丙烯醯胺 (polyacrylamide) 作為主要的電泳膠體，並使用不連續電泳，本實驗使用原態膠體電泳及 SDS 膠體電泳：其中原態膠體電泳 (disc-PAGE) 是以原態蛋白質進行電泳，一般用作純度檢定或活性分析，SDS 膠體電泳 (SDS-PAGE) 則用為分子量之測定。並且在 pH 8.8 的電泳條件下，大部分 pI 值小於 8.8 的分子均能由負極往正極泳動；而其泳動率與所帶電荷呈正比，與其分子量成反比，可以此分離不同分子量之蛋白質。

### 2.3.1 原態膠體電泳

不連續膠體電泳是最基本的聚丙烯醯胺電泳形式，可以分析原態蛋白質，因膠體不含 SDS，故酵素活性多能保持，可以在膠體上做酵素活性染色，也可用於大量樣本的純化，即製備式電泳。

#### 儀器：

鑄膠套件 (含電泳玻片及氧化鋁片)  
間隔條 (spacer, 0.75 mm)  
樣本梳 (comb, 10 well)  
垂直電泳槽 (Hofer SE-250 平板式垂直迷你電泳槽)  
電源供應器 (ISCO-453 或 Pharmacia Biotech EPS 200)

#### 藥品試劑：

A 液 (丙烯醯胺溶液，T 30%, C 2.6%)：

丙烯醯胺溶液 acrylamide	(Merck 10784)	14.6 g
Bis	(Bio-Rad 161-0201)	0.4 g

加水至 50 mL，若難溶則稍微加熱助溶之，儲存於 4°C。

(Bis = N,N'-Methylene-bis-acrylamide)

B 液 (分離膠體緩衝液)：

Tris	(Sigma T-1503)	18.2 g
TEMED	(Sigma T-8133)	0.36 mL

用 60 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 8.8 後加水至 100 mL，儲存於 4°C。

◆ TEMED = N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine

C 液 (焦集膠體緩衝液) :

Tris	(Sigma T-1503)	0.6 g
TEMED	(Sigma T-8133)	40 $\mu$ L

用 8 mL 水溶解後，以 HCl 調 pH 至 6.8 後加水至 10 mL，儲存於 4°C。

通用電泳緩衝液 (5 $\times$ ) :

Tris	90 mM $\times$ 5	(Sigma T-1503)	54.5 g
EDTA $\cdot$ 2Na	2.5 mM $\times$ 5	(Sigma E-4884)	4.7 g
Boric acid	80 mM $\times$ 5	(Sigma B-0394)	24.8 g

加水 800 mL 溶解，以 NaOH 調 pH 至 8.4 後，加水至 1000 mL，室溫保存。

使用前要以蒸餾水稀釋五倍。

APS 溶液 (ammonium persulfate, 10%) :

取 0.1 g 溶於 1 mL 水，要確實溶解完全；使用前新鮮配置，過夜者不再用。

追蹤染料 (tracking dye) :

取 bromophenol blue 約 1 mg 溶於 5 mL 通用電泳緩衝液，加 5 mL 甘油混勻。

高分子量標準蛋白質組合 (Pharmacia HMW electrophoresis calibration kit) :

Protein: 分子量	Da
Thyroglobulin	669,000
Ferritin	440,000
Catalase	232,000
Lactate dehydrogenase	140,000
Bovine serum albumin	67,000

◆ 注意：以 native-PAGE 測定的分子量，只能做為參考，不能做為唯一證據。

方法：

鑄膠：

- (1) 將電泳玻片及氧化鋁片清洗淨後擦乾，再以玻璃清潔劑擦拭乾淨，選擇所需厚度的間隔條 (spacer) 將其組裝於鑄膠套件中。
- (2) 依照表 2.2 所列的各溶液比例，選擇所需的分離膠體濃度；配置膠體溶液時，其中 APS 溶液必須最後加入，小心混合均勻，以避免氣泡產生，然後緩緩倒入裝置好的鑄膠套件中。
- (3) 注入 3.4 mL 分離膠體，加完後儘快在各膠體液面上方小心加入 100  $\mu$ L 異丙

醇，以壓平膠體液面。

- (4) 約 30 min 至 1 h 後 (天冷須更久)，凝膠完成，倒出上層的異丙醇。
- (5) 配置焦集膠體溶液，先準備好所需之樣本梳 (comb)，加入溶液後立刻插入，整個過程必須在 5 min 完成，約 30 min 可完成凝膠。
- (6) 拆卸鑄膠套件，將多餘的凝膠去除，鑄好的膠片置於封口袋中放在 4°C 保存，並加入少量蒸餾水防止膠片乾裂，使用期限約為一週。

表 2.2 常用 native-PAGE 膠體溶液 (單位 mL)

膠體溶液	分離膠體溶液						焦集膠體
	6%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%	4%
A	2	2.5	3.3	4.15	5.0	6.7	0.66
B	2.5						-
C	-						1.24
H <sub>2</sub> O	5.45	4.95	4.15	3.3	2.45	0.75	3.0
APS	0.05						0.1
總體積	10						5.0

電泳：

- (1) 先取出膠片回溫，將稀釋成一倍的通用電泳緩衝液，倒入電泳槽的底部。接著把膠片以 45 度架到電泳槽上，避免氣泡產生；當電泳夾夾妥後，在電泳玻片組合的上方，加入電泳緩衝液。
- (2) 取 20  $\mu$ L 樣本，加入 1/4 體積之追蹤染料，混合均勻後小心的注入膠體中的樣本槽，並避免氣泡的產生。
- (3) 高分子量的標準蛋白質約需 4~8  $\mu$ L，作為蛋白質分子量的參考；但在 disc-PAGE 中，分子量的測定並不可靠，因此應避免用來決定分子量。
- (4) 將電泳槽上部蓋子蓋上，確認正負極裝置正確，連接上電源供應器，定電壓以 150 V 進行電泳，若膠片需做活性染色，則必須在 4°C 冷房中進行電泳。
- (5) 待追蹤染料跑出膠片後，關掉電源，取出膠片中的膠體，以解剖刀截角做記號，準備進行染色。

### 2.3.2 SDS 膠體電泳

SDS-PAGE 是利用界面活性劑 SDS (sodium dodecyl sulfate) 附在蛋白質之疏水區表面，由 SDS 所帶之負電荷引導泳動。SDS-PAGE 廣泛應用於蛋白質次單元體分子量的決定。

#### 儀器：

同上節之原態膠體電泳

#### 藥品試劑：

除了上節所使用的藥品外，還需配置以下的藥品：

SDS 膠體電泳樣本溶液 (SDS-PAGE sample buffer) 4×：

Tris	125 mM×4	(Sigma T-1503)	3.00 g
EDTA·2Na	2 mM×4	(Sigma E-4884)	15.0 mg
SDS	2%×4	(Nakalai 316-07)	4.00 g
DTT	100 mM × 4	(Sigma M-6250)	3.09 g
Glycerol	10% x 4		20.00 mL
Bromophenol blue	0.01% x 4	(Sigma B-6896)	0.02 g

加二次水 20 mL 溶解，調 pH 值至 6.8 之後，再加水至 50 mL。

10% SDS 溶液：

取 1 g SDS 溶於 10 mL 二次水；SDS 極易揚起，注意勿吸入，以免造成傷害。

SDS 電泳緩衝液 (1×)：

配置同通用電泳緩衝液，但在稀釋時加入 SDS 使成爲 0.1 % SDS。

低分子量標準蛋白質組合 (Pharmacia LMW electrophoresis calibration kit)：

Protein: 分子量	Da
Phosphorylase b	94,000
Bovine serum albumin	67,000
Ovabumin	43,000
Carbonic anhydrase	30,000
Trypsin inhibitor	20,000
$\alpha$ -Lactalbumin	14,000

預先染色之蛋白質分子量標準品 (Biomax, prestained protein ladder)



方法：

鑄膠：

- (1) 方法同上節不連續膠體電泳，只是在膠體溶液中多加了 1% 的 SDS；膠體的濃度配方如下表 2.3，10 mL 約足夠鑄造兩片膠片。

表 2.3 常用 SDS-PAGE 膠體溶液 (單位 mL)

膠體溶液	分離膠體溶液						焦集膠體
	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%	4%
A	1.65	2.5	3.3	4.15	5.0	6.7	0.66
B	2.5						-
C	-						1.24
10% SDS	0.1						0.05
H <sub>2</sub> O	5.7	4.85	4.05	3.2	2.35	0.65	2.95
APS	0.05						0.1
總體積	10						5.0

電泳：

- (1) 先取出膠片回溫，將稀釋成一倍的 SDS 電泳緩衝液，倒入電泳槽的底部。接著把膠片以 45 度角放入，可避免氣泡的產生，當電泳夾夾妥後，在電泳玻片的上方，加入電泳緩衝液。
- (2) 取 20  $\mu$ L 樣本，加入同體積之樣本緩衝液 (sample buffer)，混合均勻後於 100°C 煮 5 min，待冷卻後離心 30 s，小心的注入膠體中的樣本槽，並避免氣泡的產生。
- (3) 低分子量標準蛋白質約需 4~8  $\mu$ L，作為蛋白質分子量參考的依據。
- (4) 將電泳槽上部的蓋子蓋上，確認正負極裝置正確，連接上電源供應器，定電壓以 150 V 進行電泳。
- (5) 待追蹤染料跑出膠片外，關掉電源，取出膠片中的膠體，以解剖刀截角做記號，準備進行染色。

### 2.3.3 膠片染色法

本實驗使用 CBR (Coomassie Brilliant Blue R-250) 染色以及蛋白質活性染色。

#### 2.3.3.1 Coomassie Brilliant Blue R (CBR) 染色法

快速且方便的染色法，為目前最常用的方法，但靈敏度不高。利用 CBR 分子上的芳香苯環，與蛋白質疏水區結合；同時其亞硫酸基團 ( $-\text{SO}_3^{2-}$ ) 與蛋白質的正電荷結合。

##### 儀器：

平台震盪器  
染色缸

##### 藥品試劑：

CBR 染色液：

Coomassie Brilliant Blue R-250	(Sigma B-0630)	0.75 g
Methanol	(Wako 136-09475)	250 mL
$\text{CH}_3\text{COOH}$	(RDH 33209)	50 mL
$\text{H}_2\text{O}$	(Milli-Q)	250 mL

用 250 mL 甲醇溶解後，再加入 250 mL 二次水及 50 mL 醋酸。

CBR 脫色液：

10%醋酸與 20%甲醇的水溶液。

##### 方法：

- (1) 將電泳完畢的膠體浸入 CBR 染色液中，染色液用量只要蓋過膠片即可；置於平台震盪器上搖盪 15 min。
- (2) 倒出染色液，用自來水沖洗後倒入脫色液，脫色液蓋過膠片即可。於染色缸中放入吸水紙，可加速脫色過程。
- (4) 若膠體表面有不溶的 CBR 染料沈積，可以用 50% 甲醇洗去。

#### 2.3.3.2 澱粉磷解酶活性染色法

澱粉磷解酶在含有基質 Glc-1-P 的環境下，可進行葡聚糖的延長反應，產生不可溶的直鏈澱粉，再以碘液將澱粉染色。此法偵測磷解酶的活性極為靈敏，但會受雜夾在樣本中  $\beta$ -amylase 的干擾。

##### 儀器：

平台震盪器、恆溫箱 (37°C)

## 藥品試劑：

MES 緩衝液 (0.04 M, pH 5.9)：

MES (2[N-morpholino] ethanesulfonic acid)	(Sigma M-8250)	1.56 g
---	----------------	--------

以 KOH 調整 pH 至 5.9 後，加水至 200 mL 置於 4°C 保存。

Glc-1-P (32 mM)：

Glucose-1-phosphate	(Sigma G-6895)	0.98 g
---------------------	----------------	--------

加水至 100 mL，置於 4°C 保存，Glc-1-P 會因儲存過久而裂解出磷酸，使用期限為三週左右。

可溶性澱粉 (1.2%)：

可溶性澱粉	(Sigma S-2630 或 Nakalai 321-22)	1.2 g
-------	---------------------------------	-------

取 1.2 g 可溶性澱粉先以少量熱水溶解，再加水至 100 mL，置室溫儲存。使用前若有不溶物則再加熱溶解之，放冷後才能加入 Glc-1-P。

肝醣 (1%)：

Glycogen	(Type II, oyster, Sigma G-8751)	0.3 g
----------	---------------------------------	-------

先溶於少量純水中，待完全溶解後定量至 30 mL，保存於 4°C。

碘液呈色劑：

Iodine	(Wako)	0.45 g
--------	--------	--------

KI	(Nakalai 296-25)	2.83 g
----	------------------	--------

加水至 200 mL。

## 方法：

- (1) 將原態電泳完畢的膠體置於基質液 (L-SP 為 MES : Glc-1-P : soluble starch = 2:1:1；H-SP 為 MES : Glc-1-P : glycogen = 2:1:1) 中，基質液用量只要蓋過膠片即可。
- (2) 於 37°C 中反應適當的時間，1~2  $\mu\text{g}$  的 SP 在含有醣引子下，反應 2 h 可染出清楚色帶。
- (3) 反應完成後，可以看到白色的澱粉色帶出現。倒去基質液，以蒸餾水清洗膠片數次，加入碘液蓋過膠片呈色，並且震盪使呈色均勻。
- (4) 此時可看見呈色色帶：含有澱粉引子的膠片，其背景顏色較深；可在蒸餾水中清洗，以洗去多餘的可溶性澱粉基質；若色帶因碘昇華而消失，可以再加入碘液重染一次。
- (5) 若樣本中含有澱粉酶 (如  $\beta$ -amylase)，則在含澱粉的膠片上出現反白色帶，會影響磷解酶的呈色。為了避免這種影響，在電泳完畢後，可將膠片先浸於 100  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  溶液中 3~5 min 後洗去，以抑制澱粉酶的活性。

### 2.3.4 膠片乾燥及護貝

膠片乾燥法，是參考莊榮輝博士論文中做法，用玻璃紙三明治法進行乾燥，利用玻璃紙半透膜的特性乾燥膠片後，再進行護貝後可以長期保存。

#### 用具：

玻璃板、玻璃紙、文書夾

#### 方法：

- (1) 在玻璃板上鋪平第一張溼潤的玻璃紙，玻璃紙的四邊要略大於玻璃板，四邊折下，避免玻璃紙與玻璃板中有任何的氣泡產生。
- (2) 將染色完畢之膠片，置於上述步驟之玻璃紙上。
- (3) 將另外一張玻璃紙浸溼，小心鋪蓋於膠片上，避免任何氣泡產生，玻璃紙的四邊要略大於玻璃板約 1~2 cm，將第二層的玻璃紙四邊反摺到玻璃板背面。
- (4) 以文書夾夾住四角，置於室溫或 37°C 烘箱中乾燥。
- (5) 檢查膠片是否完全乾燥，可以利用指甲在膠片上輕敲，乾燥完全的膠片不會留下任何指甲痕跡；可將膠片剪下，以護貝膠膜護貝後保存。

### 2.3.5 蛋白質電泳轉印

蛋白質電泳後之膠片，可以經轉印至轉印膜 (PVDF, polyvinylidene difluoride) 後，進行進一步檢定。PVDF 膜為一種疏水性材質，可與蛋白質的疏水性區域結合。

#### 儀器：

電泳轉印槽 (Hoefer TE22)

轉印紙 (Millipore Immobilon, PVDF)、濾紙 (Whatman 3 mm)

電源供應器

#### 藥品試劑：

轉印緩衝液 (Blotting buffer)：

CAPS	10 mM	(Sigma C-2632)	2.22 g
------	-------	----------------	--------

加水 600 mL 溶解，以 NaOH 調整 pH 至 11 後，加甲醇 100 mL，再定量至 1,000 mL；最後含 10% 甲醇，可視需要增加比例至 20%。

Urea-PBST：

Urea	6 M	(Sigma U-1250)	180.0 g
------	-----	----------------	---------

加入 200 mL PBST 加熱溶解後，以 PBST 定量至 500 mL。

標準蛋白質組合：

預先染色之蛋白質分子量標準品 (Biomax, prestained protein ladder)

方法：

- (1) 將所要轉印之膠片浸於轉印緩衝液中，平衡 20~30 min。通常 SDS-PAGE 中的蛋白質分子量較小，因此要加入 10%的甲醇於轉印緩衝液中，以避免小分子蛋白質過度擴散或穿過轉印膜。
- (2) 轉印膜 PVDF 為疏水性，必須先以 100%甲醇短暫溼潤後，再浸入轉印緩衝液中備用。
- (3) 取兩張稍大的濾紙，於轉印緩衝液中浸潤備用。取出轉印卡夾，先墊一張多孔性海綿，鋪上一張濾紙，再小心鋪上膠片，勿陷入任何氣泡，鋪上轉印膜，再蓋上一層濾紙及海綿，再把整個膠片卡夾裝好。
- (4) 置入已裝有轉印緩衝液的轉印槽中，注意 PVDF 面朝正極，膠片面朝負極。除去卡夾外面的氣泡，氣泡的存在將使轉印效率變差。
- (5) 以 400 mA 進行轉印，轉印 60 min 後中止。取出轉印膜，浸在尿素洗液中 1 h 以上；尿素可洗去 SDS-PAGE 樣本蛋白質分子上的 SDS，同時可以將蛋白質分子部分恢復原態，以增加抗體確認機率。
- (6) 在電泳過程中若有 pre-stained 的標準蛋白質，可作為轉印效率的參考。



## 2.4 醣類分析法

### 2.4.1 高效能液相層析法

高效能液相層析儀 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 為廣泛應用於生化或化學分析的層析法。將樣本溶於移動相中，並依其與固定相之作用力不同達到分離樣本的效果。本論文使用 reversed phase HPLC (RP-HPLC or RPC)，具有非極性的固定相，並且以水做為移動相。其中極性分子會較快溶離出來，而非極性分子則會較慢被溶離出來。

#### 儀器：

HPLC 層析管柱 (YMC Hydrosphere C18 column)

幫浦 (Binary HPLC pump, Waters 1525)

折射率偵測器 (Refractive Index Detector, Waters 2414)

過濾膜 (PALL 0.20  $\mu\text{m}$ , P.P. membrane 及 millipore 0.22 $\mu\text{m}$ , GP EXPRESS PLUS membrane)

#### 藥品試劑：

H<sub>2</sub>O (Milli-Q)

#### 方法步驟：

- (1) 在進行 HPLC 分析前，樣本需先經過離心且過濾，緩衝液則是離心後，再使用超音波震盪 Degas 15~30 min。
- (2) 將系統先以水平衡後，設定程式 (Project)。  
本論文設定程式如下：

<b>Flow rate</b>	1 mL/min
<b>Elution time</b>	15 min
<b>Elute</b>	H <sub>2</sub> O
<b>Inject Volume</b>	20 $\mu\text{L}$
<b>Temperate</b>	35°C

- (3) 將樣本注入後，即可從電腦看到數據及圖形。

## 2.4.2 高效能陰離子交換層析法

高效能陰離子交換層析 (high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection, HPAEC-PAD) 為專門針對分離醣類所研發的層析技術。並且配合脈衝安培檢測器，偵測在金電極表面被氧化的醣類所產生的電流，可以偵測到 picomole 層次的樣本濃度，並可直接將未經衍生化反應的醣類定量。本論文使用的層析管柱為 CarboPac PA-100，其最適合用來做中性醣類 (Neutral oligosaccharides) 的分析。

### 儀器：

#### 層析系統

ICS 3000 (Dionex)  
Chromatography system  
Gradient Pump  
Electrochemical Detector  
Autosampler  
分析軟體 (Dionex, Chromeleon chromatography software)  
HPAEC 層析管柱 (Dionex, CarboPac PA100 Analytical Column, CarboPac PA100 guard Column)  
過濾膜 (PALL 0.20  $\mu\text{m}$ , P.P. membrane 及 millipore 0.22 $\mu\text{m}$ , GP EXPRESS PLUS membrane)

### 藥品試劑：

#### Elute A：

NaOH	(100 mM)	5.2 mL
------	----------	--------

先取 800 mL 二次水，加入 5.2 mL NaOH 後，定量至 1000 mL。

#### Elute B：

NaOH	(100 mM)	5.2 mL
------	----------	--------

NaOAC	(500 mM)	41.0 g
-------	----------	--------

先取 800 mL 二次水，加入 NaOAC 溶解後，再加入 NaOH，定量至 1000mL。

### 方法步驟：

- (1) 樣本需先經過離心且過濾，緩衝液則是離心後，再使用超音波震盪 Degas 15~30 min。
- (2) 將準備好的樣本放入 autosampler 中，並設定好程式，本論文設定程式如下表。

<b>Flow rate</b>	0.25 mL/min	
<b>Elution time</b>	1 hr	
<b>Elute</b>	A: 100 mM NaOH B: 500 mM NaOAc in 100 mM NaOH	
	0.00	%B = 0.0 [%] %C = 0.0 [%] %D = 1.0 [%] Curve = 5
	25.00	%B = 0.0 [%] %C = 0.0 [%] %D = 1.0 [%] Curve = 5
	30.00	%B = 0.0 [%] %C = 0.0 [%] %D = 100.0 [%] Curve = 5
	30.10	%B = 0.0 [%] %C = 0.0 [%] %D = 1.0 [%] Curve = 5
	35.00	%B = 0.0 [%] %C = 0.0 [%] %D = 1.0 [%] Curve = 5
<b>Inject Volume</b>	20 $\mu$ L	
<b>Temperate</b>	25°C	

(3) 樣本注入後，即可從電腦看到數據及圖形。



## 第三章 結果與討論

澱粉磷解酶在植物體內有兩種同功酶，分別為 L-SP 及 H-SP，在甘藷塊根及其它植物中，L-SP 皆為主要存在之型態。L-SP 與 H-SP 不同之處，是在於分子中央多出了一段約 78 個胺基酸的序列，若將 L-SP 序列套用至兔肌 GP 的結構上，發現 L78 突出於酵素的葡聚糖結合位置上，可能阻擋了澱粉與其結合，使得 L-SP 對於分支較大的葡聚糖親和力較差。

本實驗室對 L-SP 之生化特性已有許多研究，發現其在 *in vitro* 情況下，除了具有磷解澱粉的活性外，亦可以利用直鏈短醣合成澱粉，此外，L-SP 更具有 PI 活性。本篇論文研究之目的，即在探討 L-SP PI 活性催化機制，分析酵素利用直鏈短醣及 PI 合成產物，並使用基質的異構物來觀察其對於 L-SP PI 合成活性之影響，最後，比較 L-SP 與 H-SP 在合成方向活性之差異，觀察 H-SP 是否具有 PI 活性。

### 3.1 酵素之製備

#### 3.1.1 甘藷塊根 L 型澱粉磷解酶製備

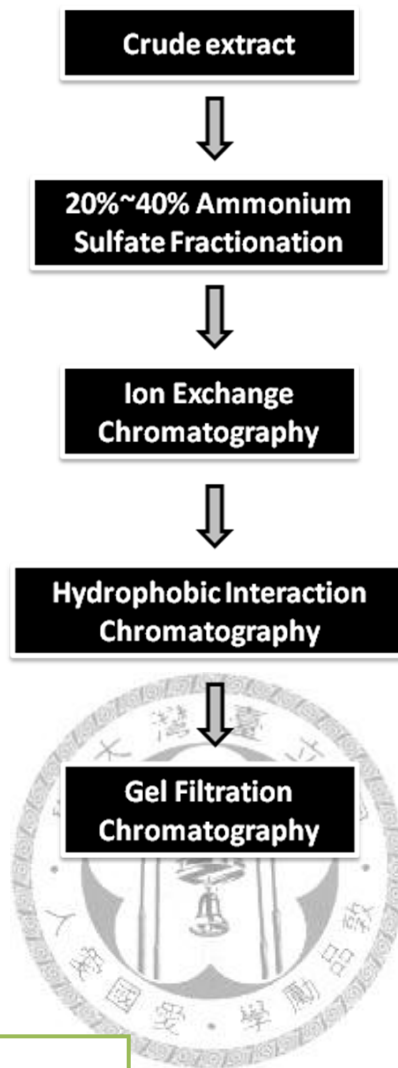
依照本實驗室所建立 L-SP 之純化方式，為求獲得完整且多量的目標蛋白質，略做一些調整，純化步驟依序為：粗抽、硫酸銨分劃、離子交換法、疏水性層析、膠體過濾，以獲得完整的 L-SP (圖 3.1)。甘藷均質後，離心得粗抽液，取 25%~45%的硫酸銨分劃，此分劃能夠取得較多完整的 110 kDa L-SP 片段，而不是降解後的 F50s。接著進行離子交換法，主要分離 L-SP 與  $\beta$ -amylase (BA)，取活性最高部分，再進行疏水性層析法，L-SP 會在疏水性最高的分劃被流洗出來，能夠分離 L-SP 與大部分蛋白質。最後進行膠體過濾法，將 L-SP 與 Proteasome 分離，取得均質的 L-SP。

### 3.1.2 甘藷塊根 H 型澱粉磷解酶製備

本實驗室建立了一套 H-SP 之純化流程 (吳其真, 1998), 粗抽之樣本經硫酸銨分劃後, 依序進行離子交換、疏水性層析、ConA 親和層析法 (不含 glycogen)、ConA 親和層析法 (含 glycogen)。進行 ConA 親和層析法 (含 glycogen) 時, 膠體上所預先結合之肝醣會與 H-SP 結合, 使其恢復活性, 但本論文純化 H-SP 之目的是要測試其不含醣引子之合成活性, 因此省略此步驟, H-SP 之純化流程如圖 3.2。甘藷粗抽後, 取 0%~50%之硫酸銨分劃, 進行離子交換法, 此一步驟能夠分離 H-SP 以及 BA, 如圖 3.2 (b)。再進行疏水性層析法, 分離 H-SP 與大部分蛋白質。

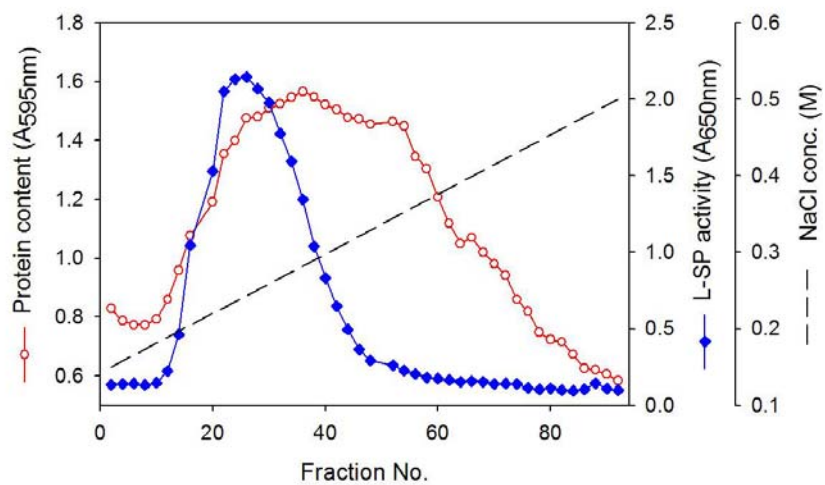


(a)



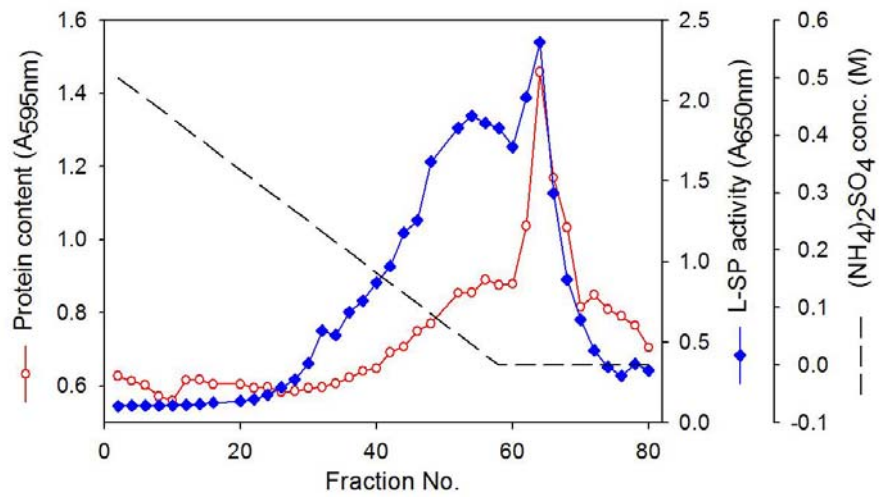
(b)

Flow rate: 45 mL/hr  
Fraction volume: 4 mL/tube  
Gradient: 0.15 mM NaCl~0.5 mM NaCl



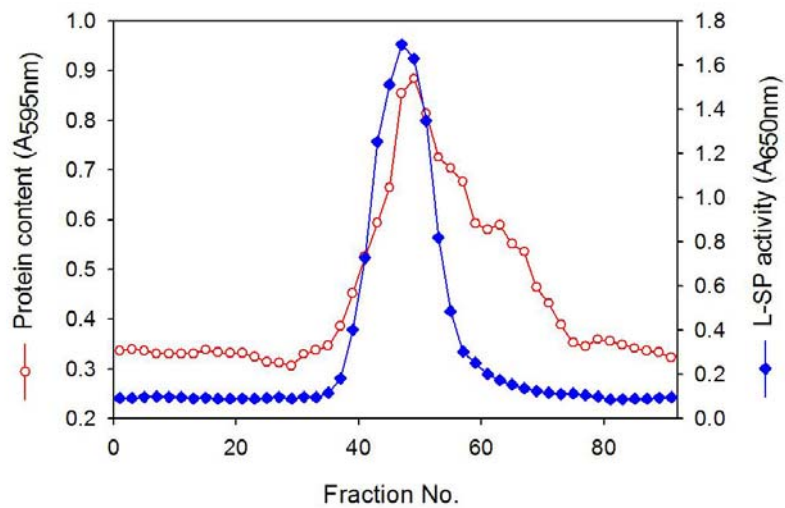
(c)

Flow rate: 45 mL/hr  
Fraction volume: 4 mL/tube  
Gradient: 0.5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ~ 0 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



(d)

Flow rate: 45 mL/hr  
Fraction volume: 4 mL/tube



(e)

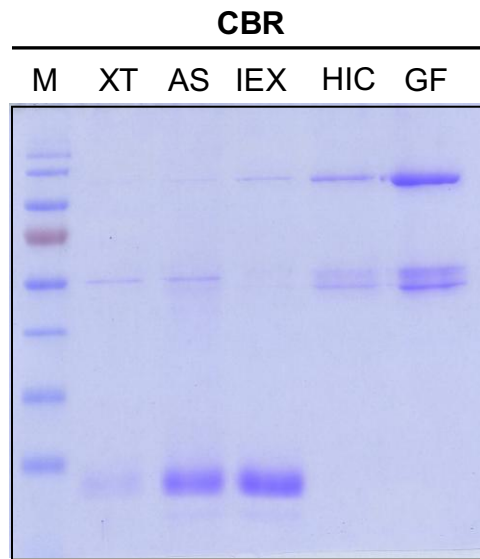


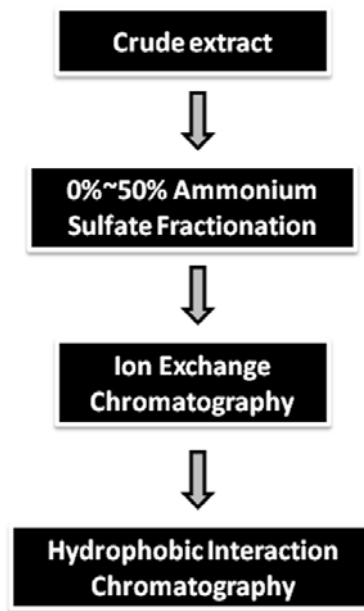
圖 3.1 L-SP 之純化流程

Fig. 3.1 Purification of L-SP from sweet potato roots

(a) L-SP 純化流程；(b) 離子交換法；(c) 疏水性層析法；(d) 膠體過濾法；(e) 各個純化步驟之蛋白質電泳圖，圖為 12.5% SDS-PAGE 以 CBR 染色。

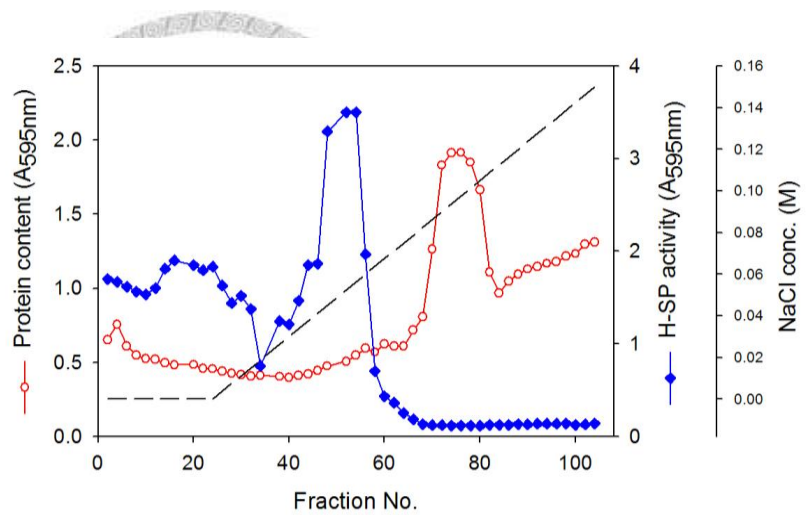


(a)



(b)

Flow rate: 45 mL/hr  
Fraction volume: 4 mL/tube  
Gradient:  
0 mM NaCl~0.15 mM NaCl



1 4 7 10 13 16 19 22 25 28 31 34 37 40 43 46 49 52 55 58 61 64 67 70 73 76 79 82 85 88



1 4 7 10 13 16 19 22 25 28 31 34 37 40 43 46 49 52 55 58 61 64 67 70 73 76 79 82 85 88



(c)

Flow rate: 45 mL/hr  
Fraction volume: 4 mL/tube  
Gradient:  
0.5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \sim 0 \text{ mM}$   
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

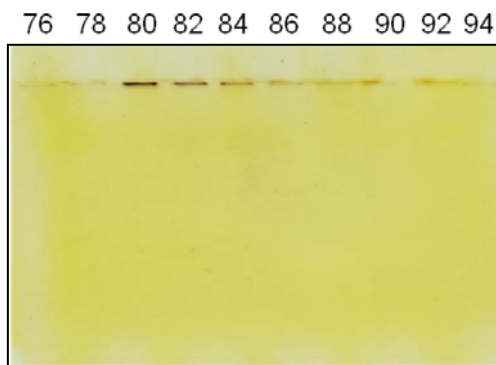
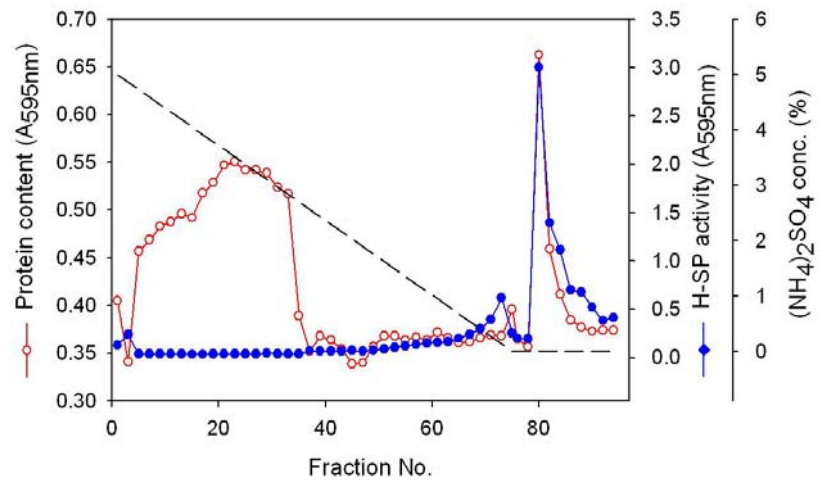


圖 3.2 H-SP 之純化流程

Fig. 3.2 Purification of H-SP from sweet potato roots

(a) H-SP 純化流程 ; (b) 離子交換法 ; (c) 疏水性層析法。各步驟之蛋白質電泳以 7.5% native-PAGE (含 0.02% glycogen) 進行 CBR 染色及活性染色。(BA:  $\beta$ -amylase)

## 3.2 L-SP 合成直鏈醣之模式

前人研究發現，L-SP 在有醣引子及不含醣引子的環境中，皆可以利用 Glc-1-P 合成直鏈醣 (Tsai and Nelson, 1968)，故推測 L-SP 可能參與澱粉和成初期的反應，提供澱粉合成酶進行延長醣鏈之醣前體 (陳翰民, 1997)。本節即在探討 L-SP 合成醣前體之活性及產物分析，藉以推測 L-SP 之催化機制。

### 3.2.1 L-SP 不需醣引子合成醣前體活性

使用 L-SP 及基質 Glc-1-P 進行酵素動力學實驗，可以發現 L-SP 的確具有 PI 活性，且在固定的酵素量下，反應速率與基質濃度作圖為雙曲線的一股，Lineweaver-Burk 作圖為一直線，證明酵素與基質的關係符合 Michaelis-Menten model (圖 3.3)。取不同時間點的產物測試其磷酸釋放量及直鏈醣生成，可以發現產物與時間的關係呈三個時期，第一個時期為慢速初始時期 (Slow initiation phase)，此時 Glc-1-P 反應形成初產物，為速率決定步驟；接著進入快速延長時期 (Rapid elongation phase)，此時磷酸釋放及直鏈醣生成量快速增加；最後則為穩定狀態時期 (Steady-state phase)，合成反應與磷解反應達到平衡。此結果與陳翰民 (1997) 所觀察 L-SP 之 PI 活性所得結論相同。而在三相反應中，磷酸釋放量與葡聚醣合成量是依循同樣的趨勢，表示磷酸釋放確實與直鏈醣之生成有關，但無法由此趨勢得知反應過程中，產物醣前體之合成情形，故本論文進行接下來的實驗，希望能夠進一步證明 L-SP 與 Glc-1-P 反應生成葡聚醣，並且了解其反應是如何進行。

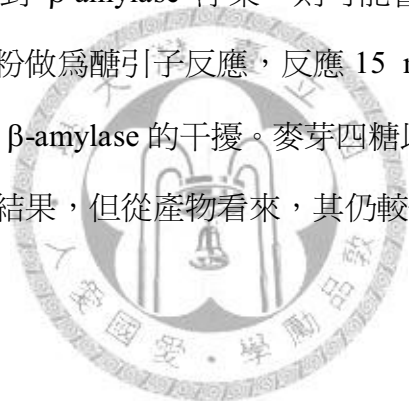
### 3.2.2 以 HPLC 測定 L-SP 利用不同短鏈醣合成直鏈醣之情形

若以 L-SP 外加短鏈醣來模擬 PI 活性形成直鏈醣時的活性，發現酵素的催化速率在使用麥芽四糖 (maltotetraose, G4) 時達到最高，並且親和力也遠比麥芽糖 (maltose, G2) 及麥芽三糖 (maltotriose, G3) 大。而鏈長再增加至麥芽七糖 (maltoheptose, G7) 時，無論是最大反應速率 ( $V_{max}$ ) 或者是  $K_m$  值都沒有顯著的差異 (王維德, 2006; 王宏祥, 2007)。



本實驗用 HPLC 以及 RI detector 測定 L-SP 利用不同短鏈糖做為醣引子進行合成反應之情形，來推知醣引子所加速的酵素催化反應，是否使得醣鏈延長，如圖 3.4。反應 15 min 後，可以發現葡萄糖 (glucose, G1) 及 G2 皆沒有明顯的產物生成，而 G3 有少許直鏈醣生成，至 G4 則能夠有效率地利用醣引子合成直鏈短醣。表示在 G3 之後，L-SP 延長醣鏈之反應較 G1 及 G2 來得快速，若以此來模擬 PI 活性合成反應，則酵素合成至麥芽三糖之後，應已經進入三相反應中的快速延長時期。

此外，若以 DP (聚合度, degree of polymerization) 大於 4 作為醣引子的反應，皆有較醣引子更小的直鏈醣生成，由於在純化過程中，L-SP 合成之直鏈醣會受到在甘藷塊根內大量存在的  $\beta$ -amylase 水解釋放麥芽糖，而影響活性的測定。若是樣本受到  $\beta$ -amylase 汙染，則可能會有較醣引子更小的直鏈醣出現，但以可溶性澱粉做為醣引子反應，反應 15 min 之間並沒有大量麥芽糖累積，故初步排除是  $\beta$ -amylase 的干擾。麥芽四糖以上的含直鏈醣合成反應，可能是小量逆反應的結果，但從產物看來，其仍較傾向於合成方向的反應。



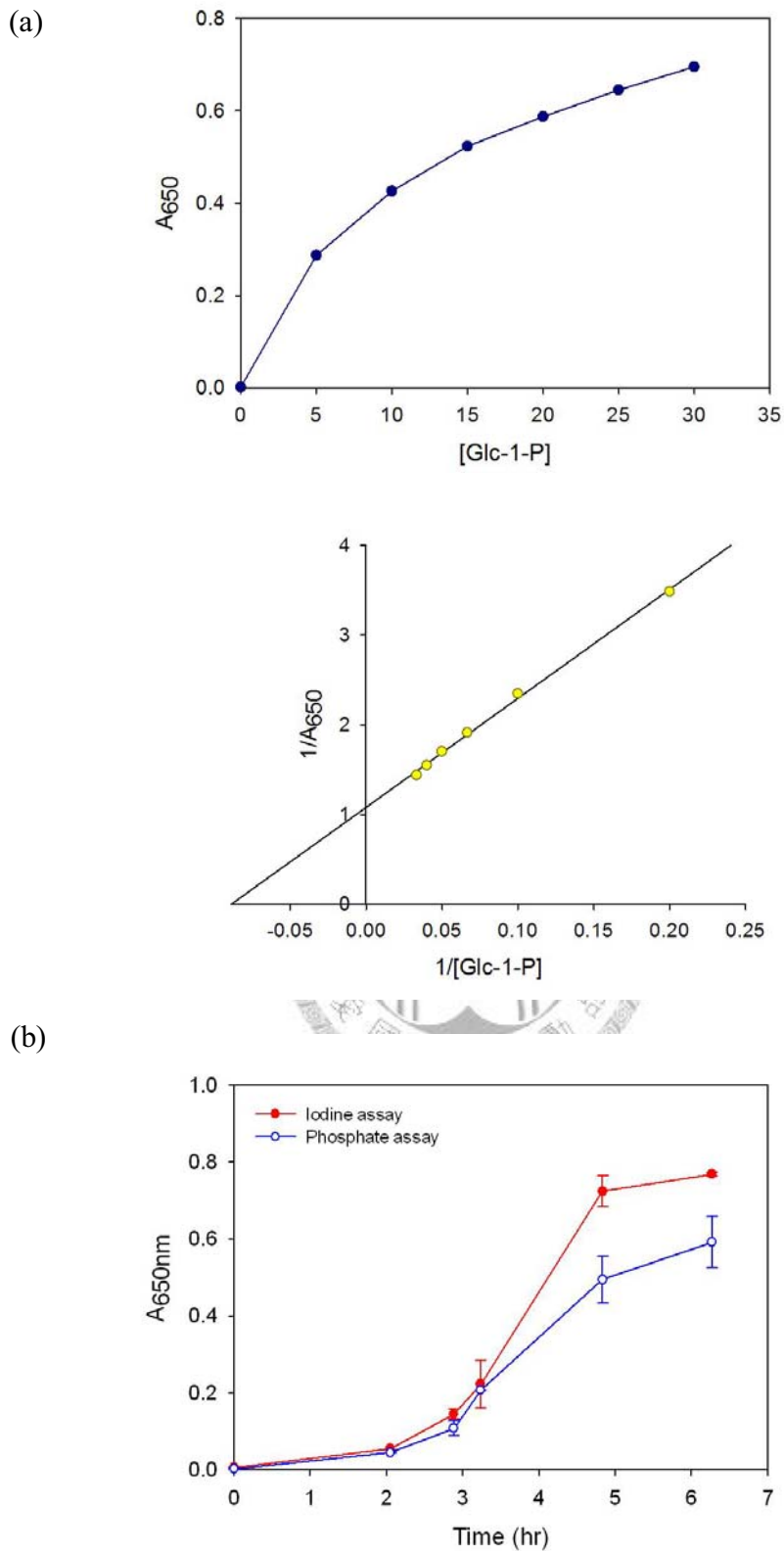


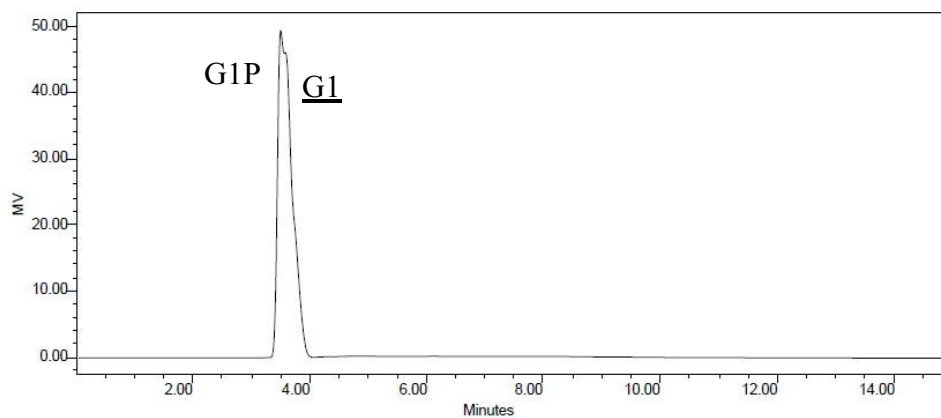
圖 3.3 L-SP 可在不含醣引子情況下合成直鏈醣

Fig. 3.3 The Primer independent activity of L-SP

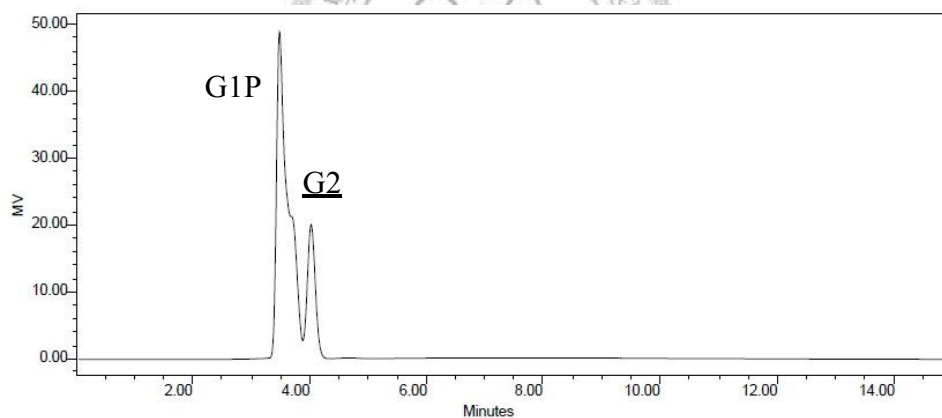
測定 L-SP PI 活性之 (a) 酵素動力學圖；(b) 三相反應圖，使用 3.5  $\mu\text{g}$  L-SP 及 60 mM Glc-1-P，取不同時間點以碘液及磷酸呈色。

Colum: Hydrosphere C18  
Elute: Water  
Flow rate: 1 ml/ min  
Inj. Volume: 20  $\mu$ l

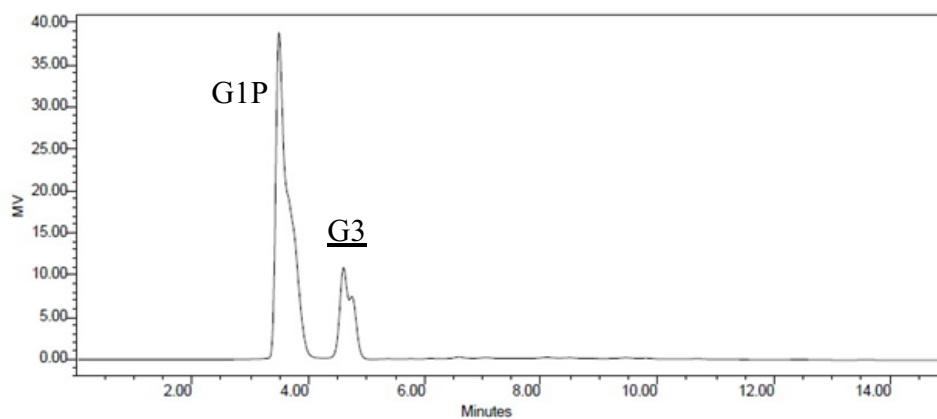
(a)



(b)



(c)



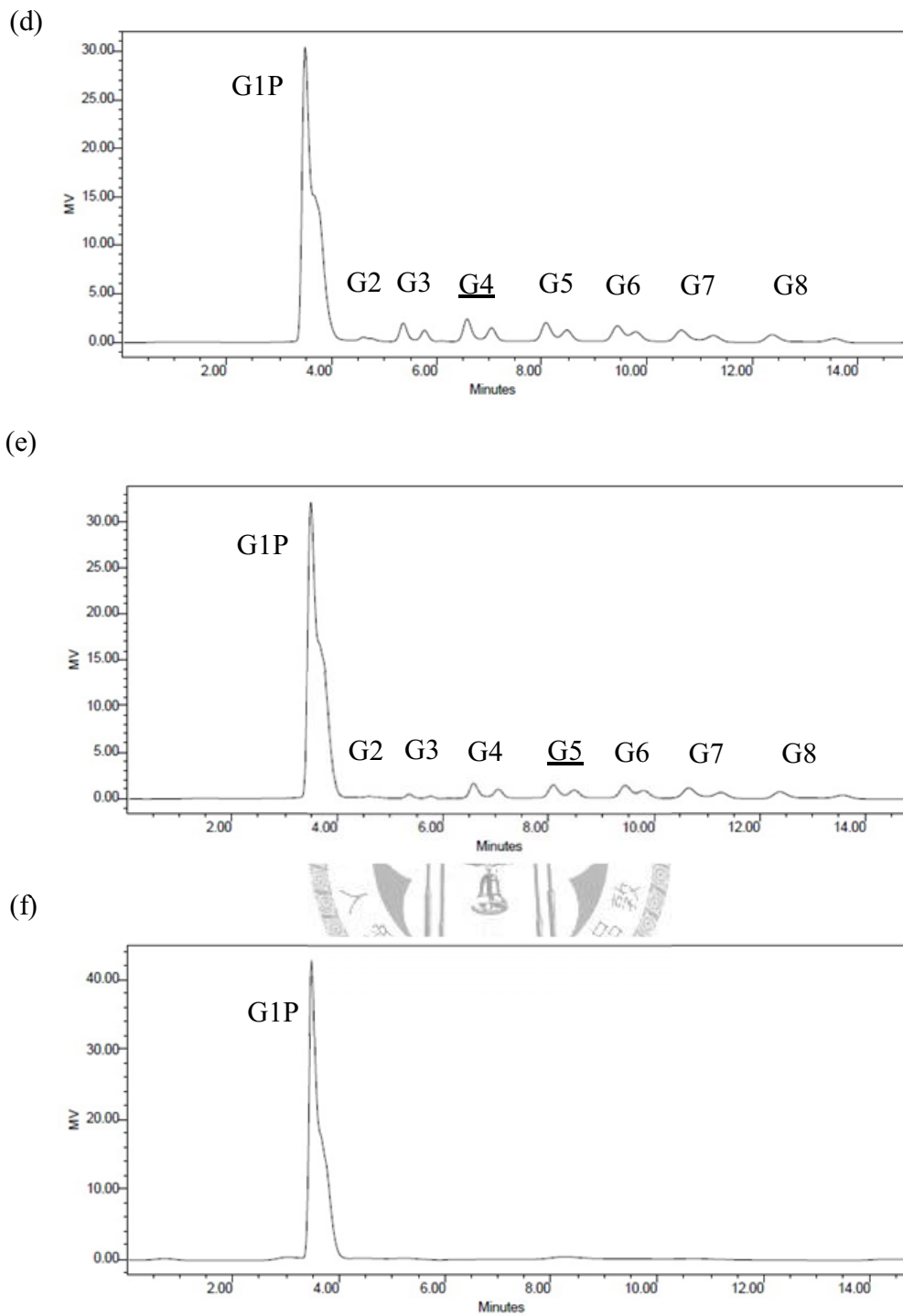


圖 3.4 L-SP 利用不同長度之短鏈醣合成直鏈醣之圖譜

Fig. 3.4 The primer dependent activity of L-SP under various malto-oligosaccharides in different chain-length

使 3.5  $\mu\text{g}$  L-SP 及 30 mM Glc-1-P , 並分別外加 2.5  $\mu\text{g}$  glucose, maltose, 或 malto-oligosaccharides , 以 HPLC 測定寡糖含量。(a) 以 G1 作為引子 ; (b) 以 G2 作為引子 ; (c) 以 G3 作為引子 ; (d) 以 G4 作為引子 ; (e) 以 G5 作為引子 ; (f) 以澱粉作為引子。(G1P: glucose-1-P; G1: glucose; G2: maltose; G3: maltotriose; G4: maltotetrose; G5: maltopentose; G6: maltohexose; G7: maltoheptose; G8: maltooctose)

### 3.2.3 以 HPAEC-PAD 分析三相反應之產物

承接上節所得之結果，本節希望探討 L-SP 進行 PI 合成醣前體反應時，其葡聚醣合成情形，是否與外加醣引子合成反應一致。由於 RI detector 對於偵測產物靈敏度的限制，不易偵測到 PI 反應所產生的產物，因此將 L-SP 與 Glc-1-P 反應後，取不同時間點產物進行 HPAEC-PAD 分析，結果如圖 3.5 (a) 所示。

在慢速初始時期，其磷酸呈色及碘液呈色之吸光值皆趨近於零，此時能夠見到葡萄糖的累積。當麥芽糖生成之後，就進入快速延長時期，此時麥芽糖繼續累積，並且持續延長，生成麥芽三糖及麥芽四糖，醣鏈延長的速度亦較前一時期快速。麥芽四糖生成之後，接著進入穩定狀態時期。從產物分布情形來看，慢速初始時期的主要產物為葡萄糖，快速延長時期的主要產物為麥芽糖，穩定狀態時期的主要產物則為麥芽三糖。由此可知，L-SP 之不含醣引子合成醣前體的速率決定步驟為葡萄糖合成麥芽糖。

但此一結果與碘液呈色有些許出入，碘液大約在 6~12 個葡萄糖單位才能夠呈色，由於直鏈澱粉中，6 個葡萄糖單位會形成一個轉彎結構 (turn)，此一個轉彎能夠卡住一個碘分子，但通常需要兩個轉彎才能夠穩定碘分子呈色。若是產物只生成至麥芽四糖，應不會有呈色現象。而由 HPLC 的結果可以發現，以大於麥芽四醣的直鏈短醣作為引子，其延長反應的速度非常快，在 15 分鐘以內，可以迅速消耗大量的醣引子以及 Glc-1-P，因此推測在 PI 反應時，一但產生麥芽四醣，則會被快速延長成更長鏈，由於 PAD detector 亦有其靈敏度限制，若在 picomole 以下之產物則無法偵測，因此碘液呈色與 HPAEC 結果有所差異的原因，應該在於測定反應期間，大於四醣之直鏈短醣不會累積，會被迅速延長成更長鏈，而較長鏈之產物含量太少，導致儀器無法偵測，但主要產物以及合成趨勢仍能夠由 HPAEC 之結果來作判斷。

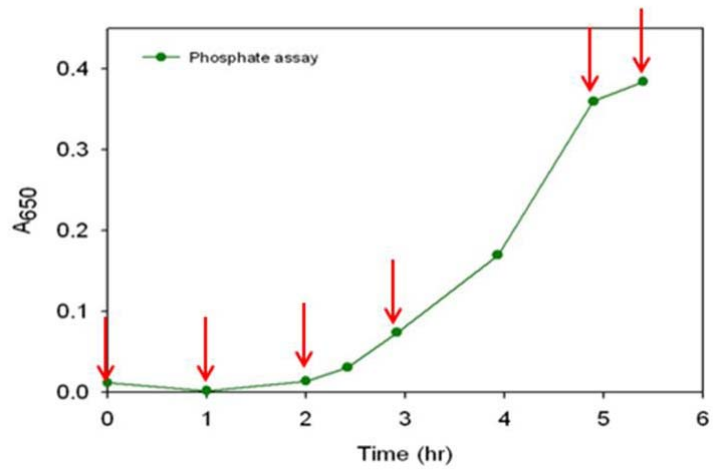
而反應初始時，最先出現為葡萄糖的累積，而後葡萄糖慢慢開始消耗，接著出現麥芽糖，麥芽糖累積至一定程度後，才進行下一步的延長，並且在醣鏈延長的同時，所偵測到的葡萄糖含量持續變少，如圖 3.5 (b)。這種現象有兩種可能：(1) L-SP 先將 Glc-1-P 裂解成為 Glc，作為初始產物之後，再繼續延長醣

鏈；(2) Glc 僅為 L-SP 合成醣鏈中的中間產物。由前人實驗可知，L-SP 較喜歡利用的基質為 Glc-1-P，若是將 Glc-1-P 部分取代為葡萄糖，則其合成活性會較相同濃度之 Glc-1-P 來得低 (王宏祥, 2007)，因此此現象並非 L-SP 先將 Glc-1-P 裂解為葡萄糖做為反應基質。而反應開始時，從兩個 Glc-1-P 合成麥芽糖為速率決定步驟，其合成速度很慢，本實驗室所推測的機制中，兩個 Glc-1-P 會與 L-SP 上的 PLP 以及 L78 結合，而 PLP 上的 Glc-1-P 會先裂解成在 C1 (1 號碳) 上帶有正電之碳陽離子，如圖 1.9 (b)。也許在慢速初始時期時，正在形成碳陽離子，還未形成麥芽糖，在酵素經處理失活後釋放出來，取得環境中的 OH 基而形成葡萄糖分子，因此進行 HPAEC 分析時才會出現單獨存在的葡萄糖高峰。而在快速延長時期，其醣鏈延長速度較快，因此未反應之碳陽離子較少，使得偵測到的葡萄糖含量也變少。因此葡萄糖的含量變化也許不是作為反應物被消耗，而是中間產物的含量，也間接表達了反應的速度。

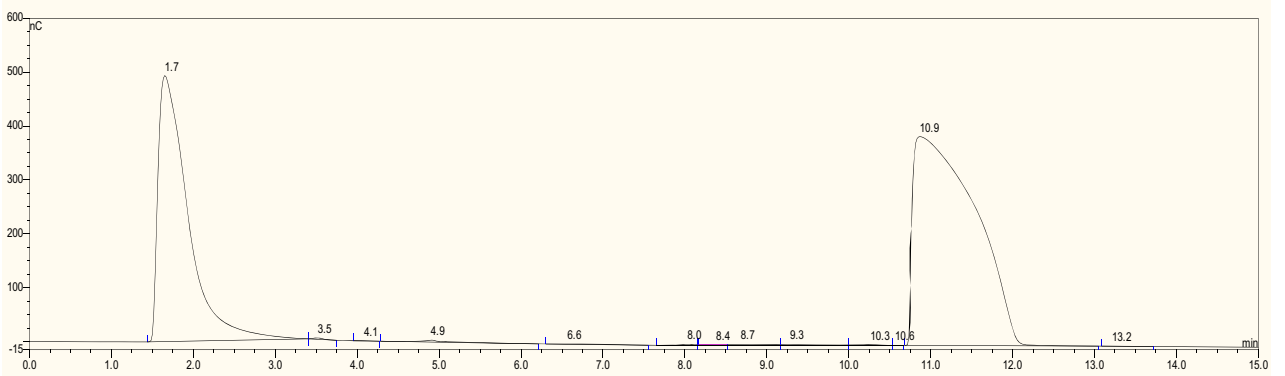


(a)

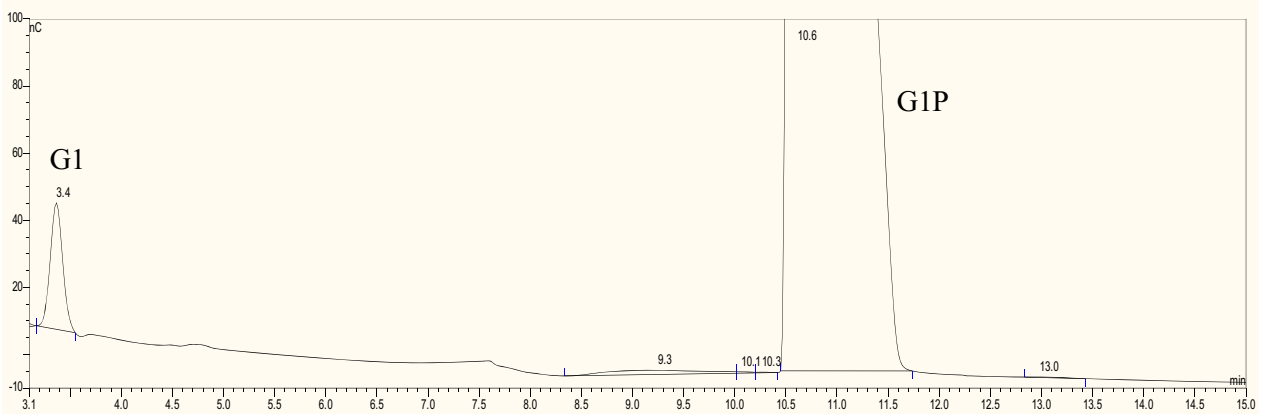
Colum: CarboPac PA-100  
Elute: 100 mM NaOH/ 500 mM NaOAc in 100 mM NaOH gradient  
Flow rate: 0.25 ml/ min  
Inj. Volume: 20  $\mu$ l



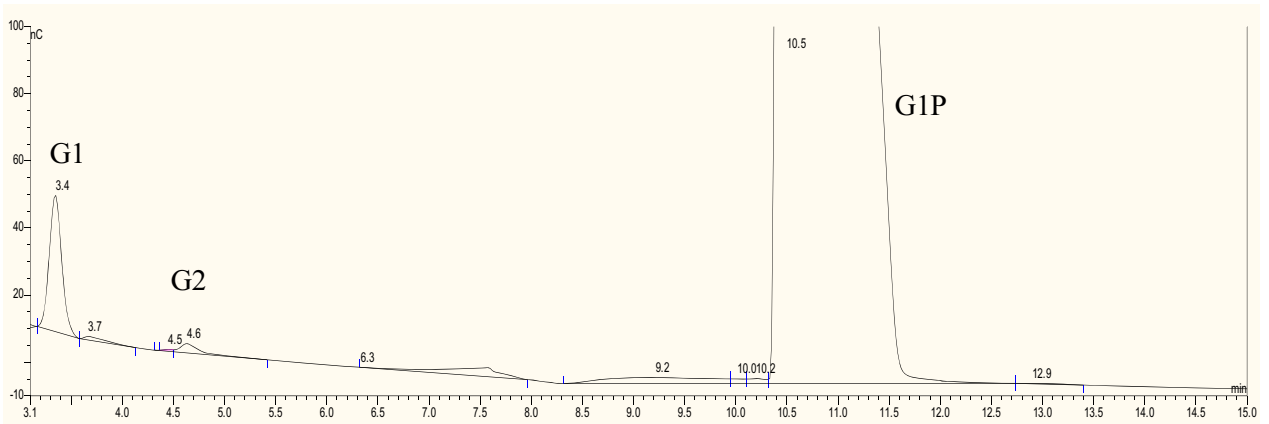
Tris + G1P



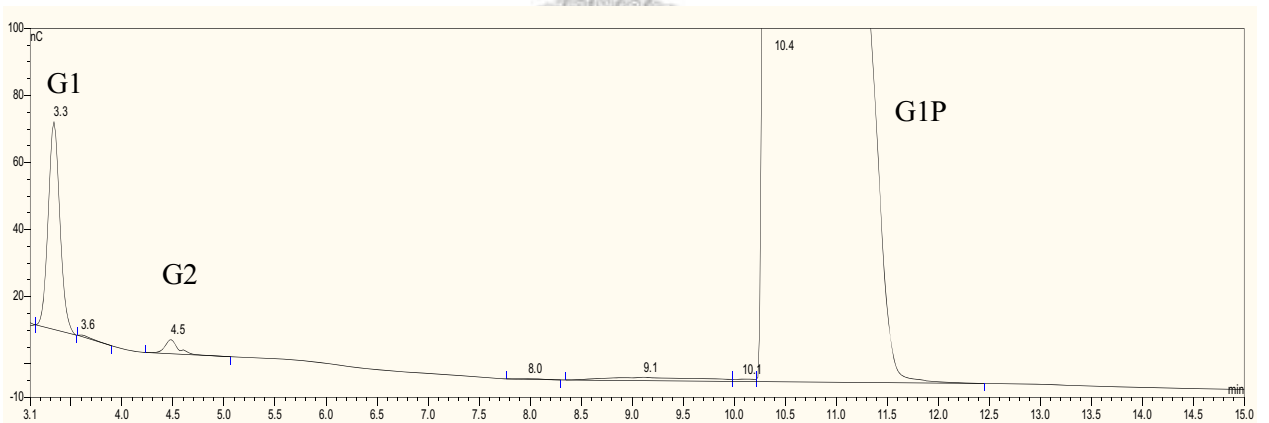
0 hr



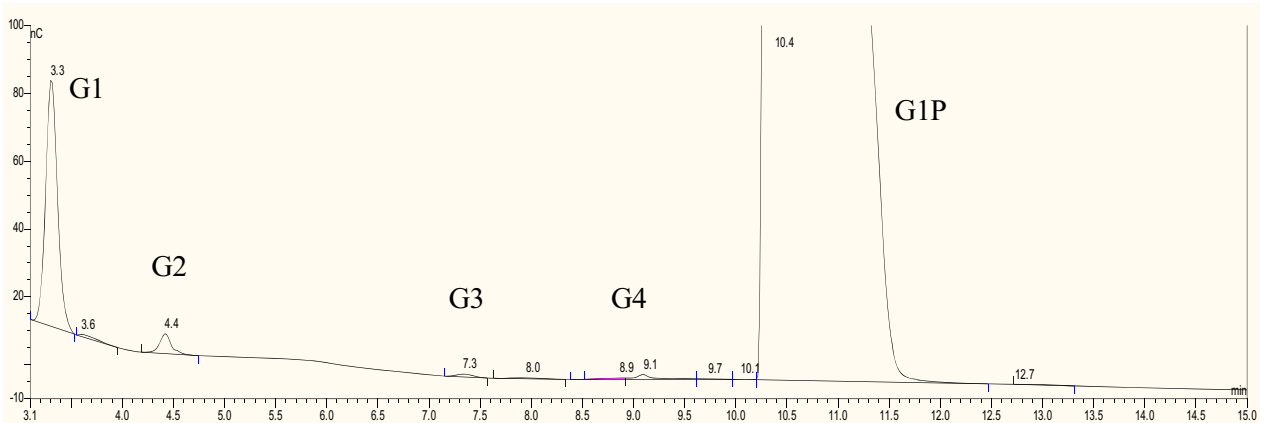
1 hr



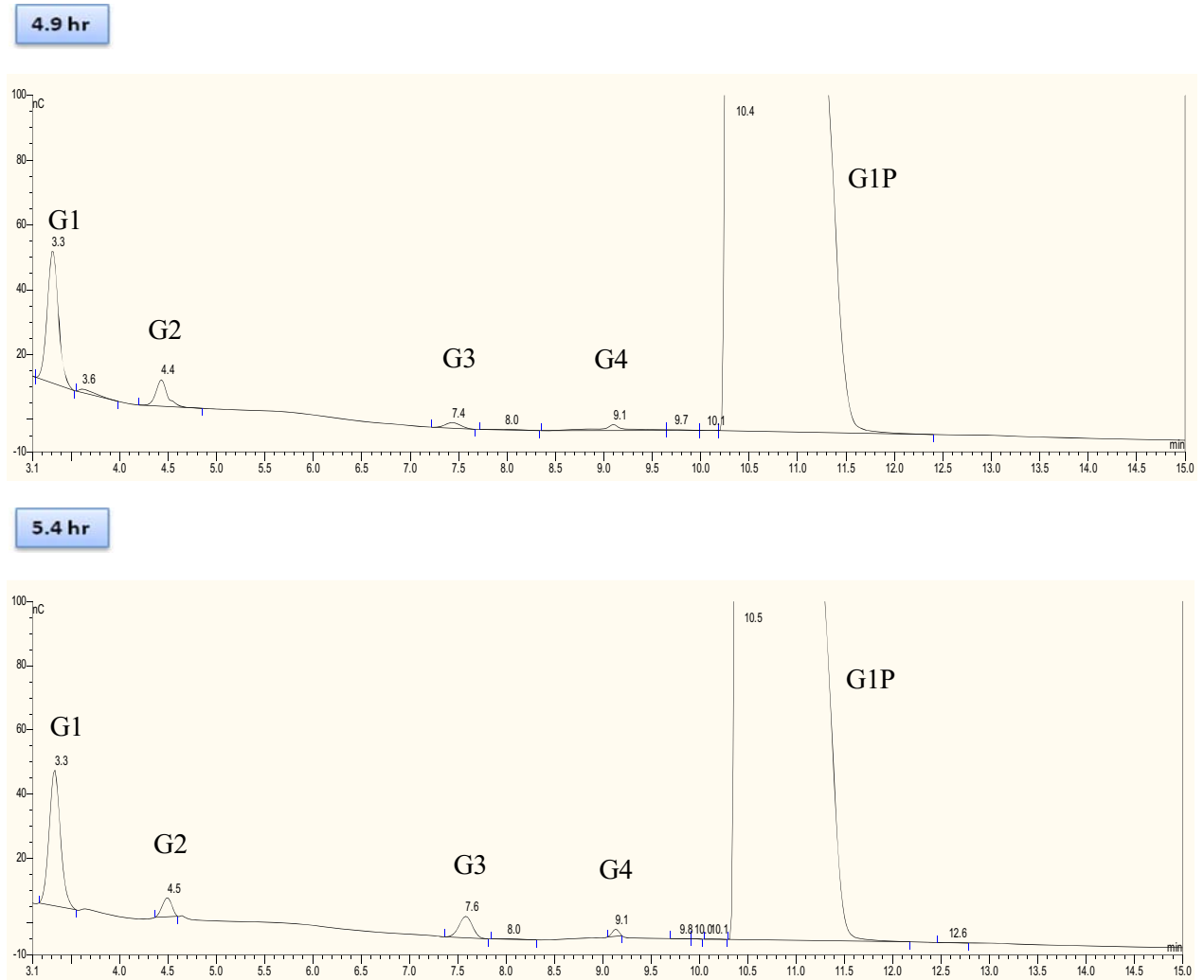
2 hr



3 hr







(b)

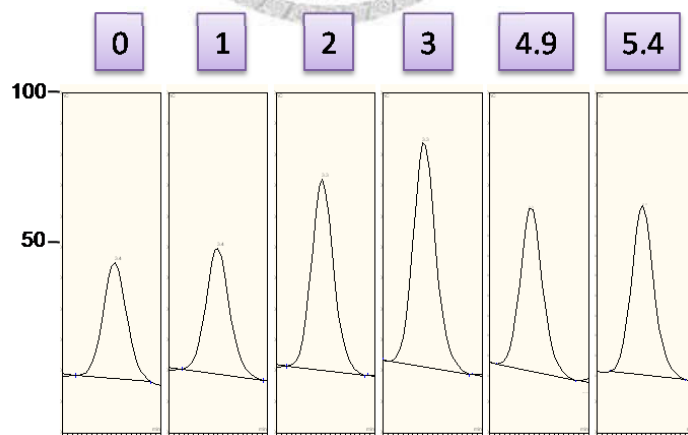


圖 3.5 以 HPAEC-PAD 分析 L-SP 三相反應之寡糖組成圖譜

Fig. 3.5 Analysis of the malto-oligosaccharide components by HPAEC-PAD during the triple phase catalysis of L-SP

L-SP 與 15 mM Glc-1-P 進行三相反應後，取不同時間點之產物進行 HPAEC 分析。0 h 的葡萄糖高峰為樣本在高溫煮沸使酵素失活所造成的 Glc-1-P 少量裂解，在之後的圖譜中使用同樣時間煮沸，亦需要扣除 Glc-1-P 之裂解。(a) 不同時間點之產物；(b) 比較葡萄糖高峰之消長。

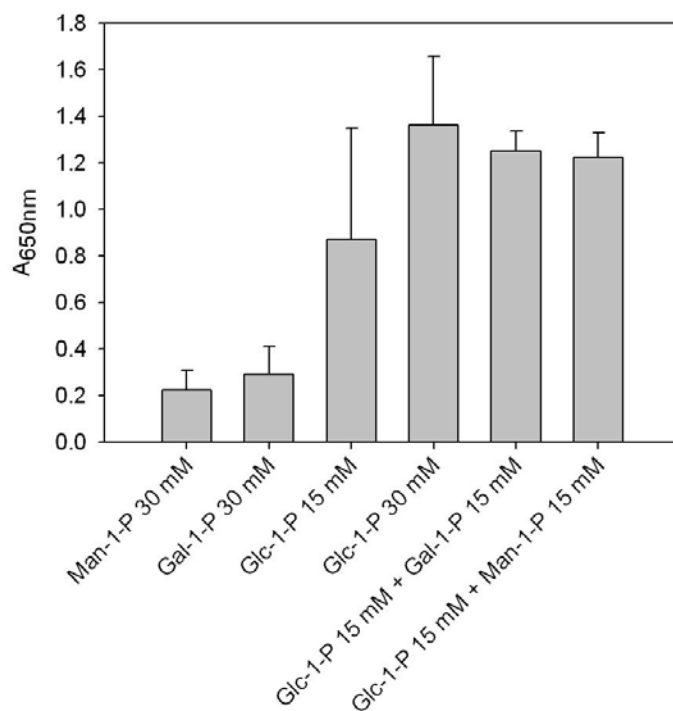
### 3.2.4 Glc-1-P 的異構物對 L-SP 不需醣引子合成直鏈醣活性之影響

由於 L-SP 是以 Glc-1-P 作為基質進行醣鏈合成反應，並且在上節證實了其會將兩個 Glc-1-P 合成為麥芽糖 (maltose)，因此本節將使用基質的異構物 (epimer)，來探討六碳醣上取代基之差異，對於 L-SP PI 合成直鏈醣活性之影響。

王宏祥 (2006) 外加 Glc-1-P 之 epimer (Gal-1-P 和 Man-1-P) 以及 analog (ADPGlc 和 G1,6BP) 進行 PI 活性實驗，發現在 1 號碳 (C1) 上修飾的 ADPGlc，其活性完全被抑制，而其它分子各有不同程度的抑制，影響最大為 Man-1-P (C2 epimer)，而影響最小為 Gal-1-P (C4 epimer)。故認為 C2 位置上的 OH 基團在反應中較為重要，而若將 C1 上的磷酸根取代為 ADP，則可能因為基團太大，而無法正常進行合成反應。因此本論文選用了 Glc-1-P 的 C2 及 C4 epimer 進行實驗，發現 L-SP 之 PI 活性確實受到 C4 位置影響較小 (圖 3.6 (a))，而 15 mM Glc-1-P 外加 Gal-1-P 及 Man-1-P 其磷酸根的釋放量會略大於單獨使用 15 mM Glc-1-P 進行反應，但會小於使用 30 mM Glc-1-P 進行反應。因此選用以 Glc-1-P 外加 Gal-1-P 之條件進行三相反應實驗，同時測定磷酸釋放及直鏈醣生成，可以看到外加 Gal-1-P 亦能夠生成直鏈醣，較單獨使用 Glc-1-P 之產物生成量為大，並且仍具有三相反應的趨勢，但若是只使用 Gal-1-P 作為基質則無法進行反應，如圖 3.7 (a), (b)。

上述結果顯示在酵素反應機制中，一定要有一個基質為 Glc-1-P，但另一個基質能夠為差別不大之異構物，表示其六碳醣之種類不完全影響 L-SP 對於基質的辨認。因此另外選用不含磷酸根的 Galactose (Gal) 作為基質進行反應，結果如圖 3.6 (b)，可以發現若是單獨利用 Gal 則無法生成產物，而 15 mM Glc-1-P 外加 15 mM Gal，其產物生成則較只含 15 mM Glc-1-P 更低。表示若反應物為單醣時，L-SP 較傾向於利用帶有磷酸根之基質，有可能是利用單醣上所帶的磷酸根來加強分子與 L-SP 之間的結合能力。

(a)



(b)

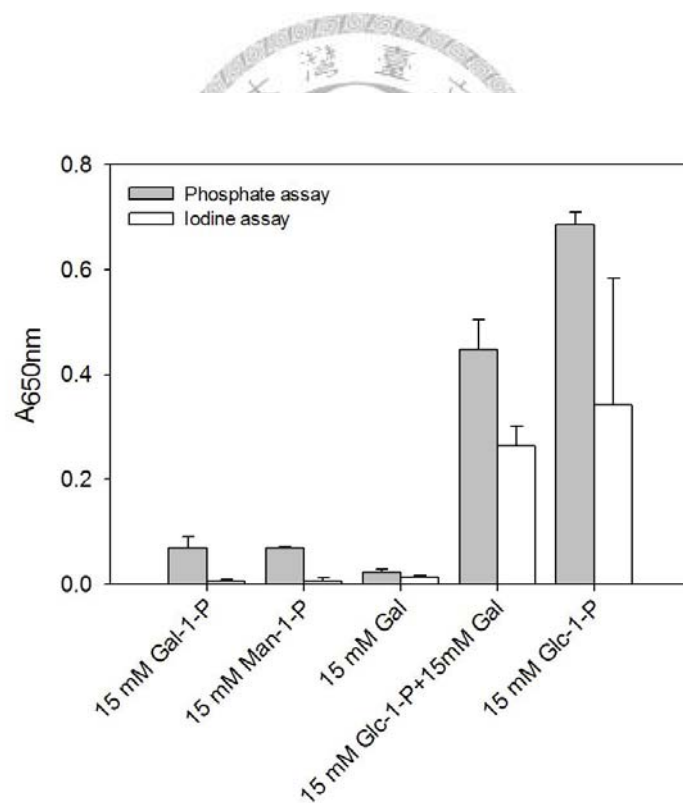
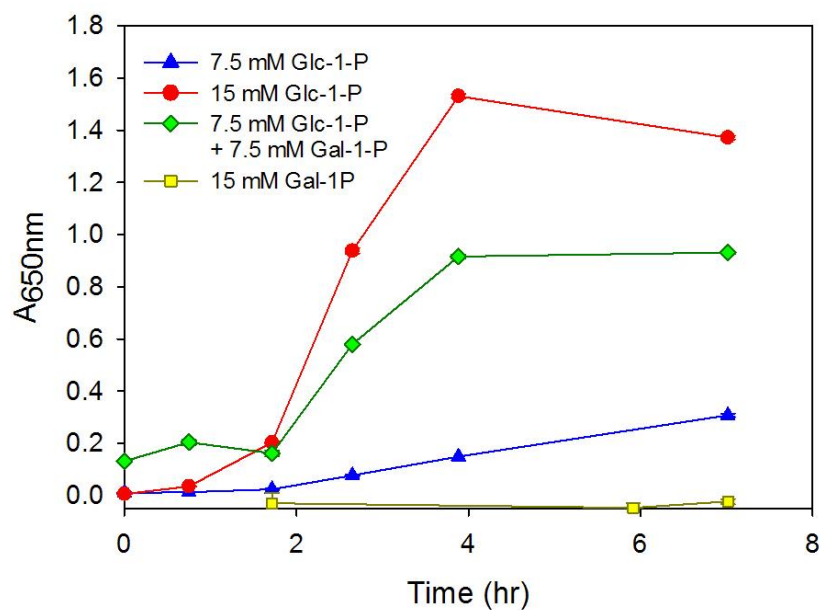


圖 3.6 L-SP 在不含醣引子情況下, 基質與其異構物合成方向反應之比較。

Fig. 3.6 Comparison of the PI activity on L-SP by using its substrate or epimers of Glc-1-P

(a) 使用基質 Glc-1-P 的 C2 異構物 Mannose-1-Phosphate (Man-1-P) 以及 C4 異構物 Galactose-1-Phosphate (Gal-1-P); (b) 使用 Gal 與 L-SP 進行不含醣引子合成直鏈醣反應, 反應 12 h 後測定其磷酸釋放量及直鏈醣生成。

(a)



(b)

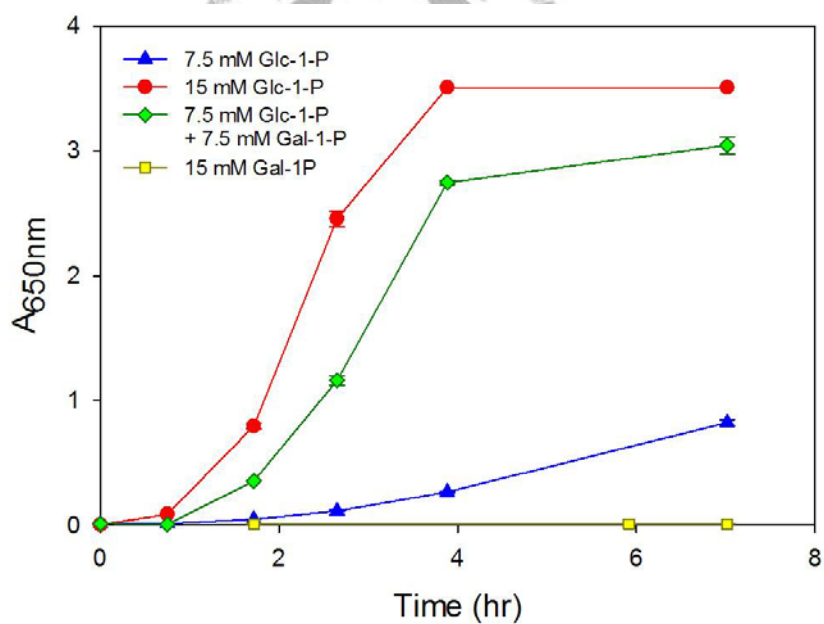


圖 3.7 L-SP 利用外加 Gal-1-P 進行不含糖引子合成直鏈糖活性之三相反應圖

Fig. 3.7 The triple phase catalytic behavior of L-SP using Gal-1-P at various concentrations

外加 Gal-1-P 進行三相反應實驗，並與相同濃度 Glc-1-P 比較。(a) 以磷酸呈色測定三相反應；(b) 以碘液呈色測定三相反應。

### 3.3 L-SP 與 H-SP 生化特性之異同

L-SP 及 H-SP 這兩種存在於植物體內類型的澱粉磷解酶，不僅在結構上以及酵素動力學特性上各異，其表現模式及細胞內位置也不同 (Steup, 1990)。相較於 H-SP，L-SP 在序列中所插入的 78 個胺基酸片段，可能造成了兩者對於基質親和力之差異。本節將比較兩者在相同基質環境下，酵素活性的高低，藉以進一步探討此兩種同功酶之作用機制。

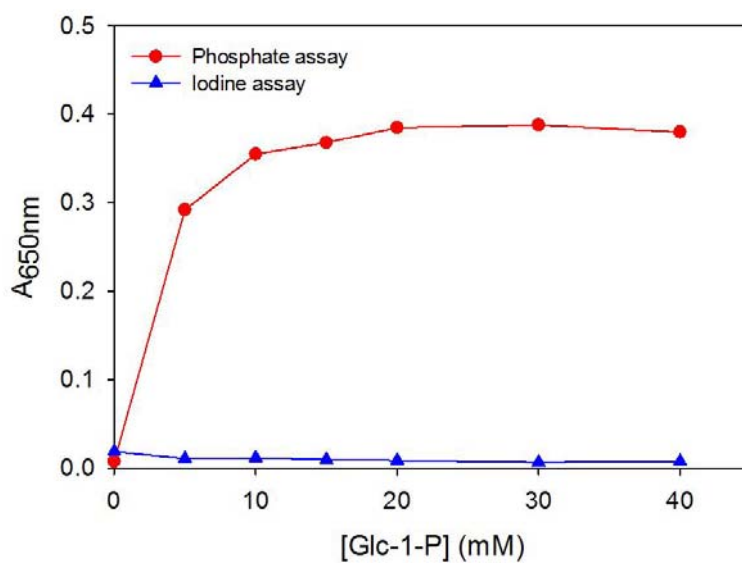
#### 3.3.1 H-SP 不需醣引子合成直鏈醣活性

已知 L-SP 具有 PI 活性，因此想要測定其同功酶 H-SP 是否具有此種活性。使用兩者共同會利用的基質 Glc-1-P 進行反應，發現反應 24 h 的 H-SP，並不會合成直鏈醣，但卻會有磷酸釋放的情形，如圖 3.8 (a)。進行三相反應實驗，可以看到在 11 h 內，H-SP 的磷酸呈色以及碘液呈色吸光值都趨近於 0，表示其不具有 PI 活性，如圖 3.9 (a), (b)。

單獨使用 Glc-1-P 作為反應基質時，H-SP 具有釋放磷酸能力，卻不具有合成能力，可能表示其具有與 L-SP 相似功能的酵素活性區域，能夠與 Glc-1-P 結合並釋放磷酸，但其不具有另一個與 Glc-1-P 結合的區域，因此無法將兩個 Glc-1-P 合成為雙醣。由序列比對的結果可以知道，L-SP 與 H-SP 最大的差別僅僅在於 L-SP 在序列中間插入的 L78，兩者具有同樣的活性區域以及 PLP 結合位置 (圖 1.1)。因此由 H-SP 具有釋放磷酸能力，不具有直鏈醣合成活性，證實了 L-SP 是以其上的 PLP 與 Glc-1-P 結合，與磷酸根裂解，形成帶有碳陽離子的化合物後，再與和 L78 結合的另一個 Glc-1-P 合成雙醣，並且繼續延長反應。

先前實驗已知，L-SP 無法在單獨與 Gal-1-P 反應時合成直鏈醣，但 Glc-1-P 外加 Gal-1-P 則可以進行合成反應。若將只具有 PLP 活性區的 H-SP 單獨與 Glc-1-P 的異構物 Gal-1-P 反應，亦無法偵測到磷酸的釋放，如圖 3.8 (b)，表示 H-SP 只會與 Glc-1-P 有交互作用。綜合以上結果得知，L-SP 的 PLP 活性區域對於基質的專一性較高，只能與 Glc-1-P 結合，但 L78 則可以接受不同的基質。

(a)



(b)

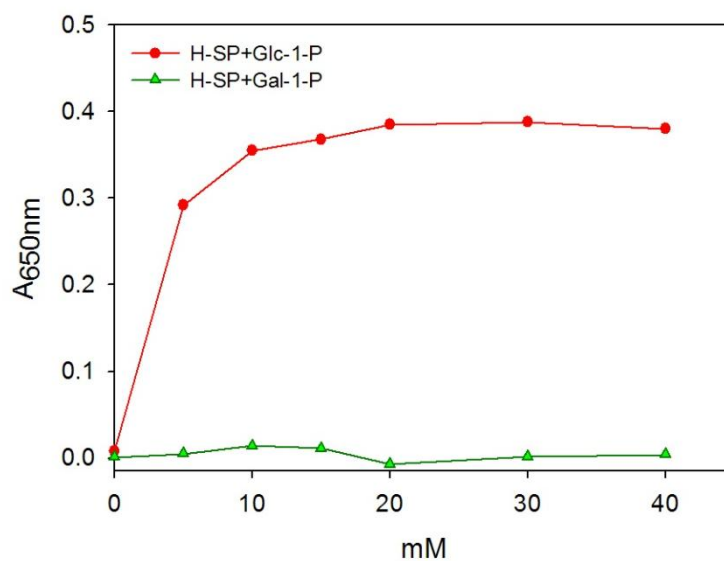
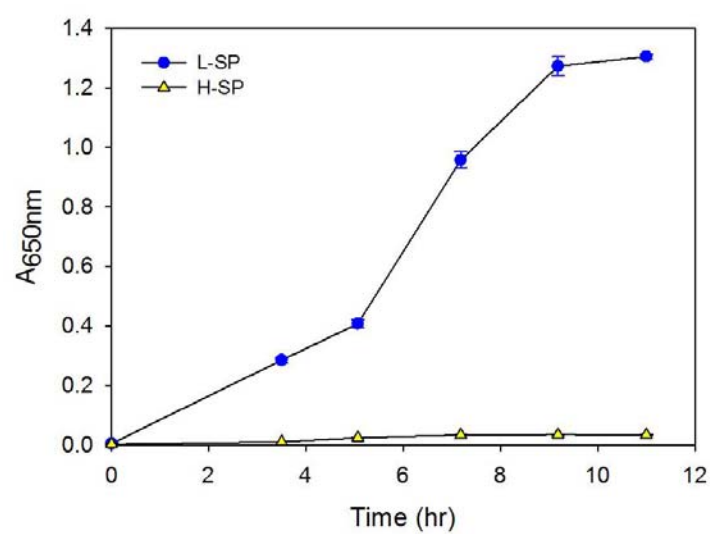


圖 3.8 H-SP 不含醣引子合成活性之酵素動力圖

Fig. 3.8 The kinetical analysis of the PI activity on H-SP

(a) 1  $\mu\text{g}$  H-SP 與不同濃度 Glc-1-P 反應 24 h 後，測定其磷酸釋放量及直鏈醣生成量，以呈色吸光值表示。(b) 1  $\mu\text{g}$  H-SP 分別與不同濃度 Glc-1-P 及 Gal-1-P 反應 24 h，磷酸釋放量之比較。

(a)



(b)

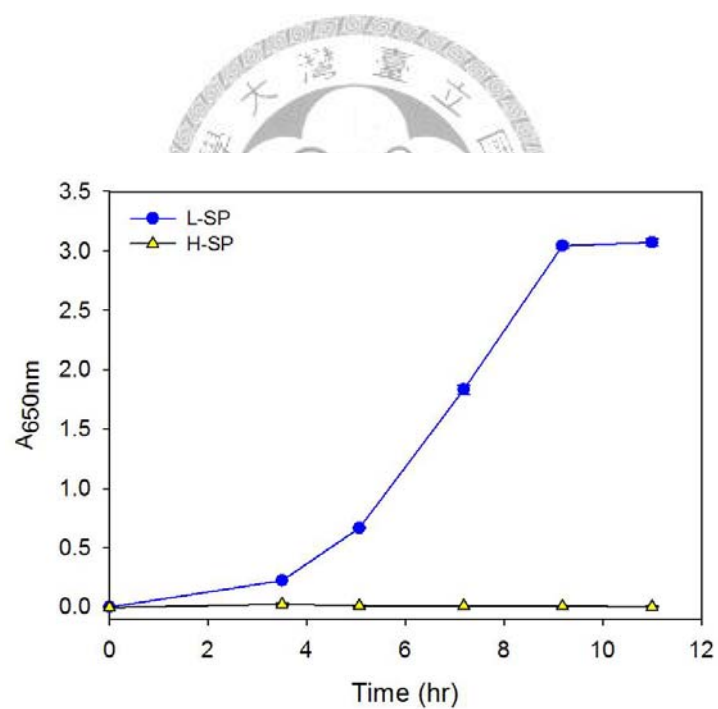


圖 3.9 H-SP 不含醣引子合成活性之三相反應圖

Fig. 3.9 The triple phase catalytic activity of H-SP

使用 1.25  $\mu\text{g}$  H-SP 或者是 L-SP 與 15 mM Glc-1-P 進行反應。(a) H-SP 與 L-SP 磷酸釋放量 (磷酸呈色) 之比較；(b) H-SP 與 L-SP 直鏈醣生成量 (碘液呈色) 之比較。

## 第四章 總結

本論文以探討 L-SP 之 PI 活性為主軸，依循前人對於 PI 活性之酵素動力學以及三相催化反應之磷酸及碘液呈色結果，進一步使用 HPLC 以及 HPAEC 測定催化反應之直鏈醣生成，並且利用基質之異構物，以及 L-SP 之同功酶進行比較。

使用 HPAEC 進行不含醣引子之三相催化反應分析，可以發現在慢速初始時期，僅有葡萄糖的累積，在形成麥芽糖之後，就進入快速延長時期，此時在磷酸呈色結果可以看到磷酸大量釋放，而合成反應速率也十分快速，在此時期可以看到麥芽三糖的生成，麥芽三糖繼續累積，生成麥芽四糖之後進入穩定狀態。此結果與使用麥芽寡糖做為醣引子所得結論相符，若使用麥芽寡糖做為醣引子進行合成反應，經 HPLC 分析可以發現 DP 大於 3 以上的麥芽寡糖皆可以看到產物生成，表示 L-SP 在出現麥芽三糖之後，合成反應速率增加。而慢速初始時期的產物以葡萄糖為主，當兩個 Glc-1-P 合成麥芽糖時，反應則進入快速延長時期，此時期之產物以麥芽糖為主，之後進入穩定狀態時期，開始之主要產物為麥芽三糖。

而進行 Glc-1-P 之異構物實驗結果發現，L-SP 一定要在有 Glc-1-P 存在的情況下，才會進行合成反應，但若外加 Gal-1-P，其磷酸釋放以及直鏈醣合成量會較未外加 Gal-1-P 多。而若是將 Gal-1-P 以不含磷酸根的 Gal 替代，則合成反應不會進行。表示 L-SP 的兩個 Glc-1-P 結合區中，有一個位置對於 Glc-1-P 的辨認較為嚴謹，另一個位置對於基質的選擇性較低。此外，我們發現 L-SP 之同功酶 H-SP 不具有 PI 活性，但若是加入 Glc-1-P 其仍會有釋放磷酸的情形。而 L-SP 與 H-SP 之差異主要在 L-SP 序列中間所插入的 L78，其序列上的活性區以及 PLP 結合位置是完全相同的，因此我們推測，L-SP 上的 PLP 結合區所負責的功能，應該為將 Glc-1-P 裂解成帶正電之碳陽離子，而後攻擊與 L78 結合的 Glc-1-P 之還原端，合成雙醣。而在 HPAEC 分析中所看到慢速初始時期生成的葡萄糖產物，則應為 Glc-1-P 剛裂解之碳陽離子，為 PI 活性之中間產物，由於合成速度很慢，因此能



夠測得，此結果也證明了由兩個 Glc-1-P 合成雙醣之反應，為 PI 活性之速率決定步驟。

由以上實驗結果，我們可以獲得以下幾點結論：

- 一、L-SP 的確具有合成醣前體之活性。
- 二、L-SP 的 PI 活性之速率決定步驟為由兩個 Glc-1-P 合成雙醣。
- 三、Glc-1-P 合成雙醣之後即進入快速延長時期，並且在麥芽三糖累積之後進入穩定狀態時期。
- 四、L-SP 的 PLP 結合區在合成反應進行時，會先將與其結合的 Glc-1-P 裂解形成碳陽離子後，再攻擊 L78 上結合的 Glc-1-P 之非還原端，形成  $\alpha$ -1,4 鍵結。
- 五、L-SP 上的兩個 Glc-1-P 結合區，其中一個對於 Glc-1-P 的專一性較高，應該為位於活性區之 PLP 結合位置；另一個區域則可以接受不同的基質，但磷酸根可以加強基質與酵素間的結合能力，應該為 L78 上的結合區。
- 六、H-SP 不具有 PI 活性，但其具有與 L-SP 相同之 PLP 結合位置以及活性區，表示 H-SP 應該也是使用 PLP 與 Glc-1-P 結合，但由於缺乏 L78，故無法進行不含醣引子合成醣前體之反應，也進一步證實 PI 活性為 L-SP 特有之催化機制。

## 參考文獻

- Albrecht T, Greve B, Pusch K, Kossmann J, Buchner P, Wobus U, Steup M** (1998) Homodimers and heterodimers of Pho1-type phosphorylase isoforms in *Solanum tuberosum* L. as revealed by sequence-specific antibodies. *Eur J Biochemistry* **251**: 343-352
- Axel T, Janneke, H. M. H., Mark, S., Anja, B., Yves, G., Eva, M. F., and Peter, G.** (2002) Starch Synthesis in Potato Tubers Is Regulated by Post-Translational Redox Modification of ADP-Glucose phosphorylase: A Novel Regulatory Mechanism Linking Starch Synthesis to the Sucrose Supply. *Plant Cell* **14**: 2191-2213
- Ball S, Guan HP, James M, Myers A, Keeling P, Mouille G, Buleon A, Colonna P, Preiss J** (1996) From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**: 349-352
- Ball SG, Morell MK** (2003) From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 207-233
- Colleoni C, Dauvillee D, Mouille G, Morell M, Samuel M, Slomiany MC, Lienard L, Wattebled F, d'Hulst C, Ball S** (1999) Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* alpha-1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol* **120**: 1005-1013
- Cori CF, Cori GT** (1936) Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new phosphate ester. *Proc Soc Exp Biol Med* **34**: 702-705
- Critchley JH, Zeeman SC, Takaha T, Smith AM, Smith SM** (2001) A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant J* **26**: 89-100
- da Mota RV CB, Nascimento J, Purgatto E, Rosseto M, Lajolo FM** (2002) Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. *Planta* **216**: 324-333
- Dauvillee D, Chochois V, Steup M, Haebel S, Eckermann N, Ritte G, Ral JP, Colleoni C, Hicks G, Wattebled F, Deschamps P, d'Hulst C, Lienard L, Cournac L, Putaux JL, Dupeyre D, Ball SG** (2006) Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **48**: 274-285
- Ewart MH, Siminovitch D, Briggs DR** (1954) Studies on the Chemistry of the Living Bark of the Black Locust in Relation to its Frost Hardiness. VIII. Possible Enzymatic Processes Involved in Starch-Sucrose Interconversions. *Plant Physiol* **29**: 407-413

- Fettke J, Eckermann N, Poeste S, Pauly M, Steup M** (2004) The glycan substrate of the cytosolic (Pho 2) phosphorylase isozyme from *Pisum sativum* L.: identification, linkage analysis and subcellular localization. *Plant J* **39**: 933-946
- Fettke J, Eckermann N, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M** (2005) Identification, subcellular localization and biochemical characterization of water-soluble heteroglycans (SHG) in leaves of *Arabidopsis thaliana* L.: distinct SHG reside in the cytosol and in the apoplast. *Plant J* **43**: 568-585
- Fettke J, Nunes-Nesi A, Alpers J, Szkop M, Fernie AR, Steup M** (2008) Alterations in cytosolic glucose-phosphate metabolism affect structural features and biochemical properties of starch-related heteroglycans. *Plant Physiol* **148**: 1614-1629
- Fettke J, Poeste S, Eckermann N, Tiessen A, Pauly M, Geigenberger P, Steup M** (2005) Analysis of cytosolic heteroglycans from leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants that under- or overexpress the Pho 2 phosphorylase isozyme. *Plant Cell Physiol* **46**: 1987-2004
- Fukui T** (1983) Plant phosphorylase: structure and function. *In* T Akazawa, T Asahi, He Imaseki, eds, *The New Frontiers in Plant Biochemistry*, Ed Japan Scientific Societies Press, Tokyo: 71-82
- Fukui T NK, Tagaya M, and Nakayama H** (1987) Phosphorylase isozymes of higher plants. *in* *Biochemistry of Vitamin B6* (Korpela T., and Christen P., eds) Birkhauser Verlag, Boston: 267-276
- Gerbrandy SJ, Shankar V, Shivaram KN, Stegemann H** (1975) Conversion of Potato Phosphorylase Isoenzymes. *Phytochemistry* **14**: 2331-2333
- Gold AM, Johnson RM, Sanchez GR** (1971) Kinetic mechanism of potato phosphorylase. *J Biol Chem* **246**: 3444-3450
- Hanes CS** (1940) The breakdown and synthesis of starch by an enzyme system from pea seeds. *Proc Roy Soc (London)* **128**: 421-450
- Hanes CS** (1940) The reversible formation of starch from glucose-1-phosphate catalysed by potato phosphorylase. *Proc Roy Soc (London)* **129**: 174-208
- Hikaru S, Kensuke, S., Takashi, T., Aiko, N, Mikako, T., Seon-Kap, H., Thomas, W. O., Nanae, K., Naoko, F., Mayumi, Y., Yuko, H., Aya, S., Yoshinori, U., Takashi, O., and Yasunori, N.** (2008) Mutation of the Plastidial  $\alpha$ -Glucan Phosphorylase Gene in Rice Affects the Synthesis and Structure of Starch in the Endosperm. *Plant Cell* **20**: 1833-1849
- Joerg F, Nora, E., Simon, P., Markus, P., and Martin, S.** (2004) The glycan substrate of the cytosolic (Pho 2) phosphorylase isozyme from *Pisum sativum* L.: identification, linkage analysis and subcellular localization. *Plant J* **39**: 933-946
- Johnson LN** (1992) Glycogen-Phosphorylase - Control by Phosphorylation and Allosteric Effectors. *Faseb J* **6**: 2274-2282

- Kossmann J, Visser RG, Muller-Rober B, Willmitzer L, Sonnewald U** (1991) Cloning and expression analysis of a potato cDNA that encodes branching enzyme: evidence for co-expression of starch biosynthetic genes. *Mol Gen Genet* **230**: 39-44
- Lao NT, Schoneveld O, Mould RM, Hibberd JM, Gray JC, Kavanagh TA** (1999) An Arabidopsis gene encoding a chloroplast-targeted beta-amylase. *Plant J* **20**: 519-527
- Liu TT, Shannon JC** (1981) A Nonaqueous Procedure for Isolating Starch Granules with Associated Metabolites from Maize (*Zea mays* L.) Endosperm. *Plant Physiol* **67**: 518-524
- Mori H, Tanizawa K, Fukui T** (1991) Potato tuber type H phosphorylase isozyme. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a full-length cDNA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**: 18446-18453
- Mori H, Tanizawa K, Fukui T** (1993) A Chimeric Alpha-Glucan Phosphorylase of Plant Type-L and Type-H Isozymes - Functional-Role of 78-Residue Insertion in Type-L Isozyme. *J Biol Chem* **268**: 5574-5581
- Mouille G, Maddelein ML, Libessart N, Talaga P, Decq A, Delrue B, Ball S** (1996) Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *Plant Cell* **8**: 1353-1366
- Nelson O, Pan D** (1995) Starch Synthesis in Maize Endosperms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 475-496
- Ohdan T, Francisco PB, Jr., Sawada T, Hirose T, Terao T, Satoh H, Nakamura Y** (2005) Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *J Exp Bot* **56**: 3229-3244
- Okita TW, Greenberg E, Kuhn DN, Preiss J** (1979) Subcellular-Localization of the Starch Degradative and Biosynthetic-Enzymes of Spinach Leaves. *Plant Physiol* **64**: 187-192
- Preiss J, Okita TW, Greenberg E** (1980) Characterization of the Spinach Leaf Phosphorylases. *Plant Physiol* **66**: 864-869
- Ritte G, Raschke, K.** (2003) Metabolite export of isolated guard cell chloroplasts of *Vicia faba*. *New Phytol* **159**: 195-202
- Scheidig A, Frohlich A, Schulze S, Lloyd JR, Kossmann J** (2002) Downregulation of a chloroplast-targeted beta-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J* **30**: 581-591
- Schupp N, Ziegler P** (2004) The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat. *Plant and Cell Physiol* **45**: 1471-1484
- Servaites JC, Geiger DR** (2002) Kinetic characteristics of chloroplast glucose transport. *J Exp Bot* **53**: 1581-1591
- Smith AM** (1999) Making starch. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 223-229
- Smith AM, Denyer K, Martin C** (1997) The synthesis of the starch granule. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 65-87
- Smith AM, Zeeman SC, Smith SM** (2005) Starch degradation. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 73-98

- Smith AM, Zeeman SC, Thorneycroft D, Smith SM** (2003) Starch mobilization in leaves. *J Exp Bot* **54**: 577-583
- Stensballe A, Hald S, Bauw G, Blennow A, Welinder KG** (2008) The amyloplast proteome of potato tuber. *Febs J* **275**: 1723-1741
- Steup M** (1988) Starch degradation. In the "The biochemistry of plants" Academia Press. New York **14**: 255-296
- Steup M, Latzko E** (1979) Intracellular-Localization of Phosphorylases in Spinach and Pea Leaves. *Planta* **145**: 69-75
- Tetlow IJ, Morell MK, Emes MJ** (2004) Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* **55**: 2131-2145
- Tsai CY, Nelson OE** (1968) Phosphorylases I and II of Maize Endosperm. *Plant Physiol* **43**: 103-112
- Weise SE, Weber AP, Sharkey TD** (2004) Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* **218**: 474-482
- Wirtz W, Stitt M, Heldt HW** (1980) Enzymic Determination of Metabolites in the Subcellular Compartments of Spinach Protoplasts. *Plant Physiol* **66**: 187-193
- Yan L, Jon, M. S., Jian, Y., and Thomas, D. S.** (2006) The Role of Cytosolic  $\alpha$ -Glucan Phosphorylase in Maltose Metabolism and the Comparison of Amylomaltase in Arabidopsis and Escherichia coli. *Plant Physiol* **142**: 878-889
- Yang Y, Steup M** (1990) Polysaccharide Fraction from Higher Plants which Strongly Interacts with the Cytosolic Phosphorylase Isozyme : I. Isolation and Characterization. *Plant Physiol* **94**: 960-969
- Yu Y, Mu, H. H., Wasserman, B. P., and Carman, G. M.** (2001) Identification of the Maize Amyloplast Stromal 112-kD Protein as a Plastidic Starch Phosphorylase and structure of starch in the endosperm. *Plant Physiol* **125**: 351-359
- Zeeman SC, Umemoto T, Lue WL, Au-Yeung P, Martin C, Smith AM, Chen J** (1998) A mutant of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen. *Plant Cell* **10**: 1699-1712
- 王宏祥** (2007) 甘藷塊根澱粉磷解酶不需醣引子活性之分子機制探討. 碩士論文 國立台灣大學 台北
- 王維德** (2006) L78 對 L 型澱粉磷解酶活性調控及催化機制之角色. 碩士論文 國立台灣大學 台北
- 吳其真** (1998) 甘藷澱粉磷解酶之生化及免疫學研究. 碩士論文 國立台灣大學 台北
- 陳翰民** (1997) 甘藷澱粉磷解酶構造與功能之研究. 博士論文 國立台灣大學 台北
- 曾光靖** (2005) 磷酸化修飾對甘藷塊根 L 型澱粉磷解酶之影響. 碩士論文 國立台灣大學 台北
- 楊光華** (2005) 甘藷塊根澱粉磷解酶激酶之純化與性質分析. 博士論文 國立臺灣大學 台北

# 問答錄

論文口試記錄

口試委員：林棋財老師、陳翰民老師、楊建志老師、張世宗老師、莊榮輝老師

指導教授：莊榮輝老師

時間：民國九十八年六月十八日

陳翰民老師：報告中你一直提到三相反應，什麼叫做三相反應，SP 的 mechanism 怎麼樣叫做三相？

林之儀：在 SP 以不同時間進行 PI 合成直鏈醣反應時，其直鏈醣生成以及磷酸釋放的情形呈現三個不同催化速率的時期，稱之為三相反應。

陳翰民老師：所以三相反應是實驗室自己定義的名詞而非酵素動力學的專有名詞？

林之儀：是的。

陳翰民老師：HPAEC 的全名是什麼？

林之儀：high performance anion exchange chromatography。

陳翰民老師：陰離子交換管柱對於沒有 charge 的物質是否有 interaction，橫軸代表的是什麼？

林之儀：這個儀器專門是針對分析醣類物質所設計的，能夠偵測經過金電極的醣類上的 OH 基進行氧化還原後所產生的電流，橫軸代表時間。

陳翰民老師：圖上的 G2 代表的是兩個 glucose 或者是 maltose-1-P？

林之儀：G2 代表 maltose，但由於樣本通過 HPAEC 之前有加熱失活，因此有可能導致 maltose-1-P 因為加熱而使磷酸根裂解。

陳翰民老師：因為前人的實驗結果中，證明產物應帶有 phosphate，而 HPAEC 的 data 可能與推測的 mechanism 不合，除非是真的因為加熱導致磷酸根裂解。

林之儀：是，謝謝老師。

陳翰民老師：我們看一下 HPLC，這上面的 G2 是否有帶磷酸根？

林之儀：也是不含磷酸根的 maltose。

陳翰民老師：是否有拿過 G2-1-P 或者是 G3-1-P 進行實驗嗎？

林之儀：沒有，現在已經停產了。

陳翰民老師：若是產物不含 phosphate，則最後所推測的 mechanism 就會有一些風險。

林之儀：是的，謝謝老師的建議。

陳翰民老師：使用 galactose-1-P 以及 mannose-1-P 做為 L-SP 的基質，它們應該會與 A site 或者是 B site 結合？

林之儀：由 H-SP 所得的結果可知，H-SP 可以釋放 glucose-1-P 的磷酸根，但卻無法釋放 galactose-1-P 的磷酸根，而 H-SP 與 L-SP 序列上同樣擁有 A site，因此我推論 glucose-1-P 的 epimer 應該是與 B site 結合。

陳翰民老師：使用 galactose 當做基質的實驗中，glucose-1-P 外加 galactose 的活性較只有 glucose-1-P 來得低，應該怎麼解釋？

林之儀：L78 對於基質的辨認除了磷酸根以外，六碳醣的部分可能也會有影響，因此外加 epimer 的活性都會比較低。我認為 galactose 也許可以與 L78 結合，但十分容易掉出來，沒有辦法進行下一步反應，但可能與基質進行競爭，也影響了反應速率。

陳翰民老師：若是我解釋這個圖，只看直鏈醣生成情形，我會認為這兩者沒有差別。

林之儀：是的，謝謝老師的建議。

陳翰民老師：那是否有做過 glucose-6-P？由於 glucose-6-P 的位向與 glucose-1-P 不同，是否 glucose-6-P 就會沒有辦法進行反應？

林之儀：我沒有做過，但王宏祥學長有做過，是沒有活性的。

陳翰民老師：應該要確定 galactose 或者是 glucose 這種沒有 charge 的，對於 L-SP 的

PI 活性是幫助或者抑制，這樣對 B site 的 mechanism 會比較清楚。

林之儀：王宏祥學長有做過外加 glucose，發現其會促進 PI 活性的反應。

楊健志老師：這個實驗很有趣，你們實驗室也做了很久了。有一種情形稱做 progress curve，橫軸為時間，一開始會快，後來會慢的，稱做 burst kinetics，但是我後來想不能用 burst phase 來形容，因為它是催化兩種不同的反應，因為它的 substrate 是不一樣的。但我們實驗室已經有乙烯的 triple response，與 triple reaction 類似，也許使用三階段動力學或者是其他更簡單易懂的名稱較好，像是論文上使用三相催化反應，但口頭上若講三相反應則不太適合，因為它較類似於 processive 的反應。

林之儀：是的，謝謝老師的建議。

楊健志老師：請問為什麼要做 epimer？

林之儀：我做這個實驗主要想要知道的是使用 L-SP 的基質 glucose-1-P 的 epimer 是不是會影響 PI 活性。

楊健志老師：為什麼會想到做這個事情？有其他人做過類似的研究？

林之儀：另外一個想法是使用 epimer 當做基質，來看看是否能夠拖慢反應速度，使我們能夠看到產物生成的情形。

莊榮輝老師：當初陳翰民開始做的時候是想要知道 L-SP 是不是由兩個 glucose-1-P 開始進行反應，因此才會使用 epimer 來探討 C1, C4 位置以及 reducing end 和 nonreducing end 的關係。

楊健志老師：由於妳在講這個實驗的時候很快就跳過來了，但是若是使用了前人設計好的實驗，應該要問清楚做這個實驗的原因。所以做 mechanism 加入 substrate analog，就可以去想像 substrate 跟 enzyme 之間的 binding 會不會有阻礙，所以妳現在是否能簡單的講解 glucose-1-P 加入 epimer 是否會作用？

林之儀：實驗結果是顯示，glucose-1-P 加入 epimer 仍會進行合成反應，但反應速度會較慢。



楊健志老師：所以 epimer 是在 reducing end 還是 nonreducing end ？

林之儀：reducing end 。

楊健志老師：這樣如果第一個是 galactose-1-P 的話，醣鏈的頭就會翹起來。

陳翰民老師：怎麼不做順序的實驗，glucose-1-P 跟 galactose-1-P 不要一起加的話，可能這個現象會更明顯。

林之儀：是的，謝謝老師的建議。

楊健志老師：妳是用什麼 data 來支持這個論點？

林之儀：是由 H-SP 所得的結果可知，H-SP 可以釋放 glucose-1-P 的磷酸根，但卻無法釋放 galactose-1-P 的磷酸根，而 H-SP 與 L-SP 序列上同樣擁有 A site，因此我推論 glucose-1-P 的 epimer 應該是與 B site 結合。

楊健志老師：那妳能否設計另一個實驗來支持這個想法？我有想到一個，但我想要聽聽妳的想法。

林之儀：若是由 L-SP 以及 H-SP 的序列比對結果來看，我會想要使用 PLP 與 H-SP 進行競爭 glucose-1-P，因為 PLP 也可以與 glucose-1-P 結合。

楊健志老師：我現在想到的是把 glucose-1-P 以及其 epimer 上面的 phosphate 改成放射線來進行實驗。

林之儀：謝謝老師的建議。

張世宗老師：所以推測的 mechanism 是把 A site 上的 glucose 給 B site 嗎？怎麼知道 galactose-1-P 真的不會與 A site binding ？

林之儀：是的，也可以從 H-SP 的 data 看到，H-SP 可以釋放 glucose-1-P 的磷酸根，但卻無法釋放 galactose-1-P 的磷酸根。

張世宗老師：為何 PLP 可以分辨 glucose-1-P 以及 galactose-1-P 呢？

林之儀：由於 A site 是一個完整的催化區，除了 PLP binding site 以外還有 Active site，所以其應該對於基質的辨認較為嚴謹。

張世宗老師：HPLC 的 data 中，為何使用 G4 當做引子，卻會有 G3 以及 G2 的生成？

林之儀：當使用 G4 以上的直鏈醣做為引子時，反應是十分迅速的，因此有可能很快地產生大量的磷酸根，使得 L-SP 進行小量的逆反應情形，因此才會有逆反應產物出現。

楊健志老師：為何 G3 以後都會有兩個 peak？

林之儀：因為醣類有兩個不同的 form，使用 RI detector 可以觀察出來。

楊健志老師：那 HPAEC 為何看不出兩個 peak？

林之儀：因為兩者偵測的原理不同，HPAEC 是偵測氧化還原醣類所產生的電流。

楊健志老師：這兩個 form 是什麼？

林之儀：椅型的不同結構.....我忘記專有名詞了。

楊健志老師：是 anomer，primer dependent 的反應只做 15 分鐘，若是做更短的時間，是否就可能不會看到逆反應物的產生。

林之儀：是的，謝謝老師的指教。

張世宗老師：那這麼短的時間為什麼以 G4 當 primer 時，G4 不是主要的 peak？

林之儀：因為在 G4 之後延長反應已經十分快速，所以反應物很快被消耗掉，就已經無法分辨產物跟反應物的 peak 了，我們也用這個結果來支持為何 HPAEC 的產物只能看到四醣以下的產物。

楊健志老師：HPLC 可以積分，怎麼沒有使用呢？

林之儀：是的，謝謝老師的建議。

張世宗老師：所以這個 data 沒有 time zero 的時候，若有 time zero 的 data 就更能夠證明這個實驗結果。

林之儀：是的，謝謝老師。

張世宗老師：使用 starch 做為引子的時候，glucose-1-P 的消耗很少，為什麼會這樣？

林之儀：若是 L78 完整的 L-SP，由於會擋住與 starch binding site，所以與澱粉的親和性可能會沒有 L78 斷裂的 L-SP 來得高。

張世宗老師：三相反應是否能確定是三相？三相之後反應就平衡了嗎？由於妳認為 L-SP 是進行合成的角色，但是現在解釋卻認為說是要磷解，因為達到平衡？

林之儀：我們傾向認為 L-SP 是進行合成醣前體的角色，當其反應到一定長度的時候，可能就會被其他合成相關的酵素拿去進行下一步的延長反應。而酵素反應到最後其正反應與逆反應的速率應該就會達到平衡。

莊榮輝老師：妳應該再多念念陳翰民的論文，當達到平衡之後磷酸與 glucose-1-P 的濃度比約為 5，一但達到這個比例則反應則會達到平衡。

陳翰民老師：但我發現她的理論跟我不一樣，她到第三相的時候產物才到 G4 而已。

莊榮輝老師：不只是到 G4，其實已經延長到很長的醣鏈了，是投影片中表示的方式不好，她是表達在 HPAEC 中有看到 G4 出現，但不是只生成這個產物。這邊不應該這樣標示。

林之儀：是的，謝謝老師。

林棋財老師：HPLC 的 peak 大概是多少量？

林之儀：我是加入 2.5 mg 的醣引子進行反應，所以 G4 產物的 peak 大約只有 1/4 的量。

林棋財老師：L-SP 的 mechanism 中為何知道會形成 carbocation？

林之儀：是套用 GP 的 mechanism，因為它也具有 PLP binding site，會進行磷解的反應。

林棋財老師：glucose 形成 carbonium 在 C1 旁邊的 O 陰電性很強，這個結構會非常不穩定，不容易存在，通常  $\alpha$ -1,4 linkage 都是脫水形成的不是嗎？

林之儀：因為 carbonium 是在 L-SP 的 active site 形成，而 active site 裡面應該有一些機制能夠保持分子的完整性，例如使用一些胺基酸來穩定分子。

莊榮輝老師：如果 L-SP 真的會利用 galactose-1-P 做為基質，妳要怎麼 detector？

林之儀：方法有很多種，可能可以打 Mass。

莊榮輝老師：但是 Mass 分子量都一樣，怎麼知道是 glucose-glucose 或者是



galactose-glucose 呢？

林之儀：另一個方法就是打 HPAEC，看其初產物，若是第一個產物包含 galactose 的話，則 peak 的位置會與 maltose 不同。

張世宗老師：starch 會抑制 PI 的活性嗎？因為 glucose-1-P 似乎沒有消耗。

林之儀：glucose-1-P 有少量消耗，但由於 starch 鏈長很長，所以 HPLC 在 15 分鐘之內無法看到產物的 peak。

張世宗老師：PI 反應 15 分鐘有產物嗎？

林之儀：看不到產物。

