

第二章

蔗糖合成酶之純化與 生化性質檢定

雖然已有若干報告敘述水稻蔗糖合成酶的純化方法^(30,31)，但我們重新探討純化條件，找出一較有效而方便的途徑。由於硝酸銀染色法的發展⁽³²⁾，使得對蛋白質純度的要求提高很多，我們所開發的一套簡單製備式電泳，可以很方便地得到最純的酵素。以純化得到的酵素，進行一些生化性質檢定，做為進一步應用於免疫學或分子生物學研究時的基礎。酵素動力學方面，本研究室李平篤博士論文⁽³⁰⁾及 Nomura、Akazawa 二人的工作⁽³¹⁾已有詳述，不再重複。

第一節 材料與酵素活性分析

材料： 用來抽取蔗糖合成酶的水稻 (*Oryza sativa* L.) 為本省臺南五號或其支系，在乳熟期前期，稻穀已開始充實澱粉乳液但尚未乾硬以前採集。不同生長期或不同地區採收的水稻，所純化得之蔗糖合成酶在生化性質上並無二致。但其他蛋白質的量與分佈，從色析圖譜上看來則有些差異，我們沒有進一步探求這些細節。採集後之水稻稻穗置 -20°C 冰箱冷凍收藏，保存至少一年不會喪失酵素活性。

酵素活性分析 (方法 2.1.1) : 蔗糖合成酶的活性分析以測定 UDPG 生成量較為可行, UDPG 則以 UDPG 去氫酶進行耦合反應氧化為 UDP-glucuronic acid, 測定輔酶由 NAD^+ 轉變為 NADH 在 340 nm 波長吸光度的改變。我們直接以最後所測的吸光值為活性單位 (OD 單位)。

圖 1 為各種酵素濃度在不同反應時間所測得的活性。酵素活性太高 ($1/8$ 稀釋) 過早出現反應終結狀態; 活性較低者 ($1/64$ 稀釋) 雖呈直線, 但反應時間較長。折衷取 6 分鐘為酵素活性分析的反應時間; 在這段時間內, 以適當濃度的 SS 所測得的反應量與時間成正比。

圖 2 顯示耦合反應的情形。SS 反應生成的 UDPG 加入去氫酶及 NAD^+ 後, NADH 隨時間而漸增, 大約在 40 分鐘後可達反應終結狀態。

因此所設定酵素反應時間為 6 分鐘, 耦合反應時間為 1 小時, 最後所測定 340 nm 的吸光直接做為活性單位 (OD 單位)。又若以 $0.1\ \mu\text{mole}$ 的標準 UDPG 行耦合反應, 可測得 1 個 OD 單位 (340 nm), 故 60 個 OD 單位 (酵素反應 6 分鐘) 約等於 1 個 μmole 活性單位 (1 分鐘)。

酵素的安定性: SS 在硫酸銨沉澱中相當安定, 溶解後則見不穩, 且易生沉澱, 在 25 天內活性減半。加入 20% 甘油後在室溫下較不加甘油者為穩定, 但在 4°C 或 -20°C 下則無差異。一般貯存於 4°C 或 -20°C 下均可, 但以 4°C 稍佳。高純度酵素可以超微濾膜 (Millex, Millipore) 過濾, 於 4°C 下無菌狀態貯存。酵素活性的下降, 疑似源自

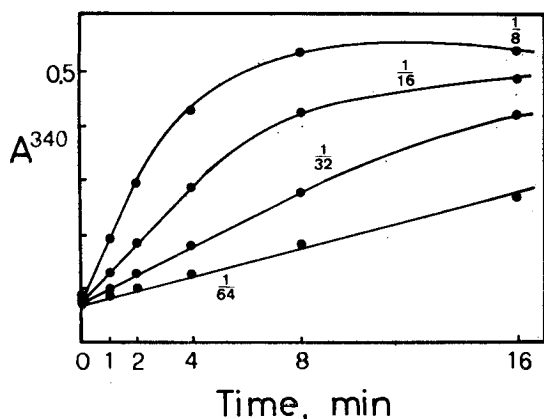


圖1 以純化得之酵素(SS-5, 約 300 OD 單位/mg) 的各種稀釋液 ($1/8$, $1/16$, $1/32$, $1/64$) 進行活性分析, 判定可維持反應直線性的時間範圍, 以便設定一個適當的反應時間。我們折衷取 6 分鐘為標準反應時間。

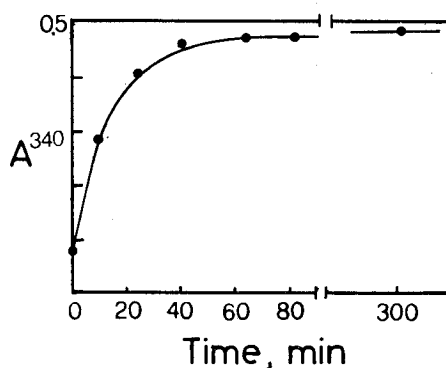


圖2 UDPG 去氫酶耦合反應的進行, 大約在 40 分鐘後達到終結點。

微生物分泌的蛋白質水解酶。但 SS 本身所含 cysteine 很少，雙硫鍵的缺乏亦可能是不安定的原因（見下述）。冷凍乾燥也可保持一部分酵素活性，長期保存可考慮之。

第二節 酵素的純化

以硫酸銨分劃（方法 2.2.1），膠體過濾（方法 2.2.2），及離子交換法（方法 2.2.3）等純化得蔗糖合成酶（SS-5），其純化情形如表一。最後純化倍數為 38 倍，活性回收 31%，可得到比活性為 344 OD 單位/mg 的 SS-5（或為 5.7 μmole 單位/mg/分鐘）。其中硫酸銨分劃收集 0.35~0.55 飽和度之間的蛋白質，損失頗鉅，可考慮擴大為 0.30~0.60 飽和度，以增加回收率。由 100 克水稻稻穀中，純化得 8.6 mg SS。純化 38 倍即得近乎均質的蛋白質，可知 SS 約佔乳熟期水稻蛋白質之 2.5%。

膠體過濾（Sephacrose CL-6B）溶離圖如圖 3，SS 活性在主要蛋白質尖峯前的斜坡出現，收集 SS 時應盡量避免主尖峯蛋白質的干擾，所收得酵素分級為 SS-4。

離子交換（DEAE-Sephacrose CL-6B）溶離圖如圖 4，SS 活性在第一個尖峯約

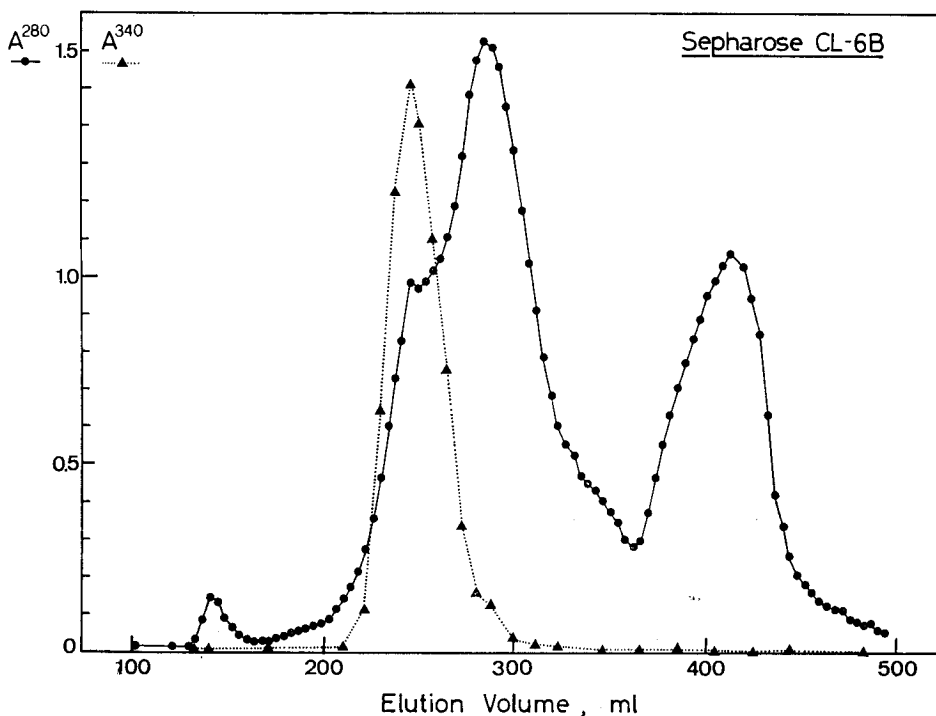


圖3 以 Sepharose CL-6B 進行膠體過濾，管柱為 2.6×75 cm，樣本為 8 ml SS-3，以每小時 25 ml 流速溶離之，收集 SS 活性部分（340 nm 波長之吸光度）即為 SS-4。

第二章 純化與生化性質檢定

0.05 M NaCl 濃度處出現，收集得 SS-5。經過離子交換層析後，損失一半活性，原因不明，其他報告亦然。SS-5 可以無菌過濾後保存於 4°C 中。

SS-5 以不連續膠體電泳經 Coomassie Brilliant Blue R (CBR) 染色後只出現一

表一 蔗糖合成酶之純化 (100 克水稻稻穀濕重)

純化步驟	全部蛋白質 (mg)	全部活性 (OD 單位 ^a)	比活性 ($\frac{\text{OD 單位}^a}{\text{mg 蛋白質}}$)	純化 (倍數)	活性回收率 (%)
粗抽取液 (SS-1) ^b	1,070	9,672	9.0	1.0	100
魚精蛋白沈澱後之上清 (SS-2) ^b	800	12,555	15.7	1.7	130
硫酸銨分劃 (SS-3)	250	6,610	26.4	2.9	68
膠體過濾法 (SS-4)	52	5,789	111.3	12.4	60
離子交換法 (SS-5)	8.6	2,960	344.2	38.2	31

a: 活性的 OD 單位為直接以 340 nm 波長吸光值計之，1 個 μmole 活性單位約等於 60 個 OD 單位。

b: 此處之 SS-1 或 SS-2 與前述之玉米 SS 異構酶 SS-1, SS-2 (請見 p. 3) 不同。

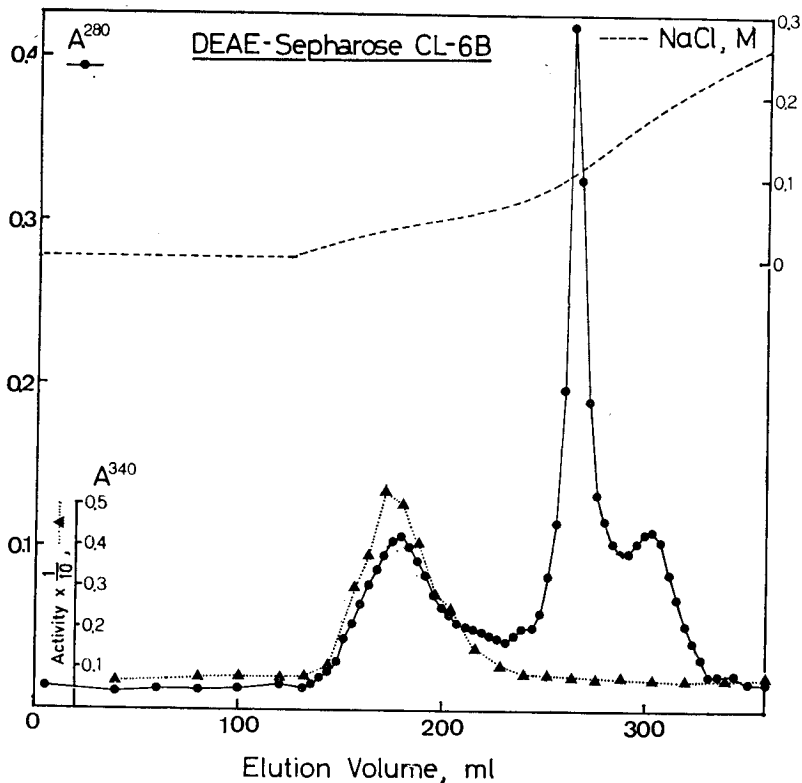


圖4 以 DEAE-Sepharose CL-6B 進行離子交換色析，管柱為 2.6×25 cm，膠體過濾所得 SS-4 全部通入後，以 0~0.3 M NaCl 梯度溶離之，第一個尖峯具 SS 活性，收集之即得 SS-5，可以超微濾膜 (Amicon YM-10) 濃縮之。

條色帶，具有 SS 活性（圖 5）。但若以硝酸銀染色，則又出現一些色帶（結果未表）。進一步純化時，若以傳統血清（兔子）做成免疫吸着劑進行親和層析（方法 2.2.5），則其純化產物仍不十分純（圖 6A 及 B）；若改以單株抗體進行，則可得到極純的酵素（圖 6C）。但親和層析的溶離條件太強烈（ pH 2.05），酵素因此失去活性。

以製備式電泳（方法 2.2.4）進行進一步的純化時，不但可得到均質酵素（圖 6D），酵素活性亦可保留。若電泳溶離的條件適當，其回收率可達 90% 以上。均質的 SS-6 在硝酸銀染色下均只出現一條色帶，分級為 SS-6。

因此，我們可以純化得各種純度的 SS，一般生化性質檢定使用 SS-5 即可，有特別需要高純度酵素的實驗時（如胜肽圖譜檢定），宜新鮮製備 SS-6。因 SS-6 經久貯

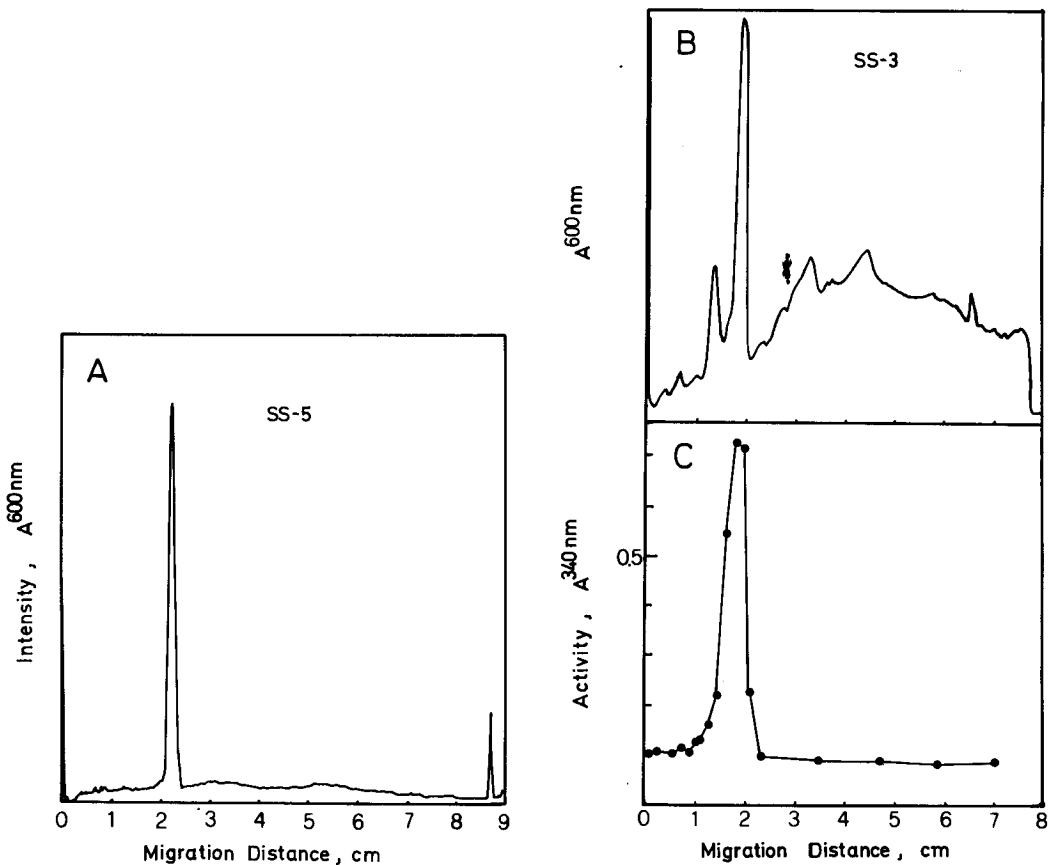


圖5 A：蔗糖合成酶（SS-5）以不連續膠體電泳（7.5%）檢示其純度，以 Coomassie Brilliant Blue 染色後只出現一條色帶。
 B：純度較低的 SS-3 同法檢示之，雜質甚多。
 C：SS-3 的膠體活性分析顯示，只有一條色帶具有 SS 活性，其泳動率與A圖中的 SS-5 色帶相仿。

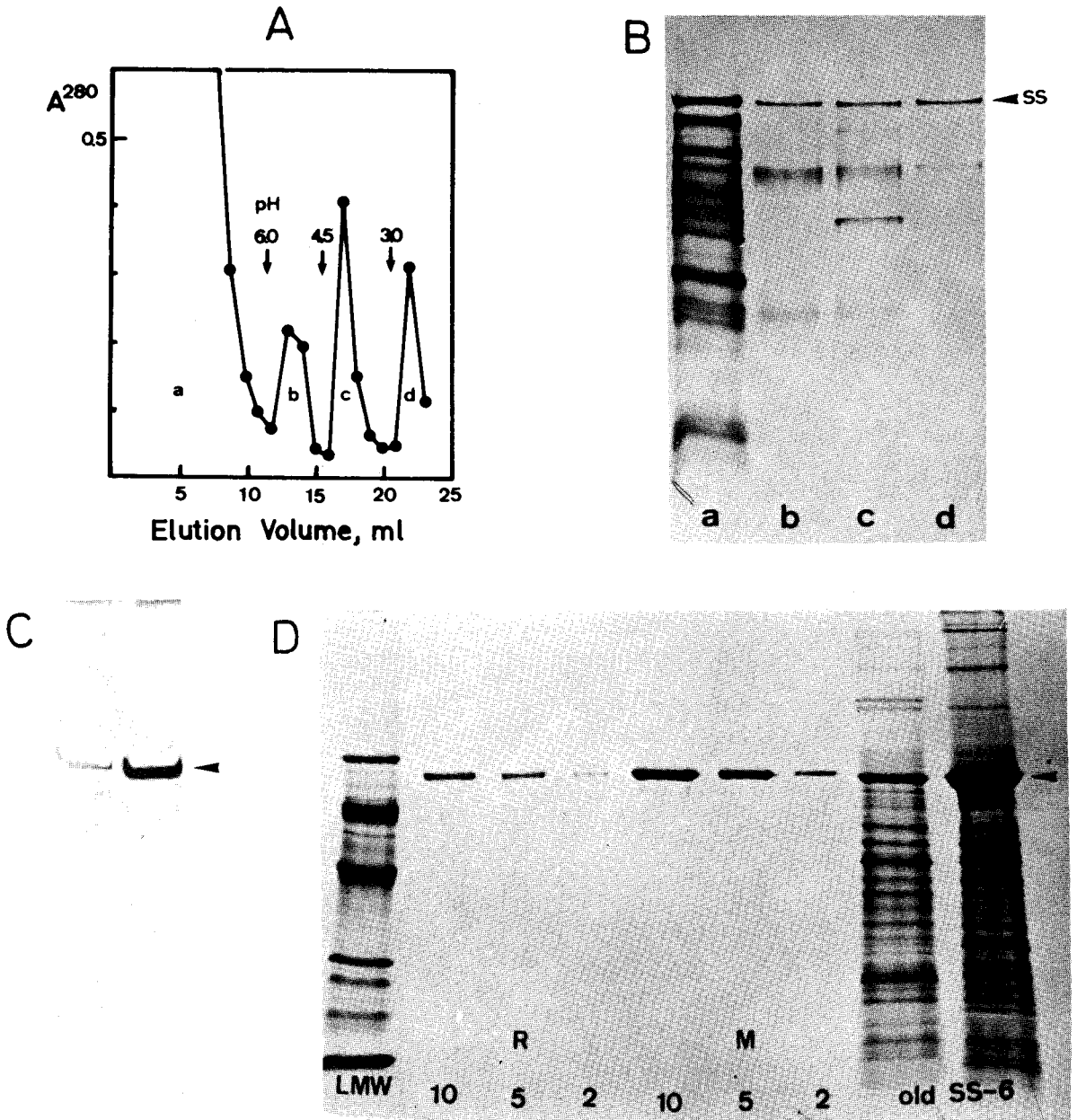


圖6 進一步純化 SS：

A, B：以傳統血清的 IgG 所製備的免疫吸着劑進行親和層析法，樣品為 SS-4，a 為未吸着部分，b, c, d 分別為 pH 6.0, 4.5 及 3.0 所溶離者。

C：以單株抗體製成的免疫吸着劑所純化得的 SS。

D：以製備式電泳純化水稻 (R) 及玉米 (M) SS，左行為標準分子量校正組 (LMW)，右兩行為久儲之 SS-6。數字為樣品體積 (μ l)。

(膠片均以硝酸銀染色，箭頭所指處為 SS)

後，又出現許多雜色帶，不復為均質者（圖 6D）。

第三節 生化性質檢定

分子量及四級構造（方法 2.3.2; 2.3.3）：由膠體過濾可測定原態 SS 的分子量為 400,000（圖 7），此可由不連續梯度（5~13%）膠體電泳（圖 8）佐證之。以 SDS-膠

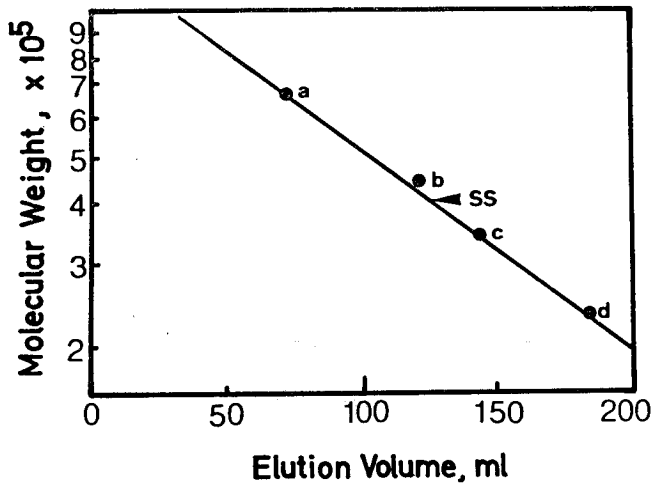
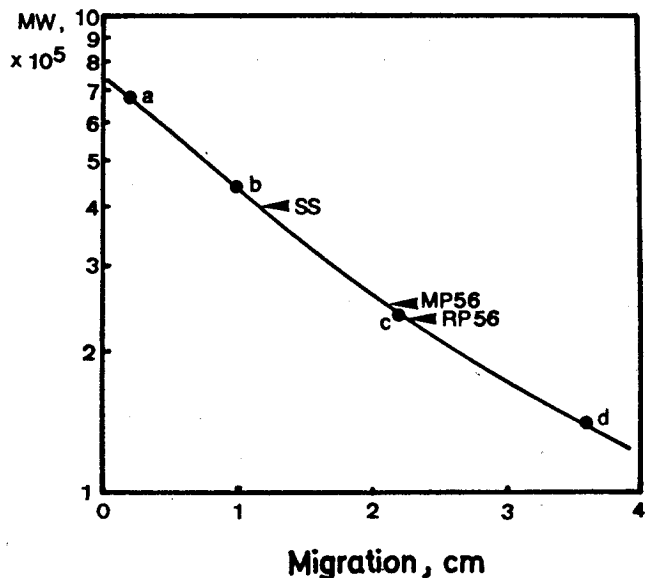


圖7 以膠體過濾法決定原態 SS 的分子量為 400,000。所用的標準蛋白質：a, Thyroglobulin (669,000) b, Ferritin (440,000) c, Thyroglobulin 次體 (330,000) d, Catalase (232,000)。

圖8 以不連續梯度電泳（5~13%）決定原態 SS 分子量為 400,000。未知蛋白質 P56: 水稻 RP56 為 235,000，玉米 MP56 為 250,000；因二者的次體分子量都在 56,000 左右，故名為 P56。有關 P56，詳述於第五章。標準蛋白質：a, Thyroglobulin (669,000)；b, Ferritin (440,000)；c, Catalase (232,000)；d, Lactate dehydrogenase (140,000)。



體電泳測得其次體分子量為 90,000 (圖 9)，故知原態 SS 由四個分子量相同的次體組合而成。Nomura 及 Akazawa⁽³¹⁾ 以 Hedrick 及 Smith⁽³³⁾ 的方法測得原態水稻 SS 分子量為 410,000，而以 Sephadex G-200 測得為 440,000；次體分子量則以 SDS-膠體電泳測得為 100,000。與玉米 SS⁽³⁴⁾ (原態 365,000；次體 88,000) 及綠豆 SS⁽³⁵⁾ (原態 405,000；次體 94,000) 比較，均相差不多。不過 Nomura 及 Akazawa 測定的 440,000 則太大了些。原本懷疑以不連續梯度膠體電泳進行原態分子量測定的可靠性，經過幾次比對之後，發現此法對較低 pI 值蛋白質的測定仍十分可信。

等電點測定 (方法 2.3.5)：SS 的等電點為 5.2 (圖 10)，故以上述不連續梯度膠體電泳進行 SS 原態分子量之測定為可行。

NH_2 端檢定 (方法 2.4.3)：如圖 11 只得一胺基酸 Arg，故原態 SS 可能是由四個相同 (homologous) 次體組成的。

分子消光係數 (方法 2.4.1)：經檢定 SS 的 $E_{1\%}^{1cm}$ (280 nm) 為 9.2，故其溶液的 280 nm 吸光度若為 1.0 者，表示其每 ml 含有 1.09 mg SS。以此定量 SS 非常方便，但需注意必須是均質 SS 方可。

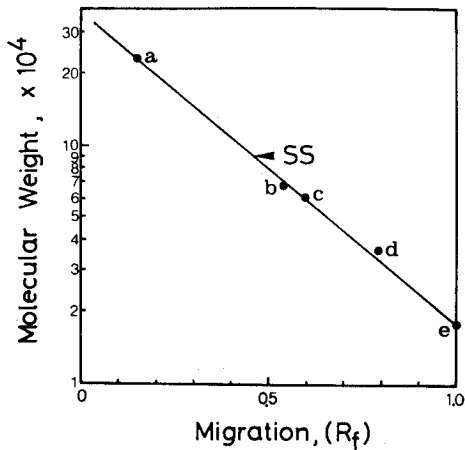


圖9 以 SDS-膠體電泳 (5%) 測定 SS 次體分子量為 90,000。所用標準蛋白質為：a, Ferritin (half unit, 220,000); b, 白蛋白 (67,000); c, Catalase (60,000); d, Lactate dehydrogenase (36,000); e, Ferritin 次體 (18,500)。

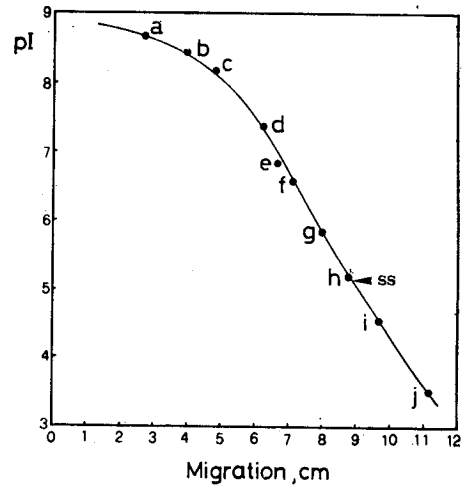


圖10 以 Ampholyte 聚丙烯醯胺膠體電泳進行等電聚焦法，決定 SS 的 pI 為 5.2。所用標準蛋白質之 pI 為：a, b, c, Lentil lectins (8.65, 8.45, 8.15); d, e, Horse myoglobins (7.35, 6.85); f, g, Carbonic anhydrase B (6.55, 5.85); h, β -lactoglobulin A (5.20); i, Soybean trypsin inhibitor (4.55); j, Amyloglucosidase (3.50)。

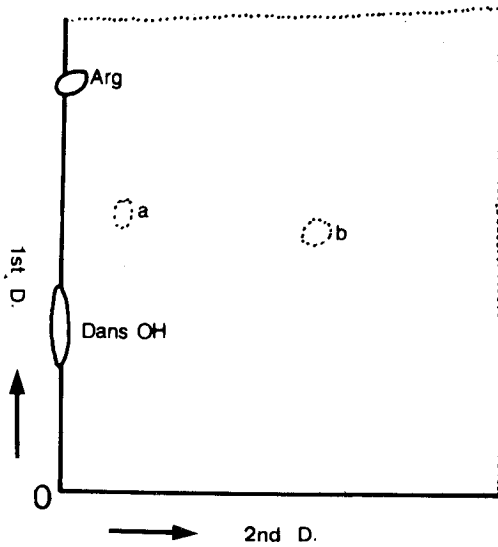


圖11 以 Dansylation 法決定 SS 的 NH_2 端為 Arg。圖中 Polyamide 薄層色析的第一次元展開液為水-90% 甲酸 (100:1.5)，第二次元展開液為苯-冰醋酸 (9:1)。圖中 a 及 b 為非常淡之螢光呈色點，不再探討。

表二 水稻蔗糖合成酶的胺基酸組成

胺基酸 ^a	% 組成	胺基酸數 ^b	胺基酸 ^a	% 組成	胺基酸數 ^b
Asp	9.2	74.2	Met	2.0	16.1
Ser	4.9	39.5	Ile	6.2	50.5
Thr	5.4	43.6	Leu	9.9	79.8
Glu	11.9	95.9	Tyr	3.4	27.4
Pro	4.4	35.4	Phe	3.9	31.5
Gly	8.1	65.3	His	3.0	24.2
Ala	7.6	61.3	Lys	9.2	74.2
Val	6.0	48.4	Arg	5.0	40.3

a : 無法測得 Cys, SS 可能不含或只含很少 Cys。我們沒有進行 Trp 的測定。
 b : 分子量以 90,000 計算, 共有 807 個胺基酸。

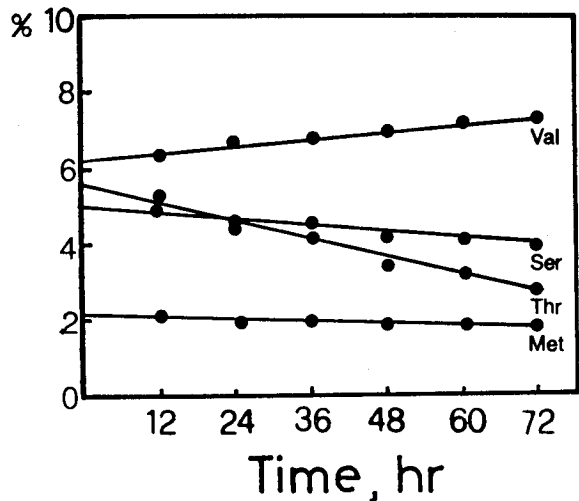


圖12 以 HCl 水解 SS 做胺基酸成分分析時, 四種胺基酸的量隨著 HCl 水解時間而有增減, 均外插至零小時修正之。

胺基酸成分分析（方法 2.4.2）： 結果如表二，其中 Val, Ser, Thr, 及 Met 四種胺基酸的百分比會因水解時間而變化，均經外插修正（圖 12）。我們測不到 Cys 的含量，故分子中可能沒有或只有極少的雙硫鍵，這也許是 SS 分子不安定的原因之一。

不含醣類： 以過碘酸-Schiff 氏試劑染 SS 的電泳膠片（方法 2.3.7.2），SS 未能染上紅色（結果未表），故 SS 分子可能不含醣類。在電泳操作時，若加入蔗糖為密度增加劑，則 SS 可被染上紅色，若改用甘油則否，可能是蔗糖與 SS 吸附在一起之故。