

第五章

水稻及玉米蔗糖合成酶之比較

第一節 生化性質之比較

不同植物來源的蔗糖合成酶有極相似的生化性質，表五列出數種植物 SS 的生化性質比較。另外，由胺基酸組成看來，水稻、玉米及綠豆有極相似的組成（圖 30）。水

表五 不同來源的蔗糖合成酶之生化性質比較

來 源 生 化 性 質		蔗 糖 合 成 酶				
		水 稻		玉 Su ⁽³⁴⁾ 米	綠 豆 Delmer ⁽³⁵⁾	豌豆 宋 ⁽²⁶⁾
		本 論 文	Nomura ⁽³¹⁾			
分 子 量	原 態	400,000	410,000	365,000	405,000	410,000
	次 體	90,000	100,000	88,000	90,000	—
四 級 構 造		相同四元體	相同四元體	相同四元體	—	—
E _{1cm} ^{1%} (280 nm)		9.2	—	—	9.5	—
pI		5.2 ^a	—	—	—	—
S _{20,w}		— ^b	13.3	12.8	12.4	11.2

a: 竹筍 SS 的 pI 亦為 5.2⁽⁴⁴⁾。

b: 蘆荀 SS 的 S_{20,w} 為 12.2。

稻與玉米 SS 經蛋白酶部分水解後，發現二者有幾乎相同的胜肽圖譜（圖 31）。由以上結果得知水稻與玉米的 SS，甚或其他所有植物的 SS，具有相當大的相似性（homology）；不但功能相似，組成相似，分子構造亦相似。我們再進一步以免疫工具比較其異同（下節）。

在進行 SS 的蛋白酶部分水解時，發現非專一性的蛋白酶，如 Protease K, Papain，或 Subtilisin 等，所得胜肽圖譜非常相似（圖 32）。推想這些蛋白酶在水解時，基質蛋白質（SS）的構形對其水解的作用位置有很大的限制，因此所切得的片段均差不多。若水解前先以 SDS 處理過，破壞基質蛋白質的構形，在同樣條件下水解，則全部被切成小段胜肽（圖 32 B）。

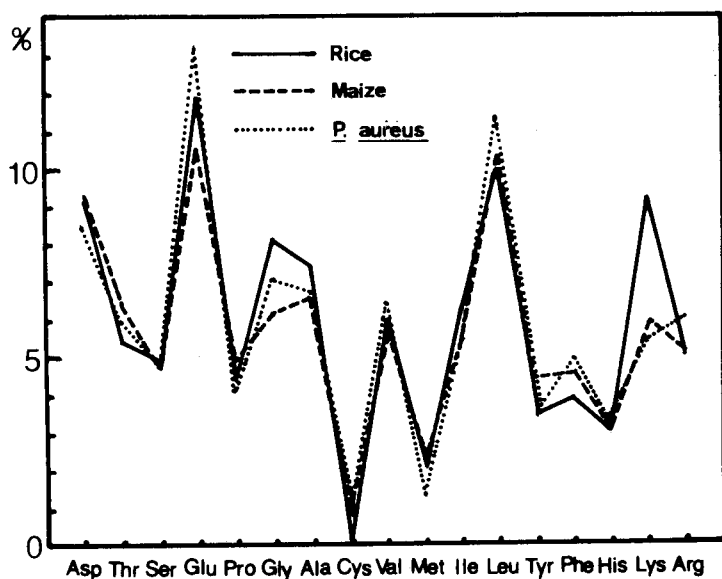


圖30 比較水稻、玉米及綠豆 SS 的胺基酸組成。橫軸的胺基酸次序以層析法溶離先後排列，雖然這樣的作圖並不適當，但為了方便比較起見，仍以連點式折線表示之。可發現三種不同植物來源的 SS，其胺基酸組成非常相似。

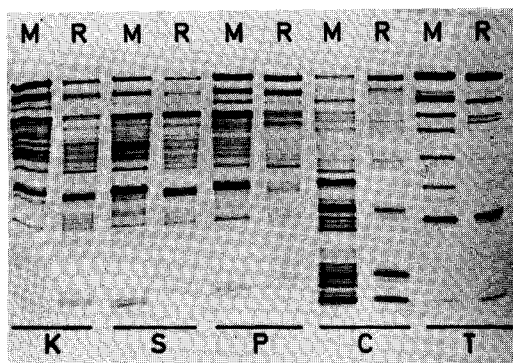


圖31 水稻 (R) 及玉米 (M) SS-6 的胜肽圖譜，所用的蛋白質水解酶為 Trypsin (T), Chymotrypsin (C), Papain (P), Subtilisin (S) 及 Protease K (K)。電泳以 SDS 梯度 (8-18%) 膠片進行。

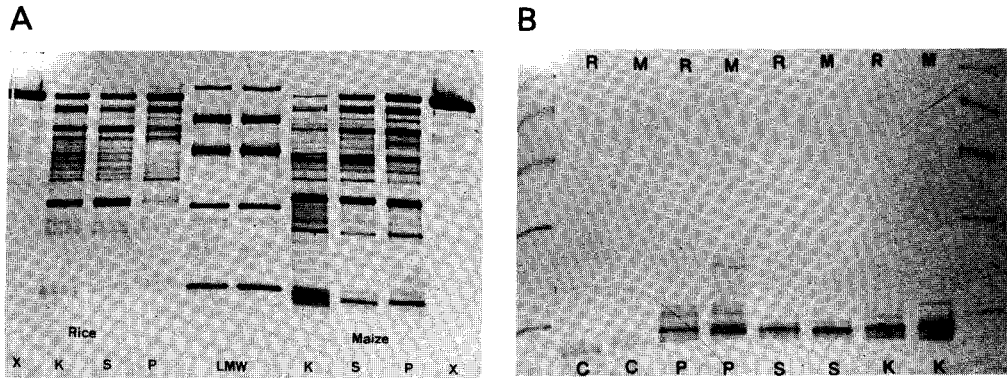


圖32 非專一性蛋白鹼的水解，會受到受質蛋白質構形的影響：

- A：受質蛋白質（SS）在原態下水解，所得到的圖譜，不論用 Protease K (K), Subtilisin (S) 或 Papain (P) 均非常相似。左邊四道為水稻 SS，右邊四道為玉米 SS，中央為標準分子量蛋白質（見圖），X 為不加蛋白鹼者。
- B：受質蛋白質（SS）在變性後水解，與A 同樣水解條件下，所有受質全被切成小分子。兩邊為標準分子量蛋白質，蛋白鹼同上，多了 Chymotrypsin (C)，受質 SS 來自水稻 (R) 及玉米 (M)。

第二節 免疫學性質之比較

以兔子抗水稻蔗糖合成酶的抗血清對水稻及玉米 SS 做雙向擴散時，所得沉澱線在靠近玉米 SS 的一邊出現 spur（圖 33）。表示水稻與玉米的 SS 具有共同的抗原性，也有不同的抗原決定基。免疫電泳結果（圖 34）並無特殊的訊息，但水稻 SS 要比玉米 SS 泳動得稍遠；在不連續膠體電泳上（圖 35），二者的差異雖不大，但水稻 SS

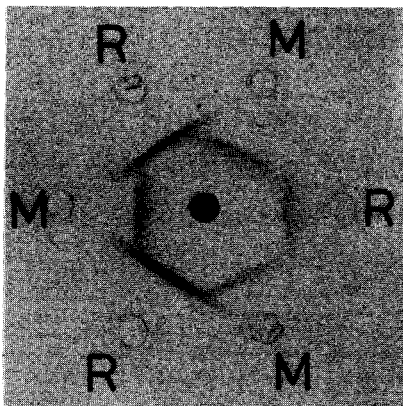


圖33 水稻 (R) 及玉米 (M) SS 對兔子抗水稻 SS 血清的雙向擴散：中央槽為兔子抗水稻 SS 血清（不稀釋）。周圍抗原部分，水稻 SS 的濃度自 11 點鐘方向開始，逆時針依次為 1, 0.5 及 0.1 mg/ml；玉米 SS 則自 9 點鐘方向依同樣各稀釋濃度加入。每槽均為 2 μ l。

圖34 免疫電泳結果：水稻 (R) 及玉米 (M) SS 經電泳後，與兔子抗水稻 SS 血清進行雙向擴散產生沉澱線。R 的泳動率比 M 大些。

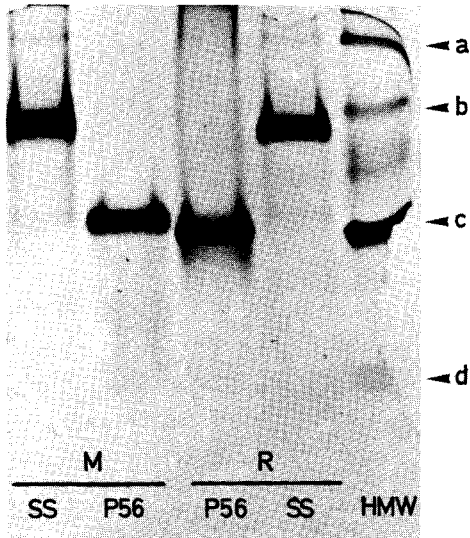
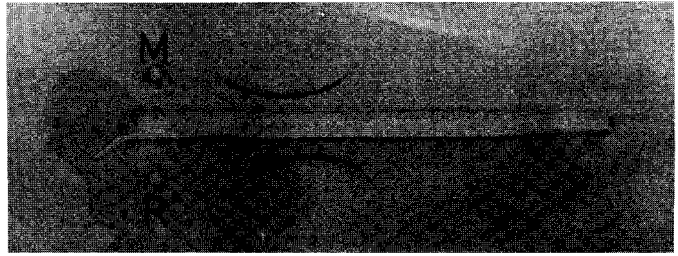


圖35 以不連續梯度 (5~13%) 電泳比較水稻 (R) 與玉米 (R) 的 SS 與 P56。HMW 為標準分子量蛋白質：a, Thyroglobulin (669,000); b, Ferritin (440,000); c, Catalase (232,000); d, Lactate dehydrogenase (140,000)。

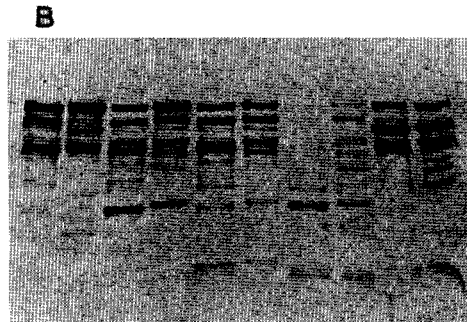
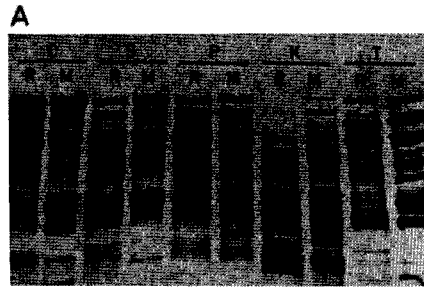


圖36 水稻 (R) 及玉米 (M) 的 SS-5 經部分水解得胨肽圖譜 (A)，此胨肽圖譜上的胨肽可以電泳轉印到硝化纖維紙上，以兔子抗水稻 SS 血清檢定之，得到胨肽免疫轉印圖譜 (B)。所用蛋白酶為 Chymotrypsin (C), Subtilisin (S), Papain (P), Protease K (K), Trypsin (T)。

的泳動率要稍微大一點。由於洋菜膠體與聚丙烯醯胺膠體的性質有所不同，故免疫電泳上二者表現的不同泳動率也許有其意義存在。

若二者的胬肽圖譜繼續由膠體轉印到硝化纖維紙，再加兔子抗水稻 SS 血清反應，以 HRP-二次抗體檢示，即得免疫轉印圖譜如圖 36。可發現由傳統血清進行免疫轉印所得圖譜看來，仍極相似；只有少數色帶有異，也許就是上述雙向擴散產生 spur 的同一原因。因此可以說水稻與玉米 SS 分子上的抗原決定基大部分是相同的，只有少數不同，以傳統血清可能因而不易辨別之。若改用單株抗體則有極顯著的差別。已如圖 28 所示，同樣對兩種 SS 的胬肽以單株抗體進行免疫轉印，結果水稻與玉米的圖譜有顯著不同。較極端的是 D8，只對水稻 SS 結合，對玉米的胬肽則均不反應。ELISA 的結果（圖 24）亦顯示我們所得到的單株抗體（第二組及第三組）可以清楚地區別此二酵素。

故由上節生化性質比較結果，可知水稻與玉米 SS 在蛋白質之組成與構形上的確有相當的相似性；而由免疫學性質檢定的結果又可知他們的分子結構是同中有異。單株抗體是探討這種構造上細微差異的最佳工具。

第三節 未知蛋白質 P56

以單株抗體進行 SS 的胬肽免疫染色時，發現 A1 及 A10 兩株抗體的圖譜相當奇特（圖 28），他們對一個分子量為 56,000 的蛋白質（圖 37）有非常強烈的親和力，

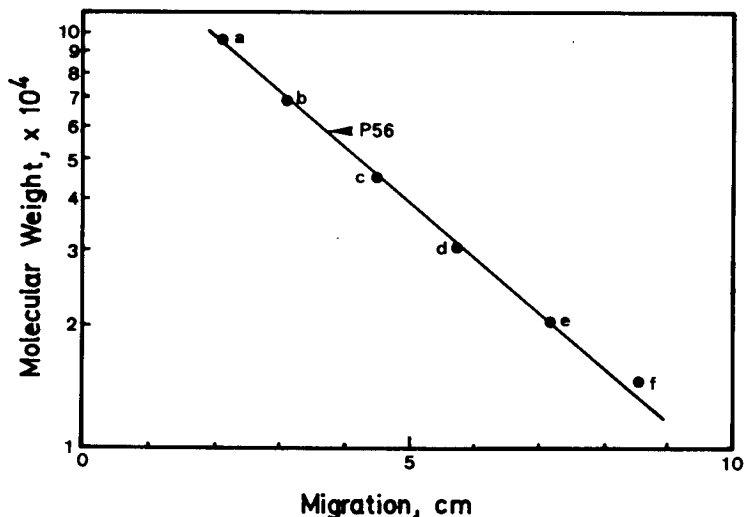


圖37 P56 蛋白質的分子量，因為是以 SDS-膠體電泳求得，故為其次體分子量，水稻與玉米的 P56 分子量相似。

而對原來 SS 或其他胜肽結合很弱 (A10) 或幾乎沒有 (A1)。在做 SS 的製備式電泳時，可以順便在其下方切出並純化此蛋白質，稱之為 P56 (如圖 35，與不連續梯度電泳的泳動率相似)。水稻與玉米均可純化得 P56，其胜肽圖譜極為相似 (圖 38)，且由胜肽免疫染色得知二者對 A1 及 A10 單株抗體都有抗原性 (圖 28)。兩種 P56 均具四級構造，由圖 8 可知其原態分子量分別為 235,000 (水稻) 及 250,000 (玉米)，可能均為相同的四元體構成。

P56 與 SS 比較，發現二者胺基酸組成極為相似 (圖 39)，但 P56 的 Phenylalanine 個數超過 SS 者。此外，取純的 SS-6 以蛋白酶水解，其胜肽以 A1 或 A10 進行胜肽免疫轉印，無法測得 P56 抗原之存在。P56 比 SS 不易受蛋白酶水解，其胜

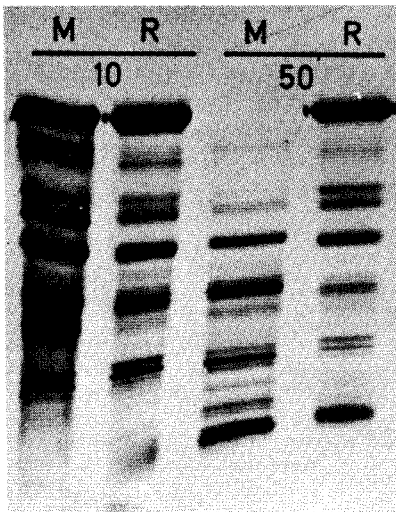


圖38 水稻 (R) 及玉米 (M) P56 以 Protease K 水解，數字為 Protease K 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)。P56 較耐水解，一般水解 SS 的濃度無法作用於 P56。箭頭處為 P56 未經水解位置。

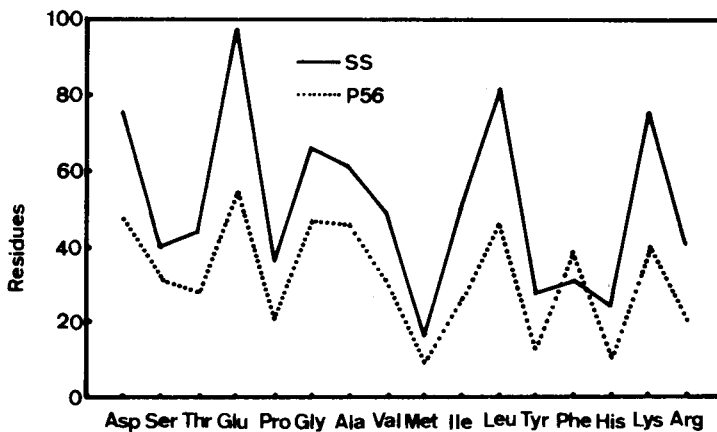


圖39 水稻 SS 與 P56 的胺基酸成分比較。二者組成相當近似，但注意 P56 的 Phenylalanine 數目超過 SS。

肽圖譜與 SS 者並無相像之處（結果未表）。這些觀察使我們放棄了 P56 為 SS 之分子片段的假想。

以純化且經濃縮的 P56 對兔子抗水稻 SS-5 血清做雙向擴散，發現「血清-P56」與「血清-SS」的沉澱線互呈交叉（圖 40），表示 SS 與 P56 在抗原性上無關。因此我們推想 P56 可能是在純化過程中雜夾的蛋白質，具有極強的抗原性，雖少量仍可誘導了 A1 及 A10 單株抗體的產生。

回顧純化過程中的膠體過濾及離子交換層析，若以 A1 或 A10 為工具進行其溶離液的檢定時，發現 A1 或 A10 偵測到 P56 的位置與 SS 的溶離帶完全一致（圖 41, 42）。在膠體過濾中，A1 只在 SS 溶離帶偵測到 P56（分子量 400,000），A10 則額外測得一個分子量為 300,000 的尖峯（圖 41）。這結果附帶暗示 A1 與 A10 兩株抗體是來自不同的 B 細胞株。

因此，P56 幾乎與 SS 如影隨形地一直被純化到離子交換的步驟。所得到的 SS-5

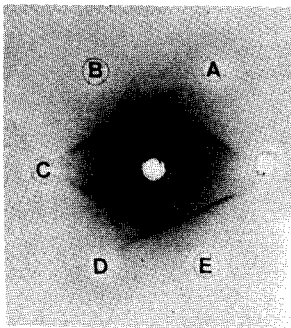


圖40 雙向擴散：中央槽為兔子抗水稻 SS-5 血清。B 及 E 為水稻 SS-5，A 及 D 為玉米 SS-5。C 為純化並經濃縮的水稻 P56。

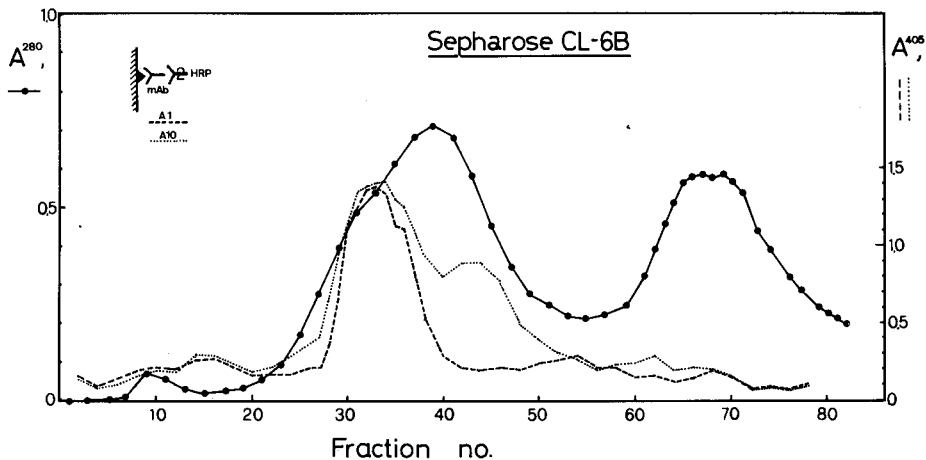


圖41 以 ELISA 檢定 SS 純化過程中膠體過濾的溶離液，所用抗體為 A1 及 A10 兩株單株抗體。

雖然在 Coomassie Brilliant Blue 染色上看似均質 (圖 5)，但在硝酸銀染色上則含雜質，其中有 P56 色帶 (結果未表)。故以 SS-5 來進行免疫 BALB/c 小鼠，並進行 ELISA 篩選融合細胞時，就篩出了 A1 及 A10 兩株抗 P56 的細胞株。

我們尚不確知 P56 與 SS 有無生理上或分子構造上的關係，但綜合以下各點看來，P56 的確是個令人深感興趣的蛋白質：

(1) 水稻與玉米均有 P56，可能其他植物亦有之，則其普遍存在性暗示著其生理上的重要性。

(2) 水稻與玉米二者的 P56，以胜肽圖譜或免疫性質觀之，均極相似。

(3) 其抗原性極強，少量即可結合相當多量的抗體。

(4) 與 SS 沒有抗原性關係，亦較不易受蛋白酶水解，但胺基酸組成與 SS 相當像。

(5) 其液相層析的溶離位置與 SS 完全一致。

(6) 其次體分子量為 56,000，但其原態分子量則較複雜，以膠體過濾測得為 400,000 及 300,000，以不連續梯度電泳測得為 250,000 (玉米) 或 235,000 (水稻)。

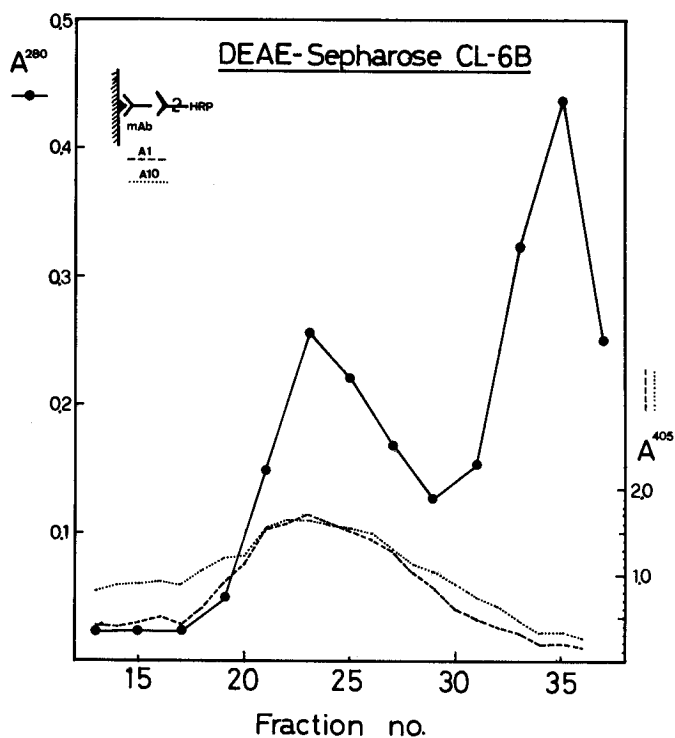


圖 42 以 ELISA 檢定 SS 純化過程中離子交換層析的溶離液，所用抗體為 A1 及 A10 兩株單株抗體。離子交換層析條件同方法 2.2.3 小節。