

## 第六章

# 結論與展望

以下將就本論文所完成的各項單元分別進行討論，並展望未來各期的工作。

### 第一節 純化與生化性質

對於蛋白質純度的檢定，通常以電泳判定之，用 Coomassie Brilliant Blue (CBR) 染色後若只呈一條色帶，即視為均質。近來由於硝酸銀染色法<sup>(32)</sup>的發展，使染色的靈敏度提高到 100 倍以上；原來 CBR 染色以為是均質的，在硝酸銀染色下則不一定是均質了。我們以硫酸銨分割、膠體過濾及離子交換法所純化得的 SS-5，若以硝酸銀染色，則出現雜質，必須進行進一步純化。以傳統抗血清製成的免疫吸著劑進行親和層析法來分離 SS 並不是一個好方法，因為所用來免疫兔子的抗原 SS 不見得是純質，此外以低 pH 溶離下來的 SS 很快失去活性。我們所發展的製備式電泳則可方便地得到純質酵素（硝酸銀的染色條件）。此法的瓶頸在於電泳後須以紫外線（300 nm）呈現出蛋白質色帶，以利切割。若蛋白質量太少或濃度不足，則不易觀察到色帶。不過我們設計以增大樣品體積，增長聚焦膠體來解決此一困難，相信大多數蛋白質均可如法純化。另一較複雜途徑是改用單株抗體製成免疫吸著劑，進行親和層析法，其純化結果比使用傳統血清者好很多，溶離的條件也有可能溫和些（視單株抗體與抗原之親和度而定）。

對於一羣性質相近而無法以一般方法分離的蛋白質混合物，可以單株抗體親和吸著劑配合免疫轉印法進行之。例如本實驗室另一研究對象為甘藷的磷解酶<sup>(40)</sup>，此酵素有五種形式，一般純化方法只得其混合物，僅能以不連續膠體電泳大略分出五條互相接近的色帶。製備式電泳亦因色帶間太靠近而無法切割。若能製備得此混合物的單株抗體羣，每一株單株抗體先以免疫轉印法檢示其對此羣抗原混合物中各個色帶的結合情形時，可能得到數種形式的單株抗體：

- (1)單株抗體能結合所有色帶，表示此株抗體對抗的是此酵素羣的共同抗原決定基。
- (2)單株抗體能結合二個或數個色帶，但非全部，表示此抗體所對抗的是部分共同決定基。
- (3)單株抗體只能與某一色帶結合，則此抗體結合的是其中單一成分抗原的專一性決定基。

因此，若每一成分色帶均能找到一株專一性單株抗體，則可以利用親和層析法分離出這些成分蛋白質。否則，佐以上述(1)、(2)兩類抗體，亦應可分出其中數個成分酵素。當然，成分蛋白質數目越少，分離越容易。

生化性質的測定結果，我們測得  $\text{NH}_2$  端為 arginine，但在其他植物者，似乎不易測得  $\text{NH}_2$  端<sup>(3,35)</sup>。在測定胺基酸組成時由於儀器的限制，我們沒有測量 tryptophan，因此可能會對整個分子的胺基酸百分比造成一點誤差。不過 tryptophan 之含量不多，我們與其他 SS 的胺基酸組成比較（圖 30），發現影響並不大。Cysteine 的含量幾近於零，其他 SS 亦有同樣的結果<sup>(3,35)</sup>。以電泳膠片染色（過碘酸-Schiff 氏染劑）檢定 SS 可能不含醣類，至於有無含有脂質則需進一步檢定。

## 第二節 免疫學研究

水稻蔗糖合成酶對兔子免疫很容易產生抗體，而玉米 SS 亦如所料可對此抗血清有交叉抗原性。在做雙向擴散時，發現有一較淡的沉澱線（圖 15），後來檢定為未知蛋白 P56 所造成的。這是因為所用來免疫的 SS-5 仍雜夾有極微量的 P56，而 P56 之抗原性非常地強（見免疫轉印圖譜，圖 28），故甚易誘導出其抗體。由圖 41, 42 看來，P56 幾乎如影隨形地跟著 SS 在純化過程中被夾帶出來，其蛋白質量很低，不易以電泳膠片經 CBR 染色檢示出來。由於 P56 的強抗原性，我們在細胞融合實驗中，也篩得兩株抗 P56 的單株抗體（A1 及 A10）。

以傳統血清抗體發展的 ELISA，約可測得  $0.5\sim 5\ \mu\text{g/ml}$  的抗原 SS，或  $0.01\sim 1\ \mu\text{g/ml}$  的抗體。其靈敏度雖比 RIA 稍遜，但足敷本實驗之應用。我們所用的明膠 NET 液在降低非專一性吸附上，有相當大的貢獻。

### 第三節 單株抗體

我們所得六株單株抗體中，有兩株是抗 P56 的 (A1, A10)，另外四株則為抗 SS。由相對親和度及胜肽免疫圖譜可判定第二組的兩株 (A12, D8) 分別對抗 SS 分子上不同的抗原決定基，而且此二株均對水稻 SS 表現出較強的親和力 (圖 24)。尤其是 A12，在 ELISA 上對玉米 SS 幾乎不反應，故可利用為鑑別兩種不同來源 SS 的工具。但 A12 在胜肽免疫轉印圖譜上 (圖 28) 對玉米的部分胜肽有呈色；反而是 D8 對玉米的胜肽不呈色，但在 ELISA 上則對玉米 SS 有一點結合能力。雖然 ELISA 與胜肽免疫轉印的機理並不完全一樣，前者是對整個抗原，而後者是對其胜肽結合，但不甚一致的結果仍令人困惑。第三組的兩株則表現出令人意外的結果，在 ELISA 上其對玉米 SS 的結合比水稻者強很多 (圖 24)。我們試過將玉米 SS 吸附到固相的溶液濃度減低至一半，但仍出現了較強的呈色 (結果未表)。在相對親和度的測定上，除了第三組外，其他各株抗體均表現出對水稻 SS 有較強呈色。對第三組抗體而言，可能玉米 SS 的抗原性大於水稻者；但此抗體原是由水稻 SS 所誘導出來的，故我們提出一些模型來解釋這個現象 (圖 26, 27)。其中之一符合 Clonal selection 理論的說法。即根據 Germ-line 理論，抗體 V-域的遺傳子在接合子的 germ-line 中佔有獨立的領域，而在生物的進化過程中亦經過變異、複製與選擇等作用，於是存在於 B 細胞表面的抗原受體 (即抗體；根據 Clonal selection 理論)，不一定與由外界所加入抗原的決定基有最好的互補結構，而可能與其變異性抗原決定基有最大親和性<sup>(39)</sup>。

測定抗體對 SS 的親和度時，因為用來做放射性標識的 Chloramine-T 很可能會破壞抗體，而導致其與抗原結合力的改變，這樣測出來的親和度可能會有問題，尤其單株抗體更易受到影響。不過我們經比較後認為相對親和度的測定，仍有相當大的參考價值與可信度。

所有單株抗體在雙向擴散上，均不造成沉澱線，混合在一起亦不產生。可能因 SS 為一相當大的蛋白質，抗原決定基甚多，而我們所收到的單株抗體數目不多，尚不足以造成沉澱的晶格。

各單株細胞株均經過一次單株化，由於在限數稀釋時，均小心挑選出只長有單一細

胞羣落者，故相信其單株性應無問題。但在往後培養過程中，由於染色體有可能因細胞分裂而失落，故其單株性會改變，則須再次進行單株化。可由其 ELISA 或胜肽免疫轉印圖譜的異常察覺到單株性的失去。

以單株抗體對抗原的胜肽圖譜進行免疫轉印法，可以提供一個判定兩株單株抗體之間關係的方法。我們相信此方法至少在判定兩株抗體為源自相異細胞株時，其結果應屬可靠。另方面，到目前尚無一個絕對的方法可以判定兩抗體源自同一細胞株。

對某抗原或一羣相關抗原進行篩選分析時，使用傳統抗血清或單株抗體為探針，以 ELISA 或胜肽免疫轉印法為手段，可以依實驗所需，進行不同組合的分析方式，如表六所示。以方法而言，當樣本數量很多時，可以採用 ELISA；小量而需精密檢定時，可用胜肽免疫轉印法。以所用抗體而言，初步篩選可用傳統血清，進一步分析可使用單株抗體找出其相異處。此系統於後日水稻遺傳學研究時，對特定遺傳形質的篩選有很大的用途。

表六 以免疫生化手法組合的篩選分析法

		檢 驗 方 法	
		ELISA	胜 肽 免 疫 轉 印 法
所使用抗體	傳 統 抗 血 清	初步大量篩選，可選出所有具抗原性者。	可檢視出胜肽中所有具有抗原性者，可比較大略的異同。
	單株抗體	可做大量篩選，檢視特定的遺傳形質標幟或分子構造。	檢視抗原構造細部異同，檢出具專一性的抗原決定基。

#### 第四節 水稻與玉米蔗糖合成酶之比較

由生化性質看來，不管在分子量、四級構造、胺基酸組成、胜肽圖譜上，兩種 SS 間均有很大的相似性。傳統免疫的檢定，則在雙向擴散上可看出二者有共同的抗原性，但亦有相異者。此同中有異的構造，可用單株抗體以 ELISA 或胜肽免疫轉印法完全解析出來（圖 28）。我們希望能進一步利用這些抗體把兩種 SS 不同的抗原決定基找出，詳究其差異，也許能對免疫抗原性與胜肽組成之間的關係有所了解<sup>(41)</sup>。

蔗糖合成酶因此可能以相當保守的分子構造普遍存在於各種植物的澱粉貯藏組織中。各種 SS 之間的相似性極大，以水稻、玉米為例，似乎只有若干抗原決定基上的差別。若把兩種植物之間如 SS 的同功酵素，以遺傳工程手法，互換到對方的基因中，觀察其表現情形，則是一相當有趣的題目。這種類似動物器官移植的操作，也是一個很好的

高等植物遺傳工程研究的模型系統。

## 第五節 P56 蛋白質

我們尚不知 P56 蛋白質的生理作用為何，不過由第五章第三節最後所提到的理由，相信其存在一定有相當的意義。P56 完全是由單株抗體 (A1, A10) 所找出來的，它在 SS-5 中的雜夾量相當少，但因抗原性很強，因此可以誘導出抗體來。這也是一個例子，說明免疫學手法，尤其是單株抗體工具，如何提供與一般生物化學方法相當不同的研究方向。另外，由於硝酸銀染色的發展，檢示樣品的靈敏度大增，使得蛋白質的純度要求亦大大地提高。綜合此二端，我們可以預測將來的生化研究將趨向更純（蛋白質）且更精細（檢定工具）。

## 第六節 展 望

如緒論中的工作分期（第一章第四節），我們已完成大部分的第一、二期工作，而第三期工作亦進行中。關於第四、五期的工作，則待第三期工作告一段落後，才有能力進行詳細策畫與執行。尤其第五期的植物遺傳工程方面的研究，世界上先進實驗室的工作亦正處於筭路藍縷的階段<sup>(42)</sup>。

不過就蔗糖合成酶而言，我們仍可描繪大略的遠景。首先要取得水稻 SS 的基因與 cDNA，由核酸定序即可得知胺基酸次序。然後進行 SS 基因與 SS cDNA 之間的混成，或比較水稻與玉米胺基酸次序異同。水稻遺傳學方面的調查，希望有適當的變異株以供比較。最好能像玉米一樣，有控制澱粉合成基因的跳動基因存在。水稻原生質體之無法再生為植株是一大難題，也許藉著與他種植物原生質體的融合<sup>(43)</sup>，導入外來基因，能達成再生目的。這些都在未知之數，不過就目前的跡象看來，研究水稻蔗糖合成酶在植物澱粉代謝上的角色，其在分子遺傳層次的控制機理，以及如何以基因重組技術來改變水稻的遺傳形質等，都是相當有趣而充滿挑戰性的。