

甘藷塊根 L 型澱粉磷解酶表現蛋白質之建構與其生化活性之研究

系所：微生物與生物化學研究所 生物化學組

研究生：張瓊尹

指導教授：莊榮輝

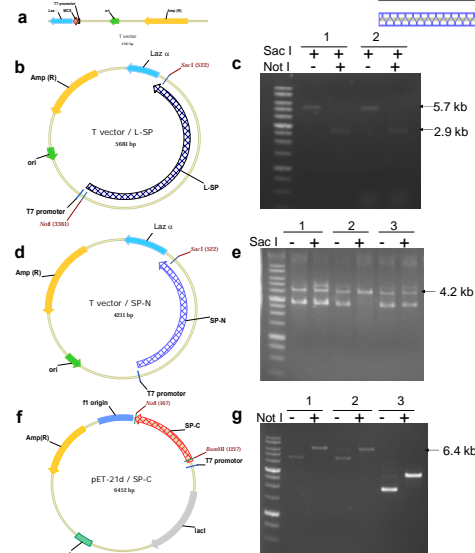
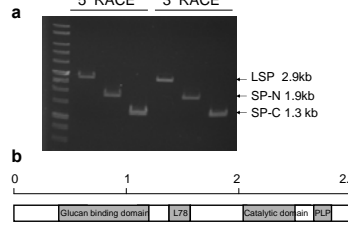
摘要

澱粉磷解酶 (SP, EC 2.4.1.1) 為植物中澱粉合成與分解的重要酵素之一，負責催化 α -1,4-葡聚糖之可逆式磷酸反應，反應式如下：
 $(\alpha$ -1,4-polyglucan) $_n$ + phosphate \rightleftharpoons (α -1,4-polyglucan) $_{n-1}$ + D-glucose-1-phosphate
 。甘藷的澱粉磷解酶有兩種同功酶 (isozyme)，分別為 L 型 (L-SP) 與 H 型 (H-SP) 澱粉磷解酶，兩者在構形上之差異為：L 型澱粉磷解酶中間多出一段 78 個胺基酸組成之序列，命名為 L78，這段區域極易遭受蛋白酶的攻擊而斷裂，斷裂的 L-SP 對整體構型影響不大。本實驗室發現完整的 L-SP 不需要醱引子 (primer) 存在就可催化葡聚糖合成反應 (primer independent activity, PI activity)；一旦 L78 斷裂則會失去 PI activity。L-SP 是從甘藷中直接純化而來，純化出來的 L-SP 混合斷裂型與完整型，且無法將這兩型分離，為了更深入研究不需要醱引子合成葡聚糖機制，我們利用重組蛋白質的方式建構出不同長度之 L-SP，未來可能參與引子合成之關鍵胺基酸突變，以證實我們的假設。目前已有的 clone 包含：全長 L-SP (2.9 kb)、含 L78 之 N 端 L-SP (SP-N, 1.8 kb)、不包含 L78 之 N 端 L-SP 與 C 端 L-SP (SP-C, 1.3 kb)；然而只有 SP-C 被成功表現出來。SP-C 於大腸桿菌 BL21 中表現，利用質體上帶有六個 histidine 胺基酸，經由 nickle affinity chromatography 將 SP-C 純化出來，推測其分子量應為 42 kDa。無論改變 IPTG 誘導濃度或培養溫度，SP-C 仍會形成 inclusion body 而沉澱下來，因此改變必須進行 inclusion body 純化與 structure refolding，使 SP-C 最後摺疊成正確構形。SP-C 帶有 catalytic domain 與 PLP binding domain，雖然沒有 glucan binding domain，但仍具有澱粉磷解與合成活性，且似乎也具有 PI activity。隨著外加入輔酶 pyridoxal phosphate 濃度越高，SP-C 活性越強，表示 PLP binding domain 上 Lys 的重要性，因此未來會進行 Lys 的點突變加以證明，另外 SP-C 並無一般磷酸酶的活性，故磷酸根的釋出為葡聚糖合成方向之活性而非水解反應的結果。

結果

● 建構三個不同片段大小之 L-SP, SP-N 上有 Glucan binding domain 與 L78 loop, SP-C 上有 Catalytic domain 與 PLP binding domain

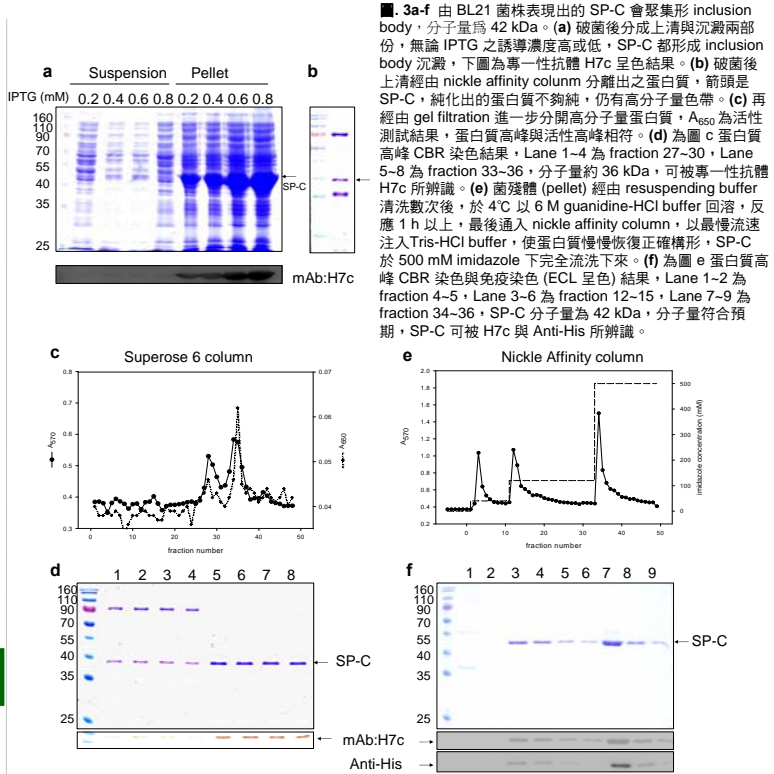
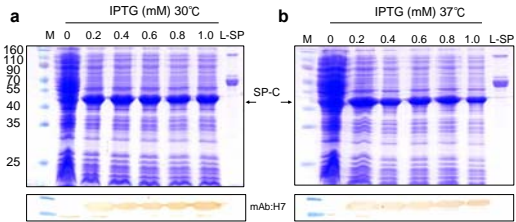
■ 1a-b 抽取甘藷塊根 mRNA，利用 5' RACE 與 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) 方式將 mRNA 反轉錄成 cDNA，設計三組專一性引子 (primer) 並以 L-SP cDNA 作為模板，以 PCR 方式放大 L-SP 全長、N 端 L-SP 與 C 端 L-SP。(a) Lane 1-3 為 5' RACE cDNA, Lane 4-6 為 3' RACE cDNA, L-SP 分子大小為 2.9 kb、SP-N 為 1.9 kb、SP-C 為 1.3 kb。(b) 分析 L-SP 上的各種功能性區域 (functional domain)：SP-N 含有 glucan binding domain 與 L78 loop, SP-C 含有 catalytic domain 與 PLP binding domain, L-SP 含有上述四種 domain。



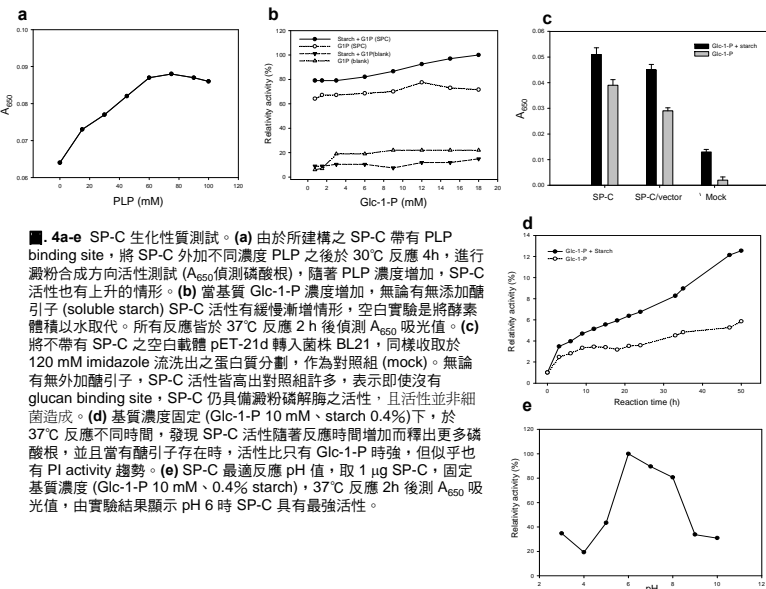
■ 2a-g 建構三種不同長度之 L-SP，並由限制酶於 37°C 反應 1.5 h 後由 1% agarose gel 確認其分子大小。(a) T vector 之基因圖譜，上面有一區域為 multiple cloning site，可接上外來基因。(b) 為 L-SP 經由 PCR 後於 3' 端加上一個 adenine，再接上 T-vector 後轉型進入 DH5a 保存，經定序結果確定為 L-SP。(c) 利用 L-SP 前端有 Sac I 切位而後端有 Not I 切位，利用 double digestion 將 L-SP 切下。Lane 2、4 為 Sac I 作用下切下之 linear form L-SP，其分子大小約為 5.7 kb，當 Sac I 與 Not I 同時作用會切出 2.8 與 2.9 kb，分子量太接近，無法從膠片上分辨出來。(d) SP-N 接上 T-vector 之基因圖譜。(e) 利用 SP-N 前端有 Sac I 切位，成功切出 4.2 kb 片段作為辨識，第二組為成功轉型株，第一、三組失敗。(f) 為已定序之 SP-C 利用前後端 Bam HI 與 Not I 切位將 SP-C 切下並接合入表現載體 pET-21d。(g) 利用 Not I 進行確認，第一、二株可切出 6.4 kb 片段，為成功轉型株，其後即於表現型大腸桿菌 BL21 中進行表現。

● SP-C 表現於 BL21 菌株中會形成 Inclusion Body，分子量大小約為 42 kDa

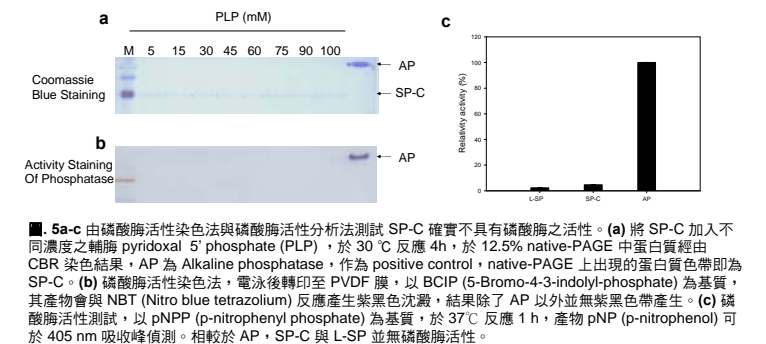
■ 2a-b 攜帶 SP-C 之表現載體 pET-21d 經轉型進入 BL21 菌株後，找出最適培養溫度為 30°C，最適 IPTG 誘導濃度為 0.8 mM。(a) 在不同 IPTG 濃度下，於 30°C 震盪培養 4h，於 15% SDS-PAGE 中蛋白質以 Coomassie Brilliant Blue 染色結果，Lane 10 為純化之 L-SP，作為控制組，下圖為免疫染色結果，SP-C 可被 L-SP 專一性抗體 H7c 所辨識。(b) 在不同 IPTG 濃度下，於 37°C 震盪培養 4h，15% SDS-PAGE 中蛋白質以 Coomassie Brilliant Blue 染色結果，下圖為免疫染色結果。



● C 端澱粉磷解酶仍具有澱粉合成方向之活性，其活性皆會隨輔酶 PLP 加入、反應時間、基質濃度 (Glc-1-P) 增加而增加



● 證明 SP-C 藉由磷解酶活性釋出 Glc-1-P 之磷酸根 (Pi)，並非磷酸酶活性所造成



■ 5a-c 由磷酸酶活性染色法與磷酸根活性分析法測試 SP-C 確實不具有磷酸酶的活性。(a) 將 SP-C 加入不同濃度之輔酶 pyridoxal 5' phosphate (PLP)，於 30°C 反應 4h，於 12.5% native-PAGE 中蛋白質經由 CBR 染色結果，AP 為 Alkaline phosphatase，作為 positive control，native-PAGE 上出現的蛋白黃色帶即為 SP-C。(b) 磷酸酶活性染色法，電泳後轉印至 PVDF 膜，以 BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) 為基質，其產物會與 NBT (Nitro blue tetrazolium) 反應產生紫色色沉澱，結果除了 AP 以外並無紫色色帶產生。(c) 磷酸酶活性測試，以 pNPP (p-nitrophenyl phosphate) 為基質，於 37°C 反應 1 h，產物 pNP (p-nitrophenol) 可於 405 nm 吸收峰偵測。相較於 AP，SP-C 與 L-SP 並無磷酸酶活性。