

答問錄 [WDJ 20060118]

Report

- (1) 目前在高等植物中，已知的 glyceraldehy-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) 有三種：GAPC (cytosolic), GAPA/B (chloroplast), GAPN。 (Powerpoint Page 5)
- (2) 以 2DE 電泳及 CBR 染色比較 (吳裕仁 2006) 結果顯示，在竹筍生長過程中 GAPC 表現量呈漸減趨勢。然而以活性染色比較，結果 GAPC 活性卻隨竹筍生長而呈漸增趨勢。 (Powerpoint Page 21)
- (3) 若分別以 NAD 或 NADP 進行 GAPDH 活性染色，可發現兩種不同的酵素活性。其中 NAD-dependent 應該是 GAPC，而 NADP-dependent protein 則無法確認為 GAPA/B 或 GAPN。原因如下：
 - a. NADP-dependent 在只有 NAD 存在的條件下，也能看到活性，但活性較弱。此為 GAPA/B 的特點。
 - b. 在活性染色實驗中，不論是否有 As 的存在，NADP-dependent protein 的活性都一樣。此為 GAPN 的特點。(但是活性染色結果也顯示 GAPC 的活性亦不會受到 As 影響，此現象與已知文獻不符)
 - c. 竹筍生長過程中，NADP-dependent protein 活性沒有明顯增減，但推論 GAPA/B 應該要有漸增的趨勢。(因為綠色部位增加，葉綠體的量也應增加)

Q&A

- 莊榮輝： 吳裕仁的實驗裡所得到的 GAPDH 為哪一種，蛋白量消長是否明顯？
- 吳岱澤： 根據吳裕仁的 2DE 電泳顯示，GAPDH 在未出土竹筍中出現的 spot 相當明顯，而比較出土 60 cm 竹筍的 2DE 電泳圖，GAPDH 在同一位子上的 spot 明顯減少。由 LC/MS/MS 結果顯示，三點皆為 GAPC。
- 吳裕仁： 此目測結論與使用電腦軟體比對結果相同，我還會再做一次實驗確認。
- 王維德： 單純用總蛋白質量作為比較的基準點，是否可信。是否能找其他特定蛋白質作為比較的基準點？
- 吳岱澤： 我目前的策略是進行蛋白質純化，最後再製作酵素純化表，比較相同重量的竹筍樣品中，所含有的酵素活性單位，再與之前實驗結果比較是否一致。
- 莊榮輝： 可以去找 paper，選擇一個蛋白質作為 internal standard 作為基準。Rubisco?
- 莊榮輝： 既然 GAPN 可能受 14-3-3 protein 調控，那麼在 2DE 電泳中 14-3-3 protein 表現量是否會隨著竹筍生長而改變？
- 吳岱澤： 目前關於 14-3-3 protein 部分，僅有 LC/MS/MS data 上發現其 protein 存在，至於在生長過程中的消長部分還未確認。
- 吳裕仁： 消長部分我會再做確認。

Conclusion

- (1) 要先確定 (2DE) 這些 GAPDH 確實在快速生長期間有消長。 (緣起)
- (2) 再分別檢視這三種 GAPDH 的消長關係，這時就要做得精確、深入。 (主體)
- (3) 若能夠再牽連到 14-3-3 就可能連上信息傳導。 (展開)