

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

不需醣引子之甘藷澱粉磷解酵素純化策略及催化 機制之研究

Catalytic mechanism and purification strategy of primer-independent starch phosphorylase

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC90-2313-B-041-006

執行期間：90年08月01日至91年07月31日

計畫主持人：陳師瑩 助理教授

協同主持人：葉東柏 教授

E-mail: shihying@mail.chna.edu.tw

執行單位：嘉南藥理科技大學

中 華 民 國 91 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

不需醣引子之甘藷澱粉磷解酵素純化策略及催化機制之研究

Catalytic mechanism and purification strategy of primer-independent starch phosphorylase

計畫編號：NSC90-2313-B-041-006

執行期限：90年08月01日至91年07月31日

主持人：陳師瑩 助理教授 嘉南藥理科技大學保健營養系

協同主持人：葉東柏 教授 嘉南藥理科技大學生物科技研究所

一、中文摘要

過去的實驗多因 SPi (Ib-LSPi) 不穩定且缺乏相關的性質研究，使得 SPi 的研究受到相當的阻力，然而近來對 SPi 活性表現的掌握越臻成熟，因此有機會進行 SPi 與 SP (Ib-LSP) 之比較性研究，結果顯示 SPi 與 SP 是不完全相同的酵素。至少有兩種可能機制仍需進一步釐清：一是 SPi 與 SP 可能有構形上的變化差異，二是存在一個輔助蛋白質可以輔助 SP 進行不需引體的活性 (SPi) 反應。

關鍵詞：不需要外源引體之澱粉磷解、催化機制。

Abstract

It was difficult to research the characteristics of SPi because of unstable in the past several year. However, stable activity of SPi was controlled well under mature analytic technique. Hence, we could proceed the comparison of the SPi and SP. The results indicated that the SPi and SP was not the same enzyme. Two types of possible mechanisms at least would be examined in advance. One of the reasons that SPi/SP was only conformational change. Two is SPi activity need assistant protein and SP cooperative each other.

Keywords: primer-independent starch phosphorylase (SPi), catalytic mechanism.

二、緣由與目的

在甘藷 (Tainong 57) 塊根中，會發現到兩種澱粉磷解：一是不需要外源引體 (Ib-LSPi, SPi; *Ipomoea batatas*, primer-independent starch phosphorylase)，另一為需要引體 (Ib-LSP, SP; *Ipomoea batatas*, primer-dependent L form SP) 才有活性。這兩種澱粉磷解目前無法用任何純化方法分離⁽¹⁾，其中一個原因是 SPi 相當不穩定。因為 SPi 不穩定且缺乏相關的性質研究，導致無法進一步的瞭解 SPi 是否存在生理意義，只有進行相關的酵素化學等性質分析後，確立穩定 SPi 活性因素，並嘗試建立其純化策略，才有機會釐清 SP 與 SPi 兩者間的關係。

本研究除了設法找到穩定 SPi 活性的要素外，並同時分析鑑定 SPi 與 SP 之間蛋白質結構與活性的差異，進而分析判斷 SPi 與 SP 是否是相同的、具雙功能的酵素？亦或是不完全相同、且另有不同的催化機制？唯有先釐清 SPi 與 SP 之間的關係，才能對澱粉合成的起始反應機制與關鍵酵素⁽²⁻⁴⁾有進一步的瞭解。

三、結果與討論

材料：本實驗材料均採用台農 57 號甘藷 (*Ipomoea batatas*, Tainong 57)，此甘藷之特色為葉片成三叉形，塊根表皮白色，肉

質成淡黃色，富含澱粉，具經濟價值。於塊根形成期，挑選適當大小的塊根，放置於 -80°C 儲藏等待試驗。

SPi 檢定：將粗抽或純化的樣品立即以原態膠體電泳分離，以不加引體的方式進行活性染色分析（內僅含 200 mM Sodium acetate buffer pH 5.4 及 100 mM Glucose-1-phosphate (G1-P)），此即為本實驗檢定 SPi 之主要方法；所以當不加引體時，出現活性染色帶時，即表示存在有 SPi⁽²⁾。

結果與討論：最適當的 SPi 活性分析條件為甘藷材料必須取自新鮮甘藷，並以 250 mM 之 imidazole buffer pH=5.4 緩衝液進行粗抽，並在 5% Native-PAGE 電泳後，以 sodium acetate pH 5.4 的緩衝液中進行活性分析效果最佳。基於本研究比以往更能掌握 SPi 活性的特性，以粗抽液為例，該蛋白質在 4°C 下可以穩定保持 13 天，比過去最多只能維持活性兩天，就有大幅的突破，並能在 3 小時內能將 SPi 蛋白質以 Pharmacia Q Sepharose Fast Flow 一步純化出來 (data not shown)，使得有較多的機會同時分析鑑定 SPi 與 SP 之間蛋白質結構與活性的差異。

有充份的理由相信 SPi (Ib-LSPi) 與 SP (Ib-LSP) 是不完全相同的。

假設 SPi 與 SP 是同一種酵素，但卻具有雙功能 (bifunction) 的生物活性；則 SPi 與 SP 活性分析之泳動圖譜應該是一致的。

證據一：甘藷在歷經硫酸銨分劃、陰離子交換層析法及製備式原態膠體電泳，所純化出來的 SP，同時在原態膠體電泳中進行不含引體 (SPi) 與 SP 的活性鑑定時，儘管在高濃度、單一受質的 G1-P 與加長反應時間下，仍未見不需引體的澱粉磷解酵素 (SPi) 的催化活性，但 SP 的活性卻

可以穩定表現出來。這個結果顯示 SPi 可能在純化過程中失去活性，或 SPi 在純化過程中被去除掉。

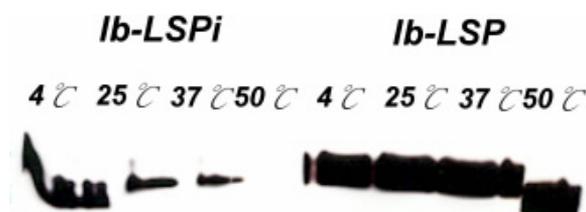
證據二：如果不經純化步驟，直接以新鮮甘藷進行粗抽後，同時在原態膠體電泳 (5%、7.5% 與 12.5%) 中進行 SPi 與 SP 的活性鑑定時，SPi 的活性，僅在 5% 原態膠體電泳中可以比較穩定的表現出來；但 SP 的活性不論在何種條件下的原態膠體電泳中，皆可以穩定呈現。這個結果顯示 SPi 可能在 7.5% 與 12.5% 原態膠體電泳過程中與 SP 分離或泳動過程中因產熱效應及泳動時間過長而失去活性。

證據三：同證據二的條件下，在進行 5% 原態膠體電泳時，如果電泳條件不一致 (使用的伏特數與電泳時間)，偶而會發現 SPi 的活性測定，不盡然全能偵測到。這個結果顯示 5% 原態膠體電泳可能是因分離效果的差異所致，換言之，SPi/SP 若在電泳中未能完全分離，則出現 SPi 活性結果的機會相當大；反之，分離效果佳，不見得觀測到 SPi 活性。為什麼 SPi/SP 在電泳中未能完全分離，出現 SPi 活性結果的機會相當大？推測原因是 SPi 所反應出的寡醣類 (primer) 若同時為 SP 所利用，並產生大量澱粉時，將容易為碘染所呈色出來；然而，SPi 單獨反應所產生的短鏈寡醣物質，並非容易與碘液形成藍黑色反應。

證據四：甘藷材料的新鮮度影響 SPi 活性分析結果，換言之，剛採集的甘藷或新鮮採集並立即在 -80°C 儲藏的甘藷比較容易偵測到 SPi 的活性；反之，在室溫或冷藏保存的甘藷很難偵測到 SPi 活性；然而，SP 不論在何種儲存條件下皆有活性。這個結果顯示 SPi 可能會在不當的儲藏條件下失去活性。

證據五：新鮮甘藷經粗抽後分別放置於 4°C 、 25°C 、 37°C 與 50°C 孵育 (incubation) 10 分鐘後，再進行電泳活性分析。結果顯示 50°C 孵育的甘藷粗抽液 SPi 活性消失。 25°C 及 37°C 條件下 SPi 活性表現不高，但 4°C 條件下 SPi 活性則穩定存在；

然而，SP 不論於上述何種條件下皆有活性。這個結果亦顯示 SPi 可能會在不當的儲藏條件下失去活性且有溫度敏感性，比 SP 還要不穩定。（圖一）

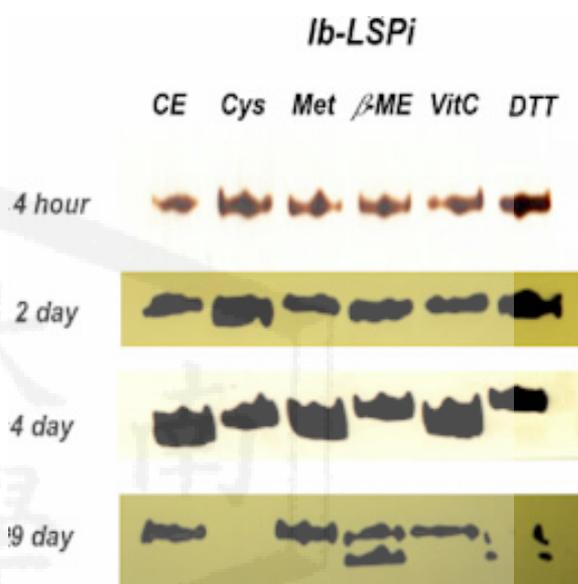


圖一：新鮮甘藷經粗抽後分別放置於 4°C、25°C、37°C 與 50°C 孵育 (incubation) 10 分鐘後，進行 Native-PAGE。

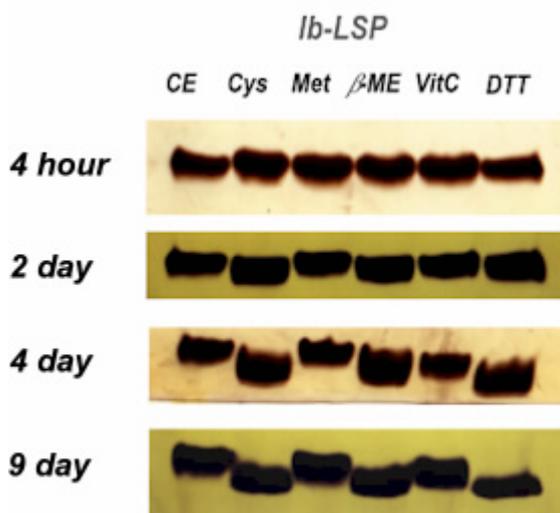
證據六：以添加不同的抗氧化物 (5 mM beta-mercaptoethanol, DTT, cysteine, vitamin C and methionine) 之緩衝液進行新鮮甘藷粗抽，粗抽液在 4°C 下儲藏，每隔數天便分析鑑定一次 SPi 與 SP 的活性，比較圖二與圖三的結果，仍可發現 SPi 與 SP 活性分析之泳動圖譜並非一致。尤其在 Cys 的處理下的第 9 天，SPi 的活性已經消失，但 SP 活性依舊在。beta-mercaptoethanol (β -ME) 與 DTT 的處理下也有一些不同 (請見圖二與三)。

如果 SPi 與 SP 是不完全相同的，則可以推論 SPi 失去活性的可能機轉有三：一是、SPi 類似 Zymogens，當 SPi 斷裂某段 鍵後，隨即轉變成 SP。由於 SPi 與 SP 在電泳中的泳動率相當類似，因此推測該 鍵分子量不會很大。且 SPi 應比 SP 分子量大，此外 SPi 一但轉變成 SP 後便應永久喪失 SPi 活性，以及應存在另一種酵素作為剪切該 鍵之用。然而從圖二的電泳圖譜來看，SPi 類似 Zymogens 的可能性不高。理由是在 β -ME 與 DTT 的處理下的第 9 天，SPi 的活性出現於兩處，以泳動率較快的 SPi 來看，分子量應該較小，以此機制來說 SPi 也不應有活性存在。

二是、SPi 與 SP 可能只是構形上的改變 (conformational change)，類似 glycogen phosphorylase a and b 的變化。如果只是構形上的改變，欲以 5% Native- PAGE 電泳分析觀測其泳動率的不同，並非容易。若以 2D SDS-PAGE 觀測其蛋白質圖譜的差異，理論上也不應觀測到差異存在。以目前的電泳圖譜來看 (圖二至六)，尚且無法確認該機制是否成立。

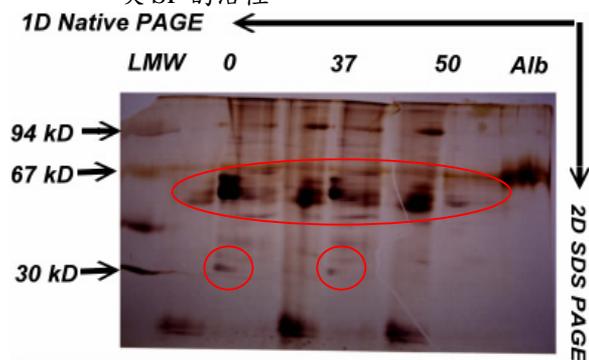


圖二；添加不同的抗氧化物 (5 mM DTT, beta-mercaptoethanol, cysteine, vitamin C and methionine) 之緩衝液進行新鮮甘藷粗抽，粗抽液在 4°C 下儲藏，每隔數天便分析鑑定一次 SPi 的活性。



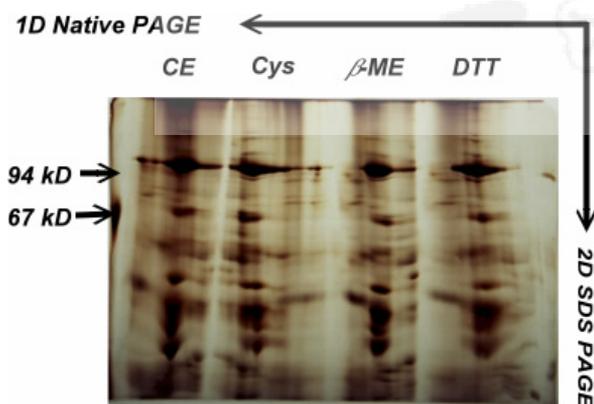
圖三；添加不同的抗氧化物 (5 mM DTT, beta-mercaptoethanol, cysteine, vitamin C and methionine) 之緩衝液進行新鮮甘藷粗抽，

粗抽液在 4°C 下儲藏，每隔數天便分析鑑定一次 SP 的活性。



圖四;將圖一結果向右旋轉後，進行 2D SDS-PAGE，因此每一條件的右方，蛋白質圖譜的相對泳動較慢。

例如圖四 2D SDS-PAGE 的結果，觀察 4°C、37°C 與 50°C 孵育 10 分鐘後，SPi 蛋白質圖譜的差異，可以觀察到 SPi 從具有催化活性演變成無活性特性時。是存在一些不同的蛋白質圖譜差異（請見圖中以紅圈顯示）。但此差異也有可能是因為實驗條件下（溫度效應）所引發的蛋白質裂解的效應，且可能與 SPi 活性的變化無關；同理也發生在添加不同抗氧化物之緩衝液所進行新鮮甘藷粗抽的實驗（圖五至六）。雖然仍可發現 SPi 活性改變後之泳動圖譜並非一致（請見圖中以紅圈顯示）。

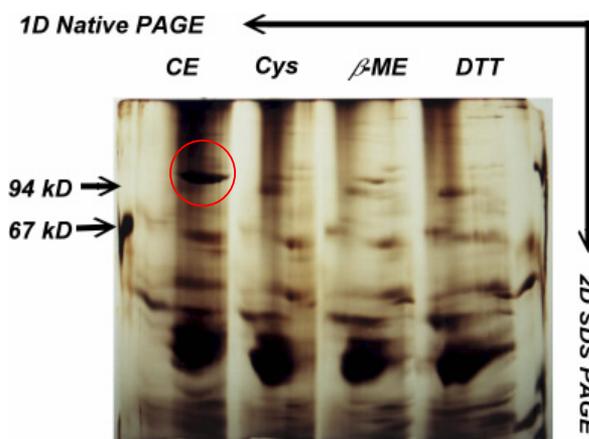


圖五;將圖二 4 hour 的結果向右旋轉 90 度後，進行 2D SDS-PAGE，因為各組無差異，故各組蛋白質圖譜亦驅於一致。

三是、SPi 可能是 SP 加上某一個未知因子（假設為 X-factor）所表現的活性。換言之，這個 X-factor 可以輔助 SP 進行不需引

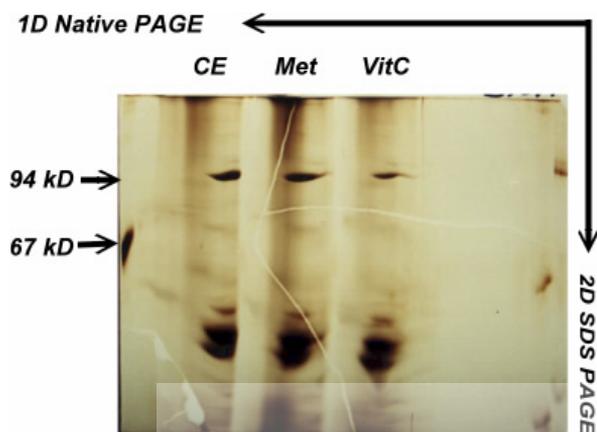
體的活性（SPi）。而 X-factor 可能類似 chaperonins⁽⁵⁾ 或 glucoproteic acceptor^(6,7) 的概念。推測 X-factor 分子量應該很小（因為 SPi 與 SP 的泳動率相當一致），並與 SP 的親和性很高，以非共價鍵的方式結合，因此 SPi 應比 SP 分子量大，但是當 SP 發生部分降解時（過去的實驗可以發現 SP 會從降解部分鍵，而改變其泳動率，造成 SP 電泳泳動中出現多形性蛋白質的型式），SP 可能戴著 X-factor 往前泳動（分子量變小），這個理由比較可以解釋圖二第 9 天 β-ME 與 DTT 條件下，SPi 活性同時出現於兩處現象的結果。如果這個機制成立，在進行 2D SDS-PAGE 時應該會發現一些不同的蛋白質圖譜，尤其在低分子量處。

觀察圖四以溫度處理的結果，是可以發現在低分子量處，0°C 與 37°C 條件下（有 SPi 活性），多一個蛋白帶（約 30 kD），明顯與 50°C（無 SPi 活性）不同（圖中以紅圈顯示顯著差異的地方），該蛋白帶是否就是 X-factor，需要進一步證實，才能定論。此外在 55 kD 與 110 kD 附近也有顯著差異（以紅圈顯示），則反應 SP 受溫度效應所導致蛋白質結構的變化與降解的程度，但這一結果似乎並不影響 SP 的活性（圖三），卻會影響 SPi 活性的表現（圖二），暗示 SPi 活性的表現需要在 SP 與 X-factor 同時存在的情形下，才能偵測到。



圖六;將圖二第 9 day 的結果向右旋轉 90 度後，進行 2D SDS-PAGE，因為各組條件在 1D

Native-PAGE 下有差異，故各組蛋白質圖譜應出現差異，圖中以紅圈顯示顯示差異的地方。



圖七；將圖二第 9 day 的結果向右旋轉 90 度後，進行 2D SDS-PAGE，因為各組分析條件無顯著差異，故各組蛋白質圖譜應趨於一致。

進一步觀察不同抗氧化處理條件的 2D SDS-PAGE 的結果（圖五至七）。圖五因為各組條件均在新鮮狀態，經 SPi 活性鑑定無差異下（圖二，4 hour），故各組 2D SDS-PAGE 蛋白質圖譜是趨於一致性；當到達第 9 天，SPi 活性出現差異時（圖二、六及七），會發現 CE、Met 及 VitC 之 110 kD 附近多一蛋白帶與 Cys、 β -ME 與 DTT 的處理的條件下有顯著差異，該蛋白質帶的出現與 SP/SPi 或 X-factor 之間是否有關尚難推斷，不過明顯與 SPi 活性的有無，呈現某些關係。未來應考慮進行 glycogen phosphorylase 與 chaperonins 之 Western blotting，進一步分析 SPi 的蛋白質結構特性，對於 SPi 的催化機制與生理角色才能有清楚的瞭解。

四、計劃成果自評

本研究已完成（1）SPi 蛋白質經 Pharmacia Q Sepharose Fast Flow 在 3 小時內可一步純化出來（data not shown）（2）比以往更能掌握 SPi 活性的特性，以粗抽液為例，該蛋白質在 4°C 下可以穩定保持 13 天，比過去最多只能保持活性兩天，有

大幅的突破。（3）進行 SPi 與 SP 參與澱粉合成起始反應之可能性鑑定與比較分析，並推論出 SPi 參與澱粉合成起始反應的可能催化機制。

五、參考文獻

- [1] Chang, T. C. Lee, P. D., and Su, J. C. (1987) Sweet potato starch phosphorylase purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.* 51: 187-195.
- [2] Chen, S. Y., Lee, P. D., and Su, J. C. (1997) The molecular mechanism of beta-amylase inhibition against starch phosphorylase. Doctor Dissertation., **Inst. Agr. Chem., National Taiwan University.**
- [3] Preiss, J. (1988) The biochemistry of plants, Vol. 14. pp. 181-253. In Preiss, J., ed. Biosynthesis of starch and its regulation. **Academic Press, New York.**
- [4] Chen, S. Y. and Chen, C. H. (2001) 對甘藷澱粉磷解酵素具有不同抑制反應的各種醣類分子之結構鑑定. *Journal of Yuanpei Technical College.* 8:11-19.
- [5] Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature.* 381: 576-575.
- [6] Tandecarz, J. S., Lavintman, N., and Cardini, C. E. (1975) Biosynthesis of starch formation of a glucoproteic acceptor by potato non-sedimentable preparation. *Biochim. Biophys. Acta.* 399: 345-355.
- [7] Sivak, M. N., Tandecarz, J. S., and Cardini, C. E. (1981) Studies on potato tuber phosphorylase catalyzed reaction in the absence of an exogenous acceptor: I. Characterization and properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 212: 525-545.

