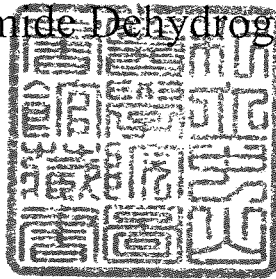


R  
008.8  
4443  
87

私立中山醫學院營養科學研究所碩士論文  
Master Thesis, Graduate Institute of Nutritional Science,  
Chung-Shun Medical and Dental College

人類二氫硫辛酸去氫酶之構造與功能的研究

Structure and Function Studies of Human  
Dihydrolipoamide Dehydrogenase (E3)



指導教授：劉德中博士、陳凌雲博士

研究生：蔡坤澤

中華民國八十七年六月

中山醫學院圖書館



C050024

參考書恕不外借

授權書  
(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 營養科學研究所  
\_\_\_\_\_ 組 86 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: 研究二氫硫辛酸去氫醇素(E3)P453-L,E192K 和 W197-F 突變蛋白質構造之穩定性

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

-----  
同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 \_\_ 年 \_\_ 月後再公開。

-----  
同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名: 劉德中、陳凌雲

研究生簽名: 蔡坤澤 學號: R85304  
(親筆正楷)

日期: 民國 87 年 7 月 15 日

- 
- 備註: 1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。  
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。  
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

## 簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尙可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：  
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：  
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話: (02)7377746 江守田、王淑貞  
地址: 台北市和平東路二段106號17樓1702室

---

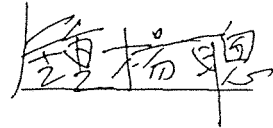
研究生姓名: 蔡坤澤 聯絡電話: 04-3209059  
地址: 台中市大聖街463號

本論文為中山醫學院授予理學碩士學位之必備條件  
之一，經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試  
委員會審查合格及口試通過

口試委員

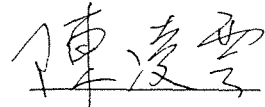
國立中興大學獸醫學系教授

鍾楊聰 博士



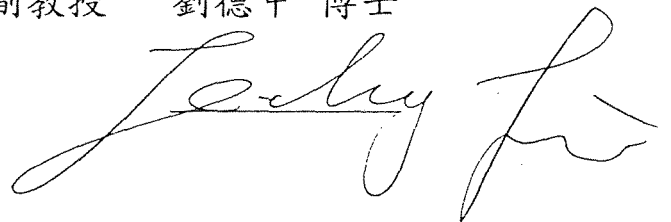
私立中山醫學院生物化學研究所教授

陳凌雲 博士



私立中山醫學院營養科學研究所副教授

劉德中 博士



中華民國八十七年六月

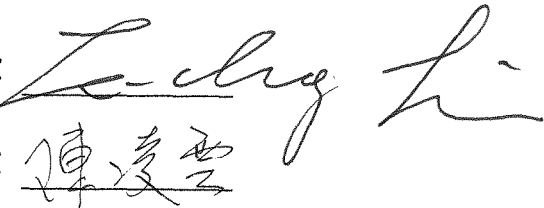
學生 蔡坤澤 論文題目為『人類二氫硫辛酸去氫  
酶之構造與功能的研究』，其論文已經中山醫學院  
營養科學研究所碩士論文考試委員會審查合格  
及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：劉德中 博士

陳凌雲 博士

簽名：

簽名：



中華民國八十七年六月

# 人類二氫硫辛酸去氫酶之構造與功能的研究

## 中文摘要

哺乳類動物的酮酸去氫酶複合體( $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex) 包括：丙酮酸去氫酶複合體(pyruvate dehydrogenase complex, PDC)、 $\alpha$ -酮戊二酸去氫酶複合體( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex,  $\alpha$ -KGDC)及側鏈酮酸去氫酶複合體(branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes, BCKADC)等三種。此類酵素複合體能將其受質經氧化脫羧產生 acetyl-CoA、CO<sub>2</sub> 及 NADH。

酮酸去氫酶複合體位於粒線體內，它是由酮酸去氫酶( $\alpha$ -Keto acid dehydrogenase, E<sub>1</sub>)、二氫硫辛酸醯基轉移酶(dihydrolipoamide acetyltransferase, E<sub>2</sub>)及二氫硫辛酸去氫酶(dihydrolipoamide dehydrogenase, E<sub>3</sub>)等三種酵素依特定比例組成複合體，進行酵素之催化反應。

上述三種酵素中，E<sub>3</sub> 是酮酸去氫酶複合體的共同組成部分，所以當 E<sub>3</sub> 酵素活性發生缺乏時，三種酮酸去氫酶複合體的活性均會受到影響。因此 E<sub>3</sub> 在能量代謝上扮演很重要的角色，缺乏 E<sub>3</sub> 的酵素活性會造成能量代謝嚴重的障礙。

因為 E<sub>3</sub> 是能量代謝上重要的酵素，所以本實驗的研究目的是研究 E<sub>3</sub> 的反應機制，尤其是 E<sub>3</sub> 反應時電子傳遞的路徑。在方法學上，本實驗是利用定點突變(SDM PCR)製造 E<sub>3</sub> 的突變蛋白質(K54E；SK-KS)，並利用分子量測定、酵素動力學、螢光分析、FAD 含量測定等方法探討酵素構造和功能間的關係。

分子量測定(molecular sieving)發現三種蛋白質的分子量大致相同大約為 100 kDa；換言之，突變本身不會影響酵素形成同質雙體(homodimer)的性質。酵素動力學研究(enzyme kinetic analysis)的結果顯示 E<sub>3</sub> 及 SK-KS 的反應機制是屬於雙受質的乒乓反應(ping pong mechanism)。蛋白質相對的 FAD 含量比 E<sub>3</sub> : SK -KS : K54E 為 100 : 82 : 90。蛋白質相對的比活性(specific activity)比 E<sub>3</sub> : SK -KS : K54E 為 100 : 46 : 1.7。螢光分析(fluorescence analysis)的結果顯示 E<sub>3</sub> 的 FAD 會被二氫硫辛酸去氫酶還原

成 FADH，然後 FADH 再進一步的將  $\text{NAD}^+$  還原產生 NADH；此一步驟在突變種明顯的比野生種慢。

綜合上述結果，推測  $E_3$  cDNA 上的第 54 號胺基酸(Lysine)參與電子的傳遞，且可能是酵素活性中心的成員之一，此胺基酸對於酵素的催化活性有關鍵性的影響。

# Structure and Function Studies of Human Dihydrolipoamide Dehydrogenase (E<sub>3</sub>)

Abstract

by

Kun-Che Tsai

Mammalian  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes includes pyruvate dehydrogenase complex (PDC),  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase ( $\alpha$ KGDC), branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes (BCKADC). These enzyme complexes catalyze the oxidative decarboxylation of  $\alpha$ -keto acid with the formation of acyl-CoA, CO<sub>2</sub> and NADH. The  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes are found in the mitochondria. Each enzyme complex is composed of three catalytic components:  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase (E<sub>1</sub>), dihydrolipoamide acyltransferase (E<sub>2</sub>) and dihydrolipoamide dehydrogenase (E<sub>3</sub>). E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> show substrates specificity and E<sub>3</sub> is the common component for all  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes. In case of E<sub>3</sub> deficiency, it will affect all  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes.

Since E<sub>3</sub> plays an important role in the energy metabolism. The approach of this study is characterizing the electron transferring pathway of E<sub>3</sub> by using site-directed mutagenesis (SDM).

To investigate the role of lysine-54 of human dihydrolipoamide dehydrogenase (E<sub>3</sub>) in the formation of intermediate during electrons transfer, two mutant human E<sub>3</sub>s, S53K54-K53S54 (SK-KS) and K54E, were overexpressed, purified and characterized. Molecular sieving analysis showed that each proteins (E<sub>3</sub>, SK-KS, K54E) was dimer with the molecular weight approximately to 100 kDa. The results of kinetic analysis show the E<sub>3</sub> and ES-KS following two substrates' ping pong mechanism. The relative FAD content of the enzymes is E<sub>3</sub> : SK -KS : K54E = 100 : 82 : 90. The relative specific



activity of the enzymes is  $E_3 : SK-KS : K54E = 100 : 46 : 1.7$ . The fluorescence analysis show that  $E_3$ ' FAD can be reduced by DHL and then formed FADH. SK-KS mutant's FADH reoxidation is significantly slowly than the wild type  $E_3$  and K54E mutant's FAD is extremely could not be reduced by DHL. The FADH will be oxidized by  $NAD^+$  with the NADH formation. At this stage, the mutant proteins (SK-KS and K54E) are significantly slowly than the wild type  $E_3$ . The data showed that the number 54th amino acid (K54) of  $E_3$  cDNA maybe participate in the enzyme's active center and specifically significantly corresponding for enzyme's activity.

## 誌 謝

兩年前的母親節，我參加了研究所入學考試；兩年後的母親節，謹以此論文獻給養育我的父母及妻玉秀、女兒蕎安、小兒明諺。若沒有他們的支持、體諒與關心，此論文是無法完成的。

大學畢業後旋即服役、工作、娶妻、生子；峰迴路轉的又回到校園，一償年輕時的夢想，得以一窺學術殿堂。兩年來恩師在研究治學上的悉心指導、體諒包容，及待人處事等各方面的啟迪薰陶，讓我獲益良多。論文撰寫期間，於繁重的研究工作中，不辭辛勞的對文稿內容多次的審校與指正，使論文能夠順利付梓。

文稿初成，復蒙中興大學獸醫學系鍾楊聰博士詳加斧正，並提供寶貴意見，使本論文更臻周延，於此一併致上萬分謝意。

研究期間承蒙王怡鈞老師、王世宗老師、廖娟妙老師李孟訓學長於實驗技巧的指導與協助；陳淑真校長於工作職務上的協助；智尹、文虎學弟、浴伶、秀仁、淑菁、佳玲學妹及本所同學的關心與協助，由衷感謝。

師恩浩蕩，無以為報；永銘於心，不敢或忘；謹藉此一隅向恩師 劉德中博士、陳凌雲博士致上最深的感謝與祝福。

蔡坤澤  
中山醫學院 營養科學研究所  
中華民國八十七年六月

# 目 錄

	頁 次
中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
誌謝 .....	V
目錄.....	VI
圖次.....	VIII
表次.....	X
附錄文次.....	XI
縮寫表.....	XII
章節	
壹、緒論.....	1
(一)二氫硫辛酸去氫酶( $E_3$ ).....	1
(二)嘌呤核苷雙硫氧化還原酶系列酵素.....	1
(三)酮酸去氫酶複合體.....	2
(四)二氫硫辛酸去氫酶缺陷的症狀.....	3
(五)二氫硫辛酸去氫酶缺陷病人的個例報導.....	4
(六)X-射線晶體結構分析.....	5
(1)NAD 結合位置的一般構造.....	5
(2)FAD 結合位置.....	6
(3)NAD 結合位置.....	7
(4)二氫硫辛酸去氫酶的活化中心.....	7
(七)二氫硫辛酸去氫酶突變蛋白之研究.....	8
(八)研究目的.....	8
貳、實驗材料與方法.....	10
(一)實驗材料.....	10
(二)實驗方法.....	12
A·表達殖體之構建.....	12
(1)定點突變核酸聚合酶鍊反應(SDM PCR)...	12

(2)聯結反應(ligation).....	12
(3)轉形作用(trnasformation).....	12
(4)微篩選作用(miniscrening).....	13
(5)去氧核醣核酸定序(DNA sequencing).....	13
(6)蛋白質大量表達(overexpression).....	14
(7)蛋白質純化(purification).....	14
B·純化 E <sub>3</sub> 及其突變蛋.....	15
(1)蛋白質濃度測定.....	16
(2)FAD 含量測定.....	16
(3)酵素動力學分析(kinetic analysis).....	16
(4)酵素螢光分析(fluorescence analysis).....	16
參、結果.....	18
(一)表達質體之構建.....	18
(二)蛋白質之表達及純化.....	18
(三)蛋白質濃度之測定.....	18
(四)FPLC 分子篩選(molecular sieving).....	18
(五)FAD 含量分析.....	19
(六)酵素動力學分析.....	19
(七)酵素螢光分析.....	20
肆、討論.....	23
伍、圖示說明.....	26
陸、參考文獻.....	55
柒、附錄.....	61

## 圖 次

	頁 次
圖 1：酮酸去氫酶複合體催化反應的總反應式.....	26
圖 2：二氫硫辛酸去氫酶催化反應的反應機制.....	27
圖 3：酮酸去氫酶複合體參與的代謝路徑圖.....	29
圖 4：二氫硫辛酸去氫酶的四個結合區.....	30
圖 5： <i>P. fluorescence</i> 的硫辛酸去氫酶雙體構造帶狀圖.....	31
圖 6：NAD 結合部位的一般構造.....	32
圖 7：FAD 與 NAD 的結構圖.....	33
圖 8：二氫硫辛酸去氫酶 NAD 結合位的胺基酸.....	34
圖 9：二氫硫辛酸去氫酶 FAD 結合位的胺基酸.....	35
圖 10：FAD 附近能與 FAD 形成氫鍵的胺基酸.....	36
圖 11：推測的人類二氫硫辛酸去氫酶活性中心.....	37
圖 12：pQE-9 表達系統 .....	38
圖 13：pQE-9-E <sub>3</sub> 突變株表達載體的構建.....	39
圖 14：FPLC Superdex HR-200 計算曲線.....	40
圖 15：FPLC 分子篩選.....	41
圖 16：E <sub>3</sub> 與 SK-KS 的酵素動力學分析.....	44
圖 17：蛋白質經 DHL 處理後的螢光反應分析.....	46
圖 18：蛋白質經 DHL 與 NAD 處理後的螢光反應分析 .....	48
圖 19：蛋白質經 NaBH <sub>4</sub> 處理後的螢光反應分析 .....	50
圖 20：蛋白質經 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 處理後的螢光反應分析.....	52
圖 21：於 FAD 與 NAD <sup>+</sup> 之間電子傳遞機制的假說.....	53
圖 22：酵素於 EH <sub>2</sub> 態與 EH <sub>4</sub> 態之間的氧化還原 機制假說 .....	54

## 表次

頁次

表一：嘧啶核苷氧化還原酶系列酵素的受質與產物 (The substrates and products of the pyridine nucleotide oxidoreductase family).....	28
表二：酵素比活性、FAD 含量、Vmax 與 Kcat (The specific activity, FAD content, Vmax and Kcat of proteins).....	43

## 附錄文次

	頁次
(1) Protocol of 1 <sup>st</sup> PCR... ..	61
(2) Protocol of purification 1 <sup>st</sup> PCR products.....	62
(3) Preparation of 1% agarose gel.....	62
(4) Protocol of 2 <sup>nd</sup> PCR .....	63
(5) Protocol of purification 2 <sup>nd</sup> PCR products.....	64
(6) Buffer preparation.....	65
(7) Restriction endonuclease digestion of <i>Bam</i> H I .....	67
(8) Restriction endonuclease digestion of <i>Sal</i> I .....	67
(9) Restriction endonuclease digestion of <i>Bam</i> H I / <i>Sal</i> I .....	68
(10) Protocol of purification <i>Bam</i> H I / <i>Sal</i> I digestion products .....	68
(11) Protocol of DNA ligation.....	68
(12) Protocol of the competent cell preparation.....	69
(13) Protocol of the plasmid DNA transformation.....	69
(14) Protocol of the plasmid DNA miniscreening... ..	71
(15).Protocol of plasmid DNA purification by Wizard Plus Minipreps kit.....	72
(16) Protocol of purification E <sub>3</sub> protein.....	73
(17) Protocol of F4500-fluorescence analysis.....	76
(18) Protocol of enzyme kinetic analysis.....	77
(19) Procedure for HPLC Mono-Q column.....	78
(19) Convert HPLC raw data to ASC II file .....	78
(20) Convert F4500-fluorescence analysis file to ASC II file.....	79

## Scheme of Abbreviation

AD:	asparaginate dehydrogenase
BCKADC:	branched-chain $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex
CoA:	coenzyme A
DHL:	dihydrolipoamide
DHLA:	dihydrolipoic acid
DNA:	deoxyribonucleic acid
E <sub>1</sub> :	$\alpha$ -keto acid dehydrogenase
E <sub>2</sub> :	dihydrolipoamide acyltransferase
E <sub>3</sub> :	dihydrolipoamide dehydrogenase
FAD:	flavin adenine dinucleotide
FPLC:	fast protein liquid chromatography
GCS:	glycine cleavage system
GR:	glutathion reductase
GSR:	bis- $\gamma$ -glutamylcystine reductase
IPTG:	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside
IR:	ion reductase
KGDC:	$\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex
K54E:	lysine 54 $\rightarrow$ glutamate
NAD:	nicotiamide adenine dinucleotide
PCR:	polymerase chain reacton
PDC:	pyruvate dehydrogenase complex
PQE:	plasmid of Qiagen expression system
SDM:	site-directed mutagenesis
SK-KS:	serine 53 lysine 54 $\rightarrow$ lysine 53 serine 54



## 壹、緒論

### (一) 二氫硫辛酸去氫酶(dihydrolipoamide dehydrogenase; $E_3$ ) :

有關  $E_3$  的研究，最早可追溯自 1939 年 Straub 自豬心純化出一種黃色的蛋白質(flavoprotein)，該蛋白質含有黃素腺嘌呤雙核苷酸(FAD)作為輔基(prosthetic group)，故呈現黃色。當時發現此蛋白質能將還原態的菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸(NADH)氧化，形成菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸(NAD)；因此 Straub 將該蛋白質命名為 diaphorase 或稱為 conzyme factor。接著 Massey (1958)發現此酵素在氧化還原態的菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸(NADH)時，可將電子傳遞至硫辛酸(lipoic acid)，而將硫辛酸還原成二氫硫辛酸(dihydrolipoic acid)，因而將此酵素重新命名為硫辛酸去氫酶(lipoyl dehydrogenase)。

Massy(1960)進一步發現硫辛酸去氫酶是 $\alpha$ -酮基戊二酸鹽去氫酶複合體( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex, KGDC)的組成分子之一。KGDC 的作用是將 $\alpha$ -酮基戊二酸鹽氧化脫羧釋放出一分子的二氧化碳，並將琥珀酸鹽基(succinyl group)轉移至 CoASH 形成琥珀酸鹽基 CoA(succinyl CoA)，同時將菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸還原成還原態的菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸(NADH)。因而得知硫辛酸去氫酶在生理狀況下的催化作用是將二氫硫辛酸氧化，形成了 lipoamide 和 NADH (參見 26 頁，附圖 1)。故將此黃色蛋白質重新命名為二氫硫辛酸去氫酶或簡稱  $E_3$ ，此一名稱即沿用至今。

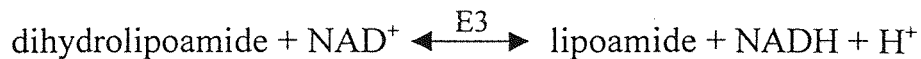
### (二) 嘌呤核苷雙硫氧化還原酶家族酵素(pyridine nucleotide disulfide oxidoreductase family) :

二氫硫辛酸去氫酶是屬於嘌呤核苷雙硫氧化還原酶(pyridine nucleotide disulfide oxidoreductase)家族酵素之一；這一族群酵素的特徵是擁有活性鹼基(active base)、活性雙硫基(active disulfide)和黃素腺嘌呤雙核苷酸(FAD)輔基；其活性中心可在電子接受者( $NAD^+$ 或  $NADP^+$ )與電子供應者(雙硫基受質, dithiol substrate)之間進行電子的傳遞。

Williams 等人(1967)曾提出:  $E_3$ 、glutathione reductase (GR)和

thioredoxin reductase (TR)等酵素的催化反應是將受質在活性鹼基的作用下，使其電子經由活性雙硫基、黃素腺嘌呤雙核苷酸傳遞到菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸(NAD<sup>+</sup>)或磷酸菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸(NADP<sup>+</sup>)。此外，同屬於嘌呤核苷雙硫氧化還原酶家族的酵素尚包括有: mercuric ion reductase (MR)、trypanothione reductase (TTR)、bis-γ-glutamylcystine reductase (GSR)和 asparaginate dehydrogenase (AD)等酵素。

E<sub>3</sub>含有活性鹼基、活性雙硫基和黃素腺嘌呤雙核苷酸，可以催化以下之可逆反應:



根據酵素動力學的研究顯示 E<sub>3</sub> 的雙受質反應屬於乒乓機制(ping pong mechanism; Massey, 1960)。此作用機制是先將二氫硫辛酸與酵素作用，反應後釋出硫辛酸；接著菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸再與酵素作用，反應後釋出還原態菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸。在整個反應中，黃素腺嘌呤雙核苷酸先被還原成還原態黃素腺嘌呤雙核苷酸(FADH)，接著還原態黃素腺嘌呤雙核苷酸(FADH)再度被氧化成黃素腺嘌呤雙核苷酸(FAD)，並將其電子傳遞給菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸(NAD)產生還原態菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸(NADH)。(參見 27 頁，附圖 2)。

### (三) 酮酸去氫酶複合體(α-keto acid dehydrogenase complexes)：

酮酸去氫酶複合體(α-keto acid dehydrogenase complexes)包括丙酮酸去氫酶複合體(pyruvate dehydrogenase complex)、酮戊醯酸去氫酶複合體(α-ketoglutarate dehydrogenase complex)及側鏈酮酸去氫酶複合體(branched chain α-keto acid dehydrogenase complex)等三種複合體。

酮酸去氫酶複合體位於粒線體(mitochondria)內，是由酮酸去氫酶(α-keto acid dehydrogenase, E<sub>1</sub>)、二氫硫辛酸醯基轉移酶(dihydrolipoamide acyltransferase, E<sub>2</sub>)及二氫硫辛酸去氫酶(dihydrolipoamide dehydrogenase, E<sub>3</sub>)等三種酵素依特定比例所組成的複合體，該複合體可催化以下反應 (Guest *et al.*, 1989):



詳細之各個部分催化反應參見 26 頁之附圖 1。E<sub>1</sub> 所催化的部分反應為不可逆反應，該反應將酮酸氧化脫羧之後形成 CO<sub>2</sub> 及噻胺焦磷酸鹽羥乙基 (hydroxyethyl-TPP); E<sub>1</sub> 及 E<sub>2</sub> 共同將羥乙基自噻胺焦磷酸鹽羥乙基轉移給 E<sub>2</sub> 上之硫辛酸，形成硫酯(thioester)。E<sub>2</sub> 將硫酯之羥乙基(hydroxyethyl group) 轉移至 CoA 形成 acyl CoA 及還原態的二氫硫辛酸(dihydrolipoamide)。E<sub>3</sub> 將還原態的二氫硫辛酸再度氧化，電子則透過黃素腺嘌呤雙核苷酸(FAD) 轉移給菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸(NAD<sup>+</sup>) 產生還原態的菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸(NADH)。

酮酸去氫酶複合體中 E<sub>1</sub> 和 E<sub>2</sub> 具受質專一性，而 E<sub>3</sub> 則是所有酮酸去氫酶複合體的共同組成部分(Reed *et al.*, 1974; Yeaman *et al.*, 1986)。

支持 E<sub>3</sub> 為上述酵素共同組成的證據包括：從 PDC 和 KGDC 分離出來 E<sub>3</sub> 可互換而不影響原酵素複合體之活性(Sakurai *et al.*, 1970)；由豬心分離出來之 E<sub>3</sub> 所引發之抗 E<sub>3</sub> 抗體可同時辨認 PDC、KGDC 及 BCKAD (Clarkson *et al.*, 1991)；E<sub>3</sub> 之 cDNA 亦只有一種(Pons *et al.*, 1987; Otulakowski *et al.*, 1987)。此外 E<sub>3</sub> 的基因只有單一拷貝(single copy)，位於第七號染色體上(Otulakowski *et al.*, 1988)。

Otuakowski 及 Pons(1988) 等人曾發表人類 E<sub>3</sub> 之 cDNA 核酸序列。其 cDNA 之閱讀框架(open reading frame)共有 1527 個鹼基對(base pair)，轉譯(translated)成 509 個胺基酸的殘基。在 N 端有一段含 35 個胺基酸的殘基是酵素進入粒線體的領導序列(leader sequence)。成熟的 E<sub>3</sub> 具有 474 個胺基酸殘基，分子量約為 50 kDa。E<sub>3</sub> cDNA 的 3' 未轉譯區(untranslated region)具有兩個聚腺核苷化位點(polyadenylation sites)，兩者之間相距 234 個鹼基對，經過輪替切割(alternative splicing)及聚腺核苷化(polyadenylation)之後，產生兩種不同長度的 mRNA，大約分別是 2.2 kb 及 2.4 kb。

(四) E<sub>3</sub> 缺陷的症狀 (syndromes of E<sub>3</sub> deficiency)：

三種酮酸去氫酶複合體( $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes; PDC,  $\alpha$ KGDC, BCKDC)各自有不同的 E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>，但其 E<sub>3</sub> 則是相同，所以當 E<sub>3</sub>

功能不足時，三種酮酸去氫酶複合體的活性均會受到影響。E<sub>3</sub> 缺乏的典型症狀包括：乳酸血酸症(lactic acidosis)、神經功能失調(neurological dysfunction)、血清胺基酸濃度增加及尿液中有機酸濃度增加。

乳酸血症形成的原因是因為丙酮酸堆積，且細胞質內的還原能力增加，導致細胞質內 NADH / NAD<sup>+</sup> 比例增高後，將過剩的丙酮酸經乳酸去氫酶(lactate dehydrogenase)還原成乳酸後釋放至血液循環，導致血液中乳酸含量上升。神經功能失調是因為腦部組織能量的主要來源是靠葡萄糖氧化來供應，因 E<sub>3</sub> 缺陷連帶引起丙酮酸去氫酶及酮戊醯酸去氫酶缺陷，使得腦部組織檸檬酸環(citric acid cycle)運轉受阻，能量供應不足，使得腦部代謝最旺盛的區域如腦幹(brain stem)和基底神經節(basal ganglia)因能量不足造成嚴重損害而導致智障(參見 29 頁，附圖 3)。

此外由於 PDC、KGDC 及 BCKAD 在胺基酸代謝和能量代謝上扮演重要角色，所以當酮酸去氫酶複合體缺陷時會造成血清胺基酸濃度增加及尿液中有機酸濃度增高的現象(Kunara *et al.*, 1983)。在 BCKAD 缺陷的病人，其尿液的顏色和風味類似楓糖漿(maple syrup)，因此稱為楓糖漿尿症(maple syrup urine disease)。

E<sub>3</sub> 除了是酮酸去氫酶複合體的組成之外，亦是甘胺酸裂解系統(glycine cleavage system, GCS)中的 L-protein(Bourguignon *et al.*, 1992)，GCS 缺陷會導致高甘胺酸血症(hyperglycinemia; Hiraga *et al.*, 1981)。以上所描述的皆是 E<sub>3</sub> 缺陷時的症狀，但亦有許多酵素缺陷時也會造成相同的症狀。因此可能只有藉著 E<sub>3</sub> 的酵素分析才能正確的診斷 E<sub>3</sub> 缺陷症。

#### (五) E<sub>3</sub> 缺陷病人的個例報導：

Haworth 等人於 1976 年首次提出 E<sub>3</sub> 缺陷病例報告，在報告中提到有三位病人(C. M., G. M. 及 D. M.)，其中兩位(G. M 及 D. M.)之血漿及腦脊髓液(cerebrospinal fluid, CSF)中的麩胺酸(glutamate)、脯胺酸(proline)、丙胺酸(alanine)含量上升且尿液中丙酮酸和酮戊醯酸濃度有提高的現象。G.

M. 及 D. M. 兩人在尿液中的丙酮酸及酮戊醯酸濃含量上升；體外活性分析發現 D. M. 病人的丙酮酸去氫酶及 $\alpha$ -酮戊醯酸去氫酶的活性很低。

Blass (1977)等人也提出在  $E_3$  缺陷病人的纖維母細胞(fibroblast)中發現其去氫酶及 $\alpha$ -酮戊醯酸去氫酶的酵素活性同時降低。此後有許多  $E_3$  缺陷症的病例報告相繼發表。其中 Taylor (1978)等人首先以測量  $E_3$  的酵素活性來診斷  $E_3$  缺陷症。Otulakowski (1985)等人更進一步利用西方墨點分析(western blot analysis)分析病人的纖維母細胞來診斷  $E_3$  缺陷症。此外 Liu (1993)等人更在  $E_3$  缺陷症病的  $E_3$  cDNA 上發現兩個點突變，其中一個突變是由 A 變成 G，造成蛋白質上第 37 個胺基酸由 Lys (K)變成 Glu (E) ( $E_3$ :K37E)。另一個突變點是由 C 變成 T，造成蛋白質上第 453 個胺基酸由 Pro (P)變成 Leu (L)( $E_3$ :P453L)。

#### (六) X-射線晶體結構的分析：

由個例報導及已知的突變研究(Hakjung Kim and Patel, 1991; Nancy and Williams, 1995)等資訊發現突變會造成酵素結構的改變，進而影響酵素的催化功能，故將酵素的分子結構加以分析如下：

##### (I) 菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合部位(NAD binding site)的一般構造：

Rossmann 和 Branden (1975)等人在研究菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸去氫酶(NADH dehydrogenase；例如：malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, liver alcohol dehydrogenase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase)的構造時，發現這些去氫酶的菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合部位都很相似。這個結合部位是由六股平行的 $\beta$ -平板( $\beta$ -sheets;  $\beta A, \beta B, \beta C, \beta D, \beta E, \beta F$ )及四個 $\alpha$ -螺旋( $\alpha$ -helices;  $\alpha B, \alpha C, \alpha E, \alpha F$ ；見 30 頁，附圖 4)所組成。這些 $\beta$ -平板和 $\alpha$ -螺旋的胺基酸序列從 N 端到 C 端分別是： $\beta A$ 、 $\alpha B$ 、 $\beta B$ 、 $\alpha C$ 、 $\beta C$ 、twist、 $\beta D$ 、 $\alpha E$ 、 $\beta E$ 、 $\alpha F$  及  $\beta F$ 。菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸是結合到 $\beta$ -平板的 C 端胺基酸和 $\alpha$ -螺旋的 N 端胺基酸。 $\beta A$ 、 $\beta B$ 、 $\beta C$ 、 $\alpha B$  和  $\alpha C$  是腺核苷單磷酸(adenine nucleotide monophosphate, AMP)的結合部位，而 $\beta D$ 、 $\alpha E$ 、 $\beta F$ 、 $\alpha E$  和  $\alpha F$  則是菸鹼醯胺單核苷(nicotinamide

mononucleotide)的結合部位，而存在於 $\beta A$ 和 $\beta E$ 之間的縫隙則是焦磷酸鹽(pyrophosphate)的結合部位。

(2)  $E_3$ 之黃素腺嘌呤雙核苷酸結合部位(FAD binding site)：

經由 *Azotobacter vinelandii*(Mattevi *et al.*, 1991)、*Pseudomonas putida*(Mattevi *et al.*, 1992)及 *Pseudomonas Fluorescence*(Mattevi *et al.*, 1993)三隻菌株的  $E_3$  X-射線的結晶構造分析，使得  $E_3$  的黃素腺嘌呤雙核苷酸結合部位有進一步的了解。此外  $E_3$  的黃素腺嘌呤雙核苷酸結合部位也經由麩胱甘肽還原酶(glutathione reductase)與  $E_3$  胺基酸序列的構造做同質性的比較(Schulz *et al.*, 1983)，進而根據麩胱甘肽還原酶的二度空間構造設計了人類  $E_3$  的平面構造模種(Jentoft *et al.*, 1992)。 $E_3$  的平面構造模種區分成四個不同的區域(domain)：黃素腺嘌呤雙核苷酸結合區域域(FAD binding domain)、菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合區域域(NAD binding domain)、中心區域(central domain)、接觸區域(interface domain) (見 31 頁，附圖 5)。這些區域上分別具有黃素腺嘌呤雙核苷酸結合部位(FAD binding site)、菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合部位(NAD binding site)、硫辛酸結合部位(lipoamide binding site)， $E_3$  分子的活化中心(active center)是  $E_3$  同質雙體(homodimer，參見 31、32 頁，附圖 5、6)上各結合部位所共同組成。其中一個單體(monomer)的黃素腺嘌呤雙核苷酸結合區域域、菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合區域域的部分胺基酸與另一個單體的接觸區域的部分胺基酸組成活化中心。一個成熟且完整的  $E_3$  雙體具有兩個活化中心，每個活化中心都含有黃素腺嘌呤雙核苷酸結合部位、菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合部位、硫辛酸結合部位以共同進行催化反應。

黃素腺嘌呤雙核苷酸的結合部位是由黃素腺嘌呤雙核苷酸區域、中心區域和接觸區域所組成(參見 32、33 頁，附圖 6、7)。參與黃素腺嘌呤雙核苷酸結合部位的胺基酸列於附圖 8(見 34 頁)；和菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合部位中 FED-ABC 平板不同的是黃素腺嘌呤雙核苷酸結合部位有一個 D-ABC 平板的構造。這些平行股的羧基端面向活化部位是黃素腺嘌呤雙核苷酸的接觸位置。在黃素腺嘌呤雙核苷酸結合區域， $\alpha C$

螺旋是擴大成  $\alpha$  II 和  $\alpha$  III 螺旋，而活性雙硫基是在  $\alpha$  II 螺旋之前。胺基酸 G17、K37、T44、I121 及 G149 位在  $\beta$ -strain 的羧基上，這些胺基酸與黃素腺嘌呤雙核苷酸主幹位置接觸；而胺基酸 E36、T44、和 K54 與黃素腺嘌呤雙核苷酸側鏈接觸。在  $E_3$  之菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合區域，胺基酸 V188，E192 和 R280 以側鏈和黃素腺嘌呤雙核苷酸接觸。在  $E_3$  之接觸區，胺基酸 H452 以主鏈(main chain)和黃素腺嘌呤雙核苷酸接觸。

### (3) $E_3$ 之菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合部位(NAD binding site)：

$E_3$  的菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合區域和黃素腺嘌呤雙核苷酸結合區域構造相似都有 D-ABC  $\beta$ -平板形成之羅斯謨曲摺(Rossmann fold)。參與菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合部位的胺基酸是位在菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合區域和接觸區。菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸在  $\beta$  股的羧基與菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合區域(NAD binding domain)接觸，這些結合區域是由胺基酸殘基 G187、V188、E208、K232、V243、R280、M327 的胜肽主幹所組成。此外， $NAD^+$  亦和接觸區域(interface domain)之胺基酸殘基 Q373 的胜肽主幹及菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合區域之胺基酸 E208 及 R280 的側鏈接觸(見 35 頁，附圖 9)。

### (4) $E_3$ 的活化中心(active center)：

$E_3$  的活化中心含活性鹼基，活性雙硫基、黃素腺嘌呤雙核苷酸、菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸及 二氫硫辛酸所組成，包括黃素腺嘌呤雙核苷酸結合區域、菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合區域、中心區域和接觸區域(參見 32 頁，附圖 5)。活性鹼基是由胺基酸 H452 和 E457 形成氫鍵後構成。H452 之咪唑 N3 經親核攻擊二氫硫辛酸後引發電子傳遞反應。將 C45 和 C50 之間活性雙硫基還原。電荷在 thio-disulfide 之間轉換後，經由胺基酸 C50 傳送到黃素腺嘌呤雙核苷酸，並進一步的將電子從黃素腺嘌呤雙核苷酸傳送至菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸。由於電子從黃素腺嘌呤雙核苷酸傳送至菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸時不會直接形成鍵結，所以可能是經

由 K54 與 E192 形成之離子對，進行黃素腺嘌呤雙核苷酸和菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸之間電子的傳遞。

#### (七) E<sub>3</sub> 突變蛋白之研究：

目前使用定點突變方法之突變蛋白的研究包括 H452Q 及 E457Q (Kim, 1992)，這兩個突變蛋白破壞了酵素的活性鹼基，使酵素比活性分別降到正常 E<sub>3</sub> 的 0.1 % 和 6 %。此外，從 E<sub>3</sub> 缺陷的病人基因中也確認了兩個突變點，其中一個突變點為 P453，造成 P453L 的改變(Liu, 1993)，突變後的酵素其黃素腺嘌呤雙核苷酸含量降低 70 %，而酵素比活性和正常 E<sub>3</sub> 比較則只剩下 0.05 % (未發表之資料)。因此推斷 P453 可能參與活性鹼基之形成以及黃素腺嘌呤雙核苷酸和蛋白質間的結合。另一個突變發生於 K37 位置，造成 K37E 的改變。突變後的蛋白質其雙體化 (dimerization) 的性質並未改變，酵素仍然是以同質雙體的形式存在；但其黃素腺嘌呤雙核苷酸含量和酵素比活性均降低 30 % (Liu, 1993)。因此推測 K37 可能參與黃素腺嘌呤雙核苷酸和蛋白質間的結合。

Kazuko(1994)等人認為麩胱甘肽還原酶(glutathion reductase)的 K53 (相當於人類 E<sub>3</sub> 之 K54)位於黃素腺嘌呤雙核苷酸的 flavin N5 及 NADPH 的 pyridinium C4' 的氫鍵距離之內，推測 K53 可能扮演電子傳遞的角色。以定點突變法(SDM PCR)將 *E. coli* 的 K53 (相當於人類 E<sub>3</sub> 的 K54)突變成 K53R，發現 K53R 對酸鹼值非常敏感，且由 CD spectrum 推測當 K53R 在相當於黃素腺嘌呤雙核苷酸的 2 倍當量濃度的二氫硫辛酸下，酵素幾乎全部以 EH<sub>4</sub> 態形式存在。

#### (八) 研究目的：

E<sub>3</sub> 在代謝過程中扮演很重要的角色，它參與了醣類、脂質、胺基酸的代謝，是人體內一個很重要的酵素。由 NMR 的資料顯示在 E<sub>3</sub> 活性中心的黃素腺嘌呤雙核苷酸與菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸之間並無直接的鍵結存在。故電子並不是直接由黃素腺嘌呤雙核苷酸傳遞給菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸；而是透過與黃素腺嘌呤雙核苷酸結合區域相鄰的某些胺基



酸當中間介質(intermediate)將電子自還原態黃素腺嘌呤雙核苷酸(FADH)傳遞至菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸，進而形成還原態菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸(NADH)。

本實驗的目的即是研究  $E_3$  的活性中心中，有那一些胺基酸參與了電子傳遞的工作，以瞭解黃素腺嘌呤雙核苷酸與菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸間的電子傳遞路徑。為了瞭解哪些胺基酸參與電子傳遞，於是採用定點突變法將黃素腺嘌呤雙核苷酸結合區域中與黃素腺嘌呤雙核苷酸可以形成氫鍵鍵結的胺基酸作定點突變；得到新的突變菌株(mutated clone)後，大量表達並純化蛋白質，再將蛋白質經由酵素動力學(enzyme kinetic study)及螢光反應分析(Flourescence analysis)觀察其酵素活性的變化，藉以推論該定點胺基酸是否參與電子的傳遞。

本實驗選擇將 Lys 54 (K54)進行定點突變，創造成 K54E 及 SK-KS 兩種突變新菌株。選擇 K54 進行定點突變是因為 K54 位於黃素腺嘌呤雙核苷酸結合區域的  $\alpha$  II 螺旋上，與菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸結合區域的 glutamic acid 192 (E192)可形成離子對(或鹽橋)，因此 K54 參與黃素腺嘌呤雙核苷酸與菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸間電子傳遞的可能性很高(參見 36、37 頁，附圖 10、11)。

## 貳、材料與方法

### (一) 實驗材料：

1. *Taq* DNA polymerase: 購自 Stratagene Biochemical Company
2. *Pfu* DNA polymerase: 購自 Stratagene Biochemical Company
3. *T4* DNA ligase: 購自 NEB Bio.Lab.
4. *Bam*H I restriction endonuclease : 購自 NEB Bio.Lab.
5. *Sal* I restriction endonuclease: 購自 NEB Bio.Lab.
6. Lysozyme : 購自 Sigma chemical company
7. Bactotryptone : 購自 DIFCO Laboratories (Detroit , Michigan )
8. Bacto-yeast extract: 購自 DIFCO Laboratories (Detroit , Michigan)
9. Sodium chloride : 購自本和光製藥公司
10. IPTG :購自 Melford Laboratories
11. 安比西林(ampicillin) :購自 Sigma chemical company
12. 康黴素(kanamycin) :購自 Sigma chemical company
13. 咪唑(imidazole) :購自 Sigma chemical company
14. 洋菜膠粉(agarose) : 購自 Sigma chemical company
15. Ethidium broamide : 購自 Sigma chemical company
16. pQE-9 plasmid, *escherichia coli* strain : 由 Dr. M.S. Patel 實驗室提供 (Department of biochemistry, school of medicine and biomedical sciences, State University of New York, Buffalo) (Kim *et al.*, 1992)
17. Anti-mouse (His)<sub>6</sub> monoclonal antibody 及 goat anti-mouse IgG antibody :購自 Bio-rad Laboratories
18. Acrylamide bis acrylamide : 購自 Pharmacia Biotech company
19. Ammonium persulfate : 購自 Sigma chemical company
20. His-bind resin in Sepharose 6B: 購自 Pharmacia Biotech company (code NO.17-0575-01)
21. N-tetramethyl ethylenediamine (TEMED):購自 Sigma chemical company
22. TriS : 購自 Bio-rad Laboratories

- 23 . Lipoic Acid : 購自 Sigma chemical company
- 24 . Dihdrolipoamide : 購自 Sigma chemical company
- 25 . 菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸(NAD) : 購自 Sigma chemical company
- 26 . 還原態菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸(NADH) : 購自 Sigma chemical company
- 27 .  $\text{NaBH}_4$  : 購自 Sigma chemical company
- 28 . PCR gel extraction kit : 購自 Qiagen Biochemical company
- 29 . Plasmid Miniprep. Kit : 購自 Qiagen Biochemical company
- 30 . Chelating Sepharose Fast Flow resin : 購自 Pharmacia Biotech company code No. 17-0575-01

## (二)實驗方法：

本實驗採用定點突變法製造新突變菌株，其表達質體的構建、蛋白質的表達與純化、酵素特性分析等之詳細步驟說明如下：

### A. 表達質體之構建：

表達質體 pQE9-E<sub>3</sub> 是由 Dr. Mulchand S. Patel (State University of New York at Buffalo) 之實驗室所提供(參見 38 頁，附圖 12)。pQE9-E<sub>3</sub>: K54E 及 pQE9-E<sub>3</sub>: SK-KS 是由中山醫學院營養科學研究所劉德中博士的實驗室所提供。其構建的方法如下：

#### (1)定點突變法聚合酶鍊鎖反應(SDM PCR):

pQE9-E<sub>3</sub>: K54E 及 pQE9-E<sub>3</sub>: SK-KS 兩個突變蛋白表達質體製作方法是先以 pQE9-E<sub>3</sub> 作為模板(template)，利用一段定點突變引子(site-directed mutated primer; SK-KS : GGT TGT ATT CCT AAG TCT GCT TTA TTG AAC; K54E : TGT ATT CCT TCT GAA GCT TTA TTG AAC)及 C-terminal primer (LS primer : 3' CAC TTG GTC GAC TCA AAA GTT GAT TGA TTT GCC5'; 內含 *SalI* site) (Liu *et al.*, 1995) 以 *Taq* DNA 聚合酶進行聚合酶鍊鎖反應合成第一段含突變點的 DNA 片段。接著再用此含突變點的 DNA 片段和一個 N-terminal primer (LI primer : 5'GCG CGC GGA TCC GCA GAT CAG CCG AAT 3'; 內含 *Bam*HI site) 用聚合酶鍊鎖反應的方法將全段 cDNA 放大(參見 39 頁，附圖 13)。

#### (2)聯結反應(Ligation):

聚合酶鍊鎖反應放大後的 DNA 片段以 *Bam*HI 及 *SalI* 內切限制酶進行水解，形成黏狀端(stick end)之 DNA 片段做為插入子(insert)。利用 *T4* ligase 從 *Bam*HI site 及 *SalI* site 將插入子與載體(vector)進行聯結反應接合成 pQE9 突變蛋白質的表達質體(參見 39 頁，附圖 13)。

#### (3)轉形作用(Transformation):

聯結反應成功後將已接合好的 DNA 送入 *JM109* competent cell。將 *JM109* competent cell 倒進入含有安比西林的洋菜膠盤後放置於 37°C 保溫

箱(incubator)隔夜培養。

(4)微篩選(Miniscreening):

將隔夜培養的洋菜膠盤中之菌落先以微篩選的方式挑出具有插入子的菌落，純化其質體(plasmid DNA)，經去氧核糖核酸序列(DNA sequencing)分析後，挑出具有正確突變點菌株質體進行第二次轉形反應，將質體送入 *M15* PDM 1.1 competent cell (含安比西林及康黴素抗藥性基因)，將 *M15* cell 轉形進入含有安比西林及康黴素的洋菜膠盤後放置於 37°C 保溫箱隔夜培養。

(5)去氧核糖核酸序列定序(DNA Sequencing):

(a)使用 USB 出品的 Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit 進行定序：

此方法是取模板 DNA 7  $\mu$ l 及引子 1  $\mu$ l (25 p mol)，reaction 緩衝溶液 2  $\mu$ l，總共 10  $\mu$ l。在 100°C 下變性五分鐘，迅速插至冰上。接著加入 1  $\mu$ l 0.1 M dithiothreitol (DTT)，2  $\mu$ l diluted labeling mix，1  $\mu$ l [<sup>35</sup>S] dATP 和 2  $\mu$ l diluted sequenase 聚合酶，混合後於室溫下反應 5 分鐘。分別各取 3.5  $\mu$ l 之前述反應混合物加至 37°C 預熱，裝有 2.5  $\mu$ l termination mixture (G、A、T、C) 的四個 eppendorf 小離心管中，混合後在 37 °C 反應五分鐘，接著於各管中加入 4  $\mu$ l 的 stop solution (含 95% formamide，20 mM EDTA，0.05 % bromophenol blue，0.05 % Xylene Cyanol FF)。接著樣品在 75°C 下處理 3 分鐘後，取 3  $\mu$ l loading 在已預熱 15 分鐘的 6 % acrylamide sequencing gel，以功率 45 W (約 65°C) 進行電泳分析。電泳完後，將 gel 浸在 fix solution (5 % 甲醇，5% 乙酸)中，靜置 10 分鐘後，以 3MM 濾紙沾起 gel，在 gel 上再鋪上一層保鮮膜，以 gel dryer 在 80°C 下抽乾 1 小時，再以 X 光片作自動放射顯影。

(b)使用 ABI PRISM 377 Automated Fluorescent DNA Sequencer 進行定序：

此方法是用 Perkin Elmer 公司的 ABI PRISM™ cycle sequencing kit 進行，主要是利用 ddNTP 上帶有四種不同顏色的螢光染劑以

deoxynucleotide termination 的方式及 PCR 的方法在 DNA 模板上 extension 後，加入 1/10x 體積的 3 M NaOAc 及 2.5x 體積的 98 % alcohol，冰上冷卻 10 分，離心倒掉上清液，加 loading dye 後經 6 % polyacrylamide sequencing gel 分析，以 sequencer detector 上的雷射光束來偵測螢光顏色的訊號，黑色代表鳥糞嘌呤(guanine)，綠色代表腺嘌呤(adenosine)，紅色代表胸腺嘧啶(thymidine)，藍色代表胞嘧啶(cytidine)。

#### (6)大量表達及蛋白質純化(Overexpression and Protein Purification):

自隔夜生長的洋菜膠盤中挑選單一菌落(single colone)培養，進行蛋白質大量表達及純化。

#### B. 純化 E<sub>3</sub> 及其突變蛋白：

##### (1)原理:

利用 pQE 9 表達系統將欲表現之基因嵌入 pQE 9 載體中，再送入 *E. coli* M15 宿主細胞中表達。在 pQE 9 表達系統中之 *E. coli* 宿主細胞含有攜帶 lac I gene 之 plasmid pDM 1.1 (具有康黴素抗藥性)會產生 lac 抑制因子(repressor)與 T5 促進因子(promoter)結合，以抑制 pQE 9 質體的表達。為使 pQE 9 表達質體正常表達，可加入 IPTG 與 lac 抑制因子結合，使抑制因子離開促進因子後，RNA 聚合酶得以順利結合到 T5 促進因子上，表現基因得以進行轉錄作用(transcription)合成 mRNA；再經 mRNA 轉譯作用(translation)合成蛋白質。此外，由於在 pQE 載體之 N 端接有六個組胺酸(histidine)，所以表達的蛋白質可以與 Ni-IMAC 樹脂(Pharmacia Biotech) 結合，再利用與組胺酸構造相似之咪唑(imidazole)梯度與蛋白質競爭樹脂上的結合部位，將蛋白質溶析(elution)出來。

##### (2)方法：

將表達質體 pQE9-E<sub>3</sub>，pQE9-E<sub>3</sub> K54E，pQE9-E<sub>3</sub> SK-KS 送入含有 pDM1.1 質體的 *E. coli* M15 菌株中表達。

首先將含有表達質體的菌株培養在含有安比西林(200 µg/ml)及康黴素(25 µg/ml)的 2 ml LB 培養液中(10g 細菌蛋白胨，5g 酵母提取物，10g 鹽)

在 37°C 下隔夜生長。第二天重新將菌液接種(inoculated)到含有安比西林(200 µg/ml)及康黴素(25 µg/ml)的 200ml LB 培養液中約三至四小時後，到達  $OD_{600}=0.7$  時再加入 IPTG(200 µg/ml)誘發蛋白質合成，在 30°C 下繼續隔夜生長(約 18 小時)。第三天時將菌液在轉速 6000 g 下離心 20 分鐘後，去除上清液；收集沉澱的細胞(cell pellete)，將沉澱的細胞懸浮在 PPE 緩衝溶液中(50 mM Potassium Phosphate, pH 8；0.25 mM EDTA, pH 8)最終體積 5 ml。隨後加入溶解酶(1 mg/ml)在冰筒中冰浴 30 分鐘，以超音波震盪器將細胞破碎後離心兩次(12000 g, 10 minutes)，收取上清液。將上清液通入之前須先平衡鎳離子管柱(Pharmacia Biotech)，該管柱平衡的方法是先加入約 1 ml 之 Ni-IMAC 樹脂(Pharmacia Biotech)，以五倍管柱體積之蒸餾水清洗管柱(約 25 ml)，再加入 2 ml 0.25 mM 的硫酸鎳( $NiSO_4$ )後依序以五倍管柱體積之蒸餾水、五倍體積之 PPE 緩衝溶液清洗管柱。完成平衡步驟後則可將經離心所得的上清液通入管柱，將上清液完全通過管柱後，再以 25 ml 之 PPE 緩衝溶液清洗管柱。標的蛋白質會吸附在樹脂上，最後以咪唑(5, 10, 20-100 mM / 2 ml 溶於 PPE 緩衝溶液)將吸附在管柱上的蛋白溶析出。收集純化出來的蛋白進行透析(樣品在 PPE 緩衝溶液中透析，一天中置換緩衝溶液三次)。透析後即進行蛋白質濃度測定(protein concentration analysis)、FAD 含量測定(FAD content analysis)、酵素比活性測定(specific activity assay)、螢光分析(fluorescence analysis)及酵素活性測定(kinetic study)等實驗。

### C. 蛋白質濃度測定：

將純化出來的蛋白質用 Bradford 方法測定其蛋白質濃度，該方法使用 1 µg / 1 µl 的 BSA(bovine serum albumin)作為定量的標準濃度，設定四組標準濃度(standard concentration)BSA 其體積分別為 0 µl、5 µl、10 µl、15 µl 後，再以 PPE 緩衝溶液將體積稀釋至 800 µl，各樣品分別再加入 200 µl 的 Bradford 緩衝溶液，使最終體積為 1000 µl 後，反應在室溫下進行 5 分鐘後置入透光石英比色管中，在波長 595 nm 下掃描偵測吸光值(Hitach U-3000)，建立標準 BSA 濃度曲線。測試樣品之濃度經標準濃度曲線內

差後即可得之。(詳細步驟請參閱附錄)。

#### D. FAD 含量測定：

將純化的 E<sub>3</sub> 蛋白質以 448 nm 的波長測定其光密度(optical density, OD)進行 FAD 的定量。各取已純化的 E<sub>3</sub> 蛋白質 50 μg、100 μg、250 μg 加熱煮沸 5 分鐘以便將蛋白質變性，將加熱後的蛋白質離心後收取上清液，終體積為 1 ml，放入透光石英比色管中，在波長 220 nm 至 500 nm 下掃描(Hitach U-3000)後選定 OD<sub>448</sub> 作為定量 FAD 之含量測定。以 E<sub>3</sub> 的 FAD 含量當作百分之百，再以相同步驟測定突變種蛋白質之 FAD 含量後，再與野生種 E<sub>3</sub> 的 FAD 含量作比較，即可得到突變種蛋白質 FAD 的相對含量之百分比。

#### E. 酵素活性測定：

酵素動力學分析是利用酵素反應之起始速率(initial velocity)計算後得之。先準備不同濃度的 NAD<sup>+</sup>及 DHLA 各七種，其濃度分別為 0.1 mM; 0.15 mM; 0.2 mM; 0.3 mM; 1.0 mM; 3.0 mM; 6.0 mM。將已純化之蛋白質以 DHLA 及 NAD<sup>+</sup>當受質進行酵素活性測定。首先固定一 NAD<sup>+</sup>的濃度，改變 DHLA 的濃度做反應，可得一組含七個反應點的數據;如此以七種 NAD<sup>+</sup>濃度重復上述步驟即可得七組數據。再以起始速度的倒數 1/V 為縱軸作圖。以 1/[DHLA]為橫軸，可得一組平行線(44 頁，圖 16A)，表示此酵素是屬於乒乓機制(ping pong mechanism);此時則可利用公式  $1/V = 1/A(K_{DHLA}/V_1) + 1/V(1+K_{NAD}/B)$ ，求出其斜率為  $K_{DHLA}/V_1$ ；求取平行線縱走軸的截距(即 1/V)後，再以 1/[NAD<sup>+</sup>]為橫軸，圖 16A 之截距為縱軸作圖，可得一條直線，其縱軸截距為 1/Vmax，斜率為  $K_{NAD}/Vmax$ ；利用公式  $1/Vmax = (K_{NAD}/V_1) \times 1/B + 1/V_1$  可求出  $K_{NAD}$ 。

#### F. 螢光分析：

當蛋白質以波長 296 nm 之光波照射時，會激發(excite)其分子內部的色胺酸(tryptophan)，當色胺酸由激發態(excitation state)回復到基態(grand



state)時會發射出波長約 300 nm 之放射光(emission light)，此放射光可進一步激發 NADH，當 NADH 被激發後由激發態回復到基態時，會使其在波長 450 nm 至 460 nm 之間放出放射光；此外色胺酸發射出之放射光亦可激發 FAD，使 FAD 在 480 nm 至 550 nm 之間產生放射光。因此，當野生種  $E_3$  以波長 296 nm 的光激發後可在波長 480 nm 至 550 nm 之間觀察到 FAD 放射光之曲線波峰；在加入受質(DHL 或 NADH)後，若 FAD 被還原成 FADH，則可以由 FAD 放射光曲線波峰的下降程度來推測反應的進行程度；若反應進一步進行，FADH 將電子遞給  $\text{NAD}^+$ ，使  $\text{NAD}^+$  還原成 NADH，則應可在 460 nm 處觀察到 NADH 之放射光曲線波峰。依上述原理，取一定量(100  $\mu\text{g}$ ) 已純化之蛋白質以 DHL、NAD、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{NaBH}_4$  等物質分成下列幾組實驗進行分析。(1) DHL 單受質處理 (2)  $\text{NAD}^+$  及 DHL 雙受質處理 (3)  $\text{NaBH}_4$  處理 (4)  $\text{H}_2\text{O}_2$  處理等四組實驗。在添加反應受質後將樣品裝入透光的石英比色管中置入 Hitach F-4500 螢光分析儀中，以 296 nm 之波長光激發，在波長 300 nm 至 570 nm 之間觀察酵素放射光螢光光譜的變化；此時 FAD 在 480 nm 至 550 nm 之間會有一放射光波峰產生，而 NADH 在 450 nm 至 460 nm 之間會有一放射光波峰產生。當加入 DHL 時，FAD 還原成 FADH，此時 FAD 在 480 nm 至 550 nm 之間放射光波峰會下降。當 FADH 將電子傳遞給 NAD 產生了 NADH 時，此時在約 460 nm 處會有一 NADH 的放射光波峰產生；藉由觀察 FAD 放射光波峰的下降及 NADH 放射光波峰的產生，可以推測出電子在 FADH 及  $\text{NAD}^+$  之間的傳遞情形。

將酵素依不同實驗組別加入所需的試劑，反應後再在不同的時間點觀察其螢光曲線的變化，據以推論電子傳遞的情形及可能的傳遞路徑。(詳細步驟請參閱附錄)。

## 參、實驗結果：

### (一)表達質體之建構：

將定點突變所合成之 pQE9-E<sub>3</sub>:K54E 及 pQE9-E<sub>3</sub>:SK-KS DNA 片段與 pQE9-E<sub>3</sub> 載體以 *T4* ligase 進行聯結反應(ligation)，將聯結成功的 DNA 送入 *JM109* competent cell，經微篩選、微製備以抽取質體 DNA 後定序(DNA sequencing)。表達質體經核酸定序確認除了定點突變之突變點(K54E；SK-KS)外無其它額外之突變(data not show)後，進行以下之蛋白質之表達。(詳細步驟請參閱附錄)

### (二)蛋白質之表達及純化：

將定序完成的質體 DNA 送入 *M15* PDM1.1 competent cell 內以 IPTG 誘發(induced)蛋白質之大量表達。破碎細胞、離心後，將收集到的蛋白質上清液通過鎳離子管柱後，以咪唑(5, 10, 20-100 mM；各 2 ml)依序溶析(elution)，收集 30 mM 到 70 mM 之咪唑的溶析液。將收集來的樣品透析 24 小時；然後再將樣品通過 Mono-Q 管柱。

由 Mono-Q 之光譜圖形(unpublished data)及 FPLC 之光譜圖形可得知蛋白質的純度與量。由 FPLC 之結果只有單一吸光波峰得知此蛋白質是一高純度的蛋白質。

### (三)FPLC 分子篩選：

將上述純化的蛋白質通入 Superdex-HR200 管柱以觀測其分子量。動相為 50 mM NaPO<sub>4</sub> (PH=8)、200 mM NaCl，在 UV 280 nm 下偵測蛋白質出現的時間(retention time)。結果顯示在流速 0.5 ml/min 之下，E<sub>3</sub> 吸光波峰約在 25 分鐘時出現，在此時間點的相對分子量為 100 kDa (參見 40 頁，附圖 14)；而 E<sub>3</sub> 單體的分子量為 50 kDa 在約 27.5 分鐘處出現，由此可知純化出來的蛋白質為雙體形態(參見 41 頁，附圖 15-A)。以相同方法處理 SK-KS 及 K54E，結果發現在與野生種 E<sub>3</sub> 相同的時間點(約 25 分鐘處)，可觀察到吸光波峰(參見 41 頁，附圖 15-B、15-C)。FPLC 分析顯示 SK-KS 及 K54E 等兩種突變蛋白不會改變 E<sub>3</sub> 之雙體化本質，酵

素仍然以同質雙體的形式存在。

(四) FAD 含量分析:

SK-KS 及 K54E 的 FAD 含量分別為  $E_3$  的 82% 及 90%。而比活性 (specific activity) 則分別為  $E_3$  的 46% 及 1.7% (參見 43 頁, 附表 2)。因此得知比活性 (specific activity) 下降的主要因素並非來自 FAD 含量的下降。

(五) Kinetic Analysis:

雙受質酵素其動力學表現有兩種不同種式, 一為乒乓機制, 可以  $V = V_{max} [A] [B] / (K_m B [A] + K_m A [B] + [A] [B])$  方程式計算出。另一種為序列機制 (order sequential mechanism), 計算方程式為:  $V = V_{max} [A] [B] / (K_{ia} K_m B + K_m B [A] + K_m A [B] + [A] [B])$ 。

酵素動力學是用起始速度動力學的資料以起始速度的倒數  $1/V$  為縱軸, 以  $1/[DHHA]$  為橫軸, 作圖時得一組平行線 (見 44 頁, 圖 16-A), 表示野生種  $E_3$  是屬於乒乓機制, 此時則可利用公式  $1/V = 1/A(K_{DHHA}/V_1) + 1/V(1 + K_{NAD}/B)$ , 求出其斜率為  $K_{DHHA}/V_1$ ; 求取平行線縱走軸的截距 (即  $1/V$ ) 後, 再以  $1/[NAD^+]$  為橫軸, 以圖 16A 之縱軸截距 ( $1/V$ ) 為縱軸作圖, 可得一條直線, 其縱軸截距為  $1/V_{max}$ , 斜率為  $K_{NAD}/V_{max}$ ; 利用公式  $1/V_{max} = (K_{NAD}/V_1) \times 1/B + 1/V_1$  可求出  $K_{NAD}$ 。

SK-KS 突變蛋白質之酵素動力學分析結果亦得到一組相互平行的直線, 故反應機制不變, 仍然是乒乓機制, 但其  $V_{max}$  下降。(參見 44 頁; 附圖 16-B)。至於 K54E 突變蛋白質因活性太低, 無法測出其酵素動力學的性質。

酵素動力學分析的結果如下:

Reaction type:	Forward			
Varying substrates:	DHHA	$NAD^+$		
Parameter	$K_m$	$K_m$	$V_{max}$	$K_{cat}$
Wild-type	0.9377	0.2183	0.4021	459 $S^{-1}$

SK-KS	0.6796	0.1637	0.0103	211 S <sup>-1</sup>
K54E	ND	ND	ND	1.45 S <sup>-1</sup>

從上述數據中得知 K54 在酵素活化中心的催化反應扮演重要角色，當 K54 發生突變時，明顯的降低酵素的周轉率(turnover rate;  $V_{max}$ 、 $K_{cat}$  下降)，但酵素對受質的親和力不但不受影響反而上升( $K_m$  下降)，因而使 SK-KS 突變蛋白質的活性明顯的比  $E_3$  低，K54E 突變蛋白質甚至測不到酵素活性。

#### (六) Fluorescence Study:

##### (a) 二氫硫辛酸(DHL)單受質處理之螢光分析：

酵素在加入 DHL 後，若酵素的 FAD 可以被還原成 FADH，則原先在 530 nm 處的 FAD 放射光波峰將會依 FADH 的生成而下降。

$E_3$  在 530 nm 處有 FAD 的放射光波峰產生，在加入 DHL 後 FAD 的放射光波峰迅速降至最低點；在 15 分鐘之後，FAD 的放射光波峰回復至原來 80% 的高度(見 46 頁，附圖 17-A)；在 NAD 不存在的情況下，電子是由 DHL 傳至 FAD，然後由 FADH 傳至可能存在的中間介質，故在高濃度的 DHL (酵素濃度的 50 倍)正向驅力下，FADH 仍可氧化成 FAD。而 SK-KS 突變蛋白質之放射光波峰與  $E_3$  有相類似的圖形，但下降後回復的速度明顯比  $E_3$  慢(約 30 分鐘時回副至原先的 80%；見 46 頁，附圖 17-C)；顯示電子自 DHL 到 FAD 間的傳遞尚能進行，但在 FADH 下傳至中間介質的路徑可能受到損傷，所以 FADH 重新氧化成 FAD 的反應進行的較  $E_3$  慢。K54E 突變蛋白質之 530 nm 放射光波峰在加入 DHL 時只有些微下降後幾乎停滯不動(見 46 頁，附圖 17-B)，推測其可能原因有二；一為 K54E 突變蛋白質的突變使自 FADH 下傳到  $NAD^+$  間的中間介質受到破壞，使得電子傳遞近乎停頓，FADH 堆積進而使得 FAD 無法被還原，所以 FAD 之 530 nm 放射光之波峰下降不多。另一可能原因為 K54E 突變蛋白質處於 EH4 態，為不活性態，故無法將 FAD 還原成 FADH。

##### (b) 二氫硫辛酸(DHL)和菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸( $NAD^+$ )雙受質之螢光分析：

在  $\text{NAD}^+$  存在的情況下，DHL 將 FAD 還原成  $\text{FADH}$ ，而  $\text{FADH}$  可進一步將其電子往前傳給  $\text{NAD}^+$  產生  $\text{NADH}$ ，在圖形上可以觀察到 FAD 之 530 nm 放射光波峰下降及  $\text{NAD}^+$  之 460 nm 放射光波峰的上升(參見 48 頁，附圖 18-A)。實驗結果發現 SK-KS 突變蛋白質具有與  $\text{E}_3$  相似的圖形，但其 FAD 放射光波峰下降後回復的速度及  $\text{NAD}^+$  放射光波峰的上升後回復的速度均較  $\text{E}_3$  慢(參見 48 頁，附圖 18-B)。顯示 SK-KS 突變蛋白質的電子傳遞是可進行的，但較  $\text{E}_3$  慢。K54E 突變蛋白質在單受質(DHL)實驗時，其電子的正向傳遞不能進行(參見 46 頁，附圖 17-B)；但在雙受質實驗時卻有與 SK-KS 突變蛋白質相似的圖形，顯示 K54E 突變蛋白質的電子傳遞在  $\text{NAD}^+$  存在的情形下亦能傳遞(參見 48 頁，附圖 18-B 以及討論的部分)。

(c) 還原劑  $\text{NaBH}_4$  之螢光分析：

電子由 DHL 經活性雙硫基傳至 FAD，使 FAD 還原成  $\text{FADH}$ ；再由  $\text{FADH}$  經中間介質傳至  $\text{NAD}^+$ ，使得  $\text{NAD}^+$  還原成  $\text{NADH}$ 。在單受質 DHL 實驗時，電子可能是由  $\text{FADH}$  傳至酵素的某部分(可能是  $\text{FADH}$  與  $\text{NAD}$  間的中間介質)。K54E 突變蛋白質之 FAD 無法順利還原成  $\text{FADH}$ ，電子無法順利由 DHL 傳至 FAD 進而將 FAD 還原，可能是活性雙硫基與 FAD 間被阻斷或  $\text{FADH}$  與  $\text{NAD}^+$  間的中間介質受到破壞所造成。為釐清此問題，於是以還原劑  $\text{NaBH}_4$  將 FAD 直接還原，嘗試由中央推動反應，避開活性雙硫基，探究  $\text{FADH}$  與  $\text{NAD}^+$  間的中間介質是否受到破壞。

結果發現 SK-KS 突變蛋白質之 FAD 放射光波峰下降後約 60 分鐘時可回復一半的高度(參見 50 頁，附圖 19-C)，而  $\text{E}_3$  則只需 5 分鐘即可回復至一半的高度(參見 50 頁，附圖 19-A)，顯示 SK-KS 突變蛋白質之 FAD 能自由的還原與氧化，但速度較野生種  $\text{E}_3$  慢。至於 K54E 突變蛋白質的放射光波峰則沒變化(參見 50 頁，附圖 19-B)，顯示 FAD 無法被還原，自  $\text{FADH}$  至  $\text{NAD}$  這一方向的反應無法進行。

(d) K54E 以 0.02 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  過夜處理：

在 DHL 單受質實驗中推測酵素可能是處於  $\text{EH}_4$  態，為證實此可能性，乃將酵素以 0.02 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  過夜處理，嘗試將其由  $\text{EH}_4$  態氧化成  $\text{EH}_2$

態或 E 態。再經過以 0.02 %  $H_2O_2$  過夜處理後，其 FAD 之 530 nm 放射光波峰較正常高度高(參見 46 頁圖 17-B 及 52 頁圖 20)，顯示  $H_2O_2$  過夜處理後，部分 FADH 氧化成 FAD。在加入受質 DHL 後觀察到 FAD 之放射光波峰在 5 分鐘時下降至一半的高度，證明酵素原是處於不具活性的 EH4 態，經  $H_2O_2$  過夜處理後氧化成具有活性的 E 態或 EH2 態後，FAD 至 FADH 方向又恢復了部分活性。但 460 nm 處並未產生  $NAD^+$  的放射光波峰，顯然 FADH 至 NAD 方向仍沒活性；此一結果與 DHL 與  $NAD^+$  雙受質實驗結果不符，可能是因  $H_2O_2$  過夜處理後酵素的部分細微構造有所改變所造成。(參見 52 頁，附圖 20)

## 肆、討論

在 *Eukarya*、*Eubacteria* 及 *Archea* 等菌，其酵素一級結構的 FAD 結合區域附近有高度的相似性(William, 1992; Patel, 1996; Patel, 1989; Deonarain, 1990)。酵素的胱胺酸殘基(cystine residue，相當於人類麩胱甘肽還原酶的 cystine-47)推測為負責酵素的電子轉移，即胱胺酸殘基附近是酵素的活性中心(Deonarain, 1990)。而酵素的 C-端胜肽則可能與酵素維持具有活性的同質雙體的穩定性有關(Benen, 1992)。

在以定點突變聚合酶鍊鎖反應(SDM-PCR)合成突變片段以作為插入子的過程中，發現以 *Taq* DNA 聚合酶合成的插入子突變片段在 DNA 定序時，每個菌落(colone)幾乎都有一個至數個額外的突變，而使得整個實驗效率不甚理想。探究其可能的原因為：

- 一: *Taq* DNA 聚合酶並無校正(proof reading)功能，故造成額外突變的可能性是一直存在的，額外突變的發生只是機率問題。
- 二: *Taq* DNA 聚合酶的錯誤率約為 1/1000 (廠商提供之數據)，而本實驗所合成帶有突變點的定點突變片段約 1500 bps，故在全長中多了一個額外的突變是可想見且合理的。
- 三: 為改進上述缺點，改用 *Pfu* DNA 聚合酶，此酵素具有校正(proof reading)的功能，能改善 *Taq* DNA 聚合酶的錯誤。但使用 *Pfu* DNA 聚合酶在 second PCR 放大時其產率較低，降低了聯結反應、轉形反應及選殖時的成功率。
- 四: 解決 *Pfu* DNA 聚合酶在 second PCR 放大時產率較低所造成增加後續實驗難度的問題，可以將 second PCR 放大的產物純化後作為模板，再加 L1 引子及 LS 引子進行 third PCR 放大來有效解決。

在蛋白質純化的過程中，利用咪唑(imidazol)與組胺酸(histidine)的構造相似，競爭取代蛋白質在樹脂的位置，進而將蛋白質純化出來。但部份亦隨蛋白質溶析(elute)出來；而咪唑會干擾蛋白質螢光反應分析的結果，所以必須將其去除。先前採用 24 小時透析法(dialysis)發現無法完全去除咪唑，於是在 24 小時透析後再將樣品通過 Mono-Q 管柱(Pharmacia)

將殘留的咪唑去除。在通過 Mono-Q 管柱時必需將樣品作 2 至 3 倍的稀釋，才能有效的去除咪唑。Mono-Q 管柱具有濃縮樣品的效果，但是在以 SDS-PAGE 檢驗中發現在洗出液(flow through)中有標的蛋白質。換言之，在以 PPE 緩衝溶液沖洗時即有部分標的蛋白質被洗出，進而減少鹽類梯度(salt gradient)時蛋白質的量，影響酵素的比活性(specific activity)。改以 DE-52 管柱取代 Mono-Q 管柱；溶析緩衝溶液則以 ddH<sub>2</sub>O 取代 PPE 緩衝溶液，明顯的提高酵素的比活性。此外，因使用 Mono-Q 管柱純化樣品時需將樣品做 2-3 倍稀釋，對咪唑才會有較佳的去除效果；如此使樣品體積增大，需較長的注入時間，加上平衡 Mono-Q 管柱亦需較長的時間，故建議改用 DE-52 管柱取代 Mono-Q 管柱，可以有效的提升工作效率，縮短純化樣品所需的時間。

K54E 在 DHL 單受質螢光分析時，在 530 nm 處所形成的 FAD 放射光波峰 幾乎不變，即 FAD 轉變成 FADH 的反應不能進行。其可能原因有二，一為 K54E 的突變使自 FADH 下傳到 NAD<sup>+</sup>間的中間介質受到破壞，使得電子傳遞近乎停頓，進而使得 FAD 無法被還原(因產物 FADH 堆積)，所以 FAD 之 530 nm 放射光曲線之波峰下降不多。另一可能原因為 K54E 處於 EH<sub>4</sub> 態，為不活性狀態，故無法將 FAD 還原成 FADH。在 NaBH<sub>4</sub> 實驗中觀察到，跳過 DHL 與 FAD 中間的電子傳遞步驟，直接對 FAD 進行反應，但是不能將 FAD 進一步的還原。K54E 之 NAD<sup>+</sup>及 DHL 雙受質反應中，卻可使 FAD 順利形成 FADH，並進一步將電子傳給 NAD<sup>+</sup>形成 NADH。

由實驗結果顯示 K54E 在 DHL 單受質反應及 NaBH<sub>4</sub> 強還劑處理時的電子傳遞遇到了瓶頸，其可能的原因是酵素形成了 EH<sub>4</sub> 態(Williams, 1995；參見 53 頁，附圖 21)。酵素在 E 態及 EH<sub>2</sub> 態間可自由的轉換，為可逆反應；但酵素一旦進入 E<sub>4</sub> 態則成為不可逆反應。為驗證此推論，故將 K54E 進行 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 過夜處理之實驗，企圖將 FAD 的氧化程度提升，印證實酵素是處於 EH<sub>4</sub> 態。

將 K54E 以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理一夜後，再進行 DHL 螢光反應分析，結果發現電子自 FAD 至 FADH 間的流動較先前的 DHL 單受質反應及 NaBH<sub>4</sub> 強還

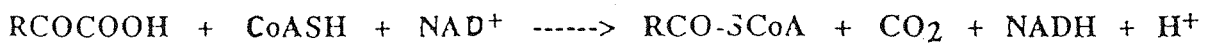
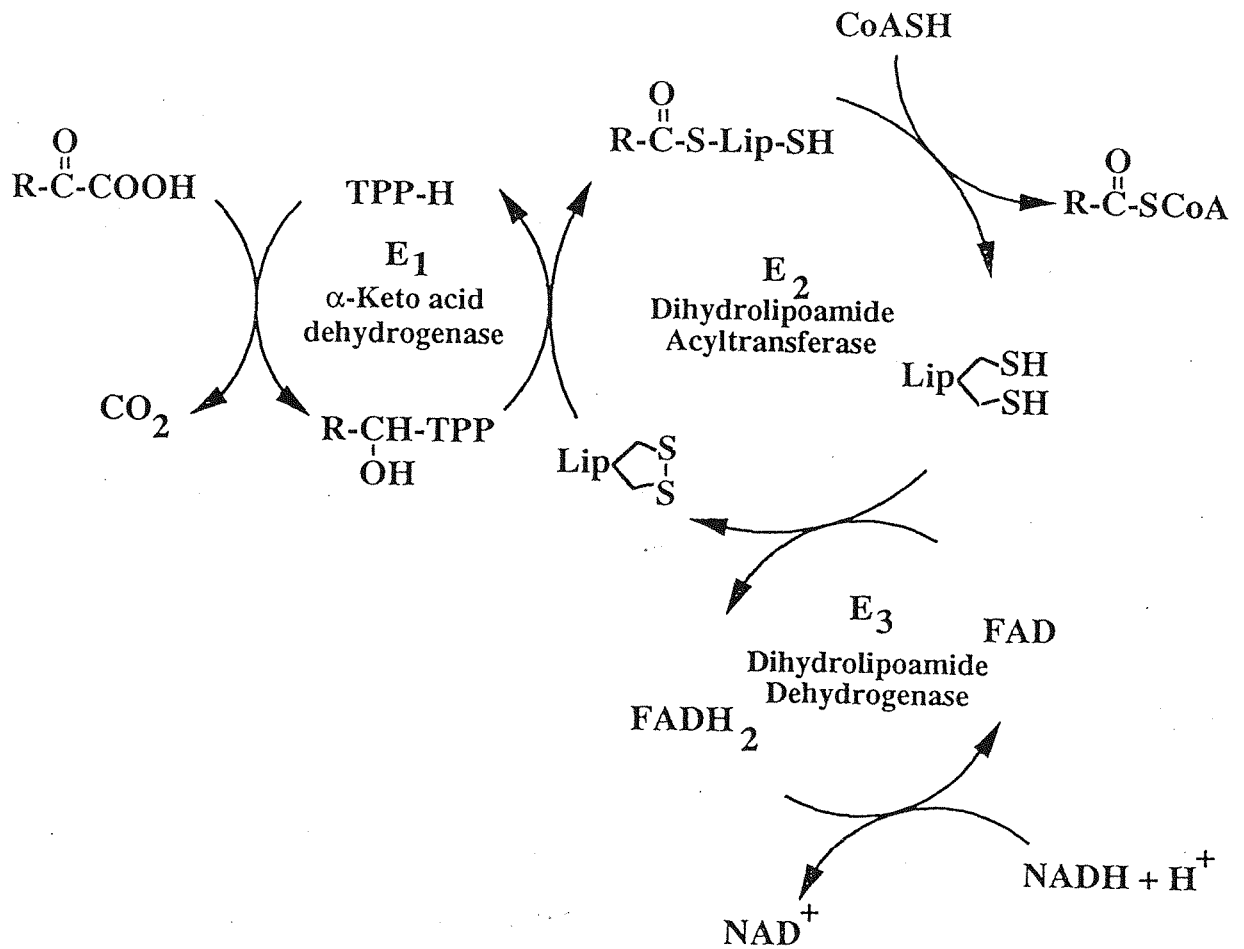


原劑處理時的電子傳遞明顯增加(圖 21, 53 頁)。此乃因 EH4 態酵素被  $H_2O_2$  給氧化成 E 態或 EH2 態，電子又可自由傳遞了。

歸納實驗結果，K54E 活性的喪失主因可能是因為突變使得活性雙硫基與 FAD 無法順利形成 thiolate-FAD 的中間體；次因 FADH 與 NAD 之間的中間體受到部分破壞。此乃因 DHL 將電子對傳給 FAD 之前，FAD 需先與活性雙硫基反應形成 thiolate-FAD 的中間反應；而 Lys-54 具有穩定 thiolate-FAD 的作用，所以當 lys-54 發生突變後 thiolate-FAD 的交互作用無法形成，以致於電子無法由 DHL 傳至 FAD 形成 FADH。在此情況下，酵素極易形成 EH4 態(Kazuko, 1994)，所以即使跳過 thiolate-FAD，以  $NaBH_4$  自中間推動反應，FAD 仍無法還原成 FADH。當 NAD 加入後，NAD 具有穩定  $E_3$  的 semiquinone 的作用，使原先無法形成 thiolate-FAD 的情況獲得改善；至於 NAD 能誘發 K54E 之活性(NAD induced activity)，可能是透過改變 K54 之 FAD semiquinone 的穩定性，進而調節酵素的活性。但在  $H_2O_2$  過夜處理的實驗中，FAD 可以再度被還原成 FADH，但 FADH 卻無法使 NAD 還原成 NADH；可能是因為突變菌種之結構原本即較不穩定，原本突變處之結構在經過  $H_2O_2$  過夜處理後，可能產生了更大的破壞，而使酵素在 FADH 下傳至 NAD 之路徑完全阻斷，NAD 無法被還原成 NADH，因而觀察到與第二組雙受質實驗(FAD 與 NAD 處理)不一樣的結果(無 NADH 之形成)，詳細的機制尚待進一步的探討。

由上述種種證據，推測在 FAD 和  $NAD^+$  之間，可能存在著一個能接受子與傳遞電子的中間體，而 K54 正是此中間體的一部分。(參見 54 頁，附圖 22)

五、圖示說明



PDC:	Pyruvate	Acetyl CoA
$\alpha$ KGDC:	$\alpha$ -Ketoglutarate	Succinyl CoA
BCKADC:	$\alpha$ -Ketoisovalerate(Val)	2-Methylpropionyl CoA
	$\alpha$ -Ketoisocaproate(Leu)	3-Methylbutyryl CoA
	$\alpha$ -Keto $\beta$ -Methylvalerate(Ile)	2-Methylbutyryl CoA
	$\alpha$ -Ketobutyrate(Thr)	Propionyl CoA
	$\alpha$ -Keto $\gamma$ -Methylthiobutyrate(Met)	3-Methylthiopropionyl CoA

圖 1：酮酸去氫酶複合體催化反應的總反應式

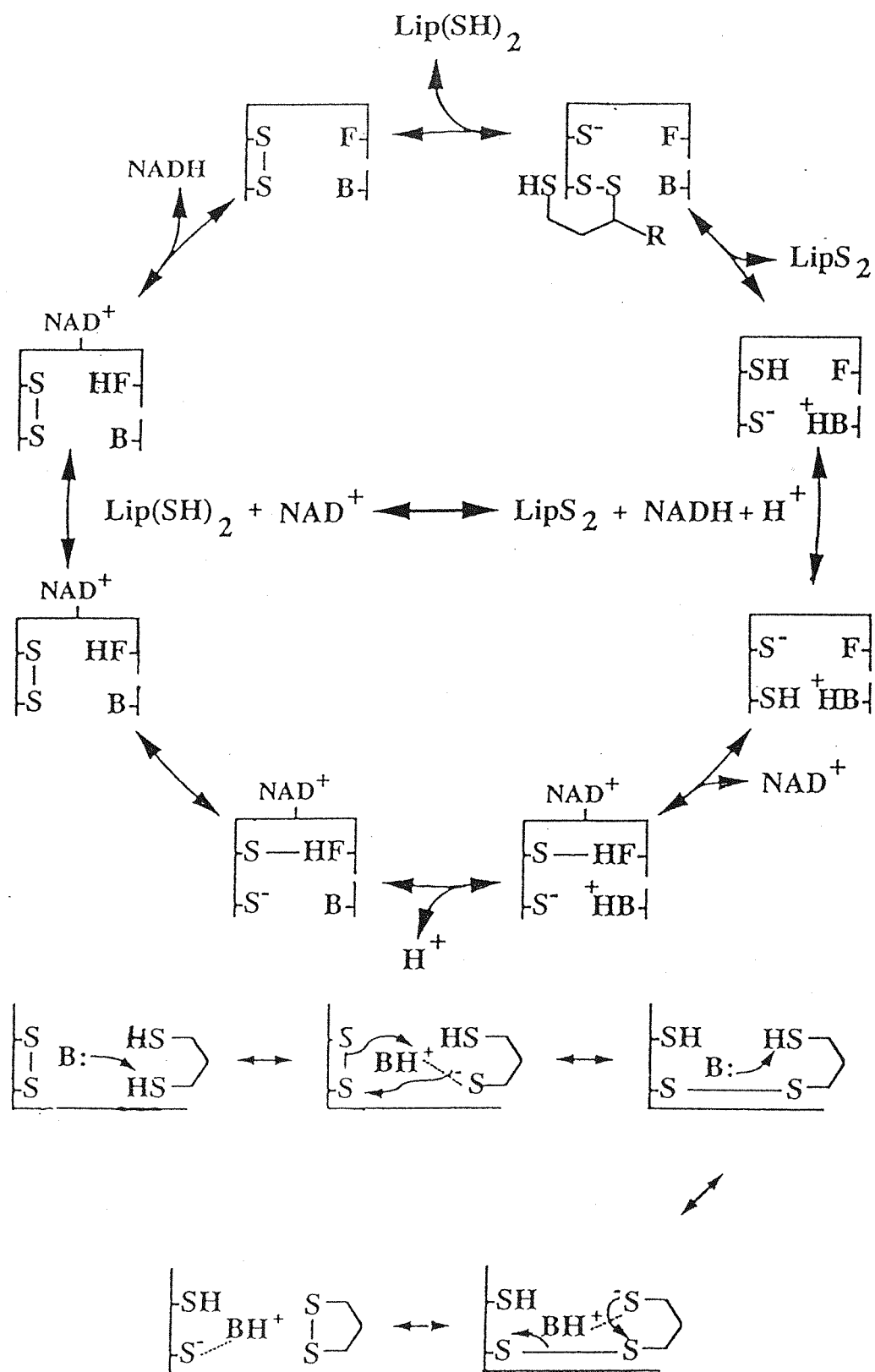


圖 2：二巯硫辛酸去氫酶催化反應的反應機制，途中 B 代表活性鹼基，S-S 代表活性雙硫基，F 代表 FAD。

表 1: 喋呤核苷氧化還原酶家族酵素的受質與產物

Enzyme	Substrates	Products
E <sub>3</sub>	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_2 \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2 \\  \diagdown \quad \diagup \\  \text{HS} \quad \text{SH}  \end{array}  $ Dihydrolipoamide	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_2 \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2 \\  \diagdown \quad \diagup \\  \text{S}-\text{S}  \end{array}  $ Lipoamide
GR	$  \begin{array}{c}  \text{Gly} \quad \text{Gly} \\    \quad   \\  \gamma\text{Glu}-\text{Cys}-\text{S}-\text{S}-\text{Cys}-\text{Glu} \\  \text{Oxidized Glutathione}  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \text{Gly} \\    \\  \gamma\text{Glu}-\text{Cys}-\text{SH} \\  \text{Reduced Glutathione}  \end{array}  $
TR	Oxidized Thioredoxin	Reduced Thioredoxin
MR	Hg(II)	Hg <sup>0</sup>
TTR	$  \begin{array}{c}  (\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4 \\    \quad   \\  \text{NH} \quad \text{NH} \\    \quad   \\  \text{Gly} \quad \text{Gly} \\  \gamma\text{Glu}-\text{Cys}-\text{S}-\text{S}-\text{Cys}-\text{Glu} \\  \text{Oxidized Trypanothione}  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  (\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4 \\    \quad   \\  \text{NH} \quad \text{NH} \\    \quad   \\  \text{Gly} \quad \text{Gly} \\  \gamma\text{Glu}-\text{Cys}-\text{SH} \quad \text{HS}-\text{Cys}-\text{Glu} \\  \text{Reduced Trypanothione}  \end{array}  $
AD	$  \begin{array}{c}  \text{COOH} \\    \\  \text{CH}_2 \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2 \\  \diagdown \quad \diagup \\  \text{HS} \quad \text{SH}  \end{array}  $ Dihydroasparagusic acid	$  \begin{array}{c}  \text{COOH} \\    \\  \text{CH}_2 \\  \diagup \quad \diagdown \\  \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2 \\  \diagdown \quad \diagup \\  \text{S}-\text{S}  \end{array}  $ Asparagusic acid
GSR	$  \begin{array}{c}  \gamma\text{Glu}-\text{Cys}-\text{S}-\text{S}-\text{Cys}-\text{Glu} \\  \text{bis-}\gamma\text{-glutamylcystine}  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \gamma\text{Glu}-\text{Cys}-\text{SH} \\  \gamma\text{-glutamylcystine}  \end{array}  $

(參見: Liu, 1994)

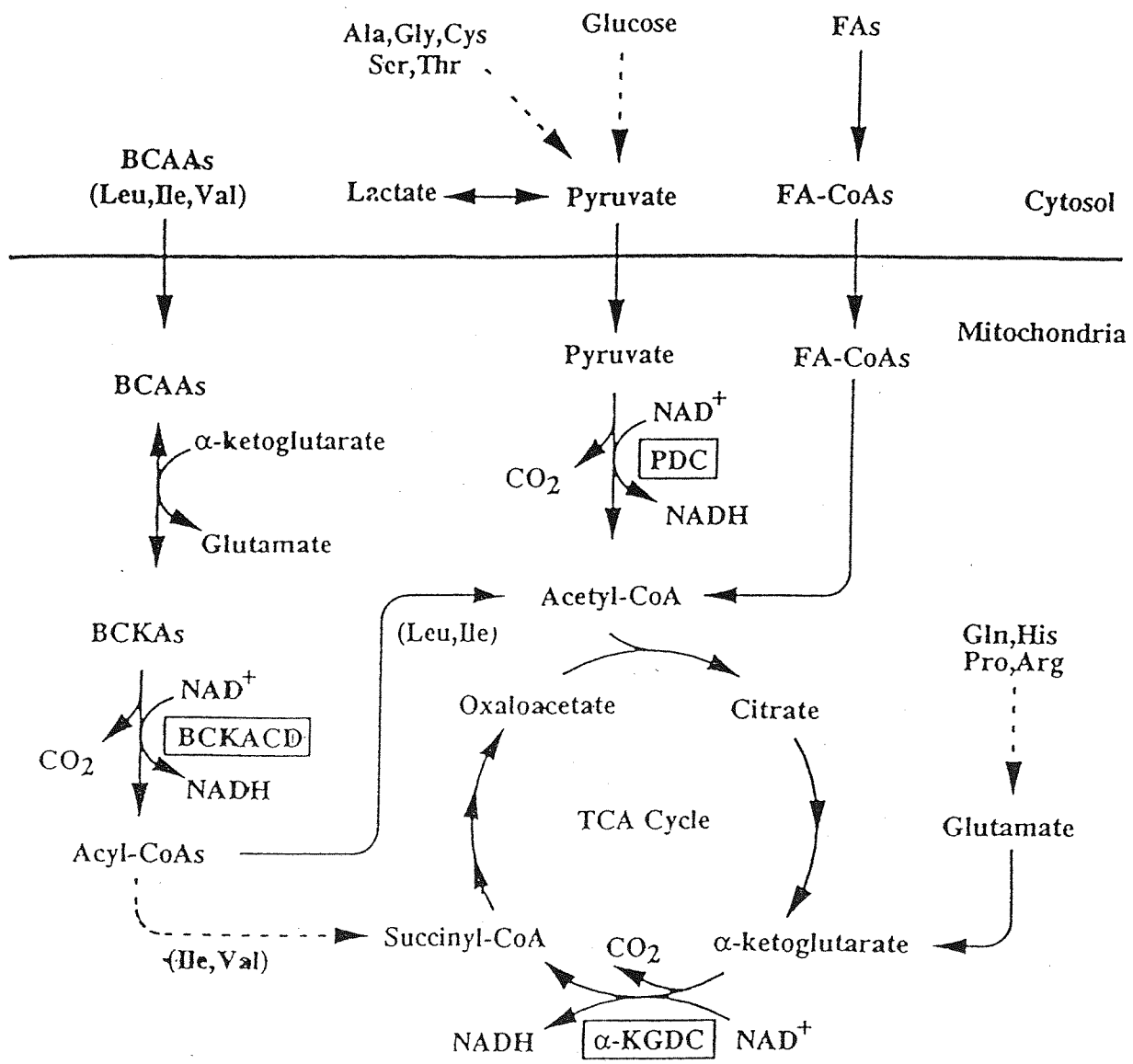


圖 3：酮酸去氫酶複合體所參與的能量代謝路徑圖。

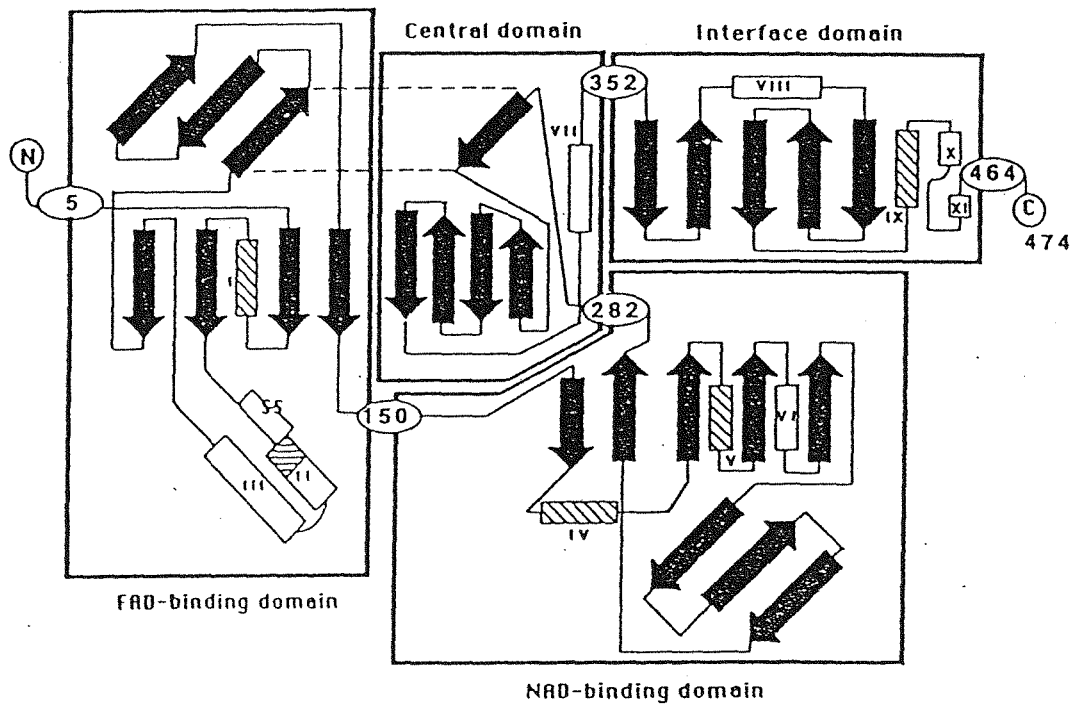


圖 4:人類二氫硫辛酸去氫酶與麩胱甘肽還原酶(GR, 60) 的鍊摺(chain fold)比較圖。以盒框區分成四個區域(domain)，由 N 端至 C 端依序為 FAD 結合區域、NAD 結合區域、中心區域及接觸區域。箭頭符號代表 $\beta$ -平板，帶有羅馬數字的長方形框代表 $\alpha$ -螺旋。空心長方框是 E<sub>3</sub> 與 GR DNA 序列相同的部分。阿拉伯數字是人類 E<sub>3</sub> 的胺基酸殘基；S-S 是酵素的活性雙硫基；N 與 C 分別代表酵素的 NH<sub>2</sub> 端與 COOH 端。(參見 Mattevi Andrea *et al.* 1992)

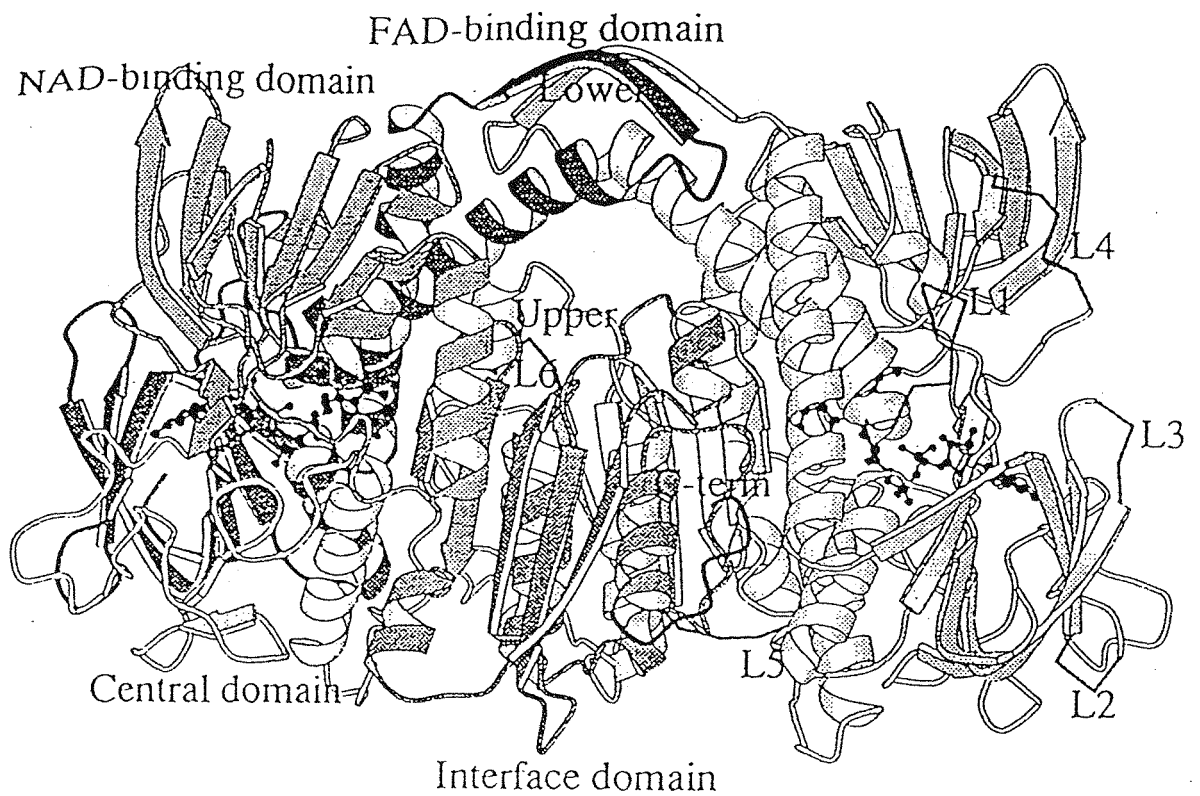


圖 5: *P. fluorescens* 菌的硫辛酸去氫酶同質雙體帶狀圖(Kraulis, 1991)。以顏色深淺來區分雙體構造的兩個單體，深灰色部分為一單體，其餘為另一單體。黑色顆粒為 FAD 分子。每一單體區分成 FAD 結合區域(胺基酸殘基 1 至 150)，NAD 結合區域(胺基酸殘基 151 至 280)，中心區域(胺基酸殘基 281 至 350)，接觸區域(胺基酸殘基 351 至 472)。酵素的活性中心是由單體的 FAD 結合區域、NAD 結合區域與另一單體的接觸區域所組成。

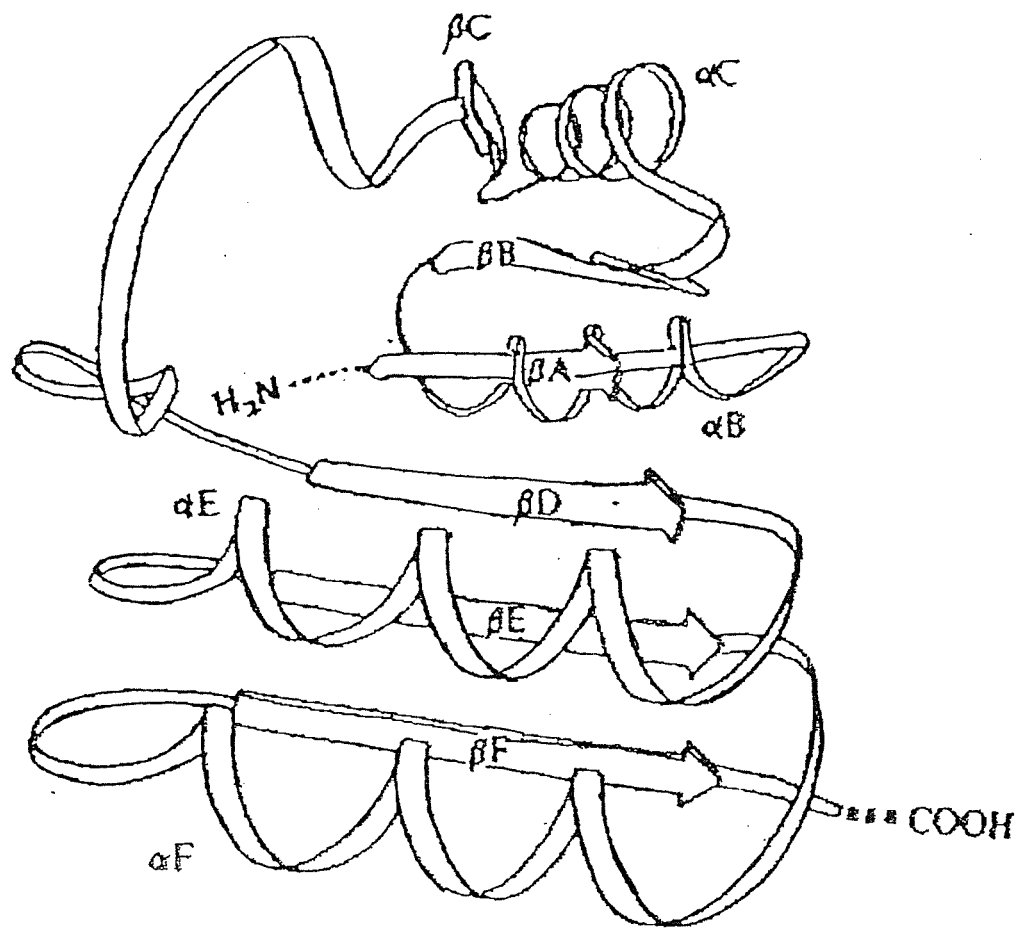
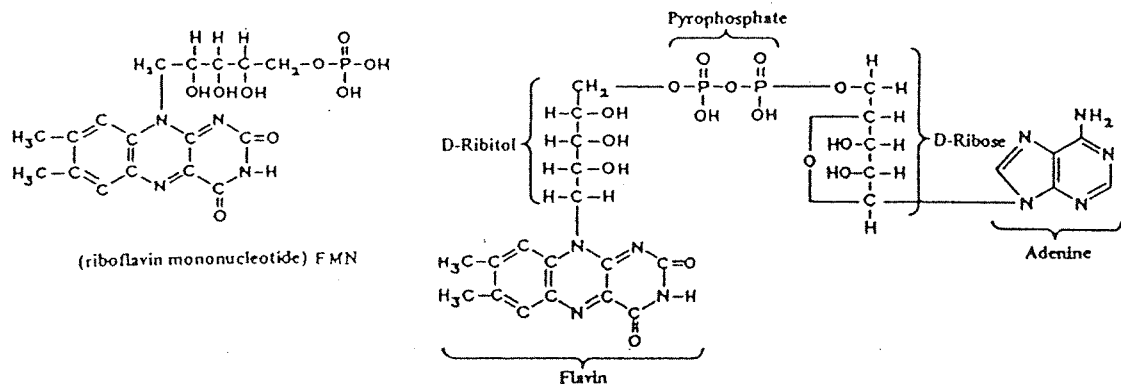


圖 6: NAD 結合部位的一般構造圖(摘自 Bourguignon, J., 1992)。NAD 結合部位是由六股平行的  $\beta$ -sheets ( $\beta A$ ,  $\beta B$ ,  $\beta C$ ,  $\beta D$ ,  $\beta E$ ,  $\beta F$ ) 及四個  $\alpha$ -helices ( $\alpha B$ ,  $\alpha C$ ,  $\alpha E$ ,  $\alpha F$ ) 所組成，其中  $\beta$ -DABC 之結構又稱為羅斯謨曲摺(Rossmann fold)。





Flavin adenine dinucleotide (FAD).

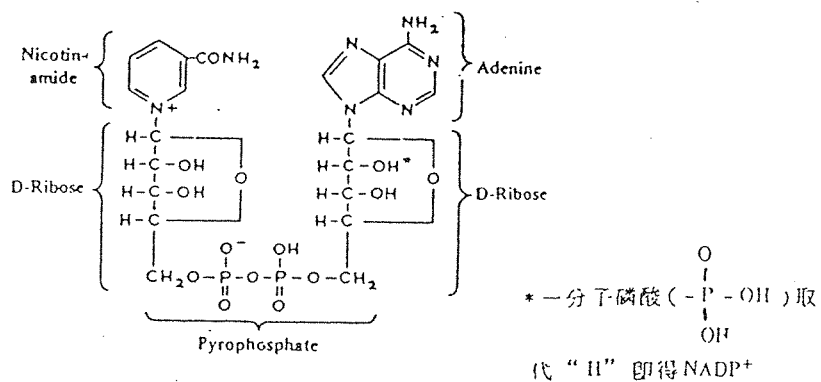
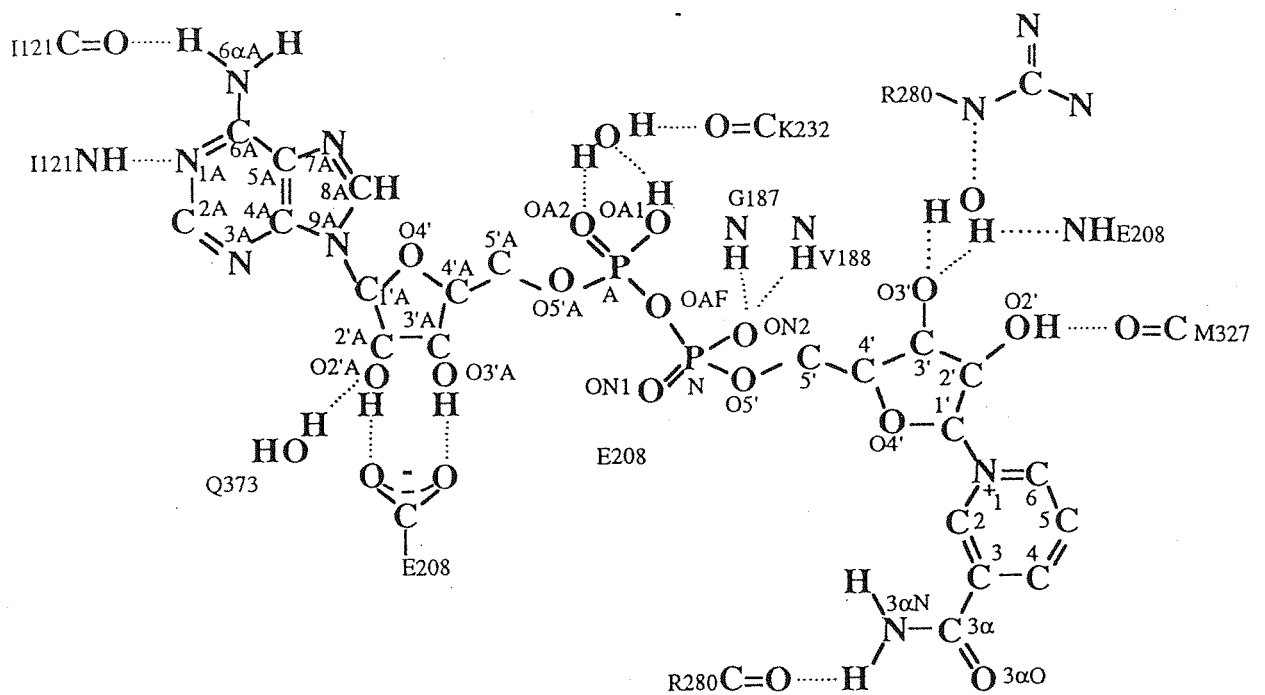


圖 7: FAD 與 NAD<sup>+</sup> 之平面構造圖




---

### NAD domain

$\alpha$ V (187-210)	G187:	main chain, amide NH, H-bond to ON2
	V188:	main chain, amide NH, H-bond to ON2
$\beta$ N4 (203-208)	E208:	main chain, amide NH, H-bond to O3' via HOH side chain, H-bond to O2'A and O3'A
$\alpha$ VI (219-233)	K232:	main chain, carbonyl O, H-bond to OA2 and OA1 via HOH
$\beta$ MN1 (240-249)	V243	main chain, amide NH, H-bond to adenine N1A main chain, carbonyl O, H-bond to adenine N6 $\alpha$ A
$\beta$ N2 (272-277)	R280:	side chain, H-bond to O3' via HOH main chain, carbonyl O, H-bond to Nicotinamide 3 $\alpha$ N
$\alpha$ VII (327-343)	M327:	main chain, Carbonyl O, H-bond to O2'

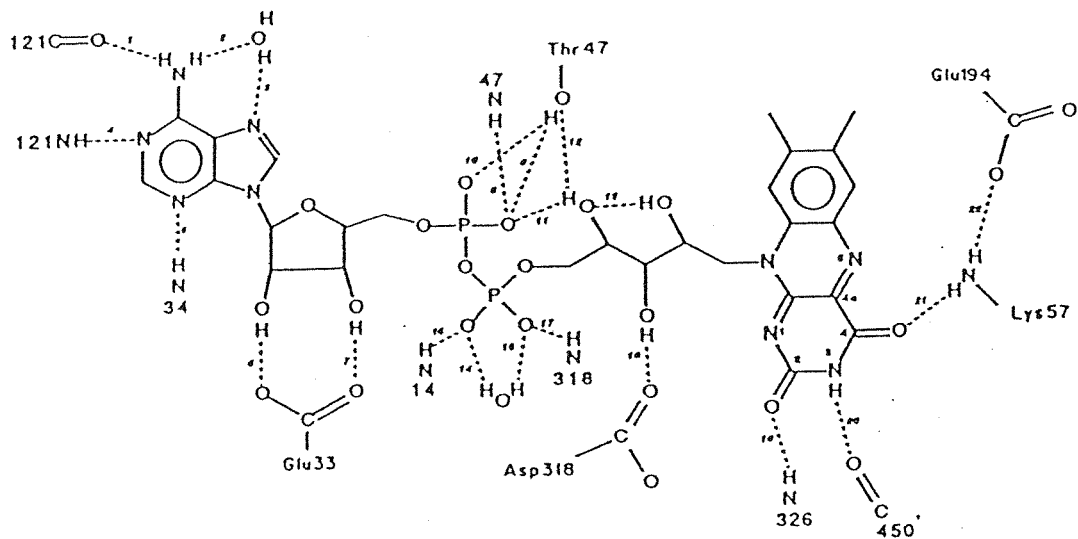
### Interface domain

$\alpha$ VIII (370-377)	Q373:	main chain, carbonyl O, H-bond to O2'A via HOH
-------------------------	-------	--

---

圖 8:位於二氫硫辛酸去氫酶的 NAD 結合部位附近的胺基酸示意圖(參見 T. C. Liu, 1994)。





Interatomic distances (Å)

Subunit		Subunit	
A	B	A	B
1:	3.0 2.8	12:	3.1 3.5
2:	3.4 3.6	13:	2.9 2.7
3:	3.3 3.2	14:	3.2 3.6
4:	3.0 2.9	15:	2.7 2.3
5:	3.5 3.5	16:	3.4 2.8
6:	2.4 2.4	17:	2.8 3.0
7:	2.7 3.3	18:	2.8 2.9
8:	2.9 3.2	19:	2.9 2.8
9:	2.9 3.5	20:	3.2 2.9
10:	3.3 3.9	21:	2.9 3.4
11:	2.6 2.8	22:	2.8 3.0

圖 10:位於 FAD 附近且與 FAD 能形成氫鍵的胺基酸示意圖。

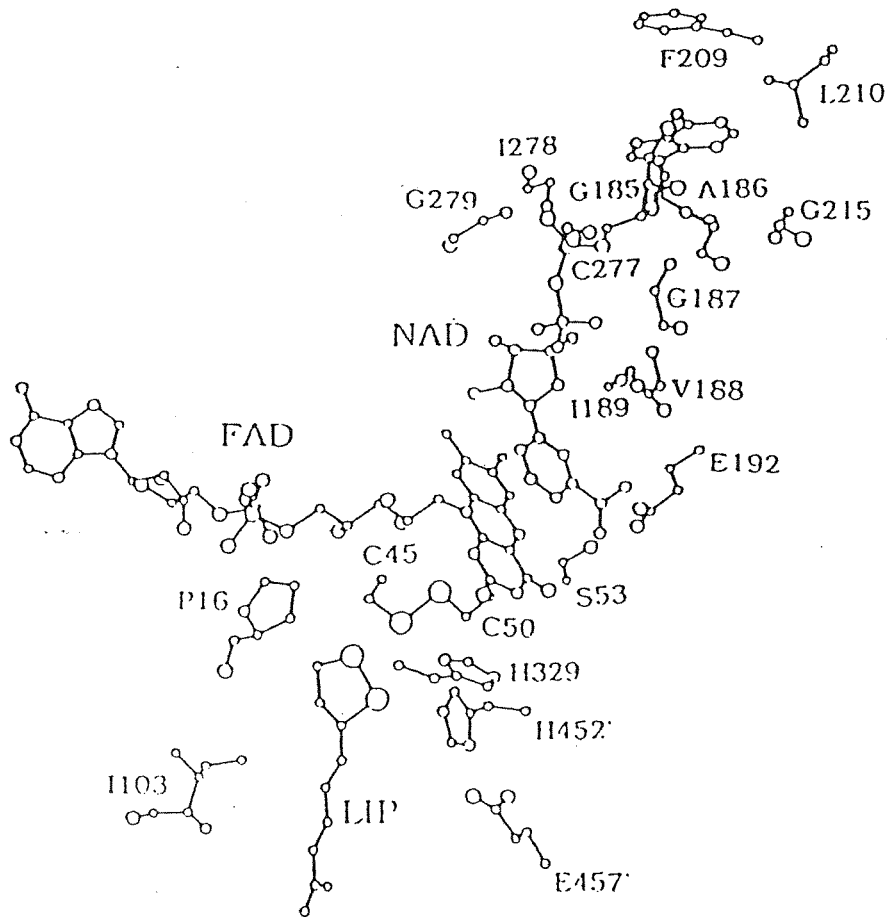
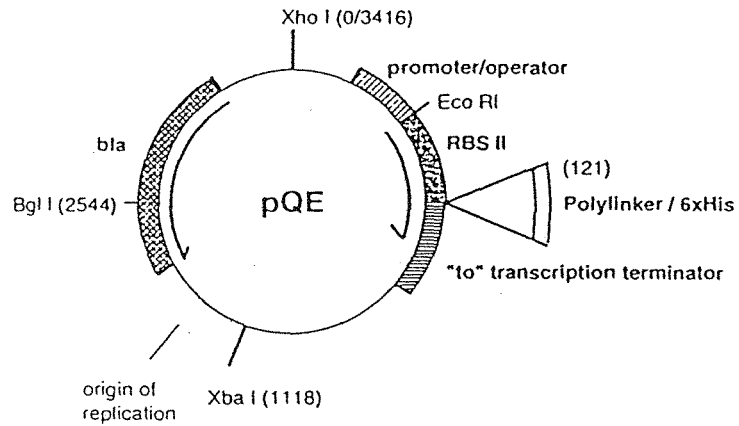
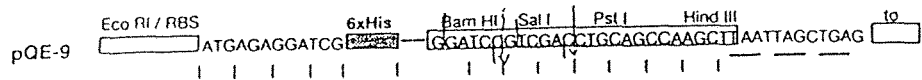


圖 11 :依據人類麩胱甘肽還原酶三度空間分子模式推測之人類二氫硫辛酸去氫酶的活性中心示意圖。該圖包括 Lipoic acid 與 NAD，活性雙硫基是由 Cys-45 與 Cys-50 所構成；活性鹼基 His-452 (H452) 與 Glu-457 (E457) 是來自另一單體。FAD 及可能與受質起作用的胺基酸殘基則如圖所示。(modified from Jentoft *et al.*)



Control regions of QIAexpress pQE-vectors.

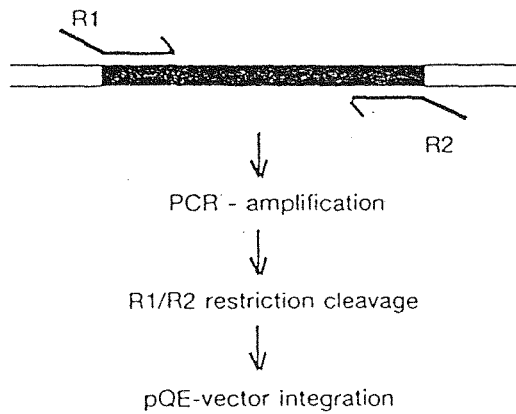


圖 12: pQE-9 表達系統之說明圖(摘錄自 Qiagen biochemical company 產品說明書)。

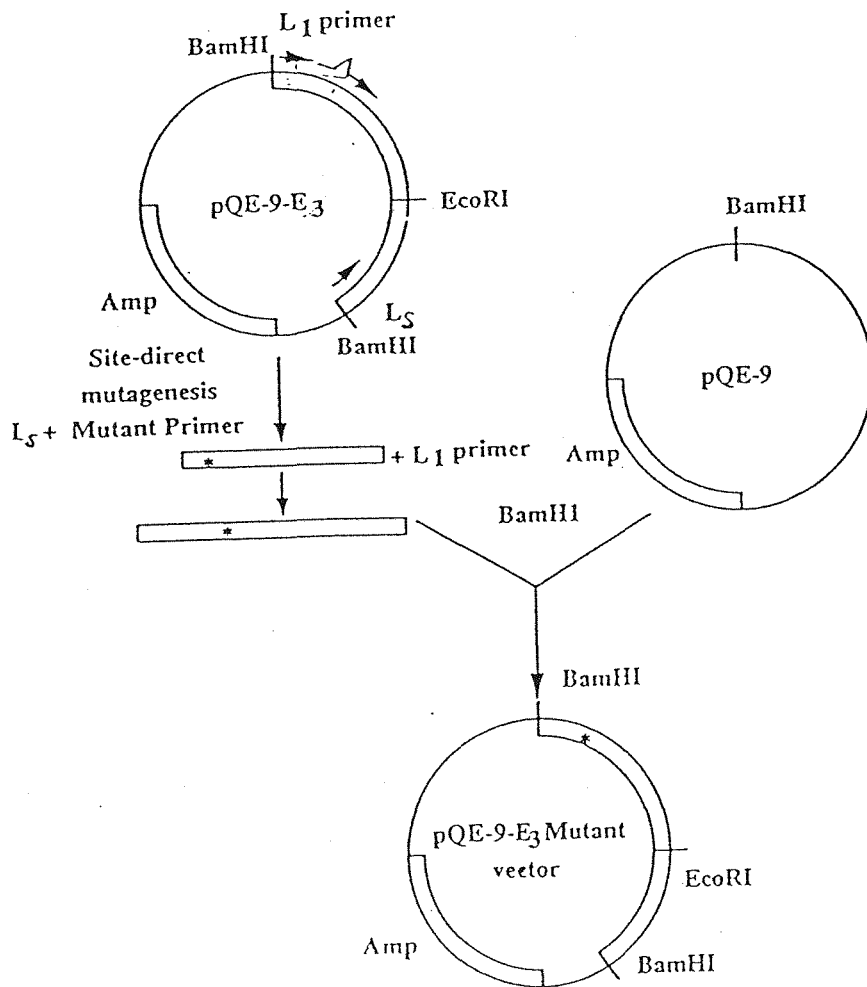


圖 13 : pQE-9-E<sub>3</sub> 突變表達載體之構建圖。模板是 pQE-9-E<sub>3</sub> ; 引子的 DNA 序列分別為 : L1: 5'-GCG CGC GGA TCC GCA GAT CAG CCG ATT-3'; LS: 5'-GCG CGC GTC GAC TCA AAA GTT GAT TGA TTT GCC-3'。(參見 Liu, T. C., 1994)

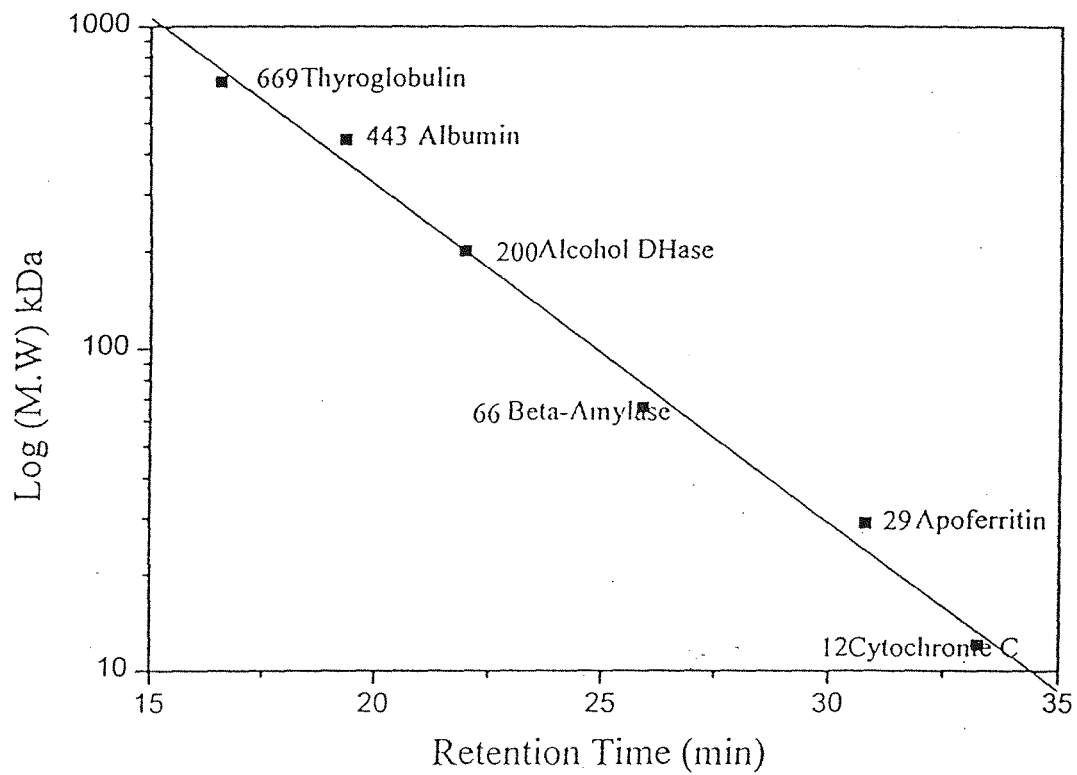


圖 14: FPLC Superdex HR-200 管柱色層分析之分子量估算圖。本圖縱軸代表分子量之對數值，橫軸代表滯留時間(retention time);本實驗中 E3 及其突變蛋白質之樣品滯留時間皆在大約 25 分鐘之處，經換算成分子量約為 100 kDa。



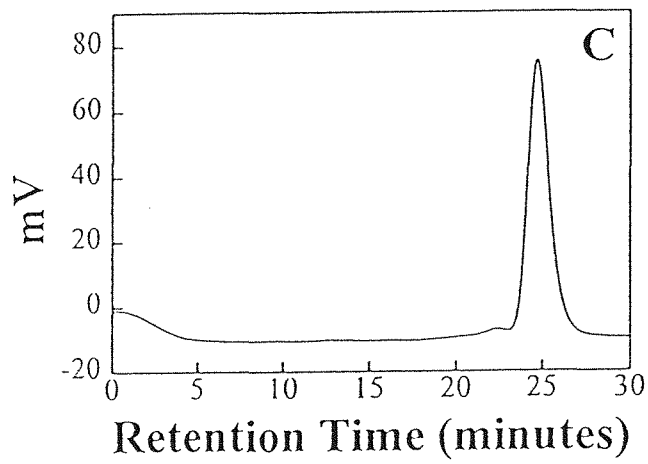
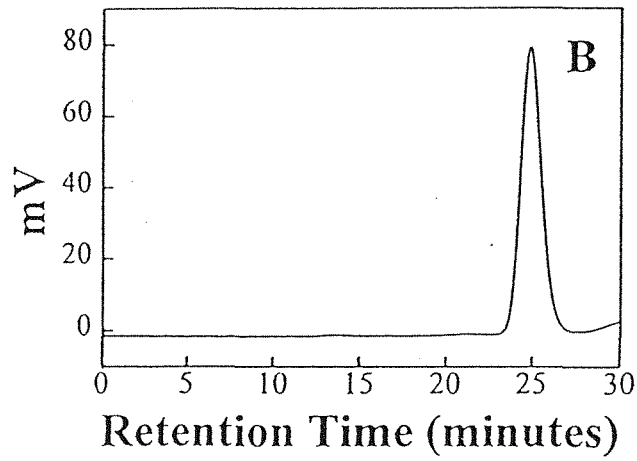
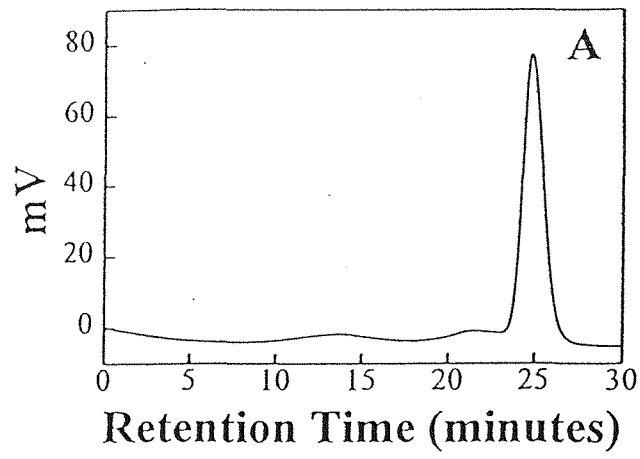
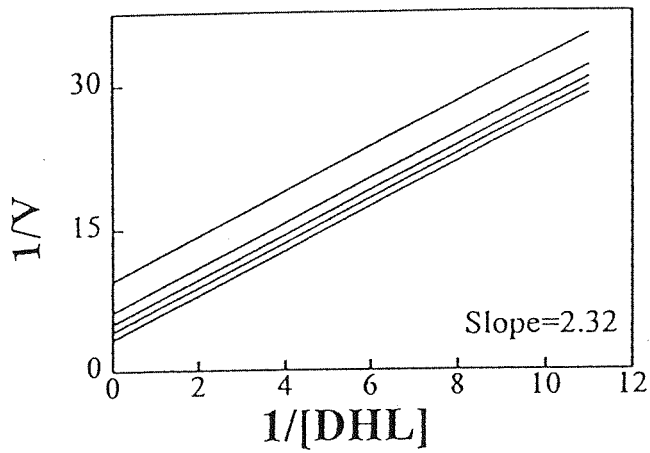


圖 15: FPLC 分子篩選(molecular sieving)色層分析圖。本實驗使用之管柱為 Superdex- HR200，流動相(moving phase)為 50 mM NaPO<sub>4</sub> (PH=8)、200 mM NaCl，流速為 0.5 ml / min。該圖中 X 軸代表滯留時間(retention time)，Y 軸代表蛋白質在 UV 280 nm 監測下的吸光值(以 m V 代表)。圖 A 為 E<sub>3</sub>，圖 B 為 SK-KS 突變蛋白質，圖 C 為 K54E 突變蛋白質。滯留時間內差至圖 14 之估算曲線後得知三者的分子量皆約為 100 kDa (參見圖 14 計算曲線)，因為 E<sub>3</sub> 的單體分子量約為 50Kda；所以本實驗證實此三種蛋白質皆為同質雙體的形式。

表 2: 個別蛋白質之酵素比活性與 FAD 之含量比較

	Specific activity	FAD content	Kcat
wild-type E <sub>3</sub>	100% (540U/mg)	100%	459 S <sup>-1</sup>
SK-KS	46% (248U/mg)	82 %	211 S <sup>-1</sup>
K54E	1.7%(9.18U/mg)	90 %	1.45 S <sup>-1</sup>

A



B

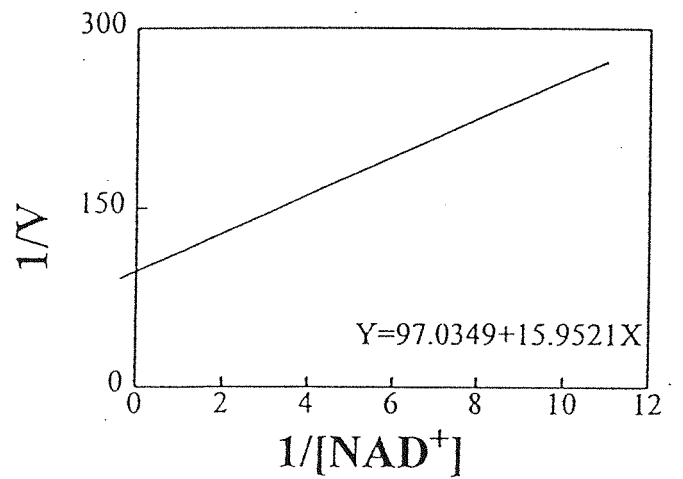
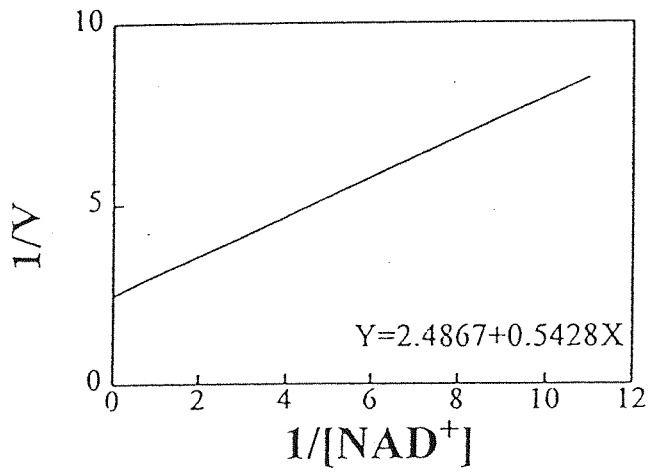
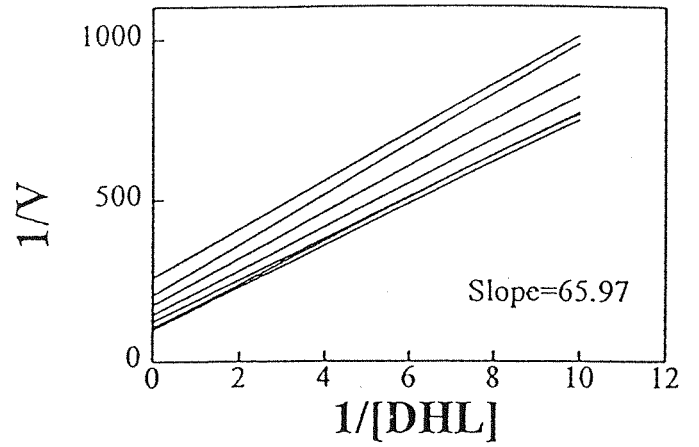


圖 16 是酵素動力學之分析圖。圖 16-A 是  $E_3$  的酵素動力學分析圖。 $E_3$  表現出雙受質的乒乓機制 (ping-pong mechanism)；正反應結果  $V_{max} = 0.4021$ ,  $K_{[NAD]} = 0.2183$ ,  $K_{[DHL]} = 0.9377$ ,  $K_{cat} = 459 S^{-1}$ 。圖 16-B 是  $E_3$ :SK-KS 突變蛋白質的酵素動力學分析圖。 $E_3$ :SK-KS 突變蛋白質亦為雙受質的乒乓機制；正反應結果  $V_{max} = 0.0103$ ,  $K_{[NAD]} = 0.1637$ ,  $K_{[DHL]} = 0.6796$ ,  $K_{cat} = 211 S^{-1}$ 。

酵素動力學分析是利用酵素之起始速率計算後得之。先準備不同濃度的 NAD 及 DHLA 各七種，其濃度分別為 0.1 mM；0.15 mM；0.2 mM；0.3 mM；1.0 mM；3.0 mM；6.0 mM。將純化出之蛋白質以 DHLA 及 NAD 當受質進行酵素活性測定。首先固定一種 NAD 的濃度，改變 DHL 的濃度進行反應，可得一組含七個反應點的數據；如此以七種 NAD 濃度重複上述步驟即可得七組數據。再以起始速度的倒數  $1/V$  為縱軸作圖。以  $1/[DHLA]$  為橫軸，可得一組平行線(圖 16A-1)，平行線之結果表示此酵素是屬於乒乓機制；此時則可利用公式  $1/V = 1/A(K_{DHLA}/V_1) + 1/V(1 + K_{NAD}/B)$ ，求出其斜率為  $K_{DHLA}/V_1$ ；求取平行線縱走軸的距(即  $1/V$ )後，再以  $1/[NAD^+]$  為橫軸，圖 16A-1 之截距為縱軸作圖，可得一條直線，其縱軸截距為  $1/V_{max}$ ，斜率為  $K_{NAD}/V_{max}$  可作出圖 16A-2；利用公式  $1/V_{max} = (K_{NAD}/V_1) \times 1/B + 1/V_1$  即可求出  $K_{NAD}$ 。

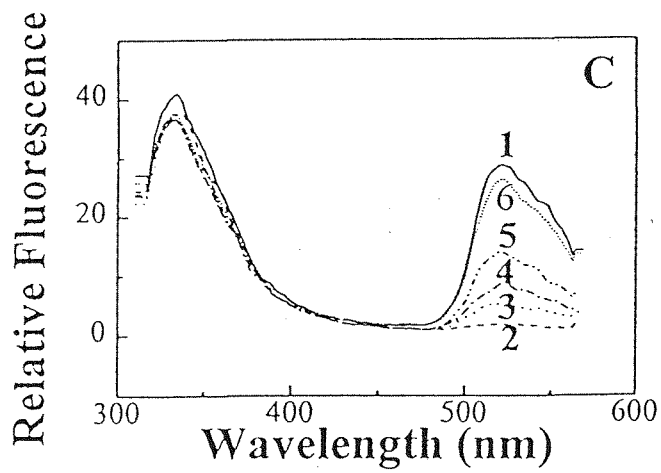
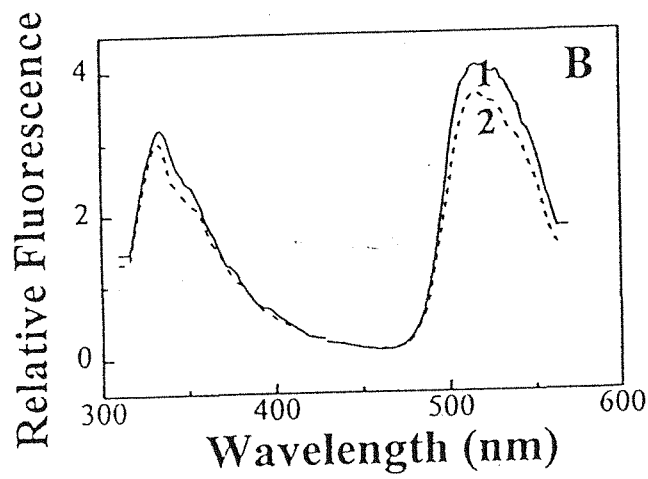
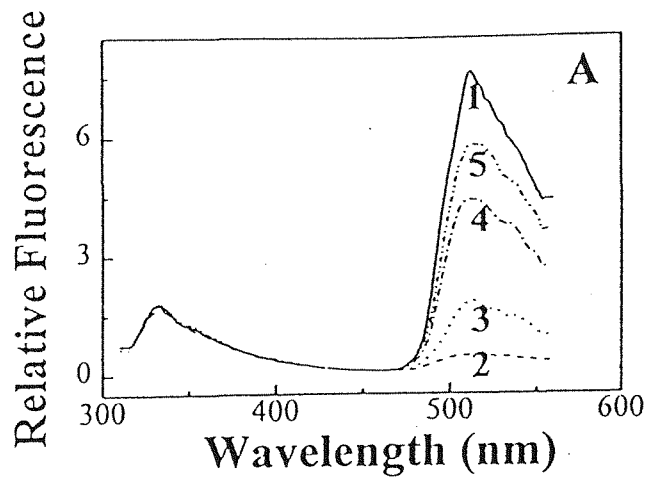


圖 17：DHL 單受質螢光反應分析圖。每一反應使用酵素 100 微克( $\mu\text{g}$ )，DHL 最終濃度為  $50 \mu\text{M}$ ，反應最終體積為 1 ml。反應在不同的時間點觀察酵素的螢光變化。

圖 A 為  $E_3$  之螢光反應曲線圖；曲線 1 為酵素 100  $\mu\text{g}$  的螢光表現圖；曲線 2 為原曲線 1 的酵素加入  $50 \mu\text{M}$  DHL 後的螢光表現圖；曲線 3 為曲線 2 經 5 分鐘後的螢光表現圖；曲線 4 為曲線 2 經 10 分鐘後的螢光表現圖；曲線 5 為曲線 2 經 15 分鐘後的螢光表現圖。

圖 B 為 K54E 突變蛋白質之螢光反應曲線圖；曲線 1 為酵素 100  $\mu\text{g}$  的螢光表現圖；曲線 2 為原曲線 1 的酵素加入  $50 \mu\text{M}$  DHL 後的螢光表現圖；反應至此停滯不動。

圖 C 為 SK-KS 突變蛋白質之螢光反應曲線圖；曲線 1 為酵素 100  $\mu\text{g}$  的螢光表現圖；曲線 2 為原曲線 1 的酵素加入  $20 \mu\text{M}$  DHL 後的螢光表現圖；曲線 3 為曲線 2 經 10 分鐘後的螢光表現圖；曲線 4 為曲線 2 經 15 分鐘後的螢光表現圖；曲線 5 為曲線 2 經 20 分鐘後的螢光表現圖；曲線 6 為曲線 2 經 30 分鐘後的螢光表現圖。

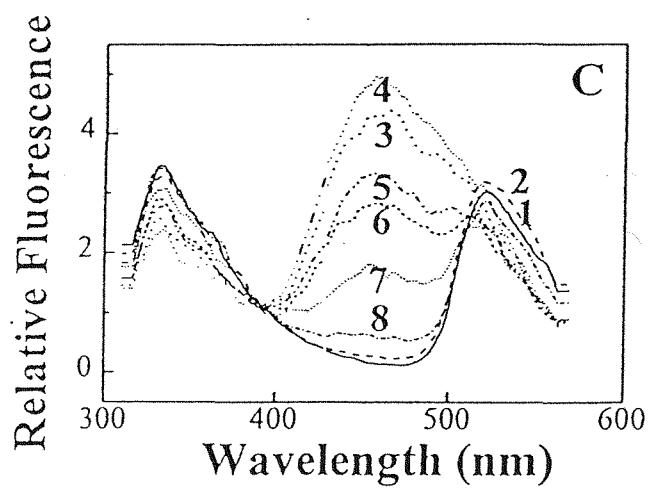
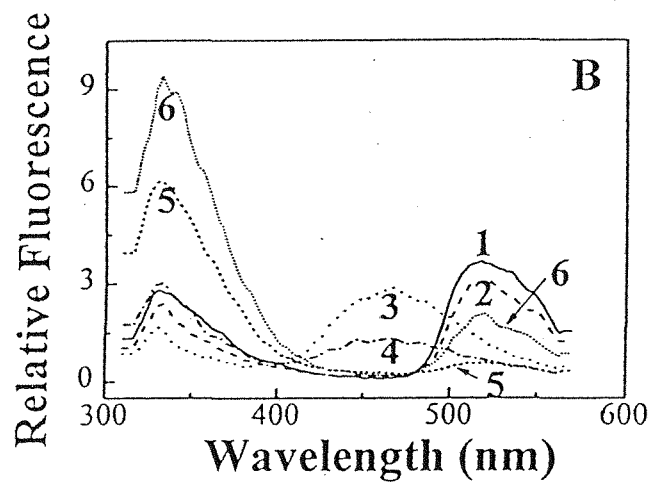
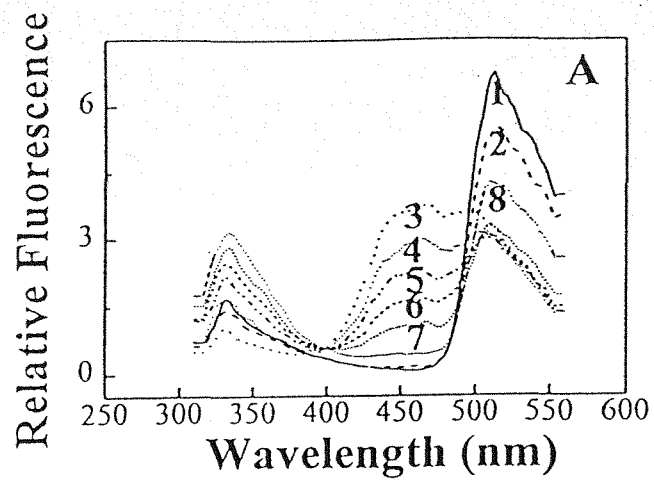




圖 18: 酵素以 DHL 與  $\text{NAD}^+$  進行雙受質處理後之螢光反應圖。每一反應使用酵素 100 微克( $\mu\text{g}$ )，DHL 及  $\text{NAD}^+$  的最終濃度為  $50 \mu\text{M}$ ，反應最終體積為 1ml。反應在不同的時間點，點觀察酵素的螢光曲線變化。

圖 A 為  $\text{E}_3$  之螢光反應曲線圖；曲線 1 為酵素 100  $\mu\text{g}$  的螢光表現圖；曲線 2 為原曲線 1 的酵素加入  $50 \mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  後測得的螢光表現圖；曲線 3 為曲線 2 再加入  $50 \mu\text{M}$  DHL 後測得的螢光表現圖；曲線 4 為曲線 3 經 5 分鐘後測得的螢光表現圖；曲線 5 為曲線 3 經 7.5 分鐘後測得的螢光表現圖；曲線 6 為曲線 3 經 10 分鐘後測得的後的螢光表現圖；曲線 7 為曲線 3 經 12.5 分鐘後測得的後的螢光表現圖；曲線 8 為曲線 3 經 20 分鐘後測得的後的螢光表現圖。

圖 B 為 K54E 突變蛋白質之螢光反應曲線圖；曲線 1 為酵素 100  $\mu\text{g}$  的螢光表現圖；曲線 2 為原曲線 1 的酵素加入  $50 \mu\text{M}$  NAD 後測得的螢光表現圖；曲線 3 為曲線 2 再加入  $50 \mu\text{M}$  DHL 後測得的螢光表現圖；曲線 4 為曲線 3 經 2 分鐘後測得的螢光表現圖；曲線 5 為曲線 3 經 5 分鐘後測得的螢光表現圖；曲線 6 為曲線 3 經 10 分鐘後測得的後的螢光表現圖。

圖 C 為 SK-KS 突變蛋白質之螢光反應曲線圖；曲線 1 為酵素 100  $\mu\text{g}$  的螢光表現圖；曲線 2 為原曲線 1 的酵素加入  $50 \mu\text{M}$  NAD 後測得的螢光表現圖；曲線 3 為曲線 2 再加入  $50 \mu\text{M}$  DHL 後測得的螢光表現圖；曲線 4 為曲線 3 經 1.5 分鐘後測得的螢光表現圖；曲線 5 為曲線 3 經 8 分鐘後測得的螢光表現圖；曲線 6 為曲線 3 經 10 分鐘後測得的後的螢光表現圖；曲線 7 為曲線 3 經 15 分鐘後測得的後的螢光表現圖；曲線 8 為曲線 3 經 25 分鐘後測得的後的螢光表現圖。

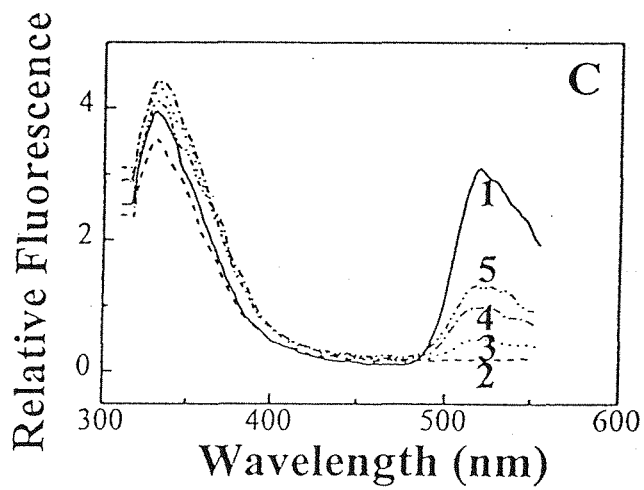
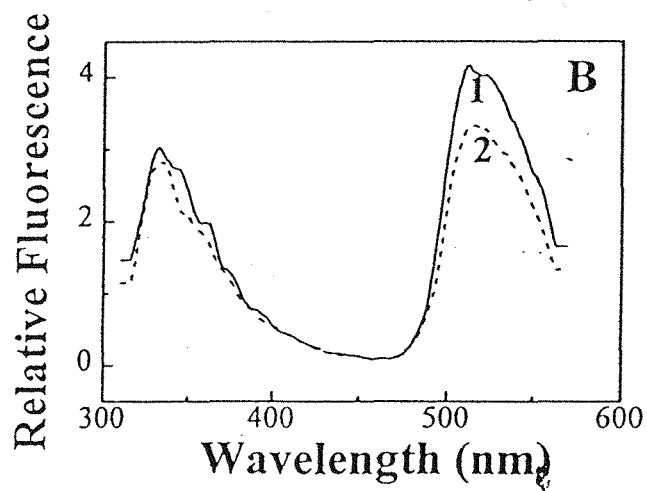
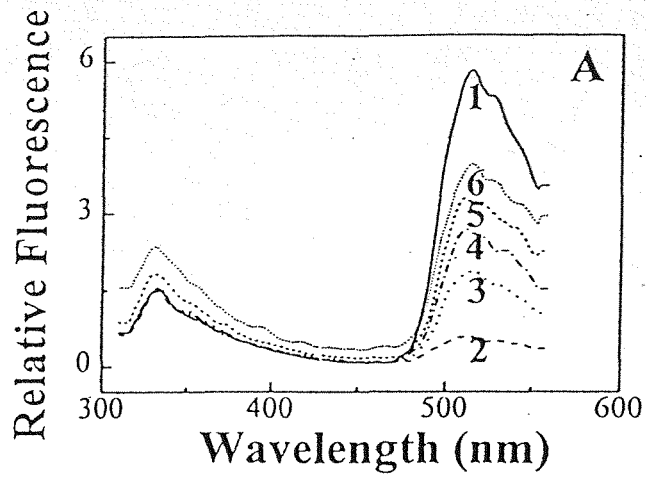


圖 19：NaBH<sub>4</sub>處理後之螢光反應圖。每一反應使用酵素 100 微克(μg)，DHL 最終濃度為 50 μM，反應最終體積為 1 ml。反應在不同的時間點觀察螢光變化。圖 A 為 E<sub>3</sub> 之螢光反應曲線圖；曲線 1 為酵素 100 μg 的螢光表現圖；曲線 2 為原曲線 1 的酵素加入 NaBH<sub>4</sub>(10 mg/ml, 10 μl)後的螢光表現圖；曲線 3 為曲線 2 經 2.5 分鐘後的螢光表現圖；曲線 4 為曲線 2 經 5 分鐘後的螢光表現圖；曲線 5 為曲線 2 經 7.5 分鐘後的螢光表現圖；曲線 6 為曲線 2 經 10 分鐘後的螢光表現圖。圖 B 為 K54E 突變蛋白質之螢光反應曲線圖；曲線 1 為酵素 100 μg 的螢光表現圖；曲線 2 為原曲線 1 的酵素加入 NaBH<sub>4</sub>(10 mg/ml, 10 μl) 後的螢光表現圖；反應至此停滯不動。圖 C 為 SK-KS 突變蛋白質之螢光反應曲線圖；曲線 1 為酵素 100 μg 的螢光表現圖；曲線 2 為原曲線 1 的酵素加入 NaBH<sub>4</sub>(10 mg/ml, 10 μl)後的螢光表現圖；曲線 3 為曲線 2 經 20 分鐘後的螢光表現圖；曲線 4 為曲線 2 經 30 分鐘後的螢光表現圖；曲線 5 為曲線 2 經 60 分鐘後的螢光表現圖。

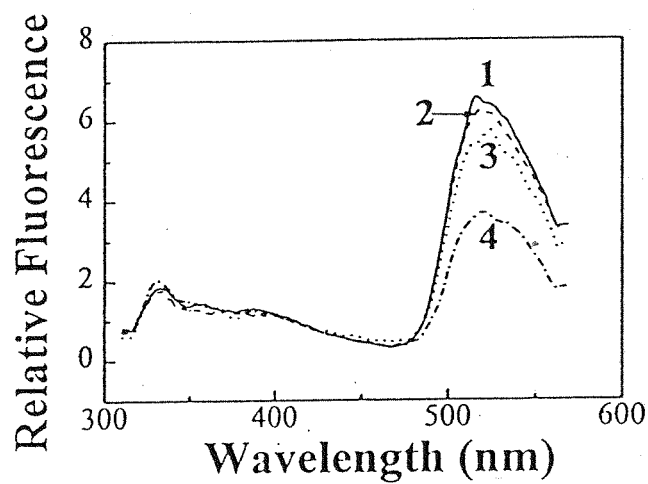


圖 20：K54E 突變蛋白質經  $H_2O_2$  過夜處理後的螢光反應。上圖為 K54E 突變蛋白質經 0.02%  $H_2O_2$  過夜處理後的螢光反應，反應使用酵素 35 微克，DHL 及 NAD 最終濃度為  $50 \mu M$ ，反應最終體積為 1 ml。反應在不同的時間點觀察螢光變化。曲線 1 為酵素的螢光表現曲線；曲線 2 為將曲線 1 酵素再加入 NAD 後的螢光表現曲線；曲線 3 為將曲線 2 酵素再加入 DHL 後的螢光表現曲線；曲線 4 為曲線 3 經 5 分鐘後的螢光表現曲線。

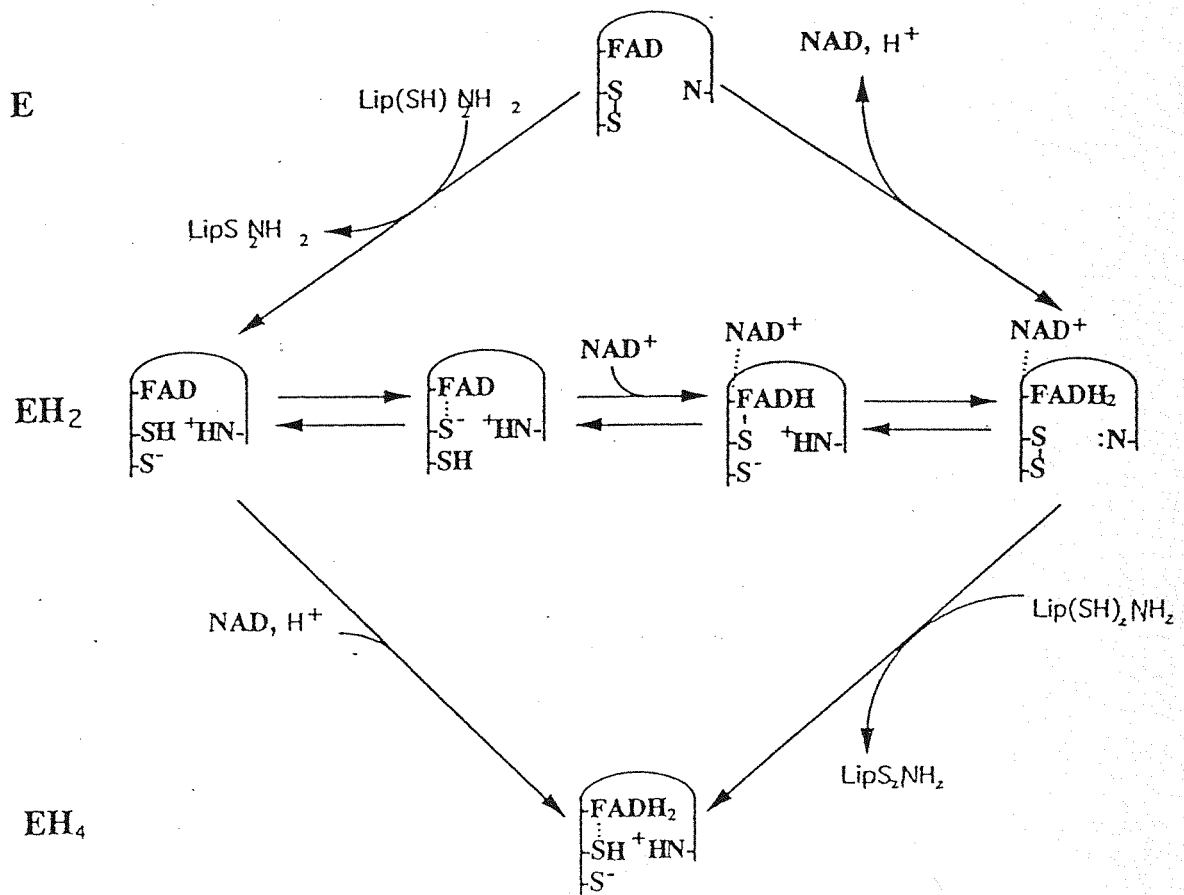


圖 21: 酵素 EH<sub>2</sub> 態與 EH<sub>4</sub> 態間的氧化還原機制假說圖  
(William, C. H., 1995)

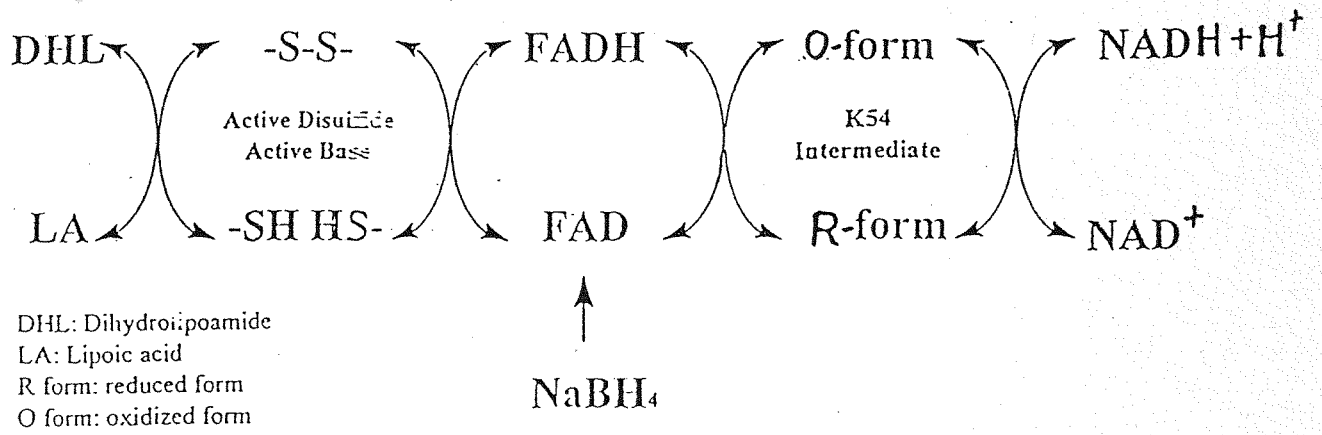


圖 22: 電子於 FAD 與 NAD 間傳遞機制的假說圖

## 陸、文獻

1. Benen, J., Van Berkel, W., Dieteren, N., Arscott, D., William, C. H. Jr., Veeger, C., de Kok, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* **207**, 487-497
2. Blass, J. P., Kark, P. and Menon, N. K. Low activity of the pyruvate and oxoglutarate dehydrogenase complexes in five patients with *Friedreichs Ataxia*. *New England J. Med.* **295**: 62-67, 1997.
3. Bourguignon, J., Machelal, D., Neuburger, M and Douce, R. Isolation, characterization, and sequence analysis of a cDNA clone encoding L-protein, the dihydrolipoamide dehydrogenase component of the glycine cleavage system from pea-leaf mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **204**:865-873, 1992.
4. Clarkson, G. D. and Lindsay, J. G. Immunology, biosynthesis and in vivo assembly of the branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex from bovine kidney. *Eur. J. Biochem.* **196**:95-100, 1991.
5. Deonarain, M. P., Scrutton, N. S., Berry, N., and Perham, R. N. (1990) *Proc. Royal Sci. Soc. London* **B241**,179-186
6. Guest, J. R., Angier, S. J. and Rusell, G. C. Structure, expression and protein engineering of the *pyruvate dehydrogenase complexes* of *Escherichia coli*. *Annual New York Academy of Science*: 77-99, 1989.
7. Haworth, J. C., Perry, T. L., Blass, J. P., Hansen, S. and Urquhart, N. Lactic acidosis in three sib due to defect in both *pyruvate dehydrogenase complex*. *Pediatr.* **58**: 564-572, 1976.
8. Hiraga, K., Kochi, H., Hayasaka, K., Kikuchi, Goro and Nyhan, W. L., Defect glycine cleavage system in nonketotic hyperglycinemia. *Clin. Invest.* **68**: 525-534, 1981.
9. Jentof, J. E., Shoham, M., Hurst, D. and Patel, M. S. A structure 9 model for human *dihydrolipoamide dehydrogenase*. *Protein: Structure, Function and Genetics*, **14**: 88-101, 1992.

10. Kim, H. & Patel, M. S. Characterization of two site-specifically mutated human dihydrolipoamide dehydrogenase (His452 -Gln and Glu457- Gln ). *J. Biol. Chem.* **267**: 5128-5132, 1992.
11. Kuhara., T., Shinka. T., Inoue, Y., Matsumoto, M., Yoshino, M. Sakaguchi, Y., and Matsumoto, I. Studies of urinary organic acid profiles of a patient with dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency. *Clinica. Chemica. Acta.* **133**: 133-140, 1983.
12. Kuroda, Y., Kline, J. J., Sweetman, L., Nyhan, W. L. and Groahang, T. D. Abnormal pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complexes in a patient with latic acidemia. *Pediatr. Res.* **13**: 928-932, 1979.
13. Liu, T. C. Ph. D. thesis, 1994.
14. Liu, T. C., Kim, H., Arimendi, C., Kitano, A. and Patel, M. S. Identification of two missense mutation in a dihydrolipoamide dehydrogenase -deficient patient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 5186-5190, 1993.
15. Liu, T. C., Korotchkins, L. G., Hyatt, S. L., Vettakkorumakankav, N. N. and Patel, M. S. Spectroscopic studyies of the characterization of recombinant human dihydrolipoamide dehydrogenase and its site-directed mutants. *J. Biol. Chem.* **270**: No. 26, 15545-15550, 1995.
16. Massey, V. The identify of diaphorase and lipoic dehydrogenase *Biochim. Biophys. Acta.* **30**: 205-206, 1958.
17. Massey, V. The composition of ketoglutarate dehydrogenase complex . *Biochim. Biophys. Acta.* **38**: 447-461, 1960.
18. Massey, V. The identify of diaphorase and lipoyl dehydrogenase *Biochim. Biophys. Acta.* **37**: 314-322, 1960
19. Massey, V. On the reaction mechanism of lipoyl dehydrogenase *Biochim. Biophys. Acta.* **40**: 184-1856, 1960.



20. Massey, V., Gibson, Q. H. and Veeger, C. Intermediates in the catalytic action of lipoyldehydrogenase (diaphorase).  
*Biochem. J.* **77**: 341-351, 1960.
21. Matalon, R., Stumpf, D. A., Michal, K., Hart, R. D., Parks, J. K., and Goodman, S. I. Lipoamide dehydrogenase deficiency with primary lactic acidosis : favorable response to treatment with oral lipoic acid. *J. Ped.* **104**: 65-69, 1984.
22. Mattevi, A., Obmolva, G., Kalk, K. H. Vanberke, W. J. and Hol, W. G. I. Three-dimensional structure of lipoamide dehydrogenase from *pseudomonas fluorescens* at 2.8 resolution . *J. Mol. Biol.* **230**: 1200-1215, 1993.
23. Mattevi, A., Obmolva, G., Schierbeek, J., Betzel, C. and Hol, W. G. I. The refined crystal structure of pseudomonas putida lipoamide dehydrogenase complex with NAD<sup>+</sup> at 2.45 resolution . *Protein: Structure, Function and Genetics*, **13**: 336-351, 1992.
24. Mattevi, A., Schierbeek, J. and Hol, W. G. I, Refined crystal structure of lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* at 2.2 resolution. *J. Mol. Biol.* **220**: 975-994, 1991.
25. Munnich, A., Saudubray, J. and J. M. Taylor, J., Charpentier, C., Marsac, C., Rocchiccioli, F., Amedee-Manesme, O., Coude, F. X., Frezal, J. and Robinson, B. H. Congenital lactic acidosis  $\alpha$  - ketoglutaric aciduria and variant form of maple syrup urine disease due to a single enzyme defect : dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency. *Acta Paediatr. Scand.* **71**: 167-171, 1982.
26. Nancy Hopkins and Charles H. Williams, Jr. Characterization of lipoamide dehydrogenase from *Escherichia coli* lacking the redox active disulfide : C44S and C49S. *Biochemistry*, **34**: 11757-11765, 1995.

27. Otulakowski, G., Nyhan, W., Sweetman, L. and Robinson, B. H. Immunoextraction of lipoamide dehydrogenase from cultured skin fibroblast in patients with combined  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase deficiency. *Clin. Chim. Acta.* vol. **152**, 27-36, 1985.
28. Otulakowski, G. and Robinson, B. H. Isolation and sequence determination of cDNA clone for porcine and human lipoamide dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **262**: 17313-17318, 1987.
29. Otulakowski, G., Robinson, B. H. and Willard, H. F. Gene for lipoamide dehydrogenase maps chromosome 7. *Somatic Cell Mol. Genet.* **14**: 411-414, 1988.
30. Pons, G., Raefsky-Estrin, C., Carothers, D. J., Pepin, R. A., Javed, A. A., Jesse, B. W., Ganapathi, M. K., Samols, D. and Patel, M. S. Cloning and cDNA sequence of the dihydrolipoamide dehydrogenase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 1422- 1426, 1988.
31. Reed, L. J. Multienzyme Complexes. *Accts. Chem. Res.* **7**: 40-46, 1974.
32. Robinson, B. H., Tayloy. J. and Sherwood, W. G. Deficiency of dihydrolipoyl dehydrogenase ( A component of the pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complexes ): A case of congenital chronic lactic acidosis in infancy. *Pediatr. Res.* **11**: 1198-1202, 1977.
33. Robinson, B. H., Tayloy. J., Kahler, S. G. and Kirkman, H. N. Lacticacidemia, neurologic deterioration and carbohydrate dependence in a girl with dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency. *Eur. J. Pediatr.* **136**:36 -39, 1981.
34. Robinson, B. H., Tayloy. J. and Sherwood, W. G. The genetic heterogeneity of lactic acidosis : occurrence of recognizable inborn errors of metabolism in a pediatric population with lactic acidosis. *Pediatr. Res.* **14**: 956-962, 1980.

35. Rossmann, M. G., Liljas, A., Brabnden, C. I. and Banaszak, L. J.  
Evolutionary and structural relationship among dehydrogenase.  
*The Enzymes*, **11**: 61-102, 1975.
36. Sakurai, Y., Fukuyoshi, Y., Hamada, M., Hayakawa, T. and  
Koike, M. Mammalian  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complexes .  
*J. Biol. Chem.* **245**: 4453-4462, 1970
37. Schulz., G. E., Schirmer, R. H. and Pai, E. F. FAD-binding site of  
glutathione reductase. *J. Mol. Biol.* **160**: 286-308, 1983.
38. Straub, F. B. Isolation and properties of a flavoprotein from heart  
muscle tissue. *Biochem. J.* **33**:787-792, 1939.
39. Taylor, J., Robinson, B. H. and Sherwood, W. G. A defect in  
branched- chain aminp acid metabolism in a patient with congenital  
lactic acidosis due to dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency.  
*Ped. Res.* **12**: 60-62, 1978.
40. William , C. H. Jr., Zanetti, G., Arscott, L. D. and McAllister, J. K.  
Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin  
reductase, and thioredoxun. *J. Biol. Chem.* **242**: 5336-5231, 1967.
41. Yeaman, S. J. The mammalian 2-oxoacid dehydrogenase:  
Acomplex family. *Trends. Biochem. Sci.* **11**: 293-296, 1986.
- 42..Yeaman, S. J. The 2-oxoacid dehydrogenase complexes:recent  
advances. *Biochem. J.* **257**: 625-632,1989.
43. Yoshida, I., Sweetman, L., Kulovich, S., Nyhan, W. L. and  
Robinson, B. H. Effect of lipoic acid in a patient with defective  
activity of pyruvate dehydrogenase, 2-oxo glutarate dehydrogenase,  
and branched-chain keto acid dehydrogenase . *Pediatr. Res.*  
**27**: 75-79, 1990.

44. Kazuko Maeda-Yorita, George C. Russel, John R. Guest, Vincent Massey, and Charles H. Williams, Jr. Modulation of oxidation-reduction of the flavin in lipoamide dehydrogenase from *E. coli* by alteration of a nearby charged residue, K53R. *Biochemistry* 33, 6213-6220, 1994

## 第六章 附錄

### Protocol of 1st PCR amplified

(一) Prepare dNTP (2.5mM) Mixture

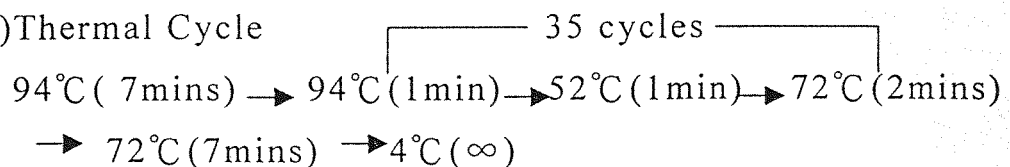
10 $\mu$ l dGTP(100mM)	}	+ 360 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
10 $\mu$ l dATP(100mM)		
10 $\mu$ l dTTP(100mM)		
10 $\mu$ l dCTP(100mM)		
		= 400 $\mu$ l

(二) Prepare Reaction Mixture:

	100 $\mu$ l	$\times n$
(1) 10 $\times$ reaction buffer	10 $\mu$ l	$n \times 10 \mu$ l
(2) dNTP	8 $\mu$ l	$n \times 8 \mu$ l
(3) template(E3 1/100 dilute )	2 $\mu$ l	$n \times 2 \mu$ l
(4) LS( or L1) primer	2 $\mu$ l	$n \times 2 \mu$ l
(5) H <sub>2</sub> O	75.5 $\mu$ l	$n \times 75.5 \mu$ l
(6) Enzyme(Taq Polymerase )	0.5 $\mu$ l	$n \times 0.5 \mu$ l
(7) SDM primer(5' or 3')	2 $\mu$ l	***

Reaction Mixture ( $n \times 8$ )/ $n=98$ ( for each )

(三) Thermal Cycle



(四) Check 1<sup>st</sup> PCR products

5  $\mu$ l Sample + 2  $\mu$ l Loading Buffer by  
2% agarose gel electrophoresis .

## Protocol of purification 1st PCR amplified products

1. 加入 4 倍體積之 N-butanol( 約 400  $\mu$ l), Mix
2. Centrifuge at 12,000 rpm for 1 minute.
3. Discard the supernatant (N-butanol)
4. Add 50  $\mu$ l N-butanol, Mix (optimal to condense sample volume to 20-25  $\mu$ l).Centrifuge at 12,000 rpm for 1 minute.
5. Discard the supernatant (N-butanol)
6. Add 50  $\mu$ l chloroform, Mix
7. Centrifuge at 12,000 rpm for 1 minute
8. Add 5  $\mu$ l Loading dye to the supernatant,mix well and loading to big comb agarose gel
9. Electrophoresis 30 minutes
10. Cut down significant band on gel (contain DNA), under UV light 365nm, transfer the gel slice to a new 1.5ml eppendorf.
11. QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol
12. check purify products(3  $\mu$ l) + 2  $\mu$ l Loading dye
13. Electrophoresis 30 minutes to check recovery rate.
14. Put DNA into -20°C freezer conserve.

### 5 $\times$ TBE for 1% agarose gel (20 ml)

- (1) Took 0.2 gm agarose powder dissolving in 16ml H<sub>2</sub>O.
  - (2) Putted into microwave stove for heating 90 seconds.
  - (3) Added 5  $\times$  TBE 4ml
  - (4) Waited the temperature decreasing to optimal ,then added 20  $\mu$ l ( 1000  $\times$  ) EtBr (Ethidium Bramide 0.5mg/ml) for fluorescence dye.
  - (5) Pouring the dissolving agarose gel into pattern box and stand in room temperature for 1 hour.
- Big gel = 40 ml    Small gel = 20 ml

## Protocol of 2nd PCR amplification.

1st PCR purified products(3') → L1 primer(5')

1st PCR purified products(5') → LS primer(3')

(一) Prepare Reaction Mixture:

	100 $\mu$ l	$\times$ n
(1) 10 $\times$ reaction buffer	10 $\mu$ l	n $\times$ 10 $\mu$ l
(2) dNTP	8 $\mu$ l	n $\times$ 8 $\mu$ l
(3) template(E3/Sal I 1/100 dilute)	2 $\mu$ l	n $\times$ 2 $\mu$ l
(4) L1( or LS) primer	2 $\mu$ l	n $\times$ 2 $\mu$ l
(5) H <sub>2</sub> O	27.5 $\mu$ l	n $\times$ 27.5 $\mu$ l
(6) Enzyme(Taq Polymerase )	0.5 $\mu$ l	n $\times$ 0.5 $\mu$ l
(7) 1 <sup>st</sup> PCR purified product	50 $\mu$ l	***
Reaction Mixture	(n $\times$ 50)/5=50( for each)	

(二) Thermal Cycles:

94°C	7mins	} 35 cycles
94°C	1min	
52°C	1min	
72°C	2mins	
72°C	7mins	
4°C	$\infty$	

(三) Check 2nd PCR products

5  $\mu$  l Sample + 2  $\mu$  l Loading Buffer by

2% agarose gel electrophoresis .

## Protocol of purification 2nd amplified PCR products

加入 4 倍體積之 N-butanol( 約 400  $\mu$ l), Mix

1. Centrifuge at 12,000 rpm for 1 minute.
2. Discard the supernatant (N-butanol)
3. Add 50  $\mu$ l N-butanol, Mix (optimal to condense sample volume to 20-25  $\mu$ l)
4. Centrifuge at 12,000 rpm for 1 minute.
5. Discard the supernatant (N-butanol)
6. Add 50  $\mu$ l chloroform, Mix
7. Centrifuge at 12,000 rpm for 1 minute
8. Add 5  $\mu$ l Loading dye to the supernatant, mix well and loading to big comb agarose gel
9. Electrophoresis 30 minutes
10. Cut down significant band on gel (contain DNA), under UV light 365nm, transfer the gel slice to a new 1.5ml eppendorf.
11. QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol
12. check purify products(3  $\mu$ l) + 2  $\mu$ l Loading dye
13. Electrophoresis 30 minutes to check recovery rate.
14. Put DNA into -20°C freezer conserve.



## Buffer preparation

— for Western blot:

### 1. SDS-PAGE gel

	10%		12.5%	
	resolving gel 4ml)	Stacking gel (2ml)	Resolving gel (4ml)	Stacking gel (2ml)
acrylamide-bisacrylamide (30:0.8)	1.33 ml	0.25 ml	1.66 ml	0.25ml
3M Tris-HCl (pH 8.8)	0.25 ml	---	1.5M Tris:1 ml	---
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	---	0.5 ml	---	0.5 ml
10 % SDS	0.04 ml	0.02 ml	0.04 ml	0.02 ml
1.5 % AP	0.5 ml	0.1 ml	0.5 ml	0.1 ml
d H <sub>2</sub> O	1.63 ml	1.03 ml	0.79 ml	1.03 ml
TEMED	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l

2. Electro buffer: Tris            3 g  
    glycine    14.4 g  
    SDS            1 g  
    add dH<sub>2</sub>O to 1000 ml

3. Sample buffer: Tris-HCl (pH 6.8)    1 ml  
    2 % SDS            2 ml  
    1.25 M DTT            0.5 ml (1/20)  
    10 % glycerol            1 ml  
    Bromophenol blue    0.5 ml (0.002 %)  
    add H<sub>2</sub>O to final volume = 10 ml

(Tris-HCl PH 6.8 用配 stacking gel 的 Tris ,10 % SDS dilute 成 2 % )

4. Coomassie blue staining solution: (total volume 500 ml )

coomassie blue R250 (0.1%) in water	208 ml
methanol	208 ml
glacial acetic acid	84 ml

⇒ 以濾紙過濾

5. Destain solution:

Acetic acid	50 ml
methanol	150 ml
dd H <sub>2</sub> O	300 ml

6. TBS buffer:

0.5M Tris-HCl (PH 7.4)	20 ml
(or Tris-HCl	1.33 g)
NaCl	9 g

add dH<sub>2</sub>O to 1000 ml

7. Blotting buffer:

Tris-HCl	9.1 g
glycine	43.2 g
methanol	600 ml

add dH<sub>2</sub>O to 3000 ml

8. Substrate solution: 4-chloro-1-naphthol (0.06% g/ml) 30mg

⇒加入 10ml methanol 使溶解

⇒加入 TBS buffer to 50 ml

(⇒加入 20 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 使 NC paper 呈色)

9. 5x TBE buffer :

Tris	54 g
Boric acid	27.5 g
EDTA (0.5M, PH 8.0)	20 ml

add dH<sub>2</sub>O to 1000 ml

## Protocol of *Bam*H I restriction endonuclease digestion

*Bam*H I Recognition Site:

5' . . . . G GATCC . . . . 3'

3' . . . . CCTAG G . . . . 5'

	20 $\mu$ l	$\times$ n
(1) 10 $\times$ <i>Bam</i> H I buffer	2 $\mu$ l	n $\times$ 2 $\mu$ l
(2) 10 $\times$ BSA	2 $\mu$ l	n $\times$ 2 $\mu$ l
(3) H <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l	n $\times$ 10 $\mu$ l
(4) Enzyme( <i>Bam</i> H I )	1 $\mu$ l	n $\times$ 1 $\mu$ l
(5) DNA	5 $\mu$ l	***

Reaction Mixture (n $\times$  15)/n=15( for each)

- (6) 37 $^{\circ}$ C water bath 4 hours ~ over night
- (7) 60 $^{\circ}$ C heating 5 minutes to inactivate enzyme .
- (8) Check products by agarose gel electrophoresis  
products(1  $\mu$ l) + 2  $\mu$ l Loading dye
- (9) Use Gel Extraction Protocol to purify *Bam*H I digestion products .

## Protocol of *Sal* I restriction endonuclease digestion

*Sal* I Recognition Site:

5' . . . . GTCGA C . . . . 3'

3' . . . . C AGCTG . . . . 5'

	20 $\mu$ l	$\times$ n
(1) 10 $\times$ <i>Sal</i> I buffer	2 $\mu$ l	n $\times$ 2 $\mu$ l
(2) 10 $\times$ BSA	2 $\mu$ l	n $\times$ 2 $\mu$ l
(3) H <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l	n $\times$ 10 $\mu$ l
(4) Enzyme( <i>Sal</i> I )	1 $\mu$ l	n $\times$ 1 $\mu$ l
(5) DNA	5 $\mu$ l	***

Reaction Mixture (n $\times$  15)/n=15( for each)

- (6) 37°C Water Bath 4hrs ~ over night
- (7) check products (1  $\mu$ l) + 2  $\mu$ l Loading dye
- (8) 60°C 5 mins Enzyme inactive
- (9) Purify *Sal* I Digestion Products Protocol

### Protocol of *Sal* I / *Bam*H I restriction endonuclease digestion

	20 $\mu$ l	$\times$ n
(1) 10 $\times$ <i>Sal</i> I buffer	2 $\mu$ l	n $\times$ 2 $\mu$ l
(2) 10 $\times$ BSA	2 $\mu$ l	n $\times$ 2 $\mu$ l
(3) H <sub>2</sub> O	9 $\mu$ l	n $\times$ 9 $\mu$ l
(4) Enzyme ( <i>Sal</i> I)	1 $\mu$ l	n $\times$ 1 $\mu$ l
(5) Enzyme ( <i>Bam</i> H I)	1 $\mu$ l	n $\times$ 1 $\mu$ l
(6) DNA	5 $\mu$ l	***

Reaction Mixture (n  $\times$  15) / n = 15 (for each)

- (7) 37°C Water Bath 4hrs ~ over night
- (8) check products (1  $\mu$ l) + 2  $\mu$ l Loading dye
- (9) 60°C 5 mins enzyme inactive
- (10) Purify *Sal* I / *Bam*H I digestion products Protocol

### Protocol of purification of *Sal* I / *Bam*H I digestion products

- (1) 加入 5  $\mu$ l Loading dye
- (2) Loading to big comb agarose gel
- (3) Electrophoresis 30 minutes
- (4) Cut down significant band on gel (contain DNA),  
under UV light 365nm, transfer the gel slice to a  
new 1.5ml eppendorf
- (5) QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol
- (6) check purify products (3  $\mu$ l) + 2  $\mu$ l Loading dye
- (7) Electrophoresis 30 mins

(8) 放入  $-20^{\circ}\text{C}$  冷凍櫃保存

### DNA ligation

	10 $\mu\text{l}$	$\times n$
(1) $10 \times T4$ DNA buffer(含 ATP)	1 $\mu\text{l}$	$n \times 1 \mu\text{l}$
(2) Enzyme( $T4$ DNA Ligase)	1 $\mu\text{l}$	$n \times 1 \mu\text{l}$
(3) Vector(pQE9/ <i>Sal</i> I / <i>Bam</i> H I )	6 $\mu\text{l}$	$n \times 6 \mu\text{l}$
(3) Insert(2 <sup>nd</sup> or 3 <sup>rd</sup> PCR/S/B )	2 $\mu\text{l}$	***

Reaction Mixture ( $n \times 8$ )/ $n=8 \mu\text{l}$  ( for each)

- (6) Incubated under  $16^{\circ}\text{C}$  for 4 hours or over night.
- (7)  $60^{\circ}\text{C}$  heated 5 minutes to inactive enzyme.
- (8) Samples are preserved at  $-20^{\circ}\text{C}$  freezer.

### Preparation of competent cell

- (1) Added 2 ml fresh broth medium (LB, 2YT, TB) into had been autoclaved clean tube.
- (2) Inoculated 200  $\mu\text{l}$  stocked bacteria sample into the tube contained 2ml fresh LB broth. (the stock sample is Bacterial solution : 60% Glycerol = 1:1 by volume, mixed and stored under  $-70^{\circ}\text{C}$ )
- (3) Optionally added optimal antibiotic (JM109 do not need to added Kanamycin; M15 added 50  $\mu\text{l}$  Kanamycin(1/1000 dilution)).
- (4) Putted it into  $37^{\circ}\text{C}$  rotating incubator for 3 hours or over night growth.
- (5) Replaced the sample into 200 ml flask which contained 50 ml fresh LB broth medium.
- (6) Optionally added optimal antibiotic(JM109 cells do not need to added Kanamycin; M15 cells needed to add 50  $\mu\text{l}$  Kamycin (1/1000 dilution))

- (7) 37°C incubated in rotating incubator 2.5~3 hours  
( for OD=0.6)
- (8) 4°C, centrifuged under 2,500 rpm, 8 minutes.
- (9) Discarded the supernatant, collected the pellet .
- (10) Added cold CaCl<sub>2</sub> 25 ml (100 mM), resuspended gently
- (11) Putted it in ice bath for 30 minutes
- (12) 4°C centrifuged under 2500 rpm for 8 minutes.
- (13) Discarded the supernatant, collected the pellet .
- (14) Added cold CaCl<sub>2</sub> 1 or 2 ml(100 mM), resuspended gently
- (15) Putted it in ice bath for 30 minutes. .
- (16) Added target DNA 1 or 2 μl into the prepared cells,  
then ice bath 30 minutes.
- (17) 40°C heat sock 5 minutes and then put into ice bottle  
quickly for ice bath 30 minutes.
- (18) Take 60 μl bacteria broth poured to plate smoothly.
- (19) Put the plate into 37°C incubator overnight growth.

### Protocol of plasmid DNA transformation

- (1)取 10 μl Ligated DNA(Vector-Insert)
- (2)加入 50 μl fresh prepared competent cell(JM109)
- (3) Ice Bath 30 minutes
- (4)42°C heat shock 3 minutes
- (5)Ice Bath 5 minutes
- (6)取 60 μl 菌液塗於 LB plate(含 Ampicillin)
- (7)37°C incubate over night growth.

## Protocol of plasmid DNA mini-screening

- (1) Subcloned clone from transformation plate
- (2) Selecting every clone to a grid new plate  
(contain Ampicillin) , 37°C incubated for over night growth.
- (3) Inoculated single clone to new LB broth (2 ml, contain Ampicillin)
- (4) Put broth at 37°C rotator over night growth.
- (5) Took the over night growth bacteria broth 50  $\mu$ l + 50  $\mu$ l P/C ( Phenol : Chloroform = 1:1)
- (6) Vibrating by vortex to mix for 30 seconds, paused 30 seconds, mixing 30 seconds (repeat 2 times).
- (7) Centrifuges at 12,000 rpm for 5 minutes.
- (8) Took the supernatant 15  $\mu$ l + 2  $\mu$ l Loading dye for agarose gel electrophoresis.
- (9) Check electrophoresis result under UV light.
- (10) Selected the correct clone which had correct insert and took the rest over night growth broth for Minipreps to extracted plasmid DNA.
- (11) Check Plasmid DNA(4  $\mu$ l)+2  $\mu$ l Loading dye
- (12) Took 4  $\mu$ l for *Sal* I /*Bam*H I digestion treatment to check Plasmid DNA even had had correct insert DNA fragment (Optional)

## Wizard plus Minipreps DNA purification system

- (1) Preparing 65°C TE buffer(Tris-EDTA).
- (2) Took some new Eppendorfs (1.5 ml)
- (3) Separating over night growth broth into Eppendorf
- (4) Centrifuging at 12,000 rpm for 10 minutes, then discarded the supernatant.
- (5) Added 100  $\mu$ l Resuspend Solution in each Eppendorf.
- (6) Added Cell Lysis Solution 100  $\mu$ l in each tube, then repeatly invert tube gently. (呈黏液狀)
- (7) Added 100  $\mu$ l Neutralization Solution to each tube, then repeatly invert tube gently.(呈豆花狀)
- (8) Centrifuging at 12,000 for 10 minutes, then transfer the supernatant to a new Eppendorf (volume 約 300  $\mu$ l)
- (9) Added Resin 300  $\mu$ l to each tube (Gel Bit Solution-- vibration before use)
- (10) Optimal invert the tube some times.
- (11) Poured sample into the Syringe Barrel which contained mini-column, then pushing the solution to flow through the mini-column
- (12) Added 2 ml Column Wash Solution (alcohol added) and discarded the flow through.
- (13) Spin down 1 minute to discard all alcohol.
- (14) Transferred to a new Eppendorf, air dried for 30 minutes
- (15) Added 30  $\mu$ l, 65°C TE , spin down 1 min
- (16) Added 30  $\mu$ l, 65°C TE , spin down 1 min
- (17) Check the DNA with 1% agarose gel (5  $\mu$ l sample + 2  $\mu$ l Loading dye)
- (18) Agarose Gel Electrophoresis 30 minutes to check.



(19) Preserved in  $-20^{\circ}\text{C}$  freezer .

protocol E3 protein purification:

(一) Choused one colony of PQE9 E3 from Kana/Amp added Plate, then inoculated into 2 ml LB broth,  $37^{\circ}\text{C}$  incubated overnight.

(二) Transfer overnight growth sample to 200ml LB broth into 1L flask ,  $37^{\circ}\text{C}$  incubated 4~5 hours until  $\text{OD} = 0.7$

(三) Added IPTG 50 mg and then transfer to  $30^{\circ}\text{C}$  incubator overnight growth to induce protein synthesis.

(四) Harvest:

(1) Centrifuge under 5000 RPM, #7roter,  $4^{\circ}\text{C}$  , 10 minutes.

(2) Discarded the supernatant, Resuspended the pellet with PE buffer (note: no NaCl )

(3) Centrifuge under 5000 RPM ,  $4^{\circ}\text{C}$  , 10 minutes two times.

(4) Discarded the supernatant, Resuspended the pellet with PE buffer (note: 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , PH8; 0.25 mM EDTA ; no NaCl )to final volume 5 ml. Added lysozyme 50 mg/5ml sample , reaction 1 hour in ice bath.

(5) Sonication 20 min (beat 10 sec / pause 5 sec) in ice bath.

(6) Liquid Nitrogen frizzed 2 times

(7) Centrifuge under 16000 RPM for 10 minutes 2 times, collect the supernatant and transfer to new tube.

(五) Prepare Nickle Column:

(1) Setup the column station

(2) added 1 ml Sepharose resin to column

(3) use water equilibrium (10~20 ml)

(4) added  $\text{NiSO}_4$  (0.25 M) 2 ml

(5)  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  wash (10~20 ml)

(6) PEN buffer wash (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , PH=8; 0.25 mM EDTA ; 100 mM NaCl )

- (7) Retained the supernatant 20 ul for SDS PAGE, the rest apply to Ni-column
- (8) Collection the flow through
- (9) PEN 2ml wash
- (10) 5mM Imidazole 2 ml (stock in PEN 5ml), collect the flow through in 2 eppendorf 1ml for each other.
- (11) 10mM Imidazole(repeat this step to 100 mM Imidazole)  
(each tube retained 5ul for SDS page)
  - ① 测 OD 280 吸光
  - ② 测 OD 450 吸光

#### (六) Dialysis:

- (1) Collection the 30 mM~60mM fraction to dialysis in PEN buffer  
(each 4 hours changes the buffer, changes buffer 2 times)
- (2) Centrifuge under 16000RPM for 20 minutes. Retained the supernatant
- (3) ① Fluorescence assay (Exi: 296nm, Emi:300-570)  
② OD Scanning (230~600nm)  
③ Protein Conc.  
Specific Activity:(sk-ks=14%)
- (4) take 0.25mg/ml protein heating 5 min, centrifuge 5 min in eppendorf, collected the supernatant to check FAD contain change or not after boiling treatment( 370 nm Excit, 400-570 nm Emmision)

#### (七) Specific activity assay.

(A): prepared enzyme=100ug/ml ( according to protein Conc.)  
eg: SK-KS Conc.=0.305mg/ml  $\Rightarrow$  En + assay buffer  
= 100 ug En/ml ; 66ul + 134ul = 200 ul

(B): Assay Buffer: per 20ml

0.1 M KPO<sub>4</sub> PH=8 10ml

0.1M EDTA PH=8 0.3ml

d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 9.7ml

(C): NAD: 10mg/ml (dissolved in PE buffer)

(D): Assay Mixture:

assay buffer: 895 ul ~ 845 ul

NAD (10mg/ml) 100 ul ~ 100 ul

Enzyme (100 ug/ml) 5 ul ~ 50 ul

DHL (25 ug/ml) 5 ul ~ 5 ul

total volume = 1000 ul ~ 1000 ul

Specific Activity =  $\Delta OD \times 1000 \times 1000 \div 6.22 \div V \times Y$

V = Enzyme volume used in assay

Y = Enzyme diluted times

$\Delta OD$  以 0.02 ~ 0.08 之間為佳,若測得的  $\Delta OD$  大於 0.08 則  
須將 enzyme 稀釋

(E): Specific Activity assayed by Hitachi U-3000

mode: time scan

Wavelength: 340 nm

Scan time: 90 Sec

Light source: D2 lamp

Output interval: 10 Sec.

### (九): Protein Concentration Assay.

(A): Scanned by Hitachi U-3000; 595 nm

(B): Set standard:

BSA (1ug/1ul): 0 ul 5 ul 10 ul 15 ul

Assay Buffer : 800 ul 795 ul 790 ul 785 ul

Bio dye : 200 ul 200 ul 200 ul 200 ul

total volume = 1000 ul

(C): Sample : 5 ul 10 ul 15 ul

Assay Buffer: 795 ul 790 ul 785 ul

Bio dye : 200 ul 200 ul 200 ul

total = 1000 ul

### (+)FAD concentration assay :

( A ) : Scan at Hitachi U-3000; WL= 450 nm

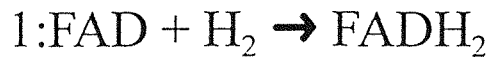
( B ) : Sample : 50 ug 100 ug 250 ug

Assay Bufer:

total volume = 1000 ul

PS: According to protein Conc. to take sample volume .

## Physical-chemistry characteristics



The FAD has an emission fluorescence photometry

pattern at 480 nm ~550 nm after E3 was excited by 296 nm



The  $\text{NADH}^+$  has an emission fluorescence photometry

pattern at 460 nm after E3 was excited by 296 nm.

## Fluorescence analysis

F-4500 Scan Parameters:

Scan Mode: Emission

Data Mode: Fluorescence

Scan Speed: 240 (nm/min)

Exiting Wavelength: 296 nm

Emission Start WL: 300 nm

Emission End WL: 570 nm

Exiting Slit: 2.5 mm

Emission Slit: 5.0 mm

## Enzyme Kinetic Study

(一) Reagent

DHL(Dihydrolipoamide) /Dissolved in 95%Alcohol

41.15 mg/ml = 200mM (stock)

LA(Lipoic Acid) /Dissolved in 95%Alcohol

20.6 mg /ml = 100 mM(stock)

NAD / Dissolved in assay buffer

66.34 mg/ml = 100mM (stock)

NADH / Dissolved in assay buffer

71 mg /ml = 100mM (stock)

(二) Assay Buffer

0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> PH=8    10 ml

0.1M EDTA    PH=7    0.3ml

d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O                            9.7ml

total = 20 ml

(三) Assay Mixture: Enzyme, DHL, NAD /ml

(a) Protein Concentration fixed (exp:10μg per assay)

DHL: 0.1 ; 0.15 ; 0.2 ; 0.3 ; 1.0 ; 3.0 ; 6.0 mM

NAD: 0.1 ; 0.15 ; 0.2 ; 0.3 ; 1.0 ; 3.0 ; 6.0 mM

total = 49 reactions

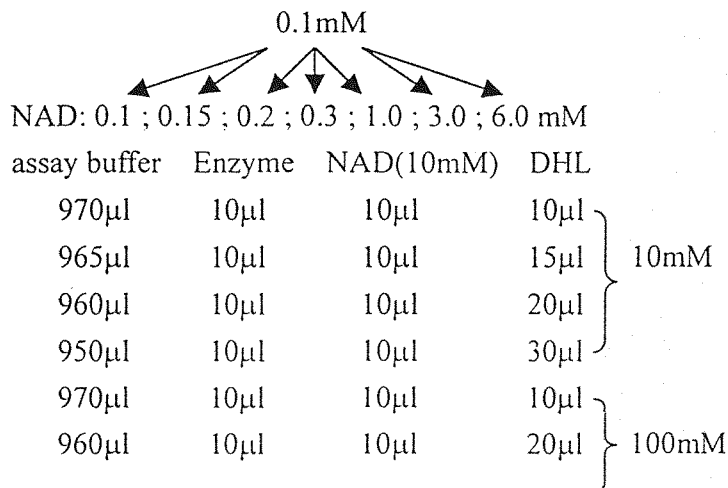
(b) Protein Concentration fixed (exp:10μg per assay)

LA : 0.1 ; 0.15 ; 0.2 ; 0.3 ; 1.0 ; 3.0 ; 6.0 mM

NADH: 0.1 ; 0.15 ; 0.2 ; 0.3 ; 1.0 ; 3.0 ; 6.0 mM

total = 49 reactions for example:

DHL: 0.1 ; 0.15 ; 0.2 ; 0.3 ; 1.0 ; 3.0 ; 6.0 mM



950 $\mu$ l      10 $\mu$ l      10 $\mu$ l      30 $\mu$ l

## Protocol of HPLC procedure for Mono-Q column

1. 將 pump power on
2. manual set: 按 enter 選擇須要修改之選項 (B%、C%、  
flow rate、max pressure: 視 column 而定)
3. degas: 將最下方之轉鈕左轉兩圈半  $\Rightarrow$  purge on  $\Rightarrow$  pump on  
依序將 A、B、C 三種 buffer 去氣泡。
4. pump off、purge off  $\Rightarrow$  將最下方之轉鈕右轉兩圈半關緊之
5. 按 set program: 設定 time  $\Rightarrow$  B %  $\Rightarrow$  C %  $\Rightarrow$  flow rate (ml/min)  
設完 program  $\Rightarrow$  按 escape
6. 平衡 column: 按 Manual set: 選擇  $d_2H_2O$  (通常為 C buffer)、  
flow rate: 0.5ml/min, 裝上 column  $\Rightarrow$  以  $d_2H_2O$  平衡  $2 \times V$  of column
7. detector on  $\Rightarrow$  PC on  $\Rightarrow$  key in "DM" or "HM"
8. select method  $\Rightarrow$  F3 (acquire data)  $\Rightarrow$  loading sample
9. start run

## 將 HPLC (#10) 之 raw data 轉換成 ASCII 檔

click main menu

$\Rightarrow$  F4 (re-proc. data)  $\Rightarrow$  F5 (convert data)

$\Rightarrow$  選擇要轉換的檔案(反白)後, click F4 (select file)

$\Rightarrow$  F3 (select one)  $\Rightarrow$  Esc

$\Rightarrow$  F7 (creat raw data)此時螢幕出現 xxxx.RW1 has been created.

$\Rightarrow$  Esc  $\Rightarrow$  Esc (main menu)  $\Rightarrow$  F6 (main utility)

$\Rightarrow$  F3 (ASCII utility)  $\Rightarrow$  F2 (convert raw data)

$\Rightarrow$  F1 (raw data files):可見已被 created 的檔案反白.

$\Rightarrow$  F1 (load file)  $\Rightarrow$  F2 (select all): 記住被轉成的 file  
name

$\Rightarrow$  F5 (convert choms)  $\Rightarrow$  Esc  $\Rightarrow$  Esc  $\Rightarrow$  Esc

$\Rightarrow$  F6 (ASCII raw data)

⇒ 選擇所要的 file 後再 click F5 (copy to floppy)

F4500-fluorescence scan file

converted to ASC II file

(一) Converted \*. fsd file to \*. dx on F4500 server.

(二) Import ASC II file to Origin program.

Start Origin program → File → New

→ Worksheet → File → Import

→ file type \*. dat change to \*. dx, select A  
or B floppy driver → select file want to import

→ delete raw1~raw6 → File → Save as \*. org

(三) Append \*. org files to a total worksheet

File → Open → select one \*.org file → Column

→ add new column (add optimal columns) → File

→ Append → select one file want to be appended

→ mark column want to Append → Edit → Copy

→ close file → mark column want to paste → Edit

→ Paste

(四) Plot a figure

Plot → Scatter → select X Column and Y Column

→ OK