

R
008.8
3444
c.1

中山醫學院營養科學研究所碩士論文

Master Thesis, Graduate Institute of Nutritional Science,

Chung Shan Medical & Dental College

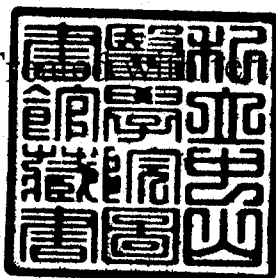
指導教授：李宗貴 博士 (Chong-Kuei Lii, Ph. D.)

利用等電點電泳分析法分析tert-Butyl Hydroperoxide

處理人體紅血球蛋白質修飾反應

Detection of Protein Modification by Isoelectric focusing of

Human Erythrocytes Treated with tert-Butyl Hydroperoxide



研究生：洪奇楠 (Chi-Nan Hung)

中華民國八十五年六月

(June 1996)

中山醫學院圖書館



C036206

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 84 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: 利用等電點電泳分析法分析tert-Butyl Hydroperoxide處理人體紅血球蛋白質修飾反應

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 85 年 8 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: 李宗貴

研究生簽名: 洪奇楠 學號: R8203103
(親筆正楷)

日期: 民國 85 年 7 月 15 日

備註: 1. 上述同意與不同意之欄立若未鈎選，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. 依著權法，凡在國內學術資料，妥當授權，如已簽署，尚屬可授。非獨占性使用權，如已簽署，尚屬可授。非獨占性使用權，如已簽署，尚屬可授。
2. 依著權法，凡在國內學術資料，妥當授權，如已簽署，尚屬可授。非獨占性使用權，如已簽署，尚屬可授。非獨占性使用權，如已簽署，尚屬可授。
3. 依著權法，凡在國內學術資料，妥當授權，如已簽署，尚屬可授。非獨占性使用權，如已簽署，尚屬可授。非獨占性使用權，如已簽署，尚屬可授。
4. 依著權法，凡在國內學術資料，妥當授權，如已簽署，尚屬可授。非獨占性使用權，如已簽署，尚屬可授。非獨占性使用權，如已簽署，尚屬可授。
5. 依著權法，凡在國內學術資料，妥當授權，如已簽署，尚屬可授。非獨占性使用權，如已簽署，尚屬可授。非獨占性使用權，如已簽署，尚屬可授。

研究生姓名：**中山醫學大學圖書館**
 地址：**中山醫學大學圖書館**

本論文為中山醫學院授予醫學(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

私立中國醫藥學院營養系副教授

沈立言 博士

沈立言

私立中山醫學院寄生蟲科主任

李秀雄 博士

李秀雄

私立中山醫學院營養科學研究所副教授
(論文指導教授)

李宗貴 博士

李宗貴

中華民國八十五年六月

學生洪奇楠論文題目為利用等電點電泳分析法分析 tert-Butyl Hydroperoxide 處理人體紅血球蛋白質修飾反應，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：李宗貴 博士

簽名：李宗貴

中華民國 85 年 7 月 16 日

誌 謝

本論文承蒙恩師李宗貴博士之悉心指導才得以順利完成，師恩浩瀚，永銘於心。文稿初成之時，更蒙李秀雄博士、沈立言博士、徐成金博士詳加審閱、大力斧正，謹此由衷感謝。

於實驗鑽研歲月中，感謝王世宗學長的懇切指導，智宏、文哲、振宇、建順、科銘等學弟，熱心獻身提供實驗材料，以及林玉玲學姐、蕙琳、妙真與曾經協助我的好友一併致十二萬分之謝意。

于此，將此論文獻給我所敬愛的祖父母、爸爸、親愛的媽媽、關心我的姐姐、遠方的妹妹、還有我那最重要的大功臣-小珮珮，由於你們的關懷、鼓勵與支持才得以完成碩士學位，最後，我還要說：“誠心感謝！”，並將此與大家分享。

祥峻

于家中

85.7.7.

23:40

目 錄

	頁數
縮寫表	1
中文摘要	2
英文摘要	4
前言	6
文獻整理	8
一. 人體紅血球之介紹	8
二. 人體紅血球氧化傷害之研究	9
三. 紅血球與氧化劑之相關研究	13
四. 動物體內抗氧化保護系統	16
五. 蛋白質 mixed-disulfide formation	17
六. 等電點電泳法(Isoelectric focusing, IEF)	19
材料與方法	21
壹、實驗材料	21
一. 材料	21
二. 化學試劑	21
三. 儀器設備	22
貳、方法	24
一. 還原態麩胱甘肽/氧化態麩胱甘肽(reduced glutathione/oxidized glutathione, GSH/GSSG) 與 Protein-released GSH 之分析法	24
1. 樣品之製備	24

	頁數
2. 分析方法	24
二. 等電點電泳法(Isoelectric focusing, IEF)	28
1. IEF 電泳膠片之製備	28
2. 樣品之製備	28
3. IEF 分析	29
三. 蛋白質純化: Sephadex G-200-IEF	31
1. 膠質製備(gel preparation)	31
2. 膠質 IEF 製備	31
3. 樣品製備	31
4. Sephadex G-200-IEF 之純化	31
5. 蛋白質純化後之處理	32
四. SDS-聚丙醯胺板膠電泳法(SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis)分析紅血球細胞膜	34
1. 12.5% SDS-聚丙醯胺板膠之製備	34
2. 樣品處理	36
3. 電泳操作	36
五. Hb 光譜方法	39
六. 蛋白質濃度測定	40
1. 樣品製備	40
2. 標準曲線製備	40
3. 蛋白質濃度測定	41
統計分析	41

	頁數
結果	42
胞內總 GSH(GSH+2XGSSG)與氧化態 GSH 濃度變化	42
t-BuOOH 處理後 Protein released-GSH 濃度之變化	42
IEF 分析-紅血球+t-BuOOH	42
IEF 分析-溶血+t-BuOOH	43
蛋白質 S-glutathionation	43
利用 Sephadex G-200 純化 band b 之蛋白質	44
利用 15% SDS-PAGE 分析純化之蛋白質	45
血紅素在 t-BuOOH 處理下吸光光譜變化	45
細胞膜蛋白質之修飾反應	46
討論	47
結論	54
參考文獻	55
圖表	68

圖 次

	頁數
一. 1.5 mM t-BuOOH 對人體紅血球總 GSH 和氧化態 GSH 之影響	68
二. 1.5 mM t-BuOOH 對人體紅血球的 protein-released -GSH 之影響	69
三. IEF 分析 1.5 mM t-BuOOH 處理下, 人體紅血球的蛋白質變化	70
四. 溶血樣品於 1.5 mM t-BuOOH 處理下的蛋白質變化情形	71
五. GSSG, IAA 或 IAM 處理下對於人體紅血球蛋白質之影響	72
六. 利用 Sephadex G-200 純化 band b 之蛋白質分析變化	73
七. SDS-PAGE 分析純化之蛋白質	74
八. t-BuOOH 處理下血紅素光譜變化	75
九. SDS-PAGE 分析 t-BuOOH 處理下細胞膜蛋白質變化分析	76

縮寫表

BSA : bovine serum albumin

Bis : N, N'- methylene bisacrylamide

DTT : dithiothreitol

EDTA : ethylene diaminetetra acetic acid

FDNB : 2, 4 - dinitrofluorobenzene

GSH : glutathione (reduced form)

GSSG : glutathione (oxidized form)

Hb : hemoglobin

H₂O₂ : hydrogen peroxide

IAA : iodoacetic acid

IAM : iodoacetamide

IEF : isoelectric focusing

Met Hb :methemoglobin

MOPS : (3 - [N - Morpolino] propanesulfonic acid)

PBS : phosphate buffered saline

PCA : perchloric acid

RBC : erythrocyte

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS - PAGE : SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis

TCA : trichloroacetic acid

TEMED : N, N, N', N', - tetramethylene diamine

Tris : tris (hydroxymethyl) - aminomethane

摘要

細胞受到氧化傷害，不但會引起細胞老化，甚至會造成細胞傷害或死亡。本實驗目的，在尋找當紅血球受到氧化緊迫時，蛋白質變化的指標。研究材料為選自人體 10% RBC 懸浮液，以 1.5 mM t-BuOOH 進行氧化緊迫處理，於 0, 5, 15, 30 和 60 分鐘後取樣分析，分別以等電點電泳法(isoelectric focusing, IEF)，蛋白質電泳法(SDS-PAGE)分析蛋白質修飾反應，並利用分光光度計(UV-VIS Spectrophotometer)來掃描 hemoglobin (Hb)光譜變化，並分析胞內 GSH/GSSG 濃度與蛋白質結合之 GSH。

結果顯示，當蛋白質等電點於氧化緊迫下發生改變時，將可在 IEF 電泳下被分辨，其中最明顯的一個蛋白質為 Hb，Hb 於 t-BuOOH 處理下，分別有兩種不同的修飾反應發生，一為增加其等電點，另一減少其等電點，且此兩種反應在有硫醇還原劑 dithiothreitol 下均是可逆的。利用部份純化 Hb 直接與 30 mM GSSG 反應，顯示前述修飾反應中的一種，是發生於所謂 Hb-GSH mixed disulfide，且此反應程度與分析蛋白質中釋放的 GSH 是一致的，且呈現劑量依賴反應(dose-dependent response)。除了 Hb-GSH mixed disulfides 形成外，另一種 Hb 修飾反應可能是 $\text{Fe}^{2+}\text{-Hb} \rightarrow \text{Fe}^{3+}\text{-Hb}$ ，這可由 IEF 膠片上蛋白質由紅轉暗，且停留位置與 Met-Hb 一致獲得證明。除此外，以 UV-VIS Spectrophotometer 掃描顯示含二價鐵的 Hb 與三價鐵的

Hb 濃度隨著處理時間呈現相反反應。利用 SDS-PAGE 分析也顯示 RBC 膜上蛋白質 spectrin 和 anion channel 其硫醇也發生聚合反應，其分子量隨處理時間而增加。所以本實驗顯示，人體紅血球蛋白質在氧化緊迫下，蛋白質硫醇可發生不同的修飾反應，其中包含 mixed disulfides exchange 及 polymerization，且 Met-Hb 與 Hb-GSH mixed disulfide 的形成可利用 IEF 進行定性與定量分析。

Abstract

Oxidative stress causes the damage of cellular macromolecules, and leads to not only the cell aging but also cell damage. The object of this study is try to identify the protein modification, especially that occurs on protein thiols in human erythrocytes under oxidative stress. Human erythrocytes (RBC) are treated with 1.5 mM tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH) to induce oxidative stress.

Sample are collected before and 0, 5, 15, 30 and 60 minutes after t-BuOOH treatment. Protein modification are analyzed either isoelectric focusing (IEF) analysis or SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis (SDS-PAGE). Furthermore, the oxidation of hemoglobin (Hb) is monitored by UV-VIS Spectrophometer, GSH, GSSG, and protein released-GSH are also measured.

As the result of IEF, several new protein bands are induced with t-BuOOH treatment. By molecular weight analysis, the most significant modified protein has 14 kDa and , thus, is regarded as hemoglobin. Two different Hb modifications are identified one increased its net charge, the other decreased. In the presence of dithiothreitol, both Hb modification disappeared suggested the involvement of protein thiol in Hb modification. To further clarify the exact Hb modification, modified Hb is purified by IEF-Sephadex gel. Thereafter, by treating this purified Hb with 30 mM GSSG, we confirmed that one of the Hb modifications is Hb-GSH mixed disulfide formation. In addition, GSH content released from

the proteins increases with t-BuOOH treatment. Except with the formation of Hb-GSH mixed disulfides, based on the change of Hb spectrin and charge changed, the other Hb modification may be the formation of Met-Hb, which Fe^{2+} is oxidized to Fe^{3+} . Other than cytosolic proteins, we also examined the possible protein modification in membrane fractions. By SDS-PAGE, we further demonstrated that two membrane proteins-spectrin and anion channel, of erythrocytes are also modified by forming the high molecular weight aggregates. By treating same samples with DTT, this protein modification is disappeared. Results indicate that protein modification especially those occur on protein thiol groups, in stimulated in human erythrocytes under the oxidative stress. These protein modification can be detected by either IEF analysis or SDS-PAGE.

前 言

人體紅血球(Erythrocytes, RBC)是一個構造單純的典型細胞，由於它的代謝途徑與細胞架構較其他細胞為簡單，因此，過去幾年一直有許多學者用來當作細胞處於氧化緊迫下的脂質過氧化作用(Lipid Peroxidation)和血紅素(hemoglobin, Hb)的降解作用(Trotta et al., 1981、1982、1983；Koster et al., 1983)，細胞膜的氧化傷害(Deuticke et al., 1987；Schrier et al., 1992)以及RBC膜蛋白改變與溶血關係的研究(Vissers et al., 1992)。不論從“in vivo”(Shiner et al., 1990；Winterbourn 1990)和“in vitro”(Deuticke et al., 1987；Ney et al., 1990)的實驗模式，均顯示氧化緊迫下，與代謝上或結構上的傷害是息息相關的。

對一個細胞而言，膜脂質(membrane lipids)和蛋白質的硫醇基群(sulfhydryl groups)在維持細胞的完整性方面扮有重要功能，為免其受到氧化傷害時，胞內抗氧化分子，例如維生素E及C，甚至於麩胱甘肽 (glutathione, GSH)和nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)及其他相關抗氧化酵素均扮演有重要保護的角色。

以細胞蛋白質來說，氧化緊迫時，細胞蛋白質非常容易受到活性氧分子(reactive oxygen species)的傷害(譬如amino acid的氧化、蛋白質的交叉反應、裂解反應等)。紅血球(RBC)是人體輸送氧的細胞，含有高量Hb，較之一般細胞尤其容易受到氧化傷害。如RBC受到氧化傷害時，最明顯的反應除了胞內

hemoglobin (Hb)之 Fe^{2+} 會被氧化成 Fe^{3+} ，變成methemoglobin (Met-Hb)外，由於大量GSSG的形成，也可使Hb與GSSG發生mixed-disulfide exchange的現象(Simplicio and Rossi, 1994)。蛋白質硫醇和GSH硫醇間所形成的mixed-disulfide exchange也稱為protein S-glutathionation，此反應為一可逆的反應，一般認為它扮演著保護蛋白質的角色，使蛋白質免於受其他不可逆的傷害。目前為止，一般用來分析此反應的形成，可用硫醇還原劑—DTT或 NaBH_4 ，間接分析蛋白質所釋出的GSH量來代表 (Brigelius et al., 1982 ; Simplicio and Rossi, 1994)，或是利用放射性元素 ^{35}S -Met或 ^{35}S -Cys來標定與 ^{35}S -GSH結合的蛋白質 (Grimm et al., 1985)，但這些方法與IEF相較之下，不但費時及不具專一性。所以本實驗嘗試利用人體紅血球，於t-BuOOH誘發氧化緊迫下，利用IEF及SDS-PAGE等方法來探討RBC蛋白質在氧化緊迫時所發生的修飾作用。

文獻整理

一、人體紅血球之介紹

人體紅血球是所有動物細胞中結構最簡單的細胞，內部沒有細胞核、粒線體和內膜，只有一個膜—原生質膜；其細胞骨架(cytoskeleton)不含管蛋白(tubulin)或中間絲狀體(intermediate filaments)-vimentin，卻含有肌動蛋白(actin)以及豐富的肌動蛋白結合蛋白(actin-binding protein)-spectrin (Tyler et al., 1981)。紅血球的產生是紅血球芽生細胞在骨髓中經過一連串連續分裂，並在嗜酸性期排出細胞核所形成，經過5至7天達到網狀紅血球階段，此時血球進入血液再成熟為紅血球；而血紅素合成在芽生細胞階段即已開始，並在網狀紅血球階段完成；血紅素由兩部份構成：

1. 蛋白質部份為血球蛋白(globin)，由兩對(四個)多生肽鏈組成，正常成人血紅素： $A-\alpha_2\beta_2$ ， $A_2-\alpha_2\delta_2$ (<2%)， $F-\alpha_2\gamma_2$ (<1%)。
2. 中央部份為血紅素原(Heme)，由原紫質及一個兩價鐵原子構成，每個血紅素原為血球蛋白上的組氨酸(Histidine)相連。

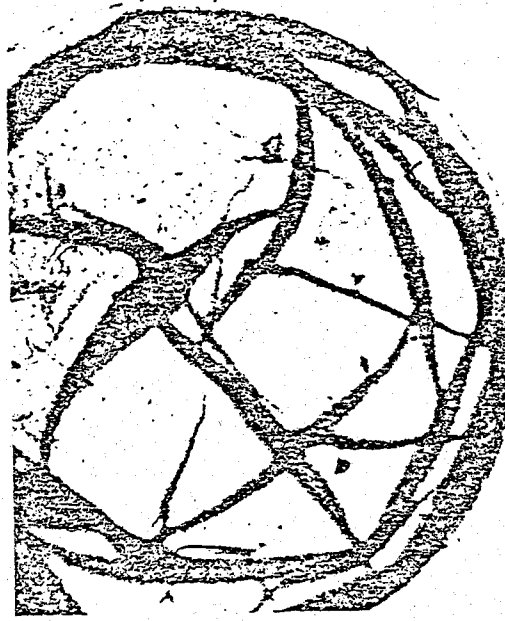
紅血球在人體中最主要的功能則是負責血液中氧的運輸，以及少許二氧化碳的排出。紅血球很容易溶解，釋出內部成份，產生殘膜—ghosts如附圖一，ghosts是一個很大的囊，也是近於純化的細胞原生質膜。如果將紅血球ghosts中蛋白質成份

萃取出來，利用 SDS-聚丙稀醯胺板膠電泳法 (SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis) 加以分析，可得到如附圖二的標準蛋白質分布：band 1 (α subunit, 240,000 daltons)，band 2 (β subunit, 220,000 daltons)，二者合稱為 spectrin，部份 spectrin 並且能夠自行結合成 $(\alpha, \beta)_2$ 型態 (920,000 daltons)。spectrin 占細胞骨架蛋白質的 75% (Lux et al., 1976)，扮演有穩定及調節紅血球形狀的功能。band 2.1 (ankyrin; 215,000, daltons) 是連接 band 3 蛋白質 N 端與 actin 的結合蛋白；band 3 (89,000 daltons) 為陰離子管道 (anion channel)，管制 HCO_3^- 和 Cl^- 進出紅血球；band 4.1 (78,000, daltons) 與 spectrin 結合有關，band 4.2 (72,000 daltons) 功能未知；band 5 (43,000 daltons) 是肌動蛋白 (actin)，為肌肉收縮，細胞活動之主要蛋白質；band 6 (35,000 daltons) 則是甘油醛-3 磷酸鹽去氫酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)，為一種糖解酶；band 7 (29,000 daltons) 是一種內蛋白 (Steck and Dawson, 1974；Mathews and Holde, 1990)。

紅血球的細胞膜主要依賴細胞架構膜蛋白 (cytoskeletal membrane proteins) 與膜脂質 (membrane lipids) 間的交互作用來維持膜的完整性 (Sweet and Zull, 1970；Juliano et al., 1971)。

二、人體紅血球氧化傷害之研究

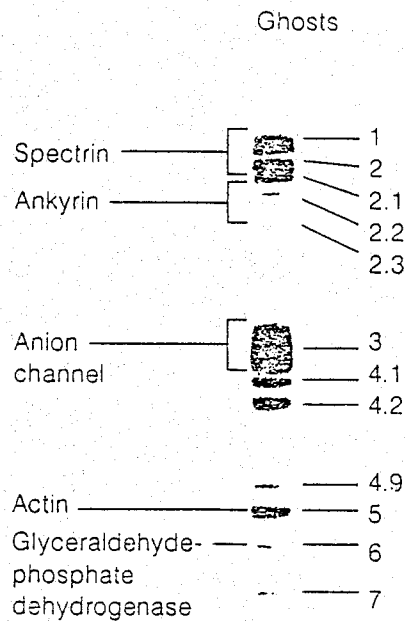
真核細胞中，由於紅血球的代謝途徑與其組織結構較為簡單，此外，紅血球由於其特殊功能—攜帶氧氣且擁有高濃度 Fe^{2+} -Hb，平常即較其他細胞易受到氧化傷害，因此，利用紅血



附圖一、電子顯微鏡下的紅血球 ghost

Electron micrograph of an erythrocyte ghost.

(Mathews, C. K. and van Holde, K. E.,1990)



附圖二、紅血球膜蛋白的電泳圖

(Mathews, C. K. and van Holde, K. E., 1990)

球來研究細胞氧化傷害引起的細胞老化與死亡是一個很好的實驗模式 (Clark, 1988)。

由於紅血球運輸氧分子的特殊功能，所以RBC也同時擁有良好的抗氧化能力，但是當此抗氧化能力受損，而使紅血球處於氧化緊迫時，將使胞內巨大分子受到傷害，例如細胞內或細胞膜中的蛋白質，其中hemoglobin (Hb)、actin或spectrin已知都會受到氧化緊迫的影響：(1) 以Hb來說，二價鐵即可因此氧化為三價鐵，使oxy-Hb變成methemoglobin (Met-Hb)，接著Met-Hb可繼續氧化為hemichromes，到此階段為止仍屬可逆過程，如仍未及時修復，將繼續氧化為不可逆的hemichromes，形成所謂的Heniz bodies (Trotta et al., 1982；MacDonald, 1994)，使Hb喪失攜氧能力。除此之外，Hb分子上胱胺酸殘基(β 93)上擁有一個活性硫醇，在氧化緊迫時也可發生氧化或其他修飾反應，例如形成mixed-disulfides (Garel et al., 1986)。de Llano et al., (1993)及Simplicio and Rossi (1995)即證實，氧化緊迫下，RBC內蛋白質形成GSH-mixed disulfides的量會顯著增加。Niketic等人(1992)即指出，長期使用藥物譬如phenolbarbital及carbamazepine的人，其血中高達7%的Hb可與GSH形成mixed disulfides。(2) 1991年Dean等人發現對細胞膜蛋白質而言，氧化緊迫下，亦會造成膜蛋白的氧化現象，進而造成蛋白質分解或斷裂。除此以外，膜上蛋白質硫氫基亦會產生intrachain和interchain雙硫鍵結合 (Kosower et al., 1981、1982)。(3) 1994年Vissers利用hypochlorous acid (HOCl)處理人體紅血球，發現膜蛋白actin發

生交叉反應 (cross-linking)，但添加2-mercaptoethanol後此交叉反應消失不見。最近Salvati等人(1995)實驗中，同樣利用tert-butyl hydroperoxide誘發人體紅血球氧化緊迫，亦發現膜蛋白有顯著的修飾反應發生，例如高分子量聚合物的出現，spectrin、band 3、band 4.5的減少，低分子量降解產物(60-55和29-23 kDa)和膜結合球蛋白的顯著增加等，顯示紅血球處於氧化緊迫時，蛋白質發生修飾反應的可能性。

另外，紅血球細胞膜中含有高濃度的多不飽和脂肪酸，因此容易產生脂質氧化作用，正常情況下，雖可藉著抗氧化保護系統予以良好的保護(Chiu et al., 1982)，但當紅血球抗氧化能力受損或消耗，將使細胞處於氧化緊迫，而發生脂質過氧化，進而傷害紅血球的完整性，使得溶血現象發生(Stocks and Dormandy, 1971；Goldberg and Stern 1977)。

綜合有關紅血球受到氧化緊迫時，Hb和細胞膜之變化如附

表一。

Portion of cell affected	Damage
Hemoglobin	Alteration of oxidation-reduction states Methemoglobin Reversible and irreversible hemichromes Formation of Heinz bodies
Membrane	
Lipids	Lipid peroxidation Lipid degradation Lipid adduct formation Alteration in phospholipid organization
Proteins	Cytoskeleton polymerization and degradation Ionic pump inactivation Sulfhydryl group oxidation or blockade Binding of hemoglobin breakdown products

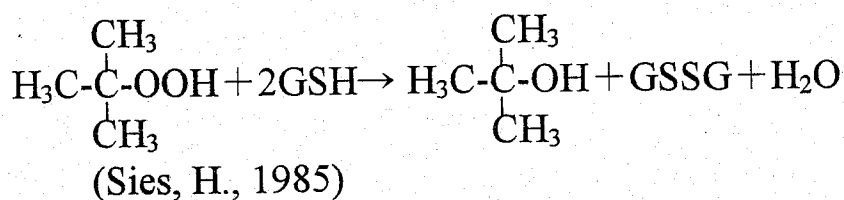
附表一、紅血球的氧化緊迫傷害(Stern, A., 1985)

三、紅血球與氧化劑之相關研究

近年來，利用不同氧化劑來探討紅血球氧化緊迫的模式，如下：

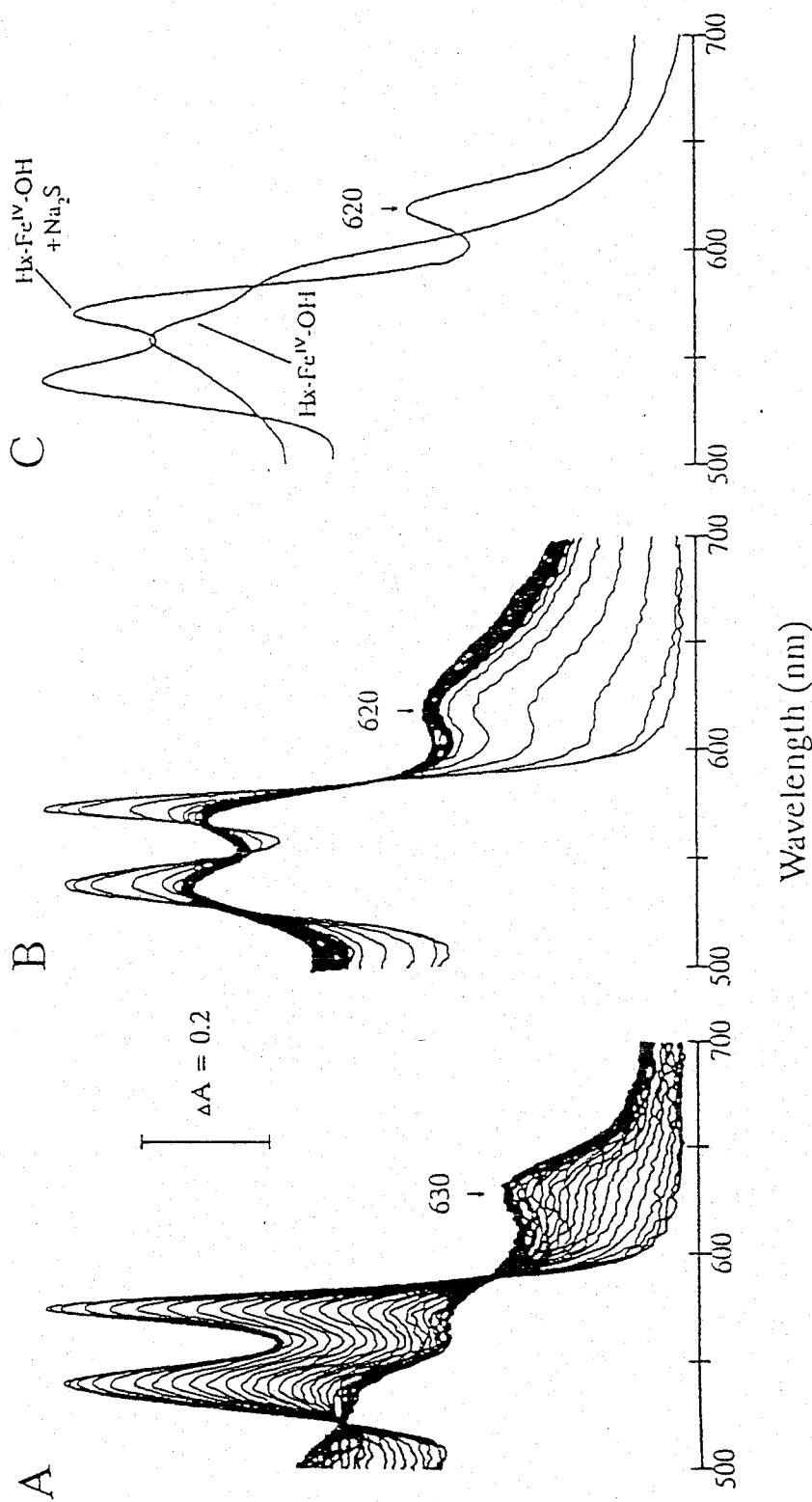
- (1) Primaquine—是一種抗瘧疾、亦是一個氧化物質，能夠抑制 glucose-6-phosphate dehydrogenase (Cotton and Sutorius, 1971)，減少NADPH生成能力，進而降低了細胞內還原力。
- (2) Phenylhydrazine—主要用於引起紅血球氧化緊迫，它會導致Hb破壞形成多種不同變性物質以及細胞膜受損而溶血(Peisach et al., 1975)。
- (3) Heavy Metals—可能引起紅血球的形態與功能的改變。例如，銅會引起細胞膜硫氫基的直接氧化(Salhany et al., 1978)，同時膜蛋白也有交叉現象。鉛則可引起血紅素(heme)生化合成的改變和紅血球的形態變形(Sassa et al., 1975；Passow, 1981)。
- (4) Protoporphyrin photooxidation—利用porphyrin敏感的光氧化作用探討光對紅血球細胞膜的影響。當紅血球曝露在光線下，protoporphyrin受到刺激，會增加紅血球的變形現象(Dubbelman et al., 1977)。
- (5) Hydrogen peroxide (H_2O_2)—紅血球以 H_2O_2 處理，過氧化脂質的產物Malondialdehyde會累積，此與溶血相關(Stocks and Dormandy, 1971)。

(6) *tert*-Butyl Hydroperoxide (t-BuOOH)—是一種簡單的有機過氧化氫化合物，它不像H₂O₂不能被catalase所還原，卻可被GSH peroxidase所還原，然而當t-BuOOH過多時，仍會生成t-butoxyl (RO·)自由基或t-butyl peroxy (ROO·)自由基(Cadenas and Sies, 1982 ; Kalyanaraman et al., 1983)。由於其水溶解特性，不需要額外添加有機溶劑於細胞和組織中，因此廣受應用為過氧化誘發物(Trotta et al., 1982 ; Simplicio and Rossi, 1994 ; Savati et al., 1995)。細胞一般具有適當的過氧化酶(oxidase)，其中，主要是GSH過氧化酶活性，其反應如下：



對GSH過氧化酶而言，為一受質，會引起GSH的氧化作用。

t-BuOOH處理紅血球對Hb所造成的氧化作用，可由Hb光譜變化得知(Trotta et al., 1981; Giulivi and Davis, 1990; 附圖三)。t-BuOOH所引起的脂質過氧化程度，也能由thiobarbituric acid-reactive substances生成的增加 (TBARS)測得(Ames et al., 1981 ; Trotta et al., 1982)。如果以t-BuOOH處理紅血球後，花生四烯酸(arachidonic acid)、磷脂絲胺酸(phosphatidylserine)和磷脂乙



Spectrophotometric determination of $X-Fe^{IV}-OH$ and $X-Fe^{III}$ generation in intact human RBC exposed to a continuous flux of H_2O_2 . *Panel A*, RBC (0.3%) in Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) plus 10 mM glucose and 7.5 μ g/ml glucose oxidase were incubated at 25 °C. *Panel B*, experimental conditions as in *panel A*, except for the addition of Na_2S (2 mM). In *panels A* and *B*, repetitive scans were recorded each minute over a 30-min incubation. *Panel C*, $X-Fe^{IV}-OH$ was obtained by adding H_2O_2 to $X-Fe^{III}$ in a molar ratio of 5:1. Catalase (2 μ M) was added to decompose excess H_2O_2 , and Na_2S (2 mM) was added to obtain the sulfoderivative.

附圖三、紅血球以 H_2O_2 處理後之光譜圖 (Giulivi, C. and Davies, K. J. A., 1990)

醇胺 (phosphatidylethanolamine) 的濃度都會減少 (Benatti et al., 1982)。此外，以 t-BuOOH 處理紅血球，由其物理化學性質顯示，細胞膜變形情況降低，不過，結合膜蛋白質的交叉現象卻增加了 (Corry et al., 1980 ; Benatti et al., 1982)。除此外，利用 t-BuOOH 進行氧化緊迫誘發實驗另有一個好處，t-BuOOH 在受 GSH 過氧化酶還原時，會大量伴隨有 GSSG 生成，因此是一探討氧化緊迫下，胞內蛋白質 mixed disulfides 形成對細胞功能或代謝影響的一適當化學藥物 (Simplicio and Rossi, 1994 ; Simplicio et al., 1995)

四、動物體內抗氧化保護系統

動物細胞為防止有毒化學物質或正常代謝下所產生的氧化物質，需有一套完善保護系統，其中 GSH 扮演有重要角色—glutathione redox cycle (Reed, D. J. 1986)。在大部份動物細胞中，均含有相當高濃度的 GSH (一般可達 0.5 mM ~ 10 mM) (Kodower and Kosower, 1978)。Glutathione (GSH)，僅由三個氨基酸 (γ -Glu-Cys-Gly) 所構成，為細胞內很重要的非蛋白質硫醇 (non-protein thiols)，通常佔總非蛋白質硫氫基化合物 (total non-protein sulfhydryl compounds) 90% 以上 (Demaster et al., 1984)。GSH 扮演有多樣性生理功能 (Meister, 1989)：

- (1) GSH 可預防氧化物質所引起的毒性作用，將本身當作受質，並利用 GSH 過氧化酶來移去 hydrogen peroxide 或其他的 organic hydroperoxides。

- (2) GSH可透過glutathione S-transferase (GST)之作用，與不同的xenobiotics或內生性反應物結合，來達到解毒和促進排出體外的目的。
- (3) GSH可維持細胞膜的完整性及保護膜內胞器。
- (4) GSH調節細胞的代謝和生長，而且維持細胞的正常生理功能等。

一般而言，正常的細胞受到氧化緊迫時，GSH可扮演一個抗氧化劑的角色，GSH直接與自由基反應或GSH利用GSH過氧化酶的催化來移除胞內生成的reactive oxygen species (ROS)，同時GSH轉變成氧化態GSH (GSSG)，然後藉由GSH還原酶(GSH reductase)再將GSSG還原回GSH。以紅血球為例，t-BuOOH處理下，經由glutathione peroxidase的作用，細胞還原型GSH會快速下降，伴隨著氧化型GSH濃度上升，然後GSSG在消耗NADPH情況下，利用GSH reductase，可將GSSG還原成GSH (Benatti et al., 1982 ; Simplicio et al., 1995)。

綜合t-BuOOH處理紅血球的作用如附圖四(Trotta et al., 1983)。由此可知GSH在動物體內抗氧化保護系統中，扮演相當重要的角色，假如系統內GSH耗盡，即造成不可逆的傷害，甚至死亡。

五、蛋白質mixed-disulfide formation

當蛋白質上硫醇和胞內低分子量硫氫基化合物(low molecular weight thiols)例如GSH、cysteamine及胱氨酸(cysteine)因發生所

Haemolysis

Malonaldehyde
 Aldehydes
 Alkanals
 Alcohols
 Ketones
 etc.

Membrane
 disruption

Haem-promotor
 decomposition
 Hb
 Membrane-
 bound Hb

t-BuOH
 Non-intact Hb
 metHb

t-BuO·
 GSH
 AA
 t-BuOH
 SDHA
 GS·

t-BuOOH

Cell membrane



t-BuOOH

Scheme of the postulated mechanism of t-butyl hydroperoxide-induced haemoglobin oxidation, lipid peroxidation and haemolysis

Abbreviations used: t-BuOOH, t-butyl hydroperoxide; t-BuOH, t-butyl alcohol; t-BuO·, t-butoxyl radical; AA, reduced ascorbate; SDHA, semidehydroascorbate; GSH-Px, glutathione peroxidase; GSSG, oxidized glutathione; GS·, glutathionyl radical; ROOH, lipid hydroperoxide.

附圖四、t-BuOOH 對血紅素所造成的氧化作用、脂質過氧化作用和溶血的機制 (Trotta et al., 1983)

謂mixed-disulfide exchange形成複合物時，就稱為protein mixed-disulfide formation或protein S-thiolation (Ziegler, 1985)。由於此反應的可逆性(reversible)，其功能被認為可調節細胞內的酵素活性或保護細胞內蛋白質硫醇不受氧化緊迫所傷害(Ziegler, 1985; Brigelius, 1985)。由於GSH為細胞內最主要的低分子量硫醇化合物，在動物組織內可高達0.5-10 mM，因此，討論protein S-thiolation時，多認為protein sulfhydryls與GSH二者關係最為密切。所以，蛋白質硫醇與GSH間的反應，又稱為protein S-glutathionation (Lii and Hendrich, 1993)。以人體紅血球Hb為例， $\alpha_2\beta_2$ 上共有6個胱氨酸，其中位於 β chain上第93個殘基上的硫醇已知是最具活性的硫醇，可與多種硫醇反應物結合(Jones, 1994)，此硫醇即可與GSH形成Hb-GSH複合物。

六、等電點電泳法(Isoelectric focusing; IEF)

利用IEF偵測蛋白質mixed-disulfide的形成，是一個簡單又靈敏的方法(Thomas et al., 1986)，其原理即根據IEF能夠分離不同等電點蛋白質的特性來進行分析。GSH於正常的生理條件下，帶有一淨負電荷(glycine上有一個 COO^- ，glutamate上有一個 NH_3^+ 與 COO^-)，因此當GSH和蛋白質形成mixed-disulfides時，將使得蛋白質多帶有一負電荷，因而改變其等電點。所以與GSH反應或未反應之蛋白質，在IEF上將會停留在不同位置，因此可以區別開來，並且，相對停留位置遠近係根據蛋白質所結合GSH數目而定。1989年Rokutan等人即利用IEF由Rat的肝臟

分析出分子量為30 kDa的細胞質蛋白質可與GSH發生反應；隨後，Lii和Hendrich (1993)並將IEF與immunoblotting結合，成功的偵測出carbonic anhydrase III發生S-glutathionation的情形。

由於紅血球易受氧化傷害，因此本計劃即針對紅血球內蛋白質，探討在氧化緊迫下，發生修飾反應種類，並嘗試利用IEF進行分析。

材料與方法

壹、實驗材料

一、材料：

人體紅血球 (來自 23 ~ 37 歲正常男子)

二、化學試藥：

1. tert-butyl hydroperoxide , sodium citrate , glucose , sodium phosphate dibasic heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) , sodium phosphate monobasic monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) , 1, 10-phenanthroline , potassium bicarbonate (KHCO_3) , 2, 4-dinitrofluorobenzene (FDNB) , 3-[N-morpholino] propane-sulfonic acid (MOPS) , dithiothreitol (DTT) , iodoacetic acid (IAA) , glutathione (oxidized form) (GSSG) , glutathione (reduced form) (GSH) , iodoacetamide (IAM) , 2-mercaptoethanol , bovine serum albumin (BSA) , potassium sodium tartrate , Folin reagent 等購自 Sigma Chemical Co.
2. sodium chloride (NaCl) , sodium hydroxide (NaOH) , sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3) , trichloroacetic acid (TCA) 等購自 Merck Co.
3. Acrylamide , N, N'-methylene bis-acrylamide , TEMED , ammonium persulfate , Tris , glycine , bromophenol blue , coomassie brilliant blue R-250 , molecular weight standard 等

購自 Bio-Rad Co.

4. Sephadex G-200 , ampholine (preblended pH5-8) 等購自 LKB Pharmacia.
5. Ether , acetic acid 等購自 TEDIA Co.
6. conc. HCl 購自 Fisher Scientific Co.
7. Perchloric acid (PCA) 購自 GFS Co.
8. Methanol 購自 ALPS Chemical Co. LTD.
9. Alcohol (99.5%)購自 Tedia 公司.
10. Cupric sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)購自林純藥工業株式會社.

三、儀器設備：

1. 冷凍離心機(Freeze centrifuge)：日本 Hitachi CR21 。
2. 恆溫水浴箱 (Shaker water bath) — 台灣 FIRSTEK SCIENTIFIC 。
3. 高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatograph ; HPLC):日本 Hitachi
 - D-2500 Chromato-Intergrator
 - AS-2000 Autosampler
 - L-4250 UV-VIS Detector
 - L-6200A Intelligent pump
4. 超音波振碎機 (Micro Ultrasonic Cell Disrupter) — 美國 KONTES 。

5. 等電點電泳裝置(Isoelectric focusing unit): 美國
Pharmacia LKB Multiphor II
Pharmacia LKB MultiDrive XL
Cooling water circulator -台灣 Hotech Inst.Co.
6. SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳裝置(SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis)—美國 Mini-PROTEAN II (Bio-Rad)。
7. 分光光度計(UV-VIS Spectrophotometer)：日本 Hitachi U-3000。
8. 微量離心機—Jouan A14。
9. 電源供應器—日本 Atto Crosspow 500。
10. 振盪機(Orbital Shaker)—台灣 HYBAID。

貳、方法

一、還原態麩胱甘肽/氧化態麩胱甘肽(reduced glutathione/oxidized glutathione, GSH/GSSG)與 Protein-released GSH 之分析法

1. 樣品之製備

A. 血球製備

由人體採血 7 ml，加入 70 μ l 的 5% sodium citrate 溶液為抗凝血劑，於 4 $^{\circ}$ C，3,000 rpm 下離心 5 分鐘後，棄去上層血漿及白血球，留取沉澱紅血球部份，以含 10 mM glucose 之 PBS (pH7.4) (Na_2HPO_4 2.41 g/L， NaH_2PO_4 0.14 g/L，NaCl 8.2 g/L)，洗滌沉澱紅血球三次；再採取洗淨之血球 100 μ l，加上 900 μ l 含 10 mM glucose 的 PBS (pH7.4) 配成 10% 的紅血球懸浮液。

B. 樣品之處理

取 10 ml 10% 血球懸浮液，置於 37 $^{\circ}$ C 水浴中，分別於加入 1.5 mM tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH) 前或後 5、15、30、60 分鐘取樣。樣品一經取出，立刻以含 10 mM glucose 的 PBS (pH7.4)，在 3,000 rpm 下，離心 1 分鐘，將血球洗淨，而後再稀釋成 10% 的血球懸浮液，準備做以下分析。

2. 分析方法

A. 樣品製備

取 200 μl 經 t-BuOOH 處理之 10% 血球懸浮液，加入 100 mM iodoacetic acid (IAA) 溶液 200 μl ，在暗室反應 5 分鐘後，再加入含 2.5 mM phenanthroline 的 10% PCA，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 30 分鐘；接著以 10,000Xg 離心 5 分鐘，可得到上層液和酸沉澱蛋白質 (pellet) 兩部份：

a. 上層液部份

- (1) 取 400 μl 上層液，每次緩緩加入少量的 KHCO_3 粉末，直到不產生氣泡為止。
- (2) 再加入 400 μl 3% FDNB 溶液 (溶於 99.5% 的 alcohol 中)。
- (3) 經振盪混合完全後，保存於 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 8 小時。
- (4) 再以 5,000 rpm 離心 3 分鐘。
- (5) 抽取上層液經過濾 (4 mm syringe filter Unit with 0.45 μM /nylon membrane) 去除雜質。
- (6) 其濾清液即以 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 進行分析 (Reed et al., 1980)。

b. Pellet 部份 (Meredith, 1983)

- (1) 先加入 1 ml ether。
- (2) 利用超音波振碎機將 pellet 打勻。
- (3) 以 10,000 Xg 離心 5 分鐘。
- (4) 再取 pellet 加入 0.5 ml 含 20 mM DTT 的 50 mM 3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid (MOPS) 溶液 (pH8.5)。

- (5) 於 37 °C 恆溫水浴下反應 1 小時。
- (6) 加入 0.5 ml 含 2.5 mM phenanthroline 的 10% PCA 於 4 °C 下作用 30 分鐘。
- (7) 以 10,000Xg 離心 5 分鐘。
- (8) 取上清液 400 μ l，並加入 40 μ l 100 mM IAA。
- (9) 每次緩緩的加入少量的 KHCO_3 ，直到不產生氣泡為止。
- (10) 於暗室反應 15 分鐘。
- (11) 加入 440 μ l 3% FDNB 溶液，經振盪混合完全後，保存於 4 °C 下 8 小時。
- (12) 以下同上層液樣品準備步驟(4)-(6)。

B. 標準品方面

- a. 取含 55 μ M GSH 及 GSSG 的標準品 400 μ l，加入 40 μ l 100 mM IAA 溶液。
- b. 其分析如同 pellet 部份之步驟(9)→(12)。

C. 測定原理

a. Perchloric acid (PCA)/Phenanthroline 的反應

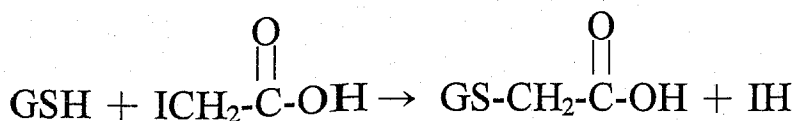
- (1) 首先，以 PCA 將細胞蛋白質沉澱，如此一來具有酸溶解性的 GSH 及 GSSG 則會溶於 PCA 溶液中，而後再將 PCA 溶液取出來做分析。由於還原態 GSH 在 PCA 中較不易自行氧化成 GSSG，所以就利用 PCA 來當作酸液。

- (2) Phenanthroline 則會與亞鐵離子形成複合物，而將鐵去

除以避免 GSH 氧化。

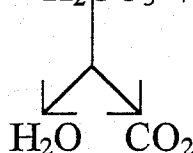
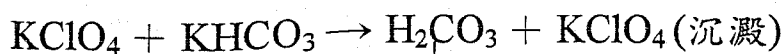
b. Iodoacetic acid (IAA) 的反應

IAA 與 GSH 作用後，使其在 HPLC 偵察下會比 GSSG 提早分離出來。



c. KHCO₃ 的反應

為中和酸溶液使成微鹼性。



d. 2, 4-dinitrofluoro-benzene (FDNB) 的反應

為與硫氨基上之硫元素反應使成為黃色化合物，以便利用偵檢器來偵測($\lambda = 365 \text{ nm}$)。

D. 標準品之製備：

- 分別秤取 GSH 0.0017g 與 GSSG 0.0036g。
- 各溶於不同之 100 μl 5% PCA/2.5 mM phenanthroline 溶液中。
- 取 b 之溶液各 5 μl 溶於 495 μl 5% PCA/2.5 mM phenanthroline 溶液中。
- 再取 c 之溶液各 100 μl 溶於 900 μl 含 2.5 mM phenanthroline 的 5% PCA，使最終濃度成為 55 μM 。

二、等電點電泳法 (Isoelectric focusing, IEF)

1. IEF 電泳膠片之製備(Rokutan et al.,1989)

取 2.53 ml 的 30% 丙烯醯胺 (acrylamide)-0.8% N, N'-methylene-bis-acrylamide 溶液，加入 14.6 ml 的 ddH₂O，0.95 ml 的 Ampholine (preblended pH5-8)，以及 19 μ l 的 TEMED，攪拌並抽氣 10 分鐘，接著加入 1 ml 1% ammonium persulfate (10 mg in 1 ml dd H₂O)，拌勻後隨即倒在 GelBond (Serva 21 cm \times 12 cm) 上，覆上玻璃片使成 0.8 mm 的厚度，置於室溫 1 小時後，即可使用。

2. 樣品的製備

- A. 10% 的血球懸浮液以 1.5 mM t-BuOOH 作用前或後 5, 15, 30, 60 分鐘取樣，當反應終止，隨即以含 10 mM glucose 的 PBS (pH7.4)，經 3,000 rpm，4 $^{\circ}$ C，離心 1 分鐘，紅血球加入 9X 體積 10 mM 低張 Tris-HCl (pH7.4) 緩衝液，使紅血球破裂，再於 4 $^{\circ}$ C 下以 10,000 Xg，離心 5 分鐘，取上層液並分為二組。其中 1 組取出後先以 30 mM dithiothreitol (DTT) 於 37 $^{\circ}$ C 恆溫水浴中反應 30 分鐘，另一組則置於冰浴中。待所有樣品均完成處理後，定量蛋白質濃度後，即可進行 IEF 分析。
- B. 取 10% 的血球溶液(加入 9X 體積 10 mM Tris-HCl (pH7.4) 的緩衝溶液進行溶血)，再於 1.5 mM t-BuOOH 作用前或後 2, 5, 15, 30 分鐘取樣，並分為 2 組，隨後樣品處理如同(A)。

C. 取 10% 的血球溶液，將其溶血(同 B)，再分別以 1, 5, 10, 30, 100 mM 的 GSSG，於 37°C 恆溫水浴中反應 30 分鐘取樣，並分為 2 組。其中 1 組取出後再以 30 mM DTT 於 37°C 恆溫水浴中反應 30 分鐘。另外部份溶血樣品，分別加入 30 mM IAA 或 30 mM IAM，置於暗室 30 分鐘。待所有樣品均完成處理後，蛋白質定量後，即可進行 IEF 分析。

3. IEF 分析

A. 電泳部份

將 IEF 電泳膠片置於 IEF 之電壓盤上，電壓設定在 1500V，電流在 2.75 mA/cm 及功率在 1.125W/cm gel width，於 4°C 下先預跑 10 分鐘，再將樣品分置於樣品槽中，使每個 well 有等量蛋白質，再電泳 1 小時。

B. 染色及褪色

a. 操作

取出 IEF 電泳片，先浸泡於 10% trichloroacetic acid (TCA) 溶液 5 分鐘，改以二次水浸洗 10 分鐘，之後用褪色液浸泡 5 分鐘，加入染色液 20 分鐘，最後改以褪色液浸泡 1 小時，把膠片撈起，置於室溫下乾燥。

b. 染色液之配製：(200ml)

Methanol	80 ml
conc. HCl	40 ml
ddH ₂ O	80 ml
Coomassie blue R250	80 mg

c. 褪色液之配製：(200ml)

methanol 50 ml

acetic acid 25 ml

ddH₂O 125 ml

三、蛋白質純化：Sephadex G-200- IEF

1. 膠質製備(gel preparation) (Rokutan et al., 1989)

稱取 5 公克乾重的 Sephadex G-200 粉末，加入 200 毫升 NaCl 溶液(0.15 M，pH7.4)，置於攝氏 100 度水浴中，隔水加熱 6 小時使膠體充份膨脹。冷卻至室溫，倒棄上層溶液及懸浮微粒，再倒入瓷器漏斗之抽氣過濾裝置，並以 ddH₂O 進行洗膠以除去 NaCl 與膠體間氣泡。

2. 膠質 IEF 製備：

量取 30 ml Sephadex G-200 膠質，加入 1.5 ml Ampholyte (preblended pH5-8)，小心拌勻並防止氣泡產生，倒在 GelBond (13 cm × 12 cm)上，均勻的打平，使成 2.5 mm 厚度，表面適度乾燥後即可使用。

3. 樣品製備

取 1 ml 10%血球懸浮液，於 4 °C 下，以 3,000 rpm 離心 1 分鐘，取 0.1 ml 紅血球加入 0.9 ml 10 mM Tris-HCl (pH7.4) buffer 使之溶血，再以 10,000 rpm，4 °C，離心 5 分鐘，取上層液，加入 3 mM t-BuOOH 於 37 °C 恆溫水浴中反應 30 分鐘後，即可將樣品置於 Sephadex G-200-IEF 上樣品槽內。

4. Sephadex G-200-IEF 之純化：

將上述附 Sephadex G-200 膠質之 GelBond 置於 IEF 之冷盤上，

電壓設定在 1500V，電流：2.75 mA/cm 及功率：1.125 W/cm gel width，先於 4°C 下預跑 10 分鐘，再將上述溶血樣本 4 μ l 放置於每個樣品槽中，1 小時後，關閉電流。刮取欲探討的蛋白質，分別裝於附有玻璃纖維之微量離心管中，以 3,000 rpm 離心 6 分鐘，濾去膠質，並收集濾液。

5. 蛋白質純化後之處理

A. IEF 分析部份

將收集的蛋白質先以 15 mM DTT 於 37°C 恆溫水浴下作用 30 分鐘，再分為 3 管，一管當對照，2 管則續以 30 mM GSSG 於 37°C 恆溫水浴下反應 30 分鐘，其中一管反應後再以 30 mM DTT 於 37°C 恆溫水浴中作用 30 分鐘；而第四管則加入 30 mM IAA，第五管加入 30 mM IAM，兩管均置於暗室反應 30 分鐘。最後以等量蛋白質進行 IEF 分析。

B. 以 SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳法(SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis)分析部份

將 Sephadex G-200 IEF 分離之任一蛋白質樣品，利用 SDS-PAGE，並分別於有或無硫醇還原劑-DTT 處理的條件之下，分析其分子量。首先將蛋白質樣品分為二組，一組先以硫醇還原劑— DTT 處理，再加入不含 2-mecaptoethanol 的 protein loading buffer，另一組則直接加入等量不含 2-mecaptoethanol 的 protein loading buffer，於 100°C 下煮沸 2 分鐘，接著將樣品在室溫冷卻後，以 15% SDS-聚丙烯醯胺

板膠電泳進行分析。

四、 SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳法(SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis) 分析紅血球細胞膜

1. 12.5% SDS-聚丙烯醯胺板膠之製備(Laemmli, 1970)

A. 器材：

垂直式電泳組合： Mini-PROTEAN II (Bio-Rad)

a. 電泳夾板： 2 組

b. 製備凝膠固定盤

c. 玻璃片-(長×寬×厚)

(1)10.2cm × 8.3cm × 0.1cm - 1 片

(2)10.2cm × 7.2cm × 0.1cm - 1 片

d. 電泳齒梳(comb)-1 個

e. spacer-共 2 條

B. 試劑及緩衝溶液：

a. 1.5 M Tris-HCl (pH8.8)緩衝溶液

b. 10% (w/v) SDS 溶液

c. 過硫酸銨 (ammonium persulfate, 10 mg/ml)

d. 30%丙烯醯胺 (acrylamide) -0.8% N, N' methylene-bis-acrylamide 溶液

e. TEMED

f. 0.5 M Tris-HCl (pH6.8)緩衝溶液

g. protein loading buffer (pH6.8)

C. 製膠

a. 裝置

將大小二玻片(10.2 cm × 8.3 cm × 0.1 cm, 10.2 cm × 7.2 cm × 0.1 cm)洗淨,烘乾拭淨後,左右兩側利用兩條 spacer (8.8 cm × 0.95 cm × 0.1 cm)為間隔,固定於夾板中,再將此夾板放置於水平固定盤上,使其夾板下方緊密與塑膠墊底接合,中空上方則準備容納凝膠。

b. 配置 12.5% 聚丙烯醯胺的 Separating gel :

取 3 ml 1.5 M Tris-HCl (pH8.8)緩衝溶液,加入 0.12 ml 10% (w/v) SDS 溶液,新配製的過硫酸銨 (ammonium persulfate, 10 mg/ml) 0.6 ml,再填加 5 ml 的 30% 丙烯醯胺 (acrylamide) -0.8% N, N' methylene-bis-acrylamide 溶液,與 4 μ l TEMED,最後加入 ddH₂O 至總體積為 12 ml。將上述配製的凝膠溶液即時混勻,並均分注入兩組夾板之玻璃中,並在膠面上覆蓋一層 ddH₂O,使膠面保持水平,於室溫下靜置 1 小時後,待凝膠界面形成,倒掉水層部份,再繼續做 stacking gel。

c. 配置 4% 聚丙烯醯胺的 Stacking gel :

取 1.5 ml 0.5 M Tris-Hcl (pH6.8)緩衝溶液,加入 0.06 ml 10% (w/v) SDS 溶液,過硫酸銨 (ammonium persulfate ; 10 mg/ml) 0.3 ml,再填加 0.8 ml 的 30% 丙烯醯胺 (acrylamide)-0.8% N, N' methylene-bis-acrylamide 溶液,與 15 μ l TEMED,最後加入 ddH₂O 至總體積為 6 ml。將上述配製的凝膠溶液即時混勻,並均分注入兩組已凝膠

之 separating gel 上方，隨後放入電泳齒梳模板(comb)於灌滿的 stacking gel 中，並固定住。於室溫下靜置 45 分鐘，待膠層凝膠後，取下齒梳模板(comb)，即形成樣品凹型槽。

2. 樣品處理(Vissers et al.,1994)

10%的血球懸浮液於 1.5 mM t-BuOOH 作用前或後 15、30 分鐘取樣，當反應終止，隨即以含 10 mM glucose 的 PBS (pH7.4)，經 3,000 rpm，4 °C，離心 1 分鐘，取紅血球用 9X 體積的 10 mM Tris-HCl (pH7.4) 緩衝液予以溶血，再以 10,000Xg，4 °C 離心 15 分鐘後，取沉澱之細胞膜，並將其洗到無色。加入等量的 3% SDS，並於 37 °C 恆溫水浴作用 20 分鐘；最後將樣品分為二組，一組加入 10 mM 2-mecaptoethanol，另一組未予以還原劑處理，二組均在 60 °C 下作用 30 分鐘，樣品冷卻後即可注入樣品槽內進行分析。

3. 電泳操作：

A. 器材：

- a. 垂直式電泳槽組合：Mini-ProTEAN II (Bio-Rad)
- b. 電源供應器：Atto CrossPow 500

B. 試劑及緩衝溶劑：

a. Tray buffer 之配製

秤取 3 g 的 Tris，加入 14.7 g 的甘胺酸(glycine)，再加入 10 ml 的 10% SDS 溶液，最後加 ddH₂O 至總體積為 1,000

ml，即為 pH8.3 的 tray buffer。

b. Protein loading buffer (pH6.8)之配製

取 0.5 M Tris-HCl (pH6.8) 10 ml，加入甘油(glycerol) 1.6 ml，10% (w/v) SDS 溶液 1.6 ml，2-mercaptoethanol 0.4 ml，0.1% (w/v) bromophenol blue 0.2 ml，最後加入 ddH₂O 至 8.0 ml。

c. Molecular weight standard 之配製

取 5 μ l 之 low molecular weight standards (Bio-Rad)，加入 95 μ l SDS reducing buffer，再以 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘即可。

d. 進行電泳

將製膠完成之兩組夾板固定於固定架上，並裝於電泳槽中，倒入 tray buffer 使夾板間之 buffer 達全滿，而夾板外之 buffer 至少淹過底膠，取 20 μ l 的 molecular weight standard 及 60 μ g 蛋白質樣品分別注入凹形槽中，電泳槽上方接負極，下方接正極，於 100 mA 的固定電流進行電泳，待指示劑移行至距底板約 0.5 cm 時，停止通電，再將固定架之夾板拆下，並取下凝膠。

e. 染色與褪色

(1) 染色液之配製

取 0.5 g Coomassie brilliant blue R-250，溶於 227 ml 甲醇及 46 ml 冰醋酸，再加入 ddH₂O 至 500 ml。

(2) 褪色液之配製

取 75 ml 冰醋酸、50 ml 甲醇，加 ddH₂O 至 1,000 ml。

(3) 將凝膠浸於染色液中 30 分鐘後，倒出染色液，以 ddH₂O 洗去染色劑 2 次，再改換褪色液進行過夜褪色即可。

五、Hb 光譜方法

將 10% 的血球懸浮液，在 25 °C 下，於 1.5 mM t-BuOOH 作用前或後分別於 5、15、30、45 分鐘時，分別以分光光度計 (UV-VIS Spectrophotometer, Hitachi U-3000)，進行波長 450 到 700 nm 掃描。

六、蛋白質濃度測定

1. 樣品製備

- (1) 樣品 20 μl ，分別加入等量 10% TCA 後，靜置 30 分鐘。
- (2) 以 10,000Xg 離心 5 分鐘，
- (3) 取 pellet，並加入 1 ml 1 N NaOH，振盪後靜置 30 分鐘，以便將沉澱的蛋白質溶解。

2. 標準曲線製備

- (1) 秤取適量 BSA (bovine serum albumin)，加入 ddH₂O，使最終濃度為 1 mg/ml。
- (2) 在分光光度計以 280 nm 測定其吸收光值，假設為 0.493。
- (3) BSA $\epsilon(280 \text{ nm/cm})$ 標準值為 0.667。
- (4) 則估算 BSA 實際濃度為 $0.493/0.677 \div 0.77 \text{ mg/ml}$ 。
- (5) 取 875 μl BSA 溶液，加入 125 μl 8 N NaOH 使成為 1 N NaOH-BSA 溶液，此時 BSA 濃度為 0.673 mg/ml。
- (6) 取 742.9 μl 濃度為 0.673 mg/ml 之 BSA 溶液，加上 257.1 μl 1 N NaOH，使 BSA 最後濃度成為 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。
- (7) 標準曲線之濃度

1 N NaOH, μl	100	84	68	52	36
BSA, μl (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0	16	32	48	64
實際 BSA 重量, μg	0	8	16	24	32

3. 蛋白質濃度測定(Lowry et al., 1951)

- (1) 取適量先前以 1 N NaOH 溶解之蛋白質樣本，若不足 100 μ l 則以 1 N NaOH 來補足。
- (2) 加入 200 μ l 二次水。
- (3) 加入 100 μ l 混合液(25% Na₂CO₃, w/v : 2% Na-K-tartrate, w/v : 1% CuSO₄, w/v = 8 : 1 : 1, v/v/v)。
- (4) 於室溫靜置 10 分鐘。
- (5) 加入 1 ml Folin reagent (Folin : dd H₂O = 1 : 19.5, v/v)。
- (6) 於 37 °C 恆溫水浴中，20 分鐘。
- (7) 室溫下冷卻。
- (8) 利用分光光度計，在波長 660 nm 下測定其吸光值。

統計分析

本實驗統計分析利用 SAS (SAS Institute, Cary, NC) 進行變異數分析(ANOVA)，並以 Student's t-test 來測試不同處理組間之顯著差異效果 ($p < 0.05$)。

結 果

胞內總 GSH ($GSH + 2 \times GSSG$) 與氧化態 GSH 濃度變化

t-BuOOH 處理前 0 分鐘，還原態 GSH、氧化態 GSH 及胞內總 GSH 分別為 4.44 ± 0.73 、 0.02 ± 0.01 、 4.48 ± 0.72 nmol/mg protein ($n=5$)，經 t-BuOOH 處理後，胞內 GSSG 濃度快速上升，在 5 分鐘後達到最高為 0.8 nmol/mg protein，隨後則逐漸下降，30 分鐘後降至 0.16 nmol/mg protein，如圖一。至於胞內總 GSH，在 t-BuOOH 處理後快速流失，5 分鐘處理後，total GSH 濃度從 4.48 ± 0.72 降至 2.38 ± 0.61 ，大約流失 40% 之多，5 分鐘內快速下降為 2.38 nmol/mg protein，隨後則並維持在大約 2 nmol/mg protein 水準。

t-BuOOH 處理後 Protein released-GSH 濃度之變化

此實驗明顯指出，t-BuOOH 處理($n=5$)後，與蛋白質結合的 GSH 隨處理時間增加而逐漸增加，且呈現時間依賴反應(time-dependent response)，從處理前約有 0.1 nmole GSH 與每 mg 蛋白質結合在一起，增加到 60 分鐘的 0.9 nmol/mg protien，增加有 9 倍之多，如圖二。

IEF 分析—紅血球 + t-BuOOH

為了進一步分析紅血球內總 GSH 的減少，是否與蛋白質發生 mixed-disulfide exchange，我們進一步利用 IEF 分析 t-BuOOH 處理後的蛋白質變化(如圖三)。由 IEF 結果顯示，t-BuOOH 處理前、後，蛋白質移動位置的確發生顯著改變，band a 顯著減少，且呈現時間依賴反應(time-dependent response)，band d 則消失，但同時在 b 及 c 位置則出現兩個新 bands；然而此變化在將樣品予以 DTT 還原後(lane 3, 5, 7, 9)，蛋白質變化恢復到 t-BuOOH 處理前型態。

IEF 分析—溶血 + t-BuOOH

紅血球先予以溶血後再給予 1.5 mM t-BuOOH 處理，其蛋白質變化與圖三結果相似(如圖四)，由 IEF 顯示，經 t-BuOOH 處理前、後，蛋白質移動位置的確亦發生改變，band a 與 d 顯著減少，band b 與 c 則增加且呈現時間依賴反應；然而此變化在將樣品予以 DTT 還原後(lane 4, 6, 8, 10)，蛋白質變化消失不見，恢復 t-BuOOH 處理前型態。

蛋白質 S-glutathionation

為確認前面實驗發現之蛋白質修飾反應是否為 protein-GSH mixed-disulfide，本實驗採用溶血後樣品直接加入不同濃度 GSSG，再觀察蛋白質變化，如圖五所示。加入 GSSG 後，band a 與 d 發生減少結果，且減少程度與 GSSG 濃度

呈正相關，同時 band c 位置則出現新蛋白質，此位置與圖三及圖四的位置完全相同，除了 band c 之外，本實驗並未出現 band b，且與前述實驗最大不同處是在 band a 下方位置，另外出現一個新的修飾蛋白質(band a')，且與 GSSG 濃度呈劑量依賴性反應。將樣品加入 DTT 還原後，前述變化均消失不見。另一方面，為了更進一步確認 band c 與新出現的新修飾蛋白質(band a')，的確是因為增加了一個淨負電荷，溶血樣品更直接與 30 mM IAA 或 IAM 反應，IAA 與 GSH 均攜有一個淨負電荷，而 IAM 則不具電荷。結果顯示，溶血樣品與 IAA 反應後，蛋白質變化形式與 GSSG 處理樣品相同，然而 IAM 處理樣品則無變化。

利用 Sephadex G-200 純化 band b 之蛋白質

為了進一步證實 band b 蛋白質與 band a 或其它蛋白質之關係，我們分別將 band a、b 以 Sephadex G-200- IEF 純化分離出來(如圖六 A)，隨後並將之分別與 GSSG 或 IAA 進行反應，結果如圖六 B。

純化的 band b 予以 15 mM DTT 處理，明顯見 band b 消失，意外的是，band a 並未出現，而是出現在 band d 的位置(圖六 B lane 1)。DTT 處理後樣品，我們再以 30 mM GSSG 處理(lane 2)，明顯發現 band d 減少，而 band c 再現。

此 sample 再以 DTT 還原後(lane 3)，明顯看出 band c 再度不見，而又回到 band d，可見 lane b、c、d 均是相同蛋白質但分別具不同修飾型態。為進一步證明 band c 較 band d 多一負電荷，下一個實驗我們利用硫醇 alkylating agents - iodoacetic acid 與 iodoacetamide 分別與 band b 蛋白質反應。結果顯示經 30 mM IAA 處理後(圖六 B lane 4)，band d 不見，band c 形成，然而以 30 mM IAM 處理後，並不會形成 band c，而只有 band d (圖六 B lane 5)。

利用 15% SDS-PAGE 分析純化之蛋白質

為進一步確定 band a、b、d 均屬同一蛋白質，我們利用 SDS - PAGE 進行分析(如圖七)，結果發現 band a (lane 1)，band b (lane 3)，band d (lane 5)的凝膠上蛋白質均呈現一致性，主要位於 14 kDa 位置，另有一少部份則在 30 kDa 位置處。將這些 sample 再予以 30 mM DTT 處理後，發現 30kDa 蛋白質減少或消失不見，僅存 14kDa 蛋白質，顯示此蛋白質非常可能為 Hb。

血紅素在 *t*-BuOOH 處理下吸光光譜變化

band a 移動到 b，乃是蛋白質增加一個正電荷所致，如此一來這個蛋白質修飾則不可能是與 GSH 反應所致，因此我們認為有可能 band b 上部份蛋白質是因為 Fe^{2+} -Hb 氧化為

Fe³⁺-Hb 所致。因此，利用 UV-VIS spectrophotometer，在 450 nm-700 nm 下，分別掃描 1.5 mM t-BuOOH 處理前、後共五個不同時間點樣品。圖八之結果顯示，在 0 分鐘時，Hb 在光譜下，出現兩個典型屬於 Fe⁺²-Hb 高峰，然後隨著 t-BuOOH 的作用時間的增加，這兩個高峰漸趨平緩，而在 620 或 630nm 處光譜漸高，顯示 Hb-Fe³⁺ 的確生成且隨時間而增加。

細胞膜蛋白質修飾反應

除了胞內蛋白質可發生氧化修飾反應外，細胞膜蛋白質也是本實驗目標之一。紅血球於 1.5 mM t-BuOOH 誘發氧化緊迫之下，明顯可見有蛋白質發生修飾反應(圖九 A)，隨著處理時間的增加，spectrin 以及 anion channel 這兩種蛋白質有聚合現象(polymerization)形成。然而當這些樣本在有 2-mercaptoethanol 還原的條件下(圖九 B)，發現 spectrin 及 anion channel 的變化消失，顯示蛋白質硫醇參與此蛋白質修飾反應。

討 論

t-BuOOH 處理後，胞內總 GSH 與氧化態 GSH 濃度變化，乃細胞在氧化緊迫下，GSH 被快速的氧化成 GSSG 所致，而後 GSSG 經由 GSH 還原酶(glutathione reductase, GRD)予以還原 (Sies, 1985)，本實驗結果與此一致，胞內總 GSH 在 5 分鐘內快速下降，而 GSSG 經 glutathione peroxidase 作用快速增加，隨後則減少(圖一)。雖然 GSSG 可經由 GSH 還原酶的作用恢復為 GSH，然而總 GSH 卻無法回復到原來濃度，反呈減少現象，這可能是部份 GSH 與蛋白質形成 mixed-disulfides 所致(Garel et al., 1986)，此可由蛋白質釋出 GSH 隨 t-BuOOH 處理時間而增加得到證實(圖二)。Simplicio 和 Rossi (1994)利用老鼠血液做材料，加入 1 mM t-BuOOH，觀察 GSH、GSSG 和 total GSH 在 0-60 分鐘之間的變化，發現 GSH 的濃度在處理後 15 秒快速下降，而後又慢慢恢復到原來的濃度，而 GSSG 在 15 秒急速上升之後，並於 4 分鐘後逐漸回復到處理前濃度，如將 GSH 和 GSSG 濃度相加，則總 GSH 均維持不變。本實驗結果和 Simplicio 等人不同之處，在於總 GSH 濃度並沒有恢復到原來狀態而是漸減，可能原因為使用 t-BuOOH 濃度較高或紅血球來源不同，本實驗使用人血為材料，而 Simplicio and Rossi 使用老鼠血，不同紅血球對 t-BuOOH 敏感性不同導致，故結果也不儘相同。另外一個可能因素就是部份 GSH 和蛋白質形成了 mixed disulfides，但這部份並無完全彌補 t-BuOOH 處理下流失的

GSH, protein released-GSH 在 60 分鐘時只增加了 0.7 nmol/mg protein, 此與圖一之胞內總 GSH 濃度所減少的 2 nmol/mg protein 相較之下, 僅佔 GSH 損失的 1/3 而已, 而另外的 2/3 GSH (約 1.3 nmol/mg protein) 並無法由 mixed-disulfides 的形成來解釋, 可能是氧化緊迫下, 紅血球細胞膜受到損傷, 導致 GSH 流失到胞外所致。

t-BuOOH 處理後的蛋白質變化, 由圖二與圖三之結果顯示, 蛋白質變化是可以利用 IEF 進行分析。由蛋白質 band 的顏色強弱與大小的關係比較起來, 我們推論 band b 應是由 band a 轉變而來, band c 則由 band d 而來, 如此一來, band a 與 band d 在經由 t-BuOOH 處理後, 移動方向恰巧相反, 顯示兩者不可能是發生相同的反應, 其中 band d \rightarrow c 是蛋白質增加負電荷, 所以 band d 的蛋白質有可能是與 GSH 發生了 mixed-disulfide exchange, 而 band a \rightarrow b 則是另外一種反應的結果。不管是紅血球直接與 t-BuOOH 反應, 或是溶血後再與 t-BuOOH 反應, 所得結果完全相同(圖三與圖四)。有趣的是, 雖此兩種反應不同, 但均是 DTT 可逆的, 蛋白質-GSH mixed disulfide 由於雙硫鍵的形成, 可受 DTT 還原。至於另一種蛋白質修飾反應, 根據 Williams (1992) 報告, MetHb 可能是由 DTT 作用而還原為 Hb, 加上 band a \rightarrow b 是增加正電荷, 所以我們認為 band b 上的蛋白質應是 MetHb, 這也可由 Hb 光譜變化得知 MetHb 隨 t-BuOOH 處理而增加(圖八), 而且 band a 與 b 與 Hb 具有相同

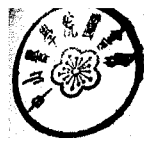
分子量(圖七)。

將前述 IEF 分析結果與圖五比較，GSSG 直接與溶血樣品反應後，band c 的確形成，且 band d 減少，此變化並與 GSSG 濃度成正相關，加入 DTT 後，band c 消失且回復到 band d。溶血樣品如與 IAA 直接反應(圖五 lane 12)，所產生的結果也和 GSSG 反應結果一致，證實 band d 的確是與 GSH 發生了 mixed-disulfide exchange 而移到 band c 位置。IAM 因不帶電荷，所以蛋白質與之反應後，淨電荷並不會改變，所以 band d 沒有變化(圖五 lane 13)。有趣的是，溶血樣品在與 GSSG 或 IAA 反應，除了 band c 的形成外，在 band a 下另出現了一個明顯且新的修飾 Hb，顯示 Hb 與 GSH 間的反應在完整的紅血球內與溶血是不同的。de Llano 等人(1993)指出 Hb- $\alpha_2\beta_2$ 上共有 6 個胱氨酸，其中在紅血球內僅 $\beta 93$ 上硫醇是有活性的，但溶血中的 Hb 則不僅 $\beta 93$ 可與 GSH 反應，所以推測可能是其他硫醇與 GSH 發生反應，才會出現這個新的 Hb-GSH 修飾產物。

1989 年 Rokutan 等人也曾成功的利用 IEF，在大白鼠肝細胞內發現了一個具有 30 kDa 的細胞質蛋白質可與 GSH 發生 mixed-disulfide exchange。目前已知蛋白質 GSH-mixed disulfides 的形成($GSSG + \text{prot-SH} \rightarrow \text{prot-SSG} + GSH$)，可有二個不同途徑：(1) 酵素作用：thiotransferase (Mannervik and Axelsson, 1980)；(2) 非酵素反應：mixed-disulfide exchange (Brigelius,

1985 ; Rokutan, 1989)。圖三與圖四證實了 band a 與 b 或 band c 與 d 有關，但 SDS-PAGE 卻證實了 band a, b, d 均具有相同分子量(圖七)，即它們可能是同一蛋白質，為了更確認此推測，純化 band b 蛋白質也於 IEF 上進行一系列實驗(圖六 B)，結果顯示 band b 在 DTT 處理後可轉變到 band d，隨後再與 GSSG 或 IAA 反應後，結果也與圖三相同，證實 band a, b, d 應屬同一蛋白質。但是為什麼純化 band b 在 DTT 還原下卻是跑到 band d 位置，而不是 band a，我們推測是圖三所見的 band b 應含有兩種不同修飾 Hb，主要為 MetHb，它在 DTT 處理下可還原為 Hb，其它則為 Hb($\alpha_2\beta_2$)-GSH₂，由於此 Hb 有兩個 GSH 反應，所以移動位置較 band c 為大而恰好與 MetHb 位於相近位置。我們利用 Sephadex G-200 純化過程中，MetHb 可能因繼續氧化而分解，最後剩下僅為($\alpha\beta$ -GSH)₂，所以當 DTT 還原後移動到 band d 位置。

根據 1994 年 MacDonald 利用分光光度計掃描不同的 Hb 之衍生產物，例如 oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, methemoglobin, azomethemoglobin, hemi-chromes，發現氧合血紅素(oxyhemoglobin)於 500-600 nm 出現 2 個明顯高峰，且此光譜與其它 4 種顯著不同，MetHb 會在 620nm 出現一個小高峰，且原先 2 個高峰則消失不見。當紅血球以 t-BuOOH 處理，0, 5, 15, 30, 45 分鐘後，oxyHb 的確會減少，而 MetHb 增加(圖八)，證實 IEF 所見的確是有 MetHb 生成。1994 年 Giulivi 等人曾利



用 hydrogen peroxide 來研究氧合血紅素與 methemoglobin 生成情形，其血紅素的光譜變化與本實驗相似。

除了 RBC 內的 Hb 發生了蛋白質修飾，本研究也利用 SDS-PAGE 的方法，針對細胞膜蛋白質是否也發生改變進行分析(如圖九)，觀察到 spectrin 和 anion channel 兩種蛋白質在 t-BuOOH 處理下，的確有顯著的變化，發生了聚合情形，導致分子量變大。Spectrin 類似的變化也曾在 Salvati 等人(1995)實驗中發現，且與紅血球在氧化緊迫下發生溶血及細胞形狀改變有關。Anion channel 發生變化則有可能影響到紅血球陰離子交換的能力。

在本篇研究中，我們企圖在 RBC 中尋找一種或數種蛋白質來當做人體受到過氧化緊迫傷害的指標。綜合以上結果得知，Hb 的電荷變化，以及細胞膜上 spectrin 和 anion channel 的修飾作用，似可應用到人類的一些疾病在發生或發生前，細胞受到氧化的初期診斷指標，尤其 Hb 不同修飾型態，本實驗相當成功的利用 IEF 即可一次偵測出，而 Hb 是紅血球內相當容易受到氧化傷害的蛋白質，Niketic 等人(1992)即指出，長期服用 phenobarbital 及 carbamazepine 的病人，有高達 7% 的 Hb 以 Hb-GSH 型態存在紅血球內。

近幾年來，科學家一直致力於研究自由基(free radical)對人體的傷害和各種疾病產生的關係，結果發現自由基經由一個複雜的機制，會增加細胞的通透性(Niki et al., 1991 ; Mckenna et

al., 1991 ; Janero et al., 1991)。在腫瘤疾病中，巨大細胞(mast cell)會有高度分化和變性的現象(de Cidre and de Lusting, 1990)，而自由基會促進巨大細胞釋出組織胺(histamine)使細胞通透性變大(Mannaioni and Masini, 1988)。此外，自由基也會導致癌症病人血液中 Hb 氧化和變性(denature) (Winterbourn, 1979 ; Jarolin et al., 1990)，並且形成 Heinz body 前驅物(如 MetHb、可溶和不可溶的 hemichromes 等)，再加上自由基會誘導脂質過氧化，使得 RBC 的膜變性(Kuypers et al., 1990)。根據研究顯示(Bowen and Mobarhan, 1995)，目前已有許多生化指標(biomarker)用來偵測罹患癌症病人的種類和程度，在病理方面，可以使用 bromodeoxyuridine immunohistochemistry， $[^3\text{H}]$ thymidine autoradiography 及 flow cytometry 等方法，來測癌細胞的生成和分化程度，也可用鏡檢的方式來觀察損害部位，但這些方法只適用在腫瘤形成後才可測得；在基因部份，以分析 DNA 斷裂程度以及 DNA 突變等來判斷 DNA 受損原因和位置，這些方法方法精準度高，但費時且缺少經濟效益；現在最常使用的方法有檢測自體分泌的生長因子和前列腺素(prostaglandin)的濃度以及鳥胺酸脫羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)與 GST 的活性，其缺點為偵測不易且酵素活性易消失。Rover 等人在 1995 年時，發現在癌症早期時。Hb 受到氧化形成 MetHb 的量會增加，推測其他修飾 Hb 也可能生成，所以，如果使用 IEF 方法來分析 Hb 或細胞膜蛋白質修飾程度，不但方法簡單，而且樣品容易取得而穩定。由於許多腫瘤形成前，細胞已有受到

氧化緊迫的影響，所以本實驗所使用的方法，對於預防醫學上的應用，應有其價值。

除此之外，一些有關血液方面的疾病，如鐮刀型貧血(sickle anemia)，地中海型貧血(thalassemic anemia)，或由某些寄生蟲(如瘧原蟲)引發的貧血症狀，其血液和氧化緊迫的關係雖有報告，但不十分清楚。例如有學者指出鐮刀型 RBC (HbS RBC)其細胞膜上的 spectrin-actin 的不可逆畸形現象(Lux et al., 1976)，膜上磷脂質的位置異常(Lubin et al., 1981)缺乏 calcium-ATPase (Dixon and Winslow, 1981)以及血管內皮易黏著 HbS RBC 等(Hebbel et al., 1980)，都和 RBC 受到氧化緊迫有關。然而，診斷 HbS RBC 被氧化程度的分析方法，大都只限於採血，測定 O_2^- (superoxide)、 H_2O_2 等(Hebbel et al., 1982)，可是這些物質不穩定性高，故偵測不易，結果難以判讀。地中海型貧血之 RBC 中磷脂質因氧化緊迫的結果，組成也和正常細胞不同(Kuyper et al., 1996)，其檢定氧化程度的缺點和 HbS RBC 相似。截至目前為止，尚未有人利用 IEF 來研究 Hb 受到氧化緊迫之後的結果，因此，本實驗提供一可能方法來探討 Hb 或其他蛋白質是否受到氧化傷害的程度。

結 論

1. 在氧化緊迫下，紅血球的确會發生蛋白質修飾反應。
2. 在本實驗中，Hemoglobin可以從 Hb^{+2} 變成 Hb^{+3} ，此外，Hb也可以和GSH發生Mixed disulfide exchange。
3. 細胞膜蛋白質 - spectrin 和 anion channel，它的硫醇隨著氧化緊迫的處理時間的增加，而會發生聚合性反應。
4. IEF可有效偵測出Hb修飾產物-MetHb 及Hb-GSH。

參考文獻

1. Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E. and Hochstrin, P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical- caused aging and cancer : a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78, 6858-6862.
2. Benatti, U., Morelli, A., Damiani, G. and DeFlora, A. (1982) A methemoglobin-dependent and plasma-stimulated experiment model of oxidative hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 106, 183-190.
3. Blot, W. J., Li, J. Y., Taylor, P. R. et al., (1993) Nutrition intervention trials in Linxian, China : supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 85, 1483-1492.
4. Bowen, P. E. and Mobarhan, S. (1995) Evidence from cancer intervention and biomarker studies and the development of biochemical markers. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62(S), 1403S-1409S.
5. Brigelius, R. (1985) Mixed disulfides : Biological functions and increase in oxidative stress. in *Oxidative stress*. (Sies, H., ed.) pp 243-272.
6. Brigelius, R., Lenzen, R. and Sies, H. (1982) Increase in hepatic mixed disulfide and glutathione disulfide levels elicited by paraquat. *Biochem. Pharmacol.* 31, 1637-1641.

7. Cadenas, E. and Sies, H. (1982) Low level chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by tert-butyl hydroperoxide. Relation to microsomal hemoproteins, oxygen dependence, and lipid peroxidation. *Eur. J. Biochem.*, 124, 349-356.
8. Clark, M. R. (1988) Senescence of red blood cells : progress and problems. *Physiol. Rev.*, 68, 503-534.
9. Chiu, D., Lubin, B. and Shohet, S. B. (1982) In : "Free Radicals in Biology" (W. A. Pryor, ed.), Vol. V, pp. 115-160. Academic Press, New York and London.
10. Corry, W. D., Meiselman, H. J. and Hochstein, P. (1980) t-butyl hydroperoxide-induced changes in the physicochemical properties of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 597, 224-234.
11. Cotton, D. W. K. and Sutorius, A. H. M. (1971) Inhibiting effect of some antimalarial substances on glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nature (London)*, 233, 197.
12. Dean, R. T., Hunt, J. V., Grant, A. J., Yamamoto, Y. and Niki, E. (1991) Free radical damage to protein : the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants and target proteins. *Free Rad. Biol. Med.*, 11, 161-168.
13. Dixon, E. and Winslow, R. M. (1981) The interaction between

- (Ca²⁺+Mg²⁺)-ATP ase and the soluble activator (calmodulin) in erythrocytes containing haemoglobin S.Br. J. Haematol., 47, 391-397.
- 14.De Cidre, L. L. and de Lustig, E. S. (1990) Mast cell kinetics during tumor growth. *Tumor Biol.*, 11, 196-201.
- 15.De Llano, J. J. M., Jones, W., Schneider, K., Chait, B. T. and Manning, J. M. (1993) Biochemical and functional properties of recombinant human sickle hemoglobin expressed in yeast. *J. Biol. Chem.*, 268, 27004-27011.
- 16.Demaster, B. G., Shirota, F. N., Redfern, B., Goon, D. J. W. and Nagasawa, H. T. (1984) Analysis of hepatic reduced glutathione, cysteine and homocystine by cation ion-exchange high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatog.*, 308, 83-91.
- 17.Deuticke, B., Heller, K. B. and Haest, C. W. M. (1987) Progressive oxidative membrane damage in erythrocytes after pulse treatment with t-butyl hydroperoxide. *Biochim. Biophys. Acta.*, 899, 113-124.
- 18.Dubbelman, T. M. A. R., deBruijne, A. W. and van Steveninck, J. (1977) Potodynamic effects of protoporphyrin on red blood cell deformability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 811-817.
- 19.Garel, M. C., Dornenget, C., Josiane, C. M., Prehu, C., Galacteros, F. and Beuzard, Y. (1986) Covalent binding of glutathione to hemoglobin.

- Inhibition of hemoglobin S polymerization. *J. Biol. Chem.*, 261, 14704-14709.
20. Giulivi, C. and Davies, K. J. A. (1990) A novel antioxidant role for hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 265, 19453-19460.
21. Giulivi, C. and Davies, K. J. A. (1994) Hydrogen peroxide-mediated ferrylhemoglobin generation in vitro and in red blood cells. *Methods, Enzymol.*, 231, 490-496.
22. Goldberg, B. and Stern, A. (1977) The mechanism of oxidative hemolysis produced by phenylhydrazine. *Mol. Pharmacol.*, 13, 832-839.
23. Grimm, L. M., Collison, M. W., Fisher, R. A. and Thomas, J. A. (1985) Protein mixed-disulfide in cardiac cells. S-thiolation of soluble proteins in response to diamide. *Biochim. Biophys. Acta.*, 844, 50-54.
24. Grinberg, L. N., Rachmilewitz, E. A. and Newmark, H. (1994) Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 48, 643-649.
25. Hebbel, R. P., Yamada, O., Moldow, C.F., Jacob, H. S., White, J. G. and Eaton, J. W. (1980) Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium. *J. Clin. Invest.*, 65, 154-160.
26. Hebbel, R. P., Eaton, J. W., Balasing, M. and Steinberg, M. H. (1982)

- Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, 70, 1253-1259.
27. Janero, D. R., Hreniu, K. D. and Sharif, H. M. (1991) Hydrogen peroxide induced oxidative stress to the mammalian heart-muscle cell: lipid peroxidative membrane injury. *J. Cell Physiol.*, 149, 347-364.
28. Jarolim, P., Lahav, M., Liu, S. L. and Palek, J. (1990) Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of heme. *Blood*, 76, 2125-2131.
29. Jones, R. T. (1994) Structural characterization of modified hemoglobins. *Methods Enzymol.*, 231, 322-343.
30. Juliano, R. L., Kimelberg, H. K. and Papahadjopoulos, D. (1971) Synergistic effects of a membrane protein (spectrin) and Ca^{+2} on the Na^{+} permeability of phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.*, 241, 894-905.
31. Kalyanaraman, B., Mottley, C. and Mason, R. P. (1983) A direct electron spin resonance and spin-trapping investigation of peroxyl free radical formation by heme/hydroperoxide systems. *J. Biol. Chem.*, 258, 3855-3858.
32. Kosower, N. S. and Kosower, E. M. (1978) The glutathione status of

- cells. *Intl. Rev. Cytol.*, 54, 109-160.
33. Kosower, N. S., Kosower, E. M., Zipser, Y., Zehava, F. and Shomrat, R. (1981) Dynamic changes of red cell membrane thiol groups followed by bimane fluorescent labeling. *Biochim. Biophys. Acta.*, 640, 748-759.
34. Kosower, N. S., Zipser, Y. and Faltin, Z. (1982) Membrane thiol-disulfide status in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells. Relationship to cellular glutathione. *Biochim. Biophys. Acta.*, 691, 345-352.
35. Koster, J. F. and Slee, R. G. (1983) Lipid peroxidation of human erythrocyte ghosts induced by organic hydroperoxide. *Biochim. Biophys. Acta.*, 752, 233-239.
36. Krinsky, N. I. (1993) Actions of carotenoids in biological system. *Annu. Rev. Nutr.*, 13, 561-587.
37. Kuypers, F. A., Schott, M. D, Scott, M. A., Lubin, B. and Chiu, D. T. (1990) Use of ektacytometry to determine red cell susceptibility to oxidative stress. *J. Lab. Clin. Med.*, 116, 535-545.
38. Kuypers, F. A., Schott, M. A. and Scott, M. D. (1996) Phospholipid composition and organization in model beta-thalassemic erythrocytes. *Am. J. Hemato.*, 51, 45-54.
39. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the

assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 277, 680-685.

40. Lii, C. K. and Hendrich, S. (1993) Selenium deficiency suppresses the S-glutathionation of carbonic anhydrase III in rat hepatocytes under oxidative stress. *J. Nutr.*, 123, 1480-1486.
41. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., (1951) Protein measurement with Folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
42. Lubin, B., Chiu, D., Bastacky, J., Roelofsen, B. and Van Deenen, L. L. M. (1981) Abnormalities in membrane phospholipid organization in sickle erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, 67, 1643-1649.
43. Lux, S. E., John, K. M. and Karnovsky, M. J. (1976) Irreversible deformation of the spectrin-actin lattice irreversibly sickled cells. *J. Clin. Invest.*, 58, 955-963.
44. MacDonald, V. W. (1994) Measuring relative rates of hemoglobin oxidation and denaturation. *Methods Enzymol.*, 231, 480-490.
45. Mannaioni, P. F. and Masini, E. (1988) The release of histamine by free radicals. *Free Rad. Biol. Med.*, 5, 177-197.
46. Mannervik, B. and Axelsson, K. (1980) Role of cytoplasmic thioltransferase in cellular regulation by thiol-disulphide interchange. *Biochem. J.*, 190, 125-130.

47. Mathews, C. K. and van Holde, K. E. (1990) In Biochemistry (Mathews, C. K. and van Holde, K. E. ed.) 314, the Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Canada.
48. Mckenna, R., Kezdy, F. J. and Epps, D.E. (1991) kinetic analysis of the free radical induced lipid peroxidation in human erythrocyte membranes : evaluation of potential antioxidants using cisparinaric acid to monitor peroxidation. Anal. Biochem., 192, 443-445.
49. Meister, A. (1989) Metabolism and function of glutathione. in Glutathione : Chemical, Biochemical and Medical Aspects. (Dolphin, D., Poulson, R. and Avramovic, O., eds), pp. 367-474, Part A. John Silley & Sons Inc., New York.
50. Meredith, M. J. (1983) Analysis of protein-glutathione mixed disulfides by high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem., 131, 504-509.
51. Ney, P. A., Christopher, M. M. and Hebbel, R. P. (1990) Synergistic effects of oxidation and deformation on erythrocyte monovalent cation leak. Blood, 75, 1192-1198.
52. Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E. and Sato, K. (1991) Membranedamage due to lipid oxidation. Am. J. Nutr., 53 (1S), 201S-205S.

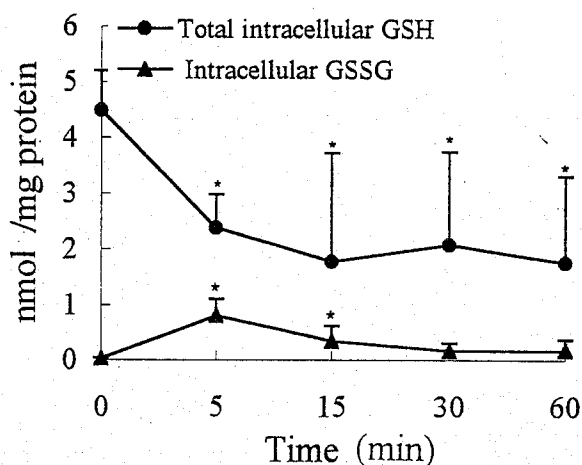
53. Oshino, N. and Chance, B. (1977) Properties of glutathione release observed during reduction of organic hydroperoxide, demethylation of aminopyrine and oxidation of some substances in perfused rat liver, and their implications for the physiological function of catalase. *Biochem. J.*, 162, 509-525.
54. Passow, H. (1981) In : "The Function of Red Cells : Erythrocyte Pathobiology" (Wallach, D. F. H. ed.), pp. 77-101., Alan R. Liss, New York.
55. Peisach, J., Blumberg, W. E. and Rachmilewitz, E. A. (1975) The demonstration of ferrichrome intermediates in heinzbody formation following the reduction of oxyhemoglobin A by acetylphenylhydrazine. *Biochim. Biophys. Acta.*, 393, 404-418.
56. Reed, D. J., (1986) Regulation of reductive process by glutathione. *Biochem. Pharmacol.*, 35, 7-13.
57. Reed, D. J., Babson, J. R., Beatty, P. W., Brodie, A. E., Ellis, W. W. and Potter, D. W. (1980) High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide and related thiols and disulfides. *Anal. Biochem.*, 106, 55-62.
58. Rokutan, K., Thomas, J. A., and Sies, H. (1989) Specific S-thiolation of a specific 30-kDa cytosolic protein from rat liver under oxidative stress, *Eur. J. Biochem.*, 179, 233-239.

59. Rover, F. D., Granata, A. Broccio, M., Zirilli, A. and Broccio, G. (1995) Hemoglobin oxidative stress in cancer. *Anticancer Res.*, 15, 2089-2096.
60. Salvati, A. M., Caprari, P., Bozzi, A., Malorni, W., Bottini, A., Iosi, F. and Santini, M. T. (1995) Junctional sites of erythrocyte skeletal proteins are specific targets of tert-butylhydroperoxide oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, 94, 243-258.
61. Sarin, K., Kumar, A., Prakash, A. and Sharma, A. (1993) Oxidative stress and antioxidant defence mechanism in plasmodium vivax malaria before and after chloroquine treatment. *Indian J. Malar.*, 30, 127-133.
62. Sassa, S., Granick, S. and Kappas, A. (1975) Effect of lead and genetic factors on heme biosynthesis in the human red cell. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 244, 419-440.
63. Schrier, S. L. and Mohandas, N. (1992) Globin-chain specificity of oxidation-induced changes in red blood cell membrane properties. *Blood*, 79, 1586-1592.
64. Shinar, E. and Rachmilewitz, E. A. (1990) Oxidative denaturation of red blood cells in Thalassemia. *Semin. Hematol.*, 27, 70-82.
65. Sies, H. (1985) "In Oxidative Stress: Hydroperoxide and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs" (Sies, H. ed.) pp. 73-90, Academic Press, London.

66. Simplicio, P. D., Cardaiol, E., Scaloni, A., Amiconi, G. and Rossi, R. (1995) Thiol groups in proteins as endogenous reductants to determine glutathione-protein mixed disulphides in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1243, 230-238.
67. Simplicio, P. D. and Rossi, R. (1994) The time-course of mixed disulfide formation between GSH and proteins in rat blood after oxidative stress with tert-butyl hydroperoxide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1199, 245-252.
68. Steck, T. L. and Dawson, G. (1974) Topographical distribution of complex carbohydrates in the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.*, 249, 2135-2142.
69. Stern, A. (1985) "In Oxidative Stress : Red cell oxidative damage." (Sies, H. ed.) pp. 331-349, Academic Press, London.
70. Stocks, J. and Dormandy, T. L. (1971) The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br. J. Haematol.*, 20, 95-111.
71. Sweet, C. and Zull, J. E. (1970) Interaction of the erythrocyte-membrane protein, spectrin, with model membrane systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 135-141.
72. Thomas, J. A. and Beidler, D. (1986) A thin-gel isoelectric focusing method of quantitation of protein S-thiolation. *Anal. Biochem.*, 157, 32-38.

73. Trotta, R. J., Sullivan, S. G. and Stern, A. (1981) Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. Dependence on glucose metabolism and hemoglobin status. *Biochim. Biophys. Acta.*, 678, 230-237.
74. Trotta, R. J., Sullivan, S. G. and Stern, A. (1982) Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. Effects of the hexose monophosphate shunt as mediated by glutathione and ascorbate. *Biochem. J.*, 204, 405-415.
75. Trotta, R. J., Sullivan, S. G. and Stern, A. (1983) Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. The relative roles of haem- and glutathione-decomposition of t-butyl hydroperoxide and membrane lipid hydroperoxides in lipid peroxidation and haemolysis. *Biochem. J.*, 212, 759-772.
76. Tyler, J., Branton, D. and Cohen, C. M. (1981) Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell*, 24, 24-32.
77. Vissers, M. C. M., Stern, A., Kuypers, F., van der Berg, J. and Witerbourd, C. C. (1994) Membrane changes associated with lysis of red blood cells by hypochlorous acid. *Free Rad. Biol. Med.*, 16, 703-712.

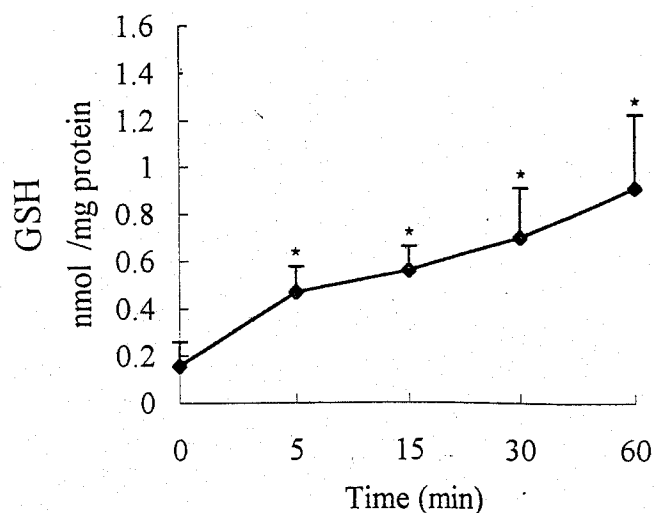
78. Williams, H., Jr. (1992) in Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes (Muller, F., ed) Vol. III, pp. 121-211, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
79. Winterbourn, C.C. (1979) Oxidative reaction of hemoglobin. Br. J. Haemat., 41, 245-251.
80. Winterbourn, C. C. (1990) Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias : the unstable hemoglobins. Semin. Hematol., 27, 41-50.
81. Ziegler, D. M. (1985) Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiol-disulfides in metabolic regulation. Ann. Rev. Biochem., 54, 305-329.



圖一、1.5 mM t-BuOOH 對人體紅血球的胞內總 GSH 和氧化態 GSH 之影響

Fig.1 Total intracellular GSH and GSSG in human RBC treated with 1.5 mM t-BuOOH.

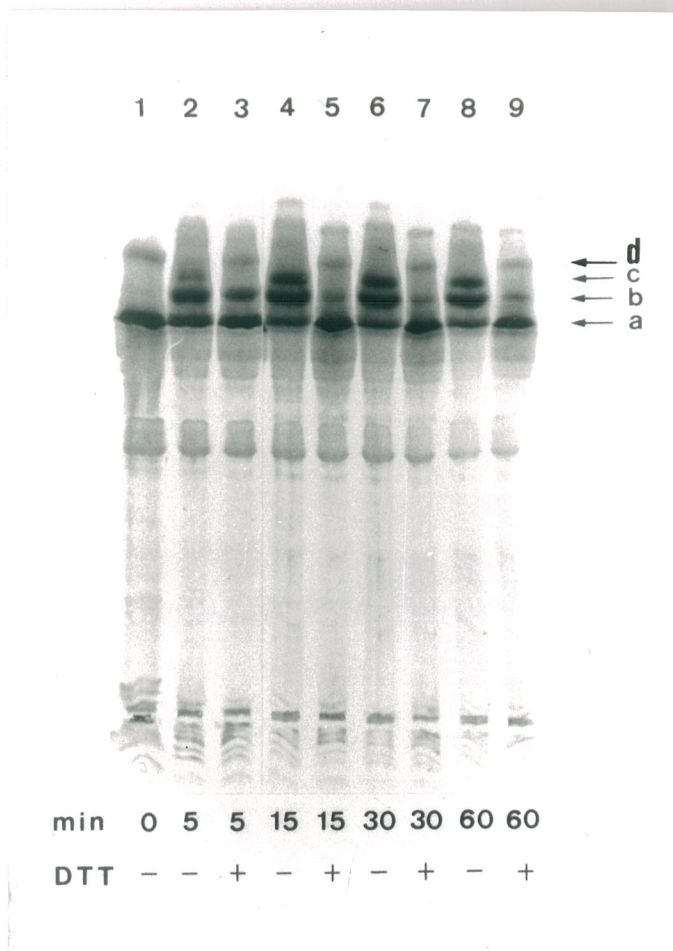
來自 5 位正常男性 10%紅血球懸浮液，加入 1.5 mM t-BuOOH 前或後 5, 15, 30, 60 分鐘取樣進行清洗，分析紅血球胞內總 GSH (●) 和胞內 GSSG (▲)。★表示與處理前 (time 0) 相較之下有顯著差異 ($p < 0.05$)



圖二、1.5 mM t-BuOOH 對人體紅血球的 Protein released-GSH 之影響

Fig.2 The content of Protein released-GSH in human RBC treated with 1.5 mM t-BuOOH .

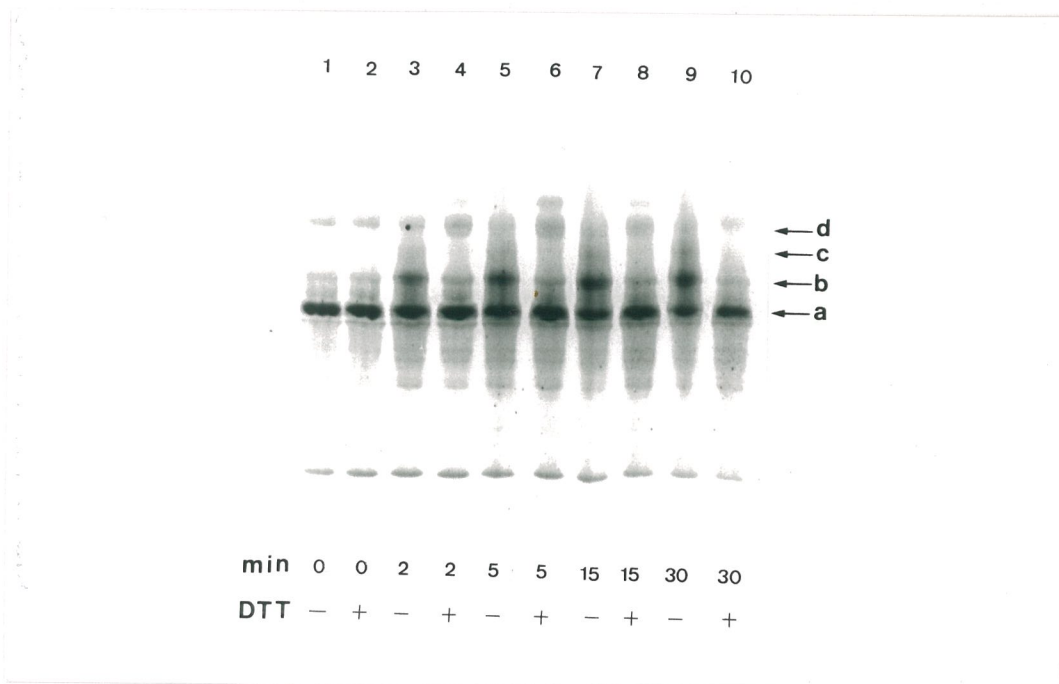
來自 5 位正常男性血液，稀釋成 10%紅血球懸浮液，於加入 1.5 mM t-BuOOH 前或後 5, 15, 30, 60 分鐘取樣，溶血後將蛋白質沉澱，再利用 DTT 將與蛋白質結合的 GSH 釋放出，然後以 HPLC 分析 GSH 濃度。★表示與處理前(time 0) 相較之下有顯著差異($p < 0.05$)



圖三、IEF 分析 1.5 mM t-BuOOH 處理下,人體紅血球的蛋白質變化

Fig.3 Pattern of protein migration on Coomassie-blue stained IEF gel in human erythrocytes under oxidative stress.

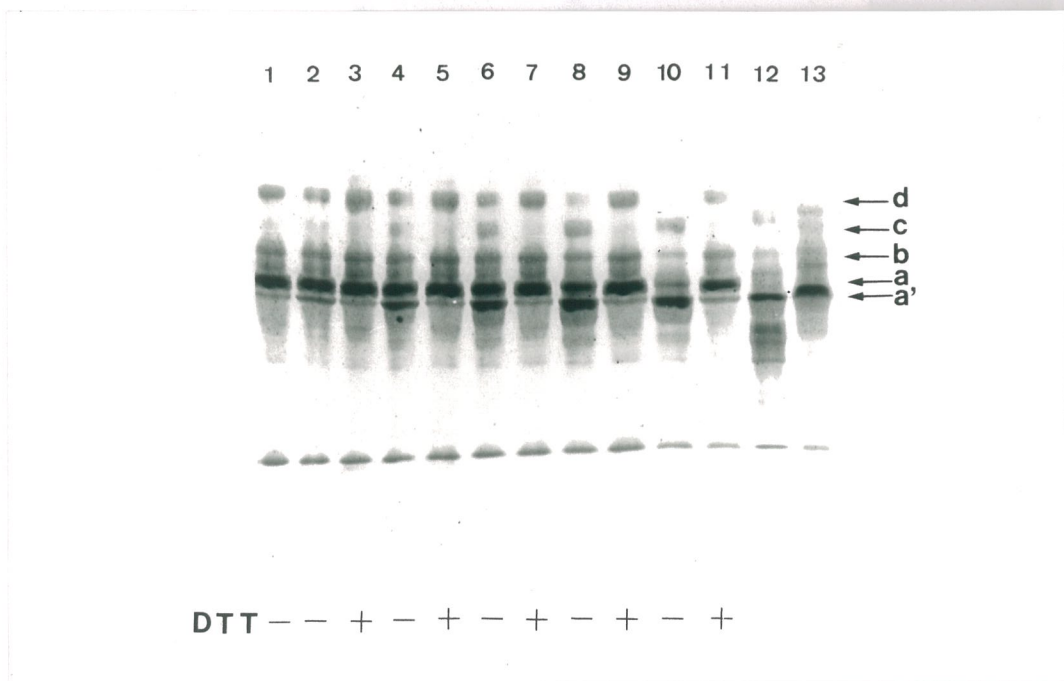
10%的紅血球懸浮液,以 1.5 mM t-BuOOH 作用前或後 5, 15, 30, 60 分鐘取樣,經含 10 mM glucose 的 PBS (pH7.4) 清洗後,取紅血球用 9X 體積的 10 mM Tris-HCl (pH7.4) 予以溶血,再以 10,000Xg, 4°C, 離心 5 分鐘,取上層液進行 IEF 分析, lane 3, 5, 7, 9 樣品在注入樣品槽前,先以 30mM DTT 於 37°C 作用 30 分鐘, DTT 處理乃用來確認蛋白質修飾反應是否與蛋白質硫醇有關。



圖四、溶血樣品於 1.5 mM t-BuOOH 處理下的蛋白質變化情形

Fig.4 Pattern of protein migration on Coomassie-blue stained IEF gel in human erythrocytes hemolysis treated with 1.5 mM t-BuOOH.

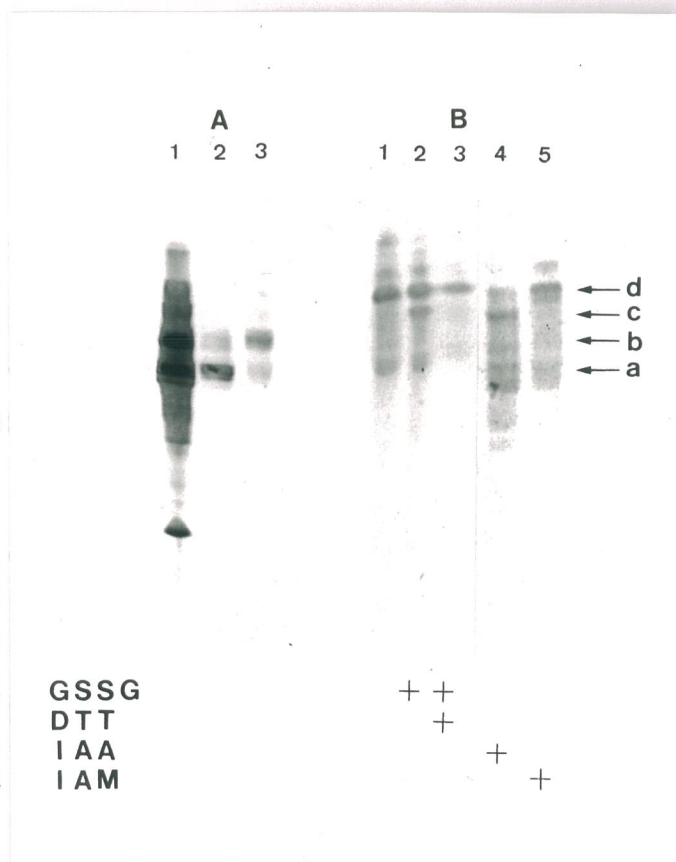
紅血球溶血後於 1.5 mM t-BuOOH 作用前或後 2, 5, 15, 30 分鐘取樣，經蛋白質定量後，注入 IEF 樣品槽中進行電泳分析，其中 lane 2, 4, 6, 8, 10 並先經 30 mM DTT 於 37°C 作用 30 分鐘。



圖五、GSSG、IAA 或 IAM 處理對人體紅血球蛋白質之影響

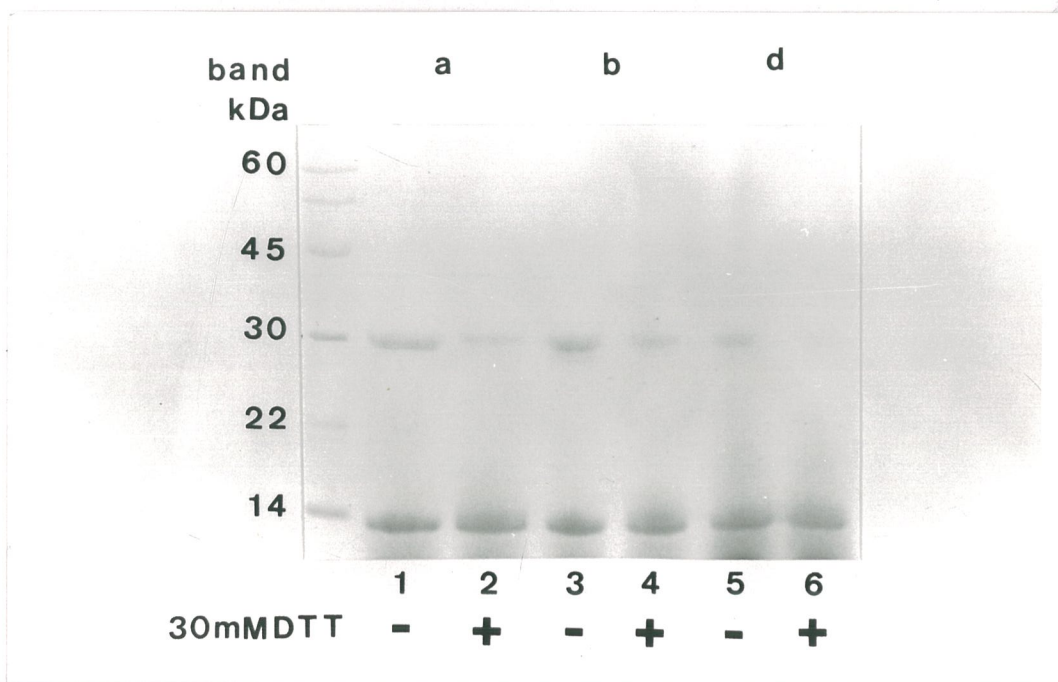
Fig.5 Protein modification of lysed RBC treated with 1、5、10、30、100 mM GSSG or 30 mM IAA or 30 mM IAM on IEF gel.

紅血球溶血後，分別加入 1 (lane 2, 3)、5 (lane 4, 5)、10 (lane 6, 7)、30 (lane 8, 9)、100 (lane 10, 11) mM 不同濃度 GSSG，於 37°C 恆溫水浴下作用 30 分鐘，其中部份樣品並再 GSSG 處理後加入 30 mM DTT 於 37°C 作用 30 分鐘 (lane 3, 5, 7, 9, 11)，lane 1 為未接受 GSSG 處理的溶血樣品。lane 12 為加入 30 mM IAA，lane 13 則加入 30 mM IAM，分別置於暗室 30 分鐘。



圖六、利用 Sephadex G-200-IEF 純化 band a & b 之蛋白質分析變化 Fig.6 Pattern of using Sephadex G-200-IEF purification of band a & b analysis on Coomassie-blue stained IEF gel.

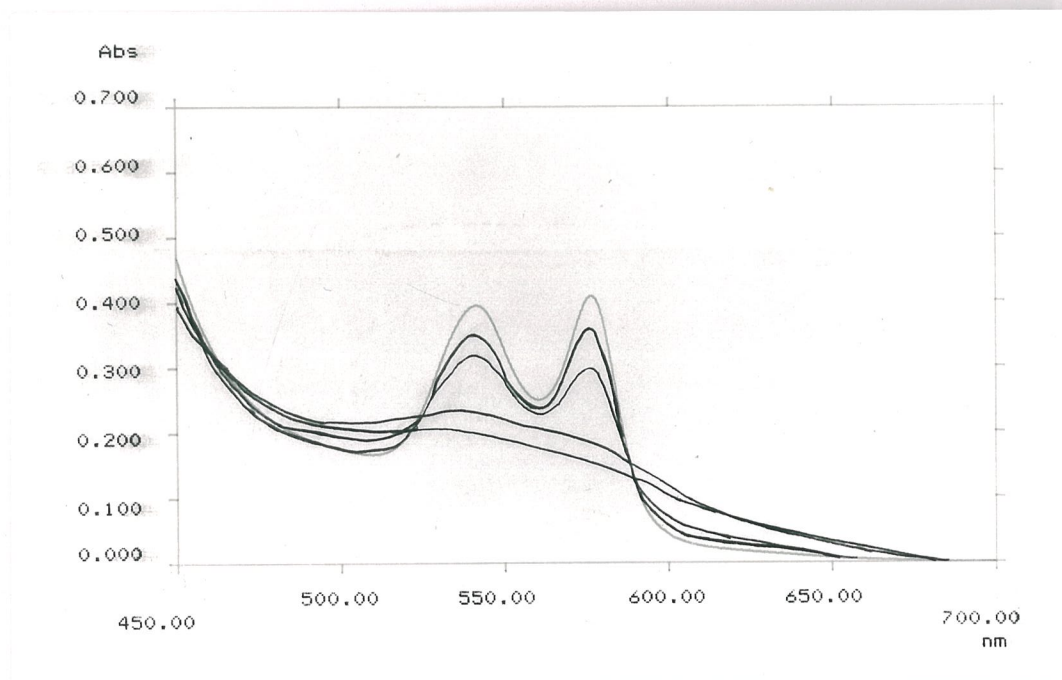
以 10% 的血球溶液，以 10,000Xg，4℃，離心 5 分鐘，取上層液，加入 3 mM t-BuOOH 於 37℃ 中反應 30 分鐘，經 Sephadex G-200，圖六 A-1 為對照組，圖六 A-2 為 band a，圖六 A-3 為 band b。取 band b 分為 3 管，分別加入 15 mM DTT 於 37℃ 作用 30 分鐘(圖六 B-1)，其中 2 管再加入 30 mM GSSG，於 37℃ 作用 30 分鐘(圖六 B-2)，其中 1 管加入 30 mM DTT，於 37℃ 作用 30 分鐘(圖六 B-3)，另外 band b 分別加入 30 mM IAA，30 mM IAM，置於暗室 30 分鐘(圖六 B-4、圖六 B-5)。



圖七、 SDS-PAGE 分析純化之蛋白質 band a, b 和 d

Fig.7 Molecular weight of band a, b and d by SDS-PAGE under reducing or nonreducing condition.

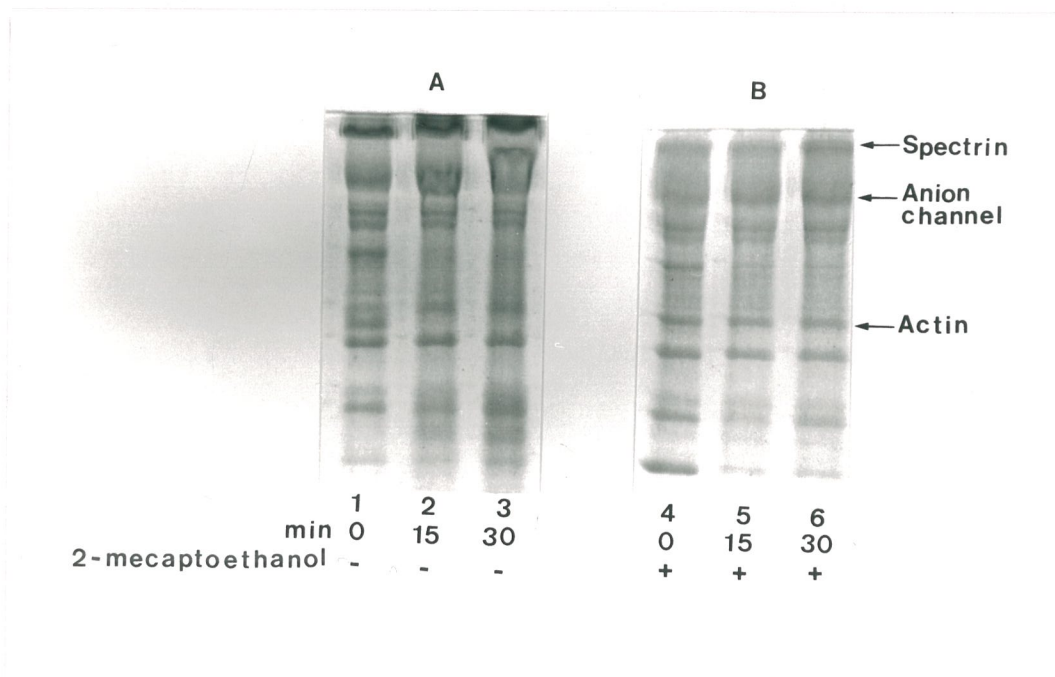
利用 Sephadex G-200-IEF 分離出之 band a, b, d 蛋白質分為二組，一組不給予 DTT 處理(lane 1,3,5)，另一組則加入硫醇還原劑 30 mM DTT (lane 2,4,6)。



圖八、t-BuOOH 處理下血紅素吸光光譜變化

Fig.8 Spectrophotometric determination of human hemoglobin exposed to 1.5 mM t-BuOOH.

10%血球懸浮液，於 1.5 mM t-BuOOH 作用前(圖中最上面一條曲線)或分別於 5, 15, 30, 45 分鐘，以分光光度計進行波長 450 到 700 nm 掃描。



圖九、 SDS-PAGE 分析 t-BuOOH 處理下細胞膜蛋白質變化

Fig.9 Protein migration pattern of membrane by SDS-PAGE gel.

10%的血球懸浮液以 1.5 mM t-BuOOH 作用前(lane 1, 4)或後 15 (lane 2, 5), 30 (lane 3, 6)分鐘取樣，樣品製備後，取沉澱之細胞膜蛋白質加入等量的 3% SDS，於 37°C 作用 20 分鐘，分別於 nonreducing (A)或 reducing (B)條件進行電泳分析。