

國立交通大學

生物科技學系

碩士論文

以螢光共振能量轉移揭示蛋白質 PGB1 分子內摺疊  
機制

The Folding Mechanism of Protein G B1 Domain Revealed by  
Fluorescence Resonance Energy Transfer

研究生：鍾偉賢

指導教授：張家靖 教授

中華民國一百年七月

以螢光共振能量揭示蛋白質 PGB1 分子內摺疊機制

The Folding Mechanism of Protein G B1 Domain Revealed by Fluorescence Resonance  
Energy Transfer

研究生：鍾偉賢

Student : Wei-Hsien Chung

指導教授：張家靖

Advisor : Chia-Ching Chang

國立交通大學

生物科技學系

碩士論文

A Thesis

Submitted to Department of Biology Science and Technology  
College of Biology Science and Technology  
National Chiao Tung University  
in partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of  
Master  
in

Biology Science and Technology

June 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一十年七月

# 以螢光共振能量轉移揭示蛋白質 PGB1 分子內摺疊機制

學生：鍾偉賢

指導教授：張家靖

國立交通大學生物科技學系碩士班

## 摘要

蛋白質如何摺疊成特殊的結構，為目前學界不斷探討的重點。為了要能夠理解蛋白質摺疊機制，研究單功能區蛋白質（single-domain protein）變成了一個很重要的指標。本研究中，我們以 Protein G B1 Domain (PGB1) 作為研究之標的蛋白質，利用本實驗室所開發之蛋白質摺疊方法，Over-critical Folding Process，將 PGB1 由未摺疊態摺疊至自然態並觀察摺疊中間的結構變化。PGB1 是一個小型蛋白質只有 56 個胺基酸，是 Protein G 的 IgG-binding domain。藉由觀察 PGB1 自身的 Trp43 螢光光譜和 acrylamide 淬熄光譜，可發現 PGB1 之摺疊是一個二狀態反應（two-state reaction）的摺疊過程；而以動態光散射（dynamic light scattering）觀察分子大小的變化認為 PGB1 摺疊過程應具有另一個中間態存在。藉由螢光共振能量轉移（Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET）分析各主要二級結構之間在摺疊過程中的變化，發現 PGB1 的  $\beta$ -hairpin 2 與  $\alpha$ -helix 在摺疊初期就已互相靠近，但其  $\beta$ -hairpin 1 顯然較前者晚形成；綜合以上結果顯示蛋白質 PGB1 的摺疊是一個多狀態反應（multi-state reaction）。本研究藉由 FRET 方法為 PGB1 摺疊研究開啟新的一頁。

# The Folding Mechanism of Protein GB1 by Fluorescence Resonance Energy Transfer

Student: Wei-Hsien Chung

Advisor: Chia-Ching Chang

Department of Biology Science and Technology  
National Chiao Tung University

## Abstract

“How does a protein fold?” This has been questioned for long period. Studying on a single-domain protein can be a remark to understand the protein folding mechanism in general. Recently, we folded the Protein G B1 Domain (PGB1) by an over-critical folding process, which was developed by our lab, and studied the conformational changes in each folding state. PGB1 is a small protein with 56 residues, and is an IgG-binding domain of protein G. Because PGB1 contains the basic folding elements in a short sequence of amino acid without disulfide bonds, making it an excellent model for protein folding studies. The intrinsic Trp43 fluorescence of PGB1 and the acrylamide-quenching fluorescence showed that the PGB1 folding is a two-state reaction. However, the molecular diameter changes during the folding process indicated a folding intermediate exists in the PGB1 folding process. The FRET experiment, with Trp/IAEDANS as fluorophore pairs, showed that the  $\beta$ -hairpin 2 attaches to the  $\alpha$ -helix long before the  $\beta$ -hairpin 1 formation. All the results together suggest the PGB1 folding process is a multi-state reaction. Overall, we were successful to reveal the folding process of PGB1 by FRET analysis.

## 謝誌

我不算是一個勤奮的好研究生，總是被周遭的事物給吸引了，老是被老師念說實驗進度太慢了……即使我鑽研得不夠深，花的心思也不算多，但還是覺得很充實，讓我對於分子層次的科學研究了解許多，每次都會對新技術的開發、新知識的挖掘感到嘆為觀止。在實驗室度過不算長也不算短的兩年，我終於完成了這個研究題目，也熬到可以寫謝誌的時候了！

這兩年有些苦悶的日子，要感謝和我共患難的一起繼續在交大打拚的大學室友們，朝彥、小光和 Dion，有他們在就會有樂子，因為我們幾個就是這麼的臭味相投，很多事不用說出來，用幾個眼神就可以猜的到，因為我們幾個就是這麼的默契一百；而我也很高興，能在離開交大登入國軍 online 之前，完成了我們幾個在大學一年級時候的約定，整個感覺就是讚！祝福彼此繼續幸福快樂！

也更要感謝這兩年每天都會遇到的實驗室學長和夥伴們，互相幫忙扶持，互相加油打氣，再辛苦也能撐過來。首先，我們有個老頑童鄭財木博士，他的待人處事值得我學習，還有他的幽默的生活小故事總讓我笑破肚皮；李星原醫師和曾憲儀姊這對賢伉儷，每天都在我們面前曬恩愛，好幸福喔！還有你們那些可愛的小孩，長大後一定和爸媽一樣都是很棒的人！年紀不小了還很幼稚的朱學亮學長，我無法想像實驗室如果沒有你的樣子，實驗室烤肉和火鍋一定是你揪的團，還有一起度過的「輕鬆寫意」的日子，怎麼會忘，以後有空一定會去找你喝喝茶。當然，還有和我一起努力熬日子的同學娟姊、虹瑋和昌瀚，一同分享生活、討論課業、分享樂子、尋找美食，以後還是會很懷念這些時候有這些真心的朋友。

我的指導老師張家靖教授帶領我走過這兩年，一邊指導我們的課業也一邊關心我們的生活，就是希望我們能夠在這兩年能過得充實也過得快樂舒適，還有機會讓我們能夠出國開開眼界，這實在是個難忘的經驗。另外，更感謝老師很重視我的另一項興趣，平面設計；因為如此，我的功力大大地進步了很多，人說要有壓力才會進步就是這個樣子，因為我從沒想過我會一個禮拜內就學會我本來根本就不會的網頁設計！

最後，謝謝永遠在背後支持的家人，你們是我驕傲的包袱，我要成為你們的榮耀！還有一位大功臣，熊，妳總是能適時的督促我，有妳在我覺得我更勇敢，生活上很多的事物和中心都和妳有關，我還要更努力更進步，還要一起繼續為未來努力！

其實，要謝得還有很多很多，這時總會想起陳之藩的那句話：謝天吧！

## 目錄

摘要.....	i
Abstract .....	ii
謝誌.....	iii
目錄.....	iv
表目錄.....	vii
圖目錄.....	viii
縮寫表.....	x
第一章 緒論 .....	1
1-1 研究動機與目的 .....	1
1-2 蛋白質結構.....	1
1-3 蛋白質摺疊.....	1
1-4 蛋白質摺疊方法 .....	2
1-5 蛋白質摺疊理論模型 .....	2
1-6 蛋白質 PGB1 (Protein G B1 Domain) .....	4
1-7 螢光淬熄 (Fluorescence Quenching) .....	6
1-8 四氯金酸 (Chloroauric acid, H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> ) .....	7
1-9 螢光共振能量轉移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer) .....	8
第二章 實驗策略.....	10
2-1 蛋白質策略.....	10
2-2 實驗策略.....	11
2-3 基因合成策略(含突變株).....	12
第三章 實驗原理與步驟 .....	14
3-1 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	14
3-2 IPTG 誘導蛋白質表現 (Protein Expression).....	16
3-3 聚丙烯醯胺膠體電泳 (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE) .....	17
3-4 蛋白質變性 (Protein Denaturation) .....	18

3-5	蛋白質摺疊 – 過臨界點摺疊法 (Over-critical Folding Process) .....	18
3-6	等溫滴定微量熱法 (Isothermal Titration Calorimetry).....	19
3-7	螢光光譜 (Fluorescence Spectrum) .....	20
3-8	螢光淬熄 (Fluorescence Quenching).....	22
3-9	螢光共振能量轉移 (Förster Resonance Energy Transfer).....	24
3-10	圓二色光譜 (Circular Dichroism Spectrum).....	25
3-11	動態光散射 (Dynamic Light Scattering) .....	27
第四章	實驗結果.....	28
4-1	基因序列.....	28
4-2	大量表現並純化 PGB1 蛋白質 .....	30
4-3	摺疊後 PGB1 功能測試 (ITC 實驗).....	31
4-4	蛋白質摺疊中間物之螢光光譜變化 .....	33
4-5	蛋白質摺疊中間物之圓二色光譜變化及二級結構比例分析 .....	35
4-6	蛋白質摺疊中間物之水合直徑分析結果.....	38
4-7	螢光淬熄光譜變化 .....	39
4-8	螢光共振能量轉移受體接合結果 .....	44
4-9	螢光共振能量轉移之 Förster Distance ( $R_0$ ) 變化 .....	46
4-10	螢光共振能量轉移螢光光譜.....	48
4-11	H <sub>Au</sub> Cl <sub>4</sub> 吸收光譜及淬熄螢光光譜.....	52
第五章	討論 .....	57
A.	摺疊後 PGB1 之功能測試.....	57
B.	螢光光譜變化與同步輻射圓二色光譜.....	57
C.	Hydrophobic Collapse : $\lambda_{\max}$ 變化與 Acrylamide 淬熄螢光光譜.....	58
D.	H <sub>Au</sub> Cl <sub>4</sub> 淬熄螢光光譜 .....	60
E.	蛋白質粒徑大小變化與 Trp43 包埋程度不同調.....	60
F.	螢光共振能量轉移距離分析 .....	60

G.	蛋白質 PGB1 摺疊為 multi-state reaction.....	61
H.	結語 .....	62
	參考文獻.....	63
	附錄.....	71
A.	pET200-PGB1wt 基因定序圖譜 .....	71
B.	pET200-PGB1G9C 基因定序圖譜.....	72
C.	pET200-PGB1G9C 基因定序圖譜.....	73
D.	各使用之緩衝液之成分.....	74
E.	IAEDANS 接合方法 .....	76



## 表目錄

表一：合成 PGB1 G9C 的 primer 組.....	13
表二：合成 PGB1 A23C 的 primer 組.....	13
表三：Over-critical Folding Process 各摺疊狀態緩衝液成分.....	19
表四：蛋白二級結構之圓二色光譜特徵峰.....	27
表五：各摺疊狀態的螢光波峰波長 ( $\lambda_{\max}$ )。.....	34
表六：由 Acrylamide 淬熄 PGB1 wt 的 Trp43 螢光之結果總表.....	43
表七：PGB1 G9C 和 A23C 在各摺疊狀態下的 Trp 螢光量子產率以及 Förster Distance.....	47
表八：PGB1 G9C-I 的光譜強度變化與螢光共振能量轉移效率.....	49
表九：PGB1 A23C-I 的光譜強度變化與螢光共振能量轉移效率。.....	50
表十：由 H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> 淬熄 PGB1 wt 的 Trp43 螢光之結果總表.....	56



## 圖目錄

圖一：蛋白質摺疊似一階態轉變示意圖 .....	3
圖二：(a)蛋白質 PGB1 上負責與 Fc 區域鍵結的胺基酸；(b)PGB1 與 IgG 上的一個 Fc 區域鍵結的結構圖 (PDB：1FCC) .....	4
圖三：PGB1 以卡通 (cartoon) 模式表示的二級結構圖 .....	5
圖四：acrylamide 結構式 .....	7
圖五：HAuCl <sub>4</sub> 結構式 .....	7
圖六：IAEDANS 化學結構式 .....	9
圖七：IAEDANS 固定在 Cys 上的化學反應 .....	9
圖八：蛋白質 PGB1 之胺基酸突變位置 .....	10
圖九：解釋螢光發生機制的 Jablonski 圖[39] .....	20
圖十：描述碰撞淬熄和螢光共振能量轉移的電子躍遷機制的 Jablonski 簡圖 .....	22
圖十一：靜態淬熄分子機制簡圖。 .....	23
圖十二：以 PGB1 fp 與 T7 rp 所挑選放大的 PGB1 wt 基因 .....	28
圖十三：PGB1G9C 基因 .....	29
圖十四：以 T7 fp 與 PGB1 rp 所挑選放大的 PGB1 A23C 基因 .....	29
圖十五：蛋白質 PGB1 (包括突變株) 表現效果以及從上清液純化效果 .....	30
圖十六：Over-critical Refolding Process 摺疊後的 PGB1 wt 與 IgG 的 Isothermal Titration Calorimetrics 結果。(a)每次滴定作用的功率變化。(b)每次滴定作用的莫爾熱變化。 .....	32
圖十七：10 μM PGB1wt 在 over-critical refolding process 中不同的摺疊狀態的螢光光譜變化，左上內插圖為各摺疊狀態的螢光波峰波長 ( $\lambda_{max}$ )。激發光波長為 295 nm。 .....	34
圖十八：不同摺疊態下的 PGB1 的圓二色光譜 .....	35
圖十九：PGB1 在 222 nm 波長的圓二色光譜變化 .....	36
圖二十：PGB1 wt 在 M <sub>5</sub> 狀態的同步輻射圓二色光譜 .....	36
圖二十一：PGB1wt 與各突變株的同步輻射圓二色光譜 .....	37
圖二十二：動態光散射之 GB1 wt 蛋白質分子水合直徑隨摺疊狀態變化圖 .....	38
圖二十三：PGB1 wt 在 denatured 狀態下被 Acrylamide 淬熄螢光的 Stern-Volmer 關係圖， $K_{SV}=3.37 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .....	39
圖二十四：PGB1 wt 在 M <sub>1</sub> 狀態下被 Acrylamide 淬熄螢光的 Stern-Volmer 關係圖，	

$K_{SV}=1.73\times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ .....	40
圖二十五：PGB1 wt 在 $M_2$ 狀態下被 Acrylamide 淬熄螢光的 Stern-Volmer 關係圖， $K_{SV}=1.79\times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ .....	40
圖二十六：PGB1 wt 在 $M_3$ 狀態下被 Acrylamide 淬熄螢光的 Stern-Volmer 關係圖， $K_{SV}=1.81\times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ .....	41
圖二十七：PGB1 wt 在 $M_4$ 狀態下被 Acrylamide 淬熄螢光的 Stern-Volmer 關係圖， $K_{SV}=1.48\times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ .....	41
圖二十八：PGB1 wt 在 $M_5$ 狀態下被 Acrylamide 淬熄螢光的 Stern-Volmer 關係圖， $K_{SV}=1.52\times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ .....	42
圖二十九：Acrylamide 對各摺疊狀態的 PGB1 wt 的 $k_q$ 變化圖.....	42
圖三十：IAEDANS（實線）和 PGB1（虛線）的吸收光譜.....	44
圖三十一：PGB1 G9C-I 吸收光譜.....	45
圖三十二：PGB1 A23C-I 吸收光譜.....	45
圖三十三：不同 pH 下的 IAEDANS 吸收光譜.....	47
圖三十四：PGB1 G9C-I 隨摺疊狀態改變的螢光光譜.....	49
圖三十五：PGB1 A23C-I 隨摺疊狀態改變的螢光光譜。.....	50
圖三十六： $\beta$ -hairpin 1 – $\beta$ -hairpin 2 (G9C)的距離變化.....	51
圖三十七： $\beta$ -hairpin 2 – $\alpha$ -helix (A23C)的距離變化.....	51
圖三十八：HAuCl <sub>4</sub> 在不同 buffer 下的吸收光譜.....	52
圖三十九：在 Denatured 狀態下，HAuCl <sub>4</sub> 淬熄 PGB1 的螢光光譜， $K_{SV}=4.66\times 10^3 M^{-1}$	53
圖四十：在 $M_1$ 狀態下，HAuCl <sub>4</sub> 淬熄 PGB1 的螢光光譜， $K_{SV}=4.04\times 10^3 M^{-1}$ .....	53
圖四十一：在 $M_2$ 狀態下，HAuCl <sub>4</sub> 淬熄 PGB1 的螢光光譜， $K_{SV}=2.78\times 10^3 M^{-1}$ .....	54
圖四十二：在 $M_3$ 狀態下，HAuCl <sub>4</sub> 淬熄 PGB1 的螢光光譜， $K_{SV}=3.43\times 10^3 M^{-1}$ .....	54
圖四十三：在 $M_4$ 狀態下，HAuCl <sub>4</sub> 淬熄 PGB1 的螢光光譜， $K_{SV}=6.49\times 10^3 M^{-1}$ .....	55
圖四十四：在 $M_5$ 狀態下，HAuCl <sub>4</sub> 淬熄 PGB1 的螢光光譜， $K_{SV}=5.34\times 10^3 M^{-1}$ .....	55
圖四十五：HAuCl <sub>4</sub> 對各摺疊狀態的 PGB1 wt 的 $k_q$ 變化圖.....	56
圖四十六：Acrylamide 對單 Trp 蛋白質的螢光淬熄能力 ( $k_q$ ) 與螢光波峰波長 ( $\lambda_{max}$ ) 之 關係圖.....	59

## 縮寫表

Ala	Alanine	Met	Methionine
Asn	Asparagine	Phe	Phenylalanine
Cys	Cysteine	Pro	Proline
Glu	Glutamic acid	Trp	Tryptophan
Gln	Glutamate	Tyr	Tyrosine
Gly	Glycine		
Lys	Lysine		
CD	Circular Dichroism		
FRET	Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer		
IAEDANS	5-[2-[(2-Iodo-1-oxoethyl)amino]ethylamino]-1-naphthalenesulfonic acid		
IgG	Immunoglobulin G		
ITC	Isothermal Titration Calorimetry		
$k_q$	Quenching Constant		
$\lambda_{\max}$	Emission Maximum		
PGB1	Protein G B1 Domain		
$R_0$	Förster Distance		
SRCD	Synchrotron Radiation Circular Dichroism		

# 第一章 緒論

## 1-1 研究動機與目的

蛋白質是組成生物體的一個很重要的分子，是由一系列的胺基酸以不同比例組成不同長度並各自擁有特定結構的巨分子。這些特定結構與其功能有很大的關係，但是如何從一團混亂的狀態摺疊成特定的構型仍未明瞭；以最簡單的想法，假若一個蛋白質有 100 個胺基酸，每個胺基酸之間具有兩個可以旋轉的鍵結，每個鍵結擁有二到三個自由度，則這個蛋白質會有  $4^{100} \sim 9^{100}$  個可能的構型。但實際上，蛋白質通常只有一個特定的構型，要排出如此多的可能構型勢必使蛋白質的摺疊所需時間大大增加，但實際上蛋白質僅需毫秒甚至是微秒時間便可摺疊完畢，因此人們對於蛋白質的摺疊充滿了好奇並積極地去了解其過程。故在此論文中，我們利用螢光共振能量轉移這種技術直接地去觀察蛋白質內部在摺疊過程的變化，去推敲蛋白質的摺疊過程。

## 1-2 蛋白質結構

蛋白質為多種胺基酸以不同比例所組成的生物巨分子，這些胺基酸的序列稱為一級結構，二級結構主要是由主鏈中胺基之間的氫鍵形成的結構，亦包含局部殘基 (residues) 之間的氫鍵；最常見的就是  $\alpha$ -helix、 $\beta$ -sheet 以及 turn。三級結構則是蛋白質的整體構型。四級結構則是多種蛋白質彼此以特定的方式形成的複合體[1]。

## 1-3 蛋白質摺疊

蛋白質摺疊是一種物理現象指的是一條胺基酸序列鏈如何從一個在空間中隨意排列的構型形成特定且具有功能的構型[1]。這些特定的構型通常為能量最低態，當某蛋白質摺疊至其特有且具有功能的構型時，我們稱該構型狀態為自然態。摺疊至自然態構型包含了溶劑的參與、鹽濃度的改變、溫度變化以及輔助分子等等。一般認為蛋白質的胺基酸序列決定了其自然態構型[2]。

## 1-4 蛋白質摺疊方法

### 直接稀釋法 (Direct Dilution)

顧名思義是以單一步驟的溶液置換使蛋白質快速從高變性劑環境進入無變性劑環境，從而使蛋白質摺疊，又稱作直接反應法 (off-path)。以此方法必須將蛋白質維持在非常低的濃度底下才能進行，蛋白質的摺疊效率隨著蛋白質濃度的增加而下降[3]。

### 階段性熱平衡透析法 (Stepwise Thermal Equilibrium Dialysis)

此方法是透過逐步緩慢的去掉溶液中的變性劑，一般是利用透析法，由於變性劑置換的過程十分緩慢，對蛋白質摺疊而言幾乎為靜止狀態，故又稱作準靜過程 (Quasi-static process) [4]。此法能夠大量地摺疊蛋白質至其自然態，避免造成錯誤的摺疊或聚集[4-7]。

## 1-5 蛋白質摺疊理論模型

### Framework Model

此理論由 Ptitsyn[8]所提出，蛋白質的摺疊是先形成二級結構，因此完成了整個蛋白質結構的架構 (framework) 再進而形成三級結構。不穩定的二級結構區段先形成再凝聚使整個肽鏈變的緊密，最後形成三級結構。

### Hydrophobic Collapse Model

此理論認為蛋白質摺疊最主要的驅動力是由疏水性作用造成，親水環境驅使疏水性胺基酸非特定的聚集。這項理論可以解釋為何蛋白摺疊速度如此快速。此理論的實驗證明是蛋白質 barstar 的摺疊研究[9]。

### Nucleation-condensation Growth Model

一個任意的蛋白質序列擁有的可能構型數量極為可觀，但其摺疊僅發生在一個極短的時間內變達到其自然態，故此理論利用蛋白質結構的核化 (nucleation) 來解釋如此快速的摺疊[10, 11]；如此一來，蛋白質所擁有的可能構型經過核化後

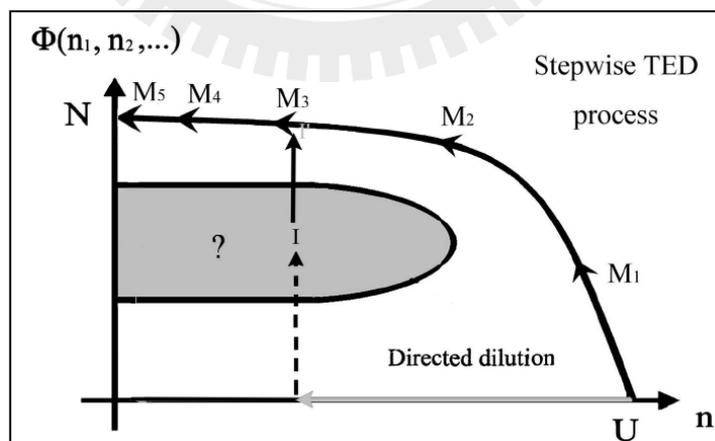
便能大量減少，因此加速了摺疊的速度。這些核化的區域是由彼此相鄰的胺基酸殘跡組成的二級或三級結構，接著核加速了四周的結構成型，而這些周邊的結構又使得核的結構更為穩定[12]。

### The Diffusion-collision Model

1976 年由 Karplus 和 Weaver[13, 14]所提出，認為蛋白質是許多微小區間 (micro-domain) 的組合，在摺疊初期各個微小區間藉由擴散碰撞尋找到最穩定的結構，接著再逐漸為調至自然態。

### First-order-like Phase Transition

此理論是本實驗室於 2002 年提出[4]，指出蛋白質在準靜態熱力學平衡的摺疊模型與 Landau 的一階相變 (first-order phase transition) 相似，系統相圖 (phase diagram) 中具有一個有限長度的相變線 (transition line)，若此一相變線存在一次微分不連續，則此稱為一階相變，通常此不連續出現在其端點，此點稱作特異點 (critical point)；此相變區隔出線兩旁的相區，此線上為兩相共存狀態，若繞過此特異點，儘管相已改變，仍不會觀察到相轉變現象。而蛋白質摺疊穿過相轉變區，則此蛋白質會發生沉澱或是玻璃態 (glassy) 的未摺疊態。故透過 stepwise thermal equilibrium dialysis 可以繞過此相轉變區，使蛋白質正確的摺疊。



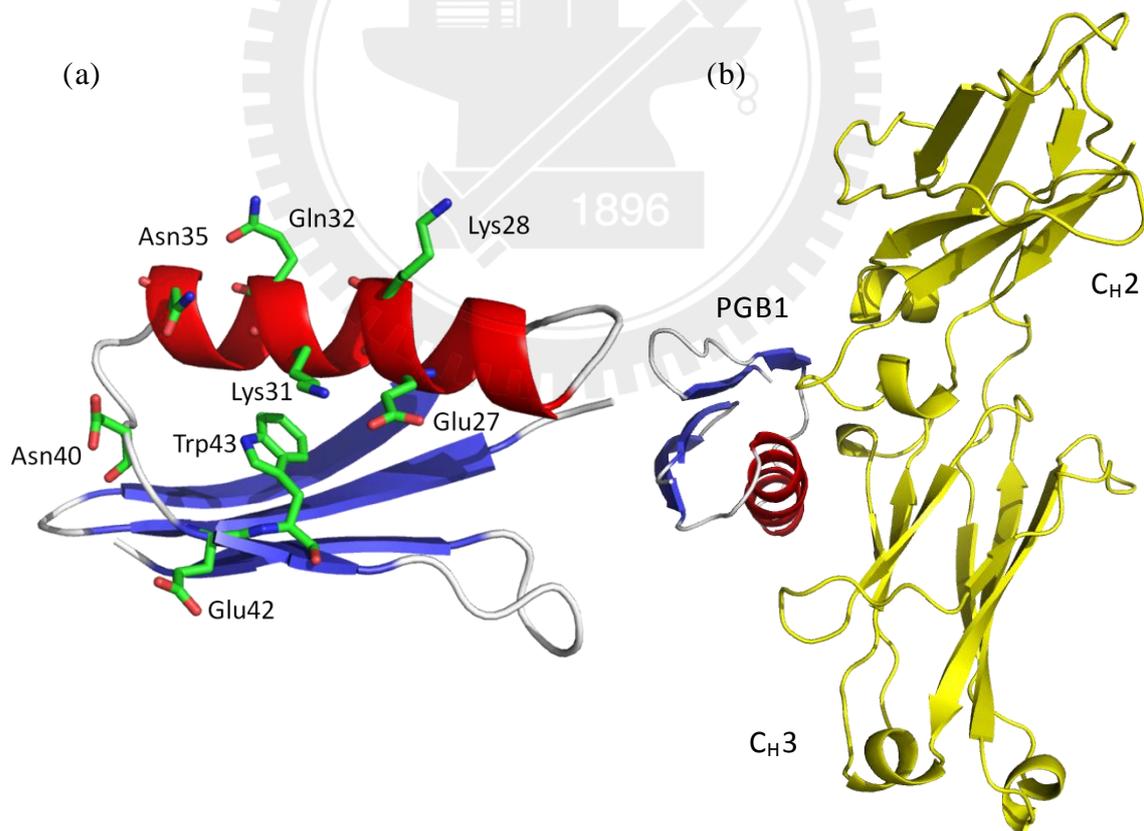
圖一：蛋白質摺疊似一階態轉變示意圖

$\Phi(n_1, n_2, \dots)$  表示蛋白質摺疊狀態 (the order parameter)；而  $n_1$ 、 $n_2$  代表著各項會影響摺疊狀態的參數像是溫度、變性劑的濃度等等[7]。

## 1-6 蛋白質 PGB1 (Protein G B1 Domain)

### PGB1 的自然功能

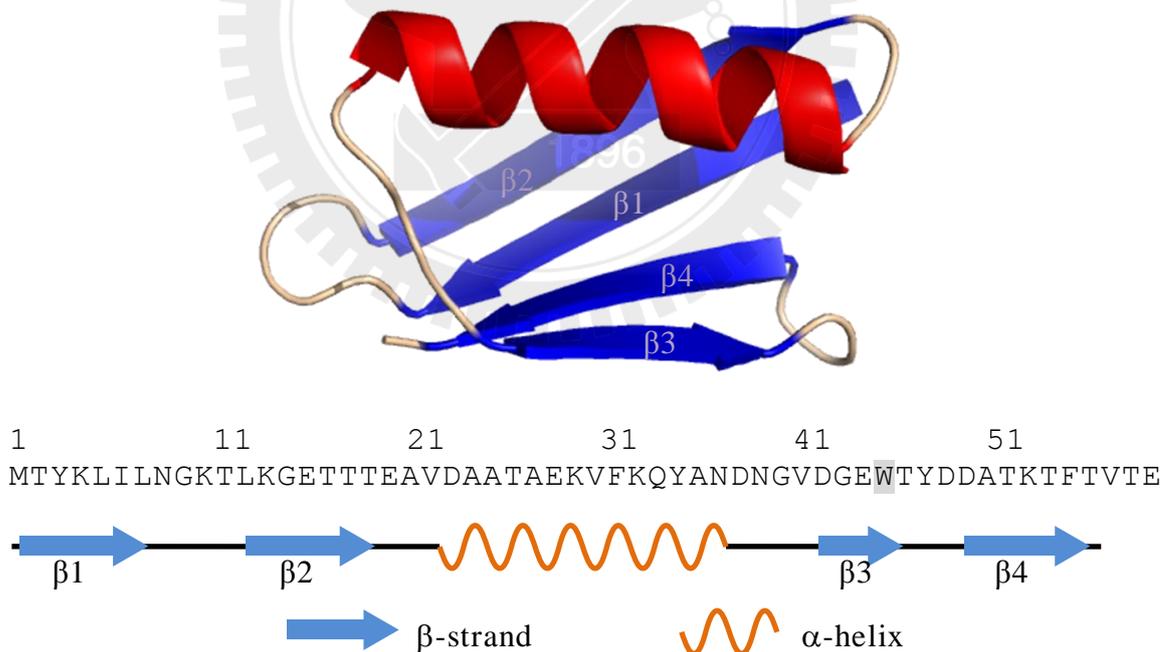
Protein G 是一個多功能區蛋白質 (multidomain protein)，存在於 Group C 和 G Streptococcus 的細胞表面，一般認為該種細菌可以藉由此蛋白質與宿主的免疫球蛋白 (Immunoglobulin G, IgG) 結合而躲避宿主身體的防禦系統[15-19]；Protein G B1 IgG-Binding Domain (PGB1) 是 Protein G 的一個功能區 (domain) 對 IgG 的 hFc 上的  $C_H^2$ - $C_H^3$  區域 (即第二與第三個 Heavy Chain Constant Domain) 有很強的親和力[20, 21]，無論是對於 monoclonal 或 polyclonal IgG 都有很好的偵測或分離特性[22, 23]；對 IgG 的 Fab 區域 (the antigen-binding region) 的親和力僅只有對 Fc 區域的 10% [22, 23]。X-ray 結晶結構顯示一個 IgG 能與兩個 PGB1 鍵結 (圖二，PDB：1FCC) [21]。



圖二：(a)蛋白質 PGB1 上負責與 Fc 區域鍵結的胺基酸；(b)PGB1 與 IgG 上的一個 Fc 區域鍵結的結構圖 (PDB：1FCC)

## PGB1 的蛋白質結構

蛋白質 PGB1 擁有 56 個胺基酸(包含 N 端的 Met)，中間序列形成一個  $\alpha$ -helix (Ala23-Asn36) 躺在由四個  $\beta$ -strand ( $\beta 1$ : Met1-Leu9;  $\beta 2$ : Lys12-Ala20;  $\beta 3$ : Glu42-Tyr45;  $\beta 4$ : Lys50-Thr55) 組成的  $\beta$ -sheet 之上;  $\beta 1$  和  $\beta 2$  以及  $\beta 3$  和  $\beta 4$  分別形成兩端的  $\beta$ -hairpin ( $\beta$ -hairpin 1: Met1-Ala20;  $\beta$ -hairpin 2: Glu42-Thr55)[24]。由於不包含半胱胺 (Cys) 或脯胺酸 (Pro) 等會形成較複雜蛋白結構的胺基酸，PGB1 非常適合做為研究蛋白質摺疊研究。又由於 PGB1 只擁有 56 胺基酸，故常被用作分子模擬的模型蛋白質。另外，將近 95% 的 GB1 胺基酸都參與了二級結構的組成，並包覆了一個緊密的疏水核心，以及超過 70% 骨幹上的 amide 和 carbonyl 都形成了氫鍵，因此擁有非常高熱穩定性[25] [26]，無論是對熱或 urea 引起的變性都有很好的抵抗性[24]，且可由熱變性中回復原有結構[26]。PGB1 的  $\beta$ -hairpin 2 被發現能夠穩定地單獨存在於水溶液中[27]，且此獨立出來的  $\beta$ -hairpin 摺疊時間約為 6  $\mu$ s [28]。



圖三：PGB1 以卡通 (cartoon) 模式表示的二級結構圖

$\alpha$ -helix 以紅色表示， $\beta$ -strand 或  $\beta$ -sheet 則以藍色表示。(PDB: 1pga)

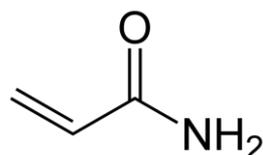
## PGB1 的摺疊

PGB1 屬於小型蛋白質，因此在早期被認為此蛋白質的摺疊會如同其他小型蛋白質一樣遵循二狀態反應 (two-state reaction) [24, 26, 29]。而此蛋白質的摺疊是否為存在中間態 (intermediate) 目前還有些爭議[30-32]。但多數的研究結果都指出蛋白質 PGB1 的摺疊最初期存在一個與自然態類似的疏水核心。氫氘交換 (hydrogen-deuterium exchange) 和核磁共振光譜 (nuclear magnetic resonance spectrum) 的研究指出 PGB1 的  $\beta$ -hairpin 2 以及  $\alpha$ -helix 的中間區段與 N 端區段在摺疊過程初期即不易進行氫氘交換且此區的胺基酸的動態 (mobility) 顯然較與其他區域來的慢，故認為此區域在摺疊初期扮演了摺疊核心的角色[33] [34]。以 continuous-flow fluorescence 測量 PGB1 上的 Trp43 螢光動態變化的研究結果推測 PGB1 的摺疊初期存在一個與自然態類似的疏水核心[35]。分子模擬也給予相同的推論，S. Kmiecik 和 A. Kolinski [36]於 2008 年以 CA-CB side (CABS) chain model [37]與蒙地卡羅模擬 (Monte Carlo simulation) 得到 PGB1 的摺疊為多狀態反應 (multi-state reaction)，摺疊由  $\alpha$ -helix 與  $\beta$ -hairpin 之間的疏水胺基酸聚集形成摺疊核心 (Phe30、Trp43、Tyr45 和 Phe52)，再由其他的疏水胺基酸繼續聚集形成二級結構，最後達到自然態。另外，David Baker [38]等人於 2000 年針對 PGB1 的  $\beta$ -sheet formation 的研究發現，在  $\beta$ -hairpin1 與  $\alpha$ -helix 上的點突變對整體結構影響最小，而在  $\beta$ 1、 $\beta$ 3 和  $\beta$ 4 的點突變對整體影響較大，故認為可能會存在由三個  $\beta$ -strand 組成的  $\beta$ -sheet 的中間態結構。

### 1-7 螢光淬熄 (Fluorescence Quenching)

螢光淬熄 (fluorescence quenching) 一般泛指任何能造成螢光強度減弱的效應，其中因分子交互作用造成的螢光淬熄包括了激發態反應 (excited-state reaction)、分子重排 (molecular rearrangements)、能量轉移 (energy transfer)、基態錯合物 (ground-state complex formation)，以及碰撞淬熄 (collisional quenching) [39]。在此研究中，我們利用碰撞淬熄 (又可稱作動態淬熄 dynamic quenching) 對於 PGB1 內部的 Trp43 的螢光淬熄能力來比較在各個摺疊狀態下 Trp43 包埋於蛋白質內部的程度。欲達到此目的，我們利用 acrylamide 這種中性的小分子淬熄劑來淬

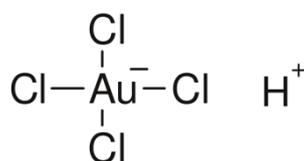
熄 Trp43 的螢光。Acrylamide 能特別針對色胺酸的螢光進行淬熄的效應[40]，此分子很小且為中性能夠藉由擴散進入蛋白質內部的疏水核心[41, 42]；故 acrylamide 的螢光淬熄能力會受到擴散速率的影響，及越接近蛋白質內部的色胺酸越不容易被淬熄，因此能夠利用此螢光淬熄能力的變化來了解色胺酸在包埋於蛋白質內部的程度。



圖四：acrylamide 結構式

#### 1-8 四氯金酸 (Chloroauric acid, $\text{HAuCl}_4$ )

化學式  $\text{HAuCl}_4$ ，一般以  $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  存在，黃色針狀結晶，易溶入水。由王水（濃鹽酸和濃硝酸按 3 比 1 混合制得）和純金反應製得。 $\text{HAuCl}_4$  的腐蝕性能極強，氧化性也極強，它能腐蝕一切金屬。但  $\text{HAuCl}_4$  不穩定，加熱即可分解成  $\text{HCl}$ ， $\text{AuCl}_3$  和  $\text{AuCl}$ 。在水中以檸檬酸根還原  $\text{HAuCl}_4$  製得奈米金粒子[43, 44]。 $\text{HAuCl}_4$  是一個平面分子，由中間一個金離子外面四個氯離子組成。 $\text{HAuCl}_4$  的吸收光譜在 217 和 287 nm 各有一個特徵峰[45]。我們實驗室發現， $\text{HAuCl}_4$  可以淬熄 Tryptophan 的螢光，但目前機制並不明瞭。



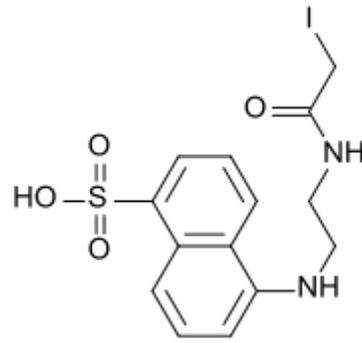
圖五： $\text{HAuCl}_4$  結構式

## 1-9 螢光共振能量轉移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

螢光共振能量轉移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 是一種發生在兩個很靠近的發光基團之間的能量轉移的機制；由德國科學家特奧多·福斯特 (Theodor Förster) 於 1946 年所發現，故此機制應正確地稱為福斯特共振能量轉移 (Förster Resonance Energy Transfer) [46]，英文縮寫與此節標題同為 FRET；Förster Resonance Energy Transfer 是較正確的英文名稱，但由於應用上大多是兩個螢光發光基團所以許多研究偏好將 FRET 作 fluorescence resonance energy transfer 解釋。

當兩個擁有彼此重疊的激發光譜與放射光譜的發光基團靠近到一定距離，其中一個發光基團(供體)受外加的光能量激發後，通過偶極-偶極作用(dipole-dipole interaction)將供體激發態能量轉移到受體。這是一種非輻射能量躍遷的過程。產生 FRET 現象後，供體螢光強度降低，而受體可以發射更強於本身的特徵螢光，也可以不發螢光(螢光淬熄)，同時也伴隨著螢光壽命的改變。另一個 FRET 最重要的特點，FRET 只能發生在很短的距離，一般約在 10 nm 內，而且 FRET 的能量轉移效率與發光基團之間的距離六次方有關，故 FRET 常被作為一種奈米等級的光學「分子尺」。因此，常應用於生物巨分子之間的交互作用[47, 48] (包括在活細胞生理條件下[49, 50])，甚至是生物巨分子內部的結構變化[51, 52]。

在此研究中，我們以色胺酸 (Trp) 和 IAEDANS 作為螢光共振能量轉移的供體和受體。色胺酸自然存在蛋白質 PGB1 上，且為該蛋白質唯一的色胺酸，位於組成  $\beta$ -hairpin 2 的  $\beta$ -strand 3 上，簡稱為 Trp43 (圖三)。IAEDANS [53] 是一個螢光發光基團，激發光波長約為 336 nm，放出的螢光波長約為 490 nm；其激發光與色胺酸的螢光光譜(325~350 nm)有很好的重疊區域。IAEDANS 上的 iodoacetyl group 能與硫醇基 (thiol) 產生反應[54]，使它的整個發光基團包括一個短碳鏈轉移到硫醇基上 (圖七)。因此，我們將 PGB1 上的特定位置胺基酸突變為 Cys，再將 IAEDANS 接合上去以觀察 PGB1 摺疊過程的內部距離變化。經由前面對蛋白質 PGB1 的摺疊研究文獻的整理，我們知道  $\beta$ -hairpin 2 與  $\alpha$ -helix 在摺疊初期便形成一個互相靠近的構型作為摺疊起始的核心，而認為  $\beta$ -hairpin 1 應在摺疊過程中是較慢形成的部分；所以我們 Cys 分別突變在 Gly9 和 Ala23 上的兩個位置 (分別為兩個突變蛋白質 PGB1 G9C 和 A23C)，並將 FRET 受體接合在點突變上以觀察  $\alpha$ -helix、 $\beta$ -hairpin 1 和  $\beta$ -hairpin 2 在摺疊過程中的變化。



圖六：IAEDANS 化學結構式

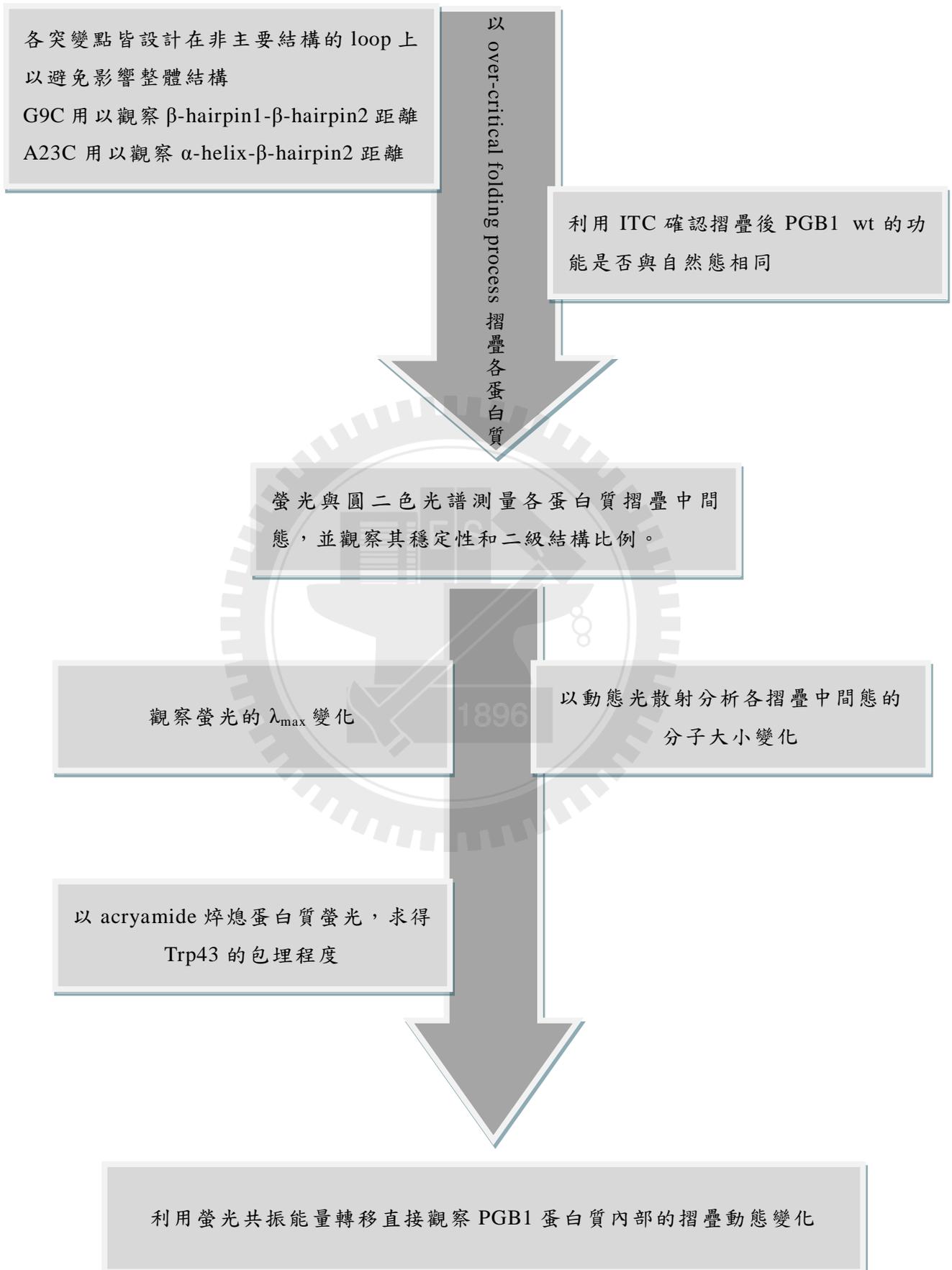


圖七：IAEDANS 固定在 Cys 上的化學反應

$\alpha$ -haloacetates 是一個很好的硫氫基反應物 (sulfhydryl-reactive compound)。此圖擷取自 ref. [54]。

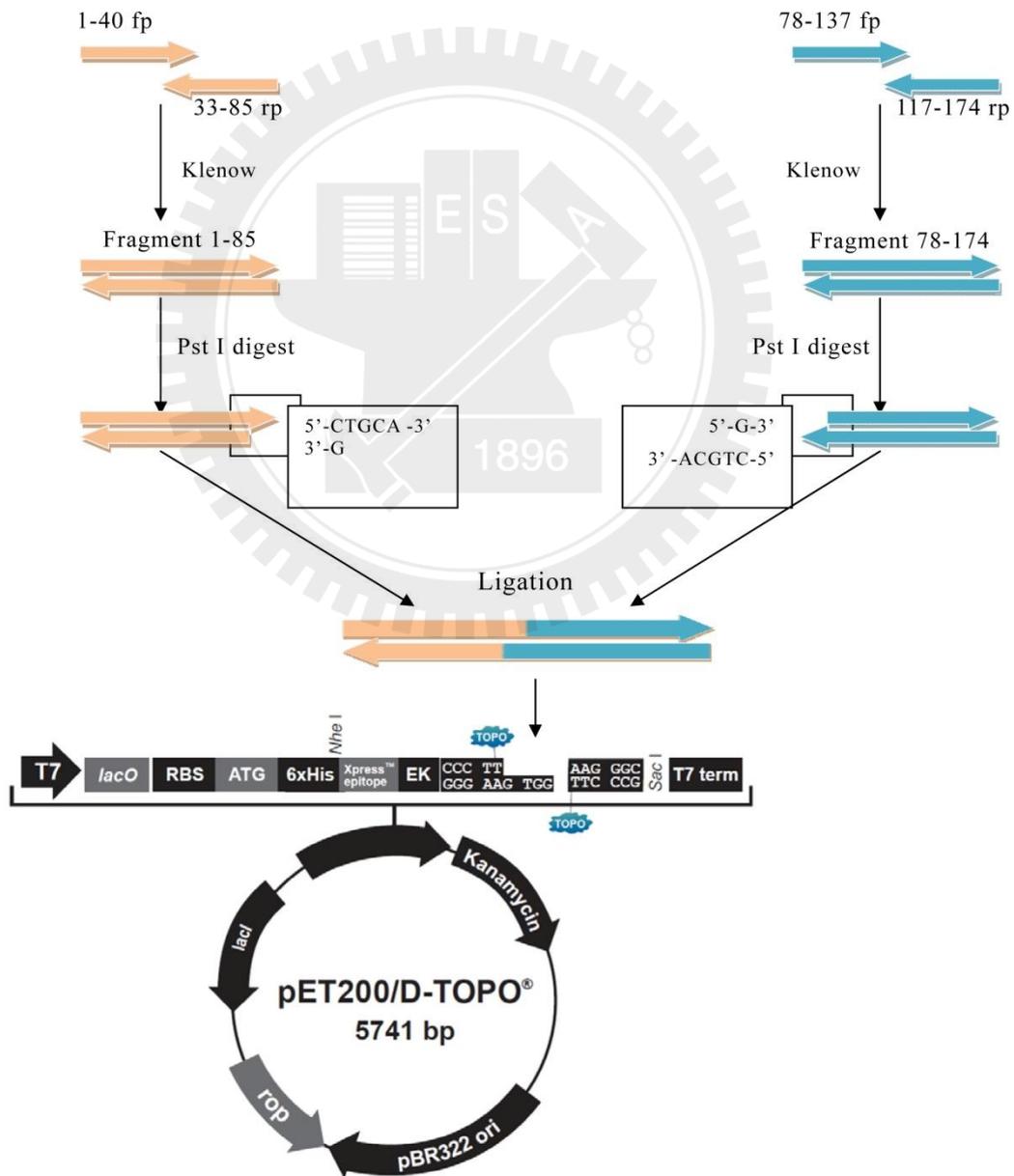


## 2-2 實驗策略



## 2-3 基因合成策略(含突變株)

由於該 DNA 序列，具有相當多的重複片段，為了避免重複的片段彼此產生錯誤的黏合，所以將整個 PGB1 基因序列分成 1-85 和 78-174 兩段有互補的部分，再各自直接合成片段的 forward primer (fp) 與 reverse primer (rp)：1-36 fp，33-85 rp 以及 78-137 fp，117-174 rp。其中各組的 fp 與 rp 有幾個鹼基能互補，再用 klenow 補齊 3'端到 5'端的 overhanging 形成一完整的雙股 DNA。兩組的雙股 DNA 再以 Pst I 切出互補的 stick end 之後進行 ligation 形成完整的 PGB1 基因，最後轉型到 pET200 載體並於 *E. coli* BL21(DE3)表現蛋白質。突變的 G9C 和 A23C 的基因序列也是直接合成再以相同手法組成完整基因。



表一：合成 PGB1 G9C 的 primer 組

	基因序列 (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)	長度
1-36 (G9C) forward primer	CATATGACGTACAAGCTCATACTCAAC <u>TGC</u> AAG <b>GACC</b>	73.6	36
33-85 reverse primer	TCTCTGCA <sup>^</sup> GTAGCACAATCAACAGCTTCAGTGGTC GTCTCCCCCTTCAG <b>GGTC</b>	74.6	53
78-137 forward primer	C <sup>^</sup> TGCAGAGAAGGTCTTCAAGCAGTACGCTAACGAC AACGGGGTGGACGGGGAG <b>GTGGACG</b>	77.0	58
117-174 reverse primer	CTACTCCGTCACTGTGAAGGTCTTAGTCGCATCGTC GTACGTCCACTCCC <b>CGTCCACC</b>	77.0	58

框起來處為突變處將被編譯為 Cys (原為 Gly); 粗體字表示為各組 primer 互補區; 畫有底線處為 Pst I 辨認區, 「^」表為切位。

表二：合成 PGB1 A23C 的 primer 組

	基因序列 (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)	長度
1-36 forward primer	CATATGACGTACAAGCTCATACTCAACGGGA <b>GACC</b>	73.6	36
33-85 (A23C) reverse primer	TCTCTGCA <sup>^</sup> GTAGC <u>TGC</u> ATCAACAGCTTCAGTGGTC GTCTCCCCCTTCAG <b>GGTC</b>	74.6	53
78-137 forward primer	C <sup>^</sup> TGCAGAGAAGGTCTTCAAGCAGTACGCTAACGAC AACGGGGTGGACGGGGAG <b>GTGGACG</b>	77.0	58
117-174 reverse primer	CTACTCCGTCACTGTGAAGGTCTTAGTCGCATCGTC GTACGTCCACTCCC <b>CGTCCACC</b>	77.0	58

框起來處為突變處將被編譯為 Cys (原為 Ala); 粗體字表示為各組 primer 互補區; 畫有底線處為 Pst I 辨認區, 「^」表為切位。

## 第三章 實驗原理與步驟

### 3-1 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

聚合酶連鎖反應是一種分子生物技術，係在生物體外以 DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 增加特定目標的 DNA 片段數量。此技術僅能夠將非常微量的 DNA 片段快速地複製增加至所需的數量，故被廣泛地應用於各種生物相關領域，例如遺傳疾病檢查、物種鑑定、親子鑑定等等。PCR 技術是由美國科學家 Kary Mullis 於 1983 發明[55]，並在七年後以此發明獲得諾貝爾化學獎。此技術發展至今已有許多的變體，例如遞減聚合酶連鎖反應 (Touchdown PCR)、反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription PCR)、熱啟動聚合酶連鎖反應 (Hot Start PCR)、即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 等等。

PCR 技術的基本原理是利用一種存在於水生嗜熱菌 (*Thermus aquaticus*) 的 DNA 聚合酶 (Taq polymerase) 在高溫環境下 ( $\sim 96^{\circ}\text{C}$ ) 將高熱解旋成單股的 DNA 片段，藉由單股的 DNA 引子 (primer) 的標定而將特定的 DNA 片段複製增加[56]。這基本原理可簡單地分成三個步驟：(1) 變性反應 (Denaturation)，以高溫分離 DNA 的雙股形成單股的模板；(2) 緩冷配對反應 (Annealing)，溫度降低至略低於引子熔點溫度 (指 50% 的兩互補單股 DNA 相結合的最高溫度) 而使引子與 DNA 模板配對；(3) 引子延展反應 (Elongation/Extension)：引子由 5' 端往 3' 端延長形成新的雙股 DNA。此三步驟為一循環，一般 PCR 反應由 20~30 個循環完成，當完成 20 個循環，目標 DNA 將數量便達到原有的 2 的二十次方倍。

另外，引子的設計好壞會影響整個 PCR 反應的效果。一般 PCR 反應會由兩段引子標定出欲複製增加的 DNA 片段，分別為前置引子 (Forward primer) 和反置引子 (Reverse primer)。引子係由人工合成的短片段 DNA，通常為 18~25 個鹼基。引子太短便可能造成有多個能與模板 DNA 結合的位置而形成非特異性複製；若太長會導致過高的熔點而使酵素活性降低。以下列出一般引子設計的原則：

- (1) 引子長度通常為 18~22 個鹼基。
- (2) GC 比例為 40%~60%。
- (3) 兩個引子的熔點相差不超過  $5^{\circ}\text{C}$ 。
- (4) 兩引子不可互補以免自相黏合。

(5) 注意模板 DNA 中所有可能與引子互補的區域並避開這些區域。

(6) 3'端的互補尤其重要。

#### 實驗步驟：

此實驗為利用 2-3 基因合成策略所提到的兩組 primer 合成兩個 PGB1 基因片段，在近一步接合形成完整的 PGB1 基因 DNA，最後接入 pET 200/D-TOPO vector。

成分	最後濃度
dNTP	10 $\mu$ M
10 $\mu$ M 1-36 fp/78-117 fp	0.2 $\mu$ M
10 $\mu$ M 33-85 rp/117-174 rp	0.2 $\mu$ M
10X reaction buffer	1X
Klenow	1 (0.5 unit)
Total Volume	30 $\mu$ l

10X reaction buffer : 500 mM Tris-HCl (pH 7.2), 100 mM MgSO<sub>4</sub> and 1 mM DTT.

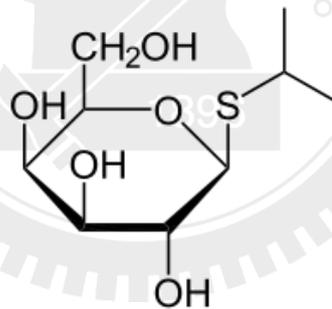
如上表標示成分及其比例加入混合。兩組 primer 先於先加熱至 94°C、2min。再降溫至室溫 (25°C) 30 分鐘，再加入 Klenow (invitrogen, Carlsbad, CA) 於溫度 30°C 下反應 15 min。反應完後，加熱至 75°C 約 10 分鐘，執行電泳並做 gel extract (Biokit, Taiwan)。加入相同於樣品體積的 binding buffer 充分混勻，加熱至 60°C，10 分鐘。將 kit 中的 column 與收集管結合，接著在將混勻溶液加入 column，並離心一分鐘，接著加入 washing buffer (含酒精) 600  $\mu$ l，並以離心機 (Beckman Coulter Avanti® J-E Centrifuge, Fullerton, CA) 14,000g 離心一分鐘。離心完後，捨去收集管內的液體，再將新的 washing buffer 加入 column，並再以 14,000g 離心一分鐘。將收集管內的液體移除，並再次離心 14,000g 離心三分鐘以去除剩餘之酒精。最後，將 column 置入新的 eppendorf tube，並加入適量無菌水，離心沉澱，即可獲得純化後產物。

純化後的基因片段以 Pst I 酵素於 37°C 下反應 overnight 後，反應完後加熱至

60°C 以去除酵素活性，並進行 lean up 純化已被 digest 的基因片段。加入 ligase 將兩段基因片段接合，於 4°C 下反應 overnight。最後，將接合產物 (ligation product) 與 pET 200/D-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) 於室溫下反應混合 30 min。

### 3-2 IPTG 誘導蛋白質表現 (Protein Expression)

Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactoside (IPTG) 誘導的蛋白質表現機制是利用 IPTG 這種乳糖相似物誘導乳糖操縱子 (*lac operon*)，啟動表現下游的 T7 RNA 聚合酶 (T7 RNA polymerase)，接著 T7 RNA 聚合酶活化載體上的 T7 促進子 (T7 promoter)，使得目標蛋白質被大量表現。由於 T7 RNA 聚合酶的活性遠高於 *E. coli* 原有的 RNA 聚合酶，*E. coli* 自身基因轉錄圖敵不過 T7 表現系統而使整個細胞的資源被用在表現目標蛋白質上。以上由 *lac operon* 調控 T7 表現系統機制的 *E. coli*，是與噬菌體 DE3 熔源化的菌株 (例如 *E. coli* BL21(DE3))，帶有 *lacI* 抑制基因和位於 *lacUV5* 啟動子下的 T7 RNA 聚合酶基因。另外，IPTG 雖能被 *E. coli* 所利用，但並不會被代謝，所以可以使得蛋白質穩定地表現。



Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactoside (IPTG)

#### 實驗步驟：

將序列確定的菌株放入 1ml LB 培養液 (以下 LB 培養液皆含有 0.02% Kanamycin) 中培養四小時。待四小時培養後，將菌液分為兩管，並各加入新鮮的 2.5 ml LB 培養液，其中一管加入 IPTG 至總濃度為 1 mM，兩管皆於 37°C 隔夜培養 (12~16 小時)。隔夜培養後，抽取 1ml LB 菌液，以 12,000 g 離心一分鐘分離細菌。分離後的細菌以 100  $\mu$ l sample buffer (4% SDS, 0.2% Bromophenol Blue, 20% Glycerol, 200 mM DTT, 100 mM Tris-HCl, pH6.8) 回溶，再以超音波震盪器 (UP200S, Hielscher, German) 以功率 70%，單次震盪 0.5 秒，震盪細菌一分

鐘共五個週期，使細菌破碎。再將破碎的細菌以 15% SDS-PAGE 確認蛋白質的表現。

將小量表現成功的菌株取出 60  $\mu$ l 加入 3ml LB 培養液隔夜培養活化。隔夜培養後，將飽和菌液取出 60  $\mu$ l 再次加入 3ml LB 培養液培養四小時，此為第二次活化。第二次活化後，取出 300  $\mu$ l 菌液加入 300 ml LB 培養液，先培養四小時後再加入 1 mM IPTG 隔夜培養。隔夜培養後，將菌液以 9,000 g 離心 20 分鐘以沉澱細菌，移除 LB 培養液後加入 15 ml His-tag binding buffer (20 mM Imidazole, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.2) 回溶細菌。利用細胞破碎機 (One Shot Model, Constant Systems Ltd, UK) 將細菌打碎，再以 12,000 g 離心 30 分鐘分離目標蛋白質；此蛋白質 PGB1 為水溶性，故分離後是存在於上清液中。取出上清液再以 His-tag Column 純化。

### 3-3 聚丙烯醯胺膠體電泳 (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE)

電泳 (Electrophoresis) 係指帶電粒子在電場作用下，向著該粒子自身相反電性方向的電極移動的現象；由於各粒子的帶電量可能不同而使遷移速率不同，故能使不同的粒子分離。此現象早於 1808 年就被發現，但一直到 1937 年才第一次被當作粒子分離方法並且該科學家 (瑞典科學家 Tiselius) 以此貢獻在 1948 年獲得諾貝爾獎。但由於該電泳所使用的介質分辨率不佳且整體儀器造價昂貴，促使在五零年代開始有許多科學家尋找最佳的電泳介質。直到六零年代 Davis 等科學家發展出以聚丙烯醯胺 (Polyacrylamide) 作為電泳介質的電泳儀器[57]，使得此技術變得更簡單方便，並擁有更佳的分辨率。

聚丙烯醯胺膠體電泳是一種不連續膠體的蛋白質膠體電泳 (Gel electrophoresis)，由焦集膠體 (Stacking gel) 和分離膠體 (Separating gel) 所組成。兩膠體皆由聚丙烯醯胺 (Polyacrylamide) 所組成，但兩者的膠體孔徑不同、pH 值不同、緩衝液離子成分亦不同。這三種不同使得蛋白質混合液在焦集膠體中進入分離膠體前壓縮成一條狹窄的區帶，而進入分離膠體後，蛋白質隨著空間中的電場遷移，因各個蛋白質所帶淨電荷不相同造成不同的遷移速率，又因分離膠體的孔徑很小造成不同分子大小和形狀的蛋白質表現出不同的遷移速率。到了六零年代，科學家發現在聚丙烯醯胺膠體電泳加入一種名為十二烷基硫酸鈉

(Sodium dodecyl sulfate, SDS) 的帶電清潔劑作為蛋白質變性劑能夠使得蛋白質變性而去除蛋白質本身形狀造成的遷移率差異，而且與 SDS 的結合使蛋白質表面均勻帶電進而使蛋白質電泳的遷移速率只與其本身的分子量大小有關[58] [59]。使用 SDS 的聚丙烯醯胺膠體電泳常簡稱做 SDS-PAGE。

### 3-4 蛋白質變性 (Protein Denaturation)

蛋白質變性係蛋白質的結構受到破壞或影響使之與原來的構型不相同，這可能造成許多的影響，例如聚集沉澱或失去其生理活性。蛋白質的變性可以發生在蛋白質的各級結構：在四級結構的變性，蛋白質的次級單元分離或是在空間排列發生錯亂；在三級結構的變性，主要影響的是各個胺基酸殘基的共價鍵（例如雙硫鍵）、極性胺基酸彼此或與溶劑之間的偶極耦合交互作用（例如 Salt bridge），以及非極性胺基酸之間的凡德瓦力和疏水性作用（Hydrophobic interaction）；在二級結構的變性，蛋白質失去原有的胺基酸排列的模式包括  $\alpha$ -helix、 $\beta$ -sheet、 $\beta$ -turn 等。不過，蛋白質變性並不包括其一級結構[60]。

穩定蛋白質結構最主要的作用力是疏水性作用、氫鍵（Hydrogen bonds）和離子作用（Ionic interaction），故大多數的變性因素是影響這些作用力而變性蛋白質，包括溫度、pH（酸鹼）、有機溶劑、變性劑、還原劑、機械力等等。變性劑（Denaturant）主要是破壞蛋白質內部的疏水性作用和氫鍵，常用的變性劑如鹽酸胍（Guanidine hydrochloride）和尿素（Urea）。而還原劑是將雙硫鍵還原為兩個硫氫基，這可能造成蛋白質三級結構崩毀，常見的還原劑有 1,4-二硫蘇糖醇（Dithiothreitol, DTT）和 2-巰基乙醇（ $\beta$ -mercaptoethanol）。

### 3-5 蛋白質摺疊 - 過臨界點摺疊法 (Over-critical Folding Process)

此蛋白質摺疊方法以階段性熱平衡透析法為基礎，以透析法使變性的蛋白質在一個緩慢變化的環境逐步摺疊成自然態，此透析過程稱作準靜過程（quasi-static process）[4, 7]。我們認為在蛋白質摺疊反應相圖中包含了一個相轉變線（phase transition line）或稱為相轉變區間（phase transition region），而且此相轉變線有一

臨界範圍，因此設計出一個繞過態轉變線的蛋白質摺疊方法，稱作過臨界點摺疊法 (over-critical folding process) [5, 6]。這樣的摺疊方法主要是藉由 urea 和 pH 值的逐步改變使蛋白質摺疊，並利用了 mannitol 作為蛋白質摺疊時的化學輔佐子 (chemical chaperone) [5, 61] 以保護並穩定蛋白質的摺疊中間態。

#### 實驗步驟：

將蛋白質 PGB1 以高鹼性及高 urea 濃度的 denature buffer (8 M urea, 0.1% mannitol, 10 mM Tris, pH 12) 變性後，利用 MWCO 為 3.5 kDa 的透析膜逐步透析至 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>、M<sub>4</sub> 和 M<sub>5</sub> 等五個摺疊階段緩衝液 (各成分如表三所示)，每次皆以 2,500 ml 摺疊緩衝液透析並至少二次。透析膜須以 0.1 M EDTA 水溶液於高溫 (> 80°C) 浸泡約五分鐘以除去透析膜上殘存的金屬離子，再以二次去離子水清洗後方可使用。

因為需要觀察各摺疊中間態的蛋白質，故在每一階段透析完成後，便從透析膜中取出適量的蛋白質溶液並以吸收光譜測量濃度，其餘的蛋白質溶液收回透析膜中繼續摺疊直至 M<sub>5</sub> 狀態。

表三：Over-critical Folding Process 各摺疊狀態緩衝液成分

Folding State	Urea M	Mannitol %	Tris-HCl mM	pH
Denature	8	0.1	10	12
M <sub>1</sub>	2	0.1	10	11.5
M <sub>2</sub>	1	0.1	10	11.5
M <sub>3</sub>	0	0.1	10	11.5
M <sub>4</sub>	0	0.1	10	8.8
M <sub>5</sub>	0	0	10	8.8

### 3-6 等溫滴定微量熱法 (Isothermal Titration Calorimetry)

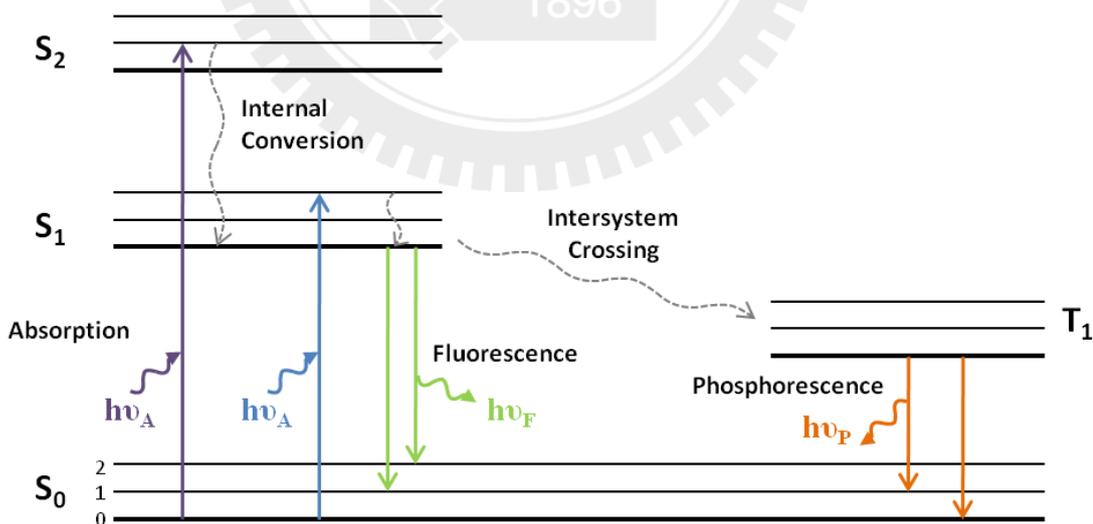
等溫滴定微量熱法是一種物理技術用以偵測溶液中的反應熱動力參數變化，包括結合常數 (associate constant,  $K_a$ )、熱焓變化 (enthalpy change,  $\Delta H$ ) 和結合比例 ( $n$ )，常被應用於小分子與生物大分子 (蛋白質或 DNA) 之間的交互作用

研究。等溫滴定量熱儀的基本架構是以兩個相同的高效率熱傳導材料的反應槽 (ampoule) 放置於絕熱套內，一為樣品槽，另一為參考槽。高敏感的熱電偶 (thermopile) 電路將偵測兩反應槽的熱量差。參考槽會持續地施加穩定的熱功率，當另一個研究樣品已精確的量滴定入樣品槽產生熱量變化(反應熱或是稀釋熱)，樣品槽的加熱器將對此產生的熱量施以一回饋熱功率，使樣品槽與參考槽再次達到熱平衡。實驗的測量將持續地偵測熱量對時間的變化。

### 實驗步驟：

將蛋白質樣品以孔徑  $0.22\ \mu\text{m}$  的濾膜過濾， $0.2\ \text{ml}$  濃度  $237\ \mu\text{M}$  的 PGB1 放置於 syringe， $2.8\ \text{ml}$  濃度  $6\ \mu\text{M}$  的 IgG 放置於 ampoule，兩者緩衝液皆為 phosphate buffer saline (pH 7.4)；攪拌器轉速設定在  $60\ \text{rpm}$ ，功率放大器 (amplifier) 設定於  $30\ \mu\text{W}$ ；實驗將 syringe 裡的樣品分為 20 滴注入 ampoule 中，每次間隔十五分鐘，測量每次樣品注入時的熱量變化。將每次熱量變化對當下樣品比例作圖可以得出 PGB1 與 IgG 的結合比例以及反應常數。

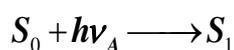
### 3-7 螢光光譜 (Fluorescence Spectrum)



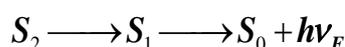
圖九：解釋螢光發生機制的 Jablonski 圖[39]

絕大部分的穩定有機化合物均屬單重態 (singlet) 分子，意即該類分子為基態時電子均成對 (故其總自旋量子數為零)，而自旋重態數 (spin multiplicity) 為 1。(  $multiplicity = 2n + 1$ ,  $n$  為未配對電子數) 一般的螢光分子都屬於單重態 (singlet)，

S)，因此當分子吸收 UV-Vis 光區的電磁波時，電子會在約  $10^{-15}$  秒從單重態基態  $S_0$  (ground State) 躍遷至具有相同自旋重態數的激發態 ( $S_1$ 、 $S_2$ 、 $\dots$ )，例：



此式子中， $h$  為普朗克常數， $\nu_A$  為吸收的光子頻率。若激發的電子躍遷到更高的激發態如  $S_2$ ，在  $10^{-14} \sim 10^{-11}$  秒的時間會經由內轉換 (internal conversion) 以無輻射躍遷至能量稍低的同自旋多重度的第一個激發態 ( $S_1$ ) 的最低振動態，接著很快地以發光的方式釋放能量 ( $h\nu_F$ ) 回到基態  $S_0$ ，如下表示：



此時所發出的光便是一般所謂的螢光，該螢光頻率為  $\nu_F$ 。一般來說，用來激發螢光分子的能量會大於釋放出的螢光能量，因此  $\nu_F$  會小於  $\nu_A$ ，及螢光波長會大於激發波長。螢光壽命 (lifetime：螢光分子維持在激發態的時間。) 大約在  $10^{-9} \sim 10^{-7}$  秒。通常電子從  $S_2$  躍遷至  $S_1$  的內轉換過程非常快 ( $10^{-14} \sim 10^{-11}$  秒)，從不同的振動態階將能量以熱方式釋放而到達  $S_1$  的振動基態，此過程稱作內轉換或振動弛緩 (vibrational relaxation)，故大多數的螢光來自於  $S_1$ 。

另外，激發的電子可以從激發單重態  $S_1$  經由系間跨越 (intersystem crossing) 無輻射躍遷至能量較低但具有不同自旋多重度的激發態 (一般多為自旋三重態)，再以同於單重態的模式由內轉換無輻射躍遷至自旋多重態的振動基態，接著又以光的形式將能量釋放而回到基態  $S_0$ ，此時所發出的光稱為磷光 (phosphorescence)。不過，從自旋多重態的振動基態回到  $S_0$  的躍遷過程受到躍遷選擇規則限制，因此磷光的壽命 (lifetime) 多半很長，而其量子產率 (quantum yield：吸收單位數量光子後，能發出多少的光子；意即發光效率) 遠小於螢光。綜合以上的電子躍遷發光機制可以用 Jablonski 圖來解釋 (圖九)。由於很多的生物分子在適當的激發光下都能夠發出螢光，故在生物科技領域中螢光的應用非常廣泛。

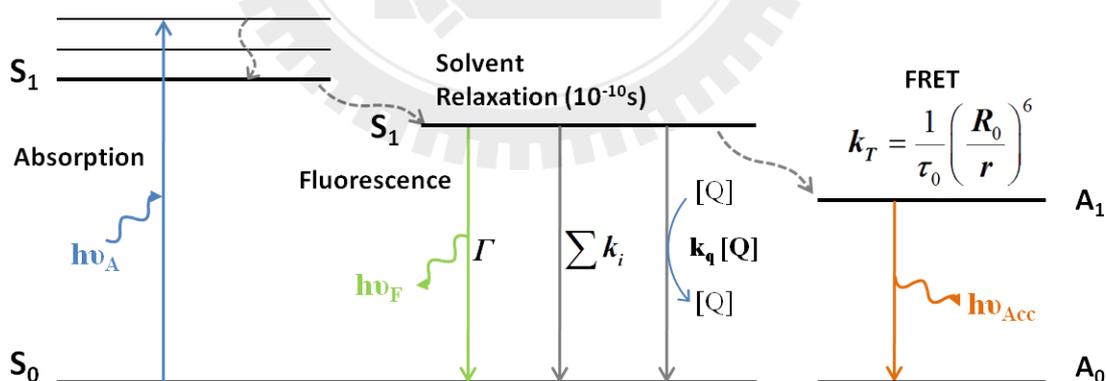
### 實驗步驟：

將蛋白質濃度調整至  $10 \mu\text{M}$ ，總體積為  $1 \text{ ml}$  放置於  $1 \text{ cm}$  厚的螢光比色管。設定實驗條件為：excitation,  $295 \text{ nm}$ ；emission,  $300 \sim 500 \text{ nm}$ ；PMT voltage,  $700 \text{ V}$ ；Scan rate,  $240 \text{ nm/min}$ ；excitation and emission slit,  $5 \text{ nm}$ 。實驗所用的螢光光譜儀為 F-7000 (Hitachi, Tokyo, Japan)。

### 3-8 螢光淬熄 (Fluorescence Quenching)

螢光淬熄意指任何造成樣品螢光強度減弱的效應，包括激發態反應 (excited-state reaction)、分子重排 (molecular rearrangements)、能量轉移 (energy transfer)、形成基態錯合物 (ground-state complex formation)，以及碰撞淬熄 (collisional quenching) [39]。在此部分，我們主要解釋碰撞淬熄 (又可稱作動態淬熄 dynamic quenching) 和靜態淬熄 (static quenching)，而能量轉移將在下一章節介紹。無論是碰撞淬熄或是靜態淬熄，都需要淬熄劑與螢光發光基團接觸，故兩者的接觸程度將決定螢光淬熄的程度；藉由此一特性便能夠以螢光淬熄的程度判斷發光基團曝露於溶劑的程度。

碰撞淬熄係指在螢光淬熄過程中，淬熄劑在溶液中擴散接觸處於激發態的發光基團並使之以非輻射方式退回基態，兩者並不形成光化學反應。重原子的碰撞淬熄劑，例如碘 (iodide) 和溴離子 (bromide)，增加了系間跨越 (intersystem crossing) 可能性而使得螢光被淬熄 [62]。另外，其他的螢光淬熄劑，例如丙烯醯胺 (acrylamide) [42]、鉍離子 ( $\text{Cs}^+$ ) [63]、咪唑 (imidazole) [64]，可能是接受了螢光發光基團的電子而使螢光淬熄。碰撞淬熄的電子躍遷機制可以 Jablonski 圖表示 (圖十)。

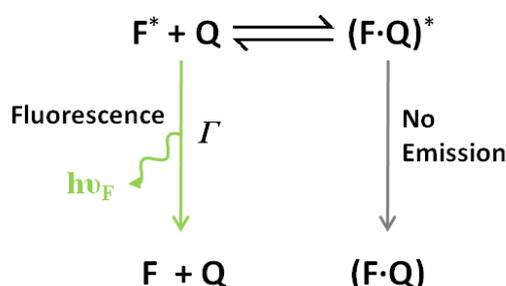


圖十：描述碰撞淬熄和螢光共振能量轉移的電子躍遷機制的 Jablonski 簡圖

$\sum k_i$  表示為除了碰撞螢光淬熄和能量轉移之外的非輻射退躍遷過程。

靜態淬熄係指在淬熄劑與螢光發光基團接觸形成基態錯合物，使其吸收光後立即回到基態而不發出螢光 (圖十一)。此淬熄過程使得部分的螢光發光基團無法發光而造成螢光強度的減弱，因此螢光發光基團的壽命 (lifetime) 將不會改變，

這是靜態淬熄與碰撞淬熄最大的不同點之一。另外，改變實驗溫度亦可以區分兩者：溫度升高會使得碰撞淬熄劑的擴散係數（diffusion constant）增加而使淬熄作用增強，反之，靜態淬熄劑與發光基團形成的基態錯合物因升溫而解離進而使淬熄作用減弱。



圖十一：靜態淬熄分子機制簡圖。

實驗上，淬熄劑的淬熄作用強度可以用 Stern-Volmer equation 表示：

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + \tau_0 k_q [Q]$$

方程式中， $F_0$  表示沒有淬熄劑存在時的螢光強度； $F$  表為淬熄劑存在時的螢光強度； $[Q]$  為所加的淬熄劑濃度； $K_{SV}$  則為 Stern-Volmer 淬熄常數； $\tau_0$  表為螢光物初始的螢光壽命； $k_q$  則為實際的螢光淬熄能力。實驗數據以  $F_0/F$  對  $[Q]$  作圖，斜率便是  $K_{SV}$ 。碰撞淬熄與靜態淬熄皆可以形成線性的  $F_0/F$  vs.  $[Q]$  關係圖；得出  $K_{SV}$  後，再除以該螢光物質最初始的螢光壽命，便獲得淬熄劑在當下環境對該螢光物質的淬熄能力。

#### 實驗步驟：

將蛋白質濃度調整至 10  $\mu$ M，總體積為 1 ml 放置於 1 cm 厚的螢光比色管。設定實驗條件為：excitation, 295 nm; emission, 300~500 nm; PMT voltage, 700 V; Scan rate, 240 nm/min; excitation and emission slit, 5 nm。實驗所用的螢光光譜儀為 F-7000, Hitachi, Tokyo。準備 5 M acrylamide 作為原液，每次取 2  $\mu$ l 加入蛋白質溶液觀察螢光強度，重複數次。以  $F/F_0$  (淬熄的螢光強度除以原螢光強度) 對淬熄劑濃度作圖，在 Stern-Volmer 方程式獲得 acrylamide 對 PGB1 的 Stern-Volmer 常數  $K_{SV}$ 。而 acrylamide 對 PGB1 的螢光淬熄能力  $k_q$  再由以下關係式獲得：

$$K_{SV} = \tau_0 \cdot k_q$$

方程式中， $\tau_0$  為蛋白質的螢光量子產率。

### 3-9 螢光共振能量轉移 (Förster Resonance Energy Transfer)

螢光共振能量轉移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)，是描述兩個發光基團之間能量轉移的機制；由德國科學家特奧多·福斯特 (Theodor Förster) 於 1946 年所發現[46]。螢光共振能量轉移是螢光淬熄機制的一種，其淬熄效果 (能量轉移效率) 與供體和受體兩者之間的距離有以下的關係式：

$$E = 1 - F_{DA} / F_D = R_0^6 / (r^6 + R_0^6)$$

$E$  表示為能量轉移效率， $F_{DA}$  與  $F_D$  各表示螢光能量供體有與沒有伴隨下的螢光強度， $R_0$  和  $r$  各表示為 Förster distance 以及供體與受體之間的距離。 $R_0$  可由以下關係式得到：

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-5} (Q_D \kappa^2 n^{-4} J(\lambda)) \quad (\text{\AA}^6)$$

$R_0$  主要受到螢光供體的螢光量子產率 ( $Q_D$ )、折射率 ( $n$ ) 和光譜重合區域 ( $J(\lambda)$ ) 所影響。光譜重合區域指的是螢光能量供體的標準化發射光譜 (normalized fluorescence spectrum) 與螢光能量受體以消光係數 (extinction coefficient) 表示的吸收光譜，兩者的重合面積： $J(\lambda) = \int f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 \cdot d\lambda$ 。

因為螢光共振能量轉移與距離有很大的關係且該距離通常為 1~10 nm，故常被用在觀察生物分子的動態研究上，例如蛋白質與蛋白質之間的交互作用[47, 65, 66]，蛋白質與 DNA 之間的交互作用[67-69]，DNA 或 RNA 構型的改變[70, 71]，以及蛋白質內部的構型變化[72-74]。

#### 實驗步驟一：測量 IAEDANS 接合率

將 PGB1 G9C 或 A23C 溶解在 Tris-HCl buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.2)。加入與蛋白質相同濃度的 DTT 使蛋白質的雙硫鍵還原，反應在室溫約九十分鐘。待雙硫鍵還原反應結束後，緩慢滴入 IAEDANS 到攪拌中的蛋白質溶液中，IAEDANS 的最後濃度為蛋白質的五倍。使 IAEDANS 與蛋白質接合反應約兩個小時在室溫並且需要避光。反應後，以大量而頻繁的透析將蛋白質與 IAEDANS 混合液置換到 Tris-HCl buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.2) 並去除多餘的 IAEDANS。最後，將透析後的溶液測量 UV 吸收光譜並以下列公式計算接合比率：

$$\begin{cases} A_{280} = 10810 \times [P] + 1448 \times [F] \\ A_{336} = 107 \times [P] + 5700 \times [F] \end{cases}$$

$A_{280}$  和  $A_{336}$  為 280 和 336 nm 的吸收值；[P]和[F]表示為蛋白質和 IAEDANS 在溶液中的濃度。此公式是 PGB1 和 IAEDANS 的在 280 和 336 nm 的消光係數組合而成。PGB1 在 280 nm 的消光係數為  $10,810 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，由 Gill 和 von Hippel [75] 的方法所預估得知；在 336 nm 的消光係數是依比例推算得知。IAEDANS[53]在 336 nm 的消光係數為  $5,700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，280 nm 的消光係數為依比例得知。代入 280 和 336 nm 的吸收值便可以以二元一次聯立方程式解出 PGB1 和 IAEDANS 的濃度，進而得知兩者接合的比例。

### 實驗步驟二：FRET 距離計算

將 PGB1 G9C-IAEDANS 與 A23C-IAEDANS 濃度調整為  $10 \mu\text{M}$ ，以前述螢光光譜測量相同的條件測量其螢光。此螢光強度為  $F_{DA}$ ，將同樣濃度的 PGB1 G9C 與 A23C 的螢光強度為  $F_D$ ，計算各突變蛋白質在各突變狀態下的螢光共振能量轉移效率  $E$ 。能量轉移效率  $E$  與供體和受體兩者之間的距離  $r$  有以下的關係式：

$$E = 1 - F_{DA} / F_D = R_0^6 / (r^6 + R_0^6)$$

$E$  表示為能量轉移效率， $F_{DA}$  與  $F_D$  各表示螢光能量供體有與沒有伴隨下的螢光強度， $R_0$  各表示為 Förster distance。 $R_0$  可由以下關係式得到：

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-5} (Q_D \kappa^2 n^{-4} J(\lambda)) \quad (\text{\AA}^6)$$

$Q_D$  表示供體的螢光量子產率， $n$  為折射率和  $J(\lambda)$  為光譜重合區域所影響。光譜重合區域指的是螢光能量供體的標準化發射光譜 (normalized fluorescence spectrum) 與螢光能量受體以消光係數 (extinction coefficient) 表示的吸收光譜，

兩者的重合面積： $J = \int f_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 \cdot d\lambda$ 。

### 3-10 圓二色光譜 (Circular Dichroism Spectrum)

當一束平面偏振光通過具有手性 (chiral) 的介質時，因該手性介質對於左右旋圓偏振光的吸光率不相同，產生一個吸光率差  $\Delta A(\lambda)$ ，此吸光率差遵循 Beer

Lambert Law [76] :

$$\Delta A(\lambda) = (\varepsilon_L(\lambda) - \varepsilon_R(\lambda))c \cdot l$$

其中  $\varepsilon_L(\lambda)$ 、 $\varepsilon_R(\lambda)$  表示在各波長下手性介質對左右旋圓偏振光的消光係數， $c$  為手性介質濃度， $l$  則為光路徑長 (cm)。此現象又稱作圓二色性 (Circular Dichroism)。由於左右旋圓偏振光的吸收率不同，故一束平面偏振光通過手性介質後便會形成一橢圓偏振光，該橢圓偏振光的橢圓率 (Ellipticity,  $\theta$ ) 可以由該物質的左右旋圓偏振光消光係數差  $\Delta A(\lambda)$  轉換獲得：

$$\theta = \left( \frac{45 \ln 10}{\pi} \right) \Delta A(\lambda) = 3297.2 \Delta A(\lambda)$$

此轉換得到的橢圓率單位為 **deg**。手性介質對各個波長造成的吸光率差不同，將各波長下形成吸光率差對該波長作圖便形成圓二色光譜，並從此光譜可以了解該介質結構的手性特性。

蛋白質是由許多胺基酸以胜肽鍵連接並具有特定結構的生物聚分子，而在其中胜肽鍵、芳香族胺基酸和雙硫鍵具有圓二色光特性。在遠紫外光波段 (光波長小於 250 nm) 的圓二色光譜能夠揭示蛋白質在該溶液中的二級結構比例 (包括  $\alpha$ -helix、 $\beta$ -sheet、 $\beta$ -turn 等等)，主要由胜肽鍵的電子躍遷引起[77]。近紫外光波段 (光波長介於 250 nm 至 300 nm) 的圓光二色光譜則能代表三級結構的變化，主要由芳香族胺基酸 (Phe、Tyr、Trp) 的電子躍遷引起[77]。

蛋白質的遠紫外光圓二色光譜中， $\alpha$ -helix 結構在 192 nm 有一正訊號 (右旋)，在 222 和 208 nm 則表現負訊號 (左旋)； $\beta$ -sheet 結構在 216 nm 有一負訊號，在 195 nm 有一正訊號； $\beta$ -turn 結構在 212 nm 有一正訊號，在 200 nm 則有一負訊號。以上結構訊號整理如表四。

為比較各個蛋白質造成的橢圓率，一般習慣將橢圓率表示為平均殘基橢圓率 (Mean residue ellipticity,  $[\theta]_{MRE}$ ) :

$$[\theta]_{MRE} = \left( \frac{Mw}{10 \cdot c \cdot l \cdot n_r} \right) \theta$$

其中  $Mw$  為蛋白質分子量， $n_r$  為組成單體或殘基的數量； $\theta_{MRE}$  單位為  $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 / \text{dmol}$ 。

表四：蛋白二級結構之圓二色光譜特徵峰

蛋白二級結構-圓二色光譜特徵峰		
Secondary Structures	- band (nm)	+ band (nm)
$\alpha$ -helix	222、208	192
$\beta$ -sheet	216	195
$\beta$ -turn	220、203	205
Polypro-II helix	190	210-230
Random coil	200	212

#### 實驗步驟：

使用 1 mm 厚度的比色管，蛋白質樣品濃度調整為 0.1~0.5 mg/ml，總體積至少 200  $\mu$ l。通入氮氣以去除光電倍增管上的氧氣，並打開水冷卻系統（20°C）等待二十分鐘；打開 Xe Lamp power 並開啟電腦，進入量測軟體。實驗參數：wavelength range, 190~260 nm；scan speed, 100 nm/min；accumulation, 10s；interval, 0.2 nm；band width, 1nm。使用機型為 AVIV model 410 (AVIV, New Jersey, USA)。

### 3-11 動態光散射 (Dynamic Light Scattering)

雷射光射入含有目標分子的溶液中，分子與雷射光產生彈性散射，該散射光的波長與原入射光相同且互相干涉並隨時間改變。散射光的改變與分子在溶液中的布朗運動 (Brownian motion) 有關，意即這變化又與分子的大小有關；分子越小則布朗運動越強烈，分子越大則反之。因此，利用 Stokes-Einstein 方程式可以得知布朗運動 (擴散) 與分子大小的關係：

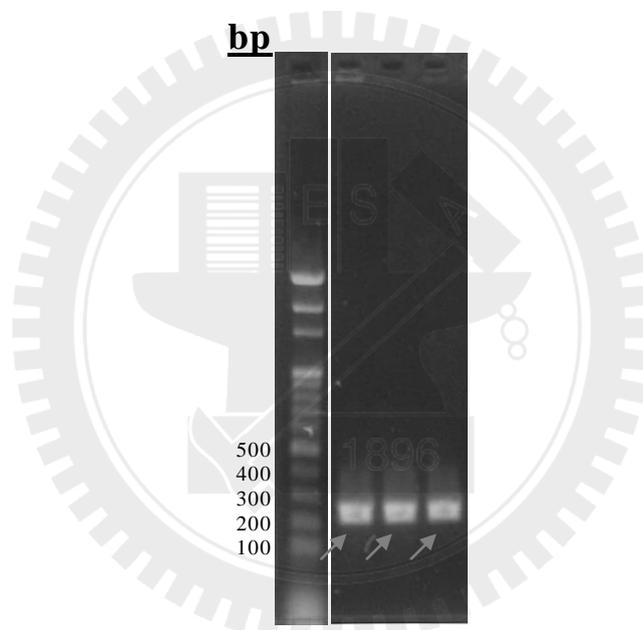
$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

$D$  表示為擴散常數， $T$  為絕對溫度， $\eta$  為溶液黏滯性 (viscosity)， $r$  為球形分子的半徑。此方程式計算得知的分子半徑包含分子外層的水合層，且以分子為球形做假設。

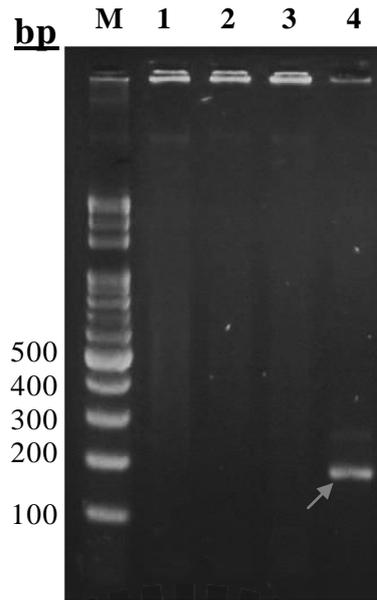
## 第四章 實驗結果

### 4-1 基因序列

目標 PGB1 基因序列全長為 178 bp (如圖十三中的 PGB1 G9C 基因所示), 接合入 pET200 基因載體中 *E. coli* BL21( DE3) 系統表現蛋白質。接入 pET200 基因載體後的 PGB1 基因可以利用 PGB1 fp 和 T7 rp 或 T7 fp 和 PGB1 rp 確認目標基因為正確方向接入載體中 (如圖十二和圖十四所示)。

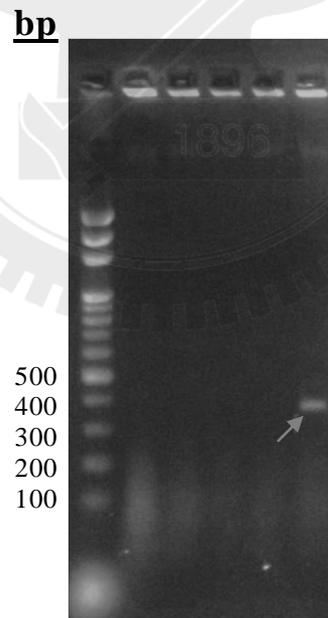


圖十二：以 PGB1 fp 與 T7 rp 所挑選放大的 PGB1 wt 基因  
以 PGB1 fp 與 T7 rp 所挑選放大的 PGB1 wt 基因長度應為 245 bp (箭頭所指處), 並且藉此確認目標 PGB1 基因是正確地接合入 pET200 基因載體中。



圖十三：PGB1G9C 基因

PGB1 基因全長為 178 bp (箭頭所指處)，利用預先設計好的 PGB1 G9C fp 與 PGB1 rp 進行 PCR 反應以此送交基因定序。

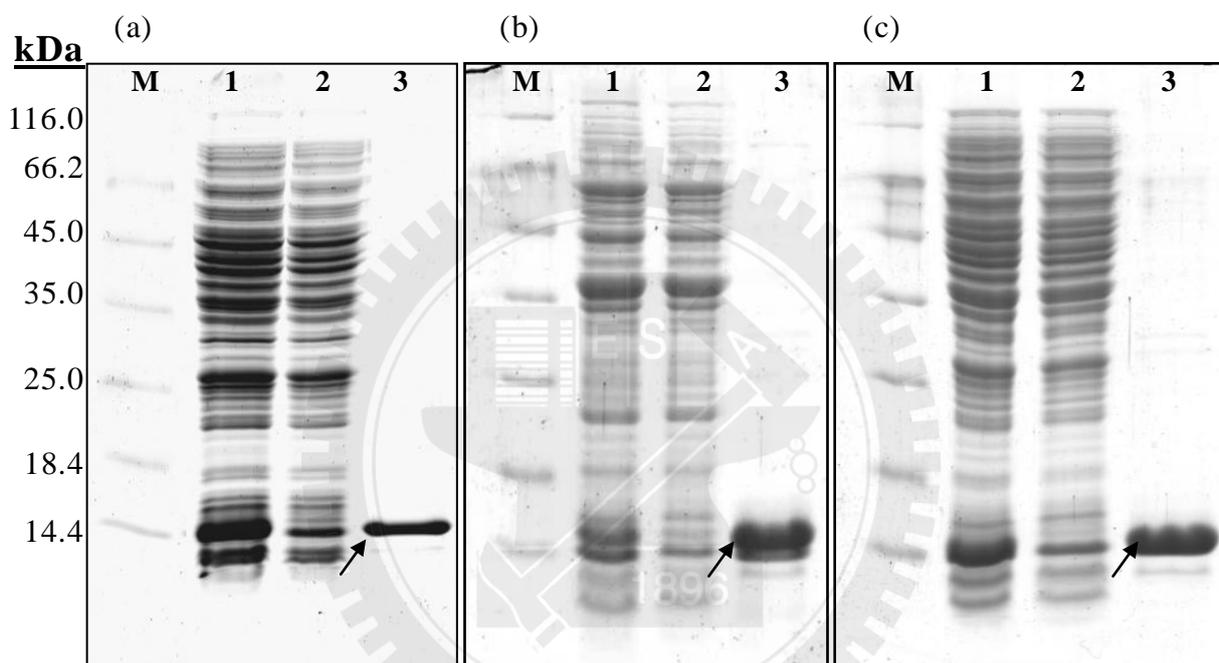


圖十四：以 T7 fp 與 PGB1 rp 所挑選放大的 PGB1 A23C 基因

以 T7 fp 與 PGB1 rp 所挑選放大的 PGB1 wt 基因長度應為 371 bp (箭頭所指處)，並且藉此確認目標 PGB1 A23C 基因是正確地接合入 pET200 基因載體中。

## 4-2 大量表現並純化 PGB1 蛋白質

將帶有 pET200-pgb1 基因的 *E. coli* BL21( DE3) 以 IPTG 誘導表現至少八小時，破菌後 12,000 離心 20 分鐘，再從上清液純化帶有 His-tag 的 PGB1。以 15% SDS-PAGE 確認表現和純化效果。大約 1.8 公升菌液可以得到約 40 mg 的蛋白質 PGB1；純化後的蛋白質純度至少 96%。各突變株皆以相同方式獲得。蛋白質 PGB1 的分子量約為 10 kDa。



圖十五：蛋白質 PGB1（包括突變株）表現效果以及從上清液純化效果

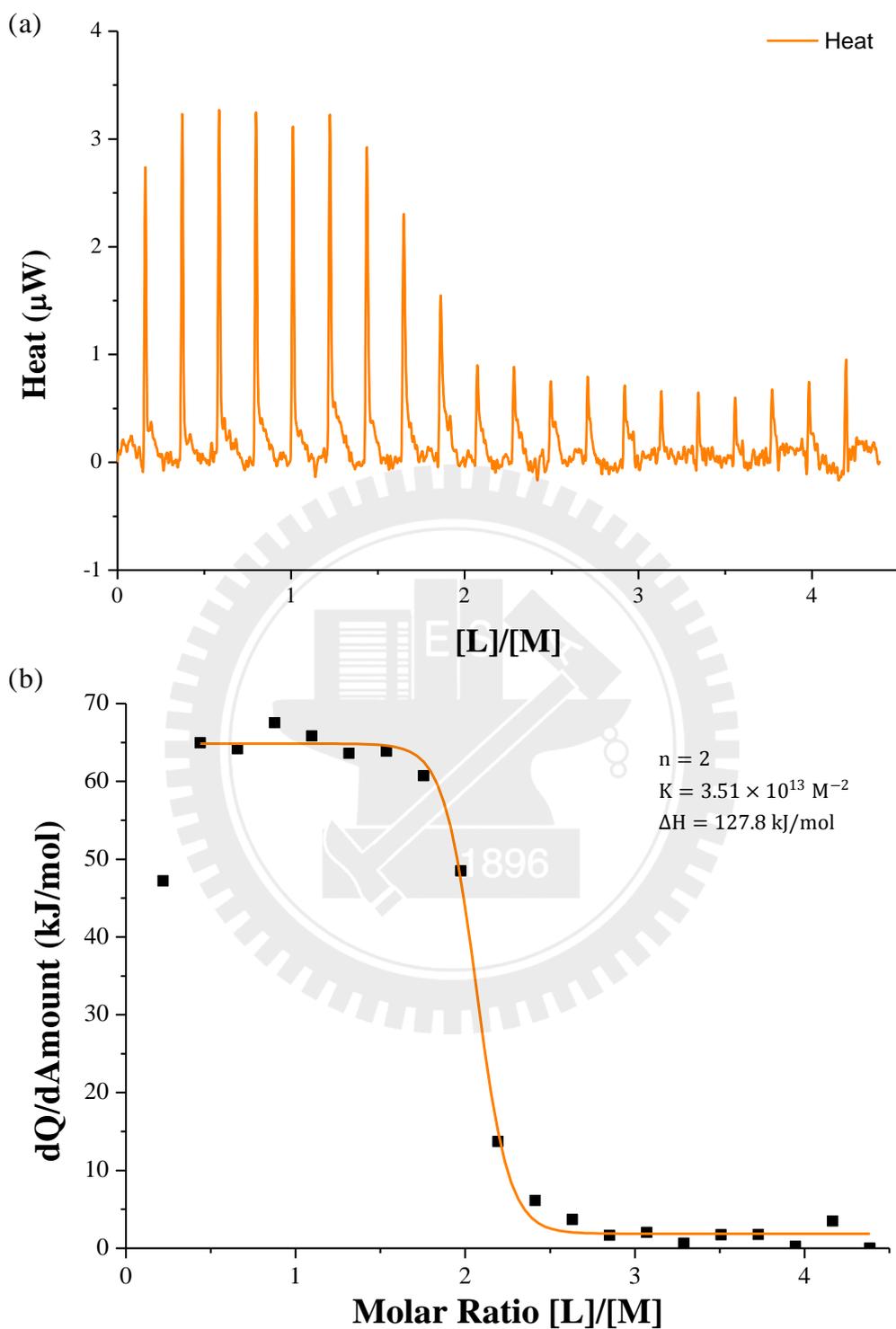
圖(a)~(c)中，各 lane 的表示為：M，Unstained Protein Marker (mid range) (3.5  $\mu$ L)；1，表現 PGB1 wt 之破菌後上清液；2，通過 His-tag column 後的上清液；3，純化後 PGB1 wt (a)、A23C (b) 或 G9C (c)。以上皆是 15% SDS PAGE。

### 4-3 摺疊後 PGB1 功能測試 (ITC 實驗)

此實驗係為了確認摺疊後之蛋白質 PGB1 是否還具有自然與免疫球蛋白質 (IgG) 結合的能力。自然狀態下，一個 IgG 能與兩個 PGB1 鍵結。PGB1 與 IgG 的鍵結與其三級結構有關。

以 47.4 nmole 摺疊後的 PGB1 wt 與 10.8 nmole rabbit IgG 進行滴定作用，觀察每一次作用的熱量變化。所使用的緩衝液為 phosphate buffer saline (pH 7.4)。圖十六(a)為每一次滴定作用所造成的熱量變化，總共有 20 次滴定作用。圖十六(b)為每次熱量的變化量與各次滴定狀態下的蛋白質濃度比例。結果顯示摺疊後的 PGB1 wt 與 IgG 的結合比率為 2:1，與自然狀態摺疊的 PGB1 wt 狀態[21]相同；反應常數為  $3.51 \times 10^{13} \text{ M}^{-2}$ ，莫爾反應熱為 127.8 kJ/mol。



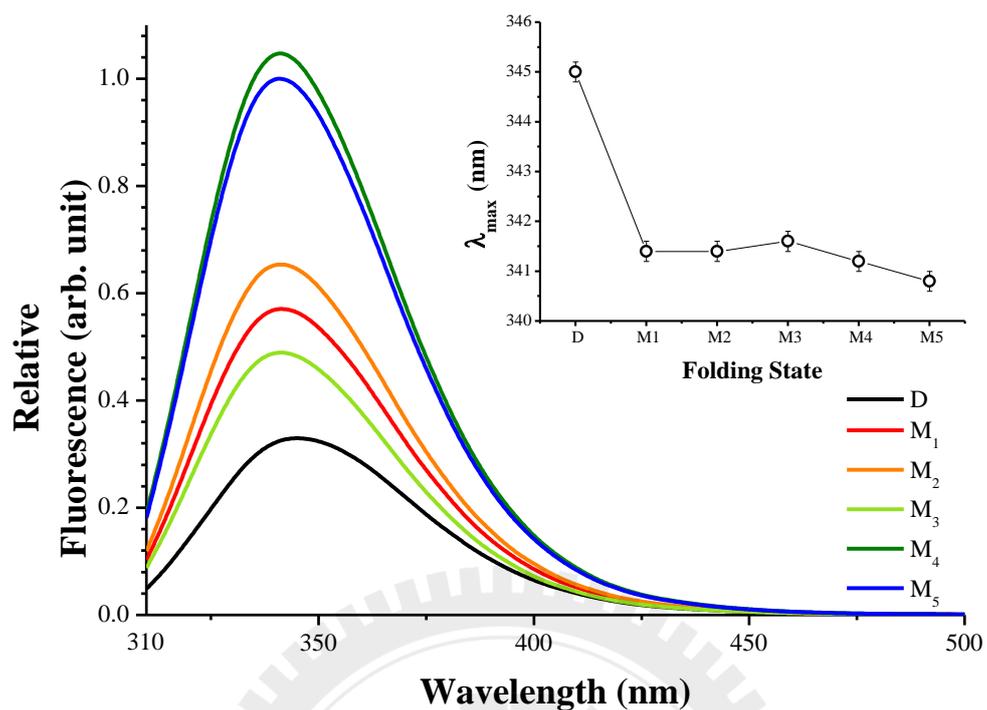


圖十六：Over-critical Refolding Process 摺疊後的 PGB1 wt 與 IgG 的 Isothermal Titration Calorimetrics 結果。(a)每次滴定作用的功率變化。(b)每次滴定作用的莫爾熱變化。

#### 4-4 蛋白質摺疊中間物之螢光光譜變化

利用 295 nm 激發光，我們能夠觀察 Trp 這個疏水性胺基酸環境的變化。隨著 Over-critical Folding Process 摺疊，蛋白質 PGB1 wt 的 Trp43 螢光整體逐漸增強(圖十七)；僅在 M<sub>2</sub> 進入 M<sub>3</sub> 摺疊態時有個明顯的下降的現象，可能與 urea 保護了蛋白質使所受的高 pH 變性的程度減低。在 8 M Urea 和 pH 12 環境(denatured 狀態)底下變性的 PGB1 wt 的螢光強度或說 Trp43 的螢光量子產率(fluorescence quantum yield) 僅約只有摺疊至 M<sub>5</sub> 狀態下的三分之一；將環境中的 urea 逐漸地減少並維持在 pH 11 的高鹼性，PGB1 wt 的螢光便逐漸地增強，當 pH 下降到 8.8 時，整體的螢光強度立刻增強原有的一倍；M<sub>4</sub> 狀態下地螢光略強於 M<sub>5</sub> 狀態可能是因為有了 mannitol 這種化學輔佐子穩定蛋白質結構使得 M<sub>4</sub> 狀態下的 PGB1 wt 略較穩定而有較強的螢光強度或螢光量子效率。

另外，從螢光光譜波峰波長 (Emission Maximum,  $\lambda_{\max}$ ) 的變化為藍位移 (圖十七內插圖)，意為波峰往低波長移動。在 denatured 狀態下， $\lambda_{\max}$  位在較大的波長  $345.0 \pm 0.4$  nm；M<sub>1</sub> 狀態下， $\lambda_{\max}$  為  $341.4 \pm 0.4$  nm；M<sub>2</sub>， $341.4 \pm 0.4$  nm；M<sub>3</sub>， $341.6 \pm 0.4$  nm；M<sub>4</sub>， $341.2 \pm 0.4$  nm；M<sub>5</sub>， $340.8 \pm 0.4$  nm。 $\lambda_{\max}$  變化與 Trp43 所處的周遭微環境變化有關，當 Trp 在極性很強的環境中時，其螢光光譜波峰波長會出現在約 350 nm，而當 Trp 在非極性(疏水性)強的環境中，波峰的位置便會下降到約 325 nm；因此，從 PGB1 wt 的  $\lambda_{\max}$  變化可以得知 Trp43 周遭的環境在 denatured 環境下是暴露在高極性環境中，隨著摺疊而被包埋入蛋白質的疏水核心 (hydrophobic core)。



圖十七：10  $\mu$ M PGB1wt 在 over-critical refolding process 中不同的摺疊狀態的螢光光譜變化，左上內插圖為各摺疊狀態的螢光波峰波長 ( $\lambda_{max}$ )。激發光波長為 295 nm。

表五：各摺疊狀態的螢光波峰波長 ( $\lambda_{max}$ )。

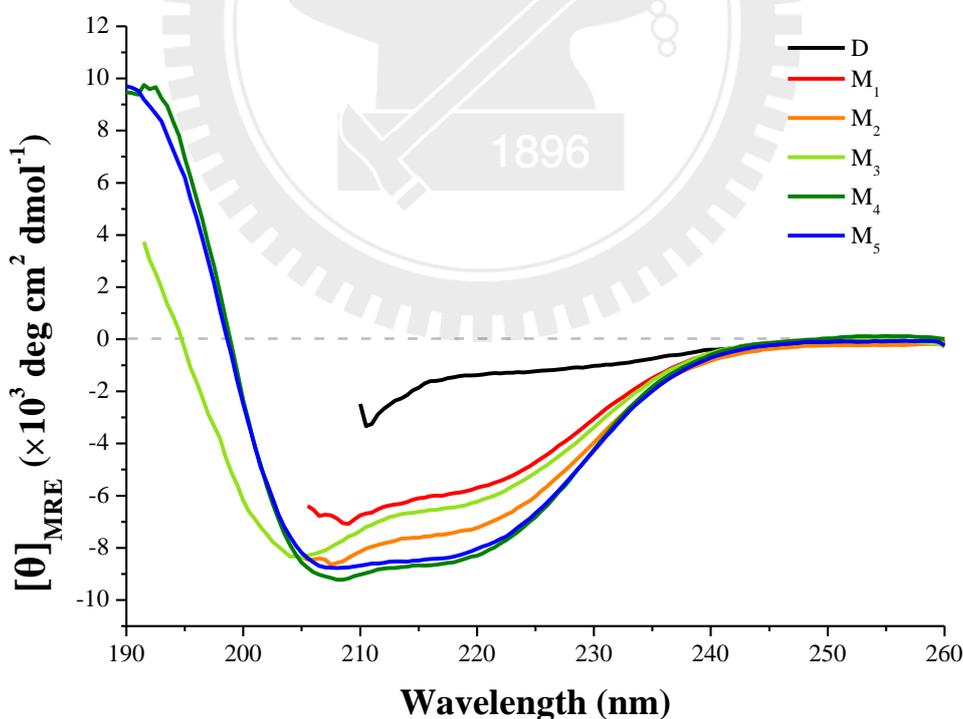
Folding State	Emission Maximum
	$\lambda_{max}$ (nm)
Denature	$345.0 \pm 0.4$
M <sub>1</sub>	$341.4 \pm 0.4$
M <sub>2</sub>	$341.4 \pm 0.4$
M <sub>3</sub>	$341.6 \pm 0.4$
M <sub>4</sub>	$341.2 \pm 0.4$
M <sub>5</sub>	$340.8 \pm 0.4$

#### 4-5 蛋白質摺疊中間物之圓二色光譜變化及二級結構比例分析

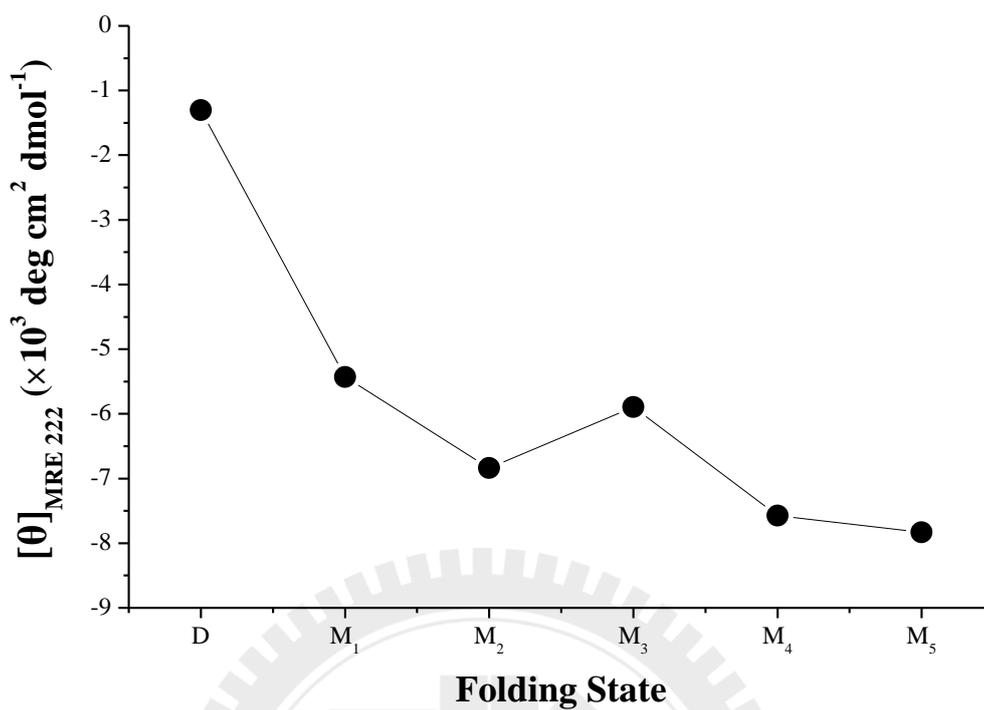
此實驗利用圓二色 (CD) 光譜測量並比較各摺疊狀態下的 PGB1 的二級結構比例變化。從圖十八可以看到，隨著摺疊整體的 CD 光譜訊號逐漸增強，顯示 PGB1 的二級結構漸趨穩定。在 222 nm 的訊號可用來觀察形成  $\alpha$ -helix 的胺基酸數量比例，在圖十九可以看到  $\alpha$ -helix 的胺基酸數量比例在進入  $M_1$  狀態後突然增加。而  $\beta$ -sheet 的 CD 訊號在 190~260 nm 波段較弱易受到  $\alpha$ -helix 的訊號影響。

圖二十為 PGB1 wt 在  $M_5$  狀態的同步輻射圓二色 (SRCD) 光譜，此光譜較一般圓二色光譜更準確且波段更短；以 Dicroprot 2000 [78] 分析軟體的 selcon 3 (self-consistent) [79, 80] 方法解析在  $M_5$  狀態下的 PGB1 wt 的 SRCD 光譜，可以得到 PGB1 主要的二級結構比例： $\alpha$ -helix，12.9%； $\beta$ -sheet，25.8%；Turn，11.2%。

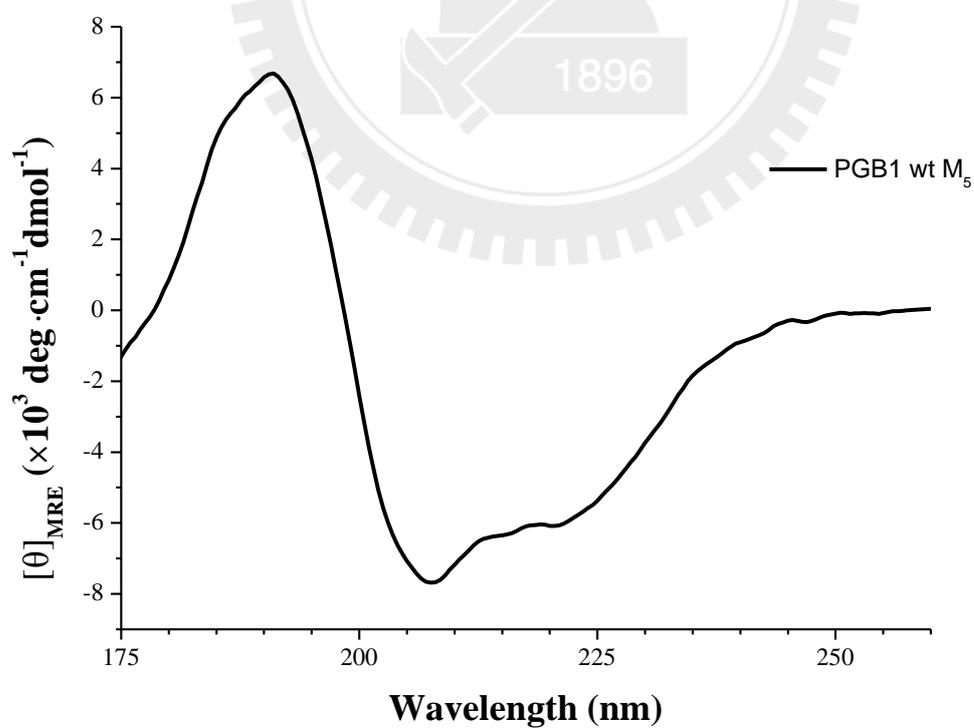
圖二十一顯示 PGB1 wt 與各突變株的圓二色光譜相似，表示突變位置不影響 PGB1 原有的二級結構比例。



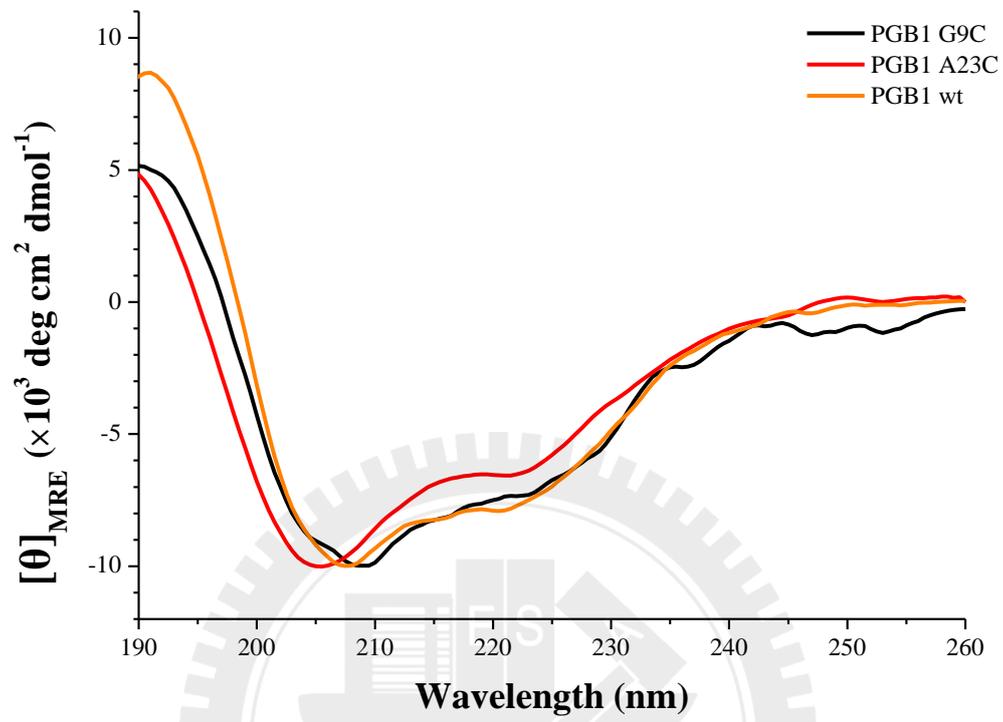
圖十八：不同摺疊狀態下的 PGB1 的圓二色光譜



圖十九：PGB1 在 222 nm 波長的圓二色光譜變化



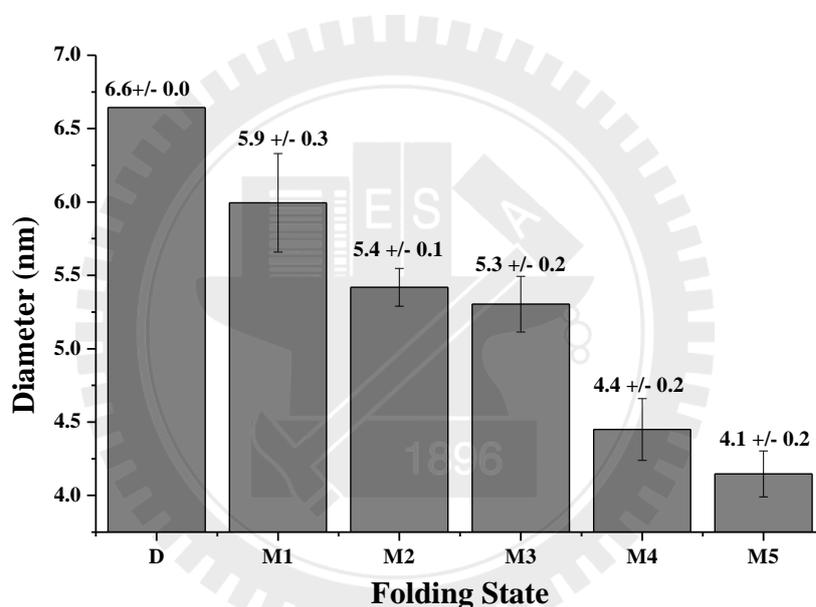
圖二十：PGB1 wt 在 M<sub>5</sub> 狀態的同步輻射圓二色光譜



圖二十一：PGB1wt 與各突變株的同步輻射圓二色光譜

#### 4-6 蛋白質摺疊中間物之水合直徑分析結果

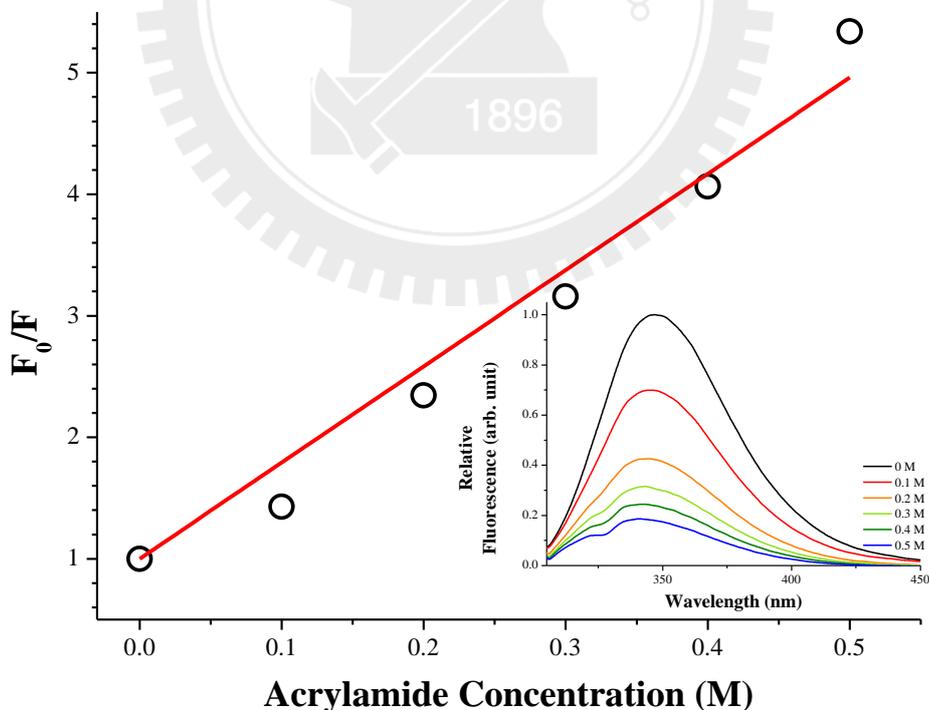
水合直徑分析的結果顯示 PGB1 wt 的水合直徑在 denatured 環境中(8 M urea, pH 12)為 6.6 nm，接著在 pH 11 逐漸降低 urea 濃度，在 M<sub>1</sub> 狀態為 5.9±0.3 nm，M<sub>2</sub> 狀態為 5.4±0.1 nm，M<sub>3</sub> 狀態為 5.3±0.2 nm，又當 pH 下降到 8.8 時(M<sub>4</sub> 狀態)，直徑突然下降到 4.4±0.2 nm，最後移除了作為 chemical chaperone 的 mannitol 而到了 M<sub>5</sub> 狀態後，蛋白質直徑略為下降到 4.2±0.2 nm。PGB1 wt 的 X-ray 結晶結構表示的凡德瓦直徑 (Van der Waal diameter) 約為 3.4 nm，若再加上水合層，其水合直徑可達 3.9 nm。因此 M<sub>5</sub> 狀態的 PGB1 wt 與 X-ray 結晶結構所揭示的 PGB1 大小幾乎相同。



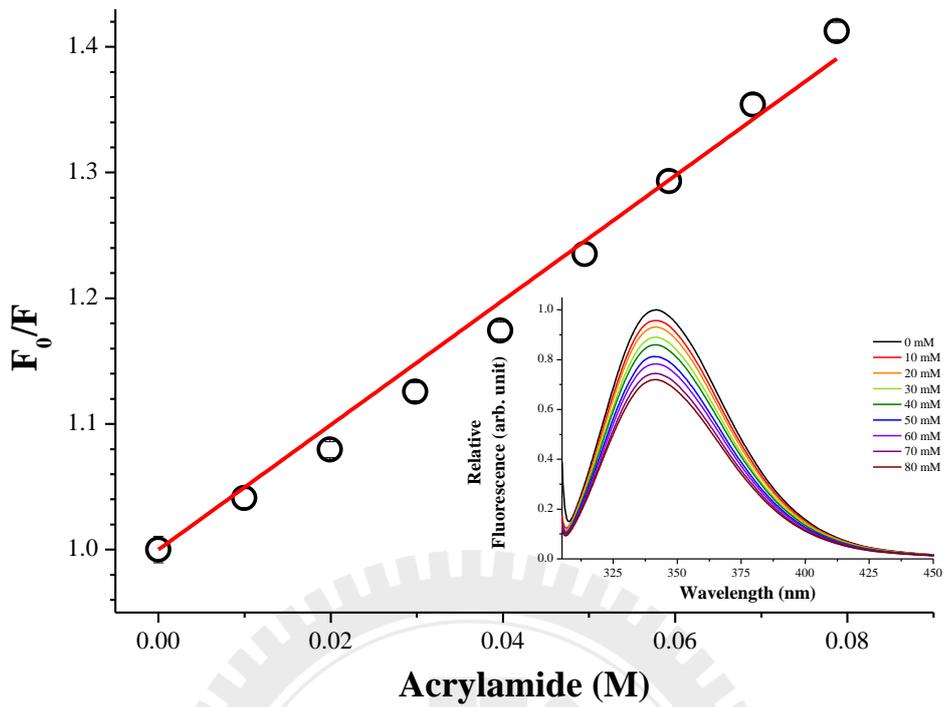
圖二十二：動態光散射之 GB1 wt 蛋白質分子水合直徑隨摺疊狀態變化圖

#### 4-7 螢光淬熄光譜變化

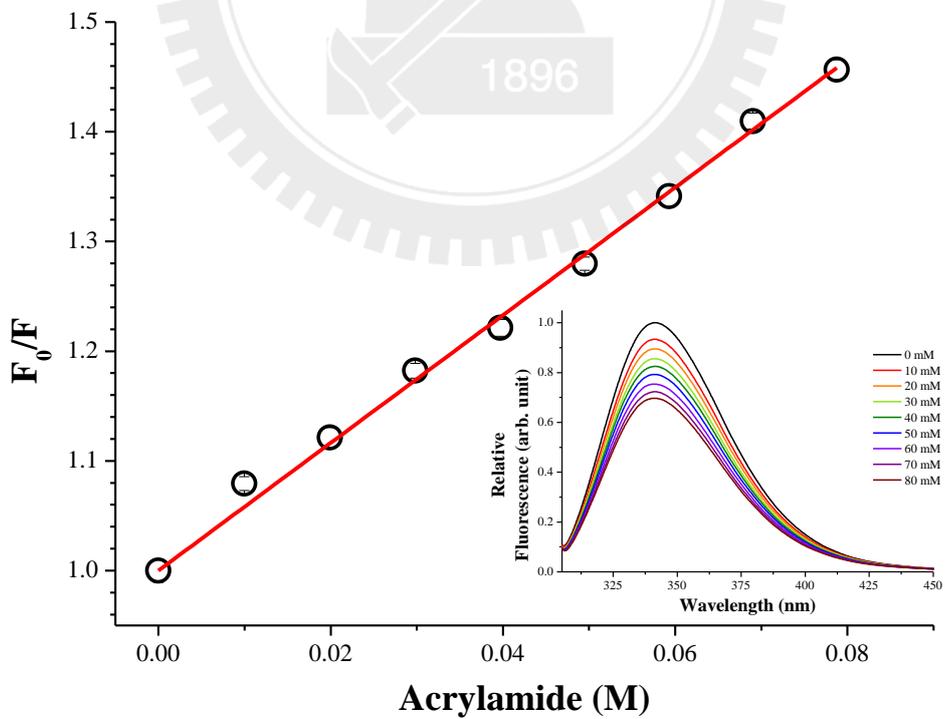
Acrylamide (丙烯醯胺) 被認為可以擴散的方式進入蛋白質內部，若該蛋白質具有色胺酸，則該色胺酸的螢光會被 acrylamide 所淬熄；因此，利用 acrylamide 對蛋白質上色胺酸的螢光淬熄能力程度變化可以相互比較得知色胺酸在蛋白質中曝露或包埋的程度。將不同摺疊狀態下的 PGB1 以 acrylamide 淬熄其螢光以了解其 Trp43 包埋的程度，各螢光光譜變化如圖二十三～圖二十八所示。以螢光淬熄對原有螢光強度比例 ( $F/F_0$ ) 對 acrylamide 濃度作圖，可以得到關係常數  $K_{SV}$ ，再除以該狀態下 PGB1 的螢光壽命 (lifetime) 便能得到 acrylamide 的螢光淬熄能力  $k_q$  (表六)。從圖二十九可以看到  $k_q$  在 denatured 狀態下最強，為  $3.37 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ； $M_1 \sim M_2$  狀態下有略大於自然態 ( $M_5$ ) 的值，約為  $1.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ； $M_4$  和  $M_5$  狀態下有最小值，約為  $1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。以上變化顯示在 denatured 到  $M_1$  過程中有一個作用很快的將曝露出來的非極性的 Trp43 包埋保護，隨著 over-critical folding process 摺疊後 Trp43 是被包覆起來的。



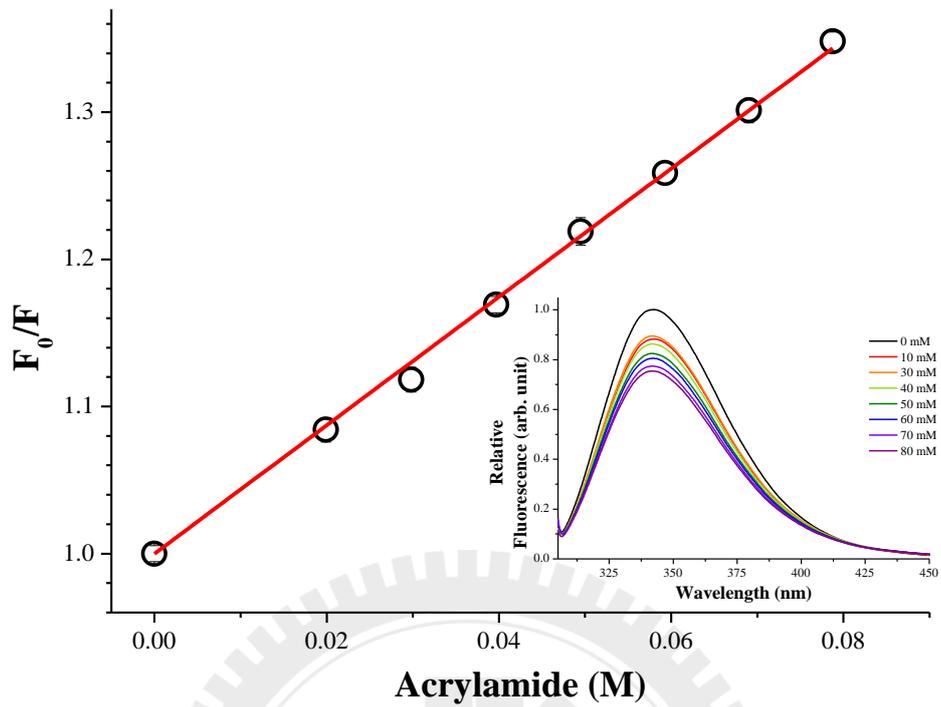
圖二十三：PGB1 wt 在 denatured 狀態下被 Acrylamide 淬熄螢光的 Stern-Volmer 關係圖， $K_{SV}=3.37 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$



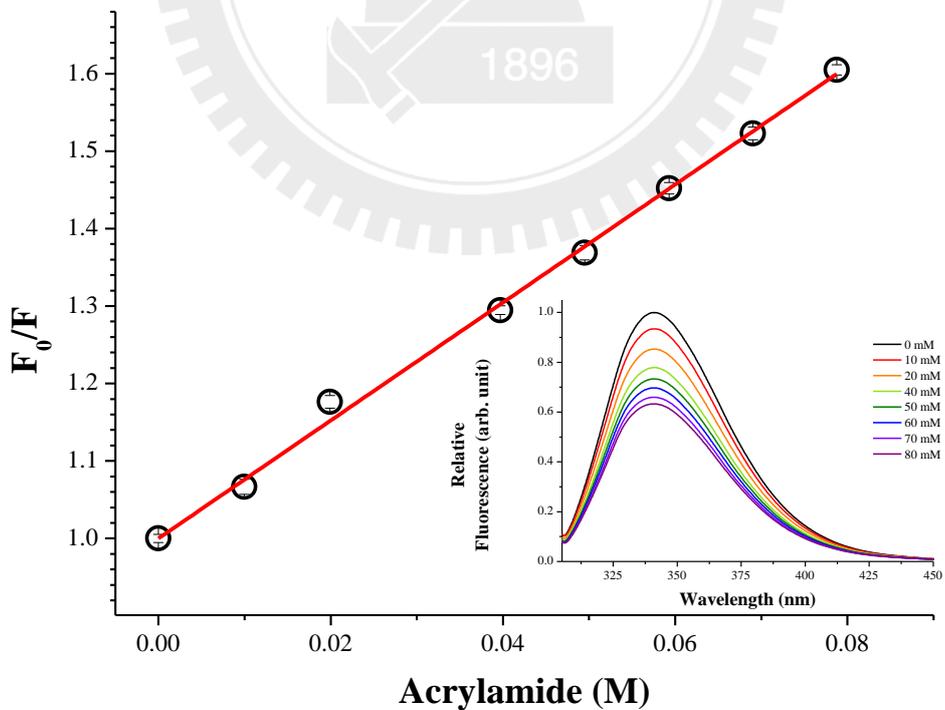
圖二十四：PGB1 wt 在  $M_1$  狀態下被 Acrylamide 淬熄螢光的 Stern-Volmer 關係圖， $K_{SV}=1.73 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$



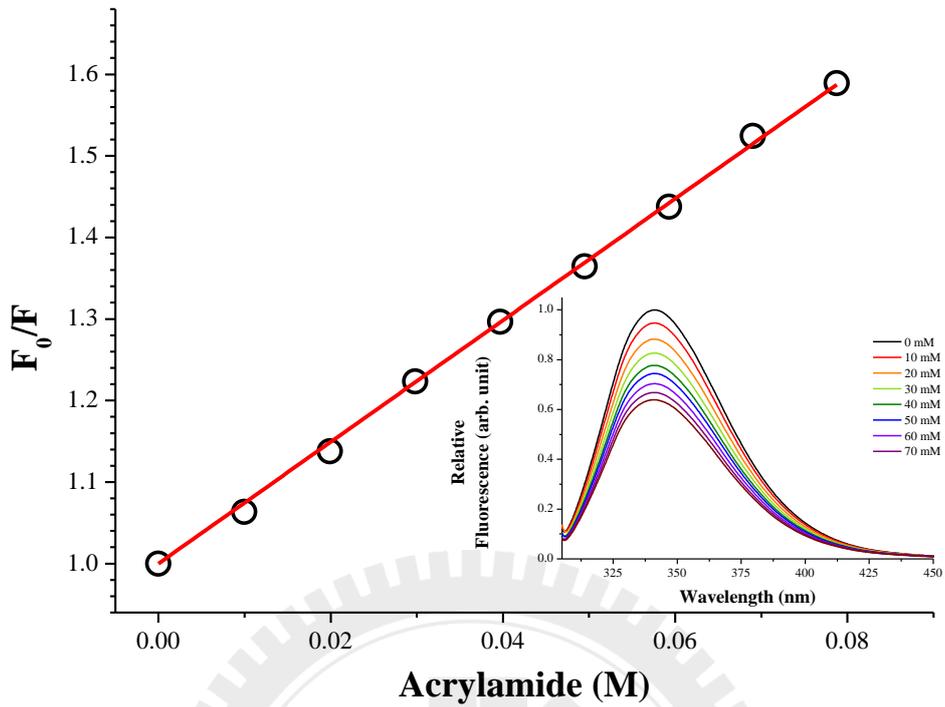
圖二十五：PGB1 wt 在  $M_2$  狀態下被 Acrylamide 淬熄螢光的 Stern-Volmer 關係圖， $K_{SV}=1.79 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$



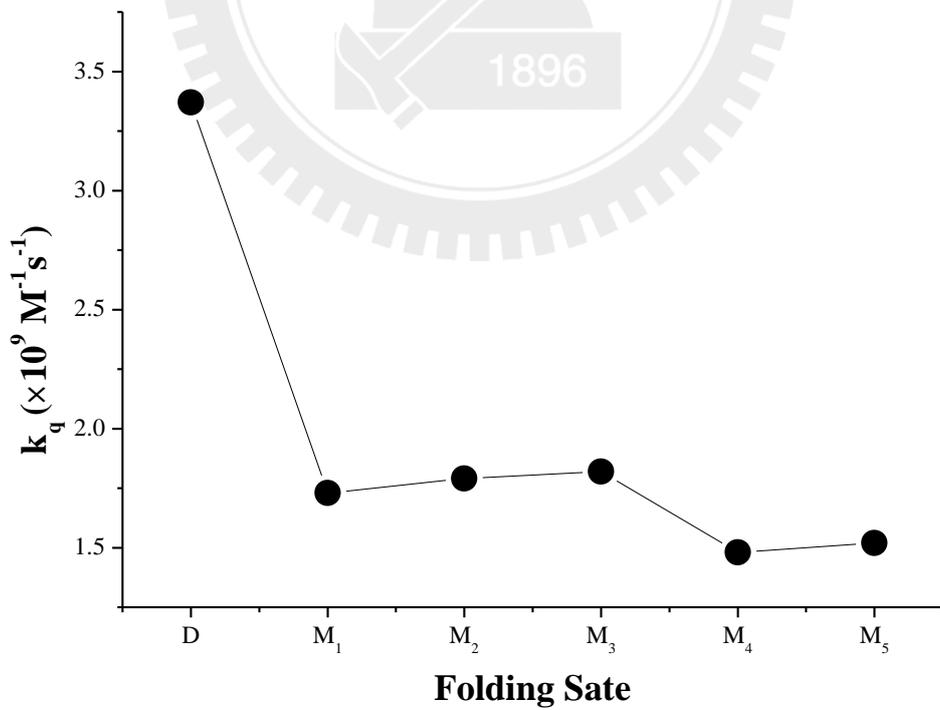
圖二十六：PGB1 wt 在  $M_3$  狀態下被 Acrylamide 淬熄螢光的 Stern-Volmer 關係圖， $K_{SV}=1.81 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$



圖二十七：PGB1 wt 在  $M_4$  狀態下被 Acrylamide 淬熄螢光的 Stern-Volmer 關係圖， $K_{SV}=1.48 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$



圖二十八：PGB1 wt 在  $M_5$  狀態下被 Acrylamide 淬熄螢光的 Stern-Volmer 關係圖， $K_{SV}=1.52 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$



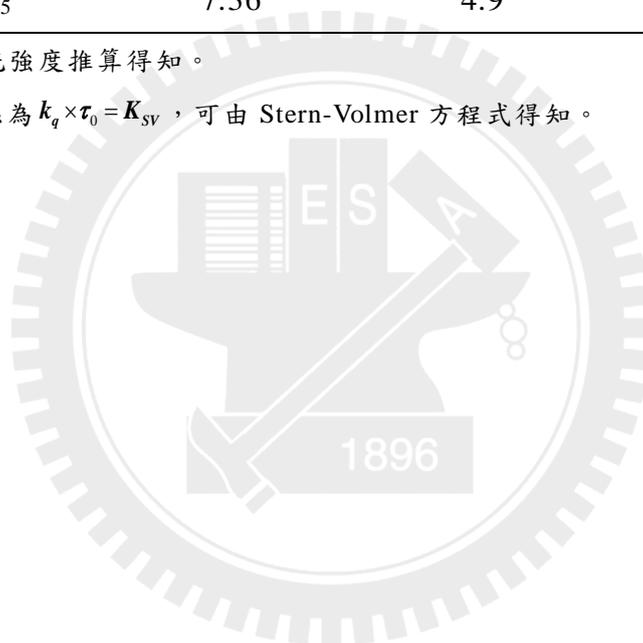
圖二十九：Acrylamide 對各摺疊狀態的 PGB1 wt 的  $k_q$  變化圖

表六：由 Acrylamide 淬熄 PGB1 wt 的 Trp43 螢光之結果總表

Folding State	Stern-Volmer Constant $K_{SV} (M^{-1})$	Fluorescence Lifetime <sup>a</sup> $\tau_0$ (ns)	Quenching Constant <sup>b</sup> $k_q (\times 10^9 M^{-1}s^{-1})$
Denature	7.92	1.8	3.37
M <sub>1</sub>	4.86	2.9	1.73
M <sub>2</sub>	5.82	3.2	1.79
M <sub>3</sub>	4.36	2.4	1.81
M <sub>4</sub>	7.61	5.1	1.48
M <sub>5</sub>	7.36	4.9	1.52

a：由各狀態的螢光強度推算得知。

b： $k_q$  與  $K_{SV}$  的關係為  $k_q \times \tau_0 = K_{SV}$ ，可由 Stern-Volmer 方程式得知。



#### 4-8 螢光共振能量轉移受體接合結果

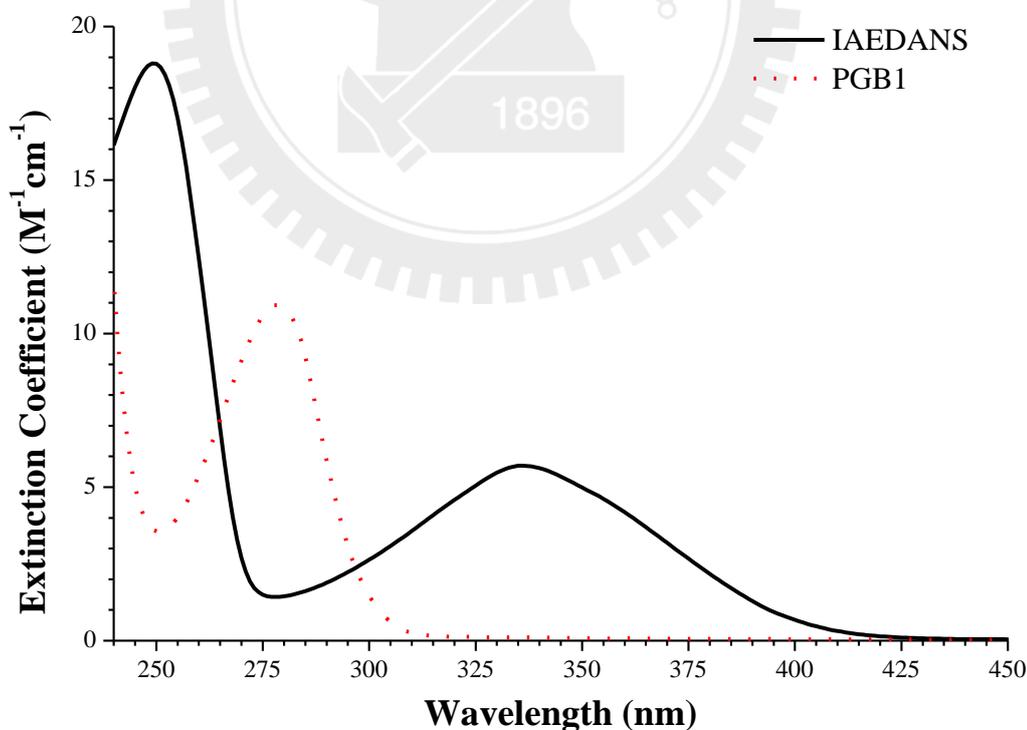
正確計算 IAEDANS (螢光共振能量轉移受體) 接合在 PGB1 上的比例, 能使螢光共振能量效率計算更準確。依照 Beer-Lambert Law 可獲得以下 PGB1 和 IAEDANS 在其各自特徵峰 (圖三十) 相疊加的吸收值公式:

$$\begin{cases} A_{280} = \epsilon_{280}^P \times [P] + \epsilon_{280}^F [F] \\ A_{336} = \epsilon_{336}^P \times [P] + \epsilon_{336}^F [F] \end{cases}$$

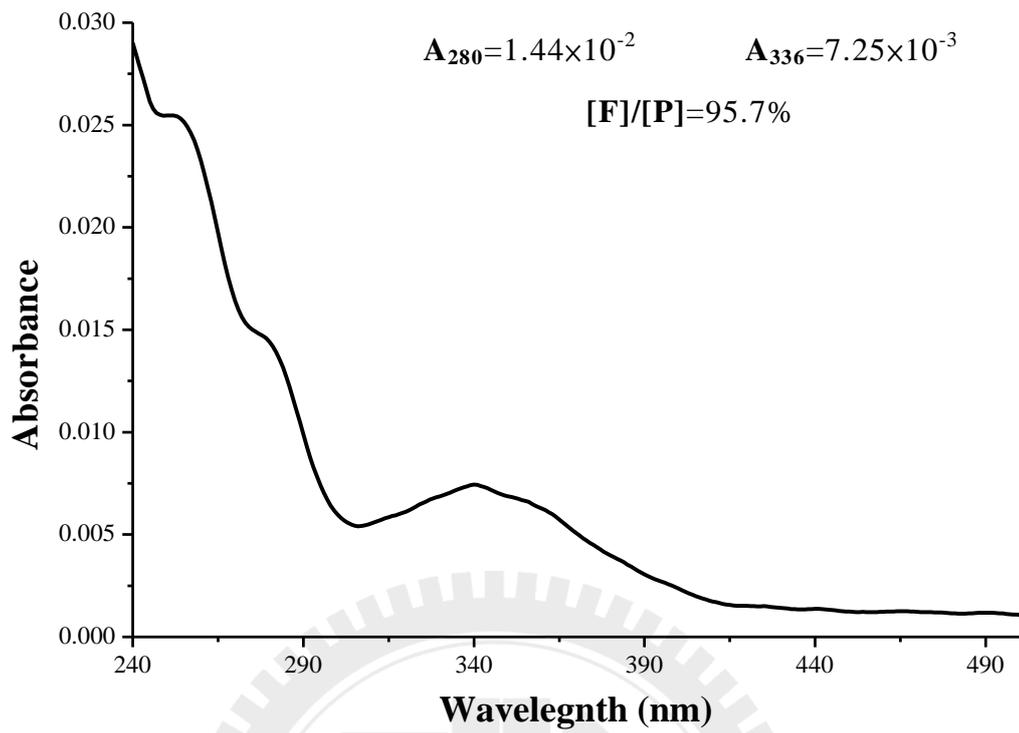
將各波長下的 PGB1 和 IAEDANS 的消光係數代入:

$$\begin{cases} A_{280} = 10810 \times [P] + 1448 \times [F] \\ A_{336} = 107 \times [P] + 5700 \times [F] \end{cases}$$

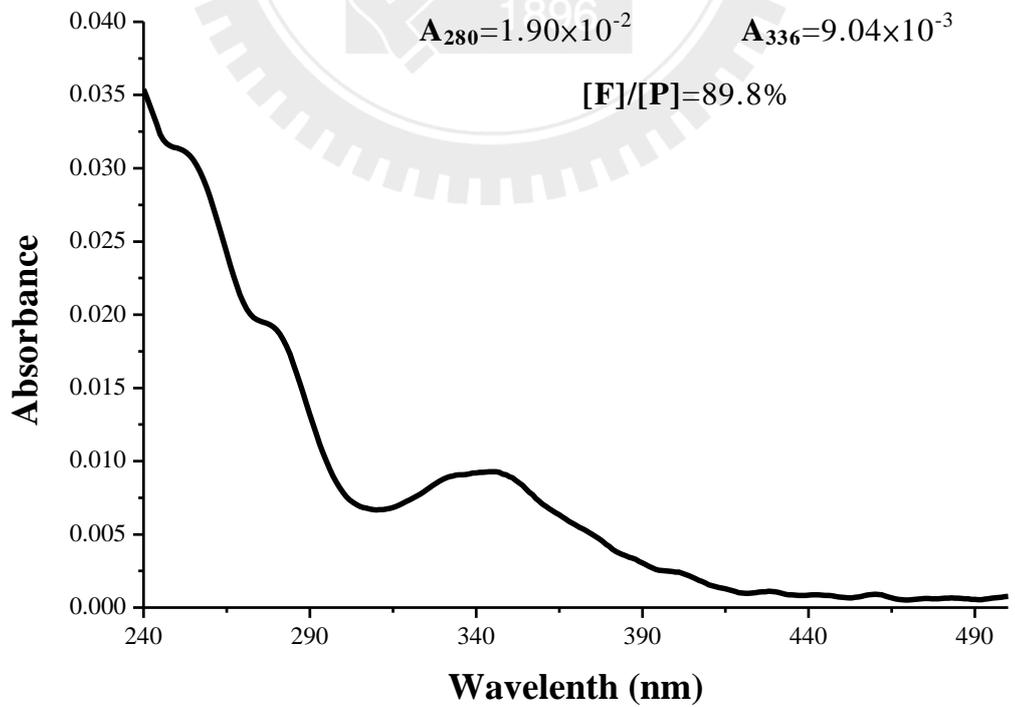
測量接合了 IAEDANS 的 PGB1, 以上述公式計算便可以獲得其中的蛋白質含量 [P] 和 IAEDANS 含量 [F], 兩者相除 ( $[F]/[P]$ ) 便得到溶液中蛋白質與 IAEDANS 的接合比率。圖三十一和圖三十二各為接合比率 95.7% 和 89.8% 的 PGB1 G9C 和 PGB1 A23C。



圖三十: IAEDANS (實線) 和 PGB1 (虛線) 的吸收光譜



圖三十一：PGB1 G9C-I 吸收光譜



圖三十二：PGB1 A23C-I 吸收光譜

#### 4-9 螢光共振能量轉移之 Förster Distance ( $R_0$ ) 變化

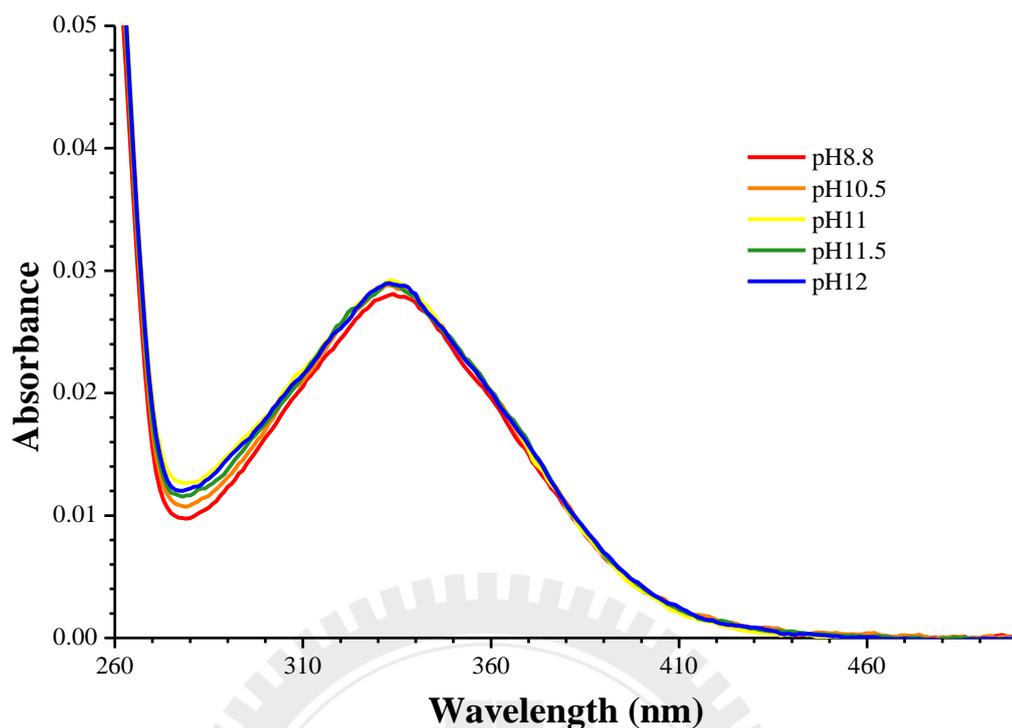
欲計算分析螢光共振能量轉移 (FRET) 距離就必須先計算出在各個摺疊狀態下的 Förster Distance ( $R_0$ )，以得到正確的距離。

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-5} \times Q_D \kappa^2 n^{-4} J(\lambda)$$

如方程式所示， $R_0$  主要受到螢光供體的螢光量子產率 ( $Q_D$ )、折射率 ( $n$ ) 和光譜重合區域 ( $J(\lambda)$ ) 所影響。光譜重合區域指的是 FRET donor 的標準化發射光譜 (normalized fluorescence spectrum) 與 FRET acceptor 的以消光係數 (extinction coefficient) 表示的吸收光譜，兩者的重合面積。此實驗所使用的 FRET acceptor—IAEDANS，在不同的 pH 值的環境中，其吸收光譜幾乎沒有變化 (圖三十三)；而 Trp43 的螢光光譜僅只有小幅度的位移 (圖十七)，因此在這邊不考慮光譜重合區域變化。溶液的折射率的改變也會造成  $R_0$  的改變，增加 urea 濃度會增加溶液的折射率而造成較小的  $R_0$  值；其折射率可以由 urea 與溶液折射率關係式推算[81]。整合以上，已知色胺酸與 IAEDANS 的  $R_0$  在水溶液 (pH 7.0) 中為 22 Å [39]， $R_0$  計算方程式可簡化成：

$$R_0 = 22 \times \sqrt[6]{(n_0^4 Q_D) / ((n_D^4 Q_0))}$$

$Q_0$ 、 $n_0$ 、 $Q_D$  和  $n_D$  表示標準能量轉移供體的螢光量子產率、標準溶液折射率、蛋白質的螢光量子產率和摺疊溶液折射率。為此實驗的 FRET donor—Trp43 的螢光量子產率由 Tryptophan 在 pH 7 的水中 (25°C) 作為標準螢光量子產率 (0.14) 推算，在  $M_5$  狀態的 PGB1 wt 的螢光量子產率為 0.26。標準溶液折射率則為水在 pH 7.0, 25°C (1.335)。PGB1 G9C 於各摺疊狀態的  $R_0$ ：Denatured, 17.5 Å； $M_1$ , 17.3 Å； $M_2$ , 16.7 Å； $M_3$ , 17.0 Å； $M_4$ , 22.4 Å； $M_5$ , 22.2 Å。A23C 於各摺疊狀態的  $R_0$ ：Denatured, 19.5 Å； $M_1$ , 21.6 Å； $M_2$ , 22.2 Å； $M_3$ , 21.2 Å； $M_4$ , 24.0 Å； $M_5$ , 23.9 Å。以上整理如表七。整體上， $R_0$  隨著摺疊過程增加。



圖三十三：不同 pH 下的 IAEDANS 吸收光譜

表七：PGB1 G9C 和 A23C 在各摺疊狀態下的 Trp 螢光量子產率以及 Förster Distance

Folding State	Urea Concentration [Urea] (M)	Refractive Index <sup>c</sup> $n$	PGB1 G9C		PGB1 A23C	
			Quantum Yield of Donor	Förster Distance <sup>b</sup>	Quantum Yield of Donor	Förster Distance <sup>b</sup>
			$Q_D$	$R_0$ (Å)	$Q_D$	$R_0$ (Å)
Denatured	8	1.401	0.05	17.5	0.09	19.5
M <sub>1</sub>	2	1.352	0.04	17.3	0.16	21.7
M <sub>2</sub>	1	1.343	0.03	16.7	0.19	22.5
M <sub>3</sub>	0	1.335	0.03	17.0	0.17	22.3
M <sub>4</sub>	0	1.335	0.18	22.4	0.27	24.0
M <sub>5</sub>	0	1.335	0.17	22.2	0.26	23.9

a：色胺酸於水中 pH 7.0, 25°C。

b：Förster Distance 係由  $R_0 = 22 \times \sqrt[4]{(n_0^4 Q_D) / ((n_0^4 Q_0))}$  計算獲得； $n_0$  和  $Q_0$  為色胺酸在水中 (pH 7.0, 25°C) 的折射率和螢光量子產率。

c：Urea 與溶液折射率關係式為  $[Urea] = 117.66 \times \Delta N + 29.753 \times (\Delta N)^2 + 185.56 \times (\Delta N)^3$ ；[Urea] 為 urea 的莫爾濃度， $\Delta N$  為水與 urea 溶液的折射率差 [81]。

#### 4-10 螢光共振能量轉移螢光光譜

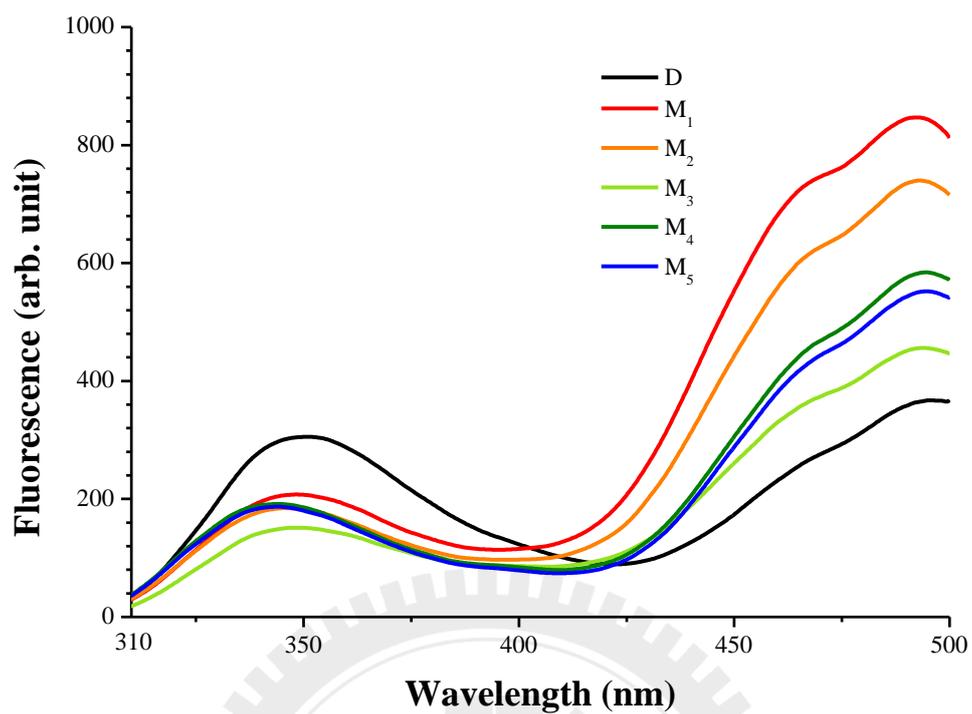
將接合了 IAEDANS 的蛋白質 PGB1 G9C 和 A23C (簡稱為 PGB1 G9C-I 和 PGB1 A23C-I) 各自皆以 over-critical Folding Process 摺疊，並且觀察各個摺疊過程中的蛋白質螢光光譜。PGB1 G9C-I 和 A23C-I 的 Trp 螢光光譜 (圖三十四、圖三十五) 因為加上了 IAEDANS 這個 FRET 受體，原來的蛋白質的 Trp 螢光強度被減弱並且大約在 460 和 490 nm 多了 IAEDANS 因能量轉移所發出的螢光。將這些被減弱的 Trp 螢光比上不存在 IAEDANS 的 Trp 螢光便可得知螢光能量轉移的效率；各蛋白質在各摺疊狀態的能量轉移效率整理如表八和表九所示。能量轉移效率計算公式如下：

$$E = 1 - F_{DA} / F_D$$

PGB1 G9C-I 的螢光共振能量轉移效率在各狀態下各為：Denatured, 59.8%；M<sub>1</sub>, 84.2%；M<sub>2</sub>, 87.8%；M<sub>3</sub>, 86.6%；M<sub>4</sub>, 92.1%；M<sub>5</sub>, 91.9% (表八)。PGB1 A23C-I 的螢光共振能量轉移效率在各狀態下各為：Denatured, 56.8%；M<sub>1</sub>, 81.9%；M<sub>2</sub>, 83.7%；M<sub>3</sub>, 80.7%；M<sub>4</sub>, 88.9%；M<sub>5</sub>, 88.4% (表九)。兩個蛋白質的螢光共振能量轉移效率都隨著摺疊而逐漸增加，表示 FRET donor 與 acceptor 的距離逐漸接近；螢光共振能量轉移效率  $E$  與  $R_0$  有代入以下關係式以得到螢光共振能量轉移供體與受體之間的距離  $r$ ：

$$r = \sqrt[6]{R_0^6 / E - R_0^6}$$

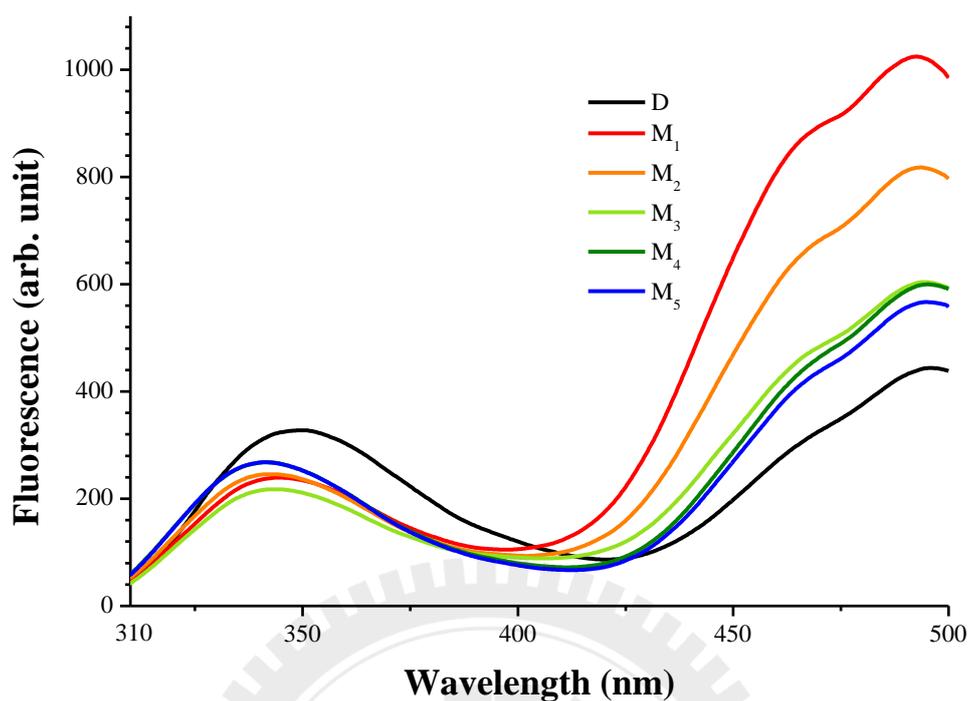
PGB1 G9C 和 A23C 各狀態下的供體受體之間的距離整理如圖三十六、圖三十七。PGB1 G9C 在各個摺疊狀態下的距離變化：Denatured, 21.3 Å；M<sub>1</sub>, 18.6 Å；M<sub>2</sub>, 18.8 Å；M<sub>3</sub>, 17.0 Å；M<sub>4</sub>, 16.1 Å；M<sub>5</sub>, 16.0 Å。PGB1 A23C 在各個摺疊狀態下的距離變化：Denatured, 18.6 Å；M<sub>1</sub>, 16.8 Å；M<sub>2</sub>, 16.7 Å；M<sub>3</sub>, 16.7 Å；M<sub>4</sub>, 17.0 Å；M<sub>5</sub>, 17.0 Å。很明顯地，兩者的距離變化趨勢不盡相同，PGB1 G9C 的距離變化所呈現的為三階層轉變 (three-state transition)，而 PGB1 A23C 的距離變化所呈現的為二階層轉變 (two-state transition)



圖三十四：PGB1 G9C-I 隨摺疊狀態改變的螢光光譜

表八：PGB1 G9C-I 的光譜強度變化與螢光共振能量轉移效率

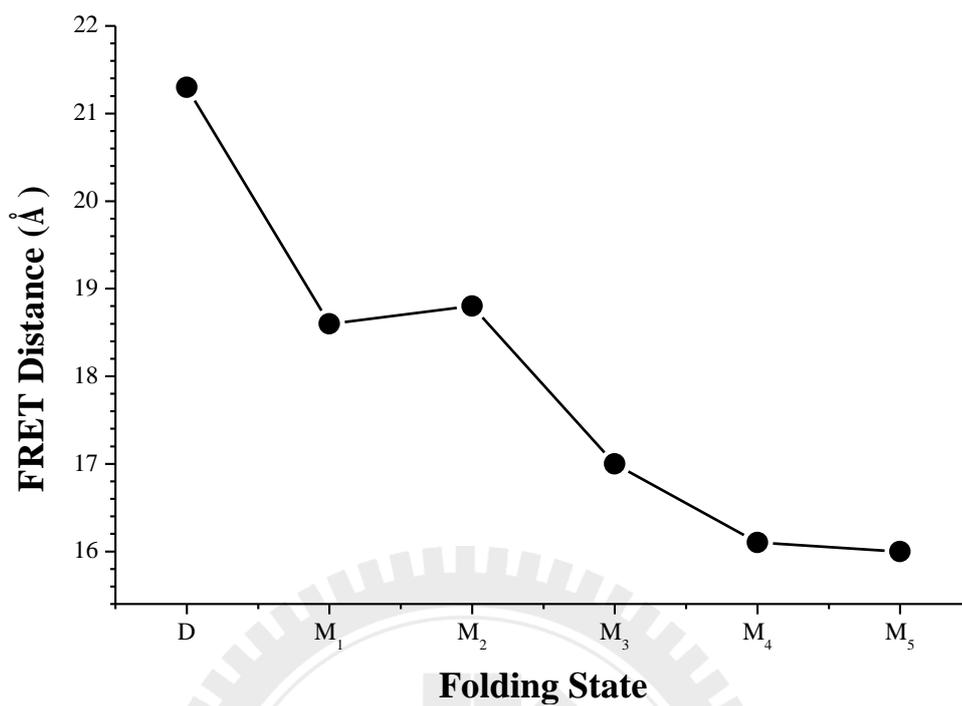
Folding State	Fluorescence Intensity $f$ (arb. unit)	FRET Efficiency $E$ (%)	Distance $r$ (Å)
Denatured	305.3	59.8	21.3
M <sub>1</sub>	207.6	84.2	18.6
M <sub>2</sub>	184.5	87.8	18.8
M <sub>3</sub>	151.3	86.6	17.0
M <sub>4</sub>	191.6	92.1	16.1
M <sub>5</sub>	187.0	91.9	16.0



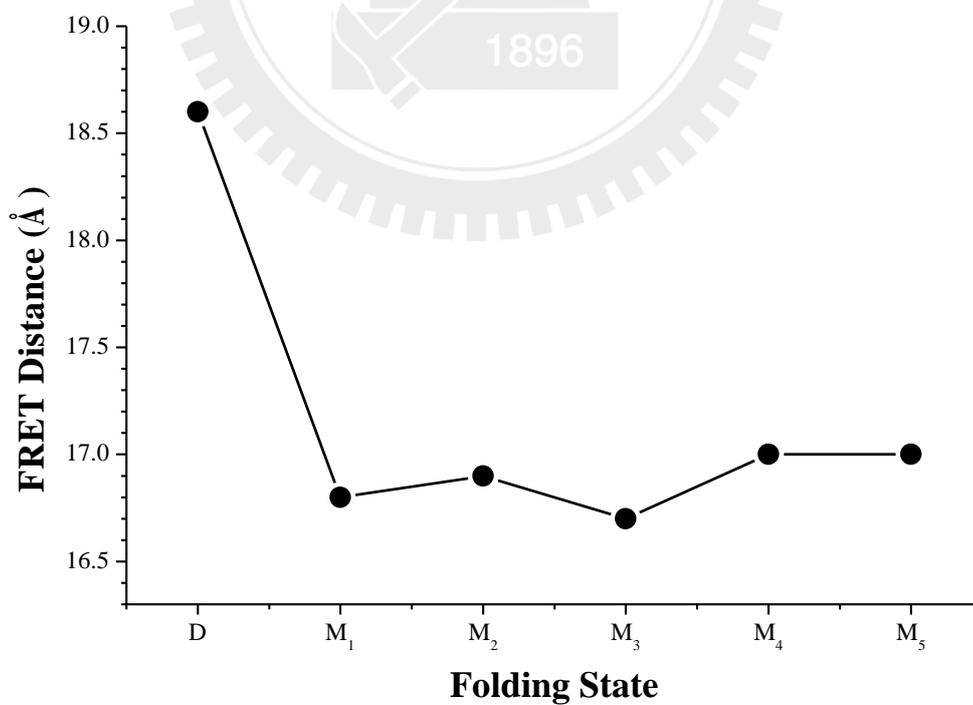
圖三十五：PGB1 A23C-I 隨摺疊狀態改變的螢光光譜。

表九：PGB1 A23C-I 的光譜強度變化與螢光共振能量轉移效率。

Folding State	Fluorescence Intensity $f$ (arb. unit)	FRET Efficiency $E$ (%)	Distance $r$ (Å)
Denatured	327.8	56.8	18.6
M <sub>1</sub>	237.9	81.9	16.8
M <sub>2</sub>	245.6	83.7	16.8
M <sub>3</sub>	217.6	80.7	16.5
M <sub>4</sub>	268.0	88.9	17.0
M <sub>5</sub>	268.0	88.4	17.0



圖三十六：β-hairpin 1 - β-hairpin 2 (G9C)的距離變化

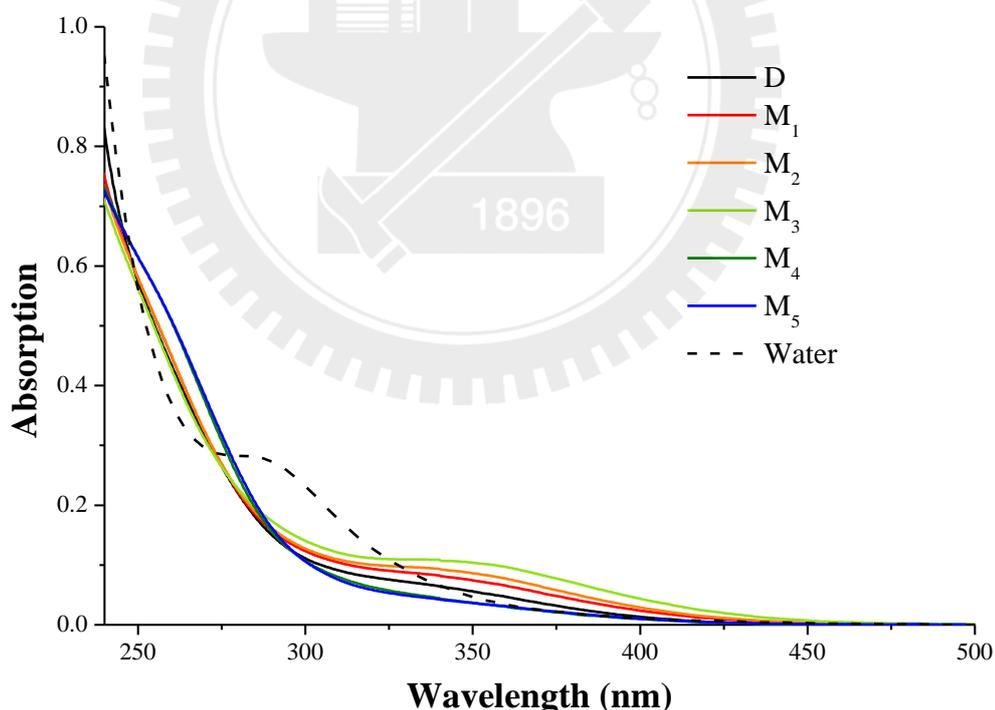


圖三十七：β-hairpin 2 - α-helix (A23C)的距離變化

#### 4-11 H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 吸收光譜及淬熄螢光光譜

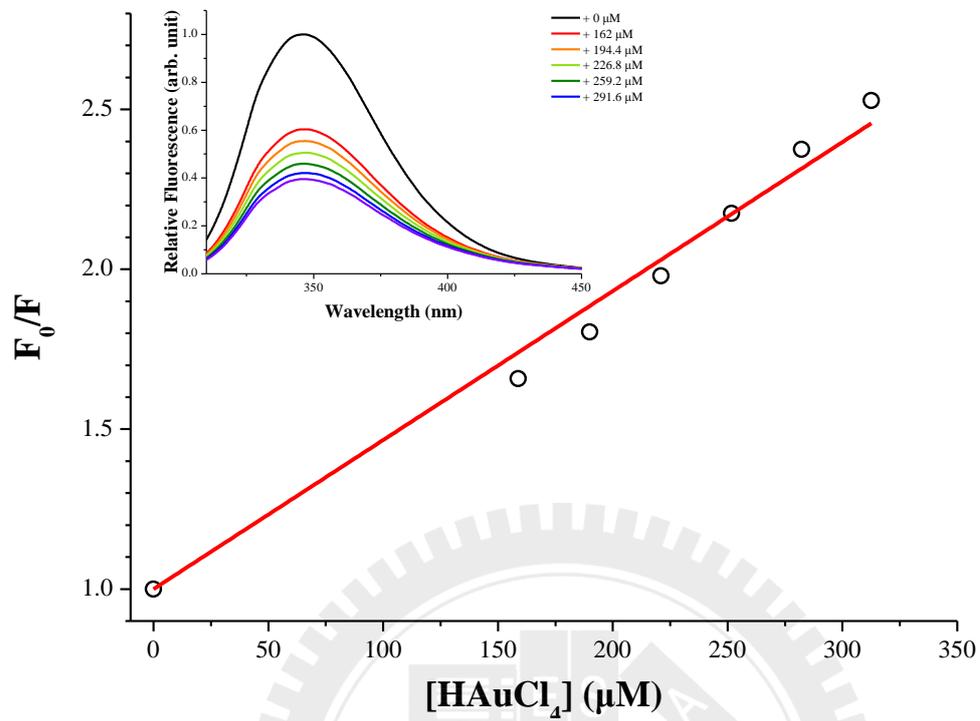
在實驗室中發現 H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 具有淬熄蛋白質螢光的能力，但對於 H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 在不同溶液環境中的光譜特性變化還不清楚。97.12 μM H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 加到 Over-critical Folding Process 的各個摺疊狀態溶液以及水中，發現吸收光譜在不同溶液中有很大的變化，如圖三十八所示。水溶液中的 H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 約在 287 nm 有一個特徵峰，此與文獻相同。在 M<sub>4</sub> 和 M<sub>5</sub> 的摺疊狀態溶液中時，在 260 和 350 nm 各有一個不明顯的特徵峰；在 M<sub>3</sub> 的摺疊狀態溶液中，260 nm 的特徵峰幾乎消失，350 nm 附近的特徵峰變得明顯；在 D、M<sub>1</sub> 和 M<sub>2</sub> 的摺疊狀態溶液中，隨著 urea 的濃度增加，350 nm 附近的特徵峰變得越來越小，但在 8 M urea 下此特徵峰還是較 M<sub>4</sub> 和 M<sub>5</sub> 時大。

以 H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 對於蛋白質 PGB1 的 Trp43 螢光淬熄光譜，如圖三十九～圖四十四所示。H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 在各摺疊狀態溶液下對 PGB1 的  $K_{SV}$  為：D,  $4.66 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ；M<sub>1</sub>,  $4.04 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ；M<sub>2</sub>,  $2.78 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ；M<sub>3</sub>,  $3.43 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ；M<sub>4</sub>,  $6.49 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ；M<sub>5</sub>,  $5.34 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 。

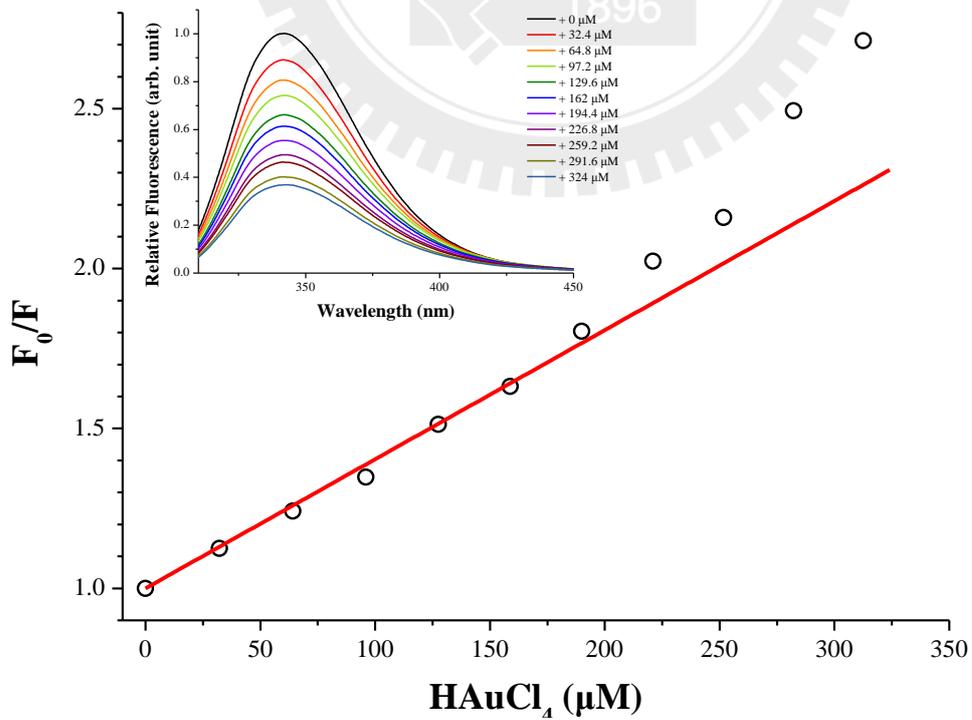


圖三十八：H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> 在不同 buffer 下的吸收光譜

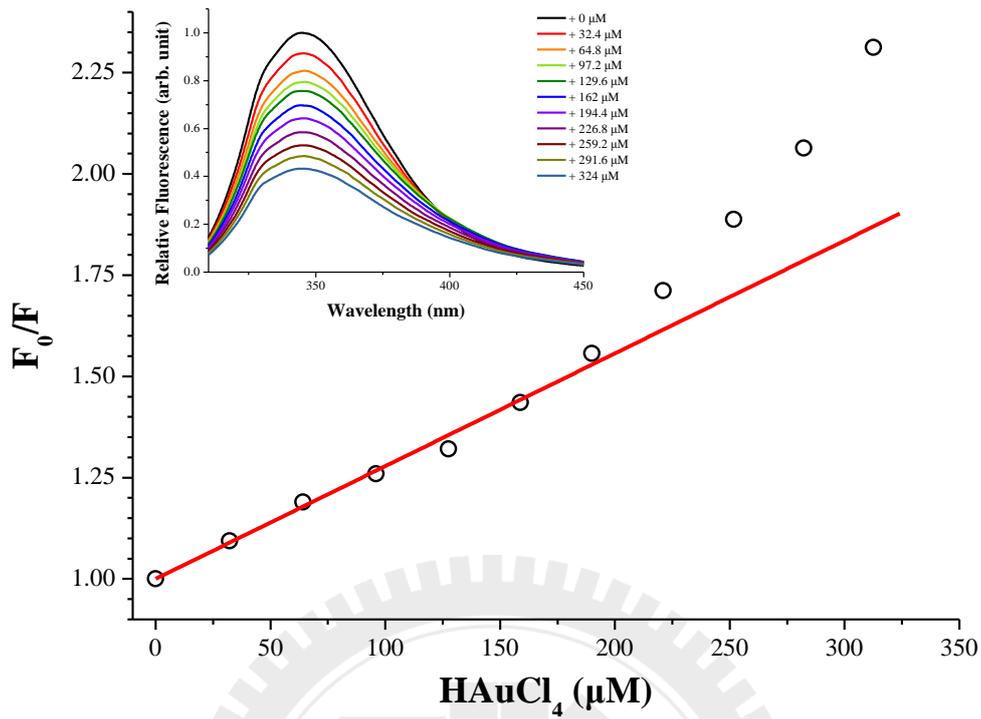
D: 8 M urea, 0.1% Mannitol, 10 mM Tris, pH 12; M<sub>1</sub>: 2 M urea, 0.1% Mannitol, 10 mM Tris, pH 11; M<sub>2</sub>: 1 M urea, 0.1% Mannitol, 10 mM Tris, pH 11; M<sub>3</sub>: 0.1% Mannitol, 10 mM Tris, pH 11; M<sub>4</sub>: 0.1% Mannitol, 10 mM Tris, pH 8.8; M<sub>5</sub>: 10 mM Tris, pH 8.8。



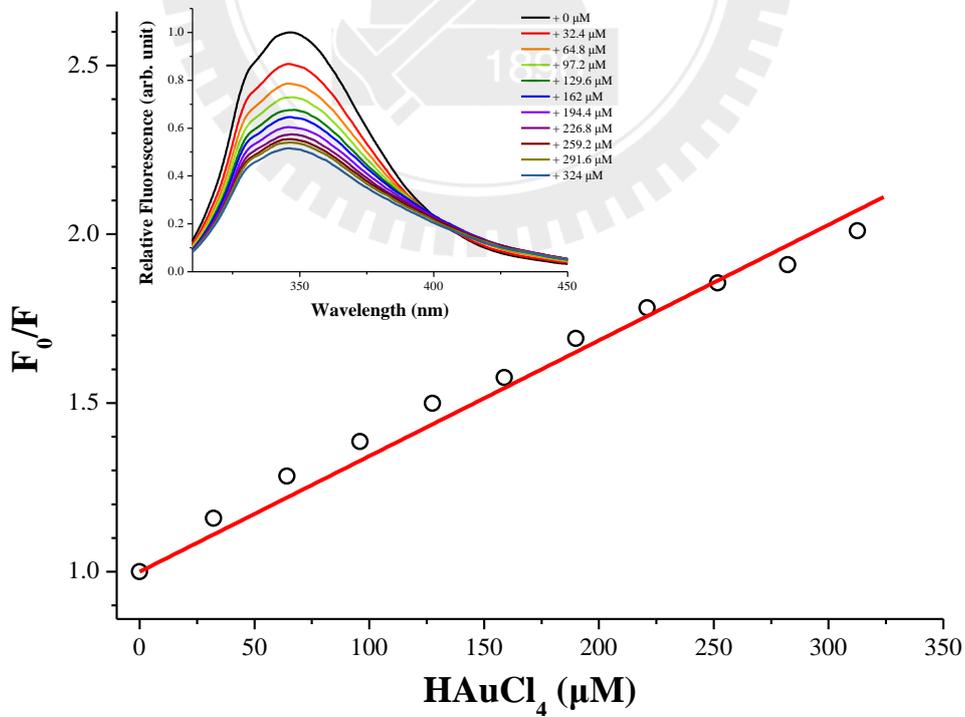
圖三十九：在 Denatured 狀態下， $\text{HAuCl}_4$  淬熄 PGB1 的螢光光譜， $K_{SV}=4.66 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$



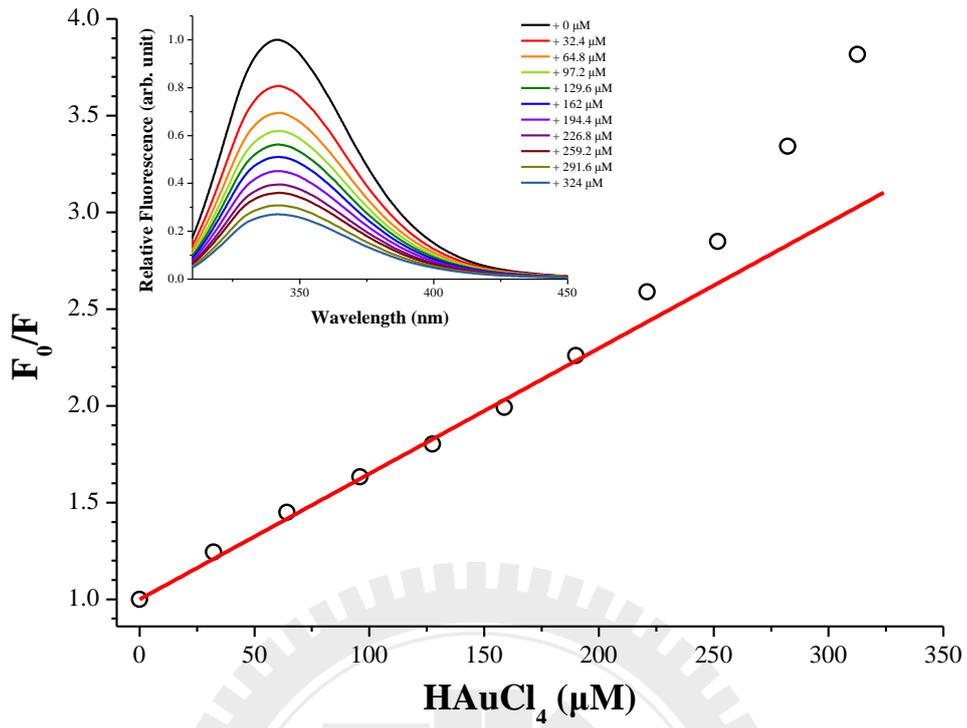
圖四十：在  $M_1$  狀態下， $\text{HAuCl}_4$  淬熄 PGB1 的螢光光譜， $K_{SV}=4.04 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$



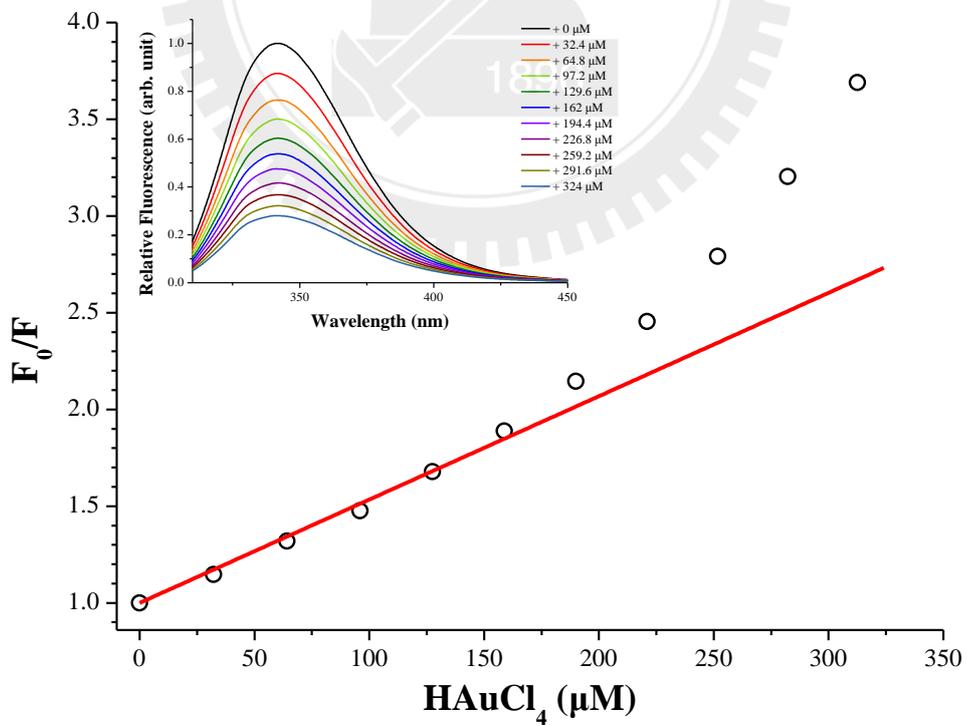
圖四十一：在  $M_2$  狀態下， $\text{HAuCl}_4$  淬熄 PGB1 的螢光光譜， $K_{SV}=2.78 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$



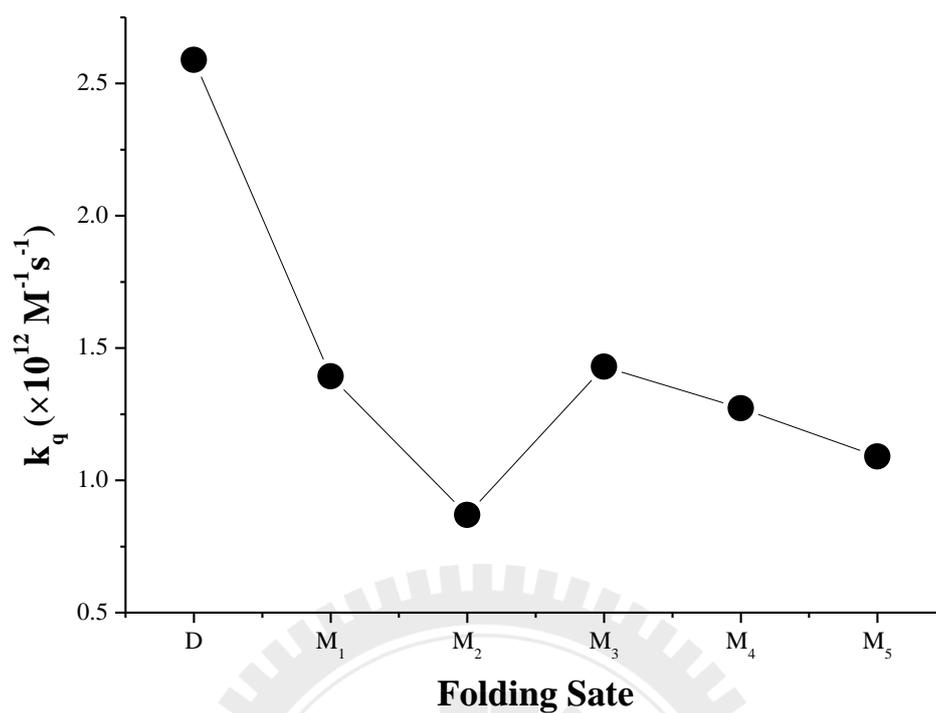
圖四十二：在  $M_3$  狀態下， $\text{HAuCl}_4$  淬熄 PGB1 的螢光光譜， $K_{SV}=3.43 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$



圖四十三：在  $M_4$  狀態下，HAuCl<sub>4</sub> 淬熄 PGB1 的螢光光譜， $K_{SV}=6.49 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$



圖四十四：在  $M_5$  狀態下，HAuCl<sub>4</sub> 淬熄 PGB1 的螢光光譜， $K_{SV}=5.34 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$



圖四十五：HAuCl<sub>4</sub> 對各摺疊狀態的 PGB1 wt 的  $k_q$  變化圖

表十：由 HAuCl<sub>4</sub> 淬熄 PGB1 wt 的 Trp43 螢光之結果總表

Folding State	Stern-Volmer Constant $K_{SV}$ ( $\times 10^3 \text{ M}^{-1}$ )	Fluorescence Lifetime $\tau_0$ (ns)	Quenching Constant <sup>b</sup> $k_q$ ( $\times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
Denatured	4.66	1.8	2.59
M <sub>1</sub>	4.04	2.9	1.39
M <sub>2</sub>	2.78	3.2	0.87
M <sub>3</sub>	3.43	2.4	1.43
M <sub>4</sub>	6.49	5.1	1.27
M <sub>5</sub>	5.34	4.9	1.09

## 第五章 討論

### A. 摺疊後 PGB1 之功能測試

蛋白質 PGB1 能與大多數的哺乳類免疫球蛋白 G (IgG) 鍵結，其鍵結主要是透過 $\alpha$ -helix 的 C 端部分、 $\beta$ -strand 3 的 N 端部分以及前述兩者之間的連結區段上的帶電和疏水性胺基酸與 IgG 的 hFc 片段上的  $C_H^2$ - $C_H^3$  區域 (即第二與第三個 Heavy Chain Constant Domain)，並且一個 IgG 能與兩個 PGB1 結合 (PDB: 1FCC) [20, 21]。因此，PGB1 的結構必須正確摺疊才能與 IgG 鍵結，我們便利用這特性證認 over-critical folding process 能夠將 PGB1 正確地摺疊。此實驗係藉由等溫滴定微量熱法測量以摺疊完成的 PGB1 wt 與 IgG 的鍵結比例以及鍵結能。等溫滴定微量熱實驗結果顯示，摺疊後的 PGB1 wt 與 IgG 的結合比例為 2:1，也就是與自然狀態下相同地兩個 PGB1 wt 與一個 IgG 結合；反應常數為  $5.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ，略小於文獻提到的  $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  [20]，兩者數值很接近，些微的差異可能來自於所使用的 IgG 來源物種不相同，或者是所使用的溶劑不相同所造成的。以此結果推測以 over-critical folding process 能夠正確地摺疊 PGB1。

### B. 螢光光譜變化與同步輻射圓二色光譜

隨著 over-critical folding process 摺疊，蛋白質 PGB1 的螢光強度逐漸增強，螢光強度自 denatured 狀態到  $M_5$  自然態增強約三倍 (圖十七)，此螢光強度變化與文獻相吻合 [33, 34, 82]。同樣地，圓二色光譜隨著摺疊增強訊號；利用 Dicroprot 2000 [78] 軟體的 selcon 3 (self-consistent) [79, 80] CD 光譜解析方法解析在  $M_5$  狀態下的 PGB1 wt 的同步輻射圓二色光譜 (SRCD)，可以得到 PGB1 主要的二級結構比例： $\alpha$ -helix，12.9%； $\beta$ -sheet，25.8%；Turn，11.2%。以 STRIDE [83] 分析 PGB1 的 X-ray 結晶結構 (PDB: 1pga) 得到 PGB1 的序列中有 15 個胺基酸形成  $\alpha$ -helix，24 個胺基酸形成  $\beta$ -sheet，Turn 則有 8 個胺基酸，再除此實驗所使用的 His-tagged PGB1 的胺基酸總數，各二級結構的比例為： $\alpha$ -helix，16.3%； $\beta$ -sheet，26.1%；Turn，8.7%。相比較可以得知，SRCD 光譜解析所預測的蛋白質二級結構與 X-ray 結晶結構很相似，證實 over-critical folding process 能夠將變性的蛋白質摺疊至正

確的構型[4-7]。從此分析也可以得知此實驗所使用的 His-tag peptide 應不形成特定二級結構且不影響原有蛋白質結構，與一般預期相同[84]。

### C. Hydrophobic Collapse : $\lambda_{\max}$ 變化與 Acrylamide 淬熄螢光光譜

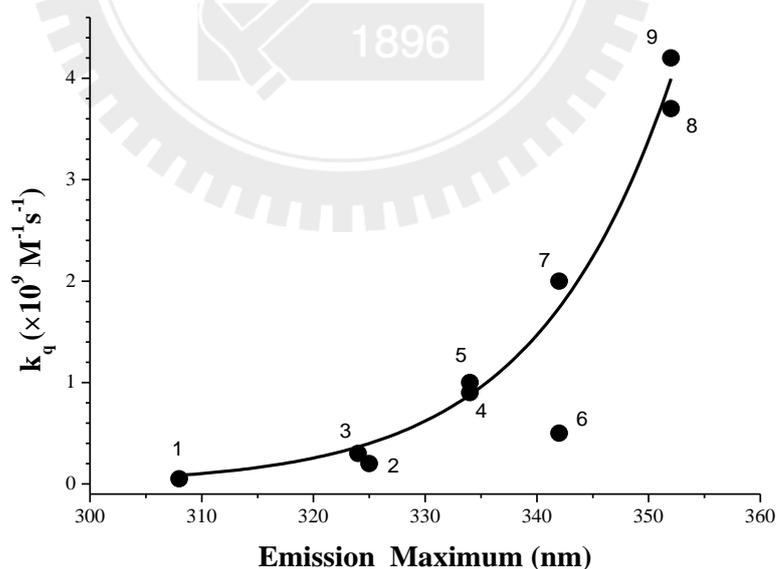
大多數自然狀態存在的蛋白質的色胺酸螢光波峰 ( $\lambda_{\max}$ ) 分布在約 325 到 350 nm 之間，一般認為  $\lambda_{\max}$  與蛋白質上的色胺酸暴露在蛋白質之外的程度有關[85, 86]。這現象主要建立在觀察自由存在的色胺酸或其衍生物（如，N-Acetyl-L-tryptophanamide）在高極性的溶劑或包圍在極性 carboxy 或 amino 基團之環境[39, 87]，以及許多變性或未摺疊（unfolded）的帶有色胺酸殘基的蛋白質所擁有的  $\lambda_{\max}$  多接近 350 nm，而當溶液環境的極性較低或介電常數（electric constant）較小時，如，dioxane，其  $\lambda_{\max}$  會往低波長位移（ $\sim 325$  nm）；因此推斷，處在極性較高的環境中，如蛋白質表面或疏水核心之外，色胺酸的  $\lambda_{\max}$  會趨向較長的波長（ $\sim 350$  nm），而包埋在非極性的蛋白質內部則趨向較短的波長（ $\sim 325$  nm）。由於，PGB1 的 56 個胺基酸組成中只包含了一個色胺酸，該色胺酸在胺基酸序列的第 43 個位置（Trp43），即位在  $\beta$ -strand 3 上，是組成在 PGB1 內部疏水核心的胺基酸之一；故非常適合利用螢光光譜中 Trp43 的螢光波峰波長 ( $\lambda_{\max}$ ) 的位移做為疏水核心結構變化的指標[88, 89]。圖十七的內插圖為  $\lambda_{\max}$  的變化圖，在 denatured 狀態下的 PGB1,  $\lambda_{\max}$  為  $345.0 \pm 0.4$  nm，當摺疊環境到達  $M_1$  之後  $\lambda_{\max}$  便大幅地位移並維持在約 341 nm；在  $M_5$  狀態下的  $\lambda_{\max}$  為  $340.8 \pm 0.4$  nm，反映出 Trp43 應是半包埋在 PGB1 的疏水核心之中，這項推測與目前已有的 NMR 和 X-ray 結晶結構[24, 25, 90]以及文獻[82, 91, 92]相符合。在 denatured 狀態下較長波峰的位置直接顯示 Trp43 所處的微環境（microenvironment）有較高的極性，而  $\lambda_{\max}$  在  $M_1$  狀態之後的大幅度降低，顯示 Trp43 突然進入了較低極性的微環境中；這現象暗示著蛋白質 PGB1 的疏水核心在摺疊初期便形成。

為了進一步證實 Trp43 週遭環境極性的降低與 Trp43 被包埋入蛋白質的疏水核心有關，我們利用 acrylamide 淬熄 Trp43 的螢光程度來判別 Trp43 隨著摺疊而被包埋的程度。Acrylamide 的螢光淬熄能力對色胺酸在蛋白質上被包埋或被曝露出來的程度很敏感，並且也有在小型球蛋白質研究中指出 acrylamide 對溶液的黏滯性（viscosity）的相關性較低，只與其穿透進入蛋白質內部的速率有關[40-42, 93]。

因此，若蛋白質上的色胺酸殘基受其他殘基包埋而減弱其曝露程度，便會反映在 acrylamide 的螢光淬熄能力 ( $k_q$ ) 變化。在多數僅具有單一色胺酸的小型蛋白質其色胺酸的  $\lambda_{\max}$  與 acrylamide 的  $k_q$  有正相關 (圖四十六)，但由於疏水核心的崩解抑或是與其他極性胺基酸殘基靠近甚至是不緊密的結構都能造成  $\lambda_{\max}$  的紅位移，因此 acrylamide 的  $k_q$  更能表現色胺酸在蛋白質上的位置[41]。

在圖二十九可以看到，denatured 狀態下 acrylamide 對 PGB1 Trp43 的淬熄能力  $k_q$  接近  $3.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  遠較其他狀態來的大，顯示 Trp43 在 denatured 狀態的曝露程度大於在其他摺疊狀態下；而在低 urea 濃度 (2~0 M) 和高鹼性 (pH 11) 的環境下 ( $M_1 \sim M_3$ )， $k_q$  僅略大於在  $M_4$  和  $M_5$  狀態 (pH 8.8)。這顯示在  $M_1$  狀態時，Trp43 被包埋的程度已經和  $M_5$  狀態 (自然態) 接近。

綜合以上 Trp43 的螢光波峰位移以及 acrylamide 螢光淬熄能力變化的結果顯示 PGB1 在摺疊的初期 (denatured~ $M_1$ ) 就已經出現類似於自然態的疏水核心，而在  $M_1 \sim M_3$  階段 PGB1 的二級結構或三級結構正在進行微調 (reshuffle)；已有文獻指出 PGB1 在摺疊初期存在一個未完全摺疊 (partially-folded) 的疏水核心[30, 33-35, 94]。這符合於 hydrophobic collapse 模型[95-97]；在一開始摺疊係以疏水胺基酸互相聚集為主要過程，接下來才開始形成特定的二級結構和三級結構。



圖四十六：Acrylamide 對單 Trp 蛋白質的螢光淬熄能力 ( $k_q$ ) 與螢光波峰波長 ( $\lambda_{\max}$ ) 之關係圖各數字對應蛋白質為：1, azurin；2, HSA-SDS；3, RNase T<sub>1</sub>；4, nuclease；5, HSA (pH 2.5)；6, HSA (pH 5.5)；7, monellin；8, glucagon；9, ACTH。重新繪製自 ref. [41]。

#### D. HAuCl<sub>4</sub> 淬熄螢光光譜

本實驗發現 HAuCl<sub>4</sub> 可以用作蛋白螢光淬熄，而且其淬熄能力是 acrylamide 的一千倍，是一個極靈敏的淬熄劑。HAuCl<sub>4</sub> 淬熄螢光的機制目前尚不清楚，但將各摺疊狀態下對 PGB1 的淬熄能力的變化（圖四十五）與 acrylamide（圖二十九）相比較，可以發現其變化都是二狀態反應，顯示蛋白質的結構變化亦可以由 HAuCl<sub>4</sub> 淬熄能力變化得知。另外，HAuCl<sub>4</sub> 的吸收光譜隨著 pH、urea 濃度而改變；350 nm 附近的特徵峰，在 M<sub>3</sub> 狀態時為最高峰，此時的 pH 為 11，不含有 urea；增加 urea 濃度，或降低 pH 都會使此特徵峰強度下降。由於這個特徵峰與蛋白質的色胺酸螢光光譜有重疊區域，可能會有能量轉移的現象，故推測這是 HAuCl<sub>4</sub> 淬熄能力遠強於 acrylamide 的原因。

#### E. 蛋白質粒徑大小變化與 Trp43 包埋程度不同調

利用動態光散射（Dynamic Light Scattering）測量 PGB1 隨著 over-critical folding process 摺疊之粒徑大小的變化。從圖二十二可以看到 PGB1 的粒徑大小在 M<sub>1</sub>~M<sub>3</sub> 狀態下 PGB1 的大小仍然較 M<sub>5</sub> 狀態下大上了 1 nm，可能結構仍然在此狀態時還是非常的鬆散。相較於 acrylamide 的  $k_q$  和 Trp43 的  $\lambda_{max}$  變化，M<sub>1</sub>~M<sub>3</sub> 狀態下 Trp43 的周遭環境已接近於 M<sub>5</sub> 自然態；而從 CD 光譜的變化看到 M<sub>1</sub> 狀態開始就出現了類似 M<sub>5</sub> 狀態的光譜而與 denatured 狀態的光譜相差甚多的現象，這顯示在 PGB1 在 M<sub>1</sub> 狀態就有類似於自然態的二級結構比例存在。這些證據指向此時的 PGB1 可能處於 molten globule state，擁有類似自然態的二級結構與三級結構，但整體結構還較為鬆散且各胺基酸的位置擾動（fluctuation）較自然態來得大 [98-101]。

#### F. 螢光共振能量轉移距離分析

在文獻中，氫氘交換（hydrogen-deuterium exchange）和核磁共振光譜（nuclear magnetic resonance spectrum）的研究指出蛋白質 PGB1 在摺疊過程最初組成核心的三個區域分別為： $\beta$ -hairpin 2、 $\alpha$ -helix 的中間區段以及  $\alpha$ -helix 的 N 端區域 [33, 34]。

因此，我們認為利用螢光共振能量轉移能夠觀察到較慢成形的  $\beta$ -hairpin 1。

我們選擇位在組成  $\beta$ -hairpin 2 的  $\beta$ -strand 4 中段上的 Trp43 作為螢光共振能量轉移的供體 (donor)，將代表  $\beta$ -hairpin 2 在摺疊過程中的位置。而作為螢光共振能量轉移受體 (acceptor) 的 IAEDANS 被選擇在 Gly9 和 Ala23 上並以 Cys 取代原有胺基酸以便藉由 S-carboxymethylation 反應形成 covalent bond 固定在該位置；因此，Gly9 位置上的 IAEDANS 將代表  $\beta$ -hairpin 1 在摺疊過程中的位置，而 Ala23 將代表  $\alpha$ -helix 的位置。這些點突變的位置皆是在結構較鬆散且暴露在蛋白質外的 loops 上，以避免影響整體蛋白質的結構。

隨著蛋白質摺疊，Gly9-Trp43 和 Ala23-Trp43 的距離呈現不一樣的變化 (圖三十六、圖三十七)。Gly9-Trp43 在 denatured 狀態下的距離 ( $r_D^{G9-W43}$ ) 為 21.3 Å 而  $M_5$  狀態下的距離 ( $r_{M5}^{G9-W43}$ ) 為 16.0 Å，相較於 Ala23-Trp43 的  $r_D^{A23-W43}$  為 18.6 Å 而  $r_{M5}^{A23-W43}$  為 17.0 Å，這兩者的距離變化相差甚多。Ala23-Trp43 的距離在離開 denatured 狀態後便穩定地維持在與自然態接近的距離，呈現二階層轉變 (two-state transition)，這與  $\lambda_{max}$  和  $k_q$  的結果變化非常類似，反映出  $\beta$ -hairpin 2 與  $\alpha$ -helix 這兩者的三級結構在摺疊初期便形成，很可能與 hydrophobic collapse 有關。反觀 Gly9-Trp43 的距離變化，有一點特別值得注意的是在  $M_1$  與  $M_2$  狀態時出現了一個過渡態，其距離平均在 18.7 Å；這顯然與呈現類似於二階層轉變的 Ala23-Trp43 距離變化不相同，因此  $\beta$ -hairpin 1 很可能在  $\beta$ -hairpin 2 與  $\alpha$ -helix 因疏水胺基酸聚集之後才形成。

另外， $r_{M5}^{G9-W43}$  與  $r_{M5}^{A23-W43}$  都比 PGB1 的 NMR 和 X-ray 結晶結構所呈現的距離多約 5~6 Å，這可能與 IAEDANS 螢光受體基團與蛋白質 Cys 之間連接的短碳鏈長度有關 [72, 73]。

## G. 蛋白質 PGB1 摺疊為 multi-state reaction

一般認為多數的小型蛋白質的摺疊遵循二階層反應 [29]，故最初 PGB1 的摺疊也被認為遵循相同反應。但有關 PGB1 的摺疊中是否存在中間態 (intermediate) 目前還有是些爭論，以 Roder [30] 等人於 1999 年所發表的研究為例，利用 continuous-flow 和 stopped-flow 測量 Trp43 的螢光變化認為 PGB1 存在一個中間態，然而 Krantz 等人 [31] 在 2002 發表另一篇研究質疑前者的研究方法分析的正確性；為此，Roder [32] 再次發表另一篇研究來平反。不過，以目前的多數研究結果，傾向認為蛋白質 PGB1 的摺疊存在中間態且推測是由  $\beta$ -hairpin 2 與  $\alpha$ -helix 之間的

疏水核心在摺得初期形成摺疊核心。而在分子模擬方面，S. Kmiecik 和 A. Kolinski [36]於 2008 年利用蒙地卡羅模擬 (Monte Carlo simulation) 得到的相同結果，認為 PGB1 的摺疊由  $\beta$ -hairpin 2 與  $\alpha$ -helix 之間的疏水核心做為摺疊起始的核心，再接著以小幅度的調整形形成整個  $\beta$ -sheet，最後進入自然狀態。

前者的結論與我們的研究結果不謀而合，acrylamide 的螢光淬熄能力變化、蛋白質 PGB1 的 Trp43 螢光光譜位移以及  $\alpha$ -helix- $\beta$ -hairpin 2 的距離分析顯示 PGB1 的 Trp43 在摺疊的初期就已經被包埋進入在  $\alpha$ -helix 和  $\beta$ -hairpin 2 之間形成的疏水核心，但這個疏水核心還不是自然狀態下的疏水核心，因為由水合直徑分析與  $\beta$ -hairpin 1- $\beta$ -hairpin 2 的距離分析我們得知此時的  $\beta$ -hairpin 1 可能尚未成形，故整個疏水核心並不完善；隨著摺疊進入後面的階段才觀察到  $\beta$ -hairpin 1 靠近  $\beta$ -hairpin 2 進而形成 PGB1 的自然態。因此，我們認為蛋白質 PGB1 的摺疊是為 multi-state reaction。

## H. 結語

在此論文中，我們證實了利用 over-critical folding process 能夠將蛋白質 PGB1 摺疊至其自然態，並且摺疊後的蛋白質擁有與一般生理環境的功能相同的功能。藉由收集 over-critical folding process 各個摺疊階段的摺疊中間態，我們觀察到了 PGB1 的摺疊過程為多階層反應，與許多文獻研究的推論相符合並且給予很直接的證據支持此論點。另外，以色胺酸和 IAEDANS 很適合做為用來觀察蛋白質內部動態變化的 FRET 供體和受體。

## 參考文獻

1. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter (2007) The Shape of the Protein. *Molecular Biology of the Cell*, (Garland Science), 5 Ed.
2. Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223-230.
3. Misawa S & Kumagai I (1999) Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Peptide Science* 51:297-307.
4. Chang C-C, Su Y-C, Cheng M-S, & Kan L-S (2002) Protein folding by a quasi-static-like process: A first-order state transition. *Physical Review E* 66:021903.
5. Chang CC, Tsai CT, & Chang CY (2002) Structural restoration of inactive recombinant fish growth hormones by chemical chaperonin and solvent restraint approaches. *Protein engineering* 15:437.
6. Liu Y-L, Lee H-T, Chang C-C, & Kan L-S (2003) Reversible folding of cysteine-rich metallothionein by an overcritical reaction path. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306:59-63.
7. Chang C-C, Yeh X-C, Lee H-T, Lin P-Y, & Kan L-S (2004) Refolding of lysozyme by quasistatic and direct dilution reaction paths: A first-order-like state transition. *Physical Review E* 70:011904.
8. Ptitsyn OB (1994) Kinetic and equilibrium intermediates in protein folding. *Protein engineering* 7:593-596.
9. Agashe VR, Shastry MCR, & Udgaonkar JB (1995) Initial hydrophobic collapse in the folding of barstar. *Nature* 377:754-757.
10. Abkevich VI, Gutin AM, & Shakhnovich EI (1994) Specific Nucleus as the Transition State for Protein Folding: Evidence from the Lattice Model. *Biochemistry* 33:10026-10036.
11. Wetlaufer DB (1973) Nucleation, Rapid Folding, and Globular Intrachain Regions in Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70:697-701.
12. Guo Z & Thirumalai D (1995) Kinetics of protein folding: Nucleation mechanism, time scales, and pathways. *Biopolymers* 36:83-102.
13. Karplus M & Weaver DL (1994) Protein folding dynamics: The diffusion

- collision model and experimental data. *Protein Science* 3:650-668.
14. Karplus M & Weaver DL (1979) Diffusion–collision model for protein folding. *Biopolymers* 18:1421-1437.
  15. Bjorck L & Kronvall G (1984) Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *The Journal of Immunology* 133:969-974.
  16. Akerström B & Björck L (1986) A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. *Journal of Biological Chemistry* 261:10240-10247.
  17. Fahnstock SR, Alexander P, Nagle J, & Filpula D (1986) Gene for an immunoglobulin-binding protein from a group G streptococcus. *J. Bacteriol.* 167:870-880.
  18. Sjöbring U, Björck L, & Kastern W (1991) Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties. *Journal of Biological Chemistry* 266:399-405.
  19. Sjöbring U, Trojnar J, Grubb A, Akerstrom B, & Bjorck L (1989) Ig-binding bacterial proteins also bind proteinase inhibitors. *The Journal of Immunology* 143:2948-2954.
  20. Gronenborn AM & Clore GM (1993) Identification of the contact surface of a streptococcal protein G domain complexed with a human Fc fragment. *Journal of molecular biology* 233:331-335.
  21. Sauer-Eriksson AE, Kleywegt GJ, Uhlen M, & Jones TA (1995) Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG. *Structure* 3:265-278.
  22. Bjorck L & Kronvall G (1984) Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *The Journal of Immunology* 133:969.
  23. Akerstrom B, Brodin T, Reis K, & Bjorck L (1985) Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *The Journal of Immunology* 135:2589.
  24. Gronenborn AM, Filpula DR, Essig NZ, Achari A, Whitlow M, Wingfield PT, & Clore G (1991) A novel, highly stable fold of the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G. *Science* 253:657.
  25. Achari A, Hale SP, Howard AJ, Clore GM, Gronenborn AM, Hardman KD, & Whitlow M (1992) 1.67 Å X-ray structure of the B2 immunoglobulin-binding

- domain of streptococcal protein G and comparison to the NMR structure of the B1 domain. *Biochemistry* 31:10449-10457.
26. Alexander P, Fahnestock S, Lee T, Orban J, & Bryan P (1992) Thermodynamic analysis of the folding of the streptococcal protein G IgG-binding domains B1 and B2: why small proteins tend to have high denaturation temperatures. *Biochemistry* 31:3597-3603.
  27. Blanco FJ, Rivas G, & Serrano L (1994) A short linear peptide that folds into a native stable  $\beta$ -hairpin in aqueous solution. *Nature structural & molecular biology* 1:584-590.
  28. Munoz V, Thompson PA, Hofrichter J, & Eaton WA (1997) Folding dynamics and mechanism of  $\beta$ -hairpin formation. *Nature* 390:196-198.
  29. Jackson SE (1998) How do small single-domain proteins fold? *Folding and Design* 3:R81-R91.
  30. Park S, Shastry M, & Roder H (1999) Folding dynamics of the B1 domain of protein G explored by ultrarapid mixing. *nature structural biology* 6:943-947.
  31. Krantz B, Mayne L, Rumbley J, Englander S, & Sosnick T (2002) Fast and slow intermediate accumulation and the initial barrier mechanism in protein folding. *Journal of molecular biology* 324:359-371.
  32. Roder H, Maki K, & Cheng H (2006) Early Events in Protein Folding Explored by Rapid Mixing Methods. *Chemical Reviews* 106:1836-1861.
  33. Kuszewski J, Clore GM, & Gronenborn AM (1994) Fast folding of a prototypic polypeptide: the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 3:1945.
  34. Frank MK, Clore GM, & Gronenborn AM (1995) Structural and dynamic characterization of the urea denatured state of the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 4:2605.
  35. Park S, O'Neil K, & Roder H (1997) An Early Intermediate in the Folding Reaction of the B1 Domain of Protein G Contains a Native-like Core. *Biochemistry* 36:14277-14283.
  36. Kmiecik S & Kolinski A (2008) Folding pathway of the B1 domain of protein G explored by multiscale modeling. *Biophysical journal* 94:726-736.
  37. Kolinski A (2004) Protein modeling and structure prediction with a reduced representation. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*-51:349-372.

38. McCallister EL, Alm E, & Baker D (2000) Critical role of [beta]-hairpin formation in protein G folding. *Nat Struct Mol Biol* 7:669-673.
39. Lacowicz J (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy* (Springer) 3rd Ed.
40. Eftink MR & Ghiron CA (1976) Fluorescence quenching of indole and model micelle systems. *The Journal of Physical Chemistry* 80:486-493.
41. Eftink MR & Ghiron CA (1976) Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry* 15:672-680.
42. Eftink MR & Ghiron CA (1977) Exposure of tryptophanyl residues and protein dynamics. *Biochemistry* 16:5546-5551.
43. Grabar KC, Freeman RG, Hommer MB, & Natan MJ (1995) Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. *Analytical Chemistry* 67:735-743.
44. Daniel M-C & Astruc D (2003) Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews* 104:293-346.
45. Liang X, Wang Z, & Liu C (2010) Size-Controlled Synthesis of Colloidal Gold Nanoparticles at Room Temperature Under the Influence of Glow Discharge. *Nanoscale research letters* 5:124-129.
46. Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437:55-75.
47. Pollok BA & Heim R (1999) Using GFP in FRET-based applications. *Trends in cell biology* 9:57-60.
48. Jares-Erijman EA & Jovin TM (2003) FRET imaging. *Nature Biotechnology* 21:1387-1395.
49. Sekar RB & Periasamy A (2003) Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of cell biology* 160:629.
50. Kenworthy AK, Petranova N, & Edidin M (2000) High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Molecular Biology of the Cell* 11:1645.
51. Jha S & Udgaonkar J (2009) Direct evidence for a dry molten globule intermediate during the unfolding of a small protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:12289.
52. Thakur A, Jayaraman M, Mishra R, Thakur M, Chellgren V, Byeon I, Anjum D,

- Kodali R, Creamer T, & Conway J (2009) Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism. *Nature structural & molecular biology* 16:380-389.
53. Hudson EN & Weber G (1973) Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents. *Biochemistry* 12:4154-4161.
  54. Hermanson GT (1996) *Bioconjugate techniques* (Academic Pr).
  55. Bartlett JMS & Stirling D (2003) *PCR protocols* (Humana Pr Inc).
  56. Sambrook J & Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold spring harbor laboratory press).
  57. Davis B (1964) Disc electrophoresis. 11. Method and application to human serum proteins. *Ann. NY Acad. Sci* 121:404-427.
  58. Shapiro AL, Viñuela E, & V. Maizel J (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 28:815-820.
  59. Weber K & Osborn M (1969) The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* 244:4406-4412.
  60. Mirsky AE & Pauling L (1936) On the structure of native, denatured, and coagulated proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 22:439.
  61. Welch WJ & Brown CR (1996) Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell stress & chaperones* 1:109.
  62. Kasha M (1952) Collisional Perturbation of Spin Orbital Coupling and the Mechanism of Fluorescence Quenching. A Visual Demonstration of the Perturbation. *The Journal of chemical physics* 20:71.
  63. Altekar W (1974) The quenching of the tryptophyl and tyrosyl fluorescence of proteins by cesium ion. *FEBS Letters* 49:208-211.
  64. Vos R & Engelborghs\* Y (1994) A FLUORESCENCE STUDY OF TRYPTOPHAN-HISTIDINE INTERACTIONS IN THE PEPTIDE ANANTIN AND IN SOLUTION. *Photochemistry and Photobiology* 60:24-32.
  65. Li HY, Ng EKO, Lee SMY, Kotaka M, Tsui SKW, Lee CY, Fung KP, & Waye MMY (2001) Protein-protein interaction of FHL3 with FHL2 and visualization of their interaction by green fluorescent proteins (GFP) two fusion fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Journal of cellular biochemistry* 80:293-303.

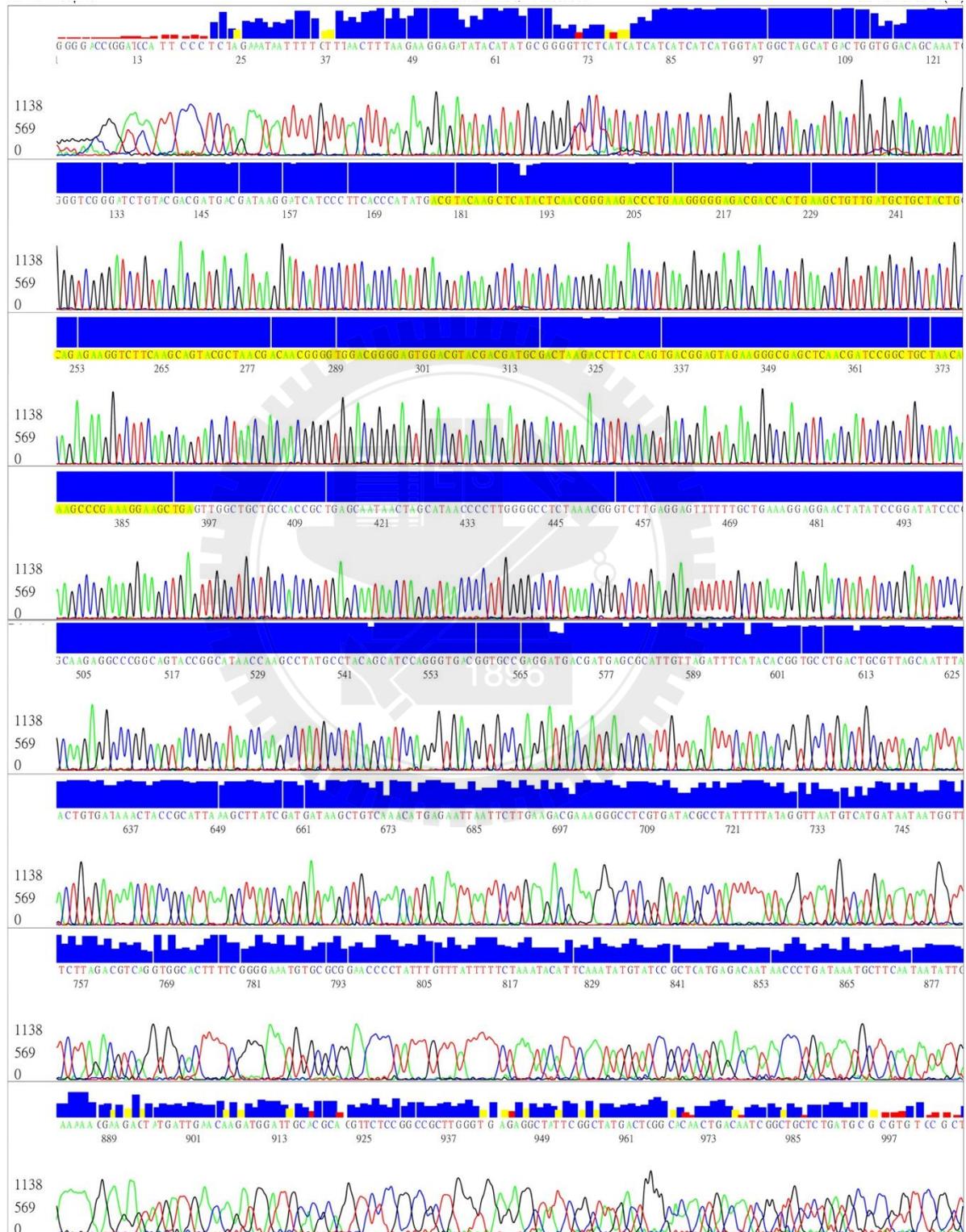
66. Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HHHW, Busse R, & Brandes RP (2004) Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 279:45935.
67. Hillisch A, Lorenz M, & Diekmann S (2001) Recent advances in FRET: distance determination in protein-DNA complexes. *Current Opinion in Structural Biology* 11:201-207.
68. Takaoka A, Wang ZC, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, & Honda K (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448:501-505.
69. Lawson CL, Swigon D, Murakami KS, Darst SA, Berman HM, & Ebright RH (2004) Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Current Opinion in Structural Biology* 14:10-20.
70. Ray PC, Fortner A, & Darbha GK (2006) Gold Nanoparticle Based FRET Assay for the Detection of DNA Cleavage. *The Journal of Physical Chemistry B* 110:20745-20748.
71. Millar DP (1996) Fluorescence studies of DNA and RNA structure and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology* 6:322-326.
72. Huang F, Settanni G, & Fersht A (2008) Fluorescence resonance energy transfer analysis of the folding pathway of Engrailed Homeodomain. *Protein Engineering Design and Selection*.
73. Magg C & Schmid FX (2004) Rapid Collapse Precedes the Fast Two-state Folding of the Cold Shock Protein. *Journal of molecular biology* 335:1309-1323.
74. Miyake-Stoner S, Miller A, Hammill J, Peeler J, Hess K, Mehl R, & Brewer S (2009) Probing protein folding using site-specifically encoded unnatural amino acids as FRET donors with tryptophan. *Biochemistry* 48:5953-5962.
75. Gill SC & von Hippel PH (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* 182:319-326.
76. Johnson Jr WC (1988) Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry* 17:145-166.
77. Kelly SM & Price NC (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1338:161-185.

78. Deléage G & Geourjon C (1993) An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* 9:197-199.
79. Sreerama N & Woody RW (1993) A Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Analytical Biochemistry* 209:32-44.
80. Sreerama N, Venyaminov SYU, & Woody RW (1999) Estimation of the number of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Science* 8:370-380.
81. Shirley BA (1995) Urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Mol Biol* 40:177-190.
82. Tcherkasskaya O, Knutson J, Bowley S, Frank M, & Gronenborn A (2000) Nanosecond dynamics of the single tryptophan reveals multi-state equilibrium unfolding of protein GB1. *Biochemistry* 39:11216-11226.
83. Frishman D & Argos P (1995) Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins-Structure Function and Genetics* 23:566-579.
84. Carson M, Johnson DH, McDonald H, Brouillette C, & DeLucas LJ (2007) His-tag impact on structure. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 63:295-301.
85. TEALE FW (1960) The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solution. *Biochem. J.* 76:381-380.
86. Burstein EA, Vedenkina NS, & Ivkova MN (1973) Fluorescence and the Location of Tryptophan Residues in Protein Molecules. *Photochemistry and Photobiology* 18:263-279.
87. Muin o PL & Callis PR (2008) Solvent Effects on the Fluorescence Quenching of Tryptophan by Amides via Electron Transfer. Experimental and Computational Studies. *The Journal of Physical Chemistry B* 113:2572-2577.
88. Callis PR & Burgess BK (1997) Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins from Hybrid Simulations: An Electrostatic Approach. *The Journal of Physical Chemistry B* 101:9429-9432.
89. Pan C-P, Callis PR, & Barkley MD (2006) Dependence of Tryptophan Emission Wavelength on Conformation in Cyclic Hexapeptides. *The Journal of Physical Chemistry B* 110:7009-7016.
90. Gallagher T, Alexander P, Bryan P, & Gilliland GL (1994) Two Crystal Structures of the B1 Immunoglobulin-Binding Domain of Streptococcal Protein

- G and Comparison with NMR. *Biochemistry* 33:4721-4729.
91. Ababou A & Bombarda E (2001) On the involvement of electron transfer reactions in the fluorescence decay kinetics heterogeneity of proteins. *Protein Science* 10:2102-2113.
  92. Toptygin D, Gronenborn AM, & Brand L (2006) Nanosecond relaxation dynamics of protein GB1 identified by the time-dependent red shift in the fluorescence of tryptophan and 5-fluorotryptophan. *The Journal of Physical Chemistry B* 110:26292-26302.
  93. Calhoun DB, Vanderkooi JM, Holtom GR, & Englander SW (1986) Protein fluorescence quenching by small molecules: protein penetration versus solvent exposure. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 1:109-115.
  94. Sheinerman FB & Brooks Iii CL (1998) Calculations on folding of segment B1 of streptococcal protein G. *Journal of molecular biology* 278:439-456.
  95. Robson B & Pain RH (1971) Analysis of the code relating sequence to conformation in proteins: Possible implications for the mechanism of formation of helical regions. *Journal of molecular biology* 58:237-257.
  96. Dill KA (1985) Theory for the folding and stability of globular proteins. *Biochemistry* 24:1501-1509.
  97. Gutin AM, Abkevich VI, & Shakhnovich EI (1995) Is Burst Hydrophobic Collapse Necessary for Protein Folding? *Biochemistry* 34:3066-3076.
  98. Dolgikh DA, Gilmanshin RI, Brazhnikov EV, Bychkova VE, Semisotnov GV, Venyaminov SY, & Ptitsyn OB (1981)  $\alpha$ -lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Letters* 136:311-315.
  99. Ohgushi M & Wada A (1983) Molten-globule state: a compact form of globular proteins with mobile side-chains. *FEBS Letters* 164:21-24.
  100. Ptitsyn OB (1995) Molten Globule and Protein Folding. *Advances in protein chemistry*, eds C.B. Anfinsen FMRJTE & David SE (Academic Press), Vol Volume 47, pp 83-229.
  101. Kuwajima K (1989) The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular protein structure. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 6:87-103.

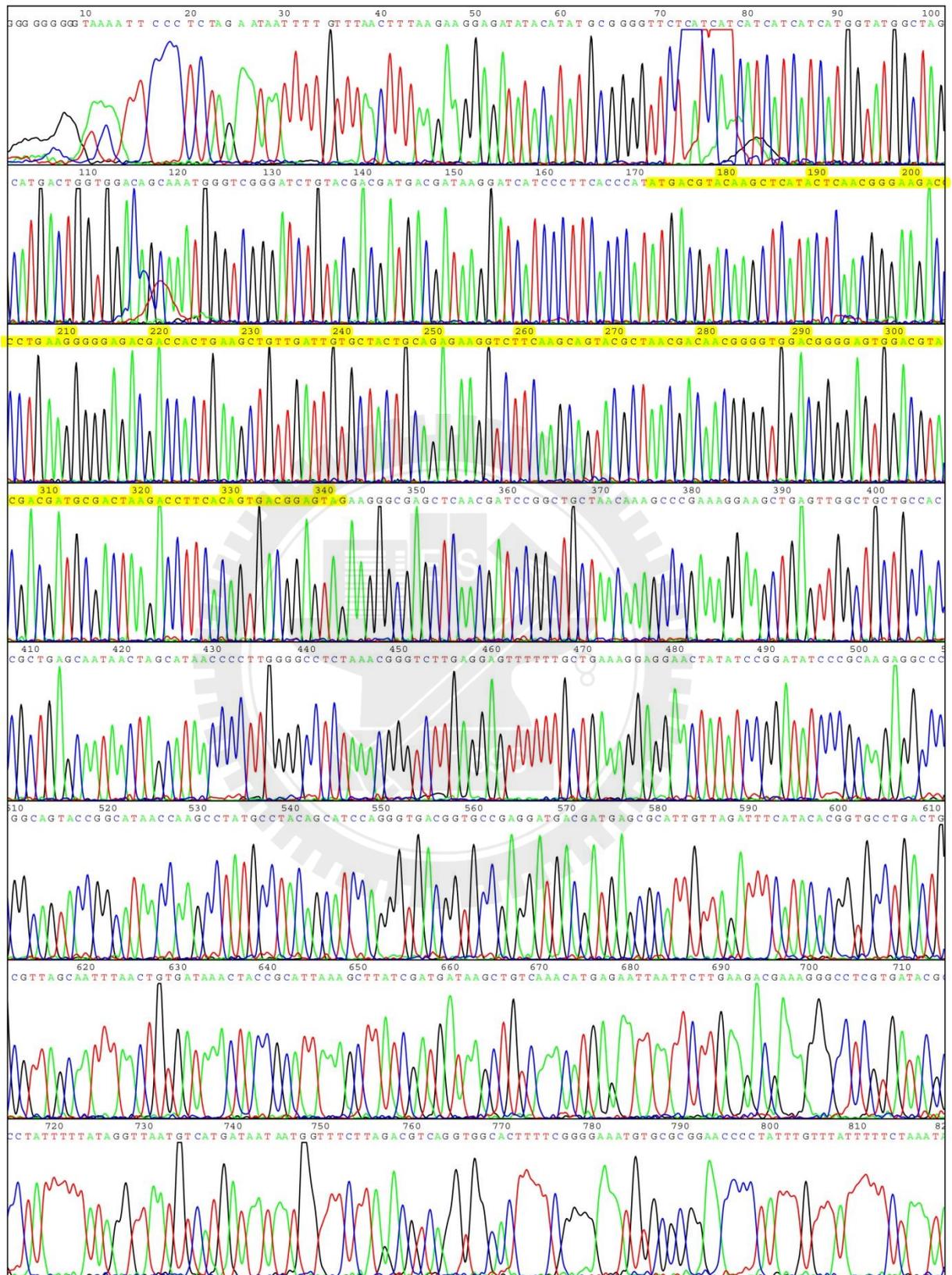
# 附錄

## A. pET200-PGB1wt 基因定序圖譜



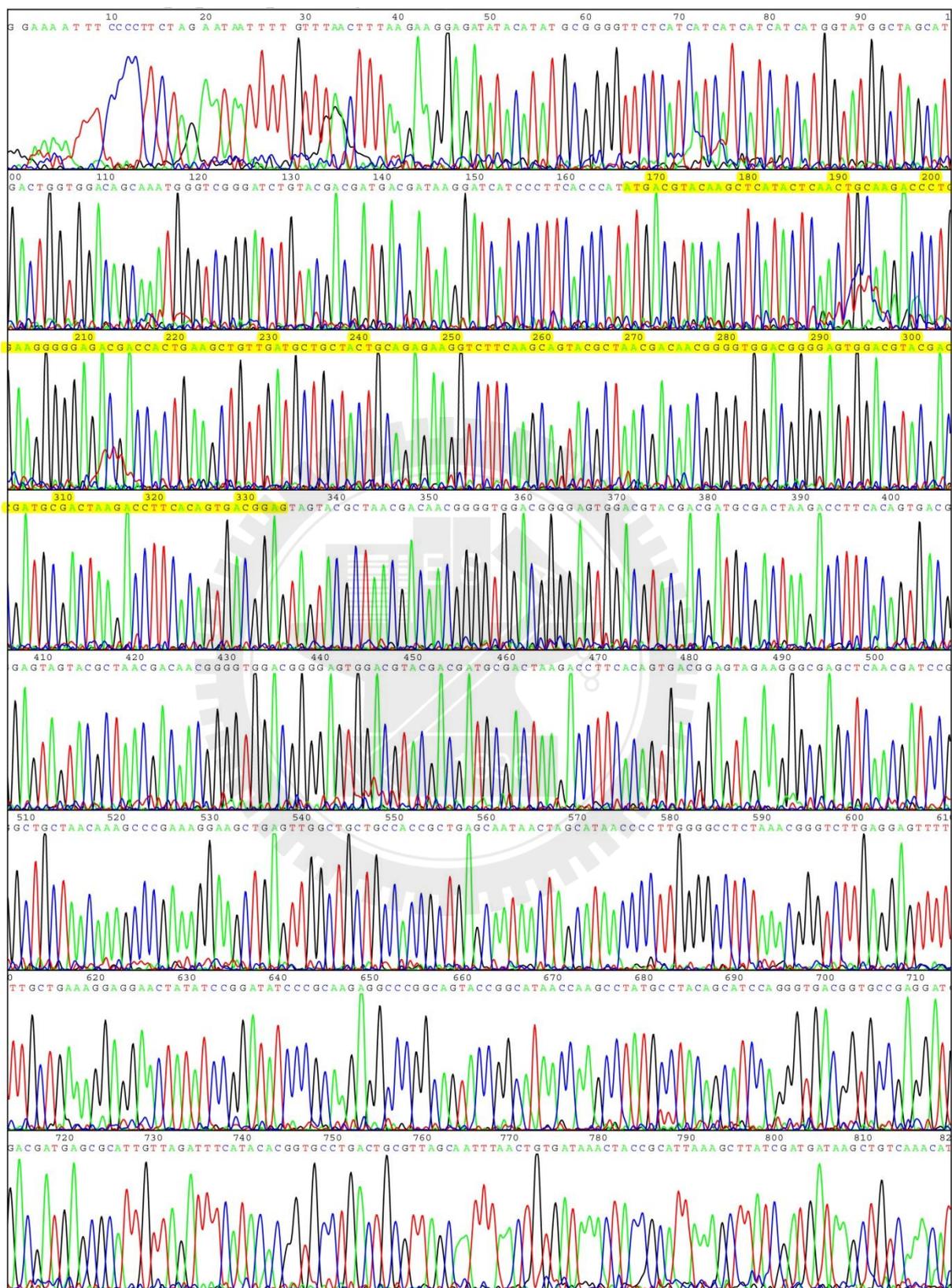
黃色標註為 PGB1 wt 基因

## B. pET200-PGB1G9C 基因定序圖譜



黃色標註為 PGB1 G9C 基因

### C. pET200-PGB1G9C 基因定序圖譜



黃色標註為 PGB1 A23C 基因

#### D. 各使用之緩衝液之成分

##### 1. 10X Phosphate Buffer Saline (PBS)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14.69 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	80.92 mM
NaCl	1.37 M
KCl	26.82 mM
pH	7.4

##### 2. His-tag binding buffer & washing buffer

Tris	10 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	20 mM
pH	7.4

##### 3. His-tag elute buffer

Tris	10 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	500 mM
pH	7.4

##### 4. Denature buffer

Tris	10 mM
Mannitol	0.1%
Urea	8 M
DTT	0.1 M
Pefabloc	0.1 mM
pH	12

##### 5. Refolding 1 buffer (R1)

Tris	10 mM
Mannitol	0.1%
Urea	2 M
DTT	0.1 mM
Pefabloc	0.1 mM
pH	11.5

6. Refolding 2 buffer (R2)

Tris	10 mM
Mannitol	0.1%
Urea	1 M
DTT	0.1 mM
Pefabloc	0.1 mM
pH	11.5

7. Refolding 3 buffer (R3)

Tris	10 mM
Mannitol	0.1%
DTT	0.1 mM
Pefabloc	0.1 mM
pH	11.5

8. Refolding 4 buffer (R4)

Tris	10 mM
Mannitol	0.1%
DTT	0.1 mM
Pefabloc	0.1 mM
pH	8.8

9. Refolding 5 buffer (R5)

Tris	10 mM
DTT	0.1 mM
Pefabloc	0.1 mM
pH	8.8

## E. IAEDANS 接合方法

1. Denature PGB1 with **pH8.8 Denature Buffer** to the concentration of about 1~2 mg/ml. (Apply DTT into the denatured protein solution by the PGB1/DTT ratio of 1:1, and allow the reaction proceed at room temperature for at least 90 minutes.)

以 **pH8.8 Denature Buffer** 將 PGB1 變性並調整成 1~2 mg/ml。(加入同於蛋白質濃度的 DTT<sup>1</sup>，並且在室溫反應至少 90 分鐘)。

2. Add **IAEDANS** drop-wise to the protein solution while it is stirring. The final concentration of IAEDANS is 5-10 folds of the protein concentration. Allow the reaction to proceed for **overnight at 4°C**. *This section should be done in dark.*

一邊緩慢攪拌溶液一邊緩慢滴入 IAEDANS，IAEDANS 最後濃度為 5~10 倍的 PGB1 濃度。在 4°C 反應過夜。此部分應避免光照射。

3. Adjust the volume with Denature buffer.

以 Denature buffer 調整至適當體積。

4. Remove the excess of reagent with exhausted dialysis. The dialysis process can be divided into three steps: 8 M Urea, 6 M, and 4.5 M. For a 5 ml of dialysis solution, it should be dialyzed against at least 500 ml IAEDANS-free buffer for an hour and three times per step. The molecular-weight-cut-off of the dialysis membrane should be about 3500 Da for PGB1.

以頻繁的透析去除多餘的反應物，可將透析過程分成以下三部分：8 M Urea、6 M 和 4.5 M，每部分分成三次透析，每次透析使用約 500 毫升無 IAEDANS 之緩衝液並透析一個小時。以 PGB1 而言，透析膜的孔徑大小應使用約 3500 Da。



IAEDANS 固定在 Cys 上的化學反應

<sup>1</sup> 加入 DTT 的是因為 PGB1 A23C 會有以雙硫鍵形成的雙體 (Dimer) 出現，但又由於此雙體相對於沒有形成雙體的比例約 30%，故不須加入太多的 DTT，此也可以省略再加入 IAEDANS 前的去除 DTT 步驟。

以原有濃度 4 mg/ml 體積 3 ml 的 PGB1 A23C 為例

1. 以 2.5 ml 的 pH8.8 Denature Buffer (8 M urea) 將 PGB1 變性並調整成 2.2 mg/ml (220  $\mu$ M)。加入 220  $\mu$ M 的 DTT，並且在室溫反應至少 90 分鐘。
2. 從配置好的 10 mM IAEDANS 原液取出 120  $\mu$ l，一邊緩慢攪拌溶液一邊緩慢滴入 IAEDANS，IAEDANS 最後濃度為 5 倍的 PGB1 濃度。在 4°C 反應過夜。此部分應避免光照射。
3. 以 pH8.8 Denature Buffer 調整溶液體積至 6 ml，此時蛋白質濃度應為 2 mg/ml (200  $\mu$ M)。
4. 選擇 MWCO 為 3.5 kDa 透析膜進行透析去除多餘的 IAEDANS。透析用的緩衝液中的 Urea 濃度分為 8 M、6 M、4 M、2 M、1 M、0.5 M，最後為 0 M，便以 UV-vis absorbance 確認其接合比例。另外，透析用之緩衝液每次 500 ml，各梯次 urea 濃度進行至少三次。
5. UV-vis absorbance 掃描條件：  
掃描區間：240-500 nm；掃描速率：400 nm/min；資料間隔：0.2 nm
6. 將 PGB1 A23C-IAEDANS 的 absorbance 扣除背景緩衝液的 absorbance，利用 280 和 336 nm 的吸收值以以下公式計算接合比率：

$$\begin{cases} A_{280} = 10810 \times [P] + 1448 \times [F] \\ A_{336} = 107 \times [P] + 5700 \times [F] \end{cases}$$

[P]和[F]各為蛋白質濃度和 IAEDANS 濃度，解出二值後，[F]/[P]便是接合比率了。(各項之係數涵義為蛋白質與 IAEDANS 於該波長下的消光係數，此單位為  $M^{-1}cm^{-1}$ )