

## 第二章 實驗方法

### 2-1 $\alpha$ -L-arabinofuranosidase 的純化

#### 2-1-1 一般敘述

1. 配製緩衝溶液之藥品均購自 Merck 以 RO 水配置
2. 分離管柱：SP Column
3. Waters 650 FPLC 系統
4. 其他儀器：UV 光譜儀 HP 8452A、高速離心機 Kubota 7700
5. 活性測試藥品 PNPAF 為自行合成

#### 2-1-2 純化步驟



1. 發酵液離心去掉菌體，取 20 mL 上層液加入硫酸銨沉澱至 80% 飽和度。在 4 °C 下，以 20000 x g (15000 rpm) 離心 10 分鐘，除去上層液。
2. 離心後取沉澱之蛋白質，用醋酸鈉緩衝液 1.5 mL (20 mM，pH 4.5) 溶解。將溶液注入預先以醋酸鈉緩衝液 (20 mM，pH 4.5) 平衡之 HiTrap Desalting column 中以去除鹽份，收 2 mL 粗提液。
3. 再加入 1 mL 醋酸鈉緩衝液到步驟 2 的粗提液中，使其成為 3 mL 粗提液，分二次將粗提液導入預先以醋酸鈉緩衝液 (20 mM，pH 4.5) 平衡之 HiTrap Desalting column 中以去除鹽份，共收 4 mL 粗提液。
4. 把所得 4 mL 去鹽胞外粗提液導入預先以醋酸鈉緩衝液 (20 mM，pH 4.5) 平衡之 SP column (陽離子交換樹脂管柱)，進行層析分離。
5. NaCl 梯度為 0 mM 到 1000 mM，流速是 0.67 mL / min。

6. 收集方式為每 3 分鐘收一管，所以每管共收集 2 mL 沖提液。
7. 收集完畢後由試管取樣，以 PNPAF，在 25 °C 觀測 400 nm 的吸收值增加率以測定其活性。

### 2-1-3 酵素對 PNPAF 的活性：

以 PNPAF 當作受質 (substrate)，將 5  $\mu$ L 的受質 (5 mM PNPAF) 置於磷酸氫二鈉緩衝液 425  $\mu$ L ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM，pH 6.5) 中，以維持反應時的酸鹼值，再加入 20  $\mu$ L 已純化的酵素溶液，觀測 400 nm 的吸收值增加率。因為 *p*-nitro-phenol 的  $\text{pK}_a$  值為 pH 7.18，而所用緩衝液之 pH 值為 6.5，所以最後得到的吸收值增加率需修正為 5.8 倍，才是真正的反應速率。(修正方法如附錄七)

### 2-1-4 決定蛋白質分子量與純度



蛋白質之純度與其分子量(MW)之估計，可藉由 SDS-PAGE 觀測，這個系統是 Laemmli 在 1970 年所提出<sup>(12)</sup>，利用蛋白質分子量大小不同而在電泳膠片上形成不同的帶狀方式，檢驗蛋白質的純度。

方法：

1. 製作 stacking gel 為 7%，separation gel 為 12.5% 之電泳膠片，其大小為 10 cm  $\times$  7.4 cm  $\times$  0.1 cm。
2. 將各步驟純化之蛋白質溶液取 20  $\mu$ L 與 5  $\mu$ L sample loading 緩衝溶液混和後，100 °C 加熱 2 分鐘，置入膠片上方之樣品槽。
3. 以 150 伏特固定電壓，Tris-glycine running buffer 的系統通電約 1.5 小時。
4. 以 Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue G-250) 染色法觀測。

藥品：

- (1) Stain solution : 200 mL acetic acid , 500 ml Isopropanol , 0.6 g Coomassie blue , 1.3 L water.
- (2) Destain solution : 4000 mL acetic acid , 400 mL Isopropanol , 3.2 L water.

方法：

- (1) 將電泳膠片浸泡在 Stain solution 中搖晃 30 分鐘至 1 小時。
- (2) 倒掉 Stain solution , 將電泳膠片浸泡在 Destain solution 中搖晃 30 分鐘至 1.5 小時。
- (3) 到掉 Destain solution , 將膠片以自然風乾的形式乾燥。

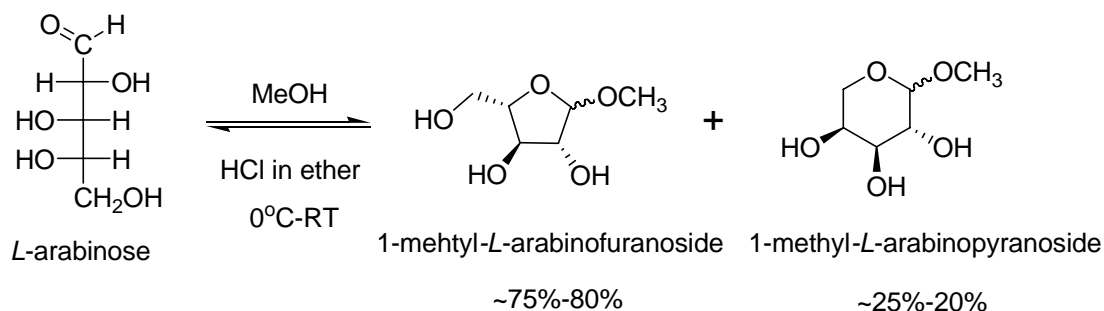


## 2-2 芳香類- $\alpha$ -L-阿拉伯糖苷化合物受質的合成 (aryl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside substrate)

### 2-2-1 一般敘述：

- 1.核磁共振光譜 (NMR) 的測定使用Bruker DRX-300 型核磁共振光譜儀。所使用的溶劑為D<sub>2</sub>O時，以DHO  $\delta$ 4.72 為內標準，使用CDCl<sub>3</sub>時，以CHCl<sub>3</sub>  $\delta$ 7.24 為內標準。化學位移單位為ppm，耦合常數 (coupling constant)單位為Hz。s表示單峰 (single)，d表二重峰 (doublet)，t表三重峰 (triplet)，q表四重峰 (quarte)，m表多重峰 (multiplet)，b表寬峰 (broad peak)。
- 2.色層分析：(a)薄層分析 (TLC) 係使用Merck Silica gel 60 F<sub>254</sub> (aluminium sheet TLC)。(b)重力管柱層析分析係使用ICN SiliTech 32-63 60Å (230~400 mesh) 型矽膠當填充物。
- 3.TLC薄層分析之染色劑係使用Anisaldehyde solution ( 9.2mL Anisaldehyde、3.75mL Acetic acid、338mL EtOH(95%)、12.5mL conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> )，以及硫酸水溶液 ( H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20mL、65mL EtOH(95%)、15mL H<sub>2</sub>O)。
- 4.使用藥品為 Sigma-Aldrich、Acros 公司(TCI)出品。
- 5.反應用有機溶劑為 TEDIA、Merck 公司出品。
- 6.充提液 (eluent solvent)、展開液 (developing solvent) 皆經自工業級溶劑蒸餾後使用。
- 7.減壓濃縮機係使用 EYELA ROTARY VACUUM EVAPORATOR N-N SERIES 型旋轉濃縮機。
- 8.冷凍乾縮係使用 PANCHUM FREEZE DRYER CT-series 型冷凍乾縮機。

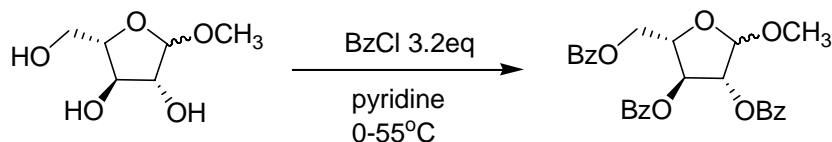
## 2-2-2 1-methyl-*L*-arabinofuranoside (MAF) 的合成<sup>(13)</sup>



方法：

1. 將 10 g 的阿拉伯糖 (*L*-arabinose) 溶在 200 mL 無水甲醇中，蓋上血清塞並且插上充滿氮氣之氣球，冰浴 30 分鐘。
2. 取 2N HCl in ether (Acros 公司購買) 35 mL 打入上述之反應瓶內。
3. 在冰浴下攪拌 30 分鐘後移開冰浴，使之回溫到室溫。
4. 反應約 5~6 小時，當溶液變澄清，點 TLC 確認，若是起始物點已消失，則停止反應。
5. 減壓抽氣濃縮至黏稠狀，加入吡啶 (pyridine) 10 mL 中和剩餘的 HCl，重覆中和的步驟 3 次。
6. 未經純化直接進行下一步驟之反應。

## 2-2-3 1-methyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl-*L*-arabinofuranoside (MTBAF) 的合成 (OBz 保護基的合成 Benzoylation)



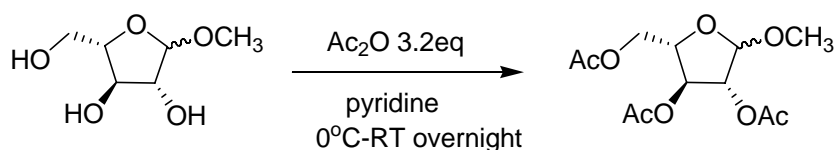
方法：

1. 取 MAF 15 g 加入除水過之吡啶 (15 mL) 蓋血清塞、插上氮氣球，並放置冰浴 30 分鐘。
2. 取 Benzoyl chloride 23.5 mL (3.2 molar equivalents)，慢慢的滴入

反應瓶內，在冰浴下反應一小時；之後再加溫至 55°C 反應 25 分鐘，以 TLC 確認反應，起始物皆已消失則中止反應。

3. 減壓抽氣濃縮至黏稠狀，以乙酸乙酯 (ethylacetate) 當作溶劑，以水萃取兩次，再依序以 1N HCl 水溶液、飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取，有機層加入無水硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4$ ) 除水，減壓抽氣濃縮至黏稠狀。
4. 加入 100 mL 絕對酒精 加熱至 35°C (absolute ethanol) 使之溶解，使溶液的溫度緩慢下降可得到結晶產物，收集固體 20.89g 而剩餘的溶液加入正戊烷 (pentane) 可再得到沉澱物 1.33g，藉由兩次再結晶純化，產率為 53%，此部分的到  $\alpha$ -form MTBAF。
5. 取殘餘的 2.5g 黏稠狀液體再以管柱層析以沖提液從 Hexane / ethylacetate = 9 / 1 到 Hexane / ethylacetate = 7 / 3 的極性梯度進行管柱層析法純化，可得到黏稠狀液體 0.87g，產率為 35%，此部分得到  $\beta$ -form MTBAF。
6.  $\alpha$  和  $\beta$  產物之總產率為 69%。

#### 2-2-4 1-methyl-2,3,5-tri-*O*-acetyl-*L*-arabinofuranoside (MTAAF) 的合成 (OAc 保護基的合成 Acetylation)

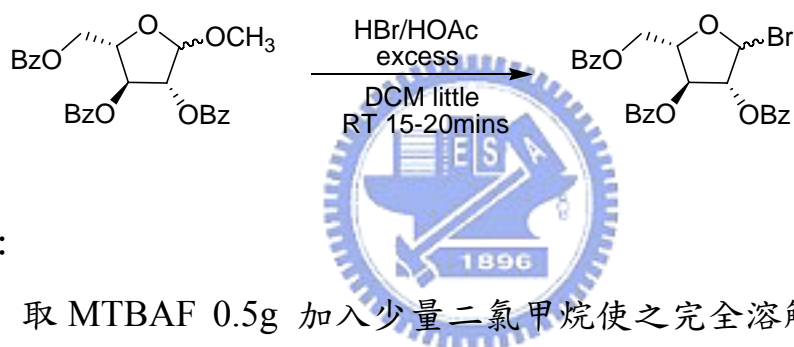


方法：

1. 取 MAF 3 g 加入除水過之吡啶 (15 mL) 蓋血清塞、插上氮氣球，並放置冰浴 30 分鐘。
2. 取醋酸酐 6mL (Acetyl anhydride 3.2 molar equivalents)，慢慢的滴入反應瓶中，加完醋酸酐後移開冰浴，反應 overnight。

3. 以TLC確認反應，起始物皆已消失則中止反應，減壓抽氣濃縮至黏稠狀，以乙酸乙酯 (ethylacetate) 當作溶劑，以水萃取兩次，再依序以 1N HCl 水溶液、飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取並合併有機層加入無水硫酸鎂 ( $MgSO_4$ ) 除水，減壓抽氣濃縮至黏稠狀。
4. 以沖提液從 Hexane / ethylacetate = 9 / 1 到 Hexane / ethylacetate = 7 / 3 的極性梯度進行管柱層析法純化；可得到 5.13g 黏稠狀產物，產率 96%。

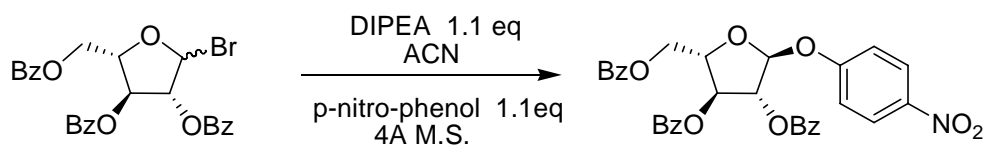
### 2-2-5 1-bromo-2,3,5-tri-*O*- benzoyl -*L*-arabinofuranoside (BTBAF)的合成



方法：

1. 取 MTBAF 0.5g 加入少量二氯甲烷使之完全溶解，放入磁石、蓋血清塞、插氮汽球以及在反應瓶外包上鋁箔。
2. 取 HBr / HOAc 3mL (HBr 33% in acetic acid)，逐滴的加入反應瓶中，加完 HBr 後反應室溫下反應 15-20 分鐘。
3. 以TLC確認反應，起始物皆已消失則中止反應，加入 20mL二氯甲烷進行萃取；先以二氯甲烷、冰和水進行萃取，確定冰在萃取完後還未完全融解（接下來的萃取均需注意到此點），再依序以飽和碳酸氫鈉水溶液、1N HCl 水溶液以及飽和食鹽水各萃取一次並合併有機層加入無水硫酸鎂 ( $MgSO_4$ ) 除水，減壓抽氣濃縮至發泡狀，可得到 0.47g；產率約為 85%。因此產物並不穩定所以不進一步做純化處理，直接做接下來與芳香環的耦合 (coupling) 反應。

## 2-2-6 2,3,5-tri-*O*- benzoyl -4-nitro-phenyl- $\alpha$ -*L*-arabinofuranoside (TBPNPAF) 的合成



方法：

1. 取 p-nitro-phenol 0.137g (1.1 eq)、DIPEA 0.14mL (diisopropyl-ethyl-amine 1.1 eq) 以及 4Å 分子篩 0.15 g (4Å molecular sieve) 放入反應瓶，加入 10 mL 乙腈 (acetonitrile)，插上氮汽球外包鋁箔。
2. 將上一步驟所合成的 BTBAF 以 2 mL 乙腈 (acetonitrile) 溶解打入方法 1 之反應瓶，再以 3ml 乙腈潤洗再打入反應瓶內，室溫反應 overnight。
3. 以 TLC 確認反應，起始物皆已消失則中止反應，減壓抽氣濃縮至黏稠狀，以乙酸乙酯 (ethylacetate) 當作溶劑，以 1N 之 NaOH 水溶液萃取，直至水層無明顯顏色呈透明澄清，再依序以 1N HCl 水溶液以及飽和食鹽水各萃取一次並合併有機層加入無水硫酸鎂 (MgSO<sub>4</sub>) 除水，減壓抽氣濃縮至發泡狀。
4. 以沖提液 Hexane / ethylacetate = 9 / 1 到 Hexane / ethylacetate = 7 / 3 的極性梯度進行管柱層析法純化；可得到 0.39g 黏稠狀產物，產率 75%。

## 2-2-7 2,3,5-tri-*O*-benzoyl-aryl- $\alpha$ -*L*-arabinofuranoside 的合成

2,3,5-tri-*O*-benzoyl-4-chloro-2-nitro-phenyl- $\alpha$ -*L*-arabinofuranoside (TBCNPAF)

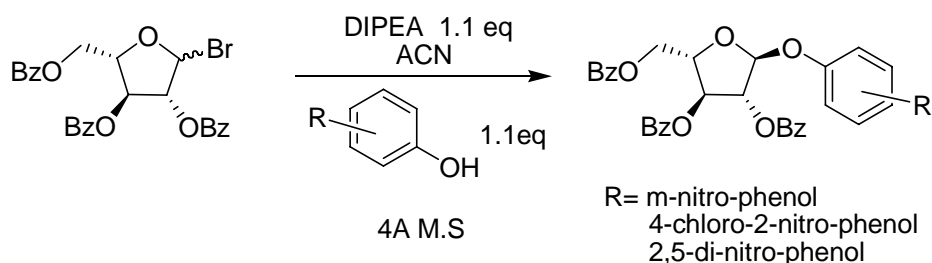
2,3,5-tri-*O*-benzoyl-m-nitro-phenyl- $\alpha$ -*L*-arabinofuranoside



(TBMNPAF)

2,3,5-tri-*O*-benzoyl-2,5-dinitro- $\alpha$ -*L*-arabinofuranoside

(TBDNPAF)



方法：

方法與 2-1-6 TBPNAF 的合成方法完全相同，只是所使用的芳香族不同，是使用了 4-chloro-2-nitro-phenol、m-nitro-phenol 以及 2,5-di-nitro-phenol 分別產率為 76%、74%以及 78%。

2-2-8 2,3,5-tri-*O*-benzoyl-cyano-phenyl- $\alpha$ -*L*-arabinofuranoside

(TBCPAF)

2,3,5-tri-*O*-benzoyl-phenyl- $\alpha$ -*L*-arabinofuranoside

(TBPAF) 的合成



方法：

此兩化合物合成方法相同，只有所使用的 phenolate 不同，下列將以 CPTBAF 作為例子。

1. 首先先製備 potassium 4-cyano-phenolate：取等當量的

4-cyano-phenol以及KOH，加入體積比 1 / 1 的acetone / H<sub>2</sub>O使之完全溶解；放入超音波震盪器振 30 分鐘使之完全溶解，然後加熱減壓抽氣濃縮至白色固體出現，再放入冷凍乾縮機中除水 overnight，可得白色粉末。

2. 將製備好的 potassium 4-cyano-phenolate 0.18 g、4Å 分子篩 0.5g 以及除過水的二氯甲烷 20 mL，放入圓底雙頸瓶內，架迴流系統，在氮氣下迴流 1 小時。
3. 以除過水的二氯甲烷 3mL 當溶劑溶解 0.55g 之 BTBAF 打入反應瓶回流系統中，再以 2mL 二氯甲烷潤洗殘餘的 BTBAF，同樣打入反應瓶。
4. 回流 30~60 分鐘，以TLC確認反應，起始物皆已消失則中止反應，以二氯甲烷當作溶劑，以 1N 之NaOH 水溶液萃取 3 次並以TLC 確認有機層是否有未coupling酚類的存在，若是還有未coupling酚類則再以 1N 之NaOH萃取 2~3 次；再依序以 1N HCl 水溶液以及飽和食鹽水各萃取一次並合併有機層加入無水硫酸鎂 (MgSO<sub>4</sub>) 除水，減壓抽氣濃縮至發泡狀。
5. 以沖提液 Hexane / ethylacetate = 9 / 1 到 Hexane / ethylacetate = 7 / 3 的極性梯度進行管柱層析法純化；可得到 0.39g 黏稠狀產物，產率 63%。(TBPAF 之產率為 54%)。

#### 2-2-9 Phenyl- $\alpha$ -L-arabiofuranoside、

p-Cyano-phenyl- $\alpha$ -L-arabiofuranoside、

m-Nitro-phenyl- $\alpha$ -L-arabiofuranoside、

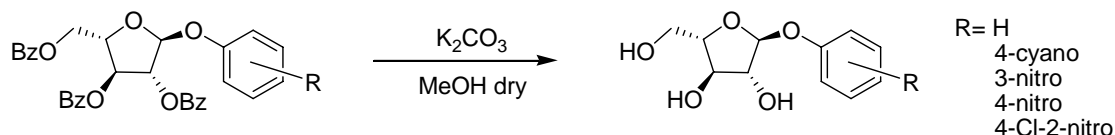
p-Nitro-phenyl- $\alpha$ -L-arabiofuranoside、

4-Chloro-2-nitro-phenyl- $\alpha$ -L-arabiofuranoside 的合成

(Synthesis of PAF、pCPAF、mNPAF、PNPAF、CNPAF)。

OBz 保護基的去保護 (debenzylation)

TBCNPAF、TBPNAF、TBMPAF、TBCPAF、TBPAF 這些醣類衍生物均是以OBz為保護基，雖然有不同的酚類取代基但可使用同樣的去保護 (debenzoylation) 條件<sup>(16)</sup>，以下以合成PNPAF為例說明。



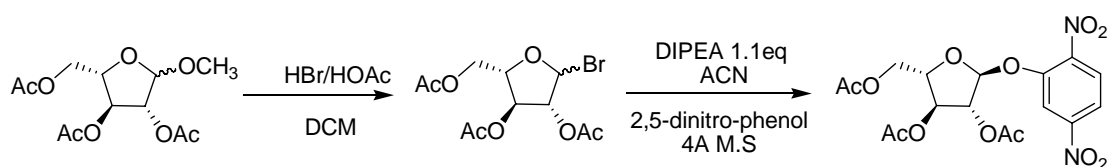
方法：

1. 取 200 mg 之 TBPNAF 溶於極少量之除過水之二氯甲烷，加入無水甲醇 20 mL 放入磁石、蓋上血清塞、插上氮氣球，冰浴 30 分鐘。
2. 打開血清塞，加入 50 mg 之碳酸鉀 (Potassium carbonate)，0°C 下劇烈攪拌，每隔 3~5 分鐘以 TLC 確認反應，觀察 TLC 上的點，觀察到三個保護基已除去則中止反應，反應約 15~20 分鐘。
3. 加入體積約 3~4 mL 的 silica gel 0 °C 下攪拌 5~10 分鐘，接著減壓抽氣濃縮至粉末狀。
4. 以沖提液 Dichloromethane / MeOH = 9 / 1 到 Dichloromethane / MeOH = 75 / 25 的極性梯度進行管柱層析法純化；可得到 82.5 mg 粉末狀產物，產率 88 %。(PAF、pCPAF、mNPAF、CNPAF 產率分別為 94 %、93 %、83 %、80 %)

## 2-2-10 2,3,5-tri-*O*-acetyl-2,5-dinitrophenyl- $\alpha$ -*L*-arabinofuranoside

(TADNPAF)的合成

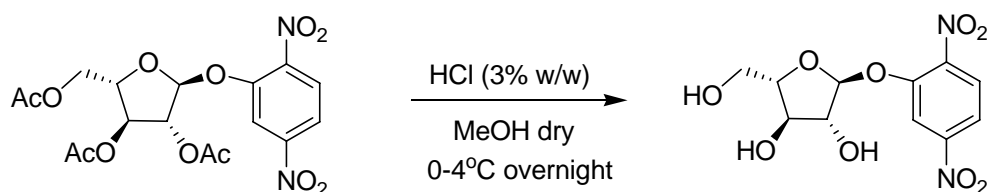
步驟與 2-1-5、2-1-6 相同，只是 MTBAF 換成 MTAAF。



此兩步驟的產率分別為 75 %、60 %。

## 2-2-11 2,5-dinitro-phenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside (DNPAF) 的合成

### OAc 保護基的去保護 (deacetylation)

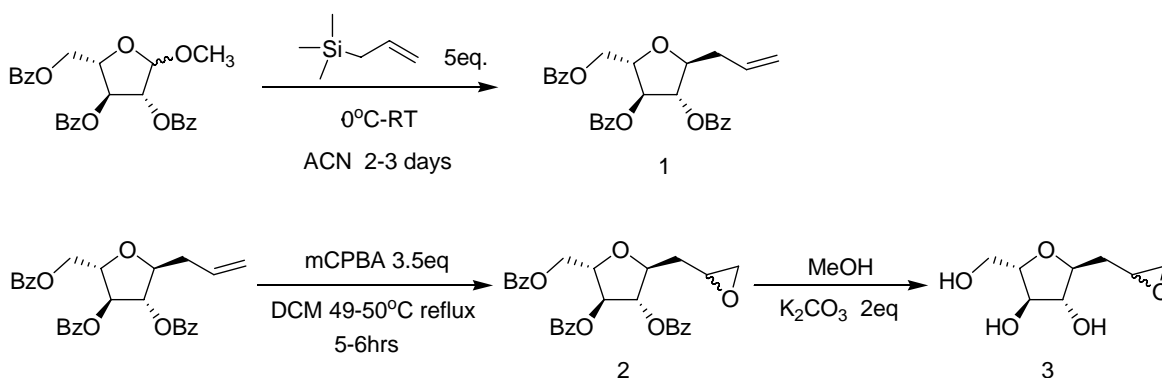


方法：

1. 取 100 mg TADNPAF (2,3,5-tri-*O*-acetyl-2,5-dinitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside) 溶在 20 mL 無水甲醇內，冰浴 30 分鐘。
2. 加入 10 mL 含 HCl (3%, w/w) 之無水甲醇溶液，在 4°C 下緩慢攪一至二天。
3. 以 TLC 確認反應，若是存在三個 OAc 保護基均被去保護的產物是主要產物 (DNPAF)，即終止反應，加入 3~5 mL 體積的 silica gel，0°C 下攪拌 5 分鐘，接著減壓抽氣濃縮至粉末狀。
4. 以沖提液 Dichloromethane / MeOH = 9 / 1 到 Dichloromethane / MeOH = 75 / 25 的極性梯度進行管柱層析法純化，收集產物點並減壓抽氣濃縮以及冷凍乾縮，可得到 50.1 mg 淡黃色粉末狀產物，產率 35 %。
5. 剩餘之未完全去保護之副產物可收集再進行去保護，可再得到 DNPAF 最後其總產率約為 42 %。

## 2-3 阿拉伯呔喃糖苷酵素抑制劑的合成

### 2-3-1 1,2-epoxy-3-( $\alpha$ -L-arabinofuranosyl)propane (EAFP) 的合成



方法：

1. 取 500 mg MTBAF 溶於 15 mL Acetonitrile 中，放入磁石、蓋血清塞以及插上氮氣氣球。
2. 室溫打入 allyl-trimethylsilane 0.87 mL (5eq)，之後冰浴 30 分鐘。
3. 0°C 下打入  $BF_3 \cdot OEt$  0.69 mL (5eq)，0°C 反應 5 小時後移開冰浴室溫反應 2~3 天。
4. 以 TLC 確認反應，起始物皆已消失則中止反應，將反應瓶置於 0 °C 下 15 分鐘，加入飽和  $NaHCO_3$  水溶液，慢慢中和直到 pH 值約為 7。
5. 減壓抽氣濃縮至黏稠狀，以乙酸乙酯 (ethylacetate) 當作溶劑，以水萃取一次，再依序以 1N HCl 水溶液、飽合碳酸氫鈉水溶液以及飽合食鹽水萃取並合併有機層加入無水硫酸鎂 ( $MgSO_4$ ) 除水，減壓抽氣濃縮至黏稠狀。
6. 以沖提液從 Hexane / ethylacetate = 9 / 1 到 Hexane / ethylacetate = 7 / 3 的極性梯度進行管柱層析法純化；可得化合物 1，產率 83%。
7. 架迴流系統，取 200 mg 化合物 2 加入 20mL 二氯甲烷在氮氣系統下溫度 49~50 °C 回流 30 分鐘。
8. 加入 250 mg m-CPBA (3.5eq)，繼續回流反應，以 TLC 確認反應，起始物皆已消失則中止反應 (約 5~6 小時)，冰浴下加入 20 mL

- 水，中和過多的 m-CPBA。
9. 以二氯甲烷為溶劑，用水萃取一次，再依序以 1N HCl 水溶液、飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取並合併有機層加入無水硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4$ ) 除水 (萃取步驟需快速)，減壓抽氣濃縮至黏稠狀。
  10. 以沖提液從 Hexane / ethylacetate = 9 / 1 到 Hexane / ethylacetate = 7 / 3 的極性梯度進行管柱層析法純化；可得化合物 2，產率 71%。
  11. 取 100 mg 化合物 2，進行去保護的反應，加入無水甲醇 20 mL 放入磁石、蓋上血清塞、插上氮氣球，冰浴 30 分鐘。
  12. 打開血清塞，加入 25 mg 之碳酸鉀 (Potassium carbonate)， $0^\circ\text{C}$  下劇烈攪拌，每隔 3~5 分鐘以 TLC 確認反應，觀察 TLC 上的點，觀察到三個保護基已除去則立即中止反應 (反應時間約為 30~60 分鐘)。
  13. 以減壓抽氣過濾，收集液體，加入體積約 3~4 mL 的 silica gel  $0^\circ\text{C}$  下攪拌 5~10 分鐘，接著減壓抽氣濃縮至粉末狀。
  14. 以沖提液 Dichloromethane / MeOH = 9 / 1 到 Dichloromethane / MeOH = 75 / 25 的極性梯度進行管柱層析法純化；可得 24 mg 產率約 65%。

## 2-4 酵素反應機制之研究

### 2-4-1 酸鹼度對酵素活性之影響

本實驗之目的在於了解相同溫度下，酸鹼度對酵素活性的影響，以了解酵素作用的最佳酸鹼值範圍。所配置不同pH值緩衝溶液為：HCl / KCl ( 100 mM , pH 1.7) 、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( 100 mM , pH 3.1) 、NaOAc ( 100 mM , pH 3.8 、4.5 、5.0 、5.5) 、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( 100 mM , pH 6.0 、6.9 、8.1) 、Tris-base ( 100 mM , pH 8.9) 。

步驟：

1. 取不同 pH 值之 buffer 在 25°C 下預熱。
2. 以 pNPAF 為受質，讀取 348 nm 吸光值增加率，分析初始其反應速率。
3. 以酵素的活性對 pH 值作圖，即可得知活性隨 pH 值變化的曲線圖。

### 2-4-2 共同反應中間體

取 pCPAF、pNPAF 以及 CNPAF 各 2 mg，分別加入 700  $\mu$ L 之醋酸鈉緩衝溶液 (NaOAc 50mM pH 4.1) 以及 200  $\mu$ L 無水甲醇，再加入 100  $\mu$ L 之酵素；總體積為 1 mL，甲醇濃度為 5M (~16%)。對照組與上述相同除酵素未加換成 100  $\mu$ L 緩衝溶液。各反應條件如表 2。

各管溶液放置在 37 °C 反應 36 小時，之後直接進行冷凍乾燥；以液態氮氣先冷凍再放入冷凍乾燥機裡乾燥，直至沒有液體，加入 0.5 mL 的 D<sub>2</sub>O 回溶殘餘物，再將液體抽乾；重複此回溶步驟 2~3 次；最後加入 400 mL 的 D<sub>2</sub>O 放入 NMR tube 中。

表 2、各受質進行轉醣反應之反應條件\*

	Weight (mg)	Conc.of MeOH	Buffer
pCPAF	2	5M (~16%)	NaOAc 50mM pH=4.1
pNPAF	2	5M (~16%)	NaOAc 50mM pH=4.1
CNPAF	2	5M (~16%)	NaOAc 50mM pH=4.1

\* Enzyme 之濃度為 5.36  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$

### 2-4-3 酵素 $k_{\text{cat}}$ 、 $K_m$ 以及Brønsted plot的研究

酵素於特定的酸鹼值及溫度條件下，對特定的受質有特異的 $K_m$ 值， $K_m$ 為受質與酵素之複合體 (enzyme-substrate complex : ES complex) 的顯現解離常數 (apparent dissociation constant)。由 $K_m$ 值大小可以定性的判斷受質與酵素之親和性，而 $k_{\text{cat}}$ 為酵素之催化常數或turnover number，表示酵素催化反應中之速率定步驟的一級反應速率，亦即將ES complex 經化學轉化而成酵素與產物之步驟。

一般而言 $K_m$ 值之求法可用以下兩種方法求得：

Michaelis-Meten equation 及雙倒數作圖法 (double reciprocal plot)，敘述如下<sup>(15)</sup>：



依 steady-state 假設可得以下速率方程式：



$$V = V_{\max} [S] / K_m + [S] \quad V_{\max} = k_{\text{cat}} \times [E]_t$$

$[E]_t$ : 總酵素濃度

$k_{\text{cat}}$ : 速率決定步驟速率常數

兩邊取雙倒數，即為雙倒數作圖法：

$$1 / V = K_m / V_{\max} \cdot 1 / S + 1 / V_{\max}$$

$V_{\max}$ : 受質濃度無限大時反應速率所趨近的極限速率值

$K_m$ : 速率為極限速率一半時的受質濃度

雙倒數作圖中斜率為  $K_m / V_{\max}$ ，縱軸之截距為  $1 / V_{\max}$ ，而橫軸之交點為  $-1 / K_m$ ，斜率對縱軸截距的比值即為  $K_m$ 。本研究所使用  $K_m$  及  $k_{\text{cat}}$  值之計算方式，主要是採用雙倒數作圖法。

動力學反應條件為：wild type Arabionfuranosidase  $[E] = 0.028 \mu\text{g} / \mu\text{L}$  在 50 mM pH 6.5  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  緩衝液下，分別和 2,5-DNPAF (0.02 mM-0.25 mM,  $\Delta \varepsilon : 3616 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , 觀測波長為 440 nm)、CNPAF (0.02 mM- 0.25 mM,  $\Delta \varepsilon : 2603 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , 觀測波長為 400 nm)、pNPAF (0.01 mM- 0.1 mM,  $\Delta \varepsilon : 3077 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , 觀測波長為 400 nm)、mNPAF (0.171 mM- 0.455 mM,  $\Delta \varepsilon : 330 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , 觀測波長為 380 nm)、pCPAF (0.111 mM- 0.333 mM,  $\Delta \varepsilon : 672 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , 觀測波長為 290 nm)、PAF (0.111 mM- 0.333 mM,  $\Delta \varepsilon : 754 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , 觀測波長為 278 nm)，進行水解反應，以UV吸收光譜儀觀察適當波長的吸收值變化，計算反應的初始速率 (initial velocity  $V_0$ )，並以雙倒數圖 (double reciprocal plot) 求  $K_m$  及  $k_{\text{cat}}$  之值。

而突變株D299G 動力學反應條件為  $[E] = 0.075 \mu\text{g} / \mu\text{L}$  在 50

mM pH 6.5  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液下，分別和 2,5-DNPAF (0.056 mM-0.22 mM， $\Delta \varepsilon$  :  $3616 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，觀測波長為 440 nm)、CNPAF (0.056 mM- 0.22 mM， $\Delta \varepsilon$  :  $2603 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，觀測波長為 400 nm)、pNPAF (0.11 mM- 0.32 mM， $\Delta \varepsilon$  :  $3077 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，觀測波長為 400 nm)，以及在酵素濃度  $[\text{E}] = 0.1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$  與mNPAF (0.44 mM- 0.61 mM， $\Delta \varepsilon$  :  $330 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，觀測波長為 380 nm)、pCNPAF (0.44 mM- 0.61 mM， $\Delta \varepsilon$  :  $672 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，觀測波長為 290 nm)，進行水解反應，以UV吸收光譜儀觀察適當波長的吸收值變化，計算反應的初始速率 (initial velocity  $V_0$ )，並以雙倒數圖 (double reciprocal plot) 求 $K_m$ 及 $k_{\text{cat}}$ 之值。

#### 2-4-4 抑制作用之研究

本實驗以合成之 1,2-epoxy-3-( $\alpha$ -L-arabinofuranosyl)propane (EAFP)來進行酵素抑制，此類型之抑制劑通常為不可逆抑制劑，我們預期它會與酵素的重要胺基酸殘基 (nucleophile 或 general acid / base) 產生共價鍵，如此一來可得到直接之證據證明哪一個重要胺基酸殘基在催化的過程中扮演重要的角色。

步驟：

1. 將 100  $\mu\text{L}$  之酵素與 20 mM 100  $\mu\text{L}$  之抑制劑混合。
2. 隨時間逐一取出部份之酵素在 pH 6.5 與 CNPAF 受值反應，觀測其反應初始速率。
3. 比較有加抑制劑以及未加抑制劑之活性差異。

另一方面在測試系統中對不同濃度之抑制劑作雙倒數圖

步驟：

1. 加入不同濃度的CNPAF受質，不加任何抑制劑的活性測試為標準測試系統（緩衝液為 50 mM pH 6.5  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ），將所得之 $V_0$ 和  $[\text{S}]$  以雙倒數作圖可得一直線。
2. 一固定濃度之 EAFP ( 0.89 mM )加入測試系統，且逐次加入不同濃度的 CNPAF，同樣可得另一條直線。
3. 另一固定濃度之 EAFP ( 2.22 mM ) 加入測試系統，逐次加入不同濃度之 CNPAF 可再得到一條直線。
4. 將三條直線處理在同一圖裡，並作分析。

