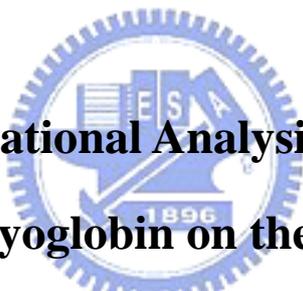


國立交通大學

生物科技研究所

碩士論文

利用定點飽和突變研究抹香鯨肌紅蛋白中
Ile-107 位置對其過氧化能力之影響


**Site-Saturated Mutational Analysis of Isoleucine 107 from
Sperm Whale Myoglobin on the Effect of Peroxidase
Activity**

研究生： 林宏明

指導教授： 吳東昆 博士

中華民國九十五年十二月

利用定點飽和突變研究抹香鯨肌紅蛋白中 Ile-107 位置對其
過氧化能力之影響

Site-Saturated Mutational Analysis of Isoleucine 107 from Sperm Whale
Myoglobin on the Effect of Peroxidase Activity

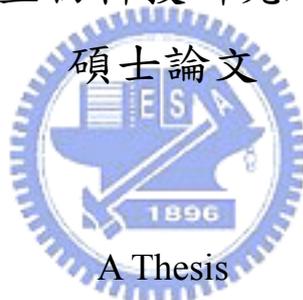
研究生：林宏明

Student: Hung-Ming Lin

指導教授：吳東昆 博士

Advisor: Dr. Tung-Kung Wu

國立交通大學
生物科技研究所



Submitted to Department of Biological Science and Technology
College of Science
National Chiao Tung University
in partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master
in
Biological Science and Technology
December, 2006
Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十五年十二月

利用定點飽和突變研究抹香鯨肌紅蛋白中 Ile-107 位置對其過氧化能力之影響

研究生：林宏明

指導教授：吳東昆 博士

國立交通大學 生物科技研究所碩士班

摘要

肌紅蛋白(myoglobin)為一種血基質蛋白(heme-protein)，在脊椎動物體內具有儲存及攜帶氧氣的功能。本論文的研究主要是將不具酵素活性的肌紅蛋白突變成具有過氧化酵素(oxidase)活性的功能。將 *mb* 基因殖入 pET28a(+)表現質體中，利用定點突變及定點飽和突變技術改變 His-64、Val-68、Ile-107 這三個推測可改變活性的胺基酸。利用 IPTG 誘導蛋白質的大量表現以形成包涵體(inclusion body)，接著以 guanidine hydrochloride 使包涵體變性再復性後，利用 DEAE 管柱純化，可以得到純度高達 90%的脫輔基肌紅蛋白(apo-myoglobin)，利用蛋白質輔基重組實驗可將血基質(heme)包入突變的脫輔基肌紅蛋白中。與過氧化氫和 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)反應後可以利用 UV/VIS 光譜儀偵測其一個電子傳遞的過氧化酵素活性。比

較文獻的雙重突變 H64D/V68L Mb 以及利用定點飽和突變技術改變 Ile-107 的三重突變，在經由動力學參數測量後發現 H64D/V68L/I107M Mb 在與過氧化氫形成 Compound I 的效率可提高 30%，與 ABTS 的一個電子傳遞效率則提高 60%。另外也發現將 Ile-107 置換成體積較小的 Ala 及 Val 對形成 Compound I 的效率影響不大，但是卻可以提高一個電子傳遞效率 47%及 36%。因此認為 Ile-107 可能藉由立體效應去影響酵素與受質的一個電子傳遞效率。未來本實驗室會將各種不同金屬的紫質包入突變的脫輔基肌紅蛋白中，並研究其特性以期能應用並開發新型的染料敏化生物性太陽能電池(dye-sensitized biosolar cell)。



Site-Saturated Mutational Analysis of Isoleucine 107 from Sperm Whale Myoglobin on the Effect of Peroxidase Activity

Student: Hung-Ming Lin

Advisor: Dr. Tung-Kung Wu

Institute of Biological Science and Technology
National Chiao Tung University

Abstract

Myoglobin is a heme-protein, functioning as oxygen storage/carrier in vertebrates. In this study, the nonenzymatic myoglobin was functionally converted into a heme enzyme with peroxidase activity. Three amino acid residues, His-64/Val-68/Ile-107, located on the putative active site cavity, were subjected to site-directed mutagenesis and cloned into a pET-28a(+) expression vector. Following IPTG induction, the cell cultures were harvested and subjected to protein purification. After guanidine hydrochloride disruption and renaturation, the soluble apo-myoglobin was purified to homogeneity by DEAE chromatography. The heme molecule was reconstituted into these renatured apo-myoglobin mutants. A well established peroxidase activity with one-electron oxidation of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) was observed by the UV/VIS spectrophotometer from the myoglobin mutants, demonstrating its capability in electron transfer reaction. Among these mutations, as compared with the original Mb^{H64D/V68L} double mutant, Mb^{H64D/V68L/I107M} triple mutant exhibited a 30% activity increase in the compound I formation, whereas, a 60% activity increase in the one-electron oxidation was observed. Alternatively, the Mb^{H64D/V68L/I107A} or Mb^{H64D/V68L/I107V} showed the similar compound I formation rate, but with the one-electron oxidation rate of 47% or 36% increment respectively. These results indicated that the Ile-107 position may influence the one-electron oxidation of substrates via steric effect after

the compound I formation. In the future, various metalloporphyrins with different metal ions will be reconstituted into the apo-myoglobin mutants to investigate their potentials as novel dye-sensitizers for biosolar cell application.



謝誌

碩士班的研究生活真的讓我獲益良多，首先當然要感謝我的指導教授吳東昆 博士，感謝老師能讓我在这實驗室新的題目中學習，並且在忙碌中也經常的提供我們實驗上的幫助及傳授正確的實驗觀念。感謝口試委員袁俊傑 教授、刁維光 教授、林敬堯 教授及鄭建中 教授於百忙中能撥空參加我的口試、審閱我的論文，有了各位寶貴的建議讓本人及本論文都進步了不少。

實驗室的各位對我的幫助都不少，因此我要感謝程翔學長及媛婷學姊在我初進實驗室時指導我分生方面的技術以及實驗和生活上許多的幫助，感謝坐在我旁邊的裕國學長將他許多實驗的經驗及技術傳授於我，感謝和我同 group 的豪哥在實驗上幫我許許多多的忙，感謝文鴻、晉源、宗哥、大鳥經常與我討論實驗上問題及週遭的生活，感謝小妹和大景陪我上英文課、吃宵夜、夾娃娃和 PK 投籃機，感謝食神皓宇、文暄及新進來的衣娟學姊、Nayak、小高、文祥、采婷還有接我題目的世勳在許多方面的幫助，感謝已畢業的小宇、宏城、小八、阿美和希希慷慨的照顧我們學弟妹們。

此外，我也要感謝袁老師實驗室的俊傑之友會成員對我的關心及

幫忙，特別感謝威震學長對本論文動力學測定方面的幫助以及感謝佳穎學姊、弘毅學長及我的好同學彥棋、詩穎對我生活上的關心，還有 fish、世昌和偉志在各方面的幫忙。

最後我要感謝我的家人，感謝讓我寄宿 2 年的三叔及三嬸，還要謝謝培養我的母親，有她的支持我才能進到交通大學來完成這篇論文。雖然碩士班短短的兩年家中卻發生了不少事情，有母親妥善的處理我才能安心的完成我的學業。感謝所有幫助過我的人，謝謝你們!!



目錄

頁次

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
謝誌.....	V
目錄.....	VII
圖目錄.....	XI
表目錄.....	XVI

第一章 緒論.....	1
1-1 肌紅蛋白(myoglobin)的簡介.....	1
1-2 紫質(prophyrin)的簡介.....	4
1-3 血基質蛋白(heme protein).....	5
1-4 過氧化酵素.....	6
1-5 肌紅蛋白經突變後具有過氧化酶酵素活性.....	9
1-6 染料敏化太陽能電池 (DSSC).....	12
1-7 肌紅蛋白在人工光合作用反應中心的應用.....	14
1-8 研究目的.....	20
第二章 實驗材料及方法.....	22

2-1 實驗材料	22
2-1-1 化學藥品與材料	22
2-1-2 緩衝液及溶液配製	24
2-1-3 實驗儀器	28
2-1-4 菌株與載體	29
2-2 實驗方法	30
2-2-1 目標基因的建構	31
2-2-2 重組質體的建構	33
2-2-2-1 質體之轉化作用	34
2-2-3 定點突變與飽和定點突變實驗	35
2-2-4 脫輔基(apo-form)蛋白質的表現	38
2-2-5 包涵體(inclusion body)粗萃液之製備	39
2-2-6 包涵體(inclusion body)的變性與再摺疊	39
2-2-7 脫輔基(apo-form)蛋白質的純化	40
2-2-8 蛋白質分子量及純度分析	40
2-2-9 蛋白質輔基重組實驗	42
2-2-10 酵素最適化條件之研究	43
2-2-10-1 最適反應環境之酸鹼值測定	43
2-2-10-2 溫度與活性之關係	43

2-2-11 酵素動力學參數測定.....	44
第三章 結果與討論	46
3-1 目標基因質體之建構.....	46
3-2 篩選目標	46
3-2-1 細胞粗萃液的活性篩選.....	49
3-3 脫輔基(apo-form)蛋白質表現及純化	51
3-4 蛋白質輔基重組	53
3-5 過氧化酵素活性最適反應條件	57
3-5-1 最適反應之pH值.....	57
3-5-2 溫度與活性之關係.....	59
3-6 酵素動力學參數	60
第四章 結論與未來展望	82
第五章 參考文獻	84
附錄一.....	87
附錄 1-1 建構不同金屬紫質的Mb ^{H64D/V68L/I107M} 三重突變肌紅蛋白	87
附錄二.....	89
附錄 2-1 單株抗體的製備	89
附錄 2-2 免疫動物	89
附錄 2-3 骨髓瘤細胞 (myeloma cell).....	90

附錄 2-4 細胞融合	91
附錄 2-5 細胞增殖及取樣篩檢	92
附錄 2-6 融合細胞之單株化	93
附錄 2-7 單株抗體之產生	94
附錄 2-8 利用西方墨點法 (Western blotting) 確認單株抗體之專一性	94



圖目錄

頁次

圖 1-1 肌紅蛋白的結構圖.....	2
圖 1-2 紫質和血基質的化學結構.....	5
圖 1-3 推測的 Compound I 形成機制.....	7
圖 1-4 兩種酵素 peroxidase 和 cytochrome P450 反應的比較.....	8
圖 1-5 在 chloroperoxidase 中 Glu-183 對形成 Compound I 的可能功能.....	11
圖 1-6 DSSC 太陽能電池的運作原理.....	13
圖 1-7 尚未與肌紅蛋白結合的兩種三聚體結構.....	15
圖 1-8 Mb(Fe ^{III} OH ₂)-Ru ²⁺ -BXV ⁴⁺ 在經過激發 Ru(bpy) ₃ 後的能階與選擇性路徑.....	16
圖 1-9 (a)為 Ru(bpy) ₃ 的 MLCT band 在 460 nm 吸收值增加的動力學追縱；(b)為時間偵測範圍至 2 ms，分別偵測在 426 和 610 nm 的瞬態吸收值動力學(transient absorption kinetics).....	17
圖 1-10 圖示將 1 和 2 與脫輔基肌紅蛋白質包覆後而形成的肌紅蛋白質三聚體.....	19
圖 3-1 含相同蛋白質量的三重突變肌紅蛋白 H64D/V68L/I107X Mb 細胞粗萃液 10 μL 與 90 μL 的 1 mM ABTS、5 mM H ₂ O ₂ 反應後偵測 405 nm 的吸光值.....	51

圖 3-2 20%的 SDS-PAGE 分析.....	53
圖 3-3 UV/Vis 全光譜掃描圖.....	55
圖 3-4 相同量蛋白質的野生型(Mb ^{wt})及Mb ^{H64D/V68L} 與Heme進行蛋白質與輔基的重組後與 1 mM ABTS及 2 mM H ₂ O ₂ 反應依時間偵測 ABTS氧化產物 730 nm 吸光值.....	56
圖 3-5 Mb ^{H64D/V68L} 於不同pH值環境之殘留活性百分率.....	58
圖 3-6 Mb ^{H64D/V68L/I107M} 於不同溫度下反應之殘留活性百分率.....	60
圖 3-7 ABTS濃度對Mb ^{H64D/V68L} 催化ABTS受質的Michaelies-Menten 曲線圖.....	61
圖 3-8 Lineweaver-Burk雙倒數圖計算Mb ^{H64D/V68L} 對受質ABTS的K'm及V'max值.....	61
圖 3-9 ABTS濃度對Mb ^{H64D/V68L/I107M} 催化ABTS受質的 Michaelies-Menten 曲線圖.....	62
圖 3-10 Lineweaver-Burk雙倒數圖計算Mb ^{H64D/V68L/I107M} 對受質ABTS的 K'm 及V'max值.....	62
圖 3-11 ABTS濃度對Mb ^{H64D/V68L/I107A} 催化ABTS受質的 Michaelies-Menten 曲線圖.....	63
圖 3-12 Lineweaver-Burk雙倒數圖計算Mb ^{H64D/V68L/I107A} 對受質ABTS的 K'm 及V'max值.....	63

圖 3-13	ABTS 濃度對 Mb ^{H64D/V68L/I107V} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖	64
圖 3-14	Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb ^{H64D/V68L/I107V} 對受質 ABTS 的 K'm 及 V'max 值	64
圖 3-15	ABTS 濃度對 Mb ^{H64D/V68L/I107L} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖	65
圖 3-16	Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb ^{H64D/V68L/I107L} 對受質 ABTS 的 K'm 及 V'max 值	65
圖 3-17	ABTS 濃度對 Mb ^{H64D/V68L/I107F} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖	66
圖 3-18	Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb ^{H64D/V68L/I10F} 對受質 ABTS 的 K'm 及 V'max 值	66
圖 3-19	ABTS 濃度對 Mb ^{H64D/V68L/I107G} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖	67
圖 3-20	Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb ^{H64D/V68L/I107G} 對受質 ABTS 的 K'm 及 V'max 值	67
圖 3-21	ABTS 濃度對 Mb ^{Wt} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖	68
圖 3-22	Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb ^{Wt} 對受質 ABTS 的 K'm 及	

V'max值.....	68
圖 3-23 H ₂ O ₂ 濃度對 Mb ^{H64D/V68L} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖.....	69
圖 3-24 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb ^{H64D/V68L} 對受質 H ₂ O ₂ 的 K'm 及 V'max 值.....	69
圖 3-25 H ₂ O ₂ 濃度對 Mb ^{H64D/V68L/I107M} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖.....	70
圖 3-26 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb ^{H64D/V68L/I107M} 對受質 H ₂ O ₂ 的 K'm 及 V'max 值.....	70
圖 3-27 H ₂ O ₂ 濃度對 Mb ^{H64D/V68L/I107A} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖.....	71
圖 3-28 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb ^{H64D/V68L/I107A} 對受質 H ₂ O ₂ 的 K'm 及 V'max 值.....	71
圖 3-29 H ₂ O ₂ 濃度對 Mb ^{H64D/V68L/I107V} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖.....	72
圖 3-30 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb ^{H64D/V68L/I107V} 對受質 H ₂ O ₂ 的 K'm 及 V'max 值.....	72
圖 3-31 H ₂ O ₂ 濃度對 Mb ^{H64D/V68L/I107L} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖.....	73



圖 3-32 Lineweaver-Burk雙倒數圖計算Mb ^{H64D/V68L/I107L} 對受質H ₂ O ₂ 的 K'm 及V'max值.....	73
圖 3-33 H ₂ O ₂ 濃度對 Mb ^{H64D/V68L/I107F} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖.....	74
圖 3-34 Lineweaver-Burk雙倒數圖計算Mb ^{H64D/V68L/I107F} 對受質H ₂ O ₂ 的 K'm 及V'max值.....	74
圖 3-35 H ₂ O ₂ 濃度對 Mb ^{H64D/V68L/I107G} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖.....	75
圖 3-36 Lineweaver-Burk雙倒數圖計算Mb ^{H64D/V68L/I107G} 對受質H ₂ O ₂ 的 K'm 及V'max值.....	75
圖 3-37 H ₂ O ₂ 濃度對Mb ^{Wt} 催化ABTS受質的Michaelies-Menten 曲線 圖.....	76
圖 3-38 Lineweaver-Burk雙倒數圖計算Mb ^{Wt} 對受質H ₂ O ₂ 的K'm 及 V'max值.....	76
圖 3-39 過氧化酶 peroxidase 和 peroxygenase 催化反應循環形成 compound I 與 compound II 的步驟.....	78

表目錄

頁次

表 2-1 設計的6條長單股DNA引子及兩端的2條短引子.....	32
表 2-2 <i>rTth</i> polymerase kit 的 PCR 反應之組成.....	33
表 2-3 PCR program.....	33
表 2-4 設計合成3種定點突變的互補引子(Primer)	37
表 2-5 Quick Change Site-Directed Mutagenesis 聚合酶連鎖反應組 成.....	38
表 2-6 QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit 使用之聚合酶連鎖 反應放大程式.....	38
表 2-7 20% separating gel 與 4% stacking gel 的 SDS-PAGE 膠片組成 份.....	41
表 3-1 野生型抹香鯨肌紅蛋白中各胺基酸殘基與血基質鐵原子最近 的原子及相距的距離.....	49
表 3-2 突變後的肌紅蛋白催化受質的動力學參數.....	80
表 3-3 突變後的肌紅蛋白催化受質的 turnover number 及 catalytic efficiency.....	80

第一章 緒論

1-1 肌紅蛋白(myoglobin)的簡介

肌紅蛋白(Myoglobin)在生理上的功能為與一分子的氧氣結合，在肌肉組織作為氧氣儲存的蛋白質，以緩衝組織呼吸時對氧氣濃度的需求。它對氧氣的親和力介於血紅蛋白(Hemoglobin)與細胞色素(Cytochromes)之間，因此肌紅蛋白在組織中接收從血紅蛋白釋出的氧氣，並將氧氣供給細胞中粒線體的細胞色素，提供其氧化呼吸作用所需的氧氣。在海洋哺乳類動物(例如：海豹和鯨魚)的肌肉中，肌紅蛋白特別豐富，因此可以延長這些動物在海底潛水的時間。



肌紅蛋白的三級結構為水溶性的橢圓球狀(44 x 44 x 25 Å)，以單體(monomer)形式存在於自然界中，分子量約為 17 kDa。肌紅蛋白的二級結構含有很高比例 (75%)的 α -螺旋結構(α -helices)，由 153 個胺基酸摺疊成 8 段右手旋的 α -螺旋結構，並分別命名為 A-H 螺旋，各螺旋的中間由一些非螺旋區連接。疏水性(hydrophobic)的胺基酸殘基在經過正確摺疊後大部分會處於整個肌紅蛋白分子的內部，而親水性(hydrophilic)的胺基酸殘基則位於分子的外部，因此使得整個肌紅蛋白分子相對的具有水溶性。

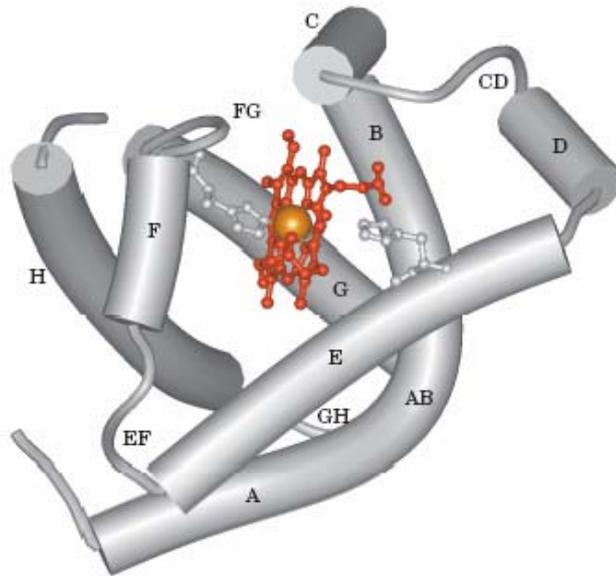


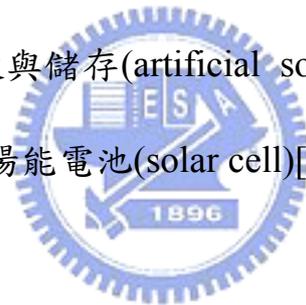
圖 1-1 肌紅蛋白的結構圖。

具有完整生物功能的肌紅蛋白除了蛋白質的部分，還需要有一個輔基團 (prosthetic group) 稱作血基質 (heme，又稱為 iron protoporphyrin IX)。血基質包含一個有機分子部份及一個鐵原子，有機分子部分稱為原紫質 (protoporphyrin) 是由四個吡咯環 (pyrrole rings) 組成。而這四個吡咯環是藉由次甲基橋 (methane bridges) 相連接而構成一個四吡咯環 (tetrapyrrole ring)，且有四個甲基 (methyl groups)，二個乙烯基 (vinyl groups) 及二個丙酸側鏈 (propionate side chains) 與這個四吡咯環相連。血基質中的鐵原子與原紫質環中心的四個氮共價結合，鐵原子還能另外形成二個鍵，分別位於血基質平面的二側，這些結合部位稱為第五及第六配位。

早在 1960 年代肌紅蛋白的結構已由英國劍橋大學的 John Kendrew 利用 X-ray 結晶學方法解出，此為第一個利用 X-ray 結晶學解出結構的蛋白質[1]。可顯示出肌紅蛋白各原子間的相對位置。其結構顯示肌紅蛋白由分別標示為 A-H 的 8 個螺旋片段構成，並在 E 和 F 螺旋片段之間留下一個疏水性的狹縫以供血基質的嵌入。血基質的四吡咯環與狹縫內的疏水性胺基酸藉由疏水性的交互作用穩定血基質與肌紅蛋白的連結。血基質中間的鐵原子直接與肌紅蛋白的近端組胺酸(proximal histidine) (稱為殘基 F8；意即 F 螺旋的第 8 個胺基酸殘基)即第 93 號組胺酸的 N ϵ (組胺酸側鏈上 ϵ 位置的氮原子)形成共價鍵結。氧氣的結合部位在血基質平面的另一側，即鐵原子的第六配位上。鐵原子可以處於亞鐵(+2)或高鐵(+3)二種不同的氧化態，分別稱為亞鐵肌紅蛋白(ferromyoglobin)及高鐵肌紅蛋白(ferrimyoglobin)，高鐵肌紅蛋白亦可稱為正鐵肌紅蛋白(metmyoglobin)。僅有亞鐵肌紅蛋白(+2 氧化態)能夠與氧氣結合。第 64 號組胺酸殘基(殘基 E7)稱為遠端組胺酸(distal histidine)，靠近血基質但不與它結合。含有血基質的肌紅蛋白稱為 holo-form 的肌紅蛋白，若沒有血基質的結合，此形態的肌紅蛋白通常稱為脫輔基肌紅蛋白(apomyoglobin)。

1-2 紫質(prophyrin)的簡介

紫質的結構是由四個吡咯環(pyrrole rings)藉由次甲基橋(methane bridges)相連接而構成一個四吡咯環(tetrapyrrole ring)。在自然界中及人類體內均存在紫質的衍生物，與人類生活有著密不可分的關係。例如，人體中負責氧氣運輸與儲存的血基質(heme)及自然界中進行光合作用的葉綠素。近幾年來關於紫質的研究與應用已愈來愈多，例如，光電元件(optoelectronic device)、分子邏輯元件(molecular logic device)、太陽能的吸收與儲存(artificial solar energy harvesting and storage scheme)以及太陽能電池(solar cell)[2-4]。



紫質的中間若嵌合一個金屬原子則此種紫質稱為金屬紫質(Metalloporphyrin)，例如：血基質(heme)就是嵌合入一個鐵原子 [the iron(II) protoporphyrin-IX complex] 在生理上作為氧氣的儲存和運輸。

含有鎂離子嵌入其中的紫質是光合作用中能將光能轉換成化學能的關鍵因子。因此不同的金屬嵌入紫質中，使其擁有許多的應用價值包括應用在光學治療[5]，新穎的光化學反應中心[6]，生物模擬

模型，催化和感測系統。圖 1-2 為紫質和血基質的化學結構。

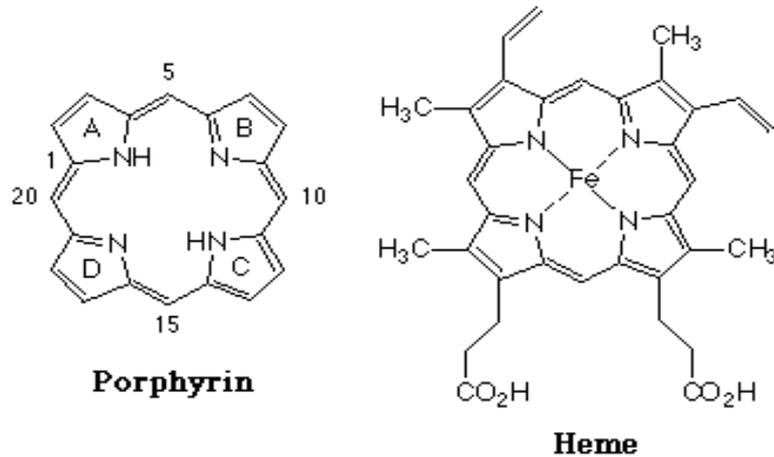


圖 1-2 紫質和血基質的化學結構。

1-3 血基質蛋白(heme protein)



含有血基質的蛋白質可被稱為血基質蛋白(heme protein or hemoprotein)，生物中目前已知的血基質蛋白可歸納出四種生物功能：電子傳遞(如：細胞色素 b5)、傳輸氧氣(如：血紅蛋白，肌紅蛋白)、氧氣或一氧化碳的感測(如：FixL，CooA)及催化氧化還原反應(如：horseradish peroxidase，cytochrome P450，catalase，NO synthase，NO reductase)。這些蛋白質雖然功能各異，但是它們都有一個共同的血基質(iron protoporphyrin IX)當作其輔基團(prosthetic group)。

在血基質蛋白中，血基質週邊的胺基酸殘基似乎是控制血基質蛋白功能的關鍵。帶電的血基質蛋白通常在其鐵原子的軸位(axial)有二個很強的配位體結合，以防止其它可能的受質進入。如肌紅蛋白的第六配位處也就是遠端口袋的(distal pocket)位置，經常會被一個水分子所佔據，以利於其它的配體，像是氧氣來交換。在近端的組胺酸殘基被當做軸位的配體，而遠端的組胺酸則是藉由氫鍵來穩定氧氣與血基質的結合。另外在作為感測氧氣的血基質蛋白 FixL 中，其血基質周圍也顯露出一個可以供配位結合的位置，而有些血基質蛋白的鐵原子亦可與過氧化氫配位結合並發生反應。同樣的血基質卻可以造成功能各異的蛋白質[7]。因此研究血基質週邊胺基酸殘基的改變，使不具酵素功能的肌紅蛋白變成具有過氧化酵素(oxidase)活性的研究，可以幫助我們更了解血基質蛋白。

1-4 過氧化酵素

山葵過氧化酵素(horseradish peroxidase；HRP)，是常見的過氧化酵素之一，這類高鐵的過氧化酵素(ferric peroxidase)與過氧化氫(H_2O_2)反應時會打斷其氧-氧鍵(HO-OH bond)，使血基質中的鐵和氧結合構

成特殊形式(oxo-ferryl($O=Fe^{IV}$)), 而紫質部分為帶有自由基的陽離子 (prophyrin radical cation), 這樣的血基質稱為Compound I (oxo-ferryl porphyrin radical cation)。在Compound I (圖 1-3)的形成過程中, 過氧化氫結合到血基質的鐵原子上, 遠端的組胺酸先是當作general base 進行質子化, 遠端質子化的組胺酸再扮演general acid的角色提供質子 給氧-氧鍵斷裂的 OH^- 以形成一分子的水。這過程中帶正電荷的遠 端精胺酸(distal arginine)亦幫助氧-氧鍵的極化(polarization)。因此對於 遠端組胺酸與精胺酸殘基的貢獻稱之為“拉效應(pull effect)”。而相 對的, 帶陰電的近端組胺酸提供很強的電子去幫助穩定氧-氧鍵斷裂 的過渡狀態(transition state), 因此對於近端組胺酸的貢獻稱為“推效 應(push effect)” [7]。

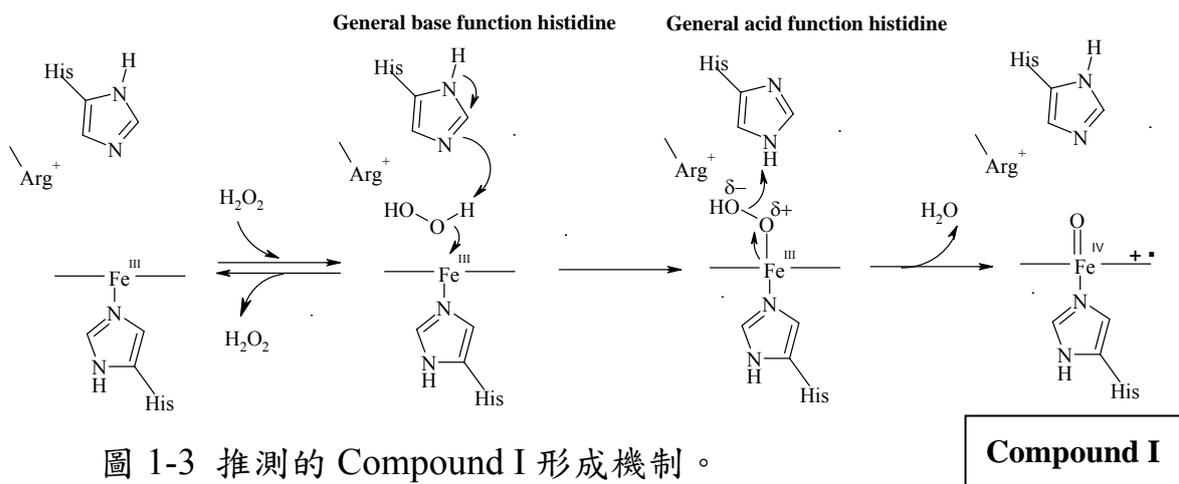


圖 1-3 推測的 Compound I 形成機制。

另外一些血基質蛋白，如細胞色素 P450 單加氧酶(cytochrome P450 monooxygenases)，則是與氧氣而非與過氧化氫結合，並且需要二個電子以形成 Compound I。圖 1-4 顯示自然界中過氧化酵素與單加氧酶(monooxygenases)相同反應中間物(reactive intermediates)的部分，以及單加氧酶與過氧化酵素的不同在於單加氧酶將 Compound I 的氧原子傳遞給受質。

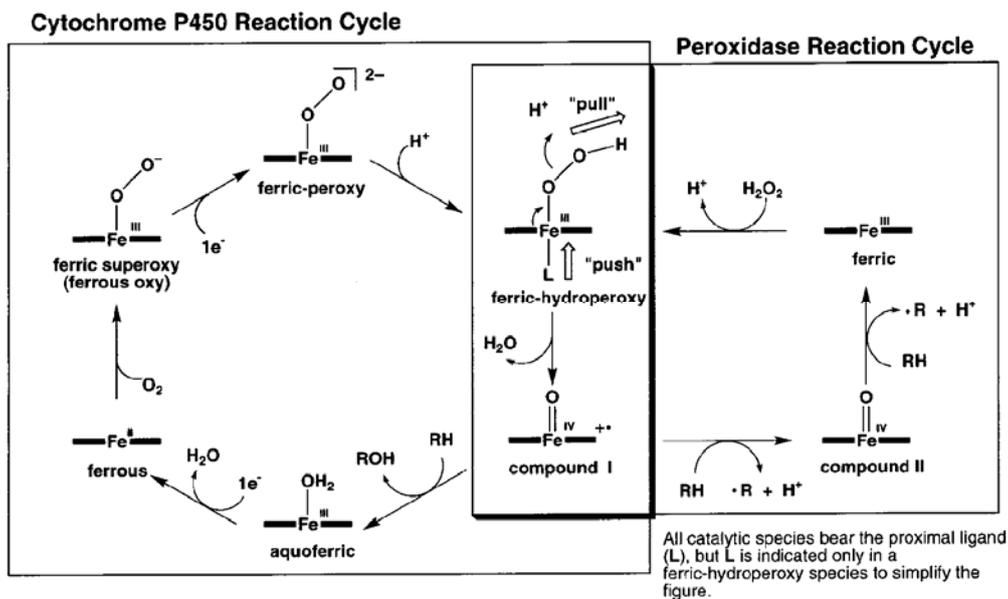


圖 1-4 兩種酵素 peroxidase 和 cytochrome P450 反應的比較[7]。

1-5 肌紅蛋白經突變後具有過氧化酶酵素活性

利用蛋白質酵素活性部位的結構可以影響其酵素活性的特性，目前已有將生理上僅能儲存氧氣的肌紅蛋白變成具有過氧化酶活性的研究報導。比較兩種已被結晶出結構的代表性血基質蛋白，肌紅蛋白及細胞色素 C 過氧化酶(cytochrome c peroxidase ; Ccp)這兩種血基質蛋白，它們具有結構完全相同的血基質，也一樣有近端的咪唑(imidazole)配體以及其遠端的活性部位皆有組胺酸殘基。但是在已結合氧氣分子的肌紅蛋白中，遠端的組胺酸可以非常靠近已配位結合鐵原子的氧氣分子。而在已結合氧氣分子的細胞色素 C 過氧化酶中，遠端的組胺酸與氧氣分子的距離則相對較肌紅蛋白中的遠。因此 Ozaki 等研究學者推測，由於肌紅蛋白中的遠端組胺酸離血基質的鐵原子較近，因此使肌紅蛋白與過氧化氫反應形成 Compound I 的能力遠低於細胞色素 C 過氧化酶[7]。

基於遠端組胺酸的位置有決定血基質蛋白的功能的重要性，Ozaki 等研究學者將抹香鯨肌紅蛋白(sperm whale myoglobin)及細胞色素 C 過氧化酶的結晶結構做活性區域的比較，再改變遠端組胺酸的位置，希望可以得到具有過氧化酶活性的突變肌紅蛋白[7]。他

們先是單純的將遠端的組胺酸殘基與其它活性區域位置的胺基酸殘基對調，因此建構 F43H/H64L 和 L29H/H64L 二組胺基酸殘對調的雙重突變肌紅蛋白，由於是將活性區域的遠端組胺酸位置改變，因此稱為“distal histidine relocation mutant”。而他們實驗的結果顯示 F43H/H64L 的雙重突變肌紅蛋白遠端組胺酸環境較相似於過氧化酶，此雙重突變肌紅蛋白的過氧化酶(oxidase activity)與過氧合酶(oxidase activity)都優於野生型肌紅蛋白，並且具有 general acid-base 的催化作用。



在野生型肌紅蛋白中 Compound I 無法形成的另一個原因可能是肌紅蛋白遠端組胺酸的迅速氧化作用，因此嘗試飽和突變實驗將遠端組胺酸置換成各種不同胺基酸的實驗亦被 Ozaki 等研究學者發表 [8]。將肌紅蛋白的遠端組胺酸殘基改變後，Compound I 便可以很快的形成，尤其是突變成天門冬胺酸 (Asp) 後功能便類似 chloroperoxidase(CPO)活性區域的麩胺酸(Glu)[9] (圖 1-5)。但是天門冬胺酸的羧酸氧原子在突變的肌紅蛋白中與血基質鐵原子的距離似乎太遠，因此推測在突變的肌紅蛋白中第 64 號天門冬胺酸(Asp)殘基的功能可能是增加對過氧化氫的極性與親合性，來改善突變肌紅蛋白的氧化活性。

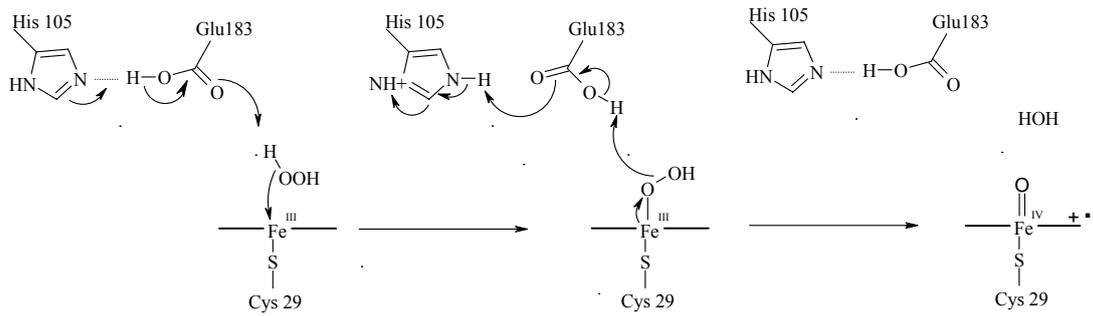


圖 1-5 在 chloroperoxidase 中 Glu-183 對形成 Compound I 的可能功能。

另外，從結構的角度來看肌紅蛋白的 Val 68 位置對受質到達活性部位有很大的重要性，將其置換成各種不同的胺基酸殘基會大大的改變其活性區域的形狀與體積[10]。因此以 H64D 為模板，將 Val 68 突變成各種不同胺基酸的雙重突變已被建構出來以測量其過氧化酶 (peroxidase) 與過氧合酶 (peroxygenase) 酵素活性，在這些雙重突變中，H64D/V68L 突變在形成 Compound I 後，與受質傳遞一個電子的效率最好，即有很好的過氧化酶活性。而 H64D/V68I 雖然形成 Compound I 的效率較差但卻有最好的過氧合酶活性，因此過氧合酶活性的速率決定步驟可能是在 Compound I 形成後與一當量的受質反應。另外也發現，H64D/V68A 和 H64D/V68S 這二組雙重突變肌紅蛋白在過氧合酶 酵素活性 (peroxygenase activity) 上具有鏡像選擇性

(enantioselectivity)，再搭配結晶結構的結果發現影響氧化速率和造成鏡像選擇性的可能原因有二，可能是第 64 號天門冬胺酸(Asp 64)殘基直接和受質的立體交互作用(steric interaction)或是使受質和遠端口袋的水分子產生極化的交互作用(polar interaction)。

在 1998 年 Wan 等人也以 PCR 隨意突變(random mutagenesis)的方法，企圖篩選比野生型肌紅蛋白的過氧化酶活性好的突變株。在經過四次 PCR 反應後，他們篩選到一株氧化酶活性較野生型有明顯差別的 T39I/K45D/F46L/I107F 突變株，由其酵素動力學的資料顯示這個突變株可以穩定 Compound I 的形成。此四重突變的肌紅蛋白與野生型肌紅蛋白的熱穩定性相似，因此其蛋白質整體結構應該沒有太大的差異[11]。

1-6 染料敏化太陽能電池 (DSSC)

由於全球氣候變遷、空氣污染問題以及資源日趨短缺之故，太陽能發電是目前廣泛被推薦使用的一種替代能源，將太陽光能轉變成電能可減少對環境的污染。瑞士科學家Grätzel在 1991 年提出一種新型的太陽能電池稱為染料敏化太陽能電池(Dye-sensitized solar cell)，此

型太陽能電池可源自 19 世紀，人們照相技術的理念。其製作是採用奈米結構的電極材料，以及適切的染料，組成光電效率超過 11% 的光電池。此類型光電池的工作原理是藉由染料做為吸光材料。染料中價電層電子受光激發，躍昇至高能階層，進而傳導至奈米二氧化鈦半導體的導電層，再經由電極引至外部。失去電子的染料則經由電池中的電解質得到電子，電解質是由 I/I^{3+} 溶於有機溶劑中形成。圖 1-6 清楚的標示染料敏化太陽能電池的運作原理[12]。

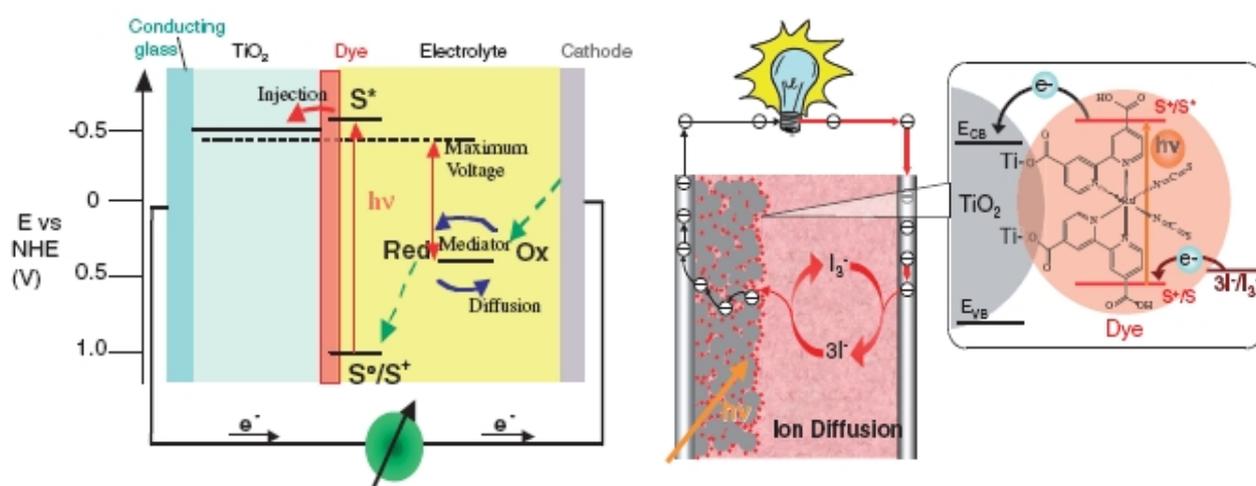


圖 1-6 DSSC 太陽能電池的運作原理。

對於應用於染料敏化太陽能電池中的染料有以下幾項要件：(1) 它必須可以堅固的連接到二氧化鈦半導體的表面，並且可以將躍昇的電子傳導到導電層中。(2) 氧化還原的位能要夠高，並可以迅速的從電解質中得到電子而還原。(3) 它還必須可以忍受至少 10^8 次以上的光

照氧化還原反應[13]。

一種編號為 N3 或 N-719 染料的有機鈦金屬化合物 cis-di(thiocyanato)bis(2,2'-bipyridyl-4,4'-dicarboxylate) ruthenium(II) 已被用於染料敏化太陽能電池中，並且經由偵測得知，此染料躍昇的電子傳導到導電層中的時間為 57 飛秒(femtosecond)，而在波長 530 nm 的光源激發下，此染料的入射光子對電流轉換效率(incident photon to current conversion efficiency；IPCE)高達 85 %[12, 14]。

1-7 肌紅蛋白在人工光合作用反應中心的應用



在自然界的光合作用包括能量傳遞和電子轉移兩個最基本的過程：太陽能首先被天線色素分子(antenna pigment molecules)接收後傳遞到光合作用的反應中心(reaction center)；反應中心接受能量後發生電荷分離(charge-separate)與電子轉移(electron transfer)繼而進行一系列的氧化還原反應，將太陽能轉變成可貯存的化學能。人們為了模擬光合作用的這兩個過程，設計合成了許多比自然界光合作用系統更簡單的模型分子，研究它們的光物理和光化學性質，探索光合作用中能量傳遞和電子轉移的機制，最終實現光能轉換的目的。其中一種模擬

光合作用反應中心的模型是利用半合成(semisynthesis)的方法製造一含有肌紅蛋白當電子提供者的donor-sensitizer-acceptor的三聚體(triad) [15]。Mb(Fe^{III}OH₂)-Ru²⁺-BXV⁴⁺,1, 的 acceptor (cyclobis(paraquat - *p*-phenylene) BXV⁴⁺)是利用catenane非共價連結sensitizer (Ru(bpy)₃)，而sensitizer則是與肌紅蛋白的血基質共價結合。另一種相似結構的三聚體Mb(ZnPP)-Ru²⁺-BXV⁴⁺,2,也被以cofactor reconstitution的方式合成出來(圖 1-7)。

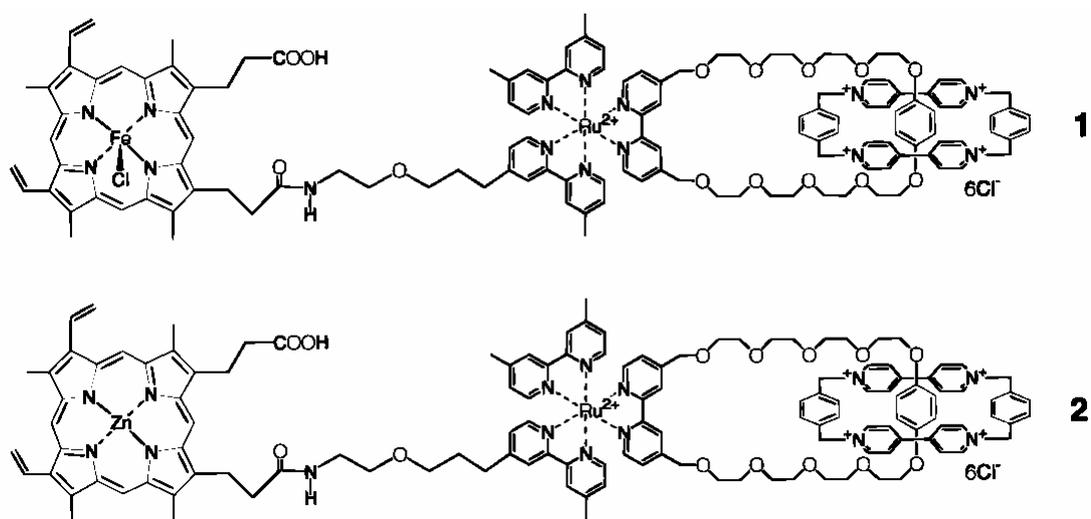


圖 1-7 尚未與肌紅蛋白結合的兩種三聚體結構[15]。

這兩種三聚體在與脫輔基肌紅蛋白質包覆後，形成一種以肌紅蛋白為光合作用反應中心的全新系統。藉由此系統可以研究光誘導後電荷分離及電子轉移的過程。實驗發現，以雷射激發此系統的sensitizer，其激發的電子會被傳遞到acceptor (BXV⁴⁺)而形成

Mb(Fe^{III}OH₂)-Ru³⁺-BXV³⁺的過渡狀態。接下來由於熱力學上的不穩定會使得一個氧化還原反應發生，即電子由系統中的高鐵肌紅蛋白 (ferric-Mb)轉移到Ru³⁺(bpy)₃上，以形成Mb(Fe^{IV}=O)-Ru²⁺-BXV³⁺。詳細反應步驟如圖 1-8。

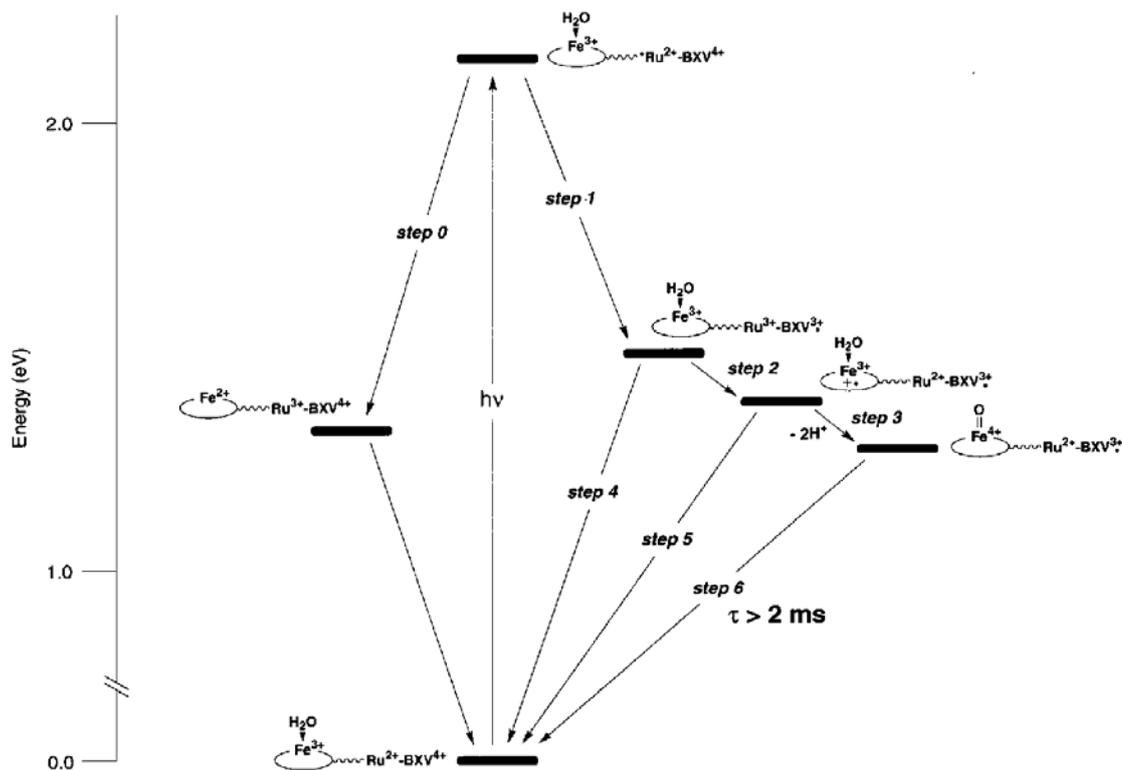


圖 1-8 Mb(Fe^{III}OH₂)-Ru²⁺-BXV⁴⁺ 在經過激發Ru(bpy)₃ 後的能階與選擇性路徑[15]。

當Ru(bpy)₃在溶液中時，其UV-Vis光譜圖會呈現兩個主要的吸收峰，一個為位於 284 nm的高能帶的吸收，此為配位基的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 的躍遷，另一個為可見光 460nm的吸收，此為MLCT band(metal-to-ligand

charge-transfer)的躍遷。此種MLCT相當於在激發態時，Ru被氧化，bpy被還原。因次藉由偵測 460 nm吸收峰消長的時間可以得知圖 1-8 中步驟 1 與步驟 2 電子傳遞的時間。步驟 1 為sensitizer中激發電子傳遞到acceptor (BXV⁴⁺)的時間由於太快因而無法測得，但在步驟 2，電子由系統中的高鐵肌紅蛋白(ferric-Mb)轉移到Ru³⁺(bpy)₃上則被偵測約為 1 μs。由Mb(Fe^{III}OH₂)-Ru³⁺-BXV³⁺變成Mb(Fe^{III}•OH₂)-Ru²⁺-BXV³⁺的狀態後很快的會轉變成電荷分離態(charge-separated state)的最低能階態即Mb(Fe^{IV}=O)-Ru²⁺-BXV³⁺。可由 426 nm的吸收峰(圖 1-9)證實oxoferryl-Mb的產生，而停留在Mb(Fe^{IV}=O)-Ru²⁺-BXV³⁺的時間經測量超過 2ms。另外(BXV³⁺)的存在可藉由偵測的 610 nm吸收峰的消長，而整個三聚體若沒有肌紅蛋白的部分則(BXV³⁺)會在 1 μs內就淬熄(quenching)消失。可見得肌紅蛋白部分在這整個系統是非常重要的。

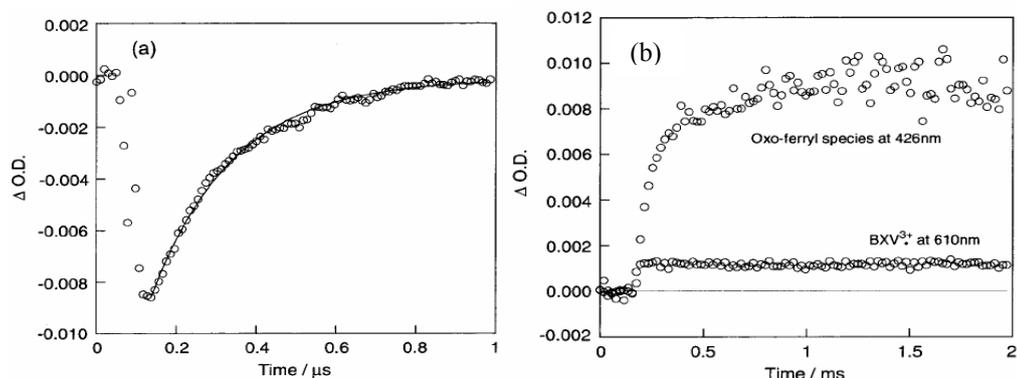


圖 1-9 (a)為Ru(bpy)₃的MLCT band在 460 nm吸收值增加的動力學追縱；(b)為時間偵測範圍至 2 ms，分別偵測在 426 和 610 nm的瞬態

吸收值動力學(transient absorption kinetics)。

以鋅取代鐵的Mb(ZnPP)-Ru²⁺-BXV⁴⁺也被用來做比較，其電荷分離態的能階依次為Mb(Zn)-*Ru²⁺-BXV⁴⁺ > Mb-(Zn)-Ru³⁺-BXV³⁺ > Mb(Zn+)-Ru²⁺-BXV³⁺。總體而言由於鋅的氧化數不像鐵如此複雜因而加快了到達其電荷分離態最低能階Mb(Zn+)-Ru²⁺-BXV³⁺的時間。相同的，若沒有肌紅蛋白的部分則(BXV³⁺)會很快的淬熄而消失。

蛋白質部分在整個系統中所扮演的功能可能是固定發射團(chromophore)以及調控電子的傳遞並穩定電荷分離態。而在結構方面可能是穩定或儘可能的延伸整個三聚體的 U-shape-like 構型。

比較鐵和鋅二種肌紅蛋白三聚體在電荷分離態最低能階停留的時間，可發現 Mb(Fe^{IV}=O)-Ru²⁺-BXV³⁺ 超過 2 ms，而 Mb(Zn+)-Ru²⁺-BXV³⁺ 只存在約 100 μs。可能是Mb(Fe^{IV}=O)在其血基質的活性區域缺乏提供質子者以幫助其還原。因此本系統中電子傳遞的關鍵可能是在遠端組胺酸的質子化與去質子化。

1-8 研究目的

經由文獻瞭解肌紅蛋白的活性區域遭受改變後，原本不易形成 compound I 的肌紅蛋白會變成具有過氧化酶酵素活性。因此我們嘗試從肌紅蛋白的結晶結構中比較各胺基酸殘基與血基質鐵原子的距離，挑選距離較近且可能影響受質進出活性區域的胺基酸殘基，並藉由定點突變的技術改變 3 個胺基酸殘基，利用過氧化酶之受質反應特性，篩選最好過氧化酶酵素活性的三重突變肌紅蛋白。



經由先前所述，在前人的研究裡已經發現第 64 號 His 位置的迅速氧化作用，尤其是突變成天門冬胺酸(Aspartic acid, Asp)後，可能會增加對過氧化氫的極性與親合性來改善突變肌紅蛋白的氧化活性。而第 68 號 Val 的位置對加速使受質到達活性部位有很大的重要性，其中雙重突變 H64D/V68L 可迅速形成 Compound I 後與受質有效的進行一個電子的傳遞，即有很好的過氧化酶活性。經由結構比較後，我們推測與血基質鐵原子距離 6.8 Å 的第 107 號 Ile 位置，對影響受質進出活性部位也可能具有重要的決定因素，因此我們嘗試利用定點飽和突變第 107 號 Ile 位置的胺基酸，篩選出過氧化酶酵素活性較好的幾種三重突變肌紅蛋白。利用酵素動力學的方式，我們可以偵測其動力

學常數，再與先前文獻的 H64D/V68L 肌紅蛋白做比較。

擁有較好過氧化酶酵素活性的三重突變肌紅蛋白在電子傳遞上也具有較好的效率。而含有不同金屬的紫質在自然界各種不同物種中也扮演著不同的角色。因此，當三重突變的肌紅蛋白在活性中心已創造了最佳的反應環境，再與不同金屬的紫質結合後是否仍然具有相似的特性亦引起我們很大的興趣去探討。

我們嘗試將本實驗室自行合成的不同金屬紫質與具有過氧化酶活性的突變型脫輔基肌紅蛋白進行蛋白質輔基重組實驗，並與野生型肌紅蛋白做比較，並偵測是否仍然具有過氧化酶的活性。



第二章 實驗材料及方法

2-1 實驗材料

2-1-1 化學藥品與材料

Acetic acid (Merck)

40% Acrylamide (GE Healthcare)

Agarose (USB)

APS (GE Healthcare)

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid) (ABTS) (Sigma)

Bacto™ Agar (DIFCO)

Bromophenol blue (USB)

Citric acid (Sigma)

Coomassie® Brilliant blue R 250 (Merck)

Dimethyl sulfoxide (MP Biomedicals)

DEAE sepharose (Bio-Rad)

Dodecyl sulfate sodium salt (Merck)

dNTP Set, 100 mM Solutions (GE Healthcare)

Ethylenediamine-tetraacetic acid (Merck)

Glycerol (Merck)

Glycine (Merck)

Guanidine hydrochloride (Gdm-HCl) (Sigma)

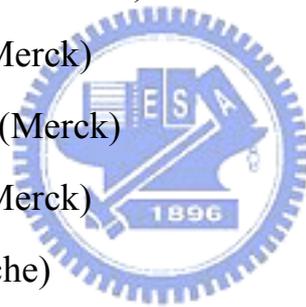
Hydrogen chloride (Merck)

IPTG (GeneMark, Taiwan)

Kanamycin sulfate (USB)



LB Broth, Miller (DIFCO)
2-mercaptoethanol (Merck)
Methanol (Merck)
N,N'-methylene-bis-acrylamide (Bis-Acrylamide)(Sigma)
Potassium chloride (Merck)
Potassium diphosphate (Merck)
Potassium phosphate (Merck)
Primers (Bio Basic Inc., Taiwan)
Restriction enzymes (New England Biolabs)
Sodium azide (Merck)
Sodium chloride (AMRESCO)
Sodium hydroxide (Merck)
Sodium diphosphate (Merck)
Sodium phosphate (Merck)
SYBR[®] Green I (Roche)
T4 DNA ligase (Promega)
TEMED (GE Healthcare)
Tris base (USB)



BCA Protein Assay Reagent and Albumin Standard (PIERCE)
BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)
LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare)
Plasmid Miniprep Purification Kit (GeneMark)
rTth DNA polymerase, XL & XL Buffer II Pack (Applied

Biosystems)

QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

2-1-2 緩衝液及溶液配製

50X TAE Buffer :

242 g Tris base、57.1 mL acetic acid、0.5M EDTA 加水至體積為 1 L，調 pH 至 8.5，儲存於室溫。使用時稀釋成 1 X 並調 pH 至 7.5-7.8。

6X DNA loading dye

0.25% bromophenol blue, 30% glycerol，儲存於-20 °C。



30% Acrylamide Mix :

取 40% acrylamide 750 mL、10 g bis-acrylamide 加二次水至體積為 1 L，避光儲存於 4 °C。

Separation Gel Buffer :

1M Tris pH 8.8，儲存於 4 °C。

Stacking Buffer :

1M Tris pH 6.8，儲存於 4 °C。

20% SDS :

20 g SDS，加水至體積為 100 mL，儲存於室溫。

10X Running Buffer :

144 g glycine、30 g Tris-base、10 g SDS，加水至體積為 1 L，儲存於 4 °C，使用時稀釋成 1 X。

樣品緩衝液 (5X Sample Buffer) :

取 1 mL 1M Tris-HCl (pH 6.8)，加入 0.8 mL 甘油、1.6 mL 10% SDS、0.4 mL 2-mercaptoethanol、0.05% bromophenol blue，加水至體積為 8 mL。



膠片染色液(0.1% Coomassie blue R-250 Stain Solution) :

取 1 g 的 Coomassie brilliant blue R-250，溶於 400 mL 的甲醇中，再加入 100 mL 的醋酸，加二次水至體積為 1 L。

脫色溶液 I (Destain Solution I) :

將甲醇 400 mL 與醋酸 100 mL 混合後，加二次水至體積為 1 L。

脫色溶液 II (Destain Solution II) :

將甲醇 50 mL 與醋酸 70 mL 混合後，加二次水至體積為 1 L。

溶菌緩衝液(Lysis buffer)：

Tris-HCl 100mM, KCl 100mM and EDTA 1mM, pH 8.0。

Solubilization buffer

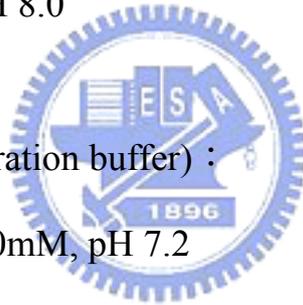
Tris-HCl 100mM, pH 8.0, Gdm-Cl 8M。

Disruption buffer

Tris-HCl 100mM, pH 8.0

平衡緩衝液(Equilibration buffer)：

Sodium phosphate 50mM, pH 7.2



LB 培養液

每升加入 10 g Bacto-Tryptone、5 g yeast extract 以及 5 g NaCl

IPTG

將 IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) 溶於二次去離子水，再用

0.22 μ m 濾膜過濾，儲存於-20 $^{\circ}$ C。

Tetracycline

每毫升取 Tetracycline 20 mg 以 Ethanol 溶解，避光存於 -20°C

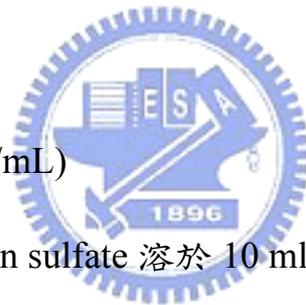
LB-Tet 培養基

每升 LB 培養液加入 15 g Agar 經過高溫滅菌後等冷卻至 70°C

以下再加入 1 mL Tetracycline 避光存放於 4°C

Ampicillin (100 mg/mL)

將 Ampicillin 溶於二次去離子水，再用 $0.22\ \mu\text{m}$ 濾膜過濾，儲存於 -20°C 。



Kanamycin (25 mg/mL)

將 250 mg kanamycin sulfate 溶於 10 ml 二次去離子水，再用 $0.22\ \mu\text{m}$ 濾膜過濾，儲存於 -20°C 。

LB-Kan 培養基

每升 LB 培養液加入 15 g Agar 經過高溫滅菌後等冷卻至 70°C

以下再加入 1 mL Kanamycin 存放於 4°C

2-1-3 實驗儀器

數位照相系統 (Kodak, DC120 Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 120)

DNA定序儀 (Applied Biosystems, ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer)

震盪培養箱 (Firstek Scientific, orbital shaking incubator Model-S302R)

桌上型高速離心機 (Beckman, Allegra[™] 21R Centrifuge)

高速離心機 (Beckman, Avanti[®] J-E Centrifuge)

微量離心機 (Eppendorf, Centrifuges 5415R)

微量旋轉式真空濃縮機 (SAVANT, Spin Vacuum SPD-111V)

紫外光/可見光光譜儀 (Beckman, DU-7500 spectrophotometer)

超過濾裝置 (Ultrafiltration System, Amicon)

微盤光譜分析儀 (Fusion Universal Microplate Analyzer, Packard)

PCR (Applied Biosystems, GeneAmp[®] PCR System 9700)

電泳槽 (Amersham Pharmacia)

2-1-4 菌株與載體

菌株

XL1-Blue

大腸桿菌之一株，購自於 Stratagene 公司。

BL21(DE3)

大腸桿菌之一株，購自於 Novagen 公司。

載體

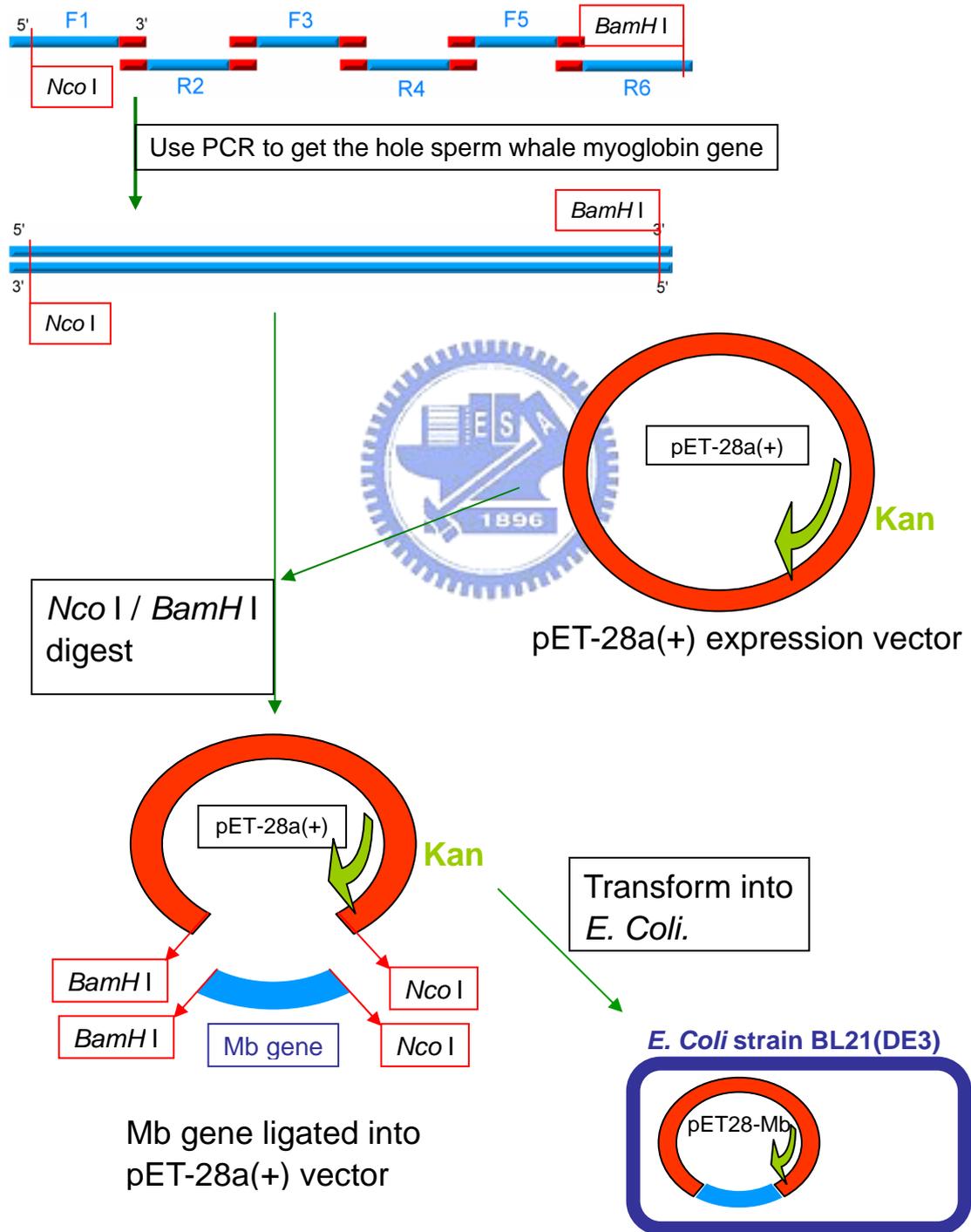
pET-28a(+)

購自於 Novagen 公司。



2-2 實驗方法

實驗流程設計



2-2-1 目標基因的建構

從 NCBI 中搜尋 sperm whale myoglobin 基因的 DNA 序列，再將此序列平均分成六段來設計六條長約 90 bp 的單股 DNA 引子 (HMLpET28-whaleMb-1~6 見表 2-1)，鄰近的引子之間有 12~18 bp 的互補重複區以供鄰近的引子黏合。引子的 N 端起始序列上游設計有 *NcoI* 的限制酶切位，C 端終止序列下游則設計有 *BamHI* 的限制酶切位，使基因全長約為 479 bp。將這 6 條引子利用具有修補功能的 *rTth* polymerase 聚合酶以 PCR 方式(表 2-2,2-3)讓這 6 條引子利用鄰近引子的互補重複區黏合並延長，得到完整的 sperm whale myoglobin 雙股 DNA 基因序列。最後在 PCR 產物加入 2 μ L 的 6 倍 Loading Buffer 及 2 μ L 的 SYBR Green I，利用 2 % 洋菜凝膠(Agarose gel)以電壓 120 伏特進行電泳分析，確認產物。

引子名稱	引子 DNA 序列
HMLpET28-whaleMb-1(F1)	5' TAT ACC ATg gTT CTg TCT gAA ggT gAA Tgg CAg CTg gTT CTg CAT gTT Tgg gCT AAA gTT gAA gCT gAC gTC gCT ggT CAT ggT CAg gAC 3'
HMLpET28-whaleMb-2(R2)	5' AgC TTC AgT TTT CAg ATg TTT gAA ACg ATC gAA TTT TTC CAg AgT TTC Cgg ATg AgA TTT gAA CAg TCg AAT CAA gAT gTC CTg ACC Atg 3'
HMLpET28-whaleMb-3(F3)	5' AAA ACT gAA gCT gAA ATg AAA gCT TCT gAA gAT CTg AAA AAA CAT ggT gTT ACC gTg TTA ACT gCC CTA ggT gCT ATC CTT AAg AAA AAA 3'
HMLpET28-whaleMb-4(R4)	5' gAT gAA TTC CAg gTA TTT gAT Cgg gAT CTT ATg TTT AgT AgC ATg CgA TTg CgC AAg Cgg TTT gAg CTC AgC TTC ATg ATg CCC TTT TTT CTT Aag 3'
HMLpET28-whaleMb-5(F5)	5' AAA TAC CTg gAA TTC ATC TCT gAA gCg ATC ATC CAT gTT CTg CAT TCT AgA CAT CCA ggT AAC TTC ggT gCT gAC gCT CAg ggT gCT ATg 3'
HMLpET28-whaleMb-6(R6)	5' Cgg gAT CCT TAA CCC Tgg TAA CCC AgT TCT TTg TAC TTA gCA gCg ATA TCT TTA Cgg AAC AgC TCg AgA gCT TTg TTC ATA gCA CCC Tg 3'
HMLpET28-whaleMb-N1	5' TAT ACC ATg gTT CTg TCT 3'
HMLpET28-whaleMb-C1	5' Cgg gAT CCT TAA CCC Tg 3'

表 2-1 設計的 6 條長單股 DNA 引子及兩端的 2 條短引子。

反應物	體積(單位 μL)
Each Primer (100 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$)	1
dNTP (10mM)	4
Mg(OAc) ₂ (1.5 mM)	3
3x3 XL <i>rTth</i> buffer	15
DDW	21
<i>rTth</i> polymerase	1
Total reaction volume	50

表 2-2 *rTth* polymerase kit 的 PCR 反應之組成。



部分	循環次數	溫度	時間
1	1	94°C	1 分
2	25	94°C	1 分
		55°C	2 分
		72°C	2 分
3	1	72°C	5 分
4	1	4°C	∞

表 2-3 PCR program。

2-2-2 重組質體的建構

利用在N端及C端設計*NcoI*及*BamHI*限制酶切位的*mb*基因將基因

嵌入pET-28a(+)表現載體 (expression vector)中。將載體與欲殖入之DNA分別利用限制酶作用 3-4 小時，於反應中加入 2 μ L的 6 倍 Loading Buffer 及 2 μ L的SYBR Green I，利用 1.2 % 洋菜凝膠 (Agarose gel)以電壓 120 伏特進行電泳分析，把經過限制酶作用後之正確大小的載體與欲接入之DNA質帶切下，以Gel Band Purification Kit(GE Healthcare) 純化凝膠中之DNA，以一定比例(insert : vector=5 : 1)混合，將樣品以微量旋轉式真空濃縮機抽乾後，利用接合酵素(T_4 DNA ligase)於 16 $^{\circ}$ C下作用 16 小時。



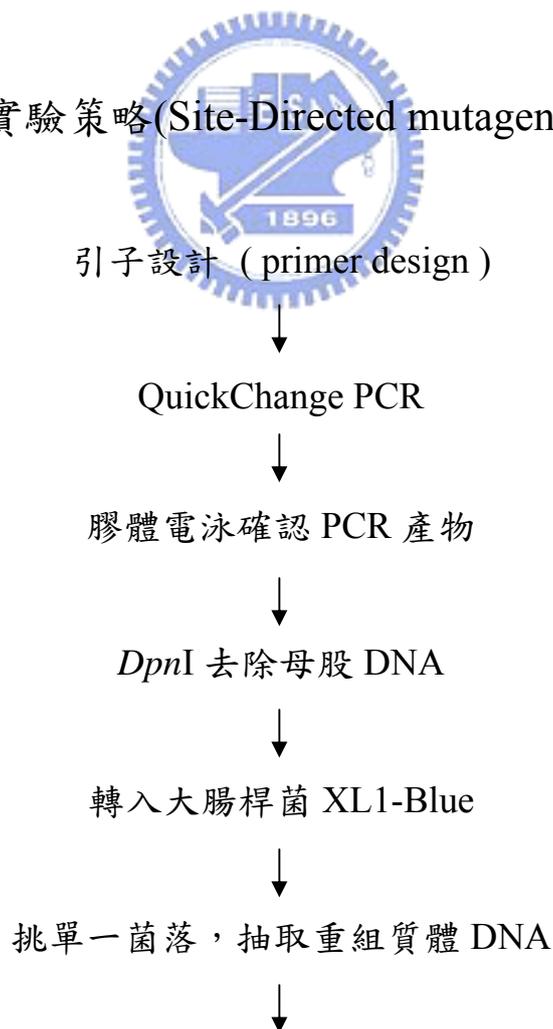
2-2-2-1 質體之轉化作用

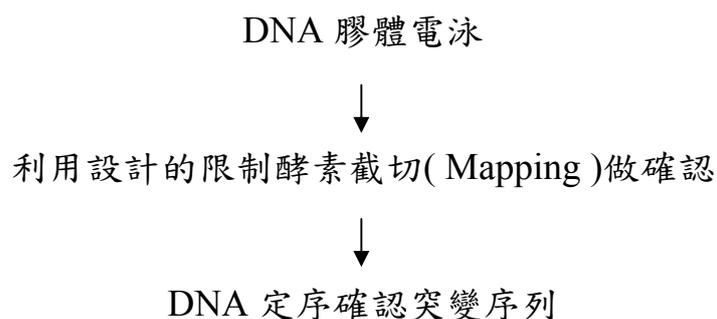
將 XL1-Blue 的 competent cell 拿出至於冰上，將經接合酵素反應之樣品與之混合，冰浴 20 分鐘，於 42 $^{\circ}$ C 水浴中反應 1 分鐘，隨即置入冰中 1 分鐘之後，將樣品全部置入 1 mL LB 培養液中，於 37 $^{\circ}$ C 振盪培養(200 rpm)1 小時，取 200 μ L 塗於含有 kanamycin (25 μ g/ml)的 LB 培養皿上，在 37 $^{\circ}$ C 培養 12-16 小時。挑單一菌落至 3 mL LB/kna 培養液中，37 $^{\circ}$ C 振盪培養(200 rpm) 16 小時，利用 Plasmid Prep Kit (GeneMark)，將建構好之質體抽出，並用原先作接合之限制酶 *Nco*I

與 *Bam*HI，確認插入之 DNA 片段是否有接入載體之中。最後得到肌紅蛋白重組質體 pET28-Mb。確認無誤的重組質體則再同上述步驟轉形至 *E.coli* BL21 (DE3) 中表現，挑單一菌落至 3 ml LB/kna 培養液中，37 °C 振盪培養(200 rpm) 16 小時後，取樣品 500 μ l 與 500 μ l 的 50 % (v/v) glycerol 混合後冰存於 -80°C 冰箱作為 stock。

2-2-3 定點突變與飽和定點突變實驗

定點突變實驗策略(Site-Directed mutagenesis strategies)





設計 3 種含有靜默突變(Silent Mutation)及欲突變的 3 個胺基酸殘基 His 64, Val 68, Ile107 位置的定點突變互補引子(Primer) (表 2-4)。利用 Stratagene (Merck 代理)的 QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit 依序進行突變實驗。以 pET28-Mb 為模板，加入 *Pfu* polymerase 聚合酶以 PCR 方式(表 2-5, 2-6)放大而得到 DNA 產物，利用 *DpnI* 限制酶截切甲基化 DNA 之特性，去除母股，留下含有定點突變之突變質體。將產物利用 2-2-2-1 節質體之轉化作用所敘述之方法直接轉形至 *E.coli* XL1-Blue 中，利用 Plasmid Prep Kit (GeneMark)，將定點突變之質體抽出後，利用在 primer 上設計的靜默突變，以特定限制酵素截切確認為突變株後再以 DNA 定序確認 DNA 的序列。以此方式依序建構 pET28-H64D Mb，pET28-H64D/V68L Mb 及 pET28-H64D/V68L/I107X Mb 突變株。

將突變處設計在 primer 上，利用 PCR 放大可直接得到突變點。突變處在 primer 上前後約各需 3~5 個胺基酸距離，以利黏合反應

(Annealing)。由於飽和突變實驗是將欲突變處突變成其它 19 種胺基酸，所以 primer 的突變處設計為 NNN，N 代表 A、T、C、G 四種鹼基，因此 primer 包含了 64 種可能性，即可轉譯(translate)出 20 種不同的胺基酸。在 primer 上設計靜默突變，可利用設計的特定限制酵素截切以確認是否為突變株。定序確認後的質體

引子名稱	引子 DNA 序列
HMLwhaleMb-H64D-1	E M K A S E D L K K D G 5' gAA ATg AA <u>g</u> gCT TCT gAA gAT CTg AAA AAA <u>gAT</u> ggT g 3'
HMLwhaleMb-H64D-2	5' C ACC <u>ATC</u> TTT TTT CAg ATC TTC AgAAgC CTT CAT TTC 3'
HMLwhaleMb-V68X-1	V T L T A L G A I 5' gTT ACC <u>(g/T/A)(C/T)(A/T)</u> TTA ACT <u>gCC CTA ggg gCT</u> ATC 3' Bgl I
HMLwhaleMb-V68X-2	5' gAT AgC CCC TAg ggC AgT TAA <u>(T/A)(G/A)(C/A/T)</u> ggT AAC 3'
HMLwhaleMb-I107X-1	K Y L E F S E A 5' C AAA TAC CTg gAg TTC <u>NNN</u> TCT gAA gCg 3'
HMLwhaleMb-I107X-2	5' CgC TTC AgA <u>NNN</u> GAA CTC CAg gTA TTT g 3'

表 2-4 設計合成 3 種定點突變的互補引子(Primer)。

反應物	體積(單位 μL)
Template	1
Primer 1 (10 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$)	1
Primer 2 (10 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$)	1
10X <i>Pfu</i> Buffer	5
dNTP (10mM)	4
DDW	37
<i>Pfu</i> polymerase	1
Total reaction volume	50

表 2-5 Quick Change Site-Directed Mutagenesis 聚合酶連鎖反應組成。

部分	循環次數	溫度	時間
1	1	95°C	2 分
2	18	95°C	30 秒
		Primer $T_m - 5 \sim 8^\circ\text{C}$	30 秒
		72°C	12 分
3	1	72°C	10 分
4	1	4°C	∞

表 2-6 Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit 使用之聚合酶連鎖反應放大程式。

2-2-4 脫輔基(apo-form)蛋白質的表現

取 stock 菌養於 25 mL LB/kna 培養液中，於 37 °C 振盪培養(200 rpm)16 小時。以 1:40 稀釋轉養至 1 L 的新鮮 LB 培養液中，於 37 °C

振盪培養(200 rpm) 3~4 小時，直到 OD600 = 0.5~1。加入 IPTG (final concentration 0.4mM)，繼續在 37 °C 振盪培養(200 rpm)5 小時。於 4 °C 下，轉速 8000 rpm，離心 30 分鐘，倒掉上清液，取菌液沉澱物。最後加入 20 mL 溶菌緩衝液(Lysis buffer)回溶菌體。

2-2-5 包涵體(inclusion body)粗萃液之製備

用溶菌緩衝液(Lysis buffer)把菌液沉澱物回溶(每升的菌液用 20 mL 緩衝液回溶)，置於冰上 1 小時之後，進行打破細胞的步驟(Sonication)。將溶液置於冰上，設定超音波震碎儀能量至 30 %，以震盪 2 秒，休息 1 秒方式，共震盪 30 秒，重複 6 個循環。將溶液於 4 °C 下，轉速 12,000 rpm，離心 30 分鐘，。倒去上清液，將沉澱物加入 20 mL 溶菌緩衝液(Lysis buffer)回溶後，置於冰上 30 分鐘，繼續於 4 °C 下，轉速 8,000 rpm 離心 20 分鐘，回溶再離心的動作重複 4 次。

2-2-6 包涵體(inclusion body)的變性與再摺疊

最後一次離心的沉澱物以 20 mL 的 disruption buffer 回溶，置於

冰上 1 小時。之後進行打破包涵體的步驟 (Sonication)，將溶液置於冰上，設定超音波震碎儀能量至 30 %，以震盪 2 秒，休息 1 秒的方式，共震盪 30 秒，重複 3 個循環。於樣品中緩慢加入 20 mL 的 solubilization buffer 稀釋 Gdm-HCl 的濃度。對 solubilization buffer 1L 透析 5-6 小時，再對 equilibration buffer 2L 透析 3-4 小時 2 次。將溶液於 4°C 下離心 30 分鐘，轉速 12000 rpm。取上清液。

2-2-7 脫輔基(apo-form)蛋白質的純化



利用離子交換管柱層析(DEAE)純化此蛋白，樣品以 BCA assay Kit 估計其蛋白質的總量，決定所要填充離子交換樹脂之體積。以 5 倍體積的 equilibration buffer 平衡管柱中的樹脂，慢慢注入樣品，收集流出物(Flow-Through)，利用試管每 5 mL 收集一管。

2-2-8 蛋白質分子量及純度分析

SDS-PAGE 是一種最常使用來分析蛋白質純度與定量的方法，尤其是在進行蛋白質純化時，於膠體(Polyacrylamide gel)中加入

sodium dodecyl sulfate (SDS)用來使蛋白質變性(denature)，SDS 會與蛋白質結合使摺疊構形蛋白質拉成直鏈狀之一級結構，此複合體均帶負電，所以在膠體中移動速率僅與蛋白質之分子量有關。以 20% separating gel 及 4% stacking gel 的 SDS-PAGE(表 2-4)分析純化後之蛋白質樣品。

組成物	20%的體積
ddH ₂ O	2 ml
30% acrylamide mix	6.6 ml
1.5 M Tris (pH8.8)	2.5 ml
20% SDS	50 μl
10% ammonium persulfate	200 μl
TEMED	10 μl
組成物	4%的體積
ddH ₂ O	3 ml
30% acrylamide mix	0.67 ml
1 M Tris (pH6.8)	1.25 ml
20% SDS	50 μl
10% ammonium persulfate	50 μl
TEMED	10 μl

表 2-7 20% separating gel 與 4% stacking gel 的 SDS-PAGE 膠片

組成份。

將經由離子交換管柱層析所得之每管樣品，取適量樣品與樣品緩衝液(5X Sample Buffer)以 1：4 比例混合，於 95°C 水浴加熱 10 分鐘後，置入樣品槽內，以 90 伏特電壓進行電泳分析，當染劑(dye)跑至下層膠片時，將電壓調至 120 伏特，直至染劑跑到膠片底下或還未完全跑掉時即可關掉，取下膠片置於膠片染色液(Stain Buffer)中，染色(含 Coomassie brilliant Blue R-250)1 小時後，用脫色溶液 I (Destain Buffer I)退染 30 分鐘，再用脫色溶液 II (Destain Buffer II)退染至隔天。



2-2-9 蛋白質輔基重組實驗

將經由離子交換管柱層析所得之蛋白質以 BCA assay Kit 偵測蛋白質濃度，以 0.5 M 氫氧化鈉溶液將蛋白質溶液的 pH 值調至 12。取莫耳濃度為蛋白質濃度 2 倍的紫質溶於 250 μ L 的 pyridine，加入 250 μ L 的 equilibration buffer 並以超音波震盪 10 分鐘，將紫質溶液與 pH 12 的蛋白質溶液混合，於 4 °C 下，磁石攪拌(stir)10 分鐘，再以 0.5 M 鹽酸調整 pH 值至 6.8，於 4 °C 下，磁石攪拌 6 小時。對 1 L 100 mM

磷酸鉀緩衝液 pH 6.8 透析 2-3 小時，共 3 次。樣品以 0.22 μm 的濾膜 (filter)。利用 desalting column 純化樣品，收集流出物(Flow-Through)，利用 eppendorf 以每 1 ml 收集一管。

2-2-10 酵素最適化條件之研究

2-2-10-1 最適反應環境之酸鹼值測定

配製不同 pH 值的受質反應溶液，將 1 mM ABTS 及 7 mM H_2O_2 溶於不同 pH 值且適合於其酸鹼值範圍的各種鹽類溶液中，酸性範圍 (pH 4-6) 為檸檬酸 (Citric acid) 溶液，中性範圍 (pH 6-8) 為磷酸鈉 (Sodium Phosphate) 溶液，鹼性範圍 (pH 8-10) 為三羥甲基氨基甲烷-鹽酸 (Tris-HCl) 溶液，緩衝液鹽濃度為 50 mM。取 1 ml 不同 pH 值的受質反應溶液與固定量的酵素溶液 5 μl 混合測定不同 PH 值的酵素活性。以不同 pH 值對酵素活性作圖，可得酵素進行反應之最適作用 pH 值。

2-2-10-2 溫度與活性之關係

將固定量的酵素溶液分別於 4，25，37，42，50，60，70 與 80 °C 下作用 30 分鐘後，置於室溫 20 分鐘。各取 5 μL 的酵素溶液與 1 mL 的 1 mM ABTS 及 7 mM H_2O_2 ，於 50 mM 磷酸鈉緩衝液 pH 7.0 中混合進行反應，測定酵素活性。以溫度對酵素活性作圖，可得到酵素的耐熱性。

2-2-11 酵素動力學參數測定

配製不同 ABTS 濃度的受質液 (0.05-5 mM) 溶於含 7 mM H_2O_2 的 50 mM 磷酸鈉緩衝液 pH 7.0 中。取 1 mL 不同 ABTS 濃度的受質液與 5 μL 適當量稀釋的酵素溶液混合進行反應，於室溫偵測 730 nm 吸光值每隔 5 秒測一次共偵測 2 分鐘，重複 3 次以上，取其平均值。取一固定時間的吸收值除以 ABTS 游離基產物在 730nm 的莫耳消光係數 ($\epsilon = 1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [8]，最後換算酵素催化受質的反應速率單位為 (mM/min)，以受質濃度對酵素反應速率作圖可得受質飽和曲線圖。將受質濃度與反應速率均換算成倒數值，以 Lineweaver-Burk plot 雙倒數作圖，加上趨勢線及其直線公式後可求得該直線的 X 截距及 Y 截距，依此可求得酵素催化 ABTS 之 apparent K_m (K'_m) 及 apparent

V_{max} (V'_{max})值($K'_m = -1/X$ 截距; $V'_{max} = 1/Y$ 截距)。

經由上述方式求得ABTS之 K'_m 後，將ABTS濃度固定於大於 K'_m 之濃度，改變 H_2O_2 濃度，測定 H_2O_2 受質之 K'_m 值及 V'_{max} 值。配製不同 H_2O_2 濃度的受質液(0.1-15 mM)溶於含 1 mM ABTS的 50 mM 磷酸鈉緩衝液pH 7.0 中。取 1 mL不同 H_2O_2 濃度的受質液與 5 μ L 適當量稀釋的酵素溶液混合進行反應，於室溫偵測供氫體ABTS氧化產物 730 nm 吸光值，以 H_2O_2 濃度對酵素反應速率作圖可得 H_2O_2 受質飽和曲線圖，並以Lineweaver-Burk plot雙倒數法求得酵素催化ABTS氧化之 H_2O_2 受質 K'_m 及 V'_{max} 值。



第三章 結果與討論

3-1 目標基因質體之建構

可轉譯出完整的抹香鯨肌紅蛋白(sperm whale myoglobin)的 *mb* 基因，在利用 6 條單股 DNA 引子以 PCR 方式黏合、延長並放大後，可以得到一條全長 479 個鹼基對的雙股 DNA。經過 2% 洋菜凝膠 (Agarose gel) 電泳後可在約 500 bp 處看到 *mb* 的 DNA 質帶。

經過多次的截切與接合反應後，我們成功的將 *mb* 基因接入 pET28a(+)這個表現載體中，並經由限制酵素截切(Mapping)確認後進行 DNA 定序的反應，可以確認我們成功的建構了 pET28-*mb* 這個質體。

3-2 篩選目標

利用定點突變的技術來對蛋白質特定胺基酸殘基做改變以觀察蛋白質的結構及活性變化，已是目前相當普遍的方法。本實驗室對這項技術亦相當純熟。而先前所述肌紅蛋白中 His64 位置在突變成天門

冬胺酸(Asp)後可能會增加對過氧化氫的極性與親合性來改善突變型肌紅蛋白的氧化活性，而第 68 號 Val 的位置對加速受質到達活性部位有很大的重要性。因此我們先以含有野生型抹香鯨肌紅蛋白(sperm whale myoglobin) *mb* 基因的質體 pET28-*mb* 為模板(template)，利用定點突變的技術得到改變 2 個胺基酸殘基位置的 pET28-H64D/V68L *mb* 質體，即文獻中過氧化酶活性最好的雙重突變肌紅蛋白。並以此為模板，挑選另一個可能會影響突變型肌紅蛋白過氧化酶活性的胺基酸殘基。

經由野生型抹香鯨肌紅蛋白結晶結構來比對每個胺基酸殘基與血基質鐵原子的最近距離後(表 3-1)。我們推測距離 6.76 Å 的第 107 號 Ile 位置的殘基對影響受質進出反應的活性部位也可能具有重要的決定因素。因此我們嘗試飽和突變第 107 號 Ile 位置的胺基酸，將它換成其它 19 種的胺基酸，再來比較過氧化酶活性。

位置	殘基	最近原子	距離	位置	殘基	最近原子	距離	位置	殘基	最近原子	距離
1	Val	CG1	-25.02	52	Glu	OE2	20.47	103	Tyr	OH	-12.87
2	Leu	CD1	-21.05	53	Ala	CB	23.68	104	Leu	CD2	-6.54
3	Ser	OG	-28.16	54	Glu	OE1	21.17	105	Glu	OE2	-17.46
4	Glu	OE2	-27.26	55	Met	CE	16.06	106	Phe	CD2	12.84
5	Gly	CA	-28.67	56	Lys	NZ	21.25	107	Ile	CD1	6.76
6	Glu	OE2	-26.5	57	Ala	CB	21.56	108	Ser	OG	-11.7

7	Trp	CH2	-18.96	58	Ser	OG	15.55	109	Glu	OE2	17.08
8	Gln	NE2	29.89	59	Glu	OE2	18.92	110	Ala	CB	12.8
9	Leu	CD2	27.28	60	Asp	OD2	12.73	111	Ile	CD1	10.53
10	Val	CG1	18.79	61	Leu	CD1	10.79	112	Ile	CD1	17.33
11	Leu	CD2	19.64	62	Lys	NZ	19.57	113	His	NE2	20.89
12	His	ND1	27.01	63	Lys	NZ	15.55	114	Val	CG2	16.19
13	Val	CG2	20.39	64	His	CD2	8.48	115	Leu	CD2	17.25
14	Trp	CH2	13.11	65	Gly	CA	9.56	116	His	NE2	25.89
15	Ala	CB	22.86	66	Val	CG1	13.08	117	Ser	OG	21.27
16	Lys	NZ	27.49	67	Thr	CG2	7.15	118	Arg	NH2	19.52
17	Val	CG1	15.96	68	Val	CG2	4.99	119	His	NE2	20.7
18	Glu	OE2	16.25	69	Leu	CD2	10.32	120	Pro	CD	26.38
19	Ala	CB	22.75	70	Thr	OG1	12.44	121	Gly	CA	29.08
20	Asp	OD1	19.63	71	Ala	CB	7.89	122	Asp	OD2	27.24
21	Val	CG1	13.9	72	Leu	CD1	10.4	123	Phe	CZ	20.28
22	Ala	CB	16.56	73	Gly	CA	13.49	124	Gly	CA	27.54
23	Gly	CA	17.5	74	Ala	CB	13.52	125	Ala	CB	28.7
24	His	ND1	17.93	75	Ile	CD1	-10.1	126	Asp	OD1	28.5
25	Gly	CA	12.16	76	Leu	CD2	-15.02	127	Ala	CB	24.54
26	Gln	OE1	17.37	77	Lys	NZ	18.69	128	Gln	OE1	23.08
27	Asp	OD1	17.94	78	Lys	NZ	-20.08	129	Gly	CA	23.7
28	Ile	CG2	10.73	79	Lys	NZ	-25.64	130	Ala	CB	23.2
29	Leu	CD2	7.64	80	Gly	CA	-19.4	131	Met	CE	17.6
30	Ile	CG1	15.2	81	His	ND1	-22.87	132	Asn	OD1	18.66
31	Arg	NH1	18.98	82	His	ND1	-15.76	133	Lys	NZ	-26.19
32	Leu	CD2	8.35	83	Glu	OE1	-20	134	Ala	CB	-17.52
33	Phe	CZ	9.33	84	Ala	CB	-17.44	135	Leu	CD1	14.03
34	Lys	NZ	21.19	85	Glu	OE2	-16.73	136	Glu	OE2	-19.09
35	Ser	OG	17.21	86	Leu	CD1	-12.72	137	Leu	CD1	-18.88
36	His	NE2	15.61	87	Lys	NZ	-17.63	138	Phe	CZ	-8.17
37	Pro	CG	17.72	88	Pro	CB	-11.24	139	Arg	NH2	-14.07
38	Glu	OE1	15.62	89	Leu	CD1	-6.2	140	Lys	NZ	-21.4
39	Thr	CG2	10.72	90	Ala	CB	-10.76	141	Asp	OD2	-17.03
40	Leu	CD1	12.3	91	Gln	NE2	-13.71	142	Ile	CD1	-9.6
41	Glu	OE1	16.17	92	Ser	OG	-6.79	143	Ala	CB	-15.44
42	Lys	NZ	-11.36	93	His	NE2	-2.18	144	Ala	CB	-18.04
43	Phe	CZ	5.25	94	Ala	CB	-11.24	145	Lys	NZ	-16.77

44	Asp	OD2	13.14	95	Thr	OG1	-12.5	146	Tyr	OH	-8.47
45	Arg	NH1	10.88	96	Lys	NZ	-10.07	147	Lys	NZ	-23.24
46	Phe	CE2	8.94	97	His	NE2	-5.69	148	Glu	OE1	-19.11
47	Lys	NZ	13.86	98	Lys	NZ	-14.52	149	Leu	CD1	-14.36
48	His	ND1	16.68	99	Ile	CD1	-6.47	150	Gly	CA	-18.92
49	Leu	CD1	14.93	100	Pro	CD	-10.07	151	Tyr	OH	-15.42
50	Lys	NZ	24.72	101	Ile	CD1	-11.69	152	Gln	OE1	-16.45
51	Thr	OG1	22.52	102	Lys	NZ	-18.05	153	Gly	CA	-16.09

表 3-1 野生型抹香鯨肌紅蛋白中各胺基酸殘基與血基質鐵原子最近的原子及相距的距離。(註 1：最近的原子第一個為原子種類，之後代表為殘基中的第幾號原子；註 2：距離單位為 Å，負號代表為位於血基質平面的近端組胺酸那一側)。



3-2-1 細胞粗萃液的活性篩選

以含有雙重突變 H64D/V68L mb 基因的質體 pET28-H64D/V68L mb 模板(template)，利用飽合突變的技術，我們得到將第 107 號 Ile 胺基酸殘基改變成其它 19 種胺基酸的三重突變株。經由 DNA 定序確認後，我們將包含雙重突變在內的 20 種胺基酸 pET28-H64D/V68L/I107X mb 轉形(transform)至可以表現出完整肌紅蛋白的 *E.coli* BL21 (DE3) 中表現。

為了達到可以快速的篩選飽和突變實驗中哪一株三重突變株具有較好的過氧化酶活性，因此我們採用小量的培養包含雙重突變株在內的 20 種胺基酸的突變株於 3 mL LB 培養液中，並在 15 mL 試管中於 37°C 震盪培養 12~16 小時。收集 1.5 mL 菌液，以 13200 rpm 離心 1 分鐘，到掉上清液，加入 300 μ L 的溶菌緩衝液以回溶沉澱物。利用溫和的破菌方法來打破細胞，隨即將樣品丟入液態氮中急速冷凍約 1 分鐘，再迅速丟入 42°C 水浴中約 2 分鐘，如此重複 3 次。最後以 12,000 rpm 離心 1 分鐘，取上清液即為用來做活性比較的細胞粗萃液。



經過蛋白質定量後，取含相同蛋白質量的細胞粗萃液與 90 μ L 含 1 mM ABTS、5 mM H₂O₂ 的 50 mM 磷酸鈉緩衝液 pH 7.0 在 96-well 的微量分析盤(microwell plate)中反應，並偵測 ABTS 氧化產物 405 nm 的吸光值以比較彼此間的過氧化酶活性大小，結果如圖 3-1 所示。

結果顯示將第 107 號 Ile 胺基酸突變成 Met、Leu、Phe、Val、Ala 這 5 種胺基酸的三重突變株的過氧化酶活性較優於文獻中的 H64D/V68L 的雙重突變株。因此我們將個別純化這幾種胺基酸的肌紅蛋白再與 H64D/V68L 的雙重突變進行過氧化酶活性的比較。

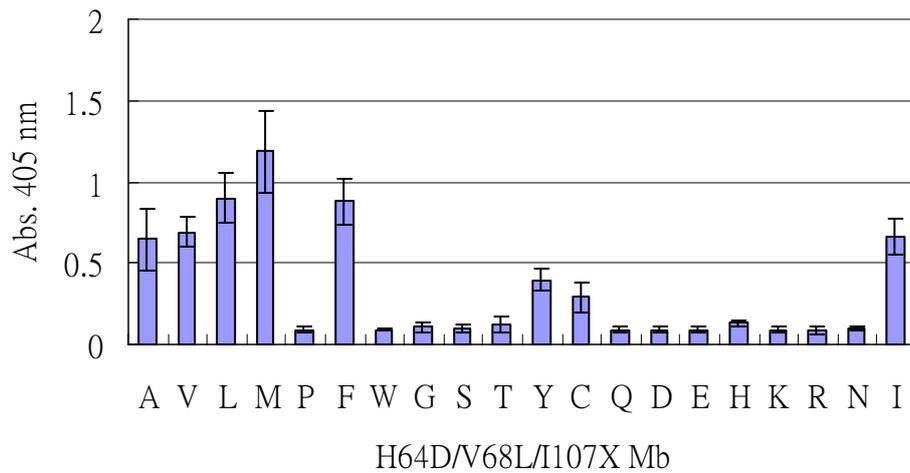


圖 3-1 含相同蛋白質量的三重突變肌紅蛋白H64D/V68L/I107X Mb細胞粗萃液 10 μ L與 90 μ L 的 1 mM ABTS、5 mM H_2O_2 反應後偵測 405 nm的吸光值。



3-3 脫輔基(apo-form)蛋白質表現及純化

由於實驗的需求，未來我們希望的是將突變後的脫輔基肌紅蛋白與不同金屬的紫質及經過各種官能基修飾過後的紫質做輔基重組，再研究其各種物理及化學特性。因此，我們參考文獻[16]將實驗採用的肌紅蛋白表現成包涵體(inclusion body)的方式，再藉由包涵體的變性與再摺疊獲得脫輔基形式的肌紅蛋白。如此可以擺脫以往利用 MEK 方法將紫質從肌紅蛋白中分離的繁複步驟，從包涵體純化脫輔基肌紅

蛋白也可以去除許多雜蛋白，省去利用第二根管柱層析純化肌紅蛋白的時間。

處理包涵體時由於蛋白質的過度堆疊，因此密度相當的大，所以在破菌後只需利用低轉速就可將包涵體離心下來。接下來以 lysis buffer 不斷的回溶去除非包涵體的雜蛋白，經過幾次處理即可得到大部分都是脫輔基肌紅蛋白的包涵體。

本實驗利用 Gdm-HCl 使包涵體變性，再利用透析去除 Gdm-HCl 使脫輔基肌紅蛋白慢慢摺疊。透析時為了避免已變性的蛋白又聚集在一起，因此會利用梯度透析的方法來避免此情況。最後只需要利用 DEAE 離子交換管柱層析收集沖提液，再將每管利用 BCA 蛋白質濃度測量分析後，收集代表含有蛋白質的吸收峰部分。

經過純化的脫輔基肌紅蛋白 (apo-Mb) 可以由以下的 20% SDS-PAGE(圖 3-2)偵測得知蛋白質的純度，並且利用 UV-Vis 光譜儀掃描全波長並無發現紫質的 410 nm 處的吸收峰，因此可以確認純化的肌紅蛋白為脫輔基的形式。

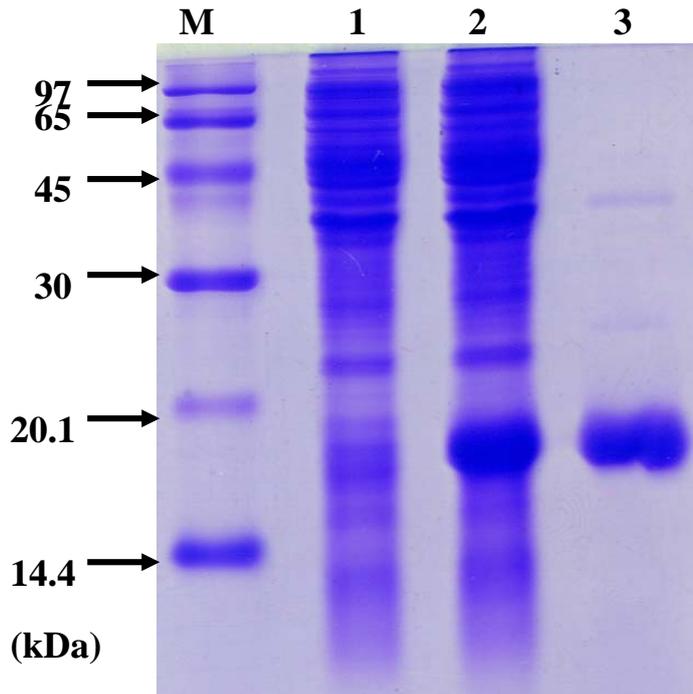


圖 3-2 20% 的 SDS-PAGE 分析 Lane M：低分子量的蛋白質 marker。Lane 1：未加入 IPTG 誘導前。Lane 2：IPTG 誘導後經超音波震盪離心之沉澱回溶。Lane 3：經純化後得到約 17kDa 的肌紅蛋白。

3-4 蛋白質輔基重組

在極性的環境(極酸或鹼)下肌紅蛋白會變性而去摺疊，紫質亦會由原本在中性 pH 值時的高度聚集(aggregate)現象而形成單體(monomer)或雙體(dimer)的形式。利用此特性我們先將脫輔基肌紅蛋白溶液與紫質溶液的 pH 值均調成 12，混合攪拌後再調回中性的 pH 值，以幫助脫輔基肌紅蛋與紫質進行蛋白質與輔基的重組(cofactor

reconstitution)。

一些有機溶劑也會加入以幫助溶解紫質及穩定蛋白質，吡啶(pyridine)與緩衝溶液等比例的混合可幫助紫質更不容易聚集(aggregate)。另外一種有機溶劑二甲基亞砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)也被加在蛋白質溶液中以穩定蛋白質，防止用來溶解紫質的吡啶(pyridine)加入後會造成蛋白質不穩定。

實驗中會加入約高於蛋白質莫耳濃度 2 倍量的紫質以確保每分子的蛋白質均可與紫質結合，經過調整 pH 值及透析去除有機溶劑後多餘未被嵌入肌紅蛋白的紫質會高度聚集，利用孔徑極小的 0.22 μm 濾膜(filter)及去鹽管柱(desalting column)可以將這些多餘未被嵌入肌紅蛋白的紫質去除。

鐵(Fe^{3+})和鋅(Zn^{2+})兩種市面上可買到的不同金屬紫質在經過蛋白質與輔基的重組實驗後已被成功的嵌入野生型及H64D/V68L雙重突變型的肌紅蛋白中。經由UV-Vis光譜儀掃描全波長後，由下圖(圖3-3)可以比較彼此間的不同。

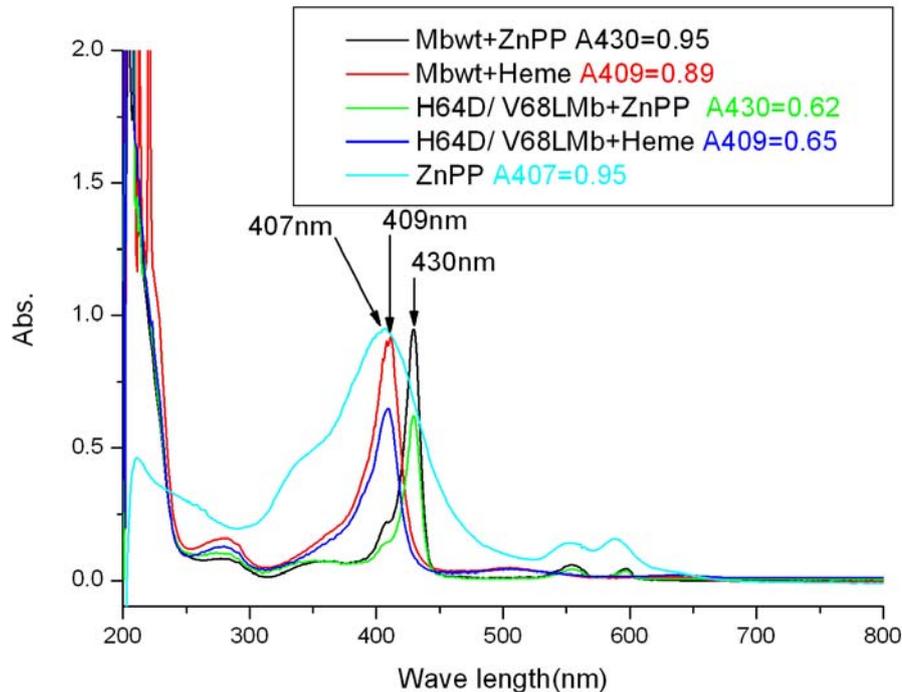


圖 3-3 UV/Vis 全光譜掃描圖 含鋅的紫質(Zinc Protoporphyrin IX, ZnPP)及含鐵的紫質(Iron(II) Protoporphyrin IX)即血基質(Heme)分別與野生型及 H64D/V68L 雙重突變型的脫輔基肌紅蛋白中進行蛋白質與輔基的重組後與對照的 ZnPP 溶於 pH6.8 的 100 mM 磷酸鉀緩衝液中。

含鐵的紫質即為自然界中常見肌紅蛋白中含的血基質(Heme)，文獻中指出Mb^{H64D/V68L}雙重突變肌紅蛋白會有過氧化酶(oxidase)的活性[10]，因此為了測試蛋白質與輔基的重組實驗是否可行，我們將經過蛋白質與輔基的重組實驗後血基質(Heme)已成功的被嵌入野生型及突變型的肌紅蛋白與 1 mM ABTS及 2 mM H₂O₂反應。結果雙重突變肌紅蛋白Mb^{H64D/V68L}如文獻所指具有很高的反應活性，與野生型肌

紅蛋白相比可在 730 nm 處見到很明顯的吸收光譜(圖 3-4)。

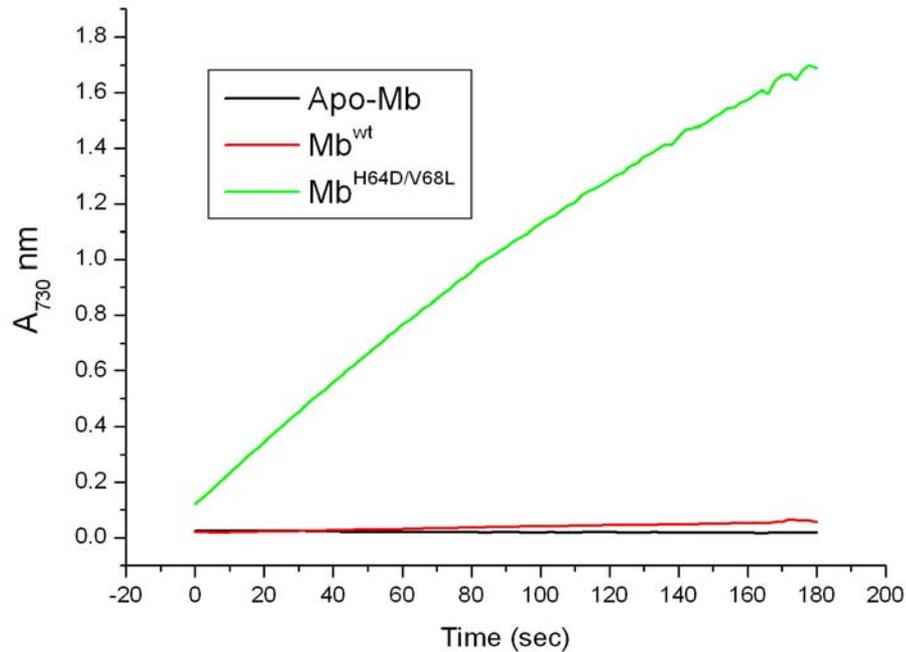


圖 3-4 相同量蛋白質的野生型(Mb^{wt})及Mb^{H64D/V68L}與Heme進行蛋白質與輔基的重組後與 1 mM ABTS及 2 mM H₂O₂反應依時間偵測 ABTS氧化產物 730 nm 吸光值，作為對照的是脫輔基的肌紅蛋白 (Apo-Mb)。

含鋅的紫質(Zinc Protoporphyrin IX, ZnPP)經過蛋白質與輔基的重組實驗後經由UV-Vis光譜儀掃描全波長後可以確認成功的嵌入野生型及突變型的肌紅蛋白中。由於鋅的電子軌域(orbital)均被填滿，所以鋅的氧化數不像鐵一樣複雜，也沒有多餘的d層軌域可與氧原子

結合，因而在ZnPP嵌入的雙重突變肌紅蛋白Mb^{H64D/V68L}並不具有過氧化酶(oxidase)的活性。但是仍然可以從光譜圖(圖 3-3)中發現ZnPP在嵌入肌紅蛋白後主要吸收帶(Soret band 或 B band)由溶液中的 407 nm紅位移(red shift)至 430 nm，且吸收峰的帶寬由於較無ZnPP聚集(aggregate)而變窄，此結果與文獻所得之吸收光譜比較則是得到一致的結果[17]。

3-5 過氧化酶活性最適反應條件

3-5-1 最適反應之 pH 值



不同pH值對酶活性的影響可以由圖 3-5 顯示出來。檸檬酸(Citric acid)溶液的緩衝範圍為 4.0~6.0，磷酸鈉(Sodium Phosphate)溶液的緩衝範圍為 5.8~8.0，Tris溶液的緩衝範圍為 7.0~9.1[18]。將整個反應在不同的pH值下進行，可以看出pH 7的中性環境對雙重突變肌紅蛋白Mb^{H64D/V68L}進行過氧化酶活性反應具有最高的反應活性。在pH 6的微酸性的環境下相對活性為 70%，較pH 8微鹼性環境的 45%相對活性高，但pH值低於 5 或大於 9 則相對活性均不到 10%。

同樣是 pH 6 但不同鹽類的緩衝液，磷酸鈉(Sodium Phosphate)溶液的相對活性高於檸檬酸(Citric acid)溶液約 10%，代表整個反應的緩衝液系統宜採用磷酸鈉(Sodium Phosphate)溶液。相較於其它過氧化酵素(例如：Horseradish Peroxidase, HRP)的最適反應環境通常在 pH 5 的酸性環境下[19]，突變後具有過氧化酵素活性的肌紅蛋白仍然在生理上的中性環境具有最佳的反應活性，這樣的特點與肌紅蛋白原本的生理功能有關。

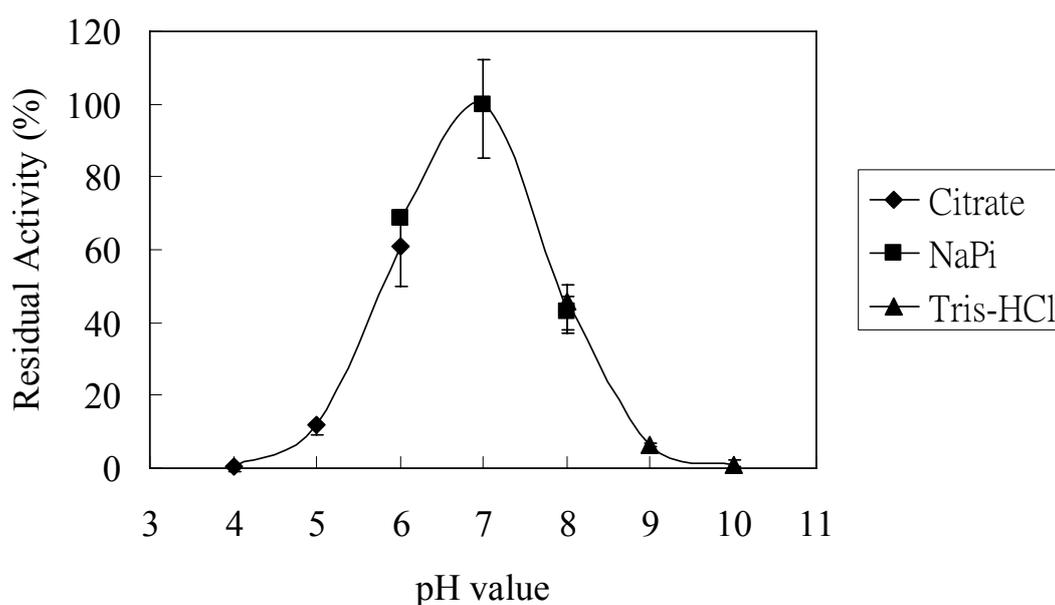
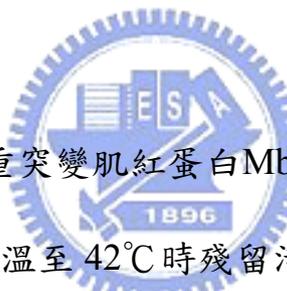


圖 3-5 Mb^{H64D/V68L}於不同pH值環境之殘留活性百分率。實驗方法如 2-2-10-1 所述，利用 3 種緩衝液系統測量肌紅蛋白在不同pH值下的反應活性，並將pH 7 活性當作 100%。

3-5-2 溫度與活性之關係

將酵素溶液加溫 30 分鐘後，不同溫度對酵素活性的影響可以由圖 3-6 顯示出來，以置於 4°C 恆溫的酵素溶液在室溫下進行催化反應的酵素活性為最高活性，其餘在經過加熱處理後活性均有下降的趨勢。整體來說三重突變肌紅蛋白 Mb^{H64D/V68L/I107M} 在經過 60°C 加溫處理 30 分鐘後仍有約 80% 的殘留活性，在更高溫 70°C 則殘留活性只剩 30%，而雙重突變肌紅蛋白 Mb^{H64D/V68L} 的耐熱性與三重突變肌紅蛋白相似。



有趣的是不管是雙重突變肌紅蛋白 Mb^{H64D/V68L} 或是三重突變肌紅蛋白 Mb^{H64D/V68L/I107M} 在加溫至 42°C 時殘留活性均達到 95%，較 25°C 的 70% 或 50°C 的 80% 要高，代表適當的加溫可提高酵素反應的動能。

由於整個反應所需要用到的酵素溶液量很少，且為了使要用來反應的酵素溶液可以均勻的受熱，且加熱的時間及溫度能夠準確，所以一個很好的方法是利用 PCR 機器來進行加熱的動作。利用 PCR 機器具有迅速且準確的加溫及高效率的使樣品均勻受熱等特性，可減少實驗的誤差性。

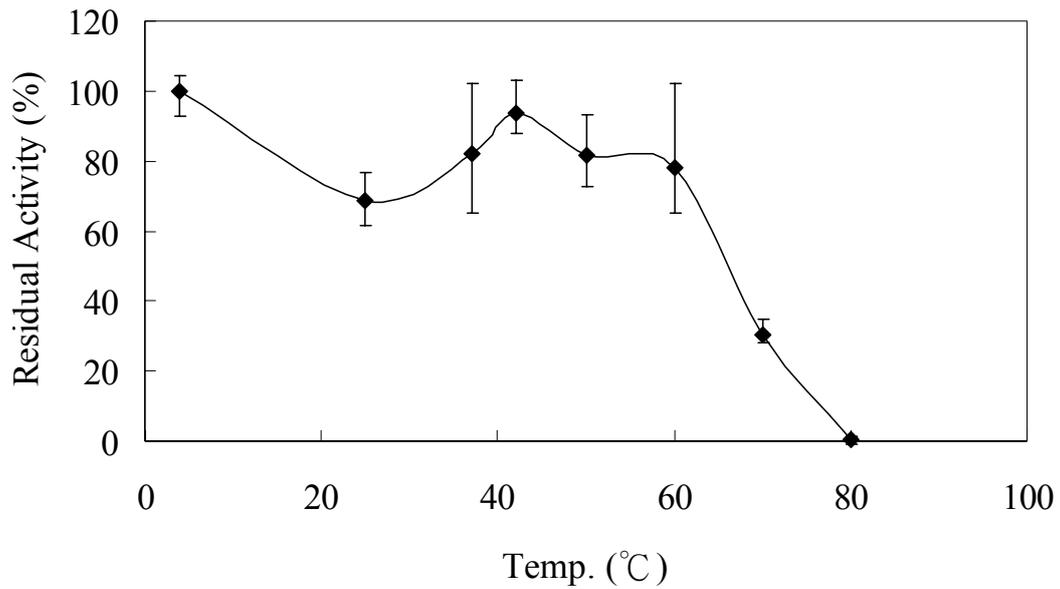


圖 3-6 Mb^{H64D/V68L/I107M}於不同溫度下反應之殘留活性百分率。實驗方法如 2-2-10-2 所述，將 4°C 恆溫的酵素溶液反應活性當作 100%。



3-6 酵素動力學參數

如圖 3-7 至 3-22 所示，先固定H₂O₂濃度為 7 mM，改變ABTS濃度，四種突變後具有過氧化酶活性的肌紅蛋白催化ABTS的受質飽和曲線為一雙曲線。而圖 3-23 至 3-38 所示先固定ABTS濃度為 1 mM，改變H₂O₂濃度，具有過氧化酶活性的突變型肌紅蛋白催化H₂O₂的受質飽和曲線亦為一雙曲線。兩種受質在高濃度時都會有受質抑制效應，但在高濃度的H₂O₂時受質抑制效應尤其明顯。

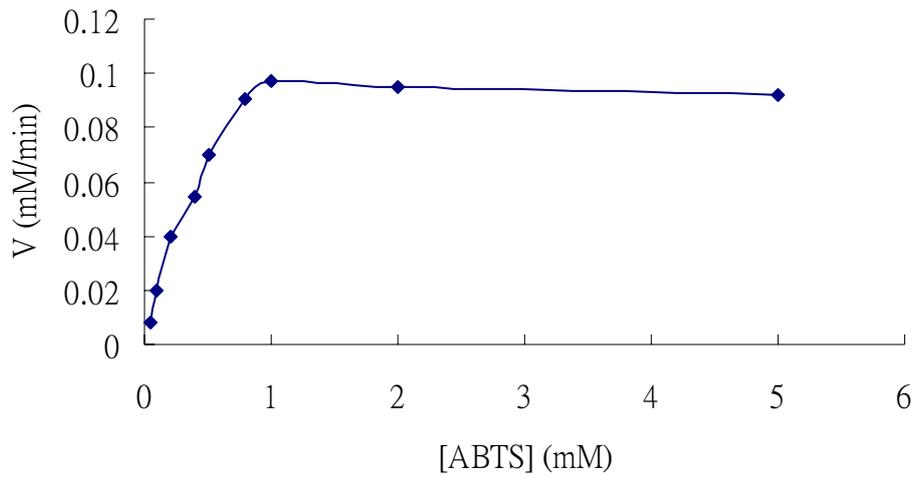


圖 3-7 ABTS 濃度對 $Mb^{H64D/V68L}$ 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖。

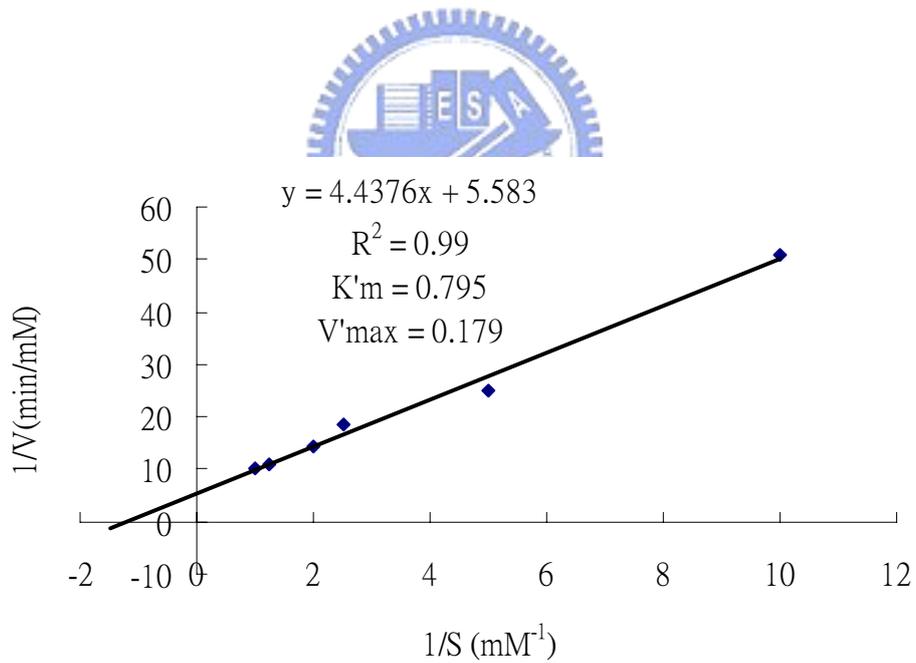


圖 3-8 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 $Mb^{H64D/V68L}$ 對受質 ABTS 的 $K'm$ 及 $V'max$ 值。

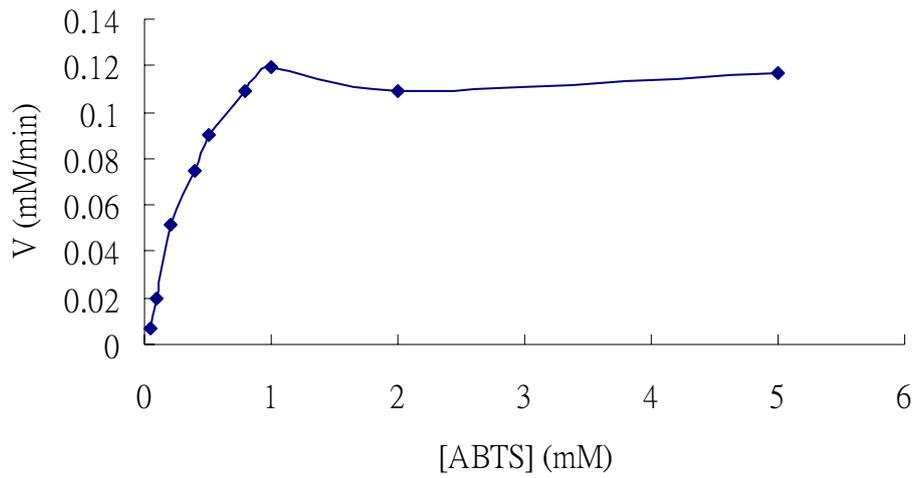


圖 3-9 ABTS 濃度對 Mb^{H64D/V68L/I107M} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖。

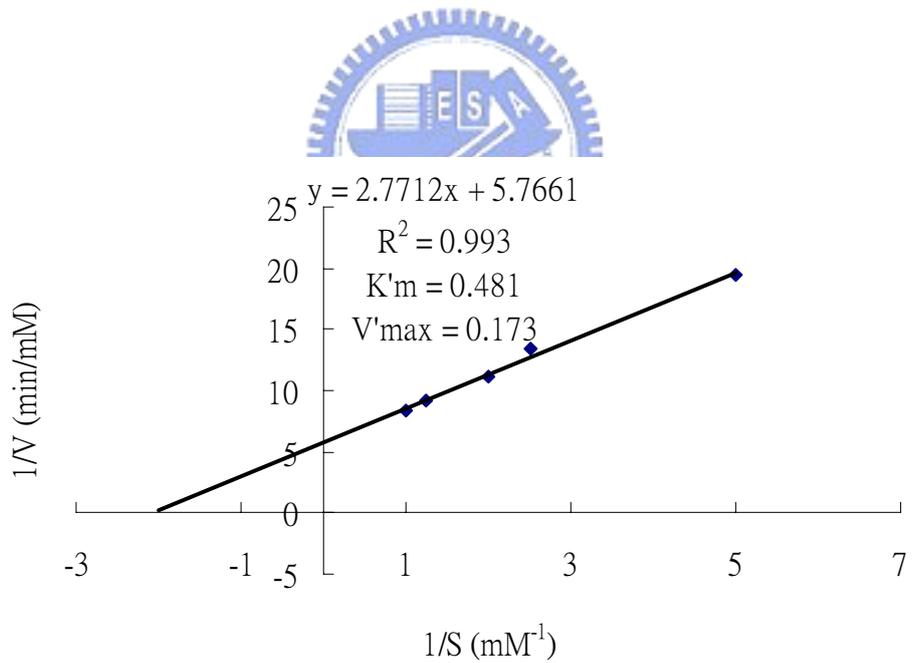


圖 3-10 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb^{H64D/V68L/I107M} 對受質 ABTS 的 K'm 及 V'max 值。

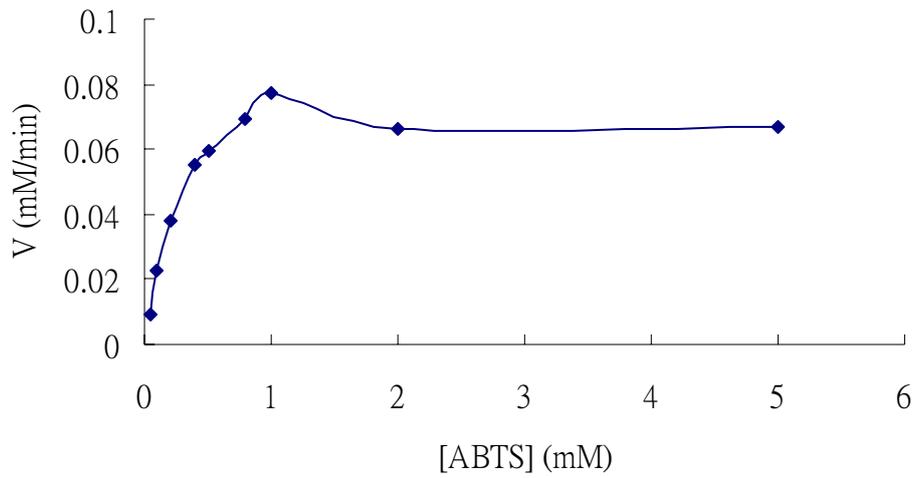


圖 3-11 ABTS 濃度對 Mb^{H64D/V68L/I107A} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖。

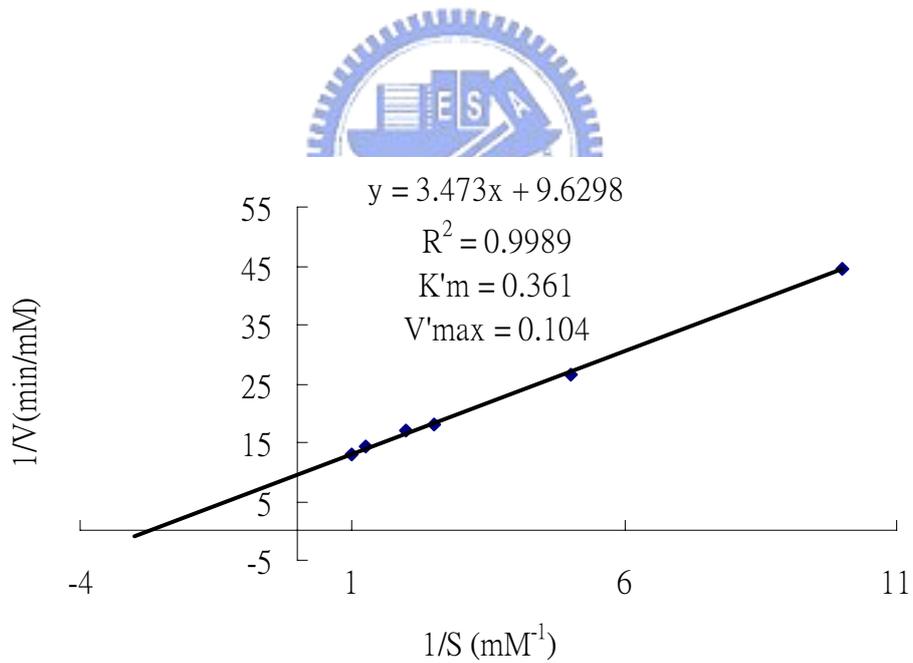


圖 3-12 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb^{H64D/V68L/I107A} 對受質 ABTS 的 K'm 及 V'max 值。

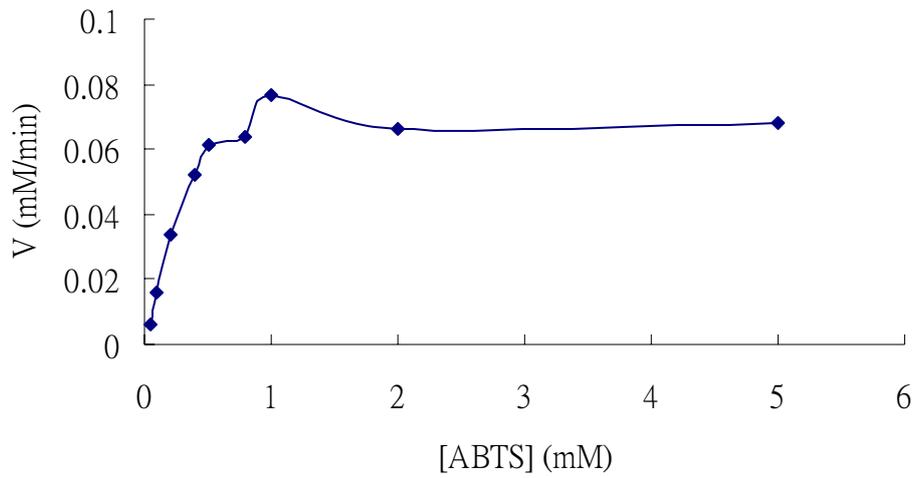


圖 3-13 ABTS 濃度對 Mb^{H64D/V68L/I107V} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖。

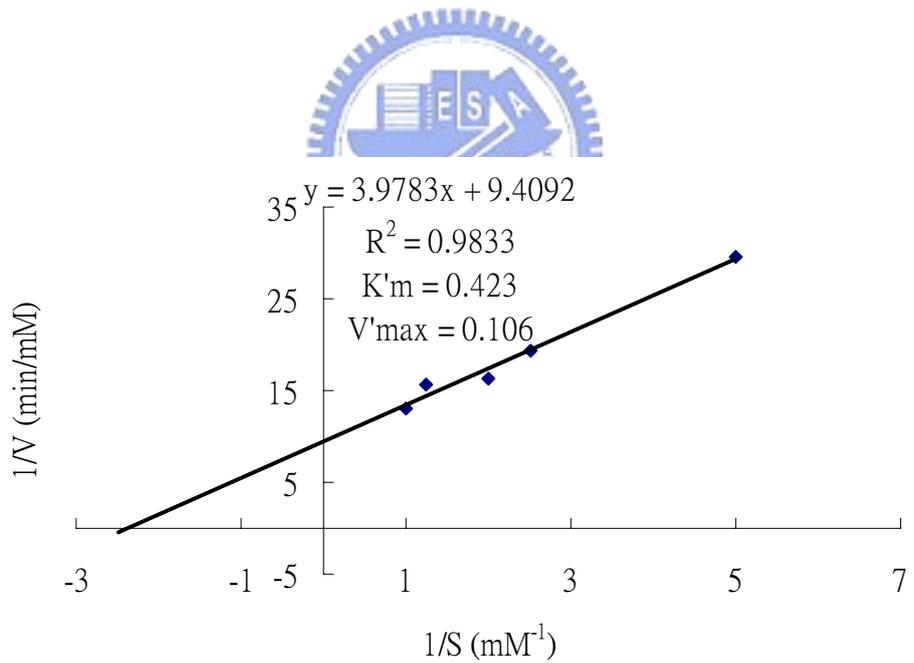


圖 3-14 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb^{H64D/V68L/I107V} 對受質 ABTS 的 K'm 及 V'max 值。

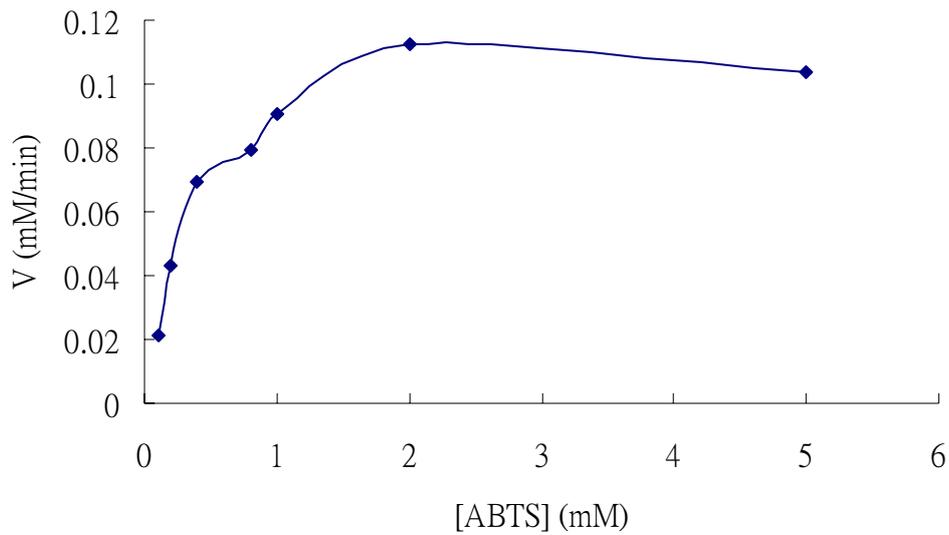


圖 3-15 ABTS 濃度對 Mb^{H64D/V68L/I107L} 催化 ABTS 受質的

Michaelies-Menten 曲線圖

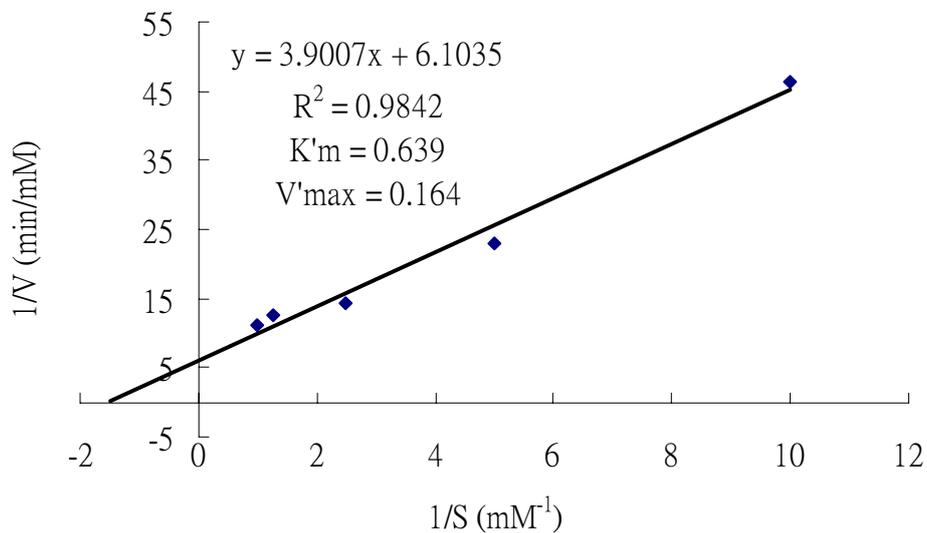


圖 3-16 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb^{H64D/V68L/I107L} 對受質

ABTS 的 K'm 及 V'max 值。

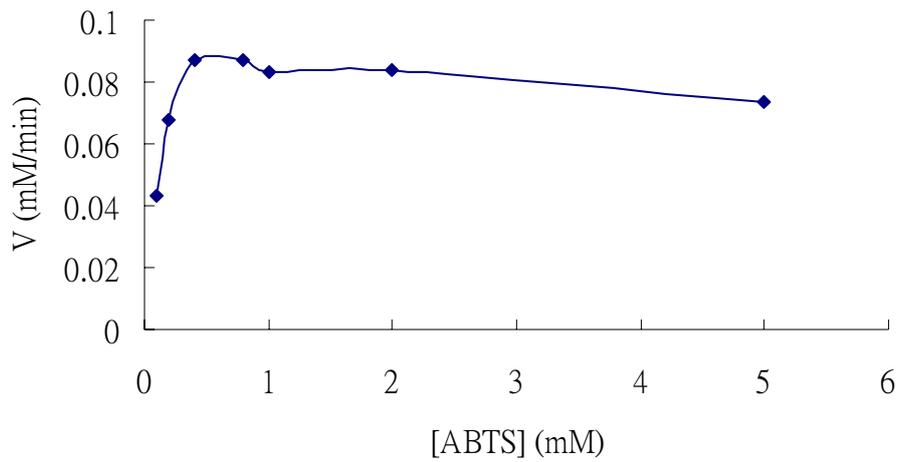


圖 3-17 ABTS 濃度對 $Mb^{H64D/V68L/I107F}$ 催化 ABTS 受質的

Michaelies-Menten 曲線圖

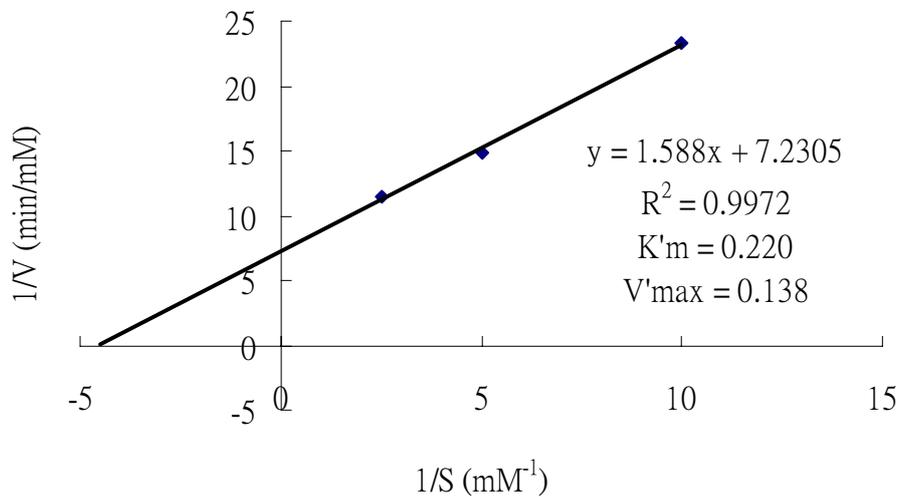


圖 3-18 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 $Mb^{H64D/V68L/I107F}$ 對受質

ABTS 的 $K'm$ 及 $V'max$ 值。

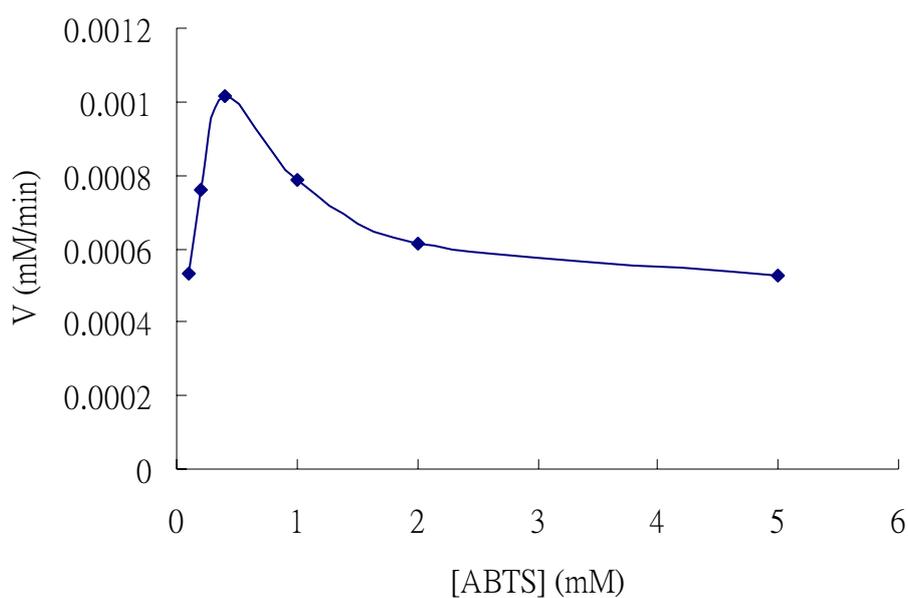


圖 3-19 ABTS 濃度對 Mb^{H64D/V68L/I107G} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖

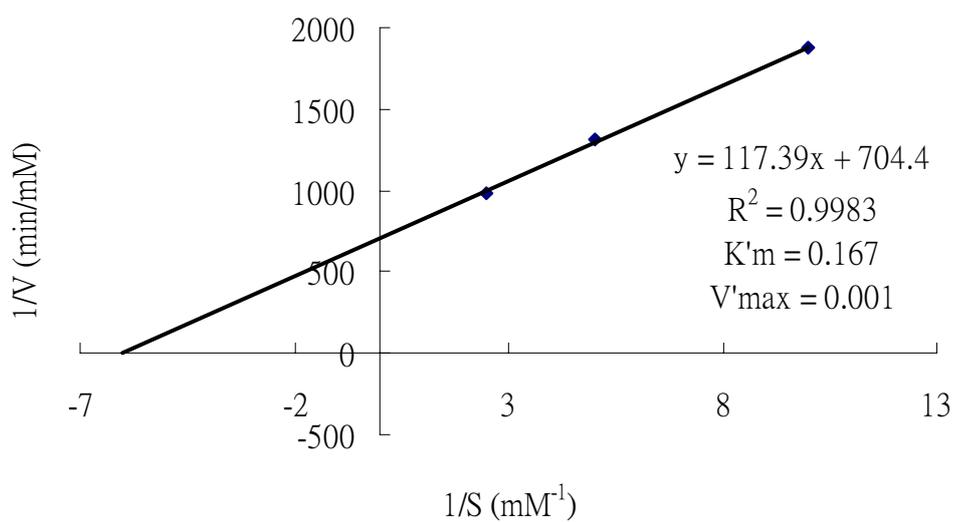


圖 3-20 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb^{H64D/V68L/I107G} 對受質 ABTS 的 K'm 及 V'max 值。

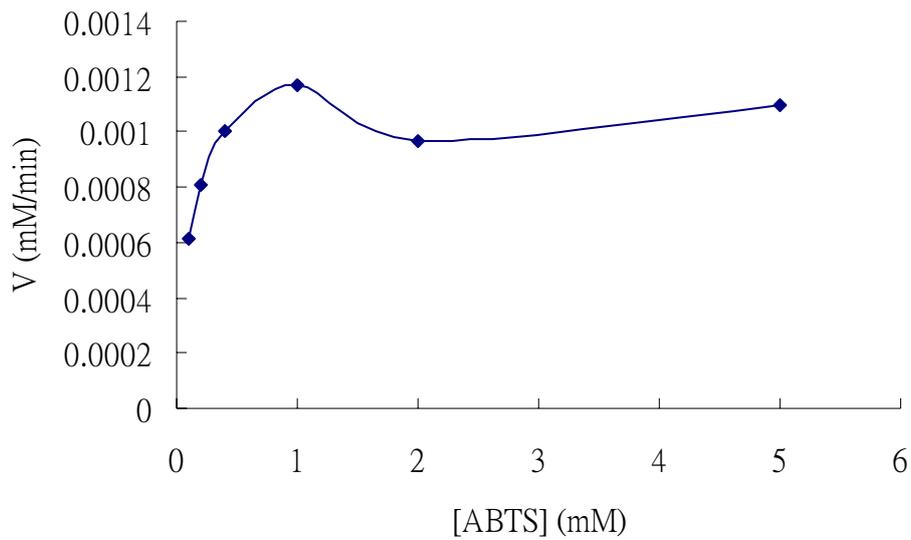


圖 3-21 ABTS 濃度對 Mb^{Wt} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten

曲線圖

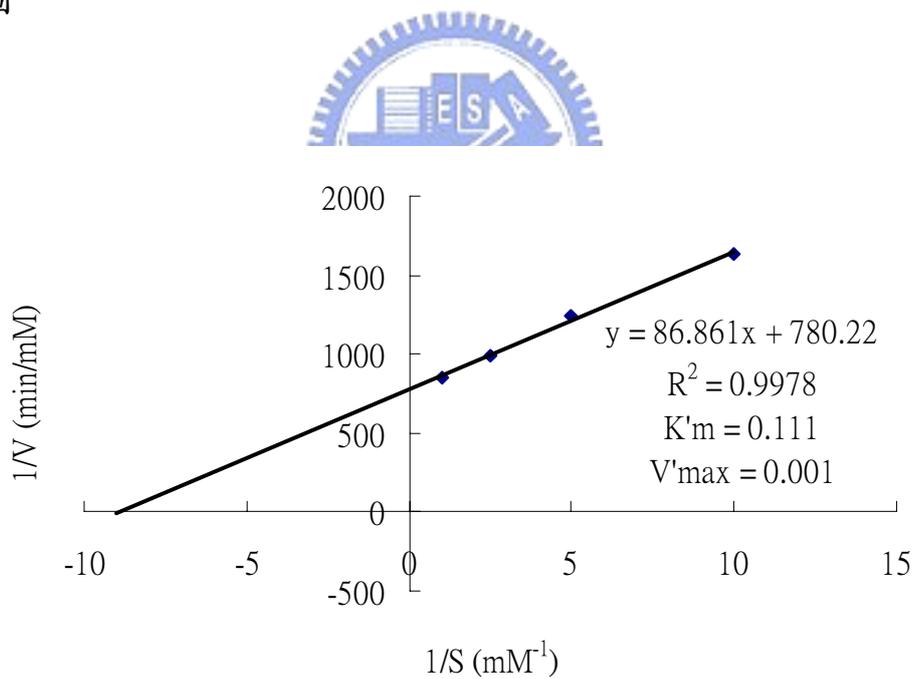


圖 3-22 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb^{Wt} 對受質 ABTS 的 $K'm$

及 $V'max$ 值。

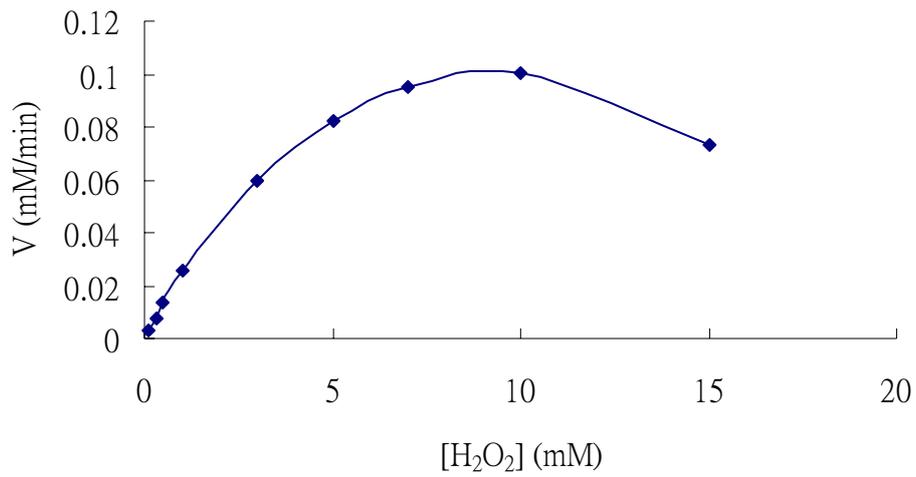


圖 3-23 H₂O₂ 濃度對 Mb^{H64D/V68L} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖。

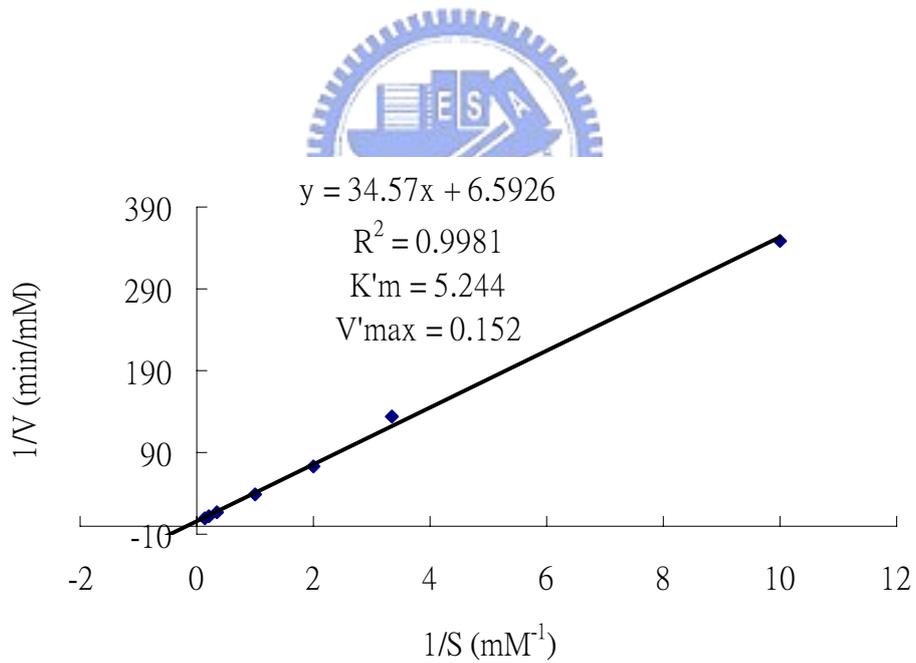


圖 3-24 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb^{H64D/V68L} 對受質 H₂O₂ 的 K'm 及 V'max 值。

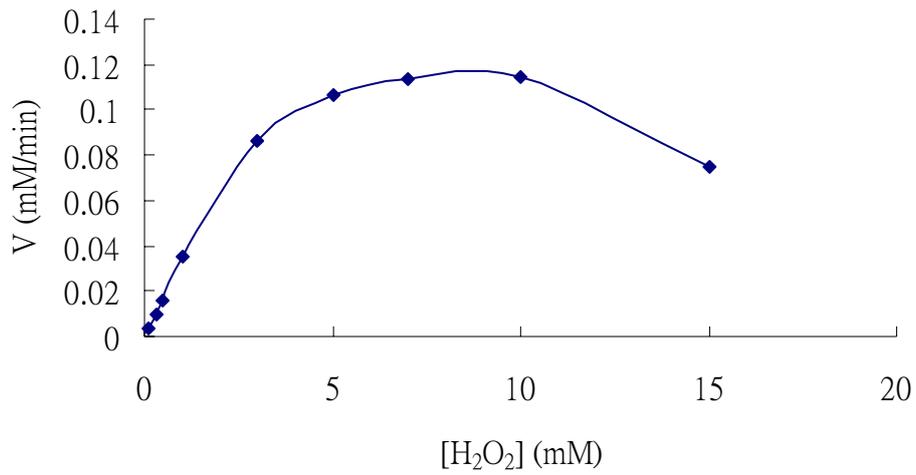


圖 3-25 H₂O₂ 濃度對 Mb^{H64D/V68L/I107M} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖。

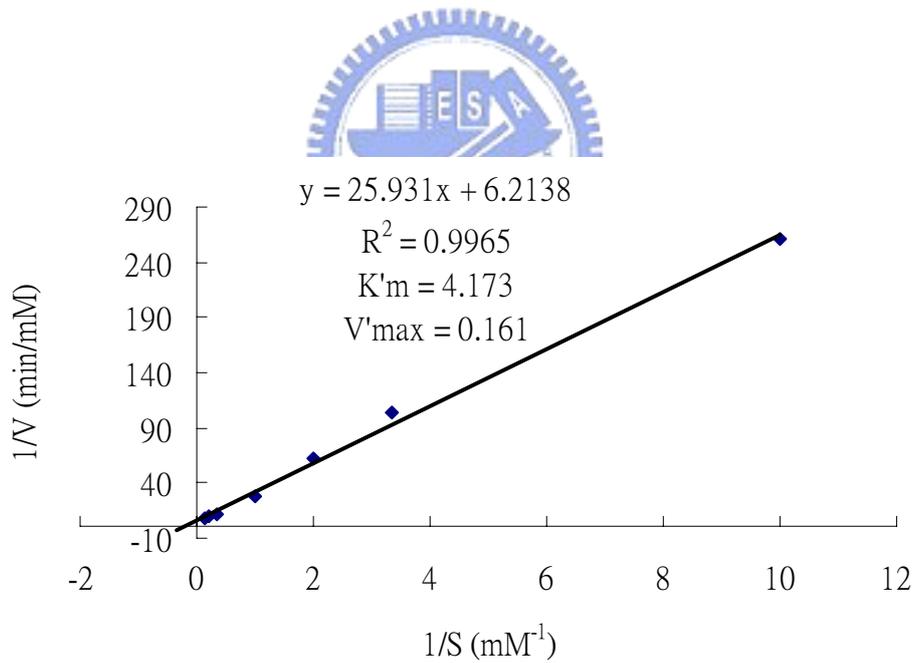


圖 3-26 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb^{H64D/V68L/I107M} 對受質 H₂O₂ 的 K'm 及 V'max 值。

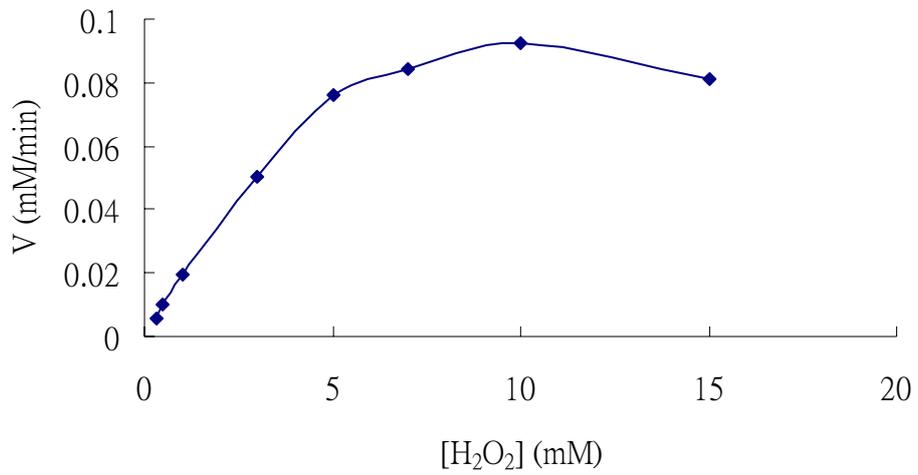


圖 3-27 H₂O₂ 濃度對 Mb^{H64D/V68L/I107A} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖。

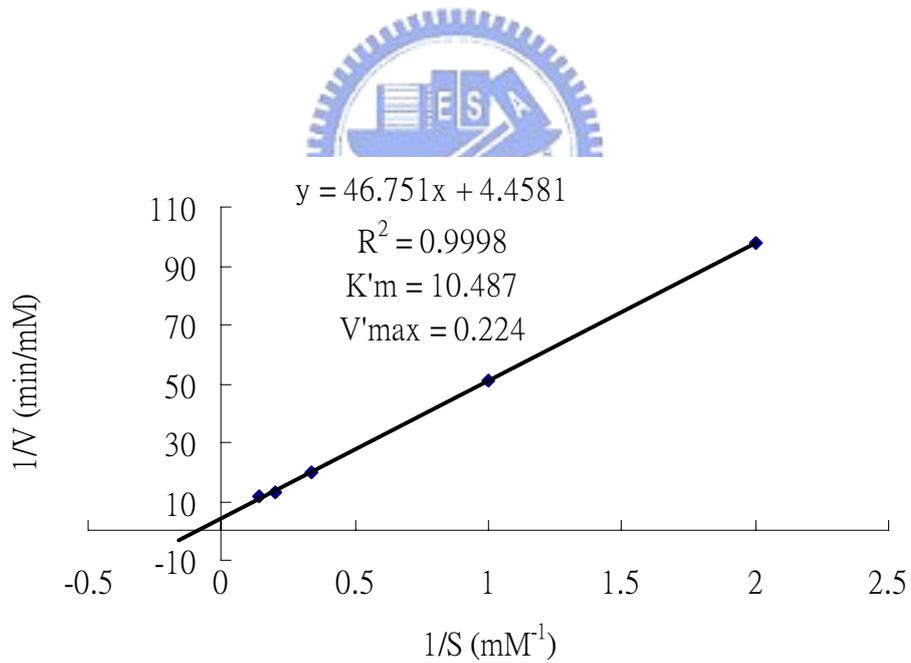


圖 3-28 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb^{H64D/V68L/I107A} 對受質 H₂O₂ 的 K'm 及 V'max 值。

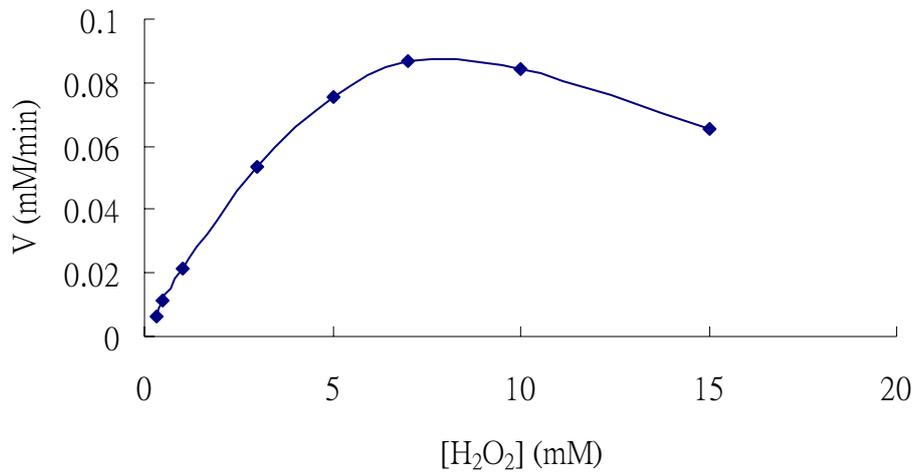


圖 3-29 H₂O₂ 濃度對 Mb^{H64D/V68L/I107V} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖。

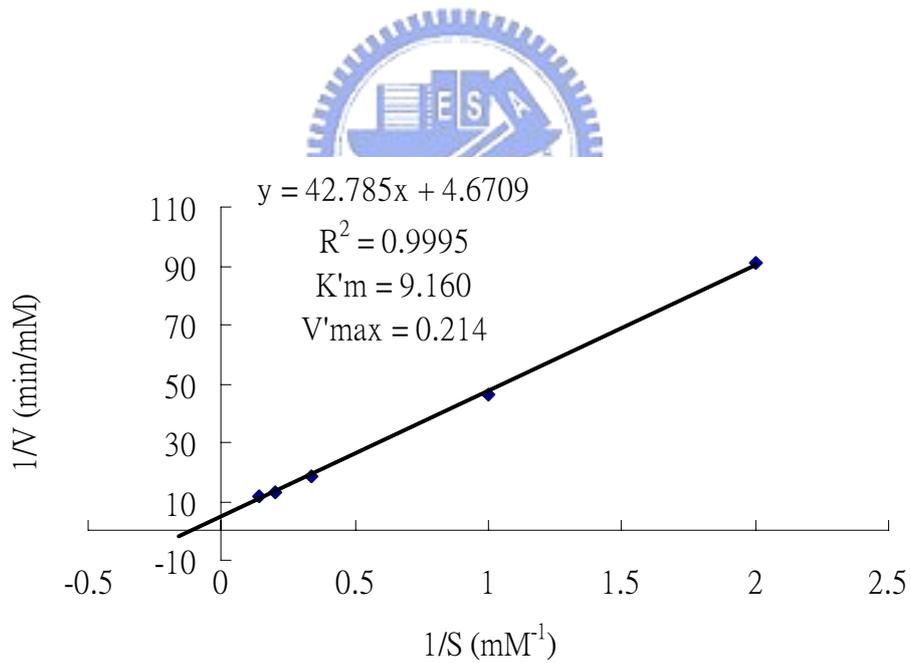


圖 3-30 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb^{H64D/V68L/I107V} 對受質 H₂O₂ 的 K'm 及 V'max 值。

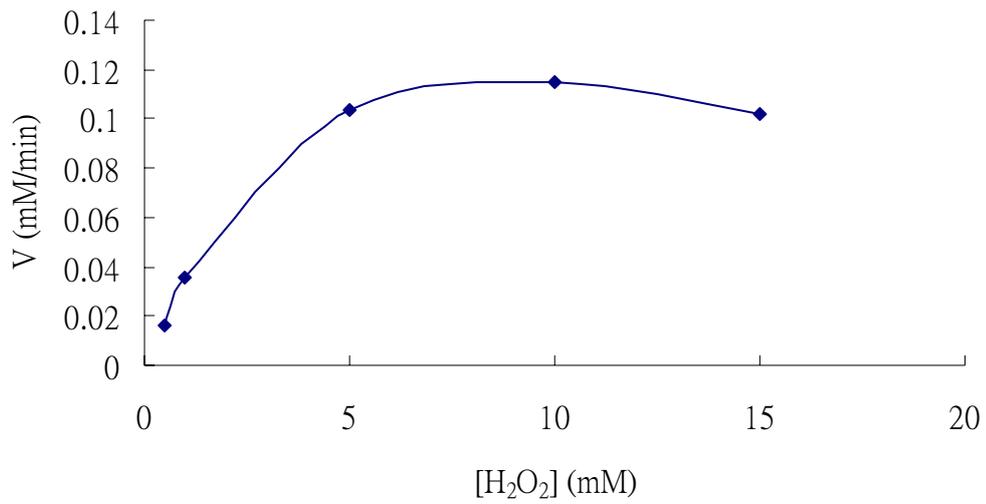


圖 3-31 H₂O₂ 濃度對 Mb^{H64D/V68L/I107L} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖。

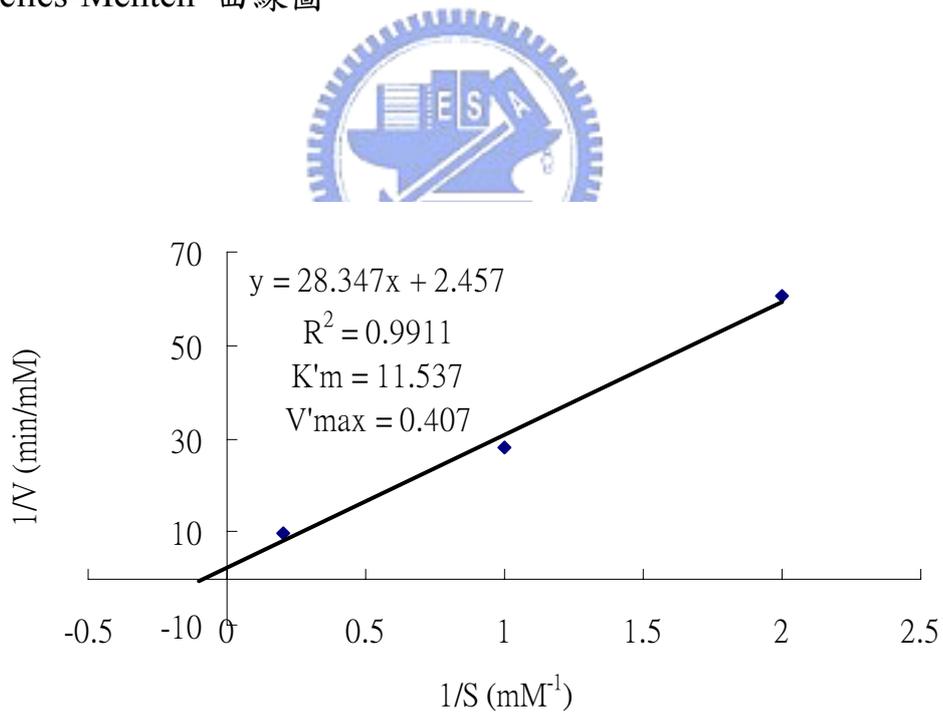


圖 3-32 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb^{H64D/V68L/I107L} 對受質 H₂O₂ 的 K'm 及 V'max 值。

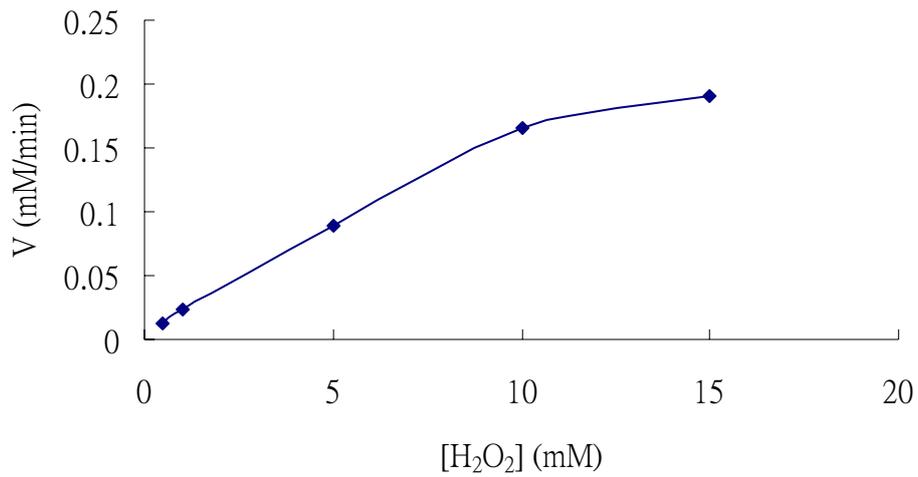


圖 3-33 H₂O₂ 濃度對 Mb^{H64D/V68L/I107F} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖。

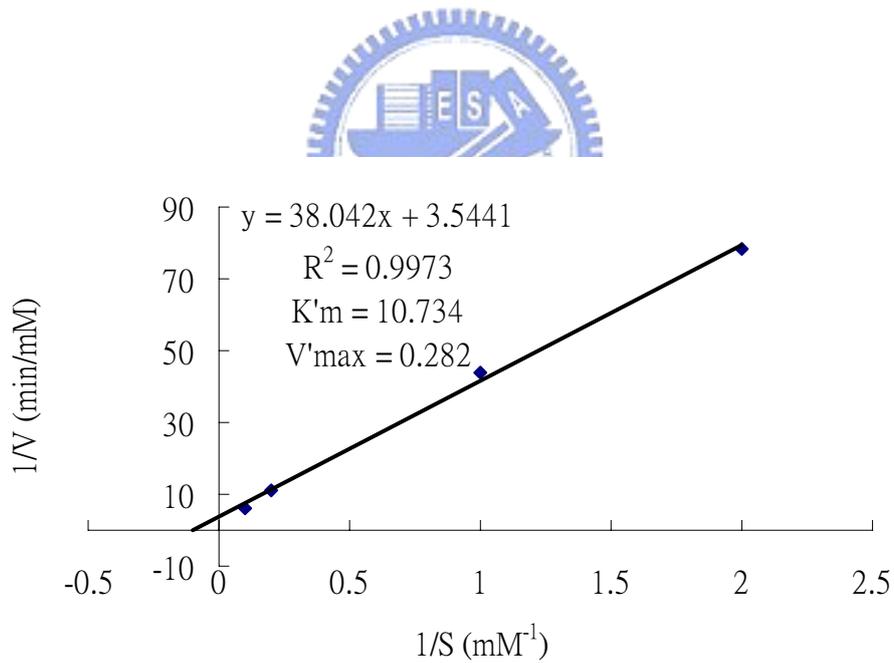


圖 3-34 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb^{H64D/V68L/I107F} 對受質 H₂O₂ 的 K'm 及 V'max 值。

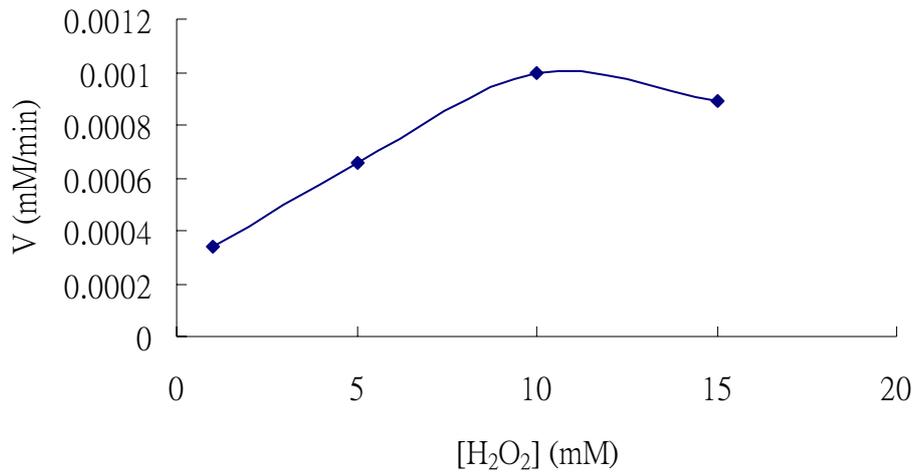


圖 3-35 H₂O₂ 濃度對 Mb^{H64D/V68L/I107G} 催化 ABTS 受質的 Michaelies-Menten 曲線圖。

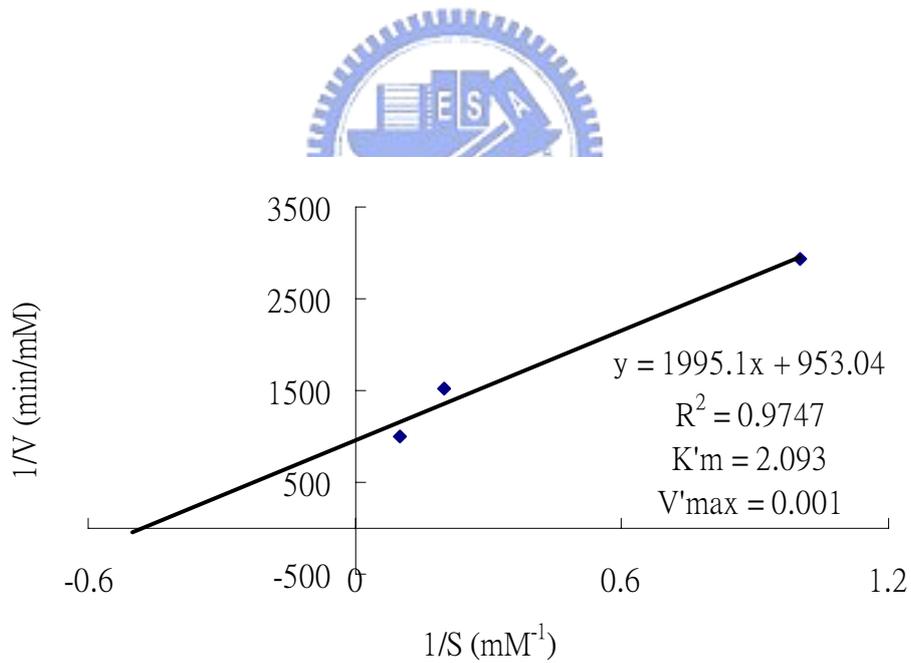


圖 3-36 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算 Mb^{H64D/V68L/I107G} 對受質 H₂O₂ 的 K'm 及 V'max 值。

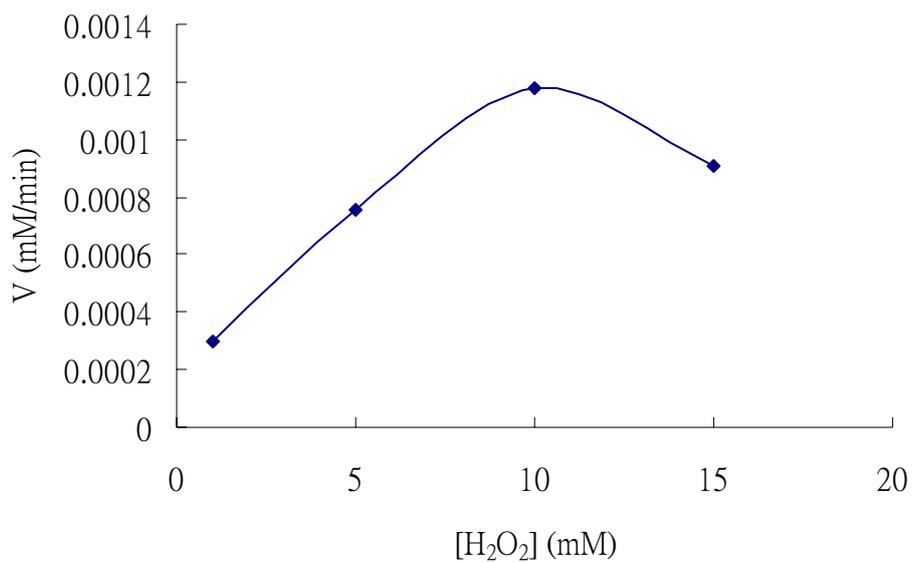


圖 3-37 H₂O₂濃度對Mb^{Wt}催化ABTS受質的Michaelies-Menten 曲

線圖。

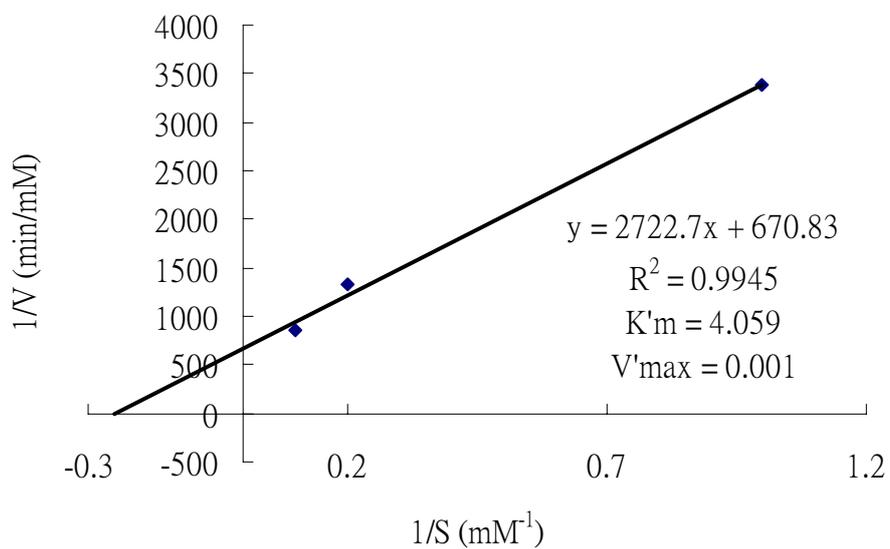


圖 3-38 Lineweaver-Burk 雙倒數圖計算Mb^{Wt}對受質H₂O₂的K'm

及V'max值。

H_2O_2 為一種氧化受質，在高濃度時會使酵素產生不具活性的Compound III(superoxide anion)或Verdohemoprotein屬自殺性的受質(suicide substrate)[20]，像ABTS等供氫體則可保護過氧化酶的活性中心不受過氧化氫的過度作用。

具有過氧化酶活性的肌紅蛋白其進行催化的反應步驟可由式 3-1 條列出。過氧化酶先與 H_2O_2 反應形成Compound I再與供氫體ABTS還原成Compound II(圖 3-39)，進一步的Compound II會繼續利用ABTS還原成高鐵(Fe^{3+})的肌紅蛋白。其中速率常數 k_1 的受質是 H_2O_2 而 k_2 、 k_3 的受質則是ABTS。所以藉由改變 H_2O_2 的濃度我們可以測得酵素催化 H_2O_2 的速率。這種反應機制在其它的過氧化酵素(如：HRP)中已經被研究，這種雙受質的酵素反應動力學被認為是一種ping-pong型的動力學，在這裡則是peroxidase ping-pong[21]。

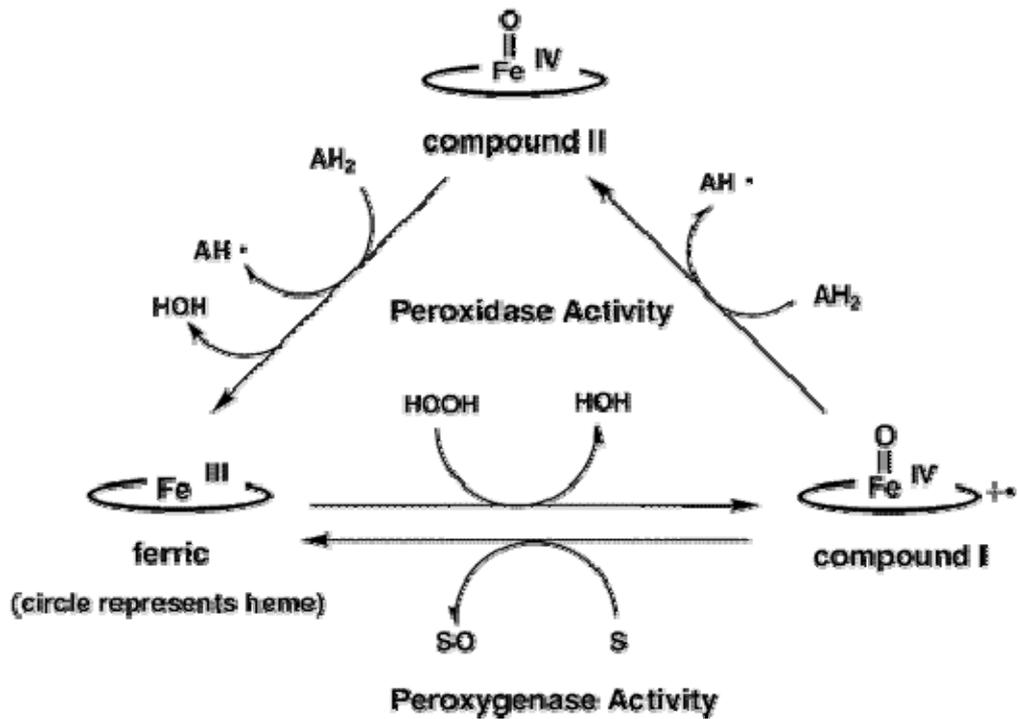
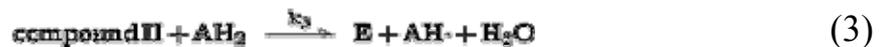
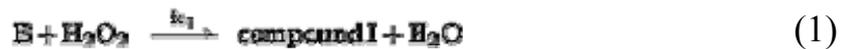


圖 3-39 過氧化酶 peroxidase 和 peroxygenase 催化反應循環形成 compound I 與 compound II 的步驟[10]。



式 3-1 過氧化酶催化反應步驟的分解式[11]。

肌紅蛋白的第 107 號 Ile 胺基酸突變成 Met、Ala、Val、Leu、Phe 這 5 種胺基酸是細胞粗萃液過氧化酶活性篩選中活性較好的三重突

變株，我們已成功純化並與血基質做蛋白質與輔基的重組實驗 (cofactor reconstitution)。並將第 107 號 Ile 胺基酸突變成 Met、Ala、Val、Leu、Phe 的三重突變肌紅蛋白與 H64D/V68L 雙重突變肌紅蛋白做動力學的參數測定，並與較無活性的 H64D/V68L/I107G 三重突變肌紅蛋白及野生型肌紅蛋白做比較，結果與粗萃液過氧化酶活性篩選的結果大致相同。

我們可以將圖 3-7 至 3-38 的突變型與野生型肌紅蛋白對兩種受質 ABTS 及 H_2O_2 的 $V'max$ 與 $K'm$ 整理成表 3-2。而我們為了比較各種突變肌紅蛋白的催化活性我們可以藉由表 3-2 計算突變肌與野生型紅蛋白催化兩種受質的 turnover number (k_{cat} , $k_{cat}=V'max/[E_T]$) 及 catalytic efficiency ($k_{cat}/K'm$)。結果我們整理成表 3-3。

Mutated Mb	apparent $V'max$ (mM/min)		apparent $K'm$ (mM)	
	ABTS	H_2O_2	ABTS	H_2O_2
H64D/V68L Mb	0.179	0.152	0.795	5.244

H64D/V68L/I107M Mb	0.173	0.161	0.481	4.173
H64D/V68L/I107A Mb	0.104	0.224	0.361	10.487
H64D/V68L/I107V Mb	0.106	0.214	0.423	9.160
H64D/V68L/I107L Mb	0.164	0.407	0.639	11.537
H64D/V68L/I107F Mb	0.138	0.282	0.220	10.734
H64D/V68L/I107G Mb	0.001	0.001	0.167	2.093
Mbwt	0.001	0.001	0.111	4.059

表 3-2 突變後的肌紅蛋白催化受質的動力學參數。

Mutated Mb	[Enzyme] (mM)	turnover number (kcat) (min ⁻¹)		catalytic efficiency (kcat/Km) (mM ⁻¹ min ⁻¹)	
		ABTS	H ₂ O ₂	ABTS	H ₂ O ₂
		H64D/V68L Mb	9.63E-06	18609.37	15759.5
H64D/V68L/I107M Mb	9.63E-06	18018.44	16720.22	37491.38	4006.637
H64D/V68L/I107A Mb	8.36E-06	12417.49	26822.63	34430.74	2557.763
H64D/V68L/I107V Mb	7.85E-06	13533.65	27262.59	32008.85	2976.296
H64D/V68L/I107L Mb	1.07E-05	15331.86	38086.28	23990.05	3301.16
H64D/V68L/I107F Mb	1.72E-05	8029.546	16381.49	36560.22	1526.146
H64D/V68L/I107G Mb	7.12E-06	199.45	147.42	1196.83	70.42
Mbwt	2.7E-05	47.47	55.21	426.39	13.60

表 3-3 突變後的肌紅蛋白催化受質的 turnover number 及 catalytic efficiency。

依定義 turnover number 代表高受質濃度時所有受質都與酵素結

合，可以表現酵素的最大催化能力。我們可以知道每分鐘單位濃度的肌紅蛋白可以催化多少受質。而catalytic efficiency可以讓我們比較不同突變型的肌紅蛋白的催化效率。如同圖 3-1 的細胞粗萃液過氧化酶活性篩選結果，我們純化出的三重突變肌紅蛋白Mb^{H64D/V68L/I107M}相較於野生型及雙重突變肌紅蛋白Mb^{H64D/V68L}均有較好的過氧化酶活性。在改變受質H₂O₂濃度測得的催化效率高於野生型肌紅蛋白約 300 倍，與文獻中的雙重突變肌紅蛋白比較則高出約 30%。在改變受質ABTS濃度測得的催化效率高於野生型肌紅蛋白約 90 倍，與文獻中的雙重突變肌紅蛋白比較則高出約 60%。從胺基酸的屬性上Met與原本的Ile同屬於非極性的胺基酸，但Ile具有支鏈碳，容易在活性區域成立體阻礙，因此推測這可能是造成突變成Met後使過氧化酶活性高於Ile的原因。

而另外兩種突變成較小非極性胺基酸殘基的三重突變肌紅蛋白Mb^{H64D/V68L/I107A}及Mb^{H64D/V68L/I107V}雖然在與H₂O₂反應形成Compound I 的效率不如文獻中的雙重突變肌紅蛋白，但在催化ABTS的效率上卻有急速的增加，各高出雙重突變肌紅蛋白約 47%及 36%。推測肌紅蛋白的第 107 號 Ile胺基酸的位置應該對受質ABTS等供氫體進入活性中心有著關鍵性的影響。



第四章 結論與未來展望

1. 我們由肌紅蛋白的結晶結構推測第 107 號 Ile 胺基酸的位置對於進行氧化還原反應所需的供氫體如 ABTS 進入反應的活性中心有著

關鍵性的影響，而經由定點飽和突變技術將得到的其它 19 種胺基酸與原本即具有過氧化酶活性的雙重突變肌紅蛋白Mb^{H64D/V68L}進行活性的篩選比較，我們得到Mb^{H64D/V68L/I107M}這個三重突變肌紅蛋白不論在與H₂O₂形成Compound I的效率或與供氫體ABTS反應的效率都顯著優於野生型肌紅蛋白，亦優於文獻中的雙重突變肌紅蛋白Mb^{H64D/V68L}。

2. 由另外兩種突變成較小非極性胺基酸殘基的三重突變肌紅蛋白Mb^{H64D/V68L/I107A}及Mb^{H64D/V68L/I107V}的動力學參數，我們推測較小的胺基酸殘基在肌紅蛋白的第107號位置可以使供氫體ABTS容易進到反應活性中心去反應，但卻可能因為體積過小無法穩定血基質平面而使得三重突變肌紅蛋白與H₂O₂形成Compound I的效率變差。
3. 我們成功的將肌紅蛋白以脫輔基的形式表現並純化出來，並且對各種突變型的肌紅蛋白都可適用。而且純化的步驟被精簡化，可以快速的得到大量的脫輔基肌紅蛋白，並且蛋白質的純度可以從SDS-PAGE 中觀察高達 90%以上。因此，這樣的純化方法非常有利於我們未來與各種不同修飾過的紫質做輔基的重組。

4. 蛋白質與輔基的重組實驗步驟經過我們多次的修改後已有很高的包覆效率，對於多餘的紫質也能利用簡單的方法去除，因此，利用脫輔基肌紅蛋白的純化搭配蛋白質與輔基的重組實驗我們可以將不同的紫質包入各種突變型的肌紅蛋白中。對於此我們也成功的篩選到將紫質中間的金屬置換成鎳(Ni)，包入我們的Mb^{H64D/V68L/I107M}三重突變肌紅蛋白中對ABTS與H₂O₂具有過氧化酶的活性。
5. 本實驗的最終目標是要將不同變種的肌紅蛋白應用在太陽能電池上，建構出生物性的太陽能電池。因此對蛋白結構的了解對未來在電池材料的設計上具有極大的參考價值，未來本實驗室將繼續在肌紅蛋白其它活性區域位置的胺基酸做突變的探討，收集蛋白質結構影響氧化還原反應的資料，並期許能做出高效率的生物性太陽能電池。

第五章 參考文獻

- [1] J.C. Kendrew, R.G. Parrish, J.R. Marrack, E.S. Orlans, The species specificity of myoglobin. *Nature* 174 (1954) 946-949.
- [2] F. Remacle, S. Speiser, R.D. Levine, Intermolecular and Intramolecular Logic Gates. *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 5589-5591.
- [3] P.G. Van Patten, A.P. Shreve, J.S. Lindsey, R.J. Donohoe, Energy-Transfer

Modeling for the Rational Design of Multiporphyrin Light-Harvesting Arrays. *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 4209-4216.

[4] E.D. Sternberg, D. Dolphin, C. Bruckner, Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron* 54 (1998) 4151-4202.

[5] R. Bonnett, Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* 24 (1995) 19-33.

[6] D. GUST, T.A. MOORE, Mimicking Photosynthesis. *Science* 244 (1989) 35 - 41.

[7] S. Ozaki, M.P. Roach, T. Matsui, Y. Watanabe, Investigations of the roles of the distal heme environment and the proximal heme iron ligand in peroxide activation by heme enzymes via molecular engineering of myoglobin. *Accounts of chemical research* 34 (2001) 818-825.

[8] T. Matsui, S.i. Ozaki, Y. Watanabe, Formation and Catalytic Roles of Compound I in the Hydrogen Peroxide-Dependent Oxidations by His64 Myoglobin Mutants. *Journal of the American Chemical Society* 121 (1999) 9952-9957.

[9] M. Sundaramoorthy, J. Turner, T.L. Poulos, The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase--cytochrome P450 functional hybrid. *Structure* 3 (1995) 1367-1377.

[10] H.J. Yang, T. Matsui, S. Ozaki, S. Kato, T. Ueno, G.N. Phillips, Jr., S. Fukuzumi, Y. Watanabe, Molecular engineering of myoglobin: influence of residue 68 on the rate and the enantioselectivity of oxidation reactions catalyzed by H64D/V68X myoglobin. *Biochemistry* 42 (2003) 10174-10181.

[11] L. Wan, M.B. Twitchett, L.D. Eltis, A.G. Mauk, M. Smith, In vitro evolution of horse heart myoglobin to increase peroxidase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998) 12825-12831.

[12] M. Gratzel, Solar Energy Conversion by Dye-Sensitized Photovoltaic Cells. *Inorg. Chem.* 44 (2005) 6841-6851.

[13] M.K. Nazeeruddin, P. Pechy, T. Renouard, S.M. Zakeeruddin, R. Humphry-Baker, P. Comte, P. Liska, L. Cevey, E. Costa, V. Shklover, L. Spiccia, G.B. Deacon, C.A. Bignozzi, M. Gratzel, Engineering of Efficient Panchromatic Sensitizers for Nanocrystalline TiO₂-Based Solar Cells. *Journal of the American Chemical Society* 123 (2001) 1613-1624.

[14] N. Hirata, J.-J. Lagref, E.J. Palomares, J.R. Durrant, N.M. K., G. M., D. Di Censo, Supramolecular Control of Charge-Transfer Dynamics on Dye-sensitized Nanocrystalline TiO₂ Films. *Chemistry - A European Journal* 10 (2004) 595-602.

[15] Y.Z. Hu, S. Tsukiji, S. Shinkai, S. Oishi, I. Hamachi, Construction of Artificial Photosynthetic Reaction Centers on a Protein Surface: Vectorial, Multistep, and Proton-Coupled Electron Transfer for Long-Lived Charge Separation. *Journal of the*

American Chemical Society 122 (2000) 241-253.

[16] E.A. Ribeiro, Jr., W.C. Regis, L. Tasic, C.H. Ramos, Fast purification of the Apo form and of a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin. *Protein expression and purification* 28 (2003) 202-208.

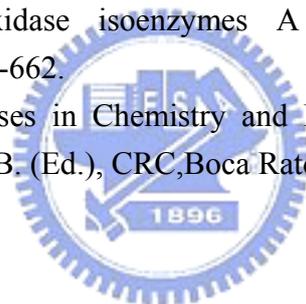
[17] S. Papp, J.M. Vanderkooi, C.S. Owen, G.R. Holtom, C.M. Phillips, Reactions of excited triplet states of metal substituted myoglobin with dioxygen and quinone. *Biophysical journal* 58 (1990) 177-186.

[18] T.K. Wu, C.Y. Huang, C.Y. Ko, C.H. Chang, Y.J. Chen, H.K. Liao, Purification, tandem mass characterization, and inhibition studies of oxidosqualene-lanosterol cyclase enzyme from bovine liver. *Archives of biochemistry and biophysics* 421 (2004) 42-53.

[19] S. Ozaki, P.R. Ortiz de Montellano, Molecular Engineering of Horseradish Peroxidase: Thioether Sulfoxidation and Styrene Epoxidation by Phe-41 Leucine and Threonine Mutants. *Journal of the American Chemical Society* 117 (1995) 7056-7064.

[20] J.H.-R.M.B.A.F.G.-C.M.A. Alexander N. P. Hiner, A comparative study of the purity, enzyme activity, and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available horseradish peroxidase isoenzymes A and C. *Biotechnology and Bioengineering* 50 (1996) 655-662.

[21] H.B. Dunford, *Peroxidases in Chemistry and Biology*, Vol. II, in: J. Everse, Everse, K. E. & Grisham, M. B. (Ed.), CRC, Boca Raton, 1991, pp. 1-24.

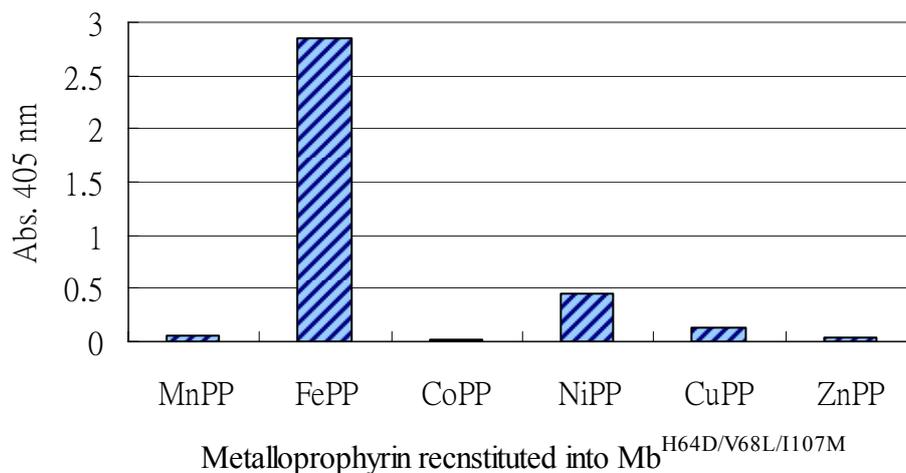


附錄一

附錄 1-1 建構不同金屬紫質的Mb^{H64D/V68L/I107M}

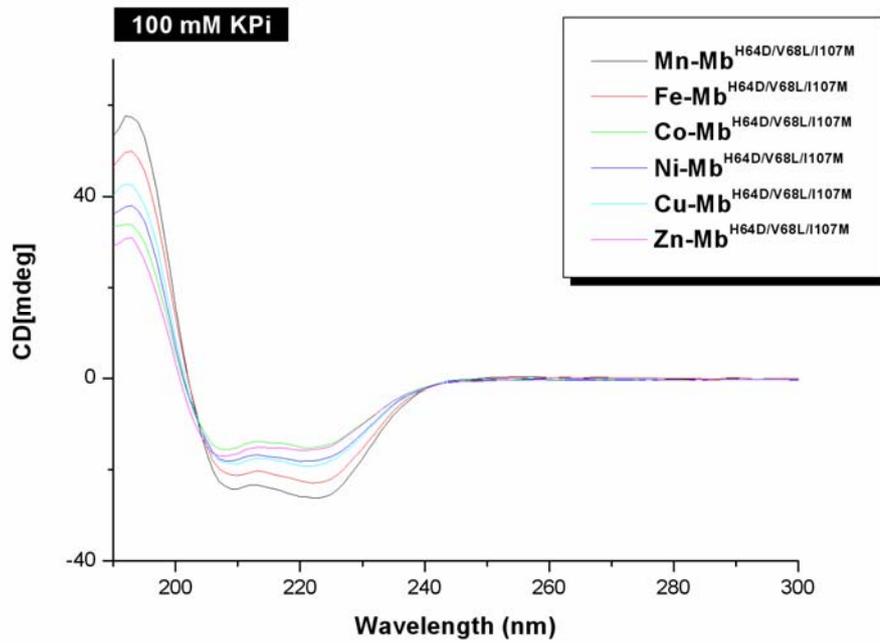
三重突變肌紅蛋白

將不同金屬的紫質利用蛋白質與輔基的重組實驗步驟(2-2-9 節)包入Mb^{H64D/V68L/I107M}三重突變肌紅蛋白中，並偵測其過氧化酶活性見【附圖 1-1】。紫質中間的金屬置換成鎳(Ni)，包入我們的Mb^{H64D/V68L/I107M}三重突變肌紅蛋白中對ABTS與H₂O₂具有不錯的過氧化酶的活性。利用circular dichroism (CD)光譜圖檢視，其中代表蛋白質 α 螺旋結構的波長(208nm, 222nm)形狀均相似，所以其結構並無因為不同金屬而有所改變【附圖 1-2】。



【附圖 1-1】六種不同金屬的三重突變肌紅蛋白Mb^{H64D/V68L/I107M}約

2 μ g與 1 mM ABTS、1mM H₂O₂ 反應後偵測 405 nm的吸光值。



【附圖 1-2】circular dichroism (CD)光譜圖分析六種不同金屬的三重突變肌紅蛋白Mb^{H64D/V68L/I107M}。

附錄二

附錄 2-1 單株抗體的製備

抗體是由 B 細胞所分泌的蛋白質，目前廣為應用的抗體分為兩種，多株抗體 (polyclonal antibody) 和單株抗體 (monoclonal antibody)。多株抗體是將抗原打入動物體內，經過數次免疫，採集血清，此血清為多株抗體，好處在於操作過程較為簡單，但其專一性低對於類似的抗原結構都會反應，稱為交叉反應 (cross reaction)。自 1973 年 Milstein 等科學家的研究發表骨髓瘤細胞 (myeloma) 之融合實驗，製造出單株抗體，彌補了多株抗體的缺點。由於血清中的每一種抗體是由單一 B 細胞所產生的，所以將 B 細胞由脾臟取出，單獨培養成細胞株，即可得到單一抗體，只會對特定抗原反應，其專一性較多株抗體高，此稱為單株抗體。由於 B 細胞不易在培養基中生長，所以無法直接在體外進行培養，因此利用癌細胞不死的生長特性，透過細胞融合的實驗，和 B 細胞作結合，則可得到在培養基中永久生長之 B 細胞株，即為融合瘤細胞株 (hybridoma cell)，經由篩選、大量培養及純化，就可得到大量的單株抗體。

附錄 2-2 免疫動物

將純化得到的肌紅蛋白作為抗原。使用 4-8 週之 BALB/C 小白鼠，抗原 (100 μg / mouse) 加等體積之佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) (Sigma) 混合成乳劑，分別於間隔兩週打入小鼠腹腔及背部

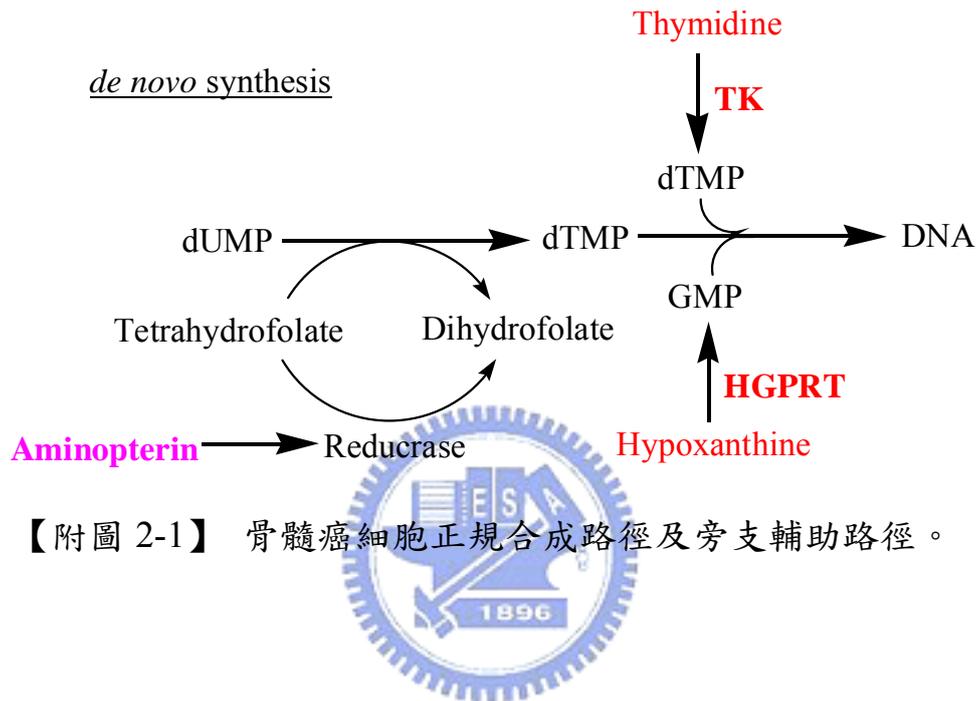
皮下慢慢釋出，約施打 3 次以上，誘使 B 細胞成熟增殖並生產抗體，此抗體為多株抗體。

附錄 2-3 骨髓瘤細胞 (myeloma cell)

所用之骨髓瘤細胞株必需極易增生，與淋巴細胞融合後仍可迅速發育且分泌高濃度免疫球蛋白。且具有容易與融合細胞分離之特性。目前最常使用為 HGPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) 缺損性骨髓瘤細胞，如 P3、P3 / 653、NS1、SP2 及 FO 等細胞，當細胞培養於 HAT (hypoxanthine aminopterin thymidine) 培養液中，其中 aminopterin 可阻止骨髓瘤細胞 DNA 之正規合成路徑 (de novo synthesis) 之進行，使細胞僅能以 HGPRT 酵素依旁支輔助路徑 (salvage synthesis) 【附圖 2-1】取用 hypoxanthine 及 thymidine 合成 DNA，若骨髓瘤細胞缺乏 HGPRT 酵素，無法合成 thymidine kinase (TK) 及 HGPRT 兩種酵素，此骨髓瘤細胞無法生長；如正常細胞 (B 淋巴球細胞) 則可經由另一條途徑繼續生長。藉由和脾臟細胞 (B 細胞) 的融合，提供 TK 及 HGPRT 兩種酵素，得以存活增殖。本實驗室採用 FO 細胞，來自食品工業研究所，使用 DMEM 培養液，添加 1.5 g 碳酸氫鈉、10 %

BCS及 1 % penicillin / streptomycin (P/S)，培養條件為 37°C，5 % CO₂。

融合前一天將細胞分為兩盤作繼代培養以保持細胞正在分裂生長之狀態。



【附圖 2-1】骨髓癌細胞正規合成路徑及旁支輔助路徑。

附錄 2-4 細胞融合

小白鼠在融合前 4 天再次補強免疫，以乙醚昏迷後，從背部以 70 %酒精消毒後，無菌操作解剖取出脾臟，放於含 10 mL DMEM培養液 (細胞融合過程中皆使用未含BCS之DMEM)之培養皿。將脾臟壓磨至碎裂，以滴管來回抽吸使細胞分散，經由無菌紗布過濾，再以 10 mL DMEM培養液沖洗。此外，將已事先從T-75 培養皿打下來的FO

細胞，分別離心 1200 rpm 5 分鐘，反覆以DMEM培養液沖洗動作二次，最後懸浮於 10 mL DMEM培養液中。取部分細胞做細胞計數，用trypan blue液計算活細胞率，以脾臟細胞：FO細胞= 4：1 之比例將細胞混合，離心 1200 rpm 5 分鐘，之後去除上清液。然後輕擊桌面打散細胞，於 1 分鐘內，搖晃細胞，同時逐漸滴入 1 mL 已加溫到 37°C 之PEG / DMSO混和液，混合後迅速至 37°C 水浴緩慢搖晃 1 分鐘，之後逐漸滴入 10 mL 已加溫到 37 °C 之DMEM培養液，離心 1000 rpm 5 分鐘，反覆以DMEM培養液沖洗細胞 2 次。計算FO細胞至 5×10^4 cells / 100 μ L HAT培養液之比例，將HY培養液 (已添加 1.5 g 碳酸氫鈉、20 % FBS及 1 % P / S)及HAT培養液以 50：1 之比例混合，加入適當體積之HY-HAT培養液與細胞混合，取 100 μ L培養液分別加入 96 孔細胞培養盤之每一孔洞，並在 37°C，5 % CO₂之條件進行細胞培養。

附錄 2-5 細胞增殖及取樣篩檢

融合後培養之細胞定期觀察其生長條件，融合後第 7 天，每孔加入 50 μ L 之 HY-HAT 培養液。七天後，待細胞長滿後，添加 100 μ L HY 培養液繼續培養，若有 clone 則顏色變黃再添加 100 μ L HY 培養液，

取 100 μL 之培養液做 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)。首先,將 100 μL 的 0.25mg/mL 純化的肌紅蛋白加入 96 孔 ELISA plate 中,於 4 $^{\circ}\text{C}$ 下隔夜。將放置隔夜之蛋白質溶液倒掉,以 PBS 緩衝液沖洗之後,將 ELISA plate 倒置拍打將 well 中的水分去除,重複三次後,加入 350 μL 的 blocking buffer 含有 5%脫脂奶粉溶於 PBS 緩衝液中,室溫放置 1.5 小時後,以 PBS 緩衝液沖洗拍打去除水分並重複三次後,以細胞單株抗體作為一抗加入 100 μL 之細胞培養液,室溫反應 1.5 小時,倒掉細胞培養液,以 PBS 緩衝液沖洗拍打去除水分並重複五次後,加入以 PBS 緩衝液 1 : 5000 倍稀釋含有 HRP 酵素的 anti-mouse 抗體,置於室溫下反應 1.5 小時,同樣以 PBS 緩衝液沖洗拍打去除水分重複五次後,最後以 ABTS 呈色試劑呈色。

附錄 2-6 融合細胞之單株化

單株化之方法有多種,但以極限稀釋法 (limiting dilution)最常被使用。其操作步驟如下:將陽性細胞經以 HY 培養液洗後,以 trypan blue 液計算活細胞率,系列稀釋至 30 cells / 10 mL HY 培養液為止,混合均勻,以 100 μL / well 分裝至 96 孔細胞培養盤,於 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 培

養。經 7 天後顯微鏡觀察，若細胞群落在一個以上或形態不對稱者均棄之。其他單株抗體細胞 (monoclonal) 則繼續增殖並篩檢其培養液，陽性細胞群落收集且擴大增殖。

附錄 2-7 單株抗體之產生

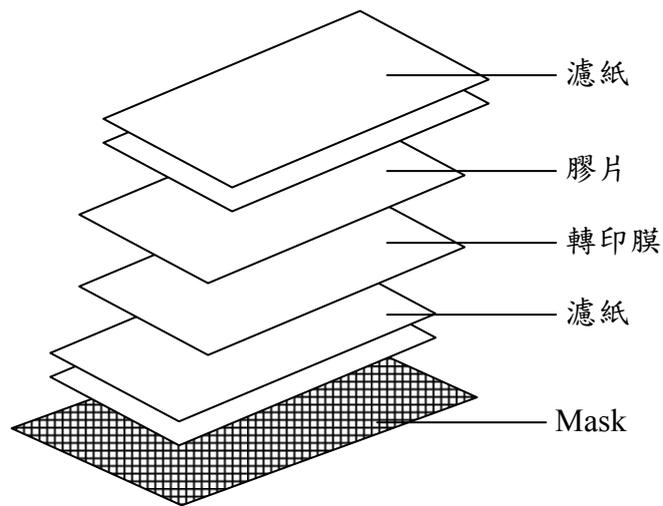
使用小白鼠接種法，將 6-11 周之 BALB/C 小白鼠腹腔注射 0.5 mL Pristane (Sigma)，經 7 天後，取融合瘤細胞，PBS 緩衝液洗滌 2 次，混合於 0.5 mL 之 PBS 中，每隻小白鼠腹腔注射 10^6 個細胞。2 周後，小白鼠腹腔膨脹，用注射針抽取其腹水 (ascites)，經離心去除細胞及脂肪，加入甘油及 NaN_3 保存在 -20°C 冰箱中備用

附錄 2-8 利用西方墨點法 (Western blotting) 確

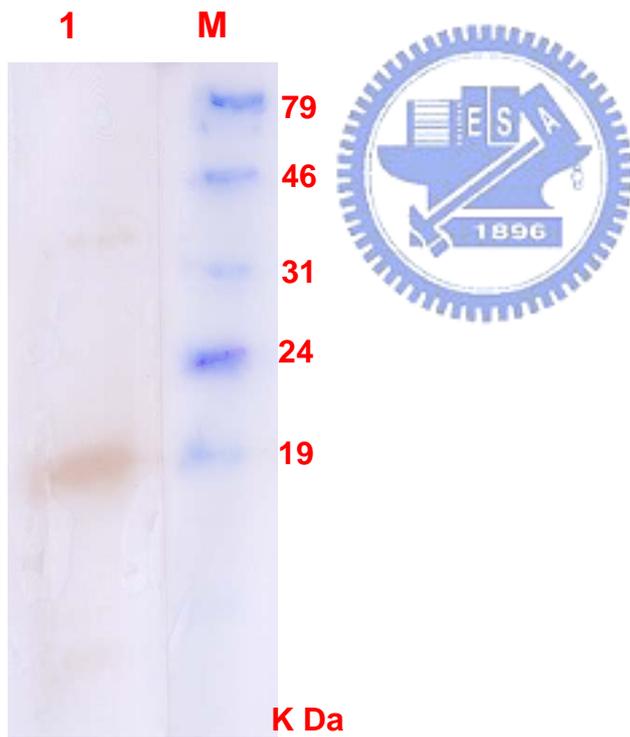
認單株抗體之專一性

取 40 μL 0.25mg/mL 純化的肌紅蛋白，跑 20 % 的 SDS-PAGE (方法如同前面描述)。之後將膠片以二次水清洗二次 (搖盪 30 秒)，再浸

在轉印緩衝液 (transfer buffer) 中 10 分鐘；同時，將 PVDF 轉印膜用甲醇浸泡 10 秒，再用二次水清洗數次，並同樣以轉印緩衝液平衡轉印膜；或者直接將 NC 轉印膜直接用轉印緩衝液平衡。轉印槽 (Hoefler) 的電極利用轉印緩衝液潤濕，且準備 4 片已事先浸濕的厚濾紙。先將一塑膠片 (mask) 放在電極上，再將 2 張厚濾紙放在轉印槽上，取一些轉印緩衝液保持濾紙濕潤，再鋪上已濕潤的轉印膜，再疊上已平衡好的膠片，最後鋪上 2 張厚濾紙即完成三明治疊法【附圖 2-2】。在過程中每一層都要特別注意不要有氣泡，以免影響轉印的效果。組裝完成蓋上電極的正極，並在正極上面加上 1 公斤的物品，通入 30 伏特電壓轉印 30 分鐘。取出轉印膜，將轉印膜右上角截角以為標幟，並以二次水清洗二次後，加入 5 % 脫脂奶粉 PBS 緩衝液室溫下搖晃 1.5 小時，以覆蓋其他沒有蛋白的部分，倒掉緩衝液後用 0.1 % PBST 緩衝液 (含 0.1 % Tween-20 的 PBS 緩衝液) 清洗轉印模 3 次每次 5 分鐘。以腹水 anti-Mb 單株抗體 (monoclonal antibody) 作為一抗來源，以 PBS 緩衝液 1 : 1000 倍稀釋單株抗體，置於室溫下反應 1.5 小時，倒掉稀釋液，以 PBST 緩衝液清洗 3 次，加入含有 HRP 酵素的 anti-mouse 抗體以 PBS 緩衝液 1 : 5000 倍稀釋，置於室溫下反應 1.5 小時，同樣以 PBST 緩衝液沖洗 5 次，最後以 DAB 呈色。結果如【附圖 2-3】所示，anti-Mb 單株抗體可準確的辨認肌紅蛋白。



【附圖 2-2】 西方墨點法三明治疊法。



【附圖 2-3】 西方墨點法分析純化的 Mb. Lane M: Prestained 蛋白質 marker。 Lane 1: anti-Mb 單株抗體辨認肌紅蛋白。