

九十年國科會專題計畫成果報告

計畫編號：NSC 90-2313-B-039-001

綠豆澱粉合成酵素的研究- 酵素鑑定與生化性質的探討(2/2)

Study of mungbean starch synthases - Biochemical properties and enzyme characterization
(2/2)

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：柯源悌 中國醫藥學院營養系 e-mail: irisko@mail.cmc.edu.tw

一、中文摘要：

綠豆(mungbean; *Vigna radiata* cv. KPS1)萃取液(B7 crude)經 Native-PAGE，再以磷解澱粉分支酵素(starch branching enzyme; SBE)之原位活性染色反應，會同時出現一電泳動慢的藍紫色(SBEI)與兩個電泳動快的紅紫色(SBEIIa, IIb)蛋白質族群。且 SBEI 於反應 2 小時即會出現，但 SBEIIa 要 16 小時後才會出現。SBEI 和 SBEIIa 族群經 SDS-PAGE 及銀染得知分別主要包含 105、62 和 55 kDa 及 96、64 和 55 kDa 的蛋白質。

B7 crude 經一連串的部份純化，發現通過 Sephacryl S-200 管柱時，會分離得到 PI 和 PII 兩個尖峰，且由活性染色實驗得知所分離出的 PI 是屬於活染為藍紫的 SBEI 族群，而分離出的 PII 是屬於紅紫的 SBEIIs 族群。最後分別經過 Q2 管柱，得到純化倍數為 30.4 倍的 PIII 和 101.9 倍的 PIV。另外，由電泳圖發現 SBEI 族群包含的 105、62 和 55 kDa 蛋白質之含量與活性有量相關性，並且也發現 SBEIIa 族群包含的 96、64 和 55 kDa 蛋白質之含量亦有量相關性。

105 kDa 蛋白質經過 trypsin 水解與蛋白質質譜鑑定得知與地瓜、玉米、稻米....等有極高的相似度，推測為綠豆之澱粉磷解酵素(starch phosphorylase; SP)。以 62 kDa 蛋白質製備的抗體，來進行免疫中和反應，發現抗體能中和 B7 crude 中的 SBE 活性達 97 %；且於西方點墨法發現此抗體主要可辨識到 62、55 和 31 kDa 的蛋白質。而 55 kDa 的抗體亦可中和 B7 crude 且辨識到 62、55 和 31 kDa 的蛋白質。因此，推斷 62 和 55 kDa 蛋白質是屬於 SBEI 族群，其會與可能為 SP 的 105 kDa 蛋白質在原始態下相互結合。

當三種不同發育時期綠豆種子之粗萃取液，以磷解澱粉 SBE 之活性染色分析，發現顆粒大的

種子其 SBE 比活性會減小，且於活染顯影知道 SBEI 族群會減少而 SBEIIa 族群反而會增加，但是 SDS-PAGE 顯示 SBEI 族群之主要蛋白質的分子量相同，包含 62 及 55 kDa，含量也相類似。由以上結果可知，至少有三種不同的 SBE 異構在綠豆發育過程中，對澱粉的生合成扮演不同的角色。

關鍵詞：綠豆、澱粉合成酶、酵素純化、澱粉生合成

Abstract

Partially purified mungbean (*Vigna radiata* var. KPS1) soluble fractions with starch branching enzyme (BE) activity detected by radioactive method were subjected to Native-PAGE and *in situ* activity staining for enzyme analysis. When native gel was incubated with G-1-P and sodium citrate (pH 7.0) to react at 30°C for 2 hrs followed by iodine staining, it visualized a blue-purple protein population with slow mobility. SDS-PAGE and silver staining showed that it was consisted of 105, 62 and 55 kDa proteins. The polyclonal antibody against the 62 kDa protein was able to immuno-neutralize 97% SBE activity and cross-react majorly with 62, 55 and 31 kDa proteins of mungbean crude extract by Western blotting. The polyclonal antibody against the 55 kDa protein also cross-reacted with 62, 55 and 31 kDa proteins. Tryptic peptide mapping and database searching for the 105 kDa protein demonstrated it to be low-affinity starch phosphorylase (L-SP) due to its high internal sequence homology with L-SP of sweet potato, corn, rice and potato. It suggested that mungbean L-SP is associated with 62 kDa and 55 kDa protein at native state. When native gel was incubated in the presence of phosphorylase a and AMP in addition to G-1-P and sodium citrate (pH 7.0) to react at 30°C for 21 hrs,

two red-purple protein populations with high mobility were visualized by iodine staining, which was similar to the finding of rice BEIIa and BEIIb. Developing mungbeans of different seed size were analyzed by the phosphorylase-stimulated activity staining method and found that the density of SP-containing slow mobile population decreased and the high mobile population increased as the seed size increase. These results demonstrated that various mungbean BE isoforms may play important roles in starch accumulation during seed development.

二、緣由與目的:

本研究的動機在於中國傳統食品綠豆 (*Vigna radiata*) 冬粉具有久煮不爛的韌性，化學性質方面被綠豆澱粉的直鏈澱粉(amylose)含量約為 32-35%，較一般澱粉的 15-30% 為高，且 amylose 與 amylopectin 的分子構造特別，使其不能為其他種類的澱粉所取代。對參與澱粉合成的酵素，包括澱粉合成酶(starch synthase, SS, EC 2.4.1.21)、澱粉支鏈化酶(starch branching enzyme, SBE, EC 2.4.1.18)，與澱粉磷解(starch phosphorylase, SP, EC 2.4.1.1)等，其在植物醣類的代謝與能量儲存方面具生理上的必要性；不同種類的澱粉合成對澱粉

角色，然而國內外對於綠豆澱粉合成酵素的研究非常有限。

因此，本研究的目的是在嘗試以傳統生化上慣用的液相層析法來部分純化酵素，並配合非變性電泳、電泳與原位(*in situ*)活性染色法來偵測與區分綠豆的 SP 和 SBE。

三、材料與方法

未成熟綠豆莢(KPS1)來自於亞洲蔬菜中心(AVRDC)，由田間種植，採收開花 14 天(DAF14)前後的豆莢於-80°C 冷凍儲存。使用儀器包括 Spectrophotometer (HITACHI U-2000)， β -Counter (Beckman LS-6500)，影像文書處理系統(AlphaImager 2200)，pH meter (Minipore MP 220)，電泳裝置(Bio-Rad Mini-PROTEAN II&III elutro-elutor)，FPLC (Bio-Rad BioLogic LP system)，高速冷凍離心機(Hitachi CR21)等。

(1) 製備綠豆溶解性區分:

未成熟綠豆粒小心自豆莢撥出後秤重紀錄，以冰冷(4°C)的萃取液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.25 mM DTT, 10 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM PMSF] 以適量體積在研鉢(使用前-20°C 預冷)以杵研磨均質化後，以 4°C、10,000 x g、離心 10 min，取上清液即為 B7 粗酵素液(B7 crude)，並測其酵素活性及蛋白質濃度。

(2) 部分純化層析:

B7 crude 經硫酸銨劃分、再依序經過 DEAE Fast Flow、Sephacryl S-200 HR (Pharmacia)、Q2 (Bio-Rad) 管柱層析等步驟純化酵素。

(3) BE 活性測定:

以放射性法測試 (Hawker et al., 1974)，利用 0.1 M sodium citrate (pH 7.0)、1 mM AMP、6 U/ml phosphorylase a、50 mM [¹⁴C]G-1-P (1540 cpm/ul) 和 BE 共 200 ul 來反應。於加入 G-1-P 開始，在 30°C 水浴、200 rpm 速度震盪反應 30 min 後，將樣品滴在 G/A filter disc 上烤乾中止酵素反應，並用抽氣過濾方式以沖洗液沖去 disc 上未反應基質，隨後 disc 放入 counting vial 中加入閃爍計數液(Cocktail)，以閃爍計數器測放射性量，活性(U)=nmole/min。

(4) 電泳:

變性電泳 (Denaturing gel electrophoresis), SDS-PAGE (SDS polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli 1970) 根據 Bio-Rad 公司的膠體製備及操作步驟，跑 7.5-12% polyacrylamide gel 的膠體電泳，以 Coomassie blue 或 Silver stain 染色。非變性電泳 (Native gel electrophoresis) (Edwards et al. 1995)，和 SDS-PAGE 操作步驟相似，但不含 SDS。

(5) 原位活性染色:

根據 Yamanouchi et al. (1992) 的方法加以修飾，BE 反應液與活性測定法相同或只含 G-1-P 和 Sodium citrate, pH 7.0。而 SP 的反應液為 G-1-P 和 Sodium citrate, pH 6.0。生成的澱粉以 KI/I₂ 溶液染色顯影。

(6) 蛋白質電流洗脫:

根據 Bio-Rad 公司的 Model 422 electro-elutor 操作方法。

(7) 抗體製備與免疫中和:

將 62, 55 kDa 蛋白質對 Balb/C 小白鼠做免疫注射收集腹水。將 B7 crude 與不同濃度的抗體於室溫下反應 1 小時，以放射性法分析殘留 BE 活性，與不加抗體的控制組比較，換算中和率 (Vos-Scheperkeuter et al., 1989)。

(8) 西方點墨法：

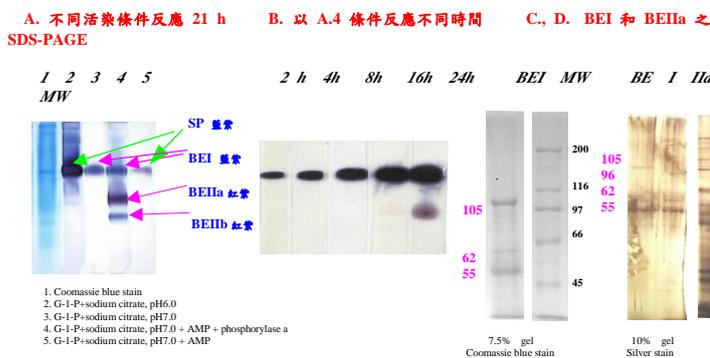
根據 Pharmacia 公司的 ECL reagent kit 操作方法。

(9) 蛋白質質譜鑑定：

將 105 kDa 蛋白質以 trypsin 作 in-gel digestion 後經 MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight MS) 得到質譜圖，再進入 NCBI 的資料庫比對。

四、結果與討論：

Figure 1. BE 異構 的活染顯影。 B7 crude 跑 Native-PAGE，不同條件活染後，切下顯影的蛋白質條紋跑 SDS-PAGE。



1. Figure 1A 顯示只有 phosphorylase-stimulation assay(條件 4)可得到三種不同的 BEs (BEI、BEIIa、BEIIb)，因 BEI 與 SP 的蛋白質位置相同，推斷 BEI 包含 SP；Figure 1B 顯示 BEIIa 於反應長時間後會出現；將條紋切下搗碎跑 SDS-PAGE 得到 BEI 包含 105、62 和 55 kDa 的蛋白質；而 BEIIa 包含 96、62/62 和 55 kDa 的蛋白質 (Figure 1C, D)。

Table 1. BE 之純化表

純化步驟	總蛋白 (mg)	總活性 (U)	比活性 (U/mg)	純化倍數 (fold)
B7 crude	1365	53235	39	1
硫酸銨劃分 (AS 20-60%)	242	45089	186	4.6
DEAE Fast Flow	27.7	13386	483	12.3
Sephacryl S-200				
PI	3.49	2598	744	19.0
PII	0.96	2288	2383	60.7
Q2 P III	0.85	1015	1194	30.4
PIV	0.226	905	4001	101.9

Figure 2. 不同純化區分之活染顯色圖



BEI 藍紫
BEIIa 紅紫
BEIIb 紅紫

2. Table 1 顯示 B7 crude 經 S-200 層析可分出兩個

BE 活性的 P I 和 P II，再分別經 Q2 層析可得到純化倍數為 30.4 的 P III 及 101.9 倍的 P IV。Figure 2 顯示純化區分的 BE 比活性與碘染顯影的深度有相關性，也分為藍紫和紅紫兩族群，且 BEI 主要在 P I，P III；BEIIa 和 BEIIb 在 P II，P IV。

Table 2. BEI 包含的 105 kDa 蛋白質，經蛋白質質譜(MALDI-TOF)鑑定為 SP

MOWSE Score	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Species	Protein Name
1.119e+005	108521/5.3	168276	IPOMOEA BATATAS	(M64362) starch phosphorylase
6.613e+004	110434/5.6	6733896	ZEA MAYS	(A85269) unnamed protein product
6.099e+004	104645/5.4	1319543	ORYZA SATIVA	(AF327055) alpha glucan phosphorylase
3526	110701/5.2	313349	SOLANUM TUBEROSUM	(X73684) starch phosphorylase

3. MOWSE Score 愈小，其內部序列質譜愈相近，由 Table 2 得知 105 kDa 蛋白質與地瓜、玉米、稻米和馬鈴薯的 SP 有極高的相似度，推測 105 kDa 蛋白質就是綠豆之 SP，其和 BE 在原始態下會相互結合。

Figure 3. 免疫中和

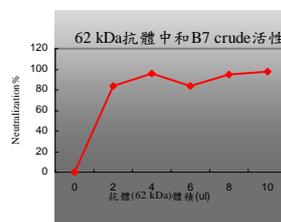
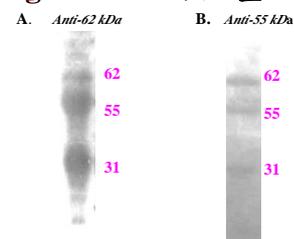
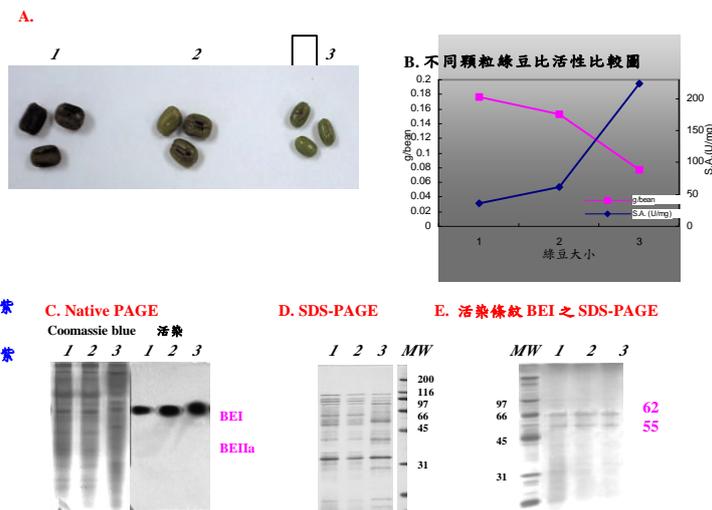


Figure 4. 西方點墨



4. Figure 3、Figure 4A 是以 62 kDa 的抗體，對 B7 crude 進行免疫中和和西方點墨試驗，顯示 62 kDa 抗體可中和活性達 97%，且可辨認 62, 55 和 31 kDa 的蛋白質。另外 Figure 4B 亦發現 50 kDa 的抗體亦辨認到 62, 55 和 31 kDa 的蛋白質，且亦可中和 B7 crude (結果未示)。

Figure 5. 三種不同顆粒大小綠豆的 B7 crude 之活性圖，與經 Native-PAGE 和活染所得的電泳圖



5. Figure 5 發現顆粒大的種子其 BE 比活性會減少(Figure 5B)，且 BEI 族群會減少而 BEIIa 族群會增加(Figure 5C，圖不明顯)，於 SDS-PAGE 發現三者蛋白圖譜相似，但量不同(Figure 5D)。三者 BEI 活染條紋之 SDS-PAGE 顯示主要蛋白質分子量相同，包含 62，55 kDa 且量相似(Figure 5E)。

本研究已成功的初步鑑定出綠豆的 BE 及其異構；綠豆 ~~萃取液~~ 再以刺激澱粉合成的磷解反應及碘染，藍紫色(BEI)與兩個電泳快的紅紫色(BEIIa, IIb)蛋白質族群 (Figure 1.A)，其現象類似於稻米的 BE IIa 與 BE IIb(Yamanouchi et al., 1992)，預測即是綠豆之 BEs。BEI 和 BEIIa 族群經 SDS-PAGE 及銀染得知分別主要包含 105、62 和 55 kDa 及 96、62 和 55 kDa 的蛋白質 (Figure 1.C, D)。62 kDa 抗體可免疫中和 B7 crude 的 BE 活性 (Figure 3)且西方點墨發現此抗體和 55 kDa 抗體均可辨認 62，55，31 kDa，但不會辨認 105 kDa (Figure 4)，顯示 55，62 kDa 蛋白質就是綠豆的 BE 並具有同源性；而 105 kDa 蛋白質經質譜比對，極可能就是綠豆的 SP (Table 2)，並且於純化過程中和 BE 活性一起出現(Figure 2, PI; PIII)，顯示原始態下與 BE 相互結合，分別參與 amylose 與 amylopectin 的合成，使得 BEI 族群碘染成為代表 amylose 的藍紫色，而 BEIIa, IIb 族群碘染成為代表 amylopectin 的紅紫色(Figure 1, 2)，而且 BEIIa 代表 55，62 kDa 蛋白質與 96 kDa 蛋白質結合的族群來共同合成紅紫色的 amylopectin；96 kDa 的蛋白質含量與純化過程中 BE 活性有量相關(結果未示)，應該是 BE 的異構。不同 ~~種~~ 的 B7 crude 之 BE 的比活性和顆粒大小成反比，但是 62，55 kDa 的 BEI 量相似(Figure 5)，顯示 BEIIa 與 IIb 的族群可能扮演活性調節的角色，將更進一步的確認。

五、計畫成果自評:

本計畫在執行期間完成對未成熟綠豆溶解區分中澱粉分支酵素的純化步驟建立，並以活性染色法鑑定出 SBEI, SBEIIa, SBEIIb 族群，並附帶發現與 SBE 在原始態與 SP 結合緊密，計劃結果已於第四十屆年會之 B-08 壁報論文作發表，目前在從事對 GBSS 及 SSS 的純化鑑定，藉由活

染顏色的差異性，對參與合成 amylose 及 amylopectin 的酵素群及其對綠豆澱粉的合成有進一步的瞭解，自許本計畫的發現具有預期具體的貢獻。

六、參考文獻:

1. Edwards, A., Marshall, J., Sidebottom, C., Visser, R. G. F., Smith, A. M., and Martin, C. (1995) *Plant J.* 8, 283-294.
2. Hawker, J. S., Ozburn, J.L., Ozaki, H., Greenberg, E., and Preiss, J. (1994) 160, 530-551.
3. Laemmli, U. K. (1970) *Nature.* 227, 680-685.
4. Mu, C., Harn, C., Ko, Y.T., Singletary, G. W. Keeling, P. L. and Wasserman, B. P. (1994) *Plant J.* 6 (2): 151-159.
5. Vos-Scheperkeuter, G., H., Wit, J.G. de, Ponstein, A. S., Feenstra, W. J., and Witholt, B. (1989) *Plant Physiol.* 90, 75-84.
6. Yamanouchi, H., and Nakamura, Y. (1992) *Plant Cell Physiol.* 33, 985-991.
7. 吳怡慧、柯源悌。6-2000。以活性染色法鑑定綠豆中的澱粉合成酵素，中國農化學會第三十八屆年會，台北市。
8. 李怡青、柯源悌。6-2000。綠豆澱粉顆粒與水溶性萃取液中 granule-bound starch synthase、branching enzyme 和 soluble starch synthase 的活性分析，中國農化學會第三十八屆年會，台北市。
9. 張敬宜、柯源悌。6-2002。The detection of starch phosphorylase and starch branching enzymes in developing mungbean. 中國農化學會第四十屆年會，台北市。
10. 張敬宜。7-2002 綠豆澱粉分支酵素的鑑定。中國醫藥學院營養所，碩士論文。