

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

綠竹筍老化相關酵素 phenylalanine-ammoinalyase 基因及酵
素功能探討(2/2)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2317-B-002-016-

執行期間：92年08月01日至93年10月31日

執行單位：國立臺灣大學生化科技學系

計畫主持人：李平篤

共同主持人：楊健志

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 5 月 12 日

第一章 緒論

1.1 竹

竹類屬於單子葉植物 (monocotyledon) 禾本科 (Gramineae) 之竹亞科 (*Bambusoideae*) 或獨立成爲竹科 (*Bambusaceae*)，共計有 62 屬，約 1250 種，主要分布在熱帶及亞熱帶等溫暖地區，生長適應性強。亞洲 37 屬 700 餘種，非洲 5 屬約 50 餘種，大洋洲 7 屬 20 餘種，北美洲只有一種。一般認爲竹類源於亞洲。亞洲之竹類與非洲及大洋洲之竹類間親緣關係較爲密切，與美洲竹類較爲疏遠。報告指出中國有 26 屬 300 種，其中 22 屬 200 種以上具有經濟價值，而台灣目前生長約有 79 種 (Chang, 1991)。主要是蓬萊竹屬 (*Bambusa*)、麻竹屬 (*Dendrocalamus*) 及孟宗竹屬 (*Phyllostachys*)。

自然界中，竹類通常以種子或地下根莖爲其繁殖方法。由於竹類的花期不穩定且具有結實率低及發芽不易等問題，繁殖以分株、竹稈扦插及種子播種爲主，但這些繁殖方法效率都不高、不便於運輸，在大量繁殖及造林上造成莫大的困難 (Prutpongse and Gavinlertvatana, 1992)。

1.2 植物二級代謝

植物由 shikimate pathway 合成芳香族胺酸 (aromatic amino acids)。酚類化合物 (phenolics) 是植物體內芳香環胺酸經過二級代謝 (secondary metabolism) 所生成之次級產物 (**Figure 1.**)。其中的 general phenyl- propanoid pathway 主要由三個酵素所組成，包括 phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5)、cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H, EC 1.14.13.11) 和 4-coumarate : CoA ligase (4CL, EC 6.2.1.12)。這是植物二級代謝中的 core-mechanism，之後所參與之反應有不同的分支，可以衍生出許多的二級代謝產物，例如：flavonoid、anthocyanin 等，目前至少有 3,000 種以上的 flavonoids 被發表。因此這三種酵素中只要任一個受到干擾，就會影響整個二級代謝。第一個關鍵步驟是將 L-phenylalanine 藉由 PAL 轉變成 *trans*-cinnamic acid。第二個步驟是將 *trans*-cinnamic acid 進行 hydroxylation 轉變成 4-coumaric acid；催化此反應的酵素爲 cytochrome P450 monooxygenase，也就是 C4H，會受到光照、誘導物 (elicitor)、創傷等原因而誘導 (Fahrendorf and Dixon, 1993; Bell- Lelong *et al.*, 1997)，而且誘導的機制與 PAL 相關 (Mizutani *et al.*, 1997)。

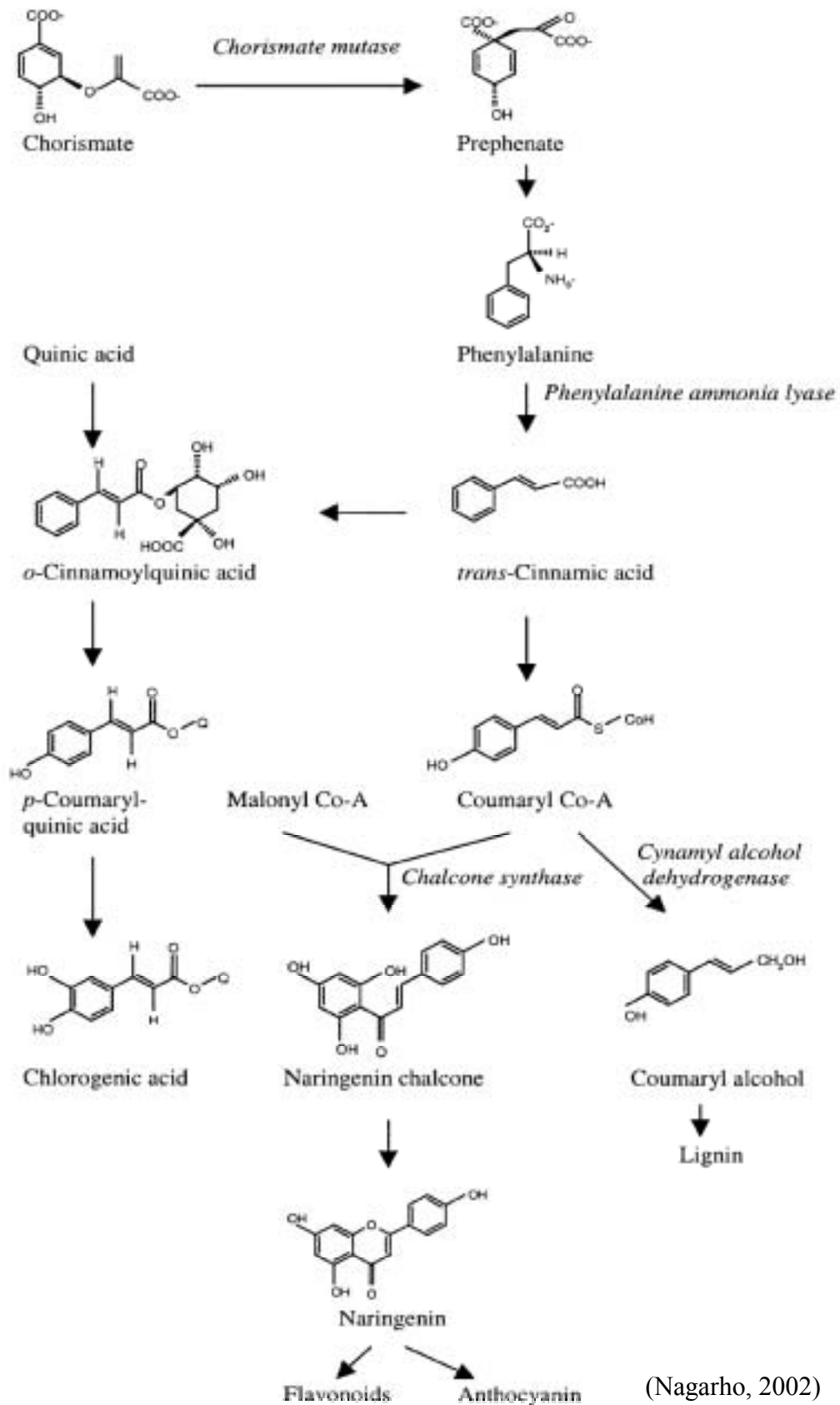


Figure 1. Pathways for biosynthesis of phenylpropanoid products derived from phenylalanine ammonia-lyase.

1.3 苯丙胺酸脫氨裂解酶

在 1961 年時，Koukol 和 Conn 最早從大麥苗中發現苯丙胺酸脫氨裂解酶 (phenylalanine ammonia-lyase, EC 4. 3. 1. 5, 以下簡稱 PAL) 的存在，經過四十多年的相關研究，PAL 成爲二級代謝中最熱門的研究酵素之一。植物二級代謝是被高度調控的，PAL 是 phenylpropanoids 生合成之第一個酵素，也是類黃酮 (flavonoids) 和木質素 (lignin) 與其他化合物生合成的關鍵酵素。在植物體中的有機成分，大約有 30-45% 是衍生自 L-phenylalanine。PAL 的活性會被光照、受傷 (wounding)、植物生長調節劑 (growth regulator) 和生物性或非生物性刺激物 (elicitor) 所誘導。所催化的反應是將 L-phenylalanine 經非氧化型 (non-oxidative) 脫氨反應 (deamination)，產生 *trans*-cinnamic acid 和 ammonia。目前發表的 PAL 大多是四元體 (tetramer) 形式存在，分子量約介於 250- 360 kD，具有一至兩個活性催化區 (catalytic site)；植物中通常都不只有一個 PAL 存在。換言之是 multigene family (Cramer *et al.*, 1989; Fukasawa-Akada *et al.*, 1996)。植物 PAL 基因會因爲微生物感染或是植物細胞直接處理 elicitor，會造成 PAL 轉錄量增加 (Edward *et al.*, 1985; Lowton and Lamb, 1987)。PAL 在植物生長與發育扮演了決定性的角色，包括表皮組織對 UV-B 的抵抗，合成訊息代謝物 (signal metabolites)，和細胞壁中結構性大分子，維持細胞堅硬與保護的功能。PAL 也是植物對抗病原菌入侵的因子之一，主要是 phenylalanine 的衍生物，包括持續性或誘導性的抗菌素與殺菌素 (phytoalexin)、系統性防禦訊息 (systemic resistance signals) 與使細胞壁堅硬之聚合物。利用基因轉殖方法降低 PAL 活性，會使植物的形態與代謝受到影響，更會增加疾病的發生。

PAL 也存在部分真菌 (fungi) 以及酵母菌 (yeast) 中，在原核生物中只有放線菌 *Streptomyces*、*Basidiomycetes* 和 *Ascomycetes* 被發表有 PAL 存在，真細菌 (eubacteria)、古細菌 (archaea) 與動物細胞則是缺乏此酵素。植物中 PAL 所扮演的角色已經相當清楚，但是在真菌中 PAL 所扮演的生理意義卻仍是未知。這些真菌產生的 PAL 可將 L-phenylalanine 代謝爲與氧結合的衍生物 (oxygenated derivatives)，例如：*hydroxyphenylacetic acid*、*benzoic acid derivatives* (Wat *et al.*, 1979) 或是完全降解該胺酸 (Moore *et al.*, 1979)。目前已經有證據顯示，如果破壞 PAL 基因，在實驗室的培養環境下，對真菌的形態與生長不會有明顯影響；在非植物材料中 PAL 的相關研究仍無法爲 PAL 的功能下定義。

Tyrosine ammonia-lyase (TAL) 將 L-tyrosine 催化產生 *trans-p*-hydroxy-cinnamic acid (*p*-coumaric acid) (Figure 2.)。Rosler 等人指出 (1997)，在單子葉禾本科植物中 PAL 與 TAL 活性是由同一條勝肽鏈 (polypeptide) 所提供。在雙子葉植物

中該酵素大多只能利用 Phe 當作催化基質。許多研究指出 (Neish, 1961; Young *et al.*, 1966; Haviy *et al.*, 1971; Jangaard, 1974), 單子葉植物利用 PAL 酵素具有 TAL 活性, 可以代謝 tyrosine; 然而在雙子葉植物只對 Phe 有專一性。

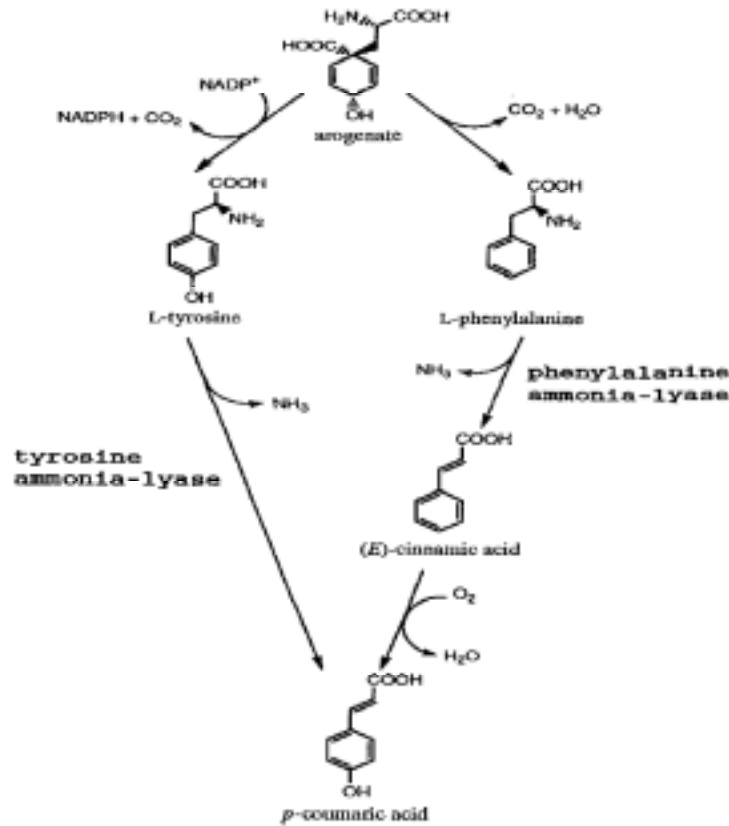


Figure 2. Two alternative pathways of *p*-coumaric acid formation.

荷蘭芹 (parsley) 有四個同質四元體 (homotetramer) 之 PAL 同功酶 (isoforms), 對 Phe 的 K_m 值範圍為 15~25 μM , 對 Tyr 則為 2~8 mM (Appert *et al.*, 1994)。以同功酶 PAL-1 而言, 對 Phe 的 turnover number 為 22 s^{-1} , 但是對 Tyr 則為 0.3 s^{-1} 。這樣的結果顯示, 在生理狀況下 Tyr 極度不可能為該酵素之基質。另外, 從玉米中純化到的 PAL 對 Phe 的 K_m 值為 270 μM , 對 Tyr 的 K_m 值為 29 μM (Havir *et al.*, 1971), 這樣的結果顯示玉米中的 PAL 具有 TAL 活性。參考荷蘭芹 PAL cDNAs 之表現 (expression) 實驗 (Schulz *et al.*, 1989; Appert *et al.*, 1994); Whetten 與 Sederoff 在 1995 年指出: 可利用同樣的實驗來檢驗玉米之 cDNA 中, 同一條胜肽鏈是否同時具有 PAL 與 TAL 活性。將玉米中 PAL cDNA 在 *E. coli* 中表現, 得到的結果可以證明 PAL 與 TAL 活性是由同一條 polypeptide 所提供。玉米與一般單子葉植物可以利用 Phe 或 Tyr 來產生 *p*-coumaric acid; 目前這兩個代謝路徑在植物中之生理意義以及對於 phenylpropanoid pathway 的影響仍不清楚。另外還有許多因素會影響此兩種胺酸在細胞質中的濃度變化, 例如 arogenate dehydrase 和 arogenate dehydrogenase 活性及不同的表現量, 在 chorismate 代謝成 Phe 或 Tyr 時之調控, 及此兩種

胺酸運輸出質體 (plastid) 膜的不同形式。並且, Phe 和 Tyr 也會參與蛋白質的生合成, 同樣會影響細胞質內的濃度。所以只有 *in vivo* 實驗可以解釋此兩種路徑對 *p*-coumaric acid 生合成所造成的影響。先前的實驗指出, 在小麥及大麥葉處理 PAL 和 TAL 的抑制劑 L- α -amino- β -phenylpropionic acid, 會造成 Phe 和 Tyr 量的增加, 因此知道此兩種芳香族胺酸都會參與脫氨反應。但是 L- α -amino- β -phenylpropionic acid 同時也是 tyrosine decarboxylase 的抑制劑, 仍然存在另一個酵素被抑制, 造成 Tyr 在植物體內累積的可能性。

1.4 轉殖菸草中 PAL 之相關研究

目前對二級代謝研究的重心擺在與代謝相關酵素基因轉錄的調控上, 並且萃取酵素分析活性在植物發育與環境影響下的變化 (Cramer *et al.*, 1985; Lowton and Lamb, 1987; Hahbrock and Scheel, 1989)。這套系統必須要能在植物體內外操作與分析 phenylpropanoids 化合物增加與減少的量, 研究胞器隔間代謝關係 (metabolic compartmentalization), 且要能對基因產物進行分子層次的研究。目前菸草有很好的系統, 已經證明在菸草中有一特定 PAL 會與菸草 microsomes 結合。在 PAL 基因大量表現的菸草轉植株中, PAL 活性的增加是不需要伴隨著 C4H 活性的增加 (Howels *et al.*, 1999)。相對地, 如果受到 elicitor 的誘導, C4H 和 PAL 的活性都會增加 (Howels *et al.*, 1999)。

當植物 PAL 活性被壓抑會造成表現型不正常, 並且較容易受病原菌的攻擊, 對於菸草鑲嵌病毒 (tobacco mosaic virus) 的感染沒有系統性防禦 (systemic acquired resistant) 機制 (Maher *et al.*, 1994)。菸草中 PAL 被壓抑 (suppress) 的現象是非常不穩定。將轉殖大豆 PAL2 基因之菸草, 經自花授粉後可得到許多不同表現型之子代。很有趣地, 在菸草 PAL 壓抑的轉植株, 經自花授粉後的 T₁ 子代約有超過 60% 會轉變成 PAL 大量表現的性狀 (Howles *et al.*, 1996)。PAL 基因靜默的植株也有可能穩定地遺傳好幾代或是表現型回復成類似野生型。在第一次轉殖時所發生的 PAL 表現量減少的現象, 稱之為 epigenetic gene silencing, 也就是 co-suppression 或 sense suppression (Flavell, 1994; Meyer, 1996)。PAL 活性在植物中會受到發育與廣泛環境因素所誘導。控制 PAL 表現是非常複雜的, 會在轉錄層次、轉譯層次、蛋白質穩定性, 以及受到內生性與外生性因子影響, 對該酵素去活化或活化 (Bolwell, 1992)。甲基化的現象已經證明會在 PAL 轉殖時發生, 但是對內生性 PAL 沒有影響, 被認為是減少基因表現的原因之一 (Dieguez *et al.*, 1997)。然而目前仍然不清楚甲基化是否為基因靜默的主因。植株矮化、葉片捲曲以及花型態的不正常, 可能都是因為 phenylpropanoid pathway 受到影響。在轉殖的菸草中利用改變 PAL 基因的表現, 來干擾 phenylpropanoid metabolism, 可以來研究並且依照需要來生產

phenylpropanoid compounds。

1.5 苯丙胺酸裂解酶同功酶

PAL 為廣泛研究之二級代謝關鍵酵素，在 ExPasy (SwissPort) 資料庫中，目前共有 129,768 個序列資料，其中有 52 個為 PAL 不同物種之序列，不同物種 PAL 具有 isoforms 存在，核苷酸序列全長為 1,863~2,265 bp。換言之，蛋白質胺酸序列介於 620~754 a.a.，推測之單元體分子量約為 67.8~82.6 kD。大多數植物中 PAL 都有 isoforms 存在，在馬鈴薯中甚至含有 30 種以上。以菜豆 (french bean) 為例，在受到逆境時，至少有四種 PAL 基因產物被調控，這些被誘導的蛋白質分子量都大約 77 kD。另外有一持續表現的 PAL，分子量約為 83 kD。目前對於 isoforms 和經誘導後的基因產物間之關係並不清楚。目前發現高等植物中 PAL 基因大多由兩個 exons 和一個 intron 所組成。在真菌中的 PAL 則多由一整段 exon 所組成，並沒有 intron 存在。在植物界中大部分的物種所含的 PAL 基因家族大約有 2 到 6 個成員。

PAL 屬於多基因家族 (multigene family)，阿拉伯芥中至少有四個 PAL 基因，其中 PAL1、PAL2 的核苷酸序列與其他植物中的 PAL 基因序列相似度很高。在基因表現方面，不同物種間對於創傷等不同的誘導因子，PAL 基因表現在值與量方面有類似的結果。然而在第三種 PAL 基因 – PAL3，其核苷酸序列與 PAL1、PAL2 和其他植物中的 PAL 核苷酸序列有明顯的差異；PAL3 有兩個 introns，且所轉錄轉譯出的 PAL 蛋白質胺酸序列和其他的 PAL 蛋白質同源性也不高，而且 PAL3 和其它 PAL promoter 比較，缺少某些保守性區域。

荷蘭芹之 PAL 的基因家族已經被完全發表，主要有四個 PAL 基因。此基因家族可依照其相似度分成兩類；其中一類的組成為 PAL1 和 PAL2，它的 TATA-proximal promoter 與 coding region 非常相似；另外一類也有兩個成員，PAL3 和 PAL4 彼此的相似度不高，且與第一類的 PAL1 與 PAL2 相似度低。使用 PAL1/2、PAL3、PAL4 在 5' untranslated regions 來設計專一性探針可以用來偵測荷蘭芹葉子與組織培養的細胞在經過 UV 照射後與真菌感染之後 mRNA 的變化量；甚至在受傷的葉或根中進行。

比對荷蘭芹四個 PAL 基因的 promoter 區域，有三個 boxes 是由 PAL1 gene promoter 經過 *in vivo* 和 *in vitro* 的實驗證明具有 DNA-protein interaction 功能，可能的功能為 *cis-acting element*，經過序列比對之後，可以推測所有荷蘭芹的 PAL 基因 promoter 區域都含有這三個 boxes。分析結果參考 **Table 2**。在荷蘭芹的四個 PAL 基因 promoter 位置有相似序列，包括 TATA box 以及三個 putative *cis-acting element* (boxes P, A, L)。利用報導基因來進行短暫表現分析 (transient expression assay) 研究個別功能，結果顯示：此三個區域並不負責 PAL

受光照或 elicitor 誘導的功能；類似報導也在 4CL 發現。荷蘭芹根部 PAL4 對創傷有強烈的反應，但是在葉中則沒有；這樣的結果顯示：組織特異性與 PAL 基因表現有關。類似的結果也在大豆 PAL2 和 PAL3 被觀察到。在荷蘭芹中，未來的研究方向在細胞層次，包括 PAL 組織特異性、胞內定位等，將可以釐清 multiple PAL 基因的功能。

Promoter	BoxP	Position	BoxA	Position	BoxL	Position
<i>Pc</i> PAL1	CTCCAACAAACCCC	-175	CCGTCC	-160	TCTCACCTACC	-107
<i>Pc</i> PAL2	CTCCAACAAACCCC	-175	CCGTCC	-160	TCTCACCTACC	-107
<i>Pc</i> PAL3	TTCCAACAAACCCC	-178	CCGTCC	-163	TCCCACCTACC	-98
<i>Pc</i> PAL4	CTCCAACCATCCAA	-183	CCGTTC	-136	TCTCACCAACC	-268
<i>Pc</i> 4CL1	CTTTACCAACCCCC	-52	CCGTCC	-228	TCTCACCAACC	-128
<i>Pc</i> 4CL2	CTTTACCAACCCCC	-52	CCGTCC	-228	TCTCACCAACC	-128
<i>At</i> PAL1	TCTCAACCAACTCC	-135	CCGTGT	-260	GCTTACCTACC	-51
<i>At</i> PAL2	TCTCACCCACCCCT	-132	?		CCTTACCTACC	-55
<i>Le</i> PAL5	TTCTACAACCCCC	?	?		CTTTACCTACC	?
<i>Ps</i> PAL1	ATTCAACAAACCAC	-136	CCATCC	-265	CCTCACCTACC	-92
<i>Ps</i> PAL2	CTCAACCAAACCAC	-204	CGCTCC	-227	CTTTACCTACC	-151
<i>Pv</i> PAL2	TCTCCACAACCCCC	-123	ACGTCC	-227	ACCCACCTACC	-76
<i>Pv</i> PAL3	CAACCACCTACCCC	-77	?		ACTCACCAACC	-53

Table 2. Putative cis-acting elements and their positions on various PAL and 4CL gene promoters.

At, *Arabidopsis thaliana*; *Le*, *Lycopersicon esculentum*; *Pc*, *Petroselinum crispum*; *Ps*, *Pisum sativum*; *Pv*, *Phaseolus vulgaris*.

1.6 推測 PAL 可能催化機制

雖然目前沒有 PAL 的結晶學結構，但是在 1999 年 *Pseudomonas putida* 內 histidine ammonia-lyase (HAL) 已經有 X-ray 結晶結構，發現含有 3,5-dihydro-5-methylidene-4H-imidazol-one (MIO) 環，主要由三個胺酸 Ala-Ser143-Gly 可以形成自體催化形式 (auto-catalytically form)，這是一種新發現的 prosthetic group，並且也存在 PAL 中，以親電性反應 (electrophilic interaction) 來活化基質。MIO 結構在 1999 年被發現，之後就立刻被用來討論 HAL (EC 4.3.1.3) 和 PAL 的反應機制。裂解酶一般會使用的 prosthetic group 包括 thiamine pyrophosphate、iron-sulfur cluster、pyridoxal 5'-phosphate、NAD(P)(H)、dihydroalanine (DHA) 和 MIO。在 *P. putida* 中 HAL 利用定點突變將 Ser143 換成 alanine，會造成活性喪失，也確定了 Ser143 為 prosthetic group 之前驅物。同樣的實驗也可以在荷蘭芹 PAL 中發現 Ser202 有相同的現象，由 **Figure 3.** 可以發現：胺酸序列 Ala-Ser-Gly-Asp-Leu 為 HAL 和 PAL 高度保守的區域。Hanson 和

Havir (1970) 假設了 PAL 的反應機制 (Path 1, **Figure 4.**)，這個假設指出，親電性催化會增加基質之胺基 (amino) 部分離開能力 (leaving ability)。雖然在親電基加上胺基會促進離去基 (leaving group) 的特性，並且解釋產物釋放的順序 (NH₃ 會最後離開)，可是沒有解釋 non-acidic β-proton 爲了移除也被活化。雖然沒有清楚的證據可以解釋這個假設的正確性，但是大多數之前的作用結果都以這個假設來解釋。

Gene of	MIO	COO ⁻	Phu
PAL <i>A. Arabis</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>B. Anthracinum</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>D. stramonium</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>J. batatas</i>	RFLHA TITASGILV SLNAP	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>L. aythyaifoliat</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>S. arvensis</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT

PAL <i>P. crispum</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>P. luteovirgatum</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>P. sativum</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>P. sativum laevis</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>Rhodospirillum rubrum</i>	RHSDC TIGASGILG LYNQT	LQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>R. solanaceae</i>	RHSDC TIGASGILG LYNQT	LQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>S. horrida</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>S. tuberosum</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>aspen</i>	RFLHV TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>avocado</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>carrot</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>French bean</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>horseradish</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>potato</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>rice</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>soy</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>tomato</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>lettuce</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>sunflower</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT
PAL <i>wheat</i>	RFLHA TITASGILV LYNQT	FQDREALATE	GRIFFQQT

HAL <i>B. subtilis</i>	LEHAC ELGASGILG LLYQT	FVQDREALAT	GRIFFQQT
HAL <i>P. putida</i>	LEHAA FVQASGILG LLYQT	FVQDREALAT	GRIFFQQT
HAL <i>T. nadori</i>	LEHCC FVQASGILG LLYQT	FVQDREALAT	GRIFFQQT
HAL <i>S. greavesii</i>	RHMAA SLGASGILG LLYQT	FVQDREALAT	GRIFFQQT
HAL <i>rat</i>	RHSGE TVGASGILG LLYQT	FVQDREALAT	GRIFFQQT
HAL <i>farmeri</i>	RHSGE TVGASGILG LLYQT	FVQDREALAT	GRIFFQQT

Figure 3. Comparison of the amino acid sequences around the active sites of PAL and HAL of different origins.

而根據 Rétey 等人在 1995 年的文獻中指出 (Path 2, **Figure 4.**)，基質帶有多電子之芳香環，親電基會以類似 Fieldel-Crafts addition 方式來進行攻擊。陽離子性中間產物在 β-hydrogens 非常鄰近的正電荷會增加其酸度。脫氨完成催化反應之後適當的路易士鹼 (base) 會移除 β-proton。在這個機制下，基質在陽離子性中間產物遺失芳香性 (aromaticity) 的能量需求是可以被補償的。有兩個可能性：第一，形成 MIO 芳香環需要將 N 原子由 sp³ 轉變成 sp²，因此控制了醱素在催化循環中結構的改變。第二，爲了要穩定陽離子性中間產物，MIO 中的羰基 (carbonyl group) 會與一帶正電基團有作用，可能部份質子化 (protonation)。

以 [β-²H₂]phenylalanine 當作基質並無法觀察到 kinetic isotope effect，解釋爲質子被帶走並非整個反應之速率決定步驟。以 [²H₅]phenylalanine 和 [³H₅]phenylalanine 當作基質，可以觀察到 kinetic isotope effect，解釋爲基質之苯環要先形成陽離子性中間產物。更進一步證明這個機制，是 4-hydroxy-phenylalanine (tyrosine) 爲 PAL 很差之基質，而 3-hydroxyphenyl- alanine (*m*-tyrosine) 的作用

速率比 L-phenylalanine 還要快。

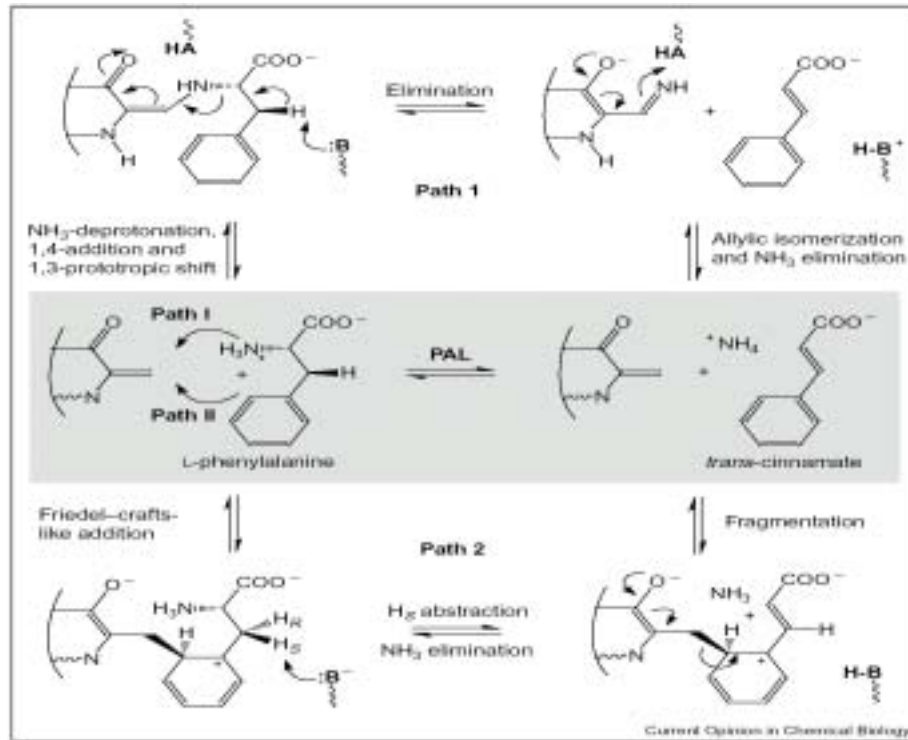


Figure 4. Predicted mechanisms for the PAL reaction. (Popple, 2001)

1.7 影響 PAL 活性之因素

1.7.1 光照

白光、紅光、遠紅光、藍光以及 UV 都會誘導 PAL 活性，白光是最早發現可以誘導馬鈴薯塊莖 PAL 活性，最終產物是 chlorogenic acid。植物色素 (phytochrome) 會牽涉到 PAL 活性變化，紅光會誘導 PAL 活性，而遠紅光則會阻止這個現象。荷蘭芹懸浮細胞之 flavonoid 生合成是需要依賴 UV 之 PAL 反應，顯示轉錄或後轉錄修飾會受到 UV receptor 的影響。小黃瓜幼苗會因為藍光刺激而誘導 PAL 活性，藉由與抑制性蛋白質分離來活化 PAL，phenolic compound/lipoprotein 複合體可能是這個抑制現象的主因。

1.7.2 創傷與感染

許多植物會因為創傷而誘導增加 PAL 活性，這樣的結果類似光照誘導的現象。甘藷塊根經過切片後，會同時伴隨著 PAL 的合成與降解，乙烯也會牽涉到整個反應的發生。當植物受到病原菌感染時也會誘導 PAL 反應。菸草鑲嵌病毒會造成 PAL 重新合成 (de novo synthesis)。大多數研究集中在真菌或多醣類衍生物對 PAL 之誘導作用 (Halbrock *et al.*, 1979)。豆科植物受感染時會合成類似木

質素物質、植物殺菌素以及類黃酮醇衍生物。快速增加 PAL 活性通常是非常大量但是短暫的，目前認為當受到真菌或 elicitor 刺激後，PAL 重新合成是一般的通則。在高濃度刺激物存在下對 PAL 活性誘導是比較有效率的，顯示可能還有其他後轉譯修飾現象存在。PAL 在十幾年前被認為是植物對病原菌防禦與逆境調節的感應器 (sensor or receptor)，一度受到大家極為重視。因為 PAL 在許多情況下都會被活化，合成許多植物殺菌素等物質，參與抗病與逆境下的反應。可是在近年的研究，已經發現許多 PR 蛋白質 (pathogen related protein)，包括 chitinase、peroxidase 等等，漸漸地 PAL 在植物病原菌防禦上，研究就不是那麼重要。目前植物 systemic acquire resistance (SAR) 是非常重要的研究領域，這是屬於全株植物系統性的抗病機制。SAR 是使用可移動訊息分子 (mobile molecule)，當病原菌感染後，這些訊息分子會運送到其他植物組織，增加抗病能力。目前最重要的兩種訊息分子是 salicylic acid (SA, 水楊酸, 柳酸) 和 jasmonic acid (JA, 茉莉酸)。SA 是 PAL 的下游產物，抗病植物中 SA 在沒有病原存在下也有非常高的累積量。

另外在植物中過氧化氫 (H_2O_2) 是極為重要的 AOS (active oxygen species)。 H_2O_2 本身當為訊息分子 (signal molecule)，一般認為 H_2O_2 是造成防禦基因活化的訊息 (Bolwell, 1999)。 H_2O_2 受 H_2O_2 所誘導是非常重要的，因為 PAL 是 SA 生合成的第一個酵素 (Dong, 1998)。藉由提高 H_2O_2 的量，來使得水楊酸鹽作用，放大外來刺激的訊息。植物訊息傳導 (signal transduction) 在近十年間，成為非常熱門的研究領域，其中 MAPK (mitogen activate protein kinase) cascade 在植物防禦訊息上扮演了非常重要的角色。受到病原菌感染或逆境活化此 cascade 後，經過一連串磷酸化與去磷酸化反應來放大訊號強度，活化下游防禦基因，使得 HR (hypersensitive response) 細胞死亡以及系統性防禦機制啟動，來達到防禦的最終目標。

1.7.3 植物生長調節劑

植物生長調節劑 (plant growth regulators) 對植物體內 PAL 活性影響機制至今仍未明瞭。在組織培養環境下，減少內生性 auxin 與增加內生性 cytokinin 會造成 PAL 活性在數日內增加。暗培養之菜豆癒創組織 (callus) 在固體培養基含有 2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)，繼代培養到含有 1 mg/L 1-naphthylacetic acid (NAA) 與 0.2 mg/L kinetin 培養基六天後，隨著發育，增加 PAL 活性；在光照培養之菜豆懸浮細胞也可以觀察到類似的反應。濃度 1 mg/L NAA 處理兩天會增加 PAL 活性，kinetin 直到活性增加前 24 小時都是不需要的；2 mg/L NAA 會對 PAL 誘導產生抑制效果，會因為 kinetin 濃度增加而被克服，光照培養之菜豆懸浮細胞在低濃度 auxin 處理下會增加 PAL 比活性。這樣的結果顯示：auxin 和 cytokinin 會在不同階段影響 PAL 活性。

光照培養之菜豆懸浮細胞加入適量轉錄及轉譯之抑制劑，來研究當細胞在增加 cytokinin 及減少 auxin 濃度時之反應。發現 PAL 活性增加現象被抑制了，顯示轉錄及轉譯都有牽涉到 PAL 活性。當 PAL 活性下降期，會被轉錄抑制劑 actinomycin D 所大量誘導，但是並不會受到轉譯抑制劑 propanemide 衍生物影響，PAL-mRNA 是此反應之重要調節因子。荷蘭芹懸浮培養細胞在生長曲線之 stationary phase 用盡培養基中之氮源時，PAL 活性受光照誘導最為明顯。吉貝素 (gibberellic acid, GA) 和離層酸 (abscisic acid, ABA) 也會對 PAL 活性有影響。菜豆癒創組織在低 auxin 與高 cytokinin 濃度下會誘導 PAL 活性，此現象會被 ABA 抑制，GA 會延遲此現象。豌豆與其他植物發現 GA 會促進 PAL 活性與木質化現象 (lignification) 的發生；菠菜懸浮細胞 GA₃ 會抑制 PAL 活性。

1.7.4 產物調控

許多實驗證明 cinnamate 與 hydroxycinnamate 衍生物會影響 PAL 之反應。利用核苷酸與蛋白質抑制劑來研究 PAL 活性受光照與內生性 cinnamate 與 *p*-coumarate 之調控。光照似乎會刺激 PAL-mRNA 之轉錄，而後轉錄影響較為快速，也許 cinnamate 會影響到 PAL-mRNA 之轉譯現象。切除豌豆表皮組織會造成短暫 PAL 活性上升，內生性之中間代謝產物會快速減少酵素活性。研究指出 cinnamate 會同時抑制酵素之重新合成與刺激移除已經存在之酵素。這種雙重影響不能歸因於 cinnamate 之細胞毒性，因為 acid phosphatase 在實驗中並沒有受到影響，cinnamate 可能是影響在後轉錄層次。

PAL 之生合成與被移除之速率會受到 cinnamate 的調節，在 *in vivo* 形況下可以用 D-phenylalanine 與 L- α -amino-oxy- β -phenylpropanoid acid (L-AOPP) 之影響來解釋。L-AOPP 為 PAL 之競爭型抑制劑，會抑制內生性 cinnamate 之生成，破壞產物回饋作用，會限制酵素之合成與促進降解。當加入 L-AOPP 會造成 PAL 重新合成，當經過 L-AOPP 處理後會促進 PAL 活性明顯上升且累積 phenylalanine。然而部分組織對內生性 L-AOPP 或 cinnamate 沒有反應，準確測定 PAL 活性需要將 L-AOPP 與 PAL 確實地分離，才不會造成假象。在部份植物如大豆或菜豆，L-AOPP 可能會與 PAL 緊密結合，即使經過透析也無法測定準確之 PAL 活性。

1.8 磷酸化與後轉譯修飾

PAL 是病原菌防禦、逆境反應與二級代謝的關鍵酵素。原本以為二級代謝酵素一般只會在 general phenylpropanoid pathway 以及代謝路徑分支位置 (branching site) 進行調控。近年來發現 PAL 會受到後轉譯磷酸化 (posttranslational phosphorylation) 作用的影響，這也是二級代謝中第一個發現有共價性的調控之酵素。針對目標蛋白以 kinase 或 phosphatase 進行磷酸化與去

磷酸化的可逆反應，是真核生物廣泛存在的調控機制。為了強調這個現象的顯著性，需要去確認負責進行磷酸化的蛋白質激酶 (protein kinase) 並且瞭解調控的環節。AtCPK1 (CDPK, calcium-dependent protein kinase) 既可磷酸化重組的 PAL 蛋白質又可以對在植物體內可被磷酸化的胜肽 (peptide, SRVAKTRTLTTA) 進行磷酸化反應 (Chang *et al.*, 2001)。針對 PAL 重要的磷酸化現象，確認此專一 CDPK 為 PAL 蛋白質激酶，也開啓了鈣離子連結到生物性逆境的訊息傳導與水楊酸、植物殺菌素產生的探討。在受刺激的細胞中可以部分純化出 Ca^{2+} -stimulated protein kinase，分子量約為 55 kD。

PAL kinase 是 ser/thr kinase，磷酸化位置已經被確認是 threonine，磷酸化後會降低 V_{\max} 並且可能造成次單元體 (subunit) 的降解，PAL 的降解路徑會有 70、53、4 kD 的中間產物被觀察到。菜豆 PAL 蛋白質磷酸化位置應為 Thr⁵⁴⁵，附近序列為 VAKRTLTT (539~546)。當菜豆受到刺激後，PAL mRNA 量會迅速提高，經過轉譯後，蛋白質的去活性與轉錄量的回饋調控，可能是因為 phenylpropanoids 量來進行控制。CDPKs 為具有 calmodulin-like domain 之蛋白質激酶，在蛋白質 N-端為 kinase 催化區，C-端有 calmodulin-like domain，具有四個 EF-hand 之 calcium 結合區，與鈣離子有高親和力，磷酸化之保守序列為 R/K-X-X-S/T。PAL 為植物二級代謝關鍵酵素，已知經過 elicitor 處理之菜豆懸浮細胞會受到磷酸化調控 (Bolwell, 1992)。目前為止，在植物二級代謝中，此蛋白質激酶是第一個被證明藉由共價鍵的磷酸化作用來調控酵素活性，然而磷酸化可能還具有其他功能。PAL 經磷酸化後，經由放射線標定追蹤，約有 20% PAL subunits 會在細胞膜上被發現。這也代表磷酸化與去磷酸化可能調控 PAL 往膜上運輸。在不同的物種中 PAL 磷酸化位置有保守性，因此 PAL 磷酸化作用可能是高等植物中廣泛存在的調控機制。

1.9 實驗緣起

綠竹筍 (*Bambusa oldhamii* Munro) 適宜種植在海拔 500 公尺以下砂質壤土或壤質砂土之土壤，台灣各地均有零星栽培，在北部地區最大栽培地區為台北縣五股鄉。綠竹筍是國內夏季生產的重要蔬菜之一，其生長一般為 4 月至 9 月，而南部由於地理環境影響，會比北部早大約 2 週到 1 個月上市，而 6 月至 8 月為颱風季節，綠竹筍因為生長於地下，根莖堅實，颱風災害較少；但是竹筍幼嫩的生長組織，在採收後旺盛的生理變化，使其品質極易發生劣質，如褐化、纖維化或木質化，嚴重影響竹筍的品質與價值，因此筍農會將剛採收的竹筍泡於水中、冷藏或是以開水殺青的方式來降低劣質程度。Neish (1964) 就發現 PAL 與木質素合成有關，有研究發現 PAL 活性的上升與細胞壁木質化有關，且此酵素活性在蘆筍嫩莖中以基部的含量最高，然後越往頂端部分酵素活性有遞減的現象。除此之外，在儲藏期間蘆筍嫩莖中 PAL 活性會隨著時間而上升。儲存的時間和

溫度對木質化有密切的關係，且實驗證明將蘆筍放在水中可以抑制木質化現象。

綠竹多以地下根莖進行無性繁殖，繁殖以分株、竹稈扦插為主。竹之花期不穩定，數十年才開一次花，且結實率低及種子發芽不易，開花後常伴隨著植株死亡。竹為自我保護 (selfish) 之植物，以群落 (community) 方式進行繁殖，一般竹林中不易有其他植物生長，可能原因為：竹子生長旺盛，對養分吸收能力強；竹林一但茂密會遮蔽陽光，造成底下植物無法進行光合作用；另外竹會分泌 phenolics 類化合物等相剋物質 (allelopathic agent)，對其他植物造成毒害。一般生物選擇無性繁殖的最主要原因是躲避天敵。以植物而言，開花結果需要消耗許多能量，而且易受到天敵攻擊，竹選擇以地下根莖繁殖的原因可能也是為了躲避天敵，數十年才開花結果一次，使得天敵無法攝食。然而用進廢退，長久演化下來選擇了無性繁殖，連帶地也將有性繁殖能力幾乎都喪失了。竹子生長旺盛，植物荷爾蒙含量高，尤其是 cytokinins 的含量高，並有實驗證實竹筍含量豐富之 tRNA 具有 cytokinesis 活性，其活性當量 (activity equivalent) 高達 $1.8 \mu\text{g kinetin}/\text{mg}$ (Lee *et al.*, 1970)，也是雨後春筍的主因；而 cytokinin 也是植物延遲老化的重要因素之一。中國人以松、竹、梅當作歲寒三友，另有松竹常青這個成語，代表終年常綠，同時也代表竹之老化現象並不明顯。竹子一但開花常常會伴隨著全植株死亡，目前仍不知其真正原因，但是可以推測的是植物荷爾蒙一定扮演重要角色，當植物體內荷爾蒙比例改變，來當作老化的訊息，使全植株或整個群落同時老化甚至死亡。

竹筍，由於澱粉含量低，因此質地脆硬，而久煮不爛；且炊熟後不油膩，除因竹筍 Lipid 含量低之外，並散發出具有清香口感的天然物—Phenolics(其中最主要的是 *p*-Hydroxybenzoic acid)所致。台大農化系生化研究室蘇教授在七十年代起就使用綠竹筍當作實驗材料，進行竹細胞壁構成分及竹筍與醣代謝相關酵素之研究 (Su, 1965; Sung, *et al.*, 1971)，也曾經嘗試進行組織培養；先前研究發現，在進行綠竹組織培養時，可以觀察到 callus 生長，但是無法長久保存 callus 與進行懸浮細胞 (suspension cell) 培養，褐化 (browning) 或黑化的發生是實驗最大之干擾因素；造成此褐化現象之主要原因為 phenolics 累積，phenolics 為木質素之前驅物 (Su, unpublished data)，為二級代謝衍生物。然而 PAL 為二級代謝關鍵酵素，抑制 PAL 活性，可能可以減緩褐化程度。研究 PAL 活性變化與褐化發生之關係，可能有助於克服懸浮細胞誘導時所遇到之困難。

為了防止採收後的綠竹筍生理代謝依舊旺盛且迅速，會造成快速劣變，包括木質化、纖維化等，使其品質和價值受到影響。本實驗將綠竹分成竹筍 (bamboo shoot)、竹葉 (bamboo leaf) 以及竹籜 (bamboo shell)，來分別探討 PAL 的生化性質以及對綠竹木質化的重要性。其中竹籜為介於竹筍與竹葉之部位，從未出土到出土過程間，會開始受到光照影響，進行光合作用，伴隨著葉綠體的發育，因

此推測竹籜 PAL 之生化性質會介於竹筍與竹葉 PAL 之間。爲了防止採收後的綠竹筍因快速劣變，使其品質和價值受到影響，本研究計畫，將分離並純化出綠竹筍的 PAL 或其 isoforms，來研究 PAL 的生化學特性；以及 PAL 對綠竹筍木質化的關連性；並以純化的酶蛋白製備專一性抗體，同以測定未採收及採收後，不同部位和不同儲藏條件，及不同儲藏時間與溫度下 PAL 的活性。此外，擬藉由本實驗所得酶蛋白資料，比較不同高等植物已發表的 pal cDNA 與序列分析，進行竹筍 pal-cDNA 及基因庫的建構與選殖；研究竹筍 pal 基因結構與調控；利用 Southern、Northern blotting 與 Western blotting 技術，比較綠竹筍中 pal gene 表現；以及 pal 基因表現調節機制。除進行綠竹 PAL 之

2.3 苯丙氨酸脫氨裂解酶活性分析法 蛋白生化學，及其基因之分子生物學之基礎研究外，期能以植物生化代謝的觀念，探討較實用的物理或化學方法降低竹筍 PAL 表現，延緩竹筍因 PAL 所導致之褐變、木質化(老化)，而使品質劣變，達到保鮮目的，以增加農民收益爲目的。

第二章 材料與方法

2.1 材料

綠竹 (*Bambusa oldhamii*)：樣本採集自台北縣五股鄉與台北市文山區筍農之竹林。採收後要清洗乾淨後，低溫保存運回實驗室，先以液態氮 (liquid nitrogen, N₂) 處理以保持低溫。運回實驗室後，立刻處理竹筍，將竹筍剝殼，依照所需不同的部位，分別儲存於 -20°C 及 -80°C 冰箱。葉子的樣本爲了新鮮，一般都是要現採現處理，無法在冰箱中長久的儲存。

2.2 蛋白質定量法

將牛血清蛋白 (bovine serum albumin) 標準液 (200 µg/mL) 分別配成各種不同濃度之牛血清白蛋白標準液。取 50 µL BSA 標準液或樣品液加入 ELISA 微量滴定盤中。加入 200 µL 染料結合試劑，混合均勻後，在室溫下靜置反應 5 分鐘，測 570 nm 吸光值。以不同濃度之牛血清白蛋白標準液及其吸光值，繪製用來定量蛋白質的標準曲線，以定量樣品液中的總蛋白質量。

於微量管中，加入 50 µL 之適當濃度酵素液。加入 950 µL 混合後之基質液，最終之 L-phenylalanine 濃度爲 12.1 mM，加蓋後於 37°C 下，反應 30 分鐘。加入 100 µL 6 N HCl，終止反應。以分光光度計 (Hitachi U-1100) 用石英材質之測光管測定 290 nm 吸光值變化。以 12.1 mM D-phenylalanine(已證明 PAL 對

D-phe 無反應) 作空白對照組 (blank)。

2.4. 電泳檢定系統

2.4.1 原態膠體電泳 (native-PAGE)

樣品與追蹤染料以 5:1 的比例混合，將10~20 μL 之樣品注入槽中。以 120 伏特進行電泳，當追蹤染料通過聚焦膠體進入分離膠體時，將電壓改成 150 伏特，追蹤染料跑出膠體後，即可停止電泳。在4°C冷房中進行電泳以保持酵素活性。電泳後進行膠體染色、活性染色及免疫轉印等實驗。

2.4.2 SDS-膠體電泳 (SDS-PAGE)

電泳前樣品需加入同體積的 SDS 膠體電泳樣品緩衝液。以 100°C 水浴加熱 10 分鐘。鑄膠、電泳、染色、脫色等步驟同 2.4.1 原態膠體電泳，但電泳緩衝液中需含 0.1% SDS。

2.4.3 膠體染色法

2.4.3.1 CBR 蛋白質染色法

將膠片放入染缸中，倒入 CBR 染色液。在旋轉器上輕搖約 20~30 分鐘後，倒出染色液 (含 10% 冰醋酸及 20% 甲醇)。以一次水洗過後，再加入脫色液進行脫色，直至背景透明為止。

2.4.3.2 醣蛋白質染色法 (過碘酸-硝酸銀法)

電泳後，膠片以固定液A(10% 醋酸及25%異丙醇的混合液體)固定過夜。隔日改以固定液B(7.5% 醋酸溶液)浸泡30分鐘。倒去固定液 B，加入過碘酸溶液於4°C反應1小時。以水洗 3-5 次。加入硝酸銀溶液，反應10分鐘。倒去硝酸銀溶液，用水洗3~5次，每次10分鐘。加入還原液乙(0.05% citric acid, 0.1%甲醛, 15% 甲醇)，開始呈色，觀察 negative control (BSA) 的蛋白質是否呈色，在其未呈色前倒去還原液乙。用水洗過膠片後，馬上加入反應中止液(0.05% citric acid, 0.001% ethylenediamine)中止呈色。1 小時後，即可進行膠片乾燥。

2.5 苯丙胺酸裂解酶的純化

2.5.1 粗抽及硫酸銨分劃

取約50-100 g之樣品，在冷房中操作，用液氮研磨成細粉末。加入 200-400 mL 之萃取液，以四層紗布過濾，將濾液離心30分鐘。取上清液，於冰浴下緩慢加入 0.5 %魚精蛋白硫酸鹽(protamine sulfate, Sigma, P-4380)，攪拌均勻，持續攪拌平衡 30 分鐘，離心 30 分鐘。取上清液，於冰浴下緩慢加入硫酸銨，直到 40% 飽

和度，持續攪拌平衡30分鐘，離心30分鐘。取上清液，於冰浴下繼續加入硫酸銨直到 60% 飽和度，攪拌平衡30分鐘，離心30分鐘。取沉澱，以少量緩衝液A(50 mM Tris – HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA • 2Na)溶之，對5000 mL緩衝液A透析，至少換三次緩衝液A。隔日取透析液，離心30分鐘(Hitachi RPR20,10,000 rpm)取上清液進行下一步純化。

2.5.2 膠體過濾管柱層析

在冷房中，將平衡後適量之Sephacryl S-200膠體與緩衝液A(50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA)在燒杯中混合均勻，將燒杯中的膠體攪拌均勻，沿著管柱緩緩倒入膠體。以緩衝液A連續流洗(30 mL/hr)，一般需要 2~5 倍膠體體積平衡。取適量樣品，離心30分鐘去沉澱。然後關掉幫浦將輸送管從緩衝液A中取出，插入樣品中，以30 mL/hr方式注入層析管柱中。樣品之溶離(elution)：當樣品注入完全後，關幫浦並將輸送管改接入1,000 mL 溶離緩衝液。溶離流速約30 mL/hr，並以分劃收集器收集每管5.0 mL。當溶離完後以1.0 M NaCl 流洗，將其餘蛋白流洗下來。當溶離完成後以ELISA reader偵測每一分劃的蛋白質濃度及活性測定A₂₉₀。收集具PAL活性部份，以限外過濾(Amicon, YM-10)濃縮，進行下一步純化。

2.5.3 疏水性作用管柱層析(Phenyl-Sepharose)

Phenyl- Sepharose 膠體以緩衝液B連續流洗至pH值及離子強度不變為止。取前一步適量樣品，離心30分鐘去沉澱。注入樣品保持正常流速(60 mL/hr)，並進行分劃收集(5 mL/tube)。注入樣品完畢後，以2~5倍管柱體積之緩衝液B，流洗至沒有蛋白質流出後，行直線梯度溶離，高限緩衝液為緩衝液B (125 mL)，低限緩衝液為酵素緩衝液A(125 mL)。溶離速度約為60 mL/hr，並以分劃收集器每管收集5 mL。當鹽濃度梯度跑完之後，又補充酵素緩衝液A到mixer中，將其餘未溶離的蛋白質沖下來。當溶離完成後以ELISA reader偵測每一分劃的蛋白質濃度，及活性測定吸光值。收集具 PAL 活性部份，離心濃縮至 5~10 mL，置於-20°C冰箱中保存，待下一步純化。

2.5.4 陰離子交換層析

DEAE Sepharose 膠體同膠體過濾法。以緩衝液A連續流洗至 pH 值及離子強度不變為止。取適量樣品，離心30分鐘去沉澱。然後關掉幫浦將輸送管從緩衝液A中取出，插入樣品中，以30 mL/hr方式注入層析管柱中，小心不要有氣泡。當樣品注入後，關幫浦並將輸送管改接入緩衝液A。溶離流速約為50 mL/hr，並以分劃收集器收集每管5 mL行直線梯度溶離。梯度由0到0.5 M NaCl，當溶離完後以含有1.0 M NaCl 緩衝液流洗，將其餘蛋白流洗下來。當溶離完成後以

ELISA reader 偵測每一分劃的蛋白質濃度及測定酵素活性變化。收集具PAL活性部份，以限外過濾(Amicon, YM-10)濃縮，進行下一步純化。

2.5.5 快速蛋白質液相管柱 (FPLC) 層析

以Mono Q HR 5/5 (50 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.5) 的，以緩衝液A流洗平衡2~3小時(流速 0.5 mL/min)。樣品先離心10分鐘 (Hitachi RPR20, 10,000 rpm)去沉澱。取1~2 mL樣品注入樣品環 (sample loop)。執行程式，以 0~100% 溶離緩衝液(50 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.5, 1 M NaCl)梯度溶離。每個分劃管收集0.5 mL 溶離液，共收31管。當溶離完成後，立刻取下放入冰中保存。以ELISA reader偵測每一分劃(0.5 mL)的蛋白質，及活性測定290 nm 吸光值，收集具PAL活性部份，進行下一步分析。

2.6.1 N-端定序

2.6. 蛋白質胺酸定序分析

取部分樣本，進行 native-PAGE 或 SDS-PAGE 分析，在電泳上層緩衝液加入 2 mM thioglycolic acid，去除自由基。將膠片浸在轉印緩衝液中平衡 30 分鐘。將轉印膜浸入 100%甲醇中 1-3 秒。再以轉印緩衝液平衡 15 min。取出轉印膜，以 1/5 濃度的 CBR 染液短暫染 1 分鐘，或等到色帶出現時，即以 50%甲醇脫去背景值；若蛋白質濃度低，脫色時間須較久，若背景顏色太深，可用 100% 甲醇脫色。染色脫色後，將轉印膜放入二次水中清洗，再放入烘箱中乾燥。將轉印膜上的目標蛋白質色帶切下，以封口袋保存送定序。

2.6.2 Q-TOF (ESI-MS-MS)

將欲檢視的蛋白質從已染色的聚丙烯醯胺膠體切下。利用解剖刀將膠體切成約 1 mm² 的顆粒，裝入 1.5 mL 的微量管內。加入 100 μL 的 25 mM ammonium bicarbonate/50% acetonitrile，以 vortex 振盪 10 分鐘。利用 gel-loading pipette tips 將溶液部分移除並且丟棄。重複清洗、脫水步驟三次。使用離心真空乾燥機 30 分鐘，使膠片顆粒乾燥成白色顆粒。加入 10 mM DTT 溶液，使之足以淹沒整個膠片顆粒，在 56°C 下還原 1 小時。將溫度降至室溫並移除 DTT 溶液，這時所有 CBR 染劑顏色都應該被去除；之後加入相同體積之 55 mM iodoacetamide。在室溫下反應 45 分鐘，避光並不時振盪。亦可加入 2% vinylpyridine 來取代 iodoacetamide 的功能。清洗膠片薄片以 100 μL 之 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.0)，反應 10 分鐘，並振盪，之後使用約 100 μL 之 25 mM ammonium bicarbonate/50% acetonitrile 脫水。重複水合與脫水的動作至少三次。將水相移除，用離心真空乾燥機乾燥。再將膠體顆粒以一倍體積 0.5-0.1 mg/mL trypsin 溶液進行水合，並 vortex 5 分鐘。在 37°C 下反應 12-16 小時。回收 peptides 加入 2 倍體積的水並且 vortex 5 分鐘，然後超音波震盪 5 分鐘。使用 gel-loading tip

將 peptide 溶液移到新的微量管。利用 2 倍體積的 5% formic acid/50% acetonitrile 再進行兩次萃取。將收集到的 peptide 溶液濃縮，使用離心真空乾燥機來將總體積降到約 10 μL 。以 5% formic acid /50% acetonitrile 將體積調整到 25 μL 。將收集到的 peptide 溶液儲存在 -20 冰箱，等待 Q-TOF-MS 使用。

2.7 蛋白質電泳轉印法

將4°C冷卻系統將轉印緩衝液(10 mM CAPS, pH11)倒入轉印槽內，並攪拌使溫度均勻。電泳後的膠片在轉印緩衝液約15 min 平衡。將轉印膜裁成略大於膠片的方形，以少許甲醇浸溼數秒鐘，再置入轉印槽中的緩衝液10 min後使用。另取兩張濾紙，以及兩片方形海綿墊放在轉印槽的緩衝液中備用。取出轉印夾打開平放，先墊一張方形海綿墊，舖上一張溼濾紙，小心疊上已潤溼的轉印紙，其間勿陷入氣泡；轉印紙再滴上數滴緩衝液後，小心平舖膠片上去，加蓋一層濾紙，及另一張海綿，也都不可陷入氣泡，即可把整個轉印三明治卡夾裝好。將轉印三明治置入已經放有一半轉印緩衝液的轉印槽中，注意有轉印膜的那一面向正極 (紅色)，膠片那面向負極 (黑色)。接好電源以400 mA 開始轉印，1.5 h 後中止。轉印後的膠片可繼續進行 CBR染色，看有無蛋白質殘留。若電泳時加有藍色標準蛋白質 marker (SeeBlue)，則可在轉印紙上看到藍色的色帶，確定轉印成功，並可評估轉印效率。轉印紙浸在約15 mL尿素洗液中浸洗過夜，期間換三次尿素洗液並溫和搖盪之。

2.8 免疫染色法

尿素浸洗過夜的轉印膜置於塑膠容器中，再以10 mL PBST (phosphate buffered saline & Tween)洗三次，每次約10 min，以下的步驟均在此容器中進行。加入明膠-NET (0.25% gelatin, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween, 5 mM EDTA \cdot 2Na, 50 mM Tris)溶液置室溫中反應1 h。倒出明膠，加入一次抗體溶液，置室溫反應1 h。反應後以PBST洗三次，每次10 min。改用二次抗體連結體溶液反應，在室溫下反應1 h。以 PBST 洗四至五次，每次10 min。以 PBS 洗二次，每次10 min。加入 DAB (diaminobenzidine) 基質溶液約10 mL呈色，儘量避光，並不時搖動呈色液。數分鐘內可呈色，在背景加深前倒去 DAB，以水沖數次後晾乾。

2.9 分子量測定

2.9.1 Superose 6 和 Superose 12 (FPLC) 膠體過濾層析

以緩衝液流洗(50 mM Tris buffer, pH 7.5)平衡2~3小時(流速0.3 mL/min)。取100 μL 樣品注入樣品環(sample loop)，以流速 0.3 mL/min 流洗。當流洗完後，以

ELISA reader偵測每一分劃(0.3 mL)的蛋白質及酵素活性。另外以100 μ L標準蛋白組製作分子量對數值的校正曲線，算出酵素分子量。

2.9.2 SDS-PAGE

酵素經由SDS-PAGE電泳分離後，算出其相對移動距離(Rf)值，利用標準蛋白質的相對移動距離值和其分子量對數值求出標準曲線後，算出酵素單元體分子量。

2.10 酵素生化性質

2.10.1 酵素反應最適 pH 值

以不同pH值緩衝液配製基質液(Universal buffer, pH 3-10)，將酵素和不同pH 值基質液混合，於 37°C 下反應30分鐘。加入100 μ L 6 N HCl 終止反應，測量A₂₉₀。

2.10.2 最適反應溫度

將酵素與基質液混合後，分別置於不同溫度下反應 30 分鐘，測量酵素活性的變化。

2.10.3 活化能 (Activation energy, Ea)

先以 $\log k_{cat}$ (turnover number)對1/T(絕度溫度)作圖，再利用Arrhenius equation： $\log k_{cat} = (-E_a/2.303R) \cdot d(1/T)$ ，求活化能 Ea；在實際計算時，使用 \log initial velocity 對 1/T 作圖。

2.10.4 熱安性

將酵素分別置於不同溫度下保溫 5、10、15、30、45、60 分鐘後，立刻移入 0°C 冰浴 5 分鐘，再加入基質液，於 37°C 下反應30分鐘，測量酵素活性的變化。

2.10.5 Km 值

以不同濃度的L-phenylalanine為基質，測定PAL催化反應之反應速率。測得之酵素反應速率與phenylalanine 濃度作成雙倒數圖，由線性迴歸方程式求Km 值。

2.10.6 金屬離子對活性影響

選用 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 及 Co^{2+} 來探討金屬離子對 PAL 活性的影響。

2.10.7 二級代謝物對活性影響

利用 PAL 的代謝衍生物，觀察活性變化。原則上，二級代謝物一般帶有苯環，

可以當作產物的回饋抑制，亦可當成反應時基質的類似物。依照實驗需要，配製成不同濃度之酵素基質液：*o*-coumaric acid, *m*-coumaric acid, *p*-coumaric acid, *trans*-cinnamic acid, ferulic acid, *p*-amino-benzonic acid, caffeic acid, tannic acid.

2.10.8 基質專一性

使用 L-phenylalanine 結構類似物，包括 D-phenylalanine、L-tyrosine 及 L-tryptophan 為基質，測定 PAL 活性。

2.10.9 化學修飾物對活性影響

選用以下幾種蛋白質化學修飾劑來探討 PAL 活性會因為何種胺酸被修飾而有所改變。依照實驗需要，配製成不同濃度之酵素基質液： β -Mercaptoethanol, DTT, PMSF, DEPC, Vinylpyridine.

2.11 綠竹中 PAL 基因的選殖

2.11.1 植物材料

使用綠竹筍 (*Bambusa oldhamii*) 之 cDNA 基因庫 (林, 2001) 及染色體 DNA 基因庫 (邱, 2000)

2.11.2 載體

Lambda ZAP II: 綠竹筍 cDNA 基因庫構築時所採用的噬菌體載體，可利用大腸桿菌 XL1-Blue MRF' 菌株作為宿主，進行重組噬菌體的放大與增殖。

pBluescript SK(-): Lambda ZAP II 載體經由胞內裁切後所得到的載體，作為 cDNA 保存與定序之載體。

2.11.3 菌種

XL1-Blue MRF' 品系: Lambda ZAP II 保存之宿主菌。

SOLR 品系: Lambda ZAP II 載體經由胞內裁切後所得到的載體保存菌。

MRA 品系: Genomic DNA 庫篩選用宿主菌。

2.11.4 培養基

LB medium (Luria-Bertani medium), LB-Ampicillin Agar (LB/amp plate), LB-Tetracycline Agar, LB-Kanamycine Agar, LB Top Agar, NZY Agar, NZY Top Agar

2.11.5 實驗藥品

SM buffer: 保存噬菌體於宿主外環境使用。20X SSC and 10% SDS: 製備 2X 與

0.5X wash buffer。10 mM MgCl₂ buffer: 用以稀釋 XL1-Blue MRF' 菌體。NBT/BCIP substrate solution: 用於呈色反應。Hybridization buffer: 用於雜合反應。Blocking reagent: 減少非專一性結合反應。Detection buffer: 呈色反應前平衡用。

2.11.6 PAL 專一性探針製備

針對甘藷、玉米、萵苣等植物的 phenylalanine ammonia lyase 之 cDNA 序列進行排列比對，選取數段具高度保留區來設計 degenerate primer，將不同 degenerate primer 以分別配對方式進行 degenerate PCR，將得到的 DNA 片段進行長度預測與判斷，經由將第一次得到的 PCR 產物稀釋後作為模版，再利用 nested PCR 確認第一次 PCR 所得產物的正確性。

PCR 反應條件如下:

94 °C	5 min	1 次循環	} 40 次循環
95 °C	45 sec		
52 °C	45 sec		
72 °C	1 min		
72 °C	7 min	1 次循環	

反應完成後，以膠體純化系統進行 PCR 產物純化，純化後的 PCR 產物直接以 T-A clone 的方式接入 pGEM-T 載體，轉殖於 competent cell 並進行定序；定序後所得之 DNA 序列進行網路核酸資料庫的比對工作，確認該序列與其他物種 PAL 基因極為相似；該段 DNA 序列有 0.8 Kb，可作為我們的專一性探針，進行綠竹筍 cDNA 基因庫的篩選工作。探針標定方法乃利用 PCR 的方式將 DIG-labeled dNTP 嵌入所合成的 PCR 產物中，作為 PCR 模版 DNA 為 pGEM-T/PAL_{0.8kb}。

2.11.7 綠竹筍 cDNA 庫之篩選

2.11.7.1 溶菌斑的轉印

λ 噬菌體 cDNA 庫的感染力價經測試後約為 1×10^6 與 1×10^7 pfu 之間，取相當於力價 50000 pfu/plate 的 λ 噬菌體 cDNA 庫，與 600 μL、A₆₀₀ = 0.5 的 XL1-Blue MRF' 大腸桿菌細胞混合後，加入 6.5 ml NZY top agar (充分溶解並降溫為 48°C)，迅速倒入 NZY agar plate。等待 NZY top agar 凝固後放入 37°C 培養箱，培養 6~8 小時；8 小時後將 NZY agar plate 放於 4°C 冰箱保存 2 小時，(防止 top agar 沾黏到 nitrocellulose 薄膜上)；2 小時後將 NZY agar plate 由 4°C 冰箱取出，覆蓋上 nitrocellulose 薄膜 5 分鐘，並利用無菌針頭作出標記(使用打洞的方式，至少需要打 3 個洞以釐清方向)；將 nitrocellulose 薄膜浸泡於 1.5 M NaCl 與 0.5 M NaOH 的混合液中 10 分鐘，使 DNA 分子變性(denature)，放於濾紙上 15 分鐘使其風乾。將 nitrocellulose 薄膜浸泡於 1.5 M NaCl 與 0.5 M Tris-HCl (pH 8) 的

混合液中 10 分鐘，使 DNA 分子復性，放於濾紙 15 分鐘使其風乾。再將 nitrocellulose 薄膜浸泡於 2 x SSC buffer 中 10 分鐘，放於濾紙上 15 到 20 分鐘使其完全風乾。風乾後將 nitrocellulose 薄膜利用能量達 12,000 μJ 的 UV 光源照射約 2 到 3 次，使 DNA 分子與 nitro-cellulose 薄膜形成共價鍵結(crosslink)。並妥善保存 NZY agar plate 於 4°C，待雜合反應完成後進行正反應株確認與挑選的工作。

2.11.7.2 雜合反應

將轉印完成的 nitrocellulose 薄膜放入洗淨後的保鮮盒當中，加入 pre-hybridization buffer/blocking reagent 以進行預先雜合反應，於 60°C 下在恆溫反應箱中反應 8 小時以上。待 pre-hybridization 完成後，加入 DIG 標定完成後的 PAL 專一性探針進行雜合反應，反應溫度為 60°C，進行至少 16 小時。

2.11.7.3 呈色反應

待雜合反應完成後取出 nitrocellulose 薄膜，放入 2x SSC buffer 於室溫下清洗 10 分鐘，重複進行共兩次，隨即放入 0.5x SSC buffer 於 60°C 下清洗 10 分鐘，重複進行共兩次，取出 nitrocellulose 薄膜並滴乾洗液，放入 washing buffer 中平衡 2 分鐘，由 washing buffer 中取出 nitrocellulose 薄膜並稍微滴乾水分，放入 blocking solution 中 60 分鐘並在室溫下輕微搖晃；加入相對於 blocking solution 體積五千分之一(1/5000)的 anti-DIG antibody，室溫下反應 60 分並緩和的搖晃，使反應能完全且均勻。反應完成後將 nitrocellulose 薄膜取出並以 washing buffer 在室溫下潤洗 15 分鐘，共進行兩次；潤洗完成後將 nitrocellulose 薄膜取出，輕微瀝乾之後放入 detection buffer 中平衡約 5 分鐘，加入適量 substrate solution (NBT/BCIP)進行呈色反應，於 37°C 下極輕微的搖晃混合，於 3 小時後觀察情形。

2.11.7.4 挑選正反應之溶菌斑

將呈色後的 nitrocellulose 薄膜放入乾淨的塑膠袋中並固定之，再以色筆將正反應溶菌斑的位置上標示記號；取出 4°C 保存下的 NZY agar plate，對照於 nitrocellulose 薄膜的正確位置後，以 yellow tip 將該位置的溶菌斑挖下懸浮於 0.5 mL 的 SM-buffer 中，再次測定力價並進行第二次獲第三次的篩選，以挑選出正確的正反應溶菌斑。

2.11.7.5 λ 噬菌質體的胞外切除 (*in vitro excision*)

以 LB/maltose/MgSO₄ 培養 XL1-blue MRF' 品系大腸桿菌與 SOLR 品系之大腸桿菌；以 2000g 離心 1 分鐘後，去除 LB medium 而加入 10 mM MgSO₄ 水溶液將兩種品系的大腸桿菌細胞調整濃度達到 A₆₀₀ = 1.0；將大腸桿菌與 λ 噬菌體以下列比例混合於無菌塑膠試管中：200 μL 的 XL1-blue MRF' (濃度為 A₆₀₀ = 1.0)，

250 μL 的 λ 噬菌體(約包含 1×10^5 力價的噬菌體), 1 μL 的輔助噬菌體(ExAssist helper phage) (約包含 1×10^6 pfu/ μL)。混合後將無菌塑膠試管置於 37°C 下, 放置 15 分鐘;隨即加入 3.0 mL 的 LB medium, 放置於 37°C shaker 上搖晃 8 小時後, 將試管於 70°C 下放置 20 min, 離心 15 分鐘($1000 \times g$), 取上清液 100 μL 與 SOLR 品系大腸桿菌 200 μL (濃度為 $A_{600} = 1.0$)混合, 於 37°C 下放置 15 分鐘後, 取出 200 μL 塗抹接種於 LB/amp plate, 放置 37°C 下 16 小時以上;能在 LB/amp plate 上生長之大腸桿菌即為轉殖成功的菌體, 隨即進行大量培養, 分離質體 DNA 後進行 DNA 定序。

2.12 綠竹筍 PAL 的定序

將轉殖成功的 SOLR 品系大腸桿菌送定序;一共送出 8 個不同的正反應株, 第一次採用 T7 primer 定序, 將得到的結果進行網路資料庫比對, 若為 PAL 的部份序列, 則再用 T3 primer 定序, 可快速確認所篩選的 PAL 基因是否為包含全長的序列(包含 start codon 與 poly-A tail), 確認可能得到全長 PAL 基因後, 則由定序結果再設計專一性引子, 進行 5'-端或 3'-端的定序, 每次定序的結果約 600 個核苷酸序列, 以 PAL 基因的長度而言, 約需要定序 4 次才能得到全長的核酸序列。

2.13 染色體 DNA 庫之篩選

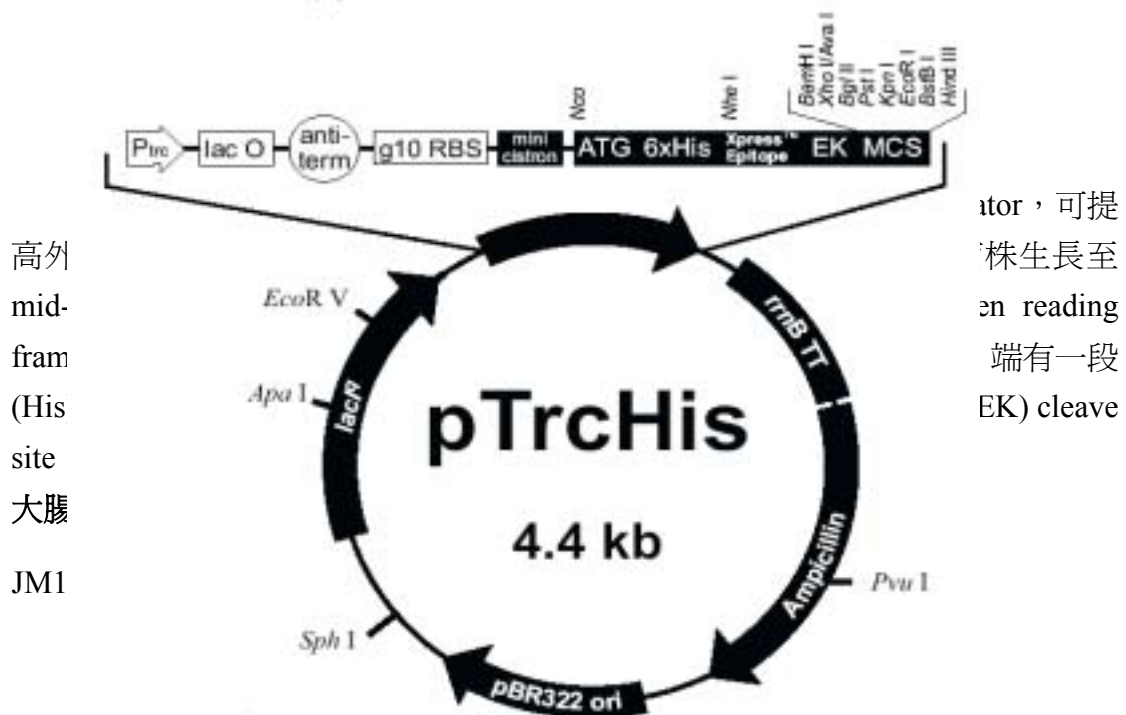
將含有約 5×10^4 pfu 之噬菌體溶液加入 600 μL 上述菌液, 置於 37°C 15 分鐘後, 加入以 50°C 預熱之 8~9 mL NZY top agar, 並快速倒入直徑為 15 cm 之 plate 中, 待其凝固後, 於 37°C 培養過夜, 使噬菌體之溶菌斑生長至全滿。隔日, 加入 6-9 mL SM buffer, 於室溫中緩慢震盪 3 小時, 使得噬菌體懸浮在 SM buffer 中。吸出 plate 上的噬菌體懸浮液, 加入 5% 體積的氯仿, 劇烈震盪後以 14,000 rpm 離心 10 分鐘, 取出上清, 加入 DNase 與 RNase 至濃度分別為 20 g/mL 與 8 g/mL, 於 37°C 下作用 30 分鐘。加入氯化鈉固體使濃度成爲 1 M, 混合溶解後置於冰上 1 小時, 此高鹽情況下可使噬菌體與宿主細菌分離。在 4°C 下以 11,000g, 離心 10 分鐘, 取上清液到乾淨離心管中。再加入 PEG 8000 使濃度為 10% (w/v) 用以沈澱噬菌體, 溶解後於室溫下放置 1 小時。 4°C 下以 11,000g 離心 10 分鐘, 沈澱物以 1-3 mL SM buffer 溶解。加入等體積之氯仿萃取 PEG 8000, 於 4°C 以 3,000g 離心 15 分鐘, 收集上清液, 並於 4°C 下以 25,000 rpm 之超高速離心 2 小時, 可得到半透明之噬菌體沈澱。半透明之噬菌體以 1-2 mL SM buffer 溶解, 於 4°C 下放置過夜以幫助回溶。隔日確定沈澱已完全回溶後, 加入 EDTA 至最終濃度為 20 mM, 加入 proteinase K 至最終濃度為 50g/mL, 再加入 SDS 至 0.5% (w/v), 混合均勻, 於 37°C 下反應 1 小時。在室溫下以等體積 PCI 萃取一

次，再用 CI 萃取一次，回收水層。加入 1/10 體積之 3 M sodium acetate (pH 7.0)，與 2 倍體積之酒精，於室溫下放置 30 分鐘，即可看到絲狀物出現，直接以 12,000 rpm 離心分鐘，沈澱再以 70% 酒精清洗，乾燥後，回溶於 40~50 mL 無菌水中，置於 -20°C 保存。

2.14 大腸桿菌之表現載體

PAL 1/pBluescript SK(-)、PAL 2/pBluescript SK(-)：為本實驗室保存綠竹 *PAL 1* 與 *PAL 2* 基因全長序列所用的質體。pTrcHisA：為表現載體，其上具有 *trc* promoter 可表現接於其下游之外源基因，圖譜如圖 2.2 所示，為 invitrogen 公司之產品。

A



Top10：為表現載體 pTrcHisA 之宿主，用於大量表現重組蛋白之菌株。

上述菌株之基因型 (genotype) 表示如下：

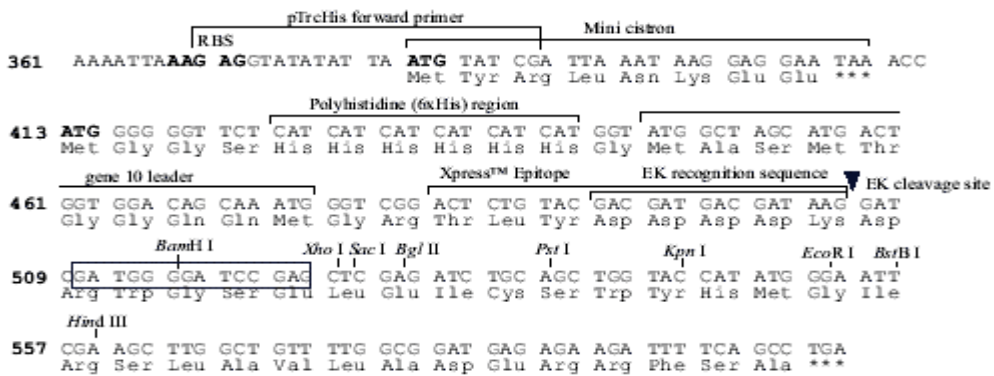
菌株	基因型
JM109	<i>e14-(McrA-)</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> (rK- mK+) <i>supE44</i> <i>relA1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F' <i>traD36</i> <i>proAB</i> <i>lacI^qZ</i> Δ M15
Top10	F-, <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> .M15 <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>

2.15 表現載體之建構

選用pTrcHisA載體系統(Invitrogene 公司之產品)作為苯丙胺酸脫氨裂解酶基因的表現載體，於大腸桿菌Top10中表現。建構表現系統時，以帶有限制酶切位 (*Bam*HI 與 *Eco*RI)的引子經聚合酶鏈鎖(polymerase chain reaction)反應產生大量 *PAL 1* 與 *PAL 2* DNA 片段，接著以限制酶 *Bam*H I 與 *Eco*R I 分別處理表現載體 pTrcHisA、*PAL 1* 與 *PAL 2* 序列，再將處理過的*PAL1*與*PAL2*分別與處理過的表現載體接和、轉形進入表現宿主大腸桿菌Top 10，最後以限制酶及定序分析所接入的序列無誤後，再進行重組蛋白最佳誘導條件之探討

2.15.1. 苯丙胺酸裂解酶基因接入表現載體

表現載體建構策略，設計四段分別包含*Bam*HI 與 *Eco*RI 限制酶切位的專一性引子 (圖 2.3)，利用PCR反應增殖放大出的*PAL 1* 與*PAL 2* 全長片段，以*Bam*HI 與 *Eco*RI 限制酶分別切割*PAL1*、*PAL2* 及 pTrcHisA，再將處理過的DNA片段分別接合(ligation)到pTrcHisA載體的His·Tag序列的下游，形成表現載體 pTrcHisA /*PAL1* 與 pTrcHisA /*PAL 2*，經誘導可產生在N 端具有連續6 個Histidine的 PAL 融合蛋白質。



For PAL1

BamHI

EcoRI

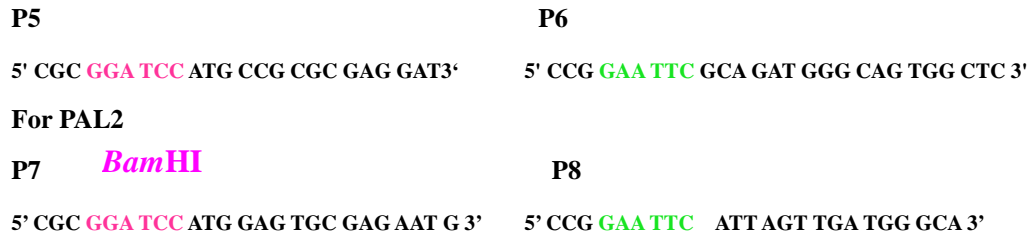
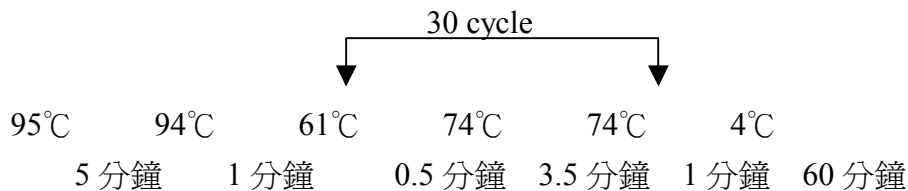


圖 2.3 含有限制酶切位的專一性引子與 pTrcHisA 部分載體

2.15.2 聚合酶鏈鎖反應

聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction, 簡稱 PCR)是利用 *pfu* DNA polymerase 之耐高溫及 PCR 溫度控制器, 在微量離心管中, 將 DNA template 高溫加熱打開雙股螺旋後, 兩個互補股末端接合上設計之 primers, 進行 n 次之反應就可得到 2^n 倍之 DNA, 於短時間內獲得大量欲增生之 DNA 片段。將離心管置入 PCR 溫度控制器中進行聚合鏈鎖反應, 其反應程式如下: 聚合酶鏈鎖反應完成後, 將離心管移置 4 °C 暫存或進行電泳分析。



2.15.3 質體 DNA 之小量分離

取 1.5 mL 菌液, 加於微量離心管中, 以 6,000 rpm 離心 2 min 後, 倒去上清, 以微量吸管頭儘可能吸去殘留液體。沉澱加入 0.1 mL MP I (25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH 8.0; 50 mM glucose), 劇烈震盪, 將沉澱完全打散。慢慢加入 0.2 mL MP II (0.2 N NaOH; 1% SDS; 使用前以 10 N NaOH, 10% SDS 稀釋混合配製), 蓋上管蓋後將管子反覆上下搖動, 注意不可震盪! 此時溶液應漸澄清且黏度增加; 將離心管置冰浴中。加入 0.15 mL MP III (3 M 醋酸鉀溶液, pH 5.2, 置冰浴中), 混合均勻, 亦不可劇烈震盪, 置冰浴中 5 min。以 12,000 rpm 離心 5 min。小心吸出上清至另一離心管, 加入 2 倍體積之純酒精 (或 0.6 倍體積之 isopropanol), 混合均勻, 置室溫 2 min。以 12,000 rpm 離心 10 min。倒去上清液, 沉澱以 70% 酒精洗二次, 每次各離心 1 min。沉澱以 SpeedVac 乾燥後, 以 30 μ L TE-8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0) 溶解。進行洋菜膠體電泳, 視色帶位置, 檢測 DNA 片段大小是否正確。

2.15.4 DNA 片段之分離純化

A. Gel Extraction Kit (Viogene)

將 PCR 產物進行洋菜膠體電泳。將 DNA 片段以小刀自洋菜膠體割下。秤膠體重量, 並加入膠體三倍體積之 Buffer GEX (100 mg 膠體視為 100 μ L)。置於 50 °C

水浴 10 分鐘至膠體完全溶解。可每隔 2-3 分鐘震盪。膠體完全溶解之後，將其加入 spin column，13,000 rpm 離心 1 分鐘。倒掉濾液，加入 500 μ L Buffer WF 至管柱中，13,000 rpm 離心 1 分鐘。倒掉濾液，加入 700 μ L Buffer WS 至管柱中，13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉濾液，再次 13,000 rpm 離心 1 分鐘。以 36 μ L 無菌水加入管柱中，室溫靜置 1 分鐘後，13,000 rpm 離心 1 分鐘將 DNA 流洗出來。反應完進行洋菜膠體電泳。檢測 DNA 片段大小是否正確。

B. PCR Clean-up Kit (viogene)

將限制酶切割後的產物加入 500 μ L Buffer PS，混合均勻。將溶液加入 spin column，13,000 rpm 離心 1 分鐘。倒掉濾液，加入 500 μ L Buffer WF 至管柱中，13,000 rpm 離心 1 分鐘。倒掉濾液，加入 700 μ L Buffer WS 至管柱中，13,000 rpm 離心 1 分鐘，倒掉濾液，再次 13,000 rpm 離心 1 分鐘。以 36 μ L 無菌水加入管柱中，室溫靜置 1 分鐘後，13,000 rpm 離心 1 分鐘將 DNA 流洗出來，收集濾液。反應完進行洋菜膠體電泳，視色帶位置，檢測 DNA 片段大小是否正確

2.15.5 質體與 DNA 片段之限制酶切割

質體 DNA (pTrcHisA vector) 1.0 μ L，加入限制酶 0.5 μ L *Bam*H I 及 0.5 μ L *Eco*R I，1.0 μ L 之 10 \times *Eco*R I Buffer，加水至總體積為 10 μ L，37 $^{\circ}$ C 下反應 1~2 小時。DNA 片段 (*PAL* 1 或 *PAL* 2) 10 μ L，加入限制酶 0.5 μ L *Bam*H I，0.5 μ L *Eco*R I，2 μ L 之 10 \times NE Buffer，加水至總體積為 20 μ L，37 $^{\circ}$ C 反應 1~2 小時。反應完後，以 Viogene PCR clean-up kit 純化 DNA 片段。

2.15.6 接合反應 (Ligation)

將分別經限制酶(*Bam*H I 與 *Eco*R I)切割的 pTrcHisA 與欲接入表現載體的 DNA 片段(*PAL* 1 與 *PAL* 2)，利用 T4 DNA ligase 連接起來，再度形成完整的表現質體。添加試劑至 1.5 mL 微量離心管：1 μ L pTrcHisA vector, 16 μ L insert DNA (*PAL* 1 or *PAL* 2), 1 μ L T4 DNA ligase, 2 μ L Ligation 10 \times buffer。12~14 $^{\circ}$ C 反應 16~20 小時。

2.15.7 Competent cell 製備

進行轉形實驗前 16~20 h，自 -70 $^{\circ}$ C 取出貯存的菌種，以劃單一菌落方式將菌株 Top10 接種在 SOB(2% Bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.5% Bacto agar)固體培養基上，在 37 $^{\circ}$ C 培養。取 40 mL SOB 培養基裝入 125 mL 已滅過菌之三角瓶。另取 1 mL SOB 加於微量離心管中。由 SOB 固體培養基上選 4~6 個約 2~3 mm 大小的單一菌落接入 1 mL SOB 中，震盪將菌體打散後，加入 40 mL SOB 中，直至 A_{600} 約 0.5~0.6。收集菌液於離心管中，置冰浴中 10~15 min。以 750~1,000 g 離心 12~15 min (4 $^{\circ}$ C)。倒去上清，並盡量將液

體倒乾，或以微量吸管頭吸乾淨。沉澱加入 1/3 菌液體積冰冷的 0.1 M CaCl₂，稍加震盪，混合均勻，置冰浴中 10~15 min。加入 1/25 菌液體積冰冷的 0.1 M CaCl₂，稍加震盪使混合均勻，competent cells 製備完成。

2.15.8 質體之轉形

將表現質體 DNA (<10 μL)先裝於微量離心管中，置冰浴中預冷，每管加入 200 μL competent cell，震盪混合後，置冰浴中 20~40 min。42°C 加熱 90 秒。置冰浴中 2 min。加入 800 μL SOC，混合後，於 37°C 震盪培養 30~60 min。將各管轉形液上下搖動混合均勻，取 20 μL 至另一離心管中，加入 180 μL SOC，混合均勻後，塗佈於 SOC/Amp plate。剩餘菌液以 6,000 rpm 離心 1 min，倒去上清，沉澱加入 200 μL SOC，均勻打散後塗抹在另一個 SOC/Amp plate 上。倒置培養皿於 37°C 培養 16~20 h 後，觀察各個 plate 上菌落的形狀並計算菌落數，抽取質體以限制酶及定序分析所建構的表現載體，確認 insert DNA。

2.16 表現蛋白之誘導

2.16.1 最適 IPTG 濃度與最適溫度探討

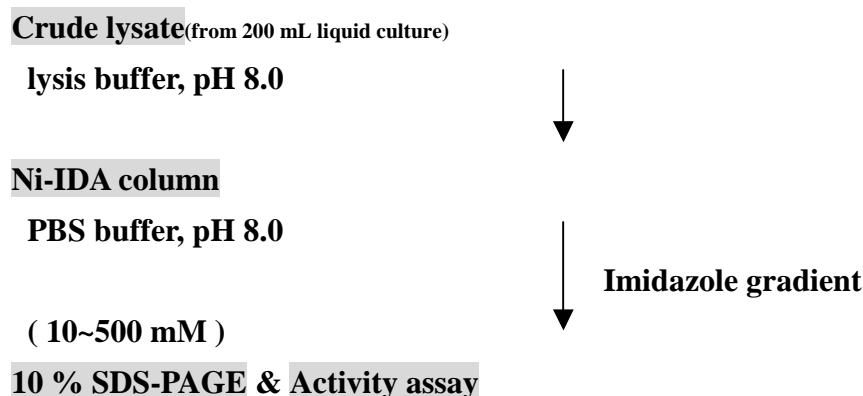
挑單一菌落培養於 3 mL LB medium(50μg / mL ampicillin)，37 °C 震盪培養過夜。隔天，取 100 μL 菌液加入 3 mL LB medium (50μg / mL ampicillin)，震盪培養至 A₆₀₀ 達到 0.6~0.8。加入不同量的 IPTG，使最終濃度分為 0、0.5、1、1.5、2 mM，誘導表現，以 120 rpm 震盪培養在 30°C、37°C 二種不同的溫度。誘導 4 h 後，收菌置於 4°C，以 8000 rpm 離心 15-20 min，倒去上清液，存於-80°C 中保存。以 10% SDS-PAGE 檢測誘導情形，並測活性。

2.16.2 最適時間探討

挑單一菌落培養於 3 mL LB medium(50 μg/mL ampicillin)，37°C 震盪培養過夜。隔天，取 100 μL 菌液加入 3 mL LB medium (50 μg/mL ampicillin)，置於 37°C，以 120 rpm 震盪培養至 A₆₀₀ 達到 0.6~0.8。加入 2 mM IPTG，置於 30°C，以 120 rpm 震盪培養，分別誘導 2、4、6、8、10、12 小時。收菌置於 4°C，以 8000 rpm 離心 15-20 min，倒去上清液，存於-80°C 中保存。

2.16.3 表現蛋白之純化

重組蛋白質在 N 端帶有由六個 Histidine 標籤，可用鎳離子親和管柱進行純化。其原理為利用 Sepharose 膠體上的基質 iminodiacetic acid 螯合鎳離子可與表現蛋白 N 端 6 個 histidine 結合，可用 imidazole 競爭結合鎳離子而溶離出目標蛋白，達到純化效果。大量培養表現菌株，離心破菌取上清，得到粗抽液，再以 Ni²⁺ chelating 親和管柱純化帶有 His₆-tagged 的 PAL，純化流程如下：



2.16.4 粗抽液之取得

大量培養所得菌體，加入 25 mL lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole)重新懸浮菌體，並加入 lysozyme (40 mg/mL) 使最終濃度為 1 mg/mL，靜置冰上 1 h。以超音波細菌粉碎機打破細胞，每打一分鐘，休息一分鐘，共打 15 次。以 4°C, 12000 rpm 離心 20 min，上清液即為粗抽液。

2.16.5 批次鎳離子親和管柱層析

Hi-Trap column 以緩衝液流洗二倍體積，注入 10 mL 之 10 mM NiSO₄，將 chelating sepharose 螯合上鎳離子。再以緩衝液流洗兩倍體積。將 25 mL 粗抽液以蠕動幫浦直接注入已螯合 Ni²⁺ 的 Hi-Trap column，並且以 50 mL 離心管開始收集第一個分劃(Flow-through)。接著以 25 mL wash buffer (100 mM imidazole) 流洗，並收集第二個分劃(Wash)。再以 25 mL elution buffer1 (250 mM imidazole) 流洗，並收集第三個分劃(Elution 1)。最後以 25 mL elution buffer1 (500 mM imidazole) 流洗，收集第四個分劃(Elution 2)。以 10% SDS-PAGE 檢測純化情形，並測活性。

第三章 實驗結果

3.1 綠竹葉苯丙胺酸脫氨裂解酶純化

3.1.1 純化步驟之流程

酵素粗抽 (crude extract)，取儲存在 -80°C 竹葉 50 g
 以金屬研磨機進行研磨，再以二倍體積粗抽緩衝液回溶
 ↓15,000g, 30 min
 加入 0.5% (w/v) protamine sulfate
 ↓15,000g, 30 min
 硫酸銨分劃，收集 40-60% 飽和濃度，透析隔夜
 ↓濃縮

Sephacryl S-200 (gel filtration)



Phenyl-Sepharose (HIC or affinity chromatography)



DEAE-Sepharose (ion exchange)

在進行酵素純化之前，先參考文獻純化其它植物 PAL 之經驗，來設計純化流程。其中魚精蛋白沉澱核酸以及 Phenyl-Sepharose 之疏水性層析法為常用之純化步驟；另外利用表面帶電荷多寡來進行分離的純化原理亦常被使用，例如離子交換法 (ion exchange) 或色層聚焦法 (chromatofocusing)。參考其他文獻之純化流程，利用實驗將純化步驟排列組合，以求得到最佳竹葉與竹殼 PAL 之純化流程。

3.2.2 活性測定

活性測定以 L-phenylalanine 當作反應基質，另外以 D-phenylalanine 當作反應對照組，以 290 nm 吸光值測活性，由於芳香族胺酸都有苯環(benzene ring)，在 UV 波長(約 280 nm)下有吸光值，因此要確定此測活性方法是否可行。由 **Figure 2.** 可知，D/L-phenylalanine (12.1 mM) 之最大吸光波長在 270 nm 附近，在波長 290 nm 幾乎沒有吸光值。反觀 *trans*- cinnamic acid 在很低的濃度下(0.1 mM) 即有很強之吸光，最大之吸光波長轉變為 280-290 nm。而 PAL 活性測定 A_{290} ，是由於苯環上的三個具有共振(resonance) 能力之共軛雙鍵(conjugated double bond) 經過非氧化型脫氨反應後，產生具有四個雙鍵之肉桂酸(*trans*-cinnamic acid)，因此在 290 nm 時有最大之淨吸光值，亦不會有 phenylalanine 吸光值干擾。所以可以使用偵測 290 nm 吸光值的變化來代表 PAL 活性。一般而言，290 nm 吸光值每增加 0.01，就代表有 3.09 nmol *trans*-cinnamic acid 產生，而活性的表示單位為 kat (katal, mol/s)，與活性單位 U (unit, $\mu\text{mol}/\text{min}$) 相比， $1 \text{ kat} = 6 \times 10^7 \text{ U}$ 。由於實驗活性定量的方便，選用 kat 來當作活性的表示單位。

3.1.3 硫酸銨分劃

一般而言，在粗抽開始前，要先沉澱蛋白質，縮小體積以便下一步純化。常用之蛋白質沉澱方法有硫酸銨分劃與 PEG 分劃。先進行硫酸銨分劃飽和度的確定，每 20% 為一個分劃，經過透析隔夜之後分別測定蛋白質量與 PAL 活性，如 **Figure 3.** 所示：蛋白質分佈以 40-80% 這兩個分劃最多，但卻只有在 40-60% 這一個分劃有活性，之後定體積進行 7.5% native-PAGE 分析，確定整體蛋白質的分佈，在 40-60% 硫酸銨飽和濃度的這一個分劃確實含有最多的蛋白質，但是由於蛋白質色帶太雜，無法由電泳片中指出確切的 PAL 色帶。

3.1.4 純化結果

將不同純化步驟所得到之樣本，定蛋白質後，以電泳分析(**Figure 4**)。經 phenyl-Sepharose 管柱層析後，PAL 色帶似乎存在 marker 色帶 232 kD 與 140 kD 之間，而且色帶有稍微擴散(smear)的現象，泳動率並不是很固定，重複實驗也得相同的結果。換言之 PAL 染色後模糊的色帶確實是該酵素之性質；由這種現象推測 PAL 可能是醣蛋白，所以造成這個現象。由於純化之酵素為 PAL，在進行 Phenyl-Sepharose 管柱層析時，phenyl- group 可以當作是基質類似物(analog)，所以 Phenyl-Sepharose 不只是疏水性作用層析法(hydrophobic interaction chromatography)，也可以當作是親和層析法(affinity chromatography)。

DEAE-Sepharose 管柱層析在 native-PAGE 無法觀察到明顯色帶，但是有活性的分割管經過離心濃縮之後可以在 232 與 140 kD 之間觀察到明顯的單一色帶，推測該色帶應為 PAL。與其他文獻比較，竹葉 PAL 色帶位置略低於其他物種 PAL，換言之，竹葉 PAL 之泳動率較其他物種快，表面所帶的電荷可能較多。在 SDS-PAGE 可觀察到一可能之色帶，分子量約 75 kD。

3.1.5 純化表

Table 3. 為此次純化過程與結果，其中添加魚精蛋白不但可以去除核酸物質，避免測活性時干擾，似乎還可以去除 PAL 的抑制物質，使得回收量大增而超過 100%，核酸物質可能會抑制 PAL 活性。另外 Phenyl-Sepharose 的純化效果不錯，可以保留 16.1% 活性，比活性也很高；但在經過離子交換法之後，蛋白質量就變得很少，活性也變低，雖然比活性有增加，但是不利於下一步的分析。

此一純化步驟還有一些潛在的缺失，經過膠體過濾法之後，蛋白質整個被稀釋，蛋白質量在整個純化流程下來變得很少，但是由於葉子中色素較多，需要使用膠體過濾法來稀釋色素；另外整體純化時間也是考量重點，由於硫酸銨分割需要一個晚上時間透析，隔天如果進行 Sephacryl S-200 分析，收完膠體一倍體積分割的時間約需要 14 小時，等於又需要隔天才能測活性與蛋白質量，之後方能進行下一步分析。因此嘗試著進行另一種純化流程：經硫酸銨分割後，不透析即直接進行 Phenyl-Sepharose 管柱層析，原本希望可以快速的完成 PAL 的純化，但是發現沒有透析則實驗結果沒有再現性，可能是硫酸銨濃度沒有控制好所造成，因此仍然使用原純化流程。另外 Phenyl- Sepharose 膠體非常容易吸附色素，因此在純化步驟中，放在膠體過濾法之後是較佳的選擇。

3.1.6 原態分子量測定

取純化之 PAL 酵素液 200 μ L，以 FPLC(Superose 6HR10/30)來定蛋白質原態分

子量，結果參考 **Figure 5**。經標準蛋白質品製作標準曲線，可以得到竹葉 PAL 之原態分子量約為 290 kD；與一般高等植物相比較並沒有很大的差異，如為同質四元體，則單元體分子量約為 72 kD，可惜的是，竹葉 PAL 沒有胺酸定序結果可以佐證，因此難以去估算單元體確實分子量。

參考 **Figure 4. (B)**，經 SDS-PAGE 分析，在樣本 IEX 可以觀察到在 marker 位置之 76 kD 附近有一明顯色帶，雖然試圖進行胺基酸定序，包括 N-端定序與 Q-TOF 質譜分析都沒有得到確切結果。但參考下述之竹殼 PAL 純化結果，推測 76 kD 色帶應為 PAL。

3.2 綠竹殼苯丙胺酸裂解酶純化

3.2.1 純化步驟之流程

酵素粗抽，取儲存在 -80°C 之竹殼 100 g 以金屬研磨機進行研磨，

再以二倍體積粗抽緩衝液回溶

↓15,000g, 30 min

加入 0.5% (w/v) protamine sulfate

↓15,000g, 30 min

硫酸銨分劃，收集 40-60% 飽和濃度，透析隔夜

↓

Sephacryl S-200 (gel filtration)

↓

Phenyl-Sepharose (HIC or affinity chromatography)

↓

Mono Q HR 5/5 (FPLC, ion exchange)

竹殼 PAL 之純化流程略異於竹葉 PAL，由實驗結果得知：將 DEAE-Sepharose 改為 mono Q 為竹殼 PAL 較佳之純化步驟，其基本之純化概念都是離子交換法。

3.2.2 硫酸銨分劃

參考竹葉純化的經驗，發現在 40-60% 硫酸銨飽和度為 PAL 活性最高之分劃，因此粗抽後的酵素液同樣要先以 0.5% (w/v) 魚精蛋白處理後，離心去沉澱；先加入 0-40% 硫酸銨百分飽和度之硫酸銨，同樣離心去沉澱；再加入硫酸銨，調整飽和度到 60%，離心之後倒去上清。沉澱以最小體積緩衝液回溶，透析隔夜。

3.2.3 純化結果

竹殼 PAL 活性可以保持的很好，比活性也有增加，在室溫中竹殼 PAL 較穩定，活性下降速度較慢，越純的蛋白質可以保存的越久。竹殼 PAL 可以放在 4°C 冰箱中儲存；但是大部分樣本還是儲存在 -20°C 冰箱，不需要加任何抗凍劑，例如 glycerol，在 -20°C 環境下一個月，PAL 活性不會有太大改變。將有

活性的分割進行電泳分析，在 native-PAGE 可以觀察到在 marker 位置 232 kD 附近有明顯的單一色帶，推測該色帶應為 PAL。

SDS-PAGE 更可以在 76 kD 位置發現一個 CBR 染色的單一色帶，可以利用此單一色帶進行單元體分子量估算、醣蛋白染色、胺酸定序等實驗 (Figure 6.)。同時以純化之竹殼 PAL 當為抗原，來免疫老鼠，得到 anti-PAL 多株抗體。此多株抗體可專一性辨識原態 (Figure 6.) 與次單元體 (Figure 7.) PAL。

3.2.4 純化表

Table 4. 為此次純化過程與結果，添加魚精蛋白似乎也可以去除 PAL 的抑制物質，回收量可以維持 90%。同樣的膠體過濾依舊有稀釋色素之好處。Phenyl-Sepharose 之純化效果佳，可以保留 22.4% 的活性，比活性也很高，在經過 Mono Q 之後，蛋白質量就變得很少，仍可保有部分活性。純化倍率也增加到約 125 倍。相對於 **Table 1.**，以純化酵素而言，竹葉 PAL 比活性為 15.56 nkat/mg，竹籜 PAL 比活性為 88.52 nkat/mg 比竹葉高約 6 倍；竹葉 PAL 回收率約為 2%，竹籜 PAL 回收率約為 10%，造成這個結果原因為：竹籜 PAL 較為穩定，不易降解，且竹籜 PAL 的含量較竹葉 PAL 豐富。因此會造成竹籜 PAL 在純化上較竹葉為順利。

3.2.5 醣蛋白染色

PAL 在 native-PAGE 之 CBR 染色為一模糊之色帶，有可能因為是醣蛋白，造成泳動率無法固定而造成之現象。首先進行 PAS(periodic acid-Schiff)染色法 (Segrest and Jackson, 1973)。所得到的結果不佳，因此改以過碘酸-硝酸銀染色法 (periodic acid-ammoniacal silver staining)。**Figure 8.**為 SDS-PAGE 分析後醣染之結果，以 LMW SDS marker (Pharmacia)當作控制組，97 kD 之 phosphorylase b 為醣蛋白，在醣染後可以染出顏色；而 66 kD 之 bovine serum albumin (BSA)為非醣蛋白，所以在醣染色時染不出顏色，在此條件下，確定可以染到顏色的蛋白質應為醣蛋白無誤。目標蛋白質 PAL 在醣染後確實有染到顏色，推測 PAL 應為醣蛋白。在原態電泳也可以得到類似結果 (**Figure 9.**)。

因此實驗的下一步可以 glycopeptidase F(N-Glycosidase F; Peptide N-glycosidase; PNGase F; EC 3.5.1.52, Sigma G-5166) 處理，試圖將 N-linked 醣基修飾位置切除，經酵素處理後，進行電泳分析，觀察分子量的變化，可以估計 N-linked 醣基修飾所佔 PAL 蛋白質分子量之比例。可惜並沒有得到預期之結果。此外還有 O-linked glycosidase 可供選擇。

3.2.6 原態分子量測定

取純化之蛋白質 200 μ L，以 FPLC (Superose 12 HR 10/30)來測定蛋白質原態分子量 (**Figure 10.**)。經標準蛋白質品製作標準曲線，可以得到竹殼 PAL 原態分子

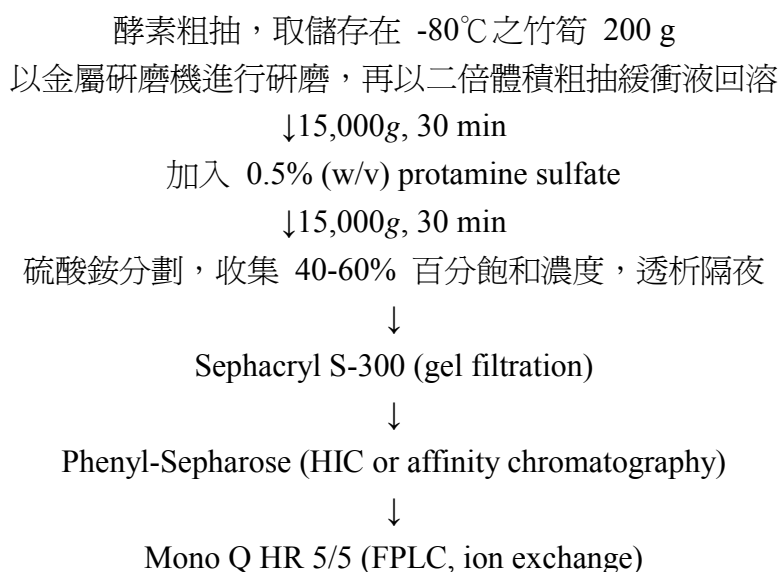
量約為 275 kD；與一般高等植物比較並沒有很大的差異，略小於竹葉 PAL 的 290 kDa；如為同質四元體(homotetramer)，則單元體分子量約為 70 kD。Superose 12 HR 10/30 適用之蛋白質分子量範圍為 1~300 kD，在蛋白質標準曲線製作上 Superose 6 與 Superose 12 沒有顯著差異，因此所得到之原態分子量應為可信之結果。

3.2.7 單元體分子量測定

以 PAL 在 SDS-PAGE 之 CBR 染色之單一色帶，搭配 HMW-SDS marker (Pharmacia) 來估算單元體(subunit)分子量，結果參考 **Figure 22**。利用標準蛋白質品泳動率的不同可以製作標準曲線，再將 PAL 色帶的泳動距離代入標準曲線可以估算出單元體分子量。筍殼 PAL 單元體分子量約略小於 76 kD，與一般高等植物的單元體分子量差異不大。搭配原態分子量的測定，推測 PAL 應為四元體之酵素。但是是否為同質四元體(homotetramer)或是異質四元體(hetero-tetramer)則仍未知。

3.3 綠竹筍苯丙胺酸裂解酶純化

3.3.1 純化步驟之流程



3.3.2 純化結果

竹筍 PAL 極不穩定，電泳上的色帶約為 260 kD，會隨著時間增加而降解。經過 mono-Q 分析後出現分子量約 68 kD 位置的主要色帶，推測為 PAL 次單元體。

3.3.3 純化表

將各純化步驟中收集到的 PAL 酵素液經蛋白質定量及活性測定後得到純化表 **Table 5**，並對各步驟之純化效率進行評估。其中魚精蛋白沉澱步驟之純化效果並不佳，其用意在於去除核酸物質，避免活性測定時的干擾。在經 Sephacryl-S300

後的純化倍率為 4.7 倍，回收率為 12.9%，而 Phenyl-Sepharose 則有不錯的效果，得到 53.7 的純化倍率。最後再經過 mono-Q 之後，純化倍率增加到 86.6 倍，回收率為 3.2%，PAL 之比活性為 43.13 nkat/mg (2587.8 Unit/mg)。

3.4 胺酸定序

3.4.1 N-端定序

PAL 胺酸之 N-端定序是委託中研院生化所，以及台大醫學院生化分生所進行分析，在將竹葉及竹殼樣本各一，進行 SDS-PAGE 分析後轉印到 PVDF 膜，送中研院生化所分析，結果為 N-端被阻塞(block)。竹筍 PAL 亦有同樣結果。再將一竹殼樣本，在跑電泳時加入 thioglycolic acid 移除自由基，轉送台大醫學院生化暨分生所進行分析，所得到之結果仍為 N-端被 block。結果參照 **Figure 12**。

N-端定序是使用 Edman degradation 之反應，使用 PITC (phenylisothio-cyanate) 在蛋白質之 N-端進行修飾反應，生成 PTH(phenylthiohydantoin)衍生物，反應後之 N-端胺酸可以被切下來，以自動定序儀之 HPLC 來檢定為何種胺酸。此 HPLC 主要是使用 C18 管柱，此管柱有膠體孔徑小、遲滯時間長等特性，可以有較佳之解析力。Edman 反應是可以循環的，因此得到的結果為：第一張圖譜通常為胺酸標準品，之後的圖譜為每一個循環被切下之胺酸經 HPLC 分析結果，會有胺酸背景值存在，可以藉由觀察 peak 之消長來推估胺酸種類，如果蛋白質量充分，甚至可以進行二十至三十個循環。

3.4.2 Q-TOF (LC-MS-MS)

由於無法利用 N-端定序來確定 PAL 序列，因此改以 trypsin in-gel digestion 後送 Q-TOF (quadruple time of flight)分析(Q-TOF 為台大農化系四樓精密儀器室於 2002 年所採購之機器)。蛋白質樣品要先經過蛋白酶水解後之 peptides，才可進行分析。得到初步的結果，竹殼 PAL 進行 Q-TPF 後的分析圖譜，如 **Figure 13** 所示，(A)-(D) 圖為質譜分析後所推得之 peptide 結果。

以 **Figure 13**. (A) 為例，胺酸組成分析結果推測如下：

(1) 圖譜之橫軸為質荷比(m/e)，縱軸為 relative intensity (%)，暫時將信號峰 y12 (1249.589)當成 parent ion，其餘信號峰皆為 daughter ion；信號峰 y9 (903.448) 為最強之訊號，稱為 base peak，將此信號峰當成 100%，其餘信號峰皆以 y9 為基準，求出 relative intensity (%)。Q-TOF 圖譜必須左右對照來看才會精準。

(2) 先由圖譜的左邊往右邊看：信號峰 b2 (213.157)，可能為 Val + Leu，分子量總合為 212.3，應可由圖譜的右方推測，但此圖譜缺乏右方之訊息。因此只能接受電腦比對結果 Val + Leu。

(3) 信號峰 y12 (1249.589)與 y11 (1148.532), 兩者之間的差值為 101.057, 與 Thr 之分子量 101.1 最為接近, 故可能序列之下一個胺酸為 Thr; 同樣的結果可以由信號峰 b2 (213.157)與 b3 (314.211)之差值為 101.054, 結果可以相互印證。

(4) 信號峰 y11 (1148.532)與 y10 (1017.482), 兩者之間的差值為 131.05, 與 Met 之分子量 131.2 最為接近, 故可能序列之下一個胺酸為 Met。

(5) 信號峰 y10 (1017.482) 與 y9 (903.448), 兩者之間的差值為 114.034, 與 Asn 之分子量 114.1 最為接近, 故可能序列之下一個胺酸為 Asn。

(6) 信號峰 y9 (903.448)與 y8 (806.394), 兩者之間的差值為 97.054, 與 Pro 之分子量 97.1 最為接近, 故可能序列之下一個胺酸為 Pro。

(7) 信號峰 y8 (806.394)與 y7 (705.359), 兩者之間的差值為 101.035, 與 Thr 之分子量 101.1 最為接近, 故可能序列之下一個胺酸為 Thr。

(8) 信號峰 y7 (705.359)與 y5 (533.311), 兩者之間的差值為 172.042, 與 Gly+Asp 之分子量 172.1 最為接近, 故可能序列之下一個胺酸為 Gly+Asp。

(9) 信號峰 y5 (533.311)與 y4 (420.22), 兩者之間的差值為 113.091, 與 Leu 之分子量 113.2 最為接近, 故可能序列之下一個胺酸為 Leu。

(10) 信號峰 y3、y2 與 y1 無法由圖譜中明顯觀察到, 但電腦可分析出胺酸序列分別為 Ser-Ser-Ala-Arg。

綜合以上結果, 預測之胺酸序列為: Val-Leu-Thr-Met-Asn-Pro-Thr-Gly-Asp-Leu-Ser-Ser-Ala-Arg (VLTMNPTGDLSSAR)。將所得到的結果, 再經由 <http://www.matrixscience.com> 所提供之 NCBI 資料庫比對功能, 將比對結果整理成 Table 6。由 Table 6. 可知經胰蛋白酶切後的 peptide 與玉米及水稻 PAL 有數條 peptides 相符合。由此結果可以確認本論文所述純化到最後一步之 SDS-PAGE 單一色帶為目標蛋白質 PAL 無誤。由於竹殼中 PAL 含量多, 經定序確認純度後, 以純化的竹殼 PAL 來進行多株抗體的製備。除竹殼 PAL 外, 純化之竹筍 PAL 也以 Q-Tof 進行胺酸定序, 確認純化結果為 PAL 無誤。

3.5 PAL 生化性質

3.5.1 最適反應溫度與活化能

由結果可知竹殼、竹葉與竹筍 PAL 反應最適溫度皆為 50°C (Figure 25.), 為相當耐熱之酵素, 而且不同組織純化之 PAL 之最適反應溫度趨勢幾乎相同。雖然活性測定時所固定的 37°C 反應溫度, 活性僅有最適溫度(50°C) 活性約 60%, 由於 50°C 非生理環境所能達到。因此仍以最多人使用之 37°C 來進行以下實驗。

活化能(activation energy)是指反應物從起始能階(initial state)到過渡狀態(transition state)所需之能量。過渡狀態通常是不穩定而且會快速地變成產物或回

到反應物，活化能表示反應發生時之能量障礙(potential barrier)。可以利用在不同溫度下之反應速率來估計活化能。在 1889 年由實驗所得到之 Arrhenius equation 為：

$$k = \text{constant} \times e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

k 為速率常數 (rate constant), E_a 為活化能, R 為氣體常數 8.314 J/mole K, 1.987 cal/mole K 或 0.0821 L atm/mole K, T 為反應之絕對溫度；方程式中的 constant 可以被視為等同於 PZ ，其中 P 為空間因子(steric factor), Z 為碰撞頻率 (collision frequency)。將上述方程式兩邊取 \log ：

$$\log_e k = \log_e PZ - \left(\frac{E_a}{RT}\right)$$

假設在溫度 T_1 時，速率常數為 k_{T_1} ；在溫度 T_2 時，速率常數為 k_{T_2} ：

$$\log_e \left(\frac{k_{T_1}}{k_{T_2}}\right) = \log_e k_{T_1} - \log_e k_{T_2} = \left(\log_e PZ - \frac{E_a}{RT_1}\right) - \left(\log_e PZ - \frac{E_a}{RT_2}\right)$$

$$= \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right) = \frac{E_a}{R} \left(\frac{T_1 - T_2}{T_1 T_2}\right)$$

$$E_a = R \left(\frac{T_1 T_2}{T_1 - T_2}\right) \log_e \left(\frac{k_{T_1}}{k_{T_2}}\right) = 2.303R \left(\frac{T_1 T_2}{T_1 - T_2}\right) \log_{10} \left(\frac{k_{T_1}}{k_{T_2}}\right)$$

假設反應速率 (velocity, V)與速率常數成比例：

$$E_a = 2.303R \left(\frac{T_1 T_2}{T_1 - T_2}\right) \log_{10} \left(\frac{V_{T_1}}{V_{T_2}}\right)$$

V_{T_1} 為溫度 T_1 時之反應速率, V_{T_2} 為溫度 T_2 時之反應速率；因此當反應速率或速率常數在兩種溫度以上被測定，則可以 $\log_{10} k$ 或 $\log_{10} V$ 對 $1/T$ 作圖，計算活化能 E_a ，斜率即為 $-\frac{E_a}{2.303R}$ 。

以 $\log V$ (velocity) 對 $1/T$ (絕對溫度) 作圖，微分求斜率，再利用 Arrhenius equation，求活化能 E_a ：

$$d \log V = \left(-\frac{E_a}{2.303R}\right) d\left(\frac{1}{T}\right)$$

由 **Figure 26**. 求得竹葉 PAL 之活化能為 13.9 kcal/mol，竹殼 PAL 之活化能為 11.8 kcal/mol，竹筍 PAL 之活化能為 15.6 kcal/mol，略低於水稻 PAL 之活化能 18.1 kcal/mol (Sarma *et al.* 1999)。

3.5.2 熱安定性

由於 PAL 可以耐受 50°C 左右高溫，先將酵素以 50°C、60°C 及 70°C 不同溫度先分別處理不同時間，再調整回到 37°C 反應 30 分鐘，來觀察 PAL 對熱的安定性 (Figure 27.)。以竹葉 PAL 而言 (Figure 27. A)，經過 50°C 處理一小時，對 PAL 活性幾乎沒有影響，即使 60°C 處理一小時，也都還可以維持約 80% 活性。但是以 70°C 處理約 15 分鐘就可以使竹葉 PAL 活性下降達 50%，很有趣的是，70°C 處理一小時，竹葉 PAL 仍可維持約 30% 活性。竹殼 PAL (Figure 27. B)，50°C 及 60°C 處理一小時的結果都類似於竹葉 PAL；但以 70°C 高溫處理 5 分鐘即可使竹籜 PAL 活性降低到僅剩約 30%，70°C 處理一小時後 PAL 則僅剩約 15% 活性。而竹筍 PAL (Figure 27. C)，50°C 及 60°C 處理一小時的結果都類似於竹葉 PAL；但是以 70°C 高溫處理 5 分鐘即可使竹筍 PAL 活性降低到僅剩約 45%，而 70°C 處理一小時後 PAL 則僅剩約 25% 活性。竹筍 PAL 耐熱性質較類似竹殼 PAL。

總而言之，竹葉、竹殼和竹筍 PAL 在經過 50°C 和 60°C 處理之後，活性變化趨勢幾乎相同，屬於耐熱的酵素，但是在 70°C 下，竹葉 PAL 的熱安定性則較竹殼和竹筍 PAL 為佳。

3.5.3 最適反應 pH

固定反應溫度為 37°C 和反應時間為 30 分鐘，利用廣用緩衝劑 (universal buffer) 來調整 pH 值由 3 - 11，可以觀察到最適反應 pH。由 Figure 28. 得知，不論是竹葉、竹殼或竹筍 PAL 在鹼性的 pH 環境 (pH 8.5-10) 可以維持一個反應活性高峰；而過低之 pH 值，似乎不適合 PAL 反應。竹葉、竹殼和竹筍 PAL 之最適用 pH 皆為 9.0，與實驗時常用之 pH 8.5 相去不遠。也與大部分高等植物 PAL 類似 (Table 16.)。

3.5.4 Km 值

PAL 為單基質反應，因此只需要改變基質 phenylalanine 濃度，即可利用基質飽和曲線及雙倒數曲線來求得 Km 值。在實驗進行之前要先確定 PAL 反應的時間與產物量 (A_{290}) 的關係。由 Figure 29. 可知，即使是反應進行了一小時，在 290 nm 吸光值依舊以直線關係增加，而分光光度計 (Hitachi U 1100) 之極限為 3.0，因此可以得知 A_{290} 從 0.3-2.0 應該都是可信範圍，可以放心地將反應時間固定在 30 分鐘。竹葉 PAL 之 Km 值 (Figure 30.) 改變 phenylalanine 濃度由 120 μ M 到 15 mM，先做出基質飽和曲線，經雙倒數作圖後，可以求得竹葉 PAL 之 Km 值為 550 μ M。竹殼 PAL 之 Km 值 (Figure 31.) 改變 phenylalanine 濃度由 120 μ M 到 12 mM，先做出基質飽和曲線，經雙倒數作圖後，可以求得竹殼 PAL 之 Km 值為 476 μ M，與竹葉非常相近。竹筍 PAL 之 Km 值 (Figure 32.) 改變 phenylalanine 濃度由 120 μ M 到 6 mM，先做出基質飽和曲線，經雙倒數作圖後，可以求得竹

殼 PAL 之 K_m 值為 $328 \mu\text{M}$ 。

與其他物種比較(**Table 16.**)，單子葉植物水稻 PAL 之 K_m 值約為 $500 \mu\text{M}$ ，與本論文結果類似；而竹筍 PAL 之 K_m 約為 $328 \mu\text{M}$ ，較低的 K_m 值代表對基質親合力較高。

3.5.5 金屬離子影響

選用 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 及 Co^{2+} 來探討金屬離子對 PAL 活性的影響。而 Ag^+ 和 Zn^{2+} 會與基質 phenylalanine 產生反應，不適合拿來做實驗。

K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 對竹葉 PAL 活性影響都不明顯；而 **Table 4.**， Mn^{2+} 在微量時似乎有活化或穩定酵素活性功能，到 5 mM 時對竹葉 PAL 有明顯抑制現象。再者 Co^{2+} 約 1.5 mM 就可將竹葉 PAL 活性抑制達 50%； Hg^{2+} 的抑制效果更強，約 1 mM 可以抑制 50% PAL 活性，而在 1.5 mM 時活性降到只有約 30%。

竹殼 PAL 之結果：由 **Figure 33.** 知 K^+ 、 Na^+ 對竹殼 PAL 影響不明顯，但是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 有抑制現象，在 35 mM 時活性大約都只剩下 50% 活性。而 **Table 5.**， Mn^{2+} 在微量時似乎有活化或穩定酵素活性功能，到 5 mM 時對竹葉 PAL 有抑制的現象，抑制的程度與竹葉 PAL 相似。而 Co^{2+} ，在 0.5 mM 就可以將竹葉 PAL 活性抑制到 60% 以下， 1.5 mM 時活性僅剩 25%，抑制的程度較竹葉 PAL 明顯； Hg^{2+} 的抑制效果依舊很強，約 0.5 mM 可以抑制掉 80% PAL 活性，換言之僅剩 20% 活性，而在 1.5 mM 時活性降到只有約 16%，抑制的程度也較竹葉 PAL 明顯。

竹筍 PAL 之結果：由 **Figure 33.** 知 Mn^{2+} 在微量時似乎有活化或穩定酵素活性功能，到 4 mM 時對竹筍 PAL 有明顯抑制現象，而 Hg^{2+} 的抑制效果非常明顯，只要 0.4 mM 即可使相對活性降至 27%。 Co^{2+} 亦有明顯抑制現象。

總結：竹葉 PAL 受到金屬離子的抑制現象較輕微，而竹殼與竹筍 PAL 受金屬離子的抑制現象較明顯。

3.5.6 二級代謝物對 PAL 活性的影響

選用一些 phenylalanine 的衍生物，大多是二級代謝的產物，來觀察產物是否有回饋抑制現象。由於都是芳香族胺酸衍生物，大多都帶有苯環，因此在 A_{290} 都有若干吸光值，會干擾 PAL 活性測定，所以使用的濃度一般都不能太高。

由 **Table 11.** 得知：比較 *o*-、*m*- 及 *p*-coumaric acid，因為 *p*-coumaric acid 亦有可能經由 tyrosine ammonia-lyase (TAL) 活性催化而得；*o*-coumaric acid 對竹葉與竹殼 PAL 而言幾乎沒有抑制作用，*m*-coumaric acid 抑制作用也不明顯，在 $100 \mu\text{M}$ 時仍能使 PAL 活性維持在 75%。反觀 *p*-coumaric acid 對三個器官 PAL 之抑制現象都非常明顯。然而 PAL 的產物 *trans*- cinnamic acid 的抑制現象對竹葉與竹殼 PAL 都不明顯，可能還需要更高濃度才有較強的回饋抑制，但對竹筍 PAL

有些微抑制。另外 ferulic acid 對三者之抑制現象也不明顯；PABA 則相反，抑制現象非常明顯。Caffeic acid 是極強的抑制劑，在 125 μM 時，竹葉 PAL 活性只剩下 28%，在 250 μM 時，PAL 幾乎測不到活性；但是較葉子 PAL 輕微，在 125 μM 時，PAL 活性仍保持 81%，但是在濃度增加到 250 μM 時，PAL 也是幾乎測不到活性，竹筍 PAL 也是如此。Tannic acid 在 0.025% 濃度時，竹葉 PAL 活性也只剩下 29%，竹殼 PAL 活性也只剩下 15%，竹筍 PAL 活性也只剩下 26%。

總結：二級代謝物除了 *o*-coumaric acid 和 ferulic acid 對竹葉 PAL 活性影響不大外，其餘的物質都有明顯的抑制現象。竹殼與竹筍 PAL 受二次代謝物的抑制情形與竹葉 PAL 相當類似。

3.5.7 基質專一性

PAL 基質專一性的探討要去除掉產物以及其他結構類似物干擾，因此只選擇 L-phenylalanine 之鏡像化合物 D-phenylalanine，以及一次代謝物中之芳香族胺酸，包括 L-tyrosine 以及 L-tryptophan。由於 L-tyrosine 之溶解度低，僅能配製成 2 mM，因此控制其他基質濃度都為 2 mM。而 2 mM phenylalanine 大約為 PAL 之 K_m 值四倍，雖然並非十倍 K_m ，但是與十倍 K_m 濃度時之活性相差不多。

不論是竹葉、竹殼或竹筍的材料，在 Table 12. 都得到相似的結果：D-phenylalanine 不會被 PAL 反應，因此可以當成反應時的空白對照組(blank)。L-tryptophan 並不是 PAL 基質，在 A_{290} 不會造成吸光的改變。而禾本科單子葉植物 PAL 酵素大多具有 TAL 活性，可以將 tyrosine 代謝成 *p*-coumaric acid，可以利用 A_{310} 變化來定量，*p*-coumaric acid 比 *trans*-cinnamic acid 在 C4 位置多了 hydroxyl-group (-OH)，吸光值會由 290 nm 轉移到 310 nm。以 PAL 活性測法 (A_{290})，並無法偵測到 L-tyrosine 是否為 PAL 之基質。並且以 A_{310} 測定 TAL 活性的方法較易有誤差。

3.5.8 化學修飾物對活性影響

選用常見之蛋白質化學修飾劑來探討 PAL 活性會因為何種胺酸被修飾而有所改變。依照化合物種類不同分別進行討論：

β -mercaptoethanol：抗氧化劑與硫醇基修飾化合物。對竹葉與竹筍 PAL 抑制現象不明顯，但是對竹殼 PAL 卻有活化的現象。

DTT(dithiothreitol)：抗氧化劑與硫醇基修飾化合物，功能類似 β -mercaptoethanol，結構上差異是多了一個官能基(-SH)，會形成穩定的環狀結構(stable cyclic oxidized form)。相較於 β -mercaptoethanol 的結果，DTT 很明顯地會抑制竹葉、殼與竹筍 PAL 活性，在 10 mM 濃度下，PAL 活性大約都只剩下 30%，同樣是硫醇基修飾化合物，但是結果卻差異極大，推測 DTT 的環狀結構，會代替 cysteine residue 提供-SH group 來與活性區結合，抑制 PAL 活性。

PMSF: Ser 型蛋白酶抑制劑, 會修飾在蛋白質之 seryl residue。結果顯示: PMSF 在 4 mM 濃度下會抑制竹葉、竹殼與竹筍 PAL 活性約 30%, 換言之, 剩下約 70% 活性。由結果可知, PAL 之白質之 seryl residue 為酵素催化反應所必需。

DEPC: 修飾 histidine 及 tyrosine residue, 常用在去除 RNase 干擾。對竹葉、竹筍與竹殼 PAL 抑制現象在此五種修飾化合物中最為明顯, 因此 histidine 及 tyrosine residue 在酵素催化反應也是不可或缺的。

Vinylpyridine: 修飾 cysteine residue。目前已經有文獻指出, cysteine residue 會與活性區結合, 造成活性下降; 利用 vinylpyridine 來修飾 cysteine residue, 所得到的結果可以印證 cysteine residue 被修飾對 PAL 活性影響最小, 亦即 PAL 之活化中心不需要 cysteine residue。

3.6 綠竹 PAL 基因選殖

根據綠竹 cDNA 庫與染色體基因庫篩選所得結果, 定序後得到四條 PAL 序列, 按照篩選次序, 命名為 *BOPAL1*、*BOPAL2*、*BOPAL3* 和 *BOPAL4*。利用染色體徒步 (genome walking) 方式, 我們得到了 *BOPAL4* 的啟動子序列。

名稱	基因長度	理論等電點	理論分子量
PAL-1	2,136 bp (712 a.a)	5.8	76.9 kD
PAL-2	2,139 bp (713 a.a)	5.9	76.9 kD
PAL-3	957 bp (319 a.a) partial sequence		
PAL-4	2,142 bp (714 a.a)	5.9	77.1 kD

分析得知: *BOPAL 1* 含 2,136 個核苷酸, 可轉譯成 712 個胺酸序列的蛋白質, *PAL 1* 基因轉譯成胺酸序列後, 利用 NCBI 資料庫進行比對 (blastp), 證實該基因確為 PAL。比對結果顯示 *BOPAL 1* 基因中的確具 PAL 的高保守性區域, 該保守性區域包含五個連續性的胺酸序列 (Ala-Ser-Gly-Asp-Leu), 而該保守性區域在其他物種中的 PAL 都會出現, 出現的位置約在第 200 個胺酸附近 (序列比對中第二紅色框線中), 文獻指出該區域中的 Ala-Ser-Gly 三個胺酸構成了特殊的 MIO group (4-methylideneimidazole-5-one group), MIO group 不僅在 PAL 的胺酸組成中會出現, 在 HAL 的胺酸中也具有相同的 MIO group, MIO group 為 PAL 催化作用中的活性中心 (Poppe *et al.*, 2001), 所篩選出之 *BOPAL 1* 與 *BOPAL 2* 序列中也含有 MIO group, 這對於綠竹中 PAL 之化活性的研究, 提供了更有利的線索。將 *BOPAL 1* 胺酸和其他物種比對的結果, 最相似的是來自稻米的 PAL (identities 為 86%), 其次是小麥的 PAL (identities 84%)。相當類似的結果也出現在 *BOPAL2* 和 *BOPAL4* 的比對過程中, 但三者約有在胺酸序列上有些不同, 以

BOPAL 1 為基準，和 *BOPAL 2* 比較之下有 27 個胺基酸位置不同，*BOPAL 2* 共包含 2,139 個核苷酸，可轉譯成 713 個胺基酸序列的蛋白質。以 *BOPAL 1* 作為基準，和 *BOPAL 4* 比較之下有 76 個胺基酸位置不同，*BOPAL 4* 共包含 2,142 個核苷酸，可轉譯成 714 個胺基酸序列的蛋白質。但可以確認的是在 *BOPAL 1*~*BOPAL 4* 第 200 個胺基酸附近，皆具有包含上述五個連續性的胺基酸序列的保守性區域。由蛋白質功能預測的結果顯示，*BOPAL 1*~*BOPAL 4* 皆包含了 PAL 的功能性區塊(functional domain)，軟體分析結果得到的 *BOPAL* 分子量大約在 77 kD，理論等電點約為 5.8~5.9 左右。利用分析軟體 iPSORT (<http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/>) 分析，發現 *BOPAL 1*~*BOPAL 4* 皆不存在運送往葉綠體或粒線體的訊息序列(signal peptide)，由軟體 PSORTII (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>)分析，綠竹中的 PAL 有比較高的機率是存在細胞質中，而非存在粒線體或葉綠體中。

3.7 *BOPAL4* 基因啓動子序列分析

植物中 *PAL* 基因在不同生理條件下會有不同的表現，這取決於不同染色體位置上的 *PAL* 基因會由不同 promoter 與 *cis*-elements 來調控。利用染色體基因庫進行篩選，取得 *PAL* 基因的 promoter 序列。針對綠竹染色體 DNA 庫所篩選的正反應株進行定序，得到包含 *BOPAL 4* 基因全長以及包含基因上游約 400 b.p 的啓動子序列，文獻指出，在 *PAL* 基因的 promoter 中存有特定的保守性序列，分別稱為 P-box、A-box、L-box，若以胡蘿蔔(carrot) 為例，L-box 約座落在基因上游 -100 左右的位置，常出現的序列為: T/C C T/C C/T ACCTACC；A-box 約座落在基因上游 -160 左右，常出現的序列為: C/A CGTC T/C；P-box 約座落在基因上游 -180 的位置。利用人工的方法進行序列比對，在 *BOPAL 4* promoter 的 -157 位置找到類似 A-box 的序列，但序列並不完全相似，故將這段稱為 A'-box。*PAL* 上游啓動子中 P-box、A-box、L-box 序列的詳細功能目前未知，推測該區域可能在不同生理條件下受到不同轉錄因子的調控，藉由轉錄因子使得 *PAL* 基因的表現提高或減弱。

將綠竹 *BOPAL4* 之 promoter 序列利用網路軟體分析工具 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 和 ProScan (<http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/proscan/>) 分析，由 ProScan 分析的結果預估 TATA-box 位在轉譯起始上游-180 核苷酸區域，且在上游-219 的位置發現有一個類似轉錄因子 AP-2 的結合位置，文獻指出轉錄因子 AP-2 本身的作用和 cAMP 具有相關，可能以 cAMP 作為誘導因子或抑制因子。在綠竹啓動子的區域中出現類似 AP-2 結合位，可能暗示 *BOPAL 4* 基因本身會受到 cAMP 相關作用的調控(文獻指出，在哺乳動物細胞中，AP-2 的作用也和維生素 A 有關，特別是內皮細胞)。由於 ProScan 分析對象屬於真核動物細胞，因此又採用針對植物啓動子分析的工具 PLACE，分析結果顯示，在這段 250 b.p. 的啓動子中，包含了幾個重要的調控區。首先，在 *BOPAL 4* 上游-228 的位置存在著之-box 序列，以及在-205 的位

置存在 A-box 序列，P-box 和 A-box 也出現在其它物種的 PAL 基因啓動子中，且已經被證實該區域是調控 PAL 基因重要的順位因子 (*cis-acting element*)，具有特殊的轉錄因子和該區域結合，藉此改變 PAL 基因的表現 (Logemann *et al.*, 1995)。啓動子-215 的位置存在著 W-box，該區域被認為是和吉貝素(gibberellin)誘導的基因抑制作用有關(Zhang *et al.*, 2004)。啓動子 -222 的位置存在 Myb-motif，Myb protein 是與 phenylpropanoid 代謝相關的轉錄因子，*BOPAL4* 啓動子中的 Myb-motif 序列和 Myb protein 結合後調控 PAL 基因表現(Tamagnone *et al.*, 1998)。啓動子-66 的位置有一特殊區域，該區域序列和 Gowik 等學者在 2004 年所發表的 CACTFTPPCA1-site 具有相似性，CACTFTPPCA1-site 被認為和 phosphoenolpyruvate carboxylase (ppcA1)的調控有關。在啓動子-57 的位置存在 GATA-box，GATA-box 被認為是促進基因高度表現的正向調控因子，在 1989 年由 Lam 等人發現 cauliflower mosaic virus (CaMV)基因的啓動子存在著 GATA-box，可被轉錄因子 ASF-2 結合，促進基因大量表現。綠竹中 *BOPAL 4* 啓動子區域發現 GATA-box 的存在，這或許可以對綠竹中二次代謝物快速累積有合理的解釋，由於 PAL 此一關鍵酵素的基因表現活性高，造成下游產物迅速可以被合成與累積，對於 GATA-box 對基因的調控有許多文獻都已證實(Gidoni *et al.*, 1989；Gilmartin *et al.*, 1990；Benfey *et al.*, 1990；Teakle *et al.*, 2002；Reyes *et al.*, 2004)。在啓動子 -29 的區域中存在 ABRELATERD1-site (ABRE-like sequence)，2004 年 Simpson 等學者在阿拉伯芥中 *erd1* 基因中(early responsive to dehydration, *erd1*)發現有 ABRELATERD1-site 的存在，該研究發現 *erd1* 基因會受到脫水(dedhydration)和黃化(etiolation)誘導，而該 ABRELATERD1-site 對於該基因的調控相當重要，綠竹 *BOPAL 4* 啓動子存在的 ABRELATERD1-site，可能和阿拉伯芥中 *erd1* 基因有相似的調控機制。目前對於 ABRELATERD1-site 的研究文獻很少，因此對於該序列的分析仍有限。關於 *BOPAL 4* 啓動子分析的結果列於附錄與附表一中。

和其他物種 PAL 基因相似，*BOPAL 4* 由兩個 exon 組成(exon I 和 exon II)，中間包含一段由 96 個核苷酸構成的 intron 序列，該 intron 序列中出現終止密碼，各物種的 intron 序列相異性大，例如蕃茄中 PAL 基因的 intron 包含 600 個核苷酸，因此 *BOPAL 4* 的 intron 在基因分析中，較不具意義。

3.8 綠竹 PAL cDNA 表現系統的建立

3.8.1 引子之設計

將本實驗室所保存之綠竹 cDNA 全長序列，經 GCG 比對找出不會切割 *PAL 1* 與 *PAL 2* 序列的限制酶(附錄一、二)，對照表現質體 pTrcHisA 圖譜所帶有的限制酶切位，選用 *Bam*H I 與 *Eco*R I 作為剪接質體與 PAL cDNA 之酵素。在 *PAL 1* 與 *PAL 2* 序列 5'端分別選 15 與 16 個核苷酸序列，再往前方增加限制酶 *Bam* H I

切位的核苷酸序列，構成正向引子(forward primer)；相同地，也在序列 3' 端選約 22 與 18 個核苷酸序列，再往後端增加限制酶 *EcoR* I 切位的核苷酸序列，經互補與反轉構成逆向引子(backward primer)。

3.8.2 表現載體之建構

用設計帶有 *Bam*H I 與 *Eco*R I 切位引子(附錄三)，進行 PCR 反應放大增殖，將 *PAL* 序列修飾成具有限制酶切位。接著以 *Bam*H I 與 *Eco*R I 兩者分別酶切表現質體 pTrcHisA、*PAL* 1 及 *PAL* 2 片段，經脫鹽純化 DNA 片段，將以處理過的質體分別與 *PAL* 1 及 *PAL* 2 接合，然後轉形於大腸桿菌 Top10 中。**Figure 25.** 與 **Figure 26.** 分別為 pTrcHisA/*PAL* 1 與 pTrcHisA/*PAL* 2 轉形進入大腸桿菌 Top10 後，所挑選出的五株正反應菌株，經抽取質體、限制酶 *Bam*H I 與 *Eco*R I 切割，得到約 4.4 kb (vector) 與 2.1 kb (insert DNA)片段的電泳圖。根據電泳結果，再各挑選其中一個正反應株進行定序比對，確認 *PAL* 基因序列已正確接入表現質體中，至此，表現系統建構完成，可進行誘導條件的探討。

3.9 表現系統最適條件探討

3.9.1 最適溫度與最適 IPTG 濃度探討

Figure 27. 為 pTrcHisA/*PAL* 1 在大腸桿菌 Top10 中，在不同溫度(30、37°C) 環境下，經不同濃度(0~2 mM) IPTG 的培養基誘導 4 小時，將 3 mL 菌液，離心收集菌體，以緩衝液懸浮，破菌離心取上清液，進行 SDS 電泳圖分析，膠片經 CBR 染色後，發現大腸桿菌不論是否經 IPTG 誘導，其蛋白質色帶差異不大，無法確切地知道重組蛋白質 *PAL* 1 色帶位置；但由酵素活性圖得知，表現菌株在 30°C 經 0.5 mM IPTG 誘導下，即有相當活性，而於 2 mM IPTG 下活性達到最高；至於更高的 IPTG 濃度，是否有更好的活性？曾嘗試以更高濃度 IPTG (4、6、8 與 10 mM)進行誘導，但是並沒有得到比 2 mM 誘導下更高的活性；而表現菌株在 37°C 環境下誘導，不論以多少濃度 IPTG 誘導，其活性都沒有太大變化。由 **Figure 29.** 得知，重組蛋白質 *PAL* 2 的誘導結果與 *PAL* 1 相似，亦於 30°C、2.0 mM IPTG 誘導下達最大活性，但 *PAL* 2 的活性為 25.80 nkat/mL 大約為 *PAL* 1 活性(14.75 nkat/mL)的一倍。可將表現菌株以 30°C、2.0 mM IPTG 誘導，進行最適表現時間之探討。

3.9.2 最適時間探討

兩種表現菌株以 2.0 mM IPTG 於 30°C 下誘導培養，每隔兩小時收取一管 3 mL 菌液，離心收集菌體，先置-20°C 保存，總共收集 12 小時。將所收集菌體，經超

音波粉碎，收集上清液進行電泳及活性分析。活性分析的結果顯示，pTrcHisA/PAL 1 (Figure 28.) 在 30°C、2.0 mM IPTG 培養兩小時，即有不錯的比活性約為 6.2 nkat/mg，培養 12 小時後，比活性增高兩倍，約為 12.4 nkat/mg；SDS 電泳膠片經 CBR 染色後發現，在 marker 蛋白質 76 kD 片段附近，色帶隨時間增長加深，推定其極可能為表現蛋白質 PAL 1。而 pTrcHisA/PAL 2 的誘導情況也大致相同，由 Figure 30. 知，SDS 電泳膠片經染色後，也有一條隨時間增長顏色漸深的色帶，而培養 12 小時後的比活性約 23.2 nkat/mg 為 PAL 1 之兩倍。大致上，兩種表現菌株誘導八小時後，比活性已到達穩定狀態，與誘導 12 小時相差無幾。因此，在往後的大量培養中，以 2.0 mM IPTG 於 30°C 下培養 8 小時定為誘導表現蛋白質的最適條件。

3.10 表現蛋白質 PAL 的純化過程

將表現菌株置於 30°C 下，以 2 mM 的之 PTG 誘導 8 小時培養 200 mL 菌液，將液態培養基離心收集菌體，以緩衝液回溶，用細胞粉碎機破菌、離心取上清液，得到粗抽液。接著將上清液通入 Ni-IDA 管柱，利用表現蛋白質上所融合的六個 Histidine 標籤，與膠體中的鎳離子螯合，以帶有不同濃度 imidazole 的流洗液中將表現蛋白質溶離出來，再以酵素活性分析與 SDS 電泳分析不同的分劃。由膠片的 CBR 染色圖 (Figure 31. B 與圖 Figure 32. B) 發現，表現蛋白質 PAL 1 與 PAL 2 在溶離緩衝液 (elution buffer 1, 含 250 mM imidazole) 即可被溶離下來與其他蛋白質分離，形成一個主要色帶；活性分析也顯示出，兩者皆在第三個分劃有最高的比活性，且表現重組蛋白質 PAL 2 的比活性約為 PAL 1 的兩倍。

將純化表現蛋白質 PAL 1 與 PAL 2 兩個步驟所預留的樣本，進行蛋白質定量與酵素活性分析，經計算得到純化表 (Table 6.、Table 7.)，由表可知，PAL 2 的比活性 (809 nkat/mL) 約為 PAL 1 比活性 (160 nkat/mg) 的五倍，但就純化倍率而言，PAL 1 約為 PAL 2 兩倍，也就是說經粗抽、親和管柱層析兩個相同純化步驟，對 PAL 1 的純化效果較好。

接著，將粗抽、親和管柱的預留樣本連同未接入 PAL 基因的表現載體與未經 IPTG 誘導的表現菌株，進行 SDS 電泳分析，再將膠片進行 CBR 染色與免疫染色得到 Figure 33. 與 Figure 34.。由 CBR 染色圖知，表現蛋白質經 Ni-IDA 管柱層析之後，其純度大幅提升成均質而呈現單一色帶；由利用綠竹 PAL 多株抗體所辨識的免疫染色圖知，色帶隨著純化步驟進行有逐漸加深現象，可再度確認 CBR 圖中的單一色帶確實為表現蛋白質 PAL。將兩個幾近均質的表現蛋白質與綠竹筍殼 PAL，進行原態電泳分析，將膠片進行 CBR 染色與免疫染色得到 Figure 35.。由 CBR 染色圖知，經由大腸桿菌表現的重組蛋白質 PAL，因其 N 端多了約 3 kD 的融合片段，所以其原態分子量略高於筍殼 PAL 而介於 242 kD 與 440 kD 之間。

將重組蛋白質 PAL1 與 PAL 2 溶液分別混合分子量標定蛋白質，進行膠體過

濾層析，估計其原態分子量。由層析法所得數據，將各標準蛋白質所在的分劃對標準蛋白質分子量的對數值繪製標準曲線，如 **Figure 35. B** 與 **Figure 36. B**；以酵素活性分析，找出 PAL 活性最高的分劃位置，帶入標準曲線估計原態分子量。經計算發現經由大腸桿菌表現的蛋白質 PAL 1 與 PAL2 分子量分別約為 320 與 330 kD，略高於綠竹葉 PAL 290 kD、綠竹筍殼 PAL 275 kD 與綠竹筍 PAL 258 kD，推測重組蛋白質仍與綠竹體內 PAL 一樣，由四個同質 PAL 單體組成，形成同質四元體構形。

3.11 表現蛋白質 PAL 的生化性質分析

取經 Ni-IDA 管柱層析後，具有 PAL 活性之酵素液，來進行生化性質分析。由綠竹不同組織部位 PAL 生化性質進行研究探討(蘇，2003；謝，2003)，因此可與本論文中所得之生化性質數值做比較，探討綠竹原態 PAL 與經大腸桿菌表現的 PAL 蛋白質，性質上有何差異。

3.11.1 產物與吸光值關係

在進行生化性質分析之前，首先要先確定 PAL 催化 *L*-Phe 經脫氨反應產生 *t*-cinnamic acid 的產量與時間的關係。經由偵測 A_{290} 變化，反應時間一小時內， A_{290} 的淨值仍以線性關係增加。因此，將之後生化性質分析之反應時間固定在 10 分鐘，其吸光值變化仍是可信範圍。

3.11.2 反應最適溫度

取適量酵素液，加入基質液後，分別置於不同溫度反應，以反應活性最高者當基準，計算相對活性比例，由 **Figure 38.** 可得知，表現重組蛋白質 PAL 1 與 PAL 2 反應最適溫度約為 60°C，略高於綠竹不同組織部位 PAL 之最適溫度 50°C。大致上與在其他物種 PAL 一樣 (**Table 13.**)，最適催化反應溫度較一般酵素為高；但由於 60°C 非一般生理環境所能達到，因此，進行重組蛋白質 PAL 1 與 PAL 2 活性測定時，大多定在 37°C 來進行以下生化性質探討。

3.11.3 活化能

活化能 (activation energy) 之指在反應過程的位能圖中，反應物轉變成活化複體 (activated complex) 與反應物間之位能差值，亦可視為分子超越能量障礙所需具有之能量。過度狀態的活化複體，通常是不穩定，而且會快速地變成產物或回到反應物，因此生物體內的反應多須經酵素的催化，以降低反應活化能，加快反應速率。活化能表示可以利用在不同溫度下之反應速率來估計活化能。

由 Arrhenius 公式推導得 $d\log V = (-E_a / 2.303R)d(1/T)$ ，因此，將在最適反應溫度所測得的反應速率，再以 $\log V$ (velocity) 對 $1/T$ (絕度溫度) 作圖得一迴歸

曲線，如 **Figure 39**，由直線斜率求出活化能 E_a 。經計算 PAL 1 活化能為 9.3 kcal/mol，PAL 2 活化能約為 10.1 kcal/mol，較低於綠竹不同部位 PAL 之活化能分別為，竹葉：13.9 kcal/mol，筍殼：11.8 kcal/mol(謝, 2003)竹筍：15.6 kcal/mol，可推定在相同溫度下，表現蛋白質 PAL 催化 *L*-Phe 的脫氨反應速率較綠竹不同部位的 PAL 快。

3.11.4 熱安定性

在許多研究中都曾發現 PAL 具有良好的熱耐受性之 Kim *et al.*, 1996; Kalghatgi *et al.*, 1975)，為測試綠竹的表現蛋白 PAL 是否也具此特性，分別將 PAL 1 與 PAL 2 分裝置於 50°C、60°C 及 70°C 等不同溫度下，處理 10~60 分鐘後取出，再加入基質液於 37°C 反應 10 分鐘，來觀察 PAL 酵素對熱的安定性。結果由 **Figure 40. A** 可看出表現蛋白質 PAL 1 在 50°C 處理一小時後能維持 50% 以上的活性，60°C 下處理 20 分鐘，活性還可以維持 50%，但在 70°C 下處理 10 分鐘後，PAL 1 活性就只剩 1%；而由 **Figure 40. B** 可看出表現蛋白質 PAL 2 在 50°C 與 60°C 處理一小時後，活性仍維持 50%，但在 70°C 下處理 20 分鐘後，PAL 活性就只剩 3%；由上述結果顯示出，綠竹筍表現蛋白質 PAL 在溫度大於 70°C 時會即易失去對熱的耐受性。

3.11.5 反應最適 pH 值

將適量酵素加入以廣用緩衝劑配置 pH 3-11 的反應基質液中，觀察表現融合蛋白質 PAL 1 與 PAL 2 於各 pH 值下活性的表現，以活性最高者當基準，計算相對比例。由 **Figure 41** 得知，PAL 1 與 PAL 2 皆在 pH 8.0 時反應活性最高，pH 9.0 時次之，在 pH 值小於 6 的環境下，表現蛋白質 PAL 反應活性不到 50%。而比較不同物種與綠竹不同部位的 PAL 的最適 pH 值可發現，PAL 在鹼性反應環境下 (pH 8.5-10) 都有較高的活性，因此在 PAL 活性測定方法中，緩衝液之 pH 值多在 8.5-9.0 之間。

3.11.6 K_m 值

由於 PAL 為單一基質的催化酵素，因此只要將基質液 *L*-phenylalanine 配成不同濃度 (0.2 mM ~ 1.2 mM)，加入酵素液反應得不同反應速率，做出基質飽和曲線與雙倒數圖，即可利用雙倒數所得迴歸曲線的斜率與截距求得 K_m 值。由 **Figure 42** 計算得 PAL 1 的 K_m 為 200 μ M，而由 **Figure 43** 計算 PAL 2 的 K_m 為 250 μ M，比較綠竹各部位 PAL 之 K_m 值，發現兩個表現蛋白質的 K_m 值皆小於綠竹各部位 PAL 的 K_m 值，顯示經大腸桿菌表現的重組蛋白質 PAL 對於基質 *L*-phenylalanine 的親合力大於綠竹各部位的 PAL。

3.11.7 金屬離子影響

藉由在基質液中分別加入不同濃度之 1A 與 2A 族的金屬離子 (K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 與過渡金屬離子 (Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ni^{2+}) 之再以適當酵素反應，由酵素活性的變化來探討金屬離子對 PAL 活性的影響。 K^+ 與 Mg^{2+} 對 PAL 1 與 PAL 2 的影響不大，兩者活性皆能維持在 80%，但是 Ca^{2+} 只要 5 mM，就對 PAL 1 與 PAL 2 造成顯著的抑制現象，使活性劇降至 60% 以下，且隨濃度上升，活性也愈趨下降至 40%；在綠竹中， Ca^{2+} 對綠竹筍 PAL (蘇, 2003) 與筍殼 (謝, 2003) 也有類似的抑制情形，但在已發表之文獻中多數物種之 PAL 受二價離子的抑制程度較小。

由表三的結果可發現，過渡金屬 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ni^{2+} 隨著濃度的增加對 PAL 1 活性的抑制現象愈顯著，其抑制程度為 $Ni^{2+} < Fe^{2+} < Mn^{2+} < Hg^{2+}$ ，以 Hg^{2+} 離子抑制效果最強，濃度在 0.5 mM 時，PAL 1 的活性就被抑制約之 0%，亦即活性只剩 30%； Hg^{2+} 對其他物種 PAL 的活性影響也有相似情形，*Ustilago maydis* 之 PAL 在 Hg^{2+} 濃度 0.5 mM 時活性完全被抑制，而向日葵中 PAL 受 Hg^{2+} 的抑制效果較低。

而由表四的結果來看，PAL 2 受過渡金屬的抑制現象與 PAL 1 相似，以 Hg^{2+} 離子抑制能力最大，在更微量的濃度 0.1 mM 即可抑制 PAL 2 近五成活性，但值得注意的是， Ni^{2+} 在 0.1 mM 與 0.5 mM 時，似乎可稍微促進 PAL 2 的催化反應，使其活性稍稍增加，但在 PAL 1 中並沒有發現此現象。

3.11.8 二級代謝物對活性的影響

在反應基質液中分別加入二次代謝產物與結構相似物，用以探討二級代謝物對 PAL 活性是否具有回饋抑制現象；由於 PAL 活性偵測是以 A_{290} 來測定，而所加入的代謝衍生物多帶有苯環與共軛雙鍵，因此，在 290 nm 下也會有若干吸光值，若濃度過高時其吸光值會超過分光光度計所能偵測的上限，因此不能使用太高的濃度。由 Table 15. 看出 PAL 的產物 *trans-cinnamic acid* 會對 PAL 造成回饋抑制，當 *trans-cinnamic acid* 濃度達 100 μ M 時，PAL 活性只剩下 70%，*trans-cinnamic acid* 的回饋抑制現象在許多物種中都曾被報告 (Sarma *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1996)。曾有文獻報導禾本科植物 PAL 具有 TAL 的活性，可催化 tyrosine 經脫氨反應後可產生 *p-coumaric acid*，因此選用分子式相同的異構物 *o-*、*m-*、*p-coumaric acid* 探討其對 PAL 影響上，可發現當 *p-coumaric acid* 濃度增加到 100 μ M 時，PAL 1 活性只剩下 60%，對 PAL 1 的抑制現象最為顯著，而其異構物 *o-*、*m-coumaric acid* 對 PAL 的抑制作用就沒有這麼明顯；*caffeic acid* 與 *ferulic acid* 只會稍微抑制 PAL 1 活性，但是值得注意的是 *tannic acid* 在極低濃度 (0.001%，0.0125%) 就會很顯著地抑制 PAL 活性，這種情形同樣也在綠竹不同部位之 PAL 出現 (謝, 2003；蘇, 2003)。

由 **Table 15.** 可看出產物 *trans*-cinnamic acid 會對 PAL 2 造成回饋抑制，當 *trans*-cinnamic acid 濃度 100 μ M 時，PAL 2 活性只剩下 70%。當 *p*-coumaric acid 濃度增加到 100 μ M 時，PAL 活性只剩下 30%，其抑制現象較 PAL 1 顯著，而其異構物 *o*-、*m*-coumaric acid 對 PAL 2 只有稍微抑制作用；caffeic acid 也會造成 PAL 活性明顯下降，但是效果較 *p*-coumaric acid 輕微；caffeic acid 與 ferulic acid 在隨著濃度增高，只會稍微抑制 PAL 2 活性；而 tannic acid 對 PAL 2 也是在極低濃度就可抑制 50% 的活性。綜合上述所得結果，二次代謝途徑上的產物確實會對綠竹的表現蛋白質 PAL 造成抑制作用，使其活性下降，顯見二級代謝中間產物確實有回饋抑制的現象。

3.11.9 化學修飾劑對活性影響

將常見的蛋白質化學修飾劑加入基質液中，加入適量酵素液，探討 PAL 活性是否會被化學修飾而有所改變。由 **Table 14.** 可得知

抗氧化劑與硫醇基修飾化合物：

β -mercaptoethanol：對 PAL 1 與 PAL 2 的抑制現象不明顯，在濃度 14.3 mM 下，兩者還保有 90% 的活性，在低濃度時 (3.6 mM, 7.2 mM) 有促進 PAL 活性之功用。

Dithiothreitol (DTT)：功能類似 β -mercaptoethanol，但 DTT 多了一個 -SH 與 -OH 基團，DTT 只有在較高濃度 9.5 mM，才會將表現蛋白質 PAL 活性抑制至 60% 以下，其抑制 PAL 活性的效果較 β -mercaptoethanol 強。有文獻指出：cysteine 的 -SH 基團會與活性區上的親電性基團 3,5-dihydro-5-methylidene - imidazol-4-one (MIO) 產生不可逆反應，造成 Histidine ammonia lyase 活性下降 (Poppe *et al.*, 2001)。而 β -mercaptoethanol 與 DTT 這兩個藥劑也都帶有 -SH 基團，因此可能也會去攻擊活性催化區 MIO 環造成 PAL 之活性下降。由於 DTT 結構上較 β -mercaptoethanol 多一個 -SH 基團，因此對於 PAL 活性之影響大於 β -mercaptoethanol。

Vinylpyridine (C_7H_7N)：可修飾 cysteine；由結果顯示 vinylpyridine 在 0.25 mM 下，就可將抑制掉 PAL 1 近五成的活性，而 PAL 2 的活性只剩 31%。

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)：會對 serine 進行修飾。結果顯示在 9.5 mM PMSF 濃度下，PAL 1 只剩 64% 活性，而 PAL 2 則剩下約 79% 活性。

Diethylpyrocarbonate (DEPC)：可修飾 histidine 及 tyrosine residues，造成 RNase 失活。在 9.5 mM DEPC 濃度下，PAL 1 與 PAL 2 受 DEPC 修飾，兩者約喪失近八成的活性。

由上述結果推測 serine、histidine、cysteine 及 tyrosine residues 在酵素催化反應是不可或缺的。曾有文獻指出，將 PAL 活性區上的保守序列，進行定點突變後，以酵素活性分析方式檢測各突變株的表現蛋白質，可發現突變株 (Y110F)

的活性明顯下降，且突變株之 K_{cat} 與原態 PAL 的 K_{cat} 相差 75,000 倍，而學者由其立體結構推測，tyrosine 110 可能位於基質進入或產物離開活性區的通道上，為催化機制上重要的胺基酸，因此才會在定點突變後，造成 PAL 活性下降 (Dagmar *et al.*, 2002)。

第四章 討論與展望

4.1 綠竹苯丙胺酸脫氨裂解酶純化

綠竹苯丙胺酸脫氨裂解酶之純化，先參考其他文獻純化其它物種 PAL 之經驗，設計純化流程；其中魚精蛋白沉澱核酸以及 Phenyl-Sepharose 之疏水性層析法為常用之純化步驟。竹葉中含有大量的色素，在純化過程中無法取得非常澄清之酵素液，Phenyl-Sepharose 之膠體有吸附色素之缺點，因此需要使用膠體過濾法來稀釋色素。總觀純化表與電泳分析結果，Phenyl-Sepharose 步驟之純化效果最佳，可以得到較為明顯之 PAL 色帶。Phenyl-Sepharose 是利用蛋白質上非極性基團間的疏水性引力 (hydrophobic interaction) 將蛋白質溶離出來，使用硫酸銨來拉鹽梯度，高濃度硫酸銨使得蛋白質表面疏水性區域增加，會被吸附在非極性之固定相擔體上，隨著硫酸銨濃度減少，環境的極性降低，蛋白質依照疏水性區域多寡分別被溶離下來。換言之，表面疏水性區域越多之蛋白質與非極性之固定相擔體結合能力越強，越不容易被溶離下來。綠竹 PAL 推測為細胞質內可溶性蛋白質，理論上表面疏水性區域不多，但是卻會與 phenyl group 緊密結合，硫酸銨濃度幾乎為 0 M 時才會被溶離下來，推測可能原因並不是 PAL 表面疏水性區域多，而是 PAL 與 phenyl group 有專一性結合，類似親和層析法而被吸附。

竹葉 PAL 極不穩定，在室溫中容易失去活性，竹筍 PAL 亦是如此，電泳分析常會觀察到可疑之降解片段，經 Q-ToF 進行胺酸定序後確認，竹筍 PAL 容易降解成分子量較小之色帶，且該色帶為 PAL 無誤。根據純化的經驗，竹葉 PAL 一天活性下降約一半，純化之效果如何取決在整體流程與時間之影響。整個純化步驟大約三天內可完成，之後必須迅速地進行生化性質與動力學探討，酵素液必須置於 -20°C 保存 PAL 活性。

竹殼 PAL 純化略異於竹葉 PAL，主要差別在最後一步驟由 DEAE-Sepharose 改為 FPLC Mono Q，但是基本的純化概念都是離子交換法。而經過測試，竹筍 PAL 純化步驟與竹殼 PAL 相同。竹殼與竹筍較少有色素干擾，活性較容易保存，整體 PAL 蛋白質量也較竹葉 PAL 多，竹殼 PAL 較為穩定，均質後之酵素儲存在 -20°C 冰箱中，無須加入抗凍劑，可以保持活性至

少一個月以上。

經過純化最後一步離子交換管柱層析後，竹殼 PAL 比活性比竹葉高約 6 倍，比竹筍 PAL 高約兩倍；且回收率較佳，可達 10% 以上，造成這個結果的可能原因為：竹殼 PAL 活性較為穩定，不易降解；又竹殼 PAL 蛋白質含量較竹葉與竹筍豐富，因此會造成竹殼 PAL 在純化上較為順利。竹殼 PAL 活性較竹筍高，細分竹殼與筍部位，差別在竹筍一旦出土，竹殼立刻會接觸到光照，誘導葉綠體發育與光合作用進行。有文獻指出 (Kubasek *et al.*, 1992)：阿拉伯芥中與 flavonoid 生合成相關基因，包括 PAL、CHS、CHI、DFR (dihydrofolate reductase) 等，受到光照誘導時，其 mRNA 量會累積，蛋白質活性也會增加；已知白光、紅光、遠紅光、藍光及 UV 都有誘導 PAL 活性之特性。以綠竹三種不同部位而言，PAL 活性由高到低依序為：竹殼>竹筍>竹葉。

綠竹為生長旺盛之植物，竹筍 PAL 活性高，可能是為了要累積木質素等二級代謝產物之前驅物，以供植物快速生長所需，而當竹筍在收成後，因為 PAL 活性高，是造成容易木質化的原因之一；一旦竹筍出土，竹殼立刻接受到光線的刺激，外型顏色由淺褐色轉變為綠色，為葉綠素之顏色。當葉綠體開始發育，會大量生合成芳香族胺酸，包括苯丙胺酸，為 PAL 催化所需之基質，酵素活性上升可能與基質量增加及光照誘導有關，這時不論二級代謝要導向哪個分支，PAL 活性上升以便產生二級代謝前驅物是必然現象。

4.2 竹殼與竹筍苯丙胺酸裂解酶可能為醣蛋白

竹殼 PAL 在原態膠體電泳分析之 CBR 染色為一擴散色帶，有可能因為是醣基化修飾使得泳動率無法固定而造成之現象。使用過碘酸-硝酸銀染色法 (periodic acid-ammoniacal silver staining)，目標蛋白質 PAL 確實有醣染色帶，推測 PAL 應為醣蛋白，在原態電泳也可以觀察有醣染之色帶。由醣染色帶之分子量推估 PAL 之單元體約為 76 kD，與高等植物預測之 PAL 分子量相去不遠，蛋白質在醣基化修飾時可能會伴隨部分肽鏈被切除，造成分子量差異不大，或是醣基化修飾程度不高，醣類分子量佔整體醣蛋白比例低，但足以進行醣染分析。竹葉 PAL 經 SDS 膠體電泳分析之蛋白質色帶類似竹殼，且原態膠體電泳亦為模糊之色帶，推測也有醣基化修飾現象，至於活性高低與醣基化程度多寡之關係則仍未知。竹筍 PAL 醣染亦有觀察到類似竹殼 PAL 的現象。

根據研究 (Kim *et al.*, 2001) 指出：真菌與植物 PAL 之核苷酸序列有預測之 N-linked 醣基化修飾位置，而部份真菌中 PAL 並非醣蛋白。另有相關研究 (Havir, 1979; Shaw *et al.*, 1990) 指出：在高等植物中 PAL 醣基化修飾對活性調節是重要的影響因素之一，以 tunicamycin 來抑制 N-linked 醣基化修飾發生，會使得 PAL 活性下降，推測是因為沒有醣基化修飾造成 PAL 蛋白質無法摺疊

成正確之催化活性區，造成與基質結合之親和力下降所致。

4.3 苯丙胺酸裂解酶之胺酸定序與分子形式

使用 N-端定序來確定 PAL 序列，由於效果不佳，無法得到預期結果，推測 PAL 之 N-端序列被 blocking，包括乙醯化修飾 (acetylation) 等；因此改以 trypsin in-gel digestion 後，進行 Q-TOF 分析。所得到的結果，經 NCBI 資料庫比對可知：經胰蛋白酶切後的 peptides 與玉米及水稻 PAL 有數條 peptide 相符合，與竹筍 PAL 結果類似，均與玉米 PAL 最相似。雖然都為綠竹不同部位之 PAL，但定序結果略有差異，可能原因為下：可能有 isoform 存在，無法排除竹殼與竹筍 PAL 並非同一個 isoform 之可能性；trypsin 處理時間不同，雖然已經是定序等級之 trypsin，也可能會有非專一性銜切結果；此外 Q-TOF 機器之穩定性亦為干擾因素之一。利用定序來確定純度，純化到最後一步之 SDS-PAGE 單一色帶應為目標蛋白質 PAL。目前正以純化之竹殼 PAL 蛋白質來進行多株抗體製備。

使用膠體過濾法可以得知竹葉 PAL 之原態分子量約為 290 kD，竹殼 PAL 之原態分子量約為 275 kD，竹筍 PAL 分子量為 258 kD；一般高等植物 PAL 之原態分子量約介於 240-360 kD，大多數為四元體結構 (tetrameric form)，少數真菌 PAL 為二元體 (dimeric form) 結構；相較之下，竹筍各部位 PAL 並沒有顯著分子量差異。竹筍 PAL 活性保存不易，蛋白質容易降解，可能是因為部分降解造成原態分子量較綠竹其他部位低，也有可能是有其他後轉譯修飾所造成。經胺酸定序結果佐證，竹殼 PAL 之單元體 (subunit) 分子量略小於 76 kD，與一般高等植物的單元體分子量差異不大。相較於原態分子量，推測 PAL 應為四元體之酵素，但是是否為同質四元體 (homotetramer) 或是異質四元體 (heterotetramer) 則仍待進一步研究。

4.4 綠竹 PAL 基因選殖與啓動子分析

篩選綠竹 cDNA 庫與染色體基因庫，經定序後得到四條 PAL 序列，按照篩選次序，命名為 *BOPAL 1*、*BOPAL 2*、*BOPAL 3* 和 *BOPAL 4*。其中 *BOPAL 1*、*BOPAL 2* 與 *BOPAL 4* 得到全長核苷酸序列，長度在 2,136~2,142 bp 之間。而 *BOPAL 3* 為部分之序列，有 957 bp 長。利用染色體徒步 (genome walking) 方式，我們得到了 *BOPAL 4* 的啓動子序列。利用美國國家資料庫 NCBI 進行比對 (blastp)，證實該四個基因皆為 PAL。將三個全長 PAL 基因之胺酸序列與其他物種比對，相似度最高為稻米與小麥的 PAL 基因。利用軟體分析，得到的 *BOPAL* 理論分子量大約在 77 kD，理論等電點約為 5.8~5.9 左右。*BOPAL* 基因中具 PAL 的高保守性區域，該保守性區域包含五個連續性的胺酸序列

(Ala-Ser-Gly-Asp-Leu)，而該保守性區域在其他物種中的 PAL 都會出現，出現的位置約在第 200 個胺酸附近，該區域中的 Ala-Ser-Gly 三個胺酸構成了特殊的 MIO group (4-methylideneimidazole-5-one group)，MIO group 可能為 PAL 催化作用的活性中心 (Poppe *et al.*, 2001)，這對於綠竹中 PAL 催化活性的研究，提供了更有利的線索。利用細胞定位分析軟體分析，發現 *BOPAL 1~BOPAL 4* 皆不存在運送往葉綠體或粒線體的訊息序列 (signal peptide)，有比較高的機率是存在細胞質中，而非存在粒線體或葉綠體中。

篩選染色體基因庫，得到 *BOPAL 4* 基因全長及包含基因上游約 400 b.p 的啓動子 (promoter) 序列。參考相關文獻指出，在 PAL 基因的啓動子中有特定的保守性序列，分別稱為 P-box、A-box、L-box。*BOPAL 4* 啓動子的 -157 位置也有類似 A-box 的序列，命名為 A'-box。將綠竹 *BOPAL 4* 之啓動子序列利用網路軟體分析工具分析，推測 TATA-box 位在轉譯起始上游 -180 核苷酸區域，且在上游 -219 位置有類似轉錄因子 AP-2 的結合位置，可能以 cAMP 作為誘導因子或抑制因子，顯示 *BOPAL 4* 基因本身可能會受到 cAMP 相關作用的調控。在這段 250 b.p. 的啓動子中，還包含了幾個重要的調控區。在啓動子 -228 的位置存在著 P-box 序列，以及 -205 位置存在 A-box 序列，在其它物種的 PAL 基因啓動子中，P-box 和 A-box 被證實該區域是調控 PAL 基因表現之順位因子 (cis-acting element)，可能有特殊轉錄因子和該區域結合，改變 PAL 基因的表現量。啓動子 -215 位置存在 W-box，該區域被認為是和吉貝素 (gibberellin) 誘導的基因抑制作用有關 (Zhang *et al.*, 2004)。啓動子 -222 位置存在 Myb-motif，已知 Myb protein 是與 phenylpropanoid 代謝調節相關的轉錄因子，啓動子中的 Myb-motif 序列藉由與 Myb protein 結合，來調控 PAL 基因表現 (Tamagnone *et al.*, 1998)。啓動子 -66 位置有一特殊區域，該區域序列 2004 年所發表的 CACTFTPPCA1-site 具有相似性，被認為和 phosphoenol- pyruvate carboxylase (ppcA1) 的調控有關。啓動子 -57 位置存在 GATA-box，GATA-box 被認為是促進基因高度表現的正向調控因子，cauliflower mosaic virus (CaMV) 基因啓動子存在著 GATA-box，可被轉錄因子 ASF-2 結合，促進基因大量表現。綠竹中 *BOPAL 4* 啓動子區域也發現 GATA-box 的存在，這或許可以對綠竹中二次代謝物快速累積提供合理的解釋，由於 PAL 此一關鍵酵素的基因表現活性高，造成下游產物迅速可以被合成與累積。啓動子 -29 的區域中存在 ABRELATERD1-site (ABRE-like sequence)，2004 年首先在阿拉伯芥中 *erd1* 基因中 (early responsive to dehydration, *erd1*) 發現有 ABRELATERD1-site 存在，*erd1* 基因會受到脫水和黃化 (etiolation) 誘導，*BOPAL 4* 啓動子存在 ABRELATERD1-site，可能和阿拉伯芥 *erd1* 基因有相似的調控機制。

4.5 大腸桿菌表現系統之建立

由純化綠竹 PAL 之經驗得知，PAL 蛋白質極有可能為醣蛋白，但是即使有

醣化現象，程度亦不高。因此在考慮表現綠竹 *PAL 1* 與 *PAL 2* 時，選擇較少轉譯後修飾的原核細胞作為表現系統。

利用設計帶有 *Bam*HI 與 *Eco*R I 切位引子 (附錄三)，進行 PCR 反應放大增殖，將 *PAL* 序列修飾成具有限制酶切位。接者以 *Bam*HI 與 *Eco*R I 兩者分別酶切表現質體 pTrcHisA、*PAL 1* 與 *PAL 2* 片段，經脫鹽純化 DNA 片段，再將處理過的 DNA 片段分別接合到載體 pTrcHisA 的 His-tag 序列的下游，形成表現載體 pTrcHisA/*PAL 1* 與 pTrcHisA/*PAL 2*，然後轉形到大腸桿菌 Top10 中。以限制酶切割及定序分析所接入的序列無誤後，再進行重組蛋白最佳誘導條件之探討。

經由不同 IPTG 濃度、溫度與時間探討最適表現條件，由實驗數據得知：pTrcHisA/*PAL 1*/Top10 與 pTrcHisA/*PAL 2*/Top10 兩個表現系統的最佳誘導條件為，在 37°C 下，以 2 mM IPTG 誘導培養 8 小時，即可表現大量具有活性的重組蛋白質 *PAL 1* 與 *PAL 2*。

4.6 表現蛋白之純化

將表現菌株在最適條件下大量培養後，破菌離心製得粗抽液，利用表現蛋白質上所帶有的六個 Histidine 標籤，將粗抽液通入鎳離子親和管柱中，使表現蛋白質與膠體上的鎳離子螯合，以含不同濃度 imidazole 的流洗液競爭結合鎳離子，而將蛋白質溶離出來，達到純化目的。

將表現蛋白質 *PAL 1* 與 *PAL 2* 兩個純化步驟所預留之樣本，進行蛋白質定量、酵素活性與膠體電泳分析，經計算得到純化表，*PAL 2* 的比活性 (809 nkat/mL) 約為 *PAL 1* 比活性 (160 nkat/mL) 的五倍，但就純化倍率而言，*PAL 1* 約為 *PAL 2* 兩倍，也就是說經粗抽、親和管柱層析兩個相同純化步驟，對 *PAL 1* 的純化效果較佳。粗抽液經鎳離子親和管柱層析後，蛋白質以 CBR 染色結果為單一色帶，而由綠竹 *PAL* 多株抗體之免疫染色圖，則進一步確認此單一蛋白質為 *PAL*。

4.7 表現蛋白之分子形式

由目前已發表文獻整理得知，*PAL* 酵素大多以四元體 (tetramer) 形式作用，原態分子量介於 250~330 kD 之間，單元體分子量介於 63~83 kD 之間。而植物體中通常不會只有一個 *PAL* 存在，亦即植物體內 *PAL* 存在兩種以上的不同單體，可能組成 heterotetramer 或 homotetramer 的酵素構形。以膠體過濾法估計綠竹不同部位 *PAL* 的分子量，得到綠竹葉 *PAL* 分子量約 290 kD、筍殼 *PAL* 約 275 kD 與竹筍 *PAL* 約 258 kD，推測綠竹 *PAL* 是以四元體構成，但無法確定是同質或異質單體所組成。

表現之 PAL 1 與 PAL 2 單元體分子量約為 79 kD，而綠竹 PAL 1 與 PAL 2 cDNA 所推演出之胺酸序列，經由電腦推測，理論計算分子量為 76 kD。PAL cDNA 因為表現載體在 N 端一段約 3 kD 的胜肽片段，所以經由大腸桿菌表現使得重組蛋白質 PAL 1 與 PAL 2 的分子量略大於預測值。兩個表現蛋白質原態分子量略高於竹殼 PAL，介於 242 kD 與 440 kD 之間。再由膠體過濾法估計 PAL 1 與 PAL 2 的分子量，經計算得知 PAL 1 分子量約為 320 kD，而 PAL 2 分子量約為 330 kD，因此可以推測經由大腸桿菌所表現之重組蛋白質 PAL 1 與 PAL 2，能以同一單體構成同質四元體形式在大腸桿菌中表現。

4.8 原態與表現之苯丙胺酸裂解酶生化性質比較

由 Table 16. 結果可知：竹殼與竹葉 PAL 反應最適溫度為 50°C，而且竹葉與竹殼 PAL 所表現的最適反應溫度趨勢相近。相較於大部份植物，包括竹筍、水稻苗、向日葵 (sunflower)、美國南瓜 (marrow) 等，最適溫度都在 50°C 左右，但亦有最適溫度為 35°C 之玉米 PAL。反應溫度 50°C 高溫可能有利於 PAL 活性催化區 Ala-Ser-Gly 組合成具有催化能力之 methylidene-imidazol-one (MIO)。太高的溫度則蛋白質無法維持正確構形，導致活性下降。

利用 Arrhenius 方程式，求活化能 (Ea)，所得結果為：竹葉活化能為 13.9 kcal/mol，竹殼為 11.8 kcal/mol，竹筍活化能為 15.6 kcal/mol，與高等植物水稻 PAL 之活化能 18.1 kcal/mol 相近 (Sarma *et al.* 1999)。而美國南瓜與甘藷 PAL 具有兩個活化能 (El-Shora, 2001； Tanaka *et al.*, 1977)，推測可能有兩個活性催化區在不同溫度下負責調控 PAL 活性，或是同一個活性區會因為溫度改變，而造成蛋白質四級結構改變。

由於 PAL 可以耐受到 50°C 左右高溫，因此先將酵素液以 50°C、60°C 及 70°C 不同溫度先分別處理不同時間，再調整回到 37°C 反應 30 分鐘，來觀察 PAL 對熱的安定性。以竹葉 PAL 而言，經過 50°C 及 60°C 處理一小時，對 PAL 活性幾乎沒有影響。要以 70°C 處理約 15 分鐘才可以使竹葉 PAL 活性下降至 50%。竹殼 PAL 在 50°C 及 60°C 處理一小時的結果都類似於竹葉 PAL；可是以 70°C 高溫處理 5 分鐘就可以使竹殼 PAL 活性降低到剩下約 30%。竹葉與殼 PAL 經過 50°C 和 60°C 處理之後，整體活性變化趨勢相似，PAL 屬於熱安定性佳之酵素，一直到高溫 70°C 處理後，才會使得 PAL 活性明顯下降。一般而言，以綠竹筍採收後之殺青過程，至少要 80°C 以上，才能去除 PAL 活性，達到防止竹筍老化降低品質效果。

PAL 為熱安定性佳之酵素，在 60°C 處理一小時，調整溫度到 37°C 測活性，約可保留 80% 活性 (Figure 27.)；但是高溫並不利於反應進行，當固定 60°C 為測活性溫度時，活性大約只有最適反應溫度 50°C 活性之 40%，相較於

37°C 當作測活性溫度，比較最適反應溫度 50°C，活性大約可以保留 70%，換言之，比較 **Figure 25.** 之結果，固定溫度 60°C 比起固定溫度 37°C 所測出之活性，大約只剩下 60%，因此推論 PAL 雖然熱安定性高，但是高溫並不適合反應進行。

利用基質飽和曲線及雙倒數曲線來求得 K_m 值，PAL 為單基質反應，因此只需要改變基質 phenylalanine 濃度即可。本論文得知竹葉 PAL 之 K_m 值為 550 μM ，竹殼為 476 μM ，與基質親和力相近；竹筍 PAL 之 K_m 值為 328 μM ，結果略小於竹葉與殼之 K_m 值， K_m 值由大到小排列為：竹葉 > 竹殼 > 竹筍，顯示綠竹筍中的 PAL 對於 phe 的親和力大於竹葉與竹殼中的 PAL，而竹葉 PAL 對 phe 親和力最差，而竹殼為介於竹葉與竹筍中間， K_m 值也正好介於兩者之間。

與其他物種 PAL 比較，單子葉植物水稻 PAL 之 K_m 值約為 500 μM ，與本論文結果相近；而竹筍 PAL 之 K_m 值約為 328 μM ，較低的 K_m 值代表對基質親和力較高。在高等植物中 PAL 之 K_m 值都極低，尤其部分單子葉植物，以玉米為例， K_m 值只有 11 和 55 μM ，這是因為 PAL 對低基質濃度有正協同性 (positive cooperativity) 所造成。

金屬離子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 對綠竹 PAL 活性抑制程度為：竹筍 > 竹殼 > 竹葉。 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 對綠竹各部位都有抑制現象； Hg^{2+} 的抑制效果更明顯。以 *Ustilago maydis* PAL (Kim, 1996) 為例， Co^{2+} 和 Hg^{2+} 也有明顯抑制作用。而 Ca^{2+} 有特殊之抑制現象，同為綠竹材料，竹筍 PAL 會有極明顯之抑制現象，竹殼 PAL 次之，而竹葉 PAL 幾乎不受影響，這是非常有趣的現象，在 *in vitro* 狀況下所得到的結果，在 *in vivo* 是否也適用，是值得深入探討的。

植物二級代謝是被嚴格調控的，代謝產物對 PAL 大多具有回饋抑制現象。一般使用之濃度不需太高即有明顯抑制作用。綠竹三個部位之 PAL 受二級代謝物的抑制情形都很類似，幾乎都有抑制現象。以 *trans-cinnamic acid* 而言，可以觀察到抑制現象，但是不是很明顯，原因可能是 100 μM 濃度不能對 PAL 產生強烈抑制反應，由於使用 A_{290} 變化量當作 PAL 活性測定方法，而 *trans-cinnamic acid* 有極高吸光值。為了解決這個問題，可以利用放線性 ^{14}C -phenylalanine 來測定 PAL 活性，這時就可以克服 *trans-cinnamic acid* 之濃度障礙。在 *in vivo* 情況下，*trans-cinnamic acid* 所造成知回饋抑制現象可以被忽略；在植物體內 PAL 與 C4H 會形成複合體，當 *trans-cinnamic acid* 產生後，會立刻被 C4H 代謝成 *p-coumaric acid*，因此 *trans-cinnamic acid* 之產物回饋抑制現象在植物體內是不被重視的。

由本論文實驗得知：PAL 作用時 serine、tyrosine、histidine residues 是催化時所必需之胺酸，與之前研究結果類似 (Kim, 1998; El-Shora, 2001)。另外

cysteine residue 被修飾對 PAL 活性影響最小。此外亦有文章指出 carboxyl group (El-Shora, 2001) 對 PAL 活性催化也是必需的。PAL 活性催化區 Ala-Ser-Gly 組合成具有催化能力之 MIO，與綠色螢光蛋白 (GFP) 發光原理相似，要能維持構形才能進行反應。

4.9 未來展望

目前已經證實玉米等禾本科單子葉植物之 PAL 酵素同時具有 TAL 活性，綠竹亦為禾本科單子葉植物。禾本科單子葉植物與其他植物 PAL 之基質專一性有極大不同，確切原因仍然不明。綠竹 PAL 在純化過程中也伴隨著可以偵測到 TAL 活性，但是無法排除是隨著純化 PAL 的流程中一起純化到 TAL，因此要先選殖出綠竹 PAL 基因，之後在沒有 PAL 活性之大腸桿菌 (*E. coli*) 中表現，純化表現之 PAL 蛋白質，分析是否具有 PAL 與 TAL 活性，方能真正釐清綠竹 PAL 是否具有 TAL 活性。

在植物生理上言之，竹殼是介於竹葉與竹筍之間的材料，在地底下時，因為沒有照光，因此沒有葉綠素的發育，外型為淺褐色，一但出土則表皮立刻呈現綠色，似乎與照光與光合作用有關。竹殼又不完全是葉子的形式，因此研究竹殼之 PAL 蛋白質有相當多意料外結果，例如 PAL 活性高、蛋白質量多、容易純化、不易降解等特性，值得再進一步探討 PAL 在竹殼所扮演之生理意義。

綠竹筍之生長有季節性，可用組織培養方式 (何，1995)，誘導癒創組織產生，目標要得到懸浮細胞以供實驗材料所需，不會受到天候與季節的影響。最終目標是建立試管內植株再生系統，可以得到自然界中較難得到之材料，例如根與花等材料。如能以癒創組織或懸浮細胞當作材料，可進行 PAL 活性與褐化現象之相關研究；並且可以在 *in vivo* 狀態下，探討滲透逆境或特定抑制劑對 PAL 之影響。

PAL 是醣蛋白，目前已知大多數物種之 PAL 序列中有預測之 N-linked 醣基化修飾位置，實驗的下一步可使用 glycopeptidase F (N-Glycosidase F; Peptide N-glycosidase; PNGase F; EC 3.5.1.52, Sigma G-5166) 處理，試圖將 N-linked 醣基化修飾位置切除，經酵素處理後，進行電泳分析，觀察分子量的變化，可以估計 N-linked 醣基化修飾所佔 PAL 蛋白質分子量之比例，另外還有 O-linked glycosidase 可供選擇。

竹殼中 PAL 有活性高、保存容易、不易降解、方便純化、蛋白質量多等好處，並且已經利用 Q-TOF 來確定蛋白質純度。直接利用純化竹殼 PAL 就有足量之蛋白質來當作抗原製備多株抗體，一旦多株抗體有一定效價，則可進行 PAL

蛋白質合成和降解與竹筍生長老化關係之探討，以及組織定位等免疫生化學相關實驗。

針對啓動子分析，找出許多可能之 *cis-acting elements*，包括保守性序列 P-box 和 A-box，cAMP 相關作用的調控位置，和吉貝素誘導的基因抑制作用有關之 W-box，與 phenylpropanoid 代謝調節相關的 Myb-motif，促進基因大量表現之 GATA-box 以及受到脫水和黃化現象誘導之 ABRELATERD1-site 存在。短短的 250 bp 啓動子序列包含如此多可能之轉錄因子調控位置，也代表了二次代謝中的 PAL 基因是被嚴格調控，未來將一一證實這些 *cis-acting elements* 與轉錄因子之間的作用，及其扮演之生理角色探討。

本實驗室已成功將 *PAL 1* 與 *PAL 2* 接入表現載體中，建立出兩套大腸桿菌表現系統，經由適當的條件誘導及純化，可生產量與質兼具的 *PAL 1* 與 *PAL 2* 表現蛋白質；經由大腸桿菌表現之 *PAL* 與綠竹 *PAL* 進行生化性質比較得知，表現蛋白質 *PAL* 與綠竹原態 *PAL* 有相似的性質。爲了更加了解 *PAL* 在綠竹中所扮演之生理角色，根據目前之研究結果，搭配分子生物學與蛋白質兩方面的技術，可繼續進行下列幾項實驗，以期深入研究 *PAL* 的代謝功能、催化機制與組織分佈等情況。

第五章 參考文獻

- Alibert, G., Ranjeva, R. and Boudet, A. (1972) Studies on enzymes catalyzing phenolic acids formation in *Quercus pendunculata* (Ehrh.). II. Intracellular location of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase and "benzoate synthase". *Biochim Biophys Acta* **279**, 282-288.
- Allwood, E. G., Davies, D. R., Gerrish, C. and Bolwell, G. P. (2002) Regulation of CDPKs, including identification of PAL kinase, in biotically stressed cells of French bean. *Plant Mol Biol.* **49**, 533-44.
- Allwood, E. G., Davies, D. R., Gerrish, C., Ellis, B. E. and Bolwell, G. P. (1999) Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. *FEBS Lett.* **457**, 47-52.
- Alunni, S., Cipiciani, A., Fioroni, G. and Ottavi, L. (2003) Mechanisms of inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by phenol inhibitors and phenol/glycine synergistic inhibitors. *Arch Biochem Biophys.* **412**, 170-5.
- Amrita, K. and Brian, E. Ellis (2001) The Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family in Raspberry. Structure, Expression, and Evolution *Plant Physiology* **127**, 230-239.
- Appert, C., Logemann, E., Hahlbrock, K., Schmid, J. and Amrhein, N. (1994) Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isozymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.). *Eur J Biochem* **225**, 491-499.
- [Appert, C., Zon, J. and Amrhein, N.](#) (2003) Kinetic analysis of the inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by 2-aminoindan-2-phosphonic acid and other phenylalanine analogues.

- Phytochemistry*. **62**, 415-22.
- Attridge, T. H., Stewart, G. R. and Smith, H. (1971) End-product inhibition of *Pisum* phenylalanine ammonia-lyase by the *Pisum* flavonoids. *FEBS Lett.* **17**, 84-86.
- Baedeker, M. and Schulz, G. E. (1999) Overexpression of a designed 2.2 kb gene of eukaryotic phenylalanine ammonia-lyase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **457**, 57-60.
- Bate, N. J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P. W., Dixon, R. A., Lamb, C. J. and Elkind, Y. (1994) Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 7608-7612.
- Benfey, P.N. and Chua, N. H. (1990) The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science.* **250**, 959-966.
- Benoit, M. A., D'Aprano, G. and Lacroix, M. (2000) Effect of gamma-irradiation on phenylalanine ammonia-lyase activity, total phenolic content, and respiration of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Agric Food Chem* **48**, 6312-6.
- Bevan, M. and Northcote, D. H. (1979) The loss of morphogenetic potential and induction of phenylalanine ammonia-lyase in suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. *J Cell Sci* **39**, 339-353.
- Blount, J. W., Korth, K. L., Masoud, S. A., Rasmussen, S., Lamb, C. J. and Dixon, R. A. (2000). Altering Expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol.* **122**, 107-116.
- Bolwell, G. P. (1992) A role for phosphorylation in the down regulation of phenylalanine ammonia-lyase in suspension cultured cells of French bean. *Phytochemistry.* **31**, 4081-6.
- Bolwell, G. P. (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 287-294.
- Bolwell, G. P., Bell, J. N., Cramer, C. L., Schuch, W., Lamb, C. J. and Dixon, R. A. (1985) L-phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*: characterization and differential induction of multiple forms from elicitor-treated suspension cultures. *Eur J Biochem* **149**, 411-419.
- Bolwell, G. P., Cramer, C. L., Lamb, C. J., Schuch, W. and Dixon, R. A. (1986) L-Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*. Modulation of the levels of active enzyme by *trans*-cinnamic acid. *Planta* **169**, 97-107.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Buchanan, B. B., Cruissem, W. and Jones, R. L., (2001) Biochemistry & Molecular Biology of Plant, Chapter 24.
- [Chaman, M. E., Copaja, S. V. and Argandona, V. H.](#) (2003) Relationships between salicylic acid content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and resistance of barley to aphid infestation. *J Agric Food Chem.* **51**, 2227-31.
- Chang, W. C. (1991) Bamboo, In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 16, Tree III. P.221-237. Springer-Verlag, Berlin.
- Chang, W. C. (1994) Somatic embryogenesis of *Bambusa oldhami*, *Bambusa beecheyana* and *Sinocalamus latiflora*. In: Jain, S. Gupta, P. and Nowton, R. (eds.). Somatic Embryogenesis in Woods Plants. P. 53-65. Kluwer Academic Publisher, Netherland.

- Cheng, S. H., Sheen, J., Gerrish, C. and Bolwell, G. P. (2001) Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active *Arabidopsis* CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Lett.* **503**, 185-188.
- Cramer, C. L., Edwards, K., Dron, M., Liang, X., Dildine, S. L., Bolwell, G. P., Dixon, R. A., Lamb, C. J. and Schuch, W. (1989) Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Mol. Biol.* **12**, 367-383.
- Czichi, U. and Kindl, H. (1975) Formation of *p*-coumaric acid and *o*-coumaric acid from L-phenylalanine by microsomal membrane fractions from potato: Evidence of membrane-bound enzyme complexes. *Planta* **125**, 115-125.
- Czichi, U. and Kindl, H. (1977) Phenylalanine ammonia-lyase and cinnamic acid hydroxylases as assembled consecutive enzymes on microsomal membranes of cucumber cotyledons: Cooperation and subcellular distribution. *Planta* **134**, 133-143.
- [Deikman, J. and Hammer, P. E.](#) (1995) Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **108**, 47-57.
- Dieguez, M. J., Belloto, M., Afsar, K., Mittelsten Scheid, O. and Paszkowski, J. (1997) Methylation of cytosines in nonconventional methylation acceptor sites can contribute to reduced gene expression. *Mol Gen Genet.* **253**, 581-588.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085-1097.
- Dixon, R. A., Browne, T. and Ward, M. (1980) Modulation of L-phenylalanine ammonia-lyase by pathway intermediates in cell suspension cultures of dwarf French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta* **150**, 279-285.
- Dunn, D. C., Duncan, L. W. and Romeo, J. T. (1998) Changes in arginine, PAL activity, and nematode behavior in salinity-stressed citrus. *Phytochemistry* **49**, 413-7.
- Edwards, K., Cramer, C. L., Bolwell, G. P., Dixon, R. A., Schuch, W. and Lamb, C. J. (1985) Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6731-6735.
- Elkind, Y., Edwards, R., Mavandad, M., Hedrick, S. A., Ribak, O., Dixon, R. A. and Lamb, C. J. (1990) Abnormal plant development and downregulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9057-9061.
- El-Shora, H. M. (2002) Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons. *Plant Sci.* **162**, 1-7.
- Emes, A. V. and Vining, L. C. (1970) Partial purification and properties of L-phenylalanine ammonia-lyase from *Streptomyces verticillatus*. *Can J Biochem.* **48**, 613-22.
- Facchini, P. J., Huber-Allanach, K. L. and Tari, L.W. (2000) Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry* **54**, 121-138.
- Flavell, R.B. (1994) Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3490-3496.
- Fukasawa-Akada, T., Kung, S. and Watson, J. C. (1996) Phenylalanine ammonia-lyase gene structure, expression, and evolution in *Nicotiana*. *Plant Mol. Biol.* **30**:711-722.
- Gidoni, D., Brosio, P., Bond-Nutter, D., Bedbrook, J. and Dunsmuir, P. (1989) Novel cis-acting elements in *Petunia* Cab gene promoters. *Mol Gen Genet.* **215**, 337-44.

- Gilmartin, P. M., Sarokin, L., Memelink, J. and Chua, N. H. (1990) Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell* **2**, 369–378.
- Given, N. K., Venis, M. A. and Grierson, D. (1988) Purification and properties of phenylalanine ammonia lyase from strawberry fruit and its synthesis during ripening. *J Plant Physiol* **133**, 31-37.
- Gloge, A., Langer, B., Poppe, L. and Rétey, J. (1998) The behavior of substrate analogues and secondary deuterium isotope effects in the phenylalanine ammonia-lyase reaction. *Arch Biochem Biophys* **359**, 1-7.
- Gloge, A., Zon, J., Kovari, A., Poppe, L. and Rétey, J. (2000) Phenylalanine ammonia-lyase: the use of its broad substrate specificity for mechanistic investigations and biocatalysis-synthesis of L-arylalanines. *Chemistry* **6**, 3386-90.
- Gray-Mitsumune, M., Molitor, E., Cukovic, D., Carlson, J. E. and Douglas, C. J. (1999) Developmentally regulated patterns of expression directed by poplar PAL promoters in transgenic tobacco and poplar. *Plant Mol Biol* **39**, 657-669.
- Habibi-Moini, S. and D'mello, A. P. (2001) Evaluation of possible reasons for the low phenylalanine ammonia-lyase activity in cellulose nitrate membrane microcapsules. *Int J Pharm* **215**, 185-96
- Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**, 347-369.
- Hanson, K. R. and Havir, E. A. (1970) L-phenylalanine ammonia-lyase. IV. Evidence that the prosthetic group contains dehydroalanyl residue and mechanism of action. *Arch Biochem Biophys* **141**, 1-17.
- Hanson, K. R. and Havir, E. A. (1972) in 'The Enzyme', 3rd Ed. (Boyer, P.D., Ed.) **7**, 75-166.
- Hao, Z., Charles, D. J., Yu, L. and Simon, J. E. (1996) Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* **43**, 735-739.
- Hatton, D., Smith, C. and Bevan, M. (1996) Tissue-specific expression of the PAL3 promoter requires the interaction of two conserved *cis* sequences. *Plant Mol Biol* **31**, 393-7.
- Hattori, T., Nishiyawa, A. and Shimada, M. (1999) Induction of L-phenylalanine ammonia-lyase and suppression of veratryl alcohol biosynthesis by exogenously added L-phenylalanine in white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Lett* **179**, 305-309.
- Havir, E. A. (1979) L-Phenylalanine ammonia-lyase. Binding of polysaccharide by the enzyme from maize. *Plant Sci Lett* **16**, 297-304.
- Havir, E. A., Reid, P. D. and Marsh, H. V. Jr (1971) L-phenylalanine ammonia-lyase (maize). *Plant Physiol* **48**, 130-136.
- Herrmann, K. M. (1995) The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol* **107**, 7-12.
- Herrmann, K. M. and Weaver, L. M. (1999) The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 473-503.
- Hisaminato, H., Murata, M. and Homma, S. (2001) Relationship between the enzymatic browning and phenylalanine ammonia-lyase activity of cut lettuce, and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 1016-21.
- Howles, P. A., Sewalt, V. J. H., Paiva, N. L., Elkind, Y., Bate, N. J., Lamb, C. J. and Dixon, R. A. (1996) Overexpression of L-phenylalanine ammonia-lyase in transgenic tobacco plants reveals control points for flux into phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol* **112**, 1617-1624.

- Jangaard, N. O. (1974) The characterization of phenylalanine ammonia-lyase from several plant species. *Phytochemistry* **13**, 1765-1768.
- Jiménez, C. R., Huang, L., Qie, Y. and Burlingame, A. L. (1998) In-gel digestion of proteins for MALDI-MS fingerprint mapping. *Current Protocols in Protein Science* 16.4.1-16.4.5.
- Jingzhong, L., Hua, X., Wei, H., Zhangling, Z., Jin, Z. and Qingyuan, L. (1999) Cloning and expression of phenylalanine ammonia-lyase cDNA in *Escherichia coli*. *Chin J Biotechnol* **14**, 227-32.
- Jones, D. H. (1984) Phenylalanine ammonia-lyase: Regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry* **23**, 1349-1359.
- Jones, D. H. and Northcote, D. H. (1984) Stability of the complex formed between French bean (*Phaseolus vulgaris*) phenylalanine ammonia-lyase and its transition-state analog. *Arch. Biochem. Biophys.* **235**, 167-177.
- Jorin, J., Lopez-Valbuena, R. and Tena, M. (1988) Purification and properties of phenylalanine ammonia lyase from sunflower (*Helianthus annuus L*) *Biochim Biophys. Acta.* **964**, 73-82
- José C. R., Muro-Pastor, M. I. and Francisco J. F. (2004) The GATA Family of Transcription Factors in Arabidopsis and Rice. *Plant Physiol.* **134**, 1718-32.
- Kalghatgi, K. K. and Subba-Rao, P. V. (1975) Microbial L-phenylalanine ammonia-lyase. Purification, subunit structure and kinetic properties of the enzyme from *Rhizoctonia solani*. *Biochem J.* **149**, 65-75.
- Kato, H., Wada, M., Muraya, K., Malik, K., Shiraishi, T., Ichinose, Y. and Yamada, T. (1995) Characterization of nuclear factors for the elicitor-mediated activation of the promoter of the pea phenylalanine ammonia-lyase gene 1. *Plant Physiol* **108**, 129-139.
- Kato, M., Hayakawa, Y., Hyodo, H., Ikoma, Y. and Yano, M. (2000) Wound-induced ethylene synthesis and expression and formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase, ACC oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiol* **41**, 440-7.
- Kawamata, S., Shimoharai, K., Imura, Y., Ozaki, M., Ichinose, Y., Shiraishi, T., Kunoh, H. and Yamada, T. (1997) Temporal and spatial pattern of expression of the pea phenylalanine ammonia-lyase gene1 promoter in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol* **38**, 792-803.
- Kawaoka, A., Kaothien, P., Yoshida, K., Endo, S., Yamada, K. and Ebinuma, H. (2000) Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *Plant J* **22**, 289-301.
- Kenichi, H, Yoshihiro, U., Masao, I. and Tomoko, K. (1999) Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res.* **27**, 297-300.
- Kim, S. H., Kronstad, J. W. and Ellis, B. E. (1996) Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Ustilago maydis*. *Phytochemistry* **43**, 351-357.
- [Kim, S. H., Kronstad, J. W. and Ellis, B. E.](#) (2001) Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity by tryptophan in *Ustilago maydis*. *Phytochemistry.* **58**, 849-57.
- Kim, S.H., Virmani, D., Wake, K., MacDonald, K., Kronstad, W. and Ellis, B. E. (2001) Cloning and disruption of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ustilago maydis*. *Curr. Genet.* **40**, 40-48.
- Koukol, J. and Conn, E. E. (1961) The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J Biol Chem* **236**, 1692-2698.

- Kristensen, D. B., Imamura, K., Miyamoto, Y. and Yoshizato, K. (2000) Mass spectrometric approaches for the characterization of proteins on a hybrid quadruple time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer. *Electrophoresis* **21**, 430-439.
- Kubasek, W. L., Shirley, B. W., Mckillop, A., Goodman, H. M. and Briggs, W. (1992) Regulation of Flavonoid Biosynthetic Genes in Germinating Arabidopsis Seedlings. *Plant Cell* **4**, 1229-1236.
- [Kumar, A. and Ellis, B. E.](#) (2001) The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant Physiol.* **127**, 230-9.
- Kyndt, J. A., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A. and Van Beeumen, J. J. (2002) Characterization of bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. *FEBS Lett* **512**, 240-244.
- Lam, E. and Chua, N. H. (1989) ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters. *Plant Cell.* **1**, 1147-56.
- Lamb, C. J. and Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **48**, 251-279.
- Langer, B., Langer, M. and Rétey, J. (2001) Methylidene-imidazole-one (MIO) from histidine and phenylalanine ammonia lyase. In *Advances in Protein Chemistry*, vol **58**, 175-214. Edited by Klinman, J.P. and Dove, J.E., New York: Academic Press.
- Langer, B., Rother, D. and Rétey, J. (1997) Identification of essential amino acids in phenylalanine ammonia-lyase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **36**, 10867-71.
- Langer, M., Reck, G., Reed, J. and Rétey, J. (1994) Identification of serine-143 as the most likely precursor of dehydroalanine in the active site of histidine ammonia-lyase. A study of the overexpressed enzyme by site-directed mutagenesis. *Biochemistry.* **33**, 6462-7.
- Lawton, M. A. and Lamb, C. J. (1987) Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding, and infection. *Mol Cell Biol.* 1987 Jan;7(1):335-41.
- Lee, P. D. and Su, J. C. (1970) Cytokinin activity of bamboo shoot soluble RNA. *J. Chinese Agr. Chem. Soc.*, Sp. Iss, 54-64.
- Lee, S. W., Robb, J. and Nazar, R. N. (1992) Truncated phenylalanine ammonia-lyase expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Biol Chem* **267**, 11824- 11830.
- Levee, V. and Seguin, A. (2001) Inducible expression of the heterologous PAL2 promoter from bean in white pine (*Pinus strobus*) transgenic cells. *Tree Physiol.* **21**, 665-72.
- Lewandowicz, A., Jemielity, J., Kanska, M., Zon, J. and Paneth, P. (1999) Tritium secondary kinetic isotope effect on phenylalanine ammonia-lyase-catalyzed reaction. *Arch Biochem Biophys* **370**, 216-21.
- [Leyva, A., Jarillo, J. A., Salinas, J. and Martinez-Zapater, J. M.](#) (1995) Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol.* **108**, 39-46.
- Liang, X. W., Dron, M., Cramer, C. L., Dixon, R. A. and Lamb, C. J. (1989) Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. *J Biol Chem.* **264**, 14486-92.
- Lim, H. W., Park, S. S. and Lim, C. J. (1997) Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from leaf mustard. *Mol Cells* **7**, 715-20.
- Lim, H. W., Sa, J. H., Park, S. S. and Lim, C. J. (1998) A second form of phenylalanine ammonia-lyase from leaf mustard. *Mol Cells* **8**, 343-9.

- Loake, G. J., Choudhary, A. D., Harrison, M. J., Mavandad, M., Lamb, C. J. and Dixon, R. A. (1991) Phenylpropanoid pathway intermediates regulate transient expression of a chalcone synthase gene promoter. *Plant Cell* **3**, 829-40.
- Logemann, E., Parniske, M. and Hahlbrock, K. (1995) Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 5905-5909.
- Lois, R., Dietrich, A., Hahlbrock, K. and Schulz, W. (1989) A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *EMBO J* **8**, 1641-8.
- Maher, E. A., Bate, N. J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R. A. and Lamb, C. J. (1994) Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7802-7806.
- Matsumoto, S., Kiriiwa, Y. and Takeda, Y. (2002) Differentiation of Japanese green tea cultivars as revealed by RFLP analysis of phenylalanine ammonia-lyase DNA *Theor Appl Genet* **104**, 998-1002.
- McKegney G. R., Butland, S.L., Theilmann, D. and Ellis, B. E. (1996) Expression of poplar phenylalanine ammonia-lyase in insect cell culture. *Phytochemistry* **41**, 1259- 1263.
- Meyer, P. (1996) Homology dependent gene silencing in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 23-48.
- Mishra, K. K. and Handa, A. K. (1998) Post-transcriptional silencing of pectin methylesterase gene in transgenic tomato fruits from impaired pre-mRNA processing. *Plant J.* **14**, 583-592.
- Nagai, N., Kitauchi, F., Okamoto, K., Kanda, T., Shimosaka, M. and Okazaki, M. (1994) A transient increase of phenylalanine ammonia-lyase transcript in kinetin-treated tobacco callus. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**, 558-559.
- Nagai, N., Kitauchi, F., Shimosaka, M. and Okazaki, M. (1994) Cloning and sequencing of a full length cDNA coding for phenylalanine ammonia-lyase from tobacco cell culture. *Plant Physiol.* **104**, 1091-1092.
- Nagai, N., Kojima, Y., Shimosaka, M. and Okazaki, M. (1988) Purification and properties of phenylalanine ammonia lyase from tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2617-9.
- Nehls, U., Ecke, M. and Hampp, R. (1999) Sugar- and nitrogen-dependent regulation of an *Amanita muscaria* phenylalanine ammonium lyase gene. *J Bacteriol* **181**, 1931-3.
- Neish, A. C. (1961) Formation of *m*- and *p*-coumaric acids by enzymatic desamination of the corresponding isomers of tyrosine. *Phytochemistry* **41**, 1259- 1263.
- Nugroho, L. H., Verberne, M. C. and Verpoorte, R. (2002) Activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in constitutively salicylic acid-producing tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.* **40**, 755-760.
- Ohl, S., Hedrick, S. A., Chory, J. and Lamb, C. J. (1990) Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from Arabidopsis. *Plant Cell* **2**, 837-848.
- O'Neal, D. and Keller, C. J. (1970) Partial purification and some properties of phenylalanine ammonia-lyase of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Phytochemistry* **9**, 1373-1383.
- [Orr, J. D., Edwards, R. and Dixon, R. A.](#) (1993) Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) (XIV. Changes in the Levels of Phenylpropanoid Pathway Intermediates in Relation to Regulation of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase in Elicitor-Treated Cell-Suspension Cultures). *Plant Physiol.* **101**, 847-856.

- Oufedjikh, H., Mahrouz, M., Amiot, M. J. and Lacroix, M. (2000) Effect of gamma-irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of Citrus clementina hort. Ex. tanaka. *J Agric Food Chem* **48**, 559-65.
- Ozeki, Y. and Takeda, J. (1994) Regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes in carrot suspension cultured cells. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **38**, 221-225.
- Ozeki, Y., Chikagawa, Y., Kimura, S., Soh, H. C., Maeda, K., Pornsiriwong, W., Kato, M., Akimoto, H., Oyanagi, M., Fukuda, T., Koda, T., Itoh, Y., Yamada, A., Davies, E., Ueno, H. and Takeda, J. (2003) Putative cis-elements in the promoter region of the carrot phenylalanine ammonia-lyase gene induced during anthocyanin synthesis. *J Plant Res.* **116**, 155-9.
- Ozeki, Y., Matsui, K., Sakuta, M., Matsuoka, M., Ohashi, Y., Kano-Murakami, Y., Yamamoto, N. and Tanaka, Y. (1990) Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during anthocyanin synthesis and by transfer effect in carrot cell suspension cultures. *Physiol Plant* **80**, 379-387.
- Pellegrini, L., Rohfritsch, O., Fritig, B. and Legrand, M. (1994) Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. *Plant Physiol.* **106**, 877-886.
- Poppe, L. (2001) Methylidene-imidazolone: a novel electrophile for substrate activation. *Curr Opin in Chem Biol* **5**, 512-524.
- Prutpongse, P. and Gavinlertvatana, P. (1992) *In vitro* micropropagation of 54 species from 15 genera of bamboo. *HortScience.* **27**, 453-455.
- Rasmussen, S. and Dixon, R. A. (1999) Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* **11**, 1537-1552.
- Reddy, J. T., Korth, K. L., Wesley, S. V., Howles, P. A., Rasmussen, S., Lamb, C. and Dixon, R. A. (2001) Post-transcriptional regulation of phenylalanine ammonia-lyase expression in tobacco following recovery from gene silencing. *J. Biol Chem* **381**, 655-65.
- Rees, D. G. and Jones, D. H. (1997) Activity of L-phenylalanine ammonia-lyase in organic solvents. *Biochim Biophys Acta* **1338**, 121-6.
- Ret y, J. (2003) Discovery and role of methylidene imidazolone, a highly electrophilic prosthetic group. *Biochim Biophys Acta.* **1647**, 179-84.
- Ro, D. K. and Douglas, C. J. (2004) Reconstitution of the entry point of plant phenylpropanoid metabolism in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): implications for control of metabolic flux into the phenylpropanoid pathway. *J Biol Chem.* **279**, 2600-7.
- Ro, D. K., Mah, N., Ellis, B. E. and Douglas, C. J. (2001). Functional characterization and subcellular localization of poplar (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*) cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol.* **126**, 317-329.
- Rosler, J., Krekel, F., Amrhein, N. and Schmid, J. (1997) Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol* **113**, 175-9.
- Rother, D., Poppe, L., Morlock, G., Viergutz, S. and Retey, J. (2002) An active site homology model of phenylalanine ammonia-lyase from *Petroselinum crispum*. *Eur J Biochem.* **269**, 3065-75.

- Sablowski, R. W., Moyano, E., Culianez-Macia, F. A., Schuch, W., Martin, C. and Bevan, M. (1994) A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO J.* **13**, 128-37.
- Sanchez-Ballesta, M. T., Zacarias, L., Granell, A. and Lafuente, M. T. (2000) Accumulation of PAL transcript and PAL activity as affected by heat-conditioning and low-temperature storage and its relation to chilling sensitivity in mandarin fruits. *J Agric Food Chem* **48**, 2726-31.
- Sarma, A. D. and Sharma, R. (1999) Purification and characterization of UV-B induced phenylalanine ammonia-lyase from rice seedling. *Phytochemistry* **50**, 729- 737.
- Sarma, A. D., Sreelakshmi, Y. and Sharma, R. (1998) Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. *Phytochemistry* **49**, 2233-2243.
- Schulz, W., Eiben, H-G. and Hahlbrock, K. (1989) Expression in *Escherichia coli* of catalytically active phenylalanine ammonia-lyase from parsley. *FEBS Lett* **258**, 335-338.
- Schuster, B. and Rétry, J. (1995) The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 8433-8437.
- Schwede, T. F., Rétey, J. and Schulz, G. E. (1999) Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. *Biochemistry*. **38**, 5355-61.
- Sean, D. S., Kazuo, N., Yoshihiro, N., Motoaki, S., Kazuo, Shinozaki and Kazuko Y. S. (2003) Two different novel *cis*-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J.* **33**, 259-70.
- Seguin, A., Laible, G., Leyva, A., Dixon, R. A. and Lamb, C. J. (1997) Characterization of a gene encoding a DNA-binding protein that interacts in vitro with vascular specific *cis* elements of the phenylalanine ammonia-lyase promoter. *Plant Mol Biol* **35**, 281-91.
- Seki, H., Nagasugi, Y., Ichinose, Y., Shiraiishi, T. and Yamada, T. (1999) Changes in *in vivo* DNA-protein interactions in pea phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase gene promoter induced by fungal signal molecules. *Plant Cell Physiol* **40**, 88-95.
- Sewalt, V. J. H., Ni, W., Blount, J. W., Jung, H. G., Masoud, S. A., Howles, P. A., Lamb, C. J. and Dixon, R. A. (1997) Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol.* **115**, 41-50.
- Shaw, N. M., Bolwell, G. P. and Smith, C. (1990) Wound-induced phenylalanine ammonia-lyase by L-phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum*) tuber discs. *Biochem J* **267**, 163-170.
- [Singh, S., Lewis, N. G. and Towers, G. H.](#) (1998) Nitrogen recycling during phenylpropanoid metabolism in sweet potato tubers. *J Plant Physiol.* **153**, 316-23.
- [Skolaut, A. and Retéy, J.](#) (2001) 1,4-Dihydro-l-phenylalanine-its synthesis and behavior in the phenylalanine ammonia-lyase reaction. *Arch Biochem Biophys.* **393**, 187-91.
- Su, J.C. (1965) Carbohydrate metabolism in the shoots of bamboo *Leleba oldhami*. I preliminary survey of soluble saccharides and sucrose-degrading enzyme. *Bot. Bull. Acad. Sinica.* **6**, 153-159.
- Subramaniam, R., Reinold, S., Molitor, E. K. and Douglas, C. J. (1993) Structure, inheritance, and expression of hybrid poplar (*Populus trichocarpa*×*Populus deltoides*) phenylalanine ammonia-lyase genes. *Plant Physiol* **102**, 71-83

- Sung, H. Y., Yuan, H. F. and Su, J. C. (1971) Carbohydrate metabolism in the shoots of bamboo *Leleba oldhami*. IX Some properties of the pentosan synthesizing system. *J. Chin. Agric. Chem. Soc. Sp Iss*, 62-73.
- Takeda, J., Ozeki, Y. and Yoshida, K. (1997) Action spectrum for induction of promoter activity of phenylalanine ammonia-lyase gene by UV in carrot suspension cells. *Photochem Photobiol* **66**, 464-70.
- Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F. A., Roberts, K. and Martin, C. (1998) The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* **10**, 135-154.
- Tanaka, Y. and Uritani, I. (1977) Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase in cut injured sweet potato. *J. Biochem* **81**, 963-970.
- Teakle, G. R., Manfield, I. W., Graham, J. F. and Gilmartin, P. M. (2002) Arabidopsis thaliana GATA factors: organisation, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Mol Biol* **50**, 43-57.
- Terauchi, R. and Kahl, G. (2000) Rapid isolation of promoter sequences by TAIL-PCR: the 5'-flanking regions of Pal and Pgi genes from yams (*Dioscorea*). *Mol Gen Genet* **263**, 554-60.
- Udo, G., Janet, B., Meryem, A., Ute, S., Maria, K., Monika, S. and Peter W. (2004) *cis*-Regulatory Elements for Mesophyll-Specific Gene Expression in the C₄ Plant *Flaveria trinervia*, the Promoter of the C₄ Phosphoenolpyruvate Carboxylase Gene. *The Plant Cell* **16**, 1077-1090.
- Wanner, L.A., Li, G., Ware, D., Somssich, I.E. and Davis, K.R. (1995) The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **27**, 327-338.
- Yamada, T., Tanaka, Y., Sriprasertsak, P., Kato, H., Hashimoto, T. and Oku, H. (1992) Phenylalanine ammonia-lyase genes from *Pisum sativum*: structure, organ-specific expression and regulation by fungal elicitor and suppressor. *Plant Cell Physiol* **33**, 715-725.
- Yazaki, K., Kataoka, M., Honda, G., Severin, K. and Heide, L. (1997) cDNA cloning and gene expression of phenylalanine ammonia-lyase in *Lithospermum erythrorhizon*. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**, 1995-2003.
- Young, M.R., Towers, G.H.N. and Neish, A.C. (1966) Taxonomic distribution of ammonia-lyases for L-phenylalanine and L-tyrosine in relation to lignification. *Can J Bot* **44**, 341-9.
- Zhu, Q., Dabi, T., Beeche, A., Yamamoto, R., Lawton, M. A. and Lamb, C. J. (1995) Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Mol Biol* **29**, 535-50.
- Zhu, Q., Maria, I. O., Tsegaye, D., Roger, N. B. and Lamb, C. (2002) Rice TATA Binding Protein Interacts Functionally with Transcription Factor IIB and the RF2a bZIP Transcriptional Activator in an Enhanced Plant in Vitro Transcription System. *Plant Cell* **14**, 795-803.
- Zon, J., Amrhein, N. and Gancarz, R. Inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase: 1-amino-benzylphosphonic acids substituted in the benzene ring. *Phytochemistry* **59**, 9-21.
- 何錦玫 (1995) 綠竹與無根萍之組織培養。博士論文，國立台灣大學園藝學研究所
- 林崇熙 (1998) 烏腳綠竹組織培養與試管內開花之研究。博士論文，國立台灣大學園藝

學研究所

莊榮輝 (1985) 水稻蔗糖合成酶之生化及免疫學研究。博士論文，國立台灣大學農業化學研究所

潘宏記 (2004) 大腸桿菌表現綠竹苯丙胺酸脫氨裂解酶及功能鑑定。碩士論文，國立台灣大學微生物與生化學研究所

謝陸盛 (2003) 綠竹葉與籐苯丙胺酸裂解酶之生化學研究。碩士論文，國立台灣大學農業化學研究所

蘇玟珉 (2003) 綠竹筍苯丙胺酸裂解酶之生化學研究。碩士論文，國立台灣大學農業化學研究所