

第二章 實驗方法

2-1 Human α -L-fucosidase 重組酵素純化

2-1-1 一般敘述

1. 配製培養液以及緩衝溶液相關藥品均購自 Sigma 以去離子水配置。
2. pCMV human α -L-fucosidase gene 購自於 Stratagene。
3. 分離管柱 SP column, Q column & G-75 column 購自於 Amersham Biosciences。
4. Pharmacia FPLC 系統進行蛋白質管柱層析。
5. 其他儀器：
搖動培養箱 (Firstek, Scientific, orbital shaking incubator Model-S302R)
UV 吸收光譜儀 HP 8452A、高速離心機 Kubota 7700、
聚合酶連鎖反應器 GeneAmp PCR system 9700
電子噴灑式串聯質譜儀 ESI-Q-TOF (Micromass)
6. Human α -L-fucosidase 表現系統由本實驗室柳勝文學長協助建立。
7. α -L-fucosidase from *Corynebacterium sp.*, Bovine kidney, *Thermotoga maritime* 由中研院林俊宏老師提供。
8. 酵素分子量質譜測定由本實驗室鄭至玉學姊協助測定。
9. 活性測試藥品 *p*-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside (PNPF) 以及相關的岩藻醣衍生物由本實驗室張世聖學長協助提供。

2-1-2 Human α -L-fucosidase 表現系統的建立

使用聚合酶連鎖反應器將 human α -L-fucosidase 基因放大後；利用接合酶將夾出的基因與處理好的 pET22b 載體進行接合。N 端的前 66 個訊息胜肽 (signal peptide) 基因組於建構表現系統時已經移除。將此以建立完成的表現載體轉型至大腸桿菌 BL21 (DE3) 中。

2-1-3 胞內粗提液的取得以及純化

1. 挑單菌落於 5 毫升 LB 培養液中活化菌體，並加入 5 微克 Ampicilline。
2. 將活化後的菌體接種 1 毫升至 1 升 LB 培養液中加入 0.1 克 Ampicilline 於 37 °C，110 rpm 培養。
3. 當 OD₆₀₀ 達到 2.4-2.6 (約 8 小時) 左右，加入 0.12 克 IPTG 進行誘導。
4. 再培養 7-8 小時之後，加入 10 克 Lactose 進行第二次誘導，6 小時之後粗提液中 α -L-fucosidase 活性達到相對最佳。
5. 將菌體離心 (6000 g，20 分鐘) 後，以 10 毫升醋酸鈉緩衝液 (20 mM，pH 5.5)，懸浮菌體，再以超音波震盪使菌體破裂。再離心 (10000 g，20 分鐘) 將細胞殘骸與上層液分開，上層液即為胞內粗提液。
6. 將胞內粗提液在冰浴下緩緩加入硫酸銨鹽至 20% 飽和度，於 4 °C 冰浴下靜置 20 分鐘之後將沉澱的蛋白質離心 (12000 g，30 分鐘) 除去；接著再繼續加入硫酸銨鹽至 75% 飽和度，靜置於冰浴下 1 小時後離心 (12000 g，40 分鐘) 取得蛋白質沉澱。
7. 將離心後取得的蛋白質用 20 毫升醋酸鈉緩衝溶液 (20 mM，pH 5.5) 溶解後，再利用 20 mM，pH 5.5 醋酸鈉緩衝溶液透析 12 小時，再進一步的進行純化。

離子交換樹脂管柱層析

1. 將透析完成的蛋白質粗提液導入預先以醋酸鈉緩衝液（20 mM，pH 5.5）平衡的SP Sepharose[®] 管柱（陽離子交換樹脂管柱）進行層析分離。
2. 使用 1M 氯化鈉醋酸鈉溶液（20 mM，pH 5.5）沖提，鹽類梯度為 185 分鐘內由 0 mM 到 800 mM，以每分鐘 3 毫升的流速進行，每 3 分鐘收集一管。將收集好的試管取樣利用 *p*-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside（PNPF）測試活性；將活性區收集後使用濾膜濃縮後再重複進行一次陽離子管柱層析提高均質度。
3. 將經過陽離子管柱層析純化並濃縮後的蛋白質溶液 5 毫升導入預先以醋酸鈉緩衝液（20 mM，pH 5.5）平衡的Q Sepharose[®] 管柱（陰離子交換樹脂管柱）進行層析分離。
4. 使用 1 M 氯化鈉醋酸鈉溶液（20 mM，pH 5.5）沖提，鹽類梯度為 110 分鐘內由 0 mM 到 800 mM，以每分鐘 1 毫升的流速進行，每 2 分鐘收集一管。將收集好的試管取樣利用 *p*-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside（PNPF）測試活性，將活性區收集後使用濾膜濃縮後進行下一步的管柱層析。

凝膠樹脂管柱層析

1. 將濃縮後的蛋白質溶液 0.5 毫升導入預先以醋酸鈉緩衝液（20 mM，pH 5.5，10 mM NaCl）平衡的Sephadex G-75[®] 管柱進行層析分離。
2. 使用醋酸鈉溶液（20 mM，pH 5.5，10 mM NaCl）沖提，以每分鐘 0.5 毫升的流速進行，每 2 分鐘收集一管。將收集好的試管取樣利用 *p*-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside（PNPF）測試活性，將活性區收集後使用濾膜濃縮後進行 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析。

2-1-4 酵素活性測試

將 5 微升的受質 (1 mM PNP) 置於磷酸氫二鈉緩衝液 50 微升 (50 mM Na_2HPO_4 , pH 7.0) 中，以維持反應時的酸鹼值，再加入 30 微升已純化的酵素溶液，使用UV吸收光譜儀觀測 400 nm的吸收值增加率。

2-1-5 決定蛋白質分子量與純度

蛋白質之純度與其分子量(MW)之估計，可藉由SDS-PAGE觀測，這個系統是Laemmli在 1970 年所提出⁸⁵，利用蛋白質分子量大小不同而在電泳膠片上形成不同的帶狀，檢驗蛋白質的純度。

藥品：

Stain solution : 200 毫升 acetic acid, 500 毫升 Isopropanol, 3 升 water
0.6 克 Coomassie blue.

Destain solution : 400 毫升 acetic acid, 400 毫升 Isopropanol, 3.2 升 water

1. 製作 stacking gel 為 7%，separation gel 為 17.5% 之電泳膠片，其大小為 10 公分 × 7.4 公分 × 0.1 公分。
2. 將各步驟純化之蛋白質溶液取 30 微升與 5 微升 loading 緩衝溶液混和後，95 °C 加熱 10 分鐘使其失活，置入膠片上方之樣品槽。
3. 以 150 伏特固定電壓，Tris-glycine running buffer 的系統通電約 1.5 小時。
4. 以 Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue G-250) 染色法觀測。

染色方法：

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

2-1-6 LC-Mass 決定蛋白質的分子量

1. 取純化之酵素溶液（50 微升）注入 Zip-Tip（Millipore）中，收集從 tip 裡分離出的溶液注入 LC-Mass 中。
2. 以 100% acetonitrile 將酵素流洗分離，直接進入質譜儀偵測其分子量。

2-1-7 蛋白質濃度的確定

以 BCA 法建立蛋白質檢量線，請參考附錄五。



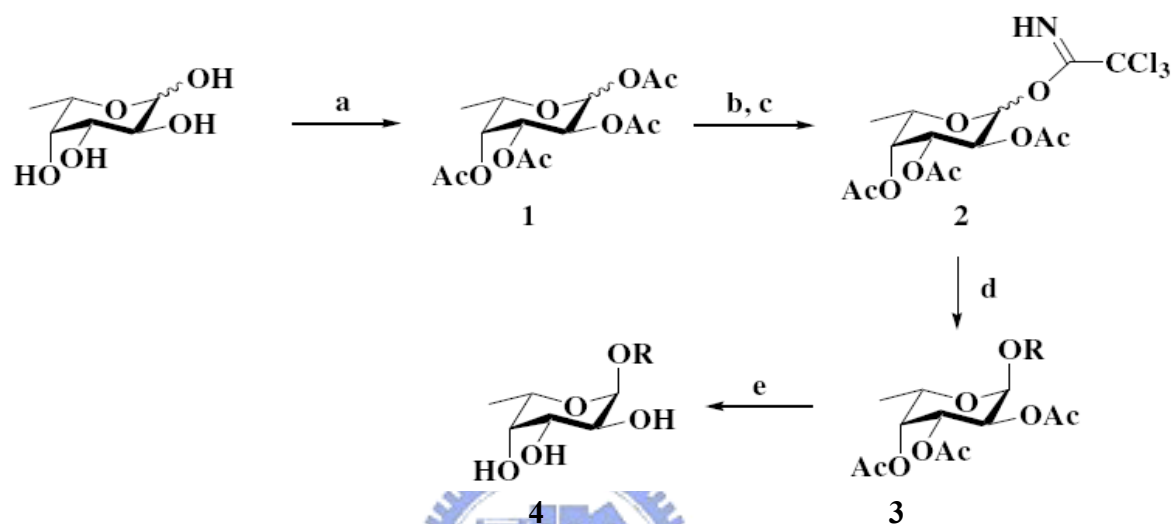
2-2 芳香類 α -L-岩藻糖苷化合物以及具抑制效果藥物之衍生物的合成

2-2-1 一般敘述

1. 核磁共振光譜 (NMR) 的測定使用 Bruker DRX-300 型核磁共振光譜儀。所使用的溶劑為 D_2O 時，以 DHO δ 4.72 為內標準，使用 $CDCl_3$ 時，以 $CHCl_3$ δ 7.24 為內標準。
2. 色層分析：薄層分析 (TLC) 係使用 Merck Silica gel 60 F₂₅₄ (aluminium sheet TLC)。重力管柱層析分析係使用 ICN SiliTech 32-63 60Å (230~400 mesh) 型矽膠當填充物。
3. TLC 薄層分析之染色劑係使用 Ninhydrin solution (0.3 克 ninhydrin in 100 毫升 n-butanol ; add 3 毫升 acetic acid)，Anisaldehyde solution (9.2 毫升 Anisaldehyde、3.75 毫升 Acetic acid、338 毫升 EtOH(95%)、12.5 毫升 H_2SO_4)。
4. 藥品購自於 Sigma-Aldrich、Acros 公司(TCI)。
5. Activated CH Sepharose 4B 購自於 Amersham Bioscience。
6. 反應用有機溶劑購自 TEDIA、Merck。
7. 展開液 (developing solvent) 皆經自工業級溶劑蒸餾後使用。
8. 減壓濃縮機係使用 EYELA ROTARY VACUUM EVAPORATOR N-N series 型旋轉濃縮機。
9. 冷凍乾縮係使用 PANCHUM FREEZE DRYER CT-series 型冷凍乾縮機。

2-2-2 芳香類 α -L-岩藻糖苷化合物及 Fuconolactone 的合成

利用本實驗室張世聖學長所建立的一套合成方式，只要改變不同的 Acceptor 即可以順利的取得一系列的芳香類 α -L-岩藻糖苷化合物。



R= 3-nitrophenyl, 4-nitrophenyl, 2,4-dinitrophenyl,
3,4-dinitrophenyl, 4-cyanophenyl, phenyl.

Scheme 2-1. Reagents and conditions: (a) Ac_2O , Pyridine, rt, 8 h; (b) $\text{H}_4\text{N}_2\text{-HOAc}$, DMF, rt, 30 min; (c) CCl_3CN , Cs_2CO_3 , CH_2Cl_2 , rt, 8 h; (d) ROH (acceptor), TMSOTf, 4Å MS, CH_2Cl_2 , -20°C , 30 min; (e) NaOMe, MeOH, rt, 30 min.

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-*O*-(trichloroacetimidate)- α -L-fucopyranoside

合成

1. 取已完成 acetylation 保護的產物 (1) 600 毫克，將其溶解於含有 183 毫克 Hydrazine acetate 的 3 毫升 DMF 中，於室溫下進行反應。
2. 約 30 分鐘後結束反應；以乙酸乙酯 (ethyl acetate) 當作溶劑，以水萃取兩次，再依序以飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取，有機層加入無水硫酸鎂 (MgSO₄) 除水，減壓抽氣濃縮至黏稠油狀，此油狀物即為粗產物。
3. 取步驟 2 的粗產物、CCl₃CN 以及碳酸鋇溶解於二氯甲烷中進行反應。其中粗產物與 CCl₃CN 當量數為 1:1，而碳酸鋇則加入催化量。
4. 反應進行約 8 小時以後；以乙酸乙酯 (ethyl acetate) 當作溶劑，以水萃取兩次，再依序以飽和碳酸氫鈉水溶液以及飽和食鹽水萃取，有機層加入無水硫酸鎂 (MgSO₄) 除水，減壓抽氣濃縮至黏稠油狀，此油狀物即為粗產物。此油狀物不再經過進一步的純化，產率約 93% ($\alpha:\beta = 7:1$) 將直接進行下一階段的反應。

2,3,4-Tri-*O*-acetyl-1-*O*- (4-nitrophenyl)- α -L-fucopyranoside 合成

1. 取上個階段的粗產物約 364 毫克與 140 毫克的 4-nitrophenol (Acceptor) 混合，加入 500 毫克 4Å 無水分子篩溶解於 5 毫升的甲苯中並將其濃縮以共沸除水，除水的動作必須進行 3 次。
2. 將上步驟的產物溶解於 3 毫升的二氯甲烷中，再加入 150 微升 TMSOTf 於 -20 °C 反應 30 分鐘。
3. 使用沖提液 ethylacetate / hexane = 1/6 進行 silica-gel 管柱層析純化，純化後取得的產物再使用 ethylacetate 和 hexane 進行再結晶，產率約為 56%。

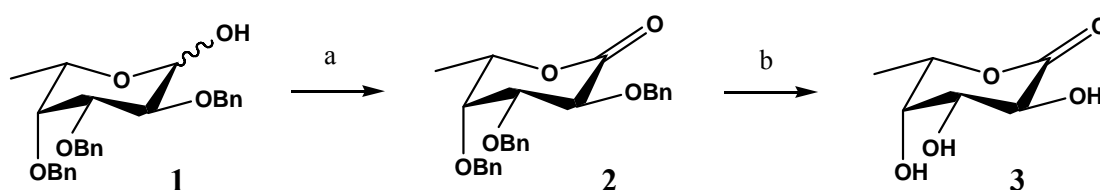
2,3,4-Tri-*O*-hydroxyl-1-*O*- (4-nitrophenyl)- α -L-fucopyranoside合成

1. 取上階段的產物 1 克溶解於 30 毫升的無水甲醇中;加入 32 毫克的 NaOMe 於室溫下反應 2 小時。
2. 以 TLC 追蹤反應，當三個保護基均被移除的產物即為主要產物，立即終止反應。
3. 使用 IR-120 酸性樹脂萃取後，減壓抽氣濃縮將溶劑移除後即可得到粉末狀的產物，產率約為 82%。

於合成產物 (3) 時，改變不同的 Acceptor 即可取得相關的芳香類 α -L-岩藻糖苷化合物。

Fuconolactone 的合成

由於 Fuconolactone 的結構與 human α -L-fucosidase 進行水解反應時的反應中間體 oxocarbenium ion 類似，因此可能與酵素分子具有較高的親和力。本實驗合成 Fuconolactone 進行抑制劑的分析，探討酵素可能的反應中間體結構。



Scheme 2-2. Reagents and conditions: (a) PCC, CH₂Cl₂, 4Å MS, rt, 1 h; (b) H₂, 5% Pt (C), EtOH, rt, 12 h.

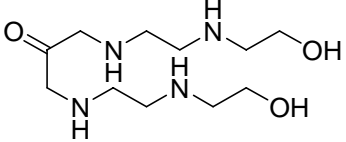
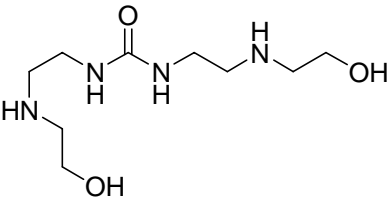
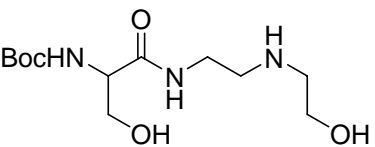
1. 取起始物 (1) 40 毫克 (製備方式請參考文獻 86) 溶於 3 毫升的二氯甲烷

- 後再加入 170 毫克的 PCC；加入 250 毫克 4Å 分子篩，室溫下反應 1 小時。
2. 使用沖提液 ethylacetate / hexane = 1/4 進行 silica-gel 管柱層析純化，純化後取得的產物利用減壓抽氣濃縮將溶劑移除即可取得產物 (2)。
 3. 取 80 毫克產物 2 溶於絕對酒精中，加入 10 毫克的 5% Pt (C) 並將反應瓶通入氫氣於室溫下進行反應，反應約 12 小時後完成。
 4. 反應後的溶液使用 celite 過濾移除 Pt (C)；再使用沖提液 methanol / dichloro methane = 1/6 進行 silica-gel 管柱層析純化，減壓抽氣濃縮將溶劑移除後即可得到產物 Fuconolactone.

2-2-3 2-(2-aminoethylamino) ethanol 衍生物合成

本實驗參考之前藥物篩選得到的具有抑制效果的藥物結構，設計出幾種可能與 human α -L-fucosidase 具有親和性的化合物，與膠體偶合後可利用於酵素的純化。


表 2-1. 2-(2-aminoethylamino) ethanol 相關衍生物

No.	Structure
1	
2	
3	

Compound 1-2 合成

1. 將各種不同的 Dichloro ketone (phosgene or 1,3-dichloro ketone) 溶於二氯甲烷中，蓋上血清塞並插上充滿氮氣的氣球。
2. 將 2-(2-aminoethylamino) ethanol 預先與 triethyl amine 1:1 當量混合活化後打入上述的反應瓶中。
3. 反應開始後，瓶中會有油滴產生；待油滴逐漸增加約 2 個小時後停止反應。
4. 反應結束之後，先將反應的溶劑吸出，再加入乾淨的二氯甲烷將起始物洗出。重複此步驟 2-3 次，可有效移除起始物。
5. 利用減壓抽氣濃縮機抽乾，即可得到黏稠狀產物，產率約為 80%。

Compound 3 合成

- 
1. 將 N-Boc-L-serine 與 DCC (*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide) 以 1:1 當量溶在二氯甲烷中，蓋上血清塞並且插上充滿氮氣的氣球。
 2. 將 2-(2-aminoethylamino) ethanol 預先與 triethyl amine 1:1 當量混合活化後打入上述的反應瓶中。
 3. 反應約 2 個小時，點 TLC 確認；當起始物點已消失，立即停止反應。
 4. 利用減壓抽氣濃縮機將溶劑移除後，以乙酸乙酯 (ethylacetate) 當作溶劑，以水萃取兩次，產物主要溶解於水層之中；用濾紙將懸浮物過濾移除。
 5. 利用減壓抽氣濃縮抽乾，即可得到粉末狀產物，產率約為 63%。

Fucosylamine 合成⁸⁷

1. 取約 0.5 克 L-fucose 溶於 10 毫升的去離子水後，加入 10 當量的 Ammonium carbonate 混合，蓋上血清塞。
2. 接著再打入約 2 毫升的 16 M 氨水後加熱至 42 °C 反應。

3. 2 天後取樣點 TLC 觀測反應是否進行完全。若反應完成，利用旋轉減壓濃縮抽乾，以進行偶合反應。

上述合成的產物需經過 ELISA reader 測試其對酵素是否具有抑制效果，根據測試後的結果選取適合的產物進行偶合反應。

2-3 酵素催化特性之研究

2-3-1 一般敘述

1. 非醣類抑制劑相關藥品購自於 Sigma。使用緩衝液配置後直接使用。
2. 岩藻醣衍生物為本實驗室張世聖學長協助合成。



2-3-2 酵素 k_{cat} 、 K_m 以及 Brønsted plot 的研究

pH profile 的測定

配置不同 pH 值緩衝溶液為：100 mM 緩衝溶液中含有 50 mM NaCl；當 pH 值為 3.5 時使用磷酸氫二鈉/檸檬酸緩衝液，pH 值介於 4.0-5.5 使用醋酸鈉緩衝液，pH 值介於 5.5-6.0 使用 MES 緩衝液，pH 值介於 6.0-7.5 使用磷酸氫二鈉緩衝液。以 *p*-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside 為受質（濃度為 0.05 mM-2 mM），取 75 微升的受質與 74 微升的緩衝液混合，再加入 1 微升 human α -L-fucosidase（ $[E] = 0.93 \mu\text{g/mL}$ ）進行水解反應，溫度以恆溫槽控制在 37 °C；以 UV 吸收光譜儀觀察 400nm 的吸收值變化，計算反應的初始速率 (initial velocity V_0)，並以 Lineweaver-Burk

method作雙倒數圖 (double reciprocal plot) 求 K_m 及 k_{cat} 值。

Brønsted plot 的測定

動力學反應條件為：human α -L-fucosidase [E] = 1.23 μ g/mL 在 100 mM (50 mM NaCl), pH 6.8 磷酸氫二鈉緩衝液中，取 75 微升的受質與 74 微升的緩衝液混合，再加入 1 微升 human α -L-fucosidase 進行水解反應，溫度以恆溫槽控制在 37 $^{\circ}$ C。受質如下所示

2,4-dinitrophenyl-fucopyranoside (濃度為 0.02 mM-0.25 mM)、

3,4-dinitrophenyl-fucopyranoside (濃度為 0.02 mM- 0.25 mM)、

4-nitrophenyl-fucopyranoside (濃度為 0.2 mM- 1 mM)、

3-nitrophenyl-fucopyranoside (濃度為 0.5mM- 1.2 mM)、

4-cyanophenyl-fucopyranoside (濃度為 0.1 mM- 0.5 mM)、

Phenyl-fucopyranoside (濃度為 0.1 mM- 0.5 mM)

以UV吸收光譜儀觀察適當波長的吸收值變化(參考附錄一)，計算反應的初始速率 (initial velocity V_0)，並以Lineweaver-Burk method作雙倒數圖 (double reciprocal plot) 求 K_m 及 k_{cat} 值。

2-3-3 Fuconolactone 抑制作用測定

1. 選取依固定的測試系統，包含固定受質濃度以及緩衝液和溫度；先測得此反應系統中的Michaelis constant K_m 常數。
2. 加入不同濃度的Fuconolactone，測得其初始反應速度(initial velocity V_0)，取其倒數與抑制劑濃度作圖，可用以計算抑制劑的抑制常數。

2-4 藥物篩選

2-4-1 一般敘述

1. 藥物庫 Spectrum Collection (MicroSource) 由國衛院徐祖安老師提供。
2. 篩選中所使用的藥品購自於 Sigma。以去離子水配置後直接使用。
3. 使用 ELISA reader 光譜儀 Bio-Tek ELx808 進行篩選。
4. Human α -L- fucosidase 為自行純化取得。

2-4-2 抑制劑篩選



抑制劑的研究有助於推測酵素的反應機制以及活性區的運作情形，本實驗透過藥物篩選的方式尋找非醣類衍生物的抑制劑，希望能篩選取得具有抑制能力的藥品以探討酵素與抑制劑的作用情形。

方法

將保存於 -80°C 欲篩選的藥品[Spectrum Collection (MicroSource)]取出，於室溫中回溫 20 分鐘。每個反應中先加入 1 微升待測藥品 (10 mM in DMSO) 並以PNPF當作受質，將 50 微升的受質 (1.5 mM PNPF) 加入磷酸氫二鈉緩衝液 50 微升 (50 mM Na_2HPO_4 , pH 7.0) 中，以維持反應時的酸鹼值，再加入 5 微升已純化的酵素溶液 (0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，於 30°C 下反應十分鐘，使用 ELISA reader 觀測 400 nm 的吸收值增加率，比較兩者初始反應速度 (initial velocity, V_0) 的差別。由於待測藥品保存於 DMSO 中，因此對照組中加入 1 微升的 DMSO，其餘條件與

實驗組均相同。

2-4-3 抑制作用之研究

初步的藥物篩選結果中，有幾個藥品對 human α -L-fucosidase 具有不錯的親和性；本實驗先針對這幾個不同的藥品，進行抑制劑類型的分析。

不可逆抑制劑的測定

1. 將 1 微升之酵素 ($0.16\mu\text{g} / \text{mL}$) 加入磷酸氫二鈉緩衝液 45 微升 (50 mM ， $\text{pH } 7.0$ ， $25\text{ }^\circ\text{C}$) 並與 5 微升之 10 mM 的抑制劑混合。
2. 隨時間逐一取出部份之酵素在 $\text{pH } 7.0$ ， $25\text{ }^\circ\text{C}$ 與 0.5 mM PNPf 受質反應，觀測其反應初始速率。
3. 比較加入抑制劑以及未加抑制劑之活性差異。



可逆抑制劑的測定

1. 加入不同濃度的 PNPf 受質，不加任何抑制劑的活性測試為標準測試系統 (50 mM 磷酸氫二鈉緩衝液， $\text{pH } 7.0$ ， $25\text{ }^\circ\text{C}$)，將所得之反應初始速度和受質濃度以雙倒數作圖可得一直線。
2. 加入一固定濃度待測抑制劑至測試系統中，且逐次加入不同濃度的 PNPf，以雙倒數作圖可得另一條直線。
3. 再加入另一固定濃度待測抑制劑至測試系統中，且逐次加入不同濃度的 PNPf，以雙倒數作圖可再得另一條直線。
4. 將三條直線處理在同一圖裡，觀察三條直線是否交於 X 軸或 Y 軸，抑或是沒有交點，判斷其屬於何種抑制作用。

可逆抑制劑抑制常數的測定

1. 選取依固定的測試系統，包含固定受質濃度以及緩衝液和溫度；先測得此反應系統中的Michaelis constant K_m 常數。
2. 加入不同濃度的抑制劑，測得其初始反應速度 (initial velocity, V_0)，取其倒數與抑制劑濃度作圖，可用以計算抑制劑的抑制常數。



2-4-4 抑制劑對不同酵素專一性測試

由於從藥物資料庫篩選出的抑制劑並非岩藻醣衍生物，對其他不同的醣類水解酵素可能也會具有抑制的效果，而透過這個實驗我們可以比較這些小分子抑制劑對於 human α -L-fucosidase 是否具有較佳的專一性。

α -Glucosidase

以 3.5 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside 為受質，將 50 微升的受質與磷酸氫二鈉緩衝液 50 微升 (50 mM Na₂HPO₄, pH 7.0) 混合並加入 1 微升抑制劑 (10 mM in DMSO)，最後加入 1 微升的酵素溶液 ([E] = 0.7 μ g/ μ L)，於 30 °C 下反應十分鐘。以 ELISA reader 觀測 400 nm 的吸收值增加率，比較兩者初始反應速度 (initial velocity, V_0) 的差別。由於待測藥品保存於 DMSO 中，因此對照組中加入 1 微升的 DMSO，其餘條件與實驗組均相同。

β -Glucosidase

以 9.7 mM *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside 為受質，將 50 微升的受質與磷酸氫二鈉緩衝液 50 微升 (50 mM Na₂HPO₄, pH 7.0) 混合並加入 1 微升抑制劑 (10 mM in DMSO)，最後加入 1 微升的酵素溶液 ([E] = 0.65 μ g/ μ L)，於 30 °C 下反應十分鐘。以 ELISA reader 觀測 400 nm 的吸收值增加率，比較兩者初始反應速度 (initial velocity, V_0) 的差別。由於待測藥品保存於 DMSO 中，因此對照組中加入 1 微升的 DMSO，其餘條件與實驗組均相同。

α -L-Arabinofuranosidase

以 0.1 mM *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside 為受質，將 50 微升的受質與磷

酸氫二鈉緩衝液 50 微升 (50 mM NaOAc, pH 4.5) 混合並加入 1 微升抑制劑 (10 mM in DMSO), 最後加入 1 微升的酵素溶液 ($[E] = 0.01 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), 於 30°C 下反應十分鐘。以 ELISA reader 觀測 340 nm 的吸收值增加率, 比較兩者初始反應速度 (initial velocity, V_0) 的差別。由於待測藥品保存於 DMSO 中, 因此對照組中加入 1 微升的 DMSO, 其餘條件與實驗組均相同。

2-4-5 抑制劑對不同來源的岩藻醣苷水解酶專一性測試

不同來源的岩藻醣苷水解酵素雖然都具有水解岩藻醣苷鍵的功能, 但是他們之間胺基酸的差異性可能會使得活性區的性質有很大的不同; 透過這個實驗我們可以比較這些小分子抑制劑對於不同來源的 $\alpha\text{-L-fucosidase}$ 是否具有不同的專一性。



$\alpha\text{-L-Fucosidase}$

以來自 Human, *Corynebacterium sp.*, Bovine kidney 以及 *Thermotoga maritime* 四種不同來源的岩藻醣苷水解酶進行抑制劑專一性比較。

以 0.5 mM *p*-nitrophenyl- $\alpha\text{-L-fucopyranoside}$ 為受質, 將 50 微升的受質與磷酸氫二鈉緩衝液 50 微升 (50 mM Na_2HPO_4 , pH 7.0) 混合並加入 1 微升抑制劑 (10 mM in DMSO), 最後加入 1 微升的酵素溶液 (酵素濃度分別為 human $0.16 \mu\text{g}/\text{mL}$, *Corynebacterium sp.* $0.4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, Bovine kidney $0.18 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 以及 *Thermotoga maritime* $0.225 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), 於 30°C 下反應十分鐘。以 ELISA reader 觀測 400 nm 的吸收值增加率, 比較兩者初始反應速度 (initial velocity, V_0) 的差別。由於待測藥品保存於 DMSO 中, 因此對照組中加入 1 微升的 DMSO, 其餘條件與實驗組均相同。