

shū
甘藷中澱粉生成之研究
(I) 澱粉磷解酶之純化及特性

Starch Biosynthesis in Sweet Potato

(I) Purification and Characterization of Starch Phosphorylase

張長泉 蘇仲卿

Tsung-Chain Chang and Jong-Ching Su



食品工業發展研究所

中華民國 臺灣省 新竹市

8312207

TS215
905

TS 215
905



甘藷中澱粉生合成之研究

(I) 澱粉磷解酶之純化及特性

張長泉 蘇仲卿

發行人：馬 保 之

出版者：食品工業發展研究所

新竹市食品路 233 號

電話：(035)223191 ~ 6 六線

郵政劃撥帳戶第15310號食品工業月刊社

印刷者：國 大 打 字 行

新 竹 市 中 山 路 2 6 6 號

電 話：(035)264220

行政院新聞局出版事業登記證：局版臺誌字第一三九八號

中華民國七十三年一月印行

甘藷中澱粉生合成之研究 (I) 澱粉磷解酶之純化及特性

張長泉 蘇仲卿

目 次

| | |
|----------------|----|
| 一 摘要..... | 1 |
| 二 前言..... | 2 |
| 三 實驗材料與方法..... | 4 |
| 四 結果..... | 8 |
| 五 討論..... | 32 |
| 六 英文摘要..... | 37 |
| 七 參考文獻..... | 38 |

Starch Biosynthesis in Sweet Potato

(I) Purification and Characterization of Starch Phosphorylase

Tsung-Chain Chang and Jong-Ching Su

CONTENTS

| | Page |
|--------------------------------|-----------|
| 1. Abstract | 1 |
| 2. Introduction | 2 |
| 3. Materials and Methods | 4 |
| 4. Results | 8 |
| 5. Discussions | 32 |
| 6. English Summary | 37 |
| 7. References | 38 |

甘藷中澱粉生合成之研究 (I) 澱粉磷解酶之純化及特性

Starch Biosynthesis in Sweet Potato

(I) Purification and Characterization of Starch Phosphorylase

張長泉 蘇仲卿

Tsung-Chain Chang and Jong-Ching Su

摘 要

由甘藷塊根粗粹取液中，經硫酸銨沉澱、DEAE-Sephacel 離子交換樹脂、Sephadex G-200 膠體過濾及第二次的 DEAE-Sephacel 色層分析，可以純化到“-組”澱粉磷解酶，使用梯度聚丙烯醯胺電泳 (gradient polyacrylamide electrophoresis, gradient PAGE) 分析，此一組酵素含有 6 個組員，分子量分別為 138000, 142000, 150000, 155000, 164000 及 167000。若使用 gradient SDS-PAGE 分析，可以看到 7 個帶 (bands)，分子量分別為 41500, 47000, 49500, 50000, 52500, 57000 及 107000。由上述結果推測此一組酵素分子含有一共通的大次單元 (subunit)，分子量 107000，和一分子量各異的小次單元，分子量 41500 至 57000，而以雙倍體 (dimer) 存在。

把由 SDS-PAGE 膠體上回收之大的及小的次單元，用木瓜酵素 (papain) 做部分水解，再跑 SDS-PAGE 做成胜肽圖 (peptide map) 比較，小的次單元很可能是大的次單元之降解產物 (proteolytic degradation product)。由 SDS-PAGE 膠體上回收之大的次單元之初活性 (initial activity) 為原酵素之 95%，但隨着反應時間增加，活性急速下降，此意味着單體 (monomer) 具有活性，但不安定。小的次單元只有原酵素 5% 之活性。

計畫編號：83 C 412

補助單位：行政院國家科學發展委員會，NSC-0409-B080-02

研究報告：第 332 號

報告提出：72年10月

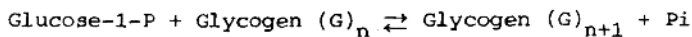
研究人員：張長泉——食品工業發展研究所副研究員

蘇仲卿——台大農化系教授

往聚葡萄糖合成方向，葡萄糖 -1- 磷酸酯及可溶性澱粉之活性分別為 0.5mM 及 0.11%，ADPG 及 UDPG 為不競爭性 (uncompetitive) 抑制劑。若往聚葡萄糖分解方向，無機磷酸及可溶性澱粉之 Km 值分別為 2.5mM 及 0.036 %，而 ADPG 及 UDPG 為競爭性 (competitive) 抑制劑。

前 言

磷解酶 (phosphorylase, α -1,4-glucan:orthophosphate glucosyltransferase) 首先在肝臟組織中發現 (Cori et al. 1939)，它催化如下可逆反應：



動物磷解酶 (animal phosphorylase) 已經有相當深入之研究，它受到許多因子之調解而改變其活性。此酶在動物內之角色是分解肝醣，對調解肝醣之分解它佔着相當重要的角色，至於肝醣之合成由肝醣合成酶 (glycogen synthase) 為之。植物磷解酶 (plant phosphorylase) 在 1940 年首次在豌豆及馬鈴薯塊莖中發現。此後陸續在玉米、大麥、大豆及植物綠葉中發現，現已知此酶在植物界廣泛存在。直到 1960 年以前，此酶為唯一知道與澱粉合成有關之酵素。接着 De Fekete 等人 (1960) 發現了一種與澱粉粒結合在一起的澱粉合成酶 (starch synthase, UDPG: glycogen 4- α -glucosyltransferase)，利用 UDPG* 當基質合成澱粉，不久又發現 ADPG 是此酵素較佳之基質 (Recondo and Leloir, 1961; Nelson and Tsai, 1964)。差不多在相同時間又發現了一種不與澱粉結合在一起之澱粉合成酶，其只能用 ADPG 當做基質合成澱粉 (Frydman and Cardini, 1964; Murata and Akazawa, 1964; Ghosh and Preiss, 1965)。所以澱粉之生合成似乎有以上三種可能之途徑，直至目前為止，均認為 ADPG 之路徑最為重要，雖然此種說法並不是很肯定的 (Fukui, 1983)。

由化學鍵能量之觀點來看，UDPG 之葡萄糖磷酸鍵 (glucosidic phosphate bond) 水解所放出之熱量 ($\Delta F^\circ = -7600 \text{ cal}$) 比葡萄糖 -1- 磷酸酯之磷酸酯鍵 (phosphate ester bond) 水解所放出熱量 ($\Delta F^\circ = -4800 \text{ cal}$) 要大。而多醣類之 α -1,4 鍵結水解能為 $\Delta F^\circ = -4300 \text{ cal}$ 。在 pH 7.5 澱粉合成酶反應之平衡常數 ($K'_{\text{eq}} = 250$) 也

* 簡寫：UDPG, uridine diphosphate glucose

ADPG, adenosine diphosphate glucose

大於磷解酶所催化之反應 ($K'_{eq}=3$) (Hassid, 1962)。Tsai and Nelson (1966) 發現一種缺乏澱粉之玉米變種 (shrunken-2, sh_2)，缺乏 ADPG 焦磷酸分解酶 (ADPG-pyrophosphorylase) 之活性，此酶用來產生澱粉合成酶之基質 ADPG。又 ADPG 和 UDPG 對植物磷解酶均有強的抑制作用 (Burr and Nelson, 1975; Singh and Sanwal, 1976; Matheson and Richardson, 1978)。又 Matheson 和 Richardson (1978) 測定豌豆內之兩種磷解酶同功酵素 (isozymes) 對葡萄糖 -1- 磷酸酯之 K_m 值分別為 4 及 5.5mM，在細胞內若要維持 4mM 濃度之葡萄糖 -1- 磷酸酯，則葡萄糖 -6- 磷酸酯及果糖 -6- 磷酸酯之含量將分別達到 70 及 30mM (依 phosphoglucomutase 及 phosphoglucoisomerase 2 k_{eq} 估算) 也就是說六碳糖磷酸酯之總濃度將超過 100mM，此估算值比 Isherwood 和 Selvendran (1971) 在照光的葉片中所測量到的高出許多。同時 ADPG 焦磷酸分解酶 (ADPG Pyrophosphorylase) 之 K_m 值為 100 μ M (Preiss et al. 1967)。而磷酸葡萄糖異構酶 (phosphoglucomutase) 之 K_m 值為 5 μ M (Ray et al. 1966)，均比磷解酶之 K_m 值低很多，所以此二種酵素之競爭將勝過磷解酶。Ewart 等人 (1954) 在刺槐木之皮層內發現無機磷酸對葡萄糖 -1- 磷酸酯之比例很高，也就是不利於往澱粉合成方向進行。

但是有一些證據顯示植物磷解酶可能與澱粉合成有關。Tsai 和 Nelson (1969) 發現在玉米種子成熟過程中可以偵測到四種磷解酶同功酵素，其中三種不需要有前體之存在即有活性，暗示澱粉之初始合成可能與磷解酶有關。Slabnik 和 Frydman (1970) 及 Tandecartz 等人 (1978) 用電泳膠體酵素染色方法，發現馬鈴薯塊莖在有前體存在下可以看到有多個磷解酶同功酵素，在沒有前體存在之下仍有一個被染出。在大麥胚乳發育過程中亦有不需前體之磷解酶存在 (Baxter and Duffus, 1973)。Vieweg 和 de Fekete (1972) 把分離出來之玉米維管束鞘細胞 (bundle sheath cells) 放在蔗糖或其他代謝物質內，細胞內之葉綠體並不能合成澱粉，只在供以葡萄糖 -1- 磷酸酯時，才有顯著之澱粉合成。Mangat 和 Badenhuizen (1971) 研究馬鈴薯和藻類 (*Polytoma uvella*) 澱粉粒內之直鏈澱粉及膠澱粉 (amylose and amylopectin) 之形成，發現在 30 $^{\circ}$ C 下生長之 *P. uvella*，其磷解酶之活性約為在 22 $^{\circ}$ C 下之一半，而其直鏈澱粉之含量由 13.5% 降至 5.0%，這間接證明了磷解酶參與直鏈澱粉之合成。但在馬鈴薯，不論 22 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 或 33 $^{\circ}$ C 生長，對磷解酶之活性沒多大影響，直鏈澱粉之含量則大致不變。Sheath 等人 (1979 a, b) 研究一種藻類 (*Porphyridium purpureum*)

之澱粉代謝，發現澱粉合成最旺盛時，也是磷解酶和澱粉合成酶活性最高的時候。Fredrick (1973) 研究二種藻類 (*Osillatoria princeps* 和 *Cyanidium caldarium*) 之磷解酶，發現有不需前體就可由葡萄糖-1-磷酸酯合成聚葡萄糖之同功酵素存在，當以澱粉酶 (amylase) 處理之後，這些磷解酶變成需要前體，而且在電泳上移動的速度也不一樣。若把經澱粉酶處理過之磷解酶和麥芽七聚糖 (maltoheptaose) 一起置放，再做分析，並不能恢復它不需前體之特性。此顯示磷解酶本身為一種醣蛋白 (glycoprotein)，其可能以它身上之醣類做為前體，這些醣類和酵素本身是以共價結合，故經澱粉酶水解掉之後，不能再回復。*Polytoma uvella* 為一種無色藻類，能在體內合成大量澱粉，當藻體生長最旺盛時 (log phase)，可以發現到二種磷解酶之同功酵素 (Mangat, 1979)，可是在衰老期 (lag phase) 却沒有發現到。

由於甘藷塊根之澱粉生合成非常旺盛，加以其中有很高的磷解酶活性，本研究之目的在了解甘藷磷解酶之特性，再進一步探討其與澱粉合成之關係。

實驗材料與方法

酵素之純化 (所有步驟均在 0 至 4 °C 進行)

台農65號甘藷 (8月種植, 12月上旬採收) 300公克削去表皮切成小塊後, 加等量緩衝液 A (2 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 10% sucrose in 50mM imidazole buffer, pH 6.4) 以均質機 (Sorvall Omni-Mixer) 打碎 (30秒鐘 2次), 粗抽取液以 23000 g 離心 15分鐘, 上清液加硫酸銨至 25% 飽和度, 在 23000 g 離心 15分鐘後, 上清液再加硫酸銨至 45% 飽和度, 約停置一個小時後, 在 27000 g 離心 15分鐘, 把沉澱物溶解在緩衝液 A 內, 以 1 公升之緩衝液 B (內含 1mM dithiothreitol, 其他同緩衝液 A) 透析過夜。透析液以 DEAE-Sephacel (pharmacia 進行管柱色層分析, 管柱 (3 × 20公分) 先以 1 公升之緩衝液 B 平衡, 透析液加入後, 以 410 毫升之緩衝液 B 流洗, 再以 0 至 0.3N 直線梯度食鹽溶液 (各 400 毫升, 溶解在緩衝液 B 內) 流洗, 流速每小時 26 毫升。有磷解酶活性之部份匯合起來, 以緩衝液 B 透析過夜, 透析液以 Amicon 之 PM-10 薄膜做超過濾 (ultrafiltration) 濃縮。濃縮液通到一事先經緩衝液 B 平衡過之 Sephadex G-200 (Pharmacia) 管柱 (2.6 × 9.5 公分), 流速每

小時16毫升。有磷解酶活性部分滙合後做超過濃縮，再以緩衝液C (1mM dithiothreitol, 0.1mM EDTA, 10% sucrose in 50mM tris-HCl buffer, pH7.2) 透析，透析液通到一事先經緩衝液C平衡過之 DEAE-Sephacel 管柱 (2 × 8.1 公分)，以 60 毫升緩衝液 C 流洗，再以 0.1 至 0.5N 直線梯度食鹽溶液 (各 210 毫升，溶在緩衝液 C 內) 流洗。活性部分滙合經緩衝液 C 透析後，再做超過濃縮。

酵素活性測定

往聚葡萄糖合成方向 (direction of glucan synthesis) 之活性，在 0.25 毫升之反應液中，葡萄糖 -1- 磷酸酯之濃度為 10mM 可溶性澱粉 0.3%，Mes (2-Morpholinoethanesulfonic acid) 緩衝液 40mM (pH 5.9)，及適當量之酵素，在 37°C 反應 10 分鐘後，使用 Fiske 和 Subbarow (1925) 之方法，測 660nm 之吸光，定無機磷酸之含量。往聚葡萄糖分解方向之活性，在 0.5 毫升之反應液中，可溶性澱粉之濃度為 0.3%，無機磷酸 10mM，氯化鎂 10mM，NADP 0.85 毫克，葡萄糖 -6- 磷酸酯去氫酵素 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, Sigma) 1 個單位，磷酸葡萄糖異構酶 (phosphoglucumutase, Sigma) 1 個單位，葡萄糖 -1，6- 二磷酸酯 (Glucose -1, 6-diphosphate) 2.5mM，Imidazole 緩衝液 (pH 7.0) 40mM，及適當量之酵素溶液，於 30°C 反應，使用光電比色計 (spectrophotometer) 連續記錄 340nm 吸光之增加 (Steup and Latzko, 1979)。酵素單位 (unit) 之定義，為依合成方向，每分鐘產生 1 微摩爾 (micro mole) 之無機磷酸之酵素量為一個單位。蛋白質之定量方法參考 Lowry 等人 (1951)。

聚丙烯醯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis)

不連續膠體電泳 (disc-gel electrophoresis) 之做法參考 Clark 和 Switzer (1977)。梯度膠體 (gradient gel) 電泳之解析力較高 (Margolis and Kenrick 1968; Lambin et al. 1976; Mahadik, 1976)，本實驗中一般使用 5 至 20%，0.8 毫米厚之平板膠體 (slab gel)，為求梯度良好，玻璃板事先加以矽化 (siliconization)，在 2% 之二甲基二氯化矽 (dimethyldichlorosilane，溶在四氯化碳內) 處理 5 分鐘，然後在 110°C 烘烤 20 分鐘。梯度電泳緩衝液為 tris 0.025M, glycine 0.192M (pH 8.3)，若 SDS - 膠體，則緩衝液中含 0.1% SDS (Lammeli, 1970)。醣蛋白 (glycoprotein) 之染色參考 Zacharius 等人 (1969)。

若由 SDS- 膠體上回收次單元 (Subunits)，則使用 1.5mm 厚 7.5% 之平板膠體，跑完電泳後浸在 4M 醋酸鈉溶液內，在振盪器內振盪 10 至 20 分鐘後，容器底下透着黑色的背景即可看到蛋白質所在之透明帶 (clear band) (Higgins and Dahmus, 1979)，此法比用氯化鉀染出法 (Nelles and Bamberg, 1976; Higgins and Dahmus, 1979; Hager and Burgess, 1980) 要清楚，再現性也較高。把含有次單元部份膠體用刀子切下後，切成較小的片段，再用 ISCO 之電泳濃縮裝置 (Model 1750) 把蛋白質由膠體上溶離出來 (Kalousek et al. 1980; Niemann et al. 1980)。

經電泳溶離出來之次單元蛋白質經冷凍乾燥後，溶解在限制蛋白酶 (limit protease) 水解緩衝液中，使成每毫升含 0.2-0.5 毫克之蛋白質，加入 1% (重量比) 之木瓜酵素 (Papain, sigma) 於 30°C 水解 1 小時，然後分別加硫醇 (mercaptoethanol) 及 SDS 至 10% 及 1%，於 60°C 加熱 5 分鐘左右後，跑 15% SDS- 膠體，做成電泳肽圖 (peptide mapping) (Cleveland et al. 1977; Haldenwang and Truitt, 1982)。

由於銀染色法 (silver stain) 比傳統性 Coomassie blue 染色要靈敏一百倍左右 (Switzer et al. 1979; Oakley et al. 1980; Merrill et al. 1981; Merrill et al. 1981; Wray et al. 1981; Eschenbruch and Bürk, 1982, Friedmann, 1982; Irie et al. 1982; Yuen et al. 1982; Willoughby and Lambert, 1983)。本實驗中肽圖銀染色法，其藥劑配方及步驟主要參考 Wray 等人 (1981)，唯稍加以修改。染色和脫色容器都先經過矽化 (Siliconization) 以防止膠體粘附在容器上，而且整個過程都在振盪 (40-60rpm) 中進行。跑完電泳後，膠體 (0.8mm 厚) 浸在 Coomassie blue (0.25 % 在 7 % 醋酸及 50 % 甲醇中) 中 30 分鐘，脫色至背景完全透明，用 50 % 甲醇浸洗 (30 分 × 3 次)，用水 (double deionized) 浸洗 (30 分 × 3 次)，浸在氨銀溶液中 (ammoniacal silver solution) 中 8 至 11 分鐘，再以水洗 (5 分 × 3 次)，以還原劑顯色，5 分鐘內就可以顯色很清楚，俟背景顏色而未變深時，即用固定液 (100 毫升中含 0.5 % 檸檬酸 10 毫升) 固定 30 分，再用水洗數次。若顏色及背景均太深，則可以用固定液 (Fuji Fixer) 處理，使顏色完全褪掉，再重頭染色。

電泳膠體上酵素活性染色 (activity stain 或 zymogram) , 把膠體浸在基質溶液中 (10mM 葡萄糖-1- 磷酸酯, 0.3 % 之可溶性澱粉溶在 40mM 之 Mes 緩衝液中, pH5.9) 經數小時或過夜, 再用 10mM 之碘及 14mM 之碘化鉀混合液染色 (Gerbrandy and Verleur, 1971) 。膠體之乾燥, 先把膠體浸在50% 甲醇 (v/v) 內30分鐘, 再浸在65% 甲醇 (內含 1.5% 甘油) 內30分鐘, 然後以二層濕的瓊璐芬 (cellophane) 夾住膠體, 固定在玻璃板上在室溫自然乾燥 (約半天) 或在60℃ 烤箱內乾燥二小時左右。

等電焦點 (electrofocusing) 分析

使用 LKB 8100 管柱進行。Ampholine 之 PH 範圍為 4-6, 濃度 1.5% 。重電極液 (dense electrode solution) 含 15 克之蔗糖, 4 毫升水及 4 毫升 1M 之磷酸, 輕電極液 (light electrode solution) 含 2.5 毫升 1M 之氫氧化鈉及 7.5 毫升水。重梯度液 (dense gradient solution) 含 27 克蔗糖, Ampholine 3.05 毫升, 純化之酵素 3 毫克及水共 54 毫升, 輕梯度液 (light gradient solution) 含 2.7 克蔗糖, Ampholine 1 毫升及水共 54 毫升, 在 6℃ 580 伏特固定電壓通電 24 小時後每毫升收集在一試管內, 測定其 pH 值及 280nm 之吸光。

密度梯度離心 (density gradient centrifugation)

離心方法參考 Martin and Ames (1961) 。甘油密度梯度由 8 至 33% (比重 1.0173 至 1.0806) , 密度梯度內含 50mM 之 Tris-HCl 緩衝液。經純化之磷解酶 (0.8 毫克 / 毫升, 在緩衝液 C 內) 0.1 毫升及標示蛋白 (Marker protein) 酵母酒精去氫酵素 (yeast alcohol dehydrogenase, 5 毫克 / 毫升, 在 50mM Tris-HCl 緩衝液內) 0.01 毫升混合, 加到梯度之上層, 使用 Hitachi 55p 超高速離心機, RPS 40 吊桶式轉盤 (Swinging bucket rotor) , 在 2℃ 37000 rpm 之下離心 11 小時。離心完使用 Isco 梯度收集器 (gradient fractionator, Model 183) , 由離心管底部打洞, 打入 50% 甘油溶液, 然後由上部收集每 0.1 毫升 (2 滴) 為一區分, 每一區分取 0.05 毫升測定磷解酶之活性。測定酒精去氫酵素之活性, 在 1 毫升反應液中酒精之濃度為 0.1

M, NAD⁺ 5.5mM、焦磷酸鈉 (sodium pyrophosphate) 緩衝液 50mM (pH 8.5), 然後加入 0.01 毫升酵素溶液, 測定40秒鐘及10秒鐘時 340nm 吸光之差。酵母酒精去氫酵素 1% 溶液之 $S_{20,W}$ 為 7.2 (Hogeboom and Kuff, 1954), 分子量 141000 (Bühner and Sund, 1969)。

氨基酸組成分析

純化之磷解酶 (1 毫克/毫升) 以 10mM 之醋酸緩衝液透析過夜後, 取 0.1 毫升加 0.1 毫升 6N HCl (Pierce), 抽真空密封於 Pyrex 試管後, 於 108-110°C 水解 24 小時, 水解後於真空狀態下把 HCl 抽乾, 加入 0.2 毫升之 0.2N 檸檬酸鈉溶液 (以過氧酸調 pH 值至 2.20), 然後以 Shimazu HPLC- 氨基酸分析系統 (high-speed liquid chromatography, amino acid analysis system) 進行氨基酸分析。此系統之特徵是 H- 型 (H-type) 之氨基酸在一強陽離子交換樹脂 (sulfonated styrene-divinylbenzene copolymer) 內進行分離, 分離之氨基酸在 OPA (O-phthaldehyde) 及 2- 硫醇 (2-mercaptoethanol) 存在下, 形成強的螢光物質。比傳統 Ninhydrin 呈色法靈敏數十倍。

結 果

甘藷塊根磷解酶之純化

酵素粗抽取液, 取硫酸銨 25-45% 飽和度沉澱之部分, 進行 DEAE-Sephacel 管柱色層分析, 其結果如圖 1 所示。有二個部分有磷解酶之活性, 一個在 0.13N 食鹽濃度, 另一個在 0.26N 食鹽濃度處流洗出來, 以 0.26N 處之酵素為主要。

圖 1 之第 135 至 144 區分合併在一起, 以緩衝液 B 透析之後, 再以 Amicon 之 PM10 薄膜做濃縮, 把濃縮液通到一 Sephadex G-200 (2.6 × 95 cm) 之管柱做膠體過濾色層分析, 其結果如圖 2 所示。活性部位與第一個蛋白質峯吻合, 把活性部位合併起來, 經電泳分析, 含有一主要及三種次要蛋白質種類, 與酵素活性染色結果比較, 主要蛋白質即為磷解酶。

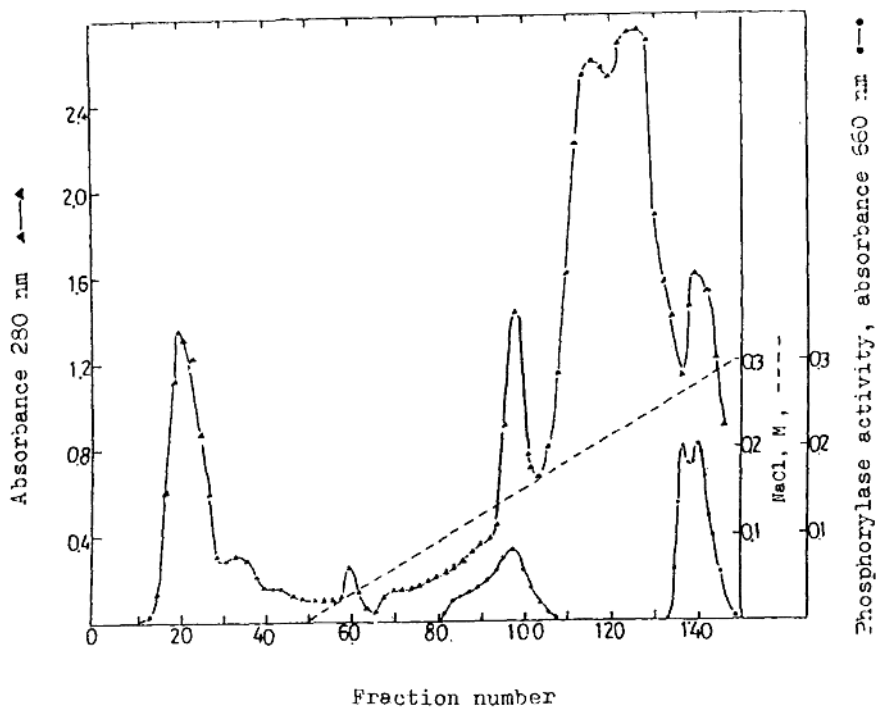


Fig 1. DEAE-Sephacel chromatogram.

圖 1：甘藷塊根粗抽取液之 DEAE-Sephacel 色層分析圖，每一區分收集 8 毫升，0.26N NaCl 處流出之具磷解酶活性部分匯合起來，再做下一步之色層分析。詳細過程參看實驗步驟。

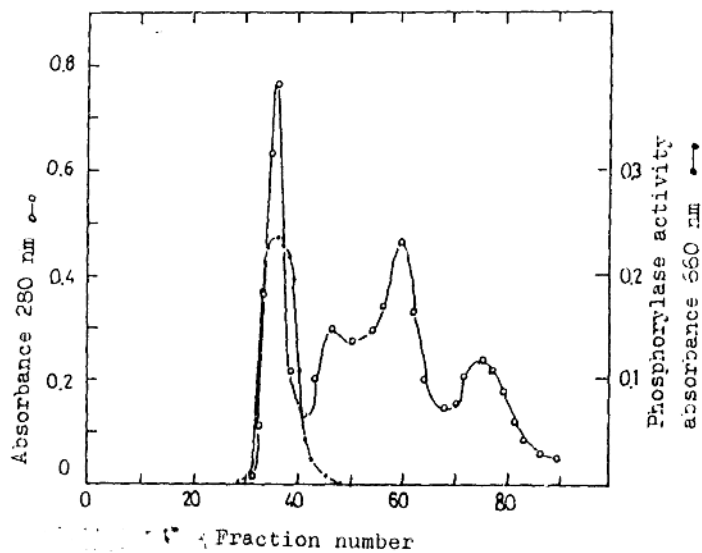


Fig 2. Sephadex G-200 chromatogram.

圖 2 : Sephadex G-200 色層分析圖。每一區分收集 6 毫升。具酵素活性之部分滙合起來，再做下一步之色層分析。詳細過程參看實驗方法。

Sephadex G-200色層分析有活性部分合併起來，再以Amincon 超過濾裝置做濃縮，經緩衝液C透析之後，加到一經緩衝液C平衡過之 DEAE-Sephacel 管柱（2 × 8.1 公分）做色層分析，其結果如圖 3 所示，最主要之蛋白質峯含有磷酸酶活性唯活性峯在頂端部分有分叉，顯示它可能含有二種主要磷酸酶。

圖 3 有活性部分合併起來，以Amicon 超過濾裝置濃縮後，再以緩衝液C做透析，得到約 8 毫克之酵素（比活性，specific activity, 28 u/mg）。取少量做 5 至 20% 梯度膠體電泳分析，其結果如圖 4 所示。由圖 4 中可以看出，所純化到之磷酸酶

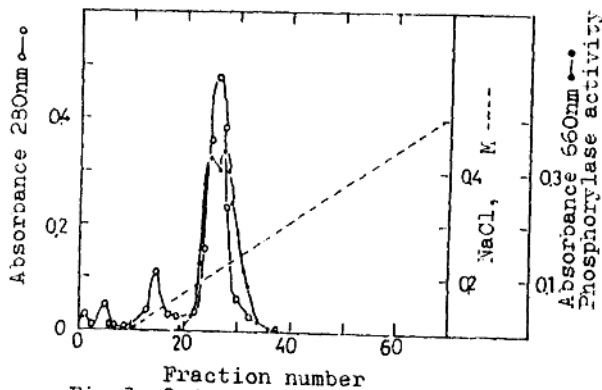


圖 3：第二次之DEAE-Sephacel 色層分析圖，每區分 6 毫升，活性曲線在頂端處有分叉，活性部分與蛋白質主峯一致。詳細過程參看實驗方法。

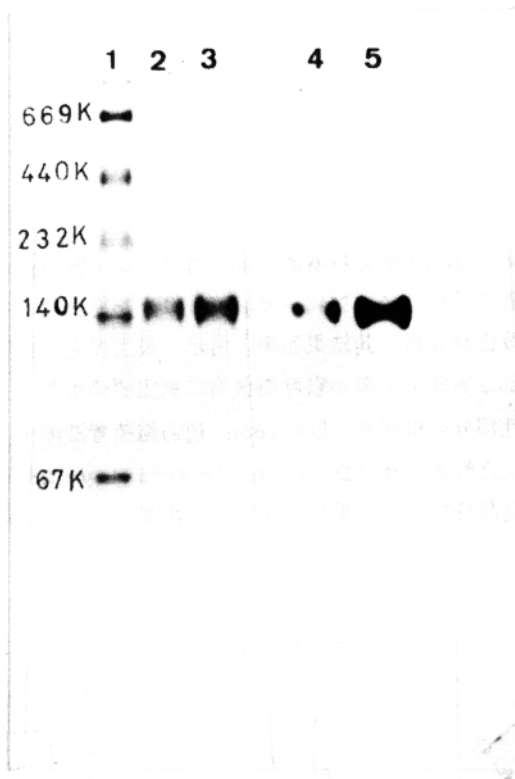


Fig. 4. Gradient gel electrophoresis (5 to 20%) of marker proteins and purified sweet potato phosphorylase. Lanes 1 to 3: Coomassie blue stain, lanes 4 and 5: activity stain. Lane 1: Phamacia high molecular weight calibration kit for electrophoresis, from top to bottom are: thyroglobulin 669000, ferritin 440000, catalase 232000, lactate dehydrogenase 140000 and albumin 67000. Lanes 2 and 3: 1.7 and 3.4 μ g phosphorylase respectively. Lanes 4 and 5: the same amount as in lanes 2 and 3.

圖 4：5 至 20% 梯度聚丙烯醯胺電泳分析。第 1 ~ 3 行蛋白質染色。4 ~ 5 行酵素活性染色。第 1 行為 Phamacia 高分子量電泳標示蛋白（每一蛋白帶之含量約 2.5 微克），分子量由上而下分別為：Thyroglobulin 669000；Ferritin 440000；Catalase 232000；Lactate dehydrogenase 140000；Albumin 67000。第 2 至第 5 行為純化之甘藷磷解酶，2, 4 行含 1.7 微克，3, 5 行含 3.4 微克之酵素。由 2、3 行中可以看出，所純化之磷解酶是由一組分子量很接近之分子所組成，而都具有酵素活性（第 4、5 行）。電泳之條件及活性染色參看實驗方法。

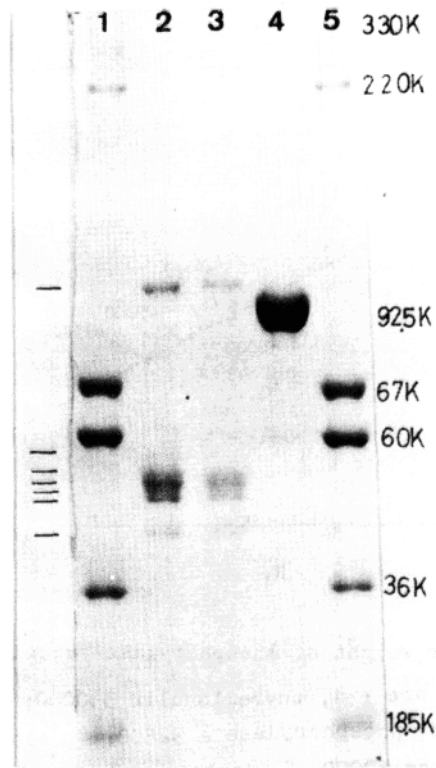


Fig. 5. Gradient SDS-gel electrophoresis (5 to 20%) of purified sweet potato phosphorylase. Lanes 1 and 5: Pharmacia high molecular weight calibration kit for electrophoresis, from top to bottom are: thyroglobulin 330000, ferritin 220000, albumin 67000, catalase 60000, lactate dehydrogenase 36000, ferritin (small subunit) 18500. Lanes 2 and 3: 2.5 and 1.25 μg phosphorylase respectively. Lane 4: 10 μg phosphorylase a (from raffinose, Sigma). Straight lines at left hand indicate the positions of phosphorylase subunits.

圖 5：甘藷磷酸酶之梯度（5 至 20%）SDS- 膠體電泳分析。

第 1、5 行為 Pharmacia 之高分子量電泳標示蛋白，第 1 行各含 2.5 微克，由上而下為：Thyroglobulin 330000；Ferritin 220000；Albumin 67000；Catalase 60000；Lactate dehydrogenase 36000；Ferritin 18500。第 5 行各含 1.25 微克。第 2、3 行為甘藷磷酸酶 3.4 及 1.7 微克，第 4 行 10 微克 Phosphorylase a。圖左邊黑線所指為磷酸酶次單元之位置。