

2025年臺灣國際科學展覽會

優勝作品專輯

作品編號	080006
參展科別	生物化學
作品名稱	突破能量屏障:探討原始固碳路徑中異檸檬酸脫氫酶的角色

就讀學校	臺中市立臺中女子高級中等學校
指導教師	黃介辰
作者姓名	吳書葶

關鍵詞	<u>逆三羧酸循環(rTCA cycle)、異檸檬酸脫氫酶(ICD、IDH)</u>
-----	--

作者簡介



我是吳書葶，目前就讀台中女中數理資優班。透過這次獨立研究，接觸了生化，並開始對這門學問愈來愈有興趣，且這次經驗也帶給我許多啟發。感謝用心指導並不吝給予資源的大學端教授和一直耐心教我實驗技巧的實驗室學長姊，以及一路支持我的家人。有了他們的幫助，我才能來到國際科展的舞台，拓展自己的視野。

研究報告封面

2025 年臺灣國際科學展覽會

研究報告

區別：

科別：生物化學科

作品名稱：突破能量屏障:探討原始固碳路徑中異檸檬酸
脫氫酶的角色

關鍵詞：逆三羧酸循環(rTCA cycle)、異檸檬酸脫氫酶
(ICD、IDH)

編號：

(編號由國立臺灣科學教育館統一填列)

摘要

原始生命的形成被推論是由化學分子透過自發性化學反應組成簡單的代謝路徑，再由這些路徑組合成為複雜的代謝網絡，最終形成原始的生命。由於自營性的代謝路徑可將無機性的 CO_2 固定為有機物可謂形成生命的前提，因此推論在自營性微生物所擁有的一種生物固碳路徑，可將 CO_2 固定進入三羧酸循環的「逆向三羧酸循環」被認為是原始細胞最初形成的代謝路徑之一。然而，以化學反應的自由能考量，自 2-Oxoglutarate 到 Isocitrate 此固碳反應並非自發性反應，並由異檸檬酸脫氫酶催化。異檸檬酸脫氫酶在逆三羧酸循環中是決定固碳反應速率的關鍵酵素之一，在當今正向三羧酸循環中亦具有重要的調節細胞能量代謝的功能。有鑑於此，本研究探討源自古老地球環境的嗜熱自營菌 *Aquifex aeolicus* 中異檸檬酸脫氫酶的酵素性質，並期待本研究結果對生命起源的探究及發展新穎固碳技術能有所助益。

Abstract

The origin of life is generally theorized to have begun when chemical molecules spontaneously formed simple metabolic pathways, which then combined into complex networks, leading to the formation of primitive life forms. With autotrophic metabolic pathways that are capable of fixing inorganic carbon dioxide into organic compounds considered a prerequisite, the reverse tricarboxylic acid (rTCA) cycle, which fixes carbon dioxide, is hypothesized to be one of the earliest metabolic pathways in primitive cells. However, from the perspective of

reaction free energy, the carbon fixation step from 2-Oxoglutarate to Isocitrate is non-spontaneous and requires catalysis by the enzyme isocitrate dehydrogenase (IDH). In the rTCA cycle, IDH is a key enzyme that determines the rate of carbon fixation, and in the present-day TCA cycle, it plays a vital role in regulating cellular energy metabolism. In light of this, this study investigates the enzymatic properties of isocitrate dehydrogenase derived from the thermophilic autotrophic bacterium *Aquifex aeolicus*, which thrives in ancient Earth-like environments. The findings from this research may contribute to our understanding of the origin of life and the development of novel carbon fixation technologies.

壹、介紹

一、前言

(一)原始生命的形成與固碳路徑

生命的起源一直以來都是令許多人感到好奇的問題。約 45 億年前地球剛形成，表面溫度極高，火山活動頻繁，大氣層主要由二氧化碳、甲烷、氨氣和水蒸氣組成，幾乎沒有氧氣。在這種環境下為化學進化提供了獨特的條件。而在深海鹼性熱泉是海底的熱液噴口，釋放出高溫的礦物質和化學物質，並形成酸鹼濃度差而為深海環境中的化學反應提供了理想的條件。再加上鐵和硫化物在高溫高壓環境下，能夠催化有機分子的合成，這些反應都可能在深海鹼性熱泉附近發生。

而要形成最原始的生命，必須先在自然界中形成一些基本物質如：醣類、胺基酸、核酸等建構生命的模塊。有理論推測，這些物質有可能是從代謝路徑形成後才產生的。至於這些代謝路徑的形成，則可能是先由一些小分子形成自發性的生成反應(代謝路徑)，這些反應的代謝路徑再組合形成較複雜的代謝網¹。

在眾多代謝路徑中，固碳路徑是指將二氧化碳轉化為有機化合物的過程，這對於形成地球上的生命至關重要。尤其自營性生物在生態系統中扮演著基礎角色，因為它們是食物鏈的起點，為其他生物提供了必要的有機物質和能量

目前已知有七種固碳路徑^{2,3}：

1. 卡爾文循環：

這是最常見的固碳路徑，主要在植物、藻類和藍菌中進行。

它利用光合作用將二氧化碳轉化為三碳糖磷酸。

2. 逆三羧酸循環：

這一循環在某些細菌和古菌中發現，通過逆向運行三羧酸循環來固定二氧化碳。

3. 乙醯輔酶 A 途徑：

這條路徑主要在厭氧細菌和古菌中發現，利用乙醯輔酶 A 作為中間體來固定二氧化碳。

4. 3-羥基丙酸循環：

這條路徑在某些古菌中發現，通過 3-羥基丙酸作為中間體來固定二氧化碳。

5. 3-羥基丙酸/4-羥基丁酸循環：

這條路徑也是在古菌中發現，利用 4-羥基丁酸作為中

間體來固定二氧化碳。

6. 二羧酸/4-羥基丁酸循環：

這是 4-羥基丁酸循環的變體，主要在某些古菌中發現，通過二氧化碳和乙酸的結合來固定二氧化碳。

7. 還原性甘氨酸路徑：

CO₂首先被還原為甲酸，再被還原並與第二個 CO₂縮合生成甘氨酸。甘氨酸進一步被甘氨酸還原酶還原為乙醯磷酸 (acetyl-P)，然後轉化為乙醯輔酶 A (acetyl-CoA)，再與另一個 CO₂ 縮合生成丙酮酸。

(二)逆三羧酸循環(以下簡稱 rTCA cycle)

在上述六種固碳代謝路徑中逆向的三羧酸循環又顯得特別重要，因為一般所認知的克氏循環(TCA cycle)是生物中常見且重要的代謝路徑，提供能量及許多重要的前驅化合物；然而其逆循環 rTCA cycle 卻較鮮為人知。rTCA cycle 被認為是生命起源中重要的一步^{4,5}，它能夠消耗能量將簡單的有機物質轉換為較複雜常見的生命基本物質，如：胺基酸、核酸等。

然而，rTCA cycle 中固碳反應 (Succinyl-CoA 到 2-Oxoglutarate 及 2-Oxoglutarate 到 Isocitrate) 卻都是非自發反應。以下為 rTCA cycle 中在 pH10、25°C 的環境下，各步驟的自由能：

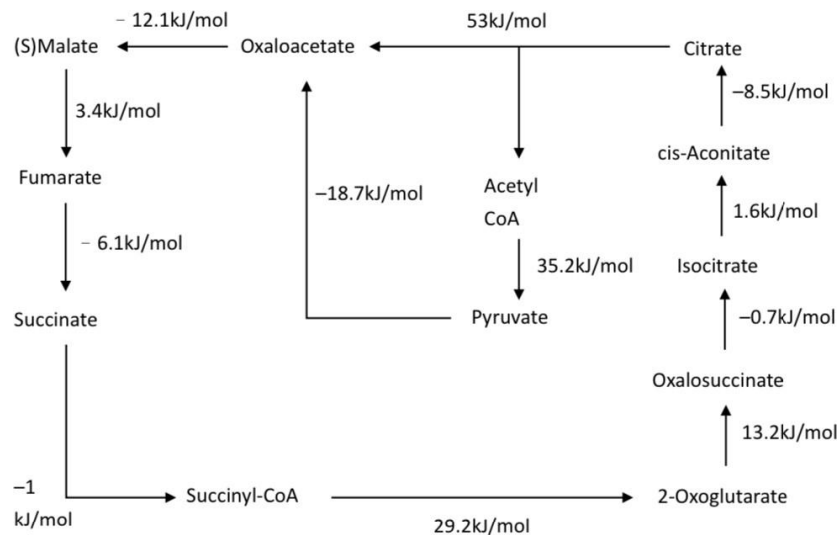


圖 1. 逆三羧酸循環在 pH10、25°C 下各步驟的自由能
(本圖為第一作者著作)

由此可知，Succinyl-CoA 到 2-Oxoglutarate ($\Delta G = 29.2 \text{ kJ/mol}$) 及 2-Oxoglutarate 到 Isocitrate ($\Delta G = -0.7 + 1.6 = 0.9 \text{ kJ/mol}$) 這兩個固碳反應均為非自發反應。然而，若是從 Pyruvate 開始反應至 2-Oxoglutarate 的話，整體自由能卻是負值，變得能夠自發。但是 2-Oxoglutarate 到 Isocitrate 這個反應卻沒辦法從循環中其他化合物使其能夠成為自發反應，因此，IDH 在 rTCA cycle 中有非常重要的角色。

(三) 異檸檬酸脫氫酶 (IDH)

此酵素在一般生物內為參與克氏循環此反應此反應的重要酵素之一，他能夠調節細胞代謝的速率，在醫學上對於腦瘤的研究扮演重要角色⁶。

然而，較不為人熟知的是此酵素能夠催化逆反應，此酵素能

夠催化的逆反應，使原始自營菌能夠進行逆三羧酸循環的固碳反應，進而合成本身所需之基本物質。

由於在眾多生物中，原始自營菌是在其環境生長下，會自行進行逆三羧酸循環的生物^{4,7}，因此本研究希望能夠測量，原始自營菌之 IDH 的固碳效率，並了解其 IDH 突破能量屏障的機制，期望能夠應用在固碳技術上。

二、研究動機

原始自營菌是少數會行 rTCA cycle 的生物，而 rTCA cycle 的固碳反應 2-Oxoglutarate 到 Oxaloacetate 為非自發性反應，須要酵素 IDH 協助。然而 IDH 固碳的化學機制較少被研究，因此本研究嘗試了解 *A. aeolicus* 之 IDH 特性，並預測其結構，測試其應用在未來生物固碳技術的可能性。

三、研究目的

- (一) 了解原始自營菌 IDH 的最佳固碳條件
- (二) 預測其固碳機制
- (三) 試圖改善其固碳效率

貳、研究方法過程

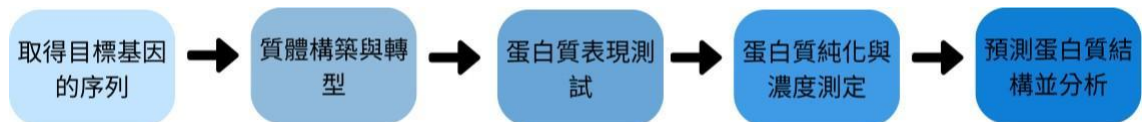
一、研究器材與設備

1. 聚丙烯醯胺膠體電泳 SDS-page
2. 小大連蛋白液相色譜

3. 分光光譜儀
4. 乾浴槽
5. 移液器(pipetman p2, p10, p20, p40, p100, p200, p1000)
6. 試管震盪器
7. 低溫冷凍櫃
8. 微生物培養箱
9. 滅菌釜
10. 96 微量分托盤

二、研究過程

從 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)網站取得 *A. aeolicus* 製造 IDH 的基因，進行其蛋白質的功能與生化特性分析，並嘗試改良其固碳效率，提高酵素之應用性。



三、實驗步驟

(一) 獲得 *A. aeolicus* IDH 的基因

1. 從 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
查詢 *A. aeolicus* 製造 IDH 的序列

(二) 質體構築

1. 選擇適合的載體，pET28-TEV
2. 將載體和目標基因片段進行重組

(三) 質體轉型

一、轉型

1. 將質體 2 μL 加入 50 μL 的勝任細胞
2. 放在冰上 30 min
3. Heat shock 42°C 30 秒
4. 放在冰上 5 分鐘
5. 加入 200 μL SOC
6. 放入 37°C 的培養箱一小

時二、塗盤

1. 將轉型完的菌從培養箱取出
2. 將 200 μL 轉型過的菌液塗在培養皿上
3. 將 200 μL 為無轉型過(只經過放入 37°C 的培養箱一小時之處理)的勝任細胞 200 μL 塗在有 Kanamycin 的培養皿上，作為對照組。

三、定序

1. 將有 Kanamycin 的培養皿上長出的菌送給基龍米克斯公司定序，使用的引子為公司提供之 T7 Promoter 與 T7 terminator
2. 以線上工具軟體 Benchling 將定序資料與質體序列

比對

(四) 蛋白質表現測試

1. IPTG 誘導

(1) 在兩個血清管內分別加入 5 mL LB + 10 mL 的菌
+ 5 mL 的 Kanamycin。

(2) 在 37°C 下培養至 O.D. = 1

(3) 加入 1 μ L IPTG 後放回 37°C 的培養箱中。

2. 破菌

(1) 將前一步血清管內的液體，倒進離心管中，於
4°C 下，以轉速 6000 rpm 離心 10 分鐘

(2) 以 10 mL lysis buffer(20 mM Tris-HCl, 500 mM
NaCl, pH 8.0) 回溶上一步離心出的菌塊，加入 PMSF
使其最終濃度為 1 mM，最後利用超音波破菌機破菌
30 分鐘。

3. SDS PAGE

(1) 將上一步破菌後得到的液體離心，跑 SDS PAGE

(五) 蛋白質純化

1. 破菌

(1) 取先前做菌保的菌 25 μ L 加入 250 ml 已滅菌的
LB，並加入 250 μ L 濃度為 1 mg/ml 的

Kanamycin。

- (2) 在 37°C 培養箱培養至 O.D 0.4
- (3) 加入 1 μ L、1 mM IPTG 在 37°C 下培養 16 hrs
- (4) 於 4°C、轉速 6000 rpm 下離心 10 分鐘。
- (5) 每 1 L 培養出之菌泥以 15 mL lysis buffer(20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.0)回溶並加入 PMSF 使其最終濃度為 1 mM，利用超音波破菌機破菌 30 分鐘。

2. 蛋白質純化

- (1) 上清液以 0.22 μ m filter 過濾。
- (2) 將上清液通入 His column 並收集液體。
- (3) 將體積分別為 15 mL 及 10 mL 之 20 mM 和 250 mM 之 imidazole buffer 依序加入管柱中，收集液體。
- (4) 進行 SDS 蛋白質膠體電泳分析，得知含有蛋白之溶液。

3. 透析、濃縮

- (1) 將樣品使用 10 k MWCO 透析管以 5000 g 離心，直到體積減少到 200 μ L。
- (2) 加入 equilibrium buffer，將體積補回 1 mL。
- (3) 將多個樣品管合併，使用 10 k MWCO 透析管進行透析，將總體積濃縮至 200 μ L。

4. 去除 His-taq

(1) 配合總體積添加 10x TEV buffer。(2)

加入 1 μL TEV 酶，進行一小時反應。

(3) 通過 Ni-NTA 管柱，流出液為無 His-taq 之蛋白質。

(六) 測定蛋白質濃度

1. 在 96 孔盤中，依序加入 40 μL 5x Bradford assay dye 和 160 μL 的 BSA 0、3.9、7.8、15.625、31.25、62.5 (ng/ μL) 和前一步已去除 His-tag 的酵素。

2. 用分光光譜儀量測吸光值。

(七) 酵素活性測試

1. 酵素於最佳溫度活性測試

(1) 實驗溫度 40°C~80°C，間隔 10°C

(2) 取 5 個新塑膠 cuvette，依序將藥品加入，NADPH 為測量吸光值前加入。且藥品加入後會出現沉澱，須先進行 pipetting 才能測量吸光值。計算使用的 NADPH 之消光係數為 6220 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

名稱	溶液中濃度
磷酸鈉緩衝液(pH7.0)	0.1M
錳離子	0.001M
α - ketoglutarate	0.0006M
碳酸氫鈉	0.02M
蛋白質	0.1mg/ml
NADPH	0.0005M

(3) 分光光譜儀設定 OD340、240 秒進行吸光值測量

(4)繪圖比較不同溫度下酵素的相對活性

2. 酵素於最佳酸鹼值活性測試

(1)配置磷酸鈉緩衝溶液(pH 值 6.5~8，間格 0.5)、
 α -ketoglutarate 溶液(pH 值 6.5~8，間格
0.5)、碳酸氫鈉溶液(pH 值 6.5~8，間格 0.5)。

(2)取 4 個新塑膠 cuvette，依序將藥品加入，NADPH
為測量吸光值前加入。且藥品加入後會出現沉澱，
要先進行 pipetting 才能測量吸光值。計算使用的
NADPH 之消光係數為 $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。

名稱	溶液中濃度
磷酸鈉緩衝液(pH7.0)	0.1M
錳離子	0.001M
α -ketoglutarate	0.0006M
碳酸氫鈉	0.02M
蛋白質	0.1mg/ml
NADPH	0.0005M

(3)分光光譜儀設定 OD340、240 秒進行吸光值測量

(4)繪圖比較不同酸鹼值下酵素的相對活性

(八) 酵素動力學測試

(1)配置三管不同濃度的碳酸氫鈉，分別是 0.04 M、0.08
M 和 0.16 M，共三種濃度

(2)取 3 個新塑膠 cuvette，依序將藥品加入，NADPH 為
測量吸光值前加入。且藥品加入後會出現沉澱，要先
進行 pipetting 才能測量吸光值。計算使用的 NADPH

之消光係數為 $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。

名稱	溶液中濃度
磷酸鈉緩衝液(pH7.0)	0.1M
錳離子	0.001M
α -ketoglutarate	0.0006M
碳酸氫鈉	0.04M、0.08M、0.16M
蛋白質	0.1mg/ml
NADPH	0.0005M

(3) 分光光譜儀設定 OD340、240 秒進行吸光值測量

(4) 繪圖並比較各碳酸氫鈉下的反應速率，並繪製 Michaelis-Menten 酵素動力學圖形，得到酵素動力學參數。

(九) 利用 AlphaFold 和 SwissDock 預測其固碳機制

1. 先利用 AlphaFold 3 beta 預測 NADP 和 Mn 離子和酵素結合的位置。
2. 再利用 SwissDock 預測 isocitrate 和酵素的結合位

參、研究結果與討論

一、依據 KEGG 上的資料，*A. aeolicus* 製造 IDH 的序列如下圖

2.：

NT seq	1281 nt NT seq +upstream0 nt +downstream0 nt
	atgaataaaaacaacgtttgaaaatgtttactactgggaaggaaaggcacaatccccag gaagggcagtttataaagctcaaagaagataaaaccttagaagttccagacaaccgata attcccttcatagaggagatgggataggtcctgaaataacgcaggctatgctccttatt atcaacacacgcggttgaaaaaacttacaacggaagcaagaagatttactgggtagaacctc ctcgcgggggataaggcgggaagaaaagactggagagaggcttctcaggaaacctggac gttttaaaagaatcaatagtaggtataaaaggacccctcggaacgccgtaggaaaagggt gtccgctccataaactcgcctcaggagggcatttgattactactctgcggttaagacc gtttactggatgggccaggcaactcggattccaatcctgagagggttgacctcgtagtt ttcagagaaaacaccgacgactctacgcgggagtggagtctttgcgggaacgccgaa gccaaaaaggtaagagaattcctcataaaggagatgggggcaaaagaggaaggcttccc gaagatgtgggaataacggtaaagcccatgagcgagttcaagacaagagacacgtgagg aaagcactcagatacgcccttgaaaacaacaagaagaacgtcgcggtaataggaaaagga aacataatgaaggcaacggaaggggccttcataaactgggcttttgaggtagcagaagag cccgaattcaaaggaaaggtagtaacggaccgggaagcagagccggcgaggacaggta aaactcacaagaatgataaccgaccagatgcttatgcaacttgtcctcaagcccgaagct tgggacgtgataatcgtcagaacttgaacgggtgactacgtttccgaccttgacgttct ctgataggagggtcaggatttgttcgagcggaaacataggggacggatatgccctcttt gaaagcaccacggaacagcttgggacatagcaggcaagggaatagcaaatccccctttcc cttacactatctggcgcgatgatgcttgaatacataggttggaagaagcagctcaaaag gtctacgacgcagtaagaagaacccttgcggaacatataggaacgccgatatcgcaagc ggattccagaaacagggaatagaagctaagcagtaggcacgatggagttcgccgaagaa attccaagagattgagtaa

圖 2. *A. aeolicus* 製造 IDH 的基因序列

(從 KEGG 的序列結果截

圖) 二、質體構築

此部分交由生技公司製作

三、質體轉型

無轉型的菌並未生長，僅有轉型的菌有生長，代表培

養基的抗生素仍有抗性，有長出的菌不是雜菌。

四、基因定序

委託基龍米克斯公司使用 T7 promoter 與

T7 terminator 引子，以 Sanger 定序法協助定序，已確

認質體上的序列與當初設計的相同。



圖 3. 質體序列與定序資料比對之結果相符

(從 Benchling 的序列比對結果截

圖) 五、蛋白質表現測試

於轉形入質體之 *E. coli* 菌液加入 1 mM 誘導物

IPTG、於 37°C 進行培養，確認蛋白質表現狀況(圖 4)。

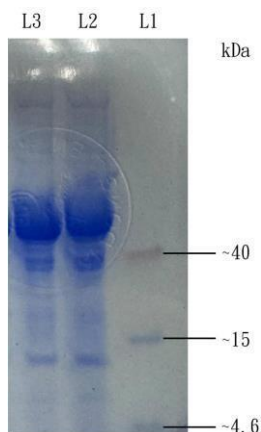


圖 4. SDS PAGE 誘導測試圖

(L1: Marker L2:有 IPTG L3:無 IPTG)

(本照片為第一作者拍攝)

(註：實驗室製作的勝任細胞，該菌株類型特性上在培養一段時間後，即使無 IPTG 的添加，大量的重組蛋白會被製造。)

六、蛋白質純化

利用 His 管柱純化 IDH，並以 15% SDS-PAGE 跑膠確認純化結果(圖 5.)。可見在 40 kDa~55k Da 間有明顯的蛋白訊號，與單體理論分子量接近，代表純化出預期的重組蛋白。

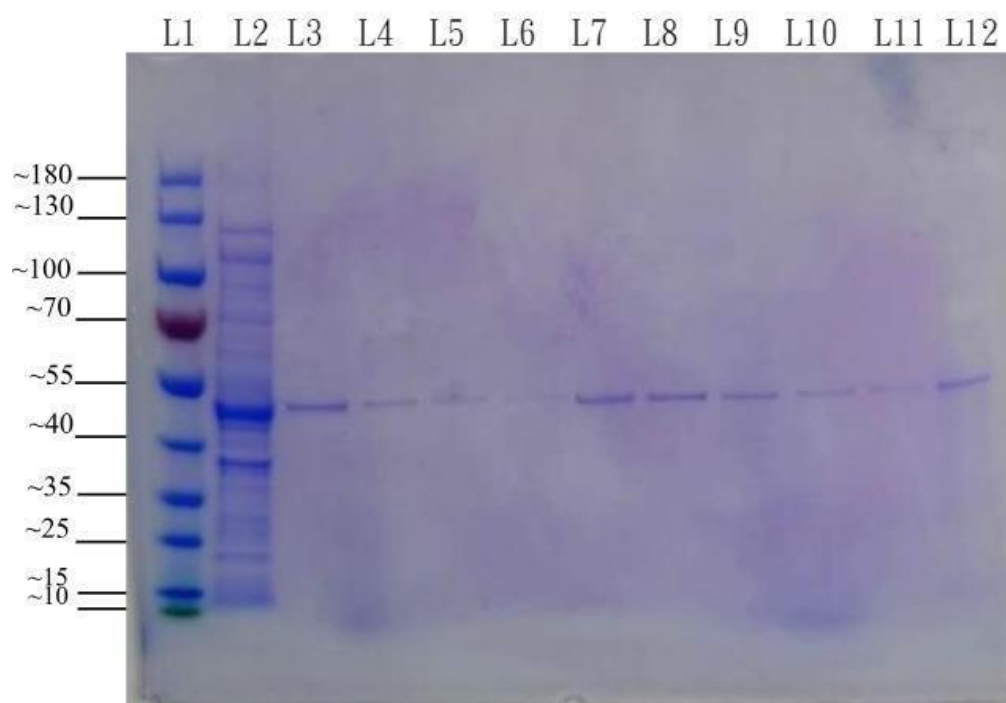


圖 5. 15%SDS-PAGE 蛋白質純化結果

(L1:Marker L2:蛋白質流洗液 L3~L7: 20mM Imidazole
L8~L12:250mM Imidazole)

(本照片為第一作者拍攝)

七、測定蛋白質濃度

做出 BSA 0、3.9、7.8、15.625、31.25、62.5($\text{ng}/\mu\text{L}$) 與其吸光值的關係圖並算出期趨勢線方程式，最後將待測定濃度蛋白質的吸光值代入方程式中，算出 IDH 濃度為 $4.8 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

八、酵素活性測試

(一) 酵素最佳酸鹼值活性測試

將純化後的 IDH 於不同 pH 值之緩衝溶液進行活性測試，得出 IDH 反應最佳環境 pH 值為 pH8 (圖 6)。由於 *Aquifex. aeolicus* 為一自海底鹼性溫泉發現的細菌，其生長環境應為偏鹼性環境。此處所得之結果符合其於生長環境下有最佳反應性的預期。然而，於酸性環境中活性極低。因此，後續將選 pH 為 8 的磷酸鈉緩衝溶液進行酵素動力學實驗。

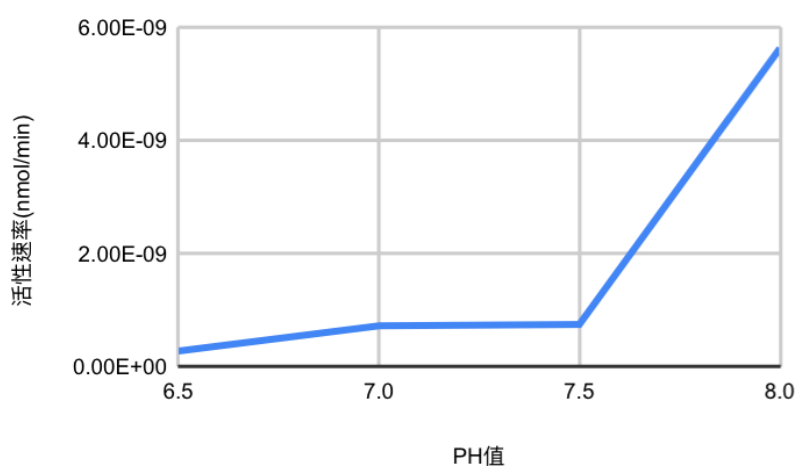


圖 6. 不同 pH 值對酵素活性的影響

(本圖片由第一作者繪製)

(二) 酵素最佳溫度活性測試

IDH 在 40°C~80°C 下進行反應，並測量酵素活性

(圖 7)。由圖可見 起初酵素活性隨溫度上升而升高，並至 70°C 達到最高點、具有最佳活性。而後活性隨著溫度上升而開始下降。如前所述，此為在海底溫泉生活之細菌，故最佳反應溫度為高溫，與該細菌的生長環境相符。然而在溫度持續上升後，酵素活性隨之降低，可能是由於酵素結構因為溫度過高而開始被破壞進而導致活性下降。

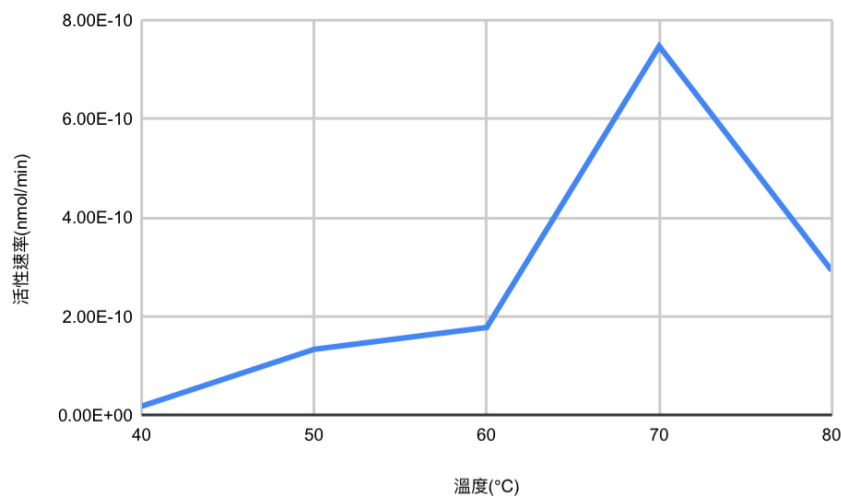


圖 7. 不同溫度對 IDH 酵素相對活性影響

(本圖為第一作者繪製)

(反應溶液內含 20 μ L 濃度為 4.84 ng/ μ L 之 IDH、0.02M NaHCO_3 ，且

在 0.1M pH 為 7.0 之磷酸鈉緩衝溶液下進行反應)

九、酵素動力學

在 pH 7.5 進行酵素動力學實驗。反應溶液配置完後，於 70°C 下反應 4 分鐘，測量 340nm 吸光值隨時間變化，取反應初始線性範圍內吸光值之斜率作為反應初速度，再將 340nm 吸光值的變化換算成 Isocitrate 的濃度變化速率。

將所得數據用 Lineweaver-Burk 雙倒數作圖法，計算得 IDH 之 $K_m=5000 \text{ mM}$ 、 $k_{cat}=48.8 \text{ min}^{-1}$ 、 $V_{max}=72360 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ 。

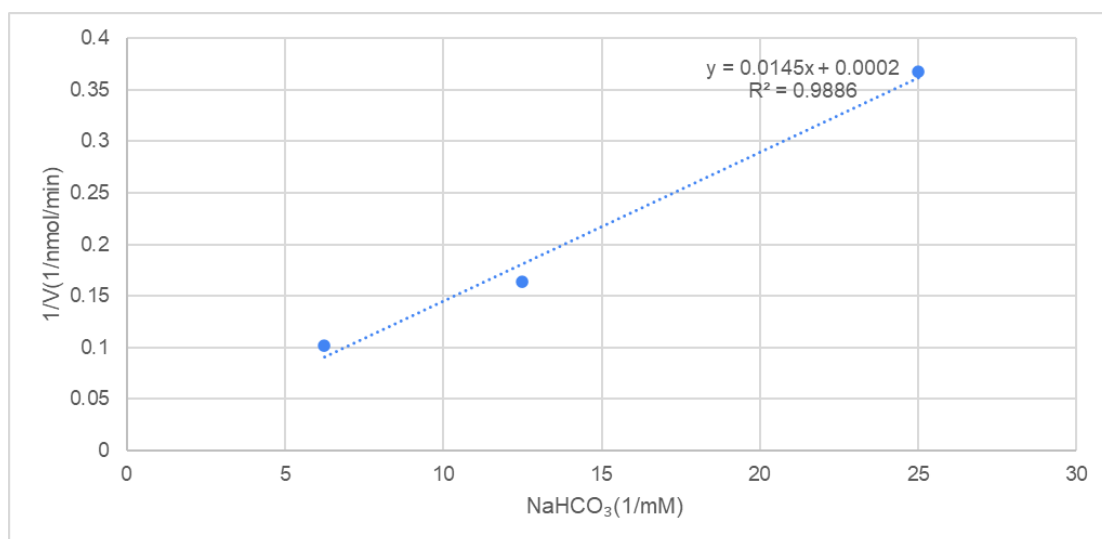


圖 8. 用 Lineweaver-Burk 雙倒數作圖法計算 IDH 的酵素動力學(本圖為第一作者繪製)

十、利用 AlphaFold 和 SwissDock 預測其固碳機制

由於固碳機制較難模擬，先模擬釋出 CO_2 之反應的機制，在推測固碳機制。

(一) 用 AlphaFold 模擬 NADPH 和 Mn 離子位置

由圖可知 NADP 及 Mn 離子的位置，Mn 在 Asp307、Asp283、Tyr160 之間。進而推測 Isocitrate 在圖 9 酵素裡 Mn 離子左上角的位置。

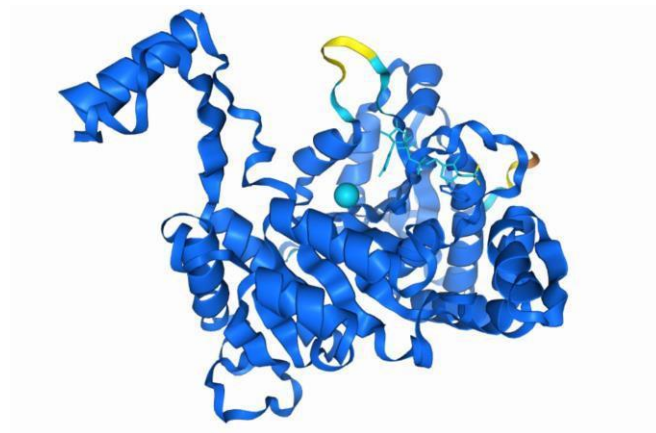


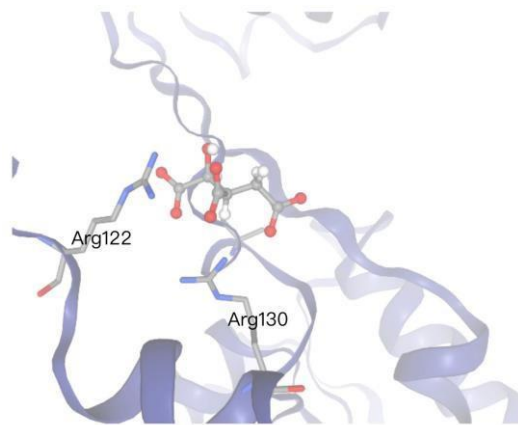
圖 9. Mn 離子為青色球狀物、青色有環的物質為 NADPH (從 AlphaFold 的模擬結果截圖)

(二)利用 SwissDock 結構預測，推測 Isocitrate 分解為 CO_2 的機制。

以目前的模擬資料(圖 10)，可預測 ARG130 與 ARG122，分別會與 isocitrate 的 C5 和 C6 carbonyl group 吸引，幫助 isocitrate 固定在預測之酵素反應位置，故推測由二氧化碳合成到 isocitrate 的 C6 carbonyl group 應是由 ARG122 所幫助吸引。

參考 IDH 的 isocitrate 分解出 CO_2 的機制，最終轉移到 NADP 的 H^+ 來源為與 isocitrate C6 group 吸引的 Lys 胺基酸側鏈。故推測此 ICD 在固碳反應時，與 C6 carbonyl

group 最靠近的 ARG122 有可能也扮演了接受從 NADPH 上跳



出的 H^+ 的腳色，進而促進二氧化碳與 alpha-ketoglutarate 結合，生成 isocitrate，但詳細機制還需未來實驗證明。

圖 10. 標示為 Arg122、Arg130 者為胺基酸，胺基酸間為 Isocitrate 的球棍模型

(從 Docking 的模擬結果截

圖) (三)可能的固碳效率改善

方向

依據以上模擬的結果，提出以下方法提升固碳效率可能的方向：

1. 透過修改蛋白質上跟 isocitrate C6 羰基吸引的胺基酸，使得與 isocitrate C6 羰基吸引的胺基酸和 isocitrate 間的分子間作用力變大，以達到提升固碳效率的目的。
2. 修改蛋白質裡跟 isocitrate 結合凹槽裡的任何骨架胺基酸，使原本與 isocitrate C6 carbonyl group 吸引

的胺

基酸側鏈更靠近一點並產生更強的吸引力。

肆、結論與應用

於 113 年 1 月至 113 年 10 月期間，我已將 *A. aeolicus* IDH 重組蛋白之純化，透過酸鹼值、溫度活性測試得出 *A. aeolicus* 的 IDH 酵素最佳反應條件為 pH=7.5、溫度 70°C 之環境，並進行了一次酵素動力學實驗；且模擬酵素的結構，提出其可能的固碳機制，並提出未來提升固碳效率的研究方向。

未來應用：

一、進一步模擬如何修改蛋白質上跟 isocitrate C6 羰基吸引的胺基酸，使得與 isocitrate C6 羰基吸引的胺基酸和 isocitrate 間的分子間作用力變大。再透過基因編輯，製造所模擬出固碳效率較好的蛋白質結構。或者，也可以嘗試透過基因選殖，找出 IDH 酵素固碳效率更好的物種。最後，大量生成固碳效率較好的 IDH 應用在固碳技術上，使二氧化碳能夠成為其他人類能夠利用的形式，如：燃料等。

二、未來可進行 IDH 晶體的培養並進行結構分析。再進行晶體浸泡得出其確切固碳機制。

三、由於在原始海洋中，逆三羧酸循環在生成生命所需基本物質時，剛開始尚未生成胺基酸，因此沒有酵素能夠催化 2-Oxoglutarate 到 Isocitrate 此固碳反應，使其突破能量屏障。未來可以透過模擬原始海洋環境，加入無機物、提高溫度或是調整生成物和反應物的濃度差，看此反應是否會發生。

參考文獻

1. Peretó, Juli. *Controversies on the origin of life* (PDF). *International Microbiology*. 2005, **8** (1): 23–31 [2015-06-01].
2. *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press. 2009. pp. 83–84. ISBN 978-0-12-373944-5.
3. Sánchez-Andrea, I., Guedes, I.A., Hornung, B. *et al.* The reductive glycine pathway allows autotrophic growth of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Nat Commun* 11, 5090 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18906-7>
4. Xiang V. Zhang; Scot T. Martin. Driving Parts of Krebs Cycle in Reverse through Mineral Photochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* December 2006, **128** (50): 16032–16033.
5. Anja Poehlein, Silke Schmidt, Anne-Kristin Kaster, Meike Goenrich, John Vollmers, Andrea Thürmer, Johannes Bertsch, Kai Schuchmann, Birgit Voigt, Michael Hecker, Rolf Daniel, Rudolf K Thauer, Gerhard Gottschalk, Volker Müller; An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis, *PloS one* 7 (3), e33439, 2012
6. Matthew S Waitkus, Bill H Diplas, Hai Yan; Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas; *Neuro-oncology* 18 (1), 16–26, 2015
7. Rogier Braakman, Eric Smith; Metabolic evolution of a deep-branching hyperthermophilic chemoautotrophic

bacterium;*PLoS One* 9 (2), e87950, 2014

【評語】 080006

可將 CO₂ 固定進入三羧酸循環的「逆向三羧酸循環」被認為是原始細胞最初形成的代謝路徑之一。本研究探討源自古老地球環境的嗜熱自營菌 *Aquifex aeolicus* 中異檸檬酸脫氫酶的酵素性質。

優點：

1. 異檸檬酸脫氫酶在逆三羧酸循環中是決定固碳反應速率的關鍵酵素之一，在正向三羧酸循環中亦具有重要的調節細胞能量代謝的功能。研究古老的異檸檬酸脫氫酶的酵素性質，可能對生命起源的探究及發展新穎固碳技術能有所助益。
2. 本研究探討 *A. aeolicus* 之 IDH 特性，並預測其結構，未來有可能應用於生物固碳技術。

建議：

1. 酵素催化速率諸圖要重複測量，標 error bars。
2. 圖八 Lineweaver-Burk 圖要把反應的受質及產物寫出，圖的 X-軸是受質濃度的倒數，圖中只有三點太少，至少要五點。
3. 此類表現純化並研究酵素性質的研究，先前已有在別物種異檸檬酸脫氫酶的酵素性質被報告，應該加以比較以瞭解源自古老地球環境的嗜熱自營菌 *Aquifex aeolicus* 中異檸檬酸脫氫酶的酵素特異性。