

2025年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	080007
參展科別	生物化學
作品名稱	探討粒線體蛋白質GATD3A的結構、功能以及去糖化機制
得獎獎項	三等獎

就讀學校	臺北市立第一女子高級中學
指導教師	姚月雲 徐駿森
作者姓名	林先敏

關鍵詞	<u>GATD3A、去糖化、糖尿病治療</u>
-----	-------------------------

作者簡介



我是北一女中數理資優班的林先敏。高一時開始在台大進行實驗，過程中體驗到了快樂與辛苦，有了許多的成長。特別感謝臺大農化系徐駿森教授，給我進入實驗室學習的機會；感謝實驗室的呂彥儒學長和簡弈歲學長指導我進行實驗；感謝姚月雲老師在專研路上的扶持與幫助。有了他們的協助，我才得以來到國際科展參賽，拓展我的視野。

2025 年臺灣國際科學展覽會 研究報告

區 別：北區

科 別：生物化學科

計畫名稱：探討粒線體蛋白質 GATD3A 的結構、功能以及去
糖化機制

關鍵詞 3 個：GATD3A、去糖化、糖尿病治療

編 號：(由本館填寫)

摘要

GATD3A 是粒線體中的蛋白質，被推測可能具有「去糖化」的能力，能移除 AGEs。糖尿病、帕金森氏症、阿茲海默症皆與人體中過高濃度的 AGEs 有關，因此 GATD3A 具有相當高的研究價值。

本研究探索 GATD3A(麩醯胺酸轉移酶樣 1 類結構域 3A)，經基因合成與蛋白表現後，大量製備蛋白質並探討其結構與功能。目前已得到蛋白質最佳製備環境、成功培養出蛋白質晶體，進行了結構分析，了解其結構、保守性、親水性及電性等，對於酵素適合反應的溫度、pH 值也有初步了解。未來也會利用酵素動力學計算酵素活性、並製備糖化蛋白質，進行去糖化測試，探討 GATD3A 是否具有臨床運用於糖尿病患者之糖化血紅素去糖化的可能性。

Abstract

GATD3A is a protein found in mitochondria, believed to have the ability to "deglycate" and remove AGEs. High concentrations of AGEs are associated with diabetes, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease, making GATD3A highly valuable for research.

This study explores glutamin amidotransferase-like class 1 domain 3A (GATD3A). After gene synthesis and protein expression, the protein was prepared in large quantities and its structure and function were explored. At present, the optimal preparation environment for GATD3A has been obtained. Also, the protein crystals have been successfully cultured. Structural analysis has been conducted to understand its structure, conservation, hydrophilicity, and electrical properties. We also have an understanding of the temperature and pH values suitable for enzyme reactions. In the future, we will also use enzyme kinetics to calculate enzyme activity. Besides, we will prepare glycated proteins, and conduct deglycation tests to explore whether GATD3A has the possibility of clinical application in deglycating glycated hemoglobin in diabetic patients.

壹、前言

一、研究動機

糖化 (glycation) 是一種非酵素型的蛋白質轉譯後修飾，又稱為梅納反應；蛋白質、核酸上的氮原子與還原糖的醛基進行半縮醛反應，將糖分子接上，進而進行一系列反應，最終產生高級糖化終產物(Advanced Glycation End products, AGEs)，影響蛋白質活性、或對 DNA 造成損傷。有研究指出，神經細胞內的酵素 DJ-1 具有將 AGEs 去糖化的功能，減少神經細胞內 AGEs 的累積，若體內 DJ-1 的活性異常，可能促成神經退行性疾病的發展，並導致罹患帕金森氏症和阿茲海默症。

粒線體是細胞能量代謝的核心，粒線體功能減退與多種疾病有關，包括神經退行性疾病、代謝疾病以、心血管疾病及老化，維護粒線體正常運作勢必是生物體運行的重要任務之一。我們好奇在粒線體是否有如同 DJ-1 去糖化功能的酵素，因此利用 DJ-1 針對粒線體進行基因體探勘(Genome mining)，發現一同源蛋白 GATD3A，我們懷疑 GATD3A 具有潛在的去糖化活性，作為粒線體內蛋白正常工作，不被糖化影響的守護者。

本次想透過研究 GATD3A 的結構、功能和生物活性，深入了解其在細胞中的角色，且粒線體作為細胞的能量工廠，GATD3A 若能將粒線體中的 AGEs 移除，對於生物的重要性不言而喻；還可能揭示其在臨床應用中的潛力。特別是在糖尿病患者中，糖化血紅素是衡量長期血糖控制的重要指標。如果 GATD3A 能夠有效去除糖化血紅素上的 AGEs，則可能為糖尿病的治療提供一種創新的方法。

二、研究目的

- (一) 將 GATD3A 基因插入質體，並以 *Escherichia coli* BL21(DE3) 進行表達測試。
- (二) 測試 GATD3A 的去糖化活性。
- (三) 測試 GATD3A 最佳反應條件，並進行酵素動力學實驗計算 K_M 、 k_{cat} 。
- (四) 以 X 光繞射進行蛋白結構分析，找出活性位點與可能的反應機構，並進行共結晶、浸泡基質實驗。
- (五) 測試 GATD3A 的其他性質，如圓二色光譜、SAXS 等。

三、文獻回顧

(一) 簡介 GATD3A

GATD3A 是一種屬於麩醯胺酸轉移酶家族 (GATD) 的蛋白質。這個家族的蛋白質在細胞代謝和信號傳導中扮演著重要角色。GATD 家族中的成員，如 DJ-1，已被證明在帕金森氏症的治療中具有潛力。DJ-1 具有抗氧化、維持線粒體功能和調節細胞存

活等多種功能，因此被認為在神經退行性疾病的治療中具有重要作用。

GATD3A 由於與 DJ-1 屬於同一蛋白質家族，因此科學家推測它可能也具有去糖化功能。去糖化是指去除蛋白質上的糖化修飾，這一過程可能對調節蛋白質的功能和穩定性具有重要意義。糖化的異常與多種疾病有關，包括阿茲海默症、帕金森氏症和糖尿病等。

目前，對於 GATD3A 的研究仍在探索階段，但由於它可能具有去糖化功能，以及在調節細胞代謝和信號傳導方面的潛力，GATD3A 被認為可能在治療多種疾病中發揮作用。未來的研究可能會進一步揭示其在疾病治療中的具體機制和應用潛力。

GATase 家族的蛋白質，即 glutamine-amidotransferase，擁有將 Glutamine 轉換成 Glutamate 的能力；GATD3A 同時也是 glyoxalase，此特性與去糖化有關聯，能移除附加在蛋白質分子上的糖化修飾，即 AGEs。

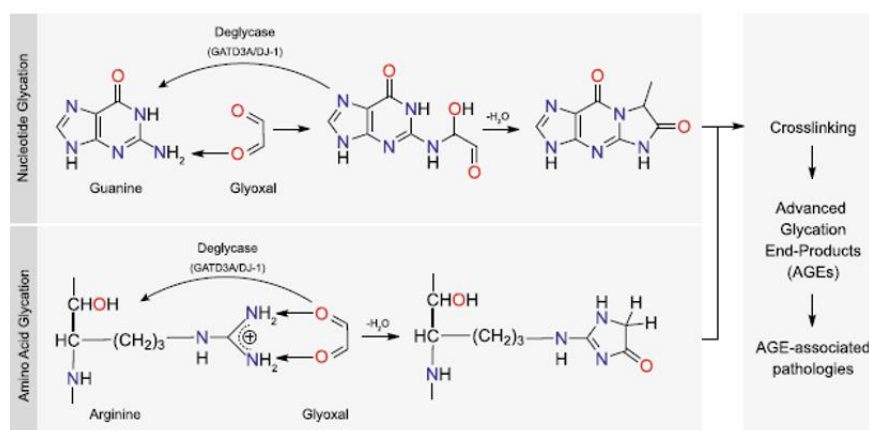
(二) 糖化 Glycation

在高血糖濃度環境中，糖化反應可以自發地發生，這是一種不需要酵素參與且不消耗能量的化學反應。糖化反應是指醣類分子（如葡萄糖）附著在蛋白質、脂質或核酸分子上，形成糖基化的產物。這一過程會導致生成高級糖化終產物（Advanced Glycation End Products, AGEs）。

AGEs 的形成與多種慢性疾病的發展有密切關係。這些終產物可以改變蛋白質的結構和功能，導致細胞和組織的損傷。AGEs 的累積會引發氧化應激和炎症反應，這些都是許多退行性疾病的病理基礎。

在阿茲海默症中，AGEs 可能促進了 β -澱粉樣蛋白的聚集和神經纖維糾結的形成，這些是阿茲海默症的典型病理特徵。而在帕金森氏症中，AGEs 可能對多巴胺能神經元造成損害，進一步加劇神經退行性變化。此外，AGEs 在糖尿病患者中也非常常見，因為長期的高血糖狀態促進了 AGEs 的生成，這與糖尿病併發症如腎病、視網膜病變和心血管疾病的發展密切相關。

因此，研究如何抑制 AGEs 的形成或加速其降解，可能對預防和治療這些疾病具有重要意義。這也使得去糖化酶等相關蛋白質成為潛在的治療靶點。



圖一、GATD3A 的去糖化反應機制(來源為參考文獻一)

(三) 高級糖化終產物

高級糖化終產物（Advanced Glycation End Products, AGEs）是由糖與蛋白質或脂質分子經非酵素性結合後形成的複雜分子。這些分子在體內的累積會對細胞的生理功能和組織完整性產生多方面的影響。

AGEs 的形成會導致蛋白質的結構改變，進而影響其功能。例如，AGEs 可以使蛋白質失去正常的折疊狀態，影響酵素的活性和受體的功能。此外，AGEs 還會影響細胞膜的流動性和通透性，進一步影響細胞的信號傳導和代謝過程。

在神經系統中，AGEs 的累積特別容易造成神經突觸和粒線體的損傷。神經突觸是神經元間傳遞信號的關鍵結構，AGEs 的存在可能干擾神經遞質的釋放和再吸收，從而影響神經信號的傳遞。粒線體是細胞的能量工廠，AGEs 會損傷粒線體膜，影響其功能，導致能量代謝障礙和氧化應激的增加，這些都是神經退行性疾病的潛在病理機制。

此外，AGEs 還會影響運動能力和生育能力。它們可能通過影響肌肉組織的彈性和功能，導致運動能力的下降。同時，AGEs 的累積可能影響生殖系統的健康，影響生育能力。

(四) DJ-1 相關蛋白與疾病

DJ-1 是一種多功能蛋白質，主要存在於動物細胞的細胞質中。在細胞面臨氧化壓力時，DJ-1 能提高細胞的抗氧化能力。DJ-1 的抗氧化功能通過多種機制實現。它可以直接中和自由基，減少氧化應激對細胞的損害。此外，DJ-1 還能調節多種與抗氧化相關的基因的表達，增強細胞的自我防禦能力。除了抗氧化功能外，DJ-1 還參與蛋白質的合成和加工，這些蛋白質對於保護多巴胺能神經元尤為重要。多巴胺能神經元在運動控制和情感調節中扮演著關鍵角色，這些神經元的損傷與帕金森氏症等神經退行性疾病密切相關。

當 DJ-1 功能失常時，細胞無法有效應對氧化壓力，導致多巴胺能神經元的損傷和死亡。這種損傷累積最終可能導致神經疾病的發生。研究表明，DJ-1 的突變或功能缺陷與帕金森氏症的發病風險增加有直接關係。因此，DJ-1 被視為治療神經退行性疾病的一個潛在靶點，針對 DJ-1 功能的調節可能為這些疾病的治療提供新的策略。

貳、研究方法及過程

一、研究設備與藥品

表一、研究設備與藥品

實驗材料與器材	
器材	
離心機	培養皿
微量滴管	離心管(2ml、5ml、40ml)
錐形瓶	分光光譜儀
恆溫水浴槽	試管振盪器
低溫冷凍櫃	微生物培養箱
乾浴槽	滅菌釜
晶體培養皿	四片膠垂直電泳槽系統
高壓細胞碎機	蛋白質 Ni-NTA 純化管柱
藥品	
LB (細菌培養液)	
NaCl	tryptone
yeast extract	
SDS-page	
Tris-HCl pH8.8 & 6.8	SDS
TEMED(Tetramethylethylenediamine)	APS (ammonium persulfate)
Acrylamide	ethanol
Plasmid kit	
Tris-HCl pH8.0	EDTA
glucose	RNase
NaOH	SDS

potassium acetate	acetic acid
Tris-HCl pH 7.5	ethanol
Others	
IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside)	protein crystallization kit*15
Ammonium Acetate	BIS-TRIS pH5.5
25% w/v PEG 3350	

二、研究方法與步驟

(一) 合成含目標基因之載體

1. 於 NCBI 網站搜尋蛋白質對應的氨基酸序列。
2. 在序列中設計 His-tag 及切位。
3. 交由生技公司優化並合成含目標基因之載體。

(二) Cloning (HsGATD3A)

1. PCR

- (1) 配置：30 μ L 5x PrimeSTAR buffer +12 μ L dNTP mixture + 7.5 μ L Primer(R) +7.5 μ L Primer(F) + 1 μ L Template + 1.5 μ L PS polymerase + 90.5 μ L 水，共 150 μ L，分裝至 3 個 PCR tube 中。
- (2) 設定溫度及時間，Stage 1 為 98°C、1 分鐘，Stage 2 為 98°C、10 秒鐘 - 58°C/60°C/63°C、20 秒鐘 - 72°C、1 分鐘，Stage 3 為 72°C、5 分鐘 - 15°C。其中 Stage 2 重複 35 次。

2. 回收 PCR 產物

- (1) 將 PCR 產物(共 150 μ L)與 750 μ L Gel/PCR buffer 混合，倒入 DFH column(裝於 2mL collection tube)，離心(9000g，1 分鐘)後，捨棄上清液。
- (2) 在 DFH column 中加入 600 μ L Wash buffer，在室溫下靜置 1 分鐘後，離心(16000g，1 分鐘)，捨棄 flow-through 後再離心(16000g，3 分鐘)以乾燥 DFH column。
- (3) 將 DFH column 放入新的 1.5 mL 離心管，加入 30 μ L 預熱(65°C)的 Elution buffer，在室溫下靜置 10 分鐘後，離心(16000g，3 分鐘)，即得純下後之 PCR product。

3. 加入酵素

- (1) 配置 insert：純化後 PCR product 25 μ L + 1 μ L Nde1 + 1 μ L Xho1 + 3 μ L neb

CutSmart buffer。

(2) 配置 vector：pET28a 34 μ L + 1 μ L Nde1 + 1 μ L Xho1 + 3 μ L neb CutSmart buffer。

(3) 將 vector、insert 兩離心管置於 37°C incubator 中 overnight。

4. Gel

(1) 在 vector 中加入 1 μ L Quick CIP，靜置於 37°C incubator 中約 30 分鐘。

(2) 在 insert 中加入 6 μ L novel juice，vector 中加入 8 μ L novel juice，並進行 DNA 電泳(100V，35 分鐘)。

(3) 以藍光觀察，切下發光處後，加入 Gel/PCR buffer，其中 gel 質量(mg)：buffer 體積(mL) = 3:5。

(4) 以 vortex 方式混合後，加熱至 65°C，並持續至 gel 完全融化，過程中每 2~3 分鐘以 vortex 混合。

(5) 將 sample 加入 DFH column(裝在 2mL collection tube 中)，離心(9000g，1 分鐘)，重複 3 次後捨棄 flow-through。

(6) 加入 400 μ L W1 buffer 到 DFH column，離心(16000g，1 分鐘)後捨棄 flow-through。

(7) 加入 600 μ L Wash buffer 到 DFH column，離心(16000g，1 分鐘)後捨棄 flow-through。

(8) 離心(16000g，3 分鐘)使 column matrix 乾燥。

(9) 加入 30 μ L 65°C 的 Elution buffer，靜置 10 分鐘後，離心(16000g，3 分鐘)。

5. 測定濃度及 ligation

(1) 測 plasmid 及 PCR product 的濃度(ng/ μ L)。

(2) 以 I : V = 5:1、3:1 計算所需 insert 及 vector 量。

(3) 在兩組分別加入 ligation high，體積為(v+i)/2。

(4) 置於 16°C incubator 中 overnight，進行 ligation。

6. Transform

(1) 在 3:1、5:1 兩組中分別加入 50 μ L DH5 α ，並放置於冰上。

(2) 在 42°C 水浴槽中進行 heat shock 2 分鐘，放回冰上。

(3) 於無菌操作台，在兩組離心管中分別加入 500 μ L LB，放在 37°C incubator 中約 1 小時。

(4) 離心(3500g，3 分鐘)後捨棄大部分的上清液，僅留約 20 μ L 與菌塊以 pipetting 方式混合

(5) 塗盤於含有 KAN^r 的 plate，在 37°C incubator 中 overnight。

7. Colony PCR

(1) 配置所需溶液：Primer F 5 μ L + Primer R 5 μ L + 150 μ L 水 + 40 μ L 5x Taq Master Mix with Dye，共 200 μ L

(2) 將溶液分裝至 16 個 PCR tube，每管 10 μ L。

(3) 準備一個 KAN^r 的 plate，在底部畫 16 格並編號。

(4) 用 pipette tip 在原本的盤上挑一顆菌，在新盤子上劃一下，再放到 PCR tube 中 pipetting。

(5) 重複步驟(4) 16 次，兩盤各挑 8 顆。

(6) 劃好的盤子放入 37°C incubator 中 overnight。

(7) 進行 PCR，Stage 1 為 95°C、5 分鐘，Stage 2 為 95°C、15 秒鐘 - 62°C、10 秒鐘 - 72°C、1 分鐘，Stage 3 為 72°C、5 分鐘 - 15°C。其中 Stage 2 重複 35 次。

(8) 將 16 管 PCR product 各取 5 μ L，與 1.5 μ L Novel juice 混合，進行 DNA 電泳 (100V，35 分鐘)，確認是否成功。挑選較亮的兩管送交基因公司定序。

(三) 質體轉型

將 cloning 完成的 HsGATD3A、用基因編輯設計的猴子質體兩種，分別轉型進 E.coli 中。

1. 將 20 μ L 勝任細胞與 1 μ L 質體混合。

2. 進行 42 °C heat shock 90 秒使質體進入細胞。

3. 加入 1mL 液態培養基，放置 37 °C 恆溫箱培養 1 小時。

4. 塗盤，放置 37 °C 恆溫箱 16 小時後以 4°C 保存。

(四) 蛋白質異源表現測試

1. 分別在不同溫度(25 及 16 °C) 及濃度 (0、0.1、1 mM)的異丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside, 下簡稱 IPTG) 之條件下養菌，每種條件分別各取兩毫升分裝至微量離心管，共六管，並分別離心。

2. 離心後留下菌塊，去除上清液（即為培養基）。

3. 將 6 管菌塊分別加入 100 μ L B-per、2 μ L lysozyme（溶菌酶）、及 2 μ L DnaseI 進行化學破菌並回溶。

4. 將六管以 13000 rpm 離心，並分離上清液及菌塊。

5. 將上清液及菌塊分別進行蛋白質電泳，並由結果得知最佳養菌狀態。

(五) 以西方墨點法 (Western Blot) 標記目標蛋白

1. 將濾紙浸泡在 TGS buffer 中。
2. 將 PVDF 膜泡到甲醇中活化 10 分鐘，後泡入 TGS buffer。
3. 進行 SDS-PAGE 電泳，將結果轉漬到 PVDF 膜上，並泡入以奶粉配置的牛奶中。
4. 以 PBST 洗三次，染一抗、再以 PBST 洗三次，染二抗，再以 PBST 洗三次。
5. 加入 ECL 試劑，照膠確認結果。

(六) 蛋白質純化

1. 破菌
 - (1) 將 200 μ L PMSF 加入含有菌液的燒杯中。
 - (2) 將燒杯置於超音波破菌機中，進行破菌 30 分鐘。
2. 蛋白質純化
 - (1) 上清液以 0.45 μ m filter 過濾。
 - (2) 將上清液通入 Ni – NTA column 並收集液體 (後標示為 flow through)。
 - (3) 將不同濃度、體積之 imidazole buffer (IMD)依序加入管柱中，收集流出液體，濃度如下(括號內為體積): 0mM(40mL)、25mM(40mL)、50mM(40mL)、75mM(20mL)、100mM(10mL)、300mM(10mL)、500m(10mL)、1000mM(5mL)。
 - (4) 進行 SDS 蛋白質膠體電泳分析，得知含有目標蛋白之溶液。
3. 蛋白質透析、濃縮
 - (1) 將含有目標蛋白之溶液加入透析袋中，並使用 Tris-HCl 20 mM、NaCl 100 mM 之 buffer，透析 3 次(置換原本的 IMD)。
 - (2) 透析後之蛋白液加至孔徑分子量大小為 10 K 之濃縮管，以轉速 4000 g 離心。
 - (3)重複離心直到加完溶液、濃縮至 0.750 mL 內。

(七) 蛋白質濃度測定

1. 在比色槽(cuvette)的不同格子中分別加入加入 Tris-HCl 20 mM + NaCl 100 mM 之 buffer，以及純化後之蛋白(其中 Tris-HCl 20 mM + NaCl 100 mM 作為背景值)。
2. 放入分光光譜儀中測得吸光值。
3. 透過比爾定律換算出蛋白質濃度。

(八) 蛋白質結構分析-晶體培養

1. 將蛋白質濃縮至 12.5mg/mL、25.0 mg/mL 及 32.7/mL
2. 以 PCT 檢測純化後的蛋白質濃度是否符合養晶條件。

3. 於 15 個 48 格結晶板每格中間的大格子中注入 15*48 種條件 150 μ L。
4. 於每大格左右兩側上方的小圓孔中點入 1 μ L 之蛋白質。
5. 吸取下方的條件 1 μ L 並點入小圓孔中，與蛋白質混和。
6. 每點完一盤即密封，放入冰箱。
7. 數周後以顯微鏡觀察是否有晶體長出。

(九) 蛋白質晶體培養條件最佳化 refine

1. 從第一次培養晶體的結果得知，較好的養晶條件為：0.2M Ammonium Acetate + 0.1M BIS-TRIS pH 5.5 + 25% w/v PEG 3350。
2. 配置較高濃度的溶液、並調整 BIS-TRIS 的酸鹼值。
3. 依比例微調各藥品濃度，配成 1mL 的混和溶液。
4. 以下列溶液為環境條件進行點晶、以及後續分析。

表二、refine 環境 1(固定 0.5M BIS-TRIS 溶液 pH 值為 5.5)

s \ p	17%	19%	21%	23%	25%	27%	29%	31%
2%	s : 40 ml p : 340 ml b : 200 ml	s : 40 ml p : 380 ml b : 200 ml	s : 40 ml p : 420 ml b : 200 ml	s : 40 ml p : 460 ml b : 200 ml	s : 40 ml p : 500 ml b : 200 ml	s : 40 ml p : 540 ml b : 200 ml	s : 40 ml p : 580 ml b : 200 ml	s : 40 ml p : 620 ml b : 200 ml
4%	s : 80 ml p : 340 ml b : 200 ml	s : 80 ml p : 380 ml b : 200 ml	s : 80 ml p : 420 ml b : 200 ml	s : 80 ml p : 460 ml b : 200 ml	s : 80 ml p : 500 ml b : 200 ml	s : 80 ml p : 540 ml b : 200 ml	s : 80 ml p : 580 ml b : 200 ml	s : 80 ml p : 620 ml b : 200 ml
6%	s : 120 ml p : 340 ml b : 200 ml	s : 120 ml p : 380 ml b : 200 ml	s : 120 ml p : 420 ml b : 200 ml	s : 120 ml p : 460 ml b : 200 ml	s : 120 ml p : 500 ml b : 200 ml	s : 120 ml p : 540 ml b : 200 ml	s : 120 ml p : 580 ml b : 200 ml	s : 120 ml p : 620 ml b : 200 ml
8%	s : 160 ml p : 340 ml b : 200 ml	s : 160 ml p : 380 ml b : 200 ml	s : 160 ml p : 420 ml b : 200 ml	s : 160 ml p : 460 ml b : 200 ml	s : 160 ml p : 500 ml b : 200 ml	s : 160 ml p : 540 ml b : 200 ml	s : 160 ml p : 580 ml b : 200 ml	s : 160 ml p : 620 ml b : 200 ml
10%	s : 200 ml p : 340 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 380 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 420 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 460 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 500 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 540 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 580 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 620 ml b : 200 ml
12%	s : 240 ml p : 340 ml b : 200 ml	s : 240 ml p : 380 ml b : 200 ml	s : 240 ml p : 420 ml b : 200 ml	s : 240 ml p : 460 ml b : 200 ml	s : 240 ml p : 500 ml b : 200 ml	s : 240 ml p : 540 ml b : 200 ml	s : 240 ml p : 580 ml b : 200 ml	s : 240 ml p : 620 ml b : 200 ml

s : 1M ammonium acetate / p : 50% w/v PEG-3350 / b : 0.5M BIS-Tris

表三、refine 環境 2(固定 Ammonium Acetate 濃度為 0.2M)

pH/p	17%	19%	21%	23%	25%	27%	29%
5.1	s : 200 ml p : 340 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 380 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 420 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 460 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 500 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 540 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 580 ml b : 200 ml
5.3	s : 200 ml p : 340 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 380 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 420 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 460 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 500 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 540 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 580 ml b : 200 ml
5.5	s : 200 ml p : 340 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 380 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 420 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 460 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 500 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 540 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 580 ml b : 200 ml
5.7	s : 200 ml p : 340 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 380 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 420 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 460 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 500 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 540 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 580 ml b : 200 ml
5.9	s : 200 ml p : 340 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 380 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 420 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 460 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 500 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 540 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 580 ml b : 200 ml
6.1	s : 200 ml p : 340 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 380 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 420 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 460 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 500 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 540 ml b : 200 ml	s : 200 ml p : 580 ml b : 200 ml

s : 1M ammonium acetate / p : 50% w/v PEG-3350 / b : 0.5M BIS-Tris(pH5.5 ~ 6.1)

(十) 蛋白質晶體結構分析

使用 Pymol、NCBI-BLAST、RCSB-PDB、PDB Sum、DALI、LIGPLOT⁺ 等網站及軟體，進行結構分析及後續探討。

(十一) 製備四種不同濃度糖化 BSA (小牛血清蛋白)

1. 配置 PBS buffer (0.1M, 1L, pH7.4): 2.23g NaH_2PO_4 + 11.56g Na_2HPO_4 + 5.5g NaCl + 0.02% NaN_3 。
2. 配置 4 濃度葡萄糖: 0M、0.15625M、0.3125M、0.625M, 每管 40mL。
3. 加入 BSA
 - (1) 0M, 40mL: 40 mg BSA+40mL PBS buffer
 - (2) 0.15625M, 40mL: 40 mg BSA+1.13g 葡萄糖, 並將 PBS buffer 加至總體積為 40mL。
 - (3) 0.3125M, 40mL: 40 mg BSA+2.25g 葡萄糖, 並將 PBS buffer 加至總體積為 40mL。
 - (4) 0.625M, 40mL: 40 mg BSA+4.51g 葡萄糖, 並將 PBS buffer 加至總體積為 40mL。
4. 放置於 37 度 incubator 中, 後每日測其 RFU 了解糖化情形。

(十二) GATD3A 初步去糖化功能測試

1. 配置 Tris-HCl buffer: Tris-HCl (pH8.0) 20mM+NaCl 100mM
2. 設計四組實驗, 其中第一組為實驗組, 第二、三、四組為對照組。BSA 為先前製備的 0.625M 糖化 BSA:
 - (1) 第一組: 190 μ L BSA+10 μ L GATD3A
 - (2) 第二組: 190 μ L BSA+10 μ L Tris-HCl buffer
 - (3) 第三組: 190 μ L 未糖化的 BSA+10 μ L GATD3A
 - (4) 第四組: 190 μ L PBS buffer+10 μ L GATD3A

(十三) 酵素穩定性測試(Thermal Shift assay)

1. 取 Sypro Orange 原液(10000x), 稀釋變為 100 倍, 再進行後續配置。
2. 配置 pH=3.0~8.0 的 phosphate buffer, 以及 pH=9.0、10.0 的 glycine NaOH。
3. 取 thermal shift 專用的 tube 共 32 個(8 種 pH 值, 四重複), 並於每管中加入 0.5 μ L GATD3A + 2.5 μ L pH buffer + 7.5 μ L Sypro Orange(100x) + 14.5 μ L 水。
4. 於室溫反應約 10 分鐘後, 放入機器, 溫度為 20°C ~ 100°C。

(十四) 以高效液相層析(HPLC)分離麩醯胺酸(Gln)與麩胺酸(Glu)

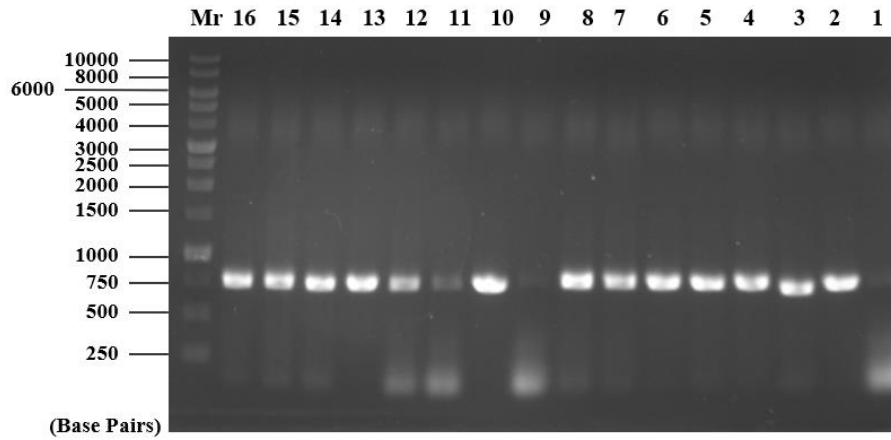
1. 使用 RP-18 與 DNaPAC 管柱測試分離條件。
2. 配置 100mM Glu 2mL、100mM Glu 2mL、100mM Glu 1mL + 100mM Glu 1mL(Mix)，裝於樣品瓶中，並測螢光強度，作為標準品。
3. 準備待測物(Gln + HsGATD3A)放入機器中，獲得結果後對照標準曲線，即可得知酵素是否有活性。

(十五) 以 N-acetylcysteine (NAC)與 methylglyoxal (MGO)測定 GATD3A 之去糖化功能

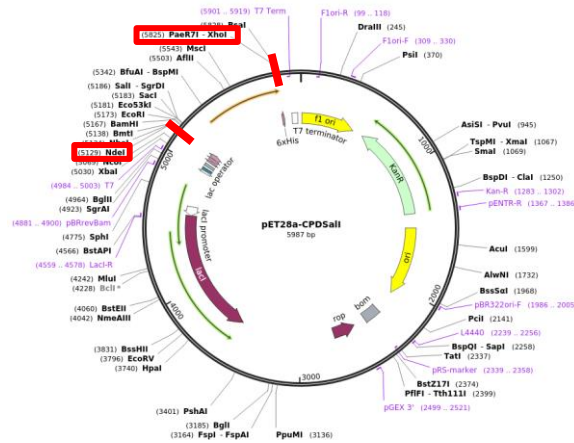
1. 配置 10mM MGO 與 10mM NAC，在 25°C 環境下 incubate，並測定其在 288nm 之吸光值，直到穩定。
2. 加入 GATD3A 終濃度為 10 μ M，並測定 6 分鐘的 288nm 吸光值。

參、研究結果與討論

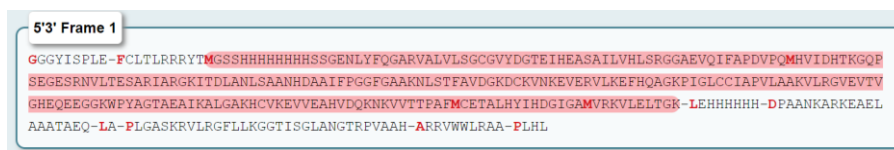
一、 HsGATD3A cloning



圖二、HsGATD3A 的 colony PCR 結果 (作者拍攝)



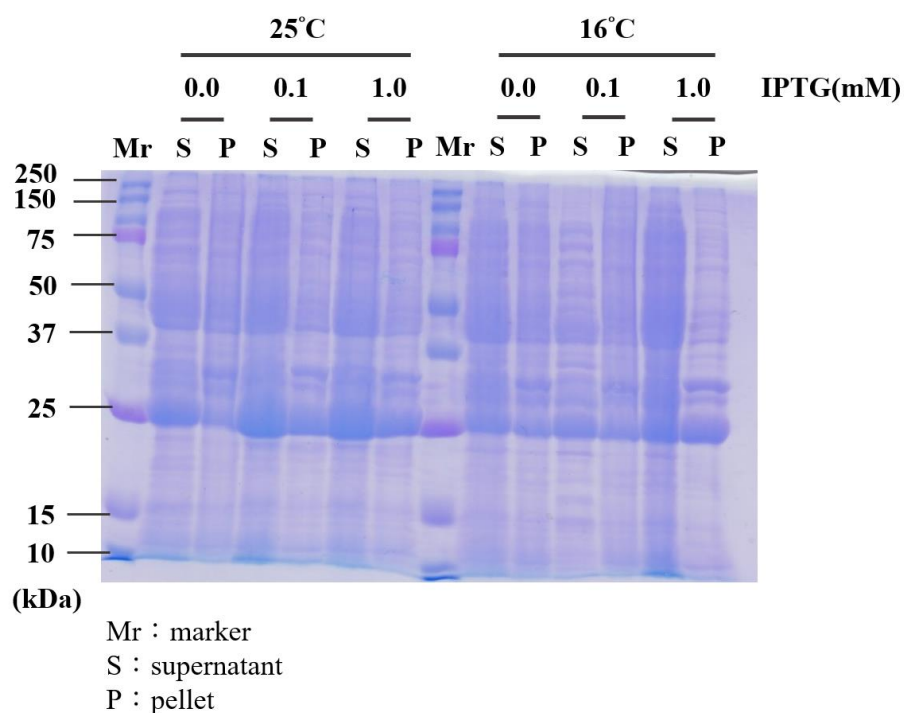
圖三、pET28a Gene map (來源為 SnapGene 網站)



圖四、定序結果(基因公司提供)

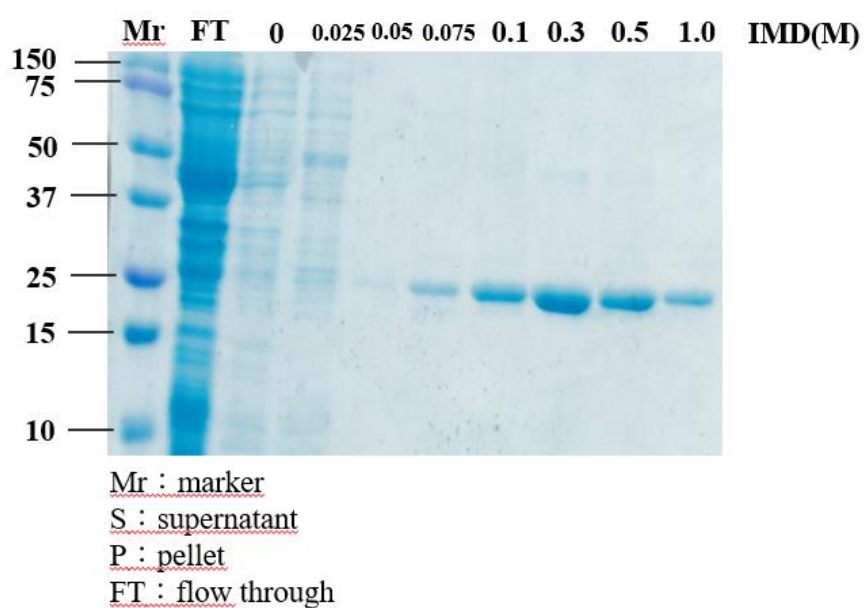
使用 cloning 技術，切除 HsGATD3A 之多餘序列。圖二為 cloning 完成後，利用 colony PCR 確認 cloning 是否成功，而判斷成功的標準為 750bp 左右是否有發亮的 band，如果有即成功。圖中大部分 sample 皆可見發光，後續取#2 及 #10 送交基因公司，進行定序。圖三為 pET28a 的 Gene map，HsGATD3A 的切位為紅框標起來的 Nde1-Xho1。圖四為基因公司定序結果，翻譯成胺基酸序列後，與原 HsGATD3A 序列進行 sequence alignment，其 sequence identity 為 100%，可見 cloning 的成功。

二、 蛋白質異源表現測試



圖五、SDS-PAGE 膠體電泳之結果。以 25°C，0.1mM IPTG 作為誘導條件 (作者拍攝)
進行了反應溫度 16°C、25°C，及誘導物 IPTG 濃度 0mM、0.1mM、1mM
的表現測試後，進行蛋白質膠體電泳。由電泳結果得知，25°C，0.1mM IPTG 之
養菌效果最好，即以此作為誘導條件。

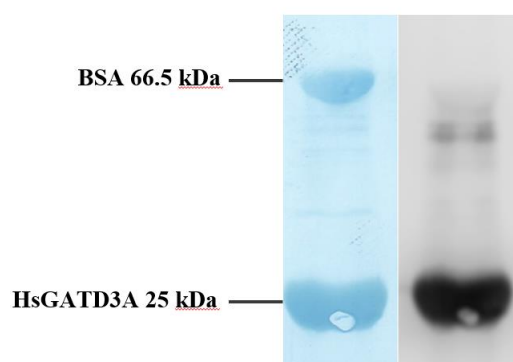
三、 蛋白質純化



圖六、純化後 SDS-PAGE 膠體電泳之結果(作者拍攝)

利用 Ni-NTA 管柱純化 GATD3A 後，以 15% SDS-PAGE 電泳確認結果。由蛋白質純化結果之電泳圖中可以看到以 0.3、0.5、1.0M 之 IMD 可以沖下最多的蛋白質，因此取 0.3M、0.5M、1.0M 之 IMD 沖下的蛋白質溶液各 10mL 作為進一步透析的樣品。

四、以西方墨點法 (Western Blot) 標記目標蛋白



圖七、Western blot 結果(作者拍攝)

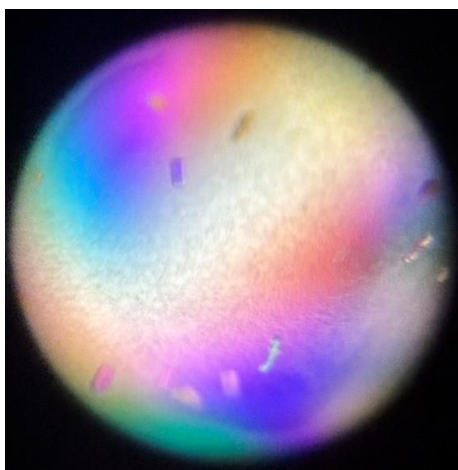
使用 anti-His 標記目標重組蛋白，在 25kDa 處有強烈訊號，應是 GATD3A。以 BSA 作為對照組，在右圖中即無訊號。而右圖上方的微弱訊號推測為未完全 denature 的 dimer-form GATD3A 造成。

五、蛋白質晶體培養初步結果

	PEGRx2 No.29	PEGRx2 No.32	JCSG-2 No.46	Index49-96 No.30
Conditions	6% v/v Tacsimate pH6 0.1 M MES monohydrate pH6 25% w/v PEG 4000	0.2 M Sodium formate 0.1 M BICINE pH8.5 20% w/v PEG MME 5000	0.2 M Ammonium acetate 0.1 M BIS-TRIS pH5.5 25% w/v PEG 3350	0.2 M Ammonium acetate 0.1 M BIS-TRIS pH5.5 25% w/v PEG 3350
Figures				

圖八、已知長晶的條件(作者拍攝)

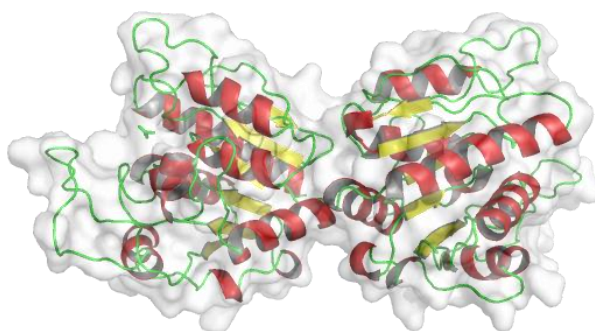
以 25mg/mL、12.5mg/mL 兩濃度之 GATD3A 進行晶體培養。由圖可見，有四種條件長出了晶體，經過晶體繞射分析後，得知 JCSG-2 No.46 養晶效果最好，具有最佳解析度，方便後續晶體分析及製圖。此養晶環境有三個成分：0.2M Ammonium Acetate、0.1M BIS-TRIS pH5.5、25%w/v PEG 3350。



圖九、HsGATD3A 晶體 (作者拍攝)

圖九為 HsGATD3A 的晶體。其培養環境為 0.08M Potassium chloride + 0.02M Magnesium chloride hexahydrate + 0.04M Sodium cacodylate trihydrate pH7.0 + 50% v/v (+/-)-2-Methyl-2, 4-pentanediol + 0.012M Spermine tetrahydrochloride，之後會進行晶體結構解析以下之「蛋白質結構分析」皆指來源為猴子的 GATD3A。

六、 蛋白質結構



圖十、GATD3A 之蛋白質二級結構(以 Pymol 軟體呈現)

圖十為利用 X 光晶體繞射技術解析 GATD3A 的結構，以二聚體呈現。紅色為 α helix、黃色則為 β sheet。

七、 GATD3A 蛋白質結構分析之基本資訊

表四、Table 1。內容為解析晶體結構時的各項數據

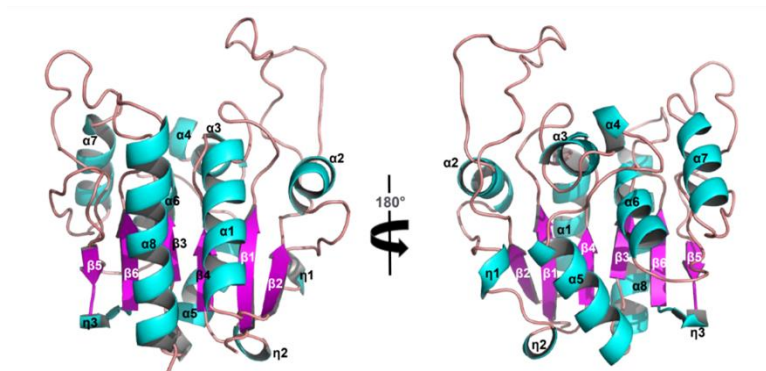
GATD3A

Unit cell	43.753 43.753 190.578 90 90 120 0.976238
Space group	<i>P</i>3₁ 29.66 - 1.96 (2.03 - 1.96)
Wavelength(Å)	0.976238
Resolution range	29.66 - 1.96 (2.03 - 1.96)
Total reflections	133235 (19192)
Unique reflections	29077 (2900)
Completeness(%)	99.14 (98.37)
<i>I</i>/σ<i>I</i>	7.22 (4.98)
Wilson B-factor	25.49
R-meas	18.00 (34.40)
CC1/2	97.9 (93.4)
Reflections used in refinement	29053 (2895)
Reflections used for R-free	1490 (148)
R-work	0.1628 (0.2499)
R-free	0.2095 (0.3316)
Number of non-hydrogen atoms	3588
macromolecules	3328
ligands	8
solvent	252
Protein residues	452
RMS(bonds)	0.006
RMS(angles)	0.80
Ramachandran favored (%)	99.11
Ramachandran allowed (%)	0.89
Ramachandran outliers (%)	0.00
Rotamer outliers (%)	0.00
Clashscore	2.54
Average B-factor	29.32

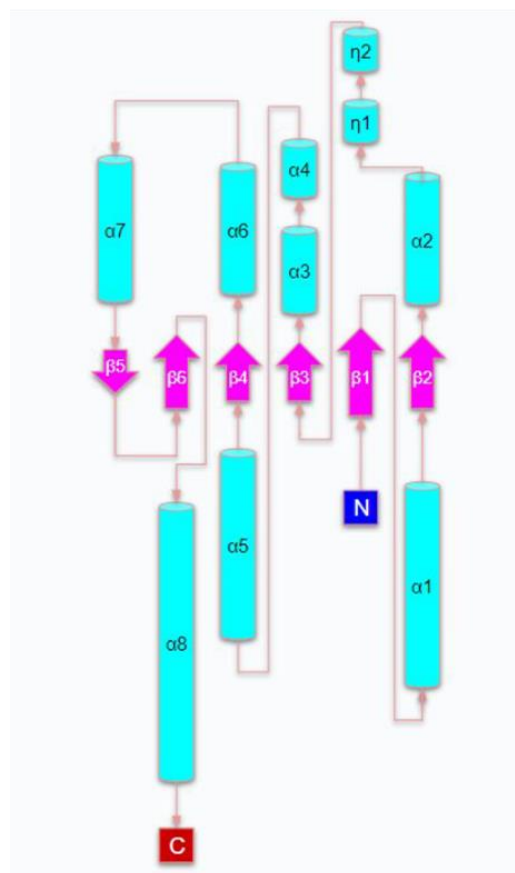
macromolecules	28.80
ligands	42.80
solvent	35.70
Number of TLS groups	9

此表格為將晶體繞射數據建構為二級結構模型時，所運用到以及計算出的數據。

八、 GATD3A 之 overall structure 與結構拓模圖



圖十一、GATD3A 蛋白質 overall structure(以 Pymol 軟體呈現)



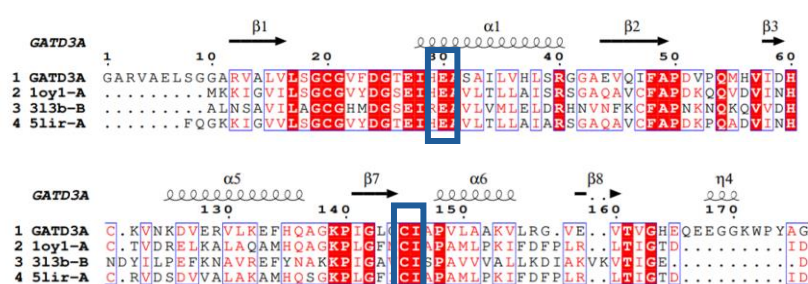
圖十二、GATD3A 之拓模圖(作者繪製)

圖十一為 GATD3A 的二級結構，以顏色區分 α helix 以及 β sheet。圖十二則以圓柱和箭頭，呈現蛋白質結構的拓撲圖，圖形的長度皆按照其胺基酸數量成比例繪製。

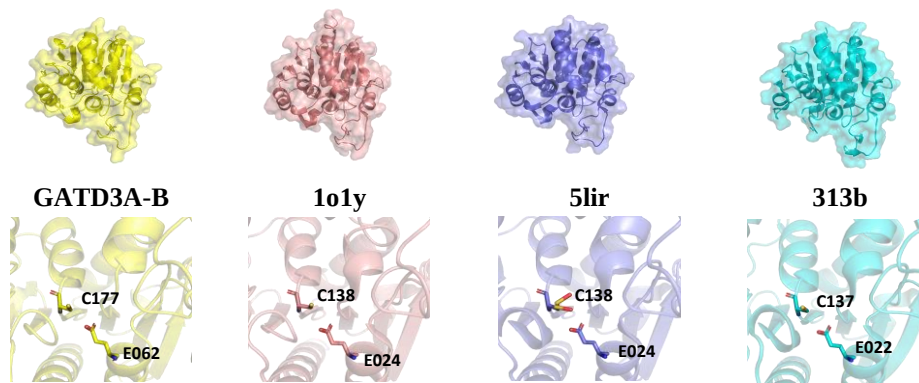
九、 GATD3A 及與其結構相似之蛋白質

表五、與 GATD3A 結構相似之蛋白質。使用 DALI 網站分析

Protein pdb	Z-score	Rmsd	Sequence identity	No. residues
1oy1-A	38.3	0.9	45%	221
5lir	38.3	0.9	47%	219
3l3b	35.5	1.0	33%	213
3ot1	19.4	2.2	21%	199
3fse	19.2	2.1	18%	349
2vrn	18.8	2.1	16%	185
3l18	18.8	2.1	18%	168
3uk7	18.8	2.2	21%	396
4hcj	18.8	2.2	16%	173
5tw0	18.8	2.0	18%	166



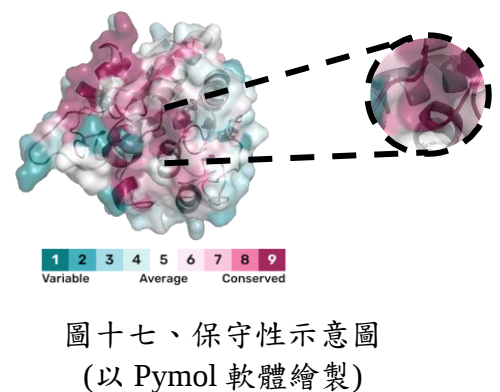
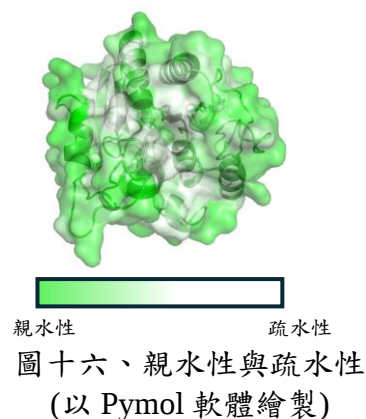
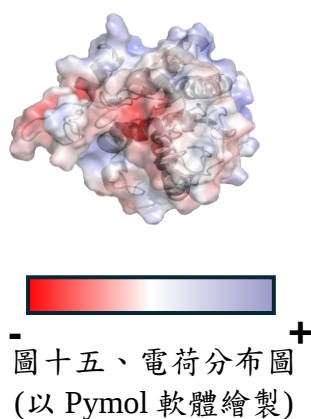
圖十三、與 GATD3A 結構相似之蛋白質序列 alignment(作者繪製)



圖十四、與 GATD3A 結構相似之蛋白質結構(以 Pymol 軟體呈現)

表五為利用 DALI 網站，列出與 GATD3A 結構最相近蛋白質的前十名、以及其各項數值，sequence identity 為與 GATD3A 序列的相似程度。圖十三為以 GATD3A 與前三名蛋白質之 sequence alignment，作胺基酸一級序列分析，紅色底色為具有高保守性的氨基酸位點，而藍框為 GATD3A 預測的活性位點。圖十四為 GATD3A 與前三名二級結構之比較，並用 stick 標出其活性位。

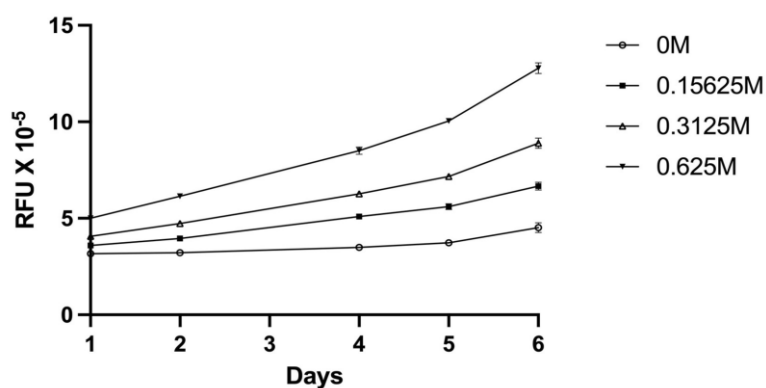
十、 GATD3A 之電荷分布、親水性及保守性示意圖



圖十五、圖十六以及圖十七，分別為蛋白質電荷分布、親水性、保守性的示意圖。在圖十七中，顏色越紅表示越保守。其中框起來放大的部分為目前推測 GATD3A 的活性位，框中紅色的占比多，可見其保守性相當高，可以成為推測活性位的證據之一。

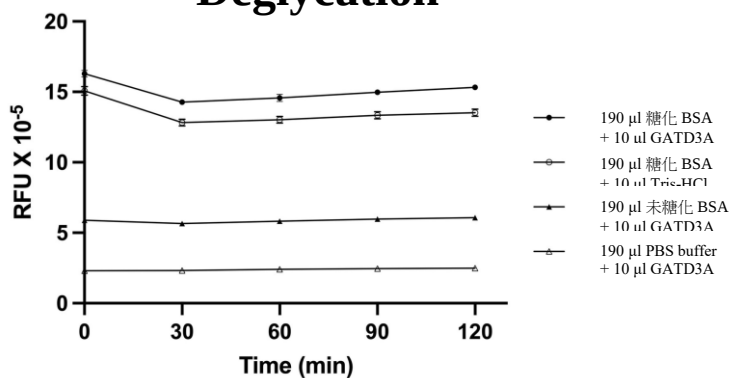
十一、 初步糖化及去糖化實驗

Glycation



圖十八、糖化 BSA 之 RFU(作者繪製)

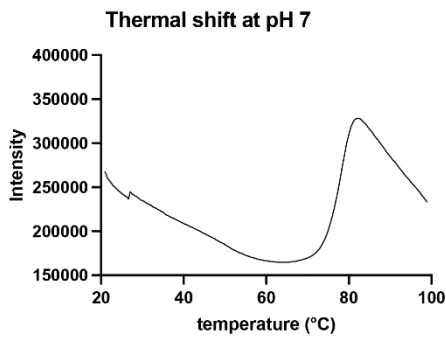
Deglycation



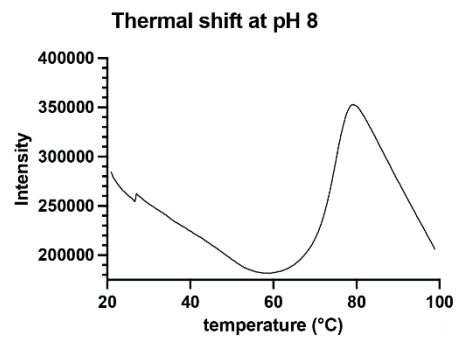
圖十九、GATD3A 去糖化之 RFU(作者繪製)

在圖十八中可以看到，每一個糖濃度的 RFU 皆有上升，顯示糖化 BSA 的成功。其中 0M 葡萄糖的組別也有上升，但屬於可接受的誤差範圍，推測原因為 BSA 中混了雜質。圖十九則是 GATD3A+糖化 BSA 與對照組別表現，理論上最上面的曲線應該要下降、下面三條則保持在相似的數值，但實際結果卻與其大相逕庭。推測可能原因為觀測時間不夠長、或實驗設計有誤。

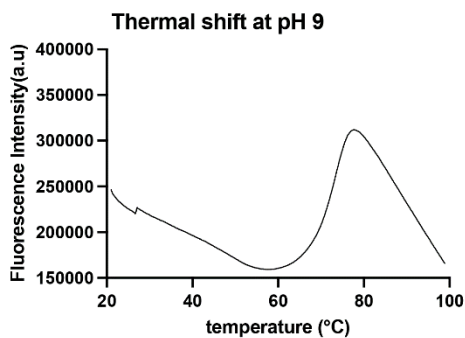
十二、 酵素穩定性測試 Thermal Shift



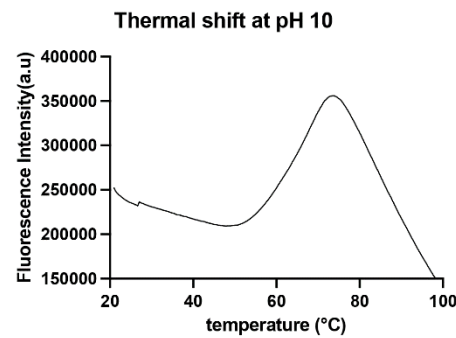
圖二十、GATD3A 於 pH7 之 TM (作者繪製)



圖二十一、GATD3A 於 pH8 之 TM (作者繪製)



圖二十二、GATD3A 於 pH9 之 TM (作者繪製)

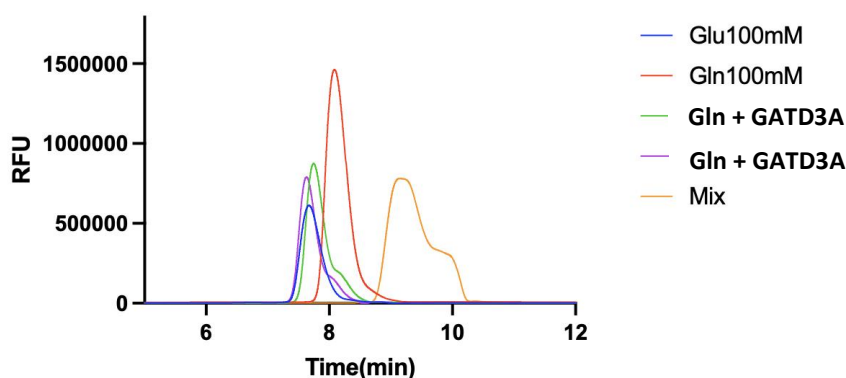


圖二十三、GATD3A 於 pH10 之 TM (作者繪製)

圖二十~圖二十三為 GATD3A 在 pH7~pH10 的環境下，不同溫度中的螢光強度。其中 pH7~10 之 TM 值(即圖形之反曲點)分別為 78.58°C、75.5°C、74.04°C、67.4°C，可見 GATD3A 在 pH=7 的環境下擁有最佳的活性，後續去糖化、酵素動力學實驗，皆會設計在 pH=7 的環境中反應。圖中約 25°C 處之雜訊應屬機器故障造成。

十三、 以高效液相層析(HPLC)測定 GATD3A 之酵素活性

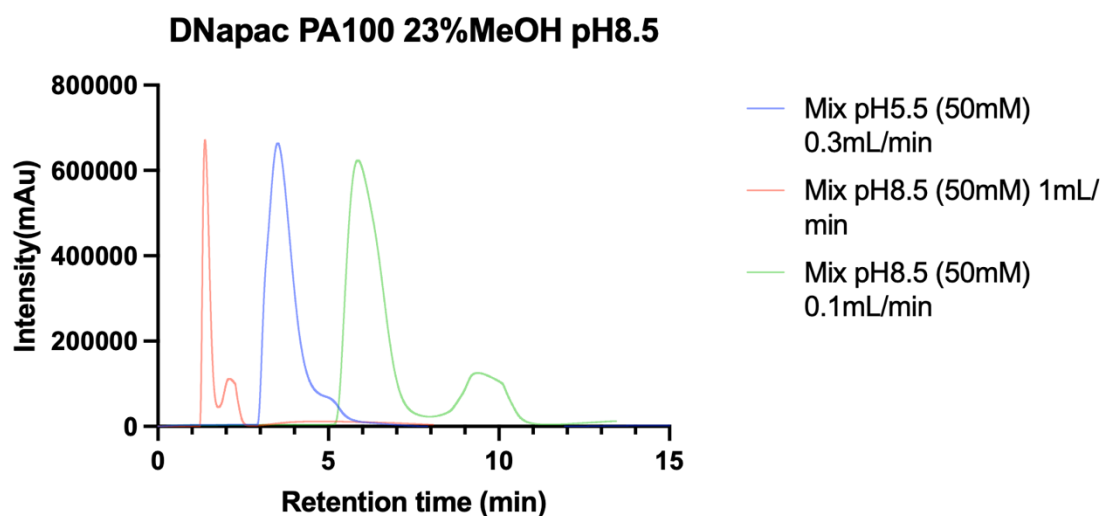
C18 23%MeOHpH5.5



圖二十四、吸收峰訊號(作者繪製)

圖中的綠色線與紫色線為 Gln 加入 GATD3A 反應之吸收峰，兩者的差異僅為 retention time 不同。可以看到兩者皆具有肩峰，峰型近似於橘色(即 Glu 與

Gln 混合)並與紅色(純 Gln)和藍色(純 Glu)的峰型不同，因此可推論出 GATD3A 確實具有將 Gln 轉變為 Glu 的能力，但目前尚無法將 Glu 與 Gln 的峰完全分離，需進一步優化。



圖二十五、Glu 與 Gln 之吸收峰(作者繪製)

測試不同 pH、管柱流速下的分離效果，其中 Gln 因不帶電，會較早從管柱中流出(出現訊號)，因此為 retention time 較短的 peak，而時間較長的 peak 則為帶負電的 Glu。圖中的綠色線為 100mM Glu+Gln 在 pH8.5 環境下、流速為每分鐘 0.1mL 的結果，可以看到兩個峰分離的比藍色與橘色都明顯，因此之後會以此條件做 GATD3A 活性分析。

十四、以 BSA 與 glucose 測定 GATD3A 之去糖化功能

表六、於 420nm 之吸光值

A420	control	加入 0.6mg/mL GATD3A
1mL BSA + 4mL Glucose	0.51	0.085
2mL BSA + 3mL Glucose	0.0562	0.092
3mL BSA + 2mL Glucose	0.0598	0.1132
4mL BSA + 1mL Glucose	0.0813	0.115

透過模擬梅納反應來測定 GATD3A 的去糖化活性，測量梅納反應終產物於 420nm 的吸光值，結果如上表。根據結果發現加入 GATD3A 的組別的吸光值高於控制組，與預期的結果不符，經過討論後，可能的原因有：1.GATD3A 加入過多導致 GATD3A 也被糖化 2.不能單純以梅納反應終產物的測量方式，來進行糖化產物的分析 3.反應時間與條件仍需要再進行調整，後續將會再重新設計去糖化實驗的方法。

肆、結論與應用

一、目前結論

在蛋白質異源表現測試中找到了最適合製備蛋白質的環境為 25°C，0.1mM IPTG，而蛋白質純化結果之電泳圖中可以觀察到 0.3M、0.5M、1.0M 的 IMD 皆可以純化出蛋白質，後以 western blotting 確認目標蛋白。進行蛋白質晶體培養，在晶體成形後以 X-ray 進行繞射，再根據解出之電子雲密度圖建構分子模型。目前對於蛋白質的活性位、電性、親水性、保守性等，皆有進一步的了解。除此之外，也進行了初步的糖化及去糖化實驗，其中糖化蛋白質的結果很成功、去糖化實驗則需進一步優化。在酵素穩定性測試後，得蛋白質的最佳反應環境約為 pH7，後續設計實驗時即能以此為基準。使用 cloning 技術切除了多餘的序列，現在有猴子與人類兩種不同來源的 GATD3A，未來能進行功能上的比較。去糖化實驗、酵素動力學以及 HsGATD3A 晶體結構解析皆在進行中，期待未來有好結果。

二、未來實驗規劃

- (一) 以酵素動力學計算 GATD3A 的計算 K_M 、 k_{cat} ，和反應活性及機制。
- (二) 優化去糖化實驗，確認 GATD3A 是否擁有去糖化的活性，拓展其未來運用於臨床治療的可能性。
- (三) 解析 HsGATD3A 結構，找出活性位點與可能的反應機構，並進行共結晶、soaking 實驗。
- (四) 測試 GATD3A 的其他性質，如圓二色光譜、SAXS 等。
- (五) 進行 Structure-guided mutagenesis，配合活性實驗，驗證參與催化的氨基酸。

伍、參考資料及其他

- 一、Andrew J. Smith, Jayshree Advani, Daniel C. Brock, Jacob Nellissery, Jessica Gumerson, Lijin Dong, L. Aravind, Breandán Kennedy & Anand Swaroop : GATD3A, a mitochondrial deglycase with evolutionary origins from gammaproteobacteria, restricts the formation of advanced glycation end products
- 二、V. Prakash Reddy,* Puspaa Aryal, and Emmanuel K. Darkwah : Advanced

Glycation End Products in Health and Disease

- 三、Yong Woong Jun , Eric T Kool : Small Substrate or Large? Debate Over the Mechanism of Glycation Adduct Repair by DJ-1
- 四、Linan Chen , Barbara Cagniard, Tiffany Mathews, Sara Jones, Hyun Chul Koh, Yunmin Ding, Paul M Carvey, Zaodung Ling, Un Jung Kang, Xiaoxi Zhuang : Age-dependent Motor Deficits and Dopaminergic Dysfunction in DJ-1 Null Mice
- 五、Qingzeng Gao, Jeremiah W. Jacob-Dolan, Rebecca A. Scheck (2023) : Parkinsonism-Associated Protein DJ-1 Is an Antagonist, Not an Eraser, For Protein Glycation
- 六、John S. Coukos, Chris W. Lee, Kavya S. Pillai, Hardik Shah, Raymond E. Moellering (2023): PARK7 Catalyzes Stereospecific Detoxification of Methylglyoxal Consistent with Glyoxalase and Not Deglycase Function
- 七、許庭瑄 (2020)。以蛋白質工程開發新穎酵素於高尿酸檢測及降解藥物 (國際科展優勝作品)
- 八、鄭秀中、廖禹晴 (2022)。微生物源之甜菜素合成酵素的結構功能探討與潛在應用 (國際科展優勝作品)

【評語】 080007

本研究探索 GATD3A(麩醯胺酸轉移酶樣 1 類結構域 3A)，經基因合成與蛋白表現後，大量製備蛋白質並探討其結構與功能。目前已得到蛋白質最佳製備環境、成功培養出蛋白質晶體，進行了結構分析，了解其結構、保守性、親水性及電性等，對於酵素適合反應的溫度、pH 值也有初步了解。未來也會利用酵素動力學計算酵素活性、並製備糖化蛋白質，進行去糖化測試。

優點：

GATD3A 是粒線體中的蛋白質，被推測可能具有「去糖化」的能力，能移除 AGEs。糖尿病、帕金森氏症、阿茲海默症皆與人體中過高濃度的 AGEs 有關，因此 GATD3A 具有相當高的研究價值。

建議：

1. 在圖十八中可以看到，每一個糖濃度的 RFU 皆有上升，顯示糖化 BSA 的成功，其中 0 M 葡萄糖的組別也有上升，推測原因為 BSA 中混了雜質，純屬猜測，應詳細驗證。
2. 圖十九則是 GATD3A+糖化 BSA 與對照組別的表現，理論上最上面的曲線應該要下降、下面三條則保持在相似的數值，但實際結果

卻與其大相逕庭，推測可能原因為觀測時間不夠長、或實驗設計有誤，應該延長觀測時間或增加 GATD3A 濃度再做實驗。

3. 圖二十~ 圖二十三為 GATD3A 在 pH7 ~ pH10 的環境下，不同溫度中的螢光強度，為何在低溫區螢光下降？
4. 圖二十四為何橘色 Glu 及 Gln 混合物在 retention time 比較長才出來？為何綠色和紫色所用條件相同卻在不同位置出來？為何把 Gln 變成 Glu 是表示 GATD3A 有活性？GATD3A 有水解 amide 及去糖二種活性嗎？應該從其解出的結構來解釋如何結合受質及催化水解反應。
5. 為何能以 BSA 與 glucose 測定 GATD3A 之去糖化功能？GATD3A 也會催化 BSA 的糖化嗎（可逆反應）？
6. 作者提到未來將利用酵素動力學計算酵素活性、並製備糖化蛋白質，進行去糖化測試，探討 GATD3A 臨床運用於糖尿病患者之糖化血紅素去糖化的可能性，那是否已經有動物實驗之規劃或合作對象？