• 系統編號	RG9011-0272
• 計畫中文名稱	保存移植器官攜氧體之合成研究
• 計畫英文名稱	Synthesis of De Novo O2 Carriers for the Preservation of Transplating Organs
• 主管機關	行政院衛生署
• 計畫編號	NHRI-GT-EX89B719L
• 執行機構	台北醫學院細胞及分子生物研究所
• 本期期間	8807 ~ 8906
• 報告頁數	2 頁
• 使用語言	中文
• 研究人員	施子弼；蕭傳鐙 Shih, Daniel Tzu-bi；Hsiao, Chwan-Deng
• 中文關鍵字	器官保存；血紅素；氧氣運送；攜氧體
• 英文關鍵字	Organ preservation；Hemoglobin；Oxygen transportation；Oxygen carrier
• 中文摘要	本計畫在今年度執行期間之目標有三：(一)以 PCR Mutagenesis 進行變異球蛋白基因之合成並純化與分析表達血紅蛋白之機能；(二)比較不同載體表達系統改進血紅蛋白之實際產量；(三)完成變異血紅蛋白之功能分析系統之評估與應用。至今我們完成的內容包括：(一)繼續合成不同之變異血紅蛋白基因，合成及純化經 PCR 定點突變之重組血紅蛋白；(二)利用本實驗室設計之高解析度氧結合分析系統，對於所合成之重組血紅蛋白進行蛋白特性分析，並評估系統之實際效能。本年度除了繼續合成及評估重組血紅蛋白變異血紅蛋白株同時建立一氧合平衡系統以加強血紅蛋白輸氧機能之分析。並比較探討不同的表現系統於大量培養時血紅蛋白的產量及品質。同時，本實驗室設計了代表蛋白生理活性之氧平衡曲線檢測系統，證實對於反應數據之準確性及靈敏度上有很大的突破。研究結果：(一)重組變異株之基因合成純化蛋白之分析：在單變異血紅蛋白部份於 external 區域增加了 β6(NA6)E→K；在雙重變異部份增加 β2(NA2)H→β6(NA6)E→K；三重變異部份 β2(NA2)H→E＋β6(NA6)E→K＋β82(EF6)K→N；四重變異部份爲 β2(NA2)H→E＋β6(NA6)E→K＋β82(EF6)K→N＋β108(G10)N→D 變異株之基因構築及蛋白合成，增進對於特定胺基酸與不同胺基酸之加成效應有更具體的瞭解。氧合平衡實驗結果顯示包含於中央空腔及蛋白表面之雙重變異株 β2(NA2)H→E＋β6(NA6)E→K 其輸氧機能明顯的對溫度變化敏感度減低，表示溫度變化對於變異蛋白之生理活性影響較小。同時此變異株之輸氧機能較野生株高。此雙重變異株之四合體的穩定性低於人類血紅蛋白，但高於野生株之人類重組血紅蛋白。(二)血紅蛋白於菌體內表達量之比較：爲了增進血紅蛋白之菌體表達量，已將血紅蛋白基因分別構築於 JM105/pKK223-3(pDLIII13e)，JM105/pKK233-2(BH)，BL21/pET29(B5)及 M15/pQE60(60Hb)四個不同的表達系統上。變異株蛋白利用不同的系統分別進行大量(4L)菌體培養，合成蛋白經蛋白分離及純化後，所得到的血紅蛋白產量較預期相近或較低。產物的穩定性在除了原始表現系統(pKK233-2，pKK223-3)外，皆有降低的現象，甚或降至 60%(pET)。(三)氧合平衡分析系統(OEC)之改進評估：本計畫於年度執行期間，爲提昇測定氧合分析系統之效率及準確性，在硬體方面，設計並製作了 OEC 氧氣平衡分析瓶，縮小體積以減少蛋白反應物之使用量。並設計了具控

溫及 magnetic stir 雙重功能之樣品載台。在軟體方面，修改了資料分析程式使可 IBM PC 在中執行，以分析實驗數據資料。此系統爲國際目前唯一之系統，將經過純化之血紅蛋白實際測試後，發現其靈敏度及準確性皆很高。改進分析系統之成效目前正評估中。研究結果討論：(一)本年度合成二重及多重變異血紅蛋白，以期觀察重組蛋白對於不同環境溫度變化及安定性之加成及消滅關連性。並針對未來一年計畫進行重組血紅蛋白之動物體內活性檢測提供了較具代表性的材料。(二)對於血紅蛋白基因表達系統之重建，依結果顯示有顯著增加重組蛋白合成量，但與舊系統表達之蛋白活性及安定性比較目前正在評估中。目前純化流程已能得到非常高純度之蛋白，因此對於蛋白之活性及機能分析，可增加其準確性與可信度。

- 英文摘要

查無英文摘要