

東海大學化學研究所

碩士論文

Department of Chemistry

Tunghai University

Master Thesis

電化學及石英晶體微天平—耗散監測分析法探討氧化

/還原態細胞色素 c 和心磷脂交互作用之研究

Interaction between Ferric/Ferrous Cytochrome c and

Cardiolipin: An Electrochemical and Quartz Crystal

Microbalance with Dissipation Study

孫心慈

Sin-Cih Sun

指導教授：莊旻傑 博士

Advisor: Min-Chieh Chuang, Ph.D.

中華民國 104 年 6 月

June, 2015

謝誌

進入研究所前懵懵懂懂一知半解，在經過研究所階段後，學習到如何邏輯思考與分析理解的能力，以及如何能完整的完成一個題目，開創從無到有的階段。碩士兩年間受過許多的幫忙以及幫助，首先要感謝我的指導老師莊旻傑老師在這兩年內細心的教導和勉勵，經過無數次實驗的討論釐清並面對問題、解決問題。以及與許員豪老師的討論和解惑；薛景中老師和林宗欣老師的協助與幫忙，讓我能夠順利完成本篇論文。

實驗室的大家幫助我許多，佩姻在我一團亂時幫忙整理非常多實驗數據和排版，俊慶提醒我繳交的時程以免我開天窗，詩穎在我壓力大時給予許多歡笑聲，以及學弟妹大小事的幫忙。晏佐和嘉樺學長在實驗時能夠排出時間借我使用真空減壓旋轉濃縮機。薛老師實驗室的偉倫學長教導我 QCM-D 的使用方式和疑問的解惑。系辦的藍姐不時地提醒與幫忙。

最後要感謝我的父母無條件的支持與鼓勵，有挫折時在電話中的加油聲，生病時很緊張的來台中照顧我，關心我有沒有吃飽穿好，讓我能夠有動力繼續努力堅持下去。

中文摘要

粒線體釋放之細胞色素 *c* (cytochrome *c*) 會引發細胞凋亡(apoptosis)內源路徑，而此釋放行為與細胞色素 *c* 和心磷脂(cardiolipin)之間交互作用有關；在電子傳遞鏈(electron transport chain)中氧化態細胞色素 *c* 及還原態細胞色素 *c* 對複合體(complex III and complex IV)的交互作用有所不同，因此了解氧化及還原態細胞色素 *c* 與心磷脂之作用機制將有助於解析細胞凋亡路徑。

我們運用最佳化的羧酸基和醇基混合的自組裝單分子層(self-assembled monolayer)靜電吸附細胞色素 *c*，並利用電化學技術分析經心磷脂吸附後之細胞色素 *c* 氧化還原反應(redox reaction)，循環伏安圖(cyclic voltammogram)及交流伏安圖(AC voltammogram)指出氧化態細胞色素 *c* 與心磷脂作用後均比還原態細胞色素 *c* 造成較大的電位負方向偏移，並且氧化態細胞色素 *c* 與心磷脂作用後形式電位(19.5 mV 和 15 mV)和峰值(24.1 mV 和 9.2 mV)電位差值均比後者還原態細胞色素 *c* 大。我們進一步使用石英晶體微天平—耗散監測(Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring)系統對細胞色素 *c* 和心磷脂之間交互作用進行探討，結果顯示氧化態細胞色素 *c* 與心磷脂的結合量(經模擬後以質量表示)大於還原態的兩倍，氧化態細胞色素 *c* 與心磷脂的能量耗散也顯示比還原態大；還原態細胞色素 *c* 與心磷脂結合後則表現出較大的彈性係數(shear modulus)為 $\mu = 4.325 \times 10^3$ Pa，經由耗散對頻率圖(*D-f* plot)中的斜率得知，細胞色素 *c* 於第一層吸附作用時單位質量氧化態細胞色素 *c* 比還原態造成較大的能量耗散，兩者於開始吸附後的第一分鐘亦有不同行為表現，綜合上述結果，我們推知氧化態細胞色素 *c* (相對於還原態)和心磷脂交互作用後可能呈現較鬆散的結構，例如解折疊(extended)狀態。此結果和近期文獻中所報導的結論呼應，證實石英晶體微天平—耗散監測系統具有依時間解析(time-resolved)氧化態及還原態細胞色素 *c* 對於心磷脂之間交互作用的能力，此結果亦助於釐清細胞凋亡的病理學機制。

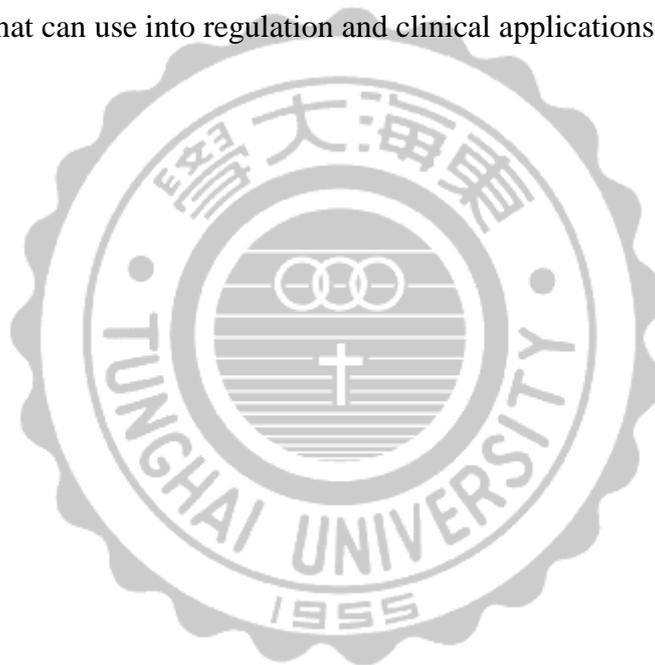
Abstract

Cytochrome *c* (cyt *c*), a protein inherent with a redox-centered heme in ferric/ferrous states, locates in the mitochondrial intermembrane space in eukaryotic cells. The oxidation state of heme regulates structure of cyt *c* and its affinity to electron transport complexes, in which the ferric cyt *c* tends to bind to complex III and the ferrous cyt *c* associates with complex IV. Approximate 15 % of the positively charged cyt *c* associates with the mitochondrial cardiolipin (CL) in homeostatic conditions and function as a peroxidase to promote CL oxidation which is referred as an early step towards apoptosis. Although ferric and ferrous cyt *c* have been shown to form complexes with CL, the exact mechanism leading to apoptosis in connection to oxidation state of cyt *c* remains unresolved.

We performed electrochemical techniques to interrogate effect of redox switch (cyt *c*) upon the interaction between cyt *c* and CL. Cyt *c* was functionalized on a carboxylic- and hydroxyl-groups terminated self-assembled monolayer on gold electrode by electrostatic and hydrophobic attraction. Cyclic voltammogram reveals that the formal potentials acquired from both ferric and ferrous cyt *c* shifted to less positive potential (by 19.5 and 15 mV) upon the association with CL. The potential separation of redox waves also increased upon the cyt *c*-CL association. The results correlated with the conclusion obtained in AC voltammetric experiments wherein the ferric cyt *c* exhibited a potential shift (24.1 mV), remarkably greater than 9.2 mV of ferrous cyt *c*, inferring a substantial structural change of ferric cyt *c* upon the association with CL. A molecular modeling also suggested a more perpendicular orientation of heme-plane (in the adsorbed ferrous cyt *c*) to the electrode surface.

The cyt *c*-CL interaction was further interrogated using Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring (QCM-D). The mass the ferric cyt *c*

adsorbed onto a phosphatidylcholine (PC)/CL (4:1 in molar ratio) lipid bilayer was 2.4-fold greater than the ferrous one which, however, represented greater shear modulus (by a difference of $\mu = 1.44 \times 10^3$ Pa) for the binding of cyt *c* to CL. The *D-f* plot revealed different slopes given by ferrous and ferric cyt *c*, presumably ascribed to distinct adsorption kinetics and different affinity to CL. Moreover, we used the *D-f* plot and the time-resolved with ΔD and Δf to assume that the effect of the interaction between ferric/ferrous cyt *c* with CL. Finally we hope to understand deeply the mechanism of the interaction between ferric/ferrous cyt *c* with CL, which is a cause to pro-apoptosis signal released, that can use into regulation and clinical applications in the future.



目錄

謝誌.....	
中文摘要.....	II
Abstract.....	III
目錄.....	V
圖目錄.....	VII
表目錄.....	VIII
第一章緒論 (Introduction).....	1
1.1 細胞色素 <i>c</i> (cytochrome <i>c</i> , cyt <i>c</i>).....	1
1.2 心磷脂(cardiolipin, CL)	3
1.3 電子傳遞鏈(electron transport chain, ETC).....	4
1.4 細胞凋亡(apoptosis)與相關疾病.....	5
1.5 細胞色素 <i>c</i> 與心磷脂之相互作用.....	8
1.6 氧化態及還原態細胞色素 <i>c</i>	10
1.7 動機.....	12
第二章實驗材料與方法.....	13
2.1 藥品試劑.....	13
2.2 實驗儀器與材料.....	14
2.3 電極製備.....	16
2.4 微脂體 (liposome) 製備.....	17
2.5 還原態細胞色素 <i>c</i> 製備.....	18
2.6 Bradford 蛋白質定量法.....	19
2.7 紫外可見吸收光譜確認還原態細胞色素 <i>c</i>	19
2.8 電化學感測.....	20
2.8.1 感測氧化/還原態細胞色素 <i>c</i> :	20
2.8.2 感測心磷脂 CL(18:1) 與氧化/還原態細胞色素 <i>c</i> 的相互作用力 :	20
2.9 二氧化矽感測晶片實驗前處理.....	21
2.10 心磷脂 CL(18:1)吸附於二氧化矽感測晶片.....	22
2.11 使用螢光染劑 (10-N-Nonyl acridine orange) 確認心磷脂 CL(18:1) 於 二氧化矽感測晶片.....	23
第三章結果與討論.....	24
3.1 測定氧化/還原態細胞色素 <i>c</i>	24
3.2 自組裝單分子層靜電吸附細胞色素 <i>c</i> —電化學法之鑑定.....	25
3.3 自組裝單分子層羧酸、醇官能基比例最佳化.....	27
3.4 自組裝單分子層羧酸官能基長度選擇最佳化.....	28
3.5 交流伏安法分析氧化態及還原態細胞色素 <i>c</i> —心磷脂交互作用.....	30

3.6 循環伏安法分析氧化態及還原態細胞色素 <i>c</i> —心磷脂交互作用	31
3.7 石英晶體微天平—耗散監測氧化態及還原態細胞色素 <i>c</i> —心磷脂.....	33
3.7.1 石英晶體微天平—耗散監測氧化態及還原態細胞色素 <i>c</i> —心磷脂 (質量).....	35
3.7.2 石英晶體微天平—耗散監測氧化態及還原態細胞色素 <i>c</i> —心磷脂 (<i>D-f</i> 圖).....	36
3.8 以 10-N-nonyl acridine orange (NAO) 螢光檢測心磷脂	41
3.9 蛋白質定量還原態細胞色素 <i>c</i>	42
第四章結論.....	43
第五章參考文獻.....	44



圖目錄

圖 1.1 細胞色素 <i>c</i> 示意圖.....	2
圖 1.2 心磷脂(18:1, tetraoleoyl cardiolipin)結構圖.....	3
圖 1.3 電子傳遞鏈示意圖.....	4
圖 1.4 細胞凋亡機制路徑圖.....	5
圖 1.5 亨丁頓舞蹈症(Huntington's disease)示意圖.....	7
圖 1.6 細胞色素 <i>c</i> 與心磷脂作用釋放至細胞質之示意圖.....	8
圖 1.7 推測細胞色素 <i>c</i> 與心磷脂相互作用之示意圖.....	9
圖 1.8 還原態細胞色素 <i>c</i> (1OCD)序列結構圖.....	10
圖 1.9 氧化態細胞色素 <i>c</i> (1OCD)序列結構圖.....	10
圖 1.10 細胞凋亡時細胞內的細胞色素 <i>c</i> 氧化還原狀態的調節示意圖.....	11
圖 3.1 細胞色素 <i>c</i> 之吸收光譜圖.....	24
圖 3.2 自組裝單分子層靜電吸附細胞色素 <i>c</i>	26
圖 3.3 自組裝單分子層羧酸、醇官能基比例最佳化.....	28
圖 3.4 自組裝單分子層羧酸官能基長度選擇最佳化.....	29
圖 3.5 氧化/還原態之細胞色素 <i>c</i> 與心磷脂之微脂體作用之交流伏安圖.....	30
圖 3.6 循環伏安法分析氧化態細胞色素 <i>c</i> —心磷脂交互作用.....	31
圖 3.7 循環伏安法分析還原態細胞色素 <i>c</i> —心磷脂交互作用.....	32
圖 3.8 氧化/還原態細胞色素 <i>c</i> 與心磷脂於二氧化矽感測晶片吸附示意圖.....	33
圖 3.9 微量石英天平頻率及耗散隨時間變化圖.....	34
圖 3.10 氧化/還原態細胞色素 <i>c</i> 與心磷脂吸附量.....	35
圖 3.11 氧化/還原態之細胞色素 <i>c</i> 與心磷脂之質量對耗散圖(<i>D-f</i> plot).....	37
圖 3.12 NAO 螢光強度圖.....	41
圖 3.13 蛋白質定量校正曲線圖 (細胞色素 <i>c</i>).....	42

表目錄

表 3.1 氧化態及還原態之細胞色素 <i>c</i> 與含有心磷脂之雙層膜作用 30 分鐘後之峰 電位結果.....	32
表 3.2 微量石英天平—耗散系統監測氧化態及還原態之細胞色素 <i>c</i> 與含有心磷脂 之雙層膜作用之質量對耗散圖(<i>D-f</i> plot)數據.....	39
表 3.3 微量石英天平—耗散系統監測氧化態及還原態之細胞色素 <i>c</i> 與含有心磷脂 之雙層膜作用圖.....	40



第一章緒論 (Introduction)

1.1 細胞色素 *c* (cytochrome *c*, cyt *c*)

西元 1884 年 MacMunn 首先發現肌肉中含有“色素物質(myohaematin and histohaematin)” [1]但不被當時廣泛的科學家接受；直到西元 1925 年 Keilin 再次證實細胞具有這些有色物質並命名為細胞色素(cytochromes)。

細胞色素為以鐵為中心離子和四個氮配位卟啉環(prophyrin)結構所形成的血基質(heme)蛋白質，而粒線體中的細胞色素家族可分為三種：細胞色素 *a*、細胞色素 *b* 以及細胞色素 *c*，因為具有不同的輔基(prosthetic group)鍵結於卟啉環上，因此，可利用最長波長的吸收峰來區分三種不同細胞色素，還原態(Fe^{2+})細胞色素 *a* 約於 600 nm、細胞色素 *b* 約於 560 nm、及細胞色素 *c* 約於 550 nm 有吸收峰[2, 3]。其中細胞色素 *a* 和細胞色素 *b* 其血基質上的輔基較為緊密，因此與蛋白質分子為非共價鍵鍵結。細胞色素 *c* 血基質上的輔基以尾端的半胱氨酸(cysteine)與蛋白質分子形成共價鍵鍵結[4]。

細胞色素 *c* 是一種球狀的水溶性血基質蛋白質，分子量約為 12000，具有 104 個胺基酸基團，普遍存在於真核生物的粒線體中。因為其具有水溶性特性，因此易被從細胞中提取結晶，大部份研究使用馬心臟中所含有的細胞色素 *c*，其主要結構包含有五個 α -螺旋(α -helix)以及位於中心的血基質，其血基質上的輔基以 14 和 17 號位置的胱氨酸與蛋白質形成硫醚鍵(thioether linkage)共價結合[5]，四個吡咯(pyrrrole)的氮以及 18 號組氨酸(histidine)和 80 號蛋氨酸(methionine)分別與血基質中的鐵離子配位[6]。

細胞色素 *c* 在生物體中所扮演的重要功能包括：

1. 在粒線體製造能量的電子傳遞鏈(electron transport chain)中，細胞色素 *c* 負責由複合體 III 傳遞電子至複合體 IV [7]。

2. 細胞色素 *c* 從粒線體釋出與凋亡蛋白酶活化因子-1(apoptosis protease activating factor-1, Apaf-1)結合，引發細胞凋亡[8]。
3. 作為催化劑，催化反應的進行（如：羥基化和芳香族氧化），並表現有過氧化物酶的活性，可以還原活性氧化物質(reactive oxygen species, ROS)[9]。

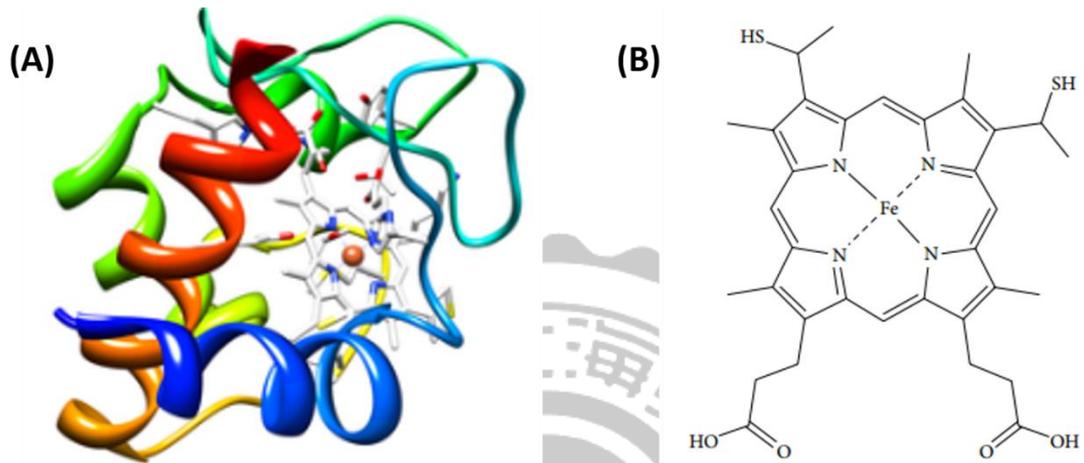


圖 1.1 細胞色素 *c* 示意圖(A)細胞色素 *c* 結構圖[10]；(B)細胞色素 *c* 血基質[3]。

1.2 心磷脂(cardiolipin, CL)

磷脂質(phospholipid)為細胞膜主要的組成。西元 1941 年 M. C. Pangborn 首先從牛心萃取出心磷脂(cardiolipin)，心磷脂也可稱為雙磷脂醯甘油(diphosphatidylglycerol)為粒線體中獨特的磷脂質，普遍存在於哺乳動物和植物細胞中粒線體內膜，含量約佔總磷脂質的百分之二十，其主結構為甘油骨架(glycerol backbone)，與兩個磷脂酸(phosphatidic acid)基團形成的二聚結構，因此帶有兩個負電荷以及四條醯基長碳鏈(acyl chain)，如圖 1.2 所示。

研究指出心磷脂有助於維持四級結構的穩定及功能性，例如粒線體內電子傳遞鏈複合體 III、IV 和 ATP 合成酶[11, 12]。粒線體內帶有正電價的陽離子和蛋白質可與帶有負電的磷酸根相互靜電吸引，因而吸附靠近內膜表面，也可做為質子阱(proton trap)在氧化磷酸化作用中維持粒線體膜間腔(mitochondrial intermembrane space)裡的 pH 值[13]。另外有文獻指出，當心磷脂被過氧化並從粒線體內膜分佈至粒線体外膜，氧化的心磷脂改變粒線體膜的結構及通透性(permeabilization)，進而釋放細胞色素 *c* 並觸發細胞凋亡的產生[14]。同時心磷脂也是研究細胞相關疾病的重要指標[如：巴氏症候群(Barth syndrome)、帕金森氏症(Parkinson's disease)和阿茲海默症(Alzheimer's disease)等][13]。

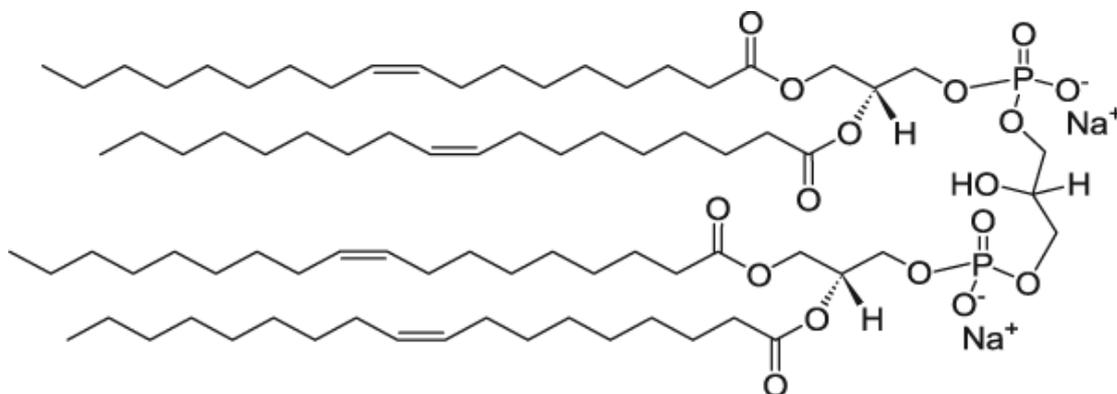


圖 1.2 心磷脂(18:1, tetraoleoyl cardiolipin)結構圖。

1.3 電子傳遞鏈(electron transport chain, ETC)

粒線體因具有氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)、電子傳遞、貯存 Ca^{2+} 等重要生理作用，因而成為提供細胞各種生命活動基礎能量的來源。西元 1961 年 Peter D. Mitchell 提出化學滲透學說(chemiosmotic hypothesis)，其主要論點為受質(substrate)氧化期間建立的質子濃度梯度提供了驅動 ADP 和 Pi 形成 ATP 的能量 [15]，並於西元 1978 年獲得諾貝爾化學獎。

電子傳遞鏈位於粒線體內膜上，其功能是產生一個跨膜質子電化學梯度作為氧化還原反應(圖 1.3)；傳遞電子的複合體(complex)位於粒線體內膜上，除了負責傳遞電子之外，還具有質子泵(proton pump)功能，使膜間腔和基質之間形成一個電化學梯度，膜間腔內的質子通過 ATP 合成酶複合體進入基質，釋放的能量用來合成 ATP。而粒線體中細胞色素 *c* 在電子傳遞鏈扮演著重要的角色，其中電子從 complex III (coenzyme Q - cytochrome *c* reductase)藉由細胞色素 *c* 傳遞到 complex IV (cytochrome *c* oxidase) [7]。

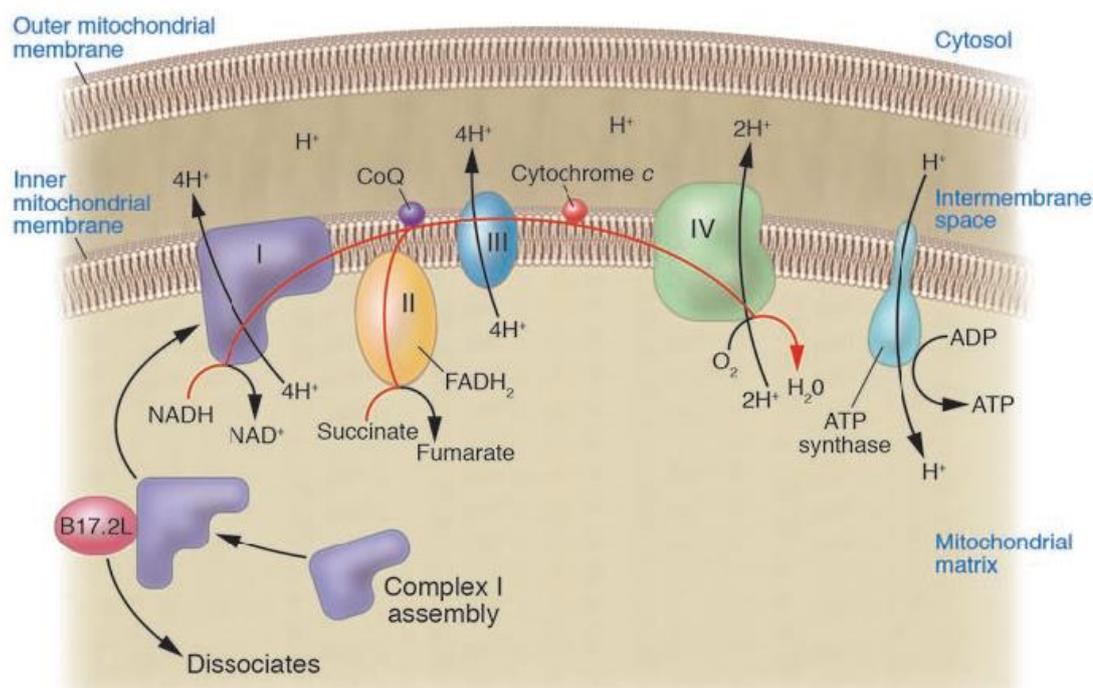


圖 1.3 電子傳遞鏈示意圖[16]。

1.4 細胞凋亡(apoptosis)與相關疾病

細胞凋亡是一種細胞程序性死亡(programmed cell death)的方式，因為細胞受到外在因素的影響，接受特定的訊號後所產生的自然死亡，並且對於生物體發育、分化以及維持細胞間的恆定具有絕對的重要性[17]。然而，細胞凋亡與細胞壞死(necrosis)有明顯差異，細胞壞死通常因受到外來的物理性刺激或化學物質侵入使細胞受到傷害而崩解，並伴隨著嚴重的發炎反應；反之，細胞凋亡時可發現細胞質中產生小泡囊(membrane blebbing)、細胞皺縮(cell shrinkage)、染色質濃縮(chromatin condensation)、DNA 斷裂(DNA fragmentation)、粒線體膜電位去極化(depolarization)，細胞色素 *c* 由粒線體釋放至細胞質(cytosol)，以及細胞崩潰分解成片段的凋亡小體(apoptotic body)等現象，並不會引起發炎反應，因此，細胞凋亡對於周圍的細胞以及組織造成傷害不大[18]。

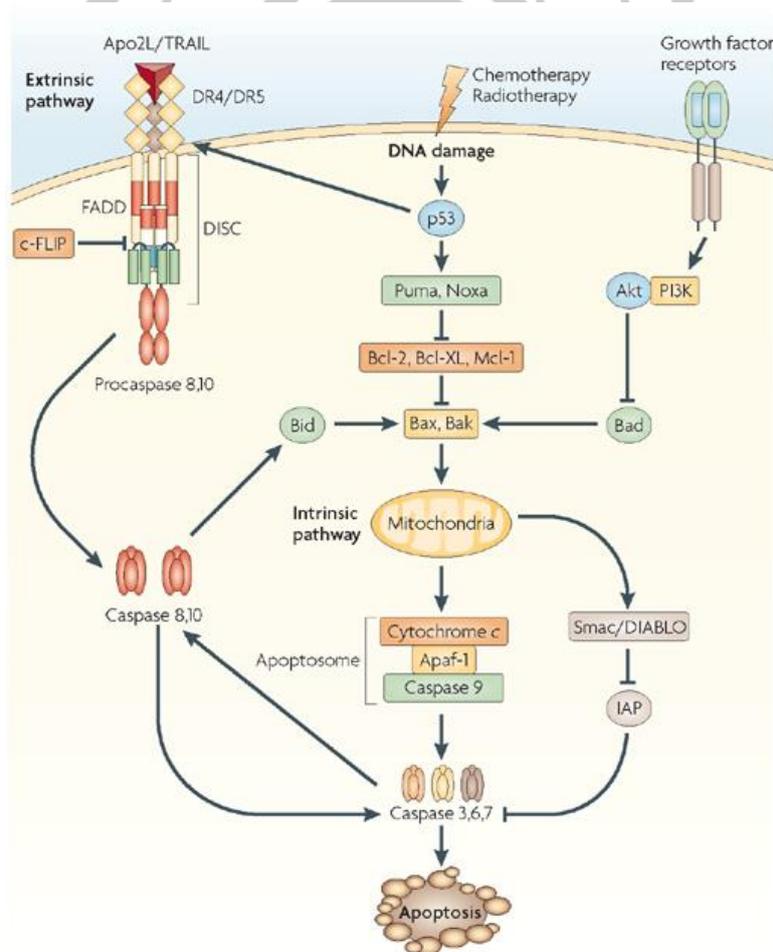


圖 1.4 細胞凋亡機制路徑圖[19]。

細胞凋亡可分為內源路徑(intrinsic apoptosis pathway)和外源路徑(extrinsic apoptosis pathway)。內源路徑又可稱為粒線體介導途徑(mitochondria-mediated pathway);則外源路徑,亦即死亡受體介導途徑(death receptor-mediated pathway),主要是依賴死亡受體(death receptor)如 Fas/CD95、腫瘤壞死因子受體-1(tumour necrosis factor receptor 1, TNF-R1)及腫瘤壞死因子相關的凋亡誘導配體 TRAIL-R1 與 TRAIL-R2 (TNF related apoptosis inducing ligand receptors 1,2)所形成的複合物,直接觸發半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶,又可稱為凋亡蛋白酶(cysteine aspartate specific proteinase, caspase)的活化[20]。

內源路徑中,由於細胞受到各種不同的外界環境刺激如紫外線、 γ 輻射線、內質網(endoplasmic reticulum, ER)壓力、生長因子剝奪(growth factor deprivation)以及氧化壓力(oxidative stress)等的作用而產生過多的活性氧物質(reactive oxygen species, ROS),並經由誘導凋亡因子 Bcl-2 家族蛋白如 Bax 和 Bak 啟動內源性凋亡途徑,在粒線體外膜上產生聚合作用(oligomerisation)導致粒線體功能失調。Bax 及 Bak 的促凋亡功能可被 Bcl-2 家族的抑制凋亡因子如 Bcl-XL 所抑制[21];若粒線體功能失恆,則凋亡因子如細胞色素 *c* 及第二粒線體衍生的凋亡蛋白酶啟動劑/低等電點之凋亡抑制蛋白直接結合蛋白(second mitochondria derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI, SMAC/DIABLO)會經由粒線體內膜間隙被釋放至細胞質(cytosol)。釋出的 SMAC/DIABLO 經由凋亡抑制蛋白質(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)來啟動凋亡蛋白酶連鎖反應;而釋出的細胞色素 *c* 與凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)結合,並與前凋亡蛋白酶-9 (procaspase-9)形成凋亡體(apoptosome),啟動凋亡蛋白酶-9 活化凋亡蛋白酶-3,-6,-7,促使細胞降解(degradation)[19, 22]。

細胞凋亡與許多疾病的產生有關,例如巴氏症候群、帕金森氏症、阿茲海默症、肌萎縮性脊髓側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)、亨丁頓舞蹈症

(Huntington's disease)及中風(stroke)等，這些神經退化疾病(neurodegenerative disorder)都因死亡的神經原(neuron)細胞過多，造成系統功能損傷[20]。

以亨丁頓舞蹈症為例，這是一種體染色體顯性遺傳所造成的腦部退化疾病。起因於第四對染色體內Huntingtin基因的CAG三核苷酸重複序列異常，造成腦局部的神經細胞凋亡，並使神經系統部分區域訊息傳遞嚴重功能不全，使得運動等神經功能一直處於興奮狀態而無法被抑制，因此會有不自主運動產生[23]。

然而，在癌症等其他疾病中，由於細胞凋亡的異常，具有兩條途徑——細胞過度增殖或細胞凋亡的機制失常。導致在正常情況下應該死亡的細胞仍然繼續存活，並於細胞凋亡的路徑上出現缺陷，導致癌細胞的形成且持續不正常生長和增生；無法活化細胞凋亡，使腫瘤細胞的存活期延長，存活下來的細胞多於死亡的細胞，使得腫瘤細胞數目持續增多且體積持續增大[24]。

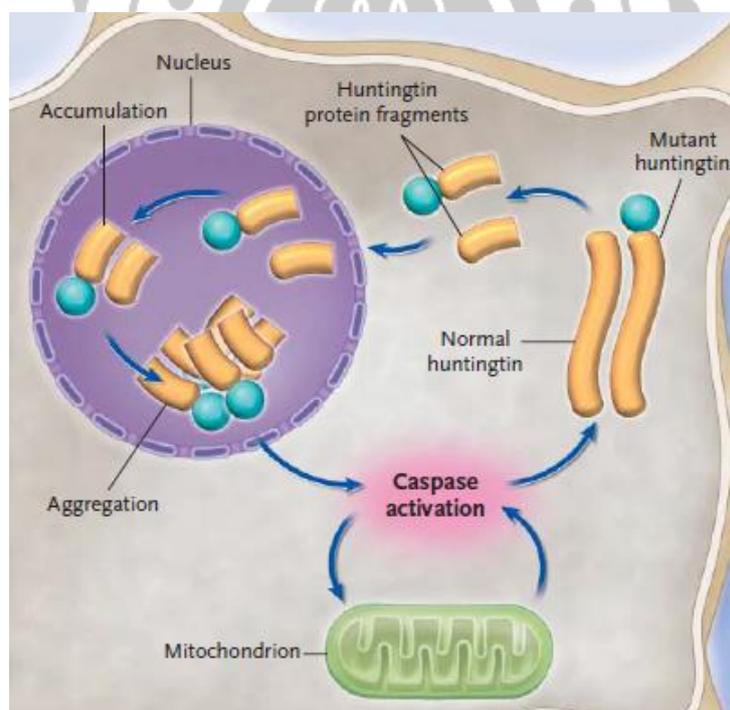


圖 1.5 亨丁頓舞蹈症(Huntington's disease)示意圖[20]。

1.5 細胞色素 *c* 與心磷脂之相互作用

心磷脂具有兩個帶負電的磷酸根，因此與帶許多正電荷胺基酸基團(lysine)的細胞色素 *c* 可藉由靜電吸引力相互作用後形成複合體。

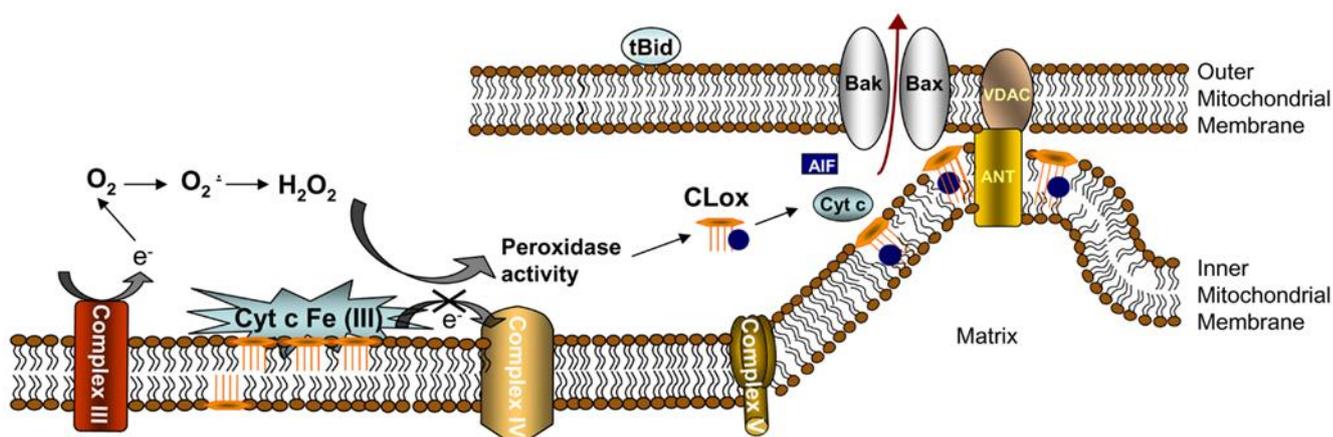


圖 1.6 細胞色素 *c* 與心磷脂作用釋放至細胞質之示意圖[18]。

文獻指出約有百分之十五的細胞色素 *c* 會與粒線體內膜上的心磷脂之間相互作用[25]，而此時膜上的心磷脂與細胞色素 *c* 相互作用後形成過氧化物酶複合體，進而催化心磷脂被氧化[26, 27]，這些被氧化的心磷脂逐漸分佈到粒線體外膜，因而改變粒線體膜的通透性使得細胞色素 *c* 被釋放至細胞質，與細胞凋亡活化蛋白酶因子-1 結合啟動凋亡蛋白酶，引發細胞凋亡的路徑。

早期科學家以傳統的方法（如 x 光繞射、螢光染劑等）研究細胞色素 *c* 與心磷脂交互作用後所產生的複合體是相當困難的，近期運用時間解析-螢光能量共振轉移(time-resolved FRET)等方法，探討細胞色素 *c* 與心磷脂之相互作用，推測出幾種模式：(i) 1999 年 Gorbenko 認為是細胞色素 *c* 嵌入含有心磷脂之細胞膜內[28]；(ii) 1995 年 Rytömaa 和 Kinnunen 等人認為是心磷脂的醯基鏈插入進細胞色素 *c* [29-31]；(iii) 西元 2012 年 Hanske 等人認為細胞色素 *c* 在含有心磷脂之細胞膜表面呈現展開的狀態（解摺疊）[32-34]。然而，至目前為止，其詳細的交互作

用機制仍未完全被證實。

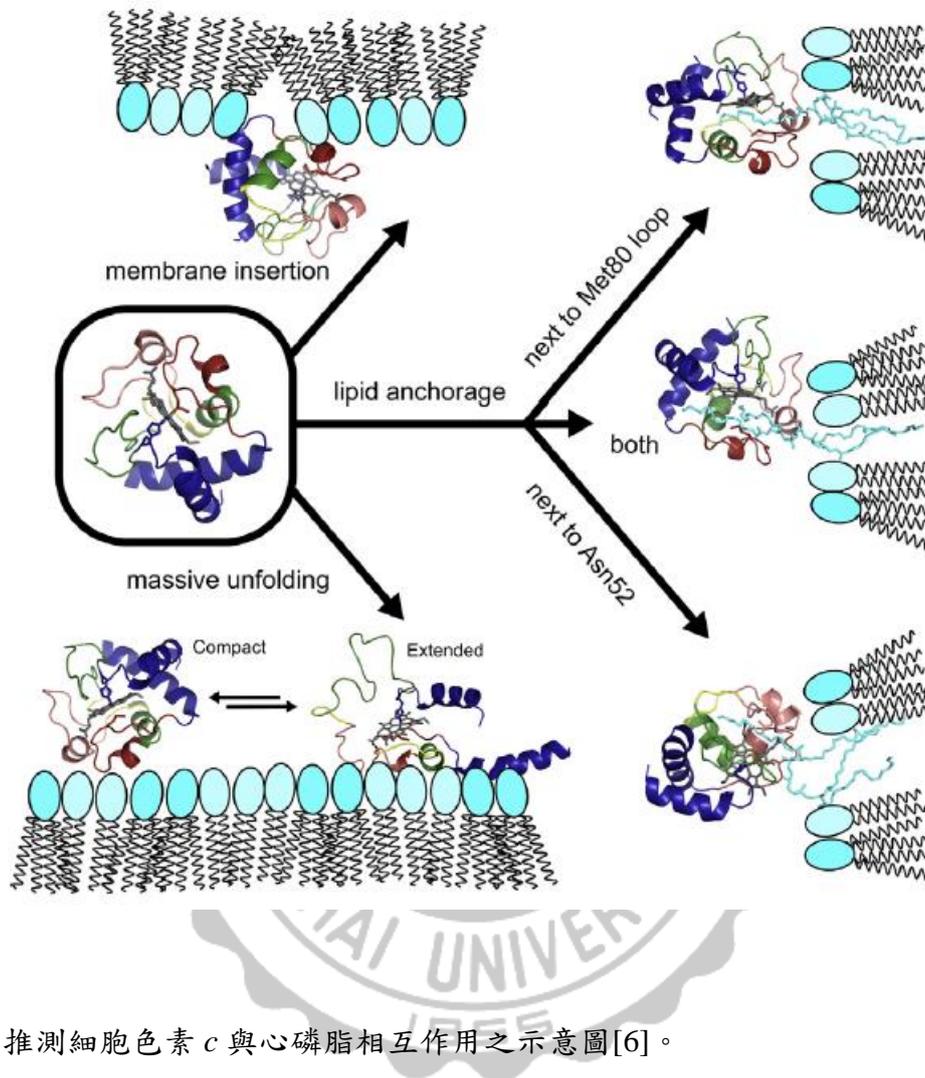


圖 1.7 推測細胞色素 *c* 與心磷脂相互作用之示意圖[6]。

1.6 氧化態及還原態細胞色素 *c*

利用蛋白質資料庫(protein data bank, PDB)分析來自於馬心的氧化態(1OCD)及還原態(2FRC)細胞色素 *c* 結構可以得知氧化態和還原態細胞色素 *c* 擁有不同的二級結構(secondary structure)，與血基質鍵結的鍵結位點(binding site)和蛋白質表面帶電的區塊及強度均有些許不同[35]，因此造成物理性質上的差異[例如：靜電吸引力、氫鍵(hydrogen bond)和疏水性作用力等]，結果可能導致氧化態和還原態有不同的行為。

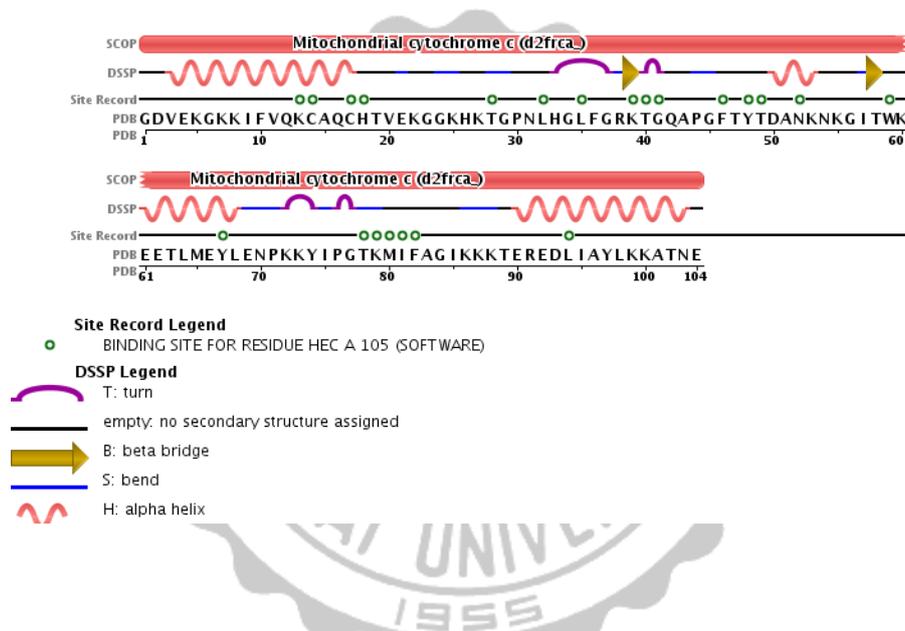


圖 1.8 還原態細胞色素 *c* (2FRC)序列結構圖[35]。

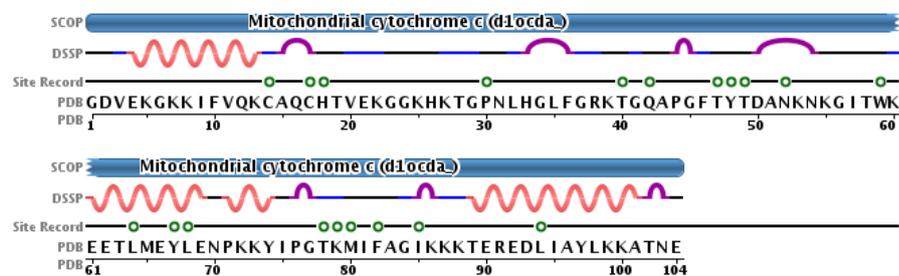


圖 1.9 氧化態細胞色素 *c* (1OCD)序列結構圖[35]。

研究指出將氧化態細胞色素 *c* 加入到細胞質萃取液，會活化凋亡蛋白酶-9 和 凋亡蛋白酶-3，引發細胞凋亡，然而還原態細胞色素 *c* 並不會有此反應[36, 37]；反之，加入還原劑還原細胞色素 *c* [如：穀胱甘肽(glutathione)、抗壞血酸鹽(ascorbate)、半胱氨酸(cysteine)和 N-乙酰基半胱氨酸(N-acetyl-cysteine)]則會抑制細胞凋亡的活性[36, 38, 39]。

Brown 等人認為氧化態和還原態細胞色素 *c* 可能是調節細胞凋亡的機制，無論是在釋放凋亡信號細胞色素 *c* 前氧化態和還原態的影響；亦或者是釋放凋亡信號細胞色素 *c* 後，氧化態及還原態細胞色素 *c* 對於和 Apaf-1 形成凋亡體複合體可能有不同的親和力(binding affinity)，因而影響細胞凋亡[38]。

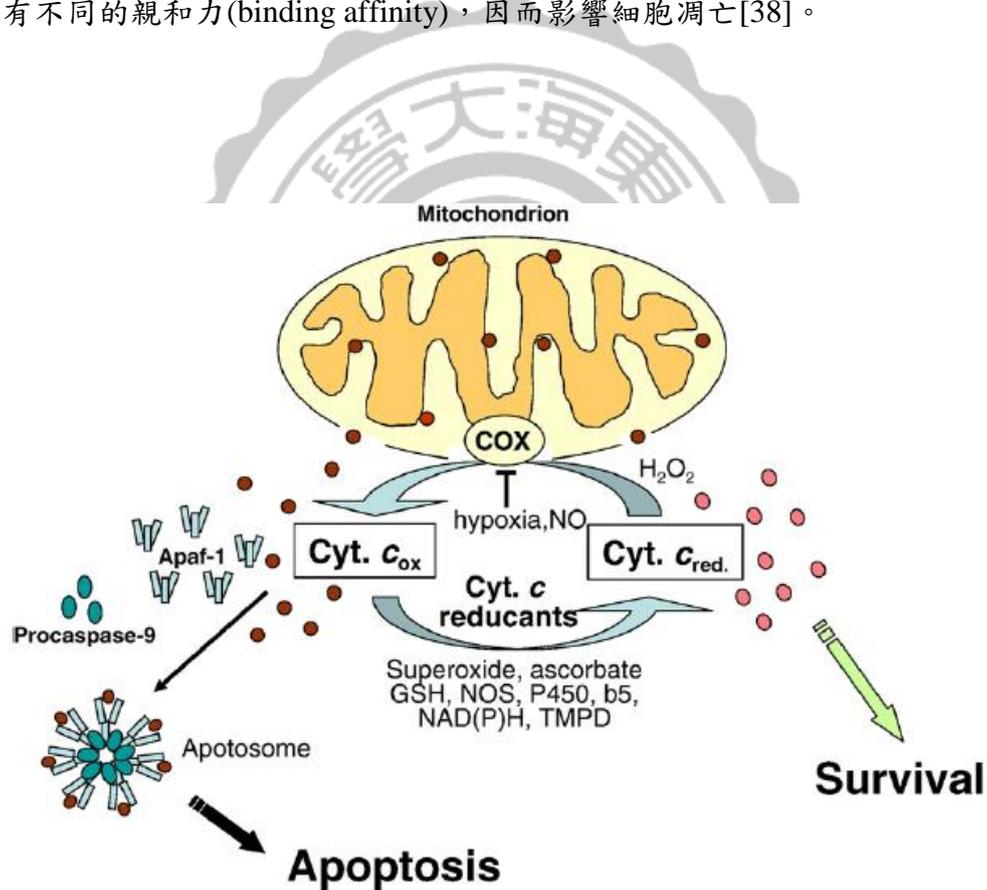


圖 1.10 細胞凋亡時細胞內的細胞色素 *c* 氧化還原狀態的調節示意圖[38]。

1.7 動機

長久以來，科學家認為構成細胞膜的脂質其主要功能是維持細胞的完整性以及區隔不同的胞器，卻忽略脂質其他重要功能，經由修飾後行為來達成傳遞訊號物質使反應進行；在哺乳動物生理反應中，含有不飽和雙鍵的心磷脂因為與細胞色素 *c* 相互作用使心磷脂氧化修飾為引發細胞凋亡的重要因素。

目前研究顯示以時間解析螢光共振能量轉移(time-resolved FRET)觀察螢光染劑標記(labeled)特定殘基(residue)之細胞色素 *c* 與心磷脂相互作用後，使得細胞色素 *c* 的構型產生改變(conformational change)，主要由 50 號、66 號和 72 號位置標記的胺基酸殘基解摺疊(unfolded) [34]。且心磷脂與細胞色素 *c* 相互作用後形成複合體，由於展開之細胞色素 *c* 其血基質暴露，進而過氧化(oxidation)心磷脂，因此造成粒線體膜的通透性改變使得細胞色素 *c* 被釋放至細胞質引發細胞凋亡[27]。

另一方面，研究指出氧化態及還原態細胞色素 *c* 對於細胞凋亡活性有著“開關”的功能，當氧化態細胞色素 *c* 被釋放至細胞質會刺激細胞凋亡而還原態細胞色素 *c* 則不會[38]。

因此，我們推論如果細胞色素 *c* 與心磷脂相互作用後產生構型改變，那麼從電化學的角度來看應該會有氧化還原電位(redox potential)的差異產生，亦有可能造成氧化還原電流峰值(redox peak)的差異；而從石英晶體微天平—耗散監測系統我們可以觀察細胞色素 *c* 與心磷脂相互作用隨時間變化之關係，預期藉由觀察能量耗散的程度可反映出結構改變的不同，藉此兩種分析方法，我們希望瞭解氧化態及還原態細胞色素 *c* 對於心磷脂之間相互作用的差異。

由於不正常的細胞凋亡行為會造成許多疾病的產生（如：巴氏症候群、帕金森氏症和阿茲海默症等），心磷脂與細胞色素 *c* 複合體為細胞凋亡的前導路徑，我們試圖了解氧化態及還原態細胞色素 *c* 對於心磷脂之間的相互作用機制，期待對於臨床的控制及治癒有所幫助。

第二章實驗材料與方法

2.1 藥品試劑

藥品名稱	化學式/縮寫	廠牌
1',3'-bis[1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho]-sn-glycerol (sodium salt)	$C_{81}H_{148}O_{17}P_2Na_2$ (18:1) CL	Avanti Polar Lipids
3-Mercaptopropionic acid	$HS(CH_2)_2CO_2H$	Sigma-Aldrich
6-Mercaptohexanol	$HS(CH_2)_6OH$	Sigma-Aldrich
7-Mercaptoheptanoic acid	$HS(CH_2)_6CO_2H$	
10-N-Nonyl acridine orange	$C_{26}H_{38}BrN_3$	Enzo Life Sciences
11-Mercaptoundecanoic acid	$HS(CH_2)_{10}CO_2H$	
Ammonium hydroxide	NH_4OH	Sigma-Aldrich
Protein assay dye reagent concentrate	-	Bio-Rad
Chloroform	$CHCl_3$	J.T. Baker
Cytochrome c (from equine heart)	-	Sigma-Aldrich
Dimethyl sulfoxide	$(CH_3)_2SO$	Merck Millipore
Dodecyl sulfate sodium salt	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Merck Millipore
Ethenol	C_2H_5OH	Sigma-Aldrich
Hydrochloric acid	HCl	Sigma-Aldrich
Hydrogen peroxide	H_2O_2	Sigma-Aldrich
L- α -Phosphatidylcholine (from egg yolk)	-	Sigma-Aldrich
L(+)-Ascorbic acid sodium salt	$C_6H_7NaO_6$	Sigma-Aldrich
Nitric acid	HNO_3	J.T. Baker
TRIS (Base)	$NH_2C(CH_2OH)_3$	J.T. Baker

2.2 實驗儀器與材料

儀器/材料名稱	型號	廠牌
2 mm Diameter Gold Working Electrode 2 mm 金電極	CHI101	CH Instruments
Amicon Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters 0.5 毫升處理量離心預濃縮管 (10K)	UFC501024	Millipore
Delta Ultrasonic Cleaners Delta 小型超音波洗淨機	D150H	Delta
Electrochemical Analyzer/Workstation 電化學分析儀	CHI 660	CH Instruments
Elite Dry Bath Incubator Elite 恆溫乾浴器	MD-MINI	Major Science
Horizontal Shaking Bath 往復式震盪水槽	KEO-150D	Cheng Yang Instrument
Microprocessor Controlled Dispensing Pump 微處理控制蠕動幫浦	ISM596D	Ismatec
Mini-Extruder 微脂體整粒器	610020	Avanti Polar Lipids
MS Orbital Shaker MS 迴轉式振盪器	MS-NOR	Major Science
Multimode Microplate Spectroscopy 多功能微量盤分析儀	SpectraMax M2 [®]	Molecular Devices
pH Meter 酸鹼度計	UB-10	Denver Instrument

Polycarbonate Membrane 聚碳酸酯膜	800309	Whatman
Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring 石英晶體微天平耗散監測系統	E1	Q-Sense
Research Inverted Microscope 研究級倒立式顯微鏡	IX71	Olympus
Rotary Vacuum Evaporator 真空減壓旋轉濃縮機	N-N Series	Eyela
Table Top Refrigerated Centrifuge 高速低溫離心機	Z326K	Hermle
UV/ozone 自製紫外光/臭氧清洗機		
Vortex 震盪器	G-560	Scientific Industries
Ag/AgCl reference electrode 銀/氯化銀參考電極	CHI111	CH Instruments
Particle Size Analyzer 粒徑分析儀	3000HSA	Malvern

2.3 電極製備

實驗使用柱狀金電極，具有 2 mm 直徑的柱狀金工作電極、輔助電極為白金絲和銀/氯化銀參考電極。在金電極上修飾自組裝單分子層(self-assembled, SAM)利用靜電吸附氧化態細胞色素 *c* (ferric cytochrome *c*, ferric cyt *c*)。

本實驗自組裝單分子層使用羧酸基(carboxylic groups)、醇基(hydroxyl group)混合官能基團的烷基硫醇(alkanethiol)，莫耳比為 3-mercaptopropionic acid (MPA) : 6-mercaptohexanol (MCH) = 1 : 3，總濃度為 5 mM 配置在絕對酒精中。

首先將柱狀金電極以 0.05 μm 氧化鋁粉拋光 8 分鐘，然後用二次去離子水潤洗 (di-water rinsed) 數次，最後用氮氣吹乾。將拋光完的工作電極以電化學方式活化、清潔，在 0.1 M H_2SO_4 的溶液中，施加電壓 $-0.4\text{ V} \sim +1.6\text{ V}$ ，以循環伏安法掃描 20 圈，掃描速率為 0.1 V/s 於工作電極，使其活化金的表面以避免氧化物鈍化電極，同時也將表面的有機物及無機物一起去除；接著，以二次去離子水潤洗後，氮氣吹乾，並快速地放入已配置好的硫金鍵自組裝混合溶液以形成自組裝單層膜於柱狀金工作電極上，靜置隔夜(over-night)放置於抽屜中避光，使金電極修飾上自組裝單分子層。修飾完成後，將金電極取出先用酒精潤洗，再使用二次去離子水潤洗並以氮氣吹乾，即可獲得自組裝單分子層金電極。

將製備好自組裝單分子層的柱狀金電極放入 50 μM 氧化/還原態細胞色素 *c* 中【回溶於 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液】，靜置兩小時於 4°C 冰箱，使細胞色素 *c* 靜電吸附於具有自組裝單分子層之金電極表面，之後小心以二次去離子水潤洗，即可獲得修飾有氧化/還原態細胞色素 *c* 的自組裝單分子層柱狀金電極。

2.4 微脂體 (liposome) 製備

圓底燒瓶使用前一晚，預先以王水清洗、烘乾。確認圓底燒瓶內部乾淨且乾燥，如有灰塵將圓底燒瓶倒置用氮氣吹落。

本實驗所使用的微脂體是以逆相蒸發法製備。將溶於氯仿的 230 μM (18:1) CL 和 920 μM egg PC 以莫耳比 1:4 混合於樣品瓶，震盪 2 分鐘使其分佈均勻，並取混合溶液放入圓底燒瓶中，封上石蠟膜保持瓶內乾淨。固定真空減壓旋轉濃縮機水浴槽溫度於 45°C (不能超過 60°C 以免氯仿突沸造成膜分佈排列不整齊)，用甲醇擦拭真空減壓旋轉濃縮機銜接管口數次，裝上含有混合溶液的圓底燒瓶。開啟抽氣機，調整旋轉閥以中速旋轉 (圓底燒瓶在水浴槽中盡量傾斜角 $< 45^\circ$ 使溶液貼附瓶壁較大面積)，保持每分鐘抽氣 15 秒，並持續抽氣至濃稠快乾，再以每 15 分鐘抽氣 10 秒直至全乾。在水浴下持續抽低壓 30 分鐘使氯仿完全揮發後取出，此時圓底燒瓶壁上形成明顯地脂質薄膜。

將抽乾的圓底燒瓶用氮氣吹乾，並將瓶口用石蠟膜封口。隨即以事先預熱至 60°C (脂質之相轉移溫度之上) 的 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液沿著圓底燒瓶壁慢慢加入後，並小心將瓶口用石蠟膜完全封起，放入水溫 60°C 的往復式震盪水槽，以 70 rpm 來回震盪 30 分鐘，使圓底燒瓶底部薄膜完全脫離瓶壁，包附水相形成微脂體，隨後靜置 90 分鐘，等待微脂體狀態穩定。

預熱超音波震盪機至 60°C (脂質之相轉移溫度之上)，放入以石蠟膜封口的微脂體溶液，震盪 30 分鐘。接著將溶液放入含有孔徑 100 nm 聚碳酸酯膜的微脂體整粒器，來回擠壓 21 次，即形成約 100 nm 直徑大小的微脂體，並於 4°C 冰箱保存。

2.5 還原態細胞色素 *c* 製備

本實驗之 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液事先預冷於 4°C 冰箱。以保持細胞色素 *c* 蛋白質之活性。

將凍乾之 1 mg 氧化態細胞色素 *c* 以 50 μ L 的 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液回溶並混合均勻，接著加入 50 μ L 以 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液溶解的 100 mM 檸檬酸鈉鹽震盪 2 分鐘使其混合均勻，並於 4°C 冰箱還原氧化態細胞色素 *c* 30 分鐘。

將 500 μ L 二次去離子水加入 0.5 mL 處理微量離心預濃縮管(10K, 10 kDa)，放入事先預冷至 4°C 的高速低溫離心機，以 14000 G 離心 5 分鐘潤洗濾膜；接著，加入還原 30 分鐘之 100 μ L 還原態細胞色素 *c* 混合溶液及 400 μ L 的 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液於 0.5 mL 處理微量離心預濃縮管，震盪 1 分鐘後，置於 4°C 的高速低溫離心機，以 14000 G 離心 14 分鐘，使分子量較小的檸檬酸鈉鹽稀釋脫去。離心後，不斷重複加入 450 μ L 的 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液於 0.5 mL 處理微量離心預濃縮管，震盪 1 分鐘後至 4°C 的高速低溫離心機，以 14000 G 離心 14 分鐘，共離心六次。

最後更換乾淨外管，將內管倒置放立，外管蓋朝向離心機內打開，置於 4°C 的高速低溫離心機，以 1000 G 離心 2 分鐘，回收還原態細胞色素 *c*；加入約 1500 μ L 的 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液，使濃度調整至稍微高於最終實驗需要的 50 μ M 還原態細胞色素 *c*，並於稍後再利用 Bradford 蛋白質定量法調整回 50 μ M 還原態細胞色素 *c*。

2.6 Bradford 蛋白質定量法

將蛋白質濃縮檢測染色試劑與二次去離子水以體積比 1 : 4 稀釋混合均勻。以氧化態細胞色素 *c* 作為標準品，序列稀釋至線性範圍 0.02 - 0.3 mg/mL 內，濃度分別稀釋為 0.25、0.03125、0.0625、0.125 mg/mL；待測約 50 μ M 的還原態細胞色素 *c* 以 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液稀釋十倍，使濃度進入線性範圍內。個別加入 10 μ L 的氧化態及還原態細胞色素 *c* 於 96 孔盤中，並同時加入 200 μ L 稀釋後的蛋白質檢測染色試劑混合均勻，計時 5 分鐘後量測 595 nm 的吸收波長。

將標準品吸收波長作圖，求得氧化態細胞色素 *c* 的線性，代入檢測的還原態細胞色素 *c* 吸收值換算成濃度，最後以 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液調整還原態細胞色素 *c* 至 50 μ M。

2.7 紫外可見吸收光譜確認還原態細胞色素 *c*

由於氧化態細胞色素 *c* 及還原態細胞色素 *c* 於紫外可見吸收光譜吸收分別有不同的特徵峰藉以區別及判斷是否還原完成。

將氧化態細胞色素 *c* 和以檸檬酸鈉鹽還原並脫鹽的還原態細胞色素 *c* 分別放入 200 μ L 於透明 96 孔盤中，並觀測 350 ~ 600 nm 之吸收光譜。紫外可見吸收光譜主要判斷氧化/還原態細胞色素 *c* 特徵峰分別以 500 ~ 600 nm 之間的區段，氧化態細胞色素 *c* 約於 540 nm 有一特徵峰，而還原態細胞色素 *c* 約於 520 nm 及 550 nm 有兩個特徵峰。

2.8 電化學感測

本實驗使用三電極系統，工作電極為柱狀金電極，對電極為白金絲，參考電極為銀/氯化銀電極；檢測溶液為 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液。

2.8.1 感測氧化/還原態細胞色素 *c*：

將修飾有氧化/還原態細胞色素 *c* 的自組裝單分子層柱狀金電極以循環伏安法感測：掃描範圍為 $-0.2\text{ V} \sim +0.3\text{ V}$ 掃描速率為 0.5 V/s ，掃描 5 圈；接著，再以交流電伏安法進行電化學感測： $-0.15\text{ V} \sim +0.25\text{ V}$ ，掃描振幅 0.025 V ，掃描頻率 0.1 Hz 。

2.8.2 感測心磷脂 CL (18:1) 與氧化/還原態細胞色素 *c* 的相互作用力：

將修飾有氧化/還原態細胞色素 *c* 的自組裝單分子層柱狀金電極浸入莫耳比 4/1 之 egg PC/CL (18:1) 微脂體溶液中靜置 30 分鐘，使氧化/還原態細胞色素 *c* 能與馬心之心磷脂 CL (18:1) 相互作用，再以 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液潤洗移除多餘之微脂體溶液後，以循環伏安法感測：掃描範圍為 $-0.2\text{ V} \sim +0.3\text{ V}$ ，掃描速率為 0.5 V/s ，掃描 5 圈；接著，再以交流電伏安法進行電化學感測： $-0.2\text{ V} \sim +0.3\text{ V}$ ，掃描振幅 0.025 V ，掃描頻率 0.1 Hz 。

2.9 二氧化矽感測晶片實驗前處理

本實驗處理利用紫外臭氧 (UV/Ozone) 反應所產生大量具有強氧化能力的氧自由基打斷碳-碳鍵分解有機物，而氧自由基與被切斷之分子結合成為高親水性官能基 (如：-OH、-CHO、-COOH 等)，因此使二氧化矽感測晶片表面具有極佳的親水性，易於與微脂體的親水端吸附。

二氧化矽感測晶片分別以酒精、二次去離子水多次沖洗表面後以氮氣吹乾。將晶片表面朝上放入乾淨之玻璃皿，並置入於自製紫外臭氧照射燈台下，以 185 nm、254 nm 照射 10 分鐘，再以二次離子水多次沖洗表面並以氮氣吹乾。接著將二氧化矽晶片放置於鐵伏龍清洗架上，放入含有 2% 十二烷基硫酸鈉 (SDS) 水溶液的燒杯中，使溶液蓋過晶片表面靜置一小時於室溫，隨後將晶片從清洗溶液中取出並快速用二次離子水多次沖洗並用氮氣吹乾。最後再放置於自製紫外臭氧照射燈台下，照射 30 分鐘使二氧化矽表面改質，具較佳的親水性表面。



2.10 心磷脂 CL (18:1) 吸附於二氧化矽感測晶片

本實驗用於石英晶體微天平—耗散監測系統所使用之二氧化矽感測晶片(QSX 301)。將含有心磷脂 CL (18:1) 之微脂體吸附於二氧化矽感測晶片，並利用此介面探討與氧化/還原態細胞色素 *c* 的相互作用力。

預設實驗機台溫度於 25°C，並設定乾浴槽溫度於 27°C，凡要流入感測槽之液體皆事先以超音波震盪除氣 5 分鐘，並放置於乾浴槽內恆溫。將前處理完的二氧化矽感測晶片放入感測槽中，流入 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液 10 分鐘後，設定基礎共振頻率為 4.95 MHz 及不同共振諧波 (3、5、7、9、11、13) 建立實驗基準線後即可開始實驗，考量實驗數據的穩定及偵測深度選用第 7 泛頻作為數據的呈現[40]。

以流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流入 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液建立實驗基準線，基準線穩定後再以流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流入約 100 nm 直徑大小，濃度為 1.052 mg/mL 的 4PC/1CL (18:1) 微脂體溶液循環兩小時，使 4PC/1CL (18:1) 微脂體吸附在二氧化矽感測晶片上，接著再以 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流入 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液沖洗 30 分鐘，將多餘未吸附在晶片上的微脂體移除。

等訊號穩定後以流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流入配置於 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液之 50 μM 氧化/還原態細胞色素 *c* 循環四小時達到平衡狀態，並以流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流入 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液沖洗 30 分鐘，將多餘未吸附在微脂體上的氧化/還原態細胞色素 *c* 移除。

計算軟體採用 Q-Tools，軟體參數採用 Kelvin - Voigt 模式，用以計算出吸附質量、黏/彈性參數等數據處理。

2.11 使用螢光染劑 (10-N-Nonyl acridine orange) 確認心磷脂 CL (18:1) 於

二氧化矽感測晶片

10-Nonyl acridine orange (NAO) 是目前可用於化學檢測心磷脂的少數螢光染料，於 1982 年被使用後發現 NAO 鍵結粒線體中的心磷脂為標靶，NAO 帶有一正電可與心磷脂靜電吸附外，且具有一個非常大的頭和小尾的結構，與心磷脂的小頭大尾結構相互補償，並安排在一個高度有序的形式[41, 42]。而本實驗用 NAO 來確認我們的目標物心磷脂 CL (18:1) 是否有被吸附於二氧化矽感測晶片。

本實驗分別為實驗組：含有 4PC/1CL (18:1) 吸附之二氧化矽感測晶片；以及兩組對照組：無脂質和含有 PC 吸附之二氧化矽感測晶片。

以二次去離子水稀釋溶劑為二甲基亞砷 (DMSO) 之 1 mM NAO 至 1 μ M 振盪五分鐘使其混合均勻。將待測的二氧化矽感測晶片表面覆蓋滿 1 μ M NAO 於 37°C，靜置 15 分鐘等待染色，接著將晶片小心地潤洗並浸泡在二次去離子水中 5 分鐘，更換二次去離子水重複浸泡 3 次，隨後將二氧化矽感測晶片表面貼附於載玻片上。以雷射激發光 488 nm 照射，收 520 nm 之放射波長 (擋螢光濾鏡為 515 nm，實際收螢光範圍為 520 ~ 825 nm)。

第三章結果與討論

3.1 測定氧化/還原態細胞色素 *c*

細胞色素 *c* 是電子傳遞鏈中的一個重要部分，為含有血基質(heme)的蛋白質，而血基質中存在的鐵原子可以為+2 或+3 價。本研究中使用抗壞血酸鈉(sodium ascorbate)還原細胞色素 *c*，為確認氧化態細胞色素 *c* (ferric cyt *c*) 已成功被抗壞血酸鈉(sodium ascorbate)還原為還原態細胞色素 *c* (ferrous cyt *c*)，我們可以藉由紫外/可見吸收光譜圖得知，還原態細胞色素 *c* 具有 α 、 β 、 γ 吸收峰，其吸收峰波長分別為 550 nm、520 nm、415 nm；而氧化態細胞色素 *c* 其吸收峰波長分別為 530 nm、408 nm [2, 39]。

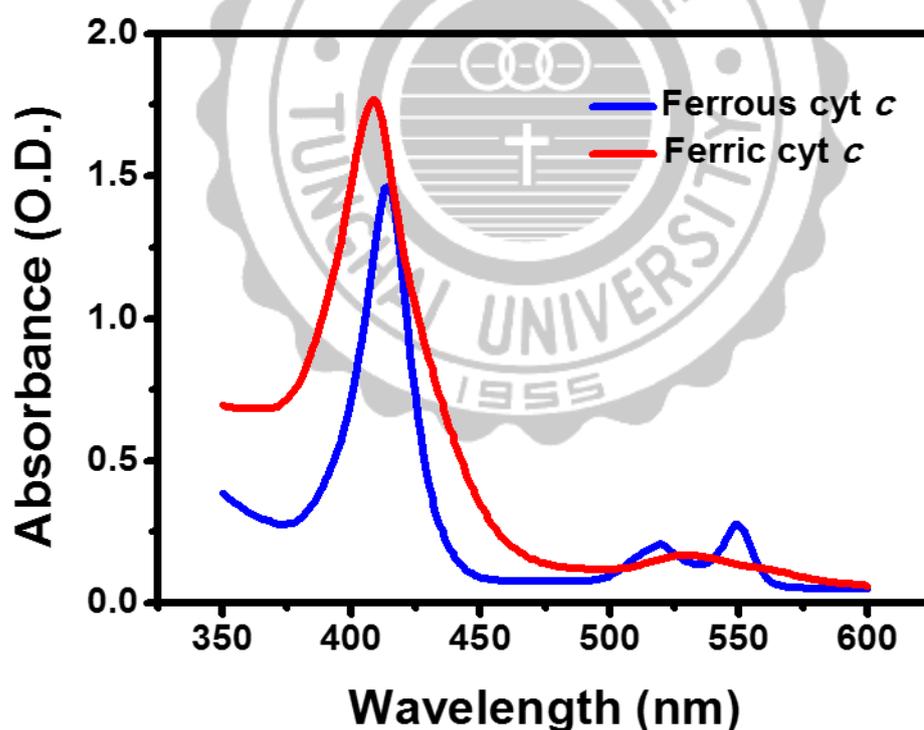


圖 3.1 細胞色素 *c* 之吸收光譜圖；氧化態(紅色曲線)和還原態(藍色曲線)。

3.2 自組裝單分子層靜電吸附細胞色素 *c*—電化學法之鑑定

利用循環伏安法探討細胞色素 *c* 的氧化還原行為，因為自組裝單分子層為帶有羧酸基(carboxylic groups)及醇基(hydroxyl group)之烷基硫醇(alkanethiol)，在金電極表面形成硫—金鍵結，表面羧酸根帶有負電，因此可靜電吸附帶正電的細胞色素 *c* 於電極表面[由於馬心臟的細胞色素 *c* 其等電位點(isoelectric point, pI)為 10.0-10.5][43]。

在 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液中，以修飾有氧化態細胞色素 *c* 的自組裝單分子層金電極掃描循環伏安法(cyclic voltammetry)可得如圖 3.2 結果，以羧酸、醇混合官能基團的烷基硫醇自組裝單分子層利用靜電吸附氧化態細胞色素 *c*，我們發現氧化態細胞色素 *c* 的氧化峰及還原峰分別位於 0.030 V 及 0.015 V，其峰值間距(peak separation)為 15 mV，證明其氧化還原反應為可逆的。氧化態細胞色素 *c* 的形式電位 (formal potential) 約在 0.025 V。掃描速率高於 0.5 V/s 時，所得到的峰淨電流值趨於定值[如圖 3.2(B)所示]。

由圖 3.2 (C)為峰電流值相對於掃描速率所做的圖，我們可發現其關係為線性關係，氧化峰值對掃描速率的迴歸係數(R^2)為 0.9956；還原峰值對掃描速率的迴歸係數為 0.9997，說明細胞色素 *c* 的氧化還原反應微電極表面反應(surface reaction)。

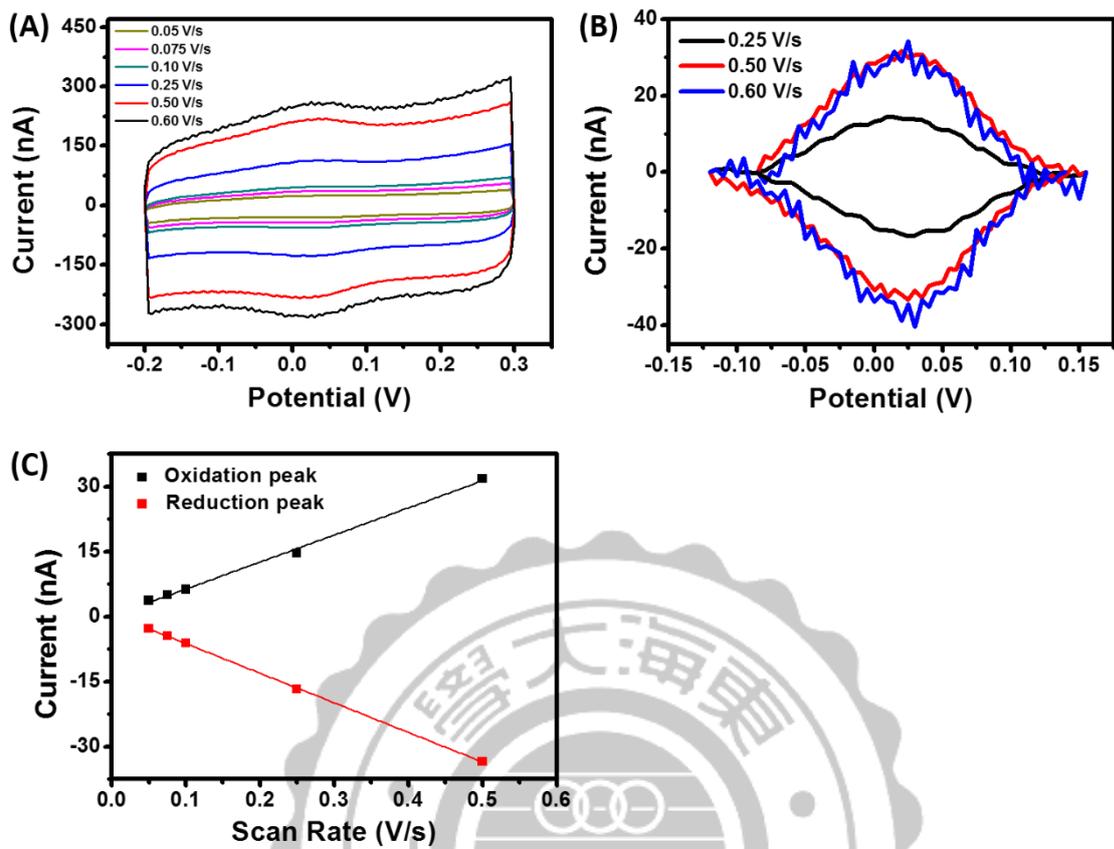


圖 3.2 自組裝單分子層靜電吸附細胞色素 *c*；圖(A)利用修飾有氧化態細胞色素 *c* 的自組裝單分子層金電極循環伏安圖(cyclic voltammogram)，掃描速率分別為 0.05、0.075、0.10、0.25、0.50、0.60V/s；圖(B)為氧化還原峰淨電流值比較圖，掃描速率分別為 0.25、0.50、0.60V/s；圖(C)為電流對掃描速率圖，掃描速率分別為 0.05、0.075、0.10、0.25、0.50V/s，緩衝溶液為 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)。

3.3 自組裝單分子層羧酸、醇官能基比例最佳化

根據 Bowden 等人的研究指出，細胞色素 *c* 於混合分子所形成的自組裝單分子層比單一帶負電的羧酸基自組裝單分子層表現出較大且可逆的氧化還原峰[44]。我們探討擁有不同比例的羧酸(carboxylic groups)、醇(hydroxyl group)兩種官能基團形成的自組裝單分子層對於吸附得到的電流強度。

將混合兩種不同比例官能基團烷基硫醇(alkanethiol)依莫耳比分別為 3-mercaptopropionic acid (MPA) : 6-mercaptohexanol (MCH) = 1:1、1:3、4:1，總濃度為 5 mM 配置於酒精中，並進行電極自組裝後吸附氧化態細胞色素 *c*。所得電極在緩衝溶液 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中，所得循環伏安圖如圖 3.3(A)及還原峰淨電流值如圖(B)所示，比較氧化態細胞色素 *c* 的還原峰電流強度，得到最大還原峰訊號發生於羧酸基：醇基 = 1:3，最小還原峰訊號則發生於 4:1，說明還原峰電流強度並不能完全以羧酸基多寡來判定，相反地，含羧酸基比例最低(1:3)反而獲得較大的還原峰訊號。結果暗示影響細胞色素 *c* 吸附於自組裝單分子層的因素不只有靜電吸引力，還與混合官能基團的親疏水性作用力(hydrophilic/hydrophobic interaction)有關，除此之外，由於含有羧酸基和醇基分子的烷基長度不同，不同比例將造成不同分子層表面結構，亦會影響如細胞色素 *c* 大分子吸附的效果。

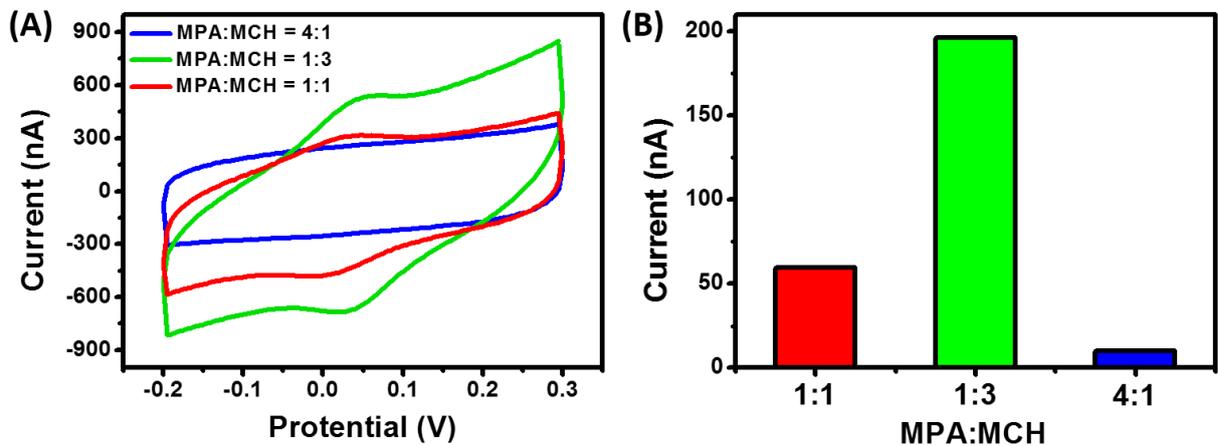


圖 3.3 自組裝單分子層羧酸、醇官能基比例最佳化。圖(A)為吸附氧化態細胞色素 *c* 之循環伏安法圖；圖(B)為還原峰淨電流值比較圖。莫耳比分別為 3-mercaptopropionic acid (MPA) : 6-mercaptohexanol (MCH) = 1:1 (紅色)、1:3 (綠色)、4:1 (藍色)。

3.4 自組裝單分子層羧酸官能基長度選擇最佳化

探討不同鏈長羧酸基的自組裝單層膜在盤狀金電極上，其吸附氧化態細胞色素 *c* 後之循環伏安法圖如圖 3.4(A)所示。在固定比例(1:3)及使用相同的醇基烷基硫醇(6-mercaptohexanol)，探討羧酸基上不同碳鏈長度的影響，我們分別使用 3-mercaptopropionic acid (MPA)、7-mercapto-heptanoic acid (MHA)、11-mercaptoundecanoic acid (MUA)並量測還原峰電流強度，我們發現 3-mercaptopropionic acid (黑色曲線) 得到的還原峰電流訊號最大，說明帶負電羧酸基的碳鏈長影響細胞色素 *c* 的電流強度，推測此行為與吸附氧化態細胞色素 *c* 到電極表面的距離有關；然而，7-mercapto-heptanoic acid (藍色) 所得的還原峰電流訊號最小，我們推測含有羧酸基及醇基之烷基硫醇碳鏈長度相同，形成緻密且平坦的單分子層，不利於細胞色素 *c* 吸附。然而，當碳鏈長度增加為 10 時，由於碳鏈間凡得瓦力(van der Waals force)增強，可形成較穩定且大區域面積含羧酸基單分子層，分子層表面因碳鏈長度和醇基烷基硫醇不同而產生相異結構，利於細胞色素 *c* 吸附，然

而，因較長的碳鏈長度而抑制了電子傳遞效率。

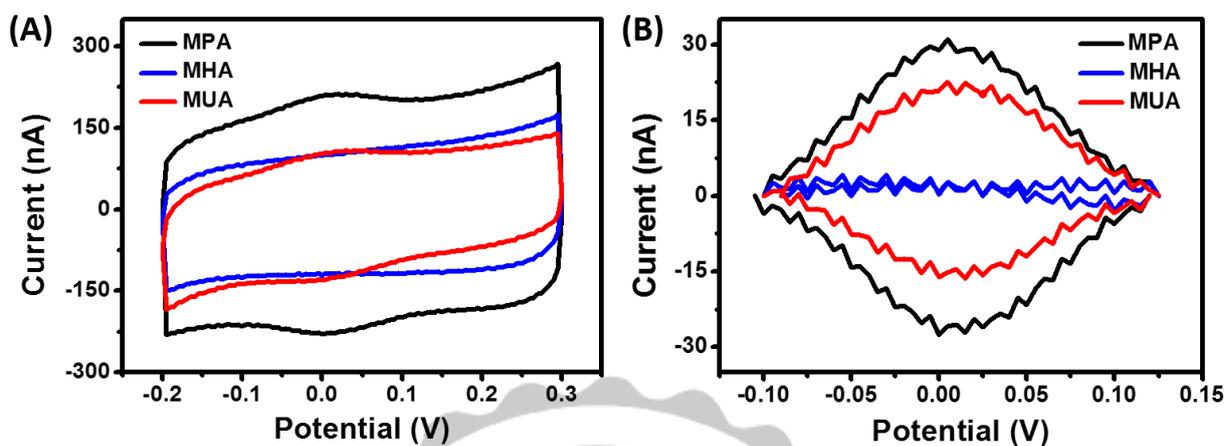


圖 3.4 自組裝單分子層羧酸官能基長度最佳化。圖(A)為已吸附氧化態細胞色素 *c* 之循環伏安法，分別為 3-mercaptopropionic acid, MPA (黑色)、7-Mercapto-heptanoic acid, MHA (藍色)、11-Mercaptoundecanoic acid, MUA (紅色)；圖(B)為電流峰值比較圖。自組裝單層膜官能基比例為 MPA: MCH = 1:3，掃描速率為 0.5 V/s，氧化態細胞色素 *c* 濃度為 50 μM 溶於 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液中。

3.5 交流伏安法分析氧化態及還原態細胞色素 *c* —心磷脂交互作用

圖 3.5 (A)表示自組裝單層膜金電極經吸附氧化態及還原態細胞色素 *c* 後所得之交流伏安圖(AC voltammograms)。結果顯示氧化態細胞色素 *c* 訊號峰峰電位為 70.6 mV，還原態細胞色素 *c* 訊號峰峰電位為 67.2 mV，兩者差異僅 3.4 mV。將修飾有氧化態及還原態細胞色素 *c* 之電極靜置吸附含有心磷脂(cardiolipin, CL)之微脂體(liposome)[莫耳比 CL (18:1): PC = 1:4]後，其所得細胞色素 *c* 訊號峰如圖 3.5 (B)所示，相對於未經微脂體交互作用之結果，訊號峰峰電位皆往負電位偏移。氧化態細胞色素 *c*—心磷脂偏移 24 mV，則還原態細胞色素 *c*—心磷脂則偏移 9.2 mV，推測心磷脂和細胞色素 *c* 交互作用後造成細胞色素 *c* 結構的轉變，進而導致峰電位往負值偏移（暗示有較小的電子交換阻抗）。

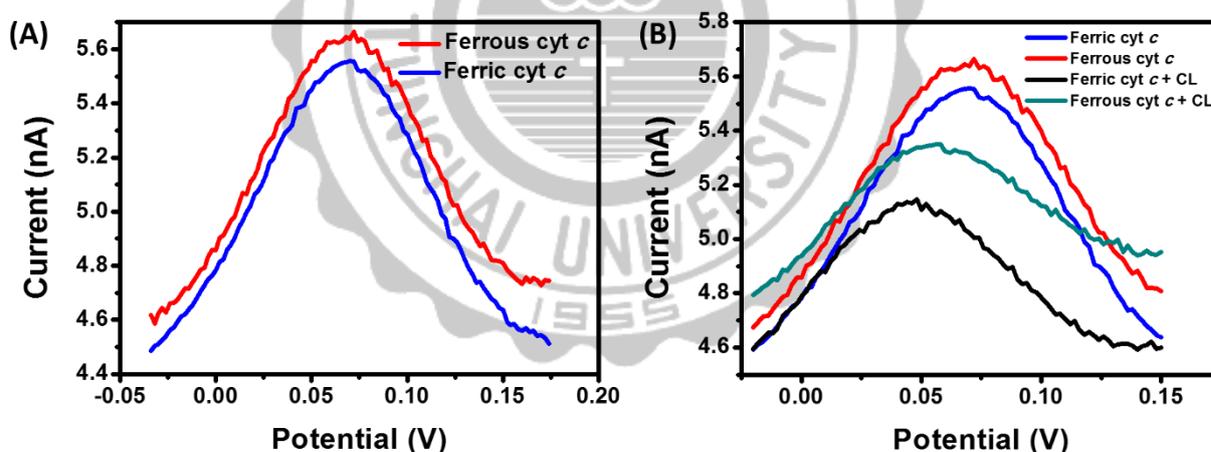


圖 3.5 氧化/還原態之細胞色素 *c* 與含有心磷脂之微脂體作用之交流伏安圖；圖(A)為氧化態及還原態細胞色素 *c* 修飾於自組裝單層膜之金電極；圖(B)為氧化態及還原態細胞色素 *c* 靜置吸附含有 230 μM 心磷脂之微脂體 30 分鐘，自組裝單層膜官能基比例為 MPA: MCH = 1:3，細胞色素 *c* 濃度皆為 50 μM 溶於 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)，掃描頻率為 0.1 Hz。

3.6 循環伏安法分析氧化態及還原態細胞色素 *c* — 心磷脂交互作用

圖 3.6(A)(B)表示自組裝單層膜金電極修飾氧化態細胞色素 *c*，並與心磷脂作用後所測得之循環伏安圖。結果顯示氧化態細胞色素 *c* 與心磷脂作用後其形式電位往負電位偏移 19.5 mV；圖 3.7(A)(B)則顯示自組裝單層膜金電極經修飾還原態細胞色素 *c* 且與心磷脂作用後，形式電位往負電位偏移 15 mV。從循環伏安圖可觀察到氧化態和還原態細胞色素 *c* 經與心磷脂作用後，其氧化及還原峰值間距皆有些許變大(4 mV)，說明氧化還原反應相較於未與心磷脂作用前具有較差的可逆性。結合圖 3.5 交流伏安圖結果，我們推論氧化態細胞色素 *c* 與心磷脂相互作用後會在結構上有較大的改變。

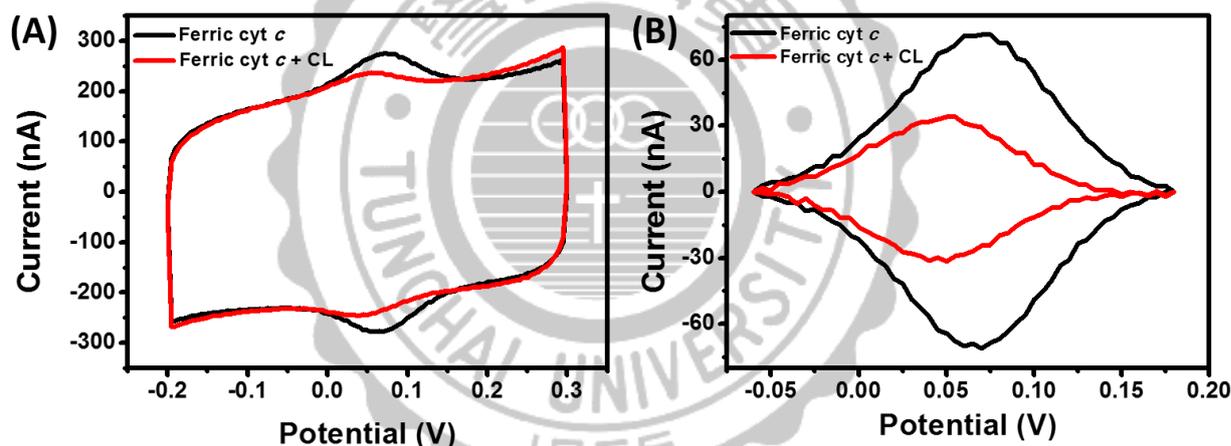


圖 3.6 循環伏安法分析氧化態細胞色素 *c* — 心磷脂交互作用；圖(A)氧化態之細胞色素 *c* 與含有 230 μM 心磷脂之微脂體作用 30 分鐘後之交流伏安法圖；圖(B)氧化還原峰淨電流值比較圖，自組裝單層膜官能基比例為 MPA: MCH = 1:3，細胞色素 *c* 濃度皆為 50 μM 溶於 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)，掃描速率為 0.5 V/s。

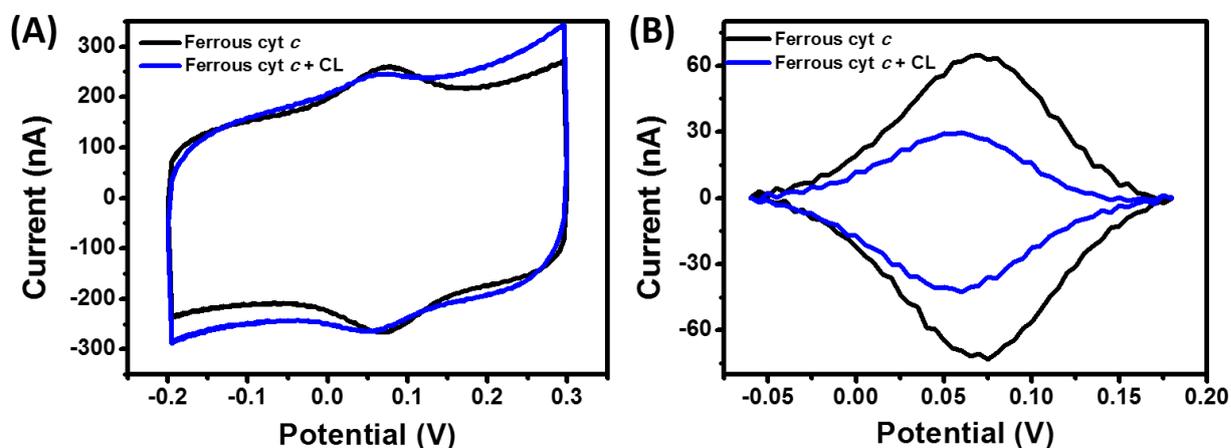


圖 3.7 循環伏安法分析還原態細胞色素 *c* 與心磷脂交互作用；圖(A)還原態之細胞色素 *c* 與含有 230 μM 心磷脂之微脂體作用 30 分鐘後之交流伏安法圖；圖(B)氧化還原峰淨電流值比較圖，自組裝單層膜官能基比例為 MPA:MCH=1:3，細胞色素 *c* 濃度皆為 50 μM 溶於 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)，掃描速率為 0.5 V/s。

表 3.1 氧化態及還原態之細胞色素 *c* 與含有 230 μM 心磷脂之微脂體作用 30 分鐘後之峰電位結果。

	CV		ACV	
	E_{Formal}	$\Delta E_{\text{Pa-Pc}}$	E_{Peak}	ΔE_{Shift}
Ferric cyt <i>c</i>	69.5	9	70.6	-
Ferric cyt <i>c</i> + CL	50.0	12	46.5	-24.1
Ferrous cyt <i>c</i>	72.5	5	67.2	-
Ferrous cyt <i>c</i> + CL	57.5	9	58.1	-9.2

Unit: mV

3.7 石英晶體微天平—耗散監測氧化態及還原態細胞色素 *c*—心磷脂

藉由石英晶體微天平—耗散(dissipation)監測系統來探討氧化態細胞色素 *c* 與含有心磷脂[PC:CL(18:1)=4:1]之雙層膜之間的相互作用。將含有心磷脂之微脂體吸附於二氧化矽微量石英天平晶片上(圖 3.8, 區段 A: 流入含有 230 μM 心磷脂之微脂體)後, 移除未吸附的微脂體[區段 B: 流入 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)], 接著, 分別流入氧化態或還原態之細胞色素 *c* (區段 C)觀察兩者間差異, 最後移除多餘未吸附的細胞色素 *c* [區段 D: 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)緩衝溶液]。從圖 3.8 (A)得知, 流入氧化態細胞色素 *c* 前頻率為-56.52 Hz, 而於區段 D 達平衡時頻率為-82.50 Hz, 表示氧化態細胞色素 *c* 與含有心磷脂之微脂體之間的吸附變化量為 $|\Delta f| = 25.98 \text{ Hz}$; 另一方面, 流入氧化態細胞色素 *c* 前耗散值為 4.07×10^{-6} , 在區段 D 時, 耗散為 5.85×10^{-6} , 氧化態細胞色素 *c* 對於含有心磷脂之微脂雙層膜造成耗散值增加為 1.78×10^{-6} 。

另一組流入還原態細胞色素 *c* 所得結果如圖 3.8 (B)所示, 在區段 B 時, 頻率為-56.22 Hz, 於區段 D 抵達平衡時, 頻率為-72.50 Hz, 還原態細胞色素 *c* 吸附變化量為 $|\Delta f| = 16.28 \text{ Hz}$; 在區段 B 時, 耗散值為 4.07×10^{-6} , 在區段 D 時, 耗散為 4.93×10^{-6} , 還原態細胞色素 *c* 對於含有心磷脂之微脂雙層膜造成耗散值增加為 0.86×10^{-6} 。由圖 3.8 (A)(B)結果得知, 氧化態細胞色素 *c* 於含有心磷脂之微脂雙層膜上的吸附量(質量)及耗散量(結構鬆散)皆大於還原態。此耗散結果暗示相較還原態細胞色素 *c*, 氧化態細胞色素 *c* 與含有心磷脂之微脂雙層膜結合後展現出較為鬆散的結構, 且可能有不同的親和力(affinity)。

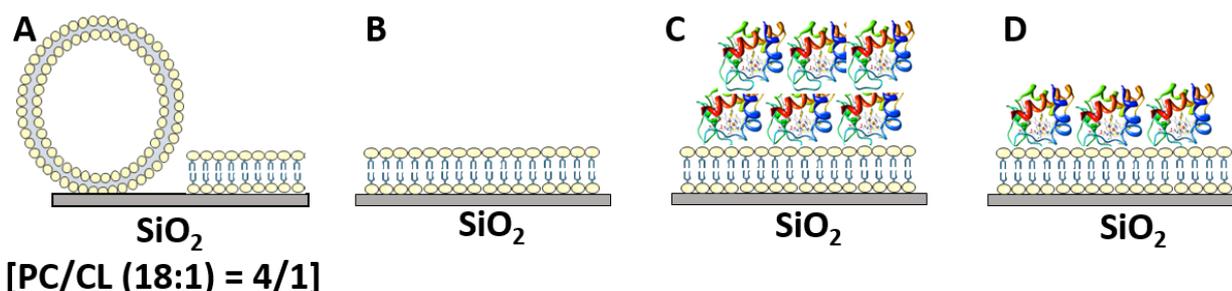


圖 3.8 氧化/還原態細胞色素 *c* 與心磷脂於二氧化矽感測晶片吸附示意圖。

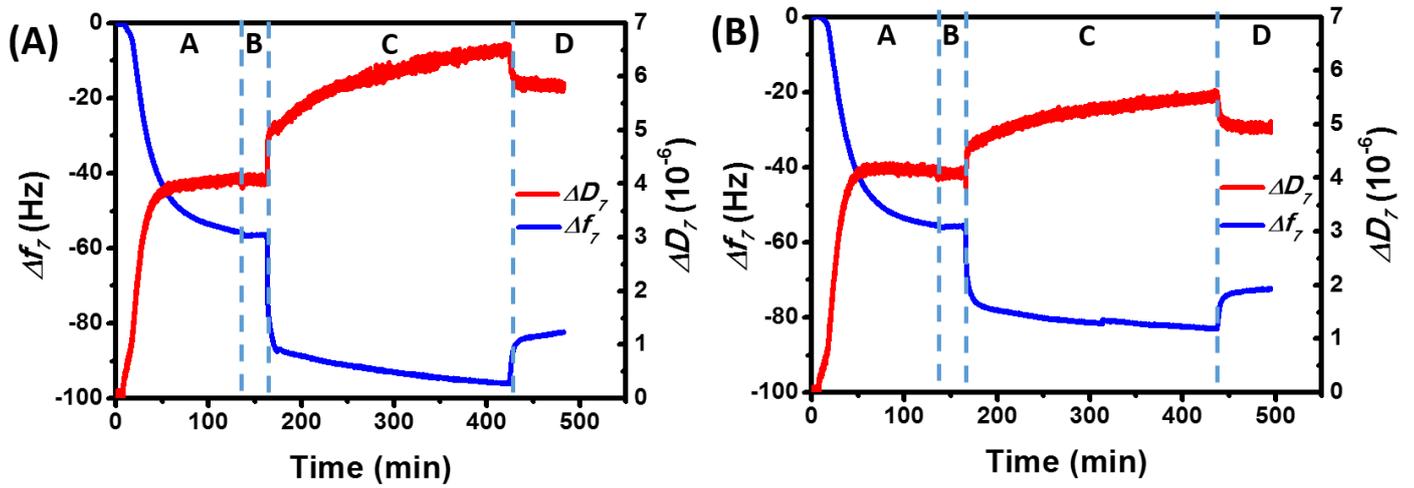


圖 3.9 微量石英天平頻率及耗散隨時間變化圖，區段 A：流入含有 230 μM 心磷脂之微脂體[PC/CL (18:1) = 4/1]；區段 B：流入 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液；區段 C：分別流入 50 μM 氧化態[圖(A)]及還原態[圖(B)]細胞色素 *c*；區段 D：50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液。[實驗數據以第 7 泛頻(f_7 、 D_7)呈現]

3.7.1 石英晶體微天平—耗散監測氧化態及還原態細胞色素 *c*—心磷脂 (質量)

實驗結果經由 QTOOL 軟體模擬運算後得到氧化態及還原態細胞色素 *c* 於心磷脂修飾之微脂雙層膜上的靜吸附量，氧化態細胞色素 *c* 為 455 ng/cm^2 ，還原態細胞色素 *c* 為 185 ng/cm^2 。氧化態為還原態細胞色素 *c* 的 2.4 倍，此結果暗示氧化態細胞色素 *c* 對含有心磷脂的雙層膜呈現較大的親合力，或因為氧化態細胞色素 *c* 與心磷脂雙層膜結合後，其結構較為鬆散，使細胞色素 *c* 攜帶較多的水分子，導致較大的質量增加。

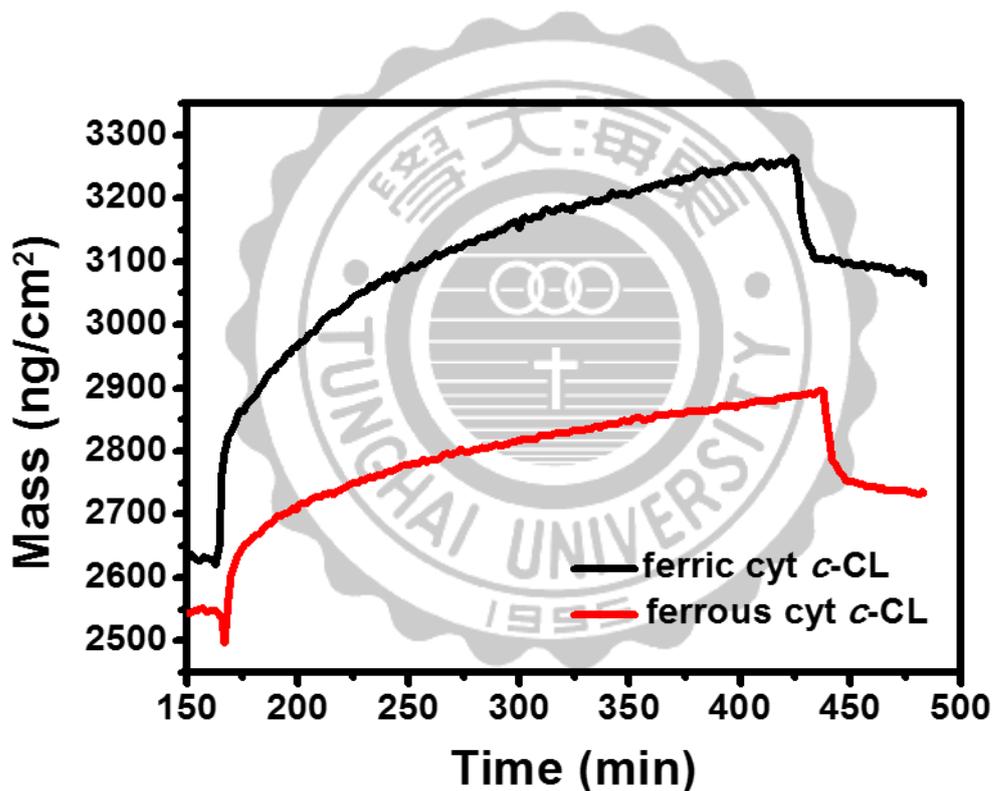


圖 3.10 氧化/還原態細胞色素 *c* 與心磷脂吸附量；氧化態(黑色曲線)及還原態(紅色曲線)

細胞色素 *c* 與含有心磷脂之雙層膜[PC/CL (18:1) = 4/1]吸附量。[實驗數據以第 7 泛頻(f_7 、 D_7)計算]

3.7.2 石英晶體微天平—耗散監測氧化態及還原態細胞色素 *c*—心磷脂(*D-f* 圖)

我們將細胞色素 *c* 溶液流入石英天平並接觸到含有心磷脂[PC/CL (18:1)= 4/1]雙層膜之二氧化矽晶片的時間點定為 a 點，且視為 $t=0$ 秒，此時所得到的頻率為 -56.40 Hz，耗散為 4.071×10^{-6} ；接著，流入氧化態細胞色素 *c*，觀察發現頻率快速往負值偏移，耗散值則呈現下降的趨勢，並將觀察得到耗散值最低點稱為 b 點，此時的 $t=15$ 秒，頻率為 -58.33 Hz，耗散為 3.995×10^{-6} ；之後耗散量持續增加，約一分鐘時稱為 b' 點，此時的頻率為 -74.64 Hz，耗散為 4.827×10^{-6} ；此增加趨勢持續至 *D-f* 圖斜率明顯改變時稱為 c 點，此時的 $t=1117$ 秒，頻率為 -87.44 Hz，耗散為 5.191×10^{-6} 。

在還原態細胞色素 *c* 方面，流入還原態細胞色素 *c* 前，稱為 a 點，並且將此時間點假設為 $t=0$ 秒，頻率為 -56.27 Hz，耗散為 4.032×10^{-6} ；接著，流入還原態細胞色素 *c*，觀察發現耗散也先有下降的趨勢，並將最低點稱為 b 點，此時的 $t=15$ 秒，頻率為 -59.30 Hz，耗散為 3.820×10^{-6} ；之後耗散量持續上升至一分鐘時稱為 b' 點，此時頻率為 -66.70 Hz，耗散為 4.322×10^{-6} ；直到斜率明顯改變前稱為 c 點，此時 $t=755$ 秒，頻率為 -76.08 Hz，耗散為 4.667×10^{-6} 。

將耗散值相對於頻率作圖(*D-f* 圖)所得結果如圖 3.10 所示。

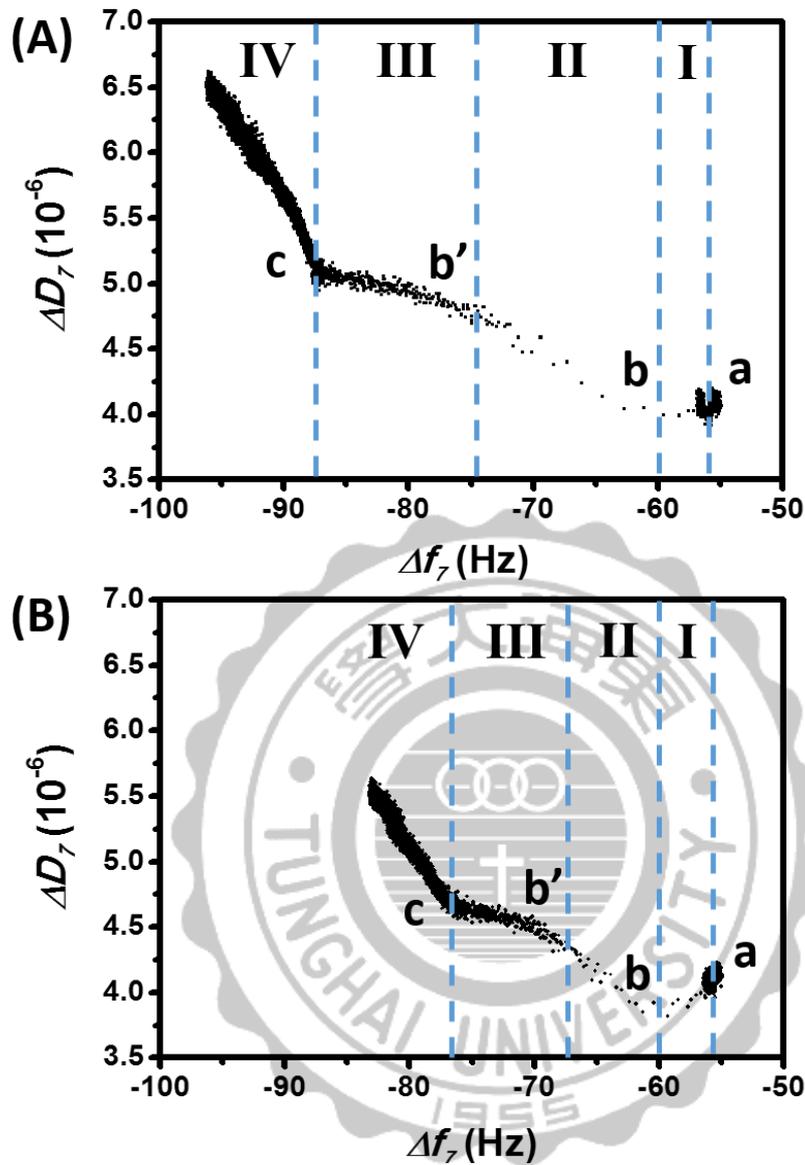


圖 3.11 氧化/還原態之細胞色素 *c* 與心磷脂之質量對耗散圖(*D-f* plot)。圖(A)為氧化態細胞色素 *c* 及；圖(B)為還原態細胞色素 *c* 與含有心磷脂之雙層膜[PC/CL (18:1) = 4/1]之質量對耗散圖(*D-f* plot)。[實驗數據以第 7 泛頻(f_7 、 D_7)呈現]

由 *D-f* 圖觀察得知，於點 *c* 之後頻率隨時間變化明顯變小，且於 *D-f* 圖上斜率卻在點 *c* 處有一明顯轉折點，我們推測點 *c* 為細胞色素 *c* 第一層及第二層吸附層的轉換點，除此之外，根據文獻指出細胞色素 *c* 和心磷脂接觸後 60 秒內發生細胞色素 *c* 分子等級

的構形變化，其中包括細胞色素 *c* 嵌入到脂質雙層膜內，導致細胞色素 *c* 結構展開[34]。

由區間 I (a 點到 b 點) 來看，並觀察到氧化態細胞色素 *c* 約於 15 秒時耗散量降至最低點，頻率往負值移動 1.93 Hz，耗散量減少 0.076×10^{-6} ；還原態細胞色素 *c* 約於 29 秒時耗散量降至最低點，頻率增加 3.03 Hz，耗散量減少 0.212×10^{-6} 。我們推測細胞色素 *c* 嵌入含有心磷脂之微脂質雙層膜內，擾亂(disorder)了雙層膜的排序分佈，因此造成整層膜耗散量降低，除此之外，氧化態及還原態細胞色素 *c* 和心磷脂形成複合體後，造成細胞色素 *c* 構形上的變化，其中氧化態分子構形上的變化大於還原態，形成較為鬆散結構（對於原本脂質層耗散特性影響較小），還原態則維持較紮實(compact)構形，因此還原態造成較大的耗散量降低。另一方面，由於氧化態的鬆散結構（相較於還原態較紮實的分子構形），可吸附較多的水，因此造成頻率有較大的負偏移。

我們亦分析加入細胞色素 *c* 後一分鐘內（區間 I & II）頻率及耗散量的變化，文獻指出加入細胞色素 *c* 後一分鐘內，細胞色素 *c* 與心磷脂之間相互作用且造成細胞色素 *c* 分子構形上的轉變(conformational change)，從我們的結果發現，此段區間氧化態細胞色素 *c* 的頻率負偏移 18.24 Hz，耗散量增加 0.756×10^{-6} ；還原態細胞色素 *c* 造成頻率負偏移 10.43 Hz，耗散量增加 0.290×10^{-6} 。此結果說明氧化態在含有心磷脂的雙層膜有較高的吸附量，因此造成不只質量的增加，亦造成耗散量大於還原態細胞色素 *c*，此與上述我們推測氧化態細胞色素 *c* 和心磷脂形成複合體後結構較為鬆散(loose)的結論一致。

在區間 III (b'點到 c 點)，斜率逐漸降低，推測由於第一層吸附分子層逐漸被細胞色素 *c* 佔滿，心磷脂脂質層對於細胞色素 *c* 的靜電吸引力逐漸降低，導致吸附細胞色素 *c* 的速率減緩。統整第一吸附層(a 點到 c 點)氧化態細胞色素 *c* 斜率為-0.0351，還原態細胞色素 *c* 斜率為-0.0297，指出氧化態細胞色素 *c* 單位頻率（質量）所貢獻的耗散能量平均較還原態細胞色素 *c* 高，也符合文獻中所推論氧化態細胞色素 *c* 於開始吸附一分鐘後即可能進行結構上較大幅度的展開變化，然而，相對於氧化態，還原態細胞色素 *c* 結構展開或鬆散程度較低。

在區間 IV (c 點之後) 中，不論氧化態或還原態，頻率隨時間變化量明顯降低，推論

是第二層細胞色素 *c* 和第一層細胞色素 *c* 的作用力明顯小於細胞色素 *c* 和心磷脂間的靜電作用力，然而單位質量造成耗散量的增加卻大於第一層細胞色素 *c*，其中氧化態細胞色素 *c* 尤其顯著。

表 3.2 微量石英天平—耗散系統監測氧化態及還原態之細胞色素 *c* 與含有心磷脂之雙層膜作用之質量對耗散圖(*D-f* plot)數據。

Name	Unit	a	b	b'	c
Ferric cyt <i>c</i> + CL	Δt (s)	0	15	60	1117
	Δf (Hz)	-56.40	-58.33	-74.64	-87.44
	ΔD (10^{-6})	4.071	3.995	4.827	6.395
Ferrous cyt <i>c</i> + CL	Δt (s)	0	29	60	755
	Δf (Hz)	-56.27	-59.30	-66.70	-76.08
	ΔD (10^{-6})	4.032	3.820	4.322	4.667

實驗結果經由 QTOOL 軟體模擬運算後，模擬採用 Kelvin - Voigt 模式，心磷脂參考參數選用負電價脂質 PS 之密度為 1100 kg/m^3 [45, 46]，細胞色素 *c* 參考參數選用蛋白質之密度為 1350 kg/m^3 [46, 47]；以計算出吸附質量、黏/彈性參數等數據處理。由表 3.3 得知氧化態及還原態之細胞色素 *c* 與含有心磷脂之雙層膜[PC/CL (18:1)= 4/1]作用後對於 shear viscosity 並沒有造成太大影響，而 shear modulus 氧化態細胞色素 *c* 大於還原態 $\mu = 1.44 \times 10^3 \text{ Pa}$ ，由此證明還原態細胞色素 *c* 的剛性大於氧化態。

表 3.3 微量石英天平—耗散系統監測氧化態及還原態之細胞色素 *c* 與含有心磷脂之雙層膜作用。

Assumed density (kg/m ³)	Mass (ng/cm ²)		Shear modulus(μ) (Pa)		Shear viscosity(η) (Pa s)	
	Ferric cyt <i>c</i>	Ferrous cyt <i>c</i>	Ferric cyt <i>c</i>	Ferrous cyt <i>c</i>	Ferric cyt <i>c</i>	Ferrous cyt <i>c</i>
1100 (CL only)	2625	2545	6.334 X 10 ³	6.505 X 10 ³	1.668 X 10 ⁻³	1.679 X 10 ⁻³
1350 (cyt <i>c</i>)	3080	2730	9.217 X 10 ³	1.083 X 10 ⁴	1.678 X 10 ⁻³	1.678 X 10 ⁻³
Δ	455	185	2.883 X 10 ³	4.325 X 10 ³	1 X 10 ⁻⁵	1 X 10 ⁻⁶



3.8 以 10-N-nonyl acridine orange (NAO) 螢光檢測心磷脂

為了確認微量石英天平—耗散監測系統所使用之二氧化矽晶片，所吸附之微脂體含有心磷脂，以 NAO 螢光檢測心磷脂(CL)，NAO 對於心磷脂具有獨特性，實驗結果表示含有 egg PC/CL 之螢光訊號為 21000，兩組控制組分別是 egg PC 螢光訊號為 7200，沒有流過脂質螢光訊號為 2700。實驗證明具有心磷脂吸附於二氧化矽晶片上。

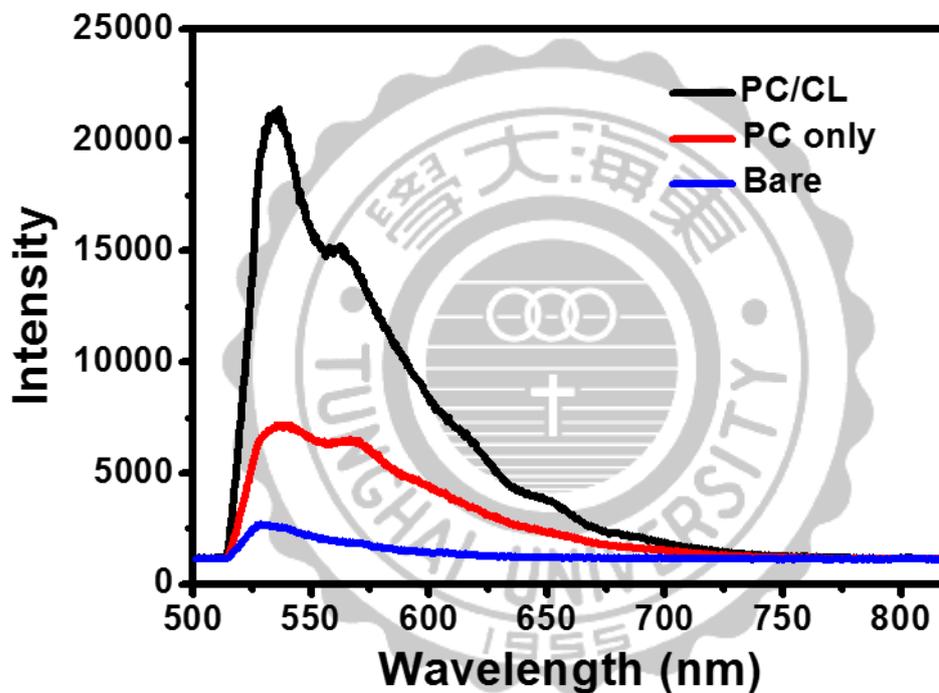


圖 3.12 NAO 螢光強度圖。(A) egg PC/CL；(B) egg PC only；(C)無脂質吸附於二氧化矽晶片。

3.9 蛋白質定量還原態細胞色素 *c*

為了使氧化態細胞色素 *c* 經由檸檬酸鈉還原後，於預濃縮管中回收之還原態細胞色素 *c*，為了要固定還原態細胞色素 *c* 的濃度能夠與氧化態細胞色素 *c* 進行實驗比較，並以 Bradford assay 蛋白質定量法由氧化態細胞色素 *c* 建立之校正曲線。Bradford assay 蛋白質定量法是利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 在酸性環境下會與蛋白質結合的特性，在 G-250 與蛋白質結合後，G-250 的顏色會從紅色轉變成為藍色，此時在 595 nm 波長下，會偵測到較高的吸收峰，且吸收峰值與蛋白質變化量呈正比。

未知濃度之還原態細胞色素 *c* 測得吸收峰值分別為 0.421 及 0.418，以二重複實驗組取平均值，換算還原態細胞色素 *c* 濃度為 0.6875 mg/mL，並以 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 緩衝溶液稀釋回 0.6192 mg/mL (50 μ M 還原態細胞色素 *c*)，確認還原態細胞色素 *c* 與氧化態細胞色素 *c* 的濃度相同。

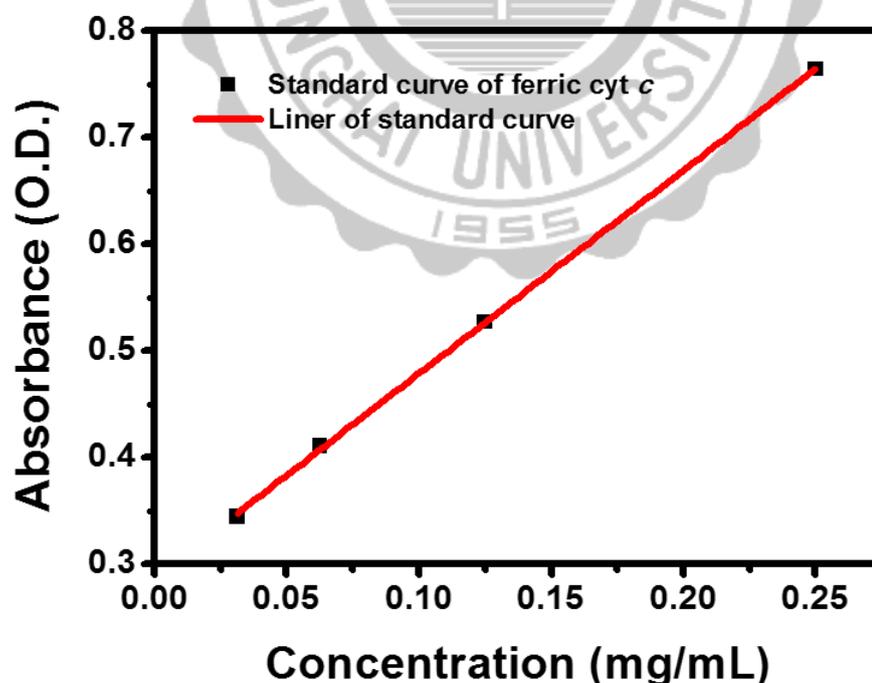


圖 3.13 蛋白質定量校正曲線圖 (細胞色素 *c*)。

第四章結論

研究指出氧化態及還原態細胞色素 *c* 對於細胞凋亡活性有著“開關”的功能，當氧化態細胞色素 *c* 被釋放至細胞質會刺激細胞凋亡而還原態細胞色素 *c* 則不會。然而，不正常的細胞凋亡行為會造成許多疾病的產生，而心磷脂與細胞色素 *c* 複合體為細胞凋亡的前導路徑，因此了解其相互作用機制十分的重要。

我們的研究發現氧化態及還原態細胞色素 *c* 與心磷脂結合後，其電位皆以負方向偏移且氧化態大於還原態，意指與心磷脂結合後細胞色素 *c* 電子傳遞效率變好；並輔以石英晶體微天平—耗散監測系統，並藉由即時監測其行為的過程來了解，我們得知氧化態細胞色素 *c* 與心磷脂的結合量是還原態的 2.4 倍，且與心磷脂的結合後氧化態細胞色素 *c* 能量耗散大於還原態；由此得知，氧化態細胞色素 *c* 對於心磷脂有著較好的親和力，且結合後結構較還原態疏鬆。

我們希望藉由更加了解細胞色素 *c* 對於心磷脂互相作用的機制，對於將來在臨床的控制及治癒有所幫助。

第五章 參考文獻

- [1] C.A. MacMunn, Researches on Myohaematin and the Histohaematin, Proceedings of the Royal Society of London, 39 (1885) 248-252.
- [2] W.R. Fisher, H. Taniuchi, C.B. Anfinsen, On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome c, J Biol Chem, 248 (1973) 3188-3195.
- [3] R. Schweitzer-Stenner, Cytochrome c: A Multifunctional Protein Combining Conformational Rigidity with Flexibility, New Journal of Science, 2014 (2014) 28.
- [4] C.J. Reedy, B.R. Gibney, Heme protein assemblies, Chem Rev, 104 (2004) 617-649.
- [5] J.W.A. Allen, O. Daltrop, J.M. Stevens, S.J. Ferguson, C-type cytochromes: diverse structures and biogenesis systems pose evolutionary problems, Philos T Roy Soc B, 358 (2003) 255-266.
- [6] J. Muenzner, E.V. Pletneva, Structural transformations of cytochrome c upon interaction with cardiolipin, Chem Phys Lipids, 179 (2014) 57-63.
- [7] H. Baum, J.S. Rieske, H.I. Silman, S.H. Lipton, On the mechanism of electron transfer in complex iii of the electron transfer chain, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 57 (1967) 798-805.
- [8] V.E. Kagan, H.A. Bayir, N.A. Belikova, O. Kapralov, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, J. Jiang, D.A. Stoyanovsky, P. Wipf, P.M. Kochanek, J.S. Greenberger, B. Pitt, A.A. Shvedova, G. Borisenko, Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death, Free radical biology & medicine, 46 (2009) 1439-1453.
- [9] F. Muller, The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging, J Am Aging Assoc, 23 (2000) 227-253.
- [10] G.W. Bushnell, G.V. Louie, G.D. Brayer, High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c, Journal of molecular biology, 214 (1990) 585-595.

- [11] K. Pfeiffer, V. Gohil, R.A. Stuart, C. Hunte, U. Brandt, M.L. Greenberg, H. Schagger, Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes, *J Biol Chem*, 278 (2003) 52873-52880.
- [12] M. Fry, D.E. Green, Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain, *J Biol Chem*, 256 (1981) 1874-1880.
- [13] T.H. Haiens, N.A. Dencher, Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation, *Febs Lett*, 528 (2002) 35-39.
- [14] V.E. Kagan, V.A. Tyurin, J.F. Jiang, Y.Y. Tyurina, V.B. Ritov, A.A. Amoscato, A.N. Osipov, N.A. Belikova, A.A. Kapralov, V. Kini, I.I. Vlasova, Q. Zhao, M.M. Zou, P. Di, D.A. Svistunenko, I.V. Kurnikov, G.G. Borisenko, Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors, *Nat Chem Biol*, 1 (2005) 223-232.
- [15] P. Mitchell, Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism, *Nature*, 191 (1961) 144-148.
- [16] R.L. Nussbaum, Mining yeast in silico unearths a golden nugget for mitochondrial biology, *The Journal of Clinical Investigation*, 115 (2005) 2689-2691.
- [17] S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic pathology*, 35 (2007) 495-516.
- [18] H. Bayir, V.E. Kagan, Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis - there is nothing more practical than a good theory, *Crit Care*, 12 (2008).
- [19] A. Ashkenazi, Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists, *Nature Reviews Drug Discovery*, 7 (2008) 1001-1012.
- [20] R.M. Friedlander, Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases, *The New England journal of medicine*, 348 (2003) 1365-1375.
- [21] M.C. Wei, T. Lindsten, V.K. Mootha, S. Weiler, A. Gross, M. Ashiya, C.B. Thompson, S.J. Korsmeyer, tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release

cytochrome c, *Gene Dev*, 14 (2000) 2060-2071.

[22] Y.P. Ow, D.R. Green, Z. Hao, T.W. Mak, Cytochrome c: functions beyond respiration, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9 (2008) 532-542.

[23] M.P. Mattson, Apoptosis in neurodegenerative disorders, *Nat Rev Mol Cell Bio*, 1 (2000) 120-129.

[24] A. Ashkenazi, Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists, *Nature reviews. Drug discovery*, 7 (2008) 1001-1012.

[25] H. Bayir, B. Fadeel, M.J. Palladino, E. Witasz, I.V. Kurnikov, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, A.A. Amoscato, J. Jiang, P.M. Kochanek, S.T. DeKosky, J.S. Greenberger, A.A. Shvedova, V.E. Kagan, Apoptotic interactions of cytochrome c: redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria, *Biochimica et biophysica acta*, 1757 (2006) 648-659.

[26] Y. Shidoji, K. Hayashi, S. Komura, N. Ohishi, K. Yagi, Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation, *Biochem Bioph Res Co*, 264 (1999) 343-347.

[27] V.E. Kagan, H.A. Bayir, N.A. Belikova, O. Kapralov, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, J.F. Jiang, D.A. Stoyanovsky, P. Wipf, P.M. Kochanek, J.S. Greenberger, B. Pitt, A.A. Shvedova, G. Borisenko, Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death, *Free Radical Bio Med*, 46 (2009) 1439-1453.

[28] G.P. Gorbenko, Structure of cytochrome c complexes with phospholipids as revealed by resonance energy transfer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1420 (1999) 1-13.

[29] M. Rytomaa, P.K. Kinnunen, Reversibility of the binding of cytochrome c to liposomes. Implications for lipid-protein interactions, *J Biol Chem*, 270 (1995) 3197-3202.

[30] E.K.J. Tuominen, C.J.A. Wallace, P.K.J. Kinnunen, Phospholipid-cytochrome c interaction - Evidence for the extended lipid anchorage, *J Biol Chem*, 277 (2002) 8822-8826.

- [31] F. Sinibaldi, B.D. Howes, M.C. Piro, F. Polticelli, C. Bombelli, T. Ferri, M. Coletta, G. Smulevich, R. Santucci, Extended cardiolipin anchorage to cytochrome c: a model for protein-mitochondrial membrane binding, *J Biol Inorg Chem*, 15 (2010) 689-700.
- [32] J. Hanske, J.R. Toffey, A.M. Morenz, A.J. Bonilla, K.H. Schiavoni, E.V. Pletneva, Conformational properties of cardiolipin-bound cytochrome c, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (2012) 125-130.
- [33] Y.N. Hong, J. Muenzner, S.K. Grimm, E.V. Pletneva, Origin of the Conformational Heterogeneity of Cardiolipin-Bound Cytochrome c, *J Am Chem Soc*, 134 (2012) 18713-18723.
- [34] J. Muenzner, J.R. Toffey, Y.N. Hong, E.V. Pletneva, Becoming a Peroxidase: Cardiolipin-Induced Unfolding of Cytochrome c, *J Phys Chem B*, 117 (2013) 12878-12886.
- [35] P.X. Qi, R.A. Beckman, A.J. Wand, Solution structure of horse heart ferricytochrome c and detection of redox-related structural changes by high-resolution ¹H NMR, *Biochemistry*, 35 (1996) 12275-12286.
- [36] Z.H. Pan, D.W. Voehringer, R.E. Meyn, Analysis of redox regulation of cytochrome c-induced apoptosis in a cell-free system, *Cell Death Differ*, 6 (1999) 683-688.
- [37] D. Suto, K. Sato, Y. Ohba, T. Yoshimura, J. Fujii, Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via a haem redox state-independent mechanism, *Biochemical Journal*, 392 (2005) 399-406.
- [38] G.C. Brown, V. Borutaite, Regulation of apoptosis by the redox state of cytochrome c, *Bba-Bioenergetics*, 1777 (2008) 877-881.
- [39] D. Suto, K. Sato, Y. Ohba, T. Yoshimura, J. Fujii, Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via a haem redox state-independent mechanism, *Biochemical Journal*, 392 (2005) 399-406.
- [40] M.V. Voinova, M. Jonson, B. Kasemo, 'Missing mass' effect in biosensor's QCM

applications, *Biosens Bioelectron*, 17 (2002) 835-841.

[41] J.M. Petit, O. Huet, P.F. Gallet, A. Maftah, M.H. Ratinaud, R. Julien, Direct Analysis and Significance of Cardiolipin Transverse-Distribution in Mitochondrial Inner Membranes, *Eur J Biochem*, 220 (1994) 871-879.

[42] J.M. Petit, A. Maftah, M.H. Ratinaud, R. Julien, 10N-nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria, *Eur J Biochem*, 209 (1992) 267-273.

[43] P. Ascenzi, F. Polticelli, M. Marino, R. Santucci, M. Coletta, Cardiolipin Drives Cytochrome c Proapoptotic and Antiapoptotic Actions, *Iubmb Life*, 63 (2011) 160-165.

[44] A. El Kasmi, J.M. Wallace, E.F. Bowden, S.M. Binet, R.J. Linderman, Controlling interfacial electron-transfer kinetics of cytochrome c with mixed self-assembled monolayers, *J Am Chem Soc*, 120 (1998) 225-226.

[45] P.A. Cuypers, J.W. Corsel, M.P. Janssen, J.M.M. Kop, W.T. Hermens, H.C. Hemker, The Adsorption of Prothrombin to Phosphatidylserine Multilayers Quantitated by Ellipsometry, *J Biol Chem*, 258 (1983) 2426-2431.

[46] M. Edvardsson, S. Svedhem, G. Wang, R. Richter, M. Rodahl, B. Kasemo, QCM-D and Reflectometry Instrument: Applications to Supported Lipid Structures and Their Biomolecular Interactions, *Anal Chem*, 81 (2009) 349-361.

[47] C. Larsson, M. Rodahl, F. Hook, Characterization of DNA immobilization and subsequent hybridization on a 2D arrangement of streptavidin on a biotin-modified lipid bilayer supported on SiO₂, *Anal Chem*, 75 (2003) 5080-5087.