

國立交通大學

理學院 應用科技 學程

碩 士 論 文

探討 Sortase A 突變株 D165A、K196T 和
P94S/D160N/D165A/K196T 的反應性

Enzymatic activity of Sortase A mutants—D65A, K196T and
P94S/D160N/D165A/K196T

研 究 生：李達人

指導教授：李耀坤 教授

中 華 民 國 一 百 零 二 年 二 月

摘要

轉肽酶 Sortase A 藉由特殊的胺基酸序列—N 端的 LPETG 序列與 C 端的 GGGGG 序列，可將兩端不同功能的蛋白質或胜肽段連接起來，同時保持正確的構形，形成多功能嵌合蛋白。本研究藉由兩種不同的螢光受質 Abz-LPETG-Dnp 與 GGGGGK-FITC，來描述 Sortase A 野生株與突變株的水解及接合之功能。發現 Sortase A 的 P94S、D160N、D165A、K196T 四點突變株比 Sortase A 的野生株在水解初速率上大 3.14 倍，在接合初速率上大 1.18 倍。同時應用 Sortase A 的作用，將 GGGGGK-FITC 的胜肽段接合在具有 LPETG 的 QCM 晶片載體上。未來可擴大此應用在具有 LPETG 的晶片載體上，接合不同的抗體作探針進行免疫檢查。

Abstract

Sortase A is kind of transpeptidase which can connect two different function proteins or peptides together to form the multifunction chimeric protein without interrupt the structure and function by using the special amino acid sequences: the N terminal LPETG and the C terminal GGGGG. In this study, we compare the function of hydrolysis and connection between the wildtype and mutant line by using two different fluorescence substrates the Abz-LPETG-Dnp and GGGGGK-FITC. We discover the P94S, D160A, D165A, K196T 4 point mutant which is 3.14 times faster in hydrolysis and 1.18 times faster in connection initial rate than the wildtype sortase A. By sortase A, we can link the protein or peptide with GGGGGK-FITC sequence to the QCM chip with LPETG sequence; using this method, we can link the antibodies to a chip to do the immunoassays.

誌謝辭

從民國九十八年七月至一百零二年二月，從桃園龍潭至新竹市交通大學來回約百公里每週三到五趟的路程終於在今日可以立下一個里程碑。

民國九十八年在家人的鼓勵下考取了交通大學理學院碩士專班應用科技組，雖然大學是唸物理系，目前從事教育工作，但因對酵素科技感到興趣便想進修相關的知識。感謝李耀坤教授能給我這個機會進入酵素科技實驗室，從對分子生物實驗操作的一無所知到熟悉相關實驗操作，對我來說實是巨大的挑戰。所幸在三年半多的夜晚與假日，實驗室清冷的燈光下，總有學長姐、同學、學弟妹給予極大的幫忙與鼓勵，如岳進、惜禾、家瑜、媛婷、裕國、晟富、模沅、彰璟、安芃、丞偉、曉眉、信宏、嘉郡、智仁等，尤其是假日見到家瑜、模沅、彰璟、晟富、丞偉出現在實驗室的身影總令人感到心安，對藥品的擺放位置、儀器的操作、實驗的內容問題總可得到滿意的答案或解決的辦法。

感謝爸爸、媽媽、明彰表哥、惠美與小采霓的支持與鼓勵，一路走來形單心不單，在李耀坤老師的指導下完成本篇論文。在此 致上萬分感謝。

目錄

摘要	I
Abstract	I
誌謝辭	II
目錄	III
圖目錄	V
表目錄	VI
第一章 緒論	1
1-1 蛋白質接合酵素簡介	1
1-2 Sortase A 的功能	2
1-3 Sortase A 活性區域的結構	4
1-4 Sortase A 的活性部位與作用機制	5
1-4-1 Sortase A 辨認受質的活性部位	5
1-4-2 鈣離子對 Sortase A 的影響	7
1-4-3 Sortase A 與受質反應的作用機制	8
1-4-4 溫度對 Sortase A 的影響	9
1-5 Sortase A 之活性檢定	11
1-6 研究目的	12
第二章 實驗材料與方法	14
2-1 實驗藥品與儀器	14
2-2 Sortase A 質體的取得與定點突變	16
2-2-1 野生型表現系統的建立	16
2-2-2 定點突變	18
2-2-3 酵素的誘導	20
2-2-4 酵素的純化	21
2-2-5 決定蛋白質分子量與純度	22
2-2-6 蛋白質身份的鑑定	23
2-2-7 酵素的保存	24
2-2-8 蛋白質濃度的測定	24
2-3 Sortase A 反應機制之研究	25
2-3-1 水解活性的檢測與比較	25
2-3-2 接合活性的檢測與比較	26
第三章 結果與討論	28
3-1 酵素的基因序列、表現與純化	28
3-1-1 酵素的基因序列	28
3-1-2 酵素的表現與純化	29

3-1-3	Sortase 野生株與突變株的分子量	32
3-1-4	野生型酵素濃度測定	32
3-2	野生型與突變型酵素的活性檢測	34
3-2-1	Sortase A 野生株的活性檢測	34
3-2-2	水解活性與比較	36
3-2-3	接合活性的檢測	37
3-2-4	接合活性的比較	40
3-2-5	野生株與突變株的活性比較討論	43
3-3	Sortase A 四點突變株之應用	44
第四章	結論	46
第五章	未來研究方向	47
References		49
附錄一	: DNA 序列與胺基酸序列對照表	55
附錄二	: MALDI-TOF 分析的分子量圖譜	58
附錄三	: Abz-LPETG-Dnp 被 Sortase A 水解的螢光量值對時間紀錄表	59
附錄四	: 不同時間點的 MRM 的面積圖譜	64

圖目錄

圖 1-1：Sortases 種類示意圖	2
圖 1-2：Sortase A 功能示意圖	3
圖 1-3：Sortase A Δ N59 的結構	4
圖 1-4：Sortase A Δ N59 的電性分佈圖	5
圖 1-5：Sortase A Δ N59 活性部位結合 LPETG 的 X-ray 晶體結構圖	6
圖 1-6：鈣離子對 Sortase A 作用示意圖	7
圖 1-7：鈣離子結合對 β 6/ β 7 區域的影響示意圖	8
圖 1-8：“LPXT—酵素”中間物的形成示意圖	8
圖 1-9：Sortase A 的水解與接合機制示意圖	9
圖 1-10：Circular Dichroism (CD) Spectroscopy	10
圖 1-11：Abz-LPETG-Dnp 之結構式	11
圖 1-12：GGGGGK-FITC 結構圖	12
圖 1-13：Sortase A 定點突變位置圖	13
圖 2-1：Sortase A 野生型表現系統質體的建立	16
圖 2-2：Sortase A 野生型表現系統質體的驗證	17
圖 3-1：Sortase A 野生型及突變株胺基酸定序表	29
圖 3-2：Sortase A 野生株及突變株的 SDS-page 蛋白質分子量	30
圖 3-3：Sortase A 野生株的 MALDI-TOF 分析圖譜	31
圖 3-4：Sortase A 野生株的 Mascot Score	31
圖 3-5：蛋白質標準品對 OD595 之標準檢量線	33
圖 3-6：Abz_LPETG_Dnp 被 Sortase A 分解的 LC/MS 圖譜	35
圖 3-7：Sortase A 野生株與突變株水解 Abz-LPETG-Dnp 的螢光值對時間關係圖	36
圖 3-8：Sortase A 野生株與突變株水解活性的反應初速率	37
圖 3-9：Sortase A 野生型對 Abz_LPETG_Dnp 與 GGGGGKFITC 的反應質譜圖	38
圖 3-10：生成物荷質比 691 訊號的 MSMS 分析	39
圖 3-11：Abz-LPETGGGGGK-FITC 的 MRM 分析	41
圖 3-12：時間對 MRM 面積的關係圖	42
圖 3-13：Sortase A 野生株與突變株接合活性的反應初速率	42
圖 3-14：SortPro 在 QCM 上的應用示意圖	45
圖 3-15：接合 GGGGGK—FITC 的 QCM 晶片圖	45
圖 5-1：Sortase A 的 FRET 研究示意圖	47

表目錄

表 1-1：Sortase A 及其突變株的活性檢測	10
表 1-2：Sortase A 野生株與突變株結構改變的臨界溫度	11
表 2-1：單一突變點寡核苷酸模版引子	18
表 2-2：PCR 反應條件	19
表 2-3：四個突變點寡核苷酸模版引子	20
表 2-4：SDS 膠片配置表	22
表 2-5：Sample loading buffer 配置表	23
表 2-6：LC—MASS 的分析條件表	27
表 3-1、不同濃度 BSA 標準品與 OD595 之吸收值	32
表 3-2：Sortase A 野生株與突變株的濃度	34
表 3-3：Abz_LPETGGGGGKFITC 訊號的 MSMS 分析表	40
表 3-4：每隔 5 分鐘的 Abz-LPETGGGGGK-FITC 之 MRM 面積積分值	41
表 3-5：野生株與突變株的活性比較表	43
表 3-6：Sortase A 水解反應研究結果之相對誤差	44

第一章 緒論

1-1 蛋白質接合酵素簡介

蛋白質接合酵素可將不同的胜肽段或不同功能的蛋白質與以接合後，形成新的多功能性蛋白質（或稱嵌合蛋白），可應用在蛋白質的研究、生化檢測或醫療上藥物傳送系統的研究等。

以化學操作方式將不同蛋白質接合的多種方法被發表出來，如 Dawson 在 2000 年提到以化學合成方法連接不同的胜肽或蛋白質(1)、根據不同策略利用內含子做蛋白質的接合(2)、以半胱氨酸或其它胺基酸的特殊殘基之親合性來接合(3)。但這些接合方式需要高度的操作技術，而且容易被非相關的胺基酸殘基或蛋白質阻擋接合位置，而影響蛋白質的接合。

在生物化學操作上最常表現嵌合蛋白的方法，是設計融合的基因序列，再表現出嵌合蛋白。但此方法常因融合基因中的組成基因序列各有其適合的表現系統與條件，故易遇到嵌合蛋白質不易表現、大量表現但表現在涵包體、或表現在溶解態卻因折疊不正確而無活性的狀況出現(4)。

為避免融合基因的表現限制，在其組成基因中各加入特殊蛋白質序列的基因，讓組成基因能在原本的表現系統與條件中表現且保持原正確的構形，再透過蛋白質間特殊的序列（N 端為 LPETG，C 端為 GGGGG），讓轉譯後的蛋白質經酵素 Sortases 作用而互相連接以形成新的嵌合蛋白質(5, 6)。

Sortases 是在革蘭氏陽性菌中發現的半胱氨酸轉移胜肽酶，依其辨認序列的同源性及功能性可分為四種類型，分別為 Sortase A、SortaseB、SortaseC、SortaseD，如下圖 1-1(7, 8)。Sortase A 透過 LPXTG（Leucine-Proline-X-Threonine-Glycine; X 為任意胺基酸）的特殊序列，能催化表面蛋白與細菌細胞壁的共價連結，此反應與細菌粘附、免疫反應、細菌感染，或噬菌體結合的受體功能有關(9)。Sortase B 透過 NPQTN 的特殊序列，讓細菌能獲得

鐵離子(10)。Sortase C 透過 LPXTG 的特殊序列催化細菌表面鞭毛的形成(11)。Sortase D 透過 LPNTA 的特殊序列與孢子的形成有關(9, 12)。

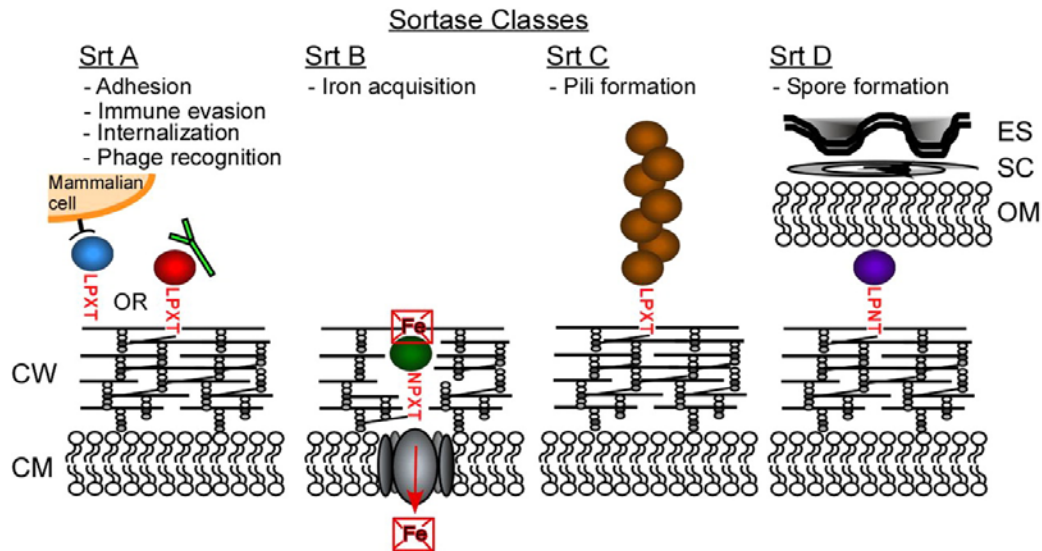


圖 1-1：Sortases 種類示意圖 (9)

Sortases 藉著辨認特殊序列，催化不同胜肽或蛋白質連結的特性，為多功能嵌合蛋白的合成提供一個有別於化學合成或生物化學上表現融合基因的方法。其中 Sortase A 被廣泛的研究，應用在不同功能蛋白的連接上。

1-2 Sortase A 的功能

在革蘭氏陽性菌上 Sortase 扮演重要的角色，若缺少了 sortases 的作用，則細菌將喪失感染的能力，如金黃色葡萄球菌若無 sortase A 的作用，則不會成為動物的感染源(13)。

在革蘭氏陽性菌中，Sortase A 其 N 端在細胞膜內，其 C 端在細胞壁中，能辨認細菌表面蛋白或訊號胜肽中 LPXTG 的特殊序列（X 為任意胺基酸），讓表面蛋白與與細菌的細胞壁肽聚糖的 GGGGG 序列以共價鍵接合(12, 14)。

以圖 1-2 Sortase A 功能示意圖來介紹攜帶 LPXTG 的胜肽段如何被 Sortase A 連結在細胞壁上。

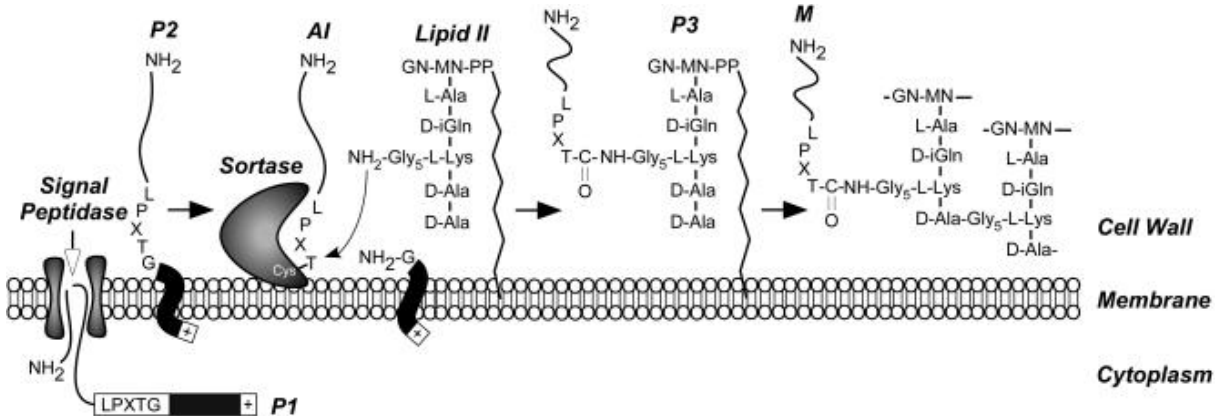


圖 1-2：Sortase A 功能示意圖 (12)

在細胞質中的訊號胜肽會與 LPXTG 序列先合成一個聚合胜肽如圖 1-2 中的“P1”。其中包含 N 端的訊號胜肽和 C 端的 LPXTG 序列。訊號序列透過 Sec protein translocation system(15) 使得聚合胜肽從細胞質中被導出“P2”。聚合胜肽被細胞分泌導出時其 C 端仍保留疏水且帶正電的 LPXTG 特殊序列。Sortase A 是附著在細胞膜上的轉移胜肽酶，藉由酶上的半胱胺酸(cysteine)活性部位，將 LPXTG 中蘇胺酸(threonine; T)與甘胺酸(glycine; G)的鍵結分離後，半胱胺酸與蘇胺酸間產生醯鍵形成“聚合胜肽—酵素”的醯基中間產物“AI”。而細胞膜上的前導物 Lipid II 中有五個聚合的甘胺酸，甘胺酸上的胺基會攻擊半胱胺酸與蘇胺酸間的醯鍵，使得甘胺酸與蘇胺酸重新連結，讓訊號胜肽藉由 LPXT—GGGGG 的橋樑與 Lipid II 相連接形成新的前導物“P3”。“P3”再連接到細胞壁上，生成錨固在細胞壁上的表面蛋白“M”。

利用 Sortase 的特性，在不同功能的胜肽或蛋白質中，以基因工程分別在 N 端加入 LPXTG 序列與 C 端加入 GGGGG 序列，就可將兩種不同的胜肽或蛋白質連接，形成新的胜肽或嵌合蛋白(14, 16, 17)。其接合受質非常廣泛如螢光蛋白(18, 19)、胜肽核苷酸(20)、糖蛋白連結(21)、聚合物(22)、固態物質(23, 24)、脂質(25, 26)、微小粒子(27)等。

其應用方法，如利用 Sortase A 接合不同的抗體在特定載體上作探針進行免疫檢查

(28)、製造傳遞蛋白(29)或標示特定領域以利核磁共振的觀察(30)等，顯示 Sortase A 的催化加成反應有廣泛的應用性(31, 32)，促使吾人對利用 Sortase A 生產嵌合蛋白的優化條件有更深入的探討與研究。

1-3 Sortase A 活性區域的結構

Sortase A 有 206 個胺基酸，其 N 端在細胞質中可將 Sortase A 錨固在細胞膜，而 C 端的部份在細胞壁中是催化反應的區域(13, 14)。

將缺少 N 端的 24 個胺基酸 (Sortase A Δ N24) 或 59 個胺基酸的基因重組 Sortase A (Sortase A Δ N59) 被證實能在大腸桿菌之水溶狀態細胞質液中大量表現(16, 33, 34)，且讓具有 LPXTG 序列 (X 可以是任意胺基酸) 與 GGGGG 的胜肽段相互連結(35)。

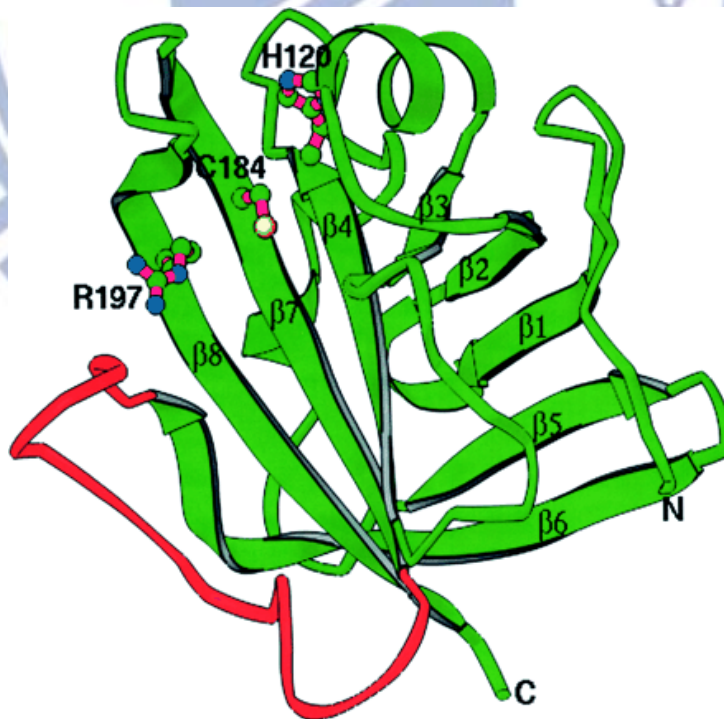


圖 1-3：Sortase A Δ N59 的結構 (35)

Sortase A $_{\Delta N59}$ 結構如圖 1-3，其核心主要有 8 段 β 折板，一個 α 螺旋與 2 個連結 β 折板的 3 折螺旋 ($\beta 3/\beta 4$ 與 $\beta 6/\beta 7$)。其中 $\beta 4$ 、 $\beta 7$ 、 $\beta 8$ 形成一個疏水性的孔洞，而連結 $\beta 6$ 、 $\beta 7$ 的螺旋線段具有彈性，使得 sortase 能像捕手手套一樣能在活性條件下改變結構捉住受質。

1-4 Sortase A 的活性部位與作用機制

1-4-1 Sortase A 辨認受質的活性部位

Sortase A $_{\Delta N59}$ 與胺基酸序列 LPETG (Leucine-Proline-Glutamate -Threonine-Glycine) 相結合時其電性分佈圖如下圖 1-4(35)。

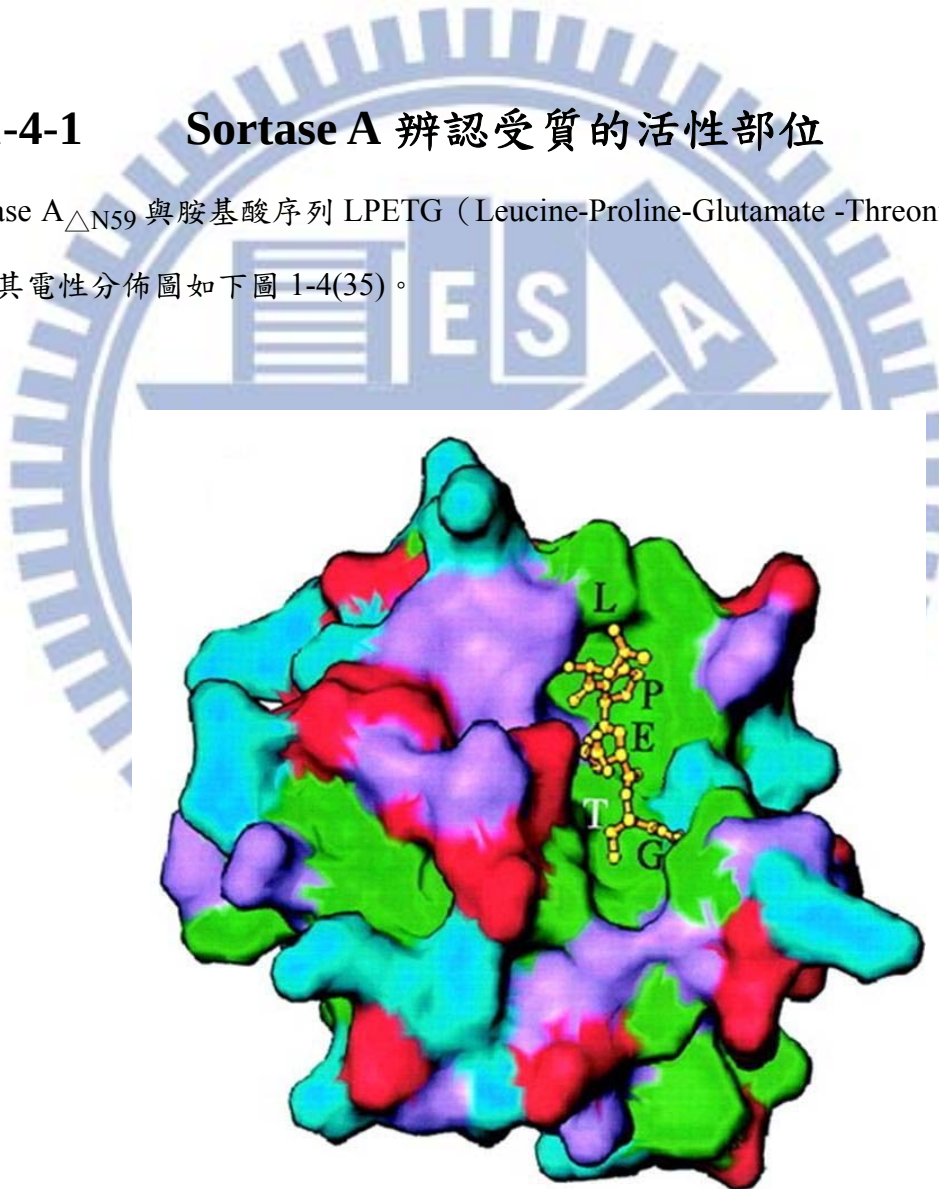


圖 1-4 :Sortase A $_{\Delta N59}$ 的電性分佈圖 (35)

圖中深綠色部份為疏水區、紫色為極性的殘基，青色為正電區域，紅色是酸性殘基。

因 LPETG 序列具疏水性且帶正電，故會與 Sortase A Δ N59 結構中的 β 4、 β 7、 β 8 形成的疏水性孔洞相親合。

當 LPETG 與 Sortase A Δ N59 相親合後，各活性部位殘基與 LPETG 作用的 X-ray 晶體結構如下圖 1-5 (16)。

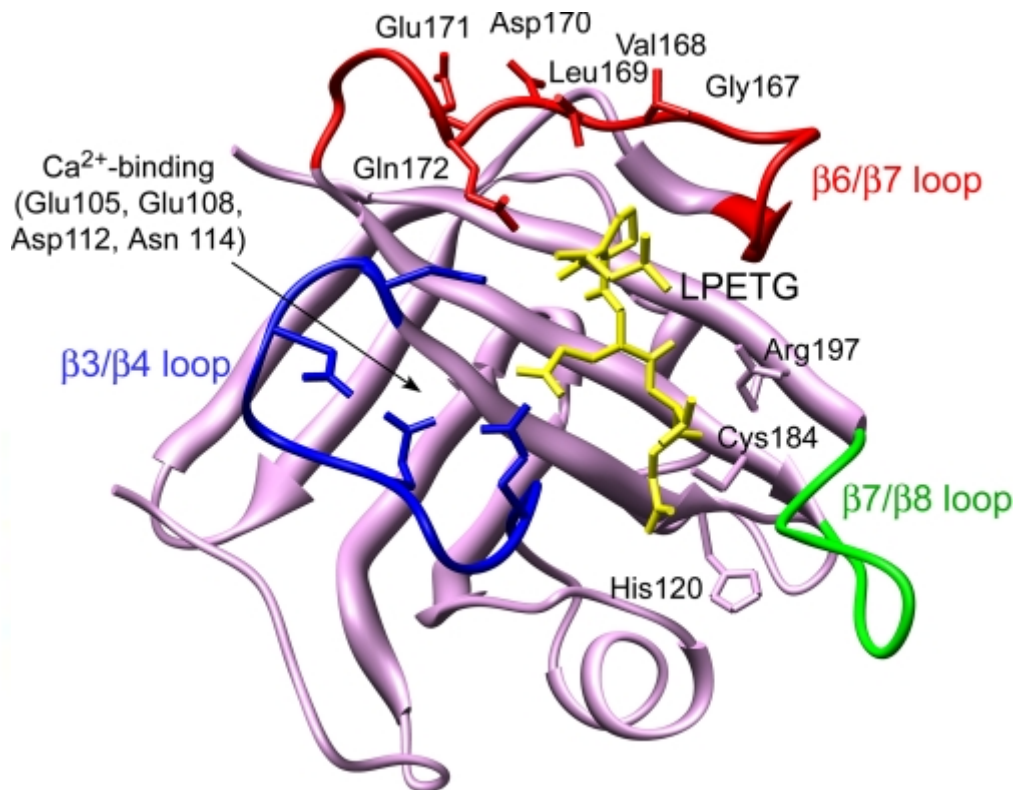


圖 1-5:SrtA Δ N59 活性部位結合 LPETG 的 X-ray 晶體結構圖 (16)

在圖 1-5 中，當 LPETG（黃色）被束縛在活性部位時，各 β 折板上活性部位與 LPETG 有如下作用： β 3/ β 4（藍）區域與鈣離子的結合有關(36)。 β 6/ β 7（紅）區域與辨認 LPETG 中的 LP 殘基有關(35-37)，其中 Val-168 和 Leu-169 被認為是重要的識別殘基、Glu-171 為鈣離子結合後的作用有關，而 Gly-167、Asp-170 和 Gln-172 則無被發現與催化作用有關(16)。 β 7/ β 8（綠）區域與 GGG 的辨認有關(35, 38)。

1-4-2 鈣離子對 Sortase A 的影響

當 $\beta 3/\beta 4$ 區域上的殘基 Glu-105, Glu-108, Asp-112, and Asn-114 與鈣離子結合時，會透過鈣離子拉住 $\beta 6/\beta 7$ 區域上的 Glu-171，如圖 1-6，讓原本具有彈性的 $\beta 6/\beta 7$ 區域改變成有次序的構形(36)。

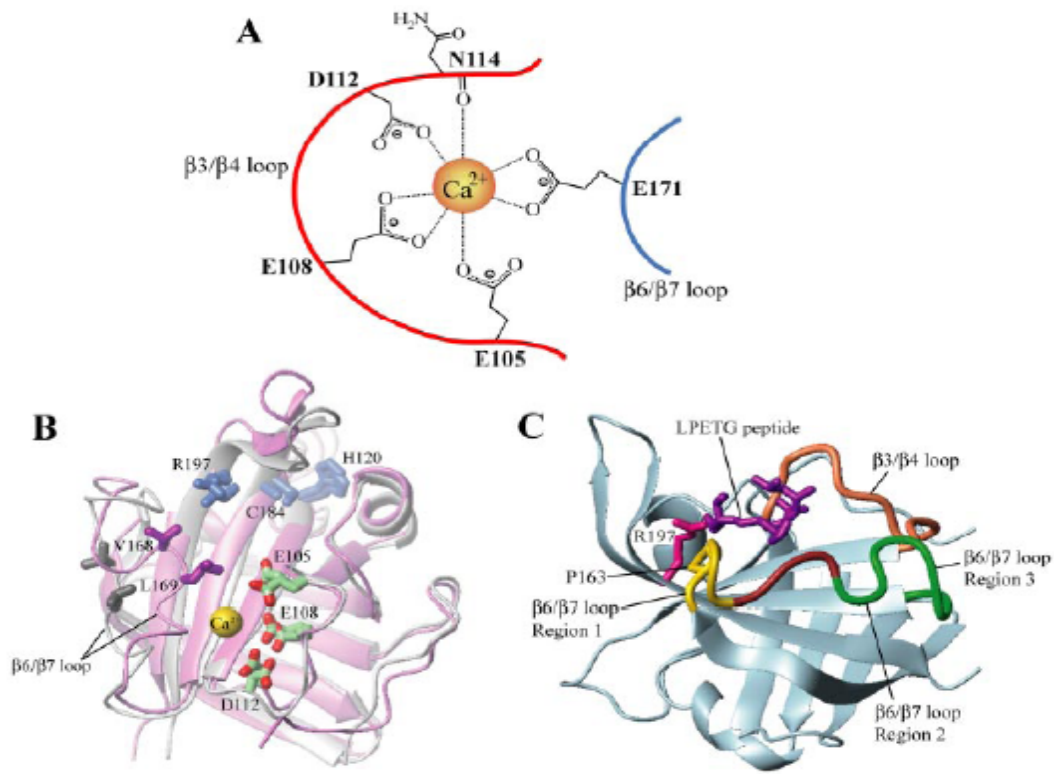


圖 1-6：鈣離子對 Sortase A 作用示意圖 (36)

而 $\beta 6/\beta 7$ 區域改變成有次序的構形時，有助於辨認 LPXTG 序列，如圖 1-7。當 LPXTG 與 Sortase A 結合後， $\beta 7$ 上的 Cys184 能裂解 LPXTG 序列中的蘇胺酸 (threonine; T) 與甘胺酸 (glycine; G)。

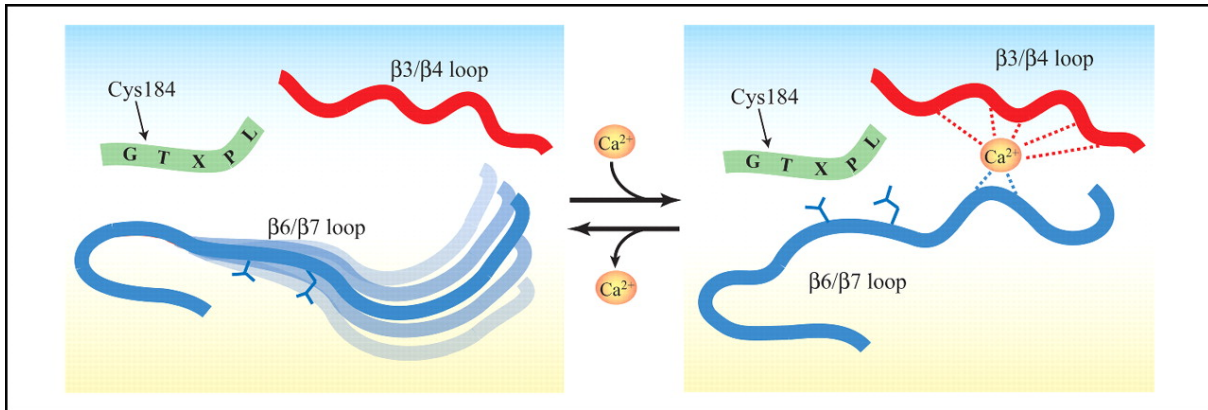


圖 1-7：鈣離子結合對 $\beta 6/\beta 7$ 區域的影響示意圖 (36)

1-4-3 Sortase A 與受質反應的作用機制

當 LPXTG 與 Sortase 疏水性孔洞相親合時，亮氨酸 L 與脯氨酸 P 被 $\beta 6/\beta 7$ 區域辨認，且分佈在 Sortase A 疏水孔洞中的三個重要活性部位：分別為在 $\beta 7$ 上的 C184、在 $\beta 8$ 上的 R197 與在 $\beta 4$ 上的 H120，開始對蘇氨酸 T 與甘氨酸 G 作用(39)，其作用示意圖如圖 1-8。半胱氨酸 Cys184 的氫硫鍵會對 LPXTG 序列中蘇氨酸 Threonine 上碳鏈上的羰基產生親核攻擊，在酵素與受質間形成硫脂鍵(thioester)，羰基與氧的共價鍵電子被擠壓至氧上，Arg197 的氮基因帶正電，提供庫倫吸引力吸住電子電，但因氧原子的陰電性大於氮基，故電子再回振到羰基上形成碳氧原子間的共價鍵，此時為滿足八隅體的穩定，碳原子與氮原子間的鍵結被切斷，電子轉移到 His120 殘基，His120 釋出氫離子，進而產生“LPXT-酵素”的中間物(40, 41)。

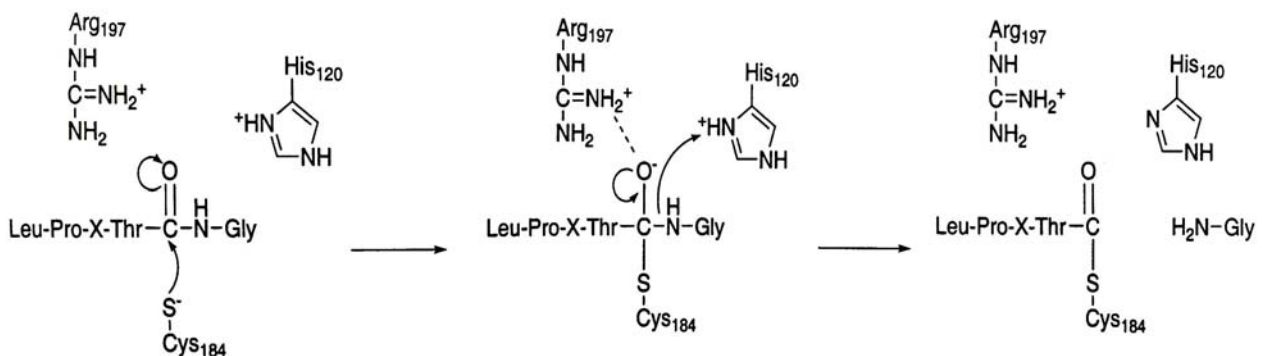


圖 1-8：“LPXT-酵素”中間物的形成示意圖 (40)

當“LPXT-酵素”中間物遇到五甘胺酸（pentaglycine）時，甘胺酸上的氨基對“LPXT-酵素”中間物產生親核性攻擊，使“LPXT-酵素”中間物的蘇胺酸 T 與五甘胺酸的 G 產生醯胺鍵（amide bond）的連結，形成 LPXT-GGGGG 的生成物。而 Sortase A 再度被釋放於溶液中，進行下一個循環的反應(42)，如圖 1-9。

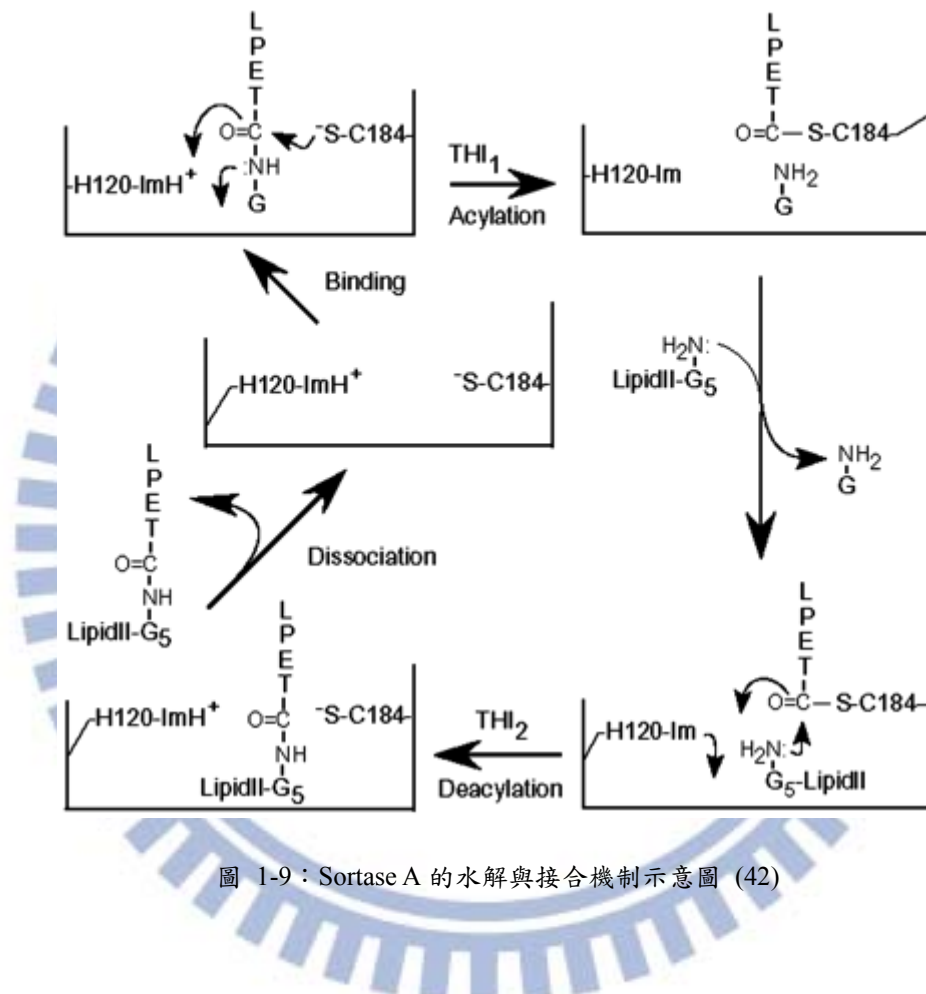


圖 1-9：Sortase A 的水解與接合機制示意圖 (42)

1-4-4 溫度對 Sortase A 的影響

根據 Matthew L. Bentley 等人的研究(16)，Sortase A 及其突變株在 37°C 下在水解 Abz-LPETGG-DNP 的活性如表 1-1。

表 1-1：Sortase A 及其突變株的活性檢測 (16)

Kinetic parameters of SrtA alanine scan mutants

Enzyme	k_{cat}	K_m	k_{cat}/K_m	Activity decrease from wt
	s^{-1}	mM	$M^{-1} s^{-1}$	-fold
wt (rec)	1.10 ± 0.06	8.76 ± 0.78	125 ± 18	
G167A	1.13 ± 0.16	8.70 ± 2.0	129 ± 48	n.c. ^a
V168A	0.15 ± 0.01	6.56 ± 0.64	22.7 ± 3.6	5.5
L169A	$1.23 \times 10^{-2} \pm 0.01 \times 10^{-2}$	9.14 ± 0.15	1.35 ± 0.14	93
D170A	1.09 ± 0.13	8.13 ± 1.7	133 ± 43	n.c.
E171A	0.16 ± 0.01	6.74 ± 0.69	23.1 ± 3.6	5.4
Q172A	1.13 ± 0.11	12.7 ± 1.9	89.3 ± 22	1.4

^a n.c., no change.

以 Circular Dichroism (CD) Spectroscopy 波長 216 nm 檢測其二級結構，發現旋光度與溫度的關係如圖 1-10。

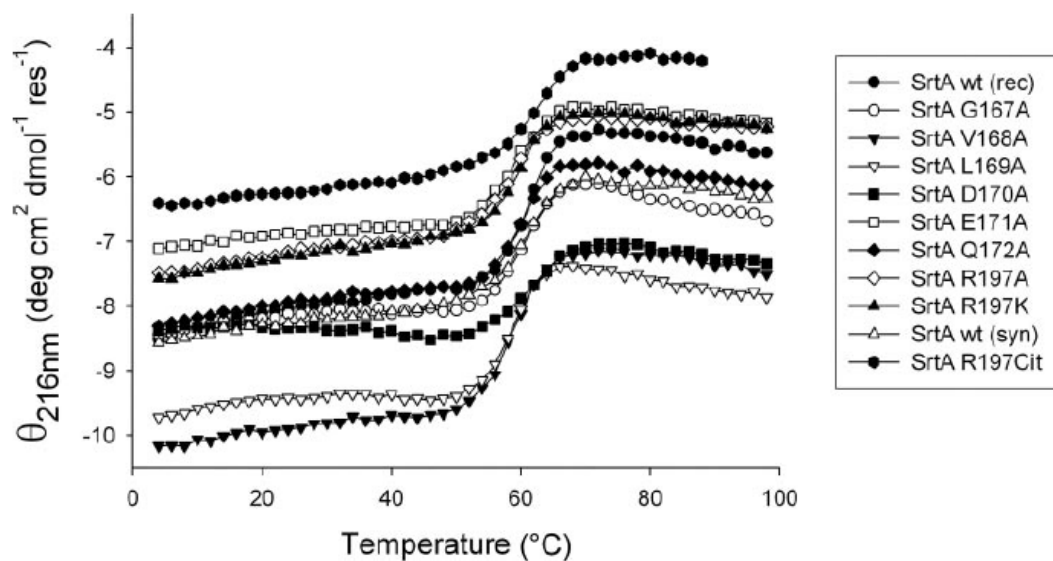


圖 1-10：Circular Dichroism (CD) Spectroscopy (16)

其結構改變的臨界溫度最低在 56 °C 以上，如表 1-2。由此推測 Sortase A 及其突變株在 10 °C 至 50 °C 以下的實驗操作中能維持原有的活性(43)。

表 1-2：Sortase A 野生株與突變株結構改變的臨界溫度 (16)

T_m values of SrtA mutants

Enzyme	T_m
	°C
wt (rec)	59.3 ± 0.5
G167A	58.8 ± 0.4
V168A	57.6 ± 0.3
L169A	57.5 ± 0.4
D170A	61.0 ± 0.4
E171A	57.5 ± 0.3
Q172A	58.1 ± 0.5
R197A	56.4 ± 0.5
R197K	57.3 ± 0.5
wt (syn)	58.0 ± 0.5
R197Cit	59.6 ± 0.6

1-5 Sortase A 之活性檢定

Sortase A 同時具有水解反應與接合反應的特性，根據研究(44)指出，Sortase A 的反應依循“乒乓機制” (ping-pong mechanism) (45)。即 Sortase A 與 LPETG 先形成醯基酶 (acyl-enzyme) 中間物後，GGGGGC 才會產生親核攻擊，最後形成 LPET—GGGGGC 的產物。故其活性檢定分兩階段，首先利用自消螢光胜肽 o-aminobenzoyl-Leucine-Proline-Glutamate-Threonine- Glycine-2,4-dinitrophenyl (以下簡稱 Abz-LPETG-Dnp) 來檢測 Sortase A 的水解活性並用 Liquid Chromatograph/Mass Spectrometer (LC/MS) 驗證其反應物與生成物分子量的訊號。

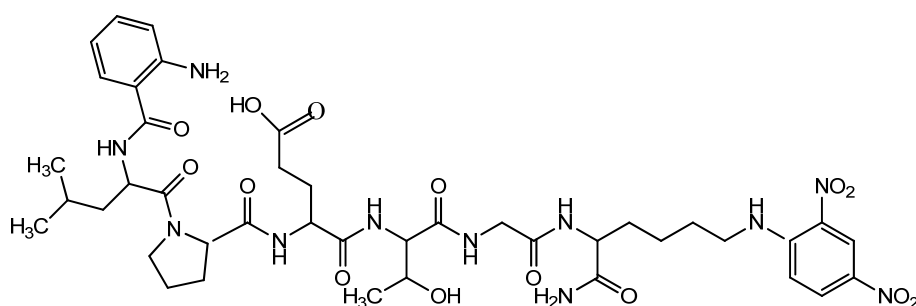


圖 1-11：Abz-LPETG-Dnp 之結構式

再取胜肽段 Glycine-Glycine- Glycine- Glycine- Glycine-Lysine- Fluorescein isothiocyanate (以下簡稱 GGGGGK-FITC)與 Abz-LPETG-Dnp 反應, Sortase A 會將 G-Dnp 從 Abz-LPETG-Dnp 切開, 再將 Abz-LPET 轉移接合到 GGGGGK-FITC 上, 最後形成 Abz-LPETGGGGGK-FITC。以 LC/MS 檢測生成物 Abz-LPETGGGGGK-FITC 的分子量訊號, 並分析其訊號量值來了解 Sortase A 的接合反應。

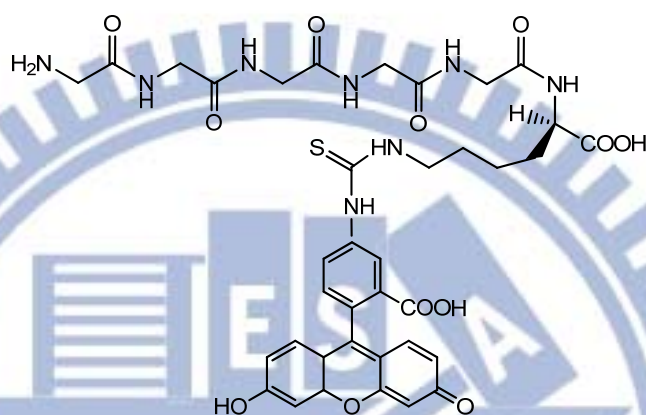


圖 1-12 : GGGGGK-FITC 結構圖

1-6 研究目的

有研究指出在 Sortase A 的三個螺旋上有四個胺基酸的突變點會影響其接合效率(46)。這四個突變點分別為在 $\beta 2/\beta 3$ 螺旋上的 P94, 在 $\beta 6/\beta 7$ 的連接螺旋上的 D160 和 D165, 與在 C 端的 $\beta 7/\beta 8$ 連接螺旋上的 K196。這些位置都在 Sortase A 的表面, 且靠近 LPXTG 結合位的疏水孔洞, 如圖 1-13。

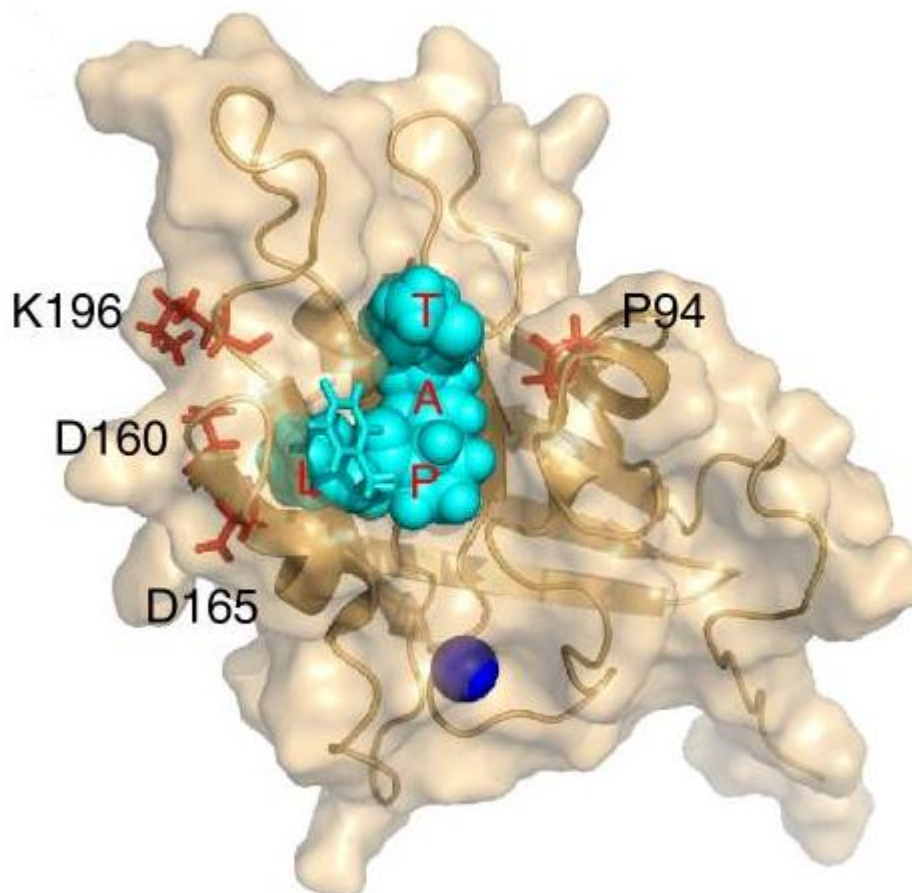


圖 1-13：Sortase A 定點突變位置圖 (46)

在研究中(46)指出 $\beta 2/\beta 3$ 螺旋上的第 94 個胺基酸由脯胺酸 (Proline, P) 突變成絲胺酸 (Serine, S)，簡稱 P94S；在 $\beta 6/\beta 7$ 螺旋上的第 160 個胺基酸由天冬胺酸 (Aspartic acid, D) 突變成天冬醯胺 (Asparagine, N)，簡稱 D160N；第 165 個胺基酸由天冬胺酸突變成丙胺酸 (Alanine)，簡稱 D165A；在 $\beta 7/\beta 8$ 螺旋上的第 196 個胺基酸由賴胺酸 (Lysine, K) 突變成蘇胺酸 (Threonine, T)，簡稱 K196T，被證實能增進 Sortase A 的效率(46)，應是此四個突變造成螺旋圈的構型改變，使 sortase 能更容易與受質結合。其中 P94S、D160N、D165A 與在 LPXT 上的結合有關；K196T 與 GGGGG-肽的接合有關。

本研究期望在 Sortase A 的野生株 (簡稱 SrtW) 上進行四個點突變 P94S、D160N、D165A 與 K196T。取得四點突變株 (簡稱 SrtPro) 後，進行突變酵素的催化反應研究，期待在室溫的環境中找出能提高蛋白質接合效率的突變型酵素，以應用在嵌合蛋白的接合中。

第二章 實驗材料與方法

2-1 實驗藥品與儀器

實驗所需之藥品來源與儀器規格敘述如下：

一. 藥品：

1. 配製菌種培養液之藥品購自 Merck、Difco、Zymeset 公司
2. 菌種轉型用之藥品均購自 Invitrogen、Sigma、Merk 公司
3. 配製緩衝液之藥品均購自 Sigma、聯工公司
4. 各種 Kit 購自 GeneMark、Viogene 公司
5. 限制酶購自 NEB 公司
6. 轉型之菌種購自益生公司
7. 胜肽 Abz-LPETG-Dnp:購自 anaSpec 公司
8. 胜肽 GGGGC-FITC:由明欣生物科技公司合成

二. 儀器

恆溫培養箱 (EYELA NDO-450ND)

搖動培養箱 (Firstek, Scientific, orbital shaking incubator Model-S302R)

UV 吸收光譜儀 (AGILEMT 8453)

螢光光譜儀 (Hitachi f 4500)

Elisa reader (Thermo,Multiskan GO Microplate Spectrophotometer)

聚合酶連鎖反應器 (GeneAmp PCR system 2400, 9700)

桌上型離心機 (Hermle)

高速離心機 (Kubata 7820)

超音波震盪器 (Misonix, ultrasonic processor)

高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography)

HPLC column: Inertsil 7 ODS-3 (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm)

三. 層析管柱：

HPLC system (Pharmacia Biotech FPLC3467)

HiTrap Desalting column (Pharmacia, 5mL)

HiTrap Ni column (Pharmacia)

四. 寡核苷酸引子與定序工作：委託明欣生物科技公司。

五. 修飾 LPETG 的石英晶體微量天平 (QCM)：由本實驗室沈模沅提供。



2-2 Sortase A 質體的取得與定點突變

2-2-1 野生型表現系統的建立

一、質體的重組

將 Sortase A 野生型的基因片段，以限制酶 Ase I 與限制酶 HindIII 將包含 Sortase A 活性部份(第 25 個胺基酸 H 到第 206 個胺基酸 K)的 DNA 片段共 546 鹼基對 (base pair, bp) 切出來(14, 16, 17)。再以限制酶 Nde I 與限制酶 HindIII 將 pet28a 的表現載體 5318 bp 切出來，因為 Ase I 與 Nde I 的切位有 TA 兩個 DNA 序列碼重疊，故上述的兩個線性基因片段可用 T₄DNA 接合酶接合共 5864 bp，在 22 °C 下進行聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 反應兩小時，得到 Sortase A 野生型表現系統的質體。

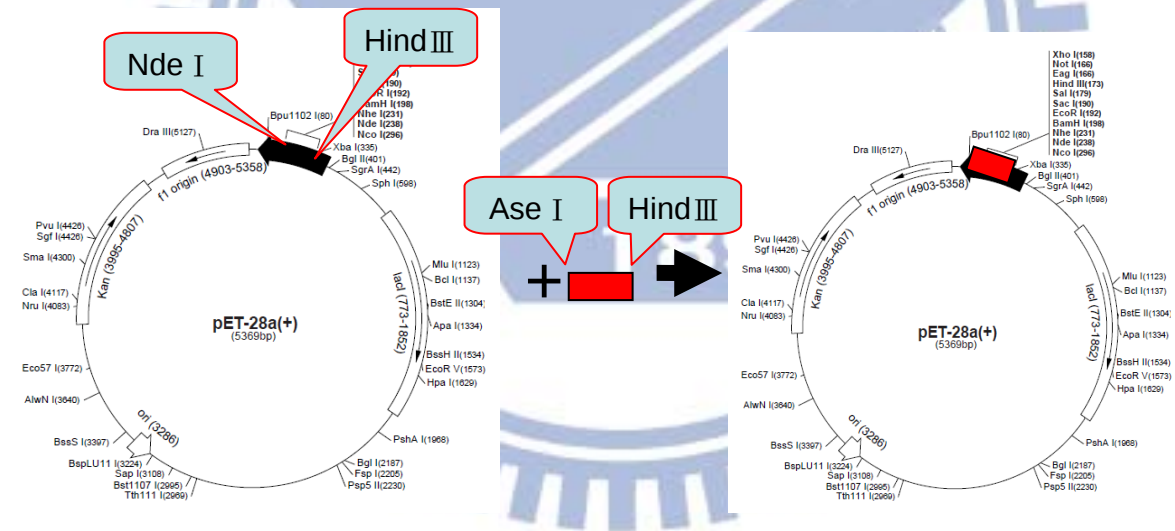


圖 2-1：Sortase A 野生型表現系統質體的建立

因 Ase I 與 Nde I 接合後切位點消失，故以含 Sortase A 活性部份的 DNA 片段的兩切位點 Nco I 與 HindIII，來作反應，以 DNA 電泳膠片來檢驗質體的大小應符合下列理論值：pet28a 的 DNA 大小為 5246 bp，含 His-tag 標識的 Sortase A 野生株 DNA 大小為 618 bp，如圖 2-2。

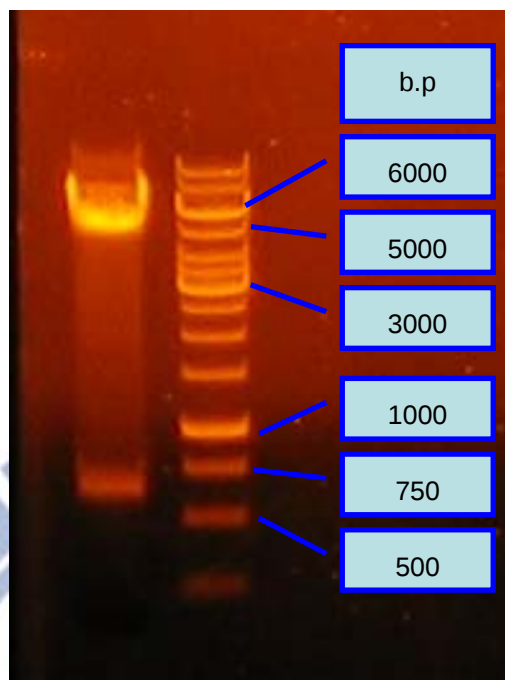


圖 2-2：Sortase A 野生型表現系統質體的驗證

二、勝任細胞的製備：大腸桿菌菌種 DH5 α 與 BL21 (DE3)

取大腸桿菌菌種加入 2 ml 之 LB 中，置入 37°C 培養箱 12 hr。稀釋 50 倍至 100 ml，再置入 37 °C 培養箱中養菌，直到 OD 值在 0.4~0.6 間。以 1500 rpm、4 °C 離心 6 min，去上清液。以 0 °C、50 ml、100 mM 的 CaCl₂ 回溶（原 0.5 倍體積），每隔 5 min 以手輕拍之且置於冰上 30 min。再以 1500 rpm、4 °C 離心 6 min，去上清液。加入 10 ml 含 30% 的 glycerol 的 CaCl₂（7 ml、100 mM CaCl₂ 與 3 ml 的甘油）回溶（原 0.1 倍體積）。最後取 100 μ l 分裝至 eppendorf。存放至 -80 °C 備用。

三、轉型

將已建立完成的表現質體以熱休克反應（heat shock response）轉型至大腸桿菌 DH5 α 的菌株中，操作如下：取勝任細胞 DH5 α 放在冰上溶解後，加入表現質體 5~10 μ l，在冰上靜置 5~10 分，以熱休克法，在 42 °C 水中放 45 秒後，在冰上靜置 3 分鐘，加入 100 μ l 培

養液，在 37 °C 培養箱養菌 30 分鐘後，在無菌操作臺上塗盤（含 kanamycin 50 µg/ml）。將塗盤後的培養皿置入 37 °C 培養箱中培養 16 小時。挑單株菌於 5 ml 的液養液中（含 kanamycin 50 µg/ml）置入 37°C 培養箱中培養 16 小時，取菌液 4.5 ml 抽出 Sortase A 野生型質體，將 DNA 質體於 -20 °C 中保存。且將菌液 200 µl 加入 200 µl 培養液與濃度 50% 的 400 µl 甘油（甘油最後濃度 25%），放入 -80 °C 中保存。

取 5 µl 質體以 Nco I 及 HindIII 限制酶水解之，並進行 DNA 電泳分析，檢驗 DNA 質體的大小，並做 DNA 定序以確定基因片段與載體已成功接合。

2-2-2 定點突變

一、單一定點突變

取得 Sortase A 野生株的質體後，設計在胺基酸位置第 165 與第 196 的突變點寡核苷酸模版引子如表 2-1。

表 2-1：單一突變點寡核苷酸模版引子

Name	Sequence(5' to 3')
D165A-F	GTG AAA CCA ACG GCC GTG GAA GTC CTG
D165A-R	CAG GAC TTC CAC GGC CGT TGG TTT CAC
K196T-F	TGG GAA ACC CGT AAA ATC TTC
K196T-R	TTT ACG GGT TTC CCA CAC ACC

各取 1 µl 的引子與 Sortase A 的質體 1 µl（濃度約 5 ng/µg）混合濃度 10 µM，利用聚合酶連鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）以核苷酸模版引子將 Sortase A 的基因放大，反應條件如表 2-2 所示。

表 2-2：PCR 反應條件

反應物					μl	濃度
Sortase A DNA Template					1	5 ng/μg
10X reaction buffer					3	
寡核苷酸引子（125ng/μl）					1	10 μM
寡核苷酸引子（125ng/μl）					1	10 μM
10 mM dNTP mix					1	10
Pfu II DNA 聚合酵素（2.5U/μl）					1	
dd H ₂ O					22	
區間	1	2			3	
次數	1	30			1	
溫度℃	95℃	95℃	55℃	72℃	72℃	4℃
時間（分：秒）	3:00	0:30	0:30	3:00	15:00	∞

將 PCR 產物取 5 μl 以 Nco I 及 HindIII 限制酶水解後，用 DNA 電泳膠片檢驗 PCR 產物，其餘 25 μl 加入 Dpn I 限制酶 1μl 與 buffer 4 反應液 3 μl 置入 37 °C 的培養箱放 3 小時將含甲基支鏈的原範本質體消化，再置入 65 °C 中放 5 分鐘，讓 Dpn I 失活，再轉形至 *E. coli* DH5α 中，培養菌液後，再將突變株的質體抽出，保存在 -20 °C，並送定序以確定突變株的 DNA 序列。

二、四個定點突變

為增加至四個突變點在表現質體 pet28a 上，本研究先縮短範本質體長度後，做點突變，最後再將四個點突變的 Sortase A 質體接回原表現質體 pet28a 上。故先去除 Sortase A 野生株 N 端的 59 個胺基酸非活性區域，保留 Sortase A 的 C 端活性區域(47)，以 primerA 與 primerB

(如表 2-3 所示) 將野生型的胺基酸序列從第 60 個胺基酸到第 206 個胺基酸的 DNA 序列利用 PCR 夾出，以 Nde I 及 HindIII 限制酶水解後，用 DNA 電泳膠片分離 PCR 產物，回收 462 bp 質體片段後，用 T4DNA 接合酶接入有相同切位的 pRSET A 載體(2756 bp)，如此可將原本長 5864 bp 的質體，縮短為長 3218 bp 的質體，以增加點突變的成功率。再以表 2-3 中的核苷酸模版引子，依序如單一定點突變的方式取得 Sortase A 四個突變的基因序列。

表 2-3：四個突變點寡核苷酸模版引子

Name	Sequence(5' to 3')
primerA	AGC CATATG CACCACCACCACCACCAAGCCAAA
primerB	CGC AAG TTA TTT CAC TTC GGT
P94S-F	GGT CCG GCT ACT TCT GAG CAA CTG AAT
P94S-R	ATT CAG TTG CTC AGA AGT AGC CGG ACC
D160N-F	ACC TCC ATC CGT AAC GTG AAA CCA ACG
D160N-R	CGT TGG TTT CAC GTT ACG GAT GGA GGT
D165A-F	GTG AAA CCA ACG GCC GTG GAA GTC CTG
D165A-R	CAG GAC TTC CAC GGC CGT TGG TTT CAC
K196T-F	TGG GAA ACC CGT AAA ATC TTC
K196T-R	TTT ACG GGT TTC CCA CAC ACC

將取得的四個突變點 Sortase A 的 DNA 序列與 pet28a 以限制酶 Nde I 及 HindIII 水解後，用 T4DNA 接合酶接合，取得四個突變點的表現質體，簡稱 SrtPro。

Sortase A 野生株與突變株的 DNA 序列與胺基酸序列對照表見附錄一。

2-2-3 酵素的誘導

將 Sortase A 野生株及突變株的質體，轉型至大腸桿菌 BL21 (DE3)，並塗盤至含

抗生素 kanamycin 的培養基上。置入 37 °C 的培養箱中約 16 小時。分別取單株菌落置入 5 ml 的培養液中（含 1 mM/ml 的 kanamycin）中約 12 小時，得到菌液。

分別取 Sortase A 野生株與突變株之菌液 1 ml 置入 500ml 的培養液中，待菌液濃度至 $OD_{600} = 0.4$ 時加入 異丙基 - β -D- 硫代吡喃半乳糖苷（Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG）（最後溶液 1 mM/1ml）誘導 12 小時後，以 15000 rpm、4 °C 離心後去上清液，留下菌體。加入貯存的 Buffer 1(50 mM tris, 150 mM NaCl, pH=8.0)10 ml。

以超音波在冰上振破菌液（強度 4.5，頻率 50Hz）振盪 3 分鐘，打破細胞壁，再以 15000 rpm、4 °C 離心 30 min 後，取得胞內粗提液。

2-2-4 酵素的純化

利用親和性管柱層析法將酵素由胞內粗提液中純化，親和層析法是利用蛋白質和固相的基質有特異性的結合而使其他雜質蛋白流過，通常會在固定相的小球上修飾和蛋白質有強接合能力的分子。現今可以利用基因重組技術將 Sortase A 的 N 端加上具親和性的 6 個組胺酸(Histidine)稱為 His-tag，且六個組胺酸分子量很小較不會影響原有蛋白質的性質。組胺酸的 imidazole ring 上的氮 (N)帶有兩個單獨電子對，於是鎳離子 (Ni^{2+}) 粒子就可以吸附上去，蛋白質因此就可以和固相的基質結合。最後要溶離出所要的蛋白質時就用未接有任何東西的 imidazole 來競爭，這是一個很溫和的方法，在溶離的過程中，蛋白質不容易變性。

首先配置 4 種溶液，分別為 Buffer 1 (50 mM tris, 150 mM NaCl, pH 8.0)、Buffer 2 (50 mM tris, 150 mM NaCl, 50 mM imidazole, pH 8.0)、Buffer 3 (50 mM tris, 150 mM NaCl, 100 mM imidazole, pH 8.0)、Buffer 4 (50 mM tris, 150 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)。先將層析管柱內的溶液置換成 Buffer 1，再以低流速將酵素粗提液流過管柱，Sortase A 因具有 His-tag，故會與管柱中的鎳離子親合，再依次用 Buffer2、Buffer3，讓雜質蛋白流過，最後利用 Buffer4 中高濃度的 imidazole 與 Sortase A 的 His-tag 競爭，將 Sortase A 純化出來。

2-2-5 決定蛋白質分子量與純度

純化的 Sortase A 蛋白質分子量 (MW) 與均質度 (homology) 之粗略估計，可藉由十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳法 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 來觀測，這個系統是由 Laemmli 在 1970 年提出(48)，此項技術的原理是利用介面活性劑 SDS (十二烷基硫酸鈉) 破壞蛋白質的二級結構，使其變性形成線性長條分子，並包覆變性蛋白質，使其帶有一致的負電荷，再利用檢體中蛋白質分子量大小的不同，使其在電泳膠片中分離，形成不同的帶狀，分子量愈大者，移動距離越短，依此可用以檢驗蛋白質的純度，是最常用的蛋白質分析技術之一。

首先製備下列 4 項膠片與藥品：

1. 製作 12.5%分離膠 (Separation gel) 與 7%堆積膠 (Stacking gel) 之電泳膠片，規格為 10 cm × 7.4 cm × 0.1 mm，其製備如下表 2-4。

表 2-4：SDS 膠片配置表

	Separation gel	Stacking gel
H ₂ O	3.59 mL	1.78 mL
50%Acrylamide	1.64 mL	0.35 mL
2M Tris-H ₃ PO ₄ (pH=8.9)	1.23 mL	
1M Tris-H ₃ PO ₄ (pH=6.5)		
10%SDS	65.63 μL	24.75 μL
APS in IPA	32.81 μL	12.75 μL
TEMED	10 μL	3.5 μL

2. 製備 Sample loading buffer，配置內容如下表 2-5.

表 2-5：Sample loading buffer 配置表

藥品	配置溶液體積
1M Tris-HCl(pH=6.8)	0.6 mL
50%甘油	5 mL
2-mercaptoethanol	0.5 mL
1%bromophenol blue	1 mL
10%SDS	2 mL
H ₂ O	0.9 mL
Total Valume	10 mL

3. Stain solution：200 mL 醋酸，500 mL 異丙醇，3 L 去離子水，0.6 克 Coomassie blue

4. Destain solution：400 mL 醋酸，400 mL 異丙醇，3.2 L 去離子水

將純化之 Sortase A 野生型與突變型各取 10 μ L 溶液，加入 5 μ L 的 Sample loading buffer 混合後，在 95°C 加熱 5 分鐘，取 5 μ L 的溶液與 5 μ L 的 protein maker 注入 SDS-page 的孔洞，以電壓 170 伏特進行電泳 1 小時，再將 SDS-page 浸泡在 Stain solution 中 2 小時，再以 Destain solution 褪去背景色，可看到酵素在 SDS-page 中的位置與 protein maker 比對可估算蛋白質的分子量與均質度。

將純化之野生型與突變型的 Sortase A 以除鹽管柱除鹽後進一步以 MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) -TOF 質譜儀鑑定蛋白質分子量。

2-2-6 蛋白質身份的鑑定

取微量 SDS-page 中酵素的膠片，先依如下步驟處理：

1. 以 1000 μ L tip 從 SDS-page 中挖取一小塊 gel 放入 tube 中。

2. 加入 50 μ l wash buffer (ABC buffer, 50% ACN), 放置 > 15 min, 將 gel 洗到白色。
3. 將澄清液吸出後，tube 蓋子打開，讓殘餘液體揮發。
4. 加入 50 μ l 100% ACN 約 5 min。
5. 重覆步驟 3, RT 室溫約 3 min。
6. 加入 3 μ l 濃度 20 μ g/ μ l 的 trypsin (in ABC buffer) 在 4 $^{\circ}$ C 下靜置 20 min。
7. 放入 37 $^{\circ}$ C 烘箱 O/N。
8. 將澄清液吸出後，tube 蓋子打開，讓殘餘液體揮發。
9. 加入 3 μ l 50% ACN, 1% TFA, sonication 20 min。

最後將處理後的樣本，用 MALDI-TOF 質譜儀鑑定蛋白質的身份。

2-2-7 酵素的保存

純化之 Sortase A 溶液保存在 4 $^{\circ}$ C 待用。或以除鹽管柱置換成 Tris buffer (50mM)，經液態氮急速冷凍後，以冷凍乾燥機抽乾，可得乾燥的粉末，冰在 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2-2-8 蛋白質濃度的測定

採用 Bradford Assay 吸收值方法(49)，進行蛋白質濃度的測定。此定量方法利用 Coomassie Brilliant Blue G-250 與蛋白質結合的特性，取 G-250 與牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)結合後，G-250 的顏色會從紅色轉變成為藍色，在 595nm 波長有強吸收，利於偵測。

以不同濃度的蛋白質標準品建立標準測量線，再利用內插法計算待測蛋白質的濃度。

其步驟如下：

1. 從 4 $^{\circ}$ C 冷藏中拿出 2 ml 的 Bradford reagent，在室溫中回溫。
2. 取 2 μ l 的 BSA 標準品 (10 mg/ml) 在 microtube 中，以 Tris buffer 稀釋到 100 μ l 最後得到標準品的濃度為 200 μ g/ml。
3. 取步驟 2 之標準品 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 μ l 至檢驗盤中，再分別加入 Tris buffer 至 20 μ l，可得

盤中 BSA 的質量分別為 0,0.4,0.8,1.2,1.6,2,3,4 μg 。

4. 加入 0.2 ml 的 Bradford reagent，在室溫中反應 2 分鐘。
5. 在 ELISA reader 上，以波長 595nm 的光測量之，可得到一標準曲線。
6. 取純化的酵素 1 μl 置於檢驗盤中，加入 Tris buffer 至 20 μl ，再加入 Bradford reagent 0.2 ml 在室溫中反應 2 分鐘。
7. 在 ELISA reader 上，以波長 595 nm 的光測量之，可得到酵素的吸收值，再參考標準品的吸收值與濃度曲線，可測得酵素的濃度。

2-3 Sortase A 反應機制之研究

2-3-1 水解活性的檢測與比較

Sortase A 有水解與接合兩階段反應。以 Abz-LPETG-Dnp 來檢驗 Sortase A 野生株與突變株的水解作用。

Abz-LPETG-Dnp 的 Abz 端具螢光性質，Dnp 端具消光性質，當連接兩者的 LPETG 被 Sortase A 切開分離成 Abz-LPET 與 G-Dnp 時，Abz 端的螢光不再被 Dnp 端抵消而呈現出來。透過螢光光譜儀，可測量得到 Abz 端的螢光會增加(42, 44)。藉由此特性，可檢測 Sortase A 的水解活性。

在 200 μl 反應溶液 (Tris 5 mM、NaCl 15 mM、鈣離子 2 mM) 中，固定 Abz-LPETG-Dnp 的量為 50 μM (溶解在 dimethyl sulfoxide 中)，Sortase A 為 4 μM ，設定螢光光譜儀中激發波長為 320 nm、散射波長為 420 nm，觀察 Abz-LPET 的螢光值會隨著反應時間的變化。

再以 LC/MS 做分子量的驗證。Abz_LPETG_Dnp 的分子式 $\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{N}_{11}\text{O}_{14}$ ，分子量為 927，在 LC/MS 檢測中應會出現帶 1 正電的分子量 928 訊號。被 sortase A 切斷後，Abz_LPET 被分解成 Abz_LPET (分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_8\text{N}_5$ 分子量 560 不帶 OH 與不帶 +1 電) 與 G-Dnp (分子式 $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_6\text{N}_6$ 分子量 367 不帶 H 與不帶電)。故在 LC/MS 質譜儀的檢測中，應會出現

Abz_LPET 分子量 578 (加 OH 及帶 +1 電) 的訊號與 G-Dnp 的分子量為 369 (加 H 及帶 +1 電) 的訊號。

由此紀錄比較野生株與突變株的反應速度，了解何者的水解效率最佳。

2-3-2 接合活性的檢測與比較

為比較 Sortase A 野生株與突變株的接合活性，以 MRM (Multiple reaction monitoring) 方法來定義 Abz-LPETGGGGGK-FITC 的產量(50)。以 GGGGGC-FITC 與 Abz-LPETG-Dnp 作為反應物，Sortase A 先將 Abz-LPETG-Dnp 水解成 Abz-LPET 後，再接合 GGGGGC-FITC，最後形成 Abz-LPETGGGGGC-FITC。

故取 Abz-LPETG-Dnp 與 GGGGGC-FITC (最後濃度各為 100 μ m) 在反應溶液 (最後濃度 Tris 5 mM、NaCl 15 mM、鈣離子 2 mM) 中加入 Sortase A (最後濃度 4 μ m)，從 Sortase A 加入後開始直到 60 分鐘，每隔 5 分鐘或 10 分鐘取出反應液，再加入 pH 值為 10 的 EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid，乙二胺四乙酸，最後濃度 5 mM)(51)，並在 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘以中止反應，取得在不同時間點含 Abz-LPETGGGGGC-FITC 的反應溶液。

以 LC/MS 檢驗其反應物與生成物，在 MS 圖譜上除了看到 Abz-LPETG-Dnp 分子量 928 的訊號、Abz-LPET 分子量 578 的訊號、G-Dnp 分子量 369 的訊號，以外應還可看到反應物的 GGGGGK-FITC 的訊號及經 Sortase A 作用後 Abz_LPET 轉移接上 GGGGGK-FITC，形成的生成物 Abz-LPETGGGGGK-FITC 訊號。GGGGGK-FITC 的分子式 $C_{37}H_{40}O_{12}N_8S$ 分子量 820，在 LC/MS 檢測中應會出現帶 1 個正電的質荷比 821 或帶 2 個正電的質荷比 411 訊號。Abz-LPETGGGGGK-FITC 的分子式為 $C_{64}H_{78}O_{14}N_{11}$ 分子量為 1380，在質譜中應會出現帶 1 個正電的質荷比 1381 或帶 2 個正電的質荷比 691 訊號。

將反應溶液進行 LC/MS 分析 (分析條件如表 2-6) 並對 Abz-LPETGGGGGC-FITC 進行 MRM 分析，透過特定碎片 FITC 胜肽段選定的 Abz-LPETGGGGGC-FITC 分子，計算其質譜儀上的面積積分值，代表 Abz-LPETGGGGGC-FITC 的生成量值。將所得的量值對時間點作圖，可了解 Sortase A 野生株與突變株的反應速率何者較佳。

表 2-6：LC—MASS 的分析條件表

時間 (分)	流速 (ml/min)	水	ACN (Acetonitrile·CH ₃ CN)
0	1	90	10
1	1	80	20
7	1	35	65
20	1	10	90
30	1	0	100
32	1	90	10
35	1	90	10

第三章 結果與討論

3-1 酵素的基因序列、表現與純化

3-1-1 酵素的基因序列

在 DNA 定序後，取得野生型與各突變株的胺基酸序列如下圖 3-1：SrtW 為 Sortase A 去除 N 端 24 個胺基酸所表現的野生株(14, 16, 17)。以 SrtW 為模版做單一定點突變得到 Srt196 為 Sortase A 的 K196T 突變株，Srt165 為 Sortase A 的 D165A 突變株。為對 Sortase 進行 P94S、D160N、D165A、K196T 的點突變，本研究縮短質體長度去除 N 端 59 個胺基酸保留有活性的區域（第 60 個胺基酸 Q 至第 206 個胺基酸 K）(47) 以利於點突變的疊加，最後得到 Sortase A 去除 N 端 59 個胺基酸且具有 P94S、D160N、D165A、K196T 點突變所表現的突變株，簡稱 SrtPro。

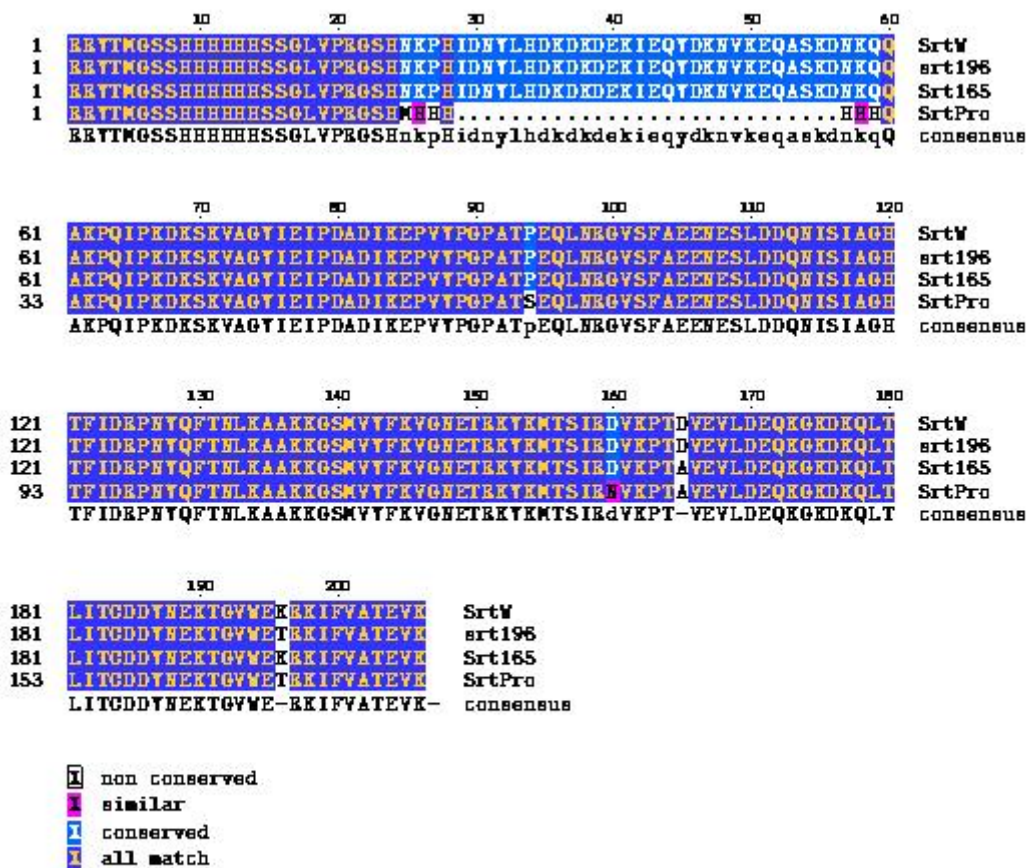


圖 3-1：Sortase A 野生型及突變株胺基酸定序表

3-1-2 酵素的表現與純化

一、Sortase A 野生株的表現與純化

Sortase A 野生株與突變株均能在胞內液中過量表現，純化後的酵素在 SDS-page 上估測的分子量 SortaseW、D165A、K196T 約 23000，如圖 3-2(A) 中所示；SortasePro 約 17000，如圖 3-2(B) 中所示。

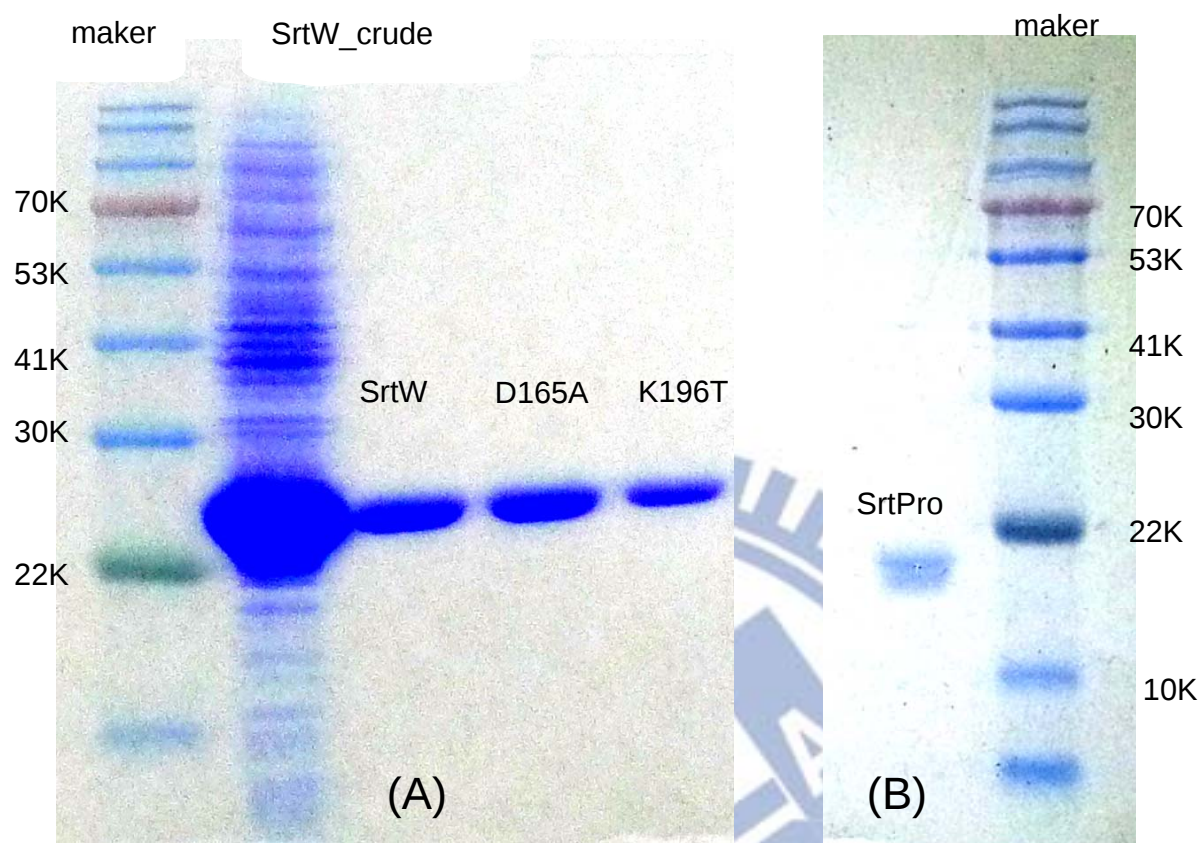


圖 3-2：Sortase A 野生株及突變株的 SDS-page 蛋白質分子量

二、Sortase A 野生株的 MALDI-TOF 分析

蛋白質經trypsin處理後，會得到不同長度的片段，因Trypsin會水解蛋白質中所有的由賴氨酸Lys或精氨酸Arg的羧基所構成的肽鍵，不過如果這兩個部份在C-terminal方向連接的是proline，它就不會水解這個地方的鍵結(52)。所以經trypsin作用之後得到的片段，以MALDI-TOF質譜儀分析，比對Matrix Science線上資料庫中Sortase A的胺基酸序列後，胺基酸序列涵蓋度（sequence coverage MS）為54.7%，有部份重疊如下圖3-3，且其Mascot score >52、significance threshold $p < 0.05$ 如圖3-4，證實所純化的蛋白質為Sortase A。

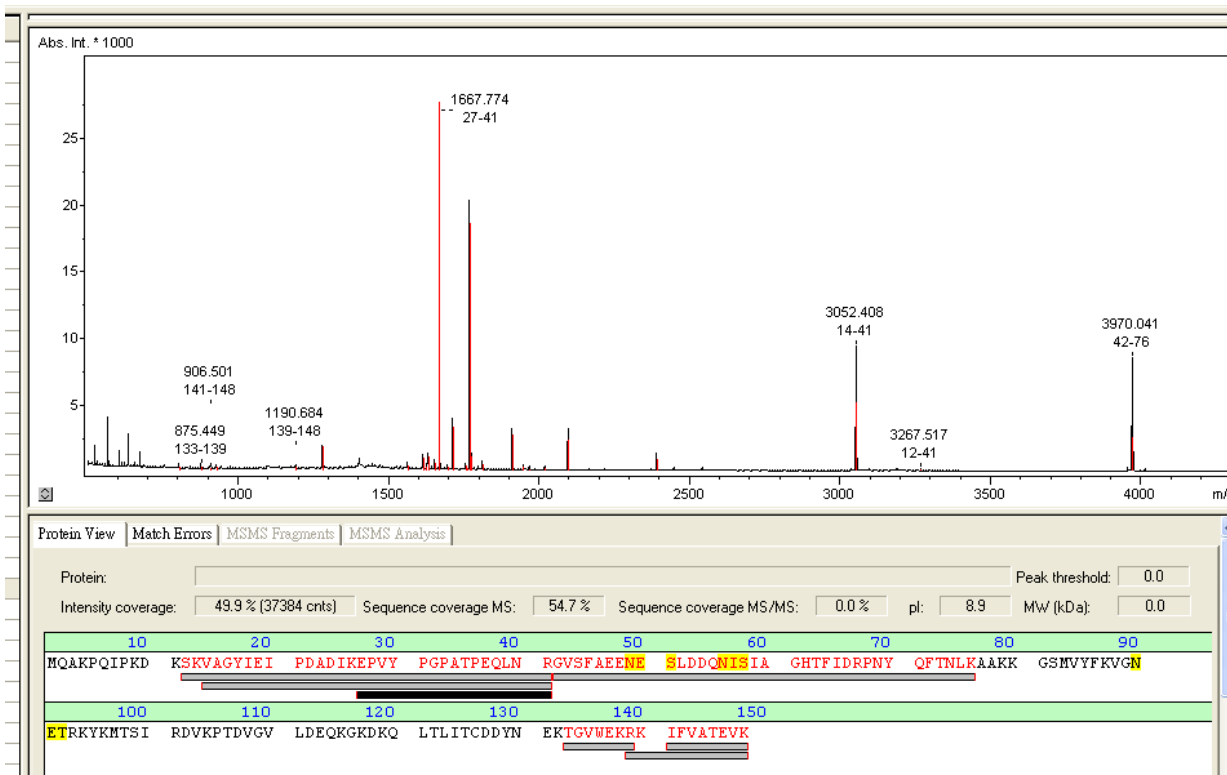


圖 3-3：Sortase A 野生株的 MALDI-TOF 分析圖譜

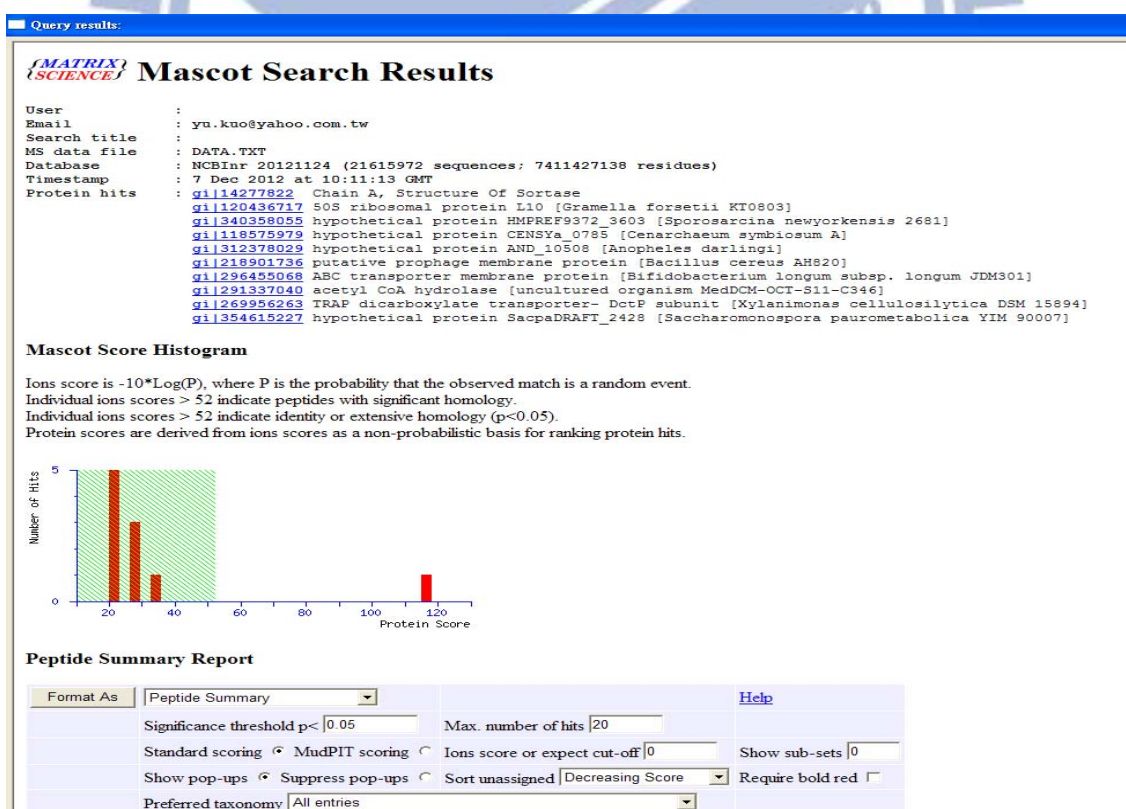


圖 3-4：Sortase A 野生株的 Mascot Score

3-1-3 Sortase 野生株與突變株的分子量

以 MALDI-TOF 質譜儀檢測 Sortase A 野生株與突變株的分子量，分析圖譜如附錄二所示，得到下列結果：SrtW 的分子量為 22970.9，其理論值 23070.79，相對誤差 0.43%；D165A 的分子量為 22942.0，其理論值 23026.78，相對誤差 0.37%；K196T 的分子量為 22902.4，其理論值 23043.72，相對誤差 0.61%；Srt Pro 的分子量為 16643.7，其理論值 17540.81，相對誤差 5.11%。檢測結果符合預測的分子量，故經蛋白質純化後取得之野生株與突變株的分子量以檢測值為準來計算對應的酵素濃度。

3-1-4 野生型酵素濃度測定

使用的蛋白質標準品為牛血清蛋白(BSA)，濃度為 10 mg/ml。將蛋白質標準品與緩衝液混合，形成不同濃度的標準品，總體積為 20 μ l，再加入 Bradford reagent 至 200 μ l，放置在室溫下 2 分鐘，以 UV 光譜儀讀取各樣品 OD595 nm 之吸收值如表 3-1。

表 3-1、不同濃度 BSA 標準品與 OD595 之吸收值

BSA (μ g)	OD595 nm
0	0.332
0.4	0.35
0.8	0.373
1.2	0.4
1.6	0.414
2	0.452
3	0.513
4	0.572

根據 UV 光譜儀讀取各樣品 OD595 nm 之吸收值劃出蛋白質標準品對 OD595 nm 之標準檢量線，如圖 3-5。故得到 OD595 nm 的量值（y 值）與 BSA 濃度（x 值）的關係為 $y=0.0613x+0.3261$ （檢量公式）。

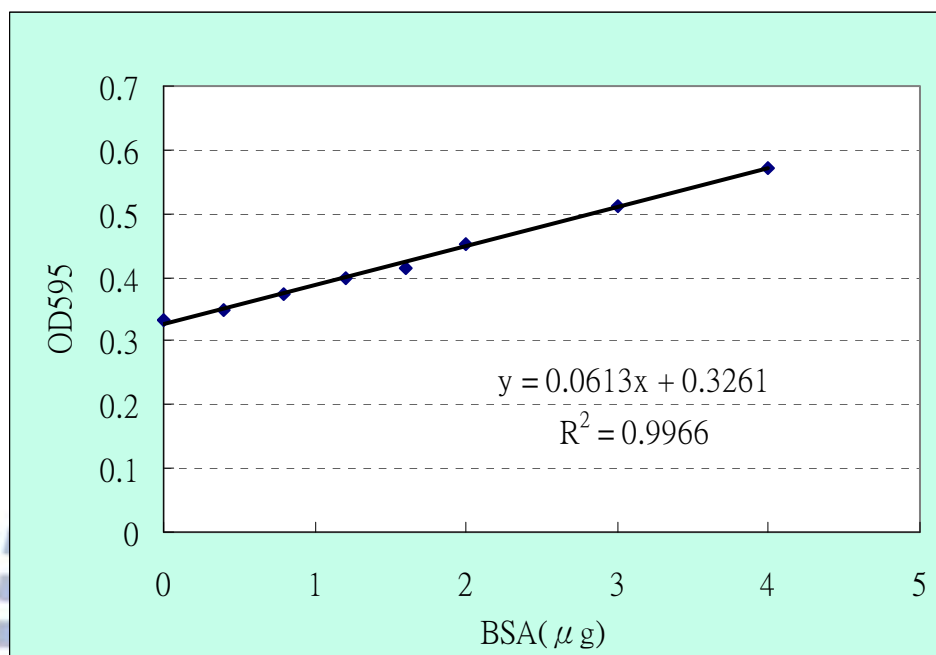


圖 3-5：蛋白質標準品對 OD595 之標準檢量線

取 1 μl 待測蛋白質溶液，所測得對應的 OD595 吸收值如下：Srt W 為 0.4896、D165A 為 0.483、K196T 為 0.443、SrtPro 為 0.3825，以內插法帶入檢量公式，可得 1μl 待測蛋白質溶液的濃度如下：Srt W 為 2.6672 (μg/μl)、D165A 為 2.5595 (μg/μl)、K196T 為 1.9070 (μg/μl)、SrtPro 為 0.9201 (μg/μl)，再參考 MALDI-TOF 分析儀鑑定 Sortase A 野生株與突變株的分子量，如表 3-2 所示，可得各溶液的莫耳濃度如下：Srt W 為 115.61 μM、D165A 為 111.16 μM、K196T 為 82.76 μM、SrtPro 為 51.11 μM。

表 3-2：Sortase A 野生株與突變株的濃度

l(μ l)	y(od)	x(μ g)	MW	(μ M)
Srt W	0.4896	2.6672	23070.79	115.61
D165A	0.483	2.5595	23026.78	111.16
K196T	0.443	1.9070	23043.72	82.76
SrtPro	0.3825	0.9201	18000	51.11

3-2 野生型與突變型酵素的活性檢測

3-2-1 Sortase A 野生株的活性檢測

Sortase A 對 Abz-LPETG-Dnp 水解後，得到產物 Abz-LPET 與 G-Dnp，其 Abz-LPET 在 320 nm 的螢光激發下會有 420 nm 的波長散射，在螢光光譜儀可見螢光量值隨時間的增加而增加，驗證 Sortase A 在 pH 為 8 且常溫的環境中具有水解活性，如圖 3-7。

以 LC-MASS 驗證其反應物與生成物。可見 Abz_LPETG_Dnp 荷質比 928 的訊號。被 Sortase A 水解後，也出現 Abz_LPET 荷質比 578 的訊號及 G_Dnp 荷質比 369 的訊號，如圖 3-6。

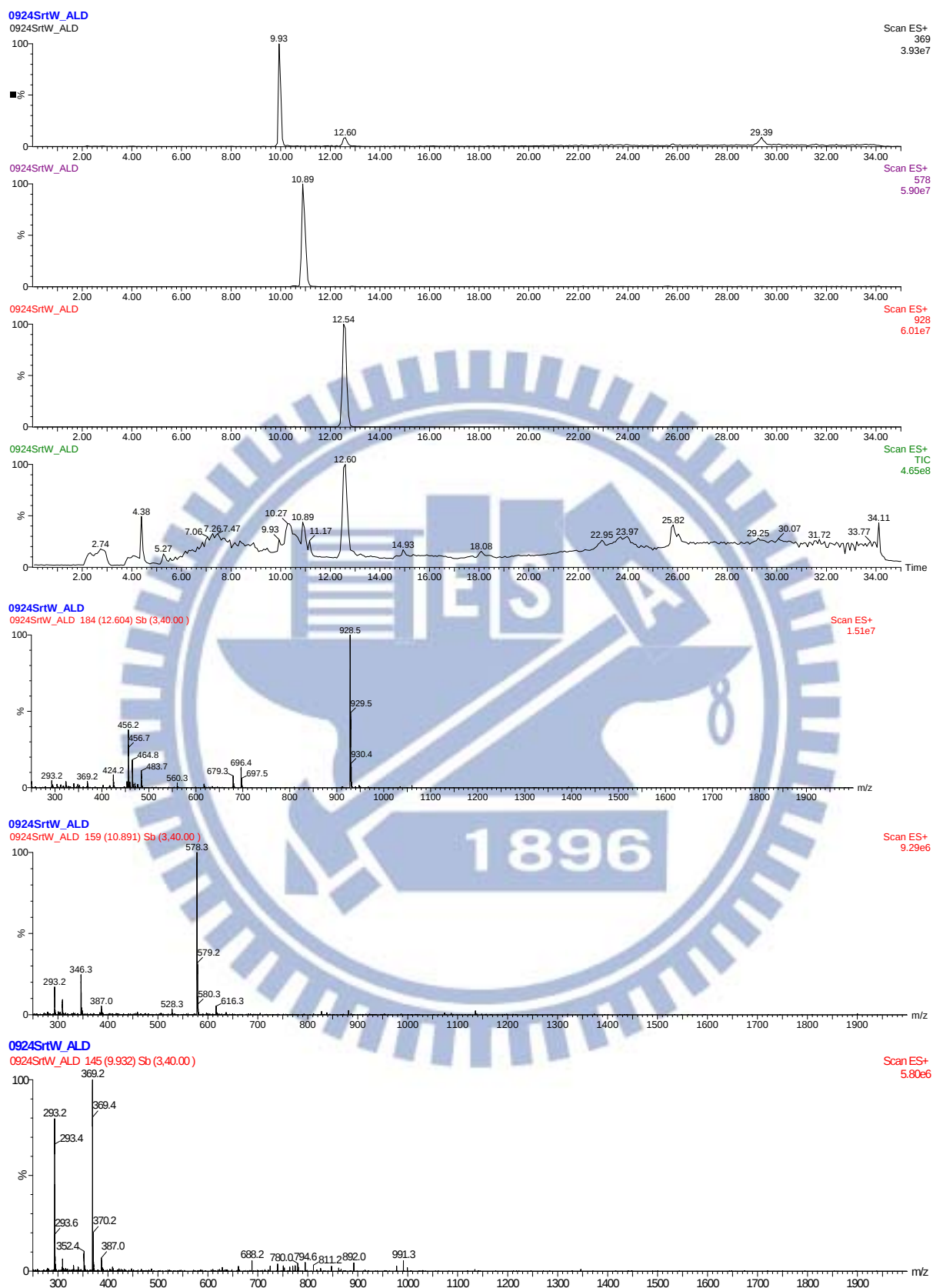


圖 3-6：Abz_LPETG_Dnp 被 Sortase A 分解的 LC/MS 圖譜

3-2-2 水解活性與比較

固定 Abz-LPETG-Dnp 濃度為 50 μM , Sortase A 野生株與突變株的濃度為均為 4 μM , 由螢光光譜儀的測量由加入酵素開始, 可得到螢光值與反應時間的關係圖, 如圖 3-7。(螢光量值對時間的紀錄值, 如附錄三) 由圖中可見 Sortase A 野生株與突變株在 120 秒內螢光值漸漸平緩, 以 SrtPro (藍色線) 與 D165A (粉紅色線) 反應最快, SrtW (黃色線) 次之, K196T (綠色線) 最差, 對照組 (紫色線) 無酵素作用, 故螢光量值未有顯著的增加。

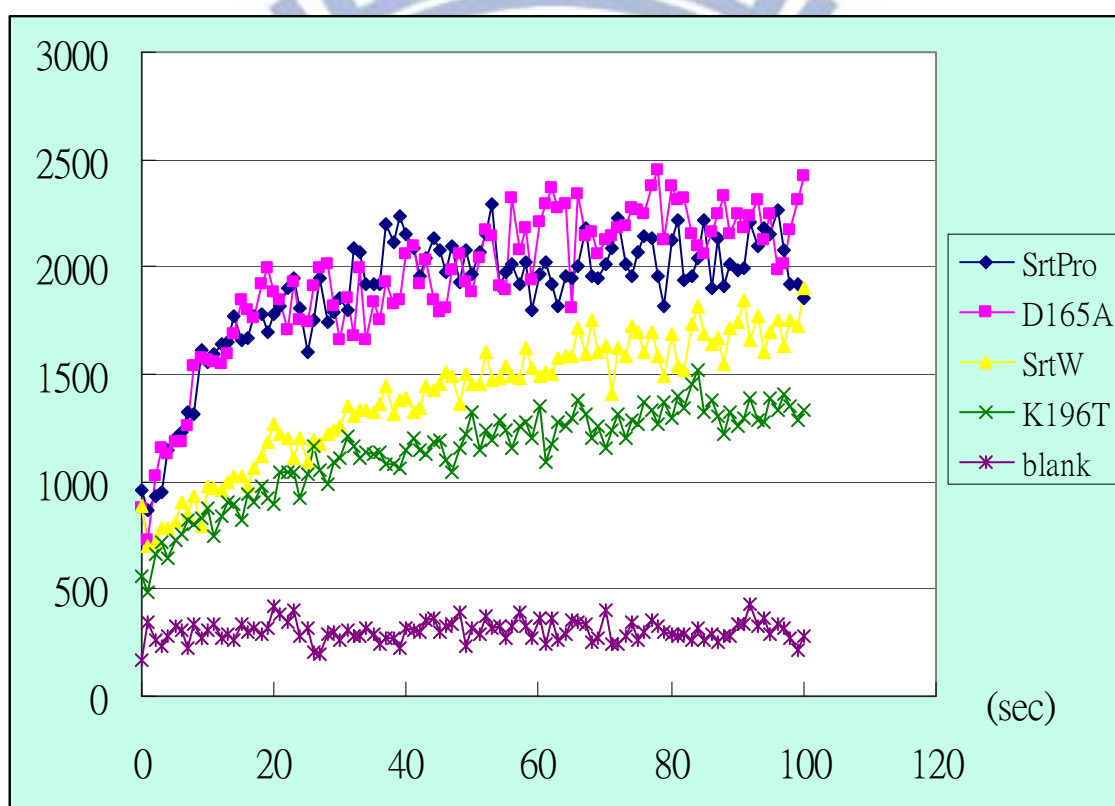


圖 3-7：Sortase A 野生株與突變株水解 Abz-LPETG-Dnp 的螢光值對時間關係圖

取 3~13 秒的數值作水解反應初速率的比較圖如下圖 3-8, 由圖中可得到反應初速率的斜率 SrtPro 為 68.986、D165A 為 55.418、SrtW 為 21.997、K196T 為 18.665, 而對照組的斜率為 2.856 (野生株與突變株線型如圖例所示)。可知對 Abz-LPETG-Dnp 水解反應初速率的大小依次為 SrtPro、D165A、SrtW、K196T。

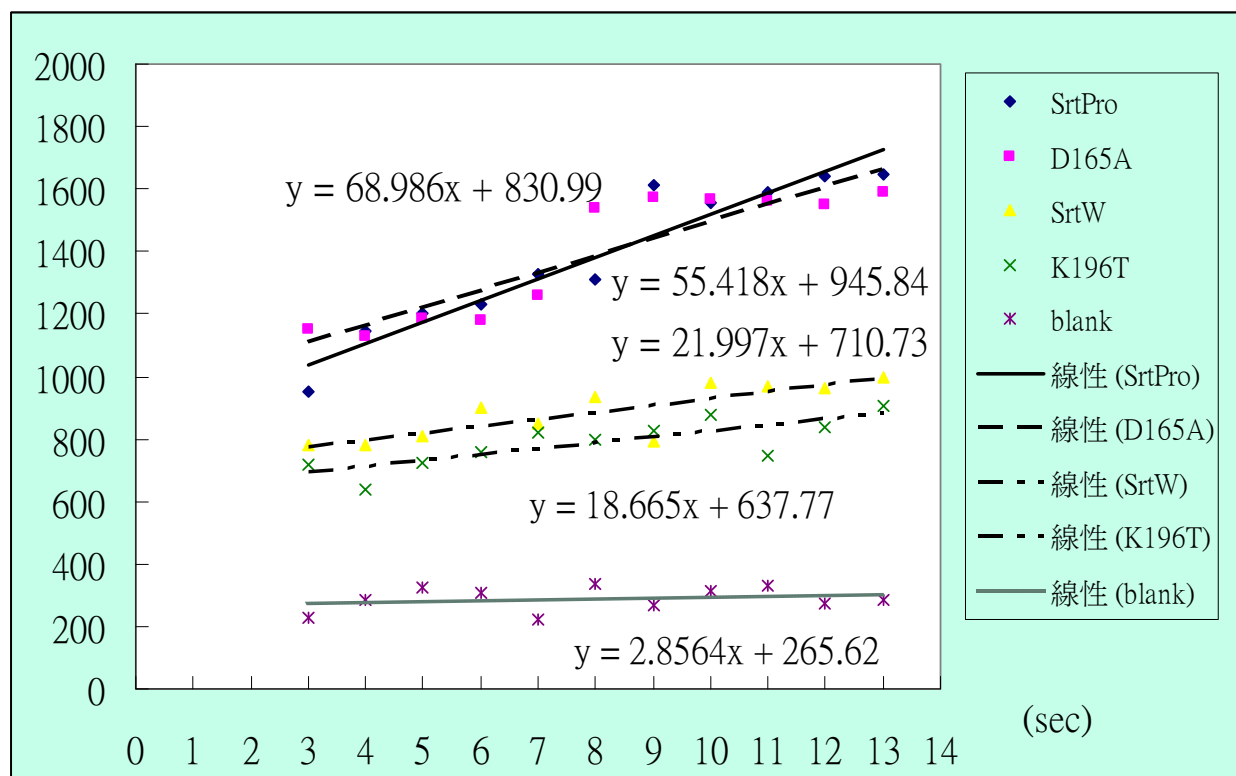
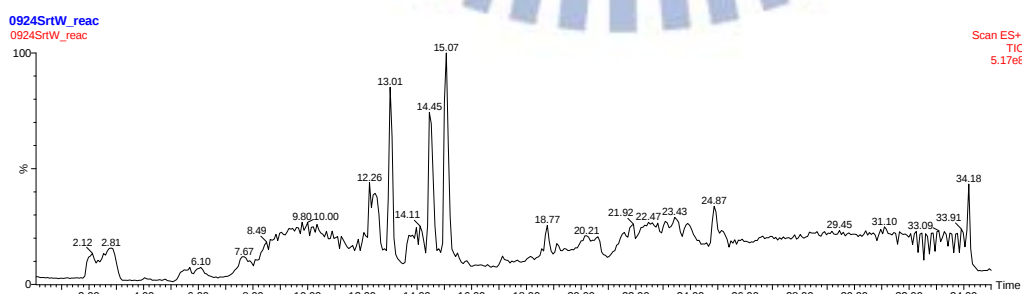


圖 3-8：Sortase A 野生株與突變株水解活性的反應初速率

3-2-3 接合活性的檢測

以 GGGGGK-FITC 與 Abz_LPETG_Dnp 檢測 SrtW 的活性，在質譜上可見 GGGGGK-FITC 荷質比為 411 的訊號（帶 2 個正電），Abz-LPETGGGGGK-FITC 質荷比為 691 訊號（帶 2 個正電），如圖 3-9。



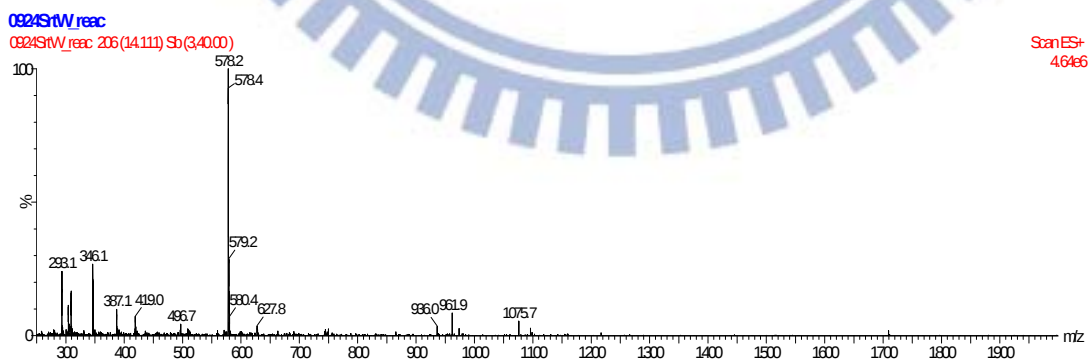
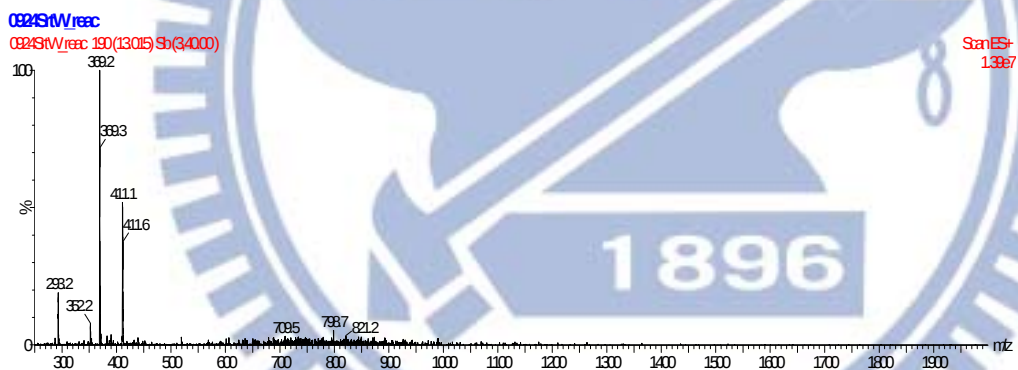
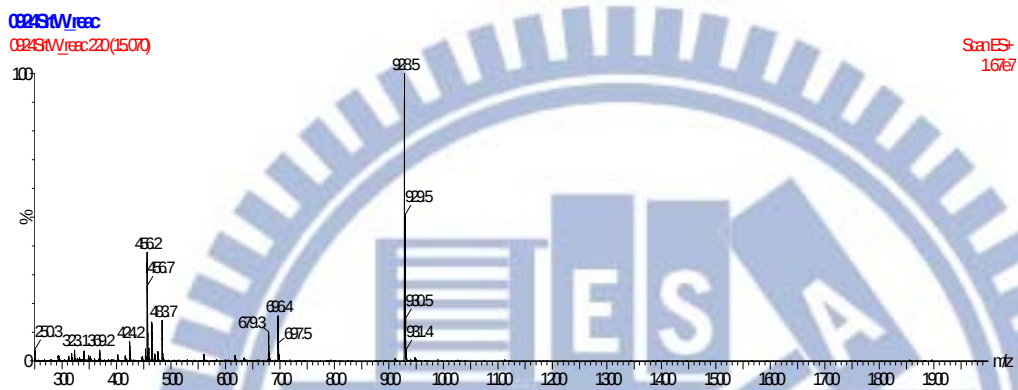
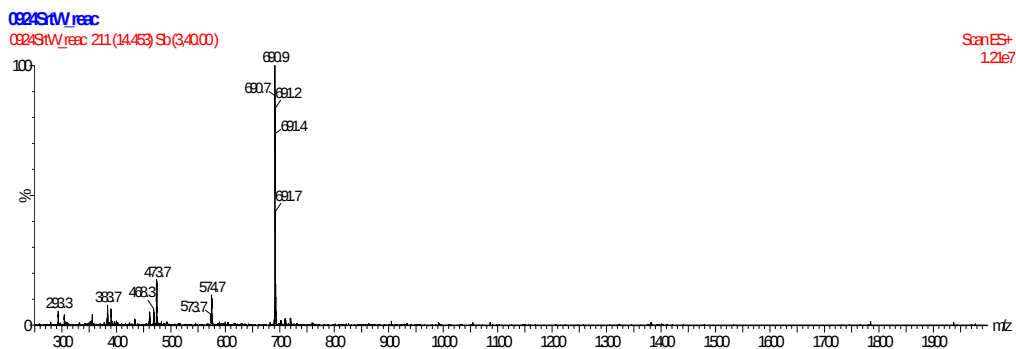


圖 3-9：Sortase A 野生型對 Abz_LPETG_Dnp 與 GGGGGKFITC 的反應質譜圖

對質荷比 691 訊號的分子作 MSMS 分析，得到大量的荷質比 233.1、390.2、574.9、759.3 碎片，如圖 3-10。

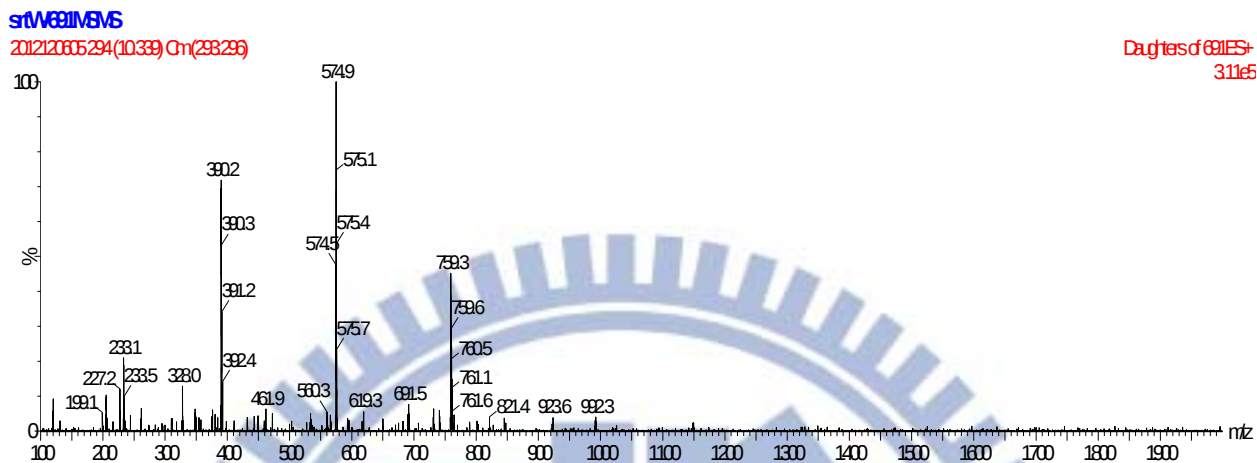


圖 3-10：生成物荷質比 691 訊號的 MSMS 分析

比對碎片的荷質比與胜肽片斷的理論值分子量，其中訊號強度較大的 233.1 的訊號來自於胜肽片斷 Abz-L 分子式 $C_{13}H_{17}O_2N_2$ 分子量理論值 232，若帶 1 個正電，則荷質比為 233；390.2 的訊號來自於胜肽片斷 FITC 分子式 $C_{21}H_{12}O_5NS$ 分子量理論值 390；574.9 的訊號來自於胜肽片斷 PETGGGGGK-FITC 分子式 $C_{51}H_{60}O_{18}N_{11}S$ 分子量理論值 1146，若帶 2 個正電，則荷質比為 574，考慮有 2 個 C 同位素的存在，則荷質比為 575；759.3 的訊號來自於胜肽片斷 PETGGGGGK 分子式 $C_{30}H_{48}O_{13}N_{10}S$ 分子量理論值 756，若帶 1 個正電，則荷質比為 757，考慮有 2 個 C 同位素的存在，則荷質比為 759。其它訊號強度較弱的碎片，也符合其理論值分子量的荷質比，如表 3-3。故在 LC—Mass 中荷質比 691 的訊號表示 Abz-LPETGGGGGK-FITC 被 Sortase A 合成。

表 3-3：Abz_LPETGGGGGK-FITC 訊號的 MSMS 分析表

MS 中的荷質比	胜肽片斷的推測	胜肽片斷的理論值分子量
227.2	PE	226
233.1	Abz-L	232
328	PET	327
390.2	FITC	390
461.9	LPET	460
560.3	Abz-LPET	560.3
574.9	PETGGGGGK-FITC	1146
619.3	Abz-LPETG	617
691.5	Abz-LPETGGGGGK-FITC	1379
759.3	PETGGGGGK	756
821.4	GGGGGK-FITC	820
923.6	TGGGGGK-FITC	921
992.3	Abz-LPETGGGGGK	989

3-2-4 接合活性的比較

Abz-LPETGGGGGK-FITC 為接合生成物，故取其中 FITC 片斷 390 的訊號峰值作為 Abz-LPETGGGGGK-FITC 的參照片斷，作 MRM 分析，如圖 3-11。在 10.39 分時檢測到 Abz-LPETGGGGGK-FITC 的產物，其 MRM 圖譜面積積分值表示產量，此面積之荷質比訊號單純為 691，表示此其產量的計算不受其它物質的干擾。

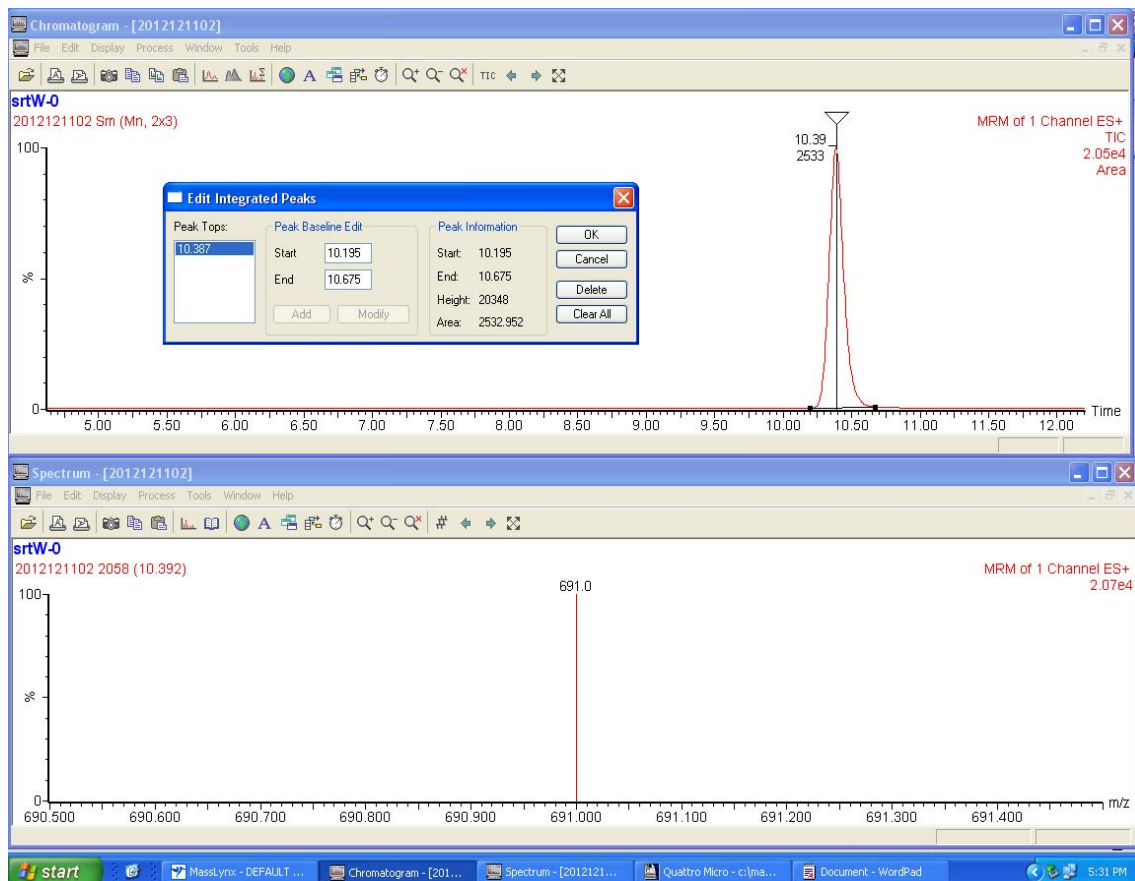


圖 3-11：Abz-LPETGGGGGK-FITC 的 MRM 分析

每隔 5 分鐘所取得的 MRM 圖譜面積積分值如表 3-4(各時間點的 MRM 圖譜見附錄四)

表 3-4：每隔 5 分鐘的 Abz-LPETGGGGGK-FITC 之 MRM 面積積分值

time(min)	0	5	10	15	20	25	30	35
SrtPro	3500	13348	19205	24671	31497	40319	44820	48597
D165A	2186	12029	15367	20792	26666	34726	38345	41400
SrtW	2533	8621	14496	19839	23694	34546	35922	40010
K196T	2735	4761	9962	15316	24594	27408	35631	33243

依此表作時間對 MRM 面積的關係圖，如圖 3-12。可見以 SrtPro 的接合反應最佳，D165 次之，K196T 最差。

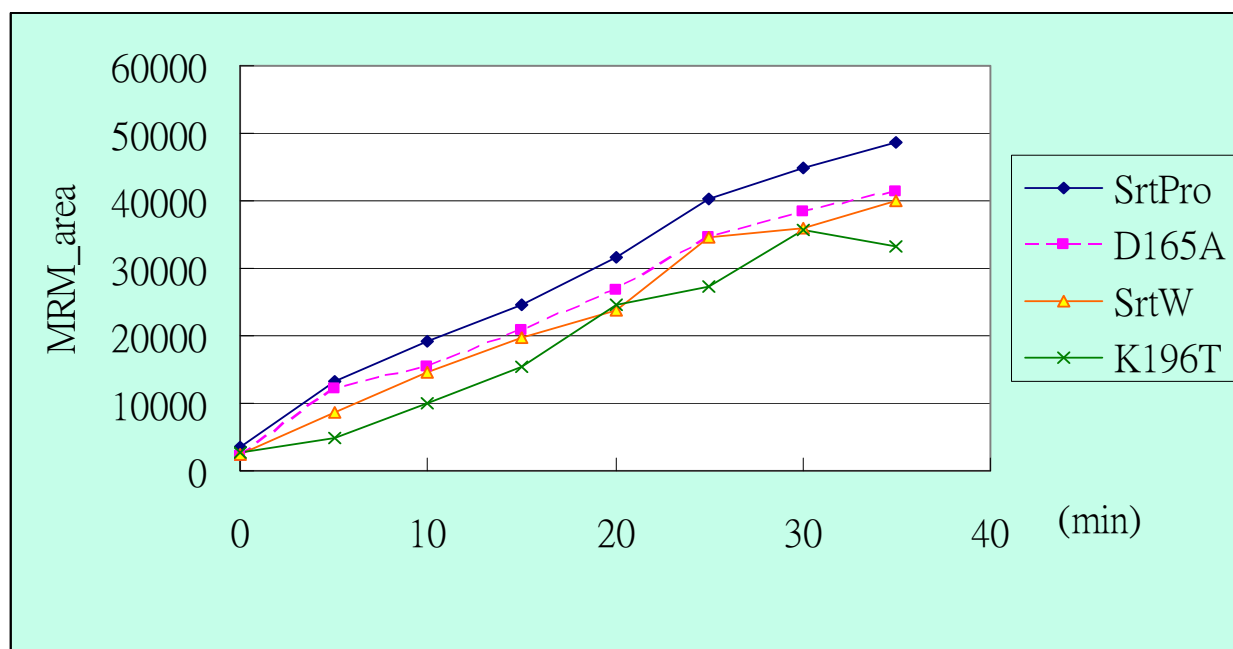


圖 3-12：時間對 MRM 面積的關係圖

取 0~30 分鐘的數值作接合反應初速率的比較圖如下圖 3-13，得到接合反應初速率的斜率 SrtPro 為 1358.5、D165A 為 1179.8、SrtW 為 1151.5、K196T 為 1133（各酵素的線型如圖例所示），可知對 Abz-LPETG-Dnp 與 GGGGGFITC 的接合反應初速率的大小依次為 SrtPro、D165A、SrtW、K196T。

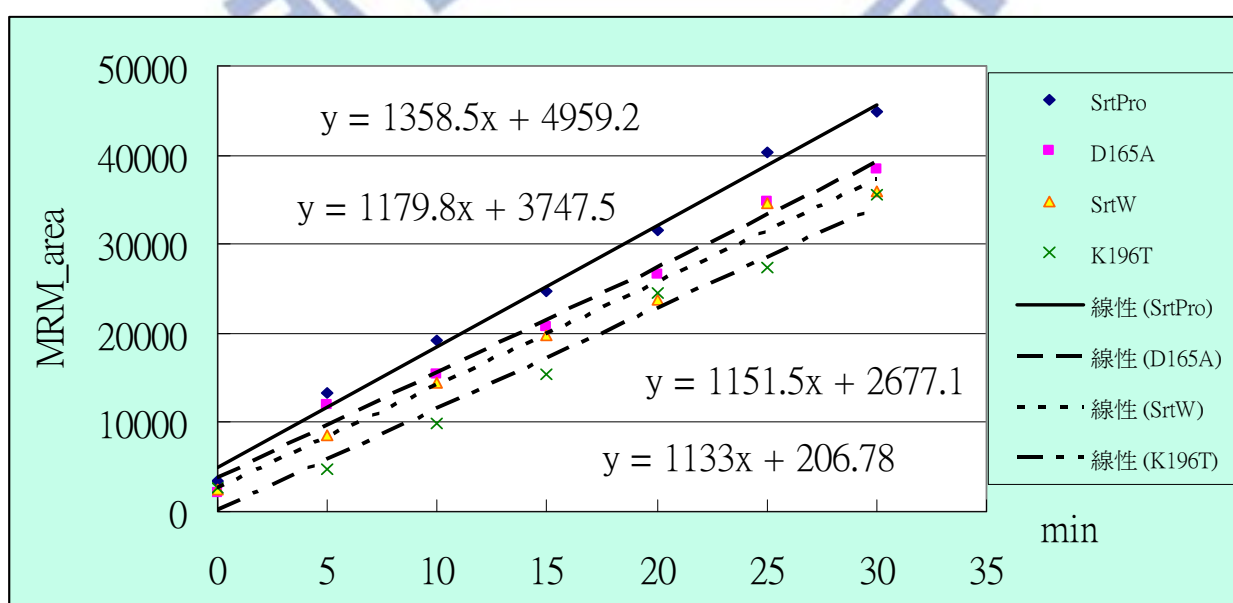


圖 3-13：Sortase A 野生株與突變株接合活性的反應初速率

3-2-5 野生株與突變株的活性比較討論

以 SrtW 的水解初速率與水解接合初速率為基準值，可得突變株的反應初速率倍數關係，如下表 3-5，令 SrtW 的水解倍數與接合倍數為 1；SrtPro 的水解倍數為 3.14，接合倍數為 1.18；D165A 的水解倍數為 2.52，接合倍數為 1.02；K196T 的水解倍數為 0.85，接合倍數為 0.98。

表 3-5：野生株與突變株的活性比較表

種類	水解反應初速率	水解倍數	接合反應初速率	接合倍數
SrtPro	68.986	3.14	1358.5	1.18
D165A	55.418	2.52	1179.8	1.02
SrtW	21.997	1.00	1151.5	1.00
K196T	18.665	0.85	1133	0.98

比較水解倍數，可知對 Abz-LPETG-Dnp 的水解活性大小依次為 SrtPro、D165A、SrtW、K196T。由接合反應初速率的接合倍數，可知對 Abz-LPETG-Dnp 與 GGGGGFITC 的接合活性大小，依次為 SrtPro、D165A、SrtW、K196T。

而 D165A 的水解倍數為 2.52，接合倍數為 1.02，顯示此突變有利於 LPETG 的水解反應，但對 GGGGG 端的接合反應並無有效的改善。K196T 的水解倍數為 0.85，接合倍數為 0.98，顯示此突變雖不利於 LPETG 的水解反應，但接合反應倍數與野生株相近，故 K196T 的突變有利於 GGGGGK-FITC 的結合。而 SrtPro 的水解倍數為 3.14，較 D165A 的水解倍數 2.52 為大，故推測 P94S 與 D160N 的突變點，也有利於 LPETG 的水解反應速率。

綜合以上討論 P94S、D160N、D165A 能增快水解速率，有利於 LP 殘基的結合，K196T 則有利於 GGGGG 殘基的結合。其中 D160N、D165A 位於 $\beta 6/\beta 7$ 的螺旋上，K196T 位於 $\beta 7/\beta 8$ 的螺旋上，與文獻探討中 $\beta 6/\beta 7$ 區域與辨認 LPXTG 中的 LP 殘基有關(35-37)， $\beta 7/\beta 8$ 區域與 GGG 的辨認有關(35, 38)的敘述相符。

在 Chen, et al.(2011)的研究中(46)指出 LPETG 被 SrtPro 催化的 Kcat (最大催化速率) 為 4.8、SrtW 的 Kcat 為 1.5、D165A 的 Kcat 為 2.4、K196T 的 Kcat 為 1.2，令 SrtW 的催化速率為基準值 1,則 SrtPro 的催化倍數為 3.2、D165A 的催化倍數為 1.6、K196T 的催化倍數為 0.8。以此數據與本研究相比，其相對誤差可見 SrtPro 為-1.9%、K196T 為 6.3%，如下表 3-6。而 D165A 的相對誤差雖為 57.5%，但仍證明 D165A 的突變有助於水解反應初速率的增加。故本研究實驗結果與之相符。

表 3-6：Sortase A 水解反應研究結果之相對誤差

種類	水解倍數 (本研究)	最大催化速率 (Irwin Chen)	催化倍數 (Irwin Chen)	相對誤差% [= (水解倍數－催化倍數) / 催化倍數 * 100%]
SrtPro	3.14	4.8	3.2	-1.9
D165A	2.52	2.4	1.6	57.5
SrtW	1	1.5	1	0
K196T	0.85	1.2	0.8	6.3

3-3 Sortase A 四點突變株之應用

在石英晶體微量天平 (QCM) 上修飾 LPETGLPETG 的胜肽段(53)，藉著 SrtPro 將 GGGGGK—FITC 接合在 LPET 上，可在顯微鏡中看見有接上 GGGGGK—FITC 的區域呈現綠色螢光。

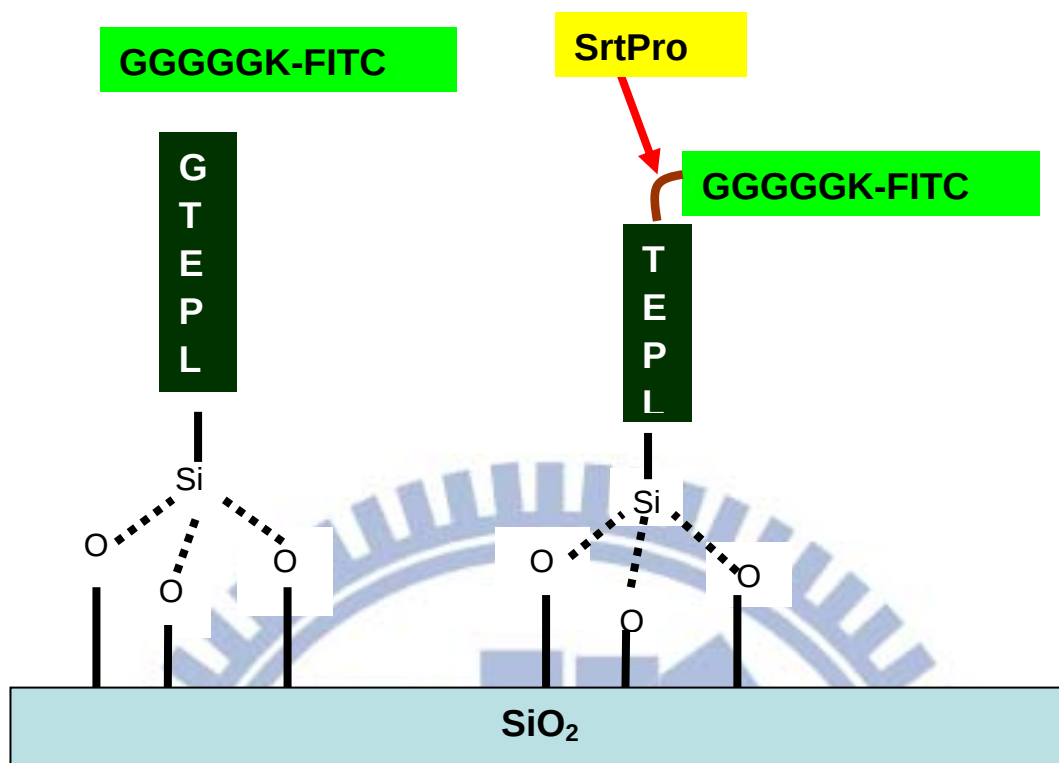


圖 3-14：SrtPro 在 QCM 上的應用示意圖

取 SrtPro 濃度 $50\mu\text{M}$ ，GGGGGK—FITC 濃度 $500\mu\text{M}$ ，作用在修飾 LPETGLPETG 的 QCM 上反應 12 小時，得到的顯微照片如下圖 3-15。可知當一端受質為固定端時，SrtPro 仍保有活性。

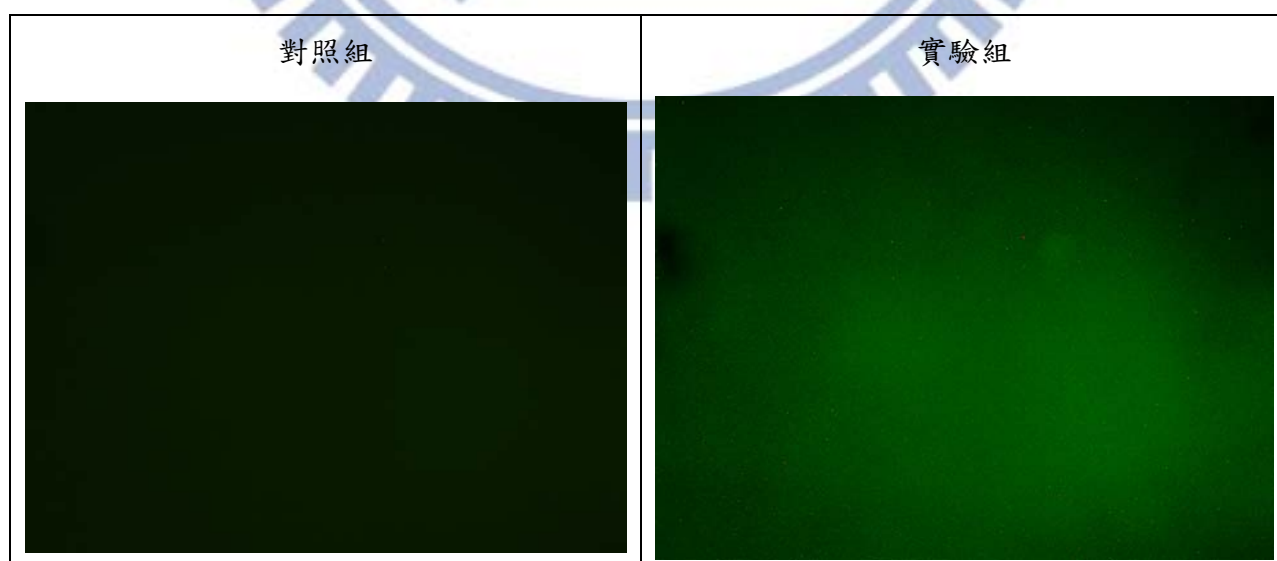


圖 3-15：接合 GGGGGK—FITC 的 QCM 晶片圖

第四章 結論

在取得 Srt W、D165A、K196T 與 SrtPro 的酵素過程中，發現 Sortase A 的野生株與 D165A、K196T、SrtPro 此三種突變株均能在胞內液中大量表現，且均能水解 Abz-LPETG-Dnp 後與 GGGGGK-FITC 接合，生成 Abz-LPETGGGGGK-FITC。故 Sortase A 的野生株與 D165A、K196T、SrtPro 的突變株在水溶液中均能呈現水解活性與接合活性。

以螢光光譜儀檢測 Abz-LPETG-Dnp 被水解後的螢光值，發現突變株 D165A、SrtPro 能增快水解速率，且 SrtPro 的水解倍數 3.14 大於 D165A 的水解倍數 2.52，顯示 P94S、D160N、D165A，有利於 LP 殘基的結合而增加水解的反應速率。K196T 水解倍數只有 0.85 但接合倍數為 0.98 顯示 K196T 則有利於 GGGGG 殘基的結合，增加接合的反應速率。在比較突變株的水解與接合反應初速率後，顯示突變株 SrtPro 比野生株 SrtW 在水解初速率上大 3.14 倍，在接合初速率上大 1.18 倍。故可以用 SrtPro 取代 SrtW 進行反應。

研究過程中發現水解反應在 1 分鐘時已接近反應速率的最大值，而接合反應在 30 分鐘後反應速率才減緩，故可知 Sortase A 的作用雖遵循「乒乓機制」(44)，先水解 Abz-LPETG-Dnp 再接合 GGGGGFITC，但要縮短接合反應的時間較能有效縮短 SortaseA 的作用時間。

最後將 SrtPro 應用在 QCM 的研究發現，雖然 LPETG 端固定在 QCM 晶片上非在溶液懸浮狀態，但懸浮在溶液中的 GGGGGK-FITC 仍能被接合在 LPET 上，表示 SrtPro 在此狀態下仍具有水解接合的作用。

第五章 未來研究方向

在實驗過程中探討接合反應速率時，以每隔 5 分鐘取得 MRM 面積的方法呈現酵素的反應量值，可進一步設計以螢光共振能量轉移（Fluorescence resonance energy transfer, FRET）的方式，藉由觀察 FRET 的螢光量值了解 Sortase A 即時的接合速率反應量值。如以 Rhodamine-QALPETG 與 GGGGGFITC 為受質，當 Sortase A 作用後形成 Rhodamine-QALPETGGGGGK-FITC，以 450nm 的螢光激發 FITC，若有產物則發散波長會由 530nm 轉移至 585nm，在螢光光譜上，可藉由觀察 585nm 波長的變化測得 Sortase A 接合反應的速率 (54)。

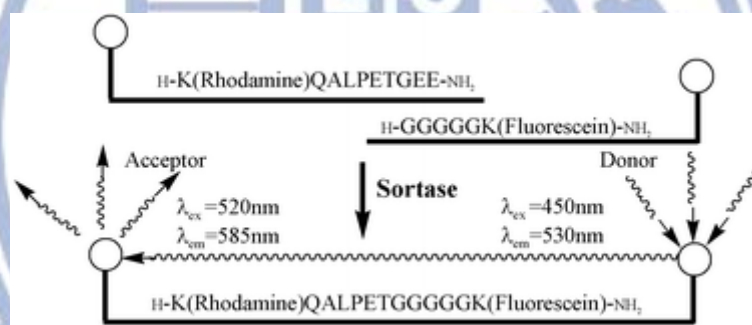
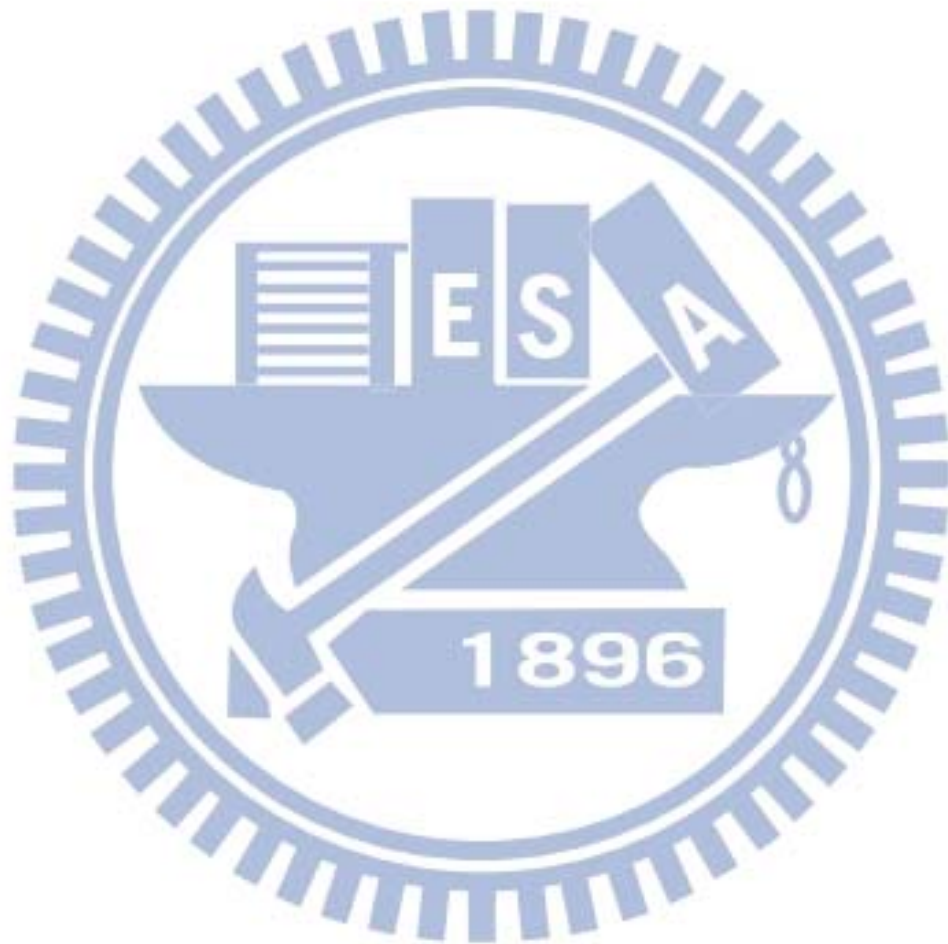


圖 5-1：Sortase A 的 FRET 研究示意圖 (54)

而本研究試以 Rhodamine-QALPETG 為受質研究其接合反應時，發現 Rhodamine-QALPETG 在 Sortase A 活性溶液（Tris5mM、NaCl 15mM、鈣離子 2 mM）中螢光會消失，將溶液中的 Tris 降低至 5 μ M 則螢光才會又出現，但 Sortase A 活性在此低濃度鹽類環境中活性降低，不利於進行 Sortase A 反應速率的探討。而在低濃度鹽類 Rhodamine-QALPETG 螢光消失的現象，未來可能是研究探討的方向。

實驗結論中顯示縮短接合反應的時間較能有效縮短 SortaseA 的作用時間，故在 β 7/ β 8（D185~K196）的螺旋上進行有利於辨認 GGGGG 受質的胺基酸突變，尚有很多的研究空間。而以 SrtPro 取代 SrtW 可將 GGGGGK-FITC 的肽段接合在修飾 LPETG 的晶片載體上，

但最佳反應條件，如 pH 值、溫度、反應時間等，仍需再做研究。且雖然 SrtPro 具有接合的專一性，但要修飾不同的抗體在 QCM 晶片上做為探針進行免疫檢查時，將胜肽段置換成蛋白質抗體，是否會有立體障礙，而阻礙 SrtPro 的反應，仍需再做研究。



References

1. Dawson, P. E., and Kent, S. B. (2000) Synthesis of native proteins by chemical ligation, *Annu Rev Biochem* 69, 923-960.
2. David, R., Richter, M. P., and Beck-Sickinger, A. G. (2004) Expressed protein ligation. Method and applications, *Eur J Biochem* 271, 663-677.
3. Ayers, B., Blaschke, U. K., Camarero, J. A., Cotton, G. J., Holford, M., and Muir, T. W. (1999) Introduction of unnatural amino acids into proteins using expressed protein ligation, *Biopolymers* 51, 343-354.
4. Levary, D. A., Parthasarathy, R., Boder, E. T., and Ackerman, M. E. (2011) Protein-protein fusion catalyzed by sortase A, *PLoS One* 6, e18342.
5. Strijbis, K., Spooner, E., and Ploegh, H. L. (2012) Protein ligation in living cells using sortase, *Traffic* 13, 780-789.
6. Matsumoto, T., Tanaka, T., and Kondo, A. (2012) Sortase A-catalyzed site-specific coimmobilization on microparticles via streptavidin, *Langmuir* 28, 3553-3557.
7. Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., and Bierne, H. (2005) Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria, *Res Microbiol* 156, 289-297.
8. Comfort, D., and Clubb, R. T. (2004) A comparative genome analysis identifies distinct sorting pathways in gram-positive bacteria, *Infect Immun* 72, 2710-2722.
9. Maresso, A. W., and Schneewind, O. (2008) Sortase as a target of anti-infective therapy, *Pharmacol Rev* 60, 128-141.
10. Klebba, P. E., Charbit, A., Xiao, Q., Jiang, X., and Newton, S. M. (2012) Mechanisms of iron and haem transport by *Listeria monocytogenes*, *Mol Membr Biol* 29, 69-86.
11. Swaminathan, A., Mandlik, A., Swierczynski, A., Gaspar, A., Das, A., and Ton-That, H. (2007) Housekeeping sortase facilitates the cell wall anchoring of pilus polymers in *Corynebacterium diphtheriae*, *Mol Microbiol* 66, 961-974.

12. Marraffini, L. A., Dedent, A. C., and Schneewind, O. (2006) Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria, *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 192-221.
13. Mazmanian, S. K., Liu, G., Jensen, E. R., Lenoy, E., and Schneewind, O. (2000) Staphylococcus aureus sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5510-5515.
14. Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H., and Schneewind, O. (1999) Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall, *Science* 285, 760-763.
15. Driessen, A. J., Fekkes, P., and van der Wolk, J. P. (1998) The Sec system, *Curr Opin Microbiol* 1, 216-222.
16. Bentley, M. L., Lamb, E. C., and McCafferty, D. G. (2008) Mutagenesis studies of substrate recognition and catalysis in the sortase A transpeptidase from Staphylococcus aureus, *J Biol Chem* 283, 14762-14771.
17. Mao, H., Hart, S. A., Schink, A., and Pollok, B. A. (2004) Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering, *J Am Chem Soc* 126, 2670-2671.
18. Popp, M. W., Antos, J. M., Grotenbreg, G. M., Spooner, E., and Ploegh, H. L. (2007) Sortagging: a versatile method for protein labeling, *Nat Chem Biol* 3, 707-708.
19. Tanaka, T., Yamamoto, T., Tsukiji, S., and Nagamune, T. (2008) Site-specific protein modification on living cells catalyzed by Sortase, *Chembiochem* 9, 802-807.
20. Pritz, S., Wolf, Y., Kraetke, O., Klose, J., Bienert, M., and Beyermann, M. (2007) Synthesis of biologically active peptide nucleic acid-peptide conjugates by sortase-mediated ligation, *J Org Chem* 72, 3909-3912.
21. Samantaray, S., Marathe, U., Dasgupta, S., Nandicoori, V. K., and Roy, R. P. (2008) Peptide-sugar ligation catalyzed by transpeptidase sortase: a facile approach to neoglycoconjugate synthesis, *J Am Chem Soc* 130, 2132-2133.

22. Parthasarathy, R., Subramanian, S., and Boder, E. T. (2007) Sortase A as a novel molecular "stapler" for sequence-specific protein conjugation, *Bioconjug Chem* 18, 469-476.
23. Chan, L., Cross, H. F., She, J. K., Cavalli, G., Martins, H. F., and Neylon, C. (2007) Covalent attachment of proteins to solid supports and surfaces via Sortase-mediated ligation, *PLoS One* 2, e1164.
24. Clow, F., Fraser, J. D., and Proft, T. (2008) Immobilization of proteins to biacore sensor chips using *Staphylococcus aureus* sortase A, *Biotechnol Lett* 30, 1603-1607.
25. Wu, Z., Guo, X., Wang, Q., Swarts, B. M., and Guo, Z. (2010) Sortase A-catalyzed transpeptidation of glycosylphosphatidylinositol derivatives for chemoenzymatic synthesis of GPI-anchored proteins, *J Am Chem Soc* 132, 1567-1571.
26. Antos, J. M., Miller, G. M., Grotenbreg, G. M., and Ploegh, H. L. (2008) Lipid modification of proteins through sortase-catalyzed transpeptidation, *J Am Chem Soc* 130, 16338-16343.
27. Wu, S., and Proft, T. (2010) The use of sortase-mediated ligation for the immobilisation of bacterial adhesins onto fluorescence-labelled microspheres: a novel approach to analyse bacterial adhesion to host cells, *Biotechnol Lett* 32, 1713-1718.
28. Sakamoto, T., Sawamoto, S., Tanaka, T., Fukuda, H., and Kondo, A. (2010) Enzyme-mediated site-specific antibody-protein modification using a ZZ domain as a linker, *Bioconjug Chem* 21, 2227-2233.
29. Popp, M. W., Dougan, S. K., Chuang, T. Y., Spooner, E., and Ploegh, H. L. (2011) Sortase-catalyzed transformations that improve the properties of cytokines, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3169-3174.
30. Refaei, M. A., Combs, A., Kojetin, D. J., Cavanagh, J., Caperelli, C., Rance, M., Sapitro, J., and Tsang, P. (2011) Observing selected domains in multi-domain proteins via sortase-mediated ligation and NMR spectroscopy, *J Biomol NMR* 49, 3-7.

31. Pritz, S., Wolf, Y., Kraetke, O., Klose, J., Bienert, M., and Beyermann, M. (2009) Enzymatic ligation of peptides, peptide nucleic acids and proteins by means of sortase A, *Adv Exp Med Biol* 611, 107-108.
32. Proft, T. (2010) Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilisation, *Biotechnol Lett* 32, 1-10.
33. Ton-That, H., Mazmanian, S. K., Faull, K. F., and Schneewind, O. (2000) Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Sortase catalyzed in vitro transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH(2)-Gly(3) substrates, *J Biol Chem* 275, 9876-9881.
34. Ilangovan, U., Ton-That, H., Iwahara, J., Schneewind, O., and Clubb, R. T. (2001) Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6056-6061.
35. Zong, Y., Bice, T. W., Ton-That, H., Schneewind, O., and Narayana, S. V. (2004) Crystal structures of *Staphylococcus aureus* sortase A and its substrate complex, *J Biol Chem* 279, 31383-31389.
36. Naik, M. T., Suree, N., Ilangovan, U., Liew, C. K., Thieu, W., Campbell, D. O., Clemens, J. J., Jung, M. E., and Clubb, R. T. (2006) *Staphylococcus aureus* Sortase A transpeptidase. Calcium promotes sorting signal binding by altering the mobility and structure of an active site loop, *J Biol Chem* 281, 1817-1826.
37. Bentley, M. L., Gaweska, H., Kielec, J. M., and McCafferty, D. G. (2007) Engineering the substrate specificity of *Staphylococcus aureus* Sortase A. The beta6/beta7 loop from SrtB confers NPQTN recognition to SrtA, *J Biol Chem* 282, 6571-6581.
38. Zong, Y., Mazmanian, S. K., Schneewind, O., and Narayana, S. V. (2004) The structure of sortase B, a cysteine transpeptidase that tethers surface protein to the *Staphylococcus aureus* cell wall, *Structure* 12, 105-112.
39. Ton-That, H., Liu, G., Mazmanian, S. K., Faull, K. F., and Schneewind, O. (1999)

Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12424-12429.

40. Frankel, B. A., Tong, Y., Bentley, M. L., Fitzgerald, M. C., and McCafferty, D. G. (2007) Mutational analysis of active site residues in the *Staphylococcus aureus* transpeptidase SrtA, *Biochemistry* 46, 7269-7278.
41. Connolly, K. M., Smith, B. T., Pilpa, R., Ilangovan, U., Jung, M. E., and Clubb, R. T. (2003) Sortase from *Staphylococcus aureus* does not contain a thiolate-imidazolium ion pair in its active site, *J Biol Chem* 278, 34061-34065.
42. Ton-That, H., Mazmanian, S. K., Alksne, L., and Schneewind, O. (2002) Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Cysteine 184 and histidine 120 of sortase form a thiolate-imidazolium ion pair for catalysis, *J Biol Chem* 277, 7447-7452.
43. Adler, A. J., Greenfield, N. J., and Fasman, G. D. (1973) Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides, *Methods Enzymol* 27, 675-735.
44. Huang, X., Aulabaugh, A., Ding, W., Kapoor, B., Alksne, L., Tabei, K., and Ellestad, G. (2003) Kinetic mechanism of *Staphylococcus aureus* sortase SrtA, *Biochemistry* 42, 11307-11315.
45. Frankel, B. A., Kruger, R. G., Robinson, D. E., Kelleher, N. L., and McCafferty, D. G. (2005) *Staphylococcus aureus* sortase transpeptidase SrtA: insight into the kinetic mechanism and evidence for a reverse protonation catalytic mechanism, *Biochemistry* 44, 11188-11200.
46. Chen, I., Dorr, B. M., and Liu, D. R. (2011) A general strategy for the evolution of bond-forming enzymes using yeast display, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11399-11404.
47. Marraffini, L. A., Ton-That, H., Zong, Y., Narayana, S. V., and Schneewind, O. (2004) Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. A conserved arginine residue is required for efficient catalysis of sortase A, *J Biol Chem* 279,

37763-37770.

48. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
49. Zor, T., and Selinger, Z. (1996) Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies, *Anal Biochem* 236, 302-308.
50. Anderson, L., and Hunter, C. L. (2006) Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins, *Mol Cell Proteomics* 5, 573-588.
51. Zhang, D., Lee, D. J., and Pan, X. (2012) Desorption of Hg(II) and Sb(V) on extracellular polymeric substances: Effects of pH, EDTA, Ca(II) and temperature shocks, *Bioresour Technol* 128C, 711-715.
52. Leiros, H. K., Brandsdal, B. O., Andersen, O. A., Os, V., Leiros, I., Helland, R., Otlewski, J., Willassen, N. P., and Smalas, A. O. (2004) Trypsin specificity as elucidated by LIE calculations, X-ray structures, and association constant measurements, *Protein Sci* 13, 1056-1070.
53. 邊郁茹. (2011) 利用苯硼酸衍生物作為抗體專一位向固定化並應用於前降鈣素檢測. 國立交通大學.
54. Kruger, R. G., Dostal, P., and McCafferty, D. G. (2002) An economical and preparative orthogonal solid phase synthesis of fluorescein and rhodamine derivatized peptides: FRET substrates for the Staphylococcus aureus sortase SrtA transpeptidase reaction, *Chem Commun (Camb)*, 2092-2093.

附錄一：DNA 序列與胺基酸序列對照表

Sortase A 野生株的 DNA 與胺基酸序列

cggggggtacattccccctctagaataattttgtttaactttaagaaggagatataccatg
G G V H S P L E - F C L T L R R R Y T M
ggcagcagccatcatcatcatcacagcagcggcctggtgccgcgcggcagccataat
G S S H H H H H S S G L V P R G S H N
aaacctcacatcgacaactatctgcacgacaaagacaaagacgagaaaaatcgagcagtat
K P H I D N Y L H D K D K D E K I E Q Y
gacaaaaatgtgaaagagcaggccagcaaagacaataaacagcaagccaaacctcaaatc
D K N V K E Q A S K D N K Q Q A K P Q I
ccgaaaagacaaaagcaaagtggcgggctatatcgaaattcctgacgccgacattaaagaa
P K D K S K V A G Y I E I P D A D I K E
cctgtgtatccgggtccggctactcctgagcaactgaatcgtggagtgcgttcgctgaa
P V Y P G P A T P E Q L N R G V S F A E
gaaaacgaaagcctggatgatcaaaacatcagcattgccggccacacctttatcgatcgt
E N E S L D D Q N I S I A G H T F I D R
ccgaactatcagttcaccaatctgaaagcggccaaaaaagggttcgatgggtgtatttcaa
P N Y Q F T N L K A A K K G S M V Y F K
gtcgggaacgaaacccgtaaatataaaatgacctccatccgtgacgtgaaaccaacggac
V G N E T R K Y K M T S I R D V K P T D
gtggaagtccctggatgaacagaaaggcaaagacaaacagctgaccctgatcacttgtgac
V E V L D E Q K G K D K Q L T L I T C D
gactataacgagaaaaccggtgtgtgggaaaaacgtaaaatcttcgtggccaccgaagtg
D Y N E K T G V W E K R K I F V A T E V
aaataagaattcaagcttgccggccgactcgagcaccaccaccaccactgagatccg
K - E F K L A A A L E H H H H H H - D P

Sortase A D165A 的 DNA 與胺基酸序列

cccccttcctagaatgaattttgtttaactttaagaaggagatataccatgggcagcagc
P P S - N E F C L T L R R R Y T M G S S
catcatcattatcatcacagcagcggcctggtgccgcgcggcagccataataaacctcac
H H H Y H H S S G L V P R G S H N K P H
atcgacaactatctgcacgacaaagacaaagacgagaaaaatcgagcagtatgacaaaaat
I D N Y L H D K D K D E K I E Q Y D K N
gtgaaagagcaggccagcaaagacaataaacagcaagccaaacctcaaatcccgaagac

V K E Q A S K D N K Q Q A K P Q I P K D
 aaaagcaaagtggcgggctatatcgaaattcctgacgccgacattaaagaacctgtgtat
 K S K V A G Y I E I P D A D I K E P V Y
 ccgggtccggctactcctgagcaactgaatcgtggagtgaagcttcgctgaagaaaacgaa
 P G P A T P E Q L N R G V S F A E E N E
 agcctggatgatcaaaacatcagcattgccggccacacctttatcgatcgtccgaactat
 S L D D Q N I S I A G H T F I D R P N Y
 cagttcaccaatctgaaagcggccaaaaaagggttcgatgggtgtatttcaaagtcgggaac
 Q F T N L K A A K K G S M V Y F K V G N
 gaaaccgtaaatataaaatgacctccatccgtgacgtgaaaccaacggccgtggaagtc
 E T R K Y K M T S I R D V K P T A V E V
 ctggatgaacagaaaggcaaagacaaacagctgacctgatcacttgtgacgactataac
 L D E Q K G K D K Q L T L I T C D D Y N
 gagaaaaccggtgtgtgggaaaaacgtaaaatcttcgtggccaccgaagtgaataagaa
 E K T G V W E K R K I F V A T E V K - E

Sortase A K196T 的 DNA 與氨基酸序列

cccccttcctaggaataattttgtttaactttaagaaggagatataccatgggcagcagc
 P L P R K - F C L T L R R R Y T M G S S
 catcatcatcatcatcacagcagcggcctgggtgccgcgcggcagccataataaacctcac
 H H H H H H S S G L V P R G S H N K P H
 atcgacaactatctgcacgacaaagacaaagacgagaaaaatcgagcagtatgacaaaaat
 I D N Y L H D K D K D E K I E Q Y D K N
 gfgaaagagcaggccagcaaagacaataaacagcaagccaaacctcaaatcccgaagac
 V K E Q A S K D N K Q Q A K P Q I P K D
 aaaagcaaagtggcgggctatatcgaaattcctgacgccgacattaaagaacctgtgtat
 K S K V A G Y I E I P D A D I K E P V Y
 ccgggtccggctactcctgagcaactgaatcgtggagtgaagcttcgctgaagaaaacgaa
 P G P A T P E Q L N R G V S F A E E N E
 agcctggatgatcaaaacatcagcattgccggccacacctttatcgatcgtccgaactat
 S L D D Q N I S I A G H T F I D R P N Y
 cagttcaccaatctgaaagcggccaaaaaagggttcgatgggtgtatttcaaagtcgggaac
 Q F T N L K A A K K G S M V Y F K V G N
 gaaaccgtaaatataaaatgacctccatccgtgacgtgaaaccaacggacgtggaagtc
 E T R K Y K M T S I R D V K P T D V E V
 ctggatgaacagaaaggcaaagacaaacagctgacctgatcacttgtgacgactataac
 L D E Q K G K D K Q L T L I T C D D Y N

gagaaaaccggtgtgtgggaaaccgtaaaatcttcgtggccaccgaagtgaataagaa
E K T G V W E T R K I F V A T E V K - E

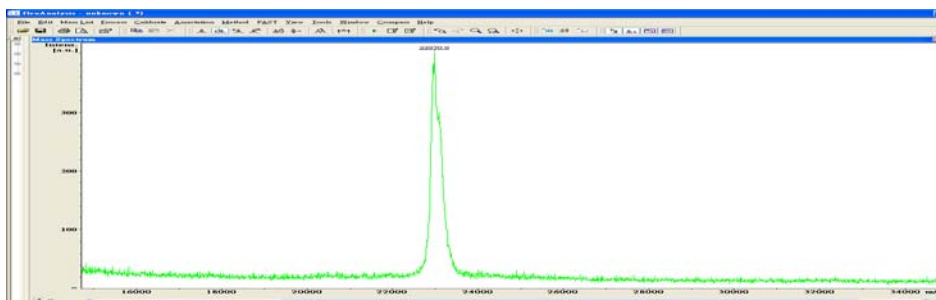
SortasePro 的 DNA 與胺基酸序列

agaaggagatataccatgggcagcagccatcatcatcatcacagcagcggcctggtg
R R R Y T M G S S H H H H H S S G L V
ccgcgcggcagccatatgcaccaccaccaccaccaagccaaacctcaaattccgaaa
P R G S H M H H H H H Q A K P Q I P K
gacaaaagcaaagtggcgggctatatcgaaattcctgacgccgacattaaagaacctgtg
D K S K V A G Y I E I P D A D I K E P V
tatccgggtccggctacttctgagcaactgaatcgtggagtgaaccttcgctgaagaaaac
Y P G P A T S E Q L N R G V S F A E E N
gaaagcctggatgatcaaaacatcagcattgccggccacacctttatcgatcgtccgaac
E S L D D Q N I S I A G H T F I D R P N
tatcagttcaccaatctgaaagcggccaaaaaagggttcgatgggtgtatttcaaagtcggg
Y Q F T N L K A A K K G S M V Y F K V G
aacgaaaccgtaaatataaaatgacctccatccgtaacgtgaaaccaacggccgtggaa
N E T R K Y K M T S I R N V K P T A V E
gtcctggatgaacagaaaggcaaagacaaacagctgacctgatcacttgtgacgactat
V L D E Q K G K D K Q L T L I T C D D Y
aacgagaaaaccggtgtgtgggaaaccgtaaaatcttcgtggccaccgaagtgaataa
N E K T G V W E T R K I F V A T E V K -

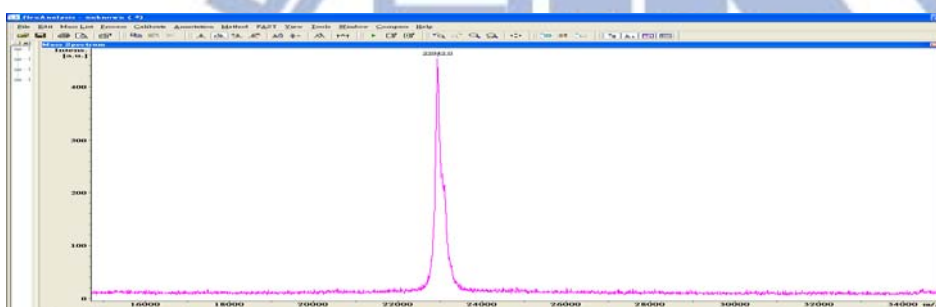


附錄二：MALDI-TOF 分析的分子量圖譜

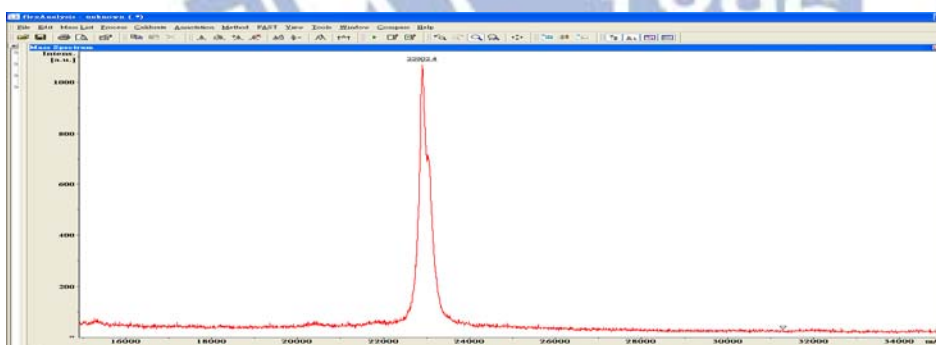
SrtW 的分子量為：22970.9



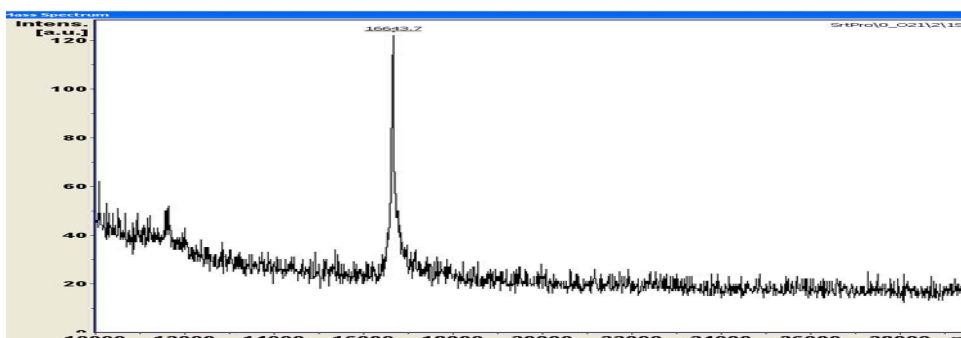
D165A 的分子量：22942.0



K196T 的分子量：22902.4



Srt Pro 的分子量：16643.7



附錄三：Abz-LPETG-Dnp 被 Sortase A 水解的螢光量值對時間紀錄表

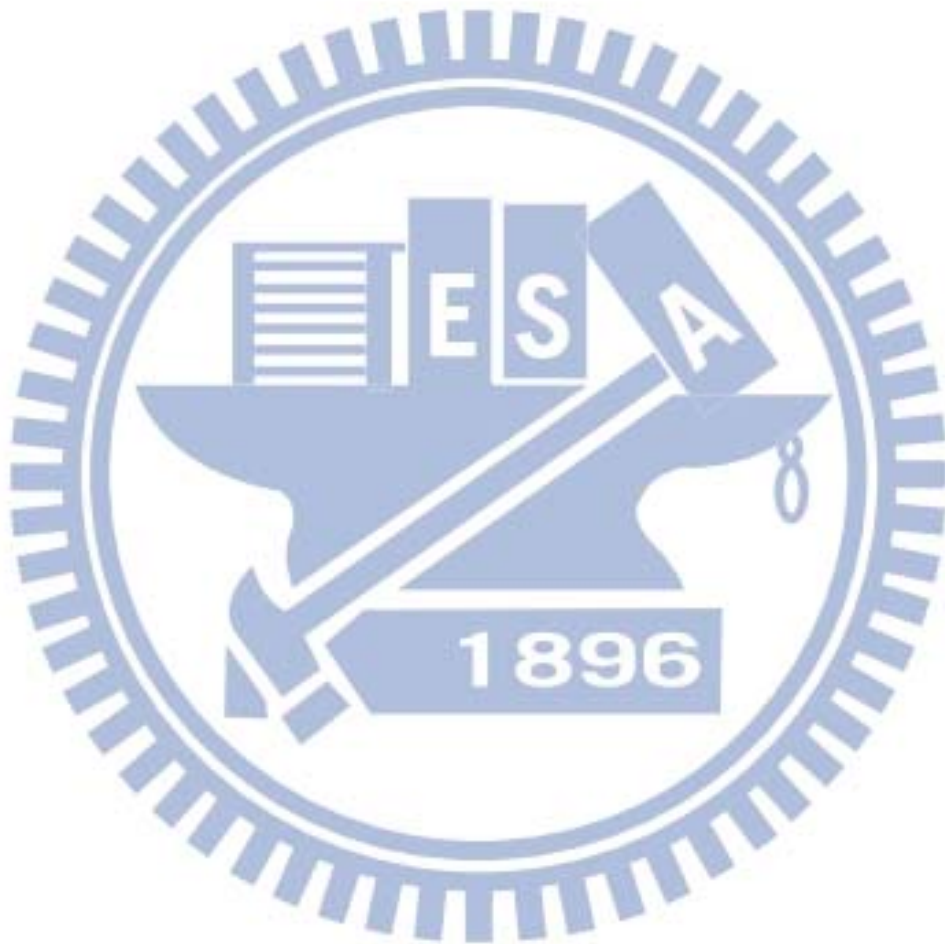
s	SrtPro	D165A	SrtW	K196T	blank
0	961.3	876	887.4	561.6	165.6
1	871	724.6	694.1	485.2	347.4
2	935.2	1029	716.1	660.8	265.4
3	951.7	1151	779.6	719.3	229.2
4	1143	1129	778.7	638.9	284.1
5	1200	1186	811.1	725.2	322.6
6	1228	1179	899.9	758.3	310.5
7	1327	1257	846.9	818.2	220.3
8	1312	1539	931.8	798.8	336.9
9	1614	1574	793.2	827	268.1
10	1557	1565	980.3	879	311
11	1591	1559	969.9	747.8	332.2
12	1639	1551	963	840.2	272.5
13	1649	1591	999.4	905.3	285.8
14	1771	1685	1026	895.9	262
15	1657	1842	1022	823.3	331.7
16	1667	1795	980	941.8	297.2
17	1769	1757	1066	904.7	314.1
18	1776	1918	1120	977.1	291.4
19	1699	1994	1186	919.4	319.5
20	1779	1880	1263	893.5	415.8

21	1813	1846	1222	1046	379.9
22	1903	1705	1203	1047	344.3
23	1949	1925	1106	1044	399.7
24	1809	1751	1204	922.8	277.9
25	1604	1743	1089	1037	316
26	1753	1914	1195	1164	208.1
27	1948	1998	1177	1049	193.1
28	1739	2012	1216	984	284.5
29	1790	1821	1235	1094	302.6
30	1853	1658	1262	1110	257.6
31	1797	1850	1349	1213	305.7
32	2084	1674	1303	1168	283.5
33	2072	1994	1331	1106	278.5
34	1915	1654	1331	1135	318.4
35	1915	1837	1325	1131	284.4
36	1917	1750	1360	1137	237.6
37	2202	1926	1445	1077	267.1
38	2113	1830	1313	1080	273.1
39	2240	1843	1380	1066	222.1
40	2151	2057	1385	1145	312.9
41	2090	2096	1325	1202	308.3
42	1958	1915	1342	1144	294.7
43	2039	2035	1448	1130	358
44	2131	1849	1421	1181	362.5
45	2073	1787	1452	1190	300.2

46	1971	1811	1505	1103	322.7
47	2093	1983	1495	1048	338.8
48	1925	2062	1356	1151	393.5
49	2075	1927	1503	1219	236.3
50	1963	1883	1458	1319	317.3
51	2066	2039	1452	1143	290.6
52	2155	2169	1604	1240	369.4
53	2294	2141	1472	1195	317.2
54	1910	1913	1481	1285	327.8
55	1976	1892	1535	1235	271.2
56	2017	2319	1493	1153	328.5
57	1923	2081	1483	1261	394
58	2019	2177	1622	1275	328
59	1795	1942	1532	1202	266.7
60	1968	2205	1488	1355	361
61	2026	2294	1512	1092	246.6
62	1917	2364	1502	1178	365.8
63	1820	2276	1572	1277	265.1
64	1953	2294	1588	1254	288.9
65	1950	1812	1580	1296	353.5
66	2005	2334	1713	1376	342.2
67	2176	2147	1595	1310	331.9
68	1952	2160	1749	1202	250.7
69	1947	2062	1607	1259	269.6
70	2011	2121	1634	1158	402.3

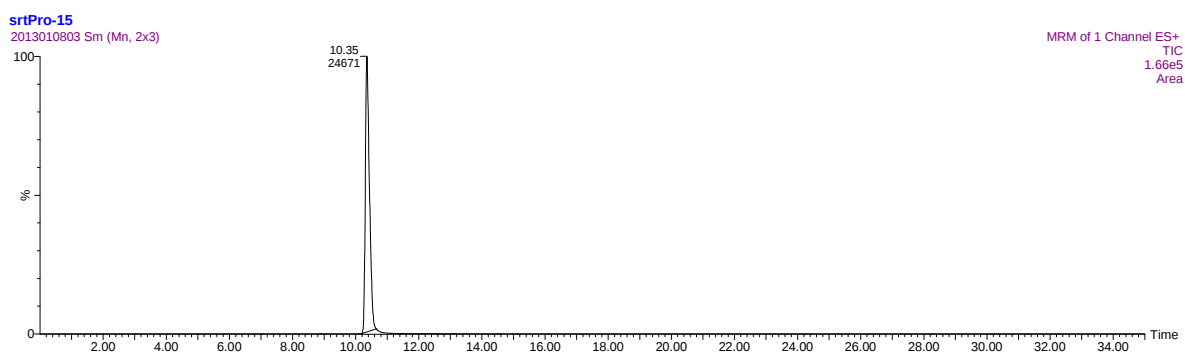
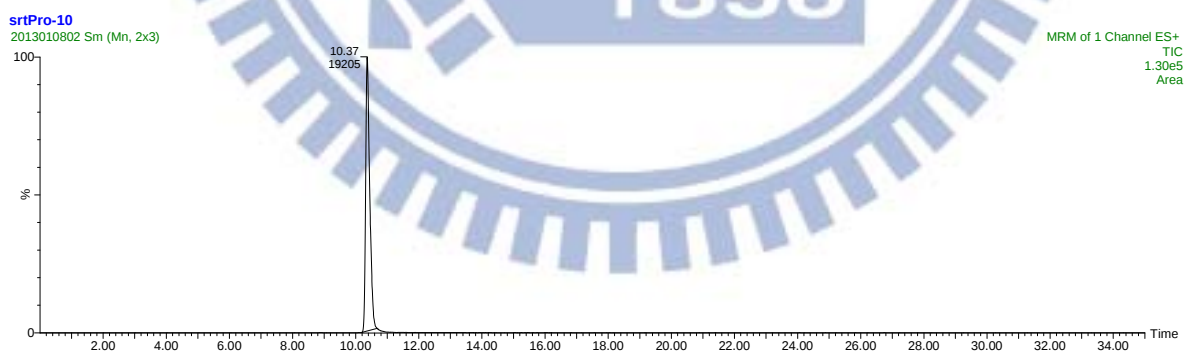
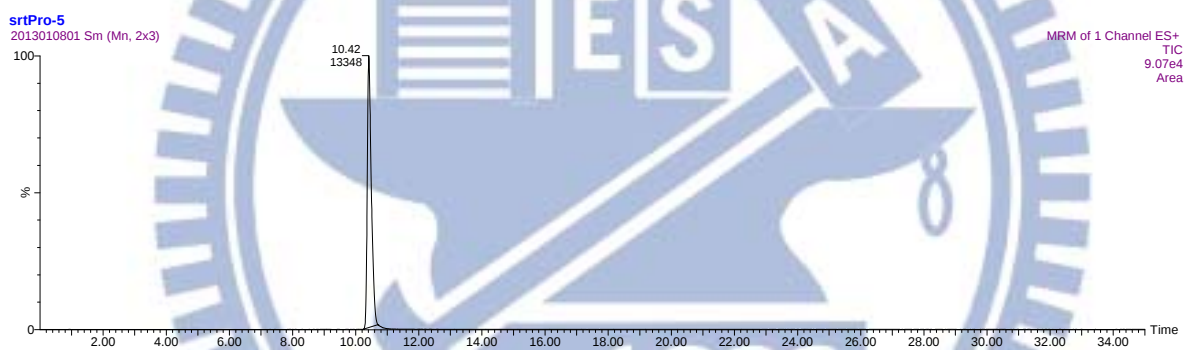
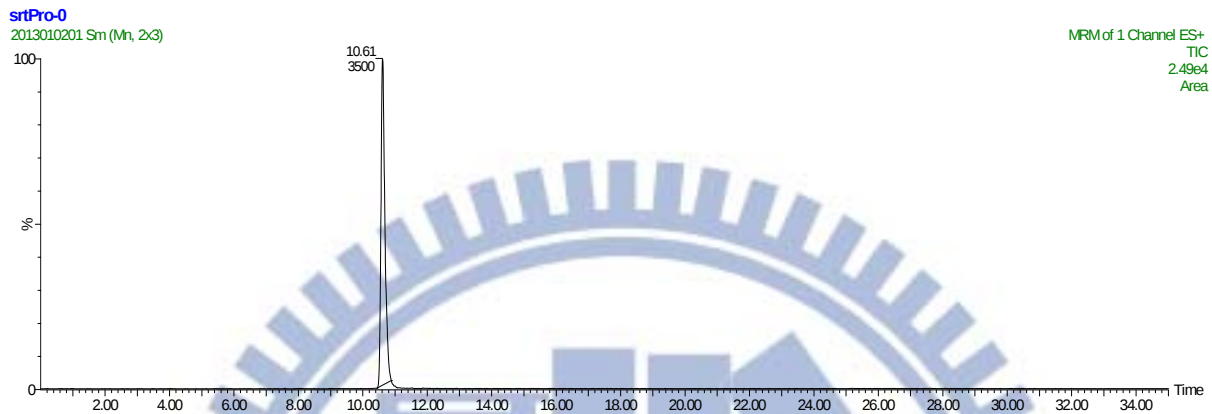
71	2088	2144	1409	1235	239.6
72	2227	2180	1618	1310	242.6
73	2008	2192	1584	1198	279
74	1959	2272	1722	1288	342.3
75	2066	2260	1697	1266	260.2
76	2140	2244	1605	1369	299.8
77	2133	2378	1696	1336	350.8
78	1957	2451	1588	1263	330.7
79	1818	2126	1491	1373	299.5
80	2120	2373	1682	1297	287.3
81	2222	2313	1537	1393	275
82	1942	2323	1514	1338	290.8
83	1956	2152	1732	1449	262
84	2041	2095	1819	1520	312.2
85	2220	2060	1684	1324	262.4
86	1899	2163	1644	1379	290.2
87	2134	2249	1670	1305	248.1
88	1907	2329	1550	1219	278.5
89	2016	2156	1713	1322	276.5
90	1980	2241	1741	1258	335.8
91	1995	2182	1841	1299	333.4
92	2207	2239	1663	1390	430.1
93	2096	2312	1767	1286	323.4
94	2183	2126	1604	1279	362.6
95	2151	2246	1700	1389	293.3

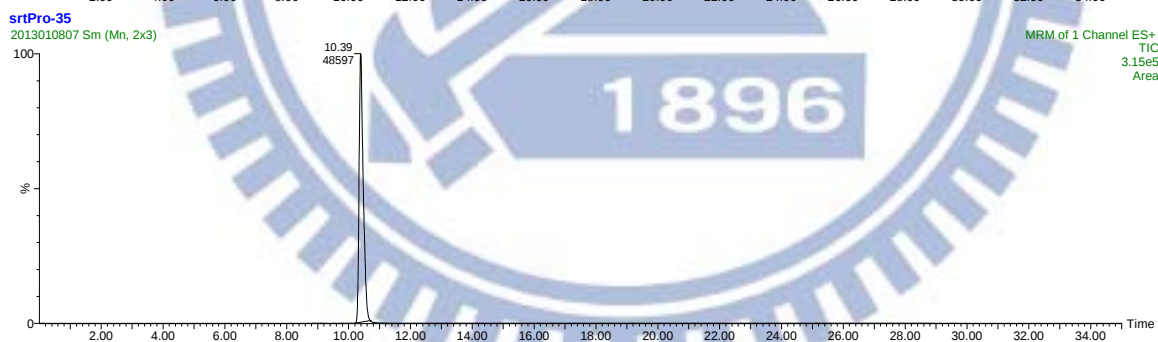
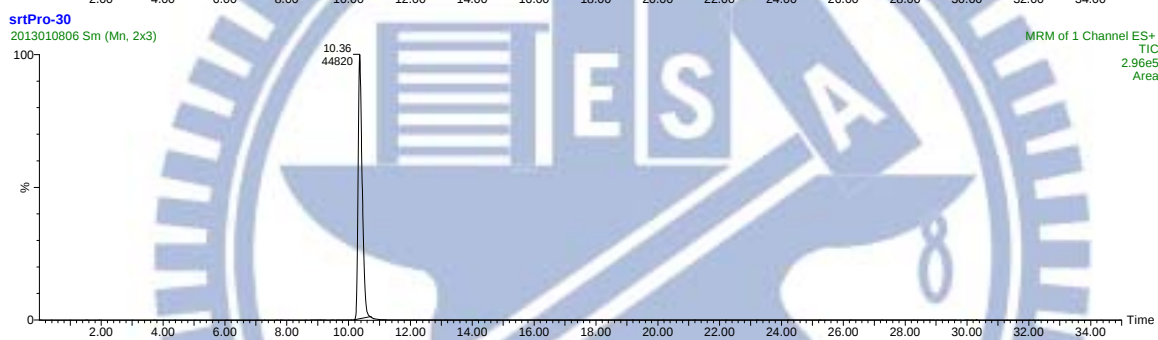
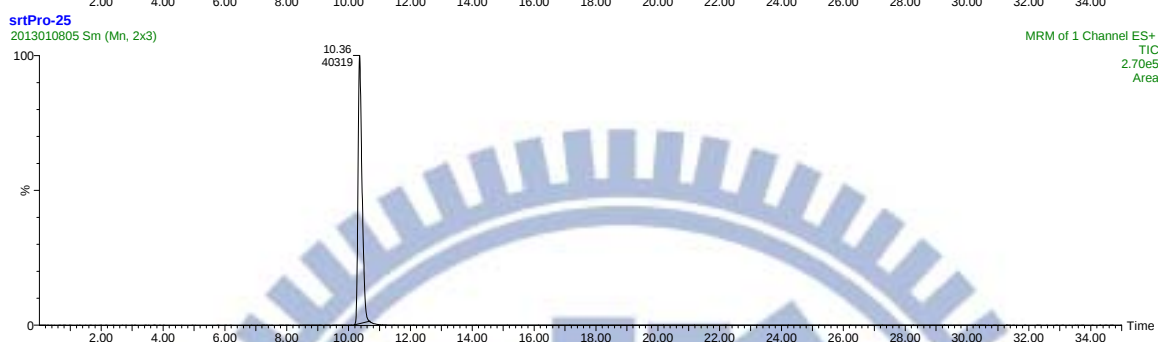
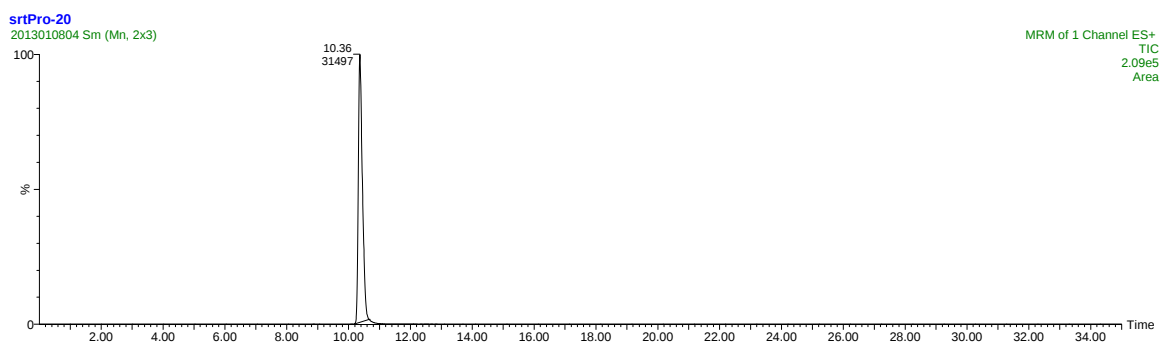
96	2265	1981	1751	1328	337.2
97	2080	2015	1626	1407	316.5
98	1922	2171	1749	1355	269.1
99	1920	2307	1727	1289	218.8
100	1854	2421	1903	1334	276.7



附錄四：不同時間點的 MRM 的面積圖譜

SrtPro

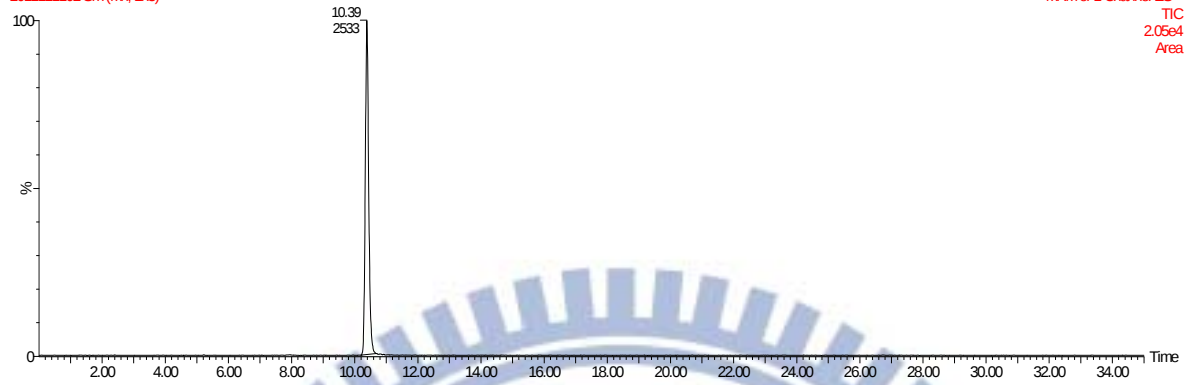




SrtW

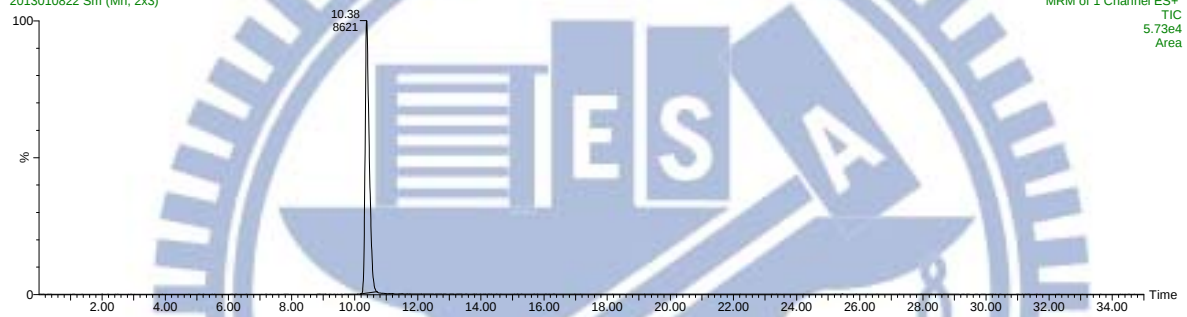
srtW-0

2012121102 Sm (Mn, 2x3)



srtW-5

2013010822 Sm (Mn, 2x3)



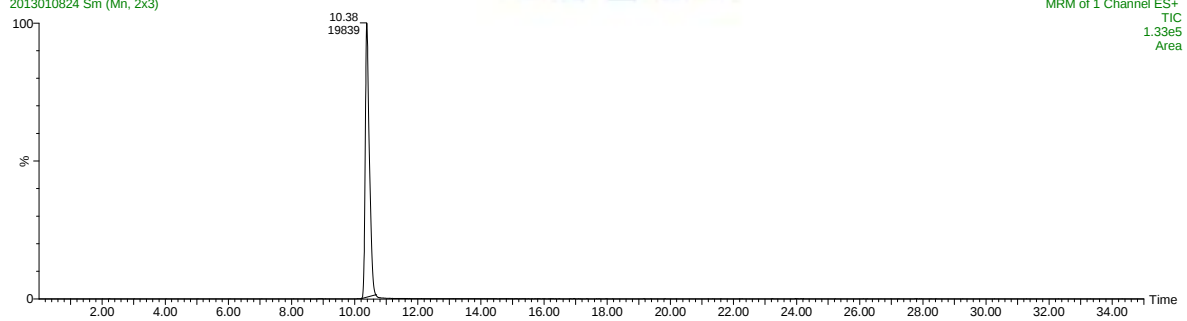
srtW-10

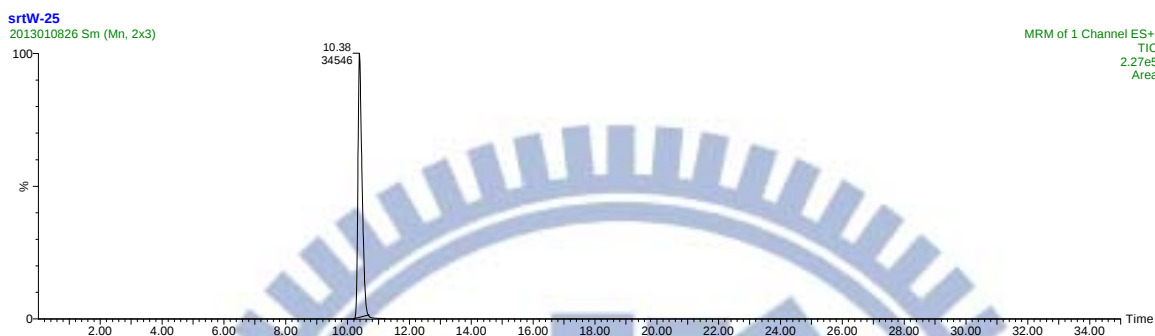
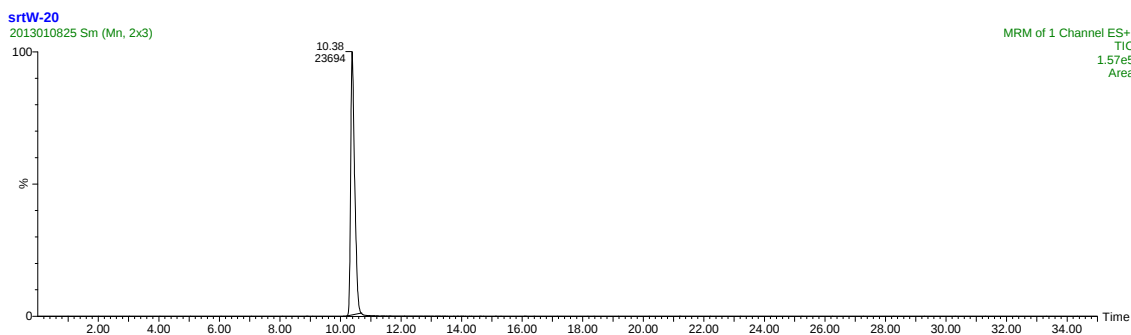
2013010823 Sm (Mn, 2x3)



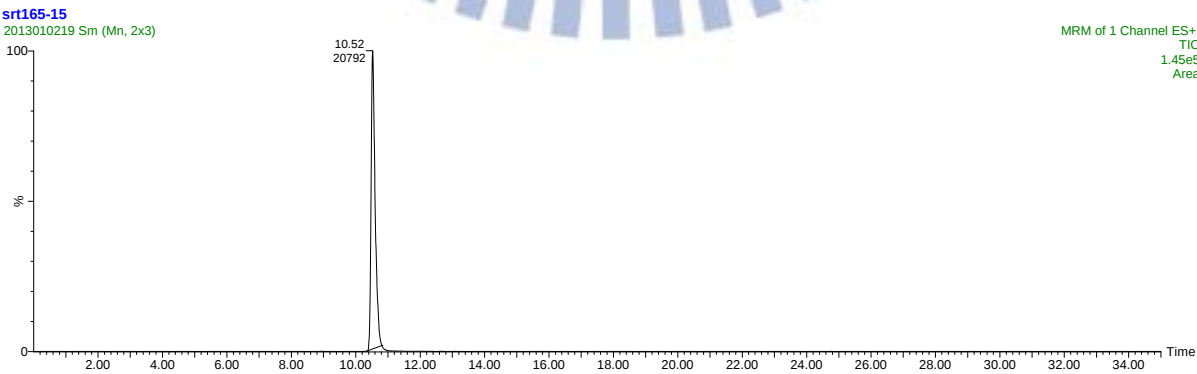
srtW15

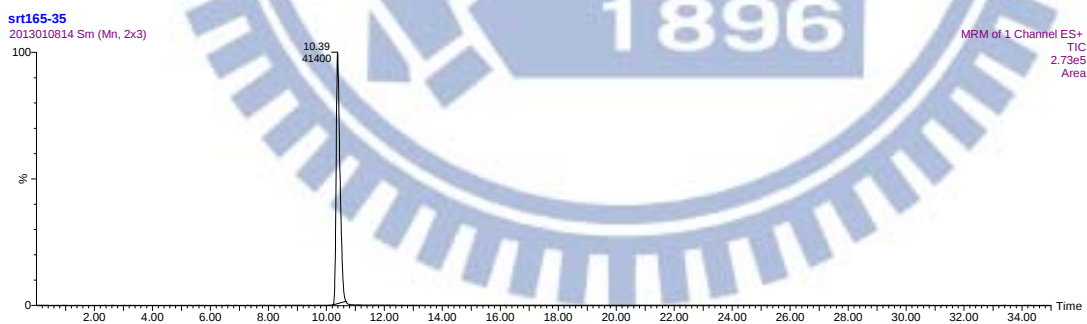
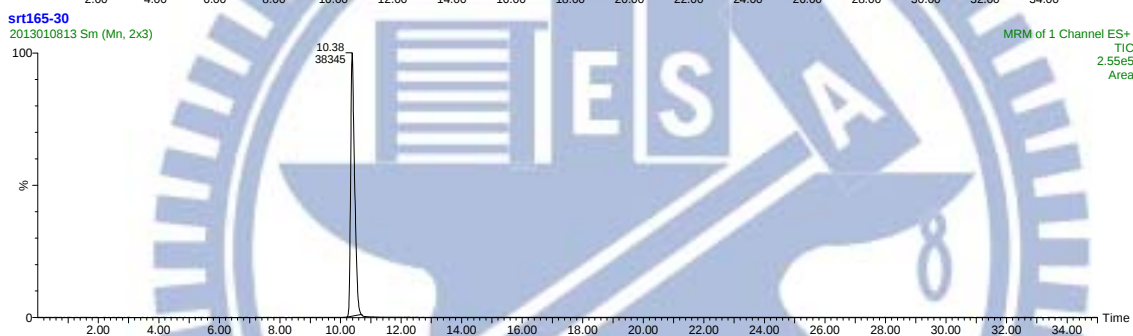
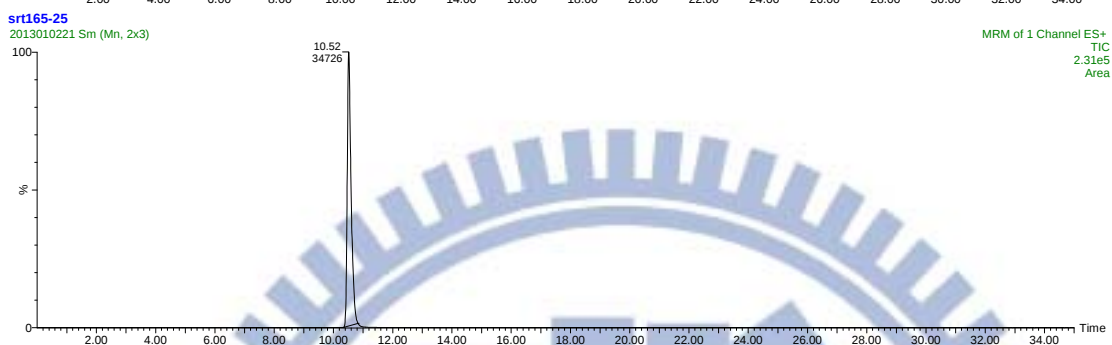
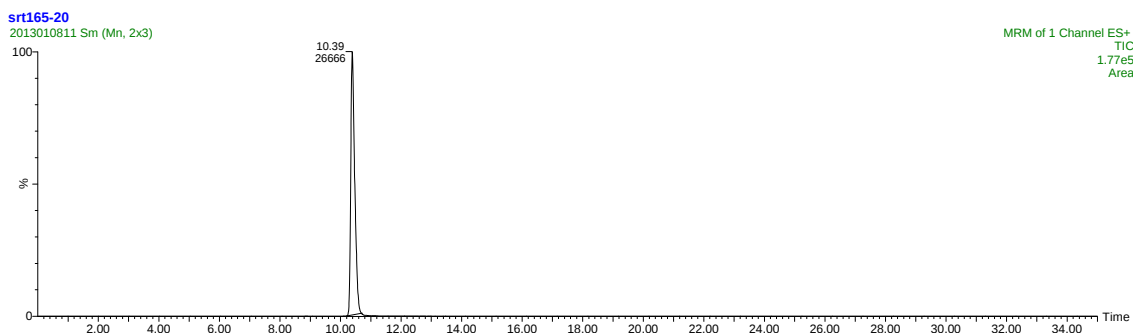
2013010824 Sm (Mn, 2x3)





D165A

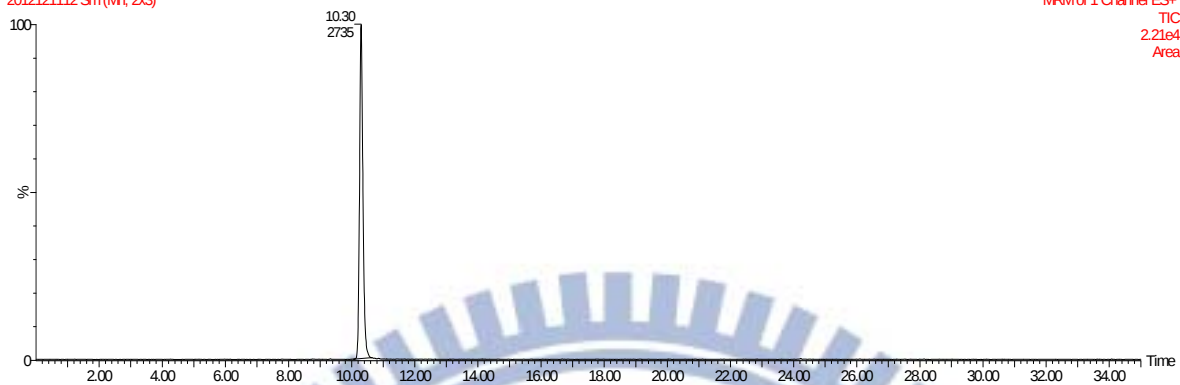




K196T

S196M-0

2012121112 Sm (Mn, 2x3)



srt196-5

2013010324 Sm (Mn, 2x3)



srt196-10

2013010325 Sm (Mn, 2x3)



srt196-15

2013010326 Sm (Mn, 2x3)

