

國立交通大學

應用化學研究所

博士論文

幾丁質酵素和幾丁質結合蛋白之基因選殖、蛋白質結構和  
反應機制以及其應用之研究

**Study of chitinase and chitin binding protein from molecular  
cloning, structure and mechanistic action to the applications**

研究生：吳岳進 (Yue-Jin Wu)

指導教授：李耀坤 博士 (Yaw-Kuen Li Ph.D)

中華民國九十八年六月

## 誌謝

感謝陳俊榮教授、林立元教授、吳淑祿教授和蒙國光教授在口試期間對於論文之評閱與指正，以及李耀坤教授九年來的指導，感激不盡。

感謝九年來實驗室許許多多的同仁，在生活上和實驗上的幫助。

感謝家人對我的支持，使我可以無後顧之憂的完成學業。

願大家實驗順利、快樂、平安！

岳進

2009/06/26



# 幾丁質酵素和幾丁質結合蛋白之基因選殖、蛋白質結構和反應機制 制以及其應用之研究

學生：吳岳進

指導教授：李耀坤 教授

國立交通大學應用化學所博士班

## 摘要

本論文旨於研究幾丁質水解之相關蛋白，其中將探討仙人掌桿菌幾丁質酵素 (ChiNCTU2) 之結構和其反應機構。我們也將探討如何利用由粘質沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 選殖所得之幾丁質酵素 Chi\_NCTU，生產幾丁雙糖。在企圖有效促進幾丁質水解的催化反應，我們亦引進了粘質沙雷氏菌幾丁質結合蛋白 (chitin binding protein, CBP)，此蛋白質除可增進幾丁質水解速率外，我們亦利用 CBP 建立了一套經濟又有效之蛋白質純化系統。

仙人掌桿菌幾丁質酵素 ChiNCTU2，屬於醣類水解酵素 18 家族，基因內含一段 27 個胺基酸的訊息胜肽 (signal peptide) 與一段 333 個胺基酸的成熟蛋白。經過胺基酸多重比對後，發現 E145 及 Y227 可能為 ChiNCTU2 中參與催化反應的重要胺基酸。透過定點突變與結構解析 (與同步輻射陳俊榮 教授合作) 後，由定點突變研究顯示，E145G 突變酵素之活性較之野生株酵素約喪失 2800 倍，顯示此殘基在催化作用中扮演重要的角色。由數種突變酵素與幾丁寡糖之共結晶所得之結構發現，在 E145Q+(NAG)<sub>2</sub> 中，-1 位置之醣基構形為椅型 (chair form)，而在 E145Q/Y227F+(NAG)<sub>2</sub> 和 E145G/Y227F+(NAG)<sub>4</sub> 中，-1 位置之醣基構形則為船型 (boat form)；在 E145Q/Y227F+(NAG)<sub>2</sub> 和 E145G/Y227F+(NAG)<sub>4</sub> 兩個共結晶結構中我們亦發現 D143、E145、E190 和 Y193 等胺基酸殘基同時存在雙重構形；由野生株酵素與突變酵素與幾丁寡糖之共結晶結構比較發現，ChiNCTU2 可能利用 dynamic loop 的移動促

進受質結合於催化位置，此特性尚未見諸於其他幾丁質水解酵素，屬於 ChiNCTU2 特有之性質。根據共結晶所給的資訊，我們可推測出 ChiNCTU2 可能的水解反應機制細節。

另一幾丁質水解酵素乃由 *Serratia marcescens* 染色體 DNA 選殖而得，該酵素可成功大量於大腸桿菌中表達，一般而言，其水解產物為單醣與雙醣之混合體，利用條件的控制(20mM NaOAc, pH 5.5)我們以可大量製備幾丁二醣。此外，由分子模擬的技術已得一多重突變點 (K367D368→367G368P ; T416A417Y418T419→416G417G418G419G)之酵素 ChiA\_NCTU\_m1,其產物則為幾丁單醣，雖然我們尚無法利用 ChiA 及其突變酵素製備參醣或更長之醣鏈產物，但我們已可成功大量製備單醣與雙醣。

同時，為了增加 ChiA\_NCTU 水解膠狀 chitin 產生 N-乙醯幾丁二醣的速率，我們亦從 *Serratia marcescens* 染色體 DNA 選殖出幾丁質結合蛋白(chitin binding protein, CBP)，CBP 具有破壞 chitin 直鏈結構的作用，憑藉 CBP21 的幫助，幾丁質酵素可加快幾丁質水解速度約 20%。而在先期試驗中得知 CBP 在 pH 8.0 條件下能與幾丁質結合，而在 pH<7 條件其結合力遽減而被洗脫。因此，可將其建構成純化蛋白質的工具或作為實行酵素固定化之用。我們應用分生技術，將 CBP 基因及在其下游續接連接肽 (linker) 蛋白酶切位點 (protease cut site) 及限制酵素多重切點 (MCS) 等 DNA 序列，建構於 pRSETA 表達載體上，再於限制酵素 MCS 位置分別嵌入數種糖類水解酵素之基因，並利用大腸桿菌進行表現。利用自製幾丁質細粒管柱進行純化，已成功純化得純度 90% 以上且回收率達 40% 以上的 CBP 融合的標的蛋白質。

我們進一步以 CBP 作為攜帶蛋白，利用(EAAAK)<sub>5</sub> 連接攜帶蛋白與標的蛋白，實驗證實，利用 CBP 一個步驟就可以純化到融合蛋白。在實驗過程中，我們發現重複連接胜肽 EAAAK 二至五次均具備一相當特別的性質，在 pH 6-7 此連接胜肽具有自動裂解的現象，使得本純化系統不需額外使用蛋白水解酶(protease)來分離融合蛋白。目前已有數個蛋白利用建立的純化系統成功的獲得標的蛋白。

# **Study of chitinase and chitin binding protein from molecular cloning, structure and mechanistic action to the applications**

**Student : Yue-Jin Wu**

**Advisor : Dr. Yaw-Kuen Li**

**Department of Applied Chemistry  
National Chiao Tung University**

## **ABSTRACT**

This thesis discussed the function, structure, catalysis and potential applications of proteins that involved in chitin degradation. Two bacterial chitinases were cloned and overexpressed for these subjects. Chitin-binding protein (CBP), recognized as an enhancer for the catalysis of chitinase, was further introduced in the study. An unexpected outcome was derived from the study of CBP that, consequently, allowed us to develop a simple and cost-effective system for protein purification. The results for all subjects were summarized as follows:

A chitinase gene from *Bacillus cereus* NCTU2 (ChiNCTU2) was previously cloned and identified as a member of family 18 glycoside hydrolases. ChiNCTU2 is a hydrolytic enzyme, which cleaves  $\beta$ -1,4-glycosidic bonds of the natural biopolymer chitin to generate di-N-acetyl-chitobiose. The matured protein containing 333-aa was over-expressed in *E. coli*. Amino acid multi-alignment revealed that E145 and Y227 of ChiNCTU2 are conserved. Mutagenic study showed that the catalytic activity of E145G mutant was reduced by 2900 fold, indicating the essential role of E145 for ChiNCTU2 catalysis. However, the function of Y227 is different from that of conserved Y390 (ChiA) and Y214 (ChiB) in *Serratia marcescens*. Besides of the mutagenic examination, we present the crystal structure of ChiNCTU2. The structure composes of only a catalytic domain without the commonly observed chitin-binding domain in other chitinases. The structures of the cocrystallized mutants, E145Q+(NAG)<sub>2</sub>, E145Q/Y227F+(NAG)<sub>2</sub> and E145G/Y227F(NAG)<sub>4</sub>, have been refined at high resolution and the interactions with the substrate have been characterized. The obtained results clearly show that the enzyme bends

and rotates the substrate in the vicinity of the scissile bond. Furthermore, the enzyme imposes a critical “chair” to “boat” conformational change on the sugar residue bound to the -1 subsite. The presence of substrate induces a significant conformational change (about 5.7Å) on a dynamic loop (from residues I106 to V112). The distance is equal to the size of a mono-saccharide imply the possibility that the saccharide can slide along the cleft. The residues, D143, E145, E190 and Y193, were also found in double conformations. Through the kinetic analyses of various mutants, the extensive inspection of sugar-complex protein structure, and a sequence comparison with homologous chitinases, the mechanistic action of ChiNCTU2 can be extensively elucidated.

Another chitinase (*chiA*) from *Serratia Marcescens* was cloned by PCR. The recombinant enzyme was characterized and tested for the preparation of chitobiose and other oligosaccharides. In general, the recombinant chitinase A exhibited an exo-type catalytic activity toward colloidal chitin and released both *N*-acetylglucosamine and *N,N*-diacetyl chitobiose as products. Although massive efforts were spent for developing mutants with anticipated power to produce uniform oligosaccharide was unsuccessful, we discovered when the enzymatic reaction was performed in sodium acetate buffer at pH 5.5 *N,N*-diacetyl chitobiose were produced as the predominant product; under such conditions, an enzymatic process is established for the production of the disaccharide on a 100-g scale.

In order to enhance the catalytic hydrolysis of chitin by chitinase, CBP from *Serratia marcescens* was cloned and employed to furnish the goal. In the presence of CBP, the catalytic activity chitinase was enhanced by 15-20%. In addition to the application of CBP as an activity enhancer of chitinase, we attempted to use CBP as the protein carrier for protein purification by  $\beta$ -chitin affinity column. We reported herein an unexpected discovery that the presence of the repeated EAAAK peptide linker in a CBP-fusion protein possessed a pH-dependent auto-cleavage feature. An expression vector derived from pREST was constructed to compose the gene of the CBP and the nucleotide sequence of the (EAAAK)<sub>5</sub> peptide linker following restriction sites for target gene insertion. Fusion proteins were expressed with *E. coli* and purified with a chitin column. In the range pH 6-7, the target protein becomes automatically released from the fusion protein without proteolytic treatment. Although the mechanism of this auto-cleavage property of an (EAAAK)<sub>5</sub> linker remains unclear, this feature has been successfully employed for many cases of protein purification without the tag of a fusion protein. Proteins with high purity (> 90% homogeneity for all cases) were easily obtained. The recovery yield was more than 40 %.

# 目 錄

謝誌.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	v
目錄.....	vii
表目錄.....	xiii
圖目錄.....	xiii

## 第一部分：仙人掌桿菌幾丁質酵素之高解析結構分析與催化反應 機制之研究與探討

第一章 緒論.....	2
1-1 幾丁質 (chitin) 的一般敘述.....	2
1-2 幾丁質的製備與應用.....	3
1-3 N-乙醯幾丁質寡醣的性質與應用.....	5
1-4 幾丁質酵素 (chitinase) 的一般敘述與分類.....	6
1-4-1 幾丁質酵素的一般敘述.....	6
1-4-2 細菌的幾丁質酵素.....	6
1-4-3 細菌幾丁質酵素胺基酸序列分析.....	7
1-4-4 幾丁質酵素的分類與結構.....	9
1-5 Family 18 幾丁質酵素簡介.....	9
1-6 Family 18 幾丁質酵素水解反應機制的推測研究.....	12
1-7 論文研究動機.....	16

<b>第二章 實驗方法</b> .....	17
2-0 一般敘述.....	17
2-1 表現載體來源.....	18
2-2 幾丁質酵素的大量表現及純化.....	18
2-2-1 Phenyl Sepharose High Performance (Hydrophobic interaction column,HIC) 層析.....	18
2-2-2 Q Sepharose High Performance 層析.....	19
2-3 酵素活性之測定.....	19
2-4 定點突變.....	19
2-5 酵素動力學之測定.....	20
2-6 蛋白質結晶.....	20
<b>第三章 結果與討論</b> .....	21
3-1 野生株 ChiNCTU2 蛋白質三維結構之建立.....	21
3-2 結構中與鋅原子鍵結的殘基.....	22
3-3 ChiNCTU2 之胺基酸序列分析與比對.....	23
3-4 反應機制的探討.....	25
3-4-1 酵素動力學分析.....	25
3-4-2 突變株 E145Q、E145Q/Y227F 和 E145G/Y227F 與幾丁質五醣之 cocrystal 分析.....	26
3-4-3 突變株 E145G/Y227F 與五醣之 cocrystal 分析.....	27
3-4-4 突變株 E145G/Y227F 與 cyclo-(L-His-L-Pro)之 cocrystal 結構.....	29





3-4-5	ChiNCTU2 的受質 binding dynamic loop.....	30
3-5	ChiNCTU2 之反應機制推測.....	33
 <b>第二部分：DNA shuffling 和分子模擬改造黏質沙雷氏桿菌幾丁質酵素以製備幾丁寡醣</b>		
 <b>第四章 緒論.....</b>		
4-1	<i>Serratia marcescens</i> 幾丁質酵素.....	36
4-2	Chitin binding protein (CBP21).....	37
4-3	DNA shuffling 介紹.....	37
4-4	論文研究動機.....	41
 <b>第五章 實驗方法.....</b>		
5-0	一般敘述.....	42
5-1	膠狀幾丁質( colloidal chitin )的製備.....	43
5-2	0.5% Chitin LBA 盤子的製備.....	43
5-3	酵素活性之測定.....	43
5-4	<i>ChiA</i> 在不同 pH 緩衝液之水解產物的分析.....	44
5-5	酵素法製備 100 克級 N-乙醯幾丁二醣.....	44
5-6	DNA shuffling.....	44
5-6-1	步驟.....	44
5-6-2	轉形作用.....	47
5-7	分子模擬 chitinase A 由 exo type 到 endo type.....	48
5-8	模擬結構 ICTN_m1 之基因突變.....	50



5-9	KD/GP、TAYT/GGGG、TAYT/GGGG 三個突變株酵素水解 chitin 之測試.....	51
5-10	酵素法製備 50 克級 N-乙醯幾丁一醣.....	52
5-11	CBP21 應用於增強 chitinase 水解幾丁質之測試.....	52
<b>第六章 結果與討論.....</b>		<b>53</b>
6-1	Chi A 水解膠狀幾丁質產物分析.....	53
6-2	酵素法製備 100 克級 N-乙醯幾丁二醣.....	54
6-3	DNA shuffling.....	55
6-3-1	利用 DNA shuffling 的方法重組 ChiA 基因.....	55
6-3-2	菌落篩選.....	56
6-3-3	重組酵素 ChiA 之水解產物分析.....	57
6-4	分子模擬改變 ChiA 之水解產物.....	58
6-5	酵素法製備 50 克級 N-乙醯幾丁一醣.....	62
6-6	CBP21 應用於增強 chitinase 水解幾丁質之測試.....	64

### 第三部分：以幾丁質結合蛋白建立一套簡便、低成本的蛋白質表現與純化系統

<b>第七章 緒論.....</b>		<b>66</b>
7-1	幾丁質結合蛋白 (Chitin binding protein : CBP21) .....	66
7-2	CBP21 與幾丁質的結合作用.....	68
7-3	融合技術之發展現況.....	70
7-3-1	融合技術的另一研究重點～攜帶蛋白的切割.....	75

7-4	醣類水解酵素簡介.....	75
7-5	論文研究動機.....	77
<b>第八章 實驗方法.....</b>		<b>78</b>
8-1	藥品與儀器.....	78
8-2	CBP21 基因之選殖及定序.....	79
8-3	CBP21/pRSET_A 質體.....	80
8-4	CBP21 蛋白質表現.....	81
8-5	緩衝溶液之酸鹼度對 CBP21 與幾丁質結合力的影響.....	82
8-6	30-50 mesh 的幾丁質重覆使用的評估.....	83
8-7	CBP21 融合蛋白質載體 (CBP21 Fusion Protein Vector) 之建構.....	83
8-7-1	分生剪接建構 CBP21 融合蛋白質的載體.....	86
8-8	CBP21 融合蛋白質載體之測試 ( <i>A. fumigatus</i> Y2K chitinase).....	92
8-9	CBP21 融合 <i>Streptomyces matensis</i> LPHase and <i>Bacillus cereus</i> NCTU2 chitinase 測試.....	93
8-10	Genenase protease cutting site 之測試.....	94
8-11	不同 pH 下 Linker 5 (EAAAK) <sub>5</sub> 之裂解反應.....	94
8-12	建構不同長度之 linker (EAAAK=2~4) V5-AF、de-Genenase protease cutting site V5-AF 與 de-CBP21 V5-AF.....	95
8-13	Mass 分析 protein 分子量.....	96
<b>第九章 結果與討論.....</b>		<b>97</b>
9-1	CBP21 之 PCR 基因選殖與基因表達系統之建構.....	97

9-2	重組 CBP21 酵素的純化.....	98
9-3	緩衝溶液之酸鹼度對 CBP21 與幾丁質結合力的影響.....	99
9-4	30-50 mesh 幾丁質重複使用的評估.....	100
9-5	CBP21 融合蛋白質載體之建構.....	101
9-6	CBP21 融合蛋白質載體之測試.....	102
9-7	CBP21 融合 <i>S. matensis</i> LPHase、 <i>B. cereus</i> NCTU2 chitinase 和 <i>A. fumigatus</i> Y2K chitosanase.....	103
9-8	以 genenase protease 分解融合蛋白獲得標的蛋白.....	109
9-9	Linker 5 (EAAAK) <sub>5</sub> 之自動裂解分析.....	110
9-10	不同長度 linker = (EAAAK) <sub>2-5</sub> 、de-Genenase protease cutting site V5-AF 與 de-CBP21 V5-AF 之自動裂解分析.....	111
9-11	CBP21 純化平台流程.....	119

<b>第十章 結論</b> .....	121
---------------------	-----

<b>第十一章 參考文獻</b> .....	124
------------------------	-----

## 附錄

附錄一.....	132
附錄二.....	136

## 表目錄

表 1-1	幾丁質酵素 family 18 和 19 之比較.....	9
表 3-1	Wild Type 和 Mutants ChiNCTU2 之動力學數據表.....	25
表 3-2	ChiNCTU2 突變株 E145G/Y227F 與 (NAG) <sub>4</sub> 間之作用.....	28
表 7-1	已有商品化的攜帶蛋白.....	73
表 8-1	建構 CBP21 結合蛋白的 7 種連接胺基酸(Linker).....	86
表 9-1	重組蛋白質 LPHase 之純化倍率表.....	104
表 9-2	V5-LPH 之純化倍率表(管柱沖提法).....	105
表 9-3	V5-LPH 之純化倍率表(離心法).....	106
表 9-4	V5-NCTU2 之純化倍率表 (管柱沖提法).....	107
表 9-5	V5-NCTU2 之純化倍率表(離心法).....	107
表 9-6	V5-AF 之純化倍率表 (離心法).....	108
表 9-7	V5-AF 之純化倍率表 (管柱沖提法).....	109
表 9-8	蛋白質分子量.....	112

## 圖目錄

圖 1-1	幾丁質、幾丁聚醣以及纖維素的化學結構其均為 $\beta$ -1,4-鍵結之天然聚醣體.....	3
圖 1-2	幾丁質和幾丁聚醣的製備流程.....	4
圖 1-3	細菌降解、運送與代謝幾丁質的系統.....	7
圖 1-4	ChiNCTU2 與其他幾丁質酵素作用區域組成之示意圖.....	8

圖 1-5	分子動力模擬 (GlcNAc) <sub>6</sub> 在 <i>S.marcescens</i> ChiA 中，當-1 位置為 boat 形式時之最低能量構形.....	10
圖 1-6	<i>S.marcescens</i> ChiA 突變株(E315L)的 3D 結構圖,在鍵結裂縫(binding cleft)內有一個幾丁六醣.....	11
圖 1-7	二步置換水解反應機制.....	12
圖 1-8	substrate-assisted catalysis.....	13
圖 1-9	<i>S.marcescens</i> ChiA 的反應機制.....	15
圖 3-1	ChiNCTU2 之 3D 結構圖.....	22
圖 3-2	活化位置中，與鋅原子相關的胺基酸殘基和兩者之間的距離.....	23
圖 3-3	鋅原子對於 ChiNCTU2 酵素活性的影響.....	23
圖 3-4	ChiNCTU2 與 family 18 chitinase 已有三維結構的 chitinase 之胺基酸序列比較.....	24
圖 3-5	突變株與 chitin 二醣之 cocrystal.....	26
圖 3-6	突變株 E145G/Y227F 與 chitin 四醣之 cocrystal.....	27
圖 3-7	ChiNCTU2 結構中具有雙重構形之胺基酸.....	28
圖 3-8	Allosamidin 為 chitinase 之 inhibitor，cyclo-(L-His-L-Pro) 結構與 allosamidin 的結構很相似.....	29
圖 3-9	突變株 E145G/Y227F 與 cyclo-(L-His-L-Pro)之 cocrystal.....	30
圖 3-10	ChiNCTU2 chitin binding 之 dynamic loops.....	31
圖 3-11	Family 18 幾丁質水解酵素 3D 結構之受質結合方式之比較.....	32
圖 3-12	Chitin 受質之水解過程.....	33

圖 3-13	推測的 ChiNCTU2 反應機制.....	34
圖 4-1	CBP21 之結構圖.....	37
圖 4-2	DNA shuffling 的原理與過程.....	40
圖 6-1	TLC 片分析水解產物.....	54
圖 6-2	Chi A 水解膠狀幾丁質之過程.....	54
圖 6-3	蛋白質與鹽類未除去之 MASS 圖.....	55
圖 6-4	蛋白質已除去之 MASS 圖.....	55
圖 6-5	DNA shuffling 個階段電泳圖.....	56
圖 6-6	以 chitin LBA 盤子篩選具有活性的重組基因.....	57
圖 6-7	<i>S.m.</i> Chi A 與 (NAG) <sub>8</sub> 的 co-crystal，紅色區塊和藍色區塊控制水解產物的專一性.....	58
圖 6-8	SWISS-model 模擬結果.....	59
圖 6-9	ChiA 之三組不同突變株之純化後電泳圖.....	60
圖 6-10	Mass 分析突變酵素之水解產物.....	60
圖 6-11	Mass 分析突變酵素水解 N-乙醯幾丁二醣.....	61
圖 6-12	藍色為 wild type 活化位置後可容納醣的區域，黃色為 mutant KD/GP 活化位置後可容納醣的區域，綠色為 mutant KD/GP+TAYT/GGGG 活化位置後可容納醣的區域.....	61
圖 6-13	突變株水解 N-乙醯幾丁二醣之反應機制.....	62
圖 6-14	酵素降解幾丁質之示意圖.....	63
圖 6-15	比較三個突變株水解膠狀 chitin 的速率.....	63

圖 6-16	S. marcescens chitinase A 及 B. cereus NCTU2 chitinase 進行添加 CBP21 及不添加 CBP21 水解幾丁質的醣含量測試.....	64
圖 7-1	CBP21 及 chitinase A 與各種不溶性多醣類的結合特性.....	68
圖 7-2	pH 值對 CBP21 及幾丁質酶 A 與再生幾丁質結合的影響.....	69
圖 8-1	以 CBP21 建構一個集酵素表現與純化的基因片段示意圖.....	83
圖 8-2	以 CBP21 建構一個集酵素表現與純化的載體示意圖.....	84
圖 8-3	ChiC 3D 結構.....	85
圖 8-4	Vector 5 載體示意圖.....	93
圖 9-1	CBP21 經幾丁質純化後之 SDS-PAGE.....	98
圖 9-2	質譜儀偵測 CBP21 分子量的結果.....	99
圖 9-3	利用不同 pH 的緩衝溶液，將 CBP21 從幾丁質上洗脫之 SDS PAGE.....	100
圖 9-4	利用含 1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 之不同 pH 的緩衝溶液，將 CBP21 從幾丁質上洗脫之 SDS PAGE.....	100
圖 9-5	自製之 30-50 mesh 幾丁質每 300 mg 可結合 CBP21 蛋白質的重量.....	101
圖 9-6	所設計之 7 種不同的 linker.....	102
圖 9-7	V5-AF、V6-AF 及 V7-AF 經幾丁質純化後之 SDS-PAGE.....	103
圖 9-8	V5-LPH 經幾丁質純化後之 SDS-PAGE 圖.....	105
圖 9-9	V5-NCTU2 經幾丁質純化後之 SDS-PAGE 圖.....	106
圖 9-10	V5-AF 經幾丁質純化後之 SDS-PAGE 圖.....	108



圖 9-11	以 genenase protease 水解 V5-AF 融合蛋白.....	109
圖 9-12	反應前之 V5-AF 蛋白質電泳圖.....	110
圖 9-13	V5-AF 蛋白質在不同 pH 下，反應 overnight 之蛋白質電泳圖.....	111
圖 9-14	V5-AF 蛋白質先在 100°C 下加熱 10 分鐘，再在不同 pH 值下，反應 overnight 之蛋白質電泳圖.....	111
圖 9-15	不同重複次數之 linker、de-genenase cut site 和 de-CBP21 gene 的電泳圖.....	112
圖 9-16	六種不同 proteins 置於 100 mM Pi buffer、300mM NaCl、pH 7.0、20°C 下反應 overnight 之電泳分析圖.....	113
圖 9-17	Linker=(EAAAK) <sub>5</sub> 時，裂解後 mass 分析圖.....	114
圖 9-18	Linker=(EAAAK) <sub>4</sub> 時，裂解後 mass 分析圖.....	115
圖 9-19	Linker=(EAAAK) <sub>3</sub> 時，裂解後 mass 分析圖.....	115
圖 9-20	Linker=(EAAAK) <sub>2</sub> 時，裂解後 mass 分析圖.....	116
圖 9-21	V5-AF(de-genenase cutting site)裂解後 mass 分析圖.....	117
圖 9-22	V5-AF(de-CBP21 gene)裂解後 mass 分析圖.....	118
圖 9-23	CBP21 純化平台之流程圖.....	119
圖 9-24	CBP21 純化平台純化過程之蛋白質電泳圖.....	120