

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

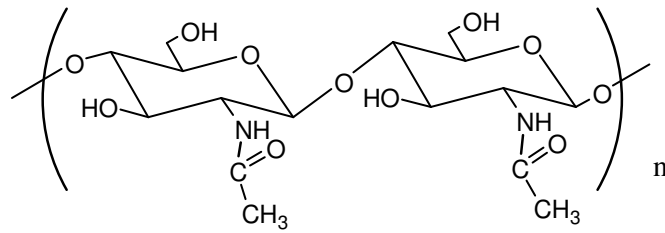
## 1-1、幾丁質 (chitin) 的一般敘述

幾丁質 (chitin) 命名是由希臘字 chiton 而來<sup>(1)</sup>，原指信封 (coat of mail) 之意，因為它首次是在 1811 年由 Braconnot 在真菌細胞壁上所發現，並廣泛存在於節肢動物外殼中。1925 年才由 Children 證實幾丁質為一含氮的化合物。幾丁質的化學結構類似纖維素，是由單體 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucose (N-acetylglucosamine) 以  $\beta$ -(1,4) 鍵結而成之聚醣。

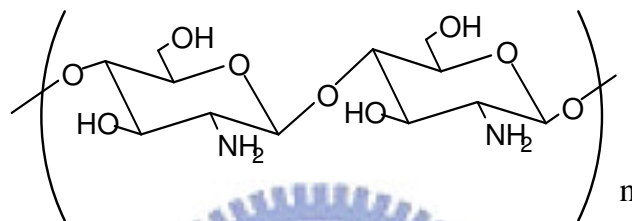
幾丁質在自然界分佈相當廣泛，如昆蟲、蟹、小蝦、龍蝦等動物外殼中，其存量相當豐富，是僅次於纖維素 (cellulose) 的生物聚合物 (biopolymer)，幾丁質和植物纖維的功能一樣，具有保護及支持生物體的作用。如螃蟹殼裡有三成左右的蛋白質、碳酸鈣和幾丁質，形成堅硬之外殼來保護及支持螃蟹。但此類漁獲中遺留下大部份不被食用之甲殼，卻造成龐大的環境污染問題，因此如何有效利用此廢棄物是個相當重要的課題。

在一般的甲殼類動物外殼中，經去除蛋白質、碳酸鈣等物質後，可得到 10 % 以上之幾丁質，使甲殼類廢棄物成為有用之物質，若將幾丁質去乙酰化後的生物聚合物被稱為幾丁聚醣，依其去乙酰化程度的不同可產生不同 DA (degree of deacetylation) 值的幾丁聚醣 (亦即甲殼素)。其結構如下圖 1-1：

A. 幾丁質 (Chitin)



B. 幾丁聚醣 (Chitosan)



C. 纖維素 (Cellulose)

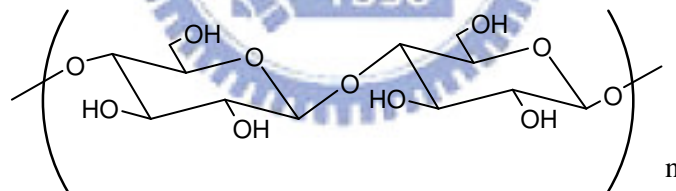


圖 1-1 幾丁質、幾丁聚醣以及纖維素的化學結構其均為  $\beta$ -1,4-鍵結之天然聚醣體。

## 1-2、幾丁質的製備與應用

螃蟹殼裡各有三成左右的蛋白質、碳酸鈣和幾丁質 (chitin)。因此可先用稀鹼去除其蛋白質，再以稀酸去除碳酸鈣，即可得到較純的幾丁質。再將幾丁質經去乙酰程序處理就變成了

幾丁聚醣。圖 1-2 為幾丁質與幾丁聚醣的製備的流程示意圖<sup>(1)</sup>。

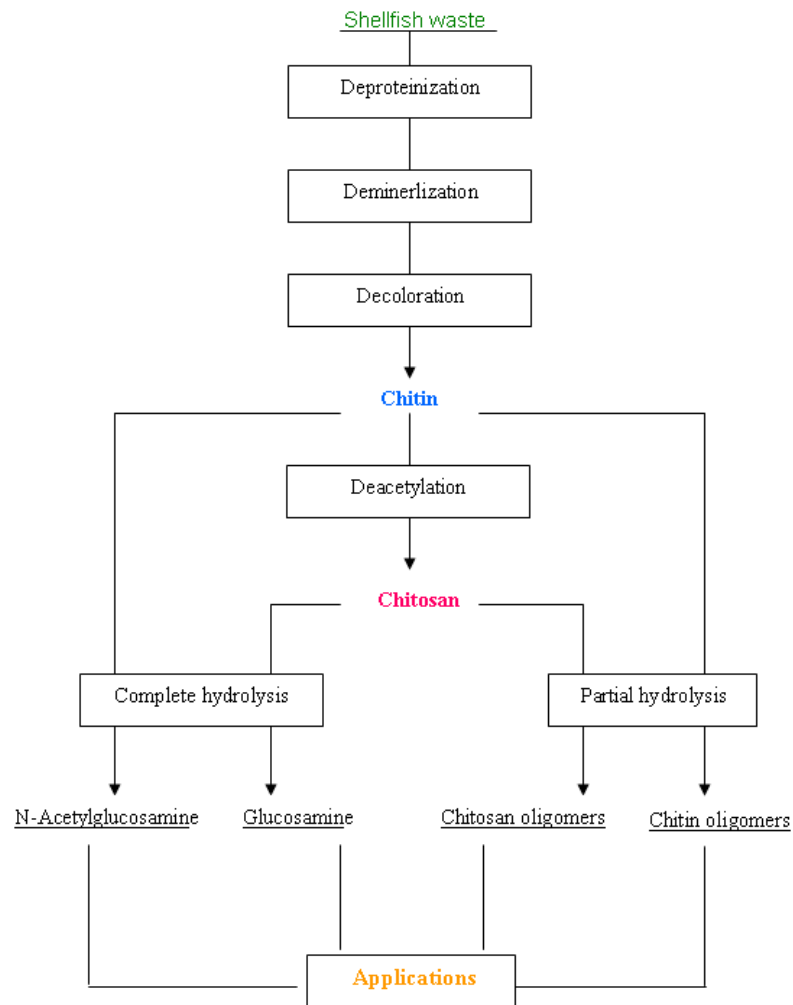


圖 1-2 幾丁質和幾丁聚醣的製備流程。

由於幾丁質可作為化妝品的基材、人造纖維的材料、也可作為酵素固定化的擔體，其衍生物並具有抗腫瘤、抗病菌的功能。而幾丁聚醣則可作為工業廢水的凝聚劑，也可作為酵素固定化的擔體，及高效能液相層析的管柱填充材料。在醫學方面，幾丁聚醣還具有作為手術用縫合線、藥物結合劑及發揮藥物緩釋作用的功能。此外，將幾丁質與幾丁聚醣進一步分解成寡醣，由於水溶性良好，且組成不像多醣類那麼複雜，因此近年已成為天然資源高度開發利用的重要課題，其已知的性質與應用簡述於下。

### 1-3、N-乙醯幾丁質寡醣的性質與應用

幾丁質會被幾丁質酵素 (chitinase) 及 N-乙醯葡萄糖胺酵素 (GlcNAcase) 水解其醣苷鍵，成為 N-乙醯幾丁寡醣 (N-acetyl-chitooligosaccharides)、幾丁二醣 (GlcNAc)<sub>2</sub>、及乙醯葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine) 等。N-乙醯幾丁寡醣 (N-acetyl-chitoligosaccharide) 一般是指由 2~7 個 N-乙醯葡萄糖胺以  $\beta$ -1,4 醣苷鍵結所形成的低分子醣類。在早期，這些寡醣僅被當作溶菌酵素 (Lysozyme) 的作用受質，以研究其反應機制。近年來寡醣的應用日益廣泛，涵蓋了食品、醫學與農業方面之應用，簡述如下：

#### (1)、食品加工方面<sup>(2)</sup>

N-乙醯幾丁寡醣具有清爽的甜味，而甜味、吸濕性均比單醣低，有助於增進保水性，同時亦具有調味及改良食品品質的功能。

#### (2)、醫學方面

具有生理活性的 N-乙醯幾丁六醣及 N-乙醯幾丁七醣的寡醣在抗癌研究上發現能對老鼠的 Sacroma 180 solid tumor 有抑制成長之效能，目前雖已知 N-乙醯幾丁寡醣及幾丁寡醣也有類似的效果<sup>(3)</sup>，但其中以 N-乙醯幾丁六醣的活性最高；另外，N-乙醯幾丁寡醣還可以促進腸內有益細菌的增殖，抑制大腸桿菌及其他引發腸內感染症的病原菌之生長<sup>(4)</sup>。除了幾丁質具有抗菌、抗腫瘤的功能以外，這些特性使得 N-乙醯幾丁寡醣在生物及醫學上有很大的發展潛力。由於寡醣為水溶性，較易被吸收利用。

#### (3)、農業方面

N-乙醯幾丁寡醣及幾丁寡醣與植物防禦系統的遺傳因子有密切關係，當病原真菌入侵植物時，植物本身有辨識系統，可知有病菌入侵，它能促進與乙醯生成有關酵素的產生，進而誘導植物產生抗菌物質（例如幾丁質酵素的增生）以分解真菌細胞壁之幾丁質，而產生之幾丁質寡醣可啟動植物之防禦系統並產生植物干擾素 (phytoalexin)、酚類化合物 (phenolic compound) 等抗病物質，於是可以抵抗病菌的侵襲<sup>(5)</sup>。因此，N-乙醯幾丁寡醣為植物抗病系統之誘發者，故將 N-乙醯幾丁寡醣的這種特性利用在植物抗病防治方面是頗值得研究的。

一般而言，製作 N-乙醯幾丁寡醣的方法有兩種，傳統法是以化學法降解幾丁質，但由於過程中會大量使用酸鹼，操作不便，所以近年來製作 N-乙醯幾丁寡醣的方法大多改採酵素法<sup>(6)</sup>，而酵素法，即是利用酵素專一性的特性達到降解幾丁質的功效。因此，本實驗致力於研究此種對幾丁質水解具有專一性的酵素（chitinase） 以及其水解產物的探討。

## 1-4、幾丁質酵素 (chitinase) 的一般敘述與分類

### 1-4-1、幾丁質酵素的一般敘述

Chitinase (EC 3.2.1.14) 是一種醣類水解酵素，可以催化幾丁質水解，被定義為切斷幾丁質上二個 GlcNAc 殘基中 C1 與 C4 之間 *O*-glycosidic bond 的酵素。其廣泛存在於許多有機體中(即使是沒有幾丁質做為結構組成的有機體)，包括細菌、黴菌、酵母菌、植物、甲殼類動物、節肢動物、脊椎動物等，在各種有機中角色各不相同<sup>(7,8)</sup>。

黴菌利用幾丁質酵素修飾做為細胞壁重要組成的幾丁質；細菌產生幾丁質酵素分解幾丁質做為氮源和碳源；昆蟲在脫殼時期更是分泌幾丁質酵素分解老舊骨骼，而在較高等植物中幾丁質酵素的產生被認為是用來防禦黴菌病原體的侵略，此些幾丁質酵素在幾丁質的分解中扮演很重要的生態角色<sup>(7,8)</sup>。幾丁質酵素最方便取得的來源卻是微生物，最被大家所熟知的有 *Aeromonas*、*Serratia*、*Vibrio*、*Streptomyces*、*Bacillus* 等，可生產大量幾丁質水解酵素<sup>(9,10)</sup>。

近年來才有哺乳類動物的幾丁質酵素被發現。第一個被發現的人類幾丁質酵素是由吞噬細胞表現，最近幾年更在腸胃中發現豐富的酸性哺乳類動物幾丁質酵素 (acidic mammalian chitinase, AMCase)，可能是被用來抵抗病原體的入。

### 1-4-2、細菌的幾丁質酵素

細菌 (bacteria) 與真菌 (fungi) 類中，已經建立起降解、運送與代謝幾丁質的系統 (圖 1-3)<sup>(11)</sup>。在菌類代謝質丁質的過程中，通常牽涉到 chitin depolymerase { EC 3.2.1.14; poly[1,4-(N-acetyl-β-D-glucosaminidase)] glycanohydrolase }，此類幾丁質酵素能降解幾丁聚醣，

釋放出幾丁單糖、幾丁雙糖及短鏈幾丁質。經降解後的幾丁質會進入周質 (cytoplasm) 中, 由 chitodextrinases (also EC 3.2.1.14) and N-acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.52;  $\beta$ -N-acetyl-D-hexosaminide N-acetylhexosaminohydroase) 再次降解成幾丁單糖及幾丁雙糖。進入細胞質 (cytoplasm) 後, 幾丁單糖及幾丁雙糖則會經過代謝途徑產生養份, 或是經過修飾作用成為細菌細胞壁。

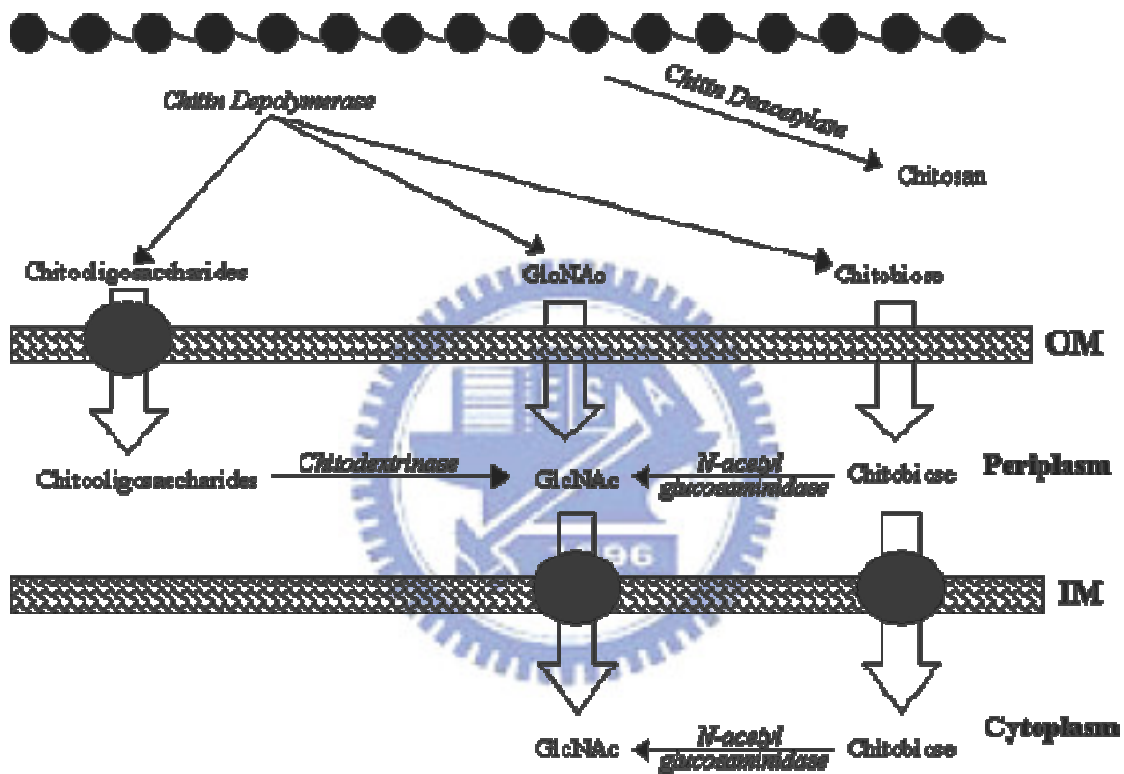


圖 1-3 細菌降解、運送與代謝幾丁質的系統。

### 1-4-3、細菌幾丁質酵素胺基酸序列分析

我們利用 ChiNCTU2 之胺基酸序列與其他 chitinase 進行相似度比較(使用 BLAST search, NCBI), 發現 ChiNCTU2 與同為細菌來源的幾丁質酵素有較高的相似度, 而與來源為植物 (plants)、真菌 (fungi)、昆蟲 (insects)、甲殼類動物 (crustacea) 的幾丁質酵素相似度較低。細菌幾丁質酵素的胺基酸序列顯示, 幾丁質酵素通常具有一些常見的作用區域 (functional

domains) ，包括訊息 胜肽 (signal peptide)、催化區與幾丁質鍵結區 (chitin-binding domain,ChBD)，此外還有一些較少見的作用區與 CaD 結合，如 type III fibronectin-like domain (Fn3D)、Pro/Thr rich linker、cadherin-like domain 以及纖維素鍵結區 (cellulose-binding domain,CBD)等<sup>(7,12)</sup>。圖 1-4 為 ChiNCTU2 與其他幾丁質酵素作用區域組成之示意圖<sup>(13)</sup>。

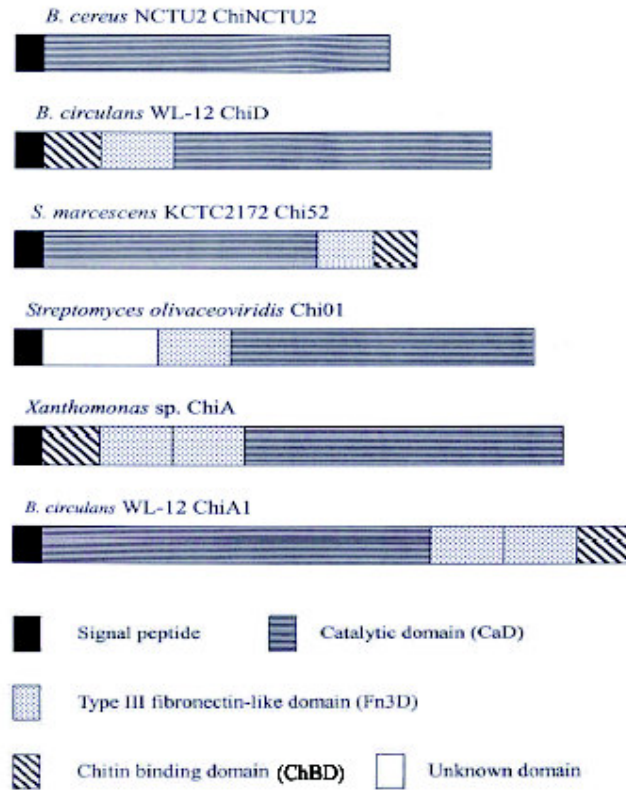


圖 1-4 ChiNCTU2 與其他幾丁質酵素作用區域組成之示意圖。

在 *S. marcescens* KCTC2172 中，Chi52 具有 CBD 及 Fn3D，將 Chi52 的 CBD 及 Fn3D 去除後可得到一個僅有 CaD 簡單構造且具有活性的幾丁質酵素 Chi35；在 *S. marcescens* 2170 中的 chitinase C2 亦僅含有一個 CaD，而此 chitinase C2 則是由含有 CBD 及 Fn3D 的 chitinase C1 修飾而成的。所以，在細菌中可常見到具有高分子量、CBD 及 Fn3D 的 chitinase，經由後轉譯修飾 (post-translational modification)，切除 CBD、Fn3D 或其他區域 (domain)，而形成一個低分子量且僅具有 CaD 的 chitinase。然而由 *B. cereus* NCTU2 產生的 ChiNCTU2 則是目前為止細菌幾丁質酵素中，非由高分子量 chitinase 後轉譯修飾而成，而僅具有一個區域 (CaD)



之低分子量chitinase 的第一個例子。

#### 1-4-4、幾丁質酶的分類與結構

根據國際生化學會 (International Union of Biochemistry) 照酶素催化反應的類型和對基質特異性而建立的命名法，幾丁質酶 (EC 3.2.1.14) 歸類在醣類水解酶素<sup>(14)</sup> (glycohydrolase) 中，已知目前醣類水解酶素可分為 115 個家族(families)，在比較胺基酸序列 (amino acid sequence) 後，幾丁質酶素主要分類在 family 18、19 和 48。而以 family 18 和 19 為例，二家族幾丁質酶的結構和機制均不相同<sup>(3)</sup>。

表 1-1 幾丁質酶素 family 18 和 19 之比較

Glycosidase family	Class of chitinase	Catalytic mechanism	Intermediate	Anomeric configuration of product	Inhibitors
18	III and V	substrate-assisted	oxazolinium ion	$\beta$	allosamidin
19	I, II, IV, VI and VII	acidic	oxocarbenium ion	$\alpha$	amidines amidrazones

Family 19 幾丁質酶素目前僅發現於植物 endochitinase 和細菌幾丁質酶素 *Streptomyces griseus* HUT 6037 ChiC，可水解導致構型反轉(inversion) 的  $\alpha$ -anomeric 組態產物。催化區有豐富的  $\alpha$  螺旋體和  $\alpha$ + $\beta$  摺疊成分，結構和溶解酶素(lysozyme)相似<sup>(12,15)</sup>。

#### 1-5、Family 18 幾丁質酶素簡介

Family 18 幾丁質酶素則廣泛分佈於其他生物體，包含其他細菌 (endochitinase 和部分 exochitinase)、黴菌、植物、昆蟲、病毒和哺乳類動物，水解產生構型保留 (retention) 的  $\beta$ -anomeric 組態產物<sup>(12)</sup>根據 Suzuki *et al.* 對於 29 個細菌幾丁質酶素的疏水性群(hydrophobic cluster)的分析和研究發現，family18 細菌幾丁質酶素全部序列的相似度雖然不高，但催化區

(catalytic domain, CaD)有相同的 $(\beta/\alpha)_8$ 筒狀(TIM barrel)構型組成。在起始的六個 $\beta$ -strands上有一些保留的胺基酸殘基，包含分別在第三和第四個 $\beta$ -strand上的SXGG和DXDXE，SXGG序列對帶催化反應的作用尚不清楚，但DXDXE序列被認為位在催化的活性中心，其中E作為參與反應的催化酸，在*Alteromonas* sp. O-7 Chi85與*Bacillus circulans* WL-12 ChiA1 研究中曾藉由定點突變導致其活性喪失證實<sup>(7,12)</sup>。而活性中心凹槽上的一連串芳香族胺基酸則是用來協助受質與酵素結合<sup>(12,16,17)</sup>。

根據催化區胺基酸序列的獨特性質，再將family 18原核幾丁質酵素其分為subfamily A、Band C，彼此在第七及第八個 $\beta$ -strand之間區域差異很大<sup>(7,12)</sup>。*Bacillus cereus* NCTU2 ChiNCTU2屬於subfamily B，*S.marcescens* ChiA則屬於subfamily A。

此外，Family 18幾丁質酵素結構上的些微差異，可能導致作用特性的不同，例如酵素與受質之間的鍵結、醣殘基被水解切除的模式、反應機制等，其中由寡醣降解的time course,分析受質鍵結缺口(substrate binding cleft)的自由能分佈可以了解鍵結的穩定性，因而推論醣殘基被水解切除的模式。而活性中心受質鍵結的位置(subsite)以圖1-5為例，從水解切除的位置算起，切下的雙醣為+1、+2，反邊為-1~-4。

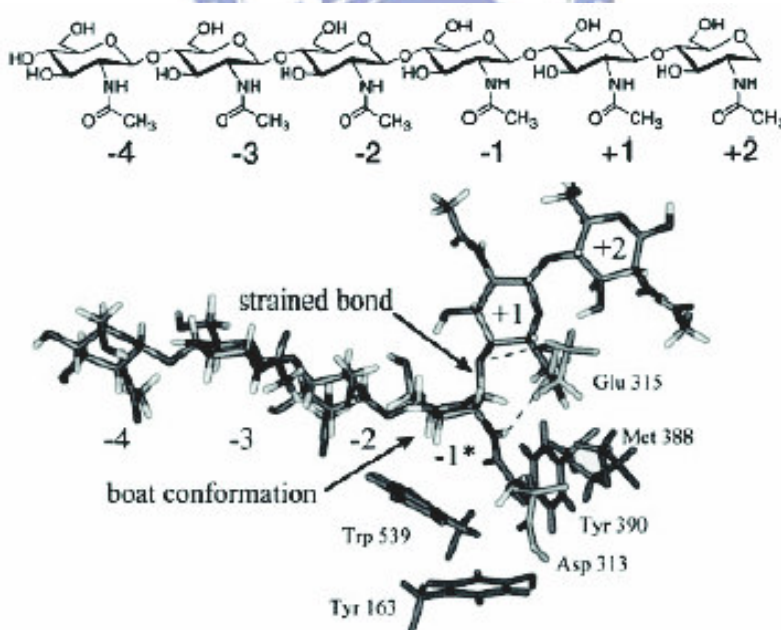


圖 1-5 分子動力模擬 (GlcNAc)<sub>6</sub> 在 *S.marcescens* ChiA 中，當-1 位置為 boat 形式時之最低能量構形<sup>(17)</sup>。

*S.marcescens* ChiA 的結構中包含了中心位置有八個  $\beta/\alpha$  所構的筒狀結構，這八條  $\beta$  摺板經由  $\alpha$  螺旋連結形成平行排列圍成筒狀柵欄，而  $\alpha$  螺旋則圍繞在外側，圖 1-6 A 左方的  $\beta$  摺板區域為幾丁質鍵結區(chitin-binding domain, ChBD)。在 C 端的第四個  $\beta$  摺板上的 G315 被認為在幾丁質水解反應中做為質子提供(proton donor)的角色，G315 殘基深埋在可以容納 7 個 GlcNAc 單位的鍵結裂縫(binding cleft)中，由 *S.marcescens* ChiA 突變株(E315L)與幾丁六醣的 3D 結構(圖 1-3)中可以得知在鍵結裂縫(binding cleft)內的芳香族殘基與幾丁六醣鍵結的位置。

在 *S.marcescens* ChiA 和幾丁六醣的複合物晶體結構中顯示(圖 1-6 B)<sup>(18)</sup>。鍵結在 binding cleft 結合區(subsite)+1、+2 的 reducing-end 幾丁雙醣是呈現  $\beta$  形式，而在鍵結區-1 的幾丁單醣被 E315 殘基質子化，代表幾丁質受質是在鍵結區+1、-1 間被水解，進而釋放出在-1 結合區為構形保留的  $\beta$ -D-GlcNAc 的幾丁雙醣，圖 1-6 為 *S.marcescens* ChiA 突變株(E315L)的 3D 結構。

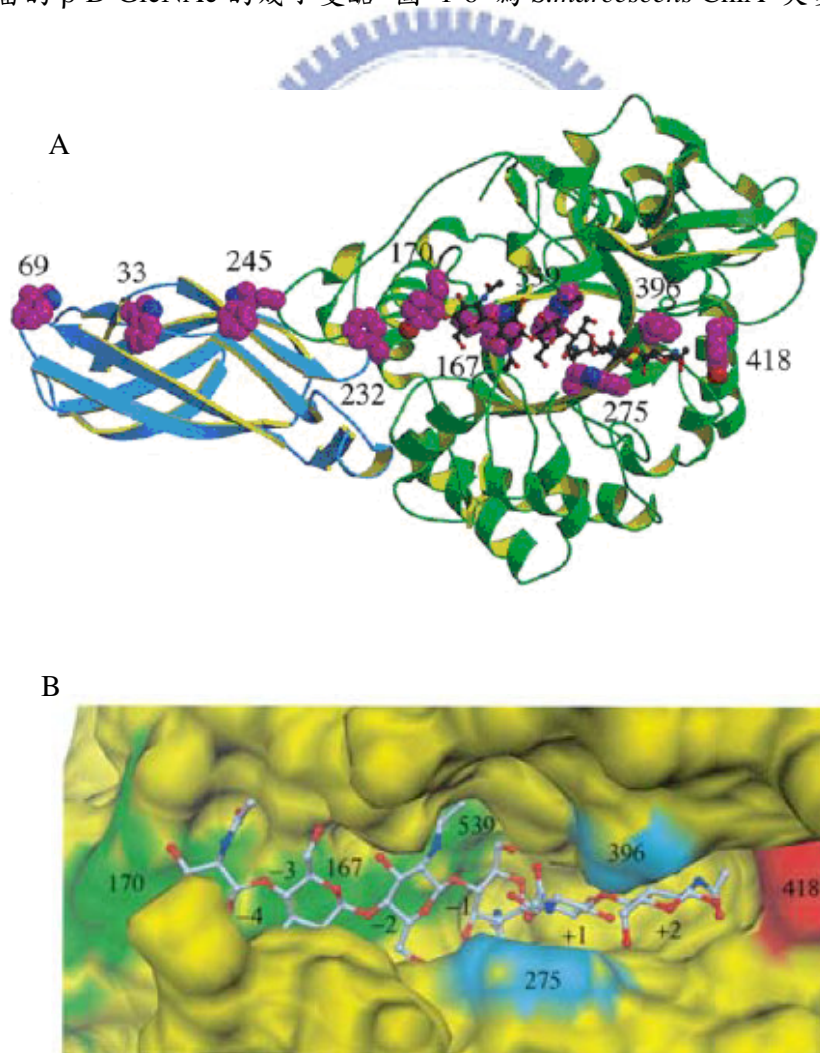


圖 1-6 *S.marcescens* ChiA 突變株(E315L)的 3D 結構圖,在鍵結裂縫(binding cleft)內有一個幾丁六糖。(A) N 端的幾丁質鍵結區(chitin-binding domain)以藍色表示, C 端的催化區(catalytic domain)以綠色表示,在鍵結裂縫(binding cleft)內的芳香族殘基以 space-filling 模型表示。(B) 鍵結裂縫(binding cleft)以 ball-and-stick 模型表示,和 reducing-end GlcNAc 中的 N-acetyl group 作用的 Y418 以紅色表示,在+2、+1 位置固定住 GlcNAc 疏水面(hydrophobic face)的 F396 及 W275 以青色表示,在-1、-3 及 -5 位置固定住 GlcNAc 疏水面的 W539、W167 及 Y170 以綠色表示。

## 1-6、Family 18 幾丁質酵素水解反應機制的推測研究

傳統構形保留的醣類水解為兩步置換(double displacement)機制(圖 1-7),例如 egg-white lysozyme 和 *Flavobacterium*  $\beta$ -Glucosidase, 通常牽涉兩個 carboxylate, 一個 carboxylate 當作催化反應的一般酸/鹼基(general acid/base), 於水解反應時先將醣苷上的氫質子化, 使形成好的離去基, 另一個 carboxylate 作為親核基(nucleophile)形成共價鍵結中間體或提供離子對以穩定 oxocarbenium 中間體, 並輔助離去基離去, 當離去基廣散離開活性中心後, 水分子進入, 行親核性取代反應, 得到構形保留產物<sup>(19,20,21)</sup>。

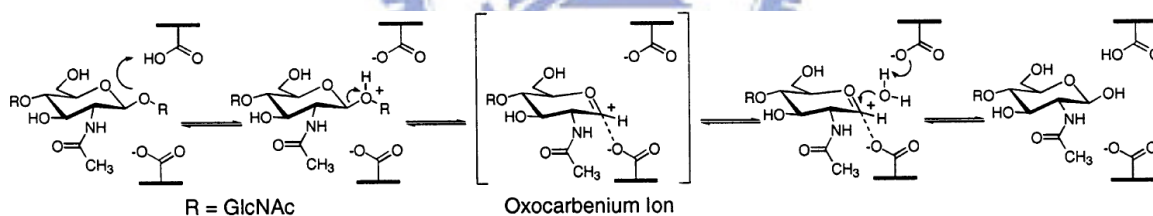


圖 1-7 二步置換水解反應機制<sup>(22)</sup>。

而同為構形保留的 family 18 幾丁質酵素也被認為應該有如上述的兩步置換水解反應機制, 具有兩個參與催化反應的 carboxylate (*Serratia marcescens* ChiA 被推測是 Glu315 和 Asp391), 但是在 family 18 幾丁質酵素的 X-ray 晶體結構中, 只發現一個作為一般酸/鹼基的 carboxylate, 而沒有用來穩定中間體結構的第二個 carboxylate 在推測的位置附近, 這暗示著中間體可能被其他方法穩定。受質上的 N-acetyl group 可能是一種分子內穩定的方法, 稱為 anchimeric assistance 或 neighboring group participation (圖 1-8), 可能經由電荷的交互作用或形成中間體而穩定<sup>(23,24)</sup>。

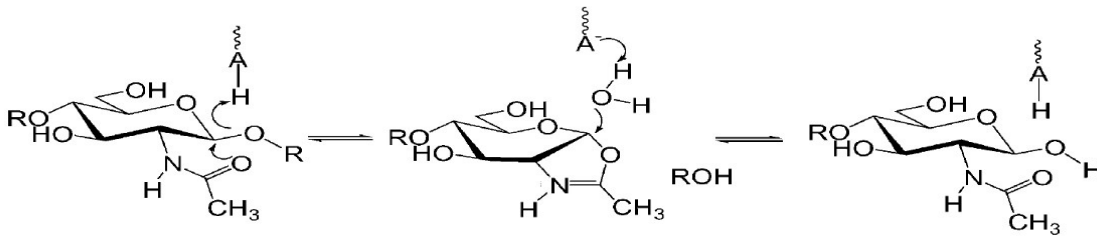


圖 1-8 substrate-assisted catalysis<sup>(25)</sup>。substrate-assisted catalysis 為一種推測的機制，在 GlcNAc 殘基的-1 位置(subsite) 上之 C2 碳上,其 acetamide group 上的氧原子做為一親核試劑(nucleophile) 攻擊同一個環上的 C1 碳，造成 glycosidic bond 斷裂，並且形成 oxazoline 中間體，最後再由去質子化的水分子攻擊 C1 碳,反應完成

許多的研究便致力於 family 18 幾丁質酵素水解反應的中間體結構、受質扭曲現象以及酵素與受質在活性中心的鍵結等。其中有分子動力(molecular dynamic,MD) 模擬在活化位置-1 位置的 boat 形式之 oxocarbenium 與 oxazoline 兩中間體結果相似，且都較-1 位置的 chair 形式之 oxocarbenium 穩定，因而推測水解反應時，鍵結在-1 位置的 GlcNAc 殘基該是 boat 形式；ab initio quantum mechanical(QM) calculation 預測 boat 形式的 GlcNAc 質子化可自發導致 anomeric bond 斷裂，得到 oxazoline 中間體；由 Low root-mean-square(RMS) coordinate fluctuation 得知 oxazoline 在-1 位置鍵結緊密，不僅穩定 oxazoline 中間體，更限制溶劑可到達之處，因此水分子做親核攻擊時，僅可得到構形保留的  $\beta$ -anomer，與實驗看到的結果相同<sup>(23)</sup>，還有由 chitobiose oxazoline 衍生物利用轉糖特性製造長鍵幾丁質的方法<sup>(26,27)</sup>、結晶學研究<sup>(23)</sup>與抑制劑 allosamidin 對於 family 18 幾丁質酵素的抑制現象，以及許多以 oxazoline moiety 化合物對幾丁質酵素的研究都支持著共價鍵 oxazoline 中間體存在的假設。Artificial NAG-thiazoline 對於 N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase 的抑制<sup>(28)</sup>對於 acetamido participate 機制與 oxazoline 中間體的形成提供了更強而有利的證據。

此種 neighboring group participate 的水解反應機制現象非 family 18 幾丁質酵素專有，在 family 20 的一細菌 chitobiase 的 X-ray 結晶中發現 C2-N-acetyl group 在可以用來形成 oxazoline 中間體的位置。而 family 7 的 endoglucanase I (cellulose)也有類似受質扭曲的現象。

但是，Yannis *et al.*(2001)由 *S.marcescens* ChiA 的結晶研究<sup>(10)</sup>對於 family 18 水解反應機制

的推測有新的看法。由突變株 D313A 和(GlcNAc)<sub>8</sub> 的結晶中, 明確看到連接在活化位置上的寡糖在切除區域(即 subsites -1 與+1 的單糖體)被旋轉以及彎曲, 證實過去對於糖類水解時受質會扭曲的猜測, 而且在 subsite -1 位置的糖基是彎曲成 boat 形式, 不同於過去曾有研究提出的 4-sofa 形式<sup>(15)</sup>。在突變株 Y390F 與(GlcNAc)<sub>6</sub> 晶體看到+1 與-1 糖基之間部分斷裂的 glycosidic bond, 原本與 Tyr390 鍵結的水分子消失, 雙糖明顯鍵結在+1 和+2 位置, 剩下的受質仍鍵結在-1 和-4 位置, 但-1 位置羰基上 O7 與 anomeric C1 距離並不符合預先推測的 oxazoline 中間體。

因此 Yannis 等對於 ChiA 水解反應機制的看法(圖 1-9)是 E315 先被 D313 質子化, 所有糖殘基上的 acetamido groups 都朝著遠離相連糖鍵的方向, 形成一個能量上有利的形態, 此時 -1 的位置糖殘基上的 acetamido groups 朝向胺基酸殘基 D313 和 E315, D313 朝向 D311(family 18 的 DXDXE 保留序列在 *S.marcescens* ChiA 為 311~315), 但部分比率形成朝向 Y390 的另種形態, 此時羰基上氧 O7 取代與 Y390 的 phenol hydroxyl 形成氫鍵水分子。

酵素對-1 糖殘基作用將其由 chair 形式轉換成 boat 形式造成約 8 kcal/mol 的自由能上升, 並伴隨著寡糖的旋轉與彎曲, 此時水分子與 -1 糖基上 acetamido group 以及 Y390 形成氫鍵, E315 將+1 糖基的 O4 質子化, 接著 C1(-1 糖殘基)-O4 (+1 糖殘基)之間的 glycosidic bond 斷裂, 其中-1 糖基的 acetamido group 翻轉朝向 Y390, 水分子進入, E315 抓水分子中的質子, 剩下的氫氧基攻擊糖殘基上的 C1, 完成反應。

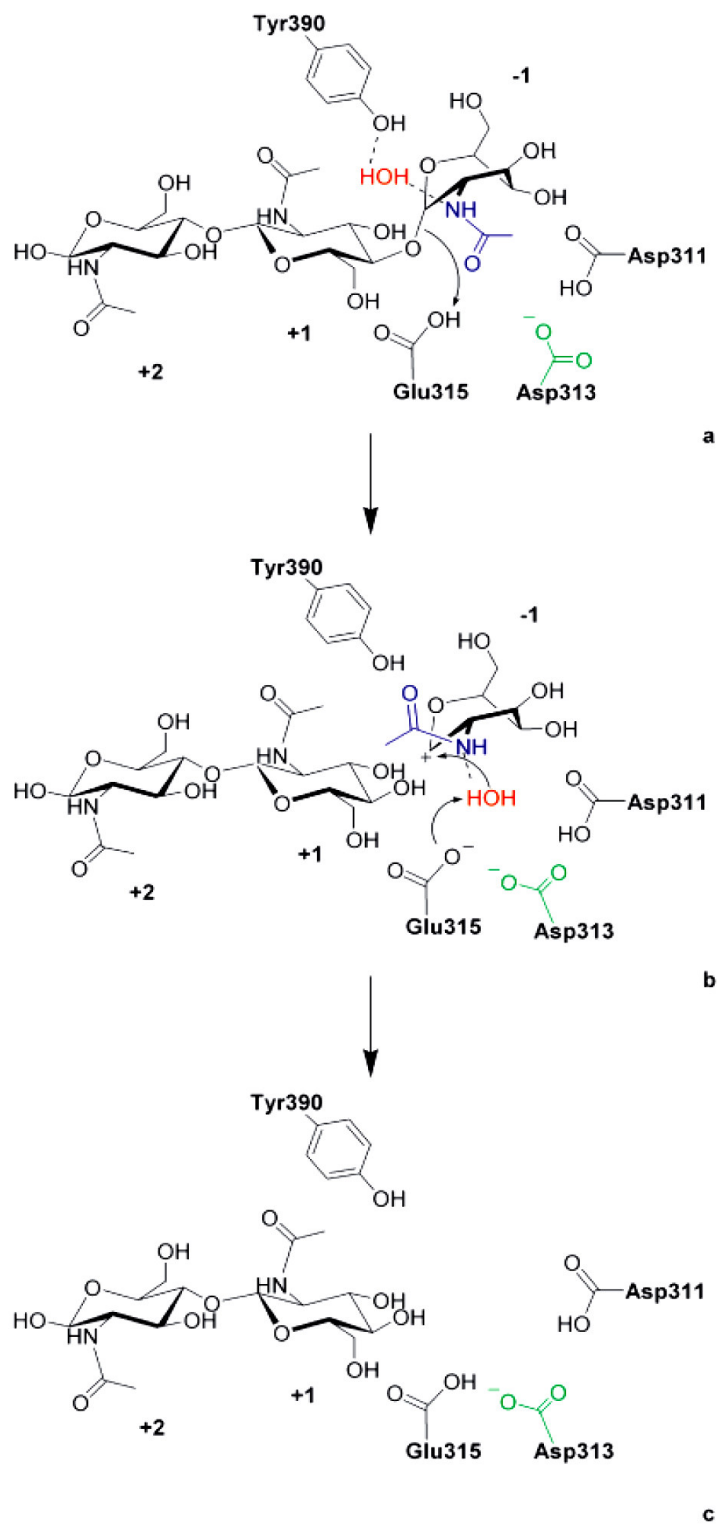


圖 1-9 *S.marcescens* ChiA 的反應機制<sup>(9,10)</sup>。

## 1-7、論文研究動機

對於幾丁質酵素水解反應機制，從模擬、理論計算與抑制作用至晶體觀測的boat 或chair 形式，到neighboring group participation 的 oxazoline ring 中間體或 Yannis *et al.* 從 *S. marcescens* ChiA 晶體研究中提到的不同論點，這些說法眾說紛紜，本實驗旨於蛋白質結晶學與同步輻射高能量的X光，以原子級的解析度，解出ChiNCTU2的蛋白質結構。並利用其突變株蛋白質與幾丁五或六醣之複合物結構，找出酵素中與醣類鍵結之相關胺基酸殘基以及研究酵素的反應機制。





## 第二章 實驗方法

### 2-0、一般敘述

#### 藥品:

菌種培養液藥品購自 Merck、Difco 公司。

活性測試用藥及緩衝液購自 Merck、Aldrich。

各式 Kit 購自 GeneMark、Viogene。

#### 儀器:

恆溫培養箱(EYELA NDO-450ND,RISEN refrigerated circulators)

搖動培養箱(FIRSTEK SCIENTIFIC B602D,S300R,S302R)

UV 吸收光譜儀(HP 8452A)

高速離心機(KUBOTA 7820)

電子噴灑式串聯質譜儀 ESI-Q-Tof(Micromass)

超高波震盪器

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

#### **FPLC system (Pharmacia Biotech FPLC):**

HiTrap Desalting column (Pharmacia,5ml)

SP column

HIC (Hydrophobic interaction column)

Q column



## 2-1、表現載體來源

由 *Bacillus cereus* ChiNCTU2 選殖(clone)出來的幾丁質酵素先前以將含 signal peptide 的全長 ChiNCTU2 基因建構帶表現載體 pET-22b(+)-之 *Nde* I 及 *Xho* I 的限制酶切位中，且 pelB leader 已被移除，命名為 pET22/ChiNCTU2，本實驗即用此載體做為後續表現及定點突變 (site-directed mutagenesis) 用。

## 2-2、幾丁質酵素的大量表現及純化

本實驗室曾嘗試將已去除 signal peptide 之 ChiNCTU2 (成熟蛋白) 建構於 pRSET A 表現載體中，但表現出來的酵素為包涵體 (inclusion body)，此包涵體以尿素溶解後進行 rescue，仍未成功恢復酵素活性。在本研究中，我們將含 signal peptide 的全長 ChiNCTU2 基因建構於載體 pET-22b(+) 進行表現，幸運的，可表現出大量具有活性的重組酵素。以下簡述其純化過程<sup>(57)</sup>：

質體 pET22/chi-sp 被轉型至大腸桿菌勝任細胞 BL21(DE3)，在 500ml 含 0.1mg/ml Ampicillin 的 LB 培養液中，於 37°C 培養箱，轉速 120rpm 下培養約 16 小時。6500rpm 轉速離心 500ml 培養液，以 20mM pH 7.0 的磷酸緩衝液 5ml 回溶沉降菌體，使用超音波震盪器打破菌體 (冰上進行)，再以轉速 15000rpm 高速離心取得胞內酵素後，以高速液相層析系統 (fast purification liquid chromatography, FPLC) 進行純化工作。

### 2-2-1、Phenyl Sepharose High Performance (Hydrophobic interaction column, HIC) 層析

先以去離子水流洗 HIC，再以 pH 7.0 含銨鹽的磷酸緩衝液 [ 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，1M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ] 平衡 HIC。將胞內酵素緩緩注入 HIC 中，利用銨鹽梯度 (1~0 M) 進行酵素分離。以流速 2 ml/min 流洗 HIC，每 2 分鐘收集一管流洗液，收集的流洗液分別取樣做活性測試。測得活性的流洗液再以蛋白質電泳 (SDS-PAGE) 估計其均質 (homogeneity)。

## 2-2-2、Q Sepharose High Performance 層析

先以 pH 7.0 含食鹽的磷酸緩衝液(20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1M NaCl)清洗 Q 管柱後，再用 pH 7.0 無鹽磷酸緩衝液(20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)平衡 Q 管柱。將 HIC 分離後測得活性的流洗液緩緩注入 Q 管柱中，利用 NaCl 鹽類梯度(0~1M)進行第二次蛋白質分離，以流速 2 ml/min 流洗 Q 管柱，每 2 分鐘收集一管流洗液，收集的流洗液分別取樣做活性測試，再以蛋白質電泳膠片估計其均質度。

## 2-3、酵素活性之測定

取 250 μL 之酵素液，添加 250 μL，1 % 膠態幾丁質，在 37 °C 下振盪反應 60 分鐘後，立即加入 500 μL 試劑 DNS，於 90 °C 下反應 10 分鐘。離心後，取上清液測定還原糖生成量 (OD 540)。以未反應的酵素反應液作相同的測定來作為空白樣品。一個酵素活性單位定義為每分鐘可水解膠態幾丁質產生 1 μmole 還原糖當量的酵素量。

## 2-4、定點突變

以質體 pET22/ChiNCTU2 為模板，利用 Quik-change 的方法做定點突變，所設計之突變點有：D143E、E145Q、E145GE190Q、Q225G、Y227F、E145G/Y227F、E145Q/Y227F、E145Q/E190Q、Q225G/Y227F 和 E145Q/Q225G/Y227F，使用之引子序列如下：

D143A	Sense strand	5' -GATGGAATAGATATTGCCCTTGAATCAGGTATT-3'
	Anti-sense strand	5' -AATACCTGATTCAAGGGCAATATCTATTCCATC-3'
E145Q	Sense strand	5' -GATGGAATAGATATTGACCTTCACTCAGGTA-3'
	Anti-sense strand	5' -TACCTGACTCAAGGTC AATATCTATTCCATC-3'
E145G	Sense strand	5' -ATAGATATTGACCTTGGATCAGGTATTTAC-3'
	Anti-sense strand	5' -GTAATACCTGATCC AAGGTC AATATCTAT-3'

E190Q	Sense strand	5' -ATTAAGCATGGCTCCTCAAACAGCTTATGT-3
	Anti-sense strand	5' -ACATAAGCTGTTCAGGAGCCATGCTTAAT-3'
Q225G	Sense strand	5' -CATTTCATGTTGGAACTACAACGCTGGTAG-3
	Anti-sense strand	5' -CTACCAGCGTTGTAGTGTC AACATGAATG-3'
Y227F	Sense strand	5' - TGTTC AACACTTCAACGCTGGTAGC-3'
	Anti-sense strand	5' - GCTACCAGCGTTG AAGTGTGAACA-3'
Q225G/Y227F	Sense strand	5' -TGTTGGACACTTTAACGCTGGTAGC-3'
	Anti-sense strand	5' -GCTACCAGCGTTAAAGTGTC AACACA-3'

## 2-5、酵素動力學之測定

6.0 nM 的ChiNCTU2 在50 mM pH 6.5 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 緩衝液下，和PNPCB (15.2 μM ~ 0.30 mM, Δε : 5088 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, 觀測波長為400 nm) 進行水解反應，以μν吸收光譜儀觀察適當波長的吸收值變化，計算反應的初始速率 (initial velocity, V<sub>0</sub>)。並以雙倒數圖 (double-reciprocal plot) 求K<sub>m</sub> 與k<sub>cat</sub> 之值。

## 2-6、蛋白質結晶

蛋白質結晶實驗是我們與同步輻射陳俊榮 博士研究室合作計畫，由實驗室的研究生郭爵源與謝殷程所共同負責。詳細步驟在郭爵源碩士論文<sup>(29)</sup>中有詳細記載，在此不詳細說明。

## 第三章 結果與討論

仙人掌桿菌 (*Bacillus cereus* NCTU2)，為本研究室所自行篩選具有幾丁質酵素活性的菌株，並由仙人掌桿菌的染色體 DNA 選殖得幾丁質酵素 (ChiNCTU2) 之基因。經由定序，ChiNCTU2 之基因共有 1,083 個核苷酸，相當於 360 個胺基酸。ChiNCTU2 為一簡單的幾丁質酵素，僅包含一個 N 端訊息胜肽與 C 端催化區，無幾丁質結合區、Fn3D 或其他作用區。經與 Genebank 基因資料庫上 *B. cereus* ChiA 比對，發現兩段基因有 27 個核苷酸不一樣，導致 7 個胺基酸的差異。經序列比較推測，其前 27 個胺基酸為訊息胜肽，剩餘之 333 個胺基酸形成胞外酵素，成熟蛋白 (mature protein) 分子量為 36,235 Da。此酵素經胺基酸序列比對，在醣類水解酵素中，屬於家族 18，第 137 個胺基酸序列 FDGIDIDLE 符合家族 18 幾丁質酵素一致的催化序列模式 [LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIVMF]-[DN]-X-E。其蛋白質結構應為  $(\alpha/\beta)_8$  的結構，且僅具有單一催化區域 (catalytic domain)，而不具備其他的輔助區域。此基因已被建構於 pRSET A 載體上並能以大腸桿菌 BL21(DE3) 表達之。此幾丁質酵素水解膠狀幾丁質及 N-乙醯幾丁寡醣所得之產物主要為雙醣及少數單醣。

### 3-1、野生株 ChiNCTU2 蛋白質三維結構之建立

我們與同步輻射陳俊榮教授實驗室合作，成功的將野生株 ChiNCTU2 之結構解出，如圖 3-1 所示。野生株幾丁質酵素 ChiNCTU2 之蛋白質分子單元體大小為  $40 \text{ \AA} \times 38 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$ ，共由 12 個  $\alpha$  螺旋及 10 個  $\beta$  褶板組成，其中有八個  $\beta/\alpha$  所構成的筒狀 TIM barrel 結構。

第一個  $\beta$  褶板的胺基酸序列由 8~13，第一個  $\alpha$  螺旋的胺基酸序列由 25~27，第二個  $\beta$  褶板的胺基酸序列由 34~38，第二個  $\alpha$  螺旋的胺基酸序列由 68~72，第三個  $\beta$  褶板的胺基酸序列由 74~79，第三個  $\alpha$  螺旋的胺基酸序列由 91~108，第四個  $\beta$  褶板的胺基酸序列由 112~115，第四個  $\alpha$  螺旋的胺基酸序列 136~152，第五個  $\beta$  褶板的胺基酸序列由 157~160，第五個  $\alpha$  螺旋的胺基酸序列由 164~172，第六個  $\alpha$  螺旋的胺基酸序列由 180~191，第六個  $\beta$  褶板的胺基酸序列由 194~196，第七個  $\beta$  褶板的胺基酸序列由 204~207，第八個  $\beta$  褶板的胺基酸序列由 210~214，第 7 個  $\alpha$  螺旋的胺基酸序列由 218~230，第八個  $\alpha$  螺旋的胺基酸序列由 247~249，

第九個  $\beta$  褶板的胺基酸序列由 252~255，第九個  $\alpha$  螺旋的胺基酸序列由 258~260，第十個  $\alpha$  螺旋的胺基酸序列由 269~281，第十個  $\beta$  褶板的胺基酸序列由 302~306，第十一個  $\alpha$  螺旋的胺基酸序列由 308~313，第十二個  $\alpha$  螺旋的胺基酸序列由 317~328。

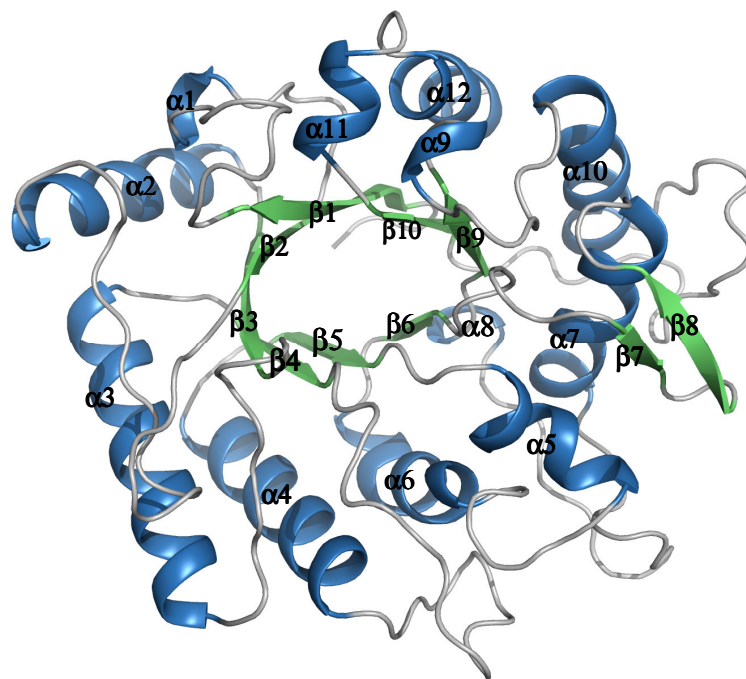


圖 3-1 ChiNCTU2 之 3D 結構圖。 $\beta$  褶板以綠色表示， $\alpha$  螺旋 ChiNCTU2 之蛋白質結構以藍色表示，loop 以灰色表示。

### 3-2、結構中與鋅原子鍵結的殘基

在 ChiNCTU2 的結構中，總共鍵結了五個鋅原子和一個醋酸鹽(acetate)分子(圖 3-2)，其中有二個鋅原子(黃色)及醋酸鹽分子(綠色)鍵結酵素催化活性區(catalytic domain)的入口。與鋅原子鍵結的殘基為 Asp143、Glu145、Glu190、Gln225 及 Tyr227，我們推測這些胺基酸殘基是參與水解反應所必需的胺基酸，故我們以定點突變的方式來進一步證實。同時我們也測試鋅原子對酵素的抑制作用，證實鋅原子會對酵素造成抑制而降低酵素活性(圖 3-3)，其原因為鋅原子鍵結在酵素活性區內所造成，因此將會影響到後續酵素與 chitin-oligo 的 cocrystal 結晶，所以必須重新調整長晶條件。

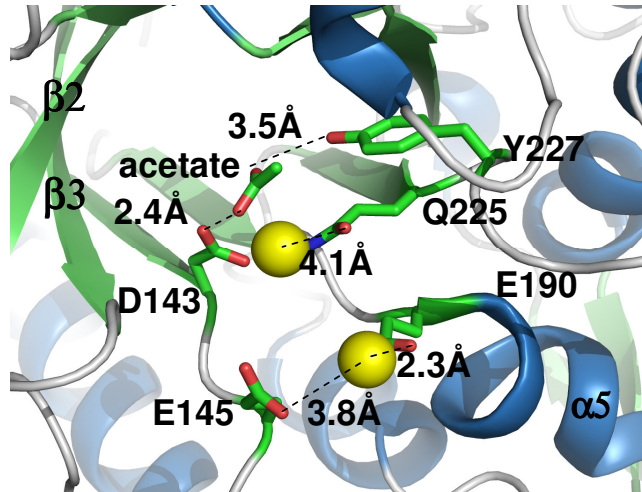


圖 3-2 活化位置中，與鋅原子相關的胺基酸殘基和兩者之間的距離。



圖 3-3 鋅原子對於 ChiNCTU2 酵素活性的影響。1. blank；2. ChiNCTU2 + chitin；3. ChiNCTU2 + chitin + 100 mM ZnCl<sub>2</sub>。

### 3-3、ChiNCTU2 之胺基酸序列分析與比對

我們將ChiNCTU2 的胺基酸序列與家族 18 中已有 3D 結構且中心位置都有八個  $\alpha/\beta$  所構成筒狀結構 (TIM barrel) 的 chitinase 進行比對，圖 3-4 為 ChiNCTU2 與 exochitinase 包括 *Serratia marcescens* chitinase A (1CTN)、*Serratia marcescens* chitinase B (1E15)<sup>(30,31)</sup>、*Homo sapiens* chitinase (1GUV)<sup>(32)</sup>、*Coccidioides immitis* chitinase 1 (1D2K)<sup>(33,34)</sup>、*Bacillus circulans*





### 3-4、反應機制的探討

#### 3-4-1、酵素動力學分析

我們根據已獲得之野生株結構 (包含Zn) 以及胺基酸序列的比對 (圖3-4), 以定點突變的方式將E145、E190、Q225和Y227分別突變成E145Q、E145G、E190Q、Q225G和Y227F並分析其活性, 結果如表9-1所示。

**表3-1: Wild-Type 和 Mutants ChiNCTU2之動力學數據表**

protein type	K <sub>m</sub> (μM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	relativek <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub>	relative activity (%)
Amino acid alignment:				
wild type	74	20.94	1.0000	100
E145Q	70	0.04	0.0020	ND
E145G	72	0.025	0.00035	ND
Y227F	113	2.37	0.0735	32
Protein structure:				
E190Q	112	10.01	0.3159	24
Q225G	69	0.17	0.0084	11

ND:No detectable activity

Relative activity: 以膠狀幾丁質為受質, 在 pH 7.0, 37°C 下反應。

結果發現與野生株ChiNCTU2之k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>值比較, E145G下降約2900倍、E145Q下降500倍、E190Q下降3倍、Q225G下降120倍和Y227F下降17倍, 因此證實E145為ChiNCTU2 的反應重要胺基酸, 此與所有已知family 18 幾丁質酵素相吻合。

然而, 令人意外的是, 突變株Y227F的k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> 值與野生株比較, 只下降17倍, 並未造成酵素活性的完全喪失, 與已知的文獻報告有很大的差異<sup>(10,48)</sup>。因此, 我們推測ChiNCTU2 與 *S. marcescens* chitinase A 和其他幾丁質酵素可能有不同的催化反應機制。

同時為了更進一步的確認 ChiNCTU2的催化反應機制, 我們也將突變株 E145Q、E145G/Y227F和E145Q/Y227F與chitin-oligo進行co-crystal, 希望對反應機制能有深入的了解。

### 3-4-2、突變株 E145Q、E145Q/Y227F 和 E145G/Y227F 與幾丁質五醣之 cocrystal 分析

根據 E145Q、E145Q/Y227F 和 E145G/Y227F 與幾丁質五醣之 cocrystal，我們發現當幾丁質五醣與三個突變株酵素結晶時，因為突變株 E145Q、E145Q/Y227F 和 E145G/Y227F 皆並未完全喪失活性，所以幾丁質五醣被水解掉，因此在 co-crystal 中只發現二醣與蛋白質形成複合物。在獲得的 E145Q 結晶中，-1 之醣殘基構形為 chair form (圖 3-5 A)，而在 E145Q/Y227F 中 -1 之醣殘基構形為 boat form (圖 3-5 B)。然而在 chitinase 的水解反應過程中，醣基的 boat form 構形為過度狀態，能量必較高，因此需要由其它能量來穩定此狀態，在 E145Q/Y227F cocrystal 中，維持醣基 boat form 構形的能量來自胺基酸 E145Q 和 Q109 與 -1 位置醣殘基之 C1-OH 的氫鍵作用，以及 D143 與 -1 位置醣殘基之乙醯基的氫鍵作用，這些作用力使 -1 位置醣殘基得以維持 boat form 構形。此外，我們也從 E145Q/Y227F co-crystal 中發現胺基酸 E145Q 具有兩個構形，並利用兩個構形的擺動攜帶一個水分子進入活化位置進行水解動作，此現象在 E145Q cocrystal 中卻沒有發現，因此可以證明水分子進入參與反應是由 E145Q 所攜帶。

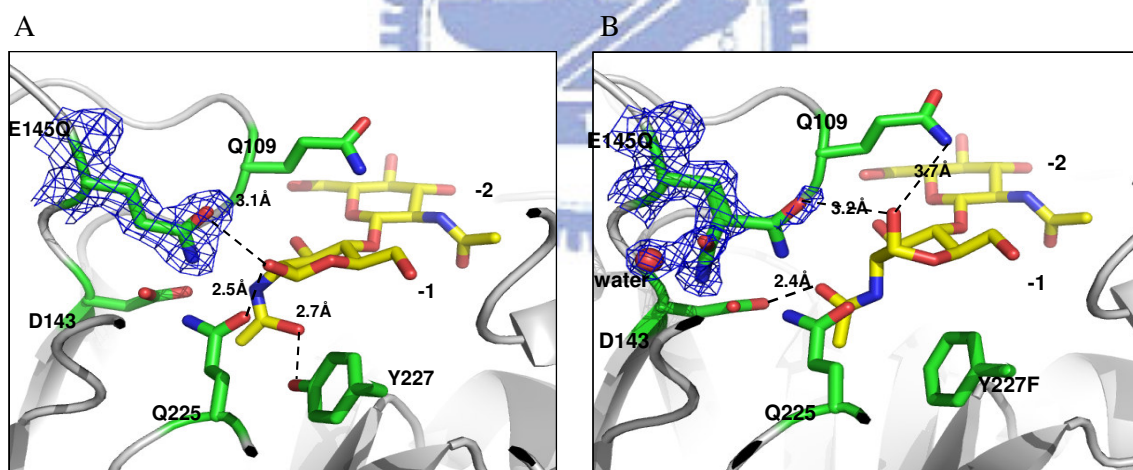


圖 3-5 突變株與 chitin 二醣之 cocrystal。(A) E145Q cocrystal 中，-1 位置醣殘基之構形為 chair form；(B) E145Q/Y227F cocrystal 中，-1 位置醣殘基之構形為 boat form。藍色網狀為電子雲密度圖。

在已知的 family 18 chitinase 反應機制，-1 位置醣殘基之構形由 chair form 轉變至 boat form 是水解過程的重要步驟，而由 co-crystal 中可以發現，chair form 與 boat form 的轉換是受到

D143 和 Y227 所共同調控，由於我們所使用之突變株酵素未完全喪失活性，因此可以觀察之反應位置被侷限在-1 和-2 的糖基上，缺乏+1 和+2 位置糖之反應情況，導致無法很準確的對酵素之反應機制進行推測與證實，故接著我們將以 chitin 五糖和突變株酵素 E145G/Y227F+(NAG)<sub>2</sub> 的複合物以 soaking 的方式進行結晶，以便可以更完整的研究酵素之反應機制。

### 3-4-3、突變株 E145G/Y227F 與五糖之 cocrystal 分析

由結晶結果，我們發現與 E145G/Y227F 形成 cocrystal 的糖基為 chitin 四糖(圖 3-6)，而非 chitin 五糖，其可能原因為-3 或+3 之糖基無法被固定在同一位置，導致其電子雲密度無法被觀測所造成。我們也由 E145G/Y227F+(NAG)<sub>4</sub> 的 cocrystal 歸納出與糖基有作用的胺基酸，如表 3-2 所示：

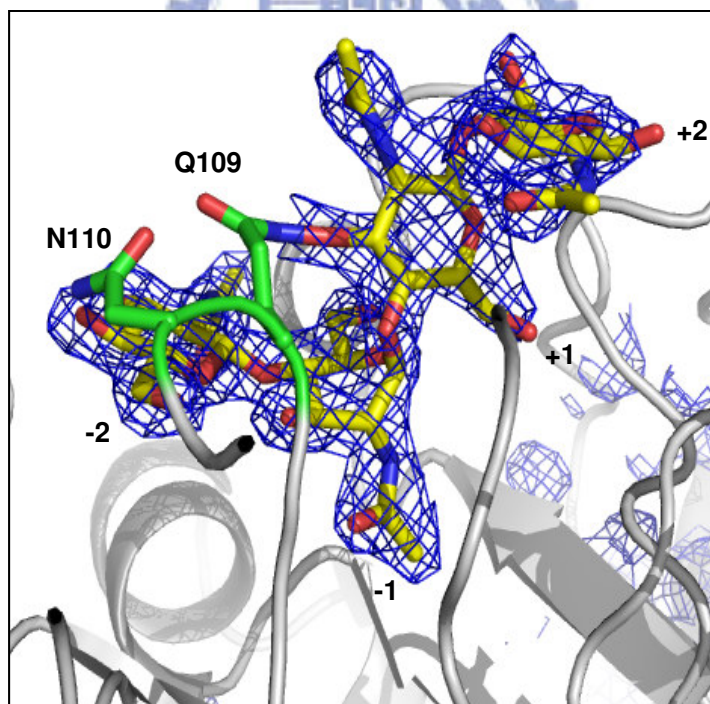


圖 3-6 突變株 E145G/Y227F 與 chitin 四糖之 cocrystal。藍色網狀為電子雲密度圖，從電子雲密度只能辨識出 chitin 四糖。

表 3-2：ChiNCTU2 突變株 E145G/Y227F 與 (NAG)<sub>4</sub> 間之作用

Protein residues	subsites for sugar residues
E190, S290	+2
Q109, E190, Q225	+1
Q109, D143, E145, Q225, N228, A287	-1
N45, Q109, W333, W337	-2

同時，我們也在 cocrystal 中發現，D143、E145、E190 和 Y193 等胺基酸殘基同時存在雙重構形，但在 Wild type 上並無此現象被觀察到。因此，我們推測這些胺基酸殘基在水解過程中扮演著重要的角色，如圖 3-7 所示。在水解過程中，當-1 和+1 間醴甘鍵斷裂時，需要水分子的參與，此時，Y193 利用構形改變引進一個水分子，接著 E145 將水分子帶至活化中心進行醴甘鍵的水解反應，在 E145 的兩種構形轉換過程中，也直接造成 E190 構形的轉動，使得-1 和+1 間醴甘鍵斷裂後，由於 E190 構形轉動的牽引，將+1 和+2 的醴基帶離，使產物釋放至溶液中。而 E145 的兩種構形轉換過程，也導致了 D143 產生兩種構形，此兩種構形所產生的效應，須進一步的研究。

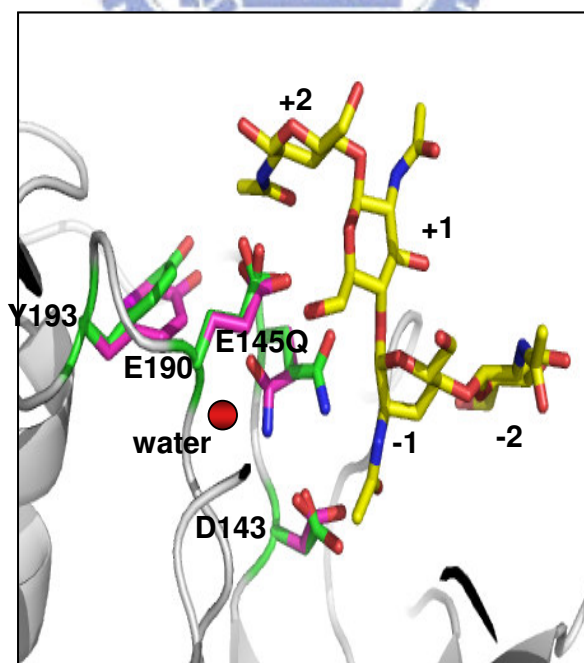


圖 3-7 ChiNCTU2 結構中具有雙重構形之胺基酸。粉紅色殘基為沒有與醴 cocrystal 時殘基的位置；綠色殘基為當與醴 cocrystal 時殘基的位置，且當與醴 cocrystal 時這些殘基



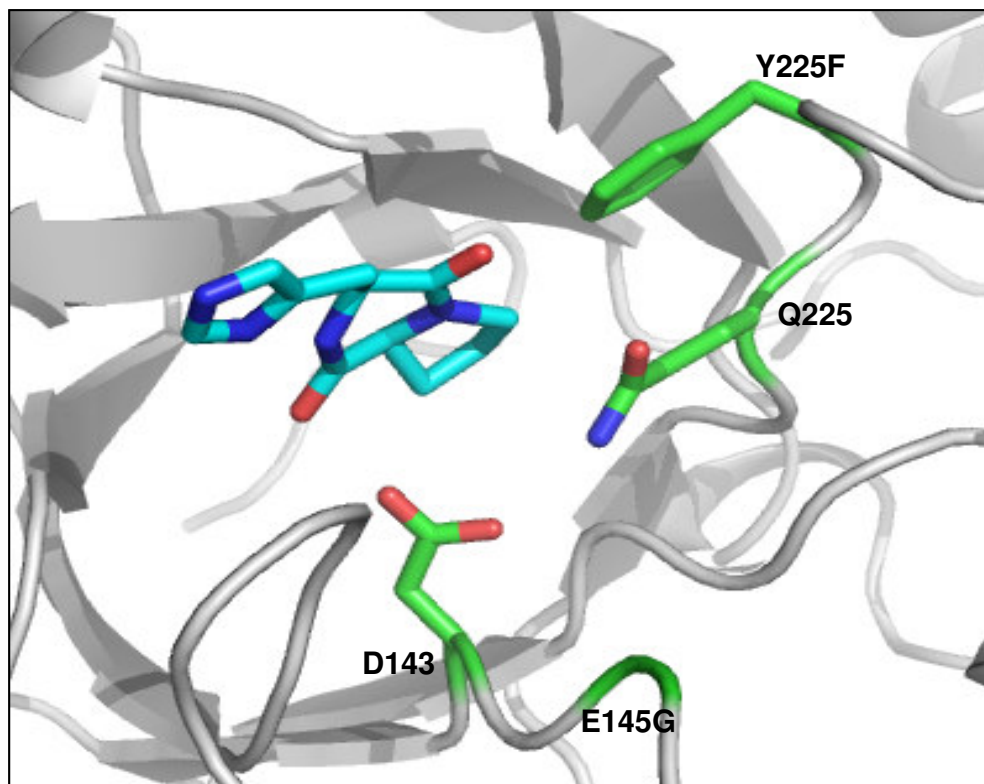


圖 3-9 突變株 E145G/Y227F 與 *cyclo*-(L-His-L-Pro) 之 cocrystal。

### 3-4-5、ChiNCTU2 的受質 binding dynamic loop

在我們所獲得的 co-crystal 中，我們觀察到，當酵素與醣基形成 cocrystal 時，會造成 dynamic loop 的移動，如圖 3-10 所示。在圖 3-10-A，紅色 (I106 to V112) 為 wild type 結構時 dynamic loop 的位置，一旦，醣基進入活化位置時，這 dynamic loop (綠色) 將會移動去 binding 醣基，使醣基固定在活化位置中，以便水解反應的進行。其中胺基酸 Q109 扮演重要的角色 (圖 3-10-B)，它的 side chain 移動大約一個單醣的距離 (5.7Å) 去覆蓋住醣基，使醣基固定在活化位置中。同時，Q109 與+1 的醣基有很強的氫鍵作用(1.1Å)，可以幫助醣基維持 boat form 的構形。

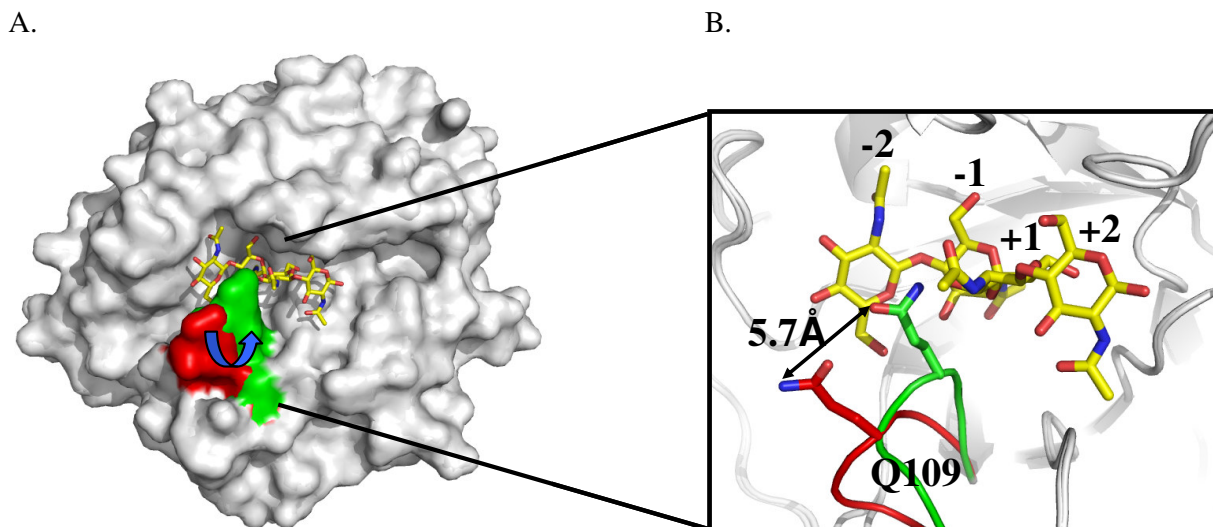
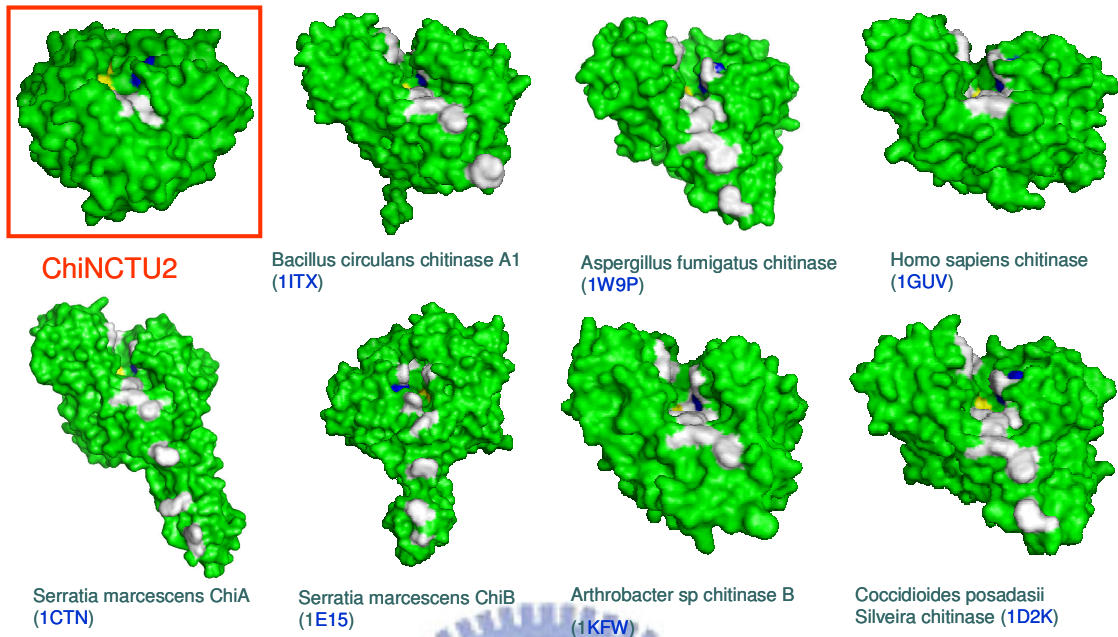


圖 3-10 ChiNCTU2 chitin binding 之 dynamic loops。(A) ChiNCTU2 的 electron surface 圖。紅色和綠色分別為 dynamic loop (from I106 to V112)在 wild type 和 E145G/Y227F cocrystal 結構中的位置。當受質進入活化位置時，loop 由紅色移動到綠色。(B) Q109 side chain 移動大約一個單糖的距離 (5.7Å) 去覆蓋住醣基，使醣基固定在活化位置中。

同時，我們也將 ChiNCTU2 結構與 family 18 中已有 PDB 結構的 exochitinase 比較，發現到目前為止所有 exo-chitinase 都有 chitin binding domain (圖 3-11 A)。而且利用芳香族殘基形成一條狹長形的通道，使受質以單鏈形式並且沿著通道進入活性催化位置進行水解反應，而且在水解後將醣鏈往前推進，達到快速水解受質的目的。由目前為止所有 family 18 chitinases PDB 結構的比較，我們發現在 exochitinases 中其 binding 受質的方式可分為兩種：

1. 幾乎所有的 exo-chitinases 屬於此類，都具有 chitin binding domain，並利用芳香族殘基形成 substrate-binding clefts (圖 3-11 A)。
2. 利用 dynamic loop 的移動來幫助 binding 受質，在目前已有的 PDB 結構中，只有 ChiNCTU2 屬於此類。

A.



B.

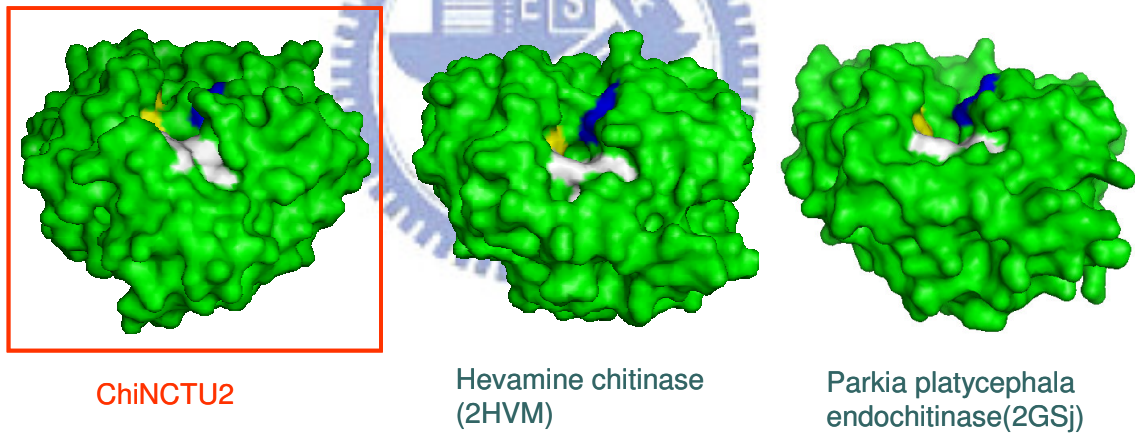


圖 3-11 Family 18 幾丁質水解酵素 3D 結構之受質結合方式之比較。(A) Exo-type chitinase 與 ChiNCTU2 之比較。exo-chitinase 利用 chitin binding domain 上的芳香族殘基(白色)形成 substrate-binding clefts，水解產物有專一性。(B) Endo-type chitinase 與 ChiNCTU2 之比較。endo-chitinase 有 shallow anchoring substrate-binding site，因此水解產物沒有專一性。



### 3-5、ChiNCTU2 之反應機制推測

根據 E145Q、E145G/Y227F 和 E145Q/Y227F 之 cocrystal 結晶，我們發現：

1. -1 糖基 chair form 和 boat form 構形的轉變是受 D143 和 Y227 兩個胺基酸所調控。
2. 比較 E145Q+(NAG)<sub>2</sub> 和 E145Q/Y227F+(NAG)<sub>2</sub> 的 cocrystal，其糖基之構形分別為 chair form 和 boat form，我們發現當糖基之構形為 boat form 時，E145Q 具有雙重結構，且吸附一個水分子。
3. 在所有的 cocrystal 中，E190 都具有雙重結構，使得-1 和+1 間糖苷鍵斷裂後，由於 E190 構形轉動的牽引，將+1 和+2 的糖基帶離和釋放到溶液中。
4. 圖 3-12 展示 chitin 受質之水解過程，由一開始-1 糖基之乙醯基朝向 D143 使-1 糖基形成 boat form 構形(3-12 A)，水解後，-1 糖基以 boat form 構形停留在活化位置中(3-12 B)，最後，在 Y227 的作用下回到 chair form 的構形(3-12 C)。

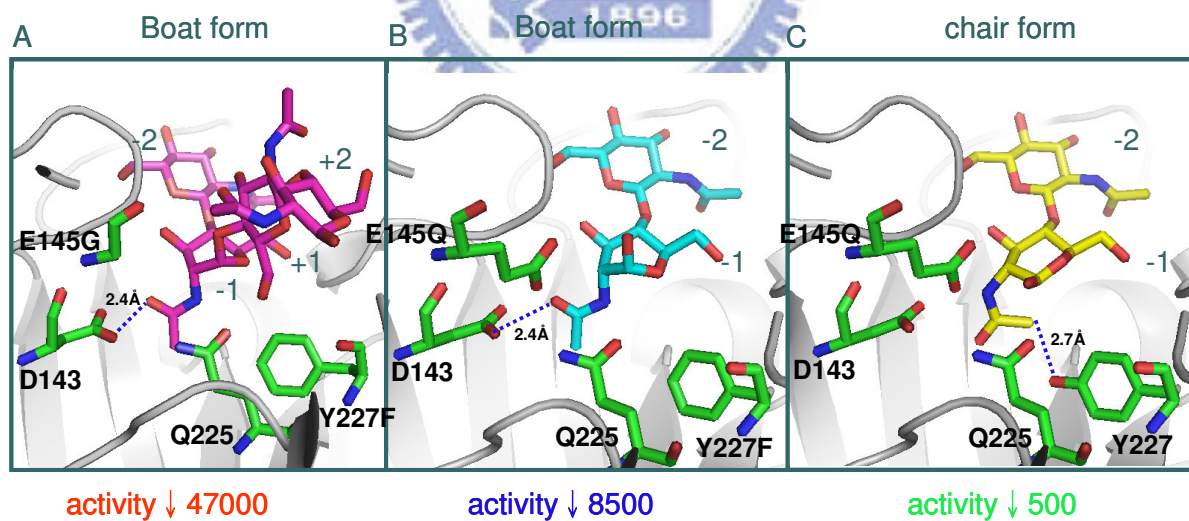


圖 3-12 Chitin 受質之水解過程。

我們推測 ChiNCTU2 之反應機制與 *S.m.* Chi A 有很大的不同。如圖 3-13 所示，以 chitin 四糖為例子。首先，chitin 四糖以能量穩定的 chair form 構形進入反應活化位置，接著 dynamic loop 移動與 chitin 四糖形成鍵結，使 chitin 四糖固定在活化位置中，隨著 chitin 四糖深入到活化位置中，-1 糖基由於胺基酸 D143 與 dynamic loop 幫助穩定能量下，慢慢由 chair form 變成 boat form。緊跟著胺基酸 E145 提供質子將 +1 糖基的 O4 質子化 (3-13 A)。接著，E145 攜帶一個水分子進入活化位置，E145 攻擊水分子的質子，剩下的氫氧基攻擊 -1 糖基上的 C1，造成 C1(-1 糖基)-O4(+1 糖基)之間的 glycosidic bond 斷裂(3-13 B)。而 +1 和 +2 之糖基由於 E190 的雙重構形轉換間產生的牽引，被釋放到溶液中(3-13 C)。水解後 -1 糖基在胺基酸 Y227 的幫助下回復到能量穩定的 chair form 構形，而完成水解反應(3-13 D)。

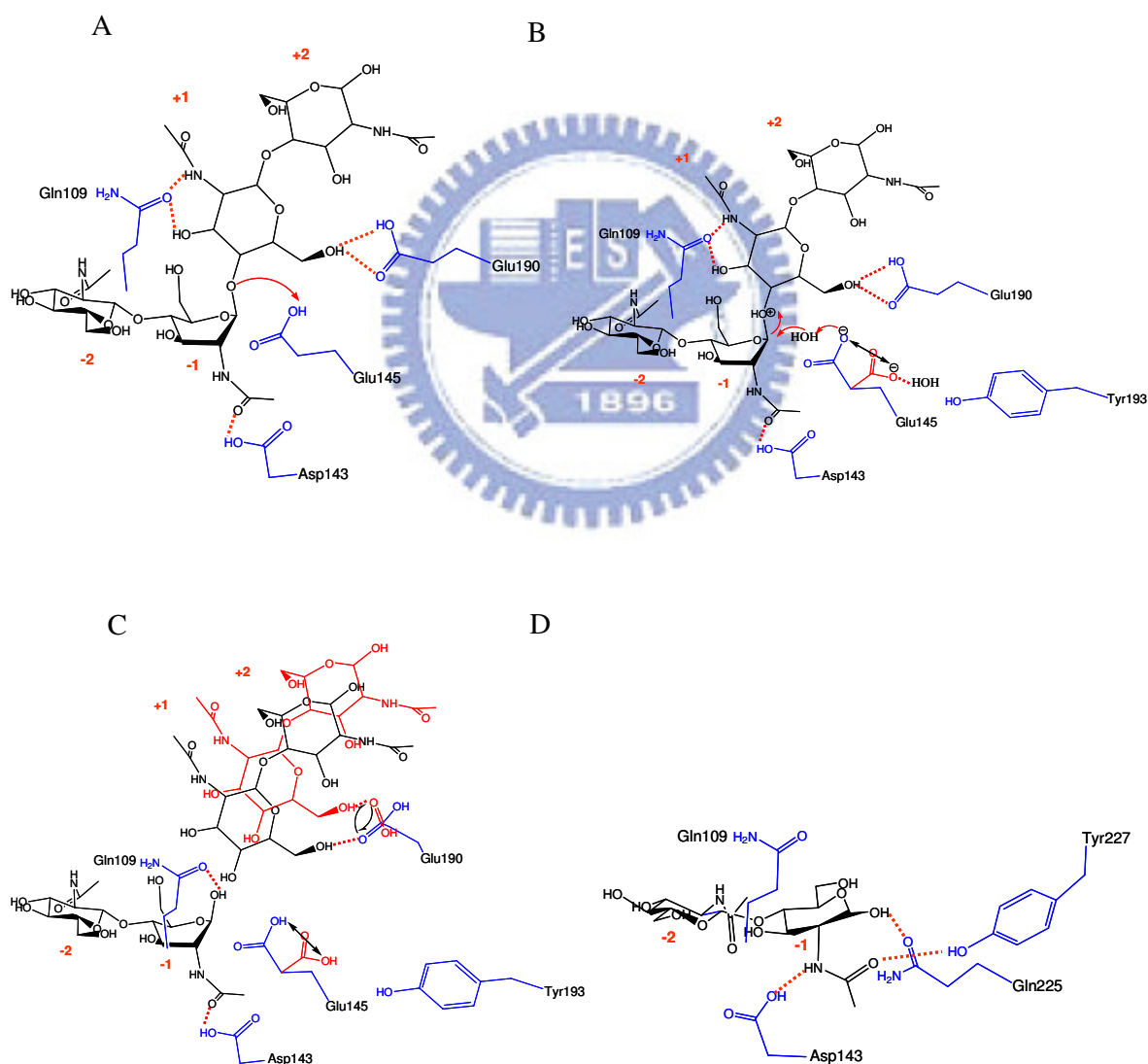


圖 3-13 推測的 ChiNCTU2 反應機制。

## 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糖



## 第四章 緒論

幾丁質寡糖為水溶性，有爽口甜味、經實驗證明具多種保健機能性功效，在食品、醫藥界均引起重視。幾丁質寡糖有爽口甜味，類似砂糖，但甜度只有 1/3，而且是人體消化酵素無法分解的糖質，高水溶性，再加工性佳，極適合做為機能性食品、飲料之素材。很早以前人類就知道乳酸菌是維持幼兒健康十分重要的腸內益生菌，但近年發現不僅對幼兒，甚至對老年人，乳酸菌對各年齡層都有助益，而幾丁質寡糖與其他寡糖功能一樣，都可促進乳酸菌。動物實驗中發現甲殼質寡糖具有多種保健功能，另幾丁質寡糖可作為測定 Lysozyme 及 Chitinase 活性之基質。文獻<sup>(5)</sup>報導幾丁質寡糖對植物防禦機制有活化作用，因此幾丁質寡糖可運用在有機農業，作為植物活力劑或肥料。

### 4-1、*Serratia marcescens* 幾丁質酵素

*Serratia marcescens*<sup>(49,50,51)</sup> 革蘭式陰性桿菌，具有周鞭毛，可生長與於 10-35°C、pH 5-9 及含 NaCl 0-4% (w/v) 的環境下。*S. marcescens* 的幾丁質酵素是最早及最廣泛被研究的研究對象，其中至少包含五種 (Chi A、Chi B、Chi C、Chi D、Chi E) 不同的幾丁質酵素，而幾丁質酵素於 *S. marcescens* 中表現時存在於細胞膜、壁之間(periplasm)。

目前，幾丁質酵素(*Chi A*)其 3D 結構已被解出，包含了 563 個胺基酸，在 N 端 (N-terminal) 的前 147 個胺基酸殘基形成一幾丁質長鏈結合區 (chitin anchoring domain)，此區有別於其活性結合的區域(binding domain)，而在 148 到 561 的胺基酸殘基則形成幾丁質酵素的 ( $\alpha/\beta$ ) 筒狀區域 ( $\alpha/\beta$  barrel domain)。其催化活性位置位於筒狀區域上緣的 Glu 315。*S. marcescens* 的幾丁質酵素 (*Chi A*) 水解幾丁質的主要產物為幾丁二糖。由於幾丁質酵素 (*Chi A*) 其水解產物主要為幾丁二糖，所以可用來生產大量的幾丁二糖。

## 4-2、Chitin binding protein (CBP21)

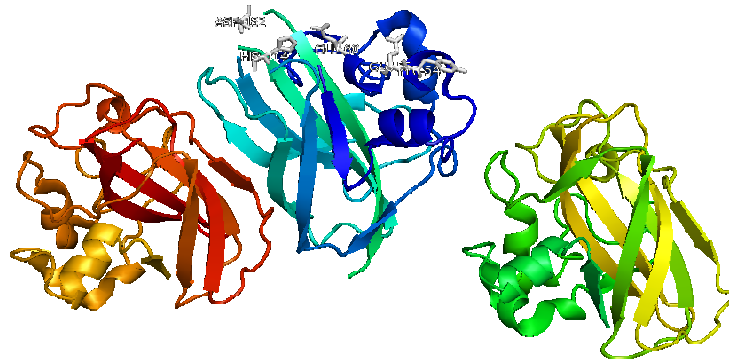


圖 4-1 CBP21 之結構圖。

CBP21 是一種幾丁質結合蛋白，分子量為 18.8 kDa，歸類在 CBMs 中的家族 33，來自於 *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) 革蘭氏陰性桿菌。是在分解幾丁質的過程中被分泌出來，但不具有幾丁質酶的催化活性，其主要作用為與不溶性的結晶狀幾丁質結合，導致受質構形的變化進而增加對幾丁質的親和性，使幾丁質酶較容易去分解幾丁質，達到降解的作用。CBP21 被分類為分泌性結合蛋白質 (secreted binding protein) 是該類蛋白質中第一個被確認為能影響非水溶性碳水化合物之降解作用。

## 4-3、DNA shuffling 介紹

重組 (recombination) 和點突變 (point mutation) 是自然界中基因演化的基本方式<sup>(52)</sup>，其中同源重組 (homologous recombination) 的方法已被證實比點突變法更適合進行基因突變的實驗<sup>(53)</sup>。實驗上利用同源重組製造突變的方法分為活體內 (*in vivo*) 和活體外 (*in vitro*) 兩大類，由於活體內製造基因突變的方法十分困難，針對活體內不同的基因、操縱子 (operon) 或細胞種類，必須設計不同的實驗步驟，反應條件也不可沿用；欲在活體內誘發功能蛋白的基因突變，平均需要經過數十個世代 (generation) 的選殖之後才能偵測出蛋白質表現程度的差異，費時而且效率極低，因此活體內製造基因突變的方法比較不被採用<sup>(54)</sup>。在 DNA shuffling 的方法發明之前，一般實驗室多半使用 oligonucleotide-directed mutagenesis、oligonucleotide

cassette mutagenesis或error-prone PCR<sup>(55,56)</sup>的方法進行活體外基因突變，進而獲得改造過的酵素，不過這些方法只適用於製造點突變，不能提供同源重組的模式。1994年Stemmer設計出一套可在活體外進行DNA重組的技術，此技術命名為DNA shuffling<sup>(55)</sup>。

DNA shuffling 的方法由下列四大步驟組成（圖4-5）：（1）製備欲進行改造或突變的基因，（2）以DNase I 隨機切割欲改造的基因成10–50bp 的片段，（3）利用未加入引子的PCR反應進行小片段DNA重組，（4）以加入引子的PCR反應擴大重組後的基因。

**步驟一：**利用PCR反應製備欲進行改造的基因，在擴大基因數量的同時引入點突變<sup>(55,57)</sup>，此步驟的反應條件可使用error-prone PCR，例如反應液中dNTP的比例不同、用Mn<sup>2+</sup>離子取代Mg<sup>2+</sup>離子、用不具3'→5'校對（proof-reading）功能的*Taq* DNA polymerase 取代*Pfu* DNA polymerase 或增加反應的循環次數<sup>(52)</sup>，error-prone PCR發生點突變的機率約為0.7%<sup>(58,59)</sup>。

**步驟二：**DNase I 是一種可以隨機切割雙股DNA的DNA水解酵素，控制DNase I的反應條件，將實驗材料切成10–50 bp的DNA片段。若取10–50 bp的小片段DNA進行DNA shuffling，因DNA片段重組而產生的點突變率為0.7%；若以100–200 bp的DNA片段進行DNA shuffling，得到的點突變率低於0.7%<sup>(55,57)</sup>。

**步驟三：**利用未加入引子的PCR反應進行小片段DNA重組，此反應是DNA shuffling的決定步驟。由於PCR反應液中不含引子，所以小片段DNA不僅作為模板用，也可互相提供引子的功能。當PCR的溫度設定同文獻<sup>(55)</sup>，經過94℃加熱，使雙股DNA變性分離成單股DNA，55℃黏合時，小片段DNA與接近互補的片段相黏，此現象稱為模板互換（template switch），72℃時由聚合酵素將兩端單股部份補齊，成為比原始片段較長的雙股DNA，此雙股DNA又可作為下一回PCR循環的模板。根據文獻記載<sup>(55)</sup>，以10–50 bp的DNA片段作為模板時，產生重組的效果最好，突變率為0.7%。

**步驟四：**使用一般加入引子的PCR反應條件，擴大重組後的基因。DNA shuffling的過程中會集合點突變和發生基因重組、互換（crossing-over），相當於模擬基因在自然界活體內的演化情形，且DNA shuffling的技術主要建立於PCR的架構之上，因此DNA shuffling又被稱作sexual PCR<sup>(60)</sup>。

DNA shuffling 的方法發明後，提供給研究者更好的選擇，此法的優點有二：（1）可以快速且有效地提高酵素的活性，例如作為reporter的green fluorescent protein（GFP）經過DNA shuffling改造後放射螢光強度增加42倍<sup>(61)</sup>。幾丁質水解酵素經過DNA shuffling改造後，可增加水解速率2.7倍<sup>(62)</sup>；甚至能改變酵素對受質的專一性，例如galactosidase經過DNA shuffling改造後反而增加 fucosidase 的活性<sup>(63)</sup>。E. coli beta-galactosidase 經過 DNA shuffling 改造後反而增加beta-glucuronidase的活性<sup>(64)</sup>；也可增加酵素的熱穩定性，例如 beta-glucuronidase 經過 DNA shuffling 改造後，耐熱性從原本的 60°C增加到 80°C<sup>(65)</sup>。Lactate oxidase 經過 DNA shuffling 改造後，耐熱性增加36倍<sup>(66)</sup>（2）不需事先確定蛋白質的立體結構，亦可改造酵素的活性。目前 DNA shuffling 在實驗上的應用有增加酵素活性、改變酵素對受質的專一性、改變蛋白質的 folding 和改善整個基因的 operon，例如 arsenic resistance operon 經過 DNA shuffling改造後細胞抗 arsenate 的能力提高40倍<sup>(67,68)</sup>，醫藥方面已使用在改良酵素疫苗和製藥的耐熱性上<sup>(69,70,71,72)</sup>，未來的發展可朝向研究已知的蛋白質功能或工業上創造新的生物催化劑<sup>(73,74)</sup>，相信 DNA shuffling 搭配上一套好的篩選方法，將為市場上帶來無限商機。

DNA shuffling的方法發明以來，主要應用在改良酵素活性或變化酵素對受質專一性的研究。由於本研究室已能有效的利用所擁有的水解酵素來生產各種寡糖，但是並無法生產更長鏈之單一長度的寡糖，故本研究使用DNA shuffling的方法改造酵素，使其能有效的改變酵素的水解產物。

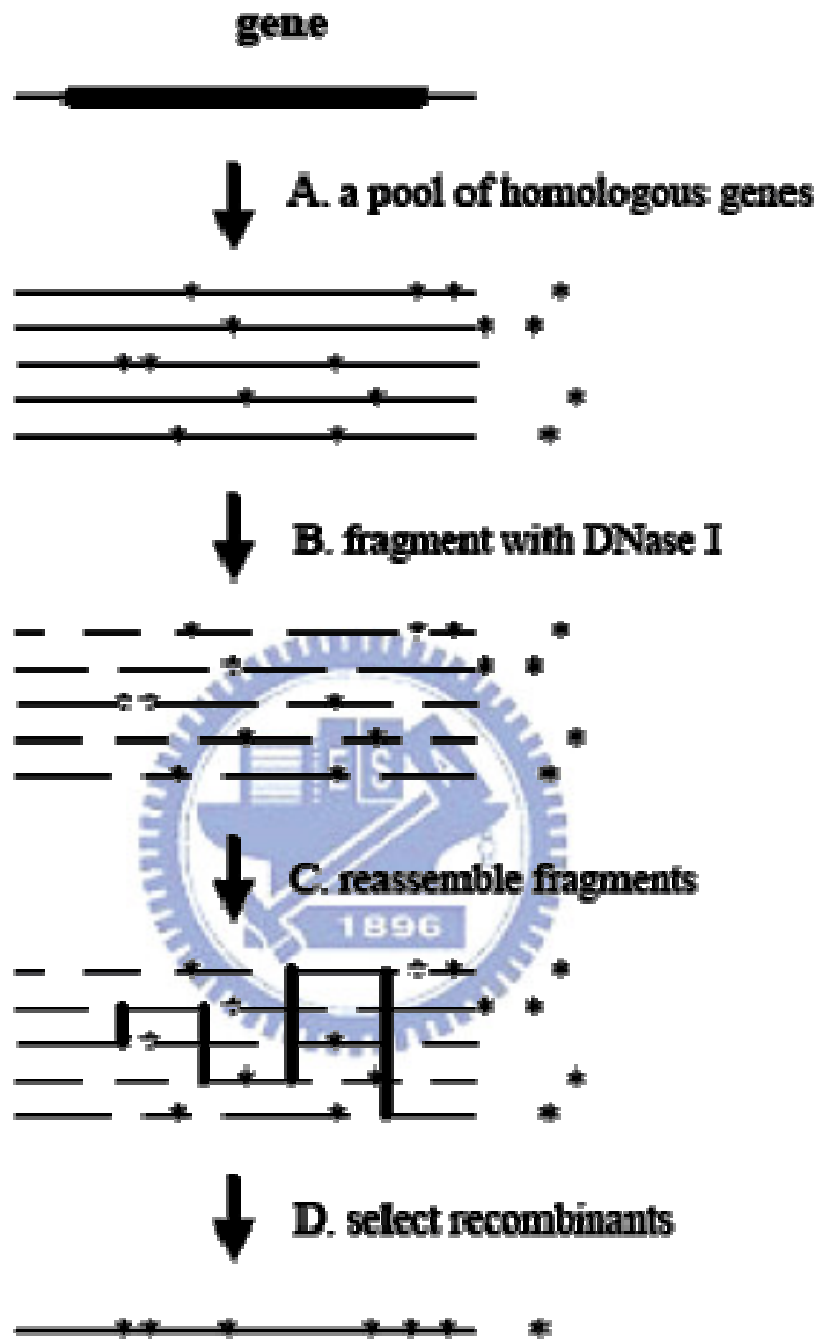


圖4-2 DNA shuffling 的原理與過程。(A) 擴大基因數量並累積不同位置的點突變，\*代表點突變。(B) 同源基因被DNase I 隨機切割成不同長度的小片段DNA。(C) 小片段DNA 彼此互為模版，重組回與原基因長度相近的DNA 序列，過程中發生點突變互換。(D) 篩選重組後的基因作更進一步的活性分析。



#### 4-4、論文研究動機

由於單一長鏈寡醣之製備或合成一直是合成化學家與生化學家努力的課題，但由於醣類含數個氫氧基和複雜的立體化學等問題，導致其相關研究進行不易。因此，本研究希望藉由 DNA shuffling 和分子模擬的方法，改變 *S. marcescens* 的幾丁質酵素(*ChiA*)的水解產物，達到可以生產各種不同鏈長的 N-乙醯幾丁寡醣並以 CBP21 來增加酵素的水解速率。



## 第五章 實驗方法

### 5-0、一般敘述

#### 藥品：

- 1、配製菌種培養液之藥品購自 Merck、Difco 公司
- 2、活性測試用的藥品及緩衝液購自 Merck、Aldrich。

#### 儀器：

##### 1.分離層析管柱：

HIC column

HiTrap Desalting column (Pharmacia, 5 mL)

HiTrap SP column (Pharmacia, 5 mL)

HiTrap Q column (Pharmacia, 5 mL)

FPLC system ( Water 650 E advanced protein purification system)

分液收集器 (fraction collector) ISCO

##### 2.其它儀器：

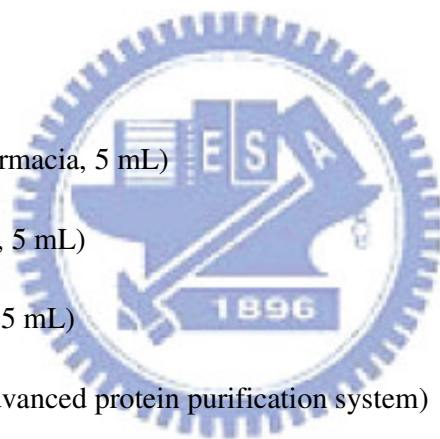
搖動培養箱 (Firstek, Scientific, orbital shaking incubator Model-S302R)

UV 光譜儀 HP 8452A

高速離心機 (Kubata 7820)

真空濃縮機 (EYELA rotary vacuum evaporator N-N series)

電子噴灑式串聯質譜儀：ESI-Q-Tof (Micromass)



ABI 310 (PE) 定序儀

超音波震盪器

### 5-1、膠狀幾丁質 (colloidal chitin) 的製備

50 克幾丁質粉末先以酒精 (工業級) 潤濕，再以 500 毫升濃鹽酸在室溫下進行酸水解反應二小時之後，離心去除未反應完的雜質及幾丁質。加水稀釋酸濃度至產生沈澱後，離心取沈澱物，然後用水清洗沈澱物數次，再以氫氧化鈉中和之。繼續以水洗滌產物數次，以除去其中所含的鹽類。最後以 pH 7.0，20 mM 的 phosphate buffer 調整為 1 % 懸浮液即可。

### 5-2、0.5% Chitin LBA 盤子的製備

取 yeast extract 2.5g、tryptone 5g、NaCl 5g、agar 20g 和 500mL 1% 的膠狀幾丁質，最後加水至 1L，進行滅菌。當溫度降至 40-50°C 時，加入 1 mL ampicillin (0.1g/mL)，搖晃均勻，倒入盤子中，每個盤子倒 15 mL，之後放置冷卻。將盤子在室溫晾乾三天，即可使用。

### 5-3、酵素活性之測定

取 250  $\mu$ L 之酵素液，添加 250  $\mu$ L，1 % 膠態幾丁質，在 37 °C 下振盪反應 60 分鐘後，立即加入 500  $\mu$ L 試劑 DNS，於 90 °C 下反應 10 分鐘。離心後，取上清液測定還原糖生成量 (OD 540)。以未反應的酵素反應液作相同的測定來作為空白樣品。一個酵素活性單位定義為每分鐘可水解膠狀幾丁質產生 1  $\mu$ mole 還原糖當量的酵素量。

#### 5-4、ChiA 在不同 pH 緩衝液之水解產物的分析

首先，配製各種 20 mM 緩衝液：NaOAc (Sodium acetate, pH 5.0)、phosphate (pH 6.0, pH 7.0)、Tris (pH 8.0) 和 NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.0)。取 50 μL 之純化酵素，加入 950 μL 不同 pH 緩衝液的 1% 膠狀幾丁質中，於 37 °C 下使其反應。反應 48 小時，以 TLC 片偵測水解產物。Chitin 寡糖 TLC 片分析條件 = N-butanol : ethanol : H<sub>2</sub>O = 5 : 3 : 2。

#### 5-5、酵素法製備 100 克級 N-乙醯幾丁二糖

利用 Chi A 產生單一幾丁水解產物的特性，達到產生 N-乙醯幾丁二糖的目的。首先將製備之 100 g 膠狀幾丁質的溶液置換成 20 mM、pH 5.0 的 NaOAc buffer。再將 100 g / 3.5 L 的膠狀幾丁質 (20 mM, pH 5.0, NaOAc buffer) 和 75 mg / 500 mL 的幾丁質水解酵素 (20 mM, pH 7.0, phosphate buffer) 置於 4 L 之發酵槽中，在溫度 37 °C 下反應 10 天，然後離心除去未反應完之膠狀幾丁質，將醱水溶液抽乾。抽乾後之黏稠狀液體加入 500 mL 95 % 的酒精加以溶解，放於 4°C overnight 以便將鹽類和蛋白質析出，之後過濾掉鹽類和蛋白質等沉澱物，將醱水溶液再次抽乾，放於 4°C 結晶。

#### 5-6、DNA shuffling<sup>(75)</sup>

##### 5-6-1、步驟：

##### 1. *S. m. ChiA* gene 的製備

依照 *S. m. chitinase A* 基因序列設計一對引子 (primer)，引子序列如下：

*S. m.*-BamHI(+): 5'-ATCgCCTggggATTCACCAAgTTCgCC-3'；底線標記為限制酵素 *Bam*HI 的切位。

S.m.-EcoR1(-): 5'-TgCAgCCCgCgAATTCTTATTgAACgCC-3'; 底線標記為限制酵素 *EcoRI* 的切位。

以 *chiA*/pRSET A 為模版 (template) 進行聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR), 擴大 (amplify) 整個 *chi A* 基因。PCR 混合液中含 template、0.2 mM dNTP/each、10 X *Taq* DNA polymerase buffer、primer S.m.-BamH1 (+) 和 primer S.m.-EcoR1 (-) 各 10 μM 及 2.5 units *Taq* DNA polymerase, 加水至總體積 50 μl 後進行 PCR 反應。反應結束後得到的 PCR 產物, 以 0.8% agarose gel 進行 DNA 電泳, 確認產物片段大小。

PCR 反應程式:

區間	1	2			3	
次數	1	25			1	
溫度	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C	4 °C
時間 (分:秒)	2 : 00	1 : 00	00 : 30	2 : 00	10 : 00	∞

## 2. 以 DNase I 水解 *chi A* gene

DNase I 是一種可以隨機切割雙股 DNA 的 DNA 水解酵素。取一微量離心管依序加入 2 – 4 μg 的 *chi A* gene、10 X digestion buffer (100mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>) 及 1 unit 的 DNase I, 在室溫下反應 10 – 20 分鐘後, 加入同體積的 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 終止反應, 利用 2 % agarose gel 膠體電泳觀察 DNA 水解情形, 切下電泳膠上 50 – 100 bp 的 DNA 片段的部份進行核酸回收。

## 3. 不加入引子 (primer) 的 PCR 反應

取 50 – 100 bp 的 DNA 片段 2 μg, 加入 PCR 混合液 (0.2 mM dNTP/each、10 X *Taq* DNA polymerase buffer 及 2.5 units *Taq* DNA polymerase), 加水至總體積為 100 μl, 混合均勻後進行 PCR 反應。

PCR 反應程式：

區間	1	2			3	
次數	1	45			1	
溫度	94 °C	94 °C	50 °C	72 °C	72 °C	4 °C
時間 (分：秒)	1 : 00	00 : 30	00 : 30	00 : 30	5 : 00	∞

由於PCR 混合液中不含引子，所以在複製DNA 時容易因模板互換而發生重組；另一方面*Taq* DNA polymerase 不具3'→5'校對 (proof-reading) 功能，因此在PCR 反應中也常會發生鹼基配對錯誤，而有產生點突變的傾向。

#### 4. 加入引子的PCR 反應

取上一步驟未加入引子的PCR 產物1 μl，加到含引子的PCR混合液 (0.2 mM dNTP/each、10 X *Taq* DNA polymerase buffer、primer sm-BamH1 (+) 和primer sm-EcoR1 (-)各10 μM及2.5 units *Taq* DNA polymerase) 中，加水至總體積為100 μl，混合均勻後進行PCR 反應。此步驟可擴大DNA shuffling 後具突變的*chi A* gene基因，最後獲得片段大小一致的產物。

PCR 反應程式：

區間	1	2			3	
次數	1	15			1	
溫度	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
時間 (分：秒)	1 : 00	00 : 30	00 : 30	00 : 30	5 : 00	∞

## 5-6-2、轉形作用

### 1. 限制酵素切割

將DNA shuffling 後得到的*chi A* gene基因用限制酵素*Bam*HI 和*Eco*RI 切割，於37 °C作用2小時，使其變成兩端為黏端的線形基因，方便下一步驟接合作用（ligation）的進行。由於限制酵素和其緩衝液會干擾接合作用的反應，必須先將基因萃取出來。首先跑電泳進行核酸回收，再加入與回收後同體積的phenol/chloroform/isoamyl alcohol（25：24：1）以14,000x rpm離心2分鐘後取上層水層，再加入等體積的95%酒精，混合後放置於-80 °C冰箱30分鐘，以14,000x rpm離心30分鐘，倒掉上清液，加入1 ml 70%酒精，再以14,000x rpm離心10分鐘，使DNA沉澱下來，DNA乾燥後加適量純水回溶。載體*ChiA/pRSET A*經過限制酵素切割後，亦用相同方法萃取回收。



### 2. 接合作用（ligation）

以vector：insert = 1：3的比例將載體與欲接合的DNA片段混合，置於45 °C水浴加熱5分鐘，使DNA的兩端完全伸展開後，置於冰上。然後加入各2 μl的10 X T4 DNA ligase buffer A和B 和1 unit的T4 DNA ligase，最後加水至總體積20 μl，置於16 °C水浴中進行反應12小時。接合後的DNA以65 °C加熱20分鐘，破壞ligase的活性，再進行對*E. coli* XL1B之轉形作用（transformation）。

### 3. DNA shuffling 後基因之篩選

將轉形作用後包含基因之*E. coli* XL1B塗於0.5% Chitin LBA盤子上，置於37°C培養24hrs，將盤子上有產生clear zoom的菌落，挑至5mL LBA培養液中培養20hrs，之後，取1mL菌液離心，取離心後的上層液500μL，加入500μL 1%的膠狀幾丁質置於37°C反應6hrs，離心取上層液，以mass分析水解產物。

## 5-7、分子模擬 chitinase A 由 exo type 到 endo type

### 分子模擬方法：

1. 以 protein data bank 中 *S.m.* chitinase A 的 3D 結構 1CTN 為模板。
2. 將修改後的胺基酸序列，送至 SWISS-model(<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>)進行模擬。

### 步驟：

- a. 進入 First Approach mode

The screenshot shows the SWISS-MODEL website. A blue box highlights the 'Modeling requests:' section, which lists the following options:

- [First Approach mode](#)
- [Alignment Interface](#)
- [Project \(optimise\) mode](#)
- [Oligomer modeling](#)
- [GPCR mode](#)

The left sidebar contains the following sections:

- Modeling requests:**
  - [First Approach mode](#)
  - [Alignment Interface](#)
  - [Project \(optimise\) mode](#)
  - [Oligomer modeling](#)
  - [GPCR mode](#)
- Model Database**
  - [SWISS-MODEL Repository](#), a database for theoretical protein models.
- Interactive tools**
  - [SWISS-MODEL Workspace](#), an interactive working environment for protein structure modelling and assessment.
  - [DeepView - Swiss-PdbViewer](#), a tool for viewing and manipulating protein structures and models.
  - [Lookup](#) EXPDB template codes accessible to SWISS-MODEL.
  - [Search](#) the SWISS-MODEL Template library.
  - [Examples](#) using SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer.
  - [AMOLEA](#) Protein structure quality check (atomic non-local environment assessment)
  - [News](#) from Swiss Model.
- Other links**
  - [Course](#) on protein structure and comparative modeling.

The right side of the page includes the SWISS-MODEL logo, the text 'An Automated Comparative Protein Modelling Server', and logos for BIOZENTRUM and SIB. Below these are several paragraphs of text, including a disclaimer: 'The result of any modeling procedure is NON-EXPERIMENTAL and MUST be considered with care. This is especially true since there is no human intervention during model building. Carefully read the header section of the files to know what templates and alignments were used during the model building process.'

- b. 填入 Email、Project Title 和修改後的胺基酸序列，然後 submit。即可得到模擬後的 3D 結構。



SwissModel Automatic Modelling Mode

Email:   
 Project Title:

Provide a protein sequence or a UniProt AC Code

輸入修改後的胺基酸序列

Options

BLAST E-value limit:  to select

Use a specific template:



c. 可將 download model 進行檢視。

Workunit: P000014 Title: siali



Go to: [\[ Template Selection \]](#) [\[ Alignment \]](#) [\[ Modelling Log \]](#) [\[ Evaluation \]](#)

[Print/Save this page as](#)

Model Details Segment 1



Model info:  
 modelled residue range: 49 to 433  
 based on template **ZhtyG (2.50 Å)**  
 Sequence Identity [%]: 98  
 Evalue: 0.00e-1

display model: as pdb - as DeepView project  
 download model: as pdb - as Deepview project - as text

Alignment [\[top\]](#)

```
TARGET 49  VILAGNSS LCFISGWAVH SKDNGIRIGS KGDVFIREF FISCSHLECR
ZhtyG 83  vklagnss lcpingwavy skdnsirigs kgdvvirep fiscshlecr

TARGET          sss sss hhhhh sss sssss sss
ZhtyG          sss sss hhhhh sss sssss sss
TARGET 97  TFFLTQGALL NDKHSGIVK DRSPHRTLMS CPVGEAPSPY NSRFESVANS
ZhtyG 131  tffltqgall ndkhangtvk drsphrtlms cpvgeapspy nsrfeevavs

TARGET          sssss sss          sssss s          sssss s
ZhtyG          sssss sss          sssss s          sssss s
TARGET 147  ASACHDGTSN LTIGISGPDN GAVAVLKYNG IITDTIKSWR NNILRTQESE
```

- d. 假如未達所需之結構，再以模擬後的 3D 結構進行胺基酸修改。
- e. 重複 b、c 步驟，直至所欲之結構。
- f. 將最終之 3D 結構，利用 Sybyl 進行 Energy optimization，最後所得之模擬結構為 1CTN\_m1。
- g. 設計 primers 進行基因突變。

## 5-8、模擬結構 1CTN\_m1 之基因突變

方法：

- 1、 設計欲做突變之 primers，而所設計之 primers 可將整個載體與基因完整放大。
- 2、 將 primers 磷酸化。
- 3、 以 PCR 放大整個基因。
- 4、 將放大之基因 self-ligation。



粗體位置為欲突變之胺基酸，設計 primers 如下：

367GP(+):5'-ggT,**ggg,CCg**,AAg,ATC,gAC,AAg,gTg,gCT-3'

367GP(-):5'-ggC,gCT,gAT,ggC,ggA,ggT,CAg-3'

4164G(+):5'-**ggC,ggT,ggC,ggC**,ACg,gTg,AAC,ggC,gTg,AAT,gCg-3'

416(-):5'-gTC,Cgg,CTT,CCA,ggC,Cgg,CgC,ATT-3'

首先，以 T4 polynucleotide Kinase 將 primers 367GP(+) 和 367GP (-) 之 5' 端磷酸化，再以 *chi A*/pRSET A 質體為模板，進行 PCR 放大反應。在實驗過程當中，使用 *pfu* DNA 聚合酵素。

PCR 反應程式：

區間	1	2			3	
次數	1	20			1	
溫度	95 °C	95 °C	55-67 °C	72 °C	72 °C	4 °C
時間 (分：秒)	5：00	1：00	00：30	1：00	10：00	∞

PCR 放大之產物，以 Dpn I 切除模板，再進行 self-ligation，後轉型至 XL1b，篩選已突變之基因。以同樣方法突變 416TAYT/GGGG。再以 367KD/GP 突變基因為模板，進行另一次突變 KD/GP、TAYT/GGGG，步驟與突變 367KD/GP 相同。故得到三個不同的突變：KD/GP、TAYT/GGGG、KD/GP+TAYT/GGGG，再轉型到 *E. Coli* JM 109 competent cell 中，進行蛋白質表現，以便偵測突變後的水解產物。

### 5-9、KD/GP、TAYT/GGGG、TAYT/GGGG 三個突變株酵素水解 chitin 之測試

取 3 組反應管，每管加入幾丁質 300 mg。每管皆以 50 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 清洗 3 次。各管設計如下：

第一組加入 **KD/GP**：0.1 $\mu$ M

第二組加入 **TAYT/GGGG**：1 $\mu$ M

第三組加入 **TAYT/GGGG**：0.1 $\mu$ M

再以 50 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 定量總體積至 50 mL 後，混合均勻，置於 37°C 恆溫箱進行反應，並於適當間隔時間取樣測試醣含量。

#### 醣含量測試步驟：

每管取 200 $\mu$ L 的樣品，加入 400 $\mu$ L 50 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 及 DNS 600 $\mu$ L。混合均勻後，立刻置於 95°C 乾式加熱器上加熱 10 分鐘，以終止酵素活性。測 UV 540 nm 波長之吸收值。

## 5-10、酵素法製備 50 克級 N-乙醯幾丁一醣

利用 Chi A 突變株 TAYT/GGGG 產生單一幾丁水解產物的特性，達到產生 N-乙醯幾丁一醣的目的。首先將製備之 50 g 膠狀幾丁質的溶液置換成 20 mM、pH 7.0 的 phosphate buffer，再加入突變株幾丁質水解酵素(0.1 $\mu$ M/2L)，總體積 2L，置於 4 L 之發酵槽中，在溫度 37 $^{\circ}$ C 下反應 14 天，然後離心除去未反應完之膠狀幾丁質，將醣水溶液抽乾。抽乾後之黏稠狀液體加入 500 mL 70 % 的甲醇加以溶解，放於 4 $^{\circ}$ C overnight 以便將鹽類和蛋白質析出，之後過濾掉鹽類和蛋白質等沉澱物，將醣水溶液再次抽乾。

## 5-11、CBP21 應用於增強 chitinase 水解幾丁質之測試

取 4 組反應管，每管加入幾丁質 300 mg。每管皆以 50 mM 磷酸緩衝液 (pH 6.3) 清洗 3 次。各管設計如下：

第一組加入 *S. marcescens* chitinase A : 0.1 $\mu$ M

第二組加入 *S. marcescens* chitinase A : 0.1 $\mu$ L 及 CBP21 : 1 $\mu$ M

第三組加入 *B. cereus* NCTU2 chitinase : 0.1 $\mu$ M

第四組加入 *B. cereus* NCTU2 chitinase : 0.1 $\mu$ L 及 CBP21 : 1 $\mu$ M

再以 50 mM 磷酸緩衝液 (pH 6.3) 定量總體積至 50 mL 後，混合均勻，置於 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱進行反應，並於適當間隔時間取樣測試醣含量。

### 醣含量測試步驟：

每管取 200 $\mu$ L 的樣品，加入 400 $\mu$ L 50 mM 磷酸緩衝液 (pH 6.3) 及 DNS 600 $\mu$ L。混合均勻後，立刻置於 95 $^{\circ}$ C 乾式加熱器上加熱 10 分鐘，以終止酵素活性。測 UV 540 nm 波長之吸收值。

## 第六章 結果與討論

首先，*S. marcescens* 的染色體 DNA 先行以傳統法抽出，再根據 NCBI 基因資料庫上 *S. marcescens* 的基因序列，設計引子(primers)如下：

CTN5P : 5´-GGAATCACCATATTGCGCAAATTTAA-3´

CTN3P : 5´-GCAACCGATTATTGAACGCCGG-3´

在設計引子時也設計了一個 Nde I cutting site 在引子 CTN5P 中 (CATAT 為突變位置) 接著以 *S. marcescens* 的染色體 DNA 為模板，進行幾丁質酵素基因 *chi A gene* 的 PCR 放大反應。在實驗過程當中，使用 *vent* DNA 聚合酵素，黏合(annealing)溫度為 60 °C，PCR 反應後，成功的將 *chi A gene* 放大。

將 *S. marcescens* 的 *chi A gene* (名為 *ChiA\_NCTU*) 成功建構於 pRSET A 之後，利用 DNA 定序儀對整段 *chi A gene* 做完整之定序，其結果顯示此段 gene 的 ORF (open reading frame) 共有 1692 個核苷酸，相當於 563 個胺基酸<sup>(76)</sup>。

### 6-1、Chi A 水解膠狀幾丁質產物分析

將 Chi A 與不同 pH buffer 之 1 % 膠狀幾丁質，在 37 °C 下反應 48 小時。由 TLC 片分析結果，圖 6-1。發現水解產物隨著 pH 值的不同而改變，pH 6~9 的水解產物包含 N-乙醯幾丁一醣和二醣，只有在 pH=5 時，其水解產物為 N-乙醯幾丁二醣。因為 pH 會改變水解產物的專一性，故在製備大量 N-乙醯幾丁二醣時，buffer 的條件為 NaOAc (20 mM, Sodium acetate, pH 5.0)。

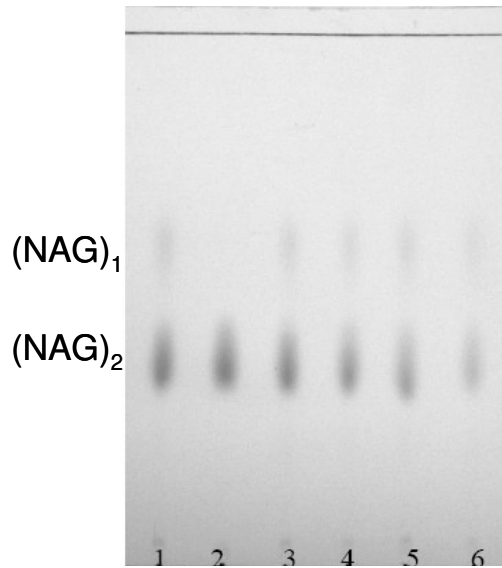


圖 6-1 TLC 片分析水解產物。Lane 1：N-乙醯幾丁一醣、二醣標準品；Lane 2：NaOAc, pH 5.0；Lane 3：Phosphate, pH 6.0；Lane 4：Phosphate, pH 7.0；Lane 5：Tris, pH 8.0；Lane 6：NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.0。

## 6-2、酵素法製備 100 克級 N-乙醯幾丁二醣

在以酵素法製備 N-乙醯幾丁二醣方面，我們選擇以 NaOAc 為緩衝液，再利用我們所選殖的 Chi A 幾丁質酵素，來產生單一幾丁水解產物。以 100g 膠狀 chitin 為基質，在反應 10 天後(圖 6-2)，經由 95% 酒精萃取的效果，可除去雜質、鹽類及蛋白質(圖 6-3 和圖 6-4)，並可結晶得高純度的固態 N-乙醯幾丁二醣，產率約 80%。經由此流程可製備大量的 N-乙醯幾丁二醣，現已將其運用於酵素受質的合成上。

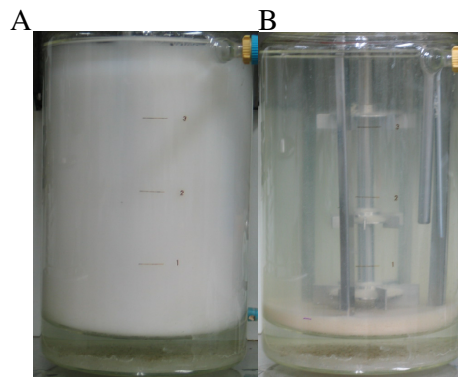


圖 6-2 Chi A 水解膠狀幾丁質之過程。(a)水解反應剛開始；(b)水解反應 10 天後。

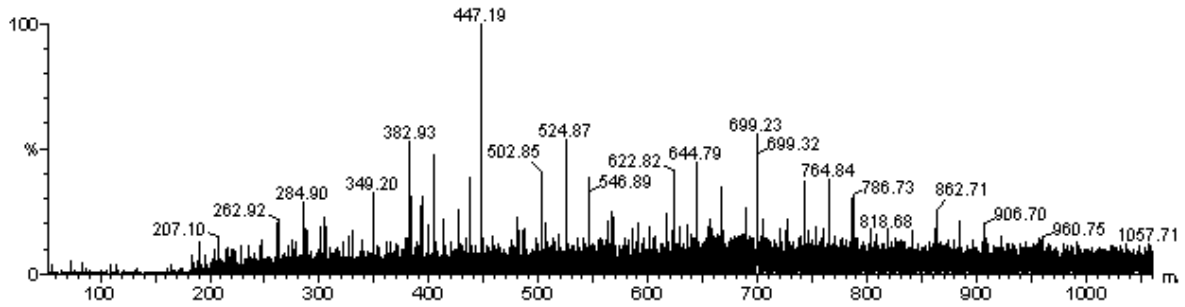


圖 6-3 蛋白質與鹽類未除去之 MASS 圖(N-乙醯幾丁二醣分子量 447)。

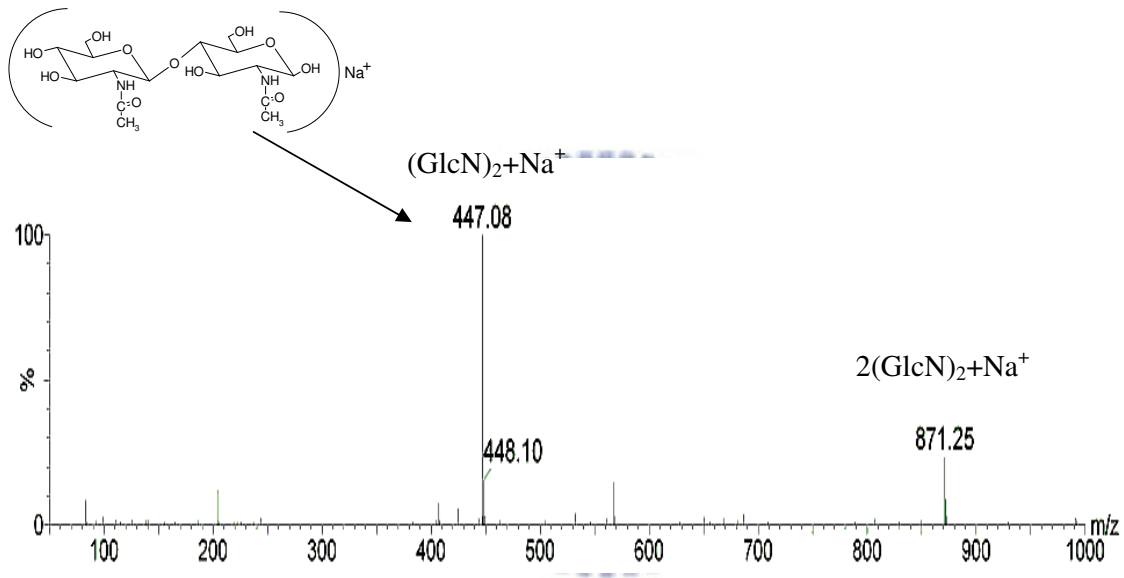


圖 6-4 蛋白質已除去之 MASS 圖(N-乙醯幾丁二醣分子量 + Na=447)。

## 6-3、DNA shuffling

### 6-3-1、利用 DNA shuffling 的方法重組 ChiA 基因

以 *chiA*/pRSET A 為模版，S.m.-BamH1 (+) 和 S.m.-EcoR1 (-) 為引子進行 PCR 放大反應，放大的序列長度約 1.6 kb(圖 6-5 A)，放大為 ChiA 全長基因。以 DNase I 隨機切割基因序列成為 50-100 bp 的小片段 DNA(圖 6-5 B)，然後膠回收。小片段 DNA 經過未加引子的 PCR 反應

步驟，利用模板互換的過程延長並重組這些小片段 DNA，由於 PCR 反應中不含引子，所以產物不具專一性，在 DNA 電泳膠上呈現 smear 情形(圖 6-5 C)。以未加引子的 PCR 反應產物作為模版，進行加入引子 ((S.m.-BamH1 (+) 和 S.m.-EcoR1 (-)) 的 PCR 反應，放大重組後的基因序列，產物具專一性，可在 DNA 電泳膠上觀察到單一亮帶(圖 6-5 D)。

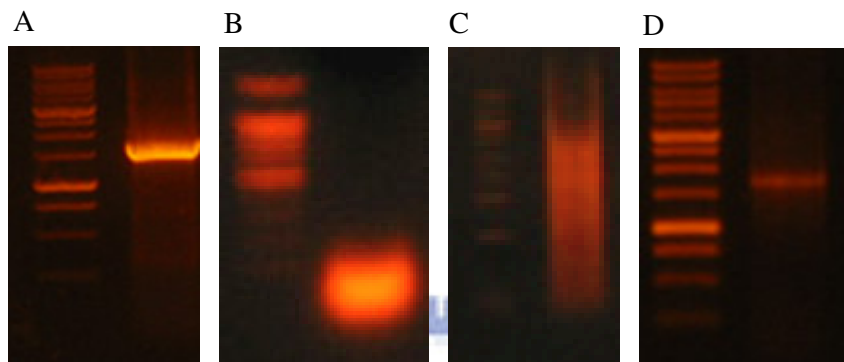


圖 6-5 DNA shuffling 個階段電泳圖。(A) *S. m. Chi A* gene 的放大 (B) 以 DNase I 水解 *chi A* gene (C) 不加入引子 (primer) 的 PCR 反應 (D) 加入引子的 PCR 反應。

### 6-3-2、菌落篩選

在 DNA Shuffling 實驗中最重要的一步，就是如何去篩選重組突變後所要的基因，我們所選用的基因 *ChiA* 為一幾丁質水解酵素，可以有效的分解幾丁質，生產 N-乙醯幾丁二醣。由於 *ChiA* 基因上包含一段訊息胜肽，當在適合的菌種中表現時，訊息胜肽可以使酵素分泌至細胞外。我們將 wild type *ChiA* 基因建構於 pRSET A 載體上並轉型至 *E. coli* XL1B 中，將菌液塗於 0.5% chitin LBA 盤子上進行培養，在經過 1 天的培養後，可以很清楚的從盤子上的菌落周圍發現有 clear zoon(圖 6-6)，這表示有酵素分泌至細胞外並將幾丁質分解。因此，利用 chitin LBA 盤子我們可以方便、快速的篩選重組後有產生 clear zoon 的菌落。



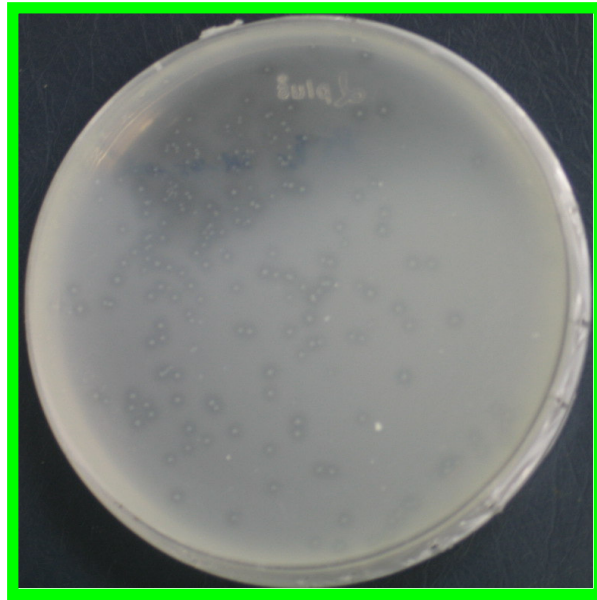


圖 6-6 以 chitin LBA 盤子篩選具有活性的重組基因。

### 6-3-3、重組酵素 ChiA 之水解產物分析

轉型作用的菌液塗抹在 0.5% chitin LBA 盤子上，經 37°C 培養後，結果在培養基上約有 2000 個菌落出現，而在 2000 個菌落中有 100 個菌落具有 clear zoon，再重複 4 次轉型作用，總共獲得 10000 個菌落，其中約 500 個菌落具有 clear zoon，將此 500 個具有 clear zoon 之菌落挑至 5mL 的 LBA 培養液中，在 37°C 培養 20 hrs，離心取胞外液，將胞外液與 1% 的膠狀幾丁質混合，在 pH5 的條件下，37°C 反應 6 hrs，接著以 mass 分析水解產物。

很可惜的在 500 個具有 clear zoon 之菌落中，我們並沒有偵測到有改變水解產物的突變酵素。為了確定是否有達到突變的效果，我們也從菌落抽取 DNA 進行定序(副錄一)，證實確實有達到突變的目的，只是造成的突變並不能使酵素改變水解產物的專一性。因此我們希望藉由分子模擬的方法，進一步來達成改變水解產物的目的。

## 6-4、分子模擬改變 ChiA 之水解產物

我們由 *S.m.* Chi A 與 (NAG)<sub>8</sub> 的共結晶結構中發現，在活化位置後的 substrate-binding clefts 上有一區域控制水解醣鏈的長度，如圖 6-7 所示，紅色區塊和藍色區塊形成一到高牆，控制活化位置的空間正好可以容納一個二醣的大小，使得水解產物具有專一性。因此改變這兩個區塊的結構，或許可以改變酵素的水解產物，所以我們希望藉由分子模擬的方式來設計可能改變水解產物的結構，再以實驗來加以證實，達到改變改變水解產物的目的。

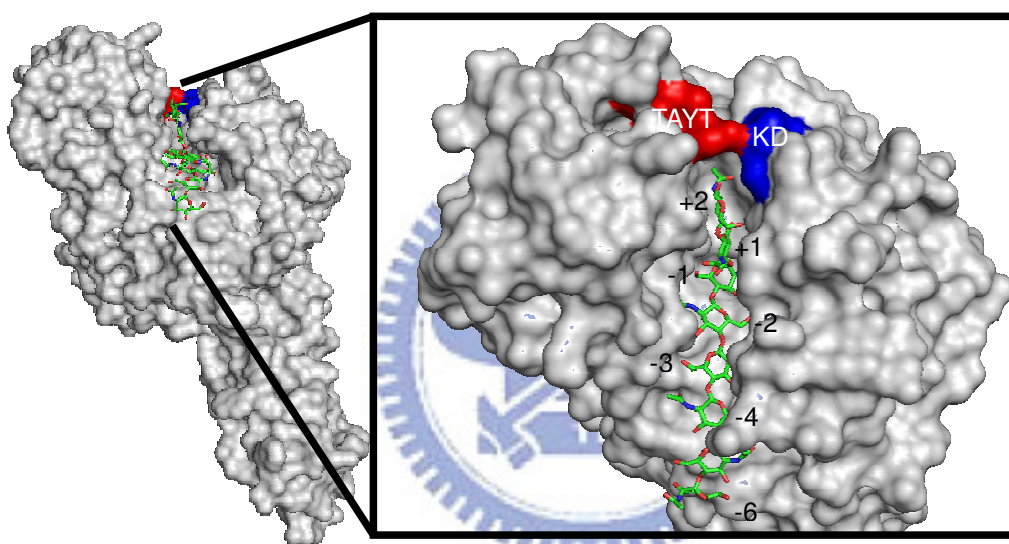


圖 6-7 *S.m.* Chi A 與 (NAG)<sub>8</sub> 的共結晶結構，紅色區塊和藍色區塊控制水解產物的專一性。

我們以 *exo-type S.m.* Chi A 為模板，經 SWISS-model 模擬修飾成 *endo-type* Chi A，如圖 6-8 所示。圖 3-8 A，模擬前後胺基酸之比對，有兩個區域經過修改，分別是 KD 變成 GP 以及 TAYT 變成 GGGG。圖 6-8 B，而綠色胺基酸(GGGG)和黃色胺基酸(GP)為模擬後之結構。由模擬後之結構表面圖 可以發現，活化位置的 substrate binding 通道上，已經沒有控制 substrate 長度的區塊，我們估計酵素之水解產物已經發生改變，但須以實驗進一步證實。

(A)

Chi A-endo PNLGSPQDGETYVLLMKELRAMLDQLSTETGRKYELTSAL SAG**GP**KIDKVAYNVAQNSMD 383

Chi A-exo PNLGSPQDGETYVLLMKELRAMLDQLSAETGRKYELTSAL SAG**KD**KIDKVAYNVAQNSMD 383

Chi A-endo HIFLMSYDFYGAFDLKNLGHQTALNAPAWKPD**GGGG**TVNGVNALLAQGVKPGKIVVGTAM 443

Chi A-exo HIFLMSYDFYGAFDLKNLGHQTALNAPAWKPD**TAYT**TVNGVNALLAQGVKPGKIVVGTAM 443

(B)

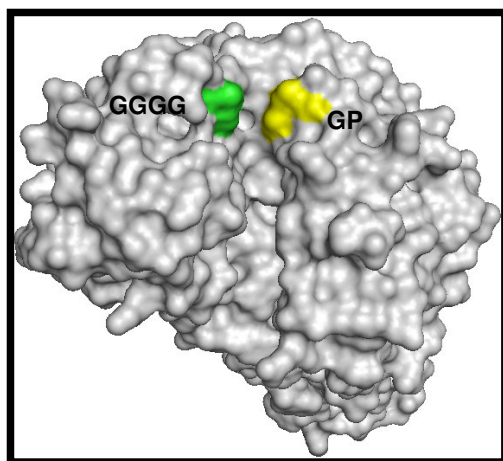


圖 6-8 SWISS-model 模擬結果 (A)模擬前後之胺基酸序列比較 (B)模擬後之結構表面圖。

根據胺基酸的序列比較後，我們設計 primer 進行胺基酸突變，並將突變分為三個部分，分別為 **KD/GP**、**TAYT/GGGG** 以及 **KD/GP+TAYT/GGGG**，所以可以獲得三個不同突變點的酵素。在經定點突變、基因表現和蛋白質純化後，可得 90% 以上純度的蛋白質，如圖 6-9。

以純化後的蛋白質進行水解產物的分析，在 phosphate buffer (20 mM, pH 7.0), 1% 膠狀幾丁質, 37 °C 下反應 48 小時下，由 mass 分析顯示，無論是突變點 **KD/GP**、**TAYT/GGGG** 和 **KD/GP+TAYT/GGGG**，其最終之水解產物均為 N-乙醯幾丁一糖，如圖 6-10 所示，並非如預期的，由 *exo-type* 轉變成 *endo-type*。故進一步追蹤其水解產物，發現一開始水解產物為 N-乙醯幾丁二糖，但隨著反應進行，N-乙醯幾丁二糖慢慢的被分解成 N-乙醯幾丁一糖，最後完全水解成 N-乙醯幾丁一糖。對此，我們也使用 N-乙醯幾丁二糖為起始物，進行水解反應分析，證實 N-乙醯幾丁二糖確實可以被水解成 N-乙醯幾丁一糖，如圖 6-11。其主要原因，

如圖 6-12 所示，無論是突變點 KD/GP、TAYT/GGGG 和 KD/GP+TAYT/GGGG，都可以將活化位置後的區域擴大，造成 N-乙醯幾丁二醣可以進入活化區域，進而被水解成 N-乙醯幾丁一醣(圖 6-13)。但擴大的區域卻不足以構成形成 endo-type 的條件。

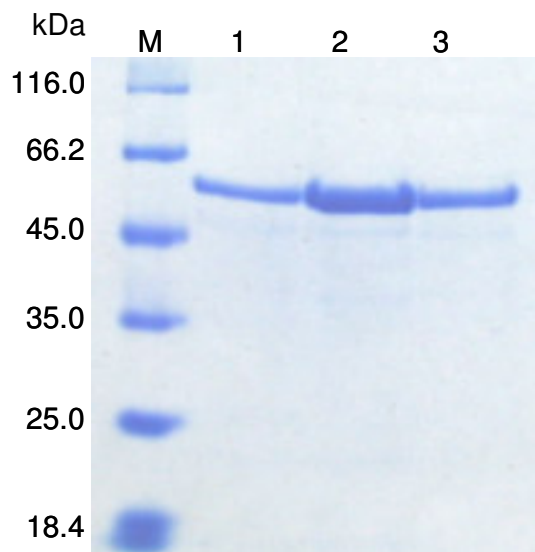


圖 6-9 ChiA 之三組不同突變株之純化後電泳圖。M：protein marker；Lane 1：KD/GP；Lane 2：TAYT/GGGG；Lane 3：KD/GP+TAYT/GGGG。

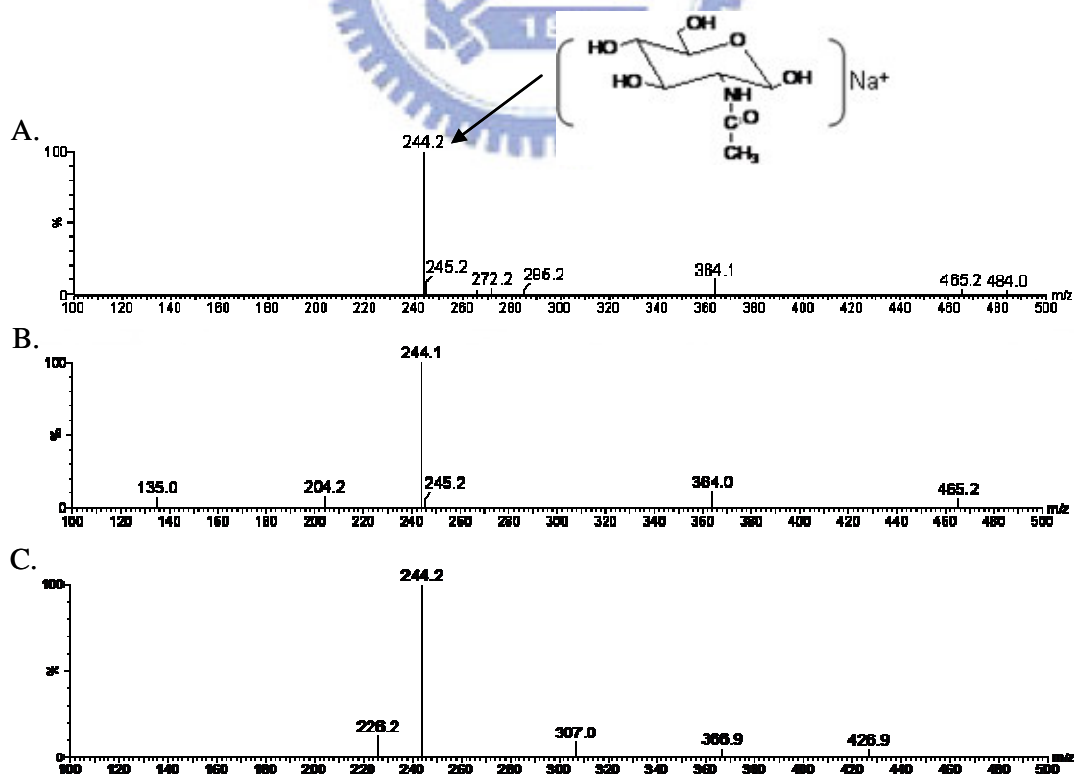


圖 6-10 Mass 分 9 析突變酵素之水解產物。(A) mutant KD/GP 水解產物(分子量 244)；(B) mutant TAYT/GGGG 水解產物(分子量 244)；(C) mutant KD/GP+AYT/GGGG 水解產物(分子量 244)。

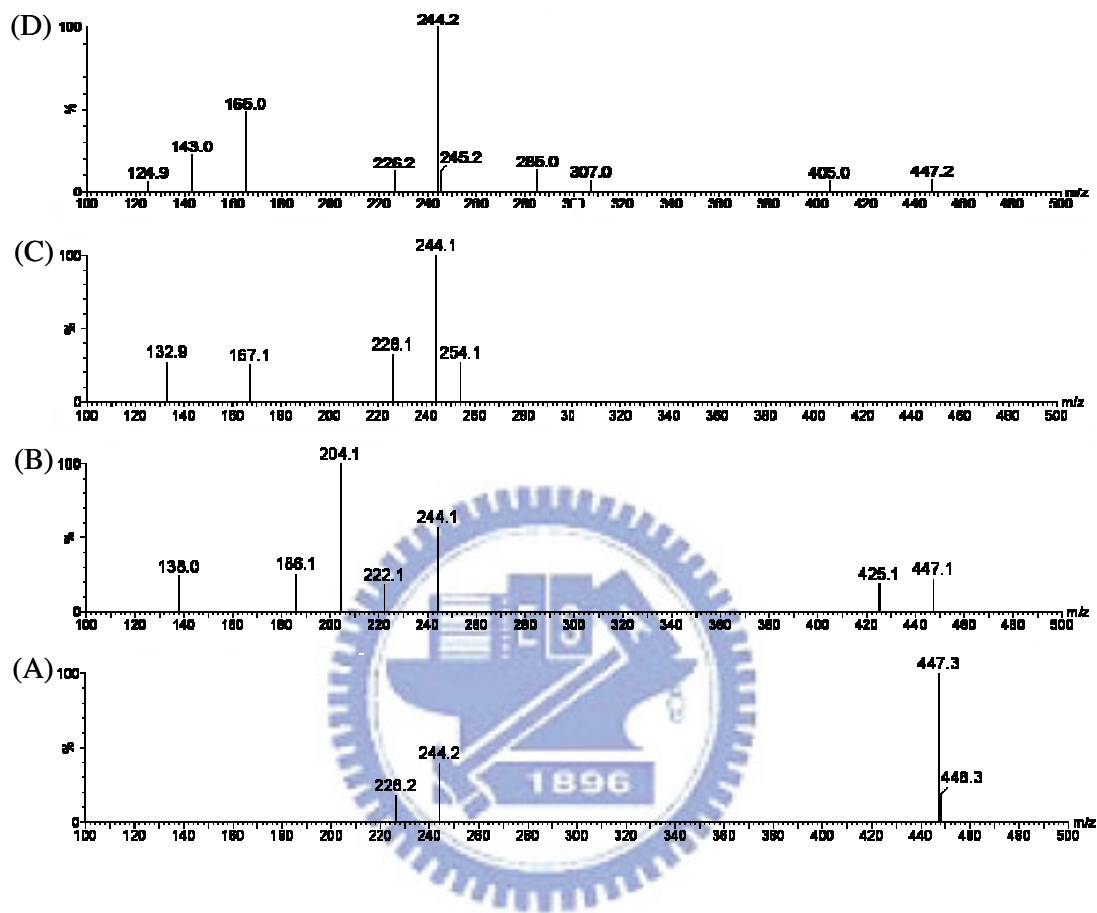


圖 6-11 Mass 分析突變酵素水解 N-乙醯幾丁二糖。(A) N-乙醯幾丁二糖標準品；(B) mutant KD/GP 與 N-乙醯幾丁二糖標準品反應；(C) mutant TAYT/GGGG 與 N-乙醯幾丁二糖標準品反應；(D) mutant KD/GP+TAYT/GGGG 與 N-乙醯幾丁二糖標準品反應。

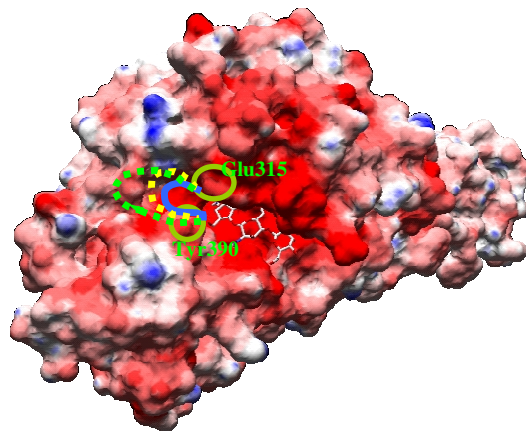


圖 6-12 藍色為 wild type 活化位置後可容納糖的區域，黃色為 mutant KD/GP 活化位置後可容納糖的區域，綠色為 mutant KD/GP+TAYT/GGGG 活化位置後可容納糖的區域。

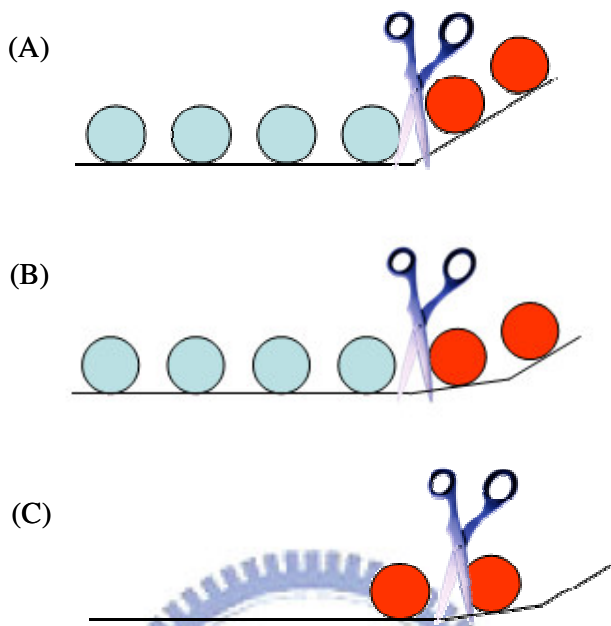


圖 6-13 突變株水解 N-乙醯幾丁二醣之反應機制。(A) exo-type ChiA 水解 chitin，其產物為 N-乙醯幾丁二醣 (B) 突變後之 ChiA 水解 chitin，其活化位置後之區域發生改變，但最初水解產物仍為 N-乙醯幾丁二醣 (C) 由於活化位置後之區域發生改變，使得 N-乙醯幾丁二醣可以再次被水解。

## 6-5、酵素法製備 50 克級 N-乙醯幾丁一醣

以往在製備 N-乙醯幾丁一醣時多採用化學法將 chitin 降解，但由於使用相當大量的酸、鹼，不但實驗過程具危險性，而且使用完畢的大量酸、鹼更對環境造成危害，因此我們從酵素方面來研究 N-乙醯幾丁一醣的製備。一般使用酵素將 chitin 降解至 N-乙醯幾丁一醣，需要多種酵素的作用才可完成(圖 6-14)，而我們的突變株酵素卻可直接將 chitin 降解成 N-乙醯幾丁一醣，不需其他酵素的配合，故較方便於製備 N-乙醯幾丁一醣。

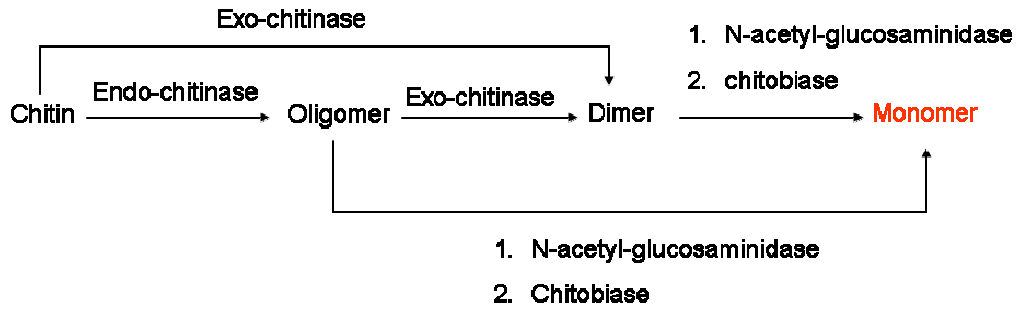


圖 6-14 酵素降解幾丁質之示意圖。

首先，我們分析三組突變株對膠狀 chitin 的分解速率，其結果如圖 6-15 所示，以突變株 TAYT/GGGG 效果較其他兩個突變株為佳，故在製備 N-乙醯幾丁一醣之實驗中，採用突變株 TAYT/GGGG 之酵素。在以酵素法製備 N-乙醯幾丁一醣方面，我們選擇以 phosphate buffer 為緩衝液，而選擇的最佳之反應 pH 值為 7.0。

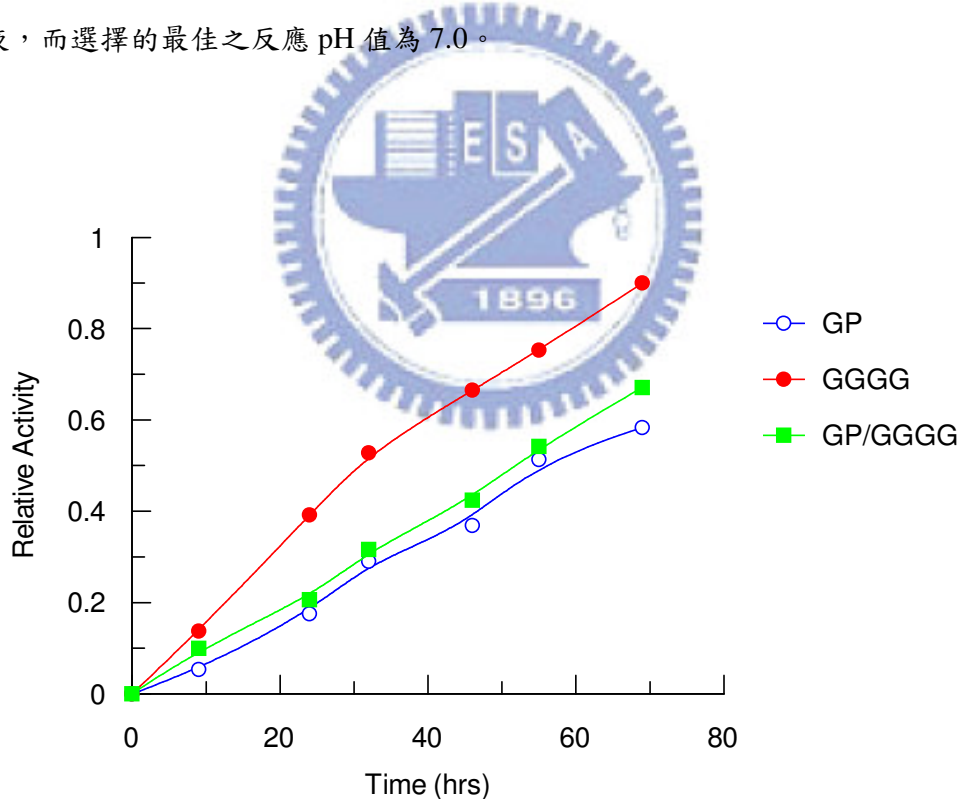


圖 6-15 比較三個突變株水解膠狀 chitin 的速率。

我們利用突變株 TAYT/GGGG 之酵素，來產生單一幾丁水解產物，以 50g 膠狀 chitin 為

基質，在反應 14 天後，將反應透過 70% 甲醇萃取的效果，達到分離蛋白質、鹽類和 N-乙醯幾丁一醣的目的，產率可達 80%。依此方法可得到高純度的 N-乙醯幾丁一醣。

## 6-6、CBP21 應用於增強 chitinase 水解幾丁質之測試

Family 33 中，細菌的 CBPs 是在分解幾丁質的過程中被分泌出來，其主要作用為破壞幾丁質的結構，使 chitinase 較容易去水解幾丁質。本實驗之目的為利用 CBP21 可破壞幾丁質結構的特性，測試添加 CBP21 以幫助不同 chitinase 水解幾丁質的情況。分別對 *S. marcescens* chitinase A 及 *B. cereus* NCTU2 chitinase 二種不同的 chitinase 進行添加 CBP21 及不添加 CBP21 水解幾丁質的測試，並分析水解期間醣含量的變化。結果由圖 6-16 顯示，不同的 chitinase 經添加 CBP21，確實可以幫助加速分解幾丁質，且水解所得醣含量約增加 20% 以上。這與 Gustav Vaaje-Kolstad 等人(2005 年)，添加 CBP21 能加速 ChiA、ChiB、ChiC 水解  $\beta$  型幾丁質的試驗結果相符合。

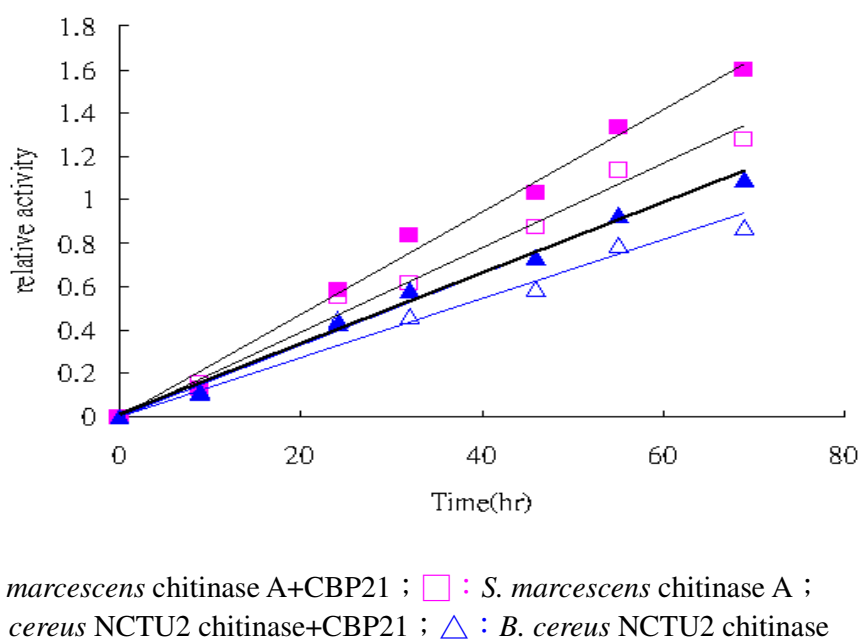


圖 6-16 *S. marcescens* chitinase A 及 *B. cereus* NCTU2 chitinase 進行添加 CBP21 及不添加 CBP21 水解幾丁質的醣含量測試。



## 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



## 第七章 緒論

近年來，生物技術因其污染性低、能源依存度低，應用範圍（包含了醫藥產業、農業、食品、特用化學品、能源產業及污染防治等）廣泛，而成為本世紀最具發展潛力之新興產業。各先進國家莫不投入大量的人力、物力及財力於研究開發上<sup>(77)</sup>。在生物體內進行的反應多以蛋白質為主，相關的蛋白質種類數以千計，因此為了解生命的奧秘，必須要對蛋白質有深入地了解。目前，研究蛋白質的主要技術瓶頸，是如何取得量足質純的蛋白。在量方面，最常利用的方法是基因重組技術，先建構欲表達標的蛋白的載體，將載體送入寄主細胞，後者會誤認載體上的標的蛋白基因為自己的基因，大量表達出標的蛋白，然後經純化步驟取得標的蛋白。相關技術已高度發展至成熟階段。蛋白質依物理特性可分水溶性與脂溶性兩類。研究顯示，高達80%所謂的水溶性蛋白，不易大量表達成能溶於水的重組蛋白，解決此問題的方法之一是融合蛋白技術（Fusion Protein Approach）<sup>(78)</sup>。此方法係將攜帶蛋白（Carrier）的基因與標的蛋白的基因，以基因重組技術結合為一，表達出「攜帶蛋白+標的蛋白」前後接合的融合蛋白。融合蛋白因攜帶蛋白的加持輔助，表現量與水溶性都可增加。融合蛋白在設計時，會在攜帶蛋白與標的蛋白間，加入一段特別的胺基酸序列，可被蛋白水解酶專一性的辨認與切割，達到分離兩者的目的，再經一輪純化步驟，即可取得標的蛋白。由過去許多生物學者實驗經驗得知，同一攜帶蛋白對不同的標的蛋白，效果有很大差異。雖目前已有十幾種不同的攜帶蛋白可供選擇，但對數以千計的標的蛋白而言，選擇性仍有受限，解決辦法之一就是多開發幾個不同特性的攜帶蛋白。在純化方面，親和性層析是目前純化方法中較能獲取高純度產品的方法，親和層析技術不僅在工業生產上有其價值，對於近來受到學界重視的蛋白質體學的相關研究上，也提供了相當的幫助<sup>(79)</sup>。

### 7-1、幾丁質結合蛋白（Chitin binding protein：CBP）

幾丁質結合蛋白質或者蛋白質中包含幾丁質鍵結區（chitin binding domains），已經在許多的生物體中被發現，從細菌到人類都有。根據醣類水解酵素（glycohydrolase）的分類，在蛋白質或蛋白質結構區域（protein domains）中，包含幾丁質結合之特性者，由其胺基酸的相似度，被歸類在CBMs中的家族（families）1、2、12、14、18、19和33。多數含有幾丁質結合區的酵素，結合區具有增加受質親和性（substrate affinity）和增強酵素反應效率的作用

(80,81)。此外，幾丁質結合模組 (chitin-binding modules) 裡也存在著單獨和沒有催化功能的 CBPs，沒有催化功能的 CBPs 分類在家族 14、18 和 33，其中家族 14、18 是由小型抗真菌蛋白 (small anti-fungal proteins) 所組成，而且都包含結構相似的幾丁質結合基序 (chitin-binding motif) (82)。家族 33 中，細菌的 CBPs 是在分解幾丁質的過程中被分泌出來，其主要作用為破壞幾丁質的結構，使幾丁質水解酶較容易去分解幾丁質 (83,84)。在不同的微生物如 *Streptomyces* 和 *Serratia* 發現類似的 CBP 存在，推論這類 CBP 廣泛存在於可分解幾丁質的生物中。

*S. marcescens* 的幾丁質酵素是最早及最廣泛被研究的研究對象，其中至少包含五種 (Chi A、Chi B、Chi C、Chi D、Chi E) 不同的幾丁質酵素，當將 *S. marcescens* 培養於以幾丁質為碳源的培養液中，CBP21 將隨著其他幾丁質酵素的分泌，而同時被分泌出來。CBP21 的基因位於 Chi B 基因下游 1.5 kb 處，由 197 個胺基酸組成，其前 27 個胺基酸為訊息胜肽 (signal peptide)。由 SWISS-PROT 蛋白質基因庫比對發現，與 CBP21 序列最相似的是由 *Streptomyces olivaceoviridis* 的 CHB1，其胺基酸序列相似度為 45%；另外由比對結果也發現，在 CHB1 序列中推測與幾丁質受質結合有關的 4 個色胺酸殘基 (Tryptophan) Trp-57, 99, 114 及 134) 中有 3 個 (Trp- 99, 114 及 134) 也出現在 CBP21 基因序列中。

隨著解析度 1.55 Å 的 3D 晶體結構被解開，在多數有幾丁質酶基因的微生物基因組中可發現 CBP21 的同源基因，而部份的 CBP21 同源基因已確認可結合於幾丁質表面或嵌入幾丁質結構內部。雖然 CBP21 與受質結合的模式尚未清楚知道，但可確認的是，多數 CBMs 能利用溶劑接觸芳香族殘基而與受質發生作用，而在 CBP21 的表面卻缺少這類芳香族殘基區域；大多數的 CBP21 存在於能降解幾丁質的微生物內，因此推測 CBP21 有一個提昇分解幾丁質活性的特殊結構。

CBP21 的發現具有多種利用價值，CBP21 能與幾丁質結合並瓦解幾丁質聚合物，從而使幾丁質更容易被幾丁質酶降解 (85)。讓轉基因作物表達幾丁質酶和 CBP21，可能使植物通過降解幾丁質來抵抗真菌的侵害。

## 7-2、CBP21 與幾丁質的結合作用

CBP21 與幾丁質結合不僅受 CBP21 特殊的功能性影響，也部份取決於在蛋白質和幾丁質之間的極性作用力。突變 CBP21 極性結合面上一個位點即能改變結合效能。而過去很多的研究報告顯示<sup>(86)</sup>在幾丁質結合作用中扮演重要的角色的芳香族官能基卻多數存在於蛋白質的內部，此類官能基推論應該不會與幾丁質相互作用；而存在於結構表面具有高度保留性的芳香族殘基 (aromatic residues) 推論應該是主要具有親水性作用的殘基。

對 6 個暴露在表面的芳香族殘基 (Tyr-54, Glu-55, Glu-60, His-114, Asp-182, and Asn-185) 進行突變及結合效能測試。結果顯示，各別突變此 6 個殘基皆會降低 CBP21 對  $\beta$ -chitin 的結合能力。因此，CBP21 與幾丁質結合作用主要與表面殘基的保留性，使用的溶劑特性及極性官能基鍵結有關。

Kazushi Suzuki 等 (1998) 利用 CBP21 及幾丁質酶 A (chitinase A) 對  $\beta$ -幾丁質 (Squid chitin) 再生幾丁質 (regenerated chitin) 粉狀幾丁質 (powdered chitin) 膠狀幾丁質 (colloidal chitin)、幾丁聚醣 (chitosan) 及纖維素 (cellulose) 等各種不溶性多醣類 (insoluble polysaccharides) 的結合特性試驗結果，如圖 7-1，得知，CBP21 與烏賊軟骨幾丁質 ( $\beta$ -chitin) 有最佳的結合特性 (圖 7-1, A)；而幾丁質酶 A (圖 7-2, B) 則與再生幾丁質及膠狀幾丁質有較好的結合作用，卻對  $\beta$ -幾丁質及粉狀幾丁質的結合能力稍弱，即幾丁質酶 A 對與這些多醣類的結合較無選擇性。

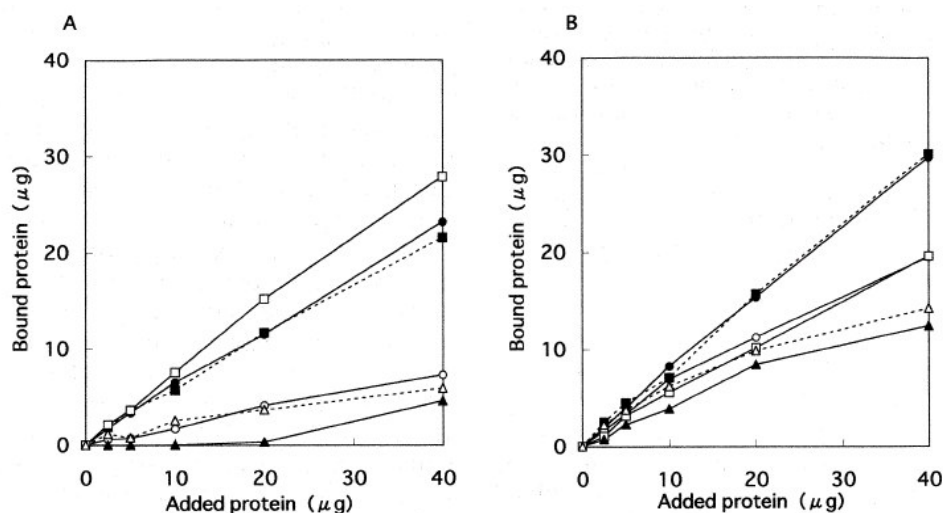


圖 7-1 CBP21 及 chitinase A 與各種不溶性多醣類的結合特性。(A) 4 mg 不溶性多醣類 +CBP21；(B) 4 mg 不溶性多醣類+chitinase A，□： $\beta$ -chitin；●：再生幾丁質；○：粉狀幾丁質；■：膠狀幾丁質；▲：幾丁聚醣；△：纖維素。

$\beta$ -幾丁質與 CBP21 有很強且獨特的結合關係；而與 CBP21 胺基酸序列有 45%相似度的 CHB1，卻與  $\alpha$ -幾丁質有較佳的結合特性，也因為在蛋白質基因庫中沒有發現與 CBP21 有更相似序列的蛋白質，因而推論此結合特性是其他 CBPs 所沒有的。這在 G. Vaaje-Kolstad 等 (2005)，將 *S. marcescens* 利用  $\beta$ -幾丁質為碳源生長速度比  $\alpha$ -幾丁質快的比較試驗結果，也佐證了  $\beta$ -幾丁質對 CBP21 的特殊性。

在測試 pH 值對 CBP21 及幾丁質酶 A 與再生幾丁質結合的影響如圖 7-2。由圖 7-2 可知，CBP21 在 pH 6-8 左右能在幾丁質上取得最大結合量，且隨著 pH 值的降低 CBP21 結合的量也跟著遞減。在 CBP21 與幾丁質親和性純化試驗發現，當 pH 值 6.5 左右時 CBP21 即可被洗脫出來。而幾丁質酶 A 在 pH 值 4 至 12 時的結合量沒太大差異，僅在 pH 3 時才有明顯的減少。此顯示 pH 值對幾丁質酶 A 與幾丁質結合的影響不靈敏。

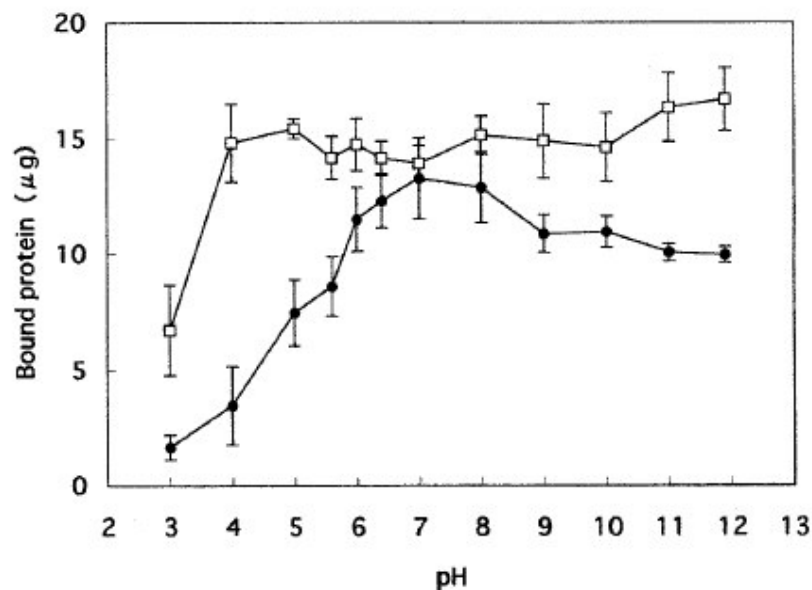


圖 7-2 pH 值對 CBP21 及幾丁質酶 A 與再生幾丁質結合的影響<sup>(84)</sup>。□：chitinase A；●：CBP21。

### 7-3、融合技術之發展現況

當前許多生物的基因組定序已經完成，蛋白質體學成為研究的主要領域，需要發展大規模和高通量的技術進行蛋白質的表達、純化、活性和結構分析。使用原核系統有許多優點，如易於操作、生長快速、表達水準高，但在原核系統真核蛋白常常不能獲得可溶性表達，主要的原因有以下幾點：原核系統沒有真核的伴護分子（chaperone）；原核系統不能進行醣基化等翻譯後修飾；不能進行亞細胞定位；沒有與其結合起穩定作用的同伴分子。親和融合策略是適應大規模原核可溶性表達最為行之有效的方法。目前研究學者也把需要表達的標的蛋白和親和純化用的攜帶蛋白融合表達，這樣使得純化相對得比較容易。理想的攜帶蛋白需要以下的幾個特點，最好能一步純化得到純品；對標的蛋白的結構和活性沒有影響；方便切除攜帶蛋白；應用範圍廣，可適用各種表達系統或標的蛋白。但是直至目前為止尚未有完美的攜帶蛋白，只能根據實際需要去自己篩選。下面(表 4-1)是部份目前已有商品化的攜帶蛋白：

#### 1. 聚組胺酸（Polyhistidine；His）攜帶蛋白和金屬螯合親和層析

金屬螯和親和層析技術是由 Porath 及其合作者在 70 年代中期發展起來的，這一方法基於蛋白質表面的一些特定的胺基酸殘基側鏈，尤其是組胺酸，在中性和弱鹼性條件下可以和固定化的金屬離子相互作用，如  $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$ ，目前 His 攜帶蛋白已經成為應用最為廣泛的親和攜帶蛋白。金屬螯和親和層析容量高，價格便宜，純度中等或低，通常一步純化只得 20% 的純度。

#### 2. 穀胱甘肽硫轉化酶（Glutathione-S-Transferase；GST）

穀胱甘肽硫轉化酶（GST）是最早使用的親和攜帶蛋白。標的蛋白加於 GST 的 C 端，再利用穀胱甘肽親和介質進行純化，或固定在親和介質上。GST 融合蛋白已成為分子生物學家的基本工具。它廣泛用於研究蛋白質—DNA 相互作用。用於親和純化的 GST 來源於日本血吸蟲，由於其分子量較大，而且以二聚體的形式存在溶液中，一般都需要去除融合攜帶蛋白。這一系統必須依賴於 GST 的正確折疊，幸運的是一般 GST 融合蛋白包涵體在溶解復性（renaturation）後都能正確折疊。GST 融合蛋白也常用來免疫動物生產，以及作為載體蛋白進行一些蛋白的結晶。GST 攜帶蛋白常被選擇用於增加可溶性表達，但實際上並不有

效。GST 攜帶蛋白可用酵素學分析或免疫分析很方便的檢測。攜帶蛋白有助於保護重組蛋白免受胞外蛋白酶的降解並提高其穩定性。GST 融合蛋白表達水準低一些，可溶性蛋白卻占了約 80%，親和層析後純度為 40%。

### 3. 麥芽糖結合蛋白 (Maltose Binding Protein ; MBP)

40kDa 的麥芽糖結合蛋白(MBP)由大腸桿菌 K12 的 *malE* 基因編碼，定位在細胞的周質空間，可以特異性的結合麥芽糖或糊精-麥芽糖複合物，協助這些物質轉運到細胞內。此系統使用交聯直鏈澱粉的親和介質純化，用麥芽糖進行競爭性洗脫。結合的融合蛋白可用 10mM 麥芽糖在生理緩沖液中進行洗脫。一些融合蛋白在 0.2% Triton X-100 或 0.25% Tween 20 存在下不能有效結合。緩衝條件為 pH7.0 到 8.5，鹽濃度可高達 1M。不能使用變性劑。其優點：

1. MBP 不含有半胱氨酸殘基，不會干擾標的蛋白形成正確的二硫鍵；
2. 使用的介質價格低廉；
3. 可以在溫和的條件下洗脫融合蛋白；
4. 加上其分泌信號，可以進行分泌表達在細胞周質，由於周質是偏氧化的環境，可以促進標的蛋白形成正確的二硫鍵；
5. 此系統最顯著的特點是與麥芽糖結合蛋白 (MBP) 進行融合表達可以改善標的蛋白的溶解性，促進正確折疊，提高活性蛋白的回收率。一般認為 MBP 促進可溶性表達與它具有類似伴護分子 (chaperone) 的特性有關，MBP 可以直接和折疊中間體 (midbody) 相互作用，抑制聚集的發生，從而使它區別於別的攜帶蛋白。

### 4. 鈣調蛋白結合肽 (Calmodulin Binding Protein ; CBP)

鈣調蛋白結合肽 (CBP) 有 26 個胺基酸殘基，來源於骨骼肌肌球蛋白輕鏈激酶 C 末段，鈣調蛋白結合肽與鈣調素結合是  $Ca^{2+}$  依賴的，這種結合不受攜帶蛋白所處的位置影響 (N 端和 C 端均可)，在中性 pH 條件下可以很方便的將標的蛋白洗脫下來。其優點為：1. 特異性很高，因為大腸桿菌沒有可以和鈣調素結合的蛋白；2. 與 His 攜帶蛋白相比可以在強還原性條件下純化。純化的純度中等。

### 5. 纖維素結合域 (Cellulose Binding Domain ; CBD)

纖維素結合域 (CBD) 融合蛋白能與纖維素介質特異性的結合，可以在溫和的條件下洗脫 (乙二醇或低鹽條件)，pET CBD 載體含有纖維素結合肽 (CBD) 的序列，可方便構建。

具有纖維素結合結構域 (CBDs) 的蛋白質種類已超過 13 種。CBD 大小從 4 到 20kDa，出現在多肽內的不同位置：N 端，C 端，或者中間。一些 CBD 與纖維素產生不可逆結合，此類 CBD 可應用於固定化；其他則可以結合，因此可用於分離和純化。纖維素的優點是它是惰性的，非專一的親和力低，它具有多種形式，也已經被批准用於許多藥物和人類的使用。CBD 在相當寬的 pH 範圍內，從 3.5 到 9.5，均可與纖維素結合。

## 6. 幾丁質結合區 (Chitin-binding Domain)

New England Biolabs 提供的 IMPACT (Intein-Mediated Purification with an affinity Chitin-binding Tag) 系統使用幾丁質結合區 (來源於環狀芽胞桿菌) 作為融合攜帶蛋白，表達的融合蛋白可以用幾丁質親和層析純化，利用內含肽 (intein) 的特異性原位剪切直接獲得標的蛋白。這一系統包括以下幾類：1. 硫氫基 (sulphydryl group, SH) 誘導的 N 端剪切系統 (相對內含肽來講)，有 pTYB1 和其衍生載體，使用的內含肽來源於釀酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) *VMA1* 基因，將最後一個胺基酸進行了 N454A 突變，使內含肽的 C 端不能被剪切，在 SH 基的誘導下，內含肽的 N 端發生重排、裂解、水解，就得到標的蛋白，由於細菌表達，標的蛋白 N 端有甲硫胺酸，C 端不引入額外的胺基酸殘基；2. SH 基誘導的 C 端剪切系統，有 pTYB11 和 pTYB12 載體，同樣使用來源於釀酒酵母菌 *VMA1* 基因的內含肽，內含肽 C 端的剪切依賴於其 N 端剪切位點的 SH 基誘導裂解，幾丁質結合肽序列插入到內含肽的核酸內切酶結構域，N 端為半胱胺酸的蛋白不能使用這一系統剪切；3. pH 誘導的 C 端剪切系統，有 pTWIN 載體，內含肽來源於一種藍細菌的 *dnaB* 基因，有 429 個胺基酸殘基，N 端的半胱胺酸殘基被丙胺酸殘基取代，使內含肽不具有 N 端的裂解活性，而保留 C 末端 pH 誘導剪切的特性，當 pH 在 6.0-7.5，剪切能有效進行，pH<5.5 或 pH>8.0 剪切可被有效的阻止，內含肽的 N 端融合幾丁質結合肽，C 端融合目標序列，在 pH8.5 純化融合蛋白，在 pH 6.0-7.0 和 4-25°C 條件下剪切；4. 可以用於蛋白質環化的雙內含肽系統，目的蛋白處於兩個內含肽之間，先通過 pH 誘導標的蛋白 N 端內含肽被剪切，再用 SH 基誘導 C 端內含肽被剪切，剪切後產生 N 端為半胱胺酸殘基和 C 端為硫脂鍵的蛋白，通過自發的縮合可形成環化蛋白。與傳統的親和融合系統相比，一般認為此系統的最大優點在於不需要使用蛋白酶來去除融合攜帶蛋白。

## 7. FLAG 表位攜帶蛋白，T7 表位攜帶蛋白和 S 攜帶蛋白



FLAG 肽序列 (DYKDDDDK) 的親水性很強，片段小，並且具有腸激酶的酶切位點，一般不會影響標的蛋白的活性。FLAG 攜帶蛋白的最初用途是用於蛋白檢測。但這種結合是  $\text{Ca}^{2+}$  非依賴的，需要使用低 pH 洗脫，或用合成的 FLAG 肽進行競爭性洗脫。這一系統可在多種表達系統中使用，主要的缺點是親和介質特別昂貴、吸附容量低。

純化蛋白質的技術考量為純度、穩定性和用途。而原材料的性質，包括表達系統（如細菌、哺乳動物細胞），主要的雜蛋白（如宿主細胞蛋白、產品的不同變體），需要處理的固體（如細胞、膜碎片、包涵體），以及蛋白的性質（如所帶電荷、滴定曲線、等電點、分子量、表面疏水性、特異的結合特性和熱穩定性），這些因素也都影響純化後的結果。

表 7-1 已有商品化的攜帶蛋白：

Name (Link to sequence)	Uses	Location relative to target Protein (N- or C-Terminal or Internal)	Related Procedures
His Tag (6,8, or 10 amino acids)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Purification - Affinity Column: His tag binds very tightly [<math>\text{Kd} \sim 10^{-13}\text{M}</math>] to immobilized divalent cations [e.g <math>\text{Ni}^{+2}</math>, <math>\text{Cu}^{+2}</math>, <math>\text{Zn}^{+2}</math>]</li> <li>Detection - Western Blot.</li> </ul>	N,C, I	<ul style="list-style-type: none"> <li>NOVAGEN: pET manual (including methods of purifying many tags) .</li> <li>QUIAGEN: Ni-NTA purification manual.</li> <li>CLONTECH: Talon Resin Protocol .</li> </ul>
T7 Tag (11-16 amino acids)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Detection: Western Blot. Immunoprecipitation.</li> <li>Purification: Affinity Column (denaturing low pH elution needed).</li> <li>Possibly enhanced expression levels since the T7-tag is derived from the T7 gene 10 which is the naturally most abundant phage T7 gene product.</li> </ul>	N, I	<ul style="list-style-type: none"> <li>NOVAGEN: T7.Tag Affinity Purification kit</li> </ul>

S-Tag (15 amino acids)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Detection: Western Blot.</li> <li>● quantitative Assay RNAse S assay possible for quantitative assay of expression levels.</li> <li>● Purification: Affinity Column.</li> </ul>	N, C, I	<ul style="list-style-type: none"> <li>● S-Tag system (Novagen)</li> </ul>
Flag- Tag (8 amino acids)	Purification.	N, C	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Sigma's Flag Protein Expression System</li> </ul>
GST (Glutathione S Transferase) (223amino acids, 26 kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Solubility (lesser quality than Nus A or MBP) [N-term only].</li> <li>● Purification: glutathione affinity or GST antibody purification.</li> <li>● Detection: Western Blot, Quantitative Assay (based on enzymatic activity).</li> </ul>	N, C	<ul style="list-style-type: none"> <li>● CLONTECH GST products Handbook.</li> <li>● AMERSHAM BIOSCIENCES-GST fusion protein Handbook</li> <li>● NOVAGEN GST.Bind Kits</li> </ul>
MBP (Maltose Binding Protein) (40kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Solubility (better quality than GST or Trx) [N-term only].</li> <li>● Purification: Amylose affinity purification with maltose elution.</li> </ul>	N, C	<ul style="list-style-type: none"> <li>● NEW ENGLAND BIOLAB: pMAL protein Fusion and Purification System</li> </ul>
CBP (Calmodulin Binding Peptide) (4kDa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Purification.</li> <li>● Detection.</li> </ul>	N, C	<ul style="list-style-type: none"> <li>● STRATAGENE: CBP Calmodulin-Binding Peptide Affinity Tag System</li> </ul>
CBP(chitin binding domain)	Purification	N, C	<ul style="list-style-type: none"> <li>● NEW ENGLAND BIOLAB: IMPACT system.</li> </ul>

### 7-3-1、融合技術的另一研究重點～攜帶蛋白的切割

親和攜帶蛋白的存在可能影響待研究蛋白的重要特性或功能。可以通過切位點專一的蛋白酶去除標的蛋白的攜帶蛋白，且切割不能降低蛋白質的活力。切割後蛋白酶的去對於帶有親和攜帶蛋白的重組蛋白酶或者生物素化的蛋白酶較為容易。生物素化的蛋白酶可通過 Strep-tag / Strep-Tactin 親和層析直接加以純化，或者通過第二步鏈球菌抗生物素蛋白親和層析。攜帶蛋白的切割不加蛋白酶也是可行的，可加入自切位點。

親和攜帶蛋白在蛋白質純化過程中，可以有助於穩定蛋白質並提高其溶解性，親和層析通常可以達到 90—99% 的純度。純化系統的選擇取決於蛋白質本身及其進一步的應用。許多對於其結合擔體具有高親和力的攜帶蛋白可以作為有用的工具在表面固定化肽類或蛋白質。有生物活性蛋白質的固定化對於研究和工業應用來說都是重要的。此外，親和攜帶蛋白技術的重要性將增加其在肽類/蛋白質晶片設計，高通量純化，肽類/蛋白質庫，大規模生產系統以及藥物釋放策略中的應用。

### 7-4、醣類水解酵素簡介

#### 1. 煙麴菌中幾丁聚醣水解酵素 (*Aspergillus fumigatus* chitosanase) 之簡介<sup>(87)</sup>

幾丁聚醣水解酵素 (chitosanase) 是煙麴菌 (*Aspergillus fumigatus*) 中擁有極高工業應用性的酵素，本實驗室於土壤中分離出 *A. fumigatus*，並透過使用幾丁質聚醣作為唯一碳源篩選而得。屬於黴菌幾丁聚醣水解酵素所屬的 GH-75 家族，分子量為 23,462 Da，有 866 個鹼基對 (base pair) 2 個基因內區 (67 和 82 bp) 成熟蛋白質 717 個鹼基對可以轉錄轉譯出 221 個胺基酸，及蛋白質序列前面一小段 17 個胺基酸的訊號勝肽 (signal peptide) GenBank 公佈序號 AY190324。本實驗室已將此段基因建構在 pRSET\_A vector 的 *NdeI* 以及 *BamHI* 限制酶切位間，並且命名為 pRSET / csn。經轉殖已能利用大腸桿菌 (*E. coli*) 進行表現並完成定性工作。水解產物利用核磁共振光譜以及質譜定序方法，證實此酵素是以反轉機制水解以及切 GlcNAc-GlcN 和 GlcN-GlcN 鍵而不切 GlcNAc-GlcNAc 和 GlcN-GlcNAc linkages 鍵。重組的酵素在大腸桿菌中以內含體 (inclusion body) 形式表現，利用 5M 尿素可回收 35% 的活性。另外，此酵素也在另一訊息勝肽表現系統中以胞內可溶蛋白質形式表現。

## 2. $\beta$ -1,3-葡聚糖生產水解酵素 (LPHase) 之簡介

分泌自鏈黴菌 DIC-108 (*Streptomyces matensis* DIC-108) 的蛋白質 Laminaripentaose hydrolase (LPHase) 又名為 Laminaripentaose-producing  $\beta$ -1,3-glucanase, 歸屬於糖苷水解酶第 64 家族 (GH-64 family) 的成員 (EC 3.2.1.39), 對  $\beta$ -1,3-葡聚糖進行催化水解反應, 為內切葡聚糖水解酵素 (Endoglucanase), 作用在長鏈型生物巨分子 (如 curdlan) 的  $\beta$ -1,3 糖苷鍵結, 可以專一性地分解  $\beta$ -1,3-葡聚糖產生五個葡萄糖所組成的 laminaripentasaccharide 寡聚物 (oligomer), 與受質隨時間反應的立體選擇性變化, 屬於反轉  $\beta$ -1,3-葡聚糖水解糖苷酵素 (invertin  $\beta$ -1,3-glucanase)。 *Streptomyces matensis* DIC-108 的 LPHase 基因 (GenBank: AB019428) 及 LPHase 蛋白質 (GenePept: BAA34349), 基因的解碼序列 (coding sequence, CDS) 有 1,206 個鹼基對 (base pair), 可以轉錄轉譯出 401 個胺基酸, 整段蛋白質序列前面有一小段具有 35 個胺基酸 (MLRTLRRRVTAVALGLATALGGGWLAAGVPSPAHA) 的訊號勝肽 (signal peptide), 除訊號勝肽外之蛋白質分子量約為 45 kDa。

## 3. 仙人掌桿菌中幾丁質水解酵素 (*Bacillus cereus* NCTU2) 之簡介<sup>(13,88)</sup>

仙人掌桿菌中幾丁質水解酵素 (*Bacillus cereus* NCTU2) 為本研究室所自行篩選具有幾丁質酵素活性的菌株, 並由 *Bacillus cereus* NCTU2 的染色體 DNA 選殖得幾丁質酵素 (ChiNCTU2) 之基因。經由定序, 幾丁質酵素 (ChiNCTU2) 之基因共有 1,083 個核苷酸, 相當於 360 個胺基酸。ChiNCTU2 為一簡單的幾丁質酵素, 僅包含一個 N 端訊息勝肽與 C 端催化區, 無幾丁質結合區、Fn3D 或其他作用區。經與 Genebank 基因資料庫上 *B. cereus* ChiA 比對, 發現兩段基因有 27 個核苷酸不一樣, 導致 7 個胺基酸的差異。經序列比較推測, 其前 27 個胺基酸為訊息勝肽, 剩餘之 333 個胺基酸形成胞外酵素, 分子量為 36,184 Da, 成熟蛋白 (mature protein) 分子量為 36,235 Da。此酵素經胺基酸序列比對, 在糖類水解酵素中, 屬於家族 18, 第 137 個胺基酸序列 FDGIDIDLE 符合家族 18 幾丁質酵素一致的催化序列模式 [LIVMFY]-[DN]-G-[LI VMF]-[DN]-[LIVMF]-[DN]-X-E。其蛋白質結構應為  $(\alpha/\beta)_8$  的結構, 且僅具有單一催化區域 (catalytic domain), 而不具備其他的輔助區域。此基因已被建構於 pRSET A 載體上並能以大腸桿菌 BL21(DE3) 表達之。此幾丁質酵素水解膠狀幾丁質及 N-乙酰幾丁寡糖所得之產物主要為雙糖及少數單糖。

## 7-5、論文研究動機

目前市面上商品化的攜帶蛋白有很大的缺點，需要使用高價格的親和性材質和蛋白質水解酵素，雖然可以得到高純度的標的蛋白，但是所需的花費非常昂貴。本研究即依據 CBP21 的特性將其設計成為攜帶蛋白，利用基因工程將標的蛋白與 CBP21 形成融合蛋白、並使用自製的  $\beta$ -幾丁質為親和性之固定相基材<sup>(89,90,91)</sup>，以進行蛋白質純化，期望能建構一兼顧蛋白質表現及快速純化標的蛋白的平台。



## 第八章 實驗方法

### 8-1、藥品與儀器

#### 1. 藥品：

菌種培養液（胰蛋白胨、酵母抽出物、洋菜等）藥品購自 Merck、Difco 公司。

試驗用藥品及緩衝液購自 Merck、Aldrich、CONDA、SHOWA。

限制酶及聚合酶購自 NEB。

Gel Elution 和 plasmid DNA extraction 等各種 Kit 購自 GeneMark、Viogene。

#### 2. 基因：

pRSET\_A vector

*Aspergillus fumigatus* Y2K chitosanase gene

laminaripentaose-producing  $\beta$ -1,3-glucanase of *Streptomyces matensis*

*Bacillus cereus* NCTU2 chitinase

*Serratia marcescens* chitinase A

#### 3. 儀器：

恆溫培養箱（EYELA NDO-450ND, RISEN refrigerated circulators）

搖動培養箱（FIRSTEK SCIENTIFIC B602D, S300R, S302R）

UV 吸收光譜儀（HP 8452A）

高速離心機（KUBOTA 7820）

電子噴灑式串聯質譜儀 ESI-Q-Tof（Micromass）

超音波震盪器

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

FPLC system（Pharmacia Biotech FPLC）

層析管柱（Chitin）

分液收集器（fraction collector）ISCO

垂直式蛋白質電泳槽

DNA 電泳槽

#### 4. 自製材料

##### 幾丁質細片 (Chitin matrix) ( $\beta$ -chitin) 的製備：

取墨魚、花枝等軟體海洋生物軟骨 20 g，加 3% 氫氧化鈉 500ml，於 100°C 水浴中加熱反應 3 小時，以去除蛋白質和色素。再用水將氫氧化鈉洗淨，並將水份吸乾。接著以 6N 的鹽酸在室溫浸泡隔夜，以去除碳酸鈣，之後再將酸洗淨直至中性。利用均質機均質之，並篩選 30-50 mesh (粒徑約 0.3-0.6 mm) 之顆粒，保存於 20% 酒精中備用。

## 8-2、CBP21 基因之選殖及定序

### 1. 菌種來源：

本實驗室幾丁質酵素之菌種為從食品工業研究所購得，其編號為 *Serratia marcescens* (黏質沙雷氏菌) ATCC 990。

### 2. CBP21 酵素之選殖：

首先，*S. marcescens* 的染色體 DNA 先行以傳統法抽出，再根據 NCBI 基因資料庫上 CBP21 的基因序列，設計引子 (primers) 如下：

CBP21 (+) 5'-GGAATTC,CAT,ATG,AAC,AAA,ACT,TCC,CGT,ACC-3'

CBP21 (-) 5'-CCG,CTC,GAG,CTC,TTA,TTT,GCT,CAG,GTT,GAC-3'

在 CBP21 (+) 引子中設計了一個 *NdeI* 切位 (cutting site)，同時也設計了 *XhoI* 和 *SacI* 的切位在 CBP21 (-) 中。另以 *BamHI* 水解 *S. marcescens* 的染色體 DNA，回收 500-4000 bp 的片段，並以之為模板 (template)。再進行 CBP21 酵素基因的聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)。

在實驗過程中，使用 *vent* DNA 聚合酵素，黏合 (annealing) 溫度為 55-67 °C。經 PCR 反應後，成功的將 CBP21 基因片段 (gene) 放大。取 1  $\mu$ L 以 DNA 電泳確認放大效果。大

小約為 700bp。其 PCR 反應程式如下：

PCR 反應程式：

區間	1	2			3	
次數	1	20			1	
溫度	95 °C	95 °C	55-67 °C	72 °C	72 °C	4 °C
時間 (分：秒)	15 : 00	1 : 00	00 : 30	1 : 00	5 : 00	∞

### 8-3、CBP21/pRSET\_A 質體

為了方便後續 CBP21 gene 的存取與定序，先行與載體接合有其必要性，於是我們將 CBP21 gene 建構在 pRSET\_A 載體 (vector)，使形成 CBP21/pRSET\_A 質體。

步驟：

分別在 CBP21 gene 及 pRSET\_A vector 中加入 DNA 限制酶 *Nde* I、*Xho*I 和 2 號緩衝液 (buffer 2)，於 37 °C 作用 2 小時，進行切割。切割完成後，利用 DNA 電泳，分別進行 CBP21 gene (insert) 及 pRSET\_A vector (vector) 的核酸回收。再以 vector : insert = 1 : 3 的比例，加入 10×T4 DNA 接合酵素 (T4 DNA ligase) 緩衝液 A 和 B 各 2 μl 和水，最後加 T4 DNA ligase 1 μl，使總體積為 20 μl，混合均勻，於 22 °C 作用 20 分鐘進行結合 (ligation)，隨即移至 4 °C 存放 1 小時。

將 CBP21/pRSET\_A 依熱休克 (heat shock) 轉型步驟，轉型 (transformation) 至已製備好的大腸桿菌 (*E. coli*) XL1-Blue 勝任細胞 (competent cell) 中。接著將 CBP21/pRSET\_A-XL1-Blue 勝任細胞塗佈於 LBA (1% 氯化鈉 + 1% 胰蛋白胍 + 0.5% 酵母抽出物 + 2% 洋菜 + 0.1% Ampicillin) 平板 (plate) 上，37 °C 培養 20 小時。再由平板上挑單菌落至 5mL LB 培養液 (1% 氯化鈉 + 1% 胰蛋白胍 + 0.5% 酵母抽出物 + 0.1% Ampicillin)，37 °C 培養 18 小時。純化其質體 DNA (稱 CBP21/pRSET\_A 質體)，以供存取與 DNA 定序之用。



## 8-4、CBP21 蛋白質表現<sup>(84)</sup>

將 CBP21/pRSET\_A 質體依熱休克轉型步驟，轉型至已製備好的 *E. coli* DE3 勝任細胞，以準備進行表現。

### 1. 培養條件：

將 CBP21/pRSET\_A- DE3 勝任細胞塗佈於 LBA 平板上，37 °C 培養 20 小時。再由平板上挑單一菌落於 5mL LB broth (0.1% Ampicillin)，37 °C 培養 15 小時。取菌液 50 μL 接種到 1,000 mL LB 培養液中，加入 0.1 g Ampicillin 和 0.1g IPTG，於搖動培養箱中 37 °C，110 rpm 發酵培養 15 小時。

### 2. 胞內粗提取液的取得：

取培養完成之菌液，在 4 °C 以 7,000 rpm 離心 15 分鐘，倒棄上層液，取離心後沈澱的菌體，以磷酸緩衝液 (phosphate buffer) 10 mL (20 mM, pH 7.0) 溶解菌體，搖晃使成均勻懸浮液。再將懸浮菌體液以超音波震盪使菌體破裂 (45 W, 75 % pulse) 於 4 °C 以 18,000 rpm 離心 30 分鐘，將上層液與細胞殘骸分開，此上層液即胞內粗提取液。

### 3. 酵素純化：

取 *E. coli* 胞內粗提液 10 mL，倒入 30 mL、2 % 的 30-50 孔目 (mesh) 之 chitin matrix 中 [tris 50 mM, 1 M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.0]，混合均勻。調整 pH 至 8.0，放在 4 °C 中進行靜置隔夜的結合。再以相同緩衝液沖洗未結合之蛋白質 10 次。最後以醋酸緩衝液 (20mM, pH 3.6) 將蛋白質洗出。

## 8-5、緩衝溶液之酸鹼度對 CBP21 與幾丁質結合力的影響

### 1. 藥品：

CBP21 enzyme  
30-50 mesh chitin matrixes

### 2. 緩衝液：

#### 第一組：

pH 8	50 mM Tris/HCl
pH 7	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
pH 6	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
pH 5	50 mM sodium acetate/acetic acid
pH 4	50 mM sodium acetate/acetic acid

#### 第二組：

pH 8	50 mM Tris/HCl +1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
pH 7	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
pH 6	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
pH 5	50 mM sodium acetate/acetic acid +1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
pH 4	50 mM sodium acetate/acetic acid +1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

### 3. 步驟：

(1) 取 5 mL、2% 的 30-50 mesh chitin matrixes (pH 8.0) 加入 0.01mg CBP21，再加入 10 mL pH 8 緩衝液 (50 mM Tris/HCl, 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 混合均勻，調整 pH 至 8.0，於 4 °C 反應 12 小時。

(2) 添加不同 pH 值緩衝液進行洗滌。取步驟 (1) 之 CBP21 與 chitin matrixes 1 mL 結合於離心管內(共 12 管) 於 4 °C 以 10,000 rpm 離心 2 分鐘，棄去上層液。各別加入 1,000 μL H<sub>2</sub>O，混合均勻後，於 4 °C 以 10,000 rpm 離心 2 分鐘，並棄去上層液。再分別加入 200 μL 不同 pH 值緩衝液 (不含鹽緩衝液 pH 8、pH 7、pH 6、pH 5、pH 4 及 pH 8、pH 7、pH 6、pH 5、pH 4 含鹽之緩衝液) 混合均勻，置於 4 °C 反應 12 小時。反應完成後，再次於 4 °C 以 10,000 rpm 離心 2 分鐘，取上層液 (約 200 μL) 用 3K 分子量過濾器濃縮至 50 μL，並取 20 μL 進行蛋白質電泳分析。

## 8-6、30-50 mesh 的幾丁質重覆使用的評估

取幾丁質 matrixes (30-50 mesh) 300 mg。以[1M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 50 mM Tris] pH 8.0 緩衝液，清洗 3 次後，加入 5 mL [1M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 50 mM Tris] pH 8.0 緩衝液 and 0.5 mg CBP21 蛋白質，混合均勻，於 4°C 反應 6 小時。再以 10 mL [1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 50 mM Tris] pH 8.0 緩衝液，清洗 3 次，另以 10 mL 去離子水，清洗 1 次。最後加入 pH 3.6 醋酸鈉緩衝液 10 mL，調 pH 到 3.6，於 4 °C 反應隔夜 (overnight) 離心，取上層液。重覆上述結合及洗脫步驟，共 6 次。分別測定上清液之 CBP21 含量。

## 8-7、CBP21 融合蛋白質載體 (CBP21 Fusion Protein Vector) 之建構

由於 CBP21 可以有效的結合在幾丁質上，可以當純化酵素的工具或用以實行酵素固定化，更因 CBP21 具有訊息胜肽可有效的解決蛋白質包涵體 (protein inclusion) 的問題。故期以 CBP21 建構一個集酵素表現與純化的載體，其設計如圖 8-1。以 pRSET\_A 為蛋白質表現載體，先以 *Nde*I 和 *Xho*I 插入 CBP21 gene，再在其後插入連結胺基酸 (linker) 和蛋白酶酶切位置 (protease (genenase I) cutting site) 最後形成一個集蛋白質表現、純化及酵素固定化於一身的載體如圖 5-2。

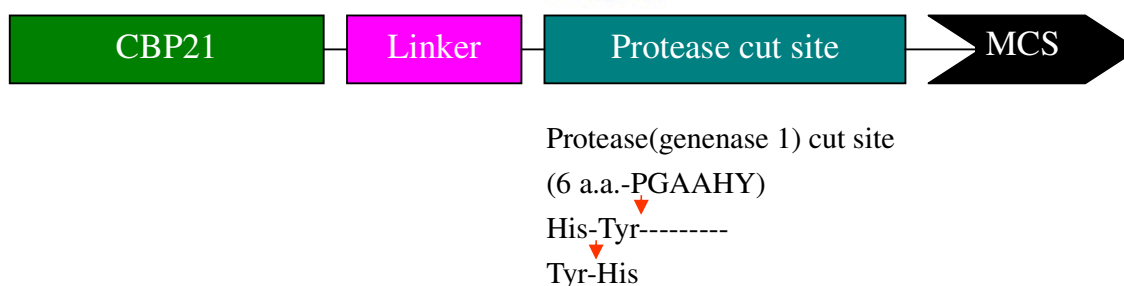


圖 8-1 以 CBP21 建構一個集酵素表現與純化的基因片段示意圖。

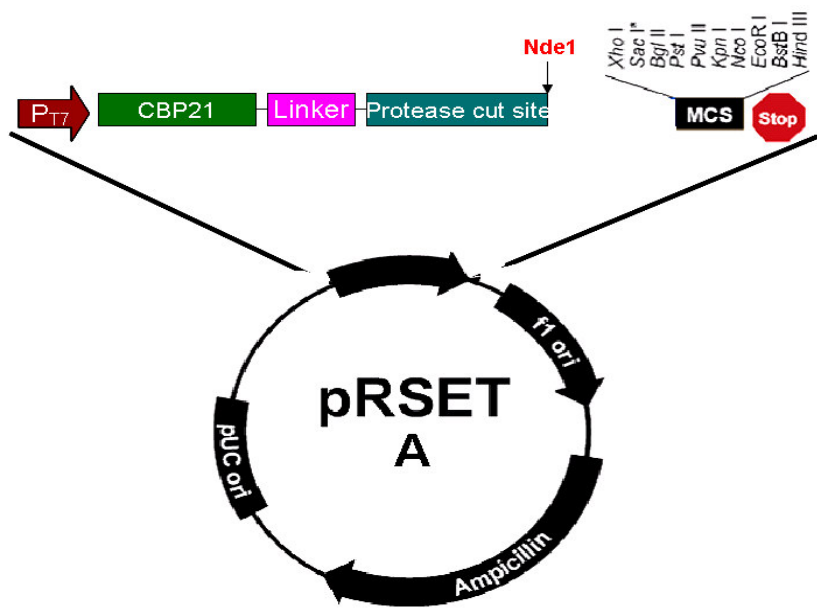


圖 8-2 以 CBP21 建構一個集酵素表現與純化的載體示意圖。

**Linker 設計之簡介：**

含有雙功能區塊的融合蛋白需要有一條 peptide 來有效的分隔，才能使每個蛋白發揮各自的功能。

在 *Streptomyces griseus* HUT6037 Chitinase C (ChiC) 的研究<sup>(92)</sup>，發現位於 N 端的 chitin binding domain 和 C 端的 catalytic domain 之間是由一條 peptide linker 所連接(圖 8-3)，此 peptide linker 可使兩功能區塊維持各自的功能，因此我們利用此 peptide linker 設計成 linker 2：GTGGEGPGG。

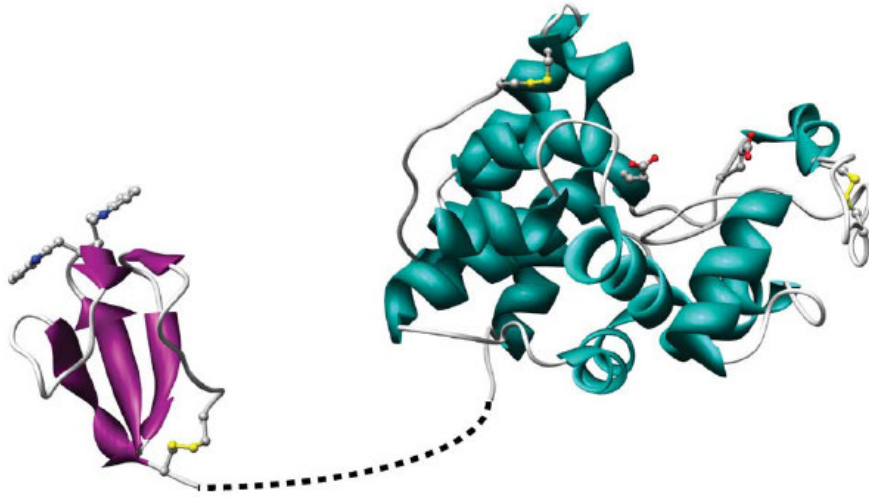


圖8-3 ChiC 3D結構。N端的chitin binding domain和C端的catalytic domain之間是由一條peptide linker所連接。

根據Ryoichi Arai<sup>(93)</sup>等的實驗結果，他們設計了具有 $\alpha$ -helix結構的peptide： $A(EAAAK)_nA$  ( $n = 2-5$ )，其 $\alpha$ -helix結構主要是依靠 $Glu^-Lys^+$ 所形成的鹽橋來維持。在將EBFP與EGFP兩螢光蛋白建構成EBFP-linker-EGFP之融合蛋白實驗，經由FRET現象的測量， $A(EAAAK)_nA$  ( $n = 4, 5$ )具有較好的FRET效果。同時，由重複次數的不同，可以有效的控制融合蛋白間的距離，且不影響到融合蛋白上各個蛋白的活性。因此，我們將linker 5設計成 $(EAAAK)_5$ 。根據文獻報告<sup>(94)</sup>，我們也設計了一段flexible linker  $(GGGGS)_5$ 命名為linker 7。

為了有效的使表現後的融合蛋白質，各自保有本身的作用機制，所以 linker 的選擇非常重要，故設計了以下七種不同的 linker (表 8-1) 以供篩選。經基因工程後，可得七種有不同 linker 的載體，再插入不同的酵素基因進行篩選。

表 8-1 建構 CBP21 結合蛋白的 7 種連接胺基酸 (Linker)

Linker candidates for the design of a stable CBP21 fusion protein	
Linker	amino acid sequence
1	AKRGWI
2	GTGGEGPGG
3	GTGGEGPGGGPGEGGTG
4	TTLGSNLGTLGLK
5	(EAAAK) <sub>5</sub>
6	GTGGEGPGGGPGEGGTGGTGGEGPGG
7	(GGGS) <sub>5</sub>

### 8-7-1、分生剪接建構 CBP21 融合蛋白的載體

#### 1. 刪除 CBP21 gene 上之 NdeI 切位：

首先為使 CBP21/pRSET\_A 之 5' 端上限制酶 *NdeI* 切點 -CATATG- 失去作用，因而設計二個互補引子 (primers) 將 *NdeI* 切位拿掉，primers 如下：

CBP21-de-Nde1 (+) : 5'-GGA GAT ATA GGG ATG AAC AAA AC-3'

CBP21-de-Nde1 (-) : 5'- GTT TTG TTC ATC CCT ATA TCT CC-3'

並以 CBP21/pRSET\_A 質體為模板 (template) 進行聚合酵素連鎖反應 (PCR)，以進行定點突變 (site-directed mutagenesis)。

PCR 反應程式：

區間	1	2			3	
次數	1	20			1	
溫度	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C	72 °C	4 °C
時間 (分：秒)	2 : 00	1 : 00	00 : 30	5 : 00	10 : 00	∞

PCR 完成後取 1 $\mu$ L 產物以 DNA 電泳確認放大效果。加入 1 $\mu$ L 的 DpnI 限制酵素，在 37 °C 作用 overnight，以分解甲基化的母股 DNA。再進行對 *E. coli* XL1B 之轉型作用 (transformation)。純化其質體，以適當的寡核甘酸引子進行定序。稱此質體為 **CBP21-de-*Nde*I/ pRSET\_A**。

## 2. Vector 1 之建構

方法說明：

- (1) 設計欲做突變之 primers，而所設計之 primers 可將整個載體與基因完整放大。
- (2) 將 primers 磷酸化。
- (3) 以 PCR 放大整個基因。
- (4) 將放大之基因自行黏合 (self-ligation)。

步驟一：

Vector 1 為在 CBP21 基因片段下游續接 linker、Protease (genenase I) 切位及 *Nde*I 切位，設計 primers 方法如下：

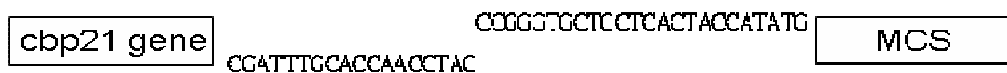
- (1) 列出欲插入之胺基酸序列。

cbp21 gene    AKRGWIPGAAHYHN    MCS

- (2) 將胺基酸序列轉譯成 DNA 序列。

cbp21 gene    GCTAAACGTGGTTGGATCCGGGGTGGCTGCTCACTACCATATG  
CGATTTCACCAAACCTAGGGCCACGACGAGTGATGGTATAC    MCS

- (3) 將 DNA 序列分成正、逆兩股。



(4) 設計 primers。

Vector 1 (+) : 5'-**CCG GGT GCG GCA CAC TAC CAT ATG** GAG CTC GAG ATC TGC AGC TGG TAC -3'  
 (protease 切位) (NdeI 切位)

Vector 1 (-) : 5'-**GAT CCA ACC ACG TTT AGC** TTT GCT CAG GTT GAC GTC GAT C -3'  
 (linker)

步驟二：

以 T4 聚核苷酸激酶 (T4 polynucleotide Kinase) 將 primers vector 1 (+) 和 vector 1 (-) 之 5' 端磷酸化。

vector 1 (+)	10 $\mu$ L
vector 1 (-)	10 $\mu$ L
PNK buffer	1.3 $\mu$ L
rATP	1 $\mu$ L
T4 Polynucleotide kinase	1 $\mu$ L

混合均勻，置於 37°C 作用 3 小時。

步驟三：

以 CBP21-de-NdeI / pRSET\_A 為模板 (template) 進行聚合酵素連鎖反應 (PCR)。

PCR 反應程式：



區間	1	2			3	
次數	1	20			1	
溫度	95 °C	95 °C	55-67 °C	72 °C	72 °C	4 °C
時間 (分:秒)	5:00	1:00	00:30	1:00	5:00	∞

PCR 完成後取 1 $\mu$ L 產物以 DNA 電泳確認放大效果。

#### 步驟四：

加入 1 $\mu$ L 的 DpnI 限制酵素，在 37 °C 作用隔夜，以分解甲基化的母股 DNA，再進行接合作用 (ligation)。將接合完成的圓形雙股 DNA (稱為 vector 1)，進行對 *E. coli* XL1B 之轉型作用 (transformation)。並純化其質體，以適當的寡核苷酸引子進行定序。

### 3. Vector 2 之建構

(1) primers 設計如下：

Vector 1 (+) : 5'- CCG GGT GCG GCA CAC TAC CAT ATG GAG CTC GAG ATC TGC AGC TGG TAC -3'

Vector 2 (-) : 5'- ACC ACC CGG ACC TTC ACC ACC GGT ACC TTT GCT CAG GTT GAC GTC GAT C -3'

(2) 以 vector 1 為模板 (template)。

(3) 實驗步驟同 vector 1。

(4) 所得之載體為 vector 2。

### 4. Vector 3 之建構

(1) primers 設計如下：

Vector 1 (+) : 5'- CCG GGT GCG GCA CAC TAC CAT ATG GAG CTC GAG ATC TGC AGC TGG TAC -3'

Vector 3 ( - ) : 5'- ACC GGT ACC ACC TTC ACC CGG ACC ACC ACC ACC CGG ACC TTC ACC ACC -3'

(2) 以 vector 2 為模板 ( template ) 。

(3) 實驗步驟同 vector 1 。

(4) 所得之載體為 vector 3 。

## 5. Vector 4 之建構

(1) primers 設計如下：

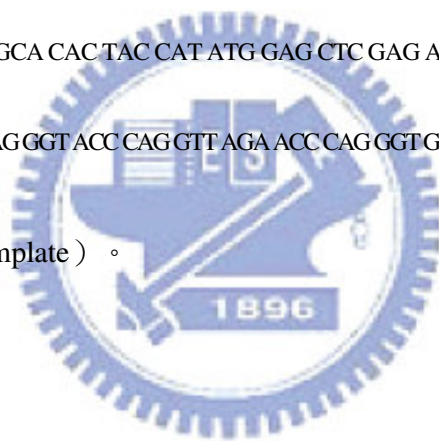
Vector 1 ( + ) : 5'- CCG GGT GCG GCA CAC TAC CAT ATG GAG CTC GAG ATC TGC AGC TGG TAC -3'

Vector 4 ( - ) : 5'- TTT CAG ACC CAG GGT ACC CAG GTT AGA ACC CAG GGT GGT TTT GCT CAG GTT GAC GTC -3'

(2) 以 vector 1 為模板 ( template ) 。

(3) 實驗步驟同 vector 1 。

(4) 所得之載體為 vector 4 。



## 6. Vector 5 之建構

(1) primers 設計如下：

Vector 5 ( + ) : 5'- CTG CTA AAG AAG CTG CTG CTA AAG AAG CTG CTG CTA AAC CCG GTG CGG CAC ACT AC -3'

Vector 5 ( - ) : 5'- CAG CTT CTT TAG CAG CAG CTT CTT TAG CAG CAG CTT CTT TGC TCA GGT TGA CGT C -3'

(2) 以 vector 1 為模板 ( template ) 。

(3) 實驗步驟同 vector 1。

(4) 所得之載體為 vector 5。

## 7. Vector 6 之建構

(1) primers 設計如下：

Vector 1 (+) : 5'- CCG GGT GCG GCA CAC TAC CAT ATG GAG CTC GAG ATC TGC AGC TGG TAC -3'

Vector 6 (-) : 5'- TTC TTC CGG TCC TTC TCC TCC AGT TCC ACC GGT ACC ACC TTC ACC CGG-3'

(2) 以 vector 3 為模板 (template)。

(3) 實驗步驟同 vector 1。

(4) 所得之載體為 vector 6。



## 8. Vector 7 之建構

(1) primers 設計如下：

Vector 7 (+) : 5'- GGG GGT GGC GGA TCT GGT GGT GGT TCT CAT ATG GAG CTC GAG ATC T -3'

Vector 7 (-) : 5'- AGA TCC TCC TCC TCC AGA CCC ACC GCC TCC TTT GCT CAG GTT GAC GTC -3'

(2) 以 vector 1 為模板 (template)。

(3) 實驗步驟同 vector 1。

(4) 所得之載體為 vector 7。

## 8-8、CBP21 融合蛋白載體之測試 (*A. fumigatus* Y2K chitosanase)

將建構完成之 vector 1~vector 7 在其 *Nde*I 及 *Hind*III 切位嵌入 *A. fumigatus* Y2K chitosanase gene，再轉型到 *E. coli* DE3 勝任細胞中，進行蛋白質表現。

挑單菌落培養於 5 ml LB 培養液活化菌體。將培養至飽和(15 小時)的菌液接種 50  $\mu$ L 到 1,000 mL LB 培養液中，加入 0.1 g Ampicillin 和 0.1g IPTG，於 37  $^{\circ}$ C 培養箱中，以 110 rpm 搖動發酵培養 15 小時後，取胞內酵素測幾丁聚醣酶活性。有活性者，再與幾丁質進行結合（結合方法同 CBP21）12 小時，接續進行酵素純化步驟，並以 SDS PAGE 分析純化後酵素之純度。

### 酵素純化方法一：(管柱沖提法)

將結合 12 小時的幾丁質懸浮液，倒入管柱進行充填，用 [1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; 50mM Tris] pH 8.0 緩衝液以 20 倍的體積沖洗，再以 20 mM 醋酸緩衝液 pH 3.6，將結合的蛋白質洗下，收集有活性之分流液。

### 酵素純化方法二：(離心法)

將結合 12 小時的幾丁質懸浮液，以離心 (7,500rpm) 去除上清液。取 [1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; 50mM Tris]pH 8.0 緩衝液約 10 倍粗提液量，與沈澱物混勻後，再離心沖洗 (7,500rpm) 去除上清液，重複此步驟至未與幾丁質結合的蛋白質完全去除。再用 20 mM 醋酸緩衝液 pH 3.6 緩衝液約 10 倍粗提液體積，與沈澱物混勻後，調整 pH 值至 4.0，於 4 $^{\circ}$ C 靜置 1 小時，最後以離心 (7,500rpm) 取上清液。重複此步驟至結合蛋白完全取得。



## 8-9、CBP21 融合 *Streptomyces matensis* LPHase and *Bacillus cereus* NCTU2 chitinase 測試

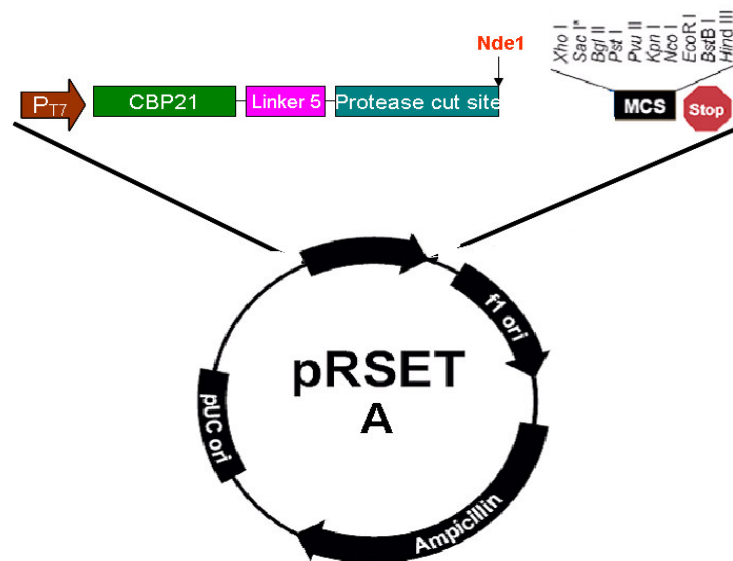


圖 8-4 Vector 5 載體示意圖。

### 1. CBP21 融合 *S. matensis* LPHase

將 vector 5 (圖 8-4) 與 LPHase (laminaripentaose - producing  $\beta$  - 1,3 - glucanase of *S. matensis*) 基因用限制酵素 *NdeI* 和 *EcoRI* 切割，於 37 °C 作用 2 小時。接著以 vector : insert = 1 : 3 的比例將 vector 5 與 LPHase 基因的 DNA 片段混合，進行接合反應。再轉型到 *E. coli* DE3 勝任細胞中，進行蛋白質表現，經菌液培養後，取胞內酵素進行純化。

### 2. CBP21 融合 *B. cereus* NCTU2 chitinase

將 vector 5 與 NCTU2 chitinase 基因用限制酵素 *NdeI* 和 *NcoI* 切割，於 37 °C 作用 2 小時。接著以 vector : insert = 1 : 3 的比例將 vector 5 與 NCTU2 chitinase 基因的 DNA 片段混合，進行接合反應。再轉型到 *E. coli* DE3 勝任細胞中，進行蛋白質表現後，取胞內酵素進行純化。

## 8-10、Genenase protease cutting site 之測試

為了可以方便從融合蛋白中獲得標的蛋白，我們設計了 genenase protease cutting site 在基因上，因此可以利用購買的 genenase protease (NEB) 進行分解測試。首先，將融合蛋白置於 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl buffer 中，加入 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的 genenase protease，在室溫反應 overnight。接著將反應完的溶液除鹽、濃縮，以 SDS PAGE 分析。

## 8-11、不同 pH 下 Linker 5 (EAAAK)<sub>5</sub> 之裂解反應

### Buffer:

pH 8.0	100 mM Tris/HCl
pH 7.5	100 mM Tris/HCl
pH 7.0	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
pH 6.0	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
pH 5.0	100 mM sodium acetate/acetic acid
pH 4.0	100 mM sodium acetate/acetic acid

### 步驟：

#### 第一組：

將 V5-AF 融合蛋白與不同 pH 的 buffer 混合，在室溫下反應 overnight，接著將反應完的溶液除鹽、濃縮，以 SDS PAGE 分析。

#### 第二組：

先將 V5-AF 融合蛋白在 100°C 下加熱 10 mins，在與不同 pH 的 buffer 混合，在室溫下反應 overnight，接著將反應完的溶液除鹽、濃縮，以 SDS PAGE 分析。

## 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

在不同長度之 linker (EAAAK=2~4) V5-AF 的建構，以 V5-AF 為模板，利用圖 2-3 所示之方法進行建構，所設計之 primer 如下：

N2-4(+)-5'-GAA GCT GCT GCT AAA GAA GCT GCT GCT AAA CCG GGT GCG GCA CAC  
TAC CAT ATG-3'

N4(-)-5'-TTT AGC AGC AGC TTC TTT AGC AGC AGC TTC TTT GCT CAG GTT GAC  
GTC-3'

N3(-)-5'-TTT AGC AGC AGC TTC TTT GCT CAG GTT GAC GTC-3'

N2(-)-5'-TTT GCT CAG GTT GAC GTC CAT CGC-3'

在 linker = (EAAAK)<sub>4</sub> 時，使用 N2-4(+)和 N4(-)兩 primer；在 linker = (EAAAK)<sub>3</sub> 時，使用 N2-4(+)和 N3(-)兩 primer；在 linker = (EAAAK)<sub>2</sub> 時，使用 N2-4(+)和 N2(-)兩 primer。

在 de-Genenase protease cutting site V5-AF 的建構，以 V5-AF 為模板，進行 DNA 放大，以 *NdeI* 水解放大之產物，之後進行 self-ligation，所設計之 primer 如下：

V5-deG(+)-5'-G GAA TTC CAT ATG TAC AAT TTG CCA AAC -3'

V5-deG(-)-5'-GTA GTG TGC CGC ACC CGG CAT ATG TTT AGC AGC AGC TTC -3'

在 de-CBP21 V5-AF 的建構，以 V5-AF 為模板，進行 DNA 放大，以 *XhoI* 水解放大之產物，之後進行 self-ligation，所設計之 primer 如下：

deCBP21-Xho1(+)-5'-GCG ATC GAC GTC AAC CTG CTC GAG GAA GCT GCT GCT-3'

deCBP21-Xho1(-)-5'-CGA TTC GAC ATA CTC GAG AGC ATT CGC CTG TTG CGA-3'

以上所有建構好之基因，均轉型至 JM 109 勝任細胞 (competent cell) 中進行蛋白質表現。

## 8-13、Mass 分析 protein 分子量

### 1. protein 除鹽步驟

首先，protein sample 加等體積的 25% TFA，混合均勻，放在 4°C 沉澱 15 min (如果 sample 太稀可放置 4°C 長時間或者 overnight) 以 13000 rpm 在 4°C 離心 15 mins。輕輕吸除 supernatant solution，用 200  $\mu$ l、-20°C 的 acetone 以 tip 沖散 pellet，清洗 pellet，以 13000 rpm 在 4°C 離心 5 mins，重複洗 2 次。置於室溫揮發去除 acetone，儲存在 -20°C。

### 2. mass 分析

將除鹽後的 protein 以適量 0.1% 甲酸水溶液回溶，再以 Q-Tof mass 進行分析。





## 第九章 結果與討論

### 9-1、CBP21 之 PCR 基因選殖與基因表達系統之建構

本研究所選定的幾丁質結合蛋白 (CBP21) 是沙雷氏菌 (*S. marcescens*) 所分泌的蛋白質，故首先以傳統法抽出 *S. marcescens* 的染色體 DNA，再根據 NCBI 基因資料庫上 CBP21 的基因序列，設計引子 (primers) 如下：

CBP21 (+) 5'-ggAATTCCCATATgAACAAAACCTTCCCgTACC-3'

CBP21 (-) 5'-CCgCTCgAgCTCTTATTTgCTCAggTTgAC-3'

在設計引子時也設計了一個 *NdeI* 切位 (cutting site) 在引子 CBP21 (+) 中，同時也設計了 *XhoI* 和 *SacI* 的切位在 CBP21 (-) 中。接著以 *BamHI* 水解 *S. marcescens* 的染色體 DNA 並以之為模板 (template) 進行 CBP21 酵素基因的聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)。在實驗過程中，使用 *vent* DNA 聚合酵素，黏合 (annealing) 溫度為 55-67 °C，經 PCR 反應後，可成功的將 CBP21 基因放大。

將 CBP21 基因建構在 pRSET\_A 載體後，完成整段 CBP21 基因的定序，其結果顯示此段基因的開放轉譯架構 (open reading frame; ORF) 共有 594 個核酸，相當於 197 個胺基酸。經與 NCBI 基因資料庫上 (ACCESSION:AY665558) 比對，結果發現，兩者間有 7 個 DNA 的差異，但轉譯後的胺基酸序列是相同的。

此 CBP21 酵素由甲硫胺酸 (Methionine) 開始的前 27 個胺基酸為訊息胜肽 (signal peptide)，可使 *S. marcescens* 細胞將此酵素送到細胞外，並加以切除，而此不含訊息胜肽的胞外酵素，稱為成熟蛋白質 (mature protein) 若以胺基酸分子量計算具有 197 個胺基酸的原生成酵素及 170 個胺基酸的成熟蛋白質之分子量分別為 21.6 kDa 及 18.7 kDa。本實驗已將此含訊息胜肽的 CBP21 gene 建構於 *E. coli* 中，並將此重組酵素誘導表現 (over expression) 於細胞內。

## 9-2、重組 CBP21 酵素的純化

本實驗我們對不同粒徑大小和不同種類 ( $\alpha$  型和  $\beta$  型) 的親和性幾丁質作為純化用之固定相基材進行測試，其中以 30-50 mesh  $\beta$  型幾丁質的結合效果最佳。因此，後續純化試驗皆使用  $\beta$  型幾丁質為固定相基材。

將胞內粗提取液，以 30-50 mesh 之幾丁質在 Tris 緩衝溶液[pH 8, 50 mM, 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] 中進行結合後，以醋酸緩衝溶液(20mM, pH 3.6) 將蛋白質洗脫。經由蛋白質 SDS-PAGE 電泳實驗以後，如圖 9-1 觀察到僅於分子量 18.4~25.0 kDa 位置附近有預測的單一蛋白質存在；再利用質譜儀分析，結果如圖 9-2，其分子量為 18,785 Da。因此，可初步證明 CBP21 於 pH 8.0 時，可結合在幾丁質上，且經多次緩衝溶液的沖洗後，能去除未與幾丁質結合的其他蛋白質，再以較低 pH 值之緩衝溶液作用即能使 CBP21 與幾丁質分離，而達到純化之目的。

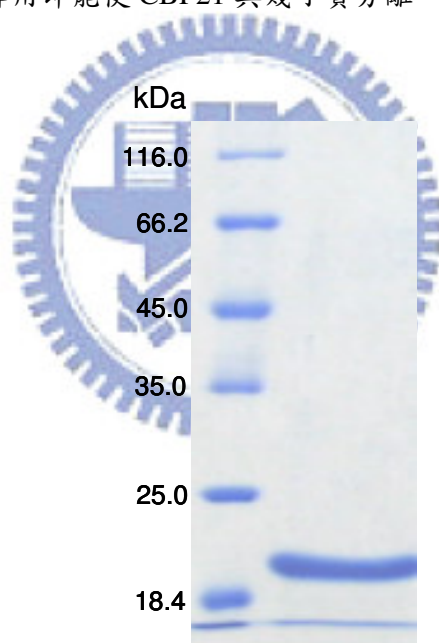


圖 9-1 CBP21 經幾丁質純化後之 SDS-PAGE。Lane 1： protein marker；Lane 2： 經過 chitin 純化後之 CBP21。

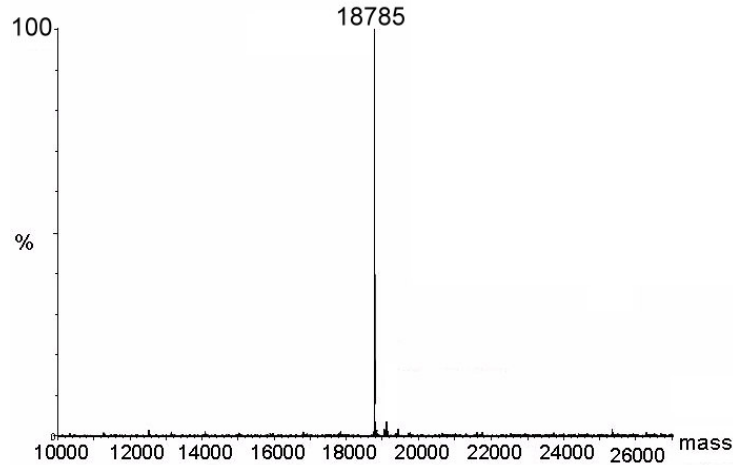


圖 9-2 質譜儀偵測 CBP21 分子量的結果。

### 9-3、緩衝溶液之酸鹼度對 CBP21 與幾丁質結合力的影響

pH 值是 CBP21 酵素與幾丁質結合與否的重要因素，但 pH 值過高或過低都將影響酵素之活性表現，因此瞭解 CBP21 酵素與幾丁質在結合或洗脫等不同作用期間其 pH 值能調控的範圍是有其必要性的。本實驗將已結合在幾丁質上之 CBP21 酵素，利用添加含鹽及不含鹽之 pH 8、pH 7、pH 6、pH 5、pH 4 緩衝溶液進行洗脫反應，再以蛋白質電泳分析，確認 CBP21 酵素（分子量約 18.8 kDa）適當之洗脫 pH 值範圍。

結果顯示，分析利用不同酸鹼度之不含鹽緩衝溶液組進行洗脫後，其洗脫液中 CBP21 存在的情形（圖 9-3）可知不同 pH 值有不同結合強度，當 pH 值 6 以下時即可洗脫，pH 值為 5 或 4 時，洗脫量明顯增多；同樣的情形也發生在含鹽緩衝溶液組（圖 9-4），而此結果與 Kazushi Suzuki 等（1997）測試得 CBP21 洗脫條件為 pH 值小於 5.5 相符合。由此推論，CBP21 與幾丁質結合受到 pH 值的調控。

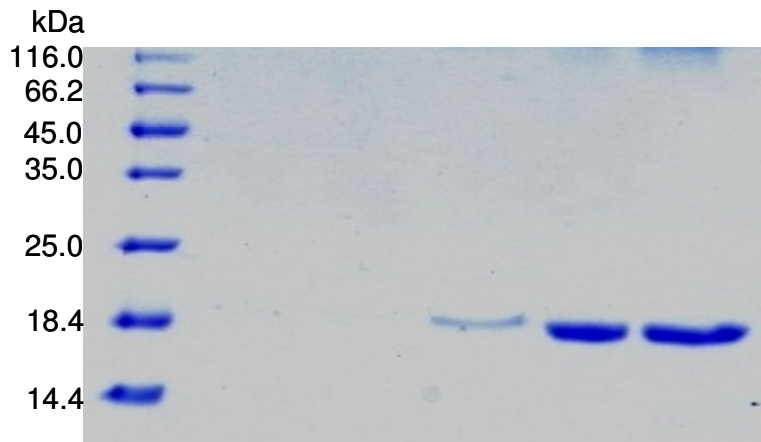


圖 9-3 利用不同 pH 的緩衝溶液，將 CBP21 從幾丁質上洗脫之 SDS PAGE。Lane 1：protein marker；Lane 2：pH 8；Lane 3：pH 7；Lane 4：pH 6；Lane 5：pH 5；Lane 6：pH 4。

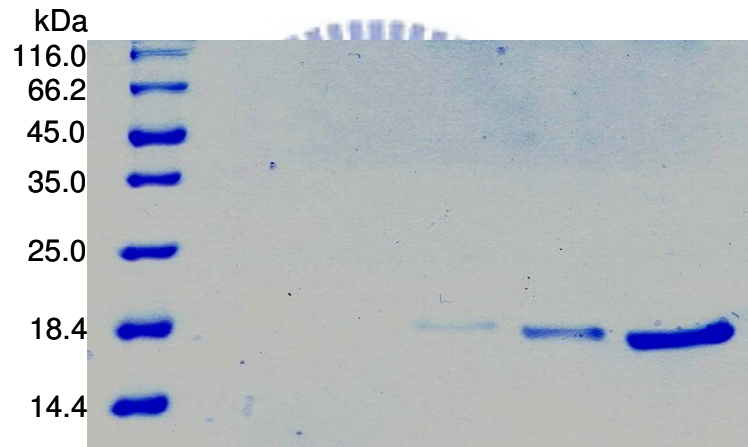


圖 9-4 利用含 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 之不同 pH 的緩衝溶液，將 CBP21 從幾丁質上洗脫之 SDS PAGE。Lane 1：protein marker；Lane 2：pH 8；Lane 3：pH 7；Lane 4：pH 6；Lane 5：pH 5；Lane 6：pH 4。

#### 9-4、30-50 mesh 幾丁質重複使用的評估

不同顆粒大小的幾丁質會影響與 CBP21 結合能力，由過去本實驗室的實驗結果得知，30-50 mesh 幾丁質與 CBP21 結合的效果最佳，因此選用 30-50 mesh 幾丁質進行後續實驗。

為確認自製之幾丁質與 CBP21 酵素結合的效果，即一定量之幾丁質可結合多少的 CBP21

酵素，以及幾丁質可重複使用之次數。本實驗利用 300 mg 幾丁質與 0.5 mg CBP21 酵素於 pH 8.0 緩衝溶液[1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM Tris]中進行結合，並以 pH 3.6 醋酸緩衝溶液 (HOAc buffer) 沖洗，對同一幾丁質重覆上述步驟 6 次，分析 CBP21 酵素的含量。

結果如圖 9-5，由圖可知，自製之 30-50 mesh 幾丁質每 300 mg 平均可結合 0.1mg 的 CBP21 蛋白質（相當於 1gm 幾丁質可與約 0.3mg CBP21 蛋白質結合）且同一幾丁質重覆使用 6 次仍能結合等量之 CBP21 酵素。其中，第 1 次洗脫量明顯較其後 5 次洗脫量為少，由過去文獻 (Gustav Vaaje-Kolstad 等, 2005) 知，CBP21 其主要作用為與不溶性的結晶狀幾丁質結合，導致受質構形的變化進而改變幾丁質的結構，使之較易與 chitinase 結合而達到降解的作用；因而推測其原因可能為 CBP21 在第 1 次與幾丁質結合時，此時幾丁質的構形仍屬緊密，能與 CBP21 結合的位點相對較少所致；隨著 CBP21 與幾丁質結合作用時間的增加，CBP21 使得幾丁質構形改變，在第 2 次結合測試時，結含量已由第 1 次的 0.02 mg 提高至 0.1 mg，因而大幅提昇二者間的結合能力。

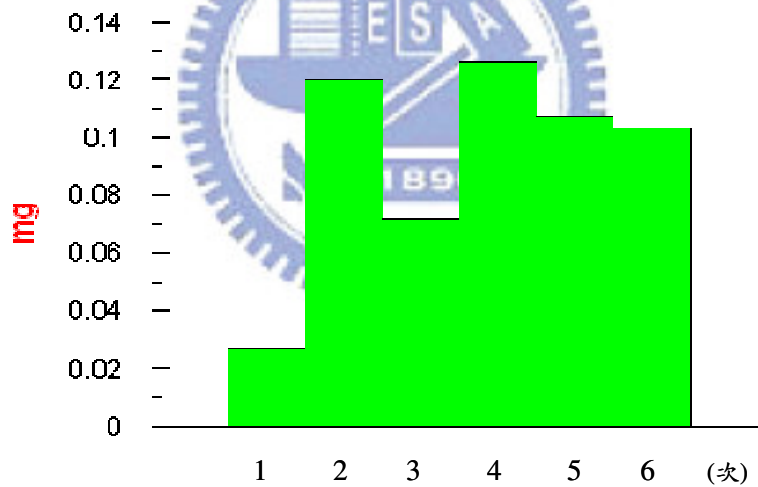


圖 9-5 自製之 30-50 mesh 幾丁質每 300 mg 可結合 CBP21 蛋白質的重量。

## 9-5、CBP21 融合蛋白質載體之建構

本實驗的主要理念是基於以上實驗數據，我們嘗試設計將 CBP21 與 chitinase 進行融合，

測試此種融合是否也能有加速 chitinase 分解幾丁質的效能。因此利用幾丁質與黏質沙雷氏菌 (*S. marcescens*) 產生的幾丁質結合蛋白 (CBP21; chitin binding protein) 的親和性結合，建立一個同時具備酵素純化系統與酵素固定化/回收系統雙項功能之平臺。

為了有效的使表現後的融合蛋白質，各自保有本身的作用機制，所以 linker 的選擇非常重要，故設計了七種不同的 linker，依所設計之方法成功建構了 vector 1~vector 7 等 7 個具有不同 linker 的載體以供篩選(圖 9-6)。

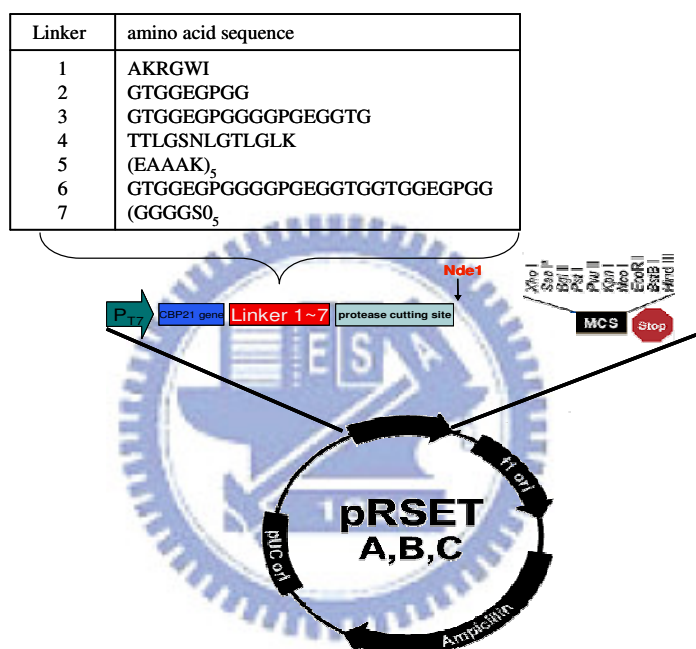


圖 9-6 所設計之 7 種不同的 linker。

## 9-6、CBP21 融合蛋白質載體之測試

將建構完成之 vector 1~vector 7 在其 *NdeI* 及 *HindIII* 切位成功的嵌入 *A. fumigatus* Y2K chitosanase gene，簡稱為 V1-AF~V7-AF，再轉形到 *E. coli* DE3 competent cell 中。經發酵培養後，取其胞內粗提液，偵測酵素是否具有活性，結果顯示 V1-AF~V7-AF 皆有活性反應。

接著將 V1-AF~V7-AF 等 7 種胞內粗提液與幾丁質進行結合及純化，並取純化後收集液，測試活性反應，測試結果得知，V1-AF~V4-AF 經純化後無活性反應，推論 V1-AF~V4-AF 可能未與幾丁質結合，因而在洗脫(去除未結合蛋白質)的步驟時，即已被沖洗移除；另 V5-AF、V6-AF 和 V7-AF 經活性測試，確定其仍具有活性。

將 V5-AF、V6-AF 和 V7-AF 純化後收集液以 SDS-PAGE 分析，由圖 9-7 得知，胞內粗提液經幾丁質純化後，明顯提升其酵素之純度。其中又以 V5-AF 所取得之酵素純度最高，是以 vector 5 載體可成功的表現 *A. fumigatus* Y2K chitosanase，並利用 CBP21 可以有效的結合在幾丁質的特性而快速被純化。後續融合試驗即採用 V5 載體為測試平台。

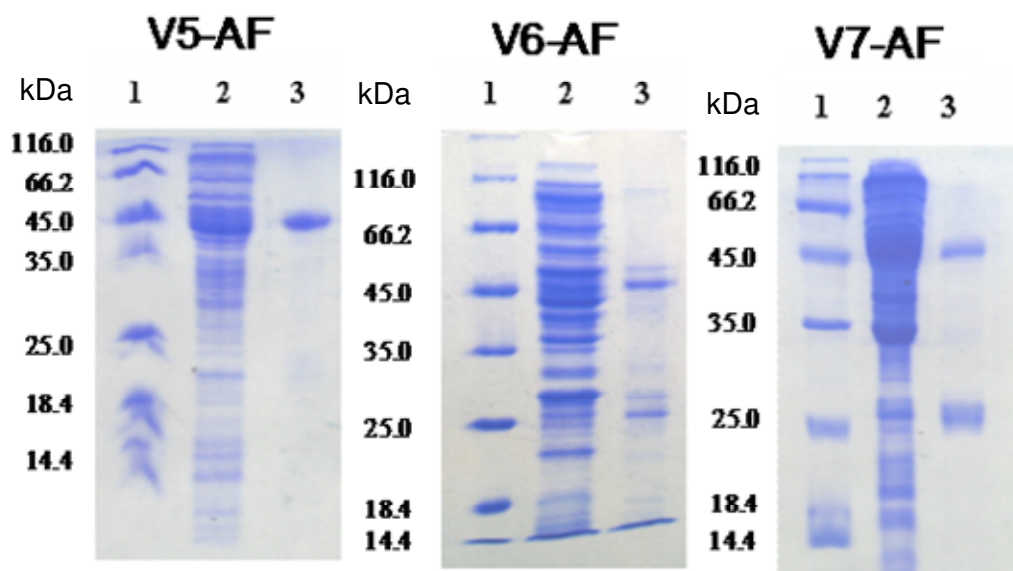


圖 9-7 V5-AF、V6-AF 及 V7-AF 經幾丁質純化後之 SDS-PAGE。Lane 1：protein marker；Lane 2：胞內粗提液；Lane 3：經過幾丁質純化後之活性流分。

### 9-7、CBP21 融合 *S. matensis* LPHase、*B. cereus* NCTU2 chitinase 和 *A. fumigatus* Y2K chitosanase

為測試 V5 載體與不同的酵素融合並進行表現與純化的適用性，因此對本實驗室現有已

知之醣類水解酵素 *S. matensis* LPHase、*B. cereus* NCTU2 chitinase 及 *A. fumigatus* Y2K chitosanase 進行測試。

### 1. CBP21融合 *S. matensis* LPHase

由本實驗室以往對 *S. matensis* LPHase 的研究結果顯示，本實驗室已成功利用人造基因的方式來建構重組此酵素，並以 T4 接合酶和以相同限制酶水解之線性表現質體 pRSET\_A 彼此相接合，隨後轉殖於 *E. coli* BL21(DE3) 中表現蛋白質。再將胞內粗提液經過 3 道不同的層析管柱純化出純度達 95% 以上的蛋白質，純化倍率為 25.9 且回收率為 33.84%，其各純化步驟的純化倍數、回收率如表 9-1 所示。

表9-1:重組蛋白質 LPHase 之純化倍率表

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purity Fold	Yield (%)
Crude enzyme solution	195	786	4.1	1.00	100
HiTrap SP ( pH 5.8 )	60.8	606	9.97	2.43	77.1
HiTrap Q ( pH 6.5 )	13.6	423	31.1	7.56	53.82
CM column( pH 5.0~7.0 )	2.5	266	106.4	25.9	33.84

本實驗擬利用 vector 5 載體的純化便利性，嘗試將 *S. matensis* LPHase 與 vector 5 載體融合，測試是否可達到簡化純化步驟之目的。因此我們在 vector 5 載體上之 *Nde*I 及 *Eco*RI 切位嵌入 LPHase gene，簡稱為 V5-LPH，再轉殖到 *E. coli* DE3 competent cell 中。經發酵培養後，取其胞內粗提液，與幾丁質進行結合及管柱沖提法純化，並取純化後收集液，依還原醣測定法進行活性反應測試。測試結果得知，V5-LPH 經純化後有活性反應。其 SDS-PAGE 分析結果，如圖 9-8，可知 Vector 5 能成功的表現 LPHase，並利用此載體的特性，得以有效的結合在幾丁質上而快速被純化，純化純度達 90 % 以上。



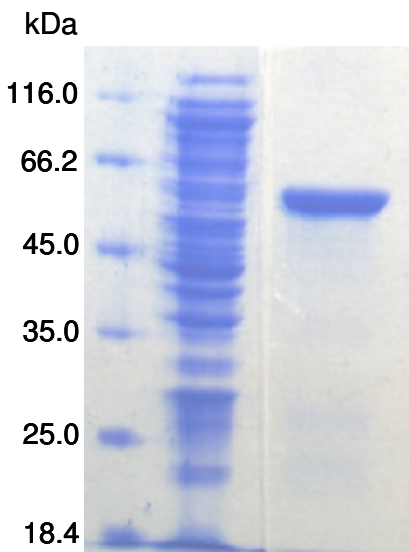


圖 9-8 V5-LPH 經幾丁質純化後之 SDS-PAGE 圖。Lane 1：protein marker；Lane 2：胞內粗提液；Lane 3：經過幾丁質純化後之活性流分。

取 10 mL **V5-LPH** 粗提液將純化過程的純化倍數、回收率等製成純化倍率表，見表 9-2。因為回收率僅 27.01%，嘗試使用重新處理的一批新的幾丁質，將顆粒控制在 30-100 mesh，並改採離心法進行純化試驗，結果如表 9-3，其純化倍率提昇為 93.38，且回收率達 44.7%，這結果比原先未使用此融合平台時所測得之純化倍率為 25.9 及回收率為 33.84% 為佳。因此，推論 Vector 5 載體所建構之融合平台，能利用幾丁質為固定相基材，即可達快速純化標的蛋白質之目的。

表 9-2:V5-LPH 之純化倍率表(管柱沖提法)

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purity Fold	Yield (%)
Crude enzyme solution	29.53	13.09	0.44	1.00	100
Chitin matrix	0.15	3.54	23.6	53.24	27.01

表 9-3:V5-LPH 之純化倍率表(離心法)

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purity Fold	Yield (%)
Crude enzyme solution	39.38	9.12	0.23	1.00	100
Chitin matrix	0.19	4.07	21.62	93.38	44.70

## 2. CBP21 融合 *B. cereus* NCTU2 chitinase

在 vector 5 上之 *Nde*I 及 *Nco*I 切位嵌入 *B. cereus* NCTU2 chitinase gene，簡稱為 V5-NCTU2，再轉形到 *E. coli* DE3 competent cell 中。經發酵培養後，取其胞內粗提液，與幾丁質進行結合及管柱沖提法純化，並取純化後收集液，依還原醣測定法進行活性反應測試。測試結果得知，V5-NCTU2 經純化後有活性反應。其 SDS-PAGE 分析結果，如圖 9-9，可知 vector 5 能成功的表現 *B. cereus* NCTU2 chitinase，並利用此載體特性得以有效的結合在幾丁質上而快速被純化，純化後純度達 90 % 以上。

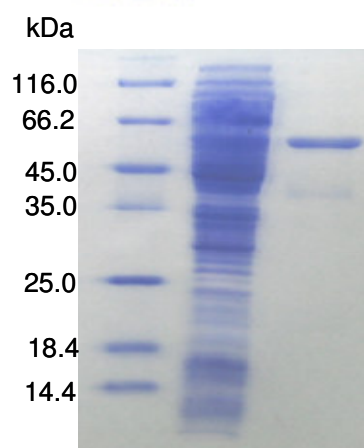


圖 9-9 V5-NCTU2 經幾丁質純化後之 SDS-PAGE 圖。Lane 1：protein marker；Lane 2：胞內粗提液；Lane 3：經過幾丁質純化後之活性流分。

將 V5-NCTU2 純化過程的純化倍數、回收率等製成一純化倍率表，由表 9-4 知純化倍率 11.68 及回收率 29.21 %。因其回收率未達 30 %，顯示此純化條件未盡理想。因而重新處理一批新的幾丁質，將顆粒控制在 30-100 mesh，並改採離心法進行純化試驗，結果如表 9-5，其純化倍率提昇為 28.94，且回收率達 100 %。

表 9-4:V5-NCTU2 之純化倍率表 (管柱沖提法)

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purity Fold	Yield (%)
Crude enzyme solution	34.34	13.41	0.39	1.00	100
Chitin Matrixes	0.86	3.92	4.56	11.68	29.21

表 9-5:V5-NCTU2 之純化倍率表(離心法)

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purity Fold	Yield (%)
Crude enzyme solution	37.6	12.24	0.33	1.00	100
Chitin Matrixes	1.32	12.44	9.42	28.94	100

### 3. CBP21 融合 *A. fumigatus* Y2K chitosanase

將建構完成之 vector 5 在其 *Nde*I 及 *Hind*III 切位成功的嵌入 *A. fumigatus* Y2K chitosanase gene，簡稱為 V5-AF，再轉形到 *E. coli* DE3 competent cell 中。經發酵培養 (3L) 後，取得胞內粗提液 35 mL，並進一步進行純化試驗。

因 V5-LPH 及 V5-NCTU2 利用離心法進行蛋白純化，都能取得較佳的回收率。所以本實驗取 V5-AF 胞內粗提液 10 mL，先利用離心法進行蛋白質純化試驗，將純化後收集液，依還原糖測定法進行活性反應測試。測試結果得知，V5-AF 經純化後有活性反應。其 SDS-PAGE 分析結果，如圖 9-10，在 45 kDa 位置有單一個蛋白質帶，顯示此純化純度已達 90 % 以上。

可見 vector 5 能成功的表現 *A. fumigatus* Y2K chitosanase，並利用此載體特性得以有效與幾丁質結合而快速被純化。

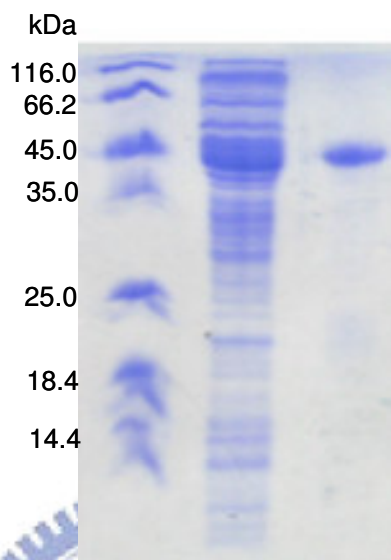


圖 9-10 V5-AF 經幾丁質純化後之 SDS-PAGE 圖。Lane 1：protein marker；Lane 2：胞內粗提液；Lane 3：經過幾丁質純化後之活性流分。

將 V5-AF 純化過程的純化倍數、回收率等製成純化倍率表，由表 9-6 知純化倍率 40.04 而回收率僅 9.74%。因其回收率過低，改採管柱沖提法再次進行純化試驗，結果如表 9-7，其純化倍率提昇為 136.81，且回收率達 58.51%。由此結果推論，不同的標的蛋白可能會使融合蛋白構形產生不同的變化，進而影響其與幾丁質結合的效能。因此，最佳純化方法的選擇仍需各別評估。

表 9-6:V5-AF 之純化倍率表 (離心法)

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purity Fold	Yield (%)
Crude enzyme solution	36.34	3.55	0.1	1.00	100
Chitin Matrixes	0.09	0.35	3.91	40.04	9.74

表 9-7:V5-AF 之純化倍率表 (管柱沖提法)

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (units)	Specific Activity (units/mg)	Purity Fold	Yield (%)
Crude enzyme solution	37.13	6.80	0.18	1.00	100
Chitin Matrixes	0.16	3.98	25.06	136.81	58.51

### 9-8、以 genenase protease 分解融合蛋白獲得標的蛋白

在已成功建構的 CBP21 融合蛋白質載體 (Vector 5) 為了方便、快速獲得所需之標的蛋白，所以設計了 genenase protease cutting site 在其上面。我們使用純化後的 V5-AF 融合蛋白，以 genenase protease 進行水解測試，其結果如電泳圖 9-11 所示。經過 genenase protease 水解後，可以有效的將融合蛋白分離成標的蛋白和 CBP21+linker 兩個部分，但須再進一步純化才可獲得所需的標的蛋白。

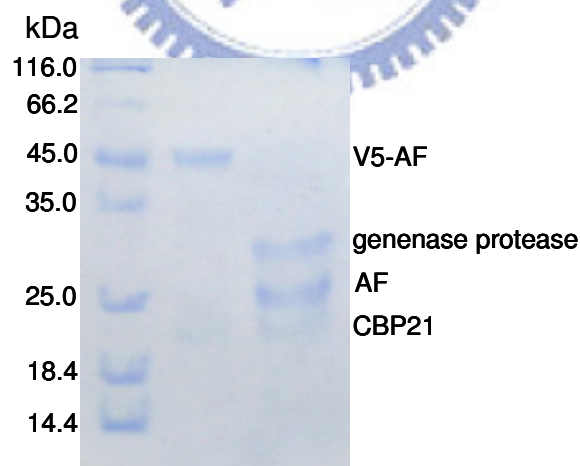


圖 9-11 以 genenase protease 水解 V5-AF 融合蛋白。Lane 1: protein marker; Lane 2: V5-AF; Lane 3: V5-AF 以 genenase protease 水解。

## 9-9、Linker 5 (EAAAK)<sub>5</sub> 之自動裂解分析

如何可以方便、快速且有效的獲得所需的標的蛋白才是我們研究所要達成的目標。目前我們已經可以使用單一管柱、單一步驟，達到純化蛋白的目的，而如何可以無須使用 protease 作用即可將標的蛋白與融合蛋白分離是研究的重點。在實驗的過程中我們意外的發現到，我們所設計的 linker 5 在特定的 pH 值下具有自動裂解的現象，其原因可能為 linker 本身的化學作用所造成胜肽鍵的裂解，或者是 protease 的作用，須進一步的研究。

我們以純化後的 V5-AF 融合蛋白，在不同 pH 下進行 linker 自動裂解分析，圖 9-12 為反應前未裂解之 V5-AF 融合蛋白，接著我們將 V5-AF 融合蛋白置於不同 pH 值下反應。

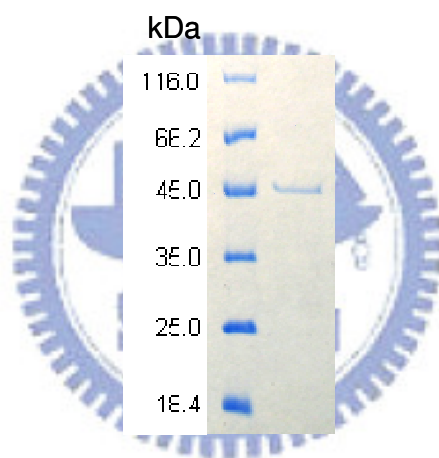


圖 9-12 反應前之 V5-AF 蛋白質電泳圖。 Lane 1：protein marker；Lane 2：V5-AF(45 kD)。

由電泳圖 9-13 分析顯示，linker 5 = (EAAAK)<sub>5</sub> 在 pH 6 和 7 時，會有自動裂解的現象發生，其原因可能為 linker 本身的化學作用而造成胜肽鍵的裂解，或者是 protease 的作用。為了證實是否為 protease 作用，我們先將 V5-AF 蛋白質在 100°C 下加熱 10 分鐘，再在不同 pH 下，反應 overnight，再以電泳分析其結果，結果如圖 9-14 所示，同樣的在 pH 6 和 7 時，會有自動裂解的現象發生，故可以初步排除 linker 的裂解為 protease 的作用，而其裂解之機制須再進一步分析。

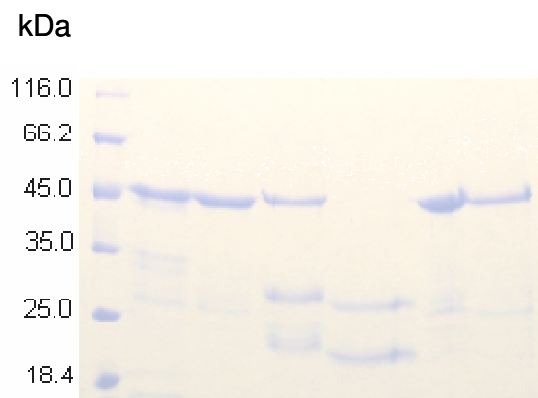


圖 9-13 V5-AF 蛋白質在不同 pH 下，反應 overnight 之蛋白質電泳圖。Lane 1：protein marker；Lane 2：NaOAc pH 4.0(4.2)；Lane 3：NaOAc pH 5.0(5.1)；Lane 4：Pi pH 6.0(6.0)；Lane 5：Pi pH 7.0(7.0)；Lane 6：Tris pH 7.5(7.3)；Lane 7：Tris pH 8.0(8.0)。

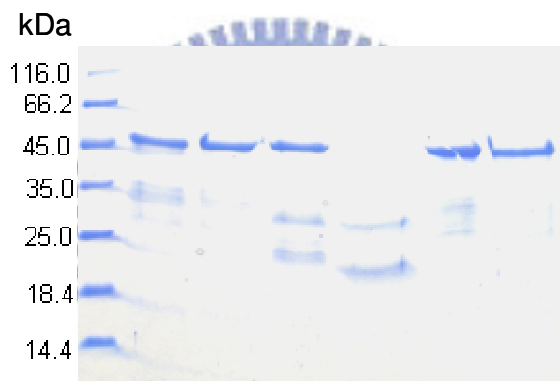


圖 9-14 V5-AF 蛋白質先在 100°C 下加熱 10 分鐘，再在不同 pH 值下，反應 overnight 之蛋白質電泳圖。Lane 1：protein marker；Lane 2：NaOAc pH 4.0(4.2)；Lane 3：NaOAc pH 5.0(5.1)；Lane 4：Pi pH 6.0(6.0)；Lane 5：Pi pH 7.0(7.0)；Lane 6：Tris pH 7.5(7.3)；Lane 7：Tris pH 8.0(8.0)。

至此，本實驗建構之 CBP21 融合蛋白載體系統，將可做到單柱一步驟純化蛋白，且無須 protease 作用即可將標的蛋白與融合蛋白分離。

### 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

為了更進一步確認 linker 的自動裂解情形，我們將 linker 做不同的調整，分別為 linker = (EAAAK)<sub>5</sub>、linker = (EAAAK)<sub>4</sub>、linker = (EAAAK)<sub>3</sub> 和 linker = (EAAAK)<sub>2</sub>，以及

V5-AF(de-genenase cut site) 和 V5-AF(de-CBP21 gene)等共六種不同的酵素以進行分析。圖 9-15 為不同重複次數之 linker 的電泳圖，由於其分子量相當接近，所以我們也以質譜儀分析其分子量，如下表 9-8。

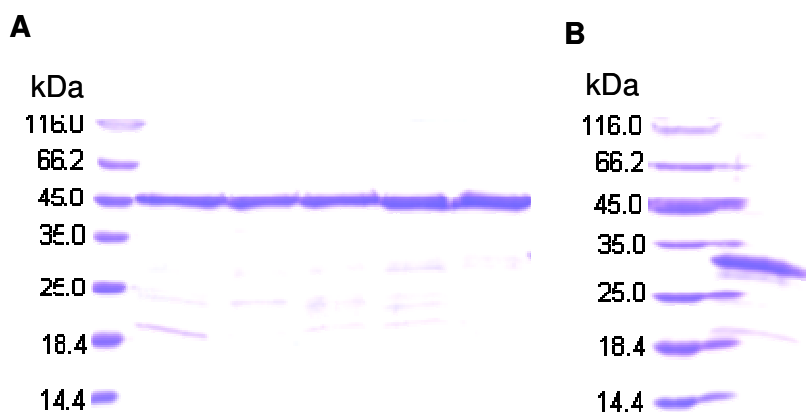


圖 9-15 不同重複次數之 linker、de-genenase cut site 和 de-CBP21 gene 的電泳圖。(A) Lane 1: protein marker; Lane 2: (EAAAK)<sub>5</sub>; Lane 3: (EAAAK)<sub>4</sub>; Lane 4: (EAAAK)<sub>3</sub>; Lane 5: (EAAAK)<sub>2</sub>; Lane 6: V5-AF(de-genenase cut site)。(B) Lane 1: protein marker; Lane 2: V5-AF(de-CBP21 gene)。

表 9-8: 蛋白質分子量

	分子量(Da)		
(EAAAK) <sub>5</sub>	45448		
(EAAAK) <sub>4</sub>	44977		471(EAAAK)
(EAAAK) <sub>3</sub>	44507		470(EAAAK)
(EAAAK) <sub>2</sub>	44036		471(EAAAK)
V5-AF(de-genenase cut site)	44852		
V5-AF(de-CBP21 gene)	26913		

EAAAK : 488.84(470) ; PGAAHY : 615.15(598) ; CBP21 : 18776(18796)

我們將此六個酵素置於 100 mM Pi buffer、300mM NaCl、pH 7.0、16°C 下反應，以蛋白質電泳配合質譜儀分析 linker 裂解情形。



由蛋白質電泳圖 9-16 可以發現，六個蛋白質不論 linker 之重複次數，或者是拿掉 CBP21 等，都可自行裂解，其裂解過程有一定之規則，在 protein marker 25 kDa~35 kDa 間的蛋白質分子量為標的蛋白 AF 之分子量，由電泳圖可看出其斷位有一定之專一性，但須進一步以質譜儀分析其裂解之位置；在 protein marker 18.4 kDa~25 kDa 間的蛋白質分子量為 CBP21 + linker 之分子量，由電泳上可看出，隨著 linker 之重複次數的增加，其片段也隨著增加，而其斷位也有一定的專一性，須進一步以質譜儀分析其斷裂之過程。

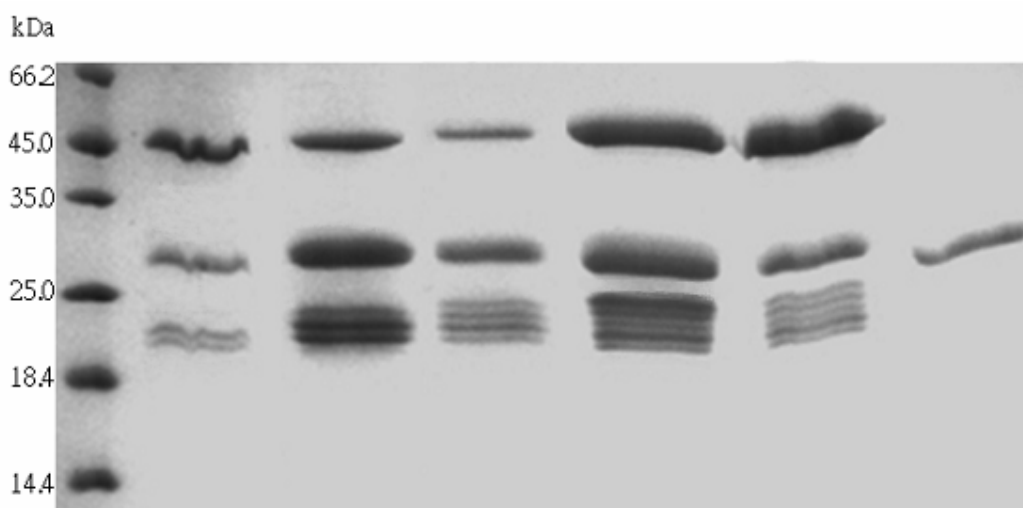


圖 9-16 六種不同 proteins 置於 100 mM Pi buffer、300mM NaCl、pH 7.0、20°C 下反應 overnight 之電泳分析圖。Lane 1: protein marker. Lane 2: CBP-V2G-CNS; Lane 3: CBP-V3G-CNS; Lane 4: CBP-V4G-CNS; Lane 5: CBP-V5G-CNS; Lane 6: CBP-V5-CNS (protein expressed without the peptide sequence of the genenase I cutting site); Lane 7: V5G-CNS (protein expressed without CBP)。

因此，我們同時以質譜儀進行分析，從 mass 圖 9-17 至圖 9-20 可以明顯看出，linker 的裂解是以 (EAAAK = 470 Da) 為單體一個一個的斷裂，其最起始之斷裂處位於 (EAAAK) 與 PGAAHY (genenase cutting site) 之鍵結處，之後在以 (EAAAK) 為單體一個一個的斷裂。

圖 9-17，在 linker = (EAAAK)<sub>5</sub> 時，分子量 20997 Da = CBP21 + (EAAAK)<sub>5</sub>；20527 Da = CBP21 + (EAAAK)<sub>4</sub>；20057 Da = CBP21 + (EAAAK)<sub>3</sub>；19587 Da = CBP21 + (EAAAK)<sub>2</sub>；19117 Da = CBP21 + (EAAAK)<sub>1</sub>，而 24448 Da 為裂解後標的蛋白之分子量，相當於 PGAAHY-HM-AF(24329) + H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>+</sup>(98) + F(19)。

圖 9-18，在 linker=(EAAAK)<sub>4</sub> 時，分子量 20527 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>4</sub>；20057 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>3</sub>；19587 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>2</sub>；19117 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>1</sub>，而 24429 Da 為裂解後標的蛋白之分子量，相當於 PGAAHY-HM-AF(24329)+H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>+</sup>(98)+F。

圖 9-19，在 linker=(EAAAK)<sub>3</sub> 時，分子量 20057 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>3</sub>；19587 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>2</sub>；19117 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>1</sub>，而 24428 Da 為裂解後標的蛋白之分子量，相當於 PGAAHY-HM-AF(24329)+H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>+</sup>(98)。

圖 9-20，在 linker=(EAAAK)<sub>2</sub> 時，分子量 19587 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>2</sub>；19117 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>1</sub>，而 24430 Da 為裂解後標的蛋白之分子量，相當於 PGAAHY-HM-AF(24329)+H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>+</sup>(98)。

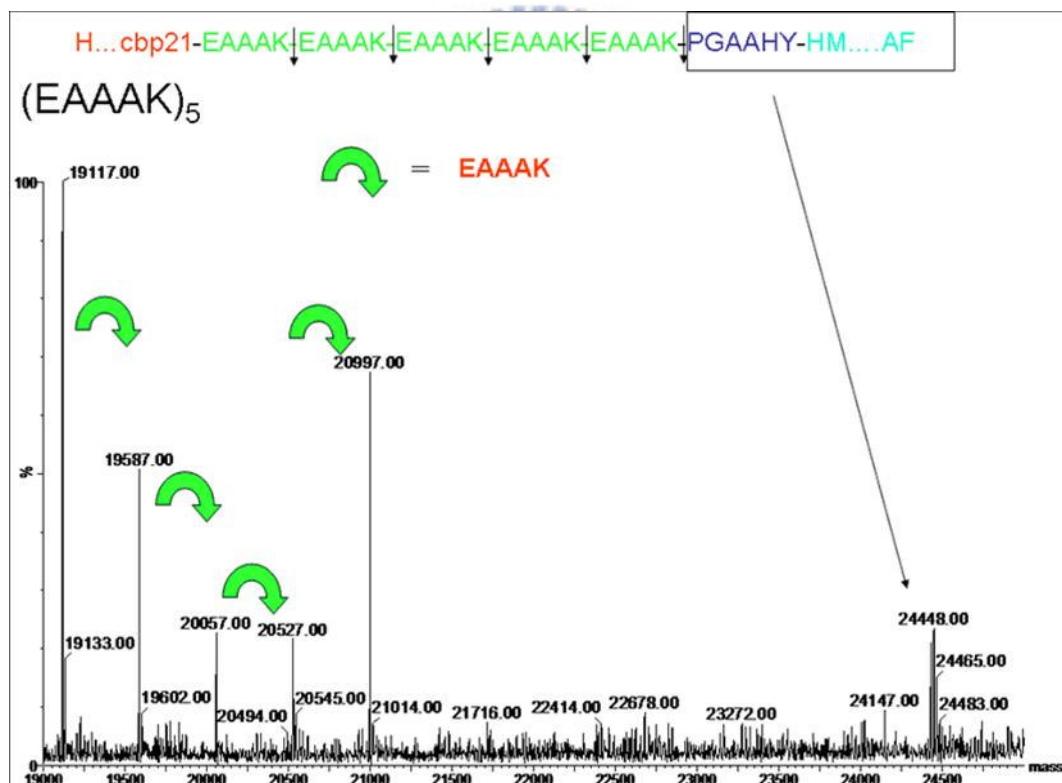


圖 9-17 Linker=(EAAAK)<sub>5</sub> 時，裂解後 mass 分析圖。

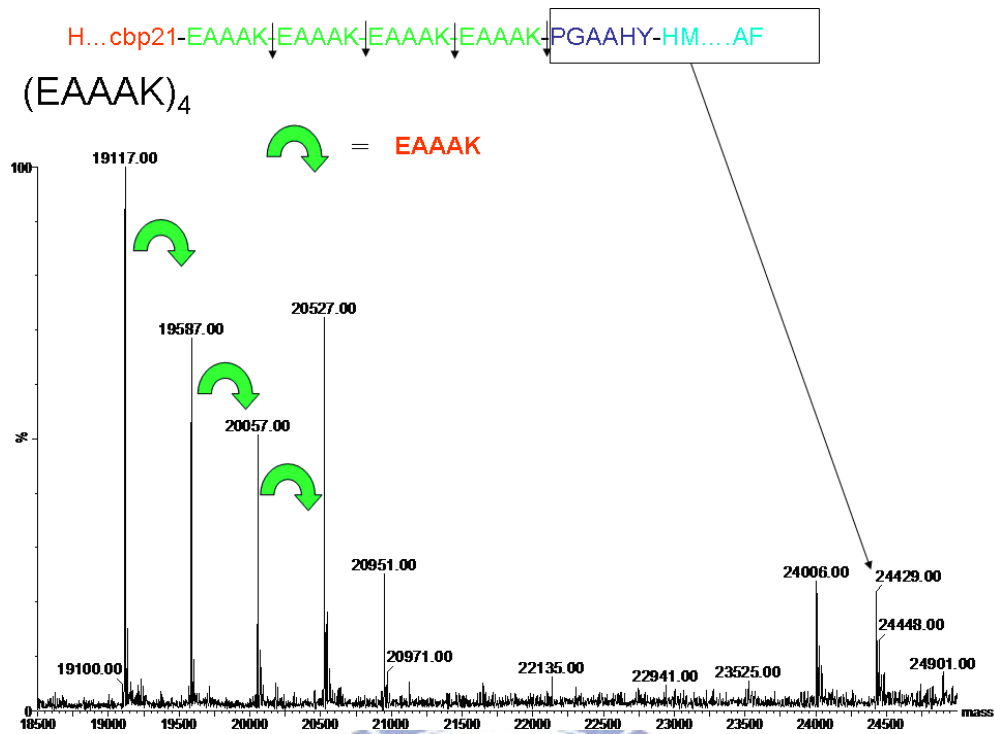


圖 9-18 Linker=(EAAAK)<sub>4</sub> 時，裂解後 mass 分析圖。

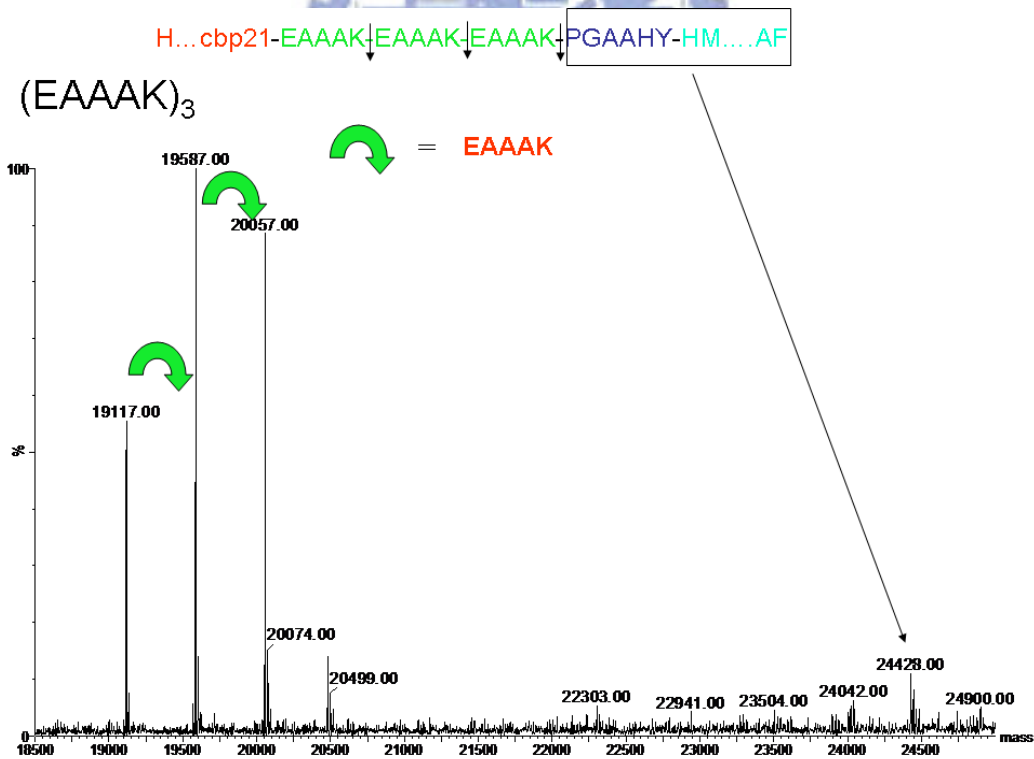


圖 9-19 Linker=(EAAAK)<sub>3</sub> 時，裂解後 mass 分析圖。

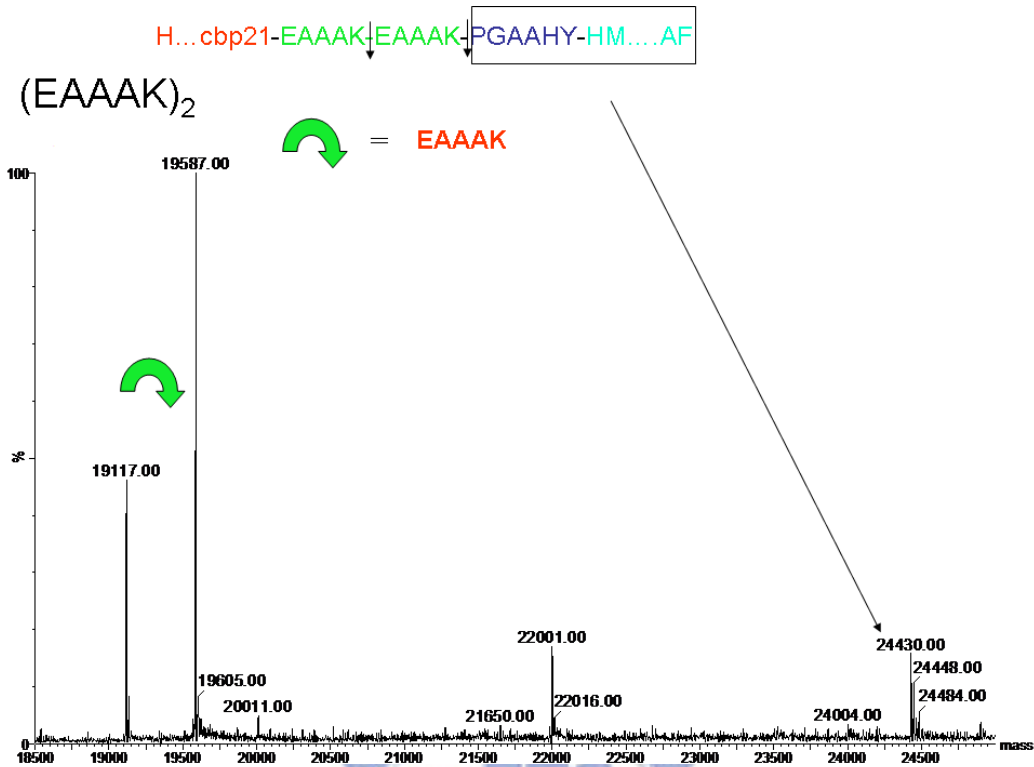


圖 9-20 Linker=(EAAAK)<sub>2</sub> 時，裂解後 mass 分析圖。

在 V5-AF(de-genenase cutting site)，我們將 genenase protease cutting site 刪除，以質譜儀分析 linker 裂解和標的蛋白斷裂位置。由 mass 圖 9-21 分析得知，20997 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>5</sub>；20527 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>4</sub>；20057 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>3</sub>；19587 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>2</sub>；19117 Da=CBP21+(EAAAK)<sub>1</sub>，而 23834 Da 為裂解後標的蛋白之分子量，相當於 HM-AF(23732)+H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>+</sup>(98)。所以在已建構的 CBP21 融合蛋白質載體 (Vector 5)，可以將 genenase protease cutting site 刪除，因為 linker 具有自動裂解的作用，故不需額外的 protease cutting site。

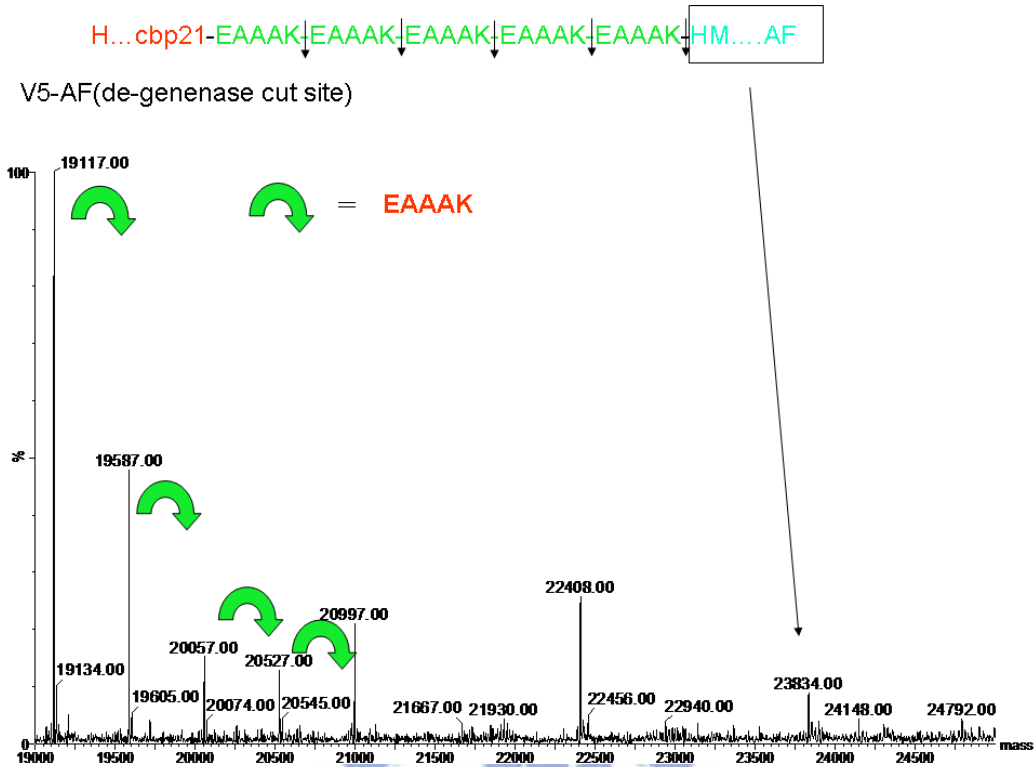


圖 9-21 V5-AF(de-genenase cutting site)裂解後 mass 分析圖。

在 V5-AF(de-CBP21 gene)，我們將 CBP21 蛋白質刪除，以質譜儀分析 linker 裂解和標的蛋白斷裂位置。由 9-22 mass 圖分析得知，26896 Da 為未裂解之完整蛋白質分子量；24091 Da = (EAAAK)<sub>1</sub> + 標的蛋白；而 24431 Da 為裂解後標的蛋白之分子量，相當於 PGAAHY-HM-AF(23732)+H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>+</sup>(98)。所以 CBP21 蛋白質的存在並不影響 linker 的自動裂解。

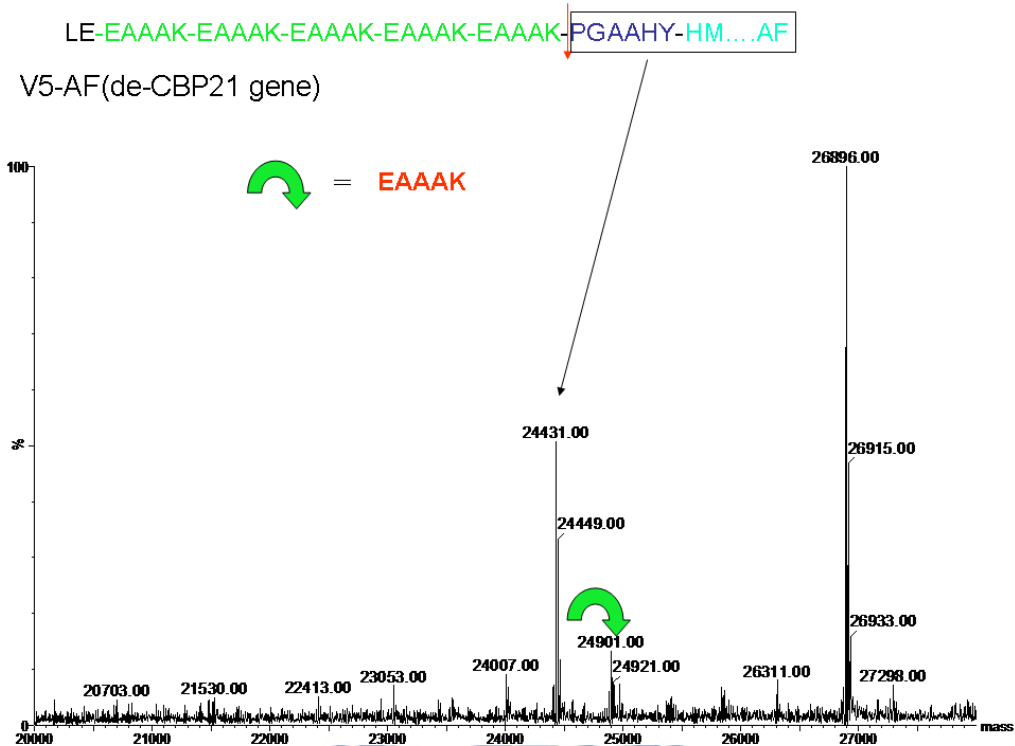


圖 9-22 V5-AF(de-CBP21 gene)裂解後 mass 分析圖。

我們由 mass 的分析可以歸納出兩個結論，其一：linker 的裂解是以(EAAAK)為單體一個一個的斷裂，其最起始之斷裂處位於(EAAAK)與 PGAAHY 之鍵結處；其二：標的蛋白在 100 mM Pi buffer、300mM NaCl、pH 7.0 在 16°C 反應條件下，其裂解點有一定之專一性。

## 9-11、CBP21 純化平台流程

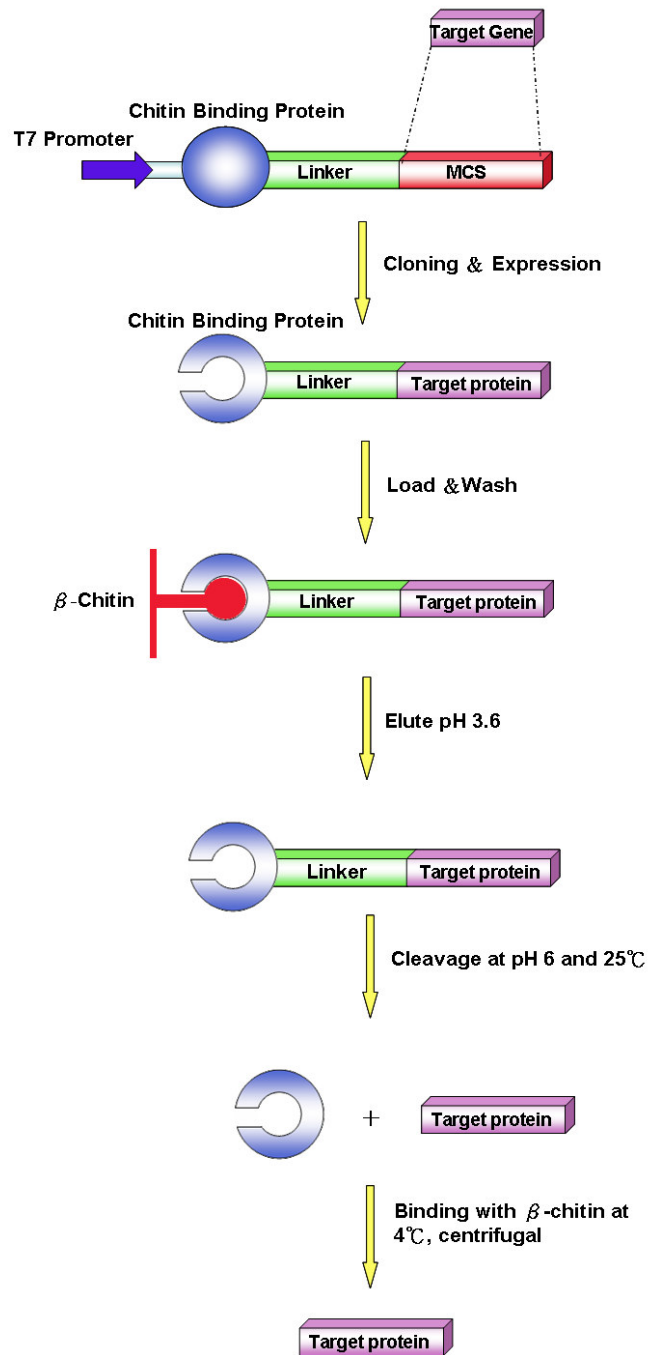


圖 9-23 CBP21 純化平台之流程圖。

圖 9-23 為 CBP21 純化平台之流程圖，首先將 target gene 以適當之切位接合到 vector 5 上，再轉型到 *E. coli*. 中進行表現並以 pH 8 以上的 buffer 保存融合蛋白粗提液，接著在得到的融合蛋白粗提液中加入 binding buffer，接著將融合蛋白粗提液置與  $\beta$ -chitin 混合於 4°C overnight，使融合蛋白 binding 到  $\beta$ -chitin 上，之後將  $\beta$ -chitin 倒入 column packing。Packing 後，以 10 倍體積的 binding buffer 沖洗  $\beta$ -chitin，再以 pH 3.6 之 HOAc 緩衝溶液洗下融合蛋白。將融合蛋白置於 pH 6 及 25°C 下，使 linker 水解以分離幾丁質結合蛋白(CBP)與標的蛋白(target protein)。再以  $\beta$ -chitin 與分解後的幾丁質結合蛋白(CBP)和標的蛋白(target protein)作用，以去除幾丁質結合蛋白(CBP)。即可獲得純的標的蛋白(target protein)。

我們以 *S. matensis* LPHase 及 *A. fumigatus* Y2K chitosanase 進行測試。由粗提液經  $\beta$ -chitin 純化，再經過 linker 之自動裂解，最後以  $\beta$ -chitin 吸附幾丁質結合蛋白(CBP)，獲得純的標的蛋白(target protein)。結果如蛋白質電泳圖 9-24 所示，經由整個純化過程，最後我們可以獲得很純的標的蛋白(target protein)。

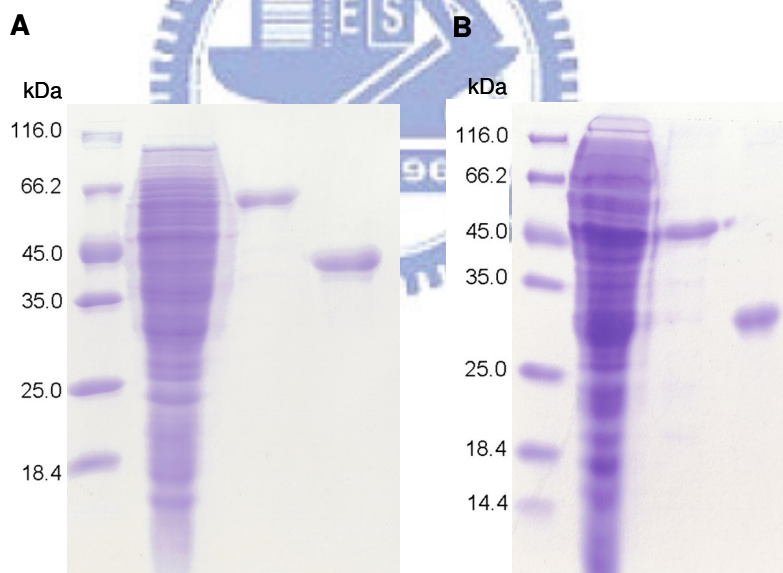


圖 9-24 CBP21 純化平台純化過程之蛋白質電泳圖。(A) *S. matensis* LPHase。Lane 1：protein marker；Lane 2：crude enzyme；Lane 3：經  $\beta$ -chitin 純化後之 CBP-LPH 融合蛋白；Lane 4：CBP-LPH 融合蛋白之 linker 自動裂解後，以  $\beta$ -chitin 吸附幾丁質結合蛋白(CBP)後，所獲得的標的蛋白(target protein)。(B) *A. fumigatus* Y2K chitosanase。Lane 1：protein marker；Lane 2：crude enzyme；Lane 3：經  $\beta$ -chitin 純化後之 CBP-AF 融合蛋白；Lane 4：CBP-AF 融合蛋白之 linker 自動裂解後，以  $\beta$ -chitin 吸附幾丁質結合蛋白(CBP)後，所獲得的標的蛋白(target protein)。



## 第十章 結論

1. 我們利用 *S.m. ChiA* 酵素在 20mM NaOAc (pH 5.5), 37°C 下反應 10 天, 經過濃縮以及乙醇萃取等步驟, 成功製備出 100 克級的 N-乙醯幾丁二醣, 產率約 80%。
2. 以 DNA shuffling 的方式將 *S.m. ChiA* 基因進行隨機突變, 我們從 10000 個菌落中獲得 500 個具有 chitinase 活性的菌落, 經水解產物分析後, 其產物均為 N-乙醯幾丁二醣。
3. 藉由分子模擬的方法, 我們嘗試去設計將 exo-type *S.m. ChiA* 酵素轉變成 endo-type 酵素, 經實驗證實並未如設計般將 exo-type 轉變成 endo-type 酵素。但卻能將 chitin 水解成 N-乙醯幾丁二醣, 再將 N-乙醯幾丁二醣水解成 N-乙醯幾丁一醣。
4. 我們也利用模擬後的酵素在 20 mM、pH 7.0 的 phosphate 37°C 下反應 14 天, 經過濃縮以及 70% 甲醇萃取等步驟, 成功製備出 50 克級的 N-乙醯幾丁一醣, 產率可達 80%。
5. Chitin binding protein(CBP21)是被選殖出來幫助增加幾丁質水解酵素的水解速率, 選自 *S. marcescens* 的 CBP21 基因片段已成功建構於 pRSET\_A 中, 並將此重組酵素誘導表現, 純化後經質譜分析證實所得為成熟蛋白質, 分子量為 18,785 Da 相當於 170 個胺基酸。在 CBP21 為 1 $\mu$ M 的條件下, 可增加 20%的水解速率。
6. CBP21 於 pH 8.0 時, 可結合在幾丁質上, 且經多次緩衝溶液的沖洗後, 能去除未與幾丁質結合的蛋白質, 再以較低 pH 值之緩衝溶液作用即能使 CBP21 與幾丁質分離, 而達到純化之目的。可見 CBP21 與幾丁質結合受到 pH 值的調控。
7. 自製之 30-50 mesh 幾丁質每 300 mg 約可結合 0.1mg 的 CBP21 蛋白質, 且同一幾丁質可多次 (至少 6 次) 重覆使用, 仍能結合等量之 CBP21 蛋白質。此自製的幾丁質親和性材質可以有效的降底實驗成本, 價格遠比市售之各種親和性材質便宜。
8. 已成功建構 CBP21 融合蛋白質載體 (Vector 5), 並完成 *A. fumigatus* Y2K chitosanase、*B. cereus* NCTU2 chitinase 及 *S. matensis* LPH  $\beta$ -1,3-glucanase 等 3 種不同醣類水解酵素之

純化。

9. 本研究開發利用 CBP21 之融合蛋白以達簡單、快速純化蛋白質之系統，極具應用價值，其純度可達 90 % 以上之均質度。
10. 實驗設計之 linker (EAAAK)<sub>n=2-5</sub> 經實驗證實，在 pH 6-7 下可自動裂解，使攜帶蛋白與標的蛋白予以分離，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。
11. 利用自製的幾丁質親和性材質和成功建構的 CBP21 融合蛋白質載體 (Vector 5) 我們建立了一套快速簡便、低成本的蛋白質表現與純化系統。
12. 最初之野生株與突變株幾丁質酵素之長晶條件為 Sodium cacodylate (100 mM)，Polyethene glycerol 8000 (22 %, w/v)及 Zinc acetate dehydrate (50 mM)。野生株幾丁質酵素之結構在自然界中為一元體，但在無 Zinc acetate dehydrate 之長晶條件中的晶體堆疊 (crystal packing)為二元體，而突變株 E145Q 幾丁質酵素之晶體堆疊為四元體。此為第一個解出的 *Bacillus cereus* chitinase 蛋白質結構。
13. 根據胺基酸序列的比對以及在催化活性區內與鋅原子鍵結的胺基酸殘基，我們推測其 essential group 可能為 E145、E190、Q225 及 Y227。利用定點突變與酵素動力學的分析，我們證實 essential group 為 E145。
14. 成功的結晶出 E145Q+(NAG)<sub>2</sub>、E145Q/Y227F+(NAG)<sub>2</sub> 和 E145G/Y227F+(NAG)<sub>4</sub> 之 cocrystal，從 cocrystal 中我們發現：a. 在 E145Q+(NAG)<sub>2</sub> 中，-1 之醣基構形為 chair form。而在 E145Q/Y227F+(NAG)<sub>2</sub> 和 E145G/Y227F+(NAG)<sub>4</sub> 中，-1 之醣殘基構形為 boat form；b. 在 E145Q/Y227F+(NAG)<sub>2</sub> 和 E145G/Y227F+(NAG)<sub>4</sub> 兩個 cocrystal 中我們發現 D143、E145、E190 和 Y193 等殘基同時存在雙重構形；c. 利用 dynamic loop 的移動來幫助 binding 受質，在目前已有的 PDB 結構中，只有 ChiNCTU2 屬於此類。
15. 從 cocrystal 發現，E145 利用雙重構形攜帶一個水分子進入活化位置，進行水解反應。此現象不同於 *S.m.* ChiA 利用 Y390 攜帶一個水分子進入活化位置參與反應，我們推測

ChiNCTU2 與 *S.m.* ChiA 應該有不同的反應機制。

16. 根據 cocrystal 獲得的資訊，我們推測出 ChiNCTU2 之反應機制。其中 E145 為 family 18 chitinases 中高度保留的 essential group，而反應的機制取決於其他輔助水解反應的胺基酸殘基。



## 第十一章 參考資料

- 1、 Shahidi, F., Arachchi, J., Kamil, V., and Jeon, Y. (1999) *Trends in Food Science and Technology*, **10**, 37-51
- 2、 坂井和男 (1989) *New Food Industry*, **31**, 17-28
- 3、 Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S., and Suzuki, M. (1986) *Carbohydr Res.* **151**, 403-408
- 4、 Barker, S. A., Foster, A. B., Stacey, M., and Webber, J. M. (1984) *J Chem Soc.* **103**, 2218-2227
- 5、 Sophie, D., Sylvie A., Gideon, J. D., Constantin, V., and Bernard, H. (1997) *Biochem J.* **328**, 945-949
- 6、 Kramer, K. J., Dziadik-Turner, C., and Koga, D. (1985) *Pergamon Press: Oxford*, 75-115
- 7、 Mabuchi, N., and Araki, Y. (2001) *Can J Microbiol.* **47**, 895-902
- 8、 Ikegami, T., Okada, T., Hashimoto, M., Seino, S., Watanabe, T., and Shirakawa, M. (2000) *J Biol Chem.* **275**, 13654-13661
- 9、 Wiwat, C., Siwayaprahm, P., and Bhumiratana, A. (1999) *Curr Microbiol.* **39**, 134-140
- 10、 Papanikolau, Y., Prag, G., Tavlas, G., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B., and Petratos, K. (2001) *Biochemistry*, **40**, 11338-11343
- 11、 Howard, M. B., Ekborg, N. A., Weiner, R. M., and Hutcheson, S. W. (2003) *J Ind Microbiol Biotechnol.* **30**, 627-635
- 12、 Wang, S. Y., Wu, S. J., Thottappilly, G., Locy, R. D., and Singh, N. K. (2001) *J Biosci Bioeng.* **92**, 59-66

- 13、溫智民，「仙人掌桿菌中幾丁質酵素的選殖與表現之研究」，國立交通大學應用化學研究所，碩士論文，2002
- 14、Flach, J., Pilet, P. E., and Jolles, P. (1992) *Experientia*. **48**, 701-716
- 15、Vaaje-Kolstad, G., Vasella, A., Peter, M. G., Netter, C., Houston, D. R., Westereng, B., Synstad, B., Eijsink, V. G. H., and Van Aalten, D. M. F. (2004) *J Biol Chem*. **279**, 3612-3619
- 16、Brameld, K. A., and Goddard III, W. A. (1998) *J Am Chem Soc*. **120**, 3571-3580
- 17、Synstad, B., Gåseidnes, S., Van Aalten, D. M. F., Vriend, G., Nielsen, J. E. and Eijsink, V. G. H. (2004) *Eur J Biochem*. **271**, 253-262
- 18、Hollis, T., Monzingo, A., F., Bortone, K., Ernst, S., Cox R., and Robertus, J. D. (2000) *Protein Sci*. **9**, 544-551
- 19、Tews, I., Van Scheltinga, A. C. T., Perrakis, A., Wilson, K. S., and Dijkstra, B.W. (1997) *J Am Chem Soc*. **119**, 7954-7959
- 20、Van Aalten, D. M., Komander, D., Synstad, B., Gåseidnes, S. Peter, M. G., and Eijsink, V. G. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 8979-8984
- 21、Li, Y. K., Chir, J., Tanaka, S., and Chen, F. Y. (2002) *Biochemistry*, **41**, 2751-2759
- 22、Dahiya, N., Tewari, R., and Hoondal, G. S. (2005) *Appl Microbiol Biotechnol*. **71**, 773-782
- 23、Van Scheltinga, A. C., Armand, S., Kalk, K. H., Isogai, A., Henrissat, B., and Dijkstra, B. W. (1995) *Biochemistry*, **34**, 15619-15623
- 24、Lai, E. C., and Withers, S. G. (1994) *Biochemistry*, **33**, 14743-14749
- 25、Honda, Y., Kitaoka, M., and Hayashi, K. (2004) *FEBS lett*. **567**, 307-310
- 26、Kobayashi, S., Kiyosada, T., and Shoda, S. (1996) *J Am Chem Soc*. **118**, 13113-13114

- 27、 Fujita, M., Shoda, S., Haneda, K., Inazu, T., Takegawa, K., and Yamamoto, K. (2001) *Biochim Biophys Acta.* **1528**, 9-14
- 28、 Fukamizo, T., Sasaki, C., Schelp, E., Bortone, K., and Robertus, J. D. (2001) *Biochemistry*, **40**, 2248-2454
- 29、 郭爵源，野生株與突變株仙人掌桿菌幾丁質酵素之結構與功能研究，國立清華大學生物資訊與結構生物研究所，2006
- 30、 Kolstad, G., Synstad, B., Eijsink, V. G., and Van Aalten, D. M. (2002) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **58**, 377-379
- 31、 Van Aalten, D. M., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G., and Wierenga, R. K. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 5842-5847
- 32、 Rao, F. V., Houston, D. R., Boot, R. G., Aerts, J. M., Sakuda, S., and Van Aalten, D. M. (2003) *Biol Chem.* **278**, 20110-20116.
- 33、 Hollis, T., Monzingo, A. F., Bortone, K., Schelp, E., Cox, R., and Robertus, J. D. (1998) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **54**, 1412-1413
- 34、 Hollis, T., Monzingo, A. F., Bortone, K., Ernst, S., Cox, R., and Robertus, J. D. (2000) *Protein Sci.* **9**, 544-551
- 35、 Ikegami, T., Okada, T., Hashimoto, M., Seino, S., Watanabe, T., and Shirakawa, M. (2000) *J Biol Chem.* **275**, 13654-13661
- 36、 Jaques, A. K., Fukamizo, T., Hall, D., Barton, R. C., Escott, G. M., Parkinson, T., Hitchcock, C. A., and Adams, D. J. (2003) *Microbiology*, **149**, 2931-2939
- 37、 Songsiriritthigul, C., Pantoom, S., Aguda, A. H., Robinson, R. C., Suginta, W. (2008) *J Struct Biol.* **162**, 491-499
- 38、 Lonhienne, T., Mavromatis, K., Vorgias, C. E., and Bouriotis, V. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 1773-1779

- 39 ․ Terwisscha van Scheltinga, A. C., Kalk, K. H., Beintema, J. J., and Dijkstra, B. W. (1994) *Structure*, **2**, 1181–1189
- 40 ․ Terwisscha van Scheltinga, A. C., Hennig, M., and Dijkstra, B. W. (1996) *J Mol Biol.* **262**, 243-257
- 41 ․ Hurtado-Guerrero, R., and van Aalten, D. M.(2007) *Chem Biol.* **14**, 589-599
- 42 ․ Correa, J. U., Elango, N., Polacheck, I., and Cabib, E. (1982) *J Biol Chem.* **257**, 1392–1397
- 43 ․ Cavada, B. S., Moreno, F. B., Castellón, R. E., Goersch, G. V., Nagano, C. S., Nascimento, K. S., Delatorre, P., Debray, H., Calvete, J. J., and Sanz, L. (2006) *FEBS J.* **273**, 3962-3974
- 44 ․ Xia, G., Jin, C., Zhou, J., Yang, S., Zhang, S., and Jin, C. (2001) *Eur J Biochem.* **268**, 4079-4085
- 45 ․ Hu, H., Wang, G., Yang, H., Zhou, J., Mo, L., Yang, K., Jin, C., Jin, C., and Rao, Z. (2004) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **60**, 939-940
- 46 ․ Mine, S., Nakamura, T., Hirata, K., Ishikawa, K., Hagihara, Y., and Uegaki, K. (2006) *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **62**, 791-793.
- 47 ․ Gao, J., Bauer M. W., Shockley, K. R., Pysz, M. A., and Kelly, R. M. (2003) *Appl Environ Microbiol.* **69**, 3119-3128.
- 48 ․ Synstad, B., Gåseidnes, S., and Eijsink, V. G. (2004) *Eur J Biochem.* **271**, 253-262
- 49 ․ Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z. Oppenheim A., Chet, I., Wilson, K., and Vorgina, C. (1994) *Structure*, **2**, 1169-1180
- 50 ․ Reid, J. D., and Oqrydziak, D. M. (1981) *Appl Environ Microbiol.* 664-669
- 51 ․ Roberts, R. L., and Cabib, E. (1982) *Anal Biochem.* **127**, 402-412
- 52 ․ Stemmer, W. P. (1995) *Biol Technology*, **13**, 549-553

- 53 ‧ Forrest, S. (1993) *Science*, **261**, 872-878
- 54 ‧ Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A., and Arnold, F. H. (1998) *Nat Biotechnol.* **16**, 258-261
- 55 ‧ Stemmer, W. P. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 10747-10751
- 56 ‧ Zhao, H., and Arnold, F. H. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 1307-1308
- 57 ‧ Stemmer, W. P. (1994) *Nature*, **370**, 389-391
- 58 ‧ Leung, D. W., Chen, E., and Goeddel, D. V. (1989) *Technique*, **1**, 11-15
- 59 ‧ Caldwell, R. C., and Joyce, G. F. (1992) *PCR Methods Applic.* **2**, 28-33
- 60 ‧ Zhao, H., and Arnold, F. H. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 1307-1308
- 61 ‧ Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E., and Stemmer, W. P. (1996) *Nat Biotechnol.* **14**, 315-319
- 62 ‧ Fan, Y., Fang, W., and Xiao, Y. (2007) *Appl Microbiol Biotechnol.* **76**, 135-139
- 63 ‧ Zhang, J. H., Dawes, G., and Stemmer, W. P. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 4504-4509
- 64 ‧ Xiong, A. S., Qiao, Y. S., and Zhang Z. (2007) *J Biochem Mol Biol.* **40**, 419-425
- 65 ‧ Xiong, A. S., Peng, R. H., and Gao, F. (2007) *Protein Eng Des Sel.* **20**, 319-325
- 66 ‧ Minagawa, H., Yoshida, Y. (2007) *Cell Mol Life Sci.* **64**, 77-81
- 67 ‧ Cramer, A., Dawes, G., Rodriguez, E., Jr., Silver, S., and Stemmer, W. P. (1997) *Nat Biotechnol.* **15**, 436-438
- 68 ‧ Cramer, A., Raillard, S. A., Bermudez, E., and Stemmer, W. P. (1998) *Nature*, **391**,



288-291

- 69、 Wallner, M., Stöcklinger, A., and Mari, A. (2007) *J Allergy Clin Immunol.* **120**, 374-380
- 70、 Locher, C. P., Paidhungat, M., Whalen, R. G., and Punnonen, J. (2005) *DNA Cell Biol.* **24**, 256-263
- 71、 Schmidt-Dannert, C., and Arnold, F. H. (1999) *Trends Biotechnol.* **17**, 135-136
- 72、 Patten, P. A., Howard, R. J., and Stemmer, W. P. (1997) *Curr Opin Biotechnol.* **8**, 724-733
- 73、 Karagüler, N. G., Sessions, R. B., and Clarke, A. R. (2007) *Biochem Soc Trans.* **35**, 1610-1615
- 74、 Moore, G. L., and Maranas, C. D. (2000) *J Theor Biol.* **205**, 483-503
- 75、 陳盈州，「以 DNA shuffling 的方法研究創傷弧菌核酸分解酵素」國立中山大學生物科學系研究所，碩士論文，2000
- 76、 吳岳進，「基因改造黏質沙雷氏桿菌幾丁質酵素之特性」，國立交通大學應用化學研究所，碩士論文，2002
- 77、 田蔚城主編，生物技術，九州圖書文物有限公司，1996
- 78、 Shih, Y. P., Kung, W. M., Chen, J. C., Yeh, C. H., Wang, A. H., and Wang T. F. (2002) *Protein Sci.* **11**, 1714-1719
- 79、 陳志浩，「無孔性苯乙烯-甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯環氧丙酯共聚顆粒之製備及其生物分子的親和層析之應用」，國立中正大學化學工程研究所，博士論文，2002
- 80、 Hashimoto, M., Ikegami, T., Seino, S., Ohuchi, N., Fukada, H., Sugiyama, J., Shirakawa, M., and Watanabe, T. (2000) *J Bact.* **182**, 3045-3054
- 81、 Suetake, T., Tsuda, S., Kawabata, S., Miura, K., Iwanaga, S., Hikichi, K., Nitta, K., and

- Kawano, K. (2000) *J Biol Chem.* **275**, 17929–17932
- 82、Svergun, D. I., Becirevic, A., Schrempf, H., Koch, M. H., and Gruber, G. (2000) *Biochemistry*, **39**, 10677–10683
- 83、Kolbe, S., Fischer, S., Becirevic, A., Hinz, P., and Schrempf, H. (1998) *Microbiology*, **144**, 1291–1297
- 84、Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Nikaidou, N., and Watanabe, T. (1998) *Biosci Biotechnol Biochem.* **62**, 128-135
- 85、Vaaje-Kolstad, G., Houston, D. R., Riemen, A. H., Eijsink, V. G., and van Aalten, D. M. (2005). *J Biol Chem.* **280**, 11313-11319
- 86、Watanabe, T., Ariga, Y., Sato, U., Toratani, T., and Sugiyama, J.. (2003) *Biochem J.* **376**, 237–244
- 87、張筑涵，「突變研究與探討煙麴菌幾丁聚醣酵素之催化必要殘基」，國立交通大學應用化學研究所，碩士論文，2005
- 88、蔡蕙如，「仙人掌桿菌幾丁質酵素的過量表現與催化反應機制的探討」，國立交通大學應用化學研究所，碩士論文，2003
- 89、Messing, R. A. (1975) Academic Press, New York, 1–10
- 90、賴慶亮，「用幾丁質為擔體之葡萄糖異構化酵素之固定化」，科學發展月刊，第七卷第九期, 1979, 921-929
- 91、Catherine Charcosset, (1998) *J Chem Technol Biotechnol.* **71**, 95-110
- 92、Kezuka, Y., Ohishi, M., Itoh, Y., and Nonaka, T. (2006) *J Mol Biol.* **358**, 472-484
- 93、Arai, R., Ueda, H., Kitayama, A., Kamiya, N., and Nagamune, T. (2001) *Protein Eng.* **14**, 529-532

94 、 Wriggers, W., Chakravarty, S., and Jennings, P. A. (2005) *Biopolymers*, **80**, 736-746



## 副錄一：DNA shuffling 菌落之 DNA 定序與胺基酸序列比較

### DNA 定序：

```
dna_shuffling -----ATGCGCA
SM -----ATGCGCA

dna_shuffling AATTTAATAAACCGCTGTTGGCGCTGTTGATCGGCAGCACGCTGTGTTCCGCGGCGCAGG
SM          AATTTAATAAACCGCTGTTGGCGCTGTTGATCGGCAGCACGCTGTGTTCCGCGGCGCAGG

dna_shuffling CCGCCGCGCCGGCAAGCCGACCATCGCCTGGGGATCCACCAAGTTCGCCATCGTTGAAG
SM          CCGCCGCGCCGGCAAGCCGACCATCGCCTGGGGACACCAAGTTCGCCATCGTTGAAG

dna_shuffling TTGACCAGGCGGCTACCGCTTATAATAATTTGGTGAAGGTAAAAATGCCGCCGATGTTT
SM          TTGACCAGGCGGCTACCGCTTATAATAATTTGGTGAAGGTAAAAATGCCGCCGATGTTT

dna_shuffling CCGTCTCCTGGAATTTATGGAATGGCGACGCGGGCACGACGCCAAGATTTTATTAAATG
SM          CCGTCTCCTGGAATTTATGGAATGGCGACGCGGGCACGACGCCAAGATTTTATTAAATG

dna_shuffling GTAAAGAGGCGTGGAGTGGTCCCTCAACCGGATCTTCCGGTACGGCGAATTTTAAAGTGA
SM          GTAAAGAGGCGTGGAGTGGTCCCTCAACCGGATCTTCCGGTACGGCGAATTTTAAAGTGA

dna_shuffling ATAAAGGCGCCGTTATCAAATGCAGGTGGCATTGTGCAATGCCGACGGCTGCACCGCCA
SM          ATAAAGGCGCCGTTATCAAATGCAGGTGGCATTGTGCAATGCCGACGGCTGCACCGCCA

dna_shuffling GTGACGCCACCGAAATTTGGTGGCCGACACCGACGGCAGCCATTTGCCGCCGTTGAAAG
SM          GTGACGCCACCGAAATTTGGTGGCCGACACCGACGGCAGCCATTTGCCGCCGTTGAAAG

dna_shuffling AGCCGCTGCGGAAAAGAATAAACCGTATAAACAGAACTCCGGCAAAGTGGTCGGTTCTT
SM          AGCCGCTGCTGAAAAGAATAAACCGTATAAACAGAACTCCGGCAAAGTGGTCGGTTCTT
```

dna\_shuffling ATTTTCGTCGAGTGGGGCGTTTACGGGGCGCAATTTACCGTCGACAAGATCCCGGCGCAA  
 SM ATTTTCGTCGAGTGGGGCGTTTACGGGGCGCAATTTACCGTCGACAAGATCCCGGCGCAA  
 dna\_shuffling AACCTGACCCACCTGCTGTACGGCTTTATCCCGATCTGCGGCGGCAATGGCATCAAACGAC  
 SM AACCTGACCCACCTGCTGTACGGCTTTATCCCGATCTGCGGCGGCAATGGCATCAAACGAC  
 dna\_shuffling AGCCTGAAAGAGATTGAAGGCAGCTTCCAGGCGTTGCAGCGCTCCTGCCAAGGCCGCGAG  
 SM AGCCTGAAAGAGATTGAAGGCAGCTTCCAGGCGTTGCAGCGCTCCTGCCAAGGCCGCGAG  
 dna\_shuffling GACTTCAAAATCTCGATCCACGATCCGTTTCGCCGCGCTGCAAAAGGCGCAGAAGGGCGTG  
 SM GACTTCAAAATCTCGATCCACGATCCGTTTCGCCGCGCTGCAAAAGGCGCAGAAGGGCGTG  
 dna\_shuffling ACCGCCTGGGATGACCCCTACAAGGGCAACTTCGGCCAGCTGATGGCGCTGAAGCAGGCG  
 SM ACCGCCTGGGATGACCCCTACAAGGGCAACTTCGGCCAGCTGATGGCGCTGAAGCAGGCG  
 dna\_shuffling CATCTGACCTGAAAATCCTACCATCGATCGGCGGCTGGACGCTGTCCGACCCATTCTTC  
 SM CATCTGACCTGAAAATCCTGCCGTCGATCGGCGGCTGGACGCTGTCCGACCCGTTCTTC  
 dna\_shuffling TTCATGGGCGACAAGGTGAAGCGCGATCGCTTCGTTCGGTTCGGTGAAGAGTTCCTGCAG  
 SM TTCATGGGCGACAAGGTGAAGCGCGATCGCTTCGTTCGGTTCGGTGAAGAGTTCCTGCAG  
 dna\_shuffling ACTTGGAAGTTCTTCGACGGCGTGGATATCGACTGGGAGTTCCCGGGCGGCAAAGGGGCC  
 SM ACTTGGAAGTTCTTCGACGGCGTGGATATCGACTGGGAGTTCCCGGGCGGCAAAGGGGCC  
 dna\_shuffling AACCTAACCTGGGCAGCCCGCAAGACGGGAAACCTATGTGCTGCAAGATGAAGGAGCTG  
 SM AACCTAACCTGGGCAGCCCGCAAGACGGGAAACCTATGTGCTGCTGATGAAGGAGCTG  
 dna\_shuffling CGGGCGATGCTGGATCAGCTGTTCGGCGGAACCGGCCGCAAGTATGAGCTGACCTCCGCC  
 SM CGGGCGATGCTGGATCAGCTGTTCGGCGGAACCGGCCGCAAGTATGAGCTGACCTCCGCC  
 dna\_shuffling ATCAGCGCCGTAAGGACAAGATCGACAAGGTGGCTTACAACGTTGCGCAGAACTCGATG  
 SM ATCAGCGCCGTAAGGACAAGATCGACAAGGTGGCTTACAACGTTGCGCAGAACTCGATG



dna\_shuffling GATCACATCTTCCTGATGAGCTACGACTTCTATGACGCCTTCGATCTGAAGAACCTGGGG

SM GATCACATCTTCCTGATGAGCTACGACTTCTATGGCGCTTCGATCTGAAGAACCTGGGG

dna\_shuffling CATCAGACCGTGCTGAATGCGCCGGCCTGGAAGCCGGACACCGCTTACCCACGGTGAAC

SM CATCAGACCGCGCTGAATGCGCCGGCCTGGAAGCCGGACACCGCTTACCCACGGTGAAC

dna\_shuffling GCGGTGAATGCGCTGCTGGCGCAGGGCGTCAAGCCGGGCAAAATCGTCGTCGGCACCGCC

SM GCGGTGAATGCGCTGCTGGCGCAGGGCGTCAAGCCGGGCAAAATCGTCGTCGGCACCGCC

dna\_shuffling ATGTATGGCCGCGGCTGGACCGGGTGAACGGCTACCAGAACAAACATTCCGTTACCGGC

SM ATGTATGGCCGCGGCTGGACCGGGTGAACGGCTACCAGAACAAACATTCCGTTACCGGC

dna\_shuffling ACCGCCACCGGGCCGGTTAAAGGCACCTGGGAGAACGGCATCGTGACTACGCCAAATC

SM ACCGCCACCGGGCCGGTTAAAGGCACCTGGGAGAACGGCATCGTGACTACGCCAAATC

dna\_shuffling GCCAGCCAGTTCATGAGCGGCGAGTGGCAGTATACCTACGACGCCACGGCGGAGGCGCCT

SM GCCAGCCAGTTCATGAGCGGCGAGTGGCAGTATACCTACGACGCCACGGCGGAGGCGCCT

dna\_shuffling TATGTGTTCAAACCTTCCACCGCGATCTGATCACCTTCGACGATGCCCGCTCGTTGCAG

SM TACGTGTTCAAACCTTCCACCGCGATCTGATCACCTTCGACGATGCCCGCTCGTTGCAG

dna\_shuffling GCTAAAGGCAAGTACGTGCTGGATAAACAGCTGGGCGGCCTGTTCTCCTGGGAGATCGAC

SM GCTAAAGGCAAGTACGTGCTGGATAAACAGCTGGGCGGCCTGTTCTCCTGGGAGATCGAC

dna\_shuffling GCGGACTACGGCGATATTCTCAACAGCATGAACGACAGCCTGGGCAACAGCGCCGGCGTT

SM GCGGACAACGGCGATATTCTCAACAGCATGAACGCCAGCCTGGGCAACAGCGCCGGCGTT

dna\_shuffling CAATAA

SM CAATAA

## 氨基酸序列：

dna_shuffling SM	MRKFNKPLLALLIGSTLCSAAQAAAPGKPTIAWGSTKFA IVEVDQAATAYNNLVKVNAA MRKFNKPLLALLIGSTLCSAAQAAAPGKPTIAWGN TKFA IVEVDQAATAYNNLVKVNAA
dna_shuffling SM	DVSVSWNLWNGDAGTTAKILLNGKEAWSGPSTGSSGTANFKVKNKGGRYQMQUALCNADGC DVSVSWNLWNGDAGTTAKILLNGKEAWSGPSTGSSGTANFKVKNKGGRYQMQUALCNADGC
dna_shuffling SM	TASDATEIVVADTDGSHLPPLKEPLPEKNKPYKQNSGKVVGSYFVEWGVYGRNFTVDKIP TASDATEIVVADTDGSHLPPLKEPLLEKNKPYKQNSGKVVGSYFVEWGVYGRNFTVDKIP
dna_shuffling SM	AQNLTHLLYGFIPICGGNGINDSLKEIEGSFQALQRSCQGREDFKISIHDPFAALQKAQK AQNLTHLLYGFIPICGGNGINDSLKEIEGSFQALQRSCQGREDFKISIHDPFAALQKAQK
dna_shuffling SM	GVTAWDDPYKGNFQQLMALKQAHPDLKILPSIGGWTLSDPFFFMGDKVKRDRFVGSVKEF GVTAWDDPYKGNFQQLMALKQAHPDLKILPSIGGWTLSDPFFFMGDKVKRDRFVGSVKEF
dna_shuffling SM	LQTWKFFDGVDIDWEFPGGKANPNLGSPODGETYVLMKELRAMLDQLSAGTGRKYELT LQTWKFFDGVDIDWEFPGGKANPNLGSPODGETYVLLMKELRAMLDQLSAETGRKYELT
dna_shuffling SM	SAISAGKDKIDKVAYNVAQNSMDHIFLMSYDFYDAFDLKNLGHQTVLNAPAWKPDATYTT SAISAGKDKIDKVAYNVAQNSMDHIFLMSYDFYGAFDLKNLGHQTVLNAPAWKPDATYTT
dna_shuffling SM	VNGVNALLAQGVKPGKIVVGTAMYGRGWTGVNGYQNNIPFTGTATGPVKGTWENGIVDYR VNGVNALLAQGVKPGKIVVGTAMYGRGWTGVNGYQNNIPFTGTATGPVKGTWENGIVDYR
dna_shuffling SM	QIASQFMSEWQYTYDATAEAPYVFKPSTGDLITFDDARSLQAKGKYVLDKQLGGLFSWE QIASQFMSEWQYTYDATAEAPYVFKPSTGDLITFDDARSVQAKGKYVLDKQLGGLFSWE
dna_shuffling SM	IDADYGDILNSMNDSLGNSAGVQ IDADNGDILNSMNASLGNSAGVQ

## 附錄二：CBP21 定序結果

```
cbp21 - 1 TAGGACTCTCTAGATATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAACAAAACCTT
cbp21 -----ATGAACAAAACCTT

cbp21 - 1 CCCGTACCCTGCTCTCTCTGGGCCGTGCTGAGCGCGGCCATGTTTCGGCGTTTCGCAACAGG
cbp21 CCCGTACCCTGCTCTCTCTGGGCCGTGCTGAGCGCGGCCATGTTTCGGCGTTTCGCAACAGG

cbp21 - 1 CGAATGCTCACGGTTATGTGCAATCGCCGGCCAGCCGCGCCTATCAGTGCAAACCTGCAGC
cbp21 CGAATGCCACGGTTATGTGCAATCGCCGGCCAGCCGCGCCTATCAGTGCAAACCTGCAGC

cbp21 - 1 TCAACACGCAGTGCGGCAGCGTGCAGTACGAACCGCAGAGCGTCGAAGGCCTGAAAGGCT
cbp21 TCAACACGCAGTGCGGCAGCGTGCAGTACGAACCGCAGAGCGTCGAAGGCCTGAAAGGCT

cbp21 - 1 TCCCACAGGCCGGCCCGGCTGACGGCCAATCGCCAGCGCCGACAAGTCCACCTTCTTCG
cbp21 TCCCACAGGCCGGCCCGGCTGACGGCCAATCGCCAGCGCCGACAAGTCCACCTTCTTCG

cbp21 - 1 AACTGGATCAGCAAACGCCGACGCGTGAACAAGCTCAACCTGAAAACCGGCCGAACCT
cbp21 AACTGGATCAGCAAACGCCGACGCGTGAACAAGCTCAACCTGAAAACCGGTCGAACCT

cbp21 - 1 CCTTTACCTGGAAGCTGACCGCCGTCACAGCACCACCAGCTGGCGCTATTTTCATCACCA
cbp21 CCTTTACCTGGAAGCTGACCGCCGTCACAGCACCACCAGCTGGCGCTATTTTCATCACCA

cbp21 - 1 AGCCAAACTGGGACGCTTCGCAGCCGCTGACCCGCGCTTCCTTTGACCTGACGCCGTTCT
cbp21 AGCCGAACTGGGACGCTTCGCAGCCGCTGACCCGCGCTTCCTTTGACCTGACGCCGTTCT

cbp21 - 1 GCCAGTTCAACGACGGCGGCCATCCCTGCCGCACAGGTCACCCACCAGTGCAACATAC
cbp21 GCCAGTTCAACGACGGCGGCCATCCCTGCCGCACAGGTCACCCACCAGTGCAACATAC

cbp21 - 1 CGGCAGATCGCAGCGGTTTCGCACGTGATCCTTGCCGTGTGGGACATAGCCGACACCGCCA
cbp21 CGGCAGATCGCAGCGGTTTCGCACGTGATCCTTGCCGTGTGGGACATAGCCGACACCGCTTA

cbp21 - 1 ACGCCTTCTATCAGGCGATCGACGTCAACCTGAGCAAATAAGAGCTCGAGATCTGCAGCT
cbp21 ACGCCTTCTATCAGGCGATCGACGTCAACCTGAGCAAATA-----
```

cbp21-1 為 ncbi 上之基因(ACCESSION:AY665558), cbp21 為選殖之基因, 兩者間有 7 個 DNA 的差異, 但轉譯後的胺基酸序列是相同的。其前 27 個胺基酸為 signal peptide。



cbp21 - protein **NKTSRTLLSLGLLSAAMFGVSQQANA**HGYVESPASRAYQCKLQLNTQCGSVQYEPQSVE  
prset - cbp21 **MNKTSRTLLSLGLLSAAMFGVSQQANA**HGYVESPASRAYQCKLQLNTQCGSVQYEPQSVE

cbp21 - protein GLKGFPQAGPADGHIASADKSTFFELDQQTPTRWKLNKLTGPNSFTWKLTAHSTTSWR  
prset - cbp21 GLKGFPQAGPADGHIASADKSTFFELDQQTPTRWKLNKLTGPNSFTWKLTAHSTTSWR

cbp21 - protein YFITKPNWDASQPLTRASFDLTPFCQFNDGGAIPAAQVTHQCNI PADRSGSHVILAVWDI  
prset - cbp21 YFITKPNWDASQPLTRASFDLTPFCQFNDGGAIPAAQVTHQCNI PADRSGSHVILAVWDI

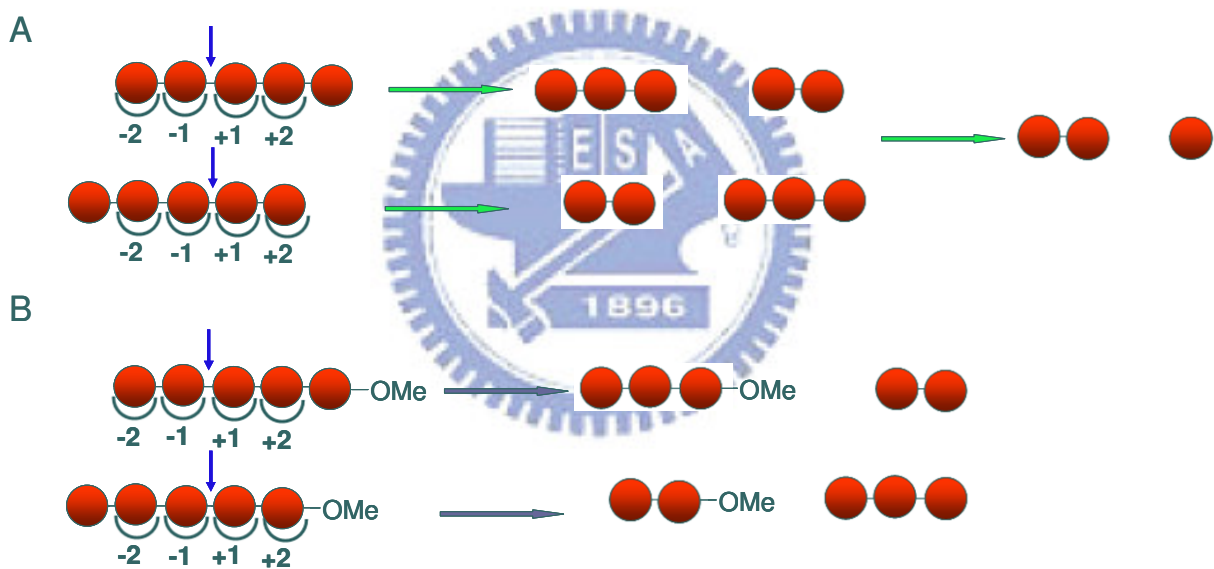
cbp21 - protein ADTANAFYQAIDVNLK  
prset - cbp21 ADTANAFYQAIDVNLK



## 未來工作

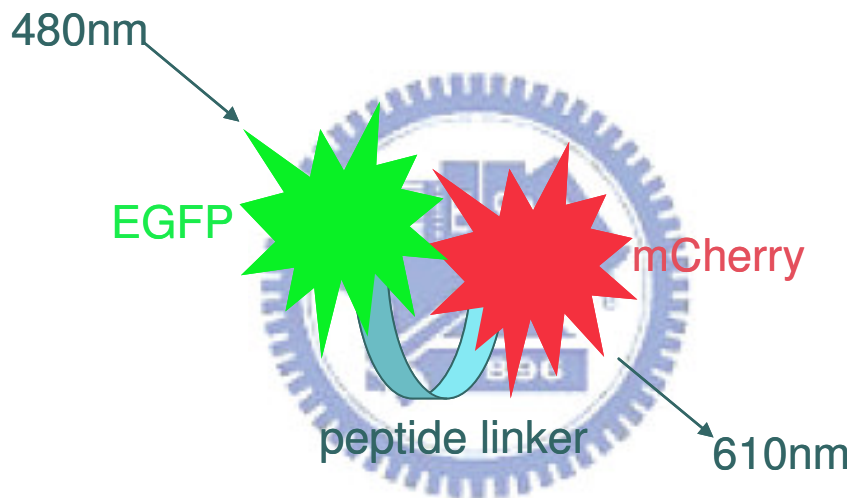
由於根據解出的蛋白質與醣之共結晶，不能判斷出-3 或+3 醣基的位置，因此須以其他方式加於證實，實驗設計如下：

(A)為推測之-3 或+3 醣基的位置，其經 ChiNCTU2 酵素水解將產生之產物為幾丁二醣和一醣，無法判斷-3 或+3 醣基的位置，因此將五醣 C1 之 OH 甲基化(B)，經 ChiNCTU2 酵素水解後，可利用 mass 分析產物判斷出-3 或+3 醣基的位置。



由於 peptide linker (EAAAK)<sub>5</sub> 之自動裂解機制尚不明朗，因此設計了 EGFP 和 mCherry 形成的融合蛋白，其目的為：

- 1、 篩選抑制 peptide linker 自動裂解的抑制劑。
- 2、 篩選不同 peptide linker，可在不同的 pH 值下自動裂解。
- 3、 研究自動裂解機制。



由於 CBP 必須在較低之 pH 值下才可以被流洗下來，如此將造成 target protein 失去活性，因此可以藉由改變 CBP 對 chitin 結合強度來避免。Asp182, His114, Glu60, Glu55 和 Tyr54 為 CBP 上經實驗證實與 chitin 結合相關的胺基酸，因此對其突變可調控 CBP 對 chitin 結合強度，使 CBP 可在較高的 pH 值下流洗下來。

- |          |            |
|----------|------------|
| ➤ Asp182 | ⊗ PKa:3.9  |
| ➤ His114 | ⊗ PKa:6.0  |
| ➤ Glu60  | ⊗ PKa:4.3  |
| ➤ Glu55  | ⊗ PKa:4.3  |
| ➤ Tyr54  | ⊗ PKa:10.1 |

