

在大腸桿菌表現系統表現 *Streptococcus zooepidemicus* HAS 蛋白質

研究生：鄭雅文

指導教授：楊昀良 博士

國立交通大學生化工程研究所 碩士班

摘要

透明質酸(hyaluronic acid)，又稱玻尿酸或醣醛酸，由葡糖醛酸-N-乙醯氨基葡糖為雙糖單位組成的直鏈高分子量之生物多醣，普遍存在於動物結締組織，常於組織中的細胞外間(extracellular matrix)結合而形成一具有支撐性及保護性的立體結構存在於細胞周圍，為結締組織多醣體的一種。它對於組織結構上整體的保養和細胞間的輸送都具有很重要的功能。目前透明質酸主要商業應用的範圍有眼科手術、骨關節炎、創傷、運動醫學、整容外科、化妝品、藥物遞送、外科手術防黏劑、牙科及腸科。目前主要生產商品用的透明質酸是以動物組織為原料的提取法和微生物發酵法。但這兩種方法基於安全性及經濟成本的理由仍有改善的空間。近年來則有提倡以分子生物技術生產透明質酸的趨勢。在本研究中，我成功的藉由genomic-PCR獲得 *Streptococcus zooepidemicus* *hasA*的轉錄區域片段，並選殖於大腸桿菌載體，並在 *E. coli*中做表現。重組蛋白上並帶有 HA或HIS 的tag，因此可使用Anti-HA-HRP或Anti-HIS-HRP抗體以Western blotting偵測HAS重組蛋白質的表現，我可在大腸桿菌加IPTG誘導四小時的pellet部分，觀察到重組蛋白質的表現。而且可以用nickel column純化帶有HIS-tag之重組蛋白質。

Expression of the Hyaluronic Acid Synthase Protein of *Streptococcus zooepidemicus* in *Escherichia coli* Expression System

Student : Ya-Wen Chen

Adviser : Dr. Yun-Liang Yang

Institute of Biochemical Engineering
National Chiao Tung University

ABSTRACT

Hyaluronic acid exists in many mammalian connective tissues such as joints, vitreous bodies, umbilical cords, cartilages, skins, and combs of fowls as a constituent; it fulfills important functions such as flexibility and structure maintenance of tissues. Hyaluronic acid is a polymer made of repeating units of glucuronic acid and N-acetyl-glucosamine bound by alternating β -1,3 and β -1,4 bonds. Its molecular weight is in the range of 10 kD~ 1000 kD. It has a wide variety of uses in cosmetics, medicine for wounds, eye drops, and medicines for ophthalmic surgery and arthritis. Currently, the production of HA comes from extraction animal tissue or fermentation of HA-producing pathogens. Both have issues concerning health and safety. Introduction of molecular recombinant DNA technique to the production of HA is a new trend to solve the problems. In this study, I have successfully constructed recombinant plasmid expressing *hasA* encoding protein of *Streptococcus zooepidemicus* in *E. coli*. The recombinant protein has contained in-vivo-expressing tag of either HA (influenzae hemagglutinin) or HA-HIS (influenzae hemagglutinin-polyhistidine). Recombinant proteins of HAS fusing with HA-HIS tag can be detected in the pellet fraction of the *E. coli* expression system by Western blotting analysis. Meanwhile, Purification using nickel column of the recombinant protein of HAS with HIS tag was also achieved.

誌謝

本論文承蒙指導教授楊昀良老師的協助下才得以順利完成，在此非常感謝老師這兩年來在實驗、生活態度及論文修改方面不厭其煩的給予我指導及幫助，讓我對實驗更了解及對做研究的態度也更加謹慎。同時感謝交大生科系楊裕雄老師及彭慧玲老師對論文修改、口試方面給我的珍貴建議及指正，使本論文的內容更趨完善。

在這兩年有苦有樂的研究生活中，有賴許多師長及朋友給予我協助，才能讓我在實驗及生活上得以順利進行。研究所兩年的時光實在是一閃即逝，很幸運也很快樂地在我們實驗室度過這些日子，相信以後我會一直記得這段難忘的時光。

感謝與我一起苦盡甘來的同窗好友錦昇、詠怡、媛婷及穎男，適時的給予我鼓勵及加油。也感謝實驗室的明浩學長、升耀學長、菁芬學姐、杏芳學姐、助理阿貴、碩士班可愛的學弟妹建孝、宛真、柏吟、嘉嘉、婷尹、歐陽、怡瑾、志豪及大學部活潑的學弟妹逸修、政毅、育穎、虹綾，非常懷念大家一起做實驗、唱歌、聚餐、吵鬧及鬥嘴的時光，因為你們，使我這兩年的研究生活充滿了許多的歡笑、甜蜜及溫暖，也讓我增添了許多的快樂及美好的回憶，希望未來的日子裏你們都能順順利利的。還有謝謝我的超級好友采瑜，總是能在我困擾及鬱悶時，給予我幫忙及開導，另外我的好室友芳雅，謝謝她在生活上的幫忙及協助。

最後由衷地感謝一直栽培我的父母親，讓我能夠衣食無缺的度過十多年的求學生涯和長久以來的照顧及關懷，謝謝我的家人们一路上的扶持，使我能夠順利的完成學位。來交大前，我對新竹的認識是陌生的，多虧這些一路陪我及幫助過我的人，再說聲謝謝你們，有你们真好。

目錄

頁次

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
誌謝.....	3
目錄.....	4
圖表目錄.....	7
壹、緒論.....	10
前言.....	10
1-1 透明質酸的結構.....	11
1-1.1 透明質酸之高分子結構.....	11
1-1.2 透明質酸在溶液中的結構.....	11
1-2 透明質酸的性質.....	12
1-2.1 生物可吸收性及生物相容性.....	12
1-2.2 黏稠性.....	12
1-2.3 保水性.....	12
1-3 透明質酸的功能及應用.....	12
1-4 透明質酸的來源.....	13
1-5 <i>S. zooepidemicus</i> 病原性質與透明質酸的關係.....	14
1-6 透明質酸的生合成步驟.....	15
1-7 透明質酸酶的基因、結構及功能.....	15
1-8 <i>E. coli</i> K5 與透明質酸的關係.....	16
1-9 本論文研究動機與目的.....	16
貳、材料.....	18
2.1 菌株.....	18
2.2 質體.....	18
2.3 引子.....	19

2.4 藥品試劑.....	20
2.5 緩衝溶液及溶劑.....	20
2.6 培養基配製.....	21
2.7 儀器設備.....	22
參、方法.....	24
3.1 大腸桿菌勝任細胞的轉形.....	24
3.1.1 大腸桿菌勝任細胞的製備.....	24
3.1.2 勝任細胞的轉形.....	24
3.2 質體 DNA 之萃取.....	24
3.3 限制酵素反應.....	25
3.4 Klenow enzyme fill in 及 blunt end ligation.....	25
3.5 萃取洋菜膠內之 DNA 片段.....	26
3.6 合成透明質酸基因之選殖.....	26
3.7 基因重組菌體之培養及誘導表現.....	27
3.8 SDS-PAGE 分析並以 Coomassie blue staining 及西方點墨法 (Western Blotting)偵測蛋白質表現.....	28
3.9 利用親和性管柱純化來自於大腸桿菌含 6X HIS 的重組蛋 白.....	29
肆、結果.....	30
4.1 pET-30a(+)-1 之建構.....	30
4.2 <i>hasA</i> 重組基因之選殖與建構.....	30
4.3 基因之定序及 DNA 序列之比對.....	31
4.4 利用限制酵素確認所建構的質體是否正確.....	31
4.5 宿主轉形作用.....	32
4.6 HAS 酵素蛋白質之表現.....	32
4.7 以 Nickel column 純化蛋白.....	35
伍、討論.....	37

5.1 DNA 序列比對結果.....	37
5.2 酵素蛋白質表現載體的選擇及重組蛋白質的誘導與表現.....	37
5.3 表現載體的設計與轉形.....	38
5.4 Nickel column 純化蛋白.....	39
5.5 結論.....	39
陸、參考文獻.....	41



圖表目錄

表一、定序 <i>hasA</i> 序列與 NCBI <i>S. zooepidemicus hasA</i> 序列互相比較之變異...	46
圖一、透明質酸雙醣結構式.....	47
圖二、透明質酸合成酶在 <i>S. zooepidemicus.</i> 之生合成路徑.....	48
圖三、推測 HAS 在膜上組成型態.....	49
圖四、在透明質酸合成時所需 HAS 的酵素作用.....	50
圖五、定序 <i>hasA</i> 序列與 NCBI <i>hasA</i> 序列比對結果之相異處.....	51
圖六、 <i>S. zooepidemicus</i> HAS 之 Kyte-Doolittle hydrophathy plot.....	53
圖七、pcDNA3-HAS-HA-HIS 質體之 map.....	54
圖八、pET-30a(+)-HAS 質體之 map.....	55
圖九、pET-30a(+)-tHAS 質體之 map.....	56
圖十、pET-30a(+)-1 質體之 map.....	57
圖十一、pBluescript II SK(+)-HAS-HA-HIS 質體之 map.....	58
圖十二、pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS 質體之 map.....	59
圖十三、pET-30a(+)-1-HAS 質體之 map.....	60
圖十四、pET-30a(+)-1-tHAS 質體之 map.....	61
圖十五、pBluescript II SK(+)-HAS-HA-HIS-1 質體之 map.....	62
圖十六、利用 <i>Mlu</i> I 及 <i>Xba</i> I 限制酵素確認所建構的 pET-30a(+)-1 是否以將 N 端的 His-tag 及 S-tag 序列去除.....	63
圖十七、利用 <i>Bam</i> H I、 <i>Xho</i> I 及 <i>Afl</i> II、 <i>Sph</i> I 這兩組限制酵素確認所建構的 pET-30a(+)-HAS 質體是否正確.....	64
圖十八、利用 <i>Bam</i> H I、 <i>Xho</i> I 及 <i>Afl</i> II、 <i>Sph</i> I 這兩組限制酵素確認所建構 pET-30a(+)-1-HAS 質體是否正確.....	65
圖十九、利用 <i>Bam</i> H I、 <i>Xho</i> I 及 <i>Hind</i> III、 <i>Sph</i> I 這兩組限制酵素確認所建構 pET-30a(+)-tHAS 質體是否正確.....	66
圖二十、利用 <i>Bam</i> H I、 <i>Xho</i> I 及 <i>Hind</i> III、 <i>Sph</i> I 這兩組限制酵素確認所建構 pET-30a(+)-1-tHAS 質體是否正確.....	67

圖二十一、藉由 12% SDS-PAGE(Comassie blue stain)分析 recombinant HAS protein 在 <i>E. coli</i> BL-21(DE3)表現之結果.....	68
圖二十二、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant HAS protein 在 <i>E. coli</i> BL21(DE3)表現之結果.....	69
圖二十三、藉由 12% SDS-PAGE Comassie blue staining 分析 recombinant HAS protein 於 <i>E. coli</i> NovaBlue(DE3)表現之結果.....	70
圖二十四、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant HAS protein 在 <i>E. coli</i> NovaBlue(DE3)表現之結果.....	71
圖二十五、藉由 12% SDS-PAGE(Comassie blue stain)分析 recombinant HAS protein 與 recombinant truncated form HAS protein 在 <i>E. coli</i> NovaBlue(DE3)表現之結果.....	72
圖二十六、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant tHAS protein 及 recombinant HAS protein 在 <i>E. coli</i> NovaBlue(DE3)表現之結果.....	73
圖二十七、藉由 12% SDS-PAGE(Comassie blue staining)分析 recombinant HAS protein 在 <i>E. coli</i> NovaBlue(DE3)表現之結果.....	74
圖二十八、使用 Anti-HA-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant HAS protein 在 <i>E. coli</i> NovaBlue(DE3)表現之結果.....	75
圖二十九、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant HAS protein 在 <i>E. coli</i> NovaBlue(DE3)表現之結果.....	76
圖三十、藉由 12% SDS-PAGE(Comassie blue stain)分析 recombinant HAS protein 在 <i>E. coli</i> NovaBlue(DE3)表現之結果.....	77
圖三十一、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant HAS protein 在 <i>E. coli</i> NovaBlue(DE3)表現之結果.....	78
圖三十二、藉由 12% SDS-PAGE(Comassie blue staining)分析 recombinant HAS protein 與 recombinant tHAS protein 在 <i>E. coli</i> NovaBlue(DE3)表現之結果的差異.....	79

圖三十三、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant HAS protein 與 recombinant tHAS protein 在 <i>E. coli</i> NovaBlue(DE3)表現之結果的差異.....	80
圖三十四、藉由 12% SDS-PAGE(Comassie blue staining)分析被 nickel column 純化後的重組蛋白.....	81
圖三十五、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析被 nickel column 純化後的重組蛋白.....	82
附錄一、 pBluescript II SK(+)-之 map.....	83
附錄二、 pET-30a(+)-之 map.....	84



壹、緒論

前言

透明質酸(hyaluronic acid)，又稱玻尿酸或醣醛酸，它是人體組織中自然存在而不可缺少的一種透明質酸鈉鹽，由葡糖糖醛酸-N-乙醯氨基葡萄糖為雙糖單位組成的直鏈高分子量之生物多醣，平均分子量介於 10 萬到 1000 萬 Dalton 之間(Meyer, 1954)，普遍存在於動物組織及組織液中，主要存在於結締組織多醣體，具特殊生物化學及物理化學特性，也普遍存於皮膚、肌肉以及軟骨等細胞間質中(Laurent and Fraser, 1992)，是重要的細胞間質成份。因常於組織中的細胞外間(extracellular matrix)結合而形成一具有支撐性及保護性的立體結構存在於細胞周圍，因此被歸納為結締組織多醣體(connective tissue polysaccharide)或是依其性質稱為黏多醣體(mucopolysaccharide)(Laurent and Comper, 1978)。其對於組織結構上整體的保養、和細胞間的輸送都具有很重要的功能(Laurent and Fraser, 1992) 。它亦提供了關節運作所需的彈性及脊椎所需的堅硬度(Balazs, 1982)，同時也是眼球水晶體的主要成份。透明質酸具有的特性有生物相容性、低免疫排斥性、黏稠性、保水性等(Laurent, 1998)。而且，由各方面之研究得知，透明質酸對身體組織的重要性包括水合作用(hydration)、潤滑作用、液體運輸、細胞移動、細胞正常運作及分化(Tool, 1990)。其在人工器官及組織工程上，亦可依需求，經由生產、萃取純化、化學修飾反應，製造各種適當的型式及形狀。目前透明質酸主要商業應用的範圍有眼科手術、骨關節炎、創傷、運動醫學、整容外科、化妝品、藥物遞送、外科手術防黏劑、牙科及腸科(Balazs,1990)。同時透明質酸在美國每年約有十幾億美元的市場(Cooney, 1999)，依其所具有的分子量及等級不同而有不同的原料價格，價格約為 150~500 美元/公克(黃定國, 2002)，由於以上之因素，使得透明質酸成為目前最具有商業價值及發展力的生物高分子之一。

透明質酸合成酶

1-1 透明質酸的結構

1-1.1 透明質酸之高分子結構

透明質酸是一線性直鏈聚合物，其結構由葡萄糖乙醯氨基(N-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc)及葡萄糖醛酸(D-glucuronic acid, GlcA)以 β -1,4 鍵結形成分子量約為 400 kDa 之雙糖(disaccharide)為重覆單元體(repeating unit)(圖一)，以 β -1,3 鍵結重覆連結此雙糖而形成之直鏈高分子聚合物(Weissman and Meyer, 1954)。由化學式結構中，可知透明質酸的分子鏈上的官能基(包括 hydroxyl group, carboxylate group, anomeric carbon, acetamide group)在立體結構的排列均屬對稱，而主鏈上其他碳原子所鍵結則為氫原子。透明質酸中的每一個雙糖平均長度約為 1 nm，若一透明質酸由一萬個雙糖重覆鍵結形成，而當分子鏈完成伸展時，其長度約為 10 μ m，相當於人體紅血球直徑(Vincent et al., 1997)。

1-1.2 透明質酸在溶液中的結構

由於透明質酸在水溶液中，其分子鏈上的羧基(carboxy group, -COOH)和乙醯基(N-acetyl group)會與水分子形成分子內及分子間氫鍵以及與溶劑發生分子間的交互作用，使其在溶液環境中形成旋轉式隨機盤繞(random coil)如緞帶般之結構(Scott et al., 1991)，因此在溶液展開後的透明質酸的分子鏈佔據了相當大的區域。透明質酸分子鏈上的 carboxyl group，其解離常數值(pK)約為 3~4(Scott et al., 1991)，當溶液為中性(pH = 7)時，此官能基因解離而露出陰離子成為聚陰離子性高分子(polyanion polymer)，溶液環境中的離子強度及 pH 值會直接影響到這些帶負電離子彼此的作用力，進而影響透明質酸分子內及分子間的分子鏈排列，因此改變透明質酸在溶液環境中的立體構形(steric conformation)。此一特殊的三度空間結構，使水、電解質及一些小分子物質可以滲透進入由透明質酸所形成的分子結構中所圍成的區域孔洞，而透明質酸的分子鏈在溶液中會持續改變其分子構形，孔洞也因此有各種不同的尺寸，如此不同體積的分子都可通過孔洞。

1-2 透明質酸的性質

1-2.1 生物可吸收性及生物相容性

鏈珠菌屬透明質酸的化學結構式與哺乳類動物的透明質酸(Chong and Nielsen, 2003)是一致的，這使得透明質酸具有低免疫排斥性及高度的生物相容性，也因為如此，讓透明質酸能被大量應用於醫藥上，例如：外科或眼科手術。

1-2.2 黏稠性

透明質酸因分子量相當大，且會與其他組織間的大分子發生交互作用，同時當其濃度更高時，其分子內及分子間也會形成鍵結而產生複雜的立體網狀結構成為細胞外間質(extracellular matrix, ECM)和細胞間質(intercellular matrix, ICM)的主要結構性物質(Laurent and Fraser, 1992)，因此透明質酸在液態具有黏彈性(viscoelastic)及擬塑性(pseudoplastic)。

1-2.3 保水性

透明質酸結構上的羧基(carboxy group, -COOH)和乙醯基(N-acetyl group)，使得 HA 極易與水分子形成分子間氫鍵及分子內氫鍵，因此原因使透明質酸具有相當高的水親合性(water-binding)。有研究指出一個透明質酸分子可與比其分子量重 1000 倍的水分子結合(Laurent, 1970)，也就是說，分子量為一百萬~七百萬 Dalton 的透明質酸每克可與 1~7 公升的水結合；所以可常在市售的化妝品中看見此添加物。

1-3 透明質酸的功能及應用

透明質酸依其分子量大小可分為：萃取自動物組織等分子量大於 1MDa 之醫療用等級透明質酸及利用微生物發酵生產分子量較小用於化妝品等兩大類。

由於透明質酸具有良好的保濕作用，又是皮膚和其他組織中廣泛存在的天然生物分子，而被譽為理想的天然保濕因子，因此透明質酸常被添加於美容化妝品(Balazs, 1990)。

透明質酸是構成關節軟骨和滑液的主要成份，對關節生理功能的發揮有著非常重要

的作用(Balazs, 1974)。當發生退化性關節炎(OA)、類風濕性關節炎(RA)以及其他感染性和非感染性的關節疾病時，HA 在關節內的產生及代謝就會發生異常，軟骨發生降解和破壞，導致關節生理功能障礙(Sharif, 1995)。黏彈性補充療法(viscosupplementation)因此應運而生，主要是利用補充外源性透明質酸，恢復滑液的潤滑功能，促進軟骨的修復並改善關節功能。

透明質酸具有黏彈性，亦可作為眼科手術時充填材料、用於白內障、青光眼、人工水晶、角膜移植等手術(Balazs, 1989)，促進傷口癒合和對炎症的抑制作用，但不會造成外科和婦科手術所產生的粘黏(Weiss et al., 1987)。並可用於冠狀動脈手術後防止心血管在狹窄的預防性藥物(Balazs, 1989)。透明質酸也可利用於抗癌，可以有效刺激免疫系統，阻止癌細胞擴散(Luo et al., 2000)。

同時透明質酸及交聯的透明質酸具有很好的生物相容性，在體內以自然的生物降解方式代謝(Roden et al., 1989)，使其作為藥物載體的應用具有廣泛的前景。作為大分子物質，透明質酸及透明質酸衍生物不僅為藥物提供了緩釋作用，並且利用其在體內與細胞的透明質酸受體結合，被特定組織如淋巴結和肝臟攝取等生物特點，可攜帶藥物至特定部位釋放(Vercruyssen and Prestwich, 1998)。

1-4 透明質酸的來源

在商業上，透明質酸的生產供應主要分為兩大類，以動物組織為原料的提取法和微生物發酵法(Conney et al., 1999)。透明質酸在動物組織中的分布較為廣泛，幾乎所有的動物組織中均含有透明質酸，只是含量不同。已從下列組織中分離出了透明質酸：結締組織、臍帶、皮膚、人血清、雞冠、關節滑液、腦、軟骨、眼玻璃體、人尿、雞胚胎、兔卵細胞、動脈和靜脈等(Laurent and Fraser, 1992)，但考慮到原料透明質酸含量的高低、數量的多少和易於取得的程度等成本因素，能夠用於生產的原料主要為雞冠、人臍帶和動物眼球。現今利用微生物發酵法產生透明質酸方面，主要是以 *Streptococcus pyogenes*、

Streptococcus faecalis、*Streptococcus dysgalactiae*、*Streptococcus zooepidemicus*、和 *Streptococcus equisimilis* 等 *Streptococci* 菌屬生產 (MacLennan, 1956)。其中以 *S. zooepidemicus* 生成透明質酸的量最高，約為 6 公克/公升，故最常用來進行發酵生產透明質酸。而所生產的透明質酸存在於細胞外莢膜，與動物組織萃取法相比，具有成本低，生產規模不受動物原料限制，發酵液中透明質酸以游離狀態存在，易於分離純化和形成規模化工業生產，且無動物來源的致病病毒污染的危險等優點。缺點則為其本身亦是病原菌且所生產之透明質酸分子量也較低。各種來源的透明質酸無種屬差異 (Rapport et al., 1951)，由不同動物組織萃取的及由不同菌種發酵生產的透明質酸，在化學本質和分子結構上是一致的，只是聚合物之單元數及相對分子量有差別。

另外，有鑑於生物技術之興起，有不少研究建議也可以利用基因工程方法自生產透明質酸之微生物中選殖出合成透明質酸基因組，以建構出一生產透明質酸之微生物，其所合成之透明質酸不會被微生物自身代謝作用所分解，且可形成醫療用高分子量透明質酸，以解決上述之缺點。



1-5 *S.zooepidemicus* 病原性質與透明質酸的關係

Streptococci 屬為具有病原性之厭氧菌，其中之一的 *S. zooepidemicus* 為致病性之革蘭氏陽性細菌，目前比較少發現會在人體身上造成疾病 (R)，不過此菌會造成馬的肺炎 (Lavoie et al., 1991)。其所生產之透明質酸存在於細胞外莢膜 (MacLennan, 1956)，同時所生產的透明質酸是具有完全的生物相容性及無免疫排斥性之特性。而透明質酸為動物體內廣泛存在的物質，因此，使鏈球菌不會被動物體內的免疫系統識別，進而免受免疫系統攻擊。

1-6 透明質酸之生合成步驟

當給透明質酸合成酶提供 UDP-GlcNAc 和 UDP-GlcA 時，可引發透明質酸合成，使

糖鏈得以延伸。Prehm (1983)提出透明質酸的合成是藉由 two-site mechanism 此機制進行，在這個機制過程中，延伸的 HA 糖鏈的還原端的多糖(GlcNAc 或 GlcA)會與端點的 UDP 共價鍵結，而下一個 UDP-sugar 會再與多糖鏈還原端的多糖鍵結，如此多糖鏈交替連接上 UDP-GlcNAc 和 UDP-GlcA 來進行 HA 的合成(Prehm, 1983)。而圖二為簡要描述透明質酸合成酶在 *S. zooepidemicus* 的生合成路徑的概要。

1-7 透明質酸酶的基因、結構及功能

Streptococcus 菌屬內 hyaluronic acid(hyaluronan) synthesis (or *has*) operon 上有 *hasA*(Dougherty, 1994)、*hasB*(Dougherty, 1993)、*hasC*(Crater et al., 1995)。這三個基因分別負責轉譯出三個不同酵素，藉由這些酵素之作用去合成 *Streptococcus* 菌上的 hyaluronan capsule。 *hasB* 基因解譯的蛋白質為 UDP-glucose dehydrogenase，此酵素會將 UDP-glucose 分解成 UDP-glucuronic acid(Dougherty, 1994)，而 *hasC* 解譯的蛋白質為 UDP-glucose pyrophosphorylase，此酵素會利用 UTP 把 glucose-1-phosphate 分解成 UDP-glucose(Crater et al., 1995)，最後，*hasA* 解譯出 hyaluronan synthase，此酵素負責把 UDP-glucuronic acid 和 UDP-N-acetyl-glucosamine 合成直鏈狀的 hyaluronic acid 之聚合物 (Dougherty, 1994)。

Hyaluronan synthase 為 membrane protein 的一種，圖三為推測此酵素在膜上大概如何組成的示意圖(Weigel et al., 1997)。此蛋白質包含一個大的 central domain 和 transmembrane domain 及位於 protein 的 N 端及 C 端的 membrane domain。Central domain 共有 264 amino acids，大概包含整個 protein 序列的 88%，此區域或許含有透明質酸酶的催化區(catalytic region)(DeAngelis and Weigel, 1994)。

對於合成透明質酸的反應過程中，此酵素扮演著極重要的角色，因為 hyaluronan synthase 至少必需擁有六個不同的功用才能完成此反應。於圖四中， 1 為 UDP-GlcNAc binding site，2 為 UDP-GlcA binding site，3 為 β -1,4 GlcNAc transferase，4 為 β -1,3 GlcA

transferase，5 為 HA(acceptor) binding site，6 為 HA transfer (translocation)，藉由這六個獨立的 activities 作用，才能合成透明質酸之聚合物(polymer)(Weigel et al., 1997)。

1-8 *E.coli* K5 與透明質酸的關係

E.coli K5 會產生一個具有多醣體(polysaccharide)的莢膜(capsule)，而此多醣體通常是由 D-glucuronic acid 和 N-acetyl-D-glucosamine(GlcA β -GlcNAc α)_n 所相互組成的聚合物(polymer) (Roman et al., 2003)。再者，*E.coli* K5 莢膜的基因群(gene cluster)包含了 *kfiA*、*kfiB*、*kfiC*、*kfiD* 這四個基因(Hodson et al., 2000)，其中的 *kfiA* 和 *kfiC* 這兩個基因所 encode 的蛋白質為 glycosyltransferase，負責把 GlcA 和 GlcNAc 加到 K5 多醣體的非還原端(non-reducing end)，所以 *E.coli* K5 莢膜的多醣體的組成是由 KfiA 和 KfiC 這兩蛋白質互相作用而形成的(Hodson et al., 2000)。至於，KfiB 這個蛋白質在 *E.coli* K5 中所扮演的角色不明，但若把 *kfiB* 基因做突變，發現會破壞 K5 的多醣體的形成(Rigg et al., 1998)。最後，*kfiD* 所 encode 的蛋白質為 UDP-glucose dehydrogenase(UDPGDH)(Rigg et al., 1998)，其功用會把 UDP-glucose 氧化成 UDP-GlcA。然而，這個菌株所產生的 UDP-GlcA 為透明質酸(HA)合成過程中所需的受質(substrate)以及在 *E.coli* K5 這個菌株中也擁有莢膜多醣體運輸(transport)所必需的基因(Hodson et al., 2000)，基於此因素，此研究將轉殖好的載體放於此菌株中作蛋白質表現(protein expression)，希望有助於透明質酸此蛋白質的大量表現。

1-9 本論文研究動機與目的

目前在商業上，生產透明質酸的方式有兩種，分別為由動物組織分離萃取及微生物基因工程發酵法(Cooney, 1999)，但這兩種方法基於安全性及經濟成本的理由仍有改善的空間。而在本論文研究中，我們利用生物技術及遺傳工程，從微生物去選殖 HA 合成酶後並觀察此合成酶在異源外的宿主的表現及純化，本論文之內容或許可作為未來進一

步發展生物合成的基礎，例如：藉由酵素分析系統的建立去測試 HA 合成酶的酵素活性。



貳、材料

2.1 菌株

1. *Escherichia coli* DH5 α (Yang laboratory collection)

Escherichia coli BL-21(DE3) (Yang laboratory collection)

Escherichia coli NovaBlue(DE3) (Novagen)

Escherichia coli K5(ATCC23500)

Streptococcus epidemicus(ATCC 35246)

2.2 質體

質體	特性	Reference
pcDNA3	篩選標誌為 Ampicillin，並含 T7 promoter 及 CMV promoter。	Invitrogen
pET-30a(+)	篩選標誌為 Kanamycin，並含 T7 promoter、HIS-tag，及 S-tag 序列。	Novagen
pBluescript II SK(+)	篩選標誌為 Ampicillin，並含 <i>lac</i> promoter 及 T7 promoter。	Stratagene
pcDNA3-HAS-HA-HIS	含 <i>hasA</i> 基因，其 5'端及 3' 端 cloning site 分別為 <i>Bam</i> H I 及 <i>Xho</i> I。	本研究
pET-30a(+)-HAS	含 <i>hasA</i> 基因，其 5'端及 3' 端 cloning site 為 <i>Bam</i> H I 及 <i>Xho</i> I。	本研究
pET-30a(+)-tHAS	含 truncated from <i>hasA</i> ，其 5'端及 3' 端 cloning site 為 <i>Bam</i> H I 及 <i>Xho</i> I。	本研究
pET-30a(+)-1	N-terminal HIS-tag 及 S-tag 序列被切除。	本研究

pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS	含 HAS-HA-HIS 之 DNA 片段,5'端及 3' 端 cloning site 為 <i>Bam</i> H I 及 <i>Sal</i> I。	本研究
PBluescript II SK(+)-HAS-HA-HIS	含 HAS-HA-HIS 之 DNA 片段,5'端及 3' 端 cloning site 為 <i>Bam</i> H I 及 <i>Eco</i> R I。	本研究
pET30b-HeptB	含 HeptB 之 ORF	交大生科 系彭慧老 師實驗室

2.3 引子

引子	序列 5'~3'	位置
hasA F	CGGGATCCATGAGAACATTAATAAAACCTC	<i>hasA</i> ORF* gene:1~21
hasA R	CCGCTCGAGTAATAATTTTACGTGTTCC	<i>hasA</i> ORF*gene:1251~1241
hasA	TCAAGTATGGTCCATAGGGC	<i>hasA</i> ORF* gene:980~961
hasA-2	GGAATTCCTAGCCATGGTGA TGGTG	pcDNA3-HAS-HA-HIS :2283~2301
hasA-3	CCGCTCGAGAACGCTAAGCGGACCT	<i>hasA</i> ORF* gene:696~681
hasA-4	ACGCGTCGACTCCTGCGTAATCTGGAA	pcDNA3-HAS-HA-HIS :2259-2274
T7 terminator primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	pET-30a(+): 69~87

*: Accession number (AF 414053)

2.4 藥品試劑

- Protag : Glycerol (Cat.No.0854-1L-PTM) 、 Phenol saturated solution (Cat.No.0945) 、 IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactoside) (Cat.No.0487-10G) 、 Acryl/Bis 37.5:1 solution(Cat.No.0254)
- Amersham: His Trap kit
- AppliChem : Ampicillin (Cat.No.A2839) 、 Kanamycin(Cat.No.K4000)
- Bio-Rad : Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Cat.No.161-0729) Ammonium Persulfate (APS) (Cat.No.161-0700)
- GeneTake:PreBlue Prestained Protein Marker (Cat.No.PBM250)
- J. T. Baker: Coomassie Brilliant Blue(Cat.No.R-250)
- Kodak : X-film (Cat.No.1651454)
- Riedel-deHaen : Dodecyl Sulfate Sodium Sat (SDS) (Cat.No.1.12012.0500) 、 Ethanol (Cat.No.1.00983.2500) 、 Tris-HCl (Cat.No.1.01547.1000) 、 Sodium hydroxide (Cat.No.30620) 、 Sodium chloride(Cat.No.31434)
- MBI: T4 DNA ligase(Cat.No.EL0335) 、 Prestained Protein Ladder(Cat.No.SM0671)
- NEB : Restriction Enzyme , *EcoR* I 、 *Xba* I 、 *Kpn* I 、 *Xho* I 、 *Sac* II 、 *BamH* I 、 *Afl* II
- PIERCE: ECL substrate (Cat.No.34079)
- Scharlau : LB agar (Cat.No.01-385) 、 LB broth (Cat.No.02-385)
- SibEnzyme : 1 kb DNA ladder (Cat.No.SEM11C001)
- Sigma: polyoxyethene-sorbitan monolaurate (Tween20) (Cat.No.P-1379) 、 Phenol (Cat.No.P-4682) 、 N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Cat.No.T-9281)
- TaKaRa : Ex Taq polymerase(Cat.No.RB001B) 、 10X PCR buffer 、 dNTPs Mixture(Cat.No.RB001B)
- Schleicher&Schuell: nitrocellulose membrane, PROTRNA (Cat.No.10401396)

2.5 緩衝溶液及溶劑

- 50X TAE buffer

48.4 g Tris base , 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml , 11.42 ml acetic acid added
dd H₂O to 200 ml

- 0.5 M EDTA stock solution

186.1 g EDTA added dd H₂O to 800 ml (pH 8.0)

- TBS buffer (Tris-buffered saline)

10mM Tris(pH 8.0) , 150 Mm NaCl

- TBST buffer

10mM Tris(pH 8.0) , 150 Mm NaCl , 0.05% Tween 20

- 5% Blocking buffer

2.5g nonfat powdered milk dissolved in 50ml 1X TBS buffer

- 0.2% Comassive blue stain solution

2g Comassive brilliant blue , 50 ml methonal , 100 ml acetic acid

- lysis buffer

20 mM sodium phosphate(pH 7.4) , 0.5M NaCl , 1% NP40 , 1% Triton , 1mM PMSF

- 10X transfer buffer

39mM Glycine , 48Mm Trisbase , 10% SDS , 20% methanol

- 10X SDS-PAGE running buffer(1000ml)

30.39g Tris base , 144g Glycine , 10g SDS

- 2X SDS-PAGE loading buffer

0.5% bromphenol blue , 0.5M Tris-HCl (pH 6.8) , 10% SDS , 100% glycerol

- binding buffer

20 mM sodium phosphate(pH 7.4) , 0.5M NaCl , 1% NP40 , 1% Triton , 1mM PMSF ,
10mM imidazole

2.6 培养基配製

- LB (Luria-Bertani)培養液

1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl

- LB (Luria-Bertani)/Ampicillin 培養基
1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl , 1.5% agar , 50 µg/ml Ampicillin
- LB (Luria-Bertani)/Kanamycin 培養基
1% tryptone , 0.5% yeast extract , 1% NaCl , 1.5% agar , 50 µg/ml Kanomycin

2.7 儀器設備

分光光度計 20GENESYS^{RT}(SPECTRONIC INSTRUMENTS)
 核酸計算儀 GeneQuant pro(AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)
 程式溫度控制儀 PTC-100^{RT}(MJ RESEARCH INC.)
 PCR溫度控制儀 Gene Cycler^{RT}(BIO-RAD)
 震盪器 VORTEX-GENIE2 G560 (SCIENTIFIC INDUSTRICS)
 試管震盪器 IKA-VIBRAX-VXR
 加熱攪拌器 S101 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
 乾燥加熱板 DB102 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
 酸鹼值檢測計 Φ360 (BECKMAN)
 電子天秤 PB153-S (METTLER TOLEDO)
 往復式恆溫水槽 B206-T1 (FIRSTEK SCIENTIFIC)
 水平式電泳槽 MJ-105(MEDCLUB)
 微量離心機 MICRO 240A (DINVILLE SCIENTIFIC INC.)
 電子防潮箱 DX106 (台灣防潮科技)
 恆溫式震盪培養箱 B206(FIRSTEK SCIENTIFIC)
 電泳影像處理系統 GEL DOC 2000(BIO-RAD)
 桌上型高速離心機 5100(KUBOTA CORPORATION)
 落地型高速離心機 SORVALL RC 5C(DUFONT)
 4°C 三門冰藏櫃 KS-101-MS (MINI KINGKON)
 -20°C 直立冷凍櫃 (WHITE-WESTINGHOUSE)
 -80°C 超低溫冷凍櫃 925/926(FIRSTEK SCIENTIFIC)

直立式電泳槽(Bio-Rad)

超音波震盪器(Sonic Dismembrator550, Fisher Scientific)



參、方法

3.1 大腸桿菌勝任細胞 (Competent cell) 的轉形 (Transformation)

3.1.1 大腸桿菌勝任細胞的製備(Sambrook et al, 1989)

挑要使用的大腸桿菌單一菌落於 5 ml 的LB培養液、37°C 震盪培養 (150rpm) 隔夜後，取 2 ml的菌液轉養於 100 ml的 LB培養液、37°C 震盪培養 (150rpm) 至O.D_{600nm}約 0.6~0.8 時，靜置於冰上 20 分鐘，以 1900g × 10 min離心後去除上清液，以 50 ml預冷的 0.1 M CaCl₂ 懸浮菌體，置於冰上 30 分鐘，以 1900g × 10 min離心後去除上清液，以 5 ml預冷的 0.1 M CaCl₂ 懸浮菌體，置於冰上 1 小時後，可直接進行細胞轉形，或是於 4°C 靜置 18 小時後，以 1900g × 10 min離心後去除上清液，以 5 ml的 0.05 M CaCl₂ (含 15% Glycerol) 懸浮菌體，以每個微量離心管 50 μl為單位進行分裝，儲存於-80 °C。

3.1.2 勝任細胞的轉形 (Sambrook et al, 1989)

將儲存於-80°C的勝任細胞取出置於冰上解凍，然後加入質體 DNA 0.1~1 μg，冰浴 30 分鐘，在 42°C 水浴中進行熱休克 (heat shock) 1 分鐘，後置於冰上 5 分鐘，加入 300 μl 的 LB 培養液於 37°C 震盪培養(150rpm)1 小時，取 100μl 的菌液塗抹於含 Ampicillin 或 Kanamycin (50 μg/ml) 之 LB 培養基上，置於 37 °C 溫箱中培養 12~18 小時。

3.2 質體 DNA 之萃取

大腸桿菌內之質體DNA以Plasmid DNA Extraction System (PREMIER, Mini-M™) 萃取之。先將菌接種於LB培養液、37°C 培養 12-14 小時，以室溫 1900g × 5 min離心，去除上清液，加入 200 μl Solution1 Buffer懸浮菌體並移置微量離心管中，取 200μl Solution2 Buffer緩和地混合均勻後，加入 200 μl Solution3 Buffer再次緩和地混合均勻，以室溫 16060g × 5 min離下菌體，取上層液至Mini-M™ Column，以室溫 16060g × 1 min離心，

倒掉收集管內液體，加入 0.7 ml WS buffer，在室溫 16060g × 1 min 離心，倒掉收集管內液體，加入 0.7 ml WS buffer，以室溫 16060g × 1 min 離心，倒掉收集管內液體，再以室溫 16060g × 3 min 離心，將 Mini-M™ Column 移至新微量離心管，於 55~60°C 的烘箱中 5 分鐘把多餘的酒精去除，最後以 50 µl 二次無菌水或 1X TE buffer 加入 Mini-M™ Column 中，靜置 2 分鐘後，以室溫 16060g × 2 min 離心後，將製備好的質體 DNA 儲存於 -20°C。

3.3 限制酵素反應 (Sambrook et al, 1989)

為製備實驗所需的 DNA 片段，取適量 DNA (約 0.5~10 µg；適反應需要) 到適量反應體積 (30 µl) 以限制酵素切割 (酵素的用量及反應溫度、時間都依照廠商所提供的條件資料進行)，反應完後，利用洋菜膠體電泳分析。所需的 DNA 片段在經限制酵素切割後，視需要以 PREMIER 之 Gel Extraction System 或 PCR Clean-up Kit 來純化 DNA 並去除限制酵素及鹽類。



3.4 Klenow enzyme fill in 及 blunt end ligation

先取適量質體 DNA (約 0.5~10 µg；適反應需要) 到適量反應體積 (30 µl) 再以兩種不同限制酵素切割 (酵素的用量及反應溫度、時間都依照廠商所提供的條件資料進行)。反應完後，以 PCR Clean-up Kit 來純化 DNA 並去除限制酵素及鹽類，最後將 DNA 溶於 30 µl 二次無菌水或 TE buffer，接著把此 DNA (約 1.25 µg) 加入 0.25 µl Klenow enzyme (1 µg/unit, 5 unit/µl) (NEB)、1 µl 1.65 mM dNTP (最終濃度為 33 µM) 及 1 X EcoPol reaction buffer，最後再加入所需二次無菌水使總體積為 50 µl，再於 25°C 15 分鐘進行反應，之後加入 1 µl 0.5 M EDTA (pH 8.0) (最終濃度為 10 mM) 於 75°C 20 分鐘進行終止反應。把完成 Klenow enzyme fill in 之 DNA 片段利用洋菜膠體電泳分析，再以 PREMIER 之 Gel Extraction System 來純化 DNA。

取適量上述之 DNA 片段進行 blunt end ligation，此反應之混合物 (mixture) 為 DNA

片段(約 25-50 ng)、5 μ l 的 10 x ligation buffer、5 μ l 的 50% PEG4000 solution 及 5 μ l T4 DNA ligase(1 μ l /unit)(MBI)，最後加入所需二次無菌水使總體積為 50 μ l，再於 22 $^{\circ}$ C 60 分鐘反應，之後於 65 $^{\circ}$ C 10 分鐘終止反應，就可直接使用此反應的混合物進行勝利細胞的轉形。

3.5 萃取洋菜膠內之 DNA 片段

使用 Gel Extraction System(PREMIER)萃取出洋菜膠內之 DNA 片段。將切下之洋菜膠(約 50-200 mg)，置於微量離心管內，加入 0.5 ml binding solution，60 $^{\circ}$ C 加熱至完全溶解後，將混合液移至 Gel-MTM Column，以室溫 16060g \times 1 min 離心，倒掉收集管內液體，加入 0.7 ml WS buffer，以室溫 16060g \times 1 min 離心，倒掉收集管內液體，再加入 0.7 ml WS buffer，以室溫 16060g \times 1 min 離心，倒掉收集管內液體，再以室溫 16060g \times 3 min 離心，將 Gel-MTM Column 移置新微量離心管，於 55~60 $^{\circ}$ C 的烘箱中 5 分鐘把多餘的酒精去除，再加入 30 μ l 二次無菌水或 TE buffer 於 Gel-MTM Column 中，靜置 2 分鐘後，以室溫 16060g \times 2 min 離心，將萃取出之 DNA 儲存於 -20 $^{\circ}$ C。

3.6 合成透明質酸基因之選殖

利用 PCR 方式如下得到與欲研究基因 *S. zooepidemicus hasA* 序列的 DNA 片段，再以洋菜膠電泳確認 PCR 產物片段大小是否正確後，利用 PCR Clean Up(PREMIER)純化 PCR 產物，以下列方式選殖於 pCDNA3 或 pET-30a(+): 把 pCDNA3 或 pET-30a(+)及純化之 PCR 產物以限制酵素 *BamH* I、*Xho* I 於 37 $^{\circ}$ C 反應 3 小時後，經 Gel Extraction System(PREMIER)，萃取出洋菜膠內之 DNA 片段，再依 vector: insert 分子數為 3:1 於 22 $^{\circ}$ C 恆溫水槽 1 小時進行接合反應(ligation)後，再於 65 $^{\circ}$ C 10 分鐘終止反應，所得之產物利用 3.1-2 方式進行轉形後，萃取質體 DNA 並以限制酵素及定序進行確認。

PCR 之 mixture 含有 1 μ l genomic DNA (*Streptococcus epidemicus*) 或 plasmid

DNA(pcDNA3-HAS-HA-HIS)、1 μ l 50mM primer(hasA-F 及 hasA-R)、10 μ l 10 x PCR buffer(TaKaRa)、8 μ l 2.5 mM dNTP(TaKaRa)、78.5 μ l 二次無菌水及 0.5 μ l Ex Tag(TaKaRa)。

PCR 溫度設定如下：

1. 94 $^{\circ}$ C 5 分鐘
2. 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘
3. 54 $^{\circ}$ C 1 分鐘
4. 72 $^{\circ}$ C 2 分鐘
5. 72 $^{\circ}$ C 3 分鐘

步驟 2 至步驟 4 重複 30 次循環

3.7 基因重組菌體之培養及誘導表現

將建構好的 pcDNA3-HAS-HA-HIS 及 pET-30a(+)-HAS 質體轉形於大腸桿菌 BL21(DE3)或NovaBlue(DE3)，隔天挑單一菌落於含有 Ampicillin 或 Kanomycin(50 μ g/ml)之LB培養液中及 37 $^{\circ}$ C 震盪培養，隔夜後，取 1/100 之菌液於 5ml的LB培養液並於 37 $^{\circ}$ C 培養箱震盪培養，至 O.D_{600nm} 約 0.6 ~ 0.8 時，加入 1mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside)誘導基因表現。而於四小時後，以 1900g \times 10 min 離心後去除上清液，接著取 200 μ l 之 1M Tris-HCl (pH8.0) 懸浮菌體並移置微量離心管中，16060g \times 3 min 離心後去除上清液，將此菌體之微量離心管於液態氮及 42 $^{\circ}$ C 恆溫水槽中反復 5~6 次，以此方法打破細胞，之後，取 200 μ l 1M Tris-HCl (pH8.0) 懸浮菌體，於 4 $^{\circ}$ C 冷凍離心機 16060g \times 15 min 離心，取上清液於另一微量離心管中，用 2x SDS-PAGE loading dye(含 β -mercaptoethanol及 8M Urea)混合菌體及上清液，於室溫一小時以上，最後儲存於-20 $^{\circ}$ C。

將建構好的pET-30a(+)-HAS-HA-HIS質體轉形於大腸桿菌NovaBlue(DE3)，隔天挑單一菌落於含有 Kanamycin(50 μ g/ml)之LB培養液中及 37 $^{\circ}$ C 震盪培養，隔夜後，取 1/100 之菌液於 50ml的LB培養液並於 37 $^{\circ}$ C 培養箱震盪培養，至O.D_{600nm}約 0.6~0.8 時，加入

1mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside)誘導基因表現。而於四小時後，菌液以 $1900g \times 10 \text{ min}$ 離心後去除上清液，接著加入 $250 \mu\text{l}$ lysis buffer 懸浮菌體，之後，再使用超音波震盪器(3x10s bursts)打破細胞。菌體於 4°C 冷凍離心機 $16060g \times 15 \text{ min}$ 離心。取上清液於另一微量離心管中，用 2x SDS-PAGE loading dye(含 β -mercaptoethanol及 8M Urea)混合菌體及上清液，於室溫一小時以上，最後儲存於 -20°C 。

3.8 以 SDS-PAGE 分析並以 Coomassie blue staining 及西方點墨法(Western Blotting) 偵測蛋白質表現

首先製作 12% SDS-PAGE gel，待膠體硬化，接著將樣品以微量吸管置入膠體之孔洞中，以 Mini-Protein 電泳槽(Bio-Rad)進行電泳 110 伏特 90 分鐘，直到 protein marker 的 11 kDa 跑到底部位置，則取出膠體於 0.2% Coomassie blue staining solution 染 1 小時，再以 Destain solution 褪染膠體；樣品先以微量吸管置入 12% SDS-PAGE gel 之孔洞中，以 Mini-Protein 電泳槽(Bio-Rad)進行電泳 110 伏特 90 分鐘後，利用 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer cell(Bio-Rad) 0.09 安培 35 分鐘，使膠體上的 protein 轉漬至醋酸纖維膜(nitrocellulose membrane, PROTRAN, Schleicher & Schuell)，把膜置入 20~25 ml Blocking buffer 於室溫下平面震盪 1 小時後，再加入 Anti-HIS 結合 HRP 之抗體於 Blocking buffer 中於室溫下平面震盪 1 小時以偵測有 His 標誌的蛋白，而 Blocking buffer 中 Anti-HIS 之抗體最終濃度為 $0.2\mu\text{g/ml}$ ，之後再以 20 ml 之 1XTBST buffer 於室溫下平面震盪 5 分鐘四次，最後將 1.4 ml 之 ECL substrate (PIERCE)均勻地加到膜上，在暗房內以 X 光底片進行壓片，感光適當時間後，沖洗底片(先以 Develop buffer 中沖洗，再置於 Fix buffer 沖洗)。

3.9 利用親和性管柱純化來自於大腸桿菌含 6XHIS 的重組蛋白

將建構好的 pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS 質體轉形於大腸桿菌 NovaBlue(DE3)，隔天挑

單一菌落於含有 Kanamycin(50 μ g/ml)之LB培養液中及 37°C 震盪培養，隔夜後，取 1/100 之菌液於 50ml的LB培養液並於 37°C 培養箱震盪培養，至O.D_{600nm}約 0.6~0.8 時，加入 1mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside)誘導基因表現。而於四小時後，菌液以 1900g \times 10 min 離心後去除上清液，接著加入 10ml ice-cold buffer(含 100 μ l 100mM PMSF)懸浮菌體，之後，再使用超音波震盪器(3x10s bursts)打破細胞。菌體於 4°C 冷凍離心機 16060g \times 15 min 離心。取上清液於另一微量離心管中以備純化，把sonication後的懸浮菌體分裝於 1.5 ml 微量離心管(1 ml/tube)，再於 4°C 冷凍離心機 16060g \times 15 min 離心。取上清液於另一微量離心管中，同時取 500 μ l ice-cold binding buffer(含 10 mM imidazole及 8 M urea)懸浮pellet，再於 4°C 冷凍離心機 16060g \times 15 min 離心，取上清液(約 500 μ l)於另一微量離心管中以備純化，接著拿 1.5 ml 微量離心管收集從column elute出來的solution(約 1 ml/tube)，最後取 100 μ l elute的solution加 100 μ l的 2x SDS-PAGE loading dye混合，再從其中取 15 μ l的sample loading 於well內作分析。其餘 solution儲存於-20°C。首先Nickel 親合性管柱需加入 700 μ l 0.1M NiSO₄，使管柱內充滿Nickel 離子，接著再用 10 ml之二次水沖洗管柱，之後，管柱用 10 ml之binding buffer(20mM sodium phosphate, pH 7.4, 0.5M NaCl, 1% NP40, 1%Triton, 1mM PMSF及 10mM imidazole)沖洗，樣品即可用column純化，於純化過程中，分別使用含有不同濃度的imidazole之 5 ml binding buffer沖洗管柱，同時，收集管柱所滴下之液體，把所收集之液體加入等量 2xSDS-PAGE loading dye混合，再於SDS-PAGE 電泳及Western blotting分析。

肆、結果

4.1 pET-30a(+)-1 之建構

使用限制酵素 *Nco* I 及 *Nde* I 將 pET-30a(+) 序列上之含有 HIS-tag 及 S-tag 序列予以切除，之後，利用 klenow enzyme 填滿 3 端到 5 端的序列，使之成為 blunt end 的 DNA 片段，接著進行 blunt end ligation，讓此 DNA 片段 self ligation 成為一個 circular 的質體；圖十六的 Lane 1 及 Lane 2 以 pET-30a(+) 為 back 修飾而成的 pET-30a(+)-1，使用限制酵素 *Mlu* I 及 *Xba* I 切割後可得 4.4 kb(箭頭 A) 及 0.9 kb(箭頭 C) 大小之 DNA 片段，Lane 3 為完整的 pET-30a(+) (圖十六) 當對照組之用，限制酵素 *Mlu* I 及 *Xba* I 切割後可得 4.4 kb(箭頭 A) 及 1.0 kb(箭頭 B) 大小之 DNA 片段；所得到之質體命名為 pET-30a(+)-1，此質體圖表於圖十。



4.2 hasA 重組基因之選殖與建構

利用 PCR 方法得到 *S. zooepidemicus hasA* 全長 1254 bp 大小之 DNA 片段，同時引入限制酵素 *Bam*H I、*Xho* I 之位置分別於 PCR 產物之 5 端及 3 端，以協助之後 *hasA* 基因能選殖於 pCDNA3。最後所得到的質體命名為 pCDNA3-HAS-HA-HIS，此質體圖表於圖七。接著使用限制酵素 *Bam*H I、*Xho* I 將基因 *hasA* 從 pCDNA3 切出，再選殖於 pET-30a(+)，而所得到之質體命名為 pET-30a(+)-HAS，此質體圖表於圖八。同樣利用 PCR 方法得到 *S. zooepidemicus* truncated form 的 HAS，其長為 696 bp 大小之 DNA 片段，限制酵素 *Bam*H I、*Xho* I 之位置分別於 PCR 產物之 5 端及 3 端，接著把此 DNA 片段亦選殖於 pET-30a(+) 並命名為 pET-30a(+)-tHAS，此質體圖表於圖九。

之後利用 PCR 反應，得到選殖於 pCDNA3 上之含有 HAS-HA-HIS 整個序列(約 1.4 Kb)，再將此序列選殖於 pBluescript II SK(+) 載體上，所得到之質體命名為 pBluescript II SK(+)-HAS-HA-HIS，此質體圖表於圖十一。再使用限制酵素 *Bam*HI 及 *Sal*I 將

HAS-HA-HIS 此片段從 pBluescript II SK(+)載體切出，同時，再把此序列選殖於 pET-30a(+)-1 上，所得到之質體命名為 pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS，此質體圖表於圖十二。

4.3 基因之定序及 DNA 序列之比對

利用 pCDNA3 上所擁有之 T7 primer、Sp6 primer 及自己所設計之 primer hasA，而把所得到的 *hasA* insert 予以定序。再將定序完之序列組裝及分析，同時與 NCBI 所發表之 *S. zooepidemicus hasA*(AF 414053)序列互相比對，發現有少數鹼基不同，突變之鹼基位置分別於 393、402、504、669、672、684、771、1065、1095、1098、1104、1107、1113、1116、1197，但這些突變為 silent 突變，在 *E. coli* 中並不改變 amino acid 的序列。此分析於圖五及表一。

4.4 利用限制酵素確認所建構的質體是否正確

圖十七為使用限制酵素切割 pET-30a(+)-HAS 質體所得之結果，plasmid 的 map 在圖八。Lane 1 為 *Bam*H I、*Xho* I 切割 pET-30a(+)-HAS 質體，可得到 5.4 kb 的 band(右方箭頭 A 所示)和 1.3 kb 之 band(右方箭頭 D 所示)；Lane 2 為 *Afl* II(nt 294)、*Sph* I(nt 1872) 切割 pET-30a(+)-HAS 質體，分別可得到 5.0 kb 之 band(右方箭頭 B 所示)及 1.6 kb 之 band(右方箭頭 C 所示)。

圖十八為使用限制酵素切割 pET-30a(+)-1-HAS 質體所得之結果，plasmid 的 map 在圖十三。Lane 1 為 *Bam*H I、*Xho* I 切割 pET-30a(+)-1-HAS 質體，可得到 5.3 kb 的 band(右方箭頭 A 所示)和 1.3 kb 之 band(右方箭頭 F 所示)；Lane 2 為 *Afl* II(nt 291)、*Sph* I(nt 1737) 切割 pET-30a(+)-1-HAS 質體，可得到 5.0 kb 的 band(右方箭頭 B 所示)和 1.4 kb 之 band(右方箭頭 E 所示)，Lane 3 為 *Afl* II、*Sph* I 切割 pET-30a(+)-HAS 質體，當對照之用，可得到 5.0 kb 的 band(右方箭頭 C 所示)和 1.6 kb 之 band(右方箭頭 D 所示)。

圖十九為使用限制酵素切割 pET-30a(+)-tHAS 質體所得之結果，plasmid 的 map 在圖九。Lane 1 為 *Bam*H I、*Xho* I 切割 pET-30a(+)-tHAS 質體，可得到 5.4 kb 的 band(右方箭頭 A 所示)和 0.7 kb 之 band(右方箭頭 C 所示)；Lane 2 為 *Hind* III(nt 760)、*Sph* I(nt 1315) 切割 pET-30a(+)-tHAS 質體，可得到 5.5 kb 的 band(右方箭頭 B 所示)和 0.6 kb 之 band(右方箭頭 D 所示)。

圖二十為使用限制酵素切割 pET-30a(+)-1-tHAS 質體所得之結果，plasmid 的 map 在圖十四。Lane 1 為 *Bam*H I、*Xho* I 切割 pET-30a(+)-1-tHAS 質體，可得到 5.3 kb 的 band(右方箭頭 A 所示)和 0.7 kb 之 band(右方箭頭 D 所示)；Lane 2 為 *Hind* III(nt 760)、*Sph* I(nt 1182) 切割 pET-30a(+)-1-tHAS 質體，可得到 5.5 kb 的 band(右方箭頭 B 所示)和 0.4 kb 之 band(右方箭頭 F 所示)；Lane 3 為 *Hind* III、*Sph* I 切割 pET-30a(+)-tHAS 質體，當對照之用，可得到 5.5 kb 的 band(右方箭頭 C 所示)和 0.6 kb 之 band(右方箭頭 E 所示)。

4.5 宿主轉形作用

將建構好之 pCDNA3-HAS-HA-HIS(圖七)質體轉形(transformation)於 *E. coli* BL-21(DE3)，pET-30a(+)-HAS(圖八)、pET-30a(+)-tHAS(圖九)、pET-30a(+)-1-HAS(圖十三)、pET-30a(+)-1-tHAS(圖十四)、pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS(圖十二)之質體轉形(transformation)於 *E. coli* NovaBlue(DE3)，而 pBluescript II SK(+)-HAS-HA-HIS-1(圖十五)質體轉形(transformation)於 *E. coli* K5，所得轉形菌株(transformants)所產生之蛋白質則利用 SDS-PAGE 分析，並以 Coomassie blue staining 或 Western blot 作偵測。

4.6 HAS 酵素蛋白質之表現

將建構好的 pCDNA3-HAS-HA-HIS、pET-30a(+)-HAS、pET-30a(+)-tHAS、pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS、pET-30a(+)-1-HAS、pET-30a(+)-1-tHAS 質體轉形於 *E. coli* BL-21(DE3)或 *E. coli* NovaBlue(DE3)，利用 SDS-PAGE 分析並以 Coomassie blue staining 或 Western blot 偵測蛋白質之表現。此重組基因所轉譯之 HAS 蛋白質含有 418

amino acid residues, 再加上尾端之 HA-tag 或 HA-HIS-tag 為 37 或 45 amino acid residues, 預測 HAS-HA 或 HAS-HA-HIS 蛋白質大小約為 50 kDa 或 51 kDa 。

在以 pCDNA3-HAS-HA-HIS 作表現時, 將所得轉形菌株(transformants)分別加入 IPTG 並以四小時誘導(induction), 利用 3.6 所描述之方法, 把所收取細胞予以打破, 可分為上清液及 pellet, 以 SDS-PAGE 分析之。首先以 Coomassie blue 染色, 在上清液部份可見一條較粗的 band 約為 26 kDa(圖二十一 Lane 3), 在 pCDNA3 vector 則無(圖二十一 Lane 2), 此外也發現以 IPTG 誘導, 並未增加 recombinant protein 產量(圖二十一 Lane 3 與 Lane 4 比較)。接著使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 偵測 recombinant protein 之表現時, 並無偵測到任何蛋白質表現(圖二十二)。

又再以 pET-30a(+)-HAS 作表現時, recombinant protein 大小為 51 kDa(HAS (46 kDa) 及 HIS-tag+S-tag(5 kDa))。將所得轉形菌株(transformants)分別加入 IPTG 並以四小時誘導(induction), 利用 3.6 所描述之方法, 把所收取細胞予以打破, 可分為上清液及 pellet, 以 SDS-PAGE 分析之。首先以 Coomassie blue 染色時, 發現不管在上清液或 pellet 部份(圖二十三 Lane 2-Lane 7、Lane 9-Lane 14)與 pET-30a(+) vector(圖二十三 Lane 1 及 Lane 8)比較, 在 55 kDa 與 40 kDa 之間並無觀察到較粗的 band 或多一條 band, 同時在加入 IPTG 誘導四小時亦無明顯增加重組蛋白之表現量(圖二十三 Lane 2-Lane 4 與 Lane 5-Lane 7 比較及 Lane 9-Lane 11 與 Lane 12-Lane 14 比較)。接著使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 偵測 recombinant protein 之表現時, 觀察到在被 IPTG 誘導四小時之 pellet 部份, 可在 79 與 46 kDa 之間靠 46 kDa marker 處可得到一條約 51 kDa 的 band(圖二十四 Lane 12-Lane 14)。

利用 12% SDS-PAGE(Coomassie blue staining)及使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant tHAS protein 及 recombinant HAS protein 在 *E. coli* NovaBlue(DE3)表現差異(圖二十五)。由圖可觀察到 recombinant tHAS protein 及 recombinant HAS protein 不管在上清液或 pellet 之部分, 在 SDS-PAGE 所呈現之型態都一

樣，並無法做區分。但由圖二十六可觀察到在被 IPTG 誘導四小時之 pellet 部份，在 55 kDa 與 40 kDa 之間可得到一條約 51 kDa band 即 pET30a-HAS 所轉譯出的蛋白質大小(圖二十六 Lane 10);而在 33 kDa 與 24 kDa 之間可得到一條約 31 kDa band 即 pET30a-tHAS 所轉譯出的蛋白質大小(圖二十六 Lane 9)。

再以 pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS 做表現時，將所得轉形菌株(transformants)加入 IPTG 並以四小時誘導(induction)，利用 3.6 所描述之方法，把所收取細胞予以打破，可分為上清液及 pellet，以 SDS-PAGE 分析之。首先以 Coomassie blue 染色時，發現不管在上清液或 pellet 部份(圖二十七 Lane 2-Lane 3 及 Lane 5-Lane 6) 與 pET-30a(+) vector(圖二十七 Lane 1 及 Lane 4)比較，在 55 kDa 與 40 kDa 之間並無觀察到較粗的 band 或多一條 band，而在加入 IPTG 誘導四小時亦無明顯增加重組蛋白之表現量(圖二十七 Lane 2 與 Lane 3 比較及 Lane 5 與 Lane 6 比較)。接著使用 Anti-HA-HRP 抗體及藉由 Western blot 偵測 recombinant protein 之表現時，觀察到在被 IPTG 誘導四小時之 pellet 部份，可看到一條約 52 kDa 大小的 band(圖二十八 Lane 6);但再使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 偵測 recombinant protein 之表現時，並無法在 55 kDa 與 40 kDa 之間，看到一條約 52 kDa 大小的 band(圖二十九)。

以 pET-30a(+)-1-HAS 做表現時，將所得轉形菌株(transformants)加入 IPTG 並以四小時誘導(induction)，利用 3.6 所描述之方法，把所收取細胞予以打破，可分為上清液及 pellet，以 SDS-PAGE 分析之。首先以 Coomassie blue 染色時，發現不管在上清液或 pellet 部份(圖三十 Lane 2-Lane 5 及 Lane 7-Lane 10 與 pET-30a(+) vector(圖三十 Lane 1 及 Lane 6)比較，在 55 kDa 與 40 kDa 之間並無觀察到較粗的 band 或多一條 band，而在加入 IPTG 誘導四小時亦無明顯增加蛋白之表現量(圖三十 Lane 2-Lane 3 與 Lane 4-Lane 5 比較及 Lane 7-Lane 8 與 Lane 9-Lane 10 比較)。接著使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 偵測 recombinant protein 之表現時，觀察到在被 IPTG 誘導四小時之 pellet 部份，在 55 kDa 與 40 kDa 之間可看到一條約 46 kDa 大小的 band(圖三十一 Lane 9 及 Lane 10)。

最後利用 12% SDS-PAGE(Comassie blue staining)及使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 pET-30a(+)-tHAS、pET-30a(+)-1-tHAS、pET-30a(+)-HAS、pET-30a(+)-1-HAS 於 *E. coli* NovaBlue(DE3)所表現之重組蛋白之差異。圖三十二為 12% SDS-PAGE Comassie blue staining 之結果，Lane 1 為 pET-30a(+)-tHAS，Lane 2 為 pET-30a(+)-1-tHAS，Lane 3 為 pET-30a(+)-HAS，Lane 4 為 pET-30a(+)-1-HAS，Lane 1~ Lane 4 皆為被 IPTG 誘導四小時之 pellet 部份，而 Lane 1~ Lane 4 在 SDS-PAGE Comassie blue staining 所呈現之型態並無明顯的不同。在圖三十三於 Lane1 33 kDa 與 24 kDa 位置之間可看到一條約 31 kDa 大小的 band(左方箭頭 C 所示)即 pET-30a(+)-tHAS 所表現之 protein 大小，在 Lane 2 33 kDa 與 24 kDa 位置之間靠 24 kDa 處，可看到一條約 25 kDa 大小的 band(左方箭頭 D 所示)即 pET-30a(+)-1-tHAS 所表現之 protein 大小，在 Lane 3 的 55 kDa 與 40 kDa 位置之間可看到一條約 51 kDa 大小的 band(左方箭頭 A 所示)即 pET-30a(+)-HAS 所表現之 protein 大小，最後在 Lane4 55 kDa 與 40 kDa 位置之間可看到一條約 46 kDa 大小的 band(左方箭頭 B 所示)即 pET-30a(+)-1-HAS 所表現之 protein 大小。

4.7 以 Nickel column 純化蛋白

利用 3.9 所描述之方法藉由 Nickel column 純化 pET30a(+)-1-HAS 於 *E. coli* NovaBlue(DE3)所表現之重組蛋白質。把純化後的重組蛋白利用 12% SDS-PAGE Comassie blue staining 及 Western blot 作分析。圖三十四為 Comassie blue staining 之結果，Lane 1 為未純化 sample 之上清液，Lane 2 為未純化 sample 之 pellet，Lane 3 為 sample 之 flow，Lane 4 為 sample 之 wash(用含有 10mM imidazole 之 binding buffer)，Lane 1~ Lane 4 當對照之用，Lane 5 為用含有 500 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第一管 sample，Lane 6 為用含有 30 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第二管 sample，Lane 7 為用含有 200 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第二管 sample，Lane 8 為用含有 500 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第二管 sample，而可於 Lane8

的 55 kDa 與 40 kDa 位置中得到一條約 46 kDa 大小的 band(左方箭頭所示)，為 HAS 重組蛋白所表現之大小；圖三十五為使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析之結果。Lane 1~ Lane 8 所 loading 之 sample 順序與圖一樣，可在 Lane 2(未純化 sample 之 pellet)和 Lane 8(用含有 500 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第二管 sample)的 55 kDa 與 40 kDa 位置中看到一條約 46 kDa 大小的 band(如左方箭頭所示)。



伍、討論

5.1 DNA 序列比對結果

將定序完之 *hasA* 序列與 NCBI 所公佈之 *hasA* 序列(AF 414053)互相比對後，發現定序之 *hasA* 序列上有少數鹼基突變，然而這些突變都為 silent mutations，因此 *hasA* 序列上之 amino acid 序列並不會受到影響，所以 *hasA* ORF 之轉譯(translation)功能應正常，而此 ORF 有 418 amino acid，其蛋白質之大小約為 46 kDa。

5.2 酵素蛋白質表現載體的選擇及重組蛋白質的誘導與表現

首先將 *S. zooepidemicus* 之 *hasA* 序列 DNA 片刻選殖於 pCDNA3 此表現載體，接著將 pCDNA3-HAS-HA-HIS(圖七)轉行於 *E. coli* BL21(DE3)，之後，藉由 12% SDS-PAGE(Coomassie blue staining)及 Western blots 以 Anti-HA-HRP 或 Anti-HIS-HRP 之抗體確認 recombinant proteins 表現，而由圖二十一之結果得知，可在 SDS-PAGE 上，total proteins 上清液之 31 kDa 與 24 kDa 位置中間，觀察到一條 protein band，但此位置並非 *hasA* 序列所轉譯之蛋白質大小，與預測之 46 kDa，少了許多。因此懷疑或許此 recombinant proteins 在 pCDNA3 載體上而轉譯出不正確的蛋白質，或 termini 有分解之現象，而使之無法轉譯出正確大小的蛋白質(約 46 kDa)。由於我無法在 Western blot 利用 Anti-HA-HRP 或 Anti-HIS-HRP 之抗體偵測蛋白質之位置(圖二十二)，因此，若是 termini 分解，因 HA 及 HIS tag 皆在 C 端，因此較可能是 C 端已分解。於是，我試著將 *hasA* 序列選殖於另一表現載體 pET-30a(+), 希望能解決上述所遇到之問題。

因此我試著把 *S. zooepidemicus* 之 *hasA* 序列及 HAS-HA-HIS 序列分別選殖於 pET-30a(+) 及 pET-30a(+)-1，再把建構好之 pET-30a(+)-HAS、pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS 轉行於 *E. coli* NovaBlue(DE3)，由圖二十三及圖二十七結果得知，此 recombinant HAS protein 不論在有無 IPTG 誘導之表現，皆無法由 Coomassie blue staining 偵測，猜測或許

是此重組蛋白質產量非常微量，因此再使用 Western blot 偵測，而由圖二十四及圖二十八結果得知，當以 Anti-HA-HRP 或 Anti-HIS-HRP 之抗體時有得到我所預期大小之蛋白質。

同時為了確認 pET-30a(+)-HAS 所表現出的 recombinant HAS protein 是否真的是 *hasA* ORF 所轉譯出的蛋白質，我建構了 pET-30a(+)-tHAS 質體，此質體所表現出的 recombinant protein 為 truncated form 的 HAS protein，此 truncated form 的 HAS protein 約有 186 個 amino acid 被移除，因此從圖二十六可觀察到 pET-30a(+)-tHAS 所表現的重組蛋白質大小與 pET-30a(+)-HAS 所表現的重組蛋白質大小(50 kDa)相比，而 pET-30a(+)-tHAS 所表現的重組蛋白質的分子量的確有變小約 20 kDa。

然而 pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS 所表現出的重組蛋白質只能用 Anti-HA-HRP 抗體偵測到，嘗試了許多方法，仍無法用 Anti-HIS-HRP 抗體偵測到 C 端的 HIS-tag。推測或許 C 端的 HA-tag 會干擾 C 端的 HIS-tag 的形成，造成 Anti-HIS-HRP 抗體無法偵測。因此我建構了 pET-30a(+)-1-HAS，希望能偵測到 pET-30a(+)-1 上 C 端重新加入的 HIS-tag 的序列，由圖三十一結果得知，Anti-HIS-HRP 抗體應該有偵測到 C 端的 HIS-tag 的序列。

5.3 表現載體的設計與轉形

當我將 *hasA* 序列選殖於 pET-30a(+)此載體上，並把 pET-30a(+)-HAS 轉形於 *E. coli* NovaBlue(DE3)勝任細胞，從圖二十三結果得知，在 SDS-PAGE 上，可觀察在 total proteins 之上清液或 pellet 中及加入 IPTG 誘導前後所呈現的型態，與 negative control pET-30a(+) vector 比較並無明顯之差異，或許此重組蛋白質之產量非常少，而使之無法利用 Coomassie blue staining 偵測；因此使用更靈敏的 Western blot，以利用 Anti-HIS-HRP 之抗體偵測重組蛋白質所表現的蛋白質大小是否正確，最後，在加入 IPTG 誘導 4 小時之 total proteins 的 pellets 可觀察到在 79 與 46 kDa(46 kDa+HIS-tag/S-tag、thrombin 及 enterokinase 之序列共為約 51 kDa)之間靠 46 kDa marker 處(圖二十四)，有符合我所預測

之大小蛋白質，但因在 pET-30a(+) vector 上，它有 N-terminal HIS-tag/S-tag、thrombin 及 enterokinase 之序列，而這些序列所轉譯出蛋白質或許會影響我所轉譯之重組蛋白質之立體結構，因此我試著重新建構 pET-30a(+) vector，將 pET-30a(+) vector 之序列上含有 N-terminal HIS-tag/S-tag、thrombin 及 enterokinase 之序列，利用限制酶 *Nco*I 及 *Nde*I 切除，再進行 Klenow enzyme fill in 及 blunt end ligation，所建構好之質體為 pET-30a(+)-1(圖十)；同時，我亦希望 *hasA* 序列所轉譯之蛋白質能被另一抗體(Anti-HA-HRP)所偵測，因此我利用 PCR 方式，以 pCDNA3-HASHA-HIS 此質體當做 template，得到含有 HAS-HA-HIS 之 DNA 片段，但因限制酶切位之問題，無法把 HAS-HA-HIS 之 DNA 片段直接選殖於 pET-30a(+)-1(圖十)，所以將 HAS-HA-HIS 之 DNA 片段先選殖於 pBluescript II SK(+) 此 vector，再利用限制酶 *Bam*H I 及 *Sal* I 把 HAS-HA-HIS 之 DNA 片段切出，再選殖於 pET-30a(+)-1，最後，再將 pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS(圖十四)此質體轉行於 *E. coli* NovaBlue(DE3)。



5.4 Nickel column 純化蛋白

在 Nickel column 純化蛋白之過程中，我分別使用了含有 30 mM、200 mM、500 mM imidazole 的 binding buffer 沖洗管柱，再將所收集之樣品於 12% SDS-PAGE(Comassie blue staining)及 Western blot 作分析。由圖三十四和圖三十五結果得知，可觀察到只有在含有 500 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第二管 sample，有所要的蛋白質，所以此蛋白是可以被純化出來的。

5.5 結論

綜合本實驗以上的結果得知，我應該有成功的把 *hasA* 此基因選殖於 pET-30a(+) 或被我修飾過的 pET-30a(+)-1 vector 上，同時 *hasA* 此基因在 *E. coli* NovaBlue(DE3)的表現，可使用 Anti-HA-HRP 或 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 偵測 recombinant protein

的表現，並可利用 nickel column 將此蛋白質純化出來，未來可針對此蛋白質做一些 functional assay 的測試及研究。



陸、參考文獻

黃定國,(2002).透明質酸開發與應用, CCRC News, 47,14(3)

Ashbaugh, C. D., Alberti, S., Wessels, M. R. Molecular analysis of the capsule gene region of group A *Streptococcus*: the hasAB genes are sufficient for capsule expression. *Journal of Bacteriology*. 180: 4955- 4959 (1998).

Akira Asari and Satoshi Miyauchi. 2000. Medical application of Hyaluronan.

<http://www.glcoforum.gr.jp>

Armstrong, D. L., Cooney, M. J., Johns, M. R. Growth and amino acid requirements of hyaluronic acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47: 309- 312 (1997).

Balazs, E. A. The physical properties of synovial fluid and the special role of hyaluronic acid. *JB Lippincott*. 63-75 (1974).

Balazs, E. A., Laurent, T. C., Jeanloz, R. W. Nomenclature of hyaluronic acid ., *Biochem.J*. 235: 903 (1986).

Balazs, E. A. Medical applications of hyaluronan and its derivatives. *Cosmetic and pharmaceutical application of polymers*. Plenum Press, New York: 293 (1990).

Balazs, E.A., Denlinger, J.L. Clinical uses of hyaluronan. *Ciba Foundation Symposium* 143:265-275 (1989).

Chong, B. F., Nielsen, L. K. Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. *Biochemical Engineering Journal* 16: 153–162 (2003).

Cooney, M. J., Goh, L. T., Lee, P. L., Johns, M. R. Structured model-based analysis and control of the hyaluronic acid fermentation by *Streptococcus zooepidemicus* : physiological implications of glucose and

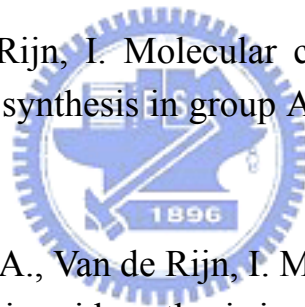
complex-nitrogen limited growth., *Biotechnol. Prog.* 15 (5): 898-910 (1999).

De Luca, C., Lansing, M., Martini, I. Overexpression, one-step purification and characterization of UDP-glucose dehydrogenase and UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* .(4) 1: 131-142 (1996).

Dougherty, B. A., Van de Rijn, I. Molecular characterization of a locus required for hyaluronic acid capsule production in group A *Streptococci*. *J.Exp.Med.*175: 1291-1299 (1992).

Dougherty, B. A., Van de Rijn, I. Molecular characterization of *hasB* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A *Streptococci*. *J.Biol.Chem.*268: 7118-7124 (1993).

Dougherty, B. A., Van de Rijn, I. Molecular characterization of *hasA* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A *Streptococci*. *J.Biol.Chem.* 269: 169-175 (1994).



Crater, D. L., Dougherty, B. A., Van de Rijn, I. Molecular characterization of *hasC* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A *Streptococci*. *J.Biol.Chem.* 270: 28676-28680 (1995).

Dinene, L. Crater, Rijn, I. V. D. Hyaluronic acid synthesis operon (*has*) Expression in Group A *Streptococci* . *J.Biol.Chem.* 270 : 18452-18458 (1995).

DeAngelis, P. L., Papaconstantinou, J., and Weigel, P. H. Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* 268:19181-19184 (1993).

DeAngelis, P. L., and Weigel, P. H. Immunochemical Confirmation of the Primary Structure of Streptococcal Hyaluronan Synthase and Synthesis of High Molecular Weight Product by the Recombinant Enzyme. *Biochemistry.* 33: 9033-9039 (1994).

DeAngelis, P. L., Drake, R. R., and Achyuthan, A. M. Identification and Molecular Cloning of a Unique Hyaluronan Synthase from *Pasteurella multocida*. J. Biol. Chem. 273:8454-8458 (1998).

Glenn D. Prestwich. 2001. Biomaterials from Chemically-Modified Hyaluronan. <http://www.glcoforum.gr.jp>

Hodson, N., Griffiths, G., Cook, N., Pourhossein, M., Gottfridson, E., Lind, T., Lidholt, K. and Roberts, I. S. Identification that KfiA, a protein essential for the biosynthesis of the *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide, is an α -UDP-GlcNAcglycosyltransferase. The formation of a membrane-associated K5 biosynthetic complex requires KfiA, KfiB, and KfiC. J. Biol. Chem. 275: 27311–27315 (2000).

Johns, M. R., Goh, L. T., Oeggerli, A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. Biotech. Letters. 16:507-512 (1994).

Kumari, K. and Weigel, P. H. Molecular Cloning, Expression, and Characterization of the Authentic Hyaluronan Synthase from Group C *Streptococcus equisimilis*. J. Biol. Chem. 272:32539-32546 (1997).

Laurent, T. C. Structure of hyaluronic acid. Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix. 2: 703-703 (1970).

Laurent, T. C., Fraser, J. R. E. Hyaluronan . FASEB J. 6: 2397- 2404 (1992).

Laurent, T.C. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Wenner-Gren International Series No. 72, Portland Press, London, 1998.

Lerner, M. Hyaluronic acid market benefits from new uses. Chem. Mark. Rep. 250: 12-13 (1997).

Larsen, N. E., Leshchiner, E. A., Parent, E. G., and Balazs, E. A. Hylan and hylan derivatives in drug delivery. In Cosmetic and Pharmaceutical Applications of Polymers; C. G. Gebelein, Ed.; Plenum Press: New York, 1991; pp 147-157.

Lavoie, J.P., Couture, L., Higgins, R. Aerobic bacterial isolates in horses in a university hospital, 1986-1988. Can Vet J 32:292-294 (1991).

Luo, Y., Ziebell, M. R., Prestwich, G. D. A hyaluronic acid- Taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells. *Biomacromolecules* 1: 208-218 (2000).

MacLennan, A. P. The production of capsules, hyaluronic acid and hyaluronidase by group A and group C *Streptococci*. *J. Gen. Microbiol.* 14: 134-142 (1956).

Meyer, K., Palmer, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 107: 629-634 (1934).

Meyer, K., Weissman, B. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord. *J. Am. Chem. Soc.* 76: 1753-1757 (1954).

Prehm, P. synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. II. Mechanism of chain growth. *Biochem. J.* 211: 191-198 (1983).

Prestwich, G. D., Marecak, D. M., Marecek, J. F., Vercruyse, K. P., Ziebell, M. R. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications and biodegradation of hydrazide derivatives. *J. Controlled Release* 53: 93-103 (1998).

Rapport, M. M., Weissman, B., Linker, A. Isolation of a crystalline disaccharide, hyalobiuronic acid from hyaluronic acid. *Nature* 168:996-997 (1951).

Rigg, G. P., Barrett, B. and Roberts, I. S. The localization of KpsC, S and T and KfiA, C and D proteins involved in the biosynthesis of the *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide: evidence for a membrane-bound complex. *Microbiology* 144: 2905–2914 (1998).

Roden, L., Campbell, P., Fraser, J.R.E. Enzymic pathways of hyaluronan catabolism. *Ciba Foundation Symposium* 143: 60-76 (1989).

Roman, E., Roberts, I., Lidholt, K., Kusche-Gullberg, M. Overexpression of UDP-glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* results in decreased biosynthesis of K5 polysaccharide. *Biochem. J.* 374: 767-772 (2003).

Sambrook J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). *Molecular cloning : a laboratory*

manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Scott, J. E., Cummings, C., Brass, A., Chen, Y. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution investigated by rotary stimulation. *Biochem.J.* 274: 99 (1991).

Sharif, M. Serum hyaluronic acid levels a predictor of disease progression in osteoarthritis of the knee. *arthritis and rheumatism.* 38(6): 760-767 (1995).

Valarie, L., Bruce, T. S., Baggenstoss, A., Clyne, Tracy, Weigel, Paul H. Purification and lipid dependence of the recombinant hyaluronan synthase from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis*. *J.Bio.Chem.* 274(7)4239-4245 (1999).

Vercruyse, K. P., Prestwich, G. D. Hyaluronate derivatives in drug delivery. *Crit. Rev. Therapeut. Carrier Syst.* (15): 513-555 (1998).

Vincent Hascall and Torvard Laurent. 1997. Hyaluronan : structure and physical properties. <http://www.glcforum.gr.jp>

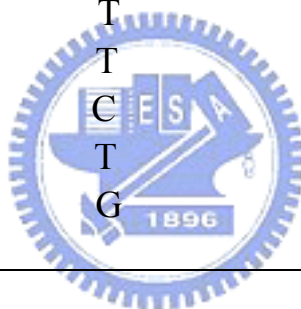
Weigel, P. H., Hascall, V. C., and Tammi, M. Minireview Hyaluronan Synthases. *J.B.C.* 272: 13997-14000 (1997).

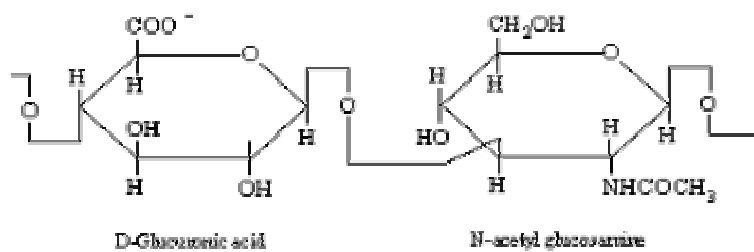
Weickert, M. J., Doherty, D. H. Best, E. A., Olins, P. O. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology.* 7: 494-499 (1996).

Weiss, C., Levy, H., Denlinger, I.L. The role of Na-hyaln in reducing postsurgical tendon adhesion. Part1. *Bull Hosp Jt Dis Orthop Inst.* 46: 9~15 (1987).

表一、定序 *hasA* 序列(1-418 amino acid)與 NCBI *S. zooepidemicus hasA*(AF 414053)序列互相比較之變異處

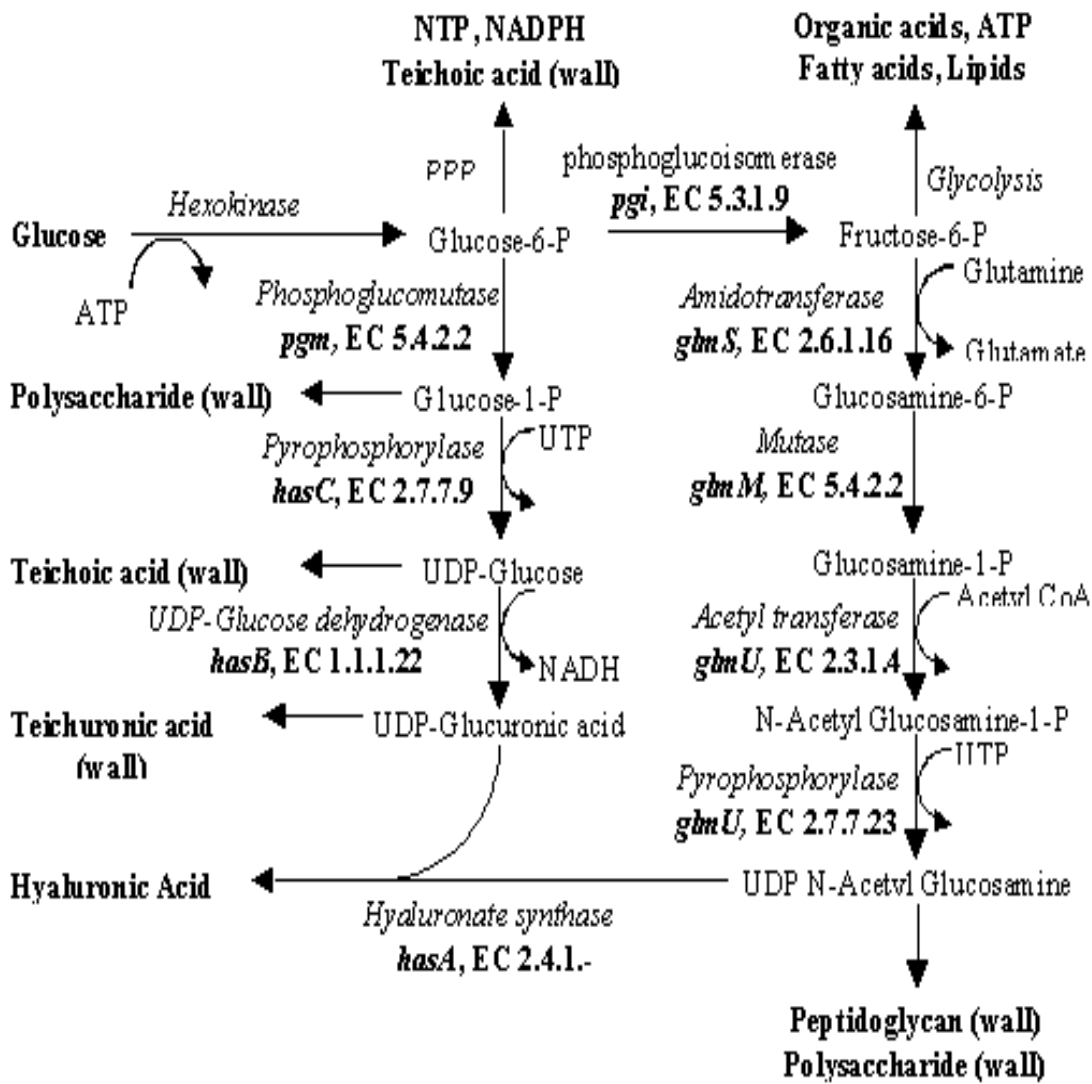
nucleotide position	nucleotide changes		amino acid changes
	NCBI	lab. <i>hasA</i>	
393	T	C	131His→His
402	G	A	133Glu→Glu
504	T	C	168Ala→Ala
669	C	T	223Ile→Ile
672	T	C	224Leu→Leu
684	T	C	228Gly→Gly
771	T	C	257Ile→Gly
1065	A	G	355Leu→Leu
1095	C	T	365Ala→Ala
1098	G	T	366Leu→Leu
1104	G	T	368Arg→Arg
1107	C	T	369Asn→Asn
1113	T	C	371His→His
1116	C	T	372Tyr→Tyr
1197	A	G	399Leu→Leu



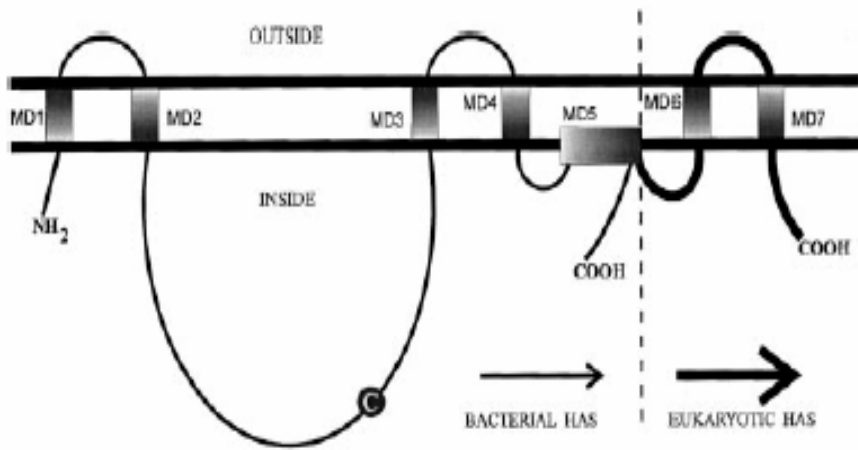


圖一. Disaccharide repeating unit of HA comprising GlcUA and GlcNAc



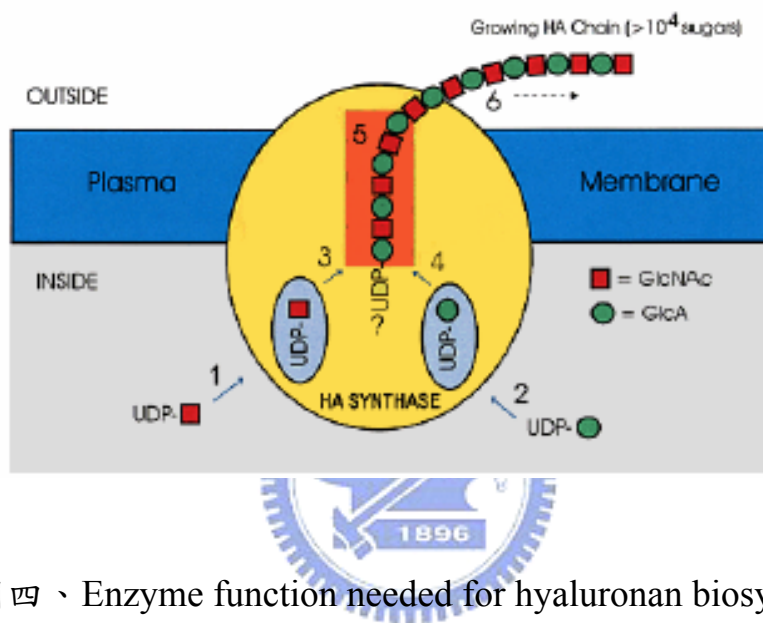


圖二、透明質酸合成酶在 *S. zooepidemicus* 之生合成路徑。



圖三、Proposed membrane topology for the HAS family.





圖四、Enzyme function needed for hyaluronan biosynthesis.

NCBI sequence 1 **atgagaacat taaaaaacct cataactggt gtggccttta gtatTTTTTg ggtactgttg**

定序 *hasA*

1 atgagaacat taaaaaacct cataactggt gtggccttta gtatTTTTTg ggtactgttg

61 atttacgtca atgtttatct ctttgggtgct aaaggaagct tgtcaattta tggctTTTTg

61 atttacgtca atgtttatct ctttgggtgct aaaggaagct tgtcaattta tggctTTTTg

121 ctgatagctt acctattagt caaaatgtcc ttatcctttt ttacaagcc atttaagggga

121 ctgatagctt acctattagt caaaatgtcc ttatcctttt ttacaagcc atttaagggga

181 agggctgggc aatataaggt tgcagccatt attcctctt ataacgaaga tgcctgagtc

181 agggctgggc aatataaggt tgcagccatt attcctctt ataacgaaga tgcctgagtc

241 ttgctagaga ccttaaaaag tttcagcag caaacctatc ccttagcaga aatttatggt

241 ttgctagaga ccttaaaaag tttcagcag caaacctatc ccttagcaga aatttatggt

301 gttgacgatg gaagtgtga tgagacaggt attaagcga ttgaagacta tgtgcgtgac

301 gttgacgatg gaagtgtga tgagacaggt attaagcga ttgaagacta tgtgcgtgac

361 actggtgacc tatcaagcaa tgcattggt caCGgtcag aAAAAatca aggaaagcgt

361 actggtgacc tatcaagcaa tgcattggt caCGgtcag aAAAAatca aggaaagcgt

421 catgcacagg cctgggcctt tgaagatca gacgctgatg tcttttgac cgttgactca

421 catgcacagg cctgggcctt tgaagatca gacgctgatg tcttttgac cgttgactca

481 gatacttata tctaccctga tgccttagag gagttgtaa aaaccttaa tgaccaact

481 gatacttata tctaccctga tgccttagag gagttgtaa aaaccttaa tgaccaact

541 gtttttctg cgacgggtca ccttaatgic agaaatagac aaaccaatct ctaaacagc

541 gtttttctg cgacgggtca ccttaatgic agaaatagac aaaccaatct ctaaacagc

601 ttgacagata ttcgctatga taatgctttt ggcgttgaac gagctgceca atccgttaca

601 ttgacagata ttcgctatga taatgctttt ggcgttgaac gagctgceca atccgttaca

661 ggtaatatcc ttgttctc aggtccgctt agcgtttaca gacgcgaggt ggttgttct

661 ggtaatatcc ttgttctc aggtccgctt agcgtttaca gacgcgaggt ggttgttct

721 aacatagata gatacatcaa ccagacctc ctgggtatc ctgtaagtat tggatgatgac

721 aacatagata gatacatcaa ccagacctc ctgggtatc ctgtaagtat tggatgatgac

781 aggtgcttga ccaactatgc aactgattta ggaaagactg ttatcaatc cactgctaaa

781 aggtgcttga ccaactatgc aactgattta ggaaagactg ttatcaatc cactgctaaa

841 tgtattacag atgttctga caagatgtct acttactga agcagcaaaa ccgctggaac

841 tgtattacag atgttctga caagatgtct acttactga agcagcaaaa ccgctggaac

901 aagtccttct ttgagagatc cattatttct gtaagaaaa tcatgaacaa tcttttcta

901 aagtccttct ttgagagatc cattatttct gtaagaaaa tcatgaacaa tcttttcta

961 gccctatgga ccatactga ggtgtctatg tttatgatgc ttgtttatc tgtggtggat

961 gccctatgga ccatactga ggtgtctatg tttatgatgc ttgtttatc tgtggtggat

1021 tctttttag gcaatgtcag agaatttgat tggctcaggg ttttagcctt tctggtgatt

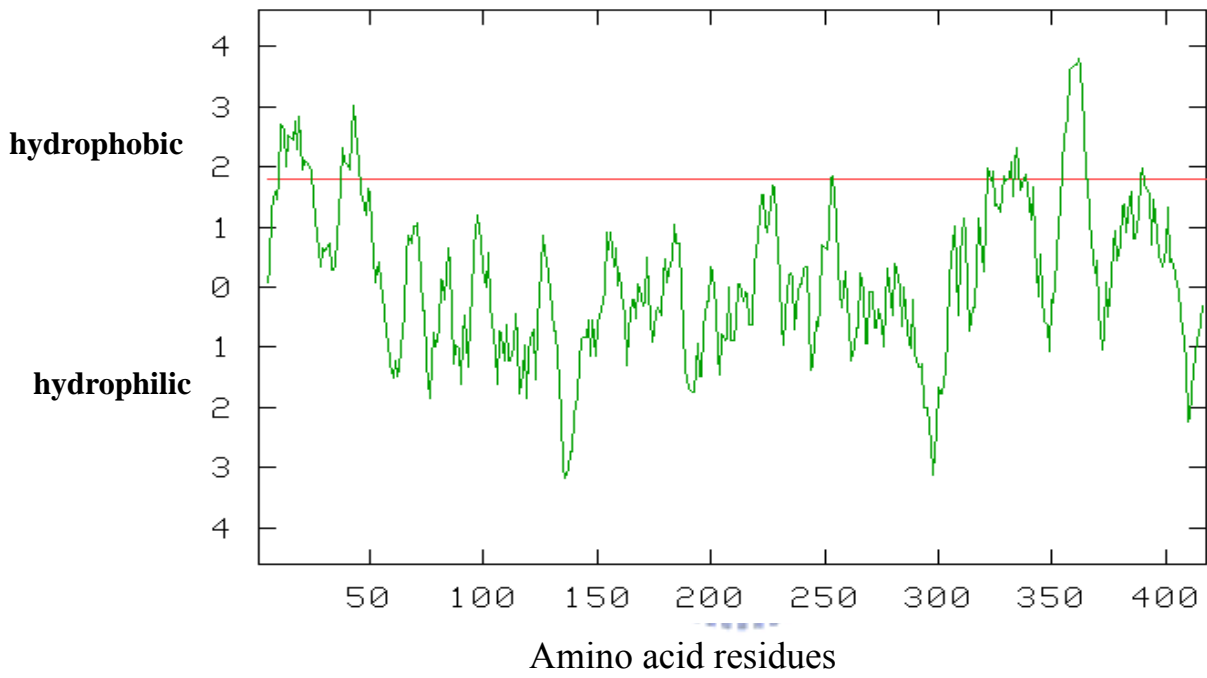
1021 tctttttag gcaatgtcag agaatttgat tggctcaggg ttttagcctt tctggtgatt

1081 atcttcattg ttgcctgtg teggaacatt cattacatgc ttaagcacc gctgtcctc

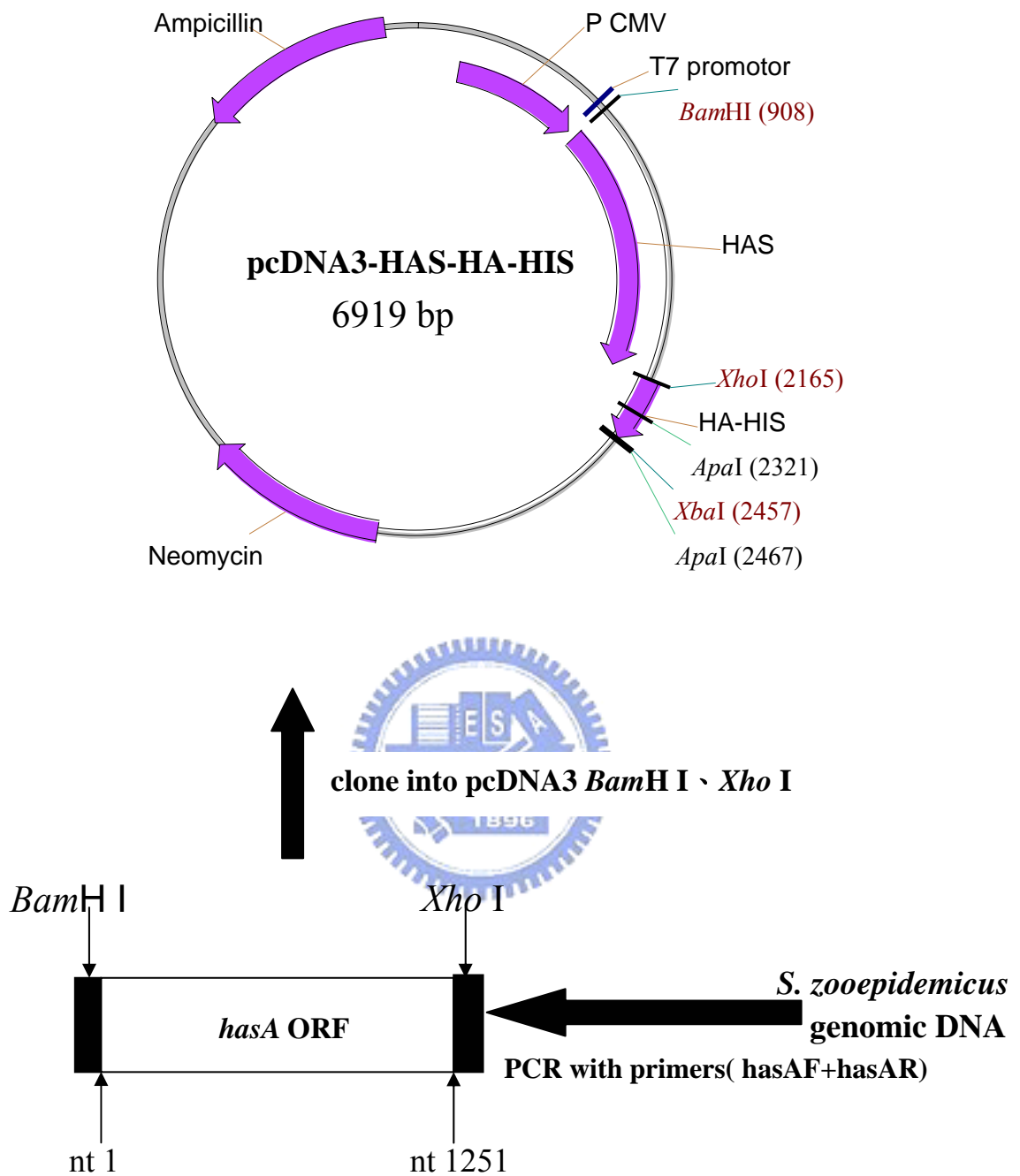
1081 atcttcattg ttgc**tt**tg tcg**ta**att ca**ta**tatgc ttaagcaccg getgtccttc
1141 ttgtatctc cgtttatgg ggtgctgcat ttgttgcc tacagccctt gaaattat
 1141 ttgtatctc cgtttatgg gga**ct**gcat ttgttgcc tacagccctt gaaatt**g**at
1201 tctctttta ctattagaaa tgctgactgg ggaacacgta aaaaattatt ataa
 1201 tctctttta ctattagaaa tgctgactgg ggaacacgta aaaaattatt ataa

圖五、定序之本研究之 *hasA* 序列與 NCBI *hasA*(AF 414053)序列比對結果相異處以 ■ 標示 *hasA* 序列上。



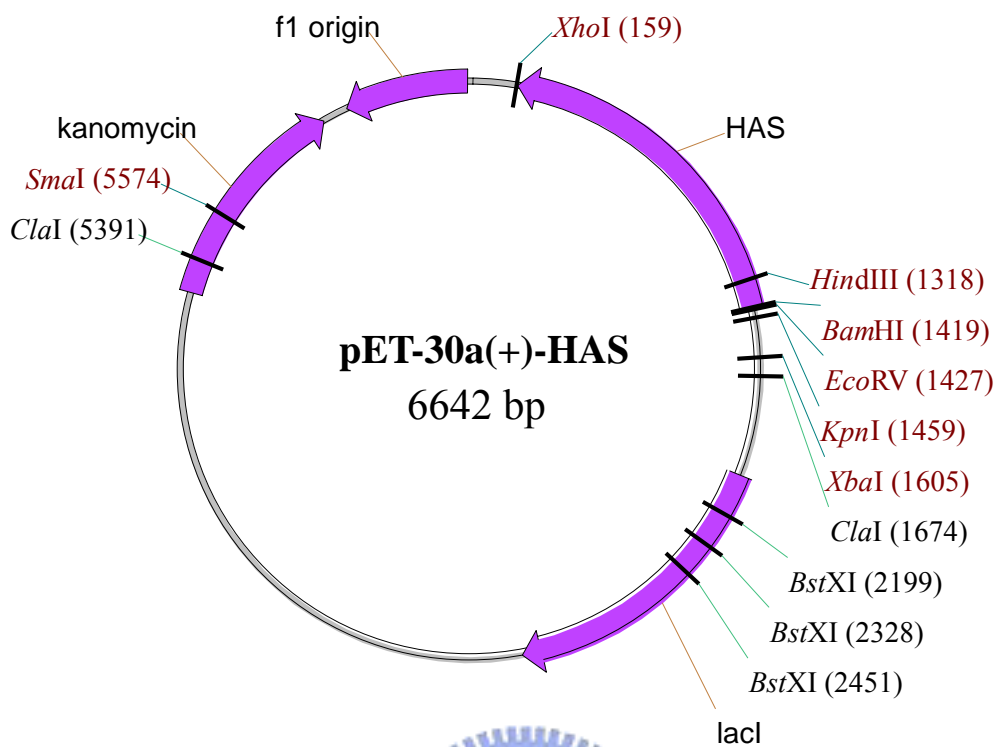


圖六、*S. zooepidemicus* HAS 之 Kyte-Doolittle hydropathy plot。



圖七、pcDNA3-HAS-HA-HIS 質體之 map。

nt indicate the position of the *hasA* ORF



clone into pET-30a(+) *BamH I* · *Xho I*

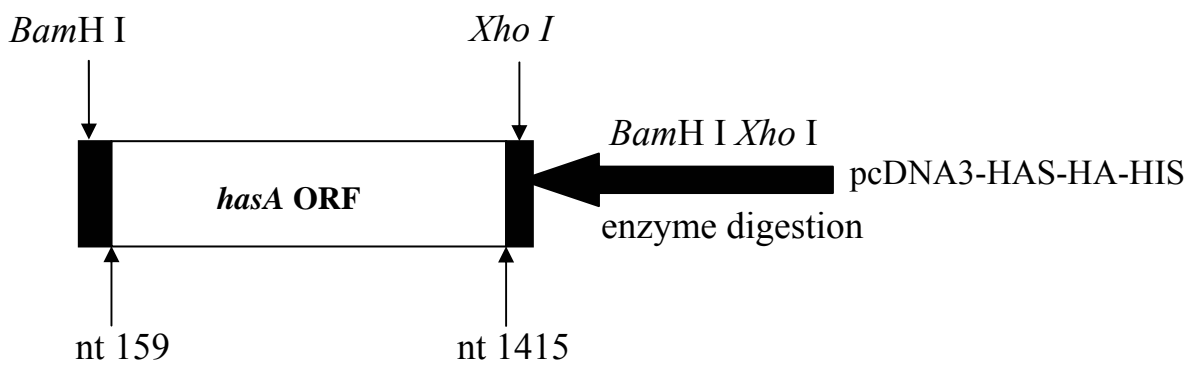
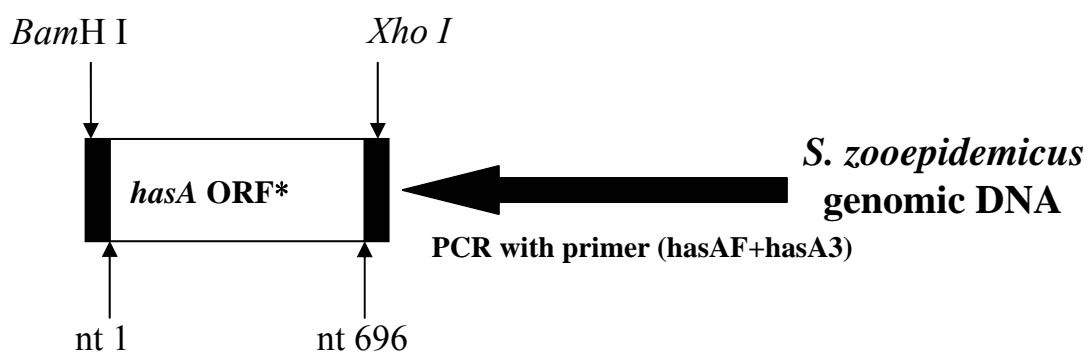
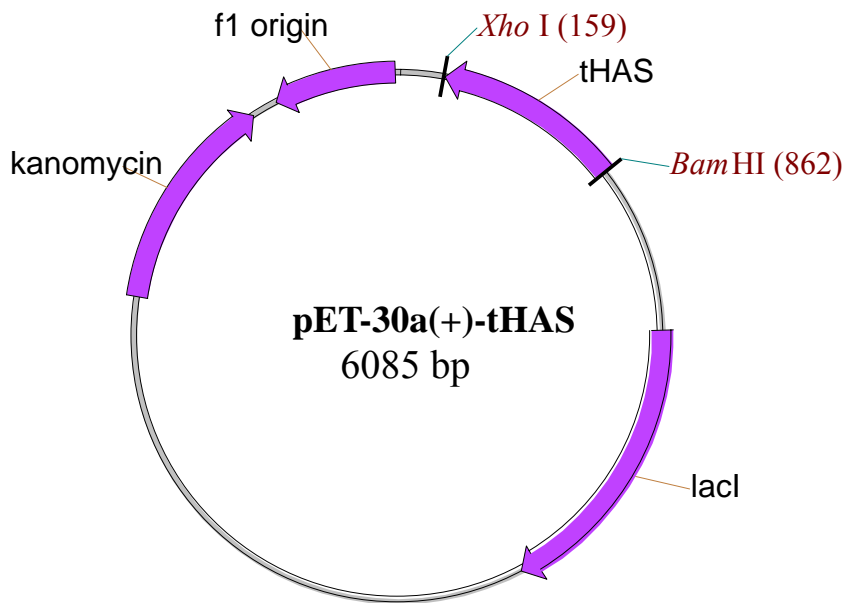


圖 八、pET-30a(+)-HAS 質體之 map。

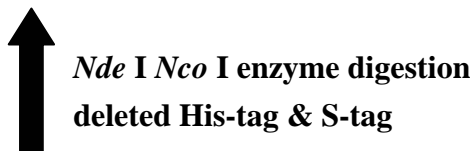
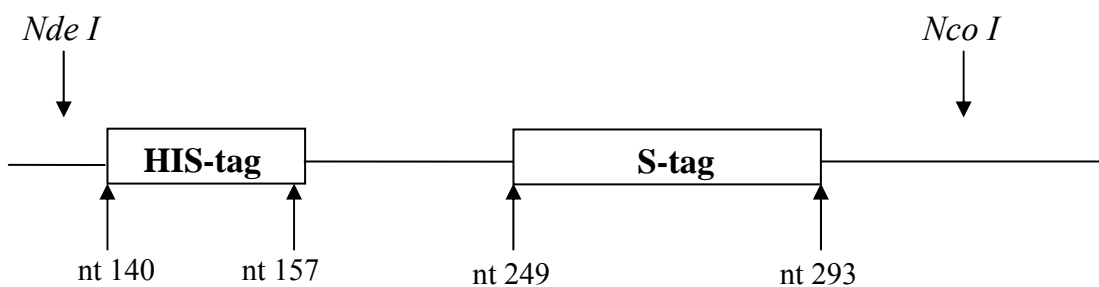
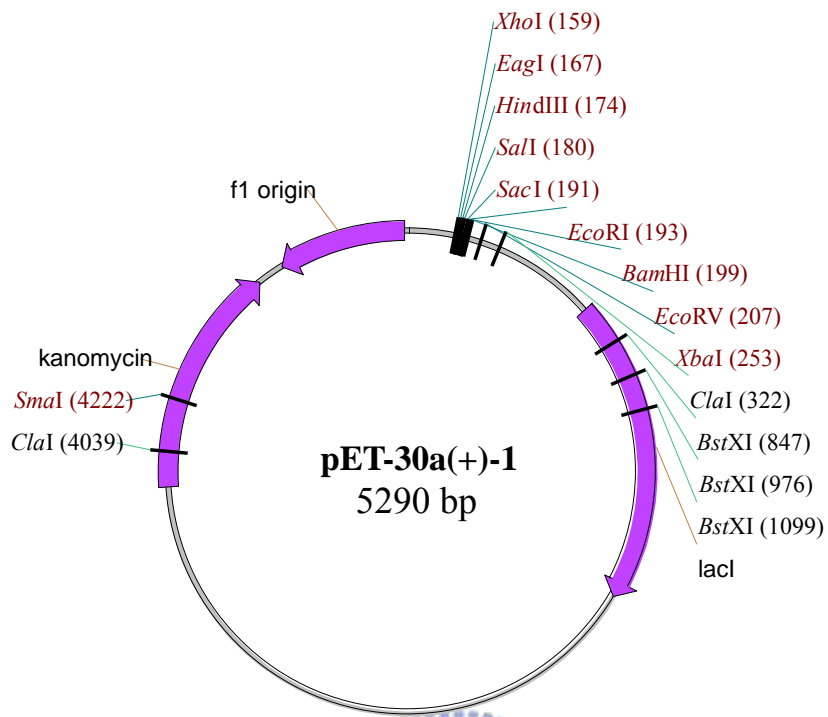
nt indicate the position of pcDNA3-HAS-HA-HIS



圖九、pET-30a(+)-tHAS 質體之 map。

nt indicate the position of the *hasA* ORF

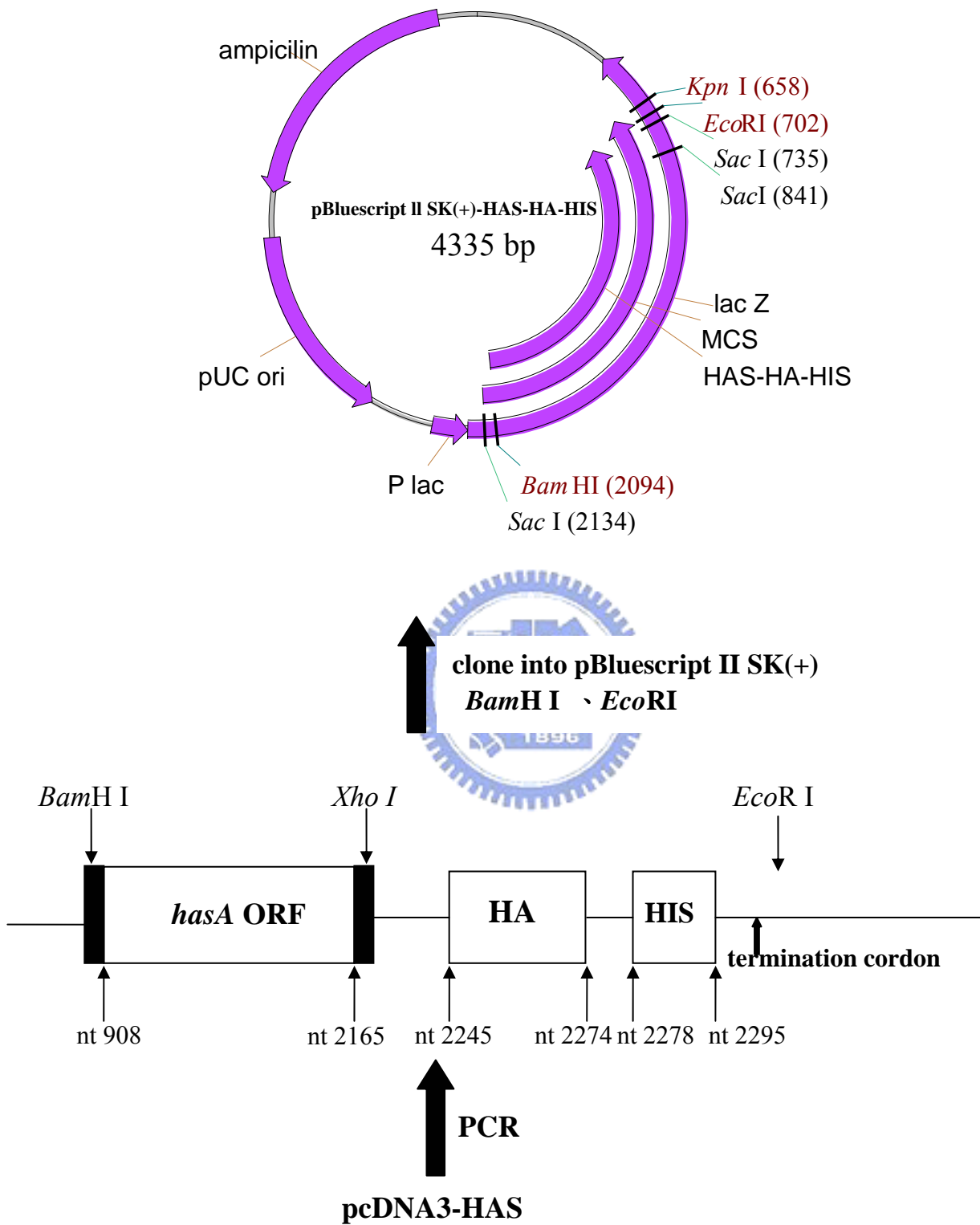
*: 為 truncated form *hasA*



pET-30a(+)

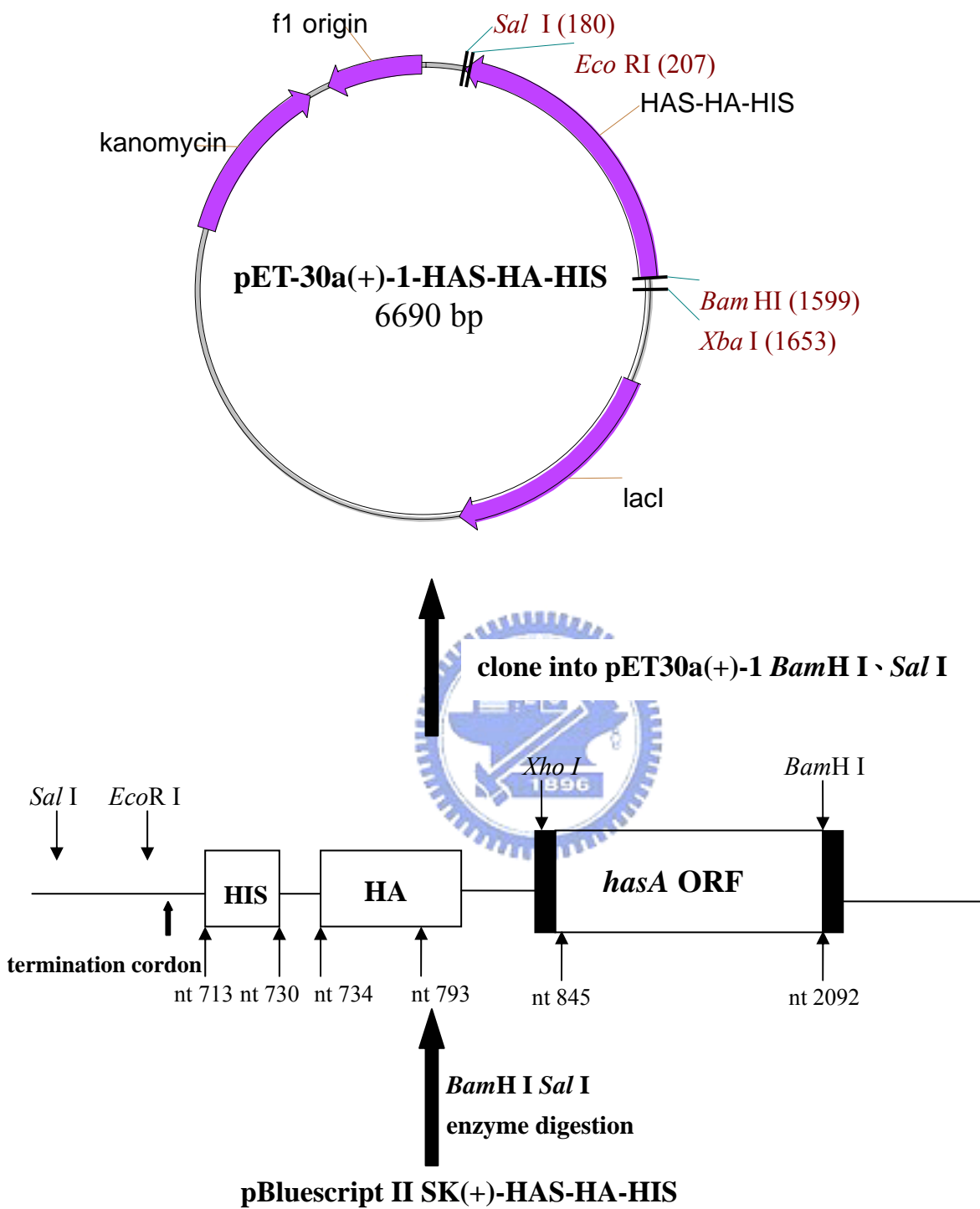
圖十、 pET-30a(+)-1 質體。

nt indicate the position of pET-30a(+)



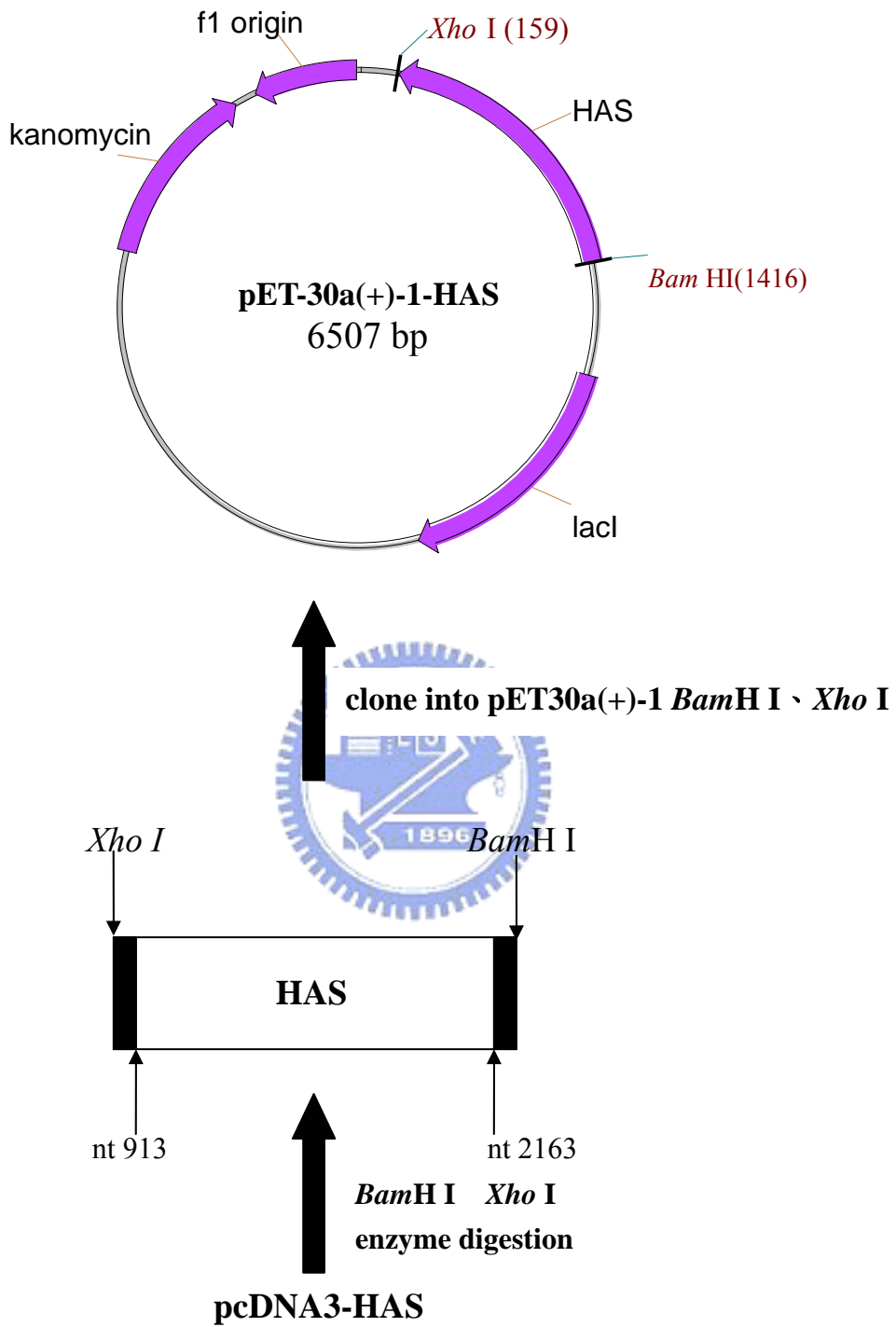
圖十一、 pBluescript II SK(+)-HAS-HA-HIS 質體之 map。

nt indicate the position of the pcDNA3-HAS



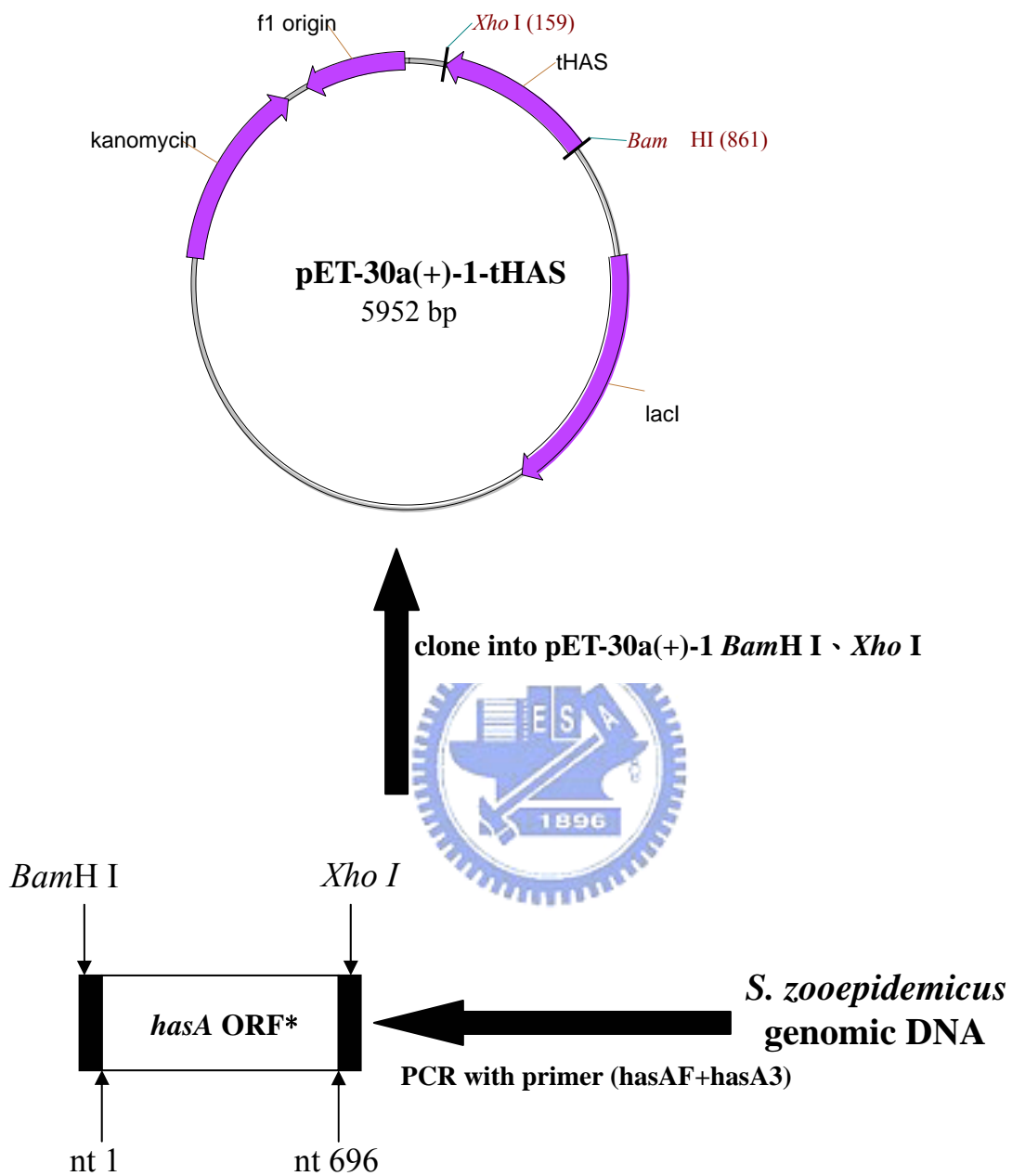
圖十二、pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS 質體之 map。

nt indicate the position of pBluescript II SK(+)-HAS-HA-HIS



圖十三、 pET-30a(+)-1-HAS 質體之 map。

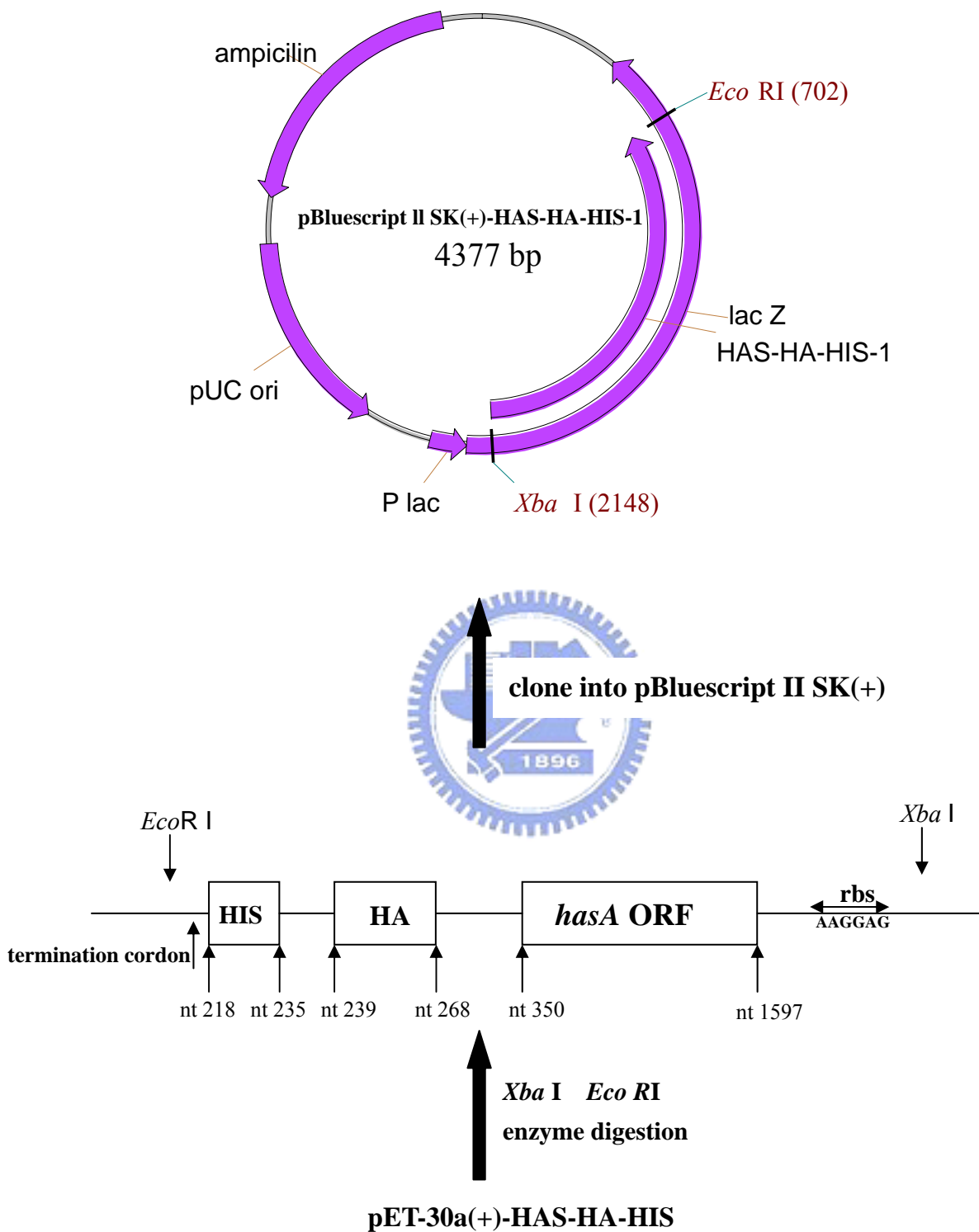
nt indicate the position of the pcDNA3-HAS-HA-HIS



圖十四、pET-30a(+)-1-tHAS 質體之 map。

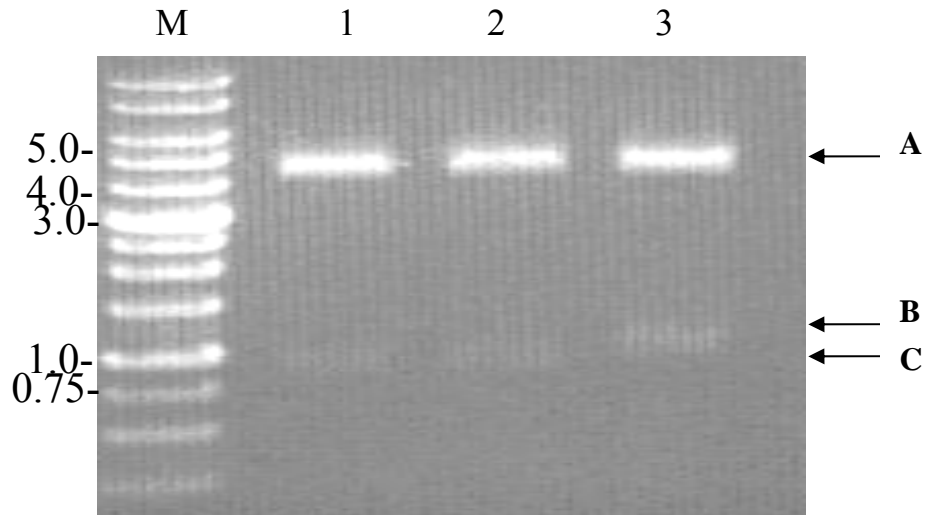
nt indicate the position of the *hasA* ORF

*: 為 truncated form *hasA*

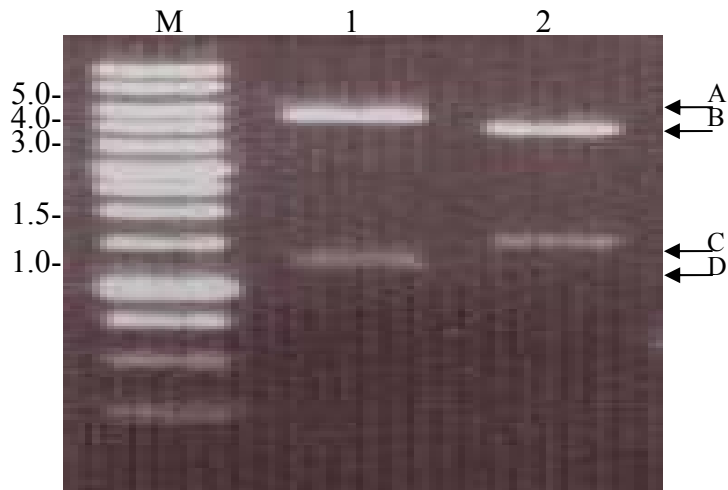


圖十五、 pBluescript II SK(+)-HAS-HA-HIS-1 質體之 map。

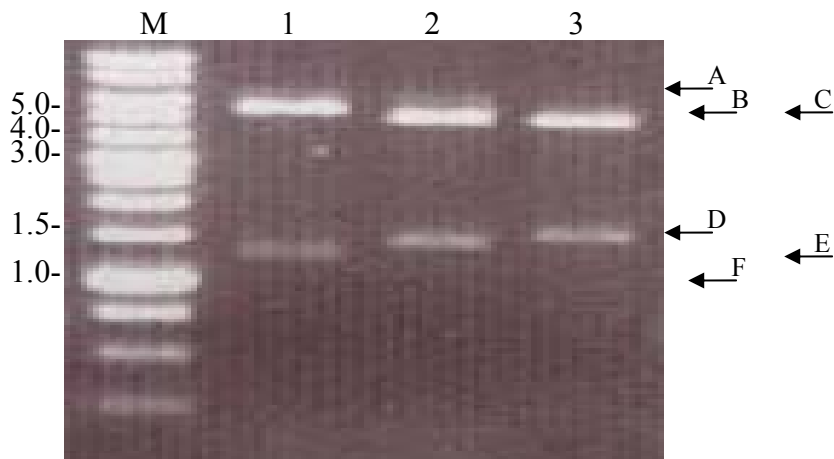
rbs: ribosomal binding site
 nt indicate the position of pET-30a(+)-HAS-HA-HIS



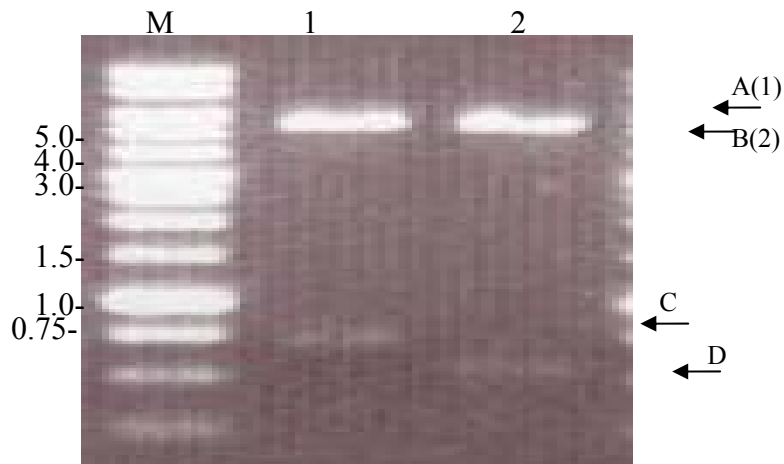
圖十六、利用 *Mlu* I 及 *Xba* I 限制酵素確認所建構的 pET-30a(+)-1 是否以將 N 端的 HIS-tag 及 S-tag 序列去除。Lane 1、lane 2 為 pET-30a(+)-1；lane 3 為 pET-30a(+) 當對照之用；右方箭頭所指為酵素切割後所得的 DNA 片段。A: 約 4.4 kb 之 band，B: 約 1.0 kb 之 band，C: 約 0.9 kb 之 band



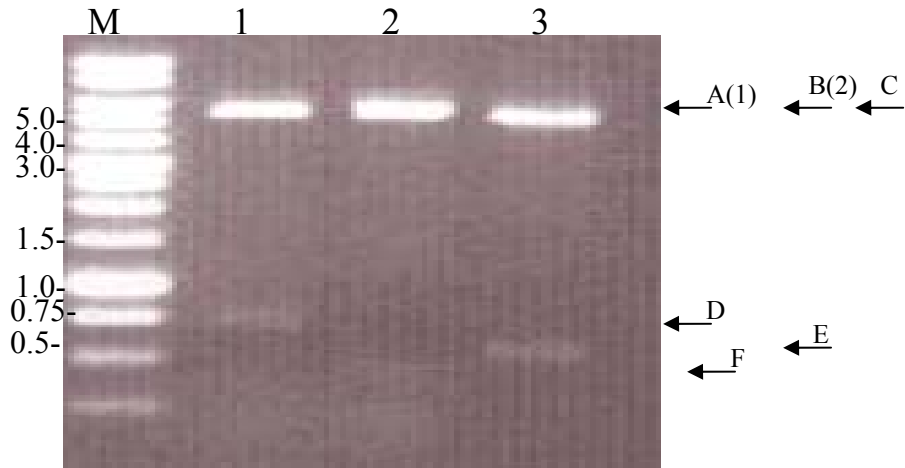
圖十七、利用 *BamH I*、*Xho I* 及 *Afl II*、*Sph I* 這兩組限制酵素確認所建構的 pET-30a(+)-HAS 質體是否正確。lane 1 為 *BamH I*、*Xho I* 切割 pET-30a(+)-HAS；lane 2 為 *Afl II*、*Sph I* 切割 pET-30a(+)-HAS；右方箭頭所指為酵素切割後所得片段。A: 約 5.4 kb 之 band，B: 約 5.0 kb 之 band，C: 約 1.6 kb 之 band，D: 約 1.3 kb 之 band。



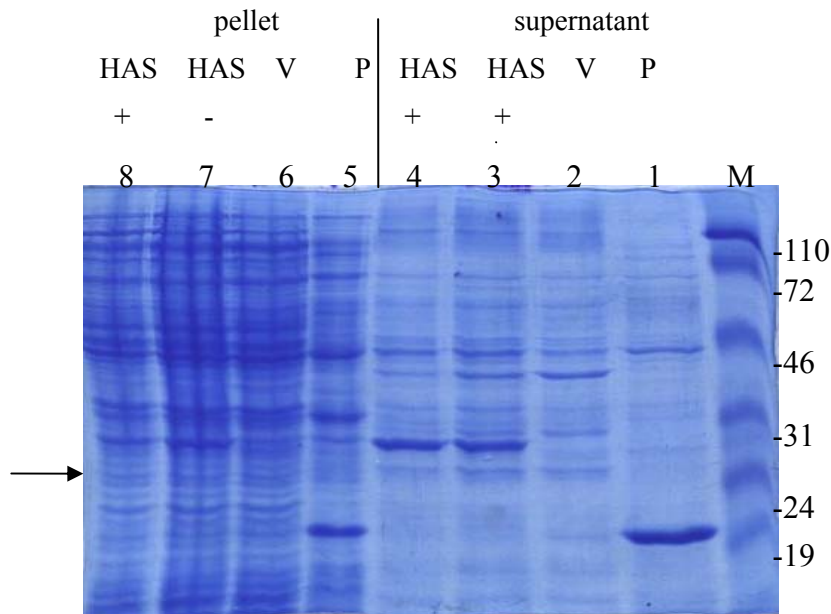
圖十八、利用 *Bam*H I 、*Xho* I 及 *Afl* II、*Sph* I 這兩組限制酵素確認所建構的 pET-30a(+)-1-HAS 質體是否正確。lane 1 為 *Bam*H I 、*Xho* I 切割 pET-30a(+)-1-HAS；lane 2 為 *Afl* II、*Sph* I 切割 pET-30a(+)-1-HAS；lane 3 為 *Afl* II、*Sph* I 切割 pET-30a(+)-HAS 當對照之用；右方箭頭所指為酵素切割後所得片段。A: 約 5.3 kb 之 band，B: 約 5.0 kb 之 band，C: 約 5.0 kb 之 band，D: 約 1.6 kb 之 band，E: 約 1.4 kb 之 band，F: 約 1.3 kb 之 band。



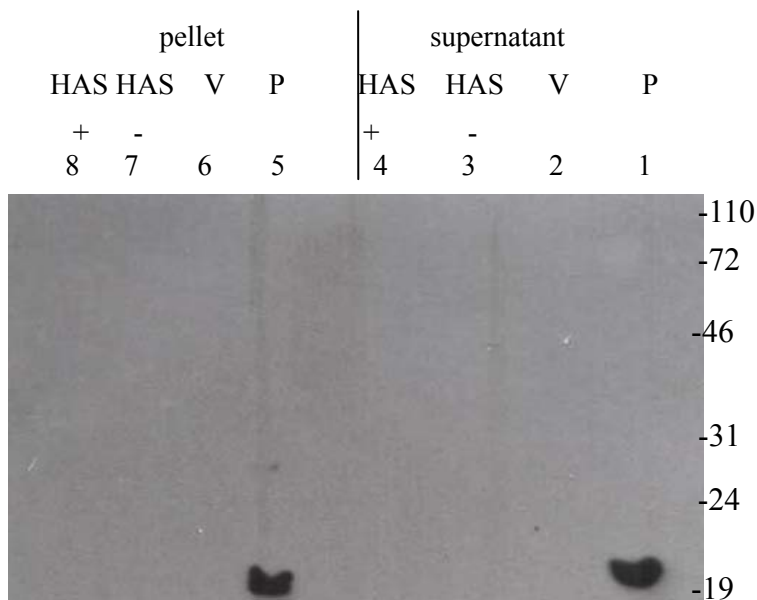
圖十九、利用 *BamH* I、*Xho* I 及 *Hind* III、*Sph* I 這兩組限制酵素確認所建構的 pET-30a(+)-tHAS 質體是否正確。lane 1 為 *BamH* I、*Xho* I 切割 pET-30a(+)-tHAS；lane 2 為 *Hind* III、*Sph* I 切割 pET-30a(+)-tHAS；右方箭頭所指為酵素切割後所得片段。A: 約 5.4 kb 之 band，B: 約 5.5 kb 之 band，C: 約 0.7 kb 之 band，D: 約 0.6 kb 之 band。



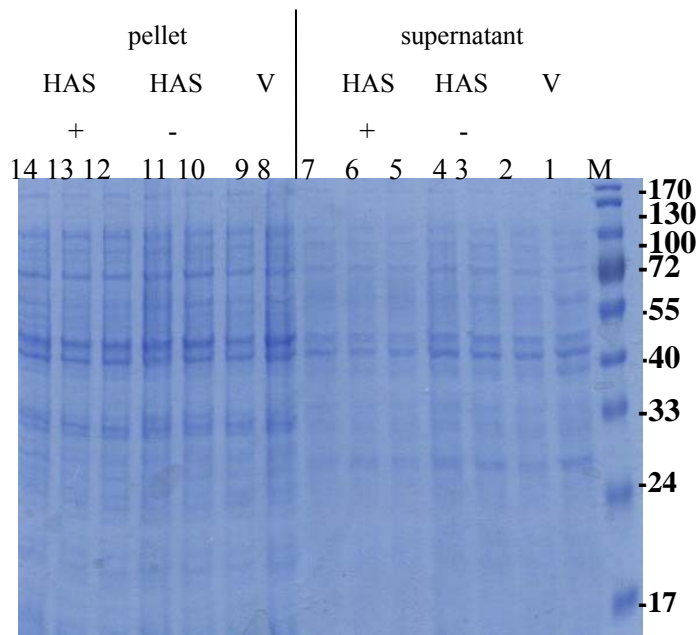
圖二十、利用 *Bam*HI、*Xho*I 及 *Hind*III、*Sph*I 這兩組限制酵素確認所建構的 pET-30a(+)-1-tHAS 質體是否正確。lane 1 為 *Bam*HI、*Xho*I 切割 pET-30a(+)-1-tHAS；lane 2 為 *Hind*III、*Sph*I 切割 pET-30a(+)-1-tHAS；lane 3 為 *Hind*III、*Sph*I 切割 pET-30a(+)-tHAS 當對照之用；右方箭頭所指為酵素切割後所得片段。A:約 5.3 kb 之 band，B:約 5.5 kb 之 band，C:約 5.5 kb 之 band，D:約 0.7 kb 之 band，E:約 0.6 kb 之 band，F:約 0.4 kb 之 band。



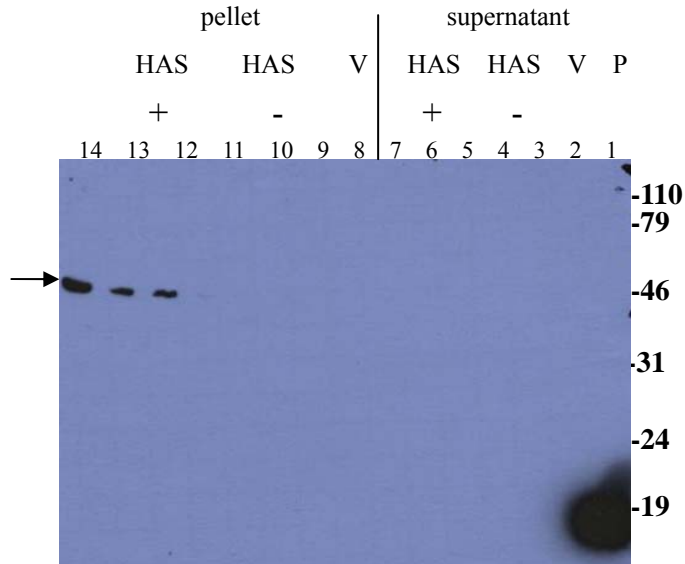
圖二十一、藉由 12% SDS-PAGE Coomassie blue staining 分析 recombinant HAS protein 在 *E. coli* BL-21(DE3)表現之結果。M 為 marker；lane 1-lane 4 為 total proteins 之 supernatant 以及 lane 5-lane 8 為 pellet；lane 1、lane 5 為 positive control pET-30b-HeptB(20 kDa)；lane 2、lane 6 為 pcDNA3 vector；lane 3、lane 7 為 pcDNA3-HAS-HA-HIS 不加 1M IPTG 誘導；lane 4、lane 8 為 pcDNA3-HAS-HA-HIS 加入 1M IPTG 誘導四小時。P: positive control，V: vector，HAS: pcDNA3-HAS-HA-HIS，+: 加 IPTG，-: 不加 IPTG



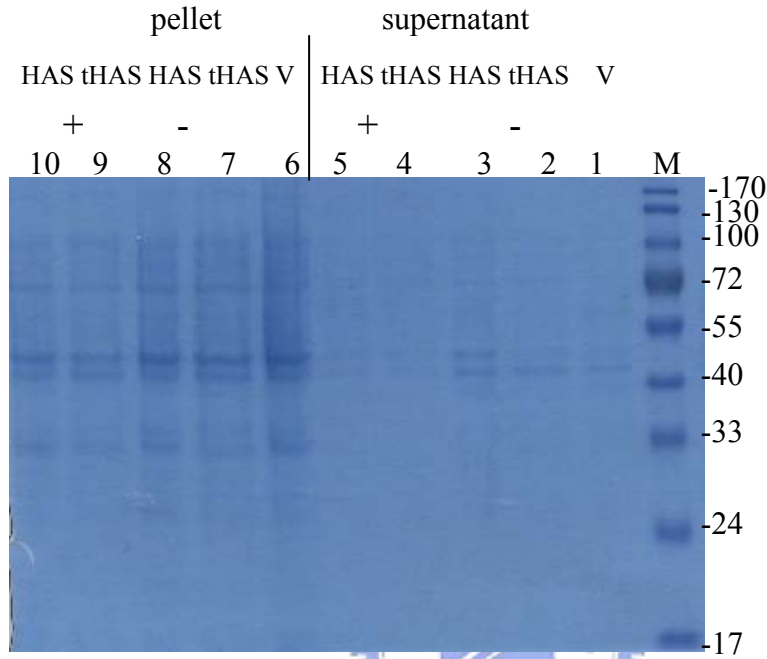
圖二十二、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant HAS protein 在 *E. coli* BL21(DE3)表現之結果。lane 1-lane 4 為 total proteins 之 supernatant 以及 lane 5-lane 8 為 pallet; lane 1、lane 5 為 positive control pET-30b-HeptB(20 kDa);lane 2、lane 6 為 pcDNA3 vector; lane 3、lane 7 為 pcDNA3-HAS-HA-HIS 不加 1M IPTG 誘導; lane 4、lane 8 為 pcDNA3-HAS-HA-HIS 加入 1M IPTG 誘導四小時。P: positive control, V: vector, HAS: pcDNA3-HAS-HA-HIS, +: 加 IPTG, -: 不加 IPTG。



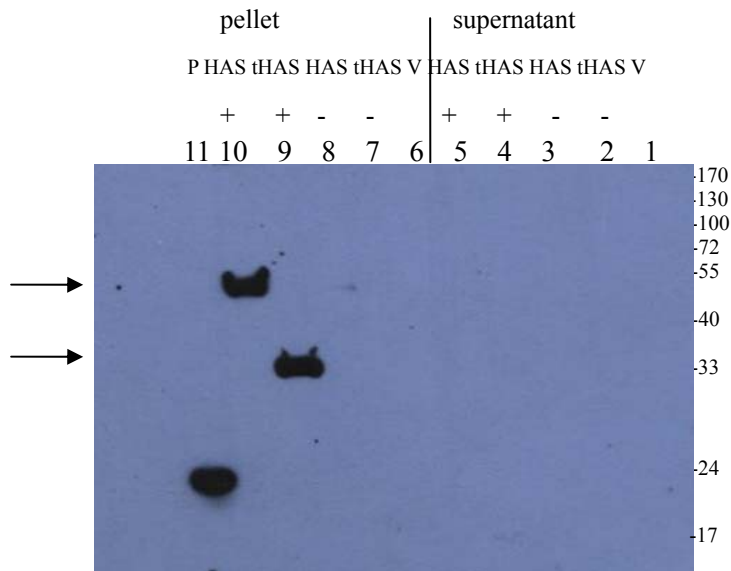
圖二十三、藉由 12% SDS-PAGE Coomassie blue staining 分析 recombinant HAS protein 在 *E. coli* NovaBlue(DE3)表現之結果。M 為 marker；lane 1-lane 7 為 total proteins 之 supernatant 以及 lane 8-lane 14 為 pellet；lane 1 及 lane 8 為 pET-30a(+) vector； lane 2、lane 3、lane 4、lane 9、lane 10 lane 11 為 pET-30a-HAS 不加 IPTG；lane 5、lane 6、lane 7、lane 12、lane 13、lane 14 為 pET-30a(+)-HAS 加入 1M IPTG 誘導四小時。V: vector，HAS: pET-30a(+)-HAS，+: 加 IPTG，-: 不加 IPTG



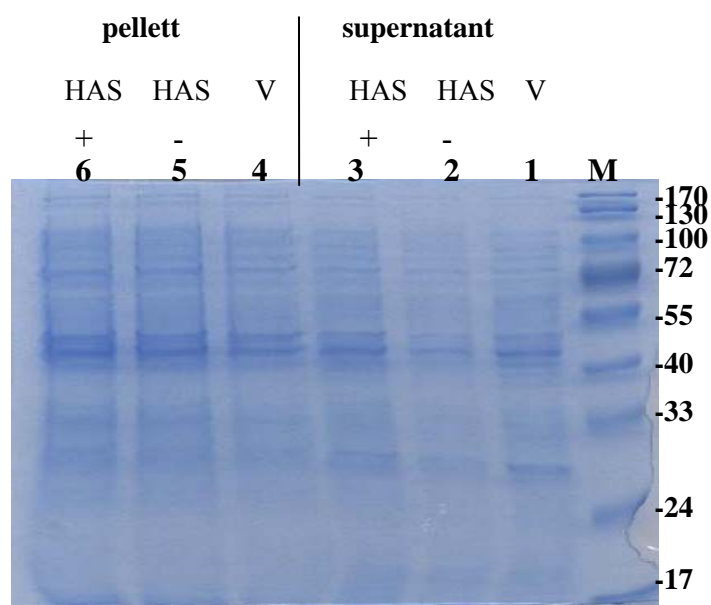
圖二十四、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant HAS protein 在 *E. coli* NovaBlue(DE3) 表現之結果。lane 1 為 positive control pET30b-HeptB(20 kDa)；lane 2-lane 8 為 total proteins 之 supernatant 以及 lane 9-lane 14 為 pallet；lane 2 為 pET-30a vector； lane 3、lane 4、lane 5、lane 9、lane 10、lane 11 為 pET-30a(+)-HAS 不加 IPTG 誘導；lane 6、lane 7、lane 8、lane 12、lane 13、lane 14 為 pET-30a(+)-HAS 加入 1M IPTG 誘導四小時。而 lane 12、lane 13、lane 14 為不同 colony。P: positive control，V: vector，HAS: pET-30a(+)-HAS，+: 加 IPTG，-: 不加 IPTG



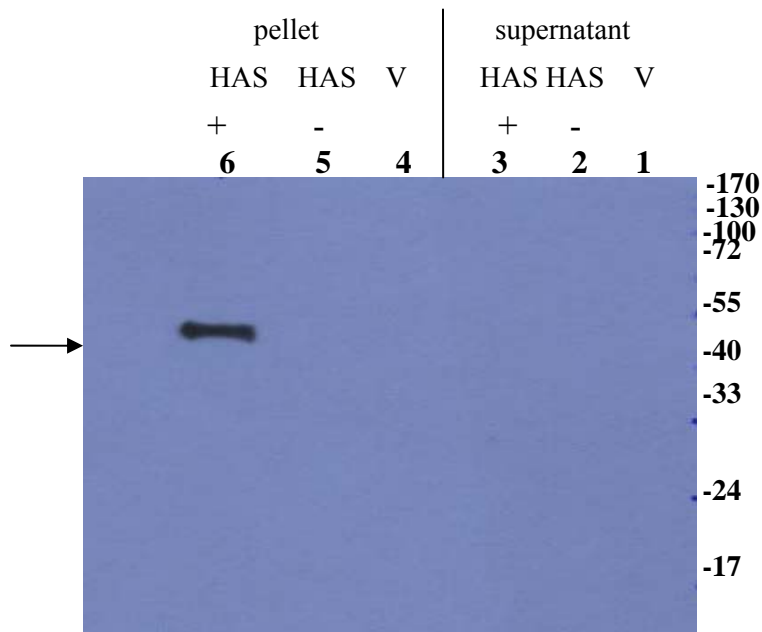
圖二十五、藉由 12% SDS-PAGE Coomassie blue staining 分析 recombinant HAS protein 與 recombinant truncated form HAS protein 在 *E. coli* NovaBlue(DE3) 表現之結果。M 為 marker: lane 1-lane 5 為 total proteins 之 supernatant 以及 lane 6-lane10 為 pellet ; lane 1、lane 6 為 pET-30a(+); lane 2 及 lane 7、lane 3 及 lane 8 pET-30a(+)-tHAS 及 pET-30a(+)-HAS 不加 IPTG 誘導; lane 4 及 lane 9、lane 5 及 lane 10 為 pET-30a(+)-tHAS 及 pET-30a(+)-HAS 加 IPTG 誘導四小時。V: vector, HAS: pET-30a(+)-HAS, tHAS: pET-30a(+)-tHAS, +: 加 IPTG, -: 不加 IPTG



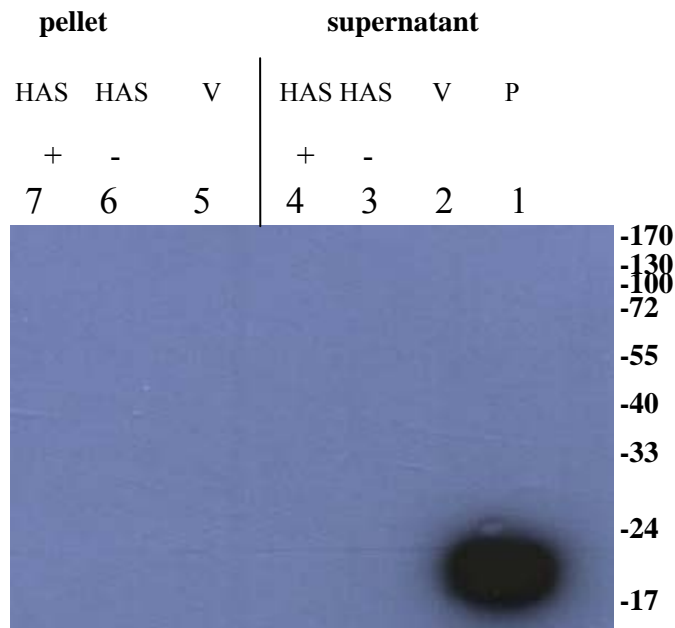
圖二十六、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant tHAS protein 及 recominant HAS protein 在 *E. coli* NovaBlue(DE3)表現之結果。lane 1-lane 5 為 total proteins 之 supernatant 以及 lane 6-lane 11 為 pallet；lane 1、lane 6 為 pET-30a(+); lane 2 及 lane 7、lane 3 及 lane 8 為 pET-30a(+)-tHAS 及 pET-30a(+)-HAS 不加 IPTG 誘導；lane 4 及 lane 9、lane 5 及 lane 10 為 pET-30a(+)-tHAS 及 pET-30a(+)-HAS 加 IPTG 誘導四小時；lane 11 為 positive control pET30b-HeptB(20 kDa)。V: vector，P: positive control HAS: pET-30a(+)-HAS，tHAS: pET-30a(+)-tHAS，+ : 加 IPTG，- : 不加 IPTG



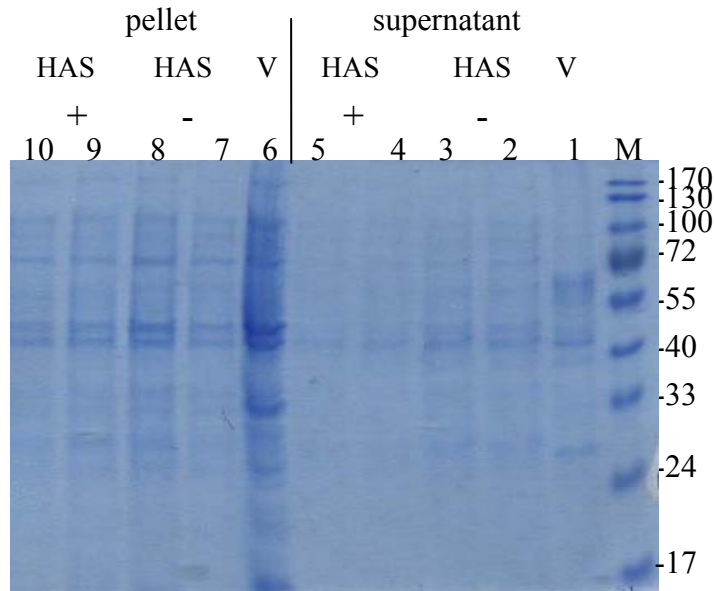
圖二十七、藉由 12% SDS-PAGE Coomassie blue staining 分析 recombinant HAS protein 在 *E. coli* NovaBlue(DE3)表現之結果。M 為 marker；lane 1-lane 3 為 total proteins 之 supernatant 以及 lane 4-lane 6 為 pallet；lane 1、lane 4 為 pET-30a(+)-1；lane 2、lane 5 為 pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS 不加 IPTG 誘導；lane 3、lane 6 為 pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS 加入 1M IPTG 誘導四小時。V: vector，HAS: pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS，+: 加 IPTG，-: 不加 IPTG



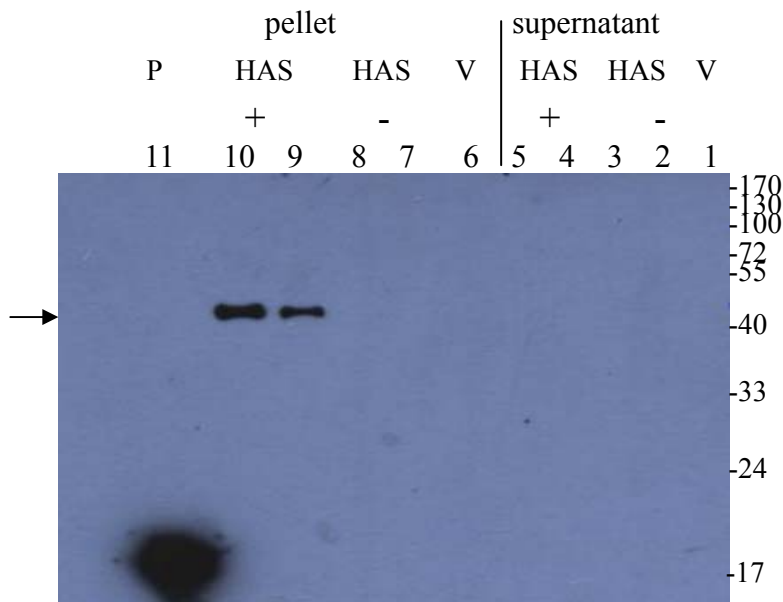
圖二十八、使用 Anti-HA-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant HAS protein 在 *E. coli* NovaBlue(DE3)表現之結果。lane 1-lane 3 為 total proteins 之 supernatant 以及 lane 4-lane 6 為 pellet；lane 1、lane 4 為 pET-30a(+)-1；lane 2、lane 5 為 pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS 不加 IPTG 誘導；lane 3、lane 6 為 pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS 加入 1M IPTG 誘導四小時。V: vector，HAS: pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS，+: 加 IPTG，-: 不加 IPTG



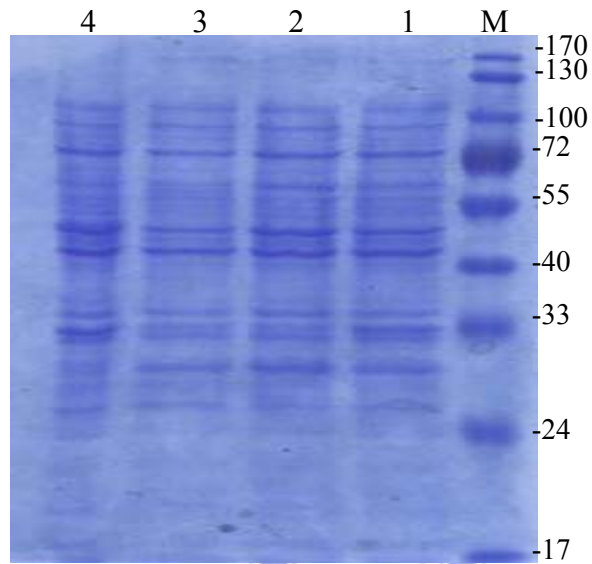
圖二十九、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant HAS protein 在 *E. coli* NovaBlue(DE3)表現之結果。lane 1-lane 4 為 total proteins 之 supernatant 以及 lane 5-lane 6 為 pallet；lane1 為 positive control pET30b-HeptB(20 kDa)；lane 2、lane 5 為 pET-30a(+)-1；lane 3、lane 6 為 pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS 不加 IPTG 誘導；lane 4、lane 7 為 pET-30a(+)-1-HAS-HA-HIS 加入 1M IPTG 誘導四小時。P: positive control，V: vector，HAS: pET-30a(+)-HAS，+: 加 IPTG，-: 不加 IPTG



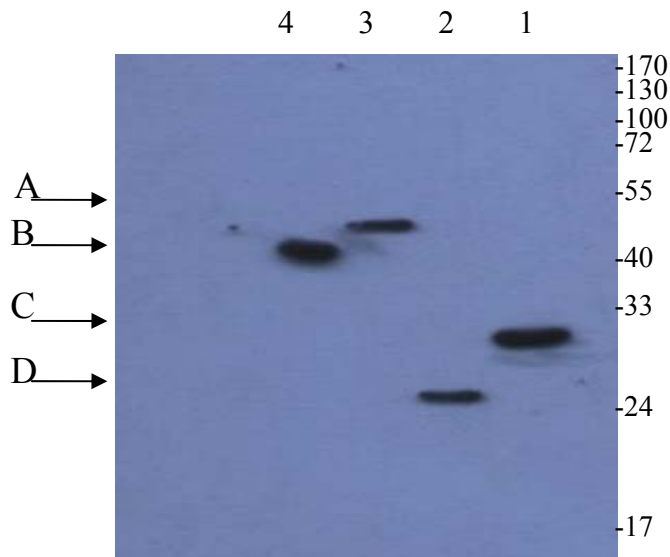
圖三十、藉由 12% SDS-PAGE Coomassie blue stain 分析 recombinant HAS protein 在 *E. coli* NovaBlue(DE3)表現之結果。M 為 marker: lane 1-lane 5 為 total proteins 之 supernatant 以及 lane 6-lane 10 為 pellet ; lane 1、lane 6 為 pET30a(+)-1 vector ; lane 2、lane 3、lane 7、lane 8 為 pET30a(+)-1-HAS 不加 IPTG 誘導 ; lane 4、lane 5、lane 9、lane 10 為 pET30a(+)-1-HAS 加 1M IPTG 誘導四小時。而 lane 9、lane 10 為不同 colony。V: vector, HAS: pET-30a-1(+)-HAS, +: 加 IPTG, -: 不加 IPTG



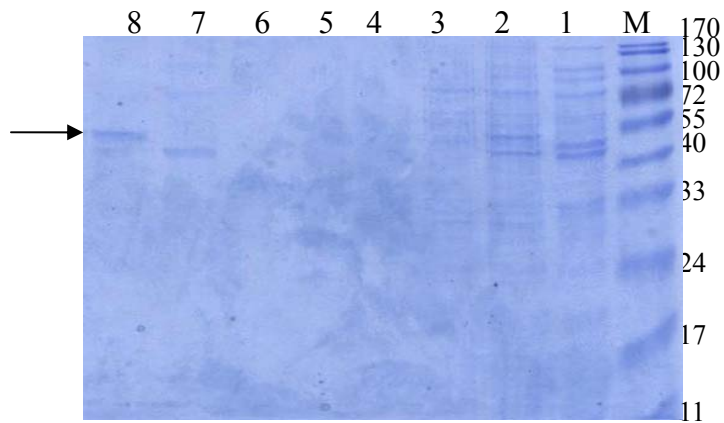
圖三十一、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant HAS protein 在 *E. coli* NovaBlue(DE3) 表現之結果。lane 11 為 positive control pET30b-HeptB(20 kDa)；lane 1-lane 5 為 total proteins 之 supernatant 以及 lane 6-lane 10 為 pellet；lane 1、lane 6 為 pET30a(+)-1 vector；lane 2、lane 3、lane 7、lane 8 為 pET30a(+)-1-HAS 不加 IPTG 誘導；lane 4、lane 5、lane 9、lane 10 為 pET30a(+)-1-HAS 加 1M IPTG 誘導四小時。而 lane 9、lane 10 為不同 colony。P: positive control，V: vector，HAS: pET-30a(+)-1-HAS，+: 加 IPTG，-: 不加 IPTG



圖三十二、藉由 12% SDS-PAGE(Coomassie blue staining)分析 recombinant HAS protein 與 recombinant tHAS protein 在 *E. coli* NovaBlue(DE3)表現之結果的差異。M 為 marker，lane 1 為 pET30a(+)-tHAS，lane 2 為 pET30a(+)-1-tHAS，lane 3 為 pET30a(+)-HAS，lane 4 為 pET30a(+)-1-HAS，lane 1-lane 4 皆為加入 1M IPTG 誘導四小時之 pellet。

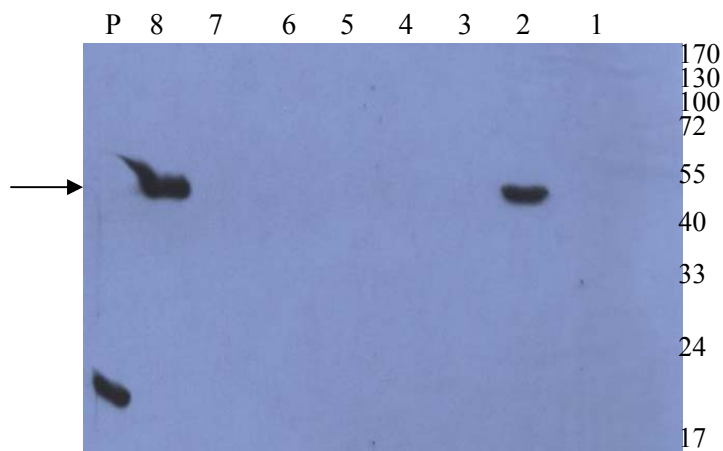


圖三十三、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析 recombinant HAS protein 與 recombinant tHAS protein 在 *E. coli* NovaBlue(DE3) 表現之結果的差異。lane 1 為 pET30a(+)-tHAS，lane 2 為 pET30a(+)-1-tHAS，lane 3 為 pET30a(+)-HAS，lane 4 為 pET30a(+)-1-HAS，lane 1-lane 4 皆為加入 1M IPTG 誘導四小時之 pellet。左方箭頭 A 所標示蛋白大小為 51 kDa；左方箭頭 B 所標示蛋白大小為 46 kDa；左方箭頭 C 所標示蛋白大小為 30 kDa；左方箭頭 D 所標示蛋白大小為 25 kDa。



圖三十四、藉由 12% SDS-PAGE(Comassie blue staining)分析被 nickel column 純化後的重組蛋白。M 為 Marker，lane 1 為未純化 sample 之上清液，lane 2 為未純化 sample 之 pellet，lane 3 為 sample 之 flow，lane 4 為 sample 之 wash(用含有 10mM imidazole 之 binding buffer)，Lane 5 為用含有 500 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第一管 sample，Lane 6 為用含有 30 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第二管 sample，Lane 7 為用含有 200 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第二管 sample，Lane 8 為用含有 500 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第二管 sample。

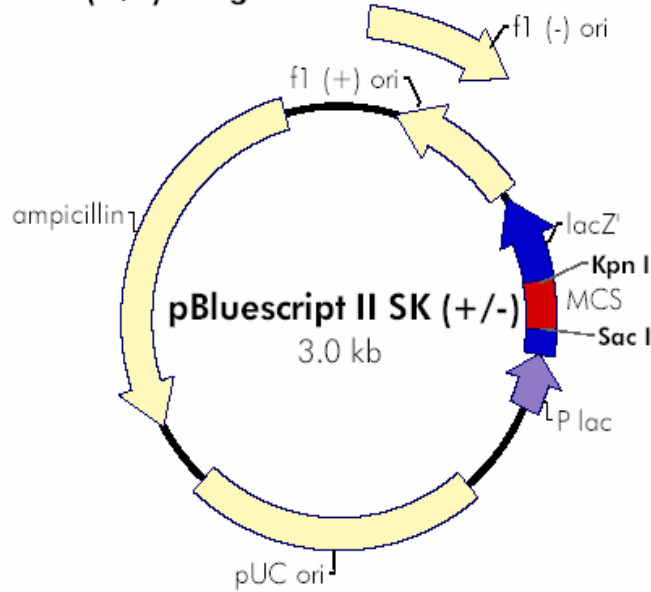




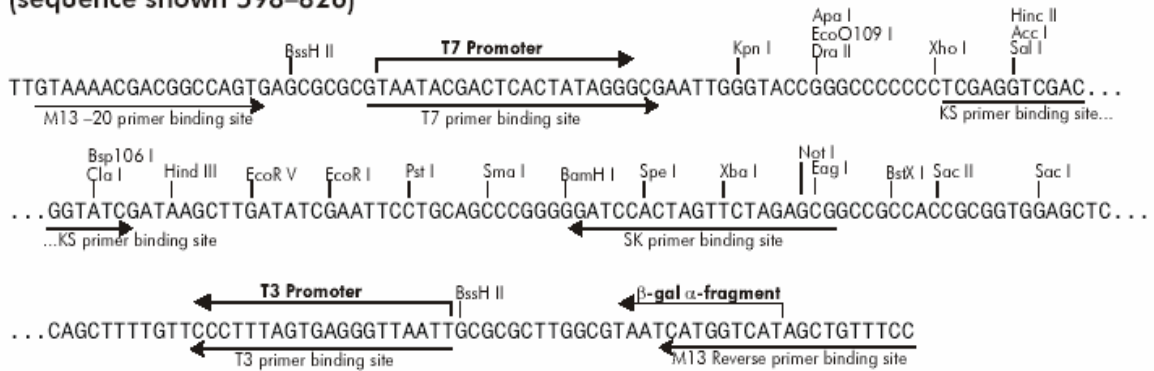
圖三十五、使用 Anti-HIS-HRP 抗體及藉由 Western blot 分析被 nickel column 純化後的重組蛋白。M 為 Marker，lane 1 為未純化 sample 之上清液，lane 2 為未純化 sample 之 pellet，lane 3 為 sample 之 flow，lane 4 為 sample 之 wash(用含有 10mM imidazole 之 binding buffer)，Lane 5 為用含有 500 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第一管 sample，Lane 6 為用含有 30 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第二管 sample，Lane 7 為用含有 200 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第二管 sample，Lane 8 為用含有 500 mM imidazole 的 binding buffer 所 elute 之第二管 sample。P: positive control pET30b-HeptB(20 kDa)

附錄一

pBluescript® II SK (+/-) Phagemids



**pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598–826)**



Feature	Nucleotide Position
f1 (+) origin of ss-DNA replication [pBluescript SK (+) only]	135–441
f1 (-) origin of ss-DNA replication [pBluescript SK (-) only]	21–327
β -galactosidase α -fragment coding sequence (<i>lacZ'</i>)	460–816
multiple cloning site	653–760
T7 promoter transcription initiation site	643
T3 promoter transcription initiation site	774
<i>lac</i> promoter	817–938
pUC origin of replication	1158–1825
ampicillin resistance (<i>bla</i>) ORF	1976–2833

附錄二

