

國立交通大學

生物科技研究所
碩士論文

利用噬菌體胜肽庫篩選對牛肝氧化鯊烯醇
素有專一性的胜肽序列



**Peptide Aptamer Selection for Bovine Liver
Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase
from Phage Display**

研究生：葉佳宜

指導教授：吳東昆 博士

中華民國九十四年七月

利用噬菌體胜肽庫篩選對牛肝氧化鯊烯酵素
有專一性的胜肽序列

Peptide Aptamer Selection for Bovine Liver
Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase from Phage Display

研究生：葉佳宜

Student : Chia-Yi Yeh

指導教授：吳東昆 博士

Advisor : Dr. Tung-Kung Wu

國立交通大學
生物科技學系
碩士論文



Submitted to Department of Biological Science and Technology
College of Science
National Chiao Tung University
in partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master
in
Biological Science and Technology
July, 2005
Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十四年七月

利用噬菌體胜肽庫篩選對牛肝氧化鯊烯酵素具有專一性的胜肽序列

研究生：葉佳宜

指導教授：吳東昆 博士

國立交通大學 生物科技學系

摘要

氧化鯊烯環化酵素 (OSC) 在固醇類和三萜類產物的生合成中，扮演重要的角色，可以催化受質鯊烯或者氧化鯊烯進行環化/重組反應，轉變成多環結構的羊毛硬脂醇及環阿屯醇。由於氧化鯊烯環化酵素催化的複雜產物膽固醇及麥角脂醇是構成細胞膜的重要要素，且在細胞生長過程中產生此酵素，所以氧化鯊烯環化酵素作為目標物設計抗菌劑及降低膽固醇藥物是相當重要的課題。我們對於篩選氧化鯊烯環化酵素有親合力作用的胜肽序列感到興趣，希望未來發展成為藥物。用兩種噬菌體胜肽庫，七個及十二個隨機胜肽的胜肽庫，對氧化鯊烯環化酵素進行配位基的篩選。將噬菌體胜肽庫和覆蓋滿目標物的盤子反應，洗去未鍵結的噬菌體，並且將有鍵結的噬菌體洗滌下來，依照這樣的過程進行五次對氧化鯊烯環化酵素的親和篩選，得到具有鍵結力的噬菌體胜肽序列，並且進行 DNA 定序，得到八個對氧化鯊烯環化酵素具有親和性的噬菌體胜肽序列，由西方墨點法測定得到 1 個七胜肽序列和 6 個十二胜肽序列具有反應。結果中，其中 1 個表現十二胜肽序列的樣品在點墨法中清楚看到反應，但在 ELISA 測試中反應較弱，利用西方墨點法測試時，卻沒有反應。

Peptide Aptamer Selection for Bovine Liver Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase from Phage Display

Student: Chia-Yi Yeh

Advisor: Dr. Tung-Kung Wu

Department of Biological Science and Technology
National Chiao Tung University

Abstract

Oxidosqualene cyclase (OSC), a remarkable enzyme catalyzing cyclization/rearrangement reaction of a acyclic squalene or oxidosqualene into polycyclic lanosterol or cycloartenol, plays important role in the biosynthesis of sterols and triterpenoids. The important role of cholesterol and ergosterol involved in the membrane function and cell growth has made the OSC enzyme design a unique target for designing antifungal and hypocholesteremic drugs. We are interested in screening OSC-binding peptide aptamer for future drug development. Two phage display libraries, one heptapeptide and one dodecapeptide library, were subjected to biopanning for OSC binding ligand identification. Following five biopanning process of OSC-binding selection and DNA sequencing of selected phages, eight OSC-bound phages were selected. Among them, one heptapeptide and six dodecapeptides, showing OSC-binding affinity were identified from Western blotting experiments. On the other hand, one dodecapeptides showed clear binding affinity to OSC on dot blotting, weak affinity on ELISA, but not on Western blotting assay.

謝誌

兩年的研究生活，充滿喜怒哀樂，在實驗上遇到挫折困難的時候，心裡總會感到難過；當實驗有所突破，就會開心很久。兩年就在這樣交錯的心情中度過，過程中有著許多人的支持陪伴，以及他們的幫忙，讓我能順利畢業，所以把這份喜悅分享給他們。首先是我的指導教授吳東昆 博士，感謝他在實驗觀念、實驗設計和生活上給予我的指導，讓我從化學界能順利的踏入生物領域，並且培養我實驗上思考、判斷與觀察的能力。感謝應化系李耀坤 教授與淡江化學系鄭建中 教授，忙碌之餘抽空對於我的論文修改及審閱，並且在實驗上提供了寶貴的意見讓論文更為完整。

實驗室的程翔、裕國、媛婷、幸如、小宇與宏城學長姐，在我最無助最無奈的時候給予我很大的鼓勵及支持，尤其是程翔學長，在實驗及純化上幫忙我很多，此外裕國學長也在實驗上指導我，讓我學到很多技術。另外特別提到嬌小的媛婷學姐，常聽我訴苦，並且關心我，安慰我，解決我很多生活上的困難。當然還有一起同甘共苦的伙伴們，單純的妍希、活潑的阿美、四千金豪哥與愛講冷笑話的文鴻，是他們讓我這兩年不寂寞，陪著我奮戰到最後，和他們一起修課，一起成長，一起分享心情，短暫的兩年卻建立我們深厚的友誼。實驗室其他學弟妹，憨厚的宗哥、搞笑的宏明、帥帥的庭翊、調皮的晉源、開心果駿哥、乖巧的大景、俏皮的文暄、可愛的怡親、任真的皓宇、搞怪的聖傑等，在我最後衝刺及寫論文的階段，幫忙很多，讓我能無後顧之憂。感謝所有的人，沒有你們我的論文不會精彩，沒有你們我的論文不會如期完成。

最後，我要謝謝最愛我的爸爸媽媽、我最愛的弟弟佳俊及默默陪著我的庭翊，對我的支持與鼓勵，沒有你們就沒有現在的我，這份論文獻給你們。

目錄

頁次

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	IV
表目錄.....	

第一章 緒論

1-1 膽固醇的重要性.....	1
1-2 膽固醇生合成.....	3
1-3 氧化鯊烯環化酵素之簡介.....	5
1-3-1 氧化鯊烯環化酵素的酵素學.....	7
1-3-2 氧化鯊烯環化酵素的反應機制.....	9
1-4 噬菌體表現系統之簡介.....	15
1-5 噬菌體表現系統之型式.....	18
1-6 噬菌體勝肽庫(peptide library)及抗體庫(antibody library)...	20
1-7 噬菌體表現系統篩選方式.....	21
1-8 研究動機與目的.....	22

第二章 實驗材料及方法

實驗材料

2-1 藥品.....	24
2-2 緩衝液及溶液配置.....	27
2-3 實驗儀器.....	31
2-4 菌株及質體.....	32

實驗方法

2-5 牛肝中氧化鯊烯環化酵素之純化.....	33
2-5-1 溶解微粒體.....	34

2-5-2 粗萃取液.....	34
2-5-3 Q-Sepharose 陰離子交換管柱層析.....	34
2-5-4 Hydroxyapatite Gel 管柱層析.....	35
2-5-5 HiTrap Heparin 管柱層析.....	35
2-5-6 酵素的分子量及純度分析.....	35
2-5-7 酵素活性測試.....	37
2-5-8 酵素濃度分析.....	38
2-6 Ph.D.-C7C 及 Ph.D.-12 對牛肝鯊烯環化酵素的親和篩選.....	39
2-6-1 牛肝鯊烯環化酵素之製備.....	40
2-6-2 負向親和篩選.....	41
2-6-3 第一次親和篩選.....	41
2-6-4 將噬菌體培養放大.....	41
2-6-5 第二次親和篩選.....	42
2-7 噬菌體效價之測定.....	43
2-7-1 方法一：培養盤菌落數計.....	43
2-7-2 方法二：光譜吸收測定.....	43
2-8 噬菌體勝肽庫對氧化鯊烯環化酵素之親和力測定.....	44
2-8-1 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA)之反應測試.....	44
2-8-2 墨點法 (Dot blot)之反應測試.....	45
2-8-3 西方墨點法 (Western blotting)之反應測試.....	45
2-9 單股 DNA 模版之純化.....	47
2-10 DNA 定序.....	47
2-11 單株抗體的製備.....	49
2-11-1 免疫動物.....	49
2-11-2 骨髓瘤細胞 (myeloma cell)	49
2-11-3 細胞融合.....	51
2-11-4 細胞增殖及取樣篩檢.....	51
2-11-5 融合細胞之單株化.....	52
2-11-6 單株抗體之產生.....	52
2-12 利用酵母菌系統表現牛肝氧化鯊烯環化酵素.....	53

2-11-1 聚合酶連鎖反應.....	54
2-11-2 質體的建構.....	55
2-11-3 功能性互補.....	55
2-11-4 酵母菌株 TKW14C2 的質體轉化作用.....	56
2-11-5 質體交換.....	56
2-11-6 酵母菌株 <i>pichia strain</i> (GS115)的質體轉化作用.....	58
2-11-7 聚合酶連鎖反應分析重組 DNA.....	58
2-11-8 利用酵母菌系統表現蛋白質.....	59

第三章 實驗結果與討論

3-1 氧化鯊烯環化酵素之純化.....	60
3-2 氧化鯊烯環化酵素的單株抗體.....	61
3-3 噬菌體胜肽庫親合篩選.....	62
3-3-1 噬菌體效價測定.....	67
3-3-2 利用墨點法作親和力測試.....	67
3-3-3 利用酵素連結免疫吸附分析法作親和力測試.....	68
3-3-4 利用西方墨點法作親和力測試.....	69
3-3-5 噬菌體胜肽庫之定序.....	72
3-4 利用酵母菌系統表現牛肝中氧化鯊烯環化酵素.....	74

第四章 結論與未來展望.....75

第五章 參考資料.....76

附錄.....79

附錄一 *Pichia pastoris* 表現牛肝氧化鯊烯環化酵素.....,.....79

圖目錄

圖 1-1 膽固醇的化學結構.....	1
圖 1-2 膽固醇在動物體內的代謝途徑.....	4
圖 1-3 動物體內氧化鯊烯環化酵素的催化反應.....	5
圖 1-4 自然界各物種間的(氧化)鯊烯環化酵素作用途徑.....	6
圖 1-5 (氧化)鯊烯環化酵素產生的相異結構產物.....	9
圖 1-6 (氧化)鯊烯環化酵素環化反應機制及產物多樣性.....	11
圖 1-7 Johnson Model 示意圖.....	12
圖 1-8 Q-W motif 理論的模型示意圖.....	13
圖 1-9 噬菌體感染大腸桿菌的生命週期.....	15
圖 1-10 絲狀噬菌體 pIII 感染大腸桿菌過程.....	16
圖 1-11 絲狀噬菌體結構示意圖.....	17
圖 1-12 噬菌體表現外來蛋白質的兩種型式.....	18
圖 1-13 SIP 技術示意圖.....	19
圖 1-14 在 ELISA 盤子上篩選過程的示意圖.....	21
圖 2-1 TLC 活性測試示意圖.....	37
圖 2-2 噬菌體胜肽庫篩選示意圖.....	40
圖 2-3 噬菌體光譜吸收圖.....	43
圖 2-4 抗原抗體測定示意圖.....	44
圖 2-5 西方墨點法三明治疊法.....	46
圖 2-6 PCR 定序條件.....	48
圖 2-7 骨髓癌細胞正規合成路徑及旁支輔助路徑.....	50
圖 2-8 酵母菌中 DNA 重組.....	54
圖 2-9 PCR 反應條件.....	54
圖 2-10 功能性互補示意圖.....	57
圖 3-1 牛肝氧化鯊烯環化酵素 SDS-PAGE.....	60
圖 3-2 西方墨點法測定單株抗體對氧化鯊烯環化酵素之專一性...61	
圖 3-3 七個隨機胺基酸序列胜肽庫對氧化鯊烯環化酵素第二次及第三次親和篩選 ELISA 鍵結力測試結果.....	63

圖 3-4 (A)噬菌體 Ph.D.-C7C 胜肽庫和氧化鯊烯環化酵素 ELISA 反應結果 (B)噬菌體 Ph.D.-12 胜肽庫和氧化鯊烯環化酵素 ELISA 反應結果.....	65
圖 3-5 墨點法測定單一噬菌體對氧化鯊烯環化酵素親和性結果...	67
圖 3-6 ELISA 方法測定單一噬菌體對氧化鯊烯環化酵素親和性結果.....	68
圖 3-7 西方墨點法測定單一噬菌體對氧化鯊烯環化酵素的親和性結果.....	70
圖 3-8 功能性互補的篩選結果示意圖	74



表目錄

表 1-1 自然界中不同物種氧化鯊烯環化酵素的純化效果及特性.....	7
表 1-2 絲狀噬菌體的基因、蛋白質及功能介紹.....	17
表 2-1 牛肝中氧化鯊烯環化酵素的純化流程簡圖.....	33
表 2-2 12 %及 4 %蛋白質電泳膠片配方.....	36
表 2-3 rTth polymerase PCR 反應試劑的量.....	55
表 2-4 Taq polymerase PCR 反應試劑的量.....	60
表 3-1 噬菌體七個胜肽庫對氧化鯊烯環化酵素第三次親和篩選得到的序列.....	63
表 3-2 噬菌體胜肽庫對氧化鯊烯環化酵素進行篩選得到的序列.....	72

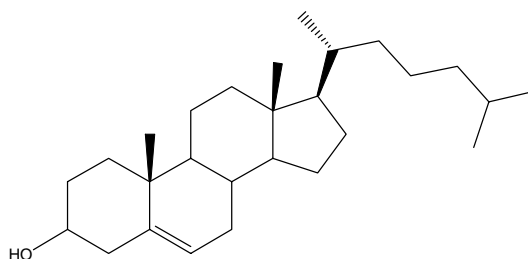


第一章 緒論

1-1 固醇類的重要性

固醇類 (sterols) 是環狀大分子醇類之統稱，位在大多數真核細胞中，是構成細胞膜以及生理調控上重要的脂質¹。固醇類存在於動物、植物及細菌中，而且其彼此的構造十分相似，皆以四或五個環相連為主要架構，差別在於支鏈上的官能基不同。

膽固醇 (cholesterol) 【圖 1-1】是哺乳動物體內主要的固醇類，在 18 世紀人們已從膽石中發現了膽固醇，1816 年化學家歇爾本將這種具脂類性質的物質命名為膽固醇。膽固醇廣泛存在於動物體內，尤以腦及神經組織中為最豐富，在腎、脾、皮膚、肝和膽汁中含量也高²。在高等動物中是生物膜的重要成分，對於調節生物膜的流動性有一定意義。溫度高時，它能阻止雙分子層的無序化；溫度低時又可干擾其有序化，阻止液晶的形成，保持其流動中性。生物體內膽固醇的合成主要來自肝臟，其次在腸、腎上腺皮質及動脈管壁上產生，同時也可經由食物中攝取獲得³。膽固醇是構成細胞膜、膽汁、維生素D₃、紅血球、神經組織及各種荷爾蒙的重要前趨物，也是血液中與細胞膜內運送脂肪的重要物質。膽固醇經由細胞利用後，代謝成膽酸 (cholic acid) 及膽鹽，可幫助食物中脂質類的消化。所以人體內每天必須要有一定含量的膽固醇才能維持正常機能的進行⁴。



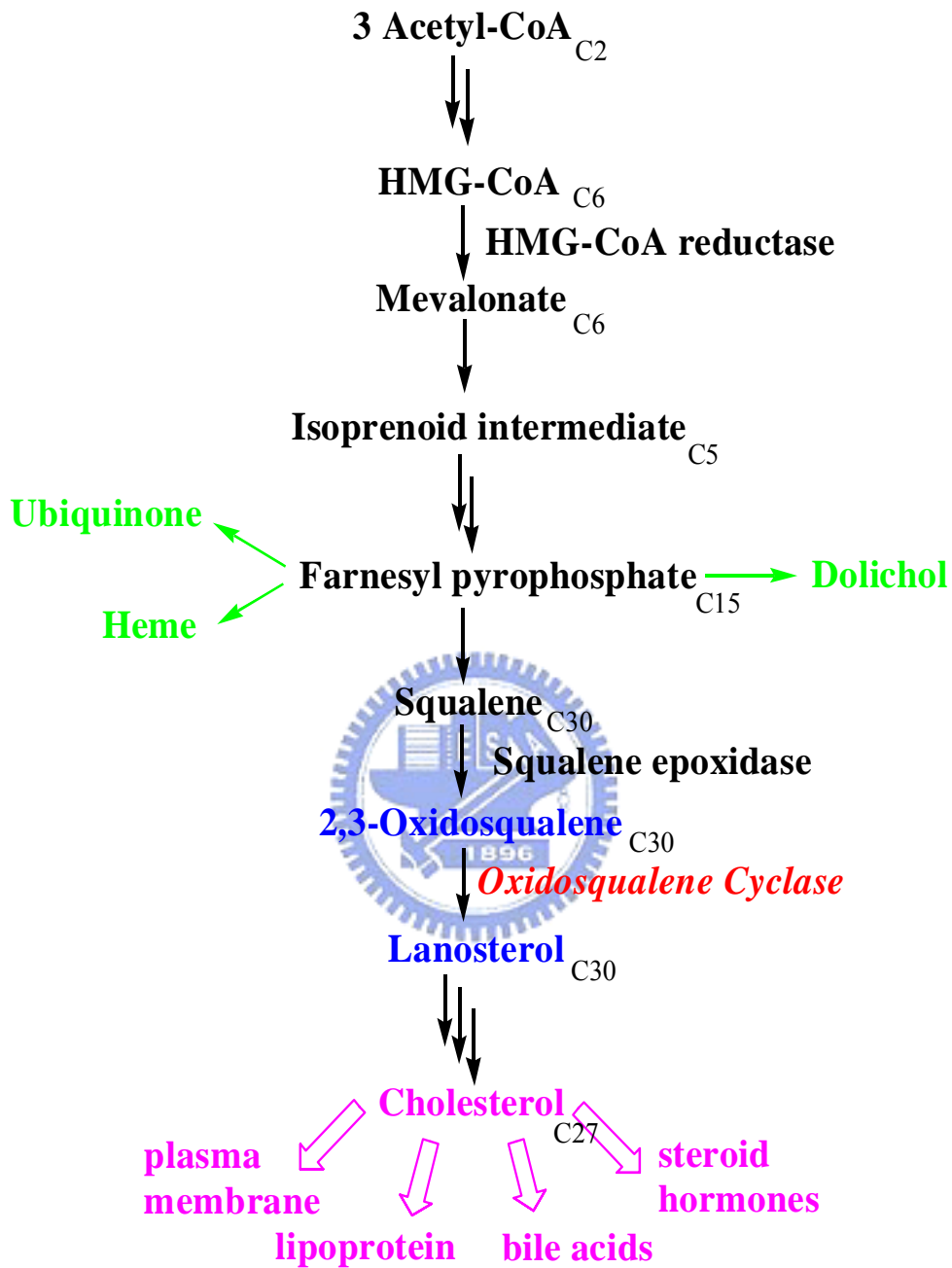
【圖 1-1】 膽固醇的化學結構

過去的研究得知，膽固醇的運送需要與脂蛋白結合才能被送到身體各部份。輸送膽固醇脂蛋白主要有兩種，低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)和高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL)。低密度脂蛋白膽固醇是釀成血管栓塞的罪魁禍首，被認為是“不良”的膽固醇。至於高密度脂蛋白膽固醇，因能清除血管內的膽固醇，所以被認為是“良性”膽固醇。隨著飲食習慣的改變，過量攝取的膽固醇沈積在血管中會引起動脈粥狀硬化 (Atherosclerosis) 和膽結石 (Cholelithiasis)，提高心血管疾病 (Cardiovascular diseases)的發生率^{5,6}，所以目前對於如何降低體內膽固醇或者避免過多的膽固醇攝取量，是大家關心的課題。



1-2 膽固醇生合成

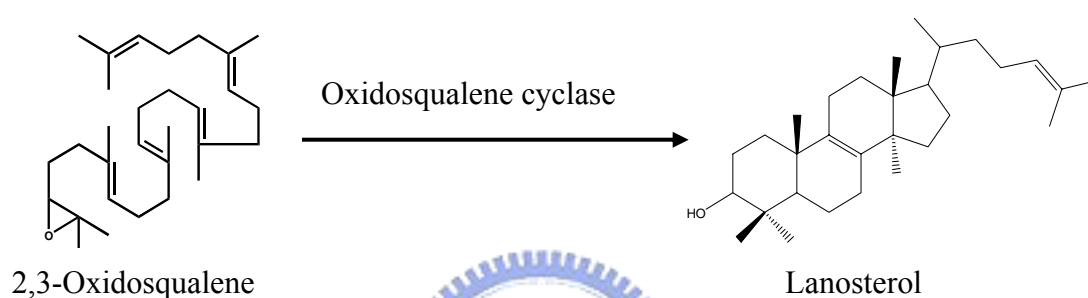
在動物體內，膽固醇合成的部位在胞液及內質網，以三個乙醯輔酶 A (Acetyl-Co A) 作為起始物。乙醯輔酶 A 是葡萄糖、脂肪酸及某些胺基酸等在粒線體內的分解代謝產物，經由檸檬酸循環進入胞液，當作膽固醇合成原料。經硫解酶及乙醯輔酶 A 還原酶催化，縮合成 3-羥基-3-甲基戊二醯輔酶 A (beta-Hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA)，生成的 3-羥基-3-甲基戊二醯輔酶則在 3-羥基-3-甲基戊二醯輔酶還原酶催化下，由 NADH 供氫還原生成甲羥戊酸 (Mevalonic acid, MVA)。甲羥戊酸由 ATP 提供能量，在胞液中一系列酶的作用下生成異戊烯焦磷酸酯 (3-isopentenyl pyrophosphate, IPP)。六個五碳化合物分子經一系列反應聚合生成三十碳的鯊烯 (Squalene)，鯊烯經內質網加上環化酶等的作用，環化生成羊毛硬脂醇，再經氧化、脫羧、還原等最後生成含二十七碳的膽固醇【圖 1-2】。在膽固醇的生合成中，我們所研究探討的氧化鯊烯環化酵素位於在整個合成途徑中的下游，扮演著重要的角色，以下的章節將簡介此酵素的特性及重要性。



【圖 1-2】 膽固醇在動物體內的代謝途徑

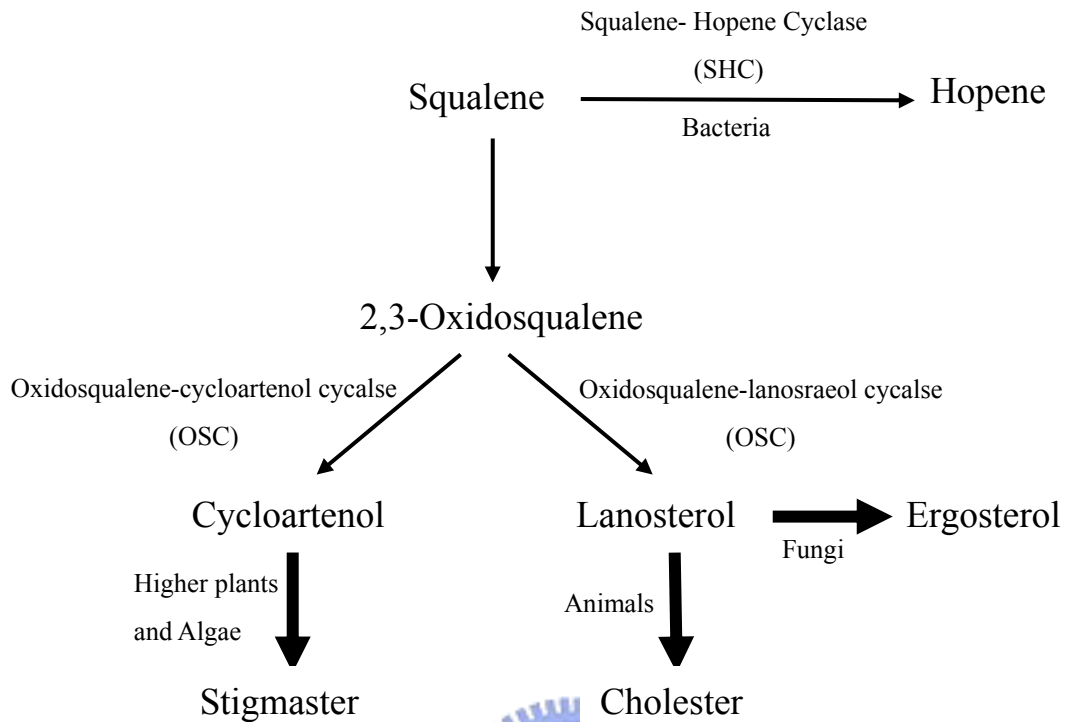
1-3 氧化鯊烯環化酵素之簡介

目前對於(氧化)鯊烯環化酵素的研究在生合成及藥學領域相當熱烈，因為此酵素控制著整個膽固醇生合成途徑中重要的環化反應，在動物體內藉由一步環化的步驟將原直鏈的氧化鯊烯變成具有多環的羊毛硬脂醇【圖 1-3】，希望藉由氧化鯊烯環化酵素當作目標物設計抑制藥物，可以達到降低膽固醇的效果，是目前極為重要的研究課題。



【圖 1-3】 動物體內氧化鯊烯環化酵素的催化反應

在不同的物種間，(氧化)鯊烯環化酵素家族負責催化鯊烯或氧化鯊烯形成不同結構的產物，保有各物種間的專一性及演化性【圖 1-4】。在動物、真菌中，氧化鯊烯環化酵素能將氧化鯊烯轉化成羊毛硬脂醇，動物體內再經 18 個步驟反應形成膽固醇，在真菌中產生麥角脂醇 (Ergosterol)；在高等植物和海藻中，類似的環化酵素 (Cycloartenol synthase, CAS) 將氧化鯊烯催化形成環阿屯醇 (Cycloartenol)、羽扇醇 (Lupeol)和 β -香桂素 (β -Amyrin)等產物。在較低等的植物、原蟲類 (Protozoa)和細菌中，以鯊烯直接當作受質，由酵素 Squalene-hopene cyclase (SHC) 催化生成蛇麻烯 (Hopene)^{7,8}。



【圖 1-4】 自然界各物種間的(氧化)鯊烯環化酵素作用途徑

由直鏈鯊烯或氧化鯊烯受質形成多環固醇或三萜類產物，整個過程僅僅為單一生合成步驟，即包含了質子化 (Protonation)、環化 (Cyclization)、重組 (Rearrangement)以及消去 (Elimination)等反應，中間牽涉超過 20 個共價鍵的斷裂及生成，這樣的一個酵素作用機制相當於在有機合成上數十個反應，所以相當令人感到好奇⁸。

1-3-1、氧化鯊烯環化酵素的酵素學

目前的氧化鯊烯環化酵素可經由牛肝、鼠肝、豬肝中直接純化得到【表 1-1】，也可藉由基因轉殖技術藉由酵母菌(yeast)、甲醇酵母系統 (pichia pastoris)以及昆蟲表現系統 (baculovirus expression system) 等不同的系統表現蛋白質。在純化過程中，氧化鯊烯環化酵素的穩定性低以及屬於膜上蛋白質 (membrane protein)的特性，所以需要藉由介面活性劑 (detergent)和適當的鹽濃度來維持酵素活性，由於不穩定的特性增加純化上的困難度，進而影響到酵素學的研究發展。

物種	參考文獻	酵素分子量	比活性
脊椎動物			
豬	9	-	256 nmol/hr/mg
豬	10	75 kDa	2643 nmol/hr/mg
老鼠	10	78 kDa	-
狗	10	73 kDa	-
人	10	75 kDa	-
老鼠	11	75 kDa	436 μ kat/mg
老鼠	12	65 kDa	58 pmol/min/mg
真菌類			
酵母菌	13	83.4 kDa	-
高等植物			
豌豆			
Cycloarten	14	55 kDa	167 pkat/mg
β -香樹脂醇	15	35 kDa	28 μ kat/mg

【表 1-1】自然界中不同物種氧化鯊烯環化酵素的純化效果及特性¹⁶

(氧化)鯊烯環化酵素最先是由植物中純化出三萜類環化酵素 (cycloartenol synthase and β -amyrin synthase)^{14,15}，研究中發現添加非離子介面活性劑 Triton X-100 及在一些穩定試劑的存在下，能大幅提高酵素的活性，有效地以可溶性形式被純化得到。之後，在 1991 年首次成功地從鼠肝中純化出氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素 (Oxidosqualene-lanosterol cyclase)¹¹，純化的倍率提高且有不錯的產率，並且得知其分子量為 75 kDa，等電點 (pI) 為 5.5，對於氧化鯊烯的 K_m 值為 55 μ M。

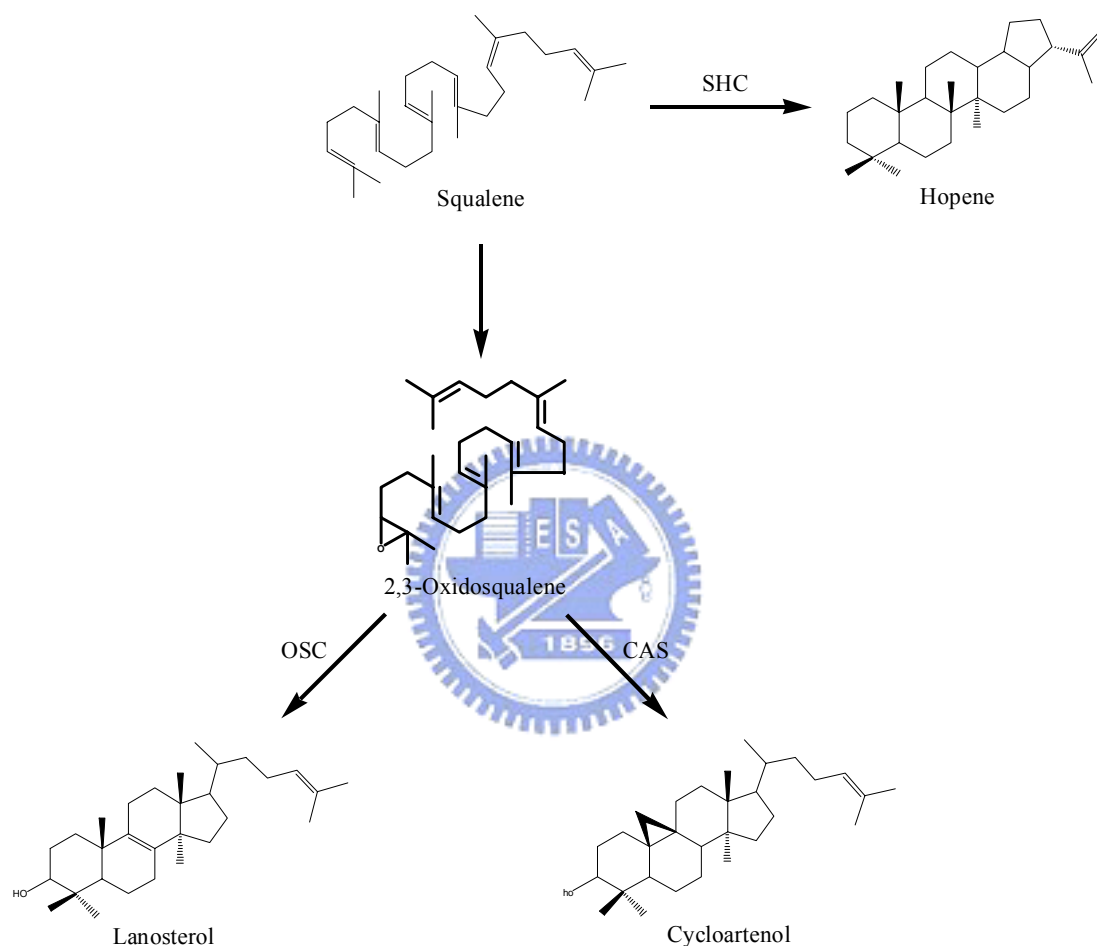
將從鼠肝中純化的氧化鯊烯環化酵素相對應的基因序列，利用基因轉殖的技術，在酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 中能成功表現出 ERG 7 酵素¹²，並且純化出氧化鯊烯環化酵素及獲得其開放解讀序列 (open reading frame, ORF)，包括終止密碼子在內含有 2196 個核苷酸，轉譯成 731 個胺基酸序列的蛋白質，其分子量為 83.7 kDa¹³。

一般哺乳類動物中的氧化鯊烯環化酵素分子量大小約 70~80 kDa，而在實驗室過去學長姐的努力下，成功從牛肝中純化得到單一 (single band) 氧化鯊烯-羊毛硬脂醇環化酵素蛋白質，其分子量約 70 kDa，酵素的純度可高達 95 %，純化產率約 5 %，純化得到的活性倍率較細胞微粒體時的比活性顯著增加了 700 多倍。

從不同的物種來源中，直接純化酵素以及利用基因轉殖技術表現氧化鯊烯環化酵素得到的結果，可加以比較這些功能相似蛋白質間的差異性，依照其蛋白質序列間的相似性比例高低，對於探討不同物種間蛋白質結構和功能關聯性有所幫助。

1-3-2 氧化鯊烯環化酵素的反應機制

不論在動物、植物或真菌中，(氧化)鯊烯環化酵素扮演在固醇類生合成途徑中最重要之環化角色。透過單一酵素催化，在不同的物種間，形成結構相似但不同的產物【圖 1-5】。

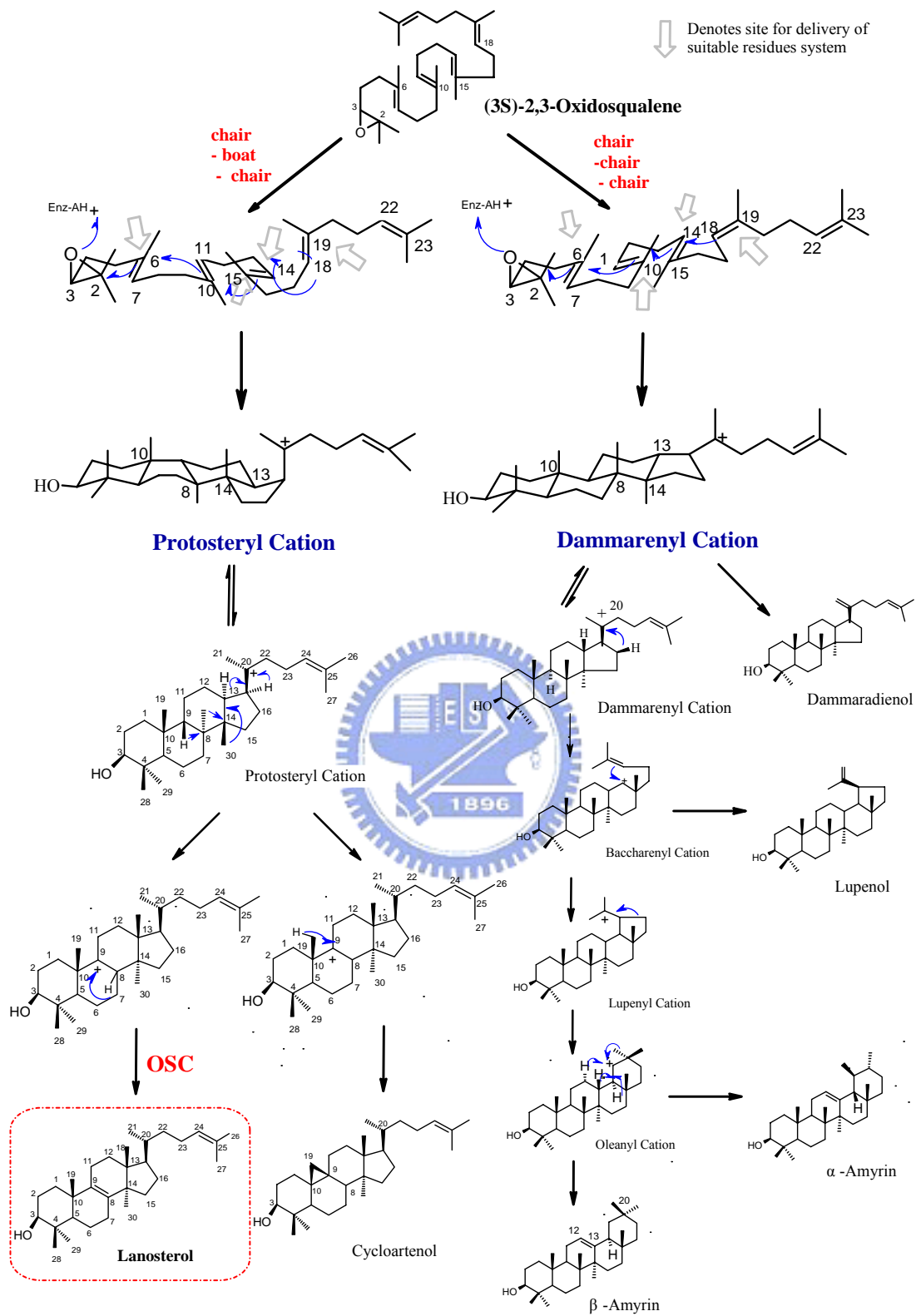


【圖 1-5】 (氧化)鯊烯環化酵素產生的相異結構產物

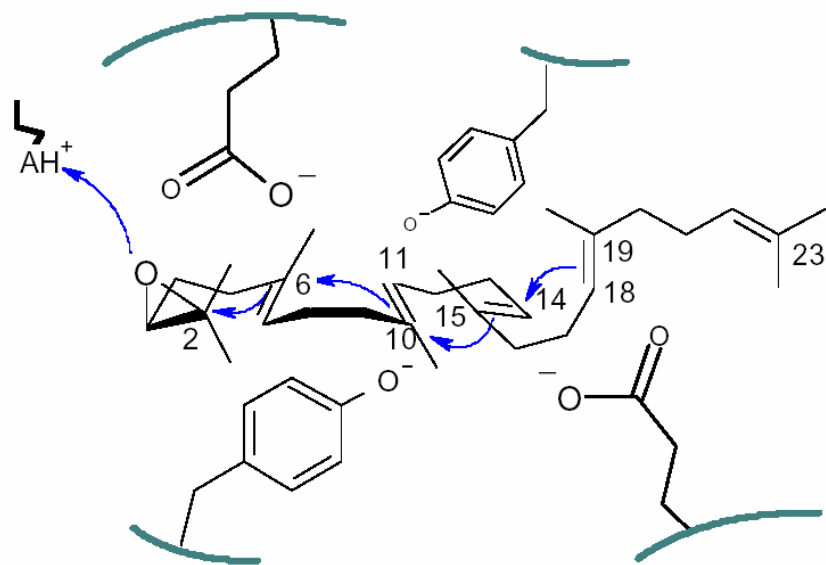
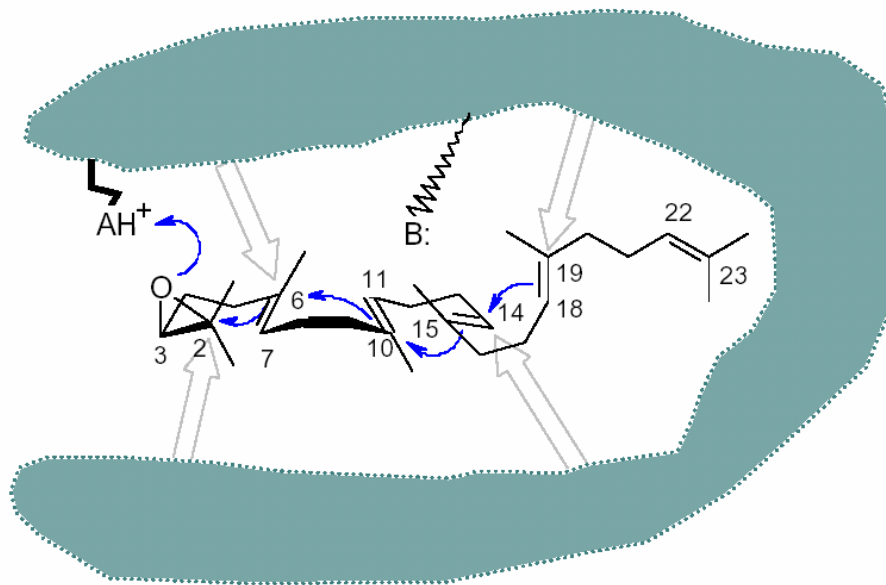
自從氧化鯊烯環化酵素的發現，科學家們開始探討代謝途徑中產物的結構及過渡態 (transition state) 的結構，例如碳陽離子。研究得知在不同的物種間受質受到酵素作用形成不同的中間過渡態，造成化學構形不一樣，而產生不同的產物⁸。在動物和真菌中，產物羊毛硬脂醇和環阿屯醇的生成是經由「椅形-船形-椅形」(chair-boat-chair)的

立體構形進行環化，而形成帶正電的中間過渡態Protosteryl Cation；在高等植物和海藻中，產物羽扇醇、 β -香桂素、達馬烯醇(Dammaradienol)及蛇麻烯等的生合成則是由「椅形-椅形-椅形」(chair-chair-chair)的立體構形進行環化，而形成另一種帶正電的中間過渡態Dammarenyl Cation。目前已知這兩種不同的碳陽離子中間產物，由於立體結構不同會造成兩個不同的環化途徑，導致在不同物種演化上有明顯的差異性，也造成同樣受質環化出產物結構多樣性的原因。【圖 1-6】說明了兩種環化過程機制。就羊毛硬脂醇的生成過程而言，酵素催化過程開始是由親電子 (Electrophilic)胺基酸對受質的環氧基(Epoxide)提供一質子化 (Protonation)反應後，在C-2 上形成第一個碳陽離子中間物，之後經過一連串雙鍵多電子的轉移，分別形成不同時期的碳陽離子中間產物，最後碳陽離子停在C-20 的位置上，形成一個四環的中間產物，再藉由連續的甲基、氫離子轉移，兩個甲基轉移由C-14 轉移至C-13 和由C-8 轉移至C-14，三個氫離子首先由C-17 轉移至C-20，接著C-13 轉移至C-17，及至最後由C-9 上的氫至C-8，以及最後一個步驟進行質子消去 (Proton Elimination)反應 (C-9 上的氫)，形成最終產物羊毛硬脂醇⁸。

由於氧化鯊烯環化酵素進行多環的環化反應，反應過程基本上為一個連續的過程。形成一系列碳陽離子中間過渡態，酵素的結構如何穩定這些過渡態，其中 1993 年Johnson等人透過酵素受質的專一性以及立體化學提出一個模型是一直備感興趣的課題。稱為Johnson Model¹⁷【圖 1-7】。根據模型的推論，氧化鯊烯環化酵素活性位置形成特殊的構形，酵素本身帶有負電的胺基酸經軸位釋放 (Axial delivery)與正在進行環化氧化鯊烯所形成的不同階段碳陽離子中間過渡態形成離子對 (ion pair)的型式以穩定陽離子中心。此模型可以用來解釋船形的B環結構或是以不安定的反-馬可尼可夫(anti-Markovnikov)構形環化形成的C環，透過了軸位釋放的理論，解釋了氧化鯊烯環化酵素特殊位置的離子對作用降低每個環化過程中的活化能，以利於酵素催化反應的進行。

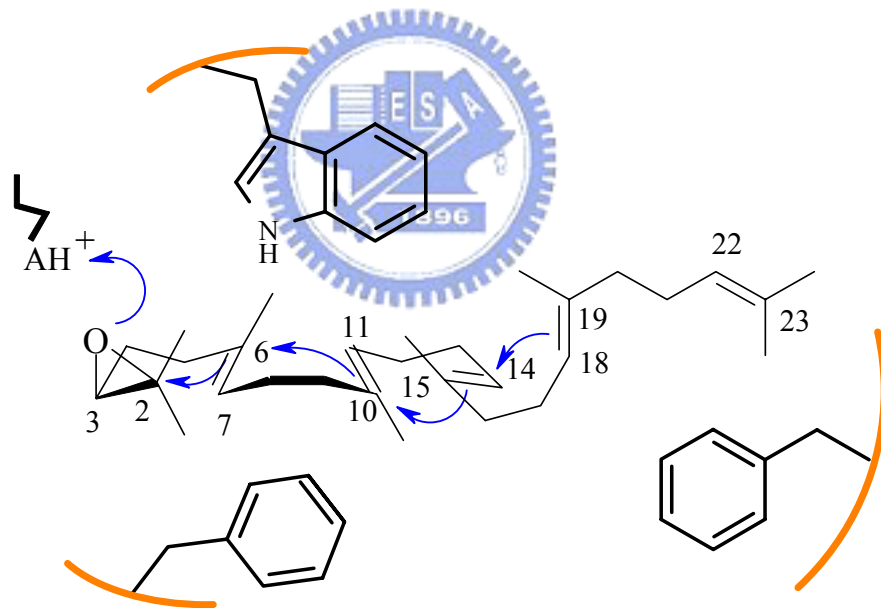


【圖 1-6】 (氧化)鯊烯環化酵素環化反應機制及產物多樣性



【圖 1-7】 Johnson Model。Johnson 等人提出 C-4，C-10，C-8，C-13，C-20 等碳陽離子，可以透過適當的軸位負電荷胺基酸使其穩定。

1994 年Poralla等人利用Poteolysis和溴化氰 (Cyanogen bromide, CNBr)等蛋白質消化方法，成功的對鼠肝作一級結構的定序，發現酵素Q-W motif區域對於氧化鯊烯環化酵素催化功能上具有重要影響¹³，由於Q-W motif為疏水性 (hydrophobic)的芳香環胺基酸 (aromatic amino group)所組成，因此推斷Q-W motif主要是利用碳陽離子與高電子密度雙鍵之間的作用力 (π -cation interaction)來達到穩定碳陽離子過渡態的效果，而非透過正負電子離子對的形成，稱為Q-W motif理論或芳香環理論 (Aromatic Hypothesis)【圖 1-8】。其中氧化鯊烯環化酵素上的芳香環及帶有負電的側鏈，可以穩定帶正電性的過渡態中間產物；另一方面，這些非極性的芳香環氨基酸 (Trp、Phe、Tyr)，對於受質疏水性結構有很合理的解釋，這是目前大家共同認同的理論。



【圖 1-8】 Q-W motif 理論的模型示意圖

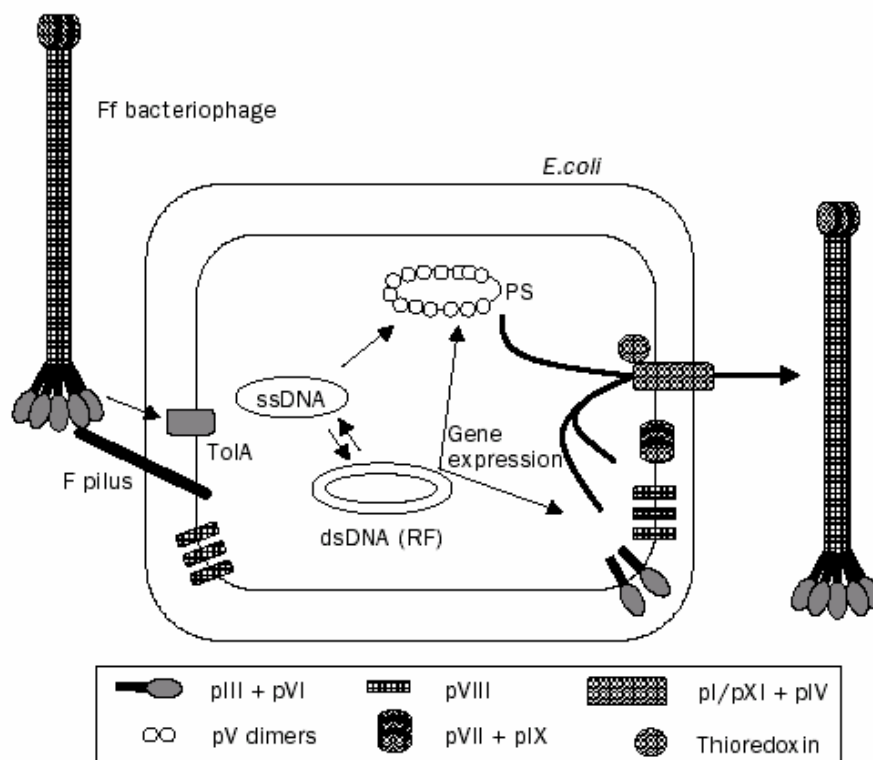
由前面的簡介，得知氧化鯊烯環化酵素的重要性及其扮演的角色，加上先前實驗室的研究，對於氧化鯊烯環化酵素不同的胺基酸進行改變之後，其酵素功能或者結構上具有重大的影響，所以氧化鯊烯環化酵素進行環化過程和酵素本身的結構具有很大的關係。綜合以上，以生物的觀點而言，在不同的物種之間氧化鯊烯環化酵素家族催化同樣的受質鯊烯或者氧化鯊烯，循不同的反應路徑，形成許多相似卻不相同的中間產物，最後造成代謝產物的不同，這在生物體間的演化上具有一定的意義；以化學的觀點而言，要將一個直鏈狀的反應物環化成四或五個環的產物，需要許多的步驟。對於這類具有複雜性 (Complexity)、效率 (Efficiency)，以及立體選擇性 (Stereo-selectivity) 的環化酵素，值得我們去探討研究。



1-4 噬菌體表現系統之簡介

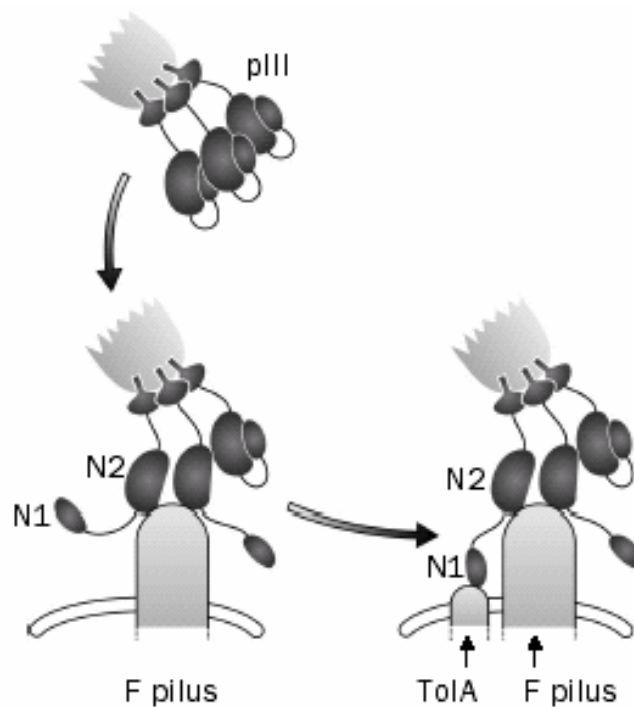
絲狀噬菌體展示系統 (filamentous phage display system) 是由 George Smith 等人於 1985 年所發展的一套基因表現系統¹⁸。將目標基因連接於絲狀噬菌體 f1 外殼蛋白 p 或 p 基因 (gIII 或 gVIII) 的 N 端或 C 端，藉由噬菌體感染大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 開始進行複製，使目標基因以融合蛋白 (fusion protein) 的形式表現於重組噬菌體 (recombinant phage) 表面。發明此項技術最大的特點就是將基因以及其蛋白質產物集中在一個重組噬菌體上，並且可以透過感染大腸桿菌的過程輕易的複製目標基因以及蛋白質。

絲狀噬菌體包括 M13、fd、f1 等，屬於潛溶性 (lysogenic) 的病毒，在複製的過程中，不會分解或殺死宿主，因此可以複製大量的噬菌體，其生命週期如【圖 1-9】¹⁹。



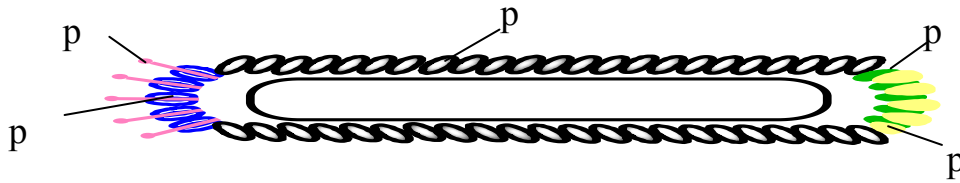
【圖 1-9】 噬菌體感染大腸桿菌的生命週期

這類的噬菌體只會感染帶有Fertility因子 (F factor)的大腸桿菌，其pIII 蛋白質上的N2 區域和宿主上的F纖毛 (F pilus)鍵結之後，可以增加pIII 蛋白質上N1 區域跟宿主的Tol A蛋白質作用，進而感染宿主，但當N2 缺乏時噬菌體則無法感染宿主【圖 1-10】²⁰⁻²³。感染後，噬菌體將其單股DNA導入*E. coil*細胞中，單股DNA利用宿主的酵素作用合成雙股DNA，而形成具有複製能力且能表現的雙股DNA (replicative form, RF)，然後以滾環模式複製 (rolling circle replication) 出子代單股DNA，此單股DNA會和pV蛋白質先形成複合物之後，在突破寄主時，pV蛋白質將被其他的外殼蛋白所取代，各種外殼膜蛋白質跟單股DNA組合起來產生新的噬菌體。



【圖 1-10】 絲狀噬菌體 pIII 感染大腸桿菌過程

絲狀噬菌體的直徑約 6.5 nm，長約 930 nm，分子量約 16.3 MD²⁴。噬菌體的複製過程中包含十種蛋白質，擔任組成、DNA複製以及外殼形成的工作。外殼蛋白主要由 2700 個pVIII蛋白質所組成，其次由pIII、pVI、pVII、pIX的蛋白質構成【圖 1-11】。



【圖 1-11】 絲狀噬菌體結構示意圖

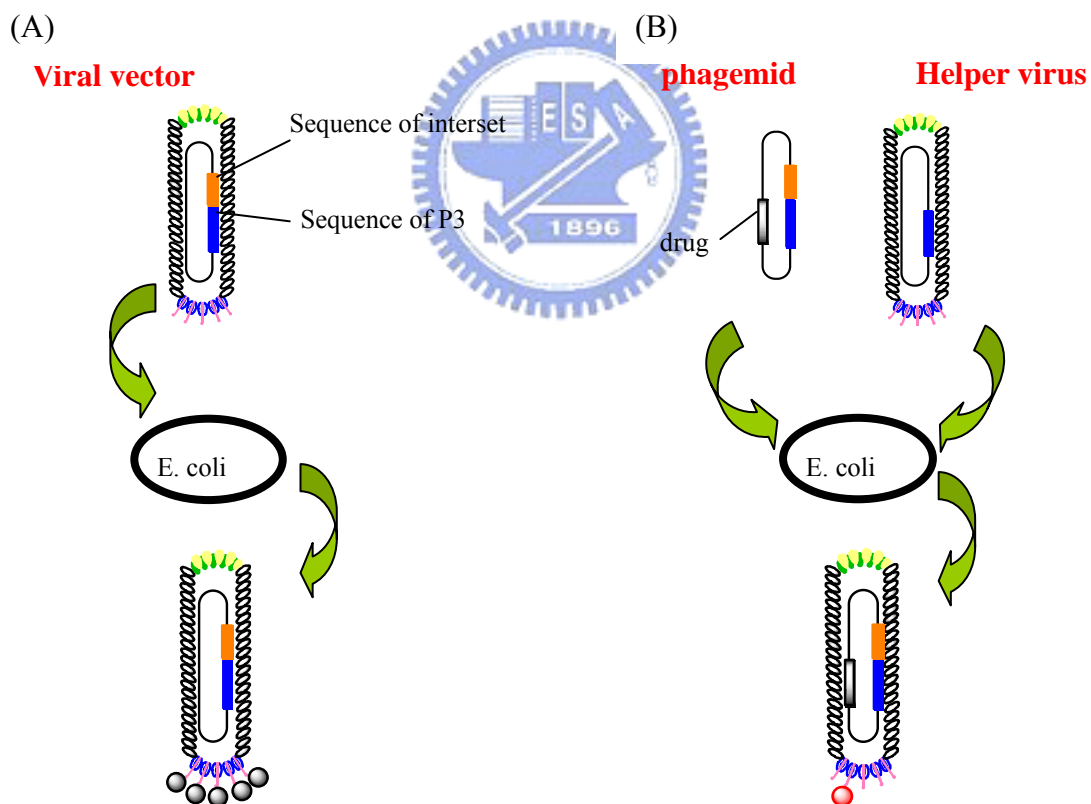
絲狀噬菌體表現系統用來表現外來蛋白質的主要有pIII 與pVIII兩種。在不影響噬菌體組裝及感染的情況下，pIII 蛋白質可以表現約 50 kDa的融合蛋白質而pVIII 只能負載 8-9 個氨基酸²⁵。由於pIII 蛋白質的分子較少，表現出來的融合蛋白質相對也較少，所以適合篩選出與目標物具有親和力 (affinity) 的片段；相對的，pVIII 蛋白質的分子數量較多，所以適合用來篩選較具有結合能力 (avidity)的片段。其他的部位也被研究來表現出融合蛋白，但有些困難或者不可行，【表 1-2】絲狀噬菌體的基因、蛋白質及功能介紹¹⁹。

Gene	Protein	Size (aa)	Function	Location	Used for display?
I	I	348	Assembly	Inner membrane	
	XI	108	Assembly	Inner membrane	
II	II	409	Replication (nickase)	Cytoplasm	
	X	111	Replication	Cytoplasm	
III	III	406 ^a	Virion component	Virion tip (end)	Yes (N-term)
IV	IV	405 ^a	Assembly (exit channel)	Outer membrane	
V	V	87	Replication (ssDNA bp)	Cytoplasm	
VI	VI	112	Virion component	Virion tip (end)	Yes (C-term)
VII	VII	33	Virion component	Virion tip (start)	Yes (N-term)
VIII	VIII	50*	Virion component	Virion filament	Yes (N- and C-term)
IX	IX	32	Virion component	Virion tip (start)	Yes (N-term)

【表 1-2】 絲狀噬菌體的基因、蛋白質及功能介紹。a代表已經成熟完整蛋白¹⁹。

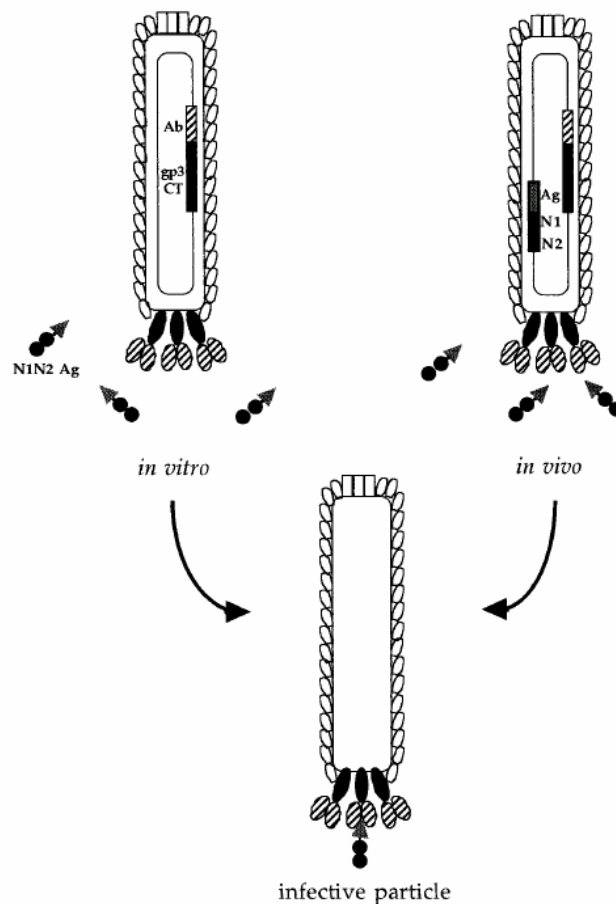
1-5 噬菌體表現系統的类型式

噬菌體表現外來蛋白的类型式有兩種，如【圖 1-12】²³。一種是病毒載體 (Viral vector) 直接將欲表現的蛋白基因接入gIII 或gVIII 的基因中，分別產生出的皆為重組過的pIII 或pVIII 蛋白質。另一種系統就是噬菌質體 (phagemid)，此載體沒有辦法重新組裝噬菌體或者根本無法感染大腸桿菌，藉由透過輔助噬菌體 (helper phage)²⁶ 提供正常功能的蛋白及其他組裝蛋白，才能使重新組噬菌體能夠組裝而且具有感染能力。這兩種系統表現出來的蛋白質之數量也有所不同，前者以多價 (polyvalent) 的类型式呈現，適合鍵結力較弱的篩選；後者以單價 (monovalent) 的类型式呈現，適合篩選親和力較強目標分子。



【圖 1-12】 噬菌體表現外來蛋白質的兩種型式。(A)為病毒載體型式，(B)為噬菌質體型式，需要輔助噬菌體的幫忙。

另一種成功的展示噬菌體的技術為selectively infective phage，簡稱SIP^{23,27-29}。這技術的發展是由於發現到pIII蛋白是由三個區域所構成的(N1、N2以及CT)，其中N1區域和感染力有關，N2區域是和F-pilus及一些增進感染力之噬菌體 (phage)的特殊辨識有關，CT區域是外套的一部份，主要和噬菌體的型態有關，如【圖 1-13】：當N1 區域及N2 區域和抗原基因融合，以及CT區域和抗體重組融合，藉由抗體和抗原互相結合，可以使得pIII 的功能恢復，而利用此方式進行噬菌體展示系統時可以提高表現量，SIP不論在生物體 (*in vivo*)或試管中 (*in vitro*)都適用。SIP比傳統的噬菌體展示系統較好，第一是此方式在進行篩選時速度會比普通的快，第二是此法可以藉由修飾不同的外套蛋白來使噬菌體表現更多種不同形式的蛋白，也就是可以同時表現兩種以上的外來蛋白。



【圖 1-13】 SIP技術示意圖²³。

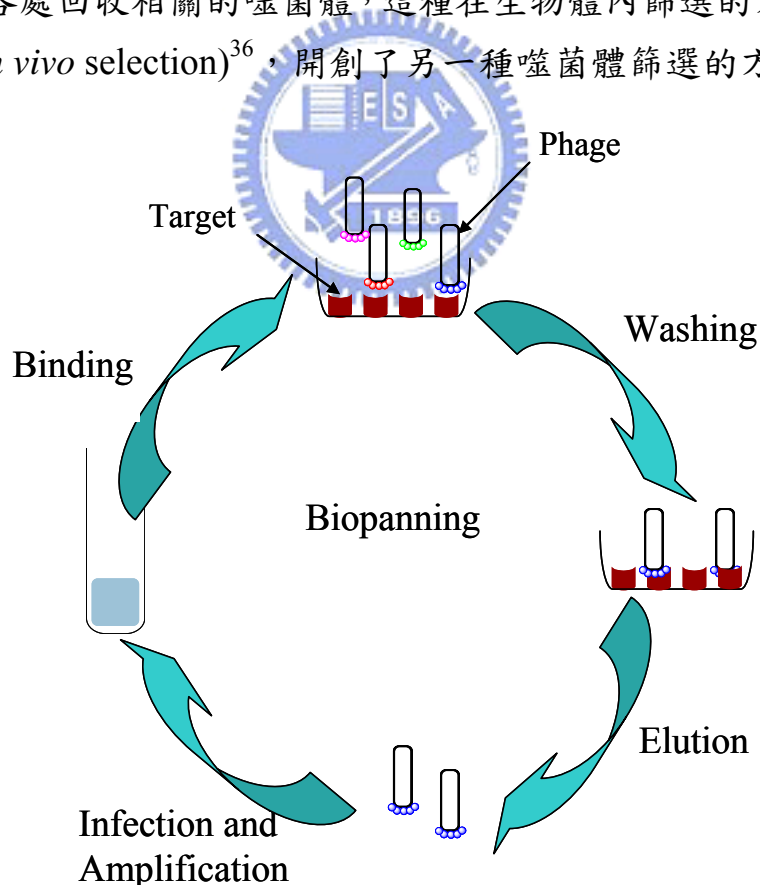
1-6 噬菌體胜肽庫 (peptide library)及 抗體庫 (antibody library)

噬菌體表現胜肽庫 (peptide library)及抗體庫 (antibody library)為目前最常被廣泛使用的兩種基因庫³⁰。噬菌體抗體庫是 1990 年 McCafferty 等人³¹利用單株抗體的基因以 RT-PCR 方式選殖出來，藉由噬菌體展示技術，將 anti-lysozyme 抗體的重鏈及輕鏈變異區 (VH/VL)，用具有彎曲性的連接片段 (flexible linker)接到載體上，以單鏈變異區片段的方式 (single chain Fv, scFv) 表現於噬菌體上，由於這是模擬抗體的結構，所以稱為噬菌體抗體 (phage antibody)。隨後在 1991 年 Hoogenboom 等人³²也發表了以同樣的方法在噬菌體上表現抗體變異區片段 (Fab)。而第一個噬菌體表現的抗體基因庫是由 Clackson 等人建構³³，他們利用抗原免疫小鼠，設計引子將小鼠中所有的抗體基因以 RT-PCR 的方式選殖出來，再藉由噬菌體抗體技術表現成噬菌體抗體庫。根據這樣的技術目前已成功的製造出人類噬菌體抗體庫，並且從中篩選出對人類腫瘤細胞具有專一性的抗體應用於腫瘤治療上。此項技術不但能夠找出單株抗體或是多株抗體在抗原分子上的結合位置，很多人也應用在辨認醣類或是核酸序列，也能夠模擬出抗原特殊結構來被抗體所辨認，稱之為類比位 (mimotope)。

另一種常用的表現系統為噬菌體胜肽庫 (peptide library)，1990 年 Devlin 等人³⁴，他利用十五胜肽隨機的序列，將其表現在噬菌體 M13 pIII 外殼蛋白上。噬菌體胜肽庫的多樣性約 2×10^7 ，並且利用在篩選 streptavidin 蛋白質上，篩選出 His-Pro-Gln 的胜肽序列是會和 streptavidin 蛋白質有很好的親和力，讓篩選的應用更廣，除了抗體篩選外多了一種篩選的選擇。噬菌體基因庫可以用來篩選和蛋白質、核酸、小分子化合物、細胞或者是組織器官等有親合性的胜肽序列。胜肽序列的大小範圍很大，表現較少胜肽可以用來篩選抗原鍵結的活性區域，而表現較多胜肽則提供構形上的變化，作為結構辨識的篩選。

1-7 噬菌體表現系統篩選方式

噬菌體表現系統的篩選方式也分兩種，一種是試管篩選 (*in vitro* selection)，利用將目標物固定在特殊管柱或是酵素連接免疫吸附分析法 (ELISA) 專用盤子中³⁵，然後加入噬菌體基因庫，讓具有親和力的噬菌體結合到目標物上，洗去多餘的部分後再從目標物上回收具有親和力的噬菌體【圖 1-14】，這樣的篩選過程叫做Biopanning。事先將目標物固定在ELISA盤子上，再將固定量噬菌體勝肽庫放入盤中和目標物進行鍵結作用，經過數次洗滌將不具鍵結作用的噬菌體洗去，再將具有鍵結作用的噬菌體利用緩衝液沖洗下來進行感染放大的過程，這樣重複的篩選可以得到鍵結力較強勝肽序列。此外，在 1996 年Pasqualini等人將噬菌體基因庫，以靜脈注射的方式打到小鼠體內，再從身體各處回收相關的噬菌體，這種在生物體內篩選的方式稱為體內篩選 (*in vivo* selection)³⁶，開創了另一種噬菌體篩選的方式。



【圖 1-14】 在 ELISA 盤子上篩選過程的示意圖

1-8 研究動機與目的

近年來膽固醇一直是心臟病、血管動脈硬化的主要元凶，除了控制飲食，可以降低膽固醇的攝取外，針對血液中過高的膽固醇含量，就目前而言主要是 statins 類藥物，這一類藥物的機制為抑制乙醯輔酶 A 還原酵素 (HMG-CoA Reductase)，使內生性膽固醇減少，達到抑制膽固醇的效果。但這一類的藥物並不適合所有病人使用，且降低心臟病風險的比率只有 20 %~40 %。此外，一些遺傳原因導致的高膽固醇病變以及其他特殊的病人皆不能使用。而且在膽固醇的生合成途徑中，statin 這類的藥物也影響了其他非固醇類物質的生合成，如攜帶鐵離子的血基質 (Heme)，為體內氧氣來源，以及和糖類分解有關多萜醇 (Dolichol)和電子轉移有關的泛醌 (Ubiquinone)等，導致體內缺乏影響其他生理功能。

因此，實驗目標是想設計同樣具有效用且安全的新型藥物，藉由抑制氧化鯊烯環化酵素的活性來降低膽固醇的生成，另一方面，由於氧化鯊烯環化酵素位於整個膽固醇生合成途徑中的下游，對於其他的二級代謝產物的產生較不造成影響，可降低其副作用。且氧化鯊烯環化酵素亦存在於真菌中，已經有很多的研究指出氧化鯊烯環化酵素的抑制劑，對於真菌生長也具有抑制效果，這類的抑制劑可發展成抗真菌 (antifungal)的藥物³⁷。

過去的研究成功利用噬菌體胜肽庫作體內篩選 (in vivo selection) 方式，篩選出對腫瘤細胞有作用的胜肽序列³⁸：Asn-Gly-Arg (NGR)³⁸ 能專一性的結合到人類乳癌腫瘤 (human breast carcinoma)、卡波西氏瘤 (Kaposi's sarcoma)與老鼠黑色素瘤 (mouse melanoma)；而 Gly-Ser-Leu (GSL)則是由乳癌腫瘤、卡波西氏瘤和惡性黑色宿瘤 (malignant melanoma)得到的胜肽序列。Wadih Arap等人³⁸在1998年發表在Science期刊上，利用上述篩選到的序列作為抗癌藥物的攜帶者，能有效的將藥物帶到腫瘤細胞上達到治療的效果。這樣的胜肽藥物正

被大量開發，由於其分子量小，不但能有效的躲過體內免疫反應的攻擊，也可以達到好的穿透效果，以達到最佳的療效。

因此我們希望利用噬菌體勝肽庫篩選對氧化鯊烯環化酶素有專一性的勝肽序列，可發展成為抑制膽固醇的藥物或者抗菌劑，另一方面也能作為各種藥物的攜帶者，能提高藥物的專一性達到更好的治療效果。除了藥物治療外，有文獻指出³⁹利用噬菌體抗體庫篩選出專一性抗體去穩定蛋白質的結構，透過co-crystallizing的方法解出膜蛋白的結構。若能篩選出穩定蛋白質結構之勝肽序列，就能如法炮製培養牛肝氧化鯊烯環化酶的單晶，透過X光繞射技術，解析出牛肝中氧化鯊烯環化酶的晶體結構，對於反應機制及環化功能可有更進一步的直接證明。

文獻指出，利用噬菌體勝肽庫對*Rhizomucor miehei* lipase蛋白質進行篩選所得到的專一性勝肽序列，做成純化蛋白質的親和性管柱，藉由管柱層析純化大量蛋白質⁴⁰。由於目前實驗室純化此酶的方法較為複雜且耗時，而所得到的產率不高，得到的純度不定，所以如果可以藉由具有專一性勝肽序列做成親和性管柱，將可達到快速純化並且提高產率。除了用此方法解決純化問題外，經由基因轉殖的技術，過去本實驗室將牛肝得到的酶基因殖入酵母菌內，並且能成功的表現出活性並建立一套篩選方式。藉由這樣的酵母菌表現系統 (yeast expression system)表現接有 6 個Histidine的氧化鯊烯環化酶，解決純化問題。

本論文的研究目的希望透過噬菌體勝肽庫，在酶連接免疫吸附分析法專用盤進行試管篩選 (in vitro selection)，挑選出跟牛肝氧化鯊烯環化酶具有親和力的勝肽序列，對於酶具有抑制性，未來可以當作藥物，並且透過墨點法 (dot blot)、西方墨點法 (western blotting) 及酶連接免疫吸附分析法 (ELISA)監測其鍵結力及測定其專一性。

第二章 實驗材料及方法

實驗材料

2-1 實驗藥品

Ph.D.-C7C 以及 Ph.D.-12 Phage Display Peptide Library Kit

限制酶酵素

以上皆購自於 New England Biolabs

ABTS

Benzamidine

Bovine Serum Albumin (BSA)

N-bromosuccinimide (NBS)

Diaminobenzidene (DAB)

Lanosterol (LA)

Phenylmethylsufonyl fluoride (PMSF)

Silver nitrate

Triton X-100 (TX-100)

以上皆購自於 Sigma。

Acetic acid

Coomassie Brilliant R250

Dichloromethane

Di-potassium hydrogen phosphate (KPi)

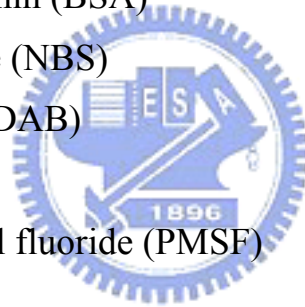
EDTA·Na₂

Ethanol (95% and 99%)

Ether

Ethyl acetate (EA)

Hydrochloric acid 37%



Hexane
Hydroxylamine 50% (HA)
Isobutanol
Methanol
Nitrobenzene
N,N-dimethylacetamide
Potassium chloride
Potassium carbonate
Sodium carbonate
Sodium sulfate
以上皆購自於 Merck。

Glycerol
Tris-(hydroxymethyl) methylamine
以上皆購自於 BDH。



Acrylamide
Dithiothreitol (DTT)
ECL western blotting detection reagent
N,N'-Methylene-bis-acrylamide
Millipore polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane
Nitrocellulose (NC) membrane
Q-Sepharose Fast Flow Gel
HiTrap Heparin column
以上皆購自於 Amersham Pharmacia Biotech。

Hydroxyapatite HT Gel
以上購自於 Bio-Rad。

Ammonium persulfate (APS)

Sodium dodecylsulfate (SDS)

以上皆購自於 Gibco BRL。

BCA Proteins Assay Kit

以上購自於 Pierce。

牛肝 (Bovine Liver)

取自台中肉品屠宰場，並保存於 -80°C 冰箱中。



2-2 緩衝液及溶液配置

Homogenization Buffer I (HB I), pH 7.4 :

含有 100 mM Tris-base、1 mM EDTA- Na_2 、1 mM DTT、1 mM Benzamidine 及 40 μg /mL PMSF。

Homogenization Buffer II (HB II), pH 7.4 :

含有 20 mM Tris-base、1 mM EDTA- Na_2 、1 mM DTT、1 mM Benzamidine 及 40 μg /mL PMSF。

Ion Exchange Buffer (IEB), pH 7.4 :

含有 20 mM Tris-base、1 mM EDTA- Na_2 、1 mM DTT、1 mM Benzamidine, 40 μg /mL PMSF 及 0.5% TX-100。

Hydroxyapatite Buffer (HAB) 與 Heparin Buffer (HB), 4 L, pH 7.4, 含有 5 mM KPi (磷酸氫二鉀)、1 mM DTT 及 0.5% Triton X-100。

膠片染色液(0.1% Coomassie blue R-250 Stain Solution) :

取 1 g 的 Coomassie brilliant blue R-250, 溶於 400 mL 的甲醇中, 再加入 100 mL 的醋酸, 加二次水至體積為 1 L。

脫色溶液 I (Destain Solution I) :

將甲醇 400 mL 與醋酸 100 mL 混合後, 加二次水至體積為 1 L。

脫色溶液 II (Destain Solution II) :

將甲醇 50 mL 與醋酸 70 mL 混合後, 加二次水至體積為 1 L。

TLC 染劑 (酵素活性測試用), 500 mL :

含有 5% 濃硫酸 (H_2SO_4)、5% *p*-Anisaldehyde 及 90% 酒精。

LB 培養液

每升加入 10 g Bacto-Tryptone、5 g yeast extract 以及 5 g NaCl

IPTG/Xgal

取 1.25 g IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) 及 1 g Xgal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) 溶於 25 ml Dimethyl formamide 避光存於 -20 °C

LB/IPTG/Xgal 培養基

每升 LB 培養液加入 15 g agar 高溫滅菌後等到溫度低於 70 °C 再加入 1 mL IPTG/Xgal，避光存放於 4 °C

Top Agarose

每升加入 10 g Bacto-Tryptone、5 g yeast extract、5 g NaCl、1 g MgCl₂ · 6H₂O 以及 7 g agarose 高溫滅菌

Tetracycline

每毫升取 Tetracycline 20 mg 以 Ethanol 溶解，避光存於 -20 °C

LB-Tet 培養基

每升 LB 培養液加入 15 g Agar 經過高溫滅菌後等冷卻至 70 °C 以下再加入 1 mL Tetracycline 避光存放於 4 °C

覆蓋液 (Blocking buffer)

配置 5 mM KPi buffer，5 mg/ml BSA 以及 0.02% NaN₃ 過 0.22 μ m filter 並存放於 4 °C

TBS 緩衝液

50 mM Tris-HCl (pH 7.5)，150 mM NaCl 滅菌置於室溫

PEG/NaCl

20% (w/v) polyethylene glycol-8000，2.5 M NaCl 滅菌置於室溫

ABTS 呈色劑

取 22 mg ABTS 溶於 100 mL 的 50 mM sodium citrate (pH 4.0) 中過 0.22 μm 的 filter 置於 4 $^{\circ}\text{C}$ 。每次反應取 21 mL 的 ABTS 溶液加入 36 μL 30% 的 H_2O_2

DAB 呈色劑

取 2.5 mg DAB 溶於 50 μL DMSO 中，加入 3 mL 的 TBS 緩衝液以及 5 μL 的 30% H_2O_2

Potassium phosphate 緩衝液 (pH 6.0)

取 132 mL 1 M K_2HPO_4 及 868 mL of 1 M KH_2PO_4 調製 pH 為 6.0 存於室溫

Ampicillin (100 mg/mL)

將 Ampicillin 溶於二次去離子水，再用 0.2 μm 濾膜過濾，儲存於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。



SD 培養液

0.17% yeast nitrogen base, 0.5% ammonium sulfate, 2% glucose

ALTHMU 培養基

0.17% yeast nitrogen base, 0.5% ammonium sulfate, 1.5% agar (固體培養基)，經高壓滅菌後加入 2% 50X ALTHMU, 2% glucose, 1M sorbitol (於進行電穿透作用時使用)

YPD 培養基

1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose (glucose) 經高壓滅菌存於 4 $^{\circ}\text{C}$

MGYH 培養基

1.34% YNB, 1% glycerol, 4×10^{-5} % biotin, 0.004% histidine
高溫滅菌後存放於 4 °C

BMGY 培養基

1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate (pH 6.0), 1.34 % YNB, 4×10^{-5} % biotin, 1% glycerol
高溫滅菌後存放於 4 °C

Transfer 緩衝液

25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS, 20% methanol



2-3 實驗儀器

均質機 (Brinkmann)

高速離心機 (Allegra 21 Series, Beckman)

超高速離心機 (Sorvall RC 5C)

微量旋轉式真空濃縮機 (Spin Vaccum, SAVANT)

紫外光/可見光光譜儀 (Amersham Pharmacia)

超過濾裝置 (Ultrafiltration System, Amicon)

微盤光譜分析儀 (Fusion Universal Microplate Analyzer, Packard)

PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9700)

電泳槽 (Amersham Pharmacia)

西方墨點法轉印槽 (TE 70, Amersham Pharmacia)



2-4 菌株及質體

菌株

XL1-Blue

大腸桿菌之一株，購自於 Stratagene 公司。

TKW14C2

為實驗室所研究出不含有 OSC 功能的酵母菌，其 *erg 7* 基因被剔除。生長條件除了要給予 ALTHMU 外還需要 Erg 及 Heme。

GS115

購自於 Invitrogen 生物科技公司。*Pichia pastoris* 的一種，基因型態為 *his4*，表現型為 Mut⁺，其生長條件需要額外加入 Histidine

載體

pPICZ α A

購自於 Invitrogen 生物科技公司。載體 pPICZ α A 是一種可於 *Pichia pastoris* 菌株中表現重組或突變之真菌基因的載體。此載體可將表現的蛋白質外吐於細胞外。



pRS314

購自於 New England BioLabs 公司。載體 RS313 是一可穿梭於酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和大腸桿菌 (*E.coli*) 間之穿梭載體 (Shuttle Vector)。

96g 引子

購自於 New England BioLabs 公司。

序列 5'- CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG -3

實驗方法

2-5 牛肝中氧化鯊烯環化酵素之純化



【表 2-1】 牛肝中氧化鯊烯環化酵素的純化流程簡圖

2-5-1 溶解微粒體 (Microsome)

由 -80°C 冰箱中取出牛肝約 500 克，置於 4°C 冰箱中解凍隔夜；以 HB I 緩衝液清洗，將肝切成小方塊狀後，以牛肝與 HB I 緩衝液為 1:2 的體積比例打碎，每攪打 30 秒鐘即冰浴冷卻 10 秒鐘，持續直到溶液中無塊狀物存在；之後在 4°C 下以轉速 12,000 rpm 離心 35 分鐘，取出上清液 (supernatant) 後將沈澱物丟棄，在 4°C 下以轉速 40,000 rpm 超高速離心 1 小時 10 分鐘，收集細胞微粒體 (microsomal pellets) 【表 2-1】。

2-5-2 粗萃取液 (Crude Extract)

將所有細胞微粒體沈澱物溶於 100mL 的 HB II 緩衝液，並置於冰浴中；以均質機轉速 20,000 rpm 將微粒體沈澱打散；再加入總濃度為 0.5 % 的 Triton X-100 和 1 mM DTT，在 4°C 下以磁石攪動至少 1 小時；最後在 4°C 下以 40,000 rpm 超高速離心 1 小時 10 分鐘，收集上清液。

2-5-3 Q-Sepharose 陰離子交換管柱層析

將上清液通入體積為 80 mL Q-Sepharose Fast Flow 陰離子交換樹脂管柱中。先以 300 mL 的 IEB 緩衝液來平衡管柱中的 Q-Sepharose 陰離子交換樹脂；再將粗萃取液導入，同時開始收集流出物 (Flowthrough)；之後利用 IEB 緩衝液沖洗，將無法與樹脂結合的蛋白質沖洗出。接著分別以含有 20 mM、50 mM、70 mM 和 100 mM 等四種鹽梯度氯化鉀 (KCl) 濃度緩衝液沖提，以每管 10 mL (約 800 滴) 收集。收集完畢後分別取樣做酵素活性測試和蛋白質濃度測量，將具有活性且蛋白質濃度較高的部分收集起來。經由透析 (Dialysis) 方式除去鹽類並且進行緩衝溶液的交換 (HAB 緩衝液, pH 7.4)，第一次透析約 4~6 小時，第二次則放置隔夜；之後利用超過濾法 (Ultrafiltration)

濃縮溶液至剩餘體積約 30 mL。

2-5-4 Hydroxyapatite Gel 管柱層析

先以 50 mL Hydroxyapatite Gel 填充樹脂以 2 倍體積的 HAB 緩衝液平衡管柱。注入上述經離子交換樹脂所得的樣品，同時收集流出物 (Flowthrough)；再以 500 mL 的 HAB 沖提，每管收集 5 mL (約 400 滴) 收集。收集完後將每管取樣做酵素活性測試和蛋白質濃度測量，具有活性且蛋白質濃度較高的部分收集起來，濃縮溶液至剩餘體積約 30 mL。

2-5-5 HiTrap Heparin 管柱層析

先以 20 mL HiTrap Heparin 填充樹脂體積的 HB 平衡管柱。將上述所得 Hydroxyapatite 管柱所得的樣品導入，同時收集流出物 (Flowthrough)；以 80mL 的 HB 緩衝液沖洗，將無法與樹脂結合的蛋白質先沖出，同時收集流出物 (Wash)。之後分別以 50 mM、100 mM 和 1 M 三種不同氯化甲 (KCl) 鹽梯度的緩衝液沖提，每管收集 2 mL (約 200 滴) 收集。收集完畢後分別取樣做酵素活性測試、蛋白質濃度測量與 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析。

2-5-6 酵素的分子量及純度分析

利用 SDS-PAGE 分析酵素的分子量及純度。配置 12 % SDS-PAGE 電泳膠片【表 2-2】，取出純化之蛋白質溶液與樣品緩衝液以 4：1 的體積比例混合，在 95 °C 水浴下加熱 10 分鐘後，注入於膠片上端的樣品凹槽內。先固定以 90 伏特的電壓進行電泳，當染劑 (Dye) 到達 separating gel 層後，再將電壓增加到 120 伏特，在 running buffer 環境下通電壓約 1 ~ 1.5 小時，待染劑至膠片底端後即完成。以膠片染色液 (0.1 % Coomassie blue R-250) 染色約 30 分鐘後，再以脫

色溶液 I (Destain Solution I) 去除染色約 20 分鐘之後，再改浸漬於脫色溶液 II (Destain Solution II)，直到膠片的藍色背景完全去除而呈現透明狀為止。

12 % Separating gel

30 % acrylamide / 1 % bis-acrylamide	8 mL
1.5M Tris-buffer (pH8.8)	5 mL
20% SDS	100 μ L
dd H ₂ O	7 mL
10% APS	100 μ L
TEMED	10 μ L
Total Amount	20 mL

4 % Stacking gel

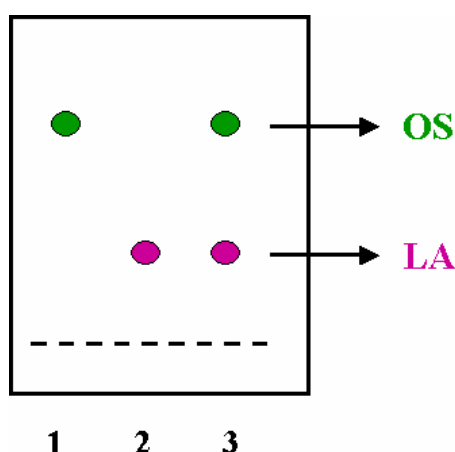
30 % acrylamide / 1 % bis-acrylamide	1.3 mL
1M Tris-buffer (pH6.8)	1.25 mL
20% SDS	50 μ L
dd H ₂ O	7.35 mL
10% APS	50 μ L
TEMED	10 μ L
Total Amount	10 mL

【表 2-2】 12 % 及 4 % 蛋白質電泳膠片配方

2-5-7 酵素活性測試

氧化鯊烯環化酵素的活性測試 (OSC Activity Assay)，是由觀察產物的生成與否，以判斷酵素是否具有活性的方法。取 2 μL 的 10 μM 受質氧化鯊烯 (OS) 至微量管 (eppendorf tube) 中，加入 200 μL 蛋白質溶液，混合均勻後置於溫度 37 $^{\circ}\text{C}$ 下進行反應 (Incubation) 2 小時以上。加入 $\text{EtOH} / \text{H}_2\text{O} = 9 / 1$ 的酒精溶液 200 μL ，於 70 $^{\circ}\text{C}$ 下加熱 20 分鐘以中止反應後，再加入 400 μL (等體積) 的二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 以萃取反應物，將混合液經劇烈振盪 30 秒鐘後，離心 5 分鐘，將其水層 (上層) 轉移至新的微量管之後，再重複進行一次萃取過程。把兩次萃取所得的有機層收集在一起，以真空濃縮機乾燥溶劑；再加入 50 μL CH_2Cl_2 ，藉由薄層液相管柱層析 (Thin-layer liquid chromatography, TLC)，以毛細管把樣品點在 TLC 玻璃片上，以 $\text{EA} / \text{Hexane} = 1 / 4$ (20% EA, v/v) 為比例的展開液展開，浸漬於 TLC 染劑 (stain solution) 數秒鐘，於加熱板 (hot plate) 上加熱並觀察結果。

如【圖 2-1】所示，具有活性的酵素溶液經過反應後，在 TLC 片上與標準物羊毛硬脂醇 (LA) 相同的位移距離 (R_f)，會出現一明顯的紫色色點；相對地，若不具有活性的酵素反應，則僅會有受質 OS 的綠色色點存在。



【圖 2-1】 TLC 活性測試示意圖

(1：OSC 無活性，2：LA 標準物，3：OSC 具有活性)

2-5-8 酵素濃度分析

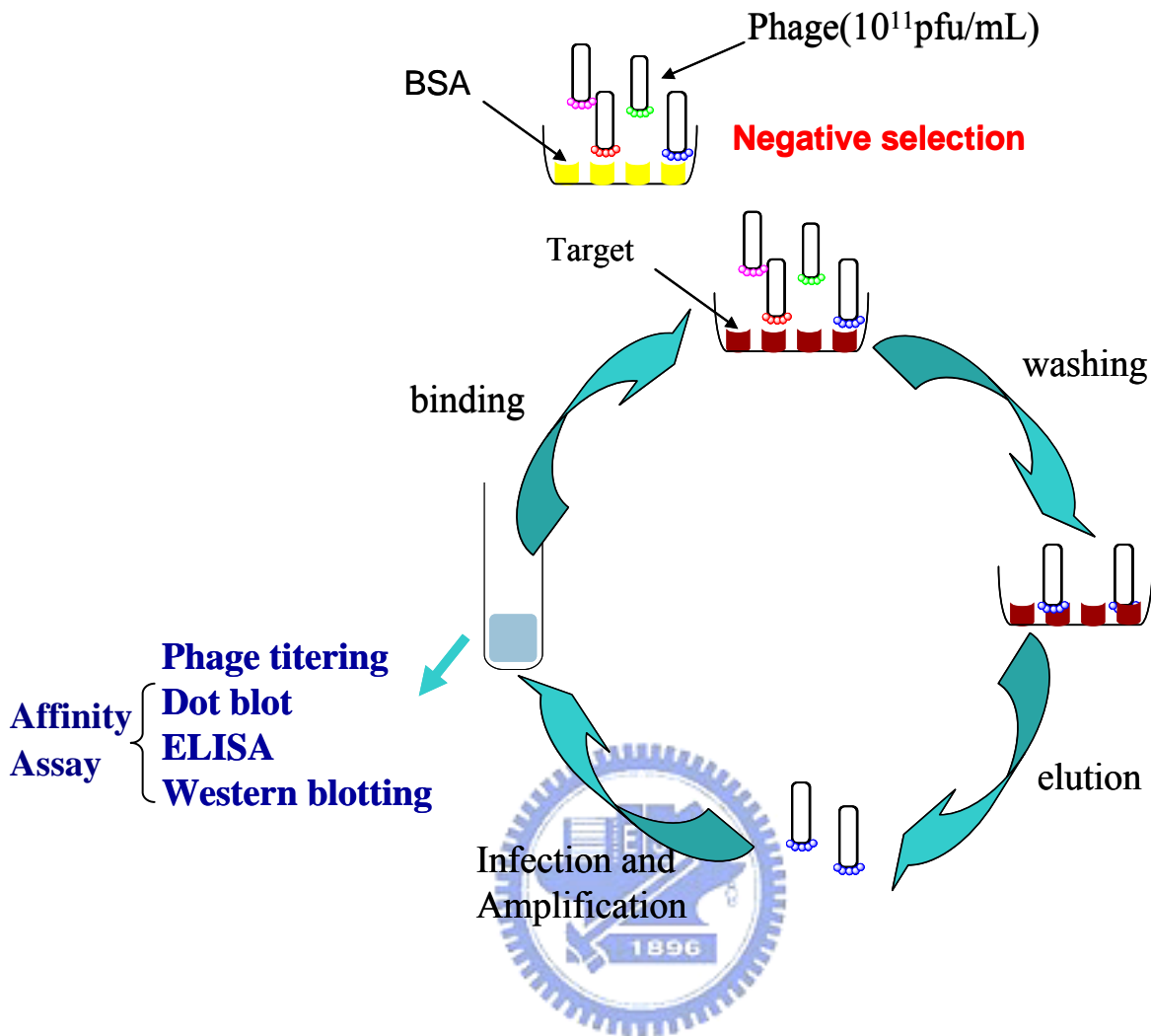
對於蛋白質濃度測定採用的方式是 BCA (bicinchoninic acid) Assay，BCA Assay 類似於 Lowry 反應，但是以 BCA 試劑取代 Folin-Cocalteu 試劑，在鹼性環境下藉由蛋白質可使二價銅離子還原成為一價銅離子，而兩個 BCA 分子則會與一價銅離子形成錯合物，在波長 562 nm 下產生明顯的紫色，以吸收值的大小判斷溶液中蛋白質濃度的多寡。取出蛋白質溶液樣品 25 μ L 於 96-well ELISA plate 之中，加入已混合均勻的 BCA 試劑 200 μ L (Reagent A / B = 50 / 1 的比例)，避光置於 37 $^{\circ}$ C 下反應 30 分鐘，測量溶液在波長 560 nm 時的吸收值變化；同時，先配置好 2 mg/mL、1.5 mg/mL、1 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL 及 0.125 mg/mL 六個不同濃度的 BSA 標準溶液在同樣的反應條件下，得到的吸收值可定出一線性的標準曲線 (linear standard curve)，將樣品吸收值以內插法的方式，換算為對應的蛋白質濃度。



2-6 Ph.D.-C7C 及 Ph.D.-12 對牛肝鯊烯環化酵素的親和篩選

Ph.D.-C7C (E8120S)及 Ph.D.-12 (E8110S)噬菌體勝肽庫由 New England Biolabs (NEB)公司購入。主要將隨機合成的DNA序列表現在 M13 的非主要外殼蛋白質 pIII 的N端上。Ph.D.-C7C噬菌體勝肽庫的隨機 7 勝肽前後各接有 cysteine 可以藉由雙硫鍵連接 (disulfide cross-link)一起，形成一個特殊環狀 (loop)構形，表現隨機勝肽多樣性約 1.28×10^9 ；Ph.D.-12 噬菌體勝肽庫表現直鏈狀的勝肽，多樣性約 2.7×10^9 。12 個勝肽序列跟 7 個勝肽序列的噬菌體基因庫相比，較長且有較高的多樣性，在鍵結篩選上較有機會篩選到具有親和力的勝肽序列；7 個勝肽的噬菌體基因庫，在隨機勝肽序列前後含有 2 個 Cysteine 可以藉由雙硫鍵連接 (cross-link)在一起，形成一個特殊的環狀 (loop)結構，可以用來篩選辨認具有結構的目標物，過去的研究也發現這種具有特殊結構的噬菌體勝肽庫，可以用來分辨 D-amino acid 這類具有鏡像異構物的結構。

實驗利用 ELISA plate 作為篩選工具，進行試管中 (*in vitro*)篩選，篩選流程如【圖 2-2】所示，將 10^{12} pfu/mL 的噬菌體勝肽庫先對 BSA 蛋白質進行負向篩選，再將未和 BSA 蛋白質結合的噬菌體放入 well 中和氧化鯊烯環化酵素進行親和反應，經由清洗、elution 及感染放大後，重複這樣的步驟循環數次，可得到對氧化鯊烯環化酵素具有鍵結力的噬菌體勝肽，過程中每次循環放大的噬菌體皆進行效價測定及親和力分析，親和力的分析主要利用墨點、，詳細步驟如下所描述。



【圖 2-2】噬菌體胜肽庫篩選示意圖

2-6-1 牛肝鯊烯環化酵素之製備

將牛肝中純化出來的氧化鯊烯環化酵素以 5 mM KPi buffer 配製成濃度為 100 μ g/mL，另外將負向控制組(Negative control)的 BSA 蛋白質，濃度配置成 5 mg/mL 各取 150 μ L 加入 ELISA plate well 中，置於 4 $^{\circ}$ C 下隔夜。

2-6-2 負向親和篩選 (Negative selection)

將放置隔夜之BSA 蛋白質倒掉，以TBS緩衝液沖洗之後，將ELISA plate倒置拍打將well中的水分去除，重複三次後，取 10 μL 2×10^{11} pfu/ μL 之Ph.D.-C7C/ Ph.D.-12 噬菌體胜肽庫與 90 μL 的TBS緩衝液混合，加入well中進行篩選，在室溫搖動混合一小時後，取上清液到欲篩選的蛋白質well中進行第一次親和篩選。

2-6-3 第一次親和篩選

將放置隔夜之ELISA plate中的氧化鯊烯環化酵素倒去，並以TBS緩衝液重複上述方式沖洗 3 次後，分別加入 400 μL 的覆蓋液，置於室溫下 2 個小時，倒掉覆蓋液並以TBST(含 0.1 % Tween-20 的TBS 緩衝液)重複上述方式沖洗 3 次。取已進行完negative親和篩選的上清液加入每個well中，在室溫搖動混合 1 小時後，同樣以TBST用力沖洗 well 20 次，去除鍵結力弱或者沒有鍵結噬菌體胜肽庫，接著加入 200 μL 洗滌緩衝液 (elution buffer)於室溫搖晃 10 分鐘。最後以微量吸管劇烈抽吸數次，取出洗滌緩衝液 (elution buffer)加入含有 15 μL 中和緩衝液 (neutralization buffer)中，快速混合後拿取 1 μL 做系列 10 倍稀釋 (稀釋倍數 $10 \sim 10^5$)計數得到的噬菌體效價，其餘保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

2-6-4 噬菌體培養放大

將培養隔夜 3 mL的ER2738 以LB培養液以 1:100 稀釋成體積 20 mL，倒入親和篩選後的噬菌體，置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養 4.5 小時，以 9,000 rpm在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下離心 15 分鐘，取上清液加入 1/5 體積的PEG/NaCl溶液，讓噬菌體沈澱下來，置於 4 $^{\circ}\text{C}$ 隔夜。第二天，以 9,000 rpm在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下離心 20 分鐘，倒掉上清液，盡量倒去所有的PEG/NaCl溶液，沈澱物以 1 mL TBS緩衝液回溶後，將溶液轉至於微量離心中。已回溶好溶液用 10,000 rpm離心 5 分鐘，以去除無法回溶的多餘沈澱物，取上

清液至新的微量離心管中，並加入 1/5 體積的PEG/NaCl溶液置於冰上 1 小時，作第二次的沈澱。之後以 10,000 rpm離心 10 分鐘倒掉上清液，盡量倒去所有的PEG/NaCl溶液，將沈澱物溶於含 0.02 % NaN₃的 200 μL TBS緩衝液中，用 10,000 rpm離心 5 分鐘，以去除無法回溶的多餘沈澱物，取上清液至新的微量離心管中，放置 4 至少 1 個小時，取 10 μL做系列稀釋 (稀釋倍數 10¹⁰~10¹⁵)計數得到的噬菌體的效價，其餘保存於 4 。

2-6-5 第二次親和篩選

第一次所篩選所得到的噬菌體效價約 10¹³ pfu/μL，取 10 μL與 90 μL的TBST緩衝液混和均勻後加入每個ELISA well中進行負向親和篩選，篩選後得到的上清液加入氧化鯊烯環化酵素well中進行第二次親合篩選，其餘步驟如前面所述，沖洗、elute、中和以及放大，特別注意第二次之後的篩選所加入的tween-20 含量提高至 0.5 % [v/v]，並且加入噬菌體後以TBST緩衝液用力沖洗 30 次，這樣的循環重複四次後。最後一次的篩選時，不進行放大動作直接作一連串稀釋計數得到噬菌體的效價，大約有 10⁴ pfu/μL，保存於 4 。

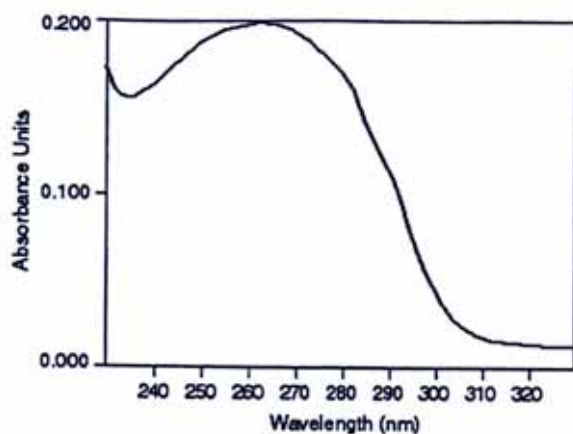
2-7 噬菌體效價之測定

2-7-1 方法一：培養盤菌落數計

培養 3 mL LB培養液的ER2738 至隔夜，第二天取 3 μ L ER2738 到新的 3 mL的LB培養液中，培養至 $OD_{600} \sim 0.5$ ，並且準備Top agarose 微波加熱溶解後分裝成 3 mL放置 45 水浴槽內備用。將噬菌體用 LB培養液做系列的 10 倍稀釋，已經經由培養放大的噬菌體稀釋至 $10^{11} \sim 10^{15}$ 倍，若未放大的噬菌體則稀釋 $10^1 \sim 10^4$ 倍，取 10 μ L 稀釋好的噬菌體加入至 200 μ L $OD_{600} \sim 0.5$ 的ER2738 中，室溫下反應 5 分鐘後，最後將已感染ER2738 的噬菌體加入先前準備好的top agarose 中均勻混和，倒入已含IPTG/Xgal的LB培養盤上，等凝固後倒置 37 培養 16~18 小時，計數藍色溶菌斑的數目，並決定其效價 ($\text{pfu}/\mu\text{L} = \text{藍色溶菌斑數目} \times \text{噬菌體稀釋倍數} \div 10$)。

2-7-2 方法二：光譜吸收測定

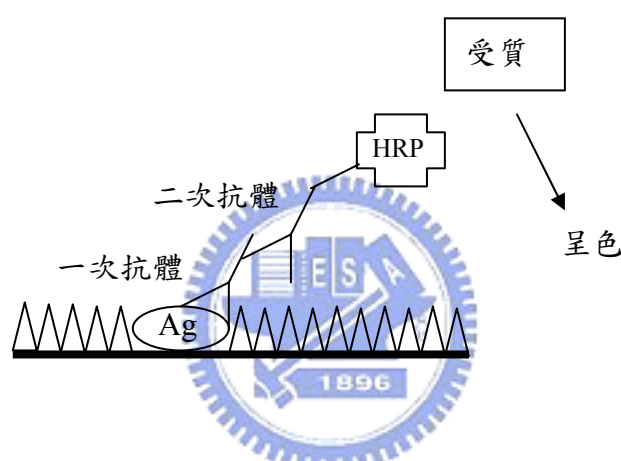
利用光譜吸收測定噬菌體效價【圖 2-3】，取 10 μ L 已放大完成的噬菌體用TBS緩衝液稀釋一百倍，使用紫外光光譜儀測吸收值 240 nm 到 320 nm，噬菌體在 269 nm會有最大的吸收值，藉由公式計算噬菌體效價：每毫升噬菌體個數 (pfu/mL) = 269 nm的吸收值 $\times 6 \times 10^{16} \div$ 所用的噬菌體其基因大小 $\times 100$ 稀釋倍數 (例如:M13 基因大小 6407 bases)。



【圖 2-3】噬菌體光譜吸收圖。

2-8 噬菌體胜肽庫對氧化鯊烯環化酵素之親和力測定

酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、墨點法 (dot blot)、西方墨點法 (western blotting) 常用在抗原抗體的分析中【圖 2-4】，利用固相吸附原理將抗原吸附在不同的材質上再將抗體加入反應，利用接有 HRP 酵素等可藉由呈色劑呈色的二次抗體，將其加入和一次抗體反應後，藉由呈色劑中的受質受到酵素反應呈色，得到的數值為抗原和一次抗體間的作用，利用這樣的反應可測定氧化鯊烯環化酵素和噬菌體之間的親和作用。



【圖 2-4】 抗原抗體測定示意圖

2-8-1 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA) 之反應測試

將 150 μL 牛肝鯊烯環化酵素 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、噬菌體 (10^{10} pfu/mL) 及 BSA 蛋白質 (5 mg/mL) 加到 ELISA plate 反應槽中，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置隔夜，隔天將反應槽中蛋白質及噬菌體倒去以 TBS 緩衝液沖洗 3 次，分別加入 400 μL 的覆蓋液，置於室溫下 2 個小時，倒掉覆蓋液並以 TBST 緩衝液 (含 0.1 % Tween 20 的 TBS 緩衝液) 沖洗 3 次。取噬菌體 10 μL 和 100 μL TBST 緩衝液混合均勻加入 well 中靜置反應 1 小時後，用 TBST 緩衝液沖洗 3 次。將含有 HRP 酵素的 anti-M13 抗體以覆蓋液 1:5000 倍稀釋，取 100 μL 的稀釋抗體加入反應槽中，置於室溫下反應

1 小時，同樣以TBST緩衝液沖洗 5 次，最後加入 100 μ L的ABTS ELISA 呈色劑 (ABTS試劑加入 H_2O_2)，放置室溫下避光反應 10~60 分鐘後測 405 nm的吸收值。

2-8-2 墨點法 (Dot blot)之反應測試

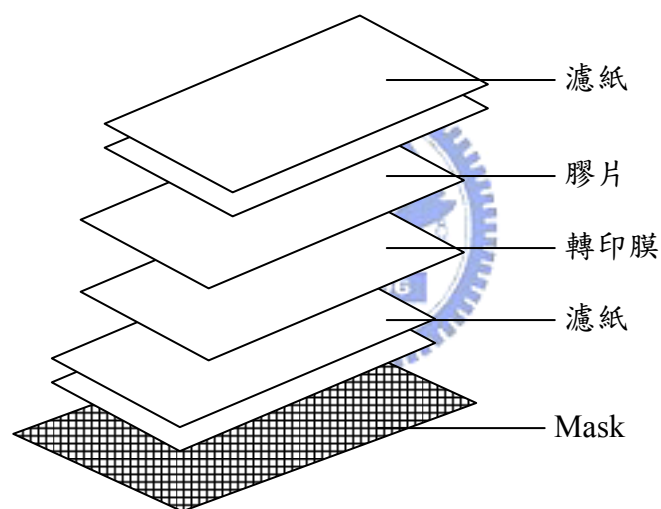
將PVDF轉印膜用甲醇浸泡 10 秒，再用二次水清洗數次，等到膜稍微乾一點，再取 10 μ L (0.5 mg/mL)的蛋白質點在轉印膜上等待膜完全乾，加入 5 %脫脂奶粉覆蓋液室溫下反應搖晃一小時，以覆蓋其他沒有蛋白的部分，倒掉覆蓋液用 0.1 %TBST 緩衝液 (含 0.1 % Tween-20 的TBS緩衝液)清洗轉印模 3 次每次 5 分鐘。取約 10^{12} 效價之噬菌體用TBST緩衝液稀釋成 1 mL加到轉印模中，用密封帶密封，室溫反應搖晃一小時或更久，倒掉噬菌體稀釋液，以同樣的方式清洗轉印模 3 次，加入以覆蓋液 1 : 5000 倍稀釋的HRP酵素anti-M13 抗體，置於室溫下反應 1 小時，同樣以TBST緩衝液沖洗 5 次，最後以DAB 呈色試劑呈色。



2-8-3 西方墨點法 (Western blotting)之反應測試

取 40 μ L由牛肝中純化出的氧化鯊烯環化酵素，跑 12 %的 SDS-PAGE (方法如同前面描述)。之後將膠片以二次水清洗二次 (搖盪 30 秒)，再浸在轉印緩衝液 (transfer buffer)中 10 分鐘；同時，將 PVDF轉印膜用甲醇浸泡 10 秒，再用二次水清洗數次，並同樣以轉印緩衝液平衡轉印膜；或者直接將NC轉印膜直接用轉印緩衝液平衡。轉印槽 (Hoefer)的電極利用轉印緩衝液潤濕，且準備 4 片已事先浸濕的厚濾紙。先將一塑膠片 (mask)放在電極上，再將 2 張厚濾紙放在轉印槽上，取一些轉印緩衝液保持濾紙濕潤，再鋪上已濕潤的轉印膜，再疊上已平衡好的膠片，最後鋪上 2 張厚濾紙即完成三明治疊法【圖 2-5】。在過程中每一層都要特別注意不要有氣泡，以免影響轉印的效果。組裝完成蓋上電極的正極，並在正極上面加上 1 公斤的物

品，通入 30 伏特電壓轉印 30 分鐘。取出轉印膜，將轉印膜右上角截角以為標幟，並以二次水清洗二次後，加入 5 % 脫脂奶粉覆蓋液室溫下搖晃 1 小時，以覆蓋其他沒有蛋白的部分，倒掉覆蓋液用 0.1 % TBST 緩衝液 (含 0.1 % Tween-20 的 TBS 緩衝液) 清洗轉印模 3 次每次 5 分鐘。取約 10^{12} 效價之噬菌體用 TBST 稀釋成 3 mL 加到轉印模中，用密封帶密封，室溫反應搖晃一小時或更久，倒掉噬菌體稀釋液，以同樣的方式清洗轉印模 3 次，加入含有 HRP 的 anti-M13 抗體以覆蓋液 1 : 5000 倍稀釋，置於室溫下反應 1 小時，同樣以 TBST 沖洗 5 次，最後以 ECL 呈色。



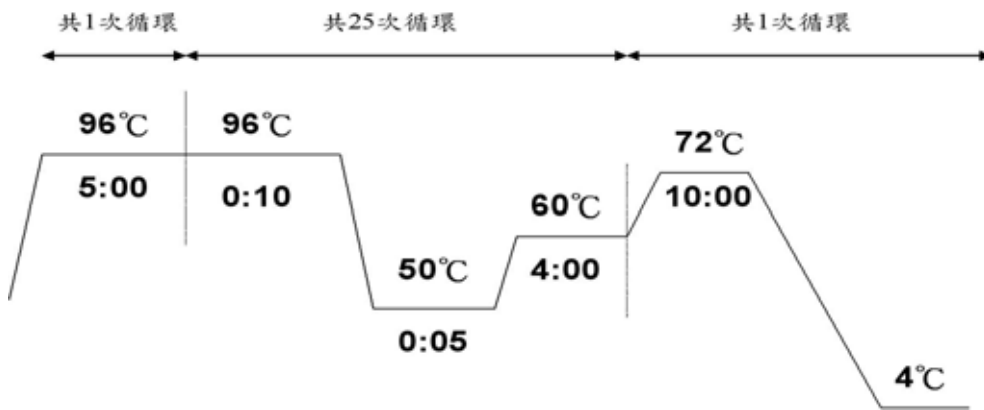
【圖 2-5】 西方墨點法三明治疊法

2-9 單股 DNA 模版之純化

挑單一顆藍色溶菌斑或者 10 μL 噬菌體加入 1 mL 以 LB 培養液稀釋 1:100 稀釋培養隔夜的 ER2738，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培養 4.5 小時後，以 10,000 rpm 離心 30 秒鐘，取上清液至乾淨的微量離心管中，置於 4 $^{\circ}\text{C}$ 或者以 1:1 比例和甘油混和保存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。隔天取 500 μL 的上清液加入 200 μL PEG/NaCl 混和均勻置於室溫 10 分鐘，以 10,000 rpm 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 10 分鐘，取沈澱物加入 200 μL TE 緩衝液回溶，再加入 200 μL phenol/chloroform (25:24) 混和均勻 30 秒並靜置 1 分鐘後，再重複混和均勻 30 秒後，以 10,000 rpm 離心 3 分鐘取上清液，加入 2 倍體積的 100 % 酒精及 1/10 體積 3 M Sodium acetate (pH 5.2) 混和完全後放置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 30 分鐘，以 10,000 rpm 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下離心 10 分鐘倒掉上清液，再用 70 % 酒精沖洗沈澱物，同樣的方法離心 10 分鐘倒掉上清液，重複清洗一次，最後用真空抽乾方法去除剩餘酒精，以 30 μL 二次水回溶，放置於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 5 μL DNA 跑 0.8 % 的 agarose gel，用 EtBr 染色觀察是否得到單股 DNA 片段。

2-10 DNA 定序

以 NEB Ph.D.-C7C Phage Display Peptide Library Kit 中所附的 96g 引子 (primer) 作定序 PCR 反應。於 PCR 微量反應管中加入 3 μL 單股 DNA、96g 引子 1 μL 、5 \times Sequence buffer 4 μL 、二次無菌水 11 μL 及 R.R Mix 1 μL 共 20 μL ，以聚合酶連鎖反應定序程式【圖 2-6】進行反應。反應完進行後處理及定序。(後處理及定序的部分由實驗室裕國學長及庭翊學弟所作)。



【圖 2-6】 PCR 定序條件



2-11 單株抗體的製備

抗體是由 B 細胞所分泌的蛋白質，目前廣為應用的抗體分為兩種，多株抗體 (polyclonal antibody) 和單株抗體 (monoclonal antibody)。多株抗體是將抗原打入老鼠體內，經過數次免疫，採集血清，此血清為多株抗體，好處在於操作過程較為簡單，但其專一性低對於類似的抗原結構都會反應，稱為交叉反應 (cross reaction)。自 1973 年 Milstein 等科學家的研究發表骨髓瘤細胞 (myeloma) 之融合實驗，製造出單株抗體，彌補了多株抗體的缺點。由於血清中的每一種抗體是由單一 B 細胞所產生的，所以將 B 細胞由脾臟取出，單獨培養成細胞株，即可得到單一抗體，只會對特定抗原反應，其專一性較多株抗體高，此稱為單株抗體。由於 B 細胞不易在培養基中生長，所以無法直接在體外進行培養，因此利用癌細胞不死的生長特性，透過細胞融合的實驗，和 B 細胞作結合，則可得到在培養基中永久生長之 B 細胞株，即為融合瘤細胞株 (hybridoma cell)，經由篩選、大量培養及純化，就可得到大量的單株抗體。

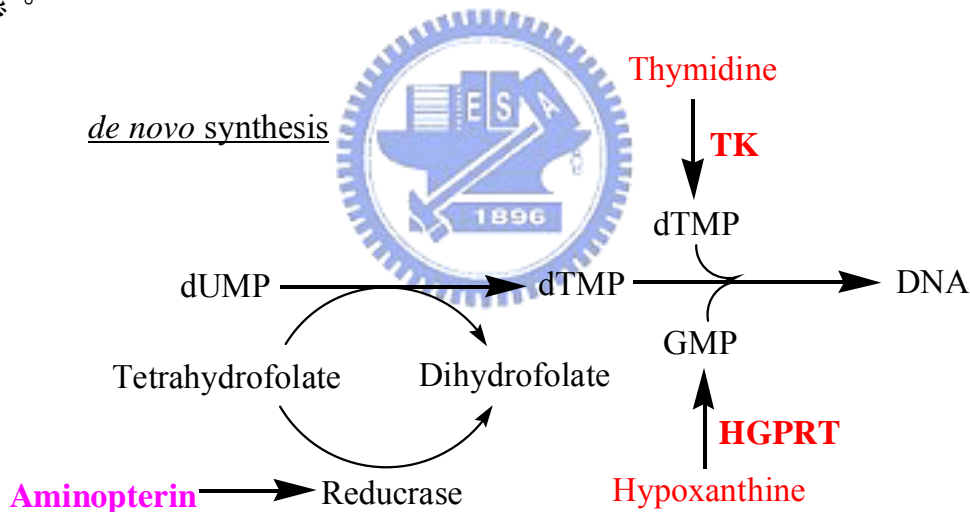
2-11-1 免疫動物

將牛肝中純化得到的氧化鯊烯環化酵素作為抗原。使用 4-8 週之 BALB/C 小白鼠，抗原 (100 μg / mouse) 加等體積之佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) (Sigma) 混合成乳劑，分別於間隔兩週打入小鼠腹腔及背部內慢慢釋出，誘使 B 細胞成熟增殖並生產抗體，此抗體為多株抗體。

2-11-2 骨髓瘤細胞 (myeloma cell)

所用之骨髓瘤細胞株必需極易增生，與淋巴細胞融合後仍可迅速發育且分泌高濃度免疫球蛋白。且具有容易與融合細胞分離之特性。目前最常用為 HGPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl

transferase)缺損性骨髓癌細胞，如P3、P3 / 653、NS1、SP2及FO等細胞，當細胞培養於HAT (hypoxanthine aminopterin thymidine)培養液中，其中aminopterin可阻止骨髓癌細胞DNA之正規合成路徑 (de novo synthesis)之進行，使細胞僅能以HGPRT酵素依旁支輔助路徑 (salvage synthesis) 【圖 2-7】取用hypoxanthine及thymidine合成DNA，若骨髓癌細胞缺乏HGPRT酵素，無法合成thymidine kinase (TK)及 HGPRT兩種酵素，此骨髓瘤細胞無法生長；如正常細胞 (B淋巴球細胞)則可經由另一條途徑繼續生長。藉由和脾臟細胞 (B細胞)的融合，提供TK及HGPRT兩種酵素，得以存活增殖。本實驗室採用FO細胞，來自食品工業研究所，使用DMEM培養液，添加 1.5 g碳酸氫鈉、10 % BCS及 1 % penicillin / streptomycin (P/S)，培養條件為 37°C，5 % CO₂。融合前一天將細胞分為兩盤作繼代培養以保持細胞正在分裂生長之狀態。



【圖 2-7】 骨髓癌細胞正規合成路徑及旁支輔助路徑

2-11-3 細胞融合

小白鼠在融合前 4 天再次補強免疫，以乙醚窒息後，腹部以 70 % 酒精消毒後，無菌操作解剖取出脾臟，放於含 10 mL DMEM 培養液 (細胞融合過程中皆使用未含BCS之DMEM)之培養皿。將脾臟壓碎，以滴管來回抽吸使細胞分散，經由無菌紗布過濾，再以 10 mL DMEM 培養液沖洗。此外，將已事先從 T75 培養皿打下來的 FO 細胞，分別離心 1200 rpm 5 分鐘，反覆以 DMEM 培養液沖洗動作二次，最後懸浮於 10 mL DMEM 培養液中。取部分細胞做細胞計數，用 trypan blue 液計算活細胞率，以脾臟細胞：FO 細胞 = 4：1 之比例將細胞混合，離心 1200 rpm 5 分鐘，之後去除上清液。然後輕擊桌面打散細胞，於 1 分鐘內，搖晃細胞，同時逐漸滴入 1 mL 已加溫到 37°C 之 PEG / DMSO 混和液，混合後迅速至 37°C 水浴緩慢搖晃 1 分鐘，之後逐漸滴入 10 mL 已加溫到 37°C 之 DMEM 培養液，離心 1000 rpm 5 分鐘，反覆以 DMEM 培養液沖洗細胞 2 次。計算 FO 細胞至 5×10^4 cells / 100 μ L HAT 培養液之比例，將 HY 培養液 (已添加 1.5 g 碳酸氫鈉、20 % FBS 及 1 % P / S) 及 HAT 培養液以 50：1 之比例混合，加入適當體積之 HY-HAT 培養液與細胞混合，取 100 μ L 培養液分別加入 96 孔細胞培養盤之每一孔洞，並在 37°C，5 % CO₂ 之條件進行細胞培養。

2-11-4 細胞增殖及取樣篩檢

融合後培養之細胞定期觀察其生長條件，融合後第 7 天，每孔加入 50 μ L 之 HY-HAT 培養液。七天後，待細胞長滿後，添加 100 μ L HY 培養液繼續培養，若有 clone 則顏色變黃再添加 100 μ L HY 培養液，取 100 μ L 之培養液做 ELISA。ELISA 的測試和前面 2-6 所描述一樣，其中以細胞單株抗體作為一抗，室溫反應一小時或更久，倒掉細胞培養液，以 TBST 緩衝液清洗，加入以覆蓋液 1：5000 倍稀釋含有 HRP 酵素的 anti-mouse 抗體，置於室溫下反應 1 小時，同樣以 TBST 緩衝液沖洗 5 次，最後以 ABTS 呈色試劑呈色。

2-11-5 融合細胞之單株化

單株化之方法有多種，但以極限稀釋法 (limiting dilution) 最常被使用。其操作步驟如下：將陽性細胞經以HY培養液洗後，以trypan blue液計算活細胞率，系列稀釋至 30 cells / 10 mL HY培養液為止，混合均勻，以 100 μ L / well分裝至 96 孔細胞培養盤，於 37°C，5 % CO₂培養。經 7 天後顯微鏡觀察，若細胞群落在一個以上或形態不對稱者均棄之。其他單株抗體細胞 (monoclonal) 則繼續增殖並篩檢其培養液，陽性細胞群落收集且擴大增殖。

2-11-6 單株抗體之產生

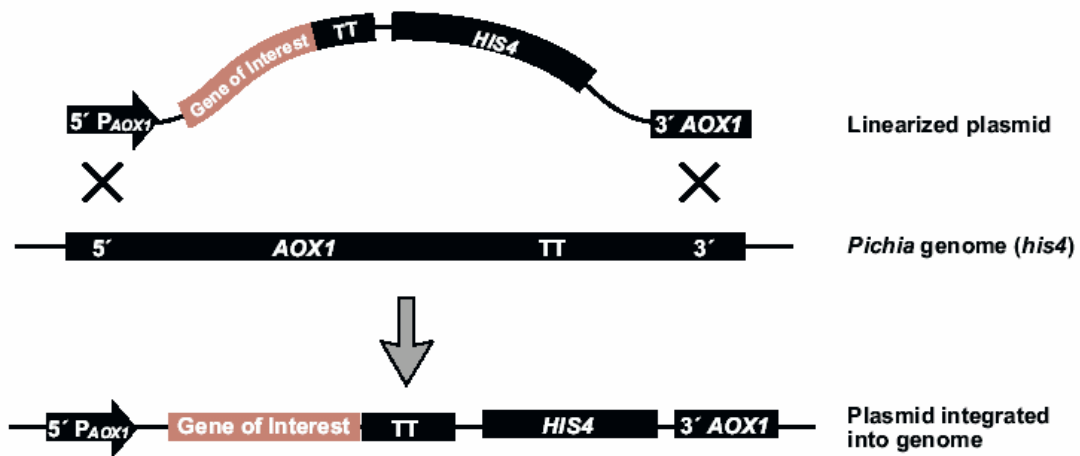
使用小白鼠接種法，將 6-11 周之BALB/C小白鼠腹腔注射 0.5 mL Pristane (Sigma)，經 7 天後，取融合瘤細胞，PBS溶液洗滌 2 次，混合於 0.5 mL之PBS中，每隻小白鼠腹腔注射 10⁶個細胞。2 周後，小白鼠腹腔膨脹，用注射針抽取其腹水 (ascites)，經離心去除細胞及脂肪，加入甘油及NaN₃保存在-20°C冰箱中備用。並且利用ELISA及西方墨點法來測定其專一性。西方墨點法測試方法和 2-8 所描述相同，其中腹水單株抗體作為一抗來源，以 1:500 覆蓋液稀釋單株抗體，倒掉稀釋液，以TBST緩衝液清洗 3 次，加入含有HRP酵素的anti-mouse抗體以覆蓋液 1 : 5000 倍稀釋，置於室溫下反應 1 小時，同樣以TBST緩衝液沖洗 5 次，最後以TMB或ABTS呈色試劑呈色。

2-12 利用酵母菌系統表現牛肝氧化鯊烯環化酵素

實驗室在純化牛肝中氧化鯊烯環化酵素的過程，步驟繁瑣且純化時間需經一週之久，在產率及純度上也常常不穩定，造成花了很多時間，但未必得到想要的蛋白質，所以為了解決這樣的問題，利用酵母菌系統來表現氧化鯊烯環化酵素，且在蛋白質的末端接有六個 Histidine，由於 Nickel 管柱對於六個 Histidine 有很高的鍵結力，所以可以快速的純化並且減少純化步驟。設計 primer 利用 PCR 反應，將牛肝中氧化鯊烯環化酵素的 C 端及 N 端接上 $6 \times$ Histidine 基因，利用實驗室 TKW14C2 及 *pichia* 表現系統來進行實驗。

TKW14C2 (MATa or MAT α ERG7 Δ ::LEU2 $ade2$ -101 $lys2$ -108 $his3$ - Δ 200 $leu2$ - Δ 1 $trp1$ - Δ 63 $ura3$ -52 $hem1$ Δ ::kan^R) 本身沒有氧化鯊烯環化酵素，所以不能產生麥角固醇 (erg)，實驗室程翔學長利用送入牛肝氧化鯊烯環化酵素質體，可以表現氧化鯊烯環化酵素功能，讓菌株在沒有含有麥角固醇的培養基中依然可以生長。所以實驗上，將牛肝氧化鯊烯環化酵素基因的 C 端接上 6 個 His，接入 RS314 載體中，RS314 是屬於可以穿梭在大腸桿菌及酵母菌中的質體，並且具有 Trp⁺ 功能性基因。將接好的質體轉化進入 TKW14C2 菌株中，並藉由功能性互補作用，選出具有表現氧化鯊烯環化酵素功能的菌落，再進一步地表現此菌株。

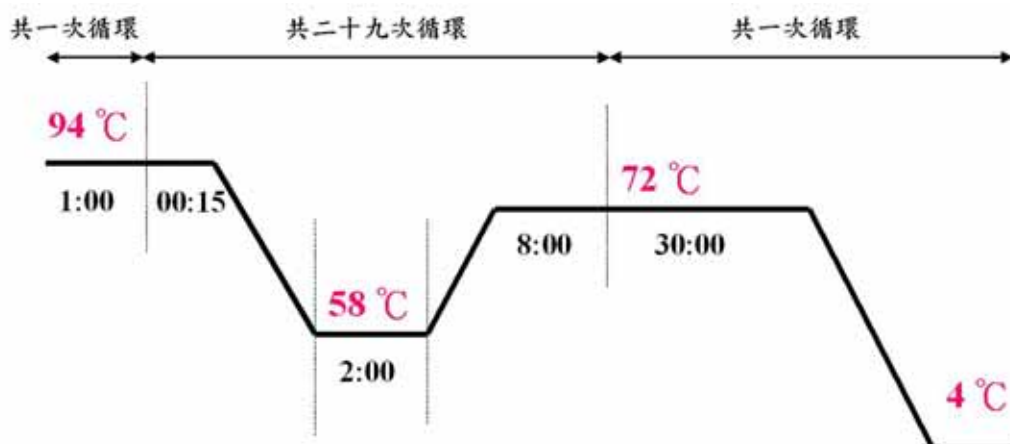
酵母菌系統 (*Pichia pastoris*) 相對於原核和生物的表現系統，其糖基化作用與哺乳動物細胞轉譯後修飾作用的能力相仿，使蛋白更接近原本在生物體內的型態，而且具有像大腸桿菌系統一樣之優點，如：高產量、生長快速、操作容易、成本低廉等。因此希望利用此系統來表現 N 端具有 6 個 His 之牛肝氧化鯊烯環化酵素，將目標基因接入 pPICZ α A 中，轉化進入 GS115 strain 中進行 DNA 交換 (DNA recombination) 【圖 2-8】，並藉由甲醇誘導大量表現蛋白質，進行純化。



【圖 2-8】 酵母菌中 DNA 重組

2-11-1 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

利用經設計過的兩段引子 (primer) 進行聚合酶連鎖反應，將目標之 DNA 片段合成出來。【圖 2-9】【表 2-3】聚合酶連鎖反應 (PCR) 反應條件



【圖 2-9】 PCR 反應條件

反應物	體積 (單位 μL)
template	0.5
Primer1	1
Primer2	1
3.3 × buffer	15
Mg(OAc) ₂	3
dNTP (10mM)	4
DDW	24.5
rTth polymerase	1

【表 2-3】 PCR 反應試劑的量

2-11-2 質體的建構



將載體 (Vector)與欲殖入之DNA序列 (Insert)分別利用限制酵素於 37 °C 之下恆溫槽作用 (Digest)至隔夜。再將DNA由恆溫槽取出，加入 1 μL Loading Buffer及 1 μL SYBR Green I，利用 1 %洋菜凝膠 (Agarose gel)以電壓 100 伏特進行電泳分析，把正確大小之載體與DNA序列切下，利用Gel Band Purification Kit純化凝膠中DNA，並以一定比例約Inset : Vector = 6 : 1 混合後，抽乾用 10 μL 的二次水回溶，再加入接合酵素 (T_4 DNA Ligase)於 4 °C 下作用至隔夜，在進行質體轉化作用進而獲得大量質體。

2-11-3 質體之轉化作用 (Transformation of *Escherichia coli*)

將 XL1-Blue 的 competent cell 拿出置於冰上，將經接合酵素反應後之DNA與 100 μL 的 competent cell 混合，冰浴 20 分鐘，於 42

水浴加熱反應 1 分鐘，立即置入冰中 1 分鐘，之後將樣品全部置入 1 mL LB 培養液中，於 37 °C 培養 2 小時後，取 200 μ L 塗在含 ampicillin 的 LB 培養皿中，培養 12-18 小時之後，挑單一菌落 (colony)，養於 3 mL LB 培養液至 16-20 小時，並利用 Plasmid Prep Kit 抽質體 DNA，以相同限制酵素確認我們之 DNA 片段有接入載體內。

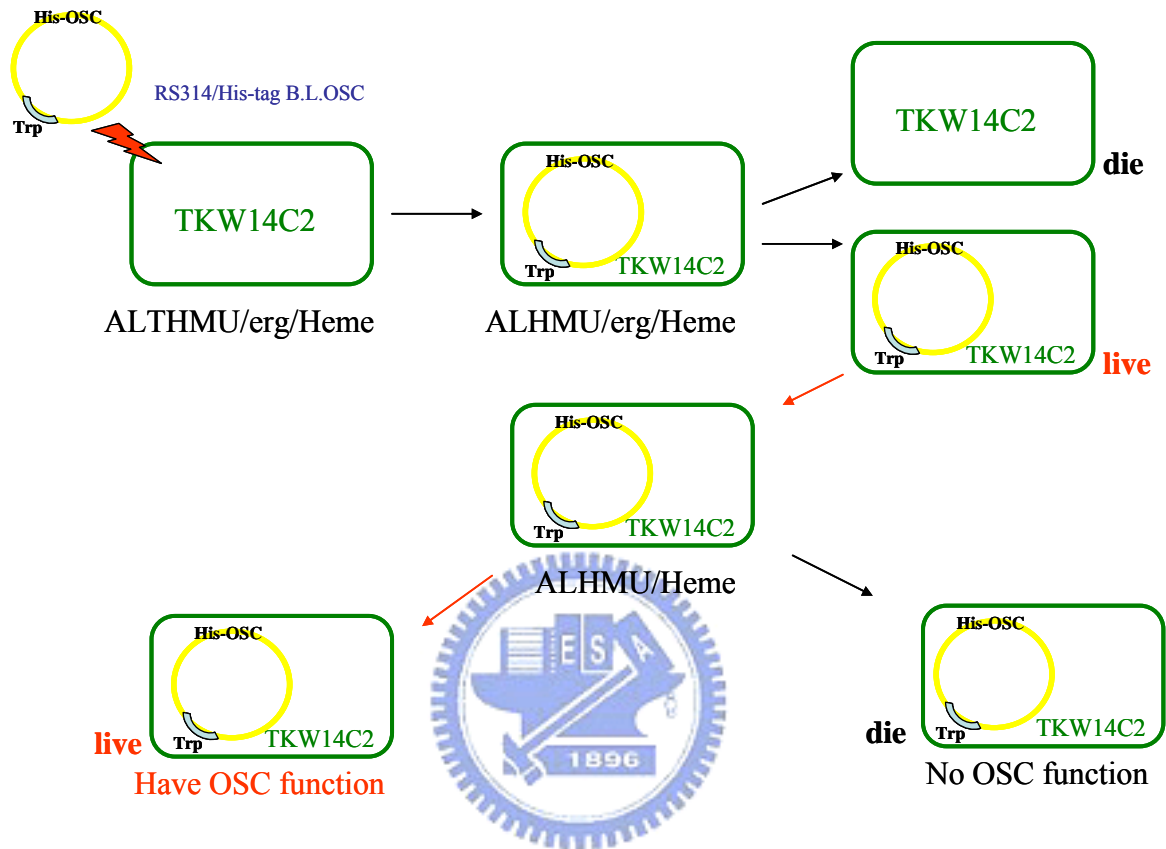
2-11-4 酵母菌株 TKW14C2 的質體轉化作用 (Electroporation of yeast)

在 30 °C 下將 TKW14C2 培養於 SD 含 ALHMU 及 Heme 的培養液，當菌液 OD₆₀₀ = 1.3 至 1.5 間。於 4 °C 下以 2000 \times g 之離心力將細胞沉澱下來，再以 50 mL 之 4 °C 無菌水將細胞懸浮，重複前面方法離心。再以 25 mL 之 4 °C 無菌水將細胞懸浮，重複前面方法離心。以 4 mL 無菌的 1 M Sorbitol 將細胞懸浮，再重複離心將細胞離心下來。取 50 μ L 菌液加入 2 μ L 重組質體，混合後冰浴 5 分鐘，將混合液置入 2 mm 的電穿透玻璃管，將玻璃管放入脈衝控制器設定以 1.5 kV，200 Ω ，25 μ F 進行電穿孔。在電擊後立刻加入 500 μ L 無菌的 1 M Sorbitol 將細胞懸浮混合均勻，各取 50 μ L 與 200 μ L 塗於含 ALTHNU、Heme 及 Erg 的 1 M Sorbitol SD 培養基上，待菌液稍乾，反置放入 30 °C 恆溫箱中培養 3 至 5 天。

2-11-5 功能性互補確認

將單獨 RS314 質體及重組 DNA 質體轉化進入 TKW14C2 酵母菌中，培養於含 ALHMU、Heme 及 Erg 的 1 M Sorbitol SD 培養基上，待菌落長出後，將每個菌落畫眉於 ALHMU/Heme/erg 中有長出的菌落代表轉化作用有成功，再將每個成功轉化的菌落畫眉於含 ALHMU/Heme/erg (為對照組) 及 ALHMU/Heme 培養基中。由於不含氧化鯊烯環化酵素的菌株是無法在 ALHMU/Heme 培養基中生長的；只有具有表現氧化鯊烯環化酵素活性的菌株才能表現出 erg 在

ALHMU/Heme 培養基中生長的。所以利用這樣的方式來篩選出具有
 氧化鯊烯環化酵素活性的菌落【圖 2-10】。



【圖 2-10】 功能性互補篩選示意圖

2-11-6 酵母菌株 *pichia strain* (GS115)的質體轉化作用

取 2 μL 質體重組DNA以Pme I 限制酶酵素切成直鏈 (linear)狀，藉由瓊膠 (agarose gel)分析，利用 gel extraction kit純化DNA，放於 -20°C 保存。另一方面， 30°C 下培養 3 mL YPD培養液GS115 的至隔天，取 0.5 mL菌液至滅菌好的 500 mL YPD培養液中， 30°C 下培養至 $\text{OD}_{600} = 1.3\sim 1.5$ 之間。於 4°C 下， $1500 \times \text{g}$ 離心 5 分鐘，使細胞成澱下來，用 500 mL的冰二次水懸浮細胞，同樣方法離心，再用 250 mL的冰二次水懸浮細胞，同樣方法離下細胞，最後以 1 M的冰sorbitol 20 mL懸浮細胞並且離心下來後，以 1 mL冰的 1 M sorbitol懸浮細胞，保存在冰上。取 80 μL 的細胞和之前切成直鏈狀的DNA混合於冰上 5 分鐘。將混合液置入 2mm的電穿透玻璃管，將玻璃管放入脈衝控制器設定以 1.5 kV， 200Ω ，25 μF 進行電穿孔。在電擊後立刻加入 1 mL無菌的 1 M Sorbitol將細胞懸浮混合均勻，置於 15 mL離心管於 30°C 靜置培養 2 小時後，取 50 mL及 200 mL培養於含有Zeocin之YPD培養基上，在 30°C 下培養 5 天。

2-11-7 PCR 分析重組 DNA

將直鏈質體送入 GS115 之後，會在 GS115 內進行 DNA 重組 (DNA recombination)重組後的 DNA 可藉由聚合酶連鎖反應來確認是否有接入目標基因。直接沾取單一菌落藉由【圖 2-10】【表 2-4】條件來分析。

反應物	體積 (單位 μL)
5' AOX I Primer	1
3' AOX I Primer	1
10 × buffer	2
dNTP (10mM)	2
DDW	13.5
Taq polymerase	0.5

【表 2-4】 Taq polymerase PCR 反應試劑的量

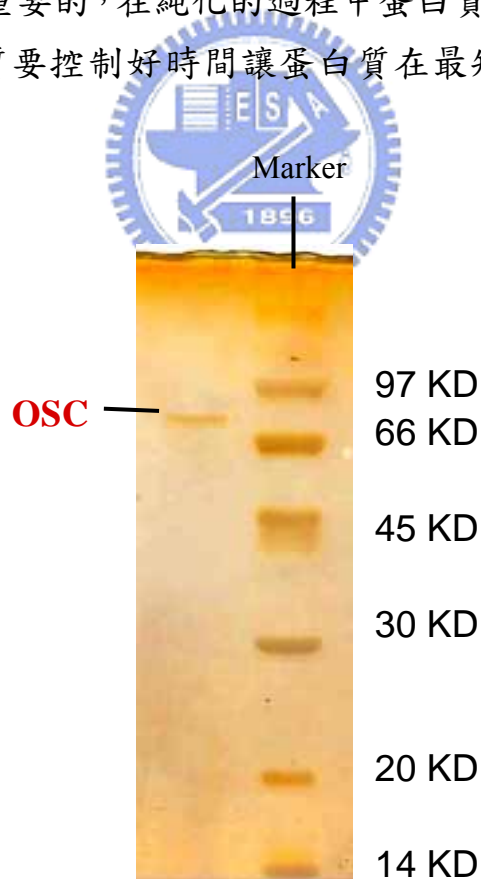
2-11-8 利用酵母菌系統表現蛋白質

將可以在Zeocin培養基中生長的菌落，挑單一顆在 3 mL BMGY 及MGYH兩種培養液中培養，30 °C下培養 16~18 小時之後，取 10 μL 加入 100 mL的BMGY及MGYH兩種培養液中培養至 $\text{OD}_{600} = 1.0$ 後，加入 0.5 % 甲醇誘導蛋白質大量產生，每 24 小時加入 0.5 % 甲醇誘導產生蛋白質。培養 3 天後，離心取上清液作蛋白質SDS-PAGE 電泳分析及活性分析，並進行nickel層析管柱純化。

第三章 結果與討論

3-1 氧化鯊烯環化酵素之純化

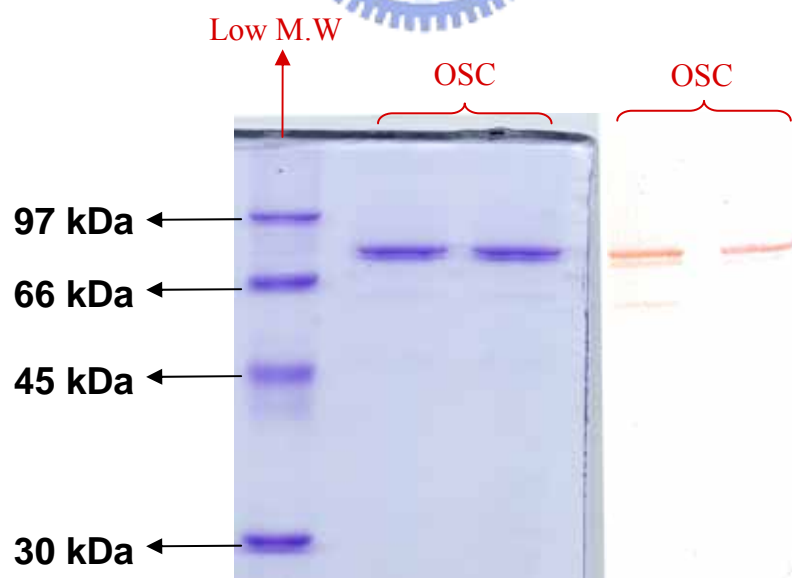
在進行噬菌體親和性篩選之前，首先蛋白質需從牛肝中純化得到。從實驗室過去學長姐的努力嘗試之下，成功的由牛肝中純化到單一氧化鯊烯環化酵素。因此我根據他們的方法加上程翔學長的指導幫忙之下，使得純化過程能得到大量 (500 g 牛肝約得到 10 mg 蛋白質) 且純度很高的蛋白質 (銀染結果)【圖 3-1】純化出的蛋白質大小約 70 kDa。在過程中遇到很多的問題，如牛肝的取得跟保存很重要，牛肝必須是新鮮且迅速放入液態氮中，酵素才不會失去活性且才能純化到所需的蛋白質。在樹脂上，也必須清洗完全且使用一段時間要更換新的樹脂。然而，最重要的，在純化的過程中蛋白質會隨時間而被分解，所以純化此蛋白質要控制好時間讓蛋白質在最短的時間內被純化出來。



【圖 3-1】牛肝氧化鯊烯環化酵素 SDS-PAGE。此圖為銀染的結果。

3-2 氧化鯊烯環化酵素的單株抗體

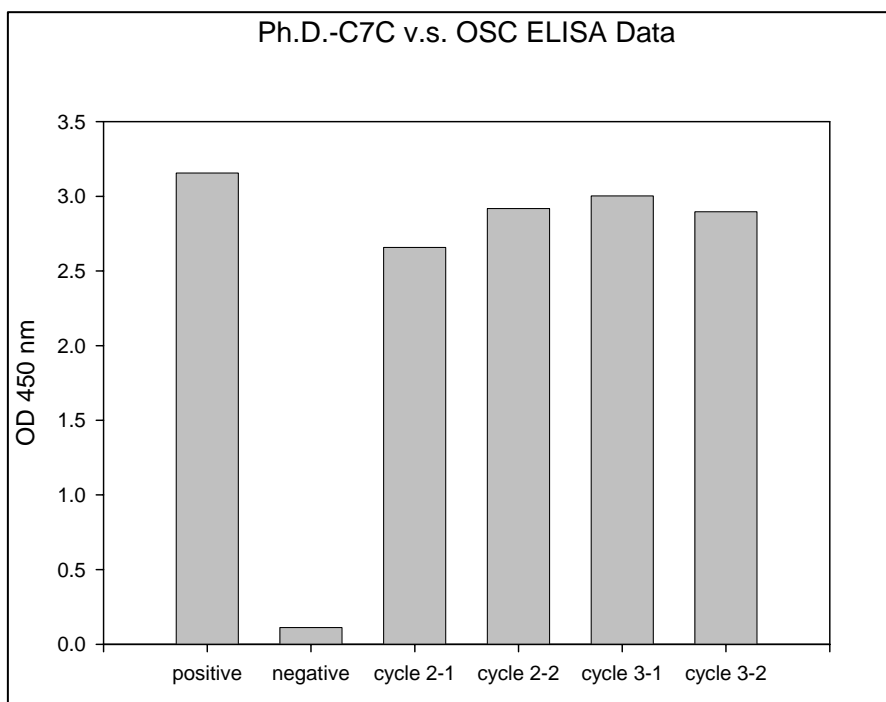
抗體的製備在目前生物科技領域來說相當重要，抗體和抗原之間的高度專一性，造成抗體的應用極為廣泛。在動物體內，由 B 細胞負責產生抗體來對抗外來物質，達到保護生物體的功能。藉由細胞融合發展出單株抗體，較傳統血清容易生產，只要細胞株存在就可以生產得到，而且專一性也比較高，在檢測上面及純化上，廣泛的應用。此外，經噬菌體展示庫篩選得到的胜肽序列，可藉由和具有高度專一性的抗體相互比較，來探討其專一性及鍵結的強弱。基於實驗需求及種種抗體的好處，在實驗室裕國學長的指導及幫助之下，我們將牛肝純化出的氧化鯊烯環化酵素打入老鼠體內，得到多株抗體，再經由細胞融合的實驗，得到單株抗體。在整個過程之中，每一個的篩選藉由 ELISA 來挑選具有明顯親和力的抗體，所以在 ELISA 的實驗上要特別的小心注意，常有的問題是 negative 值因為清洗的不乾淨造成有吸收，在判斷上會有問題。最後挑選到的單株抗體藉由 Western Blotting 【圖 3-2】來更進一步地確定其鍵結。從圖中我們更確定成功篩選到牛肝氧化鯊烯環化酵素的單株抗體。



【圖 3-2】西方墨點法測定單株抗體對氧化鯊烯環化酵素專一性左圖為 SDS-PAGE 以 coomassies blue 染劑呈色結果，右圖為 western blotting DAB 試劑呈色結果。

3-3 噬菌體胜肽庫親合篩選

本實驗利用兩種不同的噬菌體胜肽庫，12 胜肽隨機胜肽庫 (Ph.D.-12)以及七胜肽隨機胜肽庫 (Ph.D.-C7C) 來進行篩選對牛肝中氧化鯊烯環化酵素具有親和力的胜肽序列。將純化出牛肝中的氧化鯊烯環化酵素直接吸附固定在ELISA盤上，取 10 μ L 的 10^{12} pfu/mL噬菌體加入well中與蛋白質進行反應，每次篩選過程中洗滌的次數增加，以及洗滌緩衝液Tween 20 含量從 0.1 %增加至 0.5 %，這是為了能篩選得到更具有親和力的噬菌體。經過了三次親和性篩選後，得到七胜肽隨機胜肽庫【圖 3-3】第二次及第三次篩選利用ELISA方法得到的親和力比較圖，正向控制組 (positive control)為單純以噬菌體直接吸附在ELISA盤上，在經過覆蓋液覆蓋及噬菌體胜肽序列、二抗鍵結後得到結果，可以用來說明整個過程的每個環節都是正常，沒有酵素失活或者呈色劑無法呈色等問題。負向控制組 (negative control)是以BSA蛋白質當作目標物，代表的意義為所篩選的噬菌體及二抗對於BSA蛋白質不會有鍵結作用。由圖中噬菌體循環次數與負向控制組的吸收值相比較之下，可以得知第二次及第三次的親和篩選皆得到和氧化鯊烯環化酵素鍵結的噬菌體，而兩次篩選由於沒有因為選次數增加得到較高的吸收值，所以以第三次的篩選的結果挑取 25 個單一菌落株得到了數段序列【表 3-1】並進行每個單一噬菌體胜肽序列的親和性測試。



【圖 3-3】七個胜肽隨機胜肽庫對氧化鯊烯環化酵素第二次及第三次親和篩選其 ELISA 鍵結力測試結果。每一個數值代表每個樣品做二重複的平均值。

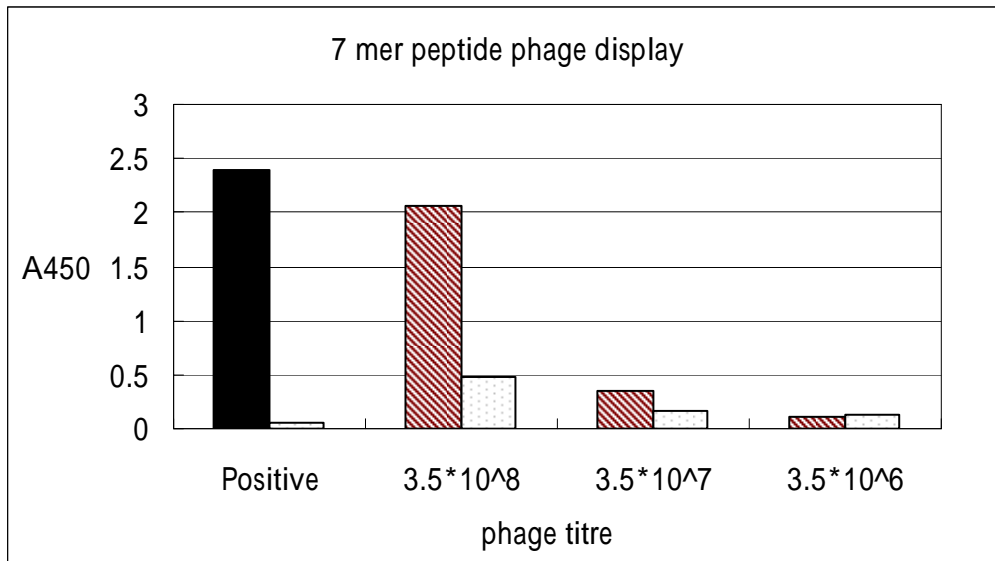
Sequence	Number	Ratio
S P W H W W A	5	6/25
S P W H C W A	1	
W W H T H W F	4	4/25
W H I W P W Y	5	8/25
W H I W H W Y	3	
L S F Q L K P	1	7/25
T T N M A H S		
L T T V C/Y S I		
L Y N P R P L P		
S T T K Q M Y		
Q A Q P H T R		
A H A W Q H W		

【表 3-1】噬菌體七個胜肽庫對氧化鯊烯環化酵素第三次親和篩選得到的序列

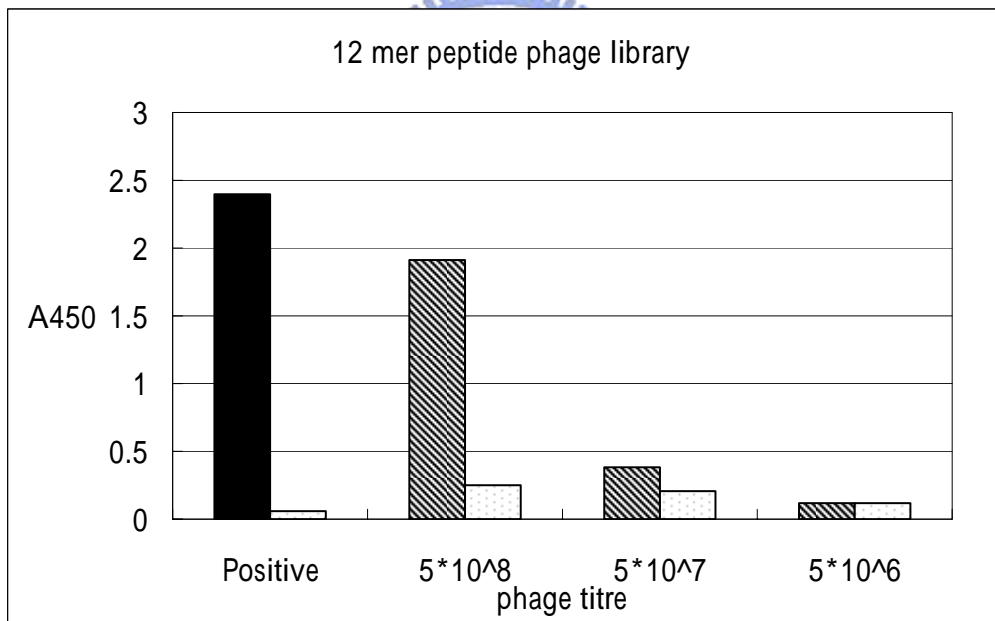
將單一菌落經由感染、放大及純化的步驟，得到表現單一胜肽序列的噬菌體透過墨點法、ELISA及西方墨點法的親和性測試後，發現其和氧化鯊烯環化酵素在墨點法及西方墨點法中沒有反應，且從ELISA親和性測試中，負向控制組 (negative control)得到很高的吸收值。根據Adey等人⁴¹在1995年得知噬菌體胜肽庫和polystyrene plates，即ELISA盤，在含有高鹽及tween 20之下有鍵結作用。而後來Gebhardt等人⁴²，將噬菌體胜肽庫和ELISA盤進行篩選得到一段具有親和性的序列：WXXWXXXW (X = 任何一種胺基酸)，而我們所用的篩選方法使用ELISA盤進行篩選，且得到的序列含有大量的色胺酸 (Trp, W)，根據前面的序列和我們所得到的序列相比較之下，且在ELISA測試中得到很高的負向控制組吸收值，推測所篩選到的胜肽序列大部分是跟ELISA盤鍵結的序列。因此在實驗的設計上，進行每次親和篩選前先加入一負向篩選 (Negative selection)，步驟即每次進行親和性篩選前都要先作ELISA盤的負向篩選，確保之後得到的單一胜肽序列對BSA蛋白質及ELISA盤不會有鍵結作用。

在篩選的過程中先經由負向篩選，去除掉部分和ELISA盤及BSA蛋白質鍵結的片段，進而和氧化鯊烯環化酵素進行親和性篩選，經過五次的篩選過程，每次篩選下來噬菌體數目都大約 $10^4 \sim 10^5$ pfu/ μ L，噬菌體經放大後的數目也約 $10^{12} \sim 10^{14}$ pfu/ μ L，利用ELISA測試其反應性【圖 3-4】。由ELISA的結果得知，對篩選出的二組胜肽庫作一連串稀釋，和氧化鯊烯環化酵素作用後，測其吸收值發現有明顯的反應，且將每個篩選到的噬菌體作一個負向控制組，得到結果發現其吸收值都比氧化鯊烯環化酵素反應結果低，跟之前的實驗相比較，可以推測在整個篩選過程中，加入負向篩選確實篩選掉跟ELISA盤及BSA蛋白質鍵結的序列，只留下和氧化鯊烯環化酵素鍵結的噬菌體。針對第五次篩選得到的噬菌體挑選其中 10 個噬菌體單一菌落進行序列及親和力分析。

(A)



(B)



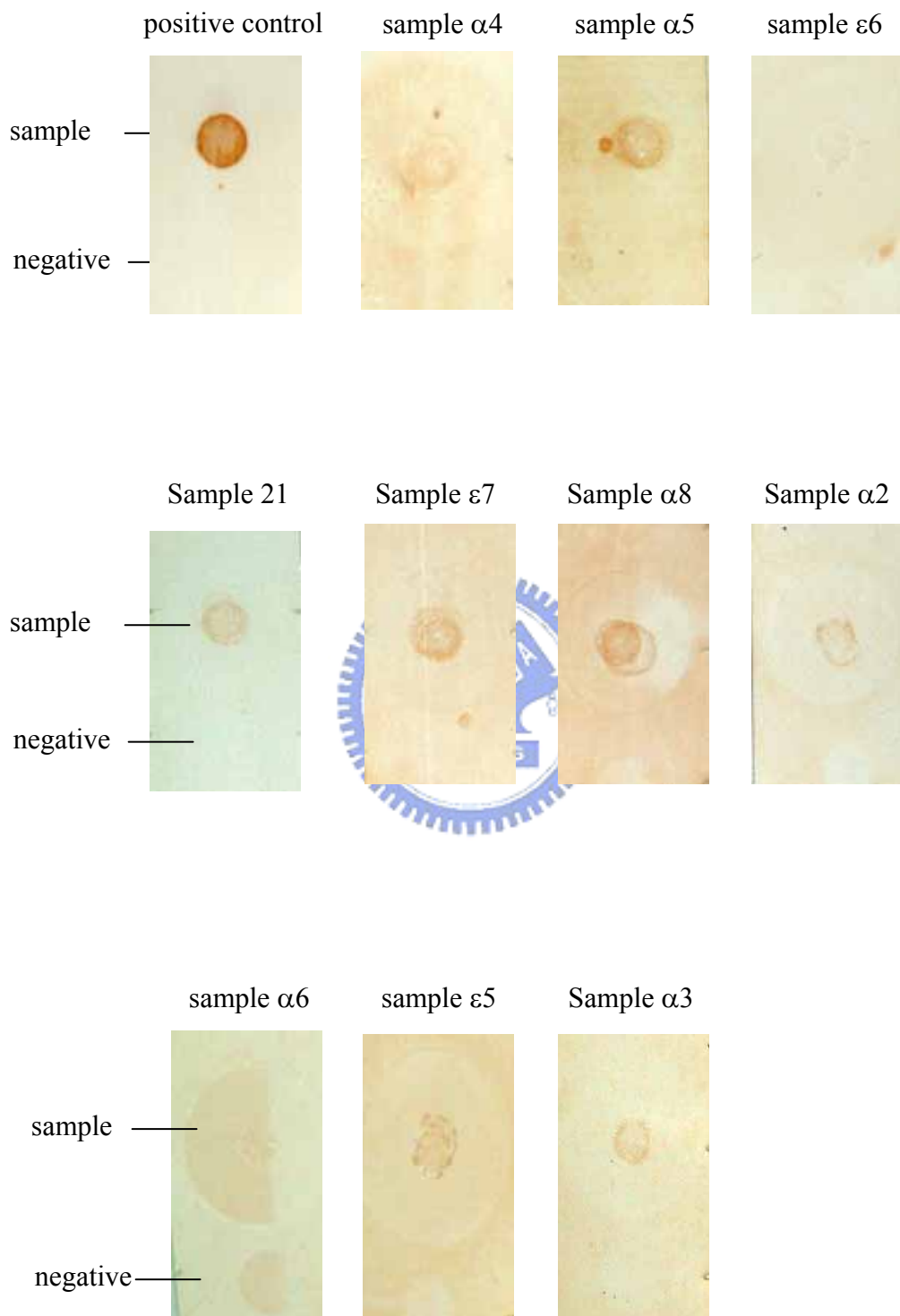
【圖 3-4】 (A)噬菌體 Ph.D.-C7C 胜肽庫和氧化鯊烯環化酵素 ELISA 反應結果。(B)噬菌體 Ph.D.-12 胜肽庫和氧化鯊烯環化酵素 ELISA 反應結果。■ 代表正向控制組，▨ 代表噬菌體對氧化鯊烯環化酵素的反應，▩ 代表負向控制組。

3-3-1 噬菌體效價測定

在篩選的過程中，會計數噬菌體效價，以作為定量。噬菌體效價測定有兩種方法，一是將噬菌體經一系列的稀釋之後感染大腸桿菌，藉由 IPTG/X-gal 的 LB 培養盤上，噬菌體上的 *lacZ* 基因被誘導產生 β -galactosidase 酵素，此酵素會水解 X-gal 造成菌落呈現藍色，而產生的每一藍色溶菌斑代表一種噬菌體，計數產生的溶菌斑數目即為其效價。這種方法牽涉到稀釋的好壞，常常造成計數上的不準確。所以根據光譜吸收測定噬菌效價，會來得較準確，不需經過感染 *E. coli* 的步驟且透過吸光值的測定有較高的靈敏度，不需人為計數菌數，減少誤差。

3-3-2 利用墨點 (dot blot)作親和力測試

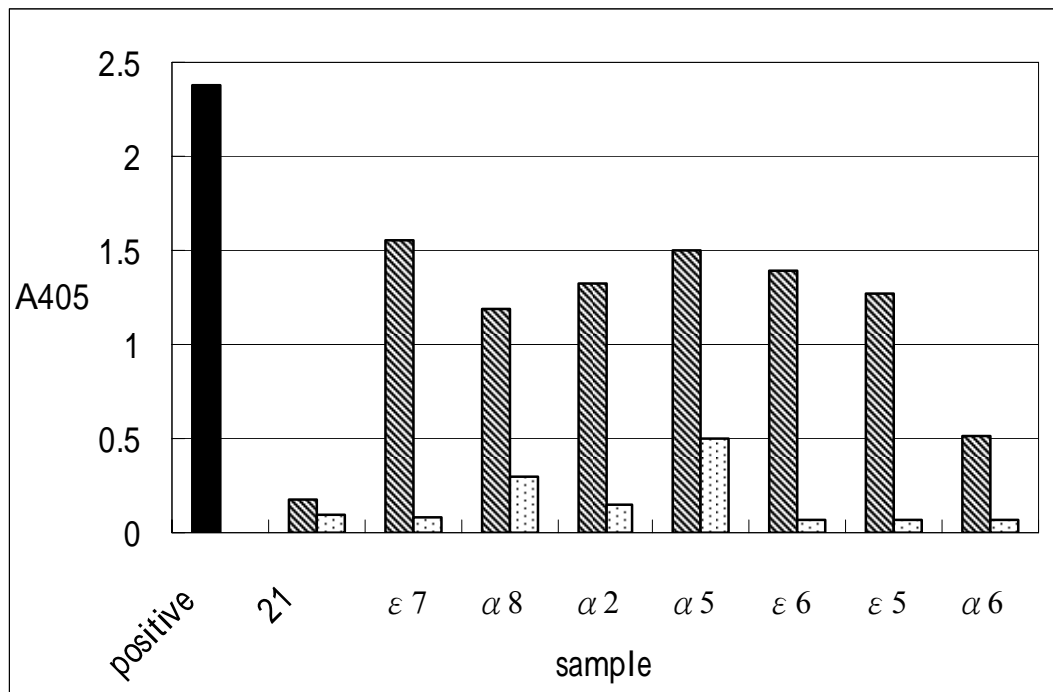
在經過五次篩選後，挑選 10 顆單一噬菌體菌落，經由放大純化得到噬菌體表現單一胜肽序列，透過墨點法作初步的親和力測試【圖 3-5】。直接將蛋白質點在轉印膜上，以所篩選到的單一噬菌體作為一抗，和蛋白質進行親和反應，其中負向控制組的部分為點上 BSA 蛋白質；正向控制組為直接在轉印膜點上噬菌體。由圖上結果得知，部分挑選到的胜肽序列和氧化鯊烯環化酵素具有鍵結作用（沒有反應的胜肽序列沒有放入圖中），其中樣品 $\alpha 6$ 負向控制組的部分呈現紅色，推測樣品 $\alpha 6$ 對於 BSA 蛋白質也有鍵結作用。墨點法是初步判斷親和性反應的方法，這種方法無法定量，因此也無法比較彼此間作用力的強弱，但可以很清楚的看到噬菌體胜肽序列對於蛋白質的反應性。噬菌體胜肽序列的鍵結強弱及專一性透過其他的親和性分析方法來加以比較。



【圖 3-5】 墨點法測定單一噬菌體對氧化鯊烯環化酵素親和作用的結果。

3-3-3 利用酵素連結免疫吸附分析法作親和力測試

前面利用墨點法測試單一噬菌體對氧化鯊烯環化酵素鍵結作用，得到十個具有親和力作用的單一噬菌體，其中 $\alpha 3$ 及 $\alpha 4$ 單一噬菌體胜肽序列沒有進行分析，之後會補上其分析結果。對於其中八個單一噬菌體胜肽序列進一步利用 ELISA 方法進行親和力測試，透過 ELISA 方法可以定量蛋白質及噬菌體，可用來比較單一噬菌體間對氧化鯊烯環化酵素親和性的大小【圖 3-6】。



【圖 3-6】ELISA 方法測定單一噬菌體對氧化鯊烯環化酵素親和性結果。■ 代表正向控制組，▨ 代表噬菌體對氧化鯊烯環化酵素的反應，▤ 代表負向控制組。

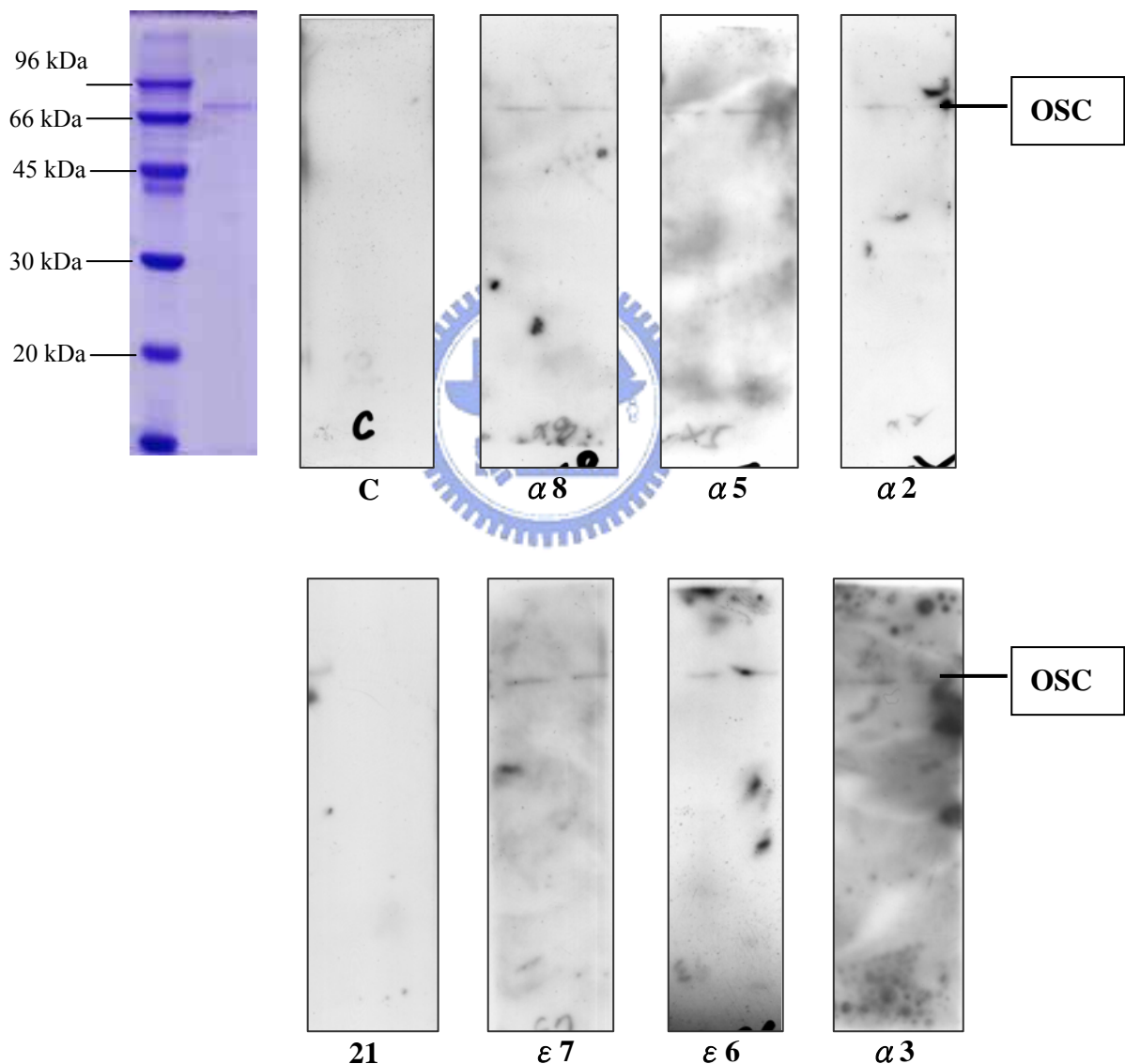
由圖中的結果可以證明這些胜肽序列對於氧化鯊烯環化酵素具有親和力，其中正向控制組直接以噬菌體吸附在 ELISA 盤中，二抗反應所得到的結果，結果有很高的吸收代表整個實驗過程中抗體及呈色試劑等是沒有問題的；負向控制組將 BSA 蛋白質吸附在 ELISA 盤中和單一噬菌體反應，再加入二抗反應，結果顯示在同樣的噬菌體效價下，單一噬菌體對於 BSA 蛋白質比對氧化鯊烯環化酵素的吸收值弱，所以可知這些序列對於氧化鯊烯環化酵素有較高的親和性。由圖中得知，樣品 21 和 $\alpha 6$ 對其他單一噬菌體胜肽序列相比較之下，其對於氧化鯊烯環化酵素的鍵結能力較低。負向控制組比較之下， $\alpha 5$ 的吸收值明顯較高，可見其對於 BSA、覆蓋液或者 ELISA 盤具有弱親和力。比較墨點法樣品 $\alpha 5$ 的結果發現，由於墨點法明顯沒有和 BSA 蛋白質作用，因此推測其和覆蓋液或 ELISA 盤發生親和作用。篩選得到的單一噬菌體序列，進一步再利用西方墨點法測定其專一性。



3-3-4 利用西方墨點法作親和力測試

除了利用墨點、ELISA 來偵測鍵結作用外，藉由西方墨點法可以更確認蛋白質跟單一胜肽序列之間的鍵結【圖 3-7】。以 SDS-PAGE 分析氧化鯊烯環化酵素，接著將膠片上的蛋白質藉由轉印槽轉印至膜上，再利用 ELISA 的原理，以單一噬菌體作為一抗，anti-M13 作為二抗，經由 ECL 呈色得到。這個實驗重複三次以上所得到的結果。對於轉印膜的選用起初使用 PVDF 膜，因為其吸附力較好且較不易擴散，但經過幾次的實驗結果發現，其背景值較深常導致無法判斷結果，所以後來改用硝化纖維 (Nitrocellulose, NC) 作為轉印膜，解決背景值問題。所以圖中的結果皆以 NC 作為轉印膜。由結果很清楚可以得知這些單一噬菌體胜肽序列對於氧化鯊烯環化酵素具有鍵結作用，對照組 (control) 為將蛋白質轉印至 NC 轉印膜上後，以未重組的噬菌體，即沒有表現胜肽序列的噬菌體作為一抗，和氧化鯊烯環化酵素進行反應得到的結果。對照組沒有反應代表噬菌體外殼上的蛋白質

不會和氧化鯊烯環化酵素進行鍵結。結果中 $\alpha 3$ 、 $\epsilon 7$ 及 $\alpha 5$ 對酵素具有親和力，但其背景值較高且相當均勻，因此推測其對脫脂奶粉中的蛋白質或轉印膜具有鍵結作用，進而影響到背景值。以下提出幾個解決的方法，在噬菌體胜肽序列反應的時候加入少量的脫脂奶粉，不要單純只用緩衝液；另一方面使用其他的覆蓋液來取代脫脂奶粉，這些需要進一步的測試。



【圖 3-7】西方墨點法測定單一噬菌體對氧化鯊烯環化酵素的親和性結果。

除了圖中的七個樣品外，還針對 $\epsilon 5$ 及 $\alpha 6$ 進行西方墨點法的測試，確定其有反應但由於所用的為 PVDF 轉印膜，導致背景值太高所以無法經由掃瞄後看到反應位置，所以圖上沒有放。

樣品 21 由西方墨點法的圖上沒有看到反應產生，但從前面墨點法及 ELISA 測定中都可以看到樣品 21 對氧化鯊烯環化酵素具有反應性，三個測定方法的差別性在於氧化鯊烯環化酵素在西方墨點法中，利用 SDS 及加熱方式將其 denature，使蛋白質不具構形，而墨點法跟 ELISA 則是直接將純化出具有活性的蛋白質吸附在膜及 ELISA 盤上，較有機會保持蛋白質本身的構形。因此推論樣品 21 對於非具結構性的氧化鯊烯環化酵素沒有親和作用，而具有結構上的選擇性。進一步探討樣品 21 可以藉由 native 蛋白質膠片進行西方墨點法分析，測定樣品是否對於氧化鯊烯環化酵素具有結構選擇性。

綜合墨點法、ELISA 及西方墨點法的測試結果，得到八個噬菌體對於氧化鯊烯環化酵素均具有反應，其餘二個序列需在進行 ELISA 及西方墨點法的測試。由墨點法可以明顯看到噬菌體胜肽序列對於 BSA 蛋白質及氧化鯊烯環化酵素的反應性，但由於不能定量所以無法互相比較，其中 $\alpha 6$ 明顯有和 BSA 蛋白質反應但在後來 ELISA 上，負向控制組卻很低的反應性，這一部份將需要在作進一步的確認。ELISA 方法可以解決定量的問題，將蛋白質及噬菌體控制在固定的反應槽中，藉由吸收值相互比較反應性，結果發現 $\alpha 6$ 及 21 的反應性較低。藉由西方墨點法可以測其專一性，由於以單一蛋白質作反應，所以沒有測定噬菌體胜肽序列對於牛肝中其他蛋白質是否也具有親和作用，所以未來可以針對這些序列作專一性的探討。

3-3-5 噬菌體胜肽庫之定序

利用 phage display library kit 所附的 96gIII primer (5'- CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG -3')定序所得到有反應的噬菌體【表 3-2】。

Sample Number	Sequence
$\alpha 8$	tcttctcattggtggtggtgggatgcgaggggttatgatggt S S H W W W W D A R G Y D G
21	tcttttcatgctgagtggtcctactccttctccttggccgggt S F H A E W P T P S P W P G
$\alpha 5$	tcttttccattggtggaatggtgggtattattagatgcctgggt S F H W W N V G Y Y Q M P G
$\alpha 3$	tcttttccattggtggaatggtgggtattattagatgcctgggt S F H W W N V G Y Y Q M P G
$\epsilon 7$	tcttttccattggtcggtggtatactcctagtaggcccgtcgggt S F H W S W Y T P S R P S G
$\epsilon 5$	tcttggcatttttaattattgggctgcttatactattccgggt S W H F N Y W A A Y T I P G
$\epsilon 6$	tcttggcataagacgccgtgggttttggcctactaatccttgggt S W H K T P W F W P T N L G
$\alpha 4$	tctacgcttccttggcataatacgcctcttcatgcttttgggt S T L P W H N T P L H A F G
$\alpha 6$	tctcatagttttaattgggtattggcttactgggtccgtctgggt S H S F N W Y W L T G P S G
$\alpha 2$	tgtaatctgctgtggcatccgccgtgc C N L L W H P P C
5	tgttctccgtctattacgtctatttgc C S P S I T S I C

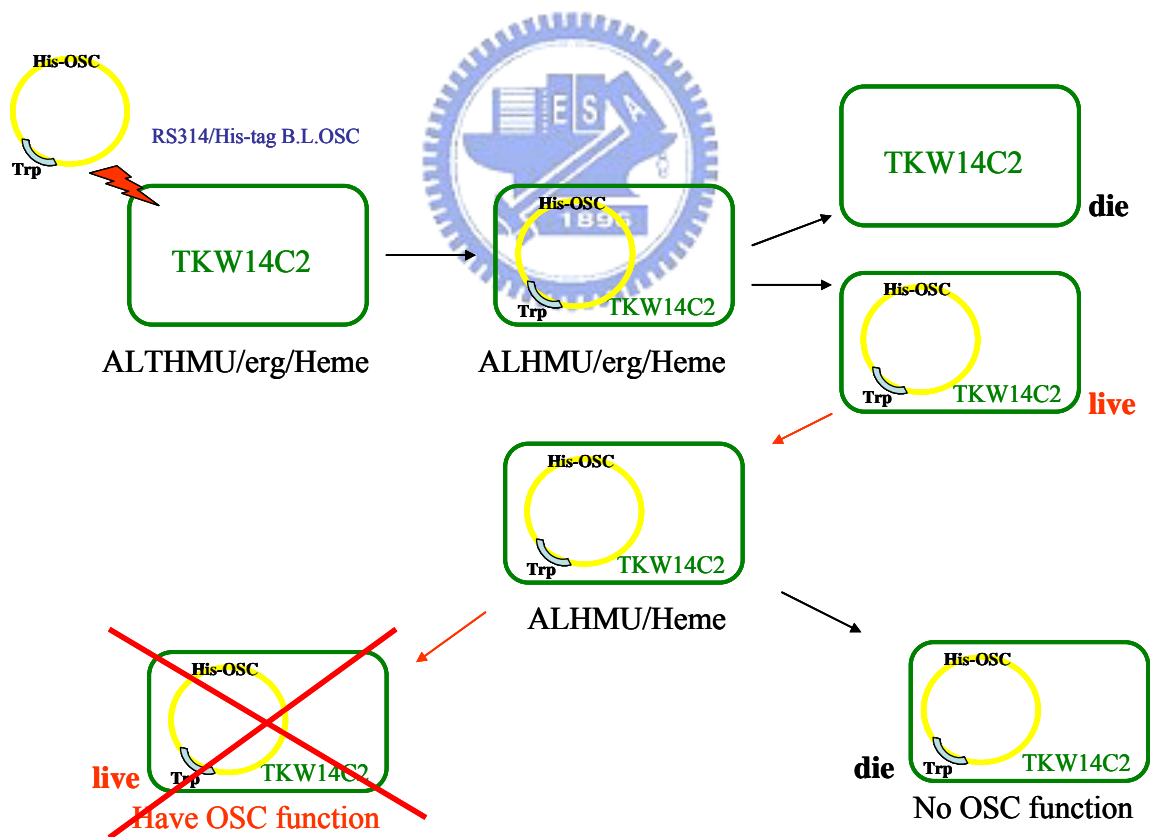
【表 3-2】 噬菌體胜肽庫對氧化鯊烯環化酵素進行篩選得到的序列。在 ER2738 的 *E. coli* 中 TGA 不為 stop condon，而可以被轉錄成 glutamine，所以序列中的 TGA 將被轉錄成 Q 胺基酸表現。

進行篩選後所得到的噬菌體胜肽庫，挑選了二十個單一噬菌體進行放大純化及墨點法初步分析，最後將具有反應噬菌體抽取其單股 DNA 進行定序。綜合 ELSIA 及西方墨點法結果，得到 7 個表現十二胜肽序列的噬菌體得到較多和蛋白質有鍵結力的序列；而七胜肽序列的噬菌體只得到 1 個。十二胜肽隨機胜肽庫得到較多具有反應性的胜肽序列，推測可能因為十二胜肽序列較七胜肽序列長，其親和力也大幅增加，所以較容易得到具有親和力的序列；另一方面，十二胜肽隨機胜肽庫以直鏈方式表現其胜肽序列，而七胜肽隨機胜肽庫的胜肽序列形成一個環狀構形，讓鍵結受到限制，能和蛋白質發生作用的部分小於七個胜肽序列，因此造成鍵結力較弱，所以挑選的序列在進行親和性測定時，不易得到具有親和性的序列。



3-4 利用酵母菌系統表現牛肝中氧化鯊烯環化酵素

在牛肝氧化鯊烯環化酵素基因 N 端接上六個 Histidine，利用實驗室發展出的 TKW14C2 菌種來表現，透過 DNA 定序確認 RS314 質體上接有氧化鯊烯環化酵素的基因，且其 N 端基因上含有六個 Histidine，將質體以電擊方式送入 TKW14C2 中，經由功能性的確認的篩選，即在 ALHMU/Heme/erg 培養基上可以生長，但篩選的最終結果發現這些菌株皆無法在 ALHMU/Heme 培養基上生長，也就是代表這些菌株無法正常表現出氧化鯊烯環化酵素的功能【圖 3-8】。2004 年文獻指出，在 pichia 表現系統表現出具有活性的人類氧化鯊烯環化酵素，所以未來實驗希望藉由此系統來表現，並且換成 C 端接上六個 His 序列，希望能藉此表現出具有活性的酵素。



【圖 3-8】 功能性互補的篩選結果示意圖。

第四章 結論與未來展望

1. 利用動物免疫實驗，將純化出的蛋白質打入老鼠體內，得到多株及單株抗體，且透過細胞實驗及西方墨點法證明得到單株抗體。得到的抗體可進一步探討其鍵結常數並且和噬菌體胜肽庫篩選所得到的胜肽片段進行競爭及比較。
2. 利用二組噬菌體隨機胜肽庫對牛肝氧化鯊烯環化酵素進行篩選，得到的胜肽序列藉由 ELISA、墨點法及西方墨點法，證明這些胜肽序列對於氧化鯊烯環化酵素具有親和力。其中樣品 21 推測其對於氧化鯊烯環化酵素具有結構選擇性，是相當有趣的，可再進一步藉由 Native 蛋白質電泳膠片進行分析。
3. 在親和力的測試中，都是以牛肝中純化單一的蛋白質 (single band) 當作測試的對象，但若要探討其專一性，必須將這些噬菌體表現單一胜肽序列也對於牛肝純化中其他蛋白質進行鍵結力的測試。專一性的探討，在對於蛋白質純化及藥物治療上都極為重要。之後會針對牛肝中其他蛋白質利用西方墨點法作親和性測定。
4. 這些胜肽序列片段可以藉由胜肽合成技術，合成胜肽序列探討其對牛肝氧化鯊烯環化酵素活性影響，是否具有抑制效果或者可以讓蛋白質結構更穩定，如熱穩定、pH 值耐受度等。並且進一步可以藉由表面電漿共振 (Surface plasmon resonance, SPR) 技術來探討其鍵結/解離常數。

第五章 參考文獻

1. Allayee, H., Laffitte, B. A. & Lusis, A. J. *Biochemistry*. An absorbing study of cholesterol. *Science* **290**, 1709-11 (2000).
2. Cocchini, F., Richichi, M., Baiocco, F., Formenti, A. & Finocchiaro, G. Otoneurologic study of Friedreich's ataxia by a multidisciplinary approach. Preliminary report. *Acta. Otorhinolaryngol Ital.* **3**, 491-501 (1983).
3. Vance, D. E. & Van den Bosch, H. Cholesterol in the year 2000. *Biochim. Biophys. Acta.* **1529**, 1-8 (2000).
4. Chugh, A., Ray, A. & Gupta, J. B. Squalene epoxidase as hypocholesterolemic drug target revisited. *Prog. Lipid. Res.* **42**, 37-50 (2003).
5. Grundy, S. M. HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* **319**, 24-33 (1988).
6. Mecozzi, S., West, A. P., Jr. & Dougherty, D. A. Cation- π interactions in aromatics of biological and medicinal interest: electrostatic potential surfaces as a useful qualitative guide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 10566-71 (1996).
7. Wu, T. K. & Griffin, J. H. Conversion of a plant oxidosqualene-cycloartenol synthase to an oxidosqualene-lanosterol cyclase by random mutagenesis. *Biochemistry* **41**, 8238-44 (2002).
8. Abe, I., Rohmer, M. & Prestwich, G. D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and terpenes. *Chem. Rev.* **93**, 2189~2206 (1993).
9. Duriatti, A. & Schuber, F. Partial purification of 2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase from hog-liver: Evidence for a functional thiol residue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**, 1378-85 (1988).
10. Abe, I., Bai, M., Xiao, X. Y. & Prestwich, G. D. Affinity labeling of vertebrate oxidosqualene cyclases with a tritiated suicide substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 32-8 (1992).
11. Kusano, M., Abe, I., Sankawa, U. & Ebizuka, Y. Purification and some properties of squalene-2,3-epoxide: lanosterol cyclase from rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 239-41 (1991).
12. Moore, W. R. & Schatzman, G. L. Purification of 2,3-oxidosqualene cyclase from rat liver. *J. Biol. Chem.* **267**, 22003-6 (1992).
13. Shi, Z., Buntel, C. J. & Griffin, J. H. Isolation and characterization of the gene encoding 2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 7370-4 (1994).
14. Abe, I. purification of 2,3-oxidosqualene:cycloartenol cyclase from pea seedlings. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 5031~34 (1988).

15. Abe, I. purification of 2,3-oxidosqualene: β -amyryn cyclase from pea seedings. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 536~538 (1989).
16. Cattel, L. & Ceruti, M. Inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase as tools for studying the mechanism and function of the enzyme. *Crit. Rev. Bioc.hem. Mol. Biol.* **33**, 353-73 (1998).
17. Johnson, W. S. The fluorine atom as a cation-stabilizing auxiliary in biomimetic polyene cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 504~511 (1993).
18. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-7 (1985).
19. Clackson, T. (oxford, usa, 2004).
20. Deng, L. W., Malik, P. & Perham, R. N. Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of Escherichia coli. *Virology* **253**, 271-7 (1999).
21. Riechmann, L. & Holliger, P. The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of E. coli. *Cell* **90**, 351-60 (1997).
22. Lubkowski, J., Hennecke, F., Pluckthun, A. & Wlodawer, A. Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure Fold Des.* **7**, 711-22 (1999).
23. Hoess, R. H. Protein design and phage display. *Chem. Rev.* **101**, 3205-18 (2001).
24. Specthrie, L. Construction of a microphage variant of filamentous bacteriophage. *J. Mol. Biol.* **228**, 720-4 (1992).
25. Smith, G. P., Schultz, D. A. & Ladbury, J. E. A ribonuclease S-peptide antagonist discovered with a bacteriophage display library. *Gene* **128**, 37-42 (1993).
26. Bass, S., Greene, R. & Wells, J. A. Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins* **8**, 309-14 (1990).
27. Duenas, M. & Borrebaeck, C. A. Clonal selection and amplification of phage displayed antibodies by linking antigen recognition and phage replication. *Biotechnology* **12**, 999-1002 (1994).
28. Gramatikoff, K., Georgiev, O. & Schaffner, W. Direct interaction rescue, a novel filamentous phage technique to study protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5761-2 (1994).
29. Krebber, C., Spada, S., Desplancq, D. & Pluckthun, A. Co-selection of cognate antibody-antigen pairs by selectively-infective phages. *FEBS Lett.* **377**, 227-31 (1995).
30. Smith, G. P. & Petrenko, V. A. Phage Display. *Chem. Rev.* **97**, 391-410 (1997).

31. McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552-4 (1990).
32. Hoogenboom, H. R. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4133-7 (1991).
33. Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. & Winter, G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**, 624-8 (1991).
34. Devlin, J. J., Panganiban, L. C. & Devlin, P. E. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* **249**, 404-6 (1990).
35. Valadon, P. & Scharff, M. D. Enhancement of ELISAs for screening peptides in epitope phage display libraries. *J. Immunol Methods* **197**, 171-9 (1996).
36. Pasqualini, R. & Ruoslahti, E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* **380**, 364-6 (1996).
37. DiDomenico, B. Novel antifungal drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 509-15 (1999).
38. Arap, W., Pasqualini, R. & Ruoslahti, E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* **279**, 377-80 (1998).
39. Rothlisberger, D., Pos, K. M. & Pluckthun, A. An antibody library for stabilizing and crystallizing membrane proteins - selecting binders to the citrate carrier CitS. *FEBS Lett.* **564**, 340-8 (2004).
40. Gaskin, D. J., Starck, K., Turner, N. A. & Vulfson, E. N. Phage display combinatorial libraries of short peptides: ligand selection for protein purification. *Enzyme Microb. Technol.* **28**, 766-772 (2001).
41. Adey, N. B., Mataragnon, A. H., Rider, J. E., Carter, J. M. & Kay, B. K. Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries. *Gene* **156**, 27-31 (1995).
42. Gebhardt, K., Lauvrak, V., Babaie, E., Eijsink, V. & Lindqvist, B. H. Adhesive peptides selected by phage display: characterization, applications and similarities with fibrinogen. *Pept. Res.* **9**, 269-78 (1996).

附錄一

Pichia pastoris 表現牛肝氧化鯊烯環化酵素

Pichia pastoris 是一種 methylotrophic 的酵母菌，可在只有甲醇的環境下，以甲醇作為唯一碳源進行代謝作用並產生能量，其代謝過程中利用 alcohol oxidase 將甲醇氧化成甲醛及過氧化氫的產物，而當在含有 glucose 及乙醇之下是不會有 alcohol oxidase 的產生，在沒有這兩種物質而有甲醇存在下，alcohol oxidase 的產率會高達 35 %。表現出 alcohol oxidase 的基因只要有兩個 AOX1 及 AOX2，以 AOX1 為主，而 AOX2 雖然其胺基酸序列和 AOX1 相似度高達 97 %，但其表現出的酵素代謝能力較 AOX1 表現出的酵素差。所以當 AOX1 基因發生缺陷的時候，在有甲醇的條件下生長會比較緩慢，這種表現型稱為 Mut^S，而 AOX1 基因沒有受到破壞，此表現型為 Mut⁺。表現的型態可利用兩種培養基 (MD 及 MM) 去作篩檢【附表一】，+ 代表菌落會生長；- 代表菌落不會生長。當菌落在 MD 及 MM 兩種培養基盤中都可以生長代表表現型為 Mut⁺；當菌落只會生長在 MD 培養基盤中代表表現型為 Mut^S。

	Minimal Dextrose (MD)	Minimal Methanol (MM)
Mut ⁺	+	+
Mut ^S	+	-

【附表一】表現型態的篩選

決定表現型之後，也決定了甲醇誘導的時間。如果表現型為Mut⁺到達long phase只需要 4-6 小時；表現型為Mut^S到達long phase只需要 18 小時，所以表現型的不同造成誘導的時間差異。所以挑選Mut⁺表現型態的菌落來進行PCR分析以及誘導表現。藉由PCR的分析可以確認氧化鯊烯環化酵素基因是否有和GS115 染色體進行基因重組 (recombination)，實驗結果挑到一顆菌落是有基因重組的。接下來要將此菌落培養誘導進行蛋白質分析及純化。

