

第二章 實驗方法

2-1 定點突變

1. sample reaction 的準備：

(1) 10 X Reaction Buffer : 5 μ l

(2) dsDNA (50 ng/ μ l) 模板 (*abf* template) : 1 μ l

(3) 25 mM dNTPs : 1 μ l

(4) primer (+) (125 ng/ μ l) : 1 μ l

primer (-) (125 ng/ μ l) : 1 μ l

(5) 加入無菌水使最後體積 50 μ l

2. 加入 1 μ l *vent* DNA 聚合酵素 (2.5 U/ μ l) (購自 NEB 公司)

3. 進行 PCR 反應：

區間	次數	溫度	時間
1	1	95°C	30 sec
2	20	95°C	30 sec
		55°C	1 min
		72°C	5 min
3	1	72°C	5 min
		4°C	∞

4. 取 5 μ l 產物進行 DNA 電泳確認後，加入 *DpnI* 限制酶 (37°C, 1 hr)。

2-2 利用電送法將質體送入表現之宿主細胞GS115 (His⁻)

利用 Shixuan Wu et al. 在 2004 年提出的方法，以 0.1 M 醋酸鋰 (lithium acetate) 水溶液和 10mM dithiothreitol (DTT) 預先處理勝任細胞而使轉型效率提升約 150 倍。⁽¹⁾

2-2-1 一般敘述

藥品：配置培養液藥品購自 Difco、Sigma 公司

各種 kit 均購自 GeneMark、Biokit、Viogene 公司

PmeI 限制酶購自 NEB 公司

儀器：高速離心機 Kubota 7700、

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

聚合酶連鎖反應器 GeneAmp PCR system 9700

多功能基因轉殖儀 (BIO-RAD Gene Pulser Xcell)

定序工作：委託明欣生物科技公司

2-2-2 *P. pastoris* 之轉型 (transformation)

2-2-2-1 勝任細胞 (Competent cell) 之製備

1. 挑 GS115 (His⁻) 宿主細胞單菌落到 5 ml 之 YPD (1% yeast extract、

2% peptone、2% glucose) 培養液，以 28°C，180 rpm 培養 16~18 小時。

2. 取上述隔夜培養液 1 ml 至 10 ml 之 YPD 培養液，以 28°C，180 rpm 培養 3 小時，使 OD₆₀₀ 約等於 1.2。

2-2-2-2 利用電送法 (electroporation) 轉型

1. 將準備好的勝任細胞以 4°C，1500 x g 離心 5 分鐘，除去 YPD。
2. 加入 2 ml 含有 100 mM LiAc、10 mM DTT、0.6 M sorbitol 和 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 的水溶液溶散菌體，將其分裝至兩個無菌微量離心管，室溫中靜置 30 分鐘。
3. 各以 1500 x g 離心 5 分鐘，除去上層液。
4. 再加入 500 μl 冰 (0°C) 1M sorbitol。
5. 將 10 μl 預先以 *PmeI* 限制酶水解成直線型的質體 DNA、及步驟 4 的菌液一起注入電送的 cuvette 中，置於冰上靜置 5 分鐘。
6. 使用基因轉殖儀給電壓 (25 μF，2000 ohm，2000 V)。
8. 將 cuvette 中全部液體取出，加入 500 μl YPD 於 28°C 培養 2 小時。
9. 菌液塗在 YPD-Zeo (zeocine, 100 μg/ml) 固態培養基上，置於 28°C 培養 2~3 天。
10. 挑數顆單菌落，進行 PCR 分析。

2-2-3 利用聚合酶連鎖 (PCR) 反應分析 DNA

利用 in-situ PCR 的方法確認欲插入基因之大小，檢測其是否進入宿主細胞，並採用 3'-D490N 及 5'-D95N 作為引子。

1. 挑單菌落至 10 μ l 的無菌水中，

2. 將以下反應物混合均勻：

(1) 10 X Reaction Buffer : 2.5 μ l

(2) 25 mM MgCl₂ : 2.5 μ l

(3) 25 mM dNTPs : 0.5 μ l

(4) 5'-D95N primer (125 ng/ μ l) : 0.5 μ l

3'-D490N primer (125 ng/ μ l) : 0.5 μ l

(5) 單菌落之菌液 : 2.5 μ l

(6) 加入無菌水使最後體積 25 μ l

3. 加入 1 μ l Taq DNA 聚合酵素 (5 U/ μ l)。

4. 進行 PCR 反應：

區間	次數	溫度	時間
1	1	95°C	3 min
2	30	95°C	1 min
		54°C	1 min
		72°C	1.5 min
3	1	72°C	7 min
		4°C	∞

4.取 5 μ l 產物進行 DNA 電泳確認。

2-3 阿拉伯呔喃糖苷酵素在 *P. pastoris* 系統之誘導與純化

2-3-1 一般敘述

藥品：配置培養液及緩衝溶液藥品購自 Difco、Sigma、Showa 公司

p-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (pNPAF) 由本實驗室陳

韋宏學長合成

儀器：高速離心機 Kubota 7700、

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



2-3-2 阿拉伯呔喃糖苷酵素的誘導條件

1.挑一顆確認有 α -L-arabinofuranosidase (*abf*) 基因之單菌落於 5 ml

YPD-Zeo培養液，以 28°C，180 rpm培養至 $OD_{600}=7\sim 8$ 。

2.取上述菌液 1 ml加入 250 mL BMGY培養液 (1% yeast extract、

2% peptone、100 mM potassium phosphate、1.34% YNB、

$4\times 10^{-5}\%$ biotin、1% glycerol) 中，以 28°C，180 rpm培養至

$OD_{600}=7\sim 8$ 。

- 3.將菌液以 4000 rpm 離心 10 分鐘。
- 4.除去上層液，加入 50 ml BMMY (將 BMGY 中的 1% glycerol 換成 100% 甲醇，甲醇最終濃度為 0.5 %)，作為誘導菌體的培養液。
- 5.誘導過程以 28°C，180 rpm，每隔 24 小時加一次 250 μ l 之 100% 甲醇，誘導 120 小時。

2-3-3 阿拉伯呔喃糖苷酵素的純化

- 1.將醱酵液離心除去菌體，取上層液加入硫酸銨至飽和度 80%，以 4°C，16000 rpm 離心 10 分鐘，除去上層液。
- 2.將所得到的蛋白質沉澱用 20 mM，pH 4.5 醋酸鈉緩衝液溶解，接著做除鹽。
- 3.以 20 mM，pH 4.5 醋酸鈉緩衝液平衡陽離子交換樹脂管柱 (SP column)，再注入樣品進行層析分離。
- 4.鹽類 (NaCl) 梯度為 0 mM 到 1 mM，流速為 0.67 ml/min。
- 5.沖提液收集方式為每三分鐘收集一管，各管收集 2 ml。
- 6.收集後，取有 OD₂₈₀ 吸收訊號區間的液體做蛋白質電泳分析。

2-3-4 決定蛋白質分子量與純度

藉由 SDS-PAGE 系統，我們可以得到蛋白質之分子量與純度的

初步估計；這個系統是 Laemmli 在 1970 年所提出的，隨著蛋白質分子量大小差異，而在膠片上形成不同的帶狀，除了可顯示蛋白質粗略的分子量還能觀測其純度。

藥品：

stain solution : 0.6 g coomassia blue 、 200 ml acetic acid 、 500 ml isopropanol 、 3 L water

destain solution : 400 ml acetic acid 、 400 ml isopropanol 、 3.2 L water

步驟：

1. 製作大小為 10 公分 × 7.4 公分 × 0.1 公分電泳膠片（7% stacking gel，12.5% running gel）。
2. 取純化過後的酵素約 30 μl 與 5 μl 的染色緩衝液混合，95°C 加熱 1 分鐘。
3. 樣品注入膠片齒槽中，設定 150 伏特電壓，在 Tris-glycine running buffer 中通電約 1 小時。
4. 以 coomassia blue (coomassia brilliant blue G-250) 染色法觀測。

2-3-5 蛋白質濃度的確定

以 BCA 法建立蛋白質檢量線，請參考附錄。

2-4 阿拉伯呋喃糖苷酵素反應機制之研究

2-4-1 一般敘述

儀器：圓二色光譜儀 Jasco J-815

UV 吸收光譜儀 HP 8452A

核磁共振光譜儀 Bruker DRX-300

薄層分析 (TLC) Merck Silica gel 60 F₂₅₄

2-4-2 阿拉伯呋喃糖苷酵素野生株與各突變株 K_m 、 k_{cat} 之測定

1. 將 pNPAF 以醋酸鈉緩衝液 (100 mM, pH 4.1) 稀釋成各種不同濃度 (0.05~0.25 mM) 在 30°C 預熱，加入純化之酵素，觀察 348 nm 的吸光值增加率，分析得反應初始速率。

2. 以初始速率的倒數對 pNPAF 濃度的倒數作圖，以線性迴歸分析得其 K_m 值與 V_{max} 值。

3. 使用 $V_{max} = k_{cat} \times [E]$ 公式可以換算得到 k_{cat} 值。

2-4-3 阿拉伯呋喃糖苷酵素野生株與各突變株和 pH 之關係

將不同 pH 值緩衝液於 30°C 預熱 (100 mM, pH 4.1)，加入 pNPAF (0.01~0.08 mM) 與純化之酵素，紀錄 348 nm 的吸光值增

加率，分析得反應初始速率，觀察pH值變化的影響。

2-4-4 由 CD (circular dichroism) 光譜觀測野生株和突變株之二級結構

我們利用 Jasco J-815 圓二色光譜儀，觀測野生株與突變株的光譜(波長:200~250 nm)，使用的酵素濃度為 0.5~1 mg/ml，醋酸鈉緩衝液濃度稀釋至 2 mM，pH 4.5；所有的光譜皆以緩衝液的背景值校正過。

