

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 *
* : 木霉菌所生產 L-lysine oxidase 之功能性殘基研究 *
* 名 稱 *
* ***** *

執行計畫學生： 陳意超
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-046-B
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授： 賴雯玲

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 99年03月31日

行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* 計畫 *
* : 木霉菌所生產 L-lysine oxidase 之功能性殘基研究 *
* 名稱 *

執行計畫學生：陳意超

學生計畫編號：NSC 98-2815-C-040-046-B

研究期間：98年7月1日至99年2月底止，計8個月

指導教授：賴雯玲

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

中華民國 99 年 3 月 31 日

一、中文摘要

Trichoderma pseudokoningii-lysine oxidase(tp-KOD)具有特殊的生理活性，且在工業與醫學上有其應用之潛力，但目前只能由麩皮固體培養，再純化蛋白而來，成本高又費時，本計劃之目的為將已選殖出之tp-KOD基因，選殖於原核表現系統，以探討其表現與純化的方法。

本實驗利用生物資訊、結構資訊與蛋白質譜儀等結果，陸續預測訊息序列切位可能為L18、V87以及E8，利用pET-24d作為載體，選殖於原核表現系統*E. coli* BL21(DE3)，加上全長基因，共構築4個重組基因。初步結果顯示以E8起始的序列，在原核系統可表現，但無酵素活性，推測可能是因為原核表現系統，缺乏tp-KOD需要的轉譯後修飾所致，或是有其他原因。取誘發表現5小時的24d-KO8菌液，進行純化測試，結果重組蛋白似乎不會與親和性管柱Ni-NTA膠體結合。

在結構序列比對中，tp-KOD較其他LAAO在C端缺失了一段保留性高的 α -helix序列，於是利用Site-Finding PCR與選殖cDNA進一步確認序列的完整性，結果顯示序列無intron，但C端的確缺失一段序列，也解釋先前重組蛋白表現不理想的原因。目前已重新選殖24d-KO8與24d-preKO，正進行蛋白表現探討。

二、背景介紹

L-胺基酸氧化酶之生理功能包括細胞毒殺作用、抗菌、抗病毒、調節免疫等[1,2]，利用其對L-胺基酸的專一性在分析定量上有相當價值。

tp-KOD (*Trichoderma pseudokoningii*-lysine oxidase)自土壤分離之有絲真菌所產，為分泌型的糖蛋白質，為二個單元體之flavoprotein，分子量約為110 kDa，對L-lysine 有最佳之反應性(表一)，其對紅血球癌細胞株(mouse erythroleukemic cell line) IW201及IW32.4.1也具毒殺作用[3]。

已知tp-KOD基因序列，並根據Phyre program所作structural fold的預測，tp-KOD與*C. rhodostoma*所分泌的蛇毒蛋白L-amino acid oxidase (crLAAO)以及人類之monoamine oxidase (MAO)類似，儘管tp-KOD、crLAAO及MAO彼此間沒有明顯的序列相似度(sequence homology)，但它們卻擁有非常類似的立體結構。根據Dym, O.等人於2001所發表的文獻[4]，將flavoproteins根據結構分成6大類，而tp-KOD可被歸類於glutathione reductase (GR) family，且又細分屬於GR2 family，GR2 family的成員中，序列相似性主要位於N端與C端區域(圖1)，此主要構成構成FAD-binding domain。根據文獻探討顯示LAAO N端具有一段序

列，稱為N-extension，推測與LAAO的生理活性有關[5,6]。

生產tp-KOD需進行麩皮固體發酵，母株菌體才能分泌此酵素，對於自動化生產極為不利，因此希望能將此酵素的基因選殖於原核系統，並探討蛋白之表現，以期建立一套能夠大量生產，且易於純化的酵素生產系統。

由於tp-KOD蛋白質N端被修飾，無法讀取其N端序列，所以無法推論其訊息序列有多長，受限了tp-KOD重組基因的構築，tp-KOD並不具有利用典型的訊息序列，因此利用生物資訊等軟體皆無法預測出訊息序列切位。根據Jan A. Veenstra所提出的monobasic與dibasic的訊息序列切位原則[7]，預測tp-KOD可能的切位有2個：一個位於L18，另一個位於V87。因胺基酸序列87之後便進入到FAD binding domain，此結構對於LAAO極為重要，故認為切位在87之後機率小。另外利用質譜儀(LC-MS-MS)分析胜肽序列，結果得到最靠近N端的序列為A15，分析A15附近的序列與二級結構，發現位在一個 α -helix中，而此 α -helix的開端可能為glutamate (E8) (圖2)，可形成常見的pyroglutamate [8]的修飾型態，推測E8可能為第一個胺基酸。

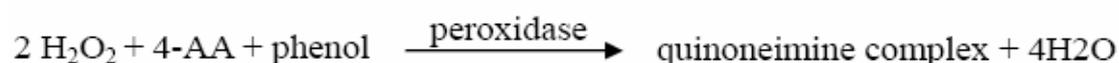
除了上述所預測的E8、L18與V87這3個可能的切位外，認為tp-KOD的訊息序列應該很短，可能不致於影響蛋白的結構，因此將全長基因序列、E8、L18與V87分別選殖於原核系統(*E. coli*)並進一步探討重組蛋白之表現。

三、實驗方法

1. 蛋白表現

將菌株在 LB broth 37°C 隔夜培養，以 1/100 體積 transfer 到 20ml 的 LB broth，培養至 O.D600 約 0.6，加入 IPTG 使最終濃度為 1mM 開始進行蛋白表現，收集表現後第 3、4、5 小時的菌體，利用超音波震盪破菌取得分泌在菌體內的蛋白粗萃取液。

2. 酵素活性測試(4-Aminoantipyrine 法):



取適當稀釋的蛋白粗萃取液加入反應液，若酵素具有活性則產物為紅色，可在 500nm 偵測吸光值變化。

3. Site-finding PCR[9]

根據 Guihong Tan 等人所發展之 Site-finding PCR 方法進行 gene walking，條件步驟如下：

- (1) Sitefinder extension：使用 nonspecific primer(**SFinder1**)(表三)，在 95°C denature 後，以 25°C 進行 annealing，使其可以接合在 KOD 基因下游位置，然後以 68°C 進行 extension，執行 1 個循環。
- (2) 第一次 PCR：接著直接加入 GSP1、SFP1 兩種 primer 進行第一次 PCR，在 95°C denature 後，以 55°C 進行 annealing，然後以 68°C 進行 extension，執行 30 個循環。
- (3) 第二次 PCR：取第一次 PCR 產物作為模版以 GSP2、SFP2 兩種 primer 在 95°C denature 後，以 68°C 進行 annealing，然後以 68°C 進行 extension，執行 30 個循環。

4. RT-PCR

由麩皮培養的原始菌株利用 RNA mini 套組(Qiagen)抽取 RNA，以 DNase I 於 37°C 作用 30 分鐘，除去 DNA 的污染後，再以 Two-step 的方法，先合成 cDNA 再進行 PCR 反應。混合 10µl RNA 與 1µl oligo (dT)₁₈ 引子，於 65°C 反應 5 分鐘，再加入 10µM 的 dNTP 混合物、1X MMLV Reverse transcriptase buffer 及 2 units MMLV Reverse transcriptase，加水補至 20µl，42°C 反應 1 小時。PCR 反應則混合 5µl cDNA、10µM Primers、1X PCR reaction buffer 及 2.5 units *Taq* DNA polymerase，於 95°C 反應 3 分鐘後，以 95°C 1 分鐘，55°C 1 分鐘，72°C 2 分鐘進行 35 次循環反應，最後再以 72°C 反應 5 分鐘。

四、結果與討論

1. 基因選殖

由於 tp-KOD 為分泌型蛋白，加上其 N 端結構可能會影響其生理活性，因此選擇 pET-24d 作為載體，其 6xHis-tag 位於 C 端，可幫助蛋白偵測與純化，但不影響蛋白本身可能的功能。將全長基因序列，以及起始殘基為 E8、L18 與 V87 的基因序列，分別利用 *NcoI*、*NotI* 兩種限制酶選殖於

pET-24d，共獲得4個構築體(constructs)，分別命名為24d-preKO、24d-KO8、24d-KO18、24d-KO87(表二)，並轉殖於*E. coli* DH5 α ，用以複製與保存質體，序列確認後，再轉殖到*E. coli* BL21(DE3) 進行蛋白表現之探討。

2. 重組蛋白之表現

將帶有重組基因之 *E. coli* BL21(DE3)，利用 IPTG 進行誘導表現，並取誘導表現後第 3、4、5 小時的菌體進行分析。利用 SDS-PAGE 與 Western blot 偵測酵素表現情形，結果 24d-KO18 與 24d-KO87 則無明顯的表現訊號，推測可能破壞到蛋白的結構完整性，而影響其表現或蛋白穩定性。而 24d-KO8 與 negative control (含 pET-24d 載體的菌株)相比，有一條明顯的 major band，且分子量介於 52kDa 與 93kDa 之間，符合預期的分子量，利用 anti-his tag antibody 偵測也獲得相同結果(圖 3A)。然活性測試結果皆偵測不到酵素活性，推測可能是因為 tp-KOD 為醣蛋白，需要轉譯後修飾，不適合原核表現系統。另外取誘發表現 5 小時的 24d-KO8 菌液，以超音波震盪破菌後，利用 Ni-NTA agarose (Invitrogen)進行親和力純化測試，結果似乎不會與 Ni-NTA 膠體結合 (圖 3B)。

另外本實驗室也將此 4 種構築體轉殖於真核系統表現，結果所有構築體在表現與活性上皆不甚理想，因此重新檢視基因序列，在結構序列比對中，tp-KOD 較其他 LAAO 在 C 端缺失了一段保留性高的序列，是組成 FAD domain 的其中一段 α -helix (α 15) (圖 1)，因此懷疑 KOD C 端序列的完整性。

3. 基因序列完整性之確認

為了進一步確認 C 端序列的完整性，利用 Site-Finding PCR 法來檢視，結果 PCR 後有一條明顯的 major band，其他雜 band 並不明顯(圖 4A)，因此將 PCR 產物直接定序，結果顯示先前 4 個構築體的確缺失了一段位於 C 端的序列，此結果也可解釋先前 tp-KOD 基因在原核或真核系統皆表現不理想的原因。另外雖然文獻、生物資訊預測皆顯示 tp-KOD 序列不含 intron，但慎重起見，仍由原始麩皮培養之母菌株抽取 RNA，利用 RT-PCR(圖 4B)選殖 cDNA，比對基因序列，確認 KOD 基因無 intron。再獲得了完整的 tp-KOD 序列後，重新設計 C 端 primer，已完成 24d-preKO、24d-KO8 重組菌株之選殖，而重組蛋白表現探討正進行中。

五、參考文獻

1. **Bohmer, A., A. Muller, M. Passarge, P. Liebs, H. Honeck, and H. G. Muller.** 1989. A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* **182**:327-332.
2. **Compagnone, D., G. Federici, R. Massoud, L. Santoro, M. Anichini, and G. Palleschi.** 1992. Analysis for transaminases in serum with an amperometric glutamate electrode. *Clin. Chem.* **38**:2306-2310.
3. **Hu, H. M., S. W. Cheng, M. C. Huang, S. J. Tang, M. C. Chang, and Y. C. Tsai.** 1994. Purification and characterization of L-lysine oxidase from *Trichoderma pseudokoningii* and its effect on growth of mouse erythroleukemia cells. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.* **32**:361-371.
4. **Dym, O., and D. Eisenberg.** 2001. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* **10**:1712-28.
5. **Geyer, A., et al.,** 2001. Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. *Eur. J. Biochem.*, **268**: 4044-53.
6. **Faust, A., et al.,** 2007. The structure of a bacterial L-amino acid oxidase from *Rhodococcus opacus* gives new evidence for the hydride mechanism for dehydrogenation. *J. Mol. Biol.*, **367**: 234-48.
7. **Veenstra, J.A.,** 2000. Mono- and dibasic proteolytic cleavage sites in insect neuroendocrine peptide precursors. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **43**: 49-63.
8. **Mozdzanowski, J., et al.,** 1998. High-yield deblocking of amino termini of recombinant immunoglobulins with pyroglutamate aminopeptidase. *Anal. Biochem.*, **260**: 183-187.
9. **Guihong, T., G. Yin, S. Miao, Z. Xinyue, H. Shanping, C.Zhangliang, and A. Chengcai.** 2005. SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Research*, Vol. 33, No. 13 e122

表一、tp-KOD 對 L-胺基酸之相對反應活性表

	反應活性(以 L-lysine 為 100%)
L-lysine	100%
L-ornithine	18.0%
L-arginine	9.7%
L-phenylalanine	9.0%
L-tyrosine	7.3%
L-histidine	4.5%

表三、本計劃中所用到的 primer

Primer	Primer sequence(5'→ 3')
➤ Cloning primers	
preKO-Nco-f	ATACTATATTTGCAACCATGGACAATGTTGACTTTG
KO8-Nco-f	ATGGACAATGTTGACTCCATGGAATCTGTCCGAACCCGC
KO18-Nco-f	CCATGGGACTTATTCGTGAGAAGGTCG
KO87-Nco-f	CCATGGTGTGCATTGTAGGCGCTGG
KO-Not-r1	GCGGCCGCGAAAGCCTCTCCGACGATATG
KO-Not-r2	TGCCGTAGTACCTCTTTCTAGATAGATCTTCACCTGGTACTCC
➤ Site-finding PCR primers	
SFinder1	CACGACACGCTACTCAACACACCACCTCGCACAGCGTCCTC AAGCGGCCGCNNNNNNGCCT
GSP1	CGCATCGGATCGTTGGTGAAGG
SFP1	CACGACACGCTACTCAACAC
GSP2	GAGCTCGTCGAGCTGATCCTGC
SFP2	ACTCAACACACCACCTCGCACAGC

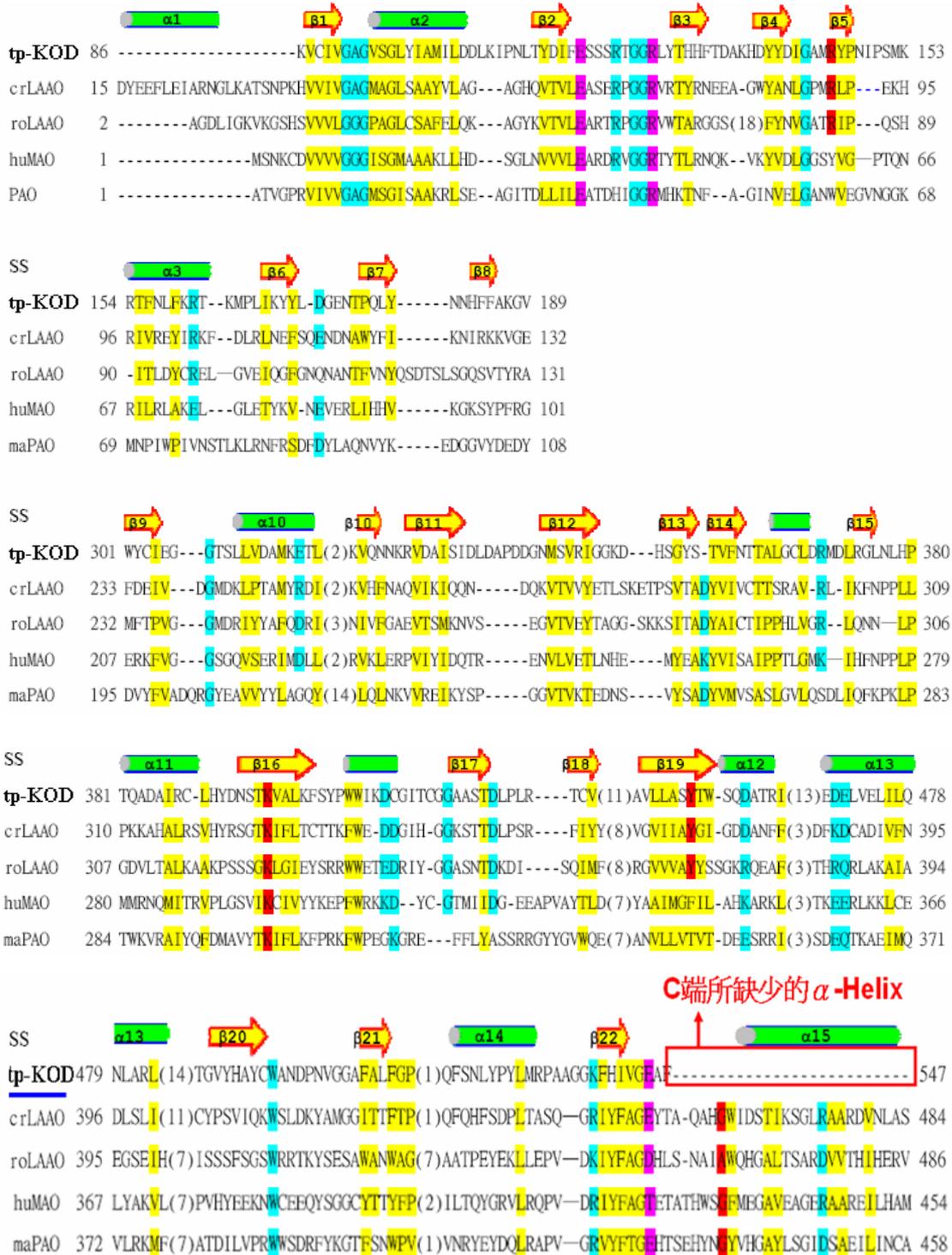


圖 1. 以結構為基礎之 N 端與 C 端序列比對。序列是分別來自 *C. rhodostoma* (crLAAO ; 1f8r)與 *R. opacus* (roLAAO ; 2jb2)之 LAAO，以及人類之 monoamine oxidase (huMAO ; 2c73)、玉蜀黍 *maize* 之 polyamine oxidase (maPAO ; 1b37)，以 crLAAO 的二級結構作為圖示(SS)。其中與 FAD 作用之殘基以桃紅色塊標示，與基質作用之殘基以紅色色塊標示，而具有保留性之疏水區以黃色色塊標示，其他保留性高之殘基則以青藍色塊標示。括號中的數字表示殘基數目。

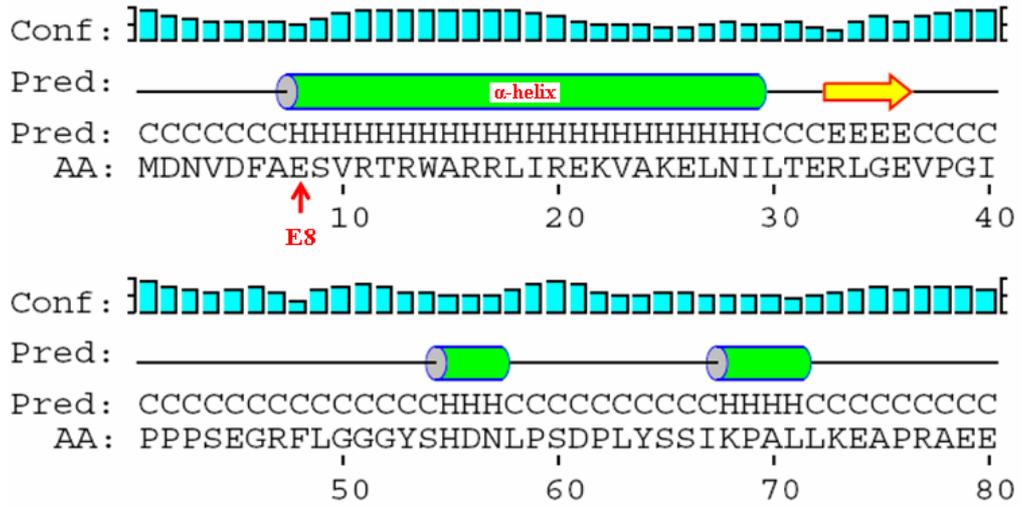
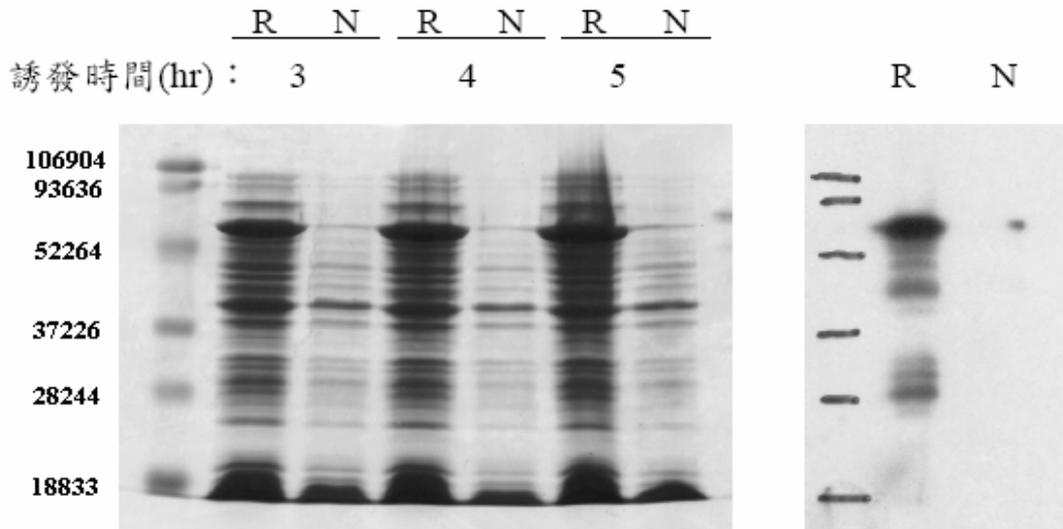


圖 2. 二級結構分析顯示 E8 為一段 α -helix 開端

(A)



(B)

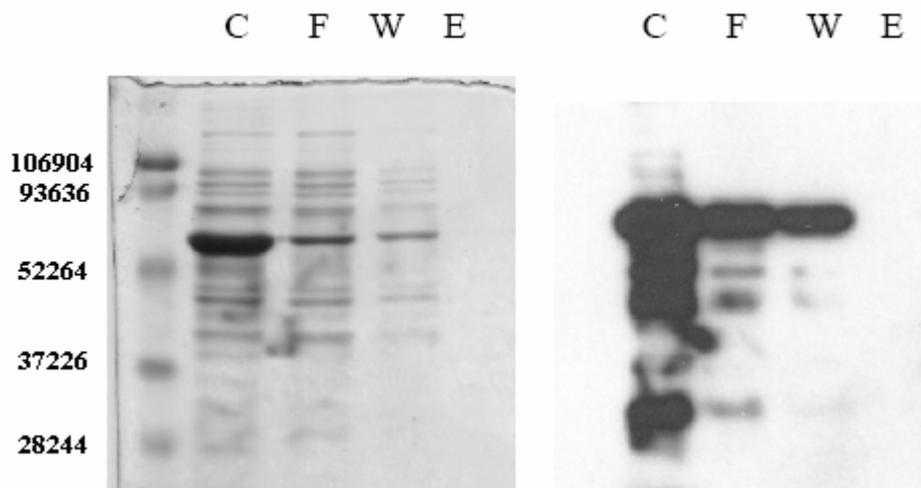
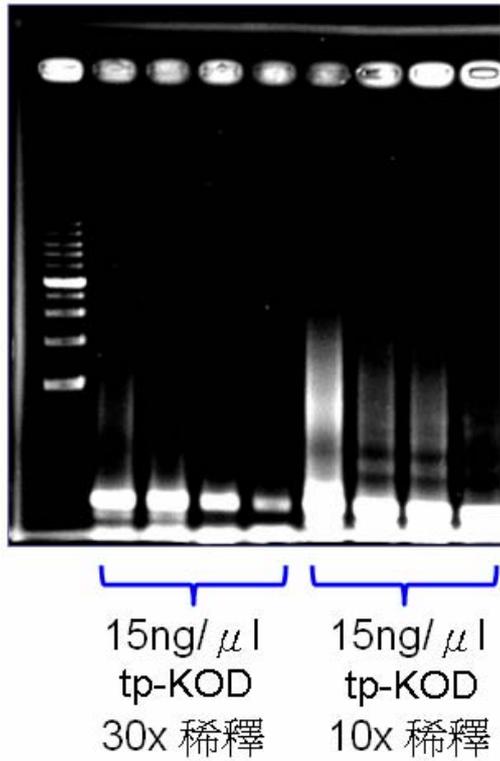


圖3. 24d-KO8 菌株表現分析；(A) 圖左為LKO 重組菌株(R)與negative control(只含載體的菌株；N)，IPTG 誘發表現後所有蛋白之SDS-PAGE 分析。圖右為誘發表現3 小時後之Western blot 分析。(B) 圖為IPTG 誘發表現5 小時後，進行親和性純化分析，C: crude extract, F: flowthrough, W: wash (20mM imidazole), E:elute (300mM imidazole)，圖左為SDS-PAGE 分析，圖右為Western blot 分析。

(A)



(B)

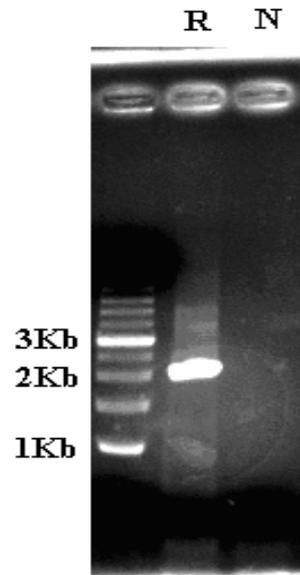


圖 4. (A) Site-finding PCR；以不同稀釋倍數之染色體 DNA 作為模版進行 site-finding PCR。(B) RT-PCR；以 RT 後的 cDNA 作為模版進行 PCR(R)，未經 RT 的 RNA 模板進行 PCR 作為 negative control(N)。