

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## L-離胺酸氧化酉每之生理活性探討與蛋白結構解析(第3年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 98-2320-B-040-004-MY3  
執行期間：100年08月01日至101年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

計畫主持人：賴雯玲

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：張頌育

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 101 年 11 月 12 日

中文摘要：氧化酶與脫氫酶在醫學及工業分析等方面應用價值極大，L-胺基酸氧化酶利用氧化酶的特性，可用來作為各種L-胺基酸之定量分析。L-離胺酸氧化酶(L-lysine oxidase, KOD)自土壤分離菌(*T. pseudokoningii*)之麩皮固體培養基中分離純化所得，為分泌型的糖蛋白質。本計畫將此酵素的基因選殖於不同的表現系統中，希望能夠建立一套能夠大量生產，且易於純化的酵素生產系統。在結構序列比對中，tpKOD較其他LAAO在C端缺失了一段保留性高的 $\alpha$ -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C端的確缺失一段70 a.a.長度的序列，也解釋先前重組蛋白表現不理想的原因。儘管利用各種預測軟體結果都顯示無訊息胜肽，然而分析蛋白二級結構，tpKOD蛋白在N端一開始就有一個頗長的 $\alpha$ -helix，認為此一長 $\alpha$ -helix應該屬於訊息胜肽，故選擇選殖G39起始之序列基因。在進入保留性高之主要結構架構 $\alpha$ 1 (V87)前的序列稱為N-extension，為了解N-extension序列的重要性，除了構築全長基因外，再選擇從G39開始，約每隔10個胺基酸建構一個重組基因，因此共構築K039、K050、K060、K082與K087於pET-24d以及pPICZ 脉A載體，另外將完整含有訊息序列的全長基因選殖於pPICZB載體，共構築13個重組基因，分別選殖於原核表現系統(*E. coli*)以及真核表現系統(*Pichia pastoris*)，並進一步分析蛋白表現與活性。結果發現所有含有完整C端序列的pET-24d構築體皆可在*E. coli*表現，但卻不如C-truncated K08的大量表現，蛋白主要以inclusion body存在；zB-preK0轉殖菌株僅在菌體內有偵測到蛋白表現訊號，顯示*P. pastoris*無法辨識tpKOD可能的訊息胜肽，無法將tpKOD帶往蛋白分泌路徑(secretory pathway)，因此無法分泌於菌體外，但也暗示此真核系統表現tpKOD蛋白的可行性，所有以pPICZ 脉A為載體之構築體同樣無法有效表現可溶性蛋白，推測*P. pastoris*的蛋白分泌路徑系統對tpKOD蛋白無法做有效的蛋白摺疊。為分析C端序列的重要性，將C端helix 15之後序列移除而構築24d-K050/r3、24d-K081/r3、24d-K087/r3以及aA-K050/r3、aA-K082/r3轉殖株，發現24d-K081/r3的表現大量提升，顯示不管N端或C端序列似乎都會影響表現量，惟仍舊是不溶的蛋白。而aA-K050/r3與aA-K082/r3轉殖株不管是在菌體內或菌體外皆無明顯的可溶性蛋白訊號，取濃縮培養液分析，可偵測到微弱的活性反應。對於蛋白表現不如預期的結果，推測除了可能正確的蛋白結構摺疊與轉譯後修飾的原因外，認為蛋白的毒性可能也是重要因素。

中文關鍵詞： L-lysine oxidase (KOD)、Site-Finding PCR、訊息胜肽、  
蛋白表現、pET-24d、pPICZ 脉 A、pPICZB、Pichia pastoris

英文摘要：

英文關鍵詞：

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫期末報告

L-離胺酸氧化酶之生理活性探討與蛋白結構解析

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 98-2320-B-040 -004 -MY3

執行期間：98年8月1日至101年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系

計畫主持人：賴雯玲

計畫參與人員：張頌育

處理方式：二年後可公開查詢

中華民國 101 年 10 月 30 日

## 目錄

中文摘要	II
英文摘要	III
一、前言	1
二、初步結果回顧與研究目的	1
三、研究方法	2
1. 菌種	2
2. 質體	2
3. Site-finding PCR	2
4. cDNA 之選殖	3
5. 大腸桿菌之轉形法	3
6. <i>Pichia pastoris</i> 之電壓脈衝轉形法	3
7. 重組蛋白之表現	4
8. 西方墨點法	4
9. 酵素活性測試	4
四、結果與討論	5
1. 基因序列完整性之確認	5
2. 基因選殖	5
3. preKO 與 KO8 重組蛋白之表現	6
4. N 端蛋白序列分析與基因選殖	7
5. 重組蛋白之表現	8
i. 原核系統-24d-KO39、24d-KO50、24d-KO81、24d-KO87	
ii. 真核系統- aA-KO39、aA-KO50、aA-KO60、aA-KO82、aA-KO87	
6. C 端蛋白序列分析	8
7. C 端缺失(r3 primer)重組蛋白之表現-24d-KO50/r3、24d-KO81/r3、 24d-KO87/r3、aA-KO50/r3、aA-KO82/r3	9
五、參考文獻	9
附表	11
附圖	13
附錄	24

## 中文摘要

氧化酶與脫氫酶在醫學及工業分析等方面應用價值極大，L-胺基酸氧化酶利用氧化酶的特性，可用來作為各種L-胺基酸之定量分析。L-離胺酸氧化酶(L-lysine oxidase, KOD) 自土壤分離菌(*T. pseudokoningii*)之麩皮固體培養基中分離純化所得，為分泌型的糖蛋白質。本計畫將此酵素的基因選殖於不同的表現系統中，希望能夠建立一套能夠大量生產，且易於純化的酵素生產系統。在結構序列比對中，tpKOD較其他LAAO在C 端缺失了一段保留性高的 $\alpha$ -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C端的确缺失一段70 a.a.長度的序列，也解釋先前重組蛋白表現不理想的原因。儘管利用各種預測軟體結果都顯示無訊息胜肽，然而分析蛋白二級結構，tpKOD蛋白在N端一開始就有一個頗長的 $\alpha$ -helix，認為此一長 $\alpha$ -helix應該屬於訊息胜肽，故選擇選殖G39起始之序列基因。在進入保留性高之主要結構架構 $\eta$ 1 (V87) 前的序列稱為N-extension，為了解N-extension序列的重要性，除了構築全長基因外，再選擇從G39開始，約每隔10個胺基酸建構一個重組基因，因此共構築KO39、KO50、KO60、KO82與KO87於pET-24d以及pPICZ $\zeta$ A載體，另外將完整含有訊息序列的全長基因選殖於pPICZB載體，共構築13個重組基因，分別選殖於原核表現系統(*E. coli*)以及真核表現系統(*Pichia pastoris*)，並進一步分析蛋白表現與活性。結果發現所有含有完整C端序列的pET-24d構築體皆可在*E. coli*表現，但卻不如C-truncated KO8的大量表現，蛋白主要以inclusion body存在；zB-preKO轉殖菌株僅在菌體內有偵測到蛋白表現訊號，顯示*P. pastoris*無法辨識tpKOD可能的訊息胜肽，無法將tpKOD帶往蛋白分泌路徑(secretory pathway)，因此無法分泌於菌體外，但也暗示此真核系統表現tpKOD蛋白的可行性，所有以pPICZ $\zeta$ A為載體之構築體同樣無法有效表現可溶性蛋白，推測*P. pastoris*的蛋白分泌路徑系統對tpKOD蛋白無法做有效的蛋白摺疊。為分析C端序列的重要性，將C端helix 15之後序列移除而構築24d-KO50/r3、24d-KO81/r3、24d-KO87/r3以及aA-KO50/r3、aA-KO82/r3轉殖株，發現24d-KO81/r3的表現大量提升，顯示不管N端或C端序列似乎都會影響表現量，惟仍舊是不溶的蛋白。而aA-KO50/r3與aA-KO82/r3轉殖株不管是在菌體內或菌體外皆無明顯的可溶性蛋白訊號，取濃縮培養液分析，可偵測到微弱的活性反應。對於蛋白表現不如預期的結果，推測除了可能正確的蛋白結構摺疊與轉譯後修飾的原因外，認為蛋白的毒性可能也是重要因素。

關鍵詞：L-lysine oxidase (KOD)、Site-Finding PCR、訊息胜肽、pET-24d、pPICZ $\zeta$ A、pPICZB、*Pichia pastoris*

## Abstract

L-Amino acid oxidases (LAAOs) have received attentions as potential diagnostic reagents and industrial biocatalysts. L-lysine oxidase (KOD) was a secreted glycoprotein purified from filamentous fungi- *Trichoderma pseudokoningii* cultured in wheat bran-containing solid medium. In this study, we cloned the tpKOD gene to prokaryotic and yeast expression systems, expect to establish a great quantity expression and easy purification procedure. At first, we confirmed the gene sequence integrity by site-finding PCR. Although the results of using various prediction programs showed no signal peptide, we analyzed the N-terminal sequence based on structural comparison. The beginning of N-terminal of tpKOD with a long  $\alpha$ -helix that was supposed to signal peptide. In order to understand the importance of N-extension sequence, starting from the G39, we constructed the recombinant genes at intervals of 10 amino acids. Except for the presequence-containing gene, we have been cloned the G39-, G50-, S60-, L82 and V87-starting sequence to pET-24d and pPICZ $\zeta$ A vectors, respectively. The presequence-containing gene were also cloned into pPICZB vector. Altogether we constructed 13 recombinants. All recombinants with pET-24d vector could be expressed by *E. coli* but presented as inclusion body and not overexpression as C-truncated KO8 transformer. zB-preKO recombinants could only express tpKOD enzyme in the cytosol. This is revealed that *P. pastoris* cannot recognize the signal peptide of tpKOD but implied the expression practicable of *Pichia pastoris* system for tpKOD. However, all recombinants with pPICZ $\zeta$ A vector could not express the significant soluble proteins to medium and intracellular successfully. It is suggested that the signal peptide of tpKOD may interfere the secretory pathway of *Pichia pastoris*, or the folding system in secretory pathway is not suitable for KOD. To analysis the effect of C-terminal sequence, we removed the C-terminal sequence after the helix 15 and build the 24d-KO50/r3, 24d-KO81/r3, 24d-KO87/r3, aA-KO50/r3 and aA-KO82/r3 constructs. The 24d-KO81/r3 recombinant was also expressed as inclusion body but the expression was enhanced significantly. However, the expression of soluble fraction of aA-KO50/r3 and aA-KO82/r3 were not improved significantly. Protein is expressed, but it is not the expected activity or size. In addition to the effects of folding system and posttranslation modification, suggested the protein toxicity may be a important effect.

Keywords : L-lysine oxidase (KOD), Site-Finding PCR, signal peptide, pET-24d, pPICZ $\zeta$ A, pPICZB, *Pichia pastoris*

## 一、前言

氧化酶與脫氫酶在醫學檢驗及工業分析等方面應用價值極大，L-胺基酸氧化酶利用氧化酶的特性，可用來作為各種 L-胺基酸之定量分析，如 L-離胺酸氧化酶可檢測 hyperlysinemia 病患血液中之 L-離胺酸濃度；且在食品及醱酵工業上，L-離胺酸常用於豬飼料的添加，以醱酵生產 L-離胺酸可達 350000 公噸，所以 L-離胺酸之定量分析也是一項重要工作。利用酵素電極或網版印刷電極(screen-printed electrodes)可連續地偵測 L-離胺酸之濃度，可使檢驗成本下降，操作更方便[1]。而基質特異性好的 L-phenylalanine oxidase 可用來檢測 phenylketonuria (PKU) 病人血液及尿液中 phenylalanine 之含量。專一性及穩定性良好的 L-glutamate oxidase 可應用於調味品、醱酵食品中及醬油釀造工業等對 L-glutamate 的含量分析。

L-離胺酸氧化酶(L-lysine oxidase, KOD) 自土壤分離菌 *Trichoderma pseudokoningii* Ts75-2 之麩皮(wheat bran)培養基中分離純化所得。經純化該酵素並研究其基質專一性後證實為一全新的酵素，其分子量為 116,000，由兩個分子量約為 58,000 之次單位所組成，每一個次單位與一個 FAD 結合，最適反應 pH 值範圍為 5.0~9.0。若此酵素對 L-lysine 活性為 100，則對 L-ornithine、L-phenylalanine、L-arginine、L-tyrosine、L-histidine 等之活性分別為 18.0 : 9.0 : 9.7 : 7.3 : 4.5。其對紅血球癌細胞株(mouse erythroleukemic cell line) IW201 及 IW32.4.1 也具毒殺作用，發現對 IW32.4.1 細胞株之毒性較強，其 ID<sub>50</sub> 為 0.2 mU/ml，而對 IW201 則為 0.4 mU/ml [2]。

*Trichoderma* spp.是種土壤中常見的黴菌，可生產許多種抗生物質，除此之外，也可寄生在其他的黴菌上，藉著菌絲纏繞或是分泌酵素，溶解寄主細胞壁，繼而使用寄主的養分，使寄主最終衰殘、死亡，此為 mycoparasitism，所以可以利用 *Trichoderma* spp.作為微生物防制(biocontrol)之用[3]。而 tpKOD 是唯一從真菌所分離出具有毒殺作用的氧化酶，而此酵素對於 *Trichoderma* spp 之生理活性為何，仍舊未解，值得進一步探討，或許有更嶄新的利用價值。

tpKOD 為分泌型的糖蛋白質，在原本的母株中表現量偏低，但是要大量取得純化酵素依舊困難。且在生產 *T. pseudokoningii* 之 KOD 需進行固體醱酵，因為必須將此菌培養於麩皮固體培養基中，*T. pseudokoningii* 菌體才能分泌此酵素，對於自動化生產極為不利。本計畫希望能夠將此酵素的基因選殖於不同的宿主中，希望能夠建立一套能夠大量生產，且易於純化的酵素生產系統。

## 二、初步結果回顧與研究目的

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 以及 pPICZ $\zeta$ A 作為載體，分別選殖於原核表現系統-*E. coli* BL21(DE3)以及真核表現系統 *Pichia pastoris* KM71，加上完整基因，共構築 8 個重組基因。另外將完整的 tpKOD 基因序列選殖於 pPICZB 載體中，送進同屬於真菌的 *Pichia pastoris* KM71 中進行表現，以期 *Pichia pastoris* KM71 可辨認其訊息序列，並進一步反應將重組蛋白分泌於菌體外。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 tpKOD 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。此外，利用 pPICZ $\zeta$ A 作為載體的重組基因，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 tpKOD 的基因序列，藉由以結構為基礎的序列比對中，發現 tpKOD 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  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ 15) (圖 1)，因此懷疑 tpKOD 基因 C 端序列的完整性。故在此實驗首先要重新確認 tpKOD 基因 C 端序列的完整性，並重新選殖完整序列於真核與原核系統，進一步探討重組蛋白的表現與活性。

### 三、研究方法

#### 1. 菌種

- (1) *Escherichia coli* INVaF'。
- (2) *Escherichia coli* DH5 $\zeta$ 。
- (3) *Escherichia coli* BL21。
- (4) *Escherichia coli* TOP10F' : F' (*proAB*, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ*÷M15, *Tn10* (Tet<sup>R</sup>)) *mcrA*, ÷(*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\lambda$ 80*lacZ*÷M15, ÷*lacX74*, *deoR*, *recA1*,  $\zeta$ -*araD139*, ÷(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*。
- (5) *Pichia pastoris* KM71 : *arg4 his4 aox1::ARG4*

#### 2. 質體

- (1) pGEM-T：用於 cDNA 之選殖
- (2) pET 24d：3.6 kb，用於原核系統表現 KOD 基因之質體。
- (3) pPICZ $\zeta$ A：3.6 kb，用於真核系統表現 KOD 基因之質體，具有  $\zeta$ -factor 訊息序列。
- (4) pPICZB：3.3 kb，用於真核系統表現 KOD 基因之質體。

#### 3. Site-finding PCR[4]

根據 Guihong Tan 等人所發展之 Site-finding PCR 方法(附錄 1)進行 gene walking，條件步驟如下：

- (1) Sitefinder extension：使用 nonspecific primer(SFinder1)(表一)，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. cDNA之選殖

將 *Trichoderma pseudokoningii* Ts75-2 接種於麩皮培養基中，靜置培養約 5-7 天待菌絲長滿，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)<sub>18</sub> 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 10 分鐘。PCR 產物純化後與 pGEM-T 質體進行接合反應，並轉殖入 *E. coli* INVaF'。

#### 5. 大腸桿菌之轉形法

從 -70°C 冰箱中取出勝任細胞置於冰上待其融解，並將 DNA 溶液（體積小於 20µl）加入勝任細胞中混合均勻，靜置於冰上 30~60 分鐘。然後在 42°C 水浴中進行 heat shock 2 分鐘，立刻置於冰上 5 分鐘。加入 0.8 ml 的 LB 培養液，置於 37°C 溫箱內培養 30~60 分鐘。取 200 µl 菌液塗抹於含有適當抗生素的培養基上，置於 37°C 培養箱內培養 12~16 小時。

#### 6. *Pichia pastoris* 之電壓脈衝轉形法

##### (1) 勝任細胞(competent cell)的製備

將單一菌落種入 5 ml YPD 培養液，於 30°C 作隔夜培養，取 0.5 ml 隔夜培養液接種於 500 ml YPD 培養液中，於 30°C 培養至 OD<sub>600</sub> = 1.3-1.5 (約 16-18 小時)。以 1500x g 於 4°C 離心 5 分鐘，收集菌體並依序以 500 ml、250 ml 冰無菌水及 20 ml 冰 1 M sorbitol 溶液清洗，最後再將菌體重新懸浮於 1 ml 冰 sorbitol 溶液中，此即為勝任細胞，需維持低溫並當天使用。

##### (2) 轉形法(transformation)

為使轉形進入 *P. pastoris* 的 DNA 能引發基因重組而嵌入宿主染色體，故先以 *Nsi*I 限制酶切割質體 DNA 之 5' AOX1(alcohol oxidase 1)區域，使質體 DNA 成線性，再純化出切割後之線性 DNA，並溶於無菌水中。取 5-10 µg (5-10 µl)切割後之線性 DNA 與 80 µl 勝任細胞均勻混合，並置於 2 mm electroporation cuvette 中，於冰上靜置 5 分鐘。以 Gene Pulser 依 1.5 kV、25 µF 及 400 Ω 的條件進行電壓脈衝轉形，緊接著立刻加入 1 ml sorbitol 於 cuvette 中，再將菌液移入 1.5 ml 試管，並於 30°C 靜置培養 1-2 小時。之後再將菌液塗抹於含有 100 µg/ml zeocine 抗生素的 YPDS 培養基上，置於 30°C 培養箱內培養 3-5 天。

## 7. 重組蛋白之表現

### (1) 原核系統:

大腸桿菌是目前使用最廣泛的蛋白質表現系統，由於使用最久，對其基因瞭解清楚，所建立的系統最為完整。使用大腸桿菌表現系統來表現酵素可進一步利用 methionine auxotroph strain (*E. coli* B834 (DE3)) 表現含重金屬的蛋白質，以利未來蛋白晶體結構解析。將菌株在 LB broth 37°C 隔夜培養後，以 1/100 體積重新接種到新的 LB broth，培養至 O.D600 約 0.7，加入 IPTG 使最終濃度為 1mM，開始誘導蛋白表現 3~5 小時。

### (2) 真核系統:

*P. pastoris* 是一種嗜甲基酵母菌(methylotrophic yeast)，可在缺乏抑制性碳源(repressing carbon source)如葡萄糖的情況下 利用甲醇來當碳源，維持其細胞內的正常生理機能。酒精氧化酶(alcohol oxidase)可催化甲醇氧化成甲醛(fomaldehyde)和過氧化氫(hydrogen peroxide)，利用酒精氧化酶 AOX1 啟動子，能使 *Pichia* 大量製造重組蛋白，可占細胞內水溶蛋白的 30%以上[5]。在製造重組蛋白上，本系統有以下四點優點：(1) 基因操作技術類似 *S. cerevisiae*，易於操作。(2)可大量產生胞內或胞外之重組蛋白質。(3)具有糖基化作用及轉譯後修飾作用。(4)容易擴大培養，且不需要昂貴的添加物，節省經費。

參照 EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen Co.) 進行；取單一菌落接種於 100 ml BMGY 培養液，於 30°C 培養至 OD<sub>600</sub> = 2-6 (約 16-18 小時)，以 1500-3000 x g 離心 5 分鐘收集菌體，再將菌體重新懸浮於 10 ml BMMY 培養液，並於 30°C 繼續培養，使開始誘導蛋白質表現，此後，每隔 24 小時追加甲醇，使終濃度為 0.5%，並持續誘導蛋白質表現 3-5 天。

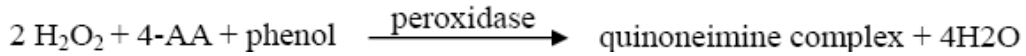
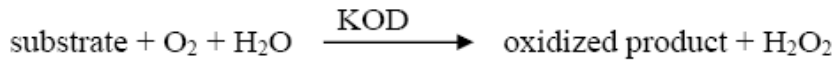
## 8. 西方墨點法(Western Blot)

蛋白質經 SDS-PAGE 分離後，利用 electroblotting 將蛋白質從電泳膠片上轉漬 PVDF 膜上。PVDF 膜事先分別浸泡於甲醇 10 分鐘及轉漬緩衝液(10% methanol, 10 mM CAPS-NaOH, pH 11.0)，以 200~500 mA 進行 1~2 小時的轉印。轉漬後的 PVDF 膜浸於 blocking buffer (5%脫脂奶粉, 1% BSA 溶於 TBS-T 緩衝液)，於室溫反應 1 小時後，改浸於經 blocking buffer 適當稀釋之一級抗體，室溫下反應 1 小時後，以 TBS-T 緩衝液清洗三次，每次 15 分鐘。再將 PVDF 膜浸於經 blocking buffer 適當稀釋之二級抗體，室溫下振盪 1 小時。同樣以 TBS-T 緩衝液進行三次 15 分鐘之清洗，最後以 ECL Western Blotting System 套組進行反應，即可利用感光底片 (Kodak X-ray film) 感光顯影。

## 9. 酵素活性測試(4-Aminoantipyrine 法):

取適當稀釋的蛋白粗萃取液加入基質及呈色劑(1 mM 4-aminoantipyrine, 5 unit/ml peroxidase, 0.04% phenol)，若酵素活性則產物為紅色，可在 500nm

偵測吸光值變化。



#### 四、結果與討論

##### 1. 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 後有二條明顯的 major band，大小約 0.3 與 1.2 Kb，其他雜 band 並不明顯（圖 2a），因此將 PCR 產物直接定序，可多獲得 305 bp 長度的序列，和原本序列做比較後（圖 3a-b），證實原本基因 3' 端序列有誤，而造成蛋白質表現發生 premature 的情況，序列校正後，蛋白質 C 端實際遺漏了 70 個胺基酸，從二級結構的預測發現，此一段 70 a.a. 新序列含有至少 2 個 helix，其中 helix 15 與其他 LAAO 的序列比對顯示具有高度保留性（圖 3c）。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 tpKOD 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 tpKOD 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 2b）選殖 cDNA，比對基因序列，確認 tpKOD 基因無 intron。

##### 2. 基因選殖

在獲得了完整的 tpKOD 序列後，重新設計 C 端 primer (KO-Not-r2, KO-Xba-r2；表二)，將完整含有訊息序列的全長基因與 E8 起始的序列基因，分別選殖於原核表現系統(*E. coli*)以及真核表現系統(*Pichia pastoris*)。由於 tpKOD 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 以及 pPICZ $\zeta$ A 作為載體，分別是 *E. coli* 與 *Pichia pastoris* 的表現載體，二者的 6xHis-tag 皆位於 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。其中 pPICZ $\zeta$ A 載體具有  $\zeta$ -factor 作為訊息序列，可將表現的蛋白分泌於菌體外，對於未來的蛋白純化非常有利。tpKOD 雖不具有典型的訊息序列，但 tpKOD 來自於真菌，為了確認其訊息序列的位置，將 tpKOD 全長序列選殖於 pPICZB 載體中，送進同屬於真菌的 *Pichia pastoris* KM71 中進行表現，以期 *Pichia pastoris* KM71 可辨認其訊息序列，並進一步反應將重組蛋白分泌於菌體外，反之 *Pichia pastoris* KM71 若無法辨識其訊息序列，則蛋白會表現於菌體內，也可比較 2 種不同蛋白質摺疊運送路徑對 tpKOD 蛋白表現的影響。

此實驗以 pET-24d 為載體所選殖出的構築體，分別命名為 24d-preKO 與 24d-KO8；以 pPICZ $\zeta$ A 與 pPICZB 作為載體所選殖出的構築體，則分別命名為 aA-preKO、aA-KO8 與 zB-preKO。將選殖於 pET-24d 的重組基因送進 *E. coli* BL21(DE3) 表現；而選殖於 pPICZ $\zeta$ A 與 pPICZB 的重組基因則送進 *E. coli*

TOP10F'大量複製，再將此質體切成直線後，重新送入 *P. pastoris* KM71 使進行同源重組(homologous recombination)而嵌入宿主染色體，以確保重組基因穩定存在宿主內。

### 3. preKO 與 KO8 重組蛋白之表現

#### (1) 原核系統

先前實驗發現，以 E8 起始的舊序列，雖然缺失一小段 C 端的序列，在原核系統仍可大量表現，因此首先偵測 tpKOD 在原核系統的表現；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 3 到 5 小時的菌液進行分析。利用 SDS-PAGE 與 Western blot 偵測酵素表現情形，同時將原本舊序列的 24d-KO8 構築體(命名為 truncated KO8)，作為蛋白表現的比較組。

取誘發表現 4 小時的 24d-preKO 與 24d-KO8 菌體，從 Western blot 結果發現 24d-preKO 與 24d-KO8 皆有蛋白表現，分子量介於 55kDa 與 72kDa 之間(圖 5)，比 truncated KO8 大，符合預期的分子量，但卻沒有顯示如 truncated KO8 一樣蛋白大量表現(overexpression)；另外以超音波震盪破菌後，取離心後的上清液(粗萃取液)，藉由比較含有 total protein 的菌體與只含可溶性蛋白的粗萃取液，來檢視 24d-preKO 與 24d-KO8 蛋白表現的型態(可溶或不溶)，同時利用 Ni-NTA agarose (Invitrogen)進行親和力純化測試，結果不管在 flowthrough、wash fraction 或 elute fraction 都未偵測到 24d-preKO 與 24d-KO8 的蛋白表現(圖 5a-d)，顯示粗萃取液似乎不含 2 個重組蛋白，換句話說，這 2 個重組蛋白的表現可能是不可溶的蛋白。因此以超音波震盪破菌，取離心後的可溶上清液，並將不溶之沉澱部分(inclusion body)以 8M urea 回溶，比較 2 個 fractions 的蛋白量，發現重組蛋白主要存在於不溶的部分(圖 5e-f)。而活性測試結果皆偵測不到酵素活性，推測正確的蛋白結構摺疊與轉譯後修飾是可能的原因，亦必須進一步實驗的確認。

#### (2) 真核系統

將構築好的 aA-preKO、aA-KO8、zB-preKO 質體切成直線後，利用電壓脈衝轉型法送入 *P. pastoris* KM71，使進行基因重組而嵌入宿主染色體。轉殖菌株以甲醇誘導蛋白表現 3-5 天後，收下菌體與培養液，培養液以蛋白濃縮管濃縮 10 倍，而菌體以 glass bead 破菌後取上清液進行分析，結果顯示，aA-preKO、aA-KO8 無酵素活性，而 SDS-PAGE 與 Western blot 亦偵測不到訊號，顯示蛋白並未成功表現於菌體外。同時亦分析 aA-preKO、aA-KO8 轉殖菌株菌體內酵素活性，發現亦無酵素活性反應，顯示 tpKOD 全長序列接上  $\alpha$ -factor 訊息序列後，不但無法成功表現於菌體外，也阻斷了細胞質的蛋白摺疊系統，因此無法表現可溶性蛋白於菌體內細胞質，推測 tpKOD 的訊息肽會干擾 *P. pastoris* 的蛋白分泌路徑，或 *P. pastoris* 的蛋白分泌路徑系統對 tpKOD 蛋白無法

做有效的蛋白摺疊。

pPICZB的重組基因是以AOX1 為啟動子，但不具有  $\alpha$ -factor的訊息胜肽，除非重組的基因本身帶有 *P. pastoris* 可辨認的訊息胜肽，否則重組蛋白理應表現在菌體內。轉殖菌株以甲醇誘導蛋白表現3-5 天後，收下菌體與培養液，培養液以蛋白濃縮管濃縮10倍，而菌體以glass bead破菌後取上清液進行分析，結果發現zB-preKO轉殖菌株僅在菌體內有偵測到蛋白表現訊號(圖6)，顯示 *P. pastoris* 無法辨識tpKOD可能的訊息胜肽，無法將tpKOD帶往蛋白分泌路徑(secretory pathway)，因此無法分泌於菌體外，但也暗示此真核系統表現tpKOD蛋白的可行性，然表現的蛋白並不具有酵素活性，因此分析其他不同長度之N-truncated tpKOD，來進一步釐清N端序列對表現與酵素活性的必要性。

#### 4. N 端蛋白序列分析與基因選殖

##### (1) KO39

tpKOD在原菌株是屬於分泌型糖蛋白，儘管利用各種預測軟體，結果都顯示無訊息胜肽，然而利用PSIPRED Protein Structure Prediction Server預測蛋白二級結構(圖7)，tpKOD蛋白在N端一開始就有一個頗長的 $\alpha$ -helix，這種情形在一般蛋白中並不尋常，同時比對分析不同分泌型LAAO之N端序列，包括crLAAO、milkLAAO等N端起始序列，也發現皆具有一段約25-35 a.a.不等之 $\alpha$ -helix，且此 $\alpha$ -helix即為其訊息胜肽，因此認為KOD之N端約前40 a.a.的這一個長 $\alpha$ -helix應該屬於訊息胜肽，故選擇選殖Gly 39起始之序列基因。

##### (2) KO50, KO60

在進入保留性高之主要結構架構 $\eta$ 1(V87)前的序列稱為N-extension(附錄2)，根據文獻研究，此段序列與蛋白的生理活性有關；由於crLAAO其N-extension可與helical domain作用，造就蛋白質具有Y型的結構通道，除了胺基酸基質的通道外，分別為 $O_2$ 進入與 $H_2O_2$ 排出的通道，其中 $H_2O_2$ 釋放通道，使 $H_2O_2$ 排出的位置，靠近蛋白糖鍊的區域，而糖鍊是蛋白與細胞結合地方，如此的結構排列，推測可導致 $H_2O_2$ 濃度局部集中於細胞表面，因而促使細胞凋亡作用(apoptotic effect)，故N-extension以及蛋白的糖基化修飾，二者被認為與蛋白的生物毒殺活性有關[6][7]。來自細菌 *Rhodococcus opacus* 的LAAO(roLAAO)因不具有此二種特徵，推測此乃roLAAO不具有生物毒殺活性的原因[8]。而KOD是糖蛋白又具有生物毒殺活性，推測KOD可能也有類似crLAAO的結構(N-extension與helical domain作用)，換言之，N端序列可能會影響蛋白的結構進而影響其活性，因此建構含有正確N端序列之重組蛋白有其必要性。然而N-extension序列保留性並不高，crLAAO其N-extension具有1-2個短小之 $\zeta$ -helix，比較序列空間位置，此短小之 $\zeta$ -helix約相當於KOD 60-70a.a.間，因此建構以Gly 50與Ser 60為起始之序列基因。

##### (3) KO81, KO87

來自細菌 *Rhodococcus opacus* 的LAAO(roLAAO)不具有N-extension序列，也無生物毒殺活性，但仍具有氧化酶活性，顯示N-extension並不影響酵素活性，但在KOD卻無法排除是否會影響蛋白結構而間接影響酵素活性，故建構以Val 87起始之序列基因；又分析crLAAO的結構，發現在進入

主要結構架構 $\eta$ 1 前的胺基酸側鏈，有參與化學鍵的形成，因此亦建構以 Glu 81 起始之序列基因。

在分析了 tpKOD 序列後，重新設計 primers(表二)，將 G39、G50、S60、E81、V87 起始的序列基因，分別選殖於原核表現系統(*E. coli*)以及真核表現系統(*Pichia pastoris*)。此實驗以 pET-24d 為載體所選殖出的構築體，分別命名為 24d-KO39、24d-KO50、24d-KO60、24d-KO81 與 24d-KO87；以 pPICZ $\zeta$ A 作為載體所選殖出的構築體，則分別命名為 aA-KO39、aA-KO50、aA-KO60、aA-KO82 與 aA-KO87 (圖 4)。

## 5. 重組蛋白之表現

### (1) 原核系統 - 24d-KO39、24d-KO50、24d-KO81 與 24d-KO87

取誘發表現 4 小時的菌體，從 Western blot 結果發現 24d-KO87 有蛋白表現，分子量介於 55kDa 與 72kDa 之間(圖 8)，比 C-truncated KO8 大，符合預期的分子量，但卻沒有顯示如 C-truncated KO8 一樣蛋白大量表現 (overexpression)；24d-KO87 誘發表現後，以超音波震盪破菌，取離心後的可溶上清液，並將不溶之沉澱部分(inclusion body)以 8M urea 回溶，比較 2 個 fractions 的蛋白量，發現都可偵測到 KOD 蛋白，但不溶的蛋白量明顯多於可溶的蛋白量。同時利用 Ni-NTA agarose (Invitrogen)進行親和力純化測試，結果發現重組蛋白的結合親和力不佳 (圖 8c-d)，推測可溶性蛋白量太少而影響純化效果。24d-KO39、24d-KO50 與 24d-KO81 轉殖株同樣可表現蛋白，然皆為 inclusion body，活性測試結果皆偵測不到酵素活性，推測正確的蛋白結構摺疊與轉譯後修飾是可能的原因，必須進一步實驗的確認。

### (2) 真核系統- aA-KO39、aA-KO50、aA-KO60、aA-KO82、aA-KO87

利用甲醇誘導蛋白表現 3-5 天後，收下培養液，並以蛋白濃縮管將培養液濃縮 10 倍進行分析。初步結果顯示酵素活性反應相當微弱，而 SDS-PAGE 與 Western blot 偵測不到蛋白訊號(圖 9)，顯示蛋白並未有效表現於菌體外。另外亦分析轉殖菌株菌體內酵素表現與活性，發現亦無明顯酵素活性反應，顯示 tpKOD 序列雖接上  $\alpha$ -factor 訊息序列，不但無法成功表現於菌體外，也阻斷了細胞質的蛋白摺疊系統，因此無法表現於菌體內細胞質，推測 *P. pastoris* 的蛋白分泌路徑系統對 tpKOD 蛋白無法做有效的蛋白摺疊。

## 6. C 端蛋白序列分析

利用 Site-Finding PCR 確認序列 C 端的完整性後，將 E8 起始的序列基因，利用 pET-24d 選殖於原核表現系統(*E. coli*)，初步結果發現 24d-KO8 可在 *E. coli* 表現，但卻遠遠不如 C-truncated KO8 的大量表現，顯示 C 端序列似乎會影響蛋白表現量，因此分析 tpKOD C 端序列，發現除了獲得一段保留性高的  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ 15) (圖 7)外，C 端序列長度比其他 LAAO 長，在  $\alpha$ 15 之後緊接著 2 個  $\zeta$ -helix ( $\alpha$ 16、 $\alpha$ 17)以及 Loop，為了分析  $\alpha$ 15 之後的序列是否會影響蛋白的表現與活性，故選擇以 G50、E81、V87 為起始序列，建構以  $\alpha$ 15 (reverse primer :KO-Not-r3)為終點之重組基因，命名為 24d-KO50/r3、24d-KO81/r3、24d-KO87/r3 以及 aA-KO50/r3、aA-KO82/r3。

## 7. C 端缺失(r3 primer)重組蛋白之表現

取誘發表現 4 小時的菌體，從 SDS-PSGE 結果發現 24d-KO50/r3、24d-KO81/r3 以及 24d-KO87/r3 皆有蛋白表現，分子量介於 55kDa 與 72kDa 之間(圖 10)，符合預期的分子量，且表現量明顯有差異，其中 24d-KO81/r3 的表現量最大(圖 10a)，顯示不管 N 端或 C 端序列似乎都會影響表現量，然取破菌後之上清液分析，發現活性反應相當微弱，進一步分析發現，重組蛋白主要為不溶之 inclusion body (圖 10c)。而 aA-KO50/r3 與 aA-KO82/r3 轉殖株不管是在菌體內或菌體外皆無明顯的可溶性蛋白訊號(圖 11)，取濃縮培養液分析，可偵測到微弱的活性反應。

根據 crLAAO 之異源性表現報導，crLAAO 在 *E. coli* 原核表現系統結果主要都是表現於 inclusion body 內的不可溶蛋白，也不具有酵素活性，然在 *P. pastoris* 真核表現系統，以 pPICZ $\zeta$ A 作為載體，可成功表現重組蛋白於培養液中，但蛋白表現量僅 0.4 mg/L [9]。另外，來自 *Trichoderma harzianum* ETS323 的 LAAO，其序列與 tpKOD 序列相似度高達 99%，thLAAO 以 pET-29a 作為載體，在 *E. coli* BL21 系統可大量表現，雖也是不溶之 inclusion body，但利用 urea 回溶後，再重新 refolding 並以 HisTrap 親和性管柱純化，獲得具有活性的蛋白，蛋白量高達 112 mg/L，但活性相當微弱[10]，分析其所選殖的蛋白序列，發現 N 端是從 helix 2 為起始序列(不含 $\eta$ 1 之前的序列)，而 C 端以 helix 15 為終點之重組基因，顯然蛋白主要結構似乎不完整，因此可能造成蛋白不穩定，然此結果仍可顯示原核系統表現 LAAO 蛋白的可行性。對於蛋白表現不如預期的結果，推測除了可能正確的蛋白結構摺疊與轉譯後修飾的原因外，認為蛋白的毒性可能也是重要因素，若宿主大量表現具有活性的 LAAO，除了耗盡胺基酸原料外，亦會產生大量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，勢必不利宿主的生存，因此可以想像毒性蛋白何以不具活性的不溶蛋白表現，基於此原因，將進一步嘗試可表現毒性蛋白之表現系統來分析 tpKOD。

## 五、參考文獻

1. Olschewski, H., et al., 2000. Screen-printed enzyme sensors for L-lysine determination. *Enzyme Microb. Technol.*, 26: 537-543.
2. Hu, H.M., et al., 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.
3. Harman, G.E., et al., 2004. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2: 43-56.
4. Guihong, T., et al. 2005. SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Research*, Vol. 33, No. 13 e122
5. Cereghino, J.L. and J.M. Cregg, 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 45-66.
6. 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.
7. Ibrahim, M.M., et al., 2006. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. *J. Mol. Biol.*, 364: 991-1002.
8. 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.
9. Kommoju, P.R., et al., 2007. Molecular cloning, expression and purification of



- L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*.  
*Protein Expr. Purif.*, 52:89-95.
10. Cheng, C. H., et al., 2011. Cloning of a novel L-amino acid oxidase from *Trichoderma harzianum* ETS 323 and bioactivity analysis of overexpressed L-amino acid oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 59:9142-9149.

表一、Site-finding PCR primers

Primer	Primer sequence(5' → 3')
SFinder1	CACGACACGCTACTCAACACACCACCTCGCACAGCGTCCTC AAGCGGCCGCNNNNNNGCCT
GSP1	CGCATCGGATCGTTGGTGAAGG
SFP1	CACGACACGCTACTCAACAC
GSP2	GAGCTCGTCGAGCTGATCCTGC
SFP2	ACTCAACACACCACCTCGCACAGC

表二、本實驗中所用到的 primers

Primer	Primer sequence(5'→ 3')
<b>For pET 24d vector</b>	
preKO-Nco-f	ATACTATATTTGCAACC <u>ATG</u> GACAATGTTGACTTTG
KO8-Nco-f	ATGGACAATGTTGACTCC <u>ATG</u> GAATCTGTCCGAACCCGC
KO39-Nco-f	GTGCC <u>ATG</u> GGAATCCCTCCTCCAAACGAAGG
KO50-Nco-f	AGGTCC <u>ATG</u> GGCGGCGGCTACTCTCACGAC
KO60-Nco-f	ACACC <u>ATG</u> GCGTCTGATCCTCTCTATTCC
KO81-Nco-f	GAGCC <u>ATG</u> GAAGTCCGCCTCGAAAGG
KO87-Nco-f	CC <u>ATG</u> GTGTGCATTGTAGGCGCTGGTGTTC
KO-Not-r2	TGCCGTAGTACCTCTT <u>GCGGCCGC</u> GATCTTCACCTGGTACTCC
KO-Not-r3	CAAGGCGGCCGCATCTTGTATTGTACAGGAACTGG
<b>For pPICZ<math>\zeta</math>A vector</b>	
preKO-Eco-f	CCAATACTATATTT <u>GAATTC</u> ATGGACAATGTTGACTTTG
KO8-Eco-f	ATGGACAATGTTGACGAATTCGAATCTGTCCGAACCCGC
KO39-Eco-f	GAGGAATTCGGAATCCCTCCTCCAAACGAAGG
KO50-Eco-f	AGGGAATTCGGCGGCGGCTACTCTCACGAC
KO60-Eco-f	<u>GAATTC</u> TCTGATCCTCTCTATTCCAGC
KO82-Eco-f	<u>GAATTC</u> CCTGCCGCCTGAAAGGTGTGC
KO87-Eco-f	<u>GAATTC</u> GTGTGCATTGTAGGCGCTGGTG
KO-Xba-r2	TGCCGTAGTACCTCTTT <u>TCTAGAT</u> AGATCTTCACCTGGTACTCC
<b>For pPICZB vector</b>	
BKO--Eco-f	<u>GAATTC</u> CAATA <u>ATG</u> TCTAATGTTGACTTTGCTGAATCTGTCC

\* 底線表示 restriction site，方框表示起始密碼子。

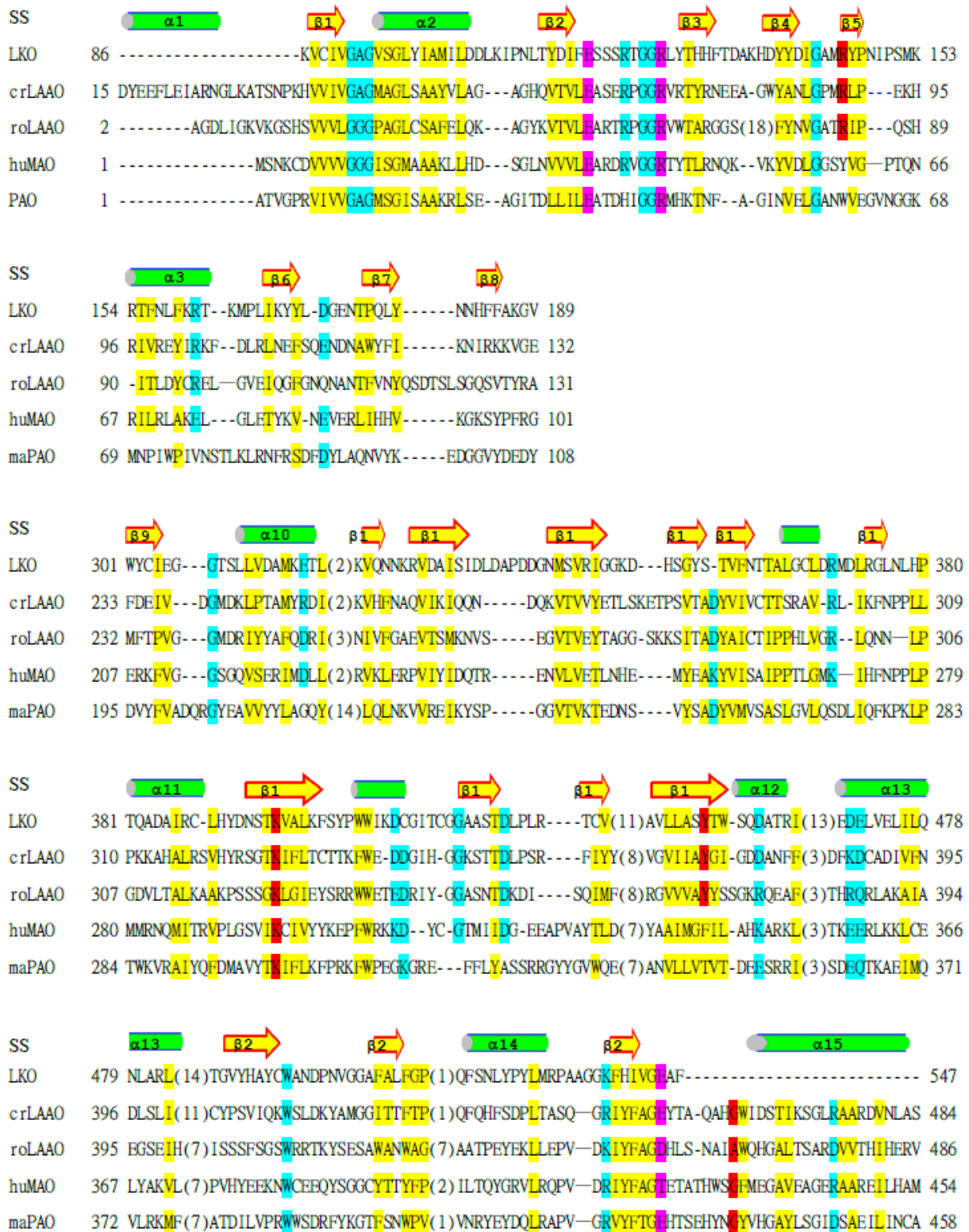


圖 1. 以結構為基礎之 N 端與 C 端序列比對；N 端與 C 端序列主要構成 FAD 結合區和基質結合區，具有較高保留性。序列是分別來自 *C. rhodostoma* (crLAAO；1f8r)與 *R. opacus* (roLAAO；2jb2)之 LAAO，以及人類之 monoamine oxidase (huMAO；2c73)、玉蜀黍 *maize* 之 polyamine oxidase (maPAO；1b37)，以 crLAAO 的二級結構作為圖示(SS)。其中與 FAD 作用之殘基以桃紅色塊標示，與基質作用之殘基以紅色色塊標示，而具有保留性之疏水區以黃色色塊標示，其他保留性高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

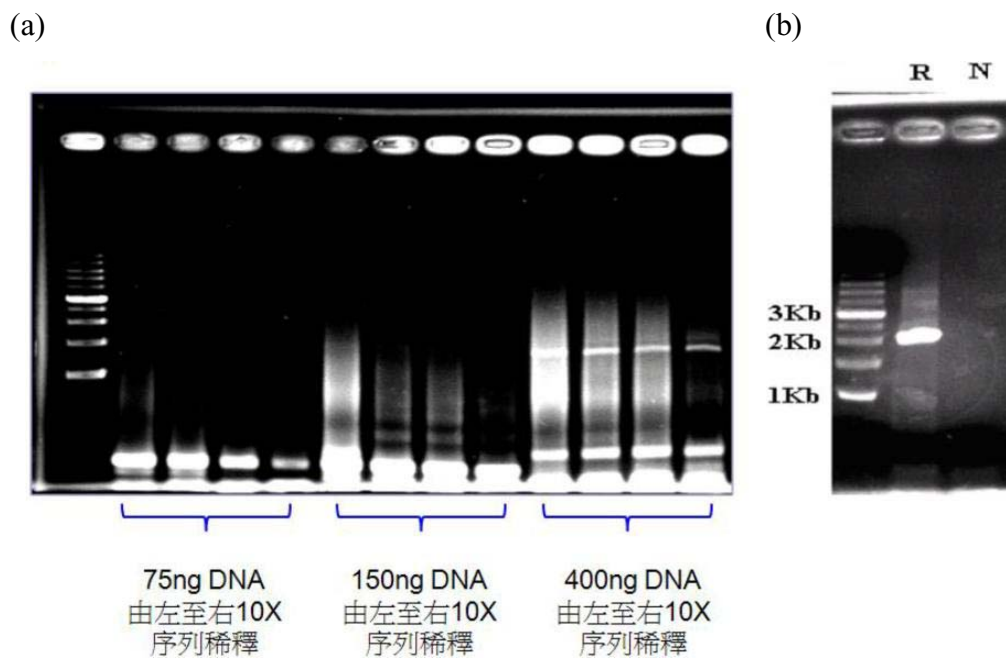


圖2. (a) Site-finding PCR；以不同稀釋倍數之染色體DNA 作為模版進行 site-finding PCR。(b) RT-PCR；以RT 後的cDNA 作為模版進行PCR (R)，未經 RT 的RNA 模板進行PCR 作為negative control (N)。

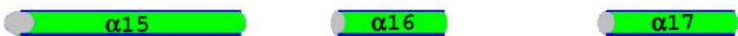
(a)

```
GAAGCTCCACCACAGCCCCCAAGGAGGATGAGCTCGTTCGAGCTGATCCTGCAGAATCTGGCCCCGCTGCACGCTGAGCATATGACCTACGAGAAGATTAAGGAGGCTTACACGGCGTA 1500
E A P P Q P P K E D E L V E L I L Q N L A R L H A E H M T Y E K I K E A Y T G V 500
TATCAGCCTAATGCTGGGCTAATGATCCCAATGTCGGTGGCGCTTTCGCCCTCTTCGGTCCCGGCCAGTTCAGCAATCTGTATCCGTACCTGATGCGGCCAGCAGCGGGCGCAAGTTC 1620
Y H A Y C W A N D P N V G G A F A L F G P G Q F S N L Y P Y L M R P A A G G K F 540
CATATCGTCCGAGAGGCTTCTCTAG 1644
H I V G E A F * 547
```

(b)

```
GAAGCTCCACCACAGCCCCCAAGGAGGATGAGCTCGTTCGAGCTGATCCTGCAGAATCTGGCCCCGCTGCACGCTGAGCATATGACCTACGAGAAGATTAAGGAGGCTTACACGGCGTA 1500
E A P P Q P P K E D E L V E L I L Q N L A R L H A E H M T Y E K I K E A Y T G V 500
TATCAGCCTAATGCTGGGCTAATGATCCCAATGTCGGTGGCGCTTTCGCCCTCTTCGGTCCCGGCCAGTTCAGCAATCTGTATCCGTACCTGATGCGGCCAGCAGCGGGCGCAAGTTC 1620
Y H A Y C W A N D P N V G G A F A L F G P G Q F S N L Y P Y L M R P A A G G K F 540
CATATCGTCCGAGAGGCTCTAGCTGCATCAGCCTGGATCATAGGGCTTTGGAGAGTCTTACACCGCTGTTTACCAGTTCCTGTACAAGTACAAGATGTGGGATTACTTGAGGCTG 1740
H I V G E A S S V H H A W I I G S L E S A Y T A V Y Q F L Y K Y K M W D Y L R L 580
TTGTTGGAGCGCTGGCAGTATGGTCTCCAGGAGTTAGAGACGGGGAAGCACGGTACGGCTCAITTCAGTATTCTGGGTTCACTCCCAAGGAGTACCAGGTGAAGATCTAA 1854
L L E R W Q Y G L Q E L E T G K H G T A H L Q F I L G S L P K E Y Q V K I * 618
AGCGAAAGAGGTACTACGGCATGGAGACGATTTGGGTAGAGATTCTAGTATTCCAGCAGTTTCATGGAAAGTGTGATGTTTGTAGTCCCACTT
```

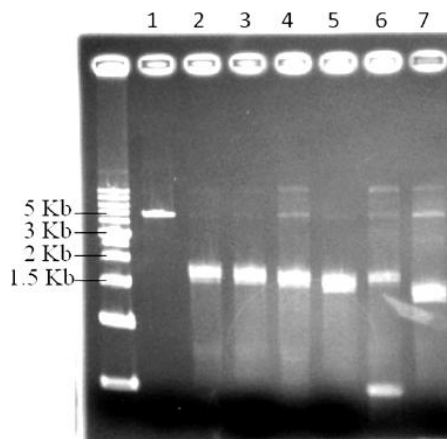
(c)

SS 

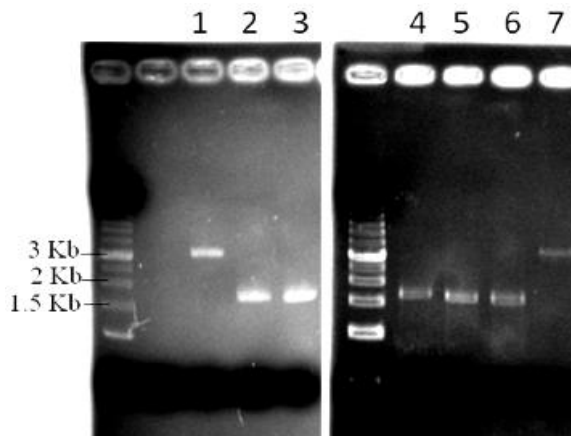
```
tp-KOD 524 VHHAWIIGSLESAYTAVYQFLYKY KMWDYLRLLLERWQYGLQELETGKHGTAHLQFILGSLPKEYQVKI*
crLAAO 460 QAHQWIDSTIKSGLRAARDVNLAS ENPSGIHLSNDNEL
roLAAO 462 NAIWQHGAITSARDVVVTHIHERV AQEA
```

圖 3、KOD 基因 3' 序列完整性之確認；(a) 3' 端舊序列；(b) 3' 端新序列，藍色是利用 site-finding PCR 進行 gene walking 後所獲得的序列，方框指的是序列發生錯誤而造成 premature 的序列，序列校正後，蛋白質 C 端實際遺漏了 70 個胺基酸；(c) C 端蛋白序列之結構序列比對，證實原本舊序列的確缺失了一段重要的  $\zeta$ -helix ( $\zeta$ 15)。

(a)



(b)



(c)

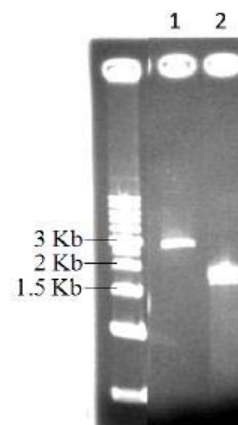


圖 4、選殖基因於 pET 24d (a)、pPICZ $\zeta$ A (b)與 pPICZB (c)。(a)lane 1: digested pET 24d (vector), lane 2: KO39, lane 3: KO50, lane 4: KO60, lane 5: KO81, lane 6: KO8-r3, lane 7: KO87-r3。(b) lane 1 和 lane 7: digested pPICZ $\zeta$ A (vector), lane 2: KO39, lane 3: KO50, lane 4: KO60, lane 5: KO82, lane 6: KO87。(c)lane 1: digested pPICZB (vector), lane 2: preKO。

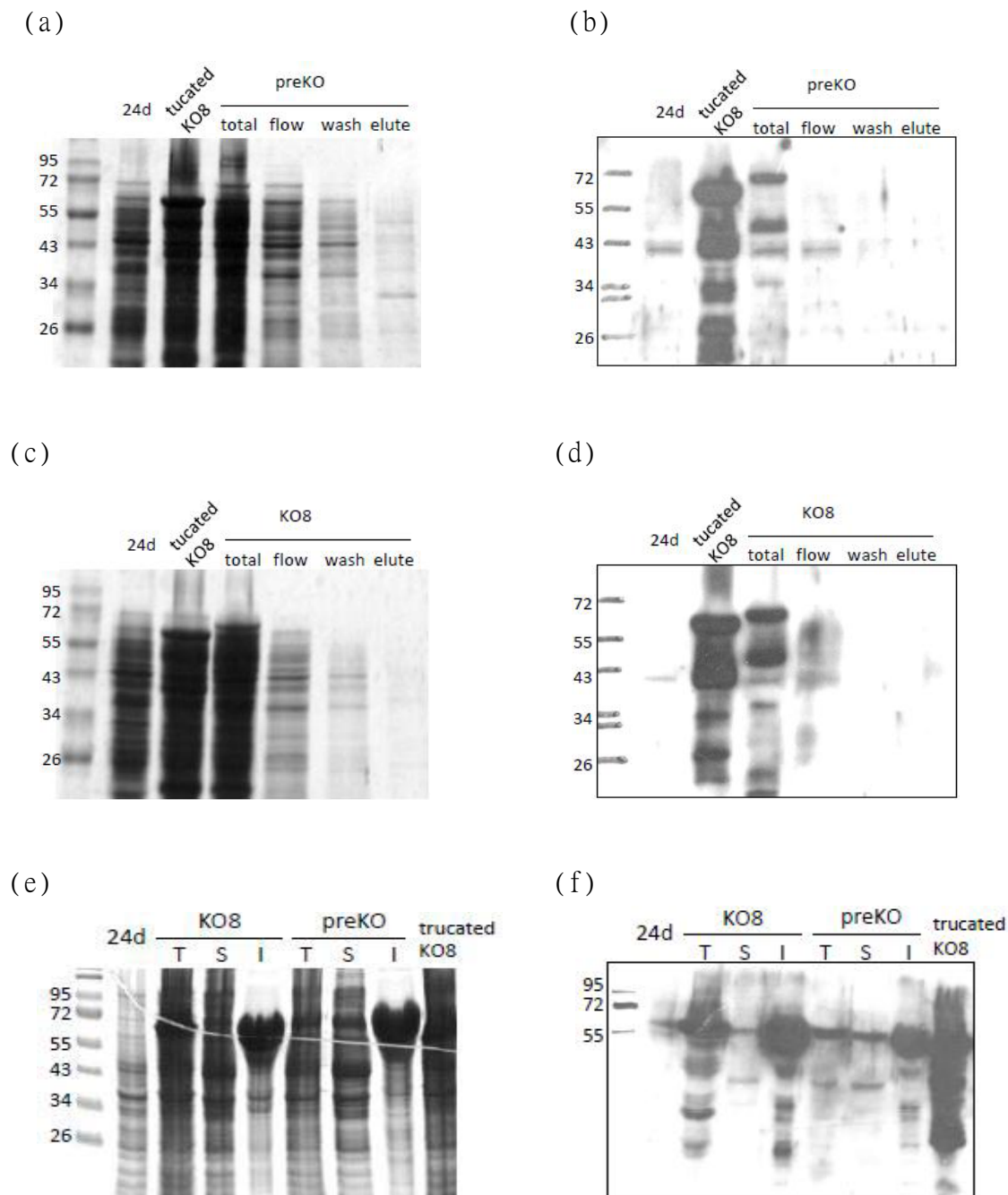


圖 5、24d-preKO 與 24d-KO8 以 IPTG 誘發表現 4 小時後之蛋白表現分析；圖左為 SDS-PAGE 分析，圖右為 Western blot 分析。(a-d) 以 pEt-24d 轉殖株做為 negative control, truncated KO8 為 C 端  $\zeta$ 15 缺失之構築體，作為蛋白表現的比較組。利用 Ni-NTA agarose 進行親和力純化測試，分別取 flowthrough、wash fraction(20mM imidazole)以及 elute fraction(250mM imidazole)分析。(e-f) T: total protein，以超音波震盪破菌，取離心後的可溶上清液(S)，並將不溶之沉澱部分(I)以 8M urea 回溶後分析。



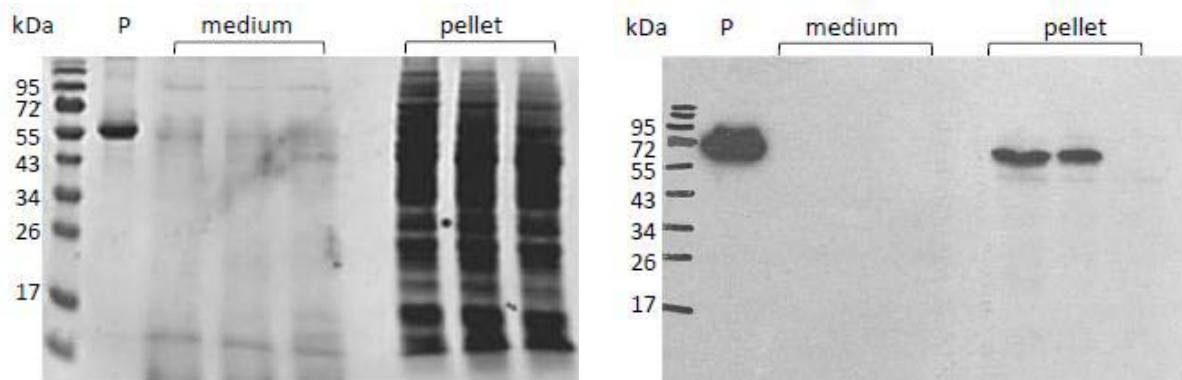


圖 6、zB-preKO 菌株表現分析；菌體誘發表現 4 天後，取濃縮培養液(medium)與菌體破菌後粗萃取液(pellet)分析，圖左為 SDS-PAGE 分析，圖右為 Western blot 分析。P: positive control。



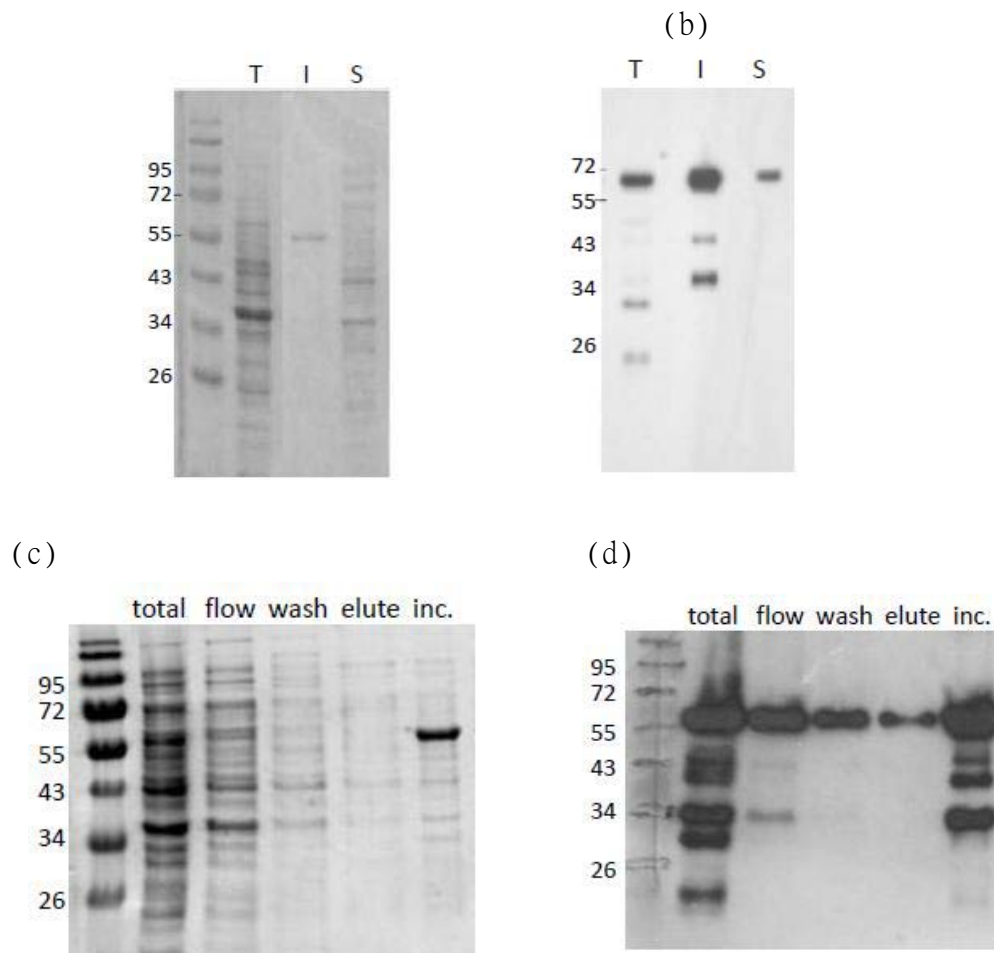
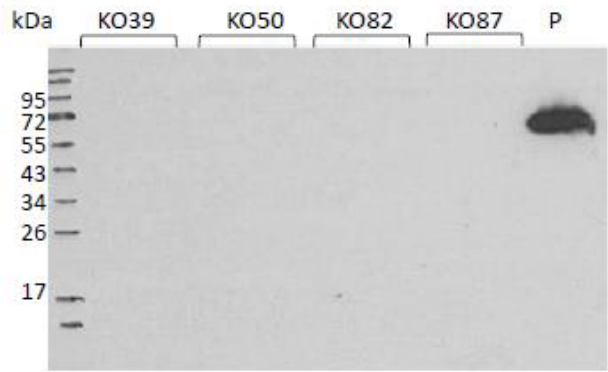
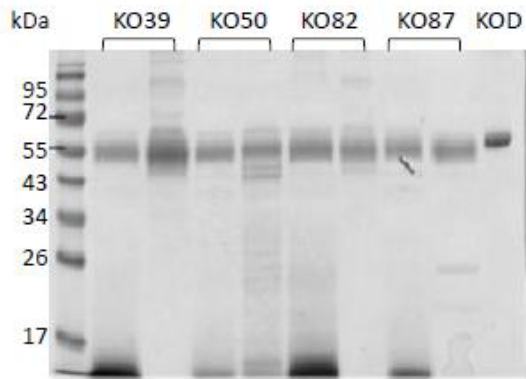
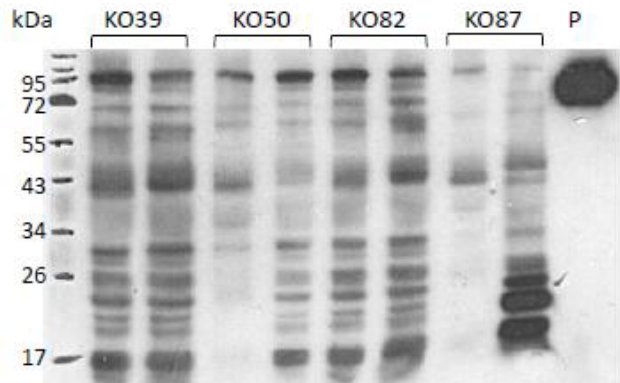
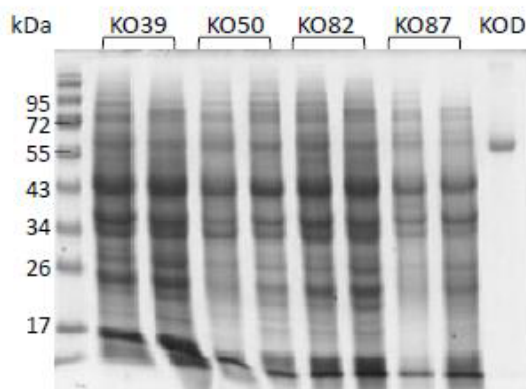


圖 8、24d-KO 87 以 IPTG 誘發表現 4 小時後之蛋白表現分析；圖左為 SDS-PAGE 分析，圖右為 Western blot 分析。(a-b) T: total protein，以超音波震盪破菌，取離心後的可溶上清液(S)，並將不溶之沉澱部分以 8M urea 回溶後(I)分析。(c-d) 利用 Ni-NTA agarose 進行親和力純化測試，分別取 flowthrough、wash fraction(20mM imidazole)以及 elute fraction(250mM imidazole)分析，inc.:不溶之沉澱部分以 8M urea 回溶後分析。

medium



(a) pellet



(c)

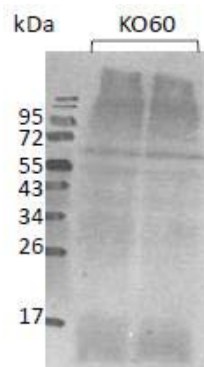
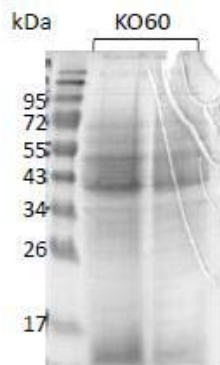
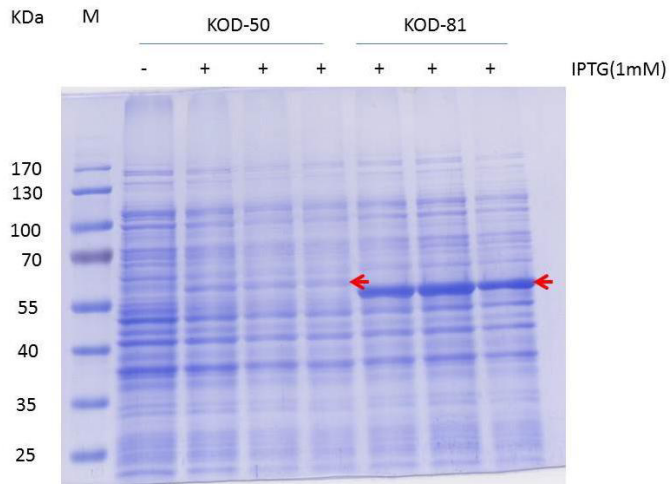
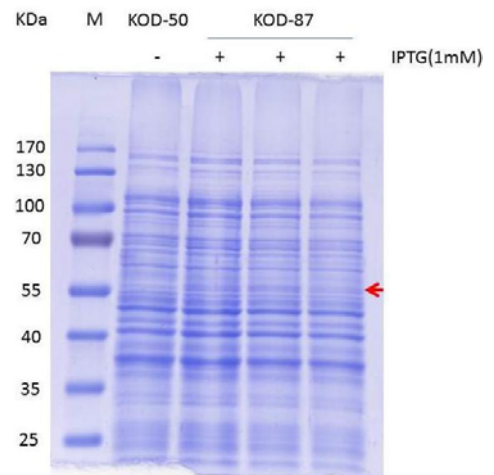


圖 9、aA-KO 菌株表現分析；菌體誘發表現 4 天後，取 10 倍濃縮培養液(a)與菌體破菌後粗萃取液(b)進行分析。圖左為 SDS-PAGE 分析，圖右為 Western blot 分析。KOD 為 native protein 做為電泳時對照，P: positive control。(c) aA-KO60 表現 4 天後，取 10 倍濃縮培養液進行分析。

(a)



(b)



(c)

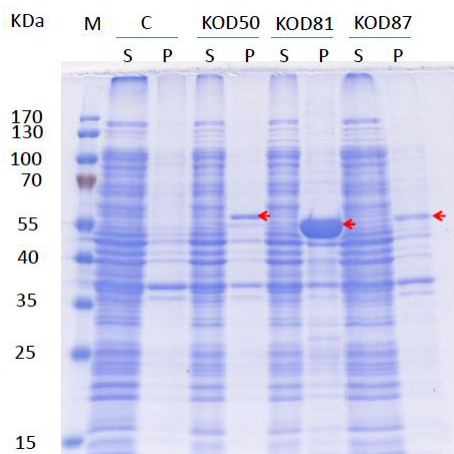
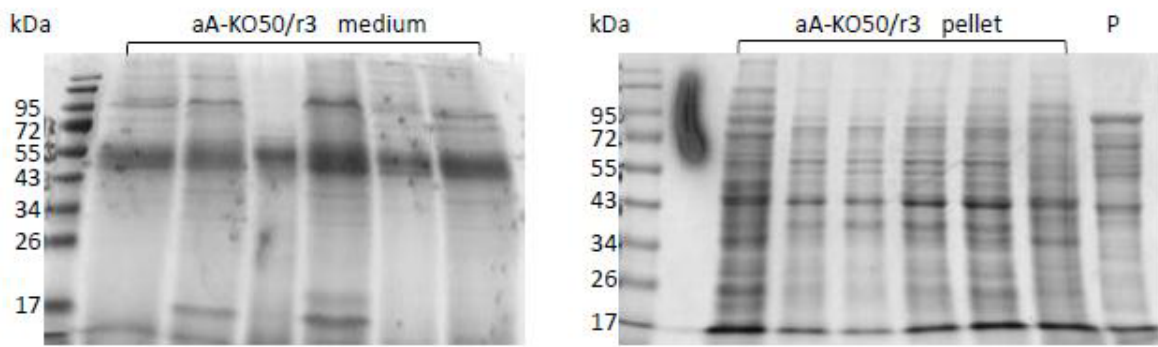


圖 10、24d-KO50/r3, KO81/r3, KO87/r3 以 IPTG 誘發表現 4 小時後之蛋白表現分析。  
(a-b) total protein, (c) S: 破菌後上清液(supernant), P: 破菌後不溶之沉澱部分以 8M urea 回溶後分析(pellet), C: pET-24d 轉殖株做為 negtive control。

(a)



(b)

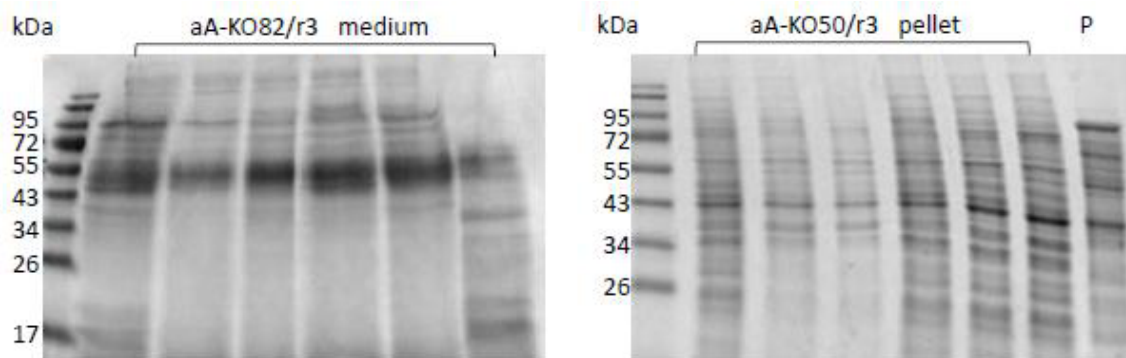
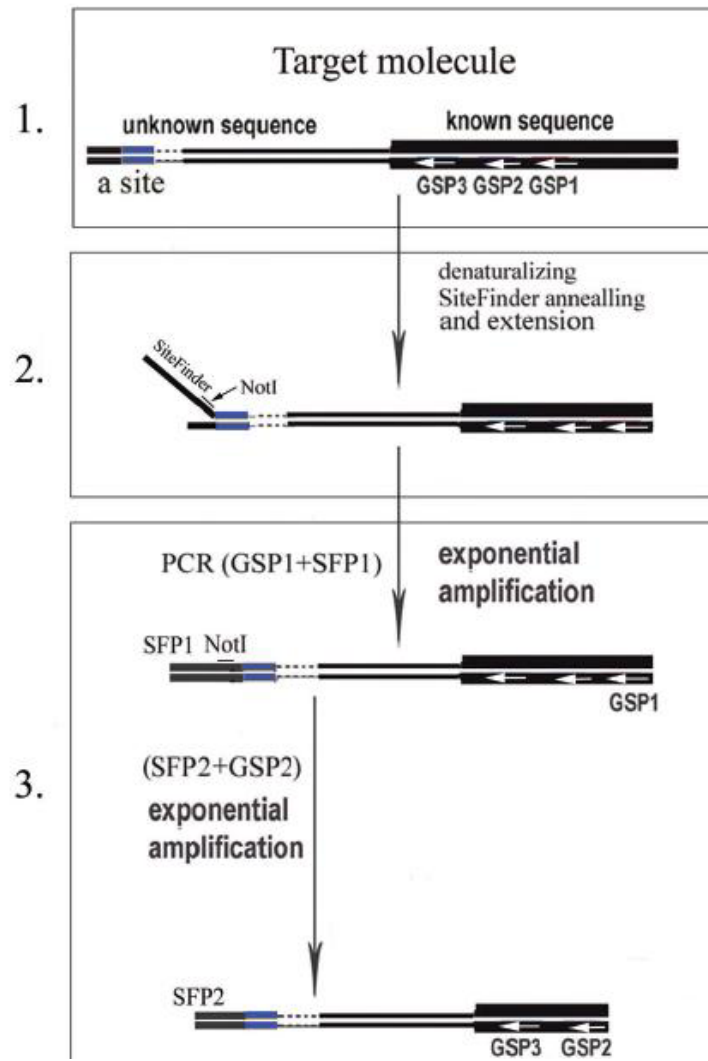
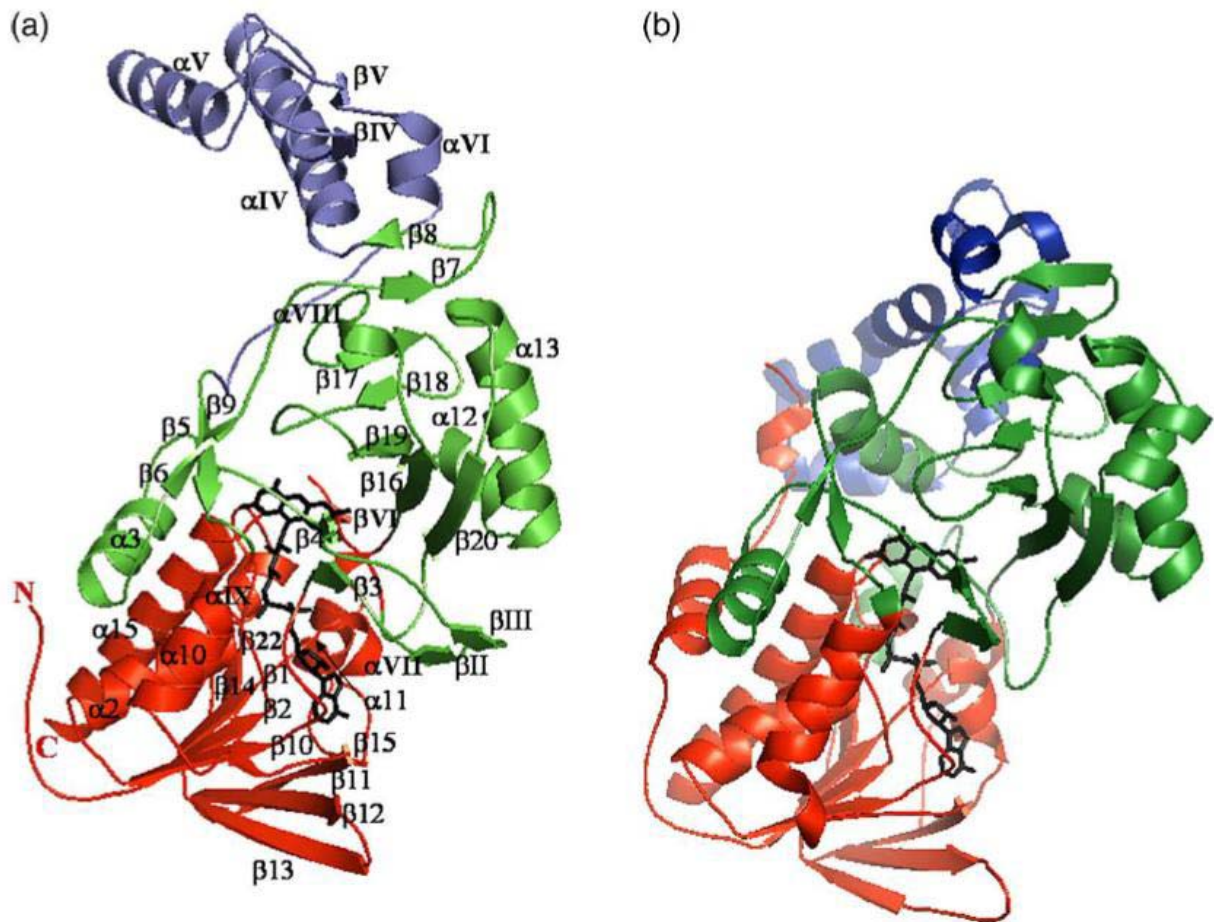


圖 11、aA-KO50/r3 (a)、aA-KO82/r3 (b)誘發表現 4 天後之蛋白表現分析；medium: 濃縮培養液，pellet:菌體粗萃取液，P: positive control of Western blot。



附錄 1、Site-finding PCR 原理[4]。



附錄 2、roLAAO(a)與 crLAAO (b)之蛋白結構，包含 FAD-binding domain(紅色)，用以結合 FAD 輔因子(以黑色 stick model 表示)，substrate-binding domain(綠色)以及 helical domain(藍色)，二個 LAAO 的主要酵素結構具有高度保留性，N 端在進入保留性高之主要結構架構 $\eta 1$  前的序列稱為 N-extension，crLAAO 其 N-extension 可與 helical domain 作用，造就蛋白質具有 Y 型的結構通道，推測 N-extension 以及蛋白的糖基化修飾，二者被認為與蛋白的生物毒殺活性有關，然來自細菌 *Rhodococcus opacus* 的 roLAAO 並不具有 N-extension 序列 [8]。



# 國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/11/12

國科會補助計畫	計畫名稱: L-離胺酸氧化西每之生理活性探討與蛋白結構解析
	計畫主持人: 賴雯玲
	計畫編號: 98-2320-B-040-004-MY3 學門領域: 寄生蟲學、醫事技術及實驗診斷
無研發成果推廣資料	

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：賴雯玲		計畫編號：98-2320-B-040-004-MY3				計畫名稱：L-離胺酸氧化酉每之生理活性探討與蛋白結構解析	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	1	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		章/本
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
----------------------------------------------------------------------------------------	----------

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

## 1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

目前重組蛋白表現雖可大量表現，但主要以 inclusion body 呈現，蛋白不溶的原因是因為蛋白摺疊出錯，或是因為轉譯後修飾(如糖基化)差異，甚至是因為蛋白有毒性所造成，尚待進一步釐清，在無法大量取得可溶性蛋白下，蛋白結晶以及結構解析並無法有效分析。正嘗試以可表現毒性蛋白之表現系統來分析 tpKOD。

## 2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：(以 100 字為限)

## 3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

L-胺基酸氧化酶利用氧化酶的特性，可用來作為各種 L-胺基酸之定量分析，如 L-離胺酸氧化酶可檢測 hyperlysinemia 病患血液中之 L-離胺酸濃度；且在食品及醱酵工業上，L-離胺酸常用於豬飼料的添加，以醱酵生產 L-離胺酸可達 350000 公噸，所以 L-離胺酸之定量分析也是一項重要工作。利用酵素電極或網版印刷電極(screen- printed electrodes)可連續地偵測 L-離胺酸之濃度，可使檢驗成本下降，操作更方便。而基質特異性好的 L-phenylalanine oxidase 可用來檢測 phenylketonuria (PKU) 病人血液及尿液中 phenylalanine 之含量。專一性及穩定性良好的 L-glutamate oxidase 可應用於調味品、醱酵食品中及醬油釀造工業等對 L-glutamate 的含量分析。此外，L-胺基酸氧化酶的抗微生物活性，在環境應用上可做為生物農藥，L-胺基酸氧化酶具有抗菌、毒殺癌細胞、抑制血小板凝集與抗凝血等作用，可進一步開發臨床之應用。此酵素的表現與結構分析等基礎研究，有助於了解蛋白作用機制，並為將來蛋白質改造奠基，開發具有應用價值之蛋白質製劑。