

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

以斑馬魚模式確認新穎的短鏈去氫 $\alpha$ -酮酸之催化特性及  
生理功能

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-040-001-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中山醫學大學營養學系

計畫主持人：劉德中

共同主持人：黃銓珍

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 30 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告  
以斑馬魚模式確認新穎的短鏈去氫酶之催化特性及生理功能

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC 93-2313-B-040-001-

執行期間：93年8月1日至94年7月31日

計畫主持人：劉德中

共同主持人：黃銓珍

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：精簡報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：一年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學營養系

中 華 民 國 九 十 四 年 十 月 三 十 日

# Cloning and Expression a Dimeric Dihydrodiol Dehydrogenase of Human and Zebrafish

## 選殖與表達人類及斑馬魚之雙氫雙羥基去氫酶

摘要：

利用生物資訊資料庫 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 中的搜尋比對工具 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), 搜尋比對到一組相對應的斑馬魚 (編號 BI326319) 與人類 (編號 NM\_014475.2/NP\_055290) 雙氫雙羥基去氫酶。此斑馬魚雙氫雙羥基去氫酶 cDNA 之開放閱讀框架 (Open Reading Frame) 含有 1002 個鹼基對, 可轉譯成 299 個胺基酸, 估計分子量 36.63kDa; 而人類已完全被放大出來, 人類雙氫雙羥基去氫酶 cDNA 之開放閱讀框架含有 1005 個鹼基對, 可轉譯成 334 個胺基酸, 估計分子量 36.74kDa。

藉由 pQE 表達質體系統, 將斑馬魚與人類雙氫雙羥基去氫酶表達與純化出來, 再以 12% SDS-PAGE 分析此重組蛋白質, 結果顯示斑馬魚和人類蛋白質分子量如預期所估計。

此酵素經北方墨點分析(Northern Blotting), 發現在大鼠的腦、心、肺、脾、腎、腸、肌肉、睪丸皆有表現。利用酵素動力學分析 (Enzyme kinetic assay) 測試酵素反應, 結果發現此斑馬魚以  $\text{NAD}^+$  為輔酶, 以 Maltose、D-Glucose、D-Mannose、D-Xylose、D-Fructose、D-Arabinose、D-Ribose 及 D-Galactose 為受質, 其比活性分別為 186、170、146、140、136、54、41 unit/mg。因此, 推斷此酵素可能為新穎之雙氫雙羥基去氫酶。

### Abstract

In this study, the search tool BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), based on NCBI (National Center for Biotechnology Information) was used against nucleotide and protein database. The analysis found a Dimeric Dihydrodiol Dehydrogenase (dimeric DD) of zebrafish (NCBI accession number BI326319) and human (NCBI accession number NM\_014475.2/NP\_055290). The dimeric DD cDNA of zebrafish and human were successfully amplified with a continuous open reading frame of 1002 and 1005 bps encoding a protein of 299 and 334 amino acid with a calculated molecular mass of 36.63 and 36.74kDa respectively.

Zebrafish and human dimeric DD were cloned and expressed with a 6-Histidine tag for specific purification. The purified recombinant protein have mobility of 36.63 kDa and 36.74 kDa on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

Northern Blotting analysis showed that dimeric DD is expressed in the rat tissues,

such as brain, heart, lung, liver, spleen, intestine, kidney, muscle, and testis. Following expression, purification, and the kinetic studies, using Maltose、D-Glucose、D-Mannose、D-Xylose、D-Fructose、D-Arabinose、D-Ribose、D-Galactose and  $\text{NAD}^+$  substrates, the specific activities of  $\text{Ni}^{2+}$  column purified recombinant zebrafish dimeric DD were 186、170、146、140、136、54、41 unit/mg respectively. Therefore, we renamed the enzyme Dimeric Dihydrodiol Dehydrogenase.

Key word: National Center for Biotechnology Information, Dimeric Dihydrodiol Dehydrogenase, initial velocity kinetic study.

#### Introduction :

本計畫是以斑馬魚模式確認新穎的二聚二氫二醇去氫酶(dimeric dihydrodiol dehydrogenase)之催化特性及生理功能，反式-二氫二醇去氫酶 (trans-Dihydrodiol dehydrogenase) (DD, EC 1.3.1.20)是以 $\text{NADP}^+$ 為輔酶將環狀碳氫化合物轉變為兒茶酚(catechol)的去氫酶；此類酵素也可以抑制來自多環的環氧化合物(polycyclic epoxides) 致癌物質 dihydrodiol 的形成 [1,2]；更進一步，此類酵素也參與以兒茶酚的產物氧化的新陳代謝反應中[3,4]。DDs 在哺乳動物的組織中是以多樣化形式存在，可分為兩大類：monomeric 和 dimeric DDs，大部份的酵素來自各種不同的哺乳動物的組織是 monomeric 形式，並且已經被顯示是屬於 $3\alpha$ -、 $17\beta$ - and  $20\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases、aldehyde reductase及(或) aldose reductase[5-10]；也是屬於aldo-keto reductase superfamily。此外，dimeric DDs 是由39 kDa 次單位組成，可以從兔子眼球水晶體[10]、猴子腎[12,13]，豬的肝臟組織[14] 和狗肝臟[15]中分離出來；dimeric DDs 的特性在組織中是相似的，但是不同於 monomeric 酵素，例如：dimeric DDs無法催化hydroxysteroid 而直接與benzene 和 naphthalene 的 (-)-(1R,2R)-trans-dihydrodiols形式的氧化有關，相反地，monomeric 酵素偏好 (-)-(1S,2S) isomers[16]；另外，monomeric 酵素對醛、酮及雙羰基 (dicarbonyl) 化合物有高度還原能力，而 dimeric DDs 功能也相當於羰基還原酶(carbonyl reductase)，所以屬於 short-chain dehydrogenase/reductase family的一員[17]。環狀碳氫化合物 (aromatic hydrocarbons) 和羰基化合物 (carbonyl compounds) 的反式-二氫二醇 (trans-dihydrodiols) 的生物轉化 (biotransformation) 能力與 DD、羰基還原酶 (carbonyl reductase) 及具有兩者酵素活性酶的多樣化形式表現量有關[10]；dimeric酵素在雙羰基 (dicarbonyl) 化合物 (例如3-deoxyglucosone 及 methylglyoxal) 所造成的細胞毒性具有解毒功能[13,14]；也參與由茶引起白內障的生成機制中[3,10] 先前研究認為 DD 或 carbonyl reductase 活性有關的酵素被分類為 aldo-keto reductase 及 short-chain dehydrogenase/reductase家族[18]；但是從兔子眼球水晶體、猴子腎、豬的肝臟組織、狗肝臟和人類小腸[19]中分離出來 dimeric DDs，

發現五者序列並不同於 aldo-keto reductase 和 short-chain dehydrogenase/reductase 家族成員，並且和最近的 DNA 序列資料庫，連同位置指示 mutagenesis 的結果一起比較，顯示了五個 dimeric DDs 和大約 20 種基因產物構成一個新穎的蛋白質的家族；除此之外，發現兔子眼球水晶體、猴子腎、豬的肝臟組織及狗肝臟分離出來 dimeric DDs（人類小腸除外）在各種不同的單糖類為受質時，dimeric DDs 有效率地使 D-木糖（D-Xylose）氧化，這一項研究也顯示 dimeric DDs 是屬於依賴 NADP 型 D-木糖的 dehydrogenase [17]。綜觀上述我們整理 dimeric dihydrodiol dehydrogenase 其受質可能是 dihydrodiol、hydroxysteroid、3 $\alpha$ -或 11 $\beta$ -或 17 $\beta$ -或 20 $\beta$ -hydroxysteroid、monosaccharide、benzene、naphthalene、3-deoxyglucosone 和 methylglyoxal 等物質之衍生物或類似物。因此在本計畫中利用”dimeric dihydrodiol dehydrogenase”關鍵詞在 NCBI（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）的蛋白質資料庫中進行搜尋，找到一個新穎的人類之氧化還原酵素，其編碼為 NP\_055290（一種假設性的 dimeric dihydrodiol dehydrogenase），其序列已確認，但是功能未知，推測其受質與上述物質有關聯性或是其類似物，因為本計畫係以生化及分子生物之方法來探討此酵素在人類生理上可能扮演的角色功能。

為了確認該新穎蛋白質之功能，並探討該功能在生理上所扮演的角色。本計畫的主要目標有二：

第一、分析該酵素催化的反應：為了分析該酵素催化的反應本計畫將包括以下之特定目標：

1. 利用 PCR 得到全長之 cDNA；
2. 利用表現質體表現並純化該酵素；
3. 利用酵素動力學分析該酵素之特性。

第二、觀察此類酵素在生物體之分佈及其效應：為了達成此一目標本計畫將包括以下之特定目標：

1. 利用北方墨點分析標定酵素在生物體之分佈；
2. 利用西方墨點分析標定酵素在細胞之分佈；
3. 利用斑馬魚的胚胎系統進行活體內之功能測試。

經由以上二個目的及其特定目標之研究自可將未知的新穎之酵素其功能作有系統的進行確認。

本計畫的目的是探討哺乳類動物及斑馬魚中未知的、新穎的代謝酵素在生理上所扮演的角色。

實驗方法：

1. 建構新穎酵素表達質體

以下實驗方法參照 J. Sambrook (Sambrook et al., 1989) 等人在“Molecular Cloning: a Laboratory Manual”中所描述之方法進行。

#### (1)全長序列聚合酶連鎖反應

利用基因重組的技術進行以下實驗。首先，設計人類及斑馬魚 5'端 (含內切限制酶位點：BamH I) 及 3'端 (含內切限制酶位點：Hind III) 各兩段引子 (如下)，以聚合酶連鎖反應 (PCR) 放大新穎酵素之全長 cDNA。

##### Zebrafish

Forward: ATA GGATCC ATGGCGCTCAGATGGGGGATA

Reverse: ACA AAGCTT TTGGCTGTCCTGCTGTAGCAC

##### Human

Forward: AAT GGATCC ATGGCGCTGCGCTGGGGGCAT

Reverse: CGG AAGCTT GCGTTTGTCTTGGGGGAAGGT

PCR 產物則由 1% 電泳瓊膠經由電泳分析，並將其切下以 Gel-M Gel Extraction System Kit 純化後，以聯結作用及轉形作用進行篩選，正確篩選後進行核酸序列分析。

#### (2)建構新穎蛋白質表達質體

經由核酸定序確定的質體 DNA 與 QIAexpress system 之 pQE-9 之表達質體，形成此重組蛋白質表達質體，點選單一菌株大量培養後收集沈澱細胞，將其懸浮於冰的 PE 緩衝溶液中，接著以 French Pressure Cells and Press 在 4°C 下高壓破碎細胞後收集上清液，注入預先以 PEN 緩衝溶液平衡之 Ni-NTA 管柱，接著再以二倍管柱體積 PEN 衝溶液清洗管柱，除去非專一性 (non-specific) 結合蛋白質。利用咪唑濃度梯度 (5-170 mM) 將蛋白質溶析出來。將收集純化的蛋白質在透析液 (Dialysis buffer) 4°C 下進行隔夜透析，藉以去除大部分的咪唑。

#### 4. 蛋白質純度測定 (SDS-PAGE)

以 SDS-PAGE 觀察標的蛋白質單體分子量與蛋白質的純度。

#### 5. 酵素動力學分析

酵素反應是以  $\text{NAD}^+$  (或  $\text{NADP}^+$ )、六碳糖 (D-(+)-Glucose、D-(+)-Fructose、

D-(+)-Galactose、D-(+)-Mannose)、五碳醣 (D -(-)- Arabinose、D-(+)-Ribose、D-(+)-Xylose) 及雙糖 (Maltose) 為受質，利用NAD<sup>+</sup>或NADP<sup>+</sup>在波長 340 nm 有最大吸光之特性，進行酵素動力學分析，監測產物NADH (或NADPH) 的生成速率，來測量酵素活性，觀察酵素反應機制、酵素對受質之親和力及代謝迴轉率。單位酵素活性 (U) 之定義是指每毫克蛋白質在每分鐘所產生 (或消失) 的產物 (ex: NADH) 含量 (μmole)。首先將反應中一個NAD<sup>+</sup> (或NADP<sup>+</sup>) 濃度固定，則改變另一受質濃度進行反應，即可得一組 5 個反應速率之數據，再利用五種NAD<sup>+</sup>濃度重複上述步驟，結果可得五組 (5×5=25 個) 數據。在每個反應濃度下分別求得酵素反應初速度，以OD/min之單位代入公式計算，將所得數據以Erithacus Software公司所設計的GraFit (Version 3.0) 軟體進行雙受質酵素分析。推測此新穎酵素之反應有兩個受質，故其反應機制有兩種可能性：

#### 1、乒乓機制

$$V=V_{max}[A][B]/(K_mB[A]+K_mA[B]+[A][B])$$

#### 2、序列機制

$$V=V_{max}[A][B]/(K_{ia} K_mB+K_mB[A]+K_mA[B]+[A][B])$$

經由電腦校正後，即可得酵素反應之初速度 (V<sub>max</sub>；是以OD/min值表示)，及K<sub>m</sub> (單位為mM)，此代表酵素與其受質之結合能力。以初速度經換算可得到K<sub>cat</sub>，即酵素反應之代謝迴轉速率。其換算公式為：

$$V_{max} = OD/6.22 \times 10^{-3} / \text{min/mg/mL} = \mu\text{mole} / \text{min/mg}$$

k<sub>cat</sub>即V<sub>max</sub> /sec/mg =V<sub>max</sub>/60×100000<sup>-5</sup> (單位是 1/sec)。比較蛋白質之酵素反應的各個K<sub>m</sub>及K<sub>cat</sub>後，由此初步確定蛋白質在酵素反應中扮演之角色。

### 6. 北方墨點分析

將組織用不鏽鋼研砵 (液態氮) 研磨成粉末，加入Trizol reagent分離total RNA、RNA定量、轉漬及雜合反應

#### 結果

一.在GeneCards網站資料庫中搜尋人類基因 (NM\_014475.2/

NP\_055290) 的相關資訊，發現此人類蛋白質與斑馬魚 (zebrafish)

、大鼠 (rat) 和果蠅 (fruit fly) 等物種具有同源相似性 (圖一)。而在Blast保留結合結構區 (conserved domain) 搜尋比對功能顯示，斑馬魚及人類dimeric DD蛋白質皆具有相同之結構區，為GFO\_IDH\_MocA (氧化還原酵素族群)(圖二)，以 $\text{NAD}^+$ 或 $\text{NADP}^+$ 作為輔酶。以上結果顯示，此新穎之斑馬魚及其對應之人類酵素的機能，可能是參與醣類有關物質的氧化還原作用之酵素 ( $\text{NAD}^+$ 或 $\text{NADP}^+$ 依賴性)。

## 二、斑馬魚 (Z-dimeric DD) 基因序列之選殖與定序、蛋白質表達質體建構

利用 PCR 放大新穎斑馬魚酵素 Z-dimeric DD 之全長 cDNA，放大產物為 1002 b.p，可轉譯成 299 個胺基酸，經 12%SDS-PAGE 進行純度分析。SDS-PAGE 膠體經染色後可觀察到斑馬魚之標的蛋白質，蛋白質分子量如預期分子量大小分子量估計為 36.630 kDa (圖三)。

## 三、人類 (H-dimeric DD) 基因序列之選殖與定序、蛋白質表達質體之建構

利用 PCR 放大人類酵素 H-dimeric DD 之全長 cDNA，放大產物為 1005 b.p，可轉譯成 334 個胺基酸，經 12%SDS-PAGE 進行純度分析。SDS-PAGE 膠體經染色後可觀察到人類之標的蛋白質，其蛋白質分子量如預期分子量大小分子量估計為 36.74 kDa (圖四)。

## 四、酵素反應分析

依據先前搜尋之資料分析，此酵素反應需輔酶存在，可能為雙受質反應。因此在酵素反應分析時，採用 $\text{NAD}^+$  (或 $\text{NADP}^+$ ) 為反應之第一受質，另一受質則推測為醣類化合物：D-(+)-Glucose、D-(+)-Fructose、D-(+)-Galactose、D-(+)-Mannose、D-(-)-Arabinose、D-(+)-Ribose、D-(+)-Xylose及Maltose。利用 $\text{NAD}^+$  (或 $\text{NADP}^+$ ) 在 340nm之吸光特性，偵測此反應之產物NADH (或NADPH) 生成速率。單位酵素活性 (U) 定義為每毫克蛋白質在每分鐘所產生的NADH (或NADPH) 的微莫耳數的量。而酵素反應是在pH 7.4 的磷酸鹽緩衝溶液 (50mM) 中進行，在測試斑馬魚新穎酵素的結果顯示，D-(+)-Glucose、D-(+)-Fructose、D-(+)-Galactose、D-(+)-Mannose、D-(+)-Arabinose、D-(+)-Ribose、



D-(+)-Xylose及Maltose與 $\text{NAD}^+$ 為正反應受質，在波長 340nm吸光下皆可偵測到NADH生成，而其中以Maltose、D-(+)-Glucose、及D-(+)-Mannose 之NADH偵測值高於其他醣類化合物。而在逆反應的測試下，加入NADPH則不能推動反應。經由波長 340nm吸光所偵測到的吸光值可計算出其酵素反應對醣類化合物之比活性 (S.A) (表一)。

#### 五、Z-dimeric DD 在大鼠之分佈與表現

取大鼠的組織器官：腦、心、肺、肝、脾、腸、腎、睪丸、肌肉，進行西方墨點分析 (Western blotting)，探討生物體中此斑馬魚新穎酵素蛋白質的表現量。分離大鼠各組織之 total RNA，進行北方墨點分析 (Northern blotting)，藉由偵測 RNA 得知其基因， Z-dimeric DD 在腦、心、肺、肝、脾、腸、腎、睪丸、肌肉均有表現 (圖五)。

#### 討論：

本實驗新穎酵素能以醣類為受質，加以分解破壞，雖目前仍未進行產物分析階段；且酵素分析只進行到斑馬魚階段，人類新穎酵素部份並未分析，找出人類 dimeric DD 之催化受質及輔酶時，才能真正確認此酵素的催化特性。但依據上述之推論，此新穎酵素確實有其未知及進一步分析的必要。

Reference:

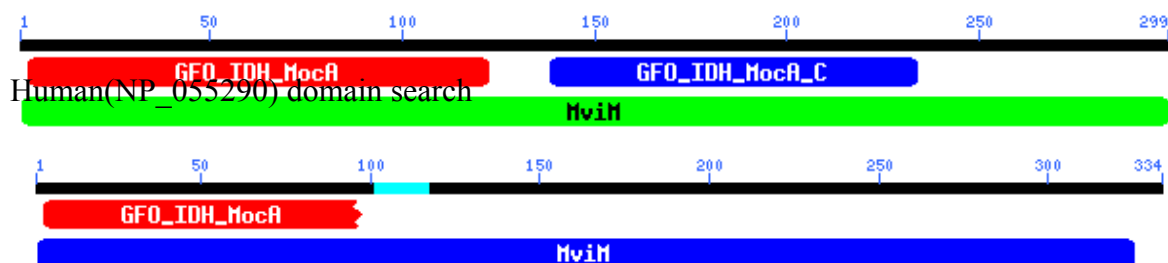
- 1 Oesch, F., Glatt, H. R., Vogel, K., Seidel, A., Petrovic, P. and Platt, K. L. (1984) in *Biochemical Basis of Carcinogenesis* (Greim, H., Jung, R., Kramer, M., Marquardt, H. and Oesch, F., eds.), pp. 23-31, Raven Press, New York
- 2 Smithgall, T. E., Harvey, R. G. and Penning, T. M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 6184-6191
- 3 Van Heyningen, R. and Pirie, A. (1967) *Biochem. J.* 102, 842-852
- 4 Flowers, L., Bleczynski, B., Burczynski, M. E., Harvey, R. G. and Penning, T. M. (1996) *Biochemistry* 35, 13664-13672
- 5 Penning, T. M., Mukharji, I., Barrows, S. and Talalay, P. (1984) *Biochem. J.* 222, 601-611
- 6 Woerner, W. and Oesch, F. (1984) *FEBS Lett.* 170, 263-267
- 7 Hara, A., Hasebe, K., Hayashibara, M., Matsuura, K., Nakayama, T. and Sawada, H. (1986) *Biochem. Pharmacol.* 35, 4005-4012
- 8 Hara, A., Taniguchi, H., Nakayama, T. and Sawada, H. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)* 108, 250-254
- 9 Deyashiki, Y., Oshima, K., Nakanishi, M., Sato, K., Matsuura, K. and Hara, A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 1041-1046
- 10 Hara, A., Nakayama, T., Harada, T., Kanazu, T., Shinoda, M., Deyashiki, Y. and Sawada, H. (1991) *Biochem. J.* 275, 113-119
- 11 Jez, J. M., Bennett, M. J., Schlegel, B. P., Lewis, M. and Penning, T. M. (1997) *Biochem. J.* 326, 625-636
- 12 Hara, A., Mouri, K. and Sawada, H. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 1260-1266
- 13 Sato, K., Inazu, A., Yamaguchi, S., Nakayama, T., Sawada, H. and Hara, A. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 286-294
- 14 Nakayama, T., Sawada, H., Deyashiki, Y., Kanazu, T., Hara, A., Shinoda, M., Matsuura, K., Bunai, Y. and Ohya, I. (1990) in *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 3* (Weiner, H., Wermuth, B. and Crabb, D. W., eds.), pp. 187-196, Plenum Press, New York
- 15 Sato, K., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A., Matsuura, K. and Ohya, I. (1994) *J. Biochem. (Tokyo)* 116, 711-717
- 16 Yamaguchi, S., Inazu, A., Deyashiki, Y., Nakayama, T., Sato, K., Miyabe, Y. and Hara, A. (1994) *J. Biochem. (Tokyo)* 115, 493-496

- 17 Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonza' lez-Duarte, R., Jeffery, J. and Ghosh, D. (1995) *Biochemistry* 34, 6003-6013
- 18 Maser, E. (1995) *Biochem. Pharmacol.* 49, 421-440
- 19 E. Arimitsu, S. Aoki, S. Ishikura, K. Nakanishi, K. Matsuura, A. Hara, Cloning and sequencing of the cDNA species for mammalian dimeric dihydrodiol dehydrogenases, *Biochem. J.* 342 (1999) 721–728.
- 20 Gritsman K, Zhang J, Cheng S, Heckscher E, Talbot WS, Schier AF. (1999) The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. : *Cell* 97,121-32
- 21 Oates,A.C., Bruce , A.E., and Ho R.K.(2000) Too much interference : injection of double –stranded RNA has nonspecific effects in the zebrafish embryo. *Dev Biol.* 224, 20-28.
- 22 Summerton, J. (1999) Morpholino antisense oligomers : the case for an RNase H-independent structural tupe . *Biochim Biophys Acta.* 1489, 141-158.
- 23 Steven A. Farber, Shiu-Ying Ho,and Michael Pack(2001) Genetic analysis of Digestive Physiology Using Fluorescent Phospholipid Reporters. *Science.* 292 :1385-1388

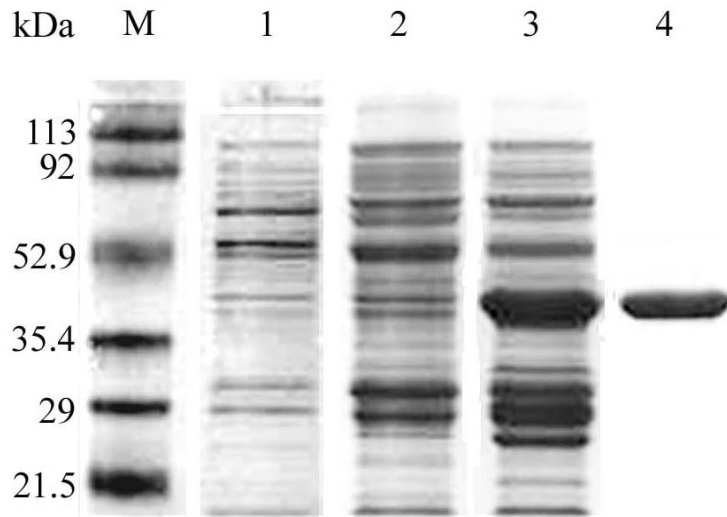


圖一 物種間H-dimeric DD胺基酸序列同元相似性比對

Zebrafish(BI326319) domain search



圖二：Z-dimeric DD及H-dimeric DD之新穎酵素的結合結構區



圖三：新穎Z-dimeric DD純化蛋白質的SDS-PAGE分析。

pQE-9-Z-dimeric DD質體轉形至E.coli M15 strain中，37°C隔夜菌液培養，37°C以IPTG (200μg/mL) 誘發蛋白質表現，經Ni-NTA管柱純化後，以12.5% SDS-PAGE分析。

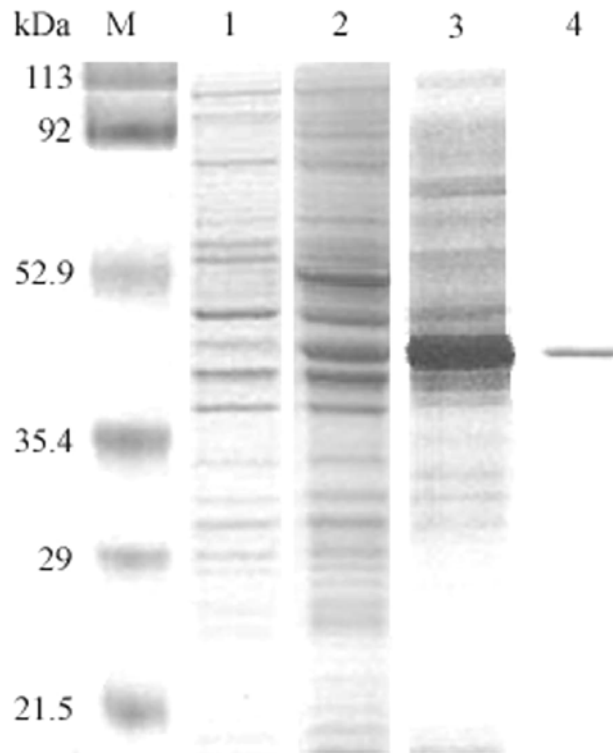
M：SDS-PAGE standard marker

Lane 1：M15strain無轉形pQE-9-Z-dimeric DD質體。

Lane 2：pQE-9-Z-dimeric DD質體轉形至E.coli M15 strain中  
無IPTG誘發。

Lane 3：pQE-9-Z-dimeric DD質體轉形至E.coli M15 strain中，以IPTG誘發。

Lane 4：經Ni-NTA管柱純化之蛋白質，箭號處為標的蛋白質Z-dimeric DD。



圖四 新穎H-dimeric DD純化蛋白質的SDS-PAGE分析。

pQE-9-Z-dimeric DD質體轉形至E.coli M15 strain中，37°C隔夜菌液培養，在37°C以IPTG (200μg/mL) 誘發蛋白質表現，經Ni-NTA管柱純化後，以12.5% SDS-PAGE分析。

M：SDS-PAGE standard marker

Lane 1：M15strain無轉形pQE-9-H-dimeric DD質體。

Lane 2：pQE-9-H-dimeric DD質體轉形至E.coli M15 strain中，無以IPTG誘發。

Lane 3：pQE-9-H-dimeric DD質體轉形至E.coli M15 strain中，以IPTG誘發。

Lane 4：經Ni-NTA管柱純化之蛋白質，箭號處為標的蛋白質H-dimeric DD

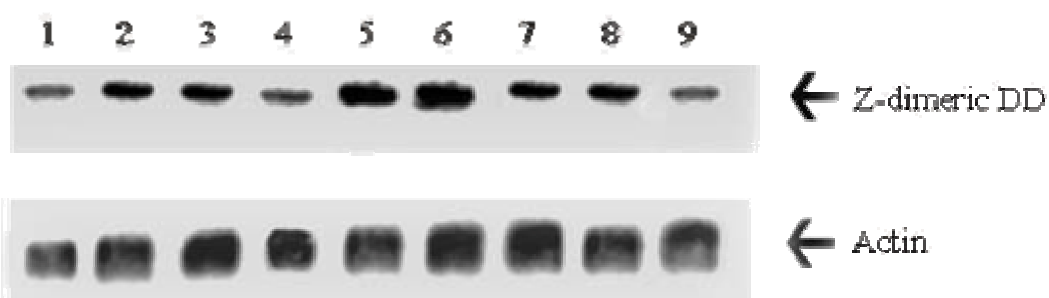
表一： Z-dimeric DD蛋白質純化表

Z-dimeric DD 蛋白質純化表		S.A
Substrate	Substrate	(specific activity; unit/mg)
雙糖	Maltose	186
六碳糖	D-Glucose	170
六碳糖	D-Mannose	146
五碳糖	D-Xylose	140
六碳糖	D-Fructose	136
五碳糖	D-Arabinose	54
五碳糖	D-Ribose	41
六碳糖	D-Galatose	24

Coenzyme:  $\text{NAD}^+$  10mM ; Absorbance: 340nm

Substrate: 10mM

Enzyme: 100ng/ml



圖五：Z-dimeric DD北方墨點分析 (Northern blotting)

分別取大鼠的腦、心、肺、肝、脾、腎、腸、睪丸、肌肉組織的蛋白質與RNA來作分析，Lane 1~ Lane 9分別為腦、心、肺、肝、脾、腎、腸、肌肉、睪丸。