

# 2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	060005
參展科別	植物學
作品名稱	纖維素內切酶 GsCelA 自我斷裂之探討
得獎獎項	三等獎

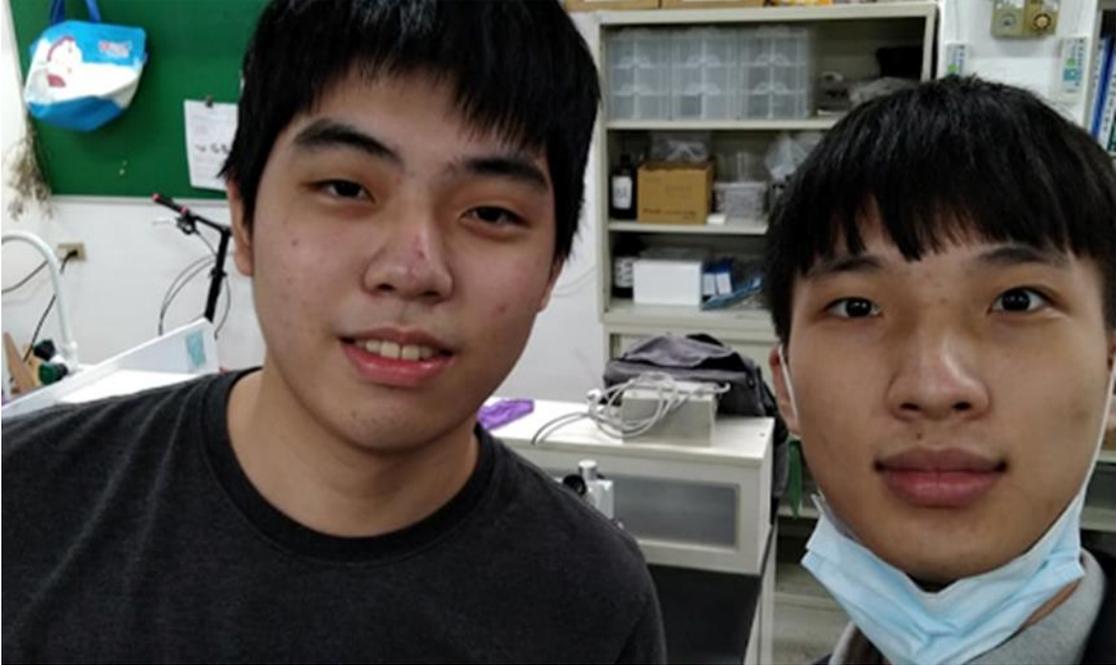
就讀學校 國立臺灣師範大學附屬高級中學

指導教師 賀端華、蘇雨菁

作者姓名 張宜慶、林宗毅

關鍵詞 纖維素內切酶、蛋白質修飾、自我斷裂

## 作者簡介



我們是來自師大附中科學班的雙人組合林宗毅和張宜慶，主要的研究領域為纖維素酶的活性分析及改良，並探索纖維素酶應用於生質能源製造的各樣可能性。我們的精神領袖是附中科學班的陳昭錦主任，因為他具有神通廣大的影響力及籠絡人心的領袖魅力。我們希望能透過我們的研究結果，彰揚我們偉大領袖的魅力及精神，並貫徹領袖一生堅持的科學價值。

## 摘要

生質能源製程中，常將植物細胞壁中的纖維素進行水解，此反應在高溫環境中進行較具商業優勢，故開發耐高溫的纖維素酶具重要性。發現嗜熱菌 *Geobacillus* sp. 70PC53 的纖維素內切酶 GsCelA 在高溫中具高活性。初步研究發現 GsCelA 蛋白質序列 N 端後第 315 和第 316 個胺基酸間會發生自我斷裂現象，導致酵素活性及熱穩定性提升。本實驗在 GsCelA 的 N 端及 C 端分別製造定點突變，探討 GsCelA 自我斷裂性質。實驗結果顯示突變 GsCelA 自我斷裂速率較低，而 EDTA 可抑制自我斷裂現象；已斷裂 GsCelA 可催化自我斷裂發生，而 N 端突變之已斷裂 GsCelA 不具此性質。整體實驗結果顯示 GsCelA 自我斷裂受已斷裂 GsCelA 催化且為一正回饋機制，並且本次的 N 端突變區段在催化 GsCelA 自我斷裂作用是必要的。

## Abstract

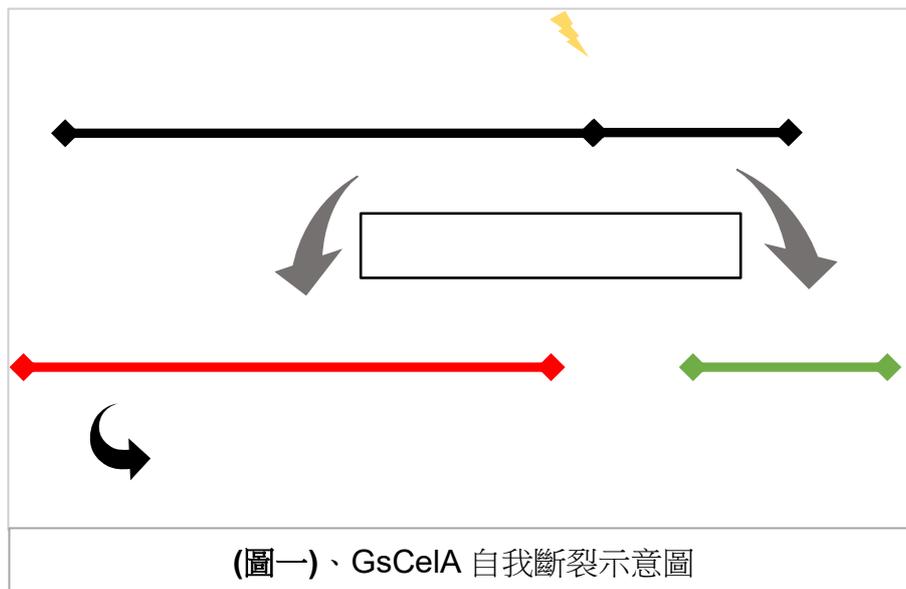
Hydrolyzation of cellulose is a common procedure in producing biofuel. The development of thermostable cellulase is vital to increase the efficiency of the biodegradation process. GsCelA is a thermostable endo-glucanase isolated from thermophilic *Geobacillus* sp. 70PC53. The self-truncation of GsCelA, in which the peptide bond between the 315th and 316th amino acid was broken spontaneously, increases its endo-glucanase activity and thermostability. To explore the mechanism of GsCelA's self-truncation, site-directed mutagenesis on C-terminal or N-terminal was conducted. The truncation rate of mutated GsCelA is lower and truncated GsCelA can accelerate the truncation rate of full-length GsCelA. Ethylenediaminetetraacetic acid inhibits both of the reactions mentioned above. Moreover, truncated GsCelA with N-terminal mutation does not sustain the acceleration effect while truncated GsCelA with C-terminal mutation does. In conclusion, truncated GsCelA can accelerate the self-truncation of full-length GsCelA and the reaction is a positive feedback loop. The N-terminal of GsCelA is necessary to the occurrence of self-truncation.

## 壹、研究動機

近年來能源需求不斷增加，使用生質能源是替代化石燃料的重要方法之一。在植物材料中常含有大量纖維素（cellulose），為極具潛力之再生能源原料，而纖維素酶（cellulase）為一種可催化纖維素單體間  $\beta$ -1,4-glycosidic linkage 水解反應之酵素，如何高效能地利用此酵素分解纖維素，並進一步轉變為可利用之能量來源（如：乙醇等），為一重要研究領域。將纖維素完全水解為單體葡萄糖，需要以下三種纖維素酶：纖維素內切酶（endoglucanase）、纖維素外切酶（exocellobiohydrolase）及葡萄糖苷酶（glucosidase）(Saranraj P, 2012)。具高熱穩定性的纖維素酶，因有縮短反應時間、減少汙染風險、降低材料加熱預處理降溫成本等優勢，在商業使用上競爭性高（Chang CJ, 2016）。開發具高熱穩定性的纖維素酶，可大幅改善生質能源製造過程，並降低其製造成本。*Geobacillus sp. 70PC53 Cellulase A*（GsCelA）為一種具高熱穩定性的纖維素內切酶，而我們以此為我們的研究起點。

GsCelA 分離自嗜熱性枯草芽孢桿菌 *Geobacillus sp. 70PC53*，由 368 個胺基酸所組成。利用 *E. coli* 表現的重組 GsCelA 在 65°C、pH5.0 下具最佳纖維素內切酶活性，其活性較現行商業使用之 *Trichoderma reesei* 纖維素內切酶高出十倍。在 65°C 處理 6 小時後，GsCelA 仍可保有 90% 的酵素活性（Ng IS, 2009）。GsCelA 在活性及熱穩定性上皆具極高之商業潛力。

實驗室初步測試發現 **GsCelA** 在序列第 315~316 個胺基酸之間，會自發地發生斷裂，導致其纖維素內切酶活性及熱穩定性提升，此過程被稱作「自我斷裂(self-truncation)」(圖一)。目前 **GsCelA** 自我斷裂之過程及機制尚未被詳細研究，於是我們開始了本次研究，希望可以了解影響 **GsCelA** 自我斷裂之因素，並透過於 **GsCelA** 之胺基酸序列上製造定點突變，了解其胺基酸序列與自我斷裂之相關性，更進一步了解自我斷裂之過程及機制。期待該酵素自我斷裂機制與自我斷裂後活性及熱穩定性提升之關係，可應用於改良現今商業使用之纖維素內切酶，提高其熱穩定性及活性等應用價值。



## 貳、研究目的

- 一、探討 N 端及 C 端定點突變對 **GsCelA** 自我斷裂性質有何影響。
- 二、探討各突變的已斷裂 **GsCelA** 對 **GsCelA** 自我斷裂有何影響。
- 三、探討 **GsCelA** 自我斷裂是否受蛋白質活性抑制劑影響。

## 參、研究設備及器材

### 一、實驗生物材料

本實驗將正常及突變後之 GsCelA 基因，轉殖入 *E. coli*，取得了 WT、NT、CT 三株相異的突變株，以表現帶定點突變之 GsCelA(表一)。

(表一)、含正常及突變 GsCelA 基因之 *E. coli* 突變株資訊表

GsCelA	質體	菌株	突變之胺基酸序列	
Wild type (WT)	pET20b(+)	Rosetta		
N-Terminal Mutation(NT)		BL21		
			突變後	0' – MAATPVAANGALAVV – 15'
C-Terminal Mutation(CT)		BL21	原序列	315' – KGAANPHQRNGNDSSGGKTGHAS – 338'
			突變後	315' – KGAAAPHQAAGAASSGGATGAAS – 338'

### 二、實驗器材

#### (一) 纖維素內切酶活性測試

##### 1. DNS 試劑：

藥品	添加量
3,5-二硝基水楊酸 (3,5-dinitrosalicylic acid)	10.6 g
氫氧化鈉	19.8 g
去離子水	1416 mL
上述藥品溶解後加入以下藥品	
酒石酸鉀鈉	306 g
焦亞硫酸鈉	8.3 g

##### 2. 實驗中使用 2% 羧甲基纖維素 (carboxymethyl cellulose, CMC) 溶液：

將 4.8g 的 CMC 以 50mM 的醋酸鈉溶液加至總體積為 1L。

##### 3. 20mM、pH7.0 磷酸鈉緩衝液：

將 1M 磷酸二氫鈉溶液加入 500mL 1M 磷酸氫二鈉溶液直到 pH=7.0，將上述混和液稀釋 50 倍。

4. 實驗中使用 0.8M 葡萄糖水溶液

## (二) 蛋白質分子量分析

1. 實驗中使用 5x SDS-PAGE loading buffer :

藥品	添加量
十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate, SDS)	10 g
甘油	50 g
2-巰基乙醇 (2-mercaptoethanol)	5 g
溴瑞香草藍 (bromothymol blue)	0.05 g
0.5M, pH8 Tris-HCl buffer	34.95 g

2. destaining solution :

為 40% 甲醇、7% 醋酸水溶液。

3. coomassie blue R-250 染劑 :

將 0.5g 的考馬斯亮藍 (coomassie brilliant blue R-250) 以 1L destaining solution 溶解而成。

## (三) 蛋白質濃度測定

1. 實驗中使用 2mg/mL 白蛋白 (albumin) 溶液

2. Bradford 試劑 :

將 5x bio-rad protein assay (廠牌: Bio-Rad) 以去離子水稀釋五倍而成。

## (四) 重組蛋白表現及破菌

1. LB 培養基 :

藥品	添加量
胰化蛋白 (tryptone)	10 g
酵母萃取物 (yeast extract)	5 g
氯化鈉	10 g
蒸餾水	1L

2. 實驗中使用 1M 異丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 水溶液

3. 高壓細胞破碎機 (廠牌: Constant Systems Limited) (圖一)

4. 濾膜（廠牌：Supor PES Membrane Disc Filters、孔徑：0.45 $\mu$ m）

5. A1 buffer：

藥品	添加量
20mM、pH7.0 磷酸鈉緩衝液	1 L
氯化鈉	29.22 g
咪唑（imidazole）	1.4 g

### (五) 蛋白質純化與透析

1. FPLC 純化系統（廠牌／型號：GE ÄKTA Pure 25）（圖二）

2. 層析管柱（型號／規格：HisTrap HP 1mL）

3. A1 buffer

4. B1 buffer：

藥品	添加量
20mM、pH7.0 磷酸鈉緩衝液	1 L
氯化鈉	29.22 g
咪唑（Imidazole）	34 g

5. 20mM、pH7.0 磷酸鈉緩衝液

6. 半透膜（型號：SnakeSkin Dialysis Tubing）

7. 96 孔 fraction collector

8. 蛋白質濃縮管（型號／規格：Vivaspin Turbo 4, 10kDa）

9. 濾膜（廠牌：Supor PES Membrane Disc Filters、孔徑：0.45 $\mu$ m）



(圖二)、高壓細胞破碎機



(圖三)、GE ÄKTA Pure 25 FPLC 純化系統

## (六) GsCelA 自我斷裂實驗

1. 實驗中使用 20mM、pH7.0 磷酸鈉緩衝液
2. GsCelA(L1)：已發生自我斷裂的 Wild Type GsCelA
3. GsCelA(L2)：已發生自我斷裂的 NT-mutation GsCelA
4. GsCelA(L3)：已發生自我斷裂的 CT-mutation GsCelA
5. 0.5M 乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)

## 肆、研究過程及方法

### 一、實驗流程：

本實驗利用 *E. coli* 表現突變重組蛋白，培養之轉殖株經破菌、純化、定性分析、透析及濃縮後，即可用於測試 GsCelA 自我斷裂性質(圖四)。

### 二、實驗方法：



(圖四)、GsCelA 樣本表現流程圖。

#### (一) 纖維素酶活性測試：

我們利用 DNS 法測定纖維素內切酶活性。以 DNS 試劑中的 3,5-二硝基水楊酸 (3,5-dinitrosalicylic acid) 可與還原糖共同加熱後產生紅棕色還原物之特性，來測定單位時間內纖維素內切酶催化產生之還原糖數量(Rahman, 2018)。我們將 10 $\mu$ L 的纖維素酶樣本，以 90 $\mu$ L 的 20mM、pH7.0 的磷酸鈉緩衝液稀釋，並以 100 $\mu$ L、2%CMC 溶液作為受質，於 50 $^{\circ}$ C 下反應 30 分鐘。加入 600 $\mu$ L 的 DNS 試劑終止酵素反應，並於 100 $^{\circ}$ C 下加熱 10 分鐘，同時以 200 $\mu$ L 的 0.8、0.6、0.4、0.2 及 0 M 的葡萄糖溶液作相同處理，作為標準液。將各樣本取出 200 $\mu$ L，加至 96 孔盤，測定其於 540nm 下之吸光值，繪製標準曲線後以線性內插法求取單位時間內待測酵素催化產生之還原糖數量，用以定量分析其纖維素內切酶活性。

#### (二) 蛋白質分子量分析：

我們利用 SDS-PAGE 來分析蛋白質分子量，用以評估 GsCelA 自我斷裂之發

生情形。本實驗將等體積待測樣本，加入其體積五分之一倍的 5x SDS-PAGE loading buffer，在 100°C 下反應 5 分鐘。視樣本移動速度，以 120V，電泳 70~90 分鐘，並以 coomassie blue R-250 染劑染色。因全長的 GsCelA 分子量約為 41kDa，已斷裂 GsCelA 分子量約為 35kDa，故判斷 GsCelA 斷裂情形之方法為觀察電泳結果上 40 及 35kDa 的位置之蛋白質訊號，若 35kDa 處有條帶，則判定自我斷裂發生，並透過條帶深淺變化觀察自我斷裂速率。

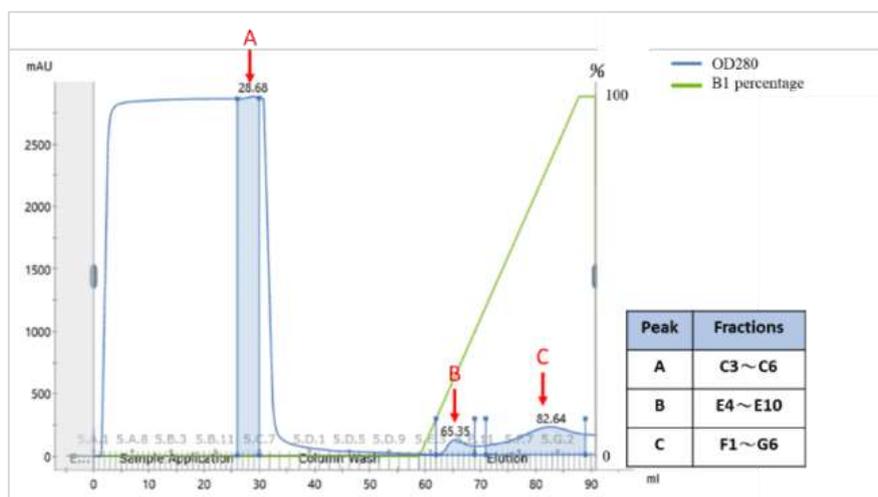
### (三) 蛋白質濃度測定：

我們利用 Bradford 法測定樣本中蛋白質濃度。首先配置 2、1、0.5、0.25、0 mg/mL 之 albumin 作為標準溶液。分別將 5 $\mu$ L 之蛋白質樣本與 200 $\mu$ L Bradford 試劑於 96 孔盤中均勻混合，並在 595nm 下測定各樣本吸光值，繪製標準曲線後，以線性內插法計算待測樣本的蛋白質濃度。

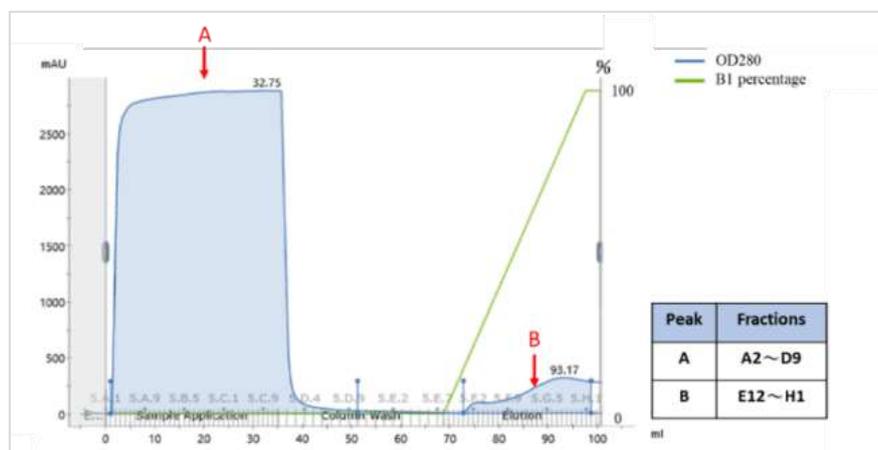
### (四) 重組 GsCelA 表現及純化：

為了大量表現重組 GsCelA，我們將各 *E. coli* 轉植株，分別於 20mL 之 LB 培養基中以 37°C 培養 24 小時，並以 200mL 之 LB 培養基稀釋上述培養完成之菌液，於 37°C 下繼續培養，每隔 20 分鐘量測一次菌液於 600nm 下之吸光值。當 OD600 介於 0.3~0.4 間時，加入 IPTG 誘導重組 GsCelA 表現（作用濃度：50mM）。在 17°C 下培養 24 小時後，在 4°C 下以 4000 rpm（Hermle, O.Z233M-2）離心 25 分鐘，拋棄上清液，並將沉澱之菌體加入約 500 mL 的 A1 buffer 混勻。以高壓細胞破碎機破碎上述菌體，並將破碎後之菌液以孔徑 0.45 $\mu$ m 濾膜過濾後，即可進行純化之流程。本實驗採用 Fast protein liquid chromatography (FPLC) 純化過濾後之菌液。其中，我們使用了組胺酸標籤 (his-tag) 重組蛋白純化系統，選用 k5 作為純化儀器，以 HisTrap HP 1mL 作為層析管柱。在使用前，A1、B1 buffer 皆由孔徑 0.45 $\mu$ m 的 Supor PES Membrane Disc Filters 過濾後，以超音波震盪清洗器處理 30 分鐘。純化流程共有三階段：sample application、wash 及 elution。在 sample application 中，過濾後之菌液被注入並流經層析管柱，此過程中含有 His-tag 的 GsCelA 將與

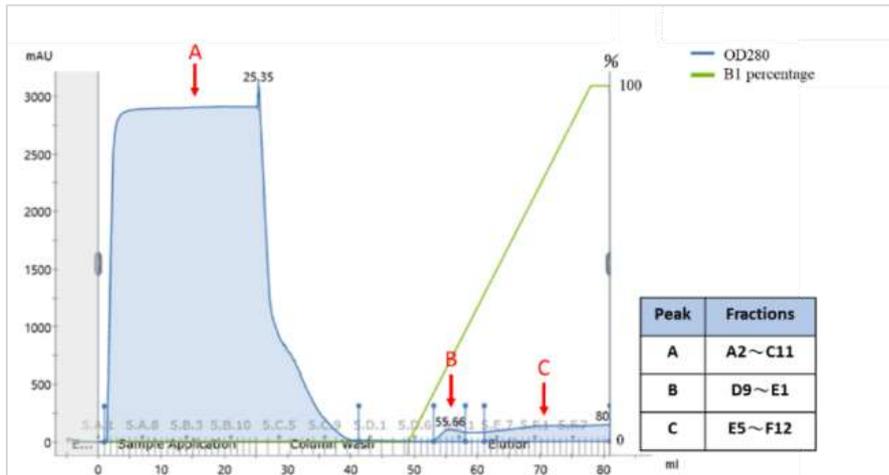
管柱中之親和性物質互相吸引。當所有菌液皆流經管柱後，即進入 wash 階段，將 30mL 的 A1 buffer 注入管柱以進一步將其餘雜蛋白沖離管柱。在 elution 階段中，利用不同比例混合之 A1 buffer 及 B1 buffer，以線性遞增之 imidazole 濃度梯度，將 GsCelA 沖離管柱，並收集於 96 孔 fraction collector 中 (1mL/fraction)，共收集 30 個 fractions。在純化期間，ÄKTA Pure 25 將量測所有流經層析管柱之液體於 260nm 下之吸光值，繪製已流經層析管柱之液體體積及其吸光值之關係圖，並自動計算圖中吸收峰值之區段。本次實驗重複了兩次純化，取得兩批 WT、NT、CT GsCelA。(圖五~十)。



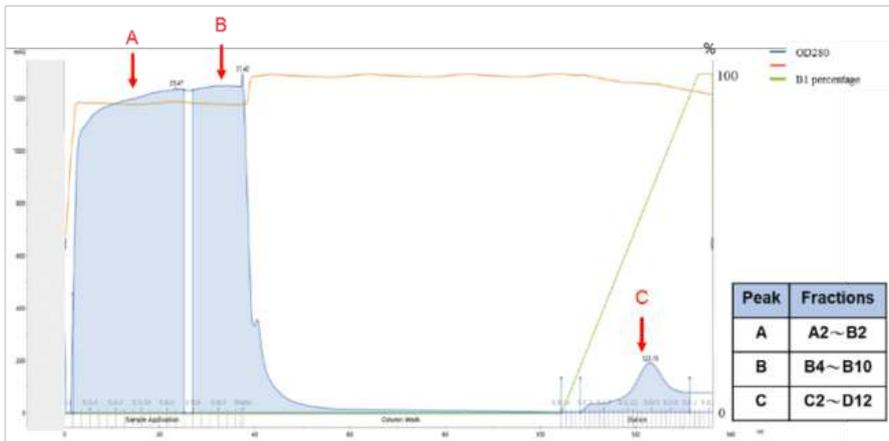
(圖五)、第一次 WT 蛋白質純化吸光值與流經體積關係圖。我們選擇了 Peak C (F1~G6) 進行 GsCelA 定性分析。



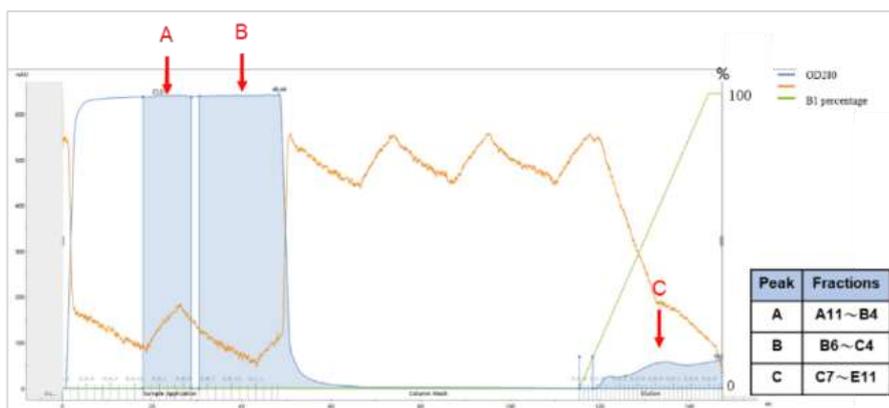
(圖六)、第一次 NT 蛋白質純化吸光值與流經體積關係圖。我們選擇了 Peak B (E12~H1) 進行 GsCelA 定性分析。



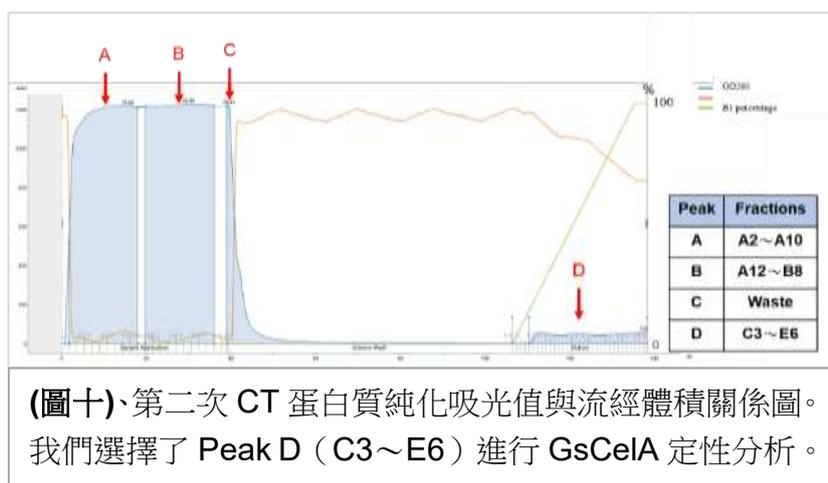
(圖七)、第一次 CT 蛋白質純化吸光值與流經體積關係圖。我們選擇了 Peak C (E5~F12) 進行 GsCelA 定性分析。



(圖八)、第二次 WT 蛋白質純化吸光值與流經體積關係圖。我們選擇了 Peak C (C2~D12) 進行 GsCelA 定性分析。



(圖九)、第二次 NT 蛋白質純化吸光值與流經體積關係圖。我們選擇了 Peak C (C7~E11) 進行 GsCelA 定性分析。



(圖十)、第二次 CT 蛋白質純化吸光值與流經體積關係圖。我們選擇了 Peak D (C3~E6) 進行 GsCelA 定性分析。

於純化完成後，我們選擇 elution 部分之吸收峰區段，分別以 DNS 法及 SDS-PAGE，分析其中各 fraction 之纖維素內切酶活性以及蛋白質組成，收取活性相對較高、蛋白質組成較純之 fractions，將其混合裝入 SnakeSkin Dialysis Tubing 中，在 20mM、pH7.0 的磷酸鈉緩衝液中透析 8 小時，重複三次（詳見附錄三）。透析完畢後，將各突變之 GsCelA 樣本裝入蛋白質濃縮管中，在 4°C 下以 2000 rpm（Hermle,O.Z233M-2）離心 10 分鐘，重複一或數次至最終體積為每個樣本體積為 3~5mL，以 Bradford 法測定各樣本濃縮後之蛋白質濃度，為斷裂實驗時濃度調整之參考，並將樣本保存於 -20°C，用於後續自我斷裂實驗(表二)。

(表二)、兩次純化各突變收取 fractions 及最終濃度表。

批次	突變	FL	NT	CT
第一次	fractions	F1~G6	E12~H1	E5~F12
	濃度 (mg/mL)	0.3247	0.4656	0.3862
第二次	fractions	C10~D9	D6~E1	C12~D6
	濃度 (mg/mL)	0.1985	0.1236	0.1299

## (五) GsCelA 自我斷裂實驗：

兩次表現之 GsCelA 依照實驗時間先後，被用於測試不同添加因子及定點突變對 GsCelA 自我斷裂之影響。我們設計以下數組實驗，觀察了各突變 GsCelA 添加不同物質，對其自我斷裂情形與速率之影響，並利用 SDS-PAGE 及 coomassie blue staining 分析其中 GsCelA 分子量大小，作為判定自我斷裂發生情形之依據。（以下實驗排序並未依照時間順序，實驗日程紀錄及各實驗配方表詳見附錄二、四）

### 1. 實驗一：測試定點突變對 GsCelA 自我斷裂之影響

本實驗使用第二次表現之 GsCelA，測試定點突變及 EDTA 在 GsCelA 濃度約為 0.1mg/mL 下，對自我斷裂之影響。我們將各突變 GsCelA 加入 20mM、pH7.0 磷酸鈉緩衝液做對照組，並以加入 EDTA 至最終濃度為 10mM 的組別作實驗組。每個樣本總體積為 150 $\mu$ L，於 25°C 下每隔 24 小時收取 10 $\mu$ L 的樣本，與 2.5 $\mu$ L 的 5x SDS-PAGE loading buffer 混合，在 100°C 下加熱 5 分鐘後置於 -20°C 保存。實驗過程持續 13 天，並在全數時間點皆收取完畢後，以 SDS-PAGE 及 coomassie blue staining 分析各突變 GsCelA 自我斷裂情形及速率。

### 2. 實驗二：測試已斷裂 WT GsCelA 對各突變 GsCelA 自我斷裂的影響

本實驗選用第一次表現之 GsCelA，測試加入已斷裂 WT GsCelA (L1) 或 EDTA，在各突變 GsCelA 濃度約為 0.2mg/mL 下，對其自我斷裂的影響。我們將 WT、NT 及 CT 加入 20mM、pH7.0 磷酸鈉緩衝液做對照組，並以加入 L1 或 EDTA 的組別作為實驗組。每個樣本總體積為 100 $\mu$ L，於 25°C 中放置 0、2、4、5、24、26 小時，並於各時間點分別收取 10 $\mu$ L 的樣本與 2.5 $\mu$ L 的 5x SDS-PAGE loading buffer 混合，於 100°C 下加熱 5 分鐘後置於 -20°C 保存。待全數時間點皆收取完畢後，以 SDS-PAGE 及 coomassie blue staining 分析各突變 GsCelA 自我斷裂情形及速率。

### **3. 實驗三：測試不同濃度已斷裂 WT GsCelA 對各突變 GsCelA 自我斷裂之影響**

在本實驗中，為了測試不同濃度的已斷裂 WT GsCelA 對各突變 GsCelA 自我斷裂之影響，我們利用 20mM、pH7.0 磷酸鈉緩衝液將 L1 作三種不同的稀釋：1 倍（1x）稀釋、0.5x 稀釋及 0x 稀釋，並將上述不同濃度之 L1 加入各突變 GsCelA 中。上述樣本總體積皆為 100 $\mu$ L，於 25 $^{\circ}$ C 下放置 0、2、24、48 小時，在各時間點分別收取 10 $\mu$ L 的樣本，與 2.5 $\mu$ L 的 5x SDS-PAGE loading buffer 混合，100 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘後放置於 -20 $^{\circ}$ C 保存。待全數時間點皆收取完畢後，以 SDS-PAGE 及 coomassie blue staining 分析各突變 GsCelA 自我斷裂情形及速率。

### **4. 實驗四：測試已斷裂 WT GsCelA 在高溫預處理前後對各突變 GsCelA 自我斷裂影響的差異**

本實驗為了測試已發生自我斷裂的 GsCelA 在高溫預處理前後，對各突變 GsCelA 自我斷裂造成影響的差異，我們將 L1 在 100 $^{\circ}$ C 下加熱 10 分鐘，以未加熱之 L1 作對照組，將上述不同處理的 L1 加入各突變 GsCelA 中，每個樣本總體積為 100 $\mu$ L，於 25 $^{\circ}$ C 下放置 0、24、48、72、96 小時。於各時間點分別收取 10 $\mu$ L 的樣本，與 2.5 $\mu$ L 的 5x SDS-PAGE loading buffer 混合，在 100 $^{\circ}$ C 下加熱 5 分鐘後放置於 -20 $^{\circ}$ C 保存。待全數時間點皆收取完畢後，以 SDS-PAGE 及 coomassie blue staining 分析各突變 GsCelA 自我斷裂情形及速率。

### **5. 實驗五：測試加入各突變的已斷裂 GsCelA 對 WT GsCelA 自我斷裂的影響**

為測試加入各突變的已斷裂 GsCelA 對 WT GsCelA 自我斷裂的影響，我們將已斷裂的 WT (L1)、NT (L2)、CT (L3) 分別加入 WT GsCelA 中作為實驗組，並以加入 EDTA 至濃度為 10mM 的組別作為對照組。每個樣本總體積為

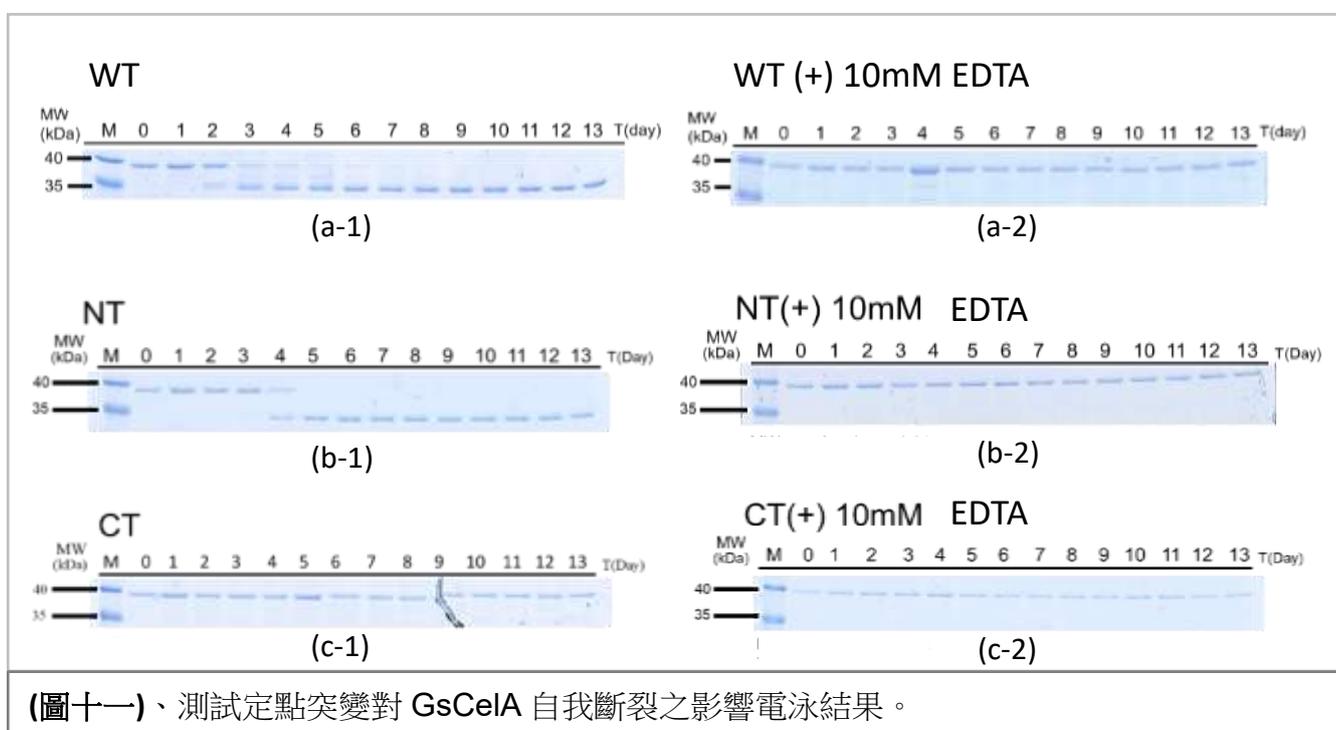
150 $\mu$ L，於 25 $^{\circ}$ C下每天分別收取 10 $\mu$ L 的樣本，與 2.5 $\mu$ L 的 5x SDS-PAGE loading buffer 混合，100 $^{\circ}$ C下加熱 5 分鐘後放置於-20 $^{\circ}$ C保存。實驗共持續五天，待全數時間點皆收取完畢後，以 SDS-PAGE 及 coomassie blue staining 分析 GsCelA 自我斷裂情形及速率。

## 伍、研究結果

### 一、GsCelA 自我斷裂實驗

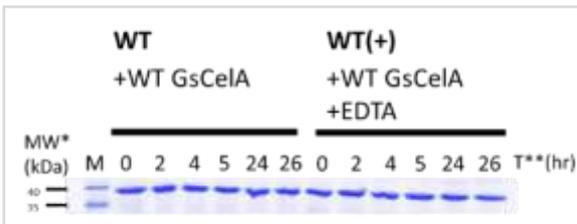
#### (一) 實驗一：測試定點突變對 GsCelA 自我斷裂之影響：

在 0 天的 WT、NT、CT GsCelA 並未發生自我斷裂，WT 及 NT 分別在第 2 天及第 4 天後，可觀察到已斷裂 GsCelA，且分別在第 7 天及第 5 天後，只可觀察到斷裂產物（圖十一之 a~b）；而 CT 在放置 13 天後並未發生自我斷裂（圖十一之 c）。加入 EDTA 的 WT、NT 及 CT（WT(+)、NT(+）、CT(+)、）在 13 天後，皆未出現斷裂片段。

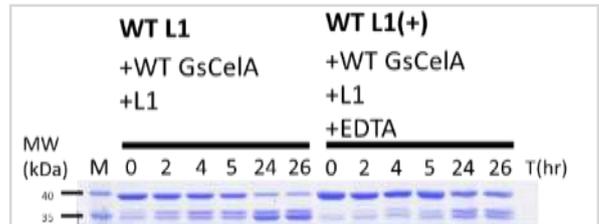


**(二) 實驗二：測試已斷裂 WT GsCelA 對各突變 GsCelA 自我斷裂的影響**

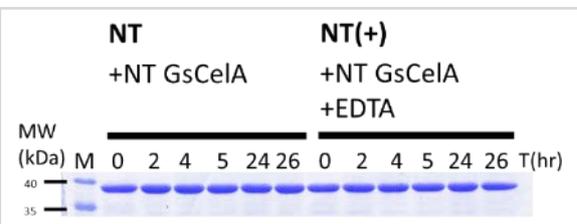
WT、NT、CT GsCelA 在 0 小時皆未發生自我斷裂，而其在放置 26 小時後，無論是否加入 EDTA，皆無法觀察到已斷裂之 GsCelA (圖十二、十四、十六)。WT、NT、CT GsCelA 在加入 L1 後，無論是否添加 EDTA，皆可觀察到已斷裂 GsCelA。值得注意的是，WT 及 NT 可以觀察到兩種分子量相異的自我斷裂的產物 (圖十三、十五)，而 CT 只有一種自我斷裂的產物。WT、NT、CT GsCelA 自我斷裂的產物濃度皆和時間呈正相關；且在相同時間點，有添加 EDTA 的實驗組較沒有添加 EDTA 的對照組，有較多的已斷裂 GsCelA。



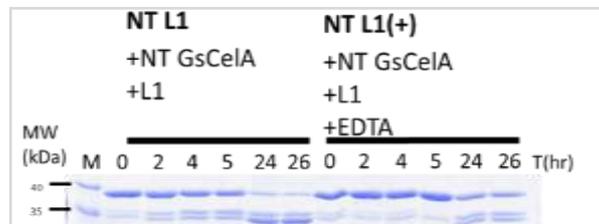
(圖十二)、WT GsCelA 加入 EDTA 與否之電泳結果圖。



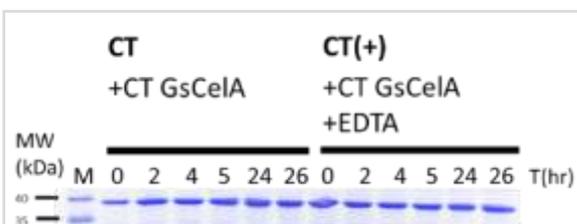
(圖十三)、WT GsCelA 與 L1 加入 EDTA 與否之電泳結果圖。



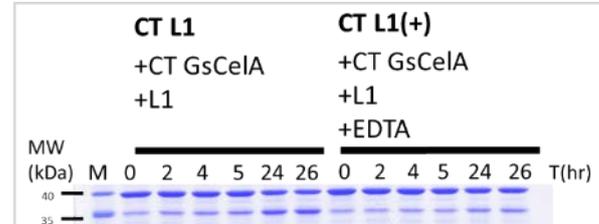
(圖十四)、NT GsCelA 加入 EDTA 與否之電泳結果圖。



(圖十五)、NT GsCelA 與 L 加入 EDTA 與否之電泳結果圖。



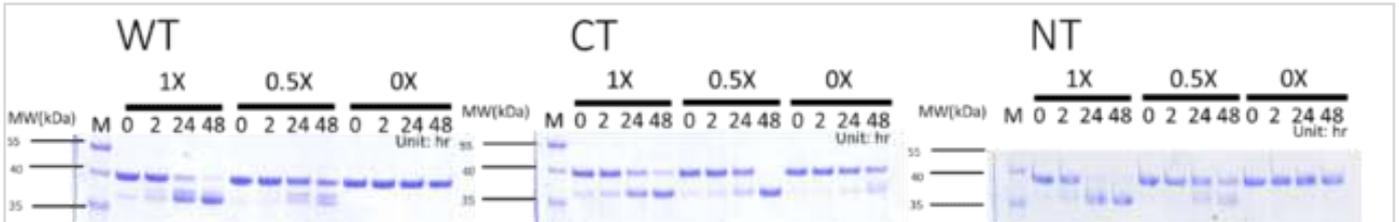
(圖十六)、CT GsCelA 加入 EDTA 與否之電泳結果圖。



(圖十七)、CT GsCelA 與 L1 加入 EDTA 與否之電泳結果圖。

(三) 實驗三：測試不同濃度已斷裂 WT GsCelA 對各突變 GsCelA 自我斷裂之影響

WT、NT、CT GsCelA 在僅加入磷酸鈉緩衝液的對照組中，在各時間點，較加入 1x 及 0.5x L1 的組別，可以觀察到極少數已斷裂 GsCelA；而加入 1x L1 的組別，又較加入 0.5 x 的有更多的自我斷裂產物(圖十八)。

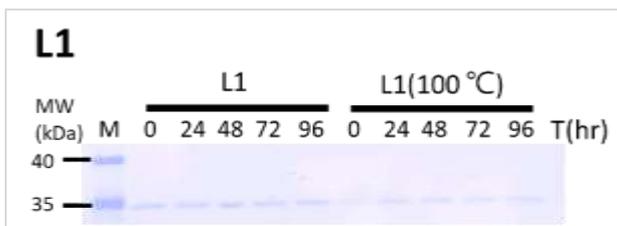


(圖十八)、各突變 GsCelA 加入不同濃度 GsCelA(L1)之電泳結果

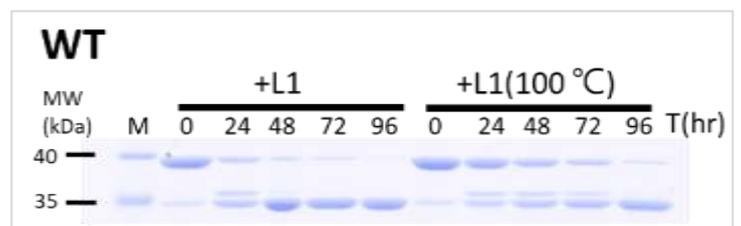
(四) 實驗四：測試已斷裂 WT GsCelA 在高溫預處理前後對各突變 GsCelA 自我斷裂影響的差異

L1 在高溫預處理後，各時間點之蛋白質分子量並未發生改變，僅觀察到經高溫處理後的蛋白質濃度有小幅下降(圖十九)。

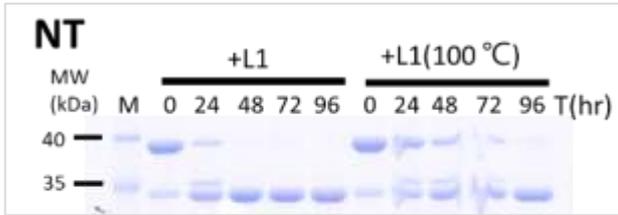
由實驗結果可知 WT、NT、CT GsCelA 無論加入之 L1 是否經過高溫預處理，皆可觀察到兩種自我斷裂之產物，但在相同時間點，加入高溫預處理 L1 的組別，其自我斷裂產物濃度較低(圖二十、圖二十一、圖二十二)。值得注意的是：在 96 小時前，WT、NT、CT GsCelA 皆可觀察到兩種斷裂產物，而在 96 小時時，WT、NT、CT GsCelA 皆只能觀察到一種斷裂片段。



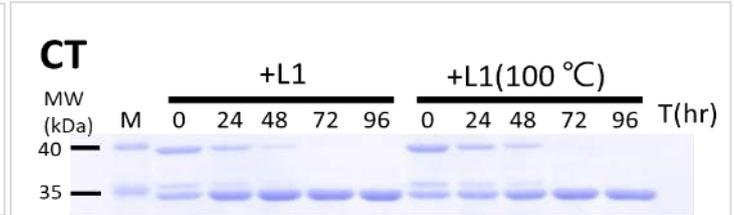
(圖十九)、高溫處理前後 L1 之電泳結果  
高溫處理前後 L1 之電泳結果圖。



(圖二十)、WT GsCelA 加入高溫處理前後 L1 之電泳結果圖。



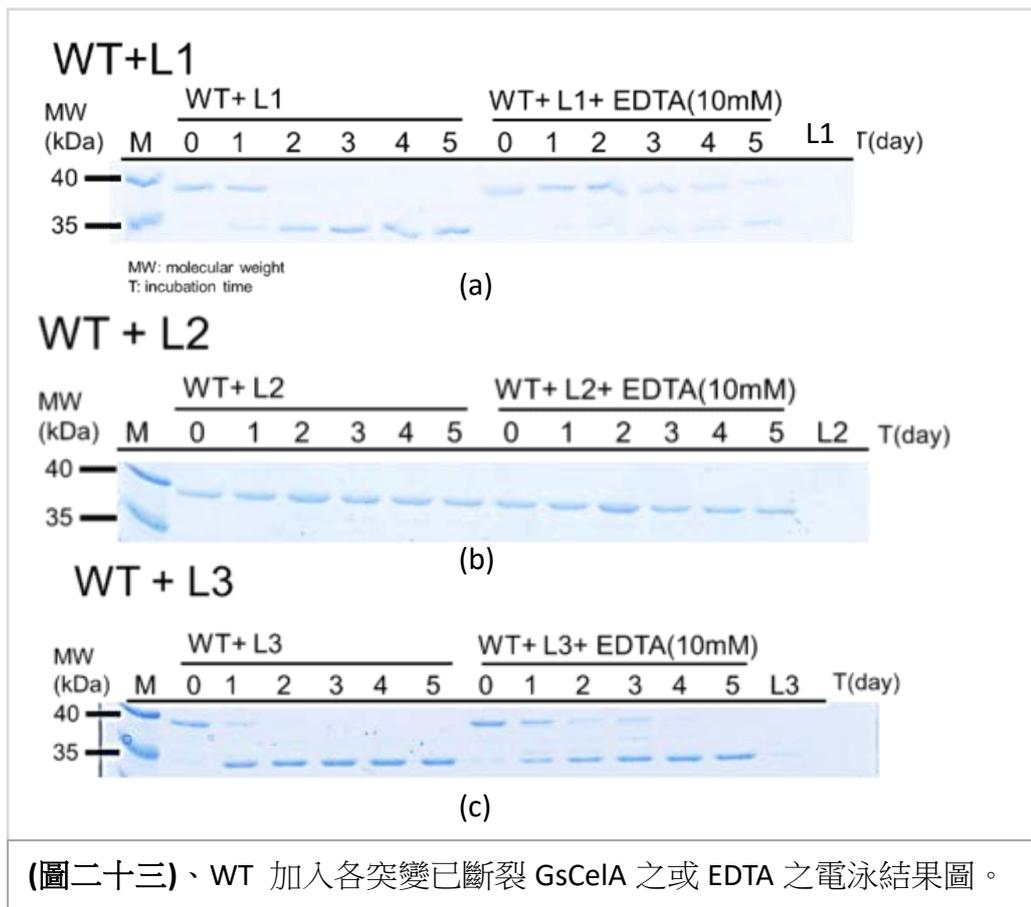
(圖二十一)、NT GsCelA 加入高溫處理前後 L1 之電泳結果圖。



(圖二十二)、CT GsCelA 加入高溫處理前後 L1 之電泳結果圖。

(五) 實驗五：測試加入各突變已斷裂 GsCelA 對 WT GsCelA 自我斷裂的影響

L1 和 L3 在加入 WT 後，於第 1 天後即可觀察到自我斷裂產物，且在第二天以完全轉變為已斷裂 GsCelA；且在相同時間點，加入 EDTA 的組別有較少之斷裂產物（圖二十三之 a、b）。而 L2 加入 WT 後，並未觀察到大量自我斷裂產物出現（圖二十三之 c）。



(圖二十三)、WT 加入各突變已斷裂 GsCelA 之或 EDTA 之電泳結果圖。

## 陸、討論

由 CT 突變 GsCelA 在 25°C 下 13 天處理後未觀察到自我斷裂產物，而 WT 及 NT 突變 GsCelA 則在第二天及第四天即發生自我斷裂，可以得知 C 端突變將導致自我斷裂速率大幅下降，而 N 端突變僅小幅降低 GsCelA 自我斷裂速率。

此外，在相同時間點，加入 L1 的 WT、NT、CT GsCelA 較未加入的組別，有較多自我斷裂產物。由此可知 WT GsCelA 將導致 WT、NT、CT GsCelA 自我斷裂速率增加，且加速的程度與加入已斷裂的 GsCelA 的濃度呈正相關。而已斷裂 GsCelA 具有高熱穩定性，在高溫處理後（100°C、10 分鐘）僅少部分降解，且其催化未斷裂 GsCelA 自我斷裂之活性並未消失。在相同時間點，加入高溫預處理 L1 的組別，其自我斷裂產物濃度較低，推測與高溫處理後已斷裂 GsCelA 濃度降低相關。

而加入各突變已斷裂 GsCelA，只有已斷裂 WT、CT GsCelA 可加速 WT GsCelA 自我斷裂，由此可知 N 端突變影響已斷裂 GsCelA 催化 WT GsCelA 自我斷裂之性質。

各實驗中加入 EDTA 的組別，在各時間點之自我斷裂產物皆少於未加入 EDTA 的組別，由此可知 EDTA 可同時抑制 WT、NT、CT GsCelA 自我斷裂，及已斷裂 WT、NT GsCelA 催化 GsCelA 自我斷裂之反應。

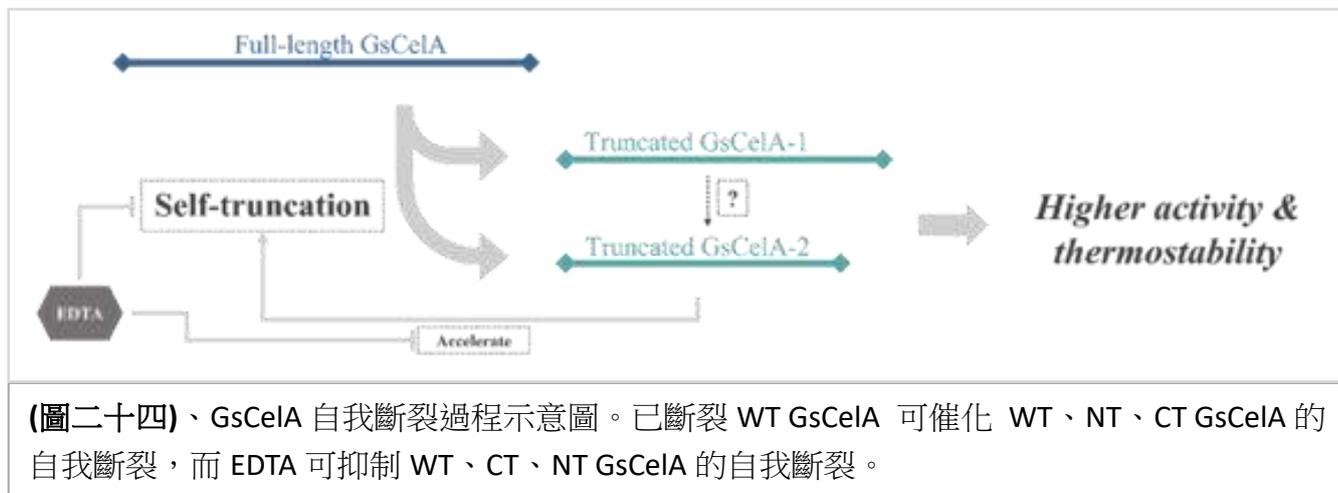
在各實驗中，常可觀察到 WT、NT、CT GsCelA 有出現兩種分子量大小相異之斷裂產物。而當樣本中所有 GsCelA 皆發生自我斷裂時，兩種斷裂產物中，只可觀察到其中分子量較小之產物。推測兩種自我斷裂的產物間，有更進一步類似 GsCelA 自我斷裂之構型轉變過程發生。惟上述兩點仍須進行深入研究以進一步探討。

## 柒、結論

在 N 端及 C 端製造之定點突變影響 GsCelA 自我斷裂速率，而 EDTA 可抑制 GsCelA 自我斷裂。NT 突變 GsCelA 自我斷裂速率小幅下降；而 CT 突變 GsCelA 自我斷裂速率大幅下降。

已斷裂 GsCelA 可催化 WT、CT、NT GsCelA 的自我斷裂，而此過程與已斷裂 GsCelA 之濃度呈現正相關，此過程同時受 EDTA 所抑制（圖二十四）。在高溫預處理

(10 分鐘、100°C) 後之已斷裂 WT GsCelA，仍保持催化 WT、CT、NT GsCelA 自我斷裂之性質。而 N 端突變將導致已斷裂 GsCelA 無法催化 WT GsCelA 自我斷裂。



(圖二十四)、GsCelA 自我斷裂過程示意圖。已斷裂 WT GsCelA 可催化 WT、NT、CT GsCelA 的自我斷裂，而 EDTA 可抑制 WT、CT、NT GsCelA 的自我斷裂。

WT、CT、NT GsCelA 發生自我斷裂後，有分子量相異的兩種產物。但當樣本中所有 GsCelA 皆發生自我斷裂時，只可觀察到其中分子量較小之產物。且在部分試驗中，樣本中之 CT GsCelA 於尚未完全發生自我斷裂時，只可觀察到一種自我斷裂產物。推測自我斷裂的兩種產物間，有更進一步之構型轉變發生，但上述假說仍需進行後續實驗進一步探討。

## 捌、參考資料及其他

### 一、參考學術論文列表：

- (一) Chang CJ, Lee CC, Chan YT, Trudeau DL, Wu MH, et al. (2016). Exploring the Mechanism Responsible for Cellulase Thermostability by Structure-Guided Recombination. PLOS ONE 11(3): e0147485.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147485>
- (二) Ng IS, Li CH, Yeh YF, Chen PT, Chir JL, et al. (2009). A Novel Endoglucanase from The Thermophilic Bacterium *Geobacillus* sp. 70PC53 with High Activity and Stability over A Broad Range of Temperatures. Extremophiles 13, 425–435.
- (三) Rahman Md, Fernando S, Ross Brian, Wu JN, Qin Wensheng. (2018).

Endoglucanase (EG) Activity Assays. 10.1007/978-1-4939-7877-9\_13.

(四) Saranraj P. (2012). Microbial Cellulases and Its Applications: A Review. International Journal of Biochemistry & Biotech Science.

## 二、圖源

(一) 圖一：尚偉股份有限公司 落地型高壓細胞破碎機 網址 <https://www.sun-way.com.tw/product-detail-2553164.html>

(二) 圖二：Cytiva ÄKTA pure protein purification system 網址 <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/chromatography/chromatography-systems/akta-pure-p-05844>

## 三、附錄：

(一)附錄一：GsCelA 自我斷裂實驗各組配方表

(表三)、(表四)、(表五)、(表六)、(表七)為 GsCelA 自我斷裂實驗實驗中各組之配方表。

	GsCelA sample( $\mu$ L)	Phosphate buffer( $\mu$ L)	EDTA( $\mu$ L)
GsCelA-WT	90	52.5	7.5
GsCelA-NT	120	22.5	7.5
GsCelA-CT	120	22.5	7.5
GsCelA-WT(+)	90	52.5	7.5
GsCelA-NT(+)	120	22.5	7.5
GsCelA-CT(+)	120	22.5	7.5

(表四)、GsCelA 自我斷裂實驗-實驗二各組配方表

	GsCelA sample( $\mu\text{L}$ )	Phosphate buffer( $\mu\text{L}$ )	L1( $\mu\text{L}$ )	EDTA( $\mu\text{L}$ )
GsCelA-WT	62	38	0	0
GsCelA-CT	52	48	0	0
GsCelA-NT	43	57	0	0
GsCelA-WT(+)	62	36	0	2
GsCelA-CT(+)	52	46	0	2
GsCelA-NT(+)	43	55	0	2
GsCelA-WT L1	62	18	20	0
GsCelA-CT L1	52	28	20	0
GsCelA-NT L1	43	37	20	0
GsCelA-WT L1(+)	62	16	20	2
GsCelA-CT L1(+)	52	26	20	2
GsCelA-NT L1(+)	43	35	20	2

(表五)、GsCelA 自我斷裂實驗-實驗三各組配方表

	GsCelA sample( $\mu\text{L}$ )	Phosphate buffer( $\mu\text{L}$ )	L1( $\mu\text{L}$ )
GsCelA-WT 0x	62	38	0
GsCelA-CT 0x	52	48	0
GsCelA-NT 0x	43	57	0
GsCelA-WT 0.5x	62	28	10
GsCelA-CT 0.5x	52	38	10
GsCelA-NT 0.5x	43	47	10
GsCelA-WT 1x	62	18	20
GsCelA-CT 1x	52	28	20
GsCelA-NT 1x	43	37	20

(表六)、GsCelA 自我斷裂實驗-實驗四各組配方表

	GsCelA sample( $\mu\text{L}$ )	Phosphate buffer( $\mu\text{L}$ )	L1( $\mu\text{L}$ )	Incubated L1( $\mu\text{L}$ )
GsCelA-WT L1	62	18	20	0
GsCelA-CT L1	52	28	20	0
GsCelA-NT L1	43	37	20	0
GsCelA-WT L1(100°C)	62	18	0	20
GsCelA-CT L1(100°C)	52	28	0	20
GsCelA-NT L1(100°C)	43	37	0	20

(表七)、GsCelA 自我斷裂實驗-實驗五各組配方表

	GsCelA sample( $\mu$ L)	Phosphate buffer( $\mu$ L)	EDTA( $\mu$ L)	Truncated GsCelA ( $\mu$ L)
GsCelA-WT+L1	90	50	20	(GsCelA L1)10
GsCelA-WT+L2	120	20	20	(GsCelA L2)10
GsCelA-WT+L3	120	20	15	(GsCelA L3)15
GsCelA-WT+L1(+)	90	42.5	7.5	(GsCelA L1)10
GsCelA-WT+L2(+)	120	12.5	7.5	(GsCelA L2)10
GsCelA-WT+L3(+)	120	12.5	7.5	(GsCelA L3)15

(三)附錄三：蛋白質純化原始數據

1. 第一次蛋白質純化

(1)WT GsCelA 純化後定性分析數據：

(表八)、WT GsCelA 於 Peak C 之各 fraction 以 DNS 法分析之 OD540 列表

Fractions	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	G1	G2	G3	G4	G5	G6
OD 540	0.764	0.817	0.829	0.735	0.962	0.926	0.936	1.066	1.03	1.088	1.098	1.122	1.073	1.006	1.063	1.035	0.849	0.945



(圖二十五)、WT GsCelA 於 Peak C 之各 fraction 以 SDS-PAGE 分析之結果圖，紅框為最終收取之 fractions

(2)NT GsCelA 純化後定性分析數據：

(表九)、NT GsCelA 於 Peak B 之各 fraction 以 DNS 法分析之 OD540 列表

Fractions	E12	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	G1	G2	G3	G4	G5
OD 540	0.421	0.653	0.697	0.639	0.524	0.535	0.641	0.758	0.655	0.648	0.695	1.203	1.013	1.109	1.085	1.165	1.113	1.175
Fractions	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	H1										
OD 540	1.194	1.218	1.214	1.132	1.169	1.692	1.095	1.058										



(圖二十六)、NT GsCelA 於 Peak C 之各 fraction 以 SDS-PAGE 分析

(3)CT GsCelA 純化後定性分析數據：

(表十)、CT GsCelA 於 Peak C 之各 fraction 以 DNS 法分析之 OD540 列表

Fractions	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
OD 540	0.743	0.829	0.894	1.005	0.949	1.046	1.129	0.658	0.989	0.962	0.727	1.023	0.914	0.92	0.55	0.708	0.714	0.643
Fractions	F11	F12																
OD 540	0.555	0.468																



(圖二十七)、CT GsCelA 於 Peak C 之各 fraction 以 SDS-PAGE 分析之結果圖，紅框為最終收取之 fractions

## 2. 第二次蛋白質純化

(1) WT GsCelA 純化後定性分析數據：

(表十一)、WT GsCelA 於 Peak C 之各 fraction 以 DNS 法分析之 OD540 列表

Fraction	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	D1	D2
OD540	0.107	0.112	0.124	0.129	0.216	0.253	0.176	0.112	0.326	0.242	0.342	0.384	0.374

Fraction	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
OD540	0.339	0.384	0.104	0.509	0.477	0.401	0.269	0.273	0.181	0.223

M C2 C3 C4 C5 C6 C7 C8 C9 C10 C11 C12

D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 D8 D9 D10 D11 D12



(圖二十八)、WT GsCelA 於 Peak C 之各 fraction 以 SDS-PAGE 分析之結果圖，紅框為最終收取之 fractions

(2) NT GsCelA 純化後定性分析數據：

(表十二)、NT GsCelA 於 Peak D 之各 fraction 以 DNS 法分析之 OD540 列表

Fraction	C7	C8	C9	C10	C11	C12	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
OD540	0.099	0.098	0.1	0.099	0.1	0.101	0.121	0.111	0.148	0.128	0.177	0.321	0.277	0.273	0.211	0.294	0.167	0.309

Fraction	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
OD540	0.199	0.115	0.129	0.11	0.097	0.099	0.098	0.098	0.096	0.098

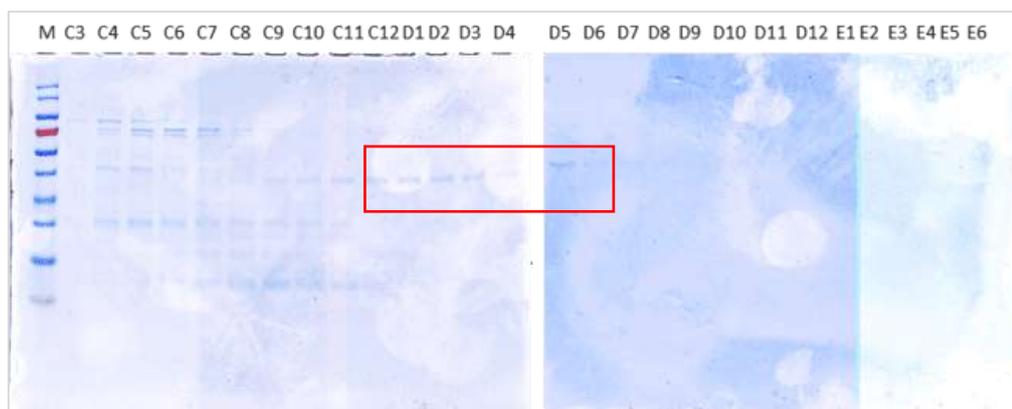


(圖二十九)、NT GsCelA 於 Peak D 之各 fraction 以 SDS-PAGE 分析之結果圖，紅框為最終收取之 fractions

(3) CT GsCelA 純化後定性分析數據：

(表十二) NT GsCelA 於 Peak C 之各 fraction 以 DNS 法分析之 OD540 列

Fraction	C7	C8	C9	C10	C11	C12	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
OD540	0.099	0.098	0.1	0.099	0.1	0.101	0.121	0.111	0.148	0.128	0.177	0.321	0.277	0.273
Fraction	D9	D10	D11	D12	E1	E2	E3	E4	E5	E6				
OD540	0.211	0.294	0.167	0.309	0.199	0.115	0.129	0.11	0.097	0.099				



(圖三十)、CT GsCelA 於 Peak C 之各 fraction 以 SDS-PAGE 分析之結果圖，紅框為最終收取之 fractions

(四) 附錄四：實驗日程紀錄

(表十三)、實驗日程紀錄

日期	實驗說明
4/30~7/15	PCR 製造定點突變及轉殖
8/17~8/18	<i>E. coli</i> 培養
8/18~8/19	IPTG 誘導
8/20	高壓細胞破碎機破菌
8/21~8/23	第一次 ÄKTA Pure 純化、透析、濃縮
8/29~11/16	GsCelA 自我斷裂實驗
1/19~1/20	<i>E. coli</i> 培養
1/20~1/21	IPTG 誘導
1/22	高壓細胞破碎機破菌
1/22~1/29	第二次 ÄKTA Pure 純化、透析、濃縮
1/29~3/5	GsCelA 自我斷裂實驗

(五) 附錄五：GsCeIA WT 胺基酸序列及核甘酸序列

1. 胺基酸序列

MERTPVEENGLRQVVG TALLNQHNKPFQLRGISTHGLQWFGQFANKD  
AFQTLRDDWKANVRLAMY TDPNANGYIAQPEWLKAKVKEGVQAALDLG  
MYVIIDWHILNDNDPNLY KEQAKRFFAEMAREY GKYPNVIYEIANEPNGNDV  
TWEEKIRPYADEVIRTIRS IDRDNLIIVGTGTWSQDVDDVASDPLPYKNIMYA  
VHFYSGTHTQWLRDRVDA ALQAGTPV FVSEWGTSDASGDGGPYLEEA EK  
WIEFLNERGISWVNWSL CDKNEASAALRPGADPHGGWGDDHLS DSGRFI  
KAKLIEAAQQSGQKAKGA ANPHQRNGNDSSDGGKTGHASGHPFFWTFILA  
AGVAFGFGGLALGKRLFKELE

2. 核甘酸序列

3'-atggagcgtacaccagtggaagaaaacgggcgcttacaagtcgttggtacggcgttgctcaa  
tcacacaataaacggtccagctgctggcatcagcactcatggcctcaatggttcggtcagtttgccaac  
aaggatgcttccaaacttgcgacgactggaaagcgaatgtgtccgtctagccatgtatacggatccc  
aatgccaacggttacattgccagcctgagtggtgaaagcgaagtgaaagaaggagtacaagcag  
cgcttgatctcggaatgtatgtatcattgattggcatattttaaacgacaatgaccctaattatataagaac  
aagccaaacggtttttgccgaaatggctcggaatacggcaatacccgaatgtatttacgaaatcgcca  
atgagccgaacggcaatgacgtaacgtgggaagaaaaatacggccgtacgctgacgaagtcacccg  
aaccattcgaagcatcgacagagacaatctcattatcgtcggcacaggaacgtggagtcaagatgtgat  
gatgctgcatccgatcctctccgtacaaaaacatcatgtacgctgttcatTTTTattcggaacacataccca  
atggctgctgacgaccgcttgatgctgctttacaggcaggaacgcctgtcttctccgaatggggaacctc  
ggatgctgagcggcgatggaggcccctatttgaagaggcagagaaatggattgagtttcaatgagcgt  
ggaatcagctgggtcaattggctctttgtgacaaaaatgaagcatctgccgccctgcgccctggggctgat  
ccacatggcgggtggggcgatgatcatcttccgattccggccggttatcaaagcaaaaactgattgaagc  
agcacaacaaagcggccaaaaggcgaaggggctgcaaatcctcaccaaaagaaatggaaacgact  
cctccgatggcggcaaaaactggccatgctccggtcatccctTTTTggacgtttattctgccgccggtgtag  
cctttggctttgggggattggcgtagggaaacggtttgtcaaagagtag-5'

## 【評語】 060005

1. 研究主題對生物能源開發有前瞻性。
2. 實驗設計完善，獲得具體結論。
3. 團隊表現優異，具良好英文程度。
4. 研究材料來源需進一步說明清楚。