

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080003

參展科別 生物化學

作品名稱 AsqJ 酵素活性庫之篩選並探討其專一性與反應性之改變

得獎獎項

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 詹迺立、吳淑芳

作者姓名 紐瑩姍、廖盈嘉

關鍵詞 AsqJ、非血基質鐵/ α -酮戊二酸依賴型雙氧化酶、酵素活性庫

作者簡介



大家好，我們是北一女中科學班的紐瑩姍和廖盈嘉。我們從國小認識彼此時就很喜歡探索未知，從刺激的化學實驗到大自然皆是，而科學正是點亮未知之霧的明燈。現在有幸能在大學實驗室參與科學歷史進程的一步，甚至可能為環境盡一份心力，令我們無比驚嘆科學之美。感謝學姊老師教授及所有在我們探索路上支持我們的人。

摘要

非血基質鐵/ α -酮戊二酸依賴型雙氧化酶為巨大酵素家族，其在生物體內進行許多重要反應。我們選用小巢狀麴菌之 AsqJ 蛋白，其與 Fe^{2+} 及 α -酮戊二酸能催化 cyclopeptin 的去飽和、環氧化，形成 cycloopenin。根據 AsqJ 蛋白結構，我們將與受質結合的 9 個胺基酸位置以不同鹼基對隨機取代，以轉譯不同胺基酸，構築酵素活性庫，送入大腸桿菌篩選並觀察 AsqJ 突變蛋白分解非典型受質之表現。

我們成功篩選出能分解 X-Gal 之 AsqJ 突變株，代表我們能以改變 AsqJ 特定位置胺基酸，進而改變其活性位點，並分解與原先截然不同的受質，故此篩選平台深具生化技術應用潛力。我們並進一步將上述突變株進行純化、晶體培養及結構解析，以釐清反應機制，並與奈米抗體結合以增強活性。目前正嘗試分解環境污染物結構相似物，期望對環境做出貢獻。

Abstract

Non-heme iron (II)-ketoglutarate-dependent dioxygenase belongs to a large family of enzymes and participates in many biologically important and energetically demanding reactions. AsqJ of *Aspergillus nidus* is a non-heme iron (II)-ketoglutarate-dependent dioxygenase, which catalyzes the continuous desaturation and epoxidation of cyclopeptin to form cyclopenin while in the presence of Fe^{2+} and α -ketoglutarate (α -KG).

According to the structure of the protein AsqJ, we know the specific amino acids that interact with the substrate. Hence, we alter base pairs in 9 positions of the DNA sequence of AsqJ, resulting in translation to different amino acids at the active sites. To create an Enzyme Activity Library, we assembled mutant *asqJ* genes using polymerase chain reaction (PCR) and inserted them into plasmids, and transformed them into *E. coli* strain DH5 α . We then identify desired AsqJ variants by their ability to break down select substrates.

We have succeeded in finding mutant AsqJ that catalyzes the breakdown of 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -d-Galactopyranoside (X-Gal), a non-native substrate. This suggests the broad potential of said selection platform in biochemical technologies. Through protein purification and X-ray crystallography, we further understand the interactions between AsqJ mutant and its non-native substrates. We seek to improve the activity of mutant AsqJ by using nanobodies. We endeavor to apply these methods in decomposing more complex chemical substances, such as plastics, Styrofoam, and other environmental pollutants.

壹、前言

一、研究動機

AsqJ 酵素屬於 α -酮基戊二酸依賴性非血基質鐵酵素這個巨大的酵素家族，其成員能催化多種化學轉化作用，包括羥基化、去飽和、環氧化、化學鍵的形成或裂解、閉環等反應、以及功能基的鍵結等多種功能，故能參與生物合成、代謝等許多關鍵的生物過程。因為這些特性，我們想要設計並構築出「酵素活性庫」，使該活性庫可作用於不同的受質，在化學和生物技術領域具有高度的應用潛力，也能讓後繼研究者不必在嘗試突變基因位點與受質結合的關係上耗費大量時間，進而加速對此種酶的研究腳步。此外，也能嘗試應用奈米抗體 library 篩選出能與 AsqJ 突變株 結合的奈米抗體，來更進一步增加分解非典型受質的能力。同時，若能了解 AsqJ 裏特定胺基酸突的排列組合，讓受質可以與有交互作用，期望便能應用到其他環境污染物等，例如塑膠或保麗龍等成分。

二、研究背景

(一)、非血基質鐵/ α -酮戊二酸依賴型雙氧化酶 (Non-heme iron (II)- α -ketoglutarate-dependent dioxygenase)

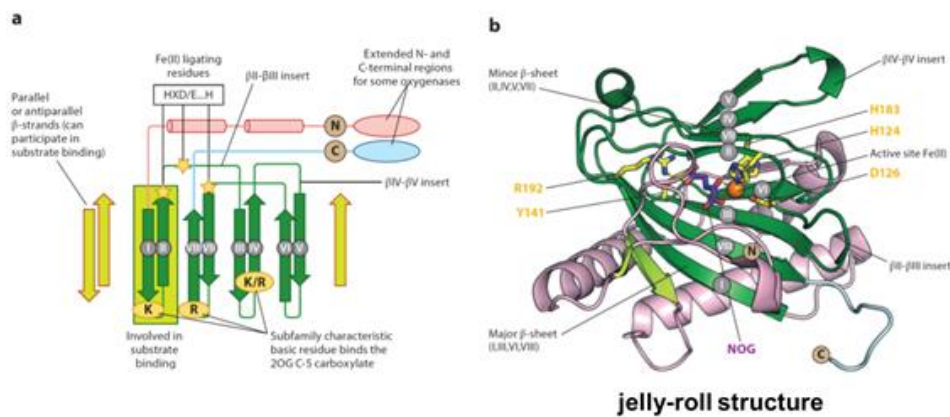
非血基質鐵/ α -酮戊二酸依賴型雙氧化酶，廣泛分佈於細菌、真菌、植物和脊椎動物中。該蛋白質家族的酵素具有類似的活性中心及催化機制，活性中心會結合二價鐵 Fe(II) 和輔受質 α -酮基戊二酸 (α -ketoglutarate, α -KG 也稱為 2-氧代戊二酸酯 2 oxoglutarate, 2-OG)，來激活氧原子使受質產生變化而產生所需產物、琥珀酸 (succinate) 和二氧化碳，而受質可以是核酸、小分子化合物、蛋白質、脂質等^[1]。

根據此家族成員的結構研究顯示，其彼此之間具有幾個相同的特徵：

1. 家族酵素之胺基酸相似性非常低，但皆具有類似的核心雙股 β -螺旋 (Double-Strand β -Helix, DSBH)，一般由八個反平行 β -摺板 (antiparallel β -

strands) 所形成亦稱為 jelly-roll 的結構，而活性中心即位於此結構中 (圖一)。

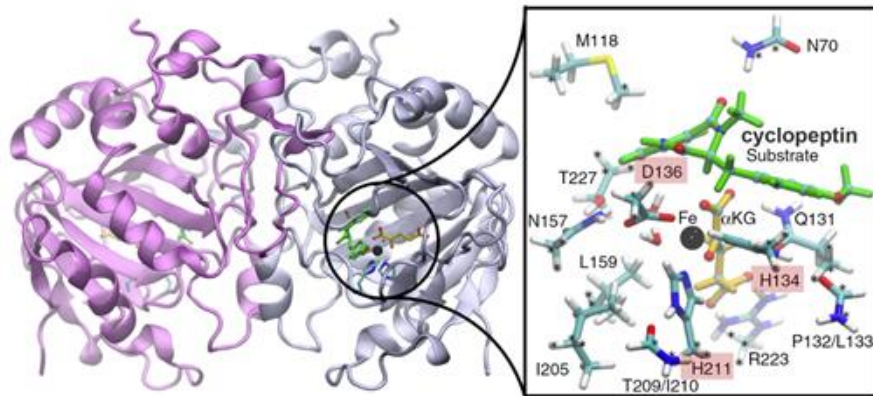
2. 活性中心具有一個 2-組胺酸-1-羧化物 (2-His-1-carboxylate; HXD/E..H) 所形成之“三面體”模體 (facial triad motif)，使其能結合二價鐵和輔受質 α -酮基戊二酸以進行氧分子的活化 (圖一、b)。該家族酵素進行的催化循環始於 α -酮基戊二酸及輔因子二價鐵會與反應中心結合，氧分子活化同時受質的結合會導致水分子解離，接著引發 α -酮基戊二酸形成琥珀酸的中間產物，最後活性中心會釋放產物和琥珀酸，即完成了催化循環 [2]。



圖一、非血基質鐵/ α -酮戊二酸依賴型雙氧化酶核心 DSBH 結構，含有二價鐵與 α -酮基戊二酸結合位^[1]。

(二)、AsqJ 酵素

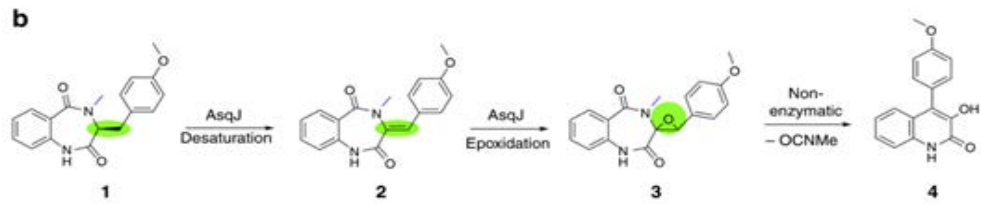
小巢狀麴菌 (*Aspergillus nidus*) 之 AsqJ 蛋白為非血基質鐵/ α -酮戊二酸依賴型雙氧化酶之一員，由圖二顯示，AsqJ 酵素為二聚體，其結構亦具有類似的核心雙股 β -螺旋 (DSBH) 折疊，其中活性中心三面體由胺基酸為 H134、D123 與 H211 所形成，可與鐵結合^[3]。



圖二、AsqJ 二聚體之結構圖，圈出位置為其活性位點。右方的放大圖顯示了 AsqJ 活性位點 H134、D123 與 H211 所形成的三面體，此中心與二價鐵鍵結^[3]。

AsqJ 的受質 cyclopeptin (圖三、1)，在含有 Fe^{2+} 與輔受質 α -酮戊二酸為才能催化受質 cyclopeptin，進行連續性的去飽和 (Desaturation) 以及環氧化反應 (Epoxidation) 以形成產物 cyclophenin (圖二、4)。根據文獻顯示 AsqJ 此雙氧化酶在不同反應中間產物 (intermediates) 存在下的不同分子結構，AsqJ 的活性位點會形成一個漏斗狀的反應室，位於反平行 β 摺疊 (DSBH) 之間的界面。受質與活性位點之金屬相互作用，後者透過 H211、H134、D136 以及 α -酮戊二酸的 C-2 酮基和 C-1 羧酸鹽連接八面體配位球中的結晶水分子。此外，H134 與受質形成 π 堆積作用，可能進一步對受質結合和催化活性造成影響^[3,4]。

儘管 AsqJ 的催化循環仍不清楚，但有研究顯示該酶通過分解雙氧產生高氧化性的 ferryl species，這與許多其他非血基質鐵酶類似。AsqJ 將一個氧原子插入 α -KG，脫羧後生成琥珀酸酯，同時形成具高氧化力之四價鐵與單氧鍵結的重要中間產物 (ferryl-oxo intermediate)，生成的亞丙基進一步用於催化 C-C 單鍵的去飽和，產生中間體 drocyclopeptin，最後再經由未被酵素催化的過程成為產物 viridicatin^[5,6]。經由 AsqJ 催化後所得到了最終產物屬於 quinolones 類的化合物，具有抗癌、抗菌或抗病毒的能力。

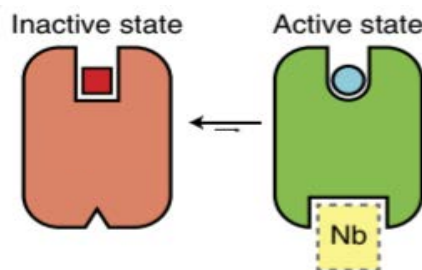


圖三、AsqJ 催化之反應過程。受質 1 cyclopeptin 由 AsqJ 催化經去飽和變為 2 dehydrocyclopeptin，再由 AsqJ 催化進行環氧化成為 3 cyclophenin，最後再經由未被酵素催化的過程成為產物 4 viridicatin^[3]。

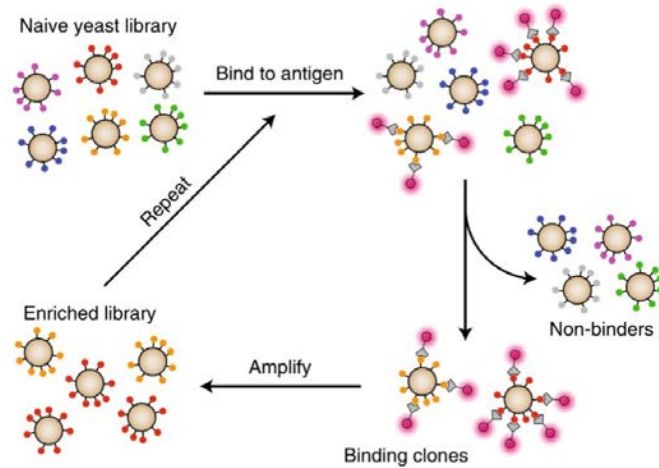
(三)、利用生物工程改變酵素活性功能

一般酵素(酶)會提供有效率、選擇性和可持續性的優勢促使生物學家想提昇生物催化轉化作用，甚至取代傳統的合成路線。由於酵素具有高效率和多功能的特性，利用合成方法與生物工程技術，可以促進生物催化領域的創新，而「分子編輯」的新酵素開發即可以特別應用於精確化學催化反應上^[7]。目前成功的例子，例如，非血基質鐵/ α -酮戊二酸依賴型雙氧化酶 SyrB2，一種來自假單胞菌 B301D 的丁香黴素的 Fe/ α -KG 酶，參與鹵化生物合成途徑 (halogenation)。這種鹵化活性被認為源自羥基化活性 Fe/ α -KG 酶的同源性，Bollinger 等人進一步由反應機制研究發現，鐵中心的非氧配體 (non-oxygen ligand) 可以導致新的酵素功能^[8]。Withers 等人將 *Agrobacterium* 中一種水解酶 (hydrolyase)，醣苷酶 (Glycosidase) 的研究中將參與催化的酸-鹼配對的關鍵胺基酸進行突變，將醣苷酶轉化成為可以合成醣苷 (glycoside) 的醣合成酶^[9]。

(四)、利用奈米抗體改變酵素活性功能



圖四、奈米抗體改變蛋白質構型之示意圖。



圖五、奈米抗體篩選過程示意圖。

McMahon 等人的研究中指出，當奈米抗體與酵素結合，能微調其構形，進而穩定酵素活性 (圖四)^[10]。我們將利用酵母菌呈現奈米抗體的 library 來篩選出能與 AsqJ 突變株結合的奈米抗體 (圖五)^[10]。

由於許多研究的發表，在蛋白質結構和機制的了解與日俱增，結構與功能的關係也被了解透徹，當科學家重新設計酵素的特異性時，可以減少嘗試和錯誤，而達到製造酵素預想的任務。而根據結構以合理設計 (rational design) 挑戰了我們對蛋白質生物化學知識，利用蛋白質工程期望設計出全新的催化機制的酵素，以利接受多種受質，對於日後在環保、製程等課題上將會有很大的助益。

二、研究目的

此研究中，我們預測可以透過 *asqJ* 基因突變，改變 AsqJ 裡特定胺基酸，使其與非典型受質結合，研究的首要目標為測試此假說。當我們成功證實此假說成立後，我們將此 AsqJ 突變蛋白與奈米抗體結合並觀察，嘗試進一步延伸增加其分解力和結構解析度。

(一)、透過 *asqJ* 基因突變，改變 AsqJ 裡特定胺基酸，使其與不同受質結合。

1. 設計引子來利用 PCR 方法增幅出 *asqJ* 突變基因 (九個特定突變位置)。
2. 尋找以 PCR 方法增幅出 *asqJ* 突變基因之最佳條件。
3. 構築 AsqJ 酵素活性庫。
4. 利用 AsqJ 非典型受質 X-Gal、dibenzo-p-dioxin、phenanthrene、fluorene 篩選 AsqJ 突變株。
5. 了解 AsqJ 突變蛋白中的突變點與 X-Gal 結合的反應機制。

(二)、表現並純化 AsqJM1-233 突變酵素

(三)、將 AsqJM1-233 突變酵素與 X-Gal、FeCl₂ 及 succinate 共結晶

(四)、確認 AsqJM1-233 分解 X-Gal 之活性

1. 利用 Ni-NTA 管柱小量純化 AsqJM1-233 (重力流純化)
2. *in vitro* 確認 AsqJM1-233 分解 X-Gal 之活性

(五)、AsqJ233 酵素活性庫構築

(六)、探討 AsqJ 突變蛋白結合奈米抗體後表現之影響。

1. 確認 AsqJ 突變蛋白結合奈米抗體後是否穩定其結構、改善結晶解析度。
2. 了解 AsqJ 突變蛋白結合奈米抗體後分解非典型受質能力變化。

貳、研究方法及過程

一、藥品

(一)、細菌培養：

LB broth、SOB broth、Agar、Ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、Chloramphenicol (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、X-Gal (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、 FeCl_3 或 FeCl_2 (3 mM)、 α -KG (0.2 M)、minimal medium (Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、NaCl、 NH_4Cl 、 MgSO_4 、 CaCl_2)。

表一、篩選 AsqJ 酵素活性庫之大腸桿菌在 1 L 的 LB 培養基中所加入之藥品。

藥品	最終濃度	註明
$\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$	3 μM	Fe^{2+} 為 AsqJ 之輔因子
α -KG	0.2 mM	α -KG 為 AsqJ 之輔受質
X-Gal 或 Cm	50 或 17 $\mu\text{g}/\text{mL}$	作為篩選受質
Ampicillin	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	為了確保質體存在大腸桿菌中

表二、篩選 AsqJ 酵素活性庫之大腸桿菌在 1 L 的 Minimal 培養基中含有成分。

藥品	最終濃度	註明
Na_2HPO_4	66 mM	
KH_2PO_4	22 mM	
NaCl	8.5 mM	
NH_4Cl	18.7 mM	

MgSO ₄	2 mM	
CaCl ₂	0.1 mM	
FeCl ₂ /FeCl ₃	3 μM	Fe ²⁺ 為 AsqJ 之輔因子
α-KG	0.2 mM	α-KG 為 AsqJ 之輔受質
X-Gal	50 μg/mL	作為篩選受質
Ampicillin	50 μg/mL	為了確保質體存在大腸桿菌中
Agar	1.5%	

(二)、PCR 使用藥品：

2x PFU master mix、Ex-Taq DNA polymerase、2x Taq master mix、2.5 mM dNTPs、DMSO

(三)、構築基因庫所需藥品：

NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit、NdeI 與 SalI 限制酵素

(四)、本實驗使用之載體：pYCTet-Z、pBADA-Z、pET28b、pET24b

(五)、PCR 使用之引子：

表三、本實驗所使用的引子



名稱	序列 (5' → 3')
AsqJ-GAF	TTGATTTAAGGAGGTAACATATGGGAGAAAGTTGTTTAAGG
L3F	GAAGATGTTCTGAACAGCAAAGTTCTGCATCGTATTTGTAGTGA TGCCTTTCATGTGTAT
L5F	GGTGCAGTTATGGAAGTGGCACCCTCAAATCCGGCACAGCCGCT GCATCGTGATATGCGT
AsqJ-2F	GCCATCCGATTGTGGAATATCTGAAACCGG
L7F	GAAACCACCGGCACCGAAACCCGTCGTCTGCTG
L9F	TATTAGCCAGCTGACACCGNNSGAAAGCAATCTGGCAGTTCCGC GTCCGGTGATTGAAAG

L11F	GGGTTGGGCAAGCCAGCGTAGCGCAGCACCCGCGTGATNNSGGC CTGCTGACAATTCGTGG
L13F	GAACCTGAAAGCAGAACAGCCTCTGCATGATGATGAAGCAGAA CCGCTGTGTCGTGAAAC
AsqJ-GAR	TTTGATGCCTCTAGCACGCGTCGACTTAAATGGTTTCACGACAC AGCGG
L12R	CTGTTCTGCTTTCAGGTTTCATGGTTTTTTTCAATGCTATTACCACG AATTGTCAGCAGGCC
L10R	CTGGCTTGCCCAACCCAGCAGACGCTGTGCCAGCGGAGTCAGG CTTTCAATCACCGGACG
L8R	CGGTGTCAGCTGGCTAATACCCATGGTAATSNNCAGCAGACGAC GGGTTTC
AsqJ-2R	CGACGGGTTTTCGGTGCCGGTGGTTTC
L6R	GATATTCCACAATCGGATGGCTSNNACGCATATCACGATGCAGC
L4R-2	CCAGTTCATAACTGCACCMNNCAGAACCCAATAATCACCATA CACATGAAAGGCATCAC
L2R	AACTTTGCTGTTTCAGAACATCTTCACGATATGCTTTGCTAATCGG TGCCAGCACATTAAC
AsqJ-1R	CGGATGATCTTTTGTGTTTTGCTGCCGG
L1F-2	CAAAAACAAAAGATCATCCGNNKCATNNKNNKAGCACCACCAC CCGTNNKGTTAATGTGCTGGCACCG
BAD-AsqJF	GCTAGCAGGAGGAATTCACATATGATGACCAGCAAAGATC-3'
pLTet-F	ACTGAGCACATCAGCAGGAC
AsqJ-TAGF	CGTCGTCTGCTGTAGATTACCATGGGTATTAG
AsqJ-TAGR	CCCATGGTAATCTACAGCAGACGACGGGTTTC
AsqJ Δ C-XhoI	CTCGACTCGAGCAGCAGACGACGGGTTTCG
AsqJ233-XhoI	GTCACTCGAGTTAGCTAATACCCATGGTAATGGTCAGCAG
AsqJ233-R	CGACTTAGCTAATACCCATGGTAATMNNCAGCAGACGACGGGT TTC
AsqJ233-GAR	TTTGATGCCTCTAGCACGCGTCGACTTAGCTAATACCCATGGT

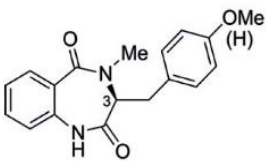
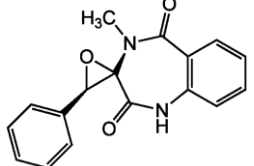
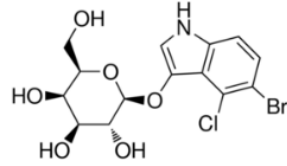
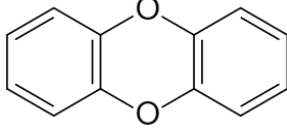
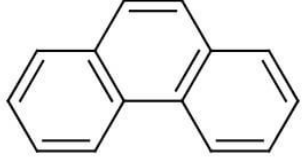
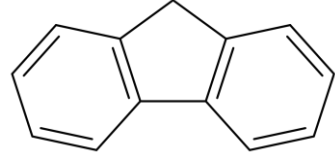
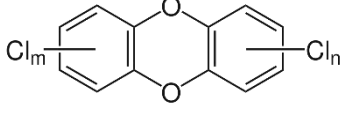
a, N, any nucleotides; S= C or G; K=T or G; M= A or C

二、器材：

				
PCR 機器	離心機	培養箱	水浴槽	分光光度計
				
滅菌釜	-80 度冰庫	DNA 膠體電泳槽	振盪器	PCR 離心管
				
精密電子秤	微量分注器	DNA 影像系統	紫外光燈箱	離心機
				
乾浴器	QIAGEN gel extraction kit	高溫加熱器	小型離心機	超音波振盪器

				
烘箱	蛋白質電泳槽			

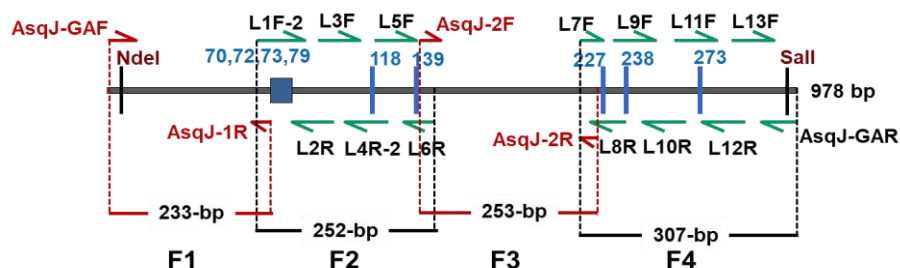
三、結構圖：

		
Cyclopeptin (AsqJ 之受質)	Cyclophenin (AsqJ 之產物)	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (亦稱 X-Gal 或 BCIG)
		
dibenzo-p-dioxin	phenanthrene	fluorene
		
dioxins		

四、實驗流程

(一)、*asqJ* 基因庫之構築與篩選

1. PCR 合成 *asqJ* 突變基因



圖六、以 PCR 合成 *asqJ* 突變基因所需引子之示意圖。

根據文獻中 AsqJ 結構之解析，已知可與受質交互作用之胺基酸分別為 N70、V72、L73、L79、M118、F139、T227、L238 及 I273 共 9 個胺基酸 (圖六中藍色標示)^[3]。欲進行 *asqJ* 突變基因之聚合酶連鎖反應 (PCR) 反應，將全長分成四部份來進行，如圖六所示，其中第一片段 (F1) 及第三片段 (F3) 沒有突變點，因此僅以一對引子進行 PCR 合成。第二片段 (F2) 與第四片段 (F4) 則分別有 6 及 3 個突變點，因此須利用所設計之引子 (圖六中綠色箭頭) 彼此之間的互補區域進行黏合後，再以 PCR 合成完整片段。如圖六所示，*asqJ* 基因之前後為具有 NdeI 及 SalI 之切位。

(1). 聚合酶連鎖反應 (PCR) 合成 *asqJ* 基因的第一、三片段 (F1 與 F3)

取 0.2 mL 微量離心管，加入表四中的藥品，並在聚合酶連鎖反應器中進行反應，反應條件如表五所示。

表四、合成 *asqJ* 第一、三片段 (F1 與 F3) PCR 中所需之藥品。

藥品	註明	體積
2x Pfu master mix	(含 Pfu DNA 聚合酶、dNTPs)	20 μ L
AsqJ-GAF 引子	(10 pmol/ μ L)	1 μ L
AsqJ-1R 引子	(10 pmol/ μ L)	1 μ L
野生型 <i>asqJ</i> 基因做為模板		1 μ L
ddH ₂ O		17 μ L
總體積		40 μ L
註：F3 片段使用 AsqJ-2F 與 AsqJ-2R 引子		

表五、合成 *asqJ* 第一、三片段 (F1 與 F3) PCR 的反應流程。

		溫度	時間	
1	DNA 變性 (Denaturation)	94°C	3 min	
2	DNA 變性 (Denaturation)	94°C	15 sec	重複 30 次
3	引子黏合 (Annealing)	55°C	20 sec	
4	引子延長 (Extension)	72°C	20 sec	
5	引子延長 (Extension)	72°C	5 min	

(2). 聚合酶連鎖反應 (PCR) 合成 *asqJ* 基因的第二、四片段 (F2 與 F4)

asqJ 中 F2 與 F4 是具有突變位點的區域，其合成是利用所

設計引子彼此之間的互補區域進行黏合後，再以 PCR 合成。先於 0.2 mL 微量離心管中加入表六中之藥品，聚合酶連鎖反應條件同表五，其中引子黏合溫度改為 46°C 進行反應。

表六、合成 *asqJ* 第二、四片段 (F2 與 F4) PCR 中所需之藥品。

藥品	註明	體積
2x Pfu master mix	(含 Pfu DNA 聚合酶、dNTPs)	20 μ L
L1F-2 引子	(10 pmol/ μ L)	1 μ L
L6R 引子	(10 pmol/ μ L)	1 μ L
mix 2	(10 pmol/ μ L) (含等體積的 L3F, L5F, L2R, L4R-2 引子)	0.4 μ L
DMSO		2 μ L
ddH ₂ O		15.6 μ L
總體積		40 μ L
註：F4 片段使用 L7F 與 <i>AsqJ</i> -GAR 引子；mix4 包括 L9F, L11F, L13F, L8R, L10R, L12R		

(3). 聚合酶連鎖反應 (PCR) 合成 *asqJ* 基因全長

asqJ 全長以 F1 至 F4 共四片段互相黏合後再以 PCR 增幅全長片段。先於 0.2 mL 之微量離心管中加入表七中之藥品，再依表八中反應流程進行聚合酶連鎖反應。

表七、合成 *asqJ* 基因全長 PCR 中所需之藥品

藥品	註明	體積
2x PFU master mix	(含 Pfu DNA 聚合酶、dNTPs)	20 μ L
AsqJ-GAF 引子	(10 pmol/ μ L)	1 μ L
AsqJ-GAR 引子	(10 pmol/ μ L)	1 μ L
AsqJ 基因的四片段	(F1 ~ F4 各 20 ng)	x μ L
ddH ₂ O		y μ L
總體積		40 μ L
註：亦可以 Ex-Taq DNA polymerase/dNTPs/10x buffer 取代 2x PFU master mix		

表八、合成 *asqJ* 基因 PCR 的反應流程

	溫度	時間	
1	94°C	3 min	
2	94°C	15 sec	重複 5 次
3	49°C	20 sec	
4	72°C	30 sec	
5	94°C	15 sec	重複 25 次
6	62°C	20 sec	
7	72°C	30 sec	
8	72°C	5 min	

每次 PCR 完成後皆必須以 2% 洋菜膠於 0.5x TAE 緩衝溶液進行電泳分離 (100 V 進行 20 分鐘) 經 ethidium bromide (EtBr) 染色後，以 DNA 影像系統進行分析，切下預期片段，以 QIAGEN gel extraction kit 進行回收 DNA。

回收 DNA 的過程如下：

- a. 切出含正確 DNA 片段的洋菜膠，置入乾淨微量離心管並秤重 (設膠重為 X mg)。
- b. 加入膠體 3 倍體積的 Buffer QG (buffer 1 μ l \approx 1 mg 膠體)。
- c. 將微量離心管置於 50°C 10 分鐘，或是直到洋菜膠完全溶解為止。
- d. 加入 X μ l 的異丙醇。
- e. 將溶液置入 QIAquick 離心管中，於 13,000 rpm 離心 1 分鐘，並拋棄下方液體。
- f. 加入 750 μ l Buffer PE，於 13,000 rpm 離心 1 分鐘，再次拋棄下方液體。
- g. 加入 30 μ l Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) 於 QIAquick 離心管中央之薄膜上，並於 13,000 rpm 離心 1 分鐘，下方之液體即為 DNA 溶液。

回收完 DNA 後，我們以分光光度計測量 DNA 的濃度，並將 DNA 存放於 -20°C 冰箱中，方便後續實驗中取定量的 DNA。

2. pYCTet-Z 及 pBADA-Z 載體之切割與回收

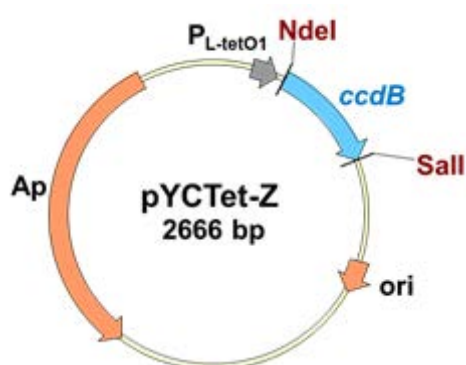
將載體 DNA 根據表九混合後，於 37°C 作用 2 小時後，以 1% 洋菜膠於 0.5x TAE 緩衝溶液進行電泳 (100 V 進行 40 分鐘)，回收步驟同 PCR 回收方式。

表九、以 NdeI 與 Sall 限制酶切割質體 pYCTet-Z 及 pBADA-Z

藥品	註明	體積
vector (質體 100 ng/ μ L)	2 μ g pYCTet 或 pBADA-Z	10 μ L
10x CutSmart buffer		3 μ L
NdeI	限制酶	2 μ L
Sall	限制酶	2 μ L
ddH ₂ O		13 μ L
總體積		30 μ L

3. 基因庫 pYCTet-AsqJm 之構築

利用 Gibson assembly 方法將 *asqJ* 全長接入 pYCTet-Z 載體 (圖七)。載體經由 NdeI 與 Sall 限制酶酵素切割後與 *asqJ* 突變 PCR 產物以莫耳數比為 1:2 混合混合後 (表十)，於 50°C 作用 20 分鐘，此即為 *asqJ* 基因庫，命名為 pYCTet-AsqJm。



圖七、pYCTet-Z 載體中之構造，依順時針分別為：P_{L-tet} 啟動子；NdeI 與 Sall 為限制酶之切位，*ccdB* 之藍色箭頭為一自殺基因，ori 之橘色箭頭為本載體之複製起點 (replication origin)，而標為 Ap 之橘色箭頭為抗 ampicillin 之基因。

表十、將 *asqJ* PCR 產物嵌入 pYCTet-Z 載體

藥品	註明	體積
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (2x)	(含 Pfu DNA 聚合酶、外切酶、接合酶)	2.5 μ L
載體	(25 ng)	1 μ L
<i>asqJ</i> PCR 產物	(21 ng)	1 μ L
ddH ₂ O		0.5 μ L
總體積		5 μ L

4. 篩選 AsqJ 活性庫

(1). 以 X-Gal 篩選 AsqJ 活性庫

基因庫 pYCTet-AsqJm 轉形送入大腸桿菌 DH5 α ，塗抹於含有 50 μ g/mL X-Gal 之 LB 培養皿，於 30°C 培養一週，觀察是否有藍色菌落形成。

a. 藉由 heat shock 將質體轉形送入 Competent cell (DH5 α)

- (a). 每管 Competent cell 中各加入 1 μ L 基因庫質體
- (b). 置於冰上 20 分鐘
- (c). 置於 42°C 水浴 1 分鐘 (此為 Heat shock)
- (d). 置於冰上 2 分鐘
- (e). 加入 700 μ L SOB 培養液放置於 37°C 以 200 rpm 搖晃 30 分鐘

b. 將前步驟菌液取 100 μ L 塗到含有 X-Gal、FeCl₃、 α -KG 與 Ampicillin 培養皿上，放置於 30°C 中靜置隔夜培養、之後觀察一至二週。

(2). 以 dibenzo-p-dioxin、phenanthrene、fluorene 篩選 AsqJ 活性庫

基因庫 pYCTet-AsqJm 轉形送入大腸桿菌 DH5 α ，以 double layer method 於 30°C 培養一週，觀察是否有菌落生長。

a. 藉由 heat shock 將質體轉形送入 Competent cell (DH5 α)

(a). 每管 Competent cell 中各加入 1 μ L 基因庫質體

(b). 置於冰上 20 分鐘

(c). 置於 42°C 水浴 1 分鐘 (此為 Heat shock)

(d). 置於冰上 2 分鐘

(e). 加入 700 μ L minimal 培養液放置於室溫

(f). 將 100 μ L 菌液加入裝含有 3.5 mL 1% agar (預熱於 42°C) 的試管中，是為 top layer

b. 將受質之丙酮溶液 (1%, 700 μ L) 均勻倒到含有 X-Gal、FeCl₃、 α -KG 與 Ampicillin 的 bottom layer agar 上。待丙酮揮發後，受質會形成白色沉澱。

c. 將含有 AsqJ library 的 top layer agar 均勻倒在 minimal 培養基。

(3). 突變 *asqJ* 基因之確認

將所篩選出的 *asqJ* 突變株，先以菌落 PCR (由表十一方式進行) 確認基因庫中的質體確實嵌入 *asqJ* 突變基因，再以 1% 洋菜膠電泳分析。確定有嵌入片段的轉形株，其質體從大腸桿菌抽取後，以定序引子 pLet-F 進行 DNA 定序，以確認突變位置所改變之鹼基，並轉譯成胺基酸，與野生型 AsqJ 進行比對。

表十一、菌落 PCR 所需之藥品

藥品	註明	體積
2x Taq Master mix	含 DNA 聚合酶、dNTPs 等 PCR 所需之藥品	5 μ L
pLet-F	與質體序列互補之引子	0.2 μ L
AsqJ-GAF	與 <i>asqJ</i> 基因序列互補之引子	0.2 μ L
ddH ₂ O		4.6 μ L
菌落	以微量吸管頭尖輕沾即可	
總體積		10 μ L

(二)、AsqJ 突變酵素之表現與純化

為大量純化 AsqJM1 蛋白，必須將 *asqJM1* 基因轉接入 pET28b 載體，並轉形送入 BL21(DE3) 菌株以 IPTG 誘導後獲得大量可溶性蛋白。將蛋白經超音波震盪器將細胞破碎後，離心後分成可溶 (S) 與不可溶 (P) 部分，再以 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 分析。可溶部分才能夠進行管純化。

1. Ni-NTA 管柱純化含有 His-tag 的 AsqJ 突變蛋白

方法如下：

- (1). 將 BL21(DE3) 含有 pET28-AsqJM1-233 質體於 50 mL 之 LB 培養液中在 37°C 中培養 2 至 2.5 小時，至 OD600 約 0.6~0.8。
- (2). 加入最終濃度為 0.2 mM 之 IPTG 以誘導基因，在 25°C 培養 4 小時。
- (3). 將菌液沉澱物懸浮於 20 mL 的 buffer A，vortex 直至均勻。
- (4). 加入 PMSF (蛋白酶抑制劑) 至濃度 1 mM。

(5). 經由超音波震碎機處理後，以 13000 rpm 在 4°C 下離心 20 分鐘。

(6). 將上清液通過 0.22 μm 孔徑的針筒過濾膜。

(7). Ni-NTA 管柱純化

- a. 加入 ddH₂O (5 倍 column 體積)
- b. 加入 Buffer A (5 倍 column 體積)
- c. 加入粗蛋白液
- d. 加入 Buffer A (8 倍 column 體積)
- e. 加入 Buffer W₂ (5 倍 column 體積)
- f. 加入 Buffer B (5 倍 column 體積) 沖提
- g. 加入 ddH₂O 清洗

Buffer A : 50mM Tris、500mM NaCl、20mM imidazole、10% glycerol

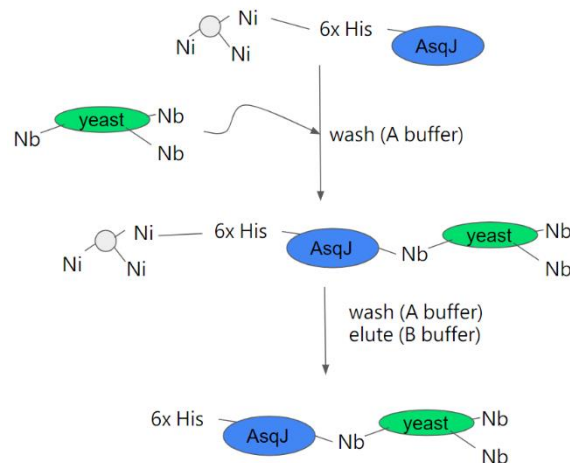
Buffer B : Buffer A 含有 500 mM imidazole

Buffer W₂ : Buffer A 含有 60 mM imidazole

2. 分子篩管柱純化 AsqJM1-233 突變蛋白

將 Ni-NTA 管柱純化後的 AsqJM1-233 突變蛋白，收集後再以 Superdex pg200 管柱進行純化，純化溶液為 50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl。收集 AsqJM1-233 蛋白並進行濃縮。

2. 篩選能與 AsqJM1-233 結合之奈米抗體



圖八、篩選能與 AsqJM1-233 結合之奈米抗體流程示意圖。其中 Nb 為奈米抗體。

- (1). 以 1 mL ddH₂O 和 50 μ l Ni-NTA 磁珠加入微量離心管，清洗磁珠。
- (2). 將微量離心管放在磁座上，待磁珠吸附後，去除上清液。
- (3). 加入 100 μ g AsqJM1-233 蛋白，在 4°C 下緩慢旋轉 1 小時使磁珠上的 Ni 和 AsqJM1-233 的 His-tag 結合。
- (4). 以 1 mL Buffer A 清洗三次。
- (5). 加入可以表現奈米抗體之酵母菌液 (yeast surface display nanobody library) 後靜置 1 小時，使酵母菌上之奈米抗體和 Ni-AsqJM1-233 複合物結合。
- (6). 以 Buffer B 沖提三次 (蒐集上清液) 後離心，將沉澱物懸浮於 -Trp 培養液，塗抹於 -Trp 培養基。
- (7). 培養基在 30°C 下靜置 48 小時，待酵母菌生長。

4. 奈米抗體蛋白之表現

- (1). 將篩選到的 pET26-NbJ3、4、7、9、11 和 23 質體分別轉形送入 BL21(DE3) 中。

- (2). 挑單一菌株加入 3 mL LB 培養液並加入 Kanamycin (50 mg/ mL) 過夜置於 37°C 培養。
- (3). 將 100 μ L 培養液放過夜後加入 3 mL LB 培養液於 37°C 培養 2 小時。加入 1 mM IPTG，於 37°C 培養 4 小時。
- (4). 將 200 μ L 培養液置入 Eppendorf 並以 12,000 rpm 離心 1 分鐘。
- (5). 將上清液倒掉，並將沉澱溶於 40 μ L 之 Tris buffer，再加入 10 μ L 的 5x sample buffer。
- (6). 將樣品煮沸 5 分鐘。
- (7). 以 70 V、20 分接著以 140 V、1 小時 40 分的條件下以 SDS-PAGE 分析 (圖二十八)。

(三)、AsqJ 突變蛋白結晶

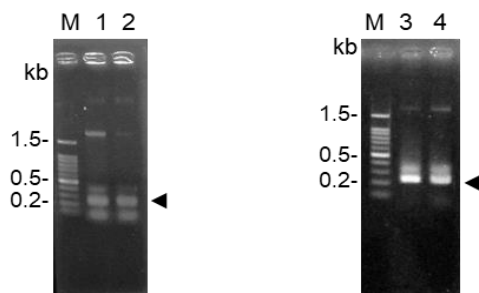
純化到的 AsqJM1-233 濃縮至 9.22 mg/mL 後，以莫耳數比為 1/1.5/2/2 的比例加入 FeCl₂、succinate 與 X-Gal，混合後置於冰上至隔夜，以 15000 rpm 離心 30 分鐘，將上清液移至微量離心管，進行蛋白質晶體培養。

晶體培養前，先於蛋白質結晶盤圓形開口處塗一圈 silicone，每一槽內加入 200 μ L 不同之結晶緩衝溶液，於矽化蓋玻片上各加 1 μ L 的結晶緩衝溶液及稀釋 1/2 倍、1/3 倍的相同結晶緩衝溶液，再於每滴結晶緩衝溶液中加入 1 μ L AsqJ/Fe²⁺/Succinate 蛋白混和液 (9 mg/mL)，於 4°C 培養數天後，觀察晶體生成情形。

參、研究結果與討論

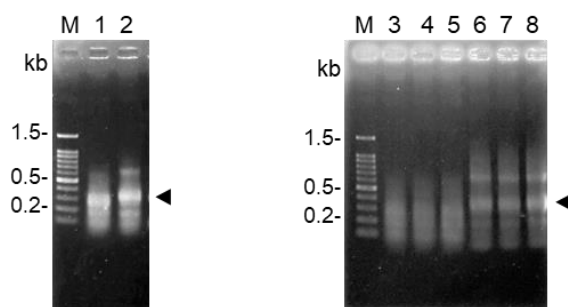
一、透過使 *AsqJ* 基因突變，改變 *AsqJ* 裡特定胺基酸，使其與不同受質結合

(一)、F1 與 F3 段之增幅：利用 PCR 方法增幅，設定不同的引子黏合溫度 52 與 55°C 進行。圖九左圖設定黏合溫度為 52°C，右圖為 55°C，顯示以 55°C 進行 PCR 的非專一性產物較少，因此之後皆以此條件進行。



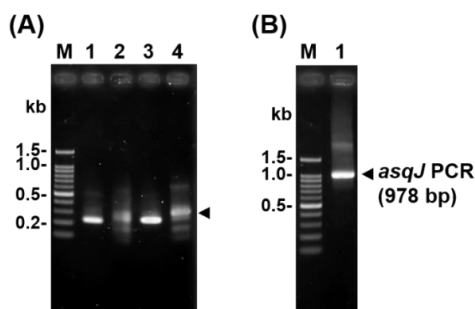
圖九、膠體電泳圖中 M 為 100-bp ladder，單數條代為 F1 PCR 產物 (233-bp)，其黏合溫度分別為 52 與 55°C；雙數條帶則為 F3 PCR 產物 (253-bp)，溫度順序同 F2。

(二)、F2 與 F4 段之增幅：利用 PCR 方法增幅出 *asqJ* 突變基因 (九個特定突變位置) 並尋找最佳條件。設定不同的引子黏合溫度 46、47、48 與 49°C 進行 PCR。由圖十結果顯示以 46°C 黏合溫度最佳。由於 PCR 產物中皆有非專一性片段，因此皆必須藉由洋菜膠電泳後回收。



圖十、膠體電泳圖 M 為 100-bp ladder，單數條代為 F2 PCR 產物 (252-bp)，其黏合溫度分別為 46、47、48 與 49°C；雙數條帶則為 F4 PCR 產物 (307-bp)，溫度順序同 F2。

(三)、*asqJ* 突變基因全長之增幅：F1~F4 片段回收後進行全長之 PCR。



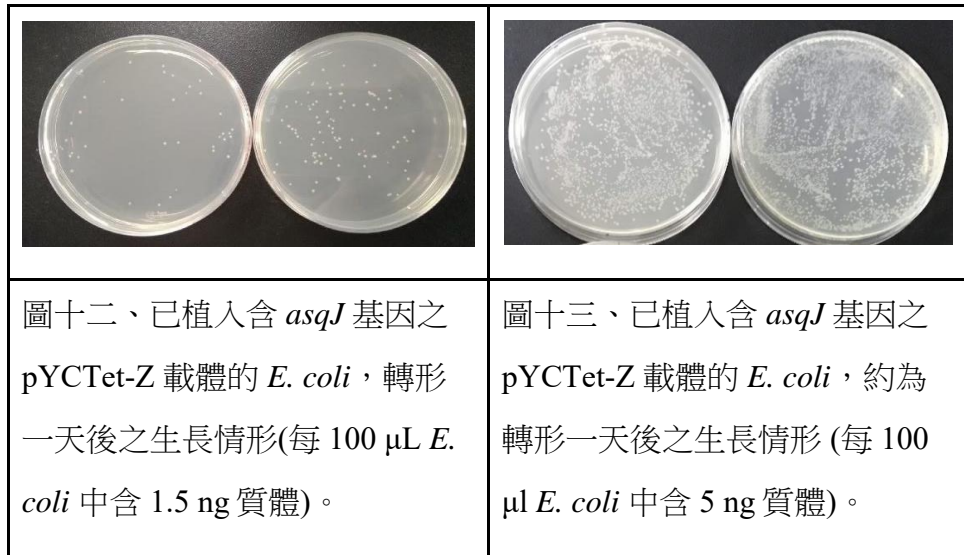
圖十一、以 DNA 膠體電泳分析 PCR 產物。(A) *asqJ* 基因之 F1 ~ F4 PCR 片段。(B) *asqJ* 基因全長 PCR 片段之大小為 978 base pairs。

(四)、構築 *AsqJ* 酵素活性庫

1. 以 Gibson Assembly Method 將 *asqJ* 基因植入 pYCTet-Z 載體

實驗中，pYCTet-Z 載體所植入的 *asqJ* 基因會取代原先 pYCTet-Z 內的 *ccdB* 自殺基因位置。故若以 *NdeI* 及 *SalI* 限制酶沒有完全切除 *ccdB* 基因並植入 *asqJ* 基因，則 *ccdB* 自殺基因會發生作用，使 DH5 α 無法生長，如此可以確保在後續在構築基因庫的菌體中皆有成功植入 *asqJ* 基因。

將嵌入含 *asqJ* 基因之 pYCTet-Z 載體依實驗流程中所述之程序轉形進入 DH5 α 後，觀察到其成功生長，如圖十二。可見 *E. coli* 有成功生長，然而菌落數量不多。



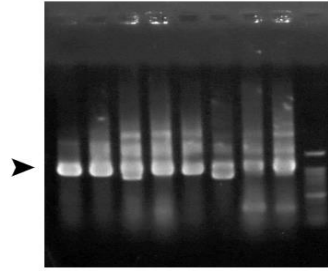
可見 *E. coli* 有成功生長，然而菌落數量不多。這意味著雖基因有成功送入質體，但轉形效率不佳，因此我們嘗試下方法以增加轉形效率。

- (1). 將 *asqJ* PCR 產物嵌入 pYCTet-Z 載體時，增加 *asqJ* PCR 產物的莫耳數比。
- (2). 轉形時增加質體和 *E. coli* DH5 α 的比值。

起初我們於每一管 100 μ L 的 *E. coli* 中加入 1.5 ng 的質體，轉形效率不佳，於是以質體的量為操作變因，測試質體和 *E. coli* 的比值與轉形效率之關係。因此改成 5 ng 的質體，其轉形效率由 $\sim 5 \times 10^5$ cfu/ μ g 增加為 $\sim 2 \times 10^7$ cfu/ μ g (圖十三)。

2. 確認 *asqJ* 基因有嵌入質體

根據表十一之流程進行菌落 PCR 之後，我們利用 DNA 膠體電泳確認質體中有成功植入的 *asqJ* 基因。pLet-F 是與載體互補之引子，而另一引子 AsqJ-GAF 則與 *asqJ* 基因互補。由圖十四之膠體電泳圖中可看出 1 kb 附近的明顯條帶，符合 *asqJ* 基因之大小 (978 bp)，可見 *asqJ* 基因有成功嵌入質體，因此在進行菌落 PCR 時方能完整複製出 *asqJ* 基因。在確認 *asqJ* 基因有成功植入質體後，我們便可以繼續進行下一階段之工作。



圖十四、菌落 PCR 之膠體電泳圖，箭頭指示處為 1 kb 之條帶

3. 以 DNA 定序確認 *asqJ* 基因突變位置

挑出圖十三的八顆菌落分別培養於 3 mL LB broth，於 37°C 隔夜培養，菌液離心之菌體，以 mini-plasmid kit 抽取質體，接著以分光光度計偵測 DNA 濃度後，加入 pLet-F 引子送至基龍米克斯公司進行 DNA 定序。由圖十五顯示此八株突變株 (M1~M11) 在預期的九個位置均有突變，表示我們所構築的 *asqJ* 基因庫成功。

	70											79	118	139	227	238	273
WT	N	H	V	L	S	T	T	R	L	M	F	T	L	I			
	NNK	CAT	NNK	NNK	KAG	CACC	CACC	ACCC	CGT	NNK	--N	NK--	NNS--	NNS--	NNS--	NNS--	NNS
M1	CT	T	C	A	T	G	A	G	C	T	A	G	C	A	G	C	A
	L	E	R						H	K	R	R	C	V			
M3	CT	G	T	G	C	C	G	A	C	T	T	G	A	G	C	T	A
	L	R	S						R	Y	P	M	S	V			
M5	CC	G	C	A	T	A	A	G	G	T	A	G	C	A	G	C	A
	P	K	G						T	*	R	R	L	S			
M6	AC	T	C	A	T	G	T	G	A	G	A	G	C	A	C	C	C
	T	V	R						S	T	N	N	G	R			
M7	GG	T	C	A	T	A	G	G	G	G	A	G	C	A	C	C	C
	G	R	G						H	T	G	R	V	P			
M8	AA	T	C	A	T	G	T	T	C	T	G	A	C	C	C	C	C
	N	V	L						L	M	F	T	V	I			
M10	T	A	G	T	T	C	C	C	A	G	C	G	G	C	A	T	G
	*	P	S						A	T	S	R	S	S			
M11	CC	G	C	A	T	G	T	T	C	T	G	A	C	C	C	C	C
	P	V	L						D	R	D	I	S	M			

圖十五、隨機挑出八株 *asqJ* 突變株定序後進行比對之結果。DNA 序列下方表示轉譯之胺基酸。WT 指野生型 *asqJ*、*表示終止子 (stop codon)、N：四種核苷酸、K：G 或 T、S：G 或 C。

(五)、AsqJ 酵素活性庫之篩選

1. LB 培養基

基因庫構築成功後，我們大量製作基因庫質體再轉形送入 DH5 α ，首先以 X-Gal 作為受質進行篩選，即使用 LB 中含有 ampicillin、FeCl₃ 及 X-Gal 之培養基，期望在培養基上篩選到藍色菌落，此表示

AsqJ 突變株的表現能夠於確切切位切斷 X-Gal 形成 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole，然後自行形成二聚體 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo 的藍色沉澱，就如同 β -半乳糖苷酶對 X-Gal 作用相同。至目前已經篩選了超過 10^7 cfu 皆沒有觀察到藍色菌落。將這些培養皿以 replica 的方式，以無菌絨布轉印菌落至含有 Cm 的培養皿上，於 30°C 培養數日。若能夠在此培養出菌落，表示 AsqJ 突變蛋白的表現可以分解 Cm 而使菌株生長。至目前沒有於 LB 培養基上篩選到可分解 X-Gal 與 Cm 的突變株，推測原因有三：

- (1). 活性庫中沒有能夠分解 X-Gal 之突變株。
- (2). LB 培養基之成分過於複雜，干擾 AsqJ 分解 X-Gal 之效率。
- (3). 產生的藍色 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo 隨即被進一步分解而無法辨識。

因此嘗試以 Minimal 培養基篩選，於下一點詳述。

2. Minimal 培養基

我們配置的 Minimal 培養基中唯一的碳源為 X-Gal，因此 *E. coli* 必要能分解 X-Gal 方能獲得碳並生長，以此做為篩選機制。我們猜測於 Minimal 培養基上較有可能篩選到菌株，因為只要 AsqJ 突變蛋白能切 X-Gal 任一位置皆可長出並成功篩選出，不像在 LB 培養基上需切於特定切位才會顯色。經 Minimal 培養基的篩選後，有成功長出一顆菌株 (圖十六)，為了確保並非雜菌或因為 *E. coli* 本身突變而使 AsqJ 突變株能在培養皿上生長，於是抽出質體後再重新送入 DH5 α 中，以確保其為 DH5 α 而非雜菌，再劃於 Minimal 培養基上，經數天培養後確定可以在 Minimal 培養基生長。而 AsqJ 野生株的 DH5 α 作為對照組，也確定無法在 Minimal 培養基存活，由此可知成功長出的菌株是因為 AsqJ 突變蛋白能分解 X-Gal，獲得碳源因而存活。接著將此突變 AsqJ 質體進行定序後，此 *asqJ* 基因於第 227 位置突變成為終止密碼子，因此並未把全長 308 個胺基酸合成完畢。由圖十七中顯示，突變的九個位點中，除了 L79 位置

沒有改變外，其他位置皆由不同胺基酸所取代，而第 227 個位置為終止密碼子，因此後續的胺基酸皆未合成。此突變蛋白命名為 AsqJM1。



圖十六、Minimal 培養基上生長之 AsqJM1。

	1				60
AsqJ wt	MTSKDHVKSQIPRLSAINDLHKIWPTVEEHGAAIIESFSLSDIVRRLNNEEVDPPFVKIEPI				
AsqJM1	MTSKDHVKSQIPRLSAINDLHKIWPTVEEHGAAIIESFSLSDIVRRLNNEEVDPPFVKIEPI				
	61	70 72 73	79		118 120
AsqJ wt	PAAKTKDHPNHVLS TTTR LVNVLAPISKAYREDVLSKVLHRLICSDAFHVYGDYWVLMGA				
AasqJM1	PAAKTKDHP FHGG S TTTR LVNVLAPISKAYREDVLSKVLHRLICSDAFHVYGDYWV LQ GA				
	121		139		180
AsqJ wt	VMELAPSNPAQPLHRDMR F SHPIVEYLPDAPATSINFLVALSPFTAENGATHVILGSHK				
AsqJM1	VMELAPSNPAQPLHRDMR T SHPIVEYLPDAPATSINFLVALSPFTAENGATHVILGSHK				
	181			227	238 240
AsqJ wt	WQNLSNVSM DATVRALMNP GDALLITDSTIHC GGAETTGTETRRLL T ITMGISQLTPLES				
AsqJM1	WQNLSNVSM DATVRALMNP GDALLITDSTIHC GGAETTGTETRRLL * ITMGISQLTP SES				
	241		273		300
AsqJ wt	NLAVPRPVIESLTPLAQRLLGWASQRS A APRD I GLLTIRGNSIEKTMNLKAEQPLHDDEA				
AsqJM1	NLAVPRPVIESLTPLAQRLLGWASQRS A APRD F GLLTIRGNSIEKTMNLKAEQPLHDDEA				
	301	308			
AsqJ wt	EPLCRETI				
AsqJM1	EPLCRETI				

圖十七、AsqJ 野生型 (wt) 及突變 AsqJM1 的胺基酸序列之比對。

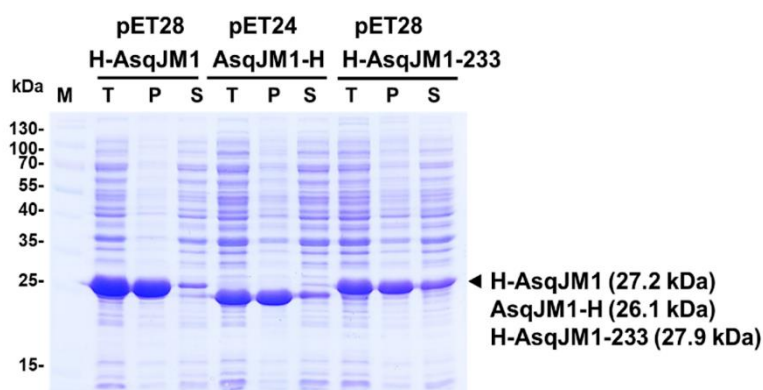
二、AsqJ 突變酵素之表現與純化

(一)、AsqJ 突變酵素之構築

將 *asqJM1* 基因片段分別構築於 pET28b 或 pET24b 後，使表現的 AsqJ 分別於 N-端及 C-端連接 6 個 histidine，因此蛋白命名為 H-AsqJM1 及 AsqJM1-H。

(二)、AsqJ 突變酵素之表現

將構築好的質體送入 BL21(DE3) 先進行小量表現、超音波破菌離心後分成可溶 (S) 與不可溶 (P) 部分，由圖十八結果分析顯示，於 25°C IPTG 誘導 6 小時後，H-AsqJM1 及 AsqJM1-H 蛋白的可溶性很低。因此根據發表的 AsqJ 結構分析，含有 226 個胺基酸的 AsqJM1 其組成活性中心的第八個 β -折板被破壞，因此我們將胺基酸延長至 233 個胺基酸位置，使其具有完整的 β -折板。利用 PCR 增幅出 233 胺基酸長度的基因片段並接入 pET28b，所表現的蛋白稱為 H-AsqJM1-233。此蛋白在相同的條件下表現後，發現可溶性蛋白有明顯增加 (圖十八)。



圖十八、SDS-PAGE 分析大量表現之 AsqJM1 蛋白。M：蛋白質標幟；T：全菌液萃取 (total crude extract)；P：不可溶部分；S：可溶部分。

(三)、H-AsqJM1-233 突變酵素之純化

為確認 H-AsqJM1-233 蛋白活性及與二價鐵與輔受質 α -KG 結合情形，因此我們即進行了 H-AsqJM1-233 的蛋白質純化。

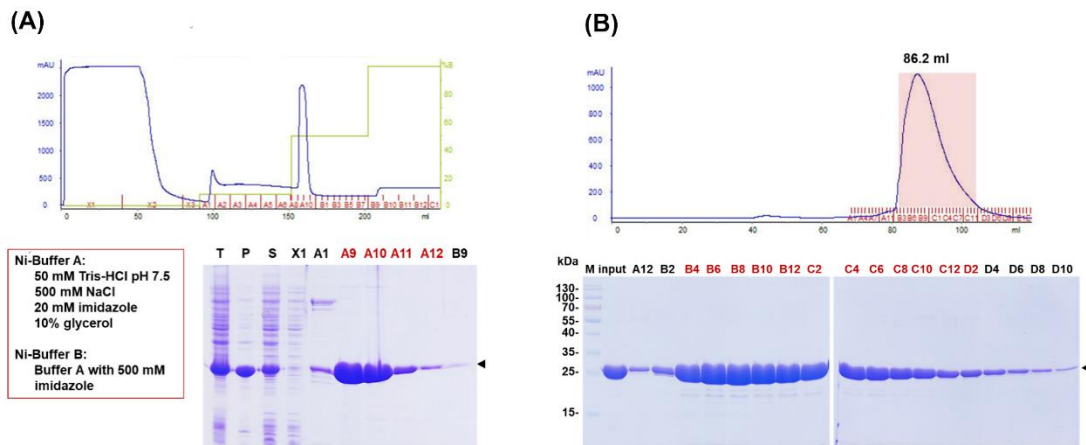
1. Ni-NTA 管柱純化

由於 *asqJm1-233* 基因轉接入 pET28b 後，於 N-端融合 6 個 His (His-tag)，可與 Ni-NTA 管柱結合，純化過程中加入 imidazole 可以去除非專一性結合蛋白，利用蛋白質純化儀純化後所得結果為圖十九 (A)。由圖在高濃度的 imidazole 可以流洗出大量的 H-AsqJM1-233 蛋白，且蛋白純度可以達到 95% 以上，收集 A8 至 A12 管數蛋白樣品並利用含有 EDTA 的緩

衝溶液進行透析，目的是要將可能殘留在 H-AsqJM1-233 裡的金屬離子去除。

2. 分子篩管柱純化

將上述透析好的 H-AsqJM1-233 蛋白，濃縮後以 Superdex pg200 分子塞管柱進行純化，其最高波峰為 86.2 mL (圖十九 B)，比對分子塞管柱標準蛋白，計算後其分子量為 28.1 kDa，與 AsqJM1-233 實際分子量 27.9 kDa 接近，表示 H-AsqJM1-233 在溶液中是以單體的形式存在而非二聚體。

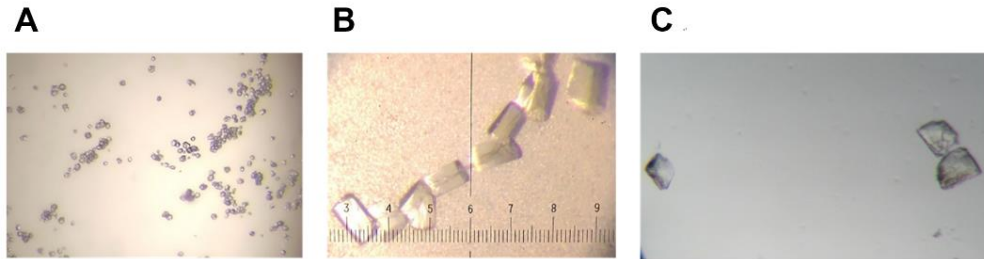


圖十九、H-AsqJM1-233 之純化。(A) 以 Ni-NTA 管柱純化 H-AsqJM1-233 蛋白；(B) 以 Superdex pg200 純化 H-AsqJM1-233 蛋白。上圖為純化之圖譜。下圖為純化後之 SDS-PAGE 分析圖。

三、H-AsqJM1-233 突變酵素與 FeCl₂ 及 succinate 共結晶

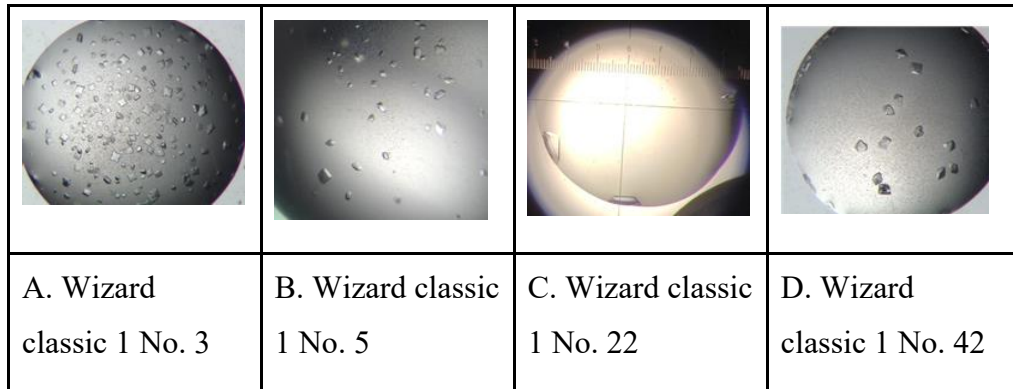
為確認 H-AsqJM1-233 突變酵素仍會與 FeCl₂ 及 succinate 進行結合，因此利用晶體結構分析確認。最終純化出的 H-AsqJM1-233 以濃縮管濃縮後並混合 FeCl₂ 及 succinate 進行晶體培養，經觀察 H-AsqJM1-233/Fe²⁺/succinate 的複合體晶體僅於 Wizard classic 2 No. 33 (1 M 磷酸氫二銨、100 mM 檸檬酸鈉 / 檸檬酸 pH 5.5、200 mM NaCl) 和 Wizard classic 1 No. 3 [15% (v/v) Reagent alcohol、100 mM CHES / NaOH pH 9.5] 培養出的晶體分別如圖二十 (A) 與 (B)。新長出的 H-AsqJM1-233 晶體 (圖二十 B) 接下來浸泡於 25%

(v/v) 乙二醇、100 mM CHES/ NaOH pH 9.5 緩衝液 (作為保護劑)，內含 2 mM X-Gal (圖二十 C)，保存於液態氮中，接著至同步輻射中心進行晶體 X 光射線繞射分析，其解析度僅 4 Å，無法進行結構解析。

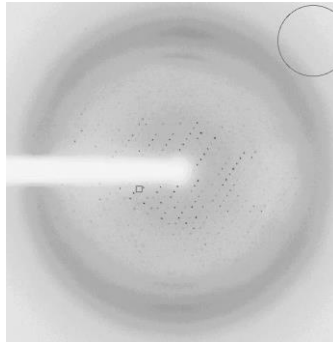


圖二十、H-AsqJM1-233 突變酵素與 FeCl₂ 及 succinate 蛋白晶體。(A) 於 Wizard classic 2 No. 33 所生成之晶體；(B) 於 Wizard classic 1 No. 3 所長出晶體；(C) 由 B 所生成的晶體加入保護劑後之晶體型態。

一開始結晶未加入受質 X-Gal，而是在加入保護劑時浸潤 X-Gal，造成晶體裂解，因此後來改為在結晶時同時加入受質。在改為結晶時同時加入受質後，於四種晶體培養液中成功培養出晶體 (圖二十一)，晶體 X 光射線繞射分析圖 (圖二十二) 解析度進步為 3.5 Å。



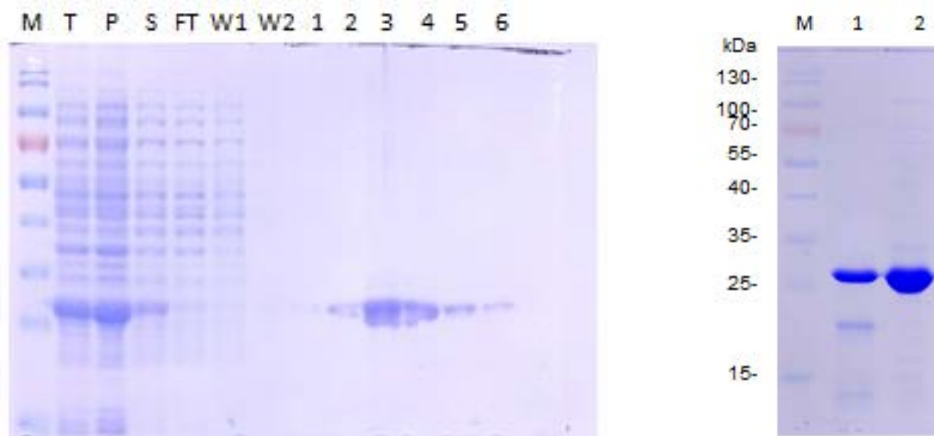
圖二十一、H-AsqJM1-233 突變酵素與 FeCl₂、succinate 及 X-Gal 之晶體。(A) Wizard classic 1 No. 3 [15% (v/v) Reagent alcohol、100 mM CHES / NaOH pH 9.5]；(B) Wizard classic 1 No. 5 [30% (v/v) PEG 400、100 mM CAPS/ NaOH pH 10.5]；(C) Wizard classic 1 No. 22 [10% (v/v) 2-propanol、100 mM Tris base/ HCl pH 8.5]；(D) Wizard classic 1 No. 42 [15% (v/v) Reagent alcohol、100 mM Tris base/ HCl pH 7.0]。



圖二十二、以 X 光繞射分析晶體，解析度約 3.5Å。

四、確認 AsqJM1-233 分解 X-Gal 之活性

1. 利用 Ni-NTA 管柱小量純化 AsqJM1-233 (重力流純化)

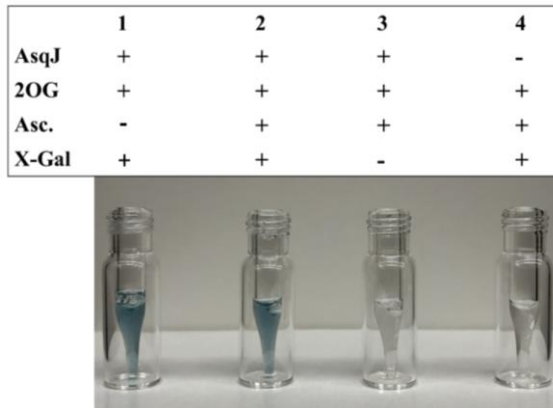


圖二十三、SDS-PAGE 分析小量表現之 AsqJM1-233 蛋白。左圖由左至右為：M：蛋白質標幟；T：全菌液萃取 (total crude extract)；1～6：沖提液；P：不可溶部分；S：可溶部分；FT：Flowthrough；W1：第一次沖洗液；W2：第二次沖洗液。右圖為 SDS-PAGE 分析濃縮後蛋白，1 至 6 沖提液收集後以蛋白濃縮管濃縮後測純度，純度可達 95%。

3. *in vitro* 確認 AsqJM1-233 分解 X-Gal 之活性

為確認 AsqJM1-233 分解 X-Gal 之活性，且創造出可測量 AsqJM1-233 活性之量化指標，以便後續以奈米抗體等方式嘗試增加其分解力時測試，我們進行 *in vitro* 之活性測試。

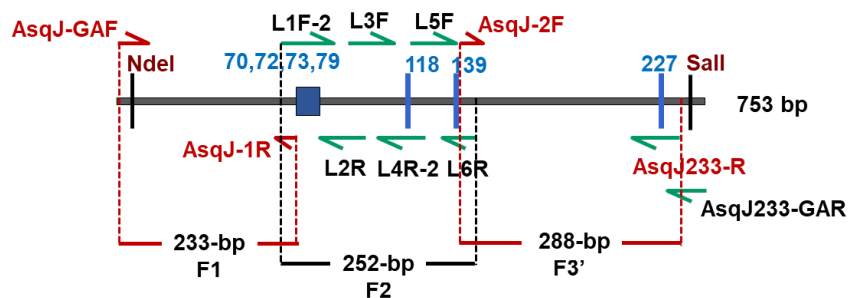
四組溶液中皆含有 Fe^{2+} ，而當溶液含有 AsqJM1-233、2OG (即 α -KG)、X-Gal 時，無論有無 ascorbate，AsqJM1-233 都能夠分解 X-Gal 使溶液呈藍色 (1, 2)。由控制組 3 (無 X-Gal)、4 (無 AsqJM1-233) 可知 AsqJM1-233 確實能分解 X-Gal，使溶液呈藍色。



圖二十四、*in vitro* 確認 AsqJM1-233 分解 X-Gal 之能力。Asc. 為 ascorbate。此圖由 Wei-Chen Chang 教授提供。

五、AsqJ233 酵素活性庫構築

由於 H-AsqJM1-233 是以單體存在，推測受質較容易進入活性中心，而增加不同受質的催化。因此將以 233 胺基酸長度為基準，構築新的 AsqJ233 酵素活性庫。此活性庫含有 7 個突變位點，為 N70、V72、L73、L79、M118、F139 及 T227，相較全長少了 L238 及 I273 (圖二十五)。

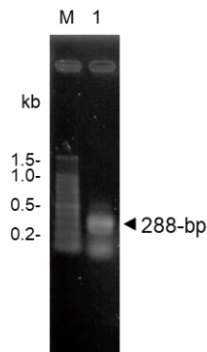


圖二十五、以 PCR 合成 *asqJ233* 突變基因所需引子之示意圖。

(一)、PCR 增幅 *asqJ233* 第三片段 (F3') DNA 片段

新版的第三片段 (F3') 的合成所需的藥品參考表四，但其中引子改為

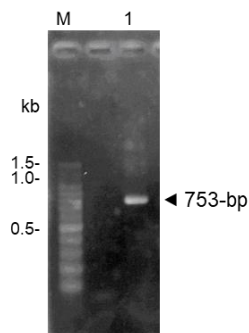
AsqJ-2F 與 AsqJ233-R；而模板則為 pET28-AsqJ233 (wt)。PCR 條件以表五進行。結果顯示 (圖二十六)，可以增幅出預期的 288 bp 片段。



圖二十六、DNA 膠體電泳圖。其中 M 為 100-bp ladder，1 條帶為 F3' PCR 產物 (288-bp)。

(二)、全長 *asqJ233* 之 PCR 增幅

新版的 *asqJ233* 全長 PCR 所加入的藥品參考表七，其中引子 AsqJ-GAR 換成 AsqJ233-GAR；而加入的模板除了先前的 F1 與 F2，再加入上述之 F3' 產物，PCR 反映條件同表八。由圖二十七顯示利用此 PCR 策略可以成功獲得 *asqJ233* 全長 PCR 產物 (753-bp)。



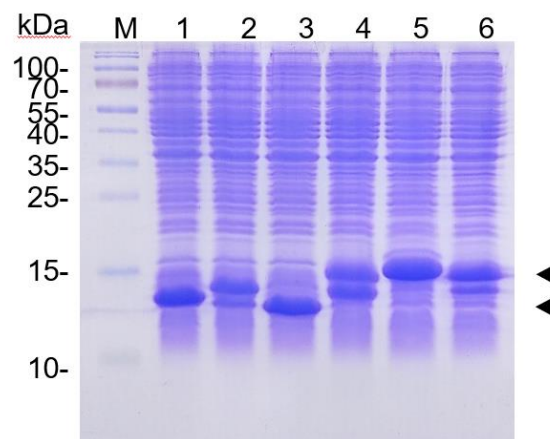
圖二十七、DNA 膠體電泳圖。M 為 100-bp ladder，1 條帶為 *asqJ233* PCR 產物 (753-bp)。

(三)、AsqJ233 突變酵素活性庫之構築：基因庫構築方式同表十，目前正在以此活性庫使用 Double Layer Agar technique 篩選 dibenzo-p-dioxin、

phenanthrene 及 fluorene，目前已篩選超過 1.9×10^6 cfu，預計十二月之前完成。

六、奈米抗體蛋白之表現

我們將篩選到的奈米抗體蛋白 pET26-NbJ3、4、7、9、11、23 及質體分別轉形送入 BL21(DE3) 中表現，再以 SDS-PAGE 分析 (圖二十八)。



圖二十八、以 SDS-PAGE 分析奈米抗體蛋白之表現。由左至右分別為：

BL21(DE3)(pET26-NbJ3)；

BL21(DE3)(pET26-NbJ4)；

BL21(DE3)(pET26-NbJ7)；

BL21(DE3)(pET26-NbJ9)；

BL21(DE3)(pET26-NbJ11)；

BL21(DE3)(pET26-NbJ23)

肆、結論與應用

一、研究結論

(一)、最佳實驗條件:

1. *asqJ* 突變基因之增幅實驗中，第一及第三片段 (F1 與 F3) 黏合溫度以 55°C 最合適；第二及第四片段 (F2 與 F4) 則以 46°C 為最佳黏合溫度。

2. 將 pYCTet-AsqJm 基因庫質體轉形送入 *E. coli* DH5 α 時，以每 100 μ L 勝任細胞 DH5 α 加入 5 ng 質體為最佳，質體量更少則轉形效率差，質體量大於 15 ng 時轉形效率則與 5 ng 時差異不大，故以每 100 μ L 勝任細胞 DH5 α 加入 5 ng 質體為最佳實驗條件。

3. 由 LB 培養基改為使用 Minimal 培養基篩選。

(二)、隨機挑選八顆 *asqJ* 基因庫的菌落進行 DNA 定序後，突變株在原先預期的九個位置均有突變，表示我們所構築的 *asqJ* 基因庫成功，以此進行後續研究。

(三)、已從 Minimal 培養基篩選到可分解 X-Gal，長度為 226 的 AsqJM1，並 *in vitro* 再度確認是 AsqJM1-233 分解 X-Gal。表示假說「透過 *asqJ* 基因突變，改變 AsqJ 裡特定胺基酸，使其能與非典型受質結合」成立。

(四)、因 AsqJM1-226 的表現蛋白大多不可溶，由結構分析推測，可能因為活性中心中第八個 β 折板不完整，因此將長度延長至 233。而根據 SDS-PAGE 結果，我們也在 N-端連接 6 個 histidine。H-AsqJM1-233 的表現蛋白可溶部分也確實明顯增加，表示蛋白結構更加穩定。

(五)、由分子篩管柱純化得知 H-AsqJM1-233 分子量，與 AsqJM1-233 實際分子量接近，表示 H-AsqJM1-233 在溶液中是以單體的形式存在而非二聚體。

(六)、因推測 H-AsqJM1-233 以單體存在，受質較易進入活性中心，故構築新的 AsqJ233 酵素活性庫，擁有 7 個突變位點，以此來篩選後續環境污染物類似結構物。

二、未來展望

(一)、目前已於 AsqJ M1-233 結晶時加入受質 X-Gal，得到解析度 3.5 Å 之晶體。期望未來收集到解析度高於 2 Å 之晶體，用於晶體 X 光射線繞射進行結構解析，進一步探討其分解 X-Gal 的詳細作用過程及機制。

(二)、持續以其他非典型受質 (戴奧辛類似結構物如 dibenzo-p-dioxin、phenanthrene 及 fluorene 等) 透過 Double Layer Agar technique 篩選 AsqJM1-233 突變蛋白，並探討其作用過程及機制。目前已篩選超過 1.9×10^6 cfu，預計十二月之前完成。

(三)、將篩選到的奈米抗體純化出後，與 AsqJ M1-233 結合，並使它構形變得穩定，增加結晶解析度，並期望能增強其分解 X-Gal 的能力。目前已篩選出六株突變株，預計十二月之前完成篩選。

三、研究應用

(一)、本研究在此非血基質鐵/ α -酮戊二酸依賴型雙氧化酶領域中，第一個以改變基因序列的方式，使其和「截然不同」的受質結合。不同於先前其他研究中酵素只能和相似結構受質結合，本研究的成功開創了酵素分解各式不同受質的可能性，將此種酶的應用潛力推升至極致。

(二)、本研究構築出之 AsqJ233 酵素活性庫，此篩選平台可供後續研究者進一步做出其他應用。而確認假說「透過 *asqJ* 基因突變，改變 AsqJ

裡特定胺基酸，使其能與非典型受質結合」成立，也代表後續研究者也可根據此邏輯發展研究。

(三)、本研究酵素活性庫的構築主要是期望藉由生物工程改變酵素的特性，此觀念將應用於更複雜的化學物質，例如分解塑膠、保麗龍等環境污染物的化學成分，對環境做出貢獻。目前已在著手進行以環境污染物類似結構物為受質的 AsqJ 突變蛋白篩選。

伍、參考文獻

- [1] Islam, M.S., Leissing, T.M., Chowdhury, R., Hopkinson, R.J. and Schofield, C.J., 2018. 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases. *Annu. Rev. Biochem.* 87, 585-620. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-044724
- [2] Liao, H.J., Li, J., Huang, J.L., Davidson, M., Kurnikov, I., Lin, T.S., Lee, J.L., Kurnikova, M., Guo, Y., Chan, N.L. and Chang, W.C., 2018. Insights into the Desaturation of Cyclopeptin and its C3 Epimer Catalyzed by a non-Heme Iron Enzyme: Structural Characterization and Mechanism Elucidation. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57(7), 1831-1835. DOI: 10.1002/anie.201710567
- [3] Mader, S.L., Bräuer, A., Groll, M. and Kaila, V.R., 2018. Catalytic mechanism and molecular engineering of quinolone biosynthesis in dioxygenase AsqJ. *Nat. Commun.* 9(1), 1-8. DOI: 10.1038/s41467-018-03442-2
- [4] Bräuer, A., Beck, P., Hintermann, L. and Groll, M., 2016. Structure of the Dioxygenase AsqJ: Mechanistic Insights into a One-Pot Multistep Quinolone Antibiotic Biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55(1), 422-426. DOI: 10.1002/anie.201507835
- [5] 廖宣任 (2019) 以結構觀點深入探討 AsqJ 所催化連續性的氧化反應機制，博士論文，國立臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所，臺北市。
- [6] Ishikawa, N., Tanaka, H., Koyama, F., Noguchi, H., Wang, C.C., Hotta, K. and Watanabe, K., 2014. Non-Heme Dioxygenase Catalyzes Atypical Oxidations of 6, 7-Bicyclic Systems To Form the 6, 6-Quinolone Core of Viridicatin-Type Fungal

- Alkaloids. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53(47), 12880-12884. DOI: 10.1002/anie.201407920
- [7] Chen, K., Arnold, F.H. Engineering new catalytic activities in enzymes. 2020. *Nat. Catal.* 3, 203–213. DOI: 10.1038/s41929-019-0385-5
- [8] Matthews, M., Chang, W., Layne, A. et al. 2014. Direct nitration and azidation of aliphatic carbons by an iron-dependent halogenase. *Nat. Chem. Biol.* 10, 209–215. DOI: 10.1038/nchembio.1438
- [9] Mayer, C., Zechel, D.L., Reid, S.P., Warren, R.A.J. and Withers, S.G., 2000. The E358S mutant of *Agrobacterium* sp. β -glucosidase is a greatly improved glycosynthase. *FEBS Lett.* 466(1), 40-44. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01751-2
- [10] McMahon, C., Baier, A. S., & Pascolutti, R. (2018). Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25, 289-296. 10.1038/s41594-018-0028-6
- [11] Song, X., Lu, J. and Lai, W., 2017. Mechanistic insights into dioxygen activation, oxygen atom exchange and substrate epoxidation by AsqJ dioxygenase from quantum mechanical/molecular mechanical calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19(30), 20188-20197. DOI: 10.1039/c7cp02687k
- [12] Su, H., Sheng, X., Zhu, W., Ma, G. and Liu, Y., 2017. Mechanistic insights into the decoupled desaturation and epoxidation catalyzed by dioxygenase AsqJ involved in the biosynthesis of quinolone alkaloids. *ACS Catalysis.* 7(8), 5534-5543. DOI: 10.1021/acscatal.7b01606
- [13] Xue, J., Lu, J. and Lai, W., 2019. Mechanistic insights into a non-heme 2-oxoglutarate-dependent ethylene-forming enzyme: selectivity of ethylene-formation versus l-Arg hydroxylation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21(19), 9957-9968.

【評語】 080003

本科展作品研究動機清楚，涵蓋的實驗內容豐富，成功篩選出能分解 X-Gal 之 AsqJ 突變株，代表能以改變 AsqJ 特定位置胺基酸，進而改變其活性位點，並分解與原先截然不同的受質，故此篩選平台深具生化技術應用潛力。

建議：

1. 圖 9：F1 與 F3 的大小若跑高濃度電泳膠應可看出差異，無法確認放大出的 DNA 具有專一性。且左右兩個電泳膠染色程度上即有差異，無法說服 55C 效果較好。
2. PCR 產物不具專一性，但隨機挑選 8 個菌落定序即能找出 8 種突變株，這些突變是否符合 primer 上所設計的突變序列？未能在報告中說明清楚。WT 序列不應用 N 表示(圖 15)，無從比對。
3. 為何 AspJ 突變株可以切斷 X-gal 作為篩選方法未說明理由。故菌落當然都是白色。
4. 發現 AsqJM1 突變株卻發現只做到 226 氨基酸，因此再將胺基酸延長至 233 個胺基酸位置，使其具有完整的 β -折板。利用 PCR 增幅出 233 胺基酸長度的基因片段並接入 pET28b，所表現的蛋白稱為 H-AsqJM1-233。卻無篩到其他全長的有活性突變 AsqJ 酵素。
5. 純化後的 H-AsqJM1-233 突變酵素有無比野生株有更佳活性並沒有測，如何說明其專一性與反應性之改變。
6. 只養了晶體但卻沒有解出可分析的高解析度結構，無法說明突變點改變的結構特性。