

肆、材料與方法

一、供試菌配

Bacillus licheniformis THSC-1，由本實驗室施宗雄博士與張資奇碩士於蛋雞糞堆肥中篩選出之革蘭氏陽性菌（附錄一），於羽毛培養基中之最適生長條件為 50 °C 及 pH 8.5（張，1999）。

二、培養基

1、Nutrient broth—Merck, Darmstadt, Germany。

2、羽毛培養基（feather medium）

其組成包含： NH_4Cl 0.5 g/L、 NaCl 0.5 g/L、 K_2HPO_4 0.3 g/L、 KH_2PO_4 0.4 g/L、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L、Yeast extract 0.1 g/L 及 Feather 10 g/L。

3、LB broth and LB agar—Difco, Detroit, USA。

三、藥品

1、一般化學藥品：

1-1、Sodium hydroxide (NaOH)，Sodium chloride (NaCl)，sulfanilic acid，

Trichloroacetic acid—Ferak, Steiheim, Switzerland。

- 1-2、Azocasein , trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-Butane (E-64) ,
isopropanol, Pepstatin A, Phenylmethanesulfonyl Fluoride (PMSF) ,
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) , Glutaraldehyde, potassium
phosphate (KH_2PO_4) , L-Leucine, Ninhydrin, Hydrindantin, Osmium
tetroxide (OsO_4) —Sigma, Louis, USA 。
- 1-3、Yeast extract—Difco, Detroit, USA 。
- 1-4、Sodium azide (NaN_3) —Merck, Darmstadt, Germany 。
- 1-5、Iso-amylacetate —Riedel-de Haën, Seelze, Germany。
- 1-6、Sodium nitrite (NaNO_2) —石津製藥株式會社，日本。
- 1-7、Hydrindantin acid(HCl) , Sodium tetraborate decahydrate($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) ,
Magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) , Potassium
dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) —林純藥工業株式會社，日本。
- 1-8、Ammonium chloride (NH_4Cl) , Methy cellosolve, Sodium acetate,
trihydrate—和光純藥工業株式會社，大阪，日本。
- 1-9、Keratin (Powder) —東京化成工業株式會社，日本。
- 1-10、Dipotassium hydrogenphosphate (K_2HPO_4) —片山純藥工業株式
會社，日本。
- 1-10、Acetic Acid, 100 % Ethanol—聯工化學，新竹，台灣。

2、離子交換介質：

CM-cellulose（弱陽離子交換劑）—Sigma, Louis, USA。

3、蛋白質定量套組：

Bio-Rad protein assay（包含 Protein assay solution 及 Bovine serum albumin, BSA）—Bio-Rad, California, USA。

4、基因選殖：

採用 pGMM-T and pGEM-T Easy Vector（3015 bp）systems—Promega, USA。

5、質體 DNA 純化：

採用 Gene-Spin Miniprep purification kit（包含 sol. I、II、III、wash buffer）—波士特生物科技公司，台灣。

四、儀器與設備

1、培養箱

恆溫培養箱：登盈儀器公司，台灣。

低溫培養箱：DBL-120 登盈儀器公司，台灣。

迴轉式低溫培養箱：HOTECH 705R 巨多儀器公司，台灣。

振盪恆溫水浴槽：登盈儀器公司，台灣。

振盪恆溫培養箱：S300R, 杏臺科技公司，台灣。

2、冷凍離心機：HERMLE 2323K，德國。

3、高壓滅菌釜：Tomin Inc., Taiwan。

4、超低溫冷凍櫃：三洋電器公司，日本。

5、傾倒式粉碎機：D3V-B 佑崎，台灣。

6、分光光度計：U-2000 Hitachi, Japan。

7、蛋白質濃縮過濾離心管：Amicon Ultra (10k), Millipore, USA.

8、灌注式蛋白質純化系統：Bio-CAD 700E, PerSeptive Biosystems, Inc.,
USA.

9、超音波細胞打碎機：Misonix, New York, USA。

10、聚合酶連鎖反應器：Minicycler, MJ Research, Inc., USA.

11、電泳槽：進亞科技公司，台灣。

12、電源供應器：MP250 Major Science Inc., Taiwan。

13、電子顯微鏡：(位於中興大學獸醫研究所)

CO₂ 臨界點乾燥機：LADD, USA。

鍍金機：SC502 Bio-Rad, California, USA。

掃描式電子顯微鏡：ABT-32, 日本。

五、分析方法

1、酵素活性測定

原理：

Azocasein是一種經過化學修飾之蛋白質，用來作為分析蛋白酶分解活性之受質 (substrate)，其製備方法為將酪蛋白 (casein) 與磺胺基 (sulfanilamide groups) 共價鍵結；磺胺基為呈色物質，sulfanilamide-azocasein可溶於鹼性溶液中，並呈現橘紅色。azocasein經由蛋白酶分解而釋出游離態的磺胺基至溶液中，再利用三氯醋酸 (trichloroacetic acid; TCA) 溶液將多餘的azocasein以及酵素蛋白質沉澱，則上清液之顏色隨著釋出磺胺基之多寡，呈現無色至橘紅色，可作為蛋白酶分解程度之代表 (Tomarelli *et al.*, 1949)。

步驟：

取 0.8 mL 0.5 % azocasein solution (溶於 50 mM 磷酸鹽緩衝液中) 加入 0.2 mL 樣品 (未知活性之酵素液) 於 1.5 mL 離心管混合均勻，同時以 0.2 mL 去離子蒸餾水 (deionized and distilled water; DDW) 取代樣品，作為對照組，於 70°C 下反應 30 分鐘，反應終了時立即加入 0.2 mL 10 % TCA solution 以沉降蛋白質，接著離心 (4°C, 10000 rpm, 10 分鐘) 取上清液 0.5 mL 加 0.5 mL 0.2M NaOH 均勻混合，測定吸光值 (440 nm in 0.1M NaOH)。

製作標準曲線：首先配製 0.025 M 之磺胺酸 (sulfanilic acid) 溶液 (內含 0.025 M NaOH 及 0.025 M NaNO₂) 混合均勻，加入 0.05 M HCl 混合均勻後加入 0.05 M NaOH (Tomarelli *et al.*, 1949)；將配製好的 0.025 M 之磺胺酸溶液稀釋成濃度為 0、250 至 2000 μmol 之標準溶液，於波長 440 nm 下測定其吸光值，根據磺胺酸濃度及所測得之吸光值製作標準曲線，得一直線方程式 $y = 345.11x + 0.0004$ ， $R^2 = 0.9994$ 。

2、蛋白質濃度測定

本項測定採用 Bio-Rad protein assay 套組。首先製作標準曲線：將濃度為 1.38 mg/mL 之牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 為標準品，並作系列稀釋；取 protein assay 試劑以滅菌水稀釋 5 倍並混合均勻備用，接著取稀釋後不同濃度之標準品各 20 μL + 1 mL protein assay 試劑均勻混合，靜置 5 分鐘後測定波長 595 nm 之吸光值，製作標準曲線，得一直線方程式 $y = 0.0378x + 0.0725$ ， $R^2 = 0.9937$ 。

取 10 μL 未知濃度之樣品 + 1 mL protein assay 試劑均勻混合，靜置 5 分鐘，測定波長 595 nm 之吸光值，對照標準曲線以換算樣品之實際濃度。

3、酵素活性單位 (U) 定義與比活性 (specific activity)

根據酵素活性之測定原理，角蛋白分解酶之酵素活性定義為：每

分鐘分解 azocasein，使磺胺酸含量增加 1 μmol 所需之酵素量稱為酵素活性單位 (U)；比活性之定義則為單位重量之酵素蛋白質所含有的酵素活性 (U/mg)。

4、茚三酮反應 (Ninhydrin reaction)

原理：

此方法針對具有 α -氨基及羧基之胺基酸和蛋白質之呈色反應，為高靈敏度之胺基酸之定量原理。茚三酮對胺基酸進行氧化脫羧作用，產生 CO_2 、 NH_3 以及比原胺基酸少一個碳的醛類。被還原的茚三酮與 NH_3 形成藍色複合物，產生的 NH_3 越多則產物顏色越深，其光譜吸收峰為 570 nm，故可利用分光光度計測定胺基酸含量；此實驗條件必須在微酸或中性 (pH 5-7) 中進行，若在鹼性環境則會褪色。hydroxyproline 及 proline 因缺乏 α -氨基，故僅產生黃色 (謝等，1985)。

步驟：

實驗進行前配製新鮮之茚三酮試劑 (Ninhydrin reagent)：ninhydrin 0.8 g +hydrindantin 0.12 g +methyl cellosolve 30 mL +4M acetate buffer (pH5.2) 10 mL。

將受測樣品以 DDW 適當稀釋，取稀釋後之樣品 2 mL 加茚三酮試劑 2 mL，沸煮 15 分鐘後立即取出並冷卻至室溫，加入 50 % 酒精 3

mL，靜置 10 分鐘後立即以分光光度計測定吸光值（Rosen, 1957）。

製作 L-leucine 標準曲線：配製濃度由 4、6 至 16 mg/L 之 L-leucine 標準品，依照上述步驟進行節三酮反應，以於波長 570 nm 下測得之吸光值，並製作標準曲線，得一直線方程式 $y = 0.0464 x + 0.0462$ ， $R^2 = 0.9975$ 。

5、統計分析

實驗至少 3 重複，依測定項目所得數據，採用 SAS 統計套裝軟體進行分析。將試驗結果以一般線性模式（General linear model; GLM）進行不同處理間之差異性測定；另以 Least-square means（LSM）測定法比較各處理組平均值之差異顯著性。

六、試驗步驟

1、Keratinase 之生產與純化

1-1、*B. licheniformis* THSC-1 生產 Keratinase 之最適培養時間

取 *B. licheniformis* THSC-1 冷凍菌醃，接種 3 % 於 Nutrient broth 中活化 9 小時，並繼代培養，使菌醃增殖，接著取菌液 3 mL（3 % v/v）接種於 100 mL 羽毛培養基中，於 50 °C 下分別進行靜態與 120 rpm 振盪培養，為期 5 天。每隔 24 小時測定酵素活性產生量，每次採樣之培養液經 0.22 μ m filter 過濾，以去除羽毛碎片及大部份小分子雜質，取

過濾後之樣品 0.2 mL 與 0.8 mL azocasein solution 於 70°C 下反應 30 分鐘，測定其酵素活性；以活性最高者，設定其活性為 100 %，計算各組之相對活性 (relative activity)。

1-2、酵素位置之確認 (胞內或胞外酵素)

將生產酵素之培養液均勻混合，取 5 mL 於離心管中，在 4 °C 5000 xg 之轉速離心 15 分鐘，取上清液並測定酵素活性，即得胞外酵素之酵素活性；取 DDW 沖洗沉澱之菌體，隨即離心 (4 °C 5000xg 15 分鐘)，取出並立即倒掉上清液，重複清洗沉澱部份 3 次後，加 5 mL DDW 混合均勻；在冰浴下以超音波振碎菌體細胞，其條件為振 1 分鐘隨即休息 1 分鐘 (以避免因超音波作用引起之溫度上升，而造成酵素活性下降)，並重複 10 次，離心 (4 °C 15000xg, 15 分鐘)，取上清液並測定酵素活性，即可測得胞內酵素之酵素活性。

1-3、粗酵素液的製備

取 *B. licheniformis* THSC-1 冷凍菌醃，接種 3 % 於 Nutrient broth 中並繼代培養，使菌醃增殖，接著取菌液 3 mL 接種於 100 mL 羽毛培養基中，於 50 °C 120 rpm 下，恆溫振盪培養 4 天。

收集上述培養完成之培養液，先以濾紙過濾，以去除較大雜質，接著於 4 °C 以 4000 rpm 離心 20 分鐘，去除沉澱之菌體，由此收集到

之上清液即為粗酵素液 (crude enzyme)，並測定酵素活性及蛋白質濃度。

1-4、超過濾濃縮

將粗酵素液置於超濃縮離心管中，此裝置分為上下兩層，上層包含分子量截留 (MWCO) 10kDa 之濾膜，以冷凍離心機在 4 °C 下離心，超過濾 (ultrafiltration; UF) 至粗酵素液體積濃縮為原來的 1/10，收集滯留液 (retentate)，並測定其酵素活性及蛋白質濃度。

1-5、陽離子交換層析 (Cation exchange chromatography)

使用管柱為 CM-cellulose 膠體管柱，以 Buffer A (含 25 mM 磷酸鉀緩衝溶液，pH 5.8) 流洗並平衡管柱後，注入 2 mL 濃縮之酵素液，再以 Buffer A 沖洗膠體管柱，除去未結合於膠體之部分。接著以 Buffer B (含 25 mM 磷酸鉀緩衝溶液，1 M NaCl, pH 5.8)，進行濃度梯度(流速 2 mL/min，100 分鐘)的緩衝溶液沖提，將溶離液以 10 mL 作一劃分收集，全程以波長 280 nm 偵測吸光值，另測定每管溶離液之酵素活性及蛋白質濃度。

2、酵素一般生化特性之測定

2-1、酵素作用之最適溫度

在 30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°C 下，各取 0.2 mL 粗酵素

液與 0.8 mL azocasein solution 反應 30 分鐘，測定其酵素活性；以活性最高者，設定其活性為 100 %，計算其他各組之相對活性。

2-2、酵素作用之最適 pH

取 0.2 mL 粗酵素液分別與 0.8 mL pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10、11 之緩衝溶液(附錄二；賴和李，1976)所配製的 azocasein solution，於 70°C 下反應 30 分鐘，測定其酵素活性；以活性最高者，設定其活性為 100 %，計算各組之相對活性。

2-3、酵素熱安定性

將粗酵素液分裝 0.2 mL 於微量離心管中，分別置於 30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°C 下保溫 1 小時後立即取出，加入 0.8 mL azocasein solution 反應 30 分鐘，測定其酵素活性；以活性最高者之活性為 100 %，計算各組之相對活性。

另將粗酵素液分裝 0.2 mL 於微量離心管中，分別置於 30°C、40°C、50°C、60°C 及 70°C 下，進行 8 天之熱安定性試驗，每隔 2 天測定其酵素活性；以第 0 天之活性為 100 %，觀察各組之殘留活性(residual activity)。

2-4、酵素之 pH 安定性

將粗酵素液分別與 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、

9.0、9.5、10、11 之緩衝溶液 1:1 混合均勻，於 4°C 下靜置 1 小時後，各取 0.2 mL 不同 pH 之粗酵素液與 0.8 mL azocasein solution，於 70°C 下反應 30 分鐘，測定其酵素活性；以測得活性最高者之活性為 100%，計算各組之相對活性。另進行 8 天之 pH 安定性試驗，每隔 2 天測定其酵素活性；以第 0 天之活性為 100%，測定各組之殘留活性。

2-5、保存性試驗

首先於粗酵素液中添加 0.02% 之疊氮化鈉 (NaN_3)，以防止實驗過程中雜菌之污染。接著取 0.2mL 分裝於 1.5mL 離心管，並依實驗所需之數量分別於 -80°C、4°C 及 25°C 下保存 20 天，每隔 4 天測定其酵素活性；設定第 0 天所測得之酵素活性為 100%，計算各組在不同保存溫度下之殘留活性。

3、酵素生化性質分析

3-1、蛋白酶抑制劑測定

此實驗使用四種蛋白酶抑制劑為 trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-Butane (E-64)、Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)、Pepstatin A 及 PMSF。首先配製此四種抑制劑之標準原液 (stock solution)：1mM E-64、10mM Pepstatin A (in 100% ethanol)、200mM PMSF (in isopropanol) 及 0.5M EDTA (pH 8.0)。

實驗進行前將此四種抑制劑之標準原液稀釋成適當濃度之操作溶液 (working solution)，各別為 1、5、10 μ M 之 E-64；0.1、0.5、1 μ M 之 Pepstatin A；0.1、0.5、1mM 之 PMSF 及 1、5、10mM 之 EDTA (附錄三) (賴，2000；Beynon *et al.*, 1989)。

取 0.2 mL 粗酵素液分別與 0.8 mL 含有不同濃度抑制劑之 azocasein solution 混和，同時與 0.8 mL 不含有抑制劑之 azocasein solution 混和者作為對照組 (control)，於 70 $^{\circ}$ C 反應 30 分鐘，測定其酵素活性。以對照組之酵素活性為 100%，計算其它組殘留之酵素活性。

3-2、天然角蛋白基質專一性測定

配製 4 種角蛋白基質溶液：將雞毛、豬毛、羊毛及頭髮分別洗淨、烘乾，並切成長短約 2 cm 之片段，以 1% 之濃度溶於 50 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 7.5) 中，滅菌備用。取粗酵素液，分別以濃度 1% 加入上述 4 種角蛋白基質溶液中，於 50 $^{\circ}$ C 120 rpm 培養 4 天，並利用茚三酮反應測定第 0 天及第 4 天之總游離胺基酸濃度變化。由於茚三酮對-胺基酸之反應相當靈敏，微量之胺基酸生成即會產生劇烈之藍色反應，因此分析時必須將樣品以 DDW 適當稀釋，再進行茚三酮反應，以利結果之判讀。

另將與角蛋白分解酶反應前後之 4 種角蛋白基質以掃描式電子顯微鏡 (scanning electron micrographs, SEM) 觀察。首先將樣品切成 0.5

至 1 cm 片段，以磷酸緩衝溶液 (pH 7.5) 重複清洗 3 次，加入 2 % 戊二醛 (glutaraldehyde) -磷酸緩衝溶液，固定 2 小時後，去上清液，以磷酸緩衝溶液重複清洗 3 次；加入鉻酸 (OSO_4) -磷酸緩衝溶液，固定 2 小時後，去上清液，以 DDW 重複清洗 4 次；再以 30%、50%、70%、90%、95%、100%、100%、100% 酒精進行系列脫水 (每次脫水 20 分鐘，去上清液，再加入新的酒精)，置入 iso-amylacetate 溶液置換 2 次 (各 20 分鐘)，以 CO_2 臨界點乾燥機乾燥。接著將乾燥之樣品置於載盤上，進行鍍金後以掃描式電子顯微鏡觀察。此試驗特別感謝中興大學獸醫系董光中副教授細心指導並借用設備。

3-3、酵素動力學

配製濃度為 1 % 之 azocasein solution，並系列稀釋為 0.95 %、0.9 % 至 0.1 % 之濃度備用；取粗酵素液 0.2 mL 分別加入 0.8 mL 不同濃度之酵素受質中，測定 70°C 下反應 30 分鐘前後之酵素活性；根據酵素活性之定義，以每分鐘所生成磺胺基之 mol 數作為反應速率 ($V = [\text{sulfanilamide}] / \text{min}$)，依 Lineweaver-Burk 取粗酵素液 0.2 mL 分別加入 0.8 mL 不同濃度之酵素受質中，測定 70°C 下反應 30 分鐘前後之酵素活性法，以 $1/V$ 對 $1/[S]$ 作圖 (呂和林，1991)，可得一回歸直線，以求得 K_m 值及 V_{\max} 值。

3-4、Azocasein 與 azokeratin 之酵素動力學關係

此試驗各別測定角蛋白分解酶對可溶性蛋白受質—azocasein及不溶性蛋白受質—azokeratin之酵素動力學反應，並比較兩者之差異。

依照酵素動力學實驗所得到之 Lineweaver-Burk 雙倒數圖；另配製濃度為 3.5 %、3.0 % 至 0.5 % 之 azokeratin solution，取粗酵素液 0.2 mL 分別加入 0.8 mL 不同濃度之 azokeratin solution，測定 70 °C 下反應 30 分鐘前後之酵素活性；以 1/V 對 1/[S]作圖，繪製 Lineweaver-Burk 雙倒數圖，以求得 K_m 值及 V_{max} 值。比較角蛋白分解酶對兩種受質（azocasein 和 azokeratin）酵素動力學之關係。

4、DNA 序列分析

4-1、聚合酶連鎖反應（Polymerase Chain Reaction，PCR）

利用 Lin 等人（1995）所發表 *B. licheniformis* PWD-1 角蛋白分解酶之基因序列來設計引子 Primer A1 及 A2，並委託明欣生物科技公司（台灣，台北）合成。Primer A1 及 A2 所設計涵蓋之序列長度為 1243 bp，其序列如下：

PA1—ATGATGAGGAAAAAGAGTT

PA2—TTTGAATCCGTTCCATGATC

取微量 *B. licheniformis* THSC-1 菌體於微量離心管中，加入 100 μ M 之 10 \times Buffer，置於 PCR 反應器中加熱 95 °C 5 至 10 分鐘，以此作為 PCR 模板；取 sample 2 μ L，並加入 100 μ M Primer（A1）5 μ L、100 μ M

Primer (A2) 5 μ L、2.5 mM dNTP 10 μ L、DNA polymerase (2 unit/ml) 2 μ L、10 \times Buffer 10 μ L，並加入 DDW 調整其總量為 100 μ L，置於 PCR 反應器中，設定反應條件為先加熱 94 5 分鐘，再以 95 1 分鐘、54 30 秒、72 1 分鐘共 35 個循環後以 72 7 分鐘，最後至 4 保存。

反應完成後，取反應產物 10 μ L 注入 1% 瓊脂凝膠 (agarose) 中，置電泳槽於電壓 100 伏特下進行 DNA 电泳 30 分鐘，結束後將膠片置於电泳影像分析系統中，以紫外線光照觀察。

4-2、接合作用 (ligation)

利用 T4 DNA ligase 使 PCR 產物與 TA cloning vector (pGEM-T) 接合，取 50 ng/ μ L pGEM-T easy vector 0.5 μ L + PCR 產物 (insert) 3.6 μ L + ligase 1 μ L + 10 \times buffer 1 μ L，並加入 DDW 3.5 μ L 使其總量為 10 μ L，在室溫下靜置一小時進行接合反應。

4-3、質體 DNA 之轉殖 (transformation)

製備 LB-Amp agar：以塗佈法在含有抗生素 ampicillin 之 LB agar 上塗上 X-gel 40 μ L 及 IPTG 40 μ L 備用；將上述接合之產物取 1 μ L 加入已經製備好的 E. coli 通透性細胞 (competent cell) 10 μ L，混合均勻，冰浴 30 分鐘後，置於 42 90 秒，再冰浴 2 分鐘，加入 500 μ L 之 LB broth，置於 37 培養一小時以上。

各取 30 μL 及 70 μL 之菌液分別塗佈於 LB-Amp agar 中，於 37 培養 14 至 16 小時，依據藍白篩選法 (blue white selection) 挑選白色菌落 (即含有重組成功之質體的細菌)，分別接入 5 mL LB broth (內含 5 μL ampicillin) 中，於 37 培養 14 至 16 小時，離心收集菌體，作為純化質體 (plasmid) DNA 之用。

4-4、質體 (plasmid) DNA 之純化

使用 Gene-Spin kit 純化質體 DNA：將上述收集之菌體置於 1.5 mL 微量管柱離心管中，首先加入 solution I 200 μL 後，加入 solution II 200 μL 並輕輕搖晃，再加入 solution III 200 μL 並輕輕搖晃，以 14000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液至 kit 之微量管柱中，以 14000 rpm 離心 1 分鐘，去除下層液體，上層加入 500 μL 之 wash buffer，14000 rpm 離心 1 分鐘，去除下層液體，再一次於上層加入 500 μL 之 wash buffer，14000 rpm 離心 3 分鐘，更換新的下層微量離心管，於上層加入 55 μL DDW 20 μL 並靜置 2 分鐘，以 14000 rpm 離心 1 分鐘，再一次於上層加入 55 μL DDW 10 μL 並靜置 2 分鐘，14000 rpm 離心 1 分鐘，下層所得之液體即為純化之質體 DNA。

4-5、限制性內切酶 (restriction enzyme) 檢測

於 1.5 mL 離心管中加入限制性內切酶 Not I 0.5 μL 、buffer D

2 μ L、質體 DNA 1 μ L，並加入 DDW 16.5 μ L 調整其總量為 20 μ L，於 37 培養一小時以上，取反應產物 10 μ L 注入 1% 瓊脂凝膠中，置電泳槽於電壓 100 伏特下進行 DNA 電泳 30 分鐘，結束後將膠片置於電泳影像分析系統中，以紫外線光照觀察反應所得之 DNA 片段。

4-6、定序

委託源資生物科技公司（台灣，台北）進行 DNA 定序分析，並利用美國衛生暨醫療研究院（National Institutes of Health, NIH）所設立的基因資料庫網站 NCBI（National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov）之 BLAST 軟體，將定序分析後所得之 DNA 序列與基因資料庫進行比對，以確認及分析結果；並利用 MEGA（Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 2.1, 2001）軟體進行 *B. licheniformis* THSC-1 角蛋白分解酶之同源性分析。