

東海大學食品科學研究所
**Graduate Institute of Food Science
Tunghai University**

食品科技組碩士論文
Master Thesis of Food Technology Section

指導教授：李根永 博士
Advisor : Ken-Yuon Li, Ph.D.

降高血壓 基因之選殖與表現
**Cloning and Expression of Antihypertensive
Peptide Gene**

研究生：余鍾蘭 撰
Graduate Student : Chung-Lan Yu

中華民國九十三年七月

July, 2004

目 錄

中文摘要-----	I
英文摘要-----	II
壹、 前言-----	1
貳、 文獻回顧-----	2
一、血管收縮素轉換酶 (Angiotensin-converting enzyme, ACE) 與 血壓的關係-----	2
(一) ACE 影響血壓之機制-----	2
(二) ACE 之性質-----	3
(三) ACE 活化位置模型-----	5
(四) ACE 抑制活性測量法-----	7
二、血管收縮素轉換酵素抑制劑(ACE inhibitors, ACEI)降血壓作用	
(一) ACEI 降血壓效果之來源與發現-----	8
(二) ACEI 作用機制-----	11
(三) ACEI 之設計-----	12
三、 肽合成方法比較-----	15
(一)化學合成法-----	16
(二)酵素性合成法-----	17
(三)DNA 基因重組法-----	18

參、 材料與方法-----	19
一、 宿主細胞(Host cell)的培養與保存-----	19
(一)材料-----	19
1.1 菌種-----	19
1.2 培養基-----	19
1.2.1 LB broth 培養基(Luria-Bertina broth)-----	19
1.2.2 LB plate 平面培養基-----	19
1.2.3 篩選型培養基(LB/Amp/X-gal agar plate)-----	19
(二)儀器-----	20
(三)方法-----	20
3.1 宿主細胞的培養-----	20
3.2 宿主細胞的保存-----	21
二、 表現載體之製備-----	21
(一)材料-----	21
1.1 表現載體-----	21
1.2 電泳試劑-----	23
(二)儀器-----	23
(三)方法-----	24
3.1 勝任細胞之製備-----	24

3.2 轉型作用-----	25
3.3 質體 DNA 之抽取-----	25
3.4 電泳分析方法-----	26
3.5 限制酶剪切反應-----	27
3.6 基因片段之回收-----	27
三、 ACEI 肽核苷酸序列之製備-----	27
(一)材料-----	28
1.1 ACEI 肽核苷酸序列之合成-----	28
(二)儀器-----	28
(三)方法-----	28
3.1 ACEI 肽核苷酸序列之黏合-----	28
3.2 限制酶截切反應-----	29
3.3 基因片段之回收-----	29
3.4 電泳分析-----	29
四、 ACEI 肽基因載體之構築-----	29
(一)材料-----	29
(二)儀器-----	30
(三)方法-----	30
3.1 接合作用-----	30

3.2 轉型作用-----	31
3.3 重組載體的篩驗-----	31
3.4 送交定序-----	31
五、 重組 ACEI 肽之表現與純化-----	32
(一)材料-----	32
1.1 定序確認成功之轉型株-----	32
1.2 一之 1.2 所述的培養基-----	32
(二)儀器-----	32
(三)方法-----	32
3.1 蛋白質的表現-----	32
3.2 蛋白質濃度測定-----	33
3.3 硫酸十二酯鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳分析(SDS-PAGE)-----	33
3.3.1 試劑-----	33
3.3.2 儀器設備-----	34
3.3.3 方法-----	35
3.4 親和性管柱層析法-----	36
3.5 以 chymotrypsin 切割融合蛋白-----	39
3.6 高效能液相層析法分離-----	39
肆、 結果與討論-----	41

一、 ACEI 肽核苷酸序列之製備-----	41
二、 ACEI 肽基因載體之構築-----	43
三、 重組 ACEI 肽之表現與純化-----	53
四、 重組 ACEI 肽之分離-----	58
五、 總結-----	63
伍、 結論-----	64
陸、 參考文獻-----	65
柒、 附錄-----	72
一、NCBI 基因庫中之質體 pEZZ18 相關資料。-----	73
二、#17 轉型株重組載體之 DNA 定序結果-DNA 定序圖譜。-78	
三、#35 轉型株重組載體之 DNA 定序結果-DNA 定序圖譜。-80	

圖 次

圖一、血管收縮素轉換酶之作用機制。	4
圖二、基 肽酶 A。	6
圖三、血管收縮素轉換酶。	6
圖四、ACE 與蛇毒 抑制物(Phe-Ala-Pro)結合之活化位置推測圖。	6
圖五、ACE 與蛇毒 抑制物(Phe-Ala-Pro)、succinylamino acid 與 captopril 等受質結合之活化位置推測圖。	13
圖六、ACE 與 captopril 結合之活化位置推測圖。	14
圖七、載體 pEZZ18 基因圖譜。	22
圖八、ACEI 肽核苷酸序列電泳圖。	42
圖九、原始宿主細胞(含載體 pEZZ18)生長於 LB/Amp/X-gal agar plate	44
圖十、轉型菌之藍白篩選測試。	45
圖十一、pEZZ18 與#17 轉型株及#35 轉型株載體電泳圖。	47
圖十二、#17、#35 轉型株之定序結果。	49
圖十三、pEZZ18 與#17 轉型株及#35 轉型株載體電泳圖。	50
圖十四、轉型菌#17 生長於 LB/Amp/X-gal agar plate。	51
圖十五、構築成功之載體說明圖。	52
圖十六、(A)pEZZ18 原始未重組融合蛋白之蛋白質吸光值測定圖。 (B)#17 菌之產生之蛋白質吸光值測定圖。 (C)#35 菌之產生之蛋白質吸光值測定圖。	54
圖十七、(A)(B)不同處理之蛋白質樣品 SDS-PAGE 電泳圖。	56、57
圖十八、(LRP) ₃ 標準品與未重組 pEZZ18 所分泌融合蛋白 HPLC 圖。	60
圖十九、(LRP) ₃ 標準品與#17 所分泌之(LRP) ₃ 肽 HPLC 圖。	61
圖二十、(LRP) ₃ 標準品與#35 所分泌之(LRP) ₃ 肽 HPLC 圖。	62

表 次

表一、不同來源之食品蛋白質水解物中分離出來的 ACEI 及其 IC_{50} 值。-9

表二、 合成方法之比較。-----15

摘 要

Leu-Arg-Pro 為一個在降高血壓方面具有高效力的三 肽，對於血管收縮素轉換酶(Angiotensin-converting enzyme,ACE)來說，為強力的競爭型抑制物。本研究主要目的是利用 DNA 重組技術建構一表現系統來生產具有抑制 ACE 的功能之降高血壓短鏈 肽。實驗依據此胺基酸殘基序列，設計兩段互補的降高血壓 肽三重複核苷酸序列 (ACEI1 & ACEI2)，利用基因重組技術將此核苷酸序列和表現載體 pEZZ18 接合起來，形成能生產降高血壓 肽的基因重組載體 (pEZZ18-ACEI)，再將此基因載體轉型進入宿主細胞 *E.coli* JM105 中，以找出能合成降高血壓 肽的轉型株。篩選出來的轉型株經由液體擴大培養後，利用親和性管柱層析膠體的專一性結合、回收具有降高血壓 肽的融合蛋白，接著將融合蛋白以 chymotrypsin 水解、釋放出(Leu-Arg-Pro)₃後，利用高效能液相層析法分析降高血壓 肽之正確性。

Abstract

The tripeptide, Leu-Arg-Pro, possesses efficacy to lower blood pressure, since the peptide is a highly competitive inhibitor of ACE (Angiotensin-converting enzyme). The objective of this study is to construct a expressing recombinant vector which confers the transformed cell to produce an ACEI (Angiotensin-converting enzyme inhibitor) peptide. The gene of the ACEI peptide consisted of two single strand complementary oligonucleotides that encode a peptide with amino acid sequence as (Leu-Arg-Pro)₃. The double strand oligonucleotides with *Sa*/I sticky end were inserted into the vector pEZZ18, and then the recombinant plasmid (pEZZ18-ACEI) were transformed into *E.coli* JM105. Some transformed colonies that were capable to produce a fused protein linking up the ACEI peptide were selected. The ACEI peptide linked with ZZ protein was isolated with an affinity chromatography. The fusion protein was treated with chymotrypsin to release the ACEI peptide. The ACEI peptide was verified with an HPLC system.

壹、前言

近二十幾年來，高血壓一直是讓國人相當煩惱的疾病之一，位居國人十大死因之列。醫藥界一直在尋找合適並具長效性的降高血壓藥物，其中主要使用的藥物為血管收縮素轉換酶抑制劑(Angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)在於阻斷 ACE 酵素在腎素-血管收縮素-皮質醛酮系統(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)造成高血壓的作用，食品界也嘗試從各式各樣的食材中分離具有抑制 ACE 功能的短鏈 肽，以開發成日常食用之保健食品。

在諸多合成 肽的方式中，化學法所使用之溶劑多具毒性且不易消除，而酵素法反應條件雖然溫和，但脯胺酸(proline)的合成仍待解決，本研究應用 DNA 重組技術製造 ACEI 肽是根據 α -玉米蛋白水解液中具有 ACEI 功能的 Leu-Arg-Pro 來設計互補的核苷酸序列，構築含有降高血壓 的基因重組載體 pEZZ18-ACEI，轉型進入宿主細胞 *E.coli* JM105 中，大量發酵並生產降高血壓 。

貳、文獻回顧

一、血管收縮素轉換酶 (Angiotensin-converting enzyme, ACE)

與血壓的關係

人的心臟就像一個幫浦，不停地將血液輸入動脈血管系統，流動的血液對血管壁產生一定的壓力，稱之為血壓。當心臟收縮時，將血液射入動脈，產生最高的壓力稱為收縮壓(高壓)；當心臟舒張時，動脈血管內壓力降到最低值，稱為舒張壓(低壓)，收縮壓與舒張壓的差值稱為脈壓，以毫米汞柱(mmHg)表示。高血壓就是由於周邊血管平滑肌的張力上升，導致小動脈阻力增加以及靜脈容積量降低，而使血壓上升。

1997年美國第六屆心血管聯合委員會將高血壓標準定為收縮壓130以下、舒張壓85 mmHg以下是正常血壓；收縮壓130~139、舒張壓80~89 mmHg為瀕臨高血壓；而收縮壓在140以上，舒張壓在90 mmHg以上就算是高血壓。

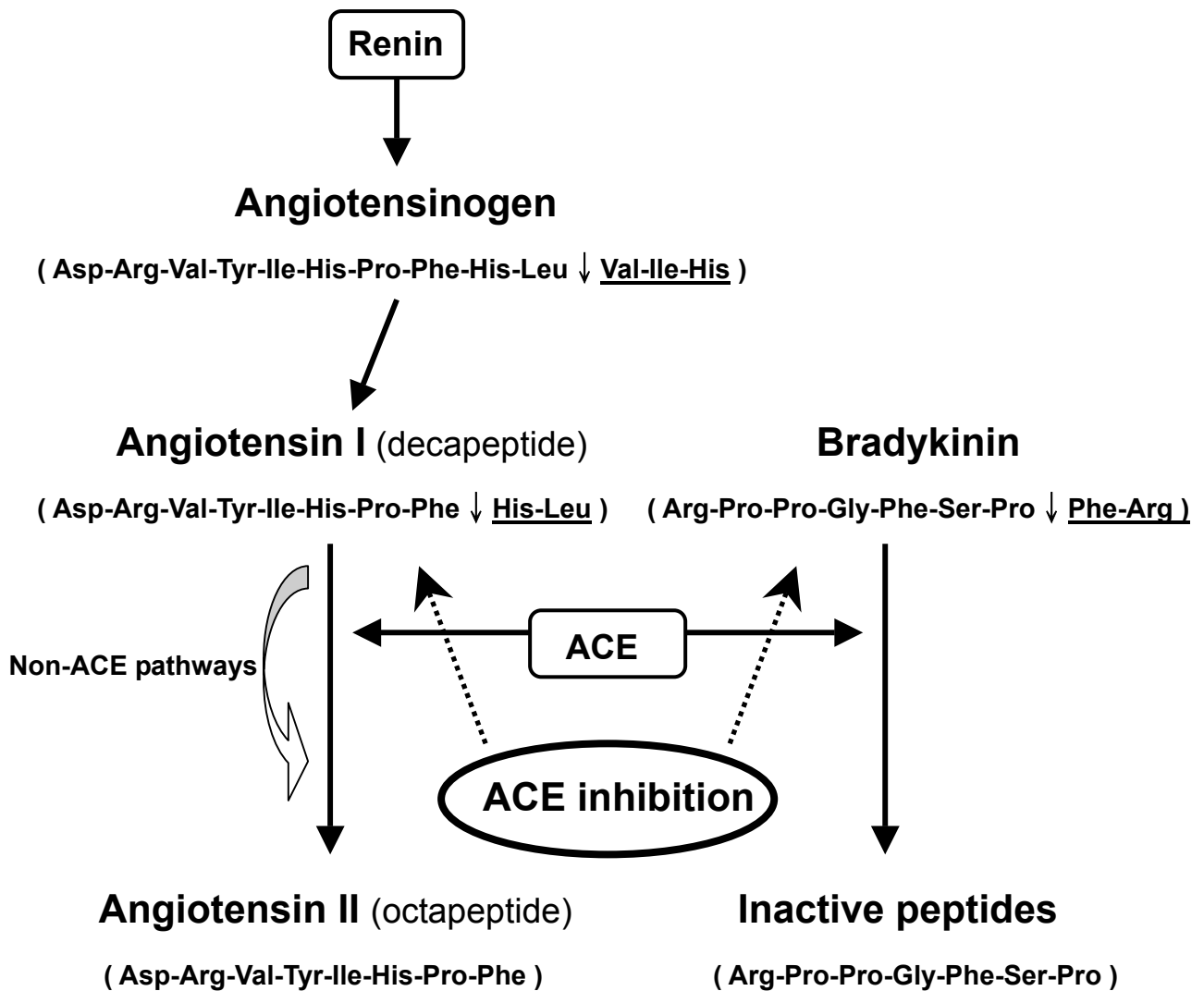
(一)ACE 影響血壓之機制

當血壓降低，腎臟血液的流量減少，血中鈉離子缺乏及交感神經受到刺激時，腎臟會釋放腎素(renin)，將肝臟所分泌的血管收縮素原(angiotensinogen)轉變為不具活性的十肽-血管收縮素I(angiotensin I, ANG-I)，而ACE在腎素-血管收縮素-皮質醛酮系統(renin-

angiotensin-aldosterone system, RAAS) 中為血壓調控及體內的水與電解質平衡所不可或缺的酵素之一(Binevski *et al.*,2003)，可催化不具活性之 ANG-I，去除末端兩個胺基酸(組胺酸和白胺酸)轉變為具有活性之八肽-血管收縮素 II (angiotensin II, ANG-II)，具有強力之血管收縮物質，會刺激交感神經系統活化、促進平滑肌收縮，造成血管收縮而使血壓上升。另外，ACE 還能水解具血管舒張作用的血管舒張素(bradykinin, BK)，去除末端兩個胺基酸(苯丙胺酸和精胺酸)，降低血管擴張的功能，同樣會造成血壓上升(Maruyama *et al.*,1985)。

(二)ACE 之性質

血管收縮素轉換酶(Angiotensin-converting enzyme, 簡稱 ACE ; kininase II ; peptidyl-dipeptidase A ; dipeptidyl carboxypeptidase I ; EC 3.4.15.1)為第一型膜固定的膜醣蛋白(type-I membrane-anchored glycoprotein)(Binevski *et al.*,2003)，位於細胞表面，其碳端有一段疏水性 肽嵌入細胞膜，使其整個具有活性的部位完全暴露在細胞膜的外側，為一胞外酵素(Hopper and Turner , 1987)；並為氯離子依賴型(Cl⁻dependent;ACE 酵素反應時，需要一定的氯離子濃度。為順序性雙反應物機制，酵素先和氯離子結合，再誘導受質與其結合)含有鋅離子的金屬蛋白酶(Zn²⁺-metalloprotease) (Bunning *et al.*,1983)。ACE 擁有兩個具有活性的作用位置，分別



圖一、血管收縮素轉換酶之作用機制。

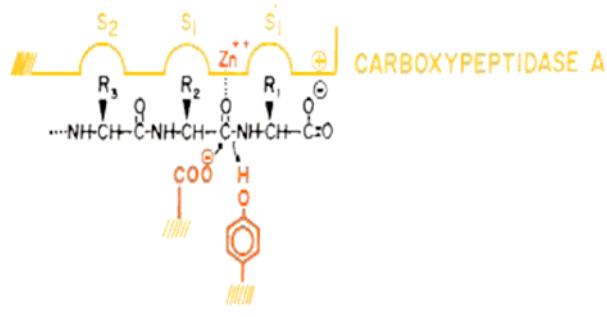
Fig.1 The mechanism of angiotensin-converting enzyme.
(Erdos,1975;Brewster *et al.*,2004)

命名為 C-domain 與 N-domain，這兩個活性區域具有幾乎相同的功能，只是對不同受質的親合力而有所差異。其分子量約為 140~160 kDa，存在於各種細胞及組織，如心、肺、腎、腦、血漿、腸道、血管內皮細胞等，以肺部分佈最多(Ondetti *et al.*,1982)。

(三)ACE 活化位置模型

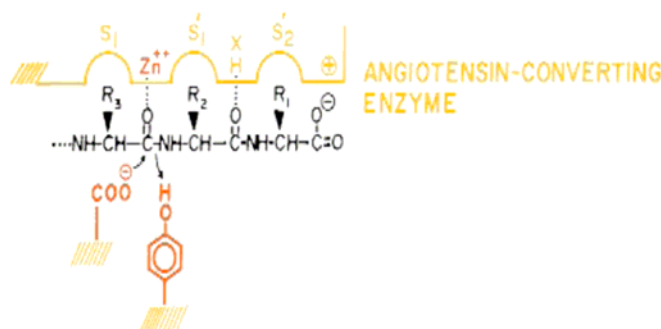
在 1960 年代，ACE 被發現在肺部的血管層中有很高的濃度，但對於它的性質卻了解不多。不知它為內切酶(endopeptidase)或是具特定位置作用的外切酶(exopeptidase)。而羧基肽酶 A (carboxypeptidase A, 見圖二)，為含鋅離子的外切酵素，會將受質碳末端的一個胺基酸切下；就許多資料顯示，ACE(圖三)為功能很相似的一種外切酶，其催化中心能夠將倒數第二個胺基酸切下，而釋出雙肽產物。所以，Ondetti 及 Cushman 便制定出一個 ACE 的假設模型，指出 ACE 為一個與羧基肽酶 A 具有相似催化機制之含鋅離子的外切型金屬蛋白酶(Ondetti and Cushman,1999)。

S_1 、 S_1' 、 S_2' 為ACE主要活性區域，而 S_2 、 S_3 、 S_4 ...等為輔助區。 S_2' 為不耐酸的側鏈，要負離子基團才能作用，對脯胺酸最有效。 S_1' 則不和脯胺酸反應，對methyl group(纈胺酸、色胺酸)最有效。 S_1 為疏水袋(針對芳香族胺基酸)。另外，鋅離子適當位於 S_1' 與 S_1 之間，參與水解從碳端數起倒數第二位與倒數第三位 鍵的裂解(圖四)。



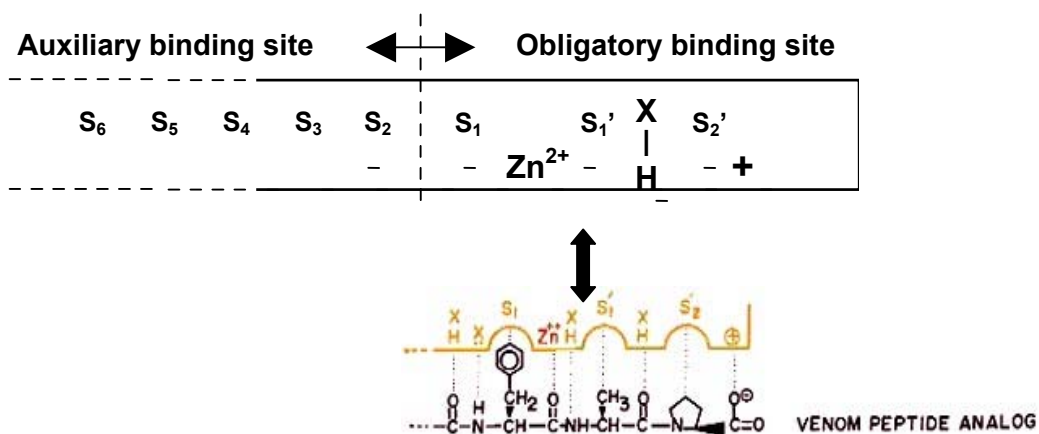
圖二、基 肽 酶 A。

Fig.2 Carboxypeptidase A. (Ondetti and Cushman,1999)



圖三、血管收縮素轉換酶。

Fig.3 Angiotensin-converting enzyme.
(Ondetti and Cushman,1999)



圖四、ACE 與蛇毒 抑制物(Phe-Ala-Pro)結合之活化位置推測圖。

Fig.4 Proposed binding to the active site of ACE by venom peptide inhibitor with terminal sequence Phe-Ala-Pro. (Ondetti and Cushman,1999)

Ondetti(1977)等提出的 ACE 活化位置模型，指出酵素表層的活化區域有兩個陽離子基，一個來自於精胺酸，另一個來自於鋅離子；因此，受質末端必須是負電荷基團才可與其形成離子鍵。在 肽抑制劑的結構與活性間之關係中也一再顯示碳端末端的精胺酸所貢獻之亞胺基甲二胺(guanidine)及離胺酸之 ϵ -胺基(ϵ -amino group)是實質影響 ACE 抑制活性的因子，例如內生性的 BK，若置換了碳端末端精胺酸殘基後，就變成了不具活性的類似物質。

(四)ACE 抑制活性測量法

測量 ACE 抑制活性的方法，目前普遍使用的是修改自 Cushman 及 Cheung (1971)之實驗方法。ACE 能把 ANG-I 碳端的 His-Leu 切下，釋出有活性的 ANG-II。以 hippuryl-histidyl-leucine (HHL)為 ACE 的受質，HHL 末端的 histidyl-leucine 會被切下，釋出具有吸收紫外光(228 nm)作用的馬尿酸(hippuric acid)，ACE 的作用越強，所釋放的馬尿酸就越多，228 nm 的吸光強度也越大，因此可利用高效能液相層析法(HPLC)測定 ACE 抑制劑添加前後 HA 於單位時間內的生成量，即可了解不同抑制劑的功效。

根據此原理，加入不同稀釋倍數的樣品，推算抑制 50%ACE 活性時所需的樣品濃度，即可得到抑制物的 IC₅₀ 值(mg protein / mL = μ M)，所需的 ACE 抑制物濃度越低表示抑制力越好。

二、血管收縮素轉換酶抑制劑(ACE inhibitors,ACEI)降血壓作用

(一)ACEI 降血壓效果之來源與發現

Goldblatt 等(1934)發現，腎動脈狹窄會造成高血壓，且在 1979 年 Oshima 等學者就已從食品蛋白質中分離出具有降低血壓功能的，統稱這類為 ACEI，能夠有效遏阻血壓升高。在醫學上，ACEI 早已為廣泛利用的降血壓藥物；這些降血壓藥物多半是短鏈的類似物(analog)，其中利用最廣也相當有效的 Captopril 就是 Ala-Pro 雙的含硫衍生物。而在食品界中，則是嘗試從各式各樣的食材中分離具有抑制 ACE 功能的短鏈肽。從食品分離之 ACEI 與合成的化學藥物最大的不同在於醫用藥物的藥效很強，食品 ACEI 效果雖沒那麼強烈，但相對來說其副作用也較低，可作為日常食用之保健食品(Saito *et al.*,1994)。這些取自食品的 ACE 抑制物來源大多是肉類或食物蛋白的水解產物，包括乳品蛋白(α_{s1} -casein; β -casein)、玉米蛋白(α -zein)、沙丁魚肉、豬肉蛋白、血漿蛋白、卵白蛋白及發酵食品等(江,2003)。從食品蛋白質水解物中分離出來的 ACEI (見表一)。在文獻(Ariyoshi,1993)中指出，從 α -玉米蛋白水解液(α -Zein hydrolysate)所純化出來的三段 Leu-Arg-Pro、Leu-Ser-Pro、Leu-Glu-Pro， IC_{50} 分別為 0.27、1.7、1.9 μ M，其中 Leu-Arg-Pro，抑制活性很強。

表一、不同來源之食品蛋白質水解物中分離出來的 ACEI 及其 IC₅₀ 值。

Table 1. Angiotensin-converting enzyme inhibitors were obtained by enzymatic hydrolysis of food proteins and their IC₅₀ values. (Ariyoshi, 1993)

Peptide no.	Compound ^a (ACEI)	Source of compound ^b	IC ₅₀ (μ M) ^c	Source of ACE
1	GPAGA Hyp	膠蛋白	8.3	豬腎臟皮質
2	GPPGA Hyp	膠蛋白	8.6	豬腎臟皮質
3	FFVAPFPEVFGK	牛-酪蛋白	77	兔子肺臟
4	FFVAP	牛-酪蛋白	6.0	兔子肺臟
5	AVPYPQR	牛-酪蛋白	15	兔子肺臟
6	VAP	化學合成	2.0	兔子肺臟
7	FVAP	化學合成	10	兔子肺臟
8	FAP	化學合成	3.8	兔子肺臟
9	LKVGVKQY	沙丁魚	11	牛肺臟
10	VKAGF	沙丁魚	83	兔子肺臟
11	KVLAGM	沙丁魚	30	兔子肺臟
12	LKL	沙丁魚	188	兔子肺臟
13	HQAAGW	沙丁魚	60	兔子肺臟
14	PTHIKWGD	鮭魚	1	牛肺臟
15	PANIKWGD	豬-GAPDH 酵素	21	牛肺臟
16	PSKIKWGD	化學合成	68	牛肺臟
17	PANLPWGSSNV	酵母菌-GAPDH	18	牛肺臟
18	GHKIATFQER	酵母菌-GAPDH	0.4	牛肺臟
19	GKKIATYQER	酵母菌-GAPDH	2	牛肺臟
20	IKPLNY	鯉魚	43	兔子肺臟
21	IKP	鯉魚	1.7	兔子肺臟
22	AVNPIR	無花果樹乳膠	13	兔子肺臟
23	LYPVK	無花果樹乳膠	4.5	兔子肺臟
24	LVR	無花果樹乳膠	14	兔子肺臟
25	LRP	α-玉米蛋白	0.27	兔子肺臟
26	LSQ	α -玉米蛋白	1.7	兔子肺臟
27	LSP	α -玉米蛋白	1.9	兔子肺臟
28	LVL	豬血清	12.2 ^d	天竺鼠血清
29	VHLPPP	化學合成	200	兔子肺臟
30	VHLPP	化學合成	18	兔子肺臟

表一(續)

31	LPP	化學合成	9.6	兔子肺臟
32	PLIYP	化學合成	4.4	兔子肺臟
33	SFQPQPLIYP	化學合成	1.4	兔子肺臟
34	LHLPLP	化學合成	2.9	兔子肺臟
35	TAP	化學合成	3.5	兔子肺臟
36	VRP	化學合成	2.2	兔子肺臟
37	YANPAVVRP	化學合成	7.8	兔子肺臟
38	IPP	化學合成	5.0	兔子肺臟
39	MYY	化學合成	9.6	兔子肺臟
40	EWPRPQIPP	蛇毒	0.56	兔子肺臟

a. The single-letter notation for amino acids is used ; N-terminal residues are at the left.

b. Peptides were obtained by enzymatic hydrolysis of food proteins unless otherwise stated.

c. Concentration inhibiting 50% of ACE activity with the substrate Hippuryl-His-Leu ; for compounds 32-39, the substrate *p*-hydroxybenzoyl-Gly-His-Leu was employed. For compound 9, the substrate was not specified.

d. The IC₅₀ value was calculated from the sequence GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

(二)ACEI 作用機制

ACEI 為一類具有抑制 ACE 活性的，這些的來源可能不同、胺基酸序列不盡相同，長度也各異，但都具有類似的功能。且為與酵素活性區域親和力比較強的競爭性抑制物，這些抑制物對 ACE 的親合度比 ANG-I 或 BK 還要強，而且也不易從 ACE 結合區釋放 (Cheung *et al.*,1980)。

Cheung *et al.*(1980)也對這類的特性做了以下歸納：(1)碳端 (C-terminal)胺基酸是此抑制物與 ACE 作用的關鍵。較具功能的 ACEI 一般在末端的胺基酸大多為芳香族的胺基酸 (如色胺酸,酪胺酸及苯丙胺酸)或是為亞胺酸類的脯胺酸。(2)氮端(N-terminal)最具活性是長鏈或具有分岔支鏈的疏水性胺基酸(如白胺酸,纈胺酸及異白胺酸)。反之，如果氮端為脯胺酸的話，則會使活性降低。目前市售的 ACEI，例如 Captopril、Enalapril、Lisinopril 等藥物的共同特徵，就是在碳端的胺基酸皆為脯胺酸，具有不易被水解的特性，並且分子量很低，其主要作用即是因為 ACE 抑制劑中所帶有的電荷基團(sulfhydryl-, carboxyl- or phosphorus-containing group)與 ACE 的活性部位緊密結合，而抑制了 ACE 的反應。另外，因雙及三容易被腸道吸收，因此 ACEI 在消化道中可不被水解而直接吸收到達體內作用位置(Yamamoto,1997;張,1999)。

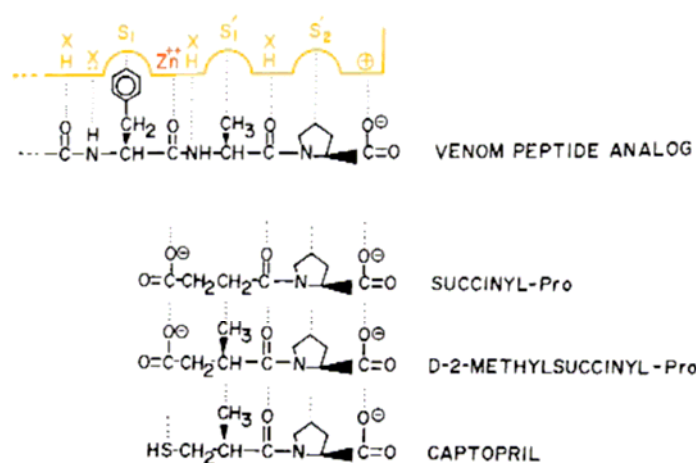
ACEI 作用機制見圖一所示，主要是作用在 ACE 酵素上，藉由阻斷 ACE 將 ANG-I 轉換成 ANG-II 的步驟，減少 ANG-II 的產生，因而防止血壓的上升。或者是阻斷 ACE 將 BK 轉變為不具活性的物質之作用，而保有血管舒張的功能。

(三)ACEI 之設計

不同階段抑制劑設計的演變，目的不外乎是要改善親合力、作用的長效性、較佳的生物可獲性等(Coric *et al.*,1996)。Teprotide 為 1970 年代所發現的蛇毒 肽，可謂為第一個 ACEI；具有長效性，但在口服治療方面缺少活性。之後，根據結構與活性的研究去合成出蛇毒 肽類似物，Phe-Ala-Pro(圖五)。不但改善受質碳末端胺基酸與酵素的結合力，這三個胺基酸的側鏈與 ACE 酵素主要活性區域(S_1 、 S_1' 、 S_2')的專一性也增高(Ondetti and Cushman,1999)。

同篇文獻也指出另有些研究學者是藉由設計 基胜肽酶 A 的抑制劑來輔助 ACEI 的尋找。並稱此抑制劑為 benzylsuccinic acid (a biproduct analog inhibitor)，他們的實驗結果顯示 benzylsuccinic acid 因含芳香族胺基酸之特性可與酵素活性部位結合。而作者同意此結果並加以論述，推測 succinyl carboxyl group 才是真正與酵素之 Zn^{2+} 離子結合的關鍵部位；也更進一步推測類似的 succinyl amino acid 衍生物的結構和雙肽產物與 Zn^{2+} 結合的功能很相似(圖五)。

將結構與活性的研究再延伸，顯示 D-2-methylsuccinyl-Pro(圖五) 也很適用與 Zn^{2+} 結合，唯獨抑制力略遜一籌；若是把與 Zn^{2+} 結合之 carboxyl group 換成 sulfhydryl group 後則可將抑制力提高 1000 倍。也由此而發展出一個具有強抑制力的競爭型抑制物，Captopril (D-3-mercapto-2-methylpropanoyl-L-proline)(見圖五、六)。不但分子量僅為 Teprotide 的五分之一，嚴格來說，並沒有 鍵，所以毫無疑問，其口服途徑的抗高血壓能力比非口服途徑來得佳。同時，也為第一個被熟知且真正使用於抑制 ACE 酵素活性部位之降高血壓藥物。

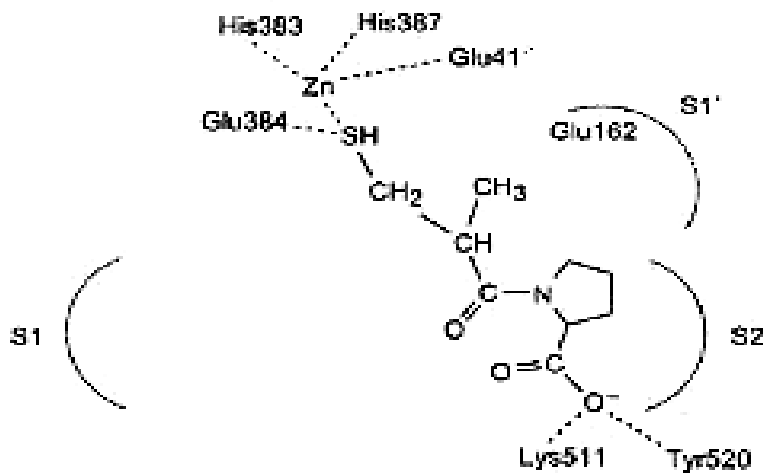


圖五、ACE 與蛇毒 抑制物(Phe-Ala-Pro)、succinylamino

acids 與 captopril 等受質結合之活化位置推測圖。

Fig.5 Proposed binding to the active site of ACE by a substrate or venom peptide inhibitor with terminal sequence Phe-Ala-Pro, by succinylamino acids, and by captopril. (Ondetti and Cushman, 1999)

另外，由圖六可看出，Captopril 與 S₁ 部位沒有交互作用；與 S₁' 位置只有些許作用，而主要的 sulfhydryl group 與 Zn²⁺ 及 Glu384 作用；至於碳端的脯胺酸 carboxyl group 在 S₂' 區域則是與 Lys511 及 Tyr520 作用(Brew,2003)。



圖六、ACE 與 captopril 結合之活化位置推測圖。

Fig.6 Proposed binding to the active site of ACE by captopril.
(Brew,2003)

三、ACEI 肽合成方法探討

肽合成的方法一般分為固相化學合成法、液相化學合成法、酵素性合成法及 DNA 重組法等，其中固相與液相化學合成法即為組合化學。而各合成法之比較如表二所示。以下也把各合成法稍作說明。

表二、 合成方法之比較。

Table 2. General comparison of currently available approaches for the synthesis of peptides. (Gill *et al.*, 1996)

	固相化學合成法	液相化學合成法	酵素性合成法	DNA 重組法
一般規模	毫克~數十克	克~噸	克~噸	克~噸
合成長度	中~長鏈	短~中鏈	短鏈	長鏈~蛋白質
序列限制	無	無	Proline 的合成技術仍待解決	無
成本	非常昂貴	昂貴	較不昂貴	不昂貴
反應條件	有害	有害	溫和 ~ 無害	溫和
產品純度	非常高	高	中~高	低~中
應用	僅用於實驗室	廣泛應用於實驗室及工業生產	工業生產	廣泛應用於實驗室及工業生產
技術與純度	成熟	成熟	發展中	仍在發展中
未來展望	成本昂貴，可用於高價值的保健生產	高價值短~中鏈保健的生產	中~高價值食品配料及保健生產	適用於長鏈和蛋白質的生產

(一)化學合成法

1.1 固相合成法

1959 年左右，美國紐約洛克斐勒大學梅里菲爾德(Robert B. Merrifield)提出：利用共價鍵結合的方式，將所要合成的 連接在固體小珠粒上，這樣就可以只用簡單的過濾方式來沖洗去除過剩的反應物及副產物，而不需要額外進行分離純化的操作，而且合成出來的 在清洗過程中不會有所損失，如此可以達到自動化合成的目標，也由於在整個合成過程中繼續增長之多 是以不溶解的固相存在的，因此稱為「固相 合成法」。至於反應所需的固體小珠粒材料由聚苯乙烯加以化學修飾，使其末端帶有氯甲基，以便和第一個胺基酸的 基發生反應而形成共價鍵結，藉此固著在小珠粒上。一旦合成反應結束，可以藉由氫氟酸將整段合成的 從聚苯乙烯小珠粒直接切下而獲得產物。這樣的珠子稱為「梅里菲爾德樹脂」(Merrifield resin)。而固相化學合成法有幾個優點：(1)多孔性固態樹脂基之化性、物性很穩定，且在非極性溶液中體積容易膨大，使反應物在空隙中容易進行，又增長中之多 因固著在不溶解之樹脂基上，只要充分洗濯就可將溶解性之多餘反應物或副產品除去，不必精製中間產物，因此而簡化了合成過程，並減少機械操作時造成量的虧損。一般用此法合成之多 ，產量相當高，約有 50~80%之回收率。(2)全

部過程可用機器自動操作，非常簡便，免除乏味的人工操作。(3)操作速度快，一天約可完成六個胺基酸的聚合。(4)消旋現象(racemization)不易發生，故合成之多具有生物功能。缺點是反應的種類受到限制，目前主要用於多肽藥物的製備。連續進行多步反應，一直到最後才純化，去除反應未完全的成分或副產物，不確定性較大。

1.2 液相合成法

在液相化學合成法方面，大多數經典的化學合成反應都是在溶液中進行的。而液相合成是在各自的微型反應器內進行，是典型的並行合成(parallel synthesis)，其優點是幾乎適用於所有反應，反應物均一混合且快速移動讓反應機會增加，樣品製備量較大，可以在每個步驟提純並分析反應化合物。缺點是一次能合成的化合物數目較少，而反應完成後，需要的化合物和副產物都一起在反應混合物中，需要分離的步驟。液相合成的每個步驟都需經過純化，雖然做得較辛苦，但結果卻相當清楚(謝,2002)。

(二) 酵素性合成法

酵素性合成法有許多優點，包括反應比較溫和；使用之藥劑毒性較低；酵素催化位置具方向性，因此不須過度保護；酵素反應具立體空間性，產物沒有消旋化的顧慮。然而，酵素法並非沒有缺點，利用蛋白酶催化的合成，最明顯的副作用是蛋白酶本身的水解效能會

造成許多不必要的產物生成。而許多技術尚未成熟，包括適合使用的蛋白酶的缺乏、蛋白酶在有機溶劑中的特性尚未完全明瞭，以及產率過低等，都限制了酵素性合成法的廣泛應用(Gill *et al.*,1996)。

(三)DNA 基因重組法

多年來，隨著分子生物技術的日新月異、發展與進步快速。以生物技術來生產降高血壓 便可以實現。早在 1977 年，Itakara *et al.* 就已將化學合成之生長激素因子(Somatostatin)基因轉殖進入大腸桿菌中，成功製造出生長激素因子。而在 1982 年美國 FDA 批准以 DNA 重組技術於大腸桿菌中製備人類胰島素(human insulin)。並且，本研究室學長也成功地構築出含牛肉鮮味 基因之載體進入大腸桿菌及應用融合蛋白系統生產牛肉鮮味 ，鑑定後為正確的胺基酸序列(林,2002)。

另外，DNA 重組法沒有化學合成法的缺點，且若整個合成系統建立良好，將可重複大量地合成所要的 。但目前的技術在基因表現與產品的回收上仍有問題，有待進一步改進(陳,1999)。

參、材料與方法

一、 宿主細胞(Host cell)的培養與保存

(一) 材料

1.1 菌種

Escherichia coli JM105 (ATCC47016)購自 Amersham Pharmacia Biotech (U.S.A)。

Genotype : *endA1, thi, rpsL, sbcB15, hsdR4, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^q ZΔM15]*

1.2 培養基

1.2.1 LB broth 培養基(Luria-Bertina broth)之製備

Tryptone (Difco, U.S.A)	10.0 g
Yeast extract (Difco,U.S.A)	5.0 g
NaCl (聯工,Taiwan)	10.0 g
In distilled water	1L

混合均勻之，滅菌 (121°C、15 mins)後使用。

1.2.2 LB agar plate 培養基之製備

同 LB broth 培養基配方，再加上 1.5% Bacto[®] Agar (Difco, U.S.A)，混合均勻之，經滅菌後以適當體積分裝於培養皿中，降溫凝固後始可使用。未使用之平面培養基可倒置封於袋中，置於 4°C 儲存備用(保存期限約兩週至一個月)。

1.2.3 篩選型培養基(簡稱 LB/Amp/X-gal agar plate)之製備

所需培養基：LB agar plate 培養基配法同上。

所需試劑：

(1)Amp (Ampicillin, Sigma®, U.S.A)：以 ddH₂O 配成最終濃度為 5 mg/mL 的濃度後以 0.22 μm 無菌過濾膜(MILLIPORE, MILLEX®GP, 33 mm)過濾，置於 4°C 儲存備用。

(2)X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside, MDBio, Inc., Taiwan)：以 Dimethylformamide(Merck, Germany)配成 20 mg/mL 的濃度後以鋁箔紙包住，置於 -20°C 儲存備用。

配法：

將滅過菌的 LB plate 培養基在凝固前(約 42°C)，加入 Amp 使其最終濃度為 50 μg/mL，均勻混合後適量分裝於培養皿中，待凝固後加入 80 μL X-gal，用 L 棒均勻塗抹即完成製備。

(二) 儀器

(1)單門式高壓滅菌釜(YANG TA MIN INSTRUMENT CO.,LTD Model:YMT)。

(2)迴轉式低溫震盪培養箱(YIH DER, TU-400)。

(3)分光光度計(Model:UV2100, Unico™, U.S.A)。

(三) 方法

3.1 宿主細胞的培養

接種環沾取 *Escherichia coli* JM105 接種至小量(約 6 mL)之 LB broth 中，37°C 溫度下在培養箱震盪培養隔夜(約 16~18 小時)。

3.2 宿主細胞的保存

接種環沾取 *Escherichia coli* JM105 接種至 LB broth 中，37 °C 下在培養箱中震盪培養隔夜(約 16~18 小時)。隔天，轉移 1% 體積之過夜培養液接種至較大量之 50 mL LB broth 中至 $A_{600} = 0.4\sim 0.6$ 左右，取 0.2 mL 培養液 + 0.1 mL 滅過菌的 20% 甘油分裝於冷凍小管中，經液態氮快速凍結後，置於 -80°C 儲存備用。

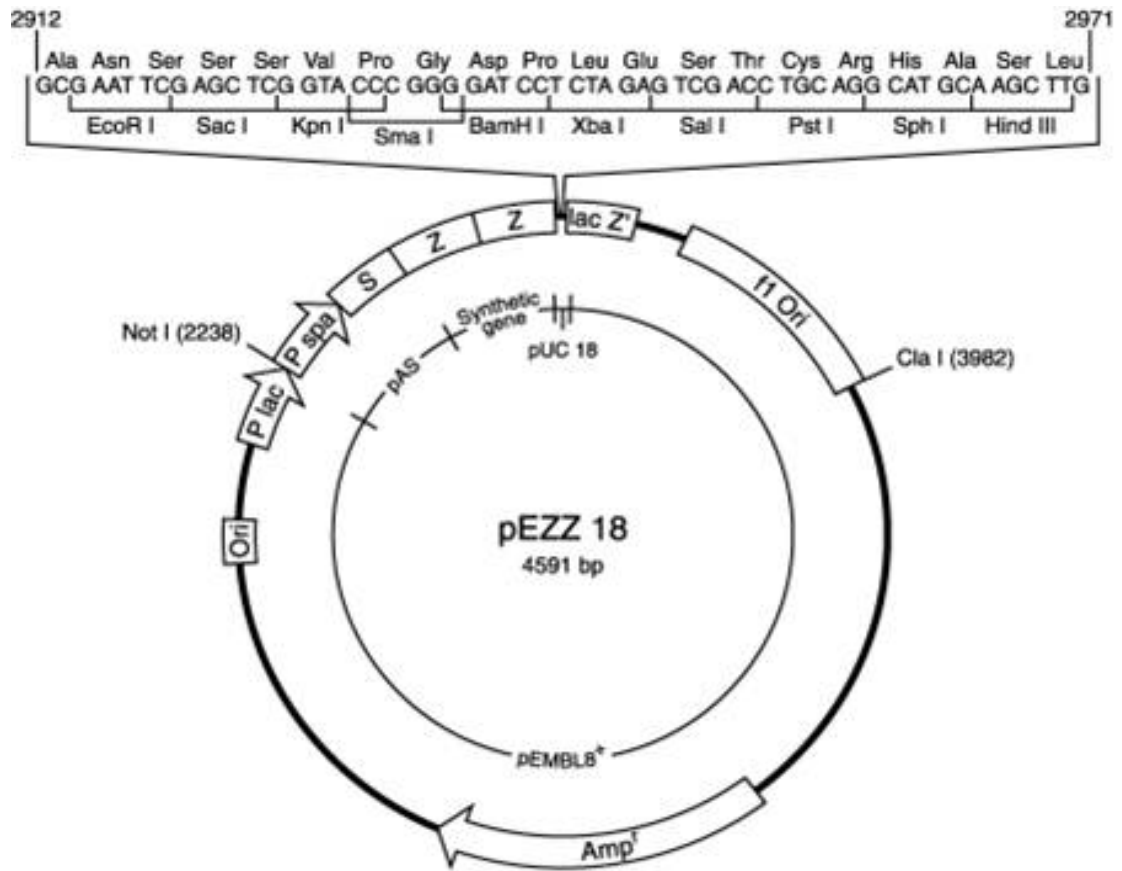
二、表現載體之製備

(一) 材料

1.1 載體 pEZZ18

本研究所使用之載體 pEZZ18 購自 Amersham Pharmacia Biotech (U.S.A)，大小為 4591 bp，具有抵抗抗生素的抗藥性基因篩選標記(Amp^r)，以及許多單一的限制酶(即 *EcoRI*、*SacI*、*KpnI*、*SmaI*、*BamHI*、*XbaI*、*SalI*、*PstI*、*SphI*、*HindIII* 等)切割位點。另外，尚有 *lac promoter* 及 *lacZ'* 基因，可藉由與宿主細胞之 α -complementary 的性質，而具有藍白篩選的功能。插入外來序列之載體由於基因被阻斷而無法產生 β -半乳糖苷酶去分解受質 X-gal (人工合成之乳糖類似物)因而無法產生藍色色素，所以正確構築之載體轉型後之宿主細胞將會呈現米白色。

除了這些上述載體的基本性質之外，還接上了一段能轉譯成 14



圖七、載體 pEZZ18 基因圖譜。

Fig.7 The genetic map of pEZZ18.

kDa 的 "ZZ" 融合蛋白的核苷酸序列。所以，當外來基因成功插入載體 pEZZ18 接合之後，經轉型進入宿主細胞，再經轉錄、轉譯則可產生帶有 ZZ 融合蛋白。便可利用此特性經 IgG-Sepharose[®] 親和性膠體專一性的結合，將融合蛋白經親和性層析管柱分離純化下來。圖七為 pEZZ18 之基因圖譜。

為了得到大量的 pEZZ18 質體，利用 pEZZ18 可在 *Escherichia coli* JM105 中自行複製的特性，將 pEZZ18 依照 Molecular Cloning 3rd ed. 的方法轉型於 *Escherichia coli* JM105 中，再將其均勻塗抹於含有 Amp(50~70 μ g/mL) 的 LB plate 上，37 $^{\circ}$ C 培養箱倒置培養過夜；隔天，挑選 LB plate 上的單一菌落接種於含有 Amp(50 ~70 μ g/mL) 的 LB broth 中，37 $^{\circ}$ C 震盪培養過夜，再離心收集菌體、抽取質體 pEZZ18 備用，並以電泳分析其效果。

1.2 電泳試劑

瓊脂膠、TAE buffer(50X TAE buffer, Amresco®, U.S.A)、DNA 標準分子量 marker、追蹤染劑、EtBr(Ethidium Bromide, Bio-Rad, U.S.A)、蒸餾水。

(二) 儀器

(1) 培養箱(SANYO incubator, Japan)。

(2) 桌上型離心機(MIKRO 22R, Hettich, Germany)。

- (3)乾浴加熱器(Digital Dry Bath. Incubator, GENEPURE TECHNOLOGY)。
- (4)恆溫水浴槽(KANSIN INSTRUMENTS, WB212-B1)。
- (5)冷凍循環水槽(FIRSTEK, B403L)。
- (6)大同微波爐(台灣)。
- (7)鑄膠齒模、鑄膠槽、電泳槽(MAJOR SCIENCE, MT-108, Taiwan)。
- (8)電源供應器(MAJOR SCIENCE, MP-250, Taiwan)。
- (9)紫外光箱(Photo-Print IP-008-SD, Vilber Lourmat, France)。

(三) 方法

3.1 勝任細胞(competent cell，供轉型作用使用)之製備

Escherichia coli JM105 在進行轉型作用之前要先以氯化鈣 (Sigma®, U.S.A.)處理，使其成為勝任細胞方可進行轉型作用。製備方法主要是參考 Molecular Cloning 3rd ed.(Sambrook, 2001)的方法略作修改：

接種 *Escherichia coli* JM105 至 LB broth 中，置於 37°C 培養箱中震盪培養過夜。隔天，取 1% 過夜培養液加到 50 mL LB broth 中。37°C 震盪培養至 $A_{600} = 0.4 \sim 0.6$ 左右。置於冰上 20 分鐘。6000 rpm，4°C 下離心 20 分鐘，將上清液倒掉。加入與菌液同體積之 0.1 M 冰氯化鈣(CaCl_2)懸浮菌體。置於冰上 20 分鐘。6000 rpm，4°C 下離心 20 分鐘，將上清液倒掉。加入 1/10 菌液體積之 0.1 M 冰 CaCl_2 懸浮菌

體。迅速取 0.4 mL 懸浮菌體 + 0.2 mL 滅過菌的 20% 甘油分裝於 1.5 mL 滅過菌的微量離心管，經液態氮快速凍結，置於 -80°C 儲存備用。

3.2 轉型作用(transformation)

自 -80°C 取出勝任細胞，先用掌心熱度略為退冰，置於冰上回溫，加入 DNA (質體 pEZZ18) 充分混合，於冰上靜置 30 分鐘，移至乾浴加熱器中 42°C 、90 秒，快速置於冰上 2~5 分鐘，加入 0.4 mL LB broth， 37°C 水浴下培養 1 小時。取 0.2 mL 左右的轉型細胞液均勻塗抹於預先製備好的選擇性培養基 LB/Amp/X-gal agar plate 上，於 37°C 培養箱中倒置培養過夜。

3.3 載體 pEZZ18 之抽取

使用 High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan) 抽取質體 DNA。將含有載體的菌落接種至含有適當 Amp 濃度的 LB broth 中， 37°C 震盪培養過夜，取 1.5 mL 菌液以 12,000 rpm，離心 1 分鐘收集菌體。移除上清液後再加入 1.5 mL 菌液同樣離心重複收集菌體，上清液移除乾淨後溶於 200 μL 含有 RNase 的細胞懸浮液(Buffer PD1) 中，加入 200 μL 溶解液(Buffer PD2)，溫和倒轉試管混合數次，直到細胞懸浮液由混濁變為澄清，加入 300 μL 中和液(Buffer PD3) 同樣溫和混合數次，會產生乳白色混濁物，以 12,000 rpm，離心 5~10 分鐘，

取上清液移於 PD column 中(下方裝置收集管)，以 8,000 rpm，離心 30 秒，去除析出液後加入 500 μ L 含酒精之沖洗液(Wash Buffer)，以 8,000 rpm，離心 30 秒，為徹底去除酒精，去除析出液後再次以 12,000 rpm，離心 2 分鐘。去除析出液後加入 50 μ L 溶離液(Elution Buffer)稍待 2 分鐘至 buffer 完全溶於 PD column 中，同時，將 PD column 下方所用之收集管換成新的無菌微量離心管，以 12,000 rpm，離心 2 分鐘，微量離心管所得溶液即含有質體 DNA。置於 -20°C 儲存備用。

3.4 電泳分析方法

將 TAE buffer 稀釋成 0.5X，並配製 1%的瓊脂膠，以微波爐加熱至完全溶解後，降溫至手可承受的溫度時，混合均勻倒入鑄膠槽後，小心地垂直插入齒模，待凝固後，取出齒模。將凝固之瓊脂膠片放入電泳槽中，倒入 0.5X TAE buffer 覆蓋過瓊脂膠片。於 DNA 標準分子量 marker 及 DNA 樣品中加入少量體積的追蹤染劑，混合後分別注入膠片樣品槽中，先以 30 伏特電壓讓 marker 及 DNA 樣品在膠片樣品槽中均勻緩慢泳動，接著再以 110 伏特的電壓進行電泳，待追蹤染劑達三分之二膠片長度時即停止，取出膠片置 EtBr(Ethidium Bromide, Bio-Rad, U.S.A)溶液中 15 ~20 分鐘後，以蒸餾水來洗去殘留的 EtBr，於紫外光箱中觀察 DNA 色帶。

3.5 限制酶剪切反應

取滅過菌的微量離心管依序加入下列反應物後於 37°C 下反應 2 小時。

質體 DNA (pEZZ18=1 µg/µL)	10 µL
10X 限制酶 buffer	2 µL
BSA	0.5 µL
ddH ₂ O	6.5 µL
混均勻後，	
加入限制酶 <i>Sal</i> I	1 µL

總體積為 20 µL。

3.6 基因片段之回收

使用 High Pure PCR Product Purification Kit(Roche,Germany)。
此套組純化之 DNA 片段至少 100 bp 以上或小於 50 bp。將限制酶截切反應後的產物 100 µL 加入 500 µL Binding Buffer 混合均勻後移至 High Pure filter tube 中，以 13,000 xg，離心 30 ~60 秒，去除析出液後加入 500 µL Wash Buffer，以 13,000 xg，離心 1 分鐘，去除析出液後加入 200 µL Wash Buffer，以 13,000 xg，離心 1 分鐘，去除析出液後加入 50 µL Elution Buffer，以 13,000 xg，離心 1 分鐘，析出液含有限制酶截切後的基因片段，放置於 -20°C 儲存備用。

三、ACEI 肽核苷酸序列(ACEI 1&2)之製備

(一) 材料

1.1 ACEI 肽核苷酸序列之合成

本實驗依據(Ariyoshi,1993)所發表的文章，設計兩段互補的單股 ACEI 肽核苷酸序列 ACEI 1 和 ACEI 2，並委託騰達行企業股份有限公司代為合成。貨品編號分別為：ACEI 1→11-3134-1/21；

ACEI 2→11.3134-2/21。ACEI

1： → LRP 三重複序列位置 ←

5'-AAAAGTCGACCTTTCTGCGTCCGCTTCGTCCACTGCGCCCT
Sal I Phe Leu Arg Pro Leu Arg Pro Leu Arg Pro
TAATGAGTCGACCCC-3'
stop stop Sal I

ACEI 2：(反向互補)

5'-GGGGTCGACTCATTAAAGGGCGCAGTGGACGAAGCGGACG
CAGAAAGGTCGACTTTTT-3'

(二) 儀器

聚合酶連鎖反應機(Model：FPROG02Y,Techne(Cambridge)
LTD., U.K.)。

(三) 方法

3.1 ACEI 肽核苷酸序列之黏合(annealing)

取相同濃度及體積之 ACEI 1 及 ACEI 2 均勻混合，加熱至 90°C 維持 3 分鐘，緩慢冷卻至 37°C，並停留此溫度 90 分鐘以上，產物為雙股之 ACEI 肽核苷酸序列。此步驟可用聚合酶連鎖反應機來進行。

3.2 限制酶截切反應

為了得到和表現載體相同的黏合端，取滅過菌的微量離心管依序加入下列反應物，使用限制酶 *Sa*I 於 37°C 下進行截切反應 1 小時。

ACEI 黏合後序列 DNA	5 μ L
10X 限制酶 buffer	2 μ L
BSA	0.2 μ L
ddH ₂ O	1.8 μ L
混均勻後，	
加入限制酶 <i>Sa</i> I	1 μ L

總體積為 10 μ L。

3.3 基因片段之回收

同前述二之 3.6 方法。使用 High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Germany)。可得到限制酶截切反應後的基因片段。

3.4 電泳分析

同前述二之 3.4 方法，但瓊脂膠濃度改為 3%，是由於三之基因序列片段較小，使用較高濃度之瓊脂膠體孔隙較小而使基因片段分得較開、解析度較好。

四、ACEI 肽載體(pEZZ18-ACEI)之構築

(一) 材料

二及三所製備，具有相同剪切位置之載體及序列。

(二) 儀器

DNA/RNA measurements (Gene Spec I, Naka Instruments, Ltd., Japan)。

(三) 方法

3.1 接合作用 (ligation)

利用 Gene Spec I 分別測量序列及載體剪切並純化後的吸光值及濃度，再施以適當的比例(insert : vector = 3 : 1)並計算後，將兩者作 ligation。舉例如下：

假設測出 Insert 濃度為 2.09 $\mu\text{g/ml}$ ，Vector 濃度為 83.5 $\mu\text{g/ml}$ ，

$MW_{\text{Insert}}=0.037$ kb，扣掉剪切 *Sall* 後之 base pair 數；

$MW_{\text{Vector}}=4.591$ kb，剪切 *Sall* 只切一刀不影響分子量。

欲求出每 μL 裡面有多少 ng？而 $\mu\text{g/ml}$ 換算後即為 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

假設 vector 濃度為 X ng，用 X 除以 83.5 即 vector 應加的體積。

則算式如下：

$$\frac{X \text{ ng}}{4.591} = \frac{2.09 \text{ ng}}{0.037} \times 3$$

▲ 若 Insert 加入體積定為 1 μL

即得 $X=777.98837$ ng，再以 83.5 除之，可得 9.3172259 μL 。

所以，所有反應物體積分別如下：

質體及序列 DNA 應加之質體體積=9.32 μL

序列體積=1 μL

10X buffer	1 μ L
T ₄ DNA ligase	1 μ L
適量 ddH ₂ O(視總體積添加)	均勻混合後，16°C 反應過夜。

3.2 轉型作用

同前述二之 3.2 方法進行轉型作用，隔天看轉型後結果。若為白色菌落，即表示可能含有重組成功之 pEZZ18-ACEI 質體轉型入 *E.coli* JM105 菌體中；反之，藍色菌落表示未成功插入序列。成功的白色菌落需進行篩驗。

3.3 重組載體 pEZZ18-ACEI 的篩驗

將白色菌落以無菌牙籤挑出來，再次點在 LB/Amp/X-gal agar plate 上，37°C 培養箱中培養過夜。若菌落仍為白色，則挑出培養於 LB/Amp 培養液中，37°C 震盪培養 16-18 小時。抽取質體(同二之 3.3 方法)，跑電泳(同二之 3.4 方法)檢視其分子量大小。(與原始的 pEZZ18 質體作比較)初步檢視之後隨即送交定序。

3.4 送交定序

定序交由明欣生物科技有限公司進行。依照質體 pEZZ18 特性以及 NCBI 基因庫完整質體基因序列資料(Accession No.M74186)，搜尋並加以比對後，委託定序所使用之引子 (primer) 為 M13 universal sequencing primer (M13 序列相對位置 2974~2990 : 5'-d【GTAAAACGACGGCCAGT】-3')。

五、重組降高血壓 肽之表現與純化

(一) 材料

1.1 定序確認成功之轉型株。

1.2 一之 1.2 所述的培養基。

(二) 儀器

(1)pH meter(CORNING, model:430)。

(2)紫外/可見光分光光度計(SHIMADZU, UV mini 1240)。

(3)超過濾裝置(Model : 8200, Amicon[®], U.S.A)。

(4)超過濾裝置(Model : 8050, Amicon[®], U.S.A)。

(5)不同截留分子量(Molecular Weight Cut-Off, MWCO)之過濾膜
(Amicon[®], U.S.A)。

(6)冷凍乾燥機(VirTis, U.S.A)。

(三) 方法

3.1 蛋白質的表現

(1)挑取經定序確認後之白色菌落接種於 LB/Amp(50 µg/mL)培養液中，37°C 震盪 16-18 小時。

(2)接著取 1% 體積之培養液接種於 100 mL 的 LB/Amp 培養液擴大培養，37°C 震盪 5-7 小時左右。

(3)將培養好的菌懸浮液於 4°C，6000 rpm 離心 30 分鐘。取上清

液置於超過濾裝置(Model : 8200, Amicon[®], U.S.A)用截留分子量 10,000 的過濾膜進行濃縮。(目標蛋白約 14 kDa 左右)。

(4)完成濃縮之上清液，以 0.22 μm 無菌濾膜過濾殘留的細胞和大分子，取一部份用 Bio-Rad Protein Assay Kit 進行蛋白質濃度測定與 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳分析(SDS-PAGE)。

3.2 蛋白質濃度測定

依據 Bradford, M.(1976)的方法，利用 Bio-Rad protein Assay Kit 進行蛋白質濃度測定。配製濃度 1 ~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 區間的 Protein Standard (Bovine Serum Albumin,Sigma[®],U.S.A)，取 0.8 mL + 0.2 mL 反應試劑後置於室溫 5 分鐘，測定 595 nm 的吸光值後繪製成蛋白質的標準濃度檢量線；取待測樣品 0.8 mL + 0.2 mL 反應試劑後置於室溫 5 分鐘，測定 595 nm 的吸光值，比對蛋白質的標準濃度檢量線求出蛋白質濃度。

3.3 硫酸十二酯鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳分析(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis,SDS-PAGE)

3.3.1 試劑

(1)Acrylamide M-bis 40% stock solution 37.5/1 (Ger-Bu, BULGARIA)。

(2)2M Tris-HCl buffer,pH=8.8 (分離膠體使用)：取 24.22 g Tris (Sigma[®],U.S.A)用 80 mL ddH₂O 溶解，以 HCl 調 pH 至 8.8

後，加 ddH₂O 定量至 100 mL，儲存於 4°C。

(3)2M Tris-HCl buffer,pH=6.8 (聚集膠體使用)：取 24.22 g Tris (Sigma®,U.S.A)用 50 mL ddH₂O 溶解，以 HCl 調 pH 至 6.8 後，加 ddH₂O 定量至 100 mL，儲存於 4°C。

(4)10%SDS：取 1 g SDS (Sodium Dodecyl Sulfate,Bio-Red, U.S.A)溶於 10 mL ddH₂O。

(5)10%APS：取 0.1 g APS (Ammonium Persulfate, Sigma®, U.S.A)溶於 1 mL ddH₂O。(於每次使用時新鮮配製)。

(6)TEMED(N,N,N,N-Tetramethylethylene diamine,Ger-Bu, BULGARIA)。

(7)10X 電泳緩衝液：取 30 g Tris (Sigma®,U.S.A)、144 g Glycine (Sigma®,U.S.A)、10 g SDS，溶於適量 ddH₂O 中定量至 1 L。

(8)2X 樣本溶液：取 Glycerol 1 mL、β-mercaptoethanol 0.5 mL、10%SDS 3 mL、0.5 M Tris-HCl(pH=6.8) 1.25 mL、0.25% Bromophenol blue 0.25 mL。

3.3.2 儀器設備

鑄膠套件(Versatile Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell, Bio-Rad, U.S.A)、電泳套件(Bio-Rad, U.S.A)、電源供應器(MAJOR SCIENCE, MP-250, Taiwan)。

3.3.3 方法

(1)將鑄膠套件清洗乾淨，玻璃用拭鏡紙擦拭。(本實驗所使用之組合，膠體製備完成後厚度會為 0.75 mm)。

(2)依照下列配方進行膠體之製備：

	分離膠體溶液 (Seperation gel)	聚集膠體溶液 (Stacking gel)
Acrylamide-Bis(40%)	3.125 mL	0.25 mL
2M Tris-HCl(pH=8.8)	1.875 mL	---
2M Tris-HCl(pH=6.8)	---	0.16 mL
10%SDS	100 μ L	25 μ L
ddH ₂ O	4.8175 mL	2.033 mL
10%APS	75 μ L	30 μ L
TEMED	7.5 μ L	2 μ L
總體積	10 mL	2.5 mL

(3)將分離膠體溶液配好並混合均勻後，用 1 mL 之微量 pipptet 吸取，以 tip 尖端靠在玻璃之間小心將溶液注入約 2/3 高後，隨即在膠體液面上方用 75% 酒精(ethanol)壓平膠體液面。等待 30 分鐘至 1 小時即凝固。

(4)倒出酒精(沒倒乾淨之酒精可用剪成方型之濾紙插入吸乾)，將聚集膠體容易配置混合好，同樣注入玻璃之間，注完後立即將齒模以 45 度角小心架入並避免產生氣泡，形成樣品槽孔洞。等待 30 分鐘至 1 小時即凝固。

(5)輕巧取出齒模，將製好膠片(含玻璃)與電泳套件組合，並稀釋事先配好之 10X 電泳緩衝液成 1X，倒入電泳套件中。

(6)厚度為 0.75 mm 之膠片，每個樣品槽約能容納 25 μ L，取適

當體積的樣品加上與樣品同體積的 2X 樣本溶液混合均勻，於 100°C 煮 5 分鐘[可利用聚合酶連鎖反應機來進行。

(7) 樣品冷卻後，與蛋白質標準品各別注入膠片樣品槽中。電泳槽上蓋後，接上電源供應器，以電壓 130 伏特進行泳動。待樣品溶液中之追蹤染劑(bromophenol blue)跑至膠片底時即停止泳動。

(8) 取出玻璃中之膠片，以 Coomassie Brilliant Blue R-250 進行染色。

見以下之步驟：

<1> 染色液：取 1.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250(WS Simpson Ltd, England) 添加於 250 mL ddH₂O、250 mL 甲醇及 50 mL 醋酸混合均勻。

<2> 脫色液(含 7% 甲醇及 7% 醋酸)：取適量 ddH₂O 加入 70 mL 甲醇及 70 mL 醋酸，用 ddH₂O 定量至 1L，均勻混合密蓋。

<3> 方式：用 50 mL Coomassie Brilliant Blue R-250 染色 30 mins 後，回收染劑，先用水沖洗之，再倒入 50 mL 脫色液，經脫色液沖洗數次(1hr 內可見 band 出現)，待背景透明後，倒去脫色液，改用 50% 甲醇沖洗一、二次，膠片縮至原尺寸，即可封膠。

3.4 親和性管柱層析法

所要產生的 ACEI peptide 於基因重組的時候在 N 端的位置接了一段可轉錄轉譯成 14 kDa 的"ZZ"核苷酸序列(Z 是一種 Staphylo-

coccal protein A 的 IgG binding domain；主要是 binding 在 IgG 的 Fc-portion)。當宿主細胞將質體 pEZZ18-ACEI 轉錄、轉譯成“ZZ-Phe-ACEI”融合蛋白後，就可利用 ZZ peptide 與 IgG-Sepharose 6 Fast Flow 膠體的專一性，將“ZZ-Phe-ACEI”融合蛋白經親和性管柱分離純化。經收集“ZZ-Phe-ACEI”融合蛋白後，利用 chymotrypsin (Sigma®, U.S.A.)對苯丙胺酸(phenylalanine)的專一性切割，經過水解後之“ZZ-Phe-ACEI”融合蛋白，利用高壓液相層析法分析重組 ACEI 肽。

試劑：

(1) IgG-Sepharose 6 Fast Flow 膠體

(2) Tris-saline Tween 20 (TST)：50 mM Tris buffer，pH=7.6、
150 mM NaCl、0.05% Tween 20

(3) 0.5 M CH₃COOH(HAc)，用 NH₄CH₃COOH(NH₄Ac)調 pH
值至 pH=3.4

(4) 5 mM NH₄Ac，以 HAc 調 pH 值至 pH=5.0

儀器：

層析管柱：C 16/40 column + AC 16 adaptor (Amersham Pharmacia Biotech., U.S.A)。

蠕動幫浦：Pump P-1 (Amersham Pharmacia Biotech., U.S.A)。

分液收集器：Model 2110 fraction collector (Bio-Rad, U.S.A)。

方法：

- (1) 將 IgG-Sepharose 6 Fast Flow 膠體懸浮後吸取於層析管柱。
- (2) 待膠體沉降後，將管柱裝置完全，在固定流速(300 mL/cm²h)下，先以 5 倍膠體體積的 TST 緩衝液平衡膠體後，再依序以 2~3 倍膠體體積的 0.5 M HAc、TST 緩衝液、0.5 M HAc、TST 緩衝液來平衡膠體。
- (3) 將五之 3.1 步驟中所得之濃縮後樣品以 TST 緩衝液添加混合至體積為 40~45 mL 左右，以流速 150 mL/cm²h 注入管柱。
- (4) 接著在流速 300 mL/cm²h 下以 10 倍膠體體積的 TST 緩衝液，洗去未 binding 之非專一性蛋白質或雜質。再用 2 倍膠體體積之 5 mM NH₄Ac 沖提膠體。
- (5) 在低速 20 mL/cm²h 之下，以 0.5 M HAc 將與膠體專一性結合的物質溶離(elute)出來，每五分鐘收集一管，每管約 1.45 mL 左右，收集後的各管測量 280 nm 下的吸光值。回收具有吸光值的部分。
- (6) 回收部份置於超過濾裝置(Model : 8050, Amicon[®], U.S.A)用 MWCO=10,000 過濾膜進行濃縮並反覆加入 ddH₂O 以達到降低鹽濃度的目的。(目標蛋白約 14 kDa 左右)。
- (7) 為因應後續酵素反應所需之緩衝液環境，再次使用超過濾裝

置及 MWCO=10,000 的過濾膜，將前述之濃縮液以 0.08 M

Tris-HCl buffer(pH=7.8)反覆沖洗達置換緩衝液環境之目的。

(8)取上述(6)及(7)一部分濃縮後的產物，以 SDS-PAGE 分析。

3.5 以 chymotrypsin 切割“ZZ-Phe-ACEI”融合蛋白

溶解 1 mg/mL chymotrypsin 於 0.001 N HCl 中，再將此溶液稀釋成 10-30 µg/ml 供反應用。取(7)之濃縮後樣品及配製好之酵素，以受質/酵素為 50/1 的比例，在 37°C 水浴中反應至少 4 小時。目的是要將“ZZ-Phe-ACEI”融合蛋白上的 Phe 切下來，而分離出具有胺基酸序列 LRP 三重複之目標物 ACEI。反應完成之後，進行 HPLC 分析。

3.6 高效能液相層析法(HPLC)分離

經由 chymotrypsin 切割後的 肽混合物，利用 HPLC 逆相管柱 (reversed phase column)加以分離純化。

儀器：

高壓幫浦：HITACHI L-6200A Intelligent Pump

偵測器：Soma UV-VIS Detector/S-3702

積分儀：HITACHI D-2500 Chromato-Integrator

分析管柱 1：Thermo Hypersil-Keystone Hypersil HS C18 5u

250 x 4.6 mm(分析型)

分析管柱 2 : Thermo Hypersil-Keystone Hyperprep HS C18 8u

250 x 10 mm(製備型)

分析條件 :

移動相 : 80 : 20 = Solvent A : Solvent B

{ Solvent A : 0.1% (v/v) TFA in ddH₂O
{ Solvent B : 0.08% (v/v) TFA in acetonitrile

流速 : 0.5 mL/min

波長 : 214 nm

注射量 : 標準品 5 μ l

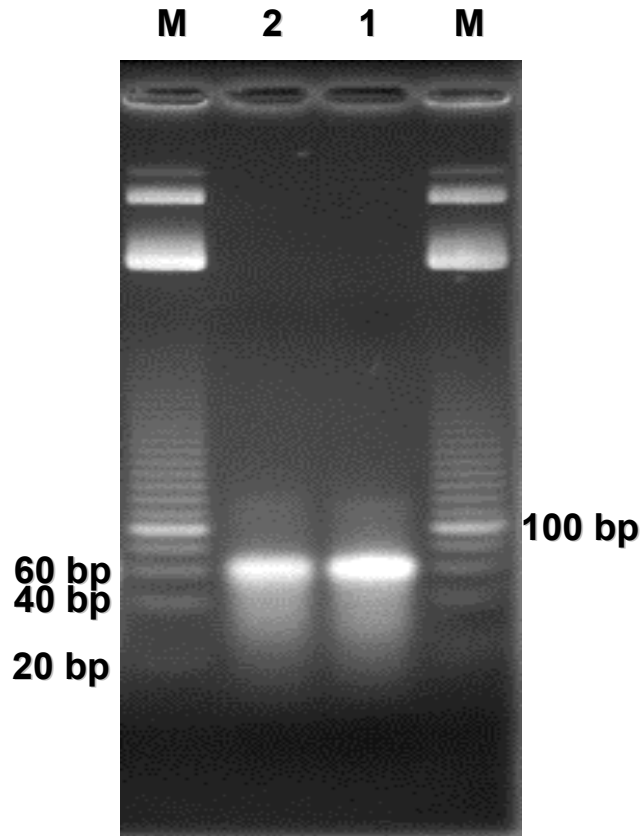
樣品 10 μ l

肆、結果與討論

一、ACEI 胜肽核苷酸序列之製備

本研究根據 Ariyoshi(1993)所發表從 α -玉米蛋白中水解液中純化出來之 Leu-Arg-Pro 胺基酸序列的文獻來設計互補的單股 ACEI 核苷酸序列 ACEI 1 及 ACEI 2；這兩個單股核苷酸序列經互補及粘合成雙股後，以電泳進行確認，結果如圖八所示。此電泳圖之瓊脂膠片濃度配製 3%，比較濃的原因是由於 DNA 標準分子量 marker 與預測樣品的基因片段都比較小，以高濃度的膠片跑電泳之分離及解析度比較好；在圖中則清楚看到左、右兩邊皆為 20 bp 的 DNA 標準分子量 marker，最亮位置是 100 bp。Lane 1 為雙股粘合後之樣品，Lane 2 為粘合後經 *Sal*I 剪切之樣品。雙股粘合後之序列全長應為 56 bp，在電泳圖中顯示出相同的大小；而經 *Sal*I 剪切之樣品也跑在差不多的位置。

在此核苷酸序列上除了有可經轉錄、轉譯成 ACEI Leu-Arg-Pro 三重複胺基酸序列的二十七個鹼基之外，還包含三個可經轉錄、轉譯成苯丙胺酸的鹼基、前後各有六個供限制酶 *Sal*I 辨識位置的鹼基，另有限制酶辨識位置旁的 AAAA 與 CCC 鹼基、兩個停止碼，及一個避免載體和插入序列接合可能產生 frameshift 現象的鹼基，共為 56 bp。



M 為 20 bp DNA 標準分子量 marker，

Lane 1 為雙股粘合後之樣品，

Lane 2 為粘合後經 *Sal*I 剪切之樣品。

圖八、ACEI 肽核苷酸序列電泳圖。

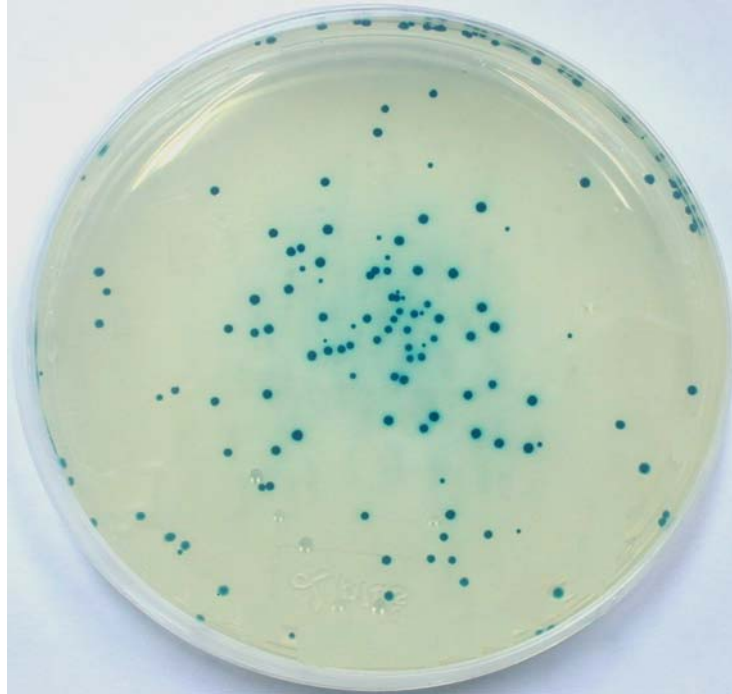
Fig.8 Agarose profile of the DNA sequence of ACEI peptide with different treatments.

二、 ACEI 肽基因載體之構築

重組載體的構築是將已先分別製備好具有相同限制酶切割位點的載體及雙股降高血壓 肽序列，經適當比例及計算後，使用連接酶進行接合反應，接著將反應後之產物以轉型作用進入宿主細胞，使用篩選型平面培養基進行篩選。

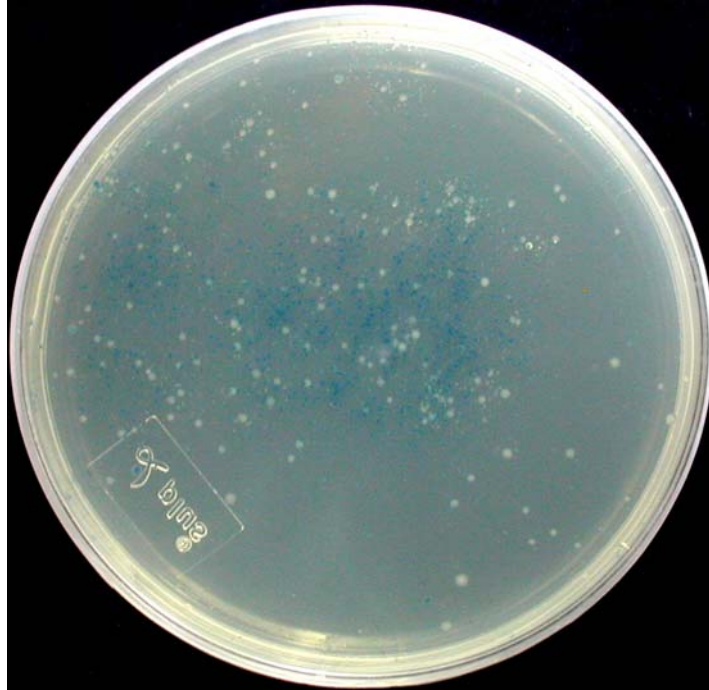
在篩選方面，由於載體 pEZZ18 所具有之 *lacZ'* 基因的缺陷，藉由 α -complementary 的作用與恢復缺陷之宿主細胞產生具有活性之 β -半乳糖苷酶能分解 X-gal (人工合成乳糖類似物)，產生藍色色素。當插入外來基因序列之載體因 *lacZ'* 基因被阻斷而無法產生 β -半乳糖苷酶去分解受質 X-gal，即無法產生藍色色素，所以構築正確之重組載體轉型後之菌落會呈現米白色。

圖九為含原始載體 pEZZ18 之宿主細胞生長於篩選型平面培養基之菌落生長圖，圖中可清楚看到藍色菌落的產生，可知未插入序列之載體在宿主細胞中能夠正確產生 β -半乳糖苷酶去分解受質 X-gal，產生藍色色素。圖十則為經外來基因序列與載體接合進行重組並轉型進入宿主細胞後之菌落生長圖，圖中可看到分別有米白色及藍色菌落的生長，米白色菌落表示 *lacZ'* 基因被阻斷而無法產生藍色色素，為插入成功之菌落。接著用無菌牙籤挑取白色菌落點於另一片篩選型平面培養基上，37°C 培養箱倒置培養過夜，再次確認是否為白色菌落。



圖九、原始宿主細胞(含載體 pEZZ18)生長於 LB/Amp/X-gal
agar plate 。

Fig.9 The original colonies grow on LB agar plate with
Amp/X-gal.

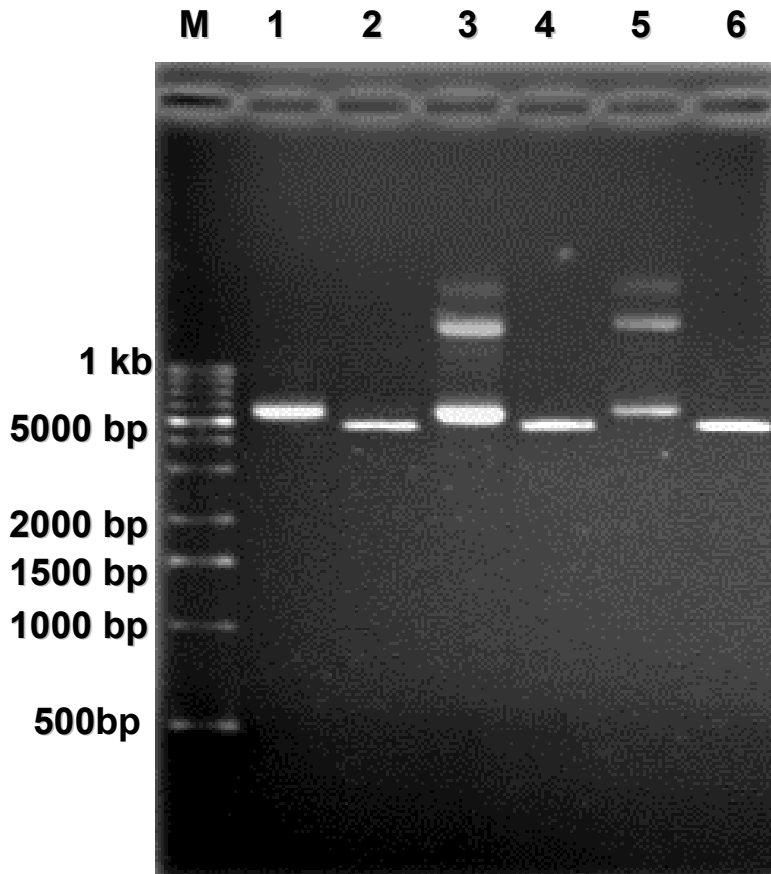


圖十、轉型菌之藍白篩選測試。

Fig.10 The blue and white screen test of transformed *E.coli* JM105.

接著，挑取確認之白色菌落接種於小量培養液中，37°C 震盪培養 16~18 小時，用 High-Speed Plasmid Mini Kit 抽取質體 DNA。輔以電泳分析，結果如圖十一所示(本圖欲分析的基因片段較大，配製之瓊脂膠片濃度為 1%)。圖中可看到最左邊為 1 kb 的 DNA 標準分子量 marker，最亮的位置為 5000 bp。Lane1 為原始載體 pEZZ18，Lane2 為原始載體 pEZZ18 經 *Sa*I 剪切，Lane 3 為#17 菌株抽取之重組載體，Lane 4 為#17 菌株抽取之重組載體經 *Sa*I 剪切，Lane 5 為#35 菌株抽取之重組載體，Lane 6 為#35 菌株抽取之重組載體經 *Sa*I 剪切。由 Lane 1、Lane 3、Lane 5 互相比較後可知兩株轉型菌與原始 pEZZ18 所抽取之載體為相近的大小；而 Lane 3 之#17 菌株及 Lane 5 之#35 菌株所抽取的重組載體皆有兩條以上的區帶(band)，可看出三種不同構形，所以進行 *Sa*I 的剪切以確認主要區帶是否與 pEZZ18 原始載體經 *Sa*I 剪切為相同位置。而兩個樣品(#17 & #35)經 *Sa*I 剪切後皆與 Lane 2 的區帶位置是相同的，即可知道主要的區帶即為接近 5000 bp 的那個位置。

藍白篩選過程所篩選之菌落很多，約有 400~500 個白色菌落。從中挑取部分菌落(約 125 株轉型菌)皆經小量培養、抽取重組載體及電泳分析等。初步分析、確認相對位置後，再挑取部分菌落(約 25 株轉型菌)送定序。主要交由明欣生物科技有限公司來進行定序。依照



M 為 1 kb 的 DNA 標準分子量 marker，

Lane1 為原始載體 pEZZ18，

Lane2 為原始載體 pEZZ18 經 *Sa*I 剪切，

Lane 3 為#17 菌株抽取之重組載體，

Lane 4 為#17 菌株抽取載體經 *Sa*I 剪切，

Lane 5 為#35 菌株抽取之重組載體，

Lane 6 為#35 菌株抽取載體經 *Sa*I 剪切。

圖十一、pEZZ18 與#17 轉型株及#35 轉型株載體電泳圖。

Fig.11 Agarose profile of the original vector pEZZ18 and the recombination vectors with different treatments.

NCBI 基因庫完整質體基因序列資料(Accession No.M74186)，搜尋完成並加以比對之後，決定委託定序所使用之引子(primer)為 M13 universal sequencing primer (M13 序列的相對位置為 2974~2990 : 5'-d【GTAAAACGACGGCCAGT】-3')。定序完成之結果，判讀方向要以反向進行比對，也就是與 ACEI 2 之 3'~5'的序列相同，而當比對相同的同時也可得知此載體的另一股必為我們所想要得到之 ACEI 1 的正確序列。

定序結果有許多不同情形，例如所插入序列由於兩端同為 *Sal*I 剪切位置而接成反向，也有接到奇怪的序列或是因雜訊太多而無法判讀，以及接到正確序列之判讀方向等。其中送交定序的菌落中，編號 17 及編號 35 轉型株是由序列接反之轉型菌所抽取之載體，經 *Sal*I 剪切、再重新接合、轉型進入宿主細胞，同樣進行篩選工作，而送交定序後經判讀為正確結果之菌株。正確定序結果如圖十二所示。而圖十三是編號 17 轉型株菌落生長圖，可觀察到生長出來的菌落有米白色及微藍色，之所以會有些許微藍色菌落之情況產生，推測可能是由於所插入的片段過短，而偶有產生跨過插入序列的區域進行轉錄、轉譯的現象。同樣的，圖十四為編號 35 轉型株菌落生長圖，也有米白色及些許微藍色菌落生長，其原因與編號 17 之轉型株相同。另外，構築成功之載體說明如圖十五。

P R L P R L P R L

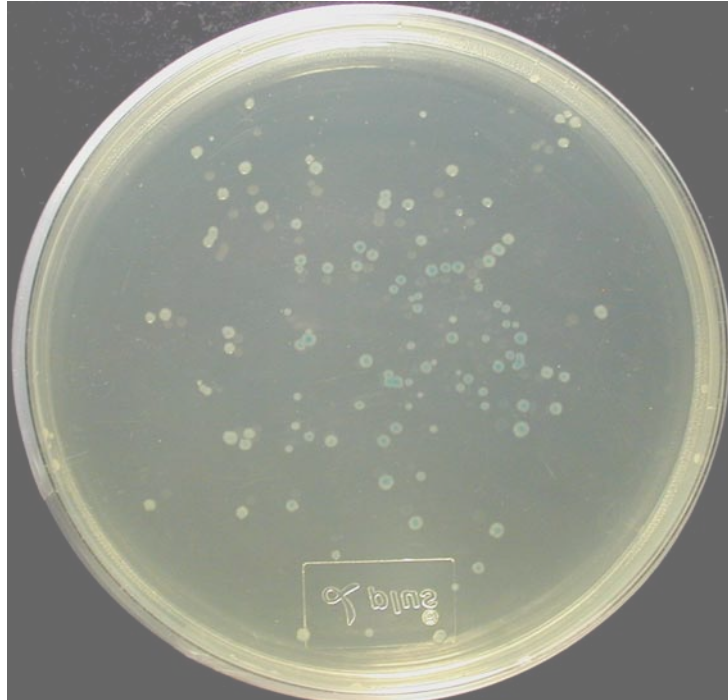
ACTCATTAAAGGGCGCAGTGGACGAAGCGGACGCAGAAAGG
 (stop codon) (LRP 三重覆序列位置) (Phe)

TCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCG
 (Sal I) → pEZZ18 基因序列

TCTACTTTCGGCGCCTGAGCATCATTTAGCTTTTTAGCTTCT
 GCTAAAAGGTTAGCGCTTTGGCTTGNGTCATCTTTTAACTT
 TGGATGAAGGCGTTTCGTTGTTCTTCGTTTAAGTTAGGTAA
 ATGTAAGATCTCATAGAACGCGTTTTGTTGTTCTTTGCTGAA
 TTTGTCGNTTANTTCCCNTGCNNTANCATTTCCCTAGAAGNC
 AACGNTTNTNTTTAAGGCCCANNCGCTTCCNGTATGGNNCC
 CCCTNTTCTTTCNAGGNNTCNGNCGCCTGTGGGTNCTTCT
 TATTCCTTTGCGGCCCCCCCCCCNCCCTNTTTTTTCTTNTACTC
 TTCNCTCTTCTCNCTCTTTCTNCCACNNTGGTANNGNCCCC
 NCTNANTNNTCTCTCC

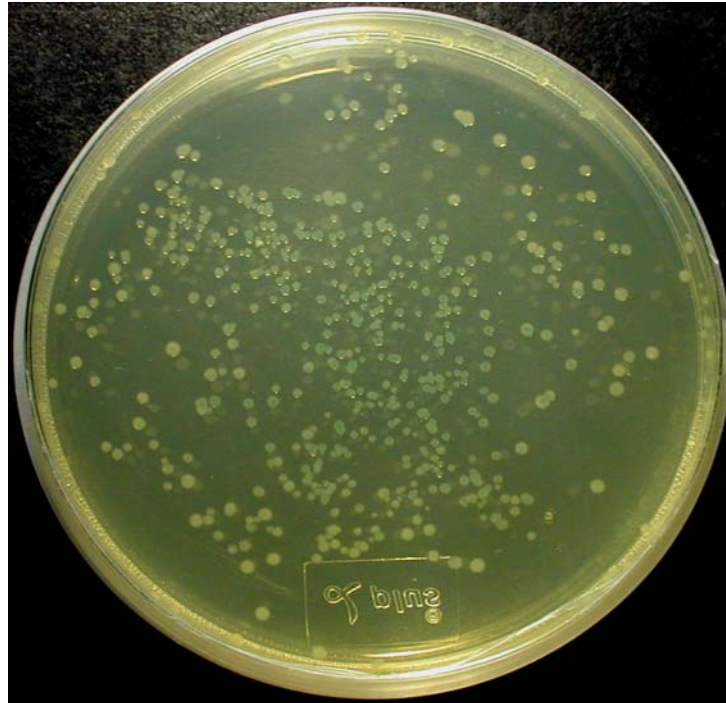
圖十二、#17、#35 轉型株之定序結果。

Fig.12 The results of DNA sequencing of the transformed strain No.17 and the transformed strain No.35.



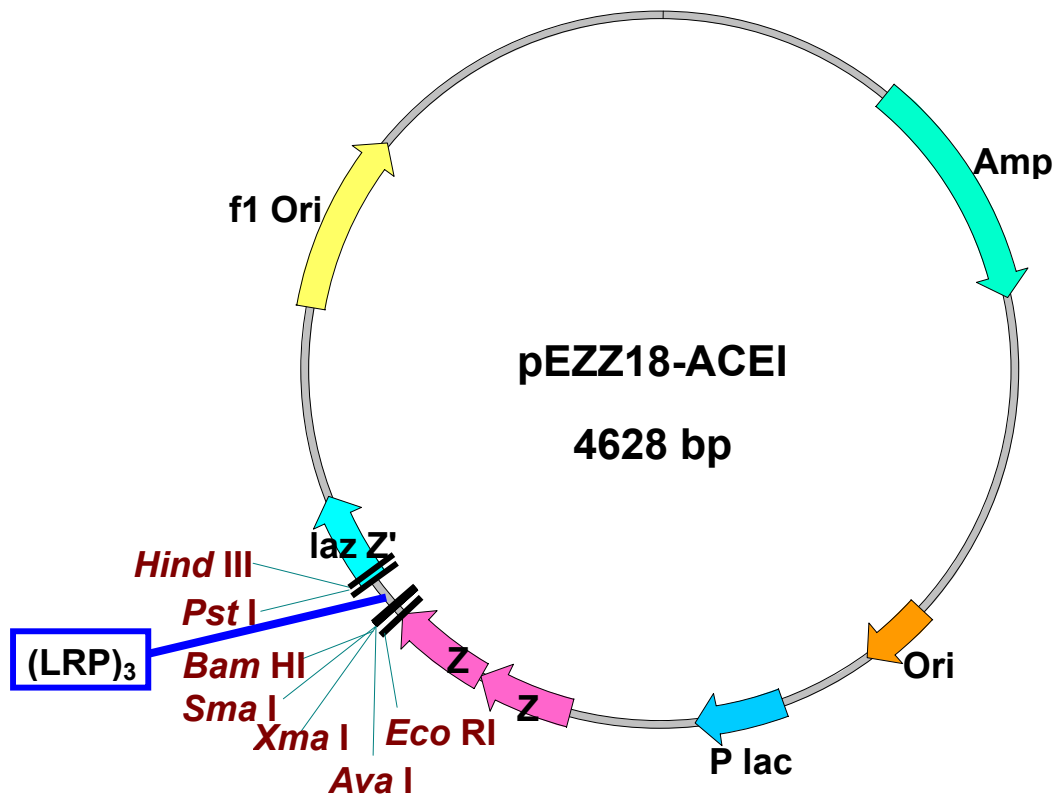
圖十三、轉型菌#17 生長於 LB/Amp/X-gal agar plate 。

Fig.13 Transformed colonies No.17 grow on LB agar plate with Amp/X-gal.



圖十四、轉型菌#35 生長於 LB/Amp/X-gal agar plate 。

Fig.14 Transformed colonies No.35 grow on LB agar plate with Amp/X-gal.



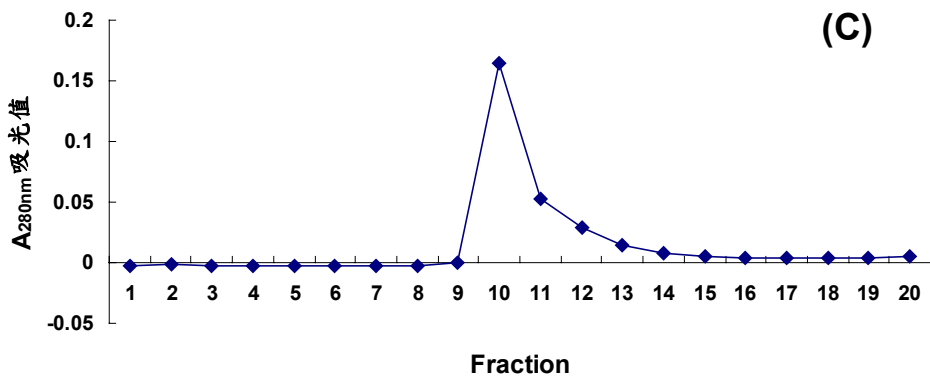
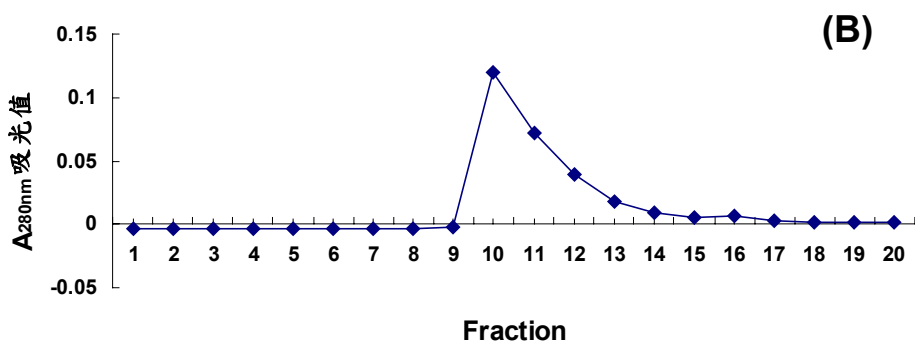
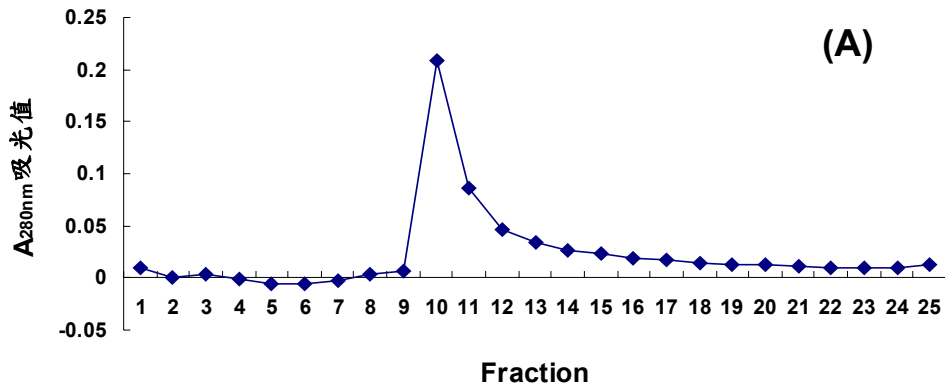
圖十五、構築成功之載體說明圖。

Fig.15 The illustration profile of the recombinant vector which was constructed successfully.

三、 重組 ACEI 肽之表現與純化

在 ACEI 肽的表現方面，由於載體 pEZZ18 含有一段可轉錄、轉譯成 14 kDa "ZZ"融合蛋白的"ZZ"核苷酸序列，當宿主細胞將載體 pEZZ18-ACEI 轉錄、轉譯成"ZZ-Phe-ACEI"融合蛋白，且由文獻 Moks, T. *et al.*(1987)可知 ZZ 融合蛋白會由質體本身所含之 P spa 起動子所產生並排出胞外，所以親合性管柱樣品的大量製備，是取胞外部分(離心後之上清液)來進行純化。利用 ZZ peptide 與 IgG-Sepharose 6 Fast Flow 膠體的專一性(Lowenadler, B. *et al.*,1987)，將"ZZ-Phe-ACEI"融合蛋白經由親和性管柱分離純化。溶離出來的蛋白質以每五分鐘收集一管，每一管的體積約為 1.45 mL，使用分光光度計測量 280 nm 的吸光值，並觀察吸光值主要分布的區間。圖十六的(A)圖為 pEZZ18 原始未重組融合蛋白之蛋白質吸光值測定圖，可清楚看到在第十管左右有最大吸光值，判定為主要的區間。另外，在(B)圖為#17 菌所分泌之蛋白質的吸光值測定圖及(C)圖則為#35 菌之所分泌蛋白質的吸光值測定圖，同樣都在第十管左右有最大吸光值出現。所以主要收集之目標融合蛋白的區間即為第十管附近的管數，收集後進行超過濾濃縮以及後續處理。

在蛋白質電泳的分析方面，可與文獻 Moks, T. (1987)之結果相對照，ZZ dimer 的分子量範圍位於 14 ~31 kDa 之間。而在圖十七所示



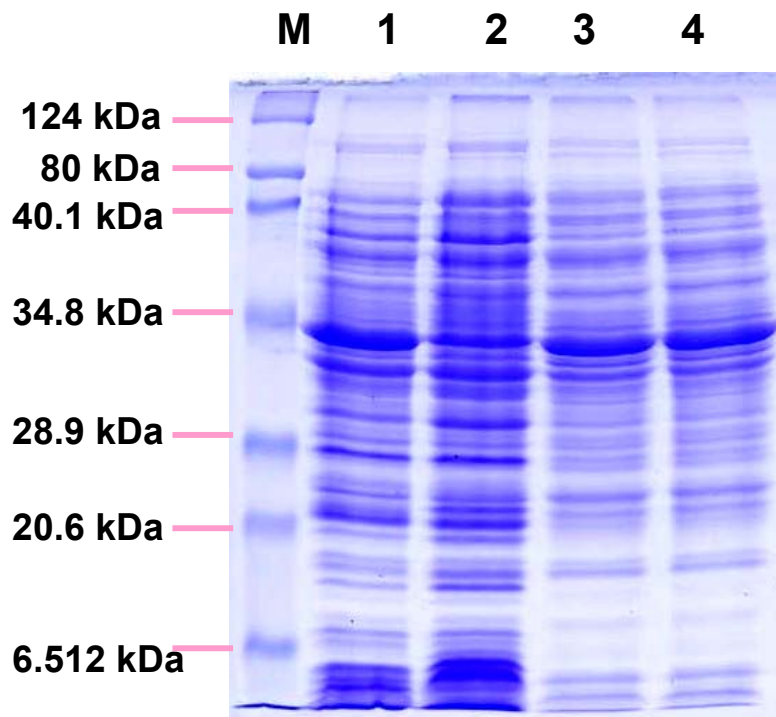
圖十六、(A)pEZZ18 原始未重組融合蛋白之蛋白質吸光值測定圖。
 (B)#17 菌之產生之蛋白質吸光值測定圖。
 (C)#35 菌之產生之蛋白質吸光值測定圖。

Fig.16 (A)The absorption spectrum profile of protein samples which was produced from the original vector pEZZ18.
 (B)From the transformed strain No.17.
 (C)From the transformed strain No.35.

(A)圖中可看到最左邊為蛋白質標準分子量 marker，分子量大小分別為 6.125、20.6、28.9、34.8、40.1、80、124 kDa。Lane 1 為 *E.coli* JM105 不含質體 pEZZ18 所分泌之蛋白質，Lane 2 為 *E.coli* JM105 含未重組質體 pEZZ18 所分泌之蛋白質，Lane 3 為轉型株#17 所分泌之重組蛋白質，Lane 4 為轉型株#35 所分泌之重組蛋白質。由此四個樣品互相比較可看出含質體 pEZZ18 之宿主細胞所分泌之蛋白質比不含質體之宿主細胞所分泌之蛋白質在 25 kDa 左右的位置多出一條明顯的區帶，且兩株轉型菌分泌之重組蛋白質也都多出此相同位置之區帶，表示 Lane 2、Lane 3、Lane 4 之樣品中皆含有載體藉由宿主細胞分泌胞外之融合蛋白。

同時，由於載體 pEZZ18 本身含有一段可轉錄、轉譯成 14 kDa "ZZ"融合蛋白的"ZZ"核苷酸序列，再加上所插入的基因序列是接續在"ZZ"核苷酸序列後面，並可轉錄、轉譯成 Phe-(Leu-Arg-Pro)₃的胺基酸序列，即可預估所重組載體所產生之融合蛋白的大小(苯丙胺酸分子量約為 165 Da、白胺酸約為 131 Da、精胺酸約為 174 Da、脯胺酸約為 115 Da，總加起來的大小約為 15.425 kDa)。

經(A)圖比較過未含質體、含未重組質體與重組載體之宿主細胞所分泌之蛋白質的差異後，再進而比較兩株轉型菌所分泌之蛋白質經由親和性管柱專一性之分離後不同處理的情形。如(B)圖所示，圖的



(A)

Lane 1 : *E.coli* JM105 不含質體 pEZZ18 所分泌之蛋白質；

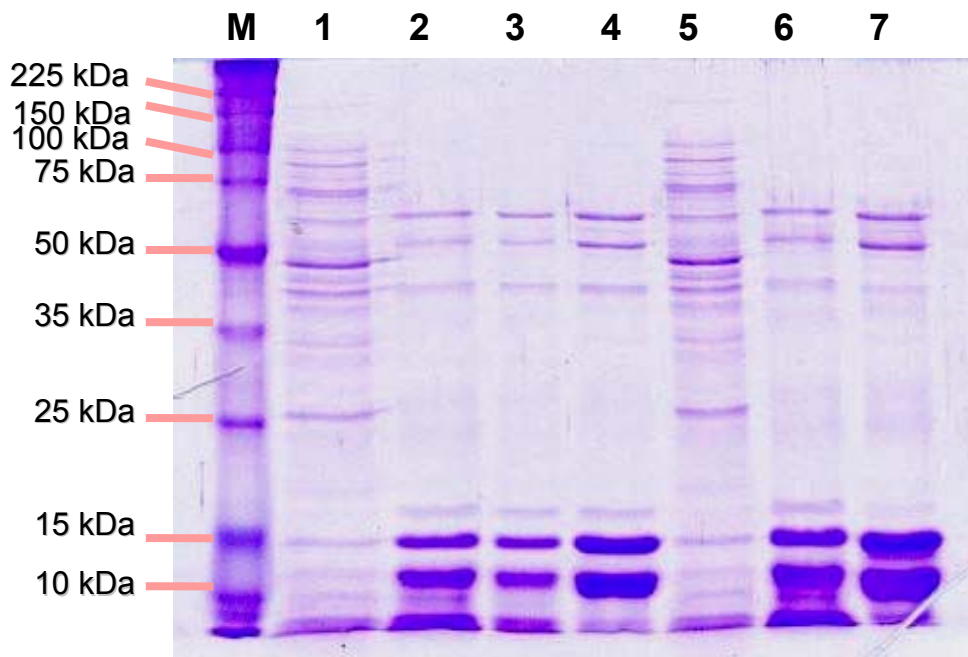
Lane 2 : *E.coli* JM105 含未重組質體 pEZZ18 所分泌之蛋白質；

Lane 3 : 轉型株#17 所分泌之重組蛋白質；

Lane 4 : 轉型株#35 所分泌之重組蛋白質。

圖十七、(A)、(B)不同處理之蛋白質樣品 SDS-PAGE 電泳圖。

Fig.17 SDS-PAGE profile of protein samples with different treatments.



(Lane 1-4 : #17 菌 ; Lane 5-7 : #35 菌)

(B)

Lane 1 : #17 蛋白樣品濃縮液 ; Lane 2 : #17 蛋白溶離後(HAc 環境) ;

Lane 3 : #17 經水洗、減鹽(HAc) ; Lane 4 : 置換緩衝液(Tris 環境)。

Lane 5 : #35 蛋白樣品濃縮液 ; Lane 6 : #35 蛋白溶離後(HAc) ;

Lane 7 : #35 蛋白置換緩衝液(Tris)。

圖十七、(A)、(B)不同處理之蛋白質樣品 SDS-PAGE 電泳圖。

Fig.17 SDS-PAGE profile of protein samples with different treatments.

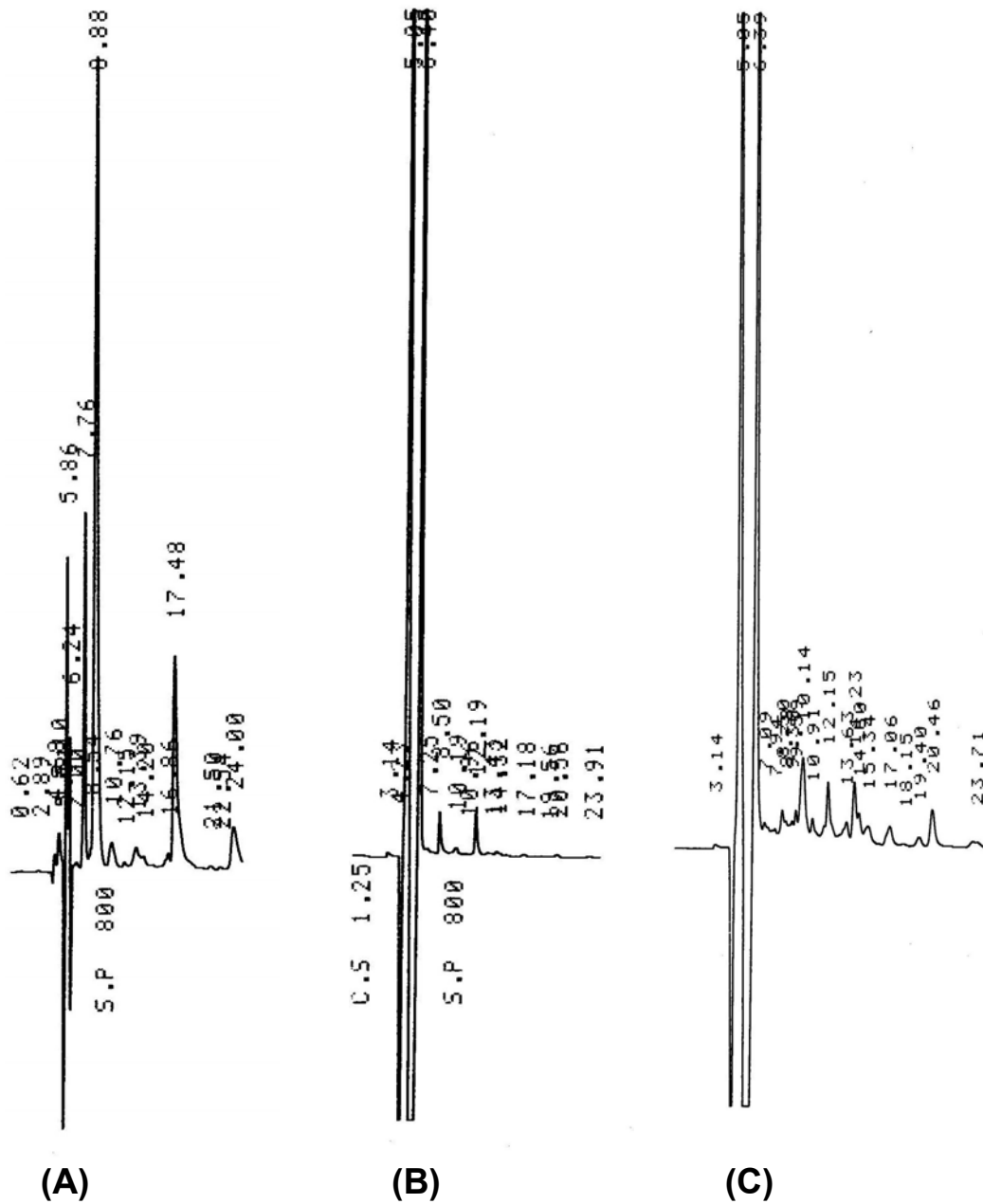
最左邊為蛋白質標準分子量 marker，分子量大小分別為 10、15、25、35、50、75、100、150、225 kDa。可看到 Lane 1 為#17 蛋白樣品濃縮液，Lane 2 為#17 蛋白溶離後(HAc 環境)，Lane 3 為#17 經水洗、減鹽(HAc)，Lane 4 為置換緩衝液(Tris 環境)，Lane 5 為#35 蛋白樣品濃縮液，Lane 6 為#35 蛋白溶離後(HAc)，Lane 7 為#35 蛋白置換緩衝液(Tris)。兩株轉型菌之蛋白濃縮異樣品皆在 15 及 25 kDa 附近有明顯的區帶，而經親和性管柱溶離下來之樣品主要是在 15 kDa 的位置，並且經超過率濃縮之樣品的蛋白質經不同緩衝液置換後，其大小及含量並不受影響。

四、重組 ACEI 肽之分離

經大量發酵、純化、收集重組後所產生的融合蛋白，進行超過濾時用去離子水置換數次，以洗去鹽類。再使用 0.08 M Tris-HCl (pH 7.8) 緩衝液去置換緩衝液，使緩衝液系統能讓 chymotrypsin 作用。超過率置換好緩衝液之樣品溶液與 chymotrypsin 以受質/酵素為 50/1 的比例，37°C 水浴中水解至少四個小時，將 Phe 與 (Leu-Arg-Pro)₃ 分開而得到最終的目標產物 (Leu-Arg-Pro)₃ 肽。

將水解後之樣品冷凍乾燥，並使用 HPLC 之 buffer A 回溶，進行 HPLC 分析，圖十八為 (LRP)₃ 標準品與未重組 pEZZ18 所分泌之 ZZ 融合蛋白未經 chymotrypsin 水解，及以 chymotrypsin 水解後之樣品

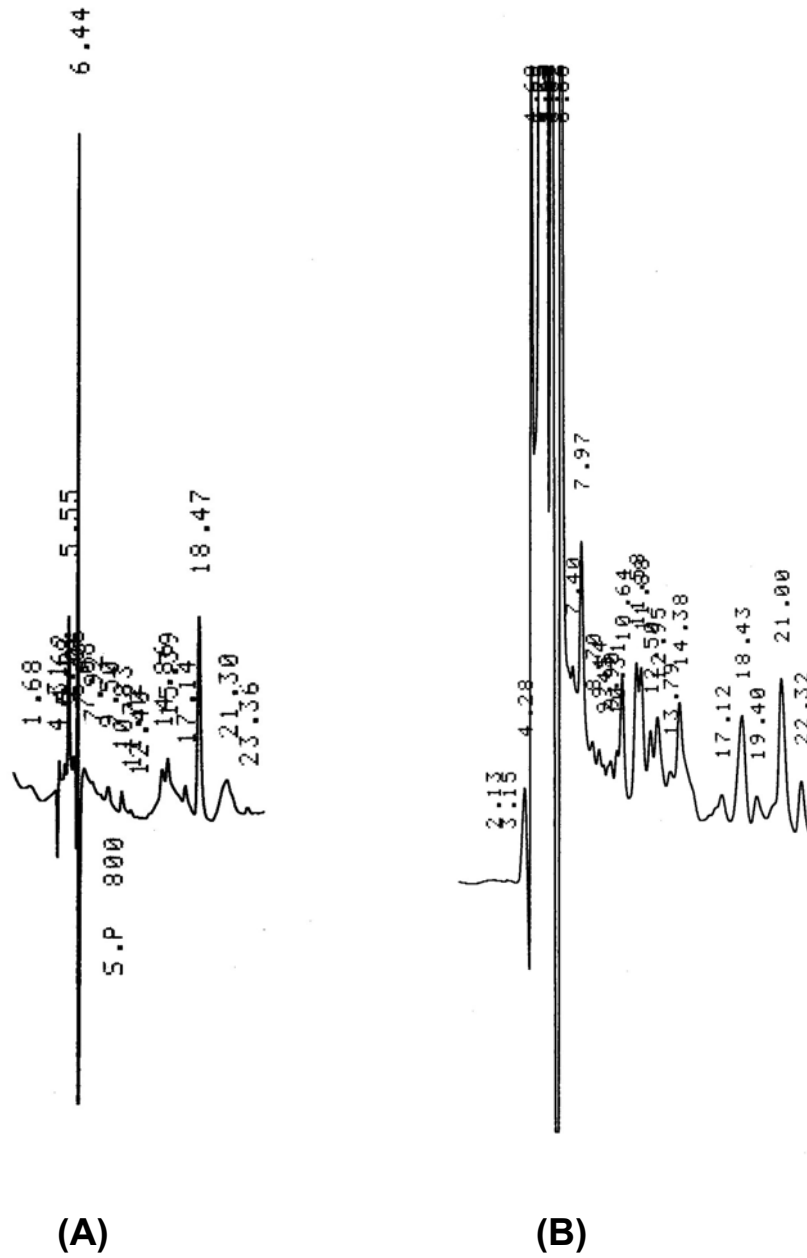
的 HPLC 圖，在(A)圖中可看到標準品滯留時間為 17.48 分，而未經 chymotrypsin 水解之融合蛋白的(B)圖只有兩個主要的小滯留波峰，經 chymotrypsin 水解後之(C)圖則有比較多小而雜的滯留區帶，並且沒有與標準品有相對位置的滯留波峰。圖十九為(LRP)₃ 標準品與#17 轉型菌所分泌之(LRP)₃ 肽 HPLC 圖，(A)圖中標準品的滯留時間為 18.47 分，(B)圖則是經 chymotrypsin 水解之 肽，在 18.43 分的滯留時間出現波峰。圖二十為(LRP)₃ 標準品與#35 所分泌之(LRP)₃ 肽 HPLC 圖，(A)圖中標準品的滯留時間為 19.99 分，(B)圖則是經 chymotrypsin 水解後之 肽，滯留時間同樣地在 19.99 分出現波峰。在這三個圖當中，由於使用高效能液相層析法分析的時間是不同天，並且在不同天分析的時候，除了偵測器的感度有所差異，在配置所需之緩衝液時也會產生些微誤差，而使得同樣為(LRP)₃ 肽的標準品會跑出不同的滯留時間。若是將圖十八、圖十九、圖二十同時比較時，除了可證明未重組之融合蛋白經 chymotrypsin 水解並不會有(LRP)₃ 肽，也可知道#17 轉型株及#35 轉型株確認有產生(LRP)₃ 肽。



- (A)(LRP)₃ 標準品
- (B)未水解 chymotrypsin 之 ZZ 融合蛋白
- (C)經 chymotrypsin 水解之 ZZ 融合蛋白

圖十八、(LRP)₃ 標準品與未重組 pEZZ18 所分泌融合蛋白 HPLC 圖。

Fig.18 The HPLC profile of the standard and the peptide secreted from the original strain.

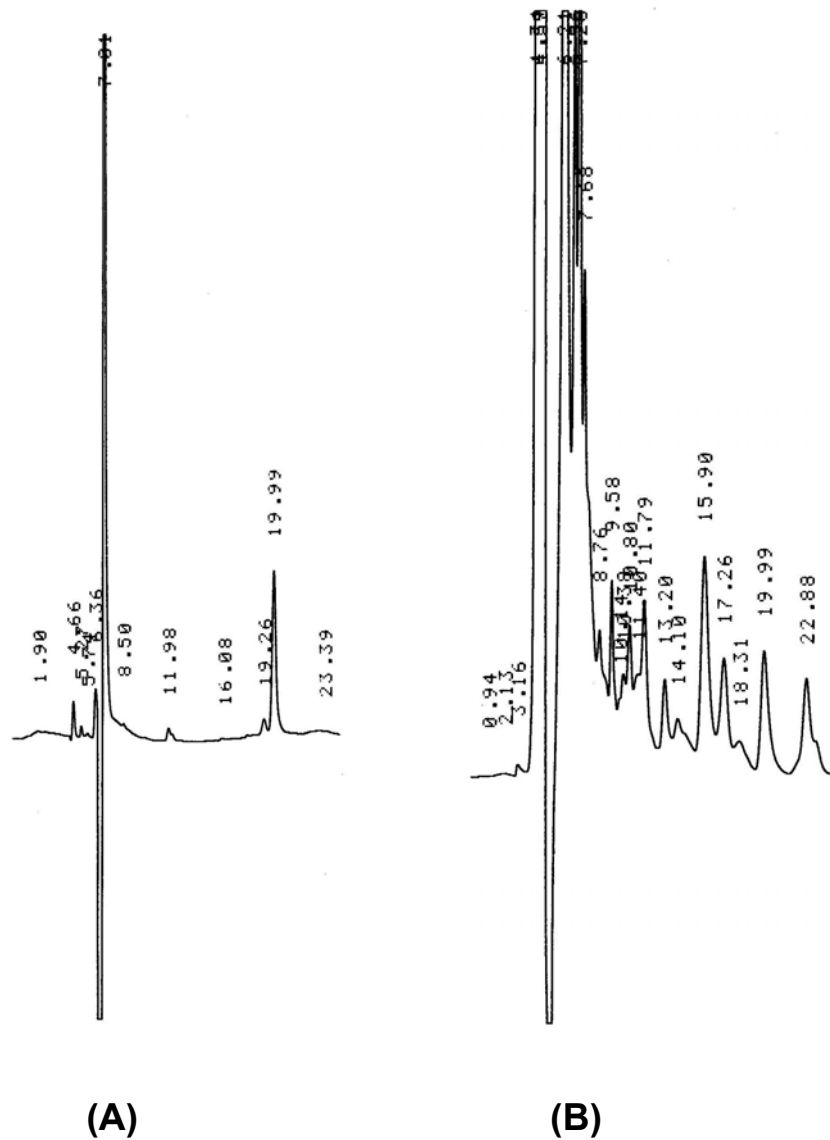


(A)(LRP)₃ 標準品

(B) #17 所分泌之融合蛋白經 chymotrypsin 水解出(LRP)₃ 肽

圖十九、(LRP)₃ 標準品與#17 所分泌之(LRP)₃ 肽 HPLC 圖。

Fig.19 The HPLC profile of the standard and the peptide secreted from transformed strain No.17.



(A)(LRP)₃ 標準品

(B) #35 所分泌之融合蛋白經 chymotrypsin 水解出(LRP)₃ 肽

圖二十、(LRP)₃ 標準品與#35 所分泌之(LRP)₃ 肽 HPLC 圖。

Fig.20 The HPLC profile of the standard and the peptide secreted from transformed strain No.35.

五、總結

綜合重組 ACEI 肽之表現與純化以及分離的結果顯示，經由親和性管柱溶離出來之樣品在 SDS-PAGE 圖中含有多條區帶，表示其成份仍屬複雜；而在經 chymotrypsin 水解後之樣品由 HPLC 分析，也有很多複雜的滯留區帶，若是能在通過親和性管柱後，再做一些有效的純化步驟，那麼在 HPLC 時就能有較清楚及單一的滯留波峰，這樣就能較有利於分析及後續收集與送交胺基酸定序的進行。

後續經由胺基酸序列鑑定成功後，除了須進行 ACEI 胜肽對 ACE 抑制活性的測試之外，也須經由動物實驗來驗證此片段由大腸桿菌系統生產是否真有抑制效果。而在抑制活性測試及動物實驗進行之前，須先將此三重複胜肽片段 $(\text{Leu-Arg-Pro})_3$ 水解成單一片段 Leu-Arg-Pro 才能著手進行大量製備餵食老鼠的工作。可使用 Proline Specific Endopeptidase 酵素或嘗試一次只切三個胺基酸的酵素來進行水解，將三重複片段水解成單一片段，而每次水解後，在量的方面則可都有三段 Leu-Arg-Pro 產生。

伍、結 論

- (一)本實驗使用大腸桿菌選殖系統與融合蛋白系統成功地建立降高血壓 肽基因的重組載體之構築及降高血壓 肽之表現。
- (二)不管是醫藥界或是食品界都積極地研究有關降高血壓藥物或食品蛋白水解產物的效能，而由學者所發表的諸多 肽片段當中，以 Leu-Arg-Pro 抑制 ACE 酵素的 IC₅₀ 值很低，再配合酵素活性位置模型的研究，可預期此 肽片段會具有很好的效能。
- (三)後續鑑定成功之降高血壓 肽，未來可使用在食品與藥物的開發，而讓國人的高血壓疾病有新的解決之道。

陸、參考文獻

- [1]江美昭。2003，酵素水解豬血漿中白蛋白以製備高血壓抑制胜肽。私立東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。
- [2]林錚威。2002，牛肉鮮味 基因之選殖與表現。私立東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。
- [3]姜中人、羅文鑫、沈仲澤、趙雲鵬。2001，建構基因表達質體以應用大腸桿菌來生產重組蛋白質。化工技術 9(2):126~152。
- [4]陳怡宏。1999，生物活性 肽及其合成。食品工業月刊 31(1):1~6。
- [5]張建棣。1999， 肽於腸胃道運輸之探討。食品工業月刊 31(1):40~50。
- [6]楊詠翔。1999，食品中抗高血壓 肽的發展現況。食品工業月刊 31(1):9~17。
- [7]劉毓蕙。1999，乳蛋白中的生物活性肽。食品工業月刊 31(1):18~28。
- [8]劉玉如。2004，乳酸菌之降血壓研究。食品工業月刊 36(3):34-44。
- [9]謝銘隆、吳天鳴、王宜君、朱延和。2002，組合化學在醫藥開發上之應用。科學發展 353:56-61。

- [10] Ariyoshi, Y. (1993) Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci. Tech.* 4:139-144.
- [11] Binevski, P.V., Sizova, E.A., Pozdnev, V.F., and Kost, O.A. (2003) Evidence for the negative cooperativity of the two active sites within bovine somatic angiotensin-converting enzyme. *FEBS Lett.* 550: 84-88.
- [12] Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248~254.
- [13] Brew, K. (2003) Structure of human ACE gives new insights into inhibitor binding and design. *TRENDS in Pharmacological Science* 24(8): 391-394.
- [14] Brewster, U.C., and Perazella, M.A. (2004) The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney : Effect on kidney disease. *Am. J. Med.* 116:263-272.
- [15] Bunning, P., and Riordan, J.F. (1983) Activation of angiotensin converting enzyme by monovalent anions. *Biochemistry* 22:110-116.
- [16] Cheung, H.S., Wang, F.L., Ondetti, M.A., Sabo, E.F., and

Cushman, D. W. (1980) Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *J. Bio. Chem.* 255(2): 401- 407.

[17] Coric, P., Turcaud, S., Meudal, H., and Roques, B.P. (1996) Optimal recognition of neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme active sites by mercaptoacyldipeptides as a means to design potent dual inhibitors. *J. Med. Chem.* 39:1210-1219.

[18] Cushman, D.W., and Cheung, H.S. (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20:1637.

[19] Cushman, D.W., and Ondetti, M.A. (1999) Design of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Nature Medicine* 5:1110-1113.

[20] Ehlers, M.R., and Riordan, J.F. (1989) Angiotensin-converting enzyme : new concepts concerning its biological role. *Biochemistry* 28:5311-5318.

[21] Erdos, E.G. (1975) Angiotensin-I converting enzyme. *Circulation Research* 36:247-255.

[22] Gill, I, Fandino, R.I., Jorba, X, and Vulfson, E.N. (1996)

Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme Microb. Technol.* 18:162-183.

- [23] Hansen K., Nyman U., Smitt U.W., Adsersen A., Gudiksen L., Rajasekharan S., and Pushpangadan P. (1995) In vitro screening of traditional medicines for anti-hypertensive effect based on inhibition of the angiotensin-converting enzyme (ACE). *Journal of Ethnopharmacology* 48:43-51.
- [24] Hopper, N.M., and Turner, A.J. (1987) Isolation of two differentially glycosylated forms of peptide-dipeptidase A(angiotensin-converting enzyme) from pig brain:a reevaluation of their role in neuropeptide metabolism. *Biochem. J.* 241:625-633.
- [25] Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Giggs, A. D., Bolivar, F., and Boter, H. W. (1977) Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science.* 198:1056-1063.
- [26] Keith Brew. (2003) Structure of human ACE gives new insights into inhibitors binding and design. *Trends in Pharmacological Sciences* 24(8):391-394.
- [27] Liu, Y-H, Tang, X-P, Sharov, V.G., Nass, O, Sabbah, H.N., Peterson, E , and Carretero, O.A.(1997) Effects of angiotensin-

converting enzyme inhibitors and angiotensin II type I receptor antagonists in rats with heart failure. *J. Clin. Invest.* 99(8): 1926-1935.

[28] Lowenadler, B., Jansson, B., Holmgren, E., Moks, T., Elmblad, A., Henrichson, C., Jones, T. A., and Uhlen M. (1987) A synthetic IgG-Binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Engineering.* 1(2):107-113.

[29] Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomizuka, N., and Suauki, H. (1985) Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 49(5):1405-1409.

[30] McFarlane, S.I., Kumar, A, and Sowers, J.R. (2003) Mechanisms by which angiotensin-converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology* 91(12A):30-37.

[31] Moks, T., Abrahmsen, I., Osterlof, B., Josephon, S., Ostling, M., Enfors, S.O., Persson, I., Nilsson, B., and Uhlen, M. (1987) Large-scale affinity purification of human insulin-like growth factor I from culture medium of *Escherchia coli*. *Bio/Technology* 5:379-382.

- [32] Moks, T, Abrahmsen, I, Holmgren, E, Bilich, M, Olsson, A, Uhlen, M, Pohl, G, Hultberg, H, Joshphson, S, Holmgren, A, Jornvall, H, and Nilsson, B. (1987) Expression of human insulin-like growth factor I in bacteria : Use of optimized gene fusion vectors to facilitate protein purification. *Biochemistry* 26:5239-5244.
- [33] Norris, K, and Vaughn, C. (2003) The role of renin-angiotensin-aldosterone system inhibition in chronic kidney disease. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 1(1):51-63.
- [34] Ondetti, M.A., and Cushman, D.W. (1982) Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 51:283-308.
- [35] Ondetti, M.A., Rubin, B., and Cushman, D.W. (1977) Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 196:441-444.
- [36] Sata N, Tanaka Y, Suauki S, Kamimura R, Mifune H, Nakamura K, Miyahara K, and Arima T.(2003) Effectiveness of angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin II receptor blocker on atrial natriuretic peptide. *Circ. J.* 67:1053-1058.

- [37] Sambrook, Joseph., and Russell, David W. (2001) Molecular Cloning 3rd ed.
- [38] Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A., and Imayasu, S. (1994) Structure and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58:1767-1771.
- [39] Struthers, A.D., and MacDonald, T.M. (2004) Review of aldosterone and angiotensin II-induced target organ damage and prevention. *Cardiovascular Research* 61:663-670.
- [40] Thurman, J.M., and Schier, R.W. (2003) Comparative effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on blood pressure and the kidney. *The American Journal of Medicine* 114:588-596.
- [41] Yamamoto, N. (1997) Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopoly.* 43:129-134.
- [42] Yoshiji H, Kuriyama S, and Fukui H. (2002) Angiotensin-I-converting enzyme inhibitors may be an alternative antiangiogenic strategy in the treatment of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol.* 23:348-356.

柒、附 錄

附錄一、NCBI 基因庫中之質體 pEZZ18 相關資料。

附錄二、#17 轉型株重組載體之 DNA 定序結果-DNA 定序圖譜。

附錄三、#35 轉型株重組載體之 DNA 定序結果-DNA 定序圖譜。

附錄一、NCBI 基因庫中之質體 pEZZ18 相關資料。

M74186. Cloning vector pE...[gi:208990]

LOCUS SYNPEZZ18A 4591 bp DNA circular SYN 21-JUN-1993

DEFINITION Cloning vector pEZZ18(bacterial,cloning,expression,secretion, fusion vector) encoding a fusion protein consisting of protein A signal sequence, partial E domain, protein A analogue ZZ and beta-Gal' (lacZ' of pEMBL8p) gene, complete cds.

ACCESSION M74186

VERSION M74186.1 GI:208990

KEYWORDS E domain;E'-ZZ-beta-Gal';NotI linker; ZZ;beta-Gal'; expression vector; fusion protein; protein A analogue; protein A promoter; protein A signal sequence.

SOURCE unidentified cloning vector

ORGANISM [unidentified cloning vector](#)
artificial sequences; vectors.

REFERENCE 1 (bases 1 to 4591)

AUTHORS Moks,T., Abrahmsen,L., Holmgren,E.D.F., Bilich,M., Olsson,A., Uhlen,M., Pohl,G., Sterky,C., Hultberg,H., Josephson,S., Holmgren,A., Joernvall,H. and Nilsson,B.

TITLE Expression of human insulin-like growth factor I in bacteria: use of optimized gene fusion vectors to facilitate protein purification

JOURNAL Biochemistry 26 (17), 5239-5244 (1987)

MEDLINE [88050797](#)

PUBMED [3676250](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 4591)

AUTHORS Lowenadler,B., Jansson,B., Paleus,S., Holmgren,E., Nilsson,B., Moks,T., Palm,G., Josephson,S., Philipson,L. and Uhlen,M.

TITLE A gene fusion system for generating antibodies against short peptides

JOURNAL Gene 58 (1), 87-97 (1987)

MEDLINE [88084449](#)

PUBMED [3692175](#)

REFERENCE 3 (bases 1 to 4591)

AUTHORS Nilsson,B., Moks,T., Jansson,B., Abrahmsen,L., Elmblad,A., Holmgren,E., Henrichson,C., Jones,T.A. and Uhlen,M.

TITLE A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A

JOURNAL Protein Eng. 1 (2), 107-113 (1987)

MEDLINE [89184394](#)

PUBMED [3507693](#)

COMMENT Original source text: Cloning vector DNA.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..4591

/organism="unidentified cloning vector"

/mol_type="genomic DNA"

/db_xref="taxon:45196"

[misc feature](#) order(1..2236,2971..4591)

/note="plasmid pEMBL8p"

[misc feature](#) 2237..2246

/note="synthetic NotI linker"

[gene](#) 2247..3157

/gene="protein A signal sequence, partial E domain,
synthetic ZZ and lacZ"

[promoter](#) 2247..2431

/gene="protein A signal sequence, partial E domain,
synthetic ZZ and lacZ"

/note="protein A promoter from Staphylococcus aureus"

[CDS](#) 2432..3157

/gene="protein A signal sequence, partial E domain,
synthetic ZZ and lacZ"

/note="synthetic Z (domain 1) = 2561-2734, synthetic Z
(domain 2) = 2735-2908, lacZ' of pEMBL8p = 2971-3157"

/codon_start=1

/transl_table=[11](#)

/product="protein A signal fusion protein"

/protein_id="[AAA73085.1](#)"

/db_xref="GI:208991"

/translation="MKKKNIYSIRKLGVGIVSLGTLISGGVTPAANAAQHDEAVD
NKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDA
QAPKVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEA
KKLNDAQAPKVDANSSSVPGDPLESTCRHASLALAVVLQRRDWENPGVTQ
LNRLAAHPPFASWRNSEEARTDRPSQQLRSLNGEWRFRFCNGWR"

[sig_peptide](#) 2432..2539

/gene="protein A signal sequence, partial E domain,
synthetic ZZ and lacZ"

/note="protein A signal peptide from Staphylococcus aureus"

[mat_peptide](#) 2540..3154
 /gene="protein A signal sequence, partial E domain,
 synthetic ZZ and lacZ"
 /product="E':ZZ:beta-Gal' fusion protein"

[misc feature](#) 2540..2560
 /gene="protein A signal sequence, partial E domain,
 synthetic ZZ and lacZ"
 /product="E domain of protein A"
 /note="partial E domain from Staphylococcus aureus"

[misc feature](#) 2561..2908
 /gene="protein A signal sequence, partial E domain,
 synthetic ZZ and lacZ"
 /standard_name="protein A analogue"
 /note="synthetic ZZ portion of gene (domain 1 = 2561-2734,
 domain 2 = 2735-2908)"

[misc feature](#) 2909..2913
 /gene="protein A signal sequence, partial E domain,
 synthetic ZZ and lacZ"
 /note="synthetic linker"

[misc feature](#) 2914..2970
 /gene="protein A signal sequence, partial E domain,
 synthetic ZZ and lacZ"
 /note="pUC18-polylinker"

[gene](#) 2971..3157
 /gene="partial E domain of protein A, synthetic ZZ and
 lacZ"

[misc feature](#) 2971..3157
 /gene="partial E domain of protein A, synthetic ZZ and
 lacZ"
 /product="beta-Gal"
 /note="lacZ' of pEMBL8p"

BASE COUNT 1206 a 1094 c 1037 g 1254 t

ORIGIN

1 gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatfff tatagggttaa tgtcatgata ataatggttt
 61 cctagacgtc aggtggcact ttccggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatfff
 121 tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat

181 aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt
241 ttgcggcatt ttgccttctt gttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg
301 ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga
361 tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagtctgc
421 tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac
481 actatttca gaatgacttg gttgagtact caccagtac agaaaagcat cttacggatg
541 gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataacat gagtgataac actgcgcca
601 acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgctttttg cacaacatgg
661 gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg
721 acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg
781 gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag
841 ttgcaggacc acttctgcgc tcggccctc cggctggctg gtttattgct gataaatctg
901 gagccgggta gcgtgggtct cgcggatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct
961 cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaatatagac
1021 agatcgctga gataggtgcc tactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact
1081 catatatact ttagattgat taaaactc attttaatt taaaaggatc taggtgaaga
1141 tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gtttctgct cactgagcgt
1201 cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt ctgagatcc tttttctg cgcgtaatct
1261 gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgttgccg gatcaagagc
1321 taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc
1381 ttctagtga gccgtagta ggccaccact tcaagaactc ttagcaccg cctacatacc
1441 tcgctctgct aatcctgta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtgc tgtcttaccg
1501 ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgacgct gtcgggctga acgggggggtt
1561 cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg
1621 agcattgaga aagcgccacg ctcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccgtaagcg
1681 gcagggctcg aacaggagag cgcacgagg agctccagg gggaaacgcc tggtatctt
1741 atagtctgt cgggttctgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgta tgcctgctag
1801 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcccctt ttacggctc ctggcctttt
1861 gctggcctt tgcacatg ttcttctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta
1921 ttaccgctt tgagttagct gataccgctc gccgagccg aacgaccgag cgcagcaggt
1981 cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gccttcccc gcgcttggc
2041 cgattcatta atgcagctgg cagcagaggt tcccgactg gaaagcgggc agtgagcga
2101 acgcaattaa tgtgagttag ctactcatt aggcaccca ggctttacac tttatgctc
2161 cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg
2221 accatgatta cgaattagcg gccgctagcc gaaatagcgt gattttgctg ttttaagcct
2281 ttacttct gaataaatct ttacgcaaaa tattttttt ataagttgta aaacttacct
2341 ttaaatttaa ttataaatat agattttagt attgcaatac ataattcgtt atattatgat
2401 gactttaca atacatacag ggggtattaa ttgaaaaag aaaaacattt attcaattcg

2461 taaactaggt gtaggtattg catctgtaac tftaggtaca ttacttatat ctgggtggcgt
 2521 aacacctgct gcaaatgctg cgcaacacga tgaagccgta gacaacaaat tcaacaaaga
 2581 acaacaaaac gcgftctatg agatcttaca ttacctaac ttaaacgaag aacaacgaaa
 2641 cgccttcac caaagttaa aagatgaccc aagccaaagc gtaaccttt tagcagaagc
 2701 taaaaagcta aatgatgctc aggcgccgaa agtagacaac aaattcaaca aagaacaaca
 2761 aaacgcgttc tatgagatct tacatttacc taacttaaac gaagaacaac gaaacgcctt
 2821 catccaaagt ttaaagatg acccaagcca aagcgctaac ctttagcag aagctaaaaa
 2881 gctaaatgat gctcaggcgc cgaaagtaga cgcgaattcg agctcggtag ccggggatcc
 2941 tctagagtcg acctgcaggc atgcaagctt ggcactggcc gtcgtttac aacgtcgtga

↑
 (Sal I)

↑
 (M13 universal sequencing primer 之互補序列)

3001 ctgggaaaac cctggcgta cccaactta tcgccttgca gcacatcccc ctftcgccag
 3061 ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgccttcc caacagttgc gcagcctgaa
 3121 tggcgaatgg cgattccgtt gcaatggctg gcgtaatat tgtctggat attaccagca
 3181 aggccgatag tttgagttct tctactcagg caagtgatgt tattactaat caaagaagta
 3241 ttgcgacaac ggtaatttg cgtgatggac agactcttt actcgggtggc ctactgatt
 3301 ataaaaacac ttctcaggat tctggcgtac cgttctgtc taaaatccct ttaatcggcc
 3361 tctgttttag ctcccgtct gattctaacg aggaaagcac gtfatacgtg ctctcaaaag
 3421 caaccatagt acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcg cggtgtggt ggttacgcgc
 3481 agcgtgaccg ctacactgc cagcgccta gcgccgctc ctftcgctt ctcccttcc
 3541 tttctcgcca cgttcgccgg ctftccccgt caagctctaa atcgggggct cccttaggg
 3601 ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac ccaaaaaaac ttgattaggg tgatggttca
 3661 cgtagtgggc catcgccctg atagacgggt ttcgccctt tgacgttga gtccacgttc
 3721 ttaatatg gactctgtt ccaaactgga acaacactca accctatctc ggtctattct
 3781 tttgattat aagggattt gccgatttc gcctattggt taaaaaatga gctgattaa
 3841 caaaaattta acgcgaatt taacaaaata ttaacgttta caattaaat atttgctat
 3901 acaatctcc tgttttggg gctttctga ttatcaaccg ggtacatat gattgacatg
 3961 ctagttttac gattaccgtt catcgattct ctgtttgct ccagactctc aggcaatgac
 4021 ctgatagcct tttagagac ctctcaaaaa tagctaccct ctccggcatg aatttatcag
 4081 ctagaacggt tgaatatcat attgatggtg atttgactgt ctccggcctt tctcaccctg
 4141 ttgaatctt acctacacat tactcaggca ttgcatttaa aatataatgag ggttctaaaa
 4201 attttatcc ttgcgtgaa ataaaggct ctcccgaac agtattacag ggtcataatg
 4261 ttttggtag aaccgattta gctttatgct ctgaggctt attgcttaatt ttgctaatt
 4321 cttgccttg cctgatgat ttattgatg ttggaattga tgcggtatt tctccttacg
 4381 catctgtgcg gtatttaca ccgcatatgg tgactctca gtacaatctg ctctgatgcc
 4441 gcatagttaa gccagccccg acaccgcca acaccgctg acgcgccctg acgggctgtg
 4501 ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag
 4561 aggtttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg a

附錄二、#17 轉型株重組載體之 DNA 定序結果-DNA 定序圖譜。(續)



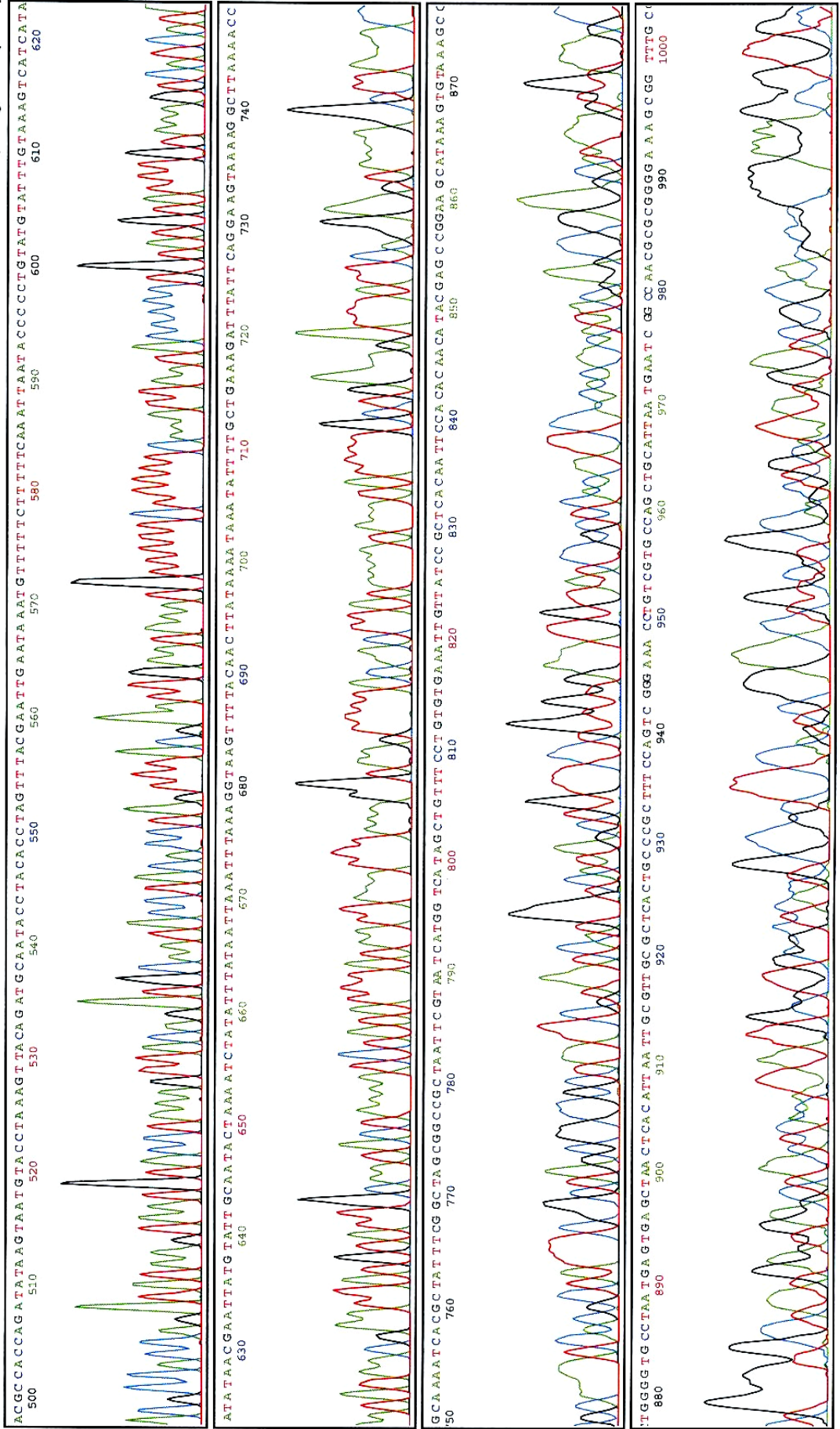
Model 3730
Version 3.4
KB.bcp
KB 1.0

028_E08_ACEI-26.1917_F
ACEI-26.1917 M13F
Lane 28

Signal G:493 A:265 T:412 C:414
KB_3730_POP7_BDTV3.mob

Points 1919 to 18381 Pk 1 Loc: 1902

Page 2 of 3
Tue, Dec 9, 2003 9:05
Mon, Dec 8, 2003 23:01
Spacing: 16.03(16.03)



附錄三、#35 轉型株重組載體之 DNA 定序結果-DNA 定序圖譜。

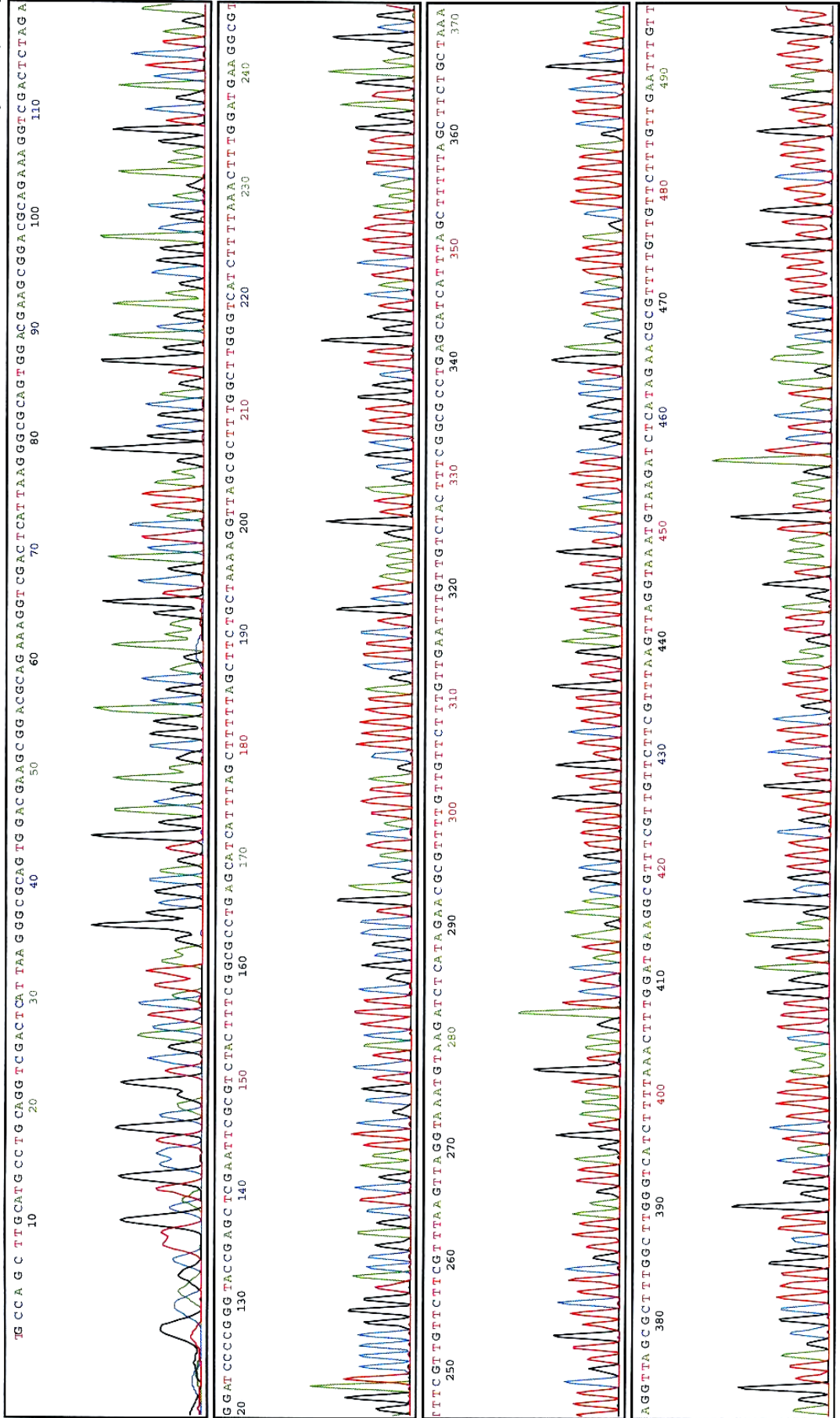


Model 3730
Version 3.4
KB.bcp
KB 1.0

027_F08_ACEI-26.1935_F
ACEI-26.1935 M13F
Lane 27

Signal G:600 A:356 T:482 C:497
KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Points 1939 to 18752 Pk 1 Loc: 1922

Page 1 of 3
Tue, Dec 9, 2003 9:06
Mon, Dec 8, 2003 23:01
Spacing: 16.15(16.15)



附錄三、#35 轉型株重組載體之 DNA 定序結果-DNA 定序圖譜。(續)



Model 3730
Version 3.4
KB.bop
KB 1.0

027_F08_ACEI+26.1935_F
ACEI+26.1935 M13F
Lane 27

Signal G:600 A:356 T:482 C:497
KB_3730_POP7_BDTV3.mob

Points 1939 to 18752 Pk 1 Loc: 1922

Page 2 of 3
Tue, Dec 9, 2003 9:06
Mon, Dec 8, 2003 23:01
Spacing: 16.15(16.15)

