

嘉南藥理學院教師專題研究計劃成果報告

計劃名稱：創傷弧菌 *Vibrio vulnificus* 藍色螢光蛋白 (BFP)

之純化及其特性分析

計劃編號：CNIS-89-07

執行期間：88年9月1日至89年6月30日

計劃類別：個別型

主持人：陳連輝

協同主持人：蘇哲弘、張淑玉

摘要：

創傷弧菌 *Vibrio vulnificus* 的藍色螢光基因(*bfp*)，可譯出 239 個氨基酸序列，蛋白質分子量約為 27 kDa；將 *bfp* in frame 接入 pET21b 表現載體，經由大腸桿菌 BL21 大量表現後，即利用 Ni²⁺ resin 進行親和性分離管柱(Affinity chromatography) 予以純化此藍色螢光蛋白質(BFP)；透過多重氨基酸序列比對，得知 BFP 應歸類於短鏈去氫氧化還原酶(short-chain dehydrogenase / reductase) (SDR) family 中之一員，依比對 SDR 氨基酸序列，如活化位置(active site) Tyr 145、催化位置(catalytic site)Lys 149 和一個靠近 N 端的輔酶(coenzyme) 結合位置 GlyXXXGlyXGly，都是具有絕對高度保留性的；經由定位點突變的方法置換這些重要的氨基酸殘基，以探討 BFP 之產光特性與 SDR 之生化特性的相關性。

關鍵字：創傷弧菌(*Vibrio vulnificus*)、藍色螢光蛋白質、定位點突變

前言：

許多不同的生物體如細菌、真菌、螢火蟲、和魚類等，皆與生俱有發光的能力[1, 2, 3]，但生物體產生螢光之機制並不相同。細菌的螢光酶基因彼此間具有同源性(homologous)[4]，而其它生物發光系統在演化上並非被保留者，故在解譯(coding)螢光蛋白的基因之間，並不具有同源性，可分為許多不相關的化學類別[5]。細菌的螢光酶(Lase)乃屬於氧化還原酶，可利用氧分子氧化受質，而此受質通稱為螢光素(luciferin)，即攜帶光的分子(chromophore)，當其被氧化時即處於受激態，此時若有長鏈醛類存在，即可進行非輻射性之能量轉移，而釋出螢光[6, 7]；即使在不同菌種中，雖然 luciferin / Lase system 之構成相同，卻也可能產生不同顏色的螢光[5]。目前細菌所屬的螢光酶，可引起藍光或紅光者，已從各種不同種類之菌株中分離出來[4]。

不同於細菌螢光酶之螢光蛋白被研究最透徹者為北大西洋之水母的螢光蛋白，由水母傘邊緣之光細胞放出綠色螢光[8]，此一螢光乃是經由兩種螢光蛋白：即水母素(aequorin)及綠色螢光蛋白(green fluorescent protein)(GFP)依序活化產生[8]。多年來，此兩種蛋白質之特性已被廣為研究[9]，然而 GFP 之 *gfp* 基因卻延至 1992 年才由水母之 cDNA 基因庫選殖出來[10]。許多實驗室的工作顯示，GFP 能在各種不同生物體中，如細菌、黏菌、植物及動物，經由長波 UV 光(395nm)照射後產生綠色螢光。目前此 GFP 已經由 X 射線結晶攝影技術做分子結構方面的研究，並經由氨基酸殘基之改造，將其激發波及發射波光譜位移，造成螢光顏色改變或螢光強度增大，使得在應用上更為方便[11, 12]。螢光蛋白的應用可有多種，包括：利用螢光蛋白作為基因表現的 reporter [13]，或作為細胞發育中血源研究的 marker[14]。又由於 fusion tag protein 可用來定位蛋白質，以便追蹤其移動，故可將其應用在細胞組成之動力學方面的研究，因此可將螢光蛋白作為 protein tag 利用[15]。

Vibrio 菌屬中之 *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholera* 普遍擁有生物螢光 (bioluminescence)[16]，但同屬之 *V. vulnificus* 卻少有這方面的報導，截至目前只有 Oliver 等人，於 1986 年首次發現有些感染性創傷弧菌(*V. vulnificus*)具有生物螢光，但卻未提及其產生螢光之機制[17]。本實驗室先前已成功由創傷弧菌(*Vibrio vulnificus*)基因庫，找出藍色螢光基因(*bfp*)，其解譯之藍色螢光蛋白質(blue fluorescent protein, BFP)可經由長波 UV 燈照射而發出顯著的藍色螢光，故與一般細菌之螢光酵素自然產生螢光的機制顯然不同，首次證實了細菌亦具有與高等生物（例如水母）類似的螢光系統存在[18]。

本研究將 *bfp* 轉譯後的氨基酸序列與 Data base 中各基因轉譯後的氨基酸序列一一作比對，顯示此蛋白質應歸類於短鏈去氫氧化還原酶(short-chain dehydrogenase / reductase) (SDR) family 中之一員[19]。為了進一步了解創傷弧菌的藍色螢光蛋白(BFP)之發光特性，我們成功地完成了創傷弧菌 *Vibrio vulnificus* 之 BFP 的大量表現及純化，並以定位點突變的方法探討 BFP 之產光特性與 SDR 的生化特性是否具有相關性。

本文：

材料與方法：

(一) 使用菌株及其培養條件

我們所使用的菌株，是由成大醫院病人檢體中分離篩選到的 *V. vulnificus* CKM-1。用來進行形質轉換(transformation) 的宿主細胞 *E. coli* BL21 : *hsdS gal* (λ *cIts857 indl Sma7 nin5 lacUV-T7 genel*)，LB 完全培養基 (Luria-Bertani medium) 含 1% Bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract 1% NaCl。

(二) 抽取質體 DNA

將帶有質體 DNA 的菌株接種於 20 ml (LB+Ap) 液態培養基，在 37 °C

振盪培養過夜，solution I (含 50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris - HCl pH 7.5, lysozyme 4~5 mg/ml) 使細胞溶解，放置於室溫 5 分鐘；隨後加入 solution II (含 1% SDS, 0.2 N NaOH)，混合均勻，於 4 °C 冰中靜置 5 分鐘；再加入 1.5 ml solution III (含 11.5 ml glacial acetate, 60 ml 5 M CH₃COOK, 28.5 ml dist. H₂O)，搖勻後繼續於 4 °C 冰中放置 5 分鐘；以 12000 rpm 轉速在 4 °C 離心 10 分鐘，取上清液至新離心管中，以等體積的 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 萃取，取水層，加入 2~3 倍體積 99% 酒精，於 -20 °C 沉澱，再以 70% 酒精清洗，利用冷凍真空濃縮機抽乾後，加入適量 TE buffer (含 10 mM Tris-HCl pH 7.5~8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)。

(三) 質體 DNA 在大腸桿菌之轉形作用 (transformation)

將大腸菌接種於 20 ml LB 液態培養基中，37°C 振盪培養過夜。以 10 ml Low buffer (含 10 mM Mops, 10 mM RbCl, pH 7.0) 清洗菌體，加入 10 ml High buffer (含 10 mM Mops, 10 mM RbCl, 50 mM CaCl₂, pH 6.5)，在 4 °C 放置 30~60 分鐘。以 5000 rpm 在 4°C 離心 5 分鐘。以 2 ml High buffer 溶解 pellet。取 100 ul 菌液，加入適量的質體 DNA。放置於 4°C 30~60 分鐘。於 43°C 加熱 30 秒使質體 DNA 進入細胞內。加入 1 ml LB 液態培養基，於 37°C 培養 1 小時。取 50 ul 均勻塗抹在 (LB + Ampicillin) 之固態培養基上，於 37°C 培養。

(四) SDS-PAGE 分析

菌體懸浮於 400 ul Tris-HCl pH 7.0 buffer 中，以 sonicator 將菌體打破，在 100°C 沸水煮沸 5 分鐘後，以 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)-15% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)，進行蛋白質之分析。

(五) BFP 的大量表現與純化

含質體的 *E. coli* BL21 培養至 OD₆₀₀ 為 0.6 時，經 1mM IPTG 誘導至少 6 小時，以 sonicator 將菌體打破，用 0.45um 的濾膜過濾，離心 13000rpm, 45 分鐘，取上清液，並利用 Ni²⁺ resin 進行親和性分離管柱 (Affinity chromatography) 予以純化。

(六) 定位點突變

以含 *bfp* 基因之質體 pVFb 為模板，各組寡核苷酸引子(primer)各 50 pmole (圖一)，其中 N1 primer 與各種點突變之負股 primer 各放大出靠 5'端的 coding region。而 C1 primer 與各種點突變之正股 primer 各放大出靠 3'端的 coding region。PCR 放大之流程如下：94°C 30 秒→51°C 30 秒→72°C 60 秒，30 個週期。隨後以 2 % agarose 分析 PCR 產物，並回收 PCR 產物。將各組之 5'端及 3'端之 PCR 產物及 N1, C1 primer 進行第二次 PCR。回收第二次 PCR 產物，並純化之。再以 *Nde*I, *Xho*I 切割此第二次 PCR 產物，並接合至 pET21b 載體。將反應完成之質體 DNA 進行 transformation。再篩選正確接入之 Clones，用核酸定序法分析。

結果與討論

吾人將完整的 *bfp* 之解譯區序列 in frame 接入 pET21b 表現載體，並進行序列分析確認，而將此質體命名為 pVFb；取長鏈醛類給予含此質體的 *E. coli* BL21，發現其並無法自然產生螢光，然此轉形體若經長波 UV 照射，則其與含有 pVF1019 (*bfp* 構築在 pUC19) 之 *E. coli* XL1B 一般[18]，皆表現藍色螢光(表一)；由此現象更進一步證明 *bfp* 的產光機制必不同於一般之發光細菌。

由於 pET21b 載體帶有很強的 T7 啟動子，若將 *bfp* in frame 構築在此載體中，並送入含有 T7 RNA 聚合酶基因的 *E. coli* BL21，經 1mM IPTG 誘導後，即可大量產生 BFP，又因 *bfp* in frame 接入 pETb，所以在 BFP 之 C 端帶有 6 個連續的 Histidine 序列，而可利用 Ni²⁺ resin 進行親和性分離管柱(Affinity chromatography) 予以純化；所以吾人著手進行 BFP 的大量表現與純化，並成功地純化出分子量約為 27 kDa 之 BFP(圖二)，此蛋白質與 *bfp* 核苷酸序列解譯之蛋白質大小相等，然此純化之 BFP 經 UV 照射，卻無法產生藍色螢光，此現象可能是因為蛋白質大量表現而影響了其折疊(folding)的效能而無法表現，也可能是 BFP 在表現螢光的過程中，是需要細菌內的某些物質共同參與的，所以一旦離開了菌體，則無法表現螢光。

bfp 轉譯後的氨基酸序列與 Data base 各基因轉譯後的氨基酸序列一一作比對，顯示此蛋白質應歸類於 short-chain dehydrogenase / reductase (SDR) family 中之一員(圖三)。SDR 是一個非常龐大的 family，其中的蛋白質至少涵蓋了 57 種不同的化學特性；而彼此間的同源性僅達 15-30%，但無論是屬於何種生物的 SDR，其氨基酸序列的相對位置中，有幾處是具有絕對高度保留性的，以人類的前列腺去氫酶(prostaglandin dehydrogenase)為例，其活化位置(active site) Tyr151、Lys155，及靠近 N 端的輔酶(coenzyme) 結合位置 GlyXXXGlyXGly，都是具有絕對高度保留性的；經由許多文獻報告得知，多種 SDR 分別利用定位點突變或化學修飾法將這些特殊的氨基酸殘基分別去除[20, 21]，亦或是將這些特殊的氨基酸殘基分別予以置換，以 *Drosophila melanogaster* 的酒精去氫酶(alcohol dehydrogenase)為例，分別進行以下之置換，G14V, Y152F, K156I，皆可導致 SDR 失去活性[19]，為了解 BFP 之發光特性是否與 SDR 之生化特性相同，故分別設計各組 primer(圖一)，分別針對各重要氨基酸殘基進行定位點突變，如 Gly(G)⁹→Val(V)⁹，Tyr(Y)¹⁴⁵→phe(F)¹⁴⁵，Lys(K)¹⁴⁹→Ile(I)¹⁴⁹，再將 PCR 後已突變之 DNA 片段，由 *Nde*I, *Xho*I，分別接至載體 pET21b，並分別將其命名為 pVFbV, pVFbF, 和 pVFbI，將這些質體分別 transformation 入 *E. coli* BL21，由表一得知擁有載體 pETb 或 pVFbV 之轉形體，經 UV 照射，並不產生藍色螢光，但擁有 pVFbF 或 pVFbI 之轉形體，經 UV 照射，則皆可產生藍色螢光，由此可知，產生螢光之特性並不完全因為突變了屬於 SDR 之關鍵性的氨基酸殘基而喪失，這樣的結果顯示了 BFP 的產光特性應與 SDR 之生化特性無關；由 BFP 的氨基酸序列比對，我們推測 BFP 在細胞內應該也扮演了屬於 SDR 功能蛋白的角色，然其與發光特性應是無關的，可能 BFP 在部份結構上同時擁有了發光特性罷了。

Oliver 等人，認為具有生物螢光之 *V. vulnificus*，其感染的半致死劑量，是一般 *V. vulnificus* 的 10~100 倍[17]，而生物螢光是否真的可以作為致病力強弱之判斷，則有賴將來進一步之探討，然目前我們已成功地將此螢光基因選殖、大量表現、純化、並進一步地探討其生化特性，証實了某些感染性 *V. vulnificus* 確實是擁有生物螢光的。

參考文獻

1. Harvey, E.N. "Bioluminescence." Academic Press, New York, NY. 1952.
2. Herring, P.J. "Bioluminescence in action." Academic Press, London. 1978.
3. Hasting, J.W. and Morin, J.G. Bioluminescence. In: Prosser, C.L.(Ed.), "Neural and Integrative Animal physiology." Wiley Interscience, New York, NY, pp.131-170, 1991.
4. Edward A. and Meighen. "Molecular Biology of Bacterial Bioluminescence." Microbiological Reviews. Mar, pp.123-142, 1991.
5. Hastings, J.W. "Chemistries and colors of bioluminescent reactions": a review. Gene, 173, pp. 5-1, 1996.
6. Eckstein, J., Cho, K.W., Colepicolo, P., Ghisla, S., Hastings, J.W. and Wilson, T. "A time-dependent bacterial luminescence emission spectrum in an vitro single turnover system: energy transfer alone cannot account for the yellow emission of *Vibrio fischeri* Y-1." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, pp.1466-1470, 1990.
7. Lee, J., Matheson, I.B.C., Muller, F., O'Kane, D.J., Vervoort, J. and Visser, A.J.J.W.G. "The mechanism of bacterial bioluminescence." In: Muller, F. (Ed.), Chemistry and Biochemistry of Flavin and Flavoenzymes, Vol. 2. CRC Press, Orlando, FL, pp. 109-1151, 1991.
8. Prasher, D.C. "Using GFP to see the light" Trends Genet. 11, pp. 320-323, 1995.
9. Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. and Tsien, R.Y. "Understanding, improving and using green fluorescent proteins." Trends Biochem. Sci. 20, pp. 448-455, 1995.
10. Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. "Structure of the murine lactotransferrin gene is similar to the structure of other transferrin-encoding genes and shares a putative regulatory region with the murine myeloperoxidase gene." Gene 110, pp. 229-234, 1992.
11. Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. "Crystal structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein." Science 273, pp.1392-1395, 1996.
12. Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y.

- "Understanding, improving and using green fluorescent protein." TIBS 20, pp. 448-455, 1995.
13. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. and Prasher, D.C. "Green Fluorescent protein as a marker for gene expression." *Science* 263, pp.802-805, 1994.
 14. Tannahill, D., Bray, S. and Harris, W.A. "A *Drosophila E(spl)* gene is "Neurogenic" in *Xenopus*: A green fluorescent protein study." *Dev. Biol.* 168, pp.694-697, 1995.
 15. Wang, S. and Hazelrigg, T. "Implication for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis." *Nature* 369, pp.400-403, 1994.
 16. Belas, R., A. Mileham, D. Cohn, M. Hilmen, M. Simon, and M. Silverman. "Bacterial bioluminescence: isolation and expression of the luciferase genes from *Vibrio harveyi*." *Science* 218, pp. 791-793, 1982.
 17. Oliver, J.D., Roberts, D. M., White, V. K., Dry, M. A., and Simpson, L. M. "Bioluminescence in a strain of the Human pathogenic bacterium *Vibrio vulnificus*." *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 52, No. 5, pp. 1209-1211, 1986.
 18. 蘇哲弘, 張淑玉, 陳連輝, 張敏政."創傷弧菌 *Vibrio vulnificus* 藍色螢光蛋白基因(*bfp*)之選殖."第十四屆全國技術及職業教育研討會論文集, 醫護類:公共衛生組, pp.81-88, 1999.
 19. Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzàlez-Duarte, R., Jeffery, J., and Ghosh, D., "Short-chain dehydrogenase/reductase(SDR)." *Biochemistry* Vol. 34, No. 18, pp. 6003-6013, 1995.
 20. Chen, Z., Lu, L., Shirley, M., Lee, W. R., and Chang, S. H. "Site-Directed Mutagenesis of Glycine-14 and Two "Critical" Cysteinyll Residues in *Drosophila* Alcohol Dehydrogenase." *Biochemistry* Vol. 29, pp. 1112-1118, 1990.
 21. Cols, N., Marfany, G., Atrian, S., and Gonzalez-Duarte, R. "Effect of site-directed mutagenesis on conserved positions of *Drosophila* alcohol dehydrogenase." *FEBS Lett.* Vol. 319, pp. 90-94, 1993.

N1 : 5' - GGATCACCCATATGAAAAAATTAGTCG -3'

*Nde*1

C1 : 5' - GAGCGGCTCGAGGCTGCTGC -3'

*Xho*1

G9V+ : 5' - ACCCATATGAAAAAATTAGTCGTTATTACAGTCGCA -3'

*Nde*1

Y145F + : 5' - ACGCGGCATTCTGTGGCACC -3'

Y145F - : 5' - GTGCCACAGAATGCCGCGTG -3'

K149I + : 5' -TGTGGCACCATCTTCGCTGTGC -3'

K149I - : 5' - CACAGCGAAGATGGTGCCACAG -3'

圖一：定位點突變 Gly(G)⁹→Val(V)⁹，Tyr(Y)¹⁴⁵→phe(F)¹⁴⁵，Lys(K)¹⁴⁹→Ile(I)¹⁴⁹寡核 酸引子序列 (primer sequence)。陰影部分代表已取代的核 酸，方框則顯示核酸突變的位置。



圖二：藍色螢光蛋白(BFP)在 *E. coli* BL21 中大量表現及純化的結果。Lane1 : Marker ; Lane2 : 純化的 BFP ; Lane3 : pVFb / *E. coli* BL21 ; Lane4 : pETb / *E. coli* BL21 ; Lane5 : *E. coli* BL21

VIVUL	MK-----KLVVITGASSGIGEAIAARRFSEEGHP-----LLLLARRVERLEAL--	42
STCLA	MPSALQGKVALITGRELGHRRATARALAPEGAA-----VAIAARRVEKLRALGD	49
LIMON	M--TIKNKVIIITGASSGIGKATALLLAEKGAK-----LVLAARRVEKLEKIVQ	47
HOSAP	ART-----VVLITGCSSGIGLHLAVRLASDPSQSFKVYATLRDLKTQGRLEAAR	50
HAINF	M----QGKIALVTRGIGSTGRAIAEELSSKGAF-----V-IGTATSEKGAEAI	44
EUVPI	MKL-VQDKITITITGGTRGIGFAAAKLFIEGAK-----VSIFGETQEEVDTALA	48
	. . . * . * . *	
VIVUL	NL-----PNTLCAQVDVTDKNTFDAAITRAEKIYGPADVLVNNAAGVMLLGQIDT	91
STCLA	ELTA--AGAKVHVLELDVADRQGVDAAVASTVEALGGDLILVNNAGIMLLGPVED	102
LIMON	I IKA--NSGEAIFAKTDVTKREDNKKLVELAIERYGKVD AIFLNAGIMPNSPLSA	100
HOSAP	ALAC--PPGSLETLQLDVRDSKSVAAARERVTE--GRVDVLCNAGLGLLPLEA	101
HAINF	A----YLGDKGKGLVNLVTDKES IETLLEQIKNDFGDIILVNNAGITRDNLIMR	95
EUVPI	QLKELYPEEEVLGFAPDLTSRDAVMAAVGTVAQKYGRLDVMINNAGITMNSVFSR	103
 * * . * * .	
VIVUL	QUANEWQRMFDVNVLGLLNGMQAVLAPMKARNSGTIINISSIAGKKTFFPDHAAYC	146
STCLA	ADTTDWTMIDTNLLGLMYMTRAALPHL-LRSKGTVVQMSSIAGRVTVRNAAVYQ	156
LIMON	LKEDWEWQ MID INIKGVLNGIAAVLPSFIAQKSGHI IATSSVAGLKAYPGGAVYG	155
HOSAP	LGEDAVASVLDVNVVGTVRMLQAFLPDMKRRGSGRVLVTG SVGGMLGLPFNDVYC	156
HAINF	MKDEEWFDMQTNLTSVYHLSKAMLRSMKKRFRGRIINIGSVVGSTGNPGQTNYC	150
EUVPI	VSEEDFKNIMDINVNGVFNGAWSAYQCMKDAKQVINTASVTGIYGSLSGIGYP	158
 * . . . * . * . . . * .	
VIVUL	GTKEAVHAI SENVREEVAASN--VRVTTIAPGAVETELLSHTTSQQIK-----	192
STCLA	ATKFGVNAFSETVRQEVTERG--VRVVVIEPGTTDTELRGHITHHTATK-----	202
LIMON	ATKWAVRDLMEVLRMESAQEGTNI RTATIYPAAINTELLETITDKETE-----	203
HOSAP	ASKFALEGLCESLAVLLLPEG--VHLSLIECGPVHTAFMEKVLGSPPEEVLDRDI	209
HAINF	AAKAGVVGFSKSLAKEVAARG--ITVNVVAPGFIATDM-----TEVLTDEQK	195
EUVPI	TSKAGVIGLTHGLGREIIRKN--IRVVG VAPGVVD TDM-----TKGLPPEIL	203
	.. * * * *	
VIVUL	DGYDAW-----KVDMGGVLAADDVARAVLFAYQQP-----	222
STCLA	EMYEQ-----RISQIRKLQAQDIAEAVRYAVTAP-----	231
LIMON	QGMTS-----LYKQYGITPDRIASIVAYAI DQP-----	231
HOSAP	HTFHRFYQYLAHASKQVFREAAQNPEEVAEVFLTALRAPKPTLRYFTTERFLPLL	264
HAINF	AGIL-----SNVPAGRLGEAKDIAKAVA-----FLASD-----	223
EUVPI	EDYL-----KTLPMKRMLKPEEIANVYL-----FLASD-----	231
	. . . * .	
VIVUL	---QNVCI REIALAPTQK-----QP	239
STCLA	---HHATVHEIFIRPT-D-----QV	247
LIMON	---EDVNVNEFTVGPTSQ-----PY	248
HOSAP	MRLDDPSGSNYVTAMHREVFGDVPA	289
HAINF	---DAGYITGTTLHVNGGLY---LS	242
EUVPI	---LASGITATTISVDGA-Y---RP	249

圖三. 各種不同來源之 SDR 之多重比對。VIVUL : Blue fluorescence protein from *Vibrio vulnificus*。STCLA : calvulanate-9-aldehyde reductase from *Streptomyces clavuligerus*。LIMON : internalinB-*Listeria monocytogenes* from *Listeria monocytogenes*。HOSAP : human 17-beta-hydroxysteroid-dehydrogenase type 1 complexed with 17-beta-estradiol from *Homo sapiens*。HAINF : 3-oxoacyl reductase from *Haemophilus influenzae*。EUVPI : 7-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Eubacterium sp.* VPI 12708. 陰影 : 將被取代的氨基酸 ; 方框 : 則顯示核酸絕對高度保留的位置 ; 星號 : 氨基酸相同的位置 ; 圓點 : 具同源性殘基的位置 ; 虛線 : 氨基酸變異的位置。

表一：含藍色螢光蛋白基因之質體及各點突變後之質體，在 *E. coli* BL21 中經 UV 照射後其藍色螢光表現的情形。

質體	藍色螢光之表現
PETb	-
PVFb	+
PVFbV	-
PVFbF	+
PVFbI	+



Purification and Characterization of the gene encoding a Blue Fluorescence Protein (BFP) from *Vibrio vulnificus*

¹ Shwu-Yuh Chang, ² Jer-Horng Su, ² Lien-Huei Chen

¹ Department of Food Health, Chia-Nan college of pharmacy and science,
Tainan, Taiwan, R. O. C.

² Department of Industrial safety and hygiene, Chia-Nan college of pharmacy and science,
Tainan, Taiwan, R. O. C.

Abstract

A gene (*bfp*) encoding the blue fluorescence protein (BFP) of 239 amino acids with a molecular weight about 27 kDa. from *Vibrio vulnificus* CKM-1 was identified. BFP has been overproduced in *Escherichia coli* BL21 with a His-tag sequence fused at the C-terminal end. It can be purified in a one-step procedure by affinity chromatography on Ni²⁺-nitrilacetate resin. BFP also belongs to short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family by multiple sequence alignment of SDR. Some residues are strictly conserved in SDR, such as an active site-Tyr 145, a catalytic site-Lys 149 and a common GlyXXXGlyXGly pattern in the N-terminal part of the molecules, these compositions were identified by means of site directed mutagenesis and the relationship between blue fluorescence production and SDR was studied.

Key words: *Vibrio vulnificus*, blue fluorescence protein, site-directed mutagenesis.