

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

異源表達果糖轉移基因研究

計畫類別：☒個別型計畫 ☐整合型計畫

計畫編號：CNBT93-04

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫主持人：張竣凱

共同主持人：江建民

計畫參與人員：謝宜祐、莊書婷

執行單位：生物科技系

中華民國九十四年二月二十五日

摘要

本計畫的目的是建立起異源表達的系統，以果糖轉移酵素基因為目標。我們選擇了大腸菌及 pET 系統，先將果糖轉移酵素的基因利用聚合酶鏈反應放大，再用限制酵素切割，最後利用連接酶構築於 pET 載體上，經轉殖入大腸菌後，以限制酵素切割檢驗及選出正確長度及正確方向的成功載體，最後以 IPTG 引發基因表達。我們成功在大腸菌中表達出果糖轉移酵素基因。

前言

果寡糖是由蔗糖再加上若干個果糖單元所構成，在對於人類的功能上，它算是一種人類無法消化的食物纖維，具有益生菌促生劑的性質，可以改善人腸內的菌相，增強人類保健的功能，可降血脂、降膽固醇、增加礦物質吸收、增強免疫反應等(Ritsema, and Smeekens, 2003)，目前已有很多公司生產開發成為健康食品。一般果寡糖的生產，可以從聚果糖經由水解酵素分解得到；也可以利用蔗糖經由具果糖轉移酵素菌株轉移果糖反應得到，例如 *Aspergillus* 麴菌屬(Hidaka, et al. 1988)。過去發現多數的果糖轉移酵素都是具有若干糖基的修飾(Yanai et al. 2001)，但是糖基扮演的功能不明，而且這個酵素的三維立體結構也尚未被解出，整個蔗糖分解同時轉移果糖的作用機制也未被闡明。若要對此進行深入的研究，有必要先建立異源表現基因的方式，方可更進一步深入探討。

我們這個計劃的目的，是從具生產果寡糖的麴菌 *Aspergillus japonicus* 中，選殖出果糖轉移酵素的基因，並利用大腸菌來表達，建立起異源表達系統。我們成功從麴菌中放大出基因，正確構築於 pET 載體上，也在大腸菌 Tuner(DE3)中表現這個基因，建立了大腸菌異源表達系統。

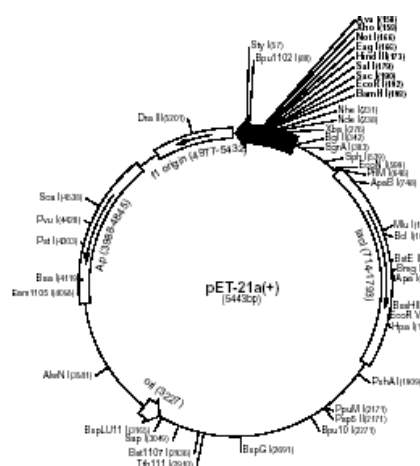
實驗材料與方法

我們已有具果糖轉移酵素的菌株，為 *Aspergillus japonicus*，以 PDB+20%蔗糖為培養基，於 28°C 培養三天。接著依 Current protocol of Molecular Biology 一書上的方法，自三天培養的 *Aspergillus japonicus* 菌株的菌絲體抽出染色體 DNA(Ausubel et al. 2001)。因為前人對果糖轉移菌株及酵素基因研究，已有 *Aspergillus niger* ATCC20611 菌株的基因被選殖，且報導並無內插序列(intron)(Yanai et al., 2001)(基因 fopA, Gene Bank AB046383)，我們假定 *Aspergillus*

japonicus 的果糖轉移基因序列與其並無很大的差異，因此直接利用 *fopA* 來設計引子對如下：forward 片段 5'-CAGAATTCAATGAAGCTCACCAC TAC-3'，reverse 片段 5'-CAGCCTTCTTTCTCTCCGGCCAGGCG-3'，前後都使用 *Eco* RI 限制酶切點，以利可以直接接入載體。聚合酶鏈反應放大出果糖轉移酵素基因於 Hibaid 的 PCR 機器上進行，條件為 95°C 4 分鐘，接下來重覆以下步驟 30 次：95°C 4 分鐘、52°C 1.5 分鐘、72°C 2 分鐘，最後再 72°C 15 分鐘。於 agarose 膠片上可以得到兩條帶放大出來的基因片段，分別約為 1.5kb 及 2.0kb。我們選用的是 2.0kb 的基因片段，質體的抽取及從膠體中抽取基因片段以 Viogene 公司的產品萃取，方法參照廠商的使用手冊。限制酵素 *Eco* RI、*Bam* HI、*Sac* I 及 T4 DNA Ligase 使用 Promega 公司的產品，使用條件參照廠商的使用說明。選用的載體是 pET21b，大腸菌使用 Tuner(DE3)，皆為 Invitrogen 公司的產品，勝任細胞的製備及載體轉殖參考 Molecular Cloning 一書(Sambrook and Russell, 2001)。SDS-PAGE 的參考 Laemmli 的方法(Laemmli, 1970)，使用 12.5%C 的膠片。大腸菌培養以 LB 培養基於 37°C 下培養至適當時間。基因表達以 IPTG 為引發物，當轉殖成功的大腸菌 Tuner(DE3)於 LB 中培養到 OD_{600nm} 的讀值約為 1 時，加入 0.2mM 的 IPTG，然後開始取樣，每隔 30 分鐘取樣。

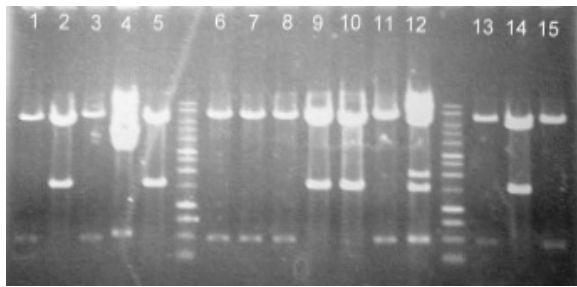
結果與討論

依假設及設計的引子對，利用聚合酶鏈反應可以放大出二個基因片段帶，分別在 1.5kb 及 2.0kb 左右，因 *Aspergillus niger* ATCC20611 的果糖轉移酵素基因為 1965bp，我們選擇大約是 2.0kb 的片段進行選殖，經部份基因定序，已定出的部份與 *fopA* 有 97%以上的相似度(已定出 1249bp)。我們也發現其與 *fopA* 相同的地方是，於基因中有一個 *Sac* I 的限制酶剪切點，約位於 1.5kb 的位置，這正好可以利用來檢驗構築好的載體之基因框架之方向是否正確，



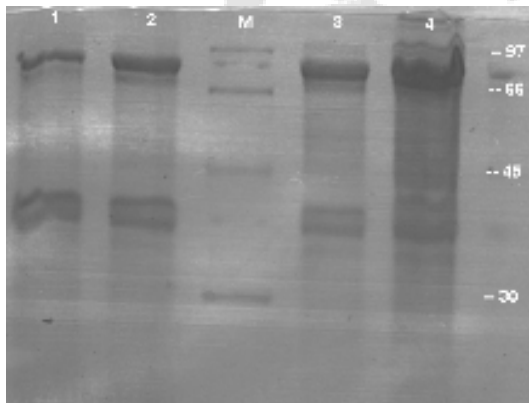
圖一、pET21 圖。

如果插入 *Aspergillus japonicus* 的果糖轉移酵素基因，大小約為 2.0kb，則構築好的載體大小約 7.5kb，若是以 *Eco* RI 切，可於電泳觀察到應有 2.0kb+5.5kb 兩條帶。而因酵素基因上約在 1.5kb 位置有一個 *Sac* I 切點，如果以 *Bam* HI 及 *Sca* I 雙限制酶剪切，則應會觀察到 7.0kb + 0.5kb 者才是方向正確的。



圖二、lane1~15 分別是轉殖成功的載體經萃取後以 *Sac* I 及 *Bam* HI 雙限制酶剪切的 agarose 電泳圖，DNA 大小標記由上而下分別是 10kb, 8kb, 6kb, 5kb, 4kb, 3kb, 2.5kb, 2kb, 1.5kb, 1kb, 0.75kb, 0.5kb, 0.25kb。依圖一解釋，剪切後應有 0.5kb + 7.0kb 兩條帶。

圖二中有十五個轉殖成功的樣本，其中 lane 1, 3, 6~8, 11, 13 及 15 是屬於載體構築正確者，酵素基因的表達以這些菌來進行。經轉殖成功且攜帶正確的載體的大腸菌 Tuner(DE3)/ft1，於 LB 培養基中培養，至 OD_{600nm} 之讀值約為 1 時加入 0.2mM 之 IPTG 來引發表達，表達結果如圖三所示。於預期之位置 72kDa 處，可以觀察到蛋白質的引發表達隨時間之增加而明顯增加。於是我們成功建立果糖轉移酵素基因之異源表達。



圖三、某一轉殖成功的大腸菌 Tuner(DE3)/ft1 經 IPTC 引發後的蛋白質表達狀況，lane 1~4 分別為加入 IPTG 後 0.5hr, 1.0hr, 1.5hr, 2.0hr，中央為蛋白質分子量標記，由上而下為 97kDa, 66kDa, 45kDa, 30kDa，分別標示於圖右。預期之表達蛋白的位置 72kDa 處，有明顯的蛋白質隨時間而增加表達的情形。

我們獲得成功的表達蛋白之後，我們可以進行這個酵素的活性分析，這是目前正深入研究的。在這個研究中，二位專題學生獲得了處理基礎基因轉殖的實際操作經驗。

參考資料

1. Ritsema, T. and Smeekens, S. (2003) "Fructans, beneficial for plants and humans" *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 223-230.
2. Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, N. (1988) "A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC20611" *Agric. Biol. Chem.* 52, 1181-1187.
3. Yanai, K., Nakane, A., Kawate, A., and Hirayama, M. (2001) "Molecular Cloning and Characterization of the fructooligosaccharide-producing b-fructofuranosidase

gene from *Aspergillus niger* ATCC 20611” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 766-773.

4. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.D. Smith, J.A., and Struhl, K. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc.
5. Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning, A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
6. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

