

耐酸性納豆菌之納豆激? 稽]選殖、表現與酵素活性分析

黃梁灝、簡宏堅

E-mail: 9511352@mail.dyu.edu.tw

摘要

由陳明造老師及王正仁老師來的DYU1001及DYU1002經由16 S rDNA鑑定為*Bacillus subtilis* 枯草桿菌。歸納納豆激?的資料後，發現納豆激?可分為三段，pre 區段，pro 區段，以及mature 區段，而mature是納豆激?主要的功能區，但其耐酸的能力不好，pre-pro是以犧牲打的方式代替mature被胃酸水解，所以依pre-pro-mature nattokinase的胺基酸序列來設計引子，以*B. subtilis* DYU1002的染色體做為模版，利用PCR，合成長度為1146 bp的DNA片段，將其與*B. subtilis*的pre-pro-mature nattokinase胺基酸序列比對之相同度為100%。由於目前市面上的納豆激?幾乎都是以膠囊或散劑的形式來販賣，其對溶解血栓來預防動脈硬化疾病的功能不是很好，可能納豆激?經過胃酸水解後，其活性就被破壞。而DYU1002這株納豆菌，據王正仁老師說其可在酸性的環境下生長(pH 3.0)，所以篩選出DYU1002含有pre-pro-mature nattokinase基因的純株 (clone)，將此段基因選殖入*Escherichia coli*菌體內可表現納豆激?的活性。此ORF全長為1146 bp可轉譯出含382個胺基酸殘基的蛋白質，分子量為42 kDa，是為一種血栓溶解的酵素，其可自體分解為3.2 kDa 的pre-peptide、8.5 kDa 的pro-peptide 及28 kDa的mature nattokinase，回收此酵素，測酵素溶解血栓的活性，發現此酵素最適溶解血栓的pH值為pH 8.0，其在菌體內的酵素溶解血栓的活性為 0.96×10^3 FU/mg。另有以0-30%硫酸銨濃縮後，跑SDS-PAGE，在SDS-PAGE上發現僅有一明顯的蛋白質產物，其位置大約在42 kDa，可能就是選殖的基因所表現出來的蛋白pre-pro-mature nattokinase，所以pre-pro-mature nattokinase在*E. coli*中可能被分泌到培養液中，推測為一種胞外酵素蛋白，而此分泌到培養液的酵素溶解血栓的活性為 5.66×10^5 FU/mg。此酵素溶解血栓活性的 pH 值耐受性為 pH3.0~pH 10.0。

關鍵詞：枯草桿菌；基因選殖；納豆激?；酵素活性分析

目錄

目錄封面內頁 簽名頁 授權書 iii 中文摘要 iv 英文摘要 vi 誌謝 viii 目錄 ix 圖目錄 xiv 表目錄 xvi 附錄目錄 xvii
第一章 前言 1
第二章 材料與方法 5
第一節 菌株及質體 5
第二節 藥品 5
第三節 培養基 5
第四節 DYU1001及DYU1002 染色體DNA的分離 6
第五節 <i>E. coli</i> 質體 (plasmid) DNA的抽取 7
第六節 引子 (primer) 的設計 8
第七節 聚合?鏈鎖反應 (polymerase Chain reaction; PCR) 9
第八節 瓊脂凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 10
第九節 DNA 片段的回收及純化 11
第十節 限制酵素剪切 (enzyme digestion) 12
第十一節 DNA 的黏接反應(ligation) 13
第十二節 大腸桿菌電勝任細胞之製備 13
第十三節 轉型作用 (transformation) 14
第十四節 萃取質體DNA 15
第十五節 DNA定序與序列比對 16
第十六節 納豆激?基因的表現 16
(1) 納豆激?基因的少量表現 16
(2) 納豆激?基因的大量表現與蛋白回收 17
(3) 納豆激?蛋白的電泳分析 18
第十七節 納豆激?酵素的溶解血栓特性 19
(1) 納豆激?酵素溶解血栓最適pH值的測定 21
(2) 納豆激?酵素溶解血栓pH值耐受性的測定 21
第十八節 納豆激?的濃縮純化 22
第三章 結果 26
第一節 設計pre-pro-mature nattokinase、pro-mature nattokinase mature nattokinase的引子 26
第二節 抽取 <i>B. subtilis</i> DYU1001及 <i>B. subtilis</i> DYU1002的染色體 26
第三節 利用polymerase chain reaction(PCR) 鑑定 <i>Bacillus sp.</i> DYU1001及 <i>Bacillus sp.</i> DYU1002的16S rDNA基因 27
第四節 <i>Bacillus sp.</i> DYU1001與 <i>Bacillus sp.</i> DYU1002 16S rDNA在 <i>E. coli</i> 之表現 27
第五節 利用polymerase chain reaction(PCR) 選殖pre-pro-mature nattokinase的基因 29
第六節 pre-pro-mature nattokinase基因的表現 29
(1) pre-pro-mature nattokinase基因在 <i>E. coli</i> 的表現 29
(2) 純化回收pre-pro-mature nattokinase的酵素 30
第七節 pre-pro-mature nattokinase基因定序及序列比對 30
第八節 納豆激?酵素的溶解血栓特性 31
(1) 納豆激?酵素溶解血栓最適pH值的測定 31
(2) 納豆激?酵素溶解血栓pH值耐受性的測定 31
(3) 納豆激?酵素在 <i>E. coli</i> 中的分泌性 32
第四章 結論 34
第一節 <i>Bacillus subtilis</i> DYU1001與 <i>Bacillus subtilis</i> DYU1002的16 S rDNA 序列 34
第二節 pre-pro-mature nattokinase的胺基酸序列 34
第三節 pre-pro-mature nattokinase基因的大量表現 35
第四節 pH值對納豆激?酵素溶解血栓活性的影響 35
第五節 納豆激?酵素在 <i>E. coli</i> 中的分泌性 36
第六節 納豆激?酵素溶解血栓pH值的耐受性 37
第七節 在胞內及胞外的納豆激?酵素 37
第八節 納豆激?的比較 38
圖表 39
參考文獻 62
附錄 65
圖目錄 圖1. 納豆激?在體內作用的示意圖 39
圖2. 納豆激?的3D立體結構圖 (SUB1) 40
圖3. 納豆激?的3D立體結構圖 (SUB2) 41
圖4. 設計pre-pro-mature nattokinase引子 42
圖5. 構築質體 43
圖6. <i>Bacillus subtilis</i> DYU1001與 <i>Bacillus subtilis</i> DYU1002染色體電泳圖 44
圖7. <i>Bacillus subtilis</i> DYU1001 16 S rDNA PCR電泳圖 45
圖8. <i>Bacillus subtilis</i> DYU1002 16 S rDNA PCR電泳圖 46
圖9. 限制酵素檢測 <i>Bacillus subtilis</i> DYU1001 16 S rDNA 47
圖10. 限制酵素檢測 <i>Bacillus subtilis</i> DYU1002 16 S rDNA 48
圖11. pre-pro-mature nattokinase PCR電泳圖 49
圖12. pre-pro-mature nattokinase抽質體電泳圖 50
圖13. 限制酵素檢測pre-pro-mature nattokinase 51
圖14. pre-pro-mature nattokinase的SDS-PAGE 52
圖15. pre-pro-mature nattokinase基因序列比對 53
圖16. pH值對 <i>B. subtilis</i> DYU1002 pre-pro-mature nattokinase溶解血栓活性的影響 54
圖17. pQE-ppm硫酸銨濃縮後溶解

血栓的活性 55 圖18.pQE-ppm硫酸銨濃縮後的SDS-PAGE 56 圖19.未濃縮pQE-ppm菌液溶解血栓的活性 57 圖20.納豆激酶?酵素的pH值耐受性 58 圖21.Bacillus subtilis DYU1001 16 S rDNA基因 序列比對 59 圖22.Bacillus subtilis DYU1002 16 S rDNA基因 序列比對 60 表目錄 表1. 比較來自不同菌株的血栓溶解酵素 61 附錄目錄 附錄1. 本實驗所使用的菌株與質體 65 附錄2. 本實驗所使用的藥劑配方 66

參考文獻

參考文獻 1. Chang CT, Fan MH, Kuo FC, Sung HY. (2000) Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of agricultural and food chemistry* 48(8):3210-3216. 2. Fujita M, Nomura K, Hong K, Ito Y, Asada A, Nishimuro S. (1993) Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochemical and biophysical research communications* 197 (3):1340-1347. 3. Fujita M, Ito Y, Hong K, Nishimuro S, (1995a) Characterization of Nattokinase-degraded products from human fibrinogen or cross-linked fibrin. *Fibrinolysis* 9, 157 – 164. 4. Fujita M, Hong K, Ito Y, Misawa S, Takeuchi N, Kariya K, Nishimuro S. (1995) Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. *Biol Pharm Bull.*18(9):1194-6. 5. Kaneki M, Hedges SJ, Hosoi T, Fujiwara S, Lyons A, Crean SJ, Ishida N, Nakagawa M, Takechi M, Sano Y, Mizuno Y, Hoshino S, Miyao M, Inoue S, Horiki K, Shiraki M, Ouchi Y, Orimo H. (2001) Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K2: possible implications for Hip-Fracture risk. *Nutrition*(4):315-21. 6. Kim W, Choi K, Kim Y, Park H, Choi J, Lee Y. (1996) Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol* 62:2482 – 2488. 7. Kim SH, Choi NS. (2000) Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 64:1722 – 1725. 8. Klein A, He X, Roche M, Mallett A, Duska L, Supko JG, Seiden MV. (2005) Prolonged stabilization of platinum-resistant ovarian cancer in a single patient consuming a fermented soy therapy. *Gynecol Oncol.*100(1):205-9. 9. Ko JH, Yan JP, Zhu L, Qi YP. (2003) Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* QK02. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 137(1):65-74. 10. Martin BL. (1997) Selective activation of calcineurin by dipicolinic acid. *Arch Biochem Biophys* 345(2):332-8. 11. Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, and Sugino Y (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucl. Acids Res.* 18:6169. 12. Peng Y, Huang Q, Zhang RH, Zhang YZ. (2003) Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*134(1):45-52. 13. Peng Y, Yang XJ, Xiao L, Zhang YZ. (2004) Cloning and expression of a fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) gene from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 in *Bacillus subtilis*. *Research in Microbiology* 155:167 – 173. 14. Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 15. Sumi H, Nakajima N, Yatagai C. (1995) A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack "Shiokara," a Japanese traditional fermented food. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*112(3):543-7. 16. Suzuki Y, Kondo K, Ichise H, Tsukamoto Y, Urano T, Umemura K. (2003) Dietary supplementation by fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening after endothelial injury in rat femoral artery. *Nutrition* 19:261 – 264. 17. Urano T, Ihara H, Umemura K, Suzuki Y, Oike M, Akita S, Tsukamoto Y, Suzuki I, Takada A. (2001) The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type 1. *Journal of Biological Chemistry* 276: 24690 – 24696. 18. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. (1991) 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* 173 (2):697-703. 19. Zheng ZL, Zuo ZY, Liu ZG, Tsai KC, Liu AF, Zou GL. (2005) Construction of a 3 D model of nattokinase, a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus natto*: A novel nucleophilic catalytic mechanism for nattokinase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 23: 373 – 380.