

自營性黃桿菌的環狀左旋胺基酸脫羧基酵素的基因選殖與酵素分析

鍾宇謙 撰、簡宏堅

E-mail: 9805368@mail.dyu.edu.tw

摘要

芳香族左旋胺基酸去羧化酶 (aromatic L-amino acid decarboxylase; AADC) 可以將左多巴 (L-DOPA) 催化並且轉化形成多巴胺 (dopamine)，在臨床上，治療帕金森氏症 (Parkinson's disease; PD) 都是使用化學合成的L-DOPA和dopamine，但是往往會有一些副作用。所以天然的來源變成更有意義且有必要性去尋找的目標。在我們的研究中，我們是以黃桿菌 (*Xanthobacter autotrophicus* Py2) 染色體中複製出片段大小為1,425 bp的AADC基因，並與pQE30表現載體連接，緊接著轉型到大腸桿菌*E. coli* Nova blue中能誘導表現含有AADC的蛋白質。其分子量為51 kDa，因為pQE30表現載體上含有6個Histidine (His-taq)，所以能夠輕易的被純化下來，再利用TNB (2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid) 試劑的方法來分析其酵素活性。首先我們將含有AADC的酵素和2.5 mM L-DOPA的緩衝溶液一起在42 °C下15分鐘反應，再將TNB加入反應15分鐘，再加入Toluene震盪及離心小試管，分離出上層的TNP-dopamine以及下層TNP-DOPA，利用分光光度計儀可以檢測出TNP-dopamine的濃度。遵循著這些方法，我們將40隻已選殖的隨機突變菌株進行分析，其中較低活性的三隻拿去做定序並比對，發現都有Q219H這位置的定點突變，在第一次篩選中，我們沒有找到高活性的突變株，所以我們改變培養液為小牛腦心臟萃取物 (BHI)，因為BHI比較營養，所以用它來篩選高活性的AADC，在第二次我們篩選出40隻已轉殖的隨機突變菌株，我們找到L400R和L325Q兩隻活性較低的突變菌株，另外也找到R406H為較高活性，值得一提的，我們發現L400R有生長遲緩的現象。利用TNB試劑與dopamine進行衍生化反應，具有很高的斜率值達0.999，製作出一個AADC酵素的活性判斷的標準曲線；另外利用BSA與Bio-Rad assay指示劑反應，製作出一個蛋白質定量用的標準曲線；野生型的AADC酵素在pH值8.0硼酸緩衝液 (65 mM) 以及42 °C下，與2.5 mM L-DOPA催化反應15分鐘，具有最適的反應，比活性分析結果為 $K_m = 209.64$ (μM)、 $V_{max} = 37.17$ ($\mu M / min$)、 $K_{cat} = 3.8 \times 10^{-3}$ 和 $K_{cat} / K_m = 1.8 \times 10^{-5}$ ，一定量的Q219H和L325Q AADC突變菌株與野生型AADC相較之下， K_{cat} / K_m 活性降低2.4倍 (Q219H) 以及18倍 (L325Q)，我們也同時加入AADC的輔因子維生素B6衍生物 (Pyridoxal-5'-phosphate; PLP)，此PLP可以活化AADC酵素使受質結合更緊密，甚至可以比原本純化野生種的AADC酵素增加近兩倍，另外R406H有較低 K_m 值，這些活性高或低的數據結果充分指出化學性質與殘基的外型在催化上基質親和力是具有很大意義的，我們已經知道豬的AADC活性中心 (Active site) 位置是H192Q、T246A以及K303A，所以我們以豬的AADC活性位置當參考值，意外發現有相同的胺基酸，分別地由我們序列中找到H180、T238以及K295，我們嘗試利用定點突變T238A，並分析活性，但我們發現黃桿菌AADC突變株T238A沒有被觀察到任何活性存在，除此之外，我們嘗試再一次回收L400R的蛋白質，且LB培養基使用超過一倍量，我們回收L400R的蛋白質，而且依然沒有檢測到任何活性存在，我們觀察到豬腎臟AADC活性中心與黃桿菌相似，依據豬腎臟AADC活性中心模型結構，我們找到L400R相對應位置在桶狀活性位置的底部，非常接近T238和K295活性中心，在這研究上，我們找到L400R和T238A是黃桿菌AADC的重要活性中心，其它AADC突變點，Q219H、L325Q和R406H在桶狀活性位置開口的外緣，改變原本胺基酸，會影響受質結合能力，因此改變AADC的活性。

關鍵詞：芳香族左旋胺基酸去羧化酶、左多巴、多巴胺、帕金森氏症、黃桿菌、比活性、活性位置、活性中心

目錄

封面內頁 簽名頁 授權書 iii 中文摘要 iv 英文摘要 vii 誌謝 ix 目錄 x 圖目錄 xv 表目錄 xvii

參考文獻

- 前言 1 1.1 芳香族左旋胺基酸去羧化酶 (Aromatic L-amino acid decarboxylase; AADC) 酵素的機能 1 1.2 左多巴 (L-3,4-dihydroxyphenylalanine; L-DOPA) 的機能 1 1.3 多巴胺 (Dopamine) 的功用 2 1.4 帕金森氏症 (Parkinson's disease; PD) 的關聯性 2 1.5 AADC功能缺失症 (AADC deficiency) 3 1.6 利用酵素的方式生產天然產物的優點及缺點 3 2. 研究動機 5 3. 材料與方法 6 3.1 材料 6 3.1.1 菌種及質體 6 3.1.2 藥品 7 3.1.3 酵素 7 3.1.4 培養液 7 3.1.4.1 LB 培養基 (Luria-bertani broth) 7 3.1.4.2 BHI培養基 (Brain heart infusion) 9 3.1.5 其他緩衝液及試劑 10 3.1.6 引子 (Primer) 設計 13 3.2 實驗方法 15 3.2.1 萃取*Xanthobacter autotrophicus* Py2 染色體DNA的抽取 15 3.2.2 聚合鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction; PCR) 16 3.2.2.1 聚合鏈鎖反應 (PCR) 16 3.2.2.2 隨機突變聚合鏈鎖反應 (Random mutation polymerase chain reaction) 18 3.2.2.3 重疊式定點突變 (Overlapping PCR) 19 3.2.3 DNA洋菜膠體 (Agarose gel) 20 3.2.4 DNA片段的回收及純化 21 3.2.5 限制酵素剪切 (Restriction enzyme digestion) 23 3.2.6 DNA黏接作用 (Ligation) 23 3.2.7 大腸桿菌 (*E. coli*) 勝任細胞 (Competent cell) 的製備 23 3.2.8 *E. coli*的轉形作用 (Transformation) 24 3.2.9 *E. coli*質體 (Plasmid) DNA的抽取 (傳統法) 25 3.2.10 快速質

體抽取套組 26 3.2.11 隨機突變芳香族胺基酸去羧化?之小量菌體 活性篩選 27 3.2.12 DNA 定序 27 3.2.13 芳香族胺基酸去羧化?蛋白質過量表現及蛋白回收 28 3.2.14 聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 分析 29 3.2.15 AADC酵素活性分析測定 30 3.2.15.1 AADC酵素最佳活性分析波長的測定 30 3.2.15.2 AADC最適受質濃度的測定 30 3.2.15.3 AADC最適反應時間的測定 31 3.2.15.4 AADC酵素最適pH值的測定 31 3.2.15.5 AADC酵素最適溫度的測定 32 3.2.15.6 AADC對基質的選擇性 32 3.2.15.7 AADC產物抑制作用測定 33 3.2.15.8 AADC與輔因子PLP的影響測定 33 3.2.15.9 標準曲線的製作 34 4. 結果 36 4.1 萃取Xanthobacter autotrophicus Py2染色體DNA 與基因分析 36 4.2 芳香族左旋胺基酸去羧化?的蛋白質表現與分析 36 4.3 野生型 (Wild type; WT) 芳香族胺基酸去羧化 ?活性分析 37 4.3.1 芳香族胺基酸去羧化?酵素最佳活性分析波長 37 4.3.2 芳香族胺基酸去羧化?酵素最適pH值 37 4.3.3 芳香族胺基酸去羧化?酵素最適溫度 38 4.3.4 芳香族胺基酸去羧化?酵素最佳反應時間 38 4.3.5 AADC對基質的選擇性 38 4.3.6 AADC最適受質濃度及抑制作用測定 39 4.3.7 AADC產物抑制作用測定 39 4.4 隨機定點突變芳香族胺基酸去羧化?的活性分析 39 4.4.1 Error-prone PCR (Random mutation) 隨機定點突變 40 4.4.2 突變芳香族胺基酸去羧化?菌株的蛋白質大量表現及回收 40 4.4.3 Wild type以及突變芳香族胺基酸去羧化?的活性分析 41 4.5 活性中心定點突變 (Overlapping PCR) 42 5. 結論 45 5.1 來自自營性黃桿菌AADC的酵素活性特性 45 5.2 AADC對不同受質的選擇性 45 5.3 AADC酵素加入輔因子 (Cofactor) 後的影響 46 5.4 隨機突變菌株對AADC酵素的影響 47 5.5 定點突變T238A對AADC酵素的影響 48 5.6 從Xanthobacter autotrophicus Py2分子選殖出的 AADC基因之應用 48 5.7 模擬黃桿菌AADC活性中心結構之探討的關係 49 參考文獻 73 附錄 76 1.Bertoldi M., Cellini B., Montioli R., Borri-Voltattorni C. 2008. Insights into the mechanism of oxidative deamination catalyzed by DOPA decarboxylase. *Biochemistry* 47 (27): 7187-7195. 2.Bio-Rad Laboratories (1994) Bio-Rad Protein Assay, Bulletin No. 600-0005, Bio- Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany. 3.Burkhard P., Dominici P., Borri-Voltattorni, C., Jansonius, J. N. and Malashkevich, V. N. 2001. Structural insight into Parkinson ' s disease treatment from drug- inhibited DOPA decarboxylase. *Nature structural biology* 8: 963-967. 4.Charteris A. and John R. 1975. An investigation of the assay of dopamine using trinitrobenzenesulphonic acid. *Analytical Biochemistry* 66 (2): 365-371. 5.Cirino P.C., Mayer K.M. and Umeno D. 2003. Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods in Molecular Biology* 231: 3-9. 6.Denora N., Laquintana V., Lopodota A., Serra M., Dazzi L., Biggio G., Pal D., Mitra A. K., Latrofa A., Trapani G. and Liso G. 2007. Novel L-Dopa and Dopamine Prodrugs Containing a 2-Phenyl- imidazo- pyridine Moiety. *Pharmaceutical Research* 24 (7): 1309-1324. 7.Gill I., Lopez-Fandino R., Jorba X., and Vulfson E. N. 1996. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology* 18 (3): 163-183. 8.Ho B., Prakash R., Morgan J. C and Sethi K. D. 2007. A case of levodopa- responsive camptocormia associated with advanced Parkinson ' s disease. *Nature Clinical Practice Neurology* 3 (9): 526-530. 9.Hoebel B. G., Avena N. M. and Rada P. 2007. Accumbens dopamine acetylcho- line balance in approach and avoidance. *Current Opinion in Pharmacology* 7: 617-627. 10.Ishii S., Mizuguchi H., Nishino J., Hayashi H., Kagamiyama H. 1996. Functionally important residues of aromatic L-amino acid decarboxylase probed by sequence alignment and site-directed mutagenesis. *Journal Biochemistry* 120: 369-376. 11.Jain C. K. and Vishwanathan N. 2007. Parkinson ' s disease: A perilous magic of nature. *Scientific Research and Essay* 2 (7): 251-255. 12.Kanoksilapatham W., Gonzalez J.M. and Robb F.T. 2007. Directed-mutagenesis and deletion generated through an improved overlapping-extension PCR based procedure. *Silpakorn University Science and Technology Journal* 1 (2): 7-12. 13.Kempster P. A., Bogetic Z., Secombe J. W., Martin H. D., Balazs N. D. H., Wahlqvist M. L. 1993. Motor effects of broad beans *Vicia faba* in Parkinson's disease: single dose studies. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 2: 85-89. 14.Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685. 15.Lee, H. F., Tsai, C. R., Chi, C. S., Chang, T. M., Lee, H. J. 2008. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency in Taiwan. *Europe Journal of Paediatric Neurology* 13: 135-140. 16.Nagai T., Hamada M., Kai N., Tanoue Y., Nagayama F. 1996. Distribution of aromatic l-amino acid decarboxylase in tissues of skipjack tuna using l-DOPA as the substrate *Journal of Fish Biology* 48: 1014-1017. 17.Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., and Sugino Y. 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research*, 18: 61-69. 18.Pritchard L., Corne D., Kella D., Rowland J., Winson M. 2005. A general model of error-prone PCR. *Journal of Theoretical Biology* 234: 497-509. 19.Quinn N., Critchley P., Marsden C. D. 1987. Young onset Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2 (2): 73-91. 20.Rahman M. K., Nagatsu T., Sakurai T., Hori S., Abe M., Matsuda M. 1982. Effect of pyridoxal phosphate deficiency on aromatic L-amino acid decarboxylase activity with L-DOPA and L-5-hydroxytryptophan as substrates in rats. *Japan Journal Pharmacol* 32: 803-811. 21.Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, and Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491. 22.Sambrook J. and Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, third edition. Cold spring harbor laboratory press, New York. 23.Sheralad A. F., Sparrow J. C. and Wrightt T. R. F. 1973. *Analytical. Biochemistry* 56: 300-305. 24.Swaving J., Leest W.V., Ooyen A. J. J. V, Jan A.M. Bont D. 1996. Electrotransfor- mation of Xanthobacter autotrophicus GJ10 and other Xanthobacter strains. *Journal of Microbiological Methods*, 25: 343-348. 25.Tehrani R., Montoya S. E., Van Lear A. D., Hastings T. G. and Perez R. G.. 2006. Alpha-synuclein (-syn) inhibits aromatic amino acid decarboxylase activity in dopaminergic cells. *Journal of Neurochemistry*. 99: 1188-1196. 26.Vered Y., Grosskopf I., Palevitch D., Harsat A., Charach G., Weintraub M. S., Graff E. 1997. The influence of *Vicia faba* (broad bean) seedlings on urinary sodium excretion. *Planta Medica* 63: 237-240.