

國立臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biochemistry and Molecular Biology

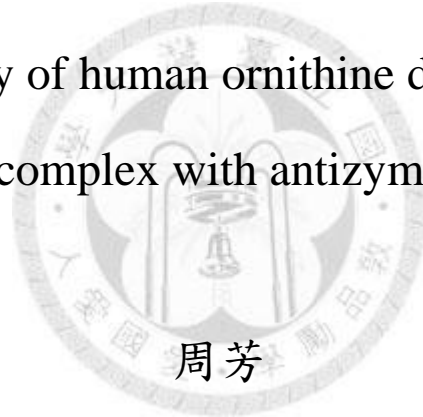
College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

人類鳥胺酸脫羧酶與抗酶複合體之結構研究

Structural study of human ornithine decarboxylase in
complex with antizyme



Fang Chou

指導教授：詹迺立 博士

Advisor : Dr. Nei-Li Chan

中華民國九十九年七月

July, 2010

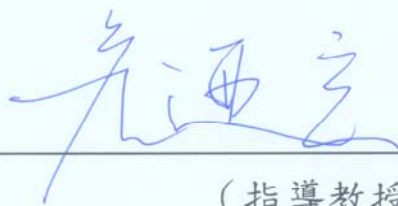
國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

人類鳥胺酸脫羧酶與抗酶複合體之結構
研究

Structural study of human ornithine decarboxylase in
complex with antizyme

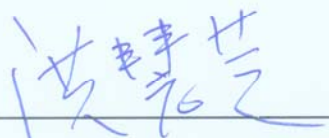
本論文係周芳君 (R97442017) 在國立臺灣大學醫學院生
物化學暨分子生物學研究所完成之碩士學位論文，於民國 99
年 7 月 5 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

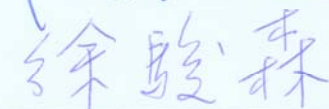
口試委員：



(簽名)

(指導教授)





中文摘要

多元胺 (polyamines) 為結構中帶有多個胺基的脂肪族小分子，包含腐胺 (putrescine)、亞精胺 (spermidine) 和精胺 (spermine)，此類帶正電的物質可和帶負電的 DNA、RNA 或蛋白質產生交互作用，參與細胞生長、分化與凋亡的過程。

人類鳥胺酸脫羧酶 (Ornithine decarboxylase, ODC ; EC 4.1.1.17) 為依賴 5'-磷酸吡哆醛 (pyridoxal 5'-phosphate, PLP) 輔酶之酵素，負責催化鳥胺酸 (ornithine) 之脫羧反應得到腐胺，此為胞內多元胺合成途徑之第一與速率決定的步驟，亦是多元胺合成的主要調控點。ODC 結構包含兩個 domains，N 端為 TIM-like α/β -barrel domain；C 端為 β -sheet domain。兩個 ODC 單體 (monomer) 以頭尾相連 (head-to-tail) 的方式組成雙聚體 (homodimer)，其活性中心之胺基酸 Lys-69 會以 Schiff base 方式和輔酶 PLP 結合，形成具有催化活性的酵素。

胞內多元胺的含量會直接影響多元胺的合成，當細胞內多元胺含量過高時，會使抗酶 (antizyme ; AZ) 的 mRNA 藉由轉譯調控合成具有功能的全長 AZ 蛋白。AZ 為 ODC 之負回饋調控因子，可和 ODC 單體結合形成異雙聚體 (heterodimer)。AZ 與 ODC 結合後不但會使 ODC 失去酵素活性，還會使 ODC C 端發生構型變化，露出可被 26S 蛋白酶體 (proteasome) 辨認的降解訊號，進行不依賴泛素的降解路徑 (ubiquitin-independent degradation pathway)，進而抑制多元胺的合成。除了上述的負調控機制外，細胞尚可藉由抗酶抑制因子 (Antizyme inhibitor, AZI) 正向調控多元胺的合成，AZI 與 ODC 具有序列與結構上的同源性，能與 AZ 形成更穩定的複合體而釋放出 ODC，使胞內 ODC 雙體的含量上升。

本篇論文的主要目的在於解析 ODC-AZ 蛋白複合體的晶體結構，以深入探討 ODC 與 AZ 交互作用的方式，進而解釋 AZ 如何促使 ODC 進行不依賴泛素的蛋白降解機制。我們已經成功置備 ODC 與多種 AZ 刪除突變形成之複合體，並順利得到複合體的晶體。目前最好的繞射數據其解析度約為 3.2 Å，初步分析顯示此晶體屬於 Primitive tetragonal 晶系，空間群為 $P4_12_12$ ，晶胞參數為 $a=b=266.64$ Å， $c=52.37$ Å， $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ 。未來希望能得到品質更高的晶體，以利後續結構的解析。

Abstract

Polyamines, such as putrescine, spermidine and spermine, are abundant multivalent organic cations. These compounds can interact with negatively charged molecules like DNA and RNA to participate in many cellular processes, including chromatin condensation, maintenance of DNA structure, RNA processing, translation and protein activation. Polyamines are essential for normal cell growth and apoptosis, they also play crucial roles during cell differentiation and the development of many cancers.

Ornithine decarboxylase (ODC) is involved in the first and rate-limiting step of the polyamine biosynthesis pathway, catalyzing the decarboxylation of ornithine to produce putrescine, which is subsequently converted into spermidine and then to spermine. Human ODC is a 53 kDa pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme consists of 461 amino acids. The ODC monomer consists of two domains: an N-terminal TIM-like α/β -barrel domain and a C-terminal β -sheet domain. The active form of ODC exists as a head-to-tail homodimer, and the active site Lys69 binds the PLP cofactor via a Schiff-base linkage. The cellular ODC level is tightly regulated by polyamine concentration via an antizyme (AZ) dependent protein degradation pathway. Accumulation of polyamines promotes translational frameshifting of AZ mRNA, allowing expression of the full-length 25 kDa AZ protein. AZ binds to and inactivates ODC by forming a tight non-covalent 1:1 complex. The ODC-AZ heterodimer formation

induces conformation changes in the ODC C-terminal region (residues 425-461), which triggers its association and degradation by the 26S proteasome in an ubiquitin-independent fashion. Residues 117-140 of ODC are critical for its association with AZ.

In addition to the AZ-mediated negative regulation, the intracellular polyamine homeostasis is also regulated by antizyme inhibitor (AZI), an enzymatically inactive ODC homolog. Because AZI binds to AZ with high affinity, ODC can be released from ODC-AZ complex in the presence of AZI, leading to the restoration of ODC activity.

This study is aimed to understand how AZ recognizes ODC and how AZ binding promotes proteasomal degradation of ODC by determining the crystal structure of ODC-AZ complex. Using vapor-diffusion crystallization technique, we have successfully obtained crystals of many different forms of AZ truncation mutants in complex with both the full-length and a mutant ODC (ODC_{Δ299-310}). A diffraction data set has been collected to 3.2 Å resolution. Preliminary diffraction analysis indicated that ODC-AZ complex belongs to space group $P4_12_12$, with unit-cell parameters $a=b=266.64$ Å, $c=52.37$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$. We will continue to optimize the crystallization as well as the cryo-protection conditions to facilitate structural determination.

目錄

口試委員會審定書.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
目錄.....	v
圖目錄.....	ix
表目錄.....	xii
縮寫表.....	xiii
一、前言.....	1
1-1 多元胺在生理上的重要性.....	1
1-2 多元胺代謝路徑.....	2
1-3 鳥胺酸脫羧酶 (ornithine decarboxylase, ODC).....	2
1-3-1 人類鳥胺酸脫羧酶的結構.....	2
1-3-2 鳥胺酸脫羧酶之催化機制.....	3
1-3-3 鳥胺酸脫羧酶與疾病.....	4
1-3-4 鳥胺酸脫羧酶之降解機制.....	5
1-4 抗酶抑制因子 (Antizyme inhibitor, AZI).....	7
1-5 抗酶 (Antizyme, AZ).....	8
1-5-1 抗酶之功能.....	8
1-5-2 抗酶之結構.....	8
1-6 鳥胺酸脫羧酶與抗酶結合區域之預測.....	9
1-7 研究目的.....	10
二、材料與方法.....	11
2-1 蛋白質表現質體之構築.....	11
2-1-1 pET28a-ODC、pET28a-ODC _{Δ299-310} 、pET21b-AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 、pET21b-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ 與 pQE30-AZ ₉₅₋₂₂₈	11

2-1-2 pET15b-AZ ₁₁₉₋₂₂₈	11
2-1-3 pET21d-N-His -AZ ₁₁₉₋₂₂₈	14
2-2 蛋白表現量的測試	15
2-2-1 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體之共表達	15
2-2-2 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)與 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體之共表達	17
2-2-3 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)與 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體之共表達	17
2-2-4 ODC _{Δ299-310} -AZ ₉₅₋₂₂₈ 與 ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體之共表達	18
2-3 蛋白純化	18
2-3-1 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體的純化	18
2-3-2 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)與 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體的純化	22
2-3-3 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)與 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體的純化	23
2-3-4 ODC _{Δ299-310} -AZ ₉₅₋₂₂₈ 與 ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的純化	23
2-4 蛋白質濃縮與定量	24
2-5 蛋白質均質性測定	24
2-6 蛋白晶體培養	25
2-6-1 PCT (Pre-Crystallization Test)	25
2-6-2 晶體生長條件測試	25
2-6-3 微調養晶條件	26
2-6-4 添加物試驗	26
2-6-5 Seeding	27
2-7 蛋白質晶體之 X-ray 繞射數據的分析與收集	27
2-7-1 蛋白質晶體冷凍保護 (cryo-protection)	27
2-7-2 單晶繞射實驗	28
三、結果	30
3-1 構築 pET15b-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ 與 pET21d-N-His -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ 質體	30
3-2 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體	30

3-2-1 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體的表現.....	30
3-2-2 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體的純化.....	30
3-2-3 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體的晶體培養與繞射數據分析.....	31
3-3 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體.....	32
3-3-1 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體的表現.....	32
3-3-2 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體的純化.....	32
3-3-3 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體的晶體培養.....	33
3-3-4 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體的數據收集.....	34
3-4 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體.....	34
3-4-1 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體的表現.....	34
3-4-2 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體的純化.....	35
3-4-3 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I) 蛋白複合體的晶體培養.....	35
3-4-4 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體的數據收集與初步結構解析.....	36
3-4-5 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體的晶體培養.....	37
3-5 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體.....	37
3-5-1 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體的表現.....	37
3-5-2 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體的純化.....	38
3-5-3 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體的晶體培養.....	38
3-6 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體.....	39
3-6-1 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體的表現.....	39
3-6-2 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II) 蛋白複合體的純化.....	39
3-6-3 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體的晶體培養與繞射數據分析.....	40
3-6-4 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體的晶體培養.....	40
3-7 ODC _{Δ299-310} -AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體.....	41
3-7-1 ODC _{Δ299-310} -AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的表現.....	41
3-7-2 ODC _{Δ299-310} -AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的純化.....	41

3-7-3 ODC _{Δ299-310} -AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的晶體培養	42
3-8 ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體.....	42
3-8-1 ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的表現	42
3-8-2 ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的純化	43
3-8-3 ODC _{Δ299-310} -AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的晶體培養	43
3-8-4 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的晶體培養	44
四、討論.....	45
4-1 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體	45
4-2 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體與 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體	45
4-3 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體與 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體.....	47
4-4 ODC _{Δ299-310} -AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體與 ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體.....	48
圖.....	49
表.....	117
參考文獻.....	124
附錄.....	131



圖目錄

圖 1-1	多元胺代謝路徑.....	49
圖 1-2	人類鳥胺酸脫羧酶單體結構.....	50
圖 1-3	人類鳥胺酸脫羧酶雙體結構.....	51
圖 1-4	ODC 雙聚體交互介面之胺基酸.....	52
圖 1-5	鳥胺酸脫羧酶的催化機制.....	53
圖 1-6	ODC 活性中心.....	54
圖 1-7	錐蟲 (<i>trypanosome brucei</i>) 之 ODC 與 DFMO 的交互作用.....	55
圖 1-8	AZ mRNA frameshift 的機制.....	56
圖 1-9	鳥胺酸脫羧酶的降解機制.....	57
圖 1-10	AZ 調控 ODC 的降解.....	58
圖 1-11	抗酶之 NMR 結構.....	59
圖 1-12	AZBE (antizyme-binding element).....	60
圖 1-13	單體 ODC 電荷分布圖.....	61
圖 1-14	ODC 與 AZ 之嵌合圖.....	62
圖 2-1	蛋白質溶液過飽和曲線.....	63
圖 2-2	蒸氣擴散法 (Vapor diffusion).....	64
圖 3-1	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 複合體小量蛋白質表現.....	65
圖 3-2	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 複合體經親和性管柱層析結果.....	66
圖 3-3	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 複合體經陰離子交換樹脂管柱層析結果.....	67
圖 3-4	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 複合體經分子篩管柱層析結果.....	68
圖 3-5	利用 DLS 測得 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 複合體之均質性與粒徑大小.....	69
圖 3-6	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體之晶體 (一).....	70
圖 3-7	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體之晶體 (二).....	71
圖 3-8	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白質晶體繞射圖譜.....	72

圖 3-9	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)與 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₀₋₂₂₈ (I)複合體小量蛋白表現.....	73
圖 3-10	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)複合體經親和性管柱層析結果.....	74
圖 3-11	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)複合體經分子篩管柱層析結果.....	75
圖 3-12	利用 DLS 測得 ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)複合體之均質性與粒徑大小.....	76
圖 3-13	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體之晶體 (一).....	77
圖 3-14	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體之晶體 (二).....	78
圖 3-15	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白質晶體繞射圖譜.....	79
圖 3-16	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)複合體經親和性管層析結果.....	80
圖 3-17	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)複合體經分子篩管柱層析結果.....	81
圖 3-18	利用 DLS 測得 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)複合體之均質性與粒徑大小.....	82
圖 3-19	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體之晶體 (一).....	83
圖 3-20	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體之晶體 (二).....	84
圖 3-21	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體之晶體 (三).....	85
圖 3-22	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體之晶體 (四).....	86
圖 3-23	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白複合體之晶體 (五).....	87
圖 3-24	利用 SDS-PAGE 分析 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I) 蛋白複合體之晶體.....	88
圖 3-25	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白質晶體繞射圖譜.....	89
圖 3-26	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白質電子密度分布圖.....	90
圖 3-27	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)與 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)複合體小量蛋白質表現.....	91
圖 3-28	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)複合體經親和性管柱層析結果.....	92
圖 3-29	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)複合體經分子篩管柱層析結果.....	93
圖 3-30	ODC _{Δ299-310} -AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體之晶體.....	94
圖 3-31	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)複合體經親和性管柱層析結果.....	95
圖 3-32	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)複合體經分子篩管柱層析結果	96
圖 3-33	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體之晶體 (一).....	97

圖 3-34	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體之晶體 (二).....	98
圖 3-35	ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白質晶體繞射圖譜.....	99
圖 3-36	含 Selenomethione 標定 ODC-AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白複合體之晶體.....	100
圖 3-37	ODC _{Δ299-310} -AZ ₉₅₋₂₂₈ 複合體與 ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 複合體小量蛋白質表現.....	101
圖 3-38	ODC _{Δ299-310} -AZ ₉₅₋₂₂₈ 複合體經親和性管柱層析結果.....	102
圖 3-39	ODC _{Δ299-310} -AZ ₉₅₋₂₂₈ 複合體經分子篩管柱層析結果.....	103
圖 3-40	利用 DLS 測得 ODC _{Δ299-310} -AZ ₉₅₋₂₂₈ 複合體之均質性與粒徑大小.....	104
圖 3-41	ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 複合體經親和性管柱層析結果.....	105
圖 3-42	ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 複合體經分子篩管柱層析結果.....	106
圖 3-43	利用 DLS 測得 ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 複合體之均質性與粒徑大小.....	107
圖 3-44	ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體之晶體 (一).....	108
圖 3-45	ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體之晶體 (二).....	109
圖 3-46	含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體之晶體.....	110
圖 3-47	ODC-AZ ₉₅₋₂₂₈ 蛋白質晶體繞射圖譜.....	111
圖 4-1	本論文中所使用的 ODC-AZ 複合體組合.....	112
圖 4-2	Molecular replacement 方式之 ODC-AZ 複合體結構與嵌合結構比較.....	113
圖 4-3	Shorten the purification tag.....	114
圖 4-4	真核生物 AZ 蛋白胺基酸序列比對.....	115
圖 4-5	老鼠 AZΔ86 蛋白之二級結構.....	116

表目錄

表 2-1	本實驗使用的菌種.....	117
表 2-2	本實驗使用的質體.....	118
表 2-3	藥品配置.....	119
表 2-4	M9 培養液成分.....	120
表 2-5	結晶試劑微調表.....	121



縮寫表

APS	ammonium persulfate
AZ	antizyme
AZI	antizyme inhibitor
β -ME	2-mercaptoethanol
BSA	bovine serum albumin
bp	base pair
DFMO	Difluoromethylornithine
DHFR	dihydrofolate reductase
DLS	dynamic light scattering
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleoside 5'-triphosphate
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
HCl	Hydrochloride
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactoside
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertaini broth
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
MPD	2-Methyl-2,4-pentanediol
mRNA	messenger ribonucleic acid
OD ₂₈₀	optical density at 280 nm
OD ₆₀₀	optical density at 600 nm
ODC	ornithine decarboxylase
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PDI	polydispersity index
PEG	polyethyleneglycol
PLP	pyridoxal 5'-phosphate
PMSF	phenylmethyl sulfonyl fluoride
rpm	revolution per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	N, N, N', N',-tetramethylenediamine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomane
UV	Ultraviolet light

一、前言

1-1 多元胺在生理上的重要性

多元胺 (Polyamine) 為結構中具有兩個或兩個以上一級胺 (amino group) 的小分子脂肪族化合物，主要包含有腐胺 (putrescine)、亞精胺 (spermidine) 和精胺 (spermine) (1-3)。多元胺是細胞維持正常功能與生長所需的重要因子，具有促進細胞生長及分化的功能。在生物體中，多元胺以毫莫耳的濃度存在於細胞內，但只有極少量的多元胺以游離態的形式存在；在正常生理 pH 值時，多數的多元胺可以藉由其帶正電的胺基與 DNA、RNA 及磷酸脂質等帶負電的分子以及蛋白質結構中帶負電的區域產生可逆的交互作用 (4-5)，多元胺參與許多胞內的生化反應，例如：維持染色質的構型、調控 DNA 複製、轉錄以及轉譯的進行，多元胺亦可以作為真核系統中合成轉譯起始因子 5A (IF5A) 的前驅物 (6)，也能與細胞膜上的蛋白質與磷脂交互作用，以維持膜的穩定性並調控離子通道的開關，在原核生物與真核生物的細胞分化、凋亡和死亡過程中扮演重要的角色 (7)。

多元胺最早被發現於 1678 年，Antonie van Leewenheuk 從人類精液中分離出一些三面的 (three-sided) 晶體，之後證實其組成為帶有三個胺基的亞精胺，以及帶有四個胺基的精胺，而帶有兩個胺基的腐胺則是 1889 年於細菌體內分離而得。除了甲烷桿菌 (Methanobacterial) 和耐鹽桿菌 (Halobacterials) 兩種古生菌以外，多元胺普遍存在於所有的生物中 (8)。當胞內多元胺濃度不足時，細胞生長會出現減緩或是停滯的現象，在給予外生性的多元胺後則可以恢復細胞的生長。大多數的真核生物，其細胞膜上含有多元胺的運輸系統 (transport system) 以幫助外生性的多元胺進入細胞內 (9)，在分裂的細胞與癌細胞中多元胺之生合成作用會快速增加，細胞膜上的運輸系統在腫瘤細胞中的含量與活性也較正常細胞來得高 (10)，當胞內多元胺的濃度過高時會促使細胞增生並可能導致癌化，而且過多的多元胺也會對細胞產生毒性進而誘發細胞凋亡，因此多元胺在細胞內的濃度受到嚴密調控。

1-2 多元胺代謝路徑

生物體內的多元胺可自飲食中攝取或是藉由細胞自行合成得到。在真核細胞中，鳥胺酸脫羧酶 (Ornithine decarboxylase, ODC；EC 4.1.1.17) 為催化胞內多元胺合成途徑之第一步驟的酵素，此反應亦為多元胺合成的速率決定步驟。ODC 可以將尿素循環中的產物-鳥胺酸 (ornithine) 脫羧得到腐胺，再依序經由亞精胺合成酶 (spermidine synthase) 和精胺合成酶 (spermine synthase) 合成分子量較大的亞精胺及精胺。亞精胺與精胺可以被亞精胺/精胺乙醯轉移酶 (spermidine/sperminen N^1 -acetyltransferase, SSAT) 催化而與 acetyl-CoA 結合，產生乙醯化的亞精胺與乙醯化的精胺再被運送至胞外。乙醯化的產物可經由多元胺氧化酶 (N^1 -acetylpolyamine oxidase, APAO) 將乙醯基去除產生分子量較小的多元胺類 (圖 1-1)。乙醯化之多元胺分子主要都被送至胞外，很少存在於正常細胞中，但是在癌細胞中可以發現高濃度乙醯化多元胺類存在，表示多元胺代謝的改變與癌化 (carcinogenesis) 有關。此外，乙醯化多元胺經過氧化後所產生的過氧化氫可以促進亞精胺/精胺乙醯轉移酶的活性，但是高濃度的過氧化氫會引起胞內氧化壓力的上升並造成細胞死亡 (6, 8)。

1-3 鳥胺酸脫羧酶 (ornithine decarboxylase, ODC)

1-3-1 人類鳥胺酸脫羧酶的結構

人類鳥胺酸脫羧酶 (hODC) 由 461 個胺基酸所組成，分子量為 51.25 kDa，其立體結構包含兩個 domains，胺基酸 46 到 280 形成 TIM-like α/β -barrel domain，活性中心可與輔酶 5'-磷酸吡哆醛 (pyridoxal 5'-phosphate, PLP) 結合之 Lys-69 即位於此 domain；胺基酸 7 到 45 以及 281 到 427 形成由兩個 β -sheet 和兩個 α -helices 共同組成的 sheet domain，其為 ODC 的疏水性中心 (hydrophobic core) (圖 1-2) (11)。

ODC 的單體 (monomer) 不具有酵素活性，必須以兩個 ODC 單體以頭尾相連 (head-to-tail) 的方式形成雙聚體 (homodimer) 才具有活性，此時一個 ODC 單體的 α / β -barrel domain 與另一個單體的 sheet domain 之間形成交互介面 (interface)，組成 ODC 的活性中心 (圖 1-3)。結構分析顯示 ODC 的交互介面間存在有兩個鹽橋 (salt bridges)，分別為 Lys-169 與 Asp-364'，以及 Asp-134 與 Lys-294'，而具有保留性的疏水性胺基酸 Phe-397'、Tyr-323'、Tyr-331、Tyr-331'、Tyr-323 和 Phe-397 會形成一個 hydrophobic zipper (圖 1-4A)，其中 Tyr-331 與空間中鄰近胺基酸 Val-322、Tyr-323、Asn-327 和 Leu-330 之間會形成凡得瓦爾交互作用 (圖 1-4B) 以穩定 ODC 雙聚體的結構 (12-13)。由於此交互作用介面的解離常數 (Kd) 約為 0.18 μ M (14)，因此 ODC 之雙聚體與單體會於細胞內形成動態的平衡 (15)。

1-3-2 鳥胺酸脫羧酶之催化機制

具有活性的雙聚體 ODC 需要 5'-磷酸吡哆醛 (pyridoxal 5'-phosphate, PLP) 作為輔酶才能進行催化反應。PLP 依賴型的酵素多以其活化中心的特定 Lys 與 PLP 結合，可廣泛地催化許多生化反應，如脫羧反應 (decarboxylation)、轉胺反應 (transamination)、消旋反應 (racemization)、 β - 或 γ -消除反應 (β - or γ -elimination) 和碳鍵形成等反應 (16)。輔酶 PLP 會與 ODC 活性中心的第 69 號離胺酸 (Lys-69) 以 Schiff base 的方式結合，形成 internal aldimine，當進行反應時，受質鳥胺酸會以 Schiff base 的方式與 PLP 結合，取代 Lys-69 與 PLP 的鍵結，破壞 internal aldimine 的結構，形成 external aldimine，此步驟稱為 Schiff-base formation。接著藉由電子的轉移而使 C α 失去一個 CO₂ 分子而形成中間產物-Quinoid，此步驟稱為脫羧反應 (decarboxylation)。由於此中間產物能量並不穩定，因此理論上可以藉由兩種不同的質子化 (protonation) 途徑形成更為穩定的產物，一條為 C α 質子化路徑，而另一條為 C4 質子化路徑。C α 質子化後會使 Quinoid 回到穩定的 external aldimine，進行 schiff-base 水解而釋放一個腐胺 (putrescine) 分子，此時 Lys-69 又會回復與 PLP

結合的狀態，以準備進行下一次的催化反應，在此過程中 schiff-base 水解的步驟為此反應機制的速率決定步驟。若進行 C4 質子化路徑則會形成 ketimine，隨後產生 γ -aminobutyraldehyde (γ ABA) 和 pyridoxamine 5-phosphate (PMP)，由於 PMP 無法利用 schiff-base 的方式與 Lys-69 結合，所以此途徑會導致 ODC 失去催化活性無法再進行反應 (圖 1-5)。研究顯示 ODC 催化 C α 質子化反應進行的效率接近 100%，Jackson 等人在 2000 年發表的論文中指出 *T. brucei* ODC 的 Cys-360 為負責控置 C α 質子化反應專一性的關鍵胺基酸，當 Cys-360 突變成丙胺酸 (Ala) 或絲胺酸 (Ser) 時，會造成 ODC 活性的下降 (17)，並且造成 ODC 在與鳥胺酸作用時，其產物有 90% 為 γ ABA，而腐胺則僅有 10%，顯示突變影響了 ODC 催化反應的專一性。進一步由 *T. brucei* ODC 與 PLP 的結構解析可以看出當 ODC 進行催化時，Cys-360 會轉向活性中心，其中硫原子距離 C α 原子為 3.4 Å，而距離 C4 原子則為 4 Å，因此推測 Cys-360 可以引導 ODC 進行 C α 質子化的反應 (圖 1-6A)。此外，ODC 的 Glu-94 和 Asp-88 在催化反應的過程中會與 Lys-69 有交互作用，以避免 Lys-69 干擾受質與 PLP 的結合，影響催化反應的進行 (圖 1-6B) (18)。

1-3-3 鳥胺酸脫羧酶與疾病

由於多元胺在胞內濃度異常時會造成癌症及其他疾病的產生，所以負責多元胺合成的重要酵素 ODC 在胞內的含量與活性受到嚴密的調控。目前已知 ODC 蛋白含量係透過由基因轉錄、mRNA 降解、mRNA 轉錄和酵素降解等方式調控 (19)。研究指出在許多癌化的細胞中，ODC 的濃度較正常細胞高且其活性有持續活化的現象 (20-21)。許多因子會調節 ODC mRNA 的含量，例如致癌基因 *c-myc* 會刺激 ODC 表現量的上升 (22)，而促使腫瘤生成或癌化 (23-24)，其過度表現也可能會造成細胞轉型 (25)。DL- α -difluoromethylornithine (DFMO) 是 ODC 的不可逆抑制劑，DFMO 可以與 ODC 活性中心 Cys-360 形成共價鍵結，使 ODC 失去催化功能 (圖 1-7)，臨床測試顯示，阻斷多元胺合成的路徑能有效抑制腫瘤的生長，許多研究亦顯示

ODC 與多元胺在體內的濃度是研究癌症疾病的重要指標 (26-28)。

此外，引起非洲昏睡病 (African sleeping sickness) 的病原體錐蟲 (*trypanosome brucei*) 其 tODC 會在宿主體內大量表達，由於 tODC 並不會與宿主的抗酶結合，因此無法抑制 tODC 的活性，臨床實驗發現 DFMO 也可用於治療錐蟲的感染 (18, 29-30)。

1-3-4 鳥胺酸脫羧酶之降解機制

細胞中許多藉由蛋白酶體 (26S proteasome) 需依賴其與泛素 (ubiquitin) 形成之共價鍵結複合體，被泛素標示的蛋白質會與蛋白酶體結合並進行降解，而 ODC 是第一個被發現不需經由與泛素結合即可進行蛋白酶體降解的蛋白，調控 ODC 降解的機制已被廣泛地研究 (31-34)。

ODC 在體內之半衰期約為 10 分鐘至 1 小時，是哺乳類細胞中半生期最短的蛋白之一，當有抗酶蛋白 (antizyme, AZ) 存在時，會使 ODC 的降解更為迅速。AZ mRNA 的轉譯 (translation) 過程受到嚴密的調控，AZ mRNA 具有兩個重疊的開放讀碼區 (open reading frame, ORF)，分別為 ORF1 及 ORF2，ORF1 序列較短，具有 AUG 起始碼和 UAG 停止碼，能合成一段含有六十八個胺基酸，不具生物功能的多肽。ORF2 序列較長幾乎包含整個 AZ 的 mRNA，但不具有 AUG 起始碼，必須經由核糖體在 ORF1 之停止碼前發生 +1 frameshift，才能合成具有功能性的全長 AZ 蛋白 (35)。胞內多元胺的濃度會影響 AZ mRNA 的轉譯，當多元胺的含量過高時，會增加 AZ mRNA 轉譯的過程中 +1 frameshift 的效率，合成更多具有功能的 AZ 蛋白 (36-37)。多元胺導致 AZ mRNA 於轉譯時產生 frameshift 的機制目前尚不清楚，推測可能與位於 AZ mRNA 3' 端的 pseudoknot 有關 (圖 1-8) (7, 19, 38-39)。

AZ 為 ODC 負回饋的調控因子，AZ 和單體 ODC 間的親合力較其與 ODC 雙聚體間更強，Kd 約為 0.1 nM (40-41)，因此 AZ 可以在快速平衡的雙聚體與單體 ODC 間，和單體 ODC 以 1:1 的比例結合形成異源雙聚體 (heterodimer)，分子篩層析管

柱 (Gel filtration) 顯示 ODC-AZ 複合體無法於高離子強度的環境中穩定存在 (19)，表示 ODC 與 AZ 間可能利用離子性交互作用結合。ODC 與 AZ 結合後會喪失酵素活性並且產生結構的變化，導致 ODC C 端第 425 到 461 之胺基酸片段暴露於溶液中 (solvent exposed)，此段由 37 個胺基酸組成的胜肽鏈稱為 C 端降解訊號 (C-terminal degradation signal)，使 ODC 能被 26S 蛋白酶體辨認並進行降解，AZ 在此過程中會被釋出，並能再與下一個 ODC 結合 (圖 1-9) (32, 42-45)。

目前所發表的 ODC 結構中皆不包含此 C 端降解訊號，推測此區域之構形較不穩定，也因此無法直接藉由結構的觀點了解此區域導致蛋白降解的機制 (11, 15)。此外，ODC 之 C 端具有兩個帶有 PEST 降解訊息 (PEST degradation signal) 的片段，其分別為 298 到 333 以及 423 到 462 部分的胺基酸，此段區域內富含脯胺酸 (Proline)、麩胺酸 (Glutamate)、絲胺酸 (Serine) 和蘇胺酸 (Threonine) 等胺基酸，在許多半衰期短、降解迅速的典型蛋白序列中常具有 PEST 區域。實驗研究顯示將老鼠 ODC 刪除 C 端最後 5 個胺基酸，或是將第 441 個胺基酸 Cys 突變成 Trp，會使 ODC 蛋白的穩定度提高。2008 年，Takeuchi 等人發現將老鼠 ODC 之 Cys-441 與 Ser-440r 或 Ala-442 的位置互相置換時，皆會抑制蛋白降解的速度，顯示 Cys-441 在 ODC 蛋白降解時扮演重要的角色。雖然 Cys 可能會在蛋白結構中形成雙硫鍵，但在此實驗中必須有還原劑存在才能促使 ODC 的降解，表示由 Cys-441 所誘發的降解並非與雙硫鍵或是硫酸酯鍵等化學鍵結的形成有關，而在 Ala-442 之突變實驗結果顯示第 442 個胺基酸位置必須是側鏈較小的胺基酸才能使 ODC 進行降解反應，表示胺基酸 441 和 442 可能為負責形成被蛋白酶體辨認的結構區域 (31, 46-49)。此外，研究也指出另一個 PEST (298-333) 的區域與 ODC 的穩定性無關 (8, 19)。由於，在雙聚體的 ODC 結構中 PEST 區域會被包埋在疏水性中心裡，推測 AZ 結合後可能導致 PEST 區域的構形變化。

若是將老鼠 ODC C 端 37 個胺基酸接至二氫葉酸還原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) 之 C 端則會加速二氫葉酸還原酶的降解 (50)。若使用會專一性辨認 ODC 第

376 到 461 個胺基酸的抗體進行免疫反應實驗，可發現 AZ 會促進 ODC 與抗體的結合，並抑制 ODC 的降解，表示 ODC 的 C 端降解訊號會因與 AZ 的結合而露出，並且抗體的結合會抑制 ODC 與 26S 蛋白酶體的交互作用 (42)。In vitro 實驗中，在不破壞活性中心的前提下，將 ODC 的 C 端序列 (308-461) 與 N 端序列 (1-307) 利用基因重組的技術連接，形成一個新的突變型 ODC，308 為 N 端的起始胺基酸，而 307 為 C 端最終的胺基酸，此 ODC 可以被 AZ 結合抑制其活性，但是無法進行降解，結果顯示基因重組可能導致 ODC C 端結構改變，無法被 26S 蛋白酶體辨認 (圖 1-10) (42)，許多實驗結果都表示 ODC 的 C 端區域與 ODC 被快速降解有關 (51-53)。

先前的研究指出在不同類型的細胞中 ODC 在細胞內分布的位置不同，細胞核與細胞質皆可能有 ODC 的存在，推測可能是因為細胞生理狀態 (生長、分化、惡性腫瘤轉移、凋亡)，而導致 ODC 於細胞內分布不同 (54)。相反地，AZ 蛋白幾乎出現於核內 (55)，且以蛋白酶體的抑制劑處理細胞會使 ODC 與 AZ 累積於核內 (56)，由於在 AZ 的 N 端序列含有細胞核輸出訊號 (nuclear export signals)，推測 AZ 可能會在與 ODC 結合後，將 ODC 由細胞核帶至細胞質以進行降解，但這樣的機制尚須要進一步的研究證實 (31, 54)。

1-4 抗酶抑制因子 (Antizyme inhibitor, AZI)

另一個參與多元胺合成路徑調控的蛋白-抗酶抑制因子 (AZI)，其分子量與序列與 ODC 相似，為 ODC 之同源性蛋白，但 AZI 無法與 PLP 結合且不具有催化活性。AZI 對 AZ 的親合性較 ODC 高約六倍，可藉由與 AZ 形成更為穩定的 AZI-AZ 異雙聚體，競爭 AZ 與 ODC 的結合，促使 ODC 由 ODC-AZ 複合體中釋出，並可避免 ODC 被 26S 蛋白酶體辨認而降解，因此 AZI 可以正回饋調控胞內多元胺的含量 (圖 1-9) (12, 41, 57)。有趣的是，AZ 與 AZI 的結合非但不會導致 AZI 被降解，AZ 還會抑制 AZI 被泛素化降解的路徑 (33)。

1-5 抗酶 (Antizyme, AZ)

1-5-1 抗酶之功能

哺乳類抗酶蛋白最早被發現於 1976 年，當時發現若給予老鼠細胞過多的多元胺時，會誘發某未知蛋白大量表現且此蛋白會抑制 ODC 的酵素活性，因此將此蛋白命名為抗酶 (Antizyme, AZ) (58)，由於 AZ 具有可以促使 ODC 降解與抑制多元胺進入胞內的功能，因此也被視為一種腫瘤抑制因子 (tumor suppressor) (38, 59-60)。人類的 AZ 存在有四種亞型 (isoform)，分別為 AZ1、AZ2、AZ3 以及 AZ4。不同亞型的 AZ 蛋白具有序列同源性，且功能相似，皆可以抑制多元胺被細胞攝入，並且其 mRNA 都具有可以被多元胺刺激產生 frameshift 的特性 (61)。最早被發現的亞型 AZ1 簡稱為 AZ，普遍存在於身體所有組織中，在胞內含量最多，AZ 能夠與 ODC 結合使 ODC 失去活性並調控其降解 (62-63)。AZ2 之分布不如 AZ 普遍，其功能與 AZ 相似，AZ2 在 *in vivo* 實驗中可以抑制 ODC 的活性並促使其降解，但在 *in vitro* 實驗中無法調控 ODC 的降解，推測 AZ2 在細胞中可能負責將 ODC 以不具活性的方式儲存 (64-65)。AZ3 具有組織特異性，僅出現於男性生殖細胞並與精子的形成有關，會抑制 ODC 的活性但無法引起 ODC 的降解，在生殖細胞中可釋放 ODC，以迅速形成具有活性的 ODC 雙體 (66)。AZ4 之二級結構與 AZ 最為相似，可以抑制 ODC 活性但其他功能則尚未釐清 (7, 38, 45, 67)。

1-5-2 抗酶之結構

人類 AZ 蛋白由 228 個胺基酸所組成，分子量約為 26.5 kDa，與老鼠 AZ 蛋白序列有高達 90% 之相同度。老鼠 AZ1 87-227 片段的結構於 2005 年以 NMR 解出 (68)，此結構包含八個 β strands 和兩個 α helices，其中 C 端區域第 121 到 227 個胺基酸推測會與 ODC 結合形成複合體，在真核生物物種間 AZ 序列 C 端的保留性也較 N 端高，但 AZ C 端無法引起 ODC 的降解，顯示主要引起 ODC 降解的胺基酸可能位

於 AZ N 端第 69-120 個胺基酸的區域 (17, 69-70)。經由老鼠 AZ 蛋白結構以及序列比對分析發現結構中第一個 α helix 中的 Glu-161、Glu-164 和 Glu-165 等酸性胺基酸位於蛋白結構表面且在物種間序列保留性高，因此可能以此帶負電的保留性區塊和 ODC 結合 (圖 1-11)。其它位於第五個至第八個 β strands 之保留性高的疏水性胺基酸，包含 Tyr-140、Phe-173、Val-198、Phe-213 和 Val-215，則可能形成一個疏水性區塊與 ODC 或是 26S 蛋白酶體發生交互作用 (68)。

1-6 鳥胺酸脫羧酶與抗酶結合區域之預測

錐蟲 ODC 與哺乳類 ODC 的序列相似度極高，但錐蟲 ODC 不會與抗酶產生交互作用，藉由序列比對結果將錐蟲 ODC 的不同片段分別取代老鼠 ODC 序列相對應片段進行嵌合蛋白 (Chimeric proteins) 實驗，結果顯示 AZ 可能結合於老鼠 ODC 第 117-140 個胺基酸的區域 (71-72)。此外，根據 2000 年發表的人類 ODC 結構 (11)，經由序列比對以及結構表面電荷分佈特性分析顯示 ODC 與 AZ 可能之作用於第 117-140 個胺基酸，此段區域稱為 AZBE (antizyme-binding element) (圖 1-12)。AZBE 係由 helix 5、 β strain 7、helix 6 所組成，在單體 ODC 結構上，Lys-115、Lys-121、Arg-144 及鄰近 Arg-183、Lys-92 共同組成一個帶正電的區塊 (圖 1-13)，推測可能 ODC 利用此正電區塊以離子性交互作用與 AZ 結合。此外，AZBE 於 ODC 雙聚體形成時包埋於單體之交互作用介面，由此可以解釋 AZ 無法與雙聚體 ODC 結合，但可以與單體 ODC 結合 (11)。

2009 年 Cohavi 利用 ODC 特定胺基酸的突變蛋白進行實驗並搭配電腦軟體運算進行老鼠 AZ 與人類 ODC 的嵌合 (docking) 分析，結果顯示 ODC 上帶正電的胺基酸 (Lys69、Lys-92 和 Lys-141) 會和 AZ 蛋白表面帶負電的胺基酸 (Asp-154、Glu-196 和 Glu-219) 發生離子性交互作用，而某些疏水性的胺基酸位於 ODC (Tyr-323 和 Phe-397) 和 AZ (Phe-173、Ile-197、Val-198 和 Phe-213) 的蛋白表面，在空間上十分靠近，亦可能形成疏水性交互作用，這些胺基酸在物種間具有高度的保留性 (圖

1-14) (41)。

1-7 研究目的

若胞內多元胺的濃度異常升高時，可能影響細胞之正常生長與分化，導致癌症等疾病的發生 (5)。ODC 在胞內多元胺的生合成路徑中扮演重要角色，雖然目前人類 ODC 與老鼠 AZ 的蛋白質結構都各自被發表 (11, 68)，但仍然無法解釋 AZ 如何與 ODC 結合。因此解析 ODC-AZ 複合體的結構有助於進一步探討 ODC 的降解機制。

先前文獻對於 ODC 與 AZ 之間交互作用的研究皆仰賴電腦預測或是間接的生化分析，並無直接的由蛋白複合體結構佐證，因此本研究希望以蛋白質結晶學的技術分析 ODC-AZ 複合體的結構，以探討 ODC 與 AZ 之間的交互作用。另一方面，其他參與細胞週期或是細胞凋亡相關的蛋白，例如：Cyclin D1、Aurora A kinase 以及 DNp73 也可與 AZ 蛋白結合，且這些蛋白部份的降解是由 AZ 所調控而非常見的以泛素化為主的降解途徑 (73-75)，解出 ODC-AZ 複合體的蛋白結構，亦可進一步了解 AZ 辨認並促使其目標蛋白進行非泛素化降解的分子機制。

二、材料與方法

A. 實驗材料

1. 菌種、質體 (表 2-1 與表 2-2)。
2. 培養基、培養液、試劑等 (表 2-3)。

B. 實驗方法

2-1 蛋白質表現質體之構築

2-1-1 pET28a-ODC、pET28a-ODC_{Δ299-310}、pET21b-AZ₁₁₀₋₂₂₈、pET21b-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 與 pQE30-AZ₉₅₋₂₂₈

表現載體 pET28a-ODC、pET28a-ODC_{Δ299-310} 與 pET21b-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 由實驗室林婉婷構築 (80)，pET21b-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 由實驗室李佩螢構築 (79)，pQE30-AZ₉₅₋₂₂₈ 由國立中興大學生命科學研究所 洪慧芝老師實驗室所提供。

2-1-2 pET15b-AZ₁₁₉₋₂₂₈

(1) 質體製備

將在 -80°C 冰箱帶有 pET21b-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 質體的 DH5α 凍菌劃於含有 75 μg/ml ampicillin 的 LB 培養基上，於 37°C 靜置培養 16 小時。挑單顆菌落於 5 ml 含有 75 μg/ml ampicillin 的 LB 培養液中，37°C 震盪培養 16-20 小時。

參考 High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) 的實驗步驟，將菌液以 14000 rpm 離心 1 分鐘後回收菌塊，以 200 μl PD1 buffer (4 °C) 回溶後加入 200 μl PD2 buffer 溫和的上下搖晃並靜置 2 分鐘，再加入 300 μl PD3 buffer 溫和搖晃產生白色沉澱，以 14000 rpm 離心 5 分鐘後，將上清液取出置於 PD Column 中，再以 14000 rpm 離心 30 秒，倒掉 flow-through 後加入 400 μl W1 buffer，再以同轉速離心 30 秒，倒掉

flow-through 後加入 600 μ l Wash buffer 離心 30 秒，倒去 flow-through 後再離心 3 分鐘，將 PD Column 蓋子打開於室溫下靜置 10 分鐘，使酒精揮發完全。加入 30 μ l 無菌的 ddH₂O 直接注入 PD Column 的膜上，靜置 5 分鐘，最後再以 14000 rpm 離心 5 分鐘，將萃取後的質體保存於 -20°C。

(2) Polymerase chain reaction (PCR) 反應條件：

以 1 μ l pET21b-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 質體為模板，加入濃度為 10 μ M 的 forward primer 以及 reverse primer 各 1 μ l、2.5 mM dNTP 2 μ l、0.5 μ l pfu polymerase (5 U/ μ l, MD Bio)、5 μ l 10x pfu buffer (MD Bio)、2.5 μ l DMSO，最後補 ddH₂O 至 50 μ l，進行 PCR program。

I. PCR program：

Step	Temperature	Time	Cycle(s)
Heat soak	94°C	5 min	1
Denaturation	94°C	1 min	30
Annealing	58°C	1 min	
Extension	72°C	1 min	
Final extension	72°C	5 min	1

II. 引子設計：

Primer	限制酶
Forward 5'-GGGAAATTCATATGCAGTCCAGGCTCACAGACG-3'	<i>Nde</i> I
Reverse 5'-GCAAATCACTCGAGCTACTCCTCCTCCTCTCCC-3'	<i>Xho</i> I

(3) 限制酶切割反應：

將 PCR 產物回收後，取 40 μl AZ₁₁₉₋₂₂₈ 之 PCR 產物、5 μl buffer (Takara、Biolabs) 以及 *Nde* I (20 U/ μl , Biolabs) 與 *Xho* I (10 U/ μl , Takara) 各 1 μl ，補 ddH₂O 至 50 μl ，於 37°C 靜置 12-16 小時，再以 1% agarose gel 回收 DNA。載體 pET15b 也以相同方法置備。

(4) DNA 連接反應 (ligation)：

將限制酶切割後的 insert (AZ₁₁₉₋₂₂₈) 與 vector (pET15b)，以莫耳數比 vector : insert = 1 : 2、1 : 3 及 1 : 6 混合，再加入 0.2 μl T4 ligase (5 U/ μl , Fermentas) 與 1 μl 10x ligase buffer (Fermentas)，最後補 ddH₂O 至 10 μl ，於 16°C 作用 20-24 小時，再放置 65°C，10-15 分鐘終止反應。

(5) 製備勝任細胞 (competent cell)

挑選 *Escherichia coli* DH5 α 單顆菌落接種至 LB 培養液，於 37°C 培養 16-20 個小時，取 300 μl 菌液注入 30 ml 的新鮮 LB 培養液中，於 37°C 培養至 OD₆₀₀=0.3-0.55，將菌液置於冰上 20 分鐘，以 2500 rpm 轉速，4°C 下離心 10 分鐘，丟棄上清液後，加入 15 ml 的 100 mM CaCl₂ 輕輕搖晃回溶 pellet，靜置於冰上 20 分鐘，以 2500 rpm 轉速，4°C 下離心 10 分鐘，倒去上清液後加入 3 ml 之 100 mM CaCl₂ 輕輕搖晃回溶 pellet，再置於冰上 10-24 小時，緩慢加入 80% 冰的甘油最終濃度至 15%，緩慢搖晃使之混合均勻，以每管 100 μl 分裝於事先預冷的 eppendorf 中，利用液態氮使之極速冷凍，再存放於 -80°C 冰箱。

(6) 轉型作用 (transformation)

從 -80°C 冰箱中取出勝任細胞 *Escherichia coli* DH5 α ，沖水回溶後置於冰上，加入 ligation 產物，置於冰上 20-30 分鐘後於 42°C 乾浴 40 秒，再迅速置於冰上 2 分鐘，加入 100 μl LB 培養液在 37°C 震盪培養箱中培養 1 小時，將菌液塗抹至含有 75 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin 的 LB 培養基上，於 37°C 靜置培養 16 小時。

(7) 挑選 LB 培養基上數顆單顆菌落，分別抽取質體，並以限制酶進行酵素切割，

將含有 insert (AZ₁₁₉₋₂₂₈) 之質體送核酸定序。

2-1-3 pET21d-N-His -AZ₁₁₉₋₂₂₈

(1) 含有 N-His tag 之 pET21d 質體的置備

將濃度 100 μ M 的 forward primer 與 reverse primer 各取 1 μ l，加入 18 μ l ddH₂O 進行 annealing program。

I. Annealing program：

Step	Temperature	Time
Denaturation	95°C	5 min
Annealing	60°C	10 min

II. 引子設計：

Primer

Forward

5'-CATGCACCATCATCATCATCATGGCTCCCATATGTCCAGGAAG-3'

Reverse

5'-GATCCTTCCATGGACATATGGGAGCCATGATGATGATGATGGTG-3'

(2) 限制酶切割反應：

載體 pET21d，加入 5 μ l buffer (Takara、Biolabs) 與 1 μ l *Bam* HI (10 U/ μ l, Takara) 補 ddH₂O 至 50 μ l，於 30°C 反應 4-5 小時，再加入 1 μ l *Nco* I (Biolabs)，於 37°C 下靜置 12-16 小時後回收 DNA。

(3) DNA 連接反應 (ligation)：將(1)與(2)的產物進行連接反應，同 2-1-2 (4) 方法。

(4) 同 2-1-2 (6)(7) 方法

(5) 將定序成功的質體命名為 pET21d-N-His (vector) 與 pET15b-AZ₁₁₉₋₂₂₈ (insert) 分別進行限制酶切割反應同 2-1-2(3)方法，再進行 DNA 連接反應，最後利用限制酶切割方法確定 insert 的存在並以 DNA 序列確認質體的正确性。

2-2 蛋白表現量的測試

2-2-1 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體之共表達

由於 ODC_{Δ299-310} 及 AZ₁₁₀₋₂₂₈ 應可藉由交互作用提升彼此的穩定性，因此將帶有 ODC_{Δ299-310} 與 AZ₁₁₀₋₂₂₈ 之載體共同送入 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中進行共表達 (co-expression)。

將 pET21b-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 與 pET28a-ODC_{Δ299-310} 轉型至 *Escherichia coli* BL21(DE3)，取單顆菌落接種至 2 ml 含有 75 μg/ml ampicillin 與 50 μg/ml kanamycin 的 LB 培養液中 37°C 震盪培養 16-20 小時。取 125 μl 菌液至 25 ml 新鮮 LB 培養液(含有 75 μg/ml ampicillin 與 50 μg/ml kanamycin)，置放於 37°C 培養箱震盪培養至 OD₆₀₀=0.4-0.6 時降溫到 25°C，使菌液在 25°C 平衡 10-15 分鐘，加入最終濃度 0.5 mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 培養 16-20 小時。

取 3 ml 菌液以 14000 rpm 轉速離心 1 分鐘，丟棄上清液，以 1 ml lysis buffer (30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β-ME) 回溶 pellet，利用超音波破菌法破菌 (機型 VCX-750、intensity 21%、pulse on 5 s and pulse off 5 s、共 1 分鐘) 置備 total cell lysate 後，以 14000 rpm 轉速離心 1 分鐘，取上清液並將 pellet 以 1 ml lysis buffer 回溶，分別將 total cell lysate、上清液和回溶後的 pellet，進行蛋白質電泳，以 14% SDS-PAGE 分析蛋白表現。

(1) 14% SDS-PAGE 分析 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis):

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis 簡稱為 SDS-PAGE，為一種能分離蛋白質的半固體膠體，以 bis-acrylamide 形成篩網，而 SDS 為一種介面活性劑，可以破壞蛋白質的分子構型 (conformation)，並在分子表面均勻佈上一層 SDS 的負價分子，使所有蛋白質分子不論原來電性為何均往正極方向移動，其泳動率與分子量成反比，因此 SDS-PAGE 可利用蛋白分子量大小不同的特性來達到蛋白

分離的目的，當膠體中 polyacrylamide 濃度越高，代表膠體的孔徑越小，因此分子量小的蛋白適用較高百分比的 SDS-PAGE，由於本篇論文中的 ODC 與 AZ 片段的大小分別約為 53 kDa 及 14 kDa，所以選擇使用 14% SDS-PAGE。

I. 膠體製備:

1.5 mm 14% 分離膠體 (separating gel): 取 3.6 ml ddH₂O、3.5 ml 40% acrylamide/bis-acrylamide、2.6 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)、100 μ l 10% SDS、200 μ l 10% APS、7.5 μ l TEMED 均勻混合後倒入已架好的玻片夾層中約 4/5 的高度，再注入 95% 酒精於頂端，使膠體凝固後表面保持水平。

1.5 mm 5% 聚焦膠體 (stacking gel): 靜置 20 分鐘分離膠體凝固後，將上層酒精倒出。取 3 ml ddH₂O、0.45 ml 40% acrylamide/bis-acrylamide、0.5 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)、40 μ l 10% SDS、40 μ l 10% APS、4 μ l TEMED 均勻混合後倒滿玻璃夾層，再插入齒梳，靜置 15 分鐘等待凝固。

II. 蛋白電泳分析

將 sample 與 5 X sample buffer 以 4:1 混合，於 100°C 水中加熱 10 分鐘後，再將樣品注入膠片凹槽間，先以 70 伏特電壓電泳 20 分鐘，待樣品到達聚焦膠體與分離膠體交界時，再以 140 伏特電泳 60 分鐘，直至樣品跑至膠體底部，其電泳結束。

III. 染色及退染

電泳完畢後以刀片切除聚焦膠體，並將膠體小心取下，放置 staining buffer 中約 30 分鐘至 1 小時，充分染色後，倒出 destaining buffer 進行退染數次，直至膠體背景呈現透明後，再以 ddH₂O 保存。

2-2-2 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)與 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體之共表達

(1) Native 蛋白複合體之共表達

將 pET15b-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 分別與 pET28a-ODC_{Δ299-310} 和 pET28a-ODC 轉型至 *Escherichia coli* BL21(DE3)後進行蛋白表達(方法同 2-2-1), pET15b-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 所表現之 AZ 蛋白片段在本篇論文中稱為 AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)。

(2) 含 Se-Methionine 標定的 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體之共表達

首先將 pET15b-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 和 pET28a-ODC 共轉型至無法自行合成甲硫胺酸 (methionine) 的 *Escherichia coli* B834(DE3) met- 中再進行蛋白共表達, 其餘方法同 2-2-1。

2-2-3 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)與 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體之共表達

(1) Native 蛋白複合體之共表達

將 pET21d-N-His AZ₁₁₉₋₂₂₈ 分別與 pET28a-ODC_{Δ299-310} 和 pET28a-ODC 轉型至 *Escherichia coli* BL21(DE3)後進行蛋白表達(方法同 2-2-1), lysis buffer (30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β-ME, 10 mM imidazole), pET21d-N-His AZ₁₁₉₋₂₂₈ 所表現之 AZ 蛋白片段在本篇論文中稱為 AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)。

(2) 含 Se-Methionine 標定的 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體之共表達

首先將 pET21d-N-His AZ₁₁₉₋₂₂₈ 和 pET28a-ODC 共轉型至無法自行合成甲硫胺酸 (methionine) 的 *Escherichia coli* B834(DE3) met- 中再進行蛋白共表達, lysis buffer (30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β-ME, 10 mM imidazole), 其餘方法同 2-2-1。

2-2-4 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 與 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體之共表達

(1) Native 蛋白複合體之共表達

將 pQE30-AZ₉₅₋₂₂₈ 分別與 pET28a-ODC_{Δ299-310} 和 pET28a-ODC 轉型至 *Escherichia coli* BL21(DE3)後進行蛋白表達(方法同 2-2-1)，ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 之 lysis buffer (30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β-ME, 15 mM imidazole)；ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 之 lysis buffer (30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β-ME, 10 mM imidazole)。

(2) 含 Se-Methionine 標定的 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體之共表達

首先將 pQE30-AZ₉₅₋₂₂₈ 和 pET28a-ODC 共轉型至無法自行合成甲硫胺酸 (methionine)的 *Escherichia coli* B834(DE3)met- 中再進行蛋白共表達，lysis buffer (30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β-ME, 10 mM imidazole)，其餘方法同 2-2-1。

2-3 蛋白純化

2-3-1 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體的純化

蛋白養晶需要純度達到 95% 以上的蛋白樣品，因此需建立最佳的純化方法才能繼續進行後續晶體培養，本篇論文選擇以鎳離子親合性層析管柱、陰離子交換樹脂與分子篩管柱層析進行 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體的純化。

(1) ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體之大量培養

從 -80°C 冰箱取出帶有 ODC_{Δ299-310} 與 AZ₁₁₀₋₂₂₈ 載體的 BL21(DE3)凍菌劃於含有 75 μg/ml ampicillin 與 50 μg/ml kanamycin 的 LB 培養基上，於 37°C 靜置培養 16 小時。挑單顆菌落置於 50 ml 含有 75 μg/ml ampicillin 與 50 μg/ml kanamycin 的 LB 培養液

中，37°C 震盪培養 16-20 小時。取 10 ml 菌液接種至 1 L 的 LB 培養液中 (含有 75 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin 與 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin)，於 37°C 培養箱震盪培養至 $\text{OD}_{600}=0.4-0.6$ 時降溫到 25°C，使菌液在 25°C 平衡 10-15 分鐘，加入最終濃度 0.5 mM Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)，培養 16-20 小時後回收菌塊，以 10 ml lysis buffer 回溶並儲存於 -80°C 冰箱。

(2) $\text{ODC}_{\Delta 299-310}\text{-AZ}_{110-228}$ 蛋白複合體之破菌與蛋白萃取

將 -80°C 冰箱取出的凍菌先沖水解凍，再倒入 100 ml 小鋼杯中，用冰塊將鋼杯周圍覆蓋好，每 10 ml 的菌液加入 0.5 ml 10% Thesit、25 μl 0.2 M PMSF 以及 3.5 μl 14.3 M β -ME，利用超音波破菌法 (sonication) 並配合均質流細胞粉碎機 (microfluidizer) 破菌。

I. 超音波破菌

機型 VCX-750 (intensity 21%、pulse on 5 s and pulse off 5 s、共 10 分鐘)。

II. 均質流細胞粉碎機破菌

將超音波破菌好的菌液放入已加入 buffer 的 microfluidizer (Model 110L) 中，於 11,000 psi 高壓下，反覆破菌 5-10 次，直到菌液變為較澄清時，表示破菌完全。破菌過程中須全程保持低溫，將破菌完的菌液以 15000 rpm、4 °C 離心 20 分鐘，取上清液相同轉速及溫度再次離心 1 小時，再回收上清液並重覆此步驟一次。將上清液以 0.22 μm syring filter 過濾，即為蛋白萃取液，置於冰上，準備進行純化。

(3) 鎳離子親和性管柱層析法：

$\text{AZ}_{110-228}$ 的 C 端融合了 6 x His-tag，其可與(二價)鎳離子進行可逆結合的特性，純化的原理是將蛋白溶液通過含有鎳離子的管柱，理想情況下，帶有 His-tag 的蛋

白會被吸附在管柱上，而其他雜蛋白則會流過管柱。再利用和組胺酸結構類似的imidazole 將帶有 His-tag 的蛋白沖提下來，因此，本篇論文選用鎳離子親和性管柱作為初步的純化。

使用前先將管柱以緩衝液 A 平衡 (30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β -ME)，再將蛋白萃取液以流速 0.5 ml/min 通過 Ni-NTA 管柱，再以緩衝液 B (30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β -ME, 500 mM imidazole) 將蛋白沖提出來同時以每管 8 ml 收集蛋白溶液，參考層析圖 (chromatogram)，將層析圖上高峰所對應的收集管進行 14% SDS-PAGE 的分析，由於純度尚不足以養晶，需再進一步進行純化。

(4) 陰離子交換樹脂層析法：

離子交換層析法屬於吸附性層析法 (adsorption chromatography) 之一，其固定相為離子交換介質，在其固體的介質表面具有帶電荷的功能基，可與帶有異性電荷的蛋白結合，此種結合為可逆性的；移動相為沖提蛋白的緩衝溶液，而此緩衝溶液中含有電荷離子，當緩衝溶液中的電荷離子濃度高時，可取代帶電荷的蛋白與固定相之帶電功能基的結合，使帶有電荷的蛋白沖出。因此，樣品中的不同蛋白分子，因其帶有不同的電荷，而和固定相的親和力大小不同，因此可以用不同離子濃度的緩衝液，或以不同 pH 值的緩衝液改變蛋白表面的電荷，進而使不同的蛋白分別析出，達到分離的目的。

本篇論文選擇使用陰離子交換樹脂，其原理是利用樹脂上的 $-N^+(\text{CH}_3)_3$ 基團與帶負電的蛋白結合，而 NaCl 解離後的 Cl⁻ 能夠與帶負電蛋白競爭樹脂的結合而達到純化的目的。為確保蛋白與管柱的結合，蛋白溶液的離子強度必須透析置換至低鹽濃度才可進行陰離子交換樹脂的純化，所以必須先將鎳離子親和性管柱層析所得的蛋白溶液 (含有 200 mM NaCl) 透析至 80 mM NaCl 的緩衝溶液中。透析時間至少 6 小時，在 4°C 進行，透析緩衝溶液為 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 80 mM NaCl, 5%

glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β -ME, 1 mM EDTA (pH 8.0)。

使用管柱前須先以緩衝液 A 平衡 Q-Sepharose 管柱 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 80 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β -ME, 1 mM EDTA (pH 8.0))，再將蛋白溶液以流速 0.5 ml/min 通過 Q-Sepharose 管柱，以緩衝液 B (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 M NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β -ME, 1 mM EDTA (pH 8.0)) 以不同比例與緩衝液 A 混合，逐步提高沖提液的離子濃度。將蛋白沖提出來，同時以每管 8 ml 收集蛋白溶液，參考層析圖 (chromatogram)，將層析圖上高峰所對應的收集管進行 14% SDS-PAGE 的分析。

(5) 蛋白質濃縮

將純度高的蛋白樣品利用濾膜孔徑 30000 MWCO 之濃縮管 (Millipore) 以轉速 2500 rpm 於 4°C 下濃縮，再將樣品以 14000 rpm 於 4°C 離心 10 分鐘留下上清液。

(6) 分子篩管柱層析法：

膠體過濾法 (gel filtration) 屬於分子篩管柱層析法的一種，其膠體 (gel) 具有許多孔洞，當分子大於孔洞的大小時，此分子無法進入膠體內而直接隨著溶液流出；而比孔洞小的分子可進入孔道內，在膠體內的停留時間較長，而較慢流出。因此可利用分子在膠體內外行進路徑所滯留的時間長短不同，分離出不同大小的分子，而本實驗主要利用膠體過濾法來分析 ODC _{Δ 299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體是否形成異雙聚體 (heterodimer)。所用管柱型號為 GE Healthcare 的 superdex 200 prep grade，管柱體積 120 ml。

將管柱以緩衝液 (30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 2 mM β -ME, 0.02 mM PLP) 平衡 1.5 倍管柱體積，利用 sample loop 將濃縮完的蛋白溶液注入管柱，再以流速 0.5 ml/min 沖洗管柱，以每管 1 ml 收集蛋白溶液並進行 14% SDS-PAGE 分析。

2-3-2 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)與 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體的純化

(1) Native 蛋白複合體的純化

ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)與 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體進行大量表現、蛋白萃取和鎳離子親合性管柱層析法，其方法與 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 相同。取純度高的蛋白溶液濃縮至適當濃度，以緩衝溶液(30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 2 mM β-ME, 0.02 mM PLP) 進行分子篩管柱的純化，以每管 1 ml 收集蛋白溶液並進行 14% SDS-PAGE 分析。

(2) 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體的純化

I. 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體之大量表現

從-80°C 冰箱取出帶有 ODC 與 AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)載體的 B834(DE3)凍菌劃於含有 75 μg/ml ampicillin 與 50 μg/ml kanamycin 的 LB 培養基上，於 37°C 靜置培養 16 小時。挑單顆菌落於 50 ml 含有 75 μg/ml ampicillin 與 50 μg/ml kanamycin 的 LB 培養液中，37°C 震盪培養 16-20 小時。取 20 ml 菌液接種至 2L 的 LB 培養液中(含有 75 μg/ml ampicillin 與 50 μg/ml kanamycin)，於 37°C 培養箱震盪培養至 OD₆₀₀=1 時，將菌液離心去除上清液，利用 1X M9-salt (表 2-4 A) 將 pellet 回溶後，除去上清液，再重覆多次上述步驟，藉此將殘留的 LB 培養液完全置換，大約用至 4 L 1X M9-Salt。最後將 pellet 回溶於 4L 的 M9 培養液(表 2-4)中，加入最終濃度 0.5 mM IPTG，於 25°C 培養 20-22 小時後回收菌塊，以 40 ml lysis buffer 回溶並儲存於-80°C 冰箱。

II. 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體之蛋白萃取以及純化方法與 native 蛋白複合體相同。

2-3-3 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)與 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體的純化

(1) Native 蛋白複合體的純化

ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)與 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體大量表現、蛋白萃取方法與 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 相同。進行鎳離子親合性管柱層析法的緩衝液 A 成分為 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β-ME, 10 mM imidazole；緩衝液 B 為 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β-ME, 500 mM imidazole，其餘純化方法與 2-3-2(1)相同。

(2) 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體的純化

I. 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體之大量表現

從-80°C 冰箱取出帶有 ODC 與 AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)載體的 B834(DE3)凍菌劃於含有 75 μg/ml ampicillin 與 50 μg/ml kanamycin 的 LB 培養基上，其餘方法與 2-3-2 (2) I 相同。

II. 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體之蛋白萃取以及純化方法與 native 蛋白複合體相同。

2-3-4 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 與 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的純化

(1) Native 蛋白複合體的純化

ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 與 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體大量表現、蛋白萃取方法與 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 相同。

ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 進行鎳離子親合性管柱層析法的緩衝液 A 成分為 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β-ME, 15 mM imidazole；緩衝液 B 為 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β-ME, 250 mM imidazole，其餘純化方法與 2-3-2 相同。

ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 進行鎳離子親合性管柱層析法的緩衝液 A 成分為 30 mM Tris-HCl

(pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β -ME, 10 mM imidazole ; 緩衝液 B 為 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 5% glycerol, 0.5 mM PMSF, 5 mM β -ME, 500 mM imidazole , 其餘純化方法與 2-3-2 相同。

(2) 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的純化

I. 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體之大量表現

從-80°C 冰箱取出帶有 ODC 與 AZ₉₅₋₂₂₈ 載體的 B834(DE3)凍菌劃於含有 75 μ g/ml ampicillin 與 50 μ g/ml kanamycin 的 LB 培養基上,其餘方法與 2-3-4 (2) I 相同。

II. 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體之蛋白萃取與純化方法與 native 蛋白複合體相同。

2-4 蛋白質濃縮與定量

先將純度高的蛋白樣品利用濾膜孔徑 30000 MWCO 之濃縮管 (Millipore) 以轉速 2500 rpm 於 4°C 下濃縮,每 10 分鐘利用可調式析量管均勻緩合蛋白溶液,再將樣品以 14000 rpm 於 4°C 離心 10 分鐘留下上清液。

利用小牛血清球蛋白 (bovine serum albumin ; BSA) 以濃度 2 mg/ml、4 mg/ml、6 mg/ml、8 mg/ml、10 mg/ml 和濃縮後的蛋白質溶液分別與 1 ml 1x protein assay reagent (Bio-rad) 均勻混合,靜置於室溫下 5 分鐘後,利用分光光度計測其吸光值,記錄標準曲線計算出蛋白濃度。

2-5 蛋白質均質性測定

樣品的均質性 (homogeneity) 高低會影響蛋白晶體的品質,本實驗使用分子篩管柱層析以及 Dynamic Light Scattering (DLS) 確定蛋白樣品之均質性。每個分子在絕對溫度 0 K 以上都具有布朗運動 (Brownian motion), 因此可以藉由不同時間點所

測得的scattering light的強度，計算出分子的hydrodynamic radius或是直徑。利用DLS所測得之polydispersity index (PDI) 可得知溶液組成的均質性，PDI值越低表示均質性越高。

將定量好的蛋白樣本取約160 μ l至1.5 ml eppendorf tube，在常溫下，以轉速14,000 rpm，離心10分鐘，以除去蛋白溶液中的微小雜質，最後取150 μ l蛋白至200 μ l拋棄式樣品槽進行測定。

2-6 蛋白晶體培養

2-6-1 PCT (Pre-Crystallization Test)

蛋白質溶液的濃度、沉澱劑的濃度、緩衝溶液的 pH 值以及鹽濃度都會影響晶體的生成，在測試晶體生長條件之前，可利用 PCT (Pre-Crystallization Test) 推測適合結晶的蛋白濃度，首先分別自四種不同試劑中各取 0.5 ml 於以塗好真空膠之養晶盤的圓格中，再各取 1 μ l 試劑與蛋白溶液點於矽化過之蓋玻片上，倒蓋於圓格上使之形成閉密空間，30 分鐘至 24 小時觀察蛋白沉澱情形。

2-6-2 晶體生長條件測試

養晶的原理主要是藉由適當濃度的沉澱劑及穩定的緩衝溶液條件，使蛋白緩慢進入過飽和狀態以利蛋白晶體的生成。本實驗主要使用的養晶方式為懸滴蒸氣擴散法 (hanging drop vapor diffusion) 以及坐式蒸氣擴散法 (sitting drop vapor diffusion)，蒸氣擴散法的原理為利用水分子蒸氣擴散的方式緩慢使蛋白溶液由未飽和進入過飽和狀態以增加蛋白結晶的機會 (圖 2-1)。

懸滴蒸氣擴散法之實驗方法為將結晶試劑取 200 μ l 於 24 孔盤 (VDX Plate, Hampton research) 的圓孔 (well) 中，在矽化好的蓋玻片上，以 1:1 的比例混合蛋白質溶液及市售的結晶試劑 (1x, 1/2x, 1/3x) 形成一個 drop 後，再將蓋玻片倒蓋在塗好

真空膠的圓孔上，形成一個密閉的空間，靜置於 4°C 培養，並在一週內每天觀察晶體成長的情形 (圖 2-2A)。

坐式蒸氣擴散法實驗方法為將結晶試劑取 500 μl 於 24 孔盤 (Sitting Drop Plate, Hampton research) 的底部圓孔，在圓孔座的凹槽上，以 1:1 的比例混合蛋白質溶液及市售的結晶試劑後，再以膠帶密封形成一個密閉的空間，靜置於 4°C 培養，並在一週內每天觀察晶體成長的情形 (圖 2-2B)。

本實驗所使用的養晶試劑 (crystallization kits) 有數種：Crystal Screen (HAMPTON)、Crystal Screen 2 (HAMPTON)、Natrix™-HR2-116 (HAMPTON)、Index™-HR2-144 (HAMPTON)、MembFac (HAMPTON)、Crystal Screen Lite (HAMPTON)、PEG/Ion (HAMPTON)、PEG/Ion 2 (HAMPTON)、SaltRx™ (HAMPTON)、Grid Screen (HAMPTON) 等。

2-6-3 微調養晶條件

結晶試劑中一般包含有三種成分：鹽、緩衝液與沉澱劑，以有晶體的結晶條件當作微調的基準點，固定鹽離子的成分，改變緩衝液的 pH 值與沉澱劑的濃度作二維的調整 (表 2-5)。

2-6-4 添加物試驗

當蛋白晶體的體積太小或是品質不好導致於單晶繞射解析度不好時，我們另外可以選擇使用最佳的養晶條件，再加入各種不同離子、有機溶劑、cofactor 等添加物 (Additive screens)，觀察是否可以幫助蛋白在晶體內穩定的堆積形成蛋白晶體。這些添加物主要分為兩種，一種為非揮發性添加物，使用時先取 4 μl 的 well solution 和 5 μl 的蛋白溶液後，再加入 1 μl 的添加物，其他步驟與原先養晶方式相同；另一種為揮發性添加物，直接將揮發性的添加物加入 well solution 內並使其為總體積的十分之一，混合後各別取 5 μl 的 well solution 和 5 μl 的蛋白質溶液 1:1 體積比

例，滴於矽化過的玻璃上並倒蓋懸掛於養晶盤上。

2-6-5 Seeding

利用 Seed Bead (HAMPTON) kit 中所提供的方法嘗試得到較大且品質較好的單晶，其步驟為首先選擇最佳晶體形成的養晶條件，取 2 μl 的結晶試劑和 2 μl 的蛋白溶液置於 sitting 養晶盤之凹槽中，加入 200 μl 結晶試劑於圓孔內，用膠帶密封，置於 4°C 平衡 12 小時；另外取出先前已生成之晶體置於 kit 所提供的管子內，管中含有 50 μl 的結晶試劑和 Seed Bead，震盪 90 秒後，加入 450 μl 的結晶試劑混合後，取 5 μl 置於 45 μl 結晶試劑中，重覆此步驟五次，作一系列連續的稀釋，將此六管稀釋後不同濃度的溶液取 0.5 μl 加至以平衡好的養晶盤中，置於 4°C 等待晶體的生成。

2-7 蛋白質晶體之 X-ray 繞射數據的分析與收集

2-7-1 蛋白質晶體冷凍保護 (cryo-protection)

X-ray 為高能量的光束線，如果直接將晶體進行 X-ray 繞射，則會產生許多自由基 (radicals) 而破壞晶體內部的組成分子規律性的排列，稱為 radiation damage，影響繞射數據的收集，一般都會使用液態氮將晶體冷凍保存以避免 radiation damage，也可以減少蛋白分子因為 X-ray 的熱而產生震動。晶體在液態氮進行急速冷凍前，須將晶體置換到含有抗凍劑成分的溶劑中，以避免蛋白分子周圍大量的水分子形成冰晶而破壞蛋白晶體。而一般抗凍劑成分為長晶的條件 (well solution) 在加上適當濃度的抗凍劑 (76)，例如：甘油、EG、PEG 400、PG、高鹽、油和醣類，其冷凍晶體的方法上有三種方式來進行：

(1) 快速轉移 (fast transfer)

將欲繞射蛋白質單晶 (single crystal) 用適當大小圈環 (loop) 撈至抗凍劑中數秒，

再將其迅速置於液態氮中冷凍。

(2) 漸進轉移 (slow transfer)

由於怕劇烈的環境改變造成晶體毀損，將晶體撈置含有較低成分抗凍劑並緩慢提高抗凍劑的成分，其步驟為首先將晶體置於晶體原先生存的條件，再加入等體積低濃度的抗凍劑，一分鐘後吸起一半的溶液，再放入等體積相同濃度抗凍劑總共三次，完成一次循環後，逐漸提高抗凍劑的成分，完成第二次循環，直到抗凍劑濃度提高到目標的濃度之後，最後一次放置三十分鐘，再以圈環取出晶體迅速置於液態氮中冷凍。

(3) 脫水 (dehydration)

有些晶體的含水量較高，繞射解析度不佳，可以利用緩慢提高抗凍劑濃度，使晶體在抗凍劑中慢慢脫水，降低晶體內的含水量，另一方面使晶體緩慢適應抗凍劑環境的改變，其步驟為首先將晶體置於晶體原先生存的條件，加入等體積低濃度的抗凍劑，半小時後吸起一半的溶液，再放入等體積次低濃度抗凍劑，重複步驟直到抗凍劑濃度提高到目標的濃度之後，最後一次放置 24 小時至 48 小時，再以圈環取出晶體迅速置於液態氮中冷凍。

2-7-2 單晶繞射實驗

數據的收集主要是利用台灣國家同步輻射中心13B1和13C1，以及日本SPRing-8 44XU的三條光束線進行晶體繞射點的收集，收集繞射結果圖後以HKL2000軟體將其數據化分析。首先，將一個空的圈環至於晶體旋轉台 (goniometer head) 上，由顯微鏡觀看圈環位置。先調整圈環巨觀位置再由微觀調整高低及水平位置，每旋轉 90°調整一次位置，直到圈環中心不會因為角度旋轉而離開旋轉軸中心。接著將含有晶體的圈環安置於晶體旋轉台 (goniometer head) 上，並由顯微鏡察看圈環位置。先調整圈環巨觀位置再由微觀調整高低及水平位置，每旋轉90°，調整一次位置，同樣直到圈環中心不會再因為角度的旋轉而離開旋轉軸中心為止。其後在數據收

集過程中，晶體皆以液態氮吹拂冷卻，以維持在 -174°C (MSC X-Stream Cryo-system)，此系統不但可以使晶體快速冷卻，避免晶體內的水分子結冰脹裂晶體並減少晶體因高能量的X光線所產生的傷害。

繞射數據的處理，利用area detector，CCD (charge coupled device)所收集到的數據，經過HKL2000軟體初步計算單位晶格維度 (Unit cell dimensions) 包括相互獨立的三軸 (a、b、c)、和其相互所夾的夾角 (α 、 β 、 γ)、所屬晶格 (Bravais lattice) 以及收集數據的起始角度收集度數，接著利用oscillation method收集完整的晶體繞射數據。收集到資料，利用DENZO分別計算每張繞射圖上各點的強度並做初步修正 (例如average the intensity of symmetry-related reflections及Lorentz factor)，再由程式計算每張繞射圖的scale factor (調整至每張image的強度相同)，最後合併計算。由軟體計算可得知晶體空間群 (Space group) 和單位晶格參數 (Cell parameters)。



三、結果

3-1 構築 pET15b-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 與 pET21d-N-His -AZ₁₁₉₋₂₂₈ 質體

使用 pET21b-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 質體為作為模版並以帶有適當限制酶 (restriction enzyme) *Nde* I 及 *Xho* I 切為的核酸作為引子，以 PCR 的方式增幅可得大小約為 330bp 的 AZ₁₁₉₋₂₂₈ 基因片段，並使用限制酶 *Nde* I 及 *Xho* I 切割後，接入以相同酵素切割的載體，可得 pET15b-AZ₁₁₉₋₂₂₈。此外將 pET15b-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 和 pET21d-N-His 載體以 *Nde* I 及 *Xho* I 酵素切割後進行連接反應可以得到 pET21d-N-His- AZ₁₁₉₋₂₂₈。

3-2 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體

3-2-1 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體的表現

ODC_{Δ299-310}由450個胺基酸組成，不具有6x Histidine tag，其分子量為49.97 kDa；AZ₁₁₀₋₂₂₈包含119個胺基酸組成，C端接入6x Histidine tag後共有125個胺基酸，其分子量為14.3 kDa。將pET21b-AZ₁₁₀₋₂₂₈與pET28a-ODC_{Δ299-310}同時轉型至*Escherichia coli* BL21(DE3)進行蛋白共表達後，以14% SDS-PAGE進行蛋白電泳分析，經過coomassie blue染色後觀察(圖3-1)。在IPTG誘導組中，可發現分子量45 kDa位置附近的蛋白含量明顯大於未誘導組，而14 kDa處蛋白誘導表現的現象則較不明顯。

3-2-2 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體的純化

大量表達 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 複合體之蛋白粗萃取液以親和性管柱 (Ni-affinity column) 進行初步純化，依照層析儀 UV 偵測器所顯示的 OD₂₈₀ 層析圖，將各吸收峰所對應的蛋白回收液，取適量以 14% SDS-PAGE 分析 (圖 3-2)。由 PAGE 圖顯示，在依序以含有 0 mM、15 mM 與 40 mM imidazole 之緩衝溶液沖提後，再以含有 500 mM imidazole 的緩衝溶液沖提可以得到大量的 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體，

由於 ODC_{Δ299-310} 不具有 6x Histidine tag，因此兩者共純化的現象顯示 ODC_{Δ299-310} 與 AZ₁₁₀₋₂₂₈ 的確如預期一般形成蛋白複合體。

由於經過鎳離子親合管柱純化後其純度尚為達養晶所需之 95%，於是再利用陰離子交換樹脂管柱 (Q-Sepharose column) 進一步純化，可以發現在含有百分之二十的 B buffer (NaCl 濃度約為 264 mM) 可以沖堤而得高純度的蛋白複合體 (圖 3-3)。

將經過陰離子交換樹脂管柱層純化的蛋白樣品以 Amicon ultra-30 (Millipore) 濃縮管濃縮至 1 ml，再利用分子篩管柱 (SuperdexTM 200) 進行純化，依據 UV 偵測器所顯示層析圖將吸收峰出現的位置所對應的蛋白回收液，同樣取適量利用 14% SDS-PAGE 進行蛋白質電泳分析 (圖 3-4)，結果顯示經此純化步驟後可收集到純度高達 99% 以上的 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體。另外將 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體與分子量標準樣品 (molecule weight standard; Bio-Rad) 在分子篩管柱層析圖上出現的位置 (圖 3-4) 比較發現，ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體吸收波峰的位置以異雙聚體 (heterodimer) 的形式存在。ODC_{Δ299-310} 與 AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白以 1:1 的比例形成複合體，由計算此複合體的分子量 (約為 75.8 kDa) 得知。

DLS 分析顯示 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體之粒徑大小平均為 6.316 nm，PDI 值為 0.218 (圖 3-5)。

3-2-3 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體的晶體培養與繞射數據分析

依據市售結晶試劑 PCT (Pre-Crystallization Test) 的測試結果，將蛋白質樣品的濃度調整至 6 mg/ml，再利用市售結晶試劑篩選合適的晶體培養條件，大約一週後在 4°C 恆溫的條件下結晶試劑 CSI No. 39、Index No. 3、Index No. 4、Index No. 5、Index No. 6、Index No. 27 (圖 3-6)、Natrix No. 27 以及 Natrix No. 30 (圖 3-7) 可發現微小的正方體晶體。CSI No. 39 經微調後，可培養出體積較大可進行 X-ray 繞射分析的晶體。此外，利用微調後最佳的養晶條件進行添加物試驗，也可以得到較多體積較大的晶體 (圖 3-7)。利用大小為 0.1-0.2 mm 的 loop 撈取晶體，再嘗試多種抗凍劑和

不同冷凍晶體的方式後，發現在將晶體以圈環取出後置於抗凍劑 (0.1 M HEPES Na (pH 7.5), 2.0 M ammonium sulfate, 2% v/v PEG 400, 30% Sucrose) 兩分鐘後，迅速以液態氮冷凍的效果較佳。而由繞射圖形可見解析度約達4.2 Å左右的繞射點，但由於此類晶體呈現多晶的繞射圖形，因此並無法得到有用的繞射數據 (圖3-8)。

3-3 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體

3-3-1 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體的表現

ODC_{Δ299-310} 分子量為49.97 kDa；AZ₁₁₉₋₂₂₈(I) 包含110個胺基酸，N端接入6x Histidine tag和protease thrombin的切位後共有131個胺基酸，其分子量為14.8 kDa。將pET15b-AZ₁₁₉₋₂₂₈與pET28a-ODC_{Δ299-310}同時轉型至*Escherichia coli* BL21(DE3)進行蛋白共表達後，以14% SDS-PAGE進行蛋白電泳分析，經過coomassie blue染色後觀察 (圖3-9)。在IPTG誘導組中，可發現分子量約45 kDa與14 kDa位置附近的蛋白表現量明顯大於未誘導組，表示ODC_{Δ299-310}與AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)皆在IPTG誘導下被大量表現，另外在小量破菌後，將菌體萃取液以離心方式區分為可溶及不可溶部份，由蛋白電泳分析可以看出ODC_{Δ299-310}與AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)皆為可溶性的蛋白。

3-3-2 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體的純化

大量表達 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I) 複合體之蛋白粗萃取液以親和性管柱 (Ni-affinity column) 進行初步純化，依照層析儀 UV 偵測器所顯示的 OD₂₈₀ 層析圖，將各吸收峰所對應的蛋白回收液，取適量以 14% SDS-PAGE 分析 (圖 3-10)。由 PAGE 圖顯示，在含有 75 mM imidazole (15% B buffer) 之緩衝溶液沖提下可以得到大量純度大於 95% 的 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I) 蛋白複合體。

將經過鎳離子親合性管柱層純化的蛋白樣品以 Amicon ultra-30 (Millipore) 濃縮管濃縮至 2 ml，再利用分子篩管柱 (SuperdexTM 200) 進行純化，依據 UV 偵測器

所顯示層析圖將吸收峰出現的位置所對應的蛋白回收液，同樣取適量利用 14% SDS-PAGE 進行蛋白質電泳分析(圖 3-11)。結果顯示經此純化步驟後可收集到純度大於 95%的 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體。另外將 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體與分子量標準樣品 (molecule weight standard ; Bio-Rad) 在分子篩管柱層析圖上出現的位置 (圖 3-11) 比較發現，ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體吸收波峰的位置以異雙聚體 (heterodimer) 的形式存在。ODC_{Δ299-310}與 AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白以 1:1 的比例形成複合體，由計算此複合體的分子量(約為 70.13 kDa)得知。

DLS分析顯示ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體之粒徑大小平均為10.96 nm，PDI值為0.372，顯示此蛋白複合體之均質性較低(圖3-12)。

3-3-3 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體的晶體培養

依據市售結晶試劑 PCT (Pre-Crystallization Test) 的測試結果，將蛋白質樣品的濃度調整至6 mg/ml，再利用市售結晶試劑篩選合適的晶體培養條件，觀察發現約一週到兩週後在4°C恆溫的條件下結晶試劑CSI No. 17、Natrix No. 18、Natrix No. 28、Natrix No. 40、Natrix No. 45 (圖3-13)、Index No. 5、SaltRx No. 62以及SaltRx No. 86 (圖3-14) 皆可看到蛋白晶體，大部分晶體的外觀與ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈晶體類似，皆為正方體型的晶型，但亦有其他外型的晶體。

為取得單晶，先將Natrix No. 18條件下形成的晶體利用細針切為單晶後，以大小為0.1-0.2 mm的loop撈取晶體，置於晶體原先生長的條件中，再加入等體積的抗凍劑 (0.01 M Magnesium acetate, 0.05 M Na cacodylate (pH 6.5), 1.3 M lithium sulfate, 5% Glycerol) 三十秒後，取出一半的溶液再加入等體積但含有10% Glycerol的抗凍劑，以每次增加 5% Glycerol為間距重覆此步驟直到Glycerol濃度達到30%，最後於含有30% Glycerol的抗凍劑中浸泡約三十分鐘，即可置於液態氮中冷凍。

SaltRx No. 62經微調後，可形成形狀較完整的正方體形晶體(圖3-14)。利用大小為0.3-0.4 mm的loop撈取晶體，將晶體以圈環取出後先置於晶體原先生長的條件

中，再加入等體積的抗凍劑 (0.1 M Bis-Tris Propane (pH 7.0), 1.5 M ammonium sulfate, 5% Glycerol) 三十分鐘後，取出一半的溶液再加入等體積但含有10% Glycerol的抗凍劑，以每次增加 5% Glycerol為間距重覆此步驟直到Glycerol濃度達到30%，最後於含有30% Glycerol的抗凍劑中浸泡十二個小時後，置於液態氮中冷凍。

3-3-4 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體的數據收集

將 Matrix No. 18 條件中形成的晶體利用國家同步輻射中心 13C1 光束線，進行晶體繞射數據的收集 (圖 3-15)。由繞射圖譜得知其解析度為 6.6 Å，經由 HKL2000 程式計算其晶型應屬於 Primitive tetragonal 晶系，晶胞參數為 a=b=268.0 Å，c=55.18 Å； $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ 。

SaltRx No. 62 產生的晶體利用日本 SPring 8 44XU 光束線，進行晶體繞射數據的收集。繞射圖譜的解析度約可達 4.5 Å，經由 HKL2000 程式計算得知其亦為 Primitive tetragonal 晶系，可能之空間群為 $P4_12_12$ ，晶胞參數與 Matrix No. 18 所得晶體無明顯差異。

3-4 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體

3-4-1 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體的表現

ODC 包含 461 個胺基酸，不具有 6x Histidine tag，分子量為 51.25 kDa；而 AZ₁₁₉₋₂₂₈(I) 分子量為 14.8 kDa。將 pET15b-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 與 pET28a-ODC 同時轉型至 *Escherichia coli* BL21(DE3) 進行蛋白共表達後，以 14% SDS-PAGE 進行蛋白電泳分析，經過 coomassie blue 染色後觀察 (圖 3-8)。在 IPTG 誘導組中，可發現分子量約 45 kDa 與 14 kDa 位置附近的蛋白含量明顯大於未誘導組，表示 ODC 與 AZ₁₁₉₋₂₂₈(I) 皆在 IPTG 誘導下被大量表現，另外在小量破菌後，將菌體萃取液以離心方式區分為可溶及不可溶部份，由蛋白電泳分析可以看出 ODC 與 AZ₁₁₉₋₂₂₈(I) 皆為可溶性的蛋白。

3-4-2 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體的純化

大量表達 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體之蛋白粗萃取液以親和性管柱 (Ni-affinity column) 進行初步純化，依照層析儀上 UV 偵測器所顯示的 OD₂₈₀ 層析圖，將各吸收峰所對應的蛋白回收液，取適量以 14% SDS-PAGE 分析 (圖 3-16)。結果顯示，在含有 100 mM imidazole (25% B buffer) 之緩衝溶液沖提下可以得到大量純度大於 95% 的 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體。

將經過鎳離子親合性管柱層純化的蛋白樣品以 Amicon ultra-30 (Millipore) 濃縮管濃縮至 5 ml，再利用分子篩管柱 (Superdex™ 200) 進行純化，依據 UV 偵測器所顯示層析圖將吸收峰出現的位置所對應的蛋白回收液，同樣取適量利用 14% SDS-PAGE 進行蛋白質電泳分析 (圖 3-17)。結果顯示經此純化步驟後可收集到純度大於 95% 的 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體。另外將 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體與分子量標準樣品 (molecule weight standard ; Bio-Rad) 在分子篩管柱層析圖上出現的位置 (圖 3-17) 比較發現，ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體吸收波峰的位置以異雙聚體 (heterodimer) 的形式存在。ODC 與 AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白以 1:1 的比例形成複合體，由計算此複合體的分子量 (約為 64.93 kDa) 得知。

DLS 分析顯示 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體之粒徑大小平均為 7.148 nm，PDI 值為 0.376，顯示此蛋白複合體之均質性較低 (圖 3-18)。

3-4-3 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I) 蛋白複合體的晶體培養

依據市售結晶試劑 PCT (Pre-Crystallization Test) 的測試結果，將蛋白質樣品的濃度調整至 6 mg/ml，再利用市售結晶試劑篩選合適的晶體培養條件，觀察發現約一週後在 4°C 恆溫的條件下結晶試劑 CSI No. 16、CSI No. 33、CSI No. 39、CSII No. 42、Index No. 67、Index No. 76 (圖 3-19 至圖 3-22) 可看到不同晶形的晶體。

依不同的晶體生成的成分分別進行微調，將 CSI No. 16 進行 Seeding 實驗後可以得到較大的晶體，將 CSI No. 33 以蛋白溶液比養晶溶液進行不同體積的比例，1：

1.5、1.5：1、2：1和1：2發現在蛋白溶液比養晶溶液1.5：1的條件下可以有大的晶體產生，而晶體會因平衡時間增長而逐漸變大(圖 3-19)。Index No. 67和Index No. 76條件中生成的多晶晶體簇，進行初步微調之後可以看到形狀漂亮的長方柱狀單晶(圖3-20、圖3-22)，利用微調後最佳的養晶條件分別進行添加物試驗以及Seeding實驗，可得到體積較大的晶體(圖3-21、圖3-23)。

CSI No. 16條件所生成的晶體，利用圈環撈取晶體置於晶體原先生長的條件中，再加入等體積的抗凍劑(0.1 M HEPES Na (pH 7.5), 1.5 M lithium sulfate monohydrate, 5% Glycerol) 三十分鐘後，取出一半的溶液再加入等體積但含有10% Glycerol的抗凍劑，以每次增加5% Glycerol為間距重覆此步驟直到Glycerol濃度達到30%，最後於含有30% Glycerol的抗凍劑中浸泡十二個小時後，置於液態氮中冷凍。

利用Index No.76微調後之最佳條件進行添加物試驗，在有晶體生成的條件中先加入10 μ l相同結晶試劑，再取出10 μ l，加入10 μ l抗凍劑(0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M HEPES Na (pH 7.5), 23% w/v PEG 3350, 5% Glycerol) 三十分鐘後，取出一半的溶液再加入等體積但含有10% Glycerol的抗凍劑，以每次增加5% Glycerol為間距重覆此步驟直到Glycerol濃度達到30%，即可置於液態氮中冷凍。

此外，為了要確定晶體是否為ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體的蛋白結晶，將單晶取出並利用結晶試劑浸洗五次，去除結晶表面附著的可溶蛋白質後，將晶體溶於二次水中與coomassie blue混合進行SDS-PAGE確認，由PAGE圖可以看到ODC與AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)的色帶(圖3-24)，證實此確為複合體的晶體。

3-4-4 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體的數據收集與初步結構解析

將CSI No. 16的晶體利用日本SPring 8 44XU光束線，進行晶體繞射數據的收集。由繞射圖譜得知解析度為4.0 Å，經由HKL2000程式計算為Primitive tetragonal晶系，空間群為 $P4_12_12$ ，晶胞參數為 $a=b=266.64$ Å， $c=52.37$ Å； $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ 。

Index No.76添加物試驗所產生的晶體利用國家同步輻射中心13B1光束線，進

行晶體繞射數據的收集。繞射圖譜的解析度約可達 3.2 Å (圖 3-25)，經由 HKL2000 程式計算得知其亦為 Primitive tetragonal 晶系，空間群為 $P4_12_12$ ，晶胞參數與 CSI No.16 所得晶體無明顯差異。此外，添加物試驗中 No. 6, No. 27 以及 No. 49 其晶體解析度都可達到 3.2-3.3 Å。

ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體晶體之含水量經過網站預測的分析為 63.62%， V_m 值為 3.38 Å³/Da，每一個不對稱單元內含有兩個複合體分子。數據化後的繞射結果以已知之 ODC (II) 與 AZ (68) 的結構作為 search models，配合 Molecular Replacement 的方式解析 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 複合體的結構，可以看到兩個 ODC 的分子在一個不對稱單元中以背對背的方式堆疊(圖 3-26)，此結構與活性型 ODC 雙聚體 head-to-tail 的方式差異極大，此外，在 ODC 之電子密度圖附近可看到零散的電子密度，推測可能是 AZ 蛋白所在的地方(圖 3-26)。

3-4-5 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體的晶體培養

將 pET15b-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 與 pET28a-ODC 同時轉型至 *Escherichia coli* B834(DE3) 進行蛋白共表達後，依照與 native 相同的方式進行複合體純化，利用 6 mg/ml 濃度，以 Index No. 66、Index No. 67、Index No. 75 以及 Index No. 76 為基準進行添加物試驗，兩週後尚無晶體生成，且多數條件為沉澱。

3-5 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體

3-5-1 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體的表現

ODC_{Δ299-310} 分子量為 49.97 kDa；AZ₁₁₉₋₂₂₈(II) 由 110 個胺基酸組成，N 端接入 6x Histidine tag 共有 116 個胺基酸，其分子量為 13.5 kDa。將 pET21d-N-H-His-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 與 pET28a-ODC_{Δ299-310} 同時轉型至 *Escherichia coli* BL21(DE3) 進行蛋白共表達後，以 14% SDS-PAGE 進行蛋白電泳分析，經過 coomassie blue 染色後觀察(圖 3-27)，在

IPTG誘導組中，可發現分子量約45 kDa與14 kDa位置附近的蛋白含量明顯大於未誘導組，表示ODC_{Δ299-310}與AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)皆在IPTG誘導下被大量表現，另外在小量破菌後，將菌體萃取液以離心方式區分為可溶及不可溶部份，由蛋白電泳分析可以看出ODC_{Δ299-310}與AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)皆為可溶性的蛋白。

3-5-2 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體的純化

大量表達 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)複合體之蛋白粗萃取液以親和性管柱(Ni-affinity column)進行初步純化，依照層析儀UV偵測器所顯示的OD₂₈₀層析圖，將各吸收峰所對應的蛋白回收液，取適量以14% SDS-PAGE分析(圖3-28)。結果顯示，在高於100 mM imidazole之緩衝溶液沖提下可以得到大量純度大於90%的ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體。

將經過鎳離子親合性管柱層純化的蛋白樣品以Amicon ultra-30 (Millipore)濃縮管濃縮至5 ml，再利用分子篩管柱(Superdex™ 200)進行純化，依據UV偵測器所顯示層析圖將吸收峰出現的位置所對應的蛋白回收液，同樣取適量利用14% SDS-PAGE進行蛋白質電泳分析(圖3-29)。結果顯示經此純化步驟後可收集到純度大於95%的ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體。另外將ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體與分子量標準樣品(molecule weight standard; Bio-Rad)在分子篩管柱層析圖上出現的位置(圖3-29)比較發現，ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體吸收波峰的位置以異雙聚體(heterodimer)的形式存在。ODC_{Δ299-310}與AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白以1:1的比例形成複合體，由計算此複合體的分子量(約為75.75 kDa)得知。

3-5-3 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體的晶體培養

依據市售結晶試劑PCT(Pre-Crystallization Test)的測試結果，將蛋白質樣品的濃度調整至6 mg/ml，並利用市售結晶試劑篩選合適的晶體培養條件，根據觀察一週後發現在4°C恆溫的條件下只有結晶試劑Index No. 5(圖3-30)在沉澱中有類似方

形的晶體生成，但是其餘養晶條件中大約有70–80%皆形成沉澱，於是再以3、4 mg/ml的蛋白樣品進行PCT測試，最後選擇將晶體培養的蛋白濃度降至4 mg/ml，重新利用市售結晶試劑篩選合適的晶體培養條件，一週後在4°C恆溫的條件下結晶試劑Index No. 4、Index No. 5、GS221 No. 23和GS211 No. 12 (圖3-30) 可發現微小的正方體晶體，但其晶型與ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈晶型一樣且大多數為多晶。

3-6 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體

3-6-1 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體的表現

ODC 分子量為 51.25 kDa；AZ₁₁₉₋₂₂₈(II) 分子量為 13.5 kDa。將 pET21d-N-H-His-AZ₁₁₉₋₂₂₈與pET28a-ODC同時轉型至*Escherichia coli* BL21(DE3)進行蛋白共表達後，以14% SDS-PAGE進行蛋白電泳分析，經過coomassie blue染色後觀察(圖3-27)。在IPTG誘導組中，可發現分子量約45 kDa與14 kDa位置附近的蛋白含量明顯大於未誘導組，表示ODC與AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)皆在IPTG誘導下被大量表現，另外在小量破菌後，將菌體萃取液以離心方式區分為可溶及不可溶部份，由蛋白電泳分析可以看出ODC_{Δ299-310}與AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)皆為可溶性的蛋白。

3-6-2 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II) 蛋白複合體的純化

大量表達 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)複合體之蛋白粗萃取液以親和性管柱 (Ni-affinity column) 進行初步純化，依照層析儀 UV 偵測器所顯示的 OD₂₈₀層析圖，將各吸收峰所對應的蛋白回收液，取適量以 14% SDS-PAGE 分析 (圖 3-31)。由 PAGE 圖顯示，在高於 80 mM imidazole (15% B buffer) 之緩衝溶液沖提下可以得到大量純度高於 95%的 ODC -AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體。

將經過鎳離子親合性管柱層純化的蛋白樣品以 Amicon ultra-30 (Millipore) 濃縮管濃縮至 5 ml，再利用分子篩管柱 (SuperdexTM 200) 進行純化，依據 UV 偵測器

所顯示層析圖將吸收峰出現的位置所對應的蛋白回收液，同樣取適量利用 14% SDS-PAGE 進行蛋白質電泳分析(圖 3-32)。結果顯示經此純化步驟後可收集到純度大於 95%的 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體。另外將 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體與分子量標準樣品 (molecule weight standard ; Bio-Rad) 在分子篩管柱層析圖上出現的位置(圖 3-32)比較發現，ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體吸收波峰的位置以異雙聚體的形式存在。ODC 與 AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白以 1:1 的比例形成複合體，由計算此複合體的分子量(約為 75.75 kDa)得知。

3-6-3 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體的晶體培養與繞射數據分析

依據市售結晶試劑 PCT (Pre-Crystallization Test) 的測試結果，將蛋白質樣品的濃度調整至 6 mg/ml，並利用市售結晶試劑篩選合適的晶體培養條件，觀察發現約一週後在 4°C 恆溫的條件下只有結晶試劑 CSI No. 39 和 CSII No. 23 (圖 3-33) 在沉澱中有類似晶體生成，但是其餘養晶條件中大約有 70-80% 皆形成沉澱，於是再以 3、4 mg/ml 的蛋白樣品進行 PCT 測試，最後選擇將晶體培養的蛋白濃度降至 4 mg/ml，重新利用市售結晶試劑篩選合適的晶體培養條件，一週後在 4°C 恆溫的條件下結晶試劑 CSI No. 38、CSII No. 14、GS217 No. 15 (圖 3-33)、Index No. 4、Index No. 29、Index No. 66 和 Index No. 75 (圖 3-34) 有不同晶型的晶體生成。

Index No. 66、Index No. 67、Index No. 75 及 Index No. 76 (圖 3-34) 經微調後，可形成形狀較完整的長方柱狀晶體。將 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II) 長方柱單晶嘗試與 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I) 晶體相同抗凍方式，再進行 X-ray 繞射分析 (圖 3-35)，其繞射點的解析度低於 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I) 之晶體，因此不再做進一步的嘗試。

3-6-4 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體的晶體培養

將 pET21d-N-H-His-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 與 pET28a-ODC 同時轉型至 *Escherichia coli* B834(DE3) 進行蛋白共表達後，依照與 native 相同的方式進行複合體純化，並以 4 mg/ml 濃度進

行晶體培養，可在CSI No. 39、Index No. 3以及Grid Screen Ammonium Sulfate kit D5中發現蛋白晶體，但都沒有形狀完整的單晶（圖3-36）。利用native晶體生成的條件進行微調後可在0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), 25% w/v PEG 3350中看到長方柱狀的單晶生成（圖3-36），經由X-ray繞射分析其解析度為4.5-5 Å。

3-7 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體

3-7-1 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的表現

將pQE30-AZ₉₅₋₂₂₈與pET28a-ODC_{Δ299-310}共同轉型至*Escherichia coli* BL21(DE3)進行共表達後，以14% SDS-PAGE進行蛋白電泳分析，經過coomassie blue染色後觀察（圖3-37），在IPTG誘導組中，可發現分子量約45 kDa與16 kDa位置附近的蛋白含量明顯大於未誘導組，表示ODC_{Δ299-310}與AZ₉₅₋₂₂₈皆在IPTG誘導下被大量表現，另外在小量破菌後，將菌體萃取液以離心方式區分為可溶及不可溶部份，由蛋白電泳分析可以看出ODC_{Δ299-310}與AZ₉₅₋₂₂₈皆為可溶性的蛋白。

3-7-2 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的純化

大量表達 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 複合體之蛋白粗萃取液以親和性管柱 (Ni-affinity column) 進行初步純化，依照層析儀 UV 偵測器所顯示的 OD₂₈₀ 層析圖，將各吸收峰所對應的蛋白回收液，取適量以 14% SDS-PAGE 分析（圖 3-38）。由 PAGE 圖顯示，在高於 25 mM imidazole 之緩衝溶液沖提下可以得到大量純度大於 90%的 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體。

將經過鎳離子親合性管柱層純化的蛋白樣品以 Amicon ultra-30 (Millipore) 濃縮管濃縮至 5 ml，再利用分子篩管柱 (SuperdexTM 200) 進行純化，依據 UV 偵測器所顯示層析圖將吸收峰出現的位置所對應的蛋白回收液，同樣取適量利用 14% SDS-PAGE 進行蛋白質電泳分析（圖 3-39）。結果顯示經此純化步驟後可收集到純度

大於 95%的 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體。另外將 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體與分子量標準樣品 (molecule weight standard ; Bio-Rad) 在分子篩管柱層析圖上出現的位置 (圖 3-39) 比較發現，ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體吸收波峰的位置以異雙聚體 (heterodimer) 的形式存在。ODC_{Δ299-310} 與 AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白以 1:1 的比例形成複合體，由計算此複合體的分子量 (約為 64.93 kDa) 得知。

DLS 分析顯示 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體之粒徑大小平均為 4.211 nm，PDI 值為 0.002，顯示此蛋白複合體之均質性高 (圖 3-40)。

3-7-3 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的晶體培養

依據市售結晶試劑 PCT (Pre-Crystallization Test) 的測試結果，將蛋白樣品的濃度調整至 10 mg/ml，並利用市售結晶試劑篩選合適的晶體培養條件，觀察一週後在 4°C 的恆溫條件下並未發現晶體的生成，且大部分的條件皆出現沉澱，於是再以 6 mg/ml 的蛋白樣品，重新利用市售結晶試劑篩選合適的晶體培養條件，觀察兩週後在 4°C 的恆溫條件下並未發現晶體的生成，而大部分的條件皆出現澄清。

3-8 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體

3-8-1 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的表現

將 pQE30-AZ₉₅₋₂₂₈ 與 pET28a-ODC 同時轉型至 *Escherichia coli* BL21(DE3) 進行蛋白共表達後，以 14% SDS-PAGE 進行蛋白電泳分析，經過 coomassie blue 染色後觀察 (圖 3-37)，在 IPTG 誘導組中，可發現分子量約 45 kDa 與 16 kDa 位置附近的蛋白含量明顯大於未誘導組，表示 ODC 與 AZ₉₅₋₂₂₈ 皆在 IPTG 誘導下被大量表現，另外在小量破菌後，將菌體萃取液以離心方式區分為可溶及不可溶部份，由蛋白電泳分析可以看出 ODC 與 AZ₉₅₋₂₂₈ 皆為可溶性的蛋白。

3-8-2 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的純化

大量表達 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 複合體之蛋白粗萃取液以親和性管柱 (Ni-affinity column) 進行初步純化，依照層析儀 UV 偵測器所顯示的 OD₂₈₀ 層析圖，將各吸收峰所對應的蛋白回收液，取適量以 14% SDS-PAGE 分析 (圖 3-41)。結果顯示，在高於 25 mM imidazole 之緩衝溶液沖提下可以得到大量純度大於 95% 的 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體。

將經過鎳離子親合性管柱層純化的蛋白樣品以 Amicon ultra-30 (Millipore) 濃縮管濃縮至 5 ml，再利用分子篩管柱 (Superdex™ 200) 進行純化，依據 UV 偵測器所顯示層析圖將吸收峰出現的位置所對應的蛋白回收液，同樣取適量利用 14% SDS-PAGE 進行蛋白質電泳分析 (圖 3-42)。結果顯示經此純化步驟後可收集到純度大於 95% 的 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體，另外將 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體與分子量標準樣品 (molecule weight standard ; Bio-Rad) 在分子篩管柱層析圖上出現的位置 (圖 3-42) 比較發現，ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體吸收波峰的位置以異雙聚體 (heterodimer) 的形式存在。ODC 與 AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白以 1:1 的比例形成複合體，由計算此複合體的分子量 (約為 64.93 kDa) 得知。

DLS 分析顯示 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體之粒徑大小平均為 4.371 nm，PDI 值為 0.023，顯示此蛋白複合體之均質性高 (圖 3-43)。

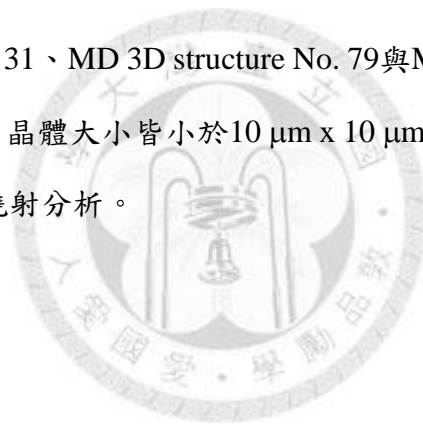
3-8-3 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的晶體培養

依據市售結晶試劑 PCT (Pre-Crystallization Test) 的測試結果，將蛋白質樣品濃度調整至 10 mg/ml，並利用市售結晶試劑篩選合適的晶體培養條件，觀察大約一週後在 4°C 恆溫的條件下許多條件皆有不同形狀之晶體生成 (圖 3-44、圖 3-45)，除了 CS Lite No.40 與 Natrix No.15 條件中產生約為 50 μm x 50 μm x 10 μm 的六邊形體晶體，其於條件所生成之晶體大小皆小於 10 μm x 10 μm x 10 μm，CS Lite No.40 所生成之晶體繞射解析度約為 9 Å (圖 3-47)。

CS Lite No. 40、Natrix No. 16 Index No. 85與Index No. 50經過微調之後，目前尚未得到較大的晶體，其中CS Lite No. 40再嘗試4°C、12°C與21°C不同溫度恆溫的微調後，發現21°C所生成的晶體會較4°C與12°C所生成的晶體大，但依舊無法進行完整繞射數據的收集。

3-8-4 含 Se-Methionine 標定 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 蛋白複合體的晶體培養

將pQE30-AZ₉₅₋₂₂₈與pET28a-ODC同時轉型至*Escherichia coli* B834(DE3)進行蛋白共表達後，依照與Native相同的方式進行複合體純化，並以10 mg/ml濃度進行晶體培養，觀察大約一週後在4°C恆溫條件下在CSI No. 6、CSI No. 9、CS Lite No. 40、Natrix No. 3、PEGRx 2 No. 6、Index No. 51、Index No. 85、MD Structure Screen I No. 16、EB Cryo Screen I No. 31、MD 3D structure No. 79與MD 3D structure No. 84條件中發現微小的蛋白晶體，晶體大小皆小於10 μm x 10 μm x 10 μm (圖3-46)，其極微小之晶體無法進行x-ray繞射分析。



四、討論

文獻指出 AZ 與 ODC 的結合區域主要位於 AZ 蛋白的 C 端片段 (68)，因此本篇論文主要利用 AZ 不同的 N 端刪除突變蛋白 (AZ₁₁₀₋₂₂₈、AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)、AZ₁₁₉₋₂₂₈(II) 以及 AZ₉₅₋₂₂₈)，分別與野生型 ODC 以及刪去結構中不規則區域之突變型 ODC_{Δ299-310} 以不同排列組合形成複合體 (圖 4-1)，以提高我們得到高品質蛋白複合體晶體的機會，再利用 X-ray 繞射解析 ODC-AZ 複合體的蛋白結構。

4-1 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體

由實驗室林婉婷學姐的論文中可知 ODC-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 複合體無法得到晶體 (80)。而本篇論文首先發現在 pH 5.5 到 8.5 以及含有 1.4 M 到 2.0 M Ammonium sulfate 的結晶試劑中可以得到正方體型的 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 複合體晶體，嘗試微調與添加物測試實驗後，可以得到較大且形狀完整的單晶。然而，大多數的 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 複合體晶體在嘗試以不同種類與濃度的抗凍劑與抗凍方式處理後，繞射解析度大約僅在 8 到 9 Å，唯有將晶體置於 30% 蔗糖抗凍劑兩分鐘後，直接凍於液態氮中，可得到解析度約為 4.2 Å 的 X-ray 繞射圖譜，但由於圖譜呈現多晶的現象，因此無法進行數據的收集，而這樣的繞射解析度在相同實驗條件下再現性不高。

4-2 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I) 蛋白複合體與 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I) 蛋白複合體

經由蛋白酶水解 (proteolysis) 實驗分析，其 AZ 蛋白 110 到 118 部分的胺基酸結構並不穩定 (80)。由於此區域不影響 AZ 與 ODC 的結合，因此本實驗室做了刪去 AZ 之 N 端 118 個胺基酸的突變蛋白，稱為 AZ₁₁₉₋₂₂₈ 蛋白。C 端帶有 His-tag 的 AZ₁₁₉₋₂₂₈ 與 ODC 蛋白形成複合體後，在鎳離子親合性管柱中無法被純化出，於是將 AZ₁₁₉₋₂₂₈ DNA 片段接至 pET15b 的載體中，使 AZ₁₁₉₋₂₂₈ 蛋白 N 端帶有 His-tag，

稱為 AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)·ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體與 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體純化的步驟比 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 複合體更為簡單，只需經過鎳離子親合性管柱與分子篩管柱即可得到高純度的蛋白。此外，ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體的晶體與 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體的晶體相較，ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)繞射解析度更好，在 CSI No.16 (0.1 M HEPES Na (pH 7.5), 1.5 M lithium sulfate monohydrate) 條件下可以得到 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體的正方體型單晶，此繞射圖譜之解析度可達到 3.7 Å 左右的繞射點，但晶體 mosaicity 高，而使完整的數據解析度只能達到 4.0 Å。

在 Heras 等人發表的文獻中指出，可以利用數種方式改善晶體排列的整齊度，包含 crystal annealing、crystal dehydration 以及 cross-linking 等方式 (77-78)。而本實驗嘗試了數種方法。首先，我們利用甘油當作抗凍劑並使晶體進行適度的脫水，希望使晶體的含水量下降，以幫助蛋白堆積更緊密，進而改善晶體的繞射解析度。而 cross-linking 和以不同時間進行 anneal 的方法則無法改善 mosaicity 的問題。

真核生物中，胞內多元胺濃度高時，會使 ODC 與 AZ 的結合更為穩定，抑制 ODC 的活性並促使其降解，因此我們也嘗試在結晶條件中額外添加最終濃度 10 mM 之多元胺 (如亞精胺與精胺) 增加 ODC-AZ 蛋白複合體的穩定度，結果發現晶體容易形成多晶，在利用細針分割取單晶進行 x-ray 繞射實驗，得知其繞射解析度沒有改善。

將可形成 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體晶體的其它結晶條件進行微調，在 Index No. 67 (0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), 25% w/v PEG 3350) 與 Index No. 76 (0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M HEPES Na (pH 7.5), 25% w/v PEG 3350) 微調之後可以看到晶體外觀與大小明顯改善，然而嘗試快速轉移、漸進轉移與脫水的抗凍方式與不同的抗凍劑成分皆不適用於此類晶體，最後發現必須以 5% 甘油為起點，以一次增加 5% 甘油，每次三十分鐘為間距，逐步將甘油濃度提高至 30% 再進行冷凍，其繞射解析度可達 4.0 Å。接著將微調後最好的條件進行添加物試驗，約一個月後可在加入氯化鎂的條件中，得到大於 0.5 mm × 0.5 mm × 1 mm 的晶體，

可能是添加物中的鎂離子或氯離子穩定了ODC-AZ複合體的蛋白堆積，令人訝異的是此條件所生成的晶體在anneal 3秒鐘之後，可以降低其mosaicity，繞射解析度達到3.2 Å。

利用已解析出的人類 ODC 結構當為模版 (template) (11)，嘗試以 molecular replacement 的技術解析 ODC-AZ 複合體的結構，結果顯示 ODC 在晶格中排列的情形和 ODC 雙聚體的結構截然不同，可知 AZ 的結合的確能影響 ODC 雙聚體的形成。若將人類 ODC 與老鼠 AZ 蛋白的結構同時作為模版進行 molecular replacement (68)，在一個不對稱單元中我們可以決定兩個 ODC 分子的位置，但僅能找到一個 AZ 蛋白分子。有時程式亦能找到兩個 AZ 蛋白，但兩者相對於 ODC 的位置並不一樣，且利用不同套數據所得到的 AZ 蛋白位置皆不相同。為進一步驗證 AZ 位置的正確性，我們以同一組數據 (解析度原為 3.2 Å) 利用不同解析度的數據 (3.4、3.6、4.0、4.2 以及 4.4 Å) 進行 molecular replacement，所找到的 ODC 與 AZ 位置皆具再現性，因此，本研究所得的模型極可能是 ODC-AZ 複合體的初步結構，與 2009 年 Cohavi 等人所 docking ODC-AZ 複合體 model 進行結構重疊後 (圖 4-2)，可以發現兩者 AZ 蛋白之空間位置並不相同。由於 molecular replacement 所得到結果之 R_{free} 值為 49.61%，顯示此結構仍需進一步的修正，或需搭配其它的方法進一步解析複合體的結構。

4-3 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體與 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體

為了增加蛋白分子於晶體中排列的規律性，以提高繞射解析度，我們認為也許可以在 His tag 上做修飾，由於原先接在 pET15b 載體上的 AZ₁₁₉₋₂₂₈ DNA，其與 N 端 His-tag 間存在一個由 11 個胺基酸組成且沒有特定結構的 thrombin 切位，於是我們重新設計一個 His-tag 可直接連結至 AZ₁₁₉₋₂₂₈ 的 N 端 (圖 4-3)，稱為 AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)，希望能增加晶體的品質。

AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)分別與 ODC_{Δ299-310} 以及 ODC 進行純化與結晶之後發現，其蛋白的

溶解度下降，相較於先前複合體利用 6 mg/ml 進行養晶， $ODC_{\Delta 299-310}-AZ_{119-228}(II)$ 與 $ODC-AZ_{119-228}(II)$ 複合體僅能以 4 mg/ml 進行養晶。 $ODC_{\Delta 299-310}-AZ_{119-228}(II)$ 複合體的結晶條件大都以 ammonium sulfate 作為沉澱劑，且晶體呈現多晶的現象，無法進行繞射解析。 $ODC-AZ_{119-228}(II)$ 複合體的晶體之結晶條件較 $ODC-AZ_{119-228}(I)$ 複合體少，取單晶進行 X-ray 繞射解析之後，繞射解析度並無預期的改善，晶體之空間群組亦沒有發生改變。

4-4 $ODC_{\Delta 299-310}-AZ_{95-228}$ 蛋白複合體與 $ODC-AZ_{95-228}$ 蛋白複合體

藉由不同真核生物間 AZ 蛋白胺基酸序列比對，其 C 端片段 (胺基酸 95 到 218) 間具有高度的保留性，此段區域可能具有其重要性 (圖 4-4)。此外，老鼠 AZ 結構中胺基酸 95 到 142 的片段會形成 β -sheet，並與結構中的其它部份發生交互作用 (圖 4-5) (68)，刪除 95 到 118 個胺基酸可能會破壞此二級結構，而造成 AZ 蛋白的不穩定。根據以上兩種原因，本篇論文選擇使用 AZ_{95-228} 分別與 $ODC_{\Delta 299-310}$ 和 ODC 進行實驗，在得到高純度的蛋白複合體後，分別進行 DLS 分析，結果顯示兩者 PDI 皆小於 0.1，表示此複合體均質性與穩定度均較 $ODC-AZ_{119-228}$ 高，並且在 PCT 的實驗中發現 $ODC-AZ_{95-228}$ 複合體溶解度比先前的複合體明顯提高許多。

在 $ODC-AZ_{95-228}$ 複合體方面，已經成功鑑定其可能的結晶條件，並且其晶型與先前得到的複合體晶型完全不同，由於目前晶體之體積極小 ($50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$)，X-ray 繞射解析度僅能達到 9 \AA ，目前的微調方式依舊未能得到較大的晶體，未來可以嘗試更多的微調與添加物試驗等結晶方式改善晶體大小。

圖

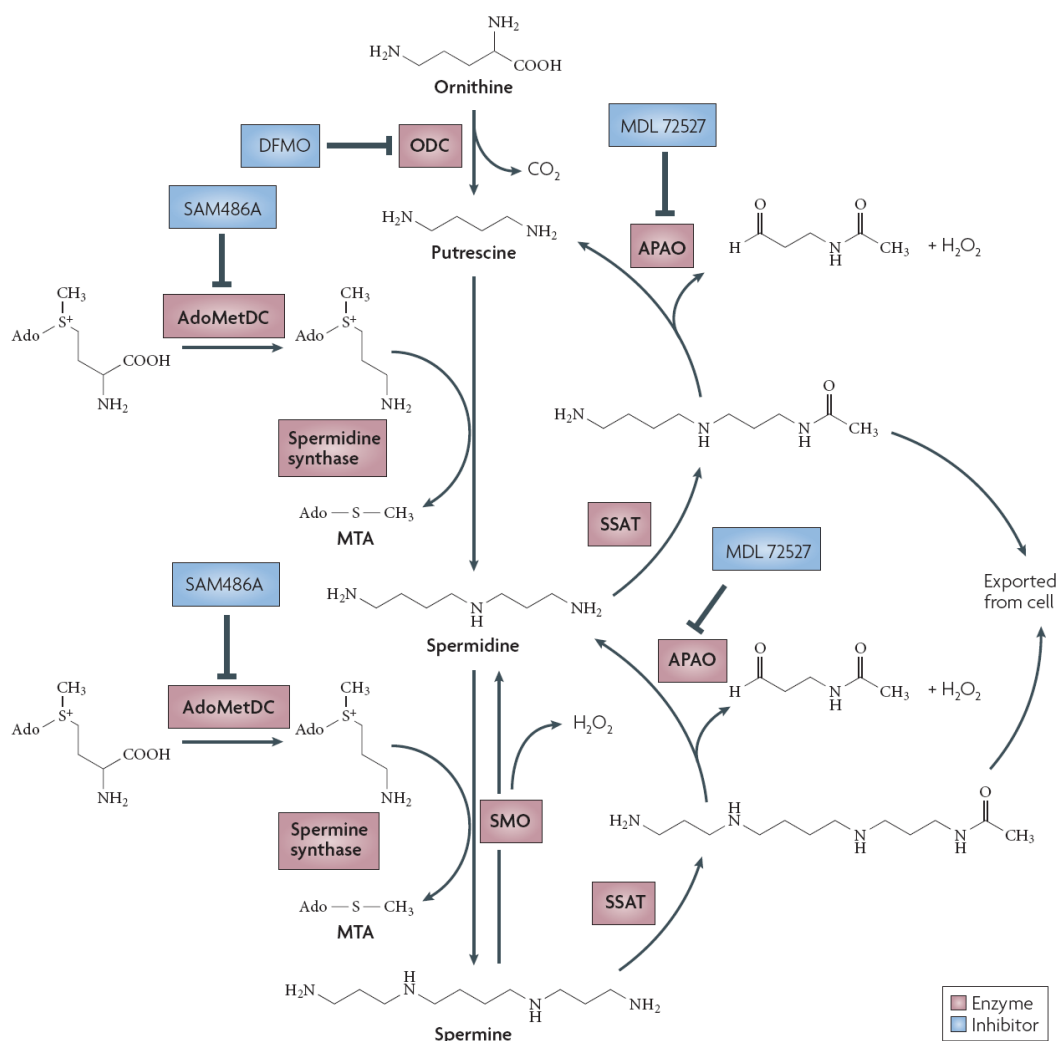


圖 1-1 多元胺代謝路徑

鳥胺酸脫羧酶 (Ornithine decarboxylase, ODC) 為催化胞內多元胺生合成途徑之第一步驟與速率限制決定的酵素，ODC 可以將鳥胺酸脫羧得到腐胺，再依序經由亞精胺合成酶 (spermidine synthase) 和精胺合成酶 (spermine synthase) 合成分子量較大的亞精胺及精胺。亞精胺與精胺可以被亞精胺/精胺乙醯轉移酶 (spermidine/spermine N¹-acetyltransferase, SSAT) 催化與 acetyl-CoA 結合，產生乙醯化的亞精胺與乙醯化的精胺再被運送至胞外。乙醯化的產物可經由多元胺氧化酶 (N¹-acetylpolyamine oxidase, APAO) 將乙醯基去除產生分子量較小的多元胺類 (Roberts et al., 2007)。

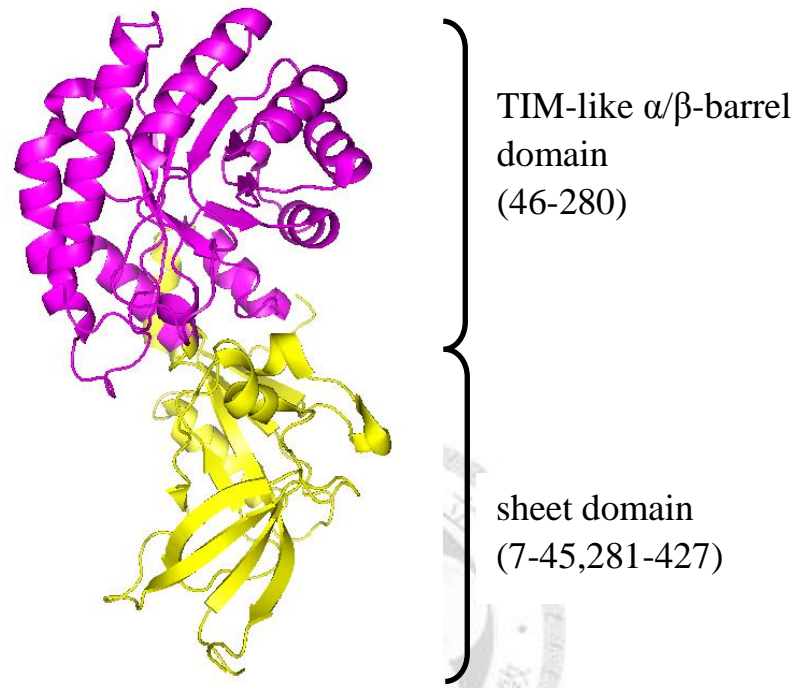


圖 1-2 人類鳥胺酸脫羧酶單體結構

ODC 單體結構包含兩個 domains，胺基酸 46 到 280 個形成 TIM-like α/β -barrel domain，活性中心可與輔酶 PLP 結合；胺基酸 7 到 45 個以及 281 到 427 形成由兩個 β -sheet 和兩個 α -helices 共同組成的 sheet domain。(PDB: 1D7K) (Almud et al., 2000)

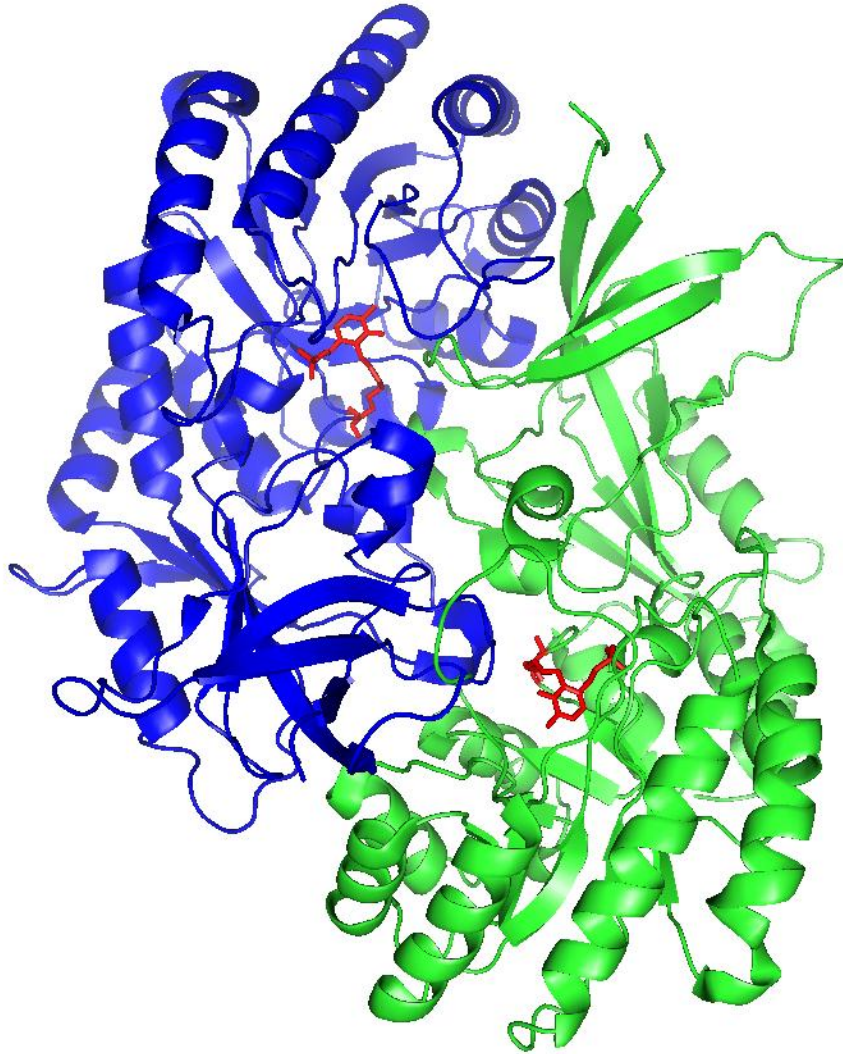
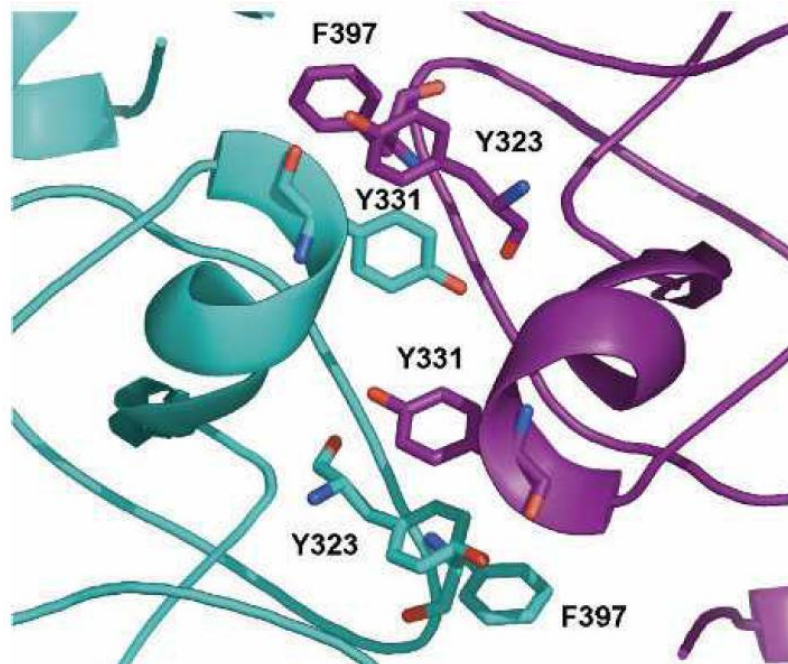
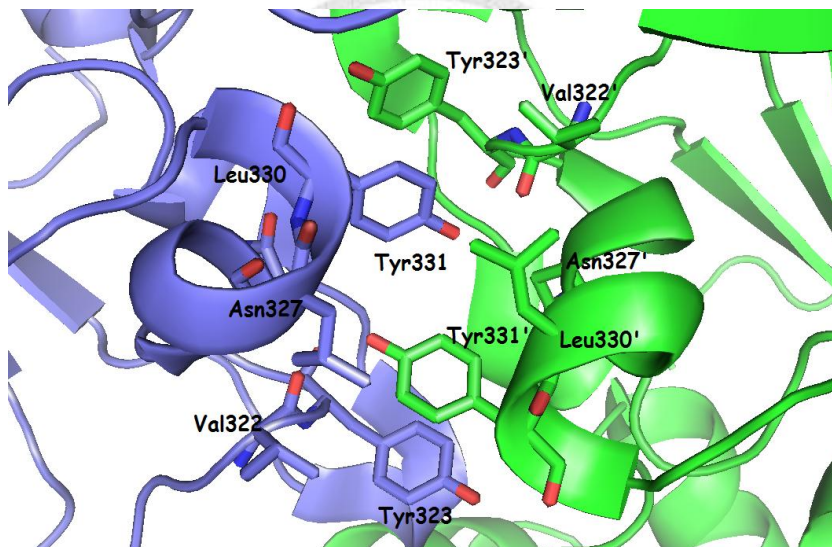


圖 1-3 人類鳥胺酸脫羧酶雙體結構

兩個 ODC 單體以頭尾相連 (head-to-tail) 的方式形成雙聚體 (homodimer)，一個 ODC 單體的 α/β -barrel domain 與另一個單體的 sheet domain 之間形成交互介面 (interface) 組成 ODC 的活性中心，Lys-69 與 PLP 以 schiff-base 的方式結合 (圖中紅色部份)。(PDB：1D7K) (Almud et al., 2000)



(A)



(B)

圖 1-4 ODC 雙聚體交互介面之胺基酸

(A) Phe-397'、Tyr-323'、Tyr-331、Tyr-331'、Tyr-323 和 Phe-397 會形成一個 hydrophobic zipper。(PDB：7ODC) (Albeck et al., 2008)

(B) Tyr-331 與空間中鄰近胺基酸 Val-322、Tyr-323、Asn-327 和 Leu-330 之間會形成凡得瓦爾交互作用，以穩定 ODC 雙聚體的結構。(PDB：1D7K) (Almrud et al., 2000)

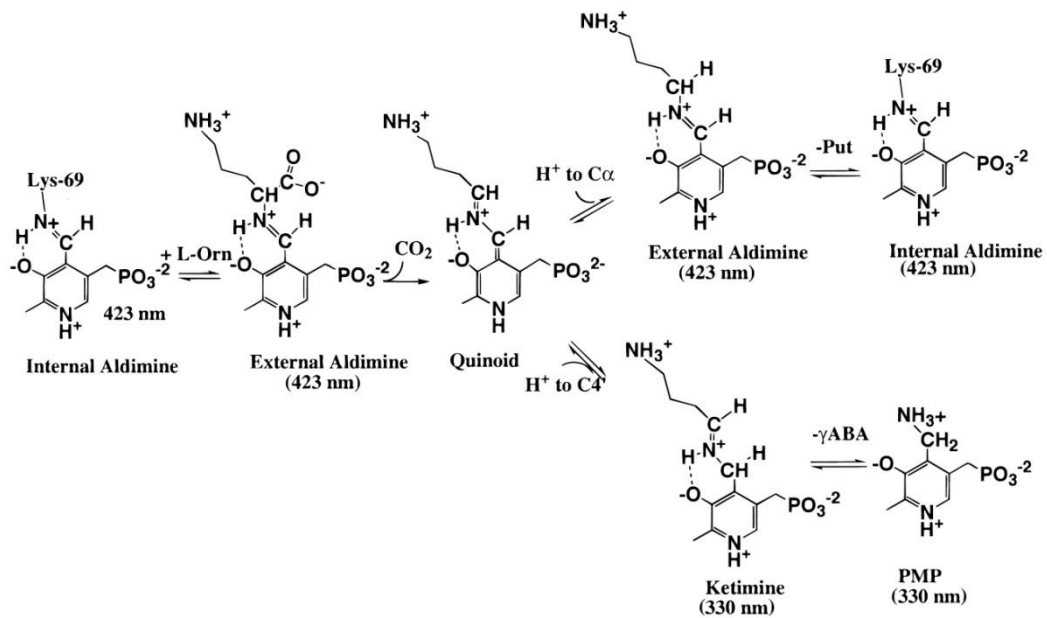
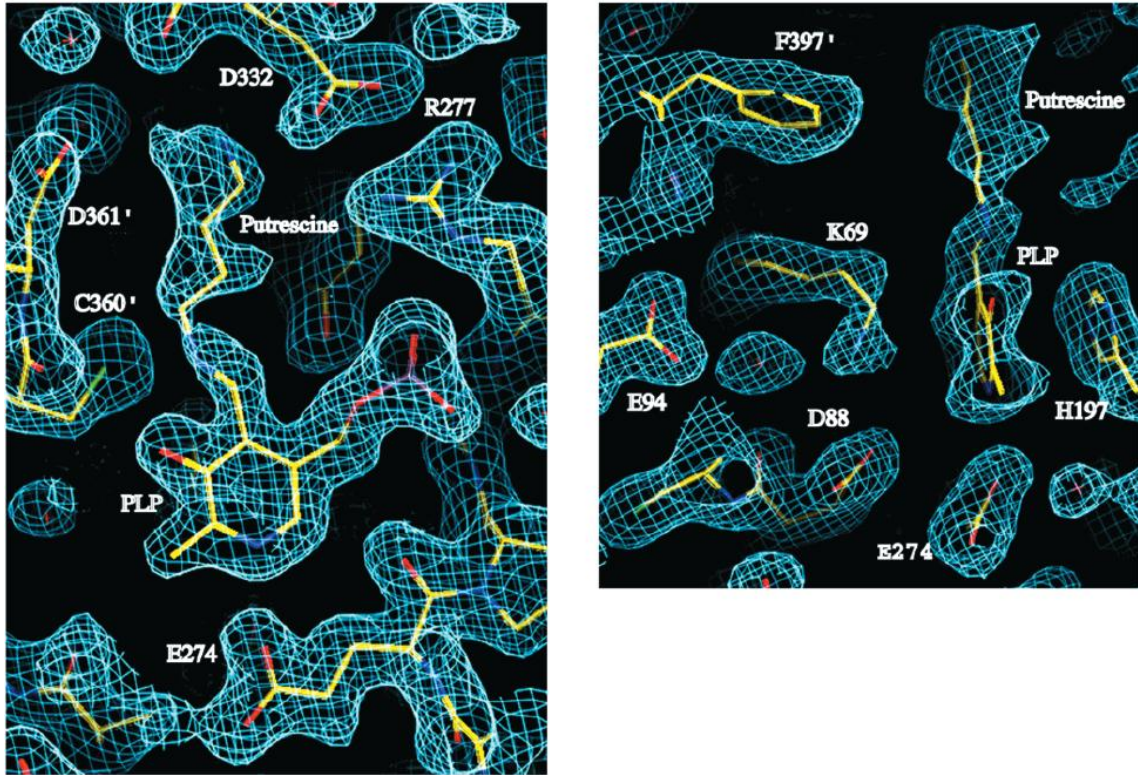


圖 1-5 鳥胺酸脫羧酶的催化機制

當進行脫羧反應時，鳥胺酸會取代 Lys-69 以 Schiff base 的方式和 PLP 結合，形成 external aldimine，此步驟稱為 Schiff–base formation。接著藉由電子的轉移而使 $C\alpha$ 失去一個 CO_2 分子而形成中間產物- Quinoid，此步驟稱 decarboxylation。接著進行 protonation，一條為 $C\alpha$ 質子化路徑， $C\alpha$ 質子化後會釋放一個 putrescine；而另一條為 $C4$ 質子化路徑，則產生 γ ABA 和 PMP。(Jackson et al., 2000)



(A)

(B)

圖 1-6 ODC 活性中心

(A) ODC 的結構中發現 Cys-360 的硫原子距離 C α 原子為 3.4 Å，而距離 C4 原子則為 4 Å，因此推測 Cys-360 可以引導 ODC 進行 C α 質子化的反應。

(B) ODC 的 Glu-94 和 Asp-88 在催化反應的過程中會與 Lys-69 有交互作用，以避免 Lys-69 干擾受質與 PLP 的結合，影響催化反應的進行。(Jackson et al., 2000)

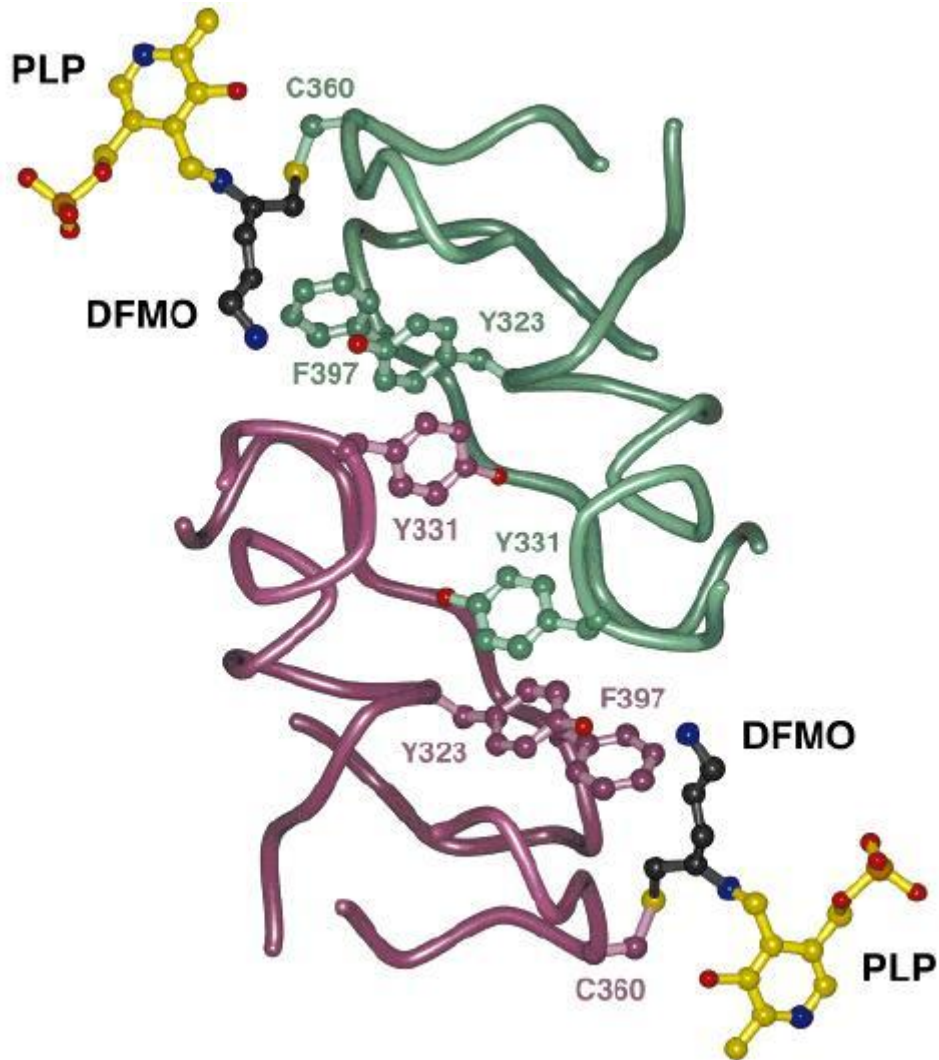


圖 1-7 錐蟲 (*trypanosome brucei*) 之 ODC 與 DFMO 的交互作用

DFMO 的結構與鳥胺酸相似，也能以 Schiff-base 和 ODC 的 Lys-69 結合，但唯一不同處在於 DFMO 會以共價鍵和 Cys-360 結合，抑制 ODC 的催化活性。(Grishin et al., 1999)

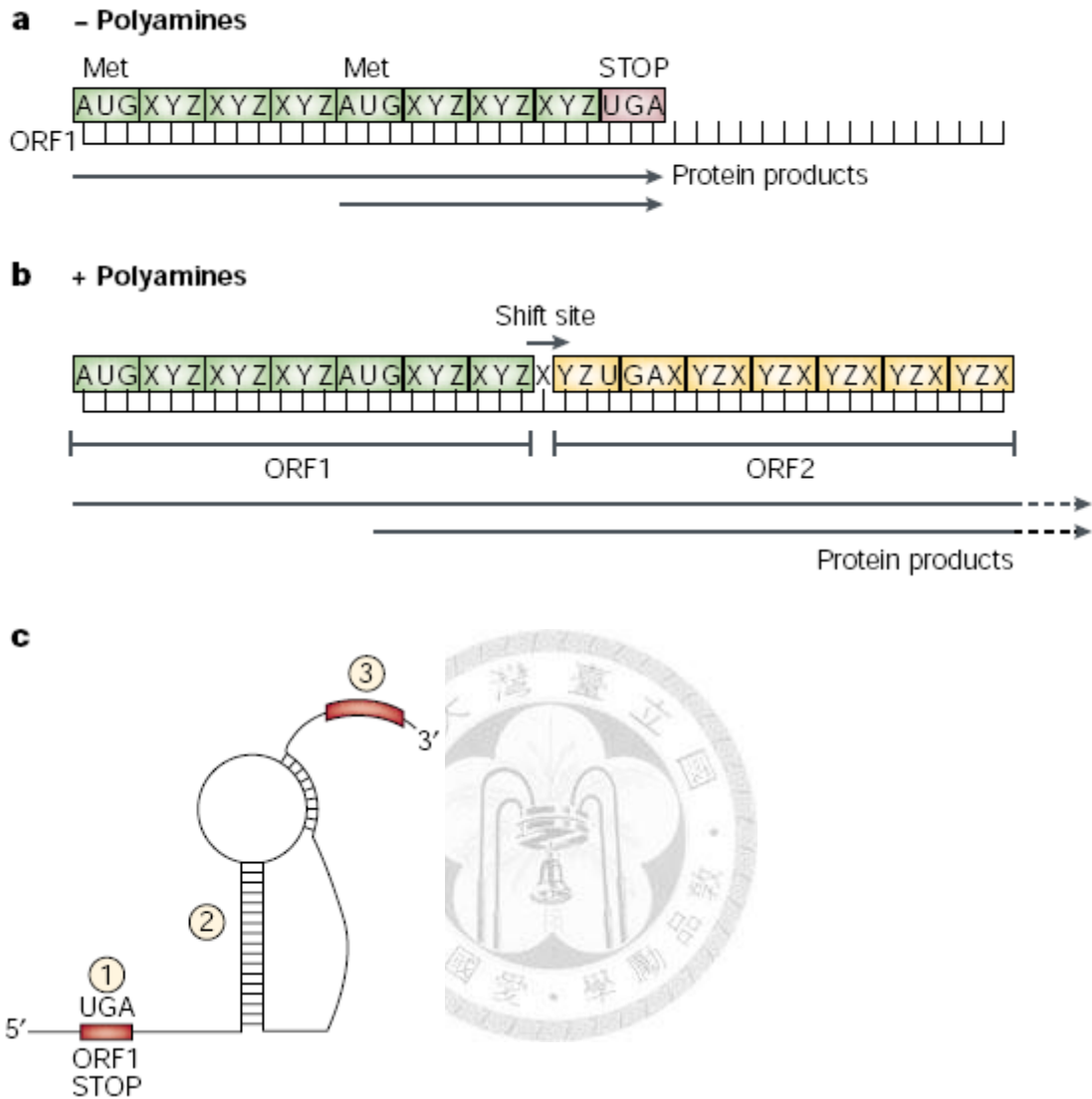


圖 1-8 AZ mRNA frameshift 的機制

AZ mRNA 含有兩個重疊的 ORF，ORF1 序列較短，具有 AUG 起始碼和 UGA 停止碼，可轉譯出一段胜肽鏈，但不具有生物功能。ORF2 序列較長幾乎包含整個 AZ 的 mRNA，但不具有 AUG 起始碼。當細胞內多元胺量過高時，會引起 ORF1 之停止碼前發生一個+1 frameshift，合成全長具有功能的 AZ 蛋白。(Coffino, 2001)

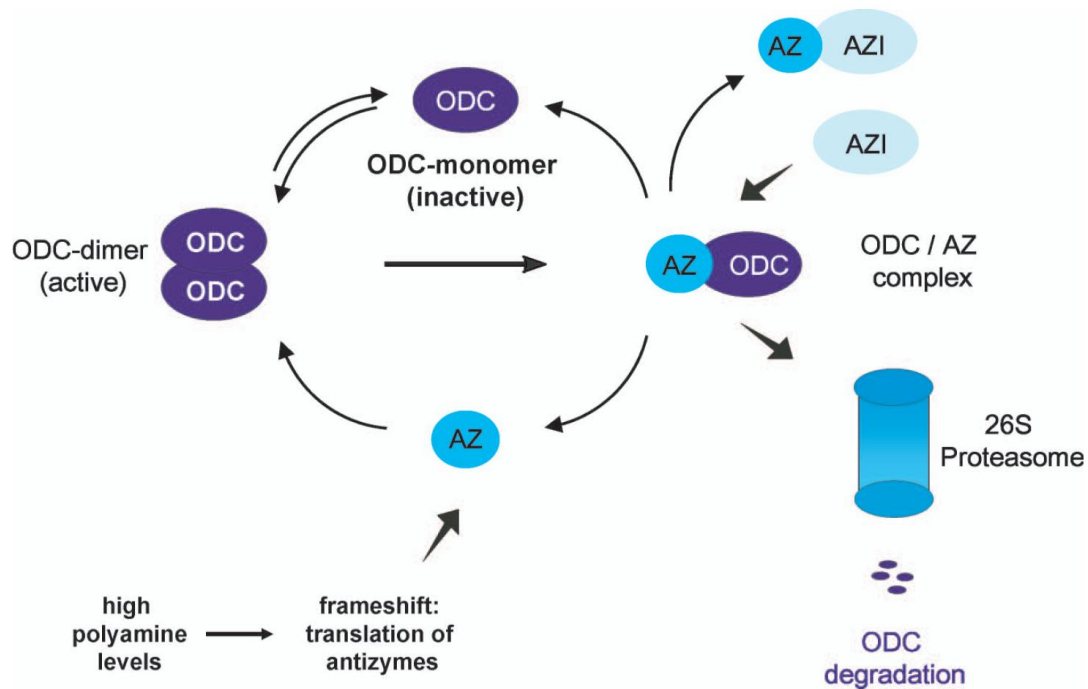


圖 1-9 鳥胺酸脫羧酶的降解機制

胞內多元胺的濃度會影響 AZ mRNA 的轉譯，當多元胺的含量過高時，會增加 AZ mRNA 轉譯的過程中+1 frameshift 的效率，合成更多具有功能的 AZ 蛋白。AZ 為 ODC 負回饋的調控因子，AZ 可以與單體 ODC 結合形成異源雙聚體，使 ODC 失去酵素活性，另一方面促使 ODC 被 26S 蛋白酶體降解。此外，AZI 可藉由與 AZ 形成更為穩定的 AZI-AZ 複合體，競爭 ODC 與 AZ 的結合，促使 ODC 由 ODC-AZ 複合體中釋出，正回饋調控多元胺的含量。(Mangold, 2005)

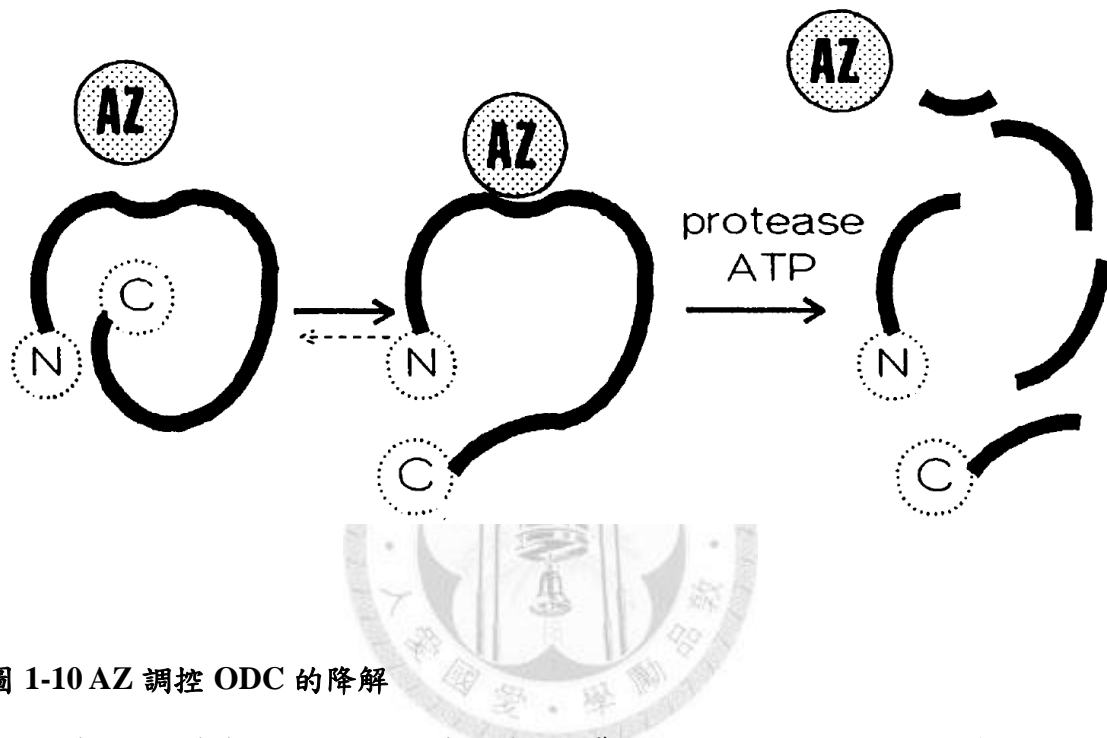


圖 1-10 AZ 调控 ODC 的降解

AZ 結合 ODC 後會引起 ODC 結構的變化，導致 ODC 之 C 端降解訊號露出，促使 ODC 被 26S 蛋白酶體辨認，進行需消耗 ATP 能量的降解。(Li et al., 1993)

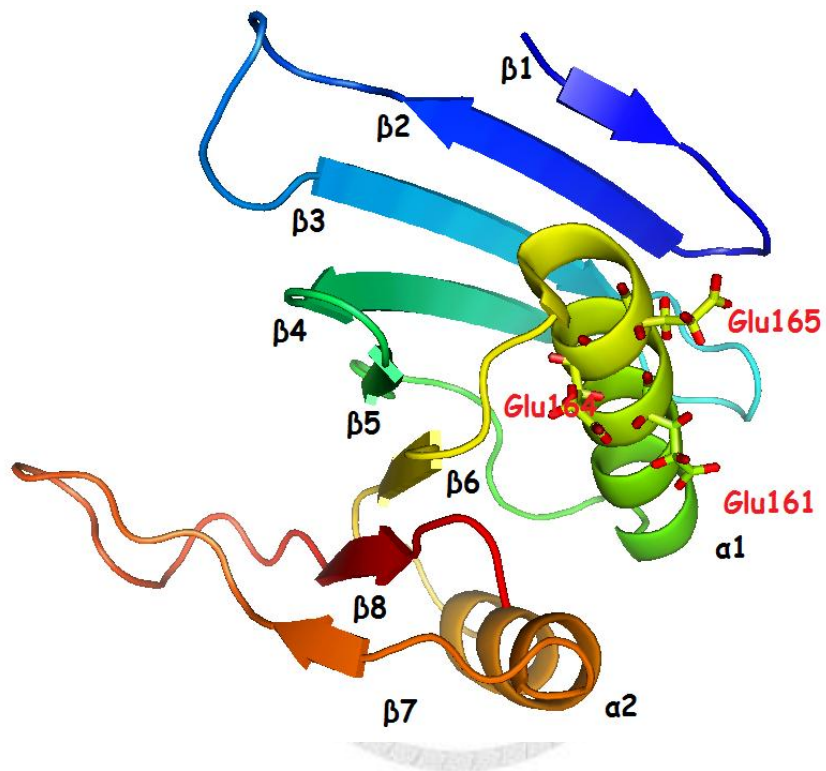


圖 1-11 抗酶之 NMR 結構

AZ 的結構包含八個 strands 和兩個 α helix，其中在第一個 α helix 中的 Glu-161、Glu-164 和 Glu-165 等酸性胺基酸，位在螺旋表面且在物種間序列保留性高，因此可能以帶負電的保留性區塊和 ODC 結合。(PDB : 1ZO0) (Hoffman et al., 2005)

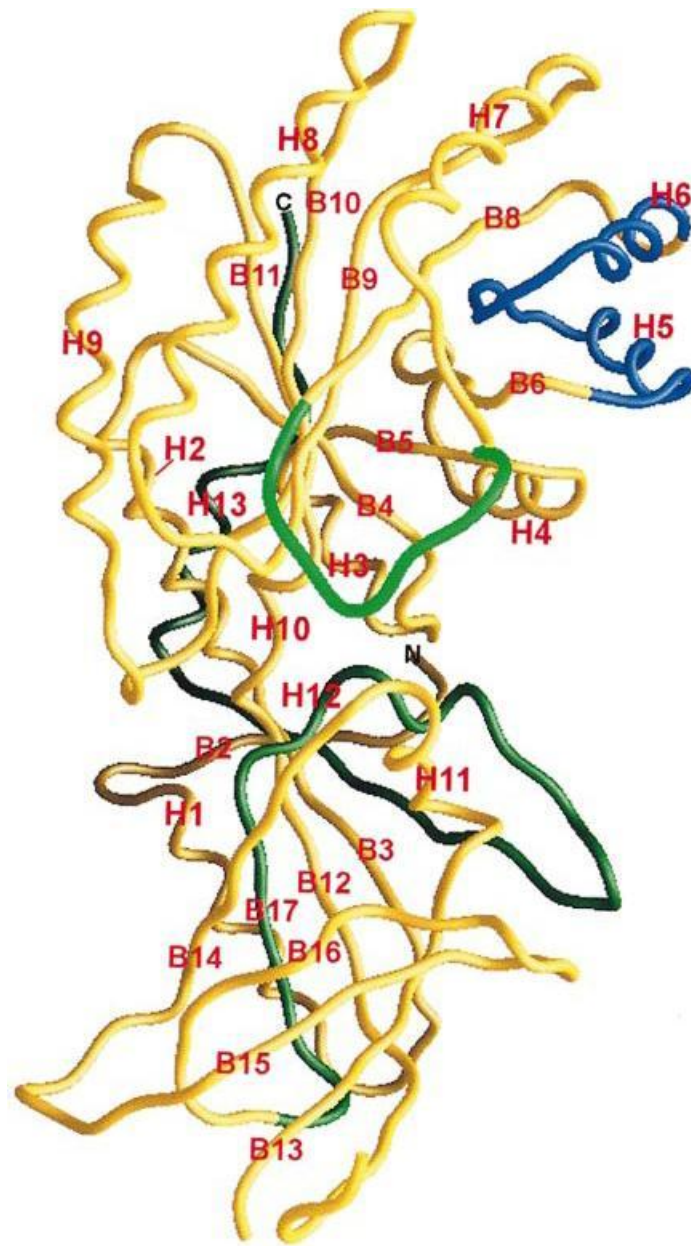


圖 1-12 AZBE (antizyme-binding element)

ODC 與 AZ 可能之作用區位於 ODC 之第 117-140 個胺基酸，此段區域稱為 AZBE (圖中藍色區域)。(Almud et al., 2000)

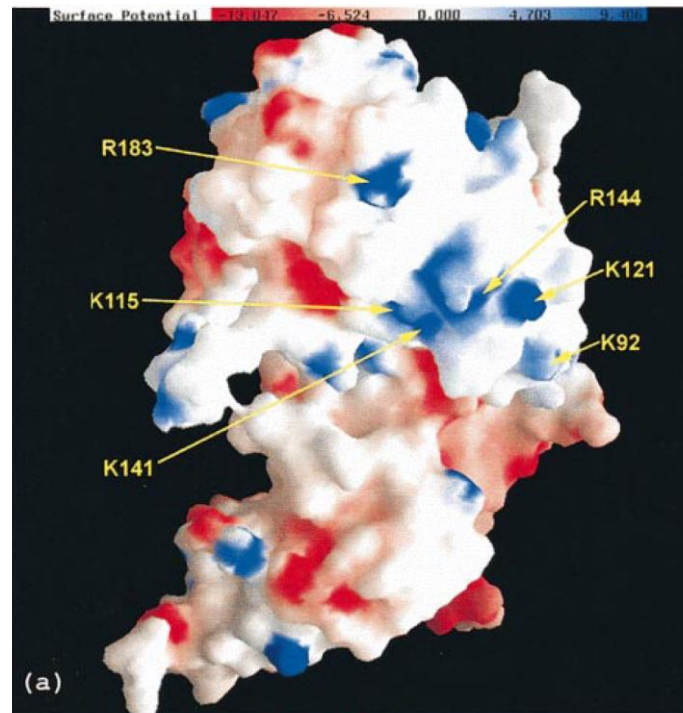


圖 1-13 單體 ODC 電荷分布圖

AZBE 係由 Lys-115、Lys-121、Arg-144 及鄰近的 Arg-183、Lys-92 共同組成一個帶正電的區塊，推測 ODC 可能利用離子性交互作用與 AZ 結合。(Almrud et al., 2000)

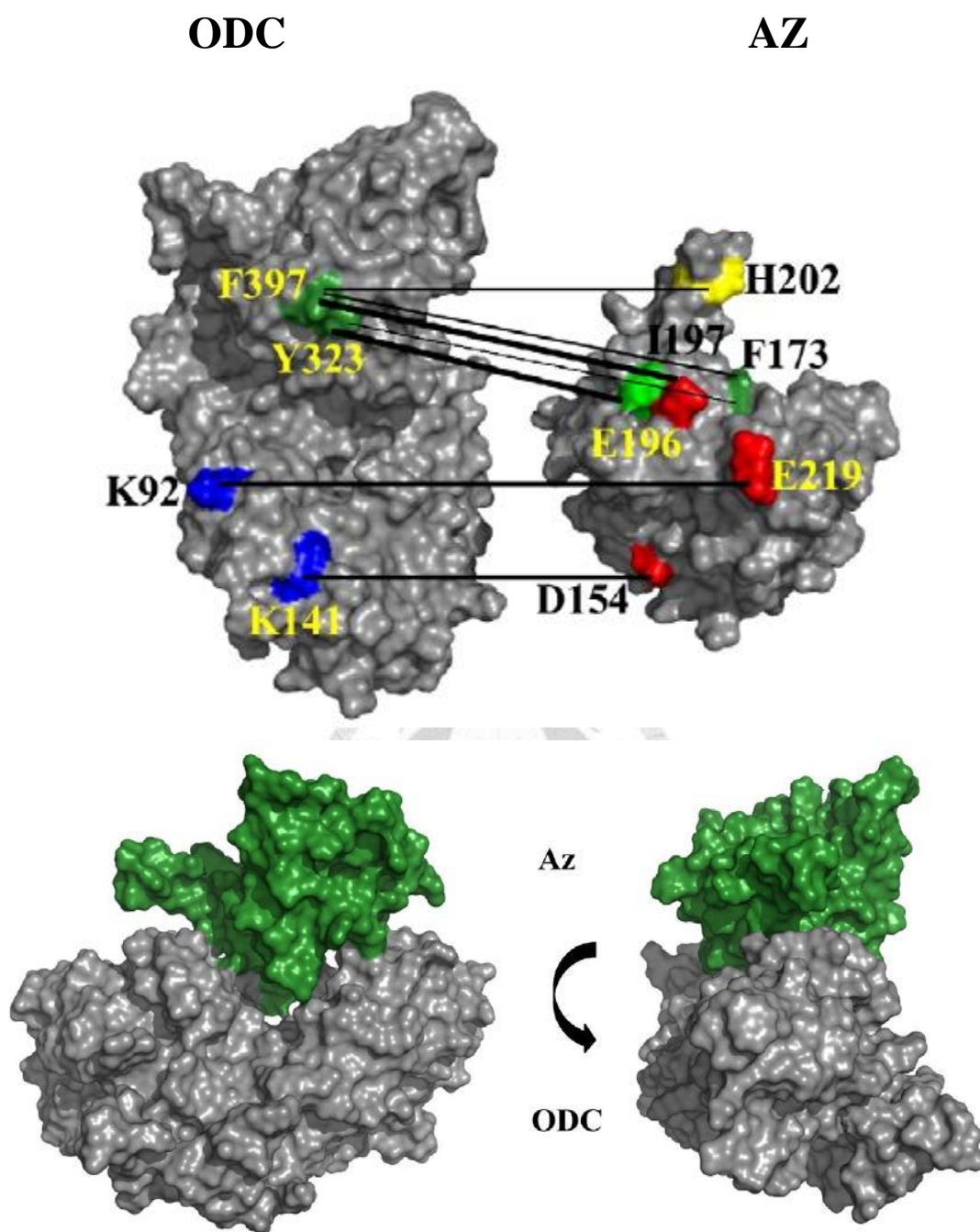


圖 1-14 ODC 與 AZ 之嵌合圖

ODC 上帶正電的胺基酸 (藍色區域) 會和 AZ 上紅色帶負電的胺基酸 (紅色區域) 發生離子性交互作用，而某些疏水性的胺基酸位於 ODC 和 AZ 的蛋白表面 (綠色區域)，在空間上十分靠近，可能互相形成疏水性交互作用，這些胺基酸在物種間具有高度的保留性。由下圖可看出嵌合所預測的 ODC-AZ 複合體結果。(Cohavi et al., 2009)

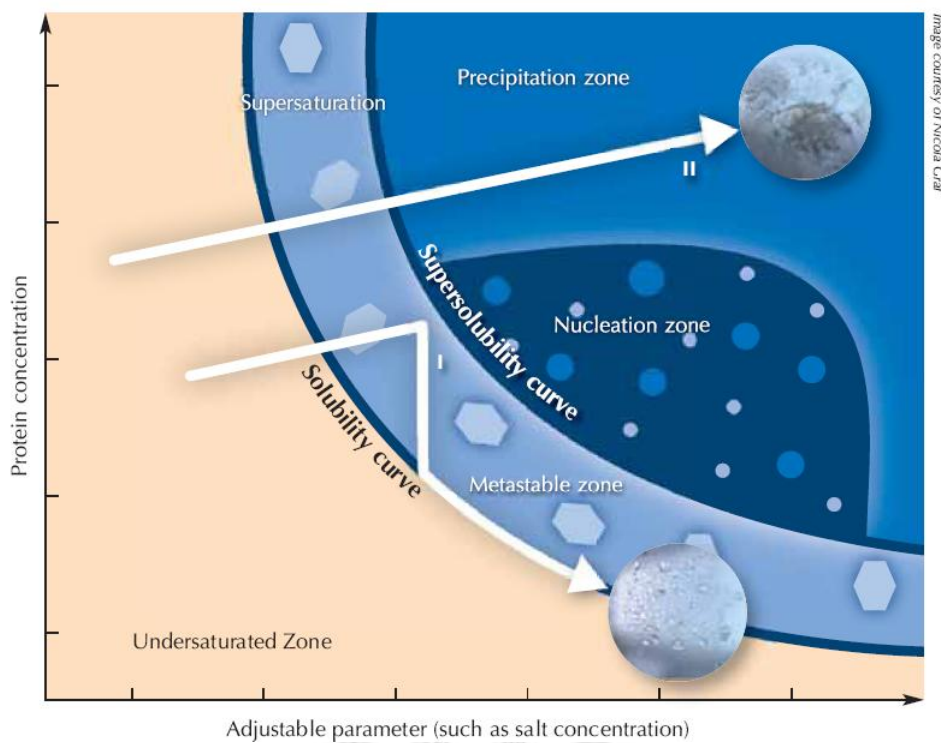
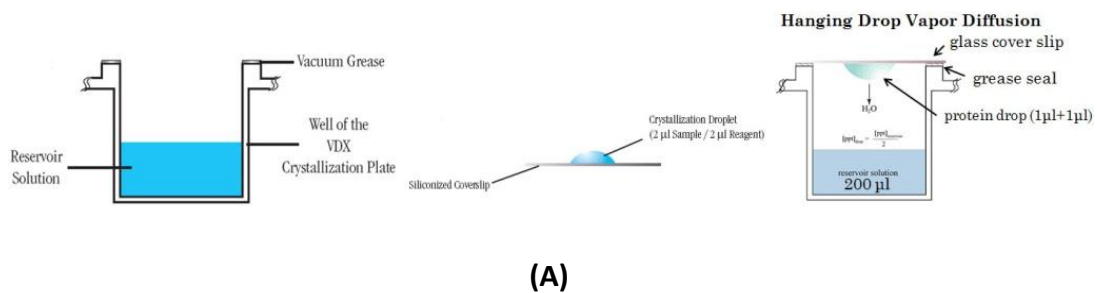
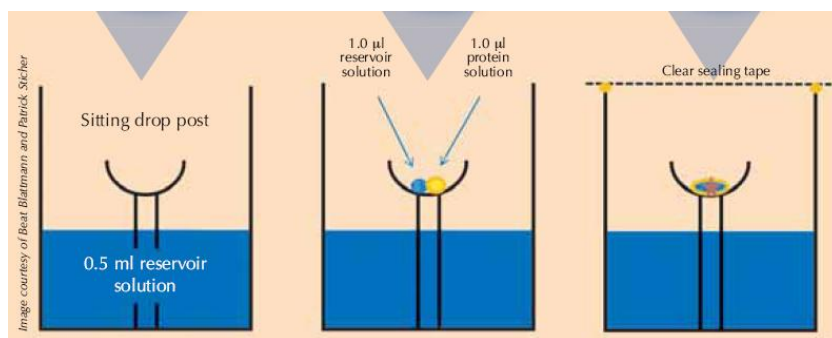


圖 2-1 蛋白質溶液過飽和曲線

橫軸表示各種影響蛋白質溶液進入過飽和之參數 (例如：沉澱劑濃度)，縱軸表示蛋白質樣品濃度。飽和曲線 (Solubility curve) 區分出過飽和與不飽和區，必須利用改變蛋白質濃度或結晶試劑沉澱劑的濃度等因素，使蛋白質緩慢進入過飽和區域以利於晶體的形成。(Blattmann et al., 2009)



(A)



(B)

圖 2-2 蒸氣擴散法 (Vapor diffusion)

(A) 懸滴蒸氣擴散法 (hanging drop vapor diffusion)

矽化過的蓋玻片上以 1:1 的比例混合蛋白質溶液以及結晶試劑，將此玻片覆蓋在裝有 200 µl 結晶試劑的 well 上並以真空膠使整個系統形成密閉環境，利用蒸氣擴散的原理使蛋白質溶液緩慢達到過飽和狀態，促使晶體形成。(Hampton research)

(B) 坐式蒸氣擴散法 (sitting drop vapor diffusion)

將結晶試劑取 500 µl 於 24 孔盤的 well 中，再以 1:1 的比例混合蛋白質溶液及市售的結晶試劑置於凹槽上，利用膠帶密封形成一個密閉的空間，藉由蒸氣擴散的原理使蛋白質溶液緩慢達到過飽和狀態，促使晶體形成。(Blattmann et al., 2009)

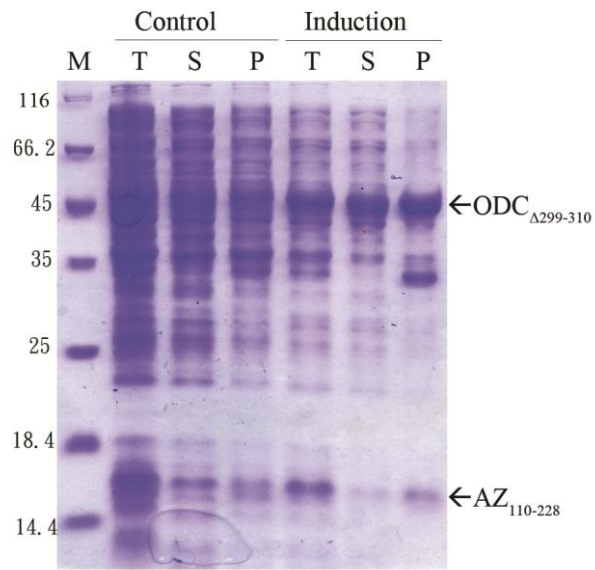


圖3-1 $ODC_{\Delta 299-310}$ - $AZ_{110-228}$ 複合體小量蛋白質表現

($ODC_{\Delta 299-310}$ 分子量為 49.97 kDa， $AZ_{110-228}$ 分子量為 14.3 kDa)。

Control：未加 IPTG

Induction：加入 final 0.5 mM IPTG

M：Marker (kDa)

T：Total cell lysate

S：Supernatant

P：Pellet

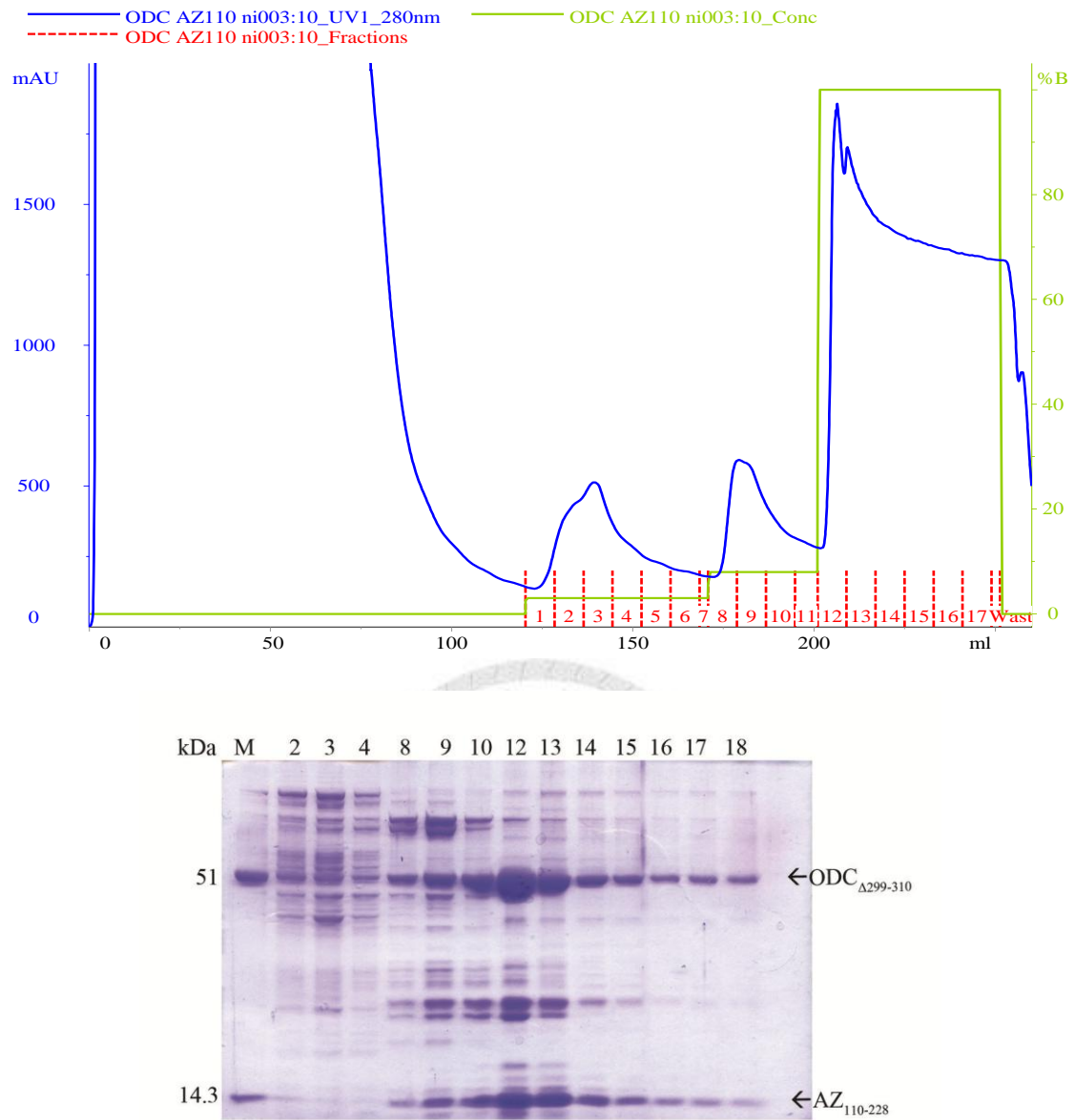


圖3-2 ODC Δ 299-310-AZ Δ 110-228複合體經親和性管柱層析結果

上圖為ODC Δ 299-310-AZ Δ 110-228複合體蛋白粗萃取液以親和性管柱 (Ni-affinity column) 層析結果，橫軸代表毫升數，左縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值，右縱軸綠線顯示衝堤液中buffer B的濃度。

下圖為Coomassie Blue染色後的SDS-PAGE，M：Marker，標示的數字對應著收集的fraction管數。

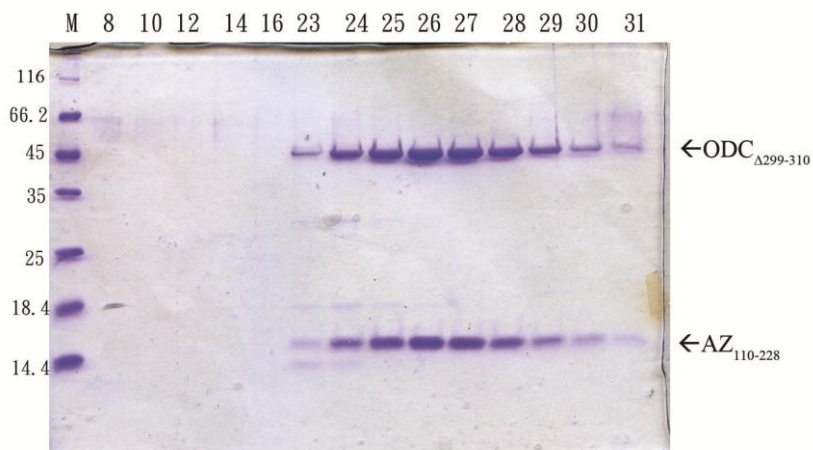
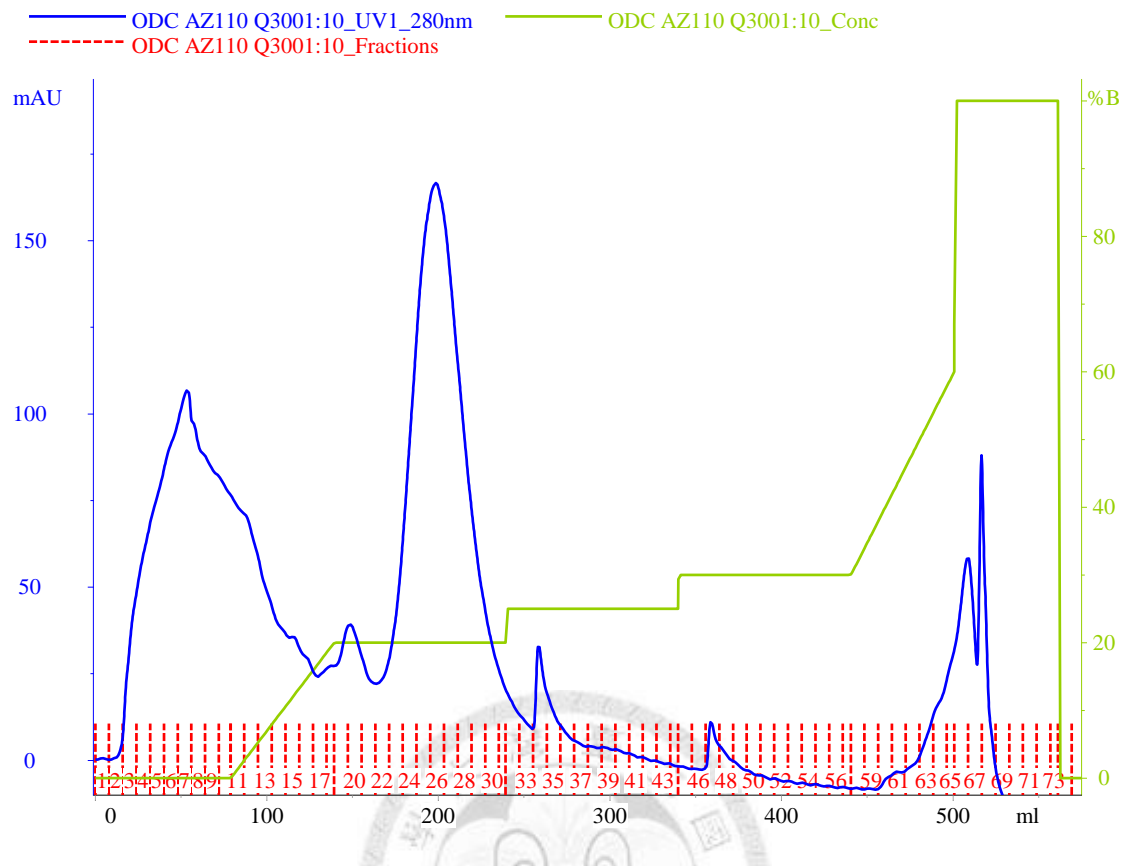


圖3-3 ODC _{Δ 299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈複合體經陰離子交換樹脂管柱層析結果

上圖為陰離子交換樹脂管柱層析結果，橫軸代表毫升數，左縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值，右縱軸綠線顯示衝提液中buffer B的濃度。

下圖為Coomassie Blue染色後的SDS-PAGE， M：Marker (kDa)，標示的數字對應著收集的fraction管數。

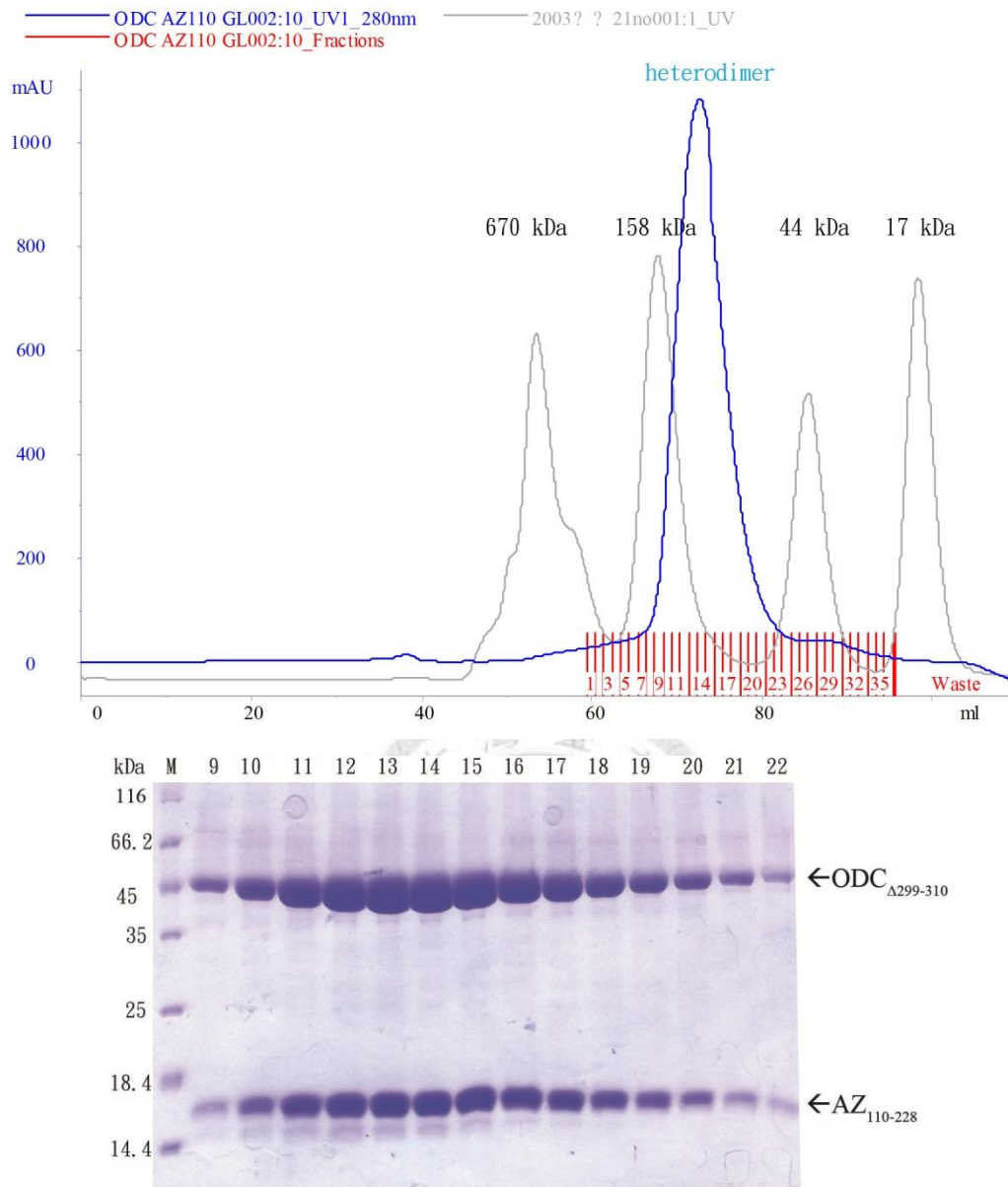


圖3-4 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈複合體經分子篩管柱層析結果

上圖為分子篩管柱層析結果，橫軸代表毫升數，縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值。

下圖為Coomassie Blue染色後的 SDS-PAGE，M：Marker，標示的數字對應著收集的fraction管數。

Sample Details

Sample Name: ODCmtAZ110 1
SOP Name: mansettings.nano
General Notes:

File Name: NLClab.dts Dispersant Name: Water
Record Number: 144 Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59 Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01 Measurement Date and Time: 2009年11月27日 下午 02:...

System

Temperature (°C): 24.9 Duration Used (s): 200
Count Rate (kcps): 29.8 Measurement Position (mm): 4.65
Cell Description: Disposable sizing cuvette Attenuator: 11

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (r.nm): 6.316	Peak 1: 6.370	94.4	1.745
Pdl: 0.218	Peak 2: 2063	5.6	516.4
Intercept: 0.929	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality **Good**

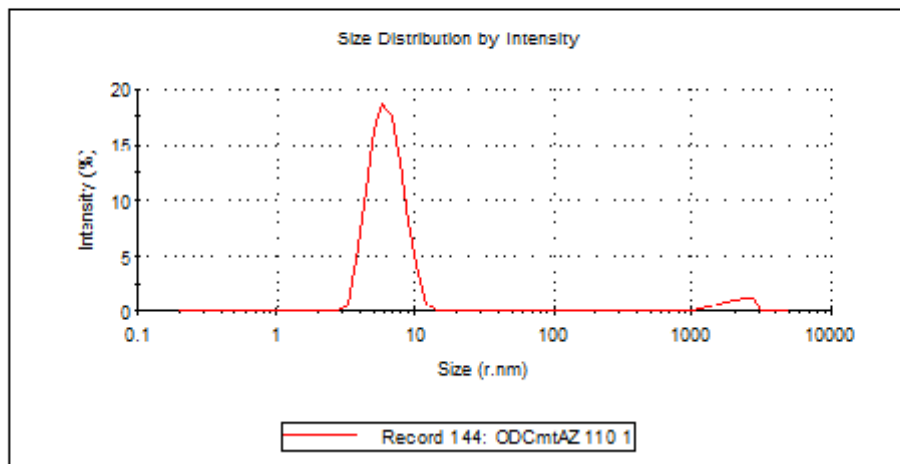


圖 3-5 利用 DLS 測得 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 複合體之均質性與粒徑大小

ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈之粒徑大小為6.316 nm, PDI值為0.218。

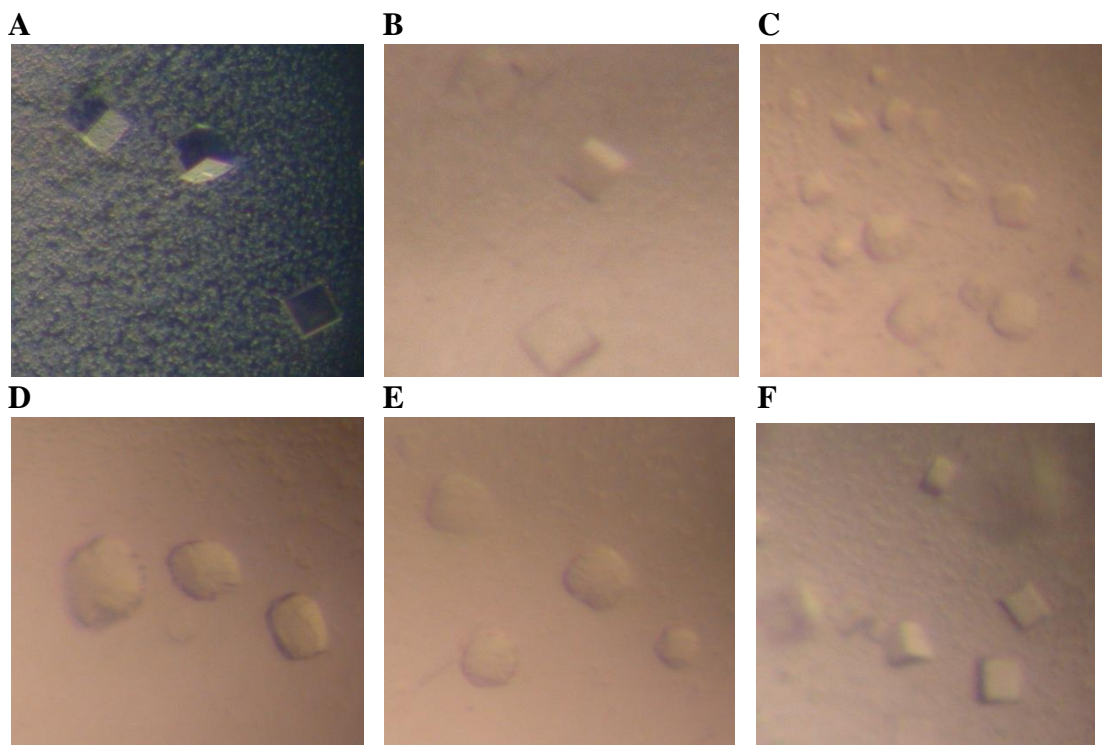


圖 3-6 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈ 蛋白複合體之晶體 (一)

- A. CSI No. 39 成分為：0.1 M HEPES-Na (pH 7.5), 2.0 M ammonium sulfate, 2% v/v PEG 400。繞射解析度為9 Å。
- B. Index No. 3 成分為：0.1 M Bis-Tris (pH 5.5), 2.0 M ammonium sulfate
- C. Index No. 4 成分為：0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), 2.0 M ammonium sulfate
- D. Index No. 5 成分為：0.1 M HEPES (pH 7.5), 2.0 M ammonium sulfate
- E. Index No. 6 成分為：0.1 M Tris (pH 8.5), 2.0 M ammonium sulfate
- F. Index No. 27 成分為：2.4 M Sodium malonate (pH 7.0)

以上晶體大小皆約為30 μm × 30 μm × 30 μm

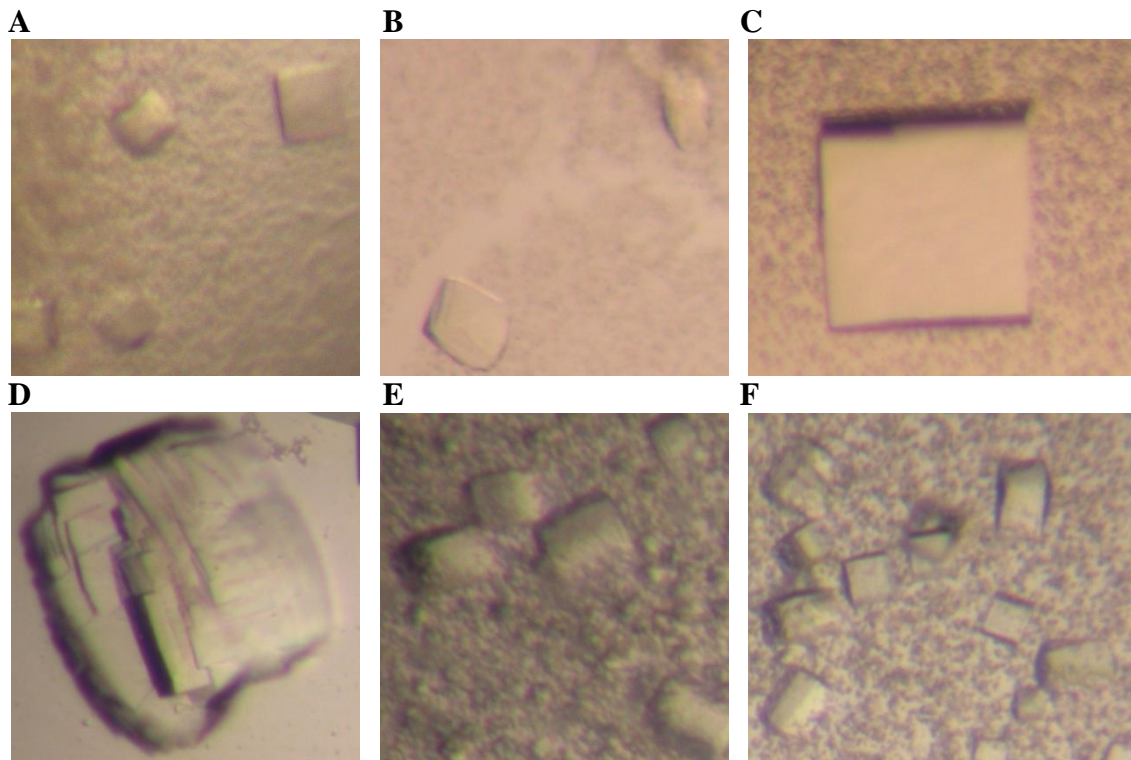


圖3-7 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈蛋白複合體之晶體 (二)

- A. Natrix No.27成分為：0.2 M Ammonium acetate, 0.01 M Mg acetate, 0.05 M Na Cacodylate (pH6.5), 30% w/v PEG 8000。晶體大小皆約為20 μm × 20 μm × 10 μm。
- B. Natrix No. 30成分為：0.01 M Magnesium chloride, 0.05 M Na HEPES (pH 7.0), 1.6 M ammonium sulfate。晶體大小約為20 μm × 20 μm × 10 μm。
- C. 依照CSI No. 39條件微調所生成之蛋白晶體。0.1 M HEPES-Na (pH 7.5), 1.6 M ammonium sulfate, 2% v/v PEG 400。晶體大小約為150 μm × 150 μm × 50 μm。

以 CSI No. 39 為基準進行添加物試驗

- D. 添加No. 28 final 10 mM 3% v/v Dimethyl sulfoxide形成較大的多晶。
- E. 添加No. 29 final 10 mM Sodium bromide。晶體大小約為20 μm × 20 μm × 30 μm。
- F. 添加No. 39 final 10 mM Spermine tetra-HCl。晶體大小約為20 μm × 20 μm × 30 μm。

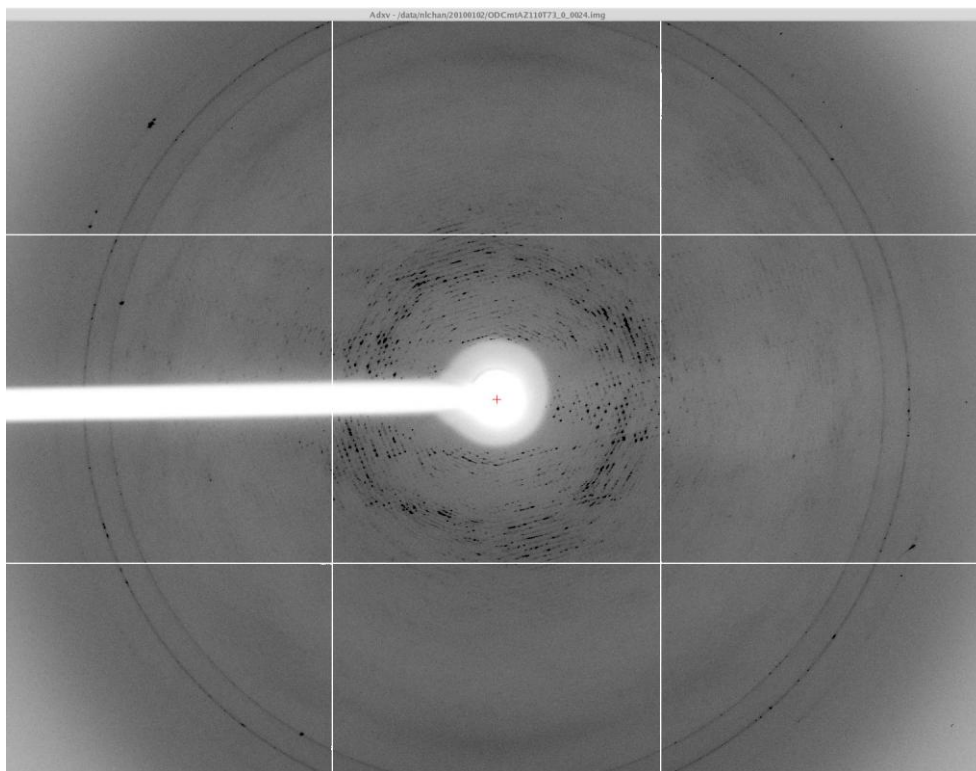


圖3-8 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₀₋₂₂₈蛋白質晶體繞射圖譜

以圖3-7C的晶體進行cryo-protection後進行X-ray繞射分析，其解析度約為4.2 Å，但繞射圖譜有多晶的現象。

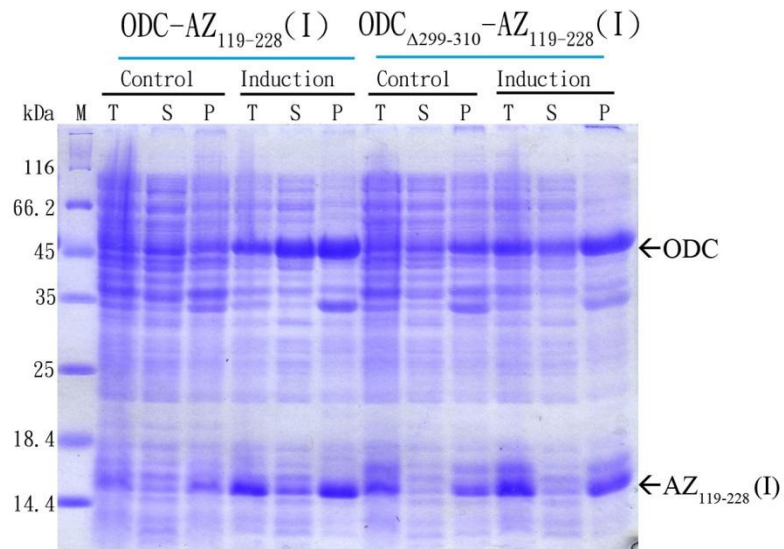


圖3-9 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)與ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體小量蛋白表現

圖Lane由左至右第二到第七條為ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體小量蛋白質表現，第八到第十三條為ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體小量蛋白質表現。(ODC分子量為51.25 kDa，ODC_{Δ299-310}分子量為49.97 kDa，AZ₁₁₉₋₂₂₈分子量為14.8 kDa)。

Control：未加 IPTG

Induction：加入 final 0.5 mM IPTG

M：Marker (kDa)

T：Total cell lysate

S：Supernatant

P：Pellet

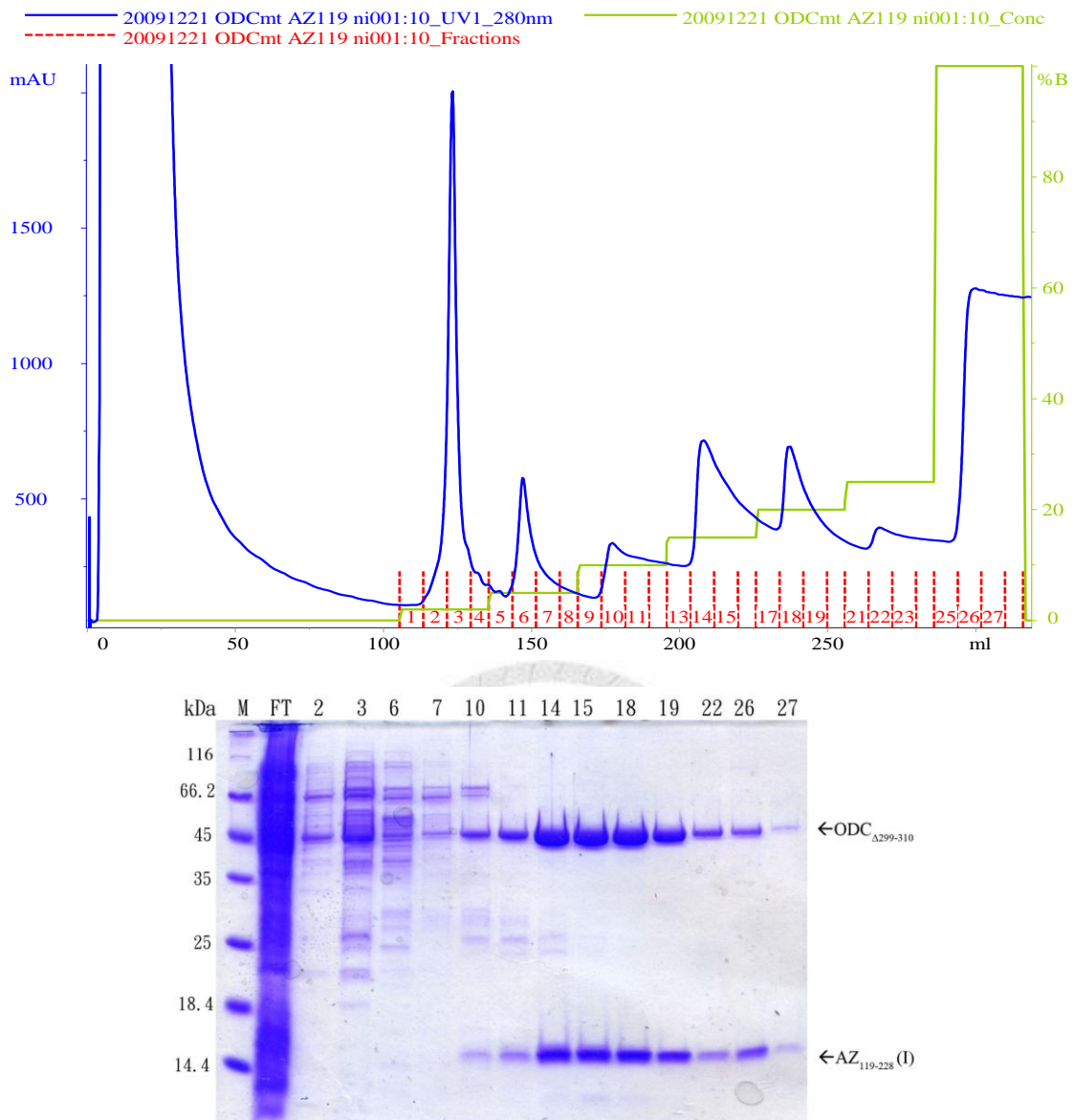


圖3-10 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈ (I)複合體經親和性管柱層析結果

上圖為ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體蛋白粗萃取液以親和性管柱 (Ni-affinity column) 層析結果，橫軸代表毫升數，左縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值，右縱軸綠線顯示衝提液中buffer B的濃度。

下圖為Coomassie Blue染色後的SDS-PAGE，M：Marker，FT：Flow through，標示的數字對應著收集的fraction管數。

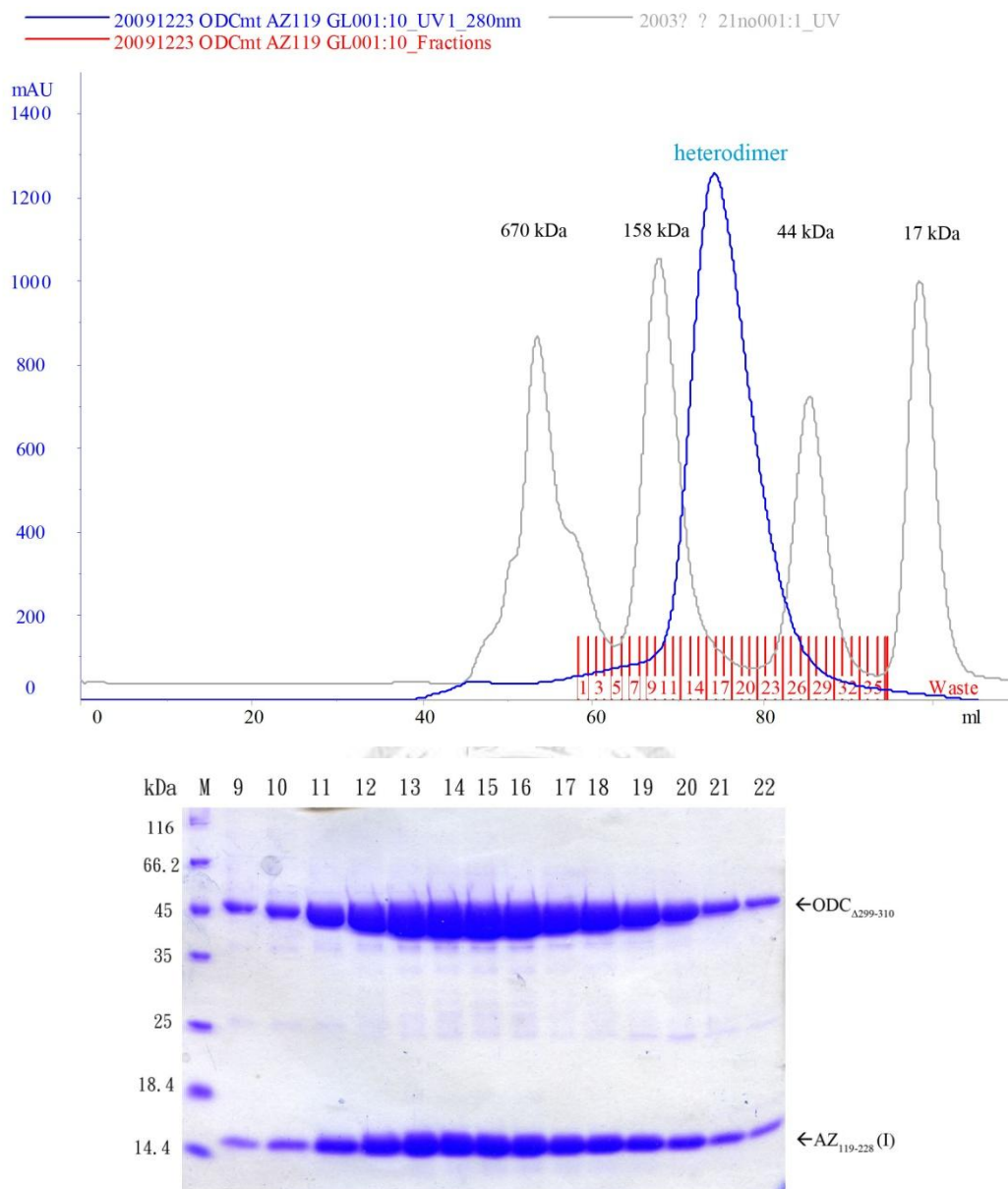


圖3-11 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體經分子篩管柱層析結果

上圖為分子篩管柱層析結果，橫軸代表毫升數，縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值。

下圖為Coomassie Blue染色後的 SDS-PAGE，M：Marker，標示的數字對應著收集的fraction管數。

Sample Details

Sample Name: ODCmtAZ119 1/10 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: NLClab.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 156	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: 2009年12月29日 下午 03:...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 50
Count Rate (kcps): 22.2	Measurement Position (mm): 4.65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 11

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (r.nm): 10.96	Peak 1: 5.541	67.2	1.055
PdI: 0.372	Peak 2: 173.6	28.2	48.54
Intercept: 0.913	Peak 3: 2503	4.6	302.7

Result quality Refer to quality report

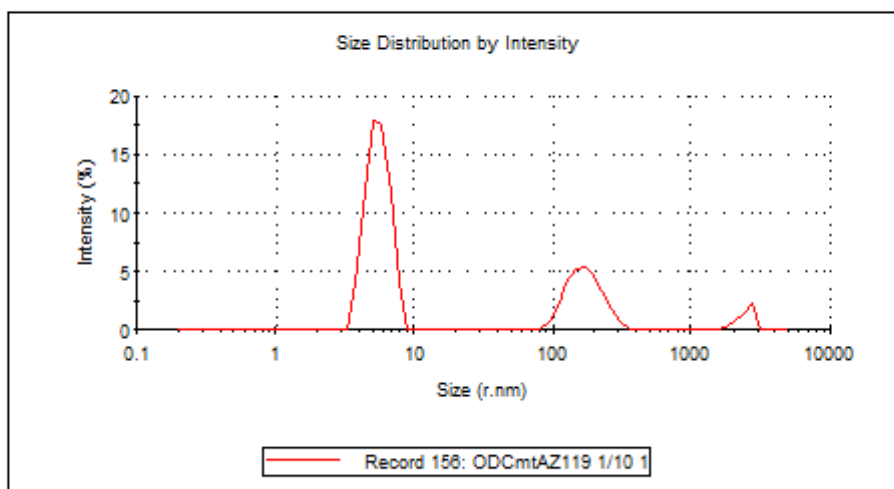


圖 3-12 利用 DLS 測得 $ODC_{\Delta 299-310}$ -AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體之均質性與粒徑大小

$ODC_{\Delta 299-310}$ -AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)之粒徑大小平均為 10.96 nm，PDI 值為 0.372。

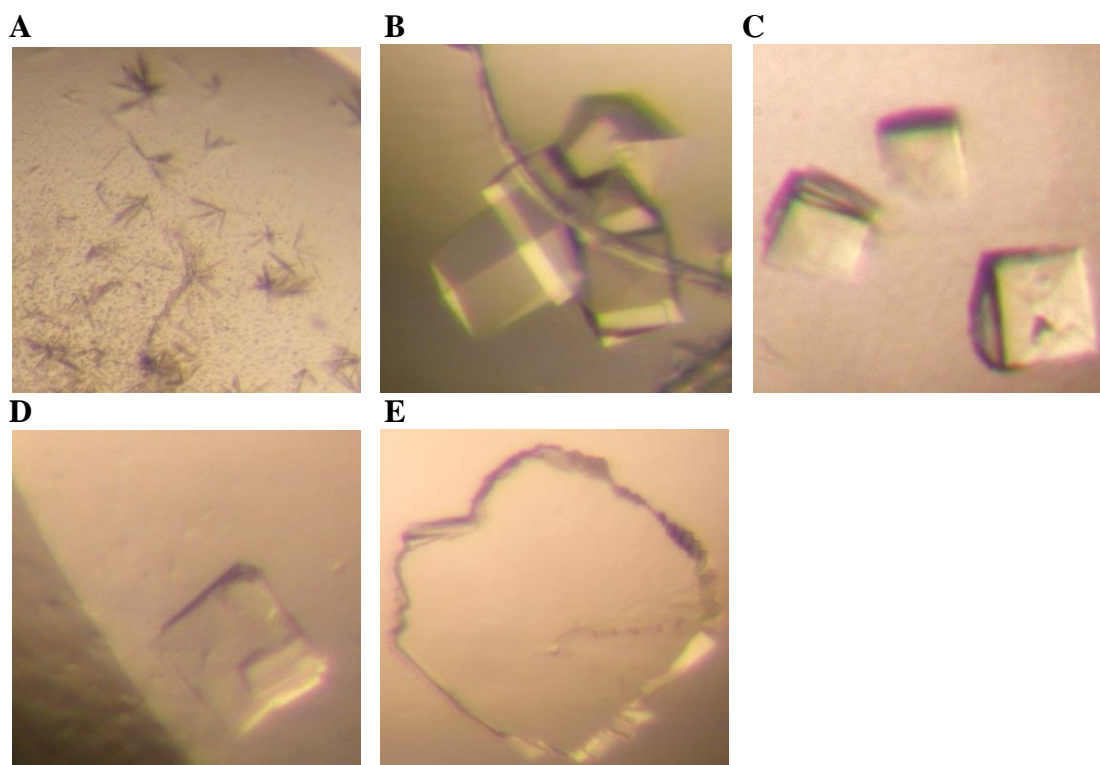
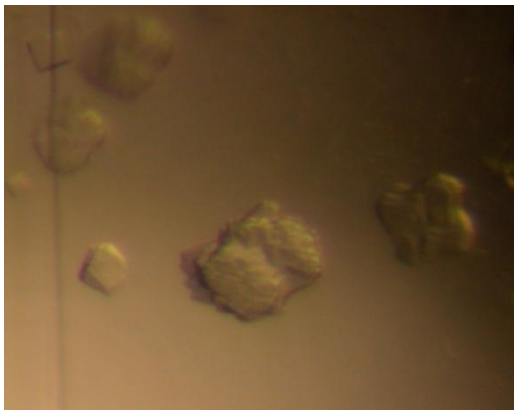


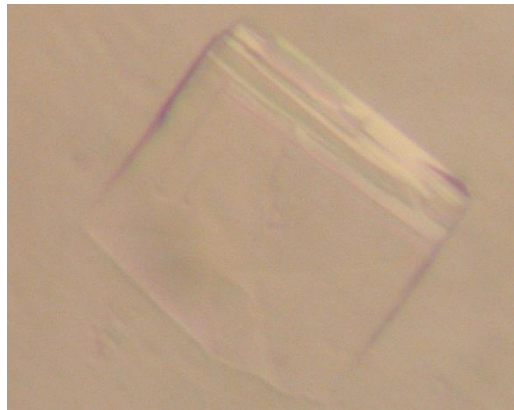
圖3-13 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體之晶體 (一)

- A. CSI No. 17成分為：0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M Tris HCl (pH 8.5), 30% w/v PEG 4000。
- B. Natrix No. 18成分為：0.01 M Magnesium acetate, 0.05 M Na cacodylate (pH 6.5), 1.3 M lithium sulfate。晶體大小約為40 μm × 40 μm × 80 μm，繞射解析度約6.6 Å。
- C. Natrix No. 28成分為：0.05 M Magnesium sulfate Aq., 0.05 M Na HEPES (pH 7.0), 1.6 M lithium sulfate。晶體大小約為40 μm × 40 μm × 10 μm。
- D. Natrix No. 40成分為：0.01 M Magnesium chloride, 0.05 M Tris HCl (pH 7.5), 1.6 M ammonium sulfate。晶體大小約為40 μm × 40 μm × 10 μm。
- E. Natrix No. 45成分為：0.025 M Magnesium sulfate Aq., 0.05 M Tris HCl (pH 8.5), 1.8 M ammonium sulfate。晶體大小約為400 μm × 400 μm × 30 μm。

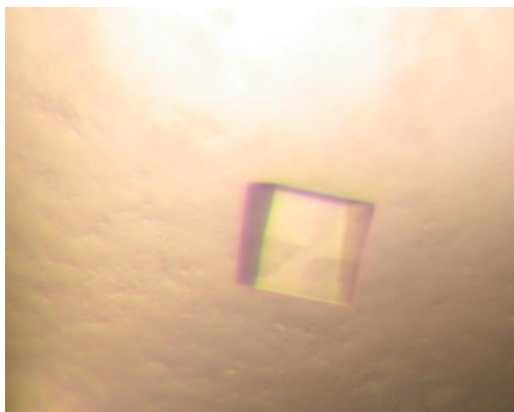
A



B



C



D

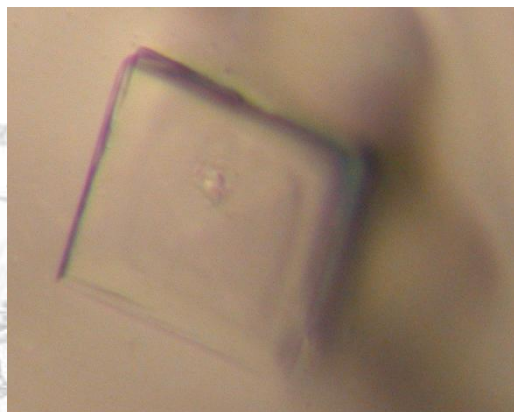


圖3-14 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈ (I) 蛋白複合體之晶體 (二)

- A. Index No. 5成分為：0.1 M HEPES (pH 7.5), 2.0 M ammonium sulfate
- B. SaltRx No. 62成分為：0.01 M Magnesium acetate, 0.05 M Na cacodylate pH 6.5, 1.3 M lithium sulfate。晶體大小約為300 μm × 300 μm × 80 μm。
- C. SaltRx No. 86成分為：0.1 M Bis-Tris propane (pH 7.0), 1.2 M potassium sodium tartrate tetrahydrate。晶體大小約為30 μm × 30 μm × 10 μm。繞射解析度約為8 Å。
- D. 以SaltRx No. 62為基準進行微調成分為：0.01 M Magnesium acetate, 0.05 M Na cacodylate (pH 7.0), 1.3 M lithium sulfate。晶體大小約為300 μm × 300 μm × 80 μm。繞射解析度約為4.5 Å。

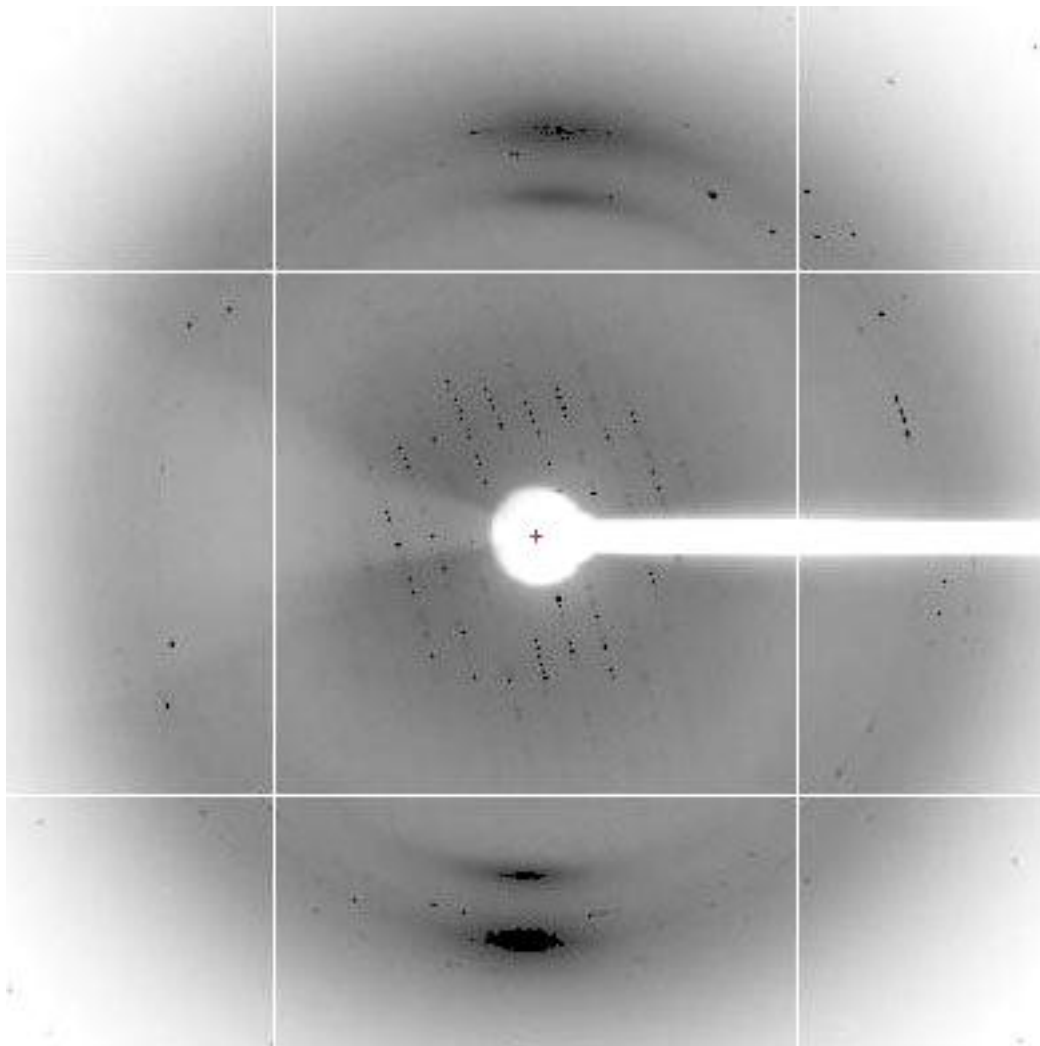


圖3-15 $ODC_{\Delta 299-310}-AZ_{119-228}$ (I) 蛋白質晶體繞射圖譜

以圖3-13B的晶體進行cryo-protect方式為slow transfer final 30% Glycerol後，進行X-ray繞射分析，其整組數據解析度約為 6.6 \AA 。經由HKL2000 程式計算為Primitive tetragonal 晶系，晶胞參數為 $a=b=268.0 \text{ \AA}$ ， $c=55.18 \text{ \AA}$ ； $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ 。

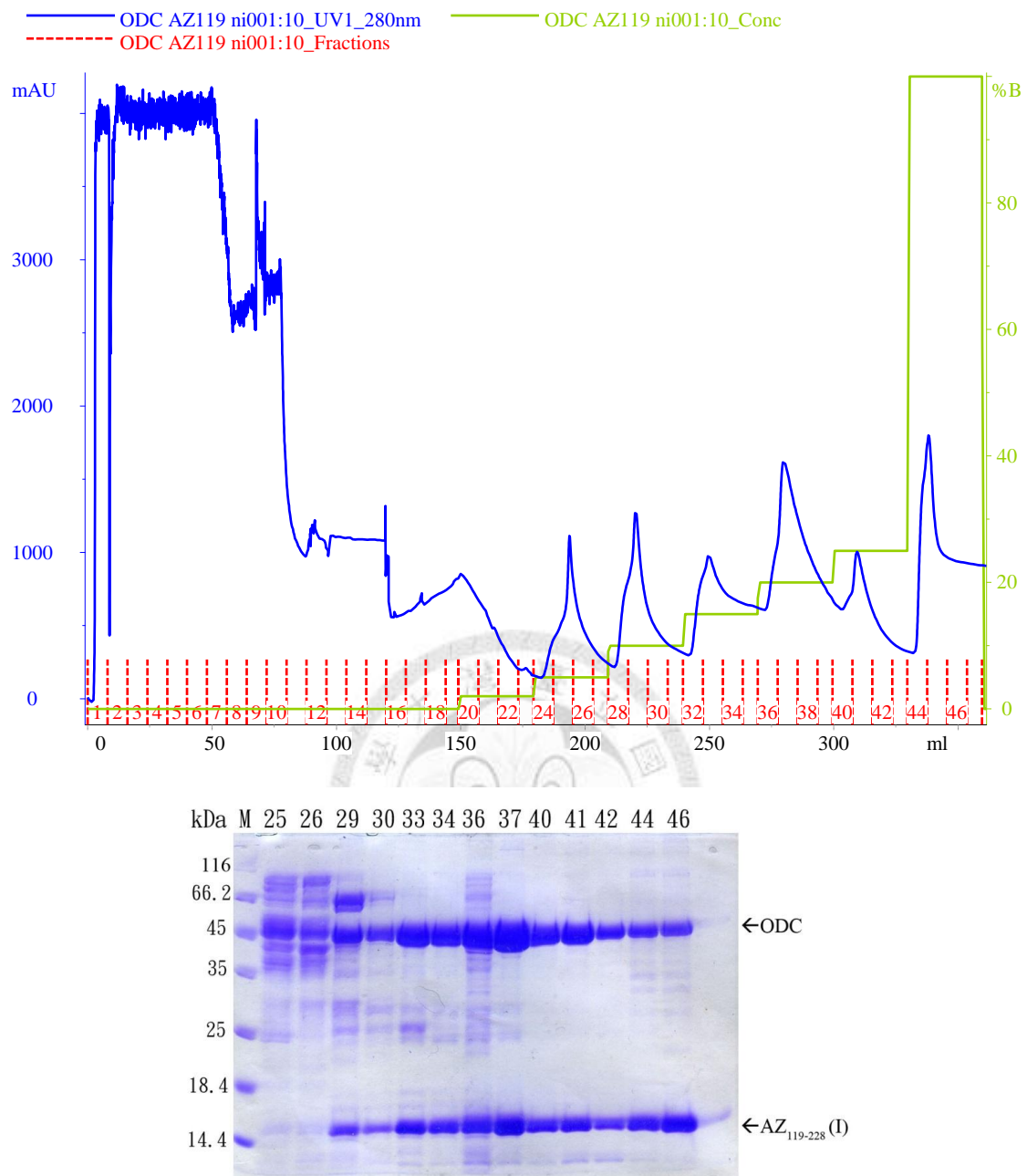


圖3-16 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體經親和性管柱層析結果

上圖為ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體蛋白粗萃取液以親和性管柱 (Ni-affinity column) 層析結果，橫軸代表毫升數，左縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值，右縱軸線線顯示衝堤液中buffer B的濃度。

下圖為Coomassie Blue染色後的SDS-PAGE，M：Marker，標示的數字對應著收集的fraction管數。

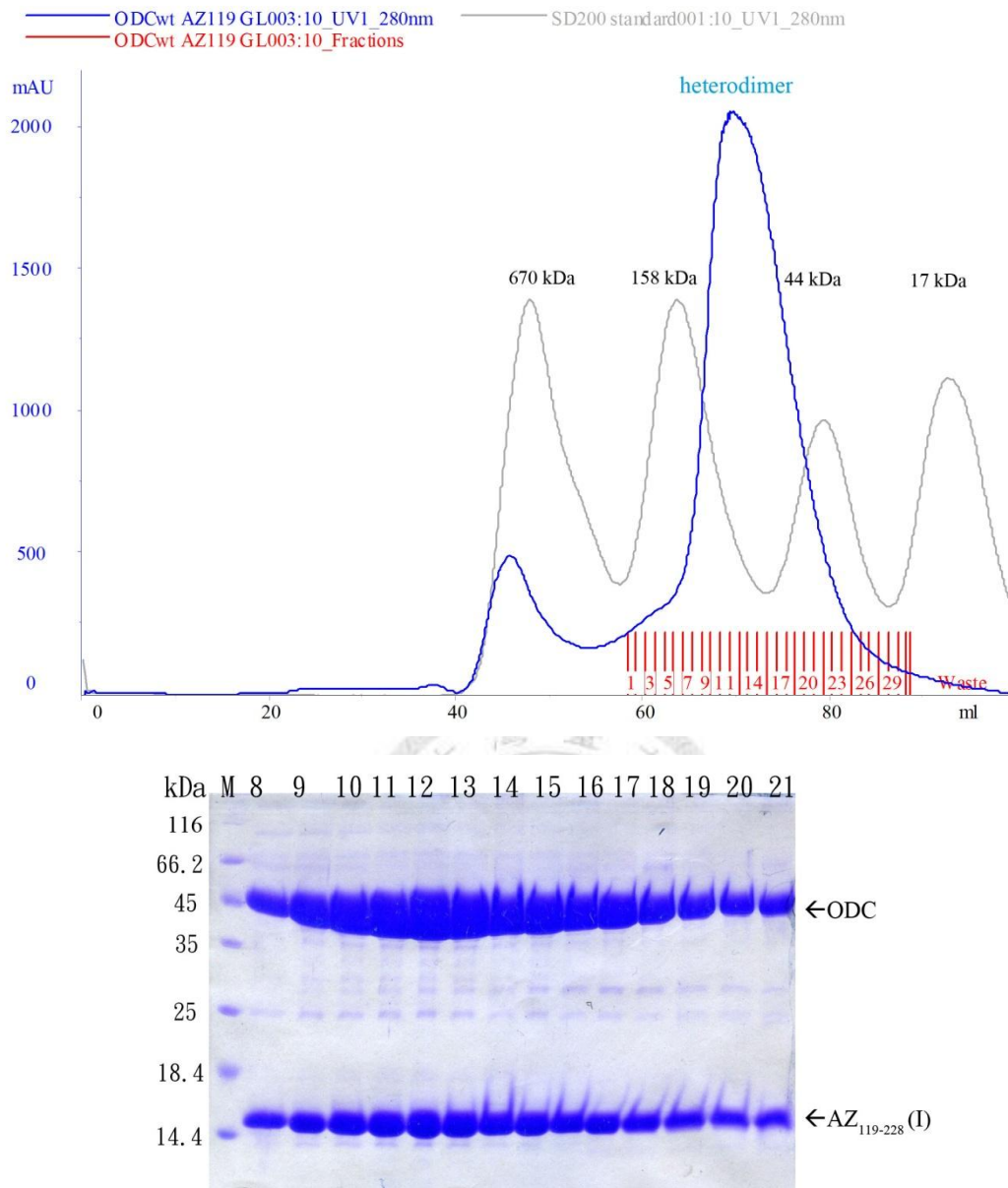


圖3-17 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體經分子篩管柱層析結果

上圖為分子篩管柱層析結果，橫軸代表毫升數，縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值。

下圖為Coomassie Blue染色後的SDS-PAGE，M：Marker，標示的數字對應著收集的fraction管數。

Sample Details

Sample Name: ODCwtAZ119 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: NLClab.dts Dispersant Name: Water
Record Number: 146 Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59 Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01 Measurement Date and Time: 2009年11月27日 下午 02:...

System

Temperature (°C): 25.0 Duration Used (s): 110
Count Rate (kcps): 70.0 Measurement Position (mm): 4.65
Cell Description: Disposable sizing cuvette Attenuator: 11

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (r.nm): 7.148	Peak 1: 5.713	75.2	1.255
PdI: 0.376	Peak 2: 140.2	24.8	46.08
Intercept: 0.944	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality **Good**

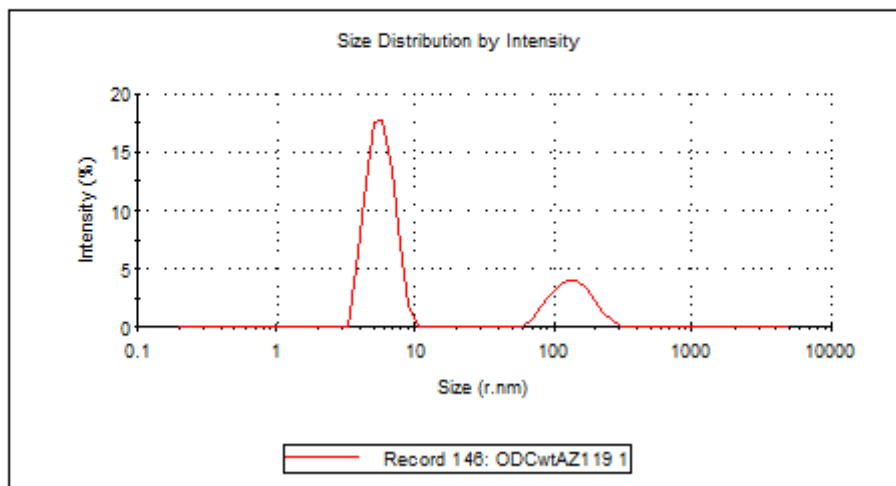


圖 3-18 利用 DLS 測得 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)複合體之均質性與粒徑大小

ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)之粒徑大小平均為 7.148 nm, PDI 值為 0.376。

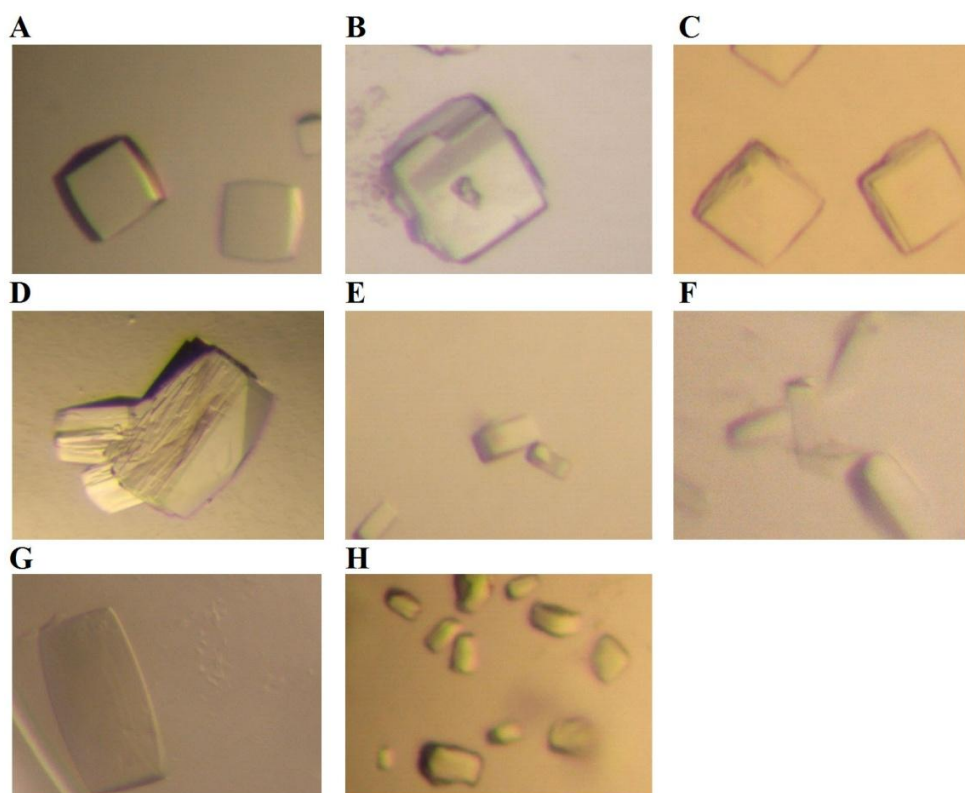


圖3-19 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體之晶體 (一)

- A. CSI No. 16成分為：0.1 M HEPES Na (pH 7.5), 1.5 M lithium sulfate monohydrate。
晶體大小約為 $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ 。繞射解析度約為 $4\ \text{\AA}$ 。
- B. 以CSI No. 16成分為基準進行Seeding。晶體大小約為 $80\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ 。
- C. CSI No. 39成分為：0.1 M HEPES-Na (pH 7.5), 2.0 M ammonium sulfate, 2% v/v PEG 400。晶體大小約為 $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ 。
- D. 以CSI No. 39成分為基準進行微調。形成較大的多晶。
- E. CSI No. 33成份為4.0 M Sodium formate，於 $4\ ^\circ\text{C}$ 培養下，約一個禮拜後晶體。
晶體大小約為 $30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ 。繞射解析度約 $9\ \text{\AA}$ 。
- F. 同上於 $4\ ^\circ\text{C}$ 培養下，約一個月後晶體。晶體大小約為 $60\ \mu\text{m} \times 60\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ 。
- G. 以CSI No. 33結晶成分為基準，以蛋白體積比溶液體積1.5:1的比例進行微調於
1/3的drop中可得到較大的晶體。晶體大小約為 $250\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ 。繞
射解析度約 $4.2\ \text{\AA}$
- H. CSII No. 42成分為：1.5 M Ammonium sulfate, 0.1 M Tris pH 8.5, 12% Glycerol。

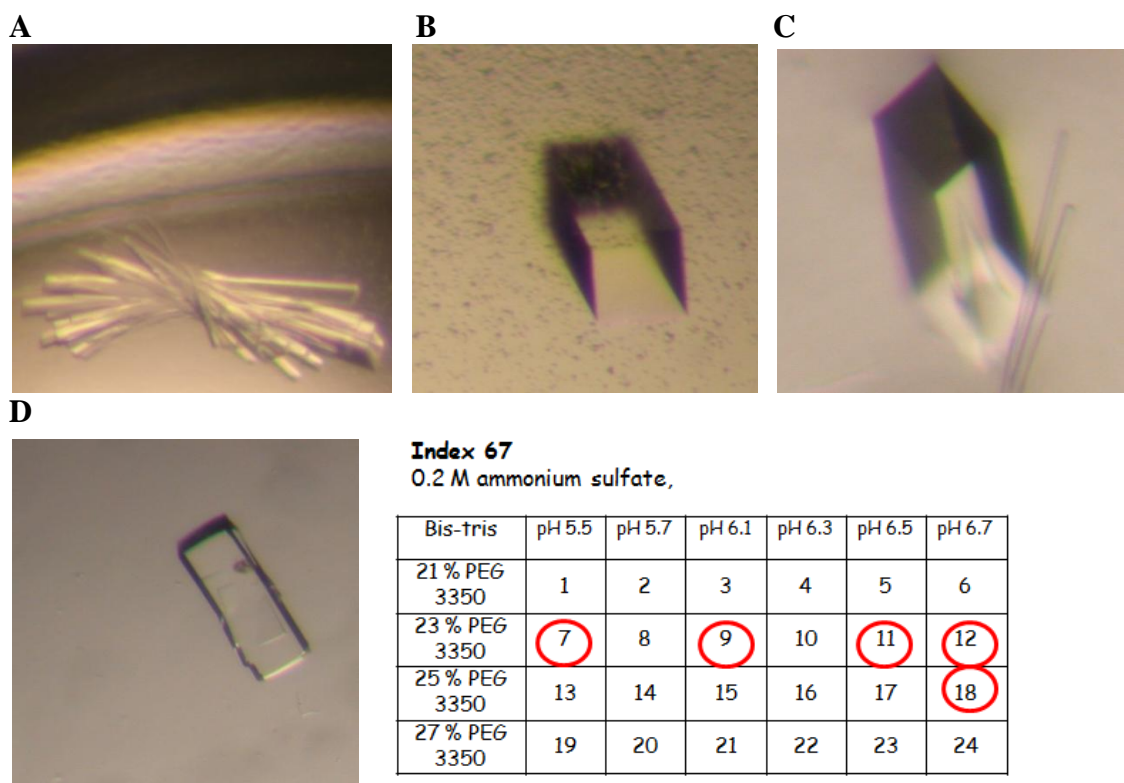


圖3-20 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體之晶體 (二)

- A. Index No. 67成分為：0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), 25 % w/v PEG 3350。
- B. 以Index No. 67為基準進行微調 (hanging drop vapor diffusion)，其微調條件如上表，可在紅色圈圈的成分中得到較大的長方柱單晶。晶體大小約為50 μm \times 50 μm \times 200 μm 。繞射解析度約為4.5 \AA 。
- C. 以Index No. 67為基準進行微調 (sitting drop vapor diffusion)，其微調條件如上表，可在紅色圈圈的成分中得到較大的長方柱單晶。。晶體大小約為50 μm \times 50 μm \times 200 μm 。
- D. 以Index No. 67為基準進行Seeding。晶體大小約為30 μm \times 30 μm \times 100 μm 。

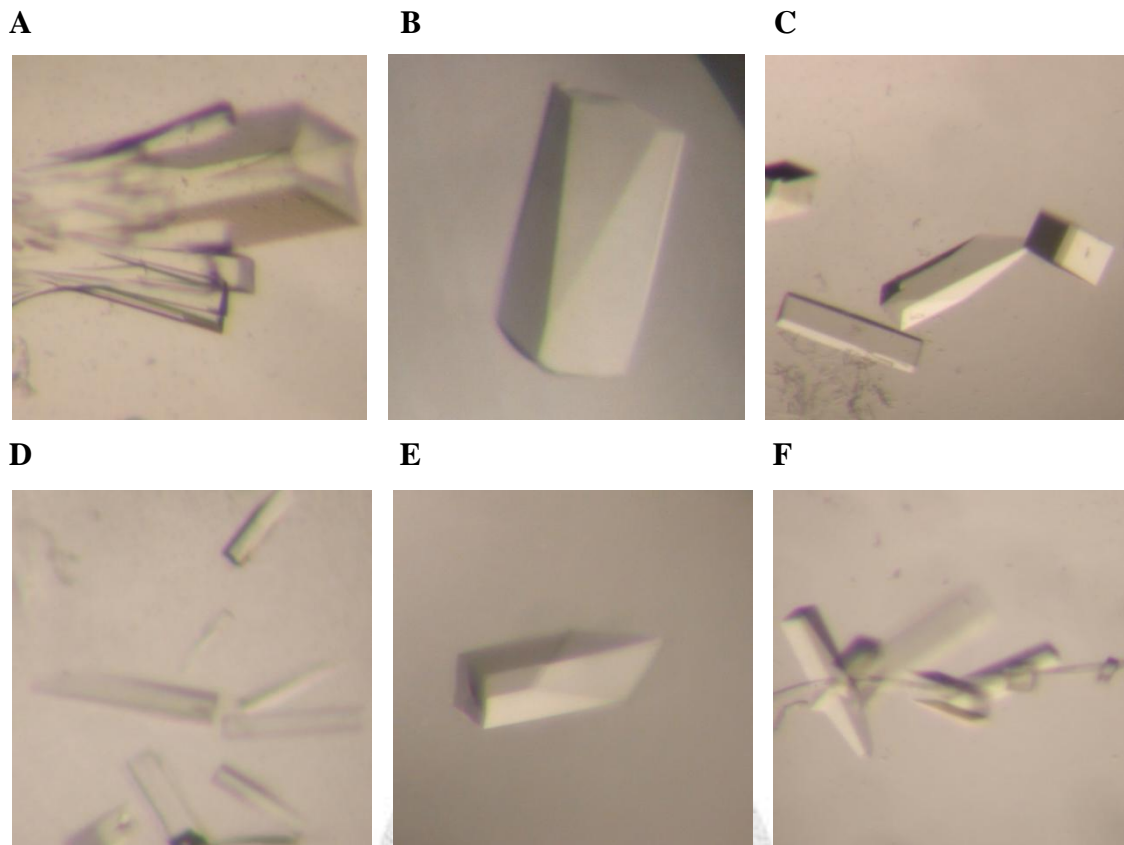


圖3-21 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體之晶體 (三)

以0.2 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), 23% w/v PEG 3350為基準進行添加物試驗。

- A. 添加No. 3 final 10 mM Calcium chloride。形成多晶。
- B. 添加No. 68 final 0.015 mM Cymal-2。晶體大小約為0.7 mm × 0.7 mm × 1 mm。
- C. 添加No. 81 final 3% Dioxane。晶體大小約為0.1 mm × 0.1 mm × 0.7 mm。
- D. 添加No. 85 final 4% v/v 1,3 Propanol。晶體大小約為0.1 mm × 0.1 mm × 0.7 mm。
- E. 添加No. 87 final 4% v/v 1,3 Propandiol。晶體大小約為0.2 mm × 0.2 mm × 0.5 mm。
- F. 添加No. 90 final 4% v/v n-Propanol。晶體大小約為0.1 mm × 0.1 mm × 0.5 mm。

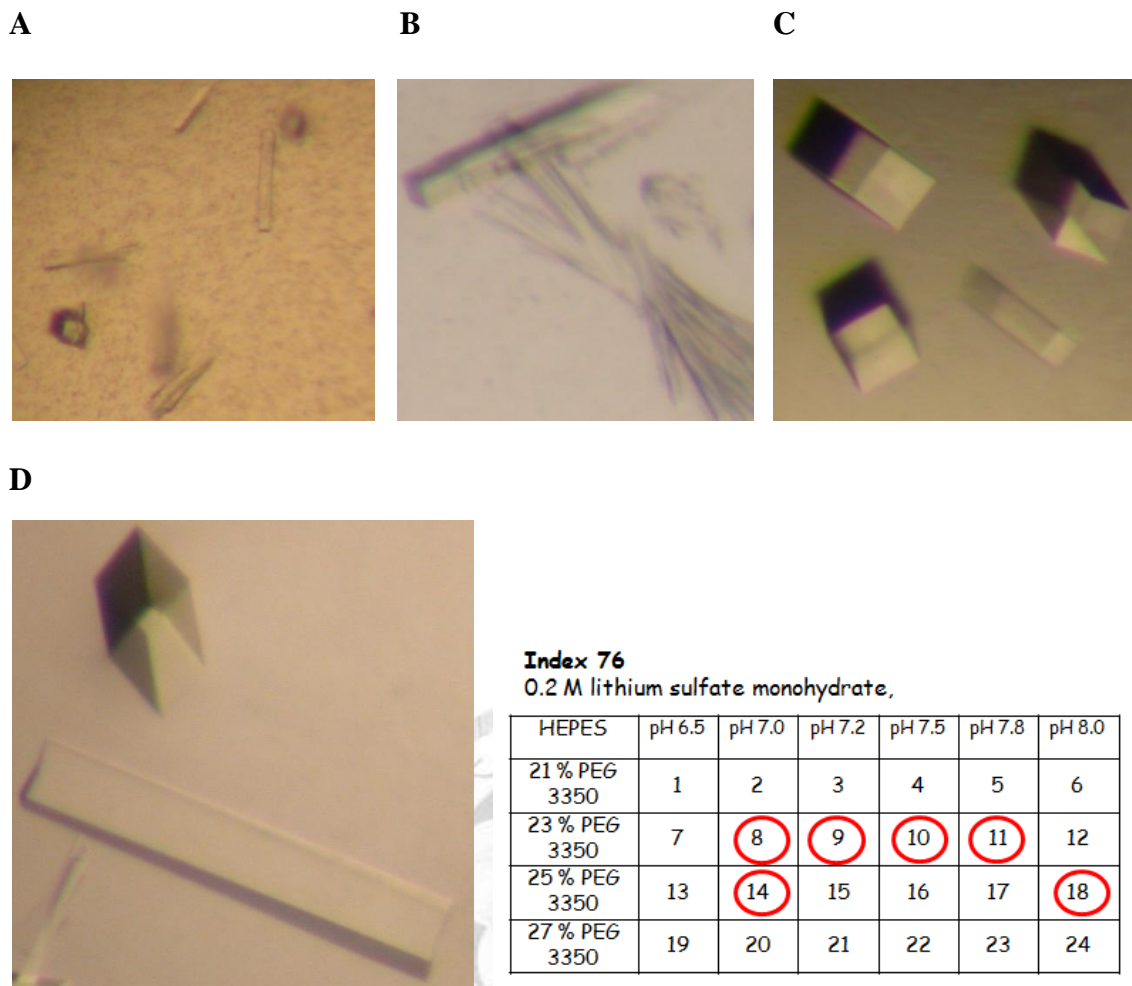


圖3-22 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體之晶體 (四)

- A. Index No. 76成分為：0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M HEPES Na (pH 7.5), 25% w/v PEG 3350。
- B. 以Index No. 76為基準進行微調(sitting drop vapor diffusion)，其微調條件如上表，可在紅色圈圈的成分中形成多晶。
- C. 以Index No. 76為基準進行微調(hanging drop vapor diffusion)，其微調條件如上表，可在紅色圈圈的成分中得到較大的長方柱單晶。一星期之後可看到晶體大小約為 $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ 。繞射解析度約為 $4.0\ \text{\AA}$ 。
- E. 同上。一個月後可長成較大單晶。晶體大小約為 $0.1\ \text{mm} \times 0.1\ \text{mm} \times 0.5\ \text{mm}$ 。

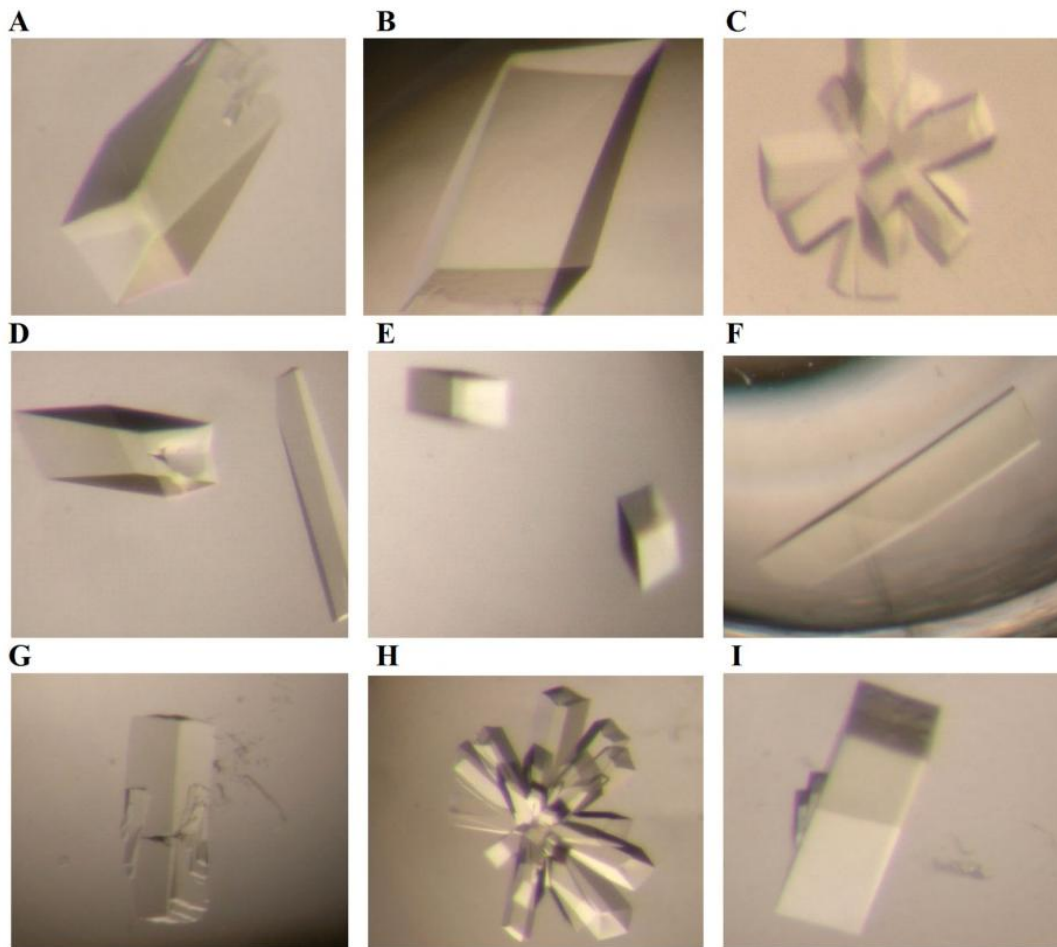


圖3-23 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體之晶體 (五)

以Index No. 76為基準進行添加物試驗

- A. 添加No. 6 final 10 mM MgCl₂。晶體大小約為0.5 mm×0.5 mm×1 mm。
- B. 添加No. 27 final 10 mM Phenol。晶體大小約為0.3 mm×0.3 mm×1 mm。
- C. 添加No. 39 final 10 mM Spermine tetra-HCl。形成多晶。
- D. 添加No. 42 final 10 mM Trimethylamine HCl。晶體大小約為0.2 ×0.2×0.5 (mm³)。
- E. 添加No. 46 final 10 mM ATP disodium salt。晶體大小約為0.1×0.1×0.3 (mm³)。
- F. 添加No. 49 final 10 mM EDTA sodium salt。晶體大小約為0.3×0.3×1.2 (mm³)。
- G. 添加No. 68 final 0.015 mM Cymal-2。形成多晶。
- H. 添加No. 81 final 3% Dioxane。形成多晶。
- I. 添加No. 94 final 0.7% v/v n-Butanol。晶體大小約為0.3 mm × 0.3 mm × 0.5 mm。

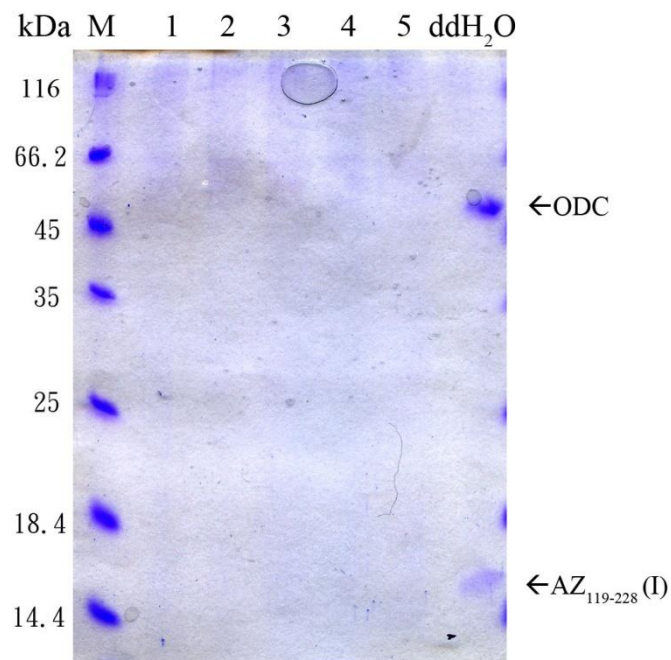
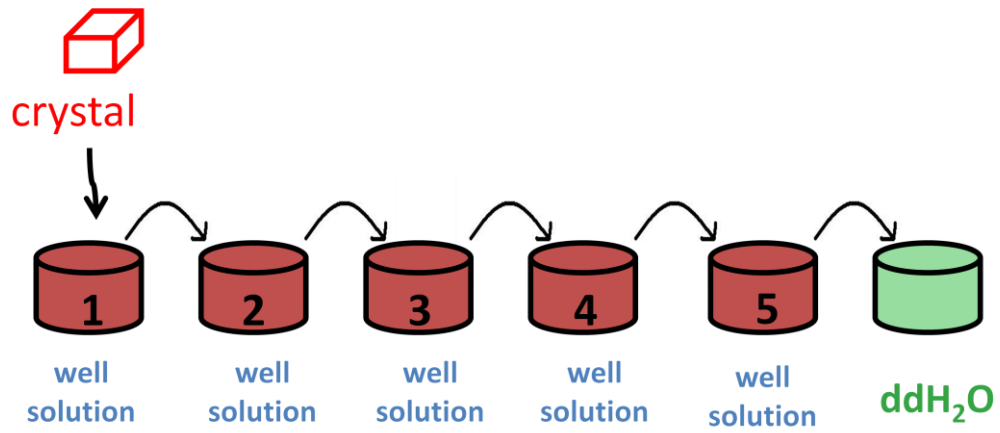


圖3-24 利用SDS-PAGE分析ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白複合體之晶體

將單晶取出並利用結晶試劑浸洗五次，去除結晶表面附著的可溶蛋白質後，將晶體溶於二次水中與coomassie blue混合進行SDS-PAGE確認。

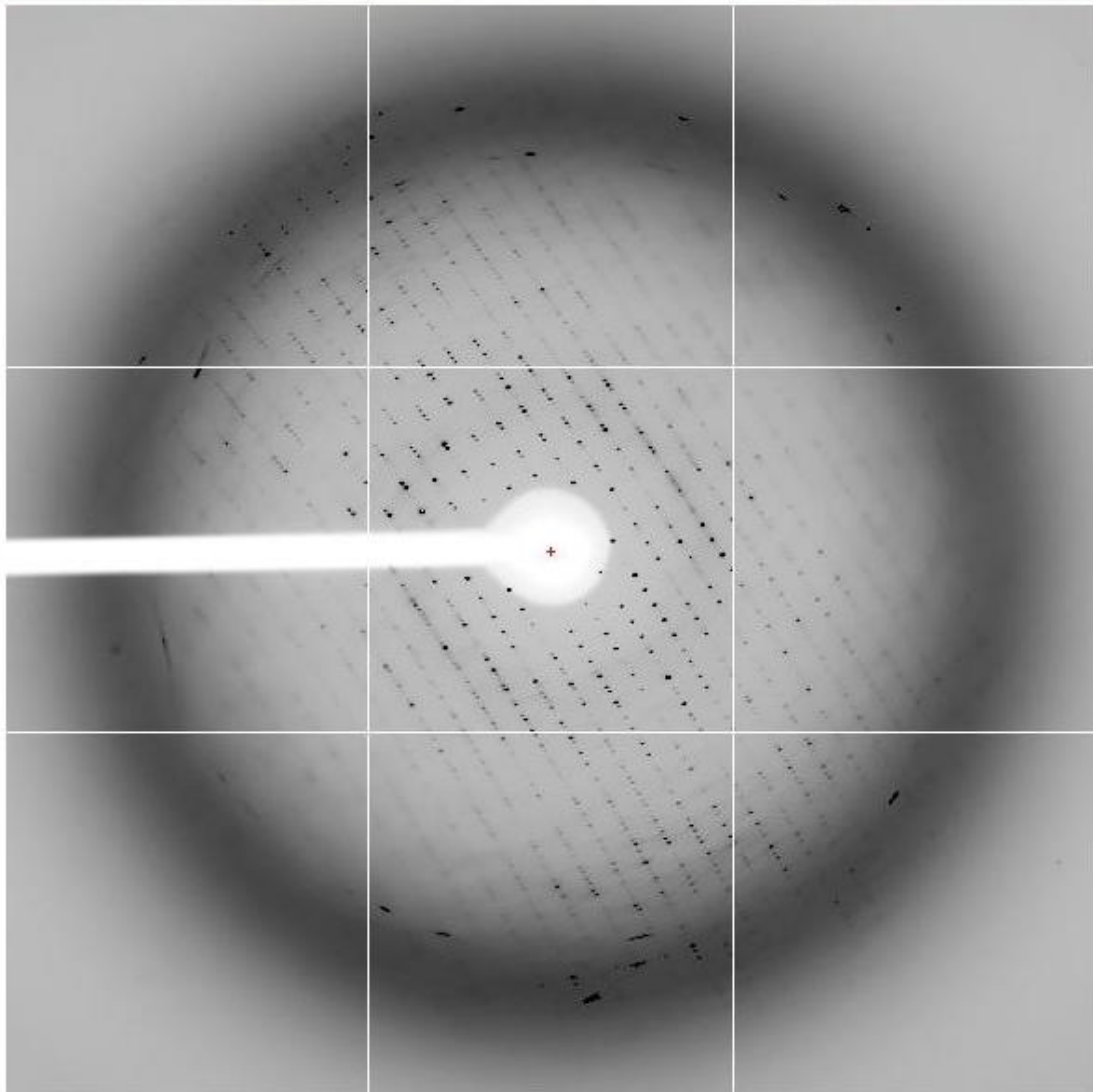


圖3-25 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈ (I)蛋白質晶體繞射圖譜

結晶試劑 (0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M HEPES Na (pH 7.5), 23% w/v PEG 3350, 10 mM MgCl₂) 進行每次三十分鐘提升5% Glycerol的抗凍方式 (最終濃度30%)，X-ray繞射解析度為3.2 Å。

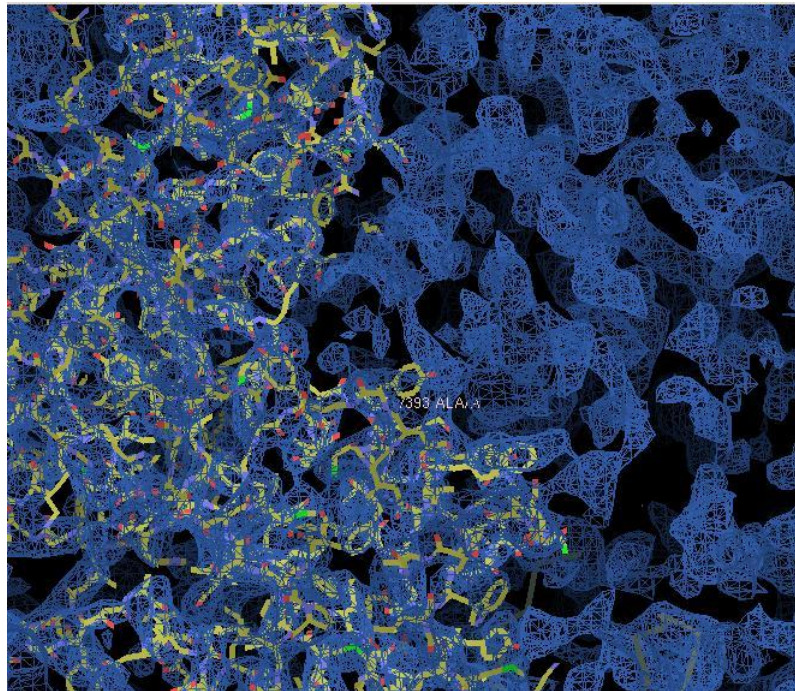
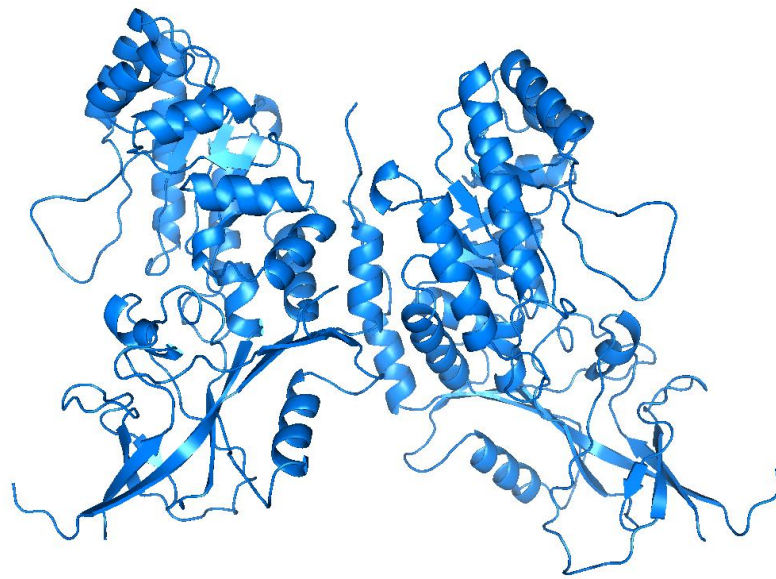


圖3-26 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(I)蛋白質電子密度分布圖

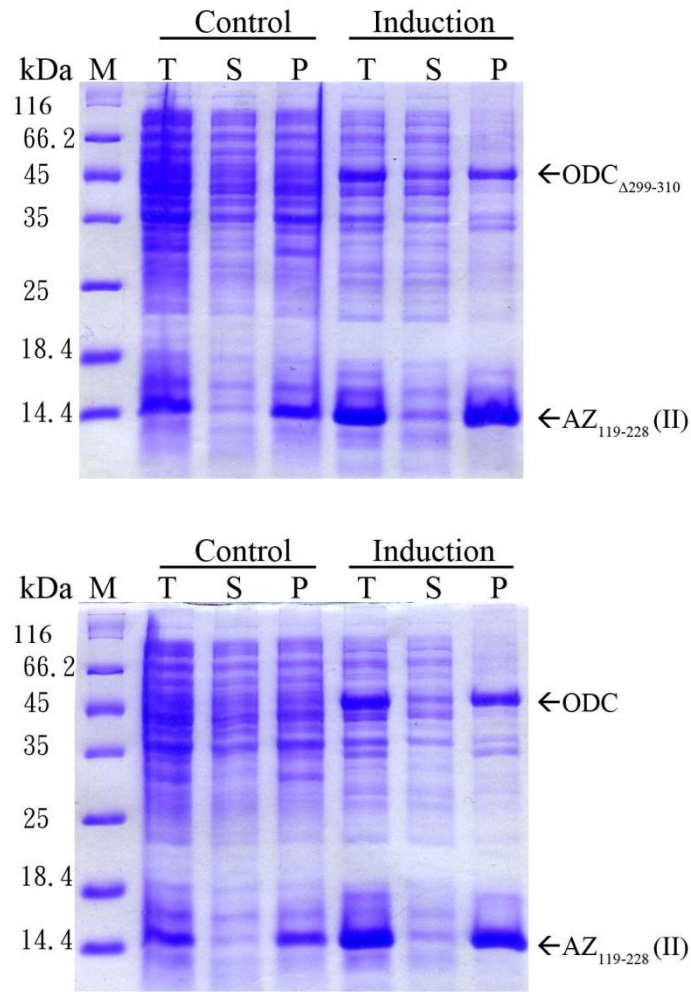


圖3-27 ODC Δ 299-310-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)與ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)複合體小量蛋白質表現

上圖為ODC Δ 299-310-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)複合體小量蛋白質表現，下圖為ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)複合體小量蛋白質表現。(ODC分子量為51.25 kDa，ODC Δ 299-310分子量為49.97 kDa，AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)分子量為13.5 kDa)。

Control：未加 IPTG

Induction：加入 final 0.5 mM IPTG

M：Marker (kDa)

T：Total cell lysate

S：Supernatant

P：Pellet

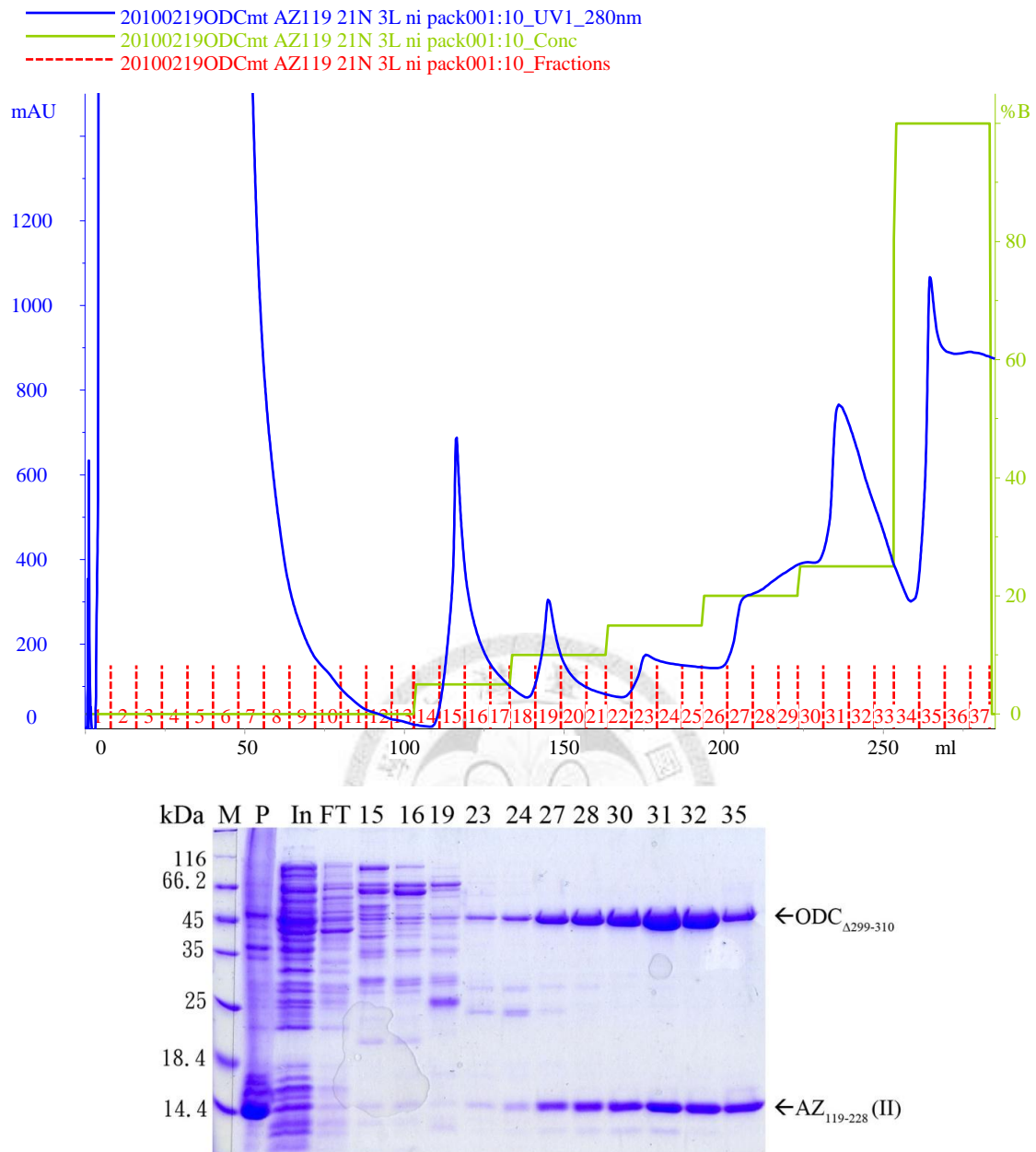


圖3-28 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)複合體經親和性管柱層析結果

上圖為ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)複合體蛋白粗萃取液以親和性管柱 (Ni-affinity column) 層析結果，橫軸代表毫升數，左縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值，右縱軸綠線顯示衝提液中buffer B的濃度。

下圖為Coomassie Blue染色後的SDS-PAGE，M：Marker，P：Pellet，In：Input，FT：Flow through，標示的數字對應著收集的fraction管數。

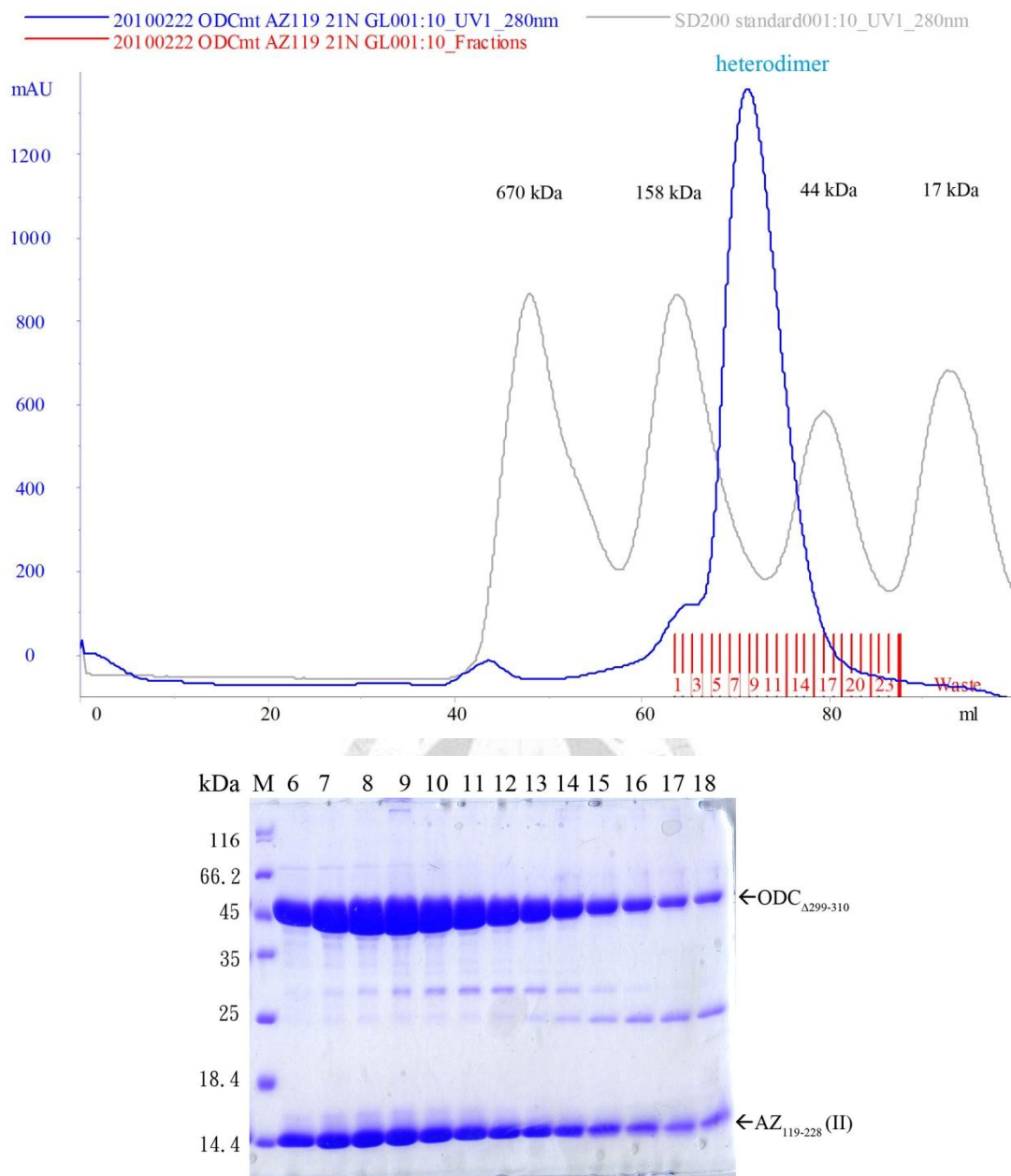


圖3-29 $ODC_{\Delta 299-310}$ - $AZ_{119-228}$ (II)複合體經分子篩管柱層析結果

上圖為分子篩管柱層析結果，橫軸代表毫升數，縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值。

下圖為Coomassie Blue染色後的SDS-PAGE，M：Marker，標示的數字對應著收集的fraction管數。

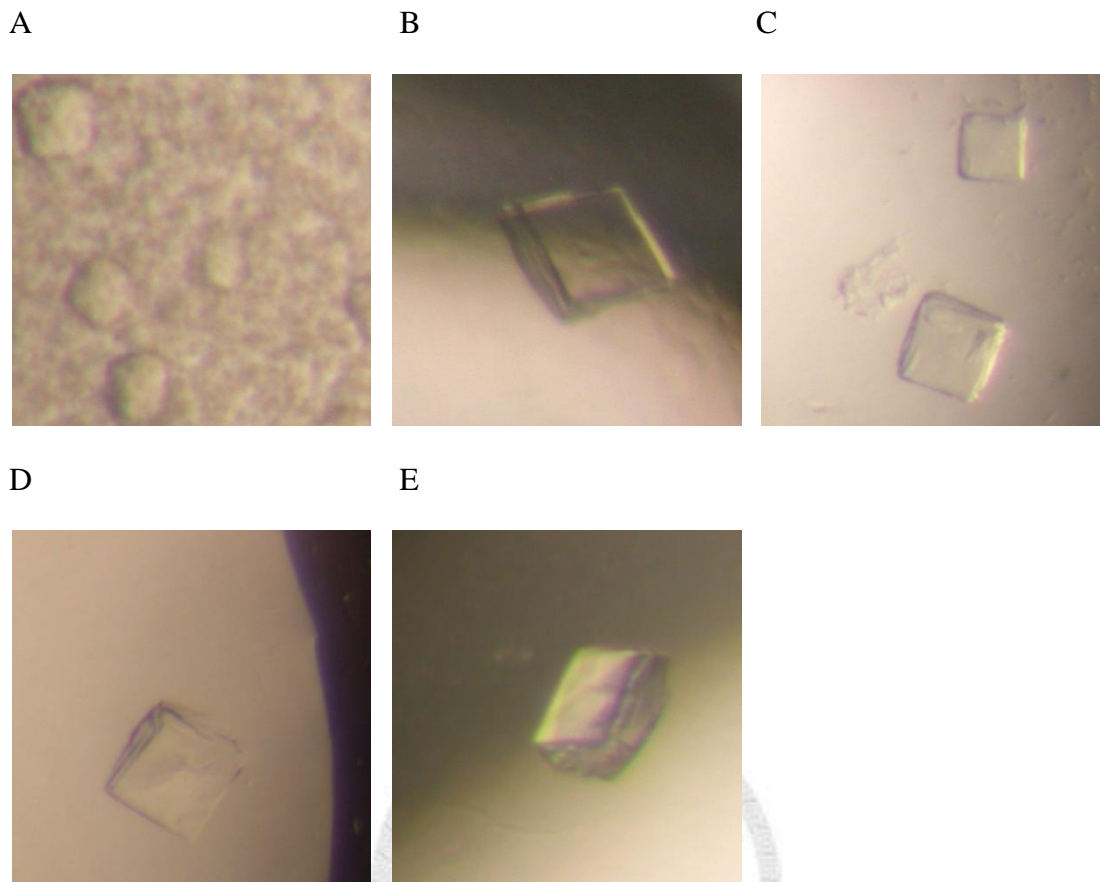


圖3-30 ODC_{Δ299-310}-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體之晶體

A. Index No. 5 成分為：0.1 M HEPES (pH 7.5), 2.0 M ammonium sulfate。蛋白濃度：6 mg/ml。

B. Index No. 4 成分為：0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), 2.0 M ammonium sulfate。蛋白濃度：4 mg/ml。

C. Index No. 5 成分為：0.1 M HEPES (pH 7.5), 2.0 M ammonium sulfate。蛋白濃度：4 mg/ml

D. Grid Screen Ammonium Sulfate kit B6 成分為：0.1 M Bicine (pH 9.0), 1.6 M ammonium sulfate。蛋白濃度：4 mg/ml

E. Quik Screen kit D5 成分為：1.4 M Sodium/Potassium phosphate (pH 7.5)。蛋白濃度：4 mg/ml

以上晶體大小大約為30 μm × 30 μm × 10 μm

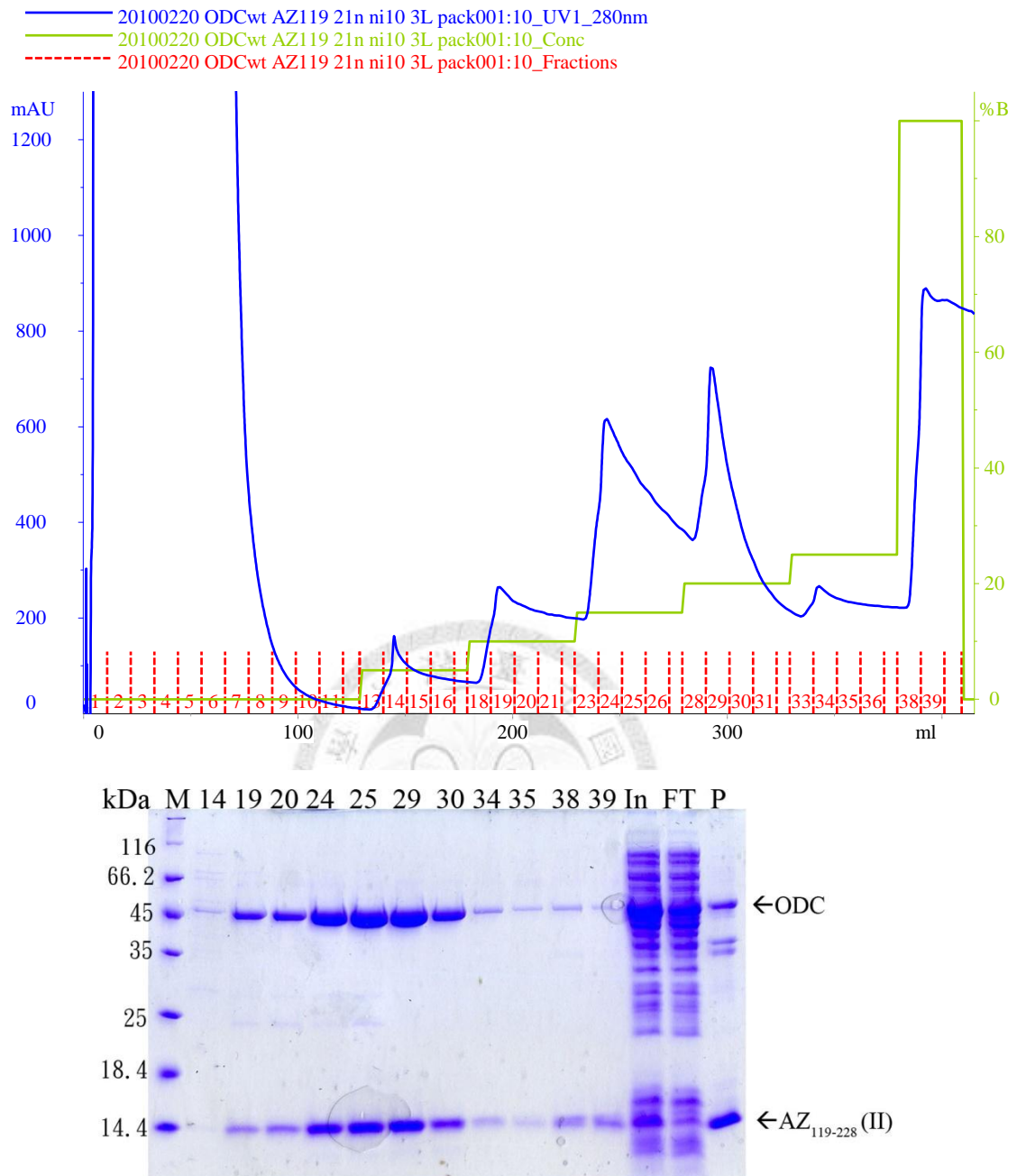


圖3-31 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)複合體經親和性管柱層析結果

上圖為ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)複合體蛋白粗萃取液以親和性管柱 (Ni-affinity column) 層析結果，橫軸代表毫升數，左縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值，右縱軸線線顯示衝堤液中buffer B的濃度。

下圖為Coomassie Blue染色後的SDS-PAGE，M：Marker，P：Pellet，In：Input，FT：Flow through，標示的數字對應著收集的fraction管數。

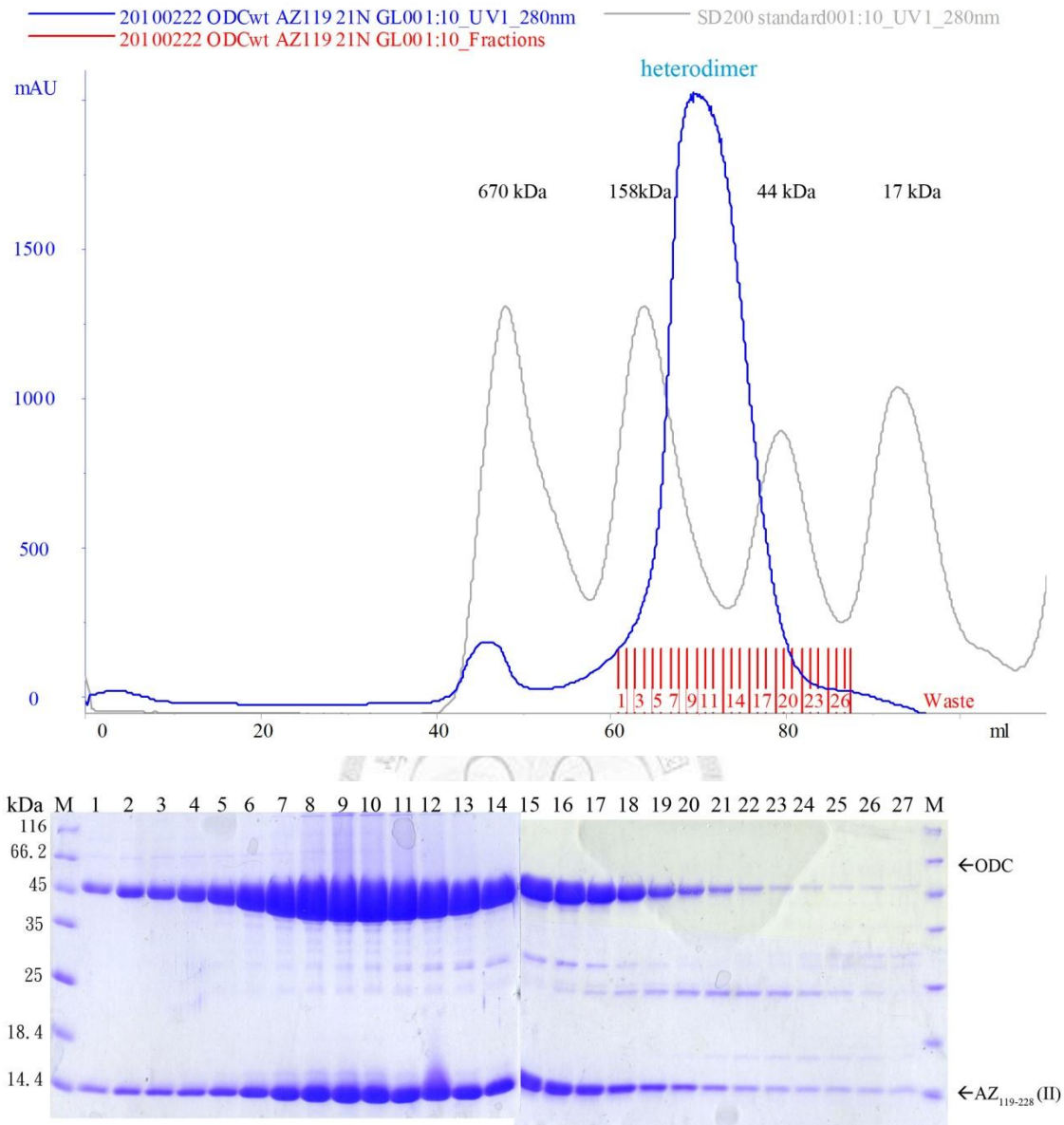


圖3-32 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)複合體經分子篩管柱層析結果

上圖為分子篩管柱層析結果，橫軸代表毫升數，縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值。

下圖為Coomassie Blue染色後的SDS-PAGE，M：Marker，標示的數字對應著收集的fraction管數。

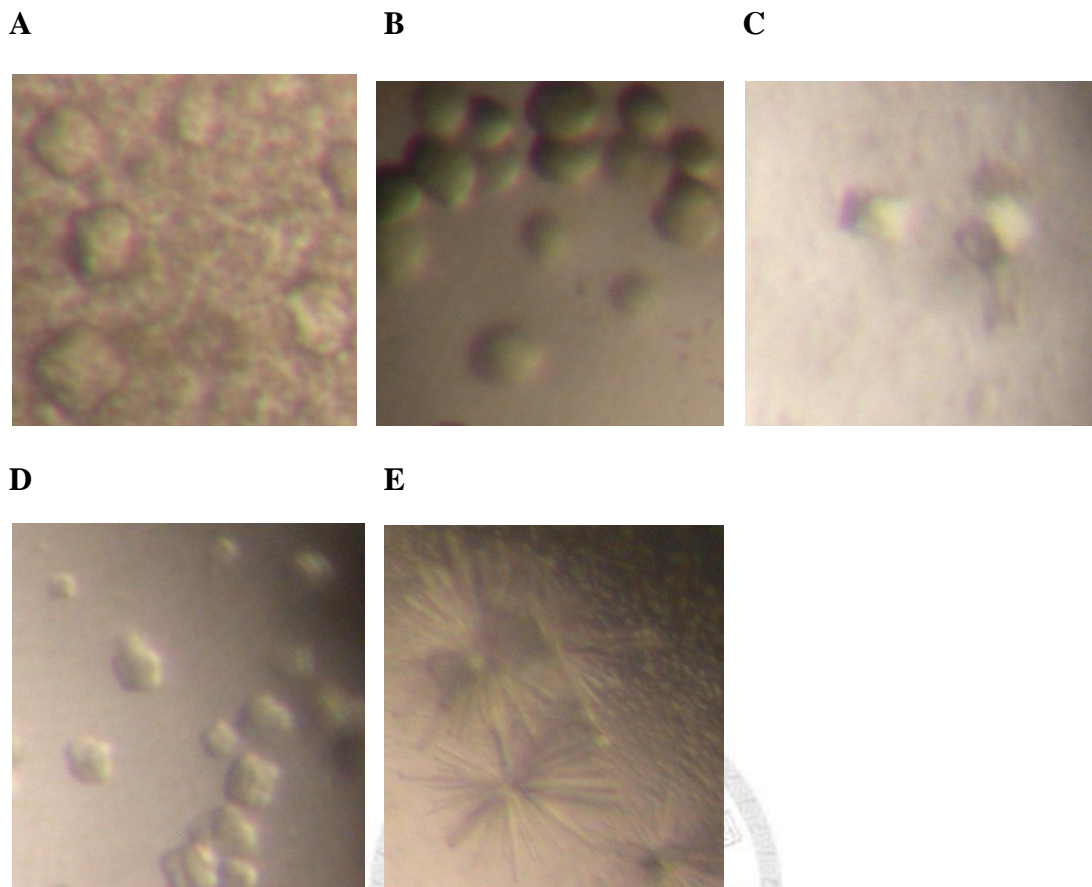


圖3-33 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體之晶體 (一)

- A. CSI No. 39成分為：0.1 M HEPES-Na (pH 7.5), 2.0 M ammonium sulfate, 2% v/v PEG 400。蛋白濃度：6 mg/ml。
- B. CSII No. 23成分為：1.6 M Ammonium sulfate, 0.1 M MES (pH 6.5), 10% v/v Dioxane。蛋白濃度：6 mg/ml。
- C. CSI No. 38成分為：0.1 M HEPES-Na (pH 7.5), 1.4 M tri-sodium citrate dihydrate。蛋白濃度：4 mg/ml。
- D. CSII No. 14成分為：0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M tri-sodium citrate dihydrate (pH 5.6), 2.0 M ammonium sulfate。蛋白濃度：4 mg/ml。
- E. Grid Screen PEG/LiCl kit C3成分為：1.0 M Lithium chloride, 0.1 M MES (pH 6.0), 20% w/v PEG 6000。蛋白濃度：4 mg/ml。

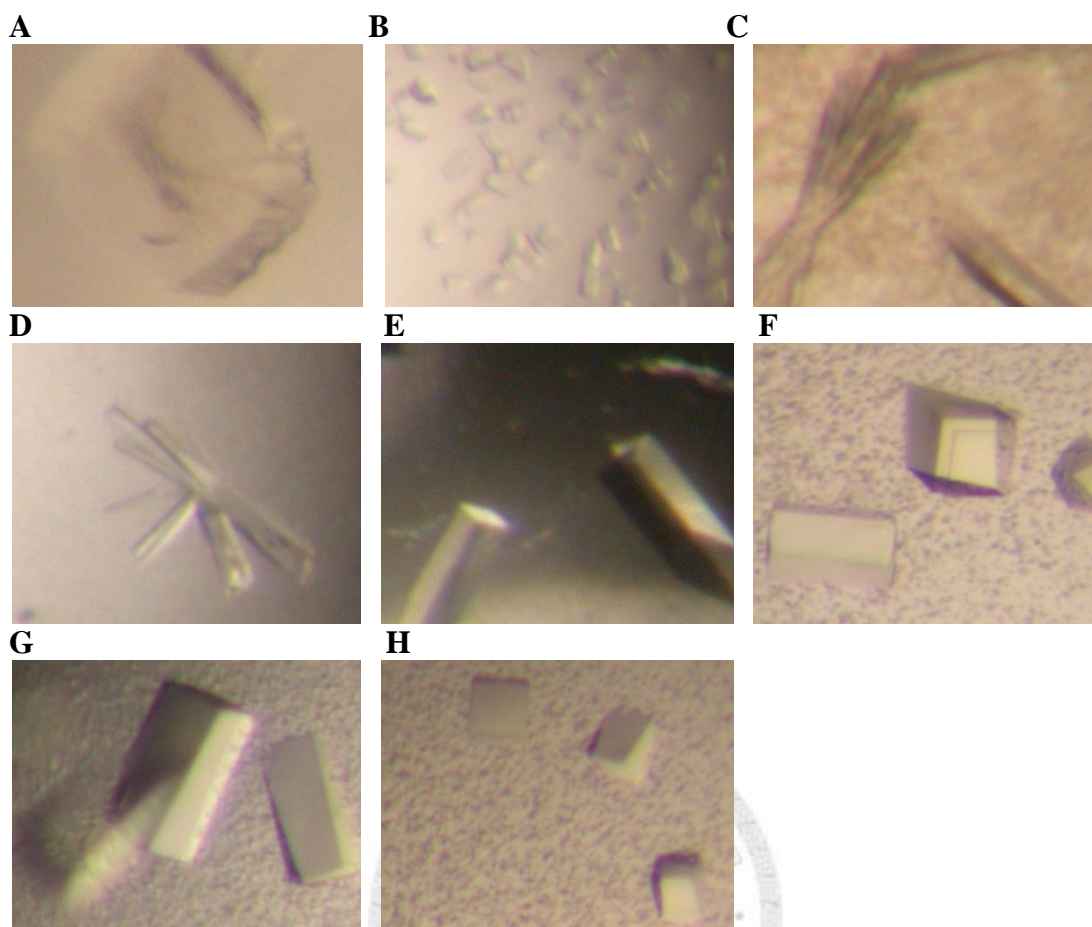


圖3-34 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體之晶體 (二)

蛋白濃度：4 mg/ml

- A. Index No. 4成分為：0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), 2.0 M ammonium sulfate。
- B. Index No. 29成分為：60% Tacsimate (pH 7.0)。
- C. Index No. 66成分為：0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Bis-Tris (pH 5.5), 25% w/v PEG 3350。
- D. Index No. 75成分為：0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), 25% w/v PEG 3350。
- E. Index No. 76成分為：0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M HEPES Na (pH 7.5), 25% w/v PEG 3350。晶體大小約為50 μm \times 50 μm \times 150 μm 。
- F. 以Index No. 66為基準進行微調。晶體大小約為50 μm \times 50 μm \times 100 μm 。
- G. 以Index No. 67為基準進行微調。晶體大小約為50 μm \times 50 μm \times 100 μm 。
- H. 以Index No. 75為基準進行微調。晶體大小約為50 μm \times 50 μm \times 100 μm 。

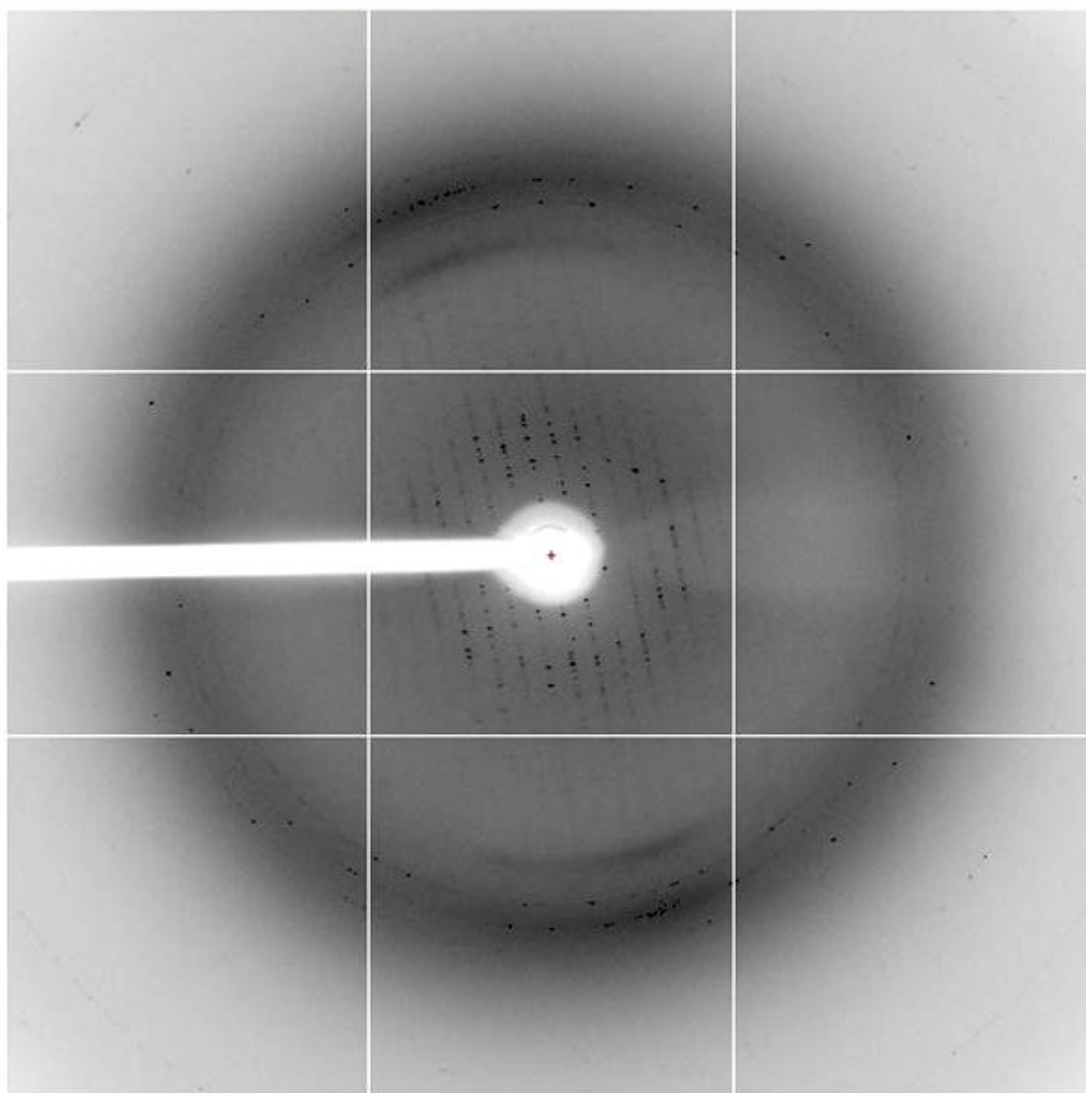


圖3-35 ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈ (II)蛋白質晶體繞射圖譜

取圖3-34E單晶進行x-ray繞射解析，解析度約為4.7 Å。

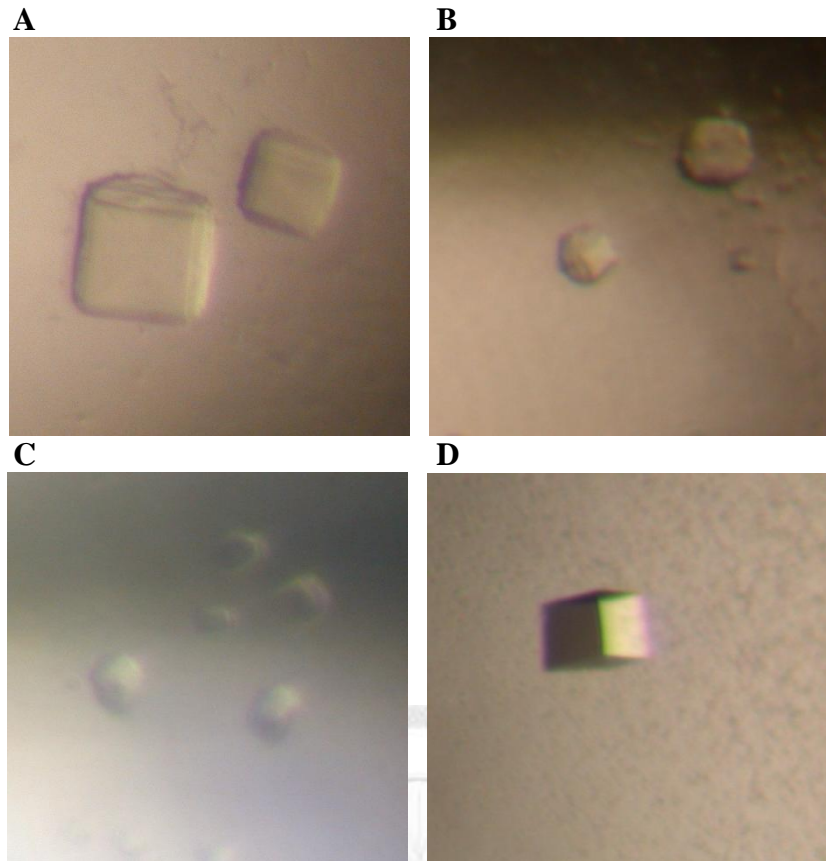


圖3-36 含Selenomethione標定ODC-AZ₁₁₉₋₂₂₈(II)蛋白複合體之晶體

蛋白濃度：4 mg/ml

- A. CSI No. 39成分為：0.1 M HEPES-Na (pH 7.5), 2.0 M ammonium sulfate, 2% v/v PEG 400。
- B. Index No. 3成分為：0.1 M Bis-Tris (pH 5.5), 2.0 M ammonium sulfate
- C. Grid Screen Ammonium Sulfate kit D5成分為：0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 3.0 M ammonium sulfate。
- D. 0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), 25% w/v PEG 3350

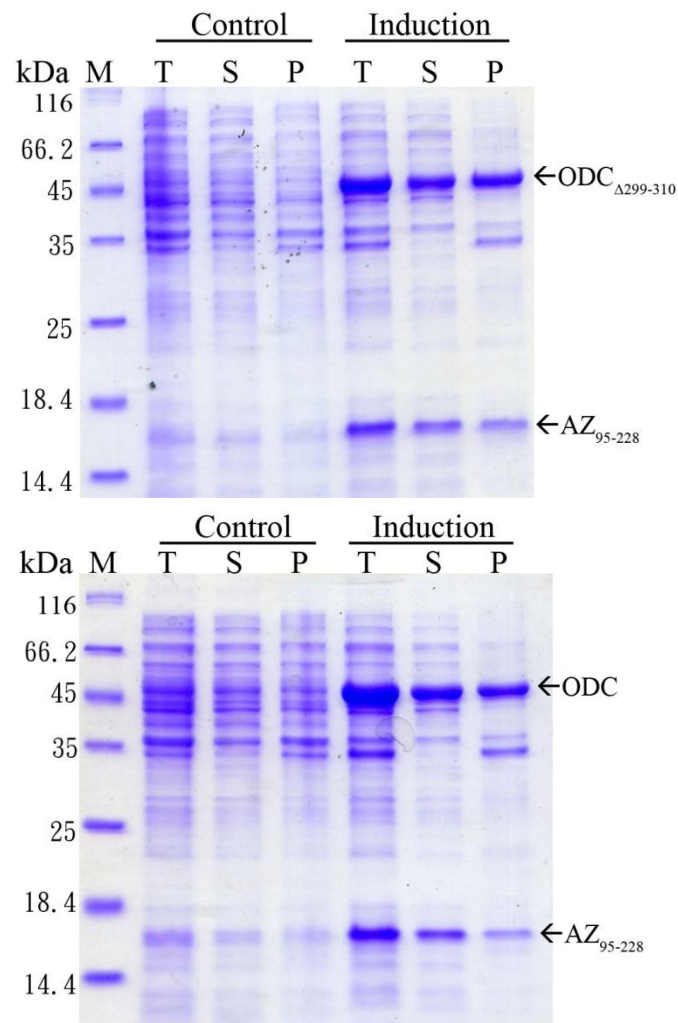


圖3-37 ODC Δ 299-310-AZ₉₅₋₂₂₈複合體與ODC-AZ₉₅₋₂₂₈複合體小量蛋白質表現

上圖為ODC Δ 299-310-AZ₉₅₋₂₂₈複合體小量蛋白質表現，下圖為ODC-AZ₉₅₋₂₂₈複合體小量蛋白質表現。(ODC分子量為51.25 kDa，ODC Δ 299-310分子量為49.97 kDa，AZ₉₅₋₂₂₈分子量為16.1 kDa)。

Control：未加 IPTG

Induction：加入 final 0.5 mM IPTG

M：Marker

T：Total cell lysate

S：Supernatant

P：Pellet

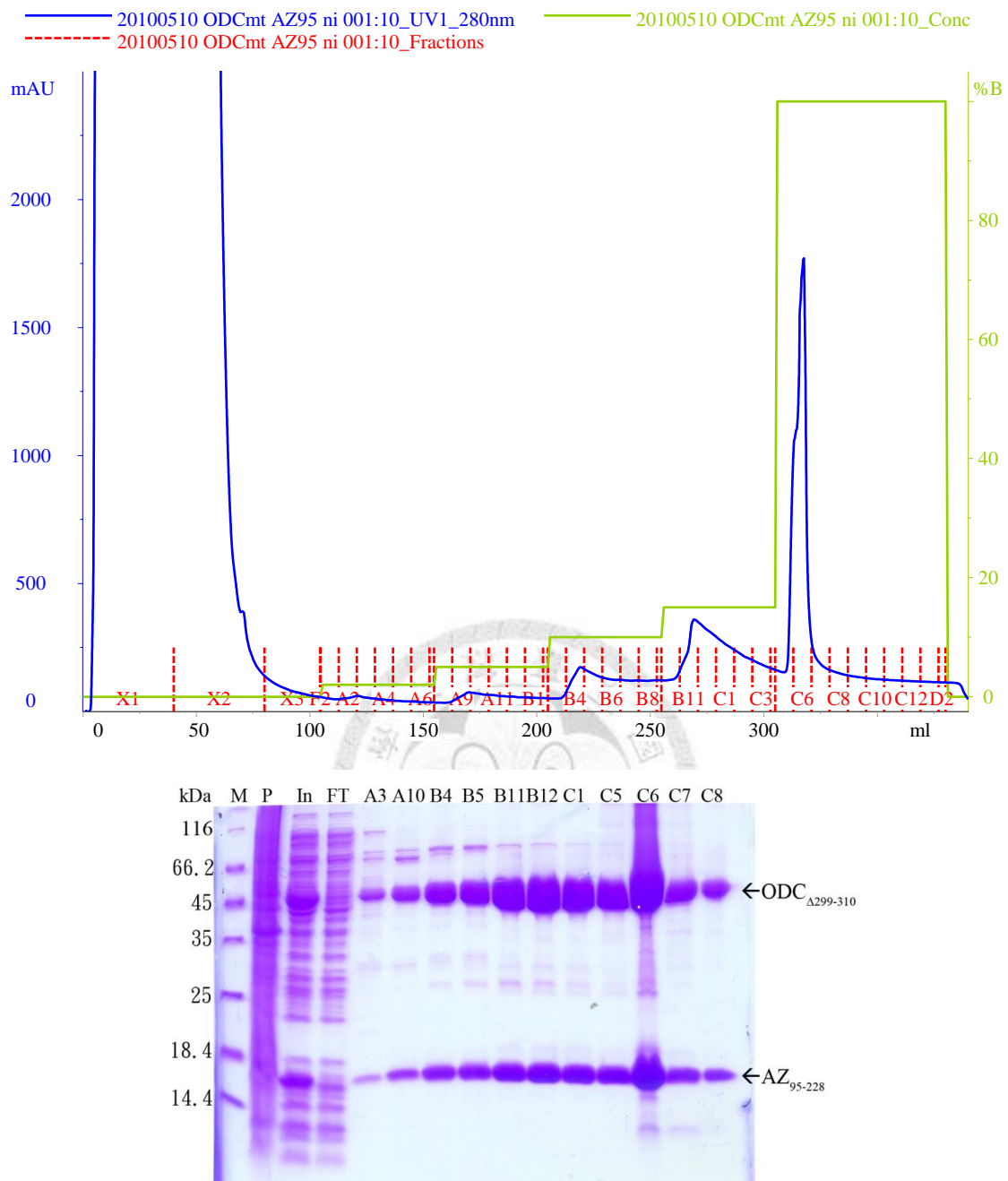


圖3-38 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈複合體經親和性管柱層析結果

上圖為ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈複合體蛋白粗萃取液以親和性管柱 (Ni-affinity column) 層析結果，橫軸代表毫升數，左縱軸代表偵測波長280 nm 之吸光值，右縱軸綠線顯示衝堤液中buffer B的濃度。

下圖為Coomassie Blue染色後的SDS-PAGE，M：Marker，P：Pellet，In：Input，FT：Flow through，標示的數字對應著收集的fraction管數。

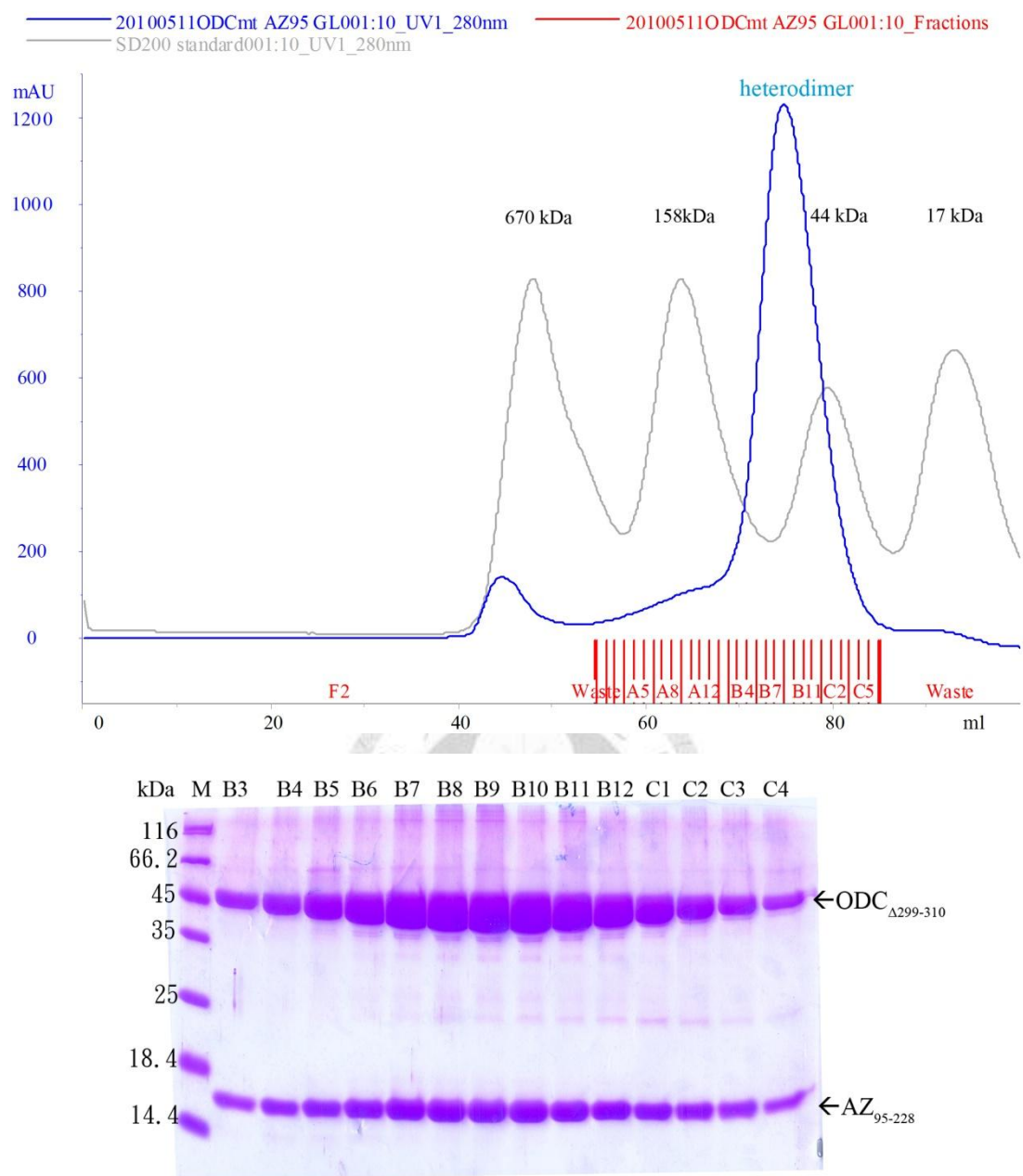


圖3-39 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈複合體經分子篩管柱層析結果

上圖為分子篩管柱層析結果，橫軸代表毫升數，縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值。

下圖為Coomassie Blue染色後的SDS-PAGE，M：Marker，標示的數字對應著收集的fraction管數。

Sample Details

Sample Name: ODCmtAZ95 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: nldlab.dts Dispersant Name: Water
Record Number: 25 Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59 Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01 Measurement Date and Time: 2010年6月8日 上午 11:58...

System

Temperature (°C): 25.0 Duration Used (s): 180
Count Rate (kcps): 38.1 Measurement Position (mm): 4.65
Cell Description: Disposable sizing cuvette Attenuator: 11

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (r.nm): 4.211	Peak 1: 4.358	100.0	0.8885
Pdl: 0.002	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.931	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality **Good**

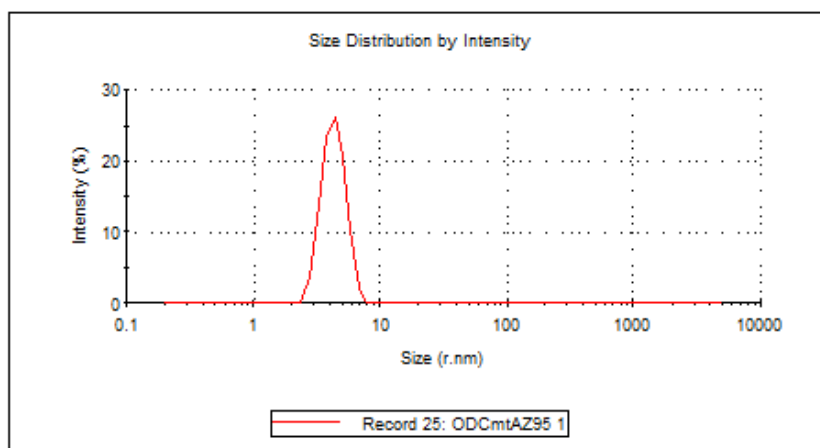


圖 3-40 利用 DLS 測得 ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 複合體之均質性與粒徑大小

ODC_{Δ299-310}-AZ₉₅₋₂₂₈ 之粒徑大小為 4.211 nm, PDI 值為 0.002。

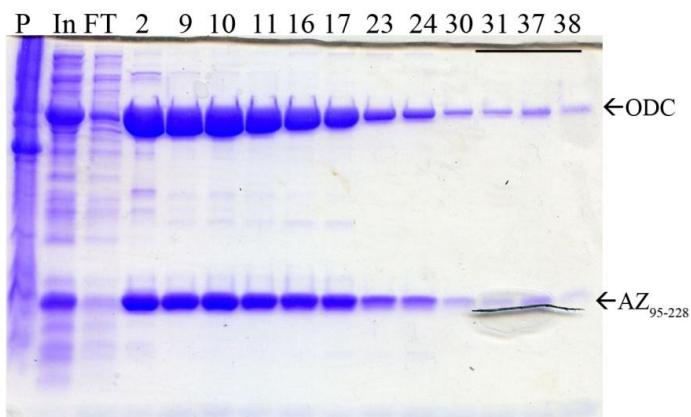
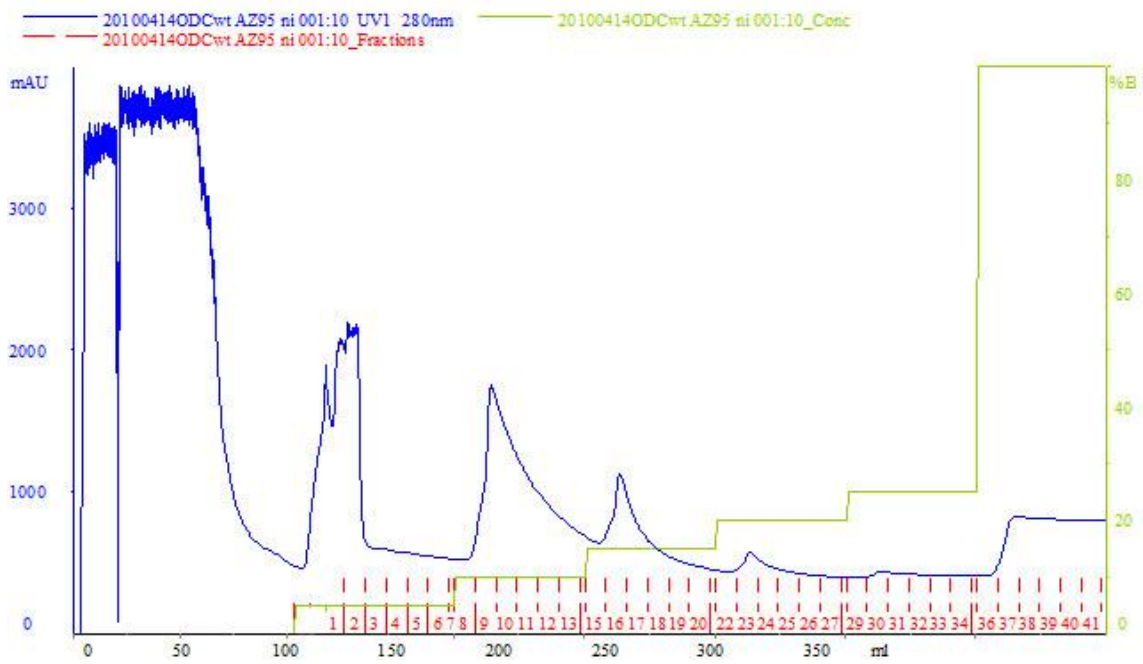


圖3-41 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈複合體經親和性管柱層析結果

上圖為ODC-AZ₉₅₋₂₂₈複合體蛋白粗萃取液以親和性管柱 (Ni-affinity column) 層析結果，橫軸代表毫升數，左縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值，右縱軸綠線顯示衝堤液中buffer B的濃度。

下圖為Coomassie Blue染色後的SDS-PAGE，P: Pellet，In: Input，FT: Flow through，標示的數字對應著收集的fraction管數。

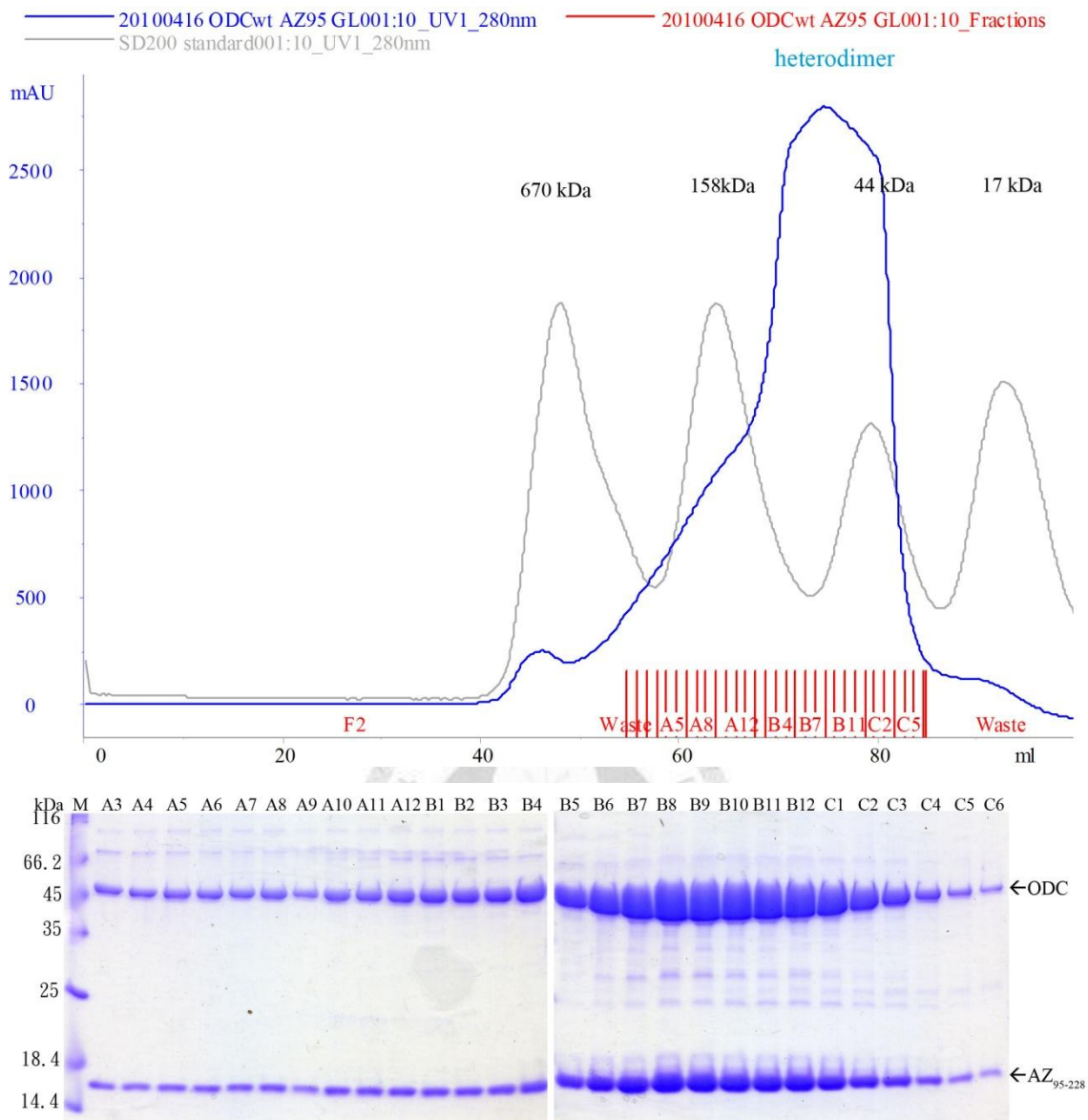


圖3-42 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈複合體經分子篩管柱層析結果

上圖為分子篩管柱層析結果，橫軸代表毫升數，縱軸代表偵測波長280 nm之吸光值。

下圖為Coomassie Blue染色後的SDS-PAGE，M：Marker，標示的數字對應著收集的fraction管數。

Sample Details

Sample Name: ODCwtAZ95 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: NLClab.dts Dispersant Name: Water
Record Number: 163 Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59 Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorption: 0.01 Measurement Date and Time: 2010年6月8日 下午 12:09...

System

Temperature (°C): 25.0 Duration Used (s): 160
Count Rate (kcps): 43.5 Measurement Position (mm): 4.65
Cell Description: Disposable sizing cuvette Attenuator: 11

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (r.nm): 4.371	Peak 1: 4.480	100.0	0.8446
PdI: 0.023	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.931	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality **Good**

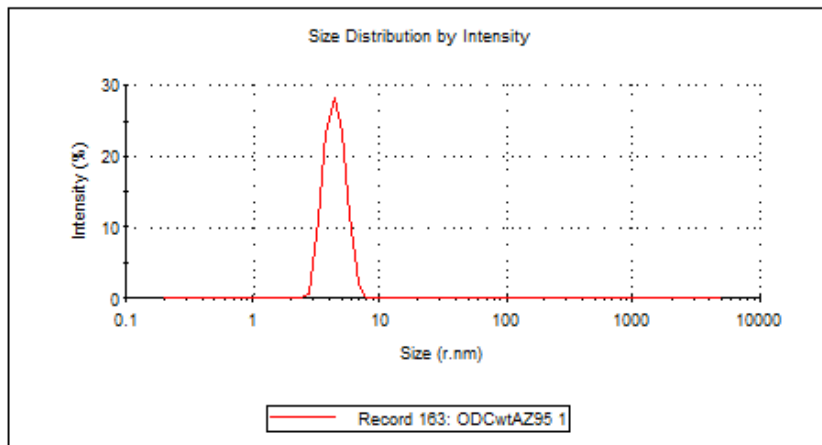


圖 3-43 利用 DLS 測得 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 複合體之均質性與粒徑大小

ODC-AZ₉₅₋₂₂₈ 之粒徑大小為 4.371 nm, PDI 值為 0.023。



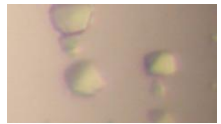




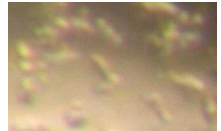


Hampton Number	condition	crystal
CS Lite No. 40	0.1 M tri-sodium citrate dihydrate pH (5.6), 10% v/v iso-propanol, 10 % w/v PEG 4000	
Natrix No. 16	0.04 M Magnesium acetate, 0.05 M Na cacodylate (pH 6.0) , 30% v/v MPD	
Grid Screen PEG 6000 B12	0.1 M Bicine pH 9.0, 30% w/v PEG 6000	
Index No. 85	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M Tris HCl (pH 8.5) , 25% w/v PEG 3350	
Index No. 50	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Bis-Tris (pH 5.5) , 45 % v/v MPD	
Index No. 51	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Bis-Tris (pH 6.5) , 45% v/v MPD	
PEG/Ion2 No. 14	8% v/v Tacsimate (pH 6.0), 20% w/v PEG 3350	
PEG/Ion2 No. 16	8% v/v Tacsimate (pH 7.0), 20% w/v PEG 3350	
PEG/Ion2 No. 32	2% v/v Tacsimate (pH 5.0), 0.1 M Sodium citrate tribasic dehydrate pH 5.6, 16% w/v PEG 3350	
Grid Screen MPD kit C4	0.1 M HEPES (pH 7.0), 40% v/v MPD	

圖3-44 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈蛋白複合體之晶體 (一)

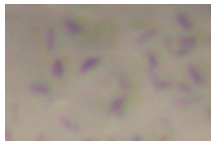
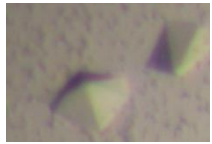
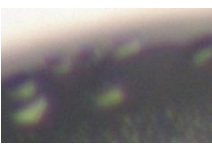
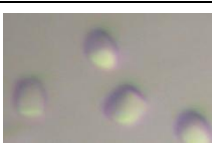

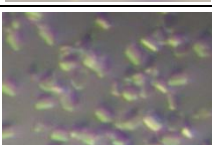
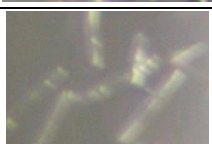
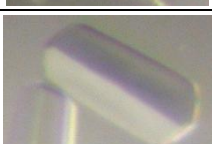

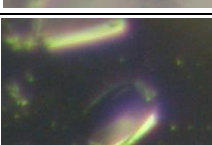
Hampton Number	condition	crystal
CSI No. 9	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M tri-Sodium Citrate dehydrate (pH 5.6), 30% w/v PEG 4000	
CSI No. 21	0.2 M Magnesium acetate, 0.1 M Na Cacodylate (pH 6.5), 30% v/v MPD	
CSI No. 22	0.2 M Sodium acetate, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 30% w/v PEG 4000	
Grid Screen PEG/LiCl B3	1.0 M Lithium chloride, 0.1 M MES (pH 6.0), 10% w/v PEG 6000	
Index No. 56	0.2 M Potassium chloride, 0.05 M HEPES (pH 7.5), 35% v/v Pentaerythritol Propoxylate (5/4 PO/OH)	
Natrix No. 3	0.1 M Magnesium acetate, 0.05 M MES (pH 5.6), 20% v/v MPD	
Natrix No. 4	0.2 M Potassium chloride, 0.01 M Mg sulfate, 0.05 M MES (pH 5.6), 10% v/v PEG 400	
Natrix No. 15	0.04 M Magnesium chloride, 0.05 M Na Cacodylate (pH 6.0), 5% v/v MPD	
Natrix No. 22	0.08 M Magnesium acetate, 0.05 M Na Cacodylate (pH 6.5), 15% v/v PEG 400	
Index No. 85 optimize	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M Tris HCl (pH 8.7) , 25% w/v PEG 3350	

圖3-45 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈蛋白複合體之晶體 (二)


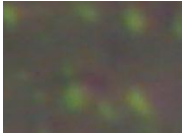
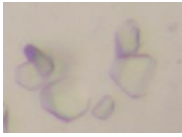


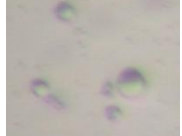
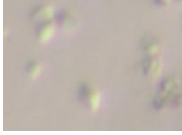
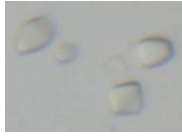

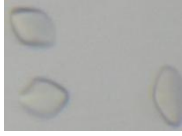
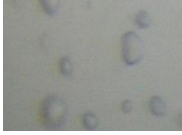
Number	Condition	crystal
CSI No. 6	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M Tris HCl (pH 8.5), 30% w/v PEG 4000	
CSI No. 9	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M tri-sodium Citrate dihydrate (pH 5.6), 30% w/v PEG 4000	
CS Lite No. 40	0.1 M tri-Sodium citrate dihydrate (pH 5.6), 10% v/v iso-propanol, 10% w/v PEG 4000	
Natrix No. 3	0.2 M Magnesium acetate, 0.05 M MES (pH 5.6), 20% v/v MPD	
PEGRx2 No. 2	0.1 M tri-Sodium citrate dihydrate (pH 5.5), 10% v/v 2-propanol, 26% v/v PEG 400	
Index No. 85	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.1 M Tris HCl (pH 8.5), 25% w/v PEG 3350	
Index No. 51	0.2 M Ammonium acetate, 0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), 45% v/v MPD	
MD Structure Screen I No. 16	0.2 M Magnesium acetate, 0.1 M Na cacodylate (pH 6.5), 30% v/v MPD	
EB Cryo Screen I No. 31	0.1 M Na Citrate (pH 5.5), 35% v/v 2-propanol 5% w/v PEG 1000	
MD 3D structure No. 79	0.2 M Magnesium acetate, 0.1 M Na cacodylate (pH 6.5), 21% v/v MPD	
MD 3D structure No. 82	0.2 M Calcium chloride, 0.1 M Na HEPES (pH 7.5), 19.6% v/v PEG 400	

圖3-46 含Se-Methionine標定ODC-AZ₉₅₋₂₂₈蛋白複合體之晶體

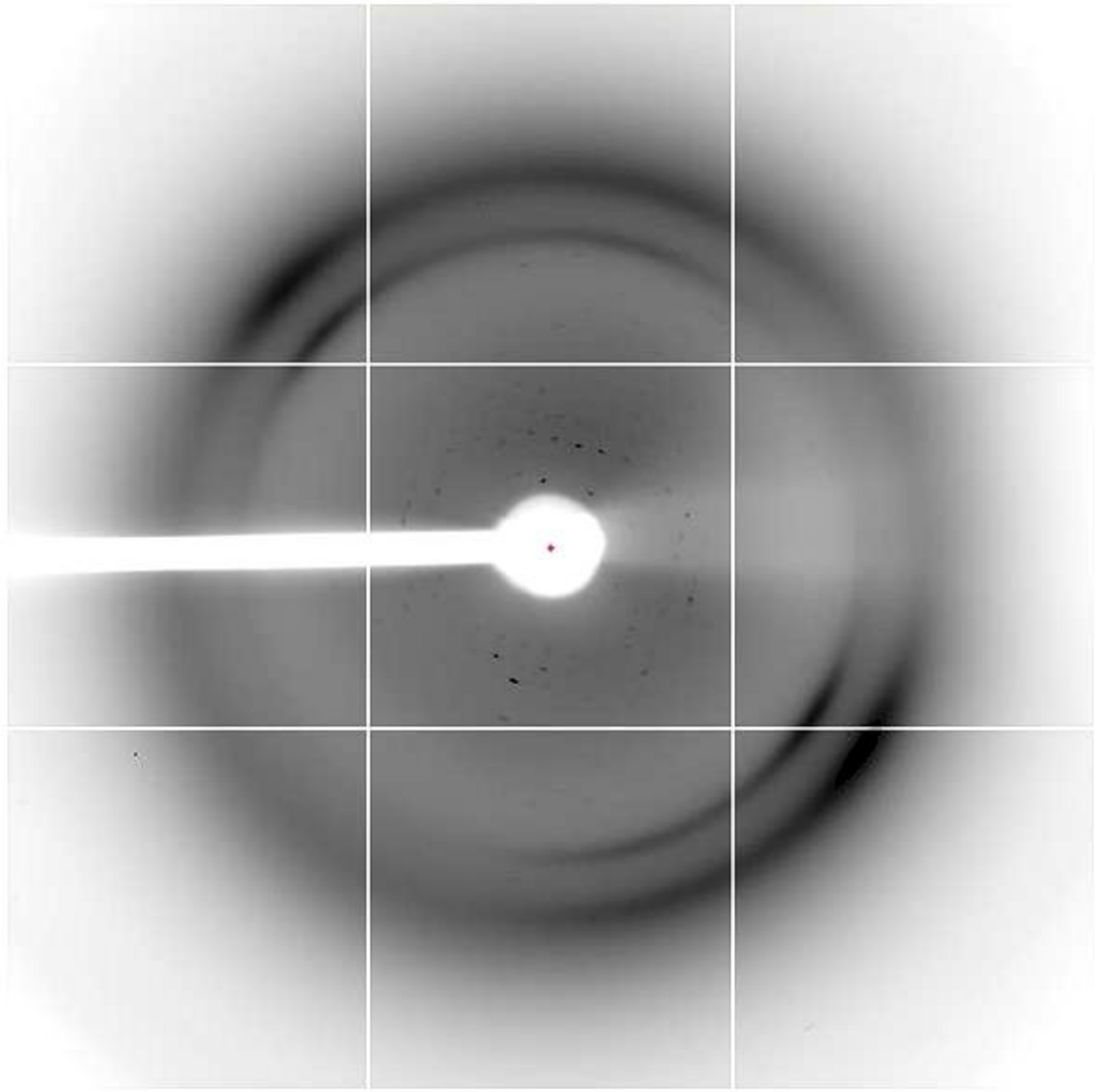


圖3-47 ODC-AZ₉₅₋₂₂₈蛋白質晶體繞射圖譜

取CS Lite No. 40單晶進行X-ray繞射，解析度約為9 Å。

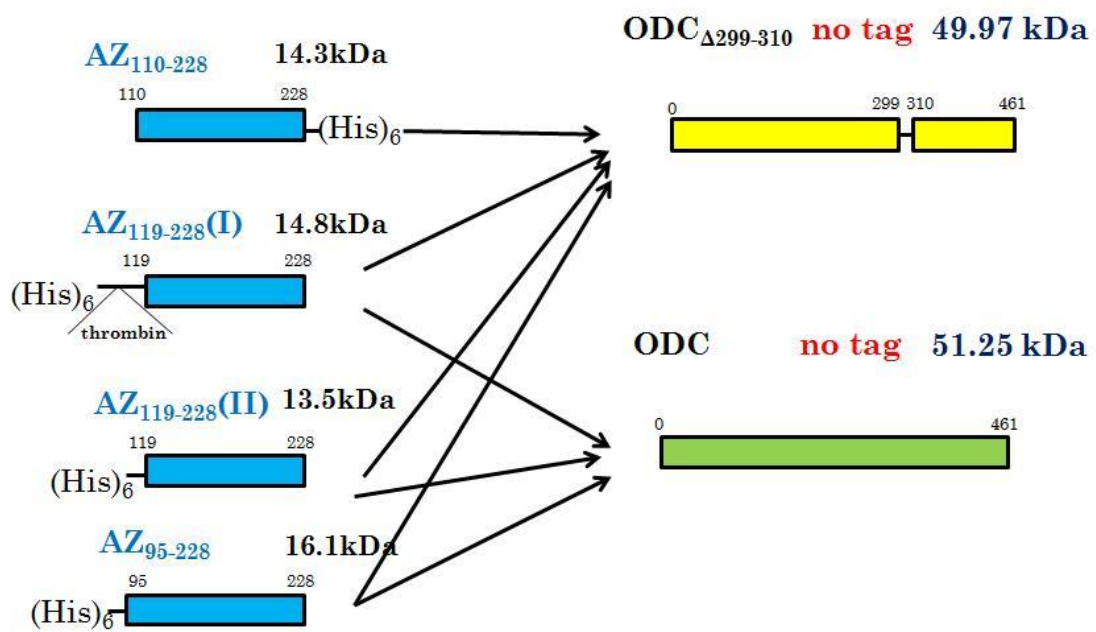


圖 4-1 本論文中所使用的 ODC-AZ 複合體組合



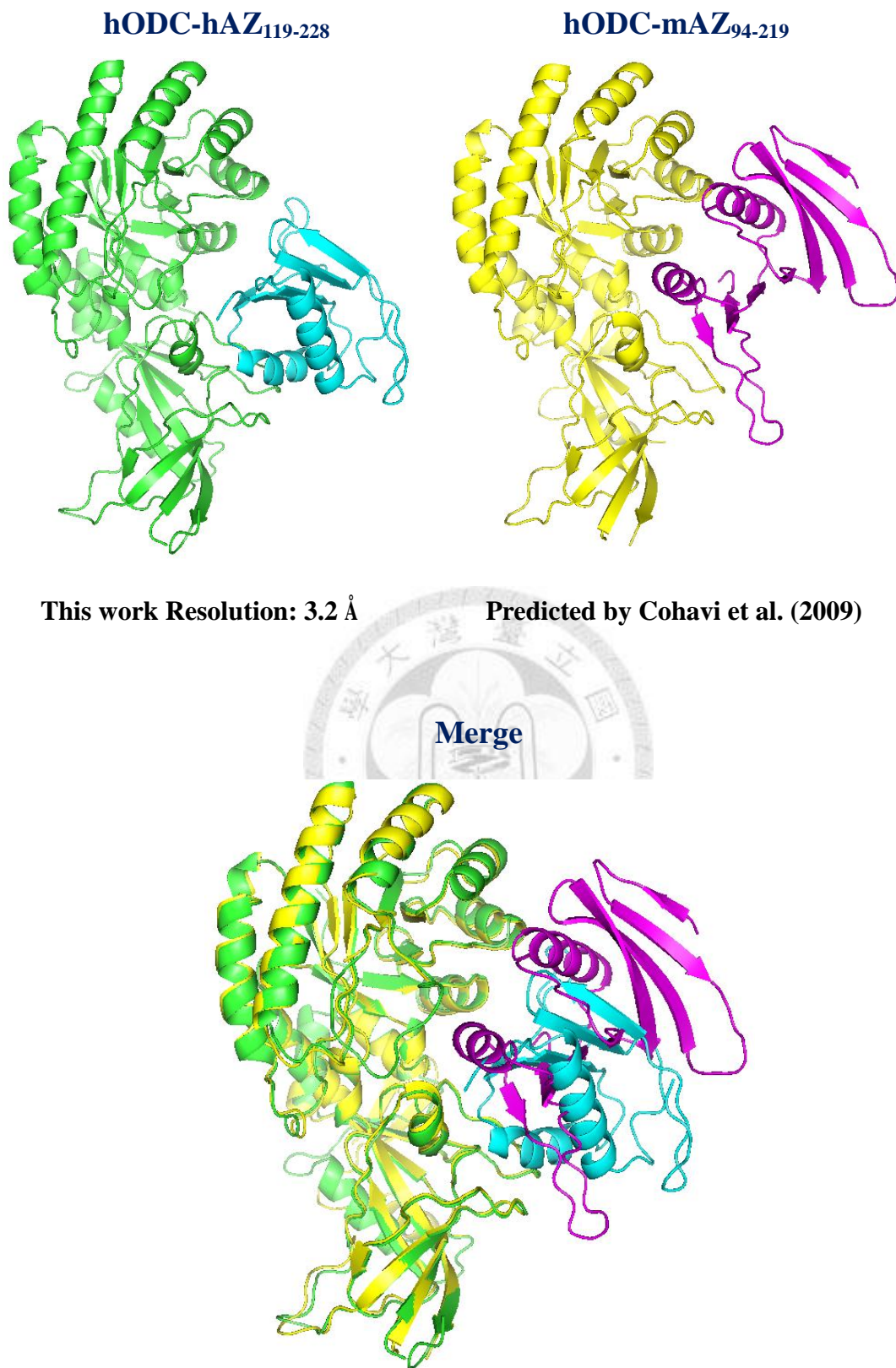


圖 4-2 Molecular replacement 之 ODC-AZ 複合體結構與嵌合結構比較

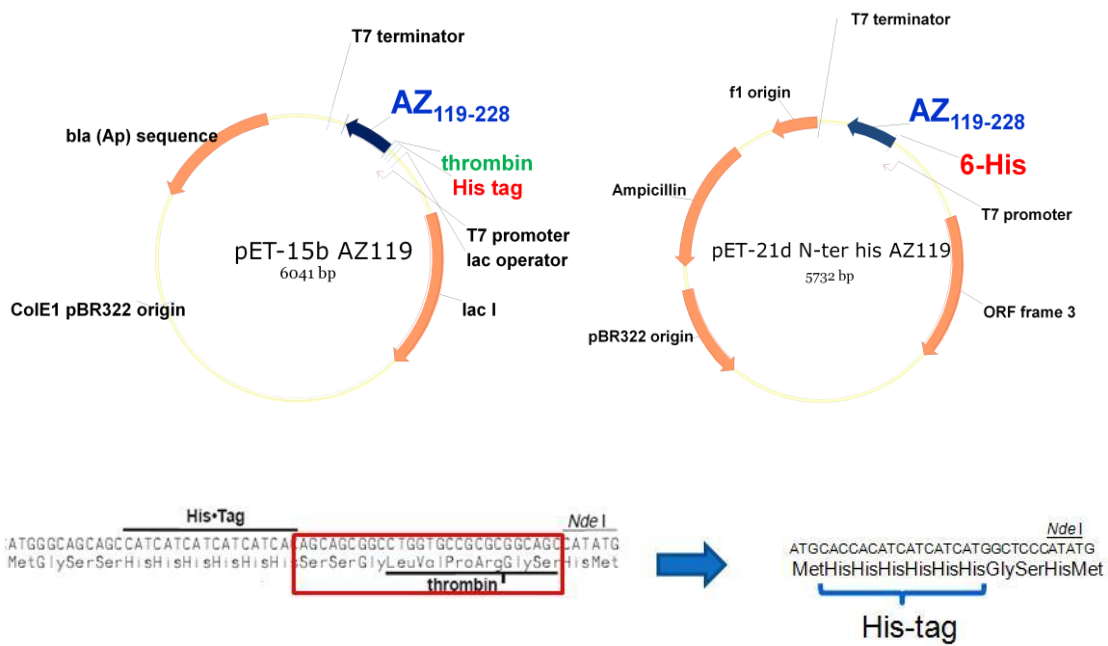


圖 4-3 Shorten the purification tag

左圖為原先接在 pET15b 的 AZ₁₁₉₋₂₂₈，其與 N 端 His-tag 間存在一個沒有特定結構的 thrombin 切位，右圖為重新設計一個 His-tag 可直接連結至 AZ₁₁₉₋₂₂₈ 的 N 端。

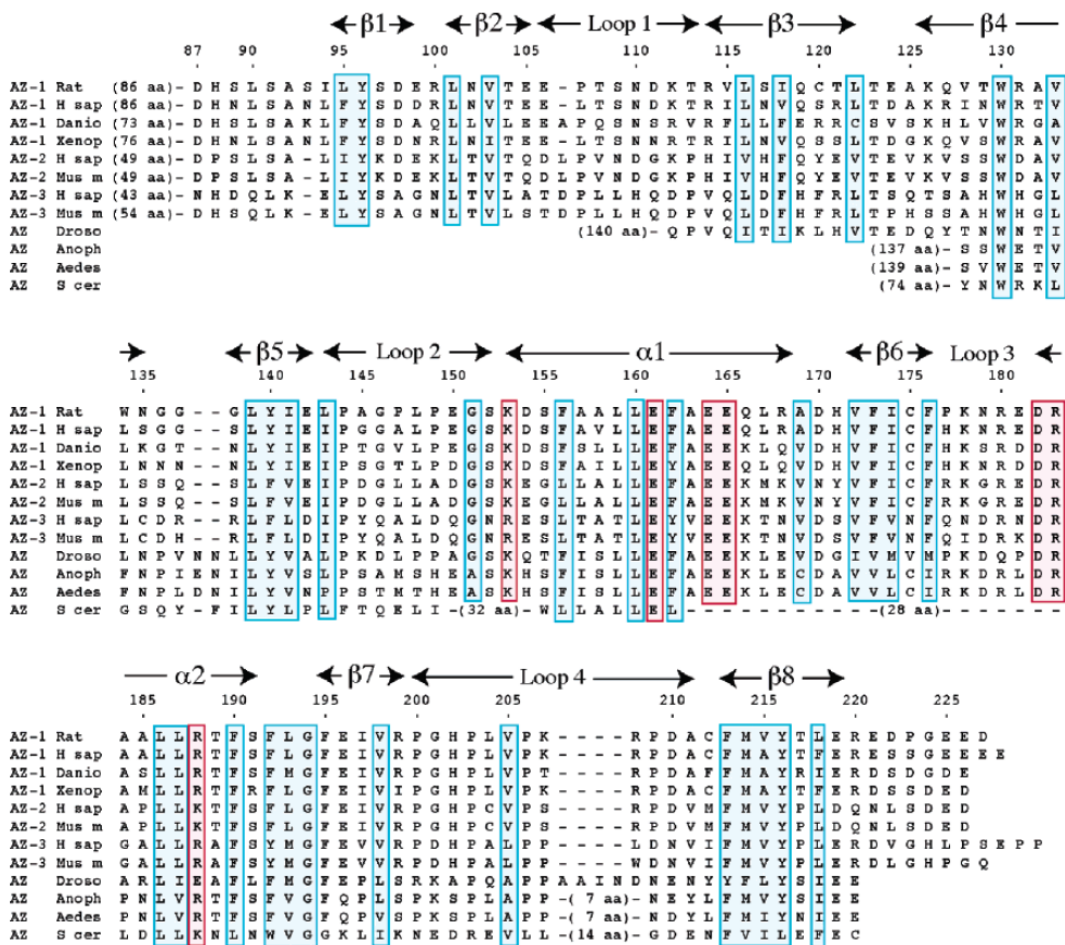


圖 4-4 真核生物 AZ 蛋白胺基酸序列比對

老鼠與人類 AZ 蛋白胺基酸序列高達 90% 相同度。(Hoffman et al., 2005)

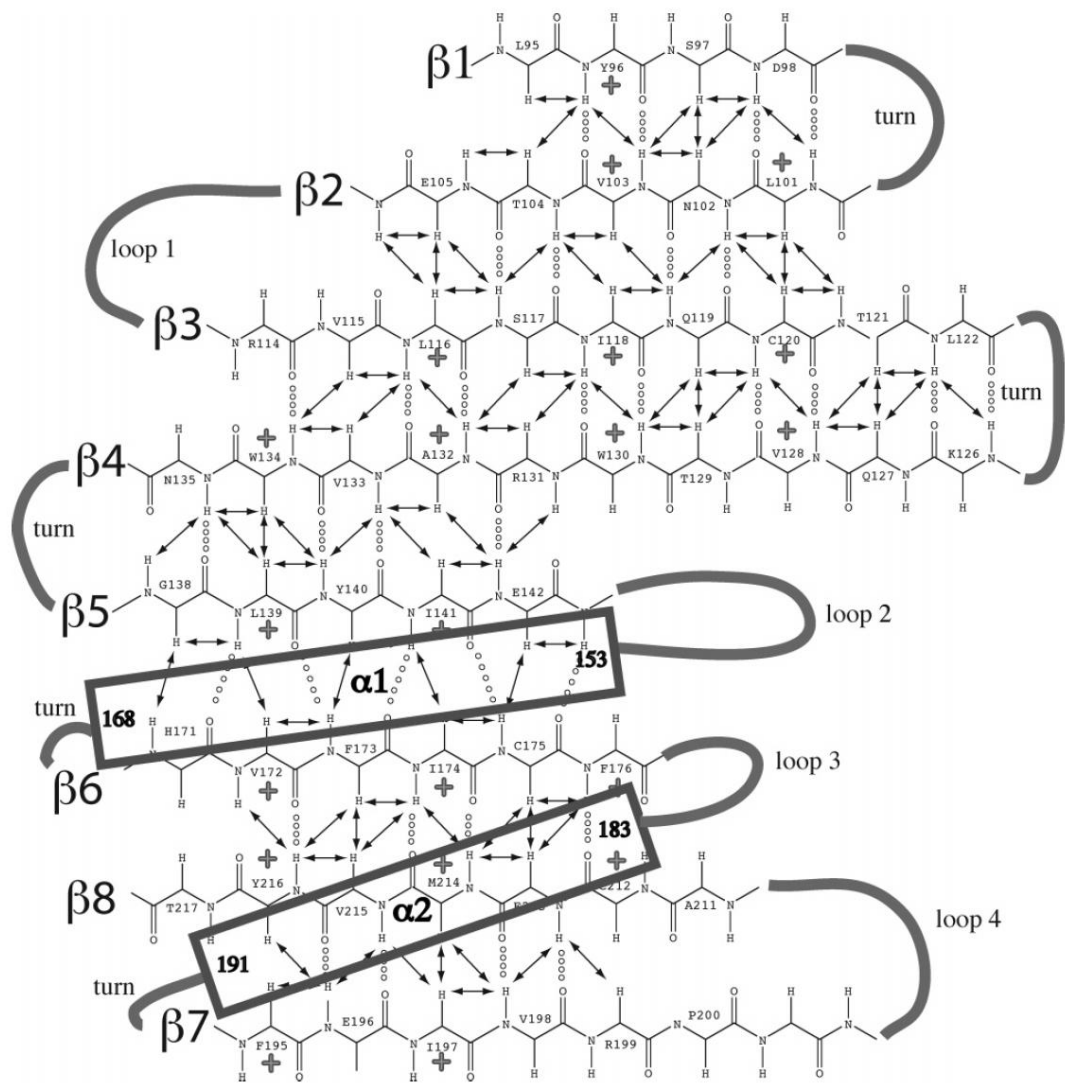


圖 4-5 老鼠 AZΔ86 蛋白之二級結構

AZ蛋白結構包含八個β strands所組成的β sheet和兩個在β sheet同側的α helices。

(Hoffman et al., 2005)

表

表2-1 本實驗使用的菌種

Bacteria	Relevant characteristics	Source/reference
Strain		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	f80dlacZ Δ M15, endA1, recA1, hsdR17 (r $_k^-$, m $_k^+$), supE44, thi-1, gyrA96, relA1, Δ (lacZYA-argF)U169	(Hanahan, 1983)
BL21(DE3)	F $^-$ ompT hsdS $_B$ (r $_B^-$ m $_B^-$) gal dcm l (DE3) (B stain)	Novagen
B834(DE3)	F $^-$ ompT hsdS $_B$ (r $_B^-$ m $_B^-$) gal dcm metI (DE3) (B stain)	Novagen



表2-2 本實驗使用的質體

plasmid	Relevant characteristics	Source/reference
pET15b	A T7 promoter-based expression vector, Ap ^r	Novagen
pET21d	A T7 promoter-based expression vector, Ap ^r	Novagen
pET21d-N-His	A T7 promoter-based expression vector, Ap ^r	this study
pET28a-ODC	Fragment of ODC (1386 bp) with <i>Nco</i> I and <i>Xho</i> I site inserted into pET28a	Wan-Ting Lin
pET28a-ODC _{Δ299-310}	Fragment of ODC _{Δ299-310} (1350 bp) with <i>Nco</i> I and <i>Xho</i> I site inserted into pET28a	Wan-Ting Lin
pET21b-AZ ₁₁₀₋₂₂₈	Fragment of AZ ₁₁₀₋₂₂₈ (357 bp) with <i>Nde</i> I and <i>Xho</i> I site inserted into pET21b	Pei-Ying Lee
pET21b-AZ ₁₁₉₋₂₂₈	Fragment of AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (327 bp) with <i>Nde</i> I and <i>Xho</i> I site inserted into pET21b	Wan-Ting Lin
pET15b-AZ ₁₁₉₋₂₂₈	Fragment of AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (327 bp) with <i>Nde</i> I and <i>Xho</i> I site inserted into pET15b	this study
pET21d-N-His-AZ ₁₁₉₋₂₂₈	Fragment of AZ ₁₁₉₋₂₂₈ (327 bp) with <i>Nde</i> I and <i>Xho</i> I site inserted into pET21d-N-His	this study
pQE30-AZ ₉₅₋₂₂₈	Fragment of AZ ₉₅₋₂₂₈ (402 bp) with <i>Bam</i> HI and <i>Hind</i> III site inserted into pQE30	洪慧芝老師實驗室

表2-3 藥品配置

名稱	成分	備註
LB medium (1 L)	25 g LB Broth (MD Bio) 1L H ₂ O	以 autoclave 滅菌
100 mM CaCl ₂ (100 ml)	1.1 g CaCl ₂ (J T. Baker) ddH ₂ O 100ml	以 autoclave 滅菌, 存放於 4°C
80% glycerol (50 ml)	40 ml 100% glycerol (聯工化學) add ddH ₂ O to 50 ml	以 autoclave 滅菌, 存放於 4°C
75 mg/ml ampicillin (Amp)	0.75 g Ampicillin Sodium (MD Bio) add ddH ₂ O to 10 ml	以 0.22 μm syring filter 過濾
50 mg/ml kanamycin (Km)	0.5 g Kanamycin Sulfate (BIO BASIC) add ddH ₂ O to 10 ml	以 0.22 μm syring filter 過濾
agar plate	10 g LB Broth (MD Bio) 6 g agar (波仕特) 400 ml H ₂ O	以 autoclave 滅菌
75 μg/ml ampicillin agar plate	10 g LB Broth (MD Bio) 6 g agar (波仕特) 400 ml H ₂ O	以 autoclave 滅菌, 冷卻至 55°C 再加入抗生素
75 μg/ml ampicillin and 50 μg/ml kanamycin agar plate	10 g LB Broth (MD Bio) 6 g agar (波仕特) 400 ml H ₂ O	以 autoclave 滅菌, 冷卻至 55°C 再加入抗生素

表2-4 M9培養液成分

A.

M-9 salt	10X /one liter
NH ₄ Cl	10 g
KH ₂ PO ₄	30 g
Na ₂ HPO ₄	35 g (anhydrous)
NaCl	10 g
Tris-base	60 g
HCl	滴定至 pH 7.4

B.

salt additive per liter (19 aa without met)		
FeCl ₃	6 mM	0.5 ml
MgSO ₄	1 M	3 ml
CaCl ₂	0.2 M	0.5 ml
Glucose	40%	12.5 ml

C.

Amino acid mixture addition		per liter	
AA mix-1	4 mg/ml each	10 ml	(16 aa mixtures)
AA mix-2	4 mg/ml each	10 ml	3 ring aa:Tyr, Phe, and Trp dissolved in 0.1 N NaOH
4 Vitamins	1 mg/ml each	1 ml	(B1, B6, riboflavin, and niacinimide, add a few drops of NaOH to dissolve)
Sel-met		50 mg	

表2-5 結晶試劑微調表

Index No. 66 0.2 M Ammonium sulfate

0.1 M Bis-Tris	pH 5.2	pH 5.4	pH 5.6	pH 5.8	pH 6.0	pH 6.3
23% PEG 3350						
24% PEG 3350						
25% PEG 3350						
26% PEG 3350						

Index No. 67 0.2 M Ammonium sulfate

0.1 M Bis-Tris	pH 5.5	pH 5.7	pH 6.1	pH 6.3	pH 6.5	pH 6.7
21% PEG 3350						
23% PEG 3350						
25% PEG 3350						
27% PEG 3350						

Index No. 75 0.2 M Lithium sulfate monohydrate

0.1 M HEPES	pH 6.3	pH 6.5	pH 6.7	pH 6.9	pH 7.1	pH 7.3
24% PEG 3350						
25% PEG 3350						
26% PEG 3350						
27% PEG 3350						

Index No. 76 0.2 M Lithium sulfate monohydrate

0.1 M HEPES	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.2	pH 7.5	pH 7.8	pH 8.0
21% PEG 3350						
23% PEG 3350						
25% PEG 3350						
27% PEG 3350						

CS Lite No. 40

0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate	pH 5.2	pH 5.4	pH 5.6	pH 5.8	pH 6.0	pH 6.2
6% isopropanol						
8% PEG 4000						
7% isopropanol						
9% PEG 4000						
8% isopropanol						
10% PEG 4000						
9% isopropanol						
11% PEG 4000						

CS Lite No. 40

0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate	pH 5.2	pH 5.4	pH 5.6	pH 5.8	pH 6.0	pH 6.2
8% isopropanol 8% PEG 4000						
9% isopropanol 9% PEG 4000						
10% isopropanol 10% PEG 4000						
11% isopropanol 11% PEG 4000						

Index No. 51 0.2 M Ammonium acetate

0.1 M Bis-Tris	pH 5.9	pH 6.1	pH 6.3	pH 6.5	pH 6.7	pH 7.0
35% MPD						
40% MPD						
45% MPD						
50% MPD						

Index No. 85 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate

0.1 M Tris-HCl	pH 7.7	pH 8.0	pH 8.3	pH 8.5	pH 8.7	pH 9.0
21% PEG 3350						
23% PEG 3350						
25% PEG 3350						
27% PEG 3350						

Natrix No. 16 0.04 M Magnesium acetate

0.05 M Na cacodylate	pH 5.6	pH 5.8	pH 6.0	pH 6.2	pH 6.4	pH 6.6
26% MPD						
28% MPD						
30% MPD						
32% MPD						

CS Lite No. 40 10% w/v PEG 4000

0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate	pH 5.2	pH 5.4	pH 5.6	pH 5.8	pH 6.0	pH 6.2
4% isopropanol						
6% isopropanol						
8% isopropanol						
10% isopropanol						

10% v/v isopropanol

0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate	pH 5.2	pH 5.4	pH 5.6	pH 5.8	pH 6.0	pH 6.2
8% PEG 4000						
9% PEG 4000						
11% PEG 4000						
12% PEG 4000						

8% v/v isopropanol

0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate	pH 5.2	pH 5.4	pH 5.6	pH 5.8	pH 6.0	pH 6.2
8% PEG 4000						
9% PEG 4000						
11% PEG 4000						
12% PEG 4000						

6% v/v isopropanol

0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate	pH 5.2	pH 5.4	pH 5.6	pH 5.8	pH 6.0	pH 6.2
8% PEG 4000						
9% PEG 4000						
11% PEG 4000						
12% PEG 4000						

參考文獻

1. Agostinelli, E., Marques, M. P., Calheiros, R., Gil, F. P., Tempera, G., Viceconte, N., Battaglia, V., Grancara, S., and Toninello, A. (2010) Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology, *Amino Acids* 38, 393-403.
2. Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions, *Biochem Biophys Res Commun* 271, 559-564.
3. Williams, K. (1997) Interactions of polyamines with ion channels, *Biochem J* 325 (Pt 2), 289-297.
4. Gerner, E. W., and Meyskens, F. L., Jr. (2004) Polyamines and cancer: old molecules, new understanding, *Nat Rev Cancer* 4, 781-792.
5. Casero, R. A., Jr., and Marton, L. J. (2007) Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases, *Nat Rev Drug Discov* 6, 373-390.
6. Childs, A. C., Mehta, D. J., and Gerner, E. W. (2003) Polyamine-dependent gene expression, *Cell Mol Life Sci* 60, 1394-1406.
7. Coffino, P. (2001) Regulation of cellular polyamines by antizyme, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 188-194.
8. Wallace, H. M., Fraser, A. V., and Hughes, A. (2003) A perspective of polyamine metabolism, *Biochem J* 376, 1-14.
9. Wang, C., Delcros, J. G., Cannon, L., Konate, F., Carias, H., Biggerstaff, J., Gardner, R. A., and Phanstiel, I. V. O. t. (2003) Defining the molecular requirements for the selective delivery of polyamine conjugates into cells containing active polyamine transporters, *J Med Chem* 46, 5129-5138.
10. Quemener, V., Blanchard, Y., Chamailard, L., Havouis, R., Cipolla, B., and Moulinoux, J. P. (1994) Polyamine deprivation: a new tool in cancer treatment, *Anticancer Res* 14, 443-448.
11. Almrud, J. J., Oliveira, M. A., Kern, A. D., Grishin, N. V., Phillips, M. A., and Hackert, M. L. (2000) Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding, *J Mol Biol* 295, 7-16.
12. Albeck, S., Dym, O., Unger, T., Snapir, Z., Bercovich, Z., and Kahana, C. (2008) Crystallographic and biochemical studies revealing the structural basis for antizyme inhibitor function, *Protein Sci* 17, 793-802.
13. Myers, D. P., Jackson, L. K., Ipe, V. G., Murphy, G. E., and Phillips, M. A. (2001) Long-range interactions in the dimer interface of ornithine

- decarboxylase are important for enzyme function, *Biochemistry* 40, 13230-13236.
14. Su, K. L., Liao, Y. F., Hung, H. C., and Liu, G. Y. (2009) Critical factors determining dimerization of human antizyme inhibitor, *J Biol Chem* 284, 26768-26777.
 15. Kern, A. D., Oliveira, M. A., Coffino, P., and Hackert, M. L. (1999) Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases, *Structure* 7, 567-581.
 16. Dunathan, H. C. (1966) Conformation and reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 55, 712-716.
 17. Pegg, A. E. (2006) Regulation of ornithine decarboxylase, *J Biol Chem* 281, 14529-14532.
 18. Jackson, L. K., Brooks, H. B., Osterman, A. L., Goldsmith, E. J., and Phillips, M. A. (2000) Altering the reaction specificity of eukaryotic ornithine decarboxylase, *Biochemistry* 39, 11247-11257.
 19. Hayashi, S., and Murakami, Y. (1995) Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase, *Biochem J* 306 (Pt 1), 1-10.
 20. Moshier, J. A., Osborne, D. L., Skunca, M., Dosesco, J., Gilbert, J. D., Fitzgerald, M. C., Polidori, G., Wagner, R. L., Friezner Degen, S. J., Luk, G. D., and et al. (1992) Multiple promoter elements govern expression of the human ornithine decarboxylase gene in colon carcinoma cells, *Nucleic Acids Res* 20, 2581-2590.
 21. O'Brien, T. G., Megosh, L. C., Gilliard, G., and Soler, A. P. (1997) Ornithine decarboxylase overexpression is a sufficient condition for tumor promotion in mouse skin, *Cancer Res* 57, 2630-2637.
 22. Packham, G., and Cleveland, J. L. (1997) Induction of ornithine decarboxylase by IL-3 is mediated by sequential c-Myc-independent and c-Myc-dependent pathways, *Oncogene* 15, 1219-1232.
 23. Yuspa, S. H., Lichti, U., Ben, T., Patterson, E., Hennings, H., Slaga, T. J., Colburn, N., and Kelsey, W. (1976) Phorbol esters stimulate DNA synthesis and ornithine decarboxylase activity in mouse epidermal cell cultures, *Nature* 262, 402-404.
 24. Gilmour, S. K., Verma, A. K., Madara, T., and O'Brien, T. G. (1987) Regulation of ornithine decarboxylase gene expression in mouse epidermis and epidermal tumors during two-stage tumorigenesis, *Cancer Res* 47, 1221-1225.
 25. Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson, L. C., and Holtta, E. (1992) Ornithine

- decarboxylase activity is critical for cell transformation, *Nature* 360, 355-358.
26. Manni, A., and Wright, C. (1985) Polyamines as mediators of the effect of prolactin and growth hormone on the growth of N-nitroso-N-methylurea-induced rat mammary tumor cultured in vitro in soft agar, *J Natl Cancer Inst* 74, 941-944.
 27. McCann, P. P., and Pegg, A. E. (1992) Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy, *Pharmacol Ther* 54, 195-215.
 28. Manni, A., and Wright, C. (1984) Polyamines as mediators of estrogen action on the growth of experimental breast cancer in rats, *J Natl Cancer Inst* 73, 511-514.
 29. Wang, C. C. (1995) Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African trypanosomiasis, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 93-127.
 30. Grishin, N. V., Osterman, A. L., Brooks, H. B., Phillips, M. A., and Goldsmith, E. J. (1999) X-ray structure of ornithine decarboxylase from *Trypanosoma brucei*: the native structure and the structure in complex with alpha-difluoromethylornithine, *Biochemistry* 38, 15174-15184.
 31. Jariel-Encontre, I., Bossis, G., and Piechaczyk, M. (2008) Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome, *Biochim Biophys Acta* 1786, 153-177.
 32. Murakami, Y., Matsufuji, S., Hayashi, S., Tanahashi, N., and Tanaka, K. (2000) Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome, *Biochem Biophys Res Commun* 267, 1-6.
 33. Bercovich, Z., and Kahana, C. (2004) Degradation of antizyme inhibitor, an ornithine decarboxylase homologous protein, is ubiquitin-dependent and is inhibited by antizyme, *J Biol Chem* 279, 54097-54102.
 34. Kahana, C. (2007) Ubiquitin dependent and independent protein degradation in the regulation of cellular polyamines, *Amino Acids* 33, 225-230.
 35. Matsufuji, S., Matsufuji, T., Miyazaki, Y., Murakami, Y., Atkins, J. F., Gesteland, R. F., and Hayashi, S. (1995) Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme, *Cell* 80, 51-60.
 36. Nilsson, J., Koskiniemi, S., Persson, K., Grahn, B., and Holm, I. (1997) Polyamines regulate both transcription and translation of the gene encoding ornithine decarboxylase antizyme in mouse, *Eur J Biochem* 250, 223-231.
 37. Palanimurugan, R., Scheel, H., Hofmann, K., and Dohmen, R. J. (2004) Polyamines regulate their synthesis by inducing expression and blocking degradation of ODC antizyme, *EMBO J* 23, 4857-4867.

38. Kahana, C. (2009) Antizyme and antizyme inhibitor, a regulatory tango, *Cell Mol Life Sci* 66, 2479-2488.
39. Ivanov, I. P., and Atkins, J. F. (2007) Ribosomal frameshifting in decoding antizyme mRNAs from yeast and protists to humans: close to 300 cases reveal remarkable diversity despite underlying conservation, *Nucleic Acids Res* 35, 1842-1858.
40. Kitani, T., and Fujisawa, H. (1984) Purification and some properties of a protein inhibitor (antizyme) of ornithine decarboxylase from rat liver, *J Biol Chem* 259, 10036-10040.
41. Cohavi, O., Tobi, D., and Schreiber, G. (2009) Docking of antizyme to ornithine decarboxylase and antizyme inhibitor using experimental mutant and double-mutant cycle data, *J Mol Biol* 390, 503-515.
42. Li, X., and Coffino, P. (1993) Degradation of ornithine decarboxylase: exposure of the C-terminal target by a polyamine-inducible inhibitory protein, *Mol Cell Biol* 13, 2377-2383.
43. Mamroud-Kidron, E., Omer-Itsicovich, M., Bercovich, Z., Tobias, K. E., Rom, E., and Kahana, C. (1994) A unified pathway for the degradation of ornithine decarboxylase in reticulocyte lysate requires interaction with the polyamine-induced protein, ornithine decarboxylase antizyme, *Eur J Biochem* 226, 547-554.
44. Kahana, C., Asher, G., and Shaul, Y. (2005) Mechanisms of protein degradation: an odyssey with ODC, *Cell Cycle* 4, 1461-1464.
45. Mangold, U. (2005) The antizyme family: polyamines and beyond, *IUBMB Life* 57, 671-676.
46. Ghoda, L., Sidney, D., Macrae, M., and Coffino, P. (1992) Structural elements of ornithine decarboxylase required for intracellular degradation and polyamine-dependent regulation, *Mol Cell Biol* 12, 2178-2185.
47. Miyazaki, Y., Matsufuji, S., Murakami, Y., and Hayashi, S. (1993) Single amino-acid replacement is responsible for the stabilization of ornithine decarboxylase in HMOA cells, *Eur J Biochem* 214, 837-844.
48. Takeuchi, J., Chen, H., Hoyt, M. A., and Coffino, P. (2008) Structural elements of the ubiquitin-independent proteasome degron of ornithine decarboxylase, *Biochem J* 410, 401-407.
49. Takeuchi, J., Chen, H., and Coffino, P. (2007) Proteasome substrate degradation requires association plus extended peptide, *EMBO J* 26, 123-131.
50. Loetscher, P., Pratt, G., and Rechsteiner, M. (1991) The C terminus of mouse ornithine decarboxylase confers rapid degradation on dihydrofolate

- reductase. Support for the pest hypothesis, *J Biol Chem* 266, 11213-11220.
51. Ghoda, L., van Daalen Wetters, T., Macrae, M., Ascherman, D., and Coffino, P. (1989) Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation, *Science* 243, 1493-1495.
 52. Zhang, M., Pickart, C. M., and Coffino, P. (2003) Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate, *EMBO J* 22, 1488-1496.
 53. Coleman, C. S., Stanley, B. A., Viswanath, R., and Pegg, A. E. (1994) Rapid exchange of subunits of mammalian ornithine decarboxylase, *J Biol Chem* 269, 3155-3158.
 54. Schipper, R. G., Cuijpers, V. M., De Groot, L. H., Thio, M., and Verhofstad, A. A. (2004) Intracellular localization of ornithine decarboxylase and its regulatory protein, antizyme-1, *J Histochem Cytochem* 52, 1259-1266.
 55. Murai, N., Murakami, Y., and Matsufuji, S. (2003) Identification of nuclear export signals in antizyme-1, *J Biol Chem* 278, 44791-44798.
 56. Gritli-Linde, A., Nilsson, J., Bohlooly, Y. M., Heby, O., and Linde, A. (2001) Nuclear translocation of antizyme and expression of ornithine decarboxylase and antizyme are developmentally regulated, *Dev Dyn* 220, 259-275.
 57. Nilsson, J., Grahn, B., and Heby, O. (2000) Antizyme inhibitor is rapidly induced in growth-stimulated mouse fibroblasts and releases ornithine decarboxylase from antizyme suppression, *Biochem J* 346 Pt 3, 699-704.
 58. Heller, J. S., Fong, W. F., and Canellakis, E. S. (1976) Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction, *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 1858-1862.
 59. Iwata, S., Sato, Y., Asada, M., Takagi, M., Tsujimoto, A., Inaba, T., Yamada, T., Sakamoto, S., Yata, J., Shimogori, T., Igarashi, K., and Mizutani, S. (1999) Anti-tumor activity of antizyme which targets the ornithine decarboxylase (ODC) required for cell growth and transformation, *Oncogene* 18, 165-172.
 60. Koike, C., Chao, D. T., and Zetter, B. R. (1999) Sensitivity to polyamine-induced growth arrest correlates with antizyme induction in prostate carcinoma cells, *Cancer Res* 59, 6109-6112.
 61. Coffino, P. (2001) Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation, *Biochimie* 83, 319-323.
 62. Mitchell, J. L., Judd, G. G., Bareyal-Leyser, A., and Ling, S. Y. (1994) Feedback repression of polyamine transport is mediated by antizyme in mammalian tissue-culture cells, *Biochem J* 299 (Pt 1), 19-22.
 63. Suzuki, T., He, Y., Kashiwagi, K., Murakami, Y., Hayashi, S., and Igarashi, K. (1994) Antizyme protects against abnormal accumulation and toxicity of

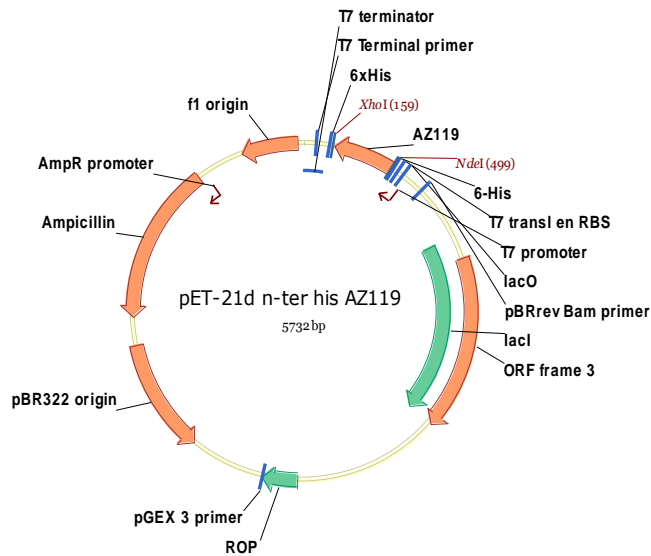
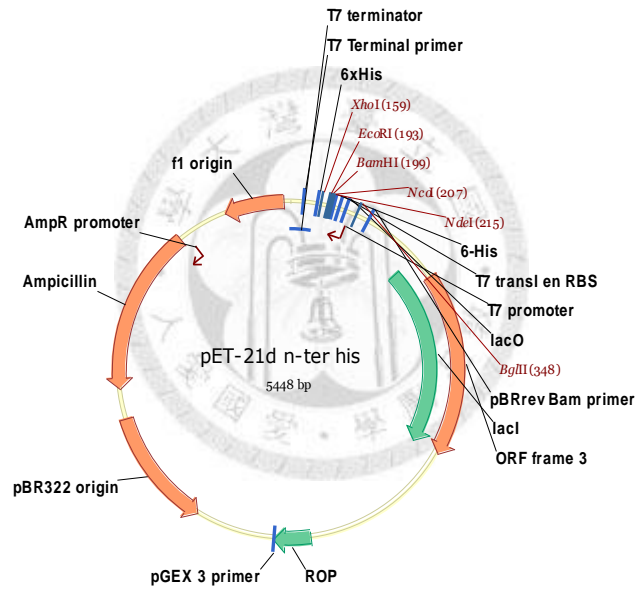
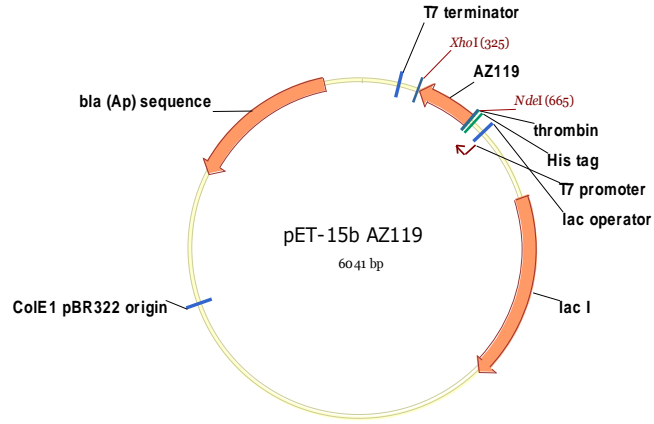
- polyamines in ornithine decarboxylase-overproducing cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8930-8934.
64. Zhu, C., Lang, D. W., and Coffino, P. (1999) Antizyme2 is a negative regulator of ornithine decarboxylase and polyamine transport, *J Biol Chem* 274, 26425-26430.
 65. Chen, H., MacDonald, A., and Coffino, P. (2002) Structural elements of antizymes 1 and 2 are required for proteasomal degradation of ornithine decarboxylase, *J Biol Chem* 277, 45957-45961.
 66. Snapir, Z., Keren-Paz, A., Bercovich, Z., and Kahana, C. (2009) Antizyme 3 inhibits polyamine uptake and ornithine decarboxylase (ODC) activity, but does not stimulate ODC degradation, *Biochem J* 419, 99-103, 101 p following 103.
 67. Mangold, U., and Leberer, E. (2005) Regulation of all members of the antizyme family by antizyme inhibitor, *Biochem J* 385, 21-28.
 68. Hoffman, D. W., Carroll, D., Martinez, N., and Hackert, M. L. (2005) Solution structure of a conserved domain of antizyme: a protein regulator of polyamines, *Biochemistry* 44, 11777-11785.
 69. Li, X., and Coffino, P. (1994) Distinct domains of antizyme required for binding and proteolysis of ornithine decarboxylase, *Mol Cell Biol* 14, 87-92.
 70. Li, X., Stebbins, B., Hoffman, L., Pratt, G., Rechsteiner, M., and Coffino, P. (1996) The N terminus of antizyme promotes degradation of heterologous proteins, *J Biol Chem* 271, 4441-4446.
 71. Li, X., and Coffino, P. (1992) Regulated degradation of ornithine decarboxylase requires interaction with the polyamine-inducible protein antizyme, *Mol Cell Biol* 12, 3556-3562.
 72. Ghoda, L., Phillips, M. A., Bass, K. E., Wang, C. C., and Coffino, P. (1990) Trypanosome ornithine decarboxylase is stable because it lacks sequences found in the carboxyl terminus of the mouse enzyme which target the latter for intracellular degradation, *J Biol Chem* 265, 11823-11826.
 73. Newman, R. M., Mobascher, A., Mangold, U., Koike, C., Diah, S., Schmidt, M., Finley, D., and Zetter, B. R. (2004) Antizyme targets cyclin D1 for degradation. A novel mechanism for cell growth repression, *J Biol Chem* 279, 41504-41511.
 74. Dulloo, I., Gopalan, G., Melino, G., and Sabapathy, K. (2010) The antiapoptotic DeltaNp73 is degraded in a c-Jun-dependent manner upon genotoxic stress through the antizyme-mediated pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4902-4907.
 75. Lim, S. K., and Gopalan, G. (2007) Aurora-A kinase interacting protein 1

- (AURKAIP1) promotes Aurora-A degradation through an alternative ubiquitin-independent pathway, *Biochem J* 403, 119-127.
76. McFerrin, M. B., and Snell, E. H. (2002) The development and application of a method to quantify the quality of cryoprotectant solutions using standard area-detector X-ray images, *J Appl Crystallogr* 35, 538-545.
77. Heras, B., and Martin, J. L. (2005) Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals, *Acta Crystallogr D* 61, 1173-1180.
78. Hanson, B. L., Schall, C. A., and Bunick, G. J. (2003) New techniques in macromolecular cryocrystallography: macromolecular crystal annealing and cryogenic helium, *J Struct Biol* 142, 77-87.
79. 李佩螢 (2009). 人類抗酶抑制因子與抗酶複合體之結晶與初步 X-ray 單晶繞射分析 (國立中興大學生物化學研究所)
80. 林婉婷 (2009). 人類鳥胺酸脫羧酶與抗酶複合體之純化與晶體培養 (國立中興大學生物化學研究所)



附錄

附錄一、pET15b-AZ₁₁₉₋₂₂₈、pET21d-N-His 與 pET21d-N-His-AZ₁₁₉₋₂₂₈ 的質體基因構築圖



附錄二、人類 ODC 與 AZ 胺基酸序列

Human ornithine decarboxylase protein sequence

1 50
MNNFGNEEFDCHFLDEGFTAKDILDQKINEVSSSDDKDAFYVADLGDILK
51 100
KHLRWLKALPRVTPFYAVKCNDSKAIVKTLAATGTGFDCASKTEIQLVQS
101 150
LGVPPERIIYANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKVARAHPKAK
151 200
LVLRIATDDSKAVCRLSVKFGATLRTSRLLLERAKELNIDVVGVSFHVGS
201 250
GCTDPETFVQAISDARCVFDMGAEVGFSMYLLDIGGGFPGSEDEVKLFEE
251 300
ITGVINPALDKYFPSDSGVRIIAEPGRYYVASAFTLAVNIIAKKIVLKEQ
301 350
TGSDDEDESSEQTFMYVNDGVYGSFNCLYDHAHVKPLLQKRPKPDEKY
351 400
YSSSIWGPTCDGLDRIVERCDLPEMHVGDWMLFENMGAYTVAAASTFNGF
401 450
QRPTIYYVMSGPAWQLMQQFQNPDFPPEVEEQDASTLPVSCAWESGMKRH
451 461
RAACASASINV

Human antizyme protein sequence

1 50
MVKSSLQRILNSHCFAREKEGDKPSATIHASRTMPLLSLHSRGGSSSESS
51 100
RVSLHCCSNPGPGPRWCS DAPHPPLKI PGGRGNSQRDHNLSANL F YSDDR
101 110 119 150
LNVTEELTSNDKTRILNVQSRLTDAKRINWRTVLSGGSLYIEIPGGALPE
151 200
GSKDSFAVLLEFAEEQLRADHV FICFHKNREDRAALLRTFSFLGFEIVRP
201 228
GHPLVPKRPDACFMAYTFERESSGEEEE