

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

利用動力素蛋白質馬達與雙價性 DNA aptamer 來達到在微流道中單方向地運輸特定分子的目的

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2218-E-038-001-

執行期間：94 年 12 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：臺北醫學大學生化學科

計畫主持人：郭泰志

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 31 日

計畫目的

本項計畫最終目的是欲利用 kinesin 馬達蛋白質 (kinesin motor protein) 在微小化的檢測器之微流道 (microchannels) 中具方向性及選擇性地運輸檢測物分子 (analytes)。然而, kinesin 不會自然地與檢測物分子結合, 兩者之間需要一個媒介分子 (adapter); 此項研究提議以雙價性 aptamers 作為所需的媒介分子 (相關背景資訊及詳細計畫內容請見計畫書)。

工作項目

本期的工作重點如下: 利用基因重組技術[包括基因選殖, 細菌轉型, 以及誘發基因表現], 生產與純化 kinesin 馬達蛋白質的重鍊(kinesin heavy chain, KHC), 輕鍊(kinesin light chain, KLC), 以及輕鍊中的 tetratricopeptide (TRP domain)蛋白質區團; 從動物的腦組織中純化微管束蛋白質 (microtubule proteins; kinesin 得在微管束上才能運動); 備製篩選 aptamers 所需的單股 DNA library (ssDNA library); 從 ssDNA library 中篩選 TRP 蛋白質區團的 DNA aptamers。

目前成果

(1) 本計畫主持人已經將專門表現於人類神經細胞的 kinesin 的重鍊 (KHC, KIF5A), 輕鍊(KLC2), 以及輕鍊中的 TRP 區團的蛋白質的互補 DNA (cDNA)以核酸聚合連鎖反應複製(圖一)並選殖到大腸桿菌的表現載體(圖二); 所殖入的 DNA 的序列也已經確認無誤。含有表現載體的大腸桿菌 *E. coli* BL21(DE3)菌株(三株菌, 分別含 r-KIF5Awt, r-KLC2 及 r-TRP), 在乳糖類似物 IPTG 的誘發下生產蛋白質, 這些蛋白質從細菌萃取液中以親和性層析方式 (immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 純化出來, 以蛋白質電泳(protein polyacrylamide gel electrophoresis)與質譜儀 (mass spectroscopy) 鑑定其身份, 確認無誤。

(2) 篩選 aptamers 所需的 ssDNA library, 已經備製妥。此 ssDNA library 含有 10^{14} 種不同序列。

(3) TRP 蛋白質 aptamers 的篩選正在進行中。

從新鮮豬腦中純化微管束蛋白質的工作正在進行中。

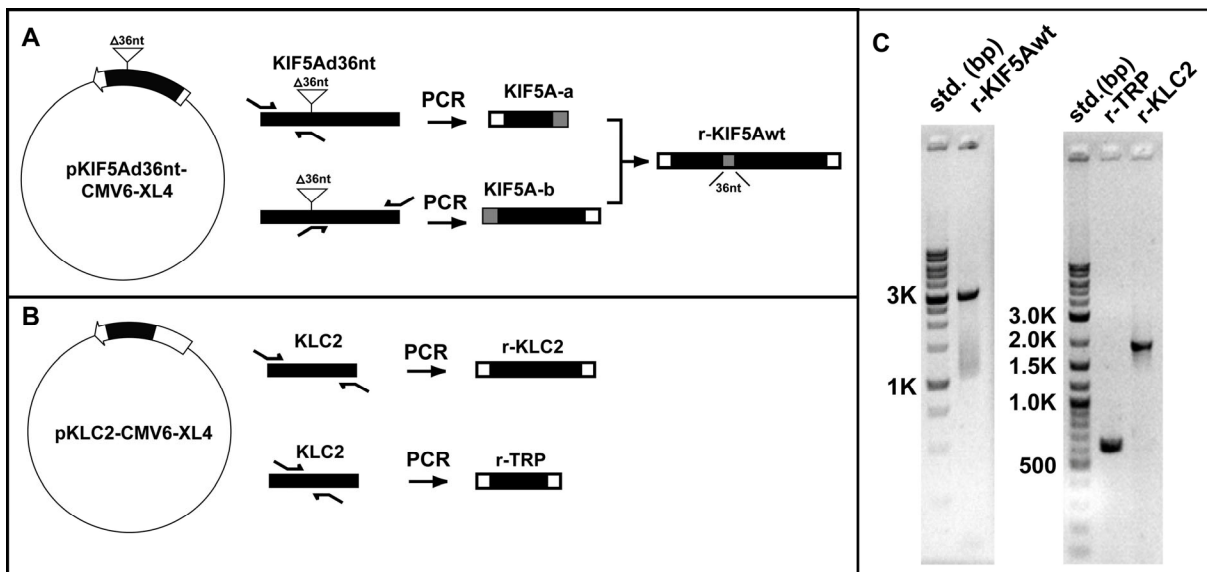
(4) 利用電腦來模擬篩選 aptamers 所用的 SELEX 技術所需的最佳條件, 其結果最近已經投稿並且為國際學術期刊 (SCI) *Computers And Chemical Engineering* 所接受 (available online Oct 16, 2006)。

成果意義與未來工作

Kinesin 以及微管束在真核細胞中參與各種胞器 (organelles) 的運輸及細胞分裂時紡錘絲及染色體的分離, 其所展現的精巧功能, 對於發展微小化檢測機件的構想很具啟發意義。因此, 能夠自行備製 kinesin 以及微管束是發展馬達蛋白質於體外系統 (in vitro system) 的仿生應用的重要基礎。另外, 目前已知 kinesin 所涉及的分子運輸與許多的神經或運動退化疾病有關, 但是 kinesin 如何辨識及結合被其所運輸的分子 (cargo molecules) 仍然不是很清楚; 能夠在體外重組 (reconstruct and manipulate) kinesin 的分子運輸系統對於這些的疾病的研究也有幫助。

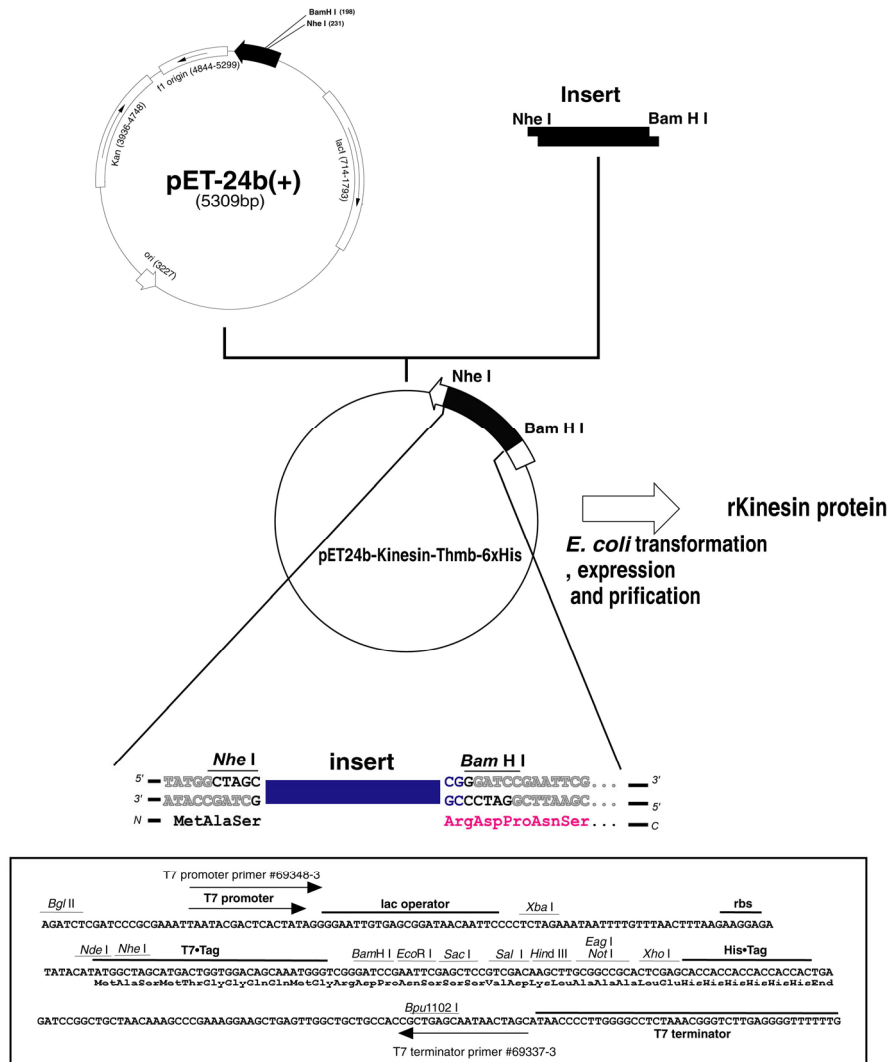
未來仍須完成的工作包括: 以生物化學及物理方法鑑定自行備製的 kinesin 以及微管束及

完成 TRP 區 aptamers 的篩選。



圖一 (A) Kinesin 馬達蛋白質的重鍊(kinesin heavy chain, KHC) , (B) 輕鍊(kinesin light chain, KLC)以及 tetratricopeptide (TRP domain)蛋白質區圖的 cDNA 複製策略; (C) 以洋菜凝膠電泳檢驗所複製的基因重組 cDNA 產物的分子量。

含有人類神經細胞的馬達蛋白質重鍊與輕鍊 cDNA 的載體 (pKIF5Ad36nt-CMV6-XL4 與 pKLC2-CMV6-XL4) 是向美國生物技術公司 OriGene 所購買。經 DNA 定序後發現所購得的重鍊的基因比起原生型(NCBI KIF5A wild type)少了 36 個重要核苷酸(nucleotides), 因此利用重複性核酸聚合連鎖反應 (overlapping PCR) 技術將短缺的部分補齊, 重新產生原生型基因重組馬達蛋白質重鍊的 cDNA (r-KIF5Awt) (圖一 A)。至於馬達蛋白質輕鍊, 所購得的基因序列則無錯誤; 經由核酸聚合連鎖反應, 分別複製了完整的基因重組馬達蛋白質輕鍊的 cDNA (r-KLC2) 以及其中的 TRP 區圖蛋白質的 cDNA (r-TRP) (圖一 B)。所獲得的基因重組 cDNA 產物, 包括 r-KIF5Awt (3126bp), r-KLC2 (1893 bp) 與 r-TRP (618 bp), 其分子量大小與預期值相符。



圖二 基因重組馬達蛋白質表現載體的建構

圖一所示的 cDNA 經過 DNA 剪制酶(*Nhe* I, *Bam* H I)的處理後，戳入細菌表現載體(pET24b, Novagen Inc.)，送入大腸桿菌 *E. coli* BL21(DE3)菌株。經選殖與定序確認後，含有載體的菌株以 IPTG 來誘發外來蛋白質基因的表現，利用 IMAC 從細胞萃取液中純化基因重組蛋白質。