• 系統編號	RC8705-0295
• 計畫中文名稱	血紅蛋白機能及安定性之工程研究－(II)安定四聚體及抑制亞鐵血紅素氧化之蛋白結構探討研究
• 計畫英文名稱	Protein Engineering of Hemoglobin Stability and Function. II. A Mutagenic Study of Tetrameric Stability and Heme-Oxidation of Oxy-Hemoglobin
• 主管機關	行政院國家科學委員會
• 計畫編號	NSC86-2314-B038-023
• 執行機構	台北醫學院細胞及分子生物研究所
• 本期期間	8508 ~ 8607
• 報告頁數	0 頁
• 使用語言	中文
• 研究人員	施子弼 Shih, Tzu-Bi D
• 中文關鍵字	蛋白質工程；合成基因；突變；人工攜氧體；血紅蛋白功能；安定四聚體；分子演化；嵌合蛋白
• 英文關鍵字	Protein engineering；Synthetic gene；Mutation；Artificial oxygen carrier；Hemoglobin function；Tetrameric stability；Molecular evolution；Chimeric protein
• 中文摘要	本計畫期間,主要方向是針對Central cavity的胺基酸殘基變異,因局部帶電性改變或非共價鍵結的增減所造成的立體結構變化,以供觀察血球蛋白對於 O/sub 2/的親和力及四單元體穩定性的影響。爲了獲得大量具有生理活性之血紅素蛋白,以便進行基因定點突變,改變人類血紅素蛋白之胺基酸序列。成功的 Expression system 將用以輔助探討血球蛋白與氧結合的特性、四單元體及二單元體的表現安定與否等性質。目前利用攜帶不同啓動子的載體 pKK233-2 及 pET29,將相同的完整人類血紅素次單元蛋白.alpha.、.beta.基因的片段殖入(分別命名爲 pKK3E 及 pET29CE),並比較二個載體在相同環境下菌體生長、蛋白的誘導表現差異,期待得到較高蛋白產量的表現系統。pKK223-3 及 pKK233-2 表現載體在質體的 DNA 序列上非常相近。不同的是 pKK233-2 與 pKK223-2 多重選殖區(MCS)的啓動子分別是 Ptrc 及 Ptac,並且 pKK233-2 在 MCS 二側具有可直接轉載真核細胞基因的限制？切位 NcoI。目前已知在 Rat lipocortin、Chicken triose phosphate isomerase 等蛋白構築在此載體上可成功地被表現。而 pET 載體表現系統控制嚴謹,且具有高度表現的啓動子 Bacteriophage T/sub 7/ promoter,在含有.lambda.DE3 lysogen 的宿主內,可以接受 IPTG 的誘導專一而且快速地生產高量的 T7 RNA polymerase,進行基因的大量表現,最高可達 50%的菌體總蛋白量。因此將人類血紅素.alpha.、.beta.次單元蛋白基因相鄰構築於載體 pKK233-2 及 pET29 上,以期在不同啓動子控制下能有較大量血紅素蛋白的表現。 由實驗結果初步了解,構築在不同載體上之人類血紅素蛋白的表現雖然會受到不同的啓動子調控,但是同時必須探討其他影響人類血紅素蛋白表現的因素。如環境中 O/sub 2/的含量、培養基溶液的酸鹼度及菌體內 Hemin 的含量是否充足。因此推測載體中人類血紅素蛋白的表現可能受到菌體一定程度的影響。所以目前除了利用不同的載體

	期望提高蛋白產量外,也觀察生長的外界環境變化對於菌體生長及血紅素蛋白表現的影響,期望能得到最大表現也較穩定的蛋白產物。本計畫所表現及純化的血球蛋白,爲了探討其結構與穩定性,並了解蛋白與 O/sub 2/結合的機制,故進行一連串的定位突變株的構築。除了之前已完成的 13 株,目前增加構築了 12 個單一胺基酸突變株、3 個雙重突變株及 2 個三重突變株,並對其部分變異株進行初步的分析。
• 英文摘要	查無英文摘要