

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※

※

※ 含人乳鐵蛋白基因乳酸菌轉型株克弗爾粒之開發 ※

※

※※※

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 89-WFA-0100073

執行期間： 89年08月01日至91年07月31日

計畫主持人： 林慶文

共同主持人： 陳全木

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

國立台灣大學畜產學系

中華民國 90 年 05 月 15 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

含人乳鐵蛋白基因乳酸菌轉型株克弗爾粒之開發

Development of kefir grain with lactobacilli transformant carrying human lactoferrin gene

計畫編號：NSC 89-WFA-0-100-073

執行期限：89年08月01日至91年07月31日

主持人：林慶文 國立台灣大學畜產學系

共同主持人：陳全木 國立中興大學動物學系

計畫參與人員：盧建宇 國立台灣大學畜產學系

一、中文摘要

乳鐵蛋白(lactoferrin)是運鐵蛋白家族中之一員，是一種能與鐵結合之醣蛋白，因兼具：1.提高腸細胞對鐵的利用性；2.抑菌與殺菌性 3.抗氧化作用等主要生物功能而備受重視。此階段之實驗在利用基因工程技术使 *Lactobacillus casei* 乳酸菌攜帶人乳鐵蛋白基因(hLF cDNA)產製乳鐵蛋白，經分析確認後，可將其定株於克弗爾粒上，成為含有 hLF 乳酸菌轉型株之克弗爾粒，而有提昇人體免疫機能及促進腸道消化吸收等之保健功能。

關鍵詞：乳鐵蛋白、基因工程、克弗爾

Abstract

Lactoferrin (LF) is an iron-binding glycoprotein of the transferrin family. The biological properties of this protein include the increasing the iron utilization in the gastrointestinal tract, antibacterial and antioxidation. Gene engineering technology is utilized to generate *Lactobacillus casei* that contains human lactoferrin cDNA in order to produce lactoferrin. The transgenic *Lactobacillus casei* has been confirmed to contain hLF. This *Lactobacillus casei* can be incorporated into kefir to produce hLF. The hLF transgene kefir grain has the functions of improving human immune function and enhancing the digestion and absorption in the gastrointestinal tract.

Keywords: lactoferrin, gene engineering technology, kefir

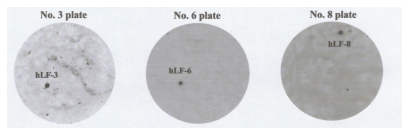
二、緣由與目的

乳鐵蛋白 (lactoferrin) 為許多哺乳動物乳汁中主要之單鏈醣蛋白，其最先在牛乳中被發現，而最早由人乳中分離完成，其於乳汁中之含量具種別差異性，人乳中含量豐富(約 1mg/ml)，僅次於酪蛋白。乳鐵蛋白能與鐵結合，屬於運鐵蛋白(transferrin)家族之一，其對動物體內鐵的運輸扮演重要角色，因其每一分子含有兩處鐵的結合位置，在低 pH 值的情況下，能與 Fe^{3+} 有高度親合力，並可將鐵吸收儲存於需鐵的細胞，故乳鐵蛋白之濃度與哺乳期之幼小動物腸道之菌叢及鐵離子之吸收代謝有關，乳鐵蛋白可能透過腸道中受體之調節促進餵食母乳嬰兒及哺乳期仔豬鐵離子之吸收，對於發育快速之哺乳期仔豬而言，至少可提供造血所需之鐵離子來源，並減少仔豬貧血的發生率，由於乳鐵蛋白對鐵的高親和力，可與微生物競爭生長所需之鐵而產生抑菌的較果。然而，真正達到殺菌的能力是在當乳鐵蛋白進入胃中受到胃蛋白 (pepsin) 消化後所生成之雙極性 鏈-lactoferricin。其易與細菌之外膜結合並大量釋出其外膜上之脂多醣(lipopolysaccharide;LPS)而使滲透壓改變而造成菌體之死亡。根據實驗結果顯示，乳鐵蛋白對格蘭氏陽性、陰性菌、酵母菌及黴菌等均有抑制生長之效果。另一方面，乳鐵蛋白透過與鐵離子之結合功能，可減少游離鐵所催化之自由基(free radical)產生及減少脂質過氧化作用所引起之細胞膜損傷，故具有抗氧化之生物功能，對於維護動物健康扮演重要角色，因此極可能被開發為健康食品醫藥製品之乳成分。

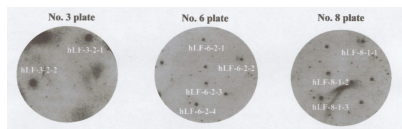
乳鐵蛋白既然如此具有營養價值與治療功效，至今仍未被大量使用，乃因目前尚無法以有效率及節省成本之方法，以商業化大量生產出具有生物活性的乳鐵蛋白供人類使用，本實驗之目的在於利用基因工程及微生物技術，使乳酸菌攜帶人乳乳鐵蛋白之基因，並能在發酵飲料中生產乳鐵蛋白，增加營養價值，最後與酵母菌共同培養，生產更具保健療效之酒精發酵乳飲料—克弗爾，冀能對人類腸胃道吸收及免疫機能之改善有所幫助。

三、結果

首先利用 GeneBank 已發表之人乳鐵蛋白 cDNA 序列設計一組引子供作 PCR 擴增反應經放射線標定後作為探針。以人類乳腺上皮組織 cDNA 基因庫作為人乳鐵蛋白基因之篩選來源，經過兩輪之篩選工作，而獲得個獨立之基因噬菌體選殖株。



第一次選殖結果



第二次選殖結果

(1)人乳鐵蛋白基因之擴增及於 pGEM-T 載體之構築及次選殖(subcloning)

開始先設計 Primers 來大量增殖 cDNA 之片段，原先設計於引子中兩個限制切割點 Bgl II 及 Cla I，但因發現在 Cla I 上之核酸序列產生突變(mutation)，故將下游引子也更換成 Bgl II 的酵素截切位，故上游引子 pLF-Bgl II (+) 序列為 5'-CAGATCTAAGGAGGAGGTGAGCAGT-3' 下游引子 pLF-Bgl II (-) 序列為 5'-AGATCTGGGAATCAAGACGG-3'。經 PCR 擴增反應後將產物(2.3kb)經過純化分離後立刻以連接酵素(T4 DNA Ligase)進行與 pGEM-T 載體之結合反應，依照 Chang and Miler(1988)方法將構築好之載體轉型於大腸桿菌 DH5 α 中，經抗生素 AP 之篩選作用與 X-gal 藍白菌落之選定後，獲得 12

個可能含有人乳鐵蛋白 cDNA 片段之白色菌落，經隔夜培養，萃取其質體 DNA(plasmid)並純化後，以限制 Bgl II 進行 3 小時截切並驗正接合反應(ligation)之產物後，將其中兩株確定含有正確人類乳鐵蛋白 cDNA 片段之質體分別與乳酸菌表現型載體 pLP-3537 以不同莫耳數比例混合後，進行接合反應。經隔夜反應時以 0.8% 洋菜膠電泳檢驗反應是否完全。

(2)Competent 乳酸菌株之製備

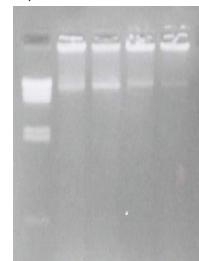
將乳酸菌 *Lactobacillus casei* 培養於液態 MRS 培養基中，置於 37°C 震盪過夜，隔日再培養至 OD₆₀₀=0.4~0.6(約 2 小時)後，將菌液離心並重新溶於無菌水中，使體積最後成為 40 μ l，將 competent 乳酸菌置於冰上等待電穿孔時使用。

(3)電穿孔(electroporation)之轉型作用

將構築好之 hLF-pLP3537 質體與製備好的 40 μ l competent cell 混合，並置入 0.2cm cuvette 中置於冰上。電穿孔使用 Bio rad Gene Pulser 器具電擊後立刻移入 SOC 中培養 2 小時，之後取 100 μ l 之菌液均勻塗於含 50 μ l erythomycin 的乳酸菌固態培養基上，放置 37°C 中培養。

(4)乳酸菌選殖株胞內與胞外之 hLF 產量之分析

最後得到兩個可能經轉型成功之菌落，將其大量培養後萃取其質體 DNA 發現位置正確(下圖)，表示轉型成功，之後便需以 SDS PAGE 及 western blotting 分析產製蛋白質是否正確



以 0.8% 洋菜膠電泳檢驗，在 8 kb 的位置有光帶，與估計位置 hLF (2.3kb) + pLP3537 (6.1kb) 位置相符。

a. 乳酸菌選殖株之胞外蛋白質濃縮

取 5ml 培養隔夜之乳酸菌液，離心後取上清液，以 0.2 μ m 的過濾膜將殘留的乳酸菌去除，再使用 Amicon microcon 濃縮管於 4 $^{\circ}$ C、12000rpm 離心 15 分鐘，進行 15 倍之濃縮作用。

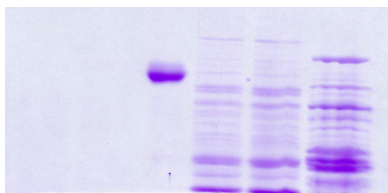
b. 乳酸菌選殖株之胞內蛋白質萃取

將去上清液之菌體加入 100 μ l 破菌緩衝液將細菌重新溶解，並加入等量之 0.5mm 酸洗玻璃珠(glass bead)，於振盪器上振盪 30 秒再置於冰上 30 秒，如此重複 8 次後完全將乳酸菌體打破，而後在 4 $^{\circ}$ C 離心 10 分鐘，取上清液準備。進行 SDS-PAGE 蛋白質電泳及西方轉漬分析。

四、討論

於膠片中 No.1、2 為基因轉殖乳酸菌胞外蛋白質濃縮液之結果，No.3 為一般正常乳酸菌胞外蛋白質濃縮液之結果。因乳酸菌為原核生物且並無法進行胞外分泌故發現並無任何表現。而 No.4 為以純化之人乳鐵蛋白做為對照組，No.5、6 為基因轉殖乳酸菌胞內蛋白質萃取之結果，No.7 為一般正常乳酸菌胞內蛋白質萃取之結果，以 No.5 及 No.6 比照對照組之結果可以看到接近的光帶，而在 No.7 中則不明顯。

1 2 3 4 5 6 7



接著將膠片轉漬至硝化尼龍膜上，再利用稀釋 2000~4000 之抗體作用後，進行西方轉漬檢測，結果發現有明顯的光帶產生，(資料未顯示)但位置稍微偏高，推測其為可能原因為：一次抗體係利用兔子抗豬乳鐵蛋白之抗體，其與人類乳鐵蛋白之敏感度及密合度可能有所偏差所造成之結果。仍需更進一步之檢驗如鐵的結合能力、抗菌試驗等來証實基因轉殖乳鐵蛋白的生物活性，以利於日後將 *Lactobacillus case* 定株於克弗爾粒上之效果。

五、參考文獻

- Bellamy, W. R., H. Warkabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura, and M. Tomita. 1993. Role of cell-binding in the antibacterial mechanism of lactoferricin B. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 478-484
- Ward, P. P., C. S. Piddington, G. A. Cunningham, X. Zhou, R. D. Wyatt, and O. M. Conneely. 1995. A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. *Bio/technology.* 13: 498-503.
- Jones, E. M., A. Smart., G. Bloomberg., L. Burgess, and M. R. Millar. 1994. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. *J. Appl. Bact.* 77: 208-214.
- 吳信志，1999。豬乳鐵蛋白及(或)人類凝血第九因子基因轉殖小鼠及基因轉殖豬之產製及分析。國立台灣大學畜產學研究所，博士論文。