

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

藉基因工程產製天然抗菌物質乳鐵蛋白素(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-378-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學畜產學系暨研究所

計畫主持人：林慶文

計畫參與人員：余佳恆

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 29 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

藉基因工程產製天然抗菌物質乳鐵蛋白素

計畫編號：NSC91-2313-B-002-378

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

計畫主持人：林慶文 國立台灣大學畜產學系

共同主持人：陳全木 國立中興大學生命科學系

計劃參與人員：余佳恆 國立台灣大學畜產學系

一、中英文摘要

牛乳鐵蛋白(bovine lactoferrin)為乳中的一種運鐵蛋白，其具有很多生理功能。牛乳鐵蛋白素(bovine lactoferricin)是乳鐵蛋白位於 N 端的一段多肽，其大小約為 25 個胺基酸。在哺乳動物體內，乳鐵蛋白被胃蛋白酶切割後可得到乳鐵蛋白素，而此片段具有比乳鐵蛋白更強的抗菌活性，係利用乳鐵蛋白素作為抗菌物質之開發。本研究旨在探討運用重組嗜甲醇酵母菌於體外產製乳鐵蛋白素之可行性。首先利用人工合成不同物種之乳鐵蛋白素以及乳鐵蛋白素抗菌中心片段之多肽，並直接對大腸桿菌、黃念珠球菌進行抗菌試驗。結果顯示，最佳殺菌效果之多肽為牛乳鐵蛋白素核心片段。挑選牛乳鐵蛋白素 25 個胺基酸當中含 11 個胺基酸之抗菌核心片段作為本研究欲進行產製、分析、試驗之目標片段。將可轉錄出此多肽之 DNA 序列以核酸合成法取得後，再將目標基因放入酵母菌表現型載體當中。確定帶有乳鐵蛋白素之質體建構無誤後，以電穿孔方式將此建構好的質體轉型至 *Pichia pastoris* 細胞，藉以產製生物性抗菌多肽。

關鍵詞 牛乳鐵蛋白素、抗酵母菌、酵母菌表現型載體

Abstract

Bovine lactoferrin is a transferrin protein found in milk, which has many biological functions. Lactoferricin is a short fragment from the N-terminus of lactoferrin. This peptide is about 25 amino acids. Lactoferricin is generated upon gastric pepsin cleavage of lactoferrin in mammalian animals. This peptide is much more effective in antibacterial properties than lactoferrin. And we could use the peptide to develop new style probiotic products. Our study is focus on the generation of the recombinant yeast, *Pichia pastoris*, containing the bovine lactoferricin gene fragment and the feasibility of large-scale production. First, we got synthetic lactoferricin and its antibacterial core peptide of different species by peptide synthesis, and then tested the antimicrobial activities against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Results revealed that the bovine lactoferricin and its antibacterial core peptide show the better ability of antimicrobial than the others. We selected 11-amino acids antibacterial core peptide of bovine lactoferricin, which has the same antibacterial activity as the native lactoferricin. Using oligonucleotide synthesis to get oligonucleotides of desired peptides, and cloned the target gene into yeast-expression

球菌

抗其

醇

vectors. After the constructed bLfcin/pPICZ α B vectors were confirmed, we transformed the recombinant vectors into *Pichia pastoris* by electroporation and selected the transformants to express the biological antibacterial peptides.
Key Words: Lactoferricin, antibacterial peptide, *Pichia pastoris*, yeast expression cassette

二、前言及目的

現今，在食品加工處理方面，如何增加產品的保存性是一門相當重要的學問。新開發的防腐劑尤其是化學合成之防腐劑，需經繁雜的毒性試驗才能被認定為 GRAS(Generally Recognized As Safe)。故目前之研究方向側重存在於動、植物中天然抑菌劑之找尋以及供作為食品配料之抑菌評估，其成分必須是對人體無害且具有可食性者為佳。乳鐵蛋白為哺乳動物體內的蛋白質，在乳汁中的含量最多，而其經產製蛋白後水熱更強的抗菌能力之稱多。不同物種乳鐵蛋白大小有些許不同。乳鐵蛋白的立體結構是呈扭曲且反平行狀的雙平板狀。以 25 個胺基酸大小的牛乳鐵蛋白來看，其中第 1-13 個胺基酸形成一個 α -helix，而第 12-15 個胺基酸形成一個轉折，之後的胺基酸形成一個 β -sheet。在第 3 及 20 個胺基酸序列的地方為半胱胺酸(cysteine)，兩個半胱胺酸可構成雙硫鍵使得乳鐵蛋白彎曲且穩定其構造。但此雙硫鍵存在與否對於乳鐵蛋白抗菌能力並未有影響。乳鐵蛋白有個特點，就是其比例上含有較多的鹼性胺基酸—精胺酸(arginine, Arg)、離胺酸(lysine, Lys)以及芳香族胺基酸—色胺酸(tryptophan, Trp)。乳鐵蛋白中的疏水性胺基酸，此等胺基酸會形成疏水性界面，而其他有親水性胺基酸及帶正電胺基酸環繞在其周性圍，形兩成巢

特性是為乳鐵蛋白素能夠抗菌之主要因素；其正電基團可與帶負電的菌膜結合，而疏水性基團也可與菌膜上疏水性基團結合，經由與細菌菌膜結合，使得菌膜主要構造—脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)大量釋出，而破壞細菌細胞膜之完整性，使得膜內外滲透壓之不同導致菌體破裂。乳鐵蛋白素對於許多微生物具有抑菌或是殺菌之效果，因此乳鐵蛋白素於天然防腐劑方面具有很大大之潛能。本研究係利用酵母菌微生物工程進而產製具有天然抗菌效果之乳鐵蛋白素，可應用於食品保存方面，而達到產品品質的保存功效。

三、結果與討論

(一)、合成不同物種間乳鐵蛋白素

本研究參照 Vorland 等人於 1998 所發表的不同物種間乳鐵蛋白素之胺基酸序列，選擇合成人類、牛及豬之乳鐵蛋白素之胺基酸片段進行抗菌活性試驗。乳鐵蛋白素(20 個胺基酸)係由國科會貴重儀器中心合成，而乳鐵蛋白素抗菌中心片段(9 個胺基酸)則由快興生物科技公司合成(表一)。

表一. 人工合成之人類、牛及豬之乳鐵蛋白素胺基酸序列

Peptide	Amino acid sequence
LfcinB	KCRRWQWRMCKKLGAPSITCV
LfcinH	KCFQWQRNMRKVRGPPVSCI
LfcinP	KCRQWQSKIRRTNPIFCIRR
LFcinB9	RRWQWRMCKK
LFcinH9	FQWQRNMRK
LFcinP9	RQWQSKIRR

B 為 bovine; H 為 human; P 為 porcine

(二)、比較各乳鐵蛋白素片段之抗菌能力

首先進行最小殺菌濃度試驗(MBC)；依照 NCCLS 的稀釋方法，將合成出的乳鐵蛋白素及乳鐵蛋白素抗菌中心片段依不同濃度(最終濃度為 512、256、128、64、32、16 μ

段一
白蛋

多

應

g/ml)配置好，再分別添加於菌中進行最小殺菌濃度試驗。選取的菌種為具代表性之大腸桿菌 *Escherichia coli*(CCRC 11509)、金黃色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*(CCRC 10781)及念珠球菌 *Candida albicans*(CCRC 20511)。其試驗結果如表二所示：在乳鐵蛋白素(20 個胺基酸)之殺菌能力方面，對於大腸桿菌之殺菌效果牛乳鐵蛋白素優於人及豬乳鐵蛋白素，但效果差異並不顯著。而在較小之抗菌片段(9 個胺基酸)的殺菌能力方面，牛乳鐵蛋白素抗菌中心片段之殺菌能力明顯優於人及豬之乳鐵蛋白素之中心片段，且差異較大。在金黃色葡萄球菌及念珠球菌之作用結果皆與大腸桿菌之結果相似。豬乳鐵蛋白素之抗菌中心片段並無抗菌能力，其可能是由於設計此片一段牛之序列順序所決定其序列而合成，故可能與真實之乳鐵蛋白素片段序列有所出入，所以並無顯著之殺菌能力。

表二、不同乳鐵蛋白素對於大腸桿菌、金黃色葡萄球菌及念珠球菌之最小殺菌濃度

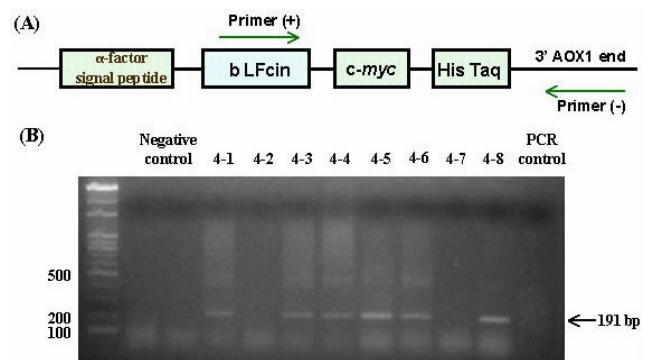
Peptide	MBC(μ g/mL)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
1. LFcinB	64	64	32
2. LFcinH	128	128	64
3. LFcinP	128	128	128
4. LFcinB9	32	32	32
5. LFcinH9	256	512	512
6. LFcinP9	>512	>512	>512

(三)、牛乳鐵蛋白素於酵母菌表現型載體之建構

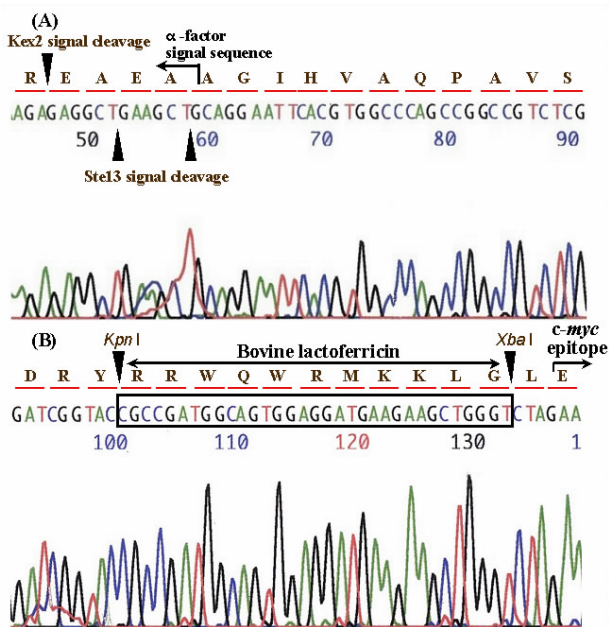
根據 Kang 等(1996)的報告指出，位於牛乳鐵蛋白素中央約含 11 個胺基酸片段，即具有相當於全長 25 個胺基酸的抑菌效力。因此，選擇合成中央 11 個胺基酸之 cDNA 序列的寡核苷酸片段，用以進行牛乳鐵蛋白素之研究。合成的寡核苷酸除了牛乳鐵蛋白素之 cDNA 本身之外，並在其前後設計了 *Kpn*I 以及 *Xba*I 切位以利後續實驗。設計的

兩段單股核酸片駁-CGC CGA TGG CAG TGG AGG ATG AAG AAG CTG GGT-3'、5'-CTA GAC CCA GCT TCT TCA TCC TCC ACT GCC ATC GGC GGT AC-3'。將合成的兩段單股寡取 4.9 μ L (100pnmol/ μ L)混合後，再加入 0.2 μ L dimethyl sulfoxide(DMSO)，接著以 60 $^{\circ}$ C、1 小時的條件進行黏合。黏合後的產物迅速與質體進行接合(ligation)實驗，本實驗之質體為酵母菌表現型載體 pPICZ α B。之後再將接合產物轉型至大腸桿菌 DH α 中。經由 zeocin 篩選後所獲得的菌株，萃取其質體進行聚合連鎖鹼解以待測之質體 DNA 為模板(template)，應用 bLFcin cDNA 序列部分片段作為上游引子：bLFcin primer (5'-CAGTGGAGGATGAAGAAGCT-3')，而下游引子則是 3' AOX1 primer (5'-GGATGTCAGAATGCCATTTGC-3')進行增值。圖一顯示 PCR 結果得到預期大小之 DNA 片段(191bp)，即可推測待測之質體 4-1、4-3、4-4、4-5、4-6 及 4-8 具有牛乳鐵蛋白素 cDNA 之序列，再將 4-8 選殖株進行定序，而從序列圖確定其含有牛乳鐵蛋白素之序列(圖二)。

較比



圖一、牛乳鐵蛋白素表現載體之構築與 PCR 篩選之結果。(A)酵母菌表現載體內含有 α -factor 訊息蛋白、牛乳鐵蛋白素抗菌中心片段、*c-myc* 序列與組胺酸序列。而圖上之引子用於 PCR 篩選；(B)PCR 篩選結果，左側為分子量指標，產物之長度為 191bp。

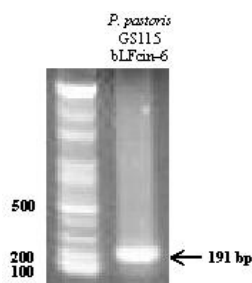


圖二、4-8 選植株之定序結果；其含有牛乳鐵蛋白素之序列、酵素截切位置、Ste13 訊息蛋白與 Kex2 蛋白截切位置、*c-myc* 與組胺酸之序列。

(四)以電穿孔(electroporation)進行酵母菌之轉型作用

本實驗採用 Invitrogen 公司的 *Pichia pastoris* GS115 為表現用的宿主細胞。將構築好的 bLFcin/pPICZ α B 質體利用 *EcoRI* 截切成線性 DNA，取 5~10 μ g 線形 bLFcin/pPICZ α B 質體及準備好的勝任酵母菌 80 μ l 混合，再移入已預冷至 0°C 的 0.2cm cuvette 中。電穿孔使用的設備為 Multipurpose Electroporation System (EJ-002) Easyjet Plus[®] 並設定條件為電壓 4500V，電容 150 μ F，電阻 99 Ω ，電擊後立刻移入 YPD 中培養 2 小時，之後將菌液均勻塗於含 zeocin(100 μ g/ml)的 YPD 培養盤上，再放入 30°C 培養 2~3 天。為了篩選嵌入 bLFcin 套數較多的轉型酵母菌，從上述的培養盤中挑取菌落，再移植到含有 5、10 及 20 倍等高倍 Zeocin YPD 培養盤中，以篩選出嵌入 bLFcin 基因套數多的菌株，期能有較佳之 bLFcin 表現效果。將長在含有 20 倍 Zeocin YPD 培養盤中的重組

酵母菌之染色體 DNA 萃取出以便進行 PCR 篩選，使用 bLFcin primer 及 3' AOX1 primer 為引子進行 PCR 擴增反應，並將 PCR 產物跑洋菜膠電泳 (0.8%)，由圖三可看到預期 PCR 產物之片段 191bp，因而確認轉植株酵母菌 GS115-bLFcin-6 染色體上確實有嵌入 bLFcin 之序列。



圖三、酵母菌染色體 DNA 進行 PCR 分析結果，左側為分子量指標，使用之引子為 bLFcin primer 及 3' AOX1 primer，而產物長度為 191bp。

四、參考文獻

- Arnold, R. R., M. Brewer, and J. J. Gautier. 1980. Bactericidal activity of human lactoferrin: Sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect. Immun.* 28:893-898.
- Bellamy, W. R., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita. 1992. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 472-479.
- Kang, J.H., M.K. Lee, K.L. Kim, and K. Hahm. 1996. Structure-biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. *Int. J. Peptide Prot. Res.* 48:357-363.

- Strom, M.B., O. Rekdal, and J.S. Svendsen. 2000. Antibacterial activity of 15-residue lactoferricin derivatives. *J. Peptide Res.* 56:265-274.
- Vorland, L. H., H. Ulvatne, J. Andersen, H. Haukland, Y. Rekdal, S. Svendsen, and T. J. Gutteberg. 1998. Lactoferricin of bovine is more active than lactoferricins of human, murine and caprine origin. *Scand. J. Infect Dis.* 30: 513-517.
- Yamauchi, K., M. Tomita., T. J. Giehl, and T. Ellison. 1993. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect. Immun.* 2: 719-728