

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(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-002-134-

執行期間：92年08月01日至93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：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 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：NSC92-2313-B-002-134

執行期間：91 年 08 月 01 日至 93 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截切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、金黃色葡萄球菌及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及其抗菌中心片段。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形至 *Pichia pastoris* 細胞，藉以產製生物性抗菌多肽。在蛋白質分析部分，藉由 Tricine-SDS PAGE 以及西方墨點法之分析，可在膠片上看到預期大小 17 kDa 的色帶。因此確認牛乳鐵蛋白素於嗜甲醇酵母菌系統當中被表現出並分泌至細胞外。

關鍵詞：乳鐵蛋白素、抗菌多肽、嗜甲醇酵母菌、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. Then 11-amino acids antibacterial core peptide of bovine lactoferricin were selected, 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 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. In protein analysis, an expected protein size of recombinant bLFcin was detected by Tricine SDS-PAGE and Western blot. The results revealed that recombinant bLFcin was successful produced by *P. pastoris* expression system.

Key Words: Lactoferricin, antibacterial peptide, *Pichia pastoris*, yeast expression cassette

二、前言及目的

近十年來對於乳鐵蛋白的研究已漸具成果，其對於身體保健上諸如：增加鐵離子代謝、抑制細菌生長、調節發炎反應及抗氧化等生物功能，也逐漸為大眾所認知。乳鐵蛋白素為乳鐵蛋白經過胃蛋白酶水解而得到的，是為一強效抗菌多肽，具有比乳鐵蛋白更強的抗菌能力，可謂一良好的天然抗菌物質，因此若將乳鐵蛋白素應用於食品保存方面，作為天然的防腐劑，用於延長食品或是飼料的使用期限，相較於化學性防腐劑，可提供另一不同的選擇；此外亦有報告指出，乳鐵蛋白素對於某些癌細胞有破壞或是抑制其轉移的效果，遂令大量產製乳鐵蛋白素的技術具有研發之價值。

而近年來生物基因工程技術的發展普遍，利用基因重組技術產製特定蛋白質漸為一可行方法，而酵母菌表現系統屬於真核表現系統，其具有便於培養、可量產及蛋白質

產量高的特性，相較於動物或是植物的表現系統而言，又有成本較低、成功率較高的優點，故若能利用酵母菌表現系統產製乳鐵蛋白素及其抗菌中心多肽，並證明其可行性，可資產品之量產或生理研究上之運用，並期能有更多元化之應用發展；而利用基因重組技術產製的產品，其仍尚需進行相關的生物試驗，確認其用量與安全性，才可擴大其應用之範圍。

三、文獻檢討

乳鐵蛋白為哺乳動物體內的蛋白質，在乳汁中的含量最多，且具有很廣泛的生理功能。Bellamy 等人於 1992 年發現，以胃蛋白酶水解乳鐵蛋白 N 端區域後，可得到一段具有抗菌能力之多肽，並且將其命名為乳鐵蛋白素(lactoferricin)。乳鐵蛋白素對眾多微生物具有抗菌能力(Jones *et al.*, 1994)。日前研究指出乳鐵蛋白素亦抑制癌細胞轉移(Yoo *et al.*, 1997)。不同物種乳鐵蛋白素大小有些許不同。牛乳鐵蛋白素大小為 25 個胺基酸，而其抗菌能力比人乳鐵蛋白素(大小為 47 個胺基酸)還要強效(Vorland *et al.*, 1998)。乳鐵蛋白素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素來看，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素彎曲且穩定其構造。但此雙硫鍵存在與否對於乳鐵蛋白素抗菌能力並未有影響。乳鐵蛋白素有個特點，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)。乳鐵蛋白素中的疏水性胺基酸，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圍，形成

具有兩極性的多肽，此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—脂多醣(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(Chapple *et al.*, 1998)。乳鐵蛋白素有疏水性及正電性兩種特性，而推測這兩種特性對於其抗菌能力佔有重要的影響力。根據 Kang 等(1996)的報告指出，位於牛乳鐵蛋白素中央約含 11 個胺基酸的多肽片段，即具有相當於全長 25 個胺基酸的抑菌效力。因此，選擇中央 11 個胺基酸乳鐵蛋白素做為本實驗主要研究的方向。

四、研究方法

(一)、合成乳鐵蛋白素片段並比較抗菌能力

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	KCRRWQWRMKKLGAPSITCV
LfcinH	KCFQWQRNMRKVRGPPVSCI
LfcinP	KCRQWQSKIRRTNPIFCIRR
LFcinB9	RRWQWRMKK
LFcinH9	FQWQRNMRK
LFcinP9	RQWQSKIRR

B 為 bovine; H 為 human; P 為 porcine

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 g/ml)配置好，再分別添加於菌中進行最小殺菌濃度試驗。而本實驗所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)。

藉由電子顯微鏡觀察受試菌菌種之微細構造，可直接檢測牛乳鐵蛋白素破壞菌膜之程度。實驗流程如以下所述，將培養隔夜之菌液以 1.5ml 離心管分裝後，以 4000rpm, 4 $^{\circ}$ C 離心 10 分鐘，掉倒上清液後，添加不同濃度之乳鐵蛋白素，再將混合之菌液置於 37 $^{\circ}$ C 培養箱內，進行不同時間之培養。於 15、30、60、90、120 分鐘培養後之菌液取出，以 4000rpm, 4 $^{\circ}$ C 離心 10 分鐘，掉倒上清液後，於 0.7% 戊二醛溶液中前固定 4 小時後，再以蒸餾水沖洗 2-3 次，每次 15 分鐘。於通風櫥中，以 1% 的四氧化銻溶液後固定 1 小時，再以蒸餾水沖洗 2-3 次，每次 15 分鐘。將上述試樣依序置於 20、40、60、80、95、100% 酒精進行脫水各 1 小時，最後將試樣保存於 100% 酒精中。將此試樣置於臨界點乾燥機(Tousimis, Samdri-PVT-3B, U.S.A.)，充入液態二氧化碳進行臨界點乾燥(critical point drying, CPD)。將經乾燥之試樣，固定於黏有雙面膠之鋁台上，以離子覆膜機(Ion coater JFC1100E, JEOL, Japan) 進行鍍金，再將試樣台放入掃描式電子顯微鏡之試樣室中，抽真空，觀察試樣表面立體構造，並照相之。

(二)、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 個胺基酸的多肽片段，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 序列的寡核甘酸片段，用以進行牛乳鐵蛋白素之研究。合成的寡核甘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。設計的兩段單股核甘酸片段序列分別為：5'-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核苷酸片段，各取 4.9 μ L (100pnol/ 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形至大腸桿菌 DH₅ α 中。經由 zeocin 篩選後所獲得的菌株，萃取其質體進行聚合酶連鎖反應檢測，分別以待測之質體 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。

(三)、酵母菌之轉形與轉形株之篩選

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 *Bgl*III 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 $^{\circ}$ C 的 0.2cm cuvette 中。電穿孔使用的設備為 Multipurpose Electroporation System (EJ-002) Easyject 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 $^{\circ}$ C 培養 2~3 天。為了篩選嵌入 bLFcin 套數較多的轉形酵母菌，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。

(四)、酵母菌轉形株之培養與甲醇誘導重組蛋白質之分泌

挑選單一菌落的重組酵母菌培養於 YPD 培養液 (Yeast extract peptone dextrose medium)，其成份為：1% yeast extract，2% peptone 與 2% dextrose。經 18 至 24 小時培養後，取適量之菌液轉接至基礎培養基 BMGY 培養液 (1% yeast extract，2% peptone，100mM potassium phosphate buffer pH6.0，1.34% YNB，4 \times 10⁻⁵M biotin，1% glycerol)中，測量 O.D.值並調整菌液之濃度使其 O.D.值相近，並於恆溫振盪培養箱中，以 30 $^{\circ}$ C，轉速 180 轉進行震盪培養，令其大量生長。待菌體於 BMGY 培養液培養至 O.D.₆₀₀=2~6 之間時，將菌液以 4 $^{\circ}$ C、3000 rpm 進行離心而沉澱，再重新懸浮於誘導型 BMMY (1% yeast extract，2% peptone，100mM potassium phosphate buffer pH6.0，1.34% YNB，4 \times 10⁻⁵M biotin，0.5% methanol) 培養基中。進行大量表現蛋白質時，則調整菌液濃度於誘導性培養基 BMMY 使其 O.D.值相近於 1；而測量酵母菌生長曲線，則調整菌液濃度使其 O.D.值相近於 0.1。之後將菌液恆溫振盪培養，以 30 $^{\circ}$ C，轉速 180 轉進行培養，爾後，每隔 24 小時添加適當量之 100% 甲醇，使甲醇的最終濃度為培養基總體積之 0.5%，作為持續誘導蛋白質表現之用。

(五)、嗜甲醇酵母菌轉形株之生長曲線測定

利用分光光度計測定含有牛乳鐵蛋白素之轉形株酵母菌於 BMGY 以及 BMMY 兩種培養液中的生長曲線，分別在培養時間 0、6、12、18、24、30、36、42 及 48 小時，測波長 600 nm 之 O.D.值，並以無菌培養液當作空白組，藉以求得菌體之吸光值。而野生型酵母菌株與 pPICZ α A 酵母菌轉形株則作為對照組。

(六)、酵母菌轉形株細胞內與細胞外之蛋白質分析

為測定轉形株酵母菌於細胞內及胞外表現牛乳鐵蛋白素重組蛋白質之能力，因此於甲醇誘導後每六小時則收集酵母菌培養液，經離心後分成上清液及細胞體，分別保存於-20°C，以利後續分析。

於胞內蛋白質分析方面，將菌體加入破菌緩衝液(breaking buffer: 50mM 硫酸鈉, pH 7.4、1mM EDTA、5%甘油) 100 μ l 及0.1M 蛋白酶抑制劑 (phenylmethylsulfonyl fluoride; PMSF, protease inhibitor) 1 μ l，用超音波細胞擊碎器(Vibra cell, SONICS & MATERIAL INC)以50Watt 輸出功率之條件將細胞體震碎，震30 秒即置於冰上30 秒，如此重複20次，使能將酵母菌體打破；於4°C 離心12000 rpm、10分鐘，將含有細胞萃出物之上清液移置另一離心管，即可進行Tricine-硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺膠電泳(Tricine-SDS-PAGE)及西方吸漬法分析。Tricine-SDS-PAGE可分離分子量小的蛋白質。本實驗所使用之膠體濃度為12.5% acrylamid-bis gel進行蛋白質電泳。而西方吸漬法(western blot)分析將經過電泳分離之蛋白質轉漬至PVDF 膜上後，利用稀釋500倍之鼠抗*c-myc* 蛋白初級抗體，以及稀釋10000倍之次級抗體(HRP-conjugated Goat anti-mouse IgG)進行免疫反應，而後利用化學螢光顯影，並以X 光片(Scientific Imaging Film, Kodak)進行曝光，經顯影、定影來判讀是否有牛乳鐵蛋白素產製出。

於胞外蛋白質分析部分，將前述所保留之酵母菌上清液利用Stirred cell以及Ultracel Amicon YM Ultrafiltration Discs (Millipore)進行濃縮；將50 mL的上清液以Stirred cell濃縮至2-3 mL後，改用Micorcon YM-3 (Millipore)繼續濃縮至200 μ l左右。接著進行Tricine-SDS PAGE及西方吸漬法分析。

五、結果與討論

(一)、比較不同物種間乳鐵蛋白素抗菌能力

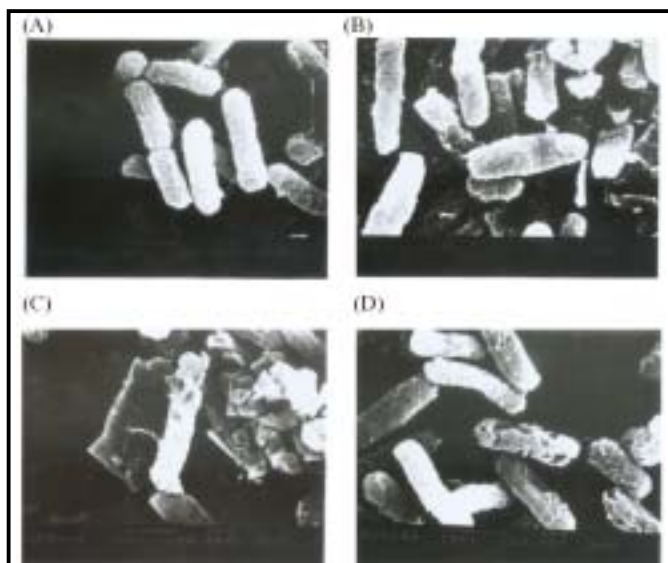
對細菌生長之影響方面，抗菌試驗結果如表二所示：在20個胺基酸大小之乳鐵蛋白素殺菌能力方面，對於大腸桿菌之殺菌效果牛乳鐵蛋白素優於人及豬乳鐵蛋白素，但效果差異並不顯著。而在較小之抗菌片段(9個胺基酸)的殺菌能力方面，牛乳鐵蛋白素抗菌中心片段之殺菌能力明顯優於人及豬之乳鐵蛋白素之中心片段，且差異較大。在金黃色葡萄球菌及念珠球菌之作用結果皆與大腸桿菌之結果相似。豬乳鐵蛋白素之抗菌中心片段並無抗菌能力，其可能是由於設計此一多肽片段時是比較人及牛之序列順序所決定其序列而合成，故可能與真實之乳鐵蛋白素片段序列有所出入，所以並無顯著之殺菌能力。

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

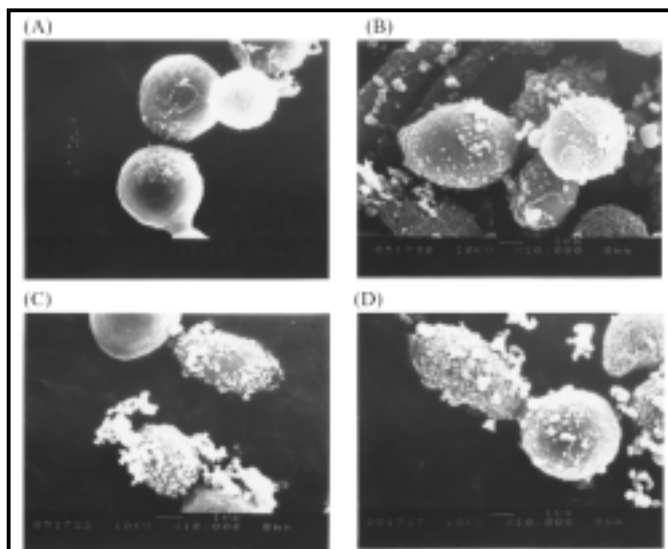
Peptide	MBC(μ g/mL)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
1. LFcInB	64	64	32
2. LFcInH	128	128	64
3. LFcInP	128	128	128
4. LFcInB9	32	32	32
5. LFcInH9	256	512	512
6. LFcInP9	>512	>512	>512

電子顯微鏡觀察乳鐵蛋白素影響菌膜生理方面，首先進行不同濃度之乳鐵蛋白素之影響，圖一是將乳鐵蛋白素與大腸桿菌共培養後經掃描式電子顯微鏡放大20000倍之結果，未經合成乳鐵蛋白素處理的情況下，大腸桿菌菌膜相當完整，而在合成乳鐵蛋白素之作用下，可看出不同濃度之培養情況其菌膜結構之改變，濃度越高之乳鐵蛋白對菌膜之破壞情況愈大。在共同培養1小時之情況下，劑量為32 μ g/ml之乳鐵蛋白素使大腸桿菌菌膜較為膨脹；劑量為64 μ g/ml時，菌膜表面產生許多孔洞；而劑量到達128 μ g/ml時，可明顯看出菌膜破裂及整個菌體之瓦

解。圖二為乳鐵蛋白素與金黃色葡萄球菌及念珠菌共同培養之結果，其顯示乳鐵蛋白素會破壞菌體之菌膜，使菌體破裂。



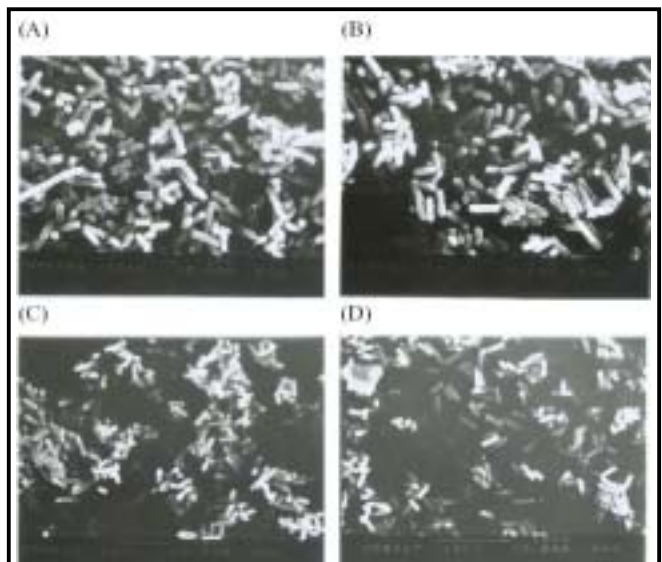
圖一、不同濃度之乳鐵蛋白素，對大腸桿菌菌膜影響之電顯圖。(A)未經處理之大腸桿菌添加(B)32mg/ml (C)64mg/ml (D)128mg/ml



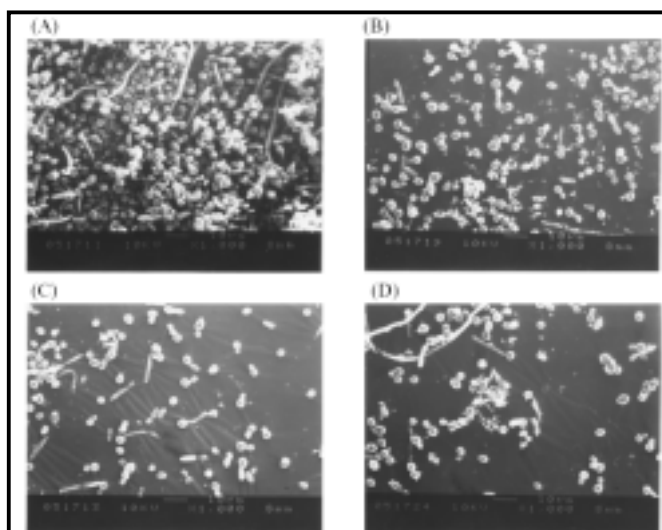
圖二、添加 1mg/ml 之乳鐵蛋白素，對金黃色葡萄球菌及念珠菌菌膜生理影響之電顯圖。(A)、(B)為金黃色葡萄球菌。(C)、(D)為念珠菌。

不同培養時間下乳鐵蛋白素對大腸桿菌及念珠菌之影響，圖三及圖四分別為乳鐵蛋白素對大腸桿菌及念珠菌之共同培養結果，

在乳鐵蛋白素濃度皆相同之情況下，採集不同不同時間之菌液進行比較，在與未經處理之細菌比對之下發現不論是大腸桿菌或是念珠菌在較長時間的培養下，菌落明顯之減少，並有較多破碎之菌體產生。在此可推測合成之乳鐵蛋白素同樣具有抗菌能力。



圖三、相同濃度(1mg/ml)，不同培養時間處理下，乳鐵蛋白素對大腸桿菌生長造成影響之電顯圖。(A)未經乳鐵蛋白處理(B)培養 15 分鐘(C)30 分鐘(D)60 分鐘。

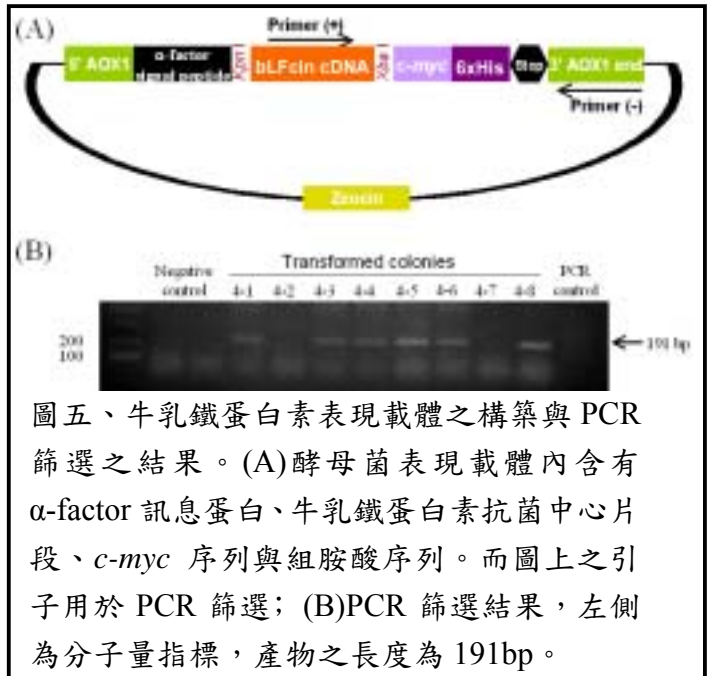


圖四、相同濃度(1mg/ml)，不同培養時間處理下，乳鐵蛋白素對念珠菌生長造成影響之電顯圖。(A)未經乳鐵蛋白處理(B)培養 15 分鐘(C) 30 分鐘(D)60 分鐘

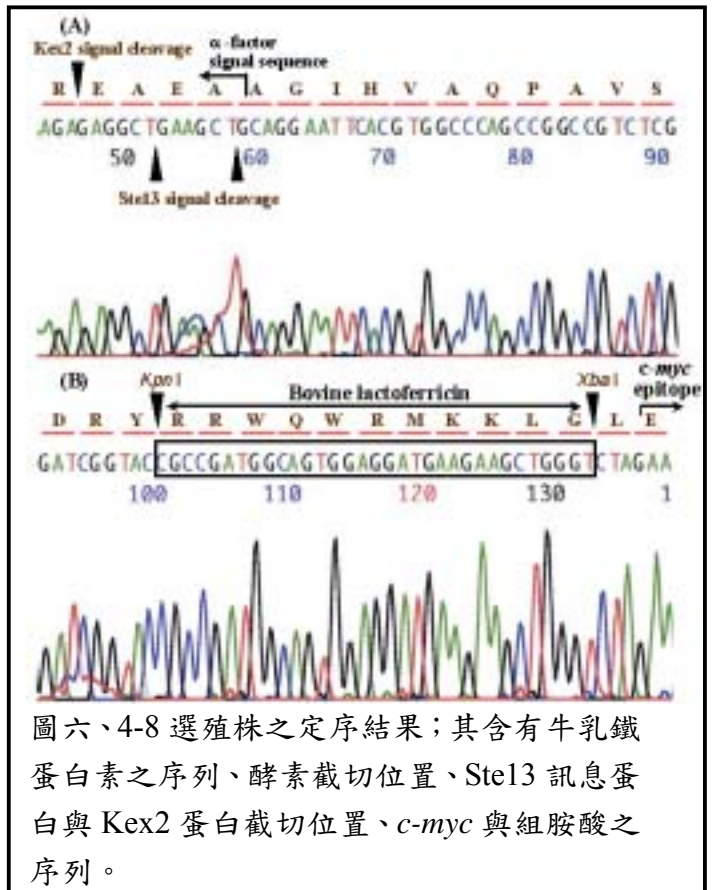
(二)、牛乳鐵蛋白素基因於嗜甲醇酵母菌之建構與表現

利用基因工程量產牛乳鐵蛋白素於酵母菌中之策略，首先須將牛乳鐵蛋白素基因轉形入酵母菌中。本實驗選擇轉入的DNA 序列可轉錄出牛乳鐵蛋白素抗菌中心片段，其為牛乳鐵蛋白N 端的第20-30胺基酸，序列片段大小只有33 個核.酸，簡稱bLFcin。藉由合成得到的正反兩個牛乳鐵蛋白素單股cDNA 片段，經過黏合作用後的產物再接合至表現載體pPICZ α B 上，再轉形至大腸桿菌DH5 α 中保存之；接著利用bLFcin 本身序列設計的上游引子，稱為bLFcin primer，及使用表現載體pPICZ α B 上之AOX1 基因序列進行設計的下游引子3' AOX1 primer，並以直接加入菌體做為模板的方式進行PCR。藉由PCR 的篩選，若菌體帶有牛乳鐵蛋白素基因片段，始可提供正確的模板，使PCR 反應得以順利進行，而致獲得一大約191 bp 的片段，即知轉形株帶有牛乳鐵蛋白素基因。圖五為菌體PCR 之結果，本實驗利用空的pICZ α B 載體轉形之菌株做為PCR 擴增反應的對照組(第2 與3 lane)，因為其不含bLFcin 基因嵌入片段，因此不會有PCR 擴增反應產物；在檢測之8 株菌株中(第4 至11 lane)，發現4-1、4-3、4-4、4-5、4-6 及4-8 之轉形株明顯具有191bp 之PCR產物，推論應帶有牛乳鐵蛋白素之基因，再將各轉形株經大量增殖後進行自動核酸定序(Automatic DNA sequencing)，以進一步確認嵌入之牛乳鐵蛋白素基因片段是否完全正確。從轉形株4-8 的定序圖譜結果(圖六)得知，於第101~133 的核酸序列與牛乳鐵蛋白素基因序列完全相同，可直接證明轉形株4-8 確實成功將牛乳鐵蛋白素基因轉入，且讀序(reading frame)並無被破壞，可正確地轉錄出牛乳鐵蛋白素。由此圖譜也顯示限制.KpnI 及XbaI 兩個酵素截切位置，Ste13 與Kex2 兩個訊息

蛋白截切位置之序列皆無誤。再將確定帶有牛乳鐵蛋白素基因之轉形株4-8 進行大量培養，收集菌體並萃取bLFcin/pPICZ α B 質體，作為酵母菌轉形之用。



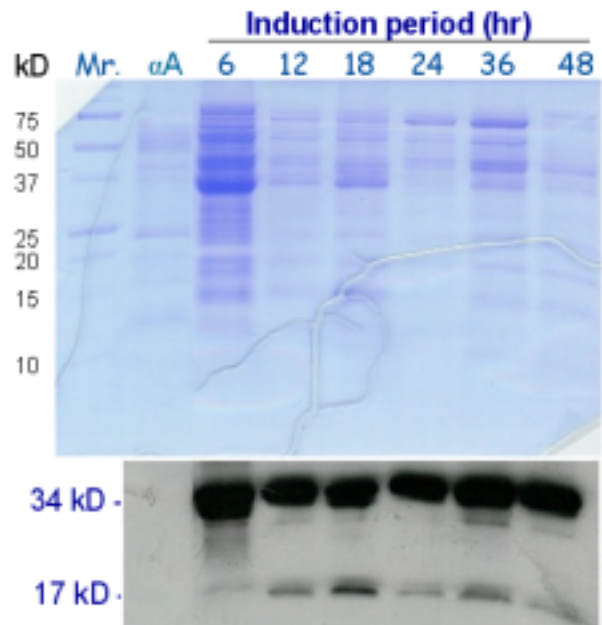
圖五、牛乳鐵蛋白素表現載體之構築與 PCR 篩選之結果。(A)酵母菌表現載體內含有 α -factor 訊息蛋白、牛乳鐵蛋白素抗菌中心片段、c-myc 序列與組胺酸序列。而圖上之引子用於 PCR 篩選；(B)PCR 篩選結果，左側為分子量指標，產物之長度為 191bp。



圖六、4-8 選殖株之定序結果；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。

大腸桿菌轉形株4-8 經大量培養後，萃取出足量的bLFCin/pPICZ α B 質體，再選擇於質體上只有單一酵素截切位置的限制酶，期能將bLFCin/pPICZ α B 質體截切成線性，以利轉形至酵母菌染色體DNA中。結果使用 *Bgl*III 限制.截切於bLFCin/pPICZ α B 質體上 *ColE1* 的區域，得以產製大量的線性DNA。配合電穿孔方式將線性DNA 送入酵母菌 *P. pastoris* GS115 中，以產生轉形株，再將這些轉形株培養於含有不同濃度Zeocin™ 抗生素之培養基，藉以進行重組酵母菌轉形株之篩選。由於轉形進入酵母菌染色體DNA 中的線性DNA 數目會隨著每一個轉形株有所不同，而進入的數目越多，越能產生可分解Zeocin™ 抗生素的蛋白質，故越能在含有高濃度Zeocin™ 抗生素的培養基中快速生長，而不受到Zeocin™ 抗生素的抑制，故篩選目標為能在含有高濃度Zeocin™ 抗生素培養基快速生長的轉形株，以期能有更多量牛乳鐵蛋白素的表現。篩選結果得到六株轉形株，其在Zeocin™ 抗生素具有良好的生長效果。將得到的六株轉形株酵母菌做好凍菌保存。

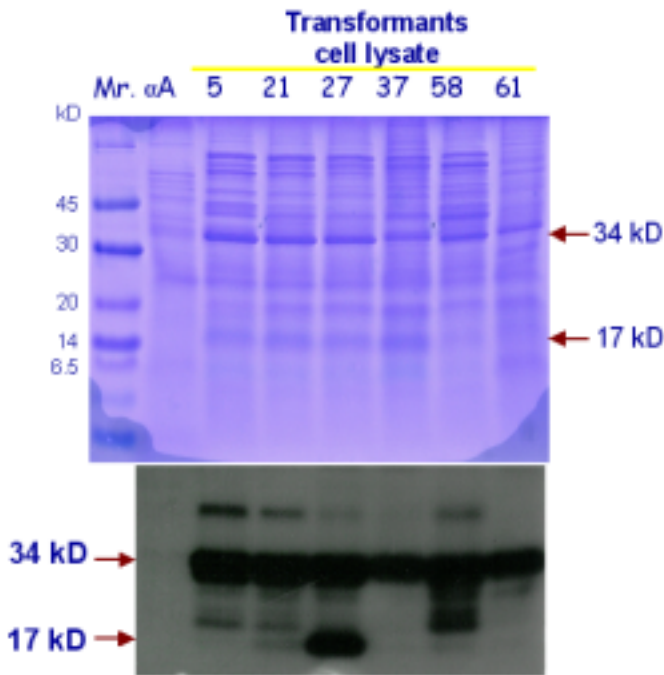
於蛋白質分析方面，首先要找出經甲醇誘導後，轉形株分泌牛乳鐵蛋白素之最佳時段。將轉形株 A-21 培養於 BMMY 後，收集第 6、12、18、24、36 及 48 小時之菌體，經 sonicator 方式破菌後，收集含有胞內蛋白質之上清液，預期重組牛乳鐵蛋白素大小為 17 kDa，而以空質體 pPICZ α A 酵母菌轉形株當作對照組。圖七為 Tricine SDS-PAGE (12.5%) 以及西方吸漬法之分析結果，其顯示經甲醇誘導後於預期蛋白質大小的地方有出現色帶，表示轉形株確實轉譯出重組牛乳鐵蛋白素，且於第 18 小時的時候分泌量為較多。而於 34 kDa 大小之處也得到一個色帶，此推測可能是重組蛋白之 dimer，此部分仍在尋找解決之道。



圖七、酵母菌轉形株 A-21 經甲醇誘導後於不同時序表現重組牛乳鐵蛋白素之蛋白質電泳與西方吸漬法分析。西方吸漬法中使用 *c-myc* 初級抗體(500 倍)以及 anti-mouse 次級抗體(10000 倍)。

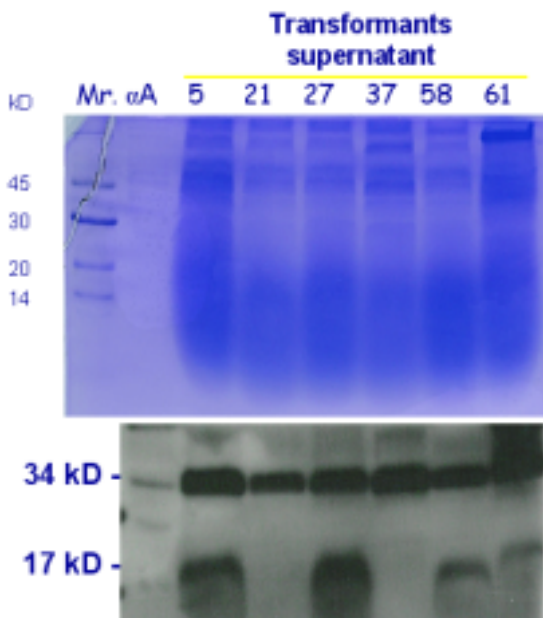
確定轉形株最佳分泌重組蛋白質之時序為誘導後第 18 小時，接著將經高濃度 Zeocin™ 篩選出的六株轉形株進行實驗，以期找出表現重組蛋白最佳的轉形株。將菌株培養於 BMMY 後，收集第 18 小時之菌體，經 sonicator 破菌後，收集含有胞內蛋白質之上清液進行分析。圖八為 Tricine SDS-PAGE (12.5%) 以及西方吸漬法之分析結果，經由比較於 17 kDa 位置的蛋白質，轉形株 A-27 明顯有較高的表現量。因此藉由胞內蛋白質分析，可確定轉形株經甲醇誘導後第 18 小時為最佳的分泌時序，而轉形株 A-27 為六株轉形株當中轉譯出胞內重組蛋白質的量最多。

在胞外蛋白質分析方面，將六株轉形株培養於 BMMY 後，於誘導後第 18 小時收集培養液，經 12000 rpm 高速離心去除菌體後，利用 Stirred cell、Ultracel Amicon YM Ultrafiltration Discs 初步濃縮以及 Micorcon YM-3 (Millipore) 更進一步濃縮至 200 μ l 左右。接著進行 Tricine-SDS PAGE 及西方吸漬法分析。圖九為六株轉形株其胞外蛋白質



圖八、不同株轉形株經甲醇誘導後，於第 18 小時表現重組牛乳鐵蛋白素之比較。西方吸漬法中使用 *c-myc* 初級抗體(500 倍)以及 anti-mouse 次級抗體(10000 倍)。

分析結果，於蛋白質 17 kDa 的位置，轉形株 A-5、A-27 以及 A-58 相較另三株轉形株，分泌重組蛋白質量較多，而以 A-27 分泌量為最高。



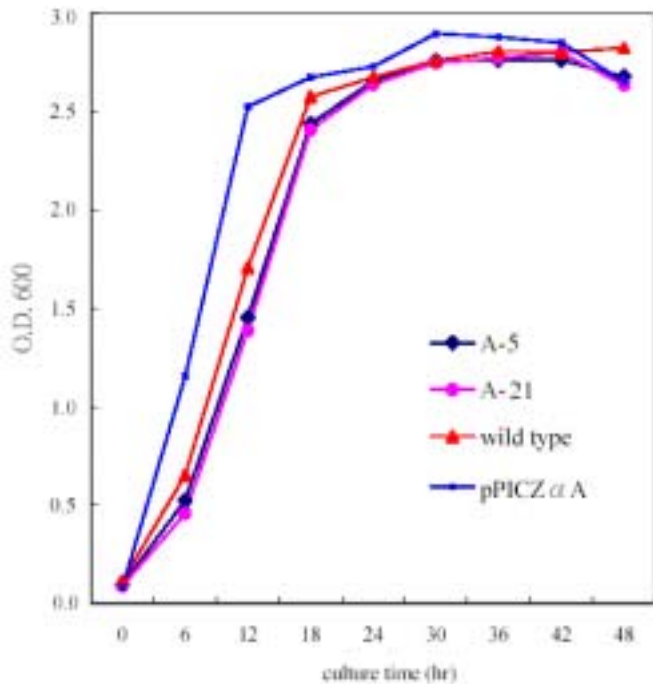
圖九、不同株轉形株經甲醇誘導後，於第 18 小時表現胞外重組牛乳鐵蛋白素之比較。西方吸漬法中使用 *c-myc* 初級抗體(500 倍)以及 anti-mouse 次級抗體(10000 倍)。

而酵母菌轉形菌株之生長測定方面，由於無法確定酵母菌轉形株所帶有之外來基因，經表現出蛋白質後對於菌體本身的生長影響。故本實驗以分光光度計分別於不同時段測量兩株酵母菌轉形株 A-5、A-21，以及野生型酵母菌與 pPICZ α A 酵母菌轉形株作為對照組，觀察其生長曲線。四株菌先分別接種於基礎培養基 BMGY 中，培養起始的 O.D. 值調整至約 0.1；而培養於誘導型培養基 BMMY 時，起始的 O.D. 值調整約至 0.26，以期起始菌數相近。圖十為四株酵母菌培養於 BMGY 中不同時段所測得之 O.D. 值變化，結果顯示，兩株酵母菌轉形株 A-5、A-21 的生長曲線，與野生型酵母菌的生長曲線相差無幾，但與 pPICZ α A 酵母菌轉形株相較下，pPICZ α A 酵母菌轉形株為一僅含空的載體之對照組，其菌體培養初期的生長速率卻顯得快速許多。圖十一為四株酵母菌培養於 BMMY 中不同時段所測得之 O.D. 值變化，結果顯示，兩株酵母菌轉形株 A-5、A-21 的生長曲線，相較於野生型酵母菌株與 pPICZ α A 酵母菌轉形株有明顯的不同；野生型酵母菌株與 pPICZ α A 酵母菌轉形株生長曲線類似培養於 BMGY 中的情況，但兩者定常期之 O.D. 值具有差異；而 A-5、A-21 在培養初期的生長速率明顯偏低，且似乎一直未達到生長的定常期，或可推論經過甲醇誘導後，確實有牛乳鐵蛋白素表現，而牛乳鐵蛋白素的抑菌效果也反映於兩株菌的生長曲線上。

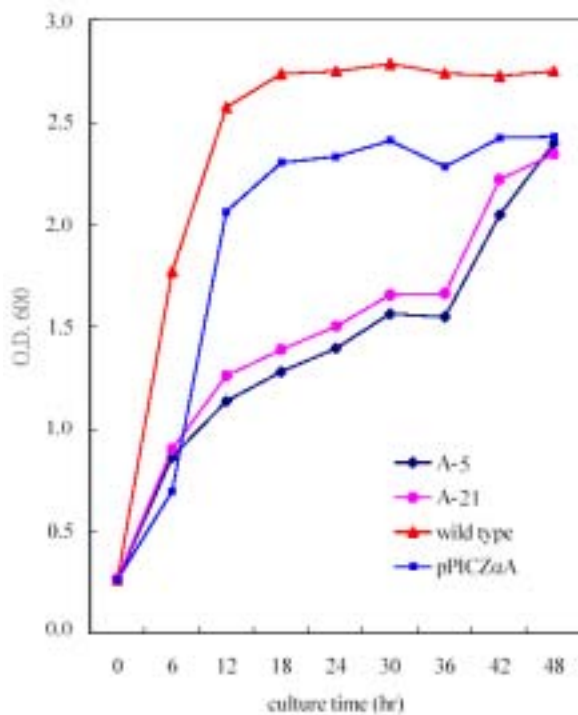
六、結論

人工合成之乳鐵蛋白素經抗菌試驗結果顯示牛乳鐵蛋白素(LFcinB)具有最佳之抑菌與殺菌能力，豬乳鐵蛋白素(LFcin P)次之而人乳鐵蛋白素(LFcin H)最差；因此後續以 LFcinB 核酸片段進行基因工程酵母菌之量產，結果顯示嗜甲醇性酵母菌 (*P. pastoris*) 之菌體及菌液均可測得重組乳鐵蛋白素之表現

與釋放，此一基因工程酵母生產平台之建立，將有助於往後抗菌活性肽之生產純化與應用。



圖十、酵母菌轉形株A-5、A-21，野生型酵母菌株以及轉形株pPICZ α A 酵母菌株培養於基礎培養基BMGY 之生長曲線。



圖十一、酵母菌轉形株A-5、A-21，野生型酵母菌株以及轉形株pPICZ α A 酵母菌株培養

於誘導型培養基BMMY 之生長曲線。

七、參考文獻

- 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.
- Chapple, D. S., D. J. Mason, C. L. Joannou, E. W. Odell, V. Gant, and R. W. Evans. 1998. Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. *Infect. Immun.* 66:2434-40.
- 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.
- 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.
- 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.
- Yoo, Y. C., S. Watanabe., R. Watanabe., K. Hata., K. Shimazaki, and I. Azuma. 1997. Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 88: 184-190.