

運用 *Yarrowia lipolytica* 酵母菌胞外分泌系統執行富含抗壓力及幫助睡眠機能性胜?之蛋白質開發與生產

簡雋杰、簡宏堅

E-mail: 345451@mail.dyu.edu.tw

摘要

抗壓力及幫助睡眠機能性胜? Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg (YLGYLEQLLR ; YLG) , 是由牛乳中酪蛋白水解而來的十胜? , 經動物實驗及人體實驗證實具有降低壓力賀爾蒙的產生及幫助睡眠品質提高之作用 (de Saint Hilaire et al., 2009) 3。為了建立 YLGYLEQLLR 胜? 高產量及高濃度的生產方式 , 本實驗使用人類酪胺酸羥基酵素 (*Home sapiens tyrosine hydroxylase* ; HTH) 來做為攜帶機能性胜? 的蛋白 (protein carrier) , 且尋找不影響此酵素活性中心之五大區段將其更換為機能性胜? (Goodwill et al., 1998) 5。執行置換之前 , 須先設計未來如何被人體內的消化? 進行切割釋出 , 由於抗壓力及幫助睡眠胜? YLGYLEQLLR 之 C 端恰好為 R , 故只需在抗壓力及幫助睡眠胜? YLGYLEQLLR 之 N 端前面設計 Lys 或 Arg , 以利於將來使用 trypsin 切割 Lys 和 Arg 之 C 端 , 將抗壓力及幫助睡眠胜? 釋出 , 確定其可行性後才進行抗壓力及幫助睡眠胜? 之引子設計與築。完成酵素外圍五大區段含有抗壓力及幫助睡眠胜? 之置換後 , 將其選殖入 *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*) 酵母菌之胞外表現載體 pYLSC1 最後將其轉形至 *Y. lipolytica* 酵母菌染色體中進行生產 , 故我們使用 *Y. lipolytica* 酵母菌中產量最高之密碼子進行設計的引子。本研究共設計了九次的基因重組含有九套抗壓力及幫助睡眠機能性胜? 之蛋白質。首先將攜帶機能性胜? 蛋白 HTH 的第一區段、第二區段、第三四區段及第五區段 , 各置換入 2 ~ 3 套抗壓力及幫助睡眠機能性胜? YLGYLEQLLR。完成單區段置換後 , 接著進行兩兩區段之連接 ; 將置換好的第三四區段及第五區段之抗壓力及幫助睡眠胜? 做連接 ; 再將已置換好的第二區段及第三四五區段之抗壓力及幫助睡眠胜? 做連接 ; 最後再將置換好第一區段與第二、三、四、五區段之抗壓力及幫助睡眠胜? 做完整的連接 ; 完成後接著選殖進入 *Y. lipolytica* 酵母菌胞外分泌的表現載體 pYLSC1 ; 最後將已置換好第一二三四五區段之抗壓力及幫助睡眠胜? 於 pYLSC1 內轉形插入至 *Y. lipolytica* 酵母菌染色體 , 完成富含抗壓力及幫助睡眠機能性胜? 之基因選殖。得到含有目標基因之酵母菌選殖株 (*Y-YLG-SC*) 並用分光光度計測定其生長曲線 , 得到最適生長時間為 16 小時 ; 將 *Y-YLG-SC* 基因表現後得到粗酵素 (crude YLG-TyrOH) , 藉由人類酪胺酸羥基酵素自身之活性 , 運用高效能液相層析儀 (HPLC) 分析產物量反推酵素最大分泌量 , 測得誘導基因表現之酵素最大分泌量的時間為 36 小時 , 將 *Y-YLG-SC* 基因表現後得到粗酵素並使用 100 mM CLARK & LUBS buffer pH 9.5 進行透析 , 並使用 Ni-NTA column 純化表現產物 , 且獲得富含抗壓力及幫助睡眠胜? 之純蛋白 (YLG-TyrOH)。隨後進行分子量預測分析可知 TyrOH 是為 54.6 kDa , 而在基因選殖階段是置換機能性胜? 進入酵素中 , 故 YLG-TyrOH 是約 54.6 kDa , 而 *Y. lipolytica* 酵母菌的轉譯後修飾導致目標蛋白醴基化會使其分子量增加約 10 kDa (Madzak et al., 2004) 9 , 故將 YLG-TyrOH 進行 SDS-PAGE 分析分子量 , 結果約為 65 kDa。經由 SDS-PAGE 分析分子量後 , 由一公升酵母菌培養液測得純化產物定量約為 1,025 μg , 其單位活性 (U) 為 $7.916 \times 10^{-2} \mu\text{mol} / \text{min}$, 接著將單位活性 (U) 除以蛋白質濃度 (mg / ml) 即可得其比活性 (specific activity) 為 3.861 U / mg。未來我們會回收 YLG - HTH 蛋白? , 經由 trypsin 水解切割並釋出抗壓力及幫助睡眠胜? , 將其水解液利用 LC-MS-MS 分析 , 確認 YLG-HTH 的蛋白? 水解液中含有 YLGYLEQLLR 抗壓力及幫助睡眠胜? , 而後將用 500 L 發酵槽生產抗壓力及幫助睡眠胜? , 再將此抗壓力及幫助睡眠胜? 進行動物試驗及人體試驗 , 希望可以幫助人類減輕壓力並提昇睡眠之品質 , 而後也將積極通過政府標章認證之健康食品。

關鍵詞 : 抗壓力及幫助睡眠機能性胜? , 人類酪胺酸?基酵素 , *Yarrowia lipolytica* 酵母菌 , 比活性 , protein carrier

目錄

目錄 封面內頁 簽名頁 中文摘要.....	iii	英文摘要.....	vi
謝.....	viii	目錄.....	ix
圖目錄.....	xiii	表目錄.....	xvii
1. 前言.....	1	1.1 壓力、失眠與記憶力.....	1
1.2 抗壓力及幫助睡眠胜?.....	2	1.3 <i>Y. lipolytica</i> 胞外分泌系統.....	3
1.4 人類酪胺酸?基酵素.....	4	2. 研究動機.....	6
3. 材料與方法.....	8	3.1 材料.....	8
3.1.1 菌種與質體.....	8	3.1.2 藥品.....	8
3.1.3 酵素.....	8	3.2 實驗設計.....	9
3.2.1 引子設計.....	9	3.2.1.1 共同引子設計之注意事項.....	9
3.2.1.2 自設引子設計之注意事項.....	10	3.2.2 實驗流程設計.....	10
3.3 實驗方法.....	11	3.3.1 快速質體抽取套組.....	11
3.3.2 瓊脂凝膠電泳.....	11	3.3.3 聚合?鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction).....	12
3.3.4 重疊式聚合?鏈鎖反應 (Overlap polymerase chain reaction).....	13	3.3.5 DNA片段的回收及純化.....	14
3.3.6 限制酵素剪切.....	15	3.3.7 DNA黏接作用.....	15
3.3.8 <i>E.coli</i> 勝任細胞 (competent cell) 的製備.....	16		

3.3.9 E.coli的轉型作用.....	16	3.3.10 篩選式聚合?鏈鎖反應.....	17	3.3.11 DNA定序.....	17	
3.3.12 菌種保存.....	18	3.3.13 Y. lipolytica的轉型作用.....	18	3.3.14 Y. lipolytica的生長曲線.....	19	
3.3.15 Y. lipolytica的誘導曲線.....	20	3.3.16 蛋白質透析.....	21	3.3.17 蛋白質純化.....	21	
3.3.18 聚丙烯?胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 分析.....	22	4. 結果	24	4.1 找尋HTH中可置換抗壓力及幫助睡眠胜?之五大區段	24	
4.1.1 五大區段之序列置換位置分析.....	24	4.1.2 不同種別之酪胺酸?基醇素胺基酸序列比對.....	25	4.2 基因選殖.....	25	
4.2.1 將抗憂鬱及幫助睡眠胜?序列置換至HTH之第一區段(YLG1)	26	4.2.2 將抗憂鬱及幫助睡眠胜?序列置換至HTH之第二區段(YLG2).....	26	4.2.3 將抗憂鬱及幫助睡眠胜?序列置換至HTH之第三四區段(YLG34).....	27	
4.2.4 將抗憂鬱及幫助睡眠胜?序列置換至HTH之第五區段(YLG5).....	27	4.2.5 接合抗憂鬱及幫助睡眠胜?序列第三四區段及第五區段(YLG 34-5).....	28	4.2.6 接合抗憂鬱及幫助睡眠胜?第二區段及三、四、五區段(YLG 2-345)	28	
4.2.7 接合抗憂鬱及幫助睡眠胜?第一區段及第二、三、四、五區段(YLG 1-2345).....	29	4.2.8 選殖抗憂鬱及幫助睡眠胜?YLG1-5於pYLSC1 表現載體(YLG-SC).....	29	4.2.9 轉型抗憂鬱及幫助睡眠胜? YLG-SC 於 Yarrowia lipolytic 中(Y-YLG-SC).....	30	
4.3 基因表現.....	30	4.3.1 Y. lipolytica之生長曲線.....	30	4.3.2 Y. lipolytica之誘導曲線.....	31	
4.3.3 SDS-PAGE 之蛋白質分子量預測.....	31	4.3.4 表現、分泌、純化回收之蛋白量.....	32	5. 結論.....	33	
5.1 抗壓力及幫助睡眠機能性胜? YLGYLEQLLR 利於人體內消化系統之蛋白?切割後被吸收之可行性.....	33	5.2 富含抗壓力及幫助睡眠胜?之蛋白質開發.....	33	5.3 未來工作.....	34	
參考文獻.....	87	圖目錄	圖 1. 將三種胺基酸序列執行比對之結果.....	35	圖 2. 抗壓力及幫助睡眠胜?可置換之五大區段示意圖.....	36
圖 3. 可置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH中之核?酸五大區段示意圖.....	37	圖 4. 更換表現載體之示意圖.....	38	圖 5. 置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第一區段，經重疊式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	39	
圖 6. 置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第一區段，經篩選式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	40	圖 7. 將置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第一區段之陽性菌抽出質體後，進行限制?切割之膠體電泳.....	41	圖 8. 置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第一區段之比對.....	42	
圖 9. 置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第二區段，經重疊式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	43	圖 10. 置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第二區段，經篩選式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	44	圖 11. 將置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第二區段之陽性菌抽出質體後，進行限制?切割之膠體電泳.....	45	
圖 12. 置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第二區段之比對.....	46	圖 13. 置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第三、四區段，經重疊式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	47	圖 14. 置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第三、四區段，經篩選式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	48	
圖 15. 將置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第三、四區段之陽性菌抽出質體後，進行限制?切割之膠體電泳.....	49	圖 16. 置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第三、四區段之比對.....	50	圖 17. 置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第五區段，經重疊式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	51	
圖 18. 置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第五區段，經篩選式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	52	圖 19. 將置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第五區段之陽性菌抽出質體後，進行限制?切割之膠體電泳.....	53	圖 20. 置換抗壓力及幫助睡眠胜?於HTH第五區段之比對.....	54	
圖 21. 接合抗壓力及幫助睡眠胜?第三四區段及第五區段於HTH中，經重疊式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	55	圖 22. 接合抗壓力及幫助睡眠胜?第三四區段及第五區段於HTH中，經篩選式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	56	圖 23. 將接合抗壓力及幫助睡眠胜?第三四區段及第五區段於HTH中之陽性菌抽出質體後，進行限制?切割之膠體電泳	57	
圖 24. 接合抗壓力及幫助睡眠胜?第三四區段及第五區段於HTH中之比對.....	58	圖 25. 接合抗壓力及幫助睡眠胜?第二區段及第三四五區段於HTH中，經重疊式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	59	圖 26. 接合抗壓力及幫助睡眠胜?第二區段及第三四五區段於HTH中，經篩選式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	60	
圖 27. 將接合抗壓力及幫助睡眠胜?第二區段及第三四五區段於HTH中之陽性菌抽出質體後，進行限制?切割之膠體電泳.....	61	圖 28. 接合抗壓力及幫助睡眠胜?第二區段及第三四五區段於HTH中之比對.....	62	圖 29. 接合抗壓力及幫助睡眠胜?第一區段及第二三四五區段於HTH中，經重疊式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	63	
圖 30. 接合抗壓力及幫助睡眠胜?第一區段及第二三四五區段於HTH中，經篩選式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	64	圖 31. 將接合抗壓力及幫助睡眠胜?第一區段及第二三四五區段於HTH中之陽性菌抽出質體後，進行限制?切割之膠體電泳.....	65	圖 32. 接合抗壓力及幫助睡眠胜?第一區段及第二三四五區段於HTH中之比對.....	66	
圖 33. 接合抗壓力及幫助睡眠胜?第一區段及第二三四五區段於HTH中，利用比對軟體將DNA序列轉胺基酸之比對.....	67	圖 34. 經聚合?鏈鎖反應後由試劑套組將目標片段純化後之膠體電泳(將6x His及Kpn I切位補足).....	68	圖 35. 目標基因更換表現載體後，經篩選式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	69	
圖 36. 目標基因更換表現載體之陽性菌抽出質體後，進行限制?切割之膠體電泳.....	70	圖 37. 目標基因更換表現載體，經基因選殖後之比對.....	71	圖 38. 目標基因更換表現載體，經基因選殖後之定序結果，利用比對軟體將DNA序列轉胺基酸之比對.....	72	
圖 39. 目標基因更換表現載體，經基因選殖後抽取質體並經限制酵素(Hpa I) 切割之膠體電泳.....	73	圖 40. 目標基因更換表現載體，經篩選式聚合?鏈鎖反應之膠體電泳.....	74	圖 41. Y. lipolytica之生長曲線.....	75	
圖 42. 使用高效液相層析儀分析 24 mM tyrosine 20 μl 標準品之滯留時間.....	76	圖 43. 使用高效液相層析儀分析 24 mM L-DOPA 20 μl 標準品之滯留時間.....	77	圖 44. 使用高效液相層析儀分析不同時間取樣之粗酵素催化受質合成產物之滯留時間.....	77	

間.....	78	圖 45. 富含抗壓力及幫助睡眠蛋白質 (YLG-TyrOH) 之誘導分泌量曲線圖.....	79
46. 目標基因表現經 Ni-NTA column 純化於聚丙烯酰胺凝膠電泳後之結果.....	80	圖 47. 利用 Bio-Rad assay 製出 BSA 標準曲線定量蛋白質...81	
圖 48. 載體 PQE30 之圖譜.....	82	圖 49. 載體 pYLSC1 之圖譜.....	83
表目錄		表 1. 菌種與質體.....	84
		表 2. <i>Yarrowia lipolytica</i> 胺基酸編碼使用頻率.....	85
		表 3. primer design.....	86

參考文獻