

Development and bioproduction of protein carrier containing the functional peptide for anti-stress a

簡雋杰、簡宏堅

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

ABSTRACT

Anti-stress and help sleep peptide Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg(YLGYLEQLLR; YLG) hydrolyzed from casein in milk had proved by the animal experiments and human trials to reduce the production of stress hormones and improve sleep quality (de Saint Hilaire et al., 2009)3. In order to establish YLGYLEQLLR peptide production of high-yield and high quantity, the experiment was performed by using human tyrosine hydroxylase (HTH) carrying the 9 copies of functional peptides in the 5 surface domains of this enzyme without affecting its activity (Goodwill et al., 1998)5. Each functional peptide with the N-terminal of Lys or Arg and C-terminal of its Arg was designed to facilitate future use of trypsin cutting in the digestion tract to release peptides. The gene completion of the replacement in five surface domains containing anti-stress and help sleep peptide was cloned into the yeast expression vector pYLSC1 with the extracellular secretion and then transformed and integrated into *Yarrowia lipolytica* chromosome, so we must use the codon usage of *Y. lipolytica* to yield the highest peptide production finally. In this study, nine copies of peptide were designed in each protein carriers. Each surface domains carried two copies of peptide, except domains 3 and 4 contained 3 copies. Therefore, HTH totally carried 9 copies of functional peptides in the 5 surface domains without affecting its enzymatic activity. After completion of the replacement of each domains, the neighboring domains were connected. The completion of construct is followed by cloning into the *Y. lipolytica* yeast expression vector pYLSC1 with extracellular secretion, and then finally integrated into *Y. lipolytica* chromosome. The optimal growth of the yeast strain *Y. lipolytica* carrying 9 copies of functional peptide was characterized as 16 hours in the growth curve with a spectrophotometer. The optimal secretion time of the peptide-carried protein was measured to be at 36 hour stimulation in the induction medium run out glucose content by HPLC. The peptide-carried protein was purified using Ni-NTA column to get rich in anti-stress and help sleep. Subsequent molecular analysis shows that the purified protein is about 65 kDa measured by SDS-PAGE analysis, because the post-translational modification in *Y. lipolytica* led to the glycosylation of target protein, and the molecular weight of target protein increased in 10 kDa (Madzak et al., 2004)9. The quantity of purified protein is 1,025 μ g from one liter of yeast culture. The unit activity and the specific activity of purified protein was measured as 7.916×10^{-2} μ mole / min and 3.861 U / mg, respectively. The amino acid sequence of YLGYLEQLLR from the purified protein hydrolysed by trypsin will be analyzed by LC-MS-MS. Finally, the functional analysis of peptide-carried protein was performed in animal experiment and human trials. We hope that the peptide reduce stress and improve the quality of sleep, and then will be active through Government ' s healthy food certification mark.

Keywords : anti-stress and help sleep peptide, human tyrosine hydroxylase, *Yarrowia lipolytica*, specific activity, protein carrier

Table of Contents

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.....	xiii
1. 前言.....	xvii	1.1 壓力、失眠與記憶力.....	1
1.2 抗壓力及幫助睡眠.....	2	1.3 Y. lipolytica 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 E.coli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醇素催化受質合成產物之滯留時間.....	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
圖 46. 目標基因表現經Ni-NTA column純化於聚丙烯?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. Yarrowia lipolytica胺基酸編碼使用頻	

率.....85 表 3. primer design.....86

REFERENCES