

# 富含抗骨質疏鬆磷酸化胜?蛋白之開發與生產

顏品澄、簡宏堅

E-mail: 364884@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

抗骨質疏鬆磷酸化胜?(CPP)是從牛奶中的乳蛋白發現，乳蛋白裡面含有 s1-casein s2-casein -casein -casein，其中以 -casein有其效果，在小腸內以蛋白?分解 -casein，切出有效的二十五個胺基酸胜?，但一部份乳蛋白會跟磷酸鈣鹽類結合，因分子太大以及磷酸鈣沉澱，使小腸無法吸收乳蛋白跟磷酸鈣結合的大分子。在乳腺裡的酪蛋白激酶?1 (Casein kinase I: CKI) 會將乳蛋白磷酸化，若食用進入小腸則由蛋白?將乳蛋白分解成磷酸化胜?，這時磷酸化的胜?會跟鈣離子結合，才由小腸吸收。所以本實驗室使用酪蛋白激酶?把胜?磷酸化，可以幫助胜?與鈣離子結合，不容易沉澱更容易讓小腸吸收。此酪蛋白磷胜?為RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR 序列其中四個serine胺基酸被磷酸化後，才能與鈣離子 (Ca<sup>2+</sup>) 結合而成為可溶狀態以促進吸收。為了建立CPP胜?高產量及高濃度的量產方式，本實驗室利用人類酪胺酸?基酵素 (Human tyrosine tyrosylase: HTH) 來做為攜帶酪蛋白磷胜?，且尋找在HTH中不影響其活性中心之五大區段將其更換為酪蛋白磷胜?，並在胜?-之N端、C端設計Phe以利於將來使用胃蛋白?切割，將酪蛋白磷胜?水解釋放出來。首先我們進行胜?引子設計與構築，利用overlap-PCR的技術，將五個外圍區段一一地置換為酪蛋白磷胜?，並插入 pQE30載體中，再利用Overlap-PCR的技術，將五個區段的酪蛋白磷胜?整合起來，並插入pQE30表現載體中形成完整五個區段CPP-HTH 後，將其選殖入pYLSC1-5s的酵母菌表現載體中，之後將CPP-HTH轉殖插入酵母菌Y. lipolytica的5s-RNA的基因中稱為Y-CPP，另一方面我們將CKI的基因選殖入胞內分泌pYLEX1的酵母菌表現載體中，並將表現CKI 基因轉殖入前面之Y-CPP酵母菌中，稱為Y-CPP-CKI，再大量複製表現。完成CPP基因選殖得到含有目標基因之酵母菌選殖株 (Y-CPP)和(Y-CPP-CKI)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；之後將Y-CPP培養於誘導培養液中，將 Y-CPP 基因表現後得到粗酵素，藉由酵素酪胺酸羥基?自身之活性，運用高效能液相層析儀(HPLC) 分析產物酵素最大分泌量，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-CPP 基因表現後得到粗酵素並使用玉米澱粉吸附回收CPP-HTH。隨後進行分子量預測分析，理論在基因選殖階段是置換機能性胜?進入酵素中，CPP-HTH應該約54.6 kDa，而Y. lipolytica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，故將 CPP-HTH進行SDS-PAGE分析此片段之分子量，結果約64.6 kDa，但如果把胞外表現CPP和胞內表現CKI整合再一起，CPP-HTH分子量會略高64.6 kDa，如果再加入CaCl<sub>2</sub>給於吸附，所測定的分子量會再更高。

關鍵詞：抗骨質疏鬆磷酸化胜?蛋白

## 目錄

目錄 封面內頁 簽名頁 中文摘要.....	iii	英文摘要.....	v	誌謝.....	vii	目錄.....	viii	圖目	
錄.....	xiv	表目錄.....	xix	1. 前言.....	1	1.1 胜?.....	1	1.1.1 生物活性?的來源及應用.....	1
1.1.2 生物活性胜?(bioactive peptide)的生產.....	2	1.2 Y. lipolytica胞外分泌系統.....	2	1.3 人類酪胺酸?基酵素.....	4	2. 研究動			
機.....	5	3. 材料與方法.....	7	3.1 材料.....	7	3.1.1 菌種及質體.....	7	3.1.2 藥品.....	7
3.1.3 酵素.....	7	3.2 實驗設計流程.....	8	3.2.1 引子設計( primer design ).....	8	3.2.1.1 共同引子設計之注意事			
項.....	8	3.2.1.2 自設引子設計之注意事項.....	9	3.2.2 實驗流程設計.....	9	3.3 實驗方法.....	10		
3.3.1 小量質體DNA製備.....	10	3.3.2 快速質體DNA抽取套組.....	11	3.3.3 瓊脂凝膠電泳(agarose gel		lectrophoresis)....	12	3.3.4 聚合?鏈鎖反應(Polymerase chain reaction PCR)....	12
3.3.5 重疊式聚合?鏈鎖反應(overlap polymerase		chain reaction)....	14	3.3.6 DNA片段的回收及純化.....	15	3.3.7 限制酵素剪切.....	16	3.3.8 DNA黏接作用.....	16
3.3.9 E.coli勝		任細胞的製備.....	16	3.3.10 轉入到大腸桿菌的 NovaBlue.....	17	3.3.11 採用聚合?鏈反應篩選出正確的基因.....	17	3.3.12	
DNA 基因定序.....	18	3.3.13 多組基因插入酵母菌染色體.....	19	3.3.14 構築能插入5S-RNA基因又胞外分泌		的pYLSC1-5s表現載體.....	19	3.3.15 將82組Gentomycin基因置換成胜?蛋白基因.....	20
3.3.16 將CKI選殖入胞內分泌		的pYLEX1表現載.....	21	3.3.17 將CKI插入82組CPP-HTH基因的酵母菌Y. lipolytica.....	21	3.3.18 轉入到酵母菌中的方			
法.....	21	3.3.19 基因表現.....	22	3.3.20 蛋白透析.....	22	3.3.21 玉米澱粉沉澱回收.....	23		
3.3.22 聚丙烯醯胺凝膠電泳分析.....	23	4. 結果.....	25	4.1 尋找CPP胜?置換區段.....	25	4.1.1 五大區			
段之序列置換位分析.....	25	4.2 基因選殖.....	26	4.2.1 單套抗骨質疏鬆胜?序列置換到第一區段HTH (CPP		1).....	26	4.2.2 單套抗骨質疏鬆胜?序列置換到第二區段HTH (CPP 2).....	27
4.2.3 單套抗骨質疏鬆胜?序列置換到第三、四區		段HTH (CPP 34)....	27	4.2.4 單套抗骨質疏鬆胜?序列置換到第五區段HTH (CPP 5).....	28	4.2.5 連結抗骨質疏鬆胜?序列第一、			
二區段(CPP1-2).....	28	4.2.6 連結抗骨質疏鬆胜?序列第三、四、五區段(CPP 34-5).....	29	4.2.7 連結抗骨質疏鬆胜?第一、二區段					

及三、四、五區段(CPP 12-345)...	29
4.2.8 選殖抗骨質疏鬆勝?CPP1-5於pYLSC1-5s表現載體(CPP-SC)...	30
4.2.9 轉型抗骨質疏鬆勝?CPP-SC於Y. lipolytica此酵母菌命名為(Y-CPP)...	30
4.2.10 將一組CKI插入82組CPP-HTH基因的酵母菌Y-CPP得到此酵母菌為Y-CPP-CKI...	30
4.3 基因表現.....	31
4.3.1 Y. lipolytica之生長曲線.....	31
4.3.2 SDS-PAGE之蛋白質分子量預測.....	31
5. 結論.....	33
5.1 酪蛋白磷酸化勝?之蛋白質開發.....	33
5.2 未來工作.....	33
參考文獻.....	100
圖目錄	圖1.
實驗流程設計.....	35
圖2. 5s轉殖PQE30示意圖.....	36
圖3. 5s經基因選殖後委託生技公司定序之比對....	37
圖4. Gentomycin 抗藥基因轉殖入5s-PQE30 之示意圖....	38
圖5. Gentomycin 抗藥基因轉殖入5s-PQE30委託生技公司定序之比對.....	39
圖6. Gentomycin resistant-5s轉殖酵母菌示意圖....	40
圖7. GF1-5S以1.10.100.1000.10000倍抗生素培養置換到酵母菌中....	41
圖8. Gentomycin resistant-5s酵母菌PCR比對82組基....	42
圖9. CPP-HTH-6H-pYLSC1-5S基因轉殖入GF1-5S置換Gentomycin 抗藥基因的抗藥性比對...43	43
圖10. 5s-L和5s-R轉殖pYLSC1之示意圖....	44
圖11. 5s-L 轉殖pYLSC1委託生技公司定序之比對....	45
圖12. 5s-R轉殖pYLSC1委託生技公司定序之比對....	46
圖13. CPP-HTH-6H轉殖pYLSC1-5S委託生技公司定序之比對.....	47
圖14. CPP-HTH-6H轉殖pYLSC1-5S胺基酸比對...48	48
圖15. CKI轉殖pYLEX1示意圖.....	49
圖16. CKI轉殖pYLEX1委託生技公司定序之比對.....	50
圖17. CKI轉殖酵母菌示意圖.....	51
圖18. CPP勝?可置換之五大區段示意圖.....	52
圖19. 更換表現載體之示意圖.....	53
圖20. E. coli系統之pQE30表現載體.....	54
圖21. 第一區段 頭段與尾段DNA回收於瓊脂凝膠電泳....	55
圖22. 第一區段經overlapping PCR於瓊脂凝膠電泳.....	56
圖23. 第一區段經篩查聚合?鏈反應於瓊脂凝膠電泳.....	57
圖24. 第一區段經基因選殖後委託生技公司定序之比對.....	58
圖25. 第二區段頭段與尾段DNA回收於瓊脂凝膠電泳.....	59
圖26. 第二區段經overlapping PCR於瓊脂凝膠電泳.....	60
圖27. 第二區段經篩查聚合?鏈反應於瓊脂凝膠電泳.....	61
圖28. 第二區段陽性菌抽出質體後進行限制?切割於瓊脂凝膠電泳.....	62
圖29. 第二區段經基因選殖後委託生技公司定序之比對.....	63
圖30. 第三、四區段頭段與尾段DNA回收於瓊脂凝膠電泳.....	64
圖31. 第三、四區段經overlapping PCR於瓊脂凝膠電泳.....	65
圖32. 第三、四區段經篩查聚合?鏈反應於瓊脂凝膠電泳.....	66
圖33. 第三、四區段陽性菌抽出質體後進行限制?切割於瓊脂凝膠電泳.....	67
圖34. 第三、四區段經基因選殖後委託生技公司定序之比對.....	68
圖35. 第五區段頭段與尾段DNA回收於瓊脂凝膠電泳.....	69
圖36. 第五區段經overlapping PCR於瓊脂凝膠電泳.....	70
圖37. 第五區段經篩查聚合?鏈反應於瓊脂凝膠電泳.....	71
圖38. 第五區段經基因選殖後委託生技公司定序之比對.....	72
圖39. 第一和第二區段連接之頭段及尾段DNA片段回收於瓊脂凝膠電泳.....	73
圖40. 第一和第二區段連接經overlapping PCR於瓊脂凝膠電泳.....	74
圖41. 第一和第二區段連接經篩查聚合?鏈反應於瓊脂凝膠電泳.....	75
圖42. 第一和第二區段連接經基因選殖後委託生技公司定序之比對.....	76
圖43. 第三四和第五區段連接之頭段及尾段DNA片段回收於瓊脂凝膠電泳.....	77
圖44. 第三四和第五區段連接經overlapping PCR於瓊脂凝膠電泳.....	78
圖45. 第三四和第五區段連接經篩查聚合?鏈反應於瓊脂凝膠電泳.....	79
圖46. 第三四和第五區段連接經基因選殖後委託生技公司定序之比對.....	80
圖47. 第一二和第三四五區段連接之頭段及尾段DNA片段回收於瓊脂凝膠電泳.....	81
圖48. 第一二和第三四五區段連接經overlapping PCR於瓊脂凝膠電泳.....	82
圖49. 第一二和第三四五區段連接經篩查聚合?鏈反應於瓊脂凝膠電泳.....	83
圖50. 第一二和第三四五區段經基因選殖後委託生技公司定序之比對.....	84
圖51. pO1g、Y-CPP、Y-CPP-CKI生長曲線.....	85
圖52. SDS之CPP、CKI+CPP、CKI+CPP+CaCl <sub>2</sub> 之子量比較.....	86
表目錄	表1. 本研究所用之primers.....
	87
	表2. 菌種與菌體.....
	89
	表3. 本實驗所使用之藥劑方.....
	91
附錄	附錄1. Yarrowia lipolytica胺基酸編碼使用頻率.....
	98

## 參考文獻

- Choi, H.-I., Kim, H.-J., Park, J.-I., Shin, E.-H., Kim, D.-W. and Kim, S.-S. Design and efficient synthesis of novel ascorbyl conjugated peptide with high collagen biosynthesis stimulating effects. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19(7):2079 – 2082.
- Claudia Gravaghi<sup>1</sup>, Elena Del Favero<sup>1</sup>, Laura Cantu<sup>1</sup>, Elena Donetti<sup>2</sup>, Marzia Bedoni<sup>2</sup>, Amelia Fiorilli<sup>1</sup>, Guido Tettamanti<sup>1</sup>, Anita Ferraretto<sup>1</sup>. Casein phosphopeptide promotion of calcium uptake in HT-29 cells - relationship between biological activity and supramolecular structure, Article first published online: 29 AUG 2007 DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06015.x
- Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol*, 2004, 109(1-2):63-81
- Meisel, H.1,\* and FitzGerald, R. J2. Biofunctional Peptides from Milk Proteins: Mineral Binding and Cytomodulatory Effects, *Current Pharmaceutical Design*, 2003, 9, 1289-1295
- Sambrook J, and Russell D.W. *Molecular cloning : a laboratory manual*, third edition. Cold spring harbor laboratory press, 2001 . New York.
- Goodwill KE, Sabatier C, Stevens RC. Crystal Structure of Tyrosine Hydroxylase with Bound Cofactor Analogue and Iron at 2.3 Å Resolution: Self-Hydroxylation of Phe300 and the Terin-Binding Site. *Biochemistry*, 1998, 37(39):13437-13445.
- Kenneth E. Goodwill, Christelle Sabatier, and Raymond C. Stevens. Crystal Structure of Tyrosine Hydroxylase with Bound Cofactor Analogue and Iron at 2.3 Å Resolution: Self-Hydroxylation of Phe300 and the Pterin-Binding Site. *Biochemistry*. 1998, 37(39):13437-13445.
- Manley CH, and Ahmedi S. The development of process flavors. *Trends Food Sci Technol.* 1995, 6(2):46-51.
- Katayama, K., Armendariz-Borunda, J., Raghov, R., Kang, A.H. and Seyer, J.M. A pentapeptide from type I procollagen promotes extracellular matrix production. *J. Biol. Chem.* 1993, 268(14):9941 – 9944 .
- Katayama, K., Seyer, J.M., Raghov, R. and Kang, A.H. Regulation of extracellular matrix production by chemically synthesized subfragments of type I collagen carboxy propeptide. *Biochemistry*. 1991, 30(29):7097 – 7104 .
- Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., and Sugino Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic acid research*. 1990, 18:61-69.