私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

指導教授：顧野松　博士

Advisor：Yesong Gu,Ph.D

構建重組 DNA 以製備抗菌胜肽

Construction of Recombinant DNA for Antibacterial Peptides Production

研究生：呂學昱 撰

Graduate Student：Hsueh-Yu Lu

中華民國一○七年七月

July , 2018

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

指導教授：顧野松　博士

Advisor：Yesong Gu,Ph.D

構建重組 DNA 以製備抗菌胜肽

Construction of Recombinant DNA for Antibacterial Peptides Production

研究生：呂學昱 撰

Graduate Student：Hsueh-Yu Lu

中華民國一○七年七月

July , 2018

碩士學位論文口試委員會審定書

化學工程與材料工程研究所 呂學昱 君所提供之論文

構建重組 DNA 以製備抗菌胜肽

經本委員會審定通過，特此證明。

論文口試委員會

委　　員：

指導教授：

中華民國 107年 7 月 23日

摘要

抗菌胜肽(Antibacterial peptides)，也可稱為抗微生物肽，大約是由10~50 個不等的胺基酸所組成，是生物體自我防禦外在感染物的系統產物之一。大部分的抗菌胜肽都是帶正電性且分子量極小，不同的抗菌胜肽具有有效抑制革蘭氏陰性菌、革蘭氏陽性菌、真菌等效果。

本實驗係利用基因重組的方式來生產抗菌胜肽，將具有抗菌功能的基因片段 MAP-04-04 選殖到 pET-28a 載體 DNA 上構建成質體並且命名為 pET28a-0404。再將此質體送入大腸桿菌 *E. coli* 中來進行蛋白質表達，但經 IPTG(異丙基-β-D-硫代半乳糖苷)誘導後透過 SDS PAGE 電泳觀察無目標蛋白產生，考慮可能是目標蛋白分子量太小，在表達過程中可能有降解的情形，或是形成包涵體的可能性。

因此考慮添加融合蛋白標籤的方法，來提高像胜肽這種小分子蛋白表達的成功率以及增加可溶性蛋白的產生，我們將抗菌基因選殖到含有 SUMO(小泛素修飾蛋白)融合蛋白標籤的載體上，並命名為 pETite–SUMO-0404。而新質體中的 SUMO 蛋白與抗菌胜肽的結合處，設計有 Ulp1 這個蛋白酶切割點，此蛋白酶只識別 SUMO 的三級結構，切割的特異性非常高，不存在任何胺基酸的殘留以便抗菌胜肽的活性正常釋放出來。

關鍵字：抗菌胜肽、基因重組、融合蛋白、SUMO

Abstract

Antibacterial peptides, also known as antimicrobial peptides, consist of approximate 10 to 50 amino acids, and are defense systems for organisms to defend against external infections. Most of the antibacterial peptides are positively charged and have very small molecular weights. Different antibacterial peptides can effectively inhibit Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria, and fungi.

In this experiment,one antibacterial peptide was produced by genetic recombination, and the gene fragment MAP-04-04 with antibacterial function was cloned into the pET-28a vector DNA to construct a plasmid and named pET28a-0404. The plasmid was then sent to E. coli for protein expression.However with IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) induction, no target protein production was detected by SDS PAGE.There were seueral possibilities,such as,the molecular weight of the target protein is too small,may be expressed protein was degraded during expressin,or forming inclusion bodies.

Therefore,it was considereal by adding a fusion protein tag to improve the success rate of small protein molecule expression cloned,like peptide, and to increase the production of soluble protein.We have cloned the antibacterial gene into a fusion tag containing SUMO (small ubiquitin-modified protein) fusion protein. On the plasmid was named pETite–SUMO-0404. The combination of SUMO protein and antibacterial peptide in the new plasmid is designed with the protease cleavage site Ulp1. This protease only recognizes the tertiary structure of SUMO. The specificity of cleavage is very high, and there is no residue of any amino acid for antibacterial. The activity of the peptide is normally released.

Keywords：antibacterial peptide、genetic recombination、fusion protein、SUMO

致謝

快要到了畢業的時間，回想到剛進實驗室的時候，對生物化學領域的技術跟知識完全一竅不通，對於顧野松教授所提出的抗菌胜肽的製備及開發更是從來沒有接觸過。可是經過這兩年時間的淬煉，現在自己可是以這領域的技術及知識來撰寫論文。

首先，要先感謝顧野松教授的熱情指導，在我剛踏入實驗室的時候不斷地加強生物化學相關的知識，讓我對於實驗相關技術有了基礎的概念。顧野松教授也提供了實驗室非常多的資源，讓我們對於實驗方法可以去做非常多的嘗試，在實驗時遇到瓶頸時，教授也會提供一些新想法讓我們有了不同的思路去面對實驗上的困境。

再來要感謝的是彭心儀博士、陳秋遐學姊及賴逸宸學弟，因為他們在與我論文題目相關的實驗技巧上比我更加地熟悉，所以有時候在實驗技巧有疑慮及不熟悉的地方都會請教他們，而他們也會給予我熱心的教導。還有一起努力奮鬥過來的實驗室同仁李建信、莊麒彥，在這碩士班的兩年時間碰到實驗瓶頸或是低潮的時候不斷地互相加油打氣，讓我們三個人的論文都能夠如期撰寫完成。最後還有實驗室後進們—陳日賢、楊家昌、鄒孟妘以及畢翔，在剛進實驗室的時候協助幫忙處理學長們一些瑣碎的事情，謝謝你們。

最後，感謝東海大學化學工程及材料工程研究所提供我們這些學生們那麼優良的教學環境及品質。畢業後我將以東海化材系為榮，謝謝你們，謝謝大家！

呂學昱　謹致　東海大學化學工程與材料工程研究所

中華民國一〇七年七月

目錄

第一章 緒論 1

1.1 前言 1

1.2 文獻回顧 2

1.2.1 大腸桿菌表達抗菌胜肽之優勢 2

1.2.2 抗菌胜肽之分類 3

1.2.3 抗菌胜肽的作用機制 4

1.2.4 抗菌胜肽的應用 7

1.2.4.1 抗菌胜肽的生物學功能 7

1.2.4.1.1 抗真菌功能 7

1.2.4.1.2 抗寄生蟲和原蟲功能 8

1.2.4.1.3 抗病毒功能 8

1.2.4.1.4 抗腫瘤功能 9

1.2.4.1.5 免疫調節功能 9

1.2.4.2 抗菌胜肽在養殖業中的應用 9

1.2.4.2.1 畜產養殖業 9

1.2-4-2-2 禽類養殖業 10

1.2-4-2-3 畜牧養殖業 10

1.2-4-2-4 水產養殖業 11
1.3 研究動機與目的 11
第二章 實驗材料與儀器 13
2.1 實驗材料 13
2.2 實驗儀器 16
第三章 實驗方法 20
3.1 大腸桿菌勝任細胞 C43(DE3)的製備 20
3.2 小量 DNA 質體萃取 22
3.3 DNA 片段來源 24
3.3.1 胜肽來源 24
3.3.2 片段合成 25
3.4 限制酵素反應 27
3.5 水平式凝膠電泳法 28
3.6 連接反應 29
3.7 大腸桿菌轉形作用 31
3.8 聚合酶連鎖反應 31
3.9 DNA 定序檢測 34

3.10 重組蛋白在大腸桿菌中誘導表達 34

3.11 蛋白質純化及分析 36

3.11.1 大腸桿菌中蛋白質萃取 36

3.11.2 聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE) 38

3.11.3 蛋白質含量檢測 42

3.12 蛋白質層析儀（FPLC） 43

3.12.1 金屬親合性管柱層析 44

3.12.2 脫鹽管柱層析 46

3.13 蛋白酶切割作用 47

第四章 結果與討論 49

4.1 pET28a-0404 質體 DNA 構建 49

4.1.1 目標片段 DNA 製備 49

4.1.2 限制性內切酶反應 51

4.1.3 pET-28a(+)載體萃取 52

4.2 基因轉殖 53

4.3 pET28a-0404 質體 PCR 產物確認 53

4.4 定序結果 55

4.5 C43(DE3)誘導表現 57

4.6 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析 pET28a-0404..... 57

4.7 Tricine-SDS-PAGE 59

4.8 Tricine-SDS-PAGE 電泳分析 pET28a-0404..... 62

4.9 pETite-SUMO-0404 質體 DNA 構建 65

4.10 pETite-SUMO-04-04 質體 PCR 產物確認 69

4.11 pETite-SUMO-0404 質體定序確認 72

4.12 C43(DE3)誘導表現 74

4.13 Tricine-SDS-PAGE 電泳分析 pETite-SUMO-0404..... 74

4.14 6His-SUMO-0404 蛋白質含量測定 78

4.15 6His-SUMO-0404 蛋白質分子量測定 79

4.16 蛋白酶切割電泳分析..... 80

第五章 結論..... 85

5.1 結論 85

5.2 未來展望..... 86

第六章 參考文獻..... 87

圖目錄

圖 1、具有不同結構的抗菌胜肽 1

圖 2、敘述 α-螺旋抗菌胜肽的抗菌機制 4

圖 3、抗菌胜肽在細胞膜上作用機制 6

圖 4、比較不同菌株轉化效率、表達誘導毒性和異源蛋白質的表達 21

圖 5、大腸桿菌遺傳密碼 25

圖 6、pET28a(+)載體序列 26

圖 7、PCE 溫度設定條件 33

圖 8、誘導劑(IPTG)誘導 pET 體系表達蛋白質之示意圖..... 35

圖 9、SDS 作用於原態蛋白質示意圖 39

圖 10、SDS 蛋白質分離示意圖 40

圖 11、鎳離子與 His tag 結合圖 45

圖 12、DNA 序列圖 49

圖 13、引子自黏產物 51

圖 14、引子限制性內切酶反應產物 52

圖 15、載體內切酶反應產物 53

圖 16、pET28a 序列圖含有 T7 promoter 和 terminator..... 54

圖 17、菌落 PCR 篩選產物 55

圖 18、pET28a-0404 定序..... 56

圖 19、pET28a-0404 誘導曲線圖..... 57

圖 20、C43 原菌與質體有無誘導之 SDS-PAGE 圖..... 58

圖 21、C43 原菌與質體有無誘導之上清液與沉澱相 SDS-PAGE 圖

..... 59

圖 22、Tricine-SDS-PAGE 電泳凝膠圖..... 60

圖 23、pET28a-0404 破菌上清液電泳分析圖..... 63

圖 24、pET28a-0404 包含體溶解液產物電泳分析圖..... 64

圖 25、pET28a-0404 包涵體溶解物沉澱相電泳分析圖..... 65

圖 26、pETite N-His SUMO Kan Vector 簡介..... 66

圖 27、目標 DNA 片段設計示意圖 67

圖 28、無酶連接反應機制示意圖 67

圖 29、目標 DNA 片段序列圖設計 68

圖 30、引子自黏產物 69

圖 31、pETite-SUMO 載體引子序列圖..... 70

圖 32、pETite-SUMO-0404 菌落 PCR 產物..... 71

圖 33、有插入目標片段與未插入目標片段的質體的 PCR 產物.. 72

圖 34、pETite-SUMO-0404 定序..... 73

圖 35、C43 誘導曲線圖..... 74

圖 36、pETite-SUMO-0404 蛋白質表達電泳分析圖 75

圖 37、FPLC 純化產物電泳分析圖 76

圖 38、pETite-SUMO-0404 蛋白質表達及 FPLC 純化電泳分析圖 77

圖 39、蛋白質含量測定之檢量線 78

圖 40、蛋白質分子量質譜圖 79

圖 41、6His-SUMO-0404 蛋白酶裂解反應電泳圖 80

圖 42、蛋白酶活性測試 81

圖 43、6His-SUMO-0404 蛋白酶裂解反應電泳圖 82

圖 44、6His-SUMO-0404 蛋白酶裂解反應電泳圖(硝酸銀染色法)

..... 84

表目錄

表 1、實驗藥品 13

表 2、實驗生化試劑及套組 15

表 3、實驗菌株 16

表 4、實驗儀器 16

表 5、胜肽合成序列 24

表 6、切割識別位點和切割緩衝液之成份 27

表 7、DNA 大小與洋菜膠濃度之配方 28

表 8、5X TBE Buffer 配方、50X TAE Buffer 配方..... 29

表 9、連接反應實驗配方 30

表 10、PCR 反應混合物配方 33

表 11、Lysis 緩衝液成份 37

表 12、SDS-PAGE 膠體配方 41

表 13、SDS-PAGE running buffer 配方表 41

表 14、蛋白質染劑配方 42

表 15、Tricine-SDS-PAGE 凝膠配方 61

表 16、蛋白質產物蛋白質含量測定 78

第一章 緒論

1.1 前言

在所有生物類別都可以找到抗菌胜肽的蹤跡，而抗菌胜肽的殺菌種類是非常廣泛的，並且可望成為新型的治療劑。實驗證明抗菌胜肽能殺死革蘭氏陰性菌和革蘭氏陽性菌、分枝桿菌、具有外套膜的病毒、真菌，甚至是癌細胞等(Swee-Seong Tanga et al, 2018)。不同於許多傳統抗生素使用久了都有抗藥性的問題產生，而抗菌胜肽被認為不較具有抗藥性的問題。

抗菌胜肽主要由具有疏水性胺基酸以及帶正電的胺基酸所組成，且一般有多於百分之五十的疏水性胺基酸殘基(Jayaram Lakshmaiah et al, 2015)。而抗菌胜肽通常以二級結構(secondary structure)來做分類，這些分子的二級結構包括 α-螺旋(α-helical)、β-摺疊(β-sheet)、延伸片段(Extended)以及環狀結構(Loop)。

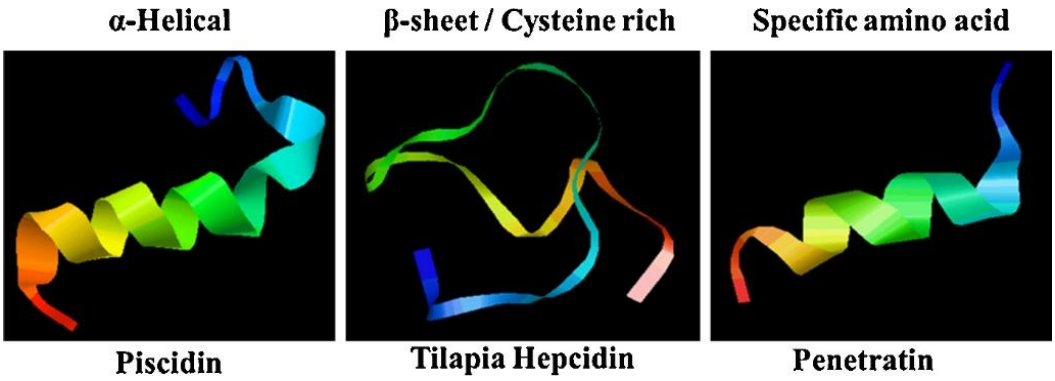

圖 1、具有不同結構的抗菌胜肽。從左至右分別為 α-螺旋; β-摺疊;

富含半胱胺酸和精胺酸的胺基酸(同上，Jayaram Lakshmaiah et al, 2015)。圖中紅色區域為帶負電位置；藍色區域為帶正電位置；綠色區域為疏水性位置；橙色區域為非極性位置；粉紅色區域為極性位置。

抗菌胜肽的殺菌機制包括破壞細菌的細胞膜、干擾細胞代謝功能及抑制蛋白質的生成等。除了殺菌功能之外，抗菌胜肽也具有一些免疫調節功能。且抗菌胜肽殺菌具有廣譜性、專一性，還有殺菌時間短暫等性能。根據一些自然的抗菌胜肽基因序列及其衍生物，現在已開發出一些新型抗感染藥物用以治療各類感染症狀，例如：口腔潰瘍、肺部感染或其他局部的皮膚感染等(Zasloff et al, 2002)。因此抗菌胜肽的開發在未來極具有發展性及創新性。

1.2 文獻回顧

1.2.1 大腸桿菌表達抗菌胜肽之優勢

抗菌胜肽作為代替抗生素的潛在應用價值受到關注，而如何製備大量高純度的抗菌胜肽為開發基礎及臨床實驗中非常重要的關鍵。從自然界中提取的抗菌胜肽其來源有限、純化困難，化學合成抗菌胜肽，雖然可以在短時間就可以製備出目標胜肽，但是難以進行大規模的量產。因此透過基因重組表達系統，可將此系統放大於工廠規模的生產，進而得到大量的抗菌胜肽是成本較低且具有高效益的方法。目前採用

大腸桿菌的表達系統以製備抗菌胜肽已成為研究人員的重要方法之一，通常是以形成融合蛋白的方式表達出所需要的目標胜肽，這不僅可避免抗菌胜肽對宿主細胞產生殺傷作用，也能保護抗菌胜肽免受到蛋白酶降解等問題。

1.2.2 抗菌胜肽之分類

將目前已知抗菌胜肽做簡單的分類可發現這些胜肽多為小分子的蛋白質，分子量約為50 kDa以下；大多數都帶有正電荷，但是其淨正電荷的變異相當的大；胜肽在非極性的溶劑中，它們具有表現兩性結構的傾向，當中同時存在疏水性(hydrophobic)和親水性(hydrophilic)的結構(Andersson et al, 2016)。根據抗菌胜肽二級結構的特徵，可以將其分類成四種類群(Van't Hoff et al, 2001)：

1. 含有一種或是多種胺基酸所構成的直線型胜肽：如proline-rich胜肽、蜂血淋巴中的apidaecin等。
2. α-螺旋形 (α-helical) 結構：如昆蟲的 cecropins、非洲赤蛙皮膚黏膜中發現的 maganins、蜂毒內的 melittin 等。
3. 具有環圈 (looped) 結構：如奶水中lactoferrin分解後的產物lactoferricin等。
4. 具有兩個至四個雙硫鍵相連接的β-sheet結構：含有兩個雙硫鍵，如鱟血球的tachyplesins；含有三個雙硫鍵，如哺乳動物的α-defensins

和β-defensins。

1.2.3 抗菌胜肽的作用機制

解釋大多數抗菌胜肽活性機制為 Shai–Matsuzaki–Huang（SMH）模型（圖 2）。該模型提出胜肽先與細菌的細胞膜產生相互作用，隨後脂質置換進而導致細胞膜的結構改變。以細菌為例，細菌的細胞膜是由磷脂質雙層所構成，表面帶負電荷、具有親水性，所以帶正電荷的抗菌胜肽能夠快速的與細菌的細胞膜做結合，使疏水性的抗菌胜肽能夠嵌入在細胞膜中，導致細胞膜產生了一個孔洞，而這個孔洞的產生對於抗菌胜肽的抗菌機制是非常重要的存在。

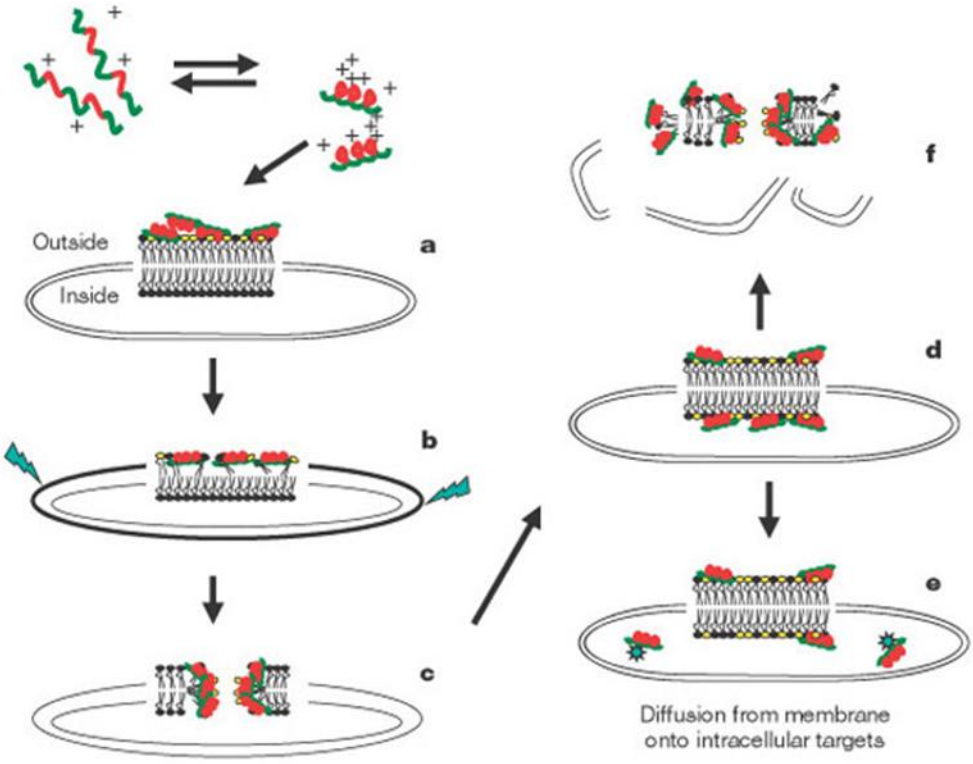

圖 2、敘述 α-螺旋抗菌胜肽的抗菌機制(Zasloff, 2002)。

a：胜肽鋪坦在膜的表面。**b**：胜肽開始進入外膜促使膜變薄，外膜的表面積相對於內膜而膨脹，導致雙層的膜發生變化（鋸齒箭頭）。**c**：細胞膜瞬間形成孔洞。**d**：脂質和胜肽輸送到內膜。**e**：胜肽到細菌裡進行擴散影響其生理機能。**f**：目標細胞膜的物理破壞，使得膜被分裂成片段。

通常透過 SMH 機制操作的胜肽可以殺死微莫耳濃度的微生物。相比之下，以肽乳鏈菌肽為例，透過產生的 14 個胺基酸的兩親性分子—乳球菌，可在奈莫耳濃度下產生抗菌效用，某些植物的防禦作用也是使用類似的方法來進行抗菌機制(同上，Zasloff, 2002)。

另外還有 3 種模型理論可以闡述抗菌胜肽與細胞膜的活性機制(Rashid, 2016)如下列所示：

1. 桶板模型理論

在桶板模型中，由於大多數抗菌胜肽帶有正電荷，可以通過靜電吸引作用聚集在細胞膜表面而形成多聚體，同時將該胜肽聚體的疏水基團垂直嵌入細胞膜的磷脂雙分子層中，由此形成了橫跨細胞膜的離子通道，隨著其他多聚體的不斷嵌入，細胞膜的完整性遭到破壞，使細胞滲透壓變化、胞質洩漏，最終使膜發生崩解，導致細胞死亡。

2. 毯式模型理論

毯式模型理論是由 Pouny 等人在研究抗菌胜肽 dermaseptin 與磷

脂膜的相互作用時提出的。該理論指出，抗菌胜肽以平鋪的方式覆蓋在帶負電的細胞膜表面，依靠靜電作用吸附在陰離子的磷脂頭部基團，當抗菌胜肽濃度累積到一定濃度時導致細胞膜破裂產生微團，形成肽－脂質混合物，破壞脂質雙層的完整性，導致細胞膜迅速解體，造成細胞內容物流失、細胞死亡(Pouny et al, 1992)。

3. 環孔模型理論

不同於桶板模型，環孔模型理論指出抗菌胜肽與膜結合時形成了α-螺旋結構，抗菌胜肽分子垂直插入膜內，使細胞膜的曲面張力發生變化，導致細胞脂質雙分子層內外兩層貫通，誘發內層磷脂分子變向。此時細胞膜結構改變，形成環孔狀通道，從而引發細胞死亡。

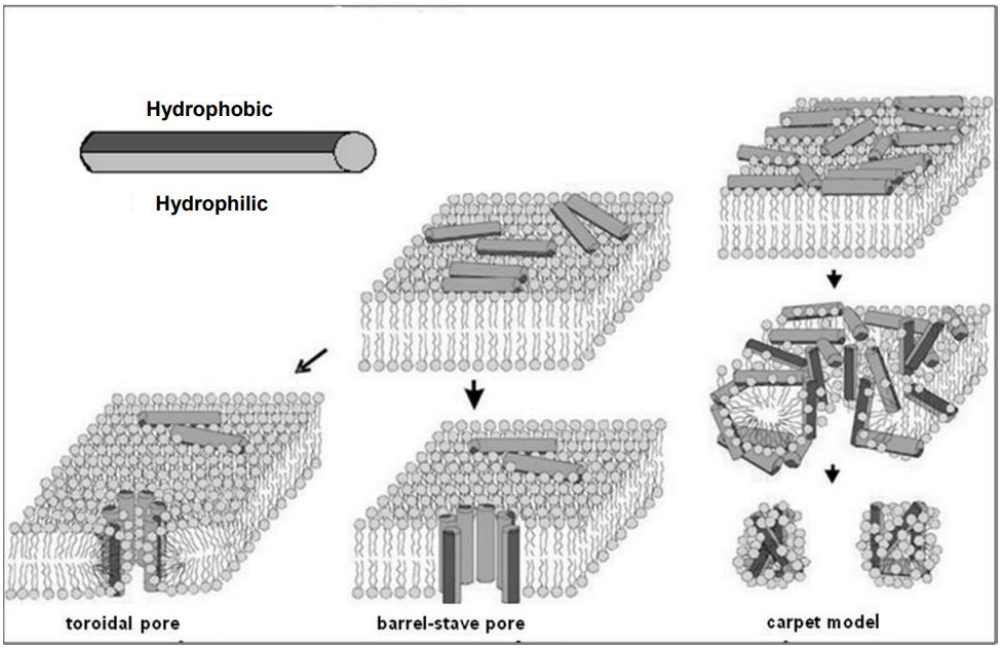

圖 3、抗菌胜肽在細胞膜上作用機制(Carnicelli et al, 2013)

1.2.4 抗菌胜肽的應用

1.2.4.1 抗菌胜肽的生物學功能

抗細菌功能研究說明絕大部分抗菌胜肽具有廣泛的抗菌性，對革蘭氏陰、陽性菌均有抑制或殺滅作用。例如韓東等人成功構建了能夠高效表達黳素 TPⅠ基因的畢赤酵母表達菌株，利用發酵上清液研究黳素對金黃色葡萄球菌的抗菌活性與抑制作用，發現黳素對金黃色葡萄球菌的最小抑菌濃度為（3.46 ± 0.76）mg/L(韓東, 2013)。

抗菌胜肽自身具有良好的抗菌作用，與其他種類的抗菌胜肽或者抗生素聯用會具有極強的協同作用，進而提高抗菌療效甚至擴大抗菌譜。

1.2.4.1.1 抗真菌功能

抗菌胜肽對真菌具有強殺傷力，其抗菌胜肽殺滅真菌的機制有三種(朱 等人, 2016)：

1. 抑制細胞壁的合成，如棘白黴素類通過抑制 1,3-β-葡聚醣合成酶的形成間接抑制葡聚醣的合成，進而抑制真菌的生理活性。
2. 與真菌粒線體、核酸等細胞質結合，抑制遺傳信號的傳導，使蛋白質的合成受阻。
3. 破壞細胞脂膜使細胞內容物流出，導致真菌死亡。

1.2.4.1.2 抗寄生蟲和原蟲功能

部分抗菌胜肽對寄生在人體或動物體內可能引發寄生蟲病如萊什曼病、瘧疾，對其原蟲和寄生蟲具有殺滅作用。抗菌胜肽殺傷原蟲的目標是質膜，通過改變細胞內部構造和細胞器來對細胞的正常新陳代謝過程進行干擾(Boman et al, 1989)。

1.2.4.1.3 抗病毒功能

病毒的結構和增殖方式特殊，且容易發生變異，抗菌胜肽在抗病毒的作用機制上也不同。目前，抗菌胜肽抗病毒的機制主要有三種(朱等人, 2016)：

1. 抗菌胜肽與病毒的外套膜結合，這種方式類似於殺滅原蟲的原理，例如 α-defensin 和美洲鱟素分別可以殺滅具膜結構的皰疹單純型病毒(herpes simplex virus,HSV) 和人類免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus,HIV) (Andreu,Rivas, 1998)。
2. 抑制病毒的增殖，Wachinger 等人發現天蠶素 A 在亞毒性濃度下通過使基因表達受到遏阻來抑制 HIV-1 增殖 (Wachinger et al, 1998)。
3. 模仿病毒的侵擾過程，Marcos 等人報導蜂毒肽透過影響病毒的組成與合成過程來抵抗病毒侵擾(Marcos et al, 1995)。

1.2.4.1.4 抗腫瘤功能

抗菌胜肽能抑制部分腫瘤細胞的生長，在一定濃度範圍內例如對哺乳動物細胞正常的生長，並不會有毒性副作用。而抗菌胜肽對腫瘤細胞的殺傷機制有三種(陳, 2014)：

1. 破壞脂膜。抗菌胜肽與細胞膜結合，使脂膜破碎而流出內容物。
2. 破壞內部結構。抗菌胜肽可能誘導腫瘤細胞核苷酸斷裂，並抑制其合成。
3. 增強免疫。抗菌胜肽可以透過免疫調節抵抗腫瘤細胞侵擾。

1.2.4.1.5 免疫調節功能

抗菌胜肽是生物體的免疫防禦系統在受到外界病原體侵染時，產生的一種生物非特異性免疫反應，具有免疫調節作用，主要促進免疫細胞增殖、提高宿主抗感染力、調節免疫因子活性、抑制過度炎症反應、激活特異性免疫反應以及充當免疫細胞的趨化因子和促進吞噬細胞的吞噬能力(李, 2015)。

1.2.4.2 抗菌胜肽在養殖業中的應用

1.2.4.2.1 畜產養殖業

關於抗菌胜肽製劑在養豬業應用的報導，多集中於防止幼豬腹瀉

和提高母豬的生產性能。飼料中添加適當比例的抗菌胜肽能抑制大腸桿菌、沙門氏菌和產氣莢膜梭菌等病原菌，從而達到有效改善或防止幼豬腹瀉、提高母豬的生產性能等目的，而且所添加的抗菌胜肽無毒、無殘留，且不會造成環境污染(王 等人, 2016)。

1.2-4-2-2 禽類養殖業

禽鳥類的養殖法往往會出現飼養密度過大、溫度濕度難以控制和鳥舍衛生狀況差等問題，而這些問題可能導致禽鳥類消化道失衡，生產性能及自體免疫力下降。大量研究證實，禽鳥類飼料中添加抗菌胜肽可以提高禽鳥類免疫力及抵抗病原菌感染的能力(王 等人, 2016)。

有研究人員於禽鳥類飲用水中添加重組抗菌胜肽 cecropin B，發現對於雛雞受大腸桿菌感染具有治療效果，且同時可以提高雛雞的日平均增質量，促進雛雞早期免疫器官的發育(王, 2011)。

1.2-4-2-3 畜牧養殖業

抗菌胜肽能夠防治乳牛隱性乳腺炎，對於乳鏈球菌和金黃色葡萄球菌所引起的乳房炎也有較好的治療作用，而且能提高動物自體免疫力及乳腺的健康，從而改善牛乳品質，提高乳牛採食量和產奶量(王等人, 2016)。

研究人員發現，將酵母培養物加入乳牛的飼料中，能夠有效地維

持乳牛的泌乳高峰，從而緩解泌乳中期產奶量下降的問題。同時提高牛奶中乳蛋白和乳脂含量，改善了牛奶品質，同時顯著降低了乳中體細胞的數量，提高了乳牛機體抵抗力(劉, 2008)。Brogden 等人深入研究了綿羊骨髓細胞抗菌胜肽 SMAP－29 和 SMAP－34 對綠膿桿菌、溶血性曼氏桿菌及其他綿羊病原菌的作用，說明這兩種抗菌胜肽均具有廣譜的抗菌活性。

1.2-4-2-4 水產養殖業

抗菌胜肽是一種安全、無污染的水產生物餌料添加劑，在水產養殖中使用抗菌胜肽可以有效提高水產生物對病原微生物的抵抗力，同時能夠顯著提高水產生物的增重率(王 等人, 2016)。

研究人員在南美白對蝦的飼料中添加抗菌胜肽，試驗結果顯示，抗菌胜肽對南美白對蝦的生長產生了顯著影響，平均終末體質量、日生長速度、相對增重率、成活率均有一定程度的提高，而且降低了飼料係數(王, 2005)。

1.3 研究動機與目的

因抗生素濫用的問題造成細菌的抗藥性問題越來越嚴重，許多專家擔心未來的日子可能沒有抗生素可以殺死細菌或是導致超級細菌的產生，但抗菌胜肽因獨特的生物活性和不同於傳統抗生素的作用機

制，讓人們開始研究抗菌胜肽代替抗生素的可能性，而且已經有部分抗菌胜肽之相關產品已經開發出來並運用在醫療及畜牧業。但是從動植物中萃取的天然抗菌胜肽其程度相當的複雜且產量可能不如預期，而化學合成的胜肽類成本不符合經濟效益。

因此利用基因重組的方式來表現大量的重組蛋白不但可以符合經濟成本也更容易設計量產。本論文之研究目的在於利用大腸桿菌的表達系統來生產透過基因重組技術製備的抗菌胜肽，並透過純化分離來分析該蛋白質。由於抗菌胜肽本身對用於表達體系的大腸桿菌是具有毒性的，而且表達微小蛋白質的難度不小，所以透過研究來開發抗菌胜肽製備體系。

第二章 實驗材料與儀器

2.1 實驗材料

表 1、實驗藥品

藥品名稱	廠商	產品編號
Acetic acid	**聯工(Taiwan)**	**AC0353**
Acrylamide	**USB(CA,USA)**	**75820**
Agar	**BD(NH,USA)**	**214010**
Agarose	**Invitrogen(CA,USA)**	**17852**
Ammonium persulfate	**Bio-Rad(CA,USA)**	**161-0700**
Ampicillin sodium salt	**Sigma(MO,USA)**	**A9518**
Beta-mercaptoethanol	**Sigma(MO,USA)**	**M6250**
Bisacrylamide	**Sigma(MO,USA)**	**146072**
Bis-acrylamide Solution 30 % (29:1)	**Biokit(Taiwan)**	**ACL-302**
Boric acid	**KANTO Chemical(Japan)**	**04232-00**
Calcium chloride	**Merck(Germany)**	**10043-52-4**
Coomassie brilliant blue	**Merck(Germany)**	**1.15444.00025**
DTT(Dithiothreitol)	**Sigma(MO,USA)**	**D632**
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	**USB(CA,USA)**	**US15699**
Ethanol	**景明化工(Taiwan)**	**0502-3160**

Glycerol	**Merck(Germany)**	**1.04092.1000**
Glycine	**USB(CA,USA)**	**123009**
Hydrogen chloride	**TEDIA(OH,USA)**	**7647-01-0**
Imidazole	**USB(CA,USA)**	**115860**
IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)	**Calbiochem (Germany)**	**B46679**
Kanamycin	**Sigma(MO,USA)**	**K0254**
Methanol	**MACRON(PA,USA)**	**67-56-1**
PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)	**Sigma(MO,USA)**	**P7626**
SDS(sodium dodecyl sulfate)	**USB(CA,USA)**	**US75819**
Silver nitrate	**Sigma(MO,USA)**	**209139**
Sodium carbonate	**Sigma(MO,USA)**	**S7795**
Sodium chloride	**KANTO Chemical(Japan)**	**37144-00**
Sodium dihydrogen phosphate	**Sigma(MO,USA)**	**1.06370.0050**
Sodium hydroxide	**Merck(Germany)**	**106469**
Sodium thiosulfate	**Sigma(MO,USA)**	**72049**
TEMED(N,N,N',N'-tetramethyl-ethane-1,2-diamine)	**Merck(CA,USA)**	**8.08742.0005**
Tricine	**生工(Taiwan)**	**101-5704-04-1**
Tris (Tris(hydroxymethyl)amino methane)	**USB(CA,USA)**	**US75825**
Triton X-100	**Sigma(MO,USA)**	**X100-100ML**
Tryptone	**ThermoFisher(MA, USA)**	**LP0042B**

Urea	**Sigma(MO,USA)**	**U5128**
Yeast extract	**Affymetrix(CA,USA)**	**4220471**

表 2、實驗生化試劑及套組

試劑名稱	廠商	產品編號
10 bp DNA Ladder	**Bioneer(South Korea)**	**D-1010**
100 bp DNA Ladder	**BioKit(Taiwan)**	**Bio-100**
1 kb DNA Ladder	**BioKit(Taiwan)**	**Bio-1kb**
40 mM dNTP	**BioKit(Taiwan)**	**Bio-NTP-10**
6X Loading dye	**BioKit(Taiwan)**	**Bio-LDY**
BlueRAY Prestained Protein Ladder	**GeneDireX(Taiwan)**	**PM006-0500**
BLUelf Prestained Protein Ladder	**GeneDireX(Taiwan)**	**PM008-0500**
HiTrap Desalting, 5 mL	**GE Healthcare(IL,USA)**	**29048684**
HisTrap HP, 1 mL	**GE Healthcare(IL,USA)**	**17524701**
Plasmid Miniprep Kit	**BioKit(Taiwan)**	**Bio-P300**
Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards	**Bio-Rad(CA,USA)**	**161-0377**
Protein Assay Reagent kit	**ThermoFisher(MA, USA)**	**23227**

SUMO Express Protease	**Lucigen(United Kingdom)**	**30801-2**
SYBR Safe DNA Gel Stain	**Invitrogen(CA,USA)**	**S33102**
T4 DNA Ligase	**NEB(MA,USA)**	**M0202T**
Taq polymerase	**AllBio(Taiwan)**	**ABTGMBP02**
Xba I	**NEB(MA,USA)**	**R0145S**
Xho I	**NEB(MA,USA)**	**R0146S**

表 3、實驗菌株

名稱	來源
***Escherichia coli* DH5α**	食品工業發展研究所**(Taiwan)**
HI-Control 10G Chemically Competent Cells	**Lucigen(United Kingdom)**
OverExpress C43(DE3) pLysS	**Lucigen(United Kingdom)**

2.2 實驗儀器

表 4、實驗儀器

儀器名稱	製造商名稱	型號
微量移液吸取器 **(Micropipette)**	**Eppendorf(Germany)**	**Research 1000/200/100/20/10/2.5**

微量電子天秤 (Micro-Electronic Balance Meter)	Ohaus(China)	AR1530
微量電子天秤 (Micro-Electronic Balance Meter)	Mettler Toledo(OH,USA)	AB-54S
酸鹼度計 (pH meter)	Suntex(Taiwan)	SP-701
純水機 (Ultrapure Water System)	Merck Millipore(MA,USA)	Type I
直立式冰箱 (Refrigerator)	TECO(Taiwan)	RE7222
臥室冷凍冰櫃 (-20℃ Freezer)	Fisher&Paykel(New Zealand)	Standard H160
超低溫冰箱 (Ultra-Low Temperature Freezer)	NIHON(Japan)	CLN-32UWT
液態氮桶 (Cryogenic Refrigerator)	Taylor Wharton(Japan)	HC35
烘箱 (Drying Oven)	DENG YNG(Taiwan)	DOV30
培養箱 (Incubator)	Cheng Sang(Taiwan)	Low-Temperature Orbital Shaker Incubator

滅菌槽 (Autoclave)	Trident Medical(Italy)	EA-635
2/3D 震盪器 (MS Waver Shaker)	Major Science(Taiwan)	MW-23
試管震盪器 (Vortex-Mixers)	LABRepCo(PA, USA)	Genie2
恆溫循環水槽 (Circulating Water Bath)	Firstek(Taiwan)	B206
微量離心機 (Micro-Centrifuge)	Eppendorf(Germany)	5415D
離心機 (Centrifuge)	Eppendorf(Germany)	5804R
藍光電泳凝膠成像切膠儀 (Transilluminator)	GeneDireX(Taiwan)	BLooK LED
水平式電泳槽 (Horizontal Gel Electrophoresis System)	Major Science(Taiwan)	MT-108
蛋白質電泳槽 (Protean Tetra Cell)	Bio-Rad(CA,USA)	1658003EDU
電源供應器 (Power Supply)	Bio-Rad(CA,USA)	Power Pac Basic
磁石加熱攪拌器 (Hot Plate Stirrer)	LabTECH(Thailand)	LMS-1003

DNA/蛋白質影像系統 **(DNA/Protein Imaging System)**	**Canon(Japan)**	**PowerShot GIX Mark II**
聚合酶連鎖反應器 **(PCR Instrument)**	**Applied Biosystems(CA,USA)**	**GeneAmp PCR System 9700**
超音波破碎儀 **(Ultrasonic Homogenizer)**	**MISONIX(NY,USA)**	**S-3000**
無菌操作台 **(Vertical floor type cabinet)**	**智勳(Taiwan)**	**GT-4L**
層析系統 **(Chromatography Systems)**	**GE Healthcare Life Sciences(IL,USA)**	**AKTA Prime plus**
酵素免疫分析儀 **(ELISA Reader)**	**Biotek(VT,USA)**	**Epoch**

第三章 實驗方法

3.1 大腸桿菌勝任細胞 C43(DE3)的製備

質體 DNA 需藉由轉殖(Transformation)或稱為轉形的技術，利用製備完成的勝任細胞，將質體 DNA 轉入勝任細胞內。本實驗是利用大腸桿菌 C43(DE3)來製備勝任細胞，藉由大腸桿菌繁殖的複製系統來達成複製質體 DNA 的目的。傳統的基因轉殖方法有氯化鈣處理法(化學法)、電穿孔法與粒子轟擊植入法等。其中進行細菌轉形作用最常用也較簡單的方法為氯化鈣處理法。此方法是使用氯化鈣和冷凍處理大腸桿菌，使大腸桿菌的細胞壁產生結構上的變化而製備成勝任細胞，細菌透過熱休克(Heat shock)的方式來接受外來的質體 DNA。

BL21 雖然是目前最常使用來表達的 *E. coli* 的菌株，但並非所有的蛋白都可以透過 BL21 表現，在挑選蛋白質表現的選殖株時失敗的原因，常與大量表現毒性蛋白(Toxic proteins)質會造成細胞虛弱甚至死亡有關。Lucigen 公司經由大量篩選突變體的方法，找到獨家的兩個抗蛋白質毒性的 DE3 strains：C41(DE3)及 C43(DE3)。其中 C41(DE3)是由 BL21(DE3)突變體中選出來的，這一個大腸桿菌品系包含了至少一個阻止細胞在表現毒蛋白時死亡的基因突變。而 C43(DE3) 則是經由在 C41(DE3)細胞中表現另外一組不同的有毒性的蛋白質而挑選出

來的。因此這兩種品系對表達不同種類的毒性蛋白具有抗性，使 *E. coli* 在表達毒性蛋白時不會影響其存活率或蛋白產量。目前有文獻指出這兩株 OverExpress™ strains 在表現毒性蛋白及膜蛋白上的有效性 (Laurence Dumon-Seignovert et al, 2004)，OverExpress C41(DE3) pLysS 和 C43(DE3) pLysS 多了一個表現 T7 Lysozyme 的基因。T7 Lysozyme 可抑制 T7 promoter，因此更可以避免毒性蛋白在未加入 IPTG 誘導劑時就有的微量的表達。

Strains	Transformation			Toxicity			Expression in liquid media		
	Yes	No	Transformation success rate (%)	No	Yes	Percentage of toxic plasmids (%)	Yes	No	Percentage of expressing plasmids (%)
BL21(DE3)	16	10	62	1	25	96	14	12	54
C41(DE3)	28	0	100	14	14	50	24	4	86
C43(DE3)	28	0	100	27	1	4	23	5	81

圖 4、比較不同菌株轉化效率、表達誘導毒性和異源蛋白質的表達 (同上，Laurence Dumon-Seignovert et al, 2004)

步驟：

取 *E.coli* C43（DE3）之單一菌落培養於 10 mL 的 LB 培養液，於 37℃下 160 rpm 震盪過夜。取 0.1 mL 過夜培養的菌液移至 10 mL 新的 LB 培養液中，繼續以 37℃下 160 rpm 震盪培養約 2 至 3 小時，使大腸桿菌處於對數生長期，OD_{600} 介於 0.4 到 0.6 之間。將培養好的菌液 1 mL 轉移至 1.5 mL 離心管中，置於冰上 20 分鐘，之後以 4℃下 4000 rpm 離心 10 分鐘後去除上清液。以 1 mL 4℃預冷的 0.1 M

$CaCl_2$ 懸浮菌體，置於冰上 30 分鐘後移置離心機以 4℃下 4000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後並輕輕打散細胞。加入 100 μL 預冷卻的 0.1 M $CaCl_2$ 並且輕彈離心管，於冰上靜置 1 小時後備用。如需長時間保存勝任細胞時須加入預冷且滅過菌的甘油，使其最終濃度為 15 % ，加入完甘油後迅速儲存於-80℃冰箱保存備用。

3.2 小量 DNA 質體萃取

細菌通常包含有被稱為質體（Plasmid）的DNA分子。質體上所攜帶的基因，可以賦予載有該質體的細菌某些特性（例如，抵禦抗生素的抗藥性）。質體通常是環狀的雙股DNA。質體的命名一般是以小寫字母p起頭，之後是幾個大寫字母，用來描述該質體的特性，或是建構（或發現）該質體的人的姓名。由環狀的雙股DNA所構成的質體即使把兩股DNA之間的鹼基對都打斷，它們還是不會完全分開來，這種性質被稱為超纏繞（Supercoiling）。

本研究實驗萃取質體DNA是使用小量質體萃取套組，它是一種去氧核醣核酸小量純化套組設計，其作用是將細菌培養起來，以陰離子界面活性劑將細胞膜打破，使其蛋白質變性，並抑制DNase的活性，避免破壞質體DNA，蛋白酶使蛋白質與質體DNA分離，增加產率，接著加入鹽類使質體DNA之負電被中和、鹽析，使其他物質被凝集形成白色沉澱物，再將析出之質體DNA與膜進行吸附，並用酒精清洗減少

鹽類的殘留，最後沖提出質體DNA。實驗步驟參考沛鑫生物科技所販售之質體小量萃取套組的使用操作手冊，並以自己實驗之需求加以更改部分步驟。

步驟：

將含有質體DNA之單一菌落培養於10 mL的培養液中，於37℃、180 rpm震盪培養10~12小時。將培養好的菌液取出1 mL移液至1.5 mL離心管中，並以25℃、12,000 rpm離心2分鐘後去除上清液。加入200 μL的 Solution I等待10秒鐘後加入200 μL的 Solution II，等待10秒鐘混合均勻後加入200 μL的 Solution III。等待溶液反應3分鐘後，以25℃、12,000 rpm離心10分鐘後將上清液移液至新的離心收集管中，並再以25℃、12,000 rpm離心6分鐘以去除流通過收集管內離心膜的液體，將600μL的洗滌緩衝液加入離心柱中，以25℃、12,000 rpm離心2分鐘，並且再重複此清洗程序一次。再以25℃、12,000 rpm離心3分鐘，打開離心管管蓋靜置3分鐘除去殘留的乙醇。將離心柱轉移至新的1.5 mL離心管中，加入30 μL的洗脫緩衝液或H_2O於離心柱中，並放置在室溫下以12,000 rpm離心2分鐘洗脫出質體DNA。重複上述步驟1次，將獲得的質體DNA溶液放置在-20℃長期保存。

3.3 DNA 片段來源

3.3.1 胜肽來源

本論文研究之抗菌胜肽MAP-04-04，其基因序列源自於東海大學化學系 龍鳳娣教授之發現。MAP-04-04是由11個胺基酸所組成，它是抗菌胜肽Ixosin-B之類似物，為減少Ixosin-B序列長度、增加疏水性、改變胜肽電荷以及為增加對carboxypeptidase的穩定性，所將C端羧基被修飾為醯胺。其Ixosin-B為壁蝨(Hard tick, *Ixodes sinensis*)之唾液腺分離純化所得。胺基酸序列如表5所示。

表 5、胜肽合成序列(龍 等人, 2012)

Peptide	**Amino acid sequence**
Ixosin-B-amide	QLKVDLWGTRSGIQPEQHSSGKSDVRRWRSRY-NH_2
MAP-01	QLKVDLWGTRSGI-NH_2
MAP-02	LWGTRSGIQPEQH-NH_2
MAP-03	QHSSGKSDVRRW-NH_2
MAP-04	KSDVRRWRSRY-NH_2
MAP-04-01	KSLVRRWRSRW-NH_2
MAP-04-02	KSLRRVWRSWR-NH_2
MAP-04-03	KWLRRVWRWWR-NH_2
MAP-04-04	KRLRRVWRRWR-NH_2

3.3.2 片段合成

將MAP-04-04的胺基酸序列，依照大腸桿菌遺傳密碼如圖5所示，編列出相對應之基因序列並優化密碼子，其序列為KRLRRVWRRWR。

CODON USAGE IN *E. COLI* GENES[1]

	Codon	Amino acid[2]	%[3]	Ratio[4]	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	
U	UUU	Phe (F)	1.9	0.51	UCU	Ser (S)	1.1	0.19	UAU	Tyr (Y)	1.6	0.53	UGU	Cys (C)	0.4	0.43	U
	UUC	Phe (F)	1.8	0.49	UCC	Ser (S)	1.0	0.17	UAC	Tyr (Y)	1.4	0.47	UGC	Cys (C)	0.6	0.57	C
	UUA	Leu (L)	1.0	0.11	UCA	Ser (S)	0.7	0.12	UAA	STOP	0.2	0.62	UGA	STOP	0.1	0.30	A
	UUG	Leu (L)	1.1	0.11	UCG	Ser (S)	0.8	0.13	UAG	STOP	0.03	0.09	UGG	Trp (W)	1.4	1.00	G
C	CUU	Leu (L)	1.0	0.10	CCU	Pro (P)	0.7	0.16	CAU	His (H)	1.2	0.52	CGU	Arg (R)	2.4	0.42	U
	CUC	Leu (L)	0.9	0.10	CCC	Pro (P)	0.4	0.10	CAC	His (H)	1.1	0.48	CGC	Arg (R)	2.2	0.37	C
	CUA	Leu (L)	0.3	0.03	CCA	Pro (P)	0.8	0.20	CAA	Gln (Q)	1.3	0.31	CGA	Arg (R)	0.3	0.05	A
	CUG	Leu (L)	5.2	0.55	CCG	Pro (P)	2.4	0.55	CAG	Gln (Q)	2.9	0.69	CGG	Arg (R)	0.5	0.08	G
A	AUU	Ile (I)	2.7	0.47	ACU	Thr (T)	1.2	0.21	AAU	Asn (N)	1.6	0.39	AGU	Ser (S)	0.7	0.13	U
	AUC	Ile (I)	2.7	0.46	ACC	Thr (T)	2.4	0.43	AAC	Asn (N)	2.6	0.61	AGC	Ser (S)	1.5	0.27	C
	AUA	Ile (I)	0.4	0.07	ACA	Thr (T)	0.1	0.30	AAA	Lys (K)	3.8	0.76	AGA	Arg (R)	0.2	0.04	A
	AUG	Met (M)	2.6	1.00	ACG	Thr (T)	1.3	0.23	AAG	Lys (K)	1.2	0.24	AGG	Arg (R)	0.2	0.03	G
G	GUU	Val (V)	2.0	0.29	GCU	Ala (A)	1.8	0.19	GAU	Asp (D)	3.3	0.59	GGU	Gly (G)	2.8	0.38	U
	GUC	Val (V)	1.4	0.20	GCC	Ala (A)	2.3	0.25	GAC	Asp (D)	2.3	0.41	GGC	Gly (G)	3.0	0.40	C
	GUA	Val (V)	1.2	0.17	GCA	Ala (A)	2.1	0.22	GAA	Glu (E)	4.4	0.70	GGA	Gly (G)	0.7	0.09	A
	GUG	Val (V)	2.4	0.34	GCG	Ala (A)	3.2	0.34	GAG	Glu (E)	1.9	0.30	GGG	Gly (G)	0.9	0.13	G
	U				C				A				G				

圖 5、大腸桿菌遺傳密碼(Maloy et al.1996)

本研究使用之載體DNA為pET28a(+)，而在這個載體序列中選擇兩個切割位點Xho I和Xba I作為DNA片段插入載體的識別位點。圖6顯示pET28a(+)載體，並顯示出Xho I和Xba I的切割位點。

圖 6、pET28a(+)載體序列

本研究使用之DNA片段經由生工有限公司(MDBio Inc.)所提供之引子合成服務，委託該公司合成兩條序列互補的引子，再使用無菌之去離子水或是TE緩衝液將引子回溶，並將兩條引子透過1：1的比例添加至1.5 mL的離心管中，並放置在95℃加熱器加熱3分鐘後，再將加熱器溫度設定至25℃，使其非常緩慢地降溫至室溫，可使兩條互補之DNA片段互補完全。

3.4 限制酵素反應

限制酶（Restriction enzyme）又可稱為限制性內切酶（Restriction endonuclease），為一種能將雙股DNA切開的酵素。切割方法是將醣類分子與磷酸之間的鍵結切斷使DNA鏈上產生一個缺口，且不破壞核苷酸與鹼基。切割的形式可分為兩種，分別為缺口產生突出單股DNA的黏滯端和缺口平整無凸起的平滑端。本研究使用的內切酶酵素為New England Biolabs公司所販售的Xba I和Xho I酵素，切割識別位點和內切酶緩衝液之成份如表6。實驗方法參考New England Biolabs公司所建議之使用方法。

表 6、切割識別位點和切割緩衝液之成份

內切酶	切割位點	端點	切割緩衝液成份
Xho I	5'--C　TCGAG—3' 3'—GAGCT　C—5'	Sticky end	50 mM Pptassium Acetate 20 mM Tris-acetate 10 mM Magnesium Acetate 100 μg/mL BSA pH 7.9
Xba I	5'--T　CTAGA—3' 3'—AGATC　T—5'	Sticky end	

步驟：

取出滅菌之200 μL的微量離心管插入冰上預冷，添加DNA約 1 μg、切割酵素1 μL、切割緩衝液(1X)5 μL，滅菌去離子水補滿至50 μL。此配方可依實驗需求等比例減少使用。放置37℃加熱器中加熱1小時

後可進行DNA凝膠電泳確認。確認完成後將該溶液放置在65℃加熱器中加熱10分鐘，可使內切酶酵素失去活性。

3.5 水平式凝膠電泳法

凝膠電泳（Gel electrophoresis）主要是利用核酸帶負電荷的特性，於電泳槽中會穿過膠體，例如瓊脂糖膠體或是聚丙烯醯胺膠體(通常使用瓊脂糖膠體)，從電泳槽中的負極朝向正極移動。

不同分子量的核酸，在膠體孔徑中的移動速度會有差異，膠體孔徑越小，對於分子較大的核酸會較難移動，進而將不同大小的核酸分開。通常以水平式電泳槽來進行電泳。本研究所涉及之 DNA 大小對應出三種不同的膠體濃度，其配方如表 7。

表 7、DNA 大小與洋菜膠濃度之配方

Agarose(%)	Size range of linear DNA molecules(bp)	Buffer of gel	Buffer of electrophoresis tank
0.8	1,000-10,000	1X TAE buffer	1X TAE buffer
1	100-1,000	0.5X TAE buffer	1X TAE buffer
2	10-100	0.5X TBE buffer	1X TBE buffer

步驟：

按照欲分離DNA的大小，製作出相對應濃度的凝膠，如表7。以

配製2%的凝膠為例，取25 mL去離子水和25 mL 1X TBE緩衝溶液和2g的瓊脂糖(Agarose)加入錐形瓶中，利用PE保鮮膜封住瓶口並戳幾個洞，置於微波爐中加熱至其溶液完全透明清澈。隨後加入1 μL的SYBR Safe DNA Gel Stain，搖晃均勻使凝膠先做預染色的動作，接著再輕輕倒入製膠模具中以避免有氣泡的產生，再放上齒梳置於室溫中使凝膠完全凝固。凝膠完全凝固之後，再拔掉齒梳將凝膠放入電泳槽中，並添加1X TBE緩衝溶液至淹沒膠體表面即可。將待測DNA溶液與6X Loading Buffer以5 μL：1 μL的量混合均勻，將樣品加入凝膠孔洞中，因6X Loading Buffer含有甘油成分，所以會沉澱至孔洞中不會溢散至電泳緩衝液中。以固定電壓110V進行電泳，視膠體及樣品大小分子電泳50至70分鐘。電泳完成後取出膠體至UV光電泳凝膠成像系統中呈色並且觀察拍照。

表 8、5X TBE Buffer 配方、50X TAE Buffer 配方

5X TBE,pH 8.3		50X TAE,pH 8.5	
Tris	54 g	Tris	242 g
Boric acid	27.5 g	Acetic acid	57.1 mL
EDTA	4.65 g	0.5M EDTA	100 mL
Total volume	1000 mL	Total volume	1000 mL

3.6 連接反應

DNA連接酶的化學反應過程首先是將一條DNA的3'端先修飾成羥基（OH^-），而另一條的5'端則是必須帶有磷酸根，藉由DNA連接酶

的作用促進磷酸雙脂鍵的共價鍵，同時核苷酸序列以嘌呤-嘧啶兩兩對應的方式完成配對，進而使兩條DNA連接成一條。T4連結酶則是以ATP作為輔助因子，促使黏滯端口(Sticky end)或是平滑端口(Blunt end)的DNA分子間連接起來。本研究所使用的T4連接酶由New England Biolabs公司提供，來進行載體和引子的連接作用。

步驟：

各別稀釋引子與載體，利用分光光度計(260 nm)測量，依照雙股DNA 1 OD=50 μg/mL，來計算出核酸的濃度(DNA濃度=OD_{260} x 50 μg/mL x 稀釋倍數)。依照載體與引子之莫耳數比例為1：3，並且參考New England Biolabs公司販售之T4連接酶的使用方式，如表 9，將所有物質加入200 μL離心管中混合均勻並且離心後放置37℃反應1.5小時或是16℃反應12~16小時。

表 9、連接反應實驗配方

Component	**Volume(μL)**
Vector DNA	variable
Insert DNA	variable
T4 DNA Ligase Buffer(10X)	1 μL
T4 DNA Ligase	0.5 μL
Sterilized water	To 10 μL

3.7 大腸桿菌轉形作用

細胞經由氯化鈣的處理後能，離子能產生滲透壓變化及導致大腸桿菌的細胞壁發生結構上的變化。這時再利用熱休克(Heat shock)處理，加熱至42℃使細胞壁瞬間產生短暫的孔洞，使DNA進入細胞中，並置於冰上過一段時間其細胞壁會恢復正常。再使用含有抗生素的培養基來篩選出含有質體的轉形成功細胞。大部分大腸桿菌的轉形效率在10^5 ~10^8 之間，即每μg質體DNA中成功的轉形細胞數目。

步驟：

將儲存於-80℃的勝任細胞取出置於冰上解凍後，加入適量的質體DNA(約25 ng至100 ng)小心混合。上述混合好的勝任細胞菌液移至預冷的15 mL離心管中，置於冰上30分鐘後再置於42℃水浴中進行熱休克（Heat shock）45秒，小心過程不要晃動太大。之後再置入於冰上2分鐘。再加入950 μL的LB培養液於37℃培養箱中震盪180 rpm培養1時後，取出100μL的菌液均勻塗布於含抗生素的固態培養基中（50 μg/mL）。置於37℃培養箱中培養12～16小時來篩選含有目標基因的大腸桿菌。

3.8 聚合酶連鎖反應

聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)是將特定DNA

片段以專一性的連鎖反應，快速大量複製特定DNA片段的方法，也是鑑定特定基因的存在與否的方法之一。本研究透過聚合酶鏈鎖反應來進行轉形成功後的菌落篩選。而進行PCR反應所需要的材料包含要複製的DNA模版片段(Template)；複製起始點兩端的引子(Primer)；合成DNA所需要的原料(脱氧核糖核苷三磷酸及緩衝溶液)；DNA聚合酶(Taq polymerase)。PCR主要由三個步驟去進行：變性、降溫黏合、延長。首先將溫度上升至95℃高溫使兩條DNA之間的鍵結打斷使其變性完全分離，再降低溫度使引子配對找到互補的位置，接著核甘酸透過聚合酶的作用沿著DNA延長形成互補鏈。

設計一對正向及反向的引子，並且注意一些引子設計的基本原則。1.引子長度一般在18-35 mer之間。2.G-C含量控制在40-60%左右。3.避免連續相同鹼基的出現，以免產生自黏互補的情況發生。4.利用公式計算Tm值：Tm(℃)=4(G+C)+2(A+T)，盡量把溫度控制在50~60℃之間。

步驟：

將PCR所需要用到的物質放入200 μL的薄壁PCR反應管中。本實驗所使用的聚合酶及PCR緩衝液為AllBio公司所提供。所需物質如表10所示。

表 10、PCR 反應混合物配方

Component	Volume(μL)
DNA Template	Variable
Forward primer (10 μM)	1 μL
Reverse primer (10 μM)	1 μL
PCR Buffer (10X)	5 μL
dNTP Mix (40 mM)	0.5 μL
Taq DNA Polymerase (5 U/μL)	0.5 μL
Double Distilled Water	To 50 μL

利用滅菌tip沾取一點點的菌落到200 μL離心管中，加入PCR反應混合物並且短暫離心。放入PCR儀器中，並將溫度設定完成以進行聚合酶連鎖反應。溫度設定如圖7。PCR完成後，與DNA標準品進行凝膠電泳測試觀察DNA大小。

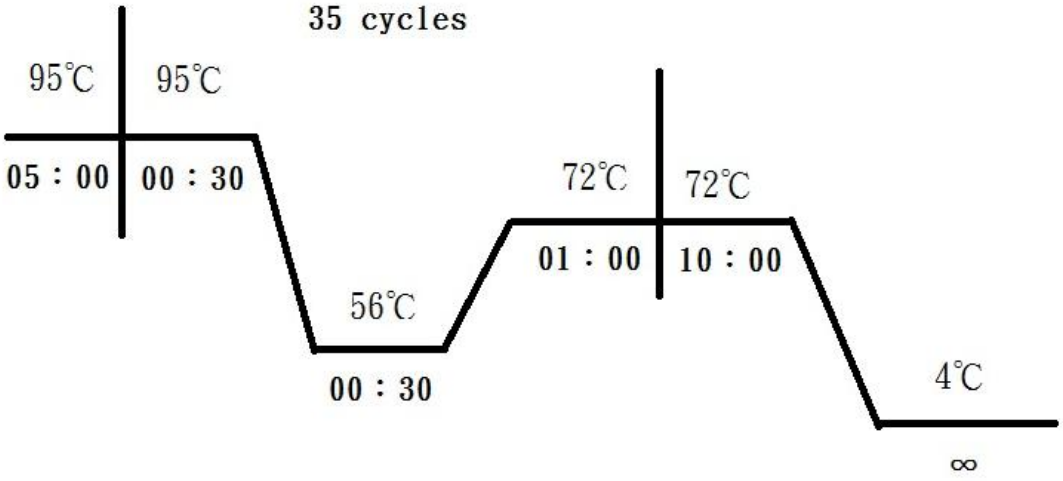

圖 7、PCE 溫度設定條件

3.9 DNA 定序檢測

本研究DNA定序程序委託明欣生物科技公司測定，該公司以ABI 3730xl毛細管電泳 (Capillary electrophoresis, CE)自動定序儀測定。將定序結果透過SnapGene電腦軟體來進行判讀跟比對DNA序列是否正確。

3.10 重組蛋白在大腸桿菌中誘導表達

本研究所建構之蛋白質表達為pET體系中的pET28a(+)載體，pET表達體系在大腸桿菌*E.coli* C43(DE3)中進行選殖和表現重組基因系統中，是最常使用及效果最好的一套系統。此表達載體中含有T7啟動子、T7轉錄酶、lactose乳糖操縱子。蛋白表現是經由在宿主細胞中提供的T7 RNA聚合酶所誘發。T7 RNA聚合酶是具有選擇性以及活性的，當透過完全誘發時幾乎所有宿主細胞中的反應都會轉為基因的蛋白表現。

在無誘導劑的情況下，lac抑制因子會與lac操縱子結合，此時RNA聚合酶與lac啟動子的結合能力就會降低，使目標蛋白的合成量減少；在添加誘導劑的情況下，誘導劑會和lac抑制因子結合，此時λDE3上的T7gene開始轉譯出RNA聚合酶，並且誘導出大量的T7聚合酶和成功地轉錄出目標蛋白基因，最後轉譯出目標蛋白。雖然這個系統非常

強有力，依舊可以簡單地利用降低誘導物質的濃度來減少目標蛋白的表現量，降低目標蛋白的表現量可能讓某些目標蛋白的溶解度增加。誘導pET體系示意圖如下圖所示。

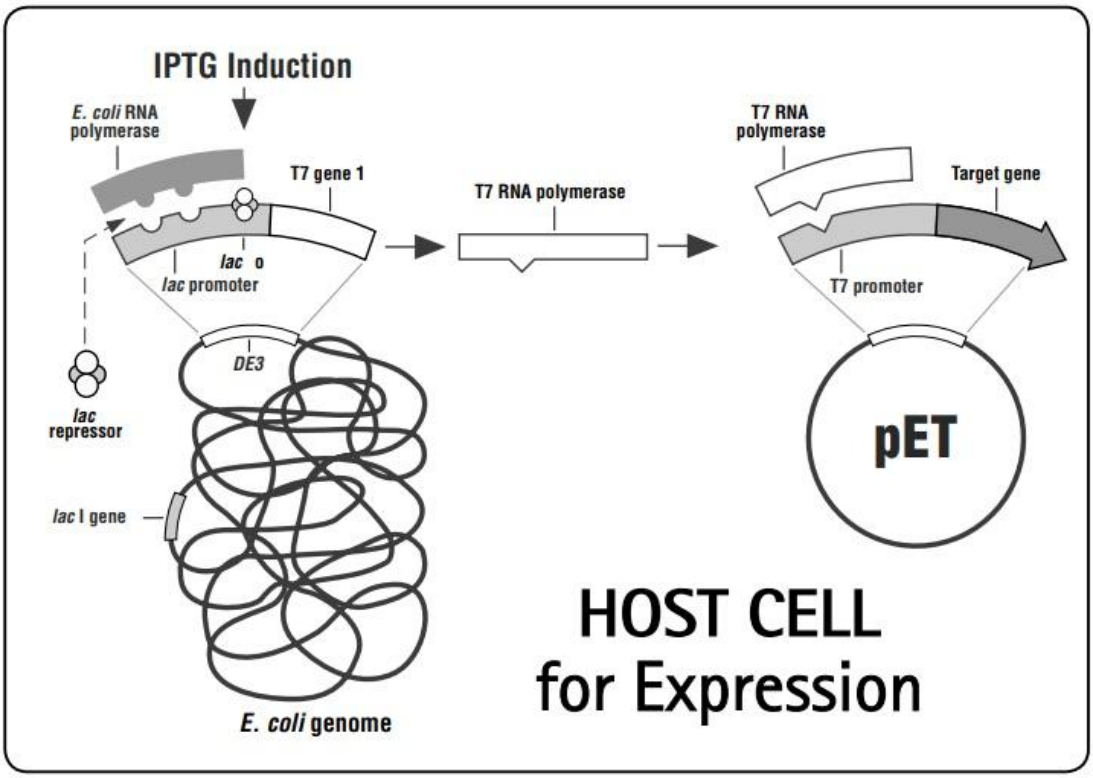

圖 8、誘導劑(IPTG)誘導 pET 體系表達蛋白質之示意圖

(Novagen,pET System Manual 11th Edition)

步驟：

挑選一個已轉殖成功的菌落培養在10 mL的培養液中，於37℃、160 rpm震盪培養過夜。吸取過夜培養的菌液以1/100稀釋於新鮮的培養液中進行大量的培養，於37℃下160 rpm震盪培養約2至3小時，使OD_{600}介於0.6到0.8之間時，加入IPTG誘導劑(最終濃度1 mM)進行誘導，繼續震盪培養4小時。將誘導完的菌液，以4℃、6000 rpm、8分鐘

離心去除上清液，將沉澱的菌塊以滅菌過的PBS溶液重新懸浮一次。將重新懸浮過的液體以以4℃、6000 rpm、8分鐘離心去除上清液，將沉澱菌體保存在-20℃的冰櫃以便往後的實驗進行。

表11、PBS溶液配方

1X PBS buffer	
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na_2HPO_4	1.44 g
KH_2PO_4	0.24 g
add dd H_2O to 1000 mL,pH 7.4	

3.11 蛋白質純化及分析

3.11.1 大腸桿菌中蛋白質萃取

從大腸桿菌之中萃取蛋白質主要是利用外力破壞細胞膜和細胞壁，使細胞裡的內容物釋放出來的技術。幾乎所有細菌的細胞壁都是由肽聚糖組成，它是一種難溶性的聚糖鏈，藉助短肽交聯而成的網狀結構包圍在細胞周圍，使細胞具有一定的形狀和強度。目前已發展了多種細胞破碎方法，以便適應不同用途和不同類型的細胞壁，主要機械法和非機械法兩大類。本研究所使用的是機械法中的超音波破碎法（Ultrasonication），利用超音波的高速剪切力和碰撞力形成氣泡，氣

泡突然破裂的瞬間能產生壓力，透過連續不斷產生的瞬間造成高壓衝擊細胞，使其細胞破碎。

步驟：

配置 Lysis 緩衝液(pH 7.5,使用前最後添加 PMSF 至最終濃度 1mM)，並置於冰上。配方如表 11。

表 11、Lysis 緩衝液成份

Component	**Stock concentration**
Tris-HCl (pH 7.5)	20 mM
NaCl	150 mM
Na_2EDTA	1 mM
EGTA	1 Mm
Triton X-100	1%
sodium pyrophosphate	2.5 mM
beta- mercaptoethanol	1 mM
Na_3VO_4	1 mM
leupeptin	1 μg/mL

（NaCl、Tris-HCl (pH 7.5)：保持溶液的離子強度；Na_2EDTA：具有螯合金屬離子的特質，預防金屬離子對酶的作用；EGTA：鈣離子的螯合劑，可以抑制巨噬細胞對凋亡細胞吞噬能力；Triton X-100：非離子性界面活性劑，溶解不溶性蛋白質，增強破碎細胞效果；beta-mercaptoethanol：為一種還原劑，保護蛋白質不被氧化而失活；Leupeptin：蛋白酶抑制劑；Na_3VO_4：一般用於檢測磷酸化的蛋白，其

作用是保護磷酸化的蛋白不會被磷酸酶還原；PMSF：蛋白酶抑制劑(在水會快速地降解，故使用前再加入溶液中）

將保存在-20℃冰櫃的菌塊放在冰上退冰，並以原培養液1/10體積的Lysis緩衝液復懸(resuspend)菌塊。開啟超音波破碎儀，設定機器參數Total time=4 min，On time=20 sec，Off time=10 sec，輸出功率=3 W。破碎細菌全程在冰上進行操作，以免超音波破碎時產生的高溫使蛋白質焦炭化。將破碎完成的細胞以4℃、12000 rpm、20分鐘，取出上清液到新的離心管中。將剩下的菌塊加入原Lysis緩衝液1/5體積的包含體溶解液(8M Urea，1M Tris-HCl，1mM PMSF，pH 8)，重新懸浮菌塊並且冰浴1小時使其反應。將冰浴完成的內容物移至200 μL的離心管中，以25℃、12000 rpm、20分鐘的速度去離心，取上清液移至新的200 μL的離心管，殘餘的菌塊拿去冷凍保存。

3.11.2 聚丙烯醯胺膠體電泳(SDS-PAGE)

本研究使用SDS-PAGE，全名十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳（Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis），用於檢測蛋白質分子量大小的不同，使其在聚丙烯醯胺凝膠中分離。使用凝膠電泳前，待測蛋白質溶液會與蛋白質Loading Buffer混合加熱，蛋白質Loading Buffer其內容物含有SDS（十二烷基硫酸鈉），SDS是一種界面活性劑會破壞蛋白質的二級結構使其變性，並包覆變性蛋白質，使

其帶有一致的負電荷。而β-mecapitalethanol為一種還原劑，可以解開蛋白質的的雙硫鍵。加熱的作用在於加速蛋白質與Loading Buffer之間的作用。

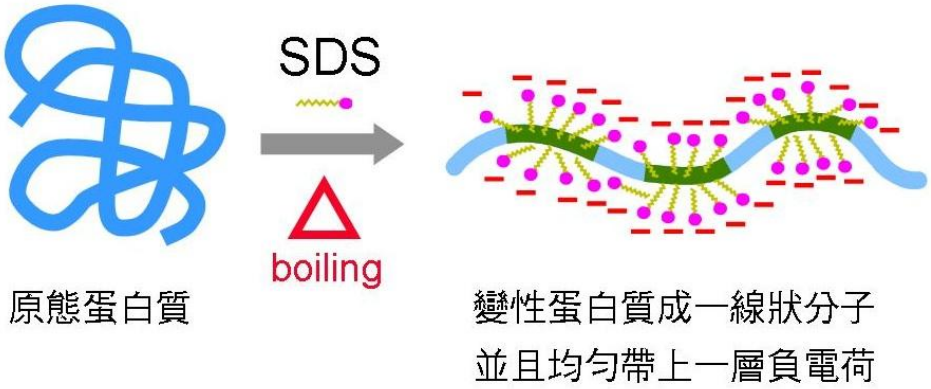

圖 9、SDS 作用於原態蛋白質示意圖(Juang, 2007)

進行SDS-PAGE時電流會從上而下傳遞，上端為負電場，下端為正電場。此時經SDS處理過的蛋白質帶負電，因此蛋白質會從負極向正極跑。而電泳的速度則與蛋白質大小呈反比，分子量較小的蛋白質會越往凝膠下層移動，分子量較大的蛋白質因為泳動速度慢，所以會位於凝膠上層。聚丙烯醯胺凝膠會分為上層膠及下層膠，上層膠為聚集膠體，用於濃縮蛋白質，使不同蛋白質濃縮在下層膠上方使所有蛋白質在同一水平線；下層膠為分離膠體，使用高濃度膠體使蛋白質按照分子量大小分離。SDS電泳圖如下圖10所示。

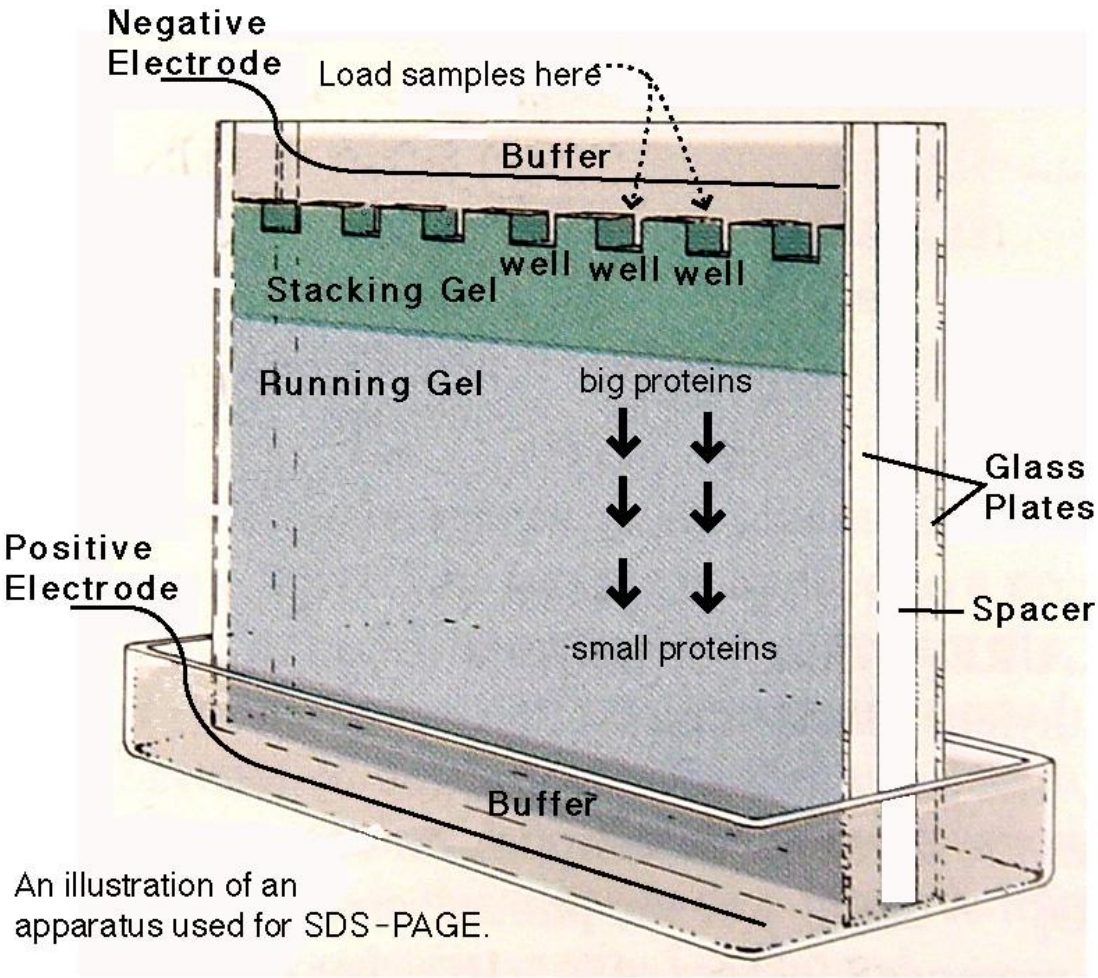

圖 10、SDS 蛋白質分離示意圖

(https://www.creative-proteomics.com/services/1d-sds-page-ief.htm)

步驟：

將1.5 mm厚度製膠板組裝在製膠台上，倒入去離子水至製膠板上緣處，並靜止5~10分鐘觀察製膠板是否有漏水的情況，如果有，重新組裝製膠板，如果沒有，將製膠板裡面的水吸乾淨。取出兩個50 mL離心管，分別用來配置上層膠及下層膠，依序倒入去離子水、Tris-HCl、SDS、APS、Bis-acrylamide，要使用前再添加TEMED，是為了避免TEMED與APS發生交聯反應而先行凝固。上下層膠配方如表12。

表 12、SDS-PAGE 膠體配方

Component	Stacking Gel(5%)	Running Gel(12.5%)
dd H_2O	6.15 mL	8.54 mL
1.5M Tris-HCl (pH6.8)	--	5 mL
0.5M Tris-HCl (pH8.8)	2.5 mL	--
10% SDS	10 μL	20 μL
10% APS	30 μL	60 μL
Bis-acrylamide(30%)	1.25 mL	6.26 mL
TEMED	15 μL	30 μL

將下膠溶液配製完成後，使用塑膠滴管灌入至製膠模具中約七分滿，隨後用95%酒精注入至製膠模具上，讓酒精壓平凝膠。約20~30分鐘後，以擦手紙將酒精吸取乾淨，在將上膠溶液注入至製膠模具上緣，並插入齒梳等待凝膠完全凝固。拔開齒梳，將製膠模具從製膠台上取下放入電泳槽上，並加入1X SDS-PAGE running buffer至完全覆蓋凝膠。Running buffer配方如表13。

表 13、SDS-PAGE running buffer 配方表

10X SDS-PAGE running buffer	
Tris	30 g
Glycine	140 g
SDS	10 g
add dd H_2O to 1000 mL,pH 8.3	

將15 μL待測蛋白質和5X Protein loading Buffer以3：1的比例加入在1.5 mL離心管中，並放置在95℃加熱器中加熱5分鐘。處理完成後再將樣品注入在凝膠的孔洞中。電泳槽插上電源，先以80V、15~25分鐘跑膠使染劑在分離膠上方呈現水平線，再提高電壓至130V、約1~2小時以讓蛋白質在聚集膠中分離。當染劑標線到達電泳槽底部上方約2~3公分後，關閉電源取出凝膠至塑膠小盒中，加入去離子水至覆蓋整塊膠面，以低速搖晃5分鐘做清洗的動作。清洗完成後，倒出去離子水，加入蛋白質染劑考馬士亮藍溶液至覆蓋整塊膠面，以50~70 rpm低速搖晃約40分鐘使其染色。蛋白質染劑配方如表14。

表 14、蛋白質染劑配方

Coomassie Blue R250	1 g
Methanol	300 mL
Acetic acid	50 mL
add dd H_2O to 1000 mL，並透過0.45 μm濾膜過濾以去雜質	

染完色後將染劑倒入另外一口血清瓶中回收。接著在在凝膠下方鋪上兩片拭淨紙，接著再倒入退染劑(Methanol 30%、Acetic acid 5%)至覆蓋膠體，使用微波爐微波15~20秒，接著以50~70 rpm低速搖晃30分鐘左右，直到背景顏色退去且有明顯色帶出現。

3.11.3 蛋白質含量檢測

蛋白質濃度的最大宗的分析方法為Bicinchoninic acid (BCA)檢測，

BCA 於鹼性條件下可還原雙價的銅離子 (Cu^{2+}) 成為單價的亞銅離子 (Cu^{+}), 再由兩分子的BCA螯合亞銅離子，產物呈藍紫色，在波長562 nm具有吸光直。BCA法很穩定，並且只需要一個步驟，就可以檢測20-2,000 μg/mL的蛋白質含量。而本研究使用Pierce公司所提供的Pierce™ BCA Protein Assay Kit套組來進行蛋白質含量檢測，而該套組可檢測到5 μg/mL的蛋白質含量。

步驟：

Pierce™ BCA Protein Assay Kit含有Reagent A (BCA)和Reagent B($CuSO_4$)這兩種溶液，將Reagent A和Reagent B以體積比例50：1混合作為工作試劑。製備BSA標準溶液，稀釋成一系列的濃度：25、125、250、500、750、1000、1500、2000 (μg/mL)，另備空白組樣品以及分析樣品。將0.1 mL BSA標準溶液和2 mL工作試劑加入於15 mL的離心管中混合，於37℃水浴中加熱30分鐘。加熱完成後各取出200 μL至96微孔盤，以ELISA檢測儀於波長562 nm偵測吸光值，並劃出標準校正曲線，便可換算出未知蛋白質濃度。

3.12 蛋白質層析儀（FPLC）

蛋白質液相層析儀 FPLC(Fast performance liquid chromatography)通常用於大量製備和純化蛋白質，本實驗所使用的液相層析儀為

AKTA prime plus。利用親合層析法來分析及分離蛋白質溶液，利用物質間的親和力強弱，將親和力較強的分子保留在擔體上並移除親和力較弱的其他分子，進而達到分離蛋白質的效果。

3.12.1 金屬親合性管柱層析

本實驗管柱為 GE Healthcare 公司所提供的 HisTrap HP 1 mL。該管柱是預裝式的即用型色譜管柱，事先將管柱注入含有鎳離子的樹脂，當含有 His-Tag 融合蛋白通過鎳離子樹脂，鎳離子空出的配位鍵與 His-Tag 結合使融合蛋白停留在樹脂上；經過層析儀洗脫這段步驟後，再以高濃度的咪唑(Imidazole)與 His-Tag 競爭配位鍵並使目標蛋白脫離樹脂，以便完成蛋白質純化。在金屬親和層析法系統裡，主要利用多牙（Multidentate）螯合化合物來螯合金屬。在 His-Tag 純化系統中常使用 IDA(Iminodiacetic acid)、NTA(Nitrilotriacetic acid)、TED(Tris-carboxymethyl ethylene diamine) 與鎳離子(Ni^{2+})進行螯合，以 NTA 為例子，四牙的 NTA 結合鎳離子比 IDA 提供更強的鍵結力，但蛋白質能結合的配位數降為 2 個，造成金屬親和層析法系統與蛋白質的結合力較 IDA 弱。

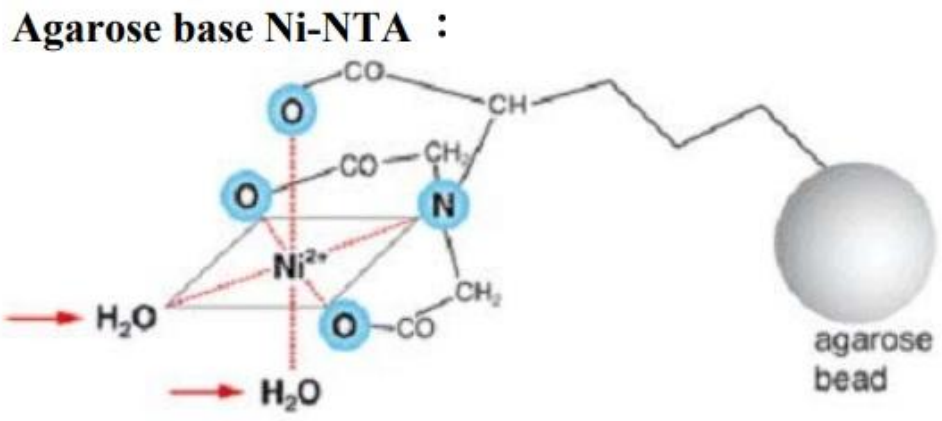

圖 11、鎳離子與 His tag 結合圖(創世紀 2011 年季刊)

步驟：

AKTA prime plus所使用的溶液及欲分析之蛋白質，皆通過0.22 μm或0.45 μm的過濾膜，以免管子堵住，並且配置dd H_2O、20%酒精水溶液、Binding buffer(20 mM Sodium phosphate,0.5 M NaCl,30 mM Imidazole,1M~7M Urea,pH7.4) 以及 Elution buffer(20 mM Sodium phosphate,0.5 M NaCl,0.5 M Imidazole,pH 7.4)這四種溶液。

將FPLC電源打開,將A、B管線放入20%酒精水溶液中，先進行清洗管路的步驟。再將A、B管線改放入dd H_2O中，在一次執行清洗管路的步驟，並且透過電腦軟體觀察UV吸光值使否平穩，如不平穩則再清洗一次。利用針筒灌注dd H_2O清洗Sample Loop，並將層析管柱安裝好(避免氣泡進入)。

以Binding buffer用流速1 mL/min跑約5~10個管柱體積的量，此目的是為了讓管路和管柱充滿buffer，並可透過電腦軟體觀察UV吸光值使否平穩。再將2 mL的預分析蛋白溶液打入Sample Loop，以Binding

buffer用流速0.5~1 mL/min跑到UV吸光值呈平穩，此目的將sample流通過管柱，將目標蛋白中的6his胺基酸與管柱中的鎳離子結合在一起。

以Elution buffer用流速1 mL/min將管柱內的目標蛋白給洗脫出來，並透過UV吸光值來觀察目標蛋白被洗脫在哪一個收集管中。最後再使用Binding buffer用流速1 mL/min將管柱內的高濃度Imidazole給沖淡稀出，操作完畢後將整個FPLC層析系統使用dd H_2O和20%酒精水溶液做清洗。而層析管柱則先使用dd H_2O清洗，最後保存在20%酒精水溶液。

3.12.2 脫鹽管柱層析

本實驗使用GE Healthcare公司所提供的HiTrap Desalting 5mL來進行蛋白質除鹽。該管柱填裝膠體排阻基質Sephadex G-25 Superfine的管柱。該基質以交聯的右旋糖苷珠為基礎，能夠獲得出色的解析度和很高的流速。HiTrap脫鹽管柱能用於pH範圍在2-13之間的水溶液，還有經常使用的溶液如尿素和鹽酸胍溶液以及所有非離子和離子型介面活性劑。

步驟：

1.管柱平衡

配置緩衝液(50~150 mM NaCl,pH 7.4)，用5個管柱體積的緩衝液以5 mL/min的速度洗滌管柱以完全去除存儲液20%的乙醇。如果管柱

中留有空氣，用去除氣體的緩衝液洗滌直到空氣消失。再次使用5~10個管柱體積的緩衝液來平衡管柱。

2.使用注射器手動脫鹽

使用2 mL的注射器以1-5 mL/min之間的流速加樣品，棄去管柱中流出的液體。使用1.5 mL的緩衝液將管柱內蛋白洗脫出來再次使用緩衝液將管柱清洗乾淨，最後再使用5 mL的20%酒精水溶液清洗及保存管柱。

3.13 蛋白酶切割作用

SUMO 蛋白酶是一種高活性的半胱胺酰蛋白酶，也稱為 Ulp，來自酵母屬的 Ulp1 的重組片段（Ub1 特異性蛋白酶 1）。SUMO 蛋白酶以高度特異性的方式裂解，識別泛素樣（Ubl）蛋白 SUMO 的三級結構以及 C 端兩個甘胺酸(Glycine)序列來進行裂解。蛋白酶可用於重組融合蛋白中裂解 SUMO 蛋白。蛋白酶裂解的最佳溫度為 30℃；而該蛋白酶在溫度範圍 4℃~37℃ 內和 pH 7.0-9.0 都具有活性。蛋白酶裂解反應完成後，SUMO 蛋白 N 端上的聚組胺酸標籤透過金屬親和層析簡單地將 SUMO 蛋白從裂解反應中除去。

1 個單位的 SUMO Express Protease 足以在 30℃ 下 1 小時內消化 10 -100 μg 的融合蛋白。其裂解反應建議在裂解緩衝液（20 mM Tris-HCl，150 mM NaCl，10％甘油，2 mM 新鮮二硫蘇糖醇（DTT），1%

Triton X-100，pH 8.0）來進行反應。本實驗將切割緩衝液取出 49 μL 加上 1 μL (1 unit)的 SUMO protease，並加上適量且足夠反應完成的融合蛋白，於 30℃ 反應 1~4 小時或是 4℃ 過夜後來進行電泳觀察。

第四章 結果與討論

4.1 pET28a-0404 質體 DNA 構建

4.1.1 目標片段 DNA 製備

本研究的抗菌胜肽為 MAP-04-04(KRLRRVWRRWR)，考慮到遺傳密碼在人體細胞與細菌中的使用有所不同，每個胺基酸對應密碼子出現的比率不同，本研究因選擇大腸桿菌為抗菌胜肽的表達體系，故根據大腸桿菌遺傳密碼，挑選出 MAP-04-04 胺基酸在細菌中較常使用之密碼子，而設計出其合適的 cDNA 序列。為達到重組 DNA 的目的，在 cDNA 序列前後分別設計 Xba I 和 Xho I 的切割位點，而且在切割位點前後再多設計 5 個核甘酸序列，此方式是為了在進行限制性內切酶切割時提高切割效率，如果切割位點前後少於 5 個核甘酸時，會影響到內切酶的消化反應。設計 DNA 序列為下圖。

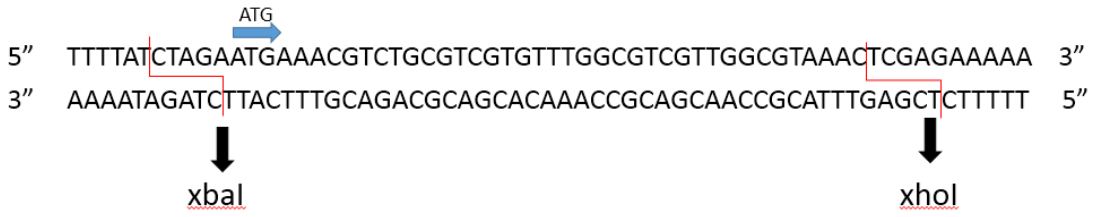

圖 12、DNA 序列圖

本研究使用的 DNA 片段委託生工有限公司合成引子。如下列所示，所設計的 DNA 片段為兩條互補的引子。

Primer　MAP-04-04-forward：

5”TTTTATCTAGAATGAAACGTCTGCGTCGTGTTTGGCGTCGTTGGCGTAAACTCGAGAAAAA 3”

Primer　MAP-04-04-reverse：

5”TTTTTCTCGAGTTTACGCCAACGACGCCAAACACGACGCAGACGTTTCATTCTAGATAAAA 3”

將兩條引子回溶於 1X TE buffer，將兩個引子溶液依照一定的比例加到 tube 混合均勻，放在 95℃的加熱器中加熱 3 分鐘，再將加熱器的溫度調到室溫，使整個降溫過程非常緩慢，以達到 DNA 片段自黏的目的。透過電泳圖來觀察 DNA 片段是否有正確地自黏，並同時將正反向兩股引子各放在 95℃的加熱器中加熱 3 分鐘再回到室溫冷卻，來觀察這兩段引子是否各自會產生自黏現象。實驗結果如下，因 DNA 螢光染劑會嵌入在雙股 DNA 之中，所以可以觀察到正反兩股引子不會各自產生自黏現象且不會有條帶產生，而同時透過正反兩向引子互補的 DNA 片段會有條帶產生，調帶出現的位置也是符合預期 61 bp 的大小。

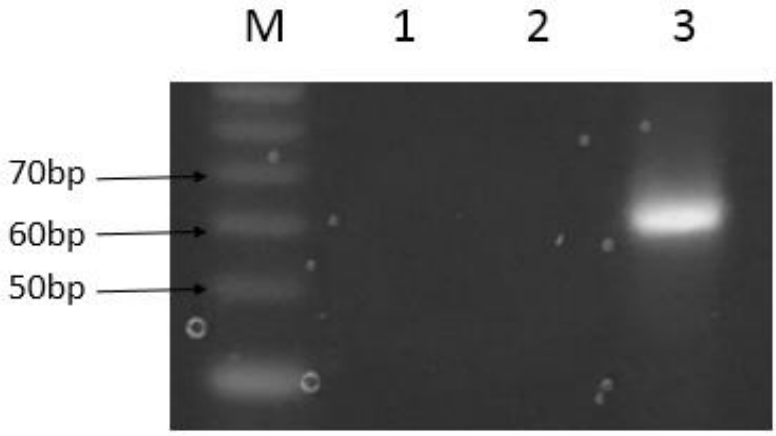

圖 13、引子自黏產物。M：10 bp DNA marker，1：Primer MAP-04-04-forward，2：Primer MAP-04-04- reverse，3：MAP-04-04 自黏片段。

4.1.2 限制性內切酶反應

本研究所使用的內切酶為 Xho I 和 Xba I,經由 SnapGene 引子設計軟體計算後經內切酶切割完的 DNA 片段大小為 45 bp。因為本研究所使用的 DNA 片段很短，所以本實驗 10μl 的內切酶反應中，分別使用 200 ng(內切酶建議使用量)、150 ng、100 ng、50 ng 的 DNA 含量來做反應，由電泳圖來觀察 DNA 的量是否會影響切割效率。經由實驗觀察出現帶狀擴散的現象，推測切割位點前後核甘酸序列設計的長度還不夠長，導致影響到內切酶酵素的識別位點及切割效率。雖然同樣也觀察到即使減少 DNA 的含量也不能改變內切酶反應的效率，但是不同 DNA 量的內切酶反應確實都有涵蓋到目標切割大小 45 bp 的範圍。

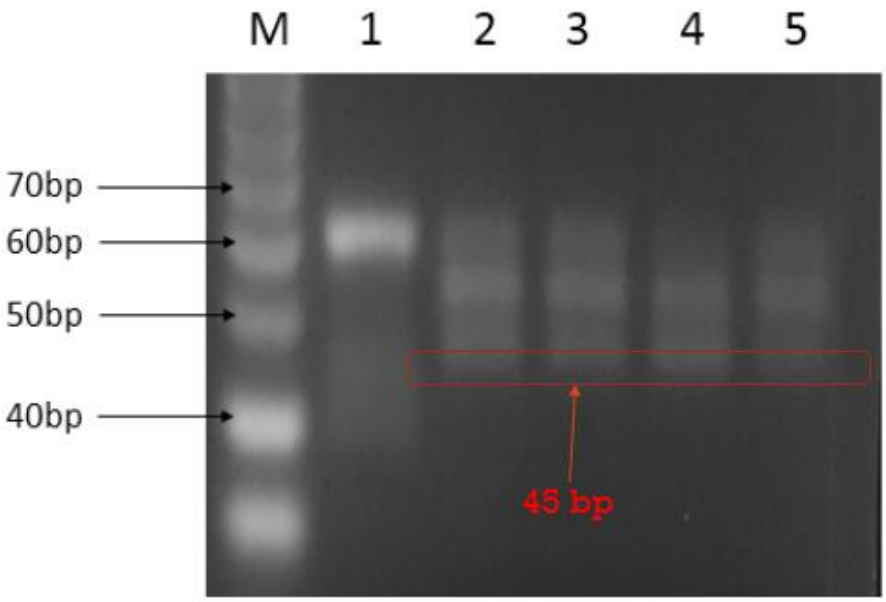

圖 14、引子限制性內切酶反應產物。M：10 bp DNA marker，1：未切割的 DNA 片段， 2：200 ng DNA，3：150 ng DNA，4：100 ng DNA，5：50 ng DNA。

4.1.3 pET-28a(+)載體萃取

pET-28a(+)載體透過 Plasmid Miniprep Kit(BioKit)從含有該載體的大腸桿菌中萃取出來，也相同地使用 xhoI 和 xbaI 做內切酶反應，在實驗的過程中，同時也單一使用一個內切酶做反應，目的是為了確認內切酶的活性。內切酶反應產物如下圖所示，

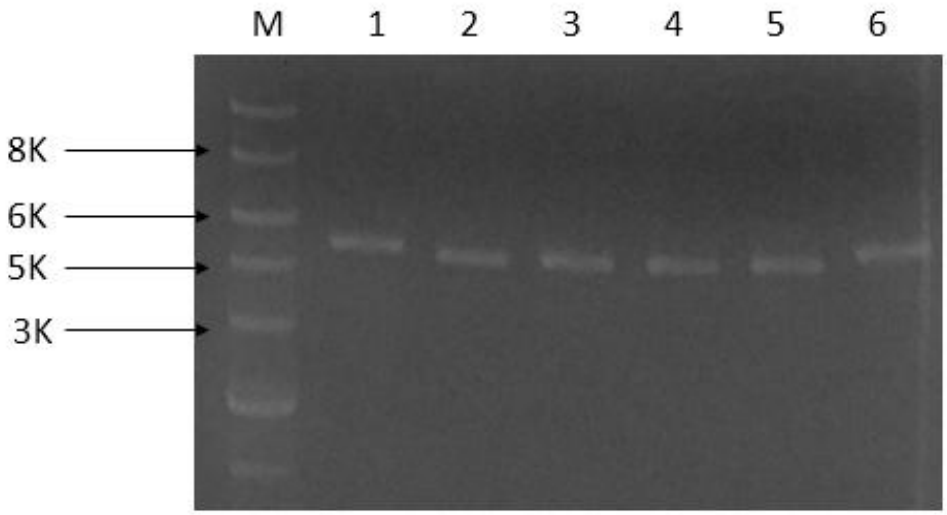

圖 15、載體內切酶反應產物。M：1 kb DNA marker，1：只使用 Xba I 切割，2-5：同時使用 Xba I 和 Xho I 切割，6：只使用 Xho I 切割。單一內切酶反應的載體大小為 5369 bp。兩個內切酶反應的載體大小為 5192 bp，被切割下來的片段為 177 bp。

4.2 基因轉殖

利用分光光度計對目標片段與載體進行定量分析，利用公式 DNA 濃度=OD_{260} x 50 μg/mL x 稀釋倍數，依照 insert:vector = 3:1 的比例去做連接反應。因 C43(DE3)比 BL21(DE3)具有非常高的轉殖率，固直接將連結反應產物直接作用於勝任細胞 C43(DE3)中。

4.3 pET28a-0404 質體 PCR 產物確認

在 pET28a 載體序列中，有一段 T7 promoter 和 T7 terminator 的序列，該兩段序列是 pET28a 常見的引子序列，利用這兩段引子就可

以檢測目標片段 DNA 是否有正確插入到載體上。如下圖所示，可以利用 Snap 軟體來計算出還有目標片段的 PCR 產物和未插入目標片段的 PCR 產物大小。

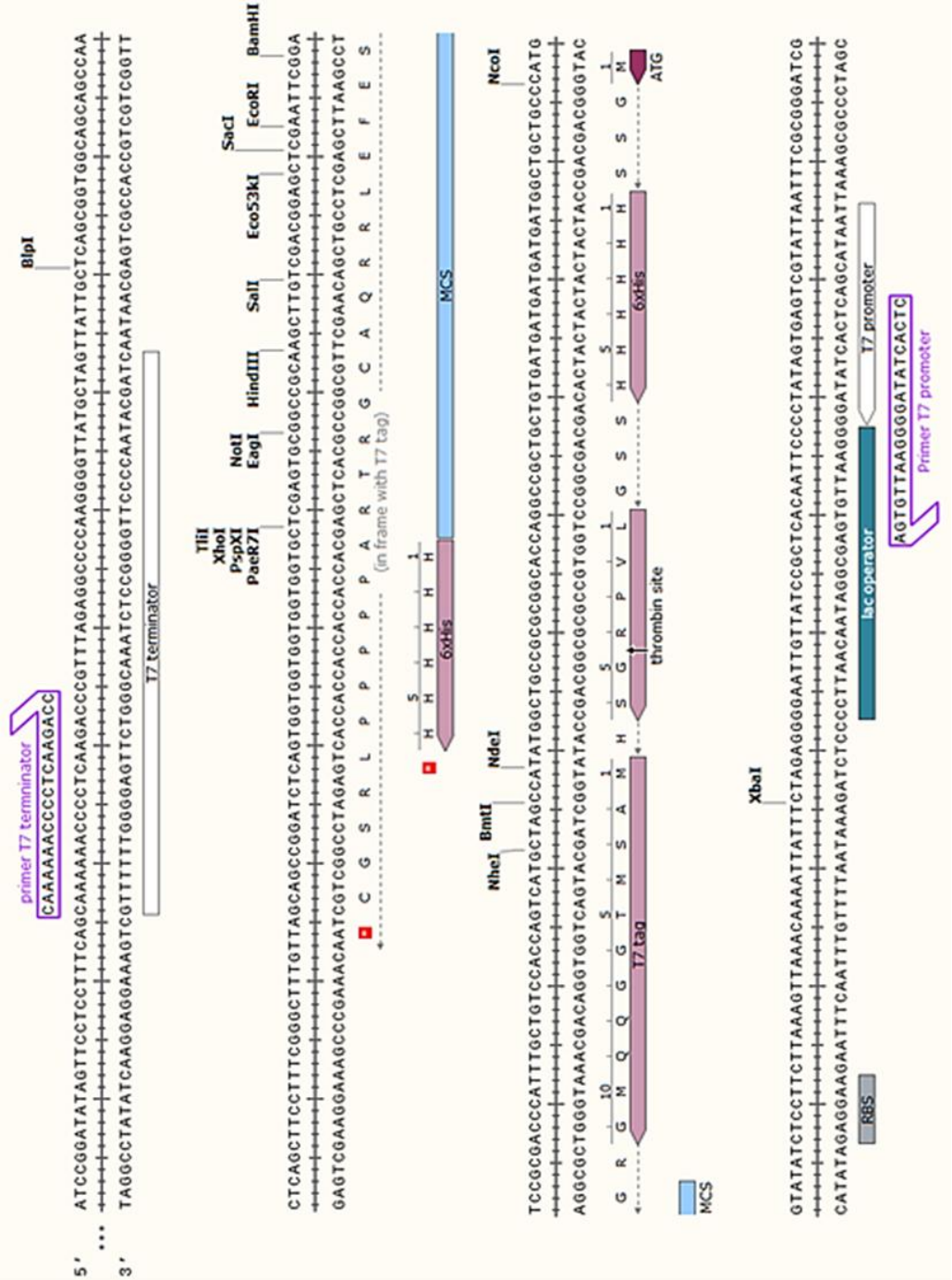

圖 16、pET28a 序列圖含有 T7 promoter 和 terminator

原始 pET28a 的 PCR 產物為 353 bp，而含有目標片段所構成的

質體 pET28a-0404 大小為 221 bp，透過凝膠電泳來判斷出，該菌落是否為基因重組後所構建的目標質體。本研究將從含 kan 抗生素的菌盤挑選 4 個菌落來進行 PCR 確認。如下圖所示。

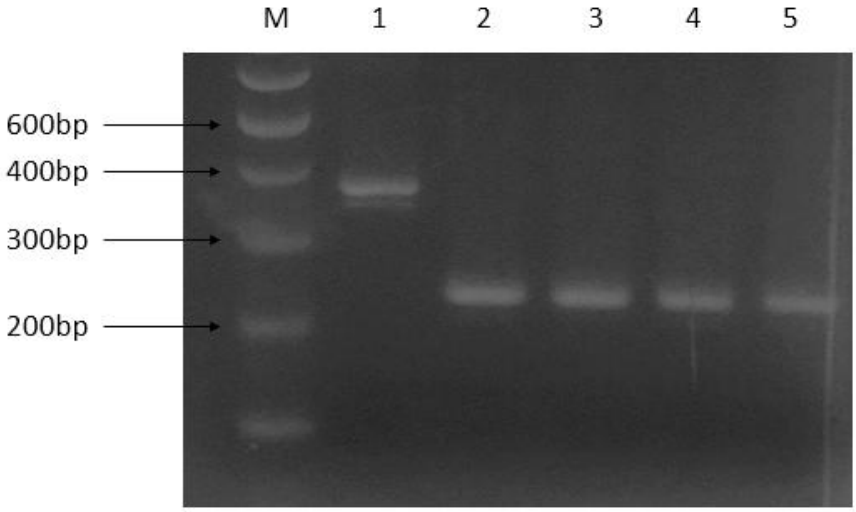

圖 17、菌落 PCR 篩選產物

M：100 bp DNA marker，1：ori pET28a PCR 確認(353bp)，2：菌落 1 PCR 確認，3：菌落 2 PCR 確認，4：菌落 3 PCR 確認，5：菌落 4 PCR 確認。可以觀察到有嵌入目標片段的 PCR 電泳目標為 221 bp，4 個菌落都為 221 bp。往後的實驗就可以從已確認的菌落來進行培養、保存以及表達。

4.4 定序結果

將挑選過後的菌落進行培養及萃取質體 DNA，並委託明欣生物科技公司來進行定序的工作，根據定序結果位置在 56~100 掃描區間對應切割位點 Xba I 至 Xho I 間，定序結果正確。定序結果如下圖。

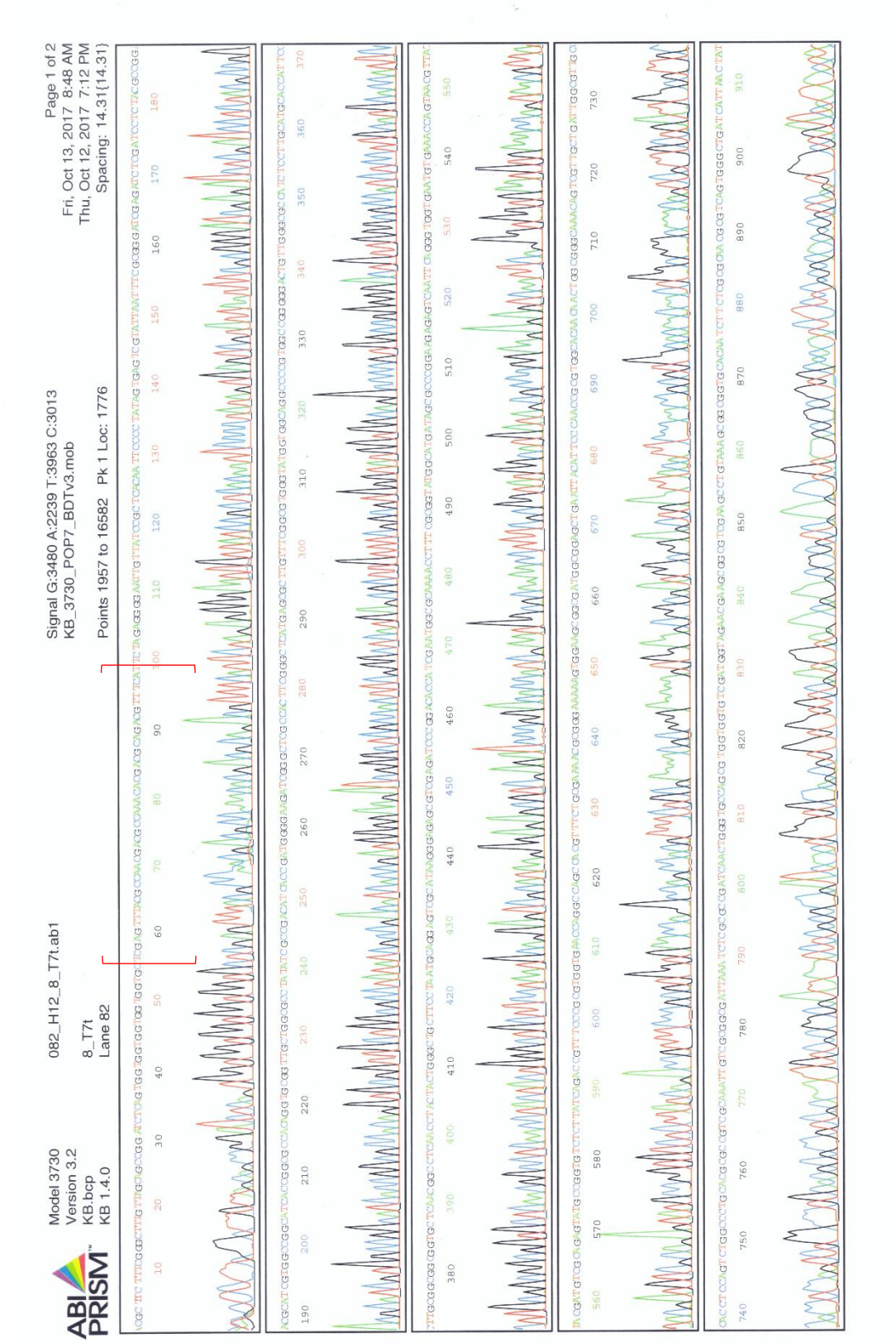

圖 18、 pET28a-0404 定序(Xba I~Xho I，位置 56~100，紅色括弧處)

4.5 C43(DE3)誘導表現

當菌液培養 1.5~2.5 小時至 OD 值 0.6~0.8 間時，於第 0 小時開始加入誘導劑 IPTG 至最終濃度 1 mM 跟沒加 IPTG 來做比較，如圖，發現有加入 IPTG 的菌生長速度比較緩慢，推估在加入誘導劑表達蛋白質時，會影響到 C43 的生長情形。

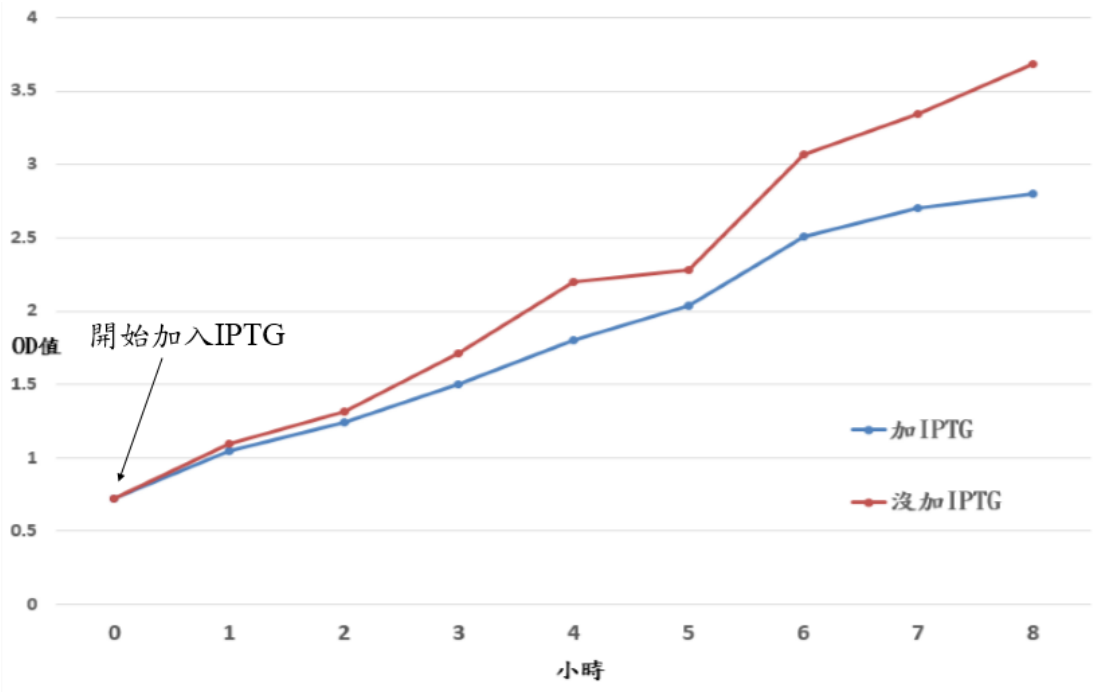

圖 19、pET28a-0404 誘導曲線圖

4.6 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析 pET28a-0404

pET28a-0404 經於 37℃誘導完 4 小時後，經超音波破碎後所得到的全蛋白來進行 SDS-PAGE 分析，如圖 20 所示。根據圖片可以觀察出，目標蛋白約 3.6 kDa 並未在電泳圖中表現出來。

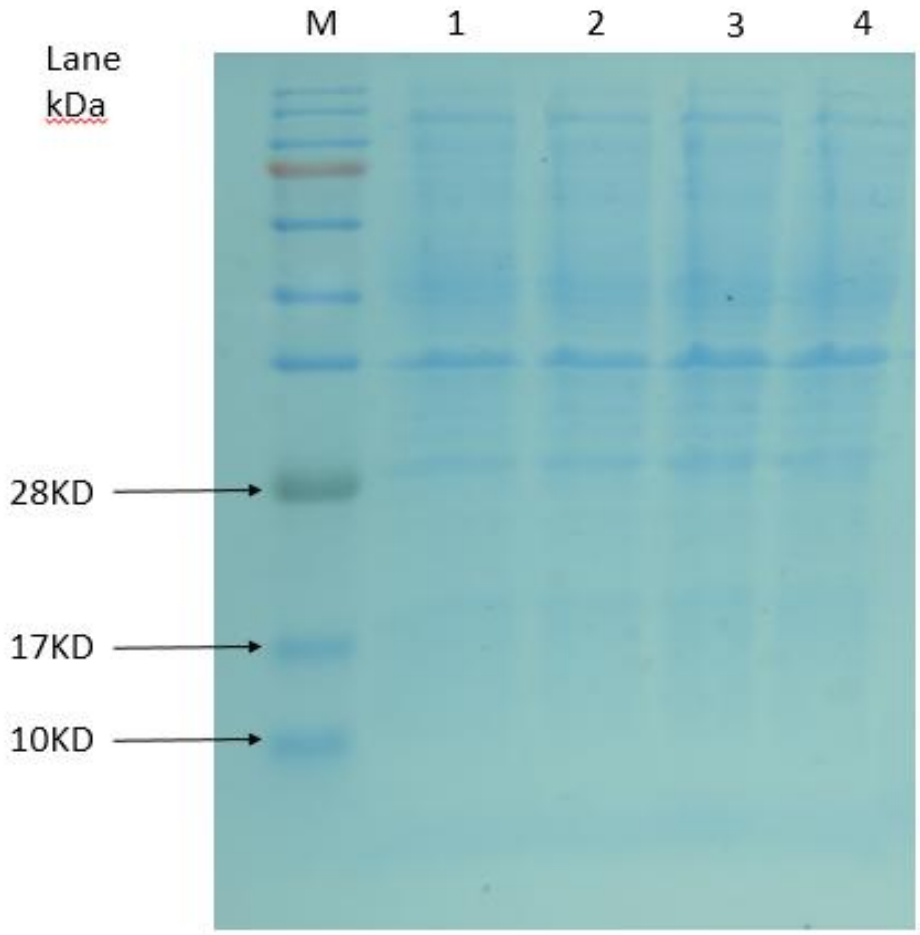

圖 20、C43 原菌與質體有無誘導之 SDS-PAGE 圖。M：Protein Marker，1：C43(DE3)原菌+IPTG 誘導劑培養四小時、2：pET28a+IPTG 誘導劑培養四小時，3：pET28a-0404 未加入 IPTG 誘導劑培養四小時，4：pET28a-0404+IPTG 誘導劑培養四小時

這次將 pET28a-0404 經於 37℃誘導完 4 小時後，破碎離心所收集的上清液以及沉澱相來進行 SDS-PAGE 分析，這次並將蛋白質標準品更換成含有 5 kDa 的標準品來做檢測，如圖 21 所示。根據圖片可以觀察出，目標蛋白約 3.6 kDa 並未在上清液以及沉澱相中出現，而且原本具有 5 kDa 之蛋白質標準品在電泳圖中也沒有顯現出來，此

時推測出常規 SDS-PAGE 電泳體系可能無法分析出 10 kDa 以下的範圍，所以本實驗另外找出一種可以分析 10 kDa 以下的電泳分析方法。

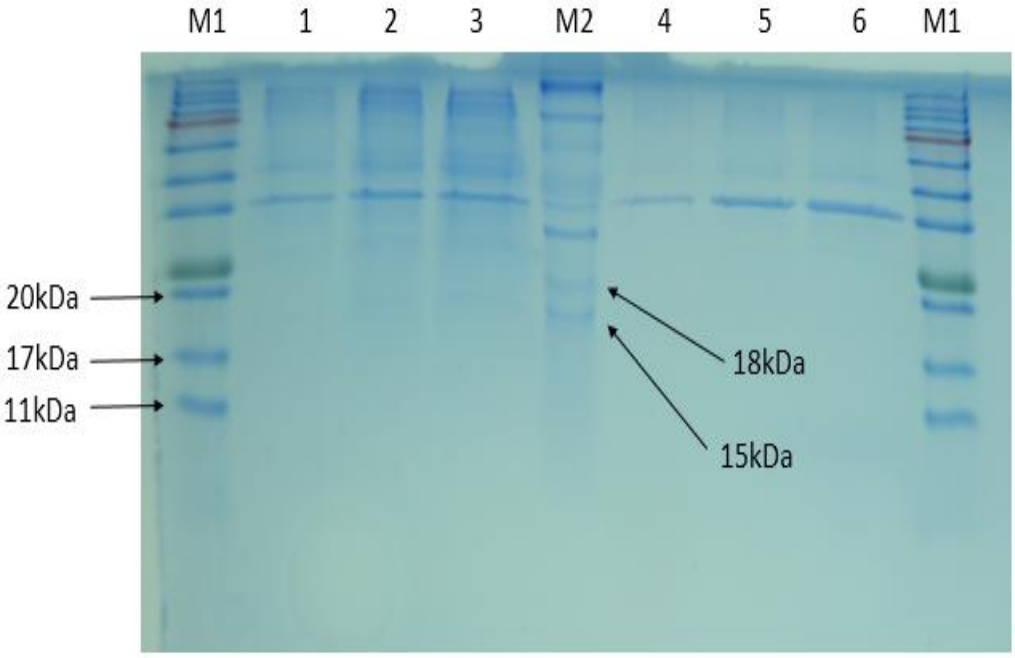

圖 21、C43 原菌與質體有無誘導之上清液與沉澱相 SDS-PAGE 圖。M1、2：Protein Marker，1：C43(DE3)原菌培養四小時之上清液、2：pET28a-0404 未加入 IPTG 誘導劑培養四小時之上清液，3：pET28a-0404 加入 IPTG 誘導劑培養四小時之上清液，4：C43(DE3)原菌培養四小時之沉澱相、5：pET28a-0404 未加入 IPTG 誘導劑培養四小時之沉澱相，6：pET28a-0404 加入 IPTG 誘導劑培養四小時之沉澱相。

4.7 Tricine-SDS-PAGE

聚丙烯酰胺凝膠電泳是分離蛋白質常用的方法，樣品的蛋白質分子經熱變性解聚後與SDS结合形成带負電的蛋白質複合物。複合物在

電泳中的遷移率取决於蛋白質的分子量大小，使用均勻濃度的SDS-PAGE來分析分子量在15~200 kDa的蛋白質時，電泳遷移率與分子量的對數成線性關係。但常規的Tris-Glycine-HCl系統中電泳分離分子量小於10 kDa的效果太差了(曹佐武， 2004)。

但是Tricine-SDS-PAGE的電泳分析系統可分離分子量在1~100 kDa的蛋白質。跟原本Tris-glycine-HCl系統中相比，使用不同濃度聚丙烯酰胺溶液，並且製成有三層不同濃度的凝膠如下圖22，並且將原本電泳緩衝溶液中的Glycine成份替換成Tricine。

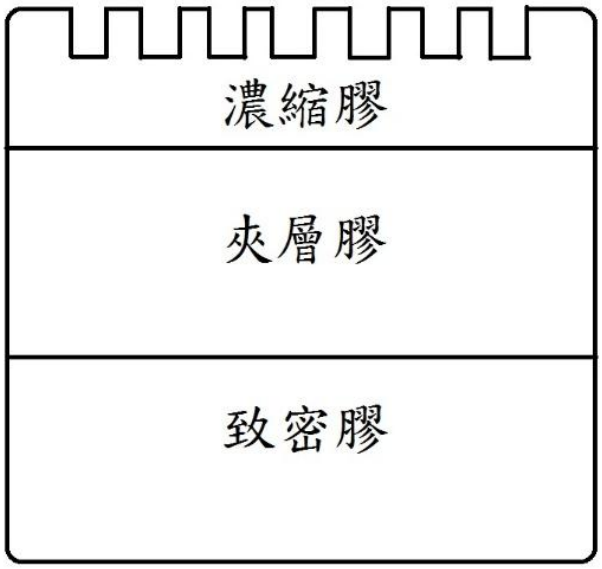

圖 22、Tricine-SDS-PAGE 電泳凝膠圖

Tricine-SDS-PAGE的凝膠由不同分子组成的丙烯醯胺和bis-丙烯醯胺混合液所聚合而成。其中濃縮縮膠由丙烯醯胺儲存液(3C)配成4%的丙烯醯胺溶液聚合而成，夾層膠由丙烯酰胺儲存液(3C)配成10%的丙烯醯胺溶液聚合而成，致密膠由丙烯醯胺儲存液(5C)配成16%的

丙烯醯胺溶液聚合而成。緩衝溶液配方如下。凝膠配方如下表15。

1. Tricine SDS running 緩衝液 10x：Tris 121.14 g、Tricine(179.17g、SDS 10 g 溶於 900 mL dd H2O，pH 調至 8.3，定溶至 1000 mL
2. 3X 凝膠緩衝液：Tris 181.5 g、SDS 1.5 g，溶於 400 mL dd H2O，用 1M 鹽酸調至 pH 8.45，定溶至 500 mL
3. 3C 丙烯醯胺儲存液：丙烯醯胺 48 g、bis-丙烯醯胺 1.5 g 溶於 100 mL 水中
4. 5C 丙烯醯胺儲存液：丙烯醯胺 47 g、bis-丙烯醯胺 2 g 溶於 100 mL 水中

表 15、Tricine-SDS-PAGE 凝膠配方

組成	濃縮膠	夾層膠	致密膠
3X 凝膠緩衝液	3 mL	7 mL	7 mL
3C 丙烯醯胺儲存液	0.625 mL	7 mL	--
5C 丙烯醯胺儲存液	--	--	7 mL
10% APS	60 μL	140 μL	70 μL
TEMED	6 μL	14 μL	7 μL
加水至	9 mL	21 mL	21 mL

步驟：

將0.75 mm厚度製膠板組裝在製膠台上，倒入去離子水至製膠板上緣處，並靜止5~10分鐘觀察製膠板是否有漏水的情況，如果有，重

新組裝製膠板，如果沒有，將製膠板裡面的水吸乾淨。取三個50 mL離心管分別來配置濃縮膠、夾層膠、致密膠溶液，依上表配方配製製膠步驟如SDS-PAGE方式相同。

等待凝膠完全凝固。拔開齒梳，將製膠模具從製膠台上取下放入電泳槽上，將電泳緩衝液倒至八分滿。將待測蛋白質15 μL和Protein loading buffer以3：1的比例加入在1 mL離心管中，並放置在95℃加熱器中加熱5分鐘。處理完成後在將樣品注入在凝膠的孔洞中。後序步驟如SDS-PAGE染色方式相同。

4.8 Tricine-SDS-PAGE 電泳分析 pET28a-0404

這次使用可以分離10 kDa以下的Tricine-SDS-PAGE體系的電泳來觀察我們的目標蛋白。這次誘導的目標蛋白考量到有包涵體的可能性，所以將誘導後的菌液經超音波破菌離心後的沉澱物，使用包涵體溶解液(1 M Tris-HCl，pH 8，1 mM PMSF，8 M Urea)使包涵體溶解出來後再次離心取出上清液的部分做電泳來觀察有無目標蛋白。本實驗將誘導後的菌液經破菌離心後的上清液；沉澱相經包涵體溶解液處理後離心的上清液以及沉澱相作Tricine-SDS-PAGE電泳分析，可是觀察到即使Protein marker的2 kDa的蛋白質標準品有顯現出來，可是目標蛋白3.6 kDa的大小並沒有跑出來。推測表達分子量太小的蛋白質再誘導時可能有降解的情形存在，所以尋找另一種方法來增加表達的成功

率。利用融合標籤與目標蛋白連接的表達方法來提高表達的成功率。

(一) pET28a-0404破菌上清液電泳分析

將加入IPTG於37℃誘導4小時的pET28a-0404和未加入IPTG誘導的pET28a-0404產物經超音破碎後離心的上清液進行分析如下圖，但並無觀察到目標蛋白。

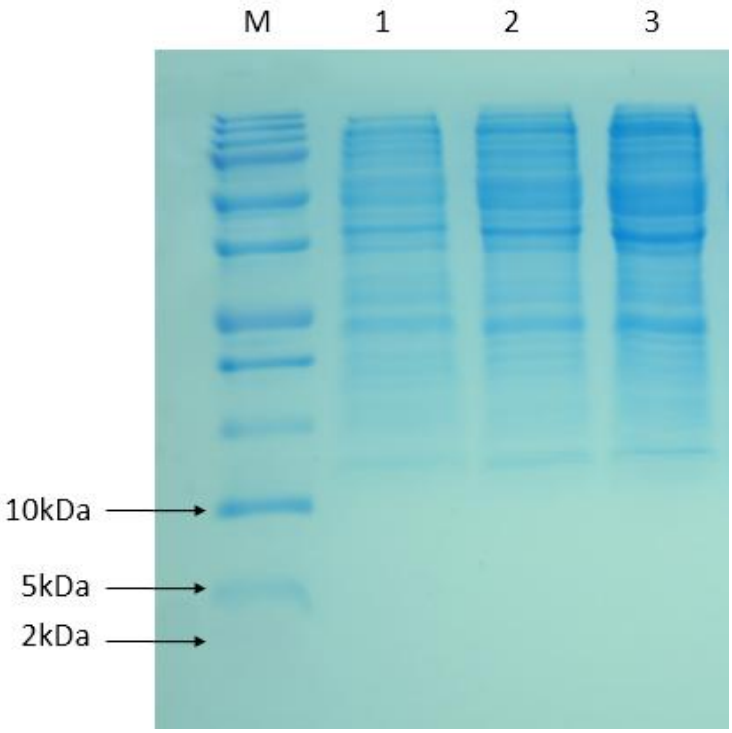

圖 23、pET28a-0404 破菌上清液電泳分析圖。M：Protein Marker，1：C43 上清液，2：未加入 IPTG 上清液，3：加入 IPTG 上清液

(二) pET28a-0404包涵體變性上清液電泳分析

將加入IPTG於37℃誘導4小時的pET28a-0404和未加入IPTG誘導的pET28a-0404產物經超音破碎後離心的沉澱相，經包涵體溶解液(1 M Tris-HCl，pH=8，1 mM PMSF，8 M Urea)重新懸浮菌塊，於冰

上反應一個小時後離心，取出上清液做電泳分析如下圖。但並無觀察到目標蛋白。

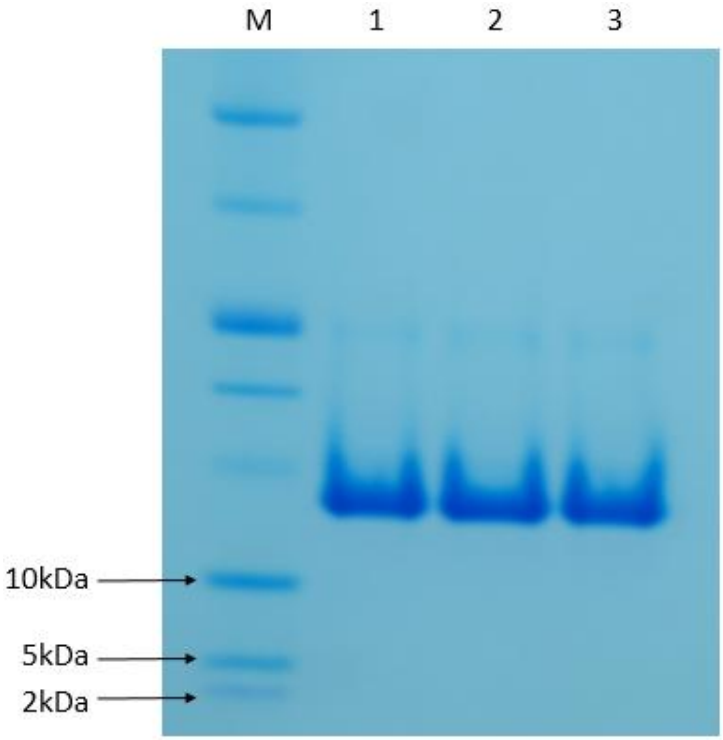

圖 24、pET28a-0404 包含體溶解液產物電泳分析圖。M：Protein Marker，1：C43 包涵體溶解液產物，2：未加入 IPTG 包涵體溶解液產物，3：加入 IPTG 包涵體溶解液產物

(三) pET28a-0404包涵體變性沉澱相電泳分析

將經包涵體溶解液重新懸浮菌塊，於冰上反應一個小時後離心，取出其沉澱相做電泳分析如下圖。也並無觀察到目標蛋白。

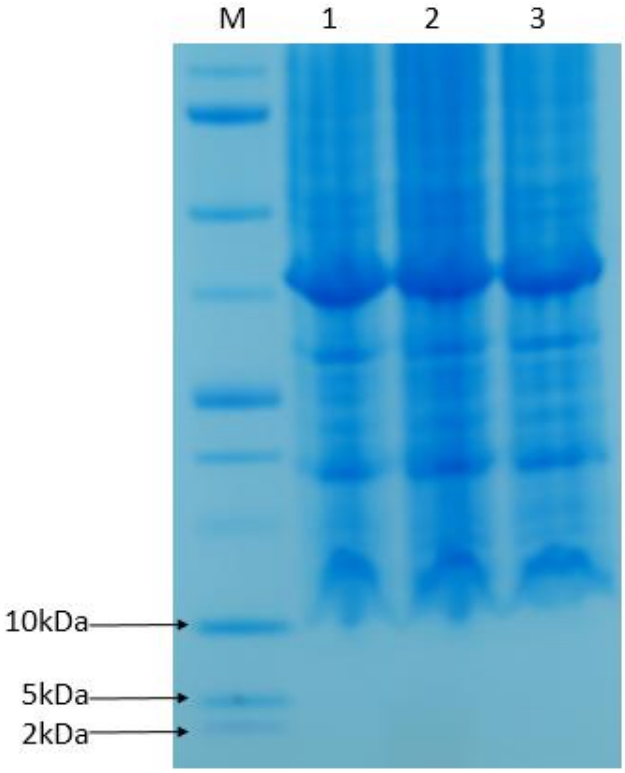

圖 25、pET28a-0404 包涵體溶解物沉澱相電泳分析圖。M：Protein Marker，1：C43 包涵體溶解物沉澱相，2：未加入 IPTG 包涵體溶解物沉澱相，3：加入 IPTG 包涵體溶解物沉澱相

4.9 pETite-SUMO-0404 質體 DNA 構建

透過一般連接6個His胺基酸標籤的蛋白質表達，推測可能無法表達出分子量較小的胜肽鏈，表達微小蛋白質可能遇到水解降解等問題(Jeffrey G. Marblestone et al, 2006)，所以我們尋找一個新方法，使用融合蛋白標籤的表達方法來提高表達小分子量蛋白的成功率。小泛素相關修飾蛋白 (Small ubiquitin-related modifier, SUMO)，融合在其他蛋白的N端可以協助蛋白摺疊且相似於保護目標蛋白的功能。且根據

文獻指出，SUMO 可提高蛋白表現量、避免目標蛋白被蛋白酶水解、增加目標蛋白的折疊和可溶性(Raymond J. Peroutka et al, 2008)。

我們尋找一個新的載體pETite N-His SUMO Kan Vector(本論文簡稱pETite-SUMO)，載體由Lucigen公司所購買。此載體上含有SUMO蛋白的DNA序列，可與目標DNA連接表達出融合蛋白。下圖為pETite N-His SUMO Kan Vector簡介，起始密碼子後接著6個His胺基酸和SUMO蛋白基因序列，非常適合用來表達MAP-04-04這種小胜肽鏈。

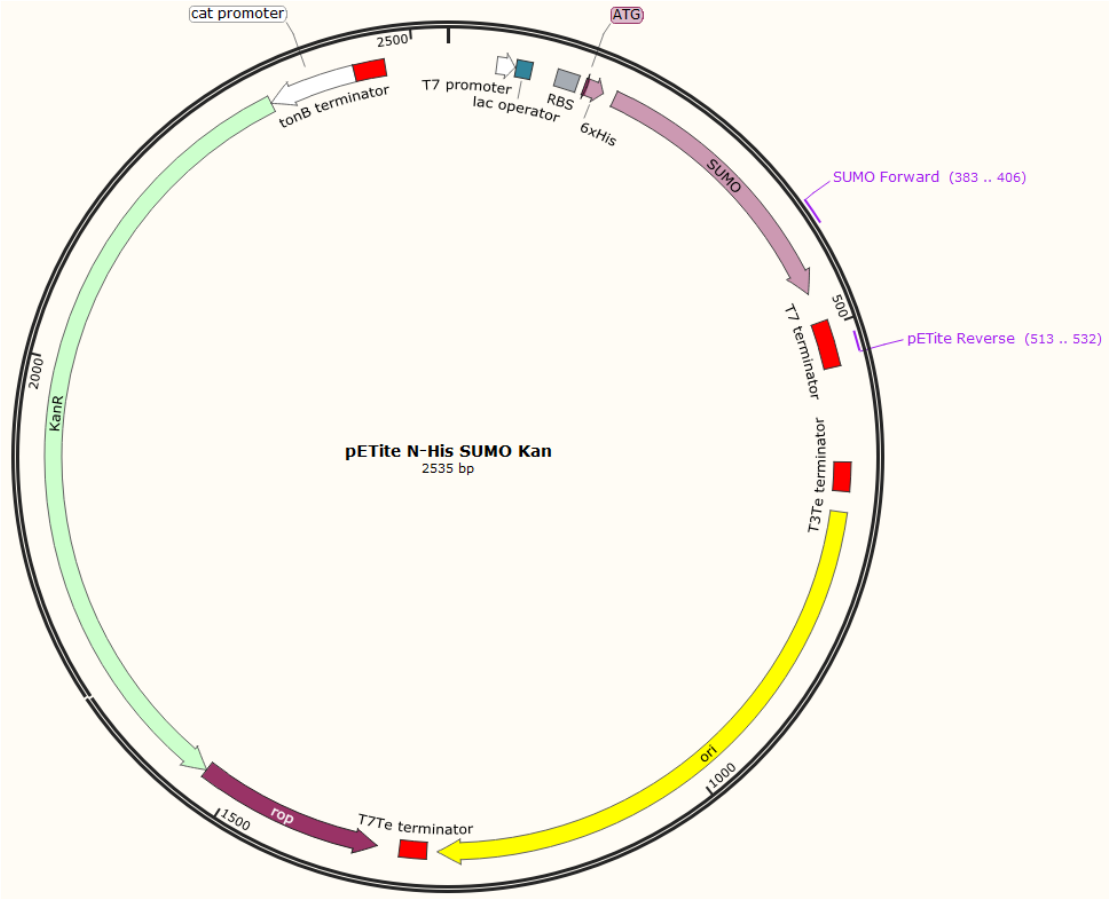

圖 26、pETite N-His SUMO Kan Vector 簡介

此載體與目標DNA片段之連接方式，使用無酶連接方式，不需要額外設計切割位點，也不需要連接酶來做連接。主要是透過目標DNA

片段前後額外各添加18個核甘酸與載體上缺口處兩端的各18個核甘酸序列相同，並且作為連接的識別序列，透過置換的方式將目標DNA片段自動連接到載體上。示意圖如下，紅色框部份為額外添加於頭尾的18個核甘酸，與載體末兩端序列相同。

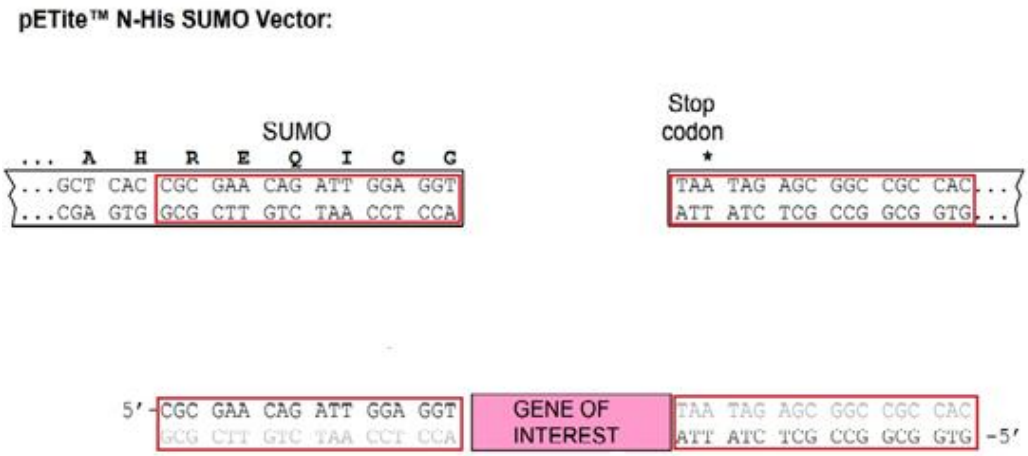

圖 27、目標 DNA 片段設計示意圖(Lucigen)

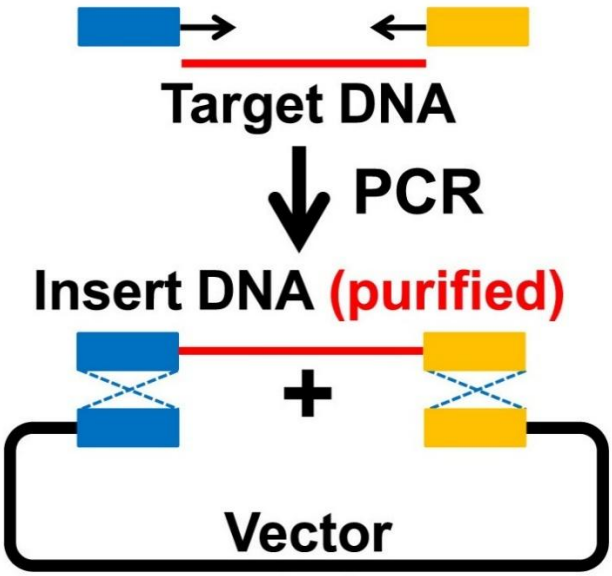

圖 28、無酶連接反應機制示意圖(Ken MotohashI, 2017)

本研究抗菌胜肽MAP-04-04(MKRLRRVWRRWR)，在此目標DNA片段頭尾各額外添加18個與載體缺口處兩端相同的核甘酸，並透過生工合成兩段互補的引子，序列圖如下圖，紅字為額外添加的核甘酸。

5′ CGC GAA CAG ATT GGA GGT AAA CGT CTG CGT CGT GTT TGG CGT CGT TGG CGT TAA TAG AGC GGC CGC CAC 3′
3′ GCG CTT GTC TAA CCT CCA TTT GCA GAC GCA GCA CAA ACC GCA GCA ACC GCA ATT ATC TCG CCG GCG GTG 5′

圖 29、目標 DNA 片段序列圖設計

將兩股引子回溶於 1x TE buffer，同樣將兩個引子溶液依照一定的比例加到 tube 混合均勻，放在 95℃的加熱器中加熱 3 分鐘，再將加熱器的溫度調到室溫，使整個降溫過程非常緩慢，以達到 DNA 片段自黏的目的。

透過電泳圖來觀察 DNA 片段是否有正確地自黏，並同時將正反向兩股引子各放在 95℃的加熱器中加熱 3 分鐘再回到室溫冷卻，來觀察這兩段引子是否各自會產生自黏現象。實驗結果如下，觀察到正反兩股引子不會各自產生自黏現象，而同時透過正反兩向引子互補的 DNA 片段也是符合預期 69 bp 的大小。

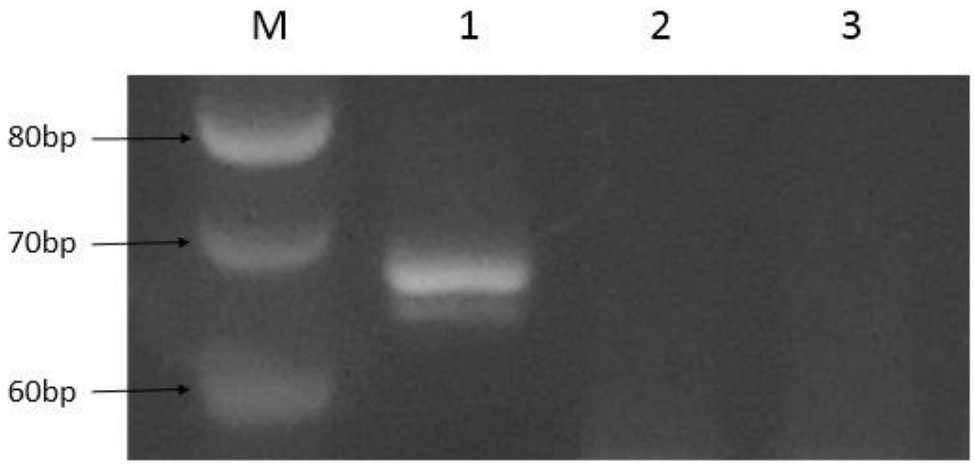

圖 30、引子自黏產物。M：10 bp marker，1：目標 DNA 自黏片段，2：正向引子，3：反向引子

將引子稀釋到 1 uL 含有 25-100 ng 的雙股 DNA 並取出 1 μL；載體取出 2 μL(25 ng)，分別加入到 HI-Control 10G Cells 勝任細胞中(Lucigen)冰浴 30 分鐘，後續步驟同質體轉形實驗步驟。此連接反應在勝任細胞中冰浴時完成。

4.10 pETite-SUMO-04-04 質體 PCR 產物確認

轉形完成後，挑選幾顆菌落進行 PCR 確認，在 pETite-SUMO 載體上兩股正反向的引子可提供 PCR 確認的引子序列，引子序列圖如下。

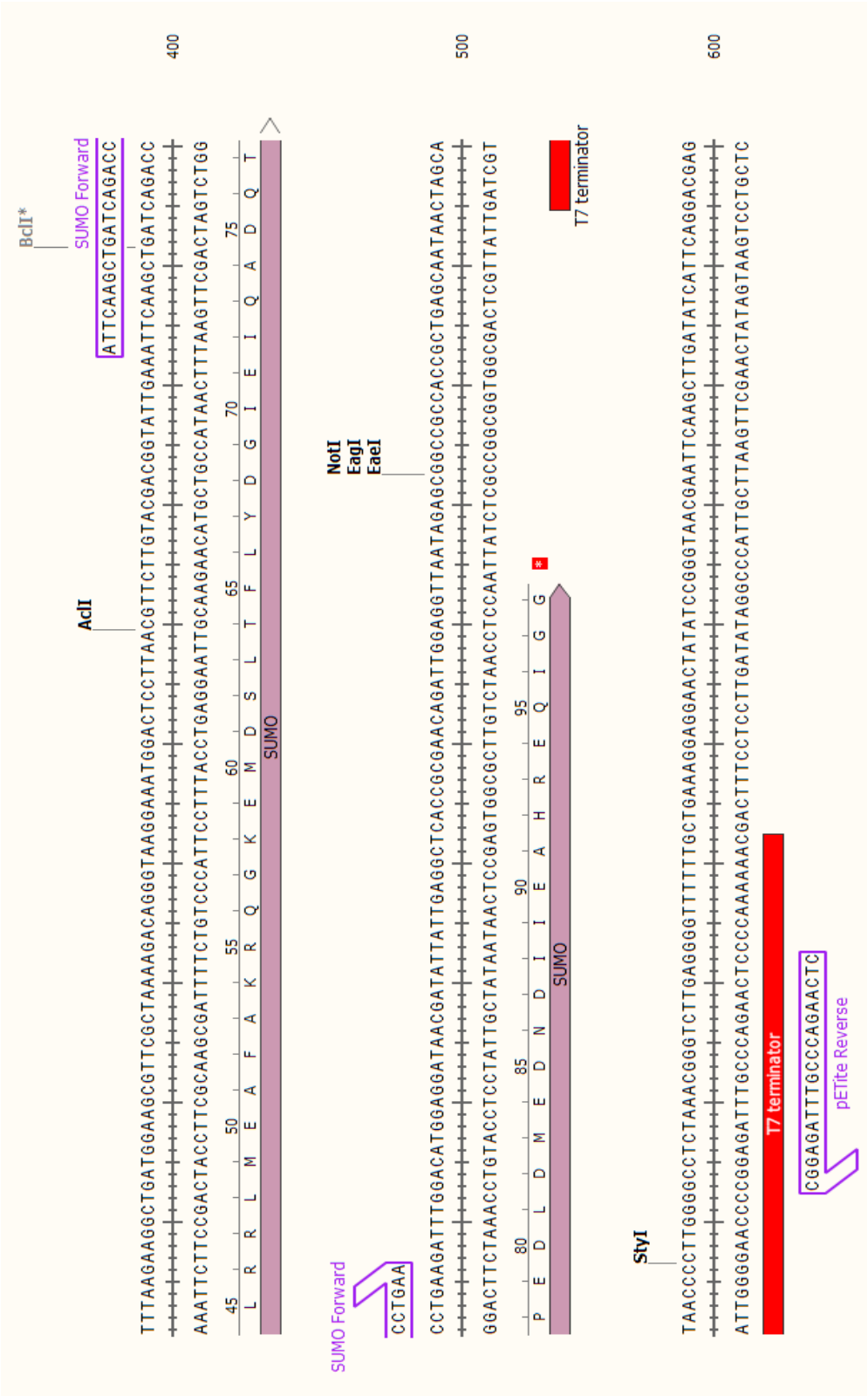

圖 31、pETite-SUMO 載體引子序列圖

pETite-SUMO 含有目標基因片段 MAP-04-04 的 PCR 產物大小為 183 bp，未含有目標基因片段的空載體 PCR 產物大小為 150 bp，透過電泳圖可以觀察到挑選的三個菌落都符合預期大小的 183 bp。並且與未插入目標片段的空載體 PCR 產物去做比較。

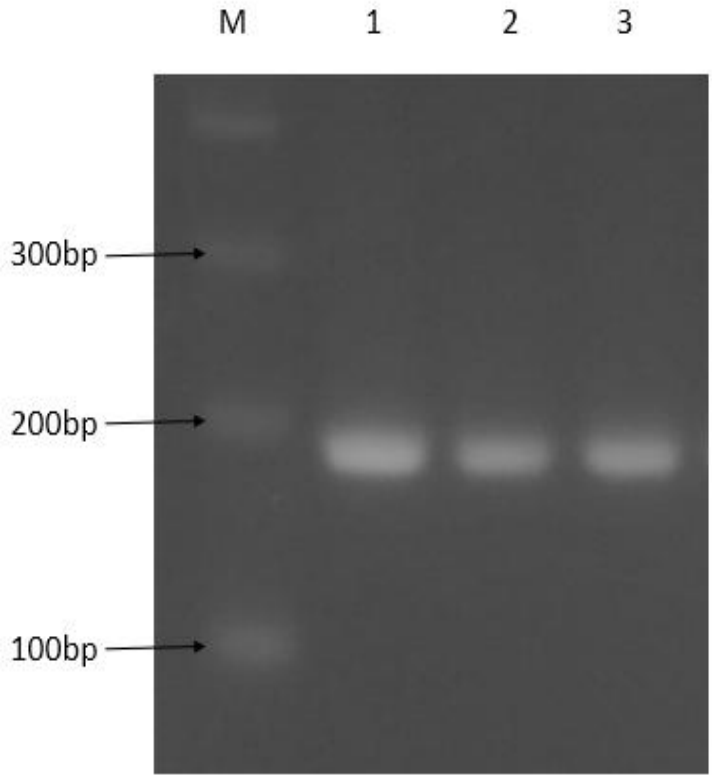

圖 32、pETite-SUMO-0404 菌落 PCR 產物。M：100 bp DNA marker，1：菌落 1 PCR 確認，2：菌落 2 PCR 確認，3：菌落 3 PCR 確認。

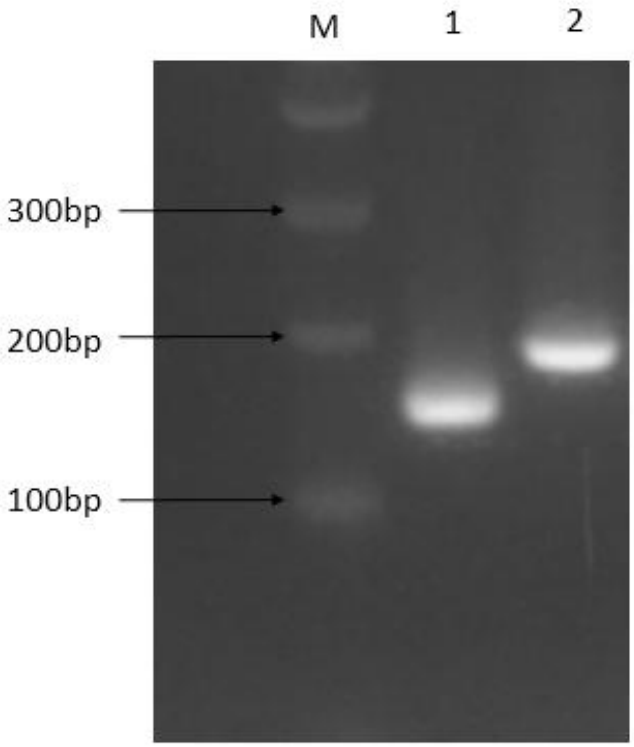

圖 33、有插入目標片段與未插入目標片段的質體的 PCR 產物。

M：100 bp DNA marker，1：pETite-SUMO PCR 確認，2：pETite-SUMO-0404 PCR 確認

4.11 pETite-SUMO-0404 質體定序確認

將質體從 HI-Control 10G Cells 勝任細胞中萃取出來，轉型進入 C43(DE3)表達菌株中，再次萃取出質體並且委託明欣生物科技公司來進行定序的工作，定序結果如下圖 34。

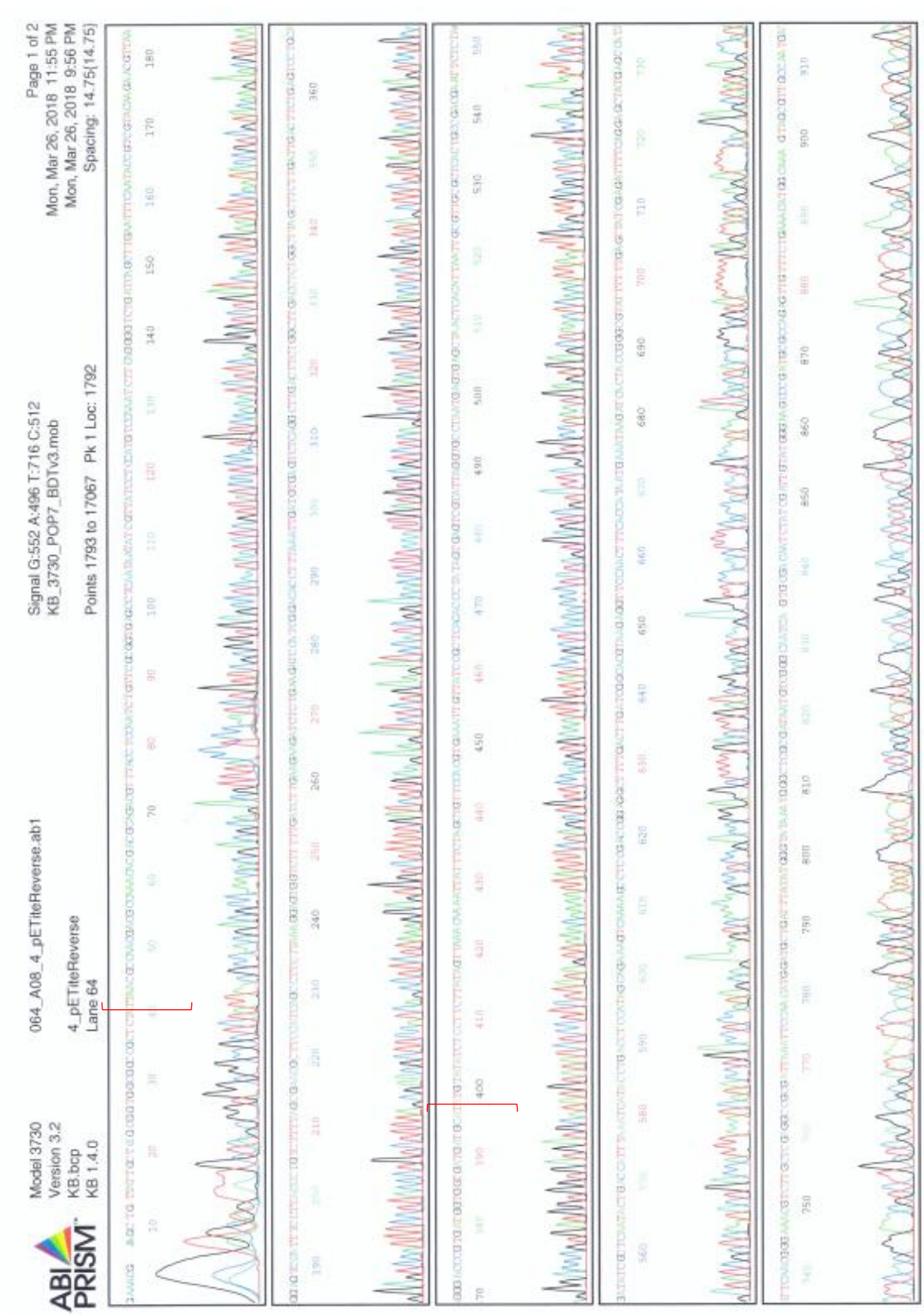

圖 34、pETite-SUMO-0404 定序(41~397，終止密碼子至起使密碼子 ，紅色括號範圍)

4.12 C43(DE3)誘導表現

當菌液培養 1.5~2.5 小時至 OD 值 0.6~0.8 間時，於第 0 小時開始加入誘導劑 IPTG 至最終濃度 1 mM 跟沒加 IPTG 來做比較，如圖，發現有加入 IPTG 的菌生長速度比較緩慢，推估在加入誘導劑表達蛋白質時，也會影響到 C43(DE3)的生長情形。

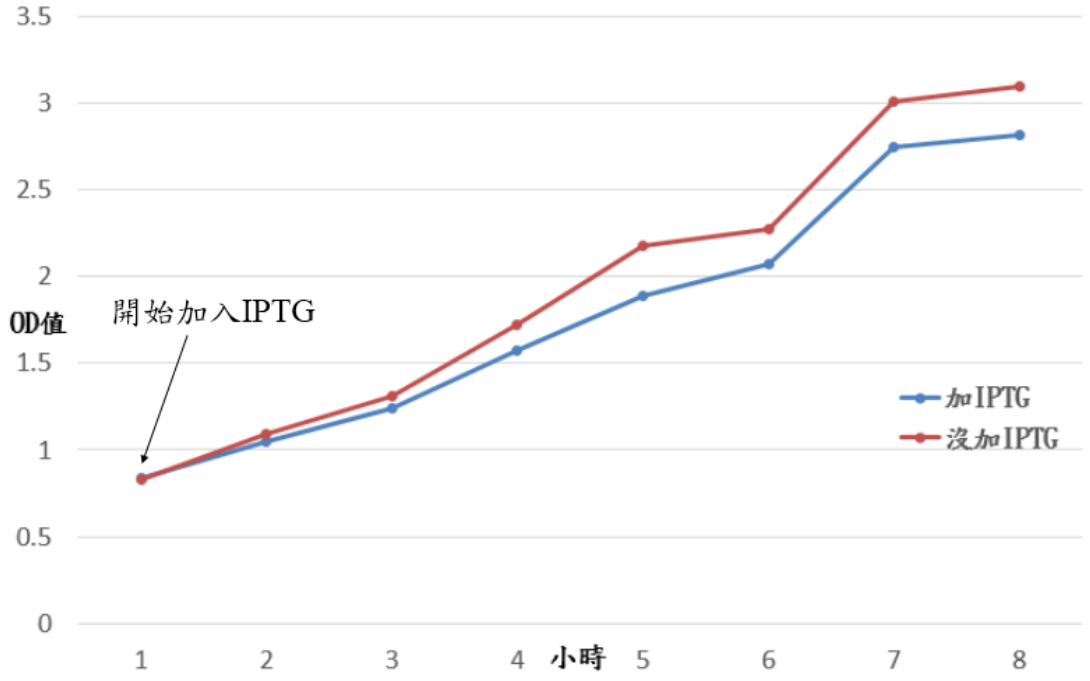

圖 35、C43 誘導曲線圖

4.13 Tricine-SDS-PAGE 電泳分析 pETite-SUMO-0404

將加入IPTG於37℃誘導4小時的pETite-SUMO-0404和未加入IPTG誘導的pETite-SUMO-0404產物經超音破碎後離心分離上清液與沉澱相，並將沉澱相加入包涵體溶解液(1 M Tris-HCl，pH=8，1 mM

PMSF，8 M Urea)重新懸浮菌塊，於冰上反應一個小時後離心，取出包涵體產物和最終沉澱相，可以觀察到有加入IPTG誘導劑的菌液，在上清液、包涵體產物和最終沉澱相均有目標蛋白(6His-SUMO-0404)約在15 kDa的位置出現，符合實驗預期目標蛋白13.85 kDa的大小。

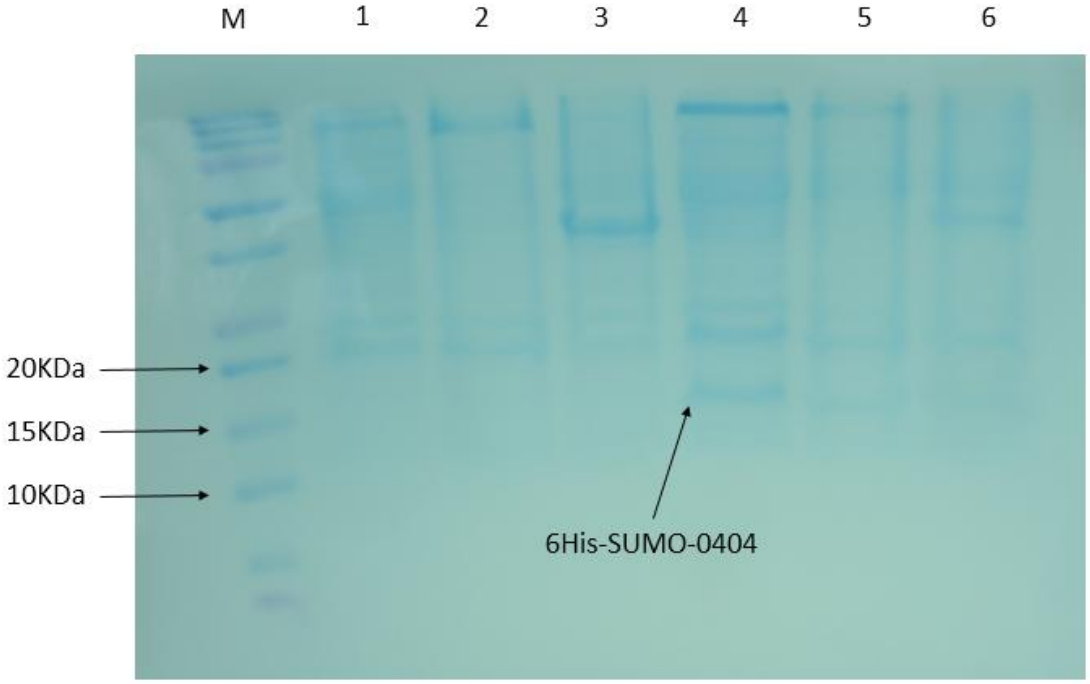

圖 36、pETite-SUMO-0404 蛋白質表達電泳分析圖。M：Protein Marker，1：未加入 IPTG 之破菌上清液，2：未加入 IPTG 之包涵體產物，3：未加入 IPTG 之最終沉澱相，4：加入 IPTG 之破菌上清液，5 加入 IPTG 之包涵體產物，6：加入 IPTG 之最終沉澱相。

根據電泳圖的分析，目標蛋白在可溶性蛋白所存在的上清液中含量較多，所以將上清液把目標蛋白透過 FPLC 分離出來，再次透過電泳圖來進行觀察。在 FPLC 所使用到的 Binding buffer 中，考慮到可

用 Urea 使目標蛋白中的 6 個 His 胺基酸完全的暴露出來，避免有其他的蛋白包覆住 6 個 His 胺基酸上。所以從 Binding buffer 中添加不同濃度 Urea 去做 FPLC 的純化分離並透過電泳圖來觀察。如下圖 36 所示。可以觀察到在 Binding buffer 在無添加 Urea 的情況下，透過管柱所純化出來的產物有其他條帶產生，推測有其他蛋白纏繞在目標蛋白 6 個 His 胺基酸上，但是有添加 1M 至 7M 的 Urea 所分離純化出來的產物只有目標蛋白產生。

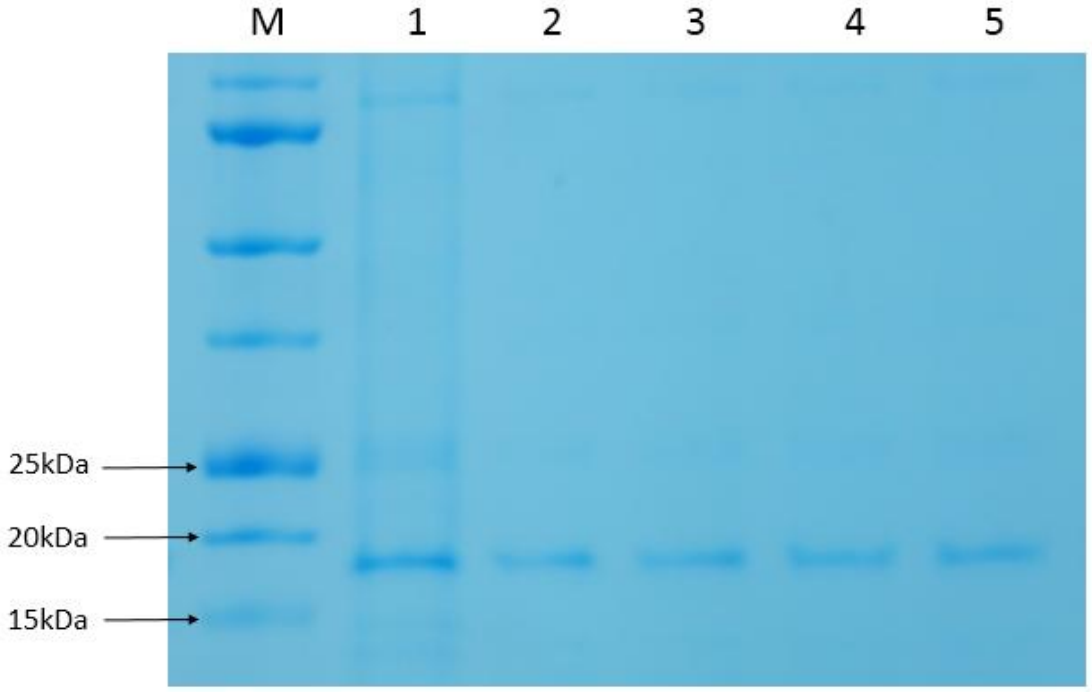

圖 37、FPLC 純化產物電泳分析圖。M: Protein Marker，1：無添加 Urea，2：1 M Urea，2：2 M Urea，3：4 M Urea，4：7 M Urea。

並且透過 FPCL 去純化出有加入 IPTG 及未加入 IPTG 之上清液，觀察到有加入 IPTG 經 FPLC 純化之目標蛋白相較於破菌上清液中的目標蛋白有 3~4 kDa 的遷移，約在 17~18 kDa 的位置，而未加入 IPTG

透過 FPCL 並沒有目標蛋白產生。根據文獻指出，一個 SUMO 蛋白質分子量為 11.5 kDa，會在聚丙烯醯胺電泳凝膠上會有至 20 kDa 的遷移率(Jeffrey G. Marblestone et al, 2006)，根據此文獻的探討符合本實驗結果所純化之目標蛋白在聚丙烯醯胺電泳凝膠具有 3~4 kDa 的遷移，推測是 SUMO 的三級結構造成電泳時條帶產生些微的遷移。如下圖 38 所示。

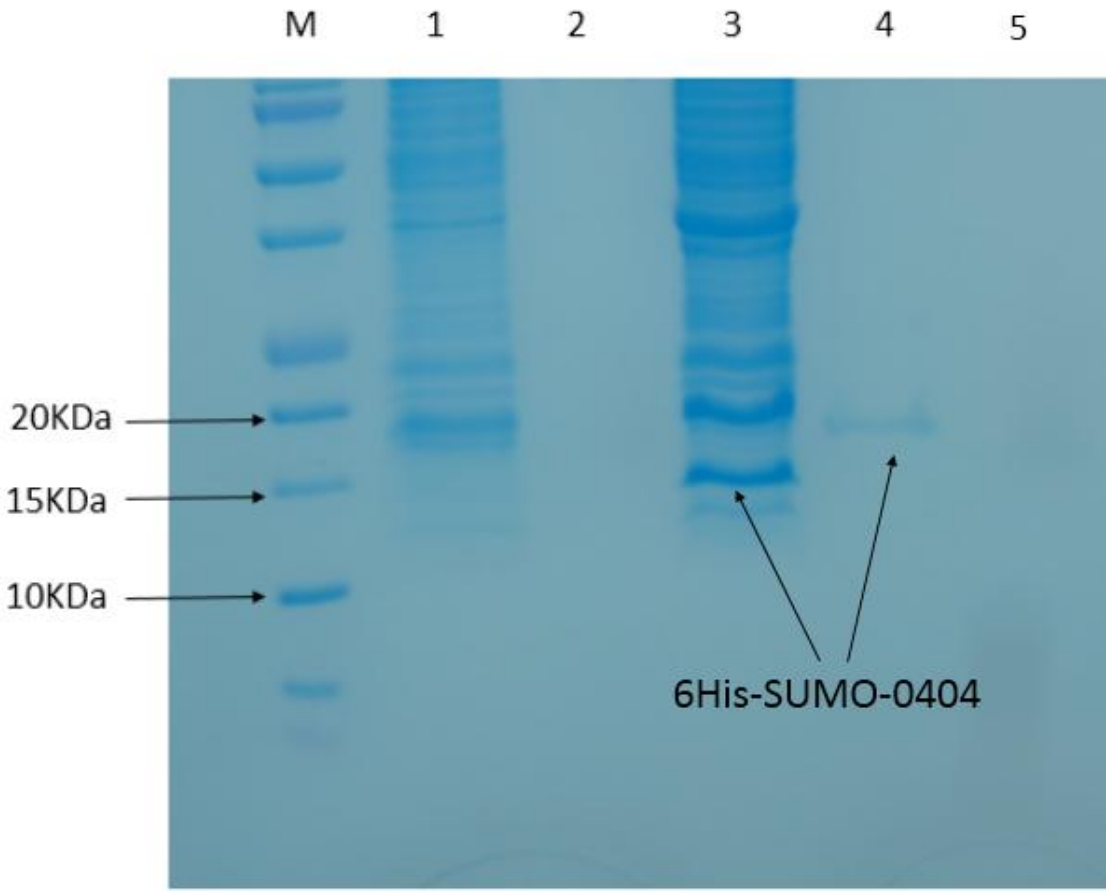

圖 38、pETite-SUMO-0404 蛋白質表達及 FPLC 純化電泳分析圖。M：Protein Marker，1：未加入 IPTG 之破菌上清液，2：未加入 IPTG 上清液之 FPLC 產物，3：加入 IPTG 之破菌上清液，4：加入 IPTG 上清液之 FPLC 產物，5：加入 IPTG 包涵體產物之 FPLC 產物

4.14 6His-SUMO-0404 蛋白質含量測定

將表達破菌完之上清液之產物 2 mL，以及該產物透過 FPLC 純化分離出來的 6His-SUMO-0404 蛋白 2 mL 透過 BCA 蛋白質含量檢測法來檢測出蛋白含量結果如下。

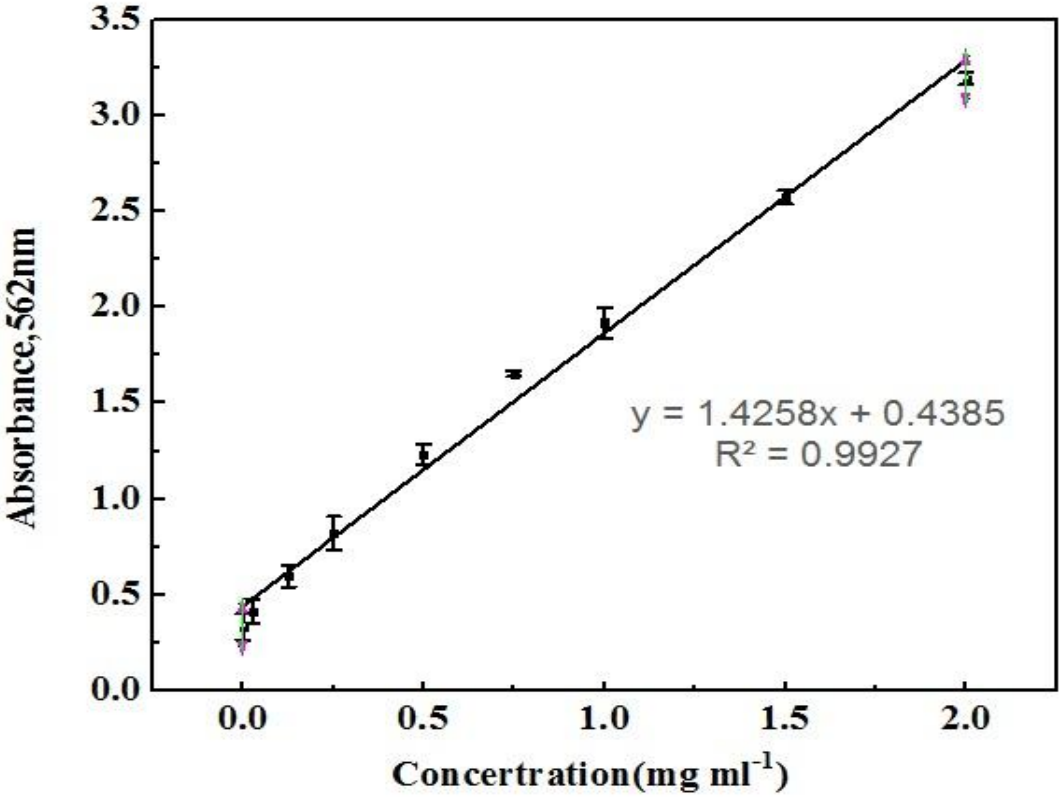

圖 39、蛋白質含量測定之檢量線

表 16、蛋白質產物蛋白質含量測定

產物	吸收度	濃度(μg/mL)
表達破菌上清液	4.535	2873
6His-SUMO-0404	0.474	25

由上表得知，6His-SUMO-0404 佔表達完之可溶性蛋白總含量約 0.8%。

4.15 6His-SUMO-0404 蛋白質分子量測定

因為 FPLC 純化分離的目標蛋白 6His-SUMO-0404，在電泳圖上有 3~4 kDa 的遷移率，很難正確去判斷該蛋白是不是目標產物 13.85 kDa 的大小，所以將產物委託明欣生物科技公司使用基質雷射輔助脫附游離飛行時間質譜儀(Martrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS)鑑定出該產物之分子量，結果如下。

【TOF MS of 6HIS-SUMO-0404】

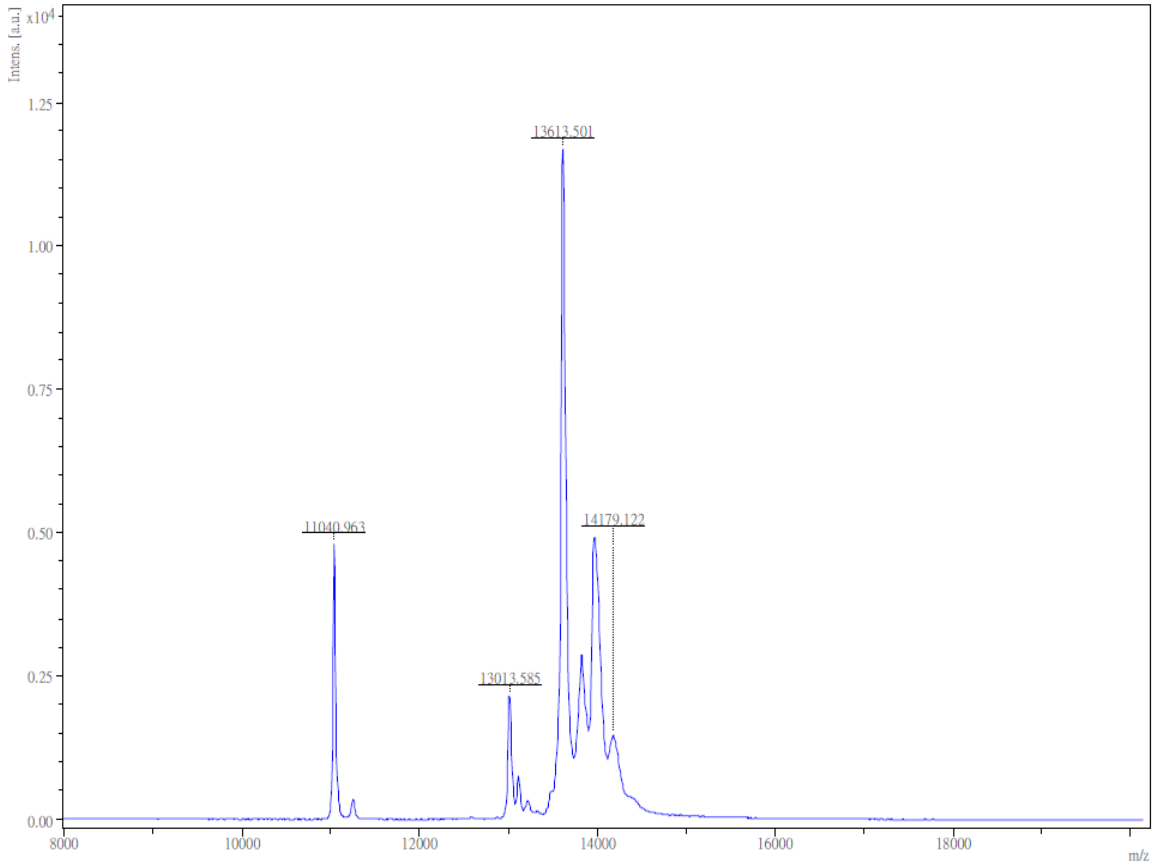

圖 40、蛋白質分子量質譜圖

該檢測結果顯示，在 8000 m/z 到 20000 m/z 的掃描區間，最高訊號的基準峰在 13613 m/z 的位置，非常接近目標蛋白 13.85 kDa 的大小。

4.16 蛋白酶切割電泳分析

將 6His-SUMO-0404 蛋白使用脫鹽管柱把原高濃度的鹽份(500 mM)去除，並將該產物額外添加 Tris-HCl、DTT、甘油、Triton X-100，使該產物環境類似於蛋白酶的切割環境，並且添加足夠的 Ulp 1 蛋白酶，分別於 30℃ 以及 4℃ 反應再透過電泳來進行觀察，結果如下圖。

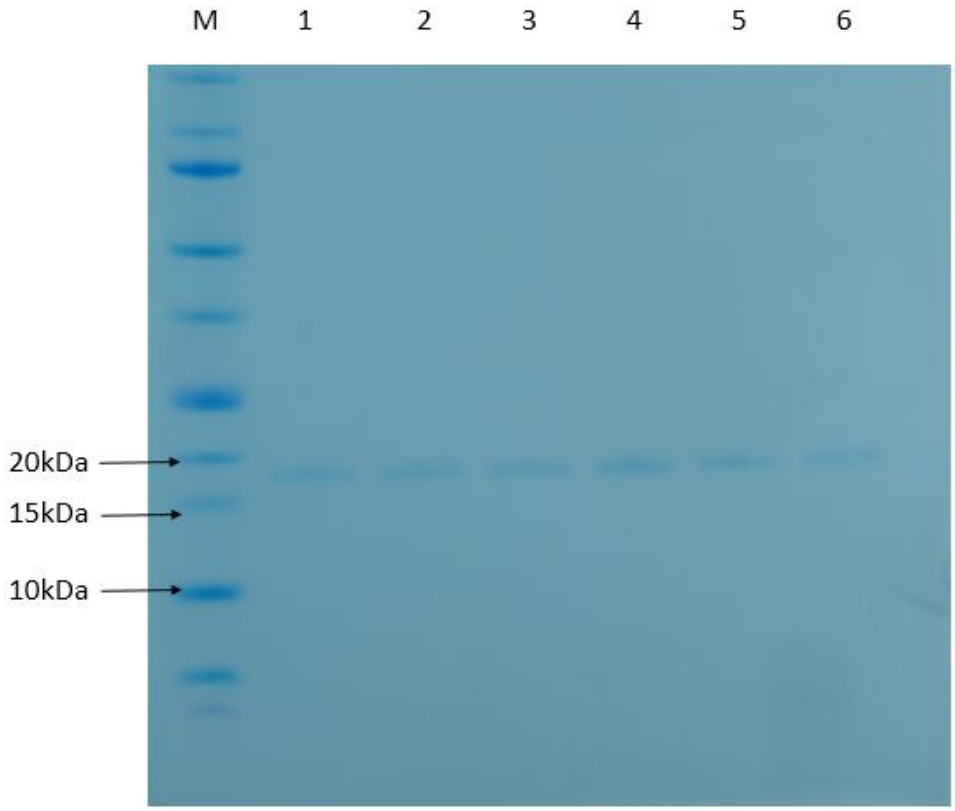

圖 41、6His-SUMO-0404 蛋白酶裂解反應電泳圖

M：Protein Marker，1：6His-SUMO-0404 脫鹽產物，2：30℃ 反應 1

小時，3：30℃ 反應 2 小時，4：30℃ 反應 4 小時，5：30℃ 反應 8 小時，6：4℃ 反應過夜。

透過電泳圖觀察到在 30℃ 反應 1~8 小時和 4℃ 反應過夜的蛋白質裂解效率並沒有顯現出來，首先考慮的是蛋白酶的活性。為了驗證蛋白酶的活性則使用對照蛋白來做檢測。對照蛋白的分子量為 40 kDa，該對照蛋白經 Ulp 1 蛋白酶反應可以裂解成 25 kDa 和 15 kDa 的蛋白。驗證方法則使用 Ulp 1 蛋白酶於 30℃ 反應 30 分鐘進行對照蛋白的裂解反應，結果如下圖 42。

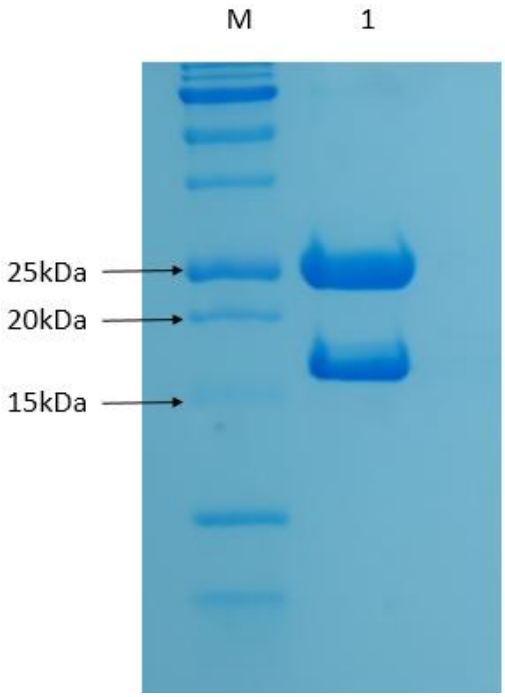

圖 42、蛋白酶活性測試，M：Protein Marker，1：對照蛋白

依據蛋白酶活性檢測蛋白酶具有活性，此時必須考量到別種可能性會影響到 6His-SUMO-0404 蛋白酶裂解效率。根據文獻指出，緊鄰 SUMO 蛋白 C 端的第一個胺基酸為脯胺酸(Proline)時，蛋白酶無法反

應裂解(Michael P. Malakhov et al, 2004)。另外根據蛋白酶販售公司 Lucigen 說明，在 SUMO 蛋白 C 端第一個胺基酸如下列所示：異亮胺酸(Isoleucine)、亮胺酸(Leucine)、纈氨酸(Valine)、天冬胺酸(Aspartate)、穀胺酸(Glutamate)、離胺酸(Lysine)，將會影響蛋白酶的裂解效率，而本研究的抗菌胜肽第一個胺基酸序列正為離胺酸(Lysine)，所以透過溫度的改變以及蛋白酶的添加量來使蛋白酶能夠反應完全。如下圖 43 所示，即使改變溫度、反應時間以及蛋白酶的添加量也無法從電泳圖觀察到目標蛋白被蛋白酶裂解的表現。

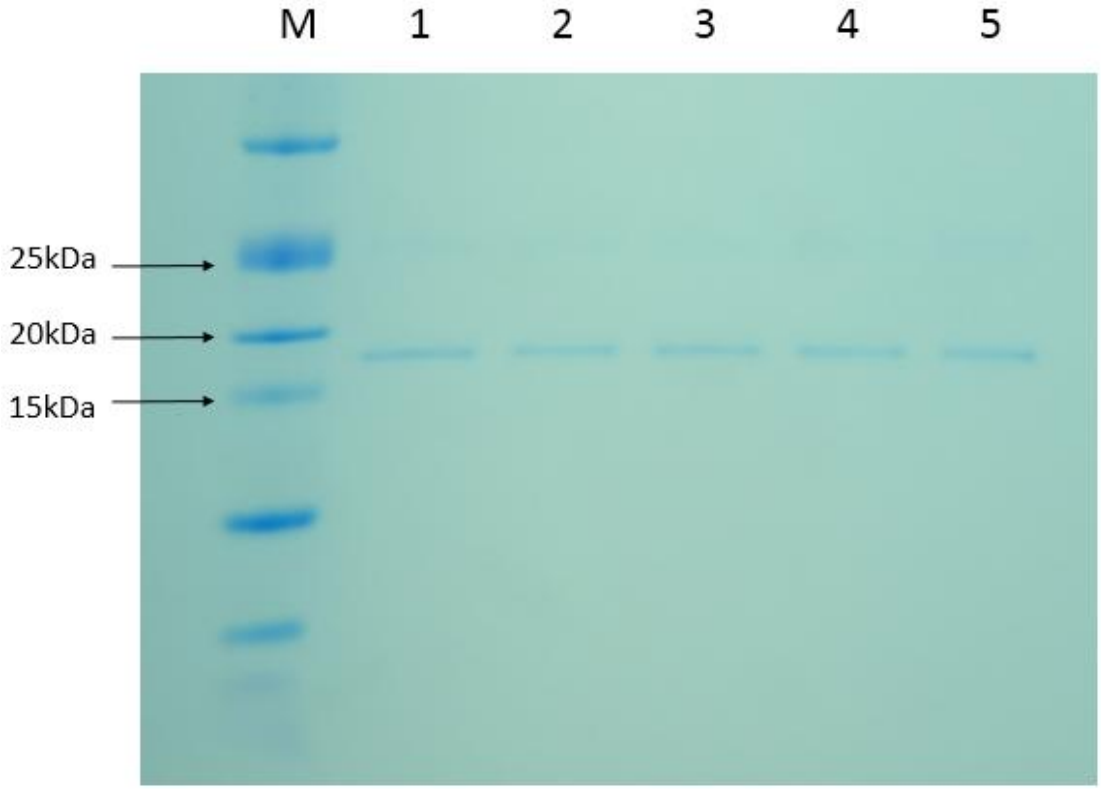

圖 43、6His-SUMO-0404 蛋白酶裂解反應電泳圖。M：Protein Marker，1：6His-SUMO-0404 脫鹽產物，2：30℃ 反應 8 小時，3：37℃ 反應 8 小時，4：30℃ 反應 8 小時、添加 2 倍蛋白酶，5：37℃ 反應 8 小

時、添加 2 倍蛋白酶

考慮到是不是有部份目標蛋白有被蛋白酶裂解成功，只是透過考馬士亮藍染色法無法被觀察出來，所以透過硝酸銀染色法來偵測低含量的蛋白是否有存在於聚丙烯醯胺凝膠當中。硝酸銀染色法是一種靈敏度非常高的蛋白質染色法，其靈敏度比考馬士亮藍染色法還要高。蛋白質分子上的酸基(COO^-)會與銀銨錯離子結合，而銀離子在酸性環境中會被還原成金屬銀，可讓聚丙烯醯胺凝膠上呈現深棕色條帶。

步驟：

將考馬士亮藍染色完的聚丙烯醯胺凝膠反覆浸泡在 50%甲醇水溶液以及 dd H_2O 各 1 小時共 2 次，將凝膠浸泡在 0.02%硫代硫酸鈉溶液中 1 分鐘取出後浸泡在 dd H_2O 清洗 1 分鐘。將凝膠浸泡在 0.1%硝酸銀水溶液中於 4℃ 下低速搖晃 70 rpm 20 分鐘取出後浸泡在 dd H_2O 清洗 1 分鐘。將凝膠浸泡在含 3%碳酸鈉、0.05%甲醛(37%)的水溶液中手動搖晃 3 至 5 分鐘後取出膠片，浸泡在 5%的冰醋酸當中手動搖晃直到凝膠上明顯出現深棕色條帶。

將圖 43 的聚丙烯醯胺凝膠透過硝酸銀染色法來觀察目標蛋白是否經蛋白酶有部份裂解反應，如下圖 44 所示，經過硝酸銀染色法結果得知，依然沒有任何的裂解反應存在。

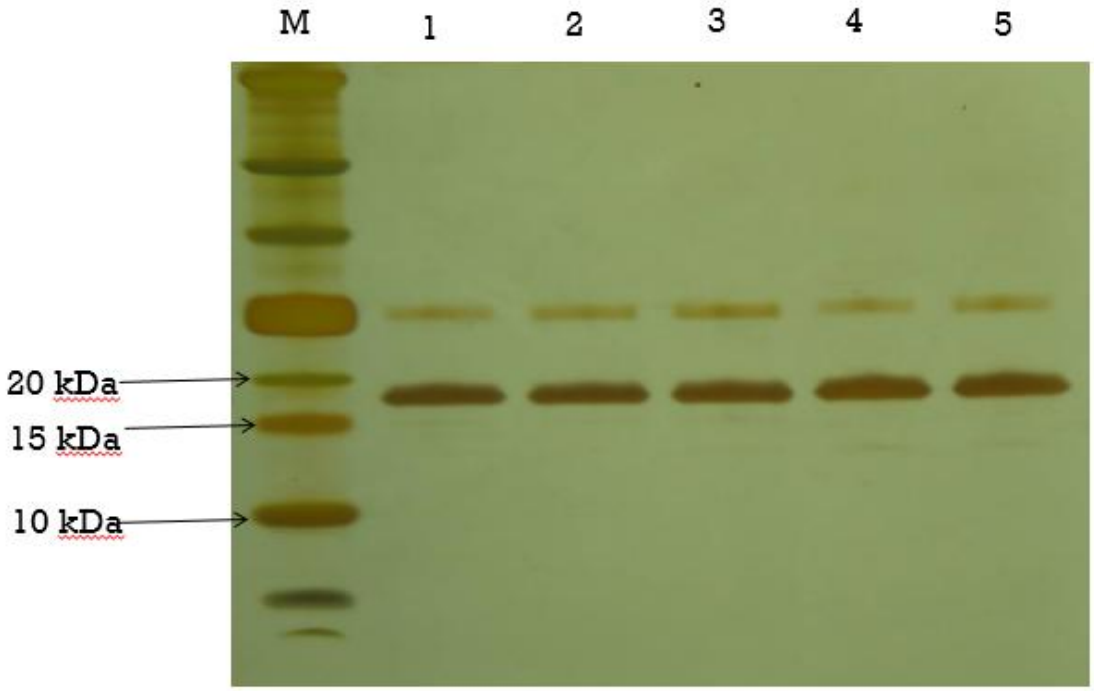

圖 44、6His-SUMO-0404 蛋白酶裂解反應電泳圖(硝酸銀染色法)。M：Protein Marker，1：6His-SUMO-0404 脫鹽產物，2：30℃ 反應 8 小時，3：37℃ 反應 8 小時，4：30℃ 反應 8 小時、添加 2 倍蛋白酶，5：37℃ 反應 8 小時、添加 2 倍蛋白酶

第五章 結論

5.1 結論

從 SDS-PAGE 得知，要表達像這種分子量非常小(1.6 kDa)的抗菌胜肽 MAP-04-04，在基因序列設計時加入小泛素相關修飾蛋白 (Small ubiquitin-related modifier, SUMO)的基因序列，在表達目標蛋白時以融合蛋白的方式顯現，可以增加表達目標蛋白的成功率。

而且多篇研究期刊表示出，蛋白質在進行表達時，容易形成包涵體存在於不可溶性蛋白裡，添加 SUMO 而且可以提高可溶性蛋白的產生。而且從 SDS-PAGE 可以得知，目標蛋白存在於可溶性蛋白的含量高於不可溶性蛋白。使用包涵體溶解液溶解不可溶性蛋白雖然同時可以觀察到目標蛋白 6His-SUMO-0404 的產生，但是將包涵體溶解液產物進行 FPLC 分離出目標蛋白時，從 SDS-PAGE 和蛋白質含量測定根本沒有目標蛋白的出現，量可說是寥寥無幾。

從蛋白質含量測定中可以推估目標蛋白 6His-SUMO-0404 的產量，將加入 IPTG 誘導劑誘導 4 小時表達完成的菌液 10 mL，平均可以產生出 25 μg 的目標蛋白 6His-SUMO-0404。

在使用蛋白酶 Ulp 1 裂解目標蛋白 6His-SUMO-0404 以釋出 MAP-04-04 抗菌胜肽的活性時，從 SDS-PAGE 並無觀察到目標蛋白

有任何裂解的反應存在。蛋白酶裂解反應在改變反應溫度、時間以及蛋白酶的使用量無法成功後，思考 MAP-04-04 這 11 個胺基酸的胜肽是否埋沒在 SUMO 這個三級結構的蛋白中，是否可以使用變性劑如 Urea 或是 Guanidine-HCl 使 MAP-04-04 完整地暴露出來以便蛋白酶裂解反應完全。另外也可以思考是否改變胺基酸序列，更改與 SUMO 蛋白 C 端相連接的第一個胺基酸序列，避免設計使用到不利於蛋白酶裂解的胺基酸。

5.2 未來展望

雖然現在陸續有許多抗菌胜肽被研究人員發現或是製造出來，而且根據實驗以及數據都可佐證具有該功能，但是製備出抗菌胜肽的量幾乎都僅限於實驗室小規模的生成。如果要投射大工廠進行大規模的生產，此時我們在實驗室時所使用的高單價藥品例如異丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、蛋白酶酵素等，就不是大規模生產所期望使用的藥品，可能就要探討同時具有這些高單價藥品的功能且成本較低的藥品。

第六章 參考文獻

Atsushi Hirano, Takuya Maruyama, Kentaro Shiraki, Tsutomu Arakawa,Tomoshi Kameda, 2017, A study of the small-molecule system used to investigate the effect of arginine on antibody elution in hydrophobic charge-induction chromatography, Protein Expression and Purification, 129, 44-52

Andersons D., Engstrom A., Josephson S., Hansson L., Steiner H., 1991, Biologically active and amidated cecropin produced in a baculovirus expression system from a fusion construct containing the antibody binding part of protein , A.Biochem. J., 280, 219-224

Andersson, D. I., Hughes, D., Kubicek-Sutherland, J. Z., 2016, Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides, Drug Resistance Updates, 26, 43-57

Andersson L., Blomberg L., Flegel M., Lepsa L., Nilsson B., Verlander M., 2000, Large-scale synthesis of peptides, Biopolymers, 55(3), 227-250

Andres E., Dimarcq J. L., 2004, Cationic antimicrobial peptides: update of clinical development, J. Intern. Med., 255(4), 519-20

Andreu D., Rivas L., 1998, Animal antimicrobial peptides, An overview peptides scinence, 47(6), 415-433

Andrushchenko, Valery V., Aarabi, Mohammed H., Nguyen, Leonard T., Prenner, Elmar J., Vogel, Hans J., 2008, Thermodynamics of the interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model and natural membranes, BBA-Biomembranes, 1778(4), 1004-1014

B. Bommarius, H. Jenssen, M. Elliott, J. Kindrachuk, Mukesh Pasupuleti, H. Gieren, K.E. Jaeger, R.E.W. Hancock, D. Kalman, 2010, Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in Escherichia coli,Peptides, 31, 1957–1965

Boman H.G., Wade D., 1989, Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropinmelittin hybrids, FEBS Letters, 259(1), 103-106

Dennis Kuo, Minghua Nie, Peter De Hoff, Michael Chambers, Martin Phillips, Ann M. Hirsch, Albert J. Courey, 2011, A SUMO–Groucho Q domain fusion protein: Characterization and in vivo Ulp1-mediated cleavage, Protein Expression and Purification, 76, 65–71

D.I. Andersson, D. Hughes, J. Z. Kubicek-Sutherland, 2016, Drug Resistance Updates, 26, 43–57

Di Luca, M., Maccari, G., Nifosi, R., 2014, Treatment of microbial biofilms in the post-antibiotic era:prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools, Pathogens and Disease, 70(3), 257-70

Dinesh K. Yadav, Neelam Yadav, Sarika Yadav, Shafiul Haque, Narendra Tuteja, 2016, An insight into fusion technology aiding efficient recombinant protein production for functional proteomics, Archives of Biochemistry and Biophysics, 612, 57-77

Dominic Esposito, Deb K Chatterjee, 2006, Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags, Current Opinion in Biotechnology, 17, 353–358

Fernandez DI, Le Brun AP, Whitwell TC, 2012, The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membranes via the carpet Mechanism, Phys Chem Chem Phys, 14(45), 15739-15751

Fernando Guerrero, Annika Ciragan, Hideo Iwaï, 2015, Tandem SUMO fusion vectors for improving soluble protein expression and purification, Protein Expression and Purification, 116, 42–49

Fu Fan, Yueming Wu, Jianxin Liu, 2010, Expression and purification of two different antimicrobial peptides,PR-39 and Protegrin-1 in Escherichia coli, Protein Expression and Purification, 73, 147–151

Jayaram Lakshmaiah Narayana, Jyh-Yih Chen, 2015, Antimicrobial peptides:Possible anti-infective agents, Peptides, 72, 88–94

Jianghui Lia, Qinxia Hana, Tao Zhanga, Jing Dub, Qianqian Suna, Yilin Panga, 2018, Expression of soluble native protein in Escherichia coli using a cold-shock SUMO tag-fused expression vector, Biotechnology Reports, 18, 0026

Jonas Lee, Sung-Hou Kim, 2009, High-throughput T7 LIC vector for introducing C-terminal poly-histidine tags with variable lengths without extra sequences, Protein Expression and Purification, 63, 58–61

Ken Motohashi, 2017, Evaluation of the efficiency and utility of recombinant enzyme-free seamless DNA cloning methods, Biochemistry and Biophysics Reports, 9, 310-31

Laurence Dumon Seignovert, Guillaume Cariot, Laurent Vuillard, 2004, The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*:a comparisonof overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3), Protein Expression and Purication, 37, 203–206

Lena Truong, Kirk E. Hevener, Amy J. Rice, Kavankumar Patel, Michael E. Johnson, Hyun Lee, 2013, High-level expression,purification, and characterization of Staphylococcus aureus dihydroorotase (PyrC) as a cleavable His-SUMO fusion, Protein Expression and Purification, 88, 8–106

Leonard T. Nguyen, Evan F. Haney, Hans J. Vogel, 2011, The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action, Trends in Biotechnology, 29, 9

Liu L., Spurrier J., Butt T.R., Strickler J.T.,2008, Enhanced protein expression in the baculovirus/insect cell system using engineered SUMO fusions, Protein Expr Purif, 62, 21.

Maja Mihajlovic, Themis Lazaridis, 2012, Charge distribution and imperfect amphipathicity affect pore formation by antimicrobial peptides, Biochimica et Biophysica Acta, 1818, 1274–1283

Makkapati Satakarni, Robin Curtis, 2011, Production of recombinant peptides as fusions with SUMO, Protein Expression and Purification 78, 113–119

Malakhov M.P., Mattern M.R., Malakhova O.A., Drinker M., Weeks S.D., Butt. T.R, 2004, SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins, J Struct Funct Genomics, 5, 75

Marcos J.F, Beachy R.N, Houghten R A, 1995, In hibition of a plant virus infection by analogs of melittin, Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92,(26), 12466-12469

Mateja Zorko, Boštjan Japelj, Iva Hafner-Bratkovič, Roman Jerala, 2009, Expression,purification and structural studies of a short antimicrobial peptide, Biochimica et Biophysica Acta, 1788, 314–323

Michael Zasloff, 2002, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, Nature, 415

Mossessova E., Lima C.D., 2000, Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. Mol Cell, 5, 865

M. Tileva, E. Krachmarova, I. Ivanov, K. Maskos, G. Nacheva, 2016, Production of aggregation prone human interferon gamma and its mutant in highly soluble and biologically active form by SUMO fusion technology, Protein Expression and Purification, 117, 26–34

Nadia Skorupa Parachin, Kelly Cristina Mulder, Antonio Americo Barbosa Viana, Simoni Campos Dias, Octavio Luiz Franco, 2012,

Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides, Peptides, 38, 446–456

Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J., 2011, The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action, Trends in Biotechnology, 29(9), 464-472

Oksana G. Travkova, Helmuth Moehwald, Gerald Brezesinski, 2017, The interaction of antimicrobial peptides with membranes, Advances in Colloid and Interface Science, 247, 521–532

Om P. Neelay, Christian A. Peterson, 2017, Antimicrobial peptides interact with peptidoglycan, Journal of Molecular Structure, 1146, 329-336

Paulina Schmitt, Rafael D.Rosa, Delphine Destoumieux Garzón, 2016, An intimate link between antimicrobial peptide sequence diversity and binding to essential components of bacterial membranes, Biochimica et Biophysica Acta, 1858, 958–970

Peroutka R.J., Elshourbagy N., Piech T., Butt., T.R., 2008, Enhanced protein expression in mammalian cells using engineered SUMO fusions: Secreted phospholipase A2, Protein Sci, 17, 1586.

P. Maturana, M. Martinez, M.E. Noguera, N.C. Santos, E.A. Disalvo, L. Semorile, P.C. Maffia, A. Hollmann, 2017, Lipid selectivity in novel antimicrobial peptides: Implication onantimicrobial and hemolytic activity, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 153, 152–159

Prashant Kumar, Gopala K. Aradhyam, 2014, Easy and efficient protocol for purification of recombinant peptides, Protein Expression and Purification, 95, 129–135

Qi Wang , Jiaojiao Zhao, Yan Wang, Honglou Sun, Yi Jiang, Lan Luo, Zhimin Yin, 2013, Functional expression of hepassocin in Escherichia coli using SUMO fusion partner and molecular chaperones, Protein Expression and Purification, 92, 135–140

Randi Nordström, Martin Malmsten, 2017, Delivery systems for antimicrobial peptides, Advances in Colloid and Interface Science, 242, 17–34

Rashid R, Veleba M, Kline KA., 2016, Focal targeting of the bacterial envelope by antimicrobial peptides, Front Cell Dev Biol, 4, 55

Richard M. Epand, Hans J. Vogel, 1999, Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action, Biochimica et Biophysica Acta 1462, 11-28

Steffen Frey,Dirk Görlich,2014,A new set of highly efficient, tag-cleaving proteases for purifyingrecombinant proteins,Journal of Chromatography

A,1337,95–105

Sándor Varga, Ganesh Ramnath Pathare, Erzsébet Baka, Marius Boicu, Balázs Kriszt, András Székács, Luca Zinzula, József Kukolya, István Nagy, 2015, Enhancing recombinant protein solubility with ubiquitin-like small archeal modifying protein fusion partners, Journal of Microbiological Methods, 118, 113–122

Santosh Kumar Upadhyay, Sharad Saurabh, Preeti Rai, Rahul Singh, K. Chandrashekar, Praveen C. Verma, P.K. Singh, Rakesh Tuli, 2010, SUMO fusion facilitates expression and purification of garlic leaf lectin but modifies some of its properties, Journal of Biotechnology, 146, 1–8

Stephen D. Weeks, Mark Drinker, Patrick J. Loll, 2007, Ligation independent cloning vectors for expression of SUMO fusions, Protein Expression and PuriWcation, 53, 40–50

Swee-Seong Tanga, Zakaria H. Prodhana, Sudhangshu K. Biswasa, Cheng-Foh Lec, Shamala D. Sekarand, 2018, Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification, Phytochemistry, 154, 94–105

Tauseef R. Butt, Suzanne C. Edavettal, John P. Hall, Michael R. Mattern, 2005, SUMO fusion technology for diYcult-to-express proteins, Protein Expression and PuriWcation, 43, 1–9

Ting Deng, Haoran Ge, Huahua He , Yao Liu , Chao Zhai , Liang Feng , Li Yi, 2017, The heterologous expression strategies of antimicrobial peptides in microbial systems, Protein Expression and Purification, 140, 52-59

Vahideh Sadr, Behnaz Saffar, Rahman Emamzadeh, 2017, Functional expression and purification of recombinant Hepcidin25 production in Escherichia coli using SUMO fusion technology, Gene, 610,112–117

Van't Hoff W.,Veerman E. C., Helmerhorst E. J., Amerongen A. V, 2001, Antimicrobial peptides:properties and applicability,Biol.Chem, 382(4), 597-619

Wachinger.M, Kleinschmidt.A, Winder.D, 1998, Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression, Journal of General Virology, 4, 731-740

Xiao-jing Li, Jin-ling Liu, Dong-sheng Gao, Wen-yan Wan, Xia Yang, Yong-tao Li, Hong-tao Chang, Lu Chen, Chuan-qing Wang, Jun Zhao, 2016, Single-step affinity and cost-effective purification of recombinant proteins using the Sepharose-binding lectin-tag from the mushroom

Laetiporus sulphureus as fusion partner, Protein Expression and Purification, 119, 51-56

Yanbing Cui, Yiwei Meng, Juan Zhang, Bin Cheng, Huijia Yin, Chao Gao, Ping Xu, Chunyu Yang, 2017, Efficient secretory expression of recombinant proteins in Escherichiacoli with a novel actinomycete signal peptide, Protein Expression and Purification, 129, 69-74

Yan Li, Jiarong Wang , Jing Yang , Chanjuan Wan, Xiaoming Wang, Hongbin Sun, 2014, Recombinant expression, purification and characterization of antimicrobial peptide ORBK in Escherichia coli, Protein Expression and Purification, 95, 182–187

Yanmei Li , Qi Xiang, Qihao Zhang, Yadong Huang, Zhijian Su, 2012, Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application, Peptides, 37, 207–215

Yeaman M. R., Yount N. Y., 2003, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, Pharmacol Rev, 55(1), 27-55

Yehonathan Pouny, Doron Rapaport, Amram Mor, Pierre Nicolas, Yechiel Shai, 1992, Interaction of Antimicrobial Dermaseptin and Its Fluorescently Labeled Analogues with Phospholipid Membranes, Biochemistry , 31, 12416-12423

Yifeng Li, 2011, Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli: A review, Protein Expression and Purification, 80, 260–267

Yifeng Li, 2013, Production of human antimicrobial peptide LL-37 in Escherichia coli using a thioredoxin–SUMO dual fusion system, Protein Expression and Purification, 87, 72–78

Zasloff M., 2002, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, Nature, 415(6870), 389-95

Zhongyuan Wang, Na Li, Yanyan Wang, Yanping Wu, Tianyang Mu, Yi Zheng, Laiqiang Huang, Xuexun Fang, 2012, Ubiquitin-intein and SUMO2-intein fusion systems for enhanced protein production and purification, Protein Expression and Purification, 82, 174–178

Zhoukun Li, Kai Ji, Weiliang Dong, Xianfeng Ye, Jiale Wu, Jie Zhou, Fei Wang, Qiongzhen Chen, Lei Fu, Shuhuan Li, Yan Huang, Zhongli Cui, 2017, Cloning,heterologous expression, and enzymatic characterization of aovel glucoamylase GlucaM from Corallococcus sp. strain EGB, Protein Expression and Purification, 129, 122-127

王 青, 張偉濤, 徐彥召, 劉保國, 張慧輝, 胡建和, 2016, 抗菌肽的活性機制及其在養殖業中的應用研究進展, 河南農業科學, 45(10), 6-9、23

王秀青, 朱明星, 張嬋, 2011, 抗菌肽 Cecropin B 對人工感染大腸桿菌雛雞的治療效果研究, 中國家禽, 11, 15-17

王廣軍, 謝駿, 餘德光, 2005, 抗菌蛋白在南美白對蝦養殖中的應用試驗, 飼料工業, 26(8), 33-34·

朱 飛, 程建波, 2016, 抗菌肽的來源、生物學功能及其在畜牧業中應用的研究進展, 中國家禽, 第38卷, 第16期

李孟孟, 王文策, 楊琳, 2015, 抗菌肽的研究進展及應用, 中國家禽, 2015, 37（6）, 42-46

李明道, 2014, 穿越細胞膜--抗菌胜肽如何在細胞膜上打洞, 物理雙月刊, 36(3), 179-185

林志勳, 2013, 抗菌胜肽之理論與應用, 現代養豬, 34(7), 87-91

曹佐武, 2004, 有效分離 1kDa 小肽的 Tricine-SDS-PAGE 方法, 中國生物工程雜誌, 24, 1

陳琛, 吳三橋, 薄新文, 2014, 天蠶素抗菌肽的性質、功能及應用研究進展, 西北農林科技大學學報（自然科學版）, 42（7）,

197-204、216

陸海榮, 李國棟, 吳宏宇, 黃晉江, 汪世龍, 黃青山, 2008, 抗菌肽GK1在大腸桿菌中的融合表達, Chin J Biotech , 24(1), 21-26

韓東，馮新，韓文瑜，等人，2013，基因工程黛素對金黃色葡萄球菌的抑菌作用及對小鼠感染的治療，中國獸醫學報，33(8)，1241-1246

劉大程, 程豔, 2008, 酵母培養物對隱性乳房炎奶牛乳品質及體細胞數的影響, 黑龍江畜牧獸醫, 6, 67-68

陳秋遐, 2017, 利用基因重組技術開發抗菌胜肽之製備, 東海大學化學工程與材料工程研究所碩士論文

蔡佩珊, 2016, 利用基因重組技術建構 6xHis-EGFP-MutY 融合蛋白表達體系及其純化製程, 東海大學化學工程與材料工程研究所碩士論文