

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
Tunghai University

食品科技組碩士論文
Master Thesis of Food Technology Section

指導教授：李根永博士

李孟修博士

Advisor : Ken-Yuon Li, Ph.D.

Meng-Shiou Lee, Ph.D.

雞貧血病毒結構蛋白最適化生產培養基之探討

Optimization of medium composition for production of
chicken anemia virus VP1 protein

研究生：林怡吩
Graduate Student : I-Fen Lin

中華民國一百零二年一月
January, 2013

碩士論文指導教授推薦書

食品科學研究所科技組 林怡吩 君所之論文

雞貧血病毒結構蛋白最適化生產培養基之探討

Optimization of medium composition for production of chicken
anemia virus VP1 proteins

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學研究所所長：

李根新

指導教授：

李根新

中華民國一百零二年一月十八日

碩士論文考試委員審定書

食品科學研究所科技組 林怡吩 君所之論文

雞貧血病毒結構蛋白最適化生產培養基之探討

Optimization of medium composition for production of chicken anemia
virus VP1 proteins

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

李宜修

中國醫藥大學暨中藥資源學系副教授

劉紹揚

國立屏東科技大學生物科技系助理教授

指導教授：

李松永

中華民國一百零二年一月十八日

謝誌

感謝恩師 李根永博士於在學期間的悉心的教導與勉勵，在學習及實驗上給予了支持與啟發。感謝 李孟修博士提供完善的研究設備與資源，兩位老師時時刻刻吸取新知以及對實驗熱誠的態度，在遇到問題與實驗瓶頸時，老師也適時給予我指導，讓我能面對問題以及能夠分析處理思考解決方法，使我受益良多，在此寥寥數字並無法表達內心感激之情，僅於卷首致最深謝意。

文稿出成，承蒙李根永博士、李孟修博士、胡紹揚博士撥冗審閱，並於口試期間給余學生寶貴的意見，使論文更嚴謹完善，於此表達最誠摯的敬意與謝意。

感謝系所老師們的指導與照顧；感謝冠閔、建廷學長在實驗上的教導；感謝鈺欣、鈺萍於實驗期間慷慨借用儀器；感謝昱仁、哲暉、慈樺互相支持打氣；感謝一立、賢康、彥甫、巧俞、昭綦、昭伶等學弟妹的幫忙，為我的研究生活中創造大量的歡笑；感謝好友佩萱給我強大的精神支持，讓我有力量克服種種挫折。

最後感謝我親愛的爸爸媽媽與哥哥，由於你們的全力支持，默默付出以及無限的愛與關懷，才能讓我完成學業。將此論文獻給我最愛的家人，願與你們一同分享這份喜悅。

林怡吩 謹致於
東海大學食品科學研究所
應用生物化學研究室
中華民國一百零二年一月

目錄

目錄.....	I
圖次.....	III
表次.....	IV
摘要.....	V
Abstract.....	VI
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	2
一、雞傳染性貧血病毒簡介.....	2
二、雞貧血病毒 VP1 蛋白之重組表現載體	3
三、培養基中的碳源與氮源對重組菌株表現之影響.....	8
四、提高重組菌株外殖蛋白產量培養條件之探討.....	11
參、材料與方法.....	13
一、試驗材料.....	13
1. 菌種.....	13
2. 培養基與試藥.....	13
3. 實驗儀器設備	14
二、實驗方法.....	15
1. 種菌的培養.....	15
2. 培養基的配置.....	15
3. 誘導作用	16
4. 蛋白質標準溶液定量.....	16
5. SDS-PAGE 蛋白電泳步驟.....	17
6. 西方點墨法.....	19
7. 發酵槽試驗.....	21

三、試驗設計.....	22
1. 試驗設計說明.....	22
2. 使用軟體.....	23
3. 實驗步驟.....	23
肆 結果與討論.....	29
一、不同培養基對 VP1 蛋白產量的影響.....	29
二、mSOC 培養基關鍵組成分之確定.....	34
三、尋找主要組成份之最佳濃度範圍.....	44
四、尋找最適培養基組成分.....	46
五、發酵槽試驗.....	57
伍、結論.....	59
陸、參考文獻.....	60

圖次

圖一、pGEX-4T-1 載體.....	4
圖二、pGEX-4T-1-VP1/ <i>E.coli</i> BL21(DE3)-pLysS 表現.....	5
圖三、Lac operon 調控機制.....	7
圖四、Lac operon 的正向調控.....	10
圖五、CAP 結合位置.....	10
圖六、雞貧血病毒 VP1 蛋白在不同培養基誘導表現西方墨點法結果	30
圖七、培養基不同時間點誘導雞貧血病毒 VP1 蛋白表現之影響.....	32
圖八、雞貧血病毒 VP1 蛋白誘導表現 4 小時產量.....	33
圖九、培養基成分 2^{5-1} 部分因子試驗的效應強度分析(Pareto chart).....	36
圖十、培養基成分對 2^4 全因子試驗的分析.....	43
圖十一、蛋白腓和離子溶液對於 VP1 蛋白產率影響之迴應曲面 圖.....	48
圖十二、蛋白腓和離子的添加對於 VP1 蛋白產率影響之等高線圖	49
圖十三、培養基組成份對中心混成試驗設計的分析.....	50
圖十四、中心混成設計之回歸分析.....	51
圖十五、最適化培養基與 Luria-Bertain (LB)培養基誘導雞貧血病毒 VP1 蛋白表現	54

表次

表一、SDS-PAGE 膠體製備比例.....	18
表二、探討培養基組成份效應之 2^{5-1} 部分因子試驗設計	
(A) Experimental worksheet	25
(B) Variables levels.....	25
表三、探討培養基組成份對產量影響力之 2^4 全因子試驗設計	
(A) Experimental worksheet.....	26
(B) Variables levels.....	26
表四、陡升路徑試驗培養基組成份層次.....	27
表五、蛋白腓及離子混合溶液之中心混成試驗設計	
(A) Experimental worksheet.....	28
(B) Variables levels.....	28
表六、 2^{5-1} 部分因子試驗設計篩選適當的培養基組成份.....	35
表七、酵母萃取物單因子實驗.....	38
表八、葡萄糖單因子實驗.....	40
表九、培養基組成之 2^4 全因子試驗設計.....	42
表十、陡升路徑試驗之培養基組成與結果.....	45
表十一、中心混成試驗之培養基組成與結果.....	47
表十二、迴應曲面法預測 VP1 蛋白產率之最適培養基組成.....	52
表十三、最適化培養基雞貧血病毒 VP1 蛋白之表現.....	55
表十四、VP1 蛋白最佳產量之驗證.....	56
表十五、發酵槽試驗.....	58

摘要

帶有雞貧血病毒 (Chicken anemia virus, CAV) 外殼蛋白 VP1 基因的大腸桿菌轉殖菌株, 可作為發酵製造 VP1 外殼蛋白的生產菌株。本研究從八種大腸桿菌轉殖菌株的培養基中, 篩選得到最適用於 VP1 蛋白表現的 mSOC (modified Super Optimal broth with Catabolic repressor) 培養基。針對此培養基各組成份, 以全因子試驗設計進行發酵實驗, 結果得知僅蛋白胨和混合離子 (NaCl, MgCl₂, MgSO₄, KCl) 溶液對 VP1 蛋白表現的有顯著的效應。後續即以中心混成試驗設計與迴應曲面法尋求蛋白胨和離子溶液最佳之濃度。由中心混成試驗設計數據結果可得下列迴歸方程式

$$\text{response} = 135.46 + 8.47075 \times \text{peptone} + 9.76969 \times \text{ions} - 3.0744 \times \text{peptone}^2 + 1.135 \times \text{peptone} \times \text{ions} - 13.8819 \times \text{ions}^2$$

依據迴應曲面法分析此方程式, 可推算出蛋白胨和離子溶液在培養基中最佳組合是: 蛋白胨=1.79%、離子溶液=0.27%。以此最適組合培養基進行發酵試驗, 結果搖瓶發酵的 VP1 蛋白產量是 137.98 μg/mL, 約為 Luria Bertani 培養基的 1.84 倍表現; 發酵槽試驗的 VP1 蛋白產量是 163.73 μg/mL, 是 Luria Bertani 培養基 2.2 倍表現。由這些數據顯示, 本研究所修飾的 mSOC 培養基以及發酵條件可有效提高 VP1 蛋白的產量。

Abstract

A cloned *E. coli* strain carrying VP1 gene of Chicken anemia virus (CAV) is able to produce VP1 protein in media, and this expressed protein has been proved to be an efficacy vaccine antigen of CAV. The aim of this research is to increase the yield of VP1 protein by improving the composition of the producing media. Firstly, mSOC (modified Super Optimal broth with Catabolic repressor) was selected as basal medium which was screened from eight media commonly used for cultivating recombinant *E. coli* strains. Then, two major effective ingredients of mSOC medium on VP1 production were revealed as peptone and mixed inorganic salts solution, according to analyzing data measured from tests of a full factorial experimental design. Finally, the optimal concentrations of peptone and mixed inorganic salt solution in the medium were determined as 1.79% and 0.27% respectively, according to the solution of a regression equation following:

$$\text{response} = 135.46 + 8.47075 \times \text{peptone} + 9.76969 \times \text{ions} - 3.0744 \times \text{peptone}^2 + 1.135 \times \text{peptone} \times \text{ions} - 13.8819 \times \text{ions}^2$$

The optimal concentrations of peptone and mixed inorganic salt solution have been verified by shaking flask tests, and the production of VP1 protein was 137.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ that was non-significant difference to the production (138.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$) estimated by the analysis of response surface methodology. The best production of VP1 protein using the modified mSOC (containing the optimal concentrations of peptone and mixed inorganic salt solution) was approximately 1.84 times higher than that fermented in conventional Luria Bertani broth. The production of VP1 was 163.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$, as using the modified mSOC in a jar fermentor test. The results of these fermentation experiments had demonstrated that optimal concentrations of peptone and mixed inorganic salt solution improved the VP1 protein production significantly.

壹、前言

雞傳染性貧血 (Chicken infectious anemia ; CIA) 會引發孵化初生雞隻的貧血、免疫缺失、淋巴組織萎縮等症狀，甚至導致死亡，因而造成養雞業者的損失。此疾病是由雞貧血病毒 (Chicken anemia virus, CAV) 引起，是環狀病毒科唯一 *Gyrovirus* 屬的成員。CAV 會轉譯出三種蛋白 (VP1、VP2、VP3)，其中 VP1 蛋白是雞傳染性貧血病病毒唯一的外殼蛋白。VP1 蛋白具有好的抗原性，因此以基因轉殖技術培育能產生 VP1 蛋白的菌株，便可利用發酵技術大量製備 VP1 蛋白，作為疫苗原體 (immunogen)。

目前已有研究將 VP1 蛋白基因選殖入表現載體 pGEX-4T-1 中，得到能表現 VP1 蛋白的載體 pGEX-4T-1-0pt-VP1。此一載體並已成功的轉殖入宿主菌株 *E coli* BL21(DE3)-pLysS 胞內，而且經試驗確認能有效表達 VP1 蛋白。所製備的 VP1 蛋白，經驗證其抗原特性可被 CAV 陽性雞血清辨識。然而此重組菌株之應用，現在仍局限於實驗室小量製備供研究使用。未來若能利用發酵技術大量製造，將可開發成具有經濟效益的雞貧血病毒疫苗。

為尋求可大量發酵生產 VP1 蛋白的最適化培養基。本研究先用二階因子試驗設計分析影響 VP1 蛋白產量的關鍵因子，再利用陡升實驗法求得關鍵因子組成份濃度之最適範圍，最後使用中心混成設計與迴應曲面法決定培養基最適化組成份。期望此結果能做為未來發酵生產 VP1 蛋白製程設計的依據。

貳、文獻回顧

一、雞傳染性貧血病毒簡介

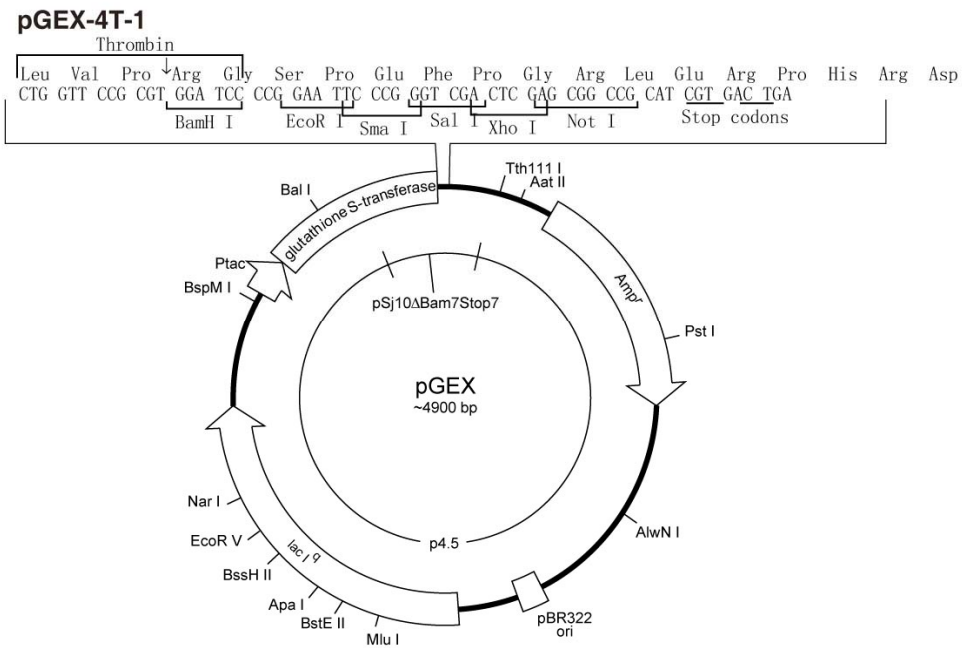
雞傳染性貧血症 (Chicken infectious anemia; CIA) 是由雞貧血病毒 (Chicken anemia virus, CAV) 感染引起，受感染的雞隻無法正常的生長及發育，嚴重者甚至死亡。雞貧血病毒特別容易垂直感染剛孵化的小雞，成雞也會從環境的接觸而被染性，因此雞貧血病毒對於大規模飼養雞隻的養殖場威脅極大。雞傳染性貧血症對雞隻造成的傷害依雞隻年齡、感染途徑、母體抗體、病毒劑量而異。受到感染的病雞臨床症狀包括蒼白虛弱、行動延遲、精神沉鬱、食慾不振、肌肉和皮膚出血。典型的雞傳染性貧血症還會出現嚴重的不良性貧(aplastic anemia)。在解剖外觀病變方面，感染雞貧血病毒的雞隻可見黃色充滿脂肪的骨髓(Vielitz & Landgraf, 1988)，尤以股骨最易評估此病變。

雞貧血病毒於 1979 年首次在日本被分離鑑定確認(Yuasa, Taniguchi, & Yoshida, 1979); 1993 在臺灣亦分離出雞貧血病毒(YS, HJ, MJ, & CS, 1993)。雞傳染性貧血病毒為環狀病毒科 (Circoviridae)，基因體為負向環狀單股 DNA (single-stranded negative-sense DNA)，大小約為 2.3 kb，為一小型、二十面體、無外套膜、病毒顆粒粒徑大約 23-25nm (Todd, Creelan, Mackie, Rixon, & McNulty, 1990)，感染細胞後環狀單股 DNA 基因體必須形成雙股 DNA 後才能進行轉錄和複製病毒 DNA。雞貧血病毒分離株的 DNA 定序，總長為 2319 個核苷酸，在正向有三個部分重複的開放讀碼區 (open-reading frame, ORF) 可以轉譯出 3 個分子量大小的蛋白分別為 51 kDa (VP1)、24 kDa (VP2)、13.6 kDa (VP3) 蛋白(Noteborn, de Boer, van Roozelaar, Karreman, Kranenburg, Vos, et al., 1991)。VP1 蛋白是由第三開放讀碼區(open-reading frame 3, ORF3) 轉譯而來，是一種核鞘蛋白可組裝成 CAV 病

毒外殼(Todd, Creelan, Mackie, Rixon, & McNulty, 1990)。VP2 是由第一開放讀碼區 (open-reading frame 1,ORF1) 轉譯而來，是一具有磷酸酶 (phosphatase)活性的病毒蛋白。VP3 是由第二開放讀碼區 (open-reading frame 2,ORF2) 轉譯而來。VP3 蛋白單獨表現時能引起細胞凋亡(Apoptosis)，故又稱細胞凋亡素(Apoptin)。推測 VP3 蛋白可能與染色質構造內的 histone 等蛋白質結合而造成超螺旋結構的崩解，最後造成 DNA 的斷裂與濃縮;或是 VP3 蛋白取代 histone H1 的位置，而讓內核酸酵素 (endonuclease) 有機會切割 DNA 進行細胞凋亡 (Noteborn, Todd, Verschueren, de Gauw, Curran, Veldkamp, et al., 1994)。

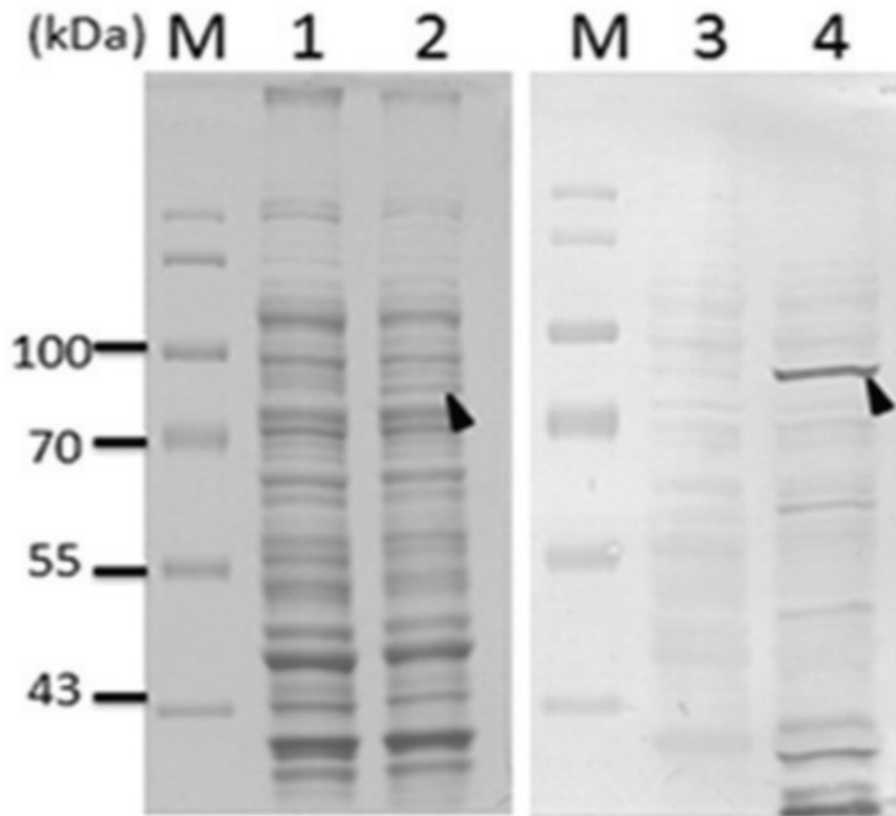
二、雞貧血病毒 VP1 蛋白之重組表現載體

雞貧血病毒結構蛋白VP1相關文獻不多，大多是透過其他環狀病毒研究來推測其功能。雞貧血病毒結構蛋白VP1為雞貧血病毒唯一的外殼蛋白，能組裝成病毒的外殼。其功能特性目前尚未完全釐清，為了進一步探究該病毒相關特性，Lee (2011)將VP1基因重組到 pGEX-4T-1表達質體中，並轉形入大腸桿菌菌株 *E.coli* BL21 (DE3) 中。此質體(圖一)選用P_{lac} 啟動子，以便調控選殖基因的表現；採用 Amp^r 篩選基因，能有效率的篩選轉形成成功的菌體；利用GST (glutathione-S-transferase) 標記蛋白基因，可與VP1形成融合蛋白有助於確認VP1的表現與分離。VP1基因與pGEX-4T-1中的GST基因序列連結，構築成pGEX-4T-1-opt-VP1表現質體，再將重組質體轉形入 *E.coli* BL21(DE3)-pLysS寄主細胞中。轉殖菌株的表現蛋白可於 SDS-PAGE或Western blotting上78 kDa (Lee, Hseu, Lai, Chang, Chen, Huang, et al., 2011) 位置觀察到表現訊號(圖二)。



圖一、pGEX-4T-1 載體。

Fig 1. pGEX-4T-1 vector.

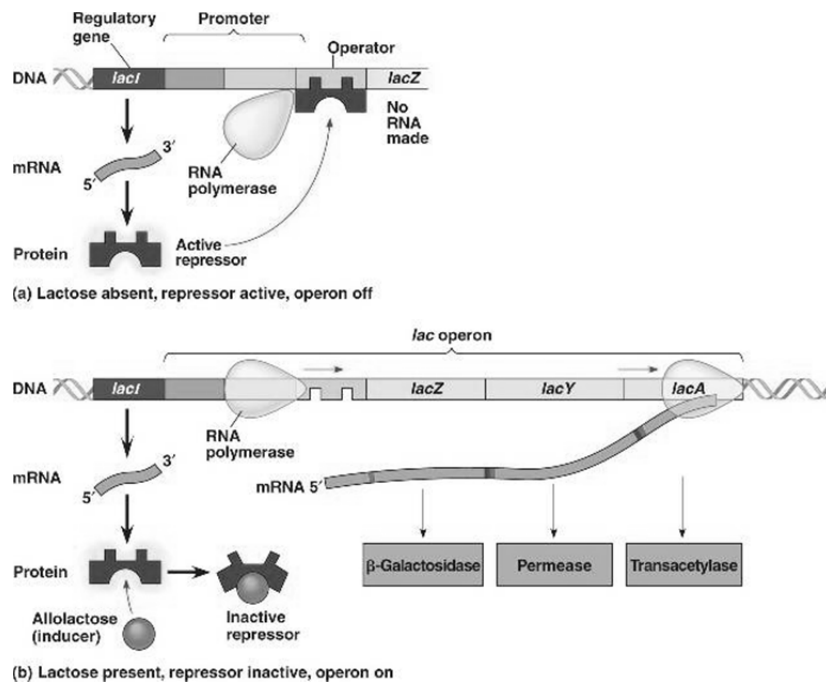


圖二、pGEX-4T-1-VP1/ *E.coli* BL21(DE3)-pLysS 表現。

Fig 2.pGEX-4T-1-VP1/ *E.coli* BL21(DE3)-pLysS expression.

圖片引用於(Lee, et al., 2011)。

如何能使殖入之質體基因在重組菌株中有效的表現是一個重要的課題。因為高度表現的基因重組菌在商業應用上才具經濟效益及競爭力。對於基因重組菌而言，能否過度表現取決於其操縱子是否能獨立於細菌生長代謝的調控機制，也就是在適當的時機能利用細胞生長所需的營養物質，生合成外源蛋白質。pGEX-4T-1-opt-VP1 利用 Lac operon 調控機制有效表現 VP1 蛋白質。傳統的 Lac operon 包括啟動子、操作子和構造基因- *lac Z*、*lac Y*、*lac A*(圖三)。在缺乏誘導物時，DNA 上的 *lac I* 轉譯出具有活性的壓制蛋白(repressor)，會與操作子(o site)結合，阻止了構造基因轉錄成 mRNA。當環境中加入誘導物(inducer)時，誘導物會與抑制蛋白結合，發生構形改變而失去活性無法和 o site 相結合，這時候構造基因就可以順利表現，轉譯出目標蛋白質。pGEX-4T-1-opt-VP1 帶有 *lacI^q* 產生壓制蛋白控制啟動子 *lac_p*，在加入誘導物構造基因後可解除壓制蛋白作用，能讓 VP1 蛋白質有效率的表現。



圖三、Lac operon 調控機制。

Fig 3. Lac operon regulation mechanism.

圖片來源:

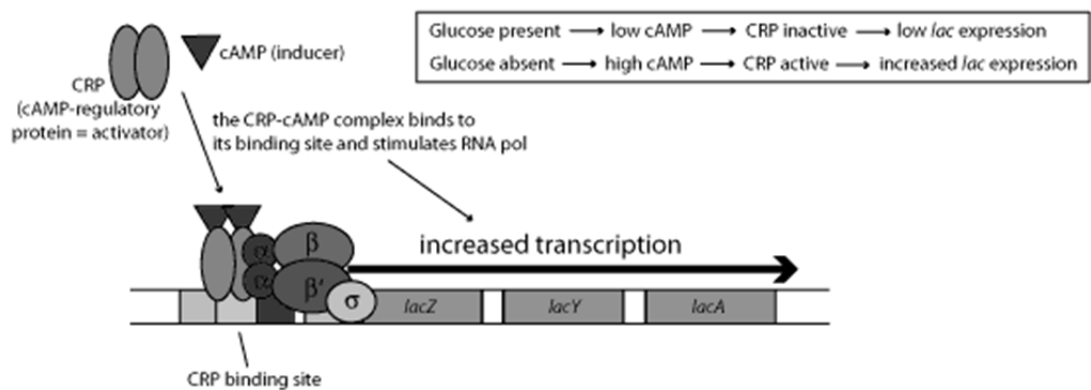
http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/ch18/lac_operon.html

三、培養基中的碳源與氮源對重組菌株蛋白表現之影響

Super Optimal broth with Catabolic repressor (SOC) medium 培養基是一種含豐富葡萄糖營養培養基(Sun, Ding, He, Sun, Shao, Luo, et al., 2009)，能提高重組菌表現效率。葡萄糖和豐富的營養成分存在於 SOC 培養基中，可以防止選殖載體上的 *lac* 啟動子隨意的活化，因而可改善重組菌株的轉化效率，提高目標蛋白基因表現。葡萄糖的分解代謝影響細菌中的 Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 含量，當細菌利用葡萄糖分解產生能量時，cAMP 生成變少而分解變多(cAMP 含量低)；相反的，當無葡萄糖可供利用時，cAMP 生成變多而分解變少含量就升高。細菌中有一種能與 cAMP 特異結合的 cAMP 受體蛋白 cAMP receptor protein (CRP)，當 CRP 沒有和 cAMP 結合時是不具有活性的，當 cAMP 濃度升高，CRP 與 cAMP 結合時構形上會發生改變而活化，轉變成活化態的 CRP-cAMP activated protein (CAP)，能與 DNA 序列中 CAP binding site 結合(圖四)。在 *lac* operon 的 p site 上游有一段序列，可以和 CAP 特異結合，稱為 CAP binding site。CAP 與這段序列結合時，可增強 RNA polymerase 的轉錄活性，使轉錄提高。相反，當有葡萄糖可供分解利用時，cAMP 濃度降低，CRP 不能被活化，*lac* operon 上的構造基因表現就會下降(圖五)。

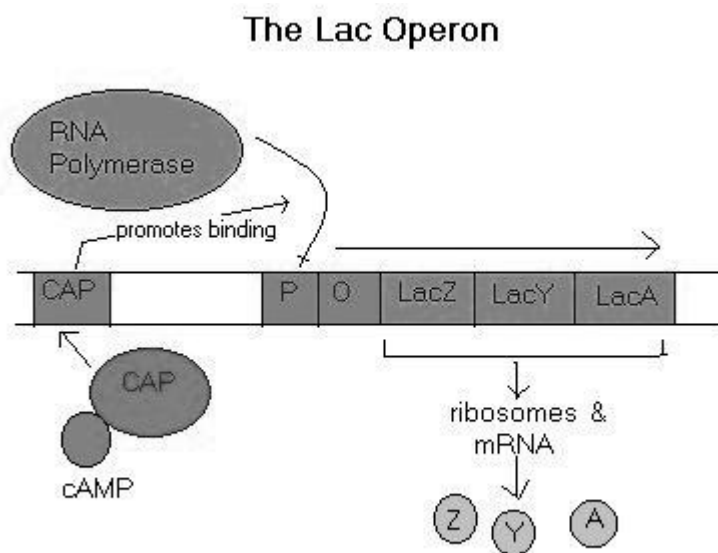
培養基中的氮源會影響質體的複製數，因此氮源亦是影響表現系統中的關鍵因子(Ramerez & Bentley, 1993)。例如陳(2011)以基因轉殖 *E. coli* 生產外切型纖維分解酵素。由實驗結果發現，使用 Luria Bertani (LB) 培養液為初始培養基，培養後饋入糖/酵母萃取物/胰蛋白胍 (0.5/1/0.5, w/w)，可得 693 U/L 的酵素量；若饋入糖/酵母萃取物 (1/1, w/w)，可得 1467 U/L 的酵素量。此結果顯示胰蛋白胍不利於纖維分解酵素的產生(陳怡綺, 2011)。有文獻數據報導，以蛋白胍代替

Luria Bertani (LB) 培養基或 Terrific Broth (TB) 中的胰蛋白胨能提高基因重組菌表現之產量(Xu, Banerjee, Pan, & Li, 2012)。



圖四、Lac operon 的正向調控。

Fig 4. positive regulation of the lac operon.



圖五、CAP 結合位置。

Fig 5. CAP binding site.

圖片來源:

http://xray.bmc.uu.se/Courses/Bke2/Exercises/Exercise_answers/GEA_transcription.html

四、提高重組菌株外源蛋白產量培養條件之探討

殖入外來基因對宿主細胞是一種生長上的負擔，重組菌株生長通常無法與原菌株競爭(Ryan, Parulekar, & Stark, 1989)。因此重組菌株為生存競爭，菌體往往會傾向於丟棄造成負擔的外來基因，如此便喪失了表現生產外殖基因蛋白的能力。因此重組菌株為有效的表現外殖蛋白基因，培養基及誘導調控時機需作適當的調整。探討重組菌株最適化產量條件的研究，有下列之實例：

利用在高密度細胞培養重組大腸桿菌可表達 Human interferon beta (hIFN- β) 蛋白，為提高表現量，使用迴應曲面法探討細胞產率與誘導物 IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) 濃度的最佳組合。結果得悉 IPTG 添加量 2.54 mM 與細胞乾重在 70 g/L，或者是 IPTG 添加量 1.29 mM 與細胞乾重在 50 g/L 的條件下，在 LB 培養液中培養可得到最高蛋白產量，其中 hIFN- β 產量為 2.2 g/L，產率 0.151 g/hr。在最適化誘導條件下，進行饋料式高密度細胞發酵，培養 6 小時，可以得到 5.037 g/hr 的 hIFN- β 產量(Tabandeh, Khodabandeh, Yakhchali, Habib-Ghomi, & Shariati, 2008)。

使用中心混成設計及迴應曲面法尋求重組大腸桿菌產生腫瘤壞死因子(Tumor necrosis factor- α (TNF- α))最佳產量的發酵條件，結果得到最佳誘導條件是在 OD₆₀₀= 0.55 前進行誘導，誘導後培養溫度為 25°C，IPTG 濃度為 1 mM，誘導時間為 4 小時，TNF- α 生產增加 11%(Papaneophytou & Kontopidis, 2012)。

為提高帶有 *Oryza sativa* non-symbiotic hemoglobin 1 (OsHb1) 基因的 *E. coli* 重組菌株合成 OsHb1 蛋白的產量，以迴應曲面法探討最適化培養基。結果求得最適化培養基組成份是 42.69 g/L 蛋白腴; 20.11 g/L 酵母萃取物; 17.77 g/L 氯化鈉和 0.33 g/L 甘油。在此培養基中發

酵，獲得最大的重組蛋白質濃度 3.50 g/L (Giordano, Martinez, Iglesias, Beccaria, & Goicoechea, 2010)。

參、材料與方法

一、試驗材料

1. 菌種

由中國醫藥大學中國藥學暨中藥資源學系李孟修老師所提供帶有雞貧血結構蛋白基因之質體 pGEX-4T-1-0pt-VP1 與轉形成功之重組菌株 *E.coli* BL21(DE3)-pLysS。

2. 培養基與試藥

- (1) Luria-Bertani (LB) broth: Becton, Dickinson and company, U.S.A.。
- (2) Tryptone Soya Broth (TSB): Becton, Dickinson and company, U.S.A.。
- (3) Peptone(amersco, U.S.A.)、Yeast Extract (YE)(amersco, U.S.A.)、Glucose (和光製藥, Japan) 、glycerol (和光製藥, Japan)。
- (4) 化學無機鹽類： NaCl(聯工製藥,台灣)、MgSO₄(和光製藥, Japan) 、MgCl₂(和光製藥, Japan) 、K₂HPO₄(昭和製藥, Japan) 、KH₂PO₄(昭和製藥, Japan)。
- (5) 抗生素：Ampicillin (SIGMA, U.S.A.) 、Chloramphenicol (SIGMA, U.S.A.)。
- (6) IPTG : Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside (SIGMA, U.S.A.)。
- (7) Acryl/BisTM 29:1, 40 % (W/V) solution (amersco, U.S.A.)。
- (8) Trizma® base(SIGMA, U.S.A.)。
- (9) Sodium dodecyl sulfate SDS (Bio-Rad, U.S.A.)。

- (10) Ammonium persulfate (APS) (amersco, U.S.A.) ◦
- (11) N,N,N,N-Tetramethylethylene diamine (TEMED, Ger-Bu, Bulgaria) (Bio-Rad U.S.A.) ◦
- (12) Bromophenol blue (SIGMA, U.S.A.) ◦
- (13) β -mercaptoethanol (Bio-Rad, U.S.A.)
- (14) Bovine serum albumin (BSA) (Bio-Rad, U.S.A.) ◦
- (15) Coomassie Brilliant Blue R-250 (amersco, U.S.A.) ◦
- (16) Methanol、Acetic acid (SIGMA, U.S.A.) ◦
- (17) PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA) ◦
- (18) anti-GST antibody (Millipore, Bedford, MA) ◦
- (19) Alkaline phosphatase (AP) conjugated affinipure Goat anti-mouse antibody (Jackson)
- (20) TEMED (amersco, U.S.A.)

3. 實驗儀器設備：

- (1) 單門式高壓滅菌釜 (YANG TA MIN INSTRUMENT CO., LTD. Model: YMT) ◦
- (2) 恆溫震盪培養箱 (YIH DER, Model: TU-400, 台灣) ◦
- (3) 無菌操作台 ◦
- (4) Cell density meter (GE-80-2116-30, U.K.) ◦
- (5) 攪拌式發酵槽 7.5L 桌上型全自動微生物培養裝置, MG750V, (微聚科技, Taiwan) ◦
- (6) 微量高速離心機 (HITACHI zentrifugen MIKRO, Japan) ◦
- (7) 鑄膠套件 (Versatile Mini-PROTEIN 3 Electrophoresis Cell, Bio-Rad, U.S.A.) ◦
- (8) 電泳套件 (Bio-Rad, U.S.A.) ◦

(9) 電源供應器(MAJOR SCIENCE, MP-250, Taiwan)。

(10) 乾浴加熱器 (#110002, Taiwan)。

(11) Orbital Shaker (Major-Science, U.S.A.)。

二、實驗方法

1. 種菌的培養

(1) 取 0.1 mL 冷凍甘油小管中的重組菌株 *E.coli* BL21(DE3)-pLysS 菌液，活化接種至 40 mL 含有 50 µg/mL Ampicillin 及 50 µg/mL Chloramphenicol 的 LB 培養液中，在 37°C 下以 200-225 rpm 震盪培養 12~16 小時。

(2) 將 0.5 mL 活化重組菌株 *E.coli* BL21(DE3)-pLysS 菌液接種於含有 50 µg/mL Ampicillin 的 50 mL LB 培養液中，在 37°C 下以 200-225 rpm 震盪培養，於 OD₆₀₀ 值為 0.3 到 0.5 之間時，取活化菌液與甘油混合(甘油最終濃度為 20%)，分裝於冷凍甘油小管中保存於-20°C 作為菌種保存。

2. 培養基的配置

(1) Luria-Bertani (LB) broth : 1% Tryptone, 0.5% Yeast extract(YE), 1% NaCl.

(2) Tryptone Soya Broth (TSB) : 0.7 % Casein peptone, 0.3 % Soya peptone, 0.5 % Sodium chloride, 0.25% Dipotassium hydrogen phosphate, 0.25% Glucose.

(3) modified Luria Bertani (mLB) medium : 1% Peptone, 0.5% Yeast extract(YE), 1% NaCl.

(4) modified Super Optimal Broth (mSOB) medium : 2% Peptone, 0.5% Yeast extract(YE), 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM

MgCl₂ , 10mM MgSO₄.

- (5) modified Super Optimal broth with Catabolic repressor (mSOC) medium : 2% Peptone, 0.5% Yeast extract(YE), 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂ , 10mM MgSO₄, 20mM glucose.
- (6) modified 2x Yeast extract and Tryptone (m2x YT) medium : 1.6% Peptone, 1 % Yeast extract(YE), 0.5% NaCl.
- (7) modified Terrific Broth (mTB) medium : 1.2% Peptone, 2.4% Yeast extract(YE), 72 mM K₂HPO₄, 17 mM KH₂PO₄, 0.4% glycerol.
- (8) modified Super Broth (mSB) : 3.2% Peptone, 2% Yeast extract(YE), 0.5% NaCl.

3. 誘導作用(Induction)

取活化重組菌株 *E.coli* BL21(DE3)-pLysS 菌液，接種至含有 50 µg/mL Ampicillin 上述各培養基中，接種比例為 1:100，在 37°C 下以 200-225 rpm 震盪培養 1.5~2 小時其 OD₆₀₀ 值為 0.4~0.5 之間，加入 IPTG (最終濃度為 1 mM) 開始誘導載體表現蛋白，收集 1、2、3、4 小時誘導菌液並測其 OD₆₀₀ 值並記錄之。將收集的菌液以 10,000 rpm 離心 10 分鐘去除上清液後，以 1X sample loading buffer 懸浮菌塊，使各樣品回溶後菌體濃度相同，於 100°C 乾浴槽上加熱 10 分鐘，以 10,000 rpm 離心 1 分鐘，跑 SDS-PAGE 檢測蛋白表現狀況。

4. 蛋白質標準溶液 bovine serum albumin (BSA) 定量

取蛋白質標準溶液 BSA，以 4X sample loading buffer 與 PBST 稀釋成 5 個濃度(50、75、100、125、150 µg/mL)。待與樣品一同跑 SDS-PAGE 後，利用 AlphaDigi™ 軟體訂出蛋白質數值制定檢量線，

回推樣品濃度。

5.SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 蛋白電泳步驟

(1)試劑配方

- a. 1.5 M Tris-HCl buffer, pH=8.8 (分離膠體使用)：取Trizma[®] base 24.22 g 用去離子水80 mL溶解，以HCl 調整到pH=8.8 後，定量至100 mL，並儲存於4°C。
- b. 0.5 M Tris-HCl buffer, pH=6.8 (聚集膠體使用)：取Trizma[®] base 24.22 g 用去離子水50 mL 溶解，以HCl 調整到pH=6.8 後，定量至100 mL，並儲存於4°C。
- c. 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)：取1 g SDS 溶於10 mL去離子水後避光儲存於4°C。
- d. 10% Ammonium persulfate (APS)溶液：取0.1 g APS溶於1 mL 去離子水中。
- e. 5 X 電泳緩衝溶液：取Trizma[®] base 15 g、Glycine 72 g、SDS 5 g 溶於適量去離子水中，定量至1 L備用。
- f. 4X sample loading buffer: 0.15M Tris-HCl pH=6.8, 4.5% SDS, 20% β -mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue.
- g. Coomassie Brilliant Blue 染色液：取1.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 添加於250 mL去離子水、250 mL 甲醇和50 mL 醋酸中混合均勻並過濾。
- h. 脫色液(Destain buffer)：先加入100 mL 甲醇和100 mL 醋酸 加入去離子水定量至1 L。
- i. PBST: 0.795 g/L Na₂HPO₄, 1.44 g/L KH₂PO₄, 9.0 g/L NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4.

(2) 膠體製備比例

表一、SDS-PAGE 膠體製備比例

	分離膠體緩衝溶液 Running gel solution(10.0%)	聚集膠體緩衝溶液 Stacking gel solution(4.0%)
d.d. H ₂ O (mL)	9.8	3.76
40% Acrylamide Bis (mL)	5	0.5
1.5M Tris-HCl (mL) pH=8.8	5	
0.5M Tris-HCl (mL) pH=6.8		0.625
10% SDS (μL)	200	100
10% APS (μL)	160	80
TEMED (μL)	16	8
總體積 (mL)	20.176	5.073

- (3) 清洗1.5mm 膠體厚度的2 片玻璃製鑄膠套件後，用75%乙醇和拭鏡紙擦拭。
- (4) 將步驟(2)中所列的分離膠體溶液，按體積由大到小的順序，一一放在50 mL燒杯內混合均勻之後，迅速地用1 mL微量吸管吸取，以吸管尖端靠在2 片鑄膠套件之間，注入約2/3的高度，馬上在膠體上方加入異丙醇壓平膠體表面，等待20分鐘凝膠。
- (5) 倒出在分離膠體表面的異丙醇，用去離子水沖洗，並用濾紙吸取乾淨水分。
- (6) 將步驟(2)中所列的聚集膠體溶液，同樣混合均勻之後，注入鑄膠套件中，並與套件表面同高，立刻放入厚度1.5mm樣品槽(well)的尺梳。等待20 分鐘凝膠，輕輕移除尺梳後備用。
- (7) 將電泳膠(含2片玻璃鑄膠套件)以well朝中央的方式，配合電泳套件放入電泳槽中。並且稀釋5 X 電泳緩衝溶液到1 X，倒入

電泳套件中；緩衝溶液須超過電泳套件下方電極線，否則電泳無法作用。

- (8) 將蛋白質標準品和已處理之樣品分別注入每個well 中，注入體積為10 μ L。
- (9) 蓋上電泳槽頂蓋後，接上電源供應器，先以75 V 電壓進行泳動20分鐘，使各well 的樣品達到聚集膠體底部後，以100 V 電壓泳動120分鐘，待樣品溶液中的追蹤染劑(Bromophenolblue) 過膠體底部即停止。
- (10) 小心翼翼取出2 片玻璃鑄膠套件中的膠片，去除聚集膠體之後，以Coomassie Brilliant Blue 染色液染色20分鐘後進行脫色。
- (11) 經過適當體積脫色液(Destain buffer)脫色數次後，觀察蛋白質電泳結果，利用AlphaDigi™ 軟體訂出誘導產生的目標蛋白質VP1相對數值。

6. 西方點墨法 (Western Blotting)

(1) 試劑配方

- a. transfer buffer : 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 192 mM glycine, 20% methanol。
- b. blocking buffer : 5% Skin milk in PBST
- c. Alkaline phosphatase (AP) buffer : 100 mM Tris-Cl pH 9.5, 100 mM NaCl ,5 mM MgCl₂ 。
- d. nitroblue tetrazolium(NBT): 50 mg/mL in 70% N,N,-dimethyl formamide(DMF)。
- e. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate(BCIP) :50 mg/mL in 70% formamide 。

(2) 操作步驟

經電泳分析後的膠片，以濕式轉漬套組(Mini Trans-Blot[®], BioRad)進行轉漬(Western transfer)。進行SDS-PAGE蛋白質電泳，待電泳完成後，轉印到PVDF membrane(Millipore, Bedford, MA)。PVDF membrane在使用前須先浸泡methanol，再置於transfer buffer中濕潤後，SDS-PAGE與membrane依序放入轉印夾中，由正極到負級放置順序為海綿、3M 濾紙1 張、PVDF membrane、SDS-PAGE、3M 濾紙1 張、海綿，於轉漬槽中注入transfer buffer 以固定電壓100伏特轉漬70分鐘。將membrane 放入10 mL blocking buffer，4°C 震盪反應over night。去除blocking buffer用適當體積PBST清洗PVDF membrane 3次每次10分鐘後，加入以PBST稀釋2,000倍的anti-GST antibody (Millipore, MA)之一級抗體(primary antibody)及，經4°C震盪反應一小時後，以適當體積PBST清洗PVDF membrane 3次每次10分鐘，再加入同樣以PBST稀釋5,000倍的 Alkaline phosphatase (AP) conjugated affinipure Goat anti-mouse antibody二級抗體(secondary antibody)，室溫下震盪反應一小時。反應後的PVDF membrane，以適當體積的PBST清洗3次每次10分鐘後，以AP呈色。AP呈色為加入 66 μ L和 33 μ L於10mL Alkaline phosphatase (AP) buffer後，以慢速搖晃方式使蛋白訊號呈現後，以去離子水中止反應。

7. 發酵槽試驗

利用 7.5 L 攪拌式發酵槽(Agitated fermenter)進行培養，

(1) 培養條件:

- a. 攪拌速率：100 rpm。
- b. 攪拌葉片：六片標準式渦輪葉。
- c. 培養溫度及時間：37°C，24 小時。
- d. 通氣量：1 vvm。

(2) 步驟

- a. 取冷凍甘油小管中的重組菌株 *E.coli* BL21(DE3)-pLysS 菌液，活化接種至 40 mL 含有 50 µg/mL Ampicillin 及 50 µg/mL Chloramphenicol 的最適化培養基中，在 37°C 下以 200-225 rpm 震盪培養 12~16 小時。
- b. 配製最適化培養基放入 7.5 L 發酵槽中，並加水至 4 L，將發酵槽放入直立式滅菌釜中，以 121°C、15 分鐘的條件滅菌，滅菌完畢後取出冷卻至室溫。
- c. 取活化重組菌株 *E.coli* BL21(DE3)-pLysS 菌液，接種比例為 1:100 至含有 50 µg/mL Ampicillin 發酵槽中，震盪培養 1.5~2 小時其 OD 值為 0.4~0.5 之間，加入 IPTG 開始誘導載體表現蛋白，收集誘導菌液並測其 OD₆₀₀ 值並記錄之。將收集的菌液以 10,000 rpm 離心 10 分鐘去除上清液後，以 4X sample loading buffer 與 PBST 混合配置而成的 1X sample loading buffer 懸浮菌塊，於 100°C 乾浴槽上加熱 10 分鐘，以 10,000 rpm 離心 1 分鐘，跑 SDS-PAGE 檢測蛋白表現狀況。

三、試驗設計

1. 本研究使用迴應曲面法決定最佳之培養基，其方法如下

(1) 部分因子試驗設計(Fractional factorial experimental design)篩選組成份

本試驗採五因子(5 factors)、二階層(2 levels)之部分因子試驗設計，五個實驗因子分別為蛋白朊、酵母萃取物、葡萄糖、離子混合溶液、時間，並將各個因子正規化成-1 和+1 之高低階層，並增加3個中心點增加試驗準確性(表二A)，以蛋白質濃度為回應值(response)，各因子濃度範圍如表二B 所示。

(2) 全因子試驗設計 (Full factorial experimental design)篩選判斷關鍵組成份

本試驗採四因子(4 factors)、二階層(2 levels)之部分因子試驗設計，五個實驗因子分別為蛋白朊、酵母萃取物、葡萄糖、離子混合溶液 (NaCl, MgCl₂, MgSO₄, KCl)，並將各個因子正規化成-1 和+1 之高低階層，並增加3個中心點增加試驗準確性(表三A)，以蛋白質濃度為回應值(response)，各因子濃度範圍如表三B所示。

(3) 陡升實驗設計(Steepest ascent design)尋求組成份濃度之最適範圍

表四為陡升路徑方法的培養基比例。以上述全因子設計得到最高產量VP1蛋白的培養基比例為陡升試驗基點，經過回歸分析得到的係數推算每個因子陡升距離，由基點逐步增加此距離得到培養基範圍。

(4) 中心混成設計實驗(Central composition design)決定培養基最適組成份

以蛋白腴、離子溶液為中心混成設計之實驗因子，其濃度如表五所示，包含 2^2 全因子設計加上4個星點(star point)、3 個中心點(central point)，共計11 個實驗。

2. 使用軟體：

使用的軟體為STATGRAPHICS Plus Version 15.1 (*StatPoint, Inc.*, Virginia, U.S.A.)。

3. 實驗步驟

(1) 利用STATGRAPHICS 軟體，以部分試驗設計尋找最適培養基組成份。取活化重組菌株 *E.coli* BL21(DE3)-pLysS 菌液，接種比例為1:100 至含有50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin，震盪培養1.5~2小時其 OD_{600} 值為0.4~0.5之間，加入IPTG開始誘導VP1表現蛋白，收集誘導菌液並測其 OD_{600} 值並記錄之，將測量結果數據輸入STATGRAPHICS 軟體分析，在近一步利用全因子試驗設計篩選判斷關鍵組成份。

(2) 利用全因子試驗設計，求得關鍵因子組成分及濃度。將測量結果數據輸入STATGRAPHICS軟體分析，得以一次方程式的係數增加於培養基中，進行陡升路徑實驗。

(3)由陡升路徑實驗可以獲得一個線性方程式，進而依分析結果的最適培養基，進行中心混成設計，找出相關成分的二次方程式和精確的最適生長培養基比例。

(4)經由STATGRAPHICS軟體分析得最適生長培養基比例，進行實驗比對與估計值是否具顯著差異。

表二、探討培養基組成份效應之 2^{5-1} 部分因子試驗設計。

Table 2. A 2^{5-1} fractional factorial experimental design for determining effects of medium ingredients. (A) Experimental worksheet (B) Variables levels.

(A) Experimental worksheet

NO.	peptone	YE	glucose	ion solution	time
1	-1	-1	-1	1	-1
2	-1	1	-1	1	1
3	-1	-1	1	-1	-1
4	-1	-1	1	1	1
5	0	0	0	0	0
6	1	-1	1	1	-1
7	-1	1	-1	-1	-1
8	1	-1	-1	-1	-1
9	-1	-1	-1	-1	1
10	-1	1	1	-1	1
11	1	1	1	-1	-1
12	0	0	0	0	0
13	1	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	-1	1
15	0	0	0	0	0
16	-1	1	1	1	-1
17	1	1	-1	1	-1
18	1	1	-1	-1	1
19	1	1	1	1	1

(B) Variables levels

Independent variables	Coded levels	
	1	-1
Peptone (%)	2	0.5
YE (%)	0.5	0.1
ion solution (%)	0.31	0.03
Glucose (%)	0.36	0

附註: ion solution為NaCl(100mM)、MgCl₂(25mM)、MgSO₄(100mM)、KCl(100mM)混合儲備溶液(stock solution)。依濃度添加最後使ion solution在二階水準試驗中高濃度添加量為0.31%(含10 mM NaCl、2.5mM MgCl₂、10 mM MgSO₄、10 mM KCl)；低濃度添加量0.03%(1 mM NaCl、0.25mM MgCl₂、1 mM MgSO₄、1 mM KCl)。

表三、探討培養基組成份對產量影響力之 2^4 全因子試驗設計

Table 3. A 2^4 Full factorial experimental design for determining influence on VP1 production. (A) Experimental worksheet, (B) Variables levels.

(A) Experimental worksheet

NO.	peptone(%)	YE(%)	glucose(%)	ion solution(%)
1	1	1	1	1
2	-1	1	-1	-1
3	-1	1	1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	-1	1
6	-1	-1	1	-1
7	1	1	1	-1
8	1	-1	-1	1
9	-1	1	-1	1
10	1	-1	1	-1
11	1	-1	-1	-1
12	0	0	0	0
13	1	1	-1	1
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	-1	-1	1	1
17	-1	1	1	-1
18	1	-1	1	1
19	-1	-1	-1	-1

(B) Variables levels

Independent variables (%)	Coded levels	
	1	-1
peptone	2	0.5
YE	0.3	0.1
ion solution	0.31	0.03
glucose	0.1	0.01

附註: ion solution 為離子(NaCl, MgCl₂, MgSO₄, KCl)混合溶液

表四、陡升路徑試驗培養基組成份層次。

Table 4. Levels of medium ingredients for the experimental design of steepest ascent path.

	peptone	ion solution
Base point	1.25	0.16
slope	1	1
new unit	0.2	0.04

表五、蛋白胨及離子混合溶液之中心混成試驗設計。

Table 5. The central composite experimental design of peptone and mixed ion solution. (A) Experimental worksheet, (B) Variables levels.

(A) Experimental worksheet

NO.	peptone (%)	ion solution (%)
1	-1	1
2	-1.41	0
3	1	-1
4	0	0
5	0	0
6	1.41	0
7	-1	-1
8	0	0
9	1	1
10	0	-1.41
11	0	1.41

(A) Variables levels

Independent variables	Coded levels					
	%	-1.41	-1	0	1	1.41
peptone		1.086	1.25	1.65	2.05	2.214
ion solution		0.1272	0.16	0.24	0.32	0.3528

附註: ion solution為離子 (NaCl, MgCl₂, MgSO₄, KCl)混合溶液。

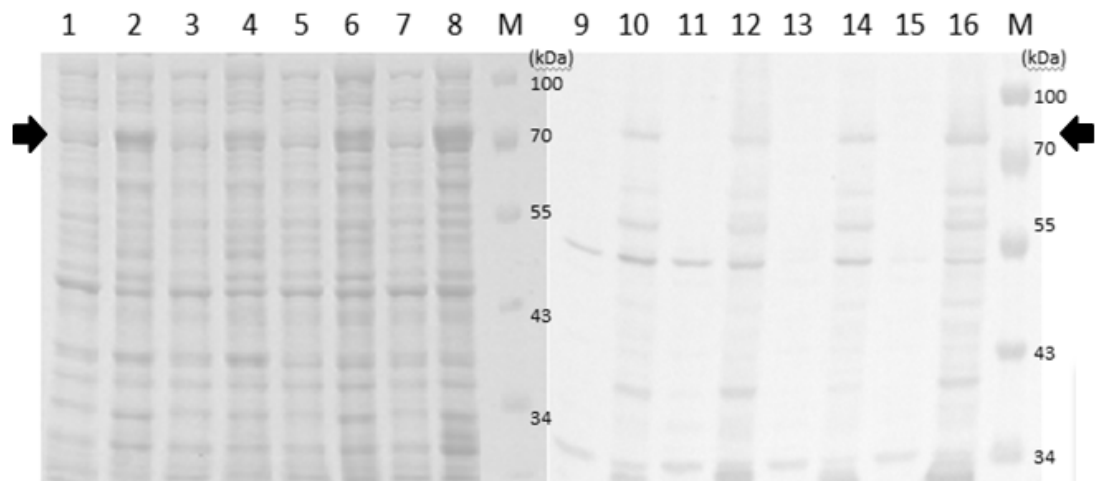
肆、結果與討論

一、不同培養基對 VP1 蛋白產量的影響

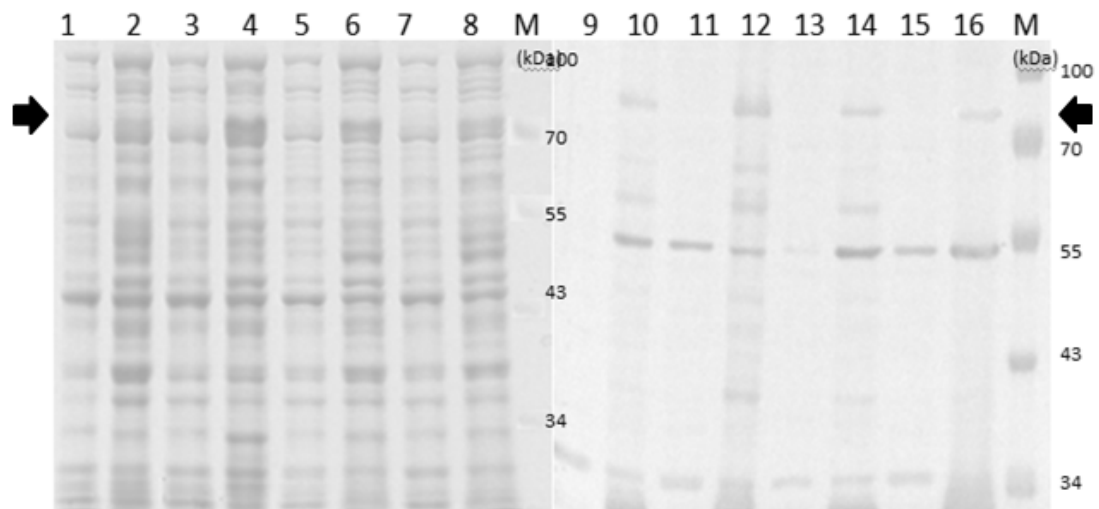
為尋求能穩定產生雞貧血病毒蛋白的培養基，從八種(mLB, LB, mSOB, mSOC, mTB, mSB, TSB, m2x YT (參考貳-二)) 液態培養基中，篩選 VP1 蛋白產量較高的培養基，以進行後續實驗。

重組菌株接種入上述八種培養基，經誘導後產生的 VP1 蛋白，以西方墨點法確認 (圖六)。圖六 A 中 Lane 1、3、5、7 是 mLB, LB, mSOB, mSOC 培養液未經誘導的蛋白質電泳圖；Lane 2、4、6、8 是經過誘導後的蛋白質電泳圖。經誘導 Lane 2、4、6、8 的蛋白質電泳圖中，可明顯的觀察到 VP1 蛋白 78 kDa 的色帶。Lane 2、4、6、8 蛋白質電泳膠塊以西方墨點法轉漬到 PVDF 膜上，相對應的 Lane10、12、14、16 上，可觀察到明顯的 VP1 蛋白 78 kDa 色帶。由圖六 B 同樣的可以確認 VP1 病毒蛋白能在 mTB, mSB, TSB, m2x YT 培養液中表現，如圖六 B 中的 Lane10、12、14、16 所示。

A:



B:



圖六、雞貧血病毒 VP1 蛋白在不同培養基誘導表現西方墨點法結果。

Fig 6. SDS-PAGE and Western-blotting profiles of Chicken anemia virus VP1 protein expression induced in eight various media.

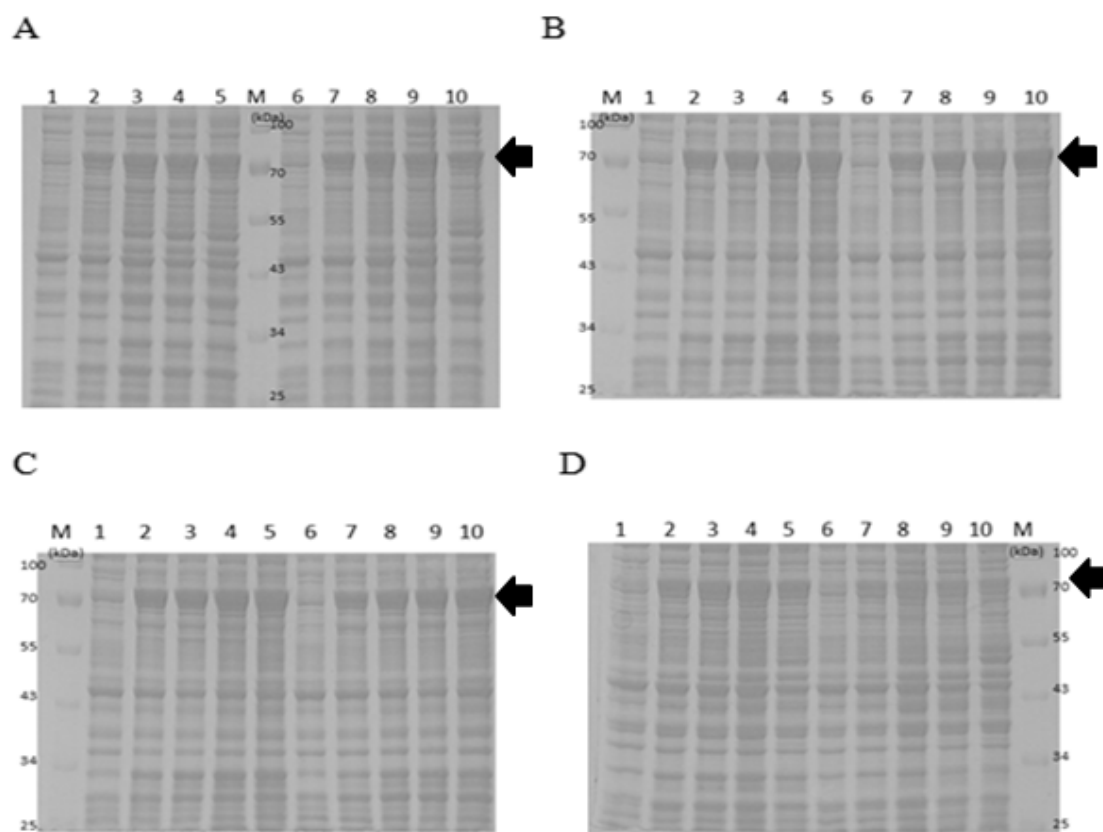
(A)左圖為 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖。Lane1、3、5、7 為 mLB, LB, mSOB, mSOC 培養基加入誘導劑前蛋白質電泳圖；Lane2、4、6、8 為加入誘導劑後蛋白質電泳圖。右圖為相對應轉漬膜結果。

(B)左圖為 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖。Lane1、3、5、7 為 mTB, mSB, TSB, m2x YT 培養基加入誘導劑前蛋白質電泳圖；Lane2、4、6、8 為加入誘導劑後蛋白質電泳圖。右圖為相對應轉漬膜結果。

由圖六結果可知重組菌株皆能在上述八種液態培養基產生 VP1 蛋白，為比較何者具有最佳的產量，將重組菌株接種於上述八種培養基中，經誘導後分別在 1、2、3、4 小時取樣，以 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖分析 VP1 蛋白的產量。

圖七 A 為重組菌株經 LB 與 mLB 培養液活化後的蛋白質電泳圖。Lane 1 為 mLB 誘導前的樣品，Lane 2、3、4、5 分別為誘導後 1、2、3、4 小時的樣品。由蛋白質電泳圖顯示，隨誘導後時間增加 VP1 蛋白的 78 kDa 色帶愈濃高。經定量分析結果得知誘導後 4 小時，VP1 蛋白表現量為 99.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。圖七 A 中的 Lane 7~10 是 LB 培養液在誘導後 1、2、3、4 小時的蛋白質電泳圖。同樣可觀察到，LB 培養液在誘導後 4 小時 VP1 蛋白產量最高，濃度是 85.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同樣的方法由蛋白質電泳圖可定量其他培養液誘導後 4 小時 VP1 蛋白的產量，圖七 B 中 mSOB 培養液誘導後 4 小時 VP1 蛋白產量是 120.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，mSOC 培養液誘導後 4 小時 VP1 蛋白產量是 126.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；圖七 C mSB 培養液誘導後 4 小時 VP1 蛋白產量是 117.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，mTB 培養液誘導後 4 小時 VP1 蛋白產量是 95.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；圖七 D 中 TSB 誘導後 4 小時 VP1 蛋白產量是 92.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，m2x YT 培養液誘導後 4 小時 VP1 蛋白產量是 70.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

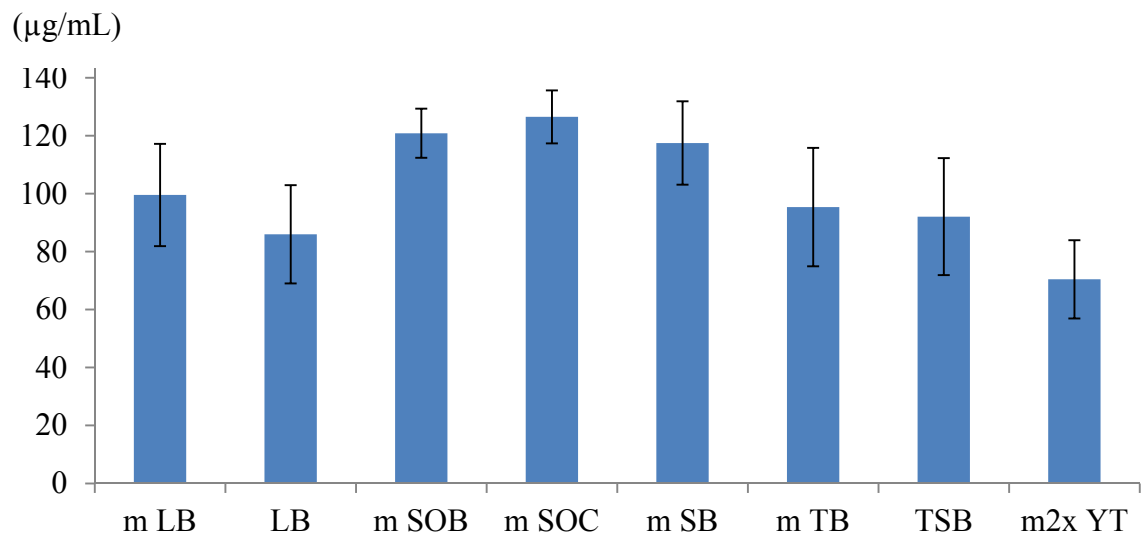
比較這八種培養基 VP1 蛋白最高產量如圖八，在這些培養基中，mSOC 有最高雞貧血病毒 VP1 蛋白表現量，後續實驗即以 mSOC 配方為最適化培養基組成之探討。



圖七、培養基不同時間點誘導雞貧血病毒 VP1 蛋白表現之影響。

Fig 7. SDS-PAGE profiles of VP1 protein expression induced in various media at different time.

- A: Lane1 為 mLB 培養液於誘導前蛋白質電泳圖；lane 2、3、4、5 為誘導後 1、2、3、4 小時蛋白質電泳圖；Lane 6 為 LB 培養液於誘導前蛋白質電泳圖；lane 7、8、9、10 為誘導後 1、2、3、4 小時蛋白質電泳圖。
- B: Lane1 為 mSOB 培養液於誘導前蛋白質電泳圖；lane 2、3、4、5 為誘導後 1、2、3、4 小時蛋白質電泳圖；Lane 6 為 mSOC 培養液於誘導前蛋白質電泳圖；lane 7、8、9、10 為誘導後 1、2、3、4 小時蛋白質電泳圖。
- C: Lane1 為 mSB 於誘導前蛋白質電泳圖；lane 2、3、4、5 為誘導後 1、2、3、4 小時蛋白質電泳圖；Lane 6 為 mTB 於誘導前蛋白質電泳圖；lane 7、8、9、10 為誘導後 1、2、3、4 小時蛋白質電泳圖。
- D: Lane1 為 TSB 於誘導前蛋白質電泳圖；lane 2、3、4、5 為誘導後 1、2、3、4 小時蛋白質電泳圖；Lane 6 為 m2x YT 培養液於誘導前蛋白質電泳圖；lane 7、8、9、10 為誘導後 1、2、3、4 小時蛋白質電泳圖。



圖八、雞貧血病毒 VP1 蛋白誘導表現 4 小時產量。

Fig 8. Amounts of VP1 protein expression after four hour inducing.

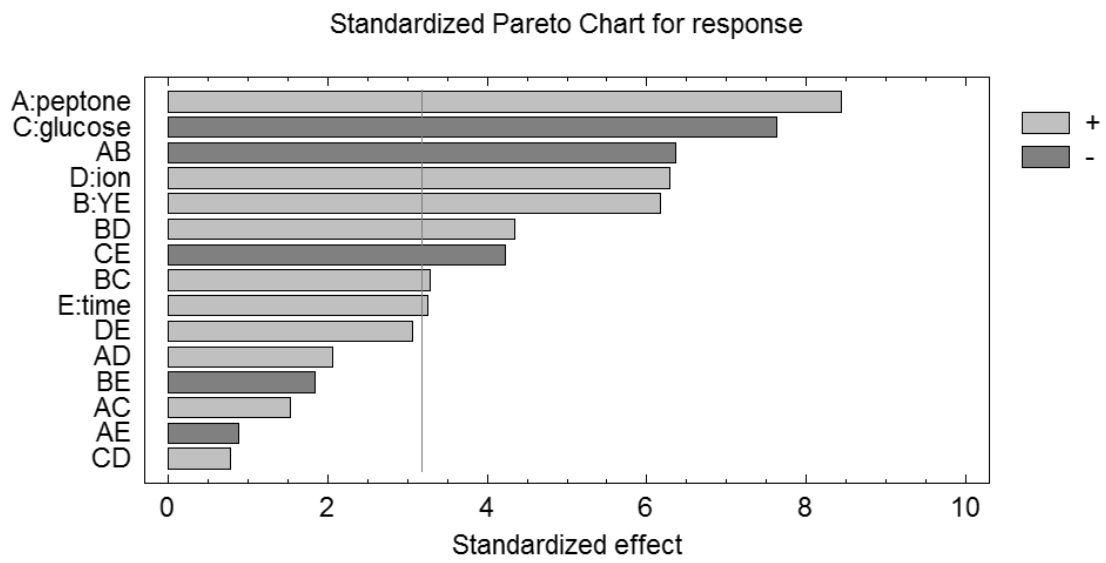
二、mSOC 培養基關鍵組成分之確定

mSOC 培養基確認可有效生產雞貧血病毒 VP1 蛋白，故以 mSOC 培養基組成分進行部分因子篩選實驗。依據 2^{5-1} 部分因子試驗設計法設計的培養基的組合進行試驗，培養基各成份比例及結果如表六。由此結果第 19 號樣品的 VP1 蛋白質含量是 $88.39 \mu\text{g/mL}$ ，菌體濁度則達到 $\text{OD}_{600}=1.52$ ；第 13 號樣品的 VP1 蛋白質含量最高為 $110.40 \mu\text{g/mL}$ ，菌體濁度則為 1.31，由此可知，菌數愈多 VP1 蛋白質不一定愈多，因此蛋白質產量與菌數似無正相關性。

表六、 2^{5-1} 部分因子試驗設計篩選適當的培養基組成份。

Table 6. The 2^{5-1} factorial experimental design for screening suitable medium ingredients.

NO.	peptone (%)	YE (%)	glucose (%)	ion solution (%)	time (hr)	菌液濁度 (OD600)	VP1產量 (µg/ml)
1	0.5	0.1	0	0.31	0	0.97	26.15
2	0.5	0.5	0	0.31	2	1.24	102.21
3	0.5	0.1	0.36	0.03	0	0.72	10.81
4	0.5	0.1	0.36	0.31	2	0.89	18.15
5	1.25	0.3	0.18	0.17	1	1.25	69.92
6	2	0.1	0.36	0.31	0	1.39	62.16
7	0.5	0.5	0	0.03	0	0.96	58.66
8	2	0.1	0	0.03	0	1.13	74.90
9	0.5	0.1	0	0.03	2	0.87	59.89
10	0.5	0.5	0.36	0.03	2	0.98	36.13
11	2	0.5	0.36	0.03	0	1.36	58.72
12	1.25	0.3	0.18	0.17	1	1.26	65.53
13	2	0.1	0	0.31	2	1.31	110.40
14	2	0.1	0.36	0.03	2	1.29	47.53
15	1.25	0.3	0.18	0.17	1	1.27	57.88
16	0.5	0.5	0.36	0.31	0	1.18	70.45
17	2	0.5	0	0.31	0	1.29	83.69
18	2	0.5	0	0.03	2	1.3	61.87
19	2	0.5	0.36	0.31	2	1.52	88.39



圖九、培養基成分 2^{5-1} 部分因子試驗的效應強度分析(Pareto chart)。

Fig 9. Effects analysis (Pareto chart) of medium ingredients according to a 2^{5-1} factorial experimental design.

以 STAGRAPHERICS 軟體 Pareto chart 分析部分因子試驗結果(如圖九)，經由 T 統計量(t-statistic)計算相對效應，得知蛋白朊、酵母萃取物、離子混合溶液、時間等四因子對 VP1 產量均為顯著的正向效應；葡萄糖對 VP1 產量為顯著的負向效應，推測原因是培養液中過多的葡萄糖可供分解利用，使 cAMP 濃度降低，CRP 不能被活化，lac operon 上的構造基因表現下降而影響 VP1 蛋白的產量。VP1 蛋白質濃度最大的兩個樣品分別是第 2 號和第 13 號 (102.21 μ g/mL、110.40 μ g/mL)，兩者差別在添加不同比例的蛋白朊與酵母萃取物。由 Pareto chart 分析結果(如圖九)顯示蛋白朊與酵母萃取物之間卻有顯著負向交互關係。表六中 6, 8, 13, 14 號試驗，即高劑量蛋白朊與低劑量酵母萃取物的組合，VP1 蛋白總和產量為 295 μ g/mL；而低劑量蛋白朊與高劑量酵母萃取物的組合 2, 7, 10, 16 號試驗，VP1 蛋白總和產量為 267.46 μ g/mL。此結果意味著高劑量蛋白朊與低劑量酵母萃取物，能得到較高的 VP1 蛋白產量。通常在培養基中蛋白朊作為主要的氮源，而酵母萃取物主要功用是提供生長因子，表六中高劑量酵母萃取物試驗組會有較高的菌量。然而蛋白 VP1 產量與菌數並無正相關性，為評估酵母萃取物的較佳添加範圍，以酵母萃取物添加量為培養基中單一變數，檢驗對 VP1 蛋白產量的效應，結果如表七。數據顯示酵母萃取物在添加量 0.2% 時，具有最高 VP1 蛋白產量(118.87 μ g/mL)，故後續全因子實驗時設定酵母萃取物高低劑量時將 0.2% 添加量包含其中。

表七、酵母萃取物單因子實驗。

Table 7. The single variable experiment of yeast extract.

NO.	YE (%)	peptone (%)	glucose (%)	ion solution (%)	time (hr)	菌液濁度 (OD ₆₀₀)	VP1 產量 (μg/mL)
1	0.1	2				1.46	90.95
2	0.2	2				1.43	118.87
3	0.3	2	0.02	0.31	2	1.41	100.4
4	0.4	2				1.45	100.4
5	0.5	2				1.42	97.23

第 13 號和第 19 號樣品 VP1 蛋白質濃度在部分因子試驗設計中為最高與第三高產量樣品(110.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、88.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，兩者差別在添加不同比例的酵母萃取物與葡萄糖。由 Pareto chart 分析結果(如圖九)顯示酵母萃取物與葡萄糖之間具有顯著正向的交互關係，表六中 1, 8, 9, 13, 號試驗，即高劑量酵母萃取物與高劑量葡萄糖的組合，VP1 蛋白總和產量為 253.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；而低劑量酵母萃取物與低劑量葡萄糖的組合 10, 11, 16, 19 號試驗，VP1 蛋白總和產量為 271.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。此結果低劑量酵母萃取物與低劑量葡萄糖，能得到較高的 VP1 蛋白產量，因葡萄糖對 VP1 產量為顯著的負向效應，為評估葡萄糖的較佳添加範圍，以葡萄糖添加量為培養基中單一變數，檢驗對 VP1 蛋白產量的效應，結果如表八。數據顯示葡萄糖在添加量 0.065 % 時，具有最高 VP1 蛋白產量(136.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，故後續全因子實驗時設定葡萄糖高低劑量時將 0.065% 添加量包含其中。

表八、葡萄糖單因子實驗。

Table 8. The single variable experiment of glucose.

NO.	glucose (%)	peptone (%)	YE (%)	ion solution (%)	time (hr)	菌液濁度 (OD ₆₀₀)	VP1 產量 (μg/mL)
1	0.02	2				1.43	130.46
2	0.065	2				1.42	136.84
3	0.11	2	0.1	0.31	2	1.45	122.84
4	0.155	2				1.46	119.58
5	0.2	2				1.44	118.53

根據 2^4 全因子試驗設計加上三個中心點尋找較具影響的組成份(蛋白朊、酵母萃取物、葡萄糖、離子溶液)，二因子階層試驗設計與試驗結果及培養基如表九。依據 Pareto chart 分析結果: 蛋白朊、離子溶液二因子對 VP1 蛋白產量均為顯著正向關係，酵母萃取物和葡萄糖二因子對產量的效應則不顯著(圖十 A)。由表九可觀察到高劑量酵母萃取物各試驗組(1, 2, 3, 4, 7, 9, 13, 17)VP1 蛋白總和產量($761.76 \mu\text{g/mL}$)高於低劑量組(5, 6, 8, 10, 11, 16, 18, 19)的產量($738.88 \mu\text{g/mL}$)，故後續實驗條件固定酵母萃取物濃度為 0.3 %；高濃度的葡萄糖似乎不利於 VP1 蛋白表現，表九中高劑量葡萄糖各試驗組(1, 3, 6, 7, 10, 16, 17, 18)VP1 蛋白總和產量為 $714.64 \mu\text{g/mL}$ ，低劑量各試驗組(2, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 19)VP1 蛋白總和產量為 $786 \mu\text{g/mL}$ ，VP1 蛋白表現在低劑量葡萄糖時顯然較佳，故後續實驗條件固定葡萄糖濃度為 0.01 %。

以全因子試驗設計所得顯著因子蛋白朊與離子溶液之回歸係數(圖十 B)，進行陡升實驗。迴歸方程式為：

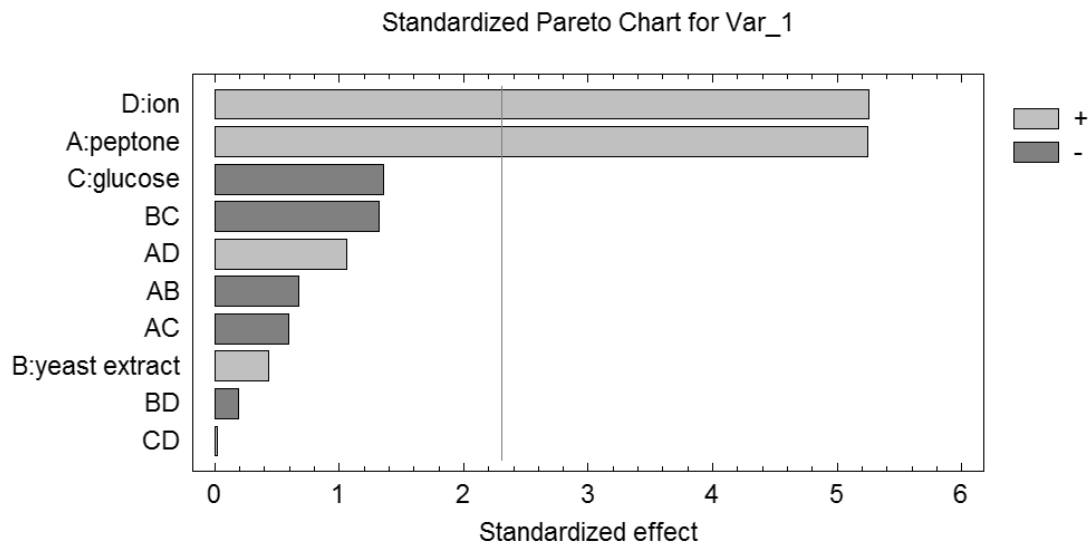
$$Y=17.22 \text{ peptone}+17.23 \text{ ion} \quad (Y:\text{VP1 蛋白表現量})。$$

表九、培養基組成之 2^4 全因子試驗設計。

Table 9. The 2^4 full factorial experimental design for estimating effects of medium ingredients on VP1 production.

NO.	peptone (%)	YE (%)	glucose (%)	ion solution (%)	菌液濁度 (OD ₆₀₀)	VP1 產量 (µg/mL)
1	2	0.3	0.1	0.31	1.39	126.16
2	0.5	0.3	0.01	0.03	1.19	75.89
3	0.5	0.3	0.1	0.31	1.28	86.02
4	2	0.3	0.01	0.03	1.43	104.92
5	0.5	0.1	0.01	0.31	1.31	71.57
6	0.5	0.1	0.1	0.03	0.88	65.53
7	2	0.3	0.1	0.03	1.43	83.66
8	2	0.1	0.01	0.31	1.44	154.91
9	0.5	0.3	0.01	0.31	1.4	109.01
10	2	0.1	0.1	0.03	1.44	89.02
11	2	0.1	0.01	0.03	1.39	83.59
12	1.25	0.2	0.055	0.17	1.37	96.65
13	2	0.3	0.01	0.31	1.4	126.18
14	1.25	0.2	0.055	0.17	1.42	97.48
15	1.25	0.2	0.055	0.17	1.49	97.52
16	0.5	0.1	0.1	0.31	1.11	94.72
17	0.5	0.3	0.1	0.03	1.08	49.92
18	2	0.1	0.1	0.31	1.37	119.61
19	0.5	0.1	0.01	0.03	1.02	59.93

A: pareto chart 結果



B: 軟體回歸係數

Regression coeffs. for Var_1	
Coefficient	Estimate
constant	94.3311
A:peptone	17.2163
B:yeast extract	1.43
C:glucose	-4.46
D:ion	17.2325
AB	-2.20625
AC	-1.93375
AD	3.47625
BC	-4.32
BD	-0.61
CD	0.065

圖十、培養基成分對 2^4 全因子試驗的分析。

Fig 10. Analysis of medium ingredients effects according to measures of 2^4 full factorial experimental design.

三、尋找主要組成份之最佳濃度範圍

採用陡升路徑方法，依據前述迴歸方程式中，各主要組成份之參數比例，陡升增加，其比例為：蛋白胨：離子溶液=0.2：0.04。其試驗設計與結果如表十。比較後發現，第2、3、4號樣品菌液VP1蛋白產量為117、115、116 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，比較LB培養液，菌體濁度 $\text{OD}_{600}=1.62$ ，VP1蛋白產量為77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。菌數以第2號樣品菌體濁度 $\text{OD}_{600}=1.41$ 與第6號樣品菌體濁度相同，但是其VP1蛋白產量為98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；第3號樣品與第8號樣品菌體濁度皆為 $\text{OD}_{600}=1.38$ ，VP1蛋白產量(115 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、78 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。比較菌數與VP1蛋白質產量，VP1蛋白質產量不會隨著菌數增加而增加，與前述(參-二)結果相符。由陡升路徑試驗找到的最佳產區域約在第2~4號試驗組之間，因此以第3號試驗組之培養基組成份比例(蛋白胨:1.65%；離子溶液:0.24%)為中心點，進行中心混成設計。

表十、陡升路徑試驗之培養基組成與結果。

Table 10. Experimental design of the path steepest ascent for searching the proximate optimal conditions.

NO	peptone (%)	ion solution (%)	菌液濁度 (OD ₆₀₀)	VP1 產量 (μg/mL)
1	1.25	0.16	1.37	88.4
2	1.45	0.2	1.41	117
3	1.65	0.24	1.38	115
4	1.85	0.28	1.35	116
5	2.05	0.32	1.38	101
6	2.25	0.36	1.41	98
7	2.45	0.4	1.36	91
8	2.65	0.44	1.38	78
9	2.85	0.48	1.29	82
10	3.05	0.52	1.28	77

四、尋找最適培養基組成分

採用中心混成實驗設計，依據上述陡升路徑試驗找到的最佳產量之培養基組成份比例為中心點(蛋白胨: 1.65%；離子溶液:0.24%)，以中心點增減 0.4%為蛋白胨的比例；增減 0.08%為離子溶液的比例，固定酵母萃取物濃度為 0.3%；葡萄糖濃度為 0.01%，其試驗設計培養基組成份與結果如表十一。

將產量結果輸入 STAGRAPHICS 軟體分析，得到一個蛋白胨和離子溶液對 VP1 蛋白產率之迴應曲面圖及等高線圖(圖十一和圖十二)，可得到最適組成份比例大約是蛋白胨= 1.79%、離子溶液=0.27%，經過分析各組成份對產量的效應(圖十三)。圖十四為中心混成設計之回歸分析表，得到一回歸方程式為：

$$\text{response} = 135.46 + 8.47075 \times \text{peptone} + 9.76969 \times \text{ions} - 3.0744 \times \text{peptone}^2 + 1.135 \times \text{peptone} \times \text{ions} - 13.8819 \times \text{ions}^2$$

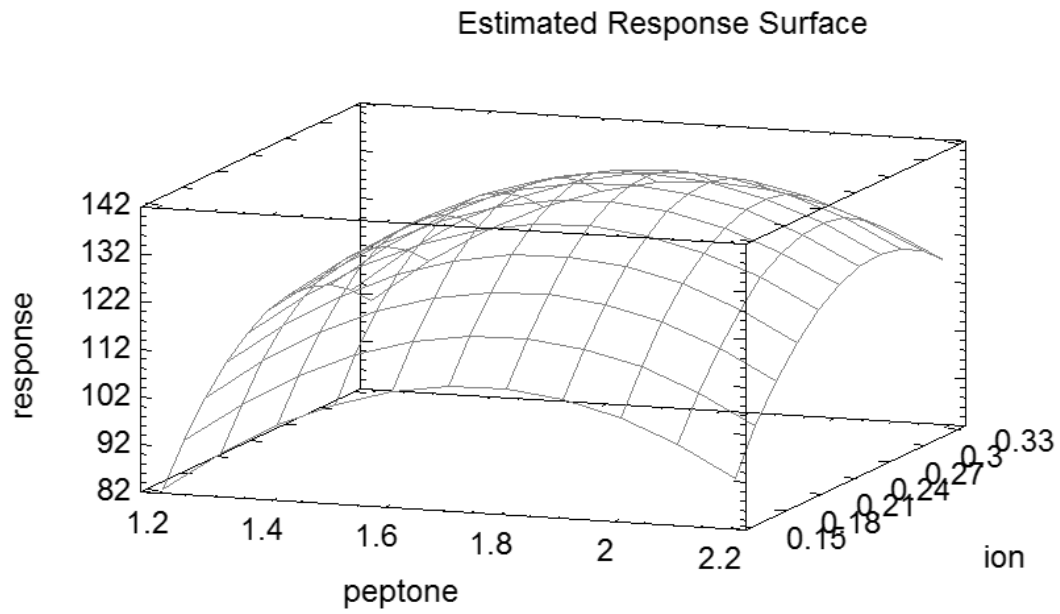
蛋白胨與離子溶液之二次項都分別具有極顯著性($p < 0.01$) (如圖十四 B)，蛋白胨與離子溶液之一次項交互作用項無顯著差異($p > 0.05$)，表示兩因子之間並無交互作用。R-squared 值達到 97.16%表示此回歸方程式足以解釋 VP1 蛋白生產能適切描述本實驗之數據，即 VP1 蛋白的產率，可用所採用之因子的變異解釋。

依據迴應曲面法估計 VP1 蛋白最佳產量之培養基組成(表十二)，進行確認實驗，並以傳統 LB 培養基當對照組進行產量比較，驗證是否符合最適值。

表十一、中心混成試驗之培養基組成與結果。

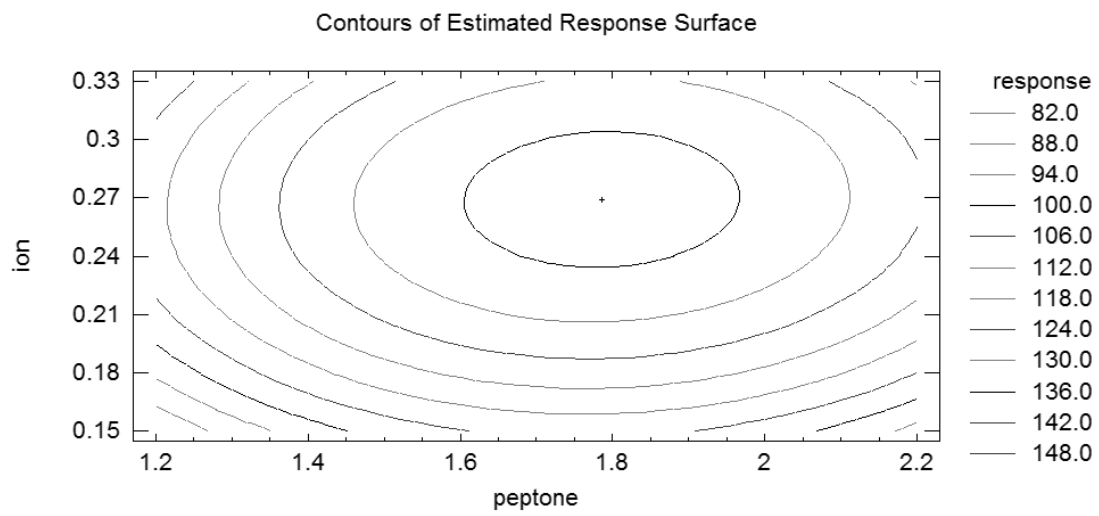
Table 11. Experimental worksheet of the central composite design for determining the optimal condition.

NO.	peptone (%)	ion solution (%)	菌液濁度 (OD ₆₀₀)	VP1 產量 ($\mu\text{g/mL}$)
1	1.25	0.32	1.5	112.89
2	1.086	0.24	1.43	95.91
3	2.05	0.16	1.34	105.58
4	1.65	0.24	1.43	135.48
5	1.65	0.24	1.49	135.61
6	2.214	0.24	1.37	118.98
7	1.25	0.16	1.41	90.28
8	1.65	0.24	1.42	135.29
9	2.05	0.32	1.49	132.73
10	1.65	0.1272	1.34	95.79
11	1.65	0.3528	1.33	115.87



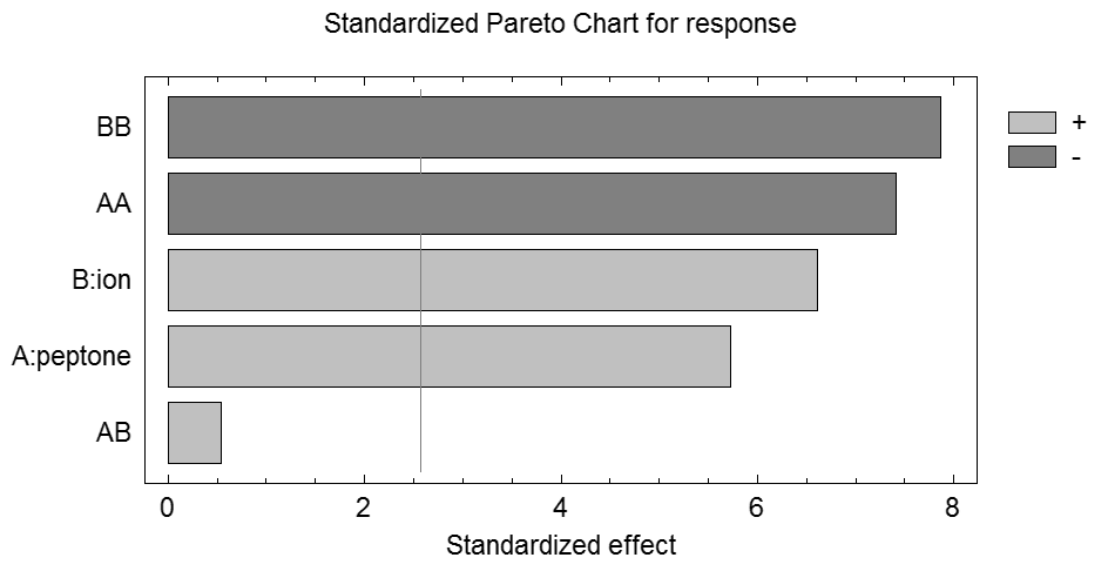
圖十一、蛋白腓和離子溶液對於 VP1 蛋白產率影響之迴應曲面圖。

Fig 11. Response surface of VP1 protein productions vs peptone and mixed ion solution.



圖十二、蛋白腓和離子的添加對於 VP1 蛋白產率影響之等高線圖。

Fig 12. 、Contours of VP1 protein productions vs peptone and mixed ion solution.



圖十三、培養基組成份對中心混成試驗設計的分析。

Fig 13. Analysis of medium ingredients effects in the central composite experimental design.

(A)、回歸係數

Regression coeffs. for Var_1

Coefficient	Estimate
constant	135.46
A:peptone	8.47075
B:ion	9.76969
AA	-13.0744
AB	1.135
BB	-13.8819

The StatAdvisor

This pane displays the regression equation which has been fitted to the data. The equation of the fitted model is

$$\text{Var}_1 = 135.46 + 8.47075*\text{peptone} + 9.76969*\text{ion} - 13.0744*\text{peptone}^2 + 1.135*\text{peptone}*\text{ion} - 13.8819*\text{ion}^2$$

(B)、回歸分析表

Analysis of Variance for Var_1

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:peptone	574.027	1	574.027	33.47	0.0022
B:ion	763.573	1	763.573	44.52	0.0011
AA	965.301	1	965.301	56.28	0.0007
AB	5.1529	1	5.1529	0.30	0.6072
BB	1088.22	1	1088.22	63.45	0.0005
Total error	85.7515	5	17.1503		
Total (corr.)	3016.51	10			

R-squared = 97.1573 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 94.3145 percent

Standard Error of Est. = 4.14129

Mean absolute error = 2.02788

Durbin-Watson statistic = 1.54262 (P=0.1392)

Lag 1 residual autocorrelation = -0.0609189

圖十四、中心混成設計之回歸分析。

Fig 9. The regression analysis of the central composite experimental design.

表十二、迴應曲面法預測 VP1 蛋白產率之最適培養基組成。

Table 12. The VP1 production estimated by using response surface methodology.

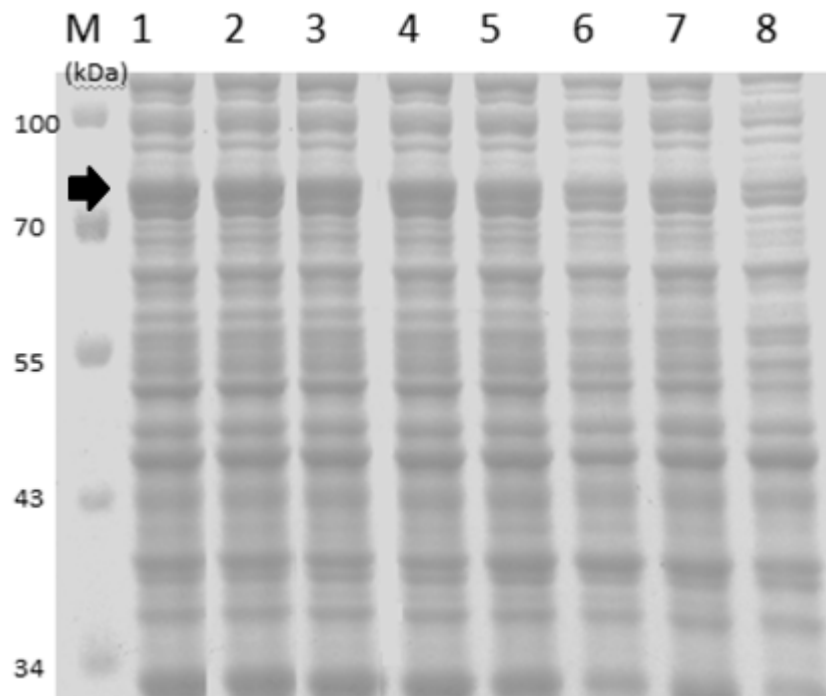
Optimum Response

Factor	Low	High	Optimum
peptone	1.086	2.214	1.7859
Ion	0.1272	0.3528	0.2693

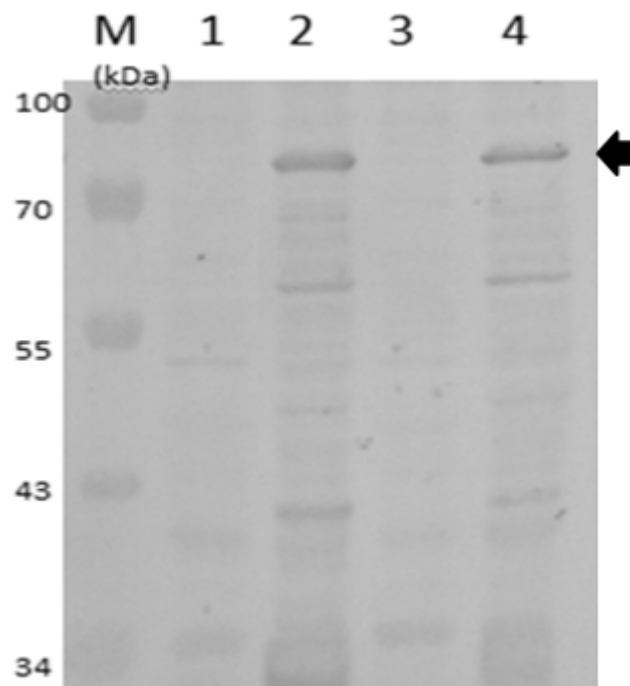
Optimum value = 138.686

圖十五 A，; Lane 1~5 為最適化培養基 5 重複實驗組誘導後 VP1 蛋白表現量; Lane 6 為最適化培養基實驗組誘導前 VP1 蛋白表現量; Lane 7 為 LB broth 誘導後 VP1 蛋白表現量; Lane 8 為 LB broth 誘導前 VP1 蛋白表現量(菌液濁度 OD₆₀₀ 為 1.72; VP1 產量 75 µg/mL)。經誘導後產生的 VP1 蛋白，以西方墨點法確認(圖十五)，圖十五 B 中 Lane 1、3 是最適化培養基實驗組與 LB 培養液誘導前; Lane 2、4 是最適化培養基實驗組與 LB 培養液誘導後 PVDF 膜上表現，可觀察到明顯的 VP1 蛋白 78 kDa 色帶，確認有效 VP1 蛋白表現。5 組實驗組中 VP1 蛋白產量如表十三，經由統計分析 5 組實驗組 VP1 蛋白產量平均為 137.97±1.02 µg/mL (如表十四 A)。進行了 T-Tests 分析結果如表十四 B，結果顯示 P 值=0.52 大於 0.05，表示實驗值符合估計值 (138.69µg/mL)的標準。並與 LB 培養液相比 VP1 蛋白產量有 1.84 倍的表現。

A: SDA-PAGE 蛋白電泳圖。



B: 西方點墨法。



圖十五、最適化培養基與 Luria-Bertain (LB) 培養基誘導雞貧血病毒 VP1 蛋白表現。

Fig 15. Comparison of VP1 protein expressions in the optimal medium and Luria-Bertain (LB) medium.

表十三、最適化培養基雞貧血病毒 VP1 蛋白之表現。

Table13. Expression of Chicken anemia virus VP1 protein by using optimal medium.

NO.	peptone (%)	ion solution (%)	菌液濁度 (OD ₆₀₀)	VP1 產量 (μg/mL)
1			1.43	140.13
2			1.44	138.27
3	1.79	0.27	1.46	137.46
4			1.44	139.64
5			1.52	134.36

表十四、VP1 蛋白最佳產量之驗證。

Table 14. Verification of VP1 protein production by using optimal medium

A. Statistics of experimental VP1 protein production data.

Variable	N	Lower CL		Upper CL		Lower CL		Upper CL	
		Mean	Mean	Mean	Std Dev	Std Dev	Std Dev	Std Dev	Std Err
y	5	135.14	137.97	140.81	1.37	2.28	6.56	1.02	

B. t-Test for verifying the optimal medium

Variable	DF	t Value	Pr > t
y	4	-0.7	0.5228

附註: The SAS system Version 8.01(SAS Institute Inc., N.C., U.S.A.)。

五、發酵槽試驗

根據試驗設計求得最適化培養基成分，利用攪拌式發酵槽進行生產試驗，在接菌誘導生產 VP1 蛋白，每隔 2 小時收發酵液測其 VP1 蛋白產量(表十五)，培養時間 2~8 小時，VP1 蛋白產量隨菌液濁度成正比;培養時間 10~24 小時，雖菌液濁度上升但 VP1 蛋白產量逐漸下降;最佳培養時間為: 誘導 8 小時，菌液濁度 $OD_{600}=1.31$ ，VP1 蛋白產量為 $163.73 \mu\text{g/mL}$ 。與 LB 培養液(菌液濁度 OD_{600} 為 1.76； VP1 產量 $76 \mu\text{g/mL}$)相比 VP1 蛋白產量有 1.84 倍的表現。

表十五、發酵槽試驗。

Table 15. VP1 protein production of the jar fermentor experiment.

發酵時間 (hr)	2	4	6	8	10	12	24
菌液濁度(OD_{600})	0.95	1.1	1.19	1.31	1.45	1.56	1.86
VP1 產量($\mu\text{g/mL}$)	26.07	74.76	107.79	163.73	99.78	87.68	78.52

肆、結論

為了提升雞貧血病毒 VP1 蛋白生產，在 8 種培養基中進行初步篩選，實驗結果 LB 培養液誘導後 VP1 蛋白表現量為 85.98 $\mu\text{g/ml}$ ，而在 mSOC 培養液誘導後 VP1 蛋白表現量為 126.51 $\mu\text{g/ml}$ 。將 mSOC 培養液組成分經由二階因子試驗尋得關鍵因子，其中蛋白胨、離子溶液，具對雞貧血病毒 VP1 蛋白具有正向顯著關係。經 STATGRAPHICS 軟體分析，進行陡升路徑實驗，求得最佳產率範圍後，經中心混成試驗設計，得最佳產率關鍵組成分添加比率為蛋白胨= 1.79 %、離子溶液= 0.27 %。以實驗驗證最適值，雞貧血病毒 VP1 蛋白平均產量為 137.98 $\mu\text{g/mL}$ ，與軟體估計值無顯著差異 ($P > 0.05$)，並與 LB 培養液相比有 1.84 倍的表現量。經發酵槽小規模生產後，可得 VP1 蛋白產量為 163.73 $\mu\text{g/mL}$ 。經實驗結果得知，最適化後培養基確能提高 VP1 蛋白產產量，未來可繼續進行發酵槽饋料培養、pH 值調控，以達提高生產雞貧血病毒蛋白 VP1 之生產。

伍、參考文獻

- Giordano, P. C., Martinez, H. D., Iglesias, A. A., Beccaria, A. J., & Goicoechea, H. C. (2010). Application of response surface methodology and artificial neural networks for optimization of recombinant *Oryza sativa* non-symbiotic hemoglobin 1 production by *Escherichia coli* in medium containing byproduct glycerol. *Bioresour Technol*, *101*(19), 7537-7544.
- Lee, M. S., Hseu, Y. C., Lai, G. H., Chang, W. T., Chen, H. J., Huang, C. H., Lee, M. S., Wang, M. Y., Kao, J. Y., You, B. J., Lin, W., Lien, Y. Y., & Lin, M. K. (2011). High yield expression in a recombinant *E. coli* of a codon optimized chicken anemia virus capsid protein VP1 useful for vaccine development. *Microb Cell Fact*, *10*, 56.
- Noteborn, M. H., de Boer, G. F., van Roozelaar, D. J., Karreman, C., Kranenburg, O., Vos, J. G., Jeurissen, S. H., Hoeben, R. C., Zantema, A., Koch, G., & et al. (1991). Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *J Virol*, *65*(6), 3131-3139.
- Noteborn, M. H., Todd, D., Verschueren, C. A., de Gauw, H. W., Curran, W. L., Veldkamp, S., Douglas, A. J., McNulty, M. S., van der, E. A., & Koch, G. (1994). A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J Virol*, *68*(1), 346-351.
- Papaneophytou, C. P., & Kontopidis, G. A. (2012). Optimization of TNF-alpha overexpression in *Escherichia coli* using response surface methodology: Purification of the protein and oligomerization studies. *Protein Expr Purif*, *86*(1), 35-44.
- Ramerez, D. M., & Bentley, W. E. (1993). Enhancement of recombinant protein synthesis and stability via coordinated amino acid addition. *Biotechnol Bioeng*, *41*(5), 557-565.
- Ryan, W., Parulekar, S. J., & Stark, B. C. (1989). Expression of beta-lactamase by recombinant *Escherichia coli* strains containing plasmids of different sizes--effects of pH, phosphate, and dissolved oxygen. *Biotechnol Bioeng*, *34*(3), 309-319.
- Sun, Q. Y., Ding, L. W., He, L. L., Sun, Y. B., Shao, J. L., Luo, M., & Xu, Z. F. (2009). Culture of *Escherichia coli* in SOC medium improves the cloning efficiency of toxic protein genes. *Anal Biochem*, *394*(1), 144-146.
- Tabandeh, F., Khodabandeh, M., Yakhchali, B., Habib-Ghomi, H., & Shariati, P. (2008). Response surface methodology for optimizing the induction conditions of recombinant interferon beta during high cell density culture. *Chemical Engineering Science*, *63*(9), 2477-2483.

- Todd, D., Creelan, J. L., Mackie, D. P., Rixon, F., & McNulty, M. S. (1990). Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. *J Gen Virol*, 71 (Pt 4), 819-823.
- Vielitz, E., & Landgraf, H. (1988). Anaemia-dermatitis of broilers: field observations on its occurrence, transmission and prevention. *Avian Pathol*, 17(1), 113-120.
- Xu, J., Banerjee, A., Pan, S. H., & Li, Z. J. (2012). Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using E. coli BL21 strains. *Protein Expr Purif*, 83(1), 30-36.
- YS, L., HJ, T., MJ, K., & CS, T. (1993). Chicken infectious anemia in Taiwan: virus isolation and antibody survey. *J Chin Soc Vet Sci*, 19, 137-146.
- Yuasa, N., Taniguchi, T., & Yoshida, I. (1979). Isolation and Some Characteristics of an Agent Inducing Anemia in Chicks. *Avian Diseases*, 23, 366-385.
- 陳怡綺. (2011). 探討轉殖大腸桿菌生產外切型纖維分解酵素之最適培養條件. 大同大學, 台北市.