

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

**Advisor : Ken-Yuon Li, Ph.D.**

重組大腸桿菌 p274 發酵生產降血壓胜肽能力之探討

**Approach of using recombinant *Escherichia coli***

**p274 to produce anti-hypertensive peptide**

研究生：高國倫 撰

**Graduate Student : Kuo-Lun Kao**

中華民國九十五年七月

**July, 2006**

# 目 錄

中文摘要-----	I
英文摘要-----	II
壹、 前言-----	1
貳、 文獻回顧-----	2
一、 血管收縮素 I 轉換酵素(Angiotensin I-converting enzyme, ACE)、血管收縮素 I 轉換酵素抑制劑(Angiotensin I-converting enzyme inhibitor, ACEI)與血壓三者的關係 ---	2
1. ACE 與血壓的調控-----	2
2. ACE 與 ACEI 的關係-----	4
3. 常見 ACEI 藥物-----	6
二、 降血壓胜肽的來源-----	7
1. 從食物當中利用酵素水解取得-----	9
2. 應用基因重組技術合成胜肽-----	11
3. 降血壓胜肽 RPLKPW 的發展過程-----	13
三、 降血壓胜肽生產菌株培養方法之探討-----	19
1. 生產 RPLKPW 重組菌株之性質-----	19
2. 培養基之最適化-----	22
3. 發酵槽培養技術-----	25

參、 材料與方法-----	27
一、 材料-----	27
1. 菌種-----	27
2. 營養培養基-----	27
3. 化學無機鹽類-----	28
4. 抗生素-----	28
5. 分子篩管柱層析試劑-----	28
6. 親和性管柱層析試劑-----	28
7. 總蛋白質含量試劑-----	29
8. 硫酸十二酯鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳分析 (Sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis analysis, SDS-PAGE) -----	29
二、 儀器-----	30
三、 試驗方法-----	33
1. 種菌的培養-----	33
2. 分子篩層析管柱方法-----	34
3. 親和性管柱層析方法-----	34
4. SDS-PAGE 電泳步驟-----	36
5. 總蛋白質含量測量方法(Micro Assay) -----	38
6. 比較重組菌株 <i>E. coli</i> p274 在不同時間下的表現-----	38

7.	以發酵槽大量培養轉型菌株-----	39
7.1.	培養條件-----	39
7.2.	步驟-----	40
8.	質體對培養基添加不同醣類的表現情形-----	40
四、	試驗設計-----	41
1.	使用的回應曲面法決定最佳之培養基-----	41
1.1.	Plackett-Burman(PB)試驗設計篩選組成份-----	41
1.2.	部分因子試驗設計判斷關鍵組成份-----	41
1.3.	陡升試驗設計尋求組成份濃度之最適範圍-----	41
1.4.	中心混成設計決定培養基最適組成份-----	42
2.	使用軟體-----	42
3.	實驗步驟-----	42
4.	液態培養發酵方法-----	43
肆、	結果與討論-----	52
一、	發酵液中融合蛋白(ZZ-RPLKPW)之回收-----	52
二、	以發酵槽大量培養重組大腸桿菌 p274-----	57
三、	轉型菌株融合蛋白表達之穩定性-----	62
四、	培養基成分對融合蛋白產量之影響-----	67
(一)	不同碳源之影響-----	67

(二) 最適培養基組成分之探討-----	70
1. 有效組成份之篩選-----	70
2. 關鍵組成份之確定-----	75
3. 尋找主要組成份之最佳濃度範圍-----	79
4. 尋找最適培養基組成分-----	81
伍、 結論-----	96
陸、 參考文獻-----	98
柒、 附錄-----	108

## 圖 次

圖一、腎素血管收縮素系統-----	3
圖二、ACEI 抗高血壓之作用途徑-----	5
圖三、Captopril 結構圖-----	6
圖四、質體 pEZZ18 的基因圖譜-----	20
圖五、預測之轉形大腸桿菌質體基因圖譜-----	21
圖六、不同培養時間的融合蛋白經親和性膠體吸附管柱層析圖-----	55
圖七、融合蛋白在不同時間的表現量之 SDS-PAGE 電泳圖-----	56
圖八、轉型菌 <i>E. coli</i> p274 發酵期間，發酵液之總蛋白質濃度、菌液 渾濁度、pH 值變化圖-----	59
圖九(A)、利用發酵槽生產的融合蛋白經分子篩管柱層析圖-----	60
圖九(B)、利用發酵槽生產的融合蛋白經親和性管柱層析圖-----	61
圖十(A)、轉型菌 <i>E. coli</i> p274 藍色菌落表現融合蛋白情形-----	64
圖十(B)、轉型菌 <i>E. coli</i> p274 白色菌落表現融合蛋白情形-----	64
圖十一(A)、 <i>E. coli</i> p274 生長於 LB/ Amp/ X-Gal 之平面培養基-----	65
圖十一(B) <i>E. coli</i> p274 生長於另一塊 LB/ Amp/ X-Gal 之平面培養基 -----	65
圖十二、接種 LB 斜面培養基上 <i>E. coli</i> p274 分泌融合蛋白之情形--	66
圖十三、以 LB 添加乳糖培養 <i>E. coli</i> p274 後融合蛋白之管柱吸附圖 -----	69

圖十四、各培養基對 Plackett-Burman 試驗結果的分析-----	74
圖十五(A)、各培養基對 $2^{4-1}$ 部分因子試驗的分析-----	77
圖十五(B)、修正各培養基對 $2^{4-1}$ 部分因子試驗的分析-----	78
圖十六、Tryptone、YE 的添加對於融合蛋白產率影響之反應曲面圖 -----	86
圖十七、Tryptone、YE 的添加對於融合蛋白/總蛋白濃度影響之等高 線圖-----	87
圖十八、培養基組成份對中心混成試驗設計的分析-----	88

## 表 次

表一、天然和人工的胜肽片段抑制 ACE 酵素活性的比較-----	8
表二、ACEI 胜肽的發展-----	10
表三、ACEI 藥物的活性-----	10
表四、胜肽合成方法之比較-----	12
表五、SHR 口服 ovokin(2-7)衍生物後的相對降血壓活性-----	17
表六、ovalbumin 和利用基因修飾的 $\beta$ -conglycinin $\alpha'$ 次單元餵食 SHR 後的降血壓活性-----	18
表七(A)、Plackett-Burman 試驗設計-----	45
表七(B)、Plackett-Burman 試驗設計培養基組成份-----	46
表八(A)、 $2^{4-1}$ 部分因子試驗設計-----	47
表八(B)、 $2^{4-1}$ 部分因子試驗設計之培養基組成份-----	48
表九、陡升路徑試驗培養基組成-----	49
表十(A)、中心混成試驗設計-----	50
表十(B)、培養基組成份之中心混成試驗設計-----	51
表十一、LB 加入不同碳源對 <i>E. coli</i> p274 生長的影響-----	68
表十二(A)、培養基組成份之 Plackett-Burman 試驗設計-----	72
表十二(B)、Plackett-Burman 試驗設計方法結果-----	73
表十三、培養基組成份之 $2^{4-1}$ 部分因子試驗設計-----	76

表十四、陡升路徑試驗之培養基組成與結果-----	80
表十五、中心混成試驗之培養基組成與結果-----	85
表十六、SAS 對組成份中心混成設計之回歸分析表-----	89
表十七、SAS 對組成份中心混成設計之變方分析表-----	90
表十八、組成份中心混成設計方程式之變方分析表-----	91
表十九、SAS 正則分析表-----	92
表二十、回應曲面法預測融合蛋白產率之最適培養基組成-----	93
表二十一、中心混成設計整體總合作用之變方分析-----	94
表二十二、預測中心混成設計得到的 RPLKPW 胜肽產量-----	95

## 摘 要

帶有 RPLKPW 降血壓胜肽基因的大腸桿菌轉殖菌株，以液體培養可產生 RPLKPW 降血壓胜肽。本研究目的在於探討利用發酵技術製造 RPLKPW 胜肽的可行性。菌種穩定性是發酵菌種的基本要求，經試驗結果得知此轉殖菌株表達胜肽的能力並不穩定，在-80°C 甘油儲存下經過一年以上，有些菌可能喪失了轉殖菌株的特性，於 LB/Amp 斜面培養基保存於 4°C 下一個月，轉殖菌株特性些微減少，兩個月後，特性迅速失去，故以-80°C 甘油長期保存轉殖菌株為宜。為尋求能提高胜肽產量的培養基，經培養基試驗，發現添加碳源無助於胜肽的產生，雖會增加轉殖菌株菌數和分泌之總蛋白質含量，但對融合蛋白的分泌較不顯著，甚至抑制融合蛋白生成。應用 Plackett-Burman 與部分因子試驗設計所得的數據，確認 tryptone 與 Yeast Extract 是關鍵性培養基成分，進一步使用回應曲面法尋找這兩種成份的最佳組合，結果可得回歸方程式

$$\text{Fusion protein proportion} = -1.614 + 3.030 * \text{tryptone} + 0.099 * \text{YE} - 1.316 * \text{tryptone}^2 + 0.150 * \text{tryptone} * \text{YE} - 0.175 * \text{YE}^2$$

經 SAS 分析轉換得到的正則方程式為

$$Y = 0.237 - 0.079 Z_1^2 - 0.112 Z_2^2 \quad (Y = \text{融合蛋白產率}, Z_1 = \text{tryptone}, Z_2 = \text{YE})$$

。依據回歸方程式，推算最佳組合為 tryptone=1.20%、YE=0.80%，利用此最適組成份進行三角瓶發酵，結果降血壓胜肽產量為 0.72 µg/mL。

## Abstract

The recombinant strain of *E. coli* p274 possesses the capability to produce RPLKPW, an anti-hypertensive peptide, in a submerged culture. The objection of this study is to approach the feasibility of producing RPLKPW by fermentation technique with this recombinant strain. Usually, the genetic stability is the first criterion for a fermentation strain, but unfortunately this strain lost part of capability to generate RPLKPW after storage in 20% glycerol at -80°C for 1 year and in LB agar slant for months. The medium studies revealed that extra carbon sources such as sugars and glycerol did not improve the productivity of RPLKPW, some of sugars even repressed the peptide gene; tryptone and Yeast Extract have been decided as indispensable in gradients of the medium, and the optimal amount used in the medium were 1.20% and 0.80%, respectively. The optimal composition was figured out according to the regressive equation:

$$\text{Fusion protein proportion} = -1.614 + 3.030 * \text{tryptone} + 0.099 * \text{YE} - 1.316 * \text{tryptone}^2 + 0.150 * \text{tryptone} * \text{YE} - 0.175 * \text{YE}^2$$

And the equation was derived from the data of response surface methodology.

## 壹、前言

血管收縮素轉換酵素(Angiotensin Converting Enzyme, ACE)藉由活化血管收縮素(angiotensin)促進血管收縮，而使血壓上升。血管收縮素轉換酵素抑制劑(Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor, ACEI)則能阻斷此酵素作用，降低血壓。許多天然食物含有一些 ACEI 功能的成分，其中由蛋白質經部份水解產生具 ACEI 功能的胜肽，是近年來機能性食品研發的重點項目。

在許多具 ACEI 功能的胜肽中，Arg-Pro-Leu-Lys-Pro-Trp (RPLKPW)降血壓效果甚佳。本研究室於 2004 年利用 DNA 重組技術，將此胜肽 RPLKPW 基因藉由 pEZZ18 質體轉殖進入大腸桿菌中。期望未來能利用發酵技術量產 ACEI 胜肽。

本研究將尋求重組菌株最適培養基，並利用最適培養基進行發酵槽試驗，以探討大量發酵生產的可行性。進一步將建立從融合蛋白中回收純化 RPLKPW 降血壓胜肽的程序，以作經濟效益評估的參考。

## 貳、文 獻 回 顧

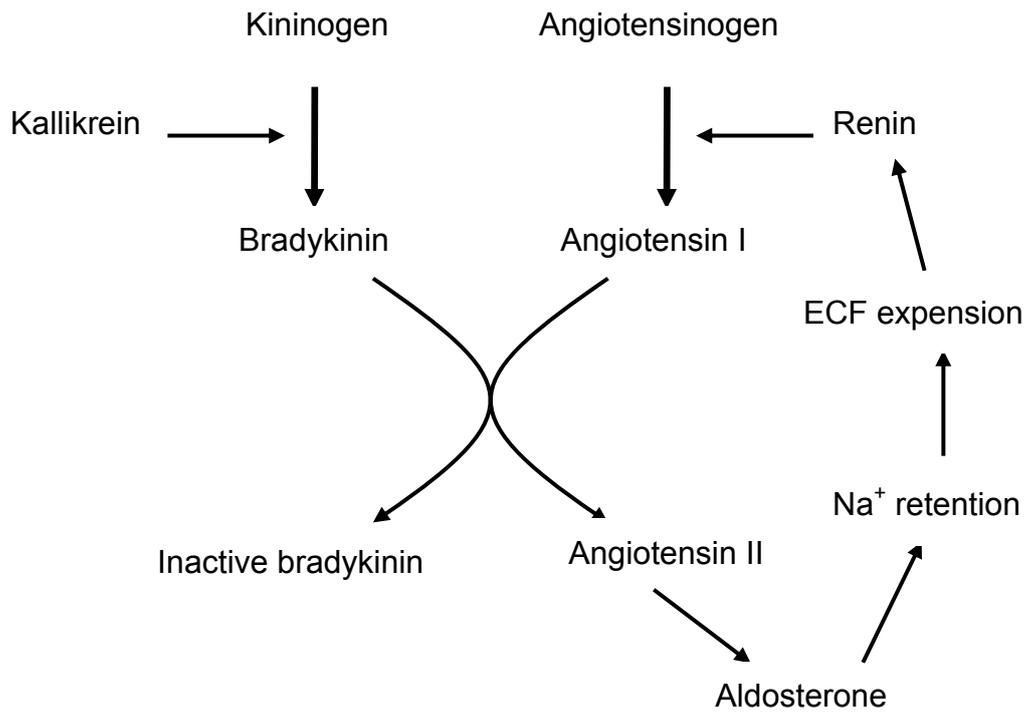
一、 血管收縮素 I 轉換酵素(Angiotensin I-converting enzyme, ACE)、血管收縮素 I 轉換酵素抑制劑(Angiotensin I-converting enzyme inhibitor, ACEI)與血壓三者的關係

### 1. ACE 與血壓的調控

人體血管彈性的調控機制之一為腎素-血管收縮素-皮質醛酮系統(rennin-angiotensin aldosterone system, RAAS)，此機制對於血壓的調控甚為重要，其中又以血管收縮素轉換酵素(angiotensin I-converting enzyme, ACE)最具有決定性的影響(見圖一)。當血壓降低，腎臟血液的流量也隨之降低，當血中的鈉離子缺乏而交感神經受到刺激時，腎臟釋放腎素(renin)，將肝臟分泌的血管收縮素原(angiotensinogen)轉變為沒有活性的血管收縮素 I (angiotensin I；Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu)。ACE 酵素在 RAAS 系統中能夠催化無活性的 angiotensin I，去除 C-terminal 的 His-Leu 兩個胺基酸，轉變成有活性的血管收縮素 II(angiotensin II)，會刺激交感神經系統，促進平滑肌收縮，造成血管收縮而使血壓上升。

另外，同樣在 RAAS 系統中，當血壓上升時，會活化 prekallikrein、kininogen，進一步產生 kallikrein 分解 kininogen 得到血管舒張素(bradykinin)物質，使血壓下降；而 ACE 酵素可催化原具有活性的

bradykinin，去除 C-terminal 的 Phe-Arg 兩個胺基酸，轉變成 inactive bradykinin，導致血壓上升。



圖一、腎素血管收縮素系統(Tabacova and Kimmel, 2001)。

Fig. 1 The renin-angiotensin system.

## 2. ACE 與 ACEI 的關係

### (1) ACE 酵素特徵

ACE 酵素分子量約為 140–160 kDa，廣泛存在於人體組織中，如心臟、肺、腎臟、腦部、腸道組織、血漿與血管內皮細胞等，其中以肺部最多。ACE 酵素具備兩個活性作用位置，分別為 C-domain 與 N-domain，這兩個活性位置幾乎有相同功能，只是對不同受質的親和力不同。

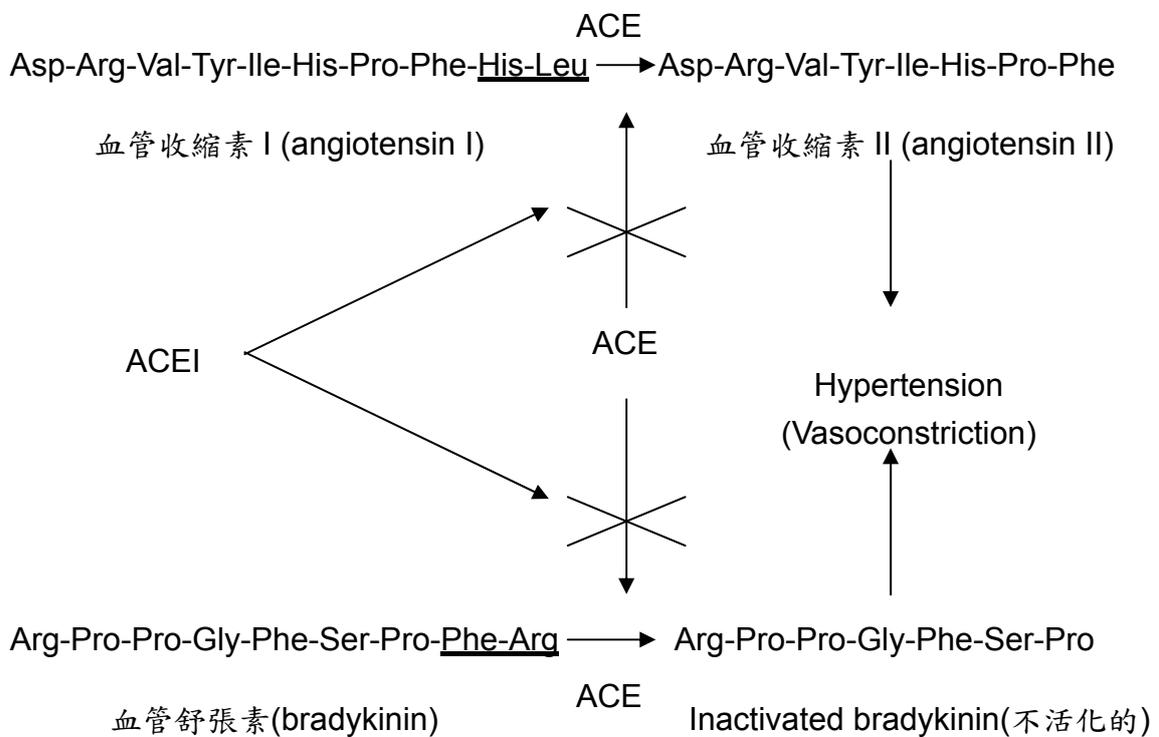
### (2) ACEI 特徵

血管收縮素轉換酵素抑制物(Angioensin I-converting enzyme inhibitor, ACEI)為用來阻斷 ACE 酵素在 RAAS 系統所造成的高血壓。這類抑制物多為由 3–12 個胺基酸組成的胜肽類和化學合成藥物，這些化學合成藥物大部分是跟短鏈胜肽結構相近的類似物(analog)。雖然 ACEI 的來源不同，分子大小、結構也不盡相同，但都具有類似的作用，就是與 ACE 酵素結合之後，都會抑制 ACE 酵素的反應。

### (3) ACEI 作用機制

ACEI、血管收縮素、血管舒張素都能夠與 ACE 酵素的活性部位結合，三者互為競爭型抑制物。但因為 ACEI 帶的電荷基團(sulfhydryl-, carboxyl- 或 phosphorus- containing group)與 ACE 的活性部位緊密

結合後，不容易從 ACE 結合區域被釋放出來，因此抑制了 ACE 酵素對 angiotensin I 和 bradykinin 的作用。ACEI 作用途徑如圖二所示，可阻止 ACE 將 angiotensin I 轉換成促使血壓上升的 angiotensin II，亦可阻止 ACE 將 bradykinin 轉換成無法讓血壓下降的 inactive bradykinin，讓血管維持舒張狀態，血壓維持穩定。

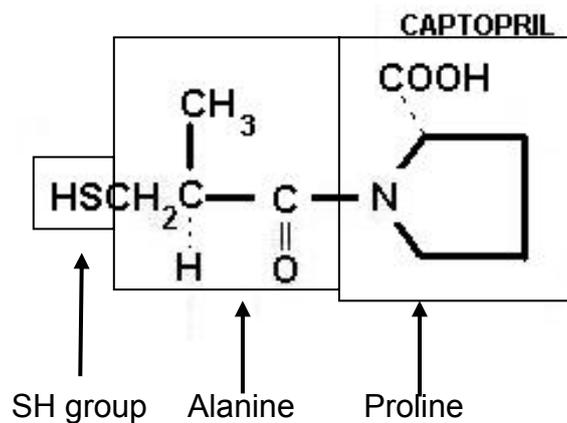


圖二、ACEI 抗高血壓之作用途徑 (Maruyama *et al.*, 1982)。

Fig. 2 The pathway of ACEI anti-hypertension.

### 3. 常見 ACEI 藥物

目前醫院給予高血壓患者的藥物，大多為 Captopril、Enalapril、Lisinopril 等，這些降血壓藥物大多是短鏈勝肽的類似物(analog)，以最普遍使用的 Captopril 為例，化學結構式是由一個 alanine 和 proline 組成，alanine 的 N-terminal 由原來的胺基(NH<sub>2</sub>)改連接上一個硫醇基(SH group)(如圖三)。常見劑量分別為 12.5、25、50、100 mg/ tab，吸收率約 70-75%，作用時間可維持 6-12 小時(與服用劑量有關)。



圖三、Captopril 結構圖。

Fig. 3 The structure of Captopril.

長期服用這類降血壓藥物，對 ACE 抑制效果佳(Enalapril 和 Lisinopril 的作用時間為 24 小時)，但存在許多副作用，輕則使患者可能有刺激性乾咳、血壓過度下降等，重則失去味覺、蛋白尿症、非糖尿病型的腎臟病(ACEI 會使鉀滯留於腎臟，血液中的鉀離子濃度過高會導致心臟負荷過高而心律不整)等、對懷孕婦女服用可能會使胎兒的血壓過低或是腎衰竭。

## 二、降血壓胜肽的來源

降血壓胜肽研究的起源來自西元 1970 年，Ferreira *et al.*發現由南美洲的腹蛇科 *Bothrops jararaca* 的血清分離出一段胜肽 EWPRPQIPP，其 IC<sub>50</sub> 約為 0.56 μM。經過 Ondetti *et al.*萃取此腹蛇類血清和人工合成的方式，再次證實此類血清分離得到的胜肽均有很好的 ACE 抑制活性(如表一)，因此揭開了人類對於降血壓胜肽的研究。

表一、天然和人工的胜肽片段抑制 ACE 酵素活性的比較。

Table 1 Comparisons of natural and synthetic peptides inhibited ACE activity.

Peptides sequence	Natural / Synthetic <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup> (µg/mL)
V-2	Natural	2
(Pyr <sup>1</sup> -EWPRPTQIPP)	Synthetic	5
V-6-1	Natural	9
(Pyr-EWPRPQIPP)	Synthetic	8
V-6-2	Natural	39
(Pyr-ENWPRPQIPP)	Synthetic	35
V-7	Natural	3
(Pyr-ENWPHPQIPP)	Synthetic	1
V-8	Natural	3
(Pyr-ESWPGPNIPP)	Synthetic	3
V-9	Natural	13
(Pyr-EGGWPRPGPEIPP)	Synthetic	17

註 1：Natural 是由腹蛇類蛇毒血清中分離，Synthetic 是由化學合成。

註 2：Pyr 是指 N-terminal 結構式為 Pyro-。

註 3：IC<sub>50</sub> 是指抑制 ACE 酵素 50% 活性所需要的濃度。

## 1. 從食物當中利用酵素水解取得

由於化學合成的 ACEI 具有多種副作用，近年來便逐漸發展一種以蛋白質水解物產生的 ACEI 來取代藥物，雖然效果差強人意 (如表二和表三)，但是副作用較低，對於高血壓患者平常使用較為安全，可作為日常食用的保健食品。西元 1979 年，Ohsima 等學者利用 clostridial collagenase(EC 3.4.24.3)水解動物膠(gelatin)得到數個具有降低血壓功能的短鏈胜肽，這類胜肽統稱為 ACEI peptide，可有效的阻止血壓升高，同時這也是第一個從食物中找到 ACEI 的研究。之後取得這些 ACEI 的食品來源主要是乳製品、魚類或植物蛋白的水解物，包括：酪蛋白(bovine casein)(Maruyama *et al.*, 1982; 1985)、玉米蛋白( $\alpha$ -zein)(Miyoshi *et al.*, 1991)、沙丁魚肉(Matsui *et al.*, 1993)、鯉魚肉(Matsumura *et al.*, 1993)等。這些原料當中的蛋白質經過不同蛋白質酵素水解後，會得到大小不一的胜肽，其中一些胜肽具有很強的 ACE 抑制效果。此外，從許多發酵食品當中同樣可分離出 ACEI，例如：醬油(Kinoshita *et al.*, 1993)、清酒(Saito *et al.*, 1994)、乳酪(Okamoto *et al.*, 1995)、發酵乳(Nakamura *et al.*, 1995; 1996)等。這些 ACEI 的食品來源不同，抑制效果雖有不同，但都具有相似的功能。

表二、ACEI 胜肽的發展。

Table 2 The development of ACEI peptides.

年代	發現者	來源	胜肽片段	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
1970	Ferreira <i>et al.</i>	腹蛇科血清	EWPRPQIPP	0.56
1979	Oshima <i>et al.</i>	食品蛋白質 (膠原蛋白)	PP、AP、AHyp at C-terminal	8.3-8.6
1982	Maruyama <i>et al.</i>	Trypsin 水解 bovine casein	FFVAPFPEVF GK	77
1985	Maruyama <i>et al.</i>	Trypsin 水解 bovine casein	FFVAP AVPYPQR	6.0 15
1991	Miyoshi <i>et al.</i>	$\alpha$ -zein 水解物	LRP、LSP、 LQP	0.27、 1.7、1.9
1993	Matsui <i>et al.</i>	沙丁魚肉水解 液		0.24
1993	Matsumura <i>et al.</i>	鯉魚肉水解物	IKP IKPLNY	1.7 43
1993	Kinoshita <i>et al.</i>	醬油		0.71-17.8
1994	Saito <i>et al.</i>	清酒、酒渣		76-136
1995	Okamoto <i>et al.</i>	乳酪		0.16-0.27

表三、ACEI 藥物的活性。

Table 3 The activities of ACEI drugs.

年代	上市公司	上市國家	藥物名稱	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
1981	Squibb(美國)	德國	Captopril	0.022
1984	Merck(美國)	德國	Enalapril	1.2
1987	Merck (美國)	紐西蘭	Lisinopril	1.5

Cheung *et al.*於 1980 年對於這類的 ACEI 胜肽特性作以下的歸納：(1)碳端(C-terminal)的胺基酸是這種抑制物與 ACE 酵素作用的結合部位(active site)。比較具有功能性的 ACEI，在碳端的胺基酸(末端胺基酸)皆為芳香族的胺基酸，包括：色胺酸(Tryptophan, Try)、酪胺酸(Tyrosine, Tyr)、苯丙胺酸(Phenylalanine, Phe)；或是亞胺酸類(imino acid)的脯胺酸(Proline, Pro)。(2)在氮端(N-terminal)最具有活性的是長鏈或是具有分岔支鏈的疏水性氨基酸，包括：白胺酸(Leucine, Leu)、纈胺酸(Valine, Val)、異白胺酸(Isoleucine, Ile)。若是氮端胺基酸是亞胺酸類的脯胺酸，則活性反而降低。具有這兩種特性的短鏈胜肽通常有較佳的 ACE 抑制效果，目前被純化定性的 ACEI 多有此特徵。

## 2. 應用基因重組技術合成胜肽

胜肽合成技術一般分為：固相化學合成、液相化學合成、酵素性合成、DNA 重組法等，表四比較了這幾種合成方法。化學合成法有數種缺點，而酵素合成法的應用又受到限制，相對於 DNA 重組法的優點而言，包括：可合成較長鏈的胜肽、反應條件溫和、成本低廉、可經由大量發酵和純化方式回收胜肽等，使用性較為廣泛，所以近年來最常被拿來生產人類所需要的胜肽(Gill *et al.*, 1996)。

表四、胜肽合成方法之比較。

Table 4 General comparison of currently available approaches for the synthesis of peptides.(Gill *et al.*,1996).

	固相化學合成法	液相化學合成法	酵素性合成法	DNA 重組法
一般規模	毫克~數十克	克~噸	克~噸	克~噸
胜肽合成長度	中~長鏈	短~中鏈	短鏈	長鏈~蛋白質
序列限制	無	無	Proline 的合成技術仍待解決	無
成本	非常昂貴	昂貴	較不昂貴	不昂貴
反應條件	有害	有害	溫和~無害	溫和
產品純度	非常高	高	中~高	低~中
應用	僅用於實驗室	廣泛應用於實驗室及工業生產	工業生產	廣泛應用於實驗室及工業生產
技術與純度	成熟	成熟	發展中	仍在發展中
未來展望	成本昂貴，可用於高價值的保健胜肽生產	高價值短~中鏈保健胜肽的生產	中~高價值食品配料胜肽及保健胜肽生產	適用於長鏈胜肽和蛋白質的生產

1977 年，Itakura *et al.* 已經將化學合成之生長激素因子 (Somatostatin) 基因轉殖進入大腸桿菌中，成功製造生長激素因子。

1979 年，Goeddel *et al.* 已經將化學合成的人類胰島素基因轉殖進入大腸桿菌，使其表現並純化，1982 年美國 FDA 隨即批准以 DNA 重組技術於大腸桿菌中製備人類胰島素。Moks *et al.* (1987a; 1987b) 利用大腸桿菌系統表現 ZZ fusion protein 和 human insulin-like growth factor I 的 fusion protein，並以 IgG Sepharose 純化。2002 年，本實驗室利用 DNA 重組技術構築大腸桿菌表現系統生產具有類似味精風味的牛肉鮮味短鏈胜肽(林，2002)，經鑑定後為正確的胺基酸序列。2004 年，本實驗室亦利用相同系統初步合成 ACEI 胜肽(彭，2004)。

### 3. 降血壓胜肽 RPLKPW 的發展過程

1995 年，日本學者 Fujita *et al.* 從卵白蛋白(ovalbumin) 中，利用 pepsin(胃液素) 酵素水解，分離純化得到一段由八個胺基酸組成之胜肽：ovokinin，序列為：Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu (FRADHPFL)，在卵白蛋白第 358-365 個胺基酸位置，當 SHR(spontaneously hypertensive rats, 先天性高血壓大鼠) 口服 25 mg/kg 時，有降血壓效果。主要原因是 ovokinin 能和 bradykinin B<sub>1</sub>

receptor 結合( $IC_{50}=64 \mu M$ )，刺激心血管細胞分泌前列腺素 (prostaglandin  $I_2$ )降低血壓。

1999 年, Matoba *et al.*將 ovokinin 以 chymotrypsin(凝乳蛋白酶) 酵素水解得到 Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe(RADHPF) 胜肽, 與 ovokinin 的第 2 到第 7 號位置的胺基酸序列相同, 故命名為 ovokinin(2-7)。這篇研究確定 SHR 服用 10 mg/kg 時, 即具有舒張 SHR 動脈血管的效果( $IC_{50}>1 \text{ mM}$ ), 血壓可將低 10 mmHg, 並發現此胜肽會直接影響內皮細胞, 刺激一氧化氮(NO)的分泌而使血管舒張, 血壓降低。Matoba *et al.*(2001a)欲增加降血壓活性, 便將此胜肽基因以點突變 (site-directed mutagenesis)的方式, 在微生物中製造出修飾過的蛋白質。當 RADHPF 氮端胺基酸 Arg 消失時, ADHPF 完全不具有 ACEI 活性, 因此 Arg 對 ovokinin(2-7)的降血壓活性是必須的。接著依據 Cheung *et al.*歸納出來之 ACEI 特性, 將 ovokinin(2-7)的胺基酸序列修改第 2 和第 3 號胺基酸, 發現 RPFHPF(該作者命名為 [Pro<sup>2</sup>,Phe<sup>3</sup>]-ovokinin(2-7))的降血壓活性更高, 10 mg/kg 的劑量就能夠讓 SHR 血壓降低  $24.5\pm 2.2 \text{ mmHg}$ 。

Matoba N. *et al.*(2001b)於同年繼續針對 RPFHPF 胜肽, 探討利用化學合成方法設計不同的降血壓胜肽, 其活性結果如表五。當氮端和碳端胺基酸分別都被酵素剪切之後, RPFHP, PFHPF 胜肽無任何

活性，因此推論與 RADHPF 胜肽相似，氮端的 Arg 和碳端的 Phe 對此胜肽有 ACEI 活性是必須的。改變碳端胺基酸並選擇疏水性胺基酸 (Ile、Leu、Pro、Tyr 和 Trp) 取代，以 Trp 取代的 RPFHPF 胜肽活性較高。接著置換 RPFHPW 的第 3 號胺基酸 Phe 為 Trp、Tyr、Ile 和 Leu，相對降血壓活性略為增加達到 2.8；最後，RPLHPW 的第 4 號胺基酸改為 Ala、Arg、Lys，發現 RPLKPW 的相對活性 3.2 是 ovokinin(2-7) 衍生物中最高的，而且 SHR 服用 0.1 mg/kg 就可降低血壓 15 mmHg，持續 4–6 小時；當 SHR 服用 0.3 mg/kg 後血壓可降低 20 mmHg 並持續大約 8 小時。這些研究學者拿 RAFHPF、RPFHPW、RPLHPW 和 RPLKPW 具有降血壓活性胜肽，在體外作抵抗模擬消化道胰液素(pancreatin)測試，結果顯示，除了 RPFHPF 幾乎被酵素水解之外，其餘三者均可維持七成以上抵抗能力，尤以 RPLKPW 的 83% 最高，推測 RPLKPW 的 Pro-Trp 鍵結被水解的速率比較緩慢。

Matoba *et al.*(2001a; 2001b; 2003) 在大豆蛋白  $\beta$ -conglycinin  $\alpha'$  次單元中發現三條相似於 RPLKPW 的序列，分別是 Arg-Pro-Gln-His-Pro-Glu (RPQHPE)、Arg-Pro-Arg-Gln-Pro-His (RPRQPH)、Arg-Pro-His-Gln-Pro-His (RPHQPH) 位於延伸區域 (extension domain) 中，用點突變的方式製造出含有四段 RPLKPW 的

DNA 序列，經由大腸桿菌系統表現。他們發現每一段 RPLKPW 的氮端和碳端分別需要再多插入一個 Arg 和 Gln，會使得大豆蛋白被 trypsin 水解後，產量顯著增加。經過大鼠試驗證實，只食用這個部分比食用總大豆蛋白的效果佳，最小有效劑量為 1.0 mg/kg(如表六)。這是第一次有學者藉著點突變法，將食品蛋白修飾成利用價值很高的活性胜肽(Onishi *et al.*, 2004)。

表五、SHR 口服 ovokinin(2-7)衍生物後的相對降血壓活性(Yamada *et al.*, 2002)。

Table 5 Relative anti-hypertensive activity of ovalbumin(2-7) derivatives after intravenous administration in SHR.

Peptides	Relative anti-hypertensive activity
RPFHPF	1.0
[Pro2,Phe3]-ovokinin(2-7)	
RPFHP	0
PFHPF	0
RPFHPI	0
RPFHPL	0
RPFHPP	0
RPFHPY	0
RPFHPW	2.5
RPWHPW	1.3
RPYHPW	1.2
RPIHPW	1.2
RPLHPW	2.8
RPLAPW	2.0
RPLRPW	3.0
RPLKPW	3.2

表六、ovalbumin 和利用基因修飾的  $\beta$ -conglycinin  $\alpha'$  次單元餵食 SHR 後的降血壓活性(Onishi *et al.*, 2004)。

Table 6 Anti-hypertensive activities of ovalbumin and genetically modified  $\beta$ -conglycinin  $\alpha'$  subunit after oral administration in SHRs.

	最小抑制劑量 (mg/kg)	Relative anti-hypertensive activity
Ovalbumin	2000	1
Modified $\beta$ -conglycinin		
Full length		
3 RPLKPW- $\alpha'$ *	10	200
4 RPLKPW- $\alpha'$	2.5	800
Extension domain		
4 RPLKPW- $\alpha'$ *	1	2000

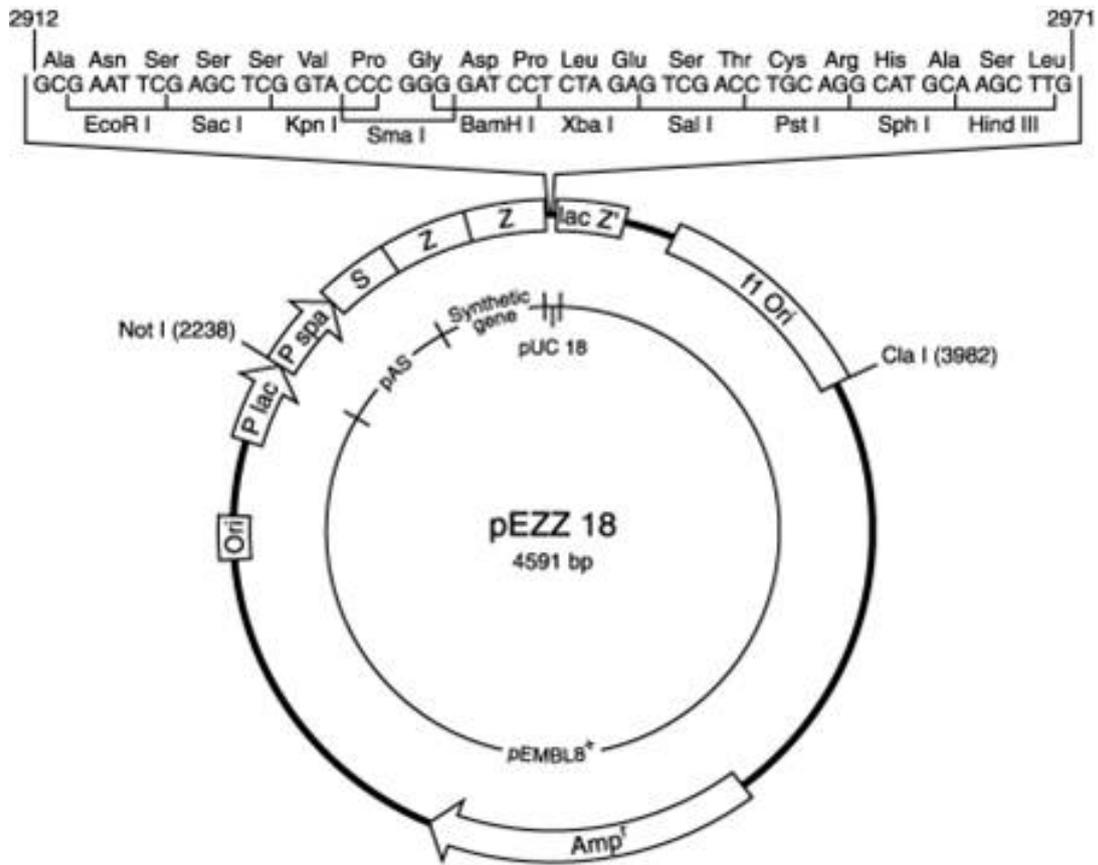
\*註：

1. 表中 3 RPLKPW 是指在大豆蛋白  $\alpha'$  次單元中，具有三段 RPLKPW 胜肽。
2. 表中 4 RPLKPW 是指在大豆蛋白  $\alpha'$  次單元延伸區域中，具有三段 RPLKPW 胜肽。

### 三、 降血壓胜肽生產菌株培養方法之探討

#### 1. 生產 RPLKPW 重組菌株之性質

本實驗室學姊將 RPLKPW 基因轉殖進入 pEZZ18(如圖四)質體中，利用大腸桿菌系統成功表現，經過轉錄、轉譯成帶有 ZZ protein 的融合蛋白(fusion protein)，降血壓胜肽接在融合蛋白的末端表現(如圖五)，利用 ZZ 與 IgG-Sepharose<sup>®</sup>親和性膠體的專一性鍵結，將融合蛋白分離。一般免疫球蛋白(抗體)與外界抗原結合位置是在免疫球蛋白 F<sub>V</sub>、F<sub>AB</sub> 區域的頂點，而 ZZ 融合蛋白則是結合在 F<sub>C</sub> 區域，因此透過 IgG-Sepharose<sup>®</sup>親和性膠體可以正確地將 ZZ 融合蛋白吸附，再利用沖提液洗出。



*Ori* : Origin of DNA replication from plasmid ColE1

*f1 Ori* : Origin of DNA replication of the phage f1

*lac Z'* : Part of the  $\beta$ -galactosidase gene

*S* : Part of *spa*(staphylococcal protein A gene) encoding the signal sequence of staphylococcal protein A

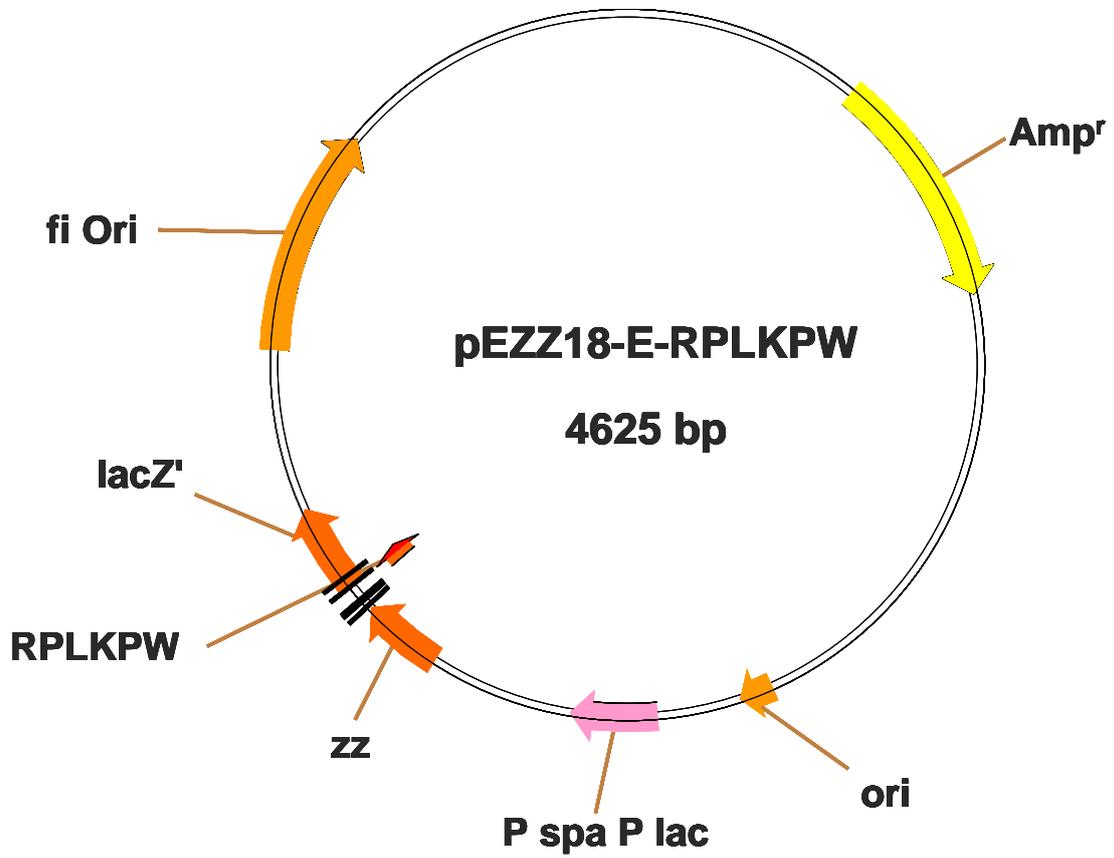
*Z* : Part of *spa* encoding a synthetic IgG-binding domain

*P lac* : The *lacUV5* promoter

*P spa* : The *spa* promoter

圖四、質體 pEZZ18 的基因圖譜。

Fig. 4 The genetic map of plasmid pEZZ18.



圖五、預測之轉型大腸桿菌質體基因圖譜。

Fig. 5 The predicted genetic map of the recombinant *E. coli*.

## 2. 培養基之最適化

### (1) 利用 Plackett-Burman(PB)試驗設計篩選組成份

Plackett 和 Burman 於 1946 年提出了部分因子設計方法，可利用  $n$  個實驗組來測定  $n-1$  個因子對反應的影響。當  $n$  為 4 的整數倍(如 8、12、16...等)時，其 +1 和 -1 的排列順序如下：

$n = 8$       + + + - + - -

$n = 12$      + + - + + + - - - + -

$n = 16$      + + + + - + - + + - - + - - -

依此排列為第一行或第一列，而第二行(列)則是一去第一行(列)的第一位，並將第一位改成此行的最後一位，依此類推，列出  $n-1$  行(列)之排列，最後一行(列)則全部補入 -1 來完成整個試驗設計。

Plackett-Burman 設計能夠用很少的實驗組處理較多的實驗因子，因此常用於培養基的初期篩選，以及培養基組成的參考文獻不足或是欲嘗試未曾使用的培養基等時候，惟此設計僅可估算因子對應變數的線性關係。

### (2) 利用二因子階層(Two factor levels)設計決定組成份的取捨：

此設計可以知道不同因子對目標函數之影響，便於設計將各因子簡化成 -1 至 +1 的正規劃水準(coded level)。此設計以立體座標的三個軸分別表示為三個因子的水準變化，而每個實驗點則位於立方體

的頂點上。此設計優點：

- a. 各實驗點彼此對稱，因此實驗產生的變異可抵銷。
- b. 這種正交(orthogonal)設計可節省計算時間，減少迴歸計算的工作。

以  $n$  個變數的因子統計而言，實驗數據經過最小平方法(least square method)迴歸後得到下列方程式：

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_nX_n + a_{12}X_1X_2 + \dots + a_{23}X_2X_3 + \dots + a_{n-1,n}X_{n-1}X_n$$
$$= a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n a_{ij} x_i x_j$$

$Y$  = 理論回應值；為  $a_0$  常數項； $a_1 \sim a_n$  分別為  $X_1 \sim X_n$  的係數； $a_{12} \sim a_{n-1,n}$  為交互作用項之係數； $X_1X_2 \sim X_{n-1}X_n$  為交互作用項。

由係數可判斷因子的影響，正值為正影響；負值則是負影響，係數愈大表回應值影響愈大。當實驗因子數目增加時，實驗組會隨之呈倍數增加，故受測因子過多時，可使用部分因子設計(fractional factorial design)取代(Perry, 1989)。

### (3) 利用陡升路徑法決定組成份之最適化範圍：

此方法能夠快速而且有效率的找出極值點(極大或極小)。依據實驗初期得到的迴歸方程式，若是係數為正則表示應增加此項因子，會使反應有正影響；反之，係數為負應減少該因子。增加與減少的比例應以各因子的迴歸係數值為基準，依各個因子間距乘上斜率，再乘以

一合理比例後得到的數值即為陡升距離。以前一個試驗設計的中心值或極大(小)值為起始點，加上上述所提之陡升距離後，進行試驗，若是得到的實驗組數據不再上升、緩慢上升或急速下降時，則表示再數據停滯或改變前的前一個實驗組極為極值點區域。

(4) 利用中心混成設計與回應曲面決定最適成分組合：

中心混成設計補充了星點(star point)及中心點(central point)，彌補試驗水準不足之處。所謂星點為原點沿著中心軸向外延伸適當距離下所設的實驗點，對於多變數因子系統而言，星點之延展距離等於 $n^{1/4}$ ( $n$ =因子設計【包括全因子或部分因子】之總實驗組數)。而中心點則是在原點(0,0,0)重複進行試驗，藉此可估計人為或是儀器所造成的實驗誤差，故各因子試驗範圍涵蓋了中心點、三個軸延伸點及立方體頂點等五個水準。

(5) 以回應曲面法分析中心混成設計之試驗數據：

實驗數據應該由統計程式分析，現有許多電腦軟體如 SAS、STAGRAPHS 等，皆可應用於資料的分析。分析結果包括了：計算二階迴歸方程式，由 P value 決定一次項(線性項)、交互作用項及二次項是否顯著，由  $R^2$ (決定係數)得知迴歸方程式是否適當表達實驗數據(洪和陳，1992)，利用這類軟體繪出各因子對實驗數據的關係圖等。

本研究綜合上述五個步驟，參考之前文獻依序進行因子的篩選、部分因子試驗、陡升路徑法和中心混成設計，尋找經轉殖降血壓基因後大腸桿菌能夠產生最大量降血壓胜肽之培養基。

### 3. 發酵槽培養技術

重組 DNA 技術已經發展成為生產一些具有功能性胜肽的方式，但在大量生產上有一些限制，尤其是最後的純化步驟。Moks *et al.*(1987a)利用大腸桿菌系統，其中插入一段由 staphylococcal A protein 衍生的 Z protein 基因，這段基因經轉錄、轉譯後得到 Z protein，除可被 IgG 吸附，還能抵抗 CNBr、NH<sub>2</sub>OH 等化學物質破壞，但在 Met 殘基和 Asp-Gly 鍵則能被專一性水解。故 Moks *et al.*(1987b)於同年利用此方式，構築出一段質體 pRIT18 生產 human insulin-like growth factor I (IGF-I)，質體上就帶有 2 個 IgG 結合區域(即 ZZ protein)。以發酵槽、饋料批次的方式來培養，經過 2 次 IgG Sepharose Fast Flow Gel 純化後，可得到 ZZ-human IGF-1 融合蛋白，再經過酵素水解後測量 human IGF-1 活性為 10,000 U/mg，與血漿中純化的相同，這表示 Moks *et al.*發現的製造系統適合用來大量生產小分子蛋白質。

本研究應用上述技術，將帶有 ZZ protein 和降血壓胜肽

RPLKPW 大腸桿菌轉型菌 p274，以回應曲面法尋找最適培養基組成  
分 and 比例，期望利用發酵槽達到大量生產的目的。

## 參、材 料 與 方 法

### 一、 材 料：

#### 1. 菌種

1. *Escherichia coli* (*E. coli*)JM105 (ATCC 47016)採購自 Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A.，作為轉殖載體的宿主細胞。
2. 表現載體 pEZZ18(基因圖譜如圖四)，採購自 Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A.，可分泌 ZZ 融合蛋白，其中具有能分解 Ampicillin 的基因，以及有限制酶 *EcoRI*, *Sac I*, *Kpn I*, *Sma I*, *BamHI*, *Xba I*, *Sal I*, *Pst I*, *Sph I*, *Hind III* 等截切位置。
3. *E. coli* p274 為帶有 RPLKPW 基因之重組菌株 (預測之基因圖譜如圖五)。

#### 2. 營養培養基

- (1) Luria-Bertina (LB) broth，購自 Becton, Dickinson and company, U.S.A. (每公升成分包含 Tryptone 10.0 g、Yeast Extract (YE) 5.0 g、Sodium chloride (NaCl) 10.0 g)。
- (2) Yeast extract (DIFCO, U.S.A.)、Casamino acid (MP Bio., U.S.A.)、Bacto Tryptone (DIFCO, U.S.A.)、甘油(SIGMA, U.S.A.)。

(3) 葡萄糖(和光製藥, Japan)、蔗糖(J.T. Baker, U.S.A.)、果糖(R.D.H., Germany)、乳糖(島久製藥, Japan)、木糖(MERCK, Germany)、木糖醇(R.D.H., Germany)。

3. 化學無機鹽類： $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (昭和製藥, Japan)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (R.D.H., German)、 $\text{CaCl}_2$ (島久製藥, Japan)、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ (和光製藥, Japan)、 $\text{NaCl}$ (聯工製藥, 台灣)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (和光製藥, Japan)、 $\text{MgSO}_4$ (和光製藥, Japan)、 $\text{CuSO}_4$ (和光製藥, Japan)、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (昭和製藥, Japan)、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (和光製藥, Japan)、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (聯工製藥, 台灣)。

4. 抗生素：Ampicillin(SIGMA, U.S.A.)。

5. 分子篩管柱層析試劑

(1) 緩衝液：Tris-Saline Tween<sup>®</sup> 20 (TST) buffer：取 Trizma Base(SIGMA, U.S.A.) 6.055 g、NaCl (MERCK, Germany) 8.766 g 和 0.05% Tween<sup>®</sup> 20 (SIGMA, U.S.A.)加入適量的 d.d.H<sub>2</sub>O 中，以 6 N HCl 滴定至 pH=7.6 後定量至 1 L。

(2) Blue dextran 2000 (SIGMA, U.S.A.)。

6. 親和性管柱層析試劑

(1) 緩衝液：Tris-Saline Tween<sup>®</sup> 20 (TST) buffer：取 Trizma Base(SIGMA, U.S.A.) 6.055 g、NaCl (MERCK, Germany)

8.766 g 和 0.05% Tween<sup>®</sup> 20 (SIGMA, U.S.A.)加入適量的 d.d.H<sub>2</sub>O 中，以 6 N HCl 滴定至 pH=7.6 後定量至 1 L。

(2) 沖提液：0.5 M CH<sub>3</sub>COOH (HAc) buffer：加入 14.368 mL 的濃 HAc (17.4 M) (J.T. Baker, U.S.A.)至適量的 d.d.H<sub>2</sub>O 中，以 conc. CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> solution 滴定至 pH=3.4 後定量至 500 mL。

(3) 平衡液：5 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (NH<sub>4</sub>Ac) buffer：秤取 0.096 g 的 CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (SIGMA, U.S.A.)加入適量的 d.d.H<sub>2</sub>O 中，以等濃度的 HAc 滴定至 pH=5.0 後定量至 250 mL。上述 3 瓶 buffer 配製後均需要經過 0.45 μm 過濾膜過濾後備用。

#### 7. 總蛋白質含量(Micro Assay)試劑(Bradford, 1976)

(1) Bio-Rad protein assay dye reagent (Bio-Rad, U.S.A.)。

(2) Protein Standard (Bovine Serum Albumin, BSA) (SIGMA, U.S.A.)。

#### 8. 硫酸十二酯鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳分析 (Sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis analysis, SDS-PAGE)

(1) Acrylamide M-bis 40% stock solution 37.5/ 1 (Ger-Bu, Bulgaria)。

(2) 2 M Tris-HCl buffer, pH=8.8 (分離膠體使用): 取 Trizma<sup>®</sup> base

- (SIGMA, U.S.A.)24.22 g 用 d.d. H<sub>2</sub>O 80 mL 溶解，以 HCl 調整到 pH=8.8 後，定量至 100 mL，並儲存於 4°C。
- (3) 2 M Tris-HCl buffer, pH=6.8 (聚集膠體使用): 取 Trizma<sup>®</sup> base 24.22 g 用 d.d. H<sub>2</sub>O 50 mL 溶解，以 HCl 調整到 pH=6.8 後，定量至 100 mL，並儲存於 4°C。
- (4) 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) : 取 1 g SDS (Bio-Rad U.S.A.) 溶於 10 mL d.d.H<sub>2</sub>O 後避光儲存於 4°C。
- (5) 10% Ammonium persulfate (APS) 溶液 : 取 0.1 g APS (SIGMA, U.S.A.) 溶於 1 mL d.d.H<sub>2</sub>O 中，每次實驗前均現配。
- (6) N,N,N,N-Tetramethylethylene diamine (TEMED, Ger-Bu, Bulgaria) 溶液。
- (7) 5 X 電泳緩衝溶液 : 取 Trizma<sup>®</sup> base 15 g、Glycine 72 g、SDS 5 g 溶於適量 d.d.H<sub>2</sub>O 中，定量至 1 L 備用。
- (8) 5 X 樣本溶液 : 取 Bromophenol blue 0.02 g 加入 0.5 mL、2 M、pH=6.8 Tris-HCl buffer 中，再加入 β-mercaptoethanol (SIGMA, U.S.A.) 0.5 mL、10% SDS 溶液 4 mL、100% Glycerol 2 mL 和 d.d.H<sub>2</sub>O 3 mL，總體積為 10 mL。
- (9) 蛋白質標準品 : 購自 Bio-Rad (U.S.A.)。
- (10) 染色液 : 取 1.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 (WS

Simpson Ltd., England)添加於 250 mL d.d.H<sub>2</sub>O、250 mL 甲醇和 50 mL 醋酸中混合均勻。

(11) 脫色液：先加入 70 mL 甲醇和 70 mL 醋酸於適量的 d.d.H<sub>2</sub>O 中，再加入 d.d.H<sub>2</sub>O 定量至 1 L。

## 二、儀器

1. 單門式高壓滅菌釜(YANG TA MIN INSTRUMENT CO., LTD. Model : YMT)。
2. pH meter : EUTECH Instruments, Cyberscan 510, Singapore 。
3. 恆溫培養箱(YIH DER, Model : TU-400,台灣)。
4. 紫外光/可見光分光光度計(Model : UV mini 1240, Shimadzu, Japan)。
5. 光電比色計(Spectronic 20,SP-20,Milton Roy Company, U.S.A.)。
6. 5 L 發酵槽(CMF-5, Taiwan)。
7. 低溫離心機(HITACHI, Japan)。
8. 高速冷凍離心機(Hettich, Model : MIKRO 22 R, Germany)。
9. 減壓濃縮裝置(Heidolph, Germany)。
10. Ultrasonic cell disruptors (BRANSON SONIFIER<sup>®</sup> Model : 250, U.S.A.)。

11. 125 mL、250 mL 三角錐形瓶數個。

12. 超過濾裝置

(1) 50 mL 超過濾裝置(Amicon<sup>®</sup>, Model : 8200, U.S.A.)。

(2) 10,000 M.W.超過濾膜(Millipore, U.S.A.)。

13. 分子篩管柱層析

(1) 主管柱：C 16/40 Liquid chromatography column (SIGMA, U.S.A.)。

(2) 結合器：AC 16 adaptor (Amersham Pharmacia Biotech., U.S.A.)。

(3) 蠕動幫浦：Pump P-1 (Amersham Pharmacia Biotech., U.S.A.)。

(4) 膠體：SEPHACRYL S-200-HR(SIGMA, U.S.A.)。

(5) 分液收集器(Model : 2110, Bio-Rad, U.S.A.)。

14. 親和性管柱層析

(1) 主管柱：C 16/40 Liquid chromatography column (SIGMA, U.S.A.)。

(2) 結合器：AC 16 adaptor (Amersham Pharmacia Biotech., U.S.A.)。

(3) 蠕動幫浦：Pump P-1 (Amersham Pharmacia Biotech.,

U.S.A.)。

(4) 膠體：IgG-Sepharose<sup>®</sup> 6 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech., U.S.A.)。

(5) 分液收集器(Bio-Rad, Model:2110, U.S.A.)。

## 15. 電泳裝置

(1) 鑄膠套件(Versatile Mini-PROTEIN 3 Electrophoresis Cell, Bio-Rad, U.S.A.)。

(2) 電泳套件(Bio-Rad, U.S.A.)。

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

## 三、 試驗方法

### 1. 種菌的培養

(1) 取 0.6 mL 冷凍甘油小管中的 *E. coli* p274 菌液 1 個接種環的菌量，以三區劃線的方式，均勻塗抹分布在含有 1% Ampicillin 的 LB plate 上培養 12 小時後置於 4°C 下保存。

(2) 以接種環挑取單一菌落，直接塗抹在含有 1% Ampicillin 的 LB 斜面培養基(slant agar)上面，可保存菌種，便於爾後製作種菌。

(3) 挑取 1 個接種環的菌量，接種至 50 mL 含有 1% Ampicillin 的 LB broth 中，在 37°C 下以 180-200 rpm 震盪培養 16 hr。此

即為種菌。

## 2. 分子篩層析管柱方法

- (1) 均勻混合 50 mL Sephacryl S-200 HR 膠體後藉由漏斗注入 liquid chromatography column(SIGMA, U.S.A.)，使其自然沉降，避免 packing 過於緊密，不利樣品通過。
- (2) 待膠體沉降完成後，將層析管柱裝置組合完成，固定蠕動 pump 流速為 50 ml/ hr，以 2 倍膠體體積的 TST 緩衝溶液平衡膠體內的溶液。
- (3) 注入 10 ml 的 2 mg/ ml Blue Dextran 2000，檢查 packing gel 的 homogeneity，確定膠體底部空的體積。
- (4) 注入 50 mL 發酵菌液，以每小時 50 mL 的流速，設定每支試管 10 分鐘的速度開始收集透析液，收集 10 小時。
- (5) 將收集的透析液測量波長 280 nm 下的吸光值。
- (6) 取測量吸光值過後的透析液進行親和性管柱試驗。

## 3. 親和性管柱層析方法

- (1) 架起 liquid chromatography column 和下層的 AC 16 adaptor。
- (2) 以 TST buffer 懸浮 IgG-Sepharose 6 Fast Flow 膠體，注入步驟(1)之層析管柱。

- (3) 將上層 AC 16 adaptor 裝置完全後，以固定流速  $300 \text{ mL/cm}^2 \text{ hr}$  下，以 5 倍膠體體積、 $\text{pH}=7.6$  的 TST buffer 置換出膠體保存液。
- (4) 依序用相同流速，以醋酸、TST buffer、醋酸、TST buffer 平衡膠體內溶液。
- (5) 將樣品以流速  $150 \text{ mL/cm}^2 \text{ hr}$  注入管柱中。
- (6) 樣品完全注入後靜置 60 min 使樣品能完全吸附到膠體上。
- (7) 再以流速  $300 \text{ mL/cm}^2 \text{ hr}$  下，用 10 倍膠體體積的 TST buffer 洗去未吸附的非專一性蛋白質或雜質。接著用 2 倍膠體體積、 $5 \text{ mM pH}=5.0$  醋酸銨溶液沖堤膠體。
- (8) 以流速  $20 \text{ mL/cm}^2 \text{ hr}$  用  $0.5 \text{ M pH}=3.4$  醋酸將與膠體具有專一性結合的物質溶離出來，每 5 分鐘收集 1 管，每 1 管體積約為  $1.2 \text{ mL}$ ；測量各管在波長  $280 \text{ nm}$  下的吸光值。
- (9) 回收具有吸光值的部分大約  $5 \text{ mL}$ ，以 d.d. $\text{H}_2\text{O}$  和  $0.08 \text{ M Tris-HCl buffer (pH}=7.8)$  重複沖洗 2-3 次置換原有的醋酸溶液。

#### 4. SDS-PAGE 電泳步驟

##### (1) 膠體製備比例

	分離膠體緩衝溶液 Running gel solution (12.5%)	聚集膠體緩衝溶液 Stacking gel solution (4%)
d.d.H <sub>2</sub> O (mL)	4.8175	2.033
40% Acrylamide Bis 溶液(mL)	3.125	0.25
2M Tris-HCl (mL)		
pH=8.8	1.875	
pH=6.8		0.16
10% SDS (μL)	100	25
10% APS (μL)	75	30
TEMED (μL)	7.5	2
總體積 (mL)	10	2.5

(2) 樣品製備：取適當體積樣品，加入 5 X 的樣本溶液混合均勻，

於 100 °C 水浴槽內煮 5 分鐘後冷卻備用。

(3) 清洗製作 0.75 mm 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(1)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，隨即在此膠體上方加入 75% 乙醇壓平膠體表面，等待 30 分鐘凝膠。

(5) 倒出在分離膠體表面的乙醇，並用 1/4 圓形濾紙片把剩餘的乙醇完全吸取乾淨。

(6) 將步驟(1)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 0.75 mm 具有 10 個樣品槽(well)的尺梳。等待 30 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；若是緩衝溶液未超過電泳套件下方電極線，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，每個 well 體積為 25  $\mu$ L。

(9) 蓋上電泳槽頂蓋後，接上電源供應器，先以 110 V 電壓進行泳動，使各 well 的樣品達到聚集膠體底部後，後以 130 V 電壓泳動 60-70 分鐘，待樣品溶液中的追蹤染劑(Bromophenol blue)到達膠體底部即停止。

(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，以染色液染色 20-30 分鐘後進行脫色。

(11) 經過適當體積脫色液脫色數次後，改以 50% 甲醇沖洗 1-2 次，最後用清水清洗所有有機溶劑後用玻璃紙封膠。

#### 5. 總蛋白質含量測量方法(Micro Assay)(Bradford, 1976)

(1) 取蛋白質標準溶液 BSA，稀釋成 4 個線性濃度(2、4、6、8  $\mu\text{g/mL}$ )。

(2) 分別取這 4 個濃度的標準溶液 800  $\mu\text{L}$  放入試管中，加入 Bio-Rad dye reagent 200  $\mu\text{L}$ ，均勻混合 5–10 分鐘後，以分光光度計測量波長 595 nm 的吸光值( $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$ )。所得到的數據作一標準曲線。

(3) 再將蛋白質溶液樣本稀釋適當倍數，使最終體積為 800  $\mu\text{L}$ ，加入 Bio-Rad dye reagent 200  $\mu\text{L}$ ，同樣均勻混合 5–10 分鐘，測量波長 595 nm 下的吸光值( $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$ )。

(4) 所得到之數值代入標準曲線求出對應之蛋白質濃度。

#### 6. 比較重組菌株 *E. coli* p274 在不同時間下的表現

(1) 從種菌中取 1% 菌液量加入 4 瓶 100 mL 分別含有 1% ampicillin LB broth 中，37°C 下分別培養 7、7、14、24 小時，

- (其中一瓶 7 小時用 Ultrasonic cell disruptors 破菌)。
- (2) 培養完成，分別取培養 7、14、24 小時 50 mL 菌液以 6000 rpm 離心 20 分鐘後去除菌體。
- (3) 取另一瓶培養 7 小時、50 mL 的菌液，用 BRANSON SONIFIER 250 以條件 Output control: 6，Duty cycle: 50% (80-85 watt)，Time: 5 min 之下破菌，再以 6000 rpm 離心 20 分鐘。
- (4) 將步驟 2、3 所得到的四瓶菌液(三瓶未破菌、一瓶破菌)分別通過 0.22  $\mu\text{m}$  過濾膜後備用。
- (5) 分別進行親和性管柱層析方法，得到融合蛋白吸附的數據。
- (6) 將步驟 5 得到的樣品，分別置於超過濾裝置(Amicon<sup>®</sup>, Model:8200, U.S.A.)用分子量 10,000 的過濾膜進行濃縮，並反覆加入 d.d. H<sub>2</sub>O 來降低樣品中的鹽濃度。
- (7) 將步驟 5 的樣品，與未轉殖質體 pEZZ18 的 *E. coli* JM105 培養 24 小時發酵液和培養 24 小時未經過親和性管柱之 *E. coli* p274 發酵液、和進行 SDS-PAGE 分析。

## 7. 以發酵槽大量培養轉型菌株

### 7.1. 培養條件

- (1) 攪拌速率：100 rpm。
- (2) 培養溫度及時間：37°C，24 小時。
- (3) 通氣量：1 vvm。

## 7.2. 步驟

- (1) 取 0.6 mL 冷凍甘油小管中的 *E. coli* 菌液接種至 100 mL 含有 1% ampicillin LB broth 中，37°C 下活化 16 hr 作為 seed。
- (2) 配製 25 g/L 的 LB 放入 5 L 發酵槽中，並加水至 3 L。
- (3) 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。
- (4) 接種 1% 的種菌至發酵槽中，培養 24 hr，從每 hr 測量一次菌數(OD<sub>600 nm</sub>)、pH、protein assay。
- (5) 培養完成後，以 6000 rpm 離心 20 分鐘，取 50 mL 進行分子篩管柱和親和性管柱純化步驟(如試驗方法 2 和 3)。

## 8. 質體對培養基添加不同醣類的表現情形

- (1) 配製 6 瓶 45 mL LB broth 為實驗組，並作二重複；另配 1 瓶 50 mL LB broth 作為對照組。
- (2) 分別配製 20% 10 mL 的醣類溶液與 LB broth 分開滅菌
- (3) 滅菌完成使其冷卻，於實驗組 LB broth 中分別加入 5 mL 的

醣類溶液，接種 1% 種菌，發酵培養 24 小時。

- (4) 培養完成後，測量菌數( $OD_{600\text{ nm}}$ )，離心發酵液後測量總蛋白質含量和 pH 值。
- (5) 收集菌液進行親和性管柱試驗(親和性管柱試驗步驟如基本試驗方法 3)

#### 四、 試驗設計

1. 本研究使用回應曲面法決定最佳之培養基，其方法如下

##### 1.1. Plackett-Burman(PB)試驗設計篩選組成份

本試驗採七因子(7 factors)、二階層(2 levels)之 PB 試驗設計，七個實驗因子分別為 tryptone、YE、NaCl、casamino acid、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、甘油、時間，並將各個因子正規化成 -1 和 +1 之高低階層，以蛋白質濃度為回應值(response)，各因子濃度範圍如表七所示。

##### 1.2. 部分因子試驗設計判斷關鍵組成份

部分因子試驗採用 tryptone、YE、NaCl、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  作為試驗因子，將其正規化成 -1 和 +1 階層，濃度範圍如表八。

##### 1.3. 陡升試驗設計尋求組成份濃度之最適範圍

表九為陡升路徑方法的培養基比例。以上述部分因子設計得

到最多總蛋白結果的培養基比例為陡升試驗基點，經過回歸分析得到的係數為每個因子陡升距離，由基點逐步增加此距離得到培養基範圍。

#### 1.4. 中心混成設計決定培養基最適組成份

固定 NaCl 的比例為 1.0%，以 tryptone、YE 為中心混成設計之實驗因子，其濃度如表十所示，包含  $2^2$  全因子設計加上 4 個星點、2 個中心點，共計 10 個實驗。

#### 2. 使用軟體：

使用的軟體為 STATGRAPHICS Plus Version 5.1 (*StatPoint, Inc., Virginia, U.S.A.*)、The SAS system Version 8.01 (*SAS Institute Inc., N.C., U.S.A.*)。

#### 3. 實驗步驟

- (1) 利用 STATGRAPHICS 軟體，以 PB 試驗設計尋找最適培養基組成份
- (2) 利用部份因子試驗設計，以三角瓶液態發酵方法培養於 37°C，24 小時後，依照基本試驗方法步驟 1.3. 測量總蛋白質，將測量結果數據輸入 STATGRAPHICS Plus 軟體分析，可得到相關成份的一次方程式。
- (3) 以此一次方程式的係數增加於培養基中，進行陡升路徑實

驗，增加培養基的量，培養於 37°C，24 小時後，將發酵液

經過親和性管柱層析之後，收集具有最大吸光值的試管 3

管，測量蛋白質濃度後輸入 STATGRAPHICS Plus 軟體分析。

(4) 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。

(5) 將中心混成實驗設計結果輸入 SAS 分析得到回歸方程式及其一次項、二次項和交互作用項間的關係，再進一步作正則分析(canonical analysis)，找出各因子二次項的係數和修正過的回歸方程式。

#### 4. 液態培養發酵方法

(1) 實驗組為依照 STATGRAPHICS Plus 軟體設計出來的各項培養基成分比例，調配成總體積 50 mL 後以 121°C、15 分鐘滅菌，對照組為 50 mL LB broth。

(2) 接 1%種菌(500 µL)至每一瓶培養基中，以 37°C、180 rpm 下培養 24 或 48 小時(視試驗設計的培養時間而定)。

(3) 培養完成後，取 1 mL 菌液並稀釋 5 倍，測量每一瓶菌液的渾濁度，估計菌數。

(4) 將其餘錐形瓶中菌液以 4°C 6000 rpm 下離心 20 分鐘，去掉

下層離心後菌體，留發酵液(上清液)測 pH 值，並稀釋適當倍數作總蛋白質含量試驗。

(5) 進行親和性管柱層析純化。

表七(A)、Plackett-Burman 試驗設計。

Table 7(A) Plackett-Burman experimental design.

No.	Tryptone	YE	NaCl	casamino	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Glycerol	Time
1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
2	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
3	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
4	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
5	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
6	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
10	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
11	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
12	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
13	LB(對照組)						-1
14	LB(對照組)						+1

表七(B)、Plackett-Burman 試驗設計培養基組成份。

Table 7(B) The medium ingredients of Plackett-Burman experimental design.

Independent variables	Coded levels	
	(%)	
	+1	-1
Tryptone	1.0	0.1
YE	0.5	0.05
NaCl	1.0	0.1
Casamino acid	0.5	0.05
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	0.05
Glycerol	0.5	0.05
Times	48 hr	24 hr

表八(A)、 $2^{4-1}$  部分因子試驗設計。

Table 8(A)  $2^{4-1}$  fractional factorial experimental design.

No.	Tryptone	YE	NaCl	casamino
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	-1	-1	+1	+1
13	-1	+1	+1	-1
14	-1	-1	+1	-1
15	+1	+1	+1	+1
16	+1	-1	+1	-1
17	LB(對照組)			

表八(B)、 $2^{4-1}$  部分因子試驗設計之培養基組成份。

Table 8(B) The medium ingredients of  $2^{4-1}$  fractional factorial experimental design.

Independent variables	Coded levels	
	(%)	
	+1	-1
Tryptone	1.0	0.1
YE	0.5	0.05
NaCl	1.0	0.1
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.5	0.05

表九、陡升路徑試驗培養基組成(二重複)。

Table 9 The medium ingredients of the path steepest ascent experimental design.

	Tryptone	YE	NaCl
Base point	1.0	0.5	1.0
Slope	5.95	14.88	6.91
New unit	0.2	0.5	0.25
Medium ingredients			
1	1.0	0.5	1.0
2	1.2	1.0	1.25
3	1.4	1.5	1.5
4	1.6	2.0	1.75

Unit : %

表十(A)、中心混成試驗設計。

Table 10(A) Central composite experimental deisgn.

No.	Tryptone	YE	NaCl
1	-1	-1	
2	-1.68	0	
3	0	+1.68	
4	+1.68	0	
5	+1	-1	均為 1.0%
6	0	0	
7	-1	+1	
8	+1	+1	
9	0	0	
10	0	-1.68	
11	LB(對照組)		

表十(B)、培養基組成份之中心混成試驗設計。

Table 10(B) The medium ingredients of central composite experimental design.

Independent variables	Coded levels					
	(%)	-1.68	-1	0	+1	+1.68
Tryptone		0.92	1.0	1.2	1.4	1.48
YE		0.29	0.5	1.0	1.5	1.71

※ 固定 NaCl 比例為 1.0%

## 肆、結 果 與 討 論

### 一、 發酵液中融合蛋白(ZZ-RPLKPW)之回收

本研究室(彭, 2004)已確認 *E. coli* p274 所產生的融合蛋白中含有 RPLKPW 胜肽, 為瞭解發酵時間對此融合蛋白產量之影響, 將不同時間發酵菌液之融合蛋白以親和性管柱分離, 其結果如圖六。培養 7、14、24 小時之菌液  $OD_{280\text{ nm}}=0.068$ 、 $0.112$ 、 $0.211$ 。經過 0.5 M 醋酸溶液沖提後, 融合蛋白在第 10 管會有一個高峰(即最大吸光值)出現, 收集第 9 支至第 11 支試管之沖提液備用。由此結果可知 *E. coli* 培養的時間愈久, 融合蛋白愈多。從圖六觀察到 7 小時培養液經超音波破菌得到的融合蛋白量較低( $OD_{280\text{ nm}}=0.040$ ), 低於未破菌之 7 小時樣品( $OD_{280\text{ nm}}=0.068$ ), 推論可能是破菌過程中, 原菌體內的蛋白質酵素因細胞壁破碎而溶於菌液, 這些蛋白質酵素可能將融合蛋白水解成更小的片段, 無法吸附在親和性膠體管柱上, 這種現象也意味著 ZZ 融合蛋白為一胞外分泌蛋白。

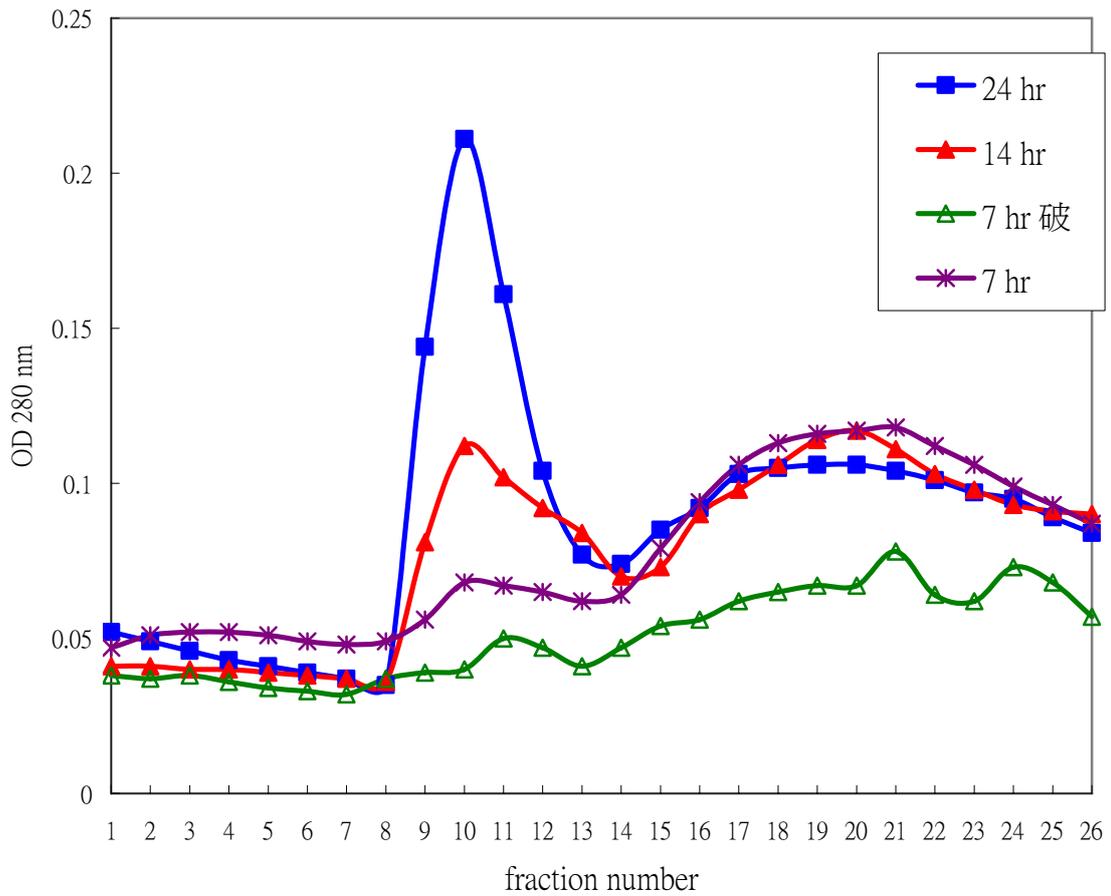
為確認經親和性管柱分離收集之沖提液是 ZZ 融合蛋白, 以膠體電泳檢驗之, 其結果為如圖七。圖中為不同時間培養下, 融合蛋白的表現情形。最左邊的色帶為蛋白質標準品分子量 marker, 分子量大小分別為 6.5、15.3、20.7、26.9、41.0、58.0、102.4、196.8 kD。Lane 1–Lane 4 均為培養轉型菌株 *E. coli* p274(含質體 pEZZ18)。

Lane 1 是培養 24 小時所分泌之總蛋白質，未經過親和性管柱純化；Lane 2 是培養 7 小時，經過超音波破菌及管柱純化後的蛋白質；Lane 3 是培養 14 小時後，經管柱純化之蛋白質；Lane 4 是培養 24 小時後，經管柱純化之蛋白質；Lane 5 是培養 *E. coli* JM105(未含質體 pEZZ18)24 小時所分泌之總蛋白質，未經過親和性管柱。從這 5 個樣品來看，Lane 1、2、3、4 在大約接近 15 kD 附近有一個較深的色帶，但是在 Lane 5 的位置沒有出現，因此色帶應為含有 RPLKPW 降血壓胜肽的 ZZ 融合蛋白位置(如圖七方框處)。

在文獻(Moks T. *et al.*, 1987a)中指出，ZZ 融合蛋白分子量約是 14 kD，而此研究的降血壓胜肽 RPLKPW 基因序列插入的位置是接續在 ZZ 核苷酸序列後面(ZZ-E-RPLKPW)，經轉錄、轉譯得到 E-RPLKPW 胺基酸序列。即可預估重組載體所產生的融合蛋白分子量。(Glu 分子量約=129.12 Da、Arg =156.19 Da、Pro=97.12 Da、Leu=113.16 Da、Lys=128.17 Da、Trp=186.12 Da)各分子量相加之後大約是 907 Da，再加上 ZZ 融合蛋白分子量，則 ZZ-E-RPLKPW 胺基酸序列分子量大約=14.9 kD，與圖七的結果相互呼應。

Lane 1、5 和 Lane 2、3、4 的比較，可看出經過親和性膠體 IgG-Sepharose 管柱層析後的蛋白質片段較少，表示利用此方法純化的效果佳。由 Lane 2、3、4 發現，隨著培養時間愈長，其色帶的顏

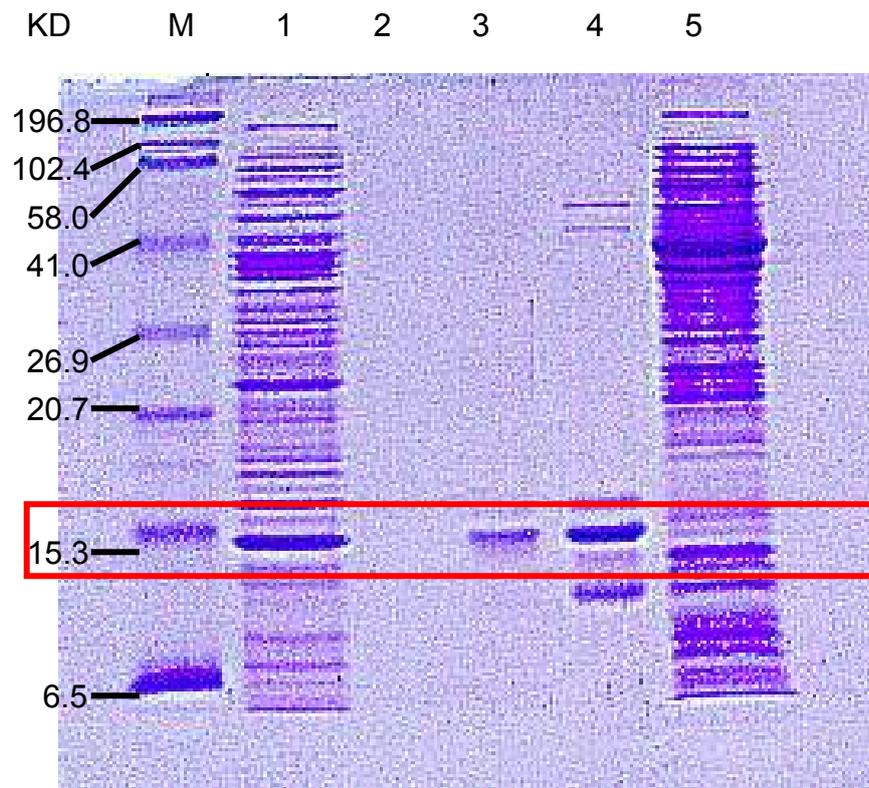
色也愈深，即表示菌體分泌之蛋白質愈多，尤其 Lane 2 幾乎完全沒有色帶出現，推測是菌體內蛋白質酵素可能水解胞外蛋白。所以之後的實驗均為培養 24 小時。



- \*：培養 7 小時經過超音波破菌之融合蛋白
- △：培養 7 小時未經過超音波破菌之融合蛋白
- ▲：培養 14 小時未經過超音波破菌之融合蛋白
- ：培養 24 小時未經過超音波破菌之融合蛋白

圖六、不同培養時間的融合蛋白經親和性膠體吸附管柱層析圖。

Fig. 6 The absorption spectrum profile of fusion protein with different incubation time.



Lane M : Marker 。

Lane 1 : 培養 24 小時所分泌之蛋白質(總蛋白質)。

Lane 2 : 培養 7 小時後所分泌之蛋白質(破菌後並經過 IgG 管柱層析)。

Lane 3 : 培養 14 小時所分泌之蛋白質(經過 IgG 管柱層析)。

Lane 4 : 培養 24 小時所分泌之蛋白質(經過 IgG 管柱層析)。

Lane 1- 4 均為培養 *E. coli* p274 轉型菌株。

Lane 5 : 培養 *E. coli* JM105(不含質體 pEZZ18)24 小時所分泌之蛋白質(總蛋白質)。

圖七、融合蛋白在不同時間的表現量之 SDS-PAGE 電泳圖。

Fig. 7 SDS-PAGE profile of fusion protein expression with different incubation time.

## 二、以發酵槽大量培養重組大腸桿菌 p274

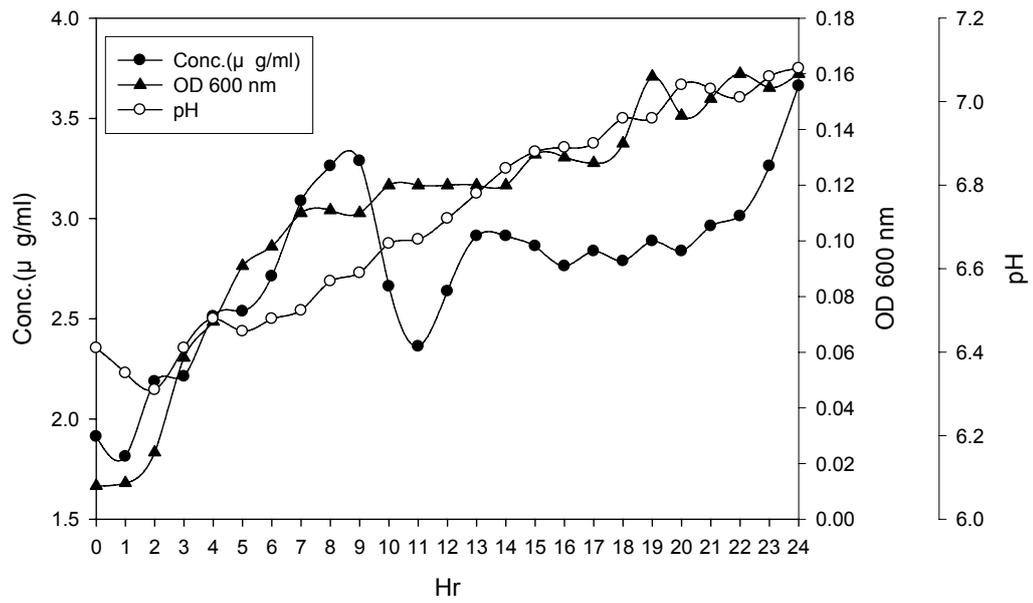
為探討發酵槽中轉型株生產情形，於 24 小時間每一小時取樣一次，每次取樣 15 mL，測量蛋白質濃度、菌數和 pH 值結果如圖八。總蛋白質濃度在第 0 和第 1 小時無太大變化，推測菌體於此時應該是在適應發酵槽環境。第 2 小時開始增加，第 3 小時濃度不變，第 4 小時增加，第 5 小時又不變，推測是菌體在這些階段中，菌體代謝營養物質產生蛋白質需要花費 2 小時的時間。隨後持續增加至第 9 小時達到一個極大值 32.88  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，然後一路降低至第 11 小時的 23.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，這可能是菌體較多，發酵槽的攪拌棒將菌體的細胞壁打破，溶出蛋白質酵素分解部分的蛋白質。第 13 小時則略為增加至 29.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，從第 13 至第 20 小時間，總蛋白質含量大約是 28-29  $\mu\text{g}/\text{mL}$  左右，第 20 小時之後才又上升至第 24 小時的 36.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，同時是發酵槽產生總蛋白質的最大量。

在菌數方面，第 0 至第 1 小時同樣由於菌體適應環境，故無明顯變化，從第 2 到第 7 小時有明顯的上升，推測這可能是菌數的生長期，而第 7 到第 9 小時呈現停滯狀態，第 10 小時略為上升後，到第 14 小時大致維持不變，第 15 小時上升一點後，稍微有降低的趨勢，直到第 19 小時之後又再度上升，推測與菌體的生長、死亡速率有關。因此在第 7 小時以前，菌數可能一直不斷生長，死亡的菌數還不多，

所以數值會緩慢上升，但是過了第 7 小時，菌體死亡速率接近生長速率，第 7 至第 9 小時和第 10 至第 14 小時數值才會呈現停滯狀態，但整體仍是上升。第 15 至第 19 小時數值下降可能因為菌體生長已到達死亡期，死亡速率大於生長速率，第 19 小時以後數值上升也有可能是菌體快速死亡所致。

在第 9 至第 11 小時總蛋白質濃度有下降的趨勢，推測可能與取樣不均勻有關係，為實驗誤差。

圖九(A)是發酵轉型菌株 24 小時後，產生的融合蛋白經過分子篩管柱純化的結果。在第 3、11、16、24、37、46 管發現有高峰出現，尤其第 11 管的  $OD_{280\text{ nm}}=0.616$  為最高。圖九(B)為取第 11 管再進一步地經親和性管柱層析純化結果，得知第 11 管(收集樣品第 140 分鐘)會有最大的吸光值  $OD_{280\text{ nm}}=0.311$ ，其他經過分子篩管柱收集的試管均無吸光值，可證明發酵液經由分子篩管柱純化而收集的第 11 管為 ZZ 融合蛋白。收集此樣品第 8 至第 12 管，經過超過濾濃縮後備用。從圖九(B)我們可以得知，透過親和性管柱純化的效果非常好，僅出現一個明顯的波峰，表示這一系列純化過程是有效率的。



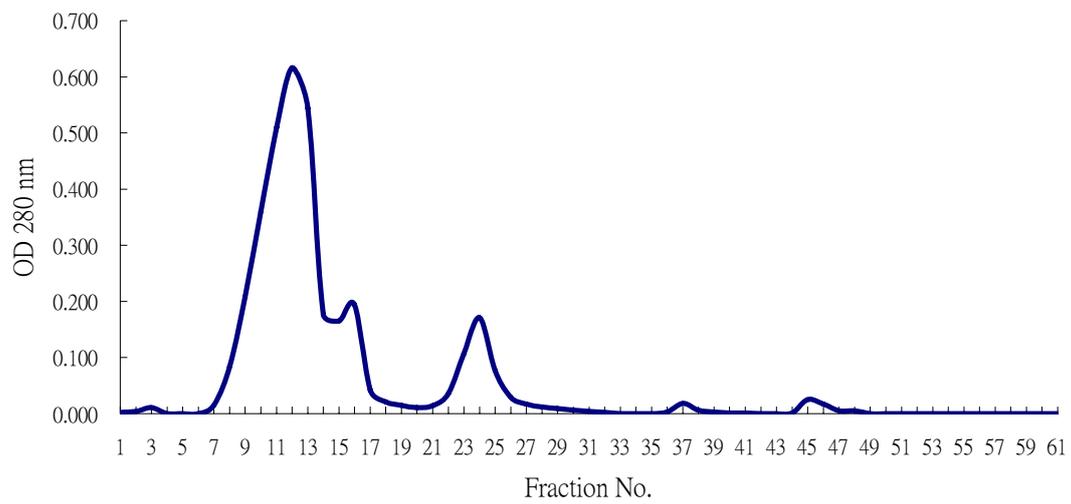
圖八、轉型菌 *E. coli* p274 發酵期間，發酵液之總蛋白質濃度、菌液  
 渾濁度、pH 值變化圖。

Fig. 8 Fermentation profile of transformed *E. coli* p274 in the LB  
 broth.

\*註：濁度為稀釋 5 倍體積測量。



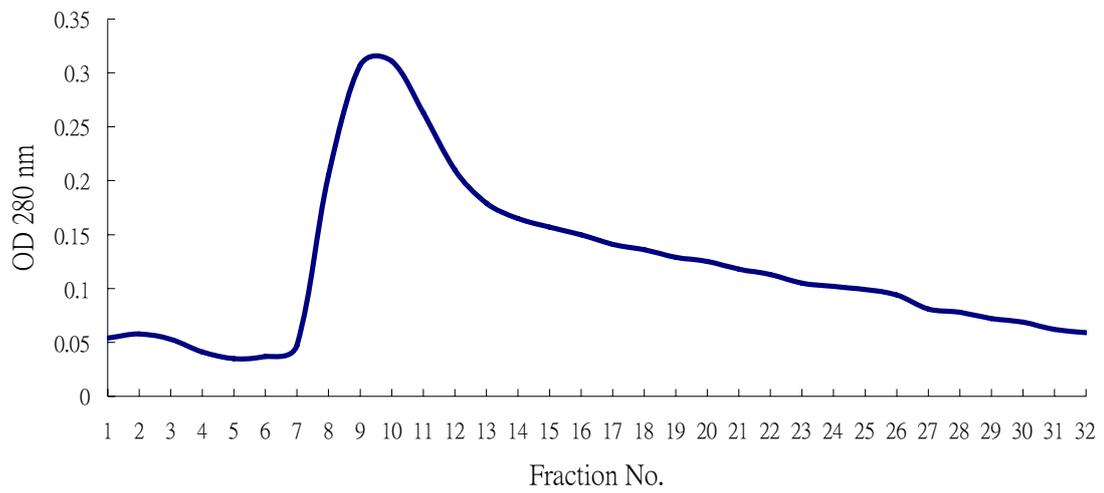
(A)



圖九(A)、利用發酵槽生產的融合蛋白經分子篩管柱層析圖。

Fig. 9(A) The absorption spectrum profile of fusion protein with the gel-filtration by fermentor.

(B)



圖九(B)、利用發酵槽生產的融合蛋白經親和性管柱層析圖。

Fig. 9(B) The absorption spectrum profile of fusion protein with the affinity column by fermentor.

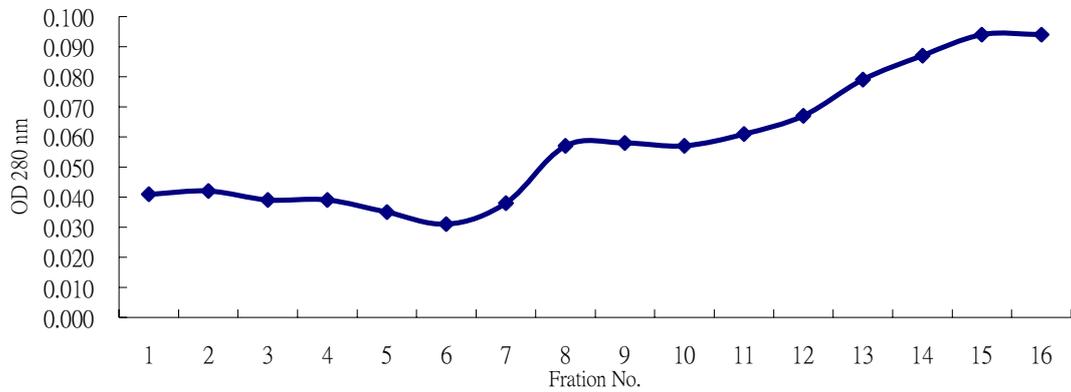
### 三、轉型菌株融合蛋白表達之穩定性

在實驗過程中發現，使用甘油管內保存時間逾一年半之菌株，經過斜面、種菌、搖瓶培養過程至通過親和性管柱，雖然會有菌體產生，但無法產生能讓附上親和性管柱吸附之融合蛋白(如圖十(A))，在第九至第十一管均無比較明顯的高峰。經過重新配置緩衝溶液、重新充填管柱後情形仍無改善，所以懷疑甘油管保存的菌株可能已喪失轉型菌株之特性或當初儲存非單一菌落所培養者。將原保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下的甘油管取出，重新作藍白篩選(如圖十一(A))，發現在 LB/Amp/X-Gal 篩選型平面培養基之菌落中，有些菌落完全是淡藍色的，有些菌落是有淡藍色的中心點但周圍是白色的。這些菌落即表示非轉型成功菌株形成的菌落，因而產生  $\beta$ -半乳糖苷酶分解 X-Gal(人工合成乳糖類似物)出現藍色色素。因此不斷以無菌牙籤挑取中間點為淡藍色而周圍是白色的菌落至另一片篩選型平面培養基上(如圖十一(B))，最後挑取白色菌落(如圖十一(B)打「v」處)，培養後以親和性管柱純化分離融合蛋白結果如圖十(B)。與圖十(A)比較後，可發現在第十管有最大值  $\text{OD}_{280\text{nm}}=0.186$ ，表示此白色菌落為成功的轉殖菌株形成。

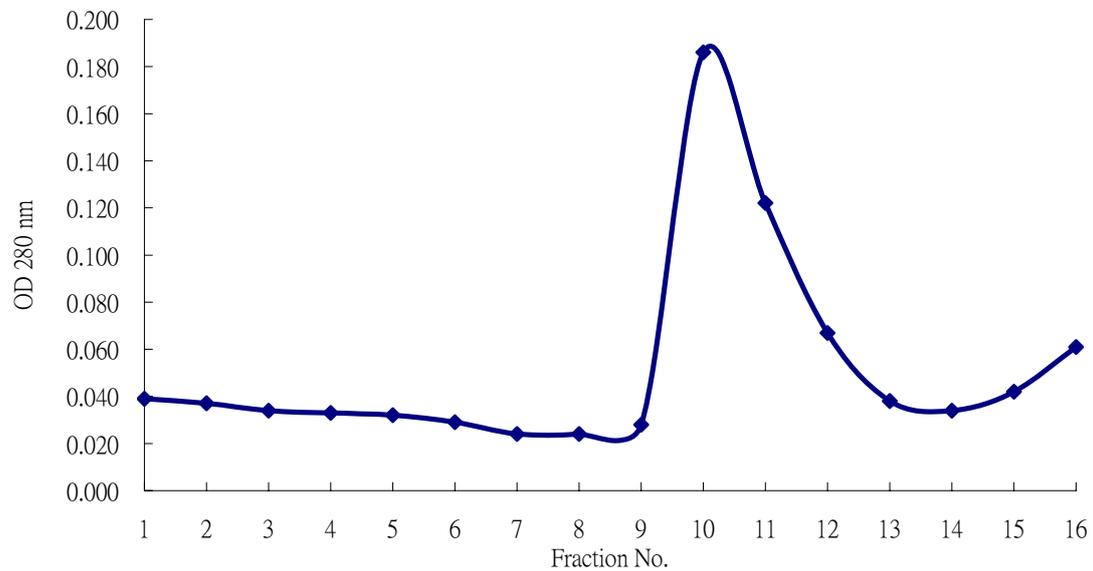
圖十二為接種在 LB/Amp 斜面培養基上放置不同時間的轉殖菌，可看出保存於 $4^{\circ}\text{C}$  LB/Amp 斜面培養基一週後的菌株，經 LB broth 培養 24 小時後產生的融合蛋白在第九至第十一管有最大值  $\text{OD}_{280}$

$OD_{280\text{ nm}} = 0.298$ ，但是放置在  $4^{\circ}\text{C}$  下一個月後，融合蛋白產生的量已略微降低至  $OD_{280\text{ nm}} = 0.201$ ，放置兩個月後融合蛋白幾乎都沒有了 ( $OD_{280\text{ nm}} < 0.1$ )。推測雖然  $4^{\circ}\text{C}$  LB 斜面培養基容易保存菌體，但是保存時間較短暫，若是要長期保存菌種，應該以  $-80^{\circ}\text{C}$  甘油管保存為主。

(A)



(B)



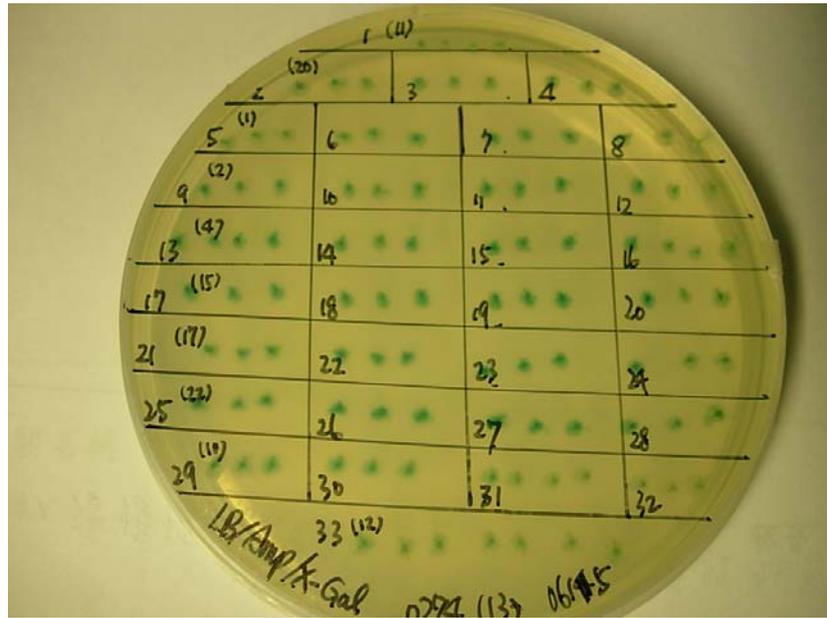
圖十(A)、轉型菌 *E. coli* p274 藍色菌落表現融合蛋白情形。

(B)、轉型菌 *E. coli* p274 白色菌落表現融合蛋白情形。

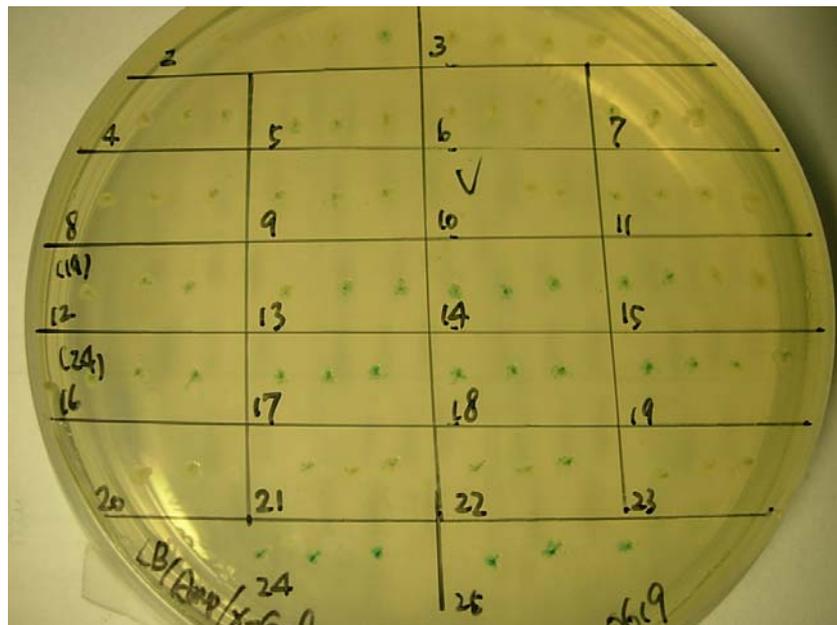
Fig. 10(A) The stability of recombinant *E. coli* p274 blue colony.

10(B) The stability of recombinant *E. coli* p274 white colony.

(A)



(B)

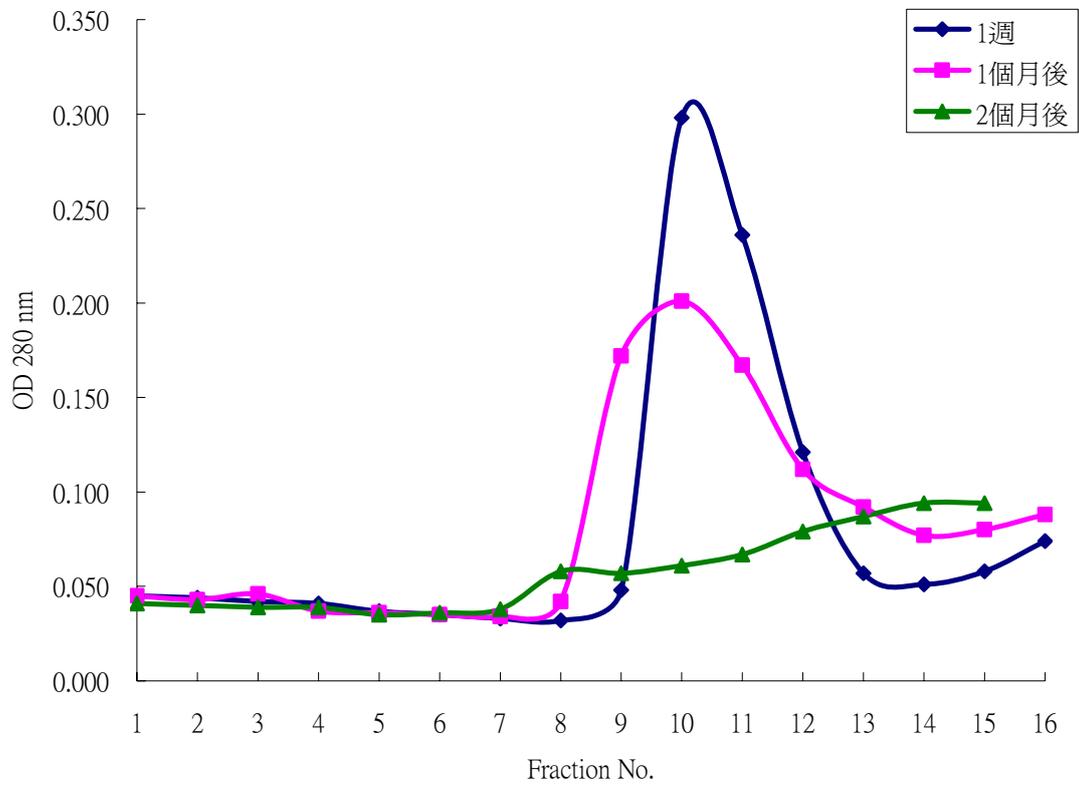


圖十一(A)、*E. coli* p274 生長於 LB/ Amp/ X-Gal 之平面培養基。

(B)、*E. coli* p274 生長於另一塊 LB/ Amp/ X-Gal 之平面培養。

Fig. 11 (A).*E. coli* p274 grew on the LB/ Amp/ X-Gal agar plate.

(B).*E. coli* p274 grew on another LB/ Amp/ X-Gal agar plate.



圖十二、接種 LB 斜面培養基上 *E. coli* p274 分泌融合蛋白之情形。

Fig. 12 The absorption spectrum profile of fusion protein secreted from *E. coli* p274 which preserved on LB slant agar.

#### 四、 培養基成分對融合蛋白產量之影響

##### (一) 不同碳源之影響

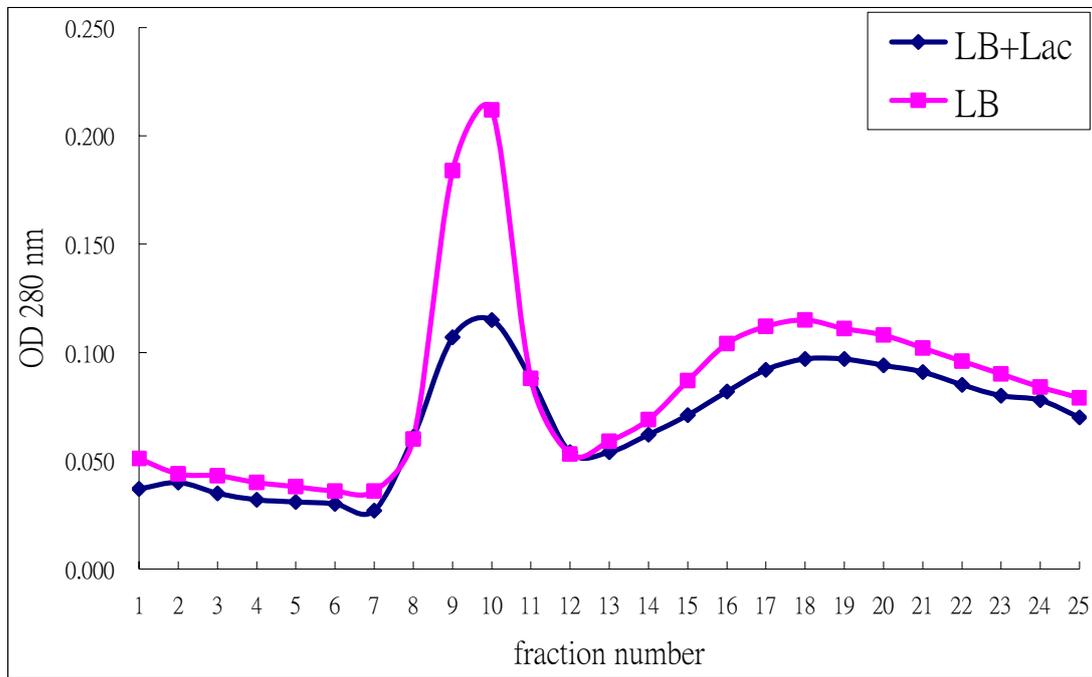
在 LB 培養基中添加 2% 不同的碳源(carbon source)，與未補充碳源的 LB 培養基比較，是否會對 *E. coli* p274 的菌數和分泌的 ZZ 融合蛋白量造成差異，結果如表十一。添加 2% 的蔗糖和乳糖使總蛋白濃度分別達到 102.63 和 160.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，但是產生的菌數差異很大。添加 2% 蔗糖發酵轉型菌株的菌液濁度為最高值( $\text{OD}_{600\text{ nm}}=0.428$ )，添加 2% 乳糖的卻為最低值( $\text{OD}_{600\text{ nm}}=0.188$ )，推測蔗糖有利於增加菌體數目，但是乳糖雖然沒有明顯增加菌數，卻能增加其蛋白質的量。經過比較添加不同的培養基後發現，添加碳源大多能增加菌數，發酵液的 pH 值也因為碳源被代謝，產生酸性物質，所以明顯下降。以 LB 添加乳糖作為培養基(第 4 號樣品)，得到的總蛋白質濃度、pH 值和菌體數目都接近於未添加其他碳源的 LB 發酵液，因此將第 4 號樣品繼續以親和性管柱層析分離融合蛋白，結果如圖十三。未額外添加碳源的 LB 培養基蛋白質吸光值可達到  $\text{OD}_{280\text{ nm}}=0.212$ ，而 LB 加上乳糖作為培養基的蛋白質吸光值  $\text{OD}_{280\text{ nm}}=0.115$ 。純化後的融合蛋白並無明顯增加，反而減少，故推測過多的碳源會抑制融合蛋白產生。

表十一、LB 加入不同碳源對 *E. coli* p274 生長的影響。

Table 11 The growth effect of *E. coli* p274 when used LB and different carbon sources.

No.	碳源	總蛋白質濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	pH	菌液濁度 ( $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ )*
1	LB+2% Glucose	37.75	4.47	0.271
2	LB+2% Sucrose	102.63	5.70	0.428
3	LB+2% Fructose	32.88	4.51	0.348
4	LB+2% Lactose	160.50	7.33	0.188
5	LB+2% Mannose	31.38	4.51	0.321
6	LB+2% Mannitol	32.50	4.61	0.330
7	LB	202.63	7.58	0.166

\*註：濁度為稀釋 5 倍體積測量。



圖十三、以 LB 添加乳糖培養 *E. coli* p274 後融合蛋白之管柱吸附圖。

Fig. 13 The absorption spectrum profile of fusion protein with LB and lactose incubated *E. coli* p274.

## (二) 最適培養基組成分之探討

### 1. 有效組成份之篩選

參考相關文獻(Hu S. Y. *et al.*, 2004, Matsui T. *et al.*, 1989)

和多次預備試驗，依據 PB 試驗設計法設計的培養基的組合進行試驗，培養基比例及結果如表十二(A)。由此結果可明顯看出，添加甘油的比例愈多，pH 值會愈低，但對總蛋白質和菌數卻無太大相關性；添加其他組成份多寡，與總蛋白質、pH 值和菌數均無觀察其間之相關性。培養時間愈久，總蛋白質量、pH 和菌數隨之升高。

第 5 號樣品的總蛋白質含量是最低的(58.88  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，菌體濁度則可達到  $\text{OD}_{600 \text{ nm}}=0.281$ ；第 11 號樣品的總蛋白質含量最高(205.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，菌體濁度則為 0.246，由此可知，總蛋白質量愈多，菌數不一定會愈多，因此總蛋白質含量與菌數似無相關性。由於第 11 號樣品總蛋白含量最高，所以試著用親和性管柱分離出融合蛋白，結果如表十二(B)，與對照組 LB 比較得知其融合蛋白量較低，推論可能是有些添加的成分會影響融合蛋白之量。

以 STAGRAPHICS 軟體詳細分析得知上述各培養組成份(如圖十四)，添加甘油對總蛋白質含量為負影響。有機氮源的部分，

casamino acid 也是負影響，故之後只添加 tryptone 和 YE(yeast extract, 酵母萃取物)，並且加入無機氮源「 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 」和金屬鹽類「NaCl」。

表十二(A)、培養基組成份之 Plackett-Burman 試驗設計。

Table 12(A) Plackett-Burman experimental design for screening suitable medium ingredients.

No.	培養基比例(單位：%)						時間 (hr)	實驗結果		
	Tryptone	YE	NaCl	casamino	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Glycerol		總蛋白質濃度 (µg/mL)	菌液濁度 (OD <sub>600 nm</sub> )*	pH
1	1.0	0.05	1.0	0.5	0.05	0.5	24	121.38	0.240	5.49
2	0.1	0.05	0.1	0.5	0.5	0.5	24	69.88	0.254	5.83
3	0.1	0.5	1.0	0.05	0.5	0.05	24	183.38	0.132	7.17
4	1.0	0.05	0.1	0.05	0.5	0.5	48	155.63	0.320	6.36
5	0.1	0.5	1.0	0.5	0.05	0.5	48	58.88	0.281	4.95
6	1.0	0.5	0.1	0.5	0.5	0.05	48	157.38	0.348	8.01
7	1.0	0.5	0.1	0.5	0.05	0.05	24	107.63	0.242	7.47
8	0.1	0.05	1.0	0.5	0.5	0.05	48	154.63	0.147	7.87
9	0.1	0.05	0.1	0.05	0.05	0.05	24	74.13	0.195	7.63
10	1.0	0.05	1.0	0.05	0.05	0.05	48	197.13	0.190	8.26
11	1.0	0.5	1.0	0.05	0.5	0.5	24	205.63	0.246	6.28
12	0.1	0.5	0.1	0.05	0.05	0.5	48	157.38	0.180	6.15
13	以 LB 作為對照組						24	195.38	0.190	8.10
14	以 LB 作為對照組						48	231.88	0.234	8.34

\*註：濁度為稀釋 5 倍體積測量。

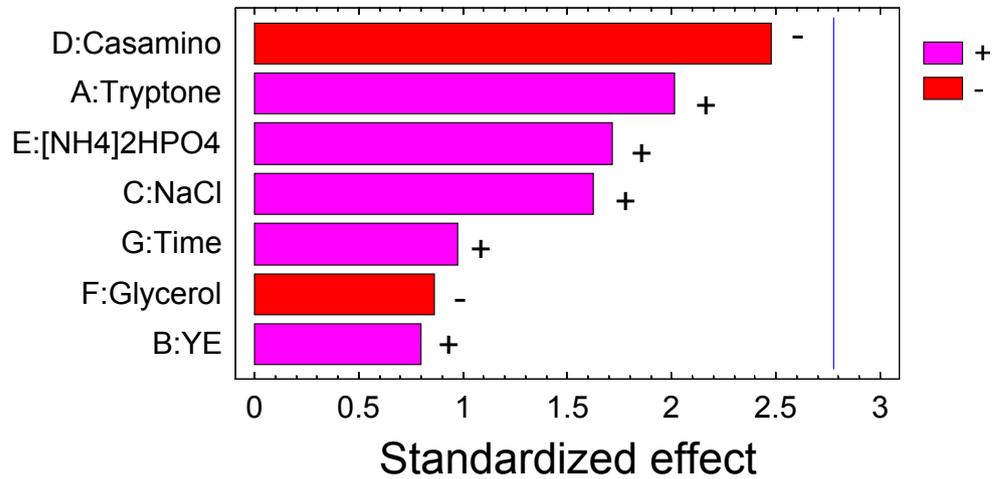
表十二(B)、Plackett-Burman 試驗設計方法部份樣品總蛋白質濃度及融合蛋白濃度之比較。

Table 12(B) The comparison between total protein concentrations and fusion protein concentrations in part of Plackett-Burman experimental design.

Sample	總蛋白質濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	融合蛋白濃度 ( $\text{OD}_{280\text{ nm}}$ )*
第 11 號	205.63	0.212
LB(培養 24 hr)	195.38	0.273
LB(培養 48 hr)	231.88	0.369

\*註：濁度為稀釋 5 倍體積測量。

### Standardized Pareto Chart for Protein



圖十四、各培養基對 Plackett-Burman 試驗結果的分析。

Fig. 14 Affects of different medium ingredients in Plackett-Burman experimental design.

## 2. 關鍵組成份之確定

根據  $2^{4-1}$  部分因子試驗設計尋找較具影響的組成份，二因子階層試驗設計與試驗結果如表十三。總蛋白質濃度最大的兩個樣品分別是第 10 瓶和第 15 瓶(161.88  $\mu\text{g/mL}$ 、171.63  $\mu\text{g/mL}$ )，兩者差別只在添加不同比例的  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 。總蛋白質濃度與四個培養基比較後發現，總蛋白質愈高，NaCl 濃度接近 1.0%，YE 濃度接近 0.5%，與 tryptone 和  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  較無關係。pH 與培養基比較後，則是  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  比例愈低，pH 值愈高。由菌數渾濁度來看，似乎 YE 比例高對菌數生長有幫助。

經過 STAGRAPHSICS 軟體分析結果如圖十五(A)。由此圖發現，在不考慮因子之間交互影響下，當加入  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  時，對整個實驗的結果是負向關係，且影響程度小；tryptone、YE、NaCl 對實驗結果均為正向關係，影響的程度較大。更進一步地，直接捨去  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  進行分析(如圖十五(B))，發現並不會影響原來的實驗結果，故接下去的陡升路徑方法中，培養基組成就只使用 tryptone、YE、NaCl。這三個成分所產生的迴歸方程式為：

$$Y = - 2.87222 + 5.95 \text{ Tryptone} + 14.8833 \text{ YE} + 6.90556 \text{ NaCl}$$

(Y = protein concentration)

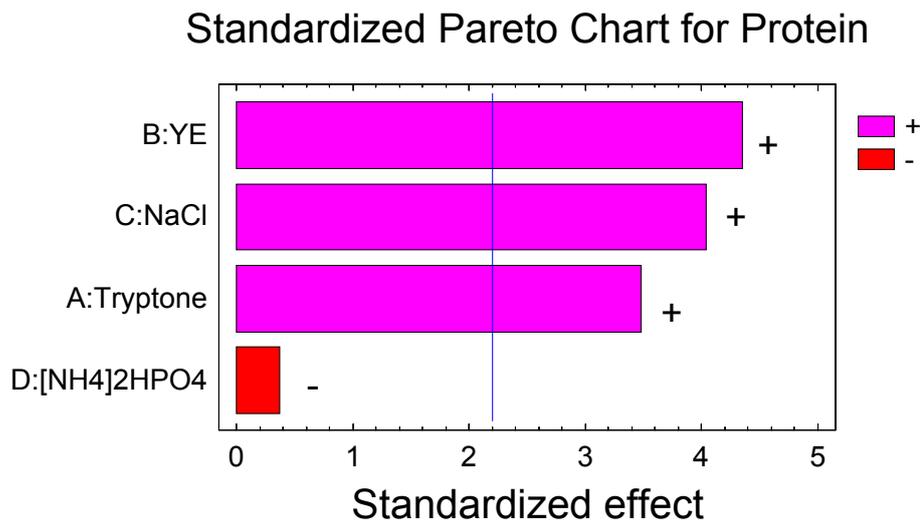
表十三、培養基組成份之  $2^{4-1}$  部分因子試驗設計。(培養時間為 24 小時)

Table 13  $2^{4-1}$  fractional factorial experimental design for screening suitable medium ingredients.

No.	培養基比例(單位：%)				實驗結果		
	Tryptone	YE	NaCl	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	總蛋白質濃度 (µg/mL)	菌液濁度 (OD <sub>600 nm</sub> )*	pH
1	0.1	0.05	0.1	0.5	-0.38	0.049	7.43
2	0.1	0.5	0.1	0.05	88.13	0.171	8.05
3	1.0	0.05	0.1	0.05	62.88	0.130	7.89
4	0.1	0.5	0.1	0.5	31.13	0.259	7.36
5	0.1	0.5	1.0	0.5	158.63	0.125	7.46
6	1.0	0.5	0.1	0.5	78.88	0.315	7.48
7	0.1	0.05	0.1	0.05	4.13	0.045	7.84
8	1.0	0.05	1.0	0.5	129.63	0.104	7.47
9	1.0	0.5	0.1	0.05	93.88	0.239	7.63
10	1.0	0.5	1.0	0.05	161.88	0.191	7.56
11	1.0	0.05	0.1	0.5	56.13	0.151	7.69
12	0.1	0.05	1.0	0.5	15.63	0.050	7.29
13	0.1	0.5	1.0	0.05	147.13	0.130	7.85
14	0.1	0.05	1.0	0.05	4.88	0.046	7.83
15	1.0	0.5	1.0	0.5	171.63	0.169	7.33
16	1.0	0.05	1.0	0.05	122.63	0.110	7.73
17	LB(對照組)				174.88	0.165	7.52

\*註：濁度為稀釋 5 倍體積測量。

(A)

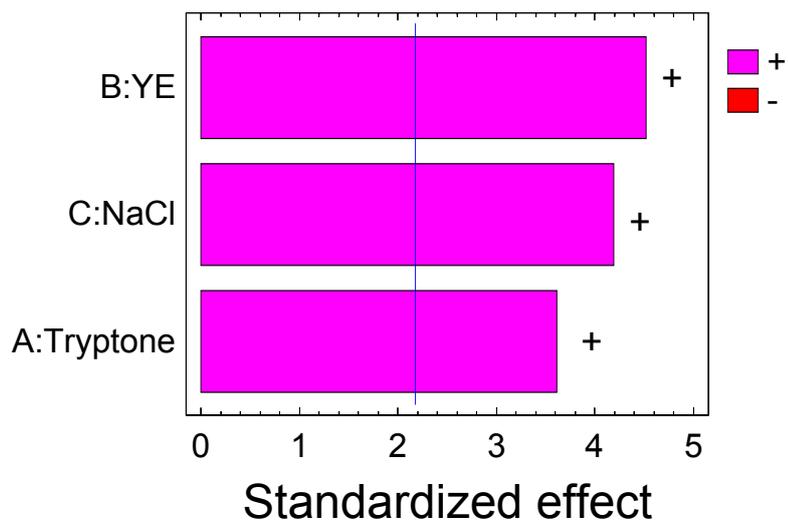


圖十五(A)、各培養基對  $2^{4-1}$  部分因子試驗的分析。

Fig. 15(A) Analysis of different medium ingredients in  $2^{4-1}$  fractional factorial experimental design.

(B)

### Standardized Pareto Chart for Protein



圖十五(B)、修正各培養基對  $2^{4-1}$  部分因子試驗的分析。

Fig. 15(B) Analysis of different modified medium ingredients in  $2^{4-1}$  fractional factorial experimental design.

### 3. 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：

$$\text{Tryptone} : \text{YE} : \text{NaCl} = 5.95 : 14.8833 : 6.90556$$

$$\doteq 0.2 : 0.5 : 0.25$$

試驗設計與結果如表十四，比較後發現，第 4 號樣品菌液總蛋白質濃度最高(323.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，但因原本培養基含蛋白質的量也高 (tryptone、YE 分別佔 1.2%、1.0%)，故應以親和性管柱吸附得到的融合蛋白濃度為準。取  $\text{OD}_{280 \text{ nm}}$  吸光值最高之三管：第 9、第 10、第 11 管測蛋白質濃度，發現  $\text{Tryptone} : \text{YE} : \text{NaCl} = 1.2 : 1.0 : 1.25$  產生的菌液，得到的融合蛋白濃度 53.81  $\mu\text{g}/\text{ml}$  最高(表九)，產率=0.23 為最大值，比 LB 的 0.17 還要再高一些。

菌數則以第 3 號樣品( $\text{OD}_{600 \text{ nm}}=0.270$ )最高，但是其總蛋白質濃度(42.94  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )卻是最低，可能是此培養基比例適合菌體生長。比較菌數與總蛋白質，發現總蛋白質不會隨著菌數增加而增加。

從 pH 值發現，培養基添加的比例愈高，pH 值逐漸下降，表示菌體利用培養基代謝產生酸性物質較多。

表十四、陡升路徑試驗之培養基組成與結果。(培養 24 小時)

Table 14 The medium ingredients and results of the path steepest ascent design.

培養基比例(單位：%)					
	第 1 瓶	第 2 瓶	第 3 瓶	第 4 瓶	LB
Tryptone	1.0	1.2	1.4	1.6	1.0
YE	0.5	1.0	1.5	2.0	0.5
NaCl	1.0	1.25	1.5	1.75	1.0
實驗結果					
總蛋白質濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	132.88	143.88	132.88	201.88	123.63
菌液濁度 ( $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ )*	0.180	0.141	0.270	0.191	0.132
pH 值	7.67	7.09	6.72	6.36	7.44
融合蛋白吸光值( $\text{OD}_{280\text{ nm}}$ )					
第 9 管	0.122	0.221	0.143	0.265	0.172
第 10 管	0.328	0.235	0.195	0.287	0.201
第 11 管	0.183	0.218	0.205	0.200	0.143
融合蛋白濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	45.44	53.81	42.94	45.56	34.19
產率*	0.21	0.23	0.20	0.14	0.17

\*註 1：濁度為稀釋 5 倍體積測量。

\*註 2：產率=融合蛋白濃度/總蛋白質濃度

#### 4. 尋找最適培養基組成分

採用中心混成設計，依據上述陡升路徑試驗找到的最佳產率(融合蛋白濃度/總蛋白濃度)之培養基組成份比例為中心點，以中心點增減 0.2% 為 tryptone 的比例，增減 0.5% 為 YE 的比例，但固定 NaCl 濃度為 1.0%，其試驗設計培養基組成份與結果如表十五。可看出第 10 號樣品的總蛋白質濃度最高(168.20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。而第 3 號樣品的 pH 值為最低 6.93，菌液渾濁度  $\text{OD}_{600\text{ nm}}=0.520$  為最高值，推測此培養基經過菌體代謝後會產酸性物質，才會使 pH 值降低。經過親和性管柱純化之後，第 10 號樣品同樣得到最大值 30.81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，但是從產率來看，最高的是第 9 號樣品(0.24)，培養基比例是 tryptone : YE : NaCl=1.2% : 1.0% : 1.0%。比較後發現，當總蛋白質濃度較高時，pH 值有略高的趨勢，但是與菌數、融合蛋白濃度較沒有關係。

將產率結果輸入 STAGRAPHSICS 軟體分析，得到一個 tryptone 和 YE 對融合蛋白產率之回應曲面圖及等高線圖(圖十六和圖十七)，可得到最適培養基比例大約是 tryptone=1.20%、YE=0.80%、NaCl=1.0%，經過分析各培養基影響的結果(如圖十八)，可得知 YE 的量需要減少；在二次項(tryp<sup>2</sup>、YE<sup>2</sup>)方面，tryptone 和 YE 都對融合蛋白的比值影響較鉅，分別添加少量即

可改變試驗結果，兩者對試驗的影響均為添加量降低，才會促進融合蛋白生成，但是兩者的交互作用項又為正向，表示 tryptone 和 YE 對試驗共同的影響是添加的量要維持一定比例，就可促進融合蛋白的生成。

當分別輸入總蛋白質和融合蛋白濃度至 STAGRAPHICS 軟體分析都無法找到最適值，因為本試驗是根據陡升路徑試驗的最佳產率而設計，因此必須輸入中心混成設計之各樣品產率，才能尋找到最適值。

表十六為中心混成設計之回歸分析表，得到一回歸方程式為

$$\text{Fusion protein proportion} = -1.613686 + 3.029643*\text{tryptone} + 0.099052*YE - 1.316434*\text{tryptone}^2 + 0.150000*\text{tryptone}*YE - 0.175354*YE^2$$

並非所有的回歸係數都顯著(如表十七)，tryptone 一次項、tryptone 與 tryptone、YE 與 YE 之二次項都分別具有極顯著性 ( $p < 0.01$ )，但是 YE 一次項和 tryptone、YE 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的可能。而圖十八的結果在 YE 的部分與表十七相異，在軟體的預測上，YE 濃度應該減少，但是不具有顯著差異性 ( $p > 0.05$ ) (如表十七)。由表十七的變方分析表的 P-value 得知， $YE = 0.0073$ 、 $\text{tryptone}^2 = 0.0053$ 、 $YE^2 = 0.0092$  在 1% 顯著水準之下是具有顯著性的，同時檢定係

數( $R^2$ )值達到 94%表示此回歸方程式足以解釋融合蛋白產率能適切描述本實驗之數據。將表十五的中心混成試驗結果之產率輸入 SAS 進行分析如表十八，可表示一次項和整個模式之回歸係數均為顯著( $p < 0.05$ )，二次項甚至能夠達到極為顯著( $p < 0.01$ )，而兩因子的交互作用項則不顯著，在此回歸模式下之 F 值為 12.72，達到顯著差異( $p < 0.05$ )。在誤差項(residual)中，缺適性(lack of fit)之 F 值為 2.43，不具有顯著水準( $p > 0.05$ )，表示由此實驗數據所回歸得到的二次多項式模式能夠適當地表達這些數據，並無配置不足情形。由  $R^2 = 0.94$  判斷，此回歸方程式能夠適當的表達本實驗之數據，即融合蛋白的產率，可用所採用之因子的變異解釋。回歸方程式經過 SAS 軟體進行正則分析(canonical analysis)，消除一次項後將二次方程式轉換得到正則方程式為(如表十九)

$$Y = 0.237 - 0.079 Z_1^2 - 0.112 Z_2^2$$

其中 Y=融合蛋白產率， $Z_1$ =tryptone， $Z_2$ =YE。方程式中之係數均為負值，表示不論 Z 值為正或負值水準變化，皆會使回應值下降，因此回應曲面法中有極大值( $Z_1, Z_2$ )=(-0.014, -0.290)，換算成各成份對應濃度為：tryptone=1.20%，YE=0.79% (表二十)，與 STAGRAPHICS 軟體分析結果相似。

表二十一為各個變數對融合蛋白產率的整體總合作用之變方分析表，由此表可知 tryptone 和 YE 這兩種培養基組成份的添加對融合蛋白產率皆具有顯著性( $p < 0.05$ )。

根據中心混成設計得到的融合蛋白產率，乘以 RPLKPW 佔融合蛋白分子量比例，回推計算可得到 RPLKPW 降血壓胜肽的估計值(如表二十二)，對於中心混成設計實驗最高產率的第 9 號樣品而言，可得到  $0.72 \mu\text{g/mL}$ 。當 SAS 估計培養基比例 tryptone=1.20%、YE=0.79%，加上 NaCl=1.0%時，得到融合蛋白最大估計值為 2.4，換算後能獲得  $0.72 \mu\text{g/mL}$  的 RPLKPW 胜肽。

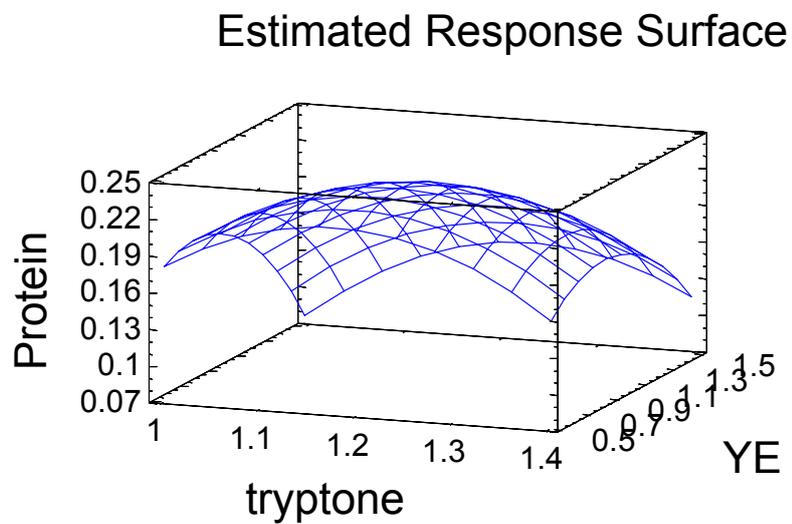
表十五、中心混成試驗之培養基組成與結果。(培養 24 小時)

Table 15 The medium ingredients and results of the central composite experimental design.

培養基比例(單位：%)		實驗結果					
NO.	Tryptone	YE	總蛋白質濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	pH	菌液濁度 ( $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ )*	融合蛋白濃度 Conc.( $\mu\text{g/mL}$ )	產率*
1	1.00	0.50	160.20	7.40	0.318	28.06	0.18
2	0.92	1.00	165.80	7.34	0.410	22.19	0.13
3	1.20	1.71	103.40	6.93	0.520	9.06	0.09
4	1.48	1.00	92.60	7.24	0.379	10.19	0.11
5	1.40	0.50	133.00	7.45	0.324	23.44	0.18
6	1.20	1.00	105.00	7.30	0.390	23.31	0.22
7	1.00	1.50	89.00	7.12	0.457	6.19	0.07
8	1.40	1.50	67.80	7.12	0.420	9.06	0.13
9	1.20	1.00	96.60	7.31	0.412	23.19	0.24
10	1.20	0.29	168.20	7.49	0.219	30.81	0.18
11	LB		194.20	7.43	0.270	17.31	0.09

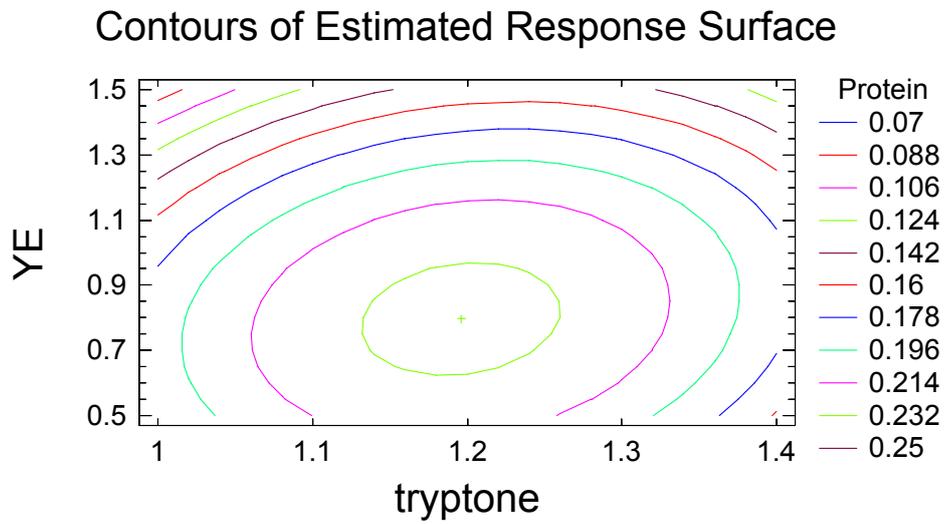
\*註 1：濁度為稀釋 5 倍體積測量。

\*註 2：產率=融合蛋白濃度/總蛋白濃度



圖十六、Tryptone、YE 的添加對於融合蛋白產率影響之反應曲面圖。

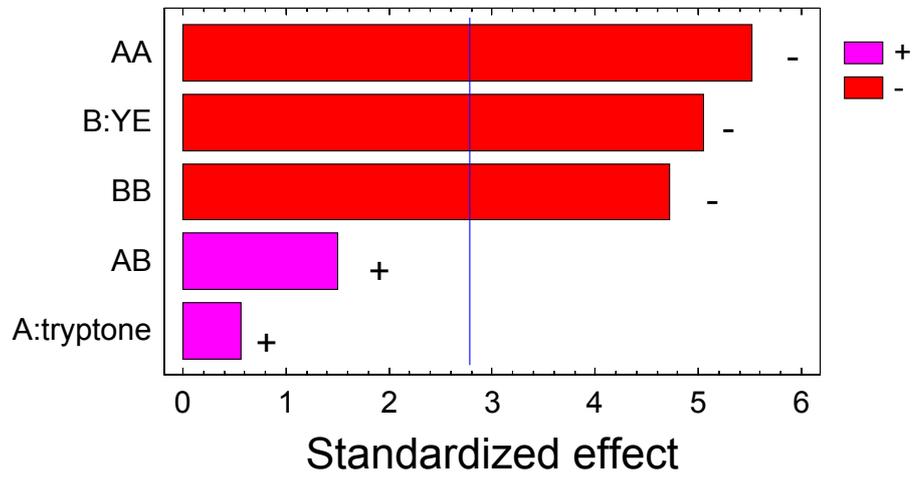
Fig. 16 Response surface of the proportion of fusion protein to total protein concentration at various concentrations of tryptone and YE.



圖十七、Tryptone、YE 的添加對於融合蛋白產率影響之等高線圖。

Fig. 17 Contours of the proportion of fusion protein to total protein concentration at various concentrations of tryptone and YE.

### Standardized Pareto Chart for Protein



圖十八、培養基組成份對中心混成試驗設計的分析。

Fig. 18 Analysis of different medium ingredients in the central composite experimental design.

表十六、SAS對組成份中心混成設計之回歸分析表。

Table 16 The analysis of regression of the central composite experimental design.

Parameter	Estimate	Estimate from coded data
Intercept	-1.613686	0.229919
tryptone	3.029643	0.005657
YE	0.099052	-0.050876
tryptone*tryptone	-1.316434	-0.103208
YE*tryptone	0.150000	0.029820
YE*YE	-0.175354	-0.088396

表十七、SAS對組成份中心混成試驗設計之變方分析表。

Table 17 The analysis of variance of the central composite experimental design.

Parameter	DF	Standard error	t value	Probability
Intercept	1	0.377789	-4.27	0.0129*
tryptone	1	0.590388	5.13	0.0068**
YE	1	0.144328	0.69	0.5302
tryptone*tryptone	1	0.241843	-5.44	0.0055**
YE*tryptone	1	0.101783	1.47	0.2146
YE*YE	1	0.037769	-4.64	0.0097**

$R^2=0.9408$

\* : Significant at 5% level

\*\* : Significant at 1% level

表十八、組成份中心混成設計方程式之變方分析表。

Table 18 Analysis of variance of central composite experimental design.

Regression	DF	Type I sum of Squares	R-Square	F Value	Probability
Linear	2	0.010441	0.3727	12.60	0.0188*
Quadratic	2	0.015012	0.5359	18.11	0.0099**
Crossproduct	1	0.000900	0.0321	2.17	0.2146
Total Model	5	0.026352	0.9408	12.72	0.0144*
Residual					
Lack of Fit	3	0.001458	0.000486	2.43	0.4332
Pure Error	1	0.000200	0.000200		
Total Error	4	0.001658	0.000414		

$R^2=0.9408$

\* : Significant at 5% level

\*\* : Significant at 1% level

表十九、SAS正則分析表。

Table 19 The canonical analyzed table calculated by SAS.

Eigenvalues	tryptone	YE
-0.079154	0.526847	0.849960
-0.112450	0.849960	-0.526847

表二十、回應曲面法預測融合蛋白產率之最適培養基組成。

Table 20 The optimum concentration of medium by response surface methodology.

Factor	Coded	Predicted value (%)*
tryptone	-0.014523	1.195933
YE	-0.290222	0.793942

\*註1：Predicted value at stationary point：%

表二十一、中心混成設計整體總合作用之變方分析。

Table 21 Analysis of variance of central composite design for studying the overall effects.

Factor	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Probability
tryptone	3	0.013308	0.004436	10.70	0.0221*
YE	3	0.020144	0.006715	16.20	0.0106*

\* : Significant at 5% level

表二十二、預測中心混成設計得到的RPLKPW胜肽產量。

Table 22 The predicted yield of RPLKPW peptide

NO.	總蛋白質濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	融合蛋白濃度 Conc.( $\mu\text{g/mL}$ )	產率*	RPLKPW 估計產量( $\mu\text{g/mL}$ )*
1	160.20	28.06	0.18	0.53
2	165.80	22.19	0.13	0.40
3	103.40	9.06	0.09	0.26
4	92.60	10.19	0.11	0.33
5	133.00	23.44	0.18	0.53
6	105.00	23.31	0.22	0.67
7	89.00	6.19	0.07	0.21
8	67.80	9.06	0.13	0.40
9	96.60	23.19	0.24	0.72
10	168.20	30.81	0.18	0.55
LB	194.20	17.31	0.09	0.27

\*註1：濁度為稀釋5倍體積測量。

\*註2：產率=融合蛋白濃度/總蛋白濃度。

\*註3：RPLKPW胜肽產量=RPLKPW分子量/融合蛋白分子量\*融合蛋白產量\*發酵體積。

## 伍、結 論

(一) 轉型菌 *E. coli* p274 在 $-80^{\circ}\text{C}$  甘油儲存下經過一年以上，取出作藍白篩選仍發現有淡藍色的菌落，表示有些可能喪失了轉型菌株的特性。於 LB 斜面培養基保存於 $4^{\circ}\text{C}$  下一個月以後，轉殖菌株的特性有些微減少，保存兩個月後，此特性失去的更加迅速，故長期保存轉殖菌株，仍以 $-80^{\circ}\text{C}$  甘油儲存較佳。

(二) 醣類對於轉殖菌株的生長、總蛋白分泌含量有明顯的增加，但對融合蛋白分泌的濃度卻不顯著，甚至抑制融合蛋白生成。

(三) 目前經由實驗得到融合蛋白最大產率為 0.24，培養基組成份為 tryptone=1.2%、YE=1.0%、NaCl=1.0%。在固定 NaCl 比例為 1.0% 下，將實驗結果輸入 STAGRAPHICS plus 軟體分析得到最適培養基比例為 tryptone= 1.20%、YE=0.80%，輸入 SAS 軟體分析亦能獲得類似的培養基組成比例，tryptone= 1.20%、YE=0.79%。

(四) 未來本研究可進行的方向

1. 試以發酵槽小規模生產，經過純化後，是否能夠產生最大量的融合蛋白。

2. 將經過藍白篩選的重組大腸桿菌淡藍色和白色菌落送定序，再次確認重組載體之 DNA 序列。
3. 將現有已收集 ZZ 融合蛋白利用 V8 protease 水解之後，注入高效能液相層析(High Performance Liquid Column, HPLC)管柱，與 RPLKPW 標準品比較，確認酵素水解融合蛋白能否產生 RPLKPW 降血壓胜肽，並將水解後產物送胺基酸定序。
4. 將 V8 protease 水解後產物進行體外 ACE 酵素抑制試驗(以 HHL 為受質)，測量 ACEI 活性；或是餵食先天性高血壓大鼠後，直接測量大鼠血壓，確認由轉型菌株生產的 RPLKPW 是否有效。
5. 試著將此 pEZZ18 質體轉殖進入可食用之菌株，例如乳酸菌，藉乳酸菌發酵大量生產降血壓胜肽，透過親和性管柱純化系統收集。

## 陸、參 考 文 獻

- [1] 余鍾蘭。2004。降高血壓胜肽基因選殖與表現。 私立東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。
- [2] 李昌憲，洪哲穎，熊光濱。1992。利用回應曲面法進行以 *Streptococcus faecalis* 生產酪胺酸脫羧酶之培養基最適化研究。中國農業化學會誌 30(2)：264–272.
- [3] 林錚威。2002。牛肉鮮味胜肽基因之選殖與表現。 私立東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。
- [4] 洪哲穎、陳國誠。1992。回應曲面實驗設計法在微生物酵素上之應用。 化工 39(2)：3–18.
- [5] 高馥君。1992。反應曲面在食品開發上的應用。 食品工業 24(3)：32–41.
- [6] 彭莉霽。2004。應用 DNA 重組技術合成 ACEI 胜肽。 私立東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。
- [7] 楊文傑。1997。以反應曲面法探討親水膠體、澱粉水解酵素和乳

化劑對麵包貯藏期間硬度變化的影響。 私立東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。

- [8] 楊詠翔。1999。食品中抗高血壓胜肽的發展現況。 食品工業 31(1) : 9–17.
- [9] 詹佳育。2002。利用紫外光誘發 *Leuconostoc mesenteroides* 突變以提高酒精發酵能力。 私立東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。
- [10] 劉玉茹。2004。乳酸菌之降血壓研究。 食品工業 36(3): 34–44.
- [11] 劉毓蕙。1999。乳蛋白中的活性胜肽。 食品工業 31(1): 18–28.
- [12] Antonios T. F. T., and MacGregor G. A. (1995) Angiotensin converting enzyme inhibitors in hypertension : potential problems. J. Hypertens. 13:S11–S16.
- [13] Brown N. J., and Vaughan D. E. (1998) Angiotensin-converting enzyme inhibitors. Circulation 97:1411–1420.
- [14] Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the

quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254

- [15] Chen, J. Y., Chang, C. Y., Chen, J. C., Shen, S. C., and Wu, J. L. (1997) Production of biologically active recombinant tilapia insulin-like growth factor-2 polypeptides in *Escherichia coli* cells and characterization of the genomic structure of the coding region. *DNA Cell Biol.* 16:883–892.
- [16] Cheung H. S., Wang F. L., Ondetti M. A., Sabo E. F. and Cushman D. W. (1980) Binding of peptide substrates and inhibitors of Angiotensin-converting enzyme: Importance of the carboxyl-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem.* 225:401–407.
- [17] Cushman D. W., and Cheung H. S. (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20:1637–1648
- [18] FitzGerald R. J., and Meisel H. (2000) Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. *Br. J. Nutr.* 84:S33–S37.
- [19] Fujita H., Sasaki R., and Yoshikawa M. (1995) Potentiation of the anti-hypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification

in egg phosphatidylcholine. Biosci. Biotech. Biochem.  
59:2344–2345.

- [20] Fujita H., Yokoyama K., and Yoshikawa M. (2000)  
Classification and anti-hypertensive activity of angiotensin  
I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food  
proteins. J. Food Sci. 65:564–569.
- [21] Fujita H., and Yoshikawa M. (1999) LKPNM : a prodrug-type  
ACE-inhibitory peptide derived from fish protein.  
Immunopharmacology 44:123–127.
- [22] Gill, I, Fandino, R.I., Jorba, X. and Vulfson, E. N. (1996)  
Biologically active peptides and enzymatic approaches to their  
production. Enzyme Microb. Technol. 18:162–183.
- [23] Goeddel D. V., Kleid D. G., Bolivar F., Heyneker H. L.,  
Yansura D. G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K.  
and Riggs A. D. (1979) Expression in *Escherichia coli* of  
chemically synthesized genes for human insulin. Proc. Natl.  
Acad. Sci. U.S.A. 76:106–110.
- [24] Hu S. Y., Wu J. L., and Huang J. H. (2004) Production of tilapia  
insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of  
recombinant *Escherichia coli*. J. Biotech. 107:161–171.

- [25] Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H.L., Bolivar F., and Boyer H.W. (1977) Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198:1056–1063.
- [26] Kinoshita E., Yamakoshi J., and Kikuchi M. (1993) Purification and identification of an Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sause. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:1107–1110.
- [27] Maruyama N., Katsube T., Wada Y., Oh M. H., Braba de la rosa A. P., Okuda E., Nakagawa S., and Utsumi S. (1998) The roles of the N-linked glycans and extension region of soybean-conglycinin in folding. *Eur J Biochem* 258:854–862.
- [28] Maruyama S., and Suzuki H. (1982) A peptide inhibitor of angiotensin I-converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* 46:1393–1394.
- [29] Maruyama S., Nakagomi K., Tomizuka N., and Suzuki H. (1985) Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and Bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 49:1405–1049.

- [30] Matoba N., Usui H., Fujita H., and Yoshikawa M. (1999) A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Letters* 452:181–184.
- [31] Matoba N., Doyama N., Yamada Y., Maruyama N., Utsumi S., and Yoshikawa M. (2001a) Design and production of genetically modified soybean protein with anti-hypertensive activity by incorporating potent analogue of ovokinin. *FEBS letter* 497:50–54.
- [32] Matoba N., Yamada Y., Usui H., Nakagiri R., and Yoshikawa M. (2001b) Designing potent derivatives of Ovokinin(2-7), an anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:736–739.
- [33] Matoba N., Yamada Y., and Yoshikawa M. (2003) Design of genetically modified soybean protein preventing hypertension based on an anti-hypertensive peptide derived from ovoalbumin. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 1:197–202.
- [34] Matsui T., Matsufuji H., Seki E., Osajima K., Nakashima M., and Osajima Y. (1993) Inhibition of Angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech.*

Biochem. 57:922–925.

- [35] Matsui T., Yokota H., Sato S., Mukataka S. and Takahashi J. (1989) Pressurized culture of *Escherichia coli* for a high concentration. *Agric. Biol. Chem.* 53:2115–2120.
- [36] Matsumura N., Fujii M., Takeda Y., and Shimizu T. (1993) Isolation and characterization of Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:1743–1744.
- [37] Miyoshi S., Kaneto T., Yoshizawa Y., Fukui F., Tanaka H., and Maruyama S. (1991) Hypertensive activity of enzymatic  $\alpha$ -Zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* 55:1407–1408.
- [38] Moks T., Abrahmsen L., Holmgren E., Bilich M., Olsson A., Uhlen M., Pohl G., Sterky C., Hultberg H., and Josephson S. (1987a) Expression of human insulin-like growth factor I in bacteria: use of optimized gene fusion vectors to facilitate protein purification. *Biochem.* 26:5239–5244.
- [39] Moks T., Abrahmsen L., Osterlof B., Josephson S., Osytling M., Enfors S., Persson I., Nilsson B. and Uhlen M. (1987b) Large-scale affinity purification of human insulin-like growth factor I from medium of *Escherichia coli*. *Bio/technology* 5:379–382.

- [40] Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S., and Takano T. (1995) Purification and characterization of Angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. J. Dairy Sci. 78:777–783.
- [41] Nakamura Y., Masuda O., and Takano T. (1996) Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. Biosci. Biotech. Biochem. 60:488–489.
- [42] Nilsson B, Moks T., Jansson B., Abrahmsen L., Elmblad A, Holmgren E., Henrichson C., Jones TA and Uhlen M. (1987) A synthetic IgG-binding domain based staphylococcal protein A. Protein Eng. 1:107–113.
- [43] Okamoto A., Hanagata H., Matsumoto E., Kawamura Y., Koizumi Y., and Yanagida F. (1995) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of various fermented food. Biosci. Biotech. Biochem. 59:1147–1149.
- [44] Ondetti M. A., Williams N. J., Sabo E. F., Pluscec J., Weaver E. R., and Kocy O. (1971) Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca* isolation, elucidation of structure, and synthesis. Biochem. 19:4033–4039.

- [45] Onishi K., Matoba N., Yamada Y., Doyama N., Maruyama N., Utsumi S., and Yoshikawa M. (2004) Optimal designing of  $\beta$ -conglycinin to genetically incorporate RPLKPW, a potent anti-hypertensive peptide. *Peptides* 25:37–43.
- [46] Oshima G., Shimabukuro H., and Nagasawa K. (1979) Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 566:128–137.
- [47] Perry, D. H. (1989) *Experimental Design in Biotechnology.* pp. 23–90. Edited by MARCEL DEKKER, INC. New York, U.S.A.
- [48] Plackett R. L. and Burman J. P. (1945) The design of optimum multi-factorial experiments. *Biometrika* 33:305–325.
- [49] Raia, Jr. J. J., Barone J. A., Byerly W. G., and Lacy C. R. (1990) Angiotensin-converting enzyme inhibitors : a comparative review. *DICP. Ann. Pharmacother.* 24:506–525.
- [50] Saito Y., Wanezaki K., Kawato A., and Imayasu S. (1994) Structure and activity of Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Biosci. Biotech.*

Biochem. 58:1767–1771.

- [51] Yamada Y., Matoba N., Usui H., Onishi K., and Yoshikawa M.  
(2002) Design of a highly potent anti-hypertensive peptide  
based on ovokinin (2-7). Biosci. Biotechnol. Biochem.  
66:1213–1217.

## 柒、附 錄

### ※ SAS分析結果

#### 1. SAS program設計

```
data yield;
input tryptone YE yield;
cards;
1.00 0.50 0.18
0.92 1.00 0.13
1.20 1.71 0.09
1.48 1.00 0.11
1.40 0.50 0.18
1.20 1.00 0.22
1.00 1.50 0.07
1.40 1.50 0.13
1.20 1.00 0.24
1.20 0.29 0.18
;
proc print data=yield;
run;
proc sort; by yield tryptone YE;
run;
proc rsreg;
model yield=tryptone YE/lackfit;
run;
```

#### 2. SAS program結果

The SAS System

08:59 Thursday, July 13, 2006 1

Obs	tryptone	YE	yield
1	1.00	0.50	0.18
2	0.92	1.00	0.13
3	1.20	1.71	0.09

4	1.48	1.00	0.11
5	1.40	0.50	0.18
6	1.20	1.00	0.22
7	1.00	1.50	0.07
8	1.40	1.50	0.13
9	1.20	1.00	0.24
10	1.20	0.29	0.18

The SAS System 08:59 Thursday, July 13, 2006 2

The RSREG Procedure

Coding Coefficients for the Independent Variables

Factor	Subtracted off	Divided by
tryptone	1.200000	0.280000
YE	1.000000	0.710000

Response Surface for Variable yield

Response Mean	0.153000
Root MSE	0.020357
R-Square	0.9408
Coefficient of Variation	13.3050

		Type I Sum			
	DF	of Squares	R-Square	F Value	Pr > F
Regression					
Linear	2	0.010441	0.3727	12.60	0.0188
Quadratic	2	0.015012	0.5359	18.11	0.0099
Crossproduct	1	0.000900	0.0321	2.17	0.2146
Total Model	5	0.026352	0.9408	12.72	0.0144

		Sum of			
	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Residual					
Lack of Fit	3	0.001458	0.000486	2.43	0.4332
Pure Error	1	0.000200	0.000200		
Total Error	4	0.001658	0.000414		

Parameter

Parameter	DF	Estimate	Standard		t Value	Pr >  t	Estimate
			Error				from Coded
							Data
Intercept	1	-1.613686	0.377789		-4.27	0.0129	0.229919
tryptone	1	3.029643	0.590388		5.13	0.0068	0.005657
YE	1	0.099052	0.144328		0.69	0.5302	-0.050876
tryptone*tryptone	1	-1.316434	0.241843		-5.44	0.0055	-0.103208
YE*tryptone	1	0.150000	0.101783		1.47	0.2146	0.029820
YE*YE	1	-0.175354	0.037769		-4.64	0.0097	-0.088396

The SAS System 08:59 Thursday, July 13, 2006 3

The RSREG Procedure

Factor	DF	Sum of		F Value	Pr > F
		Squares	Mean Square		
tryptone	3	0.013308	0.004436	10.70	0.0221
YE	3	0.020144	0.006715	16.20	0.0106

The SAS System 08:59 Thursday, July 13, 2006 4

The RSREG Procedure

Canonical Analysis of Response Surface Based on Coded Data

Factor	Critical Value	
	Coded	Uncoded
tryptone	-0.014523	1.195933
YE	-0.290222	0.793942

Predicted value at stationary point: 0.237261

Eigenvalues	Eigenvectors	
	tryptone	YE
-0.079154	0.526847	0.849960
-0.112450	0.849960	-0.526847

Stationary point is a maximum.