

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.

牛肉鮮味胜肽基因之選殖與表現
Cloning and Expressing of Beefy Meaty Peptide Gene

研究生：林錚威 撰
Graduate Student : Cheng-Wei Lin

中華民國九十一年六月
June, 2002



東海大學
Tunghai University

目 錄

中文摘要	I
英文摘要	II
前 言	1
文獻回顧	2
一、食品增味劑	2
二、牛肉鮮味胜肽	2
三、牛肉鮮味胜肽的感官特性	5
(一) 牛肉鮮味胜肽及其 N-端、C-端衍生物	
(二) 牛肉鮮味胜肽 V.S 味精	
(三) 加乘作用	
四、牛肉鮮味胜肽的鮮味感官	10
五、牛肉鮮味胜肽的熱安定性	12
六、牛肉鮮味胜肽與脂肪氧化	12
七、利用基因重組技術生產牛肉鮮味胜肽	13
材料與方法	14
一、宿主細胞的培養	14
1.1 菌種	
1.2 培養基	
1.2.1 LB broth 培養基	
1.2.2 LB plate 培養基	
1.2.3 選擇性 LB plate 培養基	
1.3 宿主細胞的培養	
二、表現載體之製備	15
2.1 表現載體	
2.1.1 轉型作用	



2.1.2 小量質體 DNA 的抽取	
2.1.3 電泳分析	
2.2 限制酶截切反應	
2.3 基因片段的回收	
三、製備牛肉鮮味胜肽核苷酸序列.....	19
3.1 牛肉鮮味胜肽核苷酸序列之合成	
3.2 黏合牛肉鮮味胜肽核苷酸序列	
3.3 接合牛肉鮮味胜肽核苷酸序列	
3.4 限制酶截切反應	
四、牛肉鮮味胜肽基因載體之構築.....	20
4.1 接合反應	
4.2 轉型作用	
4.3 定序反應	
五、重組牛肉鮮味胜肽之表現與純化.....	22
5.1 IPTG 誘導蛋白質的表現與分析	
5.1.1 蛋白質濃度測定	
5.1.2 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳分析	
5.2 純化重組牛肉鮮味胜肽	
5.2.1 親和性管柱層析法	
5.2.2 以 CNBr 切割融合蛋白	
5.2.3 高壓液相層析法分離	
六、重組牛肉鮮味胜肽之鑑定.....	29
6.1 N-端胺基酸序列分析	
6.2 胺基酸組成份分析	
結果與討論.....	31
一、宿主細胞的培養.....	31



二、表現載體之確認.....	31
三、製備牛肉鮮味胜肽核苷酸序列.....	39
四、牛肉鮮味胜肽基因載體之構築.....	42
五、重組牛肉鮮味胜肽之表現與純化.....	46
結論.....	55
參考文獻.....	56
附錄.....	61



圖 次

圖一、牛肉鮮味胜肽化學結構	3
圖二、味覺感受器的感官模型	9
圖三、質體 pEZZ18 的基因圖譜	34
圖四、轉型株之菌落生長圖--培養於含 ampicillin 之 LB plate	35
圖五、轉型株之菌落生長圖--培養於含 Amp/X-gal/IPTG 之 LB plate	36
圖六、洋菜膠電泳分析轉型於 <i>E.coli</i> JM105 之 pEZZ18 質體	38
圖七、洋菜膠電泳分析 BMP1 及 BMP2 經黏合和接合後的產物	40
圖八、製備牛肉鮮味胜肽核苷酸序列之流程圖	41
圖九、構築牛肉鮮味胜肽基因載體製備流程	43
圖十、轉型株之藍白篩選試驗	44
圖十一、從基因庫中確認轉型株中分離的質體	45
圖十二、牛肉鮮味胜肽在重組質體 pEZZ18 內的位置	47
圖十三、轉型株之生長曲線與蛋白質濃度的關係	48
圖十四、SDS-PAGE 檢定不同處理條件下之樣品內蛋白質	49
圖十五、牛肉鮮味胜肽之高效能液相層析圖	51
圖十六、鑑定牛肉鮮味胜肽之高效能液相層析圖	52
圖十七、樣品之胺基酸組成份分析	53
圖十八、樣品之胺基酸序列	54



表 次

表一、牛肉鮮味胜肽及其相關胜肽的感官品評結果.....	4
表二、牛肉鮮味胜肽及其片段的感官品評結果.....	5
表三、牛肉鮮味胜肽及其 N-端、中間部份、C-端片段混合物的感官 品評結果.....	6
表四、 <i>Escherichia coli</i> JM105 表現型的特性.....	32



摘 要

本研究是利用 DNA 重組技術構築一原核表現系統來生產具有類似味精風味的牛肉鮮味短鏈胜肽。實驗中依據牛肉鮮味胜肽的八個胺基酸殘基序列，設計兩段互補的牛肉鮮味胜肽核苷酸序列 (BMP1 & BMP2)，利用基因重組的技術將此核苷酸序列和表現載體 pEZZ18 接合在一起，形成能生產牛肉鮮味胜肽的基因載體 (pEZZ18-BMP)，再將此基因載體轉型入宿主細胞 *E.coli* JM105 中，以培育出能合成牛肉鮮味胜肽的菌株。篩選出的菌株經液體培養後，利用親和性層析管柱回收具有牛肉鮮味胜肽的融合蛋白，進一步將此融合蛋白以 CNBr 切割後，利用 HPLC 分離、純化融合蛋白中的牛肉鮮味胜肽，並輔以胺基酸分析儀及胺基酸定序儀鑑定分離出的牛肉鮮味胜肽其正確性。結果顯示，本實驗所構築之原核表現系統所生產之牛肉鮮味胜肽，其胺基酸組成份與胺基酸序列皆與原始的牛肉鮮味胜肽相同。



Abstract

In this study, DNA recombinant technique was performed to construct a prokaryotic expression vector. The recombinant vector confers the transformed host cell the ability to produce beef meaty peptide. In this experiment, two complementary polynucleotides encoding beef meaty peptide were synthesized. The double strand polynucleotides with *Sal* I sticky end were inserted in pEZZ18, and then the recombinant plasmid (pEZZ18-BMP) were transformed to *E.coli* JM105. Some transformed *E.coli* colonies with the ability to produced umami peptide were isolated. The transformed *E.coli* were cultivated in LB broth, and the culture contained some umami peptide. The umami peptide linked with ZZ protein was isolated with an affinity chromatography. The isolated fusion protein was treated with CNBr to release the umami peptide. The umami peptide was purified with an HPLC system. The amino acid composition of the peptide was determined as those extracted from beef. The amino acid sequence was identified as that originally determined by *Yamasaki* and *Maekawa*.



前 言

東方人的飲食生活中，食品增味劑扮演著重要的角色，其中以味精的歷史最久遠，且用途最廣。但不幸的，味精所引起的“中國餐館症候群”現象及加熱過度會產生致癌物質的陰影，一直在人們腦海中揮之不去。有鑑於此，食品科學家們紛紛尋求取代味精的物質，其中以木瓜酵素處理牛肉後，在其萃取液中分離出含有八個胺基酸殘基的牛肉鮮味胜肽，被認為最具發展潛力。

牛肉鮮味胜肽 (Beefy Meaty Peptide, BMP)，其分子量 848 Da，為一段含有八個胺基酸 (Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala) 的短鏈胜肽。其受注目的原因是擁有類似味精所能賦予消費者的鮮味感受，但鹹味感受卻不像味精與添加量成正比，此外，在相同濃度下能比味精給予消費者更強的鮮味感受，加熱處理不易被破壞或產生衍生物等特點，更適合應用於加工食品上。而近年來短鏈胜肽更被許多學者證實具有重要的生理活性，例如：抗菌作用、機能保健、營養強化及味覺修飾...等功能，而牛肉鮮味胜肽除了具有鮮味的特點外，也被學者證實可抵抗自由基和脂肪氧化對它的影響，無形中更增加了其價值。

自然界中每 100 g 牛肉經酵素水解後約可分離出 40 mg 的牛肉鮮味胜肽，而化學合成法或酵素法合成牛肉鮮味胜肽雖可得到較多量，但其步驟極為繁瑣，不易操作。近年來隨著分子生物學的進步，使得我們可應用生物技術的方法製造牛肉鮮味胜肽，本研究主要根據 Yamasaki *et al.* 所分離出的牛肉鮮味胜肽，設計互補的核苷酸序列，利用基因重組技術構築含有牛肉鮮味胜肽的基因載體-- pEZZ18-BMP，再轉型入宿主細胞 *E.coli* JM105 中，以培育能合成牛肉鮮味胜肽的菌株。



文獻回顧

一、食品增味劑：⁽⁴⁾

人們對於食品風味的感受是來自於味覺及嗅覺兩方面的刺激後而得的結果。學者們將味覺分為：酸、甜、苦、鹹四種基本味。但後來人們發覺四種基本味，並不能將所有味道的感覺解釋完全，即如一些物質，其本身並不具有什麼味道，但它卻能提升食品系統的風味、口感及圓滑性，此類物質即被稱之為增味劑，而這第五種味則被稱之為“umami”鮮味，這是由日語轉換過來的，意即美味、滋味、可口。

目前最被人們所熟知，且已商業化大量發酵生產的食品增味劑為麩胺酸鈉（Monosodium Glutamate, MSG），一般俗稱味精、5' IMP（disodium 5' inosinate）、5' GMP（disodium 5' guanylate）。但上述三者在複雜的食品環境（例如：高酸性、金屬離子）及嚴苛的處理（高溫、高壓）條件下，對其安定性造成莫大的影響，再加上味精被人們所擔憂的安全性問題，消費者崇尚自然的趨勢越來越強，迫使不少食品業者紛紛尋求取代的方法。目前學者提出的可取代物有：酵母抽出物、動物或植物蛋白酵素水解物、胜肽.....等。

二、牛肉鮮味胜肽

胜肽其組成的基本單位--胺基酸是吾人所熟知維持人體生命活動的重要物質，它不但具有各種生理功能，在食品的呈味方面亦扮演著十分重要的角色⁽²⁾。例如：甘胺酸由於具有作為甜味料和營養源的雙重功能，已廣泛應用於調味料中。另外，許多合成或酵素水解得到的胜肽，也在食品的呈味方面越來越受到人們的重視。其中以兩個胺基酸為單位組成的二胜肽和酵

素水解蛋白質產生的多胜肽，最為人們所熟知，如：通過 FDA 認可，且已大量商業化生產的甜味胜肽--阿斯巴甜，魚蛋白水解物 Glu-Glu、Glu-Ser、Thr-Glu 等具有香味提升作用的鮮味胜肽，可用在糖尿病人、高血壓病人等特殊人群或其他要求低鈉食品人群的鹹味二胜肽，在啤酒、咖啡以及乾酪等食品上扮演重要呈味特性的苦味胜肽。

鮮味胜肽的發現最早發表於二十多年前，由 Fujimaki *et al.*⁽¹⁰⁾ 與 Noguchi *et al.*⁽²²⁾ 從魚肉蛋白質的水解液中區分出具有鮮味的部份，並認為其鮮味的主要來源為二到三個胺基酸組成的胜肽片段。然而，真正受到注意的是 1978 年 Yamasaki & Maekawa 所分離出一條八個胺基酸殘基的美味胜肽⁽³⁴⁾

1978 年 Yamasaki & Maekawa 兩位日本學者將牛肉以木瓜酵素處理後，再以熱水萃取，所得的萃取物經 Sephadex G-25 膠體過濾及 Dowex-50 陽離子交換管柱後得到一經官能品評試驗證實具有美好風味但濾紙層析時有 2~3 點能與 ninhydrin 呈色的主要物質。

作者進一步利用濾紙電泳層析將上述物質加以分離，回收只能和 ninhydrin 呈色的部份，並改變操作條件將此回收物質再跑一次濾紙電泳層析證實其內只有單一胜肽，且能和 ninhydrin 呈色。經利用 Edman degradation 鑑定其 N-端序列，Carboxypeptidase A 鑑定其 C-端序列後，作者認為此美味風味物質的序列為 Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala，並將之命名為美味胜肽 (delicious peptide)。

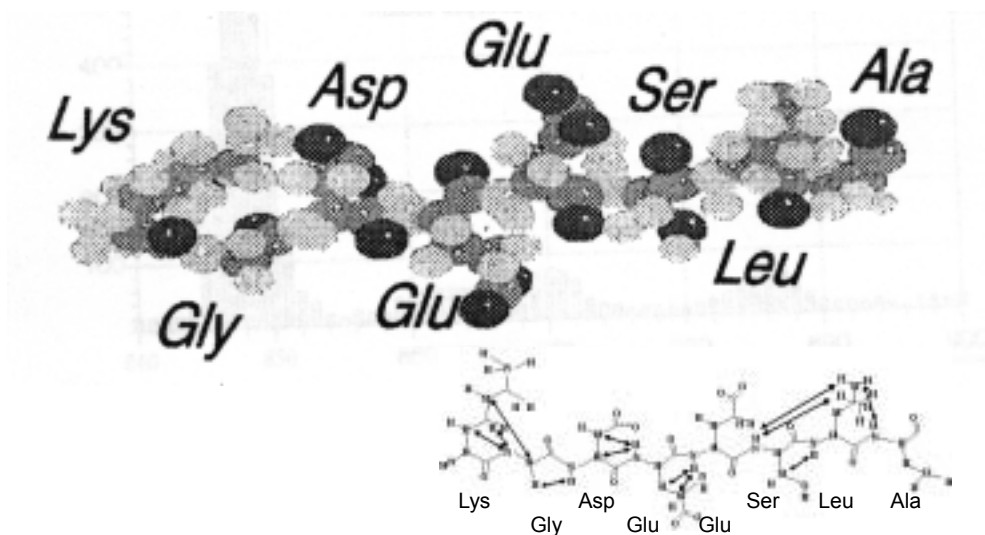
隨後在 1980 年發現美味胜肽的兩位學者⁽³⁵⁾ 為了證實他們對美味胜肽序列的推論，利用化學法合成了美味胜肽，並發現合成的與萃取的美味胜肽在其質譜分析、濾紙電泳圖譜與 TLC



板上 Rf 值的結果幾乎是完全一致的，而合成的美味胜肽經官能品評的結果，也的確顯示出美好的風味。

1992 年 Spanier *et al.*⁽²⁴⁾，認為美味胜肽所獨具的風味來自於牛肉水解物，於是將其改名為 BMP (It is found in beef (B), and it enhances the meaty (M) flavor of the beef, and is a peptide (P).)，並在 1995⁽²⁶⁾ 年改名為 STEP (Savory Taste-Enhancing Peptide)，但目前為止學者們仍習慣以 BMP (牛肉鮮味胜肽) 稱呼之。

牛肉鮮味胜肽其分子量經質譜分析的結果為 848 Da，而根據 Cutts *et al.*⁽⁸⁾ 於 1996 年利用 NMR 分析牛肉鮮味胜肽分子的空間立體結構所做的二級結構電腦模擬，如圖一所示。



圖一、牛肉鮮味胜肽化學結構

Fig. 1. The Chemical Structure of BMP

三、牛肉鮮味胜肽的感官特性

(一) 牛肉鮮味胜肽及其 N-端、C-端衍生物

表一是 1980 年 Yamasaki & Maekawa 兩位學者⁽³⁵⁾ 利用化學法合成的牛肉鮮味胜肽經官能品評的結果，表中除了顯示出牛肉鮮味胜肽確實有美好風味外，也同時說明了其不同片段所呈現的風味。N-端的二至三個胺基酸片段（Lys-Gly 及 Lys-Gly-Asp）是不呈現風味的，或是僅帶有微弱的澀味；而 C 端三個胺基酸片段（Ser-Leu-Ala）則是呈現苦味；中間的三個酸性胺基酸則提供了酸味，且酸味隨著酸性胺基酸數目的增加而逐漸增強，並同時降低了 C 端三個胺基酸片段的澀味與苦味，提高了鮮味的感官，但是其鮮味強度並不高。而只有當 N 端不具風味的胺基酸片段也接上去時，整條八個胺基酸殘基的胜肽片段才真正呈現出強烈的鮮味。

表一、牛肉鮮味胜肽及其相關胜肽的感官品評結果

Table 1. Evaluation of taste of some peptides related to the BMP

Peptides (50 mg/mL)	甜味	酸味	苦味	鮮味	澀味
Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala	10	30	0	60	0
Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala	5	60	2	10	15
Glu-Glu-Ser-Leu-Ala	0	55	5	10	18
Glu-Ser-Leu-Ala	0	44	3	5	32
Ser-Leu-Ala	0	5	55	0	10
Lys-Gly-----Ser-Leu-Ala	0	0	50	0	13
Lys-Gly-Asp	0	0	0	0	0
Lys-Gly	0	0	0	0	5



1989 年 Tamura *et al.*⁽³⁰⁾ 為了進一步了解牛肉鮮味胜肽其一級結構和味覺的關係，於是合成了鮮味胜肽及其 N-端和 C-端的胜肽衍生物，利用經訓練的品評員進行官能品評。表二說明，牛肉鮮味胜肽除了與先前學者⁽³⁵⁾ 提出具有鮮味的的觀點一致外，在其 N-端和 C-端序列所得的品評結果並非完全相同；N-端 Lys-Gly-HCl、Lys-Gly-Asp 分別帶有鹹味和甜味；中間的三胜肽 Asp-Glu-Glu 帶有酸味；C-端片段 Ser-Leu-Ala 則產生苦味。此外作者也提出了牛肉鮮味胜肽閾值濃度為 1.41mM 較味精的 1.56mM 來的強，且當其胺基酸組成份改變時其味覺感受也會跟著改變。表三是作者綜合先前學者發表的文章⁽³⁵⁾ 和自己的實驗結果，推論牛肉鮮味胜肽其鮮味可能是由 N-端 Lys-Gly 和中間的胺基酸片段 Asp-Glu-Glu 兩者同時存在時即可令人感受到鮮味。由表中可知當作者以產生鹹味的二胜肽 Orn-β-Ala 取代 Lys-Gly 或者以 Glu-Glu 取代產生酸味 Asp-Glu-Glu 時，其閾值強度以 Glu-Glu 取代 Asp-Glu-Glu 最強，這說明了牛肉鮮味胜肽其鮮味感受可能受中間酸性胺基酸的影響很大。

表二、牛肉鮮味胜肽及其片段的感官品評結果

Table 2. Tastes of delicious peptide and fragments

Compound	Taste	Threshold value (mM)
Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala	<i>Umami/sour</i>	1.41
Lys-Gly-HCl	<i>Salty/Umami</i>	1.22
Lys-Gly-Asp	<i>Sweet</i>	1.30
Asp-Glu-Glu	<i>Sour</i>	---
Ser-Leu-Ala	<i>Bitter</i>	2.40



表三、牛肉鮮味胜肽及其 N-端、中間部份、C-端片段混合物的感官品評結果

Table 3. Sensory test of the BMP and mixture of its N-terminal, middle part and C-terminal fragments of delicious peptide

Combination	Taste	Threshold value (mM)
Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala	Umami/Sour	1.41
Lys-Gly + Asp-Glu-Glu + Ser-Leu-Ala	Umami/Sour	1.41
Orn-β-Ala + Asp-Glu-Glu + Ser-Leu-Ala	Umami/Sour	1.41
Lys-Glu + Glu-Glu + Ser-Leu-Ala	Umami/Sour	0.94

(二) 牛肉鮮味胜肽 V.S 味精

1995 和 1996 年 Spanier *et al.*^(26, 28) 利用胺基酸合成儀，大量合成了牛肉鮮味胜肽，並比較與味精於水溶液和牛肉湯汁中的呈味感官差異。結果顯示兩者在水溶液中的閾值與 Tamura *et al.*⁽³⁰⁾ 的實驗結果相同，分別為 1.41 與 1.56mM，換算成重量百分比則為 0.026% 與 0.16%。而牛肉鮮味胜肽的風味感受類似味精卻不會像味精一樣賦予鹹味且在口中呈現一種奶油的滑潤感。

作者進一步以五倍閾值的水溶液進行品評試驗，結果為牛肉鮮味胜肽有較味精更強的風味感受與口感。而在牛肉湯汁中分別添加味精和牛肉鮮味胜肽的實驗結果顯示，兩者對於提高牛肉風味強度的能力相仿，但味精的添加量減低時，其風味提升能力也跟著降低，且在原始閾值 25% 的添加量時，味精幾乎已不具風味提升的能力，但是牛肉鮮味胜肽的添加量即使低到原始閾值的 12.5%，仍然可以維持很好的風味提升能力。在鹹味強度方面，牛肉湯汁中添加牛肉鮮味胜肽，樣品的鹹味強度幾乎是沒有任何變化，這與只添加原始閾值 25% 的味精就有鹹味提升的效果是有顯著差別的。

Wang *et al.*⁽³²⁾ 於 1996 年比較了牛肉鮮味胜肽在不同 pH (3.5、6.5、9.5) 值環境下的感官性質，實驗是利用七位訓練有素的品評員進行品評試驗，結果顯示，在不同 pH 值下，牛肉鮮味胜肽可讓品評員感受的閾值濃度相近，但品評員感覺的風味特性則截然不同。在 pH 3.5 下有六位品評員認為牛肉鮮味胜肽是呈現酸的感官特性，且無任何其他的感官特性被感覺出；但在 pH 6.5 下，所有品評員均感覺出鮮味的特性，少數人尚可感覺出苦味、酸味、鹹味和甜味的特性；而在 pH 9.5 下品評員只感覺出牛肉鮮味胜肽具有鮮味、鹹味和甜味的特性。這樣的感官特性與 Kato *et al.*⁽¹⁴⁾ 對味精於中性環境下呈現鮮味，酸性環境下則為酸味的實驗結果相仿，也與 Tamura *et al.*⁽³⁰⁾ 的實驗結果相同。而此次實驗中作者所測得的閾值濃度為 0.533mM 與先前學者所發表有關於牛肉鮮味胜肽於水溶液中的閾值濃度有所出入，作者推論可能是其純度 (>90%) 造成此種現象。

(三) 加乘作用

目前市面上的食品增味劑，如：MSG、IMP、GMP 和 NaCl 彼此間均具有加乘作用^(19、36)，而牛肉鮮味胜肽與上述物質是否具有加乘作用，相關的文章國內外學者均有發表。

1996 年 Wang *et al.*⁽³²⁾ 添加 NaCl 和 MSG 於牛肉鮮味胜肽水溶液中試驗彼此間是否具有加乘作用。結果顯示，於牛肉鮮味胜肽中分別添加 NaCl 和 MSG 可降低其閾值濃度約 3.5 倍，而同時添加 NaCl 和 MSG 可降低其閾值濃度高達 9 倍之多。經品評後的感官特性，牛肉鮮味胜肽、牛肉鮮味胜肽+NaCl、牛肉鮮味胜肽+MSG、牛肉鮮味胜肽+NaCl+MSG 全部均具有鮮味的描述，而牛肉鮮味胜肽+MSG 和牛肉鮮味胜肽+NaCl

+MSG 則額外具有牛肉風味和鹹味的描述。

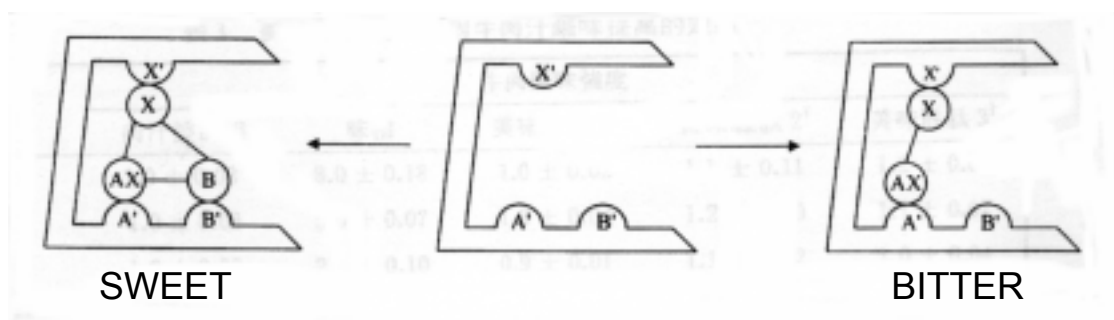
1997 年 Delphine Cazes *et al.*⁽¹²⁾ 添加 NaCl 和 MSG 於含有牛肉鮮味胜肽的牛肉湯汁中試驗彼此間的交互作用。結果顯示，在含有 0.5mM 牛肉鮮味胜肽的牛肉湯汁中，添加 8.6 g/L NaCl 的試驗組中其呈味效力影響顯著 ($p < 0.05$)，但其品評的結果並無任何有關於鮮味或肉味的描述，在添加 1.2 g/L NaCl 的試驗組中，雖然其呈味效力影響不顯著 ($p > 0.05$)，但品評結果為具有鹹味或肉味的描述。添加 MSG 的實驗中，以含有 0.45mM 牛肉鮮味胜肽的牛肉湯汁中，添加 0.15 g/L MSG 的試驗組中其呈味效力影響顯著 ($p < 0.05$)，品評結果為具有鹹味、肉味和些許酸味。作者選擇上述添加物 NaCl (1.2 g/L)、MSG (0.15 g/L) 共同加入含有不同濃度牛肉鮮味胜肽的牛肉湯汁中，發現其呈味效力影響皆不顯著 ($p > 0.05$)，作者推論可能是混合的 NaCl 和 MSG 會蓋過牛肉鮮味胜肽的呈味特性。

劉 等人於 1997 年⁽⁶⁾ 比較牛肉鮮味胜肽、味精、1:1 肉核苷單磷酸與鳥核苷單磷酸混合物 (IG) 等鮮味物質交互作用之呈味效力，並探討添加食鹽及加熱處理對該效力之影響。結果顯示，在未加熱及加熱處理的情況下，牛肉鮮味胜肽混合味精或 IG 之閾值沒有造成顯著的影響 ($p > 0.05$)，即使在牛肉鮮味胜肽、味精及 IG 之共同組合中亦然，並未呈現相乘或相抑制之作用。添加食鹽則略有呈現相乘作用之趨勢，各實驗組之閾值受添加食鹽而呈下降之現象。雖然先前學者指出添加食鹽於牛肉鮮味胜肽與味精之組合可產生以鮮味為主的風味⁽³²⁾，此實驗結果雖無顯著之味覺相乘效應，但亦無異味產生。



四、牛肉鮮味胜肽的鮮味感官⁽³⁾

人類對於食品的香味感官是一種非常複雜的反應，除了基本的酸、甜、苦、鹹等味覺外，還同時有經由鼻腔所感受的各種氣味，以及食物對口腔的直接刺激⁽¹⁸⁾。有許多報告提出人類對於甜味和苦味的感官機制是屬於一種食品物質與味蕾感受器交互作用的概念。甜味物質分子必須具有陽電性分子團（以 AH 表示）、陰電性分子團（以 B 表示）與疏水性分子團（以 X 表示）分別接到相對應的感受器位置才能令人感受到甜味；而苦味物質分子則須有一接合單位（binding unit）與一刺激單位（stimulating unit）與相對應的感受器位置進行交互作用，且兩個位置的距離為 4.1 \AA 。1993 年 Nakamura *et al.*⁽²³⁾ 將甜味和苦味的感官用同一個感受器來解釋，作者們認為過去對於苦味物質分子上所認定的接合單位與刺激單位也可以用類似的 AX-X 模型來解釋。其中 AX 表示苦味物質分子中帶陽電性或疏水性的分子團；X 表示疏水性的分子團。作者在文章中利用許多具有甜味或苦味的物質來說明他們的看法，而此時甜味的感官就改變以 AX-X-B 模型來表示，如圖二。



圖二、味覺感受器的感官模型

Fig. 2. Model of taste receptor

1993 年 Spanier *et al.*⁽²⁵⁾ 借用 Nakamura *et al.* 的模型來說明牛肉鮮味胜肽的鮮味感官。作者們認為大部份含有麩胺酸的胜肽都帶有鮮味，但是 Asp-Glu-Glu 胜肽則是呈現甜味，因此推論鮮味與甜味的感官一定具有某種關聯。作者們更進一步指出，牛肉鮮味胜肽的第 1,2,4,7 個胺基酸殘基與具有甜味的胜肽--monellin 的第 4,5,7,10 個胺基酸殘基是完全一致的，這也說明了這兩個胜肽可能共用或是競爭同一個感受器。因此由牛肉鮮味胜肽的胺基酸殘基性質來看，前兩個 N-端胺基酸 Lys-Gly 可以視為帶陽電性或為疏水性的分子團 (AX)；中間的三個酸性胺基酸 Asp-Glu-Glu 為帶陰電性的分子團 (B)；而 C-端的三個胺基酸 Ser-Leu-Ala 為疏水性的分子團 (X)。而由先前發表的報告來看^(30、35)，C-端的三個胺基酸與鮮味的感官根本沒有關係；當有酸性胺基酸存在時即可令人感受到鮮味；而前兩個胺基酸與酸性胺基酸同時存在時，則鮮味的感受會更強。因此作者認為牛肉鮮味胜肽的鮮味來源應該是由 B 分子團接到相對應的感受器，或是由 AX 與 B 分子團同時接到相對應的感受器；光只有 AX 的接合並不能產生鮮味；而 AX-X 的接合自然是產生苦味。

Cutts *et al.*⁽⁸⁾ 於 1996 年利用 NMR 分析牛肉鮮味胜肽分子的空間立體結構，並利用冷卻分子動力學 (quenched molecular dynamics) 模型模擬牛肉鮮味胜肽分子片段在空間的排列，發現牛肉鮮味胜肽的鹼性片段 (Lys-Glu) 與酸性片段 (Asp-Glu-Glu) 間有特殊的交互作用，而這交互作用正是牛肉鮮味胜肽具有鮮味的主要原因。這樣的發現也證明了 Spanier *et al.* 的 AX-B 感受器的概念。此外 Tamura *et al.*⁽³⁰⁾ 比較 Lys-Gly + Asp-Glu-Glu + Ser-Leu-Ala 與牛肉鮮味胜肽的鮮味感官和強

度相同，也印證感受器接合的觀念來說明鮮味感官中的 AX 與 B 分子團可由不同分子而來。

五、牛肉鮮味胜肽的熱安定性

雖然牛肉鮮味胜肽已經被證實具有提升食品風味的功效，但是在實際加工製品中，是否仍具有這樣的功效，與牛肉鮮味胜肽在製程中的安定性有很大關係。1995 年 Wang *et al.*⁽³¹⁾ 將合成的牛肉鮮味胜肽分別以 71°C、15 秒的巴斯德殺菌法與 121°C、20 分鐘的高壓滅菌法處理，再比較處理前後牛肉鮮味胜肽在 HPLC 分析圖譜中波峰面積的變化。結果顯示，利用巴斯德殺菌法的處理，牛肉鮮味胜肽有 97.7% 的殘留；用高壓滅菌法的處理，有 97.2% 的殘留。由此推論牛肉鮮味胜肽對熱的安定性非常好，因此在需熱加工的製品中可以扮演鮮味增強劑的角色。

六、牛肉鮮味胜肽與脂肪氧化

1995 年 Spanier *et al.*⁽²⁴⁾ 探討食品中脂肪氧化的現象，其中在“脂肪氧化對牛肉蛋白質的影響”章節中，作者利用人工合成的脂肪體 (liposome) 配合自由基產生裝置進行實驗。結果發現，自由基或脂肪氧化過程對牛肉鮮味胜肽並不會有影響，亦即可直接的抵抗脂肪氧化對它的影響；但作者也發現自由基或脂肪氧化後的產物可能使肌肉組織細胞膜破損，導致一些蛋白酶游離出來分解牛肉鮮味胜肽產生苦味。



七、利用基因重組技術生產牛肉鮮味胜肽

自然界中每 100g 牛肉經酵素水解後，約可分離出 40mg 牛肉鮮味胜肽^(34、12)，但這些量並不足以讓我們對其一般特性做徹底的探討。而利用化學合成法或酵素法雖可大量合成牛肉鮮味胜肽，但其步驟極為繁瑣。

近年來隨著分子生物學的進步，使得我們可應用生物技術的方法製造牛肉鮮味胜肽。早在 1977 年，Itakara *et al.*⁽¹³⁾ 將化學合成的生長激素抑制因子 (Somatostatin) 基因轉殖入大腸桿菌中，成功製造了生長激素抑制因子後，不論在醫學上、農業上，許多有特殊功能性的蛋白質，均以類似的方法被合成，進而大量發酵生產。

本研究主要根據 Yamasaki *et al.*⁽³⁴⁾ 所分離出的牛肉鮮味胜肽，設計互補的核苷酸序列，利用基因重組技術構築含有牛肉鮮味胜肽的基因載體--pEZZ18-BMP，再轉型入宿主細胞 *E.Coli* JM105 中，以培育能合成牛肉鮮味胜肽的菌株。



材料與方法

一. 宿主細胞 (Host Cell) 的培養

1.1 菌種：

Escherichia coli JM105 (ATCC 47016)

Genotype: *endA1*, *thi*, *rpsL*, *sbcB15*, *hsdR4*, $\Delta(lac-proAB)$, [F',
traD36, *proAB*, *lacI*^q Z Δ M15] (Amersham
Pharmacia Biotech, U.S.A)

1.2 培養基：

1.2.1 LB (Luria-Bertina) broth 培養基：

Yeast extract	5.0 g
Tryptone	10.0 g
NaCl	10.0 g
Distilled Water	1.0 L
Adjust pH to	7.0-7.5

混合均勻滅菌 (121°C、15min) 後使用。

1.2.2 LB plate 培養基：

LB broth 培養基 + 1.5% Bacto[®] Agar (Difco, U.S.A)

，混合均勻滅菌後分裝於培養皿中，凝固後使用。

1.2.3 選擇性 LB plate 培養基：

試劑：

Amp (Ampicillin, Sigma[®], U.S.A)：以 dH₂O 配成
5 mg / mL 的濃度後再以 0.22 μ m 無菌濾膜過濾，置於
-20°C 儲存備用。

IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, MDBio,
Inc., Taiwan)：以 dH₂O 配成 0.1M 後再以 0.22 μ m 無菌
濾膜過濾，置於 -20°C 儲存備用。



X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside, MDBio, Inc., Taiwan) : 以 Dimethylformamide (Merck, Germany) 配成 20mg / mL 的濃度後以鋁箔紙包住，置於 -20°C 儲存備用。

配法：

將 LB plate 培養基滅菌後尚未凝固前約 40°C 左右，加入 Amp 使其最終濃度為 $50 \sim 70 \mu\text{g} / \text{mL}$ ，混合均勻後分裝於培養皿中，凝固後分別加入 $50 \mu\text{L}$ X-Gal 及 $10 \mu\text{L}$ IPTG，用 L 棒塗抹均勻，置於 4°C 儲存備用。

1.3 宿主細胞的培養：

接種環沾取 *Escherichia coli* JM105 接種至 LB broth 中， 37°C 下培養至 $A_{600}=0.6$ (Model : UV2100, UnicoTM, U.S.A) 左右，取 0.2mL 培養液 + 0.1mL 20%滅過菌的甘油於冷凍小管中，經液態氮凍結後，置於 -80°C 儲存備用。

二. 表現載體之製備

2.1 表現載體 (Expression Vector) :

本試驗選用誘導式表現的質體 pEZZ18 (Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A)。此質體帶有 Amp^r，可利用對抗生素 Ampicillin 之抗藥性作為篩選標記 (selection marker)。

為了得到大量的 pEZZ18 質體，利用 pEZZ18 可在 *Escherichia coli* JM105 中自行複製的特性，將 pEZZ18 依照 Molecular Cloning 3rd ed. ⁽²⁹⁾ 的方法轉型於 *Escherichia coli* JM105 中，再將其均勻塗抹於含有 Amp ($50 \sim 70 \mu\text{g} / \text{mL}$) 的 LB plate 上， 37°C 培養箱中培養過夜；挑選 LB plate 上的單一菌落接種於含有 Amp ($50 \sim 70 \mu\text{g} / \text{mL}$) 的 LB broth 中， 37°C 震盪



培養過夜，再離心收集菌體後抽取質體 pEZZ18 備用，並輔以電泳分析其效果。

2.1.1 轉型作用 (Transformation) :

1. 勝任細胞 (Competent Cell) 的製備 :

Escherichia coli JM105 在進行轉型作用之前要先以氯化鈣處理，使其成為勝任細胞方可進行轉型作用。其過程主要參考 Molecular Cloning 3rd ed. ⁽²⁹⁾ 的方法略作修改：

- 1) -80°C 取出儲存的 *Escherichia coli* JM105 置於冰上回溫。
- 2) 接種至 LB broth 中，置於 37°C 培養箱中震盪培養過夜。
- 3) 取 1% 過夜培養液加到 50mL LB broth 中。
- 4) 37°C 震盪培養至 $A_{600}=0.4 \sim 0.6$ 左右。
- 5) 置於冰上 15 分鐘。
- 6) $1800 \times g$ ， 4°C 下離心 (MIKRO 22R, Hettich, Germany) 15 分鐘。
- 7) 移除上清液。
- 8) 加入 1 / 3 原菌液體積 0.1M 冰 CaCl_2 (Sigma®, U.S.A) 懸浮菌體。
- 9) 置於冰上 15 分鐘。
- 10) $1800 \times g$ ， 4°C 下離心 15 分鐘。
- 11) 移除上清液。
- 12) 加入 1 / 20 ~ 1 / 25 原菌液體積 0.1M 冰 CaCl_2 懸浮菌體。
- 13) 迅速取 0.2mL 懸浮菌體 + 0.2mL 20% 滅過菌的甘油分裝於 1.5mL 滅過菌的微量離心管中，經液態氮凍結後，置於 -80°C 儲存備用。



2. 轉型作用：

自 -80°C 取出勝任細胞置於冰上回溫，加入約 40ng DNA 充分混合後，於冰上靜置 30 分鐘，移至乾浴加熱器中 42°C 、90 秒，快速置於冰上 2 分鐘，加入 0.8mL LB broth， 37°C 水浴下培養 1~2 小時。

取 0.1mL ~ 0.2mL 轉型細胞均勻塗抹於含有 Amp (50~70 $\mu\text{g} / \text{mL}$) 的 LB plate 上， 37°C 培養箱培養過夜。

2.1.2 小量質體 DNA 的抽取：

本實驗以 QIAGEN QIAprep® Spin Miniprep Kit 抽取質體 DNA。將轉型成功含有質體的菌落接種至含有適當抗生素的 LB broth 中， 37°C 震盪培養過夜，取 1.5mL 菌液離心收集菌體，移除上清液後再加入 1.5mL 菌液離心收集菌體並重新溶於 0.25mL 含有 RNase 的細胞懸浮液 (Buffer P1) 中，加入 0.25mL 溶解液 (Buffer P2)，倒轉試管混合數次，待細胞懸浮液由混濁變為澄清，加入 0.35mL 中和液 (Buffer N3) 同樣緩慢混合數次，以 $\geq 10,000 \text{ xg}$ ，離心 10 分鐘，取上清液 0.8mL 於 QIAprep spin column 中，以 $\geq 10,000 \text{ xg}$ ，離心 30 ~ 60 秒，去除析出液後加入 0.5mL 沖洗液 (Buffer PB)，以 $\geq 10,000 \text{ xg}$ ，離心 30 ~ 60 秒，去除析出液後加入 0.75mL 溶離液 (Buffer PE)，以 $\geq 10,000 \text{ xg}$ ，離心 30 ~ 60 秒，去除析出液後再離心 1 分鐘以去除殘留的溶離液，將 QIAprep spin column 移至滅過菌的微量離心管中，加入 0.05mL 的 dH_2O ，靜置 1 分鐘後離心 1 分鐘，此時析出液中含有質體，利用 Gene Spec I (Naka Instruments, Ltd., Japan) 測其濃度後置於 -20°C 儲存備用。



2.1.3 電泳分析：

將 TAE buffer (50X TAE buffer, Amresco®, U.S.A) 稀釋成 0.5X, 並配製 1% 洋菜膠 (Agarose1™, Amresco®, U.S.A), 以微波爐加熱至完全溶解後, 混合均勻倒入鑄膠槽中, 並避免產生氣泡, 垂直插入齒模, 待凝固後, 取出齒模備用。將凝結之洋菜膠片放入電泳槽中, 加入 0.5X TAE 緩衝液至覆蓋過洋菜膠片。於 DNA 標準分子量 marker 及 DNA 樣品中加入十分之一體積的追蹤染劑, 混合後分別注入膠片樣品槽中, 以約 100 伏特的電壓進行電泳, 待追蹤染劑達三分之二膠片時即停止, 取出置於 EtBr (Ethidium Bromide, Bio-Rad, U.S.A) 溶液中 10~15 分鐘後, 於蒸餾水中洗去殘留的 EtBr, 直接於紫外光箱中 (Photo-Print IP-008-SD, Vilber Lourmat, France) 觀察 DNA 色帶。

2.2 限制酶截切反應：

取滅過菌的微量離心管依序加入下列反應物後於 37°C 下反應 2 小時。

⎧	質體 DNA (1 μg / μL)	2 μL
	限制酶 10X buffer	2 μL
	BSA	0.2 μL
	dH ₂ O	14.8 μL
	混合均勻後加入	
	限制酶 <i>Sal</i> I (Promega, U.S.A)	1 μL

2.3 基因片段之回收：

為了能快速有效的將限制酶截切後的基因片段和反應緩衝液及未反應的限制酶分離, 本實驗採用 High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Germany)。將限制酶截切反應後的產物



0.1mL 加入 0.5mL Binding Buffer 混合均勻後移至 High Pure filter tube 中，以 13,000 xg，離心 30 ~60 秒，去除析出液後加入 0.5mL Wash Buffer，以 13,000 xg，離心 1 分鐘，去除析出液後加入 0.2mL Wash Buffer，以 13,000 xg，離心 1 分鐘，去除析出液後加入 0.05mL Elution Buffer，以 13,000 xg，離心 1 分鐘，此時析出液含有限制酶截切後的基因片段，置於 -20°C 儲存備用。

三. 製備牛肉鮮味胜肽核苷酸序列

3.1 牛肉鮮味胜肽核苷酸序列之合成：

本實驗依據(Yamasaki 與 Maekawa., 1978)所發表的文章，設計兩段互補的單股牛肉鮮味胜肽核苷酸序列 BMP1 及 BMP2，並委託騰達行企業股份有限公司代為合成。

BMP1：

Sal 1 Met Lys Gly Asp Glu Glu Ser Leu Ala
5'-P-GTCGACCATGAAAGGCGATGAGGAATCTTTAGCG
stop stop
TAATAG- 3'

BMP2：

Sal 1 stop stop Ala Leu Ser Glu Glu Asp Gly
5'-P-GTCGACCTATTACGCTAAAGATTCCTCATCGCC
Lys Met
TTTCATG- 3'



3.2 黏合 (annealing) 牛肉鮮味胜肽核苷酸序列：

取相同莫耳數 BMP1 及 BMP2 加入 dH₂O 均勻混合後，加熱至 90°C 維持 3 分鐘，再緩慢冷卻至 37°C，並放置 90 分鐘以上，其產物為雙股牛肉鮮味胜肽核苷酸序列，此步驟可利用聚合酶連鎖反應機 (Model : FPROG02Y, Techne(Cambridge) LTD., U.K.) 進行。

3.3 接合 (ligation) 牛肉鮮味胜肽核苷酸序列：

取 3.2 反應後的產物 8 μ L + 1 μ L 的 10X 連接酶緩衝液 + 1 μ L (3 weiss unit) 的 T4 DNA 連接酶 (Promega, U.S.A)，於 16°C 下反應 3 小時後，取 5 ~ 10 μ L 進行電泳分析。

3.4 限制酶截切反應：

為了得到和表現載體相同的黏合端，使用限制酶 *Sal* I 於 37°C 下進行截切反應 30 分鐘。

3.3 的產物 限制酶 10X buffer BSA dH ₂ O 混合均勻後加入 限制酶 <i>Sal</i> I	5 μ L
	1 μ L
	0.1 μ L
	2.9 μ L
	1 μ L

四. 牛肉鮮味胜肽基因載體 (pEZZ18-BMP) 之構築

4.1 接合 (ligation) 反應：

將先前製備好的表現載體和牛肉鮮味胜肽核苷酸序列 (Insert) 依不同比列混合，末端序列互補的部份會進行黏合，但仍須藉由 T₄ DNA 連接酶催化 phosphodiester bond 的形成，將缺口接合起來。準備四管滅過菌的微量離心管，依下表將所有物



質混合均勻後於 16°C 下反應過夜。

	Vector	Insert	dH ₂ O	T ₄ DNA ligase	10X buffer
1	1	1	6	1	1
2	1	3	4	1	1
3	1	5	2	1	1
4	1	7	—	1	1

(單位：μL)

4.2 轉型作用：

自 -80°C 取出勝任細胞置於冰上回溫，加入 5 μL ~ 10 μL 接合反應後的產物，混合均勻後進行轉型作用。

取 0.1mL ~ 0.2mL 轉型細胞均勻塗抹於選擇性 LB plate 上，37°C 培養箱培養過夜。培養終了進行藍白菌落之篩選，白色菌落即表示可能含有 pEZZ18-BMP 質體轉型於 *Escherichia coli* JM105 菌體中。

4.3 定序反應：

為了進一步確認白色菌落中所帶的質體確實為 pEZZ18-BMP，挑取白色菌落接種於含有 Amp (50~70 μg / mL) 的 LB broth 中，37°C 震盪培養過夜，再離心收集菌體後抽取質體以 ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, U.S.A) 進行序列分析。

其步驟參照 ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit：

1) 取質體 DNA 200 ~500ng + Terminator Ready Reaction Mix

8 μL + M13 forward Primer 1 μL (3.2 pmol) 混合均勻，加 dH₂O 至總體積為 20 μL。

- 2) 利用 GeneAmp® PCR System 2400 (Applied Biosystems, U.S.A) 進行 cycle sequencing 的反應，其條件如下 (共 25 cycles) :

1°C / sec 的速率升溫至 96°C
96°C , 10 秒
1°C / sec 的速率降溫至 50°C
50°C , 5 秒
1°C / sec 的速率升溫至 60°C
60°C , 4 分鐘
反應結束後降溫至 4°C

- 3) 純化經 cycle sequencing 反應後的產物 :

樣品中加入 3M 醋酸鈉 (pH 4.6) 2 μ L , 95% 酒精 50 μ L 混合均勻後置於室溫 15 分鐘，以離心機的最大轉速離心 20 分鐘，小心移除上清液，加 70% 酒精 250 μ L 清洗沉澱物，以離心機的最大轉速離心 5 分鐘，移除上清液後移至抽氣裝置中抽乾 10 ~15 分鐘。

- 4) 將純化後的產物移入定序儀樣品槽中進行序列分析。

五. 重組牛肉鮮味胜肽之表現與純化

5.1 IPTG 誘導蛋白質的表現與分析 :

- 1) 挑選經定序確認後的白色菌落接種於含有 Amp (50 ~70 μ g / mL) 的 LB broth 中，37°C 培養箱培養過夜。
- 2) 接種 1% 過夜培養液於 50mL 的 LB broth (內含 Amp 50 ~ 70 μ g / mL) 中，37°C 培養箱震盪培養。
- 3) 培養約 4 小時後，待菌體濃度達 $A_{600}=0.6$ 左右時，加入 IPTG 使其最終濃度為 1.0mM，於 37°C 下培養 3 小時進行蛋白質表現的誘導。



- 4) 將誘導後的菌液以 4000 xg，離心 30 分鐘，去除上清液後懸浮菌體於 10mL Tris-HCl (50mM, pH7.5) 緩衝液中。
- 5) 利用 Sonicator (Model : XL2000 Microson, Misonix inc., U.S.A) 將菌體打破，其條件為 3x10 sec at setting 5，全程之操作均在冰上進行以維持低溫。
- 6) 將破碎後的菌體以 4000 xg，離心 30 分鐘，回收上清液後以 0.22 μ m 無菌濾膜過濾殘留的細胞和大分子，取一部份用 Bio-Rad Protein Assay Kit 進行蛋白質濃度測定及 SDS-聚丙稀醯胺膠體電泳分析(SDS-PAGE)，其餘置於 4°C 儲存備用。

5.1.1 蛋白質濃度測定：

依據(Bradford, M.,1976)所發表的文章⁽⁷⁾，利用 Bio-Rad protein Assay Kit 進行蛋白質濃度測定。配製濃度 1 ~10 μ g / mL 的 Protein Standard (Bovine Serum Albumin, Sigma®, U.S.A)，取 0.8mL + 0.2mL 反應試劑後置於室溫 5 分鐘，測定 595 nm 的吸光值後繪製成蛋白質的標準濃度檢量線；取待測樣品 0.8mL + 0.2mL 反應試劑後置於室溫 5 分鐘，測定 595nm 的吸光值，比對蛋白質的標準濃度檢量線求出蛋白質濃度。

5.1.2 SDS-聚丙稀醯胺膠體電泳分析 (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis ; SDS -PAGE) :

試劑：

A 液 (30% acrylamide / bis solution, Bio-Rad, U.S.A)



B 液（分離膠體緩衝液）：取 Tris（Sigma[®], U.S.A）18.2g + TEMED（*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine, Amersham Pharmacia Biotech., U.S.A）0.36mL，用 60mL dH₂O 溶解後，以 HCl 調 pH 至 8.8 後加 dH₂O 至 100mL，儲存於 4°C。

C 液（聚集膠體緩衝液）：取 Tris（Sigma[®], U.S.A）0.6g + TEMED 0.04mL，用 8mL dH₂O 溶解後，以 HCl 調 pH 至 6.8 後加 dH₂O 至 10mL，儲存於 4°C。

通用電泳緩衝液（5X TBE buffer, Amresco[®], U.S.A）：使用前用 dH₂O 稀釋五倍，若在稀釋時加入 SDS 使成為 0.1% SDS 即為 SDS 電泳緩衝液。

10% APS 溶液（ammonium persulfate, Sigma[®], U.S.A）：取 0.1g 溶於 1mL dH₂O；使用前新鮮配製，過夜者不再用。

追蹤染劑（tracking dye）：取 bromphenol blue（3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonephthalein, Sigma[®], U.S.A）約 1mg 溶於 5mL 通用電泳緩衝液，加 5mL 甘油混合。

10% SDS 溶液：取 1g SDS（Sodium Dodecyl Sulfate, Bio-Rad, U.S.A）溶於 10mL dH₂O。

SDS 膠體電泳樣本溶液：取 0.15g Tris、0.2g SDS、7.45mg EDTA（Ethylenediaminetetraacetic Acid, Sigma[®], U.S.A）、0.5mL β-mercaptoethanol（Merck, Germany），加 8mL dH₂O 溶解，調 pH 至 6.8 之後，再加水至 10mL。

方法：

- 1) 將鑄膠套件（Versatile Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell, Bio-Rad, U.S.A）清洗乾淨後晾乾備用。
- 2) 依下表配置 SDS-PAGE 膠體溶液

膠體溶液	分離膠體溶液	聚集膠體溶液
	(running gel solution)	(stacking gel solution)
	12.5%	4%
A 液	4.15	0.66
B 液	2.5	—
C 液	—	1.24
10%SDS	0.1	0.05
H ₂ O	3.3	3.0
APS	0.05	0.1
總體積	10	5.0

(單位 mL)

- 3) 將配置好的分離膠體溶液緩緩倒入裝置好的鑄膠套件中，待膠體高度約佔玻璃片的 2/3 高時，在膠體液面上方加入 100 μ L 異丙醇，以壓平膠體液面。
- 4) 約 30 分鐘至 1 小時後，凝膠完成，倒出上層的異丙醇。
- 5) 配置聚集膠體溶液，混合均勻後，倒入鑄膠套件中，立即插入所需之齒模，約 30 分鐘可完成凝膠。
- 6) 聚集膠體凝結後，取出齒模，將膠片和電泳套件組合後，放入電泳槽中，倒入稀釋成一倍的 SDS 電泳緩衝液。
- 7) 取適量的樣品，加入同體積之 SDS 膠體電泳樣本溶液再加入追蹤染劑，混合後於 100°C 中煮 5 min，待冷卻後，注入膠片樣品槽中。
- 8) 蓋上電泳槽上蓋後，連接電源供應器，以 130 伏特的電壓進行電泳，待追蹤染劑跑出膠片後，即可停止電泳。
- 9) 取出膠片中的膠體，以 Silver Stain Kit (Bio-Rad, U.S.A) 進行硝酸銀染色，方法如下表。

Reagent	Volume	Time
1. Fixative 40% methanol/10% acetic acid (v/v)	200 mL	60 min
2. Fixative 10% ethanol/5% acetic acid (v/v)	200 mL	30 min
3. Fixative 10% ethanol/5% acetic acid (v/v)	200 mL	30 min
4. Oxidizer	100 mL	10 min
5. Deionized water	200 mL	10 min
6. Deionized water	200 mL	10 min
7. Deionized water ^{註 1.}	200 mL	10 min
8. Silver reagent	100 mL	30 min
9. Deionized water	200 mL	5 min
10. Developer	100 mL	30 sec
11. Developer	100 mL	5 min
12. Developer	100 mL	5 min
13. Stop 5% acetic acid (v/v)	200 mL	5 min

註 1.：重複 5,6,7 直到膠片上的黃色完全移除

5.2 純化重組牛肉鮮味胜肽：

本實驗所要生產的牛肉鮮味胜肽於基因重組時在其 N 端處接了一段可轉譯成 14 kDa 的“ZZ”（Z is an IgG-binding domain of staphylococcal protein A）胜肽核苷酸序列。當宿主細胞正確將質體 pEZZ18-BMP 經轉錄、轉譯成“ZZ-Met-BMP”融合蛋白（fusion protein）後，便可利用 ZZ 胜肽和 IgG-Sepharose[®] 6 Fast Flow（Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A）膠體的專一性鍵結將“ZZ-Met-BMP”融合蛋白經親和性層析管柱加以分離純化。

大量收集“ZZ-Met-BMP”融合蛋白後，利用 CNBr（Cyanogen Bromide, 林純藥工業株式会社, Japan）對甲硫胺酸（Methionine）的專一性切割，將“ZZ-Met-BMP”融合蛋白與其作用後，利用高壓液相層析法回收重組牛肉鮮味胜肽。



5.2.1 親和性管柱層析法：

儀器：

層析管柱：C 16/40 column + AC 16 adaptor (Amersham Pharmacia Biotech., U.S.A)

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

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

試劑：

IgG-Sepharose[®] 6 Fast Flow 膠體

Tris-saline Tween[®] 20 (TST)：

50mM Tris buffer, pH 7.6, 150mM NaCl and 0.05% Tween[®] 20

0.5M CH₃COOH (HAc) adjusted to pH 3.4 with NH₄CH₃COOH (NH₄Ac)

5mM NH₄Ac, pH 5.0

方法：

- 1) 均勻懸浮 IgG-Sepharose[®] 6 Fast Flow 膠體後，小心吸取裝填於層析管柱中。
- 2) 固定流速 300mL/cm²h 下，依序以 2~3 倍膠體體積的 0.5M HAc, pH 3.4、TST、0.5M HAc, pH3.4、TST 緩衝液平衡管柱。
- 3) 以流速 150mL/cm²h 將 5.1 中製備完成的樣品 40mL 加到管柱中。



- 4) 在流速 $300\text{mL}/\text{cm}^2\text{h}$ 下，依序以 10 倍膠體體積的 TST、2 倍膠體體積的 $5\text{mM NH}_4\text{Ac}$, pH 5.0 洗去未與膠體專一性結合的物質。
- 5) 在流速 $20\text{mL}/\text{cm}^2\text{h}$ 下，以 0.5M HAc , pH 3.4 將和膠體專一性結合的物質溶離 (elute) 出來。每 3 分鐘收集一管 (約 1.2mL)，測各管在 280 nm 下的吸光值，並回收具有吸光值的部分。
- 6) 將回收的部分置於超過濾裝置 (Model: 8050, Amicon[®], U.S.A) 中，用截留分子量 (Molecular Weight Cut-Off, MWCO) 10,000 的過濾膜 (Amicon[®], U.S.A) 進行濃縮並反覆加入 dH_2O 以達到降低鹽濃度的目的。
- 7) 取一部分濃縮後的產物，以 SDS-PAGE 分析。

5.2.2 以 CNBr 切割 “ZZ-Met-BMP” 融合蛋白：

將超過濾濃縮後產物 1mL 加入 $5\text{mL } 0.1\text{M HCl}$ ，於抽風櫃中加入 $50\sim 100\text{ mg}$ 的 $\text{CNBr}^{(11,33)}$ ，於室溫下反應 24 小時後，加入 $20\text{mL dH}_2\text{O}$ ，冷凍乾燥後置於 -20°C 儲存備用。

5.2.3 高壓液相層析法 (HPLC) 分離：

經由 CNBr 切割後的胜肽混合物，利用 HPLC 逆相管柱 (reversed phase column) 加以分離純化，以便後續的胺基酸組成份及 N 端序列分析。

儀器：

高壓幫浦：HITACHI L-6200A Intelligent Pump

偵測器：HITACHI L-4200 UV-VIS Detector

積分儀：HITACHI D-2500 Chromato-Integrator

分析管柱：Merck LiChroCART 250-4mm LiChrospher®
100 RP-18 (5 μm)

分析條件：

移動相：80：20 = Solvent A：Solvent B

{ Solvent A：0.1% (v/v) TFA in water
{ Solvent B：0.08% (v/v) TFA in acetonitrile

流速：0.5 mL/min

UV 波長：214 nm

注射量：標準品 5 μL，樣品 15 μL (註：標準品及樣品
均溶解於 Solvent A 中)

六. 重組牛肉鮮味胜肽之鑑定

利用 HPLC 收集可能是重組牛肉鮮味胜肽的部分，經冷凍乾燥後分別鑑定樣品的胺基酸組成份及 N-端胺基酸序列。

6.1 N-端胺基酸序列分析 (Protein Sequencing)：

利用 ABI Procise® 494 Protein Sequencing System (Applied Biosystems, U.S.A) 進行 N-端胺基酸序列分析，其原理是利用 Edman degradation 的方法，以 PITC (phenylisothiocyanate) 在蛋白質的 N-端進行修飾反應，生成 PTH 衍生物以便偵測。



此實驗是委託臺大醫學院-微量蛋白質定序實驗室代為分析，其步驟大致如下：將轉印到 PVDF 纖維膜上的蛋白質小心地切下，置入轉印樣品專用的樣品匣中進行分析。過程中為避免污染所使用的器具均先以氰甲烷（acetonitrile）擦拭。

利用 HPLC 分離 PTH-胺基酸時，所使用的管柱為 Brownlee C-18 Column（Sepheri-5 PTH, 2.1×220mm, Perkin Elmer），在吸光值 269nm、溫度 55°C 下以 0.2mL/min 的流速進行分離。

6.2 胺基酸組成份分析：

此實驗委託清華大學生科系-生化合成分析儀器室代為分析送測樣品中胺基酸組成份。

樣品以 6N HCl 或 4N methanesulfonic acid 在真空 110°C 下水解 24 小時，水解液以 PICO TAG Amino Acid Analysis system（Model：Workstation, Waters, U.S.A）來分析其內胺基酸組成份。

結果與討論

一、宿主細胞 (Host Cell) 的培養

選用的宿主細胞 *Escherichia coli* JM105 其表現型的特性敘述如表四所示。在實驗中為了避免於平板培養基中不斷的重複接種 (transfer) 菌株，造成實驗上的再現性不佳 (例如：菌株突變或轉型株攜帶的質體複製數不同)，故以甘油為保護劑將菌株與之混合後，以液態氮凍結保存同一批菌株，做為每一次實驗的種源。

在整個操作過程中為避免受到空氣中微生物的污染，操作時應在無菌操作台 (Laminar flow) 內操作。培養基配置時除了用高壓殺菌釜產生的溼熱打斷菌體內蛋白質三級結構的氫鍵以達到殺菌目的外，額外添加的抗生素 ampicillin，會因加熱而遭破壞，故使用 0.22 μ m 無菌濾膜過濾溶液，將微生物留在濾膜上，以達到無菌的效果。

二、表現載體之確認

本實驗所用的表現載體 pEZZ18⁽¹⁶⁾，其大小為 4591 bp，在細胞內約有 500 ~700 個複製數 (copy number)，具有能抵抗抗生素 ampicillin 的抗藥性基因標記--Amp^r，以及單一的限制酶 *EcoR* 1、*Sac* 1、*Kpn* 1、*Sma* 1、*BamH* 1、*Xba* 1、*Sal* 1、*Pst* 1、*Sph* 1、*Hind* III 切割位置，除了具備符合做為載體的基本特點外^(5、9、15)，其上還接了一段可轉譯成 14 kDa 的“ZZ”胜肽核苷酸序列。當外來基因與質體 pEZZ18 接合，轉型入宿主細胞，經轉錄、轉譯成帶有 ZZ 胜肽的融合蛋白 (fusion protein) 後，便可利用 ZZ 胜肽和 IgG-Sepharose[®] 親和性膠體的專一性鍵結將融合蛋白經親和性層析管柱加以分離純化。其基因圖譜及相關

表四、*Escherichia coli* JM105 表現型的特性

Table 4. The characteristic of genotype of the *Escherichia coli*

JM105	
Genotype	特性
<i>endA1</i>	Endonuclease 突變，使其活性喪失。此舉被認為可改善小量抽取質體 DNA 的品質
<i>thi</i>	突變 Thiamine 新陳代謝的途徑，使得菌株在基礎培養基（minimal media）中生長時需添加 Thiamine
<i>rpsL</i>	在菌株的 subunit S12 of 30S ribosome 上帶有一突變，使其對抗生素 Streptomycin 具抵抗性
<i>sbcB15</i>	Exonuclease I 突變。此舉可改善 <i>recB</i> 和 <i>recC</i> 突變株的生長情形
<i>hsdR4</i>	此菌株在特定的位置 DNA restriction 的功能消失，但 methylation 的作用仍存在。目的在進行 DNA 選殖時不會被細胞內的限制酶所切割
$\Delta(lac-proAB)$	將菌株內 <i>lac operon</i> 及其鄰近合成 proline 的基因部份突變。此舉讓菌株在培養基中不能利用 lactose 當碳源，且須額外添加 proline 才能生長
F ⁻	指菌株不含有 F episome
<i>traD36</i>	將此基因突變可避免有 F 因子的細菌與沒有 F 因子的細菌進行 conjugation
<i>proAB</i>	此基因可和缺乏 <i>lac-proAB</i> 菌株內的基因互補，以確保 F episome 可起作用
<i>lacI^q Z</i> Δ M15	缺乏 β -galactosidase N 端序列，可與宿主的 β -galactosidase 進行 α -complement，產生藍色或白色菌落以利於我們篩選轉型成功與否的菌株

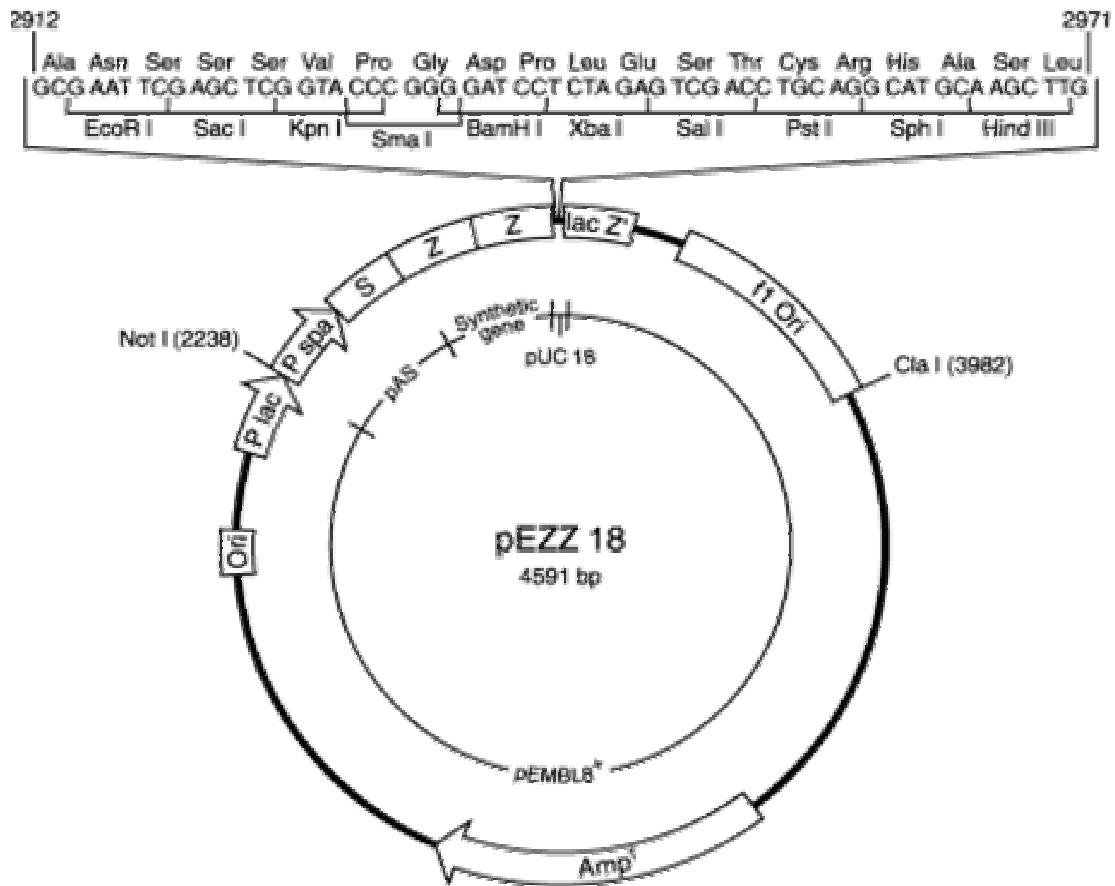
說明如圖三所示。

圖四是成功轉型質體 pEZZ18 於宿主細胞 *E.coli* JM105 中的菌落生長圖，由圖中可知，質體上帶有的抗藥性基因 Amp^r 確實可幫助我們於含有抗生素 ampicillin 的培養基中篩選轉型成功與否的菌株；而圖五和圖四的差別是將轉型株培養於含有 ampicillin、X-gal 和 IPTG 的培養基中，轉型株利用培養基中的乳糖類似物 IPTG 啟動質體上的 *lac* promoter，經轉錄、轉譯其後的基因產生 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 分解其受質 X-gal，產生藍色色素，讓我們可以藉此篩選後續實驗的轉型株中所帶有的載體是否含有牛肉鮮味胜肽核苷酸序列。

本實驗所採用的轉型方法為氯化鈣法其機制目前被認為可能是：當 DNA 加入以氯化鈣處理的勝任細胞溶液時，經過短時間的熱震 (heat shock) 後，氯化鈣使細胞壁有破損，此時 DNA 和 Ca^{2+} 形成的複合物便吸附在細胞表面，可使 DNA 送入細胞內。

利用質體所帶有的抗藥性基因--Amp^r，篩選轉型成功與否的細胞，其原理為：ampicillin 會與細菌細胞膜上伴隨細胞壁合成的酵素相結合，且抑制其活性，而抑制細菌中 peptidoglycan cross-link 的形成，進一步抑制細胞壁的合成，造成生長中的細菌死滅，而轉型成功的菌株其質體中所含的 Amp^r 基因能產生 β -內醯胺酶 (β -lactamase)，水解 ampicillin 的 13-內醯胺環 (13-lactam ring)，進而防止 ampicillin 進入細胞中。而利用 β -半乳糖苷酶基因--*lac Z*，篩選轉型株中的載體是否帶有牛肉鮮味胜肽核苷酸序列，其原理在結果與討論--四、牛肉鮮味胜肽基因載體 (pEZZ18-BMP) 之構築中會提及。





- Ori* : origin of DNA replication from plasmid ColE1.
- f1 Ori* : origin of DNA replication of the phage f1.
- lacZ'* : part of the β -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.
- Plac* : the *lacUV5* promoter. *Pspa* : the *spa* promoter.

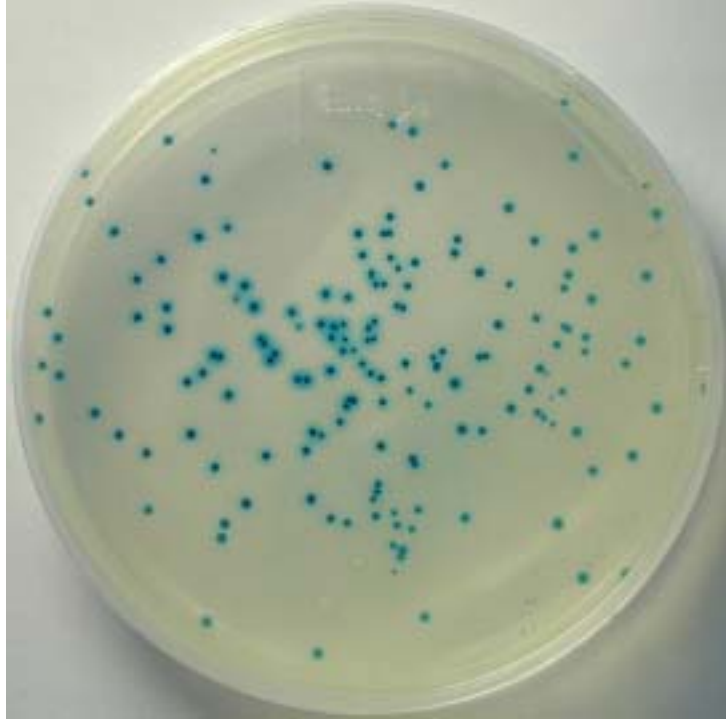
圖三、質體 pEZZ18 的基因圖譜

Fig. 3. Genetic map of plasmid pEZZ18



圖四、轉型株之菌落生長圖--培養於含 ampicillin 之 LB plate

Fig. 4. Transformed colonies grow on LB agar plate with ampicillin



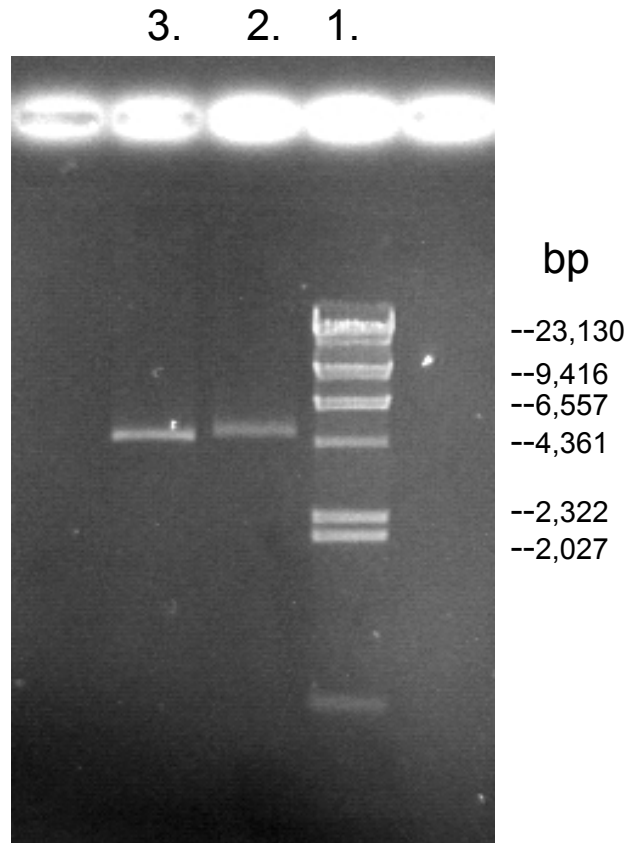
圖五、轉型株之菌落生長圖--培養於含 Amp/X-gal/IPTG 之 LB plate

Fig. 5. Transformed colonies grow on LB agar plate with
amp/X-gal/IPTG

轉型成功的菌株經液體培養後，使用商業化的套組抽取質體，其設計原理是由鹼性溶解法（alkaline lysis）衍生而來：首先將細胞懸浮在等張溶液中，再以含 SDS 的鹼性溶液處理細胞。SDS 可將細胞膜破壞，鹼液則可破壞 DNA 的氫鍵，致使細菌染色體 DNA 變性，但質體 DNA 因其為超螺旋（supercoil）的結構，在鹼性範圍較不易變性；在加入酸性溶液中和後，變性的染色體 DNA 因分子過於龐大以致於鹼基匆忙配對而形成一雜亂無序的巨大分子，而質體則維持原來形狀，經離心步驟後，對水溶解度相對降低的染色體 DNA 及蛋白質會沉澱下來，而質體 DNA 會留在上清液中；取上清液至 silica-gel membrane 上，利用正負電荷相吸的原理，經不同緩衝液沖洗後便可得到很純的質體 DNA。

分離之 pEZZ18 質體經 Agrose 電泳分析的結果，如圖六所示，我們將質體 DNA 經單一切位的限制酶截切後，成為單一的線性結構（linear form），再比較其在電泳膠片上的泳動率。lane 1 為 marker、lane 2 為原始質體 pEZZ18 經限制酶 *Sal*1 截切後的產物、lane 3 為轉型株中抽取的質體經限制酶 *Sal*1 截切後的產物。由圖中可知，lane 3 上 DNA 色帶的泳動率與 lane 2 相同，且分子量落在 4.5 kb 左右，表示我們可以很成功的將質體 pEZZ18 轉型入宿主細胞中，而使用的商業化套組也可幫助我們從宿主細胞中得到與原始質體相同的質體。

而將質體經由限制酶 *Sal*1 切割，主要是為了得到和後續實驗中牛肉鮮味胜肽核苷酸序列相同的黏合端，使質體能順利的在連接酶的幫助下和牛肉鮮味胜肽核苷酸序列接合在一起。



Lane 1 : λ \ Hind III marker

Lane 2 : 原始質體 pEZZ18 / Sal I

Lane 3 : 轉型株中抽取的質體 / Sal I

圖六、以洋菜膠電泳分析轉型於 *E.coli* JM105 之 pEZZ18 質體

Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of pEZZ18 plasmid isolated from transformant *E.coli* JM105

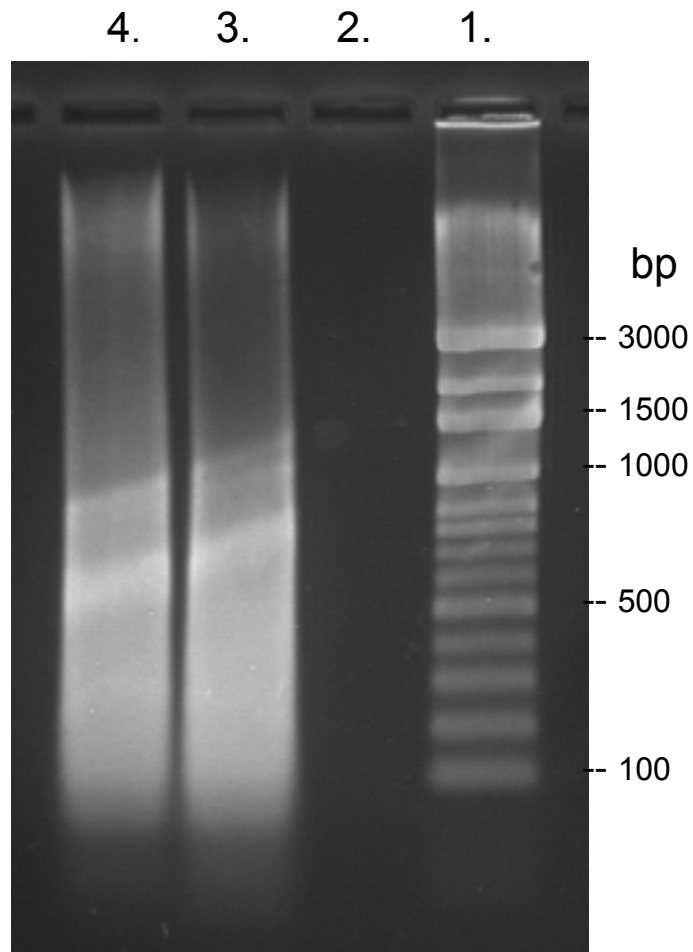
三、製備牛肉鮮味胜肽核苷酸序列

本實驗依據 Yamasaki 與 Maekawa⁽³⁴⁾ 所發表牛肉鮮味胜肽胺基酸序列的文章，配合其他文獻提及大腸桿菌中使用頻率較頻繁的密碼^(1、21)，設計兩段互補的單股牛肉鮮味胜肽核苷酸序列 BMP1 及 BMP2；在此序列上除了可經轉錄、轉譯成牛肉鮮味胜肽的 24 個密碼子外，還包含 6 個停止密碼，6 個供限制酶 *Sal*1 辨識的位置，3 個可經轉錄、轉譯成甲硫胺酸的密碼子，1 個避免載體和插入序列接合時產生 frameshift 現象的鹼基。

兩段單股的牛肉鮮味胜肽核苷酸序列經黏合 (annealing) 和接合 (ligation) 反應後，形成雙股牛肉鮮味胜肽核苷酸序列 (ds-BMP Nucleotides Sequences) 經電泳分析其結果，如圖七所示，lane 1 為 marker，lane 2 為 BMP 1 和 BMP 2 經黏合後的產物，lane 3 和 lane 4 為 BMP 1 和 BMP 2 經黏合、接合後的產物。由圖中可知，lane 2 因只經黏合反應，所以其產物的分子量較小 (40 bp)，因此在電泳膠片上的泳動率遠大於其他樣品，以致於在 lane 2 上沒有明顯的 DNA 色帶出現。lane 3 和 lane 4 其分子量落在 100~1500 bp 之間，亦即約有 2~40 個雙股牛肉鮮味胜肽核苷酸接合在一起。

爲了得到和先前製備好的質體有相同的黏合端，於是將整個雙股牛肉鮮味胜肽核苷酸序列用限制酶 *Sal*1 處理，整個流程如圖八所示。





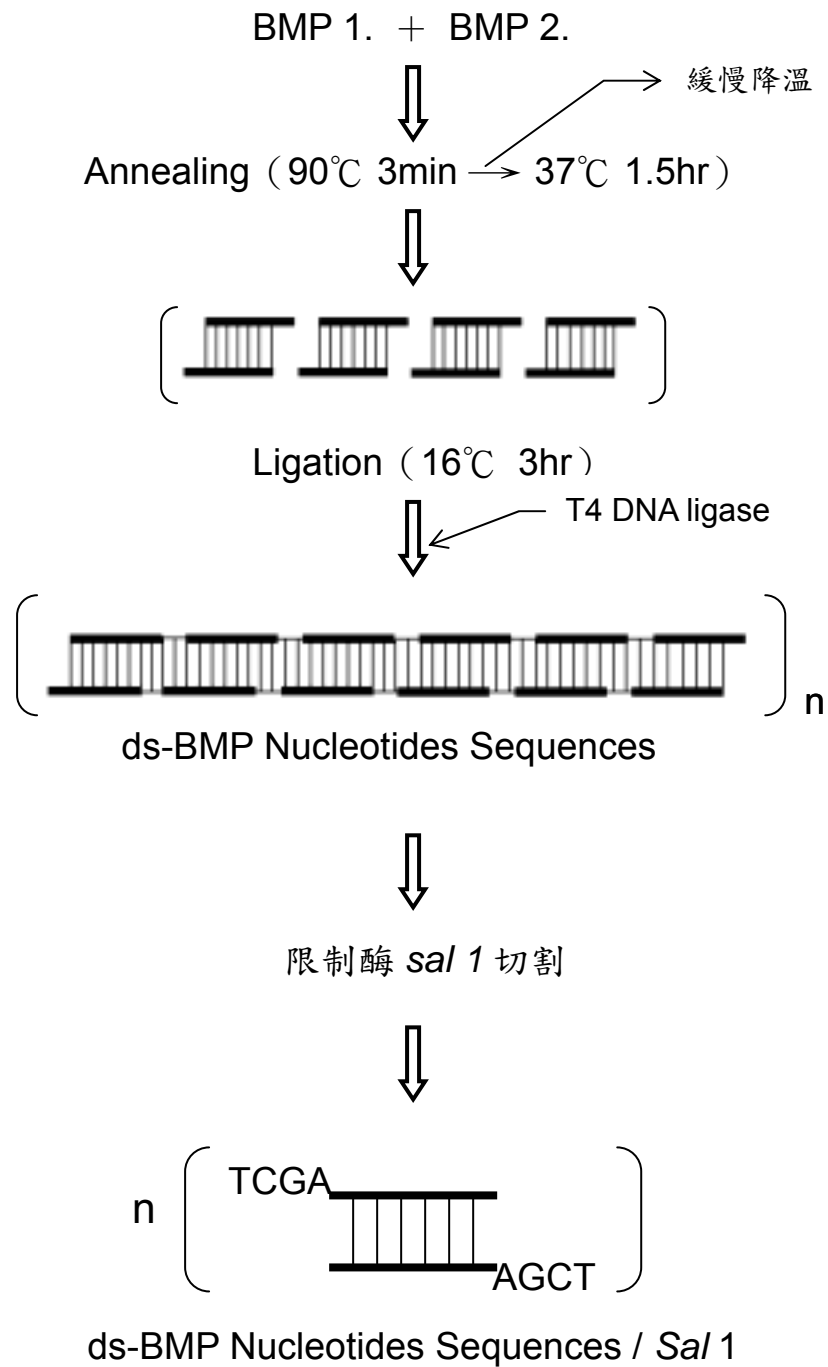
Lane 1 : 100 bp marker

Lane 2 : BMP1 和 BMP2 經黏合後的產物

Lane 3 , Lane 4 : BMP1 和 BMP2 經黏合、接合後的產物

圖七、以洋菜膠電泳分析 BMP1 及 BMP2 經黏合和接合後的產物

Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of annealing and ligation of BMP1 and BMP2



圖八、製備牛肉鮮味胜肽核苷酸序列之流程圖

Fig. 8. Procedure of preparing ds-BMP Nucleotides

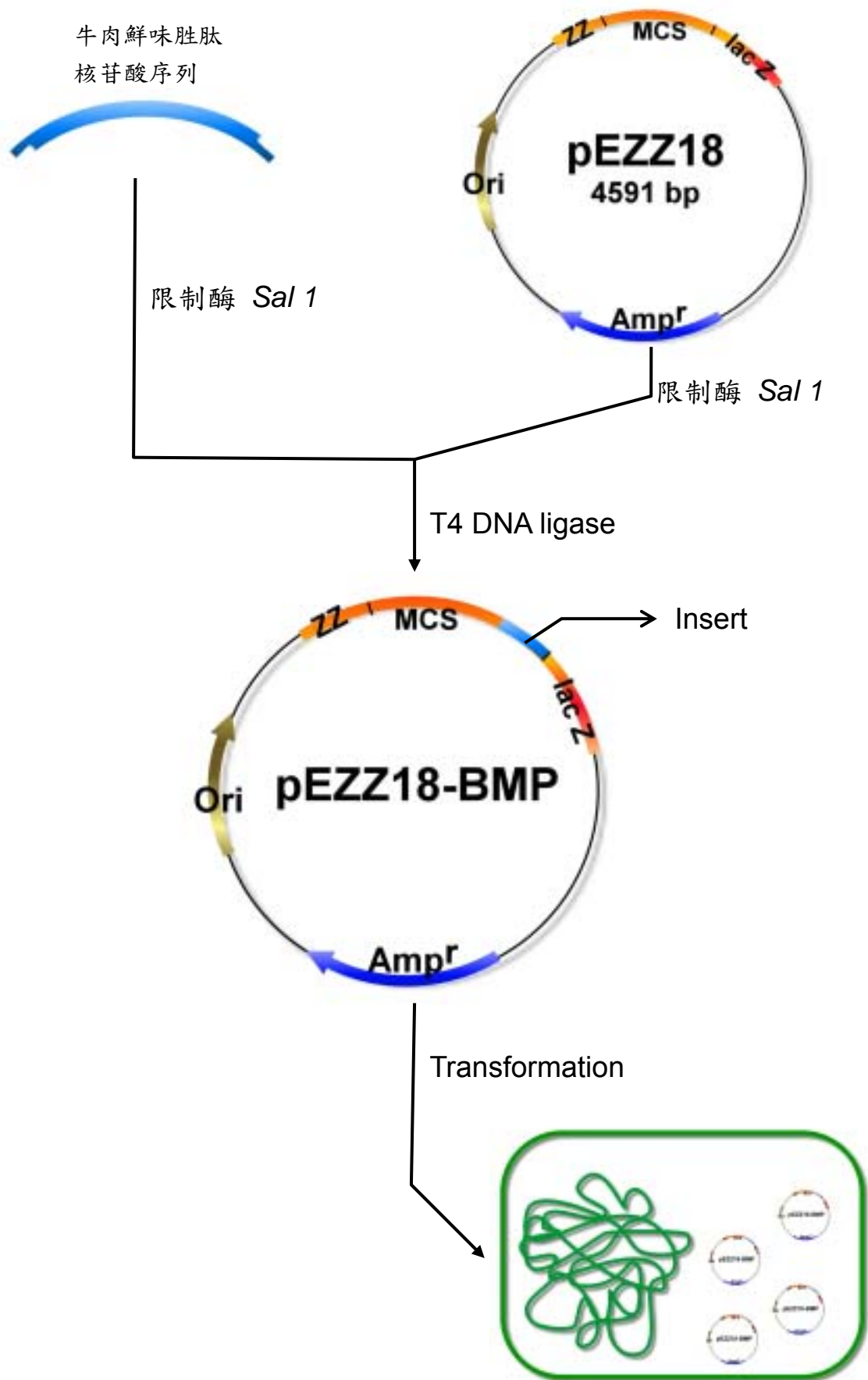
四、牛肉鮮味胜肽基因載體 (pEZZ18-BMP) 之構築

基因載體 (pEZZ18-BMP) 之構築流程，如圖九所示，首先將先前製備好具有相同黏合端的載體和雙股牛肉鮮味胜肽核苷酸序列，依不同比例混合後，在連接酶的幫助下進行接合反應，隨後將此接合反應後的產物轉型到宿主細胞內，利用選擇性培養基篩選轉型成功與否的菌落。

先前我們利用質體上所帶有的抗藥性基因，篩選出含有質體的菌株，但此篩選步驟並無法告知此菌株內的質體是否含有嵌入的 DNA 片段，於是我們利用 α -complementary 的方法篩選出其內的質體可能含有嵌入的 DNA 片段的菌株，其原理為：*lacZ* 基因所產生的 β -半乳糖苷酶，分別是由兩個 α -胜肽 (N 端) 和 ω -胜肽片段 (C 端) 所組成，可分解半乳糖或其類似物 X-gal。將只含 α -胜肽的 *lacZ* 基因之質體，送入能形成 ω -胜肽片段的突變宿主內，則可藉由互補結合，組合成具活性的 β -半乳糖苷酶，分解培養基上的 X-gal，形成藍色菌落。而當外來基因插入質體中，破壞 α -胜肽片段的形成，則無法合成 β -半乳糖苷酶，便不能分解 X-gal，於是形成了白色菌落。

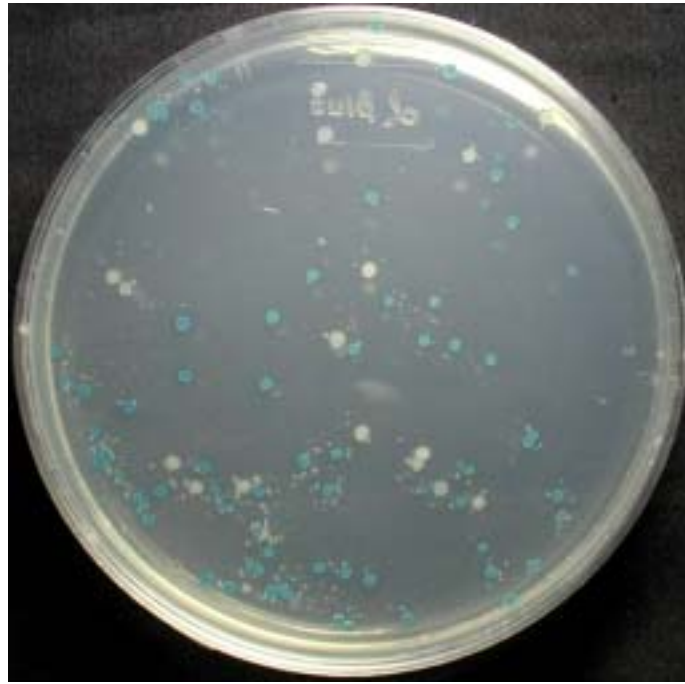
圖十是利用選擇性培養基篩選轉型成功與否的的菌株，白色菌落可能是其內的質體含有牛肉鮮味胜肽核苷酸序列的菌株，而藍色菌落則為其內的質體不含牛肉鮮味胜肽核苷酸序列的菌株。

挑選白色菌落，加以活化後，分別給予編號置於 -80°C 儲存備用。為了更進一步證實白色菌落其內的核苷酸序列確實含有我們插入的 DNA 片段--牛肉鮮味胜肽核苷酸序列，於是將白色菌落經液體培養後，抽取質體進行序列分析。定序所得 DNA 序列 (附錄一) 以 NCBI 網站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上的 BLAST 軟體進行序列比對，結果如圖十一所示，由比對結果可



圖九、構築牛肉鮮味胜肽基因載體製備流程

Fig. 9. Procedure of constructing pEZZ18-BMP



圖十、轉型株之藍白篩選試驗

Fig. 10. Blue / White screen test of transformed *E.coli* JM105

Query: 36 ggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaatfcgctctactttcggcgcctg 95
 |||
 Sbjct: 2953 ggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaatfcgctctactttcggcgcctg 2894

Query: 96 agcatcatttagcttttagcttctgctaaaaggtagcgctttggcttgggtcatcttt 155
 |||
 Sbjct: 2893 agcatcatttagcttttagcttctgctaaaaggtagcgctttggcttgggtcatcttt 2834

Query: 156 taaactttggatgaaggcgtttcgttgttcttcgtttaagtaggtaaatgtaagatctc 215
 |||
 Sbjct: 2833 taaactttggatgaaggcgtttcgttgttcttcgtttaagtaggtaaatgtaagatctc 2774

Query: 216 atagaacgcgttttgttgttctttgttgaatttgttgtctactttcggcgcctgagcatc 275
 |||
 Sbjct: 2773 atagaacgcgttttgttgttctttgttgaatttgttgtctactttcggcgcctgagcatc 2714

Query: 276 atttagcttttagcttctgctaaaaggtagcgctttggcttgggtcatcttttaact 335
 |||
 Sbjct: 2713 atttagcttttagcttctgctaaaaggtagcgctttggcttgggtcatcttttaact 2654

Query: 336 ttggatgaaggcgtttcgttgttcttcgtttaagtaggtaaatgtaagatctcatagaa 395
 |||
 Sbjct: 2653 ttggatgaaggcgtttcgttgttcttcgtttaagtaggtaaatgtaagatctcatagaa 2594

Query: 396 cgcgttttgttgttctttgttgaatttgttgtctacggcttcatcgttgcgcagcatt 455
 |||
 Sbjct: 2593 cgcgttttgttgttctttgttgaatttgttgtctacggcttcatcgttgcgcagcatt 2534

Query: 456 tgcagcagggttacgccaccagatataagtaagtacctaagttacagatgcaatacc 515
 |||
 Sbjct: 2533 tgcagcagggttacgccaccagatataagtaagtacctaagttacagatgcaatacc 2474

Query: 516 tacacctagtttacgaattgaataaatgttttcttttncaanttaatacccctgtatg 575
 |||
 Sbjct: 2473 tacacctagtttacgaattgaataaatgttttcttttcaaattaatacccctgtatg 2414

Query: 576 tatttgtaaagtcataataataacgaattatgtattgcaatactaaaatctatatna 635
 |||
 Sbjct: 2413 tatttgtaaagtcataataataacgaattatgtattgcaatactaaaatctatatna 2354

Query: 636 taa-tnaatttaaaggtaag-tttacaacttataaa--taatat ttgctgaaagaatta 691
 |||
 Sbjct: 2353 taattaaatttaaaggtaagtttacaacttataaaataaatatttgctgaaagaatta 2294

Query: 692 ttcaggaaagtaaaaggcctaaaaccgcaaaatc-cgccatttcggc 737
 |||
 Sbjct: 2293 ttcagg-aagtaaaaggcctaaaaccgcaaaatcacgctatttcggc 2248

圖十一、從基因庫中確認轉型株中分離的質體

Fig. 11. Identification of plasmid isolated from transformant with GeneBank

知白色菌落內的重組質體確實由 pEZZ18 而來，插入的 DNA 片段，如圖十二所示，確實為牛肉鮮味胜肽核苷酸序列。

五、重組牛肉鮮味胜肽之表現與純化

挑選經定序確認後的白色菌落接種於含有 ampicillin 的 LB broth 中培養，每隔一段時間取樣後測定其吸光值變化，繪製成生長曲線與蛋白質濃度的關係。結果如圖十三所示，白色菌落於培養 4.5 小時後吸光值到達 0.6 左右，當培養到 7 小時後菌體生長開始由平穩期進入死滅期，菌體破裂並釋放出許多胞內蛋白，使得相對應於同時間下的蛋白質量劇增；我們便利用此生長曲線與蛋白質濃度的關係，配合基因載體上的 *lac promoter*，於白色菌落培養到 4 小時後添加乳糖類似物 IPTG 誘導 3 小時後，回收重組蛋白。

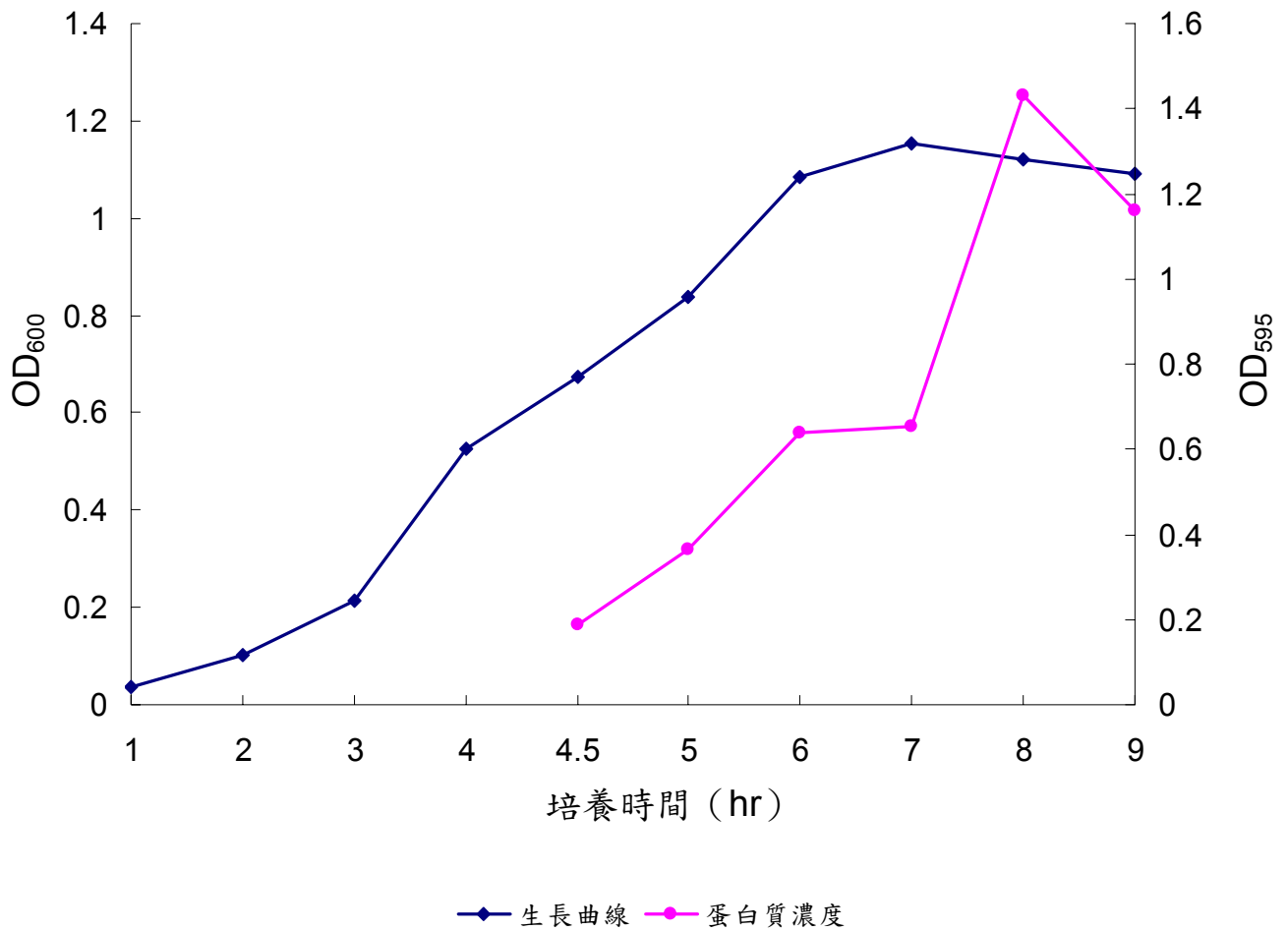
收集經誘導後的菌液，經離心及 sonicator 將細胞震碎後，以重組融合蛋白 N 端所帶的“ZZ”胜肽能與 IgG-Sepharose[®] 親和性膠體專一性鍵結的特性，回收目標蛋白，並輔以 SDS-PAGE 電泳分析其結果。

而此表現質體的設計是希望藉由其上的 signal peptide 將整個重組融合蛋白帶出胞外，以利於我們直接在去除菌體的培養液中回收目標蛋白^(16、17)，但實驗結果顯示，去除菌體的培養液中目標蛋白的含量並不足以讓我們偵測出來，而根據文獻報導⁽²⁰⁾，目標蛋白可能被附著在細胞膜上。於是我們利用 sonicator 將細胞震盪，回收所有的蛋白質，再以 SDS-PAGE 電泳分析，結果如圖十四所示，由圖中可知，經管柱層析後的樣品 (lane 2) 確實可去除絕大部分的非目標蛋白，而在 20 kDa 附近也有與目標

ACCTATTACGCTAAAGATTCCTCATCGCCTTTCATGGT
 —————▶ BMP Sequence ◀—————
CGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTC
—————▶ pEZZ18 Sequence
GCGTCTACTTTCGGCGCCTGAGCATCATTTAGCTTTTT
AGCTTCTGCTAAAAGGTTAGCGCTTTGGCTTGGGTCA
TCTTTTAAACTTTGGATGAAGGCGTTTCGTTGTTCTTC
GTTTAAGTTAGGTAAATGTAAGATCTCATAGAACGCGTT
TTGTTGTTCTTTGTTGAATTTGTTGTCTACTTTCGGCG
CCTGAGCATCATTTAGCTTTTTAGCTTCTGCTAAAAGG
TTAGCGCTTTGGCTTGGGTCATCTTTTAAACTTTGGAT
GAAGGCGTTTCGTTGTTCTTCGTTTAAGTTAGGTAAAT
GTAAGATCTCATAGAACGCGTTTTGTTGTTCTTTGTTG
AATTTGTTGTCTACGGCTTCATCGTGTTGCGCAGCATT
TGCAGCAGGTGTTACGCCACCAGATATAAGTAATGTAC
CTAAAGTTACAGATGCAATACCTACACCTAGTTTACGAA
TTGAATAAATGTTTTCTTTTNCAANTTAATACCCCNTG
TATGTATTTGTAAAGTCATCATAATATAACGAATTATGTAT
TGCAATACTAAAATCTATATTNATAATNAATTTAAAGGTA
AGTTTACAACCTATAAATAATTTTTGCTGAAAGAATTAT
TCAGGAAAGTAAAAGGCCTAAAACCGCAAATCCGCC
ATTCGGCCACCGGCGCCTATTCGTTAATATTGGTCAT
GCCGT

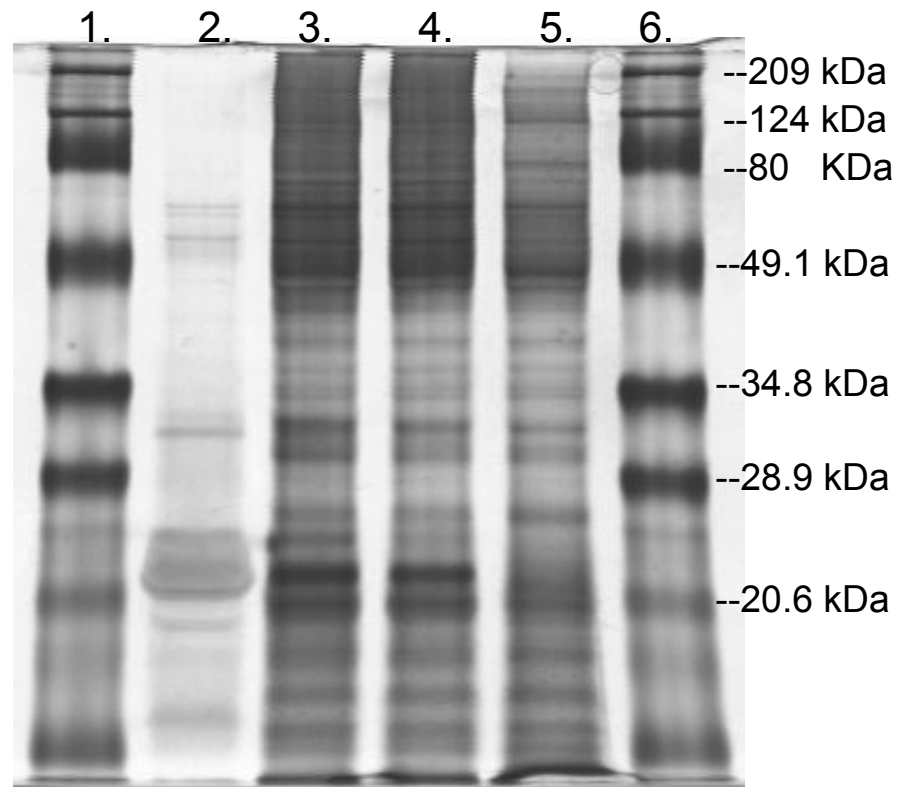
圖十二、牛肉鮮味胜肽核苷酸序列在重組質體 pEZZ18-BMP
內的位置

Fig. 12. Nucleotide sequence of BMP gene in recombinant
pEZZ18-BMP



圖十三、轉型株之生長曲線與蛋白質濃度的關係

Fig. 13. Growth curve and protein secreting in broth of transformed strain



Lane 1 , Lane 6 : Marker

Lane 2 : 管柱層析後的樣品

Lane 3 : 轉型株經 IPTG 誘導後的樣品

Lane 4 : 轉型株不經 IPTG 誘導後的樣品

Lane 5 : 原始菌株

圖十四、以 SDS-PAGE 檢定不同處理條件下之樣品內蛋白質

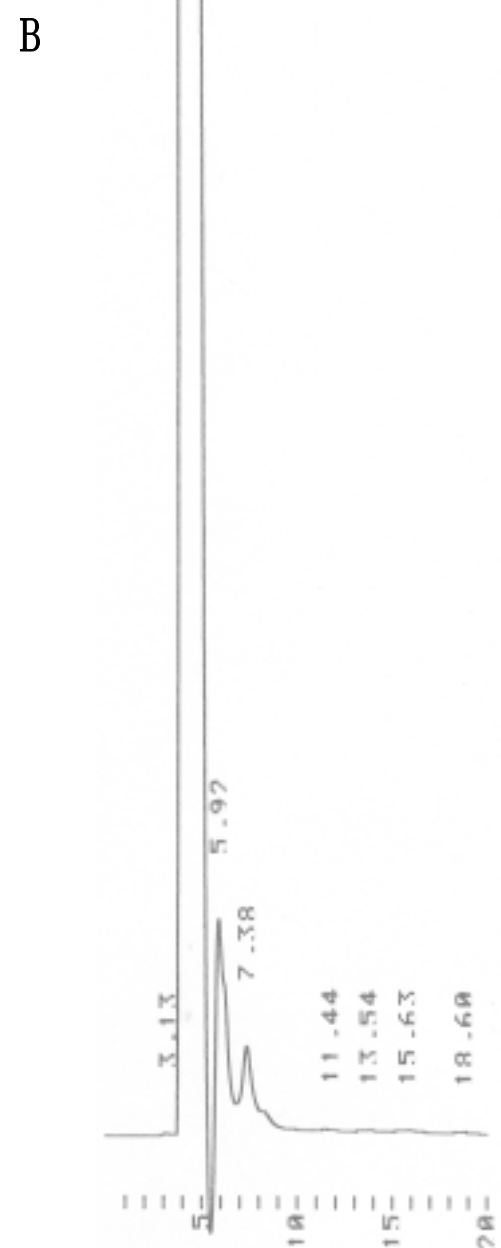
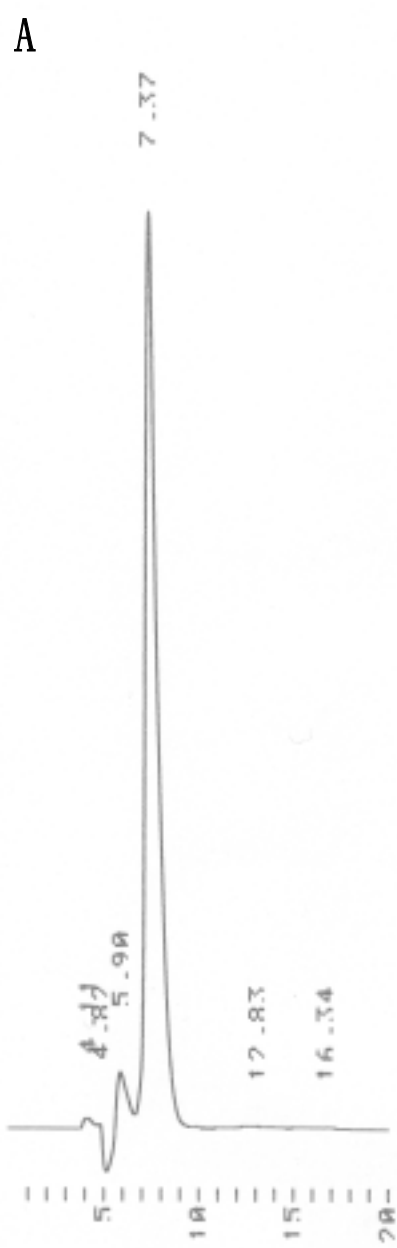
Fig. 14. SDS-PAGE Profile of protein samples with different treatments

蛋白分子量相近的色帶出現。此外比較相同蛋白質濃度下，有經 IPTG 誘導的白色菌落樣品 (lane 3) 在分子量 20 kDa 附近相對於對照組 (lane 4, lane 5) 也有較深的色帶。

大量收集經管柱層析後的融合蛋白後，利用 CNBr 對甲硫氨酸的專一性切割⁽¹¹⁾，將此融合蛋白分成兩部份，再利用 RP-HPLC 將此胜肽混合物分離純化，並輔以胺基酸組成份分析及胺基酸定序，驗證回收物是否為牛肉鮮味胜肽。

由圖十五的高效能液相層析圖可知，我們回收且經 CNBr 作用的目標蛋白，在滯留時間 7.4 分鐘左右有一 peak 與標準品出現的時間相近，由此推論樣品內可能確實含有牛肉鮮味胜肽。調整標準品濃度使其積分面積與樣品相似後，混合標準品與樣品進行共注射分析，其結果如圖十六所示，在滯留時間 7.4 分鐘左右只有一 peak 出現，且其積分面積也有變大。

將滯留時間 7.4 分鐘的 peak 回收後，分別進行胺基酸組成份分析及胺基酸定序。在組成份分析方面，其結果如圖十七所示，雖然出現有些非組成牛肉鮮味胜肽的胺基酸，但其含量均非常低，推斷可能是儀器連續操作過程中前一個樣品殘留的胺基酸或者是利用 HPLC 回收時所造成的污染，而組成牛肉鮮味胜肽的 Lys、Gly、Asp、Glu、Ser、Leu、Ala 七個胺基酸，均有被偵測出來且其積分面積均非常高，而莫耳數比也接近組成牛肉鮮味胜肽胺基酸殘基的莫耳數比；在胺基酸序列分析方面，我們將滯留時間 7.4 分鐘的 peak 回收，經由冷凍乾燥後，以少許緩衝液溶出後轉印到纖維膜上，進行序列分析。結果如圖十八所示，送檢樣品之胺基酸序列確實為組成牛肉鮮味胜肽的胺基酸序列 Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala。

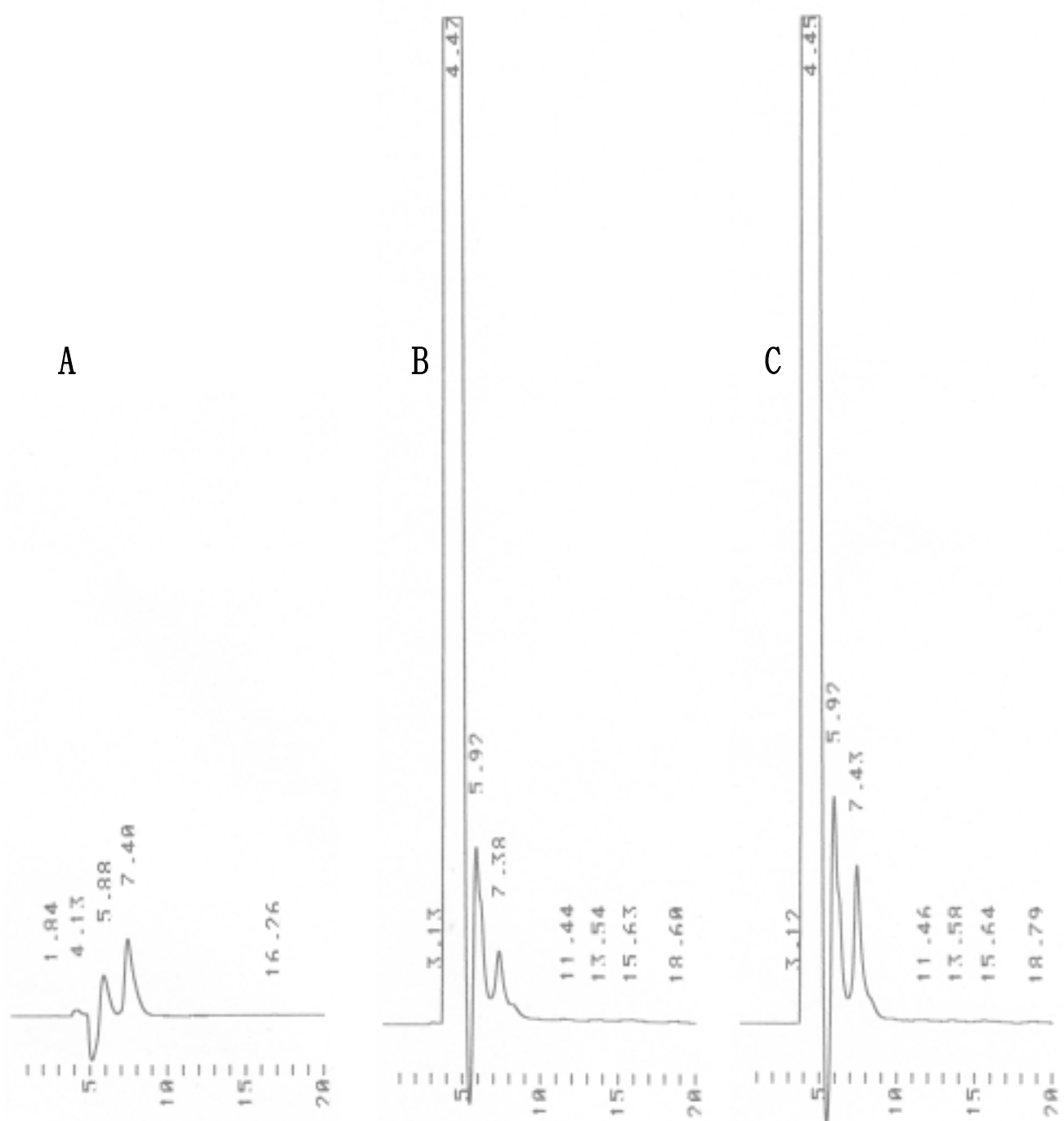


A：標準品

B：樣品

圖十五、牛肉鮮味胜肽之高效能液相層析圖

Fig. 15. Analyzing of BMP with HPLC



A：標準品

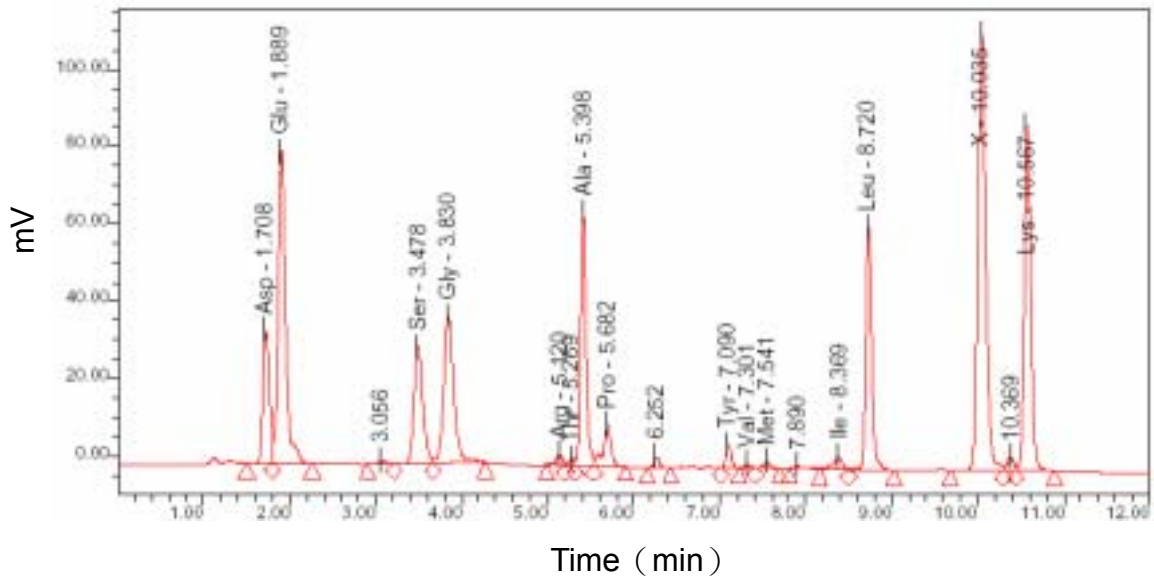
B：樣品

C：共注射

圖十六、鑑定牛肉鮮味胜肽之高效能液相層析圖

Fig. 16. Identification of BMP with HPLC

Auto-Scaled Chromatogram

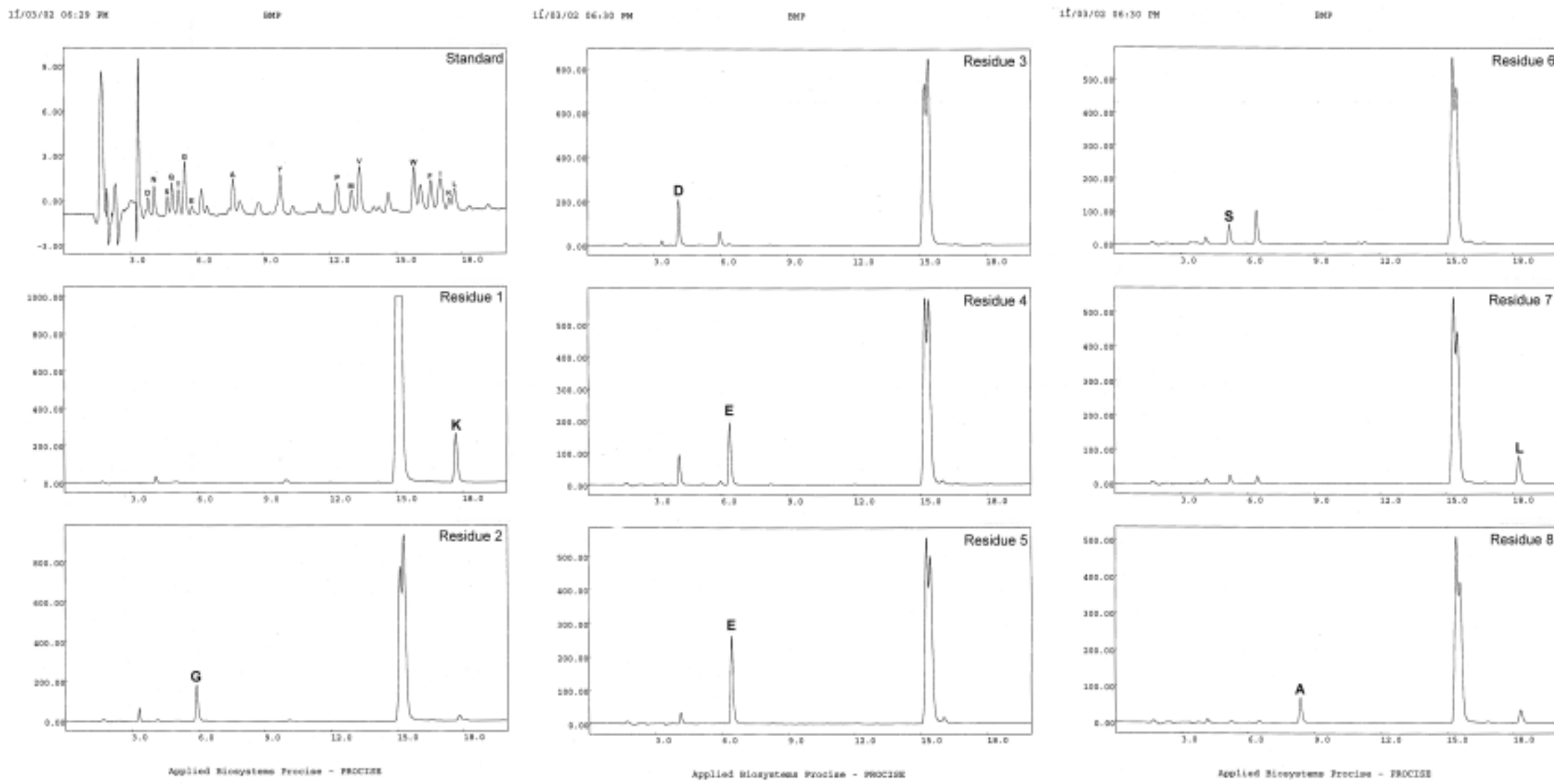


Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Asp	1.708	184594	34268	249.096	pmol
2	Glu	1.889	483365	80986	643.155	pmol
3		3.056	5824	797		
4	Ser	3.478	216383	30234	295.736	pmol
5	Gly	3.830	311133	37988	348.396	pmol
6	His	4.423				
7	Arg	5.120	15152	2746	21.149	pmol
8	Thr	5.269	8995	2002	14.286	pmol
9	Ala	5.398	291725	65913	338.852	pmol
10	Pro	5.682	69537	10834	72.996	pmol
11		6.252	11673	2773		
12	Tyr	7.090	26169	6183	29.846	pmol
13	Val	7.301	6095	1155	10.673	pmol
14	Met	7.541	9088	1737	19.726	pmol
15		7.890	6677	833		
16	Ile	8.369	23914	3410	30.392	pmol
17	Leu	8.720	298594	63119	355.975	pmol
18	Phe	9.555				
19	X	10.035	720252	113284		
20		10.369	20137	3481		
21	Lys	10.567	468824	89596	323.609	pmol

圖十七、樣品之胺基酸組成份分析

Fig. 17. Amino acid composition of cultural BMP



圖十八、樣品之胺基酸序列

Fig. 18. Amino acid sequences of cultural BMP

結 論

1. 本實驗所構築之原核表現系統，由實驗結果可知確實能正確的表現--牛肉鮮味胜肽。
2. 實驗中所使用之宿主細胞，沒有明顯受到基因嵌入而造成生長受阻之影響。
3. 實驗中所設計的牛肉鮮味胜肽基因載體，目前每單位只能生產一分子的牛肉鮮味胜肽。為求達到真正經濟生產及多元化應用之目的地，若能以此基因載體為基礎繼續研究改良，想必能達到最大收益。
4. 根據先前學者發表的報告指出，牛肉鮮味胜肽其鮮味感受會因其上胺基酸組成而變化。若往後實驗中能配合定點突變技術，改變基因載體上的核苷酸組成，進而產生不同胺基酸組成的牛肉鮮味胜肽，便可幫助我們快速有效的了解牛肉鮮味胜肽中每一個胺基酸對鮮味感受的影響。
5. 雖然選用的寄主細胞 *E.coli* JM105 能正確的表現出構築好的牛肉鮮味胜肽基因載體，但其並非 GRAS 級的菌株。若能將寄主細胞改用 GRAS 級的乳酸菌或醋酸菌，則其所生產的牛肉鮮味胜肽想必定能獲得更多人的認同。



參考文獻

1. 姜中人、羅文鑫、沈仲澤、趙雲鵬。2001，建構基因表達質體以應用大腸桿菌來生產重組蛋白質。 化工技術/第九卷第二期，126~152.
2. 武彥文、歐陽杰。2001，氨基酸和肽在食品中的呈味作用。 中國調味品/第一期，21~24.
3. 陳怡弘。1998，胜肽在肉類風味上的貢獻--一條呈味胜肽的發現與研究。 食品工業月刊/第三十卷第六期，48~54.
4. 陳秀蓮。1998，食品增味劑。 食品工業月刊/第三十卷第八期，35~48.
5. 張蓉慈。2000，電轉形法應用在選殖基因於大腸菌及乙醇生產菌 *Zymomonas mobilis*。國立中正大學化學工程研究所，碩士論文。
6. 劉名榜、周學明、李瑞玲。1997，牛肉味胜肽之鮮味呈現效果。 台糖畜產/第三卷第二期：45~54.
7. Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the Quantization of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248~254.
8. Cutts, R. J., Howlin, B. J., Mulholland, F., and Webb, G. A. 1996. Low-Energy Conformations of Delicious Peptide, a Food Flavor. Study by Quenched Molecular Dynamics and NMR. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1409~1415.
9. Ensley, B. D., and Amgen. 1986. Stability of recombinant plasmid in industrial microorganisms. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*. Vol. 4 : 236~277.



10. Fujimaki, M., Arai, S., Yamashita, M., Kato, H., and Noguchi, M. 1973. Taste peptide fractionation from a fish protein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* 37 : 2891~2898.
11. Gross, E., and Witkop, B. 1962. Nonenzymatic Cleavage of Peptide Bonds : The Methionine Residues in Bovine Pancreatic Ribonuclease. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 237, No. 6, P.1856~1860.
12. Hau, J., Cazes, D., and Fay, L. B. 1997. Comprehensive Study of the “Beefy Meaty peptide” . *J. Agric. Food Chem.* 45, 1351~1355.
13. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Giggs, A.D., Bolivar, F. and Boyer, H.W. 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science.* 198:1056-1063.
14. Kato, H., Rhue, M. R., and Nishimura, T. 1989. Role of free amino acids and peptides in food taste. In “Flavor Chemistry : Trends and Developments” R. Teranishi, R. G. Buttery, and F. Shahidi (Ed.,) p. 158~174. ACS, Columbus, OH.
15. Kumar, P. K. R., H-E. Maschke, Friehs, K. and Schugerl, K. 1991. Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactor. *Trends in Biotechnol.* August, 9, 279~284.
16. Lowenadler, B., Jansson, B., Paleus, S., Holmgren, E., Nilsson, B., Moks, T., Palm, G., Josephson, S., Philipson, L., and Uhlen M. 1987. A gene fusion system for generating antibodies against short peptides. *Gene.* 58, 87~97.
17. Lowenadler, B., Jansson, B., Holmgren, E., Moks, T., Elmblad,



- A., Henrichson, C., Jones, T. A., and Uhlen M. 1987.
A synthetic IgG-Binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Engineering*. Vol. 1, No. 2, P.107~113.
18. Labows, J. N., and Cagan, R. H. 1993. Complexity of flavor recognition and transduction. In “Food Flavor and Safety, Molecular Analysis and Design,” A. M. Spanier, H. Okai, and M. Tamura (Eds.,) Ch. 2. P. 10~27. Amer. Chem. Soc., Washington, DC, USA.
19. Maga, J. A. 1983. Flavor potentiators. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 18 : 231~312.
20. Matsumoto, T., Morita, M., Shirai, H., and Kishi, T. 1993. Sandwich Enzyme Immunoassay for Rat Retinol-Binding Protein Using Antibody against Recombinant Antigen and its Application. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*. 49, 164~172.
21. Makrides, S. C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*. 60 (3) , 512~538.
22. Noguchi, M., Aria, S., Yamashita, M., Kato, H., and Fujimaki, M. 1975. Isolation and identification of acidic oligopeptides occurring in a flavor potentiating fraction from a fish protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 23 : 49~53.
23. Nakamura, K. and Okai, H. 1993. Do we recognize sweetness and bitterness at the same receptor ? In “Food Flavor and Safety, Molecular Analysis and Design,” A. M. Spanier, H. Okai, and M. Tamura (Eds.,) Ch. 3. P. 28~35. Amer. Chem. Soc., Washington, DC, USA.



24. Spanier, A. M., Miller, J. A., and Bland, J. M. 1992.
Lipid oxidation : Effect on meat proteins. In *Lipid Oxidation in Foods*, A.J. St. Angelo (Ed.) , p.104~119. ACS Books, Inc, Columbus, OH.
25. Spanier, A. M., and Miller, J. A. 1993. Role of proteins and peptides in meat flavor. In “Food Flavor and Safety, Molecular Analysis and Design,” A. M. Spanier, H. Okai, and M. Tamura (Eds.,) Ch. 6. P. 78~97. Amer. Chem. Soc., Washington, DC, USA.
26. Spanier, A. M., Miller, J. A., and Bland, J. M. The Contribution of a naturally occurring peptide to beef flavor. *Abstracts of paper*, 210th National Meeting of the American Chemical Society, Chicago, August 20~24, 1995 ; American Chemical Society : Washington, DC. 1995 ; AGFD 0215.
27. Spanier, A. M., Bland, J. M., Miller, J. A., Glinka, J., Wasz, W., and Duggins, T. 1995. BMP : A flavor enhancing peptide found naturally in beef. Its chemical synthesis, descriptive sensory analysis, and some factors affecting its usefulness. In *Food Flavor : Generation, Analysis and process Influence*, G. Charalambous (Ed.) , p. 1365~1378. Elsevier Science B.V., New York.
28. Spanier, A. M., Miller, J. A., and Bland, J. M. 1996. Contribution of a naturally occurring, nonvolatile peptide to beef flavor. In “The Contribution of Low-and Non-Volatile Materials to the Flavor of Foods,” W. Pickenhagen, C.-T. Ho, and A. M. Spanier (Eds.,) p. 47~57. Allured Publ. Co., Carol Stream, IL,USA.

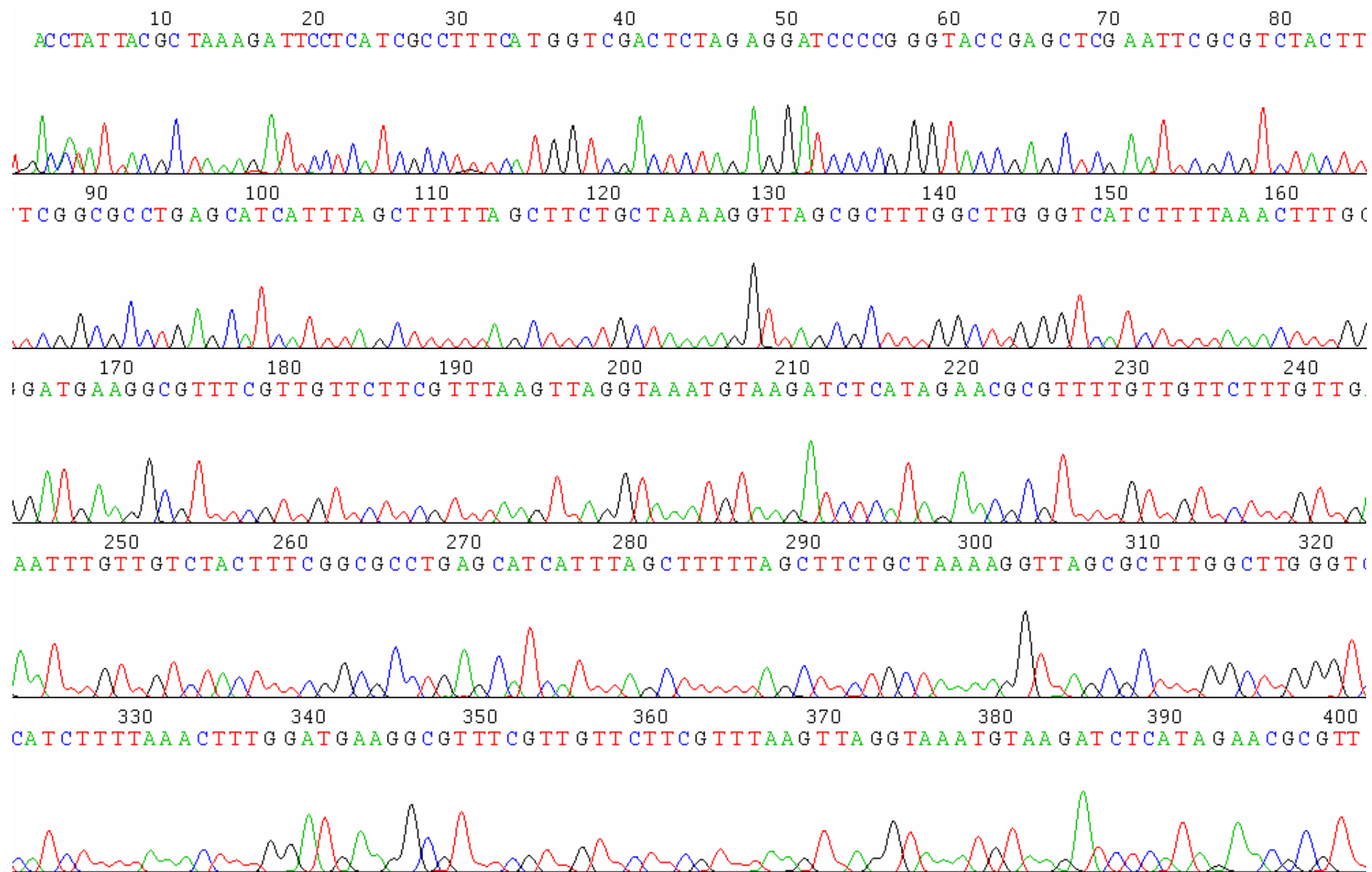


29. Sambrook, Joseph., and Russell, David W. 2001. Molecular Cloning 3rd ed.
30. Tamura, M., Nakatsuka T., Tada, M., Kawasaki, Y., Kikuchi, E., and Okai, H. 1989. The Relationship between Taste and Primary Structure of “Delicious Peptide” (Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala) from Beef Soup. *Agric. Biol. Chem.* 53 (2) , 319~325.
31. Wang, K., Maga, J. A., and Bechtel, P. J. 1995. Stability of beefy meaty peptide to pasteurization and sterilization temperatures. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* 28 : 539~542.
32. Wang, K., Maga, J. A., and Bechtel, P. J. 1996. Taste Properties and Synergisms of Beefy Meaty Peptide. *Journal of Food Science.* Vol. 61, No. 4, 837~839.
33. Wallace H. Greene, Steven T. Grubbs, Leon N.D. Potgieter. 2001. Immunoblot analysis of cyanogens bromide-cleaved *Moraxella bovis* pilin reveals presence of shared antigenic determinants on pili from heterologous strains. *Veterinary Microbiology.* Vol. 80, No. 365-372.
34. Yoshio Yamasaki and Kazuyuki Maekawa. 1978. A Peptide with Delicious Taste. *Agric. Biol. Chem.* 42 (9) , 1761~1765.
35. Yoshio Yamasaki and Kazuyuki Maekawa. 1980. Synthesis of a Peptide with Delicious Taste. *Agric. Biol. Chem.* 44(1) , 93~97.
36. Yamaguchi, S. 1991. Basic properties of umami and effects on humans. *Physiology & Behavior.* 49 : 833~841.

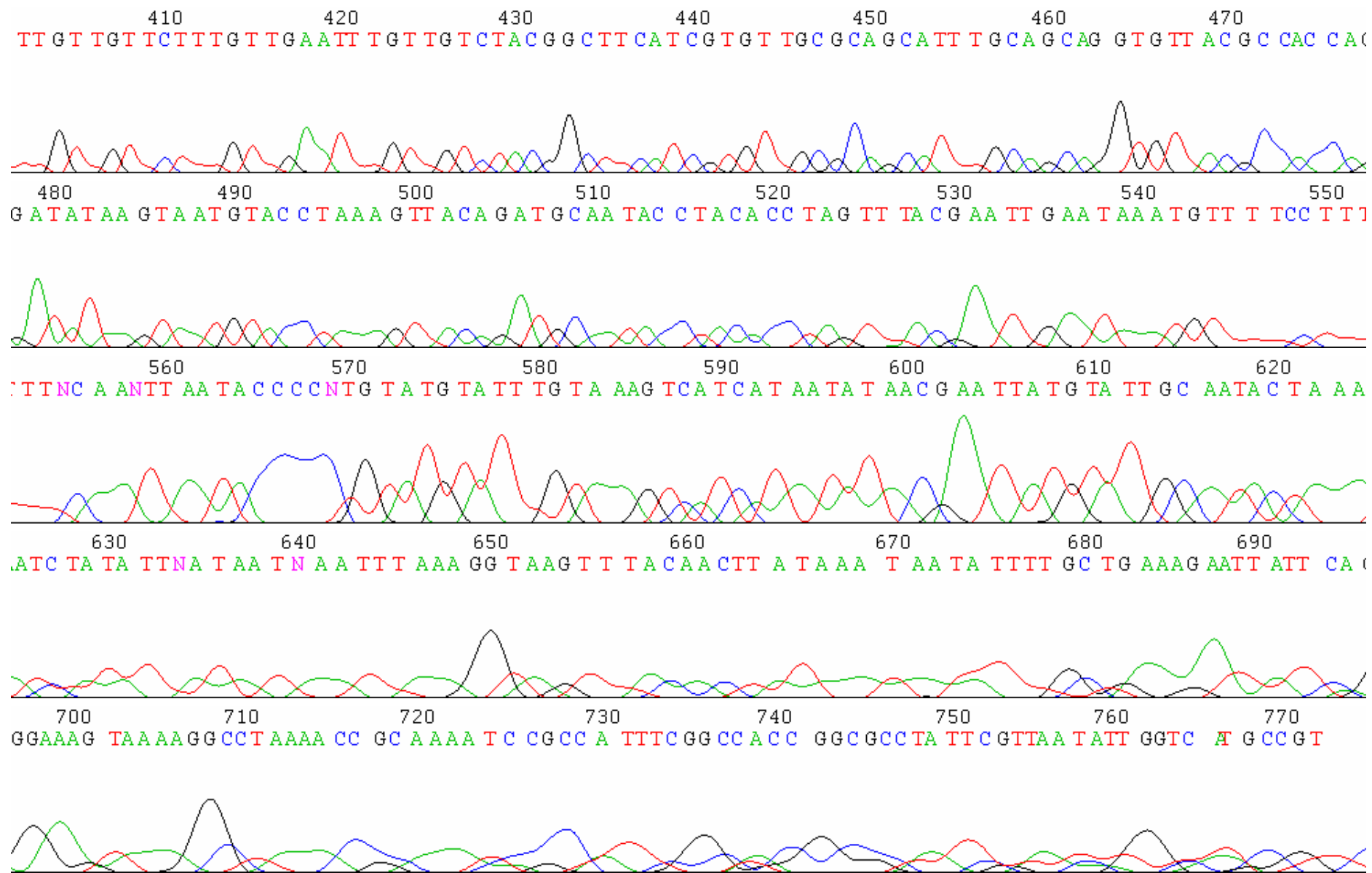


1 ACCTATTACGCTAAAGATTCCATCGCCTTTCATGGTCGACTCTAGAGG
51 ATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCGTCTACTTTCGGCGCCTGAGCAT
101 CATTTAGCTTTTTAGCTTCTGCTAAAAGGTTAGCGCTTTGGCTTGGGTCA
151 TCTTTTAAACTTTGGATGAAGGCGTTTCGTTGTTCTTCGTTTAAGTTAGG
201 TAAATGTAAGATCTCATAGAACGCGTTTTGTTGTTCTTTGTTGAATTTGT
251 TGTCTACTTTCGGCGCCTGAGCATCATTTAGCTTTTTAGCTTCTGCTAAA
301 AGGTTAGCGCTTTGGCTTGGGTCATCTTTTAAACTTTGGATGAAGGCGTT
351 TCGTTGTTCTTCGTTTAAGTTAGGTAAATGTAAGATCTCATAGAACGCGT
401 TTTGTTGTTCTTTGTTGAATTTGTTGTCTACGGCTTCATCGTGTTGCGCA
451 GCATTTGCAGCAGGTGTTACGCCACCAGATATAAGTAATGTACCTAAAGT
501 TACAGATGCAATACCTACACCTAGTTTACGAATTGAATAAATGTTTTCT
551 TTTNCAANTTAATACCCCNCTGTATGTATTTGTAAAGTCATCATAATATAA
601 CGAATTATGTATTGCAATACTAAAATCTATATTNATAATNAATTTAAAGG
651 TAAGTTTACAACCTTATAAATAATTTTTGCTGAAAGAATTATTCAGGAAA
701 GTAAAAGGCCTAAAACCGCAAATCCGCCATTTTCGGCCACCGGCGCCTAT
751 TCGTTAATATTGGTCATGCCGT

附錄一、轉型株中質體之 DNA 定序結果



附錄一、轉型株中質體之 DNA 定序結果--DNA 定序圖譜



附錄一、轉型株中質體之 DNA 定序結果--DNA 定序圖譜