

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 克隆斑馬魚似 hepacidine 抗菌胜?家族之基因
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 范文菁
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-216-001-B
研究期間： 99年07月01日至100年02月28日止，計8個月
指導教授： 張慧玫

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中華大學生物資訊學系

中華民國 100年03月29日

行政院國家科學委員會補助大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

計畫名稱：克隆斑馬魚似 hepcidin 抗菌胜肽家族之基因 Cloning of zebrafish hepcidin antimicrobial peptide gene family member

專題組員：范文菁、劉玉婷、莊晏熒、洪哲楷
指導教授：張慧攻老師

1. 摘要

抗菌胜肽是作為我們的主要研究目標，由於抗菌胜肽種類涵蓋的範圍非常廣大，所以從中我們挑選 hepcidin 基因作為我們主要研究的主題，因斑馬魚 hepcidin 基因一型已被克隆，故我們先將斑馬魚 hepcidin 以 PCR 技術克隆出來，找尋更多 hepcidin 其它基因形式來研究 hepcidin 功能的關係。我們已經成功取得斑馬魚 hepcidin N 端小片段可隨時分析其抑制細菌之功能的強弱，將有利於瀕臨絕種的水生生物、養殖漁業和醫學上之貢獻。

2. 簡介

(一) 抗菌胜肽介紹

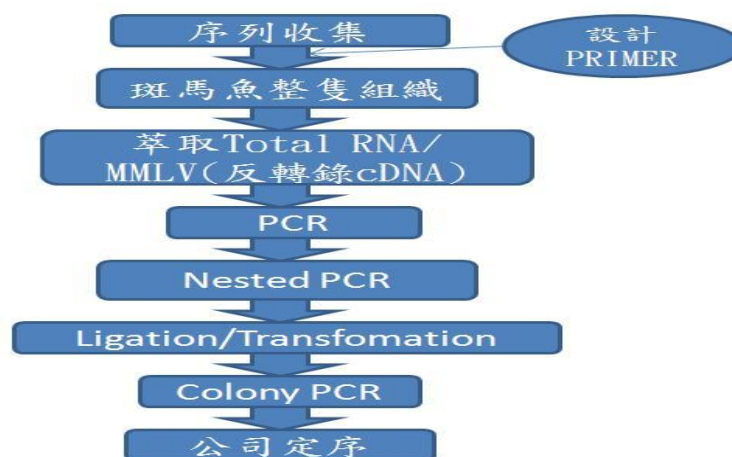
抗菌胜肽也稱為抗微生物胜肽 (Antimicrobial Peptides, AMPs)。長度大約是由 10~80 個不等的胺基酸所組成是指具有殺菌功效的天然胜肽，許多生物體內都可以產生抗菌胜肽作為生物體防禦的最前線，主要功能為滲透細菌之細胞膜、穿孔、干擾細菌增殖與促進傷口癒合等功能[1]。對抗體內的有害物質及微生物，其機轉是鑲嵌到細菌細胞膜中破壞細菌滲透壓平衡，造成病原體的死亡。抗菌胜肽的種類繁雜，hepcidin 基因其獨特的結構使得它在抗菌胜肽中自成一個家族。斑馬魚 hepcidin 基因組已被廣泛發現且資料也較齊全，故選用斑馬魚為我們實驗用魚來研究不同變化型 hepcidin 結構與功能的關係。

(二) 目標

我們希望對已被克隆斑馬魚 hepcidin 做功能分析，在實驗中克隆出更多斑馬魚的類似 hepcidin 家族基因成員，能找出比原版更強殺菌功能的 hepcidin 基因。即我們將原版做人工突變或從斑馬魚直接拿其它類似家族基因做改版。

3. 專題進行方式：主要分為兩流程

(一)



圖一、第一流程

●材料收集、Primer 設計

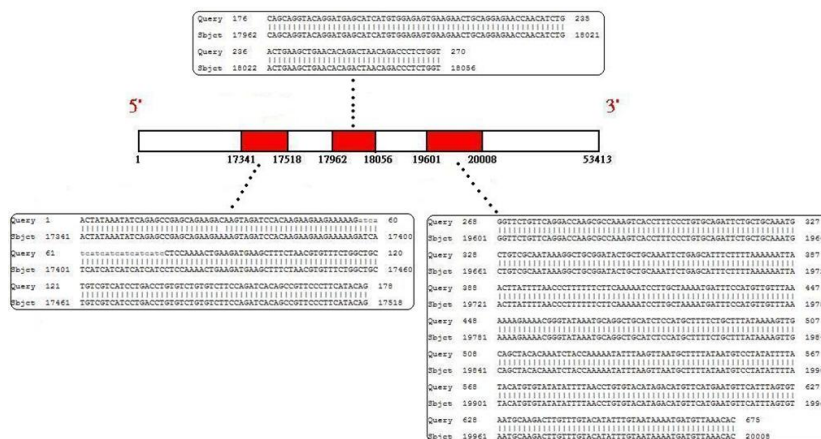
主要實驗材料—斑馬魚，我們到水族館直接購買；接著到NCBI[2]去收集所有斑馬魚hepcidin基因mRNA序列資料(mRNA 11筆、genomic DNA 4筆)。

表一、NCBI mRNA 資料

Number	Gene Name	Source	Bps
AY130989	Hepcidin antimicrobial peptide precursor(hamp)	Danio rerio(zebrafish)	695
AY258137	Hepcidin antimicrobial peptide precursor(hamp)	Danio rerio(zebrafish)	676
BC163916	Hepcidin antimicrobial peptide 1	Danio rerio(zebrafish)	414
NM_205583	Hepcidin antimicrobial peptide 1	Danio rerio(zebrafish)	695
BC162321	Hepcidin antimicrobial peptide 1	Danio rerio(zebrafish)	465
BC162314	Hepcidin antimicrobial peptide 1	Danio rerio(zebrafish)	463
EU047750	Preprohepcidin	Danio rerio(zebrafish)	276
AY363454	Preprohepcidin(hamp2)	Danio rerio(zebrafish)	686
NM_001023579	Preprohepcidin_2	Danio rerio(zebrafish)	641
AY363452	Preprohepcidin1	Danio rerio(zebrafish)	671
AY363453	Preprohepcidin2	Danio rerio(zebrafish)	641

統整結果出一張表格並開始利用NCBI的BLAST網站篩選出一個序列範圍最廣與最長的mRNA(AY130989)。

AY130989與基因組相對位置圖



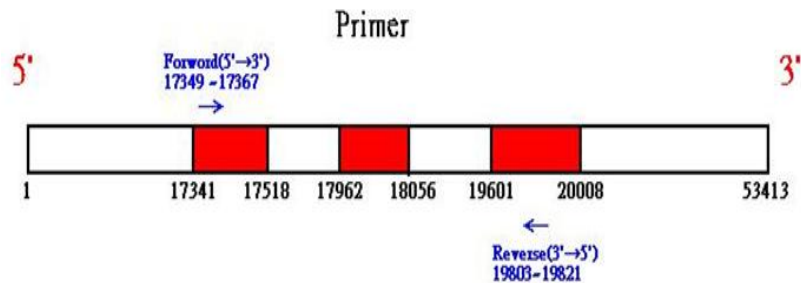
圖二：AY130989序列跟斑馬魚基因組相對圖

接著運用序列設計出primer(Primer Designer Ver 4.1軟體)要夾出的基因全長片段。設計 Primer 原則：

◎字數在 17~23 鹼基。GC% 盡量維持在 50%。TM 值不要超過 60 度。△TM 值不要超過 0.5 度。Primer 的 3'端盡量以 GC 結尾。Homo-dimer 和 Hetero-dimer 的 H-Bond 連續不能超過 3 個鍵。Hairpin 的 H-Bond 連續不能超過 3 個鍵。

表二、Primer 設計結果圖

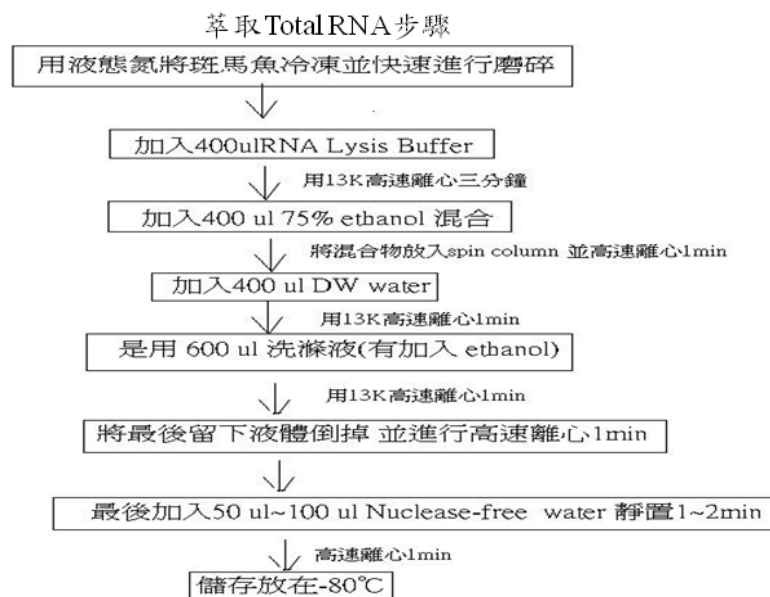
Primer名稱	序列	GC%	Tm	起/終點	PCR長度
zebrafish hepcidin-1F	5' TATCAGAGCCGAGCAGAA 3'	55	66	9~26	479
zebrafish hepcidin-1R	3' TCCGACGTAGAGGTACGA 5'	50	66	470~487	



圖三、Primer 在斑馬魚上的位置

●萃取 TotalRNA

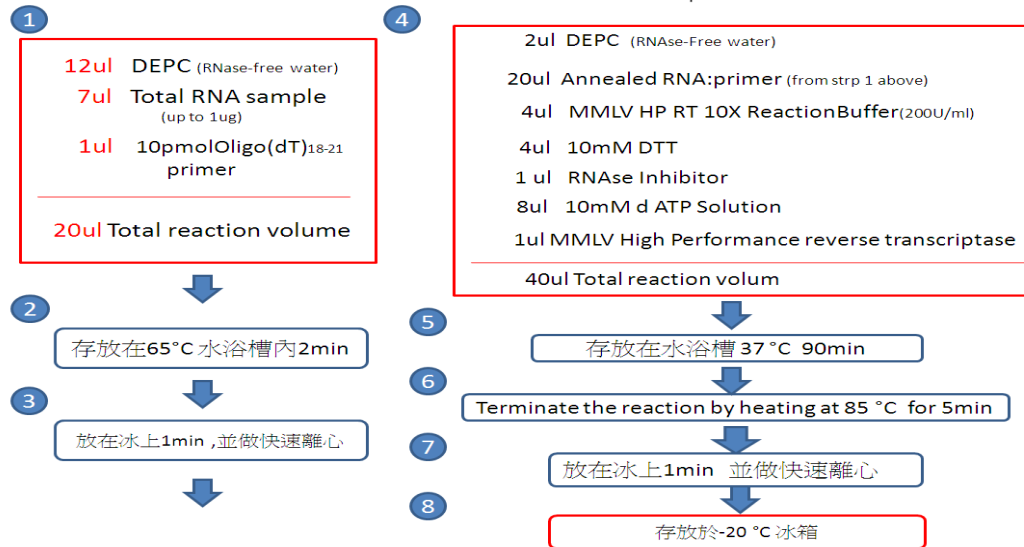
取全魚肉組織 0.7g，放入含 400ul Lysis buffer，用 13k 高速離心 3min。加入 400μl 75% 乙醇均勻混合。再加入 400μl DW Buffer，高速離心一分鐘，廢液倒掉。再用 600μl 洗滌劑(有加入乙醇)在高速離心一分鐘，將留下的廢液倒掉，在高速離心去除乙醇，以 75μl Nuclease-Free 水洗滌靜置 1 分鐘，再離心洗出 RNA，存放 -80°C。



圖四：萃取 Total RNA

Reverse Transcription(反轉錄 cDNA)

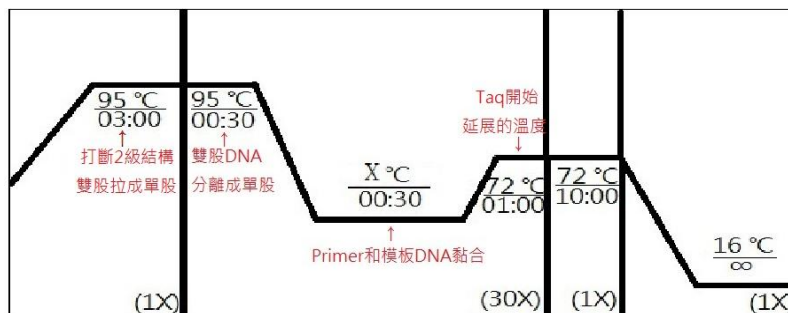
將 12μl DEPC(RNase-free water) +7μl Total RNA sample+1μl 10 pmol Oligo(dT)18-21 primer 混合後在存放在 65°C 2 分鐘後冰上 1 分鐘，並做快速離心 (15rpm)，再將 2μl DEPC+20μl Annealed RNA:primer (from strplabove) +4μlMMLVHP-RT10XBuffer(200U/ml)+4μl10mMDTT+1μlRNaseInhibitor+8μl 10mM dATP Solution+1μlMMLVHigh Performance reverse transcriptase 混合後存放在 37°C 90 分鐘、85°C 5 分鐘，放在冰上 1 分鐘，最後存於-20°C 冰箱。



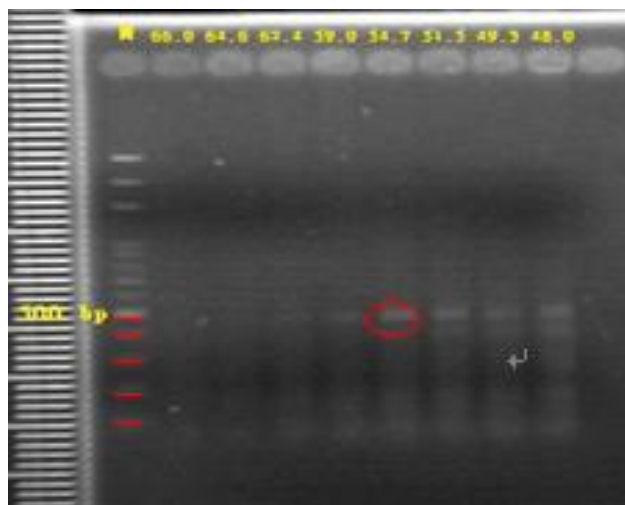
圖五：Reverse Transcription 反轉錄

●**聚合酶連鎖反應 PCR**

將兩端 Primer 各取 1 μ l、Taq 1 μ l、10X buffer 5 μ l、dNTP 1 μ l(20 μ M)、ddH₂O 36 μ l、cDNA template 5 μ l 最後體積為 50 μ l。程式如(圖六)取 5 μ l PCR 產物跑(2%電泳膠、marker 為 100bp)電泳，查看是否有符合 hepcidin 預計長度，測試 Primer 最佳化溫度。



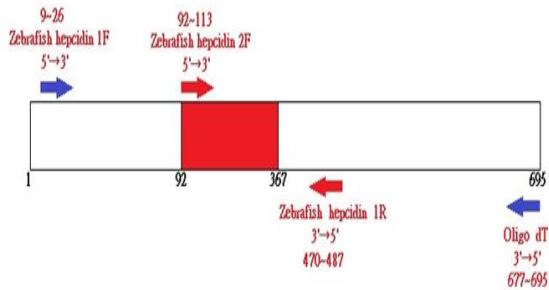
圖六、PCR 反應的循環過程



圖七、PCR 電泳圖

●**Nested PCR(巢式 PCR)**

以一般 PCR 方式先取外圍 Primer(1F 和 Oligo dT) (圖八)對做 PCR 反應。再取部分產物以內縮 primer(2F 和 1R) (圖八)對再做第二次 PCR 反應，目的是夾出更準確的 hepcidin 長度減低在 PCR 上擴增的背景值或雜訊



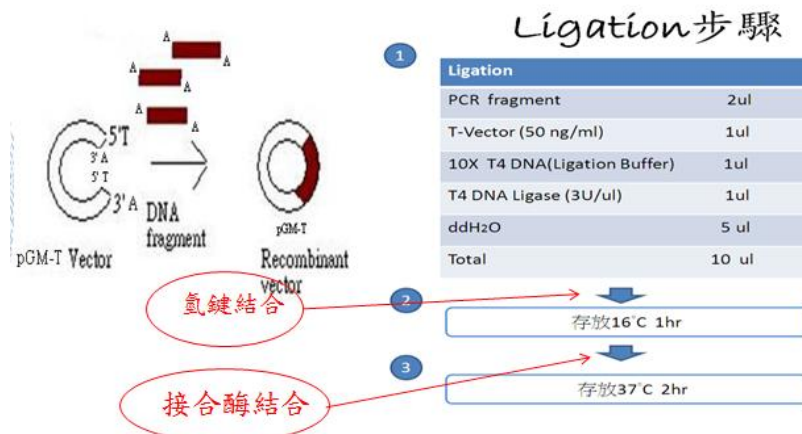
圖八、Nested PCR 的 primer 位置圖



圖九、Nested PCR 電泳圖

●接合反應 Ligation

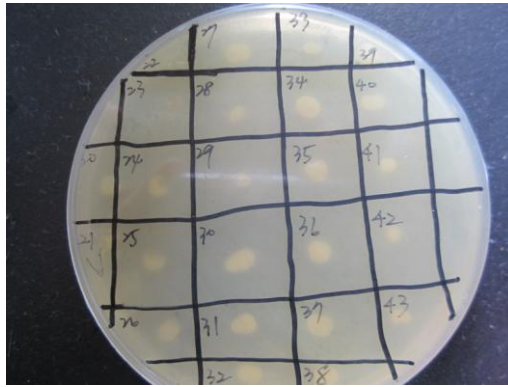
將 PCR 產物的 DNA 片段接入 pGM-T 載體，接著將藥劑依序加到 eppendorf 中均勻混合後，放入 16°C 中 1 小時使 T=A 端氫鍵形成，再放入 37°C 中 2 小時使 Ligase 接合酶接合成載體，接合成功的選殖載體，以供轉殖。



圖十：Ligation

轉殖作用 Transformation

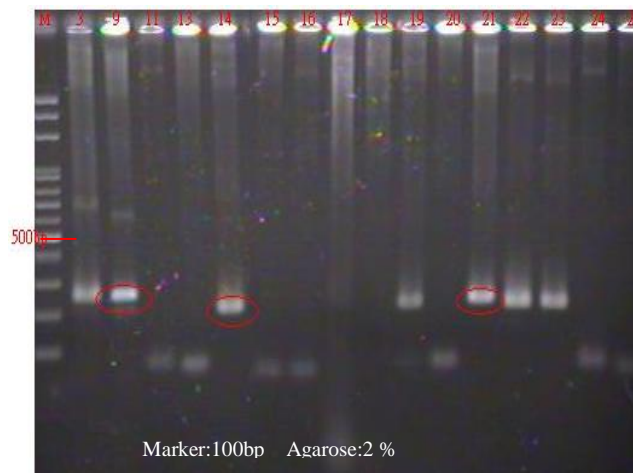
將 Ligation 產物取 2μl 加入 100μl competent cell(勝任細胞)混合後，放置冰上 10 分鐘；接著 heat shock 42°C 30 秒，立刻放回冰上；加入 1000μl SOC 培養液，放入培養箱 37°C 1 小時，培養後取 100μl 均勻抹在 LB/Ampicillin 的培養盤，37°C 培養 16 小時，觀察 Colony 菌落。



圖十一、 Transformation 菌落保存盤

●**Colony PCR(菌落 PCR)**

為了大量快速篩選 transformation 後的單一菌落，以菌落為 Template 做 PCR；滅菌過牙籤挑起菌落放入 PCR 反應液(兩端 Primer 各取 $1\mu\text{l}$ 、 5X Taq Master Mix $10\mu\text{l}$ 、 ddH_2O $38\mu\text{l}$ 讓 Total 體積為 $50\mu\text{l}$)中快速攪入中做 PCR。即先以混合菌分組快篩，看此菌落是否有在接合反應中接入載體，如果是對的再以單菌落做一次分離確認，若確認符合我們預計長度的單一菌落後，即可送公司定序。



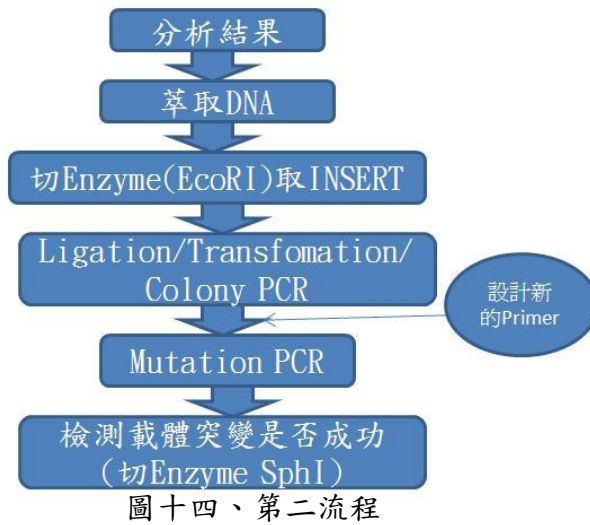
圖十二、 Colony PCR 電泳圖

●**公司定序[7]**



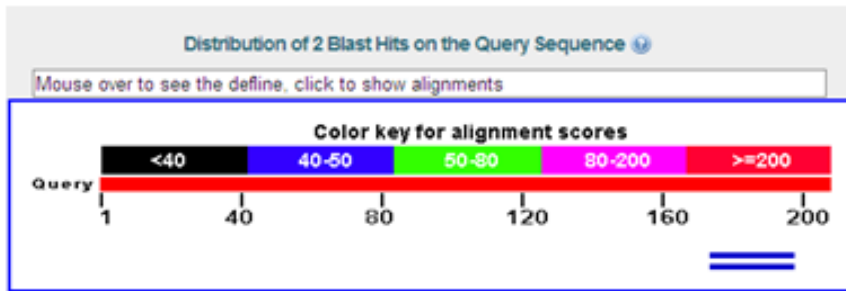
圖十三、 chromas 讀序軟體

(二)

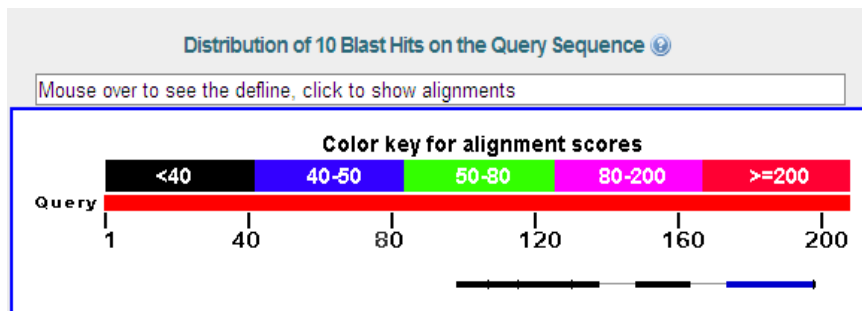


●分析定序結果

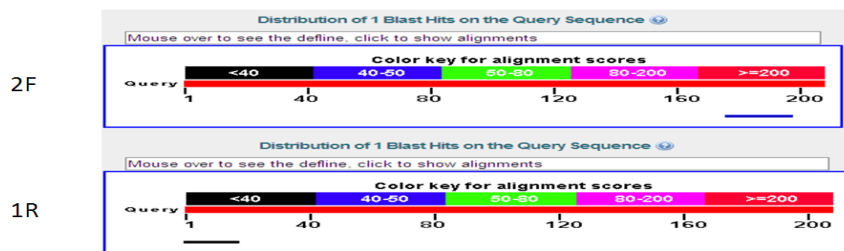
步驟 1.將公司送回的序列在 NCBI 與所有斑馬魚基因比對→步驟 2.將 insert 的序列和 AY130989 做 blast two 的比對→步驟 3.將 insert 的序列和我們的 Primer 做比對→步驟 4.序列兩兩比對→步驟 5.WORKBENCH 翻譯 ORF ;最後確認定序的 insert 跟原版的 hepcidin 基因沒有完全相似。



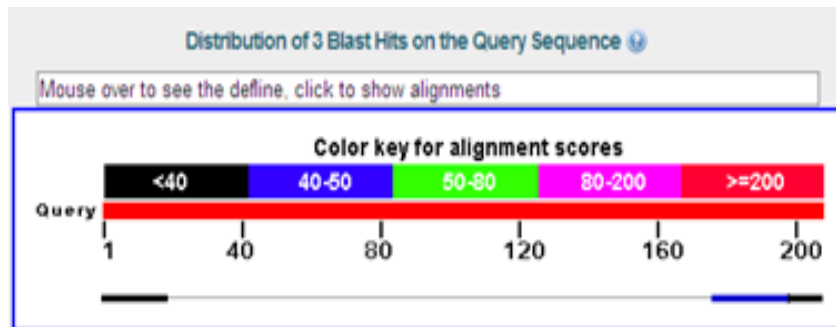
圖十五、insert 跟所有斑馬魚基因比對



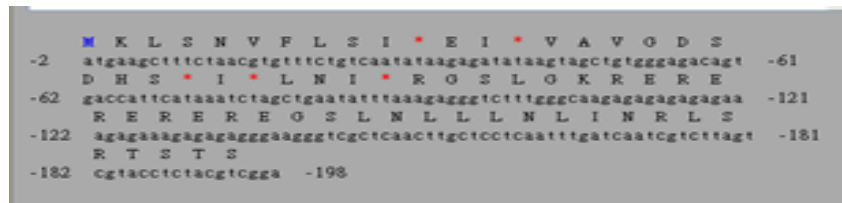
圖十六、insert 跟 hepcidin 比對



圖十七、insert 與 primer 比對



圖十八、序列兩兩比對

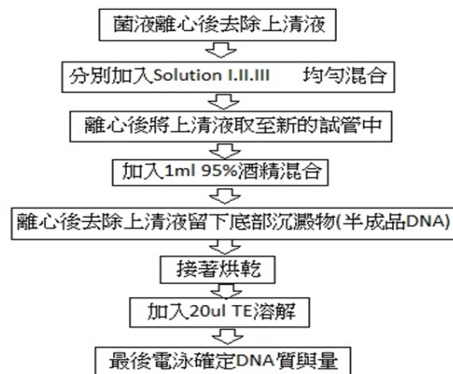


圖十九、ORF

●萃取 DNA

菌液離心，加入 Solution I(50mM 葡萄糖+25mM Tris 緩衝液，pH8.6+10mM EDTA，Solution II(0.2N NaOH+1.0% SDS，Solution III(3M 醋酸鈉+5M 醋酸)，均勻混合後離心 3 分鐘。將上清液加入 1mL 95%酒精混合後快速離心。離心後去除上清液留下底部的沉澱物(半成品 DNA)，加入 10μl TE 回溶備用。

材料		
培養液	1管	
Solution I	100ul	50mM 葡萄糖 25mM Tris緩衝液 10mM EDTA
Solution II	200ul	0.2N NaOH 1.0% SDS
Solution III	150ul	3M 醋酸鈉 5M 醋酸
TE	20ul	10mM Tris緩衝液 1mM EDTA



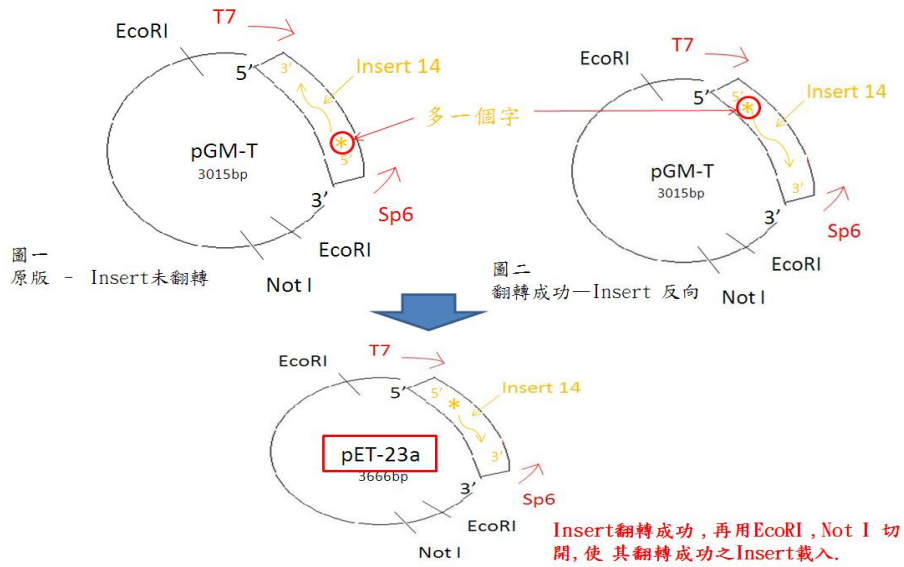
圖二十：萃取 DNA 步驟

●切酵素 ECORI 取 insert

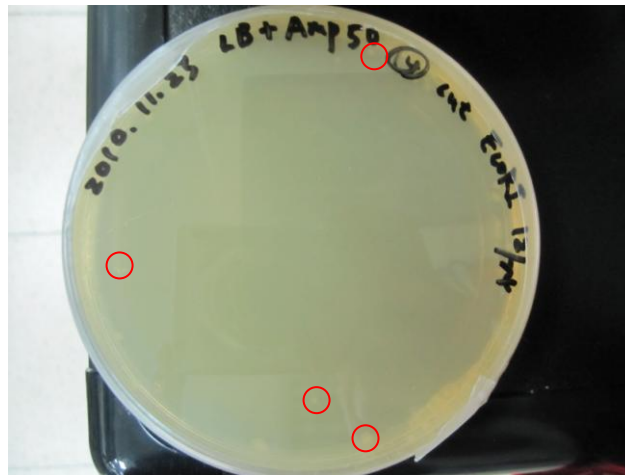
萃取 DNA 回溶到 500μl 加入 1μl RNase 放入 37°C 2hr 再加入 phenol: chloroform 混合離心，取上清液沉澱回溶至 100μl 備用;取 2μl 的 DNA + 2μl 10X ECORI buffer+ 1μl ECORI Enzyme+ 15μl ddH₂O(uv)混合，放入 37°C 水浴槽 2 小時，目的是要把 insert 取出再接合至載體。

●Insert 反轉技術(Ligation /Transformation/Colony PCR)

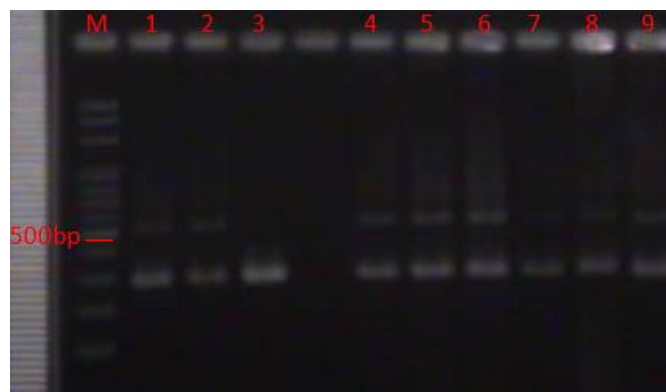
取切過 ECORI 的 DNA 5μl 加入藥劑接著放入 16°C 中 1 小時再放入 37°C 水浴槽 2 小時，接著做 Transformation 塗盤培養。以 Colony PCR(用正向或反向 primer)確認 insert 是否有翻面接合成功。



圖二十一：翻轉 Insert 原因



圖二十二、切 ECORI Plate

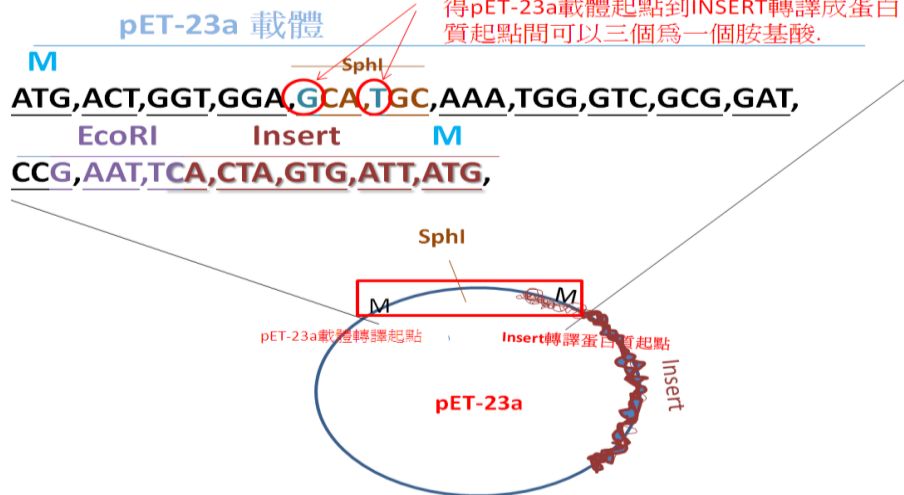


圖二十三、重新接上載體的電泳圖

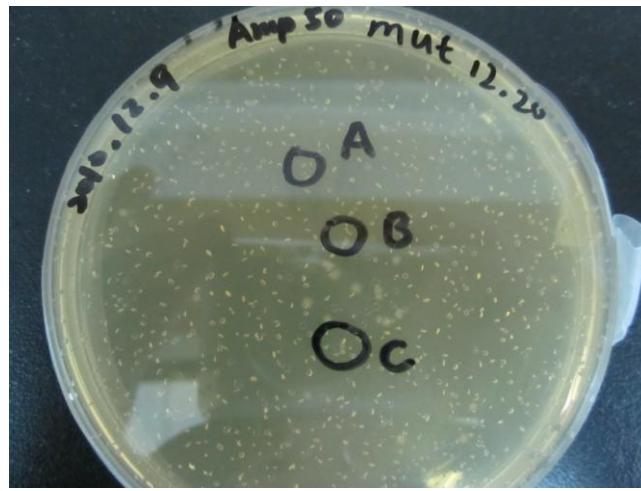
●**Mutation PCR(突變 PCR)**

以載體上常用的 Primer(T7 和 T7 terminator)為架構加入突變 primer(mut-pet)以訂正 insert 轉譯框架，均勻混和後一起做 PCR 反應，目的是用人工的方式強制讓載體改版(加兩個鹼基並產生新的 SphI 切點)，以利將來把 insert 轉譯。

pET-23a 改版



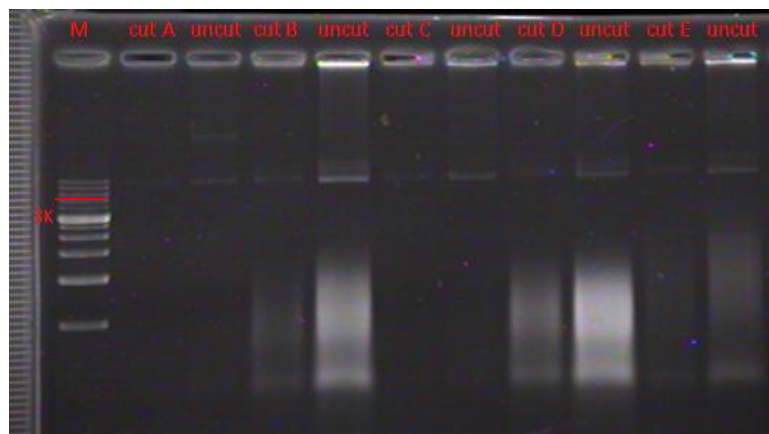
圖二十四：Mutation 原因



圖二十五、Mutation Plate

●檢測載體突變是否成功(切酵素 Sph I)

將突變載體 colony DNA 萃取出來，以新的 SphI 酵素切割。



Marker:100bp Agarose:2

圖二十六、切 SphI 酵素

4.主要成果

我們克隆出的 hepcidin 基因經過 Blast 比對，發現我們克隆的 Insert 和文獻中的 hepcidin 基因，屬非全長的相似片段，我們從 pGM-T 載體以第五個 ORF 將 insert 轉接入蛋白質表達載體 pET-23a 讓克隆的 Insert 表達在大腸菌中，以便做抗菌肽應有的抑菌測試。

5.評估與展望

原本預期的目標是要找出 hepcidin 的完整基因後再做改版，並測試改版基因之殺細菌功能，比尋找比原版的殺菌力更強，但由於經驗不足，導致第一次克隆定序後的結果並不符合 hepcidin 的基因序列，Primer 黏上了其他不相干的碎片，接著馬上再做第二次的菌種篩選，再送定序，結果比對出來的資料顯示就與原版的 hepcidin 的基因以 N 端相似，最後希望能夠讓我們 Clone 出來的類 hepcidin 基因可以在大腸菌身上表達出殺細菌的功能，這樣更可以證明我們的實驗是有效的。

因為時間關係，並未在時間內完成，故以下為我們對此實驗所設定的虛擬步驟，希望能提供將來對此實驗有興趣的研究者一個參考的依據，步驟如下：

●切酵素 EcoRI/NotI 取 insert

萃取 DNA 回溶到 500 μ l 加入 1 μ l RNase 放入 37 $^{\circ}$ C 2hr 再加入 phenol: chlorlform 混合離心，取上清液沉澱回溶至 100 μ l 備用；取 2 μ l 的 DNA + 2 μ l 10X ECORI buffer+ 1 μ l ECORI Enzyme+ 15 μ l ddH₂O(uv)混合，放入 37 $^{\circ}$ C 水浴槽 2 小時，目的是要把 insert 取出再接合至載體。

●利用電泳膠層化再接合至載體

●切酵素 SphI

萃取 DNA 回溶到 500 μ l 加入 1 μ l RNase 放入 37 $^{\circ}$ C 2hr 再加入 phenol: chlorofom 混合離心，取上清液沉澱回溶至 100 μ l 備用；取 2 μ l 的 DNA + 2 μ l 10X SphI buffer+ 1 μ l SphI Enzyme+ 15 μ l ddH₂O(uv)混合，放入 37 $^{\circ}$ C 水浴槽 2 小時，目的是要把 insert 取出再接合至載體。

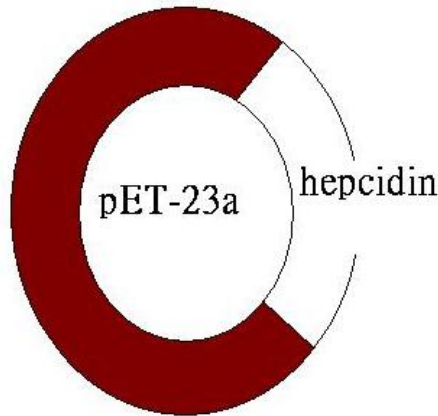
●利用電泳膠層化再接合至載體

●接合反應 Ligation

將 PCR 產物的 DNA 片段接入 pET-23a 載體，接著將藥劑依序加到 eppendorf 中均勻混合後，放入 16 $^{\circ}$ C 中 1 小時使 T=A 端氫鍵形成，再放入 37 $^{\circ}$ C 中 2 小時使 Ligase 接合酶接合成載體，接合成功的選殖載體，以供轉殖。

●轉殖作用 Transformation

將 Ligation 產物取 2 μ l 加入 100 μ l competent cell(勝任細胞)混合後，放置冰上 10 分鐘；接著 heat shock 42 $^{\circ}$ C 30 秒，立刻放回冰上；加入 1000 μ l SOC 培養液，放入培養箱 37 $^{\circ}$ C 1 小時，培養後取 100 μ l 均勻抹在 LB/Ampicillin 的培養盤，37 $^{\circ}$ C 培養 16 小時，觀察 Colony 菌落。



圖二十七、 pET-23a 與 hepcidin 接上

●Conoly PCR

為了大量快速篩選 transformation 後的單一菌落，以菌落為 Template 做 PCR；滅菌過牙籤挑起菌落放入 PCR 反應液(兩端 Primer 各取 $1\mu\text{l}$ 、5X Taq Master Mix $10\mu\text{l}$ 、ddH₂O $38\mu\text{l}$ 讓 Total 體積為 $50\mu\text{l}$)中快速攪入中做 PCR。即先以混合菌分組快篩，看此菌落是否有在接合反應中接入載體，如果是對的再以單菌落做一次分離確認，若確認符合我們預計長度的單一菌落後，再次送定序。

●公司定序

●萃取 DNA

菌液離心，加入 Solution I(50mM 葡萄糖+25mM Tris 緩衝液，pH8.6+10Mm EDTA，Solution II(0.2N NaOH+1.0% SDS，Solution III(3M 醋酸鈉+5M 醋酸)，均勻混合後離心 3 分鐘。將上清液加入 1mL 95% 酒精混合後快速離心。離心後去除上清液留下底部的沉澱物(半成品 DNA)，加入 $10\mu\text{l}$ TE 回溶備用。

●測試抑菌圈功能

取 $200\mu\text{l}$ 細菌 (Hepcidin) 滴在不含抗生素培養皿上，將細菌均勻的抹在盤子上，將泡過抗生素的小紙圈，以滅菌過鐵鑷子放在盤子上，再放入 37°C 18 ~ 20 hrs，觀察並測量記錄生長抑制圈測試有無抑菌效果。

6. 結語

經過一年下來的磨練，長期的和老師討論，中間當然有成功也有失敗，失敗了我們開始找出原因，成功了我們繼續開始新的實驗流程，我們因為專題而從實驗中學會了四種的 PCR(PCR、Nested PCR、Colony PCR、Mutation PCR)也學會了接合和轉殖的技術。我們實驗仍在進行中尚未完成，接下來將會再繼續完成目標到 hepcidin 基因在大腸菌上能有殺菌力的表現。

7. 銘謝

首先要感謝的是張慧玫老師，給予我們在實驗中所需要的生物知識和實驗技巧的教導，以及幫助我們在實驗中所遇到的相關衍生問題給予正確的解決辦法。然後實驗室助理珮宜學姊，也在老師忙碌無法解答我們之時能當下及時給予我們許多意見和幫助；還有已經畢業的昱詠學長，除了幫忙解決很多在 NCBI 上的問題，對我們專題進度的關心更是不缺席。

最後還有明欣生物科技的趙君萍小姐、BioKit、波仕特給予我們實驗耗材及讀

序技術上的支持。

致謝：行政院國家科學委員會大專學生參予專題研究計畫在專題上的支持
計畫編號: NSC 99-2815-C-216-001-B

8. 參考文獻

[1]. 魚類抗菌肽於水產養殖之應用潛力

http://agbio.coa.gov.tw/image_doc/06%E9%AD%9A%E9%A1%9E%E6%8A%97%E8%8F%8C%E8%83%9C%E6%96%BC%E6%B0%B4%E7%94%A2%E9%A4%8A%E6%AE%96%E4%B9%8B%E6%87%89%E7%94%A8%E6%BD%9B%E5%8A%9B.pdf

[2]. NCBI

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

[3]. Total RNA Mini Purification Kit (tissue&Cell) protocol

[4]. MMLV High Performance Reverse Transcriptase protocol

[5]. Fast-Run Taq Master Kit(波仕特)

[6]. p GM-T Cloning Kit(BioKit)

[7]. chromas

<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

[8]. WORKBENCH

[9]. 中華民國醫事檢驗師公會全國聯合會

https://www.mt.org.tw/wholecountry/member/public_detail.php?id=222

[10]. Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION(VOLUME 1.2.3)

[11]. GENEID:

<http://genome.imim.es/geneid.html>

[12]. 維基百科

<http://en.wikipedia.org/wiki/Hepcidin>

[13]. 科學人雜誌網站

<http://sa.ylib.com/saeasylearn/saeasylearnshow.asp?FDocNo=1258&CL=88>