

中華大學生物資訊學系專題報告
青蔥催淚因子合成酶全基因選殖與抑菌基團分析
The Lachrymatory Factor Synthase of *Allium fistulosum*
gene cloning and antibacterial domain analysis

專題組員:羅翊桓

專題編號:10107

指導老師:張慧玫 教授

1. 摘要

蔥屬植物在細胞遭到破壞之後釋出催淚因子 lachrymatory factor, 其化學分子為 propanethial S-oxide, 合成此催淚因子的重要酵素是催淚因子合成酶 (lachrymatory factor synthase, 簡稱 LFS)。依據 2015 年 Abhinandan RP 研究團隊[2] 在合成酶剔除論文與本實驗室林欣怡學姊的碩士論文[1] 都一致指出 LFS 具有殺菌能力。已知 Masamura N 研究團隊[3] 在 2012 年鑑定出洋蔥催淚因子合成酶活性的關鍵氨基酸, 本研究進而探討 LFS 其因子合成活性與殺菌能力活性是否共享相同 domain。首先 *Allium fistulosum* (青蔥) 的 LFS DNA 序列加以分析, 再以克隆技術將 DNA 剪接、轉殖、表現蛋白質, 再聚合酶連鎖反應子切割合成酶作片段表達, 企圖找出有殺菌活性的蛋白質 domain 片段, 再探討其片段殺菌能力。

關鍵字: propanethial S-oxide, *Allium fistulosum*, lachrymatory factor synthase

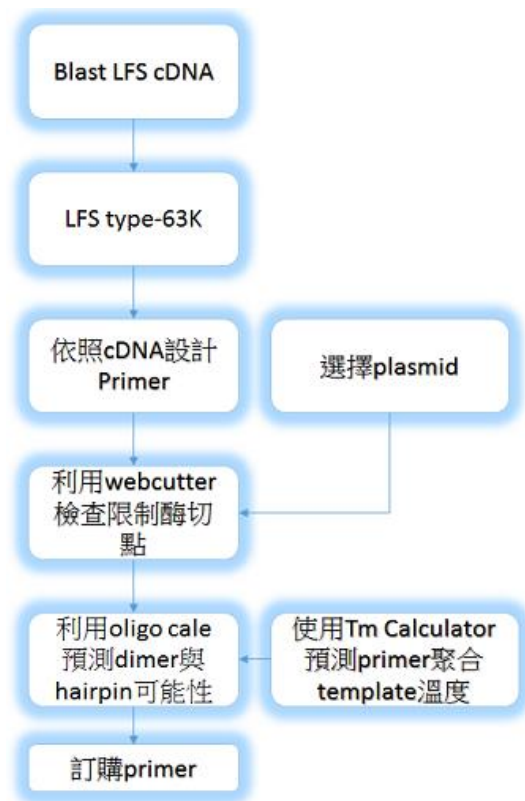
2. 簡介

本實驗室林欣怡學姊的碩士畢業論文[1] 以菌落活性染色的方法篩選出 AFD4, 經由讀序後序列做 Blast 找出

AFD4 為催淚因子合成酶的 3' 端片段。本研究首先根據在 NCBI 資料庫比對結果之中 E-value 最低的催淚因子合成酶基因全長序列為模板, 設計引子, 並加入 pET23a 質體的多限制酶克隆區的切點, 排除 primer 在進行 PCR 的時候會有自黏、互黏、髮夾的序列, 再使用 plant genomic DNA purification Kit 抽取較乾淨的青蔥基因組 DNA (genomic DNA, gDNA), 進行 PCR 增幅目標 DNA 催淚因子合成酶 LFS 基因。

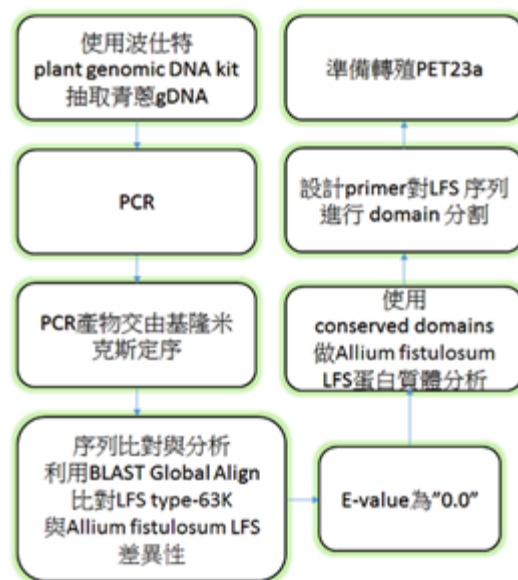
PCR 產物濃度與純度到達一定水準之後, 送往生技公司定序, 資料回傳後再以 BLAST 做序列分析, 確認為催淚因子合成酶。之後利用蛋白質體分析, 根據 Identification of amino acid residues essential for onion lachrymatory factor synthase activity 論文之關鍵氨基酸區段, 再用引子設計子切割將 LFS DNA 分成 3 段, 進行 PCR 增幅再以接合反應接上 pET23a 表達質體, 再轉殖到 BL21 competent E. coli, 再誘導 pET23a 表現 LFS 基因子片段, 觀察比較各組 LFS 片段導致後細胞死亡或生長抑制之殺菌效果, 找出殺菌關鍵 domain 是否與合成催淚因子活性 domain 重合。

3. 專題進行方式



接合(圖二)。

圖二引子最左紅色字體為限制酶切點, XhoI 切點旁綠色字體是防止造成 ORF 移位所添加的補字, 中間紅色字體是為了減少 dimer 與 hairpin 發生所修改的鹼基, 必須考量修改在轉譯後保持不變, 仍為相同胺基酸。



Allium fistulosum lfs mRNA for lachrymatory factor synthase, complete cds, note:type-63K
Sequence ID: [AB094590.1](#) Length: 739 Number of Matches: 2

Range 1: 58 to 597 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|--------------|------------|-----------|
| 798 bits(432) | 0.0 | 510/546(93%) | 12/546(2%) | Plus/Plus |

圖(一)

L-Primer 5' : **GAATTC**ATGGAGTTAAATCCTGGTG(EcoRI)

R-Primer 5' : GAGCTC**CAGCATT**CAAATCTCTTCGA(XhoI)

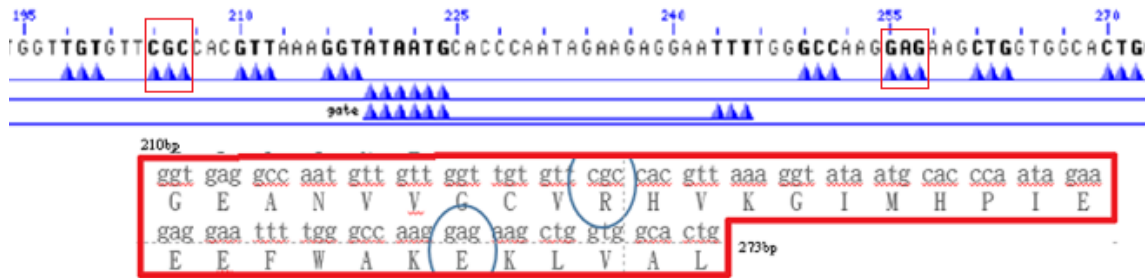
圖(二)

將林欣怡學姊 ADF4 序列[1]進行 Blast 比對, 發現 ADF4 與 *Allium fistulosum* LFS cDNA (LFS type-63K) 的 E-value 是 0.0 的數值, 代表兩序列近乎相同(圖一), 再以 *Allium fistulosum* LFS cDNA(AB094590.1)為模板設計 primer, 並避免 homo-/hetero-dimer, hairpin 的產生, 在 primer 外接 EcoRI 與 XhoI 限制酶切點, 方便往後與 pET23a 表達質體做

將青蔥 gDNA 抽取後, 進行 PCR 實驗, 測試 primer 靈敏度時, 以總體積 30 λ 進行 PCR

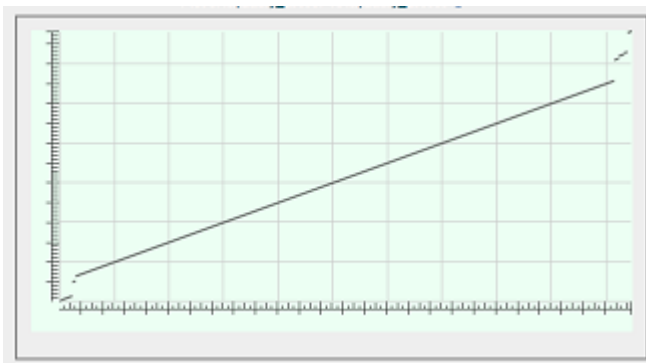
| | |
|-------------------|--------------|
| DNA: | 1 λ |
| Primer(L+R)10mM: | 2 λ |
| 5xMix (with Dye): | 6 λ |
| UVddH20: | 21 λ |
| Total: | 30 λ |

將各管 PCR 產物純化並收集, 並壓縮體積達到定序濃度 20 ng/ μ l 送往基隆米克斯定序, 待資料回傳。



LFS PCR 產物克隆到 TA 載體稱為編號 B9 菌落, 約 3 個工作天後拿到定序資料, 馬上將我的 PCR 產物與學姐的 ADF4 和 NCBI 的 LFS type-63K 做 Global align 比對, 發現 3 條序列極為相似, 確定 3 條序列都是青蔥的 LFS 基

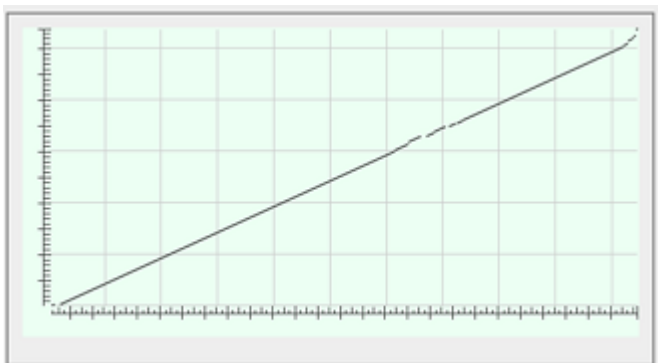
375 bp~508 片段, 以 gDNA 為模板進行 PCR 增幅。



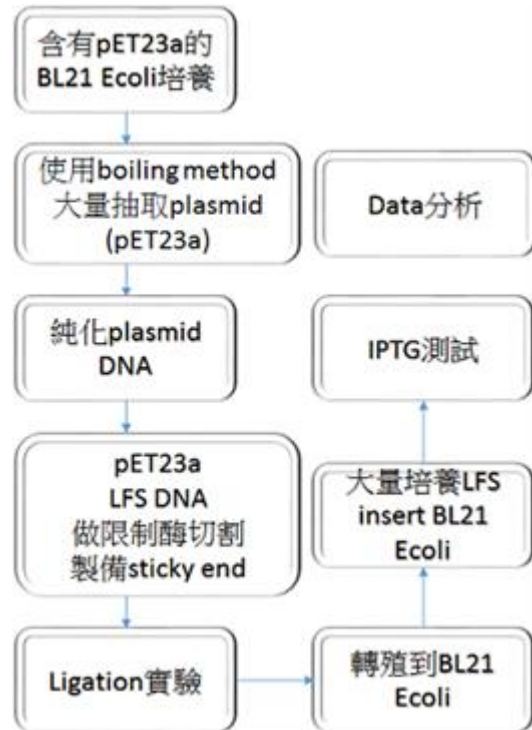
因。

(我的 LFS PCR 產物與 LFS_type63K)
(我的 LFS PCR 產物與 ADF4)

接著進行蛋白質 domain 分析, 利用 NCBI 底下 conserved domains tool 得到 domain 分佈, 已知關鍵氨基酸鑑定之論文[3]指出, LFS 蛋白質中 R71 和 E88 胺基酸是合成催淚因子活性的關鍵氨基酸, 故本計畫依照合成活性的



關鍵氨基酸將 LFS 分成 3 段, 探討其殺菌活性: 1bp~195bp、195bp~375 bp、



將單菌落 pET23a (在 BL21 E. coli 內)種進 200cc LB 培養液含 Amp 抗生素 50 g/ml 以 250rpm 搖瓶約 16 小時, 再以煮沸法抽取質體 DNA。

純化 plasmid DNA 步驟: RNase A 1 λ (水浴 37 $^{\circ}$ C/15min), Proteinase K (水浴 55 $^{\circ}$ C/15min), phenol chloroform pH8.0 (DNA 體積的 1:1), 離心取上清液, 3M Ammonium acetate (DNA 體積的 1/10), 99.5% Ethanol (至 tube 滿), -20 $^{\circ}$ c 冰箱沉澱, 產物小沉澱時間長, 高速離心 10min 後去除 Ethanol, 以 75% Ethanol 沖洗後離心 1 分鐘, 風乾 TE 回溶, DNA 冷凍保存。

限制酶切割(製備 sticky end 預備接合):

LFS B9 plasmid DNA 30 λ
EcoRI: 2 λ
XhoI: 2 λ
10xSmart Buffer: 5 λ
UVddH2O: 11 λ
Total: 50 λ

Plasmid pET23a DNA 酶切與上述方法相同

純化酶切產物:將 DNA 體積加 TE 至 500 λ , phenol chloroform (pH8.0)500 λ , 混勻馬上高速離心 5 分鐘取上清液, 3M Ammonium acetate(1/10 DNA 體積), 99.5% Ethanol(至 tube 滿) -20° c 冰箱沉澱, 離心 10min, 去除 Ethanol 後 75% Ethanol 清洗後離心 1 分鐘, 風乾 TE 回溶, DNA 冷凍保存。

Ligation 反應:

LFS B9 insert 1 λ
pET23a 載體 1 λ
T4 ligase: 1 λ
10X T4 ligase buffer: 2 λ
UVddH2O: 15 λ
Total: 20 λ
16° c 水浴槽過夜。

4. 主要成果

一. *Allium fistulosum* gDNA



利用波仕特的 plant genomic dna kit 抽取 *Allium fistulosum* gDNA 以 1k marker 作為標示比照判斷 DNA 片段大小(電泳 100V, 40 分鐘)

二. LFS_Primer 設計

R-Primer 5': **GAGCTC**AGCATTACAAATCTCTCGA(XhoI)

L-Primer 5': **GAATTC**ATGGAGTTAAATCCTGGTG(EcoRI)

| Primer | Tm (DegC) |
|--------------------------------|-----------|
| Primer #1: ATGGAGTTAAATCCTGGTG | 50.79 |
| Primer #2: AGCATTACAAATCTCTCGA | 51.17 |
| Tm Delta = 0.39 | |

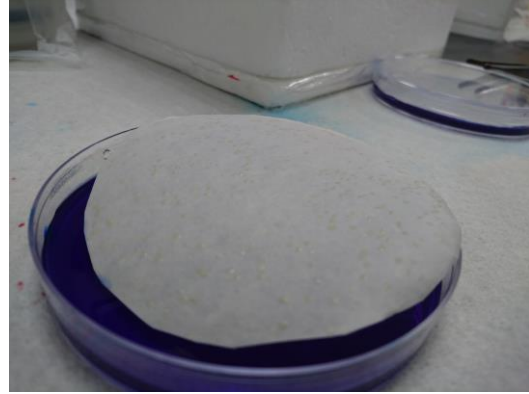
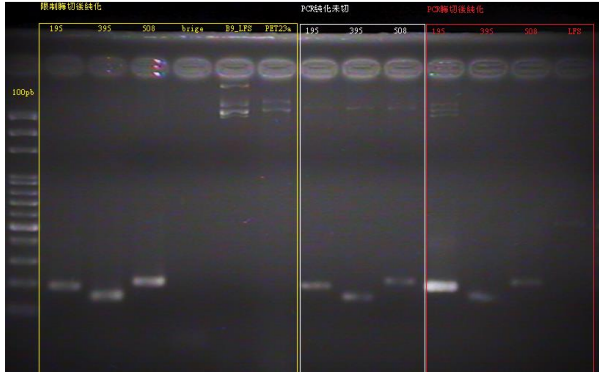
三. PCR 實驗 LFS 序列放大



四. 培養 BL21 Ecoli(有 pET23a plasmid)



五. 限制酶切 pET23a 與 LFS DNA
黃色區域是純化過的子片段 PCR 產物 LFS195、LFS375、LFS508、LFS_Brige、B9 克隆、pET23a 酶切實驗。白色區域是子片段 PCR 產物。紅色區域是未純化子片段 PCR 產物進行酶切的 DNA。



六. 熱休克轉殖

| | |
|----------------|---------------|
| LFS_Pet23a DNA | 2 λ |
| BL21 Ecoli | 200 λ |
| 冰浴 | 20min |
| 水浴槽 42°C | 30sec |
| 冰浴第二次 | 5min |
| SOC 培養液 | 400 λ |
| 37°C 搖管培養 | 1HR |

兩組分別是

第一組：

| | |
|--------------|-------------------|
| LFS_pET23a_C | \approx 109 顆菌落 |
| LFS_pET23a_D | = 12 顆菌落 |
| LFS_pET23a_E | = 3 顆菌落 |

第二組：

| | |
|--------------|-------------------|
| LFS_pET23a_A | \approx 400 顆菌落 |
| LFS_pET23a_B | \approx 200 顆菌落 |

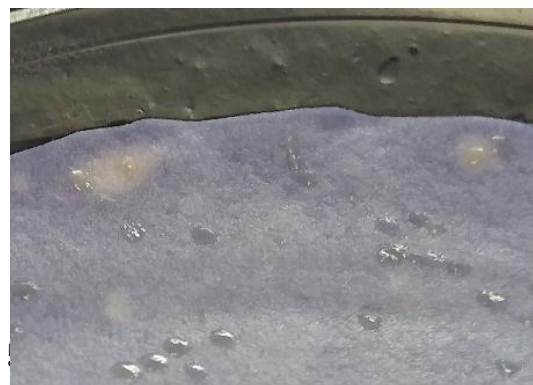


| | L_P_A | L_P_B | L_P_C | L_P_D | L_P_E |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0min | n | n | n | n | n |
| 5min | n | n | n | n | n |
| 10min | 397 | 191 | 107 | 12 | 3 |
| 15min | 397 | 191 | 107 | 12 | 3 |
| 20min | 397 | 191 | 107 | 12 | 3 |
| 25min | 397 | 191 | 107 | 12 | 3 |
| 30min | 397 | 191 | 107 | 12 | 3 |
| 35min | 397 | 191 | 107 | 12 | 3 |
| 40min | 397 | 191 | 107 | 12 | 3 |
| 45min | 397 | 191 | 107 | 12 | 3 |
| 50min | 397 | 191 | 107 | 12 | 3 |
| 55min | 397 | 191 | 107 | 12 | 3 |
| 60min | 397 | 191 | 107 | 12 | 3 |
| 1hr + | 400 | 193 | 109 | 12 | 3 |

七. 藍盤 IPTG 測試

| | |
|------------------|----------|
| ITPG | 1mM |
| Amp | 50mg/cc |
| trypan blue | 0.00125% |
| bromophenol blue | 0.0025% |
| Agar | 10g |
| Tryptone | 10g |
| Yeast extract | 5g |
| Membrane filters | |

菌落變藍時間幾乎一致，且只有 Membrane filters 未沾著 IPTG 盤的菌落有延遲死亡的現象。



近年來新的多重抗藥性細菌不斷地誕生，人類需要準備更多種對付細菌的殺手鐮，雖然 LFS 能夠抑菌的 pathway 還尚未明朗，但從其他論文之中看出 LFS 是蔥類植物特有的防禦機制，目前我能做到的只有將 LFS 轉殖進入細菌體內，嘗試誘發 LFS 基因，表現出 LFS 使 E coli 自殺，並嘗試收集有用的資料，讓未來的研究可以更順利進行。

6. 結語

目前實驗的數據看起來，含有全長 LFS 基因的細菌死亡速度幾乎一致，與林心怡學姊的 AFD4 比較殺菌時間發現

| | |
|---|---|
| AF(<i>Allium fistulosum</i>) SG(<i>Suillus granulatus</i>) | AF D4 |
| 變藍時間 | 30min |
| 序列長度(bp) | 211 |
| 有無載體、EcoRI、NotI | 有 |
| 有無primer F | 有 |
| 有無primer R | 有 |
| 核酸比對結果 | Allium fistulosum lfs mRNA for lachrymatory factor synthase, complete cds |
| E value | 1e-98 |
| JGI比對結果(E value) | - |

全長的 LFS 殺菌速度更快，代表 LFS 有比 AFD4 更完全的殺菌功能，往後將繼續探討分段的 LFS 各個 domain 組合殺菌功能強弱，並測試 LFS 對各種革蘭氏陰性菌的殺菌功效。

7. 銘謝

首先要謝謝我的指導教授、慧玫老師，因為老師不厭其煩地細心教導我分子

生物實驗，並在我受憂鬱症所苦的時候鼓勵我，也同時感謝所有曾經鼓勵過我的老師，因為我家境不好，需要支撐經濟，半工半讀…沒有老師的鼓勵，我可能就休學工作，不會繼續堅持下去。

另外我要感謝實驗室的石學長、蒜頭組、氣舉式靈芝組學弟，有你們在實驗室，每天都是很歡樂的實驗日，永不沉悶、樂不止歇。

8. 參考文獻

1. Whei-Meih Chang and Hsin Yi Lin (2014) Lachrymatory factor synthase from green onion (*Allium fistulosum*) exhibits bacterial growth inhibition activity. *J Info Tech App*, 8, 41-46.
2. Abhinandan S. Patil and Suhail Ahmad H. (August-2015) Tear-less Onion via Gene Silencing Lachrymatory Factor Synthase (LFS). *Indian Farmer* 2(8):584-586.
3. Masamura N, Ohashi W, Tsuge N, Imai S, Ishii-Nakamura A, Hirota H, Nagata T, Kumagai H. Identification of Amino Acid Residues Essential for Onion Lachrymatory Factor Synthase Activity. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2012;76(3):447-453.
4. E. Loit a, K. Wua, X. Cheng a, l, M. T. Hincke b, I. Altosaar a, (2008) Functional whole-colony

screening method to identify
antimicrobial peptides.
Journal of Microbiological
Methods 75 425 - 431