

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

誘導昆蟲抗菌蛋白之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2626-B-272-001-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：東方技術學院食品工程科

計畫主持人：關政平

計畫參與人員：陳惠民張紘蓉蔡宜靜

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式

一、說明

國科會基於學術公開之立場，鼓勵一般專題研究計畫主持人發表其研究成果，但主持人對於研究成果之內容應負完全責任。計畫內容及研究成果如涉及專利或其他智慧財產權、違異現行醫藥衛生規範、影響公序良俗或政治社會安定等顧慮者，應事先通知國科會不宜將所繳交之成果報告蒐錄於學門成果報告彙編或公開查詢，以免造成無謂之困擾。另外，各學門在製作成果報告彙編時，將直接使用主持人提供的成果報告，因此主持人在繳交報告之前，應對內容詳細校對，以確定其正確性。

本格式說明僅為統一成果報告之格式，以供撰寫之參考，並非限制研究成果之呈現方式。精簡報告之篇幅（不含封面之頁數）以 4 至 10 頁為原則，完整報告之篇幅則不限制頁數。

成果報告繳交之期限及種類（精簡報告、完整報告或期中報告等），應依本會補助專題研究計畫作業要點及專題研究計畫經費核定清單之規定辦理。

二、內容格式：依序為封面、中英文摘要、目錄（精簡報告得省略）、報告內容、參考文獻、計畫成果自評、可供推廣之研發成果資料表、附錄。

(一)報告封面：請至本會網站(<http://www.nsc.gov.tw>)下載製作(格式如附件一)

(二)中、英文摘要及關鍵詞(keywords)。

(三)報告內容：請包括前言、研究目的、文獻探討、研究方法、結果與討論（含結論與建議）等。若該計畫已有論文發表者，可以 A4 紙影印，作為成果報告內容或附錄，並請註明發表刊物名稱、卷期及出版日期。若有與執行本計畫相關之著作、專利、技術報告、或學生畢業論文等，請在參考文獻內註明之，俾可供進一步查考。

(四)頁碼編寫：請對摘要及目錄部分用羅馬字 I、II、III 標在每頁下方中央；報告內容至附錄部分請以阿拉伯數字 1.2.3. 順序標在每頁下方中央。

(五)附表及附圖可列在文中或參考文獻之後，各表、圖請說明內容。

(六)計畫成果自評部份，請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

(七)可供推廣之研發成果資料表：凡研究性質屬**應用研究及技術發展**之計畫，請依本會提供之表格（如附件二），每項研發成果填寫一份。

三、計畫中獲補助國外或大陸地區差旅費、出席國際學術會議差旅費或國際合作研究計畫差旅費者，須依規定撰寫心得報告（出席國際學術會議者須另附發表之論文），以附件方式併同成果報告繳交，並請於成果報告封面註記。

四、打字編印注意事項

1. 用紙

使用 A4 紙，即長 29.7 公分，寬 21 公分。

2. 格式

中文打字規格為每行繕打(行間不另留間距)，英文打字規格為 Single Space。

3. 字體

報告之正文以中英文撰寫均可。在字體之使用方面，英文使用 Times New Roman Font，中文使用標楷體，字體大小請以 12 號為主。

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

成果報告
期中進度報告

誘導昆蟲抗菌蛋白之探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 91 - 2626 - B - 272 - 001 -
執行期間： 91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：關政平
共同主持人： 陳惠民
計畫參與人員： 張紘蓉、蔡宜靜

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：
赴國外出差或研習心得報告一份
赴大陸地區出差或研習心得報告一份
出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢
涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：東方技術學院食品科技科

中 華 民 國 92 年 10 月 20 日

一中文摘要

由蠶血中分離昆蟲之抗菌蛋白,其中發現對於格蘭氏陰性菌可產生抗菌反應,對於格蘭氏陽性菌,如金黃色葡萄球菌及枯草桿菌,亦能有效被抑制,但對於酵母菌則無抑菌反應。其中 Cecropin 可以被初純化,利用親和性層析法,可以得到數條專一性 band,且具有強抗菌反應。經由設計引子對,使用 PCR 增殖 Cecropin B, Cecropin D 特異性抗菌蛋白基因,產生特異之 DNA 帶, 195 bp 及 335bp PCR 產物,但在野蠶體內卻無法產生特異之 DNA 帶,在經免疫之家蠶體內,可以產生 cecropin B、Cecropin D 特異之核酸,並嘗試利用 TA clone 方法做定序,分析其中之差異,並且檢測其專一性與靈敏度。

關鍵詞：抗菌蛋白、家蠶、淋巴血

Abstract

In response to an injection of bacteria, lepidopteran insects produce several kinds of proteins with antibacterial activity. We investigated the antibacterial activity of the hemolymph from *Bombyx mori* against gram-negative or positive bacteria. Cecropin, inducible antibacterial peptides were purified by simple affinity chromatography from immunized larval hemolymph of the silk worm, *Bombyx mori*. The two major cecropins were sequenced. And was compared

the different between the cecropin B and cecropin D. In the present work, we surveyed the antibacterial activity of the hemolymph against two of gram-positive bacteria, *S. aureus*, *Bacillus subtilus*. and gram-negative bacteria, *E. coli*. The partial purified peptide showed antibacterial activity against both gram-negative and positive bacterial.

Keywords: antipeptide, silkworm, hemolymph

緣起與目的

Insects have humoral immune systems, which are induced in response to microbial infection. Such humoral responses involve the production of a variety of antibacterial proteins, including cecropins, defensin, glycine-rich proteins, proline-rich proteins and lysozyme.

The cecropins constitute a family of basic proteins with potent antibacterial activity containin 35-37 amino acid residues. The three principle cecropins, A,B and D, were first purified and sequenced from the cecropia moth, *Hyalophora cecropia*, and their cDNA sequences reveal that cecropin precursors have 62-64 amino acid residues, which are processed into the mature forms by post-translatinal modification. Cecropins have also been purified,

cloned and sequenced. We now report the isolation and nucleotide and deduced amino acid sequenced of the cDNA, and comparison of the precursor with those of other cecropins.

四結果

利用抽取蟲體之脂肪體之 mRNA，經由 cDNA 合成，針對抗菌蛋白設計引子對，進行核酸增幅反應，對於經免疫刺激之家蠶，在收集培養不同之品系包括：華豐 X 華農、瀛國、華富 X 華風、華富、華國、華富 X 華國、華農、瀛國、瀛富皆形成 195bp PCR 產物，靈敏度亦可達 0.1ng。此外亦比較多化性與一化性家蠶(D type, v type)，皆可得到相同之 PCR 產物。並且利用基因轉殖與核酸定序。

分別比較不同菌種包括 *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilus*，皆可以經由核酸增幅出相同核酸片段。比較不同免疫接種時期，自接種後每隔 4 小時偵測一次，4, 8, 12, 16, 20, 24 小時，結果顯示在 4 小時已可檢定出該核酸片段；在免疫接種 16 小時後，核酸片段最高，至 24 小時亦可測出核酸片段，但在 16 小時以後蟲體逐漸死亡，故時間愈長可能並不適合作為免疫接種之適當時間。

在抗菌試驗方面，經由親和性層析管柱作分離與純化，利用於不同菌之抑菌性作檢測，結果顯示對於格蘭氏陽性與格蘭氏陰性菌皆有明顯之抗菌性，但對於酵母菌則無此效果，在免疫 8 小時以後，蟲體抗菌效果逐漸明顯，在 16 小時達抑菌效果達最高。

蟲體經誘導之抗菌蛋白質種類十分多，未來若能鑑定經刺激之昆蟲或不

同種類之比較，對於有關於抗菌蛋白基因被誘導，將有助於找出新的抗菌蛋白與應用。

參考文獻

- Bierbaum, G. & Sahl, H.-G. 1985 Induction of autolysis of *Staphylococci* by the basic peptide antibiotics pep5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. Arch. Microbiol. 141, 249-254 .
- Faye, I. And Wyatt, G. R. 1980 The synthesis of antibacterial proteins in isolated fat body from *Cecropia* silkworm pupae. Experientia 36, 1325-1326.
- Furukawa, S. et al 1999. Induction of gene expression of antibacterial proteins by chitin oligomers in the silkworm, *Bombyx mori* Insect Molecular Biology 8,1: 145-148.
- Gudmundur, H. G. et al 1991. The Cecropin Locus. The Journal of Biological Chemistry 266,18: 11510-11517.
- Hara, I. and Yamakawa, M. 1995. A novel type of antibacterial peptide isolated from *Bombyx mori* Biological Chemistry 270, 50: 20023-29927.
- Kragol, G. et al. 2001. The antibacterial peptide pyrrocorcin inhibits the ATPase action of DnaK and Prevents chaperone-assisted protein folding. Biochemistry 40, 3016-3026.
- Morishima I., Suginaka S., Bougaki T., Inoue M. and Ueno T 1988 Induction and partial characterization of antibacterial proteins in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. Agric. Biol. Chem. 52, 929-934.
- Morishima, I. Kazuhisa, Y, and Teruo, U. 1992. Bacterial peptidoglycan as elicitor of antibacterial protein synthesis in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. Molec. Boil. 22, 4: 363-367.
- Thevissen, K. et al., A. 2000 Gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*) Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 9531-9536
- Ulvatne, H. & Vorland, L. H. 2001 Bactericidal kinetics of three lactoferricins against *S. aureus* and *E. coli*. Scand. J. Infect. Dis. 33, 507-511.
- Westerhoff, H.V., Juretic, D., Hendler, R.W. & Zasloff, M. 1989 Magninins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. Proc. Natl Acad. Sci. USA 86, 6597-6601.
- Yang, L., Weiss, T.M., Lehrer, R.I. & Huang. H.W. 2000 Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protein. Biophys. J. 79, 2002-2009.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms Nature 415, 24: 389-395.