

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：95130745

※申請日期：95.8.22

※IPC 分類：C07K 14/435 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

一、發明名稱：

一種抗微生物胜肽

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：洋昇生物科技股份有限公司

代表人：柯吉剛

住居所或營業所地址：桃園市中正路 1071 號 14 樓之 3

國 籍：中華民國

三、發明人：(共2人)

姓 名： 1. 陸振岡

ID： 1. D120645554

2. 賴政宏

2. F125171480

國 籍： 1-2 中華民國

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☐ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☐ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種抗微生物胜肽，特別是指一種可抑制及殺死微生物，並用以作為治療目的與增加個體健康之抗微生物胜肽。

【先前技術】

石斑魚為亞太地區重要的養殖魚種之一，由於其肉質鮮美，長久以來位居水產品銷售之首，廣受台灣、香港、大陸、日本及東南亞地區之消費者的喜愛。台灣石斑魚繁養殖始於 1975 年，養殖方式可區分為海上箱網養殖與內陸鹹水魚塭養殖。1997 年農委會漁業署為推動台灣成為亞太水產種苗中心，已將各類石斑魚繁養殖列為首要的施政項目亦是科技養殖的重點(蔡, 2000)。台灣石斑魚養殖已有將近 20 年的歷史，在 1999-2002 年獲利率更高達 20%，顯示石斑魚為高經濟價值魚種，且在台灣已是發展成熟並且能穩定獲利的產業。

石斑魚的病害主要分為病毒與細菌性兩類，病毒是目前危害石斑魚很嚴重的病害，包括虹彩病毒(iridovirus)與神經壞死病毒(nervous necrosis virus)是為石斑魚易感染的兩種病毒；其中，神經壞死病毒(nervous necrosis virus, NNV)是目前石斑魚最為困擾的病毒，這種病毒的傳染能力迅速，致病力超強，短時間內可以讓魚苗大量的死亡。

神經壞死病毒屬於結病毒科(Nodaviride)，其沒有外套膜，構形為二十面體與球形間，具有雙股 RNA。石斑魚在魚苗時期最容易受到感染，感染時會使魚苗失去平衡能力，以螺旋方式游泳，而且還會向不同方向衝撞；嚴重的病魚會浮在水面上，體側向上漂浮，有刺激時會突然快速游動(劉, 2002)。

細菌性毒害包括：愛德華氏菌、弧菌、產氣單胞菌、鏈球菌和葡萄球菌，這些細菌類一直以來是養殖業者都會遇到的問題，石斑魚亦容易遭受

細菌性感染，造成業者的損失。魚體被細菌感染的原因有許多，最容易發病的幾個原因為：飼養密度過高、魚隻大小差異大、殘食、水質不當等，這些都是容易讓魚體產生傷口，導致細菌容易感染的因素；細菌性感染分為全身性感染以及局部性感染；全身性感染為細菌感染部位遍及每個組織，局部性感染則為細菌只感染體表或是內臟。當石斑魚受到弧菌感染時，身體表面會出現白色斑點。隨著病情的嚴重，傷口潰爛、紅腫、鱗片脫落和內臟的出血，最終導致魚隻死亡(劉, 2002)。

石斑魚為台灣經濟養殖魚種，但在魚苗時期容易被疾病所困擾，導致每年產量不穩定，目前各種研究都是利用疫苗的方式，來增加魚體的免疫能力；然而，使用疫苗所產生的免疫能力不佳，常需要追加施打疫苗來維持魚體中免疫反應，因此疫苗無法有效的讓魚體持續增加免疫能力。非但如此，這些疫苗中有五成以上利用死亡之病原菌，這方式到目前都讓業者質疑疫苗的安全性。由此可知，研究魚類免疫系統與找尋魚類自體抗菌物質有其必要性。

抗微生物胜肽(antimicrobial peptides, AMPs)普遍存在於植物與動物中，屬於內生型免疫系統中的一環。抗微生物胜肽通常是小分子的陽離子，由帶正電荷的胺基酸組成(Hancock and Lehrer, 1998)。魚類的抗微生物胜肽，從鯊魚的角鯊胺(squalamine)被發現後(Moore et al., 1993)，目前許多魚類的抗微生物胜肽也被發表。

抗微生物胜肽根據化學結構分為三大類，第一類為兩性 α -螺旋(amphipathic α -helix)，因為結構的關係也稱為線性胜肽(linear peptides)，結構中由於沒有半胱氨酸殘基(cysteine residues)，因此無雙硫鍵形成；第二類則是形成分子內雙硫鍵(interamolecular disulfide bond)，此類抗微生物胜肽含有半胱氨酸殘基(cysteine residues)，可產生雙硫鍵(disulfide bond)因而形成髮夾狀 β -摺板(hairpin-like β -sheet)及 α -螺旋 β -摺板混合(α -helix- β -sheet mix)

兩種結構(Bulet et al., 1999)；第三類為脯氨酸和/或甘氨酸過度保留區(overpresentation proline and/or glycine residues)，此種微生物胜肽含有高度脯氨酸(proline-rich)之胜肽，從分子的大小又可以分為短鏈(short-chain)及長鏈(long-chain)。

在目前抗微生物胜肽的研究上發現，抗微生物胜肽可以對革蘭氏陽性菌、革蘭氏陰性菌、真菌及原生動物都有破壞之能力(Powers and Hancock, 2003)；除了對抗微生物之外，抗微生物胜肽亦可能與發育(development)、動物脫殼(molting)及生殖(reproduction)有關聯；但目前的研究中並未揭示抗微生物胜肽和動植物的免疫因子調控有任何相關可能性。

抗微生物胜肽之抗微生物的機制分為兩大類，第一類為胜肽脂質交互作用(peptide-lipid interaction)，其中可細分為筒狀穿鑿模式(barrel-stave mode)和地毯狀覆蓋模式(carpet mode) (Shai, 1999)。筒狀穿鑿模式以兩性 α -螺旋(α -helix)抗菌肽捲成筒狀插入膜內，利用抗微生物胜肽疏水性(hydrophobic)端與菌的細胞膜接觸，另一親水性(hydrophilic)端互相面對面，則為抗微生物胜肽的親水性端面向中心點，以聚合體的方式在膜上形成孔洞，來造成菌體內外滲透壓不平行，導致菌體死亡(邱, 2001)。另外，地毯狀覆蓋模式則是在帶正電之抗微生物胜肽與帶負電菌體細胞膜結合後，抗微生物胜肽的親水性端與膜上之磷脂質(phospholipids head groups)或水分子反應，抗微生物胜肽經過翻轉後，導致疏水性端的部分包圍一部分菌體的膜，進而把此膜構造移除，破壞菌體膜的結構而使病原菌死亡(楊, 2004)。

抗微生物機制的第二類為間接由受體傳達辨識過程(Receptor-mediated recognition processes)，有些抗微生物胜肽可能與原核生物之去氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)、自溶素(autolysins)和細胞通透能力(permeability)有關，可以抑制真菌孢子的萌芽及菌絲的延長與分枝(Thevissen et al., 1997)。另外有文獻指出，抗微生物胜肽與原核生物核酸結合的能力，因而抑制蛋

白質的產生(Powers and Hancock, 2003)。

由此可見，上述習用動物抗微生物的方式仍有諸多缺失，實非一良善之設計者，而亟待加以改良。

本案發明人鑑於上述習用動物抗微生物的方式所衍生的各項缺點，乃亟思加以改良創新，並經多年苦心孤詣潛心研究後，終於成功研發完成本件一種抗微生物胜肽。

【發明內容】

本發明之目的即在於提供一種抗微生物胜肽，以減少動物體內之病原菌，達到治療效果，並提升動物體的健康狀態。

本發明之次一目的係在於提供一種用以編碼如上述發明目的抗微生物胜肽的核苷酸片段。

本發明之另一目的係在於提供一種用以殺死微生物之組合物，該組合物包含一藥學有效量之胜肽片段，以及一藥學上可接受之載劑。

本發明之又一目的係在於提供一種用以篩選能增加動物免疫力之免疫誘導劑(immune elicitors)的方法。

本發明之再一目的係在於提供一種增加動物抗病力的方法，以將一免疫誘導劑口服投予至動物體內。

可達成上述發明目的之抗微生物胜肽，包含一如序列表 SEQ ID NO: 1 所示之胺基酸序列。

由於本發明之抗微生物胜肽係為一種抗菌肽(antimicrobial peptide, AMP)，抗菌肽係為一種廣泛分布於各動植物免疫系統中的胜肽片段；因此，本發明之抗微生物胜肽可取自天然的動物，尤其是水生動物，或以習知化學合成法合成，亦可以習知分子生物學方法製備。

本發明亦包含一種用以編碼如上述抗微生物胜肽的核苷酸片段，該核苷酸片段具有如序列表 SEQ ID NO:2 所示之核苷酸序列。

本發明更提供一種用以殺死微生物的醫藥組合物，該組合物包含：
一藥學有效量之胜肽片段；以及
一藥學上可接受之載劑。

其中該胜肽片段具有如序列表 SEQ ID NO: 1 所示之胺基酸序列。

其中該組合物之形式可為包埋物、浸泡液、飼料、飼料添加物、口服液、注射疫苗、貼片、粉末、錠劑、注射液體、懸浮液、外用液、滴劑、擦劑、塗劑、乳霜、油膏、軟膏、糊狀劑、膠以及凝膠等。

其中該載劑可為賦形劑、稀釋劑、增稠劑、填充劑、結合劑、崩解劑、潤滑劑、油脂或非油脂的基劑、介面活性劑、懸浮劑、膠凝劑、輔助劑、防腐劑、抗氧化劑、穩定劑、著色劑、香料等。

其中該潤滑劑包含但不限於甘油及油類(如：花生油、蓖麻油)。

其中該基劑包含碳氫化合物(hydrocarbons)，該碳氫化合物包含但不限於硬石蠟、軟石蠟、石蠟油、甘油、蜂蠟、金屬皂、天然油(如：杏仁油、玉米油、花生油、蓖麻油或橄欖油)、羊毛脂及其衍生物、脂肪酸(如：硬脂酸或油酸)或其組合物。

其中該介面活性劑包括陰離子介面活性劑、陽離子介面活性劑、非離子介面活性劑，該介面活性劑包含但不限於山梨醇酐酯(sorbitan esters)、聚氧化乙烯(polyoxyethylene)及其衍生物(如：聚氧化乙烯脂肪酸酯 polyoxyethylene fatty acid esters)、聚羧乙烯(carboxypolymethylene)及其衍生物(如：卡伯漢樹脂 carbopol)。

其中該懸浮劑包含但不限於天然樹酯(natural gums)、纖維素(Cellulose)衍生物無機物質(如：siliceous silicas)、聚乙二醇 540 (polyethylene glycol 540)、聚乙二醇 3350 及丙二醇(propyl glycol)等。

其中該膠凝劑包含任何用於藥學上形成膠體的膠凝劑，該膠凝劑包含但不限於纖維素(Cellulose)衍生物(如：甲基纖維素(methyl cellulose)、羥基

乙基纖維素(hydroxyethyl cellulose)以及羧甲基纖維素(carboxymethyl cellulose)等)、乙烯基聚合物(vinyl polymers)(如：聚乙烯醇(polyvinyl alcohols)、polyvinyl pyrrolidones)、聚羧乙烯(carboxypolymethylene)衍生物(如：卡伯漢樹脂 carbopol)、果膠、膠類(gums)(如：阿拉伯樹膠、黃蓍膠(tragacanth)、藻膠(alginates)、瓊脂(agar)、明膠(gelatin)以及 carrageenates)。

其中該醫藥組合物係以口服、浸泡、注射、塗抹或貼片的方式投予至人體及動物體內。

其中該動物可為畜產動物或水生動物；當為畜產動物時，較佳者為牛、羊、雞或豬，更佳者為雞；當為水生動物時，較佳者為魚類，更佳者為養殖魚類；在此所稱之養殖魚類係指可藉由人工飼養之魚類，較佳為水產養殖業者所養殖之魚類，例如：石斑魚(grouper)、海鱸(cobia)、鯛魚(seabream)、比目魚(halibut)、鮭魚(salmon)、鱒魚(trout)、鯰魚(catfish)、鯉魚(carp)、金魚(goldfish)、吳郭魚(tilapia)與斑馬魚(zebrafish)等，但並不僅限於此。

本發明更進一步提供一種用以篩選能增加動物免疫力之免疫誘導劑(immune elicitors)的方法，包含：

步驟一 將所欲篩選之免疫誘導劑與一飼料混合，藉以獲得一混合物；

步驟二 對一動物口服投予該混合物，亦可使用浸泡方式投予該混合物；

步驟三 檢測該動物體內如序列表 SEQ ID NO: 1 所示之胜肽片段的表現量；以及

步驟四 以該胜肽片段的表現量高低來判斷該免疫誘導劑對該動物抗病的影響。

其中該步驟三中，該胜肽片段之檢測方法的種類在本發明中並沒有特別的限制，所屬技術領域中具有通常知識者可藉由任何方法檢測該胜肽片段的表現量，例如：膠體電泳、西方墨點法、免疫反應法等，但並不僅限

於此；該胜肽片段之檢測亦可藉由檢測能編碼該胜肽片段之 mRNA 的表現量來判定，該 mRNA 的序列如由序列表 SEQ ID NO: 2 所示之核苷酸序列所轉錄而成的序列；該 mRNA 表現量的檢測法，例如北方墨點法，但並不僅限於此。

本發明所述之動物，可為畜產動物或水生動物；當為畜產動物時，較佳者為牛、羊、雞或豬，更佳者為雞；當為水生動物時，較佳者為魚類，更佳者為養殖魚類；在此所稱之養殖魚類係指可藉由人工飼養之魚類，較佳為水產養殖業者所養殖之魚類，例如：石斑魚(grouper)、海鱺(cobia)、鯛魚(seabream)、比目魚(halibut)、鮭魚(salmon)、鱒魚(trout)、鯰魚(catfish)、鯉魚(carp)、金魚(goldfish)、吳郭魚(tilapia)與斑馬魚(zebrafish)等，但並不僅限於此。

本發明又進一步提供一種增加動物抗病力的方法，包含：

步驟 A 提供一藥學有效量之免疫誘導劑，該免疫誘導劑係可誘導動物體產生如序列表 SEQ ID NO:1 所示之抗微生物胜肽；

步驟 B 提供一動物；以及

步驟 C 將該免疫誘導劑投予至該動物的體內。

其中該免疫誘導劑亦可為以上述一種用以篩選能增加動物免疫力之免疫誘導劑(immune elicitors)的方法，以序列表 SEQ ID NO: 1 胜肽表現量或以序列表 SEQ ID NO: 2 mRNA 基因表現量多寡篩選能增加動物免疫力之免疫誘導劑的方法，所篩選出之免疫誘導劑。

其中該免疫誘導劑可進一步包含一藥學上可接受之載劑。

其中該胜肽片段可取自天然的動物尤其是水生動物體中，或以習知化學合成法合成，亦可以習知分子生物學方法製備，分子生物學方法如下：

步驟 a 提供如序列表 SEQ ID NO:2 所示之核苷酸片段；

步驟 b 提供一表現載體；

步驟 c 將該核苷酸片段與該表現載體重組為一重組表現載體；

步驟 d 將該重組表現載體送入宿主細胞中；以及

步驟 e 使該宿主細胞表現該胜肽片段。

其中該宿主細胞可以係大腸桿菌(*E. coli*)、酵母菌及動物細胞，但不僅限於此。

以大腸桿菌(*E. coli*)為例，可選定大腸桿菌(*E. coli*)系統的表現質體後，再選定該表現質體中適當的限制酶切位(restriction enzyme site)，以該限制酶剪切該表現質體，亦以該限制酶剪切含有可編碼本發明之胜肽片段的核苷酸序列之核苷酸片段，將前述經限制酶剪切後的表現質體及核苷酸片段進行接合反應(ligation)，接著將含有可編碼本發明之胜肽片段的核苷酸序列之大腸桿菌(*E. coli*)系統表現質體轉形(transform)入大腸桿菌(*E. coli*)菌體中，該大腸桿菌(*E. coli*)可為 *E. coli* BL21™ (DE3) pLysS，轉形可用電轉形(electro-transformation)或熱休克(heat shock)等任何習知轉形技術來進行，轉形後用誘導物(inducer)誘導大腸桿菌(*E. coli*)表現本發明之胜肽片段，誘導物可為異丙基硫代半乳糖(isopropylthiogalactoside, IPTG)等習知誘導物。

以酵母菌為例，則可選定酵母菌系統的表現質體及該表現質體中適當的限制酶切位後，以該限制酶剪切該表現質體，亦以該限制酶剪切含有可編碼本發明之胜肽片段的核苷酸序列之核苷酸片段，將以限制酶剪切後的表現質體及核苷酸片段進行接合反應，接著將含有可編碼本發明之胜肽片段的核苷酸序列之酵母菌系統的表現質體轉形入酵母菌中，轉形可用任何習知轉形技術來進行，例如可先去除酵母菌的細胞壁，使酵母菌形成原生質球狀體(spheroplast)再進行轉形，或是用鹼性陰離子(如：LiCl 或 RbCl)加上熱休克來處理酵母菌以進行轉形，轉形後用誘導物誘導酵母菌表現本發明之胜肽片段，誘導物可為 IPTG 等習知誘導物。

以動物細胞為例，可選定動物細胞系統的表現質體及該表現質體中適

當的限制酶切位後，以該限制酶剪切該表現質體，亦以該限制酶剪切含有可編碼本發明之胜肽片段的核苷酸序列之核苷酸片段，將以限制酶剪切後的表現質體及核苷酸片段進行接合反應，接著將含有可編碼本發明之胜肽片段的核苷酸序列之動物細胞系統的表現質體轉染(transinfection)入動物細胞中，該動物細胞可為昆蟲細胞或哺乳動物細胞，轉染可用任何習知轉染技術來進行，如用微脂粒感染法(lipofection)或磷酸鈣(calcium phosphate)法來表現本發明之胜肽片段。

此外，為使以本發明之抗微生物的方法處理之動物的抵抗疾病能力可有效提昇，前述之免疫誘導劑可經由口服、浸泡或注射的方式投予至該動物的體內；口服可以係直接口服或添加於飼料中，當以口服方式投予時，為避免該免疫誘導劑於通過該動物的消化道時，被消化道中的消化液所破壞，該免疫誘導劑可進一步藉由習知技術將其進行微包埋處理，以增強其抵抗消化液的能力；該注射方式則包括靜脈注射(intravenous injection, IV)、肌肉注射(Intramuscular injection, IM)及腹腔注射(intraperitoneal injection, IP)等，但並不僅限於此；當以靜脈注射方式投予至動物體內時，為使其能發揮最大的效果。

本發明之組合物或胜肽，可促進動物抵抗病原菌入侵，因此可增加動物抗病力，提昇動物的健康狀態。

本發明之組合物或胜肽還可做為外用防腐劑、殺菌劑之用。

【實施方式】

實施例 1 本發明之抗微生物胜肽(AMP)片段的製備

首先依 Chomczynski 及 Sacchi 的方法(1987)從龍膽石斑(*Epinephelus lanceolatus*)的鰓絲組織分離總 RNA (total RNA)；接下來，從 10 μ g 總 RNA 合成 cDNA，使用含有 200 U Molony 鼠類血癌病毒反轉錄酶(Molony murine leukemia virus reverse transcriptase)、1 mM dNTP、160 U RNase 抑制劑

(inhibitor)及 1.6 µg 隨機引子(random primer)的 1X 反轉錄緩衝液，在 42°C 進行轉錄 30 分鐘。接著以聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)放大(amplify)抗微生物肽(AMP)基因，PCR 係使用含有 20µg 反轉錄產物、0.5 U Taq DNA 聚合酶及 1 µg 正反向 AMP 引子的 80µl 1X PCR 緩衝液，正向 AMP 引子具有如 SEQ ID NO: 3 所示之核苷酸序列，反向 AMP 引子具有如 SEQ ID NO: 4 所示之核苷酸序列，PCR 係於 DNA 溫度循環反應器(thermal cycler)進行，PCR 步驟為在 55 °C 緩冷配對(annealing)1 分鐘 30 秒，在 72 °C 延長(extension)1 分鐘 30 秒，在 94 °C 變性(denaturation)1 分鐘，共 35 個循環(cycle)；PCR 反應終止後，取 15 µl 的 PCR 產物以 2% 洋菜膠體(agarose gel)作電泳分析，接著進行溴乙烷(ethidium bromide)染色。

純化的 PCR 產物會被選殖進 M13mp18 或 pBluescript 的 *Sma*I 位置，並會以雙去氧核糖鏈停止法(dideoxynucleotide chain termination)定序，AMP 基因經定序後得到如序列表 SEQ ID NO: 2 所示的序列；由序列表 SEQ ID NO: 2 所示的序列可知，經龍膽石斑鰓絲中選殖出的抗微生物肽(AMP) cDNA 序列，具有 494 個核苷酸，其中轉譯區域(coding region)由 204 核苷酸所組成，如圖一所示，經演譯(deduced)後得到具有 67 個胺基酸之抗微生物肽(AMP)，其序列如序列表 SEQ ID NO: 1 所示。

另一方面，將純化的 PCR 產物與表現載體 pET31b(+)分別以限制酶 *Alw*NI 剪切，再將剪切後的 PCR 產物及 pET31b(+)進行接合反應，將接合反應後所得含有 PCR 產物的 pET31b(+)轉形至表現宿主 *E. coli* BL21™ (DE3) pLysS 中，在 37 °C 下以 200rpm 振盪培養，並以不同濃度的 IPTG 進行誘導(induce)，結果以 1 mM IPTG 誘導的效果最好。以 12% SDS-PAGE 分析，發現 *E. coli* BL21™ (DE3) pLysS 所表現的 AMP 肽位於不可溶蛋白部分，其分子量約為 2.7 kDa，如圖二所示，西方墨漬法亦證明其確為 AMP 肽。將所得不可溶蛋白部分以組胺酸親和層析法(His·Bind® chromatography)進

行純化，接著以溴化氰(CNBr)進行剪切，藉此可得到純化的 AMP 胜肽。

實施例2 不同動物的抗微生物胜肽(AMP)序列之比對

在已知的物種中，抗微生物胜肽皆屬於小分子的胜肽，將本發明實施例 1 中所選殖出的抗微生物胜肽，與其他魚類之抗微生物胜肽胺基酸序列進行比對，比對結果如圖三所示，本發明之抗微生物胜肽與點帶石斑的抗微生物胜肽胺基酸序列最為相近，而在其他魚種則是與鱸魚和比目魚較為相近，而在抗微生物胜肽的分類上，各物種間均各成一類，但在相同物種裡抗菌肽的類型也不相同，不論脊椎動物或是無脊椎動物，都難以找到一定的規則性。

本發明之抗微生物胜肽具有 67 個胺基酸(如序列表 SEQ ID NO: 1 所示)，其中包含訊息胜肽(signal peptide)、成熟胜肽(mature peptide)及 prodomain，其 3D 立體結構如圖四所示。訊息胜肽具有如序列表 SEQ ID NO: 5 所示之胺基酸序列，主要在細胞內訊息傳遞時產生功能進行切割，剩下成熟胜肽與 prodomain。成熟胜肽具有如序列表 SEQ ID NO: 6 所示之胺基酸序列，是主要與病菌作用的位置，帶有電荷可與細菌的細胞膜做結合，目前可能之 AMP 作用模式為筒狀穿鑿模式(barrel-stave mode)以 α -helix 抗菌肽捲成筒狀插入細胞膜內，利用抗菌肽疏水性端與菌的細胞膜接觸，另一親水性端互相面對面，則為抗菌肽的親水性端面向中心點，以聚合體的方式在膜上形成孔洞，來造成菌體內外滲透壓不平行，導致菌體死亡(邱, 2001)。地毯狀覆蓋模式(carpet mode)(Shai, 1999)。帶正電之抗菌肽與帶負電之細菌細胞膜結合後，親水性端與膜反應，抗菌肽經過翻轉後導致疏水性的部分，包圍部分細菌細胞膜進而把此膜構造移除，破壞菌體膜的結構使得病原菌死亡(楊, 2004)。造成細菌的死亡，有效的抵抗病原菌產生內生型免疫。

Prodomain 具有如序列表 SEQ ID NO:7 所示之胺基酸序列，其功能則

是中和成熟胜肽的電荷，當在成熟胜肽不需要與外來病原菌作用時使成熟胜肽不具有活性，以免傷害到宿主本身(Yin *et al.*,2006)。成熟胜肽帶正電會與帶負電的細菌細胞膜作用，而在生物體本身細胞膜也為帶負電，抗菌肽無法專一性的辨認何為外來病原菌與生物體本身，所以需要 prodomain 來中和抗菌肽的電荷，以免造成生物體的傷害。

實施例3 龍膽石斑抗菌肽結構及極性分析

使用 Kyte-Doolittle hydropathy blots 程式分析 SEQ ID NO: 6 AMP 成熟胜肽，顯示第 7 到 16 胺基酸後具有明顯疏水性(hydrophobic)及親水性(hydrophilic)交錯的區域(如圖四、圖五及圖十四所示)。在使用國家衛生研究院巨分子序列分析軟體中 protein analysis 之 HelicalWheel 指令分析疏水性及親水性胺基酸的分佈以及 3-D 結構圖，可以發現龍膽石斑抗微生物胜肽所形成 α 螺旋(α helix)會有明顯疏水性及親水性的分部(如圖五及圖十四所示)，該抗微生物胜肽屬於兩性(amphipathic)分子，為傳統的抗微生物胜肽(Hancock and Lehrer, 1998)。

由本實施例可推測龍膽石斑抗微生物胜肽的殺菌機制為筒狀穿鑿模式或是地毯狀覆蓋模式，因為龍膽石斑抗微生物胜肽結構為 α 螺旋帶正電，當在殺病原菌細胞膜作用的時候，抗菌肽需要為兩性分子，才能順利把病原菌的膜產生孔洞，造成滲透壓不平衡使病原菌死亡(Shai, 1999)。ExPASy Proteomics 軟體分析後在第 30 至 35 胺基酸位置上的 N-myristoylation site 主要功能在於使蛋白質醯化與 C-14 飽和脂肪酸結合，推測為抗菌肽與細胞膜上的磷脂質結合用(Towler *et al.*,1998)。由 3D 立體結構圖預測可得知，龍膽石斑 AMP 分為三個部分，而在成熟胜肽的部分為 α -helix 結構(如圖四所示)，屬於第一類的兩性抗微生物胜肽，推測可能為本發明抗微生物胜肽主要為與細菌的細胞膜作用位置。

實施例4 抗微生物胜肽(AMP)之 mRNA 在石斑魚體內的分布

本實驗以即時定量聚合酶連鎖反應(real-time quantitative PCR)技術，分析抗微生物肽(AMP)基因在龍膽石斑各組織之表現模式。利用螢光染劑 SYBR green I 可鑲嵌在 DNA 雙股凹槽上，經由鹵素燈激發而產生螢光的特性，偵測其螢光值的量。當 SYBR green I 沒有鑲嵌在雙股 DNA 上時，螢光背景值非常低；當 SYBR green I 開始鑲嵌在 PCR 放大的標的基因片段上時，螢光值訊號也會相對的提高。如無非特異性引子的結合，或基因組 DNA (genomic DNA) 的污染等干擾影響，PCR 反應合成標的基因之 DNA 的合成狀態，可區分為：(1)兩倍倍增的幾何級數倍增期(geometric phase)；(2)反應物不足時，基因合成非兩倍倍增的線性增加期(linear phase)；以及(3)最後反應物耗盡、失效，達反應終點的高原期(plateau phase)。因此要偵測標的基因在組織器官的表現量，必須在 PCR 反應的幾何級數倍增期(geometric phase)定量才具有意義。Real-time quantitative PCR 的原理就是利用不同濃度模板在相同 PCR 反應條件下，含有高濃度模板的反應會較快達到幾何級數倍增期，相對的，低濃度的模板則較慢達到，將定義達到幾何級數倍增期中點的臨界 PCR 循環數目定為 CT (threshold cycle)，亦即 CT 值會隨模板濃度降低而升高。利用不同濃度標準品在同步定量 PCR 反應的 CT 值，由軟體計算繪製標準曲線與回歸公式，以內插法換算待測樣品內含有標的基因絕對表現量。同時若要得到熔解曲線(Melting Curve)，則在標的基因放大循環後進行 熔解溫度(melting temperature) 66°C-99°C 的連續螢光偵測，分析熔解曲線的結果可以瞭解引子是否會自行有互補的現象，或是引子的專一性，以更正確的幫助了解實驗定量的正確性。

4.1 抽取點帶石斑各組織之總 RNA (total RNA)

分別取點帶石斑之腦、鰓絲、眼、心臟、頭腎、肝臟、脾、腸、胃、肌肉、血液、皮膚組織，加入 10 倍體積之 TRIzol reagent (Invitrogen, U.S.A.)，用剪刀先將組織剪碎再用均質棒打碎，加入 1/5 體積的氯仿(chloroform)，

強力搖晃 30 秒，置於室溫下靜置 10 分鐘，在 4℃ 下 12000xg 離心 15 分鐘；吸取上清液至新的微量離心管中，加入 TRIzol reagent 等量體積的異丙醇(isopropanol)均勻混合，置於室溫下靜置 10 分鐘，在 4℃ 下 12000xg 離心 15 分鐘；將 RNA 溶解在 20µl DEPC 水中，置於 55℃ 下溶解 10 分鐘，然後儲存在 -80℃ 冰箱中備用，以測量 RNA 濃度與純度比值。

4.2 反轉錄酶反應 (Reverse Transcription)

將萃取出來的 RNA 每管定量至 5 µg 之 total RNA 並進行反轉錄酶反應。

4.3 即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative PCR)

專一性引子(Primer)根據 SEQ ID NO: 1 設計 AMP 基因部分 cDNA 序列，利用 LightCycler Probe Design program 設計即時定量聚合酶連鎖反應專一性引子(primer)，AMP 基因分別利用 real-time quantitative PCR AMP 專一性引子 A3 及 A4 (其序列分別如序列表 SEQ ID NO: 8 及 SEQ ID NO: 9 所示)進行 real-time quantitative PCR。

4.4 即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative PCR)

4.4.1 標準曲線製備

4.4.1.1 小量質體備製 (Mini-preparation)

將 SEQ ID NO: 1 定序且確定含有 Mx 基因與 AMP 基因部分 cDNA 序列之菌種由 -80℃ 冰箱中取出，培養於 30 ml 的 LB/Ampicillin 培養液 (Luria-Bertani medium) 中，以 37℃ 震盪培養至隔夜約 16 小時後，取出菌液並進行小量質體製備。

取出隔夜培養之菌液 1 ml 置入 1.5 ml 微量離心管中，於 4℃ 下以 12,000xg 離心 5 分鐘，倒掉上清液，加入 150 µl Solution I (50 mM glucose、25 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH 8.0)重新懸浮菌體，加入 200 µl 新鮮配製的 Solution II (0.2N NaOH、1% SDS)，置於冰上 10 分鐘，加入 150µl Solution III (3 M potassium acetate、10% glacial acetic acid)，置於冰上 5 分

鐘，於 4 °C 下以 12,000xg 離心 5 分鐘，收集上清液至新的微量離心管中，加入等量體積的飽和酚(phenol)與氯仿(chloroform)，強力搖晃 30 秒，置於室溫下靜置 10 分鐘，在 4 °C 下以 12,000xg 離心 15 分鐘。

收集上清液至新的微量離心管中，加入兩倍體積的 95 %冰酒精，混合均勻置於-20 °C 下 20 分鐘，於 4 °C 下以 12,000xg 離心 5 分鐘，倒掉上清液留下沉澱物，以 70 %酒精洗滌沉澱物兩次，然後真空乾燥離心沉澱物，將沉澱物溶於 20 µl 無菌水中，存於-20 °C 備用。

4.4.1.2 質體DNA濃度和純度的計算

以分光光度計測量 OD260，計算質體 DNA 的濃度的標準為 1 OD260 = 50 µg of DNA / ml，其公式為 $50 \mu\text{g} \times \text{dilute factor} \times A_{260} = \mu\text{g} / \text{ml}$ 。質體 DNA 純度以 OD260 / OD280 的比值介於 1.6~1.8 之間為較純的 DNA。

待質體 DNA 濃度計算出來後，將質體 DNA 濃度調整至 1 µg/µl，並依 10 倍稀釋方式由 10^{-1} 連續稀釋至 10^{-9} ，稀釋後將質體 DNA 存於-20°C 備用。

4.4.1.3 製備標準曲線

分別由 10^{-4} - 10^{-8} 之稀釋後質體溶液中取 3 µl 置於反應毛細管中，再分別加入 2.4 µl MgCl₂、1 µl SYBR、real-time quantitative PCR AMP 專一性引子 A3 及 A4 (其序列分別如序列表 SEQ ID NO: 8 及 SEQ ID NO: 9 所示)各 0.5 µl、12.6 µl 無菌水，最後總體積為 20 µl；將反應毛細管置入及時定量分析儀(LightCycler 1.2)中，設定以下條件反應：95°C 解離 10 分鐘；95°C 解離 0 秒；64°C 黏合 10 秒；72°C 合成 15 秒；解離、黏合、合成步驟重複 40 個循環後降溫至 40°C 後持續升溫至 95°C，以解離反應後產物並連續偵測螢光值。反應後偵測結果以 LightCycler Software 3.5 program 分析後製作標準曲線。

4.4.2.1 龍膽石斑各組織即時定量聚合酶連鎖反應偵測

取 3 µl 實施例 4.2 所製得之反轉錄酶反應(RT)產物置於反應毛細管中，分

別加入2.4 μl MgCl_2 、1 μl SYBR、real-time quantitative PCR AMP專一性引子A3及A4 (其序列分別如序列表SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 9所示)各0.5 μl 、12.6 μl 無菌水，最後總體積為20 μl 。將反應毛細管置入及時定量分析儀(LightCycler 1.2)中，設定以下條件反應：95°C解離10分鐘；95°C解離0秒；64°C黏合5秒；72°C合成15秒；解離、黏合、合成步驟重複40個循環後降溫至40°C後持續升溫至95°C，以解離反應後產物並連續偵測螢光值。反應後偵測結果以LightCycler Software 3.5 program配合標準曲線分析，分析後所得數據單位為 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，接著除以質體的鹼基對數目，再除以鹼基對分子量660 dalton以換算成 $\text{mole}/\mu\text{l}$ ，乘以 6.02×10^{23} 得copies/ μl 。實驗所得的數據，以SAS (Statistic Analysis System)軟體，運用單變量分析(One-way analysis of variance)，利用Duncan's Multiple Range Test比較各因子間顯著差異程度($p < 0.05$)，所得數據以平均 $\pm$ 標準偏差(Mean $\pm$ SD)表示；本發明中所有AMP基因表現分析均使用此方法。

請參閱圖六，由AMP基因在各組織間之表現模式實驗結果顯示，龍膽石斑在腦、心臟、肝臟、脾臟、腸、胃、肌肉、血液、鰓絲、眼睛、頭腎、皮膚及鰭均有AMP基因的表現；頭腎的表現量最高，其次是脾臟、鰓絲、血液。這些組織都具有血液流動相關組織，進一步證明AMP基因可能是由血球細胞所分泌。在比目魚的AMP研究指出，鰓在魚類中也是一個重要的免疫器官(Murray *et al.*, 2003)；而由本實施例之結果顯示，AMP基因在鰓絲有明顯的表現(如圖六所示)，因此在本發明接下來的實施例中，將以鰓絲作為分析AMP基因表現的指標性組織。

實施例5 注射仿病毒核酸之藥品polyinosinic-polycytidylic acid (polyI:C) 至龍膽石斑內，分析其抗微生物肽(AMP)基因表現情形

將龍膽石斑魚分成四組，每組分別注射不同濃度之仿病毒核酸藥品polyinosinic-polycytidylic acid (polyI:C)，以每公克魚體重(BW)為單位，每公

克魚體重注射藥品之體積為 200 μ l，各組 poly I:C 的注射濃度分別為 0 μ g/gBW (對照組)、1 μ g/gBW、2 μ g/gBW、5 μ g/gBW，溶劑為石斑魚之 PBS，以肌肉注射，注射在背部肌肉。24 小時後使用 150ppm 的 MS-222 (Ethyl 3-amino-benzoate methanesulfonate salt)，讓魚麻醉降低刺激；分別取鰓絲、頭腎、脾臟、腦、血液、肝、皮膚等七個組織，利用 TRIzol reagent 萃取 total RNA，保存於 -80 $^{\circ}$ C 冰箱，以進行即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative PCR) 分析 AMP 基因表現模式。

各組織在注射不同濃度之 poly I:C 24 小時後的 AMP 基因表現如圖七所示；以鰓絲作為分析 AMP 基因表現的指標性組織來看，以每克魚體重注射 2 μ g poly I:C 之處理組的 AMP 基因表現量最高。

針對每克魚體重注射 2 μ g poly I:C 之處理組，分別在注射後 12 小時、24 小時、48 小時、72 小時取其頭腎、腦、脾臟、肝臟、血液、皮膚和鰓絲之 total RNA，利用即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative PCR) 分析 AMP 基因表現模式，結果如圖八所示，在 72 小時的長時間處理下，鰓絲與頭腎的 AMP 基因表現均比對照組高，推測因為生物體誘導的抗微生物肽是免疫的第一道防線，當外來物質進入生物體內時，抗微生物肽 (AMP) 基因可能也會被誘導來對抗外來物。

實施例6 注射不同濃度之脂多醣類 (lipopolysaccharide, LPS) 至龍膽石斑內，分析其抗微生物肽 (AMP) 基因表現情形

將龍膽石斑魚分成四組，每組分別注射不同濃度之 LPS，以每公克魚體重 (BW) 為單位，每公克魚體重分別注射 0 μ g (對照組)、5 μ g、10 μ g、15 μ g 的 LPS，每公克魚體重的注射物中添加 200 μ l 不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant)，注射方式為腹腔注射。24 小時後使用 150ppm 的 MS-222 (Ethyl 3-amino-benzoate methanesulfonate salt)，讓魚麻醉降低刺激；分別取頭腎、腦、脾臟、肝臟、血液和鰓絲等組織，利用 TRIzol reagent 萃取 total RNA，

保存於-80℃冰箱，以進行即時定量聚合酶連鎖反應(real-time quantitative PCR)分析 AMP 基因表現模式。

各組織在注射不同濃度之 LPS 24 小時後的 AMP 基因表現如圖九所示，AMP 基因在鰓絲組織與頭腎組織在各濃度的 LPS 下，均較對照組均有明顯增加表現量($p<0.05$)，顯示 AMP 基因在不同組織所誘導的表現量不相同。

以腹腔注射每克魚體重 15 μ g 的 LPS，分別在 24 小時、48 小時、96 小時、132 小時進行採樣，探討頭腎、腦、脾臟、肝臟、血液和鰓絲之 AMP 基因表現量。如圖十所示，結果顯示鰓絲組織之 AMP 基因在 48 小時才會有明顯的增加表現量；而脾臟和頭腎均在 24 小時即有明顯的增加表現量。由此可以推論，生物體各種器官的免疫反應速度不盡相同，且會因為受到刺激的位置不同，而改變免疫產生的組織。在 Kim (2005)的研究中發現比目魚在不同組織被 LPS 誘導下，產生免疫反應的時間也會相對不同，而且長時間下有些組織的表現量會降低。

實施例7 改變環境因子鹽度後龍膽石斑抗微生物肽(AMP)基因表現情形之分析

將龍膽石斑魚分成一對照組及一實驗組，對照組為純海水(鹽度為 35‰)，而實驗組則每天鹽度減少 10 ‰，處理三天使實驗組鹽度為 5 ‰，放置 24 小時後，使用 150 ppm 的 MS-222 (Ethyl 3-amino-benzoate methanesulfonate salt)，讓魚麻醉降低刺激；分別取鰓絲、頭腎、脾臟、腦、血液、肝、皮膚等組織，利用 TRIzol reagent 萃取 total RNA，保存於-80℃冰箱，以進行即時定量聚合酶連鎖反應(real-time quantitative PCR)分析 AMP 基因表現模式。

如圖十一所示，實驗組在低鹽度環境下，其 AMP 基因在頭腎、皮膚、血液、鰓絲等組織中有明顯的增加表現量。可見在鹽度改變的時候會免疫基因會被誘導，進而增加魚類的免疫能力，改變鹽度為 5‰時，推測會刺激

龍膽石斑內生型免疫系統，使龍膽石斑不易受到病原菌感染或發病，使得龍膽石斑較不容易受到細菌和病毒感染。

魚類免疫緊迫包括：鹽度改變、溫度改變、溶氧不足、化學藥品污染等，使魚產生許多生理上的改變，對環境的緊迫作出反應。當環境出現緊迫時，魚類的生理、外表、組織和細胞都會產生免疫反應(Barton and Blanchard, 2001)。本實施例結果進一步確認，可藉由改變養殖環境鹽度以提高 AMP 基因之表現量，進一步增強龍膽石斑抗病毒與抗細菌性感染的能力；本概念可應用於養殖業，以提升魚體免疫力及抗病能力，達到減少死亡，提高存活率與產量等目的。

實施例8 化學合成石斑抗微生物胜肽對各病原菌之體外敏感性試驗

以科羅耐國際科技有限公司合成抗微生物胜肽，純度經由高效能液相層析(high performance liquid chromatography, HPLC)測試純度達 90% 以上；利用該合成抗微生物胜肽對細菌進行最小抑菌濃度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最小殺菌濃度(minimum bactericidal concentration, MBC)試驗。

8.1 菌液的製備

將大腸桿菌(*Escherichia coli* DH5 α)、哈威氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、鰻弧菌(*Vibrio anguillarum*)、鮭弧菌(*Vibrio salmonicida*)、產氣單胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)，將此七株菌株培養於 LBA (*E. coli* DH5 α)或 TSA (+1.5% NaCl)上，經過 16 小時 37°C 培養後，刮下菌落溶於指定培養液，使 OD₅₄₀ 為 1 時(濃度約為 1×10^9 菌數)，取 500 μ l 菌液加入 500 μ l 的 LB 或 TSB (+1.5% NaCl)使菌液濃度為 1×10^8 菌數/ml。

8.2 敏感性試驗 (Susceptibility test)

使用 96 孔培養皿在每個凹槽加入 130 μ l 的菌液，菌液濃度為 1×10^8 菌

數/ml，在加入 20 μ l 不同濃度(0.075 μ M-0.675 μ M)的化學合成龍膽石斑抗微生物肽後，以 37°C 培養 16 小時，觀察沒有細菌生長而呈現澄清的菌液之最低抗微生物肽濃度，此為最小抑菌濃度(MIC)；再將呈現澄清的菌液之組別，取完全菌液塗抹在培養於 LBA (*E. coli* DH5 α)或 TSA (+1.5% NaCl) 上，經過 16 小時 37°C 培養後，觀察菌落則得知最小殺菌濃度(MBC)，每個實驗組各有三重複及對照組。

測試結果如表一所示，此七株菌最小抑菌濃度(MIC)分別為：大腸桿菌(*Escherichia coli* DH5 α) 0.075 μ M、哈威氏弧菌(*Vibrio harveyi*) 0.15 μ M、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*) 0.15 μ M、鰻弧菌(*Vibrio anguillarum*) 0.15 μ M、鮭弧菌(*Vibrio salmonicida*) 0.15 μ M、產氣單胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 0.375 μ M、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) 0.075 μ M；而其最小殺菌濃度(MBC)分別為 0.15 μ M、0.225 μ M、0.375 μ M、0.45 μ M、0.3 μ M、0.675 μ M、0.525 μ M。

表一 龍膽石斑抗微生物肽(AMP)對不同病原菌之最小抑菌濃度(MIC)與最小殺菌濃度(MBC)值

菌種	最小抑菌濃度(MIC)	最小殺菌濃度(MBC)
葛蘭氏陰性菌		
產氣單胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	0.375 μ M	0.675 μ M
鰻弧菌 (<i>Vibrio anguillarum</i>)	0.15 μ M	0.45 μ M
鮭弧菌 (<i>Vibrio salmonicida</i>)	0.15 μ M	0.30 μ M
哈威氏弧菌 (<i>Vibrio harveyi</i>)	0.15 μ M	0.225 μ M
溶藻弧菌 (<i>Vibrio alginolyticus</i>)	0.15 μ M	0.375 μ M
大腸桿菌 (<i>Escherichia coli</i> DH5 α)	0.075 μ M	0.15 μ M
葛蘭氏陽性菌		
表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	0.075 μ M	0.525 μ M

由本實施例結果可知，本發明之抗微生物胜肽可殺死葛蘭氏陽性菌與葛蘭氏陰性菌，對不同微生物均有殺菌與抑菌效果，因此，本發明之抗微生物胜肽亦能作為廣效性殺菌劑或防腐劑。

實施例9 抗微生物胜肽(AMP)對石斑魚之保護作用

將龍膽石斑魚分成四組，分別注射 PBS (對照組)、弧菌(*Vibrio harveyi*，濃度為 1×10^6 cfu/fish)、抗微生物胜肽 cecropin (濃度為 $1 \mu\text{M}/\text{fish}$) + 弧菌(濃度為 1×10^6 cfu/fish)、本發明之抗微生物胜肽(gAMP，濃度為 $1 \mu\text{M}/\text{fish}$) + 弧菌(濃度為 1×10^6 cfu/fish)，經 24、48、72 小時後，觀察各組之死亡率，結果如圖十二所示，注射 PBS 組(對照組)在 72 小時後死亡率為 0%；注射弧菌組在 72 小時後死亡率為 100%；注射抗微生物胜肽 cecropin + 弧菌組在 72 小時後死亡率為 80%；注射本發明之抗微生物胜肽(gAMP) + 弧菌在 72 小時後死亡率為 60%；此實驗僅注射各種 AMP 一次，由結果顯示，注射本發明之抗微生物胜肽(gAMP)已可顯著降低龍膽石斑魚 40% 的死亡率，可見本發明之抗微生物胜肽(gAMP)已達到對魚隻提供保護作用之功效。

由注射本發明之抗微生物胜肽(AMP)對抗病力的影響試驗可直接證明，當應用本發明之抗微生物胜肽(AMP)時，確實會增加石斑魚的抗病力。由於 AMP 具有廣效性殺菌能力，故使用本發明之抗微生物胜肽(AMP)可對動物提供保護，提高其抗病能力，該動物應不限制在水產動物，亦包括畜產動物及人類。

實施例10 浸泡中草藥後龍膽石斑抗微生物胜肽(AMP)基因表現情形之分析

將龍膽石斑魚分成四組，分別為純海水沒放置任何中藥的對照組，與各含有 50 ppm 的板藍根(*Isatis indigotica*)、黃耆(*Astragalus membranaceus*)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)之海水的處理組；以強烈打氣使中藥均勻的混何 30 公升水體中，浸泡 24 小時後，使用 150ppm 的 MS-222 (Ethyl

3-amino-benzoate methanesulfonate salt), 讓魚麻醉降低刺激; 分別取鰓絲、頭腎、脾臟、腦、血液、肝、皮膚等組織, 利用 TRIzol reagent 萃取 total RNA, 保存於-80°C 冰箱, 以進行即時定量聚合酶連鎖反應(real-time quantitative PCR)分析 AMP 基因表現模式。

如圖十三所示, 浸泡黃耆之處理組, 其血液中 AMP 基因的表現具有顯著的差異($p < 0.05$); 由於黃耆具有內源性干擾素誘導作用, 能增強細胞產生干擾素能力(段, 2005)。另外在老鼠研究中, 利用黃耆萃取物中的皂素成分中含有 cycloastragenol 與 cyclogalenin, 可以增加免疫球蛋白(IgG)的能力(Yang *et al.*, 2005)。本實施例結果顯示黃耆對動物(包括水產動物)具有顯著的免疫調節功能, 包括非特異性免疫, 且能誘導產生干擾素, 是一個很強的生物調節劑, 對臨床疾病是一種很有效用的藥物。

本發明所提供之一種抗微生物肽, 與其他習用技術相互比較時, 更具有下列之優點:

1. 由上述說明及實施例可知, 本發明之抗微生物肽基因在免疫系統的表現情形、抗微生物肽殺菌種類與濃度、物理因子(鹽度)、免疫刺激物(polyI:C 及 LPS)、中草藥等分析, 均證實本發明之抗微生物肽基因表現和石斑魚的免疫力成正相關, 該抗微生物肽(AMP) mRNA 表現量上升時, 石斑魚的抗病能力亦上升; 在注射本發明之抗微生物肽(AMP)對抗病力的影響上, 更直接證明當使用本發明之抗微生物肽(AMP)時, 確實會增加石斑魚的抗病力。

2. 由本發明之抗微生物肽(AMP)之特殊化學結構, 可得知該抗微生物肽(AMP)與微生物細胞膜作用能力, 顯示此抗微生物肽具有特殊殺菌能力, 且對微生物殺菌能力具非特定性(non-specific)與廣效性; 因此, 本發明所提供之抗微生物肽(AMP), 確實具有抗菌、抗病的功能。

上列詳細說明係針對本發明之一可行實施例之具體說明, 惟該實施例



並非用以限制本發明之專利範圍，凡未脫離本發明技藝精神所為之等效實施或變更，均應包含於本案之專利範圍中。

綜上所述，本案不但為一新穎之抗微生物胜肽，並具有上述多項功效，應已充分符合新穎性及進步性之法定發明專利要件，爰依法提出申請，懇請 貴局核准本件發明專利申請案，以勵發明，至感德便。

【圖式簡單說明】

圖一為龍膽石斑抗微生物胜肽基因全長之 cDNA 序列。總共 494 核苷酸組成，包含 92 個核苷酸所組成的 5' 端未轉譯區(5' UTR)、204 核苷酸所組成的轉譯區域(coding region)及 198 核苷酸所組成的 3' 端未轉譯區域(3' UTR)。起始密碼 (start codon) ATG 以粗體表示，終止密碼(stop codon)TGA 以星號(*)表示。轉譯區域推測可以轉譯成 67 胺基酸，其中包含訊息胜肽(signal peptide)22 個胺基酸(以底線標示)，成熟胜肽(mature peptide)25 個胺基酸(以方框標示)，以及 prodomain 20 個胺基酸(以波浪底線標示)。

圖二為重組抗微生物胜肽(recombination AMP, rAMP)蛋白質之 SDS-PAGE 電泳圖。利用 15%之 SDS-PAGE 檢視誘發結果；箭號表示 rAMP。

圖三為各物種抗微生物胜肽胺基酸序列比對(alignment)。龍膽石斑(*Epinephelus lanceolatus*)，點帶石斑(*Epinephelus coioides*)，翹嘴鰻(*Siniperca chuatsi*)，歐洲狼鱸(*Dicentrarchus labrax*)，金眼狼鱸(*Morone chrysops*)，斑紋鱸魚(*Morone saxatilis*)，比目魚(*Pleuronectes americanus*)，庸鰈(*Hippoglossus hippoglossus*)，大西洋擬庸鰈(*Hippoglossus platessoides*)。

圖四為龍膽石斑抗微生物胜肽 3D 立體結構。係使用 protein structure modelling 分子模擬龍膽石斑抗菌肽 3D 結構圖，含有訊號胜肽、成熟胜肽、prodomain。

圖五為龍膽石斑 AMP 成熟胜肽(mature peptide)疏水性(hydrophobic)及親水性區域(hydrophilic)之預測。以 Kyte-Doolittle hydropathy plots 程式分析

AMP 成熟胜肽的極性區域。

圖六為 AMP 基因在龍膽石斑各組織之表現情形。分別取龍膽石斑之腦、心臟、肝臟、脾臟、腸、胃、肌肉、血液、鰓絲、眼睛、頭腎、皮膚及鰭組織以即時定量聚合酶連鎖反應(real-time quantitative RT-PCR)分析抗微生物胜肽基因在各組織表現之模式。

圖七為在不同濃度 poly I:C 處理下對龍膽石斑各組織的 AMP 基因表現之影響。每隻魚注射濃度分別為 0 $\mu\text{g/g}$ BW(對照組)、1 $\mu\text{g/g}$ BW、2 $\mu\text{g/g}$ BW、5 $\mu\text{g/g}$ BW 之 poly I:C；龍膽石斑處理 24 小時後取頭腎、腦、脾臟、肝臟、血液和鰓絲之 total RNA，利用即時定量聚合酶連鎖反應分析 AMP 基因 mRNA 表現之影響，並以 Duncan's Multiple Range Test 統計分析 a、b、c 表示有顯著差異($p < 0.05$)；實驗數據以平均值 $\pm$ SD 表示。

圖八為在不同時間點 poly I:C 處理下對龍膽石斑各組織的 AMP 基因表現之影響。每隻魚注射濃度為 2 $\mu\text{g/g}$ BW 的 poly I:C 處理後，分別在 12 小時、24 小時、48 小時、72 小時取龍膽石斑頭腎、腦、脾臟、肝臟、血液、皮膚和鰓絲之 total RNA，利用即時定量聚合酶連鎖反應分析 AMP 基因 mRNA 表現量，並以 Duncan's Multiple Range Test 統計分析 a、b、c 表示有顯著差異($p < 0.05$)，實驗數據以平均值 $\pm$ SD 表示。

圖九為在不同濃度免疫誘導物 LPS 處理下對龍膽石斑各組織的 AMP 基因表現之影響。每隻魚注射 LPS 的濃度分別為 0 $\mu\text{g/g}$ BW(對照組)、5 $\mu\text{g/g}$ BW、10 $\mu\text{g/g}$ BW、15 $\mu\text{g/g}$ BW，24 小時後取龍膽石斑頭腎、腦、脾臟、肝臟、血液和鰓絲之 total RNA，利用即時定量聚合酶連鎖反應分析 AMP 基因 mRNA 表現之影響，並以 Duncan's Multiple Range Test 統計分析 a、b、c、d 表示有顯著差異($p < 0.05$)，實驗數據以平均值 $\pm$ SD 表示。

圖十為在不同時間點免疫誘導物 LPS 處理下對龍膽石斑各組織的 AMP 基因表現之影響。每隻魚注射 LPS 的濃度為 15 $\mu\text{g/g}$ BW，於處理後 24 小

```

aagagctgca agacctggac caacgtgcct ttgaacgaga gaaagctttt gcctgagtcc 300
atgatagcct agtgaaggag ccactcattg ttaacacaaa aagaaaaagt ttttgttttt 360
gagtatagga agtattgggtt caattgggta accaaaatat ttacactga tctaattgat 420
tttggaaaaa tgtagttat ttgaaataaa tctggaatct gtgttacaca caaaaaaaaa 480
aaaaaaaaaa aaaa 494

```

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引子，正向 AMP 引子

```

<400> 3
atgaggtgca tcgccctctt t 21

```

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引子，反向 AMP 引子

```

<400> 4
tcaggcaaaa gctttctctc g 21

```

<210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 龍膽石斑 (*Epinephelus lanceolatus*)

```

<400> 5
Met Arg Cys Ile Ala Leu Phe Leu Val Leu Ser Leu Val Val Leu Met
1          5          10          15
Ala Glu Pro Gly Glu Gly
20

```

I316944

<223> PCR 引子，real-time quantitative PCR AMP 專一性引子 A4

<400> 9

caaaggcacgt tggtc

15

五、中文發明摘要：

一種抗微生物胜肽，該胜肽具有如序列表 SEQ ID NO: 1 所示之胜肽序列，該胜肽可用以有效抑制及殺死微生物，減少病原菌，達到治療目的，以提昇動物體之健康狀態；另外可藉由誘導編碼該抗微生物胜肽之免疫基因表現，以提升動物體之免疫力及抗病能力，達到減少死亡，提高動物存活率與產量。

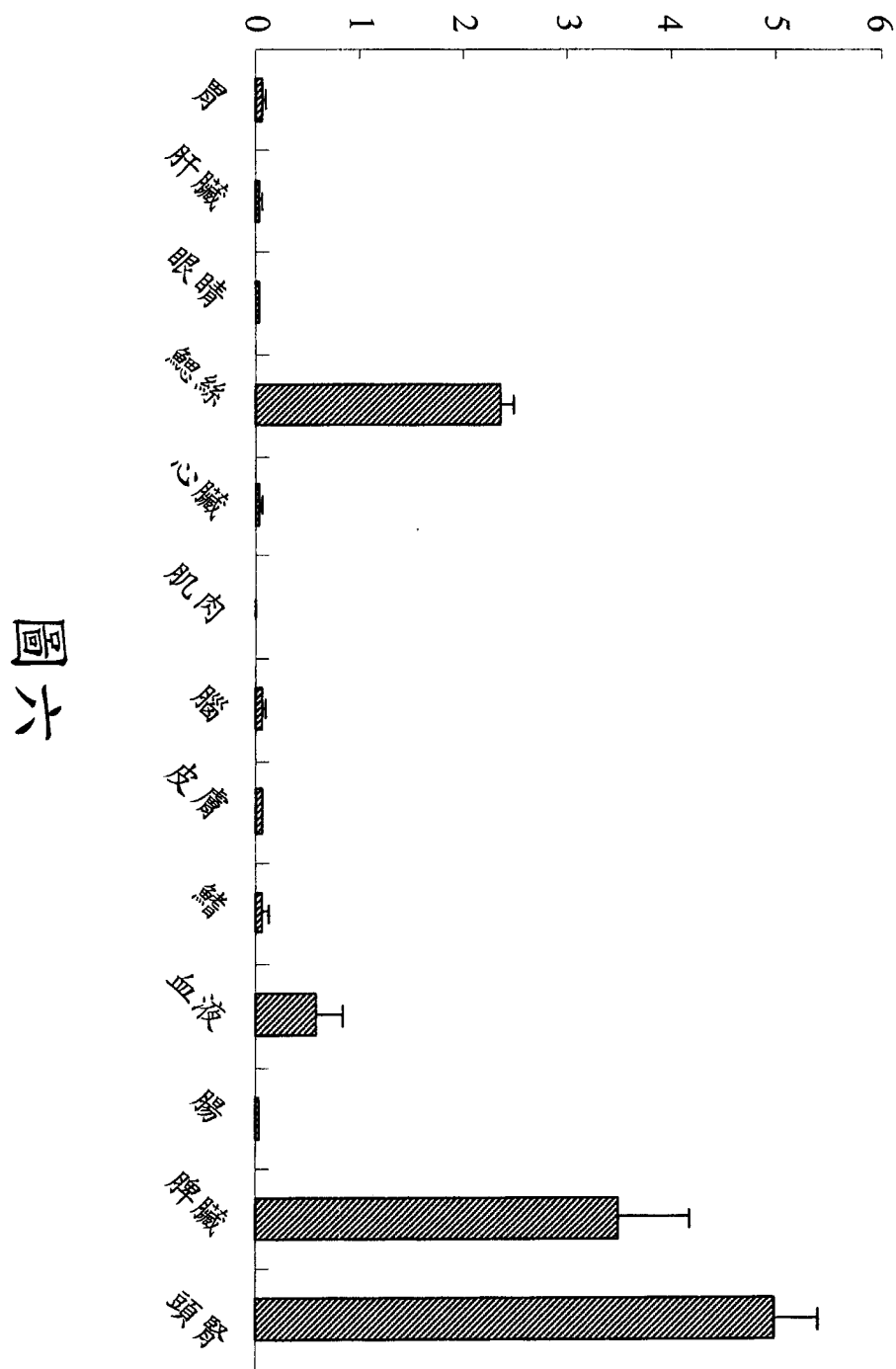
六、英文發明摘要：

十一、圖式：

1 AG AGA CTT GCA GCA TCT GTA GAT CTC ACA CTG CTC GAT TGG CCC TCT TCA GTA ACA GCT TTT TGA CAT TCA CGC
75 TCA GTC ACT GGA AAG AGG ATG AGG TGC ATC GCC CTC TTT CTT GTG TTG TCG CTG GTG GTC CTC ATG GCT GAA CCC
150 GGG GAG GGT TTT ATC TTC CAC GTC ATC AAA GGA CTC TTT CAC GCT GGC AAG ATG ATC CAT GGA CTT GTC ACC AGG
225 AGA CGA CAT GGC ATG GAA GAG CTG CAA GAC CTG GAC CAA CGT GCC TTT GAA CGA GAG AAA GCT TTT GCC TGA GTC
300 CAT GAT AGC CTA CTG AAG GAG CCA CTC ATT GTT AAC ACA AAA AGA AAA AGT TTT TGT TTT TGA GTA TAG GAA GTA
375 TTG GTT CAA TTG GGT AAC CAA AAT ATT TTA CAC TGA TCT AAT TGA TTT TGG AAA AAT GTT AGT TAT TTG AAA TAA
450 ATC TGG AAT CTG TGT TAC ACA CAA AAA AAA AAA AAA AAA AA

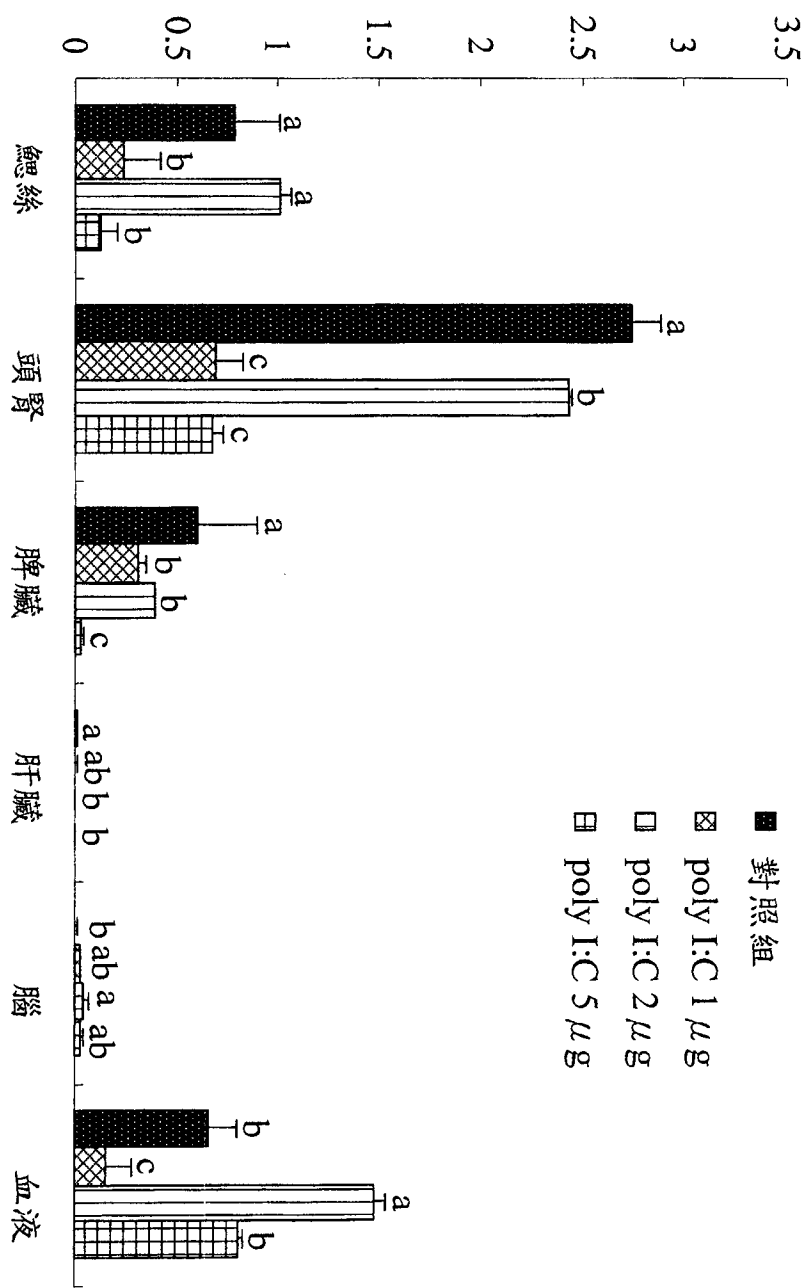
圖一

十一、圖式：

抗微生物胜肽(AMP) mRNA 拷貝數 (10^{20})/5 μ g mRNA

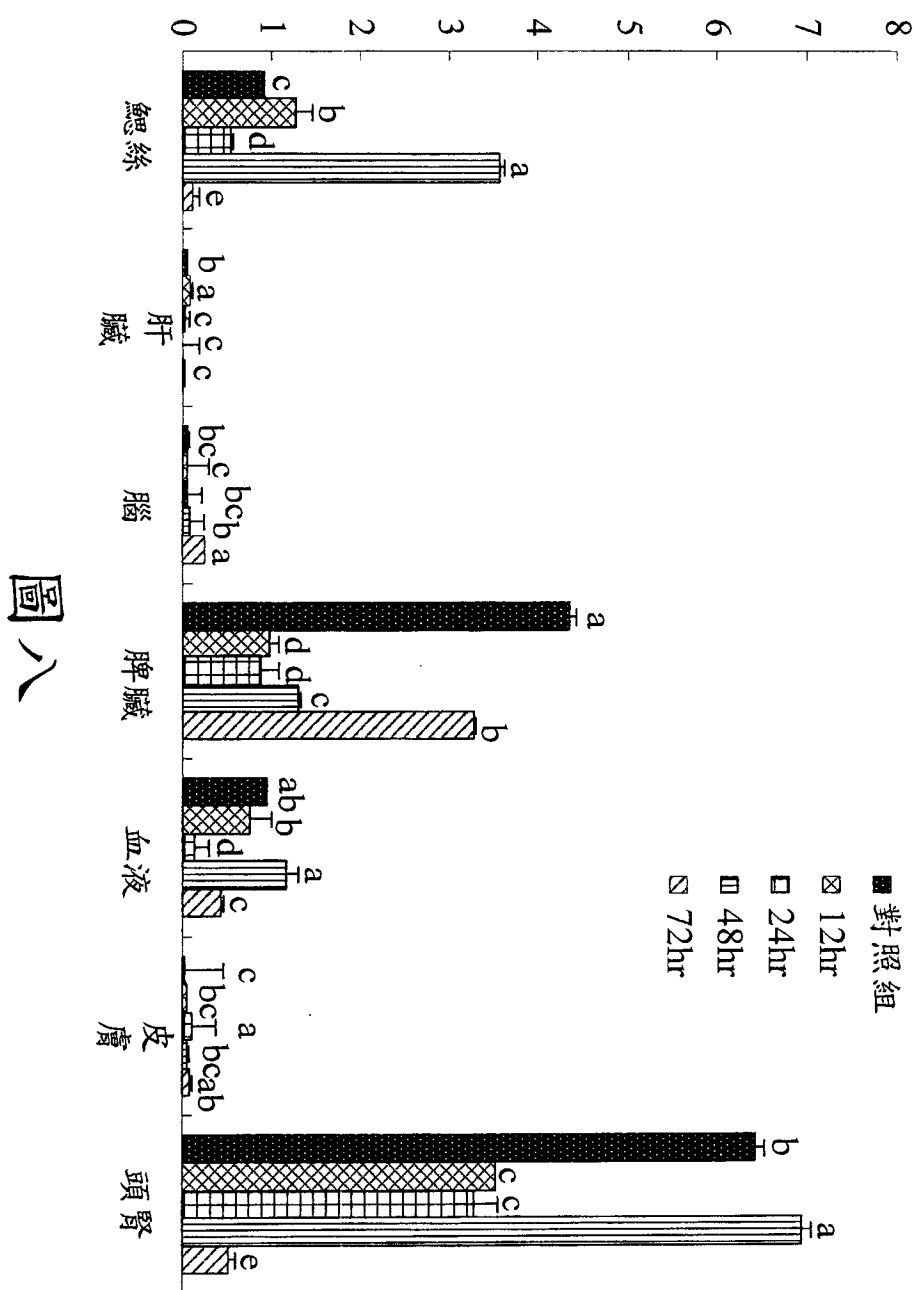
十一、圖式：

抗微生物胜肽(AMP) mRNA 拷貝數 (10^{20})/5 μ g mRNA



圖七

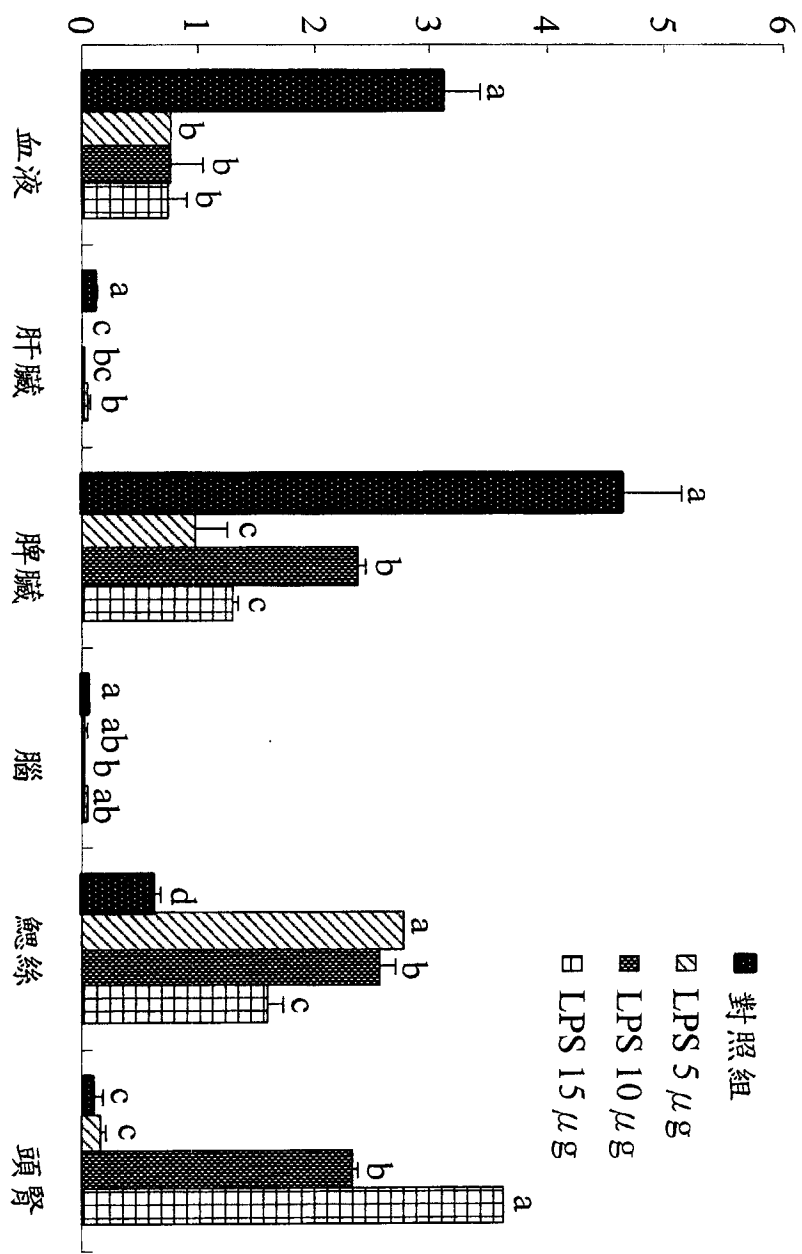
十一、圖式：

抗微生物胜肽(AMP) mRNA 拷貝數 (10^{20})/5 μ g mRNA

圖八

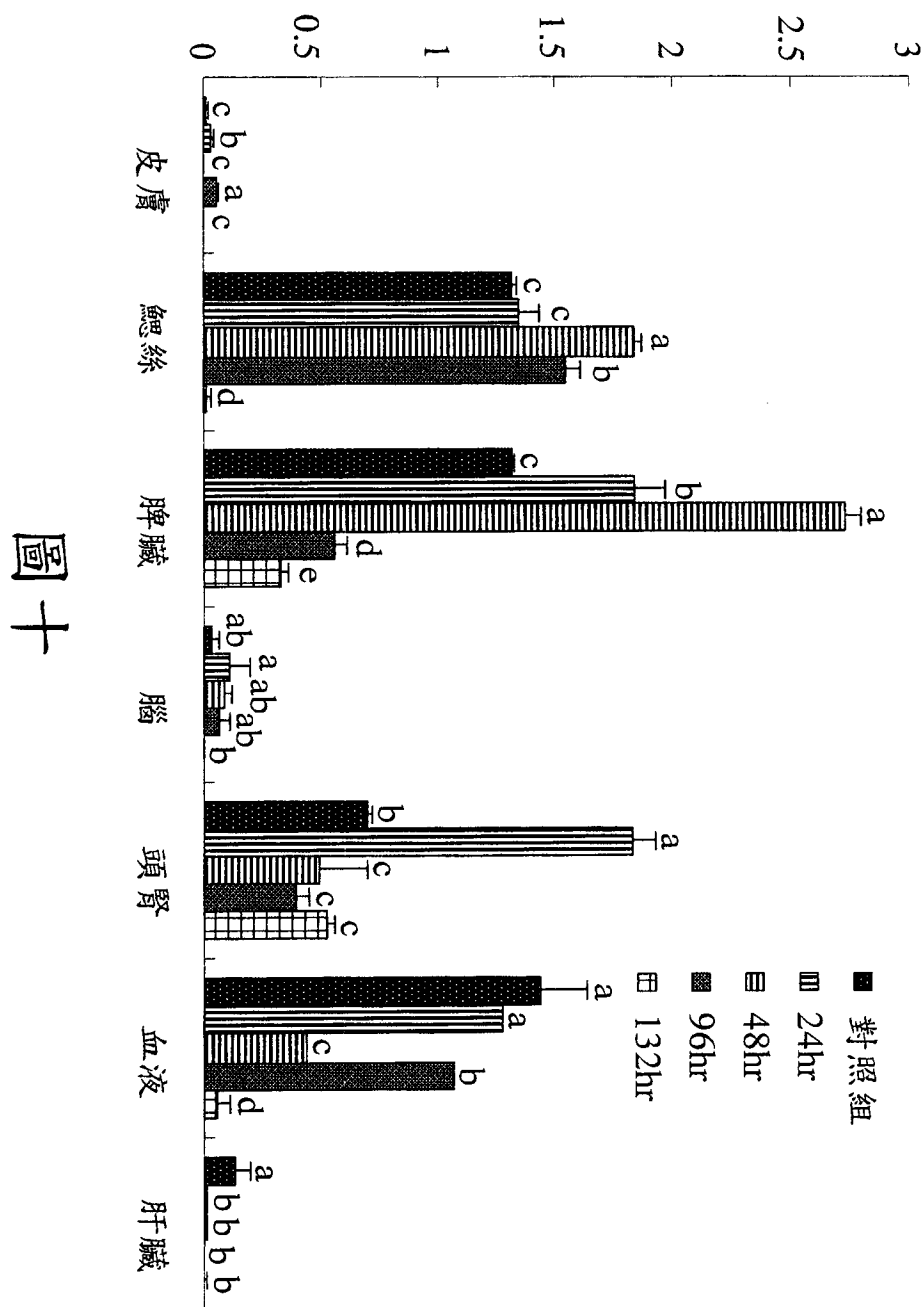
十一、圖式：

抗微生物胜肽(AMP) mRNA 拷貝數 (10^{20})/5 μ g mRNA



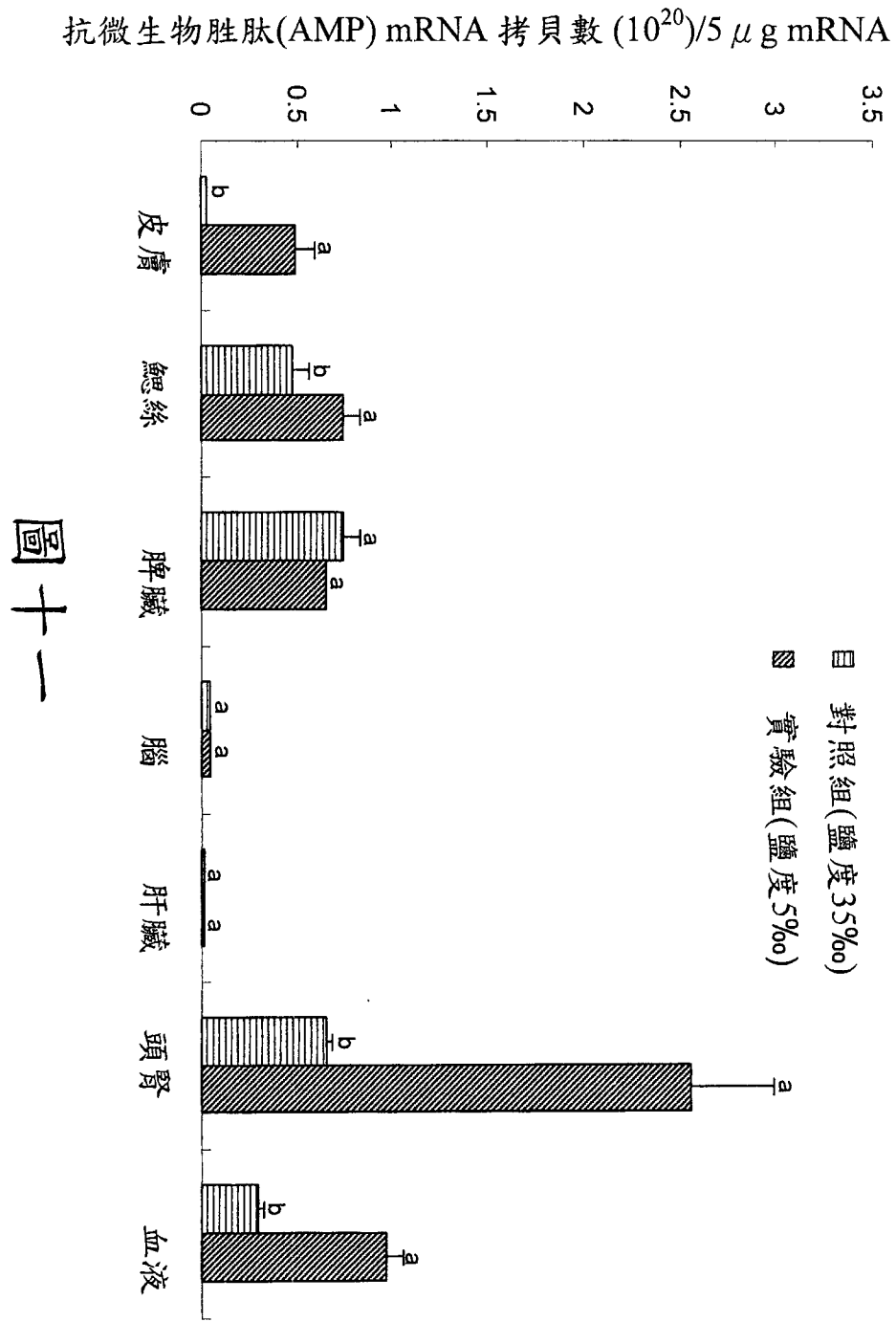
圖九

十一、圖式：

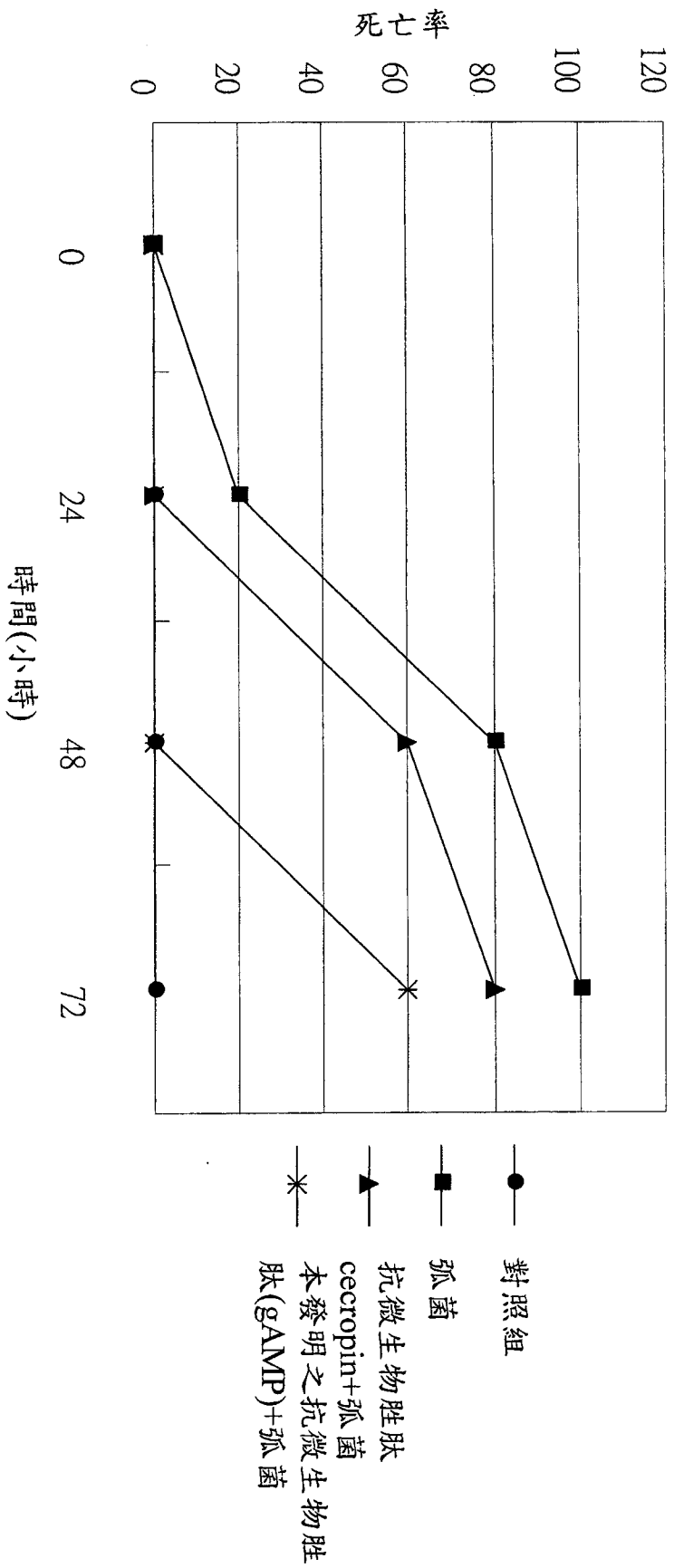
抗微生物胜肽(AMP) mRNA 拷貝數 (10^{20})/5 μ g mRNA

圖十

十一、圖式：



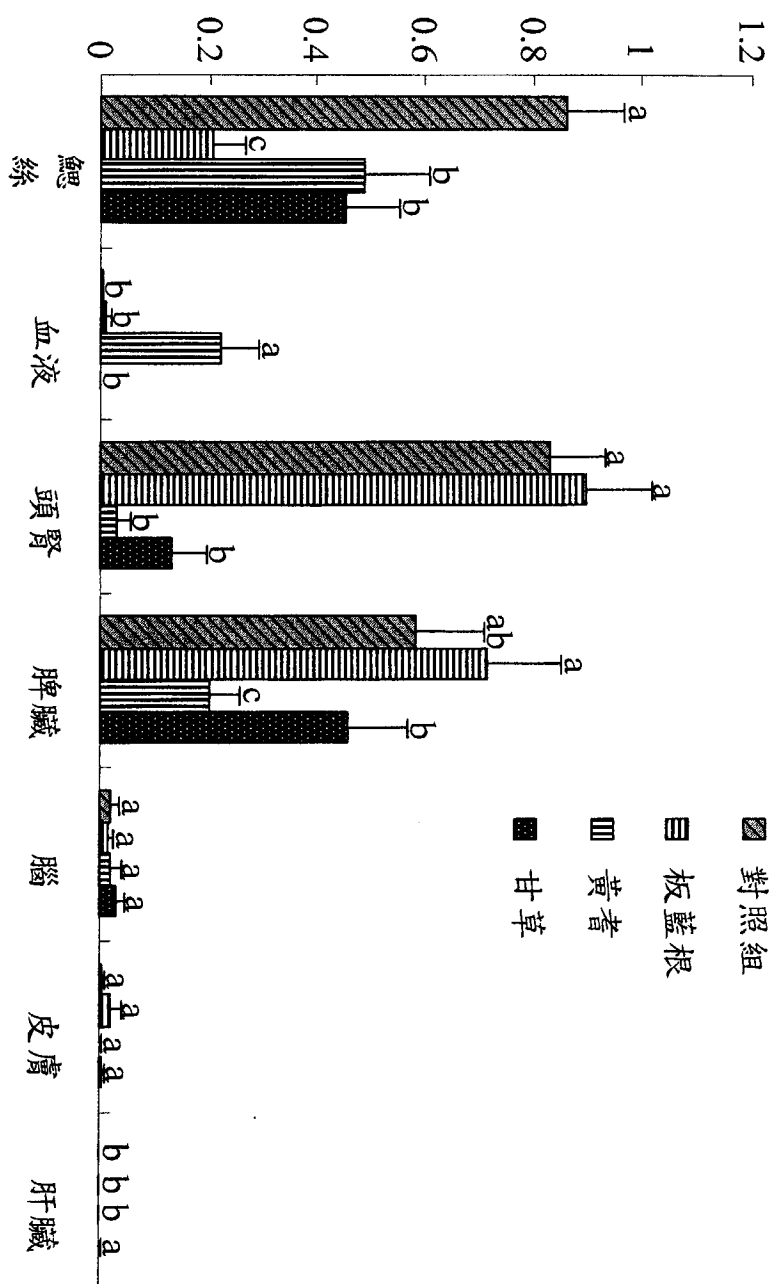
十一、圖式：



圖十二

十一、圖式：

抗微生物胜肽(AMP) mRNA 拷貝數 (10^{20})/5 μ g mRNA



圖十三

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(四)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

時、48 小時、96 小時、132 小時取龍膽石斑頭腎、腦、脾臟、血液、皮膚和鰓絲之 total RNA，利用即時定量聚合酶連鎖反應分析 AMP 基因 mRNA 表現量。並以 Duncan's Multiple Range Test 統計分析 a、b、c、d、e 表示有顯著差異($p < 0.05$)，實驗數據以平均值 $\pm$ SD 表示。

圖十一為鹽度對於龍膽石斑各組織的 AMP 基因表現之影響。將鹽度經過三天處理後調至 5 ppt 取龍膽石斑頭腎、腦、脾臟、肝臟、血液、皮膚和鰓絲之 total RNA，利用即時定量聚合酶連鎖反應分析 AMP 基因 mRNA 表現量，並以 Duncan's Multiple Range Test 統計分析 a、b 表示有顯著差異($p < 0.05$)，實驗數據以平均值 $\pm$ SD 表示。

圖十二為抗微生物胜肽(AMP)對石斑魚之保護作用。石斑魚分別注射 PBS (對照組)、弧菌、抗微生物胜肽 cecropin + 弧菌、本發明之抗微生物胜肽 + 弧菌。

圖十三為中草藥浸泡對於龍膽石斑各組織的 AMP 基因表現之影響。板藍根(*Isatis indigotica*)、黃耆(*Astragalus membranaceus*)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis*) 50ppm 浸泡 24 小時，取龍膽石斑頭腎、腦、脾臟、肝臟、血液、皮膚和鰓絲之 total RNA，利用即時定量聚合酶連鎖反應分析 AMP 基因 mRNA 表現量之影響，並以 Duncan's Multiple Range Test 統計分析 a、b、c 表示有顯著差異($p < 0.05$)，實驗數據以平均值 $\pm$ SD 表示。

圖十四為龍膽石斑 AMP 成熟胜肽(mature peptide)疏水性(hydrophobic)及親水性區域(hydrophilic)之預測。以 BioEdit 劃出 HelicalWheel 分析 α 螺旋(α helix)區域疏水性及親水性胺基酸的分布，藍色代表疏水性，紅色代表親水性。

【主要元件符號說明】

無

序列表

98年7月20日修正替换頁

<110> 洋昇生物科技股份有限公司

<120> 一種抗微生物胜肽

<140> 095130745

<141> 2006-08-22

<160> 9

<210> 1

<211> 67

<212> PRT

<213> 龍膽石斑 (*Epinephelus lanceolatus*)

<400> 1

Met	Arg	Cys	Ile	Ala	Leu	Phe	Leu	Val	Leu	Ser	Leu	Val	Val	Leu	Met
1				5					10					15	

Ala	Glu	Pro	Gly	Glu	Gly	Phe	Ile	Phe	His	Val	Ile	Lys	Gly	Leu	Phe
			20					25					30		

His	Ala	Gly	Lys	Met	Ile	His	Gly	Leu	Val	Thr	Arg	Arg	Arg	His	Gly
		35					40					45			

Met	Glu	Glu	Leu	Gln	Asp	Leu	Asp	Gln	Arg	Ala	Phe	Glu	Arg	Glu	Lys
	50					55					60				

Ala	Phe	Ala
65		

<210> 2

<211> 494

<212> DNA

<213> 龍膽石斑 (*Epinephelus lanceolatus*)

<400> 2

agagacttgac agcatctgta gatctcacac tgctcgattg gccctcttca gtaacagctt 60

tttgacattc acgctcagtc actggaaaga ggatgaggtg catcgccctc tttcttgtgt 120

tgctgctggg ggtcctcatg gctgaaccgc gggagggttt tatcttccac gtcacaaag 180

gactctttca cgctggcaag atgatccatg gacttgctac caggagacga catggcatgg 240

98年7月23日修正替换页

<210> 6
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 龍膽石斑 (*Epinephelus lanceolatus*)

<400> 6
 Phe Ile Phe His Val Ile Lys Gly Leu Phe His Ala Gly Lys Met Ile
 1 5 10 15
 His Gly Leu Val Thr Arg Arg Arg His
 20 25

<210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 龍膽石斑 (*Epinephelus lanceolatus*)

<400> 7
 Gly Met Glu Glu Leu Gln Asp Leu Asp Gln Arg Ala Phe Glu Arg Glu
 1 5 10 15
 Lys Ala Phe Ala
 20

<210> 8
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引子, real-time quantitative PCR AMP 專一性引子 A3

<400> 8
 ttgtgttgtcg ctggt 15

<210> 9
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

十、申請專利範圍：

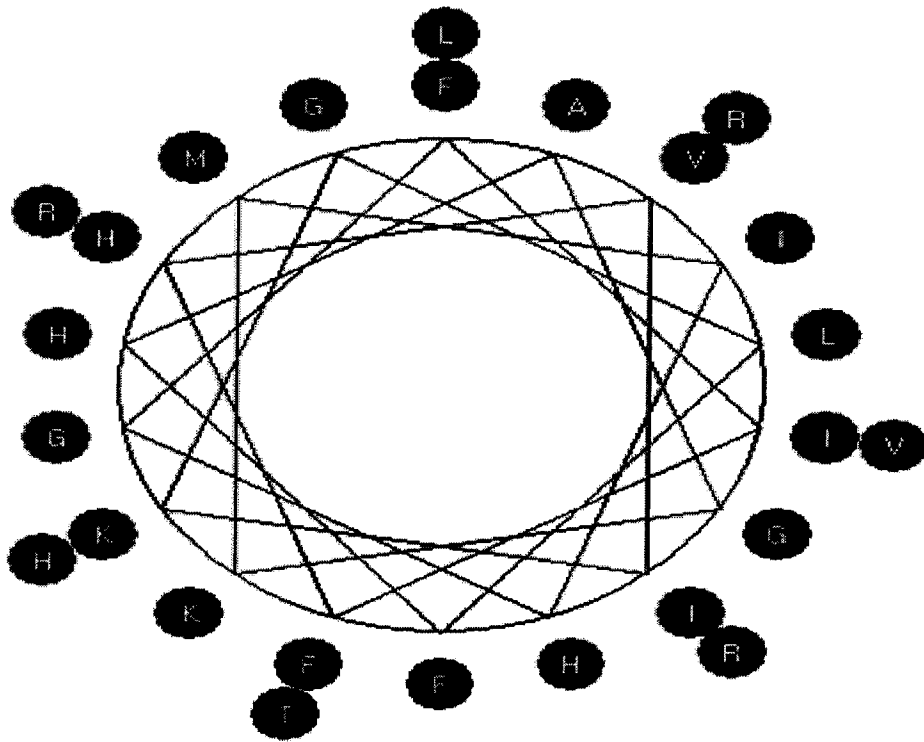
1. 一種單離自龍膽石斑之抗微生物胜肽，具有一如序列表 SEQ ID NO: 1 所示之胜肽序列，係用以抑菌及殺菌，該菌係包含大腸桿菌(*Escherichia coli* DH5α)、哈威氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、鰻弧菌(*Vibrio anguillarum*)、鮭弧菌(*Vibrio salmonicida*)、產氣單胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)。
2. 一種單離自龍膽石斑之核苷酸片段，具有如序列表 SEQ ID NO:2 所示之核苷酸序列，係為用以編碼如申請專利範圍第 1 項所述之抗微生物胜肽的核苷酸片段。
3. 一種醫藥組合物，包含：
一藥學有效量之胜肽片段，該胜肽片段具有如序列表 SEQ ID NO: 1 所示之胺基酸序列；以及
一藥學上可接受之載劑。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之醫藥組合物，其中該醫藥組合物之形式可為包埋物、浸泡液、飼料、飼料添加物、口服液、注射疫苗、貼片、粉末、錠劑、注射液體、懸浮液、外用液、滴劑、擦劑、塗劑、乳霜、油膏、軟膏、糊狀劑、膠以及凝膠。
5. 如申請專利範圍第 3 項所述之醫藥組合物，其中該載劑可為賦形劑、稀釋劑、增稠劑、填充劑、結合劑、崩解劑、潤滑劑、油脂或非油脂的基劑、介面活性劑、懸浮劑、膠凝劑、輔助劑、防腐劑、抗氧化劑、穩定劑、著色劑、香料。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之醫藥組合物，其中該潤滑劑包含但不限於甘油及油類。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之醫藥組合物，其中該油類包含但不限於花生油及蓖麻油。

8. 如申請專利範圍第 5 項所述之醫藥組合物，其中該基劑包含碳氫化合物，該碳氫化合物包含但不限於硬石蠟、軟石蠟、石蠟油、甘油、蜂蠟、金屬皂、天然油、羊毛脂及其衍生物、脂肪酸或其組合物。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之醫藥組合物，其中該天然油包含但不限於杏仁油、玉米油、花生油、蓖麻油或橄欖油。
10. 如申請專利範圍第 8 項所述之醫藥組合物，其中該脂肪酸包含但不限於硬脂酸或油酸。
11. 如申請專利範圍第 5 項所述之醫藥組合物，其中該介面活性劑包括陰離子介面活性劑、陽離子介面活性劑、非離子介面活性劑，該介面活性劑包含但不限於山梨醇酐酯、聚氧化乙烯及其衍生物、聚羧乙烯及其衍生物。
12. 如申請專利範圍第 11 項所述之醫藥組合物，其中該聚氧化乙烯之衍生物包含但不限於聚氧化乙烯脂肪酸酯。
13. 如申請專利範圍第 11 項所述之醫藥組合物，其中該聚羧乙烯之衍生物含但不限於卡伯漢樹脂(carbopol)。
14. 如申請專利範圍第 5 項所述之醫藥組合物，其中該懸浮劑包含但不限於天然樹脂、纖維素衍生物無機物質、聚乙二醇 540、聚乙二醇 3350 及丙二醇。
15. 如申請專利範圍第 14 項所述之醫藥組合物，其中該纖維素衍生物無機物質包含但不限於 siliceous silicas。
16. 如申請專利範圍第 5 項所述之醫藥組合物，其中該膠凝劑包含任何用於藥學上形成膠體的膠凝劑，該膠凝劑包含但不限於纖維素衍生物、乙烯基聚合物、聚羧乙烯衍生物、果膠、膠類。
17. 如申請專利範圍第 16 項所述之醫藥組合物，其中該纖維素衍生物包含但不限於甲基纖維素、羥基乙基纖維素以及羧甲基纖維素。

18. 如申請專利範圍第 16 項所述之醫藥組合物，其中該乙烯基聚合物包含但不限於聚乙醇、olyvinyl pyrrolidones。
19. 如申請專利範圍第 16 項所述之醫藥組合物，其中該聚羧乙烯衍生物包含但不限於卡伯漢樹脂(carbopol)。
20. 如申請專利範圍第 16 項所述之醫藥組合物，其中該膠類包含但不限於阿拉伯樹膠、黃蓍膠、藻膠、瓊脂、明膠以及 carrageenates。
21. 如申請專利範圍第 3 項所述之醫藥組合物，其中該醫藥組合物係以口服、浸泡、注射、塗抹或貼片的方式投予至人體及動物體內。
22. 如申請專利範圍第 21 項所述之醫藥組合物，其中該動物為畜產動物。
23. 如申請專利範圍第 22 項所述之醫藥組合物，其中該畜產動物係選自牛、羊、雞、豬以及其所組成的群組。
24. 如申請專利範圍第 21 項所述之醫藥組合物，其中該動物為水生動物。
25. 如申請專利範圍第 24 項所述之醫藥組合物，其中該水生動物為魚類。
26. 如申請專利範圍第 25 項所述之醫藥組合物，其中該魚類為養殖魚類。
27. 如申請專利範圍第 26 項所述之醫藥組合物，其中該養殖魚類係選自石斑魚、海鱺、鯛魚、比目魚、鮭魚、鱒魚、鯰魚、鯉魚、金魚、吳郭魚、斑馬魚以及其所組成的群組。
28. 一種用以篩選能增加龍膽石斑免疫力之免疫誘導劑(immune elicitors)的方法，包含：
 - 步驟一 將所欲篩選之免疫誘導劑與一飼料混合，藉以獲得一混合物；
 - 步驟二 對一龍膽石斑口服投予該混合物，亦可使用浸泡方式投予該混合物；
 - 步驟三 檢測該龍膽石斑體內如序列表 SEQ ID NO: 1 所示之胜肽片段的表現量；以及
 - 步驟四 以該胜肽片段的表現量高低來判斷該免疫誘導劑對該龍膽石斑

殺菌及抑菌的影響，該菌包含大腸桿菌 (*Escherichia coli* DH5α)、哈威氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、鰻弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、鮭弧菌 (*Vibrio salmonicida*)、產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)。

29. 如申請專利範圍第 28 項所述之用以篩選能增加龍膽石斑免疫力之免疫誘導劑的方法，其中該步驟三中，該胜肽片段之檢測方法可為但不限於膠體電泳、西方墨點法、免疫反應法。
30. 如申請專利範圍第 28 項所述之用以篩選能增加龍膽石斑免疫力之免疫誘導劑的方法，其中該步驟三中，該胜肽片段的表現量亦可藉由檢測能編碼該胜肽片段之 mRNA 的表現量來判定，該 mRNA 的序列如由序列表 SEQ ID NO: 2 所示之核苷酸序列所轉錄而成的序列。
31. 如申請專利範圍第 30 項所述之用以篩選能增加龍膽石斑免疫力之免疫誘導劑的方法，其中該 mRNA 表現量的檢測法可為但不限於北方墨點法、聚合酶連鎖反應、原位雜交法。



圖十四