

Development and Bioproduction of Protein Containing the GHTD Peptide to Stimulate the Formation of Active Monomeric Insulin

促進形成有活性單體胰島素的胜肽蛋白 GHTD 之開發與生產

專題生：洪永聰 Youg-Tsung Hong

指導教授：簡宏堅 Hung-Chien Roger Chien

大葉大學分子生物科技學系 (彰化縣大村鄉學府路 168 號-J514 實驗室)

E-mail : F9761812@gmail.com

摘要

降血糖機能性胜肽 *Gly-His-Thr-Asp*(GHTD-amide)是從人尿液中萃取出來的四胜肽，其萃取物經動物實驗證實具有降血糖之功效，作為預防和治療第二型糖尿病之用，將萃取液由 LC-MS-MS 分析而得到的一段胺基酸序列。我們選用人類酪胺酸羥基酵素(*Homo .sapiens* tyrosine hydroxylase ; *HTH*) 做為攜帶機能性胜肽的蛋白擔體，再尋找此酵素構造的外圍胺基酸鏈時，發現有五大區段可做為置換機能性胜肽的位置，並且置換的區段是不影響活性中心，並在其機能性胜肽之 N 端與 C 端設計“*Phe*”以利 pepsin 切割使胜肽釋出，確定其可行性後才進行降血糖胜肽之引子設計與構築。因為我們在完成酵素外圍含有降糖胜肽區段置換之後會將其轉殖於 *Yarrowia lipolytica* 中進行生產，故選用 *Yarrowia lipolytica* 使用率最高之胺基酸編碼之密碼子設計引子。本實驗總共運用十九支引子及九次的基因選殖，開發出含有二十二套降血糖機能性胜肽 GHTD 之蛋白質。首先將攜帶機能性胜肽蛋白 *HTH* 的第一區段、第二區段、第三四區段及第五區段，各置換入降血糖機能性胜肽 GHTD。完成單區段置換後，接著進行兩兩區段之連接；將置換好的第一區段及第二區段之降血糖胜肽做連接；再將已置換好的第三四區段及第五區段之降血糖胜肽做連接；最後再將置換好第一二區段與第三四五區段之降血糖胜肽做完整的連接；當連接完成後接著選殖進入 *Y. lipolytica* 酵母菌胞外分泌的表現載體 *pYLS1-5S*；最後將已置換好第一二三四五區段之降血糖胜肽於 *pYLS1-5S* 內，再轉形插入至 *Y. lipolytica* 酵母菌染色體，完成降血糖機能性胜肽之基因選殖。得到含有 82 組目標基因之酵母菌選殖株(*Y-GHTD-SC*) 並用分光光度計測定其生長曲線，得到最適生長時間為 16 小時；將 *Y-GHTD-SC* 基因表現後得到粗酵素 (crude GHTD-HTH)，藉由人類酪胺酸羥基酵素自身之活性，運用高效能液相層析儀(HPLC)分析產物量反推酵素最大分泌量，測得誘導基因表現之酵素最大分泌量的時間為 36 小時，再用 starch 回收純化隨後進行分子量預測分析可知 *HTH* 是為 54.6 kDa，而在基因選殖階段是置換機能性胜肽進入酵素中，故 *GHTD-HTH* 分子量是約 54.6 kDa，而 *Y. lipolytica* 酵母菌的轉譯後修飾導致目標蛋白醮基化，會使其分子量增加約 10 kDa，故將純化後 *GHTD-HTH* 進行 SDS-PAGE 分析分子量，結果約為 65 kDa。經由多次的純化回收，發現 1 公升的培養液可以純化回收 50 公克以上的胜肽蛋白。未來回收 *GHTD-HTH* 胜肽蛋白，經由 pepsin 水解切割並釋出降血糖胜肽，將其水解液利用 LC-MS-MS 分析，確認 *GHTD-HTH* 的蛋白酶水解液中含有 GHTD 胺基酸序列，而後將用 500L 發酵槽生產 *GHTD-HTH* 降血糖胜肽蛋白，再將此降血糖胜肽蛋白進行動物試驗及人體試驗，希望可以幫助人類治療糖尿病，而後也將積極通過政府標章認證之健康食品。

關鍵字：降血糖機能性胜肽、GHTD、第二型糖尿病。

前言

糖尿病(Diabetes mellitus；DM)目前位居國人十大死亡因素第四位，它是一種生理代謝上對於糖類無法控制恆定的一種代謝疾病，其主要原理是由於血液中的糖分無法經由正常的蛋白質產生穩定的訊號傳遞將之轉化為肝醣儲存於肝臟中。世界衛生組織 (World Health Organization；WHO) 將糖尿病分成四種類型：胰島素依賴型糖尿病 (Insulin-dependent diabetes mellitus；IDDM)、非胰島素依賴型糖尿病(Non-insulin dependent diabetes mellitus；NIDDM)、續發性糖尿病(Continues diabetes mellitus；CDM)以及妊娠型糖尿病 (Gestational diabetes mellitus；GDM)。我們實驗室所研究的胰島素依賴型糖尿病，其作用機制則是有百家爭鳴的情況。其一，血糖的升高並非由於血液中胰島素的濃度改變，而是胰臟外胰島素的作用改變而產生的(Bailey *et al.*, 1985)；其二，由於胰臟中的 beta-cell 所分泌的胰島素過少或是突變進而導致經由血液運輸到肝臟前，胰島素無法與肝臟細胞膜表面的胰島素受體 (Insulin receptor) 正確的結合(Lauge Schaffer *et al.*, 1994)所以進而導致無法產生有效的訊號傳遞將葡萄糖轉化為肝醣，最後造成血糖濃度過高的一種病症；其三，在醣質新生的生化代謝路徑中，研究表示必須藉由抑制血糖合成，除了透過抑制路徑中關鍵的葡萄糖-6-去磷酸酵素(Glucose-6-phosphatase；G6P)，或是加強啟動葡萄糖-6-磷酸去氫酵素(Glucose-6-phosphate dehydrogenase；G6PDH) 來活化葡萄糖氧化路徑 (Shibib *et al.*, 1993)。

降血糖胜肽 (Hypoglycemic peptide)研究大多偏向動物試驗，很少有其作用機制以及其成份功能性的研究。對於各種動物試驗研究表示，其降血糖胜肽的來源廣泛，包括有苦瓜及尿液。早在 1970 年由人類尿液中就已經萃取出降血糖胜肽，在最近經由動物試驗中 測試其同一時間的肝糖生成量與血糖下降量分析其血糖轉肝糖之降血糖能力證實具有降血糖活性，其胺基酸序列為 GHTD (S.G. Paule *et al.*, 2009)。

由於這段胜肽尚未被應用於保健食品，若能利用分子生物科技將多套數的 GHTD 置換到人類酪胺酸羧基酵素上，並將基因送入耶氏解脂酵母菌進行表現後執行胞外分泌，這將會有助於國內保健食品工業的發展。運用分子生物科技、生物資訊學以及生物化學原理，藉由人類酪胺酸羧基酵素的立體模擬構形找出不影響其活性中心之外側胺基酸的區段，並設計好降血糖胜肽兩端含有可被 pepsin 水解的胺基酸 Phe 得到 FGHTDF，在一個區段內置換進入四套到七套的降血糖胜肽來改造人類酪胺酸羧基酵素。由於目的是提高胜肽作用活性的置換胺基酸工程會在產生內毒素的 *Escherchia coli* 內進行，所以我們將已置換完成的基因經選殖後再送入無內毒素無害且基因表現後執行胞外分泌的 *Y. lipolytica*。站在酵素處於不適合的酸鹼值的考量之下，因為我們目的是水解出具有降血糖活性的胜肽來降低體內血糖濃度，所以不需額外加工處理，食用後抵達胃的胜肽蛋白會被 pepsin 水解而釋放出降血糖胜肽，再進入十二指腸被吸收或小腸中被吸收，進而減低血糖高濃度的情形，且促進身體健康，期望這將有助於提升國人健康指數。

研究動機

根據行政院衛生署調查結果表示，繼癌症、肺炎以及心血管疾病，糖尿病是為國人第四大死亡因素，占全台灣死亡人口總數的 5.6 % (行政院衛生署統計室，2010) 。如果血糖長時間維持在高濃度之下，容易造成血管糖化進而脆裂，嚴重時必須截肢，因此，關於此類保健食品的生產與應用，將會有助於國人提升健康指數，減低慢性疾病之發生率。食品工業發展研究所報告指出，目前全球與 胜肽 相關協會之研究領域在 食品與醫療相關產業方面投入甚多，可見具有生物活性胜肽的生產與製造在未來將會成為趨勢。從提煉與萃取技術尋找具有生物活性胜肽之功能性固然必要，但是存在著產量少、純度低以及成本高的隱憂，如果能適當的運用分子生物科技，期望可以有效的提高胜肽的純度以及其功能性之作用效率。截至目前為止，從期刊中發現 GHTD-amide 具有降血糖之功能性，並且經由動物實驗證實其功能性 (S.G. Paule *et al.*, 2009)。由於這段胜肽尚未被應用於保健食品，若能利用分子生物科技將多套的 GHTD 置換到人類酪胺酸羧基酵素上，並將 82 組基因送入耶氏解脂酵母菌進行表現後執行胞外分泌，這將會有助於國內保健食品工業的發展。運用分子生物科技、生物資訊學以及生物化學原理，藉由人類酪胺酸羧基酵素的立體模擬構形找出不影響其活性中心之外側胺基酸的區段，並設計好降血糖胜肽兩端含有可被 pepsin 水解的胺基酸 Phe 得到 FGHTDF，在一個區段內置換進入四套到七套 的降血糖胜肽 來改造人類酪胺酸羧基酵素。由於目的是提高 胜肽作用活性 的置換胺基酸工程會在產生 內毒素的 *Escherchia coli* 內進行，所以我們將已置換完成的基因經選殖後再送入無內毒素無害且基因表現後執行胞外分泌的 *Y. lipolytica*。站在酵素處於不適合的酸鹼值的考量之下，因為我們目的是水解出具有降血糖活性的胜肽來降低體內血糖濃度，所以不需額外加工處理，食用後抵達胃的胜肽蛋白會被 pepsin 水解而釋放出降血糖胜肽，再進入十二指腸被吸收或小腸中被吸收，進而減低血糖高濃度的情形，且促進身體健康，期望這將有助於提升國人健康指數。

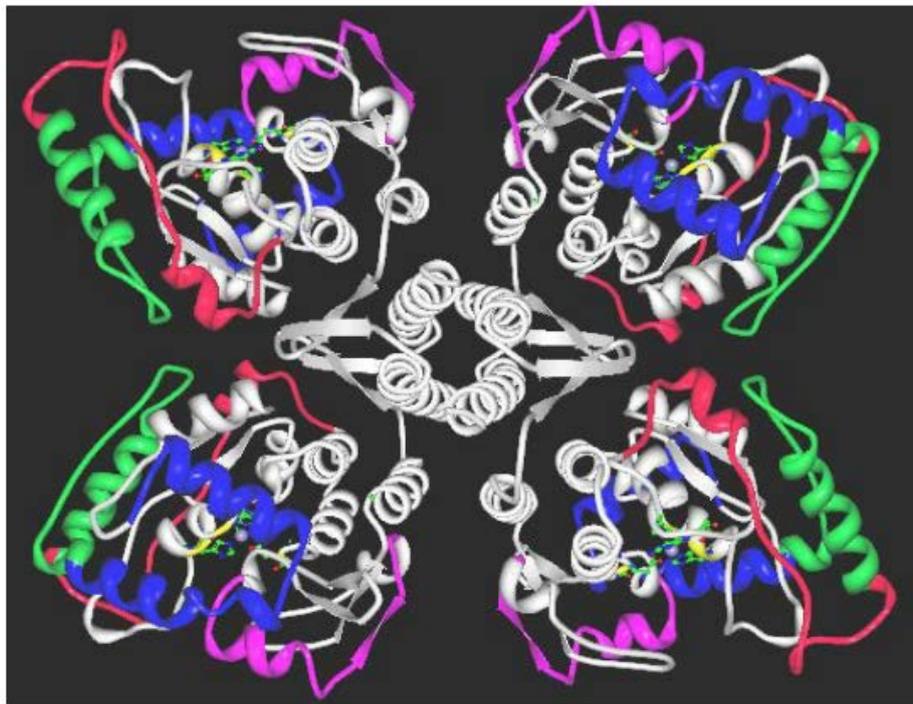


Figure 1 : *HTH* 可供降血糖胜肽 (GHTD) 置換之五大區段構型示意圖

The mechanism of GHTD

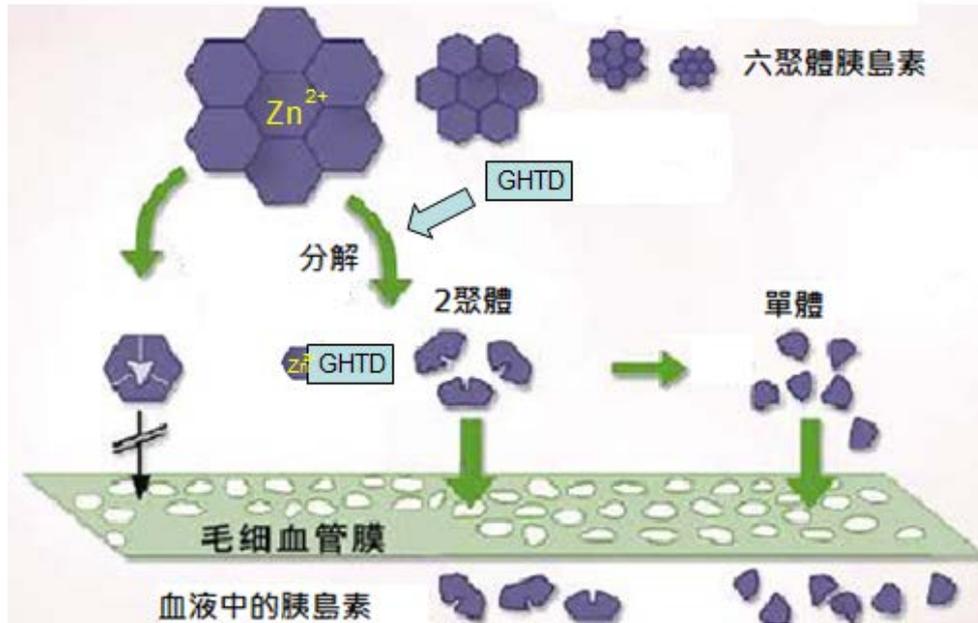


Figure 2 : GHTD 作用機制
實驗流程

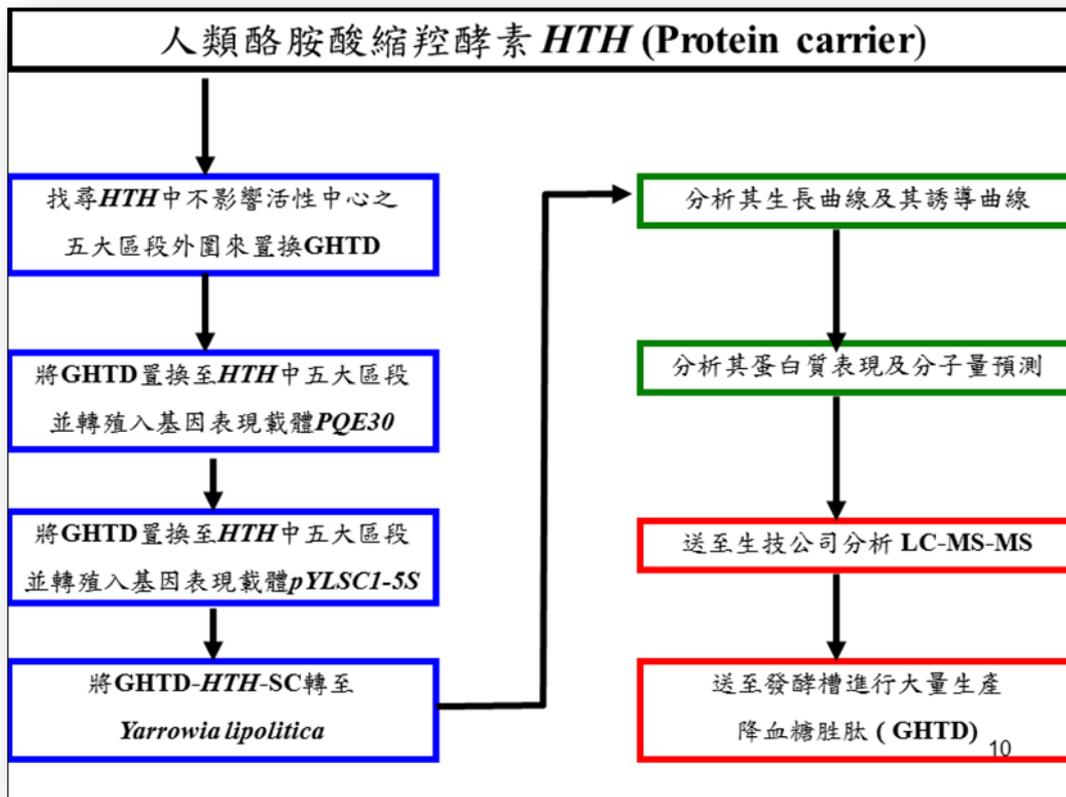


Figure 3 : 實驗流程

結果

找尋 *HTH* 中可置換降血糖胜肽之五大區段

根據 Goodwill 等人利用 X-ray 晶體繞射解析 *Rattus norvegicus tyrosine hydroxylase* (*R. norvegicus tyrosine hydroxylase*)其 Phe300、His331、His336 及 Glu376 這四個胺基酸皆與二價鐵離子鍵結形成活性中心(Goodwill *et al.*, 1998)。以避開活性中心為準則，在 *Homo sapiens tyrosine hydroxylase*(*HTH*)內設計五大區域置換機能性胜肽，以運用酵素本身固有的催化機制，對降血糖胜肽機能性蛋白(GHTD-*HTH*)進行分析，以利做為未來工業生產時之基礎依據。

五大區段之序列置換位置分析

因 *R. norvegicus tyrosine hydroxylase* 與 *HTH* 之胺基酸經比對後，相似度極高，故本研究利用已發表 *R. norvegicus tyrosine hydroxylase* 之蛋白質構形來尋找不影響酵素活性中心之五大區段位置進行置換，並且將之套用在 *HTH* 上執行富含機能性胜肽之蛋白質開發。*HTH* 可置換機能性胜肽區段有五個，其胺基酸部分參考 *R. norvegicus tyrosine hydroxylase* 之蛋白質構形，其橘色第一區段為 165~199aa，黃色第二區段為 200~229aa，綠色第三區段為 230~245aa，藍色第四區段為 250~265aa，由於第三、四區段相鄰所以將之合併執行胜肽置換之工作，第三、四區段合併後為 230~265aa，紅色第五區段為 395~415aa。而本研究於此五大區段所置換的降血糖機能性胜肽之核苷酸位置為紅色第一區段為 508 ~ 567 bp，綠色第二區段為 601~660bp，藍色第三、四區段合併後為 700~789bp，粉紅色第五區段為 1,186~1,245bp(Figure 1)。

不同種別之酪胺酸羧基酵素胺基酸序列比對

本研究所使用的人類酪胺酸羧基酵素，其分子量為 54.7 kDa、共有 497 個胺基酸殘基以及 1,494 個核苷酸。目前已發表有關酪胺酸羧基酵素的蛋白質構形研究只有同屬哺乳類之 *R. norvegicus tyrosine hydroxylase* 之基因，故將同是哺乳類 *HTH* 與其胺基酸做比對分析後，發現其相似度高達約 93.98%。

基因選殖

在基因選殖的部份，我們目標是選殖出富含降血糖胜肽之 *HTH* 基因在 *pYLS1-5S* 中；在程序設計上，我們在 *pQE30* 中各別完成單區段降血糖胜肽置換於 *HTH* 之基因選殖(Figure 4)，隨後將單區段各個連接在一起，並且於連接完成後選殖進 *pYLS1-5S* 中。最後，利用 *YLEX expression kit* 之 *YLOS transformation procedure* 將目標基因轉形成無毒無害之 *Y. lipolytica* 酵母菌以便於工業生產。

將降血糖胜肽序列置換至 *HTH* 之第一區段(GHTD1)

抽取質體後，由設計之引子夾出頭部(*HTHF*+*GHTD1R*)與尾部(*GHTD1F*+*HTHR*)並且將目標純化，隨後進行重疊式聚合酶鏈鎖反應，將頭尾重疊後成為全長 1494bp。接著藉由增幅全長並且純化，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後使目標基因與表現載體具有相同切位利於黏合作用，然後經轉形藉由篩選式聚合酶鏈鎖反應得到 4 支陽性菌株是為轉殖株。最後將轉殖株抽質體，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後再次確認含有目標基因，送 8 號菌去定序，經定序比對

後，結果無誤。

Construct of the Bioactive Peptide and Gene Cloning

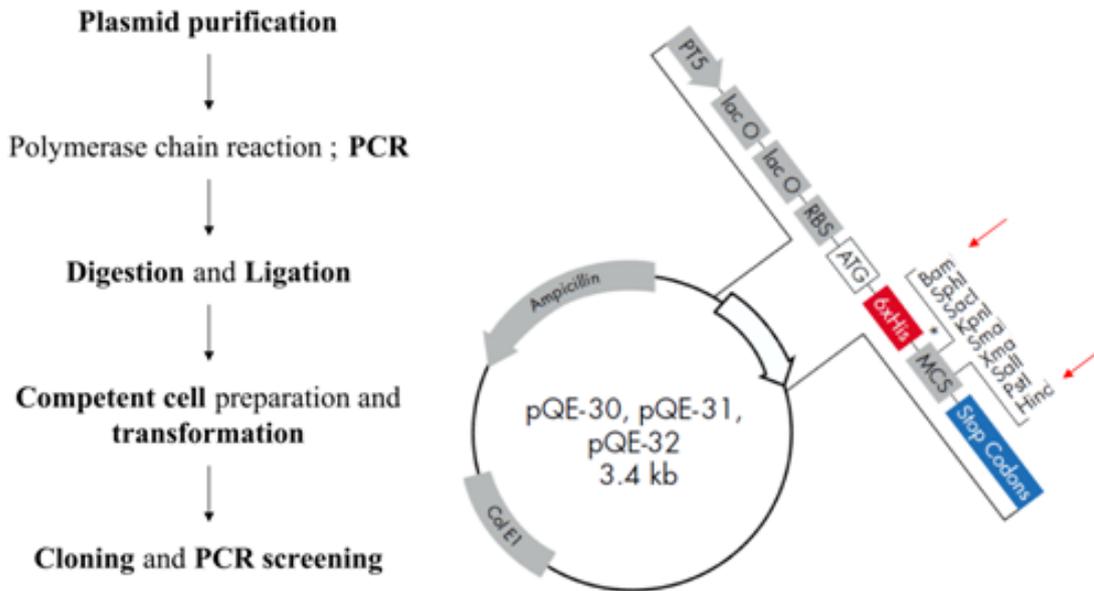


Figure 4：生物活性胜肽構築示意圖

將降血糖胜肽序列置換至 *HTH* 之第二區段(GHTD2)

抽取質體後，由設計之引子夾出頭部(*HTHF*+*GHTD2R*)與尾部(*GHTD2F*+*HTHR*)並且將目標純化，隨後進行重疊式聚合酶鏈鎖反應，將頭尾重疊後成為全長 1,494bp。接著藉由增幅全長並且純化，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後使目標基因與表現載體具有相同切位便於黏合作用，然後經轉形藉由篩選式聚合酶鏈鎖反應得到 4 支陽性菌株是為轉植株。最後將轉植株抽質體，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後再次確認含有目標基因，送 51 號菌進行定序，經定序比對後，結果無誤。

將降血糖胜肽序列置換至 *HTH* 之第三四區段(GHTD34)

抽取質體後，由設計之引子夾出頭部(*HTHF*+*GHTD34R*)與尾部(*GHTD34F*+*HTHR*)並且將目標純化，隨後進行重疊式聚合酶鏈鎖反應，將頭尾重疊後成為全長 1,494bp。接著藉由增幅全長並且純化，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後使目標基因與表現載體具有相同切位便於黏合作用，然後經轉形藉由篩選式聚合酶鏈鎖反應得到 4 支陽性菌株是為轉植株。最後將轉植株抽質體，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後再次確認含有目標基因，送 5 號菌進行，定序經定序比對後，結果無誤。

將降血糖胜肽序列置換至 *HTH* 之第五區段(GHTD5)

抽取質體後，由設計之引子夾出頭部(*HTHF*+*GHTD 5R*)與尾部(*GHTD 5F*+*HTHR*)並且將目標

純化，隨後進行重疊式聚合酶鏈鎖反應，將頭尾重疊後成為全長 1,494bp。接著藉由增幅全長並且純化，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後使目標基因與表現載體具有相同切位便於黏合作用，然後經轉形藉由篩選式聚合酶鏈鎖反應得到 4 支陽性菌株是為轉殖株。最後將轉殖株抽質體，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後再次確認含有目標基因，送 2 號菌去做定序，經定序比對後，結果無誤。

接合降血糖胜肽序列第一區段及第二區段(GHTD 1-2)

抽取 GHTD1、GHTD2 體後，由設計之引子夾出 GHTD1 是為頭部(*HTHF*+*over12R*)，夾出 GHTD2 是為尾部(*over12F*+*HTHR*)並且將目標純化，隨後進行重疊式聚合酶鏈鎖反應，將頭尾重疊後成為全長 1,494bp。接著藉由增幅全長並且純化，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後使目標基因與表現載體具有相同切位便於黏合作用，然後經轉形藉由篩選式聚合酶鏈鎖反應得到 3 支陽性菌株是為轉殖株。最後將轉殖株抽質體，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後再次確認含有目標基因，經定序比對後，結果無誤。

接合降血糖胜肽序列第三四區段及第五區段(GHTD 34-5)

抽取 GHTD34、GHTD5 質體後，由設計之引子夾出 GHTD34 是為頭部(*HTHF*+*over45R*)，夾出 GHTD5 是為尾部(*over45F*+*HTHR*)並且將目標純化，隨後進行重疊式聚合酶鏈鎖反應，將頭尾重疊後成為全長 1,494bp。接著藉由增幅全長並且純化，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後使目標基因與表現載體具有相同切位便於黏合作用，然後經轉形藉由篩選式聚合酶鏈鎖反應得到 2 支陽性菌株是為轉殖株。最後將轉殖株抽質體，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後再次確認含有目標基因，經定序比對後，結果無誤。

接合降血糖胜肽第一、二區段及第三四、五區段(GHTD 12-345)

抽取 GHTD12-GHTD345 質體後，由設計之引子夾出 GHTD12 是為頭部(*HTHF*+*over12345R*)，夾出 GHTD345 是為尾部(*over12345F*+*HTHR*)並且將目標純化，隨後進行重疊式聚合酶鏈鎖反應，將頭尾重疊後成為全長 1,494bp。接著藉由增幅全長並且純化，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後使目標基因與表現載體具有相同切位便於黏合作用，然後經轉形藉由篩選式聚合酶鏈鎖反應得到 3 支陽性菌株是為轉殖株最後將轉殖株抽質體，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後再次確認含有目標基因，經定序比對後，結果無誤(Figure 5)。

選殖降血糖胜肽 GHTD1-5 於 *pYLSC1-5S* 表現載體(GHTD-SC)

抽取 GHTD1-5 質體後，由設計之引子(*YHTHF*+*YHTH-6HKR*)做全長增幅，以將 6x His 及 *kpn1* 切位補足，並純化回收。經限制酵素切(*HindIII*、*kpn1*)割後使目標基因與表現載體具有相同切位便於黏合作用，然後經轉形藉由篩選式聚合酶鏈鎖反應得到 2 支陽性菌株是為轉殖株。最後將轉殖株抽質體，經限制酵素(*HindIII*、*BamHI*)切割後再次確認含有目標基因，經定序比對後，結果無誤(Figure 6)。

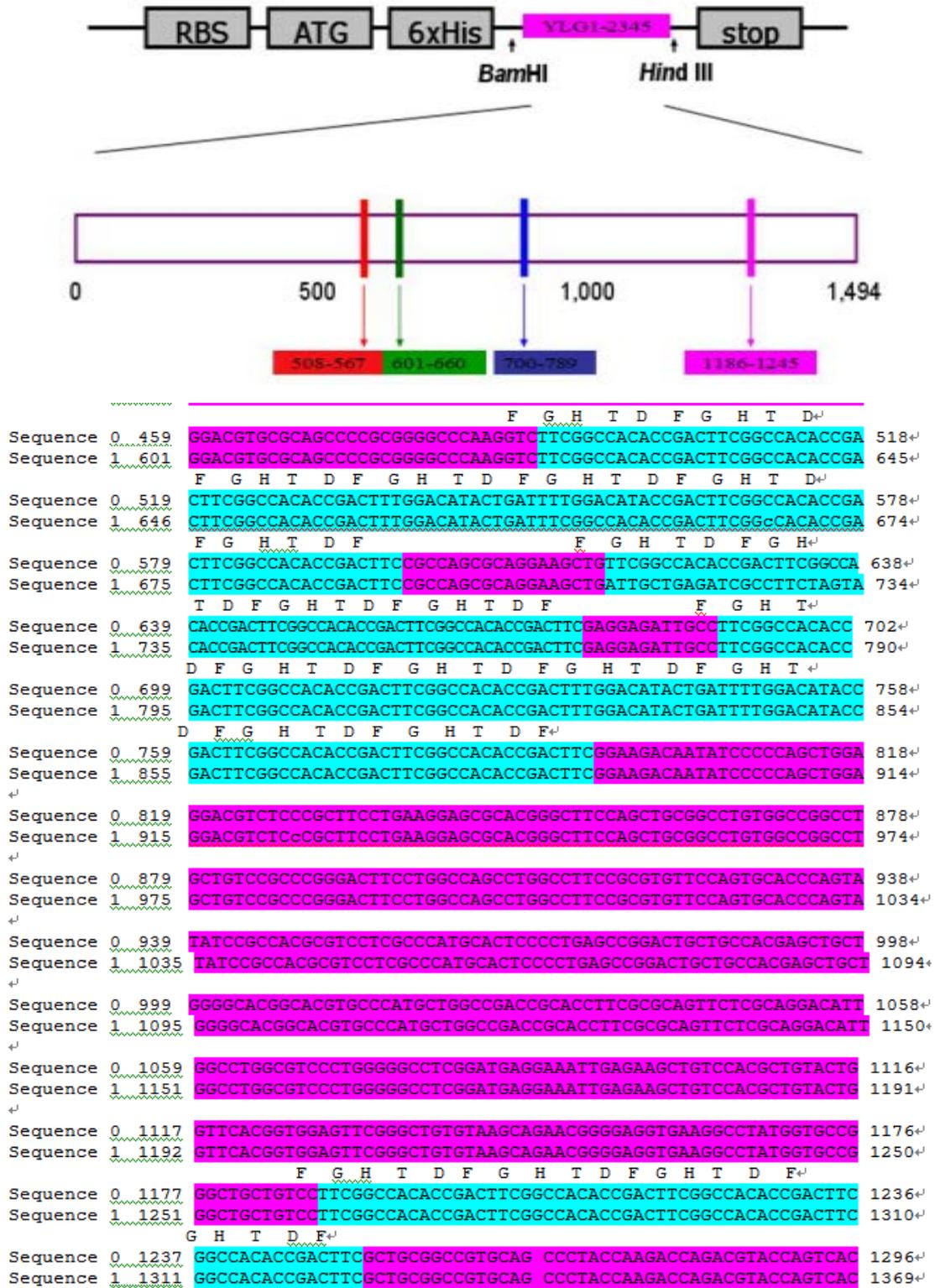


Figure 5 : 構築 GHTD 醫治五區段定序結果示意圖

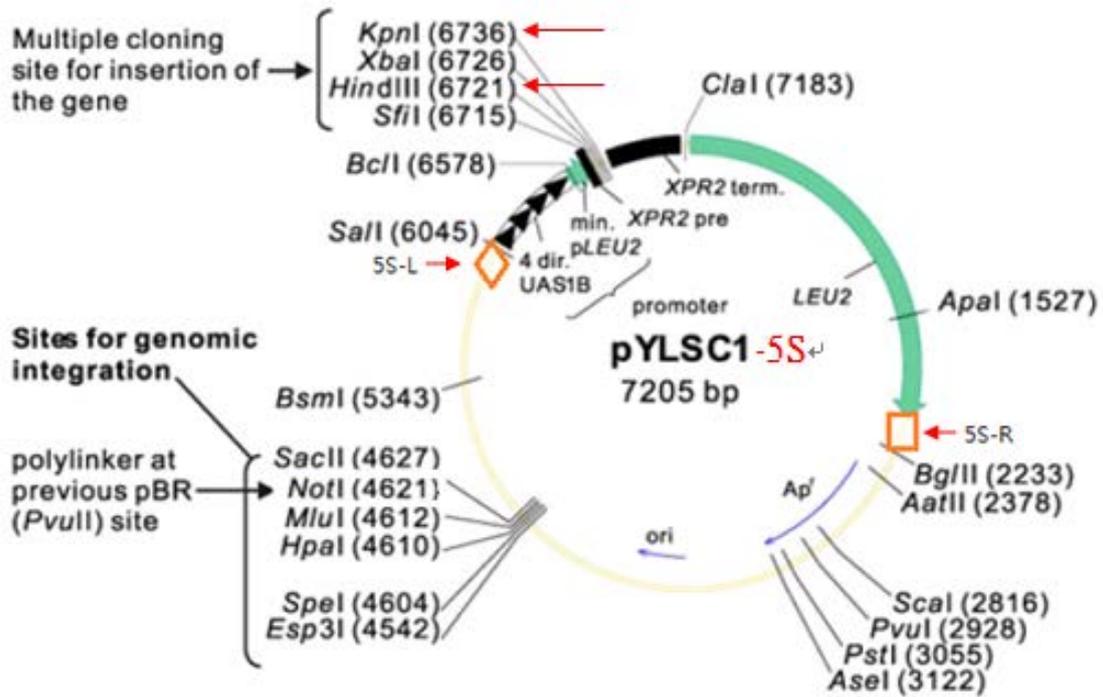


Figure 6：構築於 pYLSC1-5S 示意圖

轉型降血糖胜肽 GHTD-SC 於 *Y. lipolytica* 酵母菌中(Y-GHTD-SC)

抽取 GHTD-SC 質體後，經限制酵素(*Hpa* I)切割後使用 *YLEX* expression kit 將之轉形，最後藉由篩選式聚合酶鏈鎖反應得到 5 支陽性菌株是為轉殖株。

基因表現

將富含連結降血糖胜肽之 *Y. lipolytica* 酵母菌轉殖株(Y-GHTD-SC)基因表現，藉由營養缺乏的方式使 *Y. lipolytica* 酵母菌自身啟動子啟動執行轉錄、轉譯並且摺疊透過訊號胜肽分泌至胞外，經由離心回收上清液。接著將得到的粗酵素經過透析與純化後得到純酵素，並且由聚丙烯醯胺凝膠電泳(electrophoresis of SDS-PAGE)確認目標分子量大小。而後將送至生技公司使用液相層析串聯質譜儀(LC MS-MS)分析降血糖胜肽之序列。

Y. lipolytica 之生長曲線

Y. lipolytica 酵母菌之生長曲線是在菌體生長後於 72 小時內不同時間取樣，並使用分光光度計偵測後得到之數據作成曲線，數據表示第 16 小時開始趨近於飽和，在 16 小時之後菌體生長速率減緩。

Y. lipolytica 之誘導曲線

使用高效液相層析儀分析 24mM tyrosine 20 μ l 標準品之滯留時間為 5.45mins，使用高效液相層析儀分析 24mM L-DOPA 20 μ l 標準品之滯留時間為 4.09mins，並在開始誘導菌體分泌蛋白之 84 小時內不同時間點取樣，運用 HPLC 分析粗酵素催化受質生合成產物後得到之數據得知，避開活性中心置換機能性胜肽於 *HTH* 中，再將其產物積分值作成 *Y. lipolytica* 酵母菌之誘導曲線

可知道第 36 小時是酵素最大分泌量之時間。

SDS-PAGE 之蛋白質分子量預測

將透析結束之蛋白質液由 Ni-NTA column 純化，最後進行聚丙烯醯胺凝膠電泳確認目標分子量大小。理論值分子量應為 54.7kDa，然而，*Y. lipolytica* 酵母菌胞外分泌系統在執行胜狀鏈摺疊前會先將目標蛋白醮基化(Madzak *et al.*, 2004)，所以其分子量在 SDS-PAGE 上表示出 65kDa。

表現、分泌、純化回收之蛋白量

經由 SDS-PAGE 分析片段分子量後將之定量，將其分光值 0.702 代入 BSA 標準曲線所得到之檢量線公式 $y=0.0317x+0.052$ ，純化後的蛋白 GHTD-HTH 其濃度為 $20.505 \mu\text{g/ml}$ ，其單位活性 (unit activity) 為 $7.916 \times 10^{-2} \mu\text{mol/min}$ ，接著將單位活性(U)除以蛋白質濃度(mg)即可得其比活性 (specific activity) 為 3.861 U/mg。而在 200ml 之酵母菌培養液，共回收了 10 ml 之純蛋白，故共純化了濃度 $205.05 \mu\text{g/ml}$ 之蛋白量；由此推算，1 公升酵母菌培養液中，可獲得 $1025.25 \mu\text{g/ml}$ 之蛋白量。

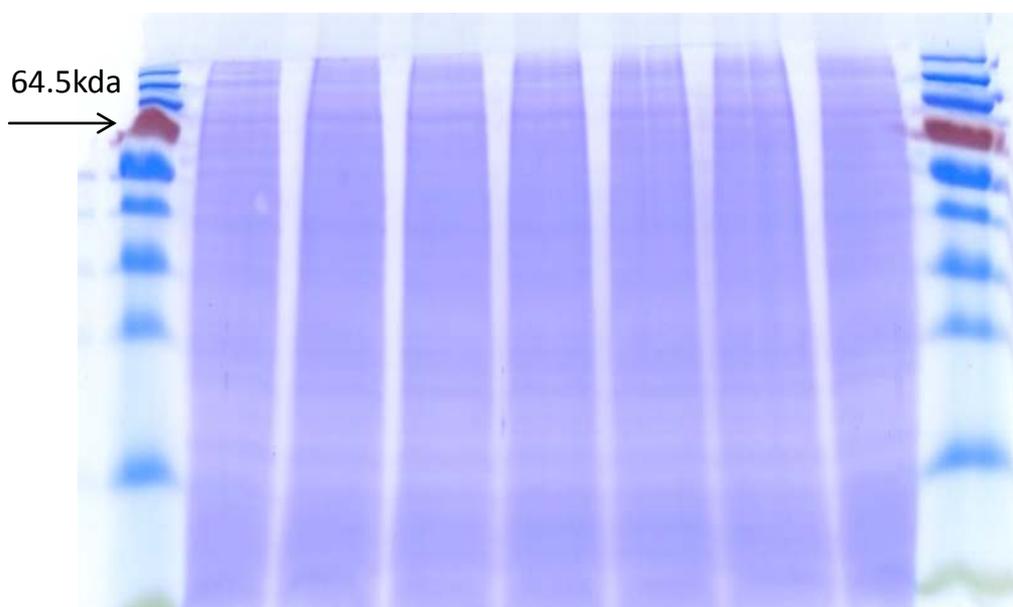


圖 7. 目標基因表現經純化於聚丙烯醯胺凝膠(SDS-PAGE)電泳後之結果。

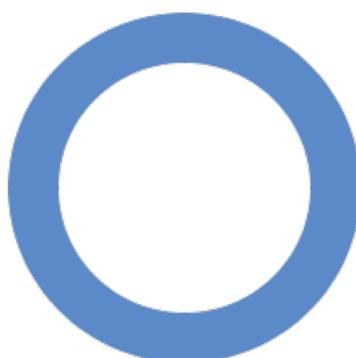


Figure 8 :由聯合國所創，代表糖尿病的藍色圓圈

結論

1. 選定 *HTH* 中不影響酵素活性區段之可供置換區域進行置換。
2. 成功置換 *HTH5* 區域中 22 套 *GHTD* 胜肽。
3. 完成 *GHTD-HTH* 送入酵母菌 *5S-RNA* 基因中。
4. 利用 *Starch binding* 回收蛋白，*HTH* 蛋白大小為 54.5kda，因酵母菌分泌時的糖化作用會提升 10kda，故最後蛋白大小為 64.5kda

參考文獻

1. S.G. Paule, B. Nikolovski, R.E. Gray, J.P. Ludeman, A. Freemantle, R.A. Spark, J.B. Kerr, F.M. Ng, P.Z. Zimmet, M.A. Myers *GHTD-amide: A naturally occurring beta cell-derived peptide with hypoglycemic activity* *Peptides*, Volume 30, Issue 5, May 2009, Pages 955–961
2. Sarah G. Paule, Biljana Nikolovski, Justin Ludeman, Robyn E. Gray, Leone Spiccia, Paul Z. Zimmet, Mark A. Myers *Ability of GHTD-amide and analogs to enhance insulin activity through zinc chelation and dispersal of insulin oligomers* *Peptides*, Volume 30, Issue 6, June 2009, Pages 1088–1097
3. 申一中：苦瓜萃取物調整血糖之活性成分的探討：2007、中國醫藥大學中國醫學研究所。
4. 邱智賢、李英惠：糖尿病特定標的之藥物開發：中研院分生所。
5. Catherine Madzak, Claude Gaillardin, Jean-Marie Beckerich. *Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review.* *Journal of Biotechnology* 109 (2004) 63–81.