

東海大學理學院化學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Chemistry

College of Science

Tunghai University

Master Thesis

以毛細管電泳暨紫外光/可見光偵測器分離組蛋白
Separation of histone by capillary electrophoresis with
ultraviolet-visible detection

賴芋蓁

Yu-Jhen Lai

指導教授：張柏齡 博士

Advisor : Dr. Po-Ling Chang

中華民國 106 年 7 月

東海大學碩士班研究生

論文指導教授推薦書

化學系 碩士班 賴芊蓁 君所提之論文

以毛細管電泳暨紫外光/可見光偵測器分離組蛋白

Separation of histone by capillary electrophoresis
with ultraviolet-visible detection

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授  (簽章)

106年7月21日

東海大學碩士班研究生
論文口試委員審定書

化學系 碩士班 賴芋蓁 君所提之論文

以毛細管電泳暨紫外光/可見光偵測器分離組蛋白

Separation of histone by capillary electrophoresis
with ultraviolet-visible detection

論文口試委員會 召集人 林泱蔚 (簽章)

委員 張祥達

譚昭W

中華民國 106 年 7 月 21 日

謝誌

隨著畢業的季節來臨，代表著碩士生涯將告一段落，我也即將與伴隨我成長的東海大學告別。從昔日的懵懂，至今則多了幾分成熟與自信，往後的日子我會時常懷念於東海的點點滴滴。

在這段碩士生涯，最為感謝的就是指導教授張柏齡老師，感謝老師總在實驗最需要協助的時候，給與即時的幫助與指導，並教導學生於研究方面應保有實事求是的處事態度，往後邁入職場，我也能夠保持如此的態度並實踐老師這些日子的諄諄教誨。還要感謝兩位口試委員譚賢明教授及林泱蔚教授，於百忙之中撥空來替學生口試，以及在論文撰寫及實驗上給予最專業的建議與指正。

此外，我要感謝實驗室的成員們，包括珮綺、心媛、雅琳、雅婷、姿誼、佳林、雅柔與肇宣在實驗上提供協助及指教，最感謝雅婷、姿誼與雅柔，有著你們的陪伴讓我在實驗室的生活不再是所謂的枯燥煩悶，反而增添了許多樂趣。另外非常感謝化學系系辦藍姐於平常的幫忙。

最後僅將此獻給我摯愛的父母及家人，因為有你們無條件地支持我才能夠無後顧之憂地完成自己的學業，願以此成果及喜悅與你們分享。最後盼望未來於實驗室的各位能繼續努力，僅祝各位實驗順利。

摘要

組蛋白(Histone)是真核生物構成染色體的基本結構蛋白。它們富含帶正電荷的鹼性胺基酸，能夠與 DNA 中帶負電荷的磷酸基團相互作用，使 DNA 緊密纏繞於組蛋白上，因此組蛋白在真核生物細胞中為參與基因調節(regulation of gene expression)的扮演重要角色。在許多癌症相關的研究中發現參與了基因表達，組蛋白本身便是重要的角色為了鑑定腫瘤細胞中的癌幹細胞，在表觀遺傳學機制的研究發現 H1.0 組蛋白與癌細胞的分裂程度呈現反比關係，藉此證實失去 H1.0 組蛋白是癌幹細胞之特徵。在此研究中，學生酸萃取出肝癌細胞(Huh7)中的組蛋白單體，並利用 uv-vis 吸收波長為 280 nm 偵測組蛋白。分離組蛋白中的基本結構包括五種類型的小分子鹼性蛋白質:H1、H2A、H2B、H3、H4。本實驗分離電壓為 15kV，並加入十二烷基硫酸鈉(Sodium dodecyl sulfate)以微胞電動力層析法的分離機制，經由改變緩衝溶液的濃度、pH 值，改善蛋白質會吸附在毛細管的表面，所造成訊號解析度下降和靈敏度降低的問題。加入不同濃度的篩分介質 250K Da 羥乙基纖維(Hydroxyethyl Cellulose)，使得可以得到最佳的分離解析度。利用最佳化條件來分離不同種類的癌細胞，包括鼻咽癌細胞(TW02)、子宮頸癌細胞(Hela)、肺癌細胞(A549)藉此探討不同癌症細胞內組蛋白之差異。

Abstract

Histones are the basic structural units protein found in eukaryotic cell. They are highly basic amino acids which can interact with negatively charged phosphate groups in DNA. They are the chief protein components of chromatin, acting as spools around which DNA winds, and playing a role in gene regulation. Heterogeneity among cancer cells within individual tumors has emerged as a general feature of cancer, with critical implications for cancer diagnosis and treatment. That demonstrate a critical role for Histone H1.0 in inhibiting tumor maintenance. Here, we present standard protocols for acid extraction of histones from human liver cancer cells. Separation of five major families of histones include H1/H5, H2A, H2B, H3, and H4 with ultraviolet visible detection, and the detection wavelength is 280 nm. The separation condition of histone is Tris-Borate buffer add SDS (Sodium dodecyl sulfate), and the separation voltage is +15 kV. By changing the buffer solution concentration, pH value, and SDS concentration can improve the protein will be adsorbed on the surface of the capillary. By adding different concentrations of 250K Da hydroxyethyl cellulose, the best separation resolution can be obtained. Under through optimized experimental conditions and apparatus, it can separate the different kind of cancer cell include Nasopharyngeal carcinoma cells (TW02), cervical cancer cells (Hela), lung cancer cells (A549). We can explore the differences in histones between different cancer cells.

總目錄

論文摘要.....	I
總目錄.....	III
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	X
參與會議.....	128
第一章 毛細管電泳及組蛋白之介紹.....	2
1.1 毛細管電泳之緒論.....	2
1.1.1 毛細管電泳分離原理.....	4
1.1.1.1 淌度 (mobility).....	4
1.1.1.2 電滲流(electroosmotic flow, EOF).....	6
1.1.1.2.1 電滲流之形成.....	6
1.1.1.2.2 影響電滲流之參數.....	7
1.1.1.2.3 電滲流的特性.....	9
1.1.1.3 毛細管凝膠電泳之分離機制.....	9
1.1.1.4 線上濃縮技術之模式.....	16
1.1.1.5 偵測系統.....	17
1.1.1.6 樣品注射方式.....	18

1.1.1.7 毛細管電泳對生物樣品之應用	21
1.1.2 毛細管電泳的分離模式	23
1.1.2.1 毛細管區帶電泳(CZE)	23
1.1.2.2 毛細管凝膠電泳 (CGE)	23
1.1.2.3 微胞電動層析法 (MEKC)	24
1.1.2.4 毛細管等電聚焦法(CIEF)	25
1.1.2.5 毛細管等速電泳(CITP)	25
1.1.2.6 毛細管電層析法 (CEC)	26
1.2 組蛋白簡介	27
1.2.1 組蛋白之歷史	27
1.2.2 組蛋白之修飾	32
1.2.2.1 Histone acetylation 組蛋白乙醯化.....	34
1.2.2.2 Histone phosphorylation 組蛋白磷酸化	35
1.2.2.3 Histone methylation 組蛋白甲基化	36
1.2.2.4 Ubiquitylation 泛素化	37
1.2.3 非組蛋白	38
1.2.4 核小體之簡介	40
1.2.5 染色體之簡介	41

1.2.6 染色體之結構	42
1.3 參考文獻	45
第二章 以毛細管電泳暨紫外光/可見光偵測器分離癌症細胞中的 組蛋白	55
2.1 緒論	55
2.2 實驗部分	60
2.2.1 研究動機	60
2.2.2 實驗試藥	61
2.2.3 細胞培養	62
2.2.4 組蛋白萃取(Histone extraction)	62
2.2.5 毛細管電泳結合紫外光可見光光譜儀之裝置	67
2.2.6 毛細管前處理	70
2.2.7 聚合物溶液製備	70
2.2.8 實驗流程	71
2.3 結果與討論	72
2.3.1 偵測波長的選擇	72
2.3.2 分離電壓對組蛋白分離之影響	74
2.3.3 緩衝溶液 pH 值對分離之影響	74

2.3.4 SDS 添加對組蛋白分離之影響	76
2.3.5 緩衝溶液濃度對於對分離時間之影響	79
2.3.6 聚合物種類和濃度對分離組蛋白之影響	83
2.4 非連續態系統分離組蛋白	86
2.4.1 緩衝溶液濃度之對組蛋白分離之影響	87
2.4.2 HEC 濃度對組蛋白分離之影響	89
2.4.3 添加 SDS 對組蛋白分離之影響.....	91
2.4.4 固定 HEC 濃度添加 SDS 對組蛋白分離之影響	93
2.4.5 固定 SDS 濃度改變 HEC 濃度對組蛋白分離之影響....	94
2.4.6 利用樣品堆積偵測組蛋白.....	97
2.5 組蛋白與腫瘤的發生.....	99
2.5.1 不同癌症細胞中組蛋白之分離	102
2.6 利用毛細管電泳暨雷射誘發螢光分離組蛋白 H1	104
2.6.1 戊二醛固定抗體之條件.....	104
2.6.1.1 二抗(Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG)固定條件	104
2.6.1.2 一抗(Anti-5-methylcytosine mouse)接二抗 (Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG)固定條件	105
2.6.1.3 組蛋白(Histone)接一抗(Anti-5-methylcytosine	

mouse)接二抗(Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG)固定 條件.....	105
2.6.2 儀器設備及系統架構.....	105
2.6.3 HEC 添加對分離之影響.....	108
2.6.4 戊二醛濃度對分離之影響.....	108
2.7 結論.....	114
2.8 參考文獻.....	119

圖目錄

圖 1-1 (a) 電雙層之結構 (b) Zeta 電位	7
圖 1-2(a)電滲流和(b)層流比較圖	9
圖 1-3 毛細管凝膠電泳在電滲流存在下分離 DNA 片段之示意圖	12
圖 1-4 毛細管凝膠電泳在電滲流存在下分離組蛋白之示意圖	19
圖 1-5 組蛋白與染色質之關係圖	27
圖 1-6 組蛋白結構示意圖	29
圖 1-7 染色體構造模型示意圖	43
圖 2-1 細胞培養	63
圖 2-2 組蛋白萃取流程圖	65
圖 2-3 組蛋白之十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳圖 ...	66
圖 2-4 毛細管電泳結合紫外光可見光偵測器之裝置圖	68
圖 2-5 UV2000 之校正	69
圖 2-6 組蛋白吸收圖	73
圖 2-7 電壓對組蛋白分離之影響	75
圖 2-8 緩衝溶液 pH 值對分離之影響	77
圖 2-9 SDS 濃度對組蛋白分離之影響	78

圖 2-10 緩衝溶液 pH 值 8.0 時其濃度對分離時間之影響	80
圖 2-11 緩衝溶液 pH 值 9.0 時其濃度對分離時間之影響	81
圖 2-12 緩衝溶液 pH 值 10.0 時其濃度對分離時間之影響 ..	82
圖 2-13 緩衝溶液聚合物種類和濃度對組蛋白分離之影響 ..	84
圖 2-14 緩衝溶液聚合物種類和濃度對組蛋白分離之影響 ..	85
圖 2-15 緩衝溶液濃度對組蛋白分離之影響	88
圖 2-16 緩衝溶液內添加 HEC 對組蛋白分離之影響	90
圖 2-17 緩衝溶液內添加 SDS 對組蛋白分離之影響	92
圖 2-18 固定 HEC 濃度添加 SDS 對組蛋白分離之影響	94
圖 2-19 添加 SDS 後 HEC 濃度對組蛋白分離之影響	96
圖 2-20 樣品堆積偵測組蛋白之影響	98
圖 2-21 不同癌症細胞中組蛋白之分離	103
圖 2-22 儀器裝置示意圖	107
圖 2-23 緩衝溶液分離抗體	110
圖 2-24 HEC 添加對抗體分離之影響	111
圖 2-25 戊二醛濃度對抗體分離之影響	112
圖 2-26 一抗濃度對抗體分離之影響之影響	113

表目錄

表 1-1 組蛋白之序列	30
表 2-1 平衡態電泳條件總表(1).....	115
表 2-2 平衡態電泳條件總表(2).....	116
表 2-3 非連續態電泳條件總表(1).....	117
表 2-4 非連續態電泳條件總表(2).....	118

第一章 毛細管電泳及組蛋白之介紹

1.1 毛細管電泳之緒論

Michaelis 於 1909 年所提出電泳 (electrophoresis) 一詞，電泳的產生是在一具有帶電粒子的溶液中施加一外加高電壓，而溶液中的帶電粒子會因為庫倫力的影響產生遷移，此現象稱之為電泳^[1]。利用這原理能讓不同荷質比(m/z)之帶電粒子產生不同的遷移速度，使溶液之帶電粒子可以進行分離，此方法稱之為電泳分離。在 1937 年 Tiselius 對電泳儀器作了改進，創造了 Tiselius 電泳儀，在此基礎上建立了研究蛋白質的自由界面電泳方法，率先將電泳分離技術應用在分離人體血清蛋白中的白蛋白及 α 、 β 、 γ 三大類的球蛋白，也因為此開拓性的貢獻在 1984 年獲得諾貝爾化學獎^[3,4]。Wieland 和 Fischer 重新發展了以濾紙作為支持介質的電泳方法，對胺基酸的進行分離。

電泳的分離效率會與外加電場大小成正比，電場增加，分離效率隨之升高，不過隨著電場的升高，分離溶液所形成的導體通路會因為電流運輸而產生焦耳熱，焦耳熱會造成然而傳統的平板(slab)電泳會因為施加高電壓及在自由溶液中而產生過多的擴散現象及熱對流而影響分離效率等缺點^[5-7]。還有製備繁瑣以及消耗樣品量大和重複性差等限制。與毛細管技術相比更凸顯了其具有、解析度高樣品需求量少、分離速度快等多種優勢，能夠改善平板電泳許多缺點。電泳技術

的發展在 1967 年 Hjérten 利用內徑為 3mm 的石英管柱，來改善傳統平板電泳的缺點，並且以改變毛細管表面性質和結合 UV 偵測器的方式，能夠有效的分離蛋白質、無機物以及核酸等物質，是由於其管壁內徑小能有效的減少產生的焦耳熱^[8]。所以到了 1974 年時 Virtanen 改善了 Hjérten 的方法，縮小了毛細管柱的內徑至 200~500 μm ，可以在 10 分鐘內有效的分離 16 種陰離子，有效的控制了焦耳熱的產生，也簡化了儀器裝置的設計，但礙於當時的技術問題毛細管內徑僅能發展至毫米等級，且因為無法使用高於 5 kV/m 的電壓導致分離效果不佳。Mikker 等人也嘗試利用管壁材質為聚四氟乙烯並將內徑縮小至 200 μm ，此設計因為其管壁較薄及較小的內徑，能有效的增加其表面積減少焦耳熱所引起的困擾。至 1981 年 Lukacs 更進一步的證明毛細管電泳是一個極具發展性的分離技術，他們使用內徑為 75 μm 的玻璃管柱把焦耳熱降至最低，能以高電壓進行分離，進而縮短了分析時間，且有效的分離胺基酸衍生物^[9,10]，並結合螢光偵測器降低其偵測極限，也開啟了毛細管電泳的新紀元。由於其分離效率高、樣品消耗量低、儀器設備簡單等優點。其分析種類可以從有機樣品、無機離子和 DNA 片段等^[10,11]，應用相當廣泛。

1.1.1 毛細管電泳分離原理

現今所使用的毛細管分離管柱的材質為融熔態成型之二氧化矽 (fused silica)，毛細管外包覆一層高分子聚合物以增加毛細管的韌性，防止在實驗過程中有斷裂的現象。可以利用壓力注射的方式將緩衝溶液或洗劑清洗毛細管，而進行分離時以壓力進樣的方式將緩衝溶液注入毛細管內，接著使用電壓差或壓力差使待測物進入毛細管內，在給予兩側白金電極之電壓差讓毛細管內的物質進行電泳，當待測物通過偵測窗口時就可以達成偵測的效果。

1.1.1.1 淌度 (mobility)

毛細管電泳原理主要是利用在系統下施加一電場，不同電荷數之離子會因為遷移速率不同而分離，帶電粒子在電場中會因庫倫力的影響以一為 (v_{ep}) 的速度前進，而此速度會與電場(E)成正比，其關係式為下列：

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} \quad (1-1)$$

為電泳淌度 (mobility)，其定義為單位電場下粒子電泳遷移速度。即為當施加一外加電場時，帶電粒子因受庫倫作用力 (F) 之影響而產生加速度移動的現象，且此庫倫作用力會與電場 (E) 與有效電荷 (q) 具有成正比之關係，其關係式如下列：

$$F = q E \quad (1-2)$$

帶電粒子在運動的過程中，會與其他介質產生摩擦力(f)，而造成移動速率下降，當帶電粒子受電場加速到某個程度時，摩擦力與庫倫作用力會達平衡，此時帶電粒子不做加速而是為等速運動。

在 Stokes 定律中，將帶電粒子假設為剛性球體，受到摩擦力時，其關係式為：

$$f = f v = 6 \pi \eta r v_{ep} \quad (1-3)$$

f 為剛性球體的動摩擦係數， η 為緩衝溶液的黏度，而 r 為粒子半徑。

當帶電粒子其庫倫作用力與摩擦力相等時，帶電粒子會做等速運動，

其關係式如下列：

$$F = q E = 6 \pi \eta r v_{ep} \quad (1-4)$$

上述公式亦可寫成：

$$v_{ep} = qE / 6 \pi \eta r \quad (1-5)$$

由以上公式代入方程式 (1-1) 可得證：

$$\mu_{ep} = v_{ep} / E = q / 6 \pi \eta r \quad (1-6)$$

由 1-6 公式亦可得知帶電粒子之電荷與淌度為正比關係，反之與粒子半徑則為反比，由此可知粒子本身之大小與電荷的多寡都是影響淌度的關鍵。

1.1.1.2 電滲流(electroosmotic flow, EOF)

1.1.1.2.1 電滲流之形成

在毛細管電泳中利用分析物在電場下荷質比之差異，產生不同淌度達成分離效果。然而除了物質的遷移速率外，電滲流為第二種驅動力，由於毛細管內壁是由熔融態的矽（fused silica）所組成，當毛細管內溶液 pH 值大於 3 時，會使管壁上的矽醇基（SiOH）解離成矽醇陰離子（SiO⁻），當溶液通過毛細管壁時的陽離子受到矽醇陰離子之吸引，在毛細管上便會形成電雙層（electrical double layer）。若在此系統施以一高電場，電雙層上的陽離子會被吸引至負極，此作用力會帶動整體溶液（bulk solution）往負極移動而產生電滲流。在此系統中如圖 1-1 所示，內層被管壁所吸引的陽離子是為固定層(stern layer)，固定層外則為擴散層(diffusion layer)。與管壁距離越遠，被吸引之正電荷數越少，因為固定層與擴散層之間電荷分布不均，體相溶液與電雙層間會產生一個電位差，稱之為 ζ 電位(zeta potential)^[12]。其表示方程式為下列 (1-7)：

$$\zeta = 4 \pi \delta e / \varepsilon \quad (1-7)$$

δ 為電雙層之厚度，e 為單位面積之總電荷，ε 為緩衝溶液之介電常數。ζ 電位與電滲流之關係式為 (1-8)：

$$\mu_{eo} = \varepsilon \zeta / \eta \quad (1-8)$$

淌度 μ_{eo} 為電滲流大小，淌度與溶液的介電常數(ϵ)和 ζ 電位之間為正比，反之與緩衝溶液的黏度(η)則為反比。Zeta 電位的強弱與毛細管壁上的質子數有關，質子越多被吸引的陽離子也隨之增加，電雙層厚度也會變厚，Zeta 電位變大，電滲流也會隨之加速。

1.1.1.2.2 影響電滲流之參數

電滲流的大小會受緩衝溶液的 pH 值影響，當緩衝溶液的 pH 值較高時，毛細管內壁質子解離的數目會較多，Zeta 電位也會提升，電滲流變大，pH 值大於 2 時矽醇基會開始解離出氫離子，當 pH 值高於 4 可以明顯地觀察到電流值的上升，直至 pH 值大於 8.0 時，電滲流才會趨近一個定值。這與溶液的離子強度有關，離子強度增加離子數目也會增多，管壁也會吸附較多的陽離子，而電雙層厚度則會因為離子變密集而變薄，Zeta 電位也會隨之變小，使的電滲流也會下降。此外溫度也是影響電滲流的原因，當毛細管內產生焦耳熱溫度升高，而使管內液體黏度降低，電解質溫度每改變一度，則黏度將會變化 2%~3%，電滲流也會藉此被影響。電滲流也會因為在毛細管內加入添加劑影響其強弱，如在管內加入濃度較高的中性鹽類，則溶液離子強度會增大，使溶液黏度增大，電滲流減小。若在毛細管內加入有機溶劑如甲醇、乙腈，而電滲流增大。界面活性劑的加入則會因為其種類不同而改變電解質之電性，可改變電滲流的大小和方向。

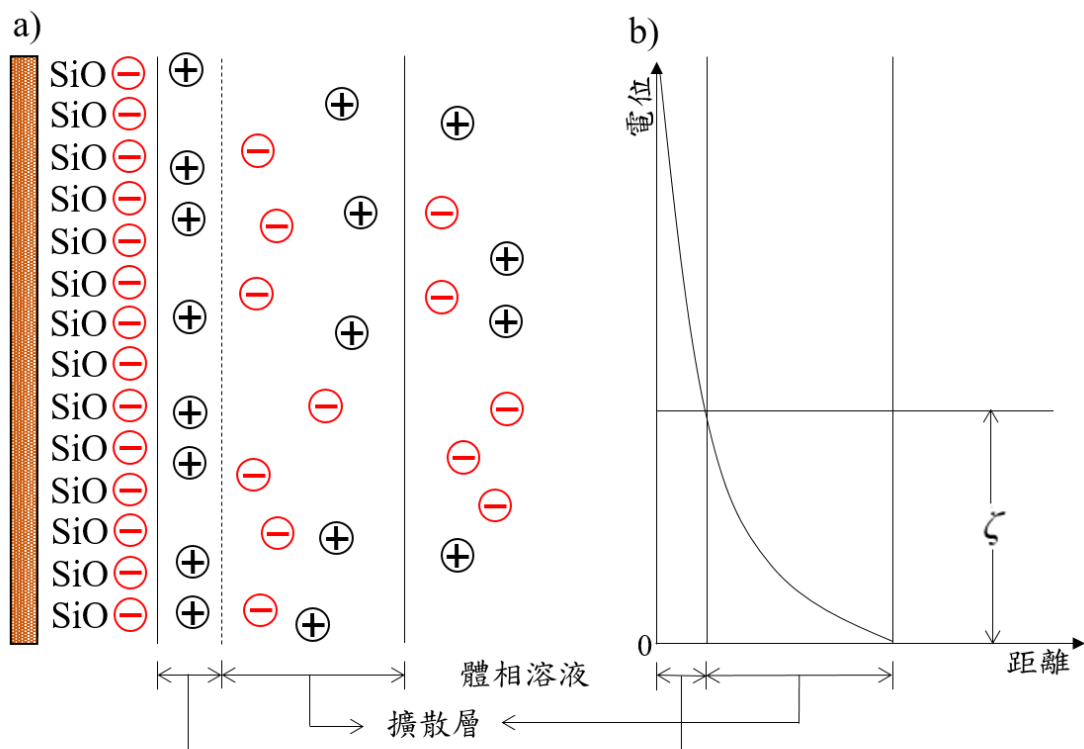


圖 1-1 (a) 電雙層之結構 (b) Zeta 電位。

1.1.1.2.3 電滲流的特性

電滲流是因擴散層中對離子受電場影響而產生遷移現象，理論上管柱內的溶液每一位置其流速都該相同，便產生獨特的平面流現象。與其他層析管柱法相比，是以幫浦產生驅動力，其流速會再管壁旁迅速減少，而靜止的液體會與毛細管壁產生摩擦力和剪切力，進而形成層流（laminar flow），如圖 1-2 在管柱中會生成拋物狀。層狀流注入毛細管中會造成樣品區帶分散，導致解析度不佳，相較之下是使用電滲流之毛細管電泳系統，不但樣品區帶不會變寬，其理論平板數甚至能提高至數百萬以上。

1.1.1.3 毛細管凝膠電泳之分離機制

毛細管電泳具有樣品需求量低和高解析度等優點，近年來常被利用在分析生物樣品上，在此以分離 DNA 樣品為例解釋其分離機制^[13]。在分離過程中需要考慮的參數包含：溫度、毛細管表面性質、電場強度、凝膠介質、進樣方式及偵測系統等。DNA 樣品在自由溶液下會以隨機纏繞的方式存在，當施加電場時會展開成長鏈狀，在此狀況下 DNA 的長鏈碰觸到溶液時，DNA 鹼基對（base pair）之數目（N）會與毛細管內之摩擦力成正比，其關係式為：

$$f \propto N \quad (1-9)$$

且 DNA 上磷酸根之負電荷（Q）也會與鹼基對之數目成正比，

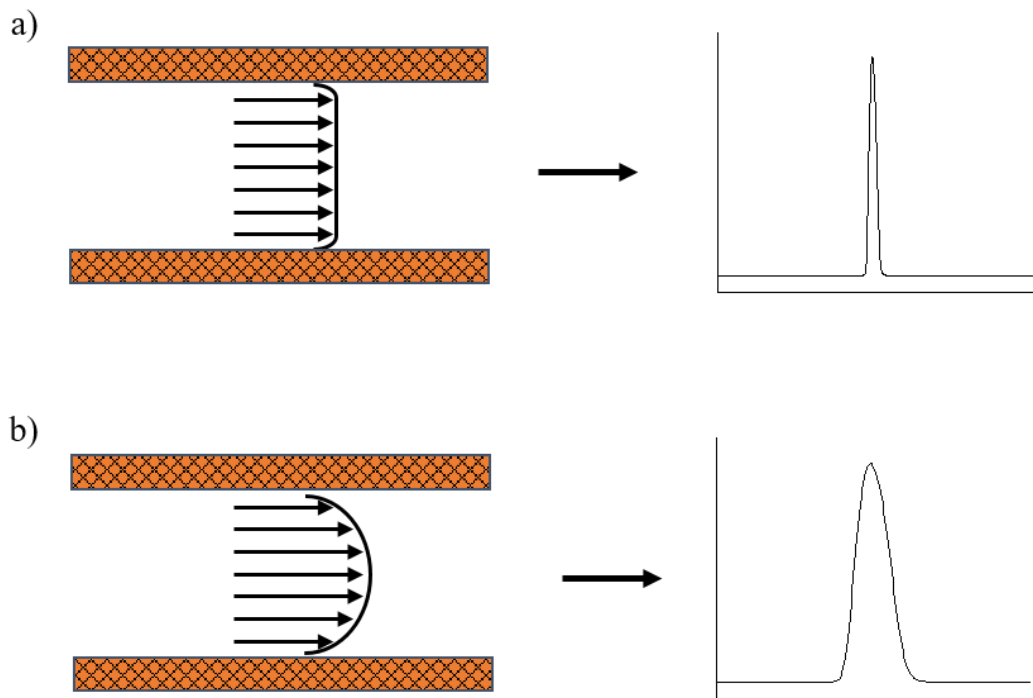


圖 1-2(a)電滲流和(b)層流比較圖。

其關係式為：

$$Q \propto N \quad (1-10)$$

因此 DNA 在自由溶液之淌度為：

$$\mu = v/E = q/f \propto N/N = \text{constant} \quad (1-11)$$

由上述可推斷 DNA 在自由溶液中淌度為定值，所以 DNA 在此狀況下是無法有效分離的。目前 DNA 的分離著重在凝膠的選擇，凝膠是具有非傳導性的介質，能減低在分離過程中所造成的區帶擴散現象，可利用改變凝膠所構成的網狀結構對 DNA 做分離。在分離的過程中 DNA 之長度不同在通過凝膠溶液時也會受到不同困難度而產生不同淌度，藉此達到分離之效果。DNA 長度較短比較容易通過凝膠的孔隙，所以所需分離時間較短，反之長度較長之 DNA 分離時間就會較長。

凝膠內的聚合物是以單體的狀態存在的，當聚合物在溶液內濃度低時，分子間的碰撞機率也較低產生作用力的機率也隨之降低，聚合物溶液的黏度也較低；倘若把聚合物濃度增加，分子間碰撞機率會上升，當上升至一個臨界點時聚合物間會彼此間開始互相作用，生成一網狀結構，當其濃度超過糾結界限（entangled limit）時此膠體溶液會從網狀結構形成孔隙。然而糾結界限的定義是假設每個聚合物分子體積都是相同的，所有聚合物所佔的總體積與溶液體積相同時的濃度。

可表示為下列：

$$\varphi^* \approx 3 M_w / 4 \pi N_A R_g^3 \quad (1-12)$$

或

$$\varphi^* \propto N^{-0.8} \quad (1-13)$$

其中 φ^* 為糾結界限， M_w 為聚合物分子量， N_A 為亞佛加厥常數， R_g 為聚合物分子的迴旋半徑（radius of gyration），而 N 為聚合物分子所包含的單體數目。但上述列式是以聚合物的平均分子量做計算的，事實上聚合物的分子量並不為定值，所以實際的糾結界限數值必須透過實驗才能得知^[14]。

由上述可知，膠體本身是為一具有非傳導性的介質，超過糾結界限所形成的孔隙（mesh）能有效的分離出待測樣品，不過此網狀結構之孔隙大小與聚合物濃度有關，

其關係式為：

$$\xi = R_g \left(C / \varphi^* \right)^{-0.75} \quad (1-14)$$

或

$$\xi \propto a \varphi^{*0.75} \quad (1-15)$$

ξ 為孔隙大小， C 為聚合物濃度， a 為常數^[15]，其數值會因為聚合物種類而不同。

早期學者探討生物分子在凝膠網狀結構中的遷移行為，將不同長度的

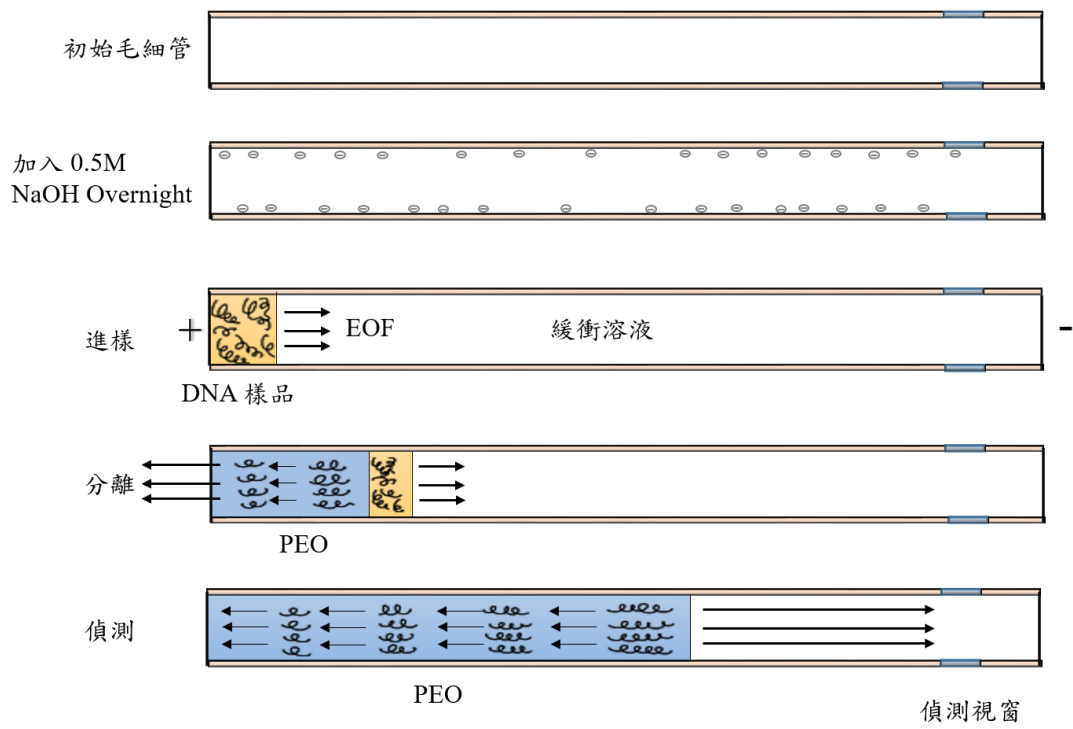


圖 1-3 毛細管凝膠電泳在電滲流存在下分離 DNA 片段之示意圖。

DNA 和不同電場條件來描述其遷移的變化，從早期的 Ogston 模型 (Ogston model) [23] 及爬行模型 (reptation model) [16] 此兩種模型可用來解釋 DNA 分子在凝膠介質中的分離機制。Ogston 模型中描述帶電大分子通過高分子聚合物形成的網狀結構，形成的孔隙大小主要與聚合物種類有關，尤其是聚合物濃度和其交聯程度有關，所以在 1958 年發展用來解釋一剛性球體在纖維隨機交錯所形成的網狀結構中的運動模式。到 1966 年時 Morris 首度引用此模型來解釋 DNA 分子在聚合網狀結構下的行為。Ogston 模型在 DNA 分子小於 3000bp 較適用，並且在此模型中會將 DNA 分子視為一剛性球體。而片段較小的 DNA 會從聚合物所形成的大孔隙結構被篩分出來，較大片段的 DNA 則會無法通過，在 Ogston 模型的描述中，DNA 的淌度可被表示為下式(1-16):

$$\mu = \mu^* P \quad (1-16)$$

μ 為 DNA 在凝膠介質中的淌度， μ^* 為 DNA 在自由溶液中的淌度，DNA 分子小於聚合網狀結構之孔隙機率則為 P 。 P 的關係是則如下列 (1-17):

$$P = \exp [-KC (R_g + r)^2] \quad (1-17)$$

其中如上述所知 DNA 分子視為一剛性球體其半徑為 R_g ， K 為比例常數， C 為聚合物濃度， r 為聚合物分子鏈厚度，上述二式經過計算後

則能表示為 DNA 的淌度關係式：

$$\mu = \mu^* \exp [-KC (R_g + r)^2] \quad (1-18)$$

接著把上式取對數後， $\log (\mu/\mu^*)$ 與濃度(C)會呈現線性關係，然而此關係圖稱之為 Ferguson 圖 (Ferguson plot)，使用此關係式可以對聚合物分子鏈之厚度及孔隙大小作估算^[17]。

當 DNA 分子為大片段分子時，則可以利用爬行模型(reptation model)，提出此模型的是 de Gennes，DNA 本身為鏈狀分子並可以改變自身構型，DNA 剛性球體的直徑大於孔隙時，DNA 則會變形其鏈狀結構，以蛇行的方式通過聚合物所形成的網狀結構，所以 DNA 分子的移動並不會受限於長度之長短，和所形成孔隙之大小，此時 DNA 的淌度與 DNA 分子大小可表示為下式(1-19)：

$$\mu \propto \frac{N}{N} = \frac{1}{N} \quad (1-19)$$

以上兩種模式都是建立於平板凝膠電泳發展的分離機制，由式中可得知 DNA 的淌度與 DNA 的長度成反比，若將這兩個模型套用在毛細管電泳時，會施加高電壓進行實驗，所以必須考慮 DNA 的構型會受到電場而改變，聚合物所形成的孔隙會隨著時間而改變，是屬於暫時性的 (transient)，所以若要深入探討 DNA 分子於毛細管凝膠電泳之分離機制，必須將上述兩個變因考慮進去。

1.1.1.4 線上濃縮技術之模式

線上樣品濃縮(on-line concentration)技術最早是 Mikker 在 1979 年時，在實驗中發現樣品堆積(sample stacking)的現象，Chien 與 Burgi 等人在 1989 年進一步研究發現，可以利用樣品與緩衝溶液導電性的差異產生不連續電場，使得帶電荷分析物在此兩種環境中遷移速率不一樣，進而形成樣品堆積。而現今發表出不同的線上濃縮技術，研究者可以依據分析物的特性選擇適合的方式進行實驗，以下則是對線上濃縮技術做一個簡介。線上堆積主要是利用具有帶電荷分析物在樣品與緩衝溶液間導電性不同所造成的電場強度差異，分析物在此兩種環境中遷移速度改變，所形成的樣品堆積。然而樣品堆積又可以分成電場放大堆積(Field-amplified sample stacking, FASS)，此方法分析物是溶於低導電度的緩衝溶液中，而背景緩衝溶液則為高導電性物質，根據歐姆定律，由於樣品區帶導電性低所受到的電場強度較強，緩衝溶液區帶則反之，所以離子分析物會在樣品區前方介面處濃縮堆疊，綜合以上機制利用電場強度不同進行分離。接下來介紹大體積樣品堆積(Large-volume sample stacking, LVSS)，此法的機制與電場放大堆積相似，最大的不同是樣品注入的量為其兩倍，其作法是以壓力注射一長段樣品，若分析物帶的電荷與電滲流方向相反，則電滲流會將樣品區帶的基質帶出毛細管，分析物因受外加電場影響，會排斥向入口端

移動，而壓縮樣品區段，當壓縮至最大電流值 95%-99%時，改變電極方向則濃縮的分析物會像偵測端移動，但此方法只能單獨偵測陽離子或陰離子。然而中性不帶電荷之分析物就適合使用掃掠式線上濃縮 (sweeping-MEKC) ，它可以有效的改善電場放大堆積或大體積樣品堆積，分析物受限於離子分析物的缺點，利用含有界面活性劑所形成的微胞與不含界面活性劑的緩衝溶液其遷移速度不同，而形成樣品堆積，並且可以利用改變界面活性劑的種類探討不同的堆積機制。

1.1.1.5 偵測系統

毛細管電泳所需的樣品進樣量小(nL 範圍) ，雖然管柱本身為透明，但其光徑較短，對於微量的樣品常受限於偵測靈敏度不足的問題，所以能選擇一套高靈敏度的方法是毛細管電泳重要的課題。毛細管電泳之偵測系統有許多種類，包括螢光 (Fluorescence) 放射法此偵測方法其優點為靈敏度高，其偵測器是放置在與激發光呈 90 度的方向來偵測所放射出的螢光，但並非所有物質都具有螢光發色團 (Fluorophore)^[18, 19]，必須透過衍生的方式使生物分子接上染料或快速的嵌入 DNA 內。質譜儀 (mass spectroscopy, MS)^[20, 21] 本身便是能提供最多有關分析物化學訊息的偵測器，例如偵測分析物的質量及判定其結構，但由於毛細管電泳本身流速非常小，因此將其分展成與傳統高效能液相層析更能有效的發揮其特長。及紫外光-可見光吸收

(ultraviolet-visible absorption) 是將毛細管前幾公分之高分子 (polyimide) 保護膜燒掉，入射光源透過裸露出的管壁照射在毛細管內的樣品溶液上，然後在另一側偵測其吸收度，因為毛細管內徑的限制，導致其靈敏度不慎理想，但因為適用的分析物相當廣泛，加上儀器裝置便宜此方法的使用仍相當普遍^[22]。

1.1.1.6 樣品注射方式

除了上述參數之外，毛細管樣品進樣方式的不同也會影響其分離效率，而最常使用之樣品進樣方法有以下幾種：虹吸進樣 (siphoning)、壓力進樣 (hydrostatically) 及電動進樣 (electrokinetically)。壓力進樣是在進樣端施加壓力或在末端抽真空 (pump)，將樣品引入毛細管中，若毛細管兩端的壓力差為 $\Delta\rho$ ，經過 t_i 的時間後，樣品注入的體積 v 如下式(1-20):

$$v = \frac{\rho g \pi r^4 \Delta h t_i}{8 \eta L} \quad (1-20)$$

ρ 與 g 分別為樣品溶液的密度與重力加速度之常數。

但此方法較繁瑣；虹吸進樣是將樣品放置一固定高度，利用重力差驅使樣品進入毛細管中。虹吸及壓力進樣的優點為進樣之總量不會因為受到離子移動力的影響而改變，此兩種方法又稱之為流體注入法並符合下列公式(1-21):

$$v = \frac{\Delta\rho\pi r^4 t i}{8\eta L} \quad (1-21)$$

電動進樣是將毛細管進樣端與電極一同放置於樣品內，並施以一電壓藉由離子移動與電滲流讓樣品進入毛細管內。與前述兩種進樣方式相比，其優點為樣品進入毛細管內的體積較多。以內徑為 75 μm 為例，若高度差為 5 公分進樣 10 秒，其進樣量約為 6 nL，電動進樣則能到達 5 至 50 nL。

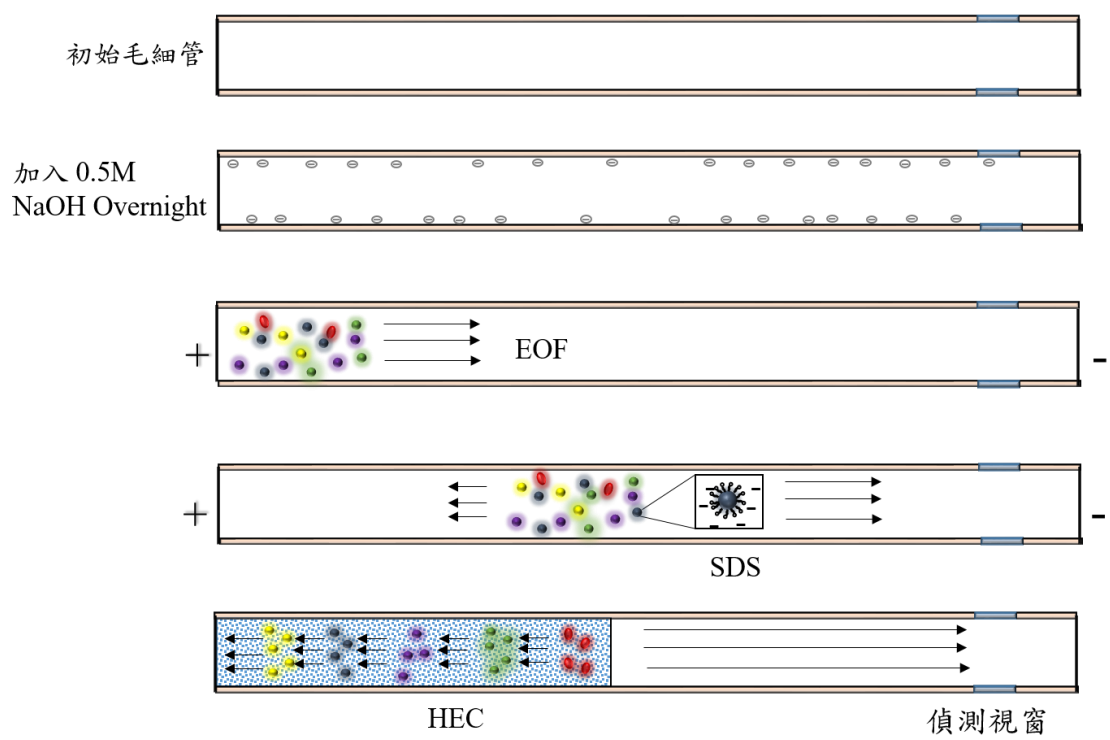


圖 1-4 毛細管凝膠電泳在電滲流存在下分離組蛋白之示意圖。

1.1.1.7 毛細管電泳對生物樣品之應用

生物樣品的分析發展至今越趨於更細節的要求，然而毛細管電泳具有分離效率高，分析速度快，樣品和試劑需求量少及易於實現自動化等優點。但因為生物樣品其種類繁多，結構複雜樣品量少、製備、濃縮及分離比較困難。然而核酸及蛋白質是兩類很重要的生物大分子，是人類生命活動的基礎，因而一直是人們研究的重點。特別是”人類基因組計畫”的實施，大大地推動了毛細管電泳技術的發展，能夠有效地應用於 DNA 測序。而且在短序列重複(short tandem repeats,STRs)偵測及分析上也有貢獻。毛細管電泳在蛋白質分析方面的應用也非常廣泛，包括物理常數測定、純度分析、微量製備、蛋白質體學(proteomics)研究、生化反應及其過程分析、結合蛋白及其衍生物研究、臨床醫學與疾病診斷等研究^[23-25]。至今在蛋白質體學的應用例如 Tong 等人採用這種技術，對酵母核糖體中所含 75 個蛋白質複合物進行了分析，成功的測定了混和物中 80% 的蛋白質^[26]。與蛋白質有關的生化反應其過程包括酶催化反應過程監測、動力學研究、蛋白質穩定性測定等，Viglio 等人利用 MEKC 研究了不同蛋白酶進行蛋白質水解的動力學過程。^[27]在蛋白複合物分析上，種類包括金屬結合蛋白、抗原-抗體複合物、蛋白質-DNA 複合物以及蛋白質-藥物複合物等。它們分子量很大，結構複雜，分離分

析相對較困難，但是由於它們很可能是能發揮生物學功能的實際存在型態，而且這些複合物在臨床診斷和藥物篩選具有非常重要的意義。例如 Wan 等則利用 CE 研究了多肽-蛋白質，蛋白質-蛋白質以及 DNA-蛋白質之間的相互作用^[28]。修飾後的蛋白質之生物研究，如醣基化、脂基化、磷酸化等，在調節蛋白質的生物學功能方面扮演著重要的角色，有著重要的生物學意義，很多種藥物本身就是屬於這類蛋白質。Camble 等人利用 CZE/UV，分離並測定了胺基酸序列相同，只有殘基磷酸化修飾不同的磷蛋白^[29]。

1.1.2 毛細管電泳的分離模式

毛細管電泳至今已衍生出很多不同的應用模式，其中較為普遍常見的模式有由 Jorgenson 和 Lukacs 所發展出來的毛細管區帶電泳 (capillary zone electrophoresis, CZE)^[30]、毛細管微胞層析 (micellar electrophoresis capillary, MEKC) 等等，以下為各類不同的模式說明^[31]。

1.1.2.1 毛細管區帶電泳(CZE)

毛細管區帶電泳其分離原理是對毛細管兩端施加一電位差時，不同分析物根據其不同的荷質比 (charge/mass)，會有不同的電泳遷移率，會在毛細管中形成不同的區帶，可藉由電位差在毛細管內形成的電滲流達到分離分析物的效果，但此系統只適用於分離陽離子或陰離子的分析物，中性物質因為它本身不受電場和緩衝溶液 pH 值改變影響^[32]。

1.1.2.2 毛細管凝膠電泳 (CGE)

與傳統的平板凝膠電泳相比，毛細管電泳能有效的降低成本、縮短分離時間的特性，能夠有效的利用在 DNA 和蛋白質的分析，不過 DNA 是由小片段所鍵結的，而這些小片段具有相同的荷質比，在進行分離時遷移時間會得到一樣的結果。接下來的研究就針對毛細管內部改質，在毛細管內部塗佈高分子聚合物形成孔洞，可以分離不同分子量的物質^[33]。

1.1.2.3 微胞電動層析法 (MEKC)

普遍來說，中性的物質在緩衝溶液中並不會帶有電荷，且不受電場作用影響，只靠著電滲流將物質帶至偵測端，因此中性的物質所遷移的時間會相同。在 1984 年由 Terabe 修改了此方法，他在緩衝溶液中添加界面活性劑，中性物質和界面活性劑之間會有選擇性，在分離中性物質上有突破性發展^[34]。其分離原理為當界面活性劑的濃度到達臨界微胞濃度 (CMC) 時會形成微胞對於中性物質做選擇性分離。微胞是由數十至數百個一端為疏水性而另一端為親水性界面活性劑分子聚集而成，而不同中性物質其疏水性質也不同，通常疏水較高的物質會較容易進入微胞內，就能有效的分離在微胞內的物質與未包覆完全的物質。MEKC 同時兼具有電泳和層析的優點，在毛細管電泳的應用中極為廣泛，並具備同時分離帶電離子和中性分析物的能力^[35]。倘若加入不同種類的界面活性劑，它與分析物的選擇性也會改變，形成表面帶正電或負電的微胞，進而改變遷移速率便能分離中性物質。2015 年，本實驗室學長以混合態微胞的形式結合聚乙烯吡咯烷酮成功分離血漿中的胺基酸生物指標^[36]。

1.1.2.4 毛細管等電聚焦法(CIEF)

此方法是用於同時帶有正電荷與負電荷的兩性化合物，也稱為兩性離子(zwitterion)，再一特定的 pH 值條件下，陰陽離子具有相同濃度總電荷為零，所以在系統中不會移動，而分析物無法分離，此時該 pH 為該物質等電點^[37]。

1.1.2.5 毛細管等速電泳(CITP)

等速電泳是一個”移動介面”的技術，在 CITP 中是使用兩種不同緩衝溶液系統，分別稱之為前導電解質(leading electrolyte)與尾隨電解質(terminating electrolyte)之緩衝溶液所構成。而前導緩衝溶液形成前端層帶，尾隨緩衝溶液形成末端層帶，將欲分析之物質形成的區帶夾在前端層帶與末端層帶之間，使區帶發生等速遷移之現象。若以分析物陽離子為例，前導電解質陽離子的速度需大於分析物的所有離子^[38]，反之尾隨電解質陽離子的速度需小於分析物的所有離子。施加一電場時，前導電解質之陽離子數量多其往陰極移動之速度便是最快，分析物的陽離子數量次之所以移動速度也略為緩慢，尾隨電解質便是最慢的。因此毛細管等速電泳的分離機制是利用分析物電泳速度的不同來達到分離的效果。

1.1.2.6 毛細管電層析法 (CEC)

毛細管電層析法是結合毛細管電泳及高效能液相層析 (high performance liquid chromatography, HPLC) 兩種分離方法的一種新分離技術，因兼具 CE 分離效率高、試劑量少與消耗樣品、分離速度快以及 HPLC 動靜相選擇性高等優點，故近年來越受重視。CEC 之原理是在毛細管兩端施以一高電壓，不同電性之分析物會被電滲流往前帶，而分析物也會因為受到靜相之作用力而滯留。然而分析物本身同時受到電滲流推動力、其自身電泳特性及動、靜相分配作用力之影響，此三種作用力成為分析物滯留時間長短之關鍵。CEC 的解析度幾乎可達氣相層析技術 (GC) 的效果，而選擇性則可和 HPLC 相比。其亦具有極高的理論板數，其最大的優點在於推動動相往前的力量是電滲流，而不是高壓幫浦，所以不會讓區帶變寬。又因為 CEC 所需樣品量遠小於 HPLC，所以 CEC 是一種高選擇性、高解析度的分離模式。

1.2 組蛋白簡介

1.2.1 組蛋白之歷史

“Histon”這名詞是在 1884 年所創造的，裡面提及培養基原料的成分是由豐富的鹼性胺基酸所組成。在染色質內組蛋白為染色體上主要的蛋白質組成，核心組蛋白和接頭組蛋白是兩種主要類型的組蛋白，根據其結構和基本功能分類^[39, 40]。核心組蛋白（H2A，H2B，H3 和 H4）是 100-140 個胺基酸長的蛋白質如圖 1-6，其在結構上由組蛋白折疊結構域（HFD）組成，側翼為固有無序的 N 和 C 末端區域^[41, 42]。組蛋白八聚體由組蛋白 H3 和 H4 的中心異源四聚體組成，側翼為兩個組蛋白 H2A 和 H2B 的異源二聚體^[43]。

組蛋白本身帶正電而 DNA 帶負電的磷酸根交互作用時可以形成穩定結構。並且此結合能有保護作用，可以防止 DNA 被酵素分解，組蛋白緊縮的鬆緊度會影響基因表現的形式，例如極重要的基因組（genome）通常會被組蛋白緊緊拴住，並且能有效的調節與組蛋白之間之鍵結，反之若是較不重要之基因組與組蛋白之間的結合會較鬆散，在 DNA 包裹上也扮演著重要的角色^[44]。組蛋白與 DNA 之間的相互作用如下，在 DNA 骨架與胺基之間的氫鍵對組蛋白的主鏈，組蛋白與 DNA 的去氧核糖的非極性相互作用，鹼性胺基酸側鏈與 DNA 磷酸氧旁鏈之間的鹽鏈及氫鍵^[45]。

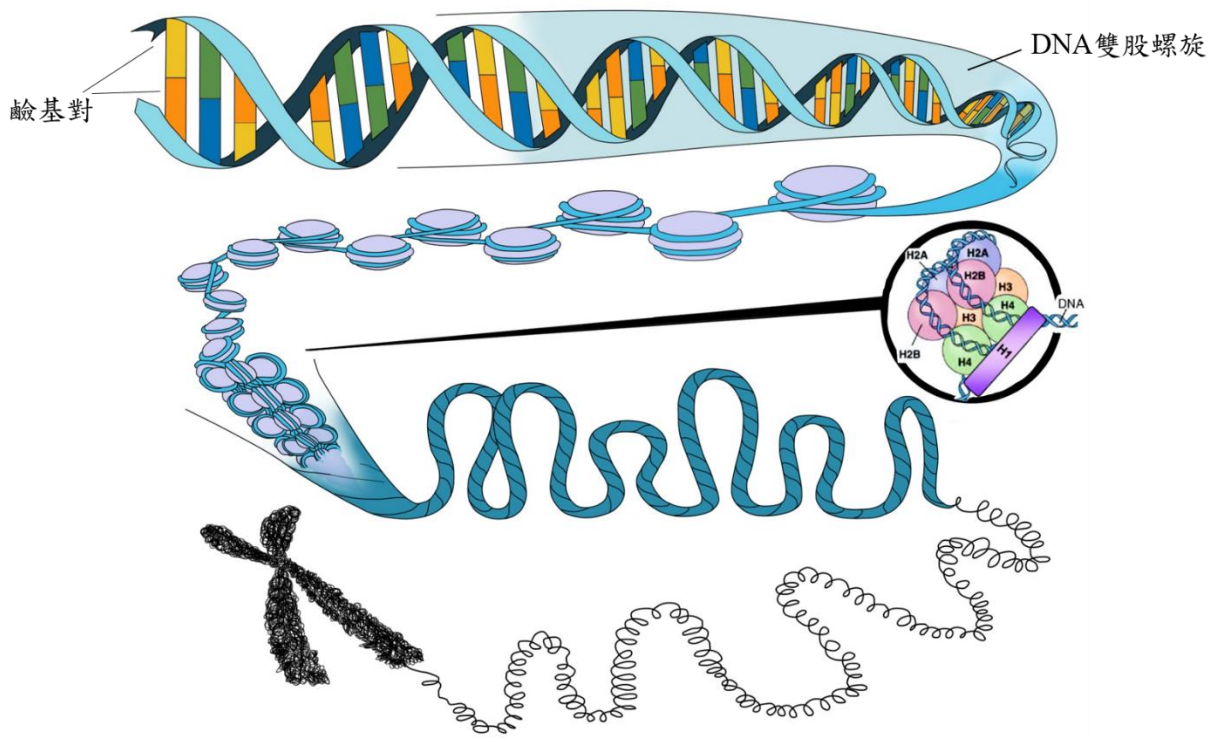


圖 1-5 組蛋白與染色質之關係圖。

因為上述組蛋白之特殊結構進而具有在演化上極具保守性，即使是在不同種生物體內，組蛋白的胺基酸組成也是非常相近的，特別是 H3 的保守性很大^[46,47]，即使是動物與植物之間也只有幾個胺基酸之差異。H2A 及 H2B 的差異性則較大^[48]，H1 的變化更大，由 H3 及 H4 在胺基酸的組成上極端保守性表明^[49]，組蛋白在真核生物染色體扮演穩定其結構的重要角色，即使經過長時間的演化，這些組蛋白的結構仍會被保留下來。並且在組蛋白結構中，鍊上胺基酸分布的不對稱性，鹼性胺基酸大部分會在 N 端^[50]，而疏水基團會分布在 C 端上，此不對稱分布可能與其功能和互相作用力有關，鹼性的半鍊易與 DNA 表面所帶的負電所結合，而另一端則會跟組蛋白、非組蛋白結合。組蛋白除了具有能夠作為 DNA 摺曲的線軸壓縮能讓出細胞核內的空間予較大的基因組的功能之外，在過去的十年中已經積累證據，說明組蛋白和核小體的作用不限於染色質的壓實，在生物過程染色質結構是動態的，能夠在轉錄中發揮重要作用。例如，核小體遷移的發現具有重要的生物學意義，位於啟動子的核小體在調節轉錄中起關鍵作用。

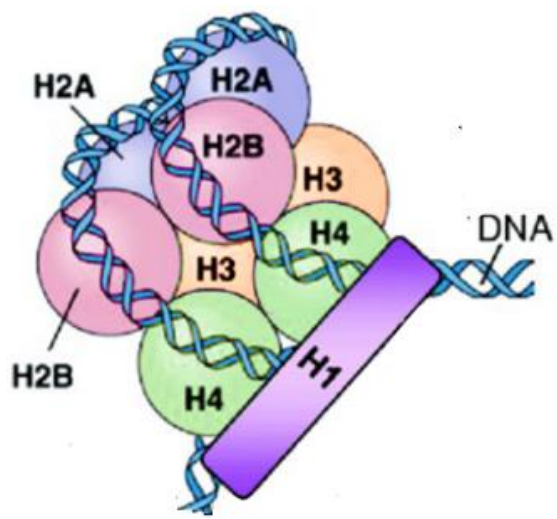


圖 1-6 組蛋白結構示意圖。

histone H1 [Homo sapiens] 219 aa	pI	Mw
msetapaapa apapaektpv kkkarksaga akrkasgppv selitkavaa skersgvsla alkkalaag ydveknnsri klgkkslvsk gtlvqtkgtg asgsfklkka aasgeakpka kkagaakakk pagaakkpkk atgaatpkks akktpkkakk paaaagakka kspkkakaak pkkapkspak akavkpkaak pktakpkaak pkkaaakkk	11.03	21865
histone H2A [Homo sapiens] 130 aa		
msgrgkqggk arakaktrss raglqfpvgr vhrllrkgnv aervgagapv ylaavleylt aeilelagna ardnkktrii prhlqlairn deelnkllgk vtiaqggvlp niqavllpkk teshhkakgk	10.9	14091
histone H2B [Homo sapiens] 126 aa		
mpepaksapa pkkggskkavt kaqkkdgkkr krsrkesysi yvykvlkqvh pdtgisskam gimnsfvndi feriageasr lahynkrsti tsreiqtavr lllpgelakh avsegtkavt kytssk	10.31	13920
histone H3 [Homo sapiens] 136 aa		
martkqtark stggkaprkq latkvarksa patggvkkph ryrpgtvalr eirryqkste llirklpfqr lmreiaqdfk tdlrfqssav malqeacesy lvglfedtnl cvihakrvti mpkdiqlarr irgera	11.13	15508
histone H4 [Homo sapiens] 103 aa		
msgrgkqggk lgkkgakrhr kvlrdniqgi tkpairrlar rggvkrisgl iyeetrgvkl vflenvirda vtytehakrk tvtamdvvya lkrqgrtlyg fgg	11.36	11367

表 1-1 組蛋白之序列^[2, 3]。

1.2.2 組蛋白之修飾

與原核生物不同，絕大多數真核生物 DNA 以結構複雜、高度折疊的染色質為載體，這使得兩者在基因表達上具有很大的差異，然而整條染色質上，細胞需要在特定的時間或特定的空間調控某些特定的基因表達。為了複雜的調控一系列的細胞核內的生命活動，組蛋白的翻譯後修飾不僅與染色體的重塑和功能狀態緊密相關，而且在細胞生長以及致癌作用的過程中發揮著重要的作用。例如在有絲分裂、DNA 損傷修復、細胞死亡、DNA 複製和重組過程中磷酸化後的組蛋白就扮演著重要的角色。組蛋白乙醯化則能激活基因轉錄，去乙醯化則會使基因轉錄受到抑制。

然而組蛋白本身的結構中是帶有模體(motif)的 C 端結構域與其他組蛋白分子間發生相互作用，並且與 DNA 之間纏繞有關，然而 N 端可以與其他調節蛋白和 DNA 作用，且具有高度精密的可變區域，並富含離氨酸(Lysine)，在組蛋白的 N 部尾端的 15-38 個胺基酸殘基是能進行組蛋白翻譯後修飾的重要位點，並具調節 DNA 的生物功能^[51]。對於組蛋白的修飾若是只有單一的修飾往往不能獨立的發揮作用，所以一個或多個在組蛋白尾巴的不同共價修飾能依次發揮作用或組合在一起，他們通過協同或拮抗來共同發揮作用。不同位點上的不同修飾可形成大量特殊信號，類似各種不同的密碼，供其他蛋白質識

別，並影響一系列相關蛋白質的活動，最終調控真核生物基因表達，這就是“組蛋白密碼”學說。^[52-54]然而組蛋白密碼通過修飾組蛋白進而控制基因表達的過程，存在幾個重要的關鍵，一個是共價修飾的位點，組蛋白上能發生共價修飾的胺基酸殘基稱為修飾位點，修飾位點通常會存在四種(H2A、H2B、H3和H4，尤其是H3和H4)常見的組蛋白的游離胺基端尾巴上，幾種較常見的修飾反應如乙醯化/去乙醯化、甲基化/去甲基化^[55-57]、泛素化/去泛素化^[58-60]、磷酸化^[61-65]和研究較少的SUMO化^[66-68]和生物素化，另一個則是蛋白複合體，共價修飾的組蛋白的蛋白質是以複合的形式存在，然而在組蛋白密碼中能發揮重要作用必須具有，轉移酶活性和識別功能此兩種功能。轉移酶活性是蛋白質複合體的其中一個蛋白質亞基發揮酶活性轉移或脫去甲基和乙醯基，其他的蛋白亞基則發揮輔助因子作用。蛋白複合物的特殊結構域可以稱之為解讀者(readers)，特殊結構域是指蛋白質的空間結構上距離較近的胺基酸殘基所形成的特殊結構，它可以通過疏水作用或靜電作用等方式與被共價修飾的組蛋白發生相互作用，這種相互作用也被稱為結構域的“識別”功能。接下來，就要討論到組蛋白密碼與基因表達之間的關係，由前段敘述可知道，染色質是真核生物DNA的載體，可以高度的折疊緊縮，其構型需要從壓縮狀態轉變為鬆散狀態，即染色體的結構決定基因的轉錄狀態。

事實上只需利用單一位點的修飾就可以改變染色體構象，進而達到調控基因表達的效果，Peterson 等人發現，位在 H4 組蛋白上的某特異位點的 Lys 經乙醯化修飾後，可抑制染色體的折疊固縮，進而促進基因表達。組蛋白密碼可影響 DNA 甲基化^[69-71]、基因組印記、X 染色體失活、克隆動物發育異常、細胞分化和凋亡以及腫瘤等等，從而造成廣泛生物學效應^[72]。以下對於組蛋白各種類的修飾做一個簡單的介紹：

1.2.2.1 Histone acetylation 組蛋白乙醯化

自從在 1976 年文森特·艾弗雷 (Vincent Allfrey) 的開創性研究以來，20 世紀 60 年代初，我們知道組蛋白是經翻譯後修飾的^[73]，首先談論到組蛋白乙醯化，並且從那之後可以知道組蛋白上的離氨酸 (Lysine) 是具高度動態的，並且受到組蛋白乙醯轉移酶 (HATs) 和組蛋白脫乙醯酶 (HDACs) 的交互作用調節^[74]。HATs 的作用機制是利用乙醯化 CoA 作為輔助因子並催化乙醯基轉移至離氨酸 (Lysine) 側鏈上的 ϵ -胺基。而此作用會中和離氨酸 (Lysine) 上的正電荷，藉此削弱組蛋白與 DNA 上的作用力。在 HATs 主要可分為兩大類：包括 A 型和 B 型，B 型的 HAT 並不是被包裹在染色質中的組蛋白，而是經乙醯化游離在細胞質中的組蛋白。HATs 是具保守性的結構，並寫所有 B 型的 HAT 會與 scHat1 具有序列同源性，然而此種 HAT 最初始的類型

包括，在新合成的組蛋白 H4 的 K5 和 K12 為位點乙醯化，並且這種乙醯化模式對於組蛋白的沉積是相對重要的。相對於 B 型，A 型的 HAT 是較多樣化的酵素，然而根據胺基酸序列同源性和構象結構，他們可以劃分為至少三類獨立的基團：GNAT^[75]、MYST^[76, 77] 和 CBP/p300^[78-80]。一般來說，這些酶皆會修飾位於組蛋白尾部 N 末端的多個位點，這些酶的確具有中和正電的能力，從而破壞靜電相互作用的影響，與許多轉錄輔助因子的酶具有相似功能。

1.2.2.2 Histone phosphorylation 組蛋白磷酸化

就如同乙醯化組蛋白，組蛋白磷酸化具有高度動態的。磷酸化主要發生在組蛋白尾巴 N 末端的酪氨酸 (tyrosines)、絲胺酸 (serine) 及蘇胺酸 (threonines)。而對於修飾的控制是透過添加或去除激酶 (kinases) 和磷酸酶 (phosphatases)，所有對於組蛋白磷酸化的定義是為利用激酶從 ATP 轉移一個磷酸基團到目標胺基酸側鍊的羧基團，而此時會增加組蛋白上的負電荷，但此作用並不會影響染色質的結構^[81-83]。然而所知的激酶尚不清楚是如何準確的對應至染色質上的作用位點，舉例來說，哺乳動物的 MAPK1 酶，具有能連接 DNA 之結構域。這對於具體的受體位置是足夠的，類似於 *bona fide* DNA 結合轉錄因子。大多數組蛋白磷酸化位點位於 N 末端尾部。組蛋白 H1 被細胞週期蛋白依賴的激酶磷酸化，是其翻譯後主要的修飾作用。組蛋白 H1 的磷酸化能夠影

響DNA二級結構的改變和染色體凝集狀態的改變^[82, 84-86]。另一方面，組蛋白H1的磷酸化需要DNA的複製，並且激活DNA複製的蛋白激酶也是促進組蛋白H1的磷酸化。因此組蛋白H1磷酸化與DNA的複製存在一個協同發生的機制^[87-90]。

1.2.2.3 Histone methylation 組蛋白甲基化

組蛋白甲基化主要發生在側鏈上的離氨酸(Lysine)和精氨酸(Arginines)與乙醯化和磷酸化不同的地方是組蛋白甲基化時並不會改變組蛋白本身的電荷。但組蛋白甲基化時必須考慮到複雜性的增加，甲基化若是離氨酸的部分可以是單(me1)、雙(me2)或三(me3)甲基化，而精氨酸(Arginines)的部分可以是單、對稱或不對稱甲基化。SUV39 蛋白是第一個被發現的組蛋白轉移酶(histone methyltransferase, HMT)，人類的SUV39H1、鼠的SUV39H1、裂變酵母(*S.pombe*)的Clr4都是屬於SUV39家族，能特異性的使組蛋白H3K9甲基化。在2005年Shi等人首次發現了去甲基酶，先前人們認為組蛋白的甲基化作用是穩定不可逆的，但這種去甲基化酶的發現使組蛋白甲基化過程更具動態性。與離氨酸(Lysine)具有特異性的去甲基化酶1(LSD1)是特異性作用於H3K4位點的去甲基化酶，他只能作用於單甲基化或雙甲基化，對於三甲基化卻無能為力^[91]。該去甲基酶是一種單胺氧化酶，通過胺基氧化作用生成甲醛和去甲基化的精氨酸殘跡達

到去甲基的目的。舉例來說，哺乳動物體內的組蛋白精氨酸(Arginine) 的去甲基過程主要是利用肽酰精氨酸去亞氨酶4(peptidylarginine deiminase 4, PAD4)催化精氨酸(Arginine)轉變為瓜氨酸(citrulline)，使PRMT等精氨酸甲基轉移酶失去作用位而達到抑制甲基化的效果。

1.2.2.4 Ubiquitylation 泛素化

以前對於組蛋白修飾地描述主要是把組蛋白側鏈變化是變成較小的胺基酸，而泛素化則是將側鏈導致了一個更大的共價修飾。泛素本身就是與組蛋白連接的76個胺基酸，而蛋白質的泛素化修飾就是蛋白質的離胺酸殘基位點與泛素分子的羧端相互結合的過程。泛素化調節的途徑共可分為三種酶催化，泛素激活酶(ubiquitin-activating enzyme, E1)，泛素接合酶(ubiquitin-conjugating enzyme, E2)，泛素-蛋白質連接酶(ubiquitin-protein ligase, E3)。多聚泛素化需要三種以上的酶共同作用，而單泛素化則只需前兩種酶。對於組蛋白來說，單一泛素化似乎是最相關的，儘管確切的修飾位點仍然在很大程度上難以捉摸^[92]。然而例如，組蛋白H2A泛素化修飾位點是具高保守度的H2AK119位點。除了H2A以外^[93]，組蛋白H2B也可以被泛素化修飾。H2B的泛素化位點也定位於C端的離胺酸殘基；哺乳動物的H2BK120位點和芽殖酵母的H2BK123位點^[94, 95]。

1.2.3 非組蛋白

在染色體內除了大量的 DNA 和等量的組蛋白之外，還有大量的非組蛋白蛋白質 (nonhistone protein)。然而非組蛋白包含很多種類，其中 80% 為酸性蛋白質，並且具有種屬專一性。然而許多酵素為較常見的非組蛋白蛋白質例如: RNA 聚合酶 (RNA polymerase)^[96]、激素受體 (Hormone receptor)、DNA 聚合酶 (DNA polymerase)、與細胞分裂有關的收縮蛋白、細胞骨架 (Cytoskeleton)、肌動蛋白 (actin)、肌凝蛋白 (myosin)、微管蛋白 (Tubulin)、核孔複合蛋白等，他們也可能是染色質的結構成份^[97]。

非組蛋白與組蛋白不同的是非組蛋白為染色體上與特異 DNA 序列結合的蛋白質，所以又稱序列特異性 DNA 結合蛋白，然而非組蛋白的特性是所組成的胺基酸種類多為酸性蛋白質，含有較多的天門冬氨酸 (aspartic acid)、谷氨酸 (glutamic acid)，所以帶負電荷，與組蛋白所帶的正電荷不同特點是既有多樣性又有專一性，且含有組蛋白沒有的色氨酸 (Tryptophan)，是 DNA 複製 RNA 轉錄活動的調控因子。所合成的時間組蛋白只在 S 期合成，非組蛋白整個細胞周期都能進行合成，並且與 DNA 複製同步進行。非組蛋白能識別特異的 DNA 序列，識別信息存在 DNA 內，識別與結合氫鍵和離子鍵。非組蛋白其功能為能幫助 DNA 分子折疊，以形成不同的結構域，從而有利於

DNA 的複製和基因的轉錄。並且能有效的協助啟動 DNA 複製和控制基因轉錄，調節基因表達。

非組蛋白能激活特定基因，非組蛋白蛋白質有幾個特性，非組蛋白本身是由 20 幾種的蛋白質所組成，所以他們之間的結構差異性很大 (structural diversity)，在同種生物體內，隨著細胞種類不同，其非組蛋白組成也不同，具有組織專一性。在轉錄作用 (transcription) 的過程中較活躍的細胞，所包含的非組蛋白含量也較多，所以對於基因表現的調控非組蛋白也佔有相當的角色。例如：高遷移族率蛋白 B1 (high mobility group box1 protein)，B1 是一種真核生物細胞中的非組蛋白染色體結合蛋白，參與多種生物學過程如基因的轉錄、DNA 損傷修復、胚系基因片段重組、分化與發展。及單鏈 DNA 結合蛋白 (single-stranded DNA-binding protein，縮寫為 SSB 或 SSBP) 是專門負責與 DNA 單鏈區域結合的一種蛋白質，為 DNA 複製、重組和修復所必需的成分^[98-100]。A24 非組蛋白 有科學家用 0.2 mol/L 的硫酸從小鼠肝臟中分離到一種稱為 A24 的非組蛋白^[101]。這種蛋白質的溶解性質與組蛋白相似。胺基酸序列測定發現 A24 的 C 端與 H2A 相同。它與 H2A 大小相近，呈酸性，含有較多的谷氨酸和天冬氨酸。A24 的總量大約是 H2A 的 1%，位於核小體內，目前對於其功能的研究較不足^[102]。

1.2.4 核小體之簡介

核小體是真核生物構成染色質的基本單位，是由 DNA 纏繞在組蛋白所形成的八聚體上構成，圍繞在旁邊的 DNA 稱之為核心 DNA (core DNA)或核小體 DNA(nucleosomal DNA)，其長度為 146bp，圍繞長度約 1.65 圈。連接核小體間的 DNA 為連接 DNA(linker DNA)，長度約在 20-54bp 不等^[42, 103]。H1 扮演著固定核小體的角色，核小體之間通過 linker DNA 串成念珠狀結構。現今組蛋白八聚體在 DNA 雙螺旋上的精確的位置稱之為核小體定位(nucleosome positioning)，可分為描述核小體 DNA 的中心點對於染色體的平移定位(translational positioning)和描述 DNA 雙螺旋與組蛋白結合表面的旋轉定位(rotational positioning)^[104]。真核細胞內 75%-90%的 DNA 纏繞在組蛋白上，組蛋白的靜電位阻作用會排斥其他蛋白質與核小體 DNA 結合，從而阻斷那些負責基本生命過程的蛋白質(如: RNA 聚合酶、DNA 複製與修復酶和轉錄因子)。研究發現核小體定位在基因轉錄調控^[105, 106]、DNA 複製與修復^[107]、可變剪接等基本生命過程都扮演著重要的角色，甚至對 DNA 序列與基因表達調控^[108-110]的進化也有著重要影響^[111, 112]。另外在核小體所組成的重要成分，組蛋白的修飾與腫瘤等重大疾病的發生也有緊密的關聯，因此核小體定位及其功能的研究有助於研究色質結構對基因表達的影響，可以為重大疾病特別是癌症的治

療提供更多的機會。

1.2.5 染色體之簡介

人們對於遺傳的認知在二十世紀初時仍然是停留在認為生物遺傳特是源自於某些分離的因子所控制而且可以在有機體傳遞到下一代，漸漸的遺傳學家們發現此遺傳基因是存在於染色體內，此基因是為大分子本身是由 DNA 所組成，並且能使生物體表現出其特殊性質與生理機能。基因”Gene”為一特殊片斷 DNA，其功能為保存及傳達訊息的單位，組成則為可轉譯的 DNA 序列，以及可調節其轉譯效率之相關序列。作用則是製造特殊生物功能 RNA 產物和蛋白質。本身含有組成裝配細胞結構之藍圖，以主導細胞活動之運作^[113]。

染色體與基因之相關研究在 1903 年時，Walter Sutton 在其發表的論文直接指出染色體即為數十年前 Mendel 所發現的遺傳因子之物質攜帶者。然而遺傳學發展的速度是緩慢的，當生物學家以顯微鏡觀察出生物的受孕、減數分裂和細胞分裂的過程時^[114]。遺傳學的研究學者才明白有機體所發展之生物特性使由於染色體所包含基因的調控和表現。有機體在日常活動當中，其組成細胞為持續性及具有一定分化功能，且其從這一代到下一代。

T. Boveri (德國學者) and W.S. Sutton (美國學者)在各別的研究中皆得到相同的結論,認為染色體在細胞分裂中的行為與Mendel所發現

的遺傳因子有關，其中包括：兩者在體細胞中都成對存在，在生殖細胞中則是單獨存在及成對的染色體在細胞減數分裂時彼此分離，進入不同的子細胞中，不同對染色體或遺傳因子可以自由組合。其對於遺傳學之研究進展和突破為一巨大之里程碑。^[115]於1943年，諾貝爾獎得主Morgan以果蠅為對象證實生物特徵可連結到染色體上之一特定基因位，發現染色體具有傳遞遺傳訊息的性聯遺傳之功能，也對日後科學家探討基因之化學特性的開端。

1.2.6 染色體之結構

真核細胞再進行減數分裂和有絲分裂時，會緊縮成棒狀，因易被鹼性染料染色故稱染色體。在1879年時，德國生物學家Wilhelm Waldeye稱這種絲狀體為染色體(chromosome)，意即可染色的小體，並猜測染色體與遺傳有關^[116]。以人體具有23對染色體為例，如果將這些染色體連接起來，其總長可高達2公尺，並且會有 6×10^9 對鹼基對。要將這麼長的DNA放入一個直徑僅6-7 μm 的細胞核內並且能正常行使功能，DNA的折疊(folding)是相當重要。染色體勢必要緊密纏繞，去氧核糖核酸分子為雙螺旋結構，一個去氧核糖核酸分子就像是一條長長的雙螺旋的飄帶。在1974年，Roger Kornberg提出染色質是由重複的單元所組成，核體是(nucleosome)為染色質和染色體之超微結構的基本單位，保留蛋白質與DNA交互作用力的方法，將

真核細胞中的 DNA 分離出，發現核蛋白複合物與 DNA 有等質量性，其中在染色質含量最多的蛋白為組蛋白，然而核體的核心就是由四對組織蛋白(H2A、H2B、H3 和 H4)各兩分子構成的扁球狀八聚體。一條染色體有一個去氧核糖核酸分子^[117]。DNA 會依序在每個組蛋白八聚體的表面纏繞 1.75 周，其長度約 146 個鹼基對，而兩個相鄰的核體間會有長度約 50-60 的鹼基對的去氧核糖核酸相互連接。而在相連接的地方有第五種組蛋白 H1，並密集串成長度約 100 埃的染色體”一級結構”。由核小體盤繞形成的一種中空螺線管，其外徑為 30 nm 每圈包含六個核小體，因此螺線管的形成縮小了一級結構六倍的體積，稱之為螺線體。螺線體形成之後 DNA 被壓縮的程度仍不足以形成能被細胞核容納的染色體，所以螺線體需再進一步螺旋化，成為直徑為 0.4 μm 的筒狀體，稱為超螺旋體，超螺旋體在經過摺疊之後會變成染色單體，而兩條染色單體會形成一條染色體，經過包裝之後的染色體 DNA 總共被壓縮了數千倍，這樣才能使染色體有效的放入直徑為數微米的細胞核中^[118, 119]。

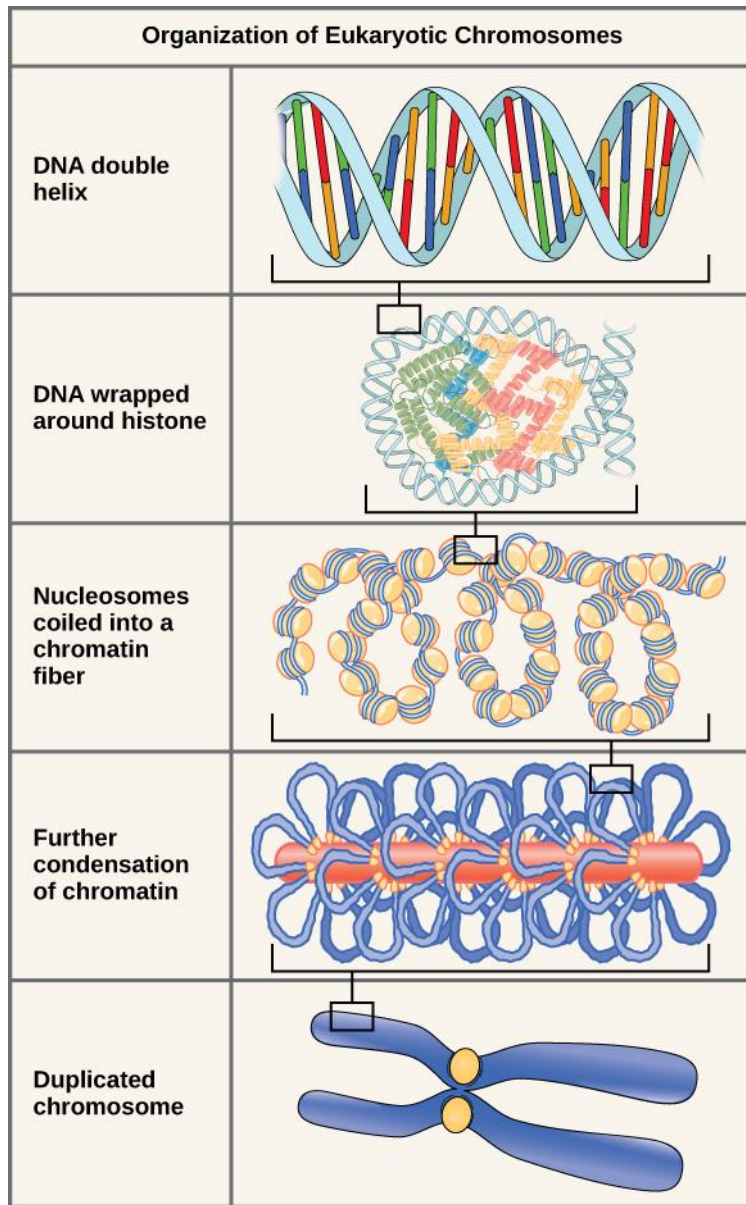


圖 1-7 染色體構造模型示意圖^[120]。

1.3 參考文獻

1. Michaelis L: **Electric transport of enzymes, malt distaste and pepsin.** *Biochemische Zeitschrift* 1909, **17**:231-234.
2. Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez JC, Frutiger S, Hochstrasser D: **The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences.** *Electrophoresis* 1993, **14**(1):1023-1031.
3. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud Se, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A: **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server:** Springer; 2005.
4. Tiselius A: **Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera.** *Biochemical Journal* 1937, **31**(9):1464.
5. Viridi AS, Loughlin JA, Irven CM, Goodship J, Sykes BC: **Mutation screening by a combination of biotin-SSCP and direct sequencing.** *Human genetics* 1994, **93**(3):287-290.
6. Hayashi K: **PCR-SSCP: a method for detection of mutations.** *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 1992, **9**(3):73-79.
7. Smooker PM, Cotton RG: **The use of chemical reagents in the detection of DNA mutations.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1993, **288**(1):65-77.
8. Hjertén S: **Free zone electrophoresis.** *Chromatographic reviews* 1967, **9**(2):122147-143219.
9. Baba Y, Ishimaru N, Samata K, Tshako M: **High-resolution separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis in cellulose derivative solutions.** *Journal of Chromatography A* 1993, **653**(2):329-335.
10. Jorgenson J, DeArman Lukacs K: **Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries: Preliminary data on performance.** *Journal of Separation Science* 1981, **4**(5):230-231.
11. Jorgenson JW, Lukacs KD: **High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis.** *Journal of Chromatography A* 1981, **218**:209-216.
12. Kuhn R: **HOFFSTETTER-KUHN. S., Capillary electrophoresis: principles and practice,** Ed. In.: Springer, Germany; 1993.
13. Olivera BM, Baine P, Davidson N: **Electrophoresis of the nucleic**

- acids.** *Biopolymers* 1964, **2**(3):245-257.
14. Grossman PD, Soane DS: **Experimental and theoretical studies of DNA separations by capillary electrophoresis in entangled polymer solutions.** *Biopolymers* 1991, **31**(10):1221-1228.
 15. Gennes P-Gd: **Scaling concepts in polymer physics.** 1979.
 16. de Gennes P-G: **Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacles.** *The journal of chemical physics* 1971, **55**(2):572-579.
 17. Ferguson K: **Starch-gel electrophoresis—application to the classification of pituitary proteins and polypeptides.** *Metabolism* 1964, **13**(10):985-1002.
 18. Fister JC, Jacobson SC, Davis LM, Ramsey JM: **Counting single chromophore molecules for ultrasensitive analysis and separations on microchip devices.** *Analytical chemistry* 1998, **70**(3):431-437.
 19. Kang SH, Yeung ES: **Dynamics of single-protein molecules at a liquid/solid interface: implications in capillary electrophoresis and chromatography.** *Analytical chemistry* 2002, **74**(24):6334-6339.
 20. Heitmeier S, Blaschke G: **Direct assay of nonopioid analgesics and their metabolites in human urine by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis–mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1999, **721**(1):109-125.
 21. Caslavská J, Gassmann E, Thormann W: **Modification of a tunable UV-visible capillary electrophoresis detector for simultaneous absorbance and fluorescence detection: profiling of body fluids for drugs and endogenous compounds.** *Journal of Chromatography A* 1995, **709**(1):147-156.
 22. Zhang Y, He Y, Yeung ES: **High-throughput polymerase chain reaction analysis of clinical samples by capillary electrophoresis with UV detection.** *Electrophoresis* 2001, **22**(11):2296-2302.
 23. Kan CW, Fredlake CP, Doherty EA, Barron AE: **DNA sequencing and genotyping in miniaturized electrophoresis systems.** *Electrophoresis* 2004, **25**(21-22):3564-3588.
 24. Bonneil E, Waldron KC: **On-line system for peptide mapping by capillary electrophoresis at sub-micromolar concentrations.** *Talanta* 2000, **53**(3):687-699.

25. Zhang Y, Tan H, Yeung ES: **Multiplexed automated DNA sequencing directly from single bacterial colonies.** *Analytical chemistry* 1999, **71**(22):5018-5025.
26. Tong W, Link A, Eng JK, Yates JR: **Identification of proteins in complexes by solid-phase microextraction/multistep elution/capillary electrophoresis/tandem mass spectrometry.** *Analytical chemistry* 1999, **71**(13):2270-2278.
27. Viglio S, Valentini G, Chiarelli L, Zanaboni G, Cetta G, Iadarola P: **Micellar electrokinetic chromatography as a complementary method to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for studying limited proteolysis of proteins.** *Electrophoresis* 1999, **20**(12):2400-2406.
28. Wan Q-H, Le XC: **Fluorescence polarization studies of affinity interactions in capillary electrophoresis.** *Analytical chemistry* 1999, **71**(19):4183-4189.
29. Gamble TN, Ramachandran C, Bateman KP: **Phosphopeptide isomer separation using capillary zone electrophoresis for the study of protein kinases and phosphatases.** *Analytical chemistry* 1999, **71**(16):3469-3476.
30. Tran AD, Park S, Lisi PJ, Huynh OT, Ryall RR, Lane PA: **Separation of carbohydrate-mediated microheterogeneity of recombinant human erythropoietin by free solution capillary electrophoresis: Effects of pH, buffer type and organic additives.** *Journal of Chromatography A* 1991, **542**:459-471.
31. Nishi H, Tsumagari N, Kakimoto T, Terabe S: **Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography.** *Journal of Chromatography A* 1989, **465**(3):331-343.
32. Jorgenson JW, Lukacs KD: **Capillary zone electrophoresis.** *Science* 1983, **222**:266-274.
33. Cohen A, Karger B: **High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins.** *Journal of Chromatography A* 1987, **397**:409-417.
34. Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K, Tsuchiya A, Ando T: **Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries.** *Analytical Chemistry* 1984, **56**(1):111-113.
35. Nakagawa T, Oda Y, Shibukawa A, Tanaka H: **SEPARATION AND DETERMINATION OF CEFPIRANIDE IN HUMAN PLASMA BY ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY**

- WITH A MICELLAR SOLUTION AND AN OPEN TUBULAR-FUSED SILICA CAPILLARY.** *Chemical and pharmaceutical bulletin* 1988, **36**(4):1622-1625.
36. Chen Y-C, Chang P-L: **Baseline separation of amino acid biomarkers of hepatocellular carcinoma by polyvinylpyrrolidone-filled capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence in the presence of mixed micelles.** *Analyst* 2015, **140**(3):847-853.
 37. Rodriguez-Diaz R, Wehr T, Zhu M: **Capillary isoelectric focusing.** *Electrophoresis* 1997, **18**(12-13):2134-2144.
 38. Smith RD, Fields SM, Loo JA, Barinaga CJ, Udseth HR, Edmonds CG: **Capillary isotachopheresis with UV and tandem mass spectrometric detection for peptides and proteins.** *Electrophoresis* 1990, **11**(9):709-717.
 39. Youngson RM: **Collins dictionary of human biology:** Collins; 2006.
 40. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM: **Lehninger principles of biochemistry:** Macmillan; 2008.
 41. Bhasin M, Reinherz EL, Reche PA: **Recognition and classification of histones using support vector machine.** *Journal of Computational Biology* 2006, **13**(1):102-112.
 42. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ: **Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.** *Nature* 1997, **389**(6648):251-260.
 43. Fowler E, Farb R, El-Saidy S: **Distribution of the core histones H2A.H2B.H3 and H4 during cell replication.** *Nucleic acids research* 1982, **10**(2):735-748.
 44. Alva V, Ammelburg M, Söding J, Lupas AN: **On the origin of the histone fold.** *BMC structural biology* 2007, **7**(1):17.
 45. Mersfelder EL, Parthun MR: **The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure.** *Nucleic acids research* 2006, **34**(9):2653-2662.
 46. Simon RH, Camerini-Otero RD, Felsenfeld G: **An octamer of histones H3 and H4 forms a compact complex with DNA of nucleosome size.** *Nucleic acids research* 1978, **5**(12):4805-4818.
 47. Simon RH, Felsenfeld G: **A new procedure for purifying histone pairs H2A + H2B and H3 + H4 from chromatin using hydroxylapatite.** *Nucleic acids research* 1979, **6**(2):689-696.

48. Jackson V: **Deposition of newly synthesized histones: new histones H2A and H2B do not deposit in the same nucleosome with new histones H3 and H4.** *Biochemistry* 1987, **26**(8):2315-2325.
49. Baneres JL, Martin A, Parello J: **The N tails of histones H3 and H4 adopt a highly structured conformation in the nucleosome.** *Journal of molecular biology* 1997, **273**(3):503-508.
50. Mon H, Izumi M, Mitsunobu H, Tatsuke T, Iiyama K, Jikuya H, Lee JM, Kusakabe T: **Post-translational modifications of the N-terminal tail of histone H3 in holocentric chromosomes of Bombyx mori.** *Insect biochemistry and molecular biology* 2011, **41**(11):902-908.
51. Lorch Y, LaPointe JW, Kornberg RD: **Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones.** *Cell* 1987, **49**(2):203-210.
52. Brehove M, Wang T, North J, Luo Y, Dreher SJ, Shimko JC, Ottesen JJ, Luger K, Poirier MG: **Histone Core Phosphorylation Regulates DNA Accessibility.** *Journal of Biological Chemistry* 2015, **290**(37):22612-22621.
53. Eickbush TH, Moudrianakis EN: **The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions.** *Biochemistry* 1978, **17**(23):4955-4964.
54. Royer CA, Ropp T, Scarlata SF: **Solution studies of the interactions between the histone core proteins and DNA using fluorescence spectroscopy.** *Biophysical chemistry* 1992, **43**(2):197-211.
55. Ye JX, Ai X, Eugeni EE, Zhang LW, Carpenter LR, Jelinek MA, Freitas MA, Parthun MR: **Histone H4 lysine 91 acetylation: A core domain modification associated with chromatin assembly.** *Mol Cell* 2005, **18**(1):123-130.
56. Rao RC, Tchedre KT, Malik MTA, Coleman N, Fang YA, Marquez VE, Chen DF: **Dynamic Patterns of Histone Lysine Methylation in the Developing Retina.** *Invest Ophth Vis Sci* 2010, **51**(12):6784-6792.
57. Sun GD, Reddy MA, Yuan H, Lanting LD, Kato M, Natarajan R: **Epigenetic Histone Methylation Modulates Fibrotic Gene Expression.** *J Am Soc Nephrol* 2010, **21**(12):2069-2080.
58. Chen HY, Sun JM, Zhang Y, Davie JR, Meistrich ML:

- Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes.** *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(21):13165-13169.
59. Long L, Thelen JP, Furgason M, Haj-Yahya M, Brik A, Cheng D, Peng J, Yao T: **The U4/U6 recycling factor SART3 has histone chaperone activity and associates with USP15 to regulate H2B deubiquitination.** *The Journal of biological chemistry* 2014, **289**(13):8916-8930.
60. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y: **Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing.** *Nature* 2004, **431**(7010):873-878.
61. Ajiro K: **Histone H2B phosphorylation in mammalian apoptotic cells. An association with DNA fragmentation.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(1):439-443.
62. Dastugue B, Tichonicky L, Kruh J: **Effect of enzymatic phosphorylation of histone on its ability to bind to RNA.** *Biochimie* 1972, **54**(11):1435-1441.
63. Goebel W, Obermeyer N, Bleicher N, Kratzmeier M, Eibl HJ, Doenecke D, Albig W: **Apoptotic DNA fragmentation is not related to the phosphorylation state of histone H1.** *Biological chemistry* 2007, **388**(2):197-206.
64. Kratzmeier M, Albig W, Hanecke K, Doenecke D: **Rapid dephosphorylation of H1 histones after apoptosis induction.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(39):30478-30486.
65. Liao R, Mizzen CA: **Histone H1 phosphorylation dynamics in cell differentiation: differential regulation and function.** *Molecular biology of the cell* 2016, **27**.
66. Fernandez-Miranda G, Perez de Castro I, Carmena M, Aguirre-Portoles C, Ruchaud S, Fant X, Montoya G, Earnshaw WC, Malumbres M: **SUMOylation modulates the function of Aurora-B kinase.** *Journal of cell science* 2010, **123**(Pt 16):2823-2833.
67. Kim JH, Choi HJ, Kim B, Kim MH, Lee JM, Kim IS, Lee MH, Choi SJ, Kim KI, Kim SI *et al*: **Roles of sumoylation of a reptin chromatin-remodelling complex in cancer metastasis.** *Nature cell biology* 2006, **8**(6):631-639.
68. Yoshida MM, Ting L, Gygi SP, Azuma Y: **SUMOylation of DNA topoisomerase II alpha regulates histone H3 kinase Haspin and H3 phosphorylation in mitosis.** *Journal of Cell Biology* 2016,

- 213(6):665-678.
69. Berkel TDM, Zhang H, Teppen T, Kyzar EJ, Krishnan HR, Pandey SC: **Interactive Role of DNA Methylation and Histone Methylation in Alcohol Drinking Behaviors.** *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 2017, **41**:189a-189a.
 70. King AD, Huang K, Rubbi L, Liu S, Wang CY, Wang YS, Pellegrini M, Fan GP: **Reversible Regulation of Promoter and Enhancer Histone Landscape by DNA Methylation in Mouse Embryonic Stem Cells.** *Cell reports* 2016, **17**(1):289-302.
 71. Yamada N, Nishida Y, Tsutsumida H, Hamada T, Goto M, Higashi M, Nomoto M, Yonezawa S: **MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells.** *Cancer research* 2008, **68**(8):2708-2716.
 72. Peterson CL, Laniel M-A: **Histones and histone modifications.** *Current Biology* 2004, **14**(14):R546-R551.
 73. Ruiz-Carrillo A, Wangh LJ, Allfrey VG: **Processing of newly synthesized histone molecules.** *Science* 1975, **190**(4210):117-128.
 74. Jeong HJ, Lam Y, de Lumen BO: **Barley lunasin suppresses ras-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2002, **50**(21):5903-5908.
 75. Draker KA, Wright GD: **Molecular mechanism of the enterococcal aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase': role of GNAT-conserved residues in the chemistry of antibiotic inactivation.** *Biochemistry* 2004, **43**(2):446-454.
 76. Smith AT, Tucker-Samaras SD, Fairlamb AH, Sullivan WJ, Jr.: **MYST family histone acetyltransferases in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*.** *Eukaryotic cell* 2005, **4**(12):2057-2065.
 77. Papaefthimiou D, Likotrafiti E, Kapazoglou A, Bladenopoulos K, Tsaftaris A: **Epigenetic chromatin modifiers in barley: III. Isolation and characterization of the barley GNAT-MYST family of histone acetyltransferases and responses to exogenous ABA.** *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 2010, **48**(2-3):98-107.
 78. Deng L, de la Fuente C, Fu P, Wang L, Donnelly R, Wade JD, Lambert P, Li H, Lee CG, Kashanchi F: **Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1**

- genome and enhances binding to core histones.** *Virology* 2000, **277**(2):278-295.
79. Das C, Lucia MS, Hansen KC, Tyler JK: **CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56.** *Nature* 2009, **459**(7243):113-117.
80. Chatterjee S, Mizar P, Cassel R, Neidl R, Selvi BR, Mohankrishna DV, Vedamurthy BM, Schneider A, Bousiges O, Mathis C *et al*: **A novel activator of CBP/p300 acetyltransferases promotes neurogenesis and extends memory duration in adult mice.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2013, **33**(26):10698-10712.
81. Cross ME, Ord MG: **Changes in histone phosphorylation and associated early metabolic events in pig lymphocyte cultures transformed by phytohaemagglutinin or 6-N,2'-O-dibutyryladenine 3':5'-cyclic monophosphate.** *The Biochemical journal* 1971, **124**(1):241-248.
82. Ghare S, Joshi-Barve S, McClain CJ, Barve S: **Alcohol Inhibits Msk-1 Activation and Downstream Promoter Histone Phosphorylation Decreasing il-2 Gene Expression in Human Cd4+T Lymphocytes.** *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* 2016, **40**:33a-33a.
83. Mueller D, Totzke F, Ketterer C, Beisenherz-Huss C, Kramer D, Weber T, Heidemann-Dinger C, Kubbutat MHG: **A comprehensive screen for protein kinases involved in histone phosphorylation using a biochemical in-vitro approach.** *Cancer research* 2015, **75**.
84. Brehove MS, Wang T, North J, Luo Y, Ottesen J, Luger K, Poirier MG: **Histone Phosphorylation Combined with Acetylation Dramatically Increase Nucleosome Accessibility.** *Biophysical journal* 2015, **108**(2):75a-75a.
85. Hohmann PG, He DX, Shows TB: **Relationship between H1-Histone Phosphorylation and Genome Replication in a Mouse Chinese-Hamster Somatic-Cell Hybrid.** *Experimental cell research* 1983, **143**(1):207-216.
86. Holmgren P, Johansson T, Lambertsson A, Rasmuson B: **Content of Histone-H1 and Histone Phosphorylation in Relation to the Higher-Order Structures of Chromatin in Drosophila.** *Chromosoma* 1985, **93**(2):123-131.
87. Asami K: **Synthesis and Phosphorylation of Histone-H1 and**

- High Mobility Group Proteins in the Regenerating Rat-Liver after X-Irradiation.** *Radiation research* 1987, **109**(2):216-226.
88. Baatout S, Derradji H: **About histone H1 phosphorylation during mitosis.** *Cell biochemistry and function* 2006, **24**(2):93-94.
89. Dou YL, Gorovsky MA: **Phosphorylation of linker histone H1 regulates gene expression in vivo by creating a charge patch.** *Molecular cell* 2000, **6**(2):225-231.
90. Dou YL, Mizzen CA, Abrams M, Allis CD, Gorovsky MA: **Phosphorylation of linker histone H1 regulates gene expression in vivo by mimicking H1 removal.** *Molecular cell* 1999, **4**(4):641-647.
91. Shi YJ, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T, Shi Y: **Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors.** *Molecular cell* 2005, **19**(6):857-864.
92. Osley MA: **Histone Ubiquitylation Introduction.** *Methods* 2011, **54**(3):295-295.
93. Higashi M, Inoue S, Ito T: **Core histone H2A ubiquitylation and transcriptional regulation.** *Experimental cell research* 2010, **316**(17):2707-2712.
94. Verrijzer P: **Antagonistic gene control through histone H2A and H2B ubiquitylation.** *Faseb Journal* 2009, **23**.
95. Zheng ST, Wyrick JJ, Reese JC: **Novel trans-Tail Regulation of H2B Ubiquitylation and H3K4 Methylation by the N Terminus of Histone H2A.** *Molecular and cellular biology* 2010, **30**(14):3635-3645.
96. Kikuchi H, Watanabe M: **Partial purification of a stimulatory factor of RNA polymerase B in nonhistone proteins; correlation with nuclear protein kinase.** *The science reports of the research institutes, Tohoku University Ser C, Medicine Tohoku Daigaku* 1980, **27**(1-4):1-9.
97. Earnshaw WC, Mackay AM: **Role of nonhistone proteins in the chromosomal events of mitosis.** *The FASEB Journal* 1994, **8**(12):947-956.
98. Lei C, Lin S, Zhang C, Tao W, Dong W, Hao Z, Liu M, Wu B: **High-Mobility Group Box1 Protein Promotes Neuroinflammation after Intracerebral Hemorrhage in Rats.** *Neuroscience* 2013, **228**:190-199.
99. Li FQ, Liao W: **Effects of rosiglitazone on the levels of high**

- mobility group protein box1 from cultured human umbilical vein endothelial cells induced by LPS. *J Am Coll Cardiol* 2015, **66**(16):C102-C103.
100. Zhang QB, Jia QA, Wang H, Hu CX, Sun D, Jiang RD, Zhang ZL: **High-mobility group protein box1 expression correlates with peritumoral macrophage infiltration and unfavorable prognosis in patients with hepatocellular carcinoma and cirrhosis.** *BMC cancer* 2016, **16**.
 101. Goldknopf IL, Baum RM, Ballal NR, Yeoman LC, Olson MOJ, Busch H: **A24 - New Histone-Like Nonhistone Chromosomal Protein.** *Federation proceedings* 1975, **34**(3):610-610.
 102. Wang S, Chiu J, Klyszejko-Stefanowicz L, Fujitani H, Hnilica L: **Tissue-specific chromosomal non-histone protein interactions with DNA.** *Journal of Biological Chemistry* 1976, **251**(5):1471-1475.
 103. Richmond TJ, Davey CA: **The structure of DNA in the nucleosome core.** *Nature* 2003, **423**(6936):145-150.
 104. Albert I, Mavrich TN, Tomsho LP, Qi J, Zanton SJ, Schuster SC, Pugh BF: **Translational and rotational settings of H2A. Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome.** *Nature* 2007, **446**(7135):572-576.
 105. Hodges C, Bintu L, Lubkowska L, Kashlev M, Bustamante C: **Nucleosomal fluctuations govern the transcription dynamics of RNA polymerase II.** *Science* 2009, **325**(5940):626-628.
 106. Tilgner H, Nikolaou C, Althammer S, Sammeth M, Beato M, Valcárcel J, Guigó R: **Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition.** *Nature structural & molecular biology* 2009, **16**(9):996-1001.
 107. Schwartz S, Meshorer E, Ast G: **Chromatin organization marks exon-intron structure.** *Nature structural & molecular biology* 2009, **16**(9):990-995.
 108. Choi JK, Kim Y-J: **Epigenetic regulation and the variability of gene expression.** *Nature genetics* 2008, **40**(2):141-147.
 109. Choi JK, Kim Y-J: **Intrinsic variability of gene expression encoded in nucleosome positioning sequences.** *Nature genetics* 2009, **41**(4):498-503.
 110. Stünkel W, Kober I, Seifart KH: **A nucleosome positioned in the distal promoter region activates transcription of the human U6**

- gene.** *Molecular and cellular biology* 1997, **17**(8):4397-4405.
111. Jiang C, Pugh BF: **Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics.** *Nature Reviews Genetics* 2009, **10**(3):161-172.
 112. Segal E, Widom J: **What controls nucleosome positions?** *Trends in Genetics* 2009, **25**(8):335-343.
 113. Armstrong SJ, Jones GH: **Meiotic cytology and chromosome behaviour in wild-type Arabidopsis thaliana.** *Journal of experimental botany* 2003, **54**(380):1-10.
 114. Sutton WS: **The chromosomes in heredity.** *The Biological Bulletin* 1903, **4**(5):231-250.
 115. Sutton WS: **ON THE MORPHOLOGY OF THE CHROMOSOME GROUP IN BRACHYSTOLA MAGNA.** *The Biological Bulletin* 1902, **4**(1):24-39.
 116. Waldeyer W: **Über Karyokinese und ihre Beziehungen zu den Befruchtungsvorgängen.** *Archiv für mikroskopische Anatomie* 1888, **32**(1):1-122.
 117. Elgin SC, Weintraub H: **Chromosomal proteins and chromatin structure.** *Annual review of biochemistry* 1975, **44**(1):725-774.
 118. Hadizadeh N, Guet C, Johnson RC, Marko JF: **Structure and Dynamics of the Bacterial Chromosome in E. coli.** *Biophysical journal* 2011, **100**(3):78-78.
 119. Hirata Y, Oda A, Ohta K, Aihara K: **Three-dimensional reconstruction of single-cell chromosome structure using recurrence plots.** *Sci Rep-Uk* 2016, **6**.
 120. <https://staging.cnx.org/contents/U7tPDRxK@8/DNA-Structure-and-Sequencing>.

第二章 以毛細管電泳暨紫外光/可見光偵測器分離癌症細胞中的組蛋白

2.1 緒論

在人類文明的發展史中，疾病已是其重要的一個環節，然而現今因為科技進步，對於疾病我們已經有相當的認識，並且也發展出了許多預防的方式。關於疾病的致病原因有非常多種，在本文中我們以探討細胞內染色體做一個簡單的介紹^[1-4]。染色質本身的重塑複合物依靠水解 ATP 來提供能量形成結構上的改變成為染色體根據水解 ATP 的亞基不同，可將複合物分為許多不同種類的複合物這些複合物及相關的蛋白均與轉錄的激活和抑制、DNA 的甲基化^[5-7]、DNA 修復^[8,9]以及細胞周期^[10]相關。對於癌症基因之研究，最早是從觀察癌細胞染色體變化開始，而在慢性骨髓性白血病中所發現的費城染色體(Philadelphia chromosome)^[11, 12]，為最早被發現的異常染色體，進而了解費城染色體造成兩個基因的重組，即為造成慢性骨髓性白血病的致癌基因。而於大腸癌研究中也發現最早期大腸黏膜細胞會出現基因的突變，陸續造成其他基因及染色體的變化，進而發展成大腸癌^[13, 14]。癌症為現今人類重大疾病，目前推測癌症的發生原因，除了直接基因序列發生突變，造成癌細胞具備增生或侵襲的能力外，也可能藉由改變基

因的表現而促使細胞癌化，此種並非由基因序列突變所引起的基因表現調控稱之為表觀基因體學（Epigenetics）^[15, 16]。

過去幾年人類基因體學快速發展，解釋出表基因體學修飾的各種作用與疾病結合的相關研究，在過去研究中發現，基因的表現與癌症和遺傳疾病有關聯性。基因的表現分為兩種：遺傳學（Genetics）與表觀基因體學（Epigenetics）。表觀基因體學是一種不影響 DNA 序列下，經由 DNA 甲基化（DNA methylation）或組蛋白修飾（histone modifications）等過程，使基因表現受到影響的生理現象。組蛋白是一群被 DNA 纏繞之核內蛋白，組蛋白與 DNA 的纏繞會形成染色質（chromatin），當組蛋白與 DNA 纏繞打開時，轉錄因子（Transcription factor）能結合至 DNA 上，促使基因表達；若兩者纏繞緊密，則會抑制基因表現^[17-21]。

孟德爾在 1833 年提出用遺傳因子來描述及計算生物表徵的遺傳現象，到了 1909 年約翰生（Wilhelm Johannsen）才提出 gene 這個名詞，並用 phenotype（生物表徵）和基因作區分，也就是說基因只是用來計算生物表徵的抽象單位，但後來經過很多科學家的努力後証實基因是有實體的，而且存在並排列於細胞的染色體中，在 1940 年阿佛利（Oswald Avery）發現純化的 DNA 可以轉化細菌的生物表徵^[22, 23]及 1953 年 Watson 及 Crick 發現 DNA 雙

螺旋結構後，大家才認定 DNA 是生物的遺傳物質^[24]，而 20 世紀後期也成為以 DNA 為主導的分子遺傳學時代，但一段 DNA 並非等於基因，透過現代表觀基因及基因表現的研究，我們才慢慢瞭解基因的本質，基因是由一些 DNA 序列片段及其合作的蛋白質或 RNA 組合形成的功能單位，若是以 DNA 是基因是肉身來比喻，而伙伴的蛋白質或 RNA 就如同是基因的外衣，藉由改變基因的「表觀」，所以才稱為「表觀基因」，因為是用組合的方式，因此經由排列組合才可以把有限的資訊放大非常多倍，生物就是用這種方式來產生許多不同的效果。

因此我們將表觀基因之機制簡單的劃分成兩大類，第一種為 DNA 甲基化，去氧核糖核酸甲基化通常發生在 CpG 雙核苷酸 cytosine 的第五個碳上，基因啟動子區域到第一個表現序列區域上有一群 CpG 雙核苷酸的重複序列，稱為 CpG islands，其中 p 是指磷酸雙酯鍵（ phosphodiester bond ），CpG islands 的長度約為 200 到 1000 個核苷酸，為 cytosine 與 guanine 高度聚集的區域，即 C+G 之比例大於 50%。去氧核糖核酸的甲基化修飾作用與基因表現的調控扮演著重要的角色，基因缺失、基因序列的突變、染色體位移及染色體重組，可以改變基因序列造成基因的不表現，而甲基化修飾作用則不需要改變基因序列就可以達到抑制基因

的功能^[25-28]。腫瘤抑制基因的表現被抑制，將導致癌症的發生。去氧核糖核酸甲基化會抑制其下游基因的表達，因此如果致癌基因的 CpG islands 發生去氧核糖核酸甲基化將會導致腫瘤的抑制功能，去氧核糖核酸甲基化如果在腫瘤抑制基因上發生，將會提高腫瘤的發生。DNA 甲基修飾也是一種生物為了暫時應付演化壓力而改變特定基因活性的策略，這是因為基因突變是隨機而且必須經過長時間的篩檢，無法應付臨時產生的環境壓力，甲基修飾可以讓生物有時間去作有效的基因表現及生理的變化來適應環境，而且這種過渡的應變措施是可逆的，最後如果環境持續對生物產生壓力再透過在已發展出來的表觀基因途徑上作定點突變，產生永久的適應^[25, 29, 30]。

第二種則為組蛋白修飾，組蛋白是由長鍊的氨基酸組成，如果其中的氨基酸被修飾，可能會改變組蛋白的結構，而影響基因表現，稱為組蛋白修飾。DNA 纏繞的核心組蛋白分別由 H2A、H2B、H3 及 H4 組蛋白構成，雖然組蛋白修飾可能會發生在所有氨基酸序列上，但是研究顯示，組蛋白 N 端（又稱為組蛋白尾端）特別容易被修飾，這些修飾包括乙醯化（acetylation）^[31-34]、甲基化（methylation）^[35-37]、泛素化（ubiquitylation）^[38-41]、磷酸化（phosphorylation）^[42-49] 以及 sumoylation^[50-52]。其中對於組蛋

白乙醯化的研究較多，目前已知組蛋白 H3 的尾端 lysine 9 及 14 位置的乙醯化，與基因轉錄有關。近年來研究顯示，組蛋白的乙醯化可能會促使基因活化表達，其原因為 DNA 骨架上的磷酸帶負電，能與組蛋白上帶正電的 lysine 互相吸引，當帶正電的 lysine 被乙醯化修飾後，會轉變為電中性，使 DNA 與組蛋白之間結合變疏鬆，因此轉錄因子便能結合至 DNA 上，利於基因轉錄發生 [53-55] 。

2.2 實驗部分

2.2.1 研究動機

癌症是人體細胞的一種疾病。它的起因是由控制細胞生長增殖機制的失常而引起。然而癌細胞除了生長失控外，還會破壞周圍的正常組織及經由體內循環系統或淋巴系統擴散至其他器官，變成侵襲性的癌症。^[56]癌症的發生係由致癌物質為引起基因突變之物質所造成，致癌物質則可依照基因損傷的方式分類為物理性致癌物例如接觸放射物質，或是受到周圍環境影響而引致的，及化學性致癌物。例如，吸菸、輻射、不健康飲食。還有某幾類癌症是經由病毒將本身的基因插入正常細胞的基因中，導致激活致癌基因，而由病毒引起的人類癌症約佔所有人類癌症的 15 %^[57]。但突變也會自然產生，所以即使已經避免接觸上述的致癌因子，仍無法完全預防癌症的產生。癌症為十大死因之首，有鑑於此，建立一個快速、經濟的癌症篩檢方法，能提早發現潛在及早期無症狀的癌症是必然的。

肝癌屬於全球最常見的癌症之一，尤其於亞太地區，有高度的致死率及復發率，現階段肝癌治療效果依然僅於癌症初期較為顯著，於肝癌晚期所獲得之醫療效果則較為勉強，因此發展一套用於癌症分期與治療的新方法顯為重要^[58, 59]。因此利用酸萃取法從肝癌細胞中萃取出組蛋白^[60]，先前研究組蛋白多以十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電

泳分離，凝膠電泳最大的問題在於採用高電壓分離時所產生的焦耳熱，會造成平板從中心至兩側或管柱內徑中的黏度與速度產生梯度變化，導致分析物區帶變寬、降低分離效率，且其影響會隨電場強度增加而加大，因而限制了電壓的使用範圍，以致分離時間過長和樣品消耗量大。為了改善這些問題，學生使用紫外光/可見光偵測器結合毛細管電泳，能夠有效的解決樣品消耗量和分離效率低等問題。

2.2.2 實驗試藥

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, Free Acid) 與 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, sodium salt (HEPES, Sodium Salt) 購自美國 J. T. Baker。2-Hydroxyethyl cellulose(HEC, M_{ave} 250,000 g/mol) 購自英國 Alfa Aesar。trichloroacetic acid(TCA)、Tris-HCl、Boric acid、Sulfuric acid、聚乙二醇 (polyethylene glycol, M_{ave} 8,000,000 g/mol) 購自美國 Sigma Alderich，十二烷基硫酸鈉 (Sodium Dodecyl Sulfate) 購自美國 UniRegion Bio-Tech。培養基 (DMEM)、胎牛血清 (FBS) 及 0.5% Trypsin-EDTA 皆向 Gibco 公司購買，三合一抗生素 (Pen-Strep Ampho. Solution) 及丙酮酸鈉 (Sodium pyruvate) 係向 Biological Industries 公司購買。

2.2.3 細胞培養

將細胞培養於 10 cm 的培養皿內，加入 10 mL 培養液，其中含有 10% FBS、1% PSA、1 mM sodium pyruvate 及 DMEM，接著將細胞於 37°C，5% CO₂ 的環境下，培養 2 至 3 天，待滿盤後，吸棄培養液，用 1x PBS 清洗細胞代謝物，再加入 4 mL 1x trypsin / EDTA in PBS，再 37°C 下反應 3 分鐘，使細胞離開培養皿表面，用等量的培養液中止反應，接著收集細胞於離心管中，以 400 xg 離心 5 分鐘，吸棄上清液，以 3 mL 培養液沖散細胞，繼代培養。

2.2.4 組蛋白萃取(Histone extraction)

首先以 1xPBS 清洗 Huh7 細胞,並且室溫下離心 400 xg，5 分鐘,取得沉澱細胞,接著再加入 500 μ L Hypotonic Lysis Buffer 沖散沉澱的細胞並移至 1.5 mL 離心管,而 Lysis Buffer 在配製時總體積為 10 mL 其中包含 10 mM 的 Tris - Cl pH 8.0 1 mM 的 KCl、1.5 mM 的 MgCl₂ 和 1 mM DTT (Dithiothreitol) 並且在 4°C 的環境中在震盪器上震盪 30 分鐘。接著將離心管放入已經預溫好的離心機內 4°C 下，轉速為 10000 xg，離心 10 分鐘，此步驟 Lysis Buffer 會將細胞膜打破，並且透過離心的方式將細胞核沉澱下來，接著將上清液丟棄。在離心管內加入 200 μ L 的 0.2 M(0.4 N) H₂SO₄ 重複吸吐以沖散核，並在 4°C 的

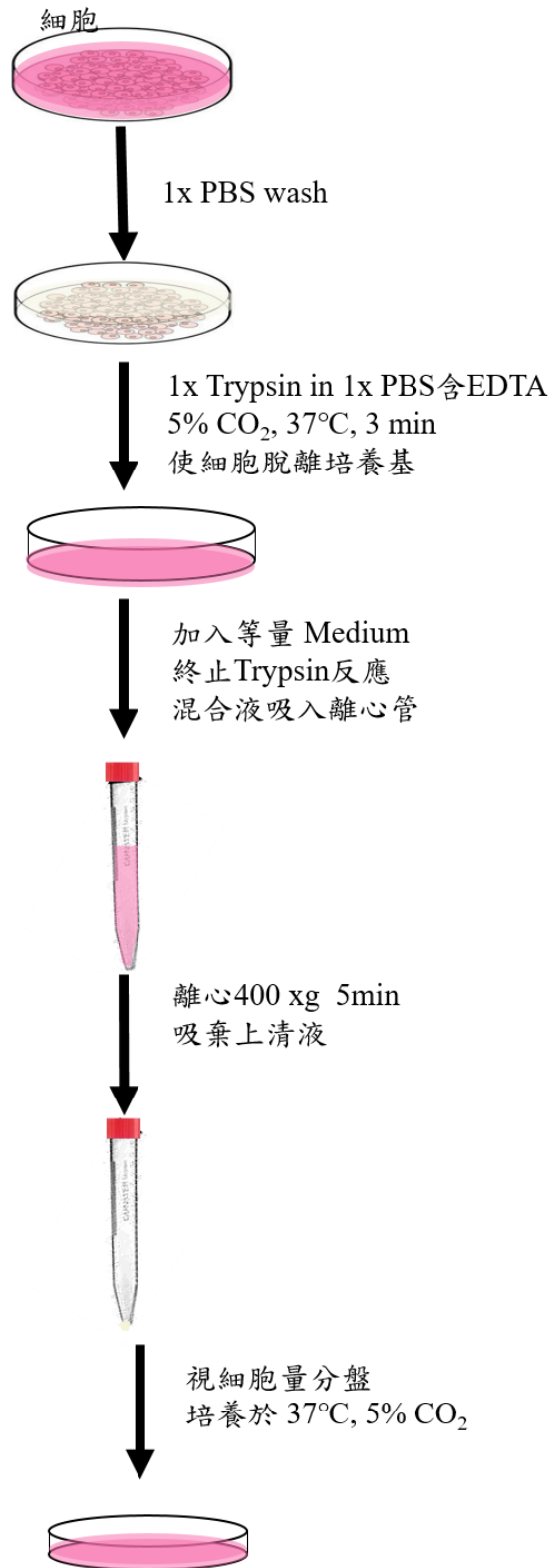


圖 2-1 細胞培養。

環境下震盪 12 小時，在此步驟破壞細胞核並打斷 DNA 與組蛋白間的鍵結，接著把離心管放入已預溫好的離心機，在 4°C 的環境內，轉速為 16000 xg，離心 10 分鐘，在此步驟會將分子量較大的核碎片離心下來，所以要將含有組蛋白的上清液放入新的離心管內，隨後加入 100% 的 TCA(trichloroacetic acid)，最終濃度為 33% 的 TCA，重複吸吐後，會出現乳白色沉澱。接著至於冰中 30 分鐘，使蛋白質溶液的 pH 改變，而達到蛋白質的等電點，使蛋白質沉澱下來。在 4°C 的離心機內，轉速為 16000 xg，離心 10 分鐘，吸棄上清液，留下已沉澱的組蛋白。加入冰的丙酮清洗組蛋白顆粒，並去除剩餘的 H₂SO₄，在 4°C 的離心機內，轉速為 16000 xg，離心 5 分鐘，並重複此步驟兩次。之後吸棄上清液，於室溫下風乾組蛋白沉澱 20 分鐘，移至新 tube 並回溶於 50 μL H₂O。以十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳圖 (SDS-PAGE) 進行定性的部分如圖 2-3，再使用吸收儀定量其濃度，而理想 260 nm 與 280 nm 的吸收值 (A₂₆₀ / A₂₈₀) 必須小於 1.7 代表所萃取出來的物質存在較多的蛋白質，倘若落在 1.7~1.9 之間則代表在萃取的過程中留下過多的 DNA。

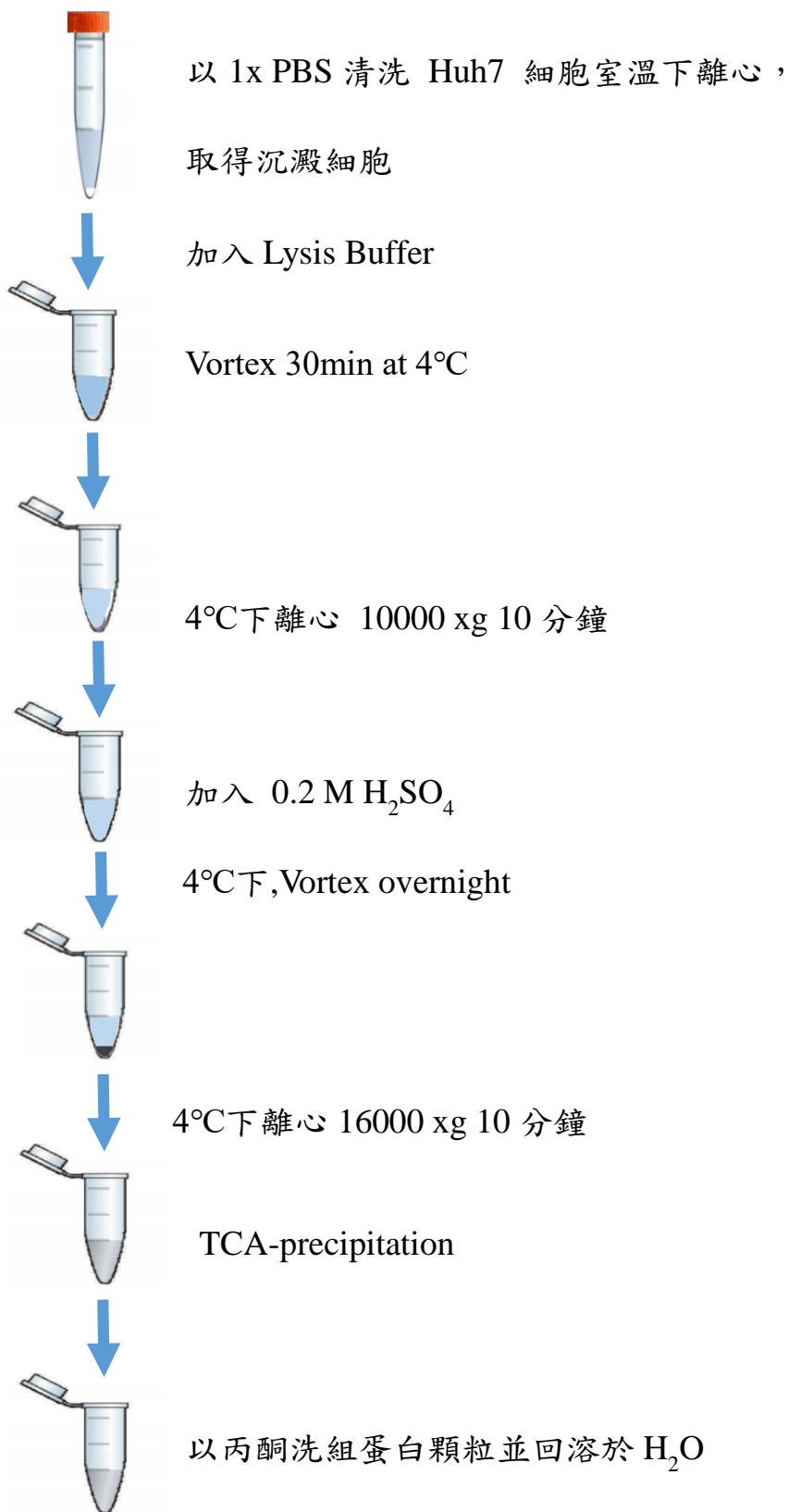


圖 2-2 組蛋白萃取流程圖。

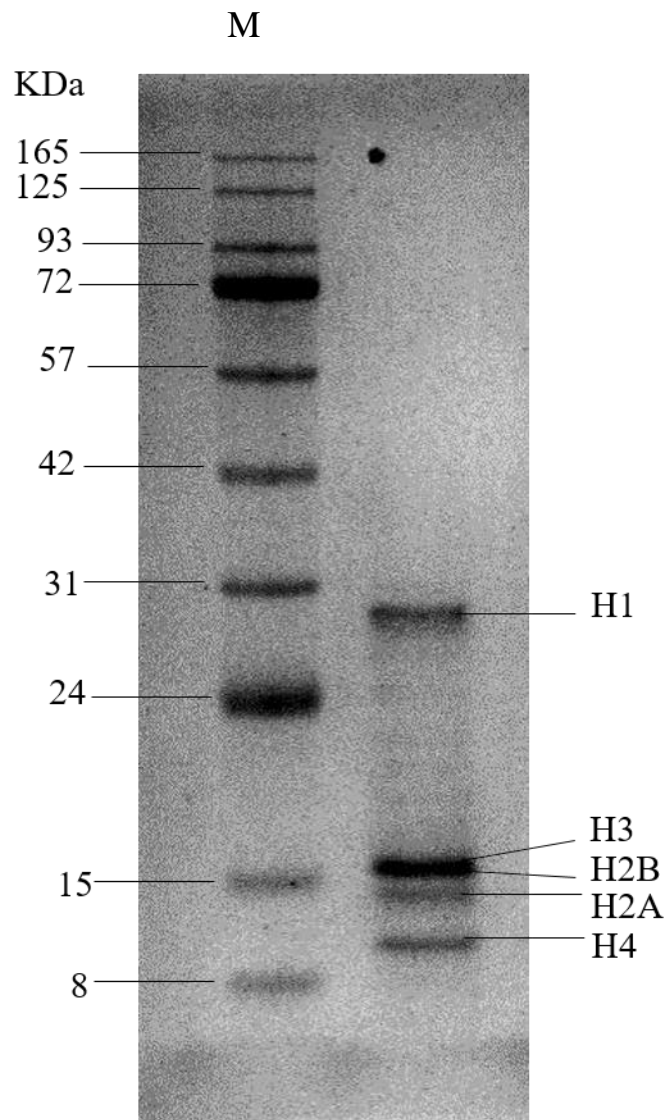


圖 2-3 組蛋白之十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳圖。

2.2.5 毛細管電泳結合紫外光可見光光譜儀之裝置

進行毛細管電泳之高電壓電源供應器購自 Gamma High Voltage Research 公司(Ormond, FL, USA)，電壓範圍 0~20 kV。熔融矽毛細管購自美國 Polymicro Technologies 公司，使用內徑為 75 μm ，外徑為 365 μm 之毛細管，總長為 55 cm，有效長度為 42.5 cm。將毛細管插入與 Thermo Fisher Scientific 公司購買的可見光/紫外光偵測器，最後使用層析軟體 Clarity(DataApex, Prague, Czech Republic)將訊號轉換成電泳層析圖。

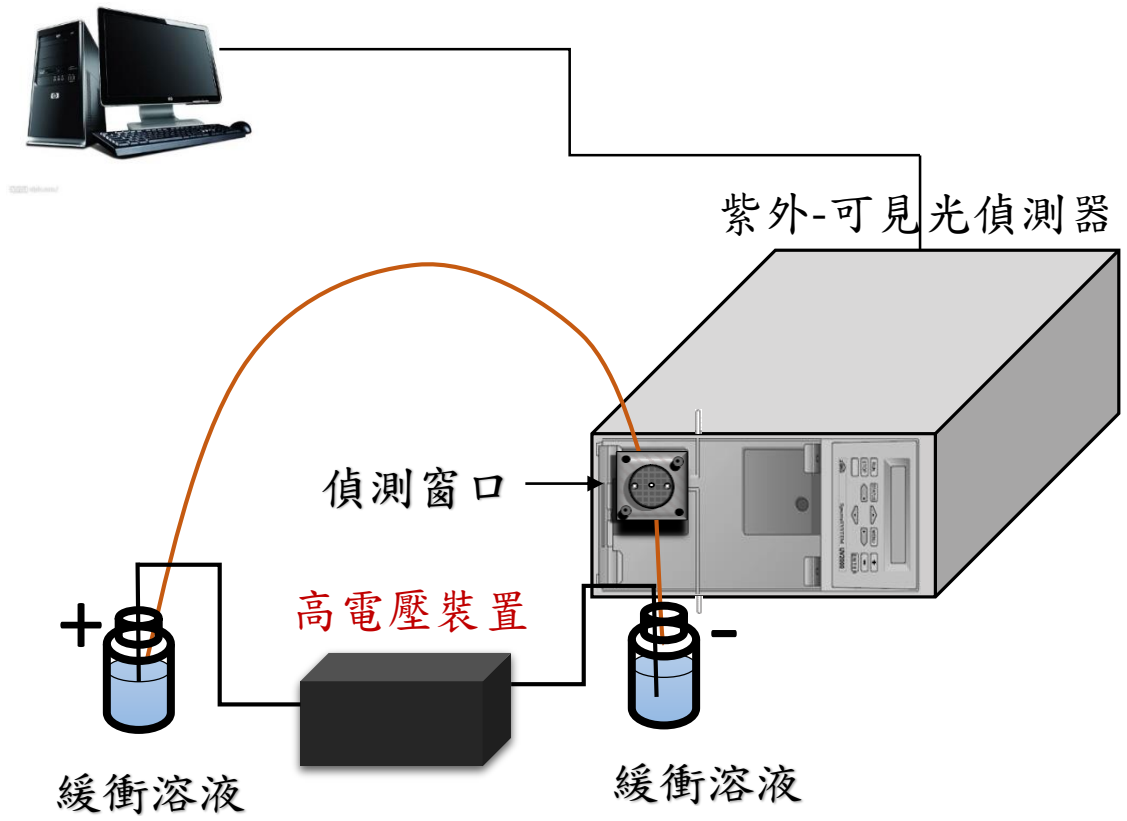
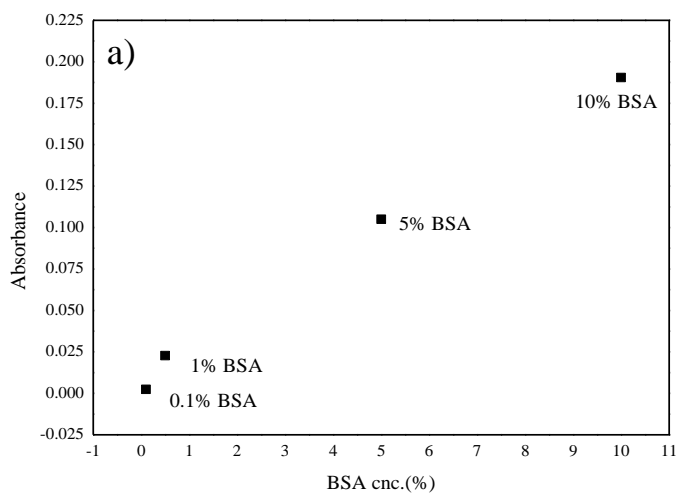


圖 2-4 毛細管電泳結合紫外光可見光偵測器之裝置圖。



c)

BSA conc.	UV2000	DS-11 (10mm)	DS-11 (0.5mm)	DS-11(0.5mm) /UV2000
0.1%	0.0023	0.5	0.025	10.87
1%	0.0227	5.737	0.28685	12.64
5%	0.105	26.616	1.3308	12.67
10%	0.1904	53.769	2.68845	14.12

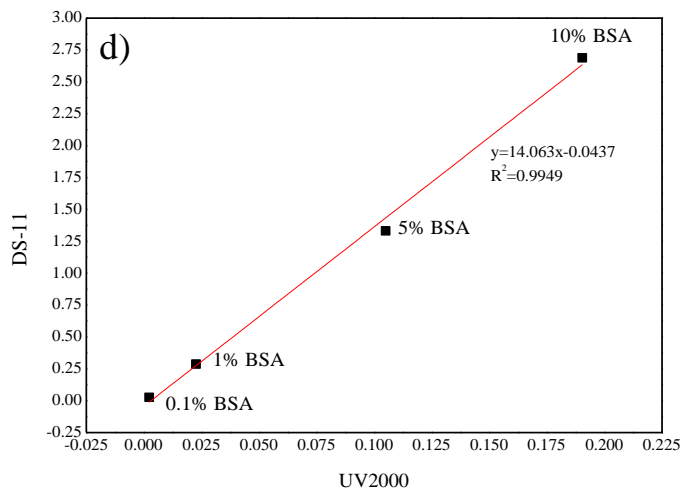
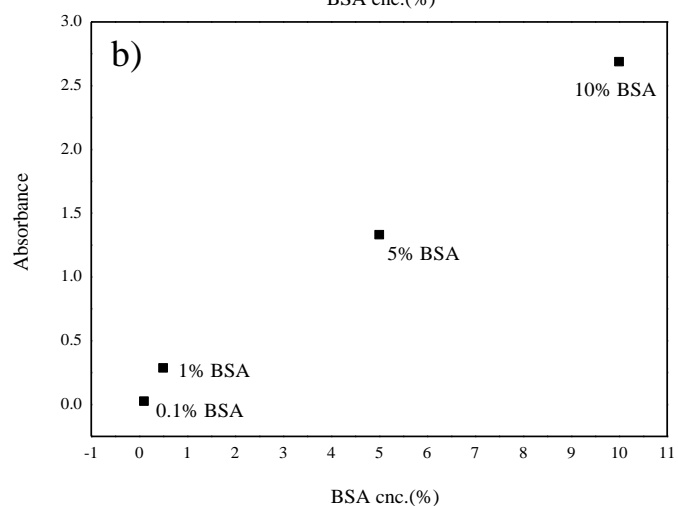


圖 2-5 UV2000 之校正。

a) 不同濃度的牛血清蛋白(BSA)在 UV2000 吸收儀之吸收度。

b) 不同濃度的牛血清蛋白(BSA)在 DS-11(10mm)吸收儀之吸收度。

c) UV2000 和 DS-11(10mm)對除之數據。

d) UV2000 和 DS-11(10mm)之回歸曲線圖。

2.2.6 毛細管前處理

實驗用的毛細管材質為熔融矽 (fused silica)，購自於美國 PolymicroTechnologies 公司，毛細管外部塗覆了一層聚亞烯胺 (polyimide)，在進行實驗之前，先以石英片切割一段 55 cm 的毛細管並於末端 12.5 cm 處燒除長度約 1.2 cm 之聚亞烯胺，毛細管外之聚合物後以甲醇擦拭，作為偵測視窗。將毛細管內壁以去離子水活化其官能基，再通入 0.5 M NaOH 靜置至隔天。通過此步驟可以使毛細管管壁矽醇基解離，管壁上充滿負電荷，隔日再通入 1.5 M TB buffer (Tris-borate) pH 10.0 緩衝溶液將 NaOH 推出，就可以使用此毛細管進行實驗。等待實驗結束之後，一樣可以使用 1.5 M TB buffer pH 10.0 進行毛細管保存和清洗毛細管，而下次實驗之前會使用 0.5 M 的 NaOH，電壓開至 1kV 通電 10 分鐘，藉此清洗毛細管壁上的物質，讓毛細管回到最初始的狀態，藉此提高實驗再現性以利下次實驗的進行。

2.2.7 聚合物溶液製備

緩衝溶液製備時會使用到的容器皆須經過清潔劑的刷洗，並且會加入去離子水放入超音波震盪器震盪五分鐘，確保在容器內並沒有留下上一位使用者留下的物質造成汙染。首先配置 1.5 M 的 TB buffer (Tris-borate) pH 10.0 和濃度為 200 mM SDS (Sodium Dodecyl

Sulfate) ,在配置聚合物緩衝溶液前在將濃度調整為 400 mM TB pH 10.0 並含有 20 mM SDS 的緩衝溶液，總體積為 15 mL 配製聚合物溶液時先將磁石放入樣品瓶中，再放置於攪拌器上，接著慢慢的增加磁石的轉速以在樣品瓶內會出現漩渦。取 0.075 g 的 250 K HEC，配製 0.5 % 250 K HEC 聚合物溶液，將聚合物粉末緩慢倒入樣品瓶，配製過程中應避免倒入速度太快而導致粉末無法均勻分布於溶液中。溶液須攪拌十二小時確定聚合物粉末已完全溶解且均勻分布。配置好的緩衝溶液大約可保存一週。若放置時間過久，HEC 溶液在高 pH 值會水解而無法使用。

2.2.8 實驗流程

每次實驗前都會將分離時會使用到的膠體溶液或者緩衝溶液放入 1.5 mL 的離心管內，並且以 10000 xg 10 分鐘先將溶液中的氣泡去除，以免在實驗的過程中會因為界面活性劑所形成的氣泡造成過多的雜訊。在毛細管內會先通過數滴的 1.5 M TB buffer (Tris-borate) pH 10.0 使毛細管內充滿緩衝溶液，末端毛細管以及負電極放入聚合物溶液中。隨後將毛細管進樣端插入樣品試管中，利用虹吸進樣 (siphoning) 的方式，進樣 10 秒鐘。再將毛細管放入正電極的聚合物溶液中形成電通路，並以 15 kV 之高電壓進行電泳分離，電極在電解水溶液時會在電極表面產生氣體，因此須避免毛細管尾端 直接碰觸

電極表面，以免吸入空氣，造成在通電過程因為氣泡造成斷電的情況。當分析物經過毛細管 42.5 公分偵測視窗時，儀器會依造所設定的波長偵測出在此波長下此分析物的吸收度，最後再由層析軟體進行訊號處理。分析完後，會先通入數滴 0.5 M NaOH、100 mM TB (Tris-borate) pH 10.0 最後再通入數滴的 1.5 M TB (Tris-borate) pH 10.0，使毛細管在每次進樣前都會回復至最初使的狀態，提高實驗的再現性。

2.3 結果與討論

2.3.1 偵測波長的選擇

在此實驗的開端偵測波長的選擇是非常重要的，學生將萃取出來的組蛋白來偵測其 UV 圖譜，來尋找其最佳的偵測波長由圖中 2-6 可知，組蛋白在 UV 波長低於 300 nm 之後就開始有吸收的現象，然而結合毛細管電泳之偵測後，學生選擇了 280 nm 的波長作為偵測波長，色胺酸(Tryptophan)和酪胺酸(Tyrosine)是為芳香族胺基酸吸收波長為 280 nm 時會有吸收峰，由於不需要化學反應所以廣泛的被使用在蛋白質或胜肽的檢測，假設目標蛋白中的色胺酸(Tryptophan)和酪胺酸(Tyrosine)的數量，因為它們的吸收值是能相加的，所以可以計算摩爾消光係數。在實驗時發現雖然在更低的波長在偵測時可以有較高的吸收值，蛋白質和胜肽也顯示 220 和 240 nm 之間的高吸光度，源於肽鍵和羧基。該波長範圍只有在溶液純淨的情況下才能用於定量評估，

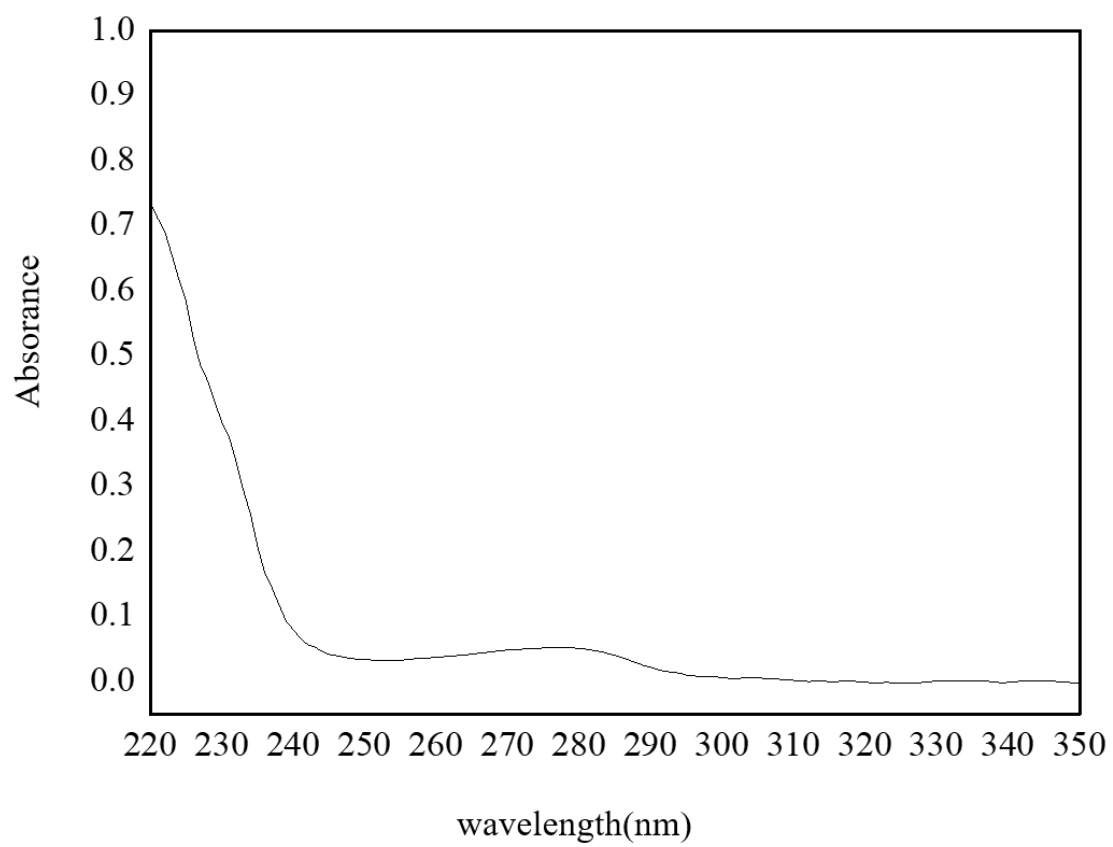


圖 2-6 組蛋白吸收圖。

因為大量的其他物質在該範圍內也具有很高的吸光度。但卻也讓整體雜訊隨之提高，而影響到組蛋白的偵測。

2.3.2 分離電壓對組蛋白分離之影響

在分離的過程中電壓也是一項重要的條件，在此學生探討利用不同分離電壓分離組蛋白對訊號之影響，在圖 2-7 中可以看到當分離電壓為+10 kV 時訊號出現時間約為 7 至 15 分鐘，並且可以清楚的看到訊號的數量變多，但因為此研究所使用的毛細管長度為 55 公分，倘若使用電壓為+10 kV 分離，在之後測試其他分離條件時常會因為淌度太小而造成解析度反而下降的現象。當分離電壓為+20 kV 時訊號出現時間約為 2 至 10 分鐘，此分離電壓雖然可以快速的分離出來，但是因為在接下來的分離條件，皆會在緩衝溶液中添加 SDS，當 SDS 被添加在緩衝溶液中時，在操作實驗的過程中容易產生氣泡，而造成分離訊號會有很多氣泡所造成的雜訊，而且也會產生過多的焦耳熱進而導致分離解析度下降。

2.3.3 緩衝溶液 pH 值對分離之影響

當緩衝溶液濃度溶液 pH 值大於 3.0 時，管壁的矽醇基 (SiOH) 會解離變成矽醇陰離子 (SiO^-)，使得管壁帶負電荷，當溶液中陽離子通過毛細管時會被 SiO^- 吸引，當施加正電壓時，擴散層中的陽離

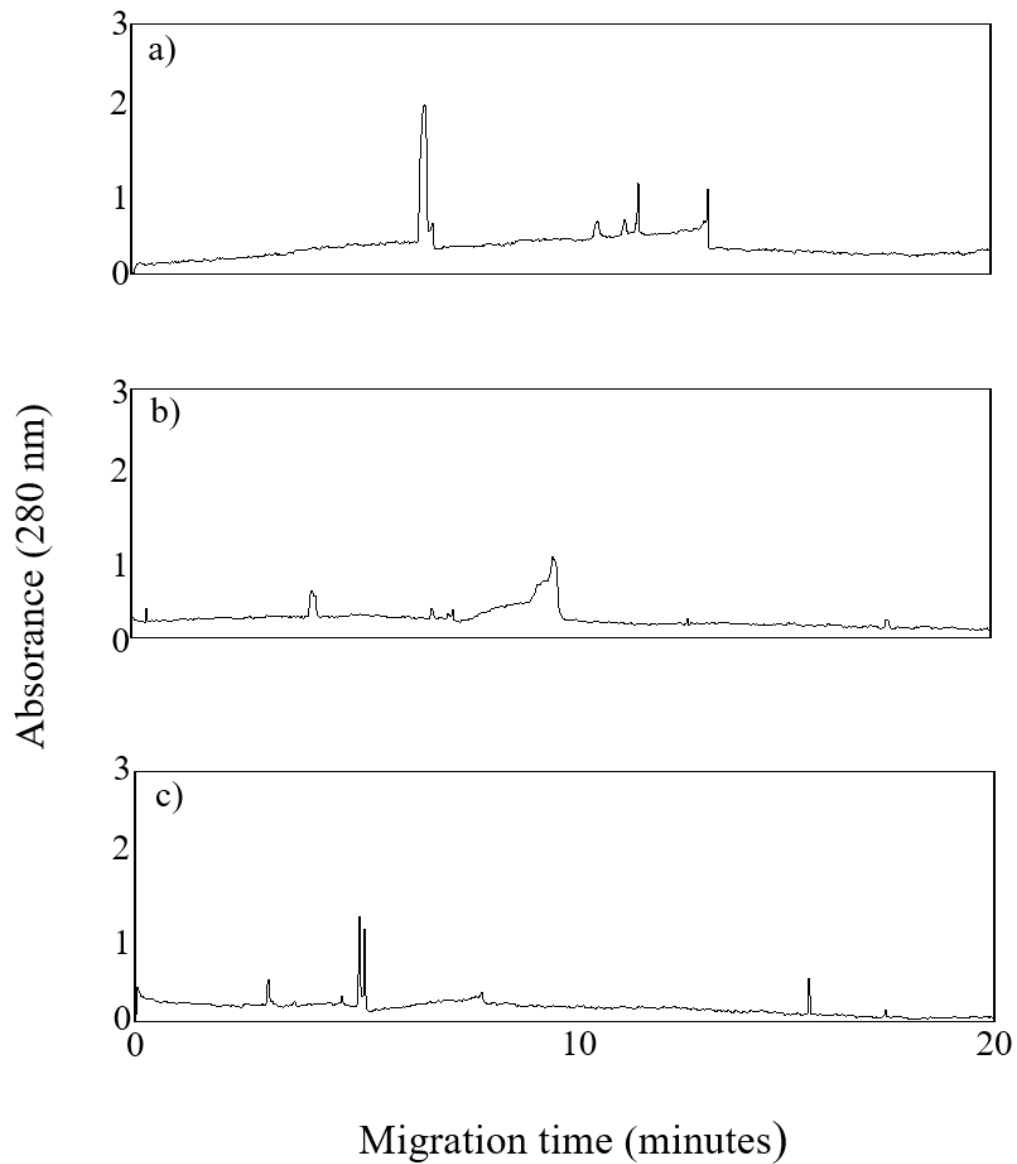


圖 2-7 電壓對組蛋白分離之影響。

Sample : 1 mg/mL Histone (Huh7) , Capillary, Inlet, Outlet : 0.2 M TB pH

9.0 + 20 mM SDS 。 a) +10 kV 、 b) +15 kV 、 c) +20 kV 。

子會受到庫倫吸引力而往負極移動，此作用力會帶動溶液中的整體溶液（bulk solution）一起往負極移動而產生電滲流。所以緩衝溶液的 pH 值也是在分離時一項重要的因素，並且溶液的種類也會影響分離的效率，然而上述我們是在高電滲流的存在下，對於界面活性劑的測試，所以便配製了不同種類和 pH 值的緩衝溶液分離組蛋白，由圖 2-8 中可以發現在 pH 3.0、4.0 的 acetate buffer 和 pH 7.0 的 HEPES buffer，因為其電滲流較小導致沒有訊號或者波峰很寬，也因組蛋白的 pka 約在 10.0，所以我們選擇高 pH 值的 TB buffer 進行接下來的實驗。

2.3.4 SDS 添加對組蛋白分離之影響

緩衝溶液條件在 0.4 M pH 9.0 TB buffer 時，我們發現組蛋白在分離時會有組蛋白吸附的現象發生，所以選擇以添加界面活性劑十二烷基硫酸鈉(sodium dodecyl sulfate)，會因為 SDS 所形成的微胞表面帶負電包覆在組蛋白的表面，以改善吸附的現象，分別添加 10 mM SDS 和 20 mM SDS，由圖 2-9 學生發現界面活性劑濃度為 20 mM SDS 時，可以有效的增加分離效率，所以我們選擇 20 mM SDS 進行接下來的實驗。

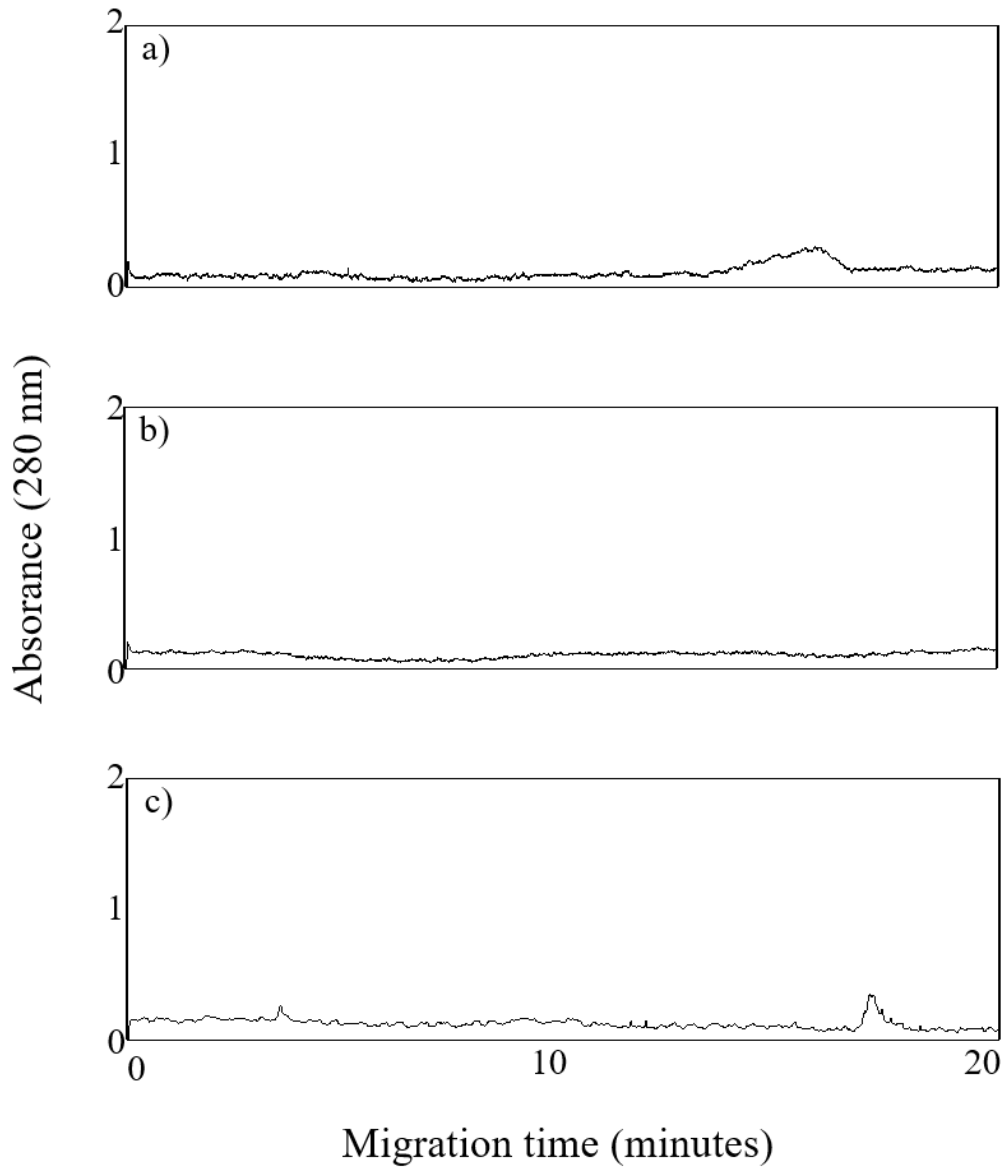


圖 2-8 緩衝溶液 pH 值對分離之影響。

Sample : 1 mg/mL Histone (Huh7) , Voltage : + 15 kV 。

Capillary,Inlet,Outlet : a) 100 mM Acetate buffer pH 3.0 、 b) 100 mM

Acetate buffer pH 4.0 、 c) 10 mM HEPES buffer pH 7.0 。

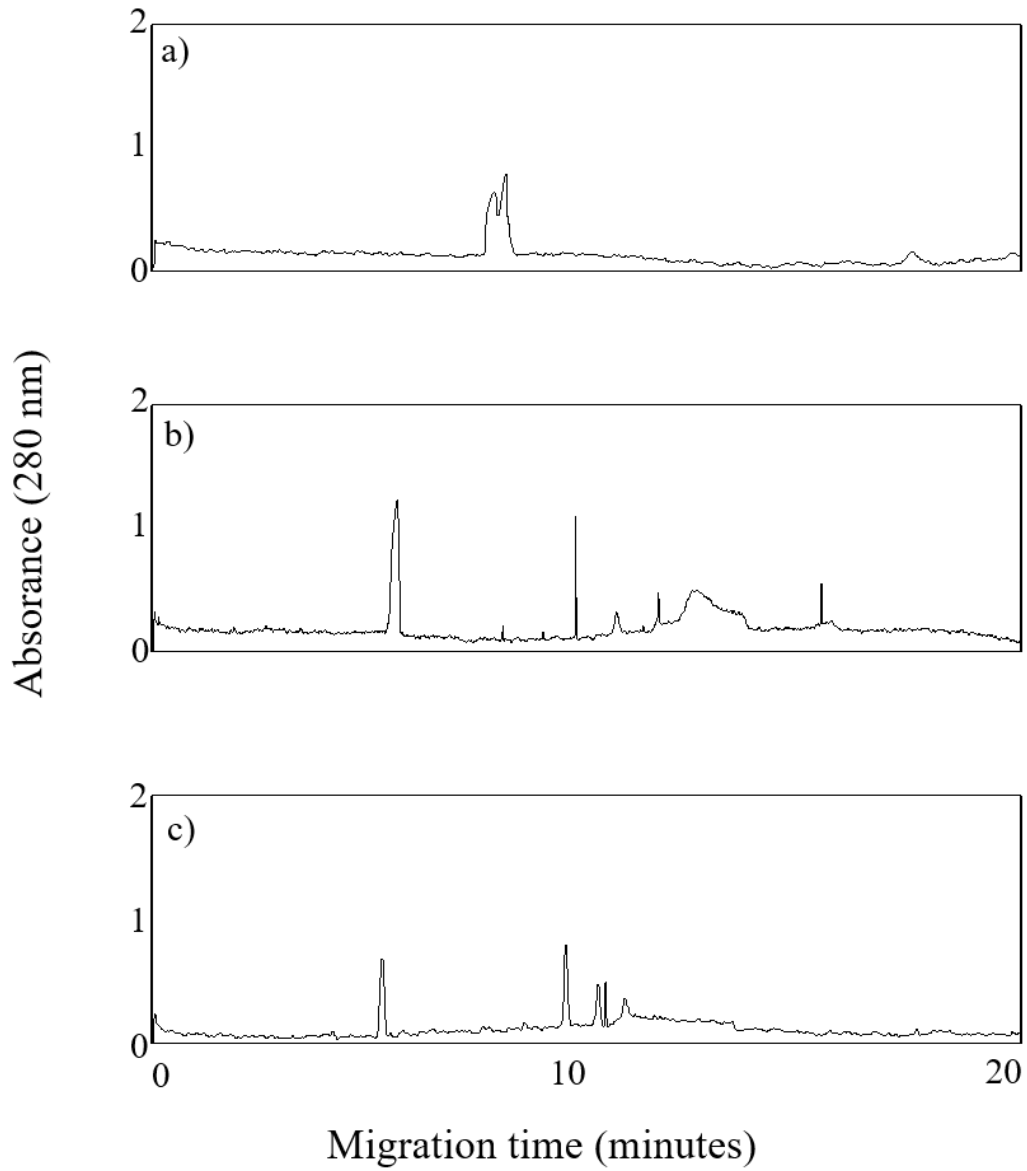


圖 2-9 SDS 濃度對組蛋白分離之影響。

Capillary, Inlet, Outlet : 0.4 M TB buffer pH 10.0 , SDS 添加在緩衝溶液

內。 a) 0 mM SDS、 b) 10 mM SDS、 c) 20 mM SDS。 其他條件同圖 2-8。

2.3.5 緩衝溶液濃度對於對分離時間之影響

本研究中，首先分別於 pH 8.0、9.0 與 10.0 的 TB buffer 添加了 20 mM SDS 中，以尋求於高電滲流存在下最佳化的 TB 溶液之 pH 值。溶液中的離子強度越強表示溶液中的離子數目越多，因此會有較多的陽離子可以吸附於毛細管內壁上，但卻使得電雙層的厚度變得密集因此減小，當電雙層厚度變小時連帶造成 Zeta 電位減小，使得電滲流因此下降。所以測試了不同濃度之緩衝溶液對於組蛋白分離之影響。因為上述兩種變因皆會影響電滲流的大小，所以觀察在不同在 pH 值和不同濃度的緩衝溶液尋找最佳化的分離條件。緩衝溶液 pH 8.0 時如圖 2-10 可以發現因為其離子強度相較於其他兩種條件是較低的，所以形成的電滲流較小，即使是在 0.2 M 的條件下，分離組蛋白時其分離時間也需要二十分鐘，而且其訊號之波峰也較寬。在圖 2-11 及圖 2-12 內的 TB buffer pH 9.0 和 10.0 時即使將緩衝溶液濃度提高至 0.4M 也能將組蛋白有效的在十五分鐘內分離出來，所以組蛋白必須在高電滲流的狀態下才能有效的分離，因此學生選擇 0.2 M TB buffer pH 9.0 和 10.0 繼續接下來的實驗。

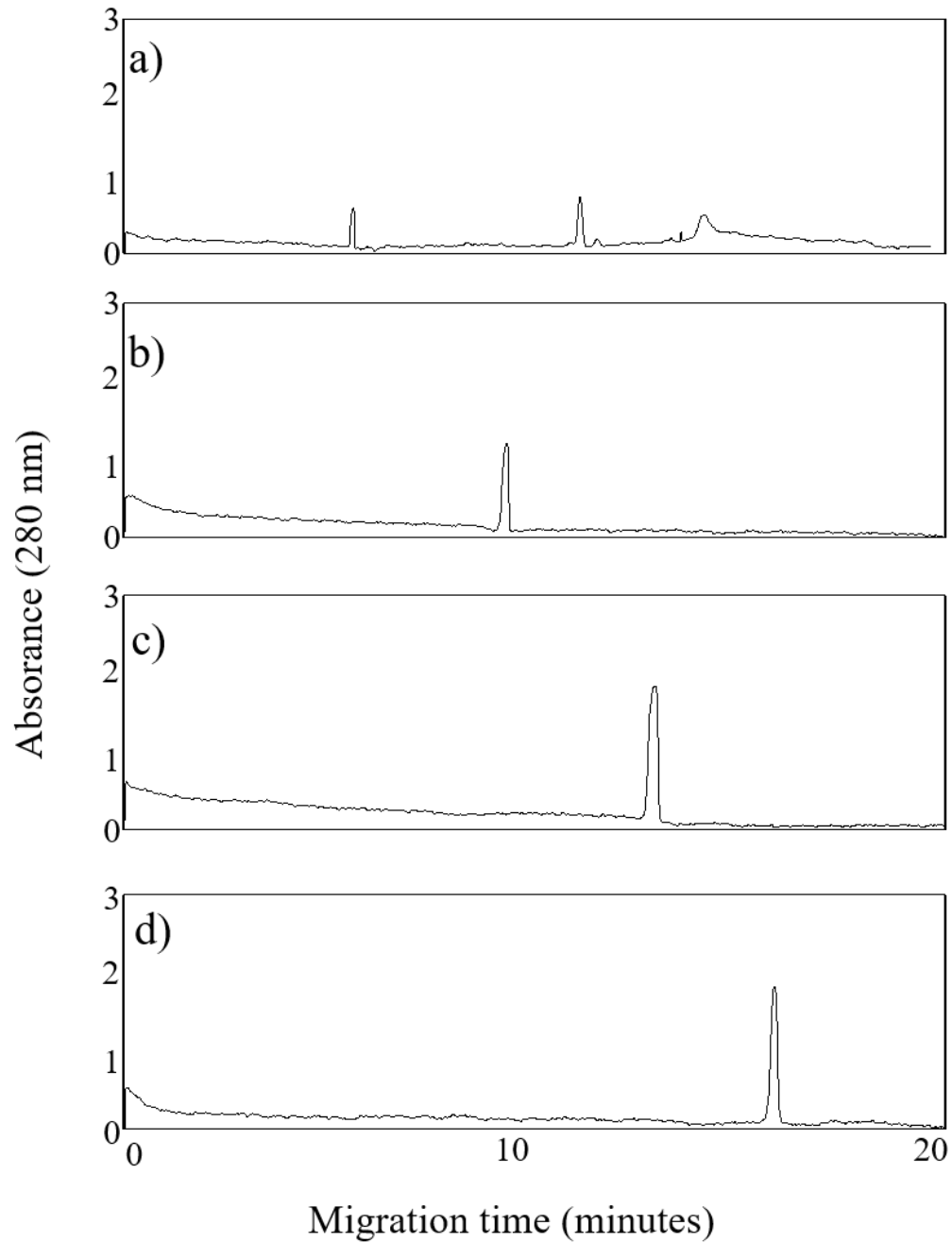


圖 2-10 緩衝溶液 pH 值 8.0 時其濃度對分離時間之影響。

Capillary, Inlet, Outlet: a) 0.2 M TB buffer pH 8.0 + 20 mM SDS、b) 0.4 M TB buffer pH 8.0 + 20 mM SDS、c) 0.6 M TB buffer pH 8.0 + 20 mM SDS、d) 0.8 M TB buffer pH 8.0 + 20 mM SDS。其他條件同圖 2-8。

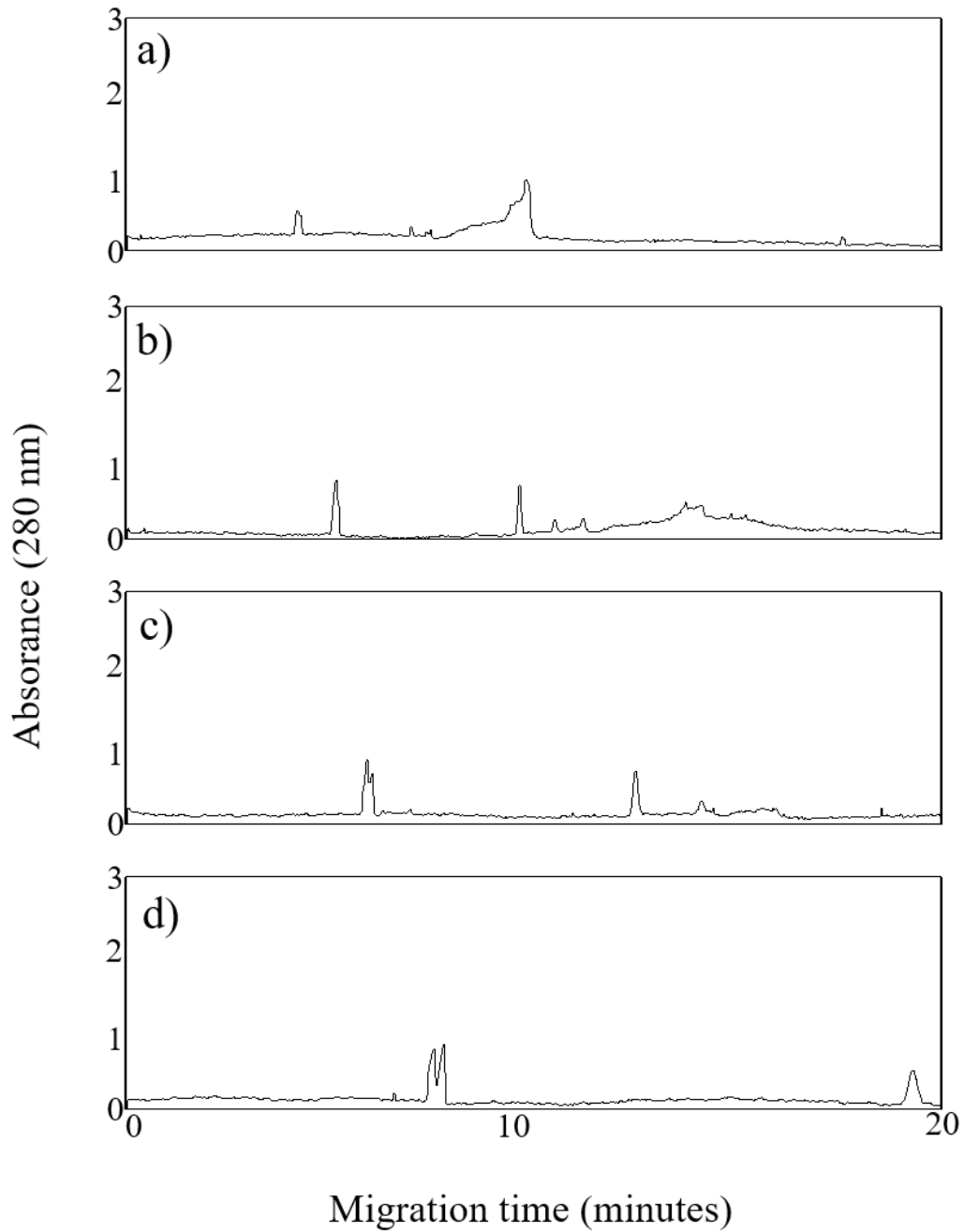


圖 2-11 緩衝溶液 pH 值 9.0 時其濃度對分離時間之影響。

Capillary, Inlet, Outlet: a) 0.2 M TB buffer pH 9.0 + 20 mM SDS、b) 0.4 M TB buffer pH 9.0 + 20 mM SDS、c) 0.6 M TB buffer pH 9.0 + 20 mM SDS、d) 0.8 M TB buffer pH 9.0 + 20 mM SDS。其他條件同圖 2-8。

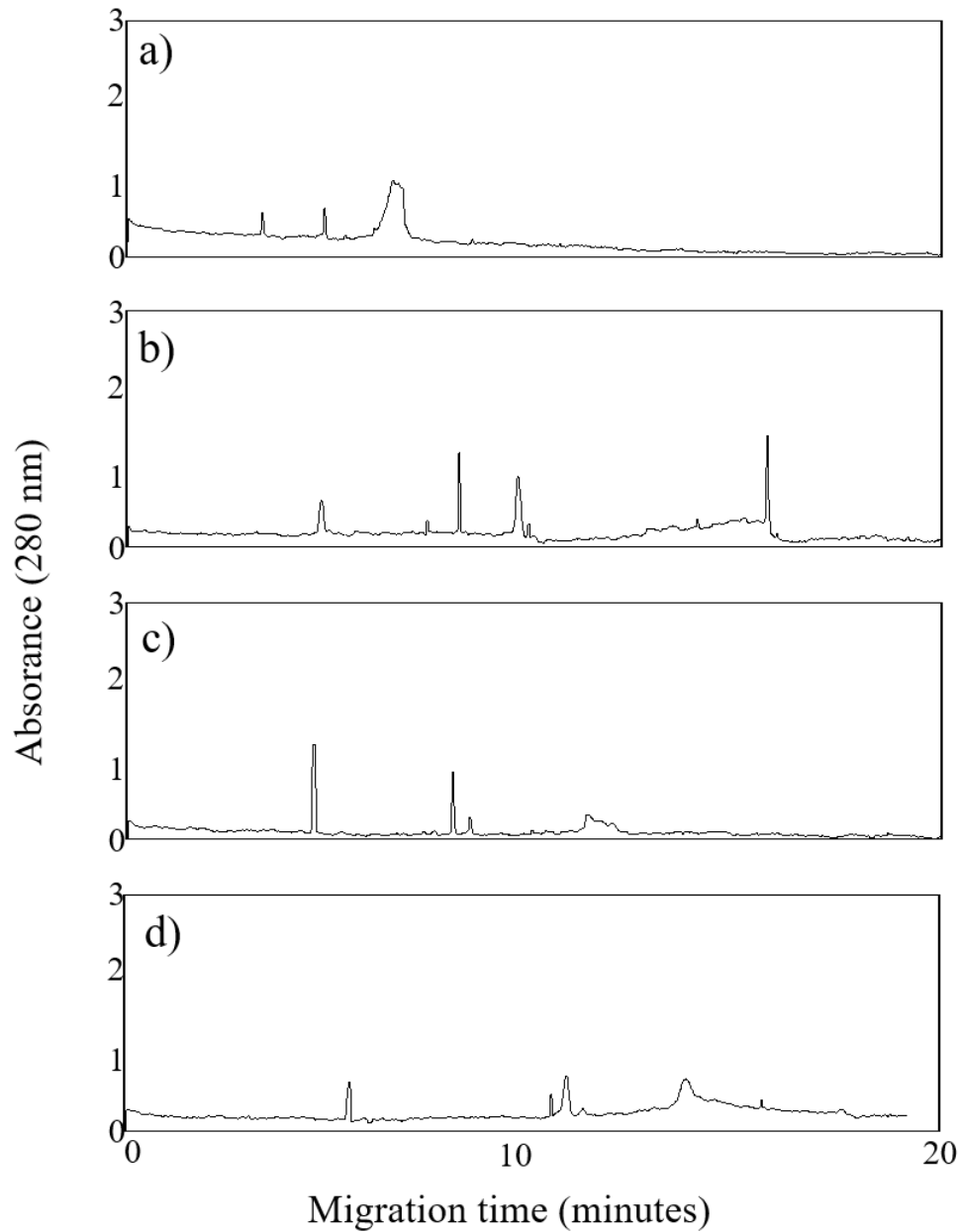


圖 2-12 緩衝溶液 pH 值 10.0 時其濃度對分離時間之影響。

Capillary, Inlet, Outlet : a) 0.2 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS、b) 0.4 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS、c) 0.6 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS、d) 0.8 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS。其他條件同圖 2-8。

2.3.6 聚合物種類和濃度對分離組蛋白之影響

在本研究中發現組蛋白在緩衝溶液濃度為 0.2 M TB buffer pH 9.0 和 10.0 添加 20 mM SDS 的系統中能夠在 10 分鐘之內分離出來，然而其訊號的解析度並不是這麼理想，因此透過聚合物的加入可以因為其網狀結構的形成增加其解析度。選擇了羥丙基甲基纖維素 (Hydroxypropyl methylcellulose, HPMC) 平均分子量為 100,000 Da，和羥乙基纖維素 (Hydroxyethyl Cellulose, HEC)，平均分子量為 250,000 Da，此兩種聚合物將較於其他種類的聚合物，都具有黏度較低，並且水溶性較高等特色，因此添加聚合物於 0.2 M TB buffer pH 9.0 和 10.0 內含 20 mM SDS 溶液中，配製不同濃度的 HEC 及 HPMC 溶液，以尋求於高電滲流存在下最佳化的 TB 溶液之 pH 值及聚合物之種類和濃度，聚合物濃度對於電滲流與解析度的影響。其中如圖 2-13，我們發現電滲流的電泳遷移率會隨著聚合物濃度的增加而產生下降現象，可能是導因於聚合物吸附與黏度的增加。同樣地，聚合物溶液對於電滲流的影響也會隨著 TB 溶液內的 pH 值不同而異。在圖 2-13 中因為其電滲流較小，所以添加了聚合物之後反而會更抑制其電滲流。反觀在圖 2-14 的系統中，因為其電滲流較大，當 HEC 濃度提高至 0.5% 時會得到最佳化之條件。然而在平衡態電泳所測試之最佳化條件，還有能發展的空間，所以將所測試出最佳化條件以非連續態

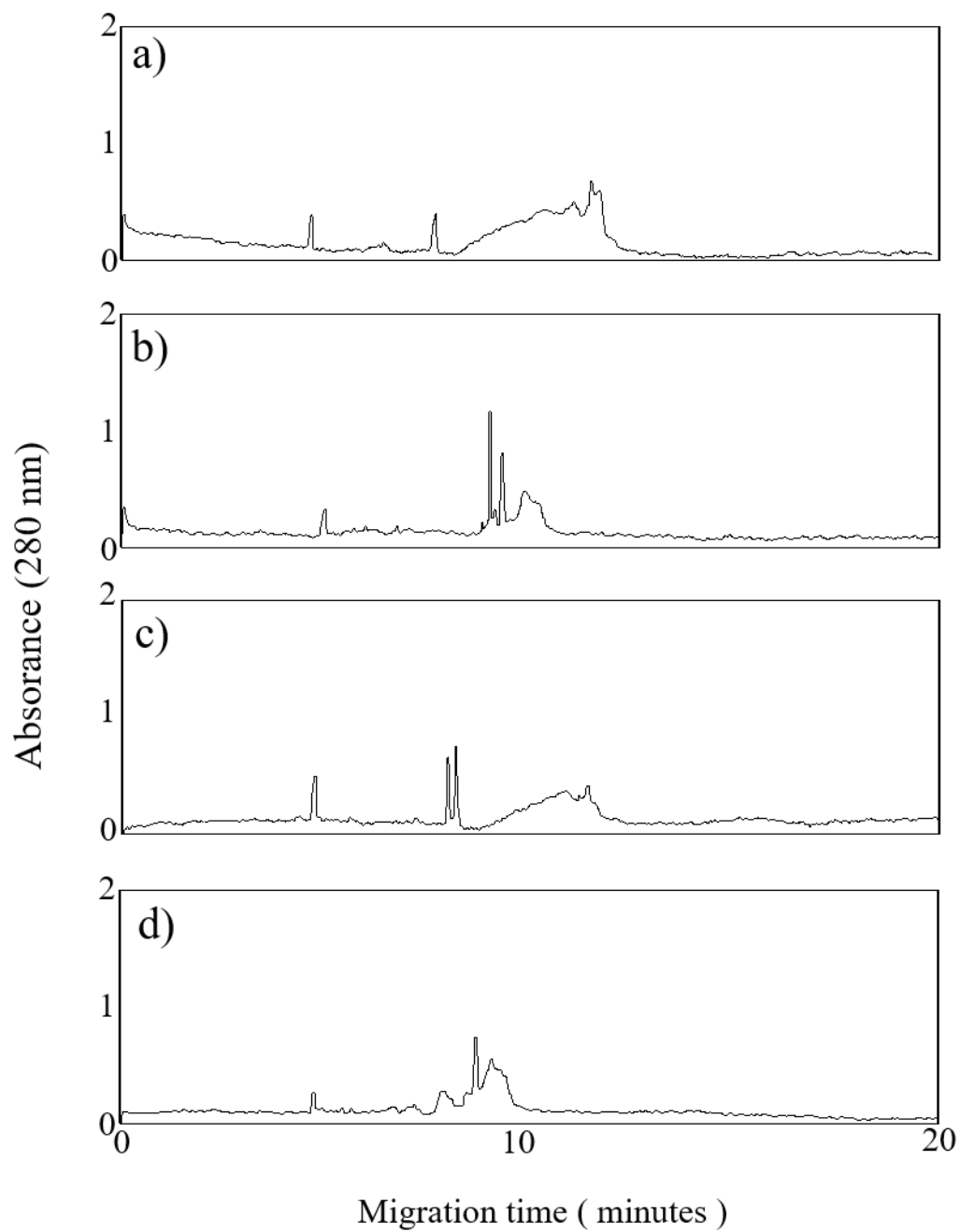


圖 2-13 緩衝溶液聚合物種類和濃度對組蛋白分離之影響。

Capillary, Inlet, Outlet : 0.2 M TB buffer pH 9.0 + 20 mM SDS ,

HEC 和 HPMC 添加在緩衝溶液內。a) 0.1% HPMC、b) 0.5% HPMC、

c) 0.1% HEC、d) 0.5% HEC。其他條件同圖 2-8。

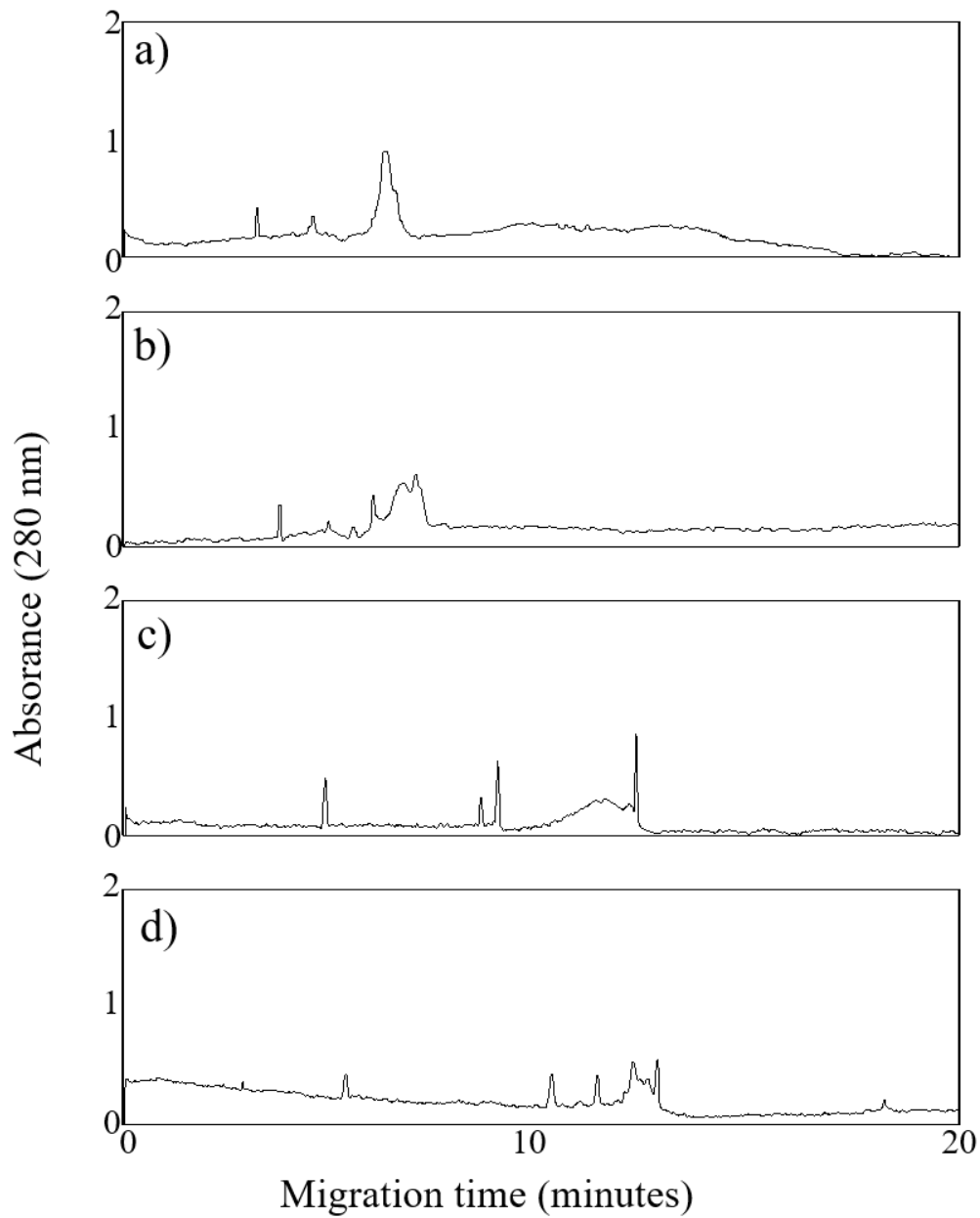


圖 2-14 緩衝溶液聚合物種類和濃度對組蛋白分離之影響。

Capillary, Inlet, Outlet : 0.2 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS ,

HEC 和 HPMC 添加在緩衝溶液內。a) 0.1% HPMC、b) 0.5% HPMC、

c) 0.1% HEC、d) 0.5% HEC。其他條件同圖 2-8。

系統進行接下來的實驗。

2.4 非連續態系統分離組蛋白

非連續態系統首見於平板膠體電泳分析蛋白質，其主要為使用兩種不同 pH 值的緩衝溶液配置膠體，可分為堆積膠體(stacking gel)及跑動膠體(running gel)。一般而言，堆積膠體體內溶液的 pH 值應小於跑動膠體並且它們在電泳槽內的排列順序為(由正極至負極):樣品區帶，堆積膠體，跑動膠體。蛋白質由樣品區帶進入到堆積膠體時，由於帶電荷的減少，會使得其電泳遷移率降低，產生農所，進而形成較窄的區帶，將較於傳統單一 pH 的分離系統，可獲得較高的解析度；此外，也可配置不同濃度的膠體，將它們至於電泳槽內，進行梯度分析，同時提高 DNA 或蛋白質的解析度，我們將他稱之為非連續態聚合物濃度的分離系統。

毛細管電泳中也常見到非連續態系統的使用，通常可分為外在分離條件的改變，如電場、溫度、毛細管的形狀等，以及內部緩衝溶液系統的變化，如 pH、導電度、黏度、組成等，其主要目的為提高分離效率及濃縮樣品。例如，(1)梯度分析：利用於不同分析時間內溫度、電場或聚合物濃度變化，提高解析度；(2)場放大堆積法：利用樣品區帶與緩衝溶液之間非連續態溶液濃度來造成場強的差異，進行樣品濃縮；(3)毛細管等速電泳：使用非連續態緩衝液組成，來形成

離子等速狀態，進而濃縮樣品；(4) pH 接合(junction)：利用兩溶液間非連續態的 pH，來調節樣品的電泳遷移率，進行樣品濃縮；(5)非連續態電滲流：利用強鹼處理毛細管表面後，於極短時間內通一低 pH 緩衝溶液，即可在低 pH，高電滲流下分析樣品。

2.4.1 緩衝溶液濃度之對組蛋白分離之影響

由上述的實驗可知，最佳的分離條件是在聚合物濃度為 0.5% HEC 混合 20 mM SDS 分離效率是最佳的，所以透過改變緩衝溶液離子強度的方式，進而改變電滲流的大小，矽醇基的解離程度會受到 pH 值的影響，當緩衝溶液有較高的 pH 值時，毛細管內壁質子解離的程度會較高，Zeta 電位也因此提升，電滲流也會變大。pH 值大於 2 時矽醇基會開始解離出氫離子，在 pH 大於 4 時可觀察到電滲流值明顯的上升。溶液中的離子強度越強表示溶液中的離子數目越多，因此會有較多的陽離子可以吸附於毛細管內壁上，但卻使得電雙層的厚度變得密集因此減小，當電雙層厚度變小時連帶造成 zeta 電位減小，使得電滲流因此下降。所以如圖 2-15 當緩衝溶液濃度提高至 0.6 M 甚至是 0.8 M 電滲流變弱訊號面積會增加，但會使分離的時間也隨之增加，有部分的訊號會因為波峰變寬而導致出現難以判讀的現象，所以在此學生選用 0.4 M TB buffer pH 10.0 做接下來的實驗。

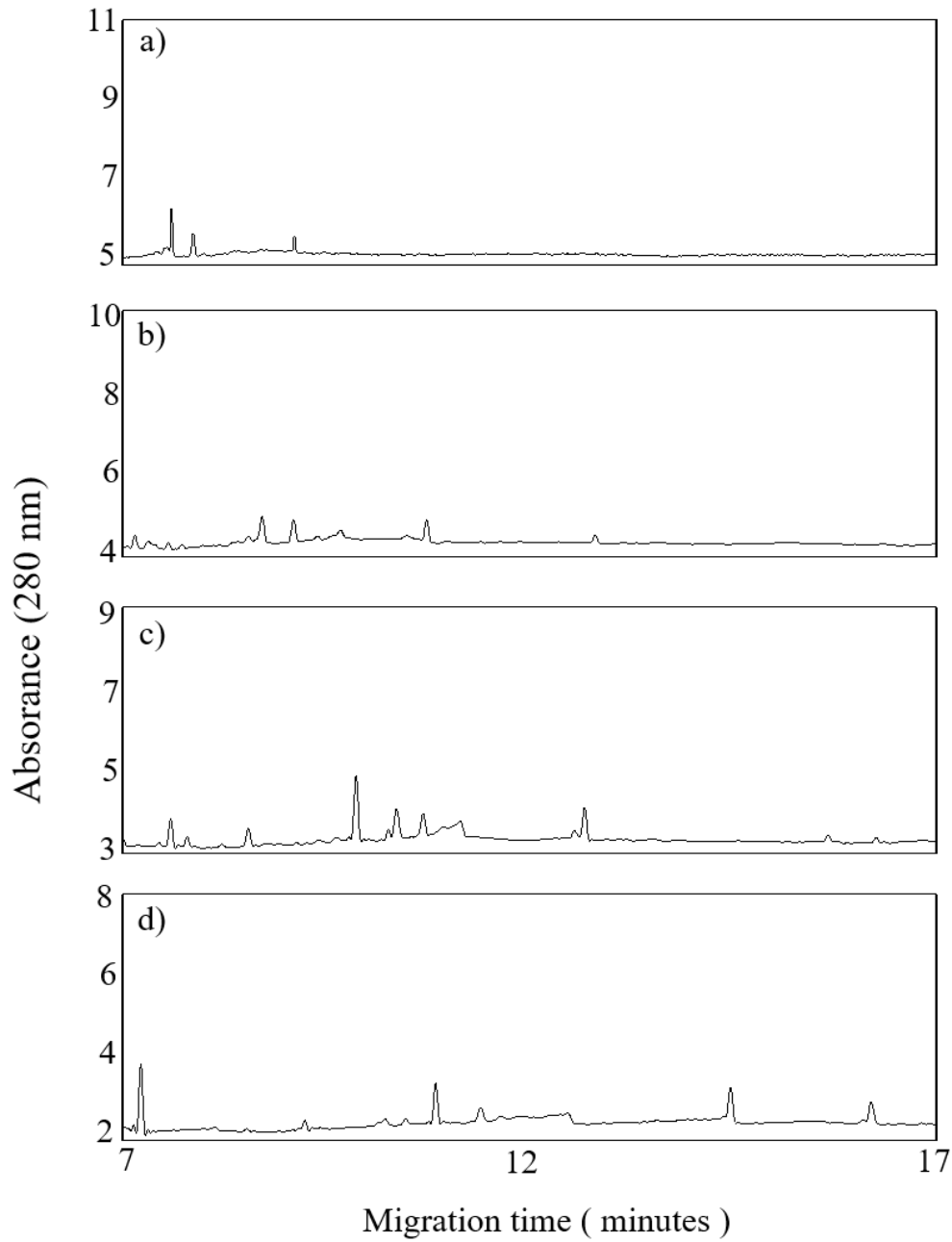


圖 2-15 緩衝溶液濃度對組蛋白分離之影響。

Capillary : 1.5 M TB buffer pH 10.0 , Inlet,Outlet : 聚合物濃度為

0.5% HEC , SDS 濃度為 20 mM 。 a) 0.2 M TB buffer pH 10.0 、 b) 0.4 M

TB buffer pH 10.0 、 c) 0.6 M TB buffer pH 10.0 、 d) 0.8 M TB buffer pH

10.0 。其他條件同圖 2-8 。

2.4.2 HEC 濃度對組蛋白分離之影響

本實驗使用了羥乙基纖維素 (Hydroxyethyl Cellulose, HEC)，平均分子量為 250,000 Da，此種聚合物在緩衝水溶液中溶解度高，與其他介質不同的地方是它具有極佳的水溶性，所以在配製聚合物緩衝溶液時較不會出現配製失敗的情況，因此學生測試了不同濃度的聚合物對於分離效率的影響，一系列的濃度由 0 %、0.5 %、1 %、以及 2 % (w/v) 之 HEC。由圖 2-16 中我們可以看到當我們沒有添加任何聚合物於緩衝溶液內時，其訊號高度很低，因此學生推測當在緩衝溶液內沒有添加任何聚合物時，組蛋白會吸附在毛細管壁導致在分離時訊號降低，然而當聚合物濃度增加，篩分介質會形成網狀結構可以有效的將訊號提升，並且隨著濃度提高至 1 % 其訊號高度也隨之增加，但分離的效果並不如預期，在然而當濃度提高至 1 及 2 % 時會因為 HEC 的濃度過高在 11 分鐘時有一支 HEC 所產生的訊號，也因為黏度高造成了遷移速度過慢，使得樣品在毛細管中產生了擴散。造成解析度增加但理論平板數卻下降的情況，因此分離的時間也隨之增長。所以學生選擇了聚合物濃度為 0.5 % 的緩衝溶液進行接下來的實驗。

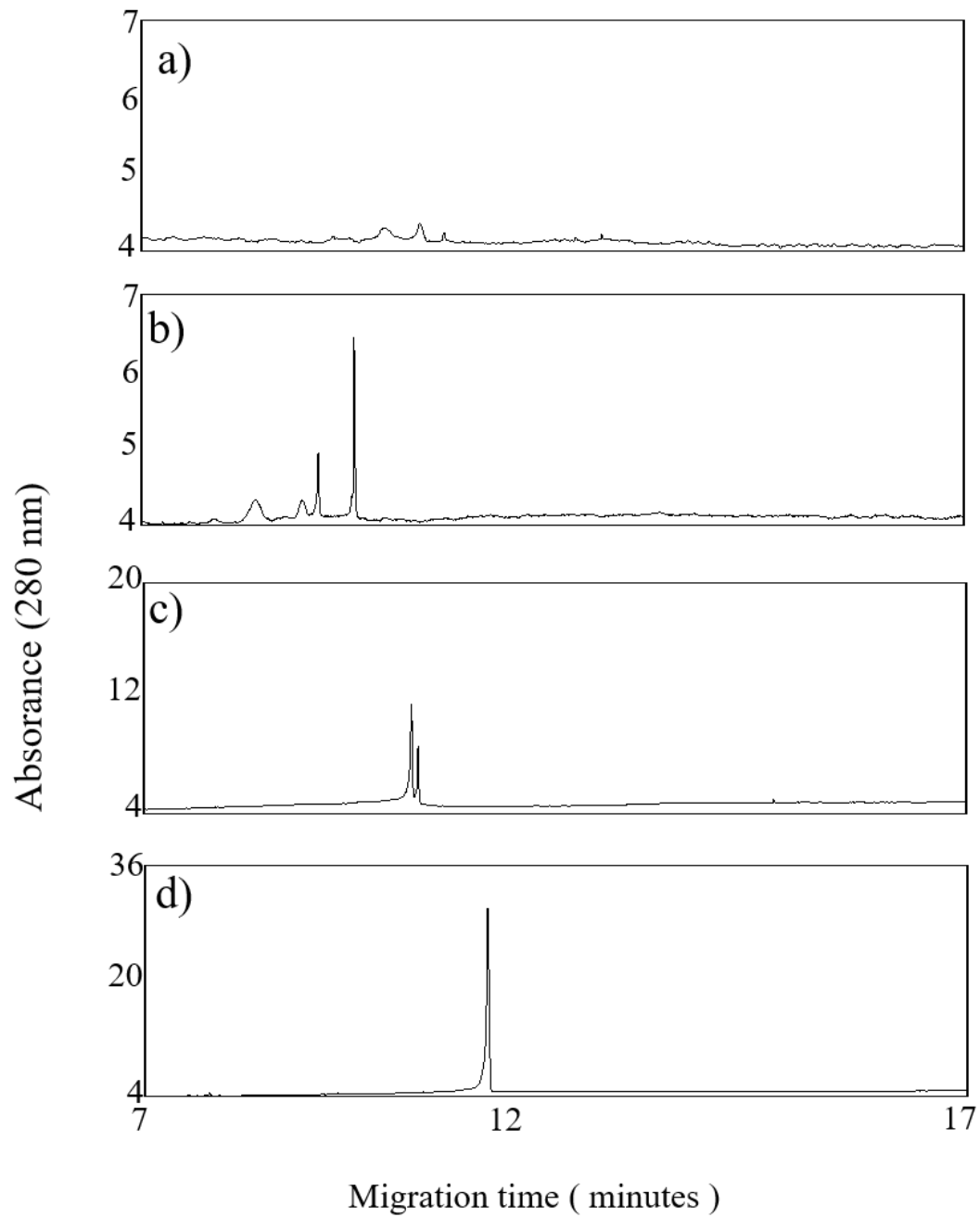


圖 2-16 緩衝溶液內添加 HEC 對組蛋白分離之影響。

Capillary : 1.5 M TB buffer pH 10.0 , Inlet,Outlet : 0.4 M TB buffer pH

10.0, HEC 添加在緩衝溶液內。a) 0 % HEC、b) 0.5 % HEC、c) 1 % HEC、

d) 2 % HEC。其他條件同圖 2-8。

2.4.3 添加 SDS 對組蛋白分離之影響

在只有鹽類緩衝溶液時，學生發現組蛋白會有吸附在毛細管壁的現象，所以選擇添加界面活性劑，十二烷基硫酸鈉(sodium dodecyl sulfate)以改善吸附的現象，接著學生透過加入不同濃度的 SDS 觀察界面活性劑的濃度對於分離效率的影響，由圖 2-17 中可以發現當 SDS 的濃度增加到 10 mM，因為 SDS 的臨界微胞濃度(critical micelle concentration, CMC)為 8.2 mM，故對分離並沒有明顯的改善。添加 20 mM SDS 時，在微胞的帶動下，分析物的遷移速度明顯加快且解析度也變好。可是當濃度提高至 30 mM SDS 時會因為 SDS 所形成的微胞表面帶負電能有效的加快分離速率，然而當帶負電的微胞過多時會因為移動速度過快導致分離效率反而變差，所以在此學生選擇含有 20 mM SDS 的緩衝溶液進行接下來的實驗。

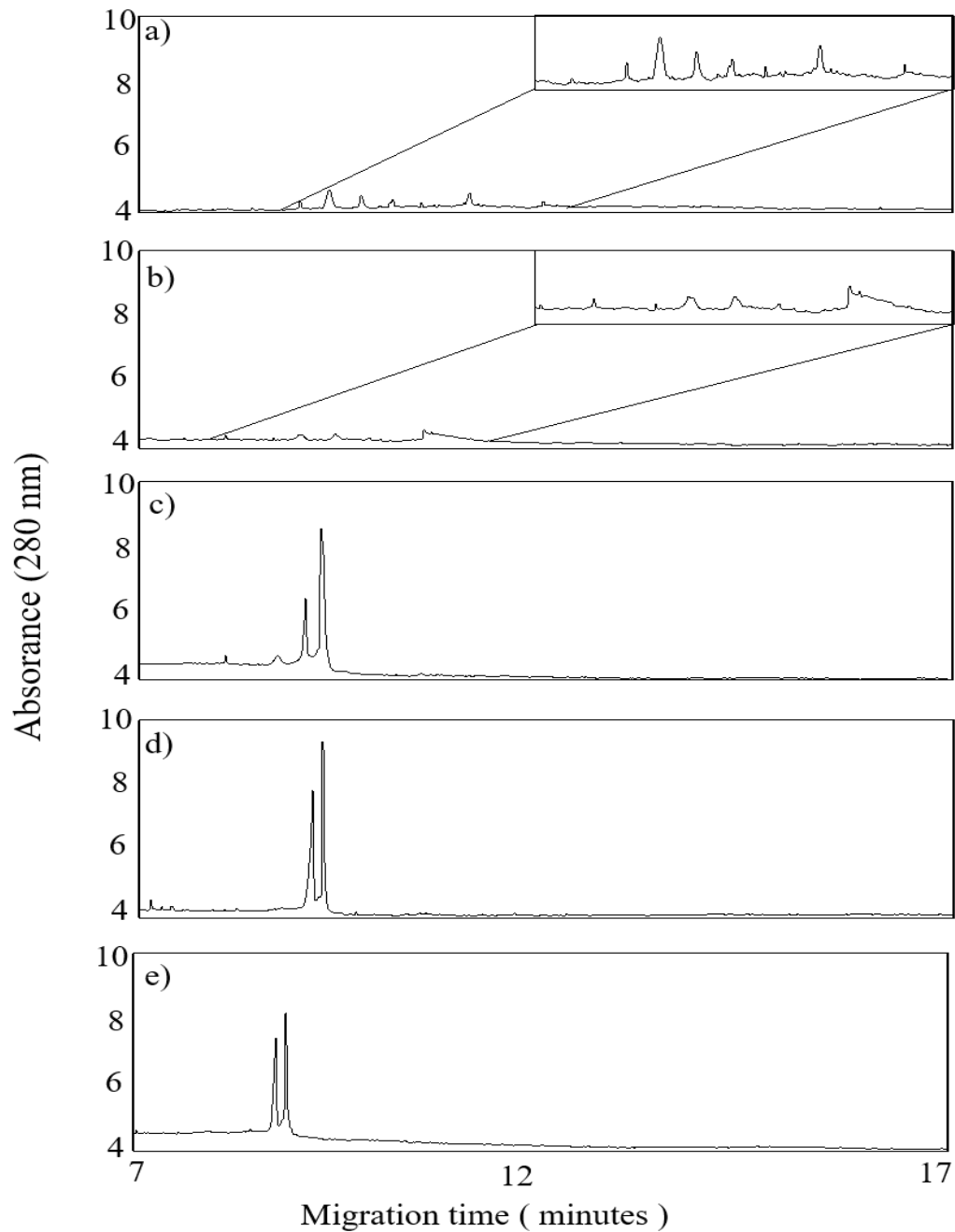


圖 2-17 緩衝溶液內添加 SDS 對組蛋白分離之影響。

Capillary : 1.5 M TB buffer pH 10.0 , Inlet,Outlet : 0.4 M TB buffer pH

10.0 , SDS 添加在緩衝溶液內。a) 10 mM SDS 、b) 20 mM SDS 、c) 30

mM SDS 、d) 40 mM SDS 、e) 50 mM SDS 。其他條件同圖 2-8 。

2.4.4 固定 HEC 濃度添加 SDS 對組蛋白分離之影響

由上述的實驗我們發現在篩分介質濃度為 0.5% HEC，當篩分介質加入緩衝溶液在進行毛細管電泳實驗時，電泳分離是利用每個帶電粒子 m/z 質不同而達到分離效果，所以我們必須添加聚合物進行分離，而在聚合物溶液中分子量大的組蛋白較不易通過聚合物孔隙中，所以會先被拉至偵測窗口，而分子量小較容易通過聚合物溶液孔隙所以較晚達到偵測窗口，藉此達到分離組蛋白的效果。所以當學生添加十二烷基硫酸鈉(sodium dodecyl sulfate)時，會因為 SDS 所形成的微胞表面帶負電包覆在組蛋白的表面，然而分子量較大的組蛋白會因為表面所包覆的負電荷較多而會以較快速度被帶往正極，反之分子量較小的組蛋白負電荷較小而會較慢被帶往正極。因此學生以篩分介質濃度 0.5% HEC 探討當界面活性劑濃度增加對分離效率的影響，由圖 2-18 中可以發現當 SDS 的加入可以有效的改善分離效率，解析度也隨之增加，其最好的條件為添加 20 mM SDS 與上述未添加界面活性劑的圖相比其解析度改善很多，但當我們將界面活性劑的濃度添加至 30 mM SDS 時會因為所形成的微胞過多組蛋白移動速度過快而導致分離效率變差，也會產生過多的焦耳熱，所以在此實驗中學生所測試分離效率最佳的是為在 0.4 M TB(Tris-borate)pH 10.0 添加 0.5 % HEC 而界面活性劑濃度為 20 mM SDS。

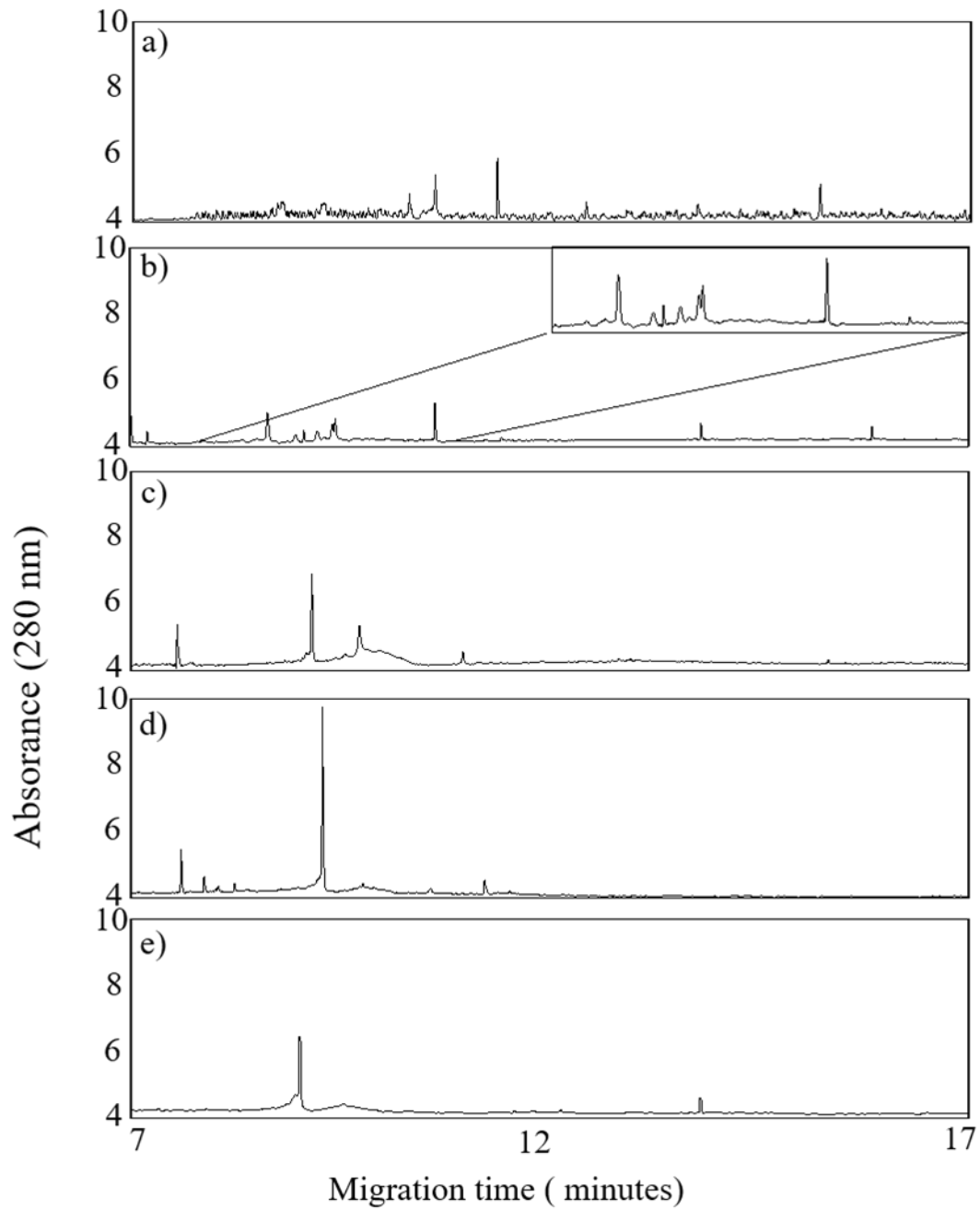


圖 2-18 固定 HEC 濃度添加 SDS 對組蛋白分離之影響。

Capillary : 1.5 M TB buffer pH 10。Inlet,Outlet : 0.5% HEC in 0.4 M TB buffer pH 10, SDS 添加在緩衝溶液內。a) 10 mM SDS、b) 20 mM SDS、c) 30 mM SDS、d) 40 mM SDS、e) 50 mM SDS。其他條件同圖 2-8。

2.4.5 固定 SDS 濃度改變 HEC 濃度對組蛋白分離之影響

當界面活性劑被加入在緩衝溶液時，會形成微胞包圍著我們所偵測的組蛋白，使組蛋白表面充滿負電荷，則會被帶往正極，所以學生固定界面活性劑的濃度，使存在毛細管內的微胞數量和包圍在組蛋白外的微胞為一固定值，由前述的實驗學生發現在界面活性劑的濃度為 20 mM SDS 分離效率是最佳的，所以接下來的實驗在此條件下改變聚合物濃度探討在具有界面活性劑的緩衝溶液中，篩分介質不同的濃度對分離效率的影響。在實驗中所選用的篩分介質為平均分子量 250,000 Da 的羥乙基纖維素(HEC)，因為與其他常用的篩分介質比較其分子量較低，所以在製成濃度較高的聚合物緩衝溶液時，其形成的孔隙會較小，所以會適用於分離組蛋白。在此實驗中學生所配置的濃度由 0.1%、0.5%、及 1% 的 HEC 由圖 2-19 中發現把聚合物的濃度降至 0.1% 時，由於篩分介質的加入會抑制電滲流所以當加入的聚合物濃度，僅包含 0.1% 時，對於分離組蛋白並沒有太大的益處，若將濃度提高至 1% 時，HEC 的黏度會增加，進而抑制電滲流使分離時間增加，導致分離效率變差，所以我們測試出來在毛細管內填充 1.5 M TB pH 10.0，而緩衝溶液濃度為 0.4 M TB pH 10.0 add 20 mM SDS 最優化的分離聚合物濃度為 0.5% HEC。

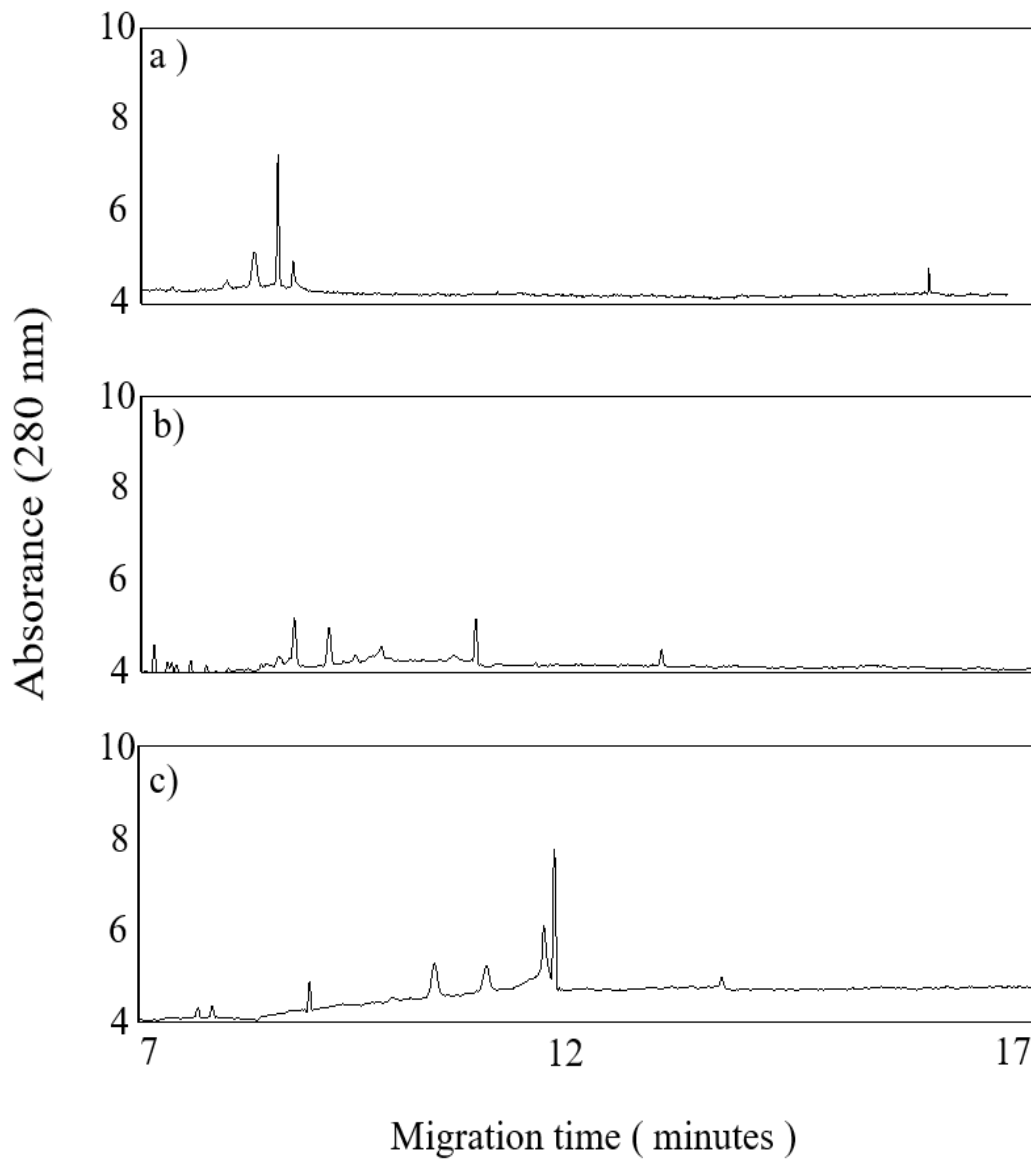


圖 2-19 添加 SDS 後 HEC 濃度對組蛋白分離之影響。

Capillary : 1.5 M TB buffer pH 10 , Inlet,Outlet : 0.4 M TB buffer pH 10

add 20 mM SDS , HEC 添加在緩衝溶液內。a) 0.1% HEC、b) 0.5% HEC、

c) 1 % HEC。其他條件同圖 2-8。

2.4.6 利用樣品堆積偵測組蛋白

在毛細管電泳中，樣品堆積時常被用來增加偵測極限，因為 UV-vis 偵測器其本身的偵測極限與其他如螢光系統相比並無法達到這麼低的偵測極限，所以學生利用樣品堆積的方式能有效的增加圖譜的判別性。其原理是藉由增加分析物進樣的時間，透過溶液黏度不同或是緩衝溶液中離子強度不同，造成單位電場不同，使分析物能在毛細管的區間內堆積濃縮，並大幅的增加毛細管電泳之偵測極限。從圖 2-19 可觀察到從進樣時間增長 10 秒，30 秒及 60 秒時，其吸收強度也跟著增強，因此我們可以證明增長樣品進樣時間，此方法確實可增加吸收度及圖形的辨別度，在將來訊號標定的部分打下良好的基礎。

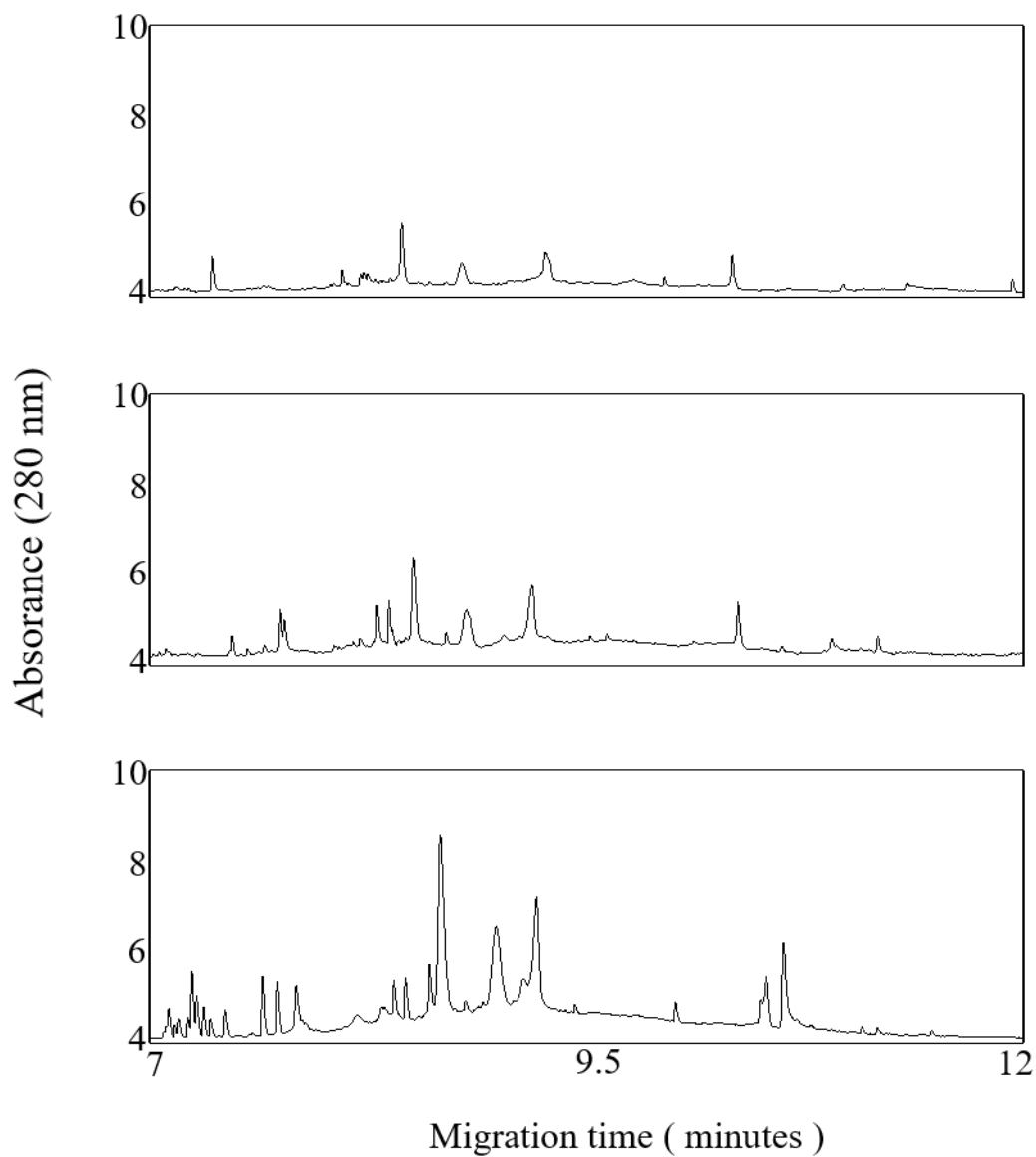


圖 2-20 樣品堆積偵測組蛋白之影響。

Capillary : 1.5 M TB buffer pH 10.0 , Inlet,Outlet : 0.5% HEC in 0.4 M TB

buffer pH 10 add 20 mM SDS 。進樣時間為 a) 10 sec 、b) 30 sec 、c) 60

sec 。其他條件同圖 2-8 。

2.5 組蛋白與腫瘤的發生

惡性腫瘤一直是人類死因之首，然而關於癌症復發之原因以及癌細胞會在人體內存活的原因，一直是各界熱烈討論並且關注的議題，同時也是現代醫療能更加突破瓶頸之關鍵。現今有一項由倫敦克里克研究院以及耶路撒冷希伯來大學的研究人員所共同領導的國際研究，揭示了癌細胞即使在侵略性治療後，仍會復發的生存機制。在這項研究中，研究學者針對癌腫瘤細胞轉變成癌幹細胞的機制進行闡述，這可能便是讓癌細胞能長期生長且生存在人體內的原因^[61]。

癌症在人體內發展時，癌細胞在生物學性質上並不是均一的，並且在腫瘤內的發展會有不同的貢獻。只有一部分的癌細胞會形成新的腫瘤或轉移至其他地方，這些細胞我們便稱為癌幹細胞。目前在了解腫瘤的性質、藥物敏感以及能夠有效治療並清除腫瘤細胞的主要挑戰，然而人體經過化療藥物作用後，都會遺留下小部分的癌幹細胞，因此如何辨識腫瘤中的癌幹細胞，並了解不同腫瘤之間的差異，以做為檢測疾病發展進程中的弱點便有其重要性^[62-64]。

過去十年來對人類癌症基因組的綜合分析顯示，在許多癌症中參與基因表達^[65-67]，DNA 修復^[68, 69]和 DNA 複製^[70-72]的表觀遺傳調控蛋白都出現了突變，在表觀遺傳學的研究中，組蛋白本身便是重要的角色為了鑑定腫瘤細胞中的癌幹細胞，研究人員便進行表觀遺傳學機制

的研究，以區分出具有無限分裂性質與生長潛能的細胞以及缺乏這些能力的細胞兩者之間不同的表現差異^[73, 74]。結果顯示，H1.0 組蛋白與癌細胞的分裂程度呈現反比關係，隨著 H1.0 組蛋白下降，癌細胞失控分裂的潛能越大，反之 H1.0 組蛋白增加則可以有效的避免癌細胞分裂之發生，藉此證實失去 H1.0 組蛋白是癌幹細胞之特徵，這項特徵對於癌幹細胞維持分裂能力以及產生生長的潛能具有其必要性^[75, 76]。

其他種類的組蛋白如組蛋白變體(Histone Variants)3.3，是常規組蛋白的一種變體。H3.3 在蛋白質一級結構上與經典組蛋白 H3(H3.2 和 H3.1)^[77, 78]高度相似，僅有 4 個和 5 個胺基酸殘基不同，但有一些研究證據顯示 H3.3 在基因轉錄調控核細胞發育分化過程中表現出不同於組蛋白 H3 的功能^[79-82]。在哺乳動物中編碼 H3.3 的 H3F3A^[83, 84]和 H3F3B 基因突變，被發現與一些兒童及青少年腫瘤有關^[85]，如非腦幹小兒成膠細胞瘤(非 BS-PG)^[86]、軟骨母細胞瘤和橋腦神經細胞瘤(DIPG)^[87-89]有關聯。軟骨母細胞瘤通常是在青春期的軟骨中發生的一類良性腫瘤，有研究人員之前發現，約 95% 的腫瘤樣品攜帶名為 H3 組蛋白的蛋白質突變。

為了探討 H3 組蛋白突變是否導致腫瘤以及如何導致腫瘤，研究人員將突變的 H3 組蛋白導入小鼠骨髓間充質祖細胞 (mesenchymal

progenitor cells, MPC), 正常情況下該細胞可發育分化成軟骨、骨和脂肪。在實驗室培養過程中, 這些帶突變的細胞失去了分化的能力。接著, 研究人員將突變細胞注入到小鼠體內, 最終在小鼠體內發現了富含 MPC 的未分化肉瘤。儘管之前的研究已證實某些類型的腫瘤(比如軟骨母細胞瘤) 帶有 H3 組蛋白突變且並無其他突變, 但這項研究第一次證明了該突變確實能導致腫瘤。接下來, 研究人員試圖了解突變如何導致腫瘤的發展。他們發現, 當突變存在時, 細胞鎖定在增殖狀態, 這意味著它不斷地分裂, 從而導致腫瘤。具體來講, 該突變抑制了能為組蛋白添加甲基基團的酶(組蛋白甲基化酶), 這類酶對基因的正常表達至關重要。

近期對於 H3.3 突變的抑癌機制展開研究, 證實在培養物模型以及原代腫瘤中, H3.3K27M^[90] 不僅可以影響突變組蛋白尾(Histone tail) 的甲基化潛能, 還可以影響 H3K27me 的整體甲基化。2014 年, 來自 Stowers 醫學研究所發表在 Science 雜誌上的一項果蠅研究發現, H3.3K27M 異位表達上模擬了 PRC2 突變, 降低了 H3K27me₃ 整體甲基化的現象, 強有力地表明了這些突變實際上驅動了癌症, 並鑑別出了有可能為癌症治療靶向的互作夥伴蛋白和信號通路, 進一步支持了上述研究發現^[91, 92]。而 Lewis 等證實 H3.3K36M 引起了 H3.3K36me 整體下降的狀態^[93]。H3.3 突變有可能通過改變局部或整體的甲基化

模式，重塑表觀基因組來發揮了致癌驅動因子作用^[86]。Haitao Li 教授也證實了在 H3.3 內的 BS69/ZMYND11 是為 H3.3K36me 的閱讀器此研究可以的將組蛋白變體介導的轉錄延伸控制與腫瘤抑制關聯起來^[94]。藍蜚與施揚教授則在另一項研究中證實，BS69/ZMYND11 是 H3.3K36me₃ 特異性地閱讀器以及內含子保留的一個調控因子，揭示出 BS69 將組蛋白 H3.3K36me₃ 與受控 RNA 剪接聯繫到一起，由此位探討 H3.3 的生物學以及他與癌症的關聯提供了一條新途徑^[95-97]。

2.5.1 不同癌症細胞中組蛋白之分離

由上述文章中我們可知組蛋白與癌症之間有著密不可分的關係，可以藉由分離組蛋白的圖譜有效的判別組蛋白在不同癌症細胞中的差異性，因此我們利用前一節所測試出最優化的分離條件，本實驗使用 0.5 % HEC，緩衝溶液則使用 0.4 M TB buffer pH 10.0 內含 20 mM SDS，進行電泳分離同樣以酸萃取的方式萃取出不同癌症細胞中的組蛋白。其中包括：鼻咽癌細胞(TW02)、子宮頸癌細胞(Hela)、肺癌細胞(A549)和肝癌細胞(Huh 7)若以肝癌細胞(Huh 7)為標準，由圖 2-21 中我們發現在不同種類的癌症細胞中的組蛋白其組蛋白的含量差異性很大，然而因為尚未將訊號標定完成，並未能準確地將不同種類的組蛋白含量之差異做一個有力的描述。

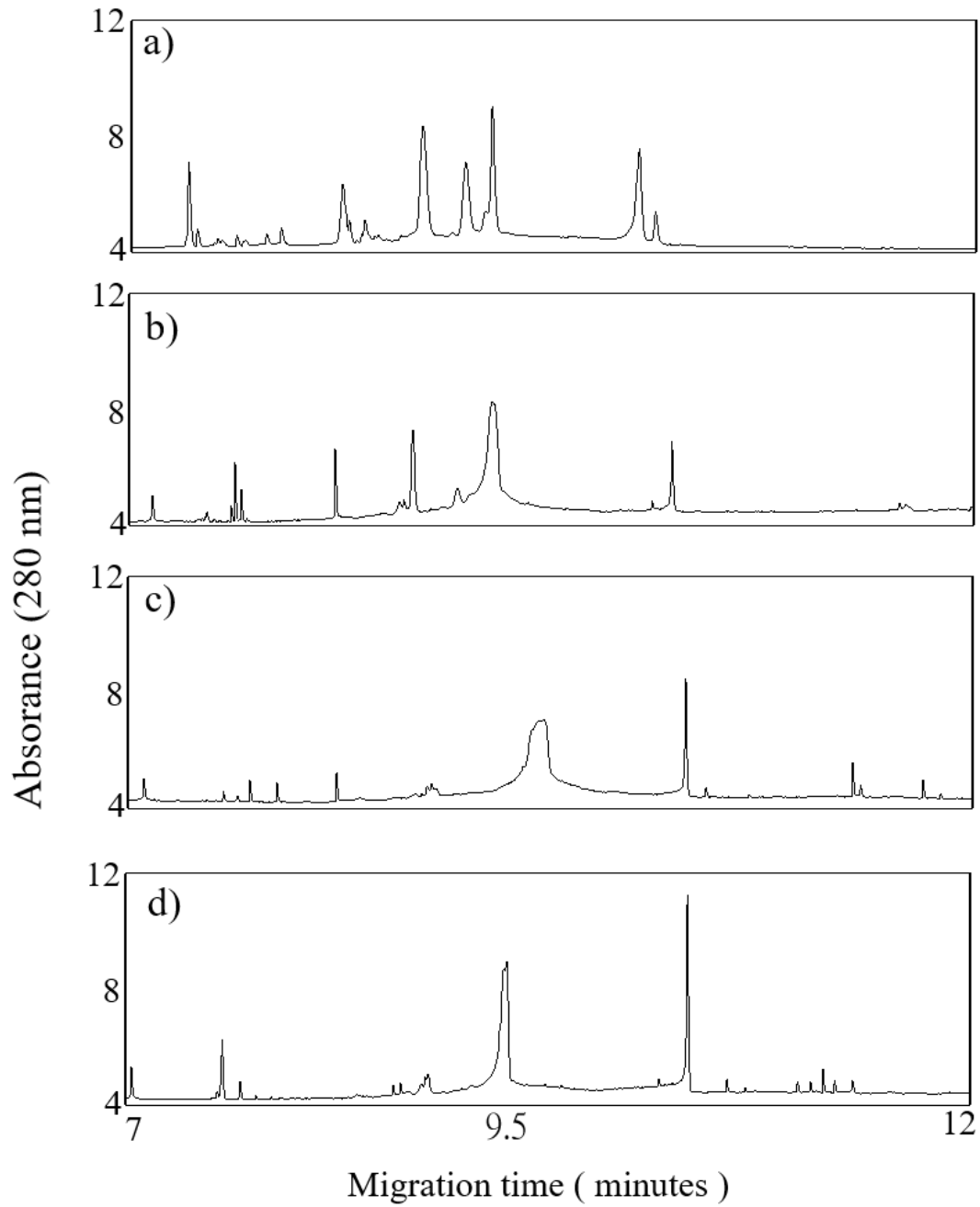


圖 2- 21 不同癌症細胞中組蛋白之分離。

Hydrodynamic injection : 60 sec , Capillary : 1.5 M TB buffer pH 10.0 ,

Inlet,Outlet : 0.5% HEC in 0.4 M TB buffer pH 10 add 20 mM SDS 。 a)

Huh7 、 b) A549 、 c) Hela 、 d) TW02 。 其他條件同圖 2-8 。

2.6 利用毛細管電泳暨雷射誘發螢光分離組蛋白 H1

毛細管電泳暨雷射誘發螢光 (capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence, CE-LIF) 具有高分離效率、高靈敏度及消耗樣品少等優點，因為 CE-LIF 能夠分離去氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA)、蛋白質 (Protein)、胺基酸及醣類等生物樣品[98]，已成為現今生物分析上重要的分析工具。在本研究中利用螢光抗體技術，使一抗(Anti-5-methylcytosine mouse)能與組蛋白 H1 特異性結合，在接上二抗(Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG) 其主要作用是檢測抗體的存在放大一抗的信號，並且能有具有螢光標籤能夠專一的辨識出一抗(Anti-5-methylcytosine mouse)。本實驗最終目的是透過毛細管電泳暨雷射誘發螢光能夠有效的標識出不同種類的組蛋白，並且能夠作為紫外光/可見光偵測器結合毛細管電泳所分離出來的圖譜的佐證，進而標定不同種類組蛋白之訊號。

2.6.1 戊二醛固定抗體之條件

2.6.1.1 二抗(Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG)固定條件

首先會將二抗至於含有 25 mM HEPES pH 7.4 及 100 mM NaCl 的溶液中 15 分鐘使蛋白能在溶液中平衡，接著將戊二醛加入溶液中反應所需之時間，最後加入最終濃度為 6.9 mM SDS 終止反應。

2.6.1.2 一抗 (Anti-5-methylcytosine mouse) 接二抗 (Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG) 固定條件

首先會將一抗和二抗至於含有 25 mM HEPES pH 7.4 及 100 mM NaCl 的溶液中 15 分鐘使蛋白能在溶液中平衡，接著將溶液放置 37 °C 反應一小時。接著將戊二醛加入溶液中反應所需之時間，最後加入最終濃度為 6.9 mM SDS 終止反應。

2.6.1.3 組蛋白(Histone)接一抗(Anti-5-methylcytosine mouse)接二抗(Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG)固定條件

首先會將一抗和組蛋白至於含有 25 mM HEPES pH 7.4 及 100 mM NaCl 的溶液中 15 分鐘使蛋白能在溶液中平衡，接著將溶液放置 37°C 反應一小時。然後將二抗加入溶液內，放置 37°C 反應一小時。接著將戊二醛加入溶液中反應所需之時間，最後加入最終濃度為 6.9 mM SDS 終止反應。

2.6.2 儀器設備及系統架構

所搭配的毛細管電泳裝置為自行組裝如圖 2-22。高電壓供應器由 Gamma High Voltage Research 公司 (Ormond, FL, USA) 購買，用來驅動電泳，高壓電的電極輸出端會穿過自製的 plexiglass box 防止觸電。所採用的激發光源係由唐裕有限公司所購買之固態雷射，其激發波長為 532nm，功率為 10 mW。首先將雷射光平行置於桌面再由凸

透鏡將雷射光聚焦於毛細管，當接上染料之抗體通過偵測視窗時，染料就會被雷射激發而產生特定波長之螢光，螢光在 90° 方向利用 10× 接物鏡 (numerical aperture = 0.25) 收集之後，藉由 568 nm 的干涉濾片 (interference filter) 過濾光源干擾及不需要的散射光，最後再使用光電倍增管 (R3896, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) 偵測螢光訊號。訊號經光電倍增管放大後，經由 10 Ω 的電阻將產生的電流訊號轉換成電壓訊號，並由 24 - bit 數位類比轉換器 (A/D converter, JMBS Development) 以 10 Hz 的頻率擷取訊號並轉換成數位資料儲存於電腦中。最後運用層析軟體 Clarity (DataApex, Prague, Czech Republic) 將訊號轉換成電泳圖。本實驗是在一密閉的黑箱裡進行以避免環境光源的干擾。

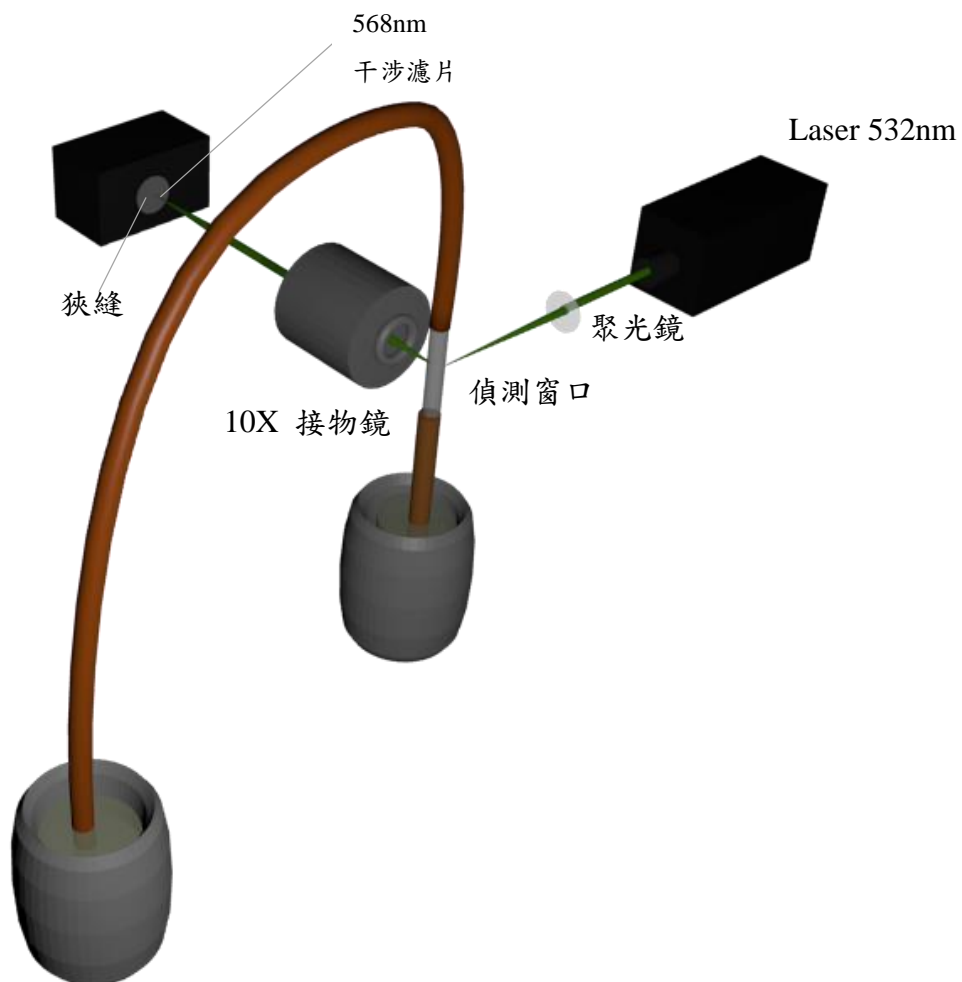


圖 2-22 儀器裝置示意圖。

2.6.3 HEC 添加對分離之影響

在本實驗中利用螢光抗體技術，目的是為了有效的標識出不同種類的組蛋白，然而抗體與抗原之間的作用力完全是依靠非共價鍵的鍵結，當以結合好的抗體與抗原在進入毛細管內分離時會因為電壓太大導致鍵結斷裂，因此選用 Protein Cross-Linking 固定抗體與抗原之間的鍵結，利用戊二醛固定蛋白質使抗體與抗原在分離時不會因為電壓而分開，藉此觀察出訊號之變化。由圖中觀察當緩衝溶液僅包含鹽類時，對於抗體的分離並沒有太大的幫助，因此學生利用加入聚合物的方式，形成網狀結構增加分離效率，當緩衝溶液內加入 0.1% 的 PEO(M_{ave} 8,000,000 g/mol)，能夠觀察到訊號的明顯變化。

2.6.4 戊二醛濃度對分離之影響

上述實驗所使用之系統，圖中可以看到很多訊號，但因為訊號太多導致難以判別抗體反應是否成功，因此選用降低戊二醛濃度的方式以減少再進行蛋白質固定時，將過多不必要的蛋白質固定，導致在判斷訊號時會有誤判的現象發生，並且由圖 2-26 中學生利用改變一抗濃度觀察是否為固定過多的蛋白質，可以發現當一抗濃度降低時訊號隨之變低，由此可知所出現過多的訊號為其他蛋白質經由固定過程中所產生的散色光，然而由圖 2-25 中可以觀察出當戊二醛濃度降低至

2%時，與原本的 4%相比訊號高度降低許多，因此選用此條件做進行
接下來的實驗。

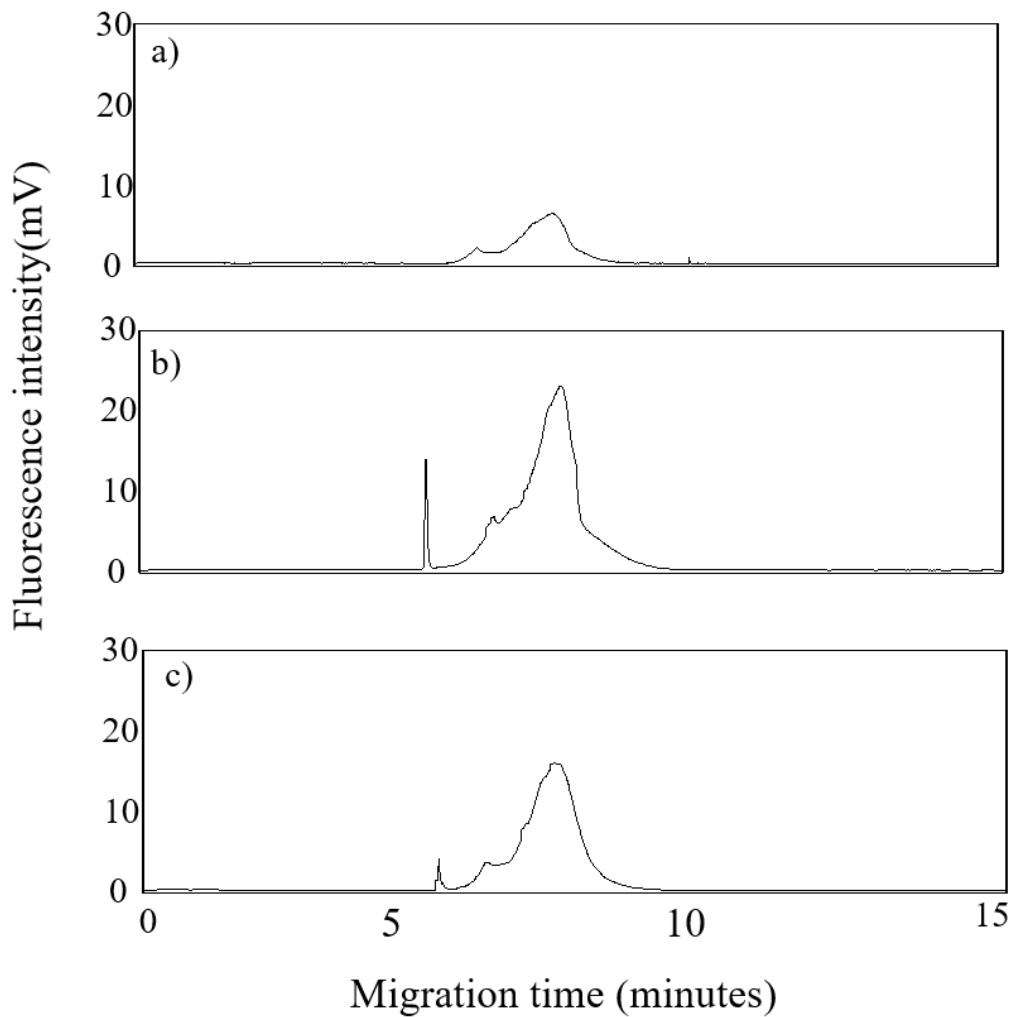


圖 2-23 緩衝溶液分離抗體。

Voltage : +10 kV , Capillary : 1.5 M TB pH10.0 , Inlet, Outlet : 400 mM TB buffer pH 9.0 add 10 mM SDS 。 固定條件 : 25 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl , Glutaraldehyde 4% ,反應 10 分鐘。終止反應: SDS 6.9 mM 。 a) Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG (0.5 ng/ μ L) 、 b) Anti-5-methylcytosine mouse(0.25 ng/ μ L) + Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG (0.5 ng/ μ L) 、 c) Histone(12.5 ng/ μ L) + Anti-5-methylcytosine mouse (0.25 ng/ μ L) + Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG (0.5 ng/ μ L) 。

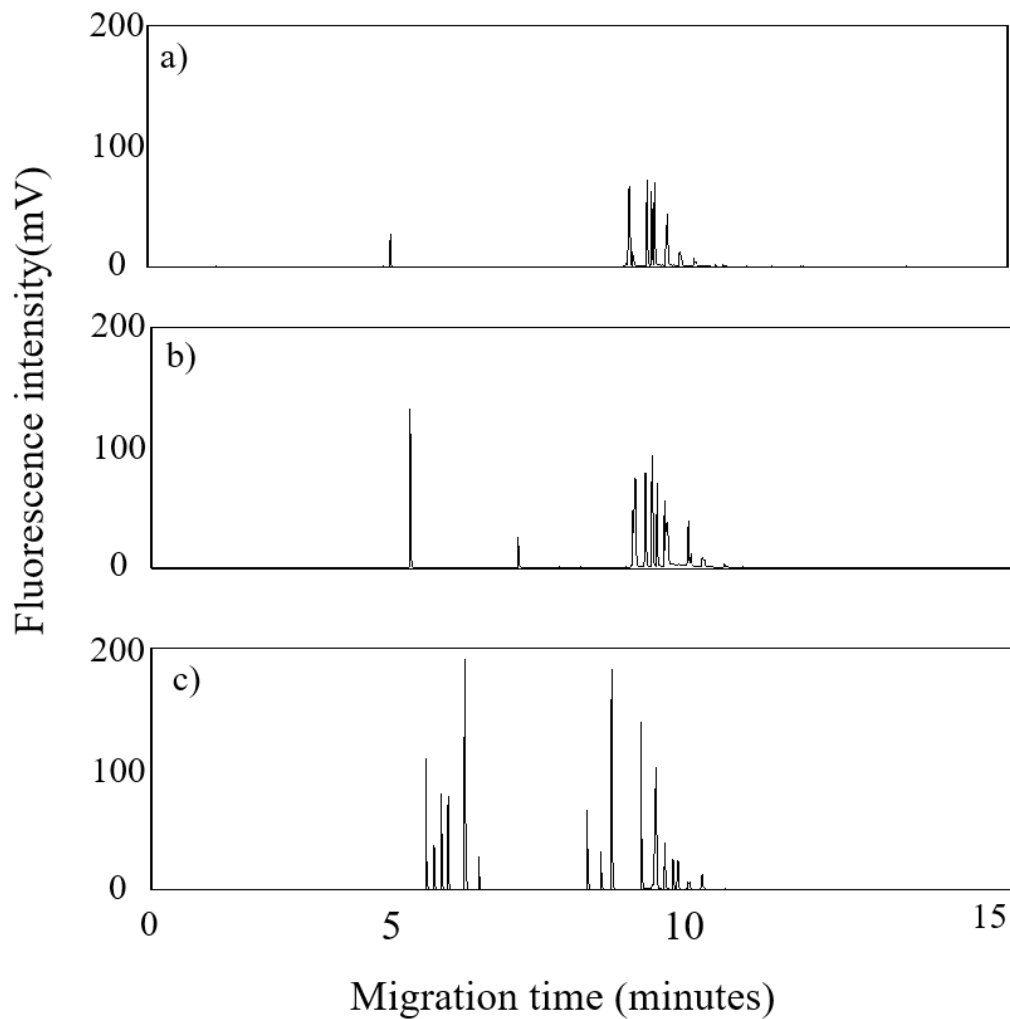


圖 2-24 HEC 添加對抗體分離之影響。

Inlet, Outlet : 0.1 % 8M PEO in 400 mM TB buffer pH 9.0 add 10 mM

SDS。固定條件： Glutaraldehyde 4% ,反應 10 分鐘。

a) Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG (0.5 ng/ μ L) 、

b) Anti-5-methylcytosine mouse(0.25 ng/ μ L) + Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG (0.5 ng/ μ L) 、

c) Histone(12.5 ng/ μ L) + Anti-5-methylcytosine mouse (0.25 ng/ μ L) + Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG (0.5 ng/ μ L)。其他條件同圖 2-23。

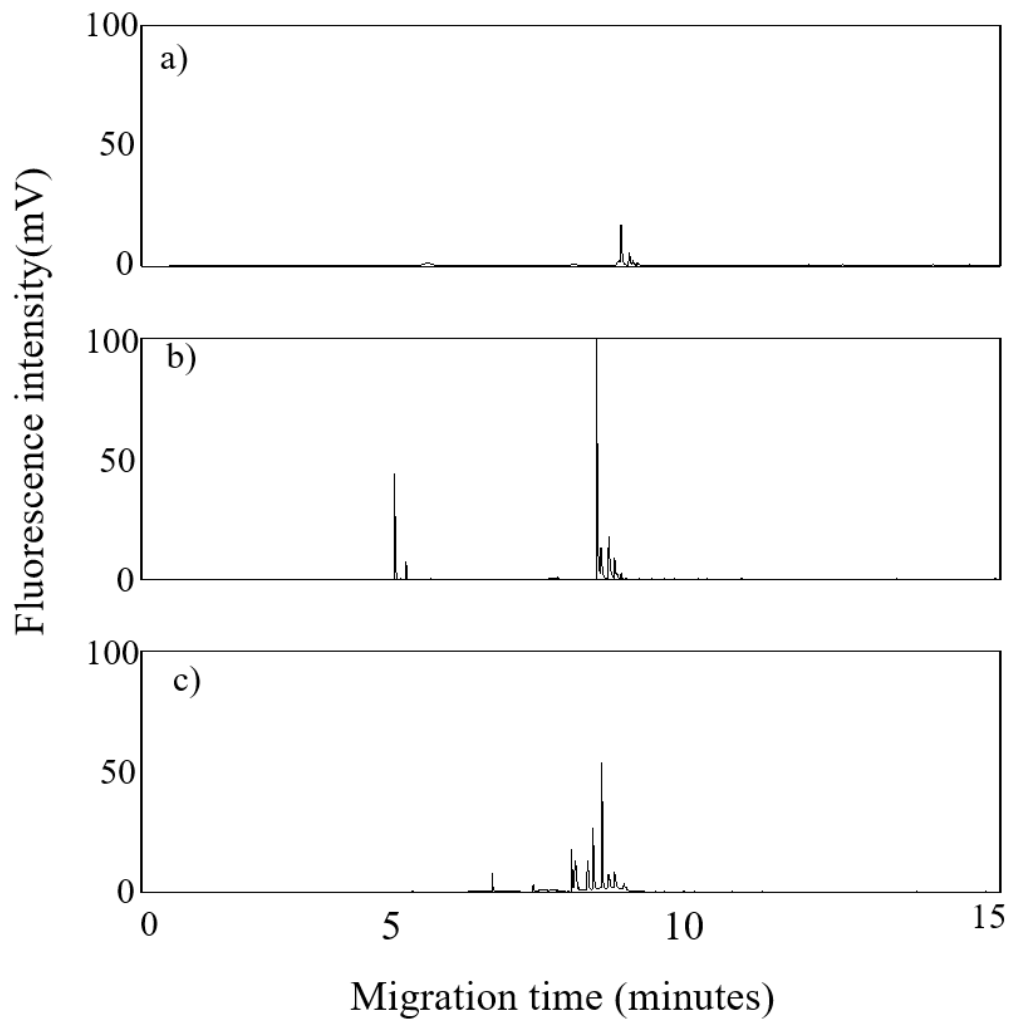


圖 2-25 戊二醛濃度對抗體分離之影響。

Inlet, Outlet : 0.1 % 8M PEO in 400 mM TB buffer pH 9.0 add 10 mM

SDS。固定條件： Glutaraldehyde 2% ,反應 10 分鐘。

a) Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG (0.5 ng/μL) 、

b) Anti-5-methylcytosine mouse(0.25 ng/μL) + Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG (0.5 ng/μL) 、

c) Histone(12.5 ng/μL) + Anti-5-methylcytosine mouse (0.25 ng/μL) + Alexa Fluor 532-goat anti-mouse IgG (0.5 ng/μL)。其他條件同圖 2-23。

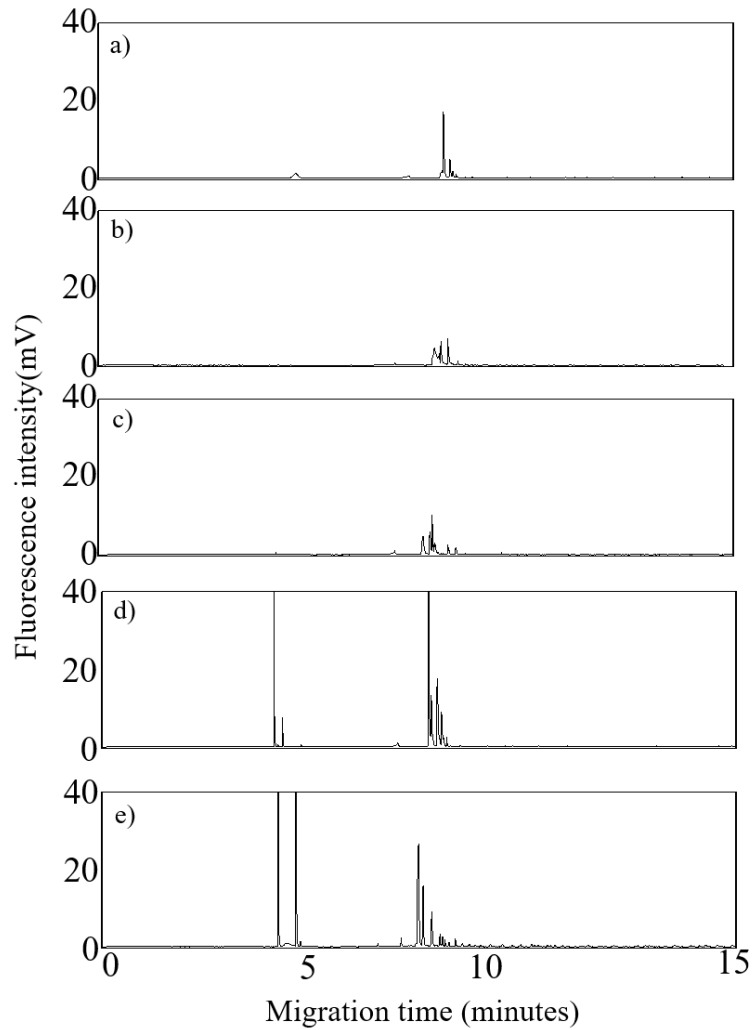


圖 2-26 一抗濃度對抗體分離之影響之影響。

Inlet, Outlet : 0.1 % 8M PEO in 400 mM TB buffer pH 9.0 add 10 mM

SDS。固定條件： Glutaraldehyde 2% ,反應 10 分鐘。

a) Anti-5-methylcytosine mouse(0 ng/ μ L) 、

b)Anti-5-methylcytosine mouse(0.025 ng/ μ L) 、

c) Anti-5-methylcytosine mouse (0.05 ng/ μ L) 、

d) Anti-5-methylcytosine mouse (0.25 ng/ μ L) 、

e) Anti-5-methylcytosine mouse (1 ng/ μ L) 。其他條件同圖 2-23。

2.7 結論

此實驗提供了簡單的以方法酸萃取出組蛋白，並且以毛細管結合紫外光可見光譜儀能高效率與符合經濟效益樣品低消耗等優點來分離樣品。並且透過平衡態電泳尋找出最佳化的濃度的聚合物和界面活性劑的條件有效的在 10 分鐘內將癌症細胞內的組蛋白分離開來，然而十二烷基硫酸鈉(SDS)及篩分介質的添加，有效的改善蛋白質吸附毛細管壁與分離效率不佳的缺點。再以非連續態系統測試更佳條件，而且能探討聚合物濃度與界面活性劑濃度之間的關係。並且相較於平衡態電泳能得到更佳的的解析度，再利用此條件對於不同癌症細胞做分離探討之間的差異。再訊號標定部分與螢光系統配合期望能夠有效地取得相關的資訊。未來希望可使用相同方法將更多組蛋白的部分分離出來，例如組蛋白修飾，這些修飾包括乙醯化 (acetylation)、甲基化 (methylation)、泛素化 (ubiquitylation)、磷酸化(phosphorylation)並能去探討其與癌症之間的關聯性。

	Sample	Capillary	Inlet, Outlet	Voltage	Polymer (% w/v)	SDS (mM)
圖2-7	Huh7	0.2 M TB pH 9.0 + 20 mM SDS		+10kV	0%	20 mM SDS
				+15kV		
				+20kV		
圖2-8	Huh7	100 mM Acetate buffer pH 3.0		+15kV	0%	0 mM SDS
		100 mM Acetate buffer pH 4.0				
		10 mM HEPES buffer pH 7.0				
圖2-9	Huh7	0.4 M TB buffer pH 10.0		+15kV	0%	0 mM SDS
						10 mM SDS
						20 mM SDS
圖2-10	Huh7	0.2 M TB buffer pH 8.0 + 20 mM SDS		+15kV	0%	20 mM SDS
		0.4 M TB buffer pH 8.0 + 20 mM SDS				
		0.6 M TB buffer pH 8.0 + 20 mM SDS				
		0.8 M TB buffer pH 8.0 + 20 mM SDS				

表 2-1 平衡態電泳條件總表(1)

	Sample	Capillary	Inlet, Outlet	Voltage	Polymer (% w/v)	SDS (mM)
圖2-11	Huh7	0.2 M TB buffer pH 9.0 + 20 mM SDS		+15kV	0%	20 mM SDS
		0.4 M TB buffer pH 9.0 + 20 mM SDS				
		0.6 M TB buffer pH 9.0 + 20 mM SDS				
		0.8 M TB buffer pH 9.0 + 20 mM SDS				
圖2-12	Huh7	0.2 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS		+15kV	0%	20 mM SDS
		0.4 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS				
		0.6 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS				
		0.8 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS				
圖2-13	Huh7	0.2 M TB buffer pH 9.0 + 20 mM SDS		+15kV	0.1% HPMC	20 mM SDS
					0.5% HPMC	
					0.1% HEC	
					0.5% HEC	
圖2-14	Huh7	0.2 M TB buffer pH 9.0 + 20 mM SDS		+15kV	0.1% HPMC	20 mM SDS
					0.5% HPMC	
					0.1% HEC	
					0.5% HEC	

表 2-2 平衡態電泳條件總表(2)

	Sample	Capillary	Inlet, Outlet	Voltage	HEC (% w/v)	SDS (mM)
圖2-15	Huh7	1.5 M TB buffer pH 10.0	0.2 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS	+15kV	0%	20 mM
			0.4 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS			
			0.6 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS			
			0.8 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS			
圖2-16	Huh7	1.5 M TB buffer pH 10.0	0.4 M TB buffer pH 10.0 + 20 mM SDS	+15kV	0%	0 mM
					0.5%	
					1%	
					2%	
圖2-17	Huh7	1.5 M TB buffer pH 10.0	0.4 M TB buffer pH 10.0	+15kV	0%	10 mM
						20 mM
						30 mM
						40 mM
						50 mM
圖2-18	Huh7	1.5 M TB buffer pH 10.0	0.4 M TB buffer pH 10.0	+15kV	0.5%	10 mM
						20 mM
						30 mM
						40 mM
						50 mM
圖2-19	Huh7	1.5 M TB buffer pH 10.0	0.4 M TB buffer pH 10.0+ 20 mM SDS	+15kV	0.1%	20 mM
					0.5%	
					1%	

表 2-3 非連續態電泳條件總表(1)

Sample	Capillary	Inlet, Outlet	Voltage	Hydrodynamic injection(sec)
Huh7	1.5 M TB buffer pH 10.0	0.5% HEC in 0.4 M TB buffer pH 10 add 20 mM SDS	+15kV	10 sec
				30sec
				60sec
Huh7	1.5 M TB buffer pH 10.0	0.5% HEC in 0.4 M TB buffer pH 10 add 20 mM SDS	+15kV	60sec
A549				
Hela				
TW02				

表 2-4 非連續態電泳條件總表(2)

2.8 參考文獻

1. Gursoy G, Liang J: **Three-dimensional chromosome structures from energy landscape**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016, **113**(43):11991-11993.
2. Khesin RB, Leibovich BA: [**Chromosome structure, histones and gene activity in Drosophila**]. *Molekuliarnaia biologii* 1976, **10**(1):3-34.
3. Lewis CD, Laemmli UK: **Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions**. *Cell* 1982, **29**(1):171-181.
4. Weintraub H, Van Lente F: **Dissection of chromosome structure with trypsin and nucleases**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1974, **71**(10):4249-4253.
5. Kathiria P, Kovalchuk I: **In situ analysis of DNA methylation in plants**. *Methods in molecular biology* 2010, **631**:41-48.
6. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JPJ: **Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer**. *Cancer research* 1998, **58**(23):5489-5494.
7. White-Ziegler CA, Angus Hill ML, Braaten BA, van der Woude MW, Low DA: **Thermoregulation of Escherichia coli pap transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor**. *Molecular microbiology* 1998, **28**(6):1121-1137.
8. Cleaver J: **Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum**. *Nature* 1968, **218**(5142):652-656.
9. Collins AR: **The comet assay for DNA damage and repair**. *Molecular biotechnology* 2004, **26**(3):249.
10. Blagosklonny MV, Pardee AB: **The restriction point of the cell cycle**. *Cell cycle* 2002, **1**(2):102-109.
11. Lozzio CB, Lozzio BB: **Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome**. *Blood* 1975, **45**(3):321-334.
12. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR: **A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia**

- chromosome in chronic myelocytic leukaemia.** *Nature* 1982, **300**(5894):765-767.
13. Solomon E: **Colorectal cancer genes.** *Nature* 1990, **343**(6257):412.
 14. Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS: **Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer.** *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-* 1993, **260**:810-810.
 15. Holliday R: **Epigenetics: a historical overview.** *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 2006, **1**(2):76-80.
 16. Riggs AD: **X inactivation, differentiation, and DNA methylation.** *Cytogenetic and genome research* 1975, **14**(1):9-25.
 17. Altaf M, Saksouk N, Cote J: **Histone modifications in response to DNA damage.** *Mutation research* 2007, **618**(1-2):81-90.
 18. Davie JR, Saunders CA, Walsh JM, Weber SC: **Histone modifications in the yeast *S. Cerevisiae*.** *Nucleic acids research* 1981, **9**(13):3205-3216.
 19. Ferreira H, Flaus A, Owen-Hughes T: **Histone modifications influence the action of Snf2 family remodelling enzymes by different mechanisms.** *Journal of molecular biology* 2007, **374**(3):563-579.
 20. Gomez D, Shankman LS, Nguyen AT, Owens GK: **Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections.** *Nature methods* 2013, **10**(2):171-177.
 21. Kizer KO, Xiao T, Strahl BD: **Accelerated nuclei preparation and methods for analysis of histone modifications in yeast.** *Methods* 2006, **40**(4):296-302.
 22. Abernethy TJ, Avery OT: **The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood.** *Journal of experimental medicine* 1941, **73**(2):173-182.
 23. Cobb M: **Oswald Avery, DNA, and the transformation of biology.** *Current Biology* 2014, **24**(2):R55-R60.
 24. Watson JD, Crick FH: **Molecular structure of nucleic acids.** *Nature* 1953, **171**(4356):737-738.
 25. Bird A: **DNA methylation patterns and epigenetic memory.** *Genes & development* 2002, **16**(1):6-21.
 26. Robertson KD: **DNA methylation and human disease.** *Nature Reviews Genetics* 2005, **6**(8):597-610.

27. Robertson KD, Wolffe AP: **DNA methylation in health and disease.** *Nature Reviews Genetics* 2000, **1**(1):11-19.
28. Bird AP: **CpG-rich islands and the function of DNA methylation.** *Nature* 1986, **321**(6067):209-213.
29. Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB: **DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer.** *Oncogene* 2001, **20**(24):3156-3165.
30. Issa J-P: **CpG island methylator phenotype in cancer.** *Nature Reviews Cancer* 2004, **4**(12):988-993.
31. Alazard N, Gruffat H, Hiriart E, Sergeant A, Manet E: **Differential hyperacetylation of histones H3 and H4 upon promoter-specific recruitment of EBNA2 in Epstein-Barr virus chromatin.** *Journal of virology* 2003, **77**(14):8166-8172.
32. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE: **Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1964, **51**:786-794.
33. Draker R, Ng MK, Sarcinella E, Ignatchenko V, Kislinger T, Cheung P: **A combination of H2A.Z and H4 acetylation recruits Brd2 to chromatin during transcriptional activation.** *PLoS genetics* 2012, **8**(11):e1003047.
34. Fusauchi Y, Iwai K: **Tetrahymena histone H2A. Acetylation in the N-terminal sequence and phosphorylation in the C-terminal sequence.** *Journal of biochemistry* 1984, **95**(1):147-154.
35. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y: **Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing.** *Science* 2002, **298**(5595):1039-1043.
36. Nekrasov M, Klymenko T, Fraterman S, Papp B, Oktaba K, Kocher T, Cohen A, Stunnenberg HG, Wilm M, Muller J: **Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes.** *The EMBO journal* 2007, **26**(18):4078-4088.
37. Seymour M, Ji LX, Santos AM, Kamei M, Sasaki T, Basenko EY, Schmitz RJ, Zhang XY, Lewis ZA: **Histone H1 Limits DNA Methylation in Neurospora crassa.** *G3-Genes Genom Genet* 2016, **6**(7):1879-1889.

38. Higashi M, Inoue S, Ito T: **Core histone H2A ubiquitylation and transcriptional regulation.** *Experimental cell research* 2010, **316**(17):2707-2712.
39. Kim J, Roeder RG: **Nucleosomal H2B ubiquitylation with purified factors.** *Methods* 2011, **54**(3):331-338.
40. Osley MA: **Histone Ubiquitylation Introduction.** *Methods* 2011, **54**(3):295-295.
41. Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y: **Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage.** *Molecular cell* 2006, **22**(3):383-394.
42. Ahmad W, Shabbiri K, Nazar N, Nazar S, Qaiser S, Shabbir Mughal MA: **Human linker histones: interplay between phosphorylation and O-beta-GlcNAc to mediate chromatin structural modifications.** *Cell division* 2011, **6**:15.
43. Burke SJ, Goff MR, Lu D, Proud D, Karlstad MD, Collier JJ: **Synergistic expression of the CXCL10 gene in response to IL-1beta and IFN-gamma involves NF-kappaB, phosphorylation of STAT1 at Tyr701, and acetylation of histones H3 and H4.** *Journal of immunology* 2013, **191**(1):323-336.
44. Green GR, Gustavsen LC, Poccia DL: **Phosphorylation of Plant H2A Histones.** *Plant physiology* 1990, **93**(3):1241-1245.
45. Harshman SW, Hoover ME, Huang CS, Branson OE, Chaney SB, Cheney CM, Rosol TJ, Shapiro CL, Wysocki VH, Huebner K *et al*: **Histone H1 Phosphorylation in Breast Cancer.** *Journal of proteome research* 2014, **13**(5):2453-2467.
46. Hohmann PG: **Phosphorylation of H1-Histones in Normal and Transformed Mouse Cells.** *Cancer biochemistry biophysics* 1983, **7**(1):45-51.
47. Langan TA, Chambers TC: **H1 histone phosphorylation, cell cycle progression and chromatin structure.** *Progress in clinical and biological research* 1987, **249**:215-223.
48. Raut VV, Sainis JK: **⁶⁰Co-gamma radiation induces differential acetylation and phosphorylation of histones H3 and H4 in wheat.** *Plant biology* 2012, **14**(1):110-117.
49. Rybaczek D, Maszewski J: **Phosphorylation of H2AX histones in response to double-strand breaks and induction of premature**

- chromatin condensation in hydroxyurea-treated root meristem cells of *Raphanus sativus*, *Vicia faba*, and *Allium porrum*.** *Protoplasma* 2007, **230**(1-2):31-39.
50. Fernandez-Miranda G, Perez de Castro I, Carmena M, Aguirre-Portoles C, Ruchaud S, Fant X, Montoya G, Earnshaw WC, Malumbres M: **SUMOylation modulates the function of Aurora-B kinase.** *Journal of cell science* 2010, **123**(Pt 16):2823-2833.
 51. Kim JH, Choi HJ, Kim B, Kim MH, Lee JM, Kim IS, Lee MH, Choi SJ, Kim KI, Kim SI *et al*: **Roles of sumoylation of a reptin chromatin-remodelling complex in cancer metastasis.** *Nature cell biology* 2006, **8**(6):631-639.
 52. Yoshida MM, Ting L, Gygi SP, Azuma Y: **SUMOylation of DNA topoisomerase II alpha regulates histone H3 kinase Haspin and H3 phosphorylation in mitosis.** *Journal of Cell Biology* 2016, **213**(6):665-678.
 53. Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, Ye Z, Lee LK, Stuart RK, Ching CW: **Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression.** *Nature* 2009, **459**(7243):108-112.
 54. Esteller M: **Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps.** *Nature Reviews Genetics* 2007, **8**(4):286-298.
 55. Cedar H, Bergman Y: **Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms.** *Nature Reviews Genetics* 2009, **10**(5):295-304.
 56. Miller A, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A: **Reporting results of cancer treatment.** *Cancer* 1981, **47**(1):207-214.
 57. Marks PA, Richon VM, Breslow R, Rifkind RA: **Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs.** *Current opinion in oncology* 2001, **13**(6):477-483.
 58. Japan LCSGo: **Primary liver cancer in Japan. Clinicopathologic features and results of surgical treatment.** *Annals of surgery* 1990, **211**(3):277.
 59. Yu L, Sun Z-J, Wu S-L, Pan C-E: **Effect of resveratrol on cell cycle proteins in murine transplantable liver cancer.** *World journal of gastroenterology* 2003, **9**(10):2341.

60. Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB: **Extraction, purification and analysis of histones.** *Nature protocols* 2007, **2**(6):1445-1457.
61. Torres CM, Biran A, Burney MJ, Patel H, Henser-Brownhill T, Cohen A-HS, Li Y, Ben-Hamo R, Nye E, Spencer-Dene B: **The linker histone H1. 0 generates epigenetic and functional intratumor heterogeneity.** *Science* 2016, **353**(6307):aaf1644.
62. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, **100**(7):3983-3988.
63. Heppner GH: **Tumor heterogeneity.** *Cancer research* 1984, **44**(6):2259-2265.
64. Marusyk A, Almendro V, Polyak K: **Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?** *Nature Reviews Cancer* 2012, **12**(5):323-334.
65. Van't Veer LJ, Dai H, Van De Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, Van Der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT: **Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.** *Nature* 2002, **415**(6871):530-536.
66. Van De Vijver MJ, He YD, Van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ: **A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.** *New England Journal of Medicine* 2002, **347**(25):1999-2009.
67. Gordon GJ, Jensen RV, Hsiao L-L, Gullans SR, Blumenstock JE, Ramaswamy S, Richards WG, Sugarbaker DJ, Bueno R: **Translation of microarray data into clinically relevant cancer diagnostic tests using gene expression ratios in lung cancer and mesothelioma.** *Cancer research* 2002, **62**(17):4963-4967.
68. Olausson KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH: **DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy.** *New England Journal of Medicine* 2006, **355**(10):983-991.
69. Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP: **DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment.** *DNA repair* 2007, **6**(7):923-935.

70. Kornberg A, Baker TA: **DNA replication**: Wh Freeman San Francisco; 1980.
71. Umar A, Kunkel TA: **DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells**. *The FEBS journal* 1996, **238**(2):297-307.
72. Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF: **Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines**. *Cancer research* 1998, **58**(20):4611-4615.
73. Easwaran H, Tsai H-C, Baylin SB: **Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance**. *Molecular cell* 2014, **54**(5):716-727.
74. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM: **Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells**. *Cancer research* 2006, **66**(19):9339-9344.
75. Doenecke D, Alonso A: **Organization and expression of the developmentally regulated H1 (o) histone gene in vertebrates**. *International Journal of Developmental Biology* 2003, **40**(1):395-401.
76. Terme J-M, Sesé B, Millán-Ariño L, Mayor R, Belmonte JCI, Barrero MJ, Jordan A: **Histone H1 variants are differentially expressed and incorporated into chromatin during differentiation and reprogramming to pluripotency**. *Journal of Biological Chemistry* 2011, **286**(41):35347-35357.
77. Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y: **Histone H3. 1 and H3. 3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis**. *Cell* 2004, **116**(1):51-61.
78. Liu C-P, Xiong C, Wang M, Yu Z, Yang N, Chen P, Zhang Z, Li G, Xu R-M: **Structure of the variant histone H3. 3–H4 heterodimer in complex with its chaperone DAXX**. *Nature structural & molecular biology* 2012, **19**(12):1287-1292.
79. Panchenko T, Sorensen TC, Woodcock CL, Kan Z-y, Wood S, Resch MG, Luger K, Englander SW, Hansen JC, Black BE: **Replacement of histone H3 with CENP-A directs global nucleosome array condensation and loosening of nucleosome**

- superhelical termini.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011, **108**(40):16588-16593.
80. Dalal Y, Furuyama T, Vermaak D, Henikoff S: **Structure, dynamics, and evolution of centromeric nucleosomes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, **104**(41):15974-15981.
81. Frank D, Doenecke D, Albig W: **Differential expression of human replacement and cell cycle dependent H3 histone genes.** *Gene* 2003, **312**:135-143.
82. Wells D, Hoffman D, Kedes L: **Unusual structure, evolutionary conservation of non-coding sequences and numerous pseudogenes characterize the human H3. 3 histone multigene family.** *Nucleic acids research* 1987, **15**(7):2871-2889.
83. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang D-A, Jones DT, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S: **Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma.** *Cancer Cell* 2012, **22**(4):425-437.
84. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu X-Y, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang D-AK, Tönjes M: **Driver mutations in histone H3. 3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma.** *Nature* 2012, **482**(7384):226-231.
85. Graber MW, Schweinfest CW, Reed CE, Papas TS, Baron PL: **Isolation of differentially expressed genes in carcinoma of the esophagus.** *Annals of surgical oncology* 1996, **3**(2):192-197.
86. Project SJC sRHWUPCG: **Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas.** *Nature genetics* 2012, **44**(3):251-253.
87. Bouffet E, Tabori U, Huang A, Bartels U: **Possibilities of new therapeutic strategies in brain tumors.** *Cancer treatment reviews* 2010, **36**(4):335-341.
88. Merchant TE, Pollack IF, Loeffler JS: **Brain tumors across the age spectrum: biology, therapy, and late effects.** In: *Seminars in radiation oncology: 2010*: Elsevier; 2010: 58-66.
89. Rutka JT, Kuo J, Carter M, Ray A, Ueda S, Mainprize T: **Advances in the treatment of pediatric brain tumors.** *Expert review of Neurotherapeutics* 2004, **4**(5):879-893.

90. Reynolds N, Salmon-Divon M, Dvinge H, Hynes-Allen A, Balasooriya G, Leaford D, Behrens A, Bertone P, Hendrich B: **NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression.** *The EMBO journal* 2012, **31**(3):593-605.
91. Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS, Cordero F, Lin S, Banaszynski LA, Garcia BA, Muir TW, Becher OJ, Allis CD: **Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma.** *Science* 2013, **340**(6134):857-861.
92. Bender S, Tang Y, Lindroth AM, Hovestadt V, Jones DT, Kool M, Zapatka M, Northcott PA, Sturm D, Wang W: **Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas.** *Cancer Cell* 2013, **24**(5):660-672.
93. Li F, Mao G, Tong D, Huang J, Gu L, Yang W, Li G-M: **The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutSa.** *Cell* 2013, **153**(3):590-600.
94. Wen H, Li Y, Li H, Shi X: **ZMYND11: an H3. 3-specific reader of H3K36me3.** *Cell cycle* 2014, **13**(14):2153-2154.
95. Guo R, Zheng L, Park JW, Lv R, Chen H, Jiao F, Xu W, Mu S, Wen H, Qiu J: **BS69/ZMYND11 reads and connects histone H3. 3 lysine 36 trimethylation-decorated chromatin to regulated pre-mRNA processing.** *Molecular cell* 2014, **56**(2):298-310.
96. Hateboer G, Gennissen A, Ramos Y, Kerkhoven R, Sonntag-Buck V, Stunnenberg H, Bernards R: **BS69, a novel adenovirus E1A-associated protein that inhibits E1A transactivation.** *The EMBO journal* 1995, **14**(13):3159.
97. Masselink H, Bernards R: **The adenovirus E1A binding protein BS69 is a corepressor of transcription through recruitment of N-CoR.** *Oncogene* 2000, **19**(12):1538-1546.
98. Hu S, Dovichi NJ: **Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers.** *Analytical chemistry* 2002, **74**(12):2833-2850.

參與學術會議

1. 2015 年中國化學年會
2. 2016 年中國化學年會
3. 第二十二屆分析化學技術交流研討會
4. 第二十三屆分析化學技術交流研討會