

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

指導教授：顧野松博士

Advisor：Yesong Gu , PhD.

利用新穎質體優化人類催乳素蛋白(Prolactin)於大腸  
桿菌的表達及其純化之研究

Optimizing the overexpression of human prolactin in  
E.coli with modified plasmid and purification.

研究生：陳日賢 撰

中華民國 108 年 08 月



## 摘要

在本研究中我們探討了新穎質體 pSEI 以何種方式銜接催乳素基因(PRL)，在送出廠商定序前如何初步確認有無做出預期的質體，PCR 引子設計的考量、各種大腸桿菌菌株的使用目的以及菌株對質體表現的影響，包含蛋白的毒性測試、改善蛋白質表達方式，使目標蛋白可以在大腸桿菌系統中有更好的可溶性，增加後期純化的便利性。最後以 His-tag 做為主要的純化方法，搭配內含肽進行目標蛋白的分割，利用膠體電泳與螢光感測儀對目標蛋白的檢測數據做檢討。

關鍵字：大腸桿菌、催乳素、低溫表達、可溶性蛋白、His-tag 純化、內含肽切割

# Abstract

The specific aims of this study are to investigate what way the new plasmid-pSEI uses to bridge Prolactin(PRL), and how to initially confirm whether the expected plasmid is made before sending the sequencing. The research also shows the design considerations of *Polymerase Chain Reaction*(PCR), the purpose of usage of every *Escherichia coli* (*E.coli*) and the influence that the strain towards the plasmid performance, including the test of toxic Protein, the improvement in the expression of the protein, making the target protein gives the good solubility in the *E.coli* system, and then increasing the convenience of the later purification. The experiment uses His-tag as a main way of the purification with the intein, dividing the target protein, then reflecting the data by testing the target protein with the Gel electrophoresis and the flurosensor.

Keywords: *E.coli* 、 Prolactin 、 Low Temperature Expression 、 Soluble Protein 、 His-tag Purification 、 Intein Cleavage

## 誌謝

兩年的研究生活多虧顧野松教授、陳菀玲老師、陳東柏學長的指導，不管是知識上的傳遞或是技術上的指教，皆有賴於三位恩師的陪伴才能成就今日的我們。謝謝實驗室的先進，建信、阿麒及學昱學長們的帶領，讓我們很快的熟悉了這個實驗室的环境，像朋友一樣沒有隔閡的相處。謝謝同期奮戰的孟妘、家昌與畢翔，一起為畢業而努力，使我在生技路上並不孤單，為開發新技術而研究的感覺真好！

謝謝同期其他實驗室的夥伴，也謝謝亦師亦友的同學們，和順、禮凡、哲嘉、子容、戴維，如果沒有各位的陪伴與幫助或許這篇論文要更久的時間才會出產，謝謝專題生詩涵、君慈學妹後期大量繁雜的實驗協助，常麻煩二位到天黑真的很不好意思。

謝謝大學到碩士六年校園生活、在工讀五年中認識的所有好友、長輩、後進，以及所有對我重要的人們，因為有大家才使得我能順利的完成學業，謝謝家人、愛人的支持鼓勵與包容，也謝謝系上老師們、學長姐們的指教，今天的成就都是因各位鼎力相助而得到的，很榮幸能跟你/妳分享這份喜悅。

## 目錄

摘要.....	II
Abstract .....	III
誌謝.....	IV
表目錄.....	VII
圖目錄.....	IX
第一章 文獻回顧.....	1
1.1 何謂催乳素 .....	1
1.2 催乳素的優劣 .....	2
1.3 微生物系統.....	4
1.4 新穎質體 pSEI 的貢獻 .....	5
1.5 實驗目的與動機 .....	6
第二章 實驗材料與儀器設備 .....	8
2.1 實驗材料 .....	8
2.1.1 菌株.....	8
2.1.2 實驗藥品.....	8
2.2 實驗儀器 .....	10
第三章 實驗方法.....	14
3.1 引子設計 (Primer design) .....	14
3.2 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction) .....	16
3.3 凝膠電泳分析法 (Gel electrophoresis).....	18
3.4 DNA 萃取 (DNA Extraction).....	19
3.5 接合反應 (Ligation).....	20
3.6 勝任細胞的製備 (Competent Cell Preparation).....	21
3.7 轉型 (Transformation).....	22
3.8 質體萃取 (Plasmid Extraction).....	23

3.9 DNA 定序 (DNA Sequencing).....	24
3.10 蛋白質表達 (Protein Expression) .....	25
3.11 破菌方法 (Cell Disruption).....	26
3.12 聚丙烯醯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis , PAGE) .....	28
3.13 BCA 蛋白質定量分析法 (BCA Protein Assay).....	30
3.14 純化方法 (Purification Method) .....	32
第四章 結果與討論 .....	34
4.1 聚合酶鏈鎖反應於擴增 PRL 片段與確認質體轉型成效之試驗條件 .....	34
4.2 pSEI 與 pSEI-P 限制型內切酶酵素切割 .....	37
4.3 pSEI-P 轉型確認 .....	39
4.4 定序確認 .....	41
4.5 菌株培養的選擇 .....	44
4.6 蛋白質表達條件 .....	46
4.7 蛋白質初步純化 .....	52
4.8 蛋白質定量 .....	53
4.9 內含肽的切割條件 .....	54
第五章 結論與未來展望 .....	59
第六章 參考文獻 .....	61

## 表目錄

表 1-1 細胞與微生物表達之比較.....	5
表 1-2 臺灣十大癌症(每十萬人口)死亡率.....	7
表 2-1 實驗藥品資訊表.....	8
表 2-2 實驗儀器資訊表.....	10
表 3-1 電泳膠濃度與欲分離 DNA 分子量大小之關係.....	18
表 3-2 接合反應試劑與條件.....	21
表 3-3 抗生素配方.....	23
表 3-4 LB 培養液(基)配方.....	23
表 3-5 裂解液配方.....	27
表 3-6 破菌液體積與破菌強度設定關係.....	28
表 3-7 聚丙烯醯胺膠體濃度配方.....	29
表 3-8 蛋白質染劑作用濃度配方.....	30
表 3-9 20-2000 $\mu\text{g/ml}$ 標準線製作之濃度稀釋.....	31
表 3-10 5-250 $\mu\text{g/ml}$ 標準線製作之濃度稀釋.....	31
表 3-11 His-tag 緩衝溶液配方(pH7.4).....	33
表 4-1 PRL 之引子.....	34
表 4-2 PRL PCR 之反應物組成.....	35
表 4-3 確認轉型之引子.....	36
表 4-4 PRL 銜接於 pSEI 之試劑條件.....	36
表 4-5 切割條件.....	38
表 4-6 上清液與純化蛋白液於 BCA 檢量下吸收值.....	53
表 4-7 BCA 檢量線吸收值測定紀錄.....	54



表 4-8 內含肽於 C-terminal 與 N-terminal 切割液配方 ..... 55

## 圖目錄

圖 1-1 催乳素胺基酸序列.....	1
圖 1-2 PRL 在人體內主要的作用器官.....	3
圖 1-3 PRL 於胸腺細胞中作用的路徑關係.....	4
圖 1-4 雙硫鍵與 DTT 作用於 Intein 的裂解機制.....	6
圖 3-1 催乳素 N-terminal、C-terminal 前後 10 個胺基酸的特性.....	14
圖 3-2 常見二十種胺基酸特性.....	14
圖 3-3 PRL 與受體之 3D 結構圖.....	15
圖 3-4 Bsa I 辨識切割示意圖.....	15
圖 3-5 PCR 溫度變化與作用機制示意圖.....	17
圖 3-6 凝膠電泳製作設備.....	19
圖 3-7 液相萃取與固相萃取步驟流程圖.....	20
圖 3-8 質體萃取步驟流程圖.....	24
圖 3-9 DNA 定序介面操作說明.....	25
圖 3-10 IPTG 誘導機制.....	26
圖 3-11 His tag 與 Ni-resin 配位示意圖.....	33
圖 4-1 二階段式 PCR 溫度設定示意圖.....	35
圖 4-2 PRL 之 PCR 結果.....	35
圖 4-3 確認 PRL 銜接於 pSEI 之 PCR 溫度條件設定.....	36
圖 4-4 以 pSEI 與 pSEI-P 做模板之 PCR 結果.....	37
圖 4-5 切割片段示意圖.....	38
圖 4-6 質體以酵素切割.....	39
圖 4-7 BL21(DE3)_pSEI-P 於三種菌盤下之生長情形.....	40

圖 4-8 轉型菌液塗抹量之菌盤外觀.....	40
圖 4-9 四向塗盤.....	41
圖 4-10 BL21(DE3)_pSEI-P 以 Forward primer 定序結果.....	42
圖 4-11BL21(DE3)_pSEI-P 以 Reverse primer 定序結果.....	43
圖 4-12 C43(DE3)與 BL21(DE3)之生長曲線.....	44
圖 4-13 BL21(左)與 C43(右)菌盤於藍光照射儀之外觀差異.....	45
圖 4-14 C43(DE3)與 BL21(DE3)以 1mM IPTG 表達之生長曲線.....	45
圖 4-15 BL21(DE3)_pSEIP 於不同溫度下誘導 4 小時之結果.....	46
圖 4-16 BL21(DE3)_pSEIP 於不同溫度下誘導 24 小時之結果.....	47
圖 4-17 低溫下表達外觀差異.....	48
圖 4-18 BL21(DE3)與 C43(DE3)於相同溫度表達之外觀差異.....	48
圖 4-19 BL21(DE3)_pSEIP 於 20°C 下加入不同 IPTG 濃度誘導 24 小時之結果.....	49
圖 4-20 BL21(DE3)_pSEI-P 於 20 度下表達 24 小時之破碎產物經螢光照射分析.....	50
圖 4-21 20°C、24hr、IPTG 1mM 之表達菌液於超音波破碎儀破菌.....	51
圖 4-22 比較不同菌量之菌液破碎成效.....	51
圖 4-23 目標蛋白於 His-tag 管柱中流洗測試.....	52
圖 4-24 目標蛋白 His 純化.....	53
圖 4-25 BCA 蛋白質標準物定量標準曲線.....	54
圖 4-26 內含肽 C 端、N 端接點與首個外接胺基酸之切割效率關係圖.....	55
圖 4-27 目標蛋白切割 20 小時之外觀變化.....	56
圖 4-28 目標蛋白切割 40 小時之外觀變化.....	56
圖 4-29 目標蛋白切割 60 小時之外觀變化.....	56

圖 4-30 於 4、25、37°C 切割 60 小時之 SDS-PAGE .....	57
圖 4-31 探討 Sample buffer 中不同濃度的 DTT 對目標蛋白的作用程度 .....	58
圖 4-32 探討 Sample buffer 中 SDS 的含量差異 .....	59

# 第一章 文獻回顧

## 1.1 何謂催乳素

催乳素(Prolactin, PRL, 又稱促乳素或催乳激素)是一種由垂體前葉腺嗜酸細胞分泌的蛋白質，由 199 個胺基酸組成的單一肽鏈組成，含有 3 個雙硫鍵分別位於 Cys (4-11)、(58-174)與(191-199)，其結構和生長激素(GH)有很高的同源性，甚至兩者間的受體結構也很相似，僅在受體上接合位點有些微差異[15]，是乳腺合成乳汁的主要成分[5]。

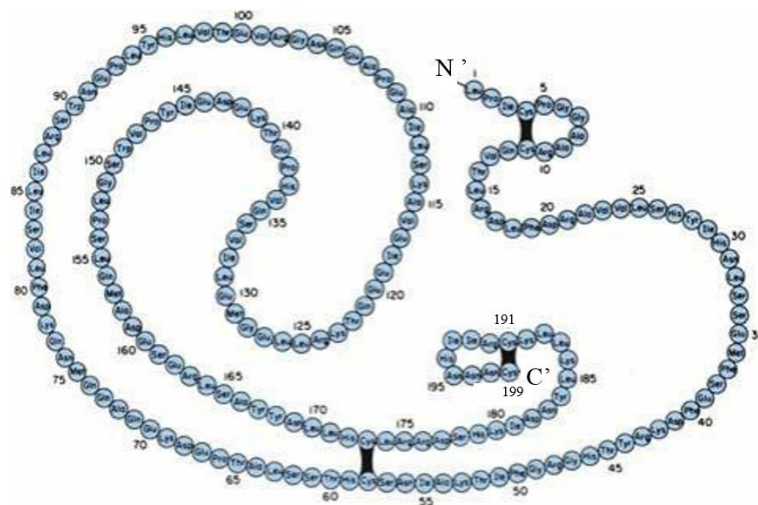


圖 1-1 催乳素胺基酸序列

PRL 在人類的乳房與子宮含量最多，其次是腎、肝、前列腺及卵巢都有高水平的信號[10]。在發育期，催乳素能與雌激素、孕激素及其他激素共同作用，並與乳腺上皮細胞的受體結合，從而刺激乳腺腺泡發育和促進乳汁的生成與分泌並維持泌乳[20]，同時還能刺激卵巢黃體分泌黃體酮；在妊娠時期可使乳腺得到充分發育，使乳腺小葉末端導管發展成為小腺泡；分娩後，催乳素的分泌大量增加，乳腺開始泌乳，提升母體

育幼、抗憂慮行為(洪，2017)，而催乳素的分泌受下視丘所分泌的多巴胺所抑制 [9],[ 16]。

## 1.2 催乳素的優劣

在醫學上我們看見催乳素是一把雙面刃，分泌過量的催乳素並不是個好現象，它可能會導致不孕、溢乳、降低性腺功能甚至導致催乳素瘤生成，而腦下腺催乳素瘤為罹患病理性高催乳素血症的主要原因[21]，甚至在近期的研究統計下，催乳素訊號的水平和併發乳癌的風險[19]或是與葡萄糖、胰島素含量異常[1]有顯著的關係，但也有研究報告指出，PRL 藉由與催乳素受體(Prolactin promoter, PRL-R)的結合，可以有效抑制特定信號的傳遞，進而降低癌細胞增生分化的程度，對三陰性乳癌的治療有著顯著的貢獻[8]，而在體外的應用亦有研究證明 PRL 能使毛髮柔順之作用[7]。

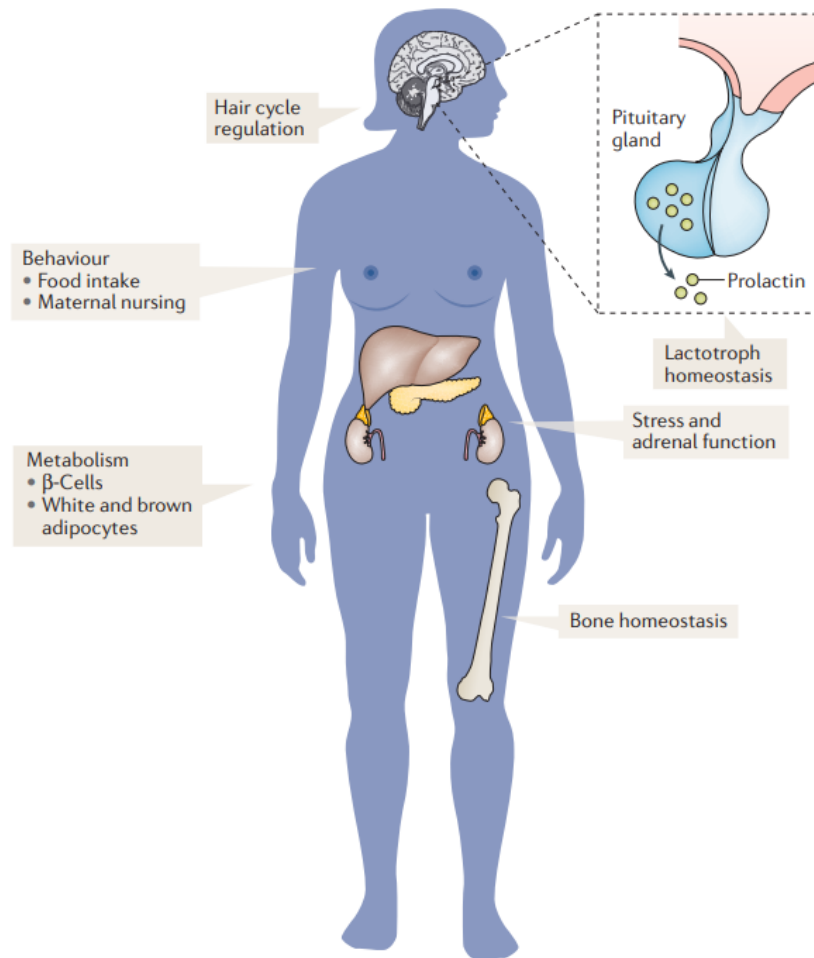


圖 1-2 PRL 在人體內主要的作用器官[2]

除了對乳腺的影響外，PRL 對哺乳動物還有很多其他的作用，例如在齧齒動物中 PRL 具有促黃體分泌激素的作用或是在哺乳動物中調節胸腺功能[17]。PRL 除了由腦下垂體製造以外，也會從能表達催乳素受體(PRL-R)的免疫系統細胞中產生，因此預判 PRL 可透過不同的路徑，在免疫系統中發揮作用， PRL 扮演健康與免疫的調節劑[16]。

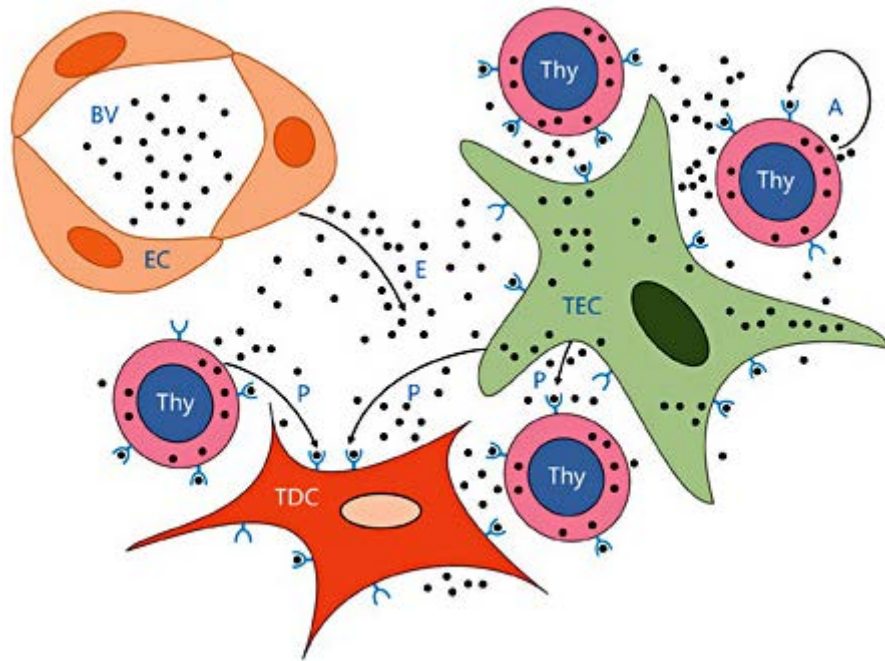


圖 1-3 PRL 於胸腺細胞中作用的路徑關係[16]

● = PRL; Y = PRL-R。BV = 血管; A = 自分泌; E = 內分泌; P = 旁分泌;

EC = Endothelial Cell, 內皮細胞; TEC = Thymus Epithelial Cell, 胸腺上皮細胞;

TDC = Thymus Dendritic Cell, 胸腺樹突細胞; Thy = 胸腺細胞

### 1.3 微生物系統

現在的生物技術已經可以使用到動植物細胞、昆蟲細胞、及酵母、細菌等微生物來量產具有開發價值的各種蛋白質[4]，本研究以大腸桿菌系統作為蛋白質生產的主要媒介，大腸桿菌學名為 *Escherichia coli* 又稱 *E.coli*，是一種人體或是溫血動物腸道中的共生菌，於 1885 年由特奧多爾·埃舍里希所發現，易培養且容易與其他菌分辨出來，目前作為模式生物廣泛應用於生技工程之中，對於蛋白質試劑藥物的製程有卓越的貢獻。

大腸桿菌的優勢在於產量高、成本低與生長快速，缺點是無法進行轉譯後修飾，且常常形成不可溶的蛋白質，稱為包含體。包含體的形成主要是結構摺疊錯誤，常需要經由試劑變性將結構中的氫鍵、疏水鍵斷開破壞結構，再經由復性的方法使蛋白質再摺疊回正確 3D 結構，恢復自然的活性。在生物工程中我們期望的產物是可溶性蛋白，不但可以減少製程上再次復性的成本，亦可以提高純化的效率，因此本研究中使用具有使蛋白質增加可溶性的新穎質體 *pSEI*，相信在蛋白質製程與純化分析上有很大的幫助。



表 1-1 細胞與微生物表達之比較

	細菌	酵母細胞	哺乳細胞	昆蟲細胞
生產成本	低	低	高	高
生長速度	快	快	慢	慢
表達程度	高	低到高	低到高	低到中等
蛋白質析出方式	胞內	胞內和體外	體外	體外
包含體的形成	是	否	否	否
蛋白質摺疊	常需復性	可能需復性	正確摺疊	正確摺疊

研究中所使用的 PRL 基因片段來自 NCBI 資料庫(NP\_000939.1)的蛋白質序列，再將序列反轉為 *E.coli* 中的密碼子，連結質體並送入宿主之中。這些被植入在宿主中的外來基因，所產出的蛋白有可能會對細胞造成損害，我們稱之為毒蛋白。隨著培養時間增長，細菌量增加，誘導後產生的蛋白質可能會毒殺細胞又造成菌量下降，因此生物技術工程常常將培養條件與表達條件區分開來，使細菌生長到最佳的狀態後，以最穩定快速的條件生產蛋白[24]。

#### 1.4 新穎質體 pSEI 的貢獻

在質體中搭載了幾個重要的功能，其中以 Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)與內含肽(Intein)尤為重要。SUMO 在近幾年的研究中發現能夠修飾目標蛋白質，它具有改變蛋白質表現與細胞內存在的位置、增加蛋白質穩定性[22]，也就是它能夠改善因使用大腸桿菌系統表達而產出包含體，使之可溶性增加，讓純化的手續更加簡易。

雖然SUMO對目標蛋白的可溶性有卓越的貢獻，但在蛋白質結構上的分離純化將面臨切割酵素昂貴、操作成本高等問題，內含肽的優勢在於可以使用化學物質 Dithiothreitol (DTT)、2-巰基乙醇( $\beta$ -mercaptoethanol)或半胱胺酸 (cysteine, Cys)來與內含肽中的雙硫鍵競爭配位[12]，使得蛋白分離，在純化上有助於成本的降低。

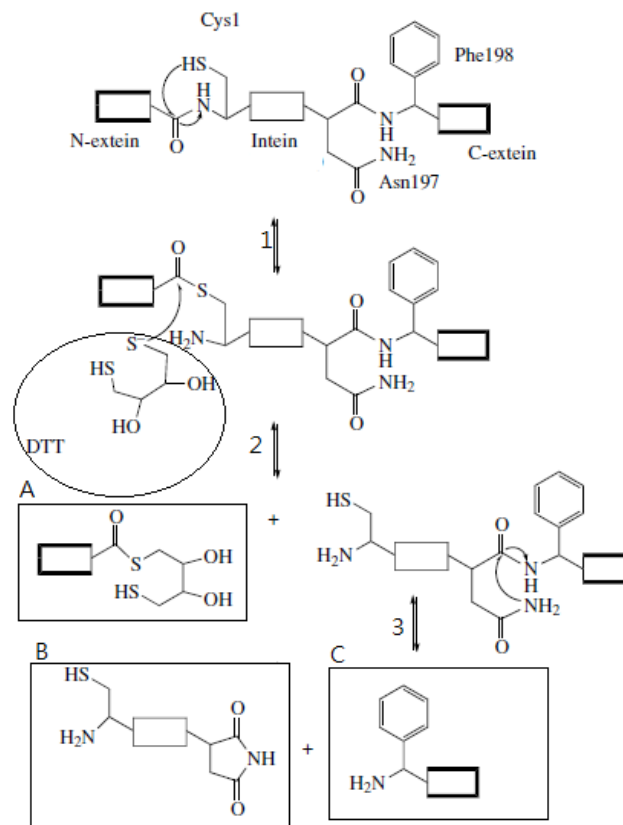


圖 1-4 雙硫鍵與 DTT 作用於 Intein 的裂解機制[18]

1. N-S 電子轉移, 2. DTT 於 N-terminal 的裂解作用, 3. C-terminal 的末端環化, A=N-terminal 融合蛋白、B=intein、C=C-terminal 融合蛋白。

### 1.5 實驗目的與動機

在日積月累的研究之下，PRL 著實與人們的身體健康息息相關，根據衛生福利部資料顯示，2016 年與 2017 年惡性腫瘤死亡率排名中，分別代表兩性的乳癌與前列腺癌一直都是榜上有名，而這兩類癌症與催乳素的影響有著密切的關係。PRL 除了與癌症息息相關以外，更有機會間接形成了多種慢性疾病，包含骨質疏鬆、慢性頭疼等[2]。

透過用實驗室開發出新穎質體 *pSEI* 以及具有成熟的基因工程的技術下，利用微生物製備特定蛋白質，在未來我們有機會將這些看不見的潛在危險，轉變為更方便觀察到的型態或是做為追蹤標記(如螢光)，如此一來便能提高人們對自我生理變化的敏銳性，使病人提早發現病徵進行相關療程，降低乳癌與前列腺癌帶來的死亡率，甚至有

助於提防慢性疾病的形成，是我完成此篇研究的動機。

本研究短期目標是期望透過探索實驗室自行建構的質體 pSEI，利用其高可溶性、可見性、純化高度專一性的特色，將 PRL 蛋白製備出來，這些製備條件數據有助於我們在遠期目標的基礎建立。遠期目標是我們可以利用 PCR 基因突變技術來改變原生型 PRL 的特定序列，搭配本實驗室既有的動物細胞培養技術，來進行小規模的細胞藥物投放試驗，最終將具療效或開發價值的目標蛋白投入到大量生產的發酵製程，模擬藥物的製程開發設計。

表 1-2 臺灣十大癌症(每十萬人口)死亡率

2016		2017	
氣管、支氣管和肺癌	39.9	氣管、支氣管和肺癌	39.2
肝和肝內膽管癌	35.5	肝和肝內膽管癌	35.7
結腸、直腸和肛門癌	24.3	結腸、直腸和肛門癌	24.7
<b>女性乳癌</b>	<b>18.4</b>	<b>女性乳癌</b>	<b>20.1</b>
口腔癌	12.5	口腔癌	12.1
<b>前列腺(攝護腺)癌</b>	<b>11.5</b>	<b>前列腺(攝護腺)癌</b>	<b>11.9</b>
胃癌	9.8	胃癌	9.8
胰臟癌	8.5	胰臟癌	8.8
食道癌	7.4	食道癌	7.6
子宮頸及部位未明示子宮癌	5.4	子宮頸及部位未明示子宮癌	5.5

節錄自衛生福利部 105、106 年統計資料

## 第二章 實驗材料與儀器設備

### 2.1 實驗材料

#### 2.1.1 菌株

本實驗室所使用的菌種有保存型的 DH5 $\alpha$  與表達型的 BL21(DE3)、C41(DE3)、C43(DE3)，在實驗初期會使用 DH5 $\alpha$  來進行保存以及大量萃取質體的步驟，原因在於其有 endA 突變的特徵使細胞內內切酶失活，對外源基因免疫缺乏，也就是說額外植入的質體較不容易被分解，故適合用來做質體的放大，在培養基上存活的時間也較長。

BL21(DE3) 是含有噬菌體 T7 RNA 聚合酶溶原的 BL21 菌株，通過 IPTG 誘導來表達含有 T7 promoter 或是 pET 系列的載體。C41(DE3) 篩選於 BL21(DE3)，C43(DE3) 又是從 C41(DE3) 中篩選出來，這三種菌株對於蛋白質表達都有高水平的表現，而 BL21(DE3) 用於表達一般蛋白，C41(DE3)、C43(DE3) 則分別用於表達不同種類的毒蛋白或疏水性蛋白。

#### 2.1.2 實驗藥品

本論文所使用的藥品如下表所示：

表 2-1 實驗藥品資訊表

藥品名稱	製造廠商	產品序號
Acetic acid	聯工化學股份有限公司 (Hsinchu, Taiwan)	AC0353
Acrylamide-Bis solution (30%)	USB (Cleveland, OH, USA)	US75820
Agar	BD (NJ, USA)	214010
Agarose	MDBio, Inc. (Taipei, Taiwan)	17852

Ammonium persulfate	Bio-Rad (Hercules, USA)	161-0700
Ampicillin sodium salt	Sigma (St. Louis, MO,USA)	A9518
Beta-mercaptoethanol	Plus one (WITHIN, EU)	17-1317-01
Boric acid	Kanto chemical (Tokyo, Japan)	04232-00
Calcium chloride	Merck (Darmstadt, Germany)	10043-52-4
Chloramphenicol	Sigma (St. Louis, MO,USA)	56757
Coomassie Brilliant Blue	Merck (Darmstadt, Germany)	1.15444.00025
DTT (Dithiothreitol)	Sigma (St. Louis, MO,USA)	D632
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	USB (Cleveland, OH,USA)	US15699
Ethanol	Showa (Tokyo, Japan)	0502-3160
Glycerol	Merck (Darmstadt, Germany)	1.04092.1000
Glycine	USB (Cleveland, OH,USA)	123009
Imidazole	USB (Cleveland, OH,USA)	115860
IPTG (Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside)	Calbiochem (Darmstadt, Germany)	B46679
Kanamycin	Sigma (St. Louis, MO,USA)	K0254
PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride)	Sigma (St. Louis, MO,USA)	P7626

Potassium chloride	Merck (Darmstadt, Germany)	1.04936.1000
Sodium chloride	Kanto chemical (Tokyo, Japan)	37144-00
Tris-Base	P&C Biotech, Inc. (Miaoli, Taiwan)	77-86-1
Tetramethylethylenediamine (TEMED、 TMEDA)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany)	110-18-9

## 2.2 實驗儀器

儀器設備如下表所示：

表 2-2 實驗儀器資訊表

儀器名稱	製造商名稱	型號
培養箱 (incubator)	Cheng Sang (Changhua, Taiwan)	CRS60
烘箱 (Oven)	Cheng Sang (Changhua, Taiwan)	CDV-603
滅菌釜 (Autoclave)	SUNWAY (Taipei, Taiwan)	TM-328
微波爐 (Microwave)	Panasonic (Kadoma shi, Japan)	NE-C30B

酸鹼度計 (pH meter)	Suntex (Taipei, Taiwan)	SP-701
微量電子天秤 (Micro-Electronic Balance)	OHAUS (New Jersey, USA)	AR1530
微量電子天秤 (Micro-Electronic Balance)	METTLER TOLEDO (Zuerich, Switzerland)	AB-54S
恆溫水浴槽 (Thermostat Bath)	FIRSTEK (Taipei, Taiwan)	B206
乾浴器 (Dry bath)	FIRSTEK (Taipei, Taiwan)	DB 130-2-110
微量盤分光光度計 (Microplate Spectrophotometer)	BioTek (Vermont, USA)	Epoch
迴旋式震盪器 (Orbital Shaker)	YIH DER (Taipei, Taiwan)	TS-500D
試管震盪器 (Vortex)	Scientific Industries (New York, USA)	VORTEX-2 GENIE
去離子水系統 (Water Purification System)	Merck (Darmstadt, Germany)	Synergy® ultrapure water (Type 1)
冰箱(4°C) (Refrigerator)	TECO (Taipei, Taiwan)	RE7222
低溫冰箱(-20°C) (-20°C freezer)	Fisher & Paykel (Queensland, Australia)	Standard H160

超低溫冰箱(-80°C)	Bioway	CLN-32UWT
(-80°C freezer)	(Taipei, Taiwan)	
液氮桶	Taylor Wharton	35 HCB
(Liquid Nitrogen tank)	(Taipei, Taiwan)	
微量移液分注器	Eppendorf	Research
(Micro-pipette)	(Hamburg, Germany)	1000/200/100/20/10/2.5
離心機	Eppendorf	Centrifuge 5804 R
(Centrifuge)	(Hamburg, Germany)	
微量離心機	Eppendorf	Centrifuge 5415 D
(Table Top Micro Centrifuge)	(Hamburg, Germany)	
聚合酶鏈鎖反應儀	Applied Biosystems	PCR 9700
(PCR machine)	(Foster City, USA)	
超音波破碎儀	Misonix	Sonicator 3000
(Sonicator)	(New York, USA)	
快速液態層析儀(Fast Performance Liquid Chromatography)	GE	ÄKTA prime plus
	(Boston, USA)	
電源供應器	Bio-Rad	Bio-Rad#1645050
(power supply)	(California, USA)	
磁石攪拌加熱器	Corning	PC-420D
(Hotplate stirring plate)	(New York, USA)	
電泳槽	Major science	MT-108
(Gel Electrophoresis System)	(Hsinchu, Taiwan)	



直立電泳槽	Bio-Rad	MV-10DSYS
(Vertical Gel Electrophoresis	(California, USA)	
無菌操作台	誠昕科技有限公司	GT-4L
(Laminar flow)	(Taichung, Taiwan)	
電子防潮箱	防潮家股份有限公司	RT-68
(Elecotronic Dry Cabinett)	(Taichung, Taiwan)	
紫外透射儀	SPECTROLINE	TL-312R
(Ultraviolet Transilluminator)	(New York, USA)	
藍光透射儀	GeneDireX	BLOOK
(Blue LED Transilluminator)	(New York, USA)	
螢光感測儀	Advance Biotechnology	TECAN Infinite® F200 PRO
(Fluorescent sensor)	(Taipei, Taiwan)	

## 第三章 實驗方法

### 3.1 引子設計 (Primer design)

根據 PRL 兩端的蛋白質特性，催乳素 N-端與 C-端分別為疏水端與親水端，而 PRL 接於 PRL Receptor 的 3D 結構圖模擬顯示 C-terminal 的末端胺基酸 Cys(199)與 Cys(191)會形成雙硫鍵，為確保未來蛋白質能做出正確摺疊以及考量親水端表露出來提升可溶性的可能，故採用將 N-terminal 連接於 pSEI 中內含肽(intein)後的方式接進質體中。

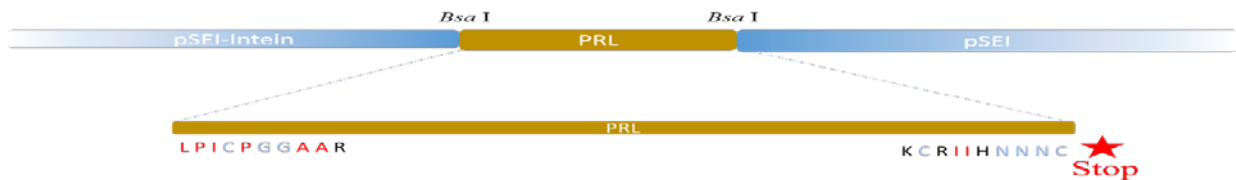


圖 3-1 催乳素 N-terminal、C-terminal 前後 10 個胺基酸的特性

G	親水性
A	疏水性
V	疏水性
L	疏水性
I	疏水性
F	疏水性
W	疏水性
Y	親水性
D	酸性
H	鹼性
N	親水性
E	酸性
K	鹼性
Q	親水性
M	疏水性
R	鹼性
S	親水性
T	親水性
C	親水性
P	疏水性

圖 3-2 常見二十種胺基酸特性

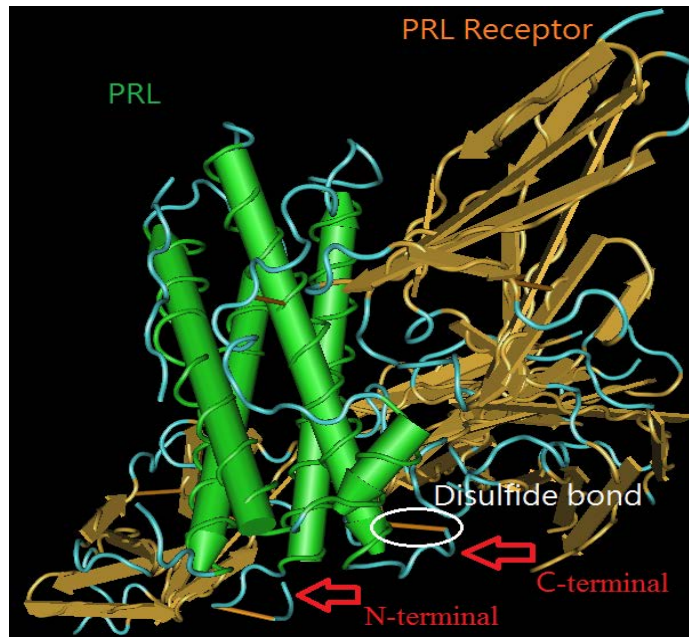


圖 3-3 PRL 與受體之 3D 結構圖

在引子設計的部分，我們所使用的切割位點為 Bsa I，特色是辨識到特定序列後，下游的位置開始切割，可使在連接後的產物不會多產生額外的鹼基，進而減少未來胺基酸合成的變異。



圖 3-4 Bsa I 辨識切割示意圖

在設計上有部分條件必須達到要求：

1. 在引子中需含有切割辨識位點
2. 引子 CG% 建議 40~60%
3.  $T_m$  溫度可以落在 55~80°C
4. 引子末端盡量避免出現連續三個 C 或是 G 的設計，避免產生迴文結構

5. 同一對引子間的  $T_m$  值不要相差超過  $5^\circ\text{C}$ ，以及自黏(Self Dimer)、相黏(Cross Dimer) 參數亦不要過大，本論文使用 Premier Biosoft 網站提供之計算程式做為優化引子設計的參考數據，Dimer 之數值建議高於-9。

在引子設計上需要考量非常多因素，而 Bsa I 的特點正好有助於我們在設計上彌補一些因為切割點上的設計限制所造成的缺憾，因在黏貼基因時無法避免黏貼端多出幾個目標序列外的鹼基，導致合成蛋白時會產出幾個預期外的氨基酸，甚至是基因序列產生錯位，使得密碼子的搭配不如預期。我們發現在辨識位點前的序列，無論如何設計皆會在完成切割之後去除，所以因素 2、3、5 中控制 CG 比例以及溫度調配就相對的好解決，這也是我們選擇此切割酶的原因之一。

### 3.2 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction)

*Polymerase chain reaction* (PCR)，此方法誕生於西元 1983 年，由凱利·穆利斯(Kary Mullis)發明，有別於利用細菌等生物體來複製基因，是利用人工添加材料與重複性的升降溫程序，短時間放大特定微小的訊號片段，在後期更運用了嗜熱細菌水生棲熱菌(錢嘉韻,1976)來彌補不斷添加聚合酶的缺點，大幅了改善 PCR 的效率與方便性。此技術目前廣泛應用於生物及醫學實驗室，例如親子鑑定、基因複製、傳染病鑑定等。

在 PCR 的過程中會添加的材料包含複製基因模板、引子對、去氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate, *dNTP*)與耐熱 DNA 聚合酶。以  $93-98^\circ\text{C}$  變性(Denaturation)3-5 分鐘，使雙股間的氫鍵充分斷開，並以 30-60 秒接著開始迴圈。根據引子的  $T_m$  來設定黏合(Annealing)溫度 30-60 秒鐘，通常為低於引子的  $T_m$  約  $5^\circ\text{C}$ ， $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ ，若黏合溫度設定過高可能導致引子貼不上模板，反之則會有錯配的情形。最後依據目標 DNA 片段的大小以及所添加的聚合酶種類來決定延伸(Elongation)溫度的時間，常用的有 *Taq*，合成速率約 1000 bp/min，*pfu* 則約 500 bp/min，溫度迴圈 20-30 次後 final Elongation 7-10 分鐘，以確保所有產物長度均達到預設值。

實驗步驟非常簡單，僅需要準備 PCR 200  $\mu$ l 薄壁離心管，將模板(可以是細菌、質體或目標 DNA)、引子對(primer pair)、dNTP、緩衝液、及水至適量濃度體積並充分混合後離心，最後再添加耐熱酵素(過程中酵素皆須至於冰上)，上機設定溫度、時間與迴圈數即可。而 PCR 雖然步驟簡單，但並非每次皆能達到預期結果，這過程中包含 dNTP 作用濃度、模板純度、引子濃度與聚合酶種類，都可能成為 PCR 實驗失敗的原因。舉例來說，過高濃度的引子濃度可能引起 primer-dimer、提高 dNTP 濃度雖可以增加產量，卻也會增加非特異性產物，而這些預期外的產物皆會與模板競爭 primer、dNTP、聚合酶，造成目標產物量下降；若以 PCR 產生的產物當作模板再次進行 PCR 使訊號放大，則要經過稀釋 100-500 倍，否則產物容易產生帶狀雜訊(smear)；聚合酶則依據實驗目的做選擇，若以效率較差但正確性較佳的 pfu 做為聚合酶則要注意延伸時間的設定，以免最終產物長度大小不對。

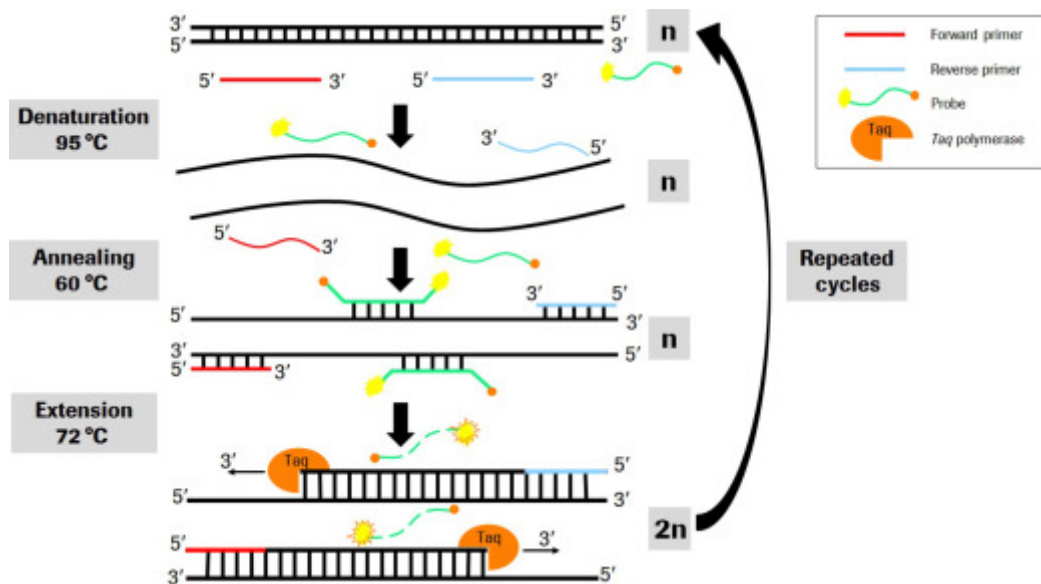


圖 3-5 PCR 溫度變化與作用機制示意圖

### 3.3 凝膠電泳分析法 (Gel electrophoresis)

如我們所知 DNA 是帶負電的，透過建構一個多孔隙材質與電場組合而成模組，可將核酸分子混合物依據分子量大小來進行分離，原理類似於分子篩，最大的差異在於分子量越小的走最快最遠，原因是在相同的驅動力(電壓)下，小分子的 DNA 在一定孔隙度的膠體中，受到的阻礙程度較小，因此行走的距離會較遠。在實驗中我們利用 Agarose 進行 DNA 的確認分析，後期會介紹蛋白質聚丙烯醯胺膠體電泳的原理與製作技巧。

表 3-1 電泳膠濃度與欲分離 DNA 分子量大小之關係

Agarose gel, %	Range of effective separation, bp
0.5	2000-50000
0.6	1000-20000
0.7	800-12000
0.8	800-10000
0.9	600-10000
1.0	400-8000
1.5	200-3000
2.0	100-2000
3.0	25-1000
4.0	10-500
5.0	10-300

根據表 3-1，依目標 DNA 大小來判斷所需濃度的電泳膠，秤取 Agarose 粉末，以 TAE Buffer(三羥甲基氨基甲烷, Tris base、乙酸, Acetic acid 和 乙二胺四乙酸, EDTA 組成)的緩衝液，在電泳過程中可以維持適當的 pH)和 ddH<sub>2</sub>O 以 1:1 比例於容器內充分混合，在容器開口上覆以一層保鮮膜後並戳 4-6 洞，防止加熱過程中突沸水蒸氣衝破封膜造成實驗人員灼傷，加熱時間依微波爐型號而異，至粉末完全溶解於溶液中即可。在 Agarose 溶液中添加 SYBR\*Safe DNA gel stain 染劑(簡稱 SYBR)並充分搖晃混合均勻，相較於溴化乙錠(Ethidium Bromide, EtBr)必須用紫外光激發，使用儀器的過程中，高能量光線可能使操作者眼部受傷、皮膚病變，且 EtBr 本身即為強誘變劑，能使遺傳訊息突

變，進而造成致癌或畸形的症狀，SYBR 僅使用藍光即可顯色，對菌落活性不會帶來傷害，相對下來是對人體較安全的一種染劑。室溫下靜置降溫至約 60°C (約手掌可持續觸碰 3-5 秒鐘)，小心地倒入模具中並依預分析的樣品數來選擇架設的尺梳規格，在模具外覆蓋一層鋁箔紙避光等待 15 分鐘使膠體固化即可使用。

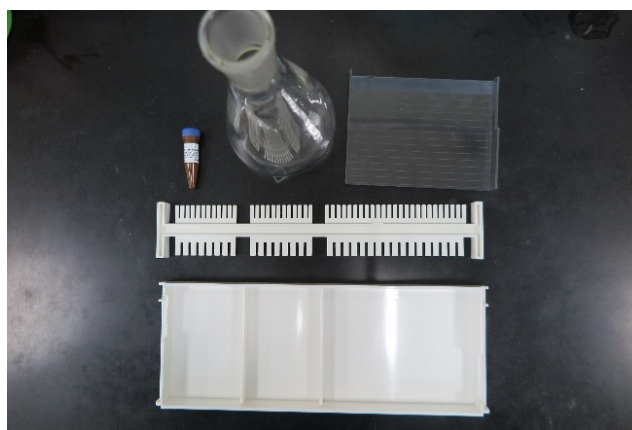


圖 3-6 凝膠電泳製作設備

### 3.4 DNA 萃取 (DNA Extraction)

DNA 的萃取使用 Gene-Spin™ 1-4-3 DNA Purification Kit (波仕特生物科技, Taipei, Taiwan)，此套組用於去除 PCR 後剩餘的引子、引子自黏物、核苷酸、聚合酶等，操作可以分為液相萃取及固相萃取，純化產物大小範圍介於 100 bp~10 kb，DNA 與套組中的低鹽緩衝溶液混合後，通過二氧化矽材料製成的薄膜，以帶有乙醇(ethanol, EtOH)的流洗液，即可去除鹽類與可溶性大分子組成，最後用低離子強度的緩衝液，甚至用水，就能簡單的收下純度高的 DNA。

液相萃取使用的材料為 PCR 後的產物(<100 µl)，加入 5 倍體積的低鹽緩衝液充分混合後開始實驗。若在電泳膠分離實驗下觀測到產物條帶並非單一個，則推薦使用固相純化，即切下電泳膠目標片段的區塊(<350 mg) 作為萃取材料。若膠體濃度>2%，使用 2~3 倍體積的低鹽緩衝液，反之則使用等量的低鹽緩衝液，並於 60°C 乾浴溶解膠體。



將混合液轉換至 Gene-Spin columns 上(每次不超過 700  $\mu$ l 為限)，以 12,000~14,000 g, 1 min 重複離心、去除離心液直到混合液完全使用完畢，固相萃取再額外添加 500  $\mu$ l 低鹽緩衝液重複離心，使用流洗液沖洗管柱中的薄膜後去除離心液，並多額外離心數分鐘，確保管柱有充分離心。將管柱放在 37~65°C 的環境下，使流洗液中的 EtOH 完全揮發，添加 35~50  $\mu$ l 套組中的流洗液或去離子水回溶，此步驟用的回溶液建議恆溫至 60~70°C 以提高 DNA 的溶解度，離心下即為產物。

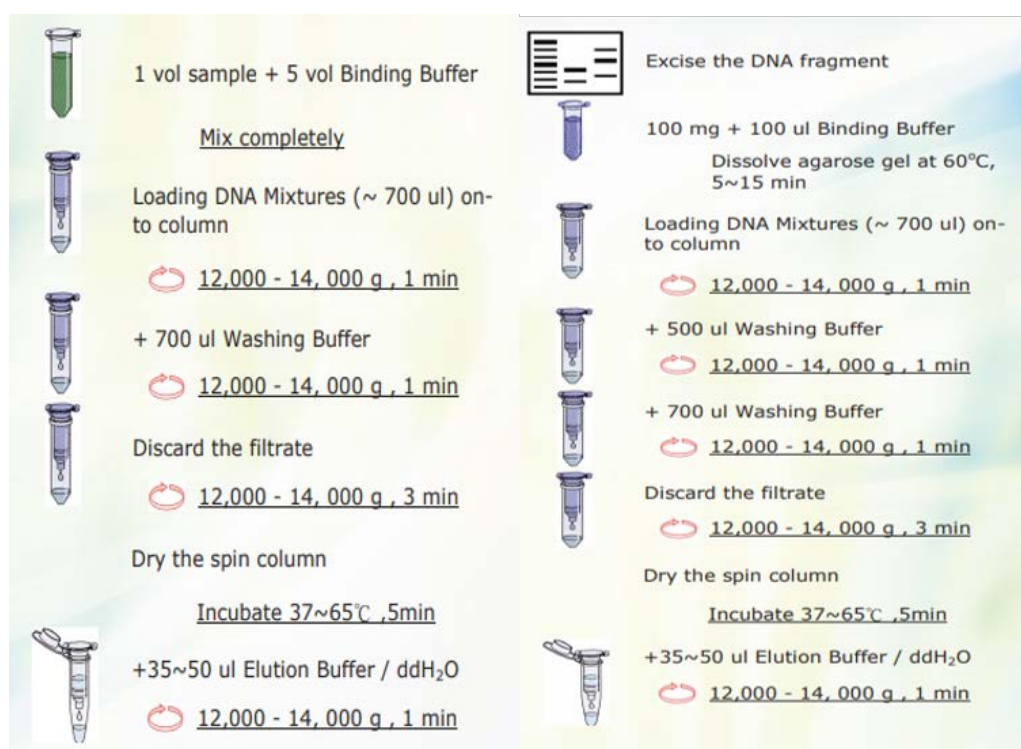


圖 3-7 液相萃取與固相萃取步驟流程圖

### 3.5 接合反應 (Ligation)

本研究中所使用的內切酶(Bsa I)最大的特色在切割與連接的反應可以在同一時間完成，也就是說不需要再將環狀 Vector 預先以內切酶切開，進行 DNA 萃取去除切割時所添加的反應劑，最後將 Insert 與 Vector 置於同一容器中以連接酶(T4 DNA ligase)做黏合。同時切割與黏貼的好處在於可以避免因再次萃取 DNA 而造成 DNA 片段損失，使 Vector 與 Insert 比例變動固定下來，進而提高連接成功的效率。



實驗材料需要 Insert (*PRL*)與 Vector (*pSEI*)、*Bsa* I-HF、酵素連接酶(T4 DNA Ligase)與緩衝液(10X T4 Buffer, 50 mM Tris-HCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ATP、10 mM DTT pH 7.5@25°C)。利用電泳膠法中的 Marker 來估算 Insert 與 Vector 的濃度，搭配 NEBioCalculator™ 網站，以鹼基數(bp)和質量計算出 Insert 和 Vector 莫爾數，依適當比例(經驗法則 1:1~7:1 皆可，通常 3:1 為最佳條件)來添加進總體積為 25 μl 的反應液中，依照 Golden Gate Assembly Protocol (NEB #E1600) 設定(37°C，5 min，16°C，5 min)，或是室溫下直接反應 overnight，最後再以 65°C，5 min 使酵素失活，完成接合反應。

表 3-2 接合反應試劑與條件

材料試劑	使用量
Insert( <i>PRL</i> )	3X(mole)
Vector( <i>pSEI</i> )	X(mole)
10X T4 DNA ligase buffer	2.5 μl
T4 DNA Ligase (NEB #M0202), 2000 U/μl	0.5 μl
<i>Bsa</i> I-HFv2 (NEB #R3733), 20 U/μl	1.5 μl
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	Final to 25 μl

註: T4 ligase BF (50 mM Tris-HCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ATP、10 mM DTT pH 7.5@25°C)

在接合反應完成後，可以使用 PCR 技術初步鑑定質體是否成功重組，使用的引子對建議設計在 Vector 切割缺口兩端上，這樣做可以從產物的凝膠電泳條帶得知 insert 是否有成功組合，結果於 4.2 節討論。

### 3.6 勝任細胞的製備 (Competent Cell Preparation)

本實驗使用的菌種為 *E.coli*，實驗原理是使用鈣離子讓細胞壁產生滲透壓的變化以及結構上的改變，形成一個有利於質體進入的脆弱結構。製作勝任細胞前須事先培養 overnight 菌液，以新鮮培養液:菌液=100:1 之比例繼代至菌液 OD<sub>600</sub>=0.3-0.4，並準備

好 100 mM CaCl<sub>2</sub>、100 mM MgCl<sub>2</sub> 與 85 mM CaCl<sub>2</sub>/15% 甘油(Glycerol)備用，以下敘述及藥劑用量以 10 ml 菌液為製作標準。

1. 使用 6000 g，10°C，10 min 離心，去除上清液。
2. 加入 5 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> 覆懸，以 6000 g，10°C，5 min 離心去除上清液，並準備新的 1.5 ml 離心管至於冰上降溫備用。
3. 加入 1 ml 85 mM CaCl<sub>2</sub>/15% Glycerol 覆懸，並以每管 50 µl 分裝至 1.5 ml 離心管中。
4. 保存於 -80 °C，使用效期約為三個月。

### 3.7 轉型 (Transformation)

轉型是指將建構好的質體送入宿主細胞中的方法，常用的有熱休克法、電穿孔法、顯微注射法、基因槍、病毒感染等。本實驗室採用熱休克的方式，使用以氯化鈣法製備而成的勝任細胞，在細胞液中加入不超過 50 ng 的質體，置於冰上(4°C) 30 分鐘等待質體附著於細胞上，將細胞液置於 42°C 水浴恆溫 30 秒後再放回冰上 5 分鐘，此為藉由熱漲冷縮使質體進入細胞內，鎖住缺孔，完成熱休克。接著將完成熱休克的菌液中加入 950µl 的 LB，在 37°C，200 rpm 下培養 1-2 小時，使細胞完成復甦的動作後即可塗盤。本質體具有的抗抗生素基因為卡納霉素(Kanamycin, Kan)，菌液在不含抗生素(Original, Ori)、氨苄(音同變)青黴素(Ampicillin, Amp)、Kan 三種菌盤下塗抹，放置在 37°C 環境下培養 14-16 個小時後可得到不同的生長結果，作為初步的驗證。取培養基上生成的菌落以 primer F2 & R2 (4.1 節介紹)重複做一次 PCR，確認目標產物大小是否正確即完成確認，並送出定序。

表 3-3 抗生素配方

抗生素	配方	作用濃度
Ampicillin (Amp.)	100 mg/ml	100µg/ml
Kanamycin (Kan.)	50 mg/ml	50µg/ml
Chloramphenicol (Cm.)	25 mg/ml (in EtOH)	25µg/ml

註：抗生素溶液需過 0.22 or 0.45µm Filter 分裝並保存於-20°C，注意 Cm.需使用鐵弗龍材質過濾。

### 3.8 質體萃取 (Plasmid Extraction)

在質體萃取的實驗中，本實驗室採用 QIAprep® Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany)，適用於一般質體、大質體(>10kb)、低複製型的質體等，此套組的特色是採用二氧化矽薄膜來吸附 DNA，過程中並不會使用到苯酚、氯仿、溴化乙錠等，亦無酒精沉澱的步驟。

實驗前先備妥 1-5ml Overnight 的菌液(in LB)並離心保留菌塊，實驗原理是使用含有 RNase 的鹼性緩衝液裂解細菌，再一步將緩衝液中和並轉換成高鹽環境，過程中 RNA、細胞碎片及沉澱大分子會隨裂解液產生白色沉澱，利用離心 13,000 rpm, 10 min 達到固液分離，抽取上清液轉換置 QIAprep 2.0 columns 的二氧化矽薄膜上，使用流洗緩衝液去除內切酶，以及去鹽緩衝液來洗去鹽類，使 DNA 回到低鹽環境後再用 50~100µl 的去離子水回溶，完成回溶後，spin column 移至新的 1.5 ml 微量離心管，離心蒐集即可馬上使用，不須再做任何去鹽或是濃縮的動作，最終產物可大於 20 µg。

表 3-4 LB 培養液(基)配方

材料	用量
NaCl	4g
Tryptone	4g
Yeast Extract powder	2g
(Agar)	6g
ddH <sub>2</sub> O	400ml

註：調整 pH 至 7.0，調配好的培養液(LB)需滅菌才可使用，使用前再添加抗生素即可。

僅製作固態培養基時從 LB 中添加 Agar，以滅菌釜滅菌溶解，倒盤前再添加抗生素。

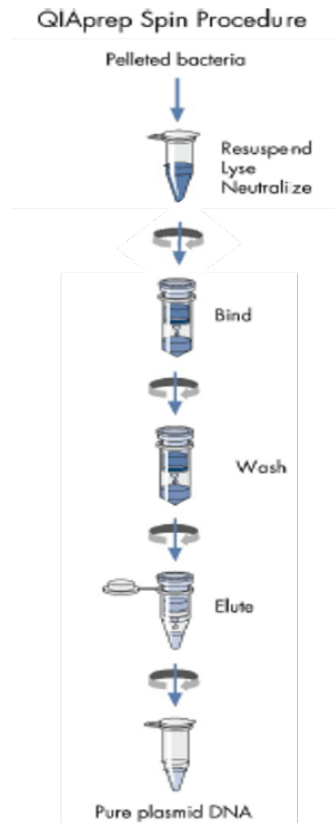


圖 3-8 質體萃取步驟流程圖

### 3.9 DNA 定序 (DNA Sequencing)

在這一部份將解說如何使用基因定序公司之訂購程序，操作步驟因各家廠商官網設計或因時間升級而不同。本研究中委託明欣生物科技股份有限公司(Mission Biotech)進行 DNA 定序，進入官網後點選「線上訂購」。

The screenshot shows the Mission Biotech website's navigation menu with '線上訂購' (Online Order) highlighted in a red box. Below the menu, the '線上訂購' (Online Order) dropdown menu is open, showing 'DNA 定序' (DNA Sequencing) selected. The main content area displays the '訂購者資料' (Orderer Information) form, which includes fields for '機構名稱' (Institution Name), '聯絡人' (Contact Person), '電子郵件' (Email), '主持人' (Principal Investigator), '電話' (Phone), and '行動電話' (Mobile Phone). A note indicates that fields with an asterisk are mandatory.

進入選單依照目的點選訂購項目，此處選擇「DNA 定序」。接著填入訂購者資料，此處填寫的電子郵件為電子檔收件處，需留意填寫避免定序結果遺失。

## 訂購內容

NO.	樣品名稱 <sup>(1)</sup>	樣品種類	Primer 名稱 <sup>(1)</sup>	Primer 來源	片段長度 <sup>(2)</sup>	載體名稱	抗生素 <sup>(3)</sup>	特殊需求	其他
1.	<input type="text"/>	請選擇 ▼	<input type="text"/>	請選擇 ▼	<input type="text"/> bp	<input type="text"/>	無 ▼	無 ▼	<input type="text"/>

圖 3-9 DNA 定序介面操作說明

「樣品名稱」即為定序後電子檔案名稱，樣品種類可以選擇菌盤、菌液、質體等，甚至是 PCR 的產物與電泳膠片亦可，質體濃度建議 50 ng/μl。若送出的樣品為 PCR 產物，需填寫片段長度，以及在「特殊需求」中選擇 Primer Tm (°C)將溫度填寫於右側欄位中。如需委託養菌保存則需選填「抗生素」欄位。定序結果在頭尾各 100 bp 準確率較低，單批次定序長度範圍約 1000 bp，在引子設計除了滿足長度 18-25 bases，儘量避免重複相同的 nucleotide (特別是 G)，Tm 值介於 50-58°C 等基本條件，建議將引子設計在 Vector 預計使用的限制內切酶(本實驗為 BsaI )前(For Forward primer)後(For Reverse primer)端，使定序結果可以包括 Insert 與 Vector 銜接後的端點，確認質體 Ligation 成功。若定序目標長度大於 1000 mer，可以在中間多設計幾組引子，使有效定序範圍(第 150~850 bp)能夠彼此 overlap，本研究中的定序結果於 4.4 節討論。

### 3.10 蛋白質表達 (Protein Expression)

蛋白質於大腸桿菌系統表達是由 lac I 生成的調節蛋白所控制，稱為乳糖阻遏物，是一個四級結構蛋白質，可以和誘導物做結合。在平時乳糖非唯一碳源時，阻遏物能與操縱子做結合，抑制細菌產生蛋白質。操縱子又分為啟動序列(promoter, P)、操作序列(operator, O)、β-半乳糖苷酶(lac Z)、β-半乳糖苷透性酶(lac Y)、β-半乳糖苷乙酰基轉移酶(lac A)，加入異丙基 β-D-1-硫代半乳糖苷 (Isopropyl β-D-Thiogalactoside, IPTG)後阻遏物被移除，使得細菌開始產生大量 mRNA 再轉譯出蛋白質。IPTG 是一種不會被細菌所代謝掉的物質，因此廣泛被應用於實驗室誘導。[23]

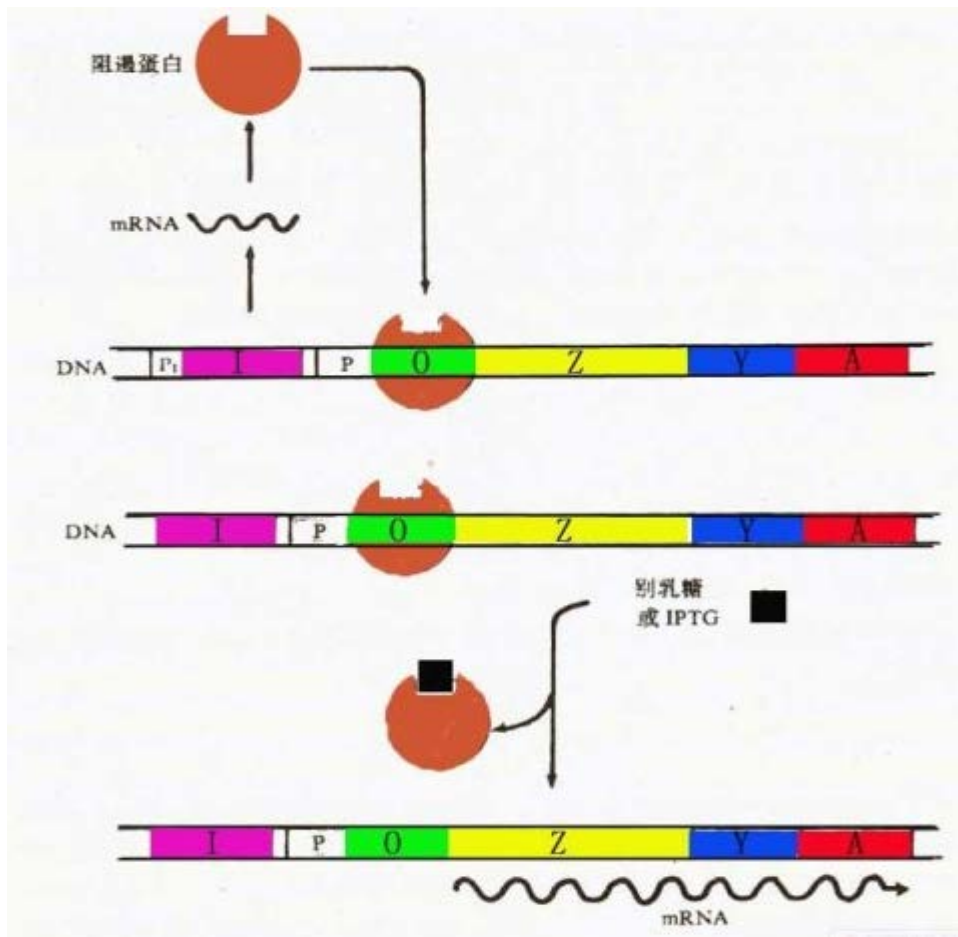


圖 3-10 IPTG 誘導機制

在表達生產蛋白質之前，必須先挑取菌落培養 overnight，此步驟是確保細菌已達平衡狀態，以新鮮培養液:菌液為 100:1 之比例，37°C，200 rpm 做繼代至 OD<sub>600</sub>=0.4~0.6，使細菌狀態為指數型成長期，取出 1ml 菌液做離心震盪於 -20°C 下保存作為表達前全蛋白，加入 IPTG，繼續以同條件培養，待培養結束後亦取出與加入 IPTG 前同 OD 值之菌液離心保存，作為表達後全蛋白。取兩者全蛋白使用聚丙烯醯胺膠體電泳可初步確認是否有完成表達。

### 3.11 破菌方法 (Cell Disruption)

本實驗使用超音波破碎儀搭配溶菌酶(Lysozyme)來使細菌破碎。Lysozyme 建議作用濃度為 0.05 %，主要用途在瓦解格蘭氏陰性菌(如:大腸桿菌)細胞壁表面的肽聚糖的

網狀結構，使細胞強度降低，配合超音波或均質機等機械式破碎效果，可以提高細菌破碎的效率。

表 3-5 裂解液配方

藥品	濃度
Tris (pH8.0)	50mM
Glycerol	10%
TritonX-100	0.1%
MgCl <sub>2</sub>	2mM
Lysozyme	0.05%
PMSF	1mM

註: Lysozyme 在破菌前 15 分鐘加入，使之稍微反應至破菌前一刻再添加 PMSF，避免 PMSF 水解。PMSF 功用在於抑制蛋白水解。

破碎開始之前先將完成表達的細菌以 4 °C、6000 g，10 min 條件離心，去除上清液(LB)後以震盪器(Vortex)震散菌塊，移至-80°C冰箱冷凍 overnight，隔日加入適量的裂解液(Lysis Buffer)以及 PMSF (1 mM/ml)，設定超音波破菌時間 5 秒、休息時間 15 秒，總長為 10 分鐘，設定瓦數與破碎菌液體積參考表 3-6。完成破菌後，以 12000 g，30 分鐘離心，準備新容器盛接上清液(Suspension)，沉澱相(Pellet)反覆以 5~10 ml Lysis Buffer 覆懸並離心重複兩次以確保沉澱相不會有殘存的上清液。不同實驗組中破菌加入的裂解液體積依達到相同 OD<sub>600</sub> 值為準，最終 OD<sub>600</sub> 建議在 2~8 之間，例：A 組 OD<sub>600</sub>=1.8，細菌液(in LB)20 ml，B 組 OD<sub>600</sub>=2.2，細菌液(in LB)18 ml，若 A 組以 5 ml Lysis Buffer 覆懸菌塊，B 組則需以 5.45 ml Lysis Buffer 回溶，使得兩組之間最終 OD<sub>600</sub> 約相同於 7。計算方式： $OD_{600\_A} * \frac{V_{LB\_A}}{V_{Lys\_A}} = OD_{600\_B} * \frac{V_{LB\_B}}{V_{Lys\_B}}$ ，LB = 培養液，Lys = Lysis Buffer。

表 3-6 破菌液體積與破菌強度設定關係

Sample Volume	Power Setting
100µl – 500µl	0-1
500µl – 2 ml	1-2
2 ml – 5 ml	2-4
5 ml – 20 ml	4-5
20 ml – 50 ml	5-7
50 ml – 200 ml	7-8

### 3.12 聚丙烯醯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

聚丙烯醯胺膠體電泳又稱 PAGE，膠體的成分由自由基的生成者過硫酸銨 (Ammonium persulfate, APS)，聚合基本單體丙烯醯胺(Bis-Acrylamide)與維持蛋白質變異性十二烷基硫酸鈉(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)在催化劑四甲基乙二胺(TEMED)與恆定 pH 值溶液(Tris、MOPS 等)作用中，慢慢交聯形成網狀結構。膠體強度取決於 Acrylamide 的濃度，聚合原理是一種自由基的連鎖反應，在聚合過程中，Acrylamide 會互相串連，形成一個鍊狀結構，再依丙烯醯胺混合液中的 bis 相互連結形成網狀結構，隨著濃度調整可以控制網目的大小。膠體的區域分為上膠(或稱聚集膠)與下膠(或稱分離膠)的不連續式膠體，而在膠體和樣品中以有無加入 SDS 的配方下可分為 SDS-PAGE 系統與 Native-PAGE，兩者各有其用途與優劣。使用 SDS 時樣品需添加能打斷雙硫鍵的反應劑，如 2-巰基乙醇(Mercaptoethanol,  $\beta$ -ME) 或二流蘇糖醇(DL-Dithiothreitol, DTT)並加熱處理使立體結構的蛋白質成為線性，優點是僅依分子量大小決定電泳快慢，缺點則在於雙硫鍵幾乎都會打斷，可能會有非預期的條帶出現；而使用 Native-PAGE 的好處在於蛋白質結構能保持完整，除了分子量以外，不均勻分布的電荷亦會影響泳動速度，甚至需考量到分離之目標蛋白質的等電點(pI)，該蛋白質在帶



正電的環境下是無法進行電泳的。

表 3-7 聚丙烯醯胺膠體濃度配方

品項	下膠				上膠
	7.5%	10%	12.5%	15%	5%
濃度	7.5%	10%	12.5%	15%	5%
ddH <sub>2</sub> O	5.65 ml	4.9 ml	4.27 ml	3.65 ml	3.075 ml
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	
0.5M Tris-HCl (pH 6.8)					1.25 ml
10% SDS	10 μl	10μl	10μl	10μl	5μl
10% APS	30μl	30μl	30μl	30μl	15μl
Acrylamide-bis	1.75 ml	2.5 ml	3.13 ml	3.75 ml	0.625 ml
TEMED	15μl	15μl	15μl	15μl	7.5μl

根據表 3-7，依欲分離之蛋白質大小來配製相對應濃度的下膠體，其中 TEMED 為交聯催化劑，僅在倒膠前加入。製作前玻璃片表面以中性清潔劑洗淨後再以 70% 酒精擦拭，確保玻璃表面無殘留物，以固定夾固定後，連同底部防水膠條一起安裝在架上，在玻璃片間加滿去離子水觀察 1 分鐘確認有無漏液。確保無漏液後倒出玻璃片中的去離子水，以紙巾吸乾即可填裝配製好的下膠溶液約至距尺梳底部約 0.5 cm 處，再加入約 1 ml 70% 酒精進行壓膠，並左右晃動確保膠面平整，靜置 20 分鐘等待膠體凝固。膠體形成後重複下膠的製作方式，填裝上膠液前記得倒出玻璃片間殘餘的 70% 酒精，並以紙巾吸乾。上膠溶液填裝至全滿後小心地插入尺梳，確認無氣泡夾存於溶液與尺梳之間，將裝置台傾斜 45 度斜放，以剩餘的上膠溶液潤濕尺梳上緣，可減少氣泡生成，等待 20 分鐘後即製作完成，每一片膠的保存期限約為 5 天。

將製作好的膠片放入直立電泳槽，玻璃片凹槽面朝內架設，在電泳槽中放入約 900ml SDS Running Buffer (0.25 M Tris, 0.5 M Glycine, 1% SDS)，準備 95 °C 乾浴槽，將樣品與 5x Sample buffer 以 4:1 比例混合套上防爆夾加熱 5 分鐘，每個樣品槽內 loading

20 $\mu$ l，完成後蓋上蓋使電路接通，以 85 伏特(V)、15 分鐘使樣品 focusing，以 190V、35 分鐘完成跑膠分離蛋白。將跑完的玻璃膠片取至 RO 水裝置下流水拆卸，上膠部分切除丟棄，下膠取出後放入容器內，加入 5ml Instant Blue 以 70 rpm 搖晃 1hr 即完成顯色。

**表 3-8 蛋白質染劑作用濃度配方**

<b>1x Sample buffer</b>
50 mM Tris-HCl (pH 6.8)
2 mM EDTA
10 mM DTT
2 % SDS
10 % Glycerol
0.01 % Bromophenol Blue

### 3.13 BCA 蛋白質定量分析法 (BCA Protein Assay)

為了定量表達出來的蛋白質含量，採用了 Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, Waltham, USA)，其中的二辛可寧酸(Bicinchoninic acid, BCA) 為主要試劑，Cu<sup>+2</sup> 在鹼性條件下可以由蛋白質還原成 Cu<sup>+1</sup>，而 Cu<sup>+1</sup> 和 BCA 方式來進行比色檢定和蛋白質總量測定。在反應實驗中產生的紫色溶液是由兩個 BCA 與一個亞銅離子鍵結而成，隨蛋白質濃度越高，最終反應出的顏色越深，以波長 562 nm 偵測吸收值製作蛋白質標準線。標準品中的蛋白質為牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)，經一系列的濃度稀釋可製作出檢量範圍為 20-2000  $\mu$ g/ml 或 5-250  $\mu$ g/ml 的檢量標準線。試驗開始前將 Kit 中的 A、B 試劑，以 50:1 的方式混合，謹記混和過程先放 B 再放 A，以便觀察工作試劑(Working Reagent, WR)由藍綠色轉為透明綠。在儀器的選擇中，可以使用單樣品式的分光光度計或是 96 孔式的微量分光光度計，若以前者進行偵測，樣品(體積至少 0.1 ml)與 WR 的比例為 1:20，96 孔式(樣品體積 10-25  $\mu$ l 即可)為 1:8。本研究中採用微量分光光度計，預計在 96 孔盤中加入 25  $\mu$ l 標準蛋白和樣品蛋

白，添加 200  $\mu\text{l}$  WR 滿足比例 1:8 反應。

表 3-9 20-2000  $\mu\text{g/ml}$  標準線製作之濃度稀釋

編號	稀釋液體積( $\mu\text{l}$ )	BSA 體積( $\mu\text{l}$ )	最終濃度( $\mu\text{g/ml}$ )
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175 of B	750
E	325	325 of C	500
F	325	325 of E	250
G	325	325 of F	125
H	400	100 of G	25
I	400	0	0

表 3-10 5-250  $\mu\text{g/ml}$  標準線製作之濃度稀釋

編號	稀釋液體積( $\mu\text{l}$ )	BSA 體積( $\mu\text{l}$ )	最終濃度( $\mu\text{g/ml}$ )
A	700	100	250
B	400	400 of A	125
C	450	300 of B	50
D	400	400 of C	25
E	400	100 of D	5
F	400	0	0

1. 取新拆封 96 孔盤，將標準蛋白 A~I 與 sample 分別做三重複，加入孔中備用
2. 每孔加入 200  $\mu\text{l}$  WR
3. 96 孔盤須以保鮮膜覆蓋(避免水氣蒸散)，再以鋁箔包覆(避光)，於 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中恆溫 30 分鐘

4. 將 96 孔盤冷卻至室溫(最好無水氣)後以 562 nm 偵測吸收值
5. 將 Sample 數值以標準線做內插即可求得蛋白質濃度。

### 3.14 純化方法 (Purification Method)

依據此新穎質體 pSEI 上的特殊設計，最終表達之蛋白質上會帶有幾個對於純化相當有利的結構，本實驗第一步採用 6xHis Tag 作為去除大部分雜蛋白的純化，接下來運用 Intein 的優勢，將留下來的蛋白質從特定胺基酸間切開，形成兩個分離的蛋白質，而其中之一個蛋白質依舊帶有 6xHis Tag 的結構，再次運用管柱即可分離出目標蛋白，完成此次蛋白質表達及純化實驗。

以管柱純化時須注意，使用前以 5-10 倍管柱體積去離子水沖洗以去除保存用的 20% 酒精，避免酒精與緩衝溶液中的鹽類反應形成結晶，使管柱堵塞。以去離子水清洗完後以 5 倍管柱體積結合緩衝液(Binding Buffer, BB)沖洗管柱來活化樹脂，可以使將通入的樣品有更好的鍵結，完成後即可通入欲純化之蛋白質溶液。若使用的是親和性管柱，在通入樣品之後還需以 Binding buffer 或是沖洗液(Washing Buffer)不斷沖洗來去除不必要的雜蛋白，再以流洗液(Elution Buffer, EB)將被抓住蛋白質流洗下來。若使用的是分子篩或去鹽管柱，則須注意蛋白質在進入管柱之後即不斷的依分子特性流出。流洗出所有管內蛋白質後再以去離子水流洗 5-10 倍管柱體積，以去除分析過程中殘留的帶鹽緩衝溶液，最後以 20% 酒精填充滿管柱後並鎖上，將使用完的管柱置放在陰暗處保存即可。過程中所使用到的所有溶液皆需要過 0.22 或 0.45 $\mu$ m Filter 來確保無雜質、雜菌通入管柱中。

本實驗室既有的管柱，是由 GE Healthcare(General Electric Company)所購置的 HisTrap™ High Performance column，在管柱中 6 個 His 胺基酸會與金屬離子結合形成配位鍵，當帶有 His-Tag 的蛋白質通過帶鎳樹脂(Ni-resin)，鎳離子空出的配位鍵與 His-Tag 結合使蛋白質留在樹脂上；經過清洗步驟後，再以高濃度的咪唑(imidazole)與 His-

Tag 競爭配位鍵並使蛋白質脫離完成蛋白質純化，此方式具有配體簡單、吸附量大、條件溫和的效果，在蛋白質製程中是最有效的技術之一。

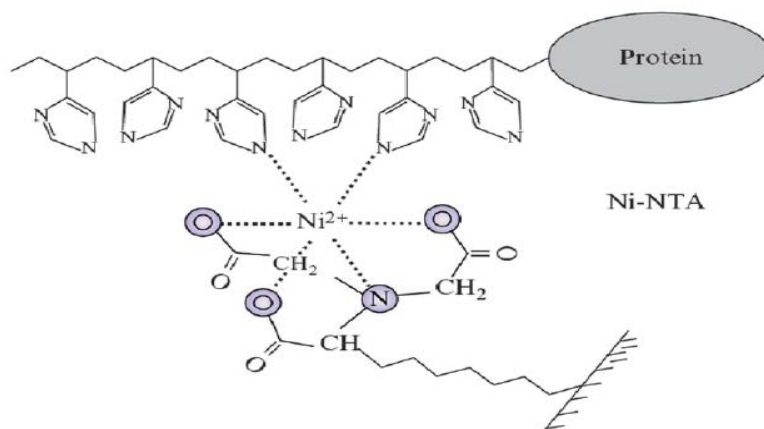


圖 3-11 His tag 與 Ni-resin 配位示意圖[14]

過程中所使用到的 Binding Buffer (BB)與 Elution Buffer (EB)中成分近乎相同，僅有 imidazole 濃度高低的差異，適量的 imidazole 有助於樹脂的活化，濃度過高時反而使蛋白質鍵結的效率降低，蛋白質可能隨著流速或是壓力的上升，變得相對容易脫落，且在相同濃度 imidazole 中不同分子量大小的蛋白質也有不同的鍵結程度，因此在進行 Ni-column 純化之前建議先測試 BB 中最佳的 imidazole 濃度，通常建議量在 10-50 mM 之間，而 EB 則需要高濃度 imidazole，通常建議使用濃度為 500 mM，可以使附著在管柱上的蛋白質在最小流洗體積下脫離，流速建議在 0.5-3 ml/min，過高的流速除可能使管柱壓力過高造成破壞外，也有可能 Binding 時間不足，使目標蛋白質流失過多，降低純化效率。

表 3-11 His-tag 緩衝溶液配方(pH7.4)

Binding Buffer	Elution Buffer
20 mM Sodium phosphate	20 mM Sodium phosphate
0.5 M NaCl	0.5 M NaCl
10-50 mM Imidazole	0.5 M Imidazole

## 第四章 結果與討論

### 4.1 聚合酶鏈鎖反應於擴增 PRL 片段與確認質體轉型成效之試驗條件

本實驗設計的引子分為 1.擴增出 PRL 之 DNA 序列引子以及 2.確認轉型成效之引子，而本實驗之 PRL DNA 委託生工有限公司(MD Bio)製備合成於質體 pUC57 中保存，使用含 Bsa I 辨識位點之 PRL 引子以及 pUC57 質體做為模板來做 PCR，而 PCR 的過程採二階段來合成出前後端帶有切割點的 PRL 基因。

表 4-1 PRL 之引子

引子	鹼基數(全長/不含內切酶位點長度)
<b>Forward(F1):</b> ATTAGGGTCTCTGAACCTGCCGATTTGCCCG	30/19
<b>Reverse(R1):</b> CACGTTGGTCTCGGTTAGCAGTTGTTGTTAT GAATAATGC	40/27

第一階段是以引子中不含 Bsa I 辨識位點之剩餘序列來計算 Anneal Temperature (46.5°C)，經過 5-10 個循環複製出相當數量的特定模板後，再以引子全長所計算出來的 Anneal Temperature(60.7°C)繼續完成後面 15-20 個循環。這樣的作法相較於直接採用 60.7°C 當作黏貼溫度來一步完成 PCR 來說準確度較高，原因來自過高的黏合溫度，可能導致引子接不上模板，而初次 PCR 所使用的模板(pUC57)中的 PRL 序列段，是不帶有 Bsa I 切割位點的序列，因此可能導致我們所設計的引子找不到適合的位置附著。事先降低黏貼溫度，讓小部分的目標 DNA(含有 Bsa I 辨識位點的序列)先被複製出來，再以這段序列當作新的模板開始後面的擴增，提升 PCR 成功的機率，預估大小 629 bp。

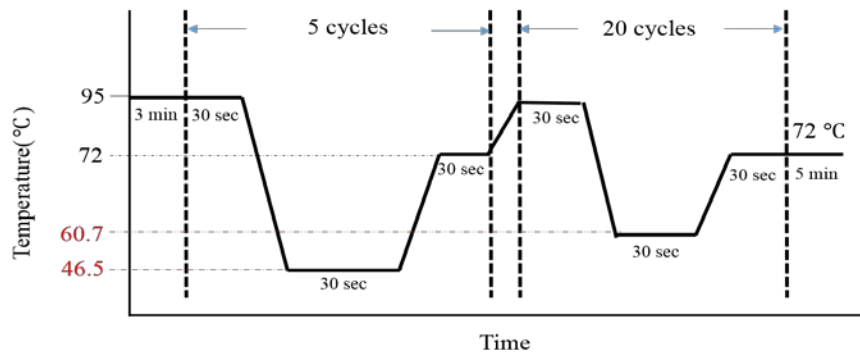


圖 4-1 二階段式 PCR 溫度設定示意圖

表 4-2 PRL PCR 之反應物組成

試劑	體積(μl)
Template(pUC57)	1
20 mM Forward primer	1.25
20 mM Reverse primer	1.25
10 mM dNTP	1
10X Taq Buffer	5
ddH <sub>2</sub> O	40
Taq DNA polymerase(5000 units/ml)	0.5

註: 1X Taq Buffer (10 mM Tris-HCl、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 8.3 @ 25°C)

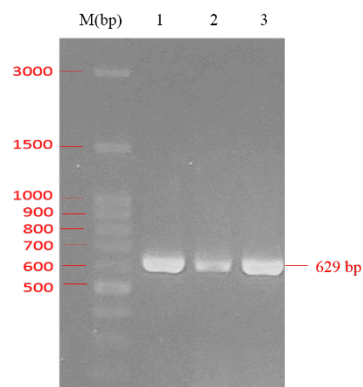


圖 4-2 PRL 之 PCR 結果

Lane1: 100 bp Marker, Lane-2~4: 以 pUC57 當作模板之 PCR 三重複試驗-目標條帶 629 bp 於 1.2% Agarose/TAE 膠體電泳。

在我們重新把 PRL 片段取下之後，接下來使用新穎質體 pSEI 來銜接目標片段，切割位點的順序是經過特殊設計以產生互補的黏貼端，經過接合反應之後形成帶有 PRL 片段的質體，我們稱為 pSEI-P。為了確認 PRL 在接合反應中有成功黏貼上新質體，運用了確認轉型成效的引子來做 PCR，這段引子是設計在 Vector 中目標 DNA 將進入的位置兩端，Anneal Temperature 為 47°C，在控制組中我們使用了不帶 PRL 的空質體作相同條件的 PCR，最後以電泳膠法來確認 PCR 完分子量的大小，來初步判斷目標 DNA 片段是否有成功接合，預估產物片段分別為 1621 bp(含 PRL)、1108 bp(不含 PRL)。

表 4-3 確認轉型之引子

引子	鹼基數
Forward(F2) ATTATGGGACGCTATTGTTG	20
Reverse(R2): TCGTCTTGAGTCCAACCC	18

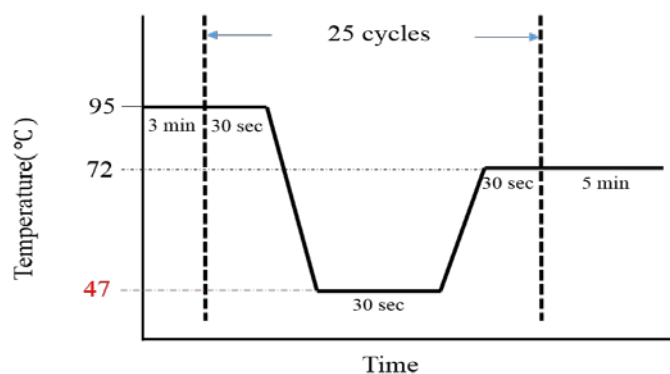


圖 4-3 確認 PRL 銜接於 pSEI 之 PCR 溫度條件設定

表 4-4 PRL 銜接於 pSEI 之試劑條件

試劑	體積(μl)
Template(pSEI/pSEIP)	1
20 mM Forward primer	1.25
20 mM Reverse primer	1.25
10 mM dNTP	1
10X Taq Buffer	5
ddH <sub>2</sub> O	40

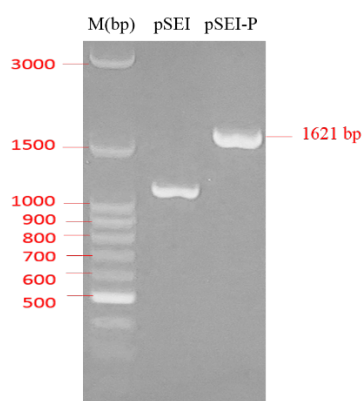


---

Taq DNA polymerase(5000 units/ml) 0.5

---

註:1X Taq Buffer (10 mM Tris-HCl、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 8.3 @ 25°C)



**圖 4-4 以 pSEI 與 pSEI-P 做模板之 PCR 結果**

Lane1:100bp Marker，Lane2:以 pSEI 當作模板進行 PCR 之目標條帶-1108 bp，Lane3-以帶有 PRL 之 pSEI(pSEI-P)進行 PCR 之目標條帶-1621 bp 於 1.2% Agarose/TAE 膠體電泳。

#### 4.2 pSEI 與 pSEI-P 限制型內切酶酵素切割

實驗開始前使用 SnapGene 進行模擬與篩選切割點，切割位點的數量須大於兩個以上，並分別位於 Vector 與 Insert 上，且切下來的片段需有一定程度的差異。此次實驗的模板為有無接上目標 DNA 片段的 Vector，其中 Sac II 僅出現在 PRL 上，可以利用此方式再次確認 Insert 有無銜接成功。本實驗中使用了 EcoR V、Sac II、Xba I 三種酵素，在 pSEI 中 EcoR V 有兩個切割位點，Sac II 與 Xba I 僅有一個，而 PRL 基因上亦有一個 Sac II 切割位點，也就是說在 pSEI-P 中可以較 pSEI 額外切出 579bp 與 225bp 的序列。

表 4-5 切割條件

試劑	用量
內切酶 Xba I	1 $\mu$ l
內切酶 EcoR V	1 $\mu$ l
內切酶 Sac II	1 $\mu$ l
Plasmid	1 $\mu$ g
10X Cutsmart BF	5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	To 50 $\mu$ l

切割條件 37 °C，5-15 min，終止條件65 °C，20 min

註: 1X Cutsmart BF (50 mM Potassium Acetate、20 mM Tris-acetate、10 mM Magnesium Acetate、100  $\mu$ g/ml BSA pH 7.9@25°C)

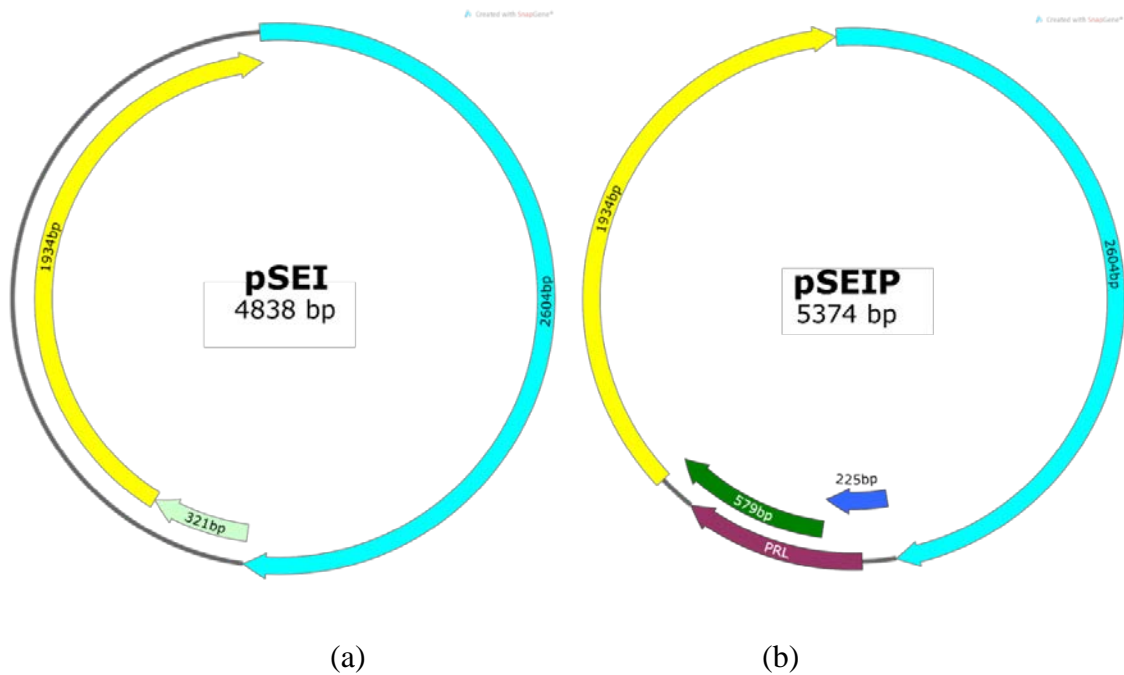


圖 4-5 切割片段示意圖

(a) pSEI (b)pSEIP 於 Snapgene 之模擬質體圖及其切割位點。

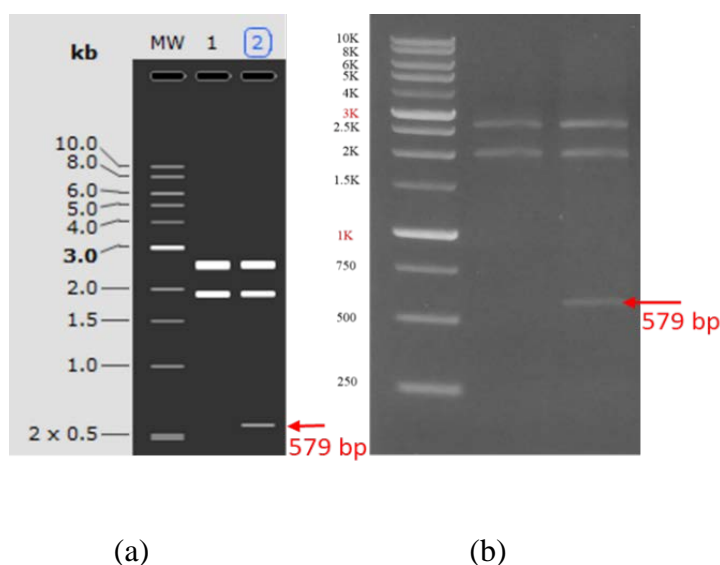


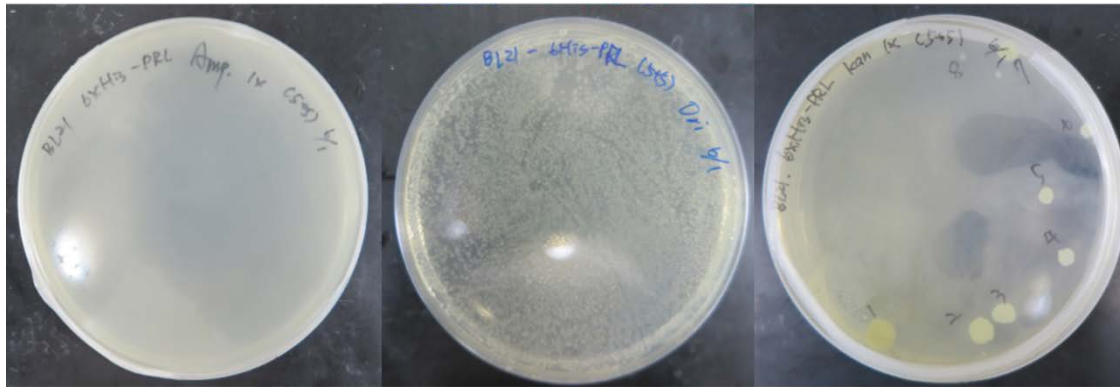
圖 4-6 質體以酵素切割

(a)模擬圖(b)實際實驗結果於 1.2% Agarose/TAE 膠體電泳，Lane1:Marker，Lane2:pSEI(無 PRL)以 Xba I、EcoR V、Sac II 切割之結果，Lane3:pSEI-P(含 PRL)以 Xba I、EcoR V、Sac II 切割之結果。在泳道 3 中可以看出 pSEI-P 中才存在的 579 bp 條帶。

在 SnapGene 模擬中預測 pSEI 與 pSEI-P 在切割後顯示的條帶數量不同，而圖 4-5 中顯示的 255bp 在圖 4-6 中並沒有出現，可能是切割成效較差濃度不高，導致條帶顯示不足以用來證明 PRL 成功連結，因此以 579bp 為判斷標準。

#### 4.3 pSEI-P 轉型確認

將 pSEI-P 轉入勝任細胞中進行塗盤，塗盤時會取一株沒有進行轉型的勝任細胞當作對照組，培養基分別帶有 Kan(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )、Amp(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的抗生素及不代抗生素的 Ori 來確認菌株是否能夠成長。pSEI-P 中的抗抗生素基因為 Kan，實驗預期結果在 LB plate 中是包括未轉型的任何菌株都能生長，菌盤發展狀況活菌數極多，僅轉入 pSEIP 之菌株可在 Kan 中生長，Amp 菌盤不會有任何菌落生成。根據 2.1.1 節討論，轉型時我們建議先轉到 DH5 $\alpha$ 中，挑出帶有目標基因的菌落後再大量培養萃取質體，最後轉進 BL21(DE3)或其他具表達體系的菌種中。



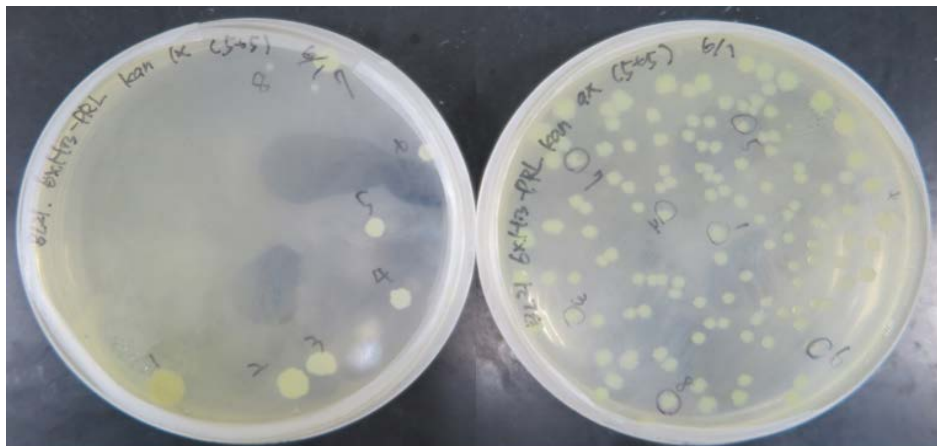
LB/Amp

LB

LB/Kan

圖 4-7 BL21(DE3)\_pSEI-P 於三種菌盤下之生長情形

塗盤是取在 37°C、200 rpm 環境下培養的轉型菌液 100  $\mu$ l 來進行塗盤，若使用的勝任細胞存放時間已達二至三個月，會將剩餘的轉型菌液全部塗上第二盤 Kan 菌盤(同濃縮 9 倍)，以防因轉型效率降低，使成功長出的菌落量過少。在以往的實驗中，本實驗室所製備的勝任細胞可以存放至半年還保有不錯的轉型成效。

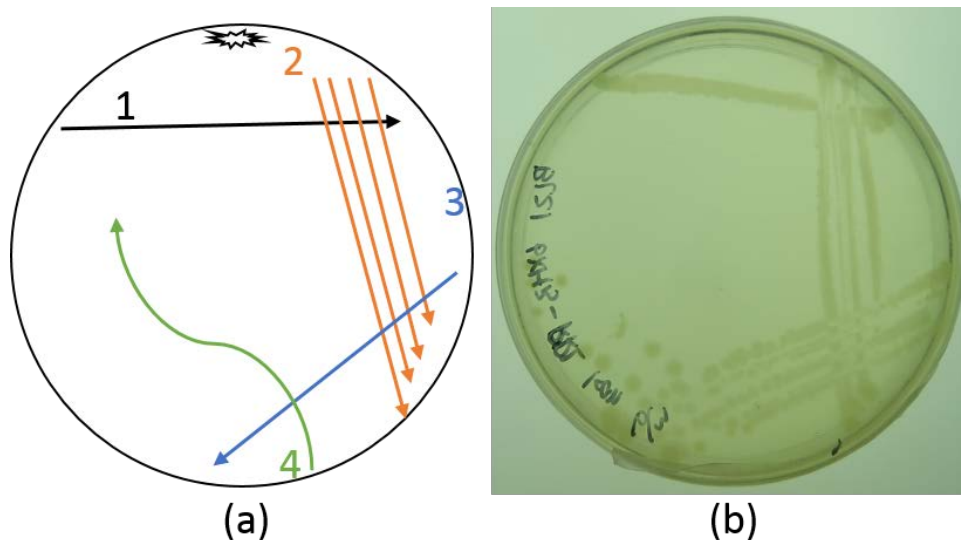


1X

9X

圖 4-8 轉型菌液塗抹量之菌盤外觀

將長出的菌落挑出做 PCR 及凝膠電泳確認目標基因(PRL)條帶是否出現，挑出帶有目標質體的菌落做培養並萃取出質體，重覆轉型步驟進 BL21(DE3)或是 C43(DE3)等具表達能力的菌種中，再次進行 PCR 初步確認轉型結果。取出帶目標質體的菌落培養並畫四向盤以及萃質體做保存、凍存、定序或後續表達實驗。



**圖 4-9 四向塗盤**

(a)四向圖盤之操作順序，每次畫線前，塗抹棒均需以酒精燈燒至發紅來殺死附著在塗抹棒上的菌體，為避免塗抹棒過熱，導致在接觸已塗抹在菌盤上的細菌死亡，可在盤中固定點輕觸培養基，使塗抹棒降溫。(b)BL21(DE3)\_pSEI-P 實際於 Kan/LB 培養盤操作結果。

#### 4.4 定序確認

將初步確認轉型成功後的細菌塗盤或萃取質體以及準備欲確認序列範圍的引子，委託明欣生物科技有限公司(Mission Biotech)進行 DNA 定序，時間約兩周即可回傳報告，最佳定序範圍約 1000 bp，前後 100 個 bp 會有一定程度的偏差，在引子設計或定序範圍的選擇需多加留意，若定序範圍較大可增加多段定序範圍，並使定序範圍有一定程度的重疊，可避免因定序偏差造成前後端幾個鹼基遺漏。本次定序將引子設計在 Vector 之上，即可確認外來基因有無銜接成功，定序結果如附圖所示。







#### 4.5 菌株培養的選擇

本實驗室的表達菌株為 BL21(DE3)與 C43(DE3)，在初次轉型表達菌種時選擇 BL21(DE3)，並記錄生長曲線以及表達後的生長狀況，觀察表達出來的蛋白是否為毒蛋白。

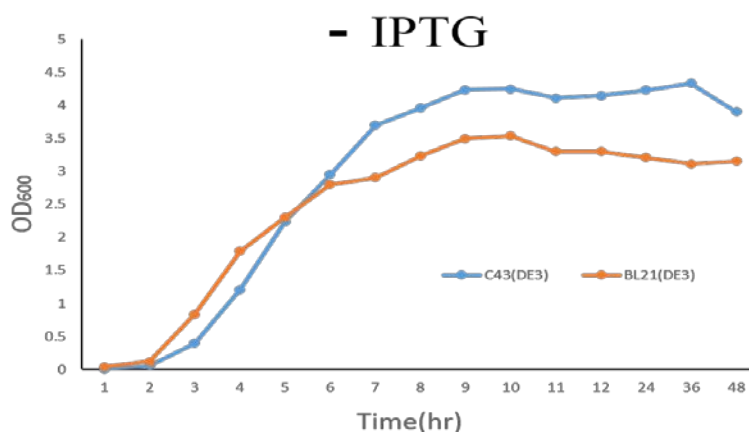


圖 4-12 C43(DE3)與 BL21(DE3)之生長曲線

在培養階段，BL21(DE3)達到  $OD_{600}=0.4\sim 0.6$  之速率較 C43(DE3)快，僅需 2.5 小時，C43(DE3)則約 3 小時。經長時間 37°C、200rpm 的培養下，細菌生長趨於穩定，C43(DE3)菌含量略多。

隨著菌盤保存的時間增長，發現 BL21(DE3)菌落逐漸產生螢光，在藍光顯示器下尤為明顯。根據參考文獻指出，當 lac 基因不足以抑制 T7 promoter 時，細菌在未加入 IPTG 誘導的狀況下也有可能產生微量的表達[6],[ 13]，這個問題在使用我們帶有 EGFP 基因的質體下，讓我們快速發現了這項蛋白質洩漏問題(Leaky)。而 C43(DE3)中含有 T7-lysozyme 基因，T7-lysozyme 可以抑制 T7 promote，因此能有效抑制 Leaky 的狀況發生。在圖 4-13 之中我們可以明顯看到，C43(DE3)在未含有 IPTG 之培養基上，並不會誘導而產生螢光，BL21(DE3)則明顯帶螢光色。



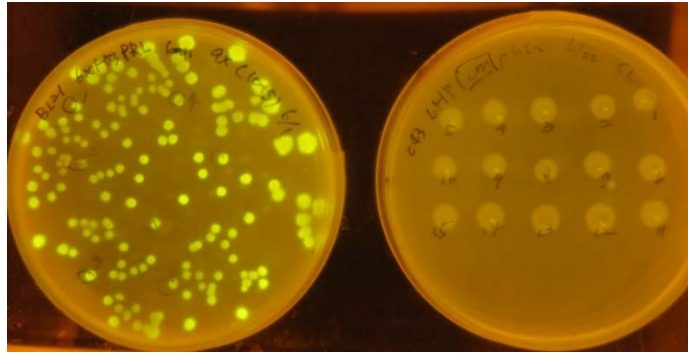


圖 4-13 BL21(左)與 C43(右)菌盤於藍光照射儀之外觀差異

若目標蛋白對於細菌具毒殺性(稱為毒蛋白)，BL21(DE3)大量表達的機制特色會使得存活的菌量下降，這時 C43(DE3)較適合用於該基因的表達。在經過繼代至  $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$ ，加入表達後繼續測量兩菌株於  $20^{\circ}\text{C}$ 、 $200\text{rpm}$  生長曲線，發現兩菌種菌量均達平衡狀態且無明顯下降的現象，代表此表達蛋白(PRL)並非毒蛋白，在 BL21(DE3)中進行表達並不會使細胞死亡。

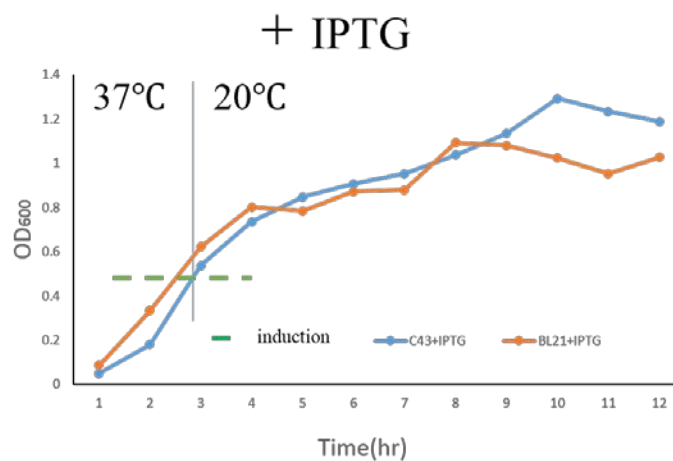


圖 4-14 C43(DE3)與 BL21(DE3)以 1mM IPTG 表達之生長曲線

BL21(DE3)在前期成長速度依舊較 C43(DE3)快，為探討表達蛋白對細菌的影響，將培養條件轉為  $20^{\circ}\text{C}$ 、 $200\text{rpm}$  之下以利蛋白質表達的條件進行培養，因溫度降低而使整體細菌數量成長有限，相較於  $37^{\circ}\text{C}$  平衡時的菌量較少，但整體趨勢仍無死亡的狀況出現。

#### 4.6 蛋白質表達條件

在菌盤保存在低溫環境的觀察下，意外的發現菌落中已有 Leaky 的情況發生，導致菌落呈現綠色螢光的現象，於是我們判斷溫度的調降雖會使菌株生長速度降低，但也可能因此改善蛋白質摺疊，形成具有活性、溶解性的正確結構。本研究設計不同溫度來進行表達，以找出最佳表達溫度，實驗設計溫度設定為 4、20、37°C 下，轉速固定 200 rpm，IPTG 作用濃度為 1mM，表達時間 4 小時，觀察細菌表達狀況(菌塊顏色)，並以 SDS-page 電泳來分析表達量的差異。

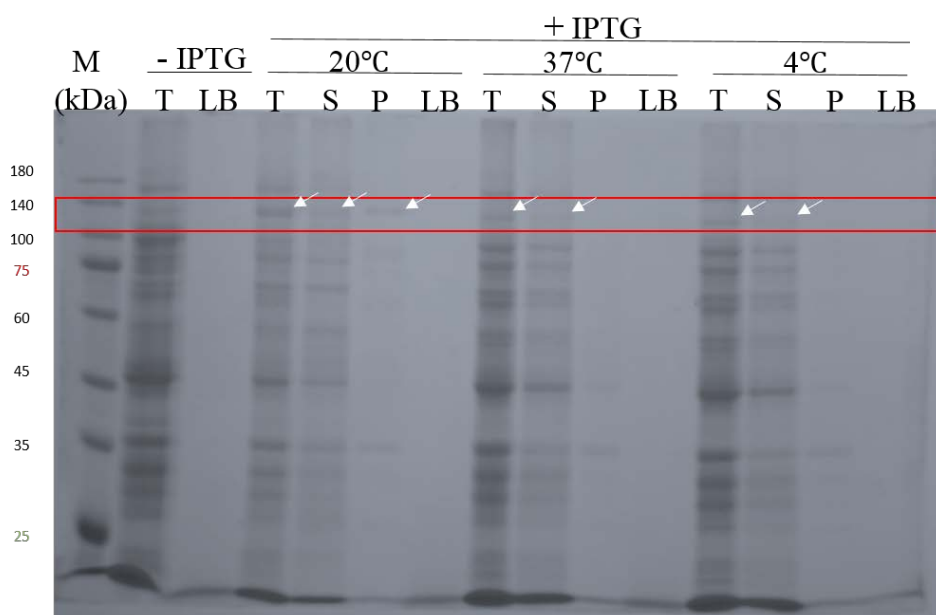


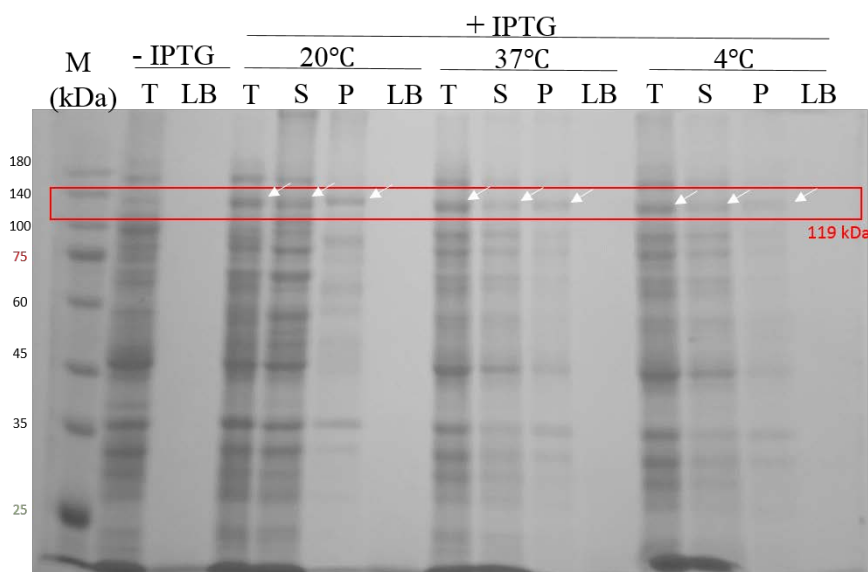
圖 4-15 BL21(DE3)\_pSEIP 於不同溫度下誘導 4 小時之結果

M: Marker (PM2500)、T: 全蛋白、LB: 培養液、S: 破菌上清液、P: 破菌沉澱相  
膠體濃度，聚集膠 5 %、分離膠 12.5 %。目標蛋白質大小 119 kDa，在表達後的全蛋白皆有明顯條帶，各條件中的上清與沉澱皆有微弱的條帶出現。

圖 4-15 顯示這組實驗中我們再次確認蛋白質不會因為 Leaky 的關係洩漏至培養液 (LB) 中，且 20°C 的上清液也出現了 119kDa 條帶，在 4、37°C 的條件僅有全蛋白出現目標條帶，無法確認目標蛋白存留在哪一相。因為整體條帶都偏弱，推測是菌量較少的緣故，導致蛋白質產量不高。

從上一組表達 4 小時的狀態推測，菌量在經過四小時的誘導後並無顯著的增加，

因此設計一組相同 IPTG 濃度與轉速的條件，溫度設定為 4、20、37°C，並將培養時間增至 24 小時，觀察蛋白質是否會隨著培養時間增長而增加。



**圖 4-16 BL21(DE3)\_pSEIP 於不同溫度下誘導 24 小時之結果**

M: Marker (PM2500)、T: 全蛋白、LB: 培養液、S: 破菌上清液、P: 破菌沉澱相  
 膠體濃度，聚集膠 5%、分離膠 12.5%。相較於 4 小時的表達，在 24 小時表達的目標條帶(119kDa)相對明顯許多，且不論條件為何，上清液與沉澱相都含有 119kDa 之條帶。

在圖 4-16 這組實驗中蒐集下來的菌量確實的增加，在相同菌量下目標蛋白質條帶也顯著提升，且在 4°C 與 20°C 離心下來的菌塊已較 37°C 的菌塊明顯帶綠色，但是除了上清液以外，pellet 的部分有出現了明顯的條帶，推測有可能是破菌不完全所導致。有趣的是，表達溫度並非越低越好，在中低溫表達的外觀明顯優於 4°C，如圖 4-18 所示。



**圖 4-17 低溫下表達外觀差異**

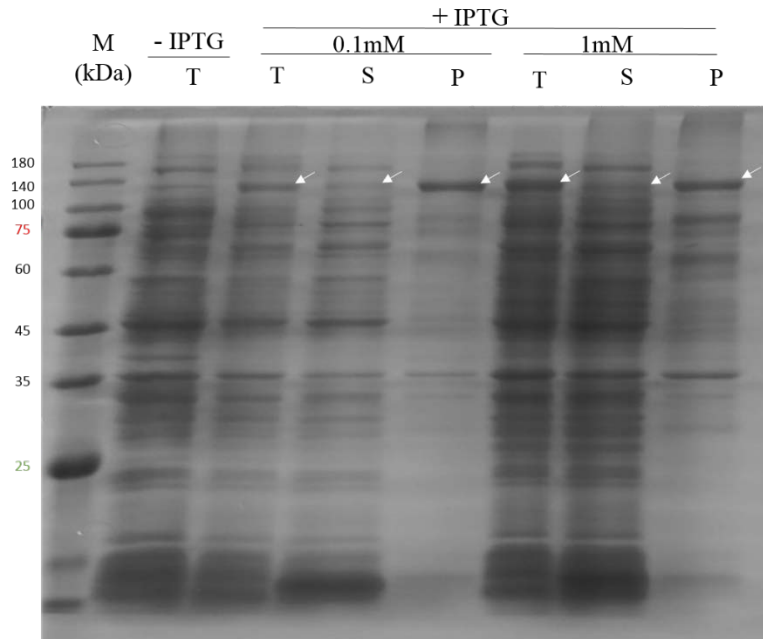
以 IPTG =1 mM，在 200 rpm 下表達 24 小時後，使用 6000g 離心 10 分鐘之 (a)表達溫度 20°C 菌塊外觀，(b)表達溫度 4°C 菌塊外觀。兩者間皆帶有螢光綠之色澤，而 20°C 螢光強度明顯高於 4°C。



**圖 4-18 BL21(DE3)與 C43(DE3)於相同溫度表達之外觀差異**

以 IPTG =1 mM，20°C，在 200rpm 下表達 24 小時後，使用 6000g 離心 10 分鐘之(a)BL21(DE3) 菌塊外觀與，(b) C43(DE3)菌塊外觀。在肉眼觀察下 BL21 表達 pSEI-P 的效力優於 C43。

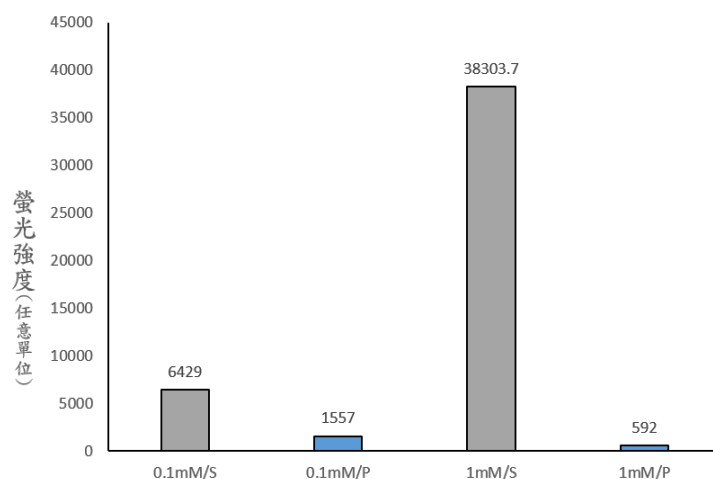
根據參考文獻指出，IPTG 作用濃度範圍為 0.1-1 mM，而在低濃度的條件下可以亦可改善蛋白質形成正確的折疊[3]，故實驗條件訂為 20 °C 下，作用濃度 0.1 mM 與 1 mM IPTG 在固定誘導時間 24 小時的影響。



**圖 4-19 BL21(DE3)\_pSEIP 於 20°C下加入不同 IPTG 濃度誘導 24 小時之結果**

M: Marker (PM2500)、T: 全蛋白、S: 破菌上清液、P: 破菌沉澱相，膠體濃度，聚集膠 5%、分離膠 12.5%。從 0.1mM 與 1mMIPTG 誘導後的全蛋白可以知道，高濃度的誘導劑確實的增加了蛋白質產量，兩者的沉澱相目標條帶(119kDa)亮度仍高於上清液的部分。

在圖 4-19 中觀察到雖然上清液有出現 119 kDa 條帶(lane4)，但很明顯沉澱相居多 (lane5、8)，1 mM 誘導出來的蛋白質量也更勝 0.1 mM 的實驗組，由此可知 1 mM IPTG 的表達效果較佳。就肉眼來看，雖沉澱相仍有螢光菌塊懸浮，但上清液已明顯帶螢光，SDS-PAGE 條帶的上清相不應該這麼微弱，於是將兩組實驗破菌液與誘導前後全蛋白分別位於螢光感測儀下偵測螢光強度，發現上清液的強度確實較強，故推測是在 SDS-PAGE 分析中 Sample buffer 的成分會切割了目標蛋白，導致膠上的目標條帶 119kDa 強度不足，切割完的片段大小分別為 56.7 kDa、39.1 kDa 與 23 kDa，除 (lane6、7)的 56.7 kDa 條帶較為明顯，其餘兩片段可能因尚未純化而與雜蛋白混合在一起，進行上清液的純化後繼續來探討目標條帶(119 kDa)變淡的可能。

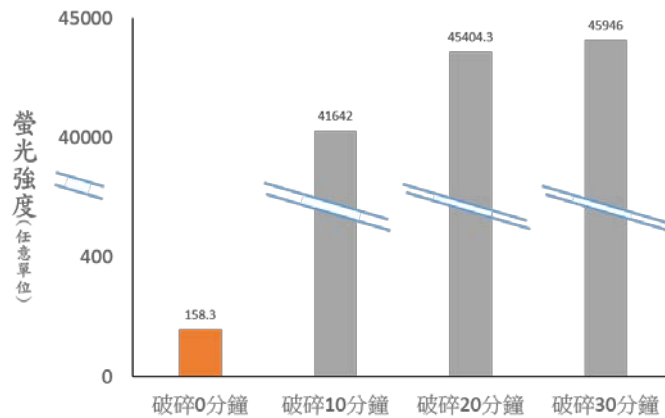


**圖 4-20 BL21(DE3)\_pSEI-P 於 20 度下表達 24 小時之破碎產物經螢光照射分析**

表達條件固定於 20°C、24 小時，探討 BL21(DE3)\_pSEI-P 於 IPTG 濃度為 0.1mM 與 1mM 的表達差異。菌塊於超音波破碎條件:瓦數 12W，震盪 5 秒、暫停 15 秒，批次總長 10 分鐘，將產物以 12000g 離心 30 分鐘後區分上清液與沉澱相，經 Excitation =430nm，Emission =505 nm，Gain=85 之照射數據分析，S：破菌上清液、P：破菌沉澱相。

在各個溫度條件表達之下我們發現，20°C 的表達螢光強度明顯優於 37°C，但溫度在更低的條件下反而會使細菌生長量驟減，使得整體表達出來的螢光蛋白質質量減少，於是得到在 10-20°C 的表達環境優於 4°C 與 37°C 的結論。而 IPTG 誘導濃度的探討中，我們由圖 4-19 顯示 0.1 mM-1 mM 所誘導出來的蛋白質含量中存在顯著差異，綜合溫度與 IPTG 濃度的測試，將把製備蛋白溫度條件固定在 20°C 且 IPTG 作用濃度為 1 mM 之下做誘導。

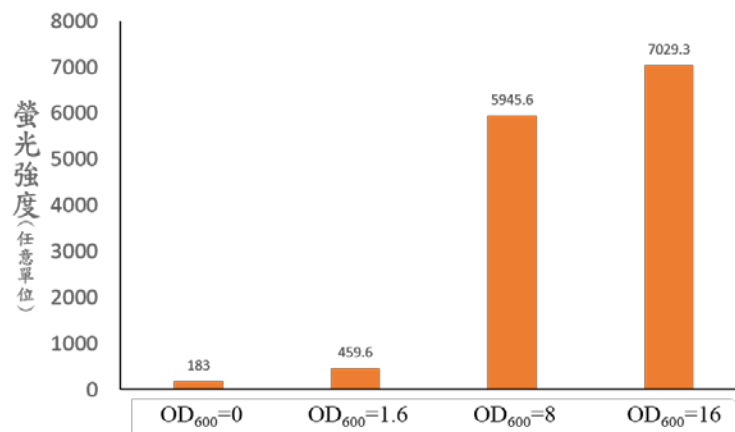
雖然肉眼與螢光照射儀的結果均指向目標蛋白是具可溶性的，明顯存在於上清液之中，但不可否認的是沉澱相也帶有不少目標蛋白，我們懷疑是細菌在破碎時並不完全，導致沉澱相裡的原菌量過多，使得 SDS-PAGE 分析時沉澱相出現 overexpression 的現象比上清液明顯許多，於是針對超音波破菌機做了一些試驗。



**圖 4-21 20°C、24hr、IPTG 1mM 之表達菌液於超音波破碎儀破菌**

超音波破碎條件:瓦數 12W，震盪 5 秒、暫停 15 秒，批次總長 10 分鐘，將產物以 12000g 離心 30 分鐘後取上清液，於螢光照射儀設定 Excitation =430nm，Emission =505 nm，Gain=85 之數據分析

我們從結果中知道在同樣的裂解液裡，蛋白質產量會隨破菌時間增加而提高，約在總長 20 分鐘之後緩和。我們猜測蛋白質是否在同樣裂解液中會達到飽和，於是將原菌液濃度稀釋至原液的 10% 與 50% 分別再次以相同條件破菌，探討不同菌量下獲得的螢光強度有無差別。



**圖 4-22 比較不同菌量之菌液破碎成效**

超音波破碎條件:瓦數 12W，震盪 5 秒、暫停 15 秒，批次總長 10 分鐘，將產物以 12000g 離心 30 分鐘後取上清液，於螢光照射儀設定 Excitation =430nm，Emission =505 nm，Gain=85 之數據分析



在試驗之下我們發現破菌時的細胞數量也是有極限值的，在超過作用範圍的菌量會使整體破菌效力變差，殘存過多未完成破碎的菌塊，使得離心下來的可溶性蛋白螢光強度並沒有得到顯著的提升，有效破碎的菌液濃度範圍約在  $OD_{600}=2\sim 8$ 。由於擔心 BL21(DE3) 產生 Leaky 的關係使得細菌強度產生變化，這裡採用 C43(DE3) 來進行蛋白質表達，在 4.5 節就已證明 C43(DE) 的外觀螢光強度並不如 BL21(DE3)，螢光強度照射結果再次證明 BL21(DE3) 較適合用來表達 pSEI-P。

#### 4.7 蛋白質初步純化

在經過 SDS-PAGE 與螢光感測儀數據分析顯示，目標蛋白是具有螢光性並且確實存在於上清液裡的，將上清液通入 HisTrap<sup>TM</sup> HP 中並以快速液態層析儀(FPLC)觀察  $OD_{254}$ (或  $OD_{280}$ )之吸收值，經過重複三次 loading 1 ml 破菌上清液，HisTrap column 明顯呈亮綠色，雜蛋白因缺乏與樹脂鍵結的能力，隨 Binding Buffer 不斷沖洗時帶出產生高訊號(3000mAu)，透過梯度流洗的方式觀察吸收值或電導度的變化，知道在約 30~50% EB 的比例下即可沖出 His-tag protein，這個方式可以幫助我們去知道多少濃度的 imidazole 是適合我們用來 Elute 的，直到以 100% EB 流洗後仍無其他峰值，推測管柱中剩餘的蛋白質符合我們的預期，僅只有目標蛋白成功鍵結。

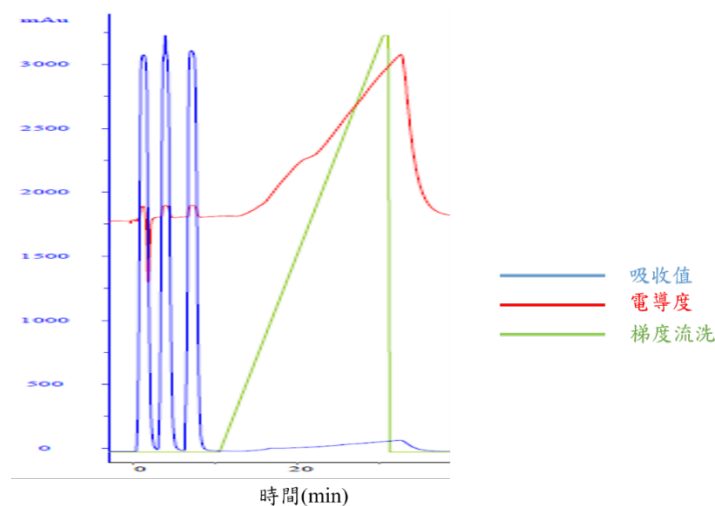


圖 4-23 目標蛋白於 His-tag 管柱中流洗測試



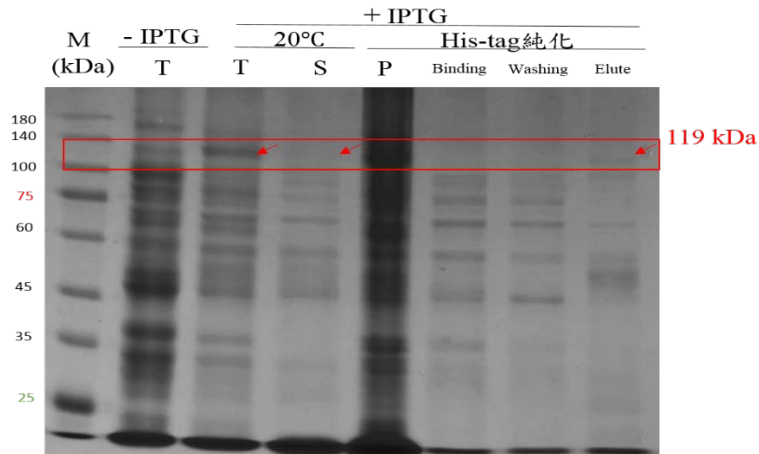


圖 4-24 目標蛋白 His 純化

M: Marker (PM2500)、T: 全蛋白、S: 破菌上清液、P: 破菌沉澱相，膠體濃度，聚集膠 5%、分離膠 12.5%。

分析 BL21(DE3)\_pSEI-P 於 20°C，IPTG=1mM 下表達 24 小時之表達前蛋白與表達後全蛋白的條帶差異，在 119kDa 之處可以觀察到表達後全蛋白有明顯的 overexpression。經過超音波破碎條件:瓦數 12W，震盪 5 秒、暫停 15 秒，總長 10 分鐘，將產物以 12000g 離心 30 分鐘分離上清液與沉澱相，以 Histrap HP column 通入 5 ml 上清液蛋白，蒐集通入樣品時不斷流洗出的液體 5 ml，與以 Washing Buffer 進行沖洗後流出的液體 5 ml，最終蒐集使用 Elution Buffer 流洗出的液體 5ml，進行 SDS-PAGE 分析。

從這片膠可以看出在蛋白質鍵結(Binding)、沖洗(Washing)過程中並沒有目標蛋白(119kDa)跟著流出，在蒐集完螢光區塊後的流洗相(Elute)出現微弱的目標條帶，推測管柱中剩餘的蛋白質濃度可能較低，使條帶不明顯，提高注入樣品量應可改善。在 Elute 中條帶依舊明顯斷開成數個片段(45kDa~60kDa、23kDa)，可能是樣品槽中的蛋白，因加熱變性與 DTT 的作用，使得內含肽提前發生作用而斷裂。

#### 4.8 蛋白質定量

在 BCA 蛋白質定量法下，我們製作了檢量線，此次定量的樣品是將 5 ml 的破菌上清液純化為 5 ml His-tag 融合蛋白，可以計算純化後目標蛋白的回收率。

表 4-6 上清液與純化蛋白液於 BCA 檢量下吸收值

測定	破菌上清液	純化蛋白液
1	4.548	1.181
2	4.639	1.187

3	4.64	1.125
---	------	-------

表 4-7 BCA 檢量線吸收值測定紀錄

次序	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	6.297	4.97	3.605	2.752	1.855	1.008	0.578	0.15	0.001
2	6.35	4.966	3.504	2.816	1.971	1.053	0.573	0.12	-0.002
3	6.296	4.907	3.437	2.743	1.922	1.047	0.557	0.119	0.001
平均	6.314	4.948	3.515	2.770	1.916	1.036	0.569	0.130	0

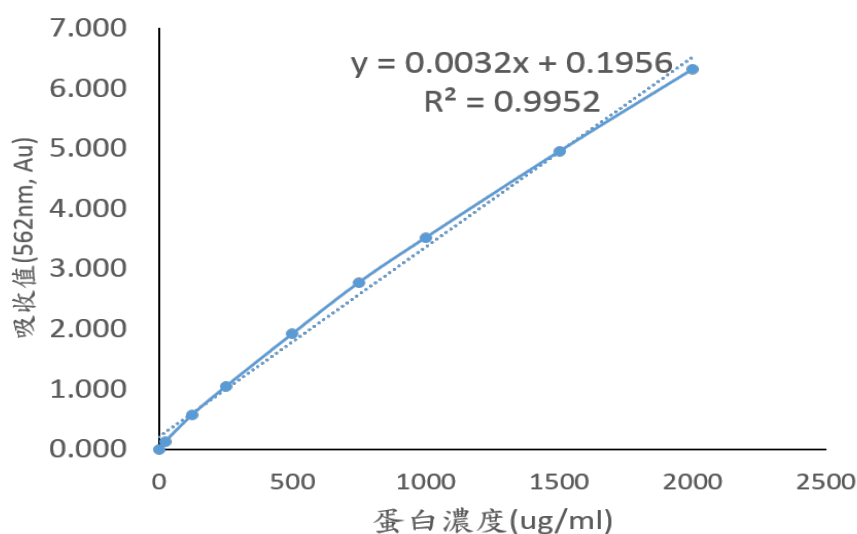


圖 4-25 BCA 蛋白質標準物定量標準曲線

經三重覆測量，本次純化後得到的平均吸收值為 1.16 與 4.609，將數值帶入回歸方程式可得純化後的蛋白質濃度約為 301.1 $\mu\text{g/ml}$ ，破菌上清液的蛋白濃度約為 1379  $\mu\text{g/ml}$ ，換算下來回收率約為 21.8%。

#### 4.9 內含肽的切割條件

在 pSEI 中添加了一段內含肽(intein)作為後續純化優化的特定蛋白，經由管柱分離出來的螢光蛋白中，依據文獻中提到，溫度的變化以及作用時間長度對切割條件有明

顯的影響[18]，於是我們將高濃度的切割溶液以帶螢光蛋白(119kDa)做稀釋，在 4°C、25°C、37°C 環境下加入旋轉、震盪的方式進行切割。

表 4-8 內含肽於 C-terminal 與 N-terminal 切割液配方

C-terminal site cleavage	N-terminal site cleavage
40 mM DTT	40 mM DTT
30 mM Tris pH 8.5	30 mM Hepes, pH 8.0
0.5 NaCl	0.5 NaCl

內含肽的特性在於 C 端與 N 端都能被切割下來，切割效率與相接的第一個胺基酸有關，但不論是何者幾乎都沒有足以反應完全的條件，因此後續純化方式需再加考量。在本論文中所使用的 PRL 蛋白質序列，第一個為 Leu 並且接在 N 端之後，根據圖 4-26 顯示，長時間室溫下的反應是有效率的

Table 1A

C-TERMINAL RESIDUE OF THE TARGET PROTEIN	% CLEAVAGE AFTER 16 HOURS*		% CLEAVAGE AFTER 40 HOURS*	
	4°C	23°C	4°C	23°C
Tyr Phe Gln Asn Thr Lys Ala His Leu <sup>1</sup> Met	65-80	80-95	75-90	85-95
Ile Arg Glu Trp Cys	30-55	60-85	50-70	70-95
Val	30	70	60	90
Gly	10	40	20	60
Asp <sup>2</sup>	10	20	20	30
Ser Pro	5-15	5-15	5-15	5-20

Table 1B

N-TERMINAL RESIDUE OF THE TARGET PROTEIN	% CLEAVAGE AFTER 16 HOURS*		% CLEAVAGE AFTER 40 HOURS*	
	4°C	23°C	4°C	23°C
Met Ala Gln	40-60	> 95	60-90	> 95
Gly Leu Asn Trp Phe Tyr	10-40	75-95	40-60	> 90
Val Ile Asp Glu Lys Arg His	< 10	50-80	10-20	70-95
Pro	< 10	< 10	< 10	< 10
Thr Ser Cys	< 10 not determined not determined	80 not determined not determined	20 not determined not determined	> 90 not determined not determined

圖 4-26 內含肽 C 端、N 端接點與首個外接胺基酸之切割效率關係圖[3]

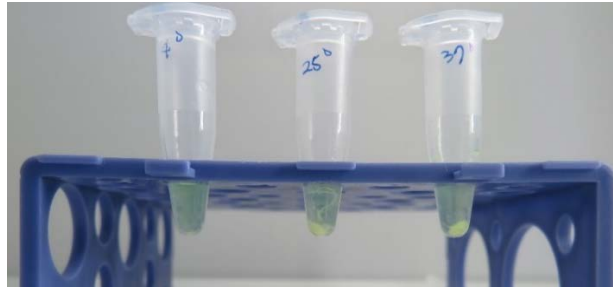


圖 4-27 目標蛋白切割 20 小時之外觀變化

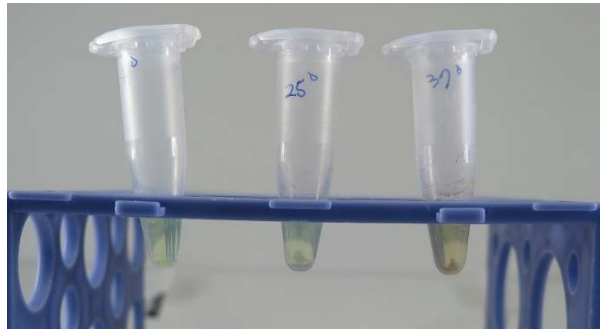


圖 4-28 目標蛋白切割 40 小時之外觀變化

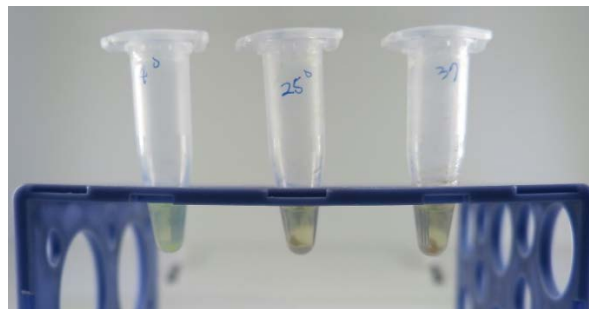
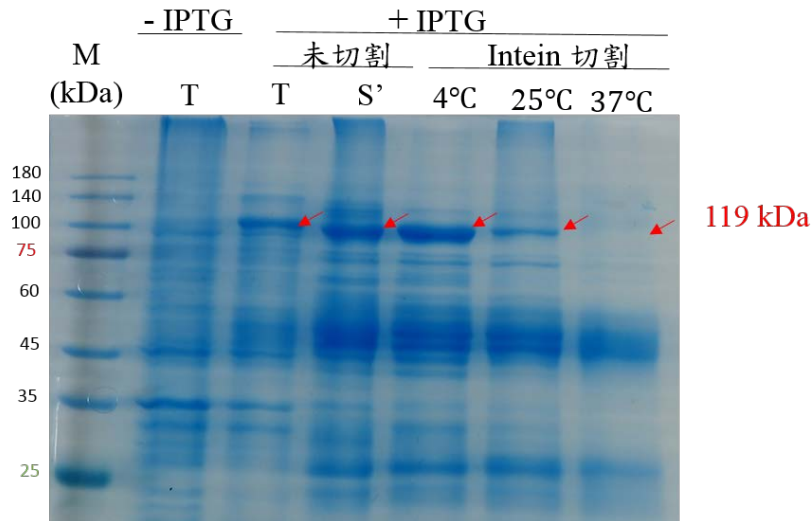


圖 4-29 目標蛋白切割 60 小時之外觀變化

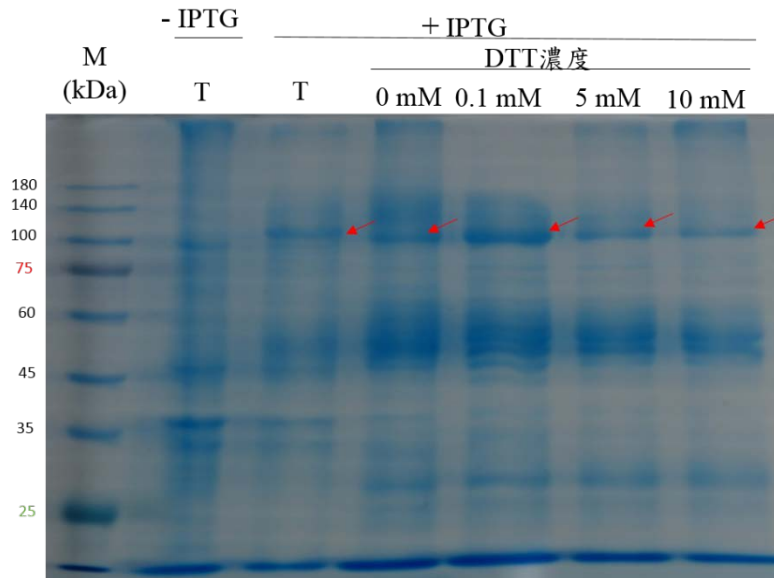
為了方便肉眼觀察，我們使用的反應物為將純化後的蛋白質濃縮為 5 倍，換算下來濃度約為  $1500\mu\text{g/ml}$ ，發現  $25^{\circ}\text{C}$ 、 $37^{\circ}\text{C}$  的切割測試下有明顯的沉澱物析出，隨切割時間增長，顏色發生不同的變化， $4^{\circ}\text{C}$  的作用相對緩慢。在 SDS-PAGE 分析下可以看出  $25^{\circ}\text{C}$ 、 $37^{\circ}\text{C}$  的切割使原條帶明顯縮減、甚至消失，表示常溫以上的溫度作用效果較佳，因此將切割條件設為  $37^{\circ}\text{C}$  下作用 40 小時。



**圖 4-30 於 4、25、37°C 切割 60 小時之 SDS-PAGE**

M: Marker (PM2500)、T: 全蛋白、S': 純化蛋白溶液，膠體濃度，聚集膠 5%、分離膠 12.5%。分析 BL21(DE3)\_pSEI-P 於 20°C，IPTG=1mM 下表達 24 小時之表達前蛋白與表達後全蛋白的條帶差異，在 119kDa 之處可以觀察到表達後全蛋白有明顯的 overexpression。經過 His-tag purification 分析未經切割液處理之純化蛋白與在 4°C、25°C、37°C 切割 60 小時後之純化蛋白之比較。

在分析 DTT 作用時間與切割效率的關係時，我們在 SDS-PAGE 分析遇到了困難，由於已知 Sample buffer 中含有 DTT 成分，會在跑膠分析時再次進行一次切割，導致膠體無法顯示真正的切割效率。於是設計了一組探討不同 DTT 濃度的 Sample buffer，在進行 SDS-PAGE 時的影響，出乎意料的是在無 DTT 成分的染劑中，目標蛋白仍被分割，使分析遇到了困難。



**圖 4-31 探討 Sample buffer 中不同濃度的 DTT 對目標蛋白的作用程度**

M : Marker(PM2500), T :全蛋白。分析 BL21(DE3)\_pSEI-P 於 20°C, IPTG=1mM 下表達 24 小時之表達前蛋白與表達後全蛋白的條帶差異, 在 119kDa 之處可以觀察到表達後全蛋白有明顯的 overexpression。配製 3 倍濃度的 Sample buffer 並調整 DTT 含量, 探討染劑中無 DTT、含有 0.1mM DTT、含有 5mM DTT 及一般作用濃度(含 10mM DTT)。

測試後我們發現, 即便是使用無 DTT 成分的蛋白質染劑來跑 SDS-PAGE 分析, 依然會有非預期的分離條帶出現, 因此使用 Native 的非變性膠來觀察是否是因 SDS 變性導致蛋白質提早斷裂。由於斷裂後的蛋白與欲分析的蛋白質 pI 值落在 7.2-7.4 之間, 因此在 Native SDS-PAGE 的聚集膠與染色用的 Sample buffer, 皆須將 pH 值調整至 8, 避免因蛋白質處於正電荷的關係而無法分析。

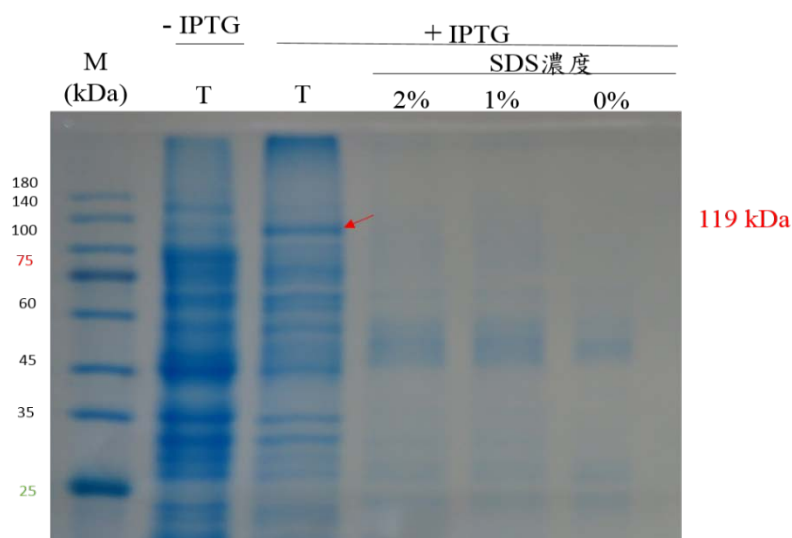


圖 4-32 探討 Sample buffer 中 SDS 的含量差異

M: Marker(PM2500), T: 全蛋白。分析 BL21(DE3)\_pSEI-P 於 20°C, IPTG=1mM 下表達 24 小時之表達前蛋白與表達後全蛋白的條帶差異, 在 119kDa 之處可以觀察到表達後全蛋白有明顯的 overexpression。配製 3 倍 Sample buffer 不含 DTT 且含有 2% SDS(一般作用含量)、1% SDS、與 0% SDS 之差異。

最終我們發現無論使用不含 DTT 的蛋白質染劑或是減少 SDS 帶來的變異性, 仍舊得不到僅有 119kDa 的條帶, 甚至使用非變異性膠分析時, 可能因蛋白質結構沒有完整解開, 整體蛋白質在電場的作用機制不穩固, 無法得出完善的分析結果。

## 第五章 結論與未來展望

本研究論文在確立蛋白質表達的部分有不錯的發現, 我們改變了實驗室以往在 37°C 下生長完即表達的做法, 採取將培養與表達區分成兩組條件的方式進行蛋白質的生產, 這樣的作法使蛋白質的正確性以及可溶性有一定程度的改善, 使後期蛋白質純化更加容易。實驗中有些問題尚未克服, 例如破菌成效不彰、沉澱相的目標蛋白仍不算少數, 以及切割後的分析遇到了很大的困難。因為 DTT 是切割時主要的影響條件之一, 在 SDS-PAGE 中的蛋白質染劑成分含有 DTT, 針對未進行切割的蛋白質作分析時, 目標蛋白亦會明顯斷開, 除了 DTT 以外, 染劑中的成分必須再逐一探討對雙硫鍵的影響, 來改善 SDS-PAGE 的分析結果。

在未來，我們可以嘗試在目標蛋白之前加入另一段帶色基因(EBFP、ERFP 等)，或許在分離純化的外觀上有些許幫助。針對目前既有研究有不少文獻指出 PRL 的突變 (G129R)可以和原生型 PRL 產生競爭，使突變 PRL 與 PRLR 結合，迫使訊號無法正常的傳遞，達到抑制癌細胞的功效[11]，建議後期可以嘗試使用 pfu 聚合酶來做 PCR 單點突變，再結合實驗室的細胞實驗系統，進行蛋白質藥物的模擬投遞試驗。



## 第六章 參考文獻

1. Auriemma, R.S., D. De Alcubierre, R. Pirchio, R. Pivonello, and A. Colao, *Glucose Abnormalities Associated to Prolactin Secreting Pituitary Adenomas*. 2019. **10**(327).
2. Bernard, V., J. Young, and N. Binart, *Prolactin - a pleiotropic factor in health and disease*. *Nat Rev Endocrinol*, 2019. **15**(6): p. 356-365.
3. Biolabs, N.E., *PROTEIN EXPRESSION & ANALYSIS-IMPACT™ Kit Instruction Manual*. NEW England Biolabs, 2019.
4. Hodgson, J., *Expression systems: a user's guide. Emphasis has shifted from the vector construct to the host organism*. *Biotechnology (N Y)*, 1993. **11**(8): p. 887-93.
5. Jonathan S. Berek, M., *MMS, Berek and Novak's Gynecology Fifteenth Edition*, ed. M. Deborah L. Berek. 2012, Amsterdam, The Netherlands: Wolters Kluwer.
6. Kang, Y., M.S. Son, and T.T. Hoang, *One step engineering of T7-expression strains for protein production: increasing the host-range of the T7-expression system*. *Protein Expr Purif*, 2007. **55**(2): p. 325-33.
7. Littlejohn, M.D., K.M. Henty, K. Tiplady, T. Johnson, C. Harland, T. Lopdell, R.G. Sherlock, W. Li, S.D. Lukefahr, B.C. Shanks, D.J. Garrick, R.G. Snell, R.J. Spelman, and S.R. Davis, *Functionally reciprocal mutations of the prolactin signalling pathway define hairy and slick cattle*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5861.
8. Lopez-Ozuna, V.M., I.Y. Hachim, M.Y. Hachim, J.J. Lebrun, and S. Ali, *Prolactin Pro-Differentiation Pathway in Triple Negative Breast Cancer: Impact on Prognosis and Potential Therapy*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 30934.
9. MacLeod, R.M., *Influence of norepinephrine and catecholamine-depleting agents on the synthesis and release of prolactin and growth hormone*. *Endocrinology*, 1969. **85**(5): p. 916-23.
10. Peirce, S.K., W.Y. Chen, and W.Y. Chen, *Quantification of prolactin receptor mRNA in multiple human tissues and cancer cell lines by real time RT-PCR*. *J Endocrinol*, 2001. **171**(1): p. R1-4.
11. Ramamoorthy, P., R. Sticca, T.E. Wagner, and W.Y. Chen, *In vitro studies of a prolactin antagonist, hPRL-G129R in human breast cancer cells*. *Int J Oncol*, 2001. **18**(1): p. 25-32.
12. Rodriguez Camargo, D.C., K. Tripsianes, T.G. Kapp, J. Mendes, J. Schubert, B. Cordes, and B. Reif, *Cloning, expression and purification of the human Islet Amyloid Polypeptide (hIAPP) from Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2015. **106**: p. 49-56.

13. Rosano, G.L. and E.A. Ceccarelli, *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 172.
14. Rowinska-Zyrek, M., D. Witkowska, S. Potocki, M. Remelli, and H. Kozlowski, *His-rich sequences – is plagiarism from nature a good idea?* New J. Chem., 2013. **37**(1): p. 58-70.
15. Rozakis-Adcock, M. and P.A. Kelly, *Identification of ligand binding determinants of the prolactin receptor*. J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7428-33.
16. Savino, W., *Prolactin: An Immunomodulator in Health and Disease*. Front Horm Res, 2017. **48**: p. 69-75.
17. SMITH, M.S., B.K. MCLEAN, and J.D. NEILL, *Prolactin: The Initial Luteotropic Stimulus of Pseudopregnancy in the Rat*. Endocrinology, 1976. **98**(6): p. 1370-1377.
18. Starokadomskyy, P.L., I.Y. Dubey, O.V. Okunev, and D.M. Irodov, *Construction of a chimeric intein-containing protein and the search for conditions for its cleavage*. Cytology and Genetics, 2007. **41**(2): p. 69-75.
19. Tikk, K., D. Sookthai, T. Johnson, S. Rinaldi, I. Romieu, A. Tjonneland, A. Olsen, K. Overvad, F. Clavel-Chapelon, L. Baglietto, H. Boeing, A. Trichopoulou, P. Lagiou, D. Trichopoulos, D. Palli, V. Pala, R. Tumino, S. Rosso, S. Panico, A. Agudo, V. Menendez, M.J. Sanchez, P. Amiano, J.M. Huerta Castano, E. Ardanaz, H.B. Bueno-de-Mesquita, E. Monninkhof, C. Onland-Moret, A. Andersson, M. Sund, E. Weiderpass, K.T. Khaw, T.J. Key, R.C. Travis, M.J. Gunter, E. Riboli, L. Dossus, and R. Kaaks, *Circulating prolactin and breast cancer risk among pre- and postmenopausal women in the EPIC cohort*. Ann Oncol, 2014. **25**(7): p. 1422-8.
20. Wallis, M., *Chapter 14 Mechanism of action of prolactin*, in *Hormones and their Actions Part II - Specific actions of protein hormones*. 1988. p. 295-319.
21. 吳令怡, 邱., *泌乳素的生理和高泌乳素血症*. 內科學誌, 2010: p. 305-321.
22. 施修明, *揭示 SUMO 蛋白質修飾化 (sumoylation) 抑制轉錄因子活性的分子機制*. 中央研究院週報第 1056 期, 2006: p. 3-4.
23. 德泰生物. *bacterial-IPTG-expression*. 2019.
24. 蘇遠志, *Microbial System*. 1999: 華香園.