

# 第一章 前言

近數十年來，世界各國罹患癌症的人數及其死亡率不斷向上爬升<sup>1,2</sup>。自 1982 年起，癌症已成為國內十大死因排名的第一位，每年罹患癌症的人數已突破三萬人以上，可說是國人健康的最大威脅。對女性而言，乳癌是全世界女性最常見的癌症，根據世界衛生組織的統計報告：全球一年約有 50 萬人死於乳癌。根據行政院衛生署的統計，台灣的乳癌發生率與死亡率也是有逐年遞增的趨勢。行政院衛生署 98 年國人前十大主要癌症死因分別為：(1)肺癌占 19.9%、(2)肝癌占 19.4%、(3)結腸直腸癌占 11.4%、(4)女性乳房癌占 4.0%、(5)胃癌占 5.7%、(6)口腔癌占 5.6%、(7)攝護腺癌占 2.3%、(8)食道癌占 3.7%、(9)胰臟癌占 3.7%、(10)子宮頸癌占 1.6%。乳癌在國人的癌症死因中名列前茅，可見其對女性生命是有極大威脅的。

臨床上，乳癌治療仍以手術治療為主，放射治療、化學治療及荷爾蒙治療為輔。目前臨床上最常使用的抗癌藥物有：葉酸拮抗劑(Methotrexate)、氟尿嘧啶(5-Fluorouracil)、阿霉素(Adriamycin)、三苯氧胺(Tamoxifen)等。這些藥物通常會混合使用，於周邊靜脈注射後，利用血液循環而運送至全身各部位，殺死手術無法切除及放射線治療無法觸及的癌細胞，但是對正常細胞也會造成傷害，因而產生了噁心、嘔吐、食慾不振、口腔潰爛、嚴重腹瀉、落髮及貧血等副作用。此外，西元1997年有學者發現，原本用來治療乳癌的藥物三苯氧胺可能會導致子宮頸癌的發生<sup>3</sup>，所以開發副作用小的抗癌藥物或發掘天然抗癌成分便成為一個很重要之研究方向。

胜肽藥物為小分子藥物中最具開發潛力的新穎藥物<sup>4</sup>，胜肽藥物的潛力在於胜肽為身體內最自然的傳輸與代謝產物，所以它能打破生物的屏障(Breaking the Biobarrier)，使其順利穿透腸胃道的細胞膜或血管內壁(Blood-Brain Barrier；BBB)而進入血液循環中，發揮治癒疾病的療效。在 2010 年本實驗室所發表的論文<sup>21</sup>中，作者設計一系列以 MyoD 蛋白質為藍本的胜肽，這些胜肽片段可以減弱 Id 蛋白質與鹼性的螺旋-環-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH) 區塊之蛋白

質 (MyoD 蛋白質等等) 間的交互作用力，使癌細胞的生長被抑制，其中，以 peptide 3C 的效果較為顯著。

實驗利用表面膜漿共振技術(surface plasmon resonance, SPR)和西方墨點轉漬法(Western blot)依序偵測以 peptide 3C 處理過的人類乳癌細胞內蛋白質，並對其中之特定蛋白質( $\beta$ -actin、Id1、Bax 和 Bcl-2 蛋白質)的含量變化進行評估與測量。實驗發現兩種分析技術對癌細胞內特定蛋白質的偵測結果具有相同的趨勢性。這代表表面膜漿共振技術於評估抗癌功效上的確有可能取代西方墨點轉漬法。

## 第二章 文獻探討

### 第一節 乳癌

#### 1-1 乳癌之簡介

女性乳房之發育和女性荷爾蒙有關，而女性荷爾蒙又分為兩大類：雌激素(estrogen)和黃體激素(progesterone)。雌激素中又分為三種醇素：春情素(estrone, E<sub>1</sub>)、雌二醇(17 $\beta$ -estradiol, E<sub>2</sub>)、雌三醇(estriol, E<sub>3</sub>)，其中雌二醇的作用性最強。雌二醇可由卵巢濾泡內膜(theca interna)、顆粒細胞(granulosa cell)、黃體(corpus luteum)、胎盤(previa)中分泌出來，其主要生理功能有：刺激濾泡的生長、刺激子宮內膜的增生、發育第二性徵、刺激乳房內乳腺的生長等。而黃體激素可由黃體及胎盤中分泌，其主要生理功能有：刺激月經前子宮內膜的增生、刺激子宮頸及陰道的生理週期變化、乳腺小葉及腺泡的發育等。許多的研究皆指出雌激素會參與乳癌的誘發和擴展，而雌激素之荷爾蒙取代療法也會增加乳癌的發生率<sup>5</sup>。一般而言，乳癌的發生主要和年齡、種族、第一次懷孕年齡、家族疾病史、飲食習慣與生活作息有一定相關性，但是導致乳癌發生的相關原因與作用機制卻依然不明<sup>6</sup>。

當正常乳房細胞被誘發為原發性或早期之乳癌細胞時，其細胞的生長雖仍受雌激素的控制，但其對雌激素的感受度卻具有很高的敏感性，這代表著此時期的乳癌細胞是屬於雌激素依賴(estrogen-dependent)型的。復發性或是較後期的乳癌細胞則會失去對雌激素的高敏感性，其癌細胞的生長轉變為不受雌激素之影響，這代表著此時期的乳癌細胞是屬於非雌激素相關(estrogen-independent)型的。

#### 1-2 實驗常用的人類乳癌細胞株

實驗室中常用的人類乳癌細胞株有以下三種，分別是 MCF-7 cells (estrogen dependent)、MDA-MB-231 cells (estrogen independent)以及 MDA-MB-453 cells (ErbB over-expression)。

### **1-2-1 MCF-7 cells (estrogen dependent)**

MCF-7 cells 類型為 human breast adenocarcinoma，種 (species) 為 *Homo sapiens* (human)。其生長特性為貼附型的細胞，具有雌激素接受體(Estrogen receptor) 過度表現，ER (+)，為雌激素依賴型的乳癌細胞株，卻有極低之 ErbB-2 接受器表現<sup>7,8</sup>。

### **1-2-2 MDA-MB-231 cells (estrogen independent)**

MDA-MB-231 cells 類型為 human breast adenocarcinoma，種 (species) 為 *Homo sapiens* (human)。其生長特性為貼附型的細胞，具有突變的 p53 和缺乏功能性的雌激素接受體(Estrogen receptor)，ER (-)，為非雌激素依賴型乳癌細胞株<sup>5</sup>。

### **1-2-3 MDA-MB-453 cells (ErbB over-expression)**

MDA-MB-453 cells 類型為 human breast adenocarcinoma，種 (species) 為 *Homo sapiens* (human)。其生長特性為貼附型的細胞，具有 ErbB-2/neu 接受器過度表現，為目前臨床乳癌治療中最頑強的乳癌細胞種類<sup>9,10</sup>。

## 第二節 Id1蛋白質之胜肽拮抗物peptide 3C

文獻<sup>11,12</sup>指出Id 蛋白質與MyoD蛋白質間的親和性很好，而Id 蛋白質對於腫瘤細胞的形成是必須的因子之一<sup>13-20</sup>，因此若抑制Id 蛋白質的活性將可以減緩或抑制癌細胞生長與腫瘤的轉移性。在2010年本實驗室所發表的論文<sup>21</sup>中，作者設計一系列以MyoD蛋白質為藍本的胜肽，如表2-1，這些胜肽片段可以抑制Id蛋白質的高親和力，使Id蛋白質與鹼性的螺旋-環-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 區塊之蛋白質 (MyoD 蛋白質等等) 間的交互作用力被干擾，而抑制了癌細胞的生長。應用固相胜肽合成法合成設計之胜肽後，以逆相高效能液相層析儀分離純化胜肽，並經由基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀鑑定其分子量。最後，培養出不同的腫瘤細胞株並以胜肽處理後，進一步評估胜肽對癌細胞之影響性。研究結果發現 peptide 3C (H-Tyr-Ile-Glu-Gly-Leu-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg-Asp-Gln-Cys-NH<sub>2</sub>) 具有不錯之抗癌細胞增生的效果，如圖2-1。從細胞存活率實驗(MTT assay)中發現peptide 3C在濃度25 μM左右時，可以使將近一半的人類直腸癌細胞(HT-29 cells)及人類乳癌細胞(MCF-7 cells)走向細胞死亡的結果；另外，peptide 3C在濃度0, 25, 50, 75, 和100 μM下，都不會使大量的人類皮膚細胞死亡，顯示peptide 3C在一定濃度範圍內對正常細胞沒有毒殺作用。在流式細胞技術(flow cytometry)的實驗中發現人類乳癌細胞加入5 μM 的peptide 3C 24小時及48小時後，細胞週期中的sub-G1(細胞休眠)期上升，G0/G1期(細胞生長)下降，顯示癌細胞走向了細胞死亡的路徑；S期(合成細胞內的DNA)的下降，則會使細胞內蛋白質的產量降低。

表2-1. 以MyoD蛋白質為藍本的胜肽之名稱與胺基酸序列組成(Chen, C. H. et al.

*J Pept Sci.* 2010, 16, 231 - 241.)

序列名稱	胺基酸序列組成
peptide 3A	H-Lys-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Gln-Ala-Ile-Arg-Tyr-Ile-Glu-Gly-Leu-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg-Asp-Gln-NH <sub>2</sub>
peptide 3B	H-Leu-Arg-Gln-Ile-Arg-Tyr-Ile-Glu-Gly-Leu-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg-Asp-Gln-Cys-NH <sub>2</sub>
peptide 3C	H-Tyr-Ile-Glu-Gly-Leu-Gln-Ala-Leu-Leu-Arg-Asp-Gln-Cys-NH <sub>2</sub>
peptide 3D	H-Ala-Leu-Leu-Arg-Asp-Gln-NH <sub>2</sub>

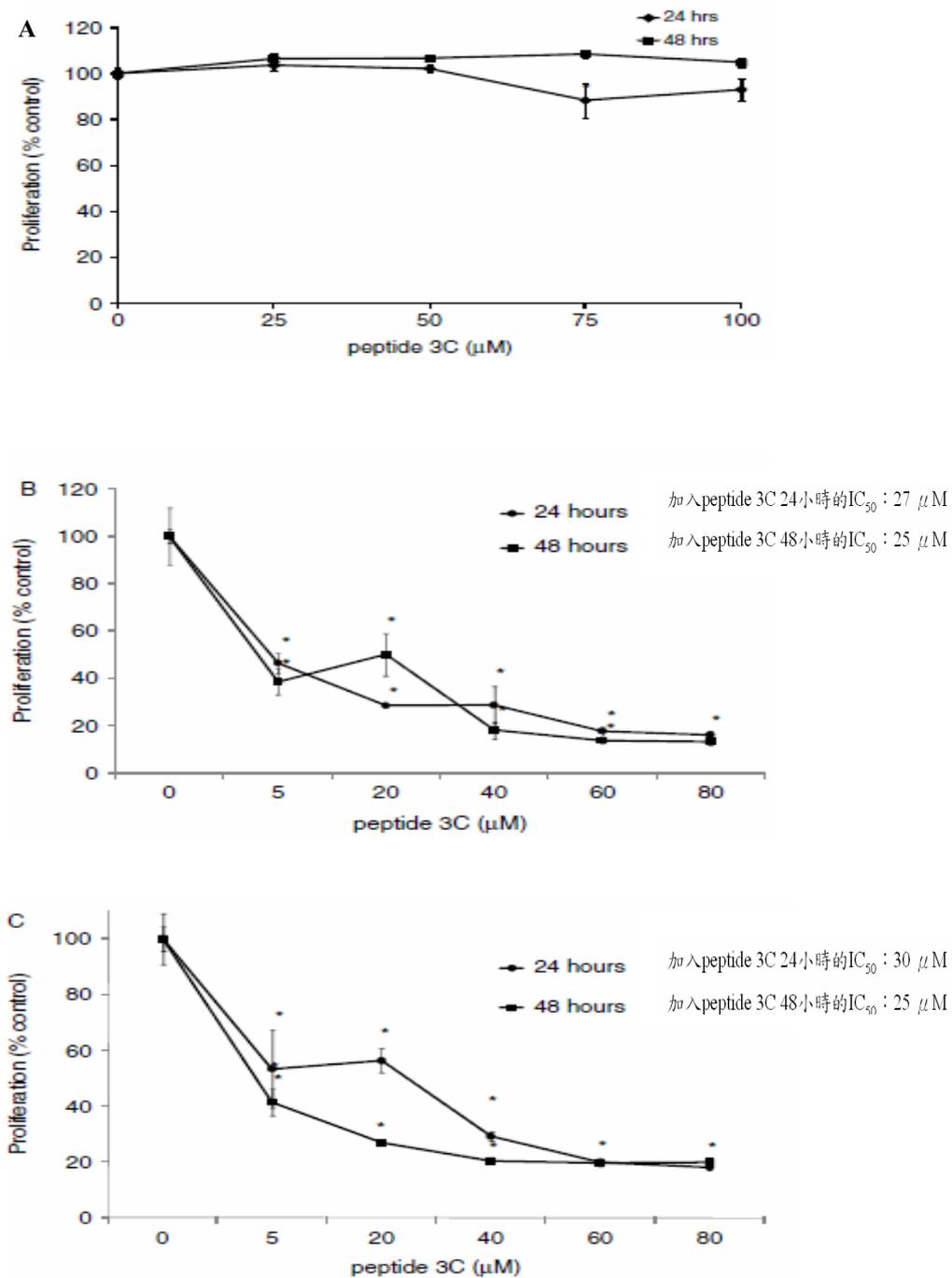


圖 2-1. 以 peptide 3C 處理不同細胞株之細胞存活率測試圖。(A) 以 0, 25, 50, 75, 和 100  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理人類皮膚細胞(human skin cells) 24 小時及 48 小時的細胞存活率實驗圖 (B) 以 5, 20, 40, 60, 和 80  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理人類直腸癌細胞(HT-29 cells) 24 小時及 48 小時的細胞存活率實驗圖 (C) 以 5, 20, 40, 60, 和 80  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理人類乳癌細胞(MCF-7 cells) 24 小時及 48 小時的細胞存活率實驗圖 (Chen, C. H. et al. *J Pept Sci.* 2010, 16, 231–241.)

## 第三節 細胞凋亡 (apoptosis)

### 3-1 細胞凋亡的定義

細胞凋亡 (apoptosis) 的詞彙最先是由在亞伯丁(Aberdeen)大學從事古典希臘文學的 James Cormack 教授在 1972 年建議使用的，而病理學家 John Kerr 也在 1972 年首度提出了細胞凋亡 (apoptosis) 的概念<sup>22</sup>。至今，人們對細胞凋亡的現象、細胞凋亡分子和相關的生化機制造今仍尚未徹底了解；目前的初步研究成果大多源自於對 Bcl-2 基因家族的研究。細胞凋亡原本字面上的意思是指秋天的樹葉或花瓣從樹上自然凋謝或掉落。其中“*Apo*”的意思是指「分離、分開」的意思；而“*ptosis*”的字根意義是指「落下」，也有「閉上眼」的意思。細胞凋亡也被稱為是生理上的細胞死亡 (physiological cell death) 或是計畫性的細胞死亡 (programmed cell death)，在細胞的生理上扮演著相當重要的角色<sup>23</sup>。在胚胎發育或是精子形成的過程中都會發生細胞凋亡<sup>24</sup>。除此之外，當正常的細胞受到傷害而發生基因突變時，也會自動引發細胞凋亡的機制使突變的細胞死亡，避免突變的遺傳<sup>25</sup>。

### 3-2 細胞凋亡的啟動

細胞凋亡的啟動方式有三種方式：第一種方法是沉默基因 (silent gene) 的誘導與活化，也就是影響細胞凋亡的發生是取決於某些沉默基因的表達上；第二種方法是細胞中死亡訊息的釋放，也就是細胞在某些抑制因子 (例如 Bcl-2 蛋白質) 的作用下，會使細胞死亡的效能受到抑制或阻遏，但是只要將抑制因子消除，則細胞的死亡訊息就會被釋放出來，並在細胞中予以表達；第三種方法是細胞外的信號傳導，當外界的細胞凋亡觸發因子以跨越細胞膜的方式，將細胞凋亡的訊息傳遞給細胞，並因此產生出一系列的細胞死亡訊息之傳遞，最後造成細胞產生出快速的凋亡反應。

### 3-3 細胞凋亡的過程

細胞凋亡可分為三個階段：誘導期(induction phase)，效應期(effector phase)，降解期(degradation phase) 和清除期。在誘導期<sup>26</sup>的過程中，細胞會接受各種產生凋亡之信號而因此引發出各種不同的效應：細胞核中的核仁會率先崩解，並形成數個碎塊；核膜內層表面的染色質邊緣會形成一些新月形的碎塊，細胞表面微絨毛消失，最後細胞與細胞核的體積也會隨之萎縮，這會使細胞的密度垂直上升，核膜因此向內凹陷。進入效應期<sup>27</sup>後，經過一些決定細胞命運（存活/死亡）的調控點後，細胞會進入不可逆的細胞死亡現象，這些調控分子包括一系列原癌基因和抑癌基因的產生和作用，其中 Bcl-2 基因家族有著決定性的作用：向內凹陷的核膜會被染色質所包圍，形成細小的團塊(膜被顆粒)。細胞的細胞膜也會進一步向內凹陷及皺折，並在細胞膜表面形成泡狀的架構，藉此包覆住核膜裂解後所形成的膜被顆粒，進一步形成凋亡小體。降解期和清除期則會產生出更明顯的凋亡現象<sup>28</sup>：走向細胞凋亡的細胞其絕大部分或全部皆會形成凋亡小體，並被所在部位附近的巨噬細胞或其他免疫細胞所辨識、清除和吞噬。

細胞凋亡是一種對細胞具有保護性的死亡方式，此種細胞死亡過程完全不影響其它周遭細胞的生理運作，這也是細胞凋亡的最大特色，與一般的細胞死亡方式有很大之不同。當細胞凋亡處於早期時，在細胞內可以偵測到鈣離子( $\text{Ca}^{2+}$ )濃度的上升。研究<sup>29</sup>發現細胞內增加出的鈣離子會與三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)一起作用於染色質表面，使原本呈現出緊密折疊狀的染色質變得鬆散，並會因此露出其親水端的部位，以便去氧核糖核酸酶(DNase)加以水解。當細胞凋亡進入晚期後，細胞內的去氧核糖核酸酶會被活化，進一步將細胞內的去氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)加以分解，最後產生出180~200個鹼基對(base pair, bp)或是其倍數的去氧核糖核酸片段。此時如果藉由1.8%的洋菜糖膠體(agarose gel)對此去氧核糖核酸片段進行電泳分析，膠體上會出現特殊的梯形電泳帶，此實驗結果可做為判定細胞凋亡是否發生的特徵及依據<sup>30</sup>。

### 3-4 細胞凋亡 (apoptosis) 與細胞壞死 (necrosis) 的差異

細胞凋亡<sup>36</sup> 大部分是發生在單一細胞中。依其時間發生的先後順序，它可以分為兩個時期：早期(early stage)以及晚期(later stage)。在細胞凋亡的早期時，會出現染色質濃縮(condensation of nuclear chromatin)、細胞質濃縮(condensation of cytoplasm)、細胞核破碎化(nuclear fragmentation)以及細胞皺縮(shrinkage)等特殊現象；到了細胞凋亡的晚期時，細胞會開始發生裂解作用，進一步形成凋亡小體(apoptotic bodies)<sup>31</sup>。在整個細胞凋亡的過程中，並不會發生胞器或是細胞膜的破裂與受損，因此不會引起發炎反應或危害到周圍組織。如圖 2-2。

細胞壞死大部分是同時發生在一群細胞中，依其時間發生的先後順序，也可以分為早期與晚期兩個時期。在細胞壞死的早期時，細胞與細胞內之胞器會脹大(swelling)；到了細胞壞死的晚期時，細胞膜會承受不住細胞膨脹的壓力而發生破裂的現象(rupture)。由於細胞膜發生了破裂，因此會釋放出一些細胞內的發炎物質而引起了局部之發炎反應，最後也會因此傷害到鄰近的細胞或組織其完整性<sup>32-35</sup>。如圖2-2。

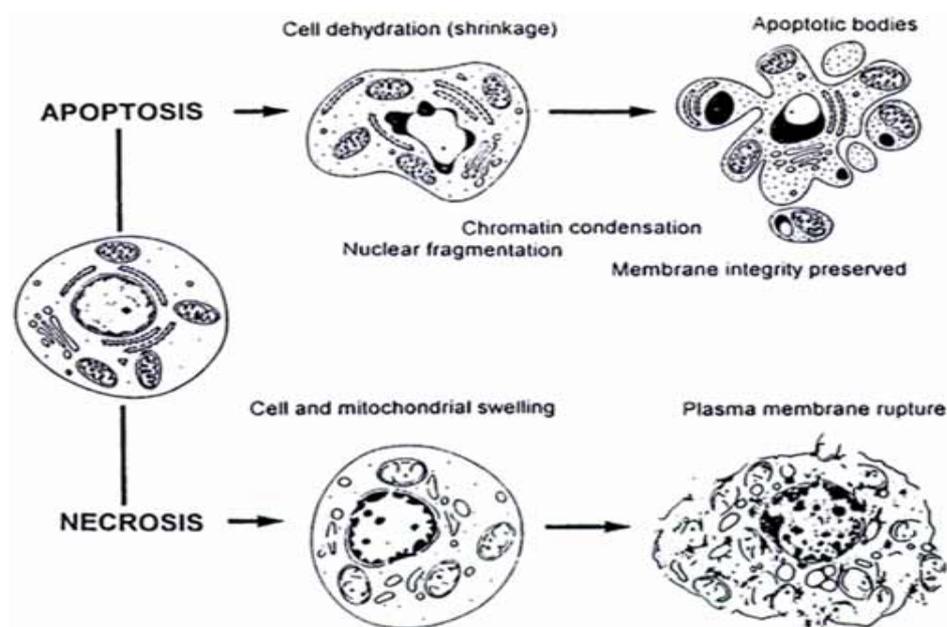


圖 2-2. 細胞凋亡 (apoptosis) 與細胞壞死 (necrosis) 的差異。(Lawen A. *BioEssays*.

2003, 25, 888–896.)

### 3-5 細胞凋亡的基因調節

細胞凋亡(apoptosis)是最常見的細胞死亡方式。細胞凋亡對細胞發展主體防禦(host defense)和抑制致癌蛋白質的表現上非常重要。細胞凋亡的調節如果產生異常現象，會導致風濕病、血管疾病、愛滋病或是癌症等病狀的發生。在許多蛋白質及調節基因中，Bcl-2 家族在抑制或促進細胞凋亡上扮演重要的角色。

細胞凋亡會受到許多基因的調控，這些基因包含p53基因、Bcl家族、cytochrome c、FAS基因...等，其中本篇論文主要著重在Bcl家族。Bcl家族包含Bcl-2、Bax、Bcl-xL、Bad...等基因，是一個與細胞凋亡相關的基因家族<sup>37</sup>。

細胞凋亡的抑制基因中以Bcl-2與Bcl-xL為其代表性的基因，它們會造成腫瘤的發生與癌細胞的誘發<sup>38</sup>。Bcl-2蛋白質是細胞膜上的整合蛋白質，在粒腺體會參與細胞凋亡途徑中的調控作用，對細胞凋亡因子的釋放也有所控制。Bcl家族中能促進細胞凋亡之蛋白質以Bad、Bak、Bax和Bcl-Xs為主要作用者<sup>39</sup>。Bax蛋白質是以不活化的狀態存在於許多細胞的細胞質中，當面臨細胞凋亡因子的刺激時，Bax蛋白質會產生構型上的變化並露出原本被覆蓋住的細胞膜區域，因此促使Bax蛋白質轉移至粒線體的膜上，進一步引起下游的cytochrome c 和其他凋亡基因的表現及釋放。在正常情況下，Bcl-2蛋白質與Bax蛋白質之間維持著一定的表現量比率以調節細胞內的狀態。當Bcl-2蛋白質的表現量高於Bax蛋白質時，會使細胞凋亡的發生被阻礙；然而若是Bax蛋白質表現量大於Bcl-2蛋白質時，細胞便會進入細胞凋亡的狀態<sup>40</sup>。

## 第四節 $\beta$ -actin 蛋白質( $\beta$ -肌動蛋白質)

### 4-1 細胞骨架的簡介

細胞骨架的效用在於維持細胞的形態和保持細胞內部結構的有序性。細胞骨架(cytoskeleton)是由蛋白質(proteins)所構成的複雜而精細之框架，相互交錯地分布在細胞質(cytoplasm)中，有微管(microtubule)、中間絲(intermediate filament)和微絲(microfilament)三種，這些框架的主要成分都是蛋白質<sup>41,42</sup>。由肌動蛋白質(actin)所構成的多聚體纖維(fibros actin)-微絲，是一種較主要的細胞骨架組成因子。另一種重要的細胞骨架纖維則是由微管(microtubules)所組成。微管也是一種蛋白質的多聚體，由 $\alpha$ -微管蛋白質及 $\beta$ -微管蛋白質所組成，其分子量皆為55 kDa。中間絲則是由纖維蛋白質所組成的。如圖2-3。

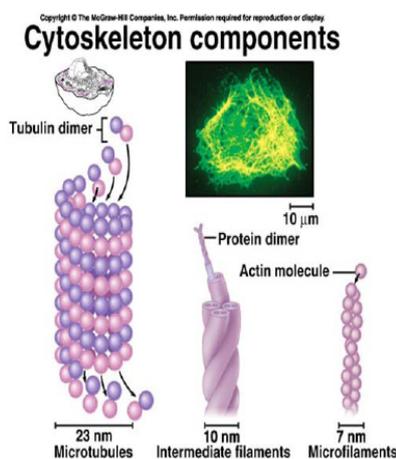


圖2-3. 細胞骨架的組成成分。(http://catalogs.mhhe.com/mhhe/home.do)

### 4-2 $\beta$ -actin蛋白質的簡介

$\beta$ -actin 蛋白質是細胞骨架(cytoskeleton)蛋白質之一，分子量為43 kDa，與細胞的移動能力(mobility)有關。 $\beta$ -actin 蛋白質常以聚合物(polymer)的型態存在於許多細胞的突出部位(protusion)之內，這顯示其功能與細胞的活動力是有其關連性的。最近的研究更顯示出 $\beta$ -actin 蛋白質在癌細胞內的位置和癌細胞轉移的能力有密切關係，尤其是針對具有高度轉移性的癌細胞，其對生長因子的化學趨向性(chemostasis)以及癌細胞之移動性都和 $\beta$ -actin 蛋白質有一定的關連性。細胞的移動性又與 $\beta$ -actin 蛋白質在細胞突出部位的聚合化程度有關。 $\beta$ -actin 蛋白質在細胞中為一種常態性表現的蛋白質，可作為生物化學實驗中的內控制組。

## 第五節 Id (inhibitor of DNA binding or inhibitor of differentiation)蛋白質

### 5-1 Id蛋白質之簡介

Id(Inhibitor of DNA binding, inhibitor of differentiation)蛋白質是DNA結合蛋白質的抑制物，屬於抑制DNA與轉錄因子結合的蛋白質家族，由Id 基因所轉譯的Id蛋白質可分為Id1蛋白質、Id2蛋白質、Id3蛋白質及、Id4蛋白質四大類<sup>43, 44</sup>。Id 蛋白質包含了一個高度保留的helix-loop-helix (HLH)雙體區塊<sup>45</sup>，如圖2-4。Id 蛋白質會與DNA 形成結合並藉此抑制細胞的分化，是屬於負調節因子的一種，其作用機制是與目標鹼性的螺旋-環-螺旋(Basic helix-loop-helix, bHLH)蛋白質形成具有高親和性的異二聚體(heterodimer)後，藉此阻止bHLH 蛋白質與另一個具有組織特異性之bHLH 蛋白質形成同二聚體(homodimer)而抑制了DNA 分化基因的轉錄<sup>46-49</sup>。Id蛋白質也可藉由與E蛋白質、Ets(E26 transformation specific)錄因子、以及腫瘤抑制因子之Rb蛋白質(retinoblastoma protein)家族的結合而抑制基因的轉錄作用<sup>50-57</sup>。

	helix-1	loop	helix-2
	<i>abcdefghijkl</i>		<i>abcdefghijkl</i>
(66-106)-hId1	LYDM <u>NG</u> CYSRLKELVP	TL <u>PQ</u> NRKVS	KVEILQHVIDYI <u>RD</u> LQ
(36-76)-hId2	LY <u>NM</u> ND <u>CYS</u> LKELVP	S <u>IP</u> QNKVS	K <u>ME</u> ILQHVIDYI <u>LD</u> LQ
(41-81)-hId3	L <u>DD</u> M <u>NH</u> CYSRL <u>REL</u> VP	<u>GV</u> PR <u>GT</u> QLS	<u>Q</u> VEIL <u>Q</u> RVIDYI <u>LD</u> LQ
(65-105)-hId4	<u>QC</u> DM <u>ND</u> CYSRL <u>RR</u> LVP	T <u>IP</u> PNKVS	KVEILQHVIDYI <u>LD</u> LQ
conserved residues	---MN-CYS-L--LVP	--P-----S	--EILQ-VIDYI-DLQ

圖 2-4. Id 蛋白質的 helix-loop-helix (HLH) 區塊之胺基酸組成。(Sebastian K. Biopolymers. 2005, **80**, 762–774)

越來越多研究<sup>46, 58-60</sup>顯示Id蛋白質的過度表現與腫瘤生長或轉移的關係非常密切，其中有研究<sup>61</sup>發現Id1蛋白質在胰臟癌細胞中會有過度之表現，但是在正常的胰臟細胞卻很少發現Id1蛋白質的蹤跡。由此篇論文結果可歸納出Id 蛋白質

的過度表現可能會導致腫瘤的生成。在其他的研究中<sup>62</sup>也指出Id蛋白質對胚胎的中樞神經系統及其血管的形成有著重要且關鍵的影響。另外，有關子宮內膜細胞、乳癌細胞與Id1 蛋白質過度表現的關係與組織切片的研究論文亦在2000<sup>63</sup>及2001<sup>64</sup>年發表。此外亦有論文顯示腫瘤組織中Id 2、Id3 和Id 4 蛋白質的高度表現與腫瘤組織的生長性有關。有些研究顯示，若抑制腫瘤細胞的Id 蛋白質的DNA 表現，則腫瘤細胞將會產生自殺現象<sup>65</sup>。

Id 蛋白質與致癌基因(oncogene)有互相影響的關係，當致癌基因被啟動時，Id 蛋白質的重要性更是不可或缺的<sup>55, 56, 66</sup>，如圖2-5。學者研究當同時轉殖Id 基因與Bcl-2 基因或是只單一轉殖Id 基因都會讓正常細胞變異成腫瘤。另外，也有研究結果指出若剷除或是抑制Id 家族的基因之後，將使得腫瘤細胞變得脆弱或是喪失其轉移性<sup>62</sup>。有學者指出Id 蛋白質會藉著使視網膜母細胞瘤蛋白質(retinoblastoma protein, Rb protein) 失去活性後，來增加端粒酶(telomerase) 的活性或使p53蛋白質所調節的DNA damage系統受到損害。而在很多臨床組織或細胞實驗中顯示Id 蛋白質在許多腫瘤中的表現量很高，而相對的正常細胞或組織的Id 蛋白質表現量較少。Id 蛋白質被認為是細胞週期路徑中的下游分子而且其機轉被定義成蛋白-蛋白之間的交互作用。所以很多報告指出抑制Id 蛋白質的表現量以及減少Id 基因的表現可以降低腫瘤細胞的血管增生作用(vascularization) 以及抑制腫瘤的轉移<sup>58, 66</sup>。

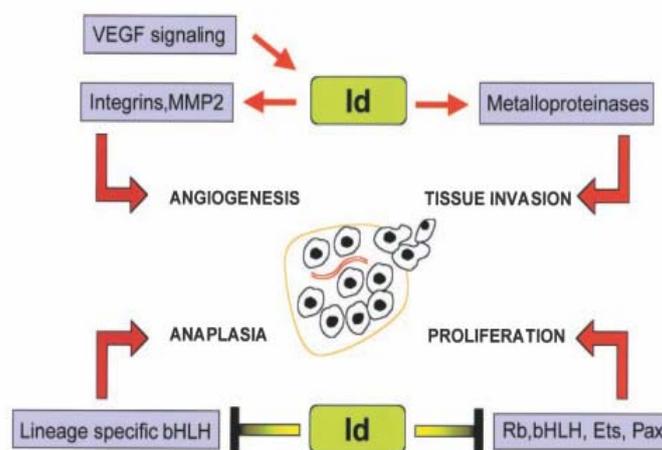


圖2-5. Id 蛋白質參與細胞調節及細胞週期。(Lasorella, A. et al. *Oncogene*. 2001, 20, 8326-8333.)

## 5-2 鹼性的螺旋-環-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)蛋白質之簡介

鹼性的螺旋-環-螺旋蛋白質結構在細胞增生(cell proliferation)與細胞分化(cell differentiation)中為一種相當重要的轉錄因子。包含bHLH的蛋白質存在於脊椎及無脊椎動物的各種組織中。有著bHLH之蛋白質其主要功能區域有兩個具有雙極性的螺旋結構，並富含許多的鹼性胺基酸序列。兩個雙極性的螺旋結構分別位於環(loop)的兩側<sup>67</sup>，而鹼性胺基酸序列的主要功能是與E-box的DNA做結合，進一步促進目標基因的轉錄作用。擁有螺旋-環-螺旋(helix-loop-helix, HLH)區塊的蛋白質會與另一個包含bHLH之蛋白質形成雙聚合體(dimer)。一般來說具有組織特異性的B型bHLH會與A型的bHLH形成聚合體後，促使細胞趨向特殊之目的<sup>68</sup>，例如骨骼肌的發展是由MyoD， Myf-5， myogenin 及MRF4共同參與，並在彼此間形成聚合的結構，藉此控制哺乳動物的肌肉組織發展<sup>69,70</sup>。此外研究顯示，bHLH 或HLH 區塊也扮演調控細胞分化的功能性結構因子的角色，如圖2-6。

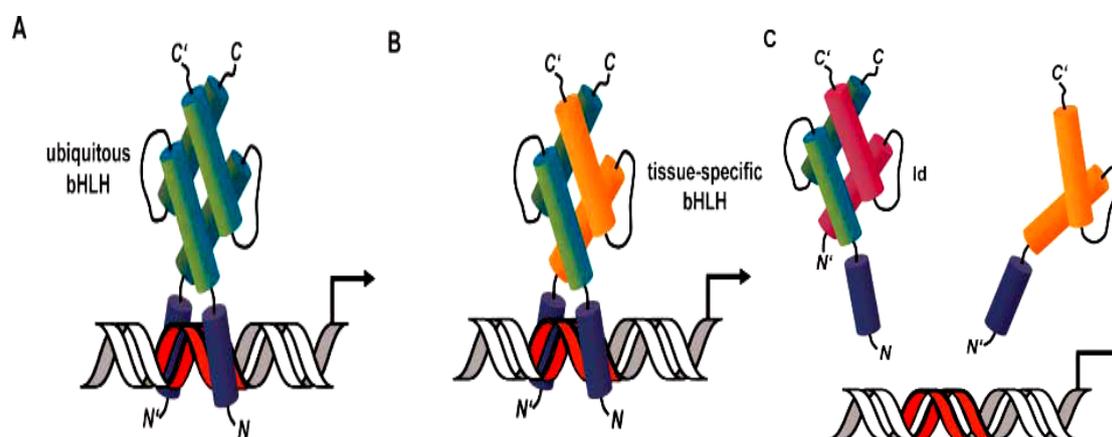


圖2-6. bHLH蛋白質的作用示意圖。(Olson, E. N. et al. *Genes Dev.* 1994, **8**(1), 1-8.)

A為A型bHLH蛋白質與A型bHLH蛋白質雙聚合體示意圖。

B為A型bHLH蛋白質與有組織特異性的B型bHLH。

C為A型bHLH蛋白質與Id蛋白質雙聚合體示意圖。

## 第六節 Bcl-2 蛋白質與Bax 蛋白質

### 6-1 Bcl-2蛋白質家族之簡介

Bcl-2 家族的蛋白質是細胞凋亡的重要調節因子，在很多癌症中都呈現出過度表達，因而幫助腫瘤的生長，並增強其對治療措施的抵抗力。Bcl-2 蛋白質家族有眾多成員，如 Bcl-2、Mcl-1、NR-B、A1、Bcl-w、Bcl-x、Bax、Bak、Bad、Bim 等，它們對於凋亡作用的影響有抑制也有促進，如圖 2-7。目前已經發現的 Bcl-2 蛋白質家族按其功能可分為兩大類<sup>71</sup>，一類蛋白質是像 Bcl-2 蛋白質一樣具有抑制細胞凋亡(anti-apoptotic)的作用，例如哺乳動物的 Bcl-x、Bcl-w、Mcl-1、A1、Ced-9、E1B19kD 等，而另一類蛋白質則具有促進細胞凋亡(pro-apoptotic)的作用，例如 Bax、Bcl-xs、Bad、Bak、Bik/Nbk、Bid 和 Harakiri。多數的 Bcl-2 家族成員間皆有四個 BH 區塊(Bcl-2 homology domain): 區塊 BH1、BH2、BH3 及 BH4；此區域在 Bcl-2 家族成員之間的二聚體化(dimerization)過程中起了相當重要的作用。Bcl-2 家族成員間的二聚體化是成員之間功能展現或調節的重要機轉過程。Bcl-2 可與 Bcl-2 家族的 Bcl-x1、Bcl-xs、Bax、Bcl-2、Bad 和 Mcl-1 形成蛋白質的二聚體，而此特定的蛋白質二聚體則可作為在細胞死亡信號通路上的分子開關。Bcl-2 蛋白質也可與促進細胞凋亡的蛋白質(例: Bak, Bax...)形成二聚體，如果促進細胞凋亡的蛋白質相對含量高於 Bcl-2 蛋白質，則促進細胞凋亡的蛋白質間所形成的同二聚體(homodimer)之數量會增多，進一步促進細胞的死亡；而如果 Bcl-2 蛋白質相對量高於促進細胞凋亡的蛋白質時，則會促進 Bcl-2 蛋白質與促進細胞凋亡蛋白質的異二聚體(heterodimer) 形成，因而阻止了可促進細胞凋亡的蛋白質與粒線體結合，並能使 Bcl-2 與 Bcl-2 蛋白質間所形成的同二聚體(homodimer)之數量增多，從而抑制了細胞的死亡；而促進細胞凋亡的蛋白質會和 Bad 蛋白質和 Bcl-Ss 蛋白質競爭結合細胞死亡之抑制分子如 Bcl-x1 蛋白質或 Bcl-2 蛋白質，由此替換了 Bax 蛋白質並促進 Bax 與 Bax 蛋白質間所形成的同二聚體形成，因而誘導細胞的凋亡，如圖 2-8。另外，Bcl-2 家族的 Bcl-2 蛋白質還可與家族外的 11 種蛋白質結合，包括蛋白激酶 Raf-1、蛋

白磷酸酶 Calcineurin、GTP 酶、R-Ras 和 H-Ras、p53-BP2、朊蛋白質 Pr-1、Ced-4、BAG-1、Nip-1、Nip-2 和 Nip-3 等，並可藉此展現出其抵抗細胞凋亡的作用。

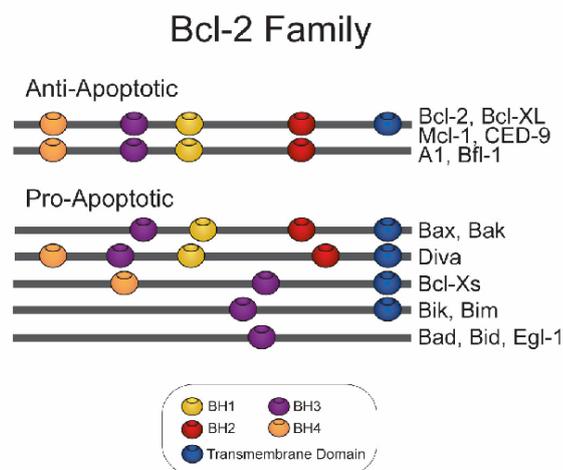


圖 2-7. Bcl-2 蛋白質家族。(Chao, D. T. et al. *Annu. Rev. Immunol.* 1998, **16**, 395–419.)

## 6-2 Bcl-2 蛋白質之簡介

Bcl-2 (B-cell lymphoma / leukemia-2) 基因全名為 B 細胞淋巴瘤/白血病基因-2，最初是從小鼠 B 細胞的淋巴瘤中所分離出來，它是一種原癌基因，有 Bcl-2 $\alpha$ 、Bcl-2 $\beta$  兩種，皆含 2 個外顯子(exon)，分子量分別是 26 kDa 和 22 kDa 的蛋白質，該蛋白質位於具有琥珀酸脫氫酶活性的粒線體內膜上<sup>72</sup>，在內質網膜及核膜上也有分佈。在各種正常細胞的激發和發育過程中會有所表現，而在成熟期細胞和走向凋亡期的細胞中，表現量卻是偏低的。如果 Bcl-2 蛋白質過度的表達，細胞則不會發生凋亡現象。Bcl-2 基因具有抗細胞凋亡的功能，其路徑機制目前被認為有以下幾種：分別是拮抗促細胞凋亡基因 Bax 的作用及表現量；抑制促進細胞凋亡的蛋白質細胞色素 c 自粒線體被釋放到細胞質；阻止細胞質中的細胞色素 c 刺激活化 caspase；調節粒線體的功能<sup>73</sup>，進一步使細胞產生抗氧化之作用並因此抑制氧自由基的生成，增加還原性輔酶 I 和谷胱甘肽(glutathione)，使細胞對缺氧的環境更有耐受性<sup>74, 75</sup>；Bcl-2 基因也可以使 Ca<sup>2+</sup>從內質網向細胞質的釋放量減少，藉此維持細胞內的鈣含量；封閉 P53 進入細胞核，因而阻斷了 P53 所誘導的細胞凋亡路徑。另外，Bcl-2 基因的啟動子具有 NF- $\kappa$ B 的結合位點並受

其調控，所以 NF- $\kappa$ B 可以藉著活化 Bcl-2 及其他抗凋亡基因而阻止細胞的凋亡。

Bcl-2 蛋白質可以抑制由多種細胞毒原素所引起的細胞死亡。Bcl-2 蛋白質的過度表達能增強細胞對大多數細胞毒原素的抵抗力。此發現使人們認識到細胞凋亡的各種信號傳導途徑有一個共同的通路或交匯點，而該通路或交匯點是受 Bcl-2 蛋白質所調節，如圖 2-8。Bcl-2 蛋白質也能抑制熱休克(heat shock)、放射線、抗癌藥物等多種途徑誘導的細胞凋亡現象。Bcl-2 蛋白質結構中存在著三個分別被稱為 BH-1、BH-2、BH-3 的區塊。這三個區塊可以形成通道式的立體結構。缺失這三個部位的 Bcl-2 會失去對細胞凋亡的抑制功能性。Bcl-2 的 N 端存在著 BH-4 的區塊，是與多種蛋白質互相結合的區域，其中包括了 Bad 蛋白質、Raf-1 蛋白質等。Bcl-2 蛋白質的 C 端存在著疏水性的區域，Bcl-2 蛋白質可以借助此區域與粒線體膜、內質網膜、核膜等多種胞器內膜結合。缺失 C 末端的 Bcl-2 蛋白質只會存在於細胞質中，而且對細胞凋亡沒有抑制的作用，由此可見 Bcl-2 蛋白質的作用位點是在胞器的內膜上。此外 Bcl-2 在區塊 BH-3 與 BH-4 之間存在所謂的環形區域(loop region)，當此領域中的絲氨酸(serine)被磷酸化後，Bcl-2 的細胞凋亡抑制作用也會減退<sup>76</sup>。在細胞培養以及活體測試上都已經證明了 Bcl-2 對細胞凋亡，甚至於一部分的細胞壞死有相當程度的抑制作用。關於其細胞凋亡抑制作用的機制尚無定論。

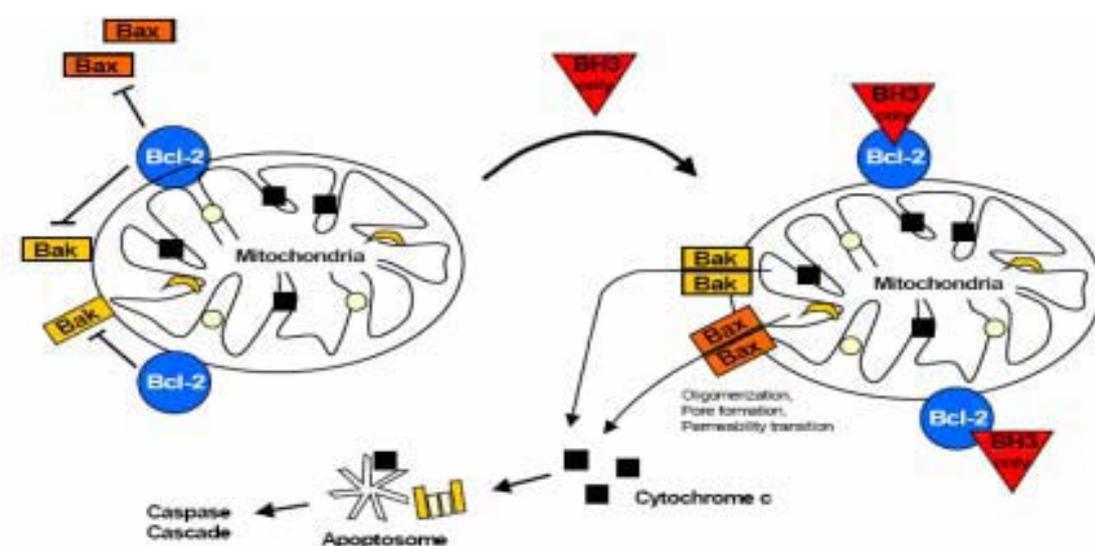


圖 2-8. Bcl-2 蛋白質抑制細胞凋亡的機轉。(Kuida, K. et al. *Nature*. 1996, **384**, 368-372.)

目前Bcl-2蛋白質抑制細胞凋亡的學說中，以其對粒線體的保護作用最受到關注。在各種刺激所誘導的細胞凋亡實驗中發現，當細胞凋亡出現之前會出現粒線體膜電位低下的現象，這也代表了粒線體內膜的通透性增加，使粒線體內存在的50 kDa的蛋白質AIF (apoptosis inducing factor)向細胞質中漏出，進而活化Caspase-3，最後將細胞凋亡的訊息傳遞下去<sup>77</sup>。Bcl-2蛋白質能抑制AIF的漏出，其機制可能與Bcl-2蛋白質通過直接和間接的作用保持住了粒線體膜的膜電位，並藉此調整膜通透性有關<sup>78</sup>。此外電子傳遞體系中的細胞色素C (cytochrome c, Cyt c)也會從粒線體向細胞質中漏出，並在細胞質中存在的去氧腺苷三磷酸 (deoxyadenosine triphosphate, dATP)和凋亡蛋白質活化因子1 (apoptosis protein activating factor 1, Apaf-1)的共同作用下，啟動了Caspase-3的作用途徑，最後導致了細胞凋亡。但是細胞色素C的漏出和粒線體膜電位的改變無關，儘管Bcl-2也能抑制細胞色素C的漏出，但細胞色素C漏出的機制以及其被抑制的機制仍然還不清楚。

### 6-3 Bax 蛋白質之簡介

Bax (Bcl-2-associated X)基因長 415 kb，含 6 個外顯子(exon)，因剪接方式的不同，會編碼出三種蛋白質，各自含有 192 個氨基酸，分子量皆為 22 kDa，分別為 Bax- $\alpha$  蛋白質、Bax- $\beta$  蛋白質、Bax- $\gamma$  蛋白質。Bax 基因可在多種細胞中表達，與 EIB19K 蛋白質和 Bcl-xL 蛋白質結合能使神經生長因子(nerve growth factor, NGF)喪失作用，並且能阻止 EIB19K 蛋白質的保護細胞作用，因而使細胞產生凋亡的現象<sup>79, 80</sup>。有人研究發現，有細胞毒性的藥物在誘發細胞凋亡時，細胞核膜上的 Bax 蛋白質表現量會上升，且 Lamin 及 PARP 這兩種核蛋白質的降解量也會上升。Bax 基因是屬於 Bcl-2 基因家族的成員之一，所以 Bax 蛋白質可與 Bcl-2 蛋白質形成二聚體，對 Bcl-2 蛋白質產生阻擋抑制的作用。研究發現 Bax 蛋白質與 Bcl-2 蛋白質之間的比例關係是決定對細胞凋亡抑制作用強弱的關鍵因素，因此認為 Bax 基因是極重要的促細胞凋亡基因之一。Bax 蛋白質在下肝細

胞、腎小管上皮細胞、氣管上皮細胞、支氣管平滑肌和血管平滑肌細胞都有廣泛的表現。

Bax 蛋白質是 Bcl-2 蛋白質家族中參與細胞凋亡的一個成員，當其誘導的細胞凋亡產生時，Bax 蛋白質會從細胞中的胞液遷移到線粒體和核膜上以利作用。Bax 蛋白質會先與 Bcl-2 蛋白質形成異二聚體，使 Bcl-2 蛋白質的活性被抑制，因此 Bax 蛋白質對細胞凋亡的進行是有促進的作用<sup>81</sup>。另外，Bax 蛋白質與 Bcl-2 蛋白質+Bcl-x 蛋白質的比值會決定細胞受刺激後是否傾向凋亡路徑，Bax 蛋白質的表現量較多時，會使細胞凋亡的現象產生；反之，如果是 Bcl-2 蛋白質與 Bcl-x 蛋白質的表現量較多時，則不會發生細胞凋亡的現象<sup>82</sup>。

## 第七節 生物感測器(Biosensor)

生物感測器是由生物元件、電子換能器和訊號處理器所組成的分析儀器。生物感測器是利用生物元件和待測物進行交互作用後而產生進一步的反應來加以判別待測物的含量變化；而且生物感測器中的生物元件對待測物也有其特殊之專一性(specificity)。藉由以上兩個特點可以用來增強生物感測器的選擇性(selectivity)和靈敏度(sensitivity)。一般的生物元件大多是利用生物體(植物和動物)的組織物、微生物、細胞的胞器、細胞的受體、生物分子的模仿物(bio-mimic intimately)、酵素、抗原、抗體和核酸等生物化學上的物質來偵測待測物中的分析物含量。將生物元件和待測物質反應後物理量或化學量的變化，轉換成電子訊號後，依照其所依據的物理或化學原理之不同，分為光學(optic)、質量感應(mass-sensitive)、熱化學(thermal)、電化學(electrochemical)、磁感應(magnetic)等生物感測器<sup>83</sup>。

質量式感測器以石英晶體微天平(quartz crystal microbalance, QCM)為主要代表，又名壓電石英晶體生物感測器，其應用範圍之廣泛，從生物科技、醫療檢測、環境汙染監測及食品工業上都可見到石英晶體微天平的應用<sup>84</sup>。石英晶體微天平具有操作方便、成本低廉以及即時偵測等優點。光學式生物感測器以表面膜漿共振技術為主要代表(surface plasmon resonance, SPR)，根據統計，近期中與生物感測器有關的國際期刊上，以光學式生物感測器做為分析生物分子間交互作用力之主要實驗依據的相關論文數有明顯上升的趨勢。表面膜漿共振技術是對生物元件其表面質量的改變非常敏感之分析儀器，而且不需另外標定即可即時偵測生物分子間的交互作用力。SPR可以偵測感應晶片的薄膜層其折射率之改變，藉此對定量物質被生物元件吸附的量進行偵測<sup>85, 86, 87</sup>。表面膜漿共振技術的優點為快速、即時偵測和不需另外標定<sup>88</sup>。

## 第八節 西方墨點轉漬法(Western blot)

西方墨點轉漬法又稱蛋白質轉漬法或免疫墨點法 (immunoblot)，是分子生物學、生物化學和免疫遺傳學中常用的一種實驗方法，也是檢測愛滋病病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 的方法之一。發明者為美國史丹福大學的 George Stark 博士。

西方墨點轉漬法是一種分析檢測特定蛋白質的生物學檢測技術。其主要作用機制是利用特定抗體能夠專一性的與其抗原蛋白質結合之原理來對待測物進行標定與著色，並透過分析著色的位置和著色深度來獲得特定蛋白質在所分析的細胞或組織中其表達情況和信息傳遞。

西方墨點轉漬法與南方墨點轉漬法(Southern blot)或北方墨點轉漬法(Northern blot)的雜交方法類似，但西方墨點轉漬法是用聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)來分離檢測物中的蛋白質混合物<sup>89</sup>，並利用一級抗體來偵測其中的特定蛋白質，顯色則是用螢光分子標記的二級抗體。蛋白質樣品經過聚丙烯醯胺凝膠電泳分離後，將其轉移到固相載體（例如硝化纖維轉漬膜）上，固相載體會以非共價鍵的形式來吸附蛋白質，且能保持電泳分離產物的多肽類型及其生物活性不變。以固相載體上的蛋白質或多肽作為抗原，與對應的抗體起免疫反應，再與酵素或同位素標記的二級抗體作用，藉由其底物顯色或放射顯影來檢測特定蛋白質<sup>90,91</sup>。

## 第九節 研究目的

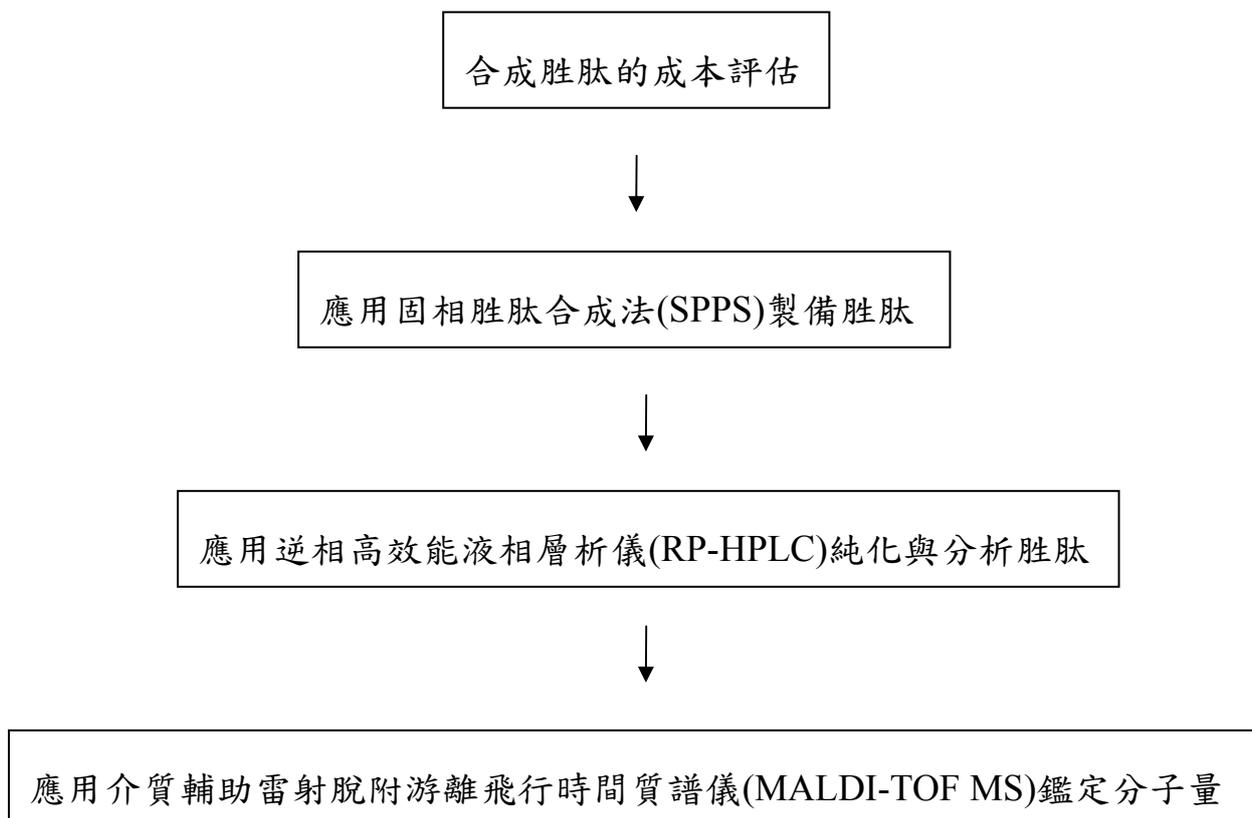
本實驗室的研究成果<sup>21</sup>發現以 MyoD 蛋白質為藍本的胜肽中，peptide 3C 之抗癌細胞效果是最有潛力的。將人類乳癌細胞以 peptide 3C 處理 24 及 48 小時後，萃取其中的總體蛋白質並觀測細胞內特定蛋白質的含量變化，對瞭解癌細胞走向細胞凋亡的機制與路徑是很重要的。

以西方墨點轉漬法和表面膜漿共振技術依序分析以 peptide 3C 處理的人類乳癌細胞內特定蛋白質之含量變化，藉此得到兩種分析結果間的關係並比較其中的差異性，對於表面膜漿共振技術於評估抗癌功效上取代西方墨點轉漬法之願景實現是有其必要性與重要性的。

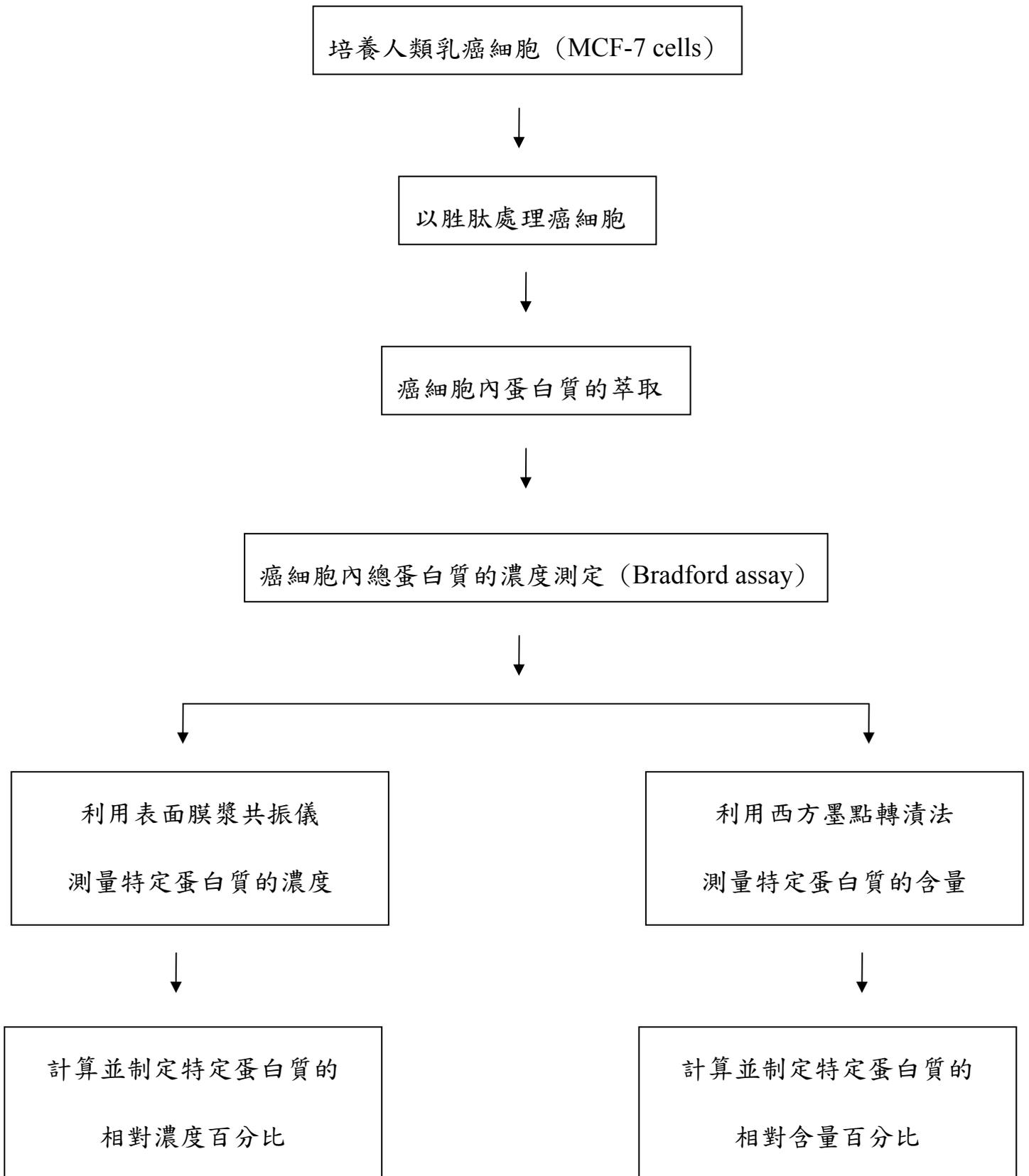
## 第三章 材料與方法

### 第一節 實驗設計與流程

#### 1-1. 胜肽之合成



## 1-2. 合成胜肽之活性探討



## 第二節 固相胜肽合成法

### 2-1. 固相胜肽合成法的實驗材料、試劑和設備

固相胜肽合成法(solid phase peptide synthesis, SPPS)的實驗材料、試劑和設備分別購自於不同的廠商，資料整理如表 3-1。

### 2-2. 固相胜肽合成法的實驗原理

美國紐約洛克斐勒大學的 Robert Bruce Merrifield 博士在 1959 年提出了一個嶄新的想法，那就是如果將所要合成的胜肽利用共價鍵鍵結的方式連接在固體小顆粒上<sup>92</sup>，那麼對於去除過剩的反應物及副產物之步驟簡化會很有幫助，因為實驗上只需要以簡單的抽氣過濾方式來沖洗固體小顆粒就可以達成目的，而不需要額外進行分離純化的實驗操作，而且合成出來連接在固體小顆粒上的胜肽在清洗純化的過程中不會有所損失，因為固體小顆粒會以共價鍵鍵結的方式與胜肽結合在一起，如此可以達到自動化合成胜肽的最終目標。至於反應所需的固體小顆粒材料，是由聚苯乙烯(polystyrene)加以化學修飾後，使其分子末端帶有氯甲基，以便與第一個胺基酸的羧基發生反應而形成共價鍵結，藉此固著在固體小顆粒上。當胜肽的合成反應結束後，可以藉氫氟酸將整段合成的胜肽從聚苯乙烯的小顆粒直接切下而獲得產物，這個方法被稱為固相胜肽合成法。

本實驗所使用的胜肽合成法即為固相胜肽合成技術，並且應用了Fmoc Chemistry<sup>93</sup>來進行胜肽的合成，如圖3-3。首先以樹脂(resin)做為胜肽的固相支撐物，本實驗採用Rink amide AM resin當做起始胺基酸的固相支撐物。首先將Rink amide AM resin上的Fmoc-保護基(9-fluorenylmethyl oxycarbonyl, Fmoc-protecting group)於鹼性條件下去除之，這是因為Fmoc-保護基並不耐鹼的緣故。Rink amide AM resin去保護基後能夠與活化後胺基酸的C端形成胜肽鍵結(peptide bond)而使胺基酸固著於樹脂上。

當第一個胺基酸固著於樹脂上後，再次於鹼性條件下將第一個胺基酸N端的

Fmoc-保護基 ( $N_{\alpha}$ -protection) 去除後，使用耦合試劑 (coupling reagents)，使第二個胺基酸的C端被活化，那麼第二個胺基酸才能被合成上去。重覆上述步驟便能持續的產生出胜肽間之胜肽鍵鍵結，依序地接上所有組成的胺基酸。最後利用化學裂解 (chemical cleavage) 的方法以三氟醋酸(trifluoroacetic acid, TFA)將胜肽從樹脂上分離<sup>94</sup>。在切除掉所有胺基酸上支鏈的保護基團後，即可完成胜肽的粗產物。

## 2-2-1. 固相胜肽合成法的反應試劑之作用原理

### (1) 耦合試劑 (coupling reagent)

胺基酸之  $C_{\alpha}$  上 (amino acid  $C_{\alpha}$ ) 的 COOH 官能基需要被 HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)、HOBT (1-hydroxybenzotriazole, anhydrous) 與 DIEA (N,N-Diisopropylethylamine) 等類之化學反應試劑活化，而呈現出強烈拉電子的作用力，最後與另一個胺基酸的  $C_{\alpha}$  上之 NH 形成胜肽鍵 (peptide bond)。

HBTU 與 HOBT 常廣泛被應用於固相胜肽合成，做為胜肽合成的耦合試劑，可提高反應產率與縮短反應時間，並抑制產物外消旋化 (racemization) 的發生。

### (2) 去保護基試劑 (deprotecting reagent)

Rink amide AM resin 及胺基酸之  $N_{\alpha}$  都有 Fmoc 保護基團，而加入 20% (v/v) piperidine in DMF 的作用是為了把 Fmoc 從 Rink amide AM resin 與胺基酸的 N 端上切下以形成  $NH_2$  官能基。

### (3) 裂解試劑 (cleavage reagent)

當直鏈胜肽依序合成接好後，需要使用裂解試劑(如三氟醋酸等)把胜肽從 Rink amide AM resin 上切下，並同時切下胺基酸上的支鏈 (side chain) 保護基，以得到胜肽粗產物。

### 2-2-2. 寧海得林法(Nihydriin test)的作用原理

在合成胜肽的過程中，可以使用節三碲(nihydriin)來進行一種成色反應，進一步確認胜肽中的胺基酸 N 端之 Fmoc 保護基是否存在<sup>95</sup>，如圖 3-1 至圖 3-2。倘若在固相胜肽合成法的過程中經過 piperidine 的作用(deprotecting)後，經由此成色反應測試為透明無色或是淡黃色，表示胺基酸 N 端的 Fmoc 保護基依然存在；倘若經過 piperidine 作用(deprotecting)後，經由節三碲的成色反應測試結果為深藍色的話，表示胺基酸 N 端的 Fmoc 保護基已經被去除了。而胜肽在耦合新的胺基酸後，因為被耦合的胺基酸 N 端上具有 Fmoc 保護基，所以節三碲的成色反應測試結果應該是透明或是淡黃色的；反之，如果此成色反應的結果為深藍色，表示新的胺基酸並未完全耦合上原本的胜肽。

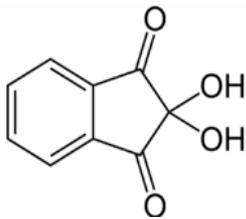


圖 3-1. 節三碲(nihydriin)的化學結構式。

主要反應<sup>96</sup>：

若為一級胺基(-NRH<sub>2</sub>) → 深藍色

若為二級胺基(-NR<sub>2</sub>H) → 黃色

若為三級胺基 (-NR<sub>3</sub>) → 透明無色或淡黃色

Proline 由於其 N 端結構，導致成色反應的顏色不易辨別，所以無法使用此法測試其是否耦合上或是 Fmoc 保護基是否已去除。

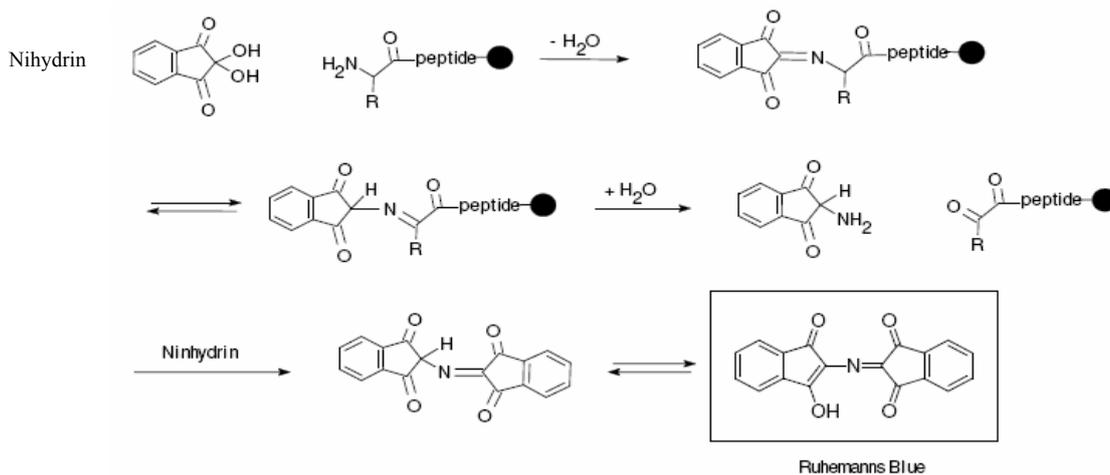


圖 3-2. Ninhydrin test 成色機制是藉由共軛鍵吸收特定波長的光後,而顯示出其特定的顏色(互補色)。(sigma-aldrich)

### 2-3. 固相胜肽合成法的實驗流程

1. 進行 Peptide 3C 之胜肽合成實驗，如表 3-2。計算並評估所需的胺基酸、HOBT、HBTU、DIEA、Rink amide AM resin 之用量。
2. 拿一個 PD-10 column，依序放入濾紙和 Rink amide AM resin。為了保險起見，將此 PD-10 column 放入 50 mL 的 polypropylene conical tube 中，以免 PD-10 column 中的液體外漏。
3. 加入 5 mL DCM 去膨脹 Rink amide AM resin 後，加入 5 mL DMF 去洗 Rink amide AM resin，兩次，共十分鐘。之後利用真空萃取裝置抽掉 PD-10 column 中的液體。
4. 加入 5 mL 20% piperidine 去除 Rink amide AM resin 的 N<sup>α</sup>-Fmoc 保護基，三次，共六十分鐘。之後利用真空萃取裝置抽掉 PD-10 column 中的液體。
5. 加入 5 mL DMF 去洗 Rink amide AM resin，三次，共十五分鐘。之後利用真空萃取裝置抽掉 PD-10 column 中的液體。
6. 另外將具有 N<sup>α</sup>-Fmoc 保護基的胺基酸，HOBT，HBTU，DIEA 及 5 mL DMF 加入 15 mL high clarity polypropylene conical tube 中，混合五分鐘，使胺基酸的 C 端被活化。
7. 將經過步驟 6.處理後的反應液加入原本的 PD-10 column 中，進行胺基酸的偶合(coupling)，共兩個小時，使胺基酸能與 Rink amide AM resin 結合。之後利

- 用真空萃取裝置抽掉 PD-10 column 中的液體。
8. 加入 5 mL DMF 去洗 Rink amide AM resin，兩次，共十分鐘。之後利用真空萃取裝置抽掉 PD-10 column 中的液體。
  9. 重複步驟四到步驟八，接下來的胺基酸序列就會依序被合成到 Rink amide AM resin 之上。
  10. 中止此反應可加入 5 mL DCM，兩次，共十分鐘。之後利用真空萃取裝置抽掉 PD-10 column 中的液體，用 parafilm 封好並保存於 4°C 冰箱中。
  11. 要獲得肽的粗產物，需依序加入 5 mL 20% piperidine 和 PD-10 column 中的產物反應，三次，共一小時，以去除肽的 N<sup>α</sup>-Fmoc 保護基；之後再加入 95 % 的 5 mL 三氟醋酸，反應一次，共 2 個小時，以去除肽的側鏈保護基並且使肽從 Rink amide AM resin 上被裂解出來。收集 PD-10 column 中的液體，再用氮氣將液體中的三氟醋酸趕出來。加入乙醚使肽沉澱出來，進行冷凍乾燥。
  12. 肽主產物的分離純化(HPLC，Mass)。

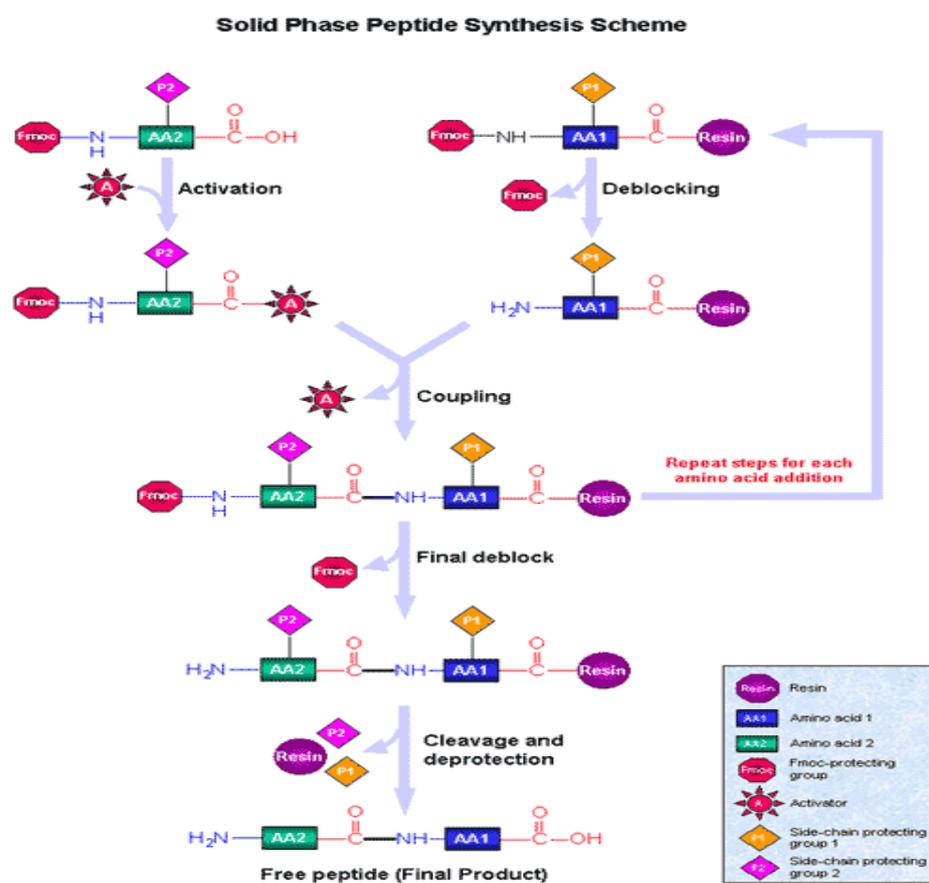


圖 3-3. 固相肽合成法的流程圖。(sigma-aldrich)

### 第三節. 逆相高效能液相層析法

#### 3-1. 逆相高效能液相層析法的實驗材料、試劑和設備

高效能液相層析法(reverse phase- high performance liquid chromatography, RP-HPLC)的實驗材料、試劑和設備分別購自於不同的廠商，資料整理如表 3-3。

#### 3-2. 高效能液相層析法的實驗原理

##### 3-2-1. 高效能液相層析法的實驗原理

高效能液相層析法(high performance liquid chromatography，簡稱HPLC)適用於半揮發性和非揮發性化合物或遇熱易被裂解的待測物，此層析法的先決條件是待測物（本實驗中的待測物為胜肽混合物）能溶於移動相的溶劑之中；移動相溶劑是在幫浦加壓下輸送的，所以又稱為高壓液相層析法(high pressure liquid chromatography)。逆相高效能液相色譜層析法 (RP-HPLC)則是一種能將蛋白質和胜肽依照其極性大小的不同而加以分離的分析方法。

高效能液相層析法的分析原理是藉著移動相溶劑通過固定相管柱來達到分離的效果；待測物中的各成份在固定相管柱和移動相溶劑之間的分配係數 (partition coefficient) 不同(即親和力不同)，所以使待測物中的各成份在管柱中的滯留時間不相同而得以分離出來。若待測物與固定相管柱的親和力較強，則被移動相溶劑沖提得較慢(即滯留管柱的時間較長)，而待測物與移動相溶劑的親和力較強時，則被移動相溶劑沖提得較快(即滯留管柱的時間較短)，依照此原理，待測物中的複雜成分就會因此被分離出來。

##### 3-2-2. 逆相高效能液相層析法的實驗原理

逆相高效能液相色譜層析法(RP-HPLC)的原理是經由移動相(mobile phase)溶劑的攜帶，將待測物（胜肽混合物）中複雜的胜肽成份，通過帶有非極性官能基之固定相(stationary phase)管柱，利用不同胜肽的成分在非極性固定相管柱

間的差異(疏水性交互作用力的不同)，而達到分離的效果。

逆相高效能液相色譜層析法的固定相管柱表面的填充材質為低至中極性的物質，通常是鍵結很強的非極性官能基團，如由 C<sub>4</sub>、C<sub>8</sub>、C<sub>18</sub> 所組成的長烷鏈等。由長烷鏈官能基團所組成的固定相管柱適用的 pH 值範圍為 2~10。移動相沖提液則是極性強度偏中等的溶劑，如乙腈(氫甲烷)、甲醇等與水所組成的混合物等。材料與設備請參照表 3-3。

逆相高效能液相色譜層析法的分離機制是利用胜肽混合物與固定相管柱間的疏水性作用力(hydrophobic interaction)不同，使胜肽混合物中不同的胜肽成份於移動相溶劑的沖提下，各成分之滯留時間不同而加以分離出來，極性最大的胜肽成份與管柱填充物表面間作用力最小，故最早被沖提出來；極性越小的胜肽成份與管柱填充物表面間作用力越強，故越晚被沖提出來。

### 3-3. 逆相高效能液相層析法的實驗方法

應用逆相高效能液相層析法分析胜肽混合物之成份，設定 UV 光源的波長為 220 nm 和 280 nm 進行偵測後，經由電腦處理以積分圖形呈現出數據(滯留時間，retention time, Rt)。分離之最佳狀態可由進樣品之速度、管柱孔徑與離析率調校而求得。本實驗將逆相高效能液相層析儀做下列之參數設定可得最佳的分離及分析效果。

我們使用 C<sub>18</sub> 的分析級層析管柱，UV detector 的檢測波長為 220 nm，固定移動相流速在 1 mL/min，移動相溶劑的組成分別為 solvent A : D.D.water 4L + 0.05% TFA；solvent B : acetonitrile 4L + 0.05% TFA。在移動相溶劑中加 0.05% TFA(trifluoroacetic acid)，主要是利用共同離子效應防止蛋白質或胜肽混合物解離以及增加待測物之溶解度，分析的方法利用線性梯度沖提。線性梯度：在 35 分鐘內 solvent A / solvent B 含量比例由 95:5 到 5:95，接著 3 分鐘內維持在 5:95 的比例，將還殘留於管柱內的剩餘干擾物沖提出來，立刻再轉換成 95:5 的比例維持 7 分鐘，讓管柱達到最初時的平衡狀態，觀測波長為 220 nm。

欲分析或純化的蛋白質或胜肽溶液需於分析或純化前，先以孔徑 0.22 μm

的針筒過濾器 (filter) 過濾以去除雜質。過濾後之樣品注射至儀器之前，必須先使用逆相高效能液相層析儀的 Purge 功能去除儀器中微流管柱或鐵氟龍管內及移動相內的氣泡。先不注入樣品於逆相高效能液相層析儀的注射孔中，將注射孔的開關由 load 轉至 inject 的位置，以逆相高效能液相層析儀進行分析以便確認管柱內沒有殘留的干擾物，若有雜訊出現（即圖譜還有若干大小不一的 peak 出現，表示管柱未達平衡狀態），應設定適當條件（流速、溶劑分配比係數）將管柱清洗乾淨後，才進行過濾後樣品之分析。

當按下操作軟體於螢幕上“Start Run”後，螢幕會出現“Waiting for injection”並將欲分析或純化的蛋白質或胜肽溶液注入樣品注射閥，此時注射閥箭頭應停留在 load 位置，如此待測物才會仍然裝載於金屬閥內；待逆相高效能液相層析儀與電腦的同步化操作完成，將注射閥往下推至 inject 位置，胜肽混合物就會隨移動相進入 C<sub>18</sub> 層析管柱進行分析。電腦中的積分軟體會隨蛋白質或胜肽混合物內成份於不同時間出現面積大小不一的波峰 (peak)，並依其圖譜來確認純度與滯留時間 (retention time, Rt)。此時若要進行分離純化胜肽混合物的流程，可依積分後圖譜所出現的波峰，並判別胜肽混合物中主要成份可能所出現滯留時間之區間，個別收集每個波峰出現時逆相高效能液相層析儀所層析流出的溶液，並標示分類完成，經冷凍乾燥，便能得到純化後的白色乾燥粉末，待分析製備之用。

## 第四節. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀

### 4-1. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的實驗材料、試劑和設備

基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(matrix- assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 裝置購置於Bruker Daltonics 公司(Germany)產品，型號：MicroFlex，本實驗之基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀為MicroFlex，具備一波長為337 nm 的氮氣脈衝式雷射，其飛行模式可分為直線型和反射型，飛行管長度分別為1.05 m 和 1.96 m，各自有一偵檢器進行偵測，而本研究皆使用反射型模式進行操作，其質譜儀操作參數設定如表3-4所示。

基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的基質溶液配製所需之試劑，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表 3-5。

### 4-2. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的實驗原理

基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜法在1985年由德國科學家Michael Karas 和 Franz Hillenkamp 共同提出，其基質輔助雷射脫附游離法是藉由基質吸收雷射光的能量後，再傳遞給分析物，使得分析物進行脫附游離的一種游離方式；可以用以輔助分析高極性的胺基酸分子。在1988年將可偵測質量上限擴展至上萬質量單位的蛋白質，基質輔助雷射脫附游離源通常搭配著飛行時間質量分析器，因此通常稱為基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀。而基質的功能在於吸收雷射能量，而分析物本身則不一定吸收雷射能量，因此基質輔助分析物脫附與游離，使分析物能由凝相脫附成氣體分子，並游離成為氣體離子，在游離源經外加電壓作用而得到一加速動能而進入無場飛行管中，依據分析物離子到達偵測器的時間不同而達到質量分析的目的。由於基質扮演著能量緩衝的角色，使得一些熱不穩定的樣品，可以避免直接得到大量能量的輸入而產生熱裂解的現象，此屬於軟性離子化法，現今常被應用於生化樣品的分析。

#### 4-2-1. 基質的特性與功用

基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀在進行分析時，添加了基質來幫助分析物分子進行脫附游離。正因如此基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀可以藉由基質分子先吸收雷射能量後，再傳遞給分析物使之脫附游離，得到完整的分子離子訊號。早期被研究發展出來的基質多屬於具芳香環的有機酸(如 sinapinic acid 及 2,5-dihydroxybenzoic acid ) 會在 UV 範圍內吸收雷射能量，迄今已有八十餘種此類基質被發展出來。常用的基質輔助雷射脫附(MALDI)之基質包括有 Sinapinic Acid、 $\alpha$ -CHCA( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid)等，多達數十種以上(表 3-6)<sup>97</sup>。根據研究顯示，對不同種類的分析物而言，選擇了適合的基質與分析物形成良好的共結晶之後，就可以得到較好的分析結果。

基質通常都具低揮發性，因為質譜儀在真空狀態下操作，若是基質容易揮發則無法穩定覆蓋於分析物的周圍扮演好基質的功用，這樣會造成分析上和圖譜判斷上的困擾，因此一般而言，基質需要具備以下三種必要的功用：有效吸收雷射能量並轉移給分析物、有效地防止分析物聚集及提供氫離子，幫助分析物游離化。基質大多數為具酸性官能基的芳香族有機物，可有效地提供氫離子給分析物，使分析物帶上電荷。

#### 4-2-2. 飛行時間質量分析器的原理

飛行時間質量分析器 (time of flight mass analyzer, TOF analyzer) 為基質輔助雷射脫附游離-時間飛行管質譜儀的質量分析器；在真空狀態下，以脈衝式雷射 (氬氣雷射或是Nd-YAG 雷射) 照射樣品進行脫附游離的動作。共結晶固體 (包含分析物與基質) 被照射之後，大部分的能量會直接被基質吸收，然後傳遞給分析物分子，使得分析物分子得以在極短的時間內 (pico seconds ~ nano seconds) 由固態昇華至氣態而脫附 (desorption)；脫附過程中會同時進行電荷轉移的反應和一連串的離子-分子反應，分析物分子因而被游離化並帶電荷。但由於MALDI 是以雷射光作為游離化能量來源，所以除了傳統脫附游離法中常見的離子-分子反應之外，尚包含光游離及光化學反應。

飛行時間質量分析器是由離子加速電場與無場區域所組成。當分析物氣態離子產生後，在進入飛行管之前會有一電壓使所有離子集中在同一起始位置後（此過程稱為延遲萃取, delay extraction, DE），再經電場加速送入飛行管。如圖3-4。加速電場提供的能量會讓所有氣態離子具有相同的動能，進入無電場之區域飛行後，不同的離子會因質荷比不同而有不同速度；質量大的離子具有較小的速度，所以會比質量小的離子慢到達偵測器，而我們便可藉由到達偵測器的時間長短求得質荷比並分別不同質荷比的離子。但分析物分子在被雷射激發形成氣態離子之後，同質荷比的分析物離子可能得到不同大小的能量而有不同的速度，或是在游離源中不同位置下形成離子造成進入飛行管的時間不一，這些因素都會造成相同分析物離子被偵測為不同質荷比而誤判的現象，在飛行管之前設置延遲萃取的原因便在此。

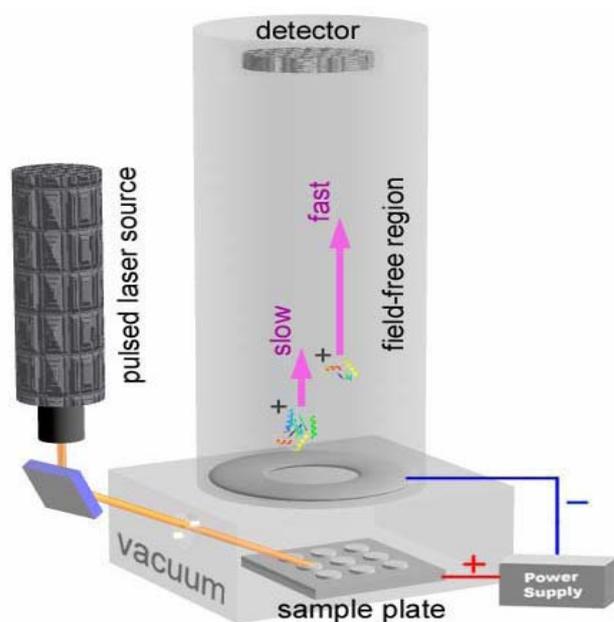


圖3-4. MALDI-TOF MS 之作用原理簡圖。(Bruker Daltonics)

### 4-3. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的實驗方法

#### 4-3-1. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的待測樣品製備方法

一般傳統的製備方式，是將有吸光性質之有機酸溶於適合的有機溶劑中當做基質溶液，基質溶液通常濃度皆趨於飽和狀態，接著將基質溶液以適當比例

跟分析物溶液均勻混合，最後取1  $\mu\text{L}$  ~2  $\mu\text{L}$  混合液置於樣品盤上在空氣中自然風乾(air-dried)。由於混合液中含有大量的小分子有機酸與少量的分析物，因此等溶液中的水與有機溶劑揮發後，在樣品盤上會形成共結晶(co-crystallization)，此時即可將樣品盤置入質譜儀中進行分析。一般來說，基質與分析物的莫耳濃度比大約都在1000:1以上，但對於一些生物巨分子而言，會因為其分子愈大，而基質的莫耳濃度也需要調整至較高的濃度，才可以使用。

#### 4-3-2. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的基質溶液配製方法

- (1) 飽和  $\alpha$ -CHCA 溶液：稱取 10 mg 的  $\alpha$ -CHCA 溶於 1 mL 的 0.1 % TFA 溶劑中，其溶劑含 50% 的 ACN 及 50% 的純水。
- (2) seed-layer 溶液：稱取 2 mg 的  $\alpha$ -CHCA 溶於 1 mL 的 0.1% TFA 溶劑中，其溶劑含 100% 的 ACN。
- (3) 校正的標準溶液：取 1 mg 標準品，以去離子水配製成濃度為 1.0  $\mu\text{M}$  的水溶液作為校正的標準溶液。

## 第五節. 應用體外細胞實驗將細胞以胜肽處理

### 5-1. 細胞培養之常用藥品試劑及設備

細胞培養相關實驗之常用藥品試劑及設備，分別購自於不同的廠商，相關資料整理於表 3-7。實驗所用之人類乳癌細胞購自食品工業發展研究所，生資中心(新竹·臺灣·中華民國)。MCF-7 類型的人類乳癌細胞為 human breast adenocarcinoma，種 (species) 為 *Homo sapiens* (human)。其生長特性為貼附型的細胞，具有雌激素接受體 Estrogen receptor 過度表現 ER (+)，為雌激素依賴型乳癌細胞株，卻有極低的 ErbB-2 接受器表現。

### 5-2. 細胞培養的實驗方法

#### 5-2-1. 細胞培養液的配製

- a. DMEM 細胞培養溶液：將 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)粉末溶於 4.5 L 已滅菌之去離子水中，加入 23.5 g 的  $\text{NaHCO}_3$ ，再用 HCl 調整 pH 至 7.2~7.4 後，以滅菌之去離子水補足溶液體積至 5 公升，再以孔徑 0.22  $\mu\text{m}$  的過濾器過濾並滅菌。配製好的 DMEM 細胞培養液需再添加抗生素 (Penicillin-Streptomycin, 0.1 %)與 10%的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)，儲存於 4°C 冰箱備用。
- b. 10 倍 PBS 溶液：20 g NaCl + 2 g KCl + 14.4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 2.4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 1000 mL 去離子水。使用前需稀釋 10 倍之後，經高溫高壓滅菌後備用。
- c. 配製冷凍保存溶液：將 DMSO 加入新鮮培養液中，最後濃度為 7%，混合均勻，置於室溫下待用。

#### 5-2-2. 無菌操作台及容器的滅菌方法

實驗進行前，無菌室和無菌操作臺以紫外燈照射 36-60 分鐘後，以 75%的酒精擦拭無菌操作台的檯面，並開啟無菌操作台風扇運轉 10 分鐘後，才開始實驗操作。所有進入無菌操作台的器物均需先噴灑 75%酒精，有瓶蓋的容器在旋開

瓶蓋之前，均需先經過以火燒烤的動作後，再行使用。

### 5-2-3. 細胞冷凍保存的方法

細胞冷凍的原則為慢凍，而且維持在大約為 80-90%之緻密度，冷凍保存之細胞濃度為  $2 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$  cells/mL，可使冷凍保存之細胞生長良好，且處於增生率較高之狀態，但仍需注意冷凍保護劑之品質，DMSO 應為試劑級等級，必須無菌且無色(以 0.22 micron FGLP TeLflon 過濾或是直接購買無菌產品)，再以 5-10 mL 小體積分裝後，放置於 4°C 冰箱中避光保存，切勿多次重複解凍。

細胞冷凍保存之操作步驟為：冷凍前一日更換培養液，觀察細胞生長情形。取 Trypan blue 90  $\mu$ L 與細胞懸浮液 10  $\mu$ L 計數細胞濃度。以高速離心機設定 1500 rpm、5 分鐘離心細胞懸浮液，去除上清液後，加入 DMEM 溶液，使細胞濃度為  $2 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$  cells/mL，混合均勻，分裝於已標示完全之冷凍保存管中(1 mL/vial)。冷凍保存方法：冷凍保存管放入 5 公分厚的密閉保麗龍盒中置於 -80°C 冰箱，24 小時之後，隔日置入液態氮筒中長期儲存。

### 5-2-4. 冷凍細胞活化的方法

冷凍細胞之活化原則為快速解凍，以避免冰晶重新結晶而對細胞造成傷害，導致細胞之死亡。細胞活化後，約需數日，或繼代一至二代，其細胞生長或特性表現才會恢復正常。冷凍細胞之快速解凍的方法為：將冷凍保存管由液態氮筒中取出，立即放入 37°C 水槽中快速解凍，輕搖冷凍保存管使其在 3 分鐘內全部融化。

以 75% 酒精擦拭保存管的外部，移入無菌操作臺內。取出解凍之細胞懸浮液，緩緩加入有培養液之細胞培養瓶中，混合均勻，放入 CO<sub>2</sub> 培養箱培養。在解凍培養後隔日將培養液更新且利用一般倒立式顯微鏡觀察細胞貼附增生情形。

### 5-3. 將人類乳癌細胞以胜肽 peptide 3C 處理之實驗方法

將人類乳癌細胞以DMEM 培養液，培養於細胞培養皿中。當細胞生長到培養皿的八分滿時，收集其細胞代謝物至15 mL 離心管內，並在轉速1500 rpm下，離心5分鐘，最後取其沉澱物，此沉澱物即是死去的人類乳癌細胞粒。將2 mL的TE緩衝液(trypsin-EDTA buffer)加入培養皿的活細胞中，待其充分作用後，培養皿中的活細胞就會被TE緩衝液給切下來，使活細胞因此脫離培養皿的底部。用5 mL 的PBS溶液清洗細胞培養皿，並收集培養皿中的溶液至15 mL 離心管內，在轉速1500 rpm下，離心5分鐘，最後取其沉澱物，此沉澱物即是存活的人類乳癌細胞粒。將死去的人類乳癌細胞粒與存活的人類乳癌細胞粒合併在一起，即是未以胜肽處理的人類乳癌細胞粒。

將人類乳癌細胞以DMEM 培養液，培養於細胞培養皿中。當細胞生長到培養皿的八分滿時，抽去細胞代謝物，加入5 mL之65  $\mu$ M的 peptide 3C胜肽溶液，並在5%二氧化碳(CO<sub>2</sub>)的氣體濃度以及溫度37°C的實驗條件下，分別培養24小時及48小時後，收集其細胞代謝物至15 mL 離心管內，並在轉速1500 rpm下，離心5分鐘，最後取其沉澱物，此沉澱物即是死去的人類乳癌細胞粒。將2 mL的TE緩衝液(trypsin-EDTA buffer)加入培養皿的活細胞中，待其充分作用後，培養皿中的活細胞就會被TE緩衝液給切下來，使活細胞因此脫離培養皿的底部。用5 mL 的PBS溶液清洗細胞培養皿，並收集培養皿中的清洗液至15 mL 離心管內，在轉速1500 rpm下，離心5分鐘，最後取其沉澱物，此沉澱物即是存活的人類乳癌細胞粒。將死去的人類乳癌細胞粒與存活的人類乳癌細胞粒合併在一起，即是以胜肽處理24小時及48小時後的人類乳癌細胞粒。

## 第六節. 應用破細胞技術來取得人類乳癌細胞內的蛋白質

### 6-1. 應用破細胞技術來取得人類乳癌細胞內的蛋白質之實驗材料、試劑和設備

應用破細胞技術來取得人類乳癌細胞(MCF-7 cells)內的蛋白質之實驗材料、試劑和設備分別購自於不同的廠商，資料整理如表 3-8。

### 6-2. 應用破細胞技術來取得人類乳癌細胞內的蛋白質之實驗原理

細胞裂解緩衝液(cell lysis buffer)，是一種在非變性條件下裂解細胞的裂解液，其主要成分為 Ser 型蛋白酶的抑制劑(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 乙烯二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), 胃蛋白酶抑制劑(pepstatin A), 亮肽素(leupeptin), 胰凝乳蛋白酶抑制劑(aprotinin)等多種的蛋白質酶抑制劑，可以有效抑制細胞內蛋白質的降解，並維持原有蛋白質間的相互作用。經由離心、震盪、或是化學方法使細胞的細胞膜破裂溶解(lysis)後，細胞內的蛋白質就會從細胞中被釋出，收取蛋白質後就可以利用聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)或是一些與細胞蛋白質相關的分析來加以研究。這些細胞裂解的方法可適用於一般的動物生長性細胞(vegetative cell)。植物細胞因為有細胞壁的構造，因此不能直接加入裂解緩衝液(lysis buffer)來抽提出細胞內的蛋白質。

### 6-3. 應用破細胞技術來取得人類乳癌細胞內的蛋白質之實驗方法

1. 使用前先將細胞裂解緩衝液搖晃均勻，使其溶液中的不溶物能夠重新被溶解。
2. 將適量的細胞裂解緩衝液(cell lysis buffer)加入人類乳癌細胞粒(cell pellet)中。細胞粒中的細胞數量與裂解緩衝液用量間之相對關係如下：加入體積約 200  $\mu\text{L}$  的細胞裂解緩衝液到人類乳癌細胞粒中，約可使數量  $10^7$  個的人類乳癌細胞之細胞膜完整性被加以破壞，這是因為細胞裂解緩衝液可以破裂溶解人類乳癌細胞粒的細胞膜。當人類乳癌細胞粒的細胞膜被破壞後，細胞內的蛋白質就會往外流出，這使得從人類乳癌細胞粒中萃取出其內含的蛋白質變得更容易。
3. 利用巴斯德移液管(Pasteur pipette)和微量吸管(tip)使人類乳癌細胞粒和

細胞裂解緩衝液混合均勻。

4. 以控溫離心機處理(轉速約 11000 rpm，4°C，時間 20 分鐘)。
5. 離心後取其上清液。因為從人類乳癌細胞粒中所萃取出來的蛋白質是存在於上清液中。

## 第七節. 表面膜漿共振技術

### 7-1. 表面膜漿共振技術的實驗材料、試劑和設備

應用表面膜漿共振技術(surface plasmon resonance, SPR)來分析人類乳癌細胞(MCF-7 cells)內的蛋白質之實驗材料、試劑和設備分別購自於不同的廠商，資料整理如表 3-9。

### 7-2. 表面膜漿共振技術的實驗原理

表面膜漿共振技術(surface plasmon resonance, SPR) 對表面細微的變化非常靈敏並且是現今常用的分析方法之一。表面膜漿共振技術可用來偵測分子間的交互作用力。表面膜漿共振技術早在1968年就由Otto A 所提出，但直到近幾年才變成有用的光譜分析技術。1983年，瑞典Linkoping 理工學院應用物理實驗室的Liedberg 等人率先把表面膜漿共振技術應用於IgG 抗體與其抗原相互作用力的檢測上，其後BIAcore life science (Biomolecular Interaction Analysis, Biacore, Uppsala, Sweden) 公司進一步於1991年研發出SPR 生物感應器(BIAcore 3000 biosensor)。SPR 生物感應器提供一個快速的檢測方法，並且不用標記即可決定其反應的平衡和速率常數。於是BIAcore life science公司可以廣泛地運用SPR 生物感應器來研究許多生物分子，像是蛋白質、核酸、脂質和醣類的分子間交互作用。

現今，表面膜漿共振技術的應用已經涵蓋在醫藥發展、化學、工程學和環境科學中。表面膜漿共振技術生物感測器應用在交互作用的分析可獲得抗原-抗體間蛋白質-蛋白質之間、蛋白質-胜肽之間和蛋白質-去氧核醣核酸之間的親和力和量測反應動力學參數。其他顯著的應用像是epitope mapping。表面膜漿共振技術的優點有即時偵測(real time)、原位(in situ)、靈敏度高(high sensitivity)、免標定(labeled-free)、快速定量(quantitative)以及可同時對大量樣品進行檢測(high throughput screening)<sup>88</sup>。

### 7-2-1. 漸逝波的原理

當多角度的入射光源 (incident light) 由折射率較大的介質(玻璃稜鏡, prism) 射向折射率較小的介質(金屬薄層), 且入射角度大於其臨界角度時, 理論上入射進去的光束會在兩介質的界面上全部反射出來, 也就是光的全反射現象(total internal reflection)。但實際上, 當入射光的角度等於其臨界角度時, 光束會於折射率較小的金屬薄層中穿透而產生薄膜般的區域, 並在這個區域中產生出光的反射, 而這段區域被稱為漸逝波 (evanescent wave) 或逐漸消失場(evanescent field), 而這段區域的深度則被稱為滲透距離 (penetration depth)。如圖3-5。此漸逝波能夠打亂金屬薄層內的電子分佈, 因而產生出表面電漿波。

### 7-2-2. 表面電漿現象的原理

表面電漿現象泛指於玻璃稜鏡與金屬表層界面上之自由電子因受到外來光源之激發使電子有脫離金屬往玻璃稜鏡移動之趨勢, 同時, 電子的脫離使得金屬晶格內之電荷分布有所改變而產生將電子拉回至金屬晶格內之交互作用力。此作用力以簡諧運動的方式運作且會沿著金屬表層傳遞其震盪方向, 此震盪方向與漸逝波行進之方向垂直。因為是發生在金屬表層自由電子之移動故稱之為表面電漿波。

電子激發或光子激發的實驗方式可以激發出玻璃稜鏡與金屬表層界面間的表面電漿波, 但其條件為入射光子(或粒子)的角頻率和角動量必需與表面電漿波相符合; 電子激發的方式則需要在高真空之環境下進行。光子激發的實驗方式其設備要求不高但其方式則不如電子激發方式那麼地直接(於高真空狀態直接射擊金屬表面)。

### 7-2-3. 表面電漿共振現象的原理

生物感應器是分析分子與分子間之交互作用的有用技術, 在一些臨床的分析或是生物化學方面的研究特別重要。surface plasmon resonance (SPR) 生物感測器的基本原理是利用光學的實驗方法, 來測量金屬表層界面生物分子間的反應

變化。BIAcore life science公司利用表面膜漿共振現象(surface plasmon resonance, SPR)的原理進行樣品的檢測：當漸逝波與表面電漿波的頻率相同，會產生彼此間的共振作用(resonance reaction)，使入射光的能量會被介質所吸收，反射光能量會大幅降低，並且會引起反射角度的急劇變化。

生物感應器的晶片上通常會固定對分析物具有高度選擇性的辨識物質作為其辨識元件(在BIAcore 3000的系統中則稱為ligand)，例如：酵素、抗體、細胞、DNA等物，它們都能對特定的分析物產生出高度的選擇性，並且能夠再生使用。當分析物(例如抗原)流經生物晶片的表面時，抗原與抗體之間的結合程度會影響晶片表面的環境，進而使晶片上分析物的質量、濃度與密度遭受改變，結果促使了共振角由原本的Angle1轉移至Angle2(圖3-6)。SPR會根據時間(time)與共振角度(resonance signal)間的關係變化量做圖，並統整出一系列的感應圖(sensorgram)，其縱軸為共振單位(resonance unit, RU)，橫軸為時間(圖3-7)。表面膜漿共振所產生的訊號單位為共振單位，1000 RU表示共振角度轉移 $0.1^\circ$ ，也相當於濃度變化了 $1 \text{ ng/mm}^2$ 或 $10 \text{ mg/mL}$ <sup>98</sup>。

在BIAcore 3000的生物感應器系統中，是使用感應晶片作為辨識分析物的實驗配件，其中共有許多不同用途的感應晶片，如表5-10，較常用的感應晶片為CM5晶片(CM5 chip)。感應晶片的表面和充滿樣品溶劑的環境是低折射率介質的一面，而玻璃稜鏡被光源照射的另外一面則是高折射率之介質。利用光的偵測分析器來量測發生光的全反射時其反射光強度，當光源的入射角接近共振角時，反射光的能量會急驟下降。當光源的入射角等於共振角時，反射光的強度為零。入射角的差異會影響SPR中的折射角角度(SPR angle)，藉此而測得共振訊號。利用此種現象可以偵測出分子間的交互作用力。

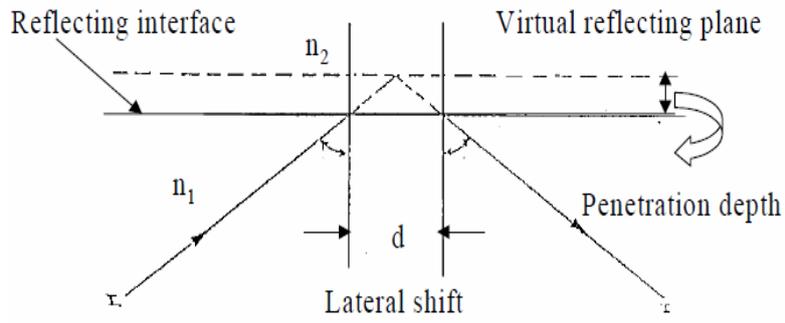


圖3-5.光的全反射與漸逝波。

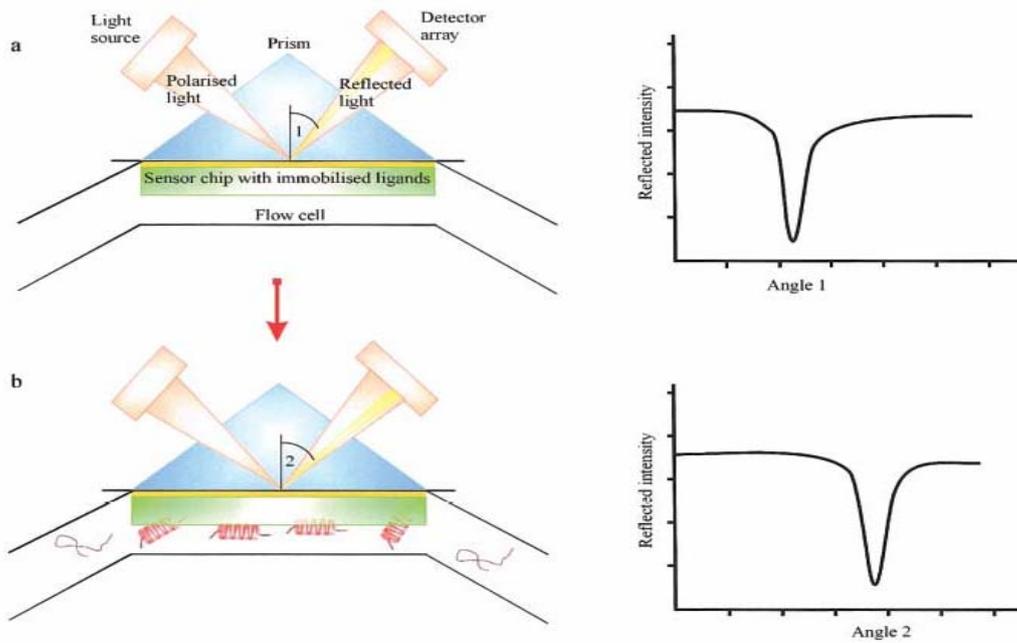


圖3-6.表面膜漿共振技術的基本架構。(BIAcore)

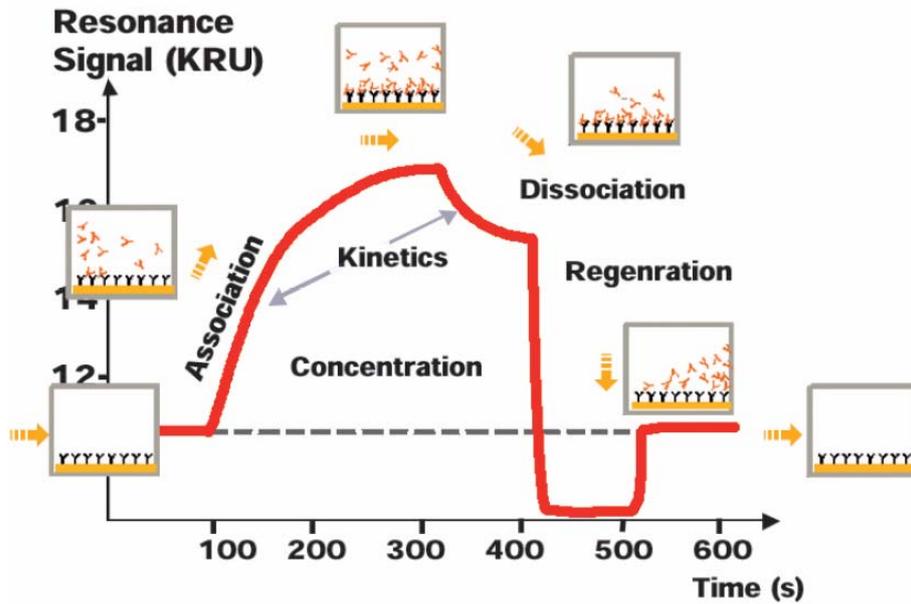


圖 3-7. BIAcore 之感應曲線圖。縱軸為共振單位(resonance unit；RU)，1000 RU 的變化相當於  $1 \text{ ng/mm}^2$  或  $10 \text{ mg/mL}$  的表面蛋白質濃度變化；橫軸為時間(秒)。

❶ 當偵測開始時( $t=0$  秒)，感測晶片的表面上僅有已固定之生物元件存在，RU 值維持在基礎穩定狀態；❷ 當生物元件與分析物的結合反應發生時( $t=100$  秒)，可以明顯看出 RU 值急劇上升，❸ 當表面生物元件與分析物的結合程度趨近於飽和後，曲線上升速度會達到穩定平衡的狀態；❹ 待測物注射結束後( $t=320$  秒)，系統立即自動切換至緩衝溶液，此時段內 RU 值下降的情況代表了表面生物元件與分析物的複合物其解離過程❺  $t=400$  秒時，注入解離劑，快速移除表面生物元件與分析物的複合物；❻ 最後，注入能使系統恢復的緩衝溶液，RU 值會回到起始值的平衡狀態，感測晶片的感應面即可進入另一種待測物的分析。(BIAcore)

#### 7-2-4. 儀器組成

BIAcore 3000儀器是由三大系統所組成的，包括感應晶片、微流體系統和表面膜漿共振偵測系統(圖3-8)。

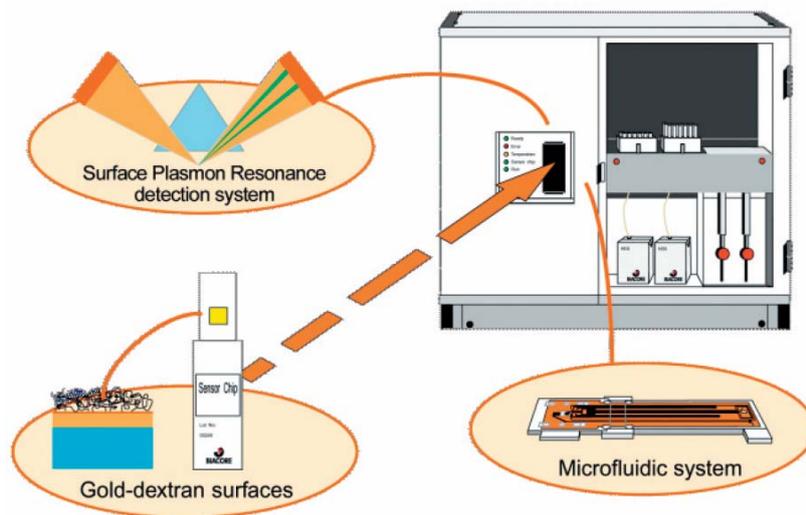


圖3-8.組成Biacore 3000儀器的三大系統。(BIAcore)

### 1. 感應晶片

在BIAcore 3000的儀器中、感應晶片是訊號傳導者也是分子間交互作用發生的地點，可以將質量變化轉成表面膜漿共振訊號。感應晶片表面組成如圖3-9，主要由四個部份組成：玻璃稜鏡層(glass prism layer)、金屬薄層(gloden film)、連接層(linker layer)和專一反應層(specific layer)。

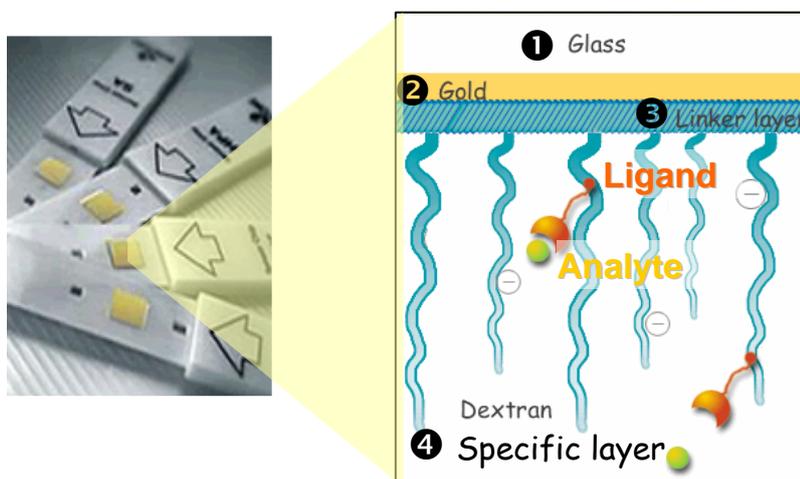


圖 3-9. Biacore 3000 sensor 之感應晶片主要構造。(BIAcore)

晶片表面為玻璃稜鏡層，由約50 nm的金屬薄膜層覆蓋，此金屬層對表面膜漿共振現象的產生是非常重要的。而選擇金是因其可有效率的產生表面膜漿共振訊號。透過連接層將羧甲基化葡聚糖(carboxymethylated dextran layer) 修飾至

金屬層上，羧甲基化葡聚糖提供親水性環境以利生物分子固定，保護它們存在不被變性的狀態。在蛋白質間交互作用中，常利用amine coupling、thiol coupling和aldehyde coupling的方法將鍵合物(抗體、蛋白質、核酸、脂質或醣類)固定在CM5 晶片。我們所使用的固定方法為amine coupling，其作用原理是利用共價鍵的方式將鍵合物與晶片上的羧甲基化葡聚糖結合在一起。

## 2. 微流體系統(Microfluidics)

微流體系統主要由幫浦(pump) 及超微量液體匯流卡(integrated fluidic cartridge; IFC) 所組成。BIAcore 利用獨特設計的超微量液體匯流卡精確控制反應組成的接觸時間與流速(1-100  $\mu\text{L}/\text{min}$ )。超微量液體匯流卡的優點為所需樣品體積量極少(在5-100  $\mu\text{L}$ )且同時能利用超微量液體匯流卡可將液體運送至晶片表面，這確保可以非常精確的傳遞樣品。

## 3. 表面膜漿共振技術偵測系統(surface plasmon resonance detection)

光源由一個兩極真空管中發射出近紅外光，先通過玻璃稜鏡(glass prism)後才入射至金屬薄層。此玻璃稜鏡為具一特殊楔形(wedge-shaped)之耦合器(coupler)，可提供一定的入射角度，以便將光聚焦於金屬的表面，進而激發共振現象。此部份為訊號轉換元件，可將生物分子與待測物反應後，偵測到的折射係數變化轉換成共振角度的變化量。當表面膜漿共振產生時，晶片中的金屬層會促使產生物理變化。偵測折射率(refractive index)改變的程度即可知道晶片上質量改變多少。

### 7-3. 表面膜漿共振技術的實驗方法

#### 7-3-1. CM5 感應晶片的固定(immobilization)和再生(regeneration)

固定(immobilization)是根據 Johansson 等人所使用的方法來進行，使 Id1 單株抗體、Bax 單株抗體和 Bcl-2 單株抗體能依序固定於 CM-5 感應晶片的不同頻

道 (channel) 上：BIAcore 3000 是使用 HBS-EP (10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Tween-20, pH=7.4)buffer 當緩衝液，將通過微射流系統之流速設定為 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。先注入 200  $\mu\text{L}$  的 NHS (0.05 M, N-hydroxysuccinimide) 和 EDC (0.2 M, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) (50:50,v/v)之混合物進行 CM-5 感應晶片上羧甲基化葡聚糖(carboxymethylated dextran)之活化，羧甲基化葡聚糖活化後會與 NHS 形成 NHS-esters。接著再注入 200  $\mu\text{L}$  的 Id1 單株抗體稀釋液(利用 pH=4.5 的醋酸鈉溶液稀釋成 1/100 倍後使用)，與 CM5 晶片上的 NHS-esters 相互作用，使 Id1 單株抗體能結合到 CM5 感應晶片的表面上。再利用 200  $\mu\text{L}$  的 EA (pH = 8.5, 1 M, ethanolamine hydrochloride)將 CM5 晶片表面上之 NHS-esters 去活化(blocking)，以避免任何不當的非專一性吸附 (non-specific binding) 之發生。

再生(regeneration)實驗的進行是為了確保 CM5 晶片上的抗體分子與抗原分子作用後，能藉由一再生試劑(緩衝液、酸性溶液或鹼性溶液)的沖提，使抗原分子與 CM5 晶片上抗體分子的結合性被破壞，使 CM5 晶片上抗體分子的活性能因此回復，這對於實驗的再現性之影響是很重要並且顯著的。再生的實驗過程：BIAcore 3000 是使用 HBS-EP(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Tween-20, pH=7.4)buffer 當緩衝液，將通過微射流系統之流速設定為 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。當 CM5 晶片中的環境狀態與緩衝液達到平衡後，注入 20  $\mu\text{L}$  的抗原分子(Id1 蛋白質標準品、Bax 蛋白質標準品、Bcl-2 蛋白質標準品和人類乳癌細胞的內容物蛋白質)，觀察其與 CM5 晶片上的抗體分子(Id1 單株抗體、Bax 單株抗體和 Bcl-2 單株抗體)之結合是否有飽和的情況發生。注射 20  $\mu\text{L}$  的抗原分子完畢後，將通過微射流系統之流速設定為 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ ，並注入再生試劑(緩衝液、酸性溶液或鹼性溶液)加以沖提之，觀察 CM5 晶片中的環境與作用的再生試劑是否能再次達到原始的平衡狀態。

## 7-3-2 單株抗體感應晶片的製備

### 7-3-2-1 Anti-X actin 單株抗體感應晶片的製備

將 Anti-X actin 單株抗體固定在 CM5 感應晶片之表面上，用以分析人類  $\beta$ -actin 的重組蛋白質、人類乳癌細胞內的蛋白質和 Anti-X actin 單株抗體之交互作用。圖 4-7 是先將 Anti-X actin 單株抗體固定在 CM5 感應晶片的表面膜漿共振感應曲線圖。縱軸為共振單位變化量( $\Delta$ resonance unit,  $\Delta$ RU)；橫軸為時間，以秒為單位(秒, second)。

利用胺類耦合法(amine coupling)將 Anti-X actin 單株抗體固定在 CM5 感應晶片表面上的流程共有三個步驟，包括 a. 活化(activation): 將 EDC/NHS(等量混合)注射至 CM5 感應晶片的表面；b. 固定(immobilization): 注射 Anti-X actin 單株抗體稀釋液至需活化的 CM5 感應晶片表面；c. 去活化(blocking): 注射 ethanolamine 至 CM5 感應晶片表面，藉此覆蓋住 CM5 感應晶片上尚未與 Anti-X actin 單株抗體結合之 NHS-esters，以避免任何不當的非專一性吸附產生。三個步驟完成後，此時所觀察到之共振單位變化量即為 Anti-X actin 單株抗體實際固定於 CM5 感應晶片之總量( $\Delta$ RU 約等於 861.9 RU,  $1000 \text{ RU} = 1 \text{ ng/mm}^2 = 10 \text{ mg/mL}$ )。

### 7-3-2-2 Anti-Id1 HLH 單株抗體感應晶片的製備

將 Anti-Id1 HLH 單株抗體固定在 CM5 感應晶片的表面上，用以分析人類 Id1 重組蛋白質、人類乳癌細胞內的蛋白質和 Anti-Id1 HLH 單株抗體之交互作用。圖 4-8 是先將 Anti-Id1 HLH 單株抗體固定在 CM5 感應晶片的表面膜漿共振感應曲線圖。縱軸為共振單位變化量( $\Delta$ resonance unit,  $\Delta$ RU)；橫軸為時間，以秒為單位(秒, second)。

利用胺類耦合法(amine coupling)將 Anti-Id1 HLH 單株抗體固定在 CM5 感應晶片表面上的流程共有三個步驟，包括 a. 活化(activation): 將 EDC/NHS(等量混合)注射至 CM5 感應晶片的表面；b. 固定(immobilization): 注射 Anti-Id1 HLH

單株抗體稀釋液至需活化的 CM5 感應晶片表面; c. 去活化(blocking): 注射 ethanolamine 至 CM5 感應晶片表面, 藉此覆蓋住 CM5 感應晶片上尚未與 Anti-Id1 HLH 單株抗體結合之 NHS-esters, 以避免任何不當的非專一性吸附產生。三個步驟完成後, 此時所觀察到之共振單位變化量即為 Anti-Id1 HLH 單株抗體實際固定於 CM5 感應晶片之總量( $\Delta$ RU 約等於 1686.6 RU,  $1000 \text{ RU} = 1 \text{ ng/mm}^2 = 10 \text{ mg/mL}$ )。

### 7-3-2-3 Anti-Bcl-2 單株抗體感應晶片的製備

將 Anti-Bcl-2 單株抗體固定在 CM5 感應晶片的表面上, 用以分析人類 Bcl-2 重組蛋白質、人類乳癌細胞內的蛋白質和 Anti-Bcl-2 單株抗體之交互作用。圖 4-9 是先將 Anti-Bcl-2 單株抗體固定在 CM5 感應晶片的表面膜漿共振感應曲線圖。縱軸為共振單位變化量( $\Delta$ resonance unit,  $\Delta$ RU); 橫軸為時間, 以秒為單位 (秒, second)。

利用胺類耦合法(amine coupling)將 Anti-Bcl-2 單株抗體固定在 CM5 感應晶片表面上的流程共有三個步驟, 包括 a. 活化(activation): 將 EDC/NHS(等量混合)注射至 CM5 感應晶片的表面; b. 固定(immobilization): 注射 Anti-Bcl-2 單株抗體稀釋液至需活化的 CM5 感應晶片表面; c. 去活化(blocking): 注射 ethanolamine 至 CM5 感應晶片表面, 藉此覆蓋住 CM5 感應晶片上尚未與 Anti-Bcl-2 單株抗體結合之 NHS-esters, 以避免任何不當的非專一性吸附產生。三個步驟完成後, 此時所觀察到之共振單位變化量即為 Anti-Bcl-2 單株抗體實際固定於 CM5 感應晶片之總量( $\Delta$ RU 約等於 859.9 RU,  $1000 \text{ RU} = 1 \text{ ng/mm}^2 = 10 \text{ mg/mL}$ )。

### 7-3-2-4 Anti-Bax 單株抗體感應晶片的製備

將 Anti-Bax 單株抗體固定在 CM5 感應晶片的表面上, 用以分析人類 Bax 重組蛋白質、人類乳癌細胞內的蛋白質和 Anti-Bax 單株抗體之交互作用。圖 4-10

是先將 Anti-Bax 單株抗體固定在 CM5 感應晶片的表面膜漿共振感應曲線圖。縱軸為共振單位變化量( $\Delta$ resonance unit,  $\Delta$ RU)；橫軸為時間，以秒為單位(秒, second)。

利用胺類耦合法(amine coupling)將 Anti-Bax 單株抗體固定在 CM5 感應晶片表面上的流程共有三個步驟，包括 a. 活化(activation)：將 EDC/NHS(等量混合)注射至 CM5 感應晶片的表面；b. 固定(immobilization)：注射 Anti-Bax 單株抗體稀釋液至需活化的 CM5 感應晶片表面；c. 去活化(blocking)：注射 ethanolamine 至 CM5 感應晶片表面，藉此覆蓋住 CM5 感應晶片上尚未與 Anti-Bax 單株抗體結合之 NHS-esters，以避免任何不當的非專一性吸附產生。三個步驟完成後，此時所觀察到之共振單位變化量即為 Anti-Bax 單株抗體實際固定於 CM5 感應晶片之總量( $\Delta$ RU 約等於 1686.6 RU， $1000 \text{ RU} = 1 \text{ ng/mm}^2 = 10 \text{ mg/mL}$ )。

### 7-3-3. CM5 晶片上的抗體分子與抗原分子間之鍵結親合性測試 (Binding Analysis)

BIACore 3000 是使用 HBS-EP(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Tween-20, pH=7.4)buffer 當緩衝液，將通過微射流系統之流速設定為 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。注入 60  $\mu\text{L}$  的抗原分子(Id1 蛋白質標準品、Bax 蛋白質標準品、Bcl-2 蛋白質標準品和人類乳癌細胞的內容物蛋白質)，使其依序與 CM5 晶片上的抗體分子(Id1 單株抗體、Bax 單株抗體和 Bcl-2 單株抗體)作用，歷時共三分鐘。之後等待 2.5 分鐘，使整體環境(CM5 晶片與緩衝液)能因此趨向新的平衡狀態。平衡後，將通過微射流系統之流速設定為 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ ，並利用再生試劑(緩衝液、酸性溶液或鹼性溶液)加以沖提與 CM5 晶片上抗體分子作用的抗原分子，使 CM5 晶片上抗體分子的活性能回復。之後將不同濃度的抗原分子標準品與其對應的共振單位(resonance unit, RU)變化量整理出一線性關係的曲線圖，此圖有助於求取人類乳癌細胞內的特定蛋白質含量。

## 第八節. 應用 Bradford 蛋白質染料染色法測定人類乳癌細胞內的蛋白質濃度

### 8-1. 應用 Bradford 蛋白質染料染色法測定蛋白質濃度之實驗材料、試劑和設備

應用 Bradford 蛋白質染料染色法(Bradford assay)測定人類乳癌細胞內的蛋白質濃度之實驗材料、試劑和設備分別購自於不同的廠商，資料整理如表 3-11。

### 8-2. 應用 Bradford 蛋白質染料染色法來測定人類乳癌細胞內的蛋白質濃度之實驗原理

應用 Bradford 蛋白質染料染色法的方法(Compton and Jones et al. 1985)進行蛋白質濃度之定量。此蛋白質濃度定量方式是利用 Bradford 蛋白質染料試劑(Bradford protein-binding assay kit)中的考馬斯亮藍 G-250( coomassie brilliant blue G-250, 圖 3-10)會與蛋白質結合的特性。考馬斯亮藍 G-250 在強酸的環境下，會接受兩個質子(proton)，顏色也會因此有了變化，從原本的紅褐色轉變成深紅色，此時在 470 nm 的波長下，會有較高的吸收值可供偵測。另外，考馬斯亮藍 G-250 (紅褐色)也會與蛋白質結合，進一步形成複合物，因此使得其顏色從原本的紅褐色轉變成為藍色，此時在 590 nm 的波長下，會有較高的吸收值。此蛋白質染料的作用原理是以考馬斯亮藍 G-250 分子上的芳香苯環，與蛋白質與胜肽的疏水區結合；同時其亞硫酸基團 ( $-\text{SO}_3^{2-}$ ) 與蛋白質與胜肽上的正電荷結合，可使蛋白質與胜肽被染出藍色色帶，以便 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)測定儀(又名微量盤分光光譜儀)偵測。在 590 nm 波長下的吸光值變化量(optical density value, OD value)與待測物中蛋白質濃度會呈現出正相關的關係，Bradford 蛋白質染料染色法變色的原理及各種的蛋白質定量參照圖 3-11。

### 8-3. 應用 Bradford 蛋白質染料染色法來測定人類乳癌細胞內的蛋白質濃度之實驗方法

我們利用已知濃度的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)標準品(1 mg BSA /mL)以二次水稀釋成一系列濃度：100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，以此作為校正標準曲線，每次做出的校正曲線，其  $R^2$  值皆大於 0.98。依序取出 10  $\mu\text{L}$  體

積量的待測物樣品(標準品與未知物)與 200  $\mu\text{L}$  的考馬斯亮藍 G-250 稀釋液(原液以二次水稀釋成 0.2 倍)均勻混合，使樣品中的蛋白質與胜肽因此被染出藍色色帶，以利微量盤分光光譜儀偵測。測量人類乳癌細胞內的蛋白質之吸光值後，計算得到人類乳癌細胞內的蛋白質濃度。

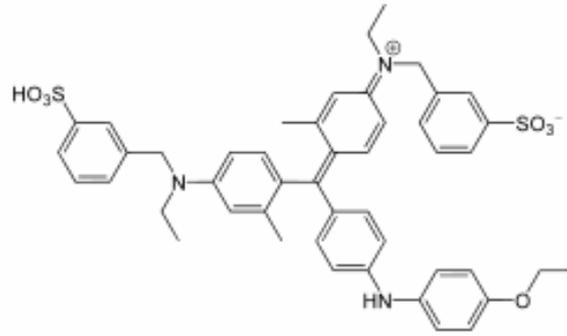


圖 3-10. 考馬斯亮藍 G250 的化學結構式。

■ 各種蛋白質定量法：

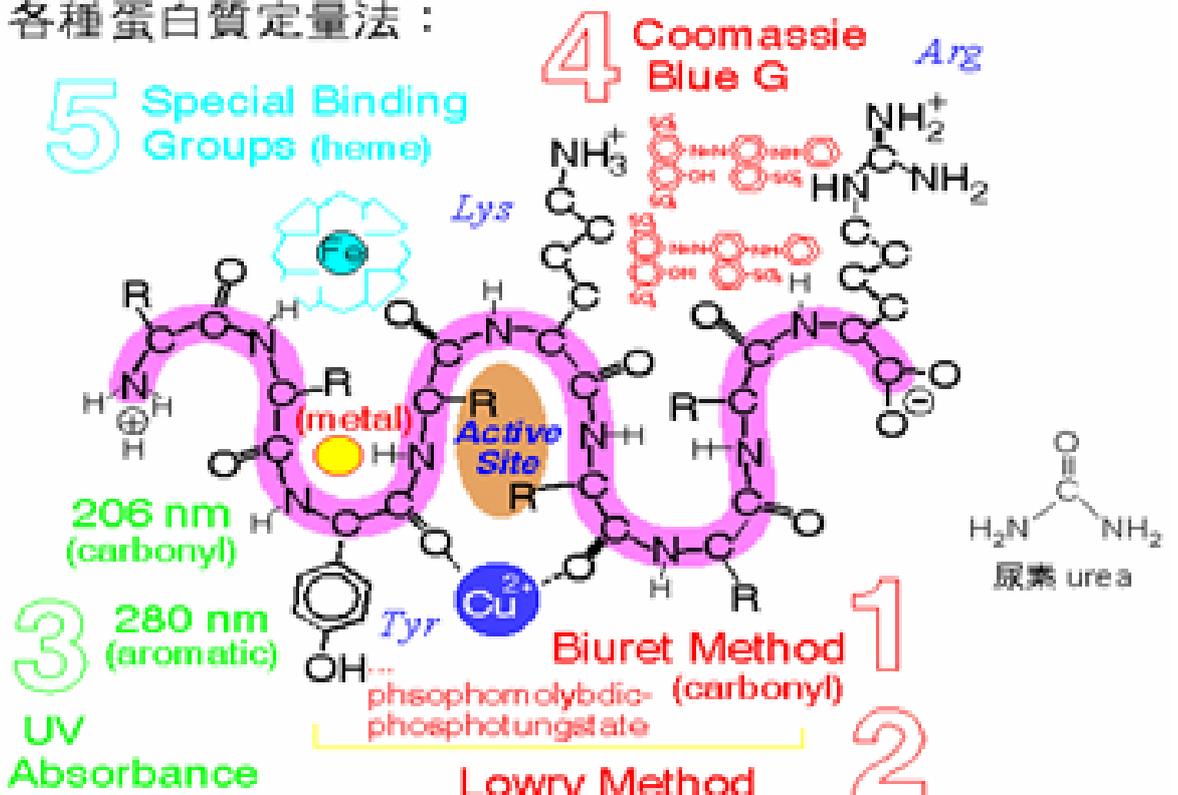


圖 3-11. 各種的蛋白質定量圖。(國立臺灣大學生化科技學系莊榮輝 教授)

## 第九節. 應用聚丙烯醯胺凝膠電泳鑑定人類乳癌細胞內蛋白質的分子量

### 9-1. 應用聚丙烯醯胺凝膠電泳鑑定人類乳癌細胞內蛋白質的分子量之實驗材料、試劑和設備

聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)的實驗材料、試劑和設備分別購自於不同的廠商，資料整理如表 3-12。

### 9-2. 聚丙烯醯胺凝膠電泳的實驗原理

聚丙烯醯胺凝膠電泳是在電泳系統中，先利用穩定的熱源(95°C, 10 分鐘)破壞蛋白質的三級及四級結構，使其分子內部的疏水區暴露出來，之後以界面活性劑十二烷基硫酸鈉(sodium dodecyl sulfate, SDS)依附在蛋白質的疏水區表面，使十二烷基硫酸鈉本身所帶之大量負電荷包附住蛋白質而引導泳動的發生。因此蛋白質本身的電荷與結構對電泳的泳動率沒有影響，泳動率只決定於蛋白質的分子量，故聚丙烯醯胺凝膠電泳適合測定蛋白質的分子量差異。在蛋白質樣品的前處理上常加入還原劑來破壞蛋白質分子內的雙硫鍵，常用還原劑有 2-巯醇乙醇(2-mercaptoethanol, 2-Me)或二硫代蘇糖醇(dithiothreitol, DTT)。因此聚丙烯醯胺凝膠電泳可以廣泛地應用於測定蛋白質次單元體的分子量。

### 9-3. 聚丙烯醯胺凝膠電泳的實驗方法

首先粗略估計人類乳癌細胞內蛋白質分子量的範圍，選擇適宜濃度之凝膠及相應分子量的蛋白質標準品 (protein standard)。蛋白質標準品及未知樣品(人類乳癌細胞內的內容物蛋白質)同時進行電泳，接著進行染色及褪染步驟。根據蛋白質標準品作一標準曲線，即可由未知樣品(人類乳癌細胞內的內容物蛋白質)的相對遷移率，分析出各種不同蛋白質的分子量分布。

#### 9-3-1. 分離膠體(separating gel)的配製

架好電泳設備，準備好形成分離膠體的丙烯醯胺單體分子(separating gel monomer)；注膠前再加入四甲基二乙胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)，用

巴斯德移液管(Pasteur pipette) 和安全吸球(rubber bulb) 注膠。當分離膠體尚未凝聚完全時，可在膠體上方蓋上一層乙醇(ethanol)，可使下方的分離膠體更平整。若使用較高百分比的膠，可以直接將焦集膠體(stack gel)倒入未完全聚合的分離膠體上，注意不要將兩層膠體混合到。分離膠體的配法請參照表 3-13。

### 9-3-2. 焦集膠體(stack gel)的配製

待分離膠體完全聚合變成固體後，倒去上層的乙醇，準備焦集膠體的製備，當加入四甲基二乙胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)後馬上注入焦集膠體，插上齒梳(comb)，等膠體完全凝固後即可使用。焦集膠體的配法請參照表 3-14。

### 9-3-3. 電泳實驗

取適量的樣本 (約 5~10 mL)，加入同體積之樣本緩衝液 (sample buffer) 再加入 2 mL 追蹤染料，混合均勻後於 100 °C 中煮 5 分鐘，待冷卻後離心 30 秒，以微量針管小心注入膠體中的樣本槽，並避免氣泡產生。根據電泳膠的大小採用 25~50 mA 固定電流，依下列配方準備 5 倍的聚丙烯醯胺凝膠電泳之 running buffer 並儲存於室溫，使用前稀釋至 1 倍。電壓以 100~150 V 進行電泳。待追蹤染料跑出膠片外，關掉電源，取出膠片中的膠體，以解剖刀截角做記號，準備進行染色。Tris-glycine SDS PAGE 的 running buffer 之配法請參照表 3-15。Tris-glycine SDS PAGE 的 sample buffer 之配法請參照表 3-16。

#### 9-3-4. 染色與退染

以考馬斯亮藍 R-250 (coomassie brilliant blue R-250, CBR-250, 圖 3-12) 分子上的芳香苯環，與蛋白質與胜肽的疏水區結合；同時其亞硫酸基團 ( $-\text{SO}_3^{2-}$ ) 與蛋白質與胜肽上的正電荷結合，可使蛋白質與胜肽染出藍色色帶。是非常方便的蛋白質與胜肽染色法。膠體浸入考馬斯亮藍 R-250 染色液中，置於平台震盪器上搖盪 30 min。若膠體中的蛋白質與胜肽濃度較低，則染色時間可加長至 60 min。倒出染色液，用自來水沖洗後倒入脫色液。於染色缸中放入一塊吸水紙，可加速脫色過程。若膠體表面有不溶的考馬斯亮藍 R-250 染料沈積，可以用 50% 甲醇洗去。考馬斯亮藍 R-250 染色液與考馬斯亮藍 R-250 脫色液的配法請參照表 3-17。

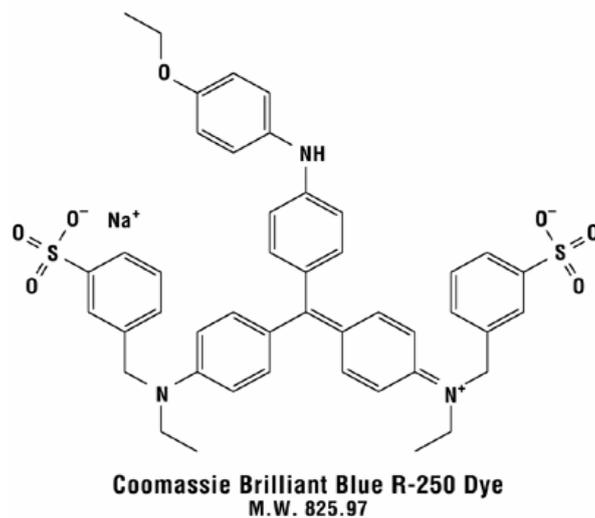


圖 3-12. 考馬斯亮藍 R-250 的化學結構式。

## 第十節. 西方墨點轉漬法

### 10-1. 西方墨點轉漬法的實驗材料、試劑和設備

應用西方墨點轉漬法 (Western blot) 來分析人類乳癌細胞(MCF-7 cells)內的蛋白質之實驗材料、試劑和設備分別購自於不同的廠商，資料整理如表 3-18。

### 10-2. 西方墨點轉漬法的實驗原理

西方墨點轉漬法的免疫檢驗方法，是可以強力偵測一細胞或體液中特定的微量蛋白質，這項技術是結合膠體電泳 (gel electrophoresis) 的優越解析力、抗體的專一性、酵素的敏感性。如此一來，使得在一複合物中，海底撈針地找尋一蛋白質，成為可能。

西方墨點轉漬法又稱免疫染色法(immunoblotting)，主要分成三個步驟流程：第一步，將蛋白質混合物以聚丙烯醯胺凝膠電泳的方式分離之，接著是轉漬法的施行，將需解析的蛋白質混合物置於穩定電場中，使其能從原本的膠體上轉移到硝化纖維轉漬膜(nitrocellulose transfer membrane)。第二步，將硝化纖維轉漬膜浸於含有標的蛋白質的一級抗體 (primary antibody) 稀釋溶液中，形成抗原與一級抗體的複合物。第三步，藉由對一級抗體具有專一性的二級抗體 (enzyme-linked secondary antibody)，來漂洗此硝化纖維轉漬膜，再加入胺基苯二醯(luminol)，與二級抗體上的辣根過氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)產生出具有螢光性質的物質，偵測此螢光(electrochemiluminescence, ECL)可以進一步得知感興趣蛋白質的表現量。如圖 3-13。

### 10-3. 西方墨點轉漬法的實驗方法

1. 將人類乳癌細胞內的蛋白質混合物以聚丙烯醯胺凝膠電泳分析後，將膠體取下，使膠片中的蛋白質混合物轉移至硝化纖維轉漬膜上，此過程稱為蛋白質的轉漬(protein transfer)。
2. 將硝化纖維轉漬膜放入封鎖緩衝液(blocking solution，5%脫脂奶粉溶於 1×

- TBST)中，均勻搖晃 1 小時。
3. 用 1× TBST(tris basewith triton x-100 buffer)清洗硝化纖維轉漬膜，2 次(10 分鐘)。
  4. 去除 1× TBST(tris basewith triton x-100 buffer)，將硝化纖維轉漬膜放入一級抗體稀釋液中，置於 4°C，均勻搖晃 16~18 小時。
  5. 回收一級抗體稀釋液，並將硝化纖維轉漬膜以 1× TBST(tris basewith triton x-100 buffer)洗之，2 次(10 分鐘)。
  6. 去除 1× TBST(tris basewith triton x-100 buffer)，將硝化纖維轉漬膜放入二級抗體稀釋液中，置於 4°C，均勻搖晃 1~2 小時。
  7. 去除二級抗體稀釋液，以 1× TBS(含有 0.05% tween 20 的 tris-buffered saline)洗硝化纖維轉漬膜，2 次(10 分鐘)。
  8. 去除 1× TBS(含有 0.05% tween 20 的 tris-buffered saline)，以 1× TBS (tris-buffered saline)洗硝化纖維轉漬膜，2 次(10 分鐘)。
  9. 去除 1× TBS(tris-buffered saline)，將硝化纖維轉漬膜放入壓片夾中並加入螢光顯色劑(luminol)於硝化纖維轉漬膜上。
  10. 將底片置於硝化纖維轉漬膜上，壓緊壓片夾，開始壓片並利用底片偵測螢光。
  11. 將底片取出，置入洗片機中，使蛋白質的螢光表現在底片上呈現出來。
  12. 實驗結果以影像分析處理設備(Gel Logic 100 Imagine System, Kodak)擷取影像後，進行感興趣蛋白質的積分定量分析。

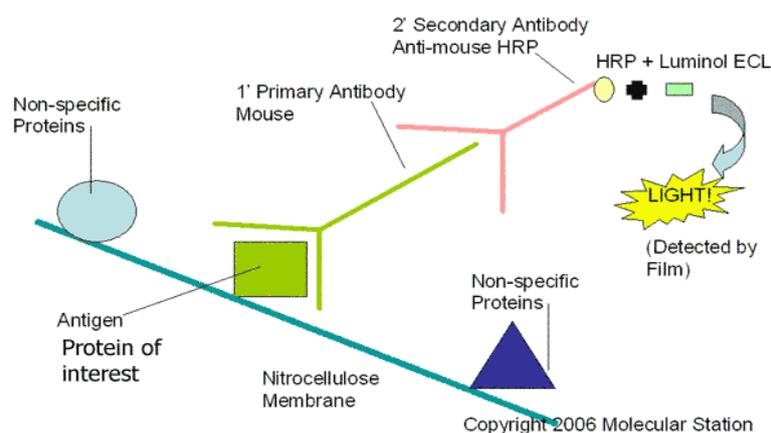


圖 3-13. 西方墨點轉漬法的作用原理圖。(Molecular Station)

## 第四章 結果與討論

### 第一節 胜肽之合成、純化的實驗結果

#### 1-1 逆相高效能液相層析儀的分析及純化

利用三氟醋酸(trifluoroacetic acid, TFA)以化學裂解 (chemical cleavage) 的方式將合成的胜肽從樹脂 (resin) 固著物切下，得到其胜肽粗產物，所得到的粗產物應用逆相高效能液相層析法(reverse phase- high performance liquid chromatography, RP-HPLC)進行初步的分析與分離。逆相高效能液相層析儀的分離原理是根據胜肽初產物與固定相管柱間之疏水性作用力不同，而使胜肽粗產物中的各個成分滯留在固定相管柱中之時間也有所不同，藉由這個特性，幫助我們分離純化出最終的胜肽主產物。胜肽經由逆相高效能液相層析儀分析並純化收集所得的層析圖譜如圖4-1 (A)與圖4-2 (A)。圖4-1 (A)為peptide 3C粗產物之逆相高效能液相層析結果圖，由於一開始分析之樣品為peptide 3C的粗產物，因此其主產物及副產物皆會被逆相高效能液相層析儀的偵測器所偵測到，此時每個訊號的層析產物都要加以收集，並利用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀(Matrix- Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) 鑑定其分子量，進一步確定哪一個訊號峰的收集液是胜肽之主產物。當要分離純化peptide 3C的主產物時，即可根據胜肽中的各成分之滯留時間不同來個別收集，純化後則需再經由高效能液相層析儀確認其純度。圖4-2 (A)為peptide 3C粗產物經過分離純化後之逆相高效能液相層析結果圖，結果可得到一明顯的主峰訊號，其滯留時間為13.63分鐘，顯示peptide 3C經逆相高效能液相層析儀純化過後，除了其主要產物外，已不具有任何的副產物。將合成完畢且已經逆相高效能液相層析儀分離純化好的胜肽主產物經由基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀鑑定其正確的分子量。

## 1-2 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的分析與鑑定

peptide 3C 胜肽主產物的分子量經由理論計算後，得知為 1521.8 Da (Dalton, 道耳吞)。利用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀分析鑑定 peptide 3C 胜肽粗產物，在其質譜圖中，可以發現胜肽主產物(1521.4 Da)與副產物的訊號，如圖 4-1 (B)。藉由比較主產物與副產物間的訊號強度比，可以得知胜肽粗產物中主產物的比例。

收集經高效能液相層析儀純化後之 peptide 3C 胜肽主產物，並利用基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀分析鑑定後，得知其分子量測量值為 1520.9 Da，如圖 4-2 (B)。Peptide 3C 胜肽主產物的分子量經由理論計算後，得知為 1521.8 Da。兩者的實驗結果具有一致性，證實胜肽 peptide 3C 已經被成功的製備出來。

## 第二節 應用 Bradford 蛋白質染料染色法檢測人類乳癌細胞內的總蛋白質濃度

Bradford 蛋白質染料染色法(Bradford assay)是以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)作為其標準品，這是因為牛血清白蛋白不易受到雜質干擾而影響到其反應的準確度及再現性，而且價格上也比市面上其它的標準品便宜。將濃度 1 mg/mL 的牛血清白蛋白溶液稀釋成 100 µg/mL、200 µg/mL、300 µg/mL、400 µg/mL 及 500 µg/mL，以此製作校正標準曲線，每次做出的校正曲線，其 R 平方係數值( $R^2$ )皆大於 0.95。由牛血清白蛋白的濃度與吸光值(optical density value, OD value)之間的關係推導出之線性方程式為  $y = 0.0011x + 0.3362$ ，其中 y 為吸光值的變化，x 為牛血清白蛋白的濃度，R 平方係數值是 0.9823，如圖 4-3。由於 R 平方係數值能呈現出趨勢線對原始數據點的解釋能力，所以當原始數據點與趨勢線貼近的程度愈高，那麼 R 平方係數值就會愈接近於 1，這代表著此趨勢線對其原始數據點的解釋能力會愈強，相對誤差值也會愈小。

應用 Bradford 蛋白質染料染色法可以藉由牛血清白蛋白的校正標準曲線來定量人類乳癌細胞(MCF-7 cells)中的總蛋白質濃度。未加入 peptide 3C 時，人類乳癌細胞內蛋白質之總濃度為 12718.18 µg/mL；加入 65 µM 的 peptide 3C 處理 24 小時後，人類乳癌細胞內蛋白質之總濃度為 10627.27 µg/mL；加入 65 µM 的 peptide 3C 處理 48 小時後，人類乳癌細胞內蛋白質之總濃度為 4990.91 µg/mL，如表 4-1。

本實驗室之前以 MyoD 蛋白質為藍本設計出胜肽，並期望這些胜肽片段可以對 Id1 蛋白質具有高親和力，以期抑制 Id1 蛋白質與 bHLH 區塊蛋白質(例如 MyoD 蛋白質)間的交互作用力，其中以 peptide 3C 的抑制效果為最佳，而癌細胞內的 Id1 蛋白質之表現又與癌細胞的生長有密切關聯性。從細胞存活率實驗(MTT assay)中可以發現以 peptide 3C 處理人類直腸癌細胞(HT-29 cells) 24 小時，其  $IC_{50}$  為 27 µM，處理 48 小時的  $IC_{50}$  為 25 µM；以 peptide 3C 處理人類乳癌細胞(MCF-7 cells) 24 小時，其  $IC_{50}$  為 30 µM，處理 48 小時的  $IC_{50}$  為 25 µM，顯示 peptide 3C 在低濃度下

對癌細胞有毒殺作用。在流式細胞技術(flow cytometry)的實驗中也發現人類乳癌細胞在加入5  $\mu\text{M}$  的peptide 3C處理24小時及48小時後，其細胞週期中的sub-G1(細胞休眠)期會上升，G0/G1期(細胞生長)下降，顯示癌細胞走向了細胞死亡的路徑；其S期(合成細胞內的DNA)的下降，則會使細胞內蛋白質的產量降低。

根據此篇參考資料，推論：隨著加入 peptide 3C 的時間愈久，愈多的人類乳癌細胞走向細胞凋亡的路徑，細胞中蛋白質的總含量也會因此而下降。由此推測可能是因為癌細胞走向細胞凋亡後，會進一步引起細胞內蛋白質的生產出現停滯現象，所以才會造成細胞中的總蛋白質含量隨著加藥時間愈長而持續下降的結果。

### 第三節 應用西方墨點轉漬法分析人類乳癌細胞內的蛋白質

#### 3-1 聚丙烯醯胺凝膠電泳的檢測與分析

從人類乳癌細胞內萃取出蛋白質後，以 10%的聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)的小膠(10 cm × 7.3 cm)加以分析，結果發現以胜肽處理後和未以胜肽處理的人類乳癌細胞內之蛋白質成分是很複雜的，如果只利用分子量的不同來區分特定蛋白質是非常困難的，更何況是在加入胜肽的前後，特定蛋白質的含量變化更是難以檢測的。經過評估後，利用抗體與抗原(蛋白質)間的專一性鍵結來偵測特定蛋白質的表現量及含量變化是可行性較高的一種生化分析方法。因此決定應用西方墨點轉漬法檢測並分析細胞內特定蛋白質含量之變化。

#### 3-2 西方墨點轉漬法的檢測與分析

本實驗室之前之報導證實peptide 3C於低濃度下對癌細胞有毒殺作用。在流式細胞技術(flow cytometry)的實驗中也發現人類乳癌細胞在加入peptide 3C處理24小時及48小時後，其細胞週期中的sub-G1(細胞休眠)期會上升，G0/G1期(細胞生長)下降，顯示癌細胞走向了細胞死亡的路徑；其S期(合成細胞內的DNA)的下降，則會使細胞內蛋白質的產量降低。

利用西方墨點轉漬法 (Western blotting) 評估並測量人類乳癌細胞(MCF-7 cells)中蛋白質 $\beta$ - actin、Id1、Bax和Bcl-2之相對含量百分比，結果如圖4-5、圖4-6與表4-2。根據結果可以發現人類乳癌細胞內的 $\beta$ - actin ( $\beta$ -肌動蛋白質)，無論是否有加入peptide 3C，或是加藥時間的長短，亦或是在不同時間(inter day 與intra day)的偵測，都呈現出穩定的表現量，且得到的相對標準偏差值也很小，這表示 $\beta$ -actin在人類乳癌細胞中具有常態性表現的特徵， $\beta$ -actin的這一個特點會使得 $\beta$ -actin能持續的被細胞分泌出來，而不會影響其在細胞中的表現量，所以 $\beta$ -actin可以作為實驗中的內標準品，幫助確認實驗的手法與實驗結果的可信度和再現

性。

利用西方墨點轉漬法對未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內蛋白質中之 Id1 蛋白質進行偵測，結果發現有 Id1 蛋白質的表現，且隨著加入 peptide 3C 的時間愈長，人類乳癌細胞內蛋白質中的 Id1 蛋白質表現量也會隨之大量下降。當加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 24 小時後，細胞中的 Id1 蛋白質表現量會下降到原來的  $3.44 \pm 0.49\%$ ；當加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 48 小時後，細胞中的 Id1 蛋白質表現量則會繼續下降到原來的  $2.41 \pm 0.85\%$ 。由西方墨點轉漬法實驗的結果推論：peptide 3C 會對人類乳癌細胞中之 Id1 蛋白質產生抑制的作用，並促使人類乳癌細胞走向細胞凋亡的路徑。

利用西方墨點轉漬法對未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內容物蛋白中的 Bcl-2 蛋白質進行偵測，結果發現有 Bcl-2 蛋白質的表現，且隨著加入 peptide 3C 的時間愈長，人類乳癌細胞內蛋白質中的 Bcl-2 蛋白質表現量也會隨之大量下降。當加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 24 小時後，細胞中的 Bcl-2 蛋白質表現量會下降到原來的  $4.62 \pm 0.53\%$ ；當加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 48 小時後，細胞中的 Bcl-2 蛋白質表現量則會繼續下降到原來的  $4.16 \pm 0.82\%$ 。由西方墨點轉漬法實驗的結果推論：peptide 3C 會對人類乳癌細胞中之 Bcl-2 蛋白質產生抑制的作用，並藉此使人類乳癌細胞走向細胞凋亡的路徑。

利用西方墨點轉漬法對未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內蛋白質中的 Bax 蛋白質進行偵測，結果發現有 Bax 蛋白質的表現，且隨著加入 peptide 3C 的時間愈長，人類乳癌細胞內蛋白質中的 Bax 蛋白質表現量也會改變。當加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 24 小時後，細胞中的 Bax 蛋白質表現量會上升到原來的  $147.36 \pm 3.84\%$ ；當加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 48 小時後，細胞中的 Bax 蛋白質表現量則會下降到原來的  $67.64 \pm 5.09\%$ 。根據西方墨點轉漬法實驗的結果推論：peptide 3C 在加入 24 小時後會促進人類乳癌細胞中之 Bax 蛋白質表現量，並促使人類乳癌細胞走向細胞凋亡的路徑。Peptide 3C 在加入 48 小時後，人類乳癌細胞中之 Bax 蛋白質表現量則是下降了，這有可能是因為其細胞週期中的 S 期

(合成細胞內的 DNA)下降，使細胞內的 Bax 蛋白質有停滯生產或產量降低的現象，所以才會有 Bax 蛋白質表現量有先上升後下降的情況發生。

### 3-3 西方墨點轉漬法的結果檢討

根據圖 4-5 的實驗結果，發現應用西方墨點轉漬法來偵測癌細胞內的蛋白質  $\beta$ -actin、Id1 和 Bax 時，都會有一個共通的問題：與一級抗體有專一性鍵結的特定蛋白質雖然被二級抗體(HRP-labeled)偵測到了，但卻有其它的蛋白質與一級抗體產生了非專一性的鍵結，因而在此實驗的結果中也被二級抗體所偵測而產生了訊號。這有可能是一級抗體稀釋液、二級抗體稀釋液或是注入樣品的濃度過高所致，因而使過多的抗體分子或抗原分子產生了非專一性的鍵結。將一級抗體稀釋液、二級抗體稀釋液或是注入樣品的濃度加以稀釋，使抗體分子或抗原分子的量沒有過多的現象，或許可以降低抗體分子與抗原分子間之非專一性鍵結的發生率。另外，當利用西方墨點轉漬法來偵測癌細胞內的蛋白質  $\beta$ -actin 與 Bcl-2 時，則又有一個問題產生，那就是背景值的干擾。可能是清洗(washing) 硝化纖維轉漬膜之時間過少所導致的，加長清洗時間與次數或是降低二級抗體稀釋液的濃度是可能的解決方案之一。另外，在清洗液中加入適量的 tween 20 或 SDS(sodium dodecyl sulfate)也可以達到降低整體背景值之效果，因為這兩種物質皆為 detergent 的一種，可以將背景中的非專一性之蛋白質洗去，而達到相同的成效。

## 第四節 應用表面膜漿共振技術分析人類乳癌細胞內的蛋白質

### 4-1 應用表面膜漿共振技術分析人類乳癌細胞內的 $\beta$ -actin 蛋白質

從人類乳癌細胞(MCF-7 cells)內萃取出蛋白質，共有三組(未加入胜肽、加入胜肽 24 小時及加入胜肽 48 小時)，各稀釋 5000 倍後，依序注入表面膜漿共振儀的微流體系統中，使之與固定於 CM-5 感應晶片表面的 anti-X actin 單株抗體作用。從圖 4-11 中，我們可以發現未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內之蛋白質和加入 65  $\mu$ M peptide 3C 處理 24 小時和 48 小時的人類乳癌細胞內之蛋白質在與 CM-5 感應晶片表面的 anti-X actin 單株抗體作用後，其共振單位變化量 ( $\Delta$ resonance unit,  $\Delta$ RU)是很相似的，其共振單位變化量分別是 67.86、67.84 和 67.81。這代表著未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內之蛋白質與加入 65  $\mu$ M peptide 3C 的人類乳癌細胞內之蛋白質(加藥時間：24 小時和 48 小時)中其蛋白質  $\beta$ -actin 的含量是很接近地。這是因為  $\beta$ -actin 基因在細胞中是一種常態性表現的基因(housekeeping gene)，這使得  $\beta$ -actin 能持續的被細胞分泌出來，且無論加藥與否，都不會影響到  $\beta$ -actin 於細胞中的表現量及含量，所以  $\beta$ -actin 可以作為我們實驗中的內標準品，幫助確認實驗手法與實驗結果的可信度和再現性。

### 4-2 應用表面膜漿共振技術分析細胞內的 Id1 蛋白質

#### 4-2-1 應用表面膜漿共振技術分析人類 Id1 重組蛋白質

將原始濃度為 1.8 mg/mL 的人類 Id1 重組蛋白質，稀釋成一系列不同的濃度 (18  $\mu$ g/mL, 9  $\mu$ g/mL, 4.5  $\mu$ g/mL, 2.25  $\mu$ g/mL, 1.13  $\mu$ g/mL, 0.56  $\mu$ g/mL, 0.28  $\mu$ g/mL, 0.14  $\mu$ g/mL)，並依序注入表面膜漿共振儀的微流體系統中，使之與固定於 CM-5 感應晶片表面的 anti-Id1 HLH 單株抗體作用。從圖 4-12 中，我們可以發現人類 Id1 重組蛋白質與 CM-5 感應晶片表面的 anti-Id1 HLH 單株抗體作用後，其產生的共振單位變化量 ( $\Delta$ resonance unit,  $\Delta$ RU)與人類 Id1 重組蛋白質的濃度會呈現出正相關的關係。這是因為愈多的人類 Id1 重組蛋白質與晶片表面的 anti-Id1

HLH 單株抗體結合時，晶片上的結合物體積會因此上升，並使表面膜漿共振儀中的折射角角度變大，最後共振單位變化量也會因此相對的有所提高。所以我們可以利用表面膜漿共振儀來探討人類 Id1 重組蛋白質的濃度與其共振單位變化量間的關係及演算，並可進一步的偵測與評估人類乳癌細胞中的 Id1 蛋白質之含量與濃度。

#### 4-2-2 應用表面膜漿共振技術分析人類乳癌細胞內的 Id1 蛋白質

從人類乳癌細胞(MCF-7 cells)內萃取出蛋白質，共有三組：加入胜肽、加入胜肽 24 小時及加入胜肽 48 小時。將三組細胞內的蛋白質各稀釋 5000 倍後，依序注入表面膜漿共振儀的微流體系統中，使之與固定於 CM-5 感應晶片表面的 anti-Id1 HLH 單株抗體作用。從圖 4-13 中，我們可以發現未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內之蛋白質和加入 65  $\mu\text{M}$  peptide 3C 處理 24 小時和 48 小時的人類乳癌細胞內之蛋白質在依序與 CM-5 感應晶片表面的 anti-Id1 HLH 單株抗體作用後，其共振單位變化量( $\Delta\text{resonance unit}$ ,  $\Delta\text{RU}$ )以未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內之蛋白質為最大( $\Delta\text{RU} = 82.11$ )，其後依序是加入 65  $\mu\text{M}$  peptide 3C 處理 24 小時的人類乳癌細胞內之蛋白質( $\Delta\text{RU} = 29.69$ )及加入 65  $\mu\text{M}$  peptide 3C 處理 48 小時的人類乳癌細胞內之蛋白質( $\Delta\text{RU} = 20.85$ )。這表示未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞中含有較高含量的 Id1 蛋白質，但是隨著加入 peptide 3C 的時間愈長，人類乳癌細胞中的 Id1 蛋白質含量會因此下降愈多。

#### 4-2-3 應用表面膜漿共振技術評估人類乳癌細胞內的 Id1 蛋白質濃度

藉由人類 Id1 重組蛋白質的濃度與共振單位變化量( $\Delta\text{resonance unit}$ ,  $\Delta\text{RU}$ )間的關係，我們首先可以得到一個線性方程式： $y = 4.7562x + 6.4472$ ，其中的  $y$  為共振單位變化量， $x$  為人類 Id1 重組蛋白質的濃度( $\mu\text{g/mL}$ )， $R$  平方係數值( $R^2$ )為 0.9959，如圖 4-14。由於  $R$  平方係數值能呈現出趨勢線對原始數據點的解釋

能力，所以當原始數據點與趨勢線貼近的程度愈高，那麼 R 平方係數值就會愈接近於 1，這代表著此趨勢線對其原始數據點的解釋能力會愈強，相對誤差值也會愈小。由人類 Id1 重組蛋白質的濃度與共振單位變化量間關係所導出的線性方程式之 R 平方係數值為 0.9959，與 1 的數值是非常接近的，這顯示出此趨勢線的可信度高且相對誤差值小，是一個有意義的實驗結果。但是在表面膜漿共振儀的實驗中，理論上而言，當沒有人類 Id1 重組蛋白質與 CM-5 感應晶片表面的 anti-Id1 HLH 單株抗體作用時，CM-5 感應晶片表面的結合物體積是不會改變的，那麼其共振單位變化量也會等於零，所以我們要將這個情況考慮進去，也就是將此趨勢線的截距設為零，使原點通過原始數據點的趨勢線。經過此一操作設定後，我們會得到一個新的線性方程式： $y = 5.2913x$ ，其中的 y 為共振單位變化量，x 為人類 Id1 重組蛋白質的濃度( $\mu\text{g/mL}$ )，R 平方係數值( $R^2$ )為 0.962，如圖 4-15。我們可以發現新趨勢線的 R 平方係數值會略降，且數值依然會大於 0.95，所以這個實驗結果是在一個可接受的範圍內。利用此新趨勢線來對人類乳癌細胞內中的 Id1 蛋白質進行偵測與定量，是一個比較合理的實驗操作。

為了符合理論的情況，先將舊趨勢線的截距設定成零，並針對人類 Id1 重組蛋白質的濃度與共振單位變化量( $\Delta\text{resonance unit}$ ,  $\Delta\text{RU}$ )之關係推導出新線性方程式： $y = 5.2913x$ ，其中的 y 為共振單位變化量，x 為人類 Id1 重組蛋白質的濃度( $\mu\text{g/mL}$ )，R 平方係數值( $R^2$ )為 0.962。以此新趨勢線針對未加入胜肽以及加入胜肽 24、48 小時的人類乳癌細胞內蛋白質中之 Id1 蛋白進行偵測與定量。結果如表 4-3：未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內容物蛋白中有  $76.45 \pm 0.99 \text{ mg/mL}$  的 Id1 蛋白；加入  $65 \mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 24 小時後的人類乳癌細胞內蛋白質中有  $26.99 \pm 1.31 \text{ mg/mL}$  的 Id1 蛋白質；加入  $65 \mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 48 小時後的人類乳癌細胞內蛋白質中有  $19.13 \pm 0.79 \text{ mg/mL}$  的 Id1 蛋白質。peptide 3C 在濃度  $65 \mu\text{M}$  的時候，不管是作用 24 小時或是 48 小時，都可以將人類乳癌細胞內蛋白質中的 Id1 蛋白質抑制掉一半以上的表現，而 Id1 蛋白質是使癌細胞不受控制增長的元兇之一。根據此結果推論：peptide 3C 可以藉著抑制 Id1 蛋白質

的表現，最後達到使癌細胞走向細胞凋亡的最終目的。

### 4-3 應用表面膜漿共振技術分析細胞內的 Bcl-2 蛋白質

#### 4-3-1 應用表面膜漿共振技術分析人類 Bcl-2 重組蛋白質

將原始濃度為 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的人類 Bcl-2 重組蛋白質，稀釋成一系列不同的濃度(3.5  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , 1.67  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , 1.25  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , 1  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , 0.83  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , 0.5  $\text{ng}/\mu\text{L}$ )，並依序注入表面膜漿共振儀的微流體系統中，使之與固定於 CM-5 感應晶片表面的 anti-Bcl-2 單株抗體作用。從圖 4-16 中，我們可以發現人類 Bcl-2 重組蛋白質與 CM-5 感應晶片表面的 anti-Bcl-2 單株抗體作用後，其產生的共振單位變化量( $\Delta\text{resonance unit}$ ,  $\Delta\text{RU}$ )與人類 Bcl-2 重組蛋白質的濃度會呈現出正相關的關係。這是因為愈多的人類 Bcl-2 重組蛋白質與晶片表面的 anti-Bcl-2 單株抗體結合時，晶片上的結合物體積會因此上升，並使表面膜漿共振儀中的折射角角度變大，最後共振單位變化量也會因此相對的有所提高。所以我們可以利用表面膜漿共振儀來探討人類 Bcl-2 重組蛋白質的濃度與其共振單位變化量間的關係及演算，並可進一步的偵測與評估人類乳癌細胞中的 Bcl-2 蛋白質之含量與濃度。

#### 4-3-2 應用表面膜漿共振技術分析人類乳癌細胞內的 Bcl-2 蛋白質

從人類乳癌細胞(MCF-7 cells)內萃取出蛋白質，共有三組：未加入胜肽、加入胜肽 24 小時及加入胜肽 48 小時。將三組細胞內的蛋白質各稀釋 5000 倍後，依序注入表面膜漿共振儀的微流體系統中，使之與固定於 CM-5 感應晶片表面的 anti-Bcl-2 單株抗體作用。從圖 4-17 中，我們可以發現未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內之蛋白質和加入 65  $\mu\text{M}$  peptide 3C 處理 24 小時和 48 小時的人類乳癌細胞內蛋白質在依序與 CM-5 感應晶片表面的 anti-Bcl-2 單株抗體作用後，其共振單位變化量( $\Delta\text{resonance unit}$ ,  $\Delta\text{RU}$ )以未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內之蛋白質為最大( $\Delta\text{RU}=71.7$ )，其後依序是加入 65  $\mu\text{M}$  peptide 3C 處理 24 小時的人類乳癌細胞內之蛋白質( $\Delta\text{RU}=34.5$ )及加入 65  $\mu\text{M}$  peptide 3C 處理 48 小時的人類乳癌細胞內之蛋白質。

類乳癌細胞內之蛋白質( $\Delta RU=30$ )。這表示著未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞中含有較高含量的 Bcl-2 蛋白質，但是隨著加入 peptide 3C 的時間愈長，人類乳癌細胞中的 Bcl-2 蛋白質含量會因此下降愈多。

#### 4-3-3 應用表面膜漿共振技術評估人類乳癌細胞內的 Bcl-2 蛋白質濃度

藉由人類 Bcl-2 重組蛋白質的濃度與共振單位變化量( $\Delta$ resonance unit,  $\Delta RU$ )間的關係，我們首先可以得到一個線性方程式： $y = 61.145x - 18.398$ ，其中的  $y$  為共振單位變化量， $x$  為人類 Bcl-2 重組蛋白質的濃度( $ng/\mu L$ )， $R$  平方係數值( $R^2$ )為 0.9934，如圖 4-18。由於  $R$  平方係數值能呈現出趨勢線對原始數據點的解釋能力，所以當原始數據點與趨勢線貼近的程度愈高，那麼  $R$  平方係數值就會愈接近於 1，這代表著此趨勢線對其原始數據點的解釋能力會愈強，相對誤差值也會愈小。由人類 Bcl-2 重組蛋白質的濃度與共振單位變化量間關係所導出的線性方程式之  $R$  平方係數值為 0.9934，與 1 的數值是非常接近的，這顯示出此趨勢線的可信度高且相對誤差值小，是一個有意義的實驗結果。但是在表面膜漿共振儀的實驗中，理論上而言，當沒有人類 Bcl-2 重組蛋白質與 CM-5 感應晶片表面的 anti-Bcl-2 單株抗體作用時，CM-5 感應晶片表面的結合物體積是不會改變的，那麼其共振單位變化量也會等於零，所以我們要將這個情況考慮進去，也就是將此趨勢線的截距設為零，使原點通過原始數據點的趨勢線。經過此一操作設定後，我們會得到一個新的線性方程式： $y = 52.462x$ ，其中的  $y$  為共振單位變化量， $x$  為人類 Bcl-2 重組蛋白質的濃度( $ng/\mu L$ )， $R$  平方係數值( $R^2$ )為 0.9643，如圖 4-19。我們可以發現新趨勢線的  $R$  平方係數值會略降，且數值依然會大於 0.95，所以這個實驗結果是在一個可接受的範圍內。利用此新趨勢線來對人類乳癌細胞內容物中的 Bcl-2 蛋白質進行偵測與定量，是一個比較合理的實驗操作。

為了符合理論的情況，先將舊趨勢線的截距設定成零，並針對人類 Bcl-2 重組蛋白質的濃度與共振單位變化量( $\Delta$ resonance unit,  $\Delta RU$ )之關係推導出新線性

方程式： $y = 52.462x$ ，其中的  $y$  為共振單位變化量， $x$  為人類 Bcl-2 重組蛋白質的濃度( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )， $R$  平方係數值( $R^2$ )為 0.9643。以此新趨勢線針對未加入胜肽以及加入胜肽 24、48 小時的人類乳癌細胞內蛋白質中之 Bcl-2 蛋白質進行偵測與定量。結果如表 4-4：未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內蛋白質中有  $6.74 \pm 0.11 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 Bcl-2 蛋白質；加入  $65 \mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 24 小時後的人類乳癌細胞內蛋白質中有  $3.21 \pm 0.14 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 Bcl-2 蛋白質；加入  $65 \mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 48 小時後的人類乳癌細胞內蛋白質中有  $2.88 \pm 0.09 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 Bcl-2 蛋白質。peptide 3C 在濃度  $65 \mu\text{M}$  的時候，不管是作用 24 小時或是 48 小時，都可以將人類乳癌細胞內之蛋白質中的 Bcl-2 蛋白質抑制掉一半以上的表現，而 Bcl-2 蛋白質是使癌細胞不走向細胞凋亡的元兇之一。根據此結果推論：peptide 3C 可以藉著抑制 Bcl-2 蛋白質的表現，最後達到使癌細胞走向細胞凋亡的最終目的。

#### 4-4 應用表面膜漿共振技術分析細胞內的 Bax 蛋白質

##### 4-4-1 應用表面膜漿共振技術分析人類 Bax 重組蛋白質

將原始濃度為  $0.28 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  的人類 Bax 重組蛋白質，稀釋成一系列不同的濃度( $50.4 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $25.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $21 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $12 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $7 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $4.48 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ,  $3.36 \text{ ng}/\mu\text{L}$ )，並依序注入表面膜漿共振儀的微流體系統中，使之與固定於 CM-5 感應晶片表面的 anti-Bax 單株抗體作用。從圖 4-20 中，我們可以發現人類 Bax 重組蛋白質與 CM-5 感應晶片表面的 anti-Bax 單株抗體作用後，其產生的共振單位變化量 ( $\Delta\text{resonance unit}$ ,  $\Delta\text{RU}$ )與人類 Bax 重組蛋白質的濃度會呈現出正相關的關係。這是因為愈多的人類 Bax 重組蛋白質與晶片表面的 anti-Bax 單株抗體結合時，晶片上的結合物體積會因此上升，並使表面膜漿共振儀中的折射角角度變大，最後共振單位變化量也會因此相對的有所提高。所以我們可以利用表面膜漿共振儀來探討人類 Bax 重組蛋白質的濃度與其共振單位變化量間的關係及演算，並可進一步的偵測與評估人類乳癌細胞中的 Bax 蛋白質之含量與濃度。

#### 4-4-2 應用表面膜漿共振技術分析人類乳癌細胞內的 Bax 蛋白質

從人類乳癌細胞(MCF-7 cells)內萃取出蛋白質，共有三組：未加入胜肽、加入胜肽 24 小時及加入胜肽 48 小時。將三組細胞內的蛋白質各稀釋 5000 倍後，依序注入表面膜漿共振儀的微流體系統中，使之與固定於 CM-5 感應晶片表面的 anti-Bax 單株抗體作用。從圖 4-21 中，我們可以發現未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內之蛋白質和加入 65  $\mu$ M peptide 3C 處理 24 小時和 48 小時的人類乳癌細胞內之蛋白質在依序與 CM-5 感應晶片表面的 anti-Bax 單株抗體作用後，其共振單位變化量( $\Delta$ resonance unit,  $\Delta$ RU)以加入 65  $\mu$ M peptide 3C 處理 24 小時的人類乳癌細胞內之蛋白質( $\Delta$ RU=109)為最大，其後依序是未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內之蛋白質( $\Delta$ RU=74.7)及加入 65  $\mu$ M peptide 3C 處理 48 小時的人類乳癌細胞內之蛋白質( $\Delta$ RU=31)。這表示著加入 65  $\mu$ M peptide 3C 處理 24 小時的人類乳癌細胞中含有較高含量的 Bax 蛋白質，但是隨著加入 peptide 3C 的時間愈長，人類乳癌細胞中的 Bax 蛋白質含量反而會因此下降許多，這表示 peptide 3C 可能會在 24 小時內促進並增加細胞中 Bax 蛋白質的表現，在 24 小時之後，peptide 3C 反而會使細胞中 Bax 蛋白質的表現量下降。

#### 4-4-3 應用表面膜漿共振技術評估人類乳癌細胞內的 Bax 蛋白質濃度

藉由人類 Bax 重組蛋白質的濃度與共振單位變化量( $\Delta$ resonance unit,  $\Delta$ RU)間的關係，我們首先可以得到一個線性方程式： $y = 3.7791x + 2.5649$ ，其中的 y 為共振單位變化量，x 為人類 Bax 重組蛋白質的濃度( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )，R 平方係數值( $R^2$ )為 0.9945，如圖 4-22。由於 R 平方係數值能呈現出趨勢線對原始數據點的解釋能力，所以當原始數據點與趨勢線貼近的程度愈高，那麼 R 平方係數值就會愈接近於 1，這代表著此趨勢線對其原始數據點的解釋能力會愈強，相對誤差值也會愈小。由人類 Bax 重組蛋白質的濃度與共振單位變化量間關係所導出的線性方程式之 R 平方係數值為 0.9945，與 1 的數值是非常接近的，這顯示出此趨勢線的可信度高且相對誤差值小，是一個有意義的實驗結果。但是在表面膜漿共

振儀的實驗中，理論上而言，當沒有人類 Bax 重組蛋白質與 CM-5 感應晶片表面的 anti-Bax 單株抗體作用時，CM-5 感應晶片表面的結合物體積是不會改變的，那麼其共振單位變化量也會等於零，所以我們要將這個情況考慮進去，也就是將此趨勢線的截距設為零，使原點通過原始數據點的趨勢線。經過此一操作設定後，我們會得到一個新的線性方程式： $y = 3.8616x$ ，其中的  $y$  為共振單位變化量， $x$  為人類 Bax 重組蛋白質的濃度( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )， $R$  平方係數值( $R^2$ )為 0.9936，如圖 4-23。我們可以發現新趨勢線的  $R$  平方係數值會略降，且數值依然會大於 0.95，所以這個實驗結果是在一個可接受的範圍內。利用此新趨勢線來對人類乳癌細胞內之蛋白質的 Bax 蛋白質進行偵測與定量，是一個比較合理的實驗操作。

為了符合理論的情況，先將舊趨勢線的截距設定成零，並針對人類 Bax 重組蛋白質的濃度與共振單位變化量( $\Delta\text{resonance unit}$ ,  $\Delta\text{RU}$ )之關係推導出新線性方程式： $y = 3.8616x$ ，其中的  $y$  為共振單位變化量， $x$  為人類 Bax 重組蛋白質的濃度( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )， $R$  平方係數值( $R^2$ )為 0.9936。以此新趨勢線針對未加入胜肽以及加入胜肽 24、48 小時的人類乳癌細胞內蛋白質中之 Bax 蛋白質進行偵測與定量。結果如表 4-5：未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內蛋白質中有  $95.17 \pm 0.28 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 Bax 蛋白質；加入  $65 \mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 24 小時後的人類乳癌細胞內蛋白質中有  $139.40 \pm 0.39 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 Bax 蛋白質；加入  $65 \mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 48 小時後的人類乳癌細胞內蛋白質中有  $41.00 \pm 0.20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 Bax 蛋白質。濃度  $65 \mu\text{M}$  的 peptide 3C 在人類乳癌細胞中作用 24 小時，可以使人類乳癌細胞內之蛋白質中的 Bax 蛋白質增加出一半左右的表現量，而 Bax 蛋白質的功能是促使癌細胞走向細胞凋亡的路徑，所以 peptide 3C 可以藉著促進 Bax 蛋白質的表現量，最後達到使癌細胞凋亡的最終目的。在 24 小時之後，peptide 3C 反而會使細胞中 Bax 蛋白質的表現量下降。根據此結果推論：可能是因為其細胞週期中的 S 期(合成細胞內的 DNA)下降，使細胞內的 Bax 蛋白質有停滯生產或產量降低的現象，所以才會有 Bax 蛋白質表現量有先上升後下降的結果。

## 第五節 應用表面膜漿共振技術及西方墨點轉漬法研發評估抗癌功效的新方法

### 5-1 應用表面膜漿共振技術及西方墨點轉漬法評估細胞內 Id1 蛋白質含量結果間的關係

利用表面膜漿共振技術偵測並加以運算以胜肽處理之人類乳癌細胞中的 Id1 蛋白質其相對濃度百分比，結果如下：未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內蛋白質之 Id1 蛋白質相對濃度百分比為 100%；加入 65  $\mu$ M 的 peptide 3C 處理 24 小時後之人類乳癌細胞內蛋白質中其 Id1 蛋白質相對濃度百分比為 35.3%；加入 65  $\mu$ M 的 peptide 3C 處理 48 小時後之人類乳癌細胞內蛋白質中其 Id1 蛋白質相對濃度百分比為 25.02%。利用西方墨點轉漬法偵測並加以運算以胜肽處理之人類乳癌細胞中的 Id1 蛋白質其相對含量百分比，結果如下：未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內蛋白質之 Id1 蛋白質相對含量百分比為 100%；加入 65  $\mu$ M 的 peptide 3C 處理 24 小時後之人類乳癌細胞內蛋白質中其 Id1 蛋白質相對含量百分比為 3.44%；加入 65  $\mu$ M 的 peptide 3C 處理 48 小時後之人類乳癌細胞內蛋白質中其 Id1 蛋白質相對含量百分比為 2.41%。兩種定量方法在原理上有所不同，表面膜漿共振技術是利用抗原直接結合上抗體的方式，對 Id1 蛋白質的濃度進行定量偵測；西方墨點轉漬法則是採用三明治夾擊的方式，對 Id1 蛋白質的濃度進行定量偵測。其原理是先利用一級抗體與抗原作用後，再用二級抗體加以確認，與一級抗體和抗原的複合體作用，最後才判定出抗原的相對含量。兩種定量方法的實驗結果雖然有些許之差異，但其實驗的結果卻具有相同趨勢性：以 peptide 3C 處理人類乳癌細胞後，會使癌細胞內的 Id1 之蛋白質含量下降。

### 5-2 應用表面膜漿共振技術及西方墨點轉漬法評估細胞內 Bcl-2 蛋白質含量結果間的關係

利用表面膜漿共振技術偵測並加以運算以胜肽處理之人類乳癌細胞中的 Bcl-2 蛋白質其相對濃度百分比，結果如下：未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內蛋白質中之 Bcl-2 蛋白質相對濃度百分比為 100%；加入 65  $\mu$ M 的 peptide 3C 處理 24 小時後之人類乳癌細胞內蛋白質中其 Bcl-2 蛋白質相對濃度百分比為

47.63%；加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 48 小時後之人類乳癌細胞內蛋白質中其 Bcl-2 蛋白質相對濃度百分比為 42.73%。利用西方墨點轉漬法偵測並加以運算以胜肽處理之人類乳癌細胞中的 Bcl-2 蛋白質其相對含量百分比，結果如下：未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內蛋白質中之 Bcl-2 蛋白質相對含量百分比為 100%；加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 24 小時後之人類乳癌細胞內蛋白質中其 Bcl-2 蛋白質相對含量百分比為 4.62%；加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 48 小時後之人類乳癌細胞內蛋白質中其 Bcl-2 蛋白質相對含量百分比為 4.16%。兩種定量方法在原理上有所不同，表面膜漿共振技術是利用抗原直接結合上抗體的方式，對 Bcl-2 蛋白質的濃度進行定量偵測；西方墨點轉漬法則是採用三明治夾擊的方式，對 Bcl-2 蛋白質的濃度進行定量偵測。其原理是先利用一級抗體與抗原作用後，再用二級抗體加以確認，與一級抗體和抗原的複合體作用，最後才判定出抗原的相對含量。兩種定量方法的實驗結果雖然有些許之差異，但其實驗的結果卻具有相同趨勢性：以 peptide 3C 處理人類乳癌細胞後，會使癌細胞內的 Bcl-2 之蛋白質含量下降。

### 5-3 應用表面膜漿共振技術及西方墨點轉漬法評估細胞內 Bax 蛋白質含量結果間的關係

利用表面膜漿共振技術偵測並加以運算以胜肽處理之人類乳癌細胞中的 Bax 蛋白質其相對濃度百分比，結果如下：未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內蛋白質中之 Bax 蛋白質相對濃度百分比為 100%；加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 24 小時後之人類乳癌細胞內蛋白質中其 Bax 蛋白質相對濃度百分比為 146.47%；加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 48 小時後之人類乳癌細胞內蛋白質中其 Bax 蛋白質相對濃度百分比為 43.08%。利用西方墨點轉漬法偵測並加以運算以胜肽處理之人類乳癌細胞中的 Bax 蛋白質其相對含量百分比，結果如下：未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內蛋白質中之 Bax 蛋白質相對含量百分比為 100%；加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 24 小時後之人類乳癌細胞內蛋白質中其 Bax 蛋白質相對含量百分比為 147.36%；加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 48 小時

後之人類乳癌細胞內蛋白質中其 Bax 蛋白質相對含量百分比為 67.64%。兩種定量方法在原理上有所不同，表面膜漿共振技術是利用抗原直接結合上抗體的方式，對 Bax 蛋白質的濃度進行定量偵測；西方墨點轉漬法則是採用三明治夾擊的方式，對 Bax 蛋白質的濃度進行定量偵測。其原理是先利用一級抗體與抗原作用後，再用二級抗體加以確認，與一級抗體和抗原的複合體作用，最後才判定出抗原的相對含量。兩種定量方法的實驗結果雖然有些許之差異，但其實驗的結果卻具有相同趨勢性：以 peptide 3C 處理人類乳癌細胞 24 小時後，會使癌細胞內的 Bax 之蛋白質含量上升；以 peptide 3C 處理人類乳癌細胞 48 小時後，會使癌細胞內的 Bax 之蛋白質含量下降。

## 第五章 結論與未來展望

應用表面膜漿共振技術及西方墨點轉漬法評估人類乳癌細胞內  $\beta$ -actin、Id1、Bcl-2 和 Bax 的蛋白質含量變化，實驗發現兩種偵測技術所得到的結果具有相同趨勢性：以 peptide 3C 處理人類乳癌細胞後，會使癌細胞內的 Id1 和 Bcl-2 的蛋白質含量下降，Bax 的蛋白質含量則會上升。表面膜漿共振技術及西方墨點轉漬法的實驗原理雖然有所不同，但對癌細胞內特定蛋白質含量變化的分析結果卻很相似，所以我們有可能以表面膜漿共振技術來取代西方墨點轉漬法。另外，西方墨點轉漬法的實驗時間與實驗結果的不確定性都比表面膜漿共振技術要來得高，而耗材的花費成本則是兩種分析方法相差不多，如表 4-9 至表 4-12。基於以上原因，發現以表面膜漿共振技術取代西方墨點轉漬法來偵測癌細胞內的特定蛋白質，就經濟效應與實驗成本的考量上，的確是具有其潛力性與前瞻性的一種新思維，這代表表面膜漿共振技術於評估抗癌功效上的確有可能取代西方墨點轉漬法。

未來可以應用奈米粒子(nano particle)與質譜技術(mass spectrometry)來確認表面膜漿共振技術及西方墨點轉漬法的實驗結果。首先，將一級抗體視為生物探針(probe)，並藉由化學反應將其披覆在奈米粒子的表面，用以偵測人類乳癌細胞內的特定蛋白質。奈米粒子與一級抗體之複合物與癌細胞內特定蛋白質作用後，應用質譜技術偵測其質譜訊號強度的改變量，以此作為依據來判斷其癌細胞內特定蛋白質含量的多寡。最後，統整實驗結果間的關係，檢查是否有相同的一致性與趨勢性。如果表面膜漿共振技術、西方墨點轉漬法與奈米粒子-質譜技術的實驗結果很相似，那麼比較哪一種分析方法最具有經濟效益與實驗成效是接下來需要努力的目標與願景。

## 第六章 參考文獻

1. Leistikow, B. Lung cancer rates as an index of tobacco smoke exposures: validation against black male approximate non-lung cancer death rates. *B. Leistikow / Preventive Medicine*. 2004, **38(5)**, 511-515.
2. Warnes, A.M., UK and western European late-age mortality: trends in cause-specific death rates, 1960-1990. *Health Place*. 1999, **5(1)**, 111-118.
3. Newbold, R.R., Jefferson, W.N., Padilla-Burgos, E. and Bullock, B.C. Uterine carcinoma in mice treated neonatally with tamoxifen. *Carcinogenesis*. 1997, **18(12)**, 2293-2298.
4. Song, Y.L., Peach, M.L., Roller, P.P., Qiu, S., Wang, S., Long, Y.Q. and Med, J. Discovery of a novel nonphosphorylated pentapeptide motif displaying high affinity for Grb2-SH2 domain by the utilization of 3'-substituted tyrosine derivatives. *J Med Chem*. 2006, **49(5)**, 1585-1596.
5. Sommer, S. and Fuqua, S.A. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2001, **11(5)**, 339-352.
6. McPherson, K., Steel, C.M. and Dixon, J.M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj*. 2000, **321(7261)**, 624-628.
7. Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V. and Lebleu, B. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*. 2003, **278(1)**, 585-590.
8. Saceda, M., Grunt, T.W., Colomer, R., Lippman, M.E., Lupu, R. and Martin, M.B. Regulation of estrogen receptor concentration and activity by an erbB/HER ligand in breast carcinoma cell lines. *Endocrinology*. 1996, **137(10)**, 4322-4330.
9. Niewolik, D., Vojtesek, B. and Kovarik, J. p53 derived from human tumour cell lines and containing distinct point mutations can be activated to bind its consensus target sequence. *Oncogene*. 1995, **10(5)**, 881-90.
10. Berova, N. and Robert, W. Circular dichroism: Principles and applications. 2000, . 601-616.
11. Akazawa, A., Nishikawa, K., Suzuki, K., Asano, R., Kumadaki, I., Satoh, H., Hagiwara, K., Shin, S.J., Yano, T. Induction of apoptosis in a human breast cancer cell overexpressing ErbB-2 receptor by alpha-tocopheryloxybutyric acid. *Jpn J Pharmacol*. 2002, **89(4)**, 417-21.
12. Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L. and Weintraub, H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*. 1990, **61**, 49-59.
13. Christy, B.A., Sanders, L.K., Lau, L.F., Copel and, N.G., Jenkins, N.A., and Nathans, D. An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth

- factor-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, **88**, 1815–1819.
14. Norton, J.D.. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci*. 2000, **113**, 3897–3905.
  15. Coppe, J.P., Smith, A.P., Desprez, P.Y. Id proteins in epithelial cells. *Exp Cell Res*. 2003, **285**, 131–145.
  16. Ruzinova, M.B., Benezra, R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol*. 2003, **13**, 410–418.
  17. Fong, S., Debs, R.J., Desprez, P.Y. Id genes and proteins as promising targets in cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2004, **10**, 387–392.
  18. Iavarone, A., Lasorella, A. ID proteins as targets in cancer and tools in neurobiology. *Trends Mol Med*. 2006, **12**, 588–594.
  19. Kim, H., Chung, H., Kim, H.J., Lee, J.Y., Oh, M.Y., Kim, Y., Kong, G. Id-1 regulates Bcl-2 and Bax expression through p53 and NF-kappaB in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2008, **112**, 287–296.
  20. Meteoglu, I., Meydan, N., Erkus, M.. Id-1: regulator of EGFR and VEGF and potential target for colorectal cancer therapy. *J Exp Clin. Cancer Res*. 2008, **27**, 69.
  21. Chen, C. H., Kuo, S. C., Huang, Li. J., Hsu M. H. and Lung F. D. Affinity of synthetic peptide fragments of MyoD for Id1 protein and their biological effects in several cancer cells. *J Pept Sci*. 2010, **16**, 231–241
  22. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972, **26**, 239–257.
  23. Fadeel, B. and S. Orrenius, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med*. 2005, **258(6)**, 479-517.
  24. Sapunar, D., Vilovic, K., England, M. and Babic, S. Morphological diversity of dying cells during regression of the human tail. *Ann Anat*. 2001, **183**, 217-222.
  25. Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y., Inohara, N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 1998, **17(25)**, 3237-45.
  26. Cotran, S. R., Kumar, V. and Collins, T. Robbins Pathologic Basis of Disease. *Philadelphia: W.B Saunders Company*. 1998, **0**, 7216-7335.
  27. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397(6718)**, 441–446.
  28. Kroemer, G, Petit, P.X., Zamzami, N., Vayssiere, J.L. and Mignotte, B. The biochemistry of apoptosis. *The FASEB J*. 1995, **9**, 1277-1287.
  29. Kameda, K., et al., The role of intracellular Ca(2+) in apoptosis induced by

- hyperthermia and its enhancement by verapamil in U937 cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001, **49(5)**, 1369-1379.
30. Zhang, J., Lee, H., Low, D.W., Bovin, X.P., Xu, M. Lack of obvious 50 kilobase pair DNA fragments in DNA fragmentation factor 45-deficient thymocytes upon activation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, **274(1)**, 225-229.
  31. Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, **407(6805)**, 770-6.
  32. Stacey, N.H., Bishop, C.J., Halliday, J.W., Kerr, J.F. Apoptosis as the mode of cell death in antibody-dependent lymphocytotoxicity. *J Cell Sci.* 1985, **74**, 169-79.
  33. Searle, J., Kerr, J.F. and Bishop, C.J. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 1982, **17**, 29-59.
  34. Nicotera, P., Leist, M. and Ferrando-May, E. Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp.* 1999, **66**, 69-73.
  35. Strebel, F.R., Kaneko, T., Stephens, L.C. and Danhauser, L.L. Apoptosis and necrosis occurring during different stages of primary and metastatic tumor growth of a rat mammary adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 1996, **16**, 1117-21.
  36. Lawen A. Apoptosis—an introduction. *BioEssays.* 2003, **25**, 888–896.
  37. McDonnell, T. J., Beham, A., Sarkiss, M., Andersen, M.M. and Lo, P. Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia.* 1996, **52(10-11)**, 1008-1017.
  38. Ibrado, A.M., Huang, Y., Fang, G., Liu, L. and Bhalla, K. Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL inhibits Ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL-60 cells. *Cancer Res.* 1996, **56(20)**, 4743-4748.
  39. Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., and Youle, R. J. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol.* 1997, **139(5)**, 1281-1292.
  40. Ruoslahti, E. and Reed, J. New way to activate caspases. *Nature.* 1999, **397(6719)**, 479-80.
  41. Shestakova, A. E., Wyckoff, J., Jones, J., Singer, H. R., John Condeelis. Correlation of  $\beta$ -actin Messenger RNA Localization with Metastatic Potential in Rat Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Res.* 1999, **59**, 1202-1205.
  42. <http://catalogs.mhhe.com/mhhe/home.do>
  43. Jen, Y., Manova, K., Benezra, R. Expression patterns of Id1, Id2, and Id3 are highly related but distinct from that of Id4 during mouse embryogenesis. *Dev Dyn.* 1996, **207**, 235–252.
  44. Jen, Y., Manova, K., Benezra, R. Each member of the Id gene family exhibits a

- unique expression pattern in mouse gastrulation and neurogenesis. *Dev. Dyn.* 1997, **208**, 92–106
45. Sebastian K. *Biopolymers (Peptide Science)*. 2005, **80**, 762–774
  46. Norton, J.D. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci.* 2000, **113**, 3897–3905.
  47. Sikder, H.A., Devlin, M.K., Dunlap, S., Ryu, B., Alani, R.M. Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2003, **3**, 525–530.
  48. Coppe, J.P., Smith, A.P., Desprez, P.Y. Id proteins in epithelial cells. *Exp Cell Res.* 2003, **285**, 131–145.
  49. Moldes, M., Boizard, M., Liepvre, X.L., Fève, B., Dugail, I., Pairault, J. Functional antagonism between inhibitor of DNA binding (Id) and adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol regulatory element-binding protein-1c (ADD1/SREBP-1c) transactors for the regulation of fatty acid synthase promoter in adipocytes. *Biochem J.* 1999, **344**, 873–880.
  50. Roberts, E.C., Deed, R.W., Inoue, T., Norton, J.D., Sharrocks, A.D. Id helix-loop-helix proteins antagonize pax transcription factor activity by inhibiting DNA binding. *Mol Cell Biol.* 2001, **21**, 524–533.
  51. Iavarone, A., Garg, P., Lasorella, A., Hsu, J., Israel, M.A. The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 1994, **8**, 1270–1284.
  52. Engel, I. and Murre, C. The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. *Nature Rev Immunol.* 2001, **1**, 193–199.
  53. Massari, M. E. and Murre, C. Helix–loop–helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol.* 2000, **20**, 429–440.
  54. Xiao, X., Athanasiou, M., Sidorov, I.A., Horikawa, I., Cremona, G., Blair, D., Barret, J.C., Dimitrov, D.S. Role of Ets/Id proteins for telomerase regulation in human cancer cells. *Exp Mol Pathol.* 2003, **75(3)**, 238-47.
  55. Perk, J., Iavarone A., Benezra R. ID Family of Helix-Loop-Helix Proteins in Cancer: Oncogenic Activation of Id. *Nat Rev Cancer.* 2005, **5(8)**, 603-614.
  56. Lasorella, A., Uo, T. and Iavarone, A. Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene.* 2001, **20**, 8326-8333.
  57. Kee, L. B. E and Id proteins branch out. *Nature Reviews Immunology.* 2009, **9**, 175-184.
  58. Fong, S., Debs, R. J. and Desprez, P. Y. Id genes and proteins as promising targets in cancer therapy. *Trends Mol Med.* 2004, **10**, 387-392.

59. Han, S., Gou, C., Hong, L., Liu, J., Zheyi, H. and Liu, C. Expression and significances of Id1 helix-loop-helix protein overexpression in gastric cancer. *Cancer Lett.* 2004, **216**, 63-71.
60. Ruzinova, M. B. and Benezra, R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol.* 2003, **13(8)**, 410-418.
61. Lee, K. T., Lee, Y. W., Lee, J. K., Choi, S. H., Rhee, J. C., Paik, S. S. and Kong, G. Overexpression of Id-1 is significantly associated with tumour angiogenesis in human pancreas cancers. *Br J. Cancer.* 2004, **90(6)**, 1198-1203.
62. Lyden, D., Young, A. Z., Zagzag, D., Yan, W., Gerald, W., O'Reilly, R., Bader, B. L., Hynes, R. O. and Zhuang, Y. Manova, K.; Benezra, R., Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature.* 1999, **401(6754)**, 670-677.
63. Lin, C. Q., Singh, J., Murata, K., Itahana, Y., Parrinello, S., Liang, S. H., Gillett, C.E., Campisi, J. and Desprez, P. Y. A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2000, **60(5)**, 1332-1340.
64. Takai, N., Miyazaki, T., Fujisawa, K., Nasu, K. and Miyakawa, I. Id1 expression is associated with histological grade and invasive behavior in endometrial carcinoma. *Cancer Lett.* 2001, **165(2)**, 185-193.
65. McAllister, S. D., Christian, R. T., Horowitz, M. P., Garcia, A. and Desprez, P. Y. Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2007, **6(11)**, 2921-2927.
66. Fong, S., Itahana, Y., Sumida, T., Singh, J., Coppe, J. P., Liu, Y., Richards, P. C., Bennington, J. L., Lee, N. M., Debs, R. J. and Desprez, P. Y. Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, **100(23)**, 13543-13548.
67. Jan, Y. N. and Jan, L. Y. Functional gene cassettes in development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993, **90(18)**, 8305-8307.
68. Olson, E. N. and Klein, W. H., bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev.* 1994, **8(1)**, 1-8.
69. Weintraub, H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell.* 1993, **75(7)**, 1241-1244.
70. Murre, C., Bain, G., van Dijk, M. A., Engel, I., Furnari, B. A., Massari, M. E., Matthews, J. R., Quong, M. W., Rivera, R. R., Stuiver, M. H. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1994, **1218(2)**, 129-135.

71. Cummmings, M.C. and Winterford, C.M., Waller, N.I. Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* 1997, **21**, 88–101.
72. Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996, **87**, 171.
73. Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P. and Flavell R. A. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature.* 1996, **384**, 368-372.
74. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998, **391**, 43-50.
75. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Y. Funahashi, Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H. and Tsujimoto Y. Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. *Oncogene.* 1996, **12**, 2251-2257.
76. Farrow, S.N., White, J.H.M. and Martion, I. Cloning of a Bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B19K. *Nature.* 1995, **374**, 731-736.
77. Kiefer, M.C., Brauer, M.J. and Powers, V.C. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue bak. *Natuer.* 1995, **374**, 736-739.
78. Susin, S.A., Zamzam, I.N. and Castedo, M. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med.* 1996, **184**, 1331- 1341.
79. Maroto, R. and Perez-Polo, J.R. Bcl-2-related protein expression in apoptosis: oxidative stress versus serum deprivation in PC12 cells. *J Neurochem.* 1997, **69**, 514-523.
80. Simonian, P.L., Grillo, D.A.M. and Nunez, G. Bcl-2 and Bcl-xL can differentially block chemotherapy-induced ceel death. *Blood.* 1997, **90**, 1208-1216.
81. Ito, T., Deng, X., Carr, B. and May, W.S. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem.* 1997, **272**, 11671-11673.
82. Susin, S.A., Zamzam, I.N. and Castedo, M. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1997, **186**, 25-37.
83. Bunde, R. L., Jarvi, E. J. and Rosentreter, J. J. Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta.* 1998, **46**, 1223-1236.
84. Schulze, W. X., Deng, L. and Mann, M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol.* 2005, **1**, 5-8..

85. Cheskis, B. J., Karathanasis, S. and Lyttle, C. R. Estrogen receptor ligands modulate its interaction with DNA. *J Biol Chem.* 1997, **272**, 11384-11391.
86. Smith, E. A., Erickson, M. G., Uljasz, A. T., Weisblum, B. and Corn, R. M. Surface plasmon resonance imaging of transcription factor proteins: interactions of bacterial response regulators with DNA arrays on gold films. *Langmuir.* 2003, **19**, 1486-1492.
87. Maillart, E., Brengel-Pesce, K., Capela, D., Roget, A., Livache, T., Canva M., Levy, Y. and Soussi, T. Versatile analysis of multiple macromolecular interactions by SPR imaging: application to p53 and DNA interaction. *Oncogene.* 2004, **23**, 5543-5550.
88. Homola, J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal Bioanal Chem.* 2003, **377**, 528-39.
89. Hempelmann, E., Schirmer, R.H., Fritsch, G., Hundt, E. and Gröschel-Stewart, U. Studies on glutathione reductase and methemoglobin from human erythrocytes parasitized with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1987, **23(1)**, 19-24.
90. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979, **76(9)**, 4350-4354.
91. Renart, J., Reiser, J. and Stark, G.R.. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979, **76(7)**, 3116-3120.
92. Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society.* 1963, **85**, 2149-2154.
93. Carpino, L.A. and Han, G.Y. The 9-fluorenylmethoxy-carbonyl amino protecting group. *J Org Chem.* 1972, **37**, 3404-3409.
94. Hammer, R.P., et al., Practical approach to solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions based on a photolysable anchoring linkage. *Int J Pept Protein Res.* 1990, **36(1)**, 31-45.
95. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D. and Cook, P. I. *Analytical Biochemistry.* 1970, **34**, 595.
96. <http://www.sigmaaldrich.com>.
97. Carda-Broch, S., Berthod, A. and Armstrong, D. W. Ionic matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight detection of DNA oligomers. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003, **17(6)**, 553-560.
98. Myszka, D. G. Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with BIACORE. *Methods Enzymol.* 2000, **323**, 325-340.

表 3-1. 固相胜肽合成法的實驗材料、試劑、設備和購買廠商

實驗材料、試劑和設備	備註	購買廠商
Rink amide AM resin	胺基酸的固著物	NOVA Biochem.
具 N <sup>α</sup> -Fmoc 保護基的氨基酸	N 端具 Fmoc，側鏈具保護基之胺基酸	ANA SPEC
HBTU (O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium Hexafluorophosphate)	活化胺基酸 C 端之試劑 (Coupling reagents)	ANA SPEC
HOBT (1-hydroxybenzotriazole)	活化胺基酸 C 端之試劑 (Coupling reagents)	ANA SPEC
DIEA (N,N-Diisopropylethamine)	活化胺基酸 C 端之試劑 (Coupling reagents)	Sigma-Aldrich
DMF (N,N-dimethylformamide)	溼潤並清洗 resin	Fisher scientific
TFA (Trifluoroacetic acid)	將合好之胜肽由 resin 切下	Alfa Aesar - Lancaster
Piperidine	去除胺基酸 N 端的 Fmoc	TEDIA
DCM (Dichloromethane)	膨脹 resin	TEDIA
Column PD-10 (17-0435-01)	反應容器	Amersham Biosciences
polypropylene conical tube	反應容器	Becton Dickinson
Nihydrin test Kit	需加溫至 120°C	Molecular Devices
真空萃取裝置 (SPE Vacuum manifold)		Great tide
冷凍乾燥機 (FD3-12P)		Kingmech
自動旋轉器 (Model. SD-50)		Young chenn

表 3-2. Peptide 3C 之胜肽序列及分子量

序列名稱	序列組成	序列分子量	疏水性殘基的比例 <sup>a</sup>	等電點	淨電荷 <sup>b</sup>	成本 <sup>c</sup>
Peptide 3C	YIEGLQALLRDQC	1520.8 Da	38%	4.1	-1	1865 元

<sup>a</sup> 疏水性的胺基酸殘基數(residues)/全部的胺基酸殘基數

<sup>b</sup> 胜肽 peptide 3C 在 pH 值為 7.0 時的淨電荷(net charge)

<sup>c</sup> 合成 0.125 mmole 的 peptide 3C 所需的成本(只考慮胺基酸的花費)

表 3-3. 以逆相高效能液相層析法分離胜肽混合物實驗材料、試劑、設備和購買廠商

實驗材料、試劑和設備	購買廠商
Acetonitrile	ECHO
TFA ( Trifluoroacetic acid )	Lancaster
0.22 $\mu\text{m}$ filter	Millipore
玻璃過濾裝置 ( AK95375-00000 )	KONTES
translucent Buchner flasks	KIMBLE
微量注射針 ( 500 $\mu\text{L}$ , 25 $\mu\text{L}$ )	HAMILTON
C18 monomeric column	Waters
RP-HPLC ( Pump L-2130 、 UV detector L-2400 )	HITACHI

表3-4. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀操作參數設定

操作參數設定	Reflector mode
Laser Frequency ( Hz )	20
Ion Source 1 ( kV )	19.00
Ion Source 2 ( kV )	16.25
Lens ( kV )	9.55
Reflector ( kV )	20.00
Pulsed Ion Extraction ( ns )	60
Laser shot	50
Laser energy ( $\mu\text{J}$ / pulse )	12~15

表 3-5. 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀實驗過程中，所需之試劑

藥品試劑	購買廠商
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid	ALDRICH
Acetonitrile	ECHO
質譜儀校正用標準品	
Substance P	Sigma-Aldrich
Angiotensin I	Sigma-Aldrich
Angiotensin II	Sigma-Aldrich
Bradykinin	Sigma-Aldrich

表 3-6.常用的基質輔助雷射脫附游離基質之結構<sup>97</sup>

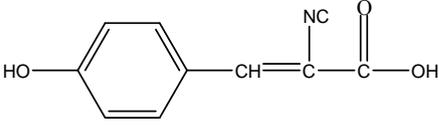
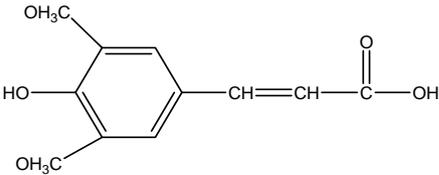
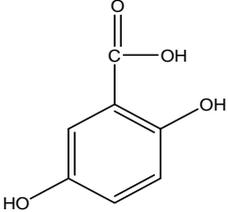
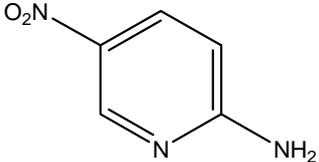
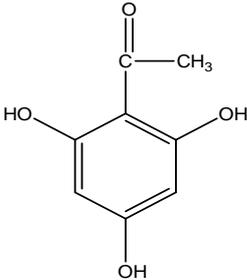
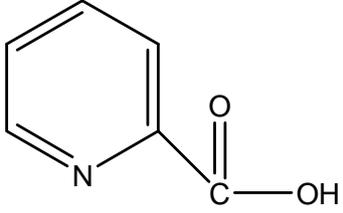
基質名稱	結構式	主要適用的分析物
$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ -CHCA)		胜肽 蛋白質
3,5-dimethoxy-4-Hydroxycinnamic acid (Sinapinic acid, SA)		胜肽 蛋白質
2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB)		胜肽 蛋白質 碳水化合物
2-amino-5-nitropyridine		核苷酸
2,4,6-trihydroxyacetophenone (2,4,6-THAP)		胜肽 核苷酸
2-pyridine carboxylic acid (picolinic acid)		胜肽 蛋白質 核糖核酸

表 3-7. 細胞培養相關實驗之藥品、試劑、設備及購買廠商

材 料	備 註	購 買 廠 商
DMEM Medium (DuLbecco's modified EagLe's)	細胞培養	GIBCO Corporation
Trypsin	細胞繼代	
Penicillin-Streptomycin	Medium 配置	
Fetal Bovine Serum (FBS)	Medium 配置	Biological Industries
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	PBS 配製	Merck
KCl	PBS 配製	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	PBS 配製	Sigma-Aldrich
NaCl	PBS 配製	
Trypan bLue	細胞染色	
NaHCO <sub>3</sub>	Medium 配置	
DMSO (dimethyl sulfoxide)	抗凍劑	Merck
Ethanol	消毒清潔	

表 3-8. 應用破細胞技術來取得人類乳癌細胞內的蛋白質之實驗材料、試劑、設備和購買廠商

實驗材料、試劑和設備	購買廠商
PRO-PREP Protein Extraction Kit (Cat.NO.=17081.1)	iNtRON Biotechnology
桌上型微量管高速離心機(Centrifuge 5415 D)	Eppendorf

表 3-9. 應用表面膜漿共振技術來分析人類乳癌細胞內的蛋白質之實驗材料、試劑、設備和購買廠商

材 料	備 註	購 買 廠 商
Sensor chip CM5 (BR-1000-14)	Research grade	Biacore AB
Running buffer : HBS-EP buffer (BR-1001-88)	0.01 M HEPES, pH 7.4	
	0.15 M NaCl	
	3 mM EDTA	
	0.005% Surfactant P20	
Amine coupling kit (BR-1000-50)	115 mg NHS (N-hydroxysuccinimide)	
	750 mg EDC 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimide hydrochloride	
	10.5 mL Ethanolamine hydrochloride	
Coupling buffer (S-2889)	10 mM Sodium acetate, pH 5.0	Sigma-Aldrich
Regeneration buffer	10 mM Glycine-HCl, pH 1.5 10 mM Glycine-HCl, pH 2.0 10 mM Glycine-HCl, pH 2.5	ANGUS Buffers & Biochemicals
設 備		購 買 廠 商
BIAcore-3000 (Biomolecule Interaction Analysis System)		Biacore AB, Pharmacia Inc.

表3-10. 不同種類的生物感應器(BIAcore 3000)晶片

感應晶片(sensor chip)	CM5 chip	SA chip	NTA chip	HPA chip
用途	基礎研究	針對鍵結上生物素的DNA、胜肽及蛋白質	利用金屬來螯合配體	探討膜上受體的作用性
鍵合物與感應晶片的鍵結原理	amine coupling、thiol coupling and aldehyde coupling	amine coupling and thiol coupling	amine coupling	hydrophobic interaction

表 3-11. 應用 Bradford 蛋白質染料染色法來測定人類乳癌細胞的蛋白質濃度之  
實驗材料、試劑、設備和購買廠商

實驗材料、試劑和設備	購買廠商
Bradford protein-binding assay kit	Bio Rad
Comassie Brilliant blue G-250	Bio Rad
牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)	ZYMESET
96 孔盤	GeneDirex
微孔盤分析儀	Molecular Devices

表 3-12. 應用聚丙烯醯胺凝膠電泳鑑定人類乳癌細胞的分子量之實驗材料、試劑、設備和購買廠商

實驗材料、試劑和設備	購買廠商
甲醇	ECHO
醋酸	ECHO
乙醇	ECHO
十二烷基硫酸鈉 (sodium dodecyl sulfate, SDS)	Sigma-Aldrich
三羥甲基胺基甲烷鹽酸鹽 (Tris-amine)	Sigma-Aldrich
溴酚藍 (bromophenol blue)	Sigma-Aldrich
甘油 (glycerol)	Sigma-Aldrich
ammonium persulfate (APS)	Bio Rad
N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)	Bio Rad
2-mercaptoethanol (2-Me)	aMRESCO
glycine	Lancaster
Acrylamide/Bis-acrylamide (30% , 0.8% w/v)	Bio Rad
Comassie Brilliant blue R-250	aMRESCO
齒梳(comb)	Bio Rad
解剖刀	Bio Rad
Mini-Protean 3 Electrophoresis Module	Bio Rad
直流電壓供應器	Rainbow
酸鹼度計(pH meter)	Suntex
Prestained protein ladder	Yeastern Biotech
Gel Logic 100 Imagine System	Kodak
Light Viewer	Kodak

表 3-13. 配製 Tris-glycine SDS PAGE 之 separating gel

Separating Gels				
% of Separating Gels	10%	12%	15%	20%
distilled H <sub>2</sub> O	4.04 mL	3.53 mL	2.37 mL	1.5 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
10% (w/v) SDS	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Acrylamide/Bis-acrylamide (30% , 0.8% w/v)	3.33 mL	3.84 mL	5.0 mL	6.0 mL
10% (w/v) ammonium persulfate	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
TEMED	0.01 mL	0.01 mL	0.01 mL	0.01 mL
Total monomer	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL

表 3-14. 配製 Tris-glycine SDS PAGE 之 stacking gel

Stacking Gels, 4.75% gel	
distilled H <sub>2</sub> O	2.3 mL
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1 mL
10% (w/v) SDS	0.04 mL
Acrylamide/Bis-acrylamide (30% , 0.8% w/v)	0.63 mL
10% (w/v) ammonium persulfate	0.04 mL
TEMED	0.004 mL
Total Stack monomer	4 mL

表 3-15. 配製 Tris-glycine SDS PAGE 之 running buffer

10X Running Buffer, pH 8.6	
Tris Base	30 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
add distilled water to 1 liter	

表 3-16. 配製 Tris-glycine SDS PAGE 之 sample buffer

2X sample Buffer	
1M Tris (pH 6.8)	1 mL
Glycerol	2 mL
SDS	0.4 g
2-Me	0.2 mL
Bromophenol Blue	20 mg
add distilled water to 10 mL	

表 3-17. 考馬斯亮藍 R-250 染色液(Coomassie Brilliant Blue R-250, CBR 250 )與  
考馬斯亮藍 R-250 脫色液

CBR 染色液	考馬斯亮藍 R-250(Sigma B-0149) 0.75 g + 250 mL 甲醇 + 250 mL 二次水 + 50 mL 醋酸
CBR 脫色液	10%醋酸與 20%甲醇的水溶液

表 3-18. 應用西方墨點轉漬法來分析人類乳癌細胞(MCF-7 cells)內的蛋白質之實

驗材料、試劑、設備和購買廠商

實驗材料、試劑和設備	購買廠商
iBlot Gel Transfer System	Invitrogen
iBlot Cathode Stacks, Regular	Invitrogen
iBlot Anode Stacks, Regular	Invitrogen
iBlot Filter Paper, Regular	Invitrogen
iBlot Disposable Sponge, Regular	Invitrogen
Gel Logic 100 Imagine System	Kodak
Light Viewer	Kodak
Anti-Id1 Mouse Monoclonal	Abnova
Anti- X Actin Mouse Monoclonal	Chemicon International
Anti-Mouse IgG (Goat, HRP-Labeled)	Perkin
Anti-Bax Mouse Monoclonal	Stressgen
Anti-Bcl-2 Mouse Monoclonal	Assay Designs

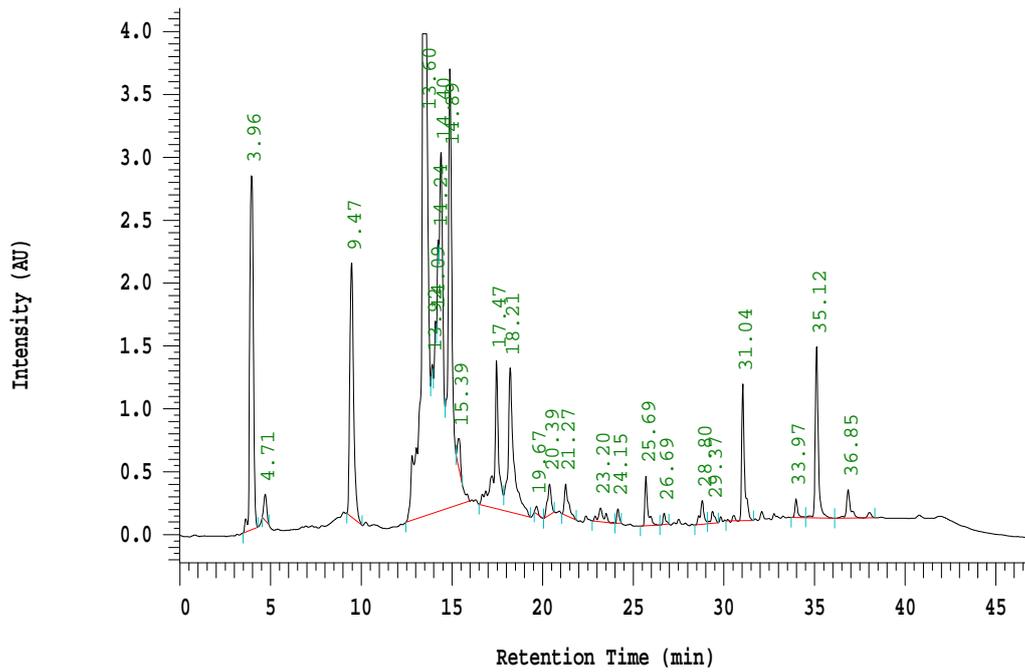
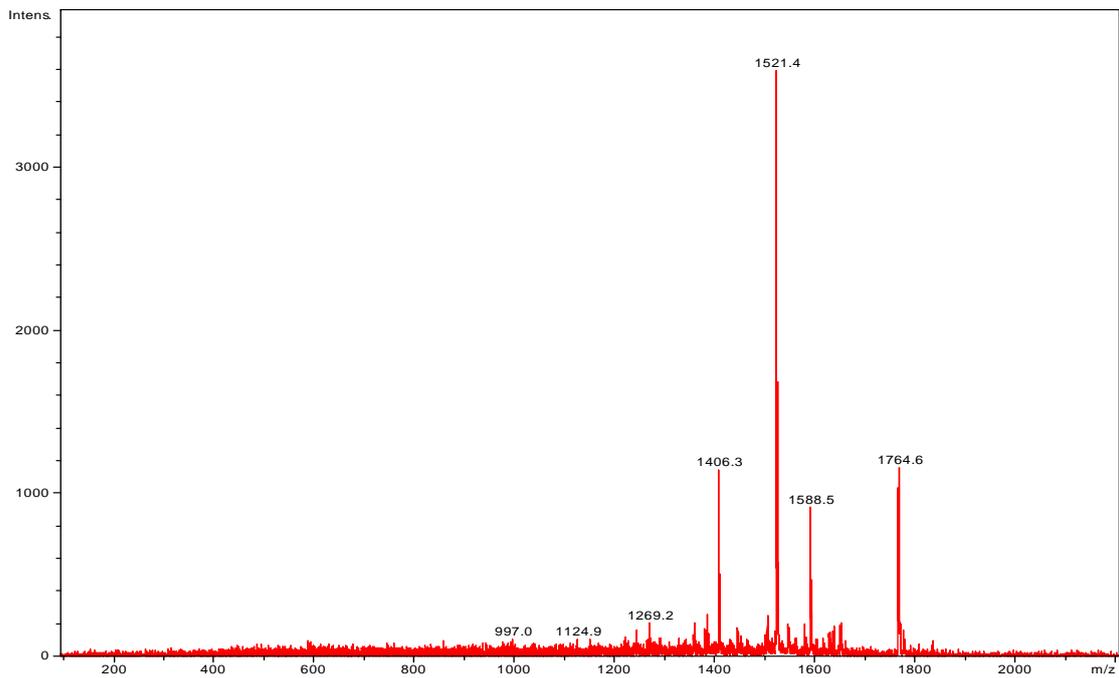
**A****B**

圖 4-1. Peptide 3C 粗產物的 RP-HPLC 層析圖與 MALDI-TOF MS 質譜圖。(A)

Peptide 3C 粗產物經由 RP-HPLC 分析後，所得到的層析結果圖，梯度請參照 31 頁 (B) Peptide 3C 粗產物經過 MALDI-TOF MS 分析後，所得到的質譜結果圖

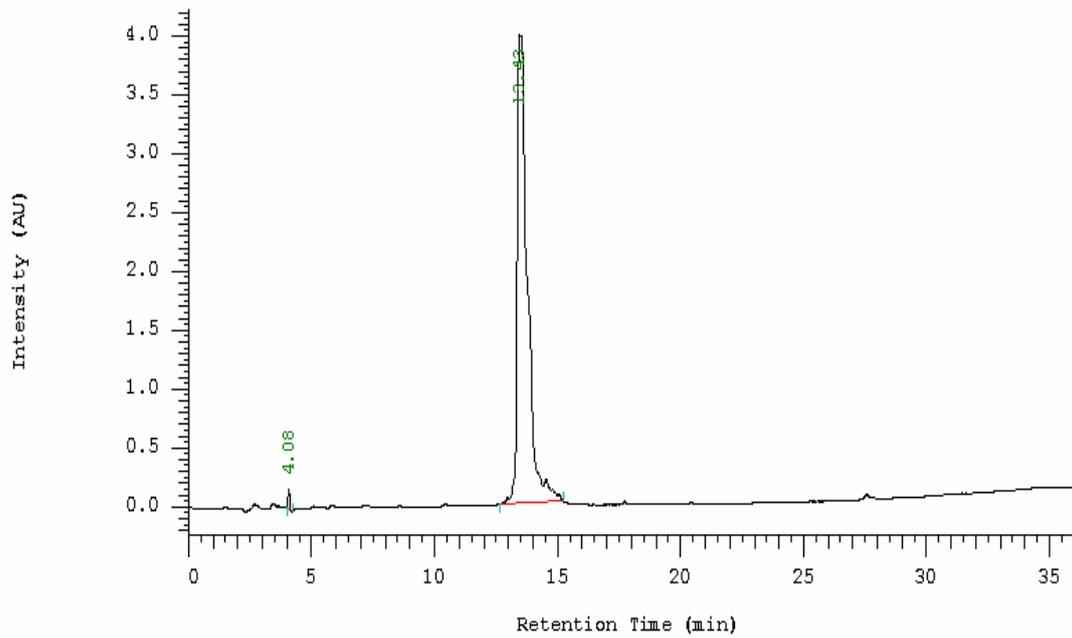
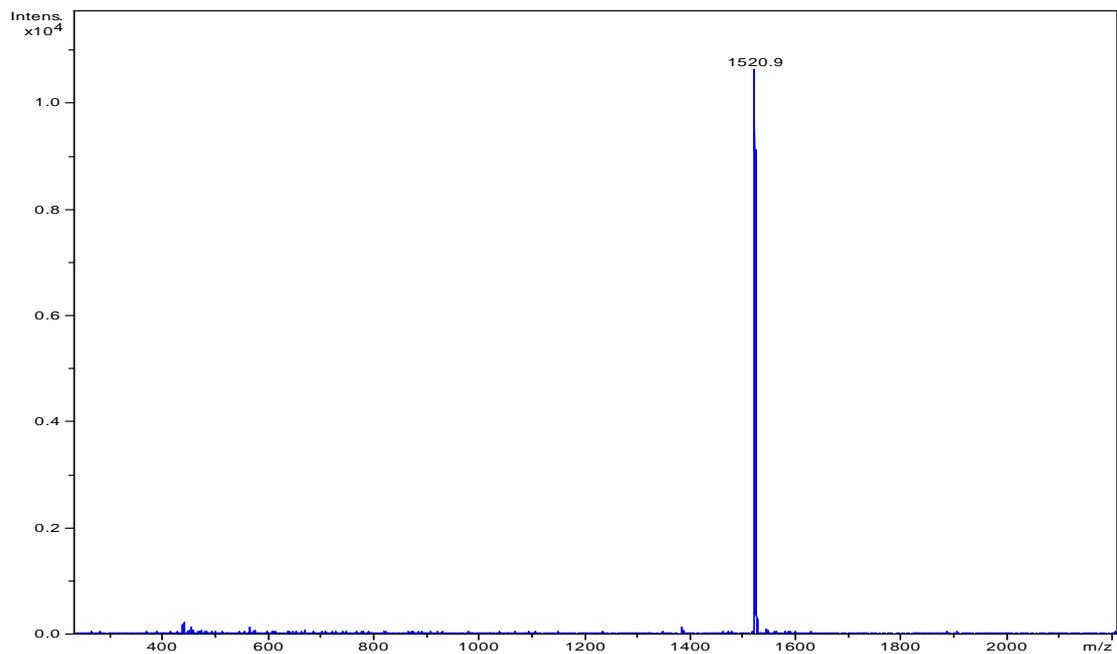
**A****B**

圖 4-2. Peptide 3C 主產物的 RP-HPLC 層析圖與 MALDI-TOF MS 質譜圖。Peptide 3C 主產物經由 RP-HPLC 分析後，所得到的層析結果圖，其滯留時間為 13.63 分鐘，梯度請參照 31 頁 (B) Peptide 3C 主產物經過 MALDI-TOF MS 分析後，所得到的質譜結果圖，證實其分子量為 1520.9 Da

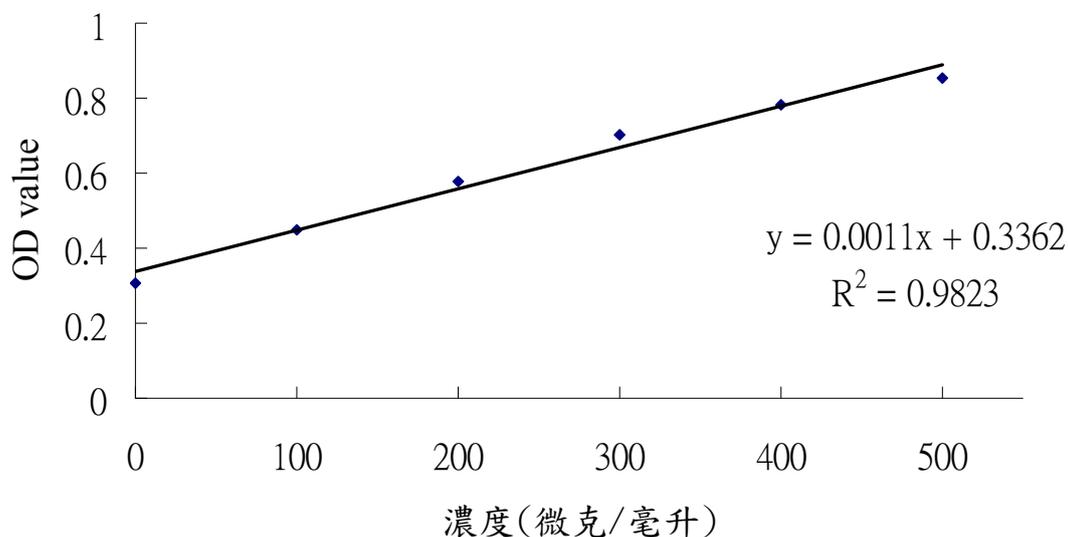


圖 4-3. 牛血清白蛋白的濃度與吸光值間關係變化之標準曲線圖。

表 4-1. 利用 Bradford 蛋白質染料染色法評估測量人類乳癌細胞中的總蛋白質濃度

group	濃 度	50 倍細胞稀釋液的 OD value <sup>d</sup>	50 倍細胞稀釋液的濃度 (µg/mL)	細胞原液的濃度 (µg/mL)
MCF-7 cells (control) <sup>a</sup>		0.616	254.363	12718.18
MCF-7 cells (peptide were treated for 24 hrs) <sup>b</sup>		0.570	212.545	10627.27
MCF-7 cells (peptide were treated for 48 hrs) <sup>c</sup>		0.446	99.818	4990.91

<sup>a</sup> 未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞

<sup>b</sup> 加入 65 µM 的 peptide 3C 處理 24 小時後的人類乳癌細胞

<sup>c</sup> 加入 65 µM 的 peptide 3C 處理 48 小時後的人類乳癌細胞

<sup>d</sup> OD value = optical density value = 吸光值

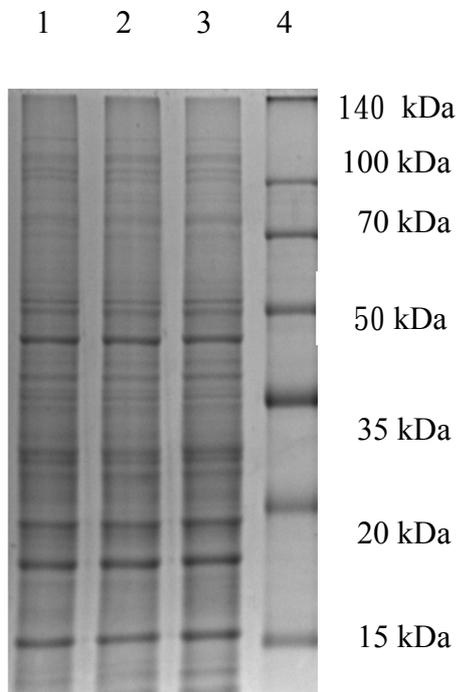
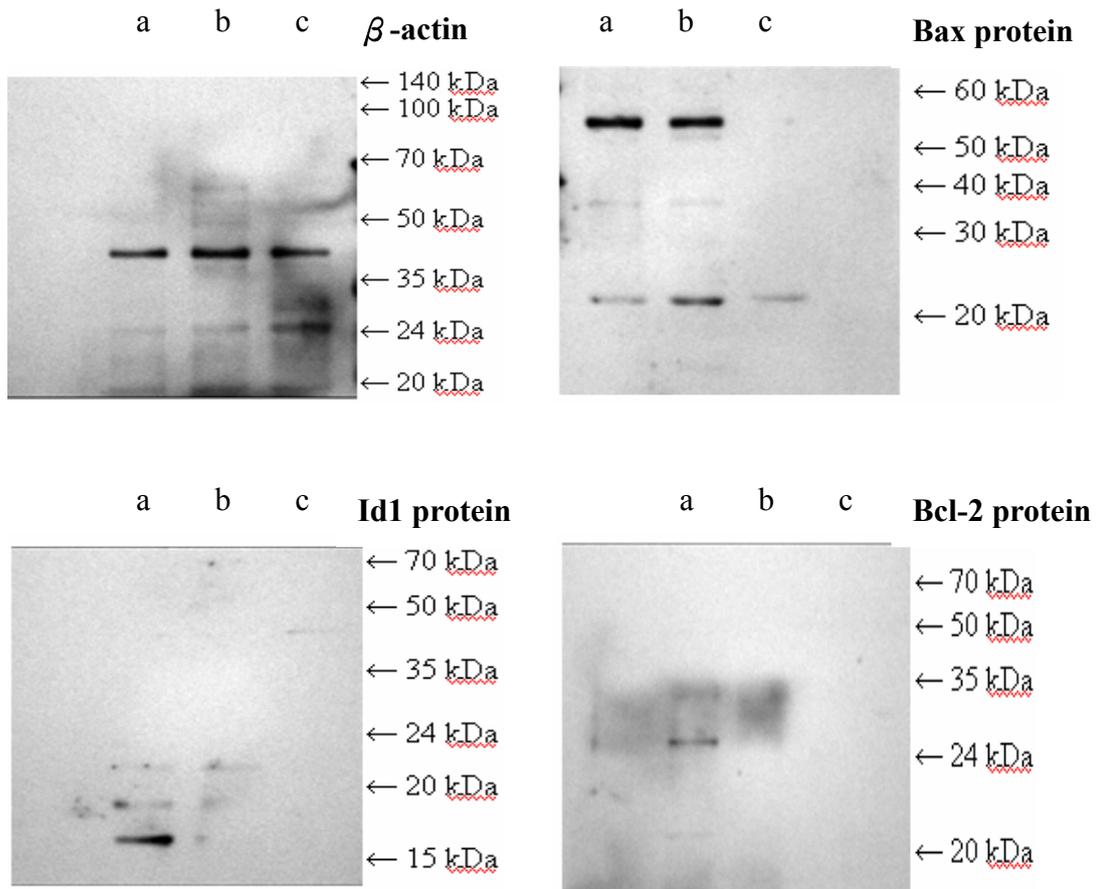


圖 4-4. 人類乳癌細胞內的蛋白質與蛋白質標準品的 10%小膠電泳圖。Lane 1 為未加入 Peptide 3C 時，人類乳癌細胞內的蛋白質；Lane 2 為加入 Peptide 3C 處理 24 小時後，人類乳癌細胞內的蛋白質；Lane 3 為加入 Peptide 3C 處理 48 小時後，人類乳癌細胞內的蛋白質；Lane 4 為蛋白質標準品。

(A)



(B)

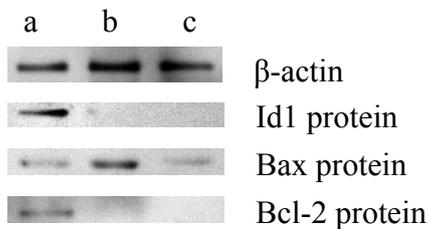


圖 4-5. 人類乳癌細胞內的蛋白質之西方墨點轉漬法分析圖。(A)蛋白質  $\beta$ -actin、Id1、Bax 和 Bcl-2 的西方墨點轉漬法整片分析圖。(B) A 圖的部分擷取圖。a 組是不加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞內之蛋白質；b 組是加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 24 小時後，其人類乳癌細胞內之蛋白質；c 組是加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 48 小時後，其人類乳癌細胞內之蛋白質。針對的分析蛋白質有蛋白質  $\beta$ -actin、Id1、Bax 和 Bcl-2。實驗次數為三次。

表 4-2. 利用西方墨點轉漬法評估測量人類乳癌細胞內的蛋白質  $\beta$ - actin、Id1、  
Bax 和 Bcl-2 之相對含量百分比

group	protein				
	$\beta$ - actin (inter day)	$\beta$ - actin (intra day)	Id1 protein	Bax protein	Bcl-2 protein
MCF-7 cells (control) <sup>a</sup>	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0
MCF-7 cells (peptide were treated for 24 hrs) <sup>b</sup>	100 $\pm$ 0.462	100.65 $\pm$ 2.58	3.44 $\pm$ 0.49	147.36 $\pm$ 3.84	4.62 $\pm$ 0.53
MCF-7 cells (peptide were treated for 48 hrs) <sup>c</sup>	100 $\pm$ 0.56	100.79 $\pm$ 1.10	2.41 $\pm$ 0.85	67.64 $\pm$ 5.09	4.16 $\pm$ 0.82

<sup>a</sup> 未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞

<sup>b</sup> 加入 65  $\mu$ M 的 peptide 3C 處理 24 小時後的人類乳癌細胞

<sup>c</sup> 加入 65  $\mu$ M 的 peptide 3C 處理 48 小時後的人類乳癌細胞

實驗重複次數為三次，實驗數據以平均值  $\pm$  標準偏差的方式呈現

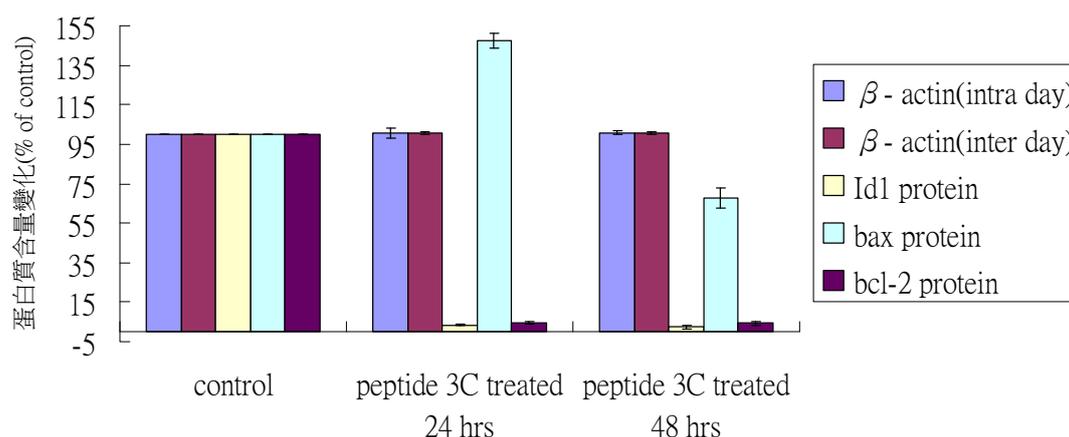


圖 4-6. 利用西方墨點轉漬法評估測量人類乳癌細胞內的蛋白質  $\beta$ - actin、Id1、  
Bax 和 Bcl-2 的相對含量百分比。實驗重複次數為三次，實驗數據以平  
均值  $\pm$  標準偏差的方式呈現。

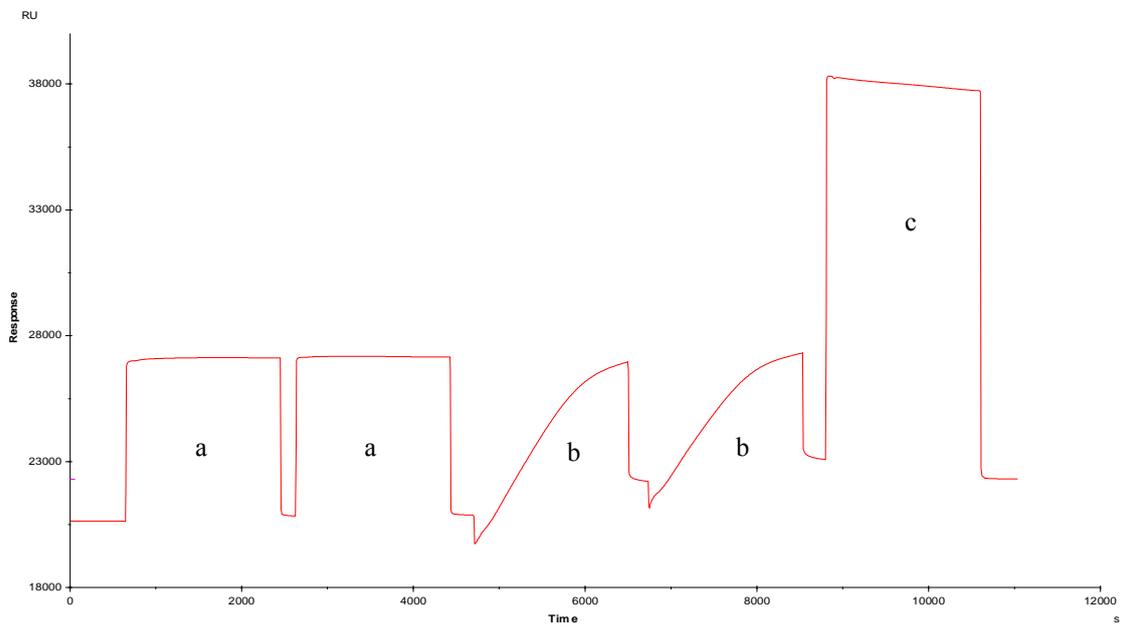


圖 4-7. Anti-X actin 單株抗體(百倍稀釋)的 immobilization 圖。

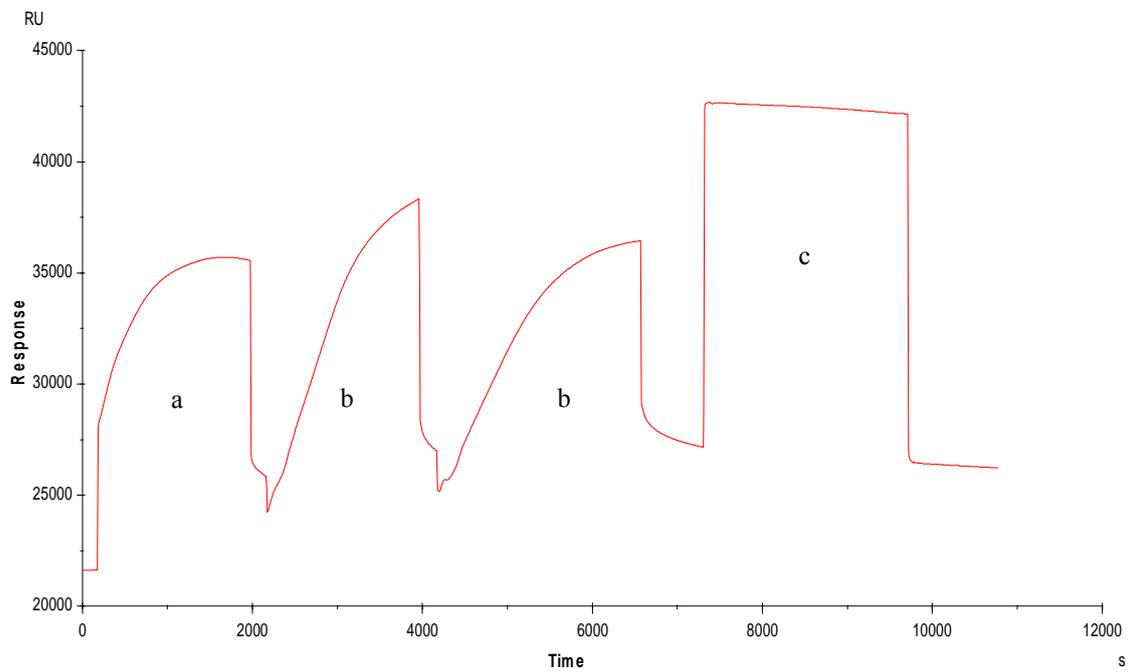


圖 4-8. Anti-Id1 HLH 單株抗體(百倍稀釋)的 immobilization 圖。

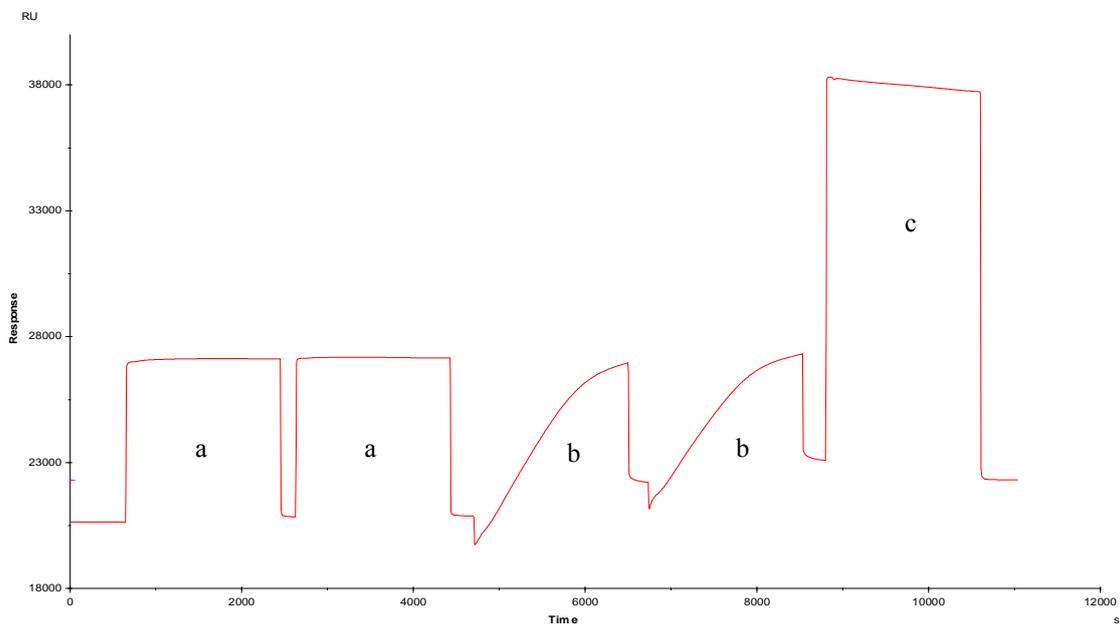


圖 4-9. Anti-Bcl-2 單株抗體(百倍稀釋)的 immobilization 圖。

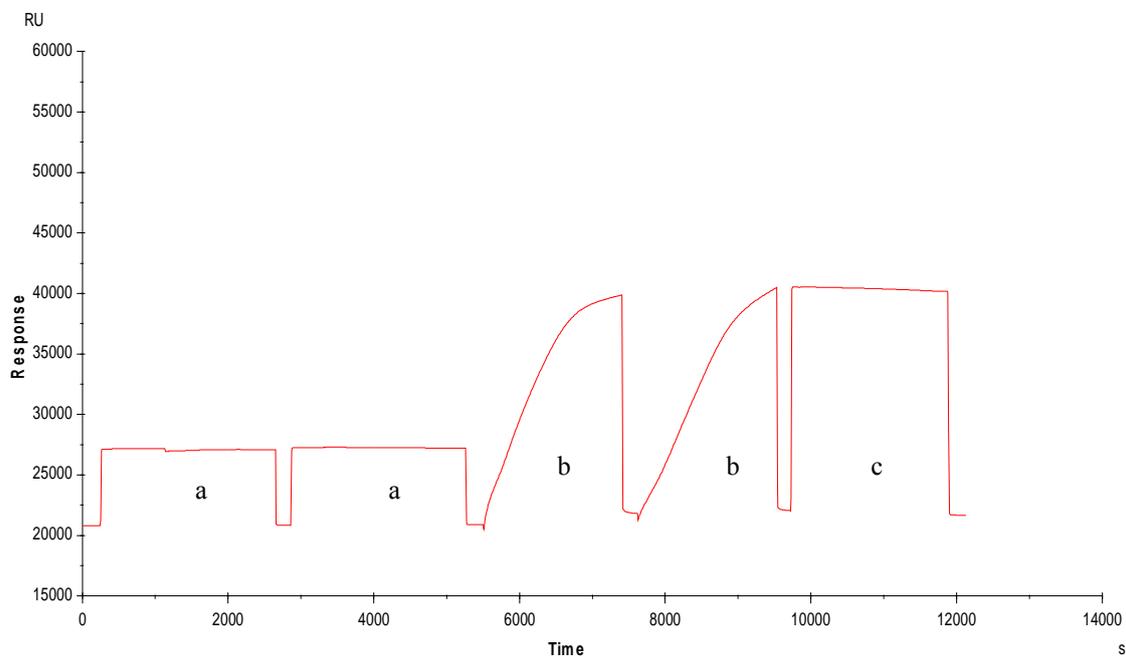


圖 4-10. Anti-Bax 單株抗體(百倍稀釋)的 immobilization 圖。

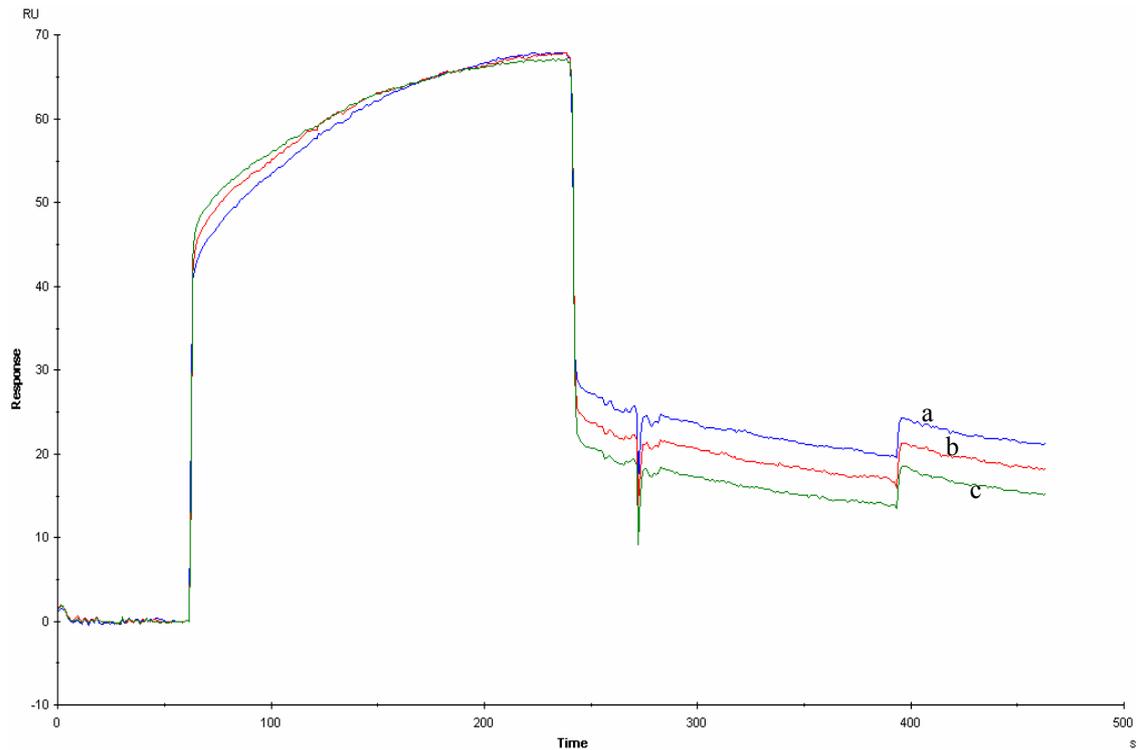


圖 4-11. 5000 倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質與固定於 CM-5 感應晶片表面 anti-X actin 單株抗體作用之表面膜漿共振感應曲線圖。實驗重複次數為三次。a. 5000 倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質(control) b. 5000 倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質(cells were treated with 65  $\mu$ M peptide 3C for 24 hrs) c. 5000 倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質(cells were treated with 65  $\mu$ M peptide 3C for 48 hrs)

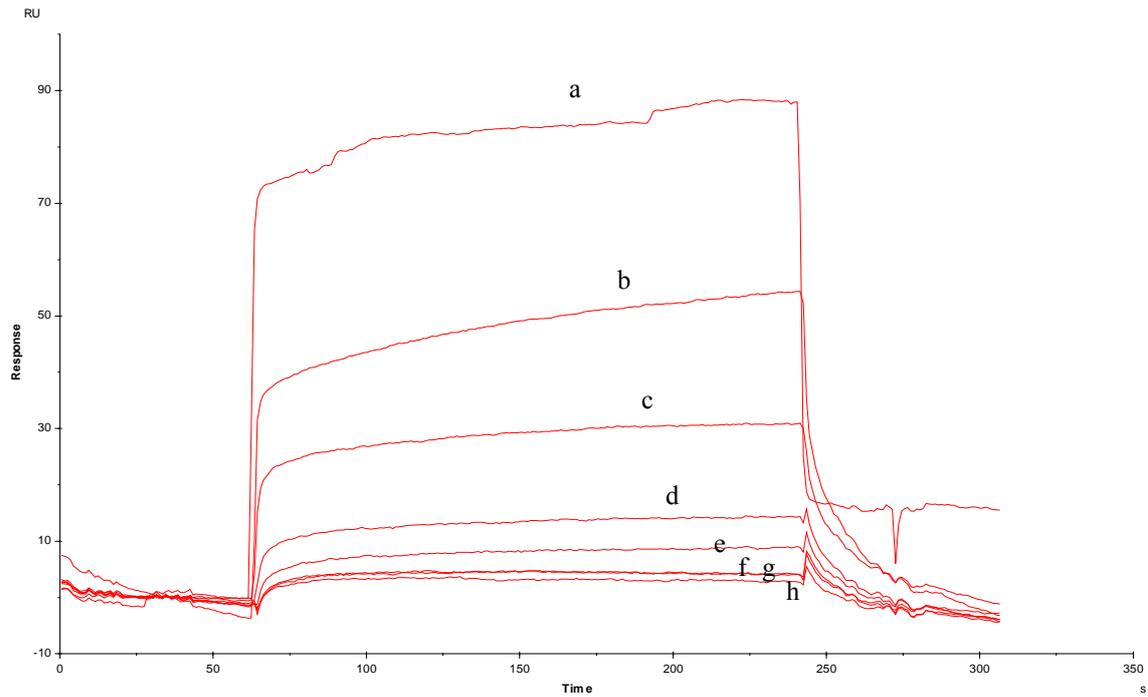


圖 4-12. 人類的 Id1 重組蛋白質與固定於 CM-5 感應晶片表面的 anti-Id1 HLH 單抗株體作用之表面膜漿共振感應曲線圖。實驗重複次數為三次。a. 18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的人類 Id1 重組蛋白質 b. 9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的人類 Id1 重組蛋白質 c. 4.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的人類 Id1 重組蛋白質 d. 2.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的人類 Id1 重組蛋白質 e. 1.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的人類 Id1 重組蛋白質 f. 0.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的人類 Id1 重組蛋白質 g. 0.28  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的人類 Id1 重組蛋白質 h. 0.14  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的人類 Id1 重組蛋白質

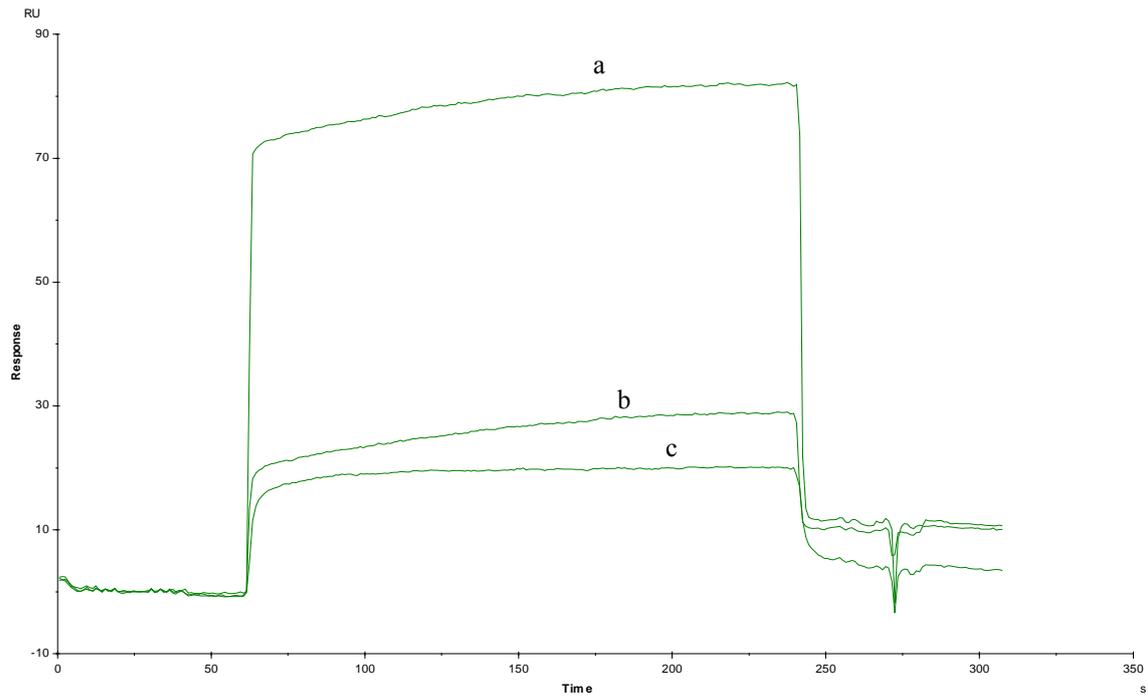


圖 4-13. 5000 倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質與固定於 CM-5 感應晶片表面 anti-Id1 HLH 單株抗體作用之表面膜漿共振感應曲線圖。實驗重複次數為三次。a. 5000 倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質(control) b. 5000 倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質(cells were treated with 65  $\mu$ M peptide 3C for 24 hrs) c. 5000 倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質(cells were treated with 65  $\mu$ M peptide 3C for 48 hrs)

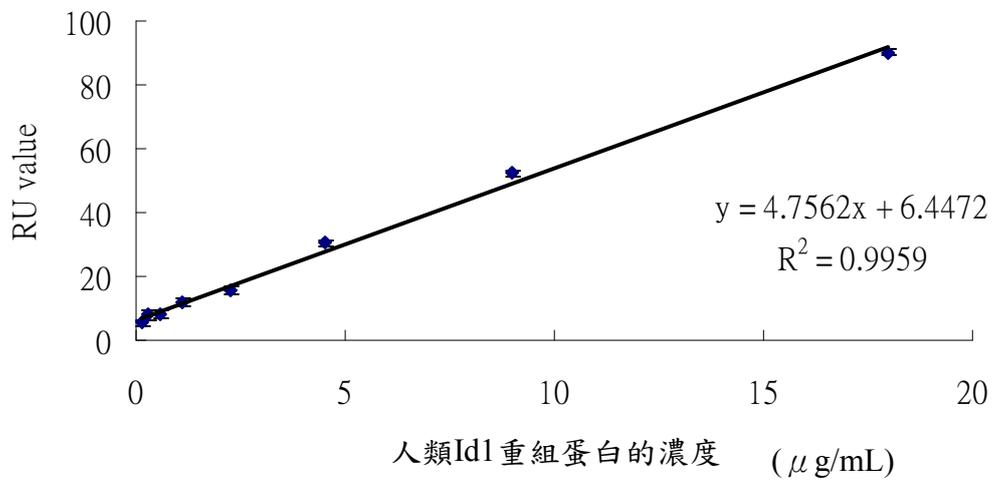


圖 4-14. 截距不等於零時，不同濃度的人類 Id1 重組蛋白質與 RU 變化量的線性關係圖。實驗重複次數為三次，實驗數據以平均值 ± 標準偏差的方式呈現。

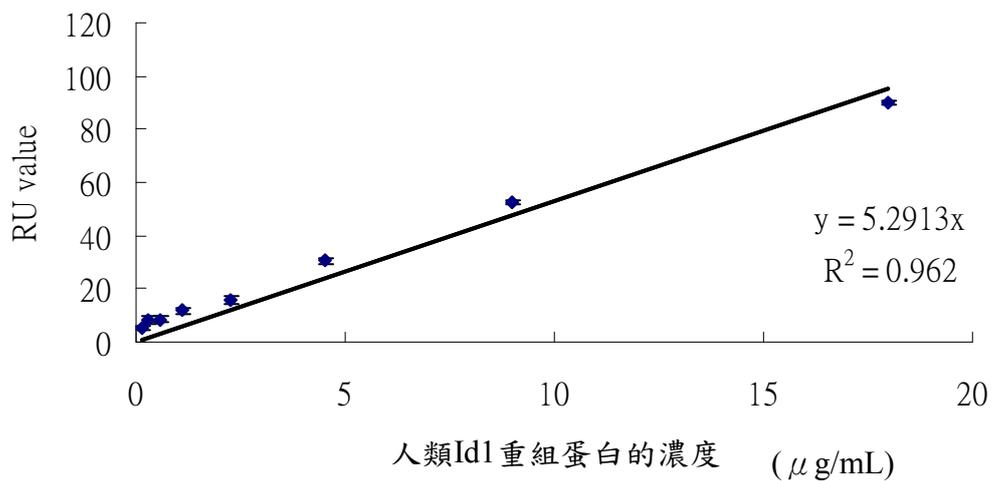


圖 4-15. 截距等於零時，不同濃度的人類 Id1 重組蛋白質與 RU 變化量的線性關係圖。實驗重複次數為三次，實驗數據以平均值 ± 標準偏差的方式呈現。

表 4-3. 利用表面膜漿共振技術評估測量以胜肽處理之人類乳癌細胞中的 Id1 蛋白質濃度

濃度 \ group	MCF-7 cells (control) <sup>a</sup>	MCF-7 cells (peptide were treated for 24 hrs) <sup>b</sup>	MCF-7 cells (peptide were treated for 48 hrs) <sup>c</sup>
Id1 蛋白質的濃度 (mg/mL)	76.45 ± 0.99	26.99 ± 1.31	19.13 ± 0.79

<sup>a</sup> 未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞

<sup>b</sup> 加入 65 μM 的 peptide 3C 處理 24 小時後的人類乳癌細胞

<sup>c</sup> 加入 65 μM 的 peptide 3C 處理 48 小時後的人類乳癌細胞

實驗重複次數為三次，實驗數據以平均值 ± 標準偏差的方式呈現

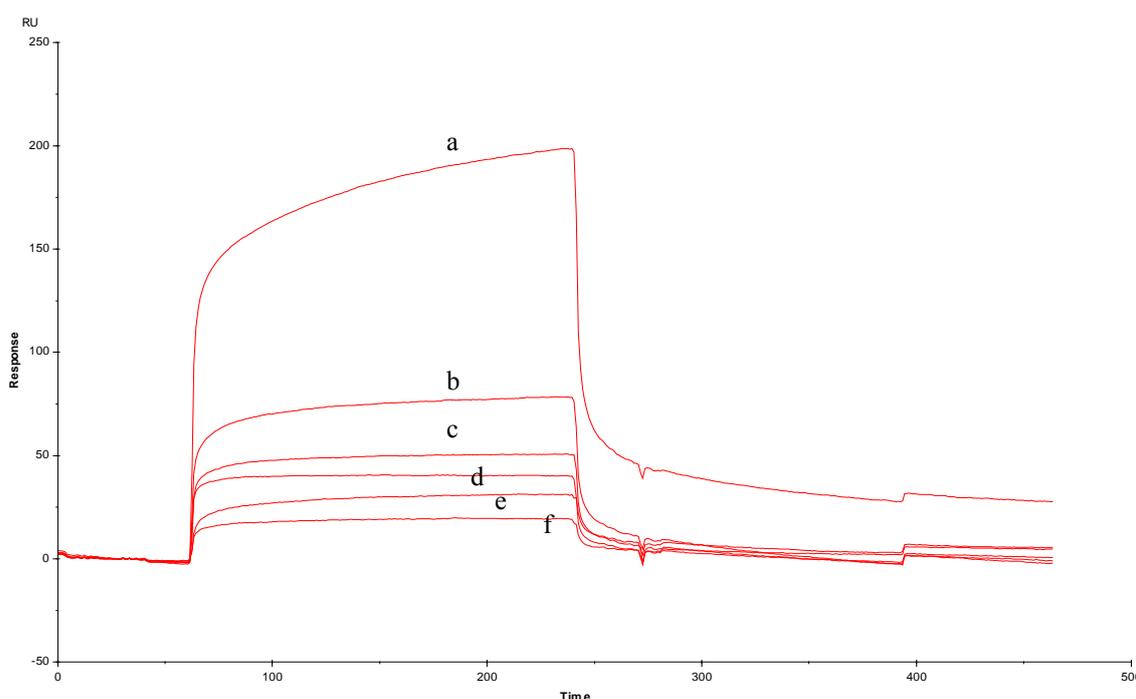


圖 4-16. 人類的 Bcl-2 重組蛋白質與固定於 CM-5 感應晶片表面的 anti-Bcl-2 單株抗體作用之表面膜漿共振感應曲線圖。實驗重複次數為三次。 a. 3.5 ng/μL 的人類 Bcl-2 重組蛋白質 b. 1.67 ng/μL 的人類 Bcl-2 重組蛋白質 c. 1.25 ng/μL 的人類 Bcl-2 重組蛋白質 d. 1 ng/μL 的人類 Bcl-2 重組蛋白質 e. 0.83 ng/μL 的人類 Bcl-2 重組蛋白質 f. 0.5 ng/μL 的人類 Bcl-2 重組蛋白質

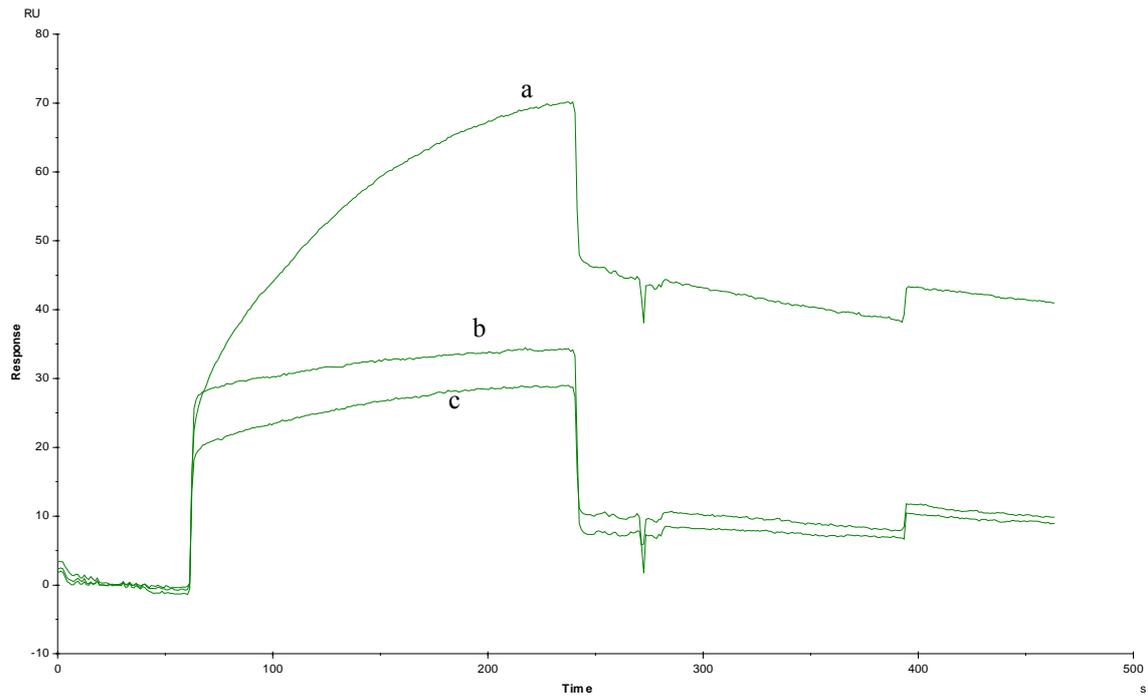


圖 4-17. 5000 倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質與固定於 CM-5 感應晶片表面 anti-Bcl-2 單株抗體作用之表面膜漿共振感應曲線圖。實驗重複次數為三次。a. 5000 倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質(control) b. 5000 倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質(cells were treated with 65  $\mu$ M peptide 3C for 24 hrs) c. 5000 倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質(cells were treated with 65  $\mu$ M peptide 3C for 48 hrs)

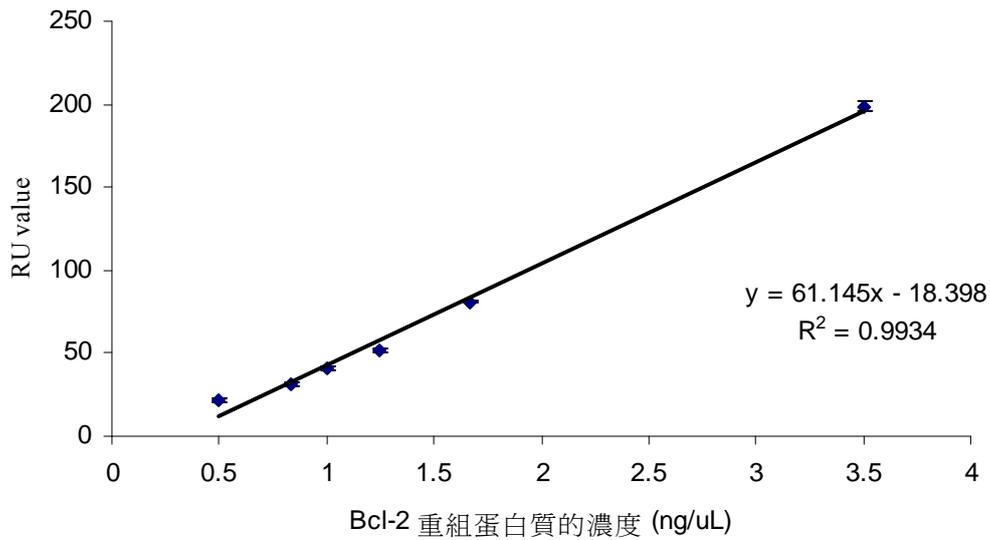


圖 4-18. 截距不等於零時，不同濃度的人類 Bcl-2 重組蛋白質與 RU 變化量的線性關係圖。實驗重複次數為三次，實驗數據以平均值 ± 標準偏差的方式呈現。

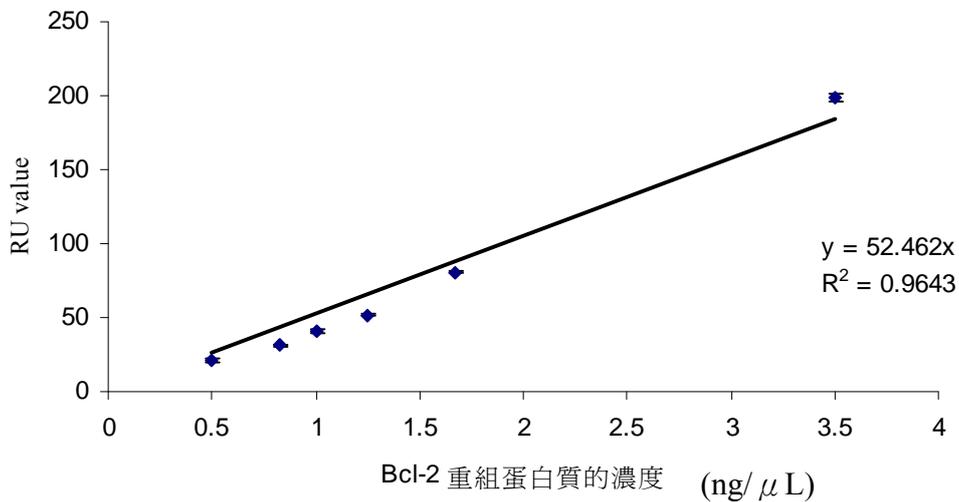


圖 4-19. 截距等於零時，不同濃度的人類 Bcl-2 重組蛋白質與 RU 變化量的線性關係圖。實驗重複次數為三次，實驗數據以平均值 ± 標準偏差的方式呈現。

表 4-4. 利用表面膜漿共振技術評估測量以胜肽處理之人類乳癌細胞中的 Bcl-2 蛋白質濃度

濃度	group	MCF-7 cells (control) <sup>a</sup>	MCF-7 cells (peptide were treated for 24 hrs) <sup>b</sup>	MCF-7 cells (peptide were treated for 48 hrs) <sup>c</sup>
Bcl-2 蛋白質的濃度 (μg/μL)		6.74 ± 0.11	3.21 ± 0.14	2.88 ± 0.09

<sup>a</sup> 未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞

<sup>b</sup> 加入 65 μM 的 peptide 3C 處理 24 小時後的人類乳癌細胞

<sup>c</sup> 加入 65 μM 的 peptide 3C 處理 48 小時後的人類乳癌細胞

實驗重複次數為三次，實驗數據以平均值 ± 標準偏差的方式呈現

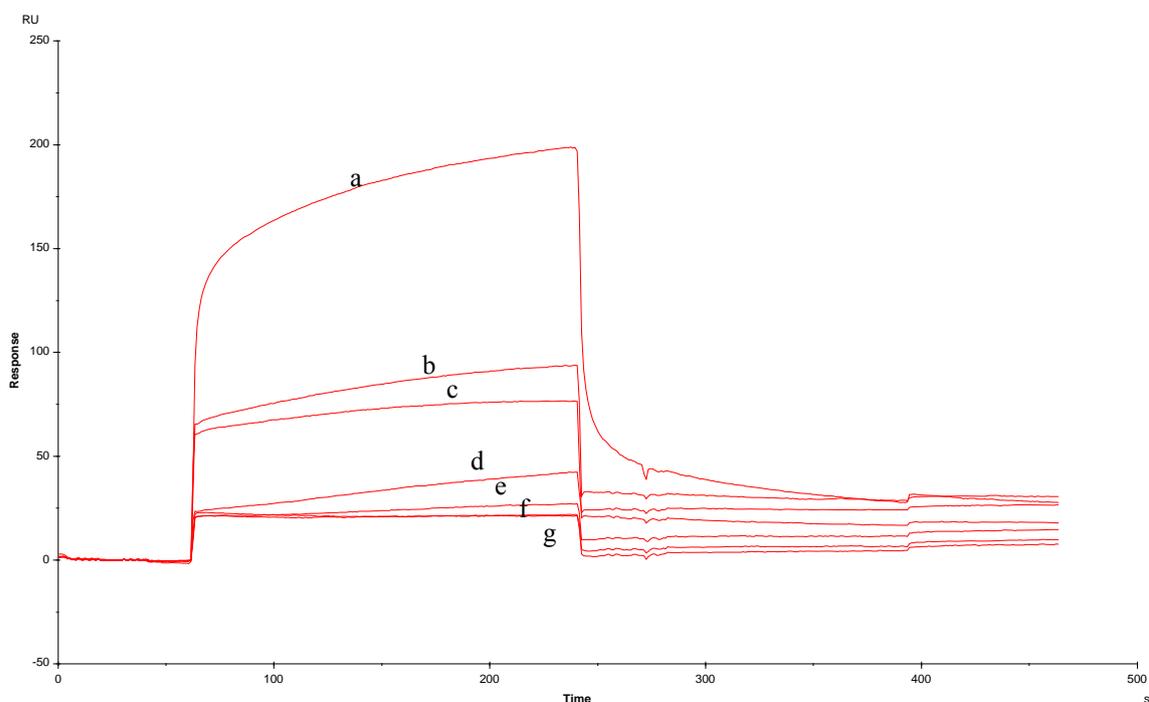


圖 4-20. 人類的 Bax 重組蛋白質與固定於 CM-5 感應晶片表面的 anti-Bax 單株抗體作用之表面膜漿共振感應曲線圖。實驗重複次數為三次。 a. 50.4 ng/μL 的人類Bax重組蛋白質 b. 25.2 ng/μL 的人類Bax重組蛋白質 c. 21 ng/μL 的人類Bax重組蛋白質 d. 12 ng/μL 的人類Bax重組蛋白質 e. 7 ng/μL 的人類Bax重組蛋白質 f. 4.48 ng/μL 的人類Bax重組蛋白質 g. 3.36 ng/μL 的人類Bax重組蛋白質

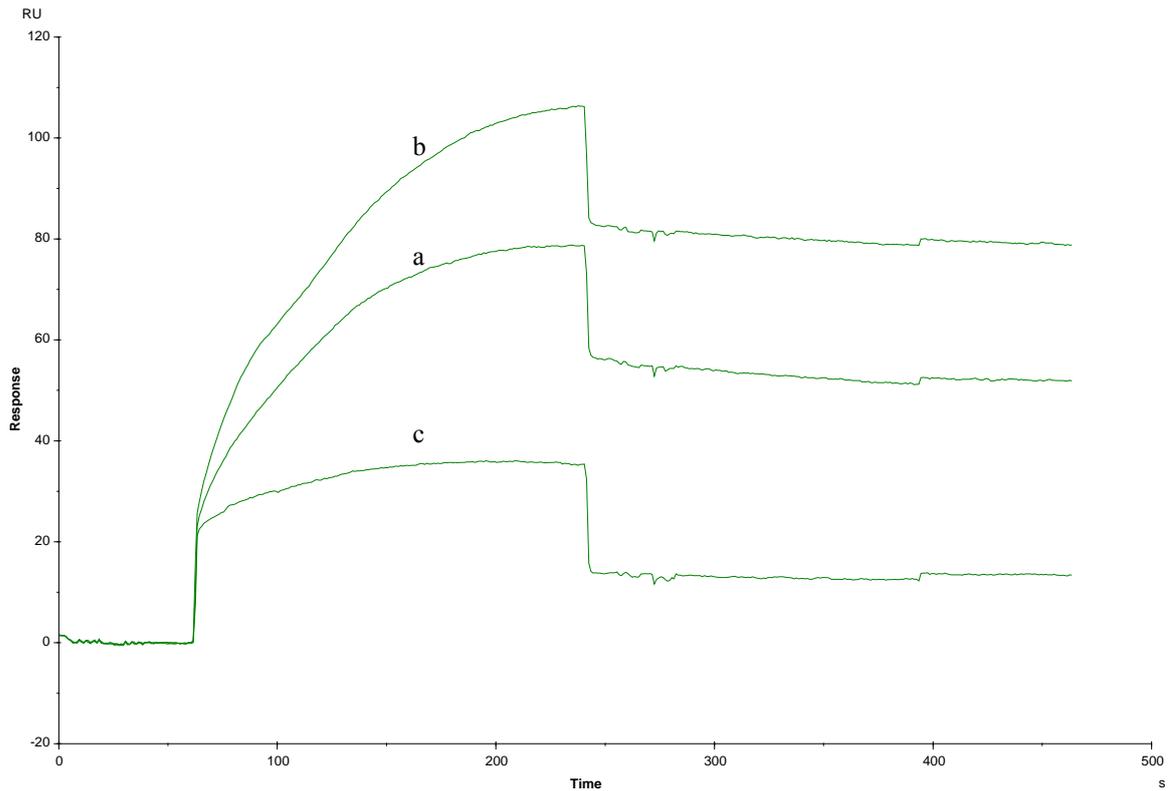


圖 4-21. 5000 倍稀釋的人類乳癌細胞內容物蛋白與固定於 CM-5 感應晶片表 anti-Bax 單株抗體作用之表面膜漿共振感應曲線圖。實驗重複次數為三次。a. 5000倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質(control) b. 5000倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質(cells were treated with 65  $\mu$ M peptide 3C for 24 hrs) c. 5000倍稀釋的人類乳癌細胞內之蛋白質(cells were treated with 65  $\mu$ M peptide 3C for 48 hrs)



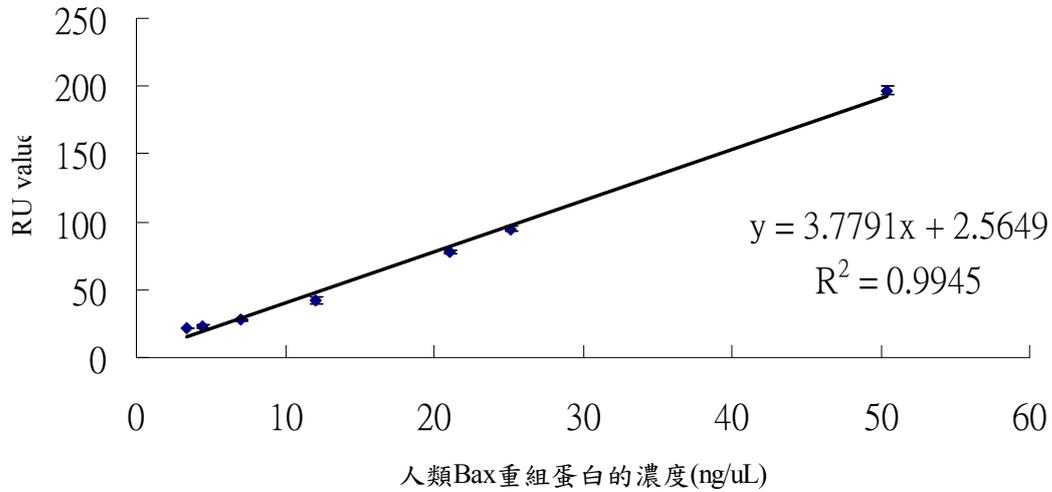


圖 4-22. 截距不等於零時，人類 Bax 重組蛋白質的濃度與共振單位間關係變化之標準曲線圖。實驗重複次數為三次，實驗數據以平均值  $\pm$  標準偏差的方式呈現。

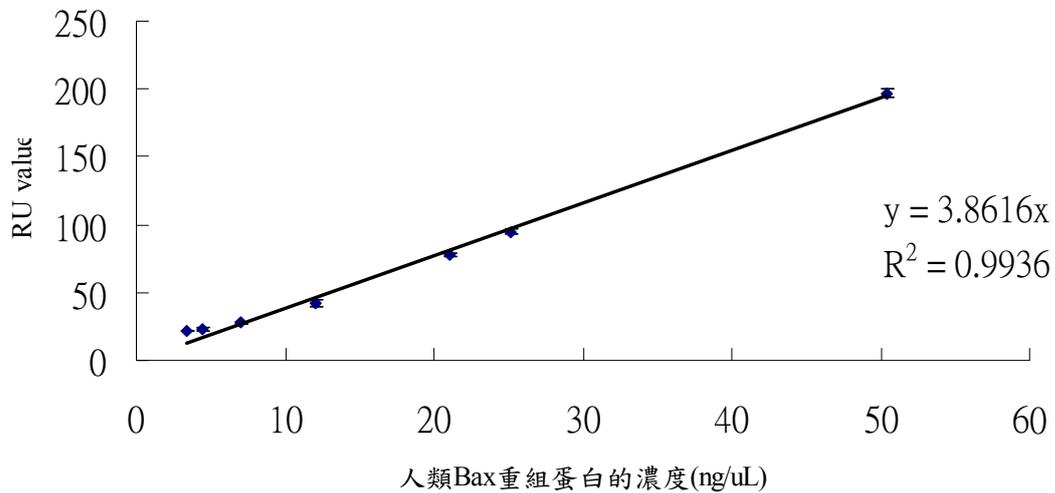


圖 4-23. 截距等於零時，人類 Bax 重組蛋白質的濃度與共振單位(RU, resonance unit)間關係變化之標準曲線圖。實驗重複次數為三次，實驗數據以平均值  $\pm$  標準偏差的方式呈現。

表 4-5. 利用表面膜漿共振技術(surface plasmon resonance, SPR)評估測量以胜肽

處理之人類乳癌細胞(MCF-7 cells)中的 Bax 蛋白質濃度

濃度 group	MCF-7 cells (control) <sup>a</sup>	MCF-7 cells (peptide were treated for 24 hrs) <sup>b</sup>	MCF-7 cells (peptide were treated for 48 hrs) <sup>c</sup>
Bax 蛋白質的濃度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	95.17 $\pm$ 0.28	139.40 $\pm$ 0.39	41.00 $\pm$ 0.20

<sup>a</sup> 未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞

<sup>b</sup> 加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 24 小時後的人類乳癌細胞

<sup>c</sup> 加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 48 小時後的人類乳癌細胞

實驗重複次數為三次，實驗數據以平均值  $\pm$  標準偏差的方式呈現

表 4-6. 依序利用表面膜漿共振技術及西方墨點轉漬法評估測量以胜肽處理之人

類乳癌細胞中的 Id1 蛋白質相對濃度百分比及相對含量百分比。實驗重

複次數為三次

group method	MCF-7 cells (control) <sup>a</sup>	MCF-7 cells (peptide were treated for 24 hrs) <sup>b</sup>	MCF-7 cells (peptide were treated for 48 hrs) <sup>c</sup>
表面膜漿共振技術 <sup>d</sup>	100	35.3	25.02
西方墨點轉漬法 <sup>e</sup>	100	3.44	2.41

<sup>a</sup> 未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞

<sup>b</sup> 加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 24 小時後之人類乳癌細胞

<sup>c</sup> 加入 65  $\mu\text{M}$  的 peptide 3C 處理 48 小時後之人類乳癌細胞

<sup>d</sup> 利用表面膜漿共振技術評估測量以胜肽處理之人類乳癌細胞中的 Id1 蛋白質相對濃度百分比

<sup>e</sup> 利用西方墨點轉漬法評估測量以胜肽處理之人類乳癌細胞中的 Id1 蛋白質相對含量百分比

表 4-7. 依序利用表面膜漿共振技術及西方墨點轉漬法評估測量以胜肽處理之人類乳癌細胞中的 Bcl-2 蛋白質相對濃度百分比及相對含量百分比。實驗重複次數為三次。

group method	MCF-7 cells (control) <sup>a</sup>	MCF-7 cells (peptide were treated for 24 hrs) <sup>b</sup>	MCF-7 cells (peptide were treated for 48 hrs) <sup>c</sup>
表面膜漿共振技術 <sup>d</sup>	100	47.63	42.73
西方墨點轉漬法 <sup>e</sup>	100	4.62	4.16

<sup>a</sup> 未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞

<sup>b</sup> 加入 65  $\mu$ M 的 peptide 3C 處理 24 小時後之人類乳癌細胞

<sup>c</sup> 加入 65  $\mu$ M 的 peptide 3C 處理 48 小時後之人類乳癌細胞

<sup>d</sup> 利用表面膜漿共振技術評估測量以胜肽處理之人類乳癌細胞內的 Bcl-2 蛋白質相對濃度百分比

<sup>e</sup> 利用西方墨點轉漬法評估測量以胜肽處理之人類乳癌細胞內的 Bcl-2 蛋白質相對含量百分比

表 4-8. 依序利用表面膜漿共振技術及西方墨點轉漬法評估測量以胜肽處理之人類乳癌細胞中的 Bax 蛋白質相對濃度百分比及相對含量百分比。實驗重複次數為三次。

group method	MCF-7 cells (control) <sup>a</sup>	MCF-7 cells (peptide were treated for 24 hrs) <sup>b</sup>	MCF-7 cells (peptide were treated for 48 hrs) <sup>c</sup>
表面膜漿共振技術 <sup>d</sup>	100	146.47	43.08
西方墨點轉漬法 <sup>e</sup>	100	147.36	67.64

<sup>a</sup> 未加入 peptide 3C 的人類乳癌細胞

<sup>b</sup> 加入 65  $\mu$ M 的 peptide 3C 處理 24 小時後之人類乳癌細胞

<sup>c</sup> 加入 65  $\mu$ M 的 peptide 3C 處理 48 小時後之人類乳癌細胞

<sup>d</sup> 利用表面膜漿共振技術評估測量以胜肽處理之人類乳癌細胞內的 Bax 蛋白質相對濃度百分比

<sup>e</sup> 利用西方墨點轉漬法評估測量以胜肽處理之人類乳癌細胞內的 Bax 蛋白質相對含量百分比

表 4-9. 應用西方墨點轉漬法偵測細胞內蛋白質含量的耗材效益評估表

效 益 流 程	試劑	費用	時間
電泳	Electrophoresis reagents	4000	五小時
轉漬	iBlot Gel Transfer membrane and electrode	5000	七分半鐘
標記	Monoclonal antibody	14000	十八小時
	Anti-Mouse IgG (Goat, HRP-Labeled)	8000	
	Blocking solution	100	
	TBST buffer	100	
	TBS buffer	100	
		<b>總費用</b>	<b>總時間</b>
		約三萬	約一天

表 4-10. 應用表面膜漿共振技術偵測細胞內蛋白質含量的耗材效益評估表

效 益 流 程	設備與試劑	費用	時間
製作抗體的感 應晶片	Sensor chip CM5	7000	三小時
	HBS-EP buffer	3900	
	Amine coupling kit	16400	
	Regeneration buffer	100	
	Monoclonal antibody	14000	
分析	Sensor chip CM5	7000	四小時
	HBS-EP buffer	3900	
	Regeneration buffer	100	
		<b>總費用</b>	<b>總時間</b>
		約四萬	約七小時

表 4-11. 應用西方墨點轉漬法偵測細胞內蛋白質含量的設備評估表

設備	費用
Mini-Protean 3 Electrophoresis system	30000
iBlot Gel Transfer System	47000
Computer	15000
Gel Logic 100 Imagine System	270000

表 4-12. 應用表面膜漿共振技術偵測細胞內蛋白質含量的設備評估表

設備	費用
BIAcore-3000	2000000
Computer	15000