私立東海大學應用化學研究所

碩士論文

合成 Idl 蛋白質之胜肽拮抗物暨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

Synthesis of a peptide antagonist of Id1 protein and development of novel methods for evaluation of its anticancer effects using surface plasmon resonance technology and Western blotting

指導教授:龍鳳娣 博士 (Feng-Di Lung)

研究生:廖志偉 (Chih-Wei Liao)

中華民國九十九年七月

私立東海大學碩士班研究生

論文指導教授推薦書

化學系碩士班 廖志偉君所提之論文

合成 Idl 蛋白質之脏肽拮抗物暨應用西方墨點轉潰法 及表面膜漿共振技術研發評估抗癌功效的新方法

Synthesis of a peptide antagonist of Id1 protein and development of novel methods for evaluation of its anticancer effects using surface plasmon resonance technology and Western blotting

係由本人指導撰述,同意提付審查。

指导教授

99 年 7 月 16 日

私立東海大學碩士班研究生

論文口試委員審定書

化學系碩士班 廖志偉 君所提之論文

合成 Idl 蛋白質之胜肽拮抗物暨應用西方墨點轉 漬法及表面膜漿共振技術研發評估抗癌功效的 新方法

Synthesis of a peptide antagonist of Id1 protein and development of novel methods for evaluation of its anticancer effects using surface plasmon resonance technology and Western blotting

中華民國 99 年 7 月 16 日

博碩士論文電子檔案上網授權書

(爲維護您的權益,請慮漂客回供授權管理/E) ID-098THU00065019 本授權書所授權之論交爲授權人在東海大學(學院)化學系系所_____ 組98學年度第二學員 取得 强士學位之論文,

输交圈目: 合成1d1蛋白質之性肽拮抗物暨應用表面膜漿共振技術及西方重點轉讀法研發評估 抗癌功效的新方法

指導教授: 龍麗鄉,Feng-Di Lung

茲同意將授權人擁有著作權之上列論文全文(含摘要),提供讀者基於個人非營利性質之緣上8 索、擬覽、下載或列印,此項授權係非專屬、無償授權國家圖書館及本人畢業學校之圖書館, 不限地域、時間與次數、以数館、光碟或數位化方式將上列論交進行重要、並同意公開傳輸書 位檔案。

□上列論文為授權人向經濟部智慧財產局申請專利之對件或相關文件之一(專利申請案號:) -請於2015年12月15日後再將上列論交公開或上載網路。

它因上列論文向未正式對外發表,請於2015年12月15日後再將論文數位化檔案上載網路公開。 □不同意授權 ·

民國 91年7 月22日

授權人:廖志你 觀察簽名及蓋章: 序志住

身分讀字號: B122401585 電話:0919022857 傳真: 聯絡地址:台中市西屯區港尾里廣福路150巷35號 E-Mail : njpu04y2u4uaup6@hotmail.com :



謝誌

南風又輕輕地吹送,鳳凰花也悄悄地綻放了,兩年的研究所生涯, 就這樣劃上了句點。回想這段研究所的求學過程,深深地感謝東海對我 的栽培,感謝良師與學長姐的指導及學弟妹相伴,更感謝一路上陪伴 我、支持我的家人及好友,因為你們的鼓勵與協助才會有今日的成果!

本碩士論文得以順利完成,首先要感謝恩師龍鳳娣 博士,感謝老師讓我的論文一步一步從荒蕪到結實,最後得以完成。感謝老師這二年 來對我的悉心指導與鼓勵栽培,不僅在學術研究方面給予許多寶貴見解 外,更教導我許多待人處事的道理,使我獲益良多。口試期間,承蒙張 玉珍 老師、張柏齡 老師和張定國 老師於百忙之中撥冗詳閱並於口試 時提出寶貴的建議,使本論文能因此更臻完善,在此至上無限謝忱。

最後,謹以此篇論文獻給我最親愛的家人,感謝你們對我無怨無悔 的支持與鼓舞,在求學的路途上不斷地為我加油打氣,也特別感謝陳丘 泓 博士、又誠學長、玲音學姐、小芳學姊、毓姿學姊、宛靜學姐、姿 螢學姐、飛儀學長、雲川學長、俊蔚學長、德倫、詩瑩、佳昕、凱宣、 銘軒、惠玲、梓捷、佳玫、佳民、笠崴、俊強、憲夫以及系上同學、學 弟妹、助教與老師的指教、鼓勵與關懷,因為你們,研究所生活才會如 此精采豐富!

廖志偉 謹誌 東海大學應用化學研究所

中華民國九十九年七月

摘要

Idl 蛋白質對於腫瘤細胞的形成與移動是重要的影響因子之 一。本實驗室的研究目的為抑制 Idl 蛋白質的活性以期減緩或抑制癌 細胞生長與腫瘤細胞的轉移性。2010 年本實驗室的發表論文中以 MyoD 蛋白質為藍本設計出 Id1 蛋白質之胜肽拮抗物 peptide 3C,發 現此胜肽在低濃度下,對癌細胞具有不錯的毒殺效果。所以本論文的 研究目的為希望藉由探討癌細胞內特定蛋白質的含量變化,進一步瞭 解癌細胞的凋亡與特定蛋白質間的關係。實驗先將人類乳癌細胞 (MCF-7 cells)以 peptide 3C 處理 24 小時及 48 小時後, 萃取癌細胞內 的總體蛋白質並測量其總蛋白質濃度後,依序以西方墨點轉漬法 (Western blot)和表面膜漿共振技術(surface plasmon resonance, SPR)偵 測癌細胞內特定蛋白質的含量變化。實驗結果發現,兩種對細胞內特 定蛋白質定量的方式之結果具有相同的趨勢性:將 peptide 3C 加入人 類乳癌細胞後, 會使癌細胞內的 Idl 蛋白質和 Bcl-2 蛋白質含量下 降; Bax 蛋白質含量上升; β -actin 蛋白質含量則是不變。互相比較 雨種細胞內特定蛋白質定量的方式之結果,有助於我們研發並評估抗 癌功效的新方法。

關鍵字: Id1 蛋白質、Bcl-2 蛋白質、Bax 蛋白質、β-actin 蛋白質、 胜肽拮抗物、peptide 3C、人類乳癌細胞、細胞凋亡、西方 墨點轉漬法、表面膜漿共振技術。

Abstract

Id1 protein is an important factor of tumorigenesis and metastasis. The objective of our study is to suppress the activity of Id1 protein in order to slow down or inhibit the tumorigenesis and metastasis. Our recent study reported in 2010 revealed that peptide 3C, a peptide fragment of MyoD protein, exhibited cytotoxic effect on cancer cells at low concentration. The objective of this thesis is to investigate the relationship between apoptosis and the expression of specific proteins by analyzing the changes of expression levels of specific proteins in cancer cells and peptide-treated cancer cells. Human breast cancer cells (MCF-7 cells) were cultured and treated with peptide 3C for 24 hours and 48 hours, followed by extraction of proteins from cancer cells and measuring the total concentration of cellular proteins. Changes of amounts of specific proteins in cancer cells were analyzed by Western blot and surface plasmon resonance technology. Results obtained by these two methods are correlated, indicating that the changes of expression levels of specific proteins in cancer cells are similar : After MCF-7 cells were treated with peptide 3C, the concentrations of Id1 protein and Bcl-2 protein were decreased, the concentration of Bax protein was increased, and the concentration of β -actin protein remained the same as expected. Comparison of these two methods for quantification of concentrations of specific proteins in cancer cells is useful for the development of novel methods for evaluation of anticancer effects of peptides or drugs.

Keywords : Id1 protein, Bcl-2, Bax, β -actin, peptide antagonist, human breast cancer cells, apoptosis, Western blot, surface plasmon resonance.

第一章	前言
第二章	文獻探討
第	一節 乳癌
	1-1 乳癌的簡介
	1-2 實驗常見的人類乳癌細胞株3
	1-2-1 MCF-7 cells (estrogen dependent) 4
	1-2-2 MDA-MB-231 cells (estrogen independent) 4
	1-2-3 MDA-MB-453 cells (ErbB over-expression) 4
第	二節 peptide 3C
第	三節 細胞凋亡(apoptosis)
	3-1 細胞凋亡的定義
	3-2 細胞凋亡的啟動
	3-3 細胞凋亡的過程
	3-4 細胞凋亡 (apoptosis) 與細胞壞死 (necrosis) 的差異 9
	3-5 細胞凋亡的基因調節
第	四節 β-actin 蛋白質(β-肌動蛋白質) ······11
	4-1 細胞骨架的簡介
	4-2 β-actin蛋白質的簡介
第	五節 Id (inhibitor of DNA binding or inhibitor of differentiation)蛋白質
	5-1 Id蛋白質之簡介
	5-2 鹼性的螺旋-環-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)蛋白質之簡介
第	六節 Bcl-2 蛋白質與Bax 蛋白質

目錄

6-1 Bcl-2蛋白質家族之簡介
6-2 Bcl-2蛋白質之簡介
6-3 Bax 蛋白質
第七節 生物感測器(Biosensor)
第八節 西方墨點轉漬法(Western blot)
第九節 研究目的
第三章 材料與方法
第一節 實驗設計與流程
1-1 胜肽之設計與製備
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
2-2 固相胜肽合成法的實驗原理
2-2-1 固相胜肽合成法的反應試劑之作用原理
2-2-2 寧海得林法 (Nihydrin test) 的作用原理
2-3 固相胜肽合成法的實驗流程
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 30
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
3-2-2 逆相高效能液相層析法的實驗原理
3-3 逆相高效能液相層析法的實驗方法
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
4-2 基質輔助雷射脫附游離飛行時間質譜儀的實驗原理

4-2-1	基質的特性與功用	•••••	 34
4-2-2.	飛行時間質量分析	器的原理	 34

- 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

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

- - 5-3 將人類乳癌細胞以胜肽 peptide 3C 處理之實驗方法 …………………… 39

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、

- 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 …40
- 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 …40
- 第七節 表面膜漿共振技術 ……………………………………………………………………………42
 - 7-1 表面膜漿共振技術的實驗材料、試劑和設備 …………………… 42
 - 7-2 表面膜漿共振技術的實驗原理 ………………………………………………………… 42

 - 7-2-3. 表面膜漿共振現象的原理 ………………………………………………………… 43

7-2-4 儀器組成
7-3 表面膜漿共振技術的實驗方法 48
7-3-1 CM5 感應晶片的固定(immobilization)和再生(regeneration) 48
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 50
7-3-2-2 Anti-Id1 HLH 單株抗體感應晶片的製備 50
7-3-2-3 Anti-Bcl-2 單株抗體感應晶片的製備
7-3-2-4 Anti-Bax 單株抗體感應晶片的製備
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
(binding analysis) 52
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
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
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
質濃度之實驗法 53
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55
9-2 聚丙烯醯胺凝膠電泳的實驗原理
9-3 聚丙烯醯胺凝膠電泳的實驗方法
9-3-1 分離膠體(separating gel)的配製

9-3-2 焦集膠體(stacking gel)的配製
9-3-3 電泳實驗
9-3-4 染色與退染
第十節 西方墨點轉漬法58
10-1 西方墨點轉漬法的實驗材料、試劑和設備 58
10-2 西方墨點轉漬法的實驗原理 58
10-3 西方墨點轉漬法的實驗方法 58
第四章 結果與討論
第一節 胜肽之合成、純化的實驗結果 60
1-1 逆相高效能液相層析儀的分析及純化 60
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 61
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
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 64
3-1 聚丙烯醯胺凝膠電泳的檢測與分析64
3-2 西方墨點轉漬法的檢測與分析 64
3-3 西方墨點轉漬法的結果檢討 66
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 67
4-1 應用表面膜漿共振技術分析人類乳癌細胞內的 β-actin 蛋白質 … 67
4-2 應用表面膜漿共振技術分析細胞內的 Id1 蛋白質 67

4-2-1 應用表面膜漿共振技術分析人類 Id1 重組蛋白質 67
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 68
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
4-3 應用表面膜漿共振技術分析細胞內的Bcl-2蛋白質 70
4-3-1 應用表面膜漿共振技術分析人類 Bcl-2 重組蛋白質 70
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… 70
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
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 72
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 73
4-4-3 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
第五節 應用表面膜浆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
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 ······75
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
第五章 結論與未來展望
第六章 參考文獻

圖目錄

圖 2-1. 以 peptide 3C 處理不同細胞株之細胞存活率測試圖6
圖 2-2. 細胞凋亡(apoptosis)與細胞壞死(necrosis)的差異9
圖 2-3. 細胞骨架的組成成分
圖 2-4. Id 蛋白質的 helix-loop-helix (HLH)區塊之胺基酸組成 12
圖 2-5. Id 蛋白質參與細胞調節及細胞週期
圖 2-6. bHLH 蛋白質的作用示意圖
圖 2-7. Bcl-2 蛋白質家族 ······16
圖 2-8. Bcl-2 蛋白質抑制細胞凋亡的機轉
圖 3-1. 茚三硐(nihydrin)的化學結構式
圖 3-2. Nihydrin test 成色機制
圖 3-3. 固相胜肽合成法的流程圖
圖 3-4. MALDI-TOF MS 之作用原理簡圖
圖3-5. 光的全反射與漸逝波····································
圖3-6. 表面膜浆共振技術其基本架構····································
圖3-7. BIAcore之感應曲線圖 ·······46
圖3-8. 組成Biacore 3000儀器的三大系統 47
圖 3-9. Acore 3000 sensor 之感應晶片主要構造 47
圖3-10. 考馬斯亮藍G250的化學結構式
圖 3-11 各種的蛋白質定量圖 54
圖 3-12 考馬斯亮藍 R-250 的化學結構式 57
圖 3-13 西方墨點轉漬法的作用原理圖
圖 4-1. Peptide 3C 粗產物的 RP-HPLC 層析圖與 MALDI-TOF MS 質譜圖 97
圖 4-2. Peptide 3C 主產物的 RP-HPLC 層析圖與 MALDI-TOF MS 質譜圖 98

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	
------------------------	-----------	--

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 ……… 100

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 …………………… 101

- 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 β- actin、Id1
 - ·Bax和Bcl-2的相對含量百分比 ······102
- 圖 4-7. Anti-X actin 單株抗體(百倍稀釋)的 immobilization 圖 ………………… 103
- 圖 4-8. Anti-Idl HLH 單株抗體(百倍稀釋)的 immobilization 圖 …………… 103

圖 4-9. Anti-Bcl-2 單株抗體(百倍稀釋)的 immobilization 圖 ………………………… 104

圖 4-10. Anti-Bax 單株抗體(百倍稀釋)的 immobilization 圖 ……………………… 104

- 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 …………… 105

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 ……………………… 106

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 ……… 107

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 …………………………………… 109

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 …………… 110

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

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

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112

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113

- 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 ………………………… 114
```

表目錄

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
表3-1. 固相胜肽合成法的實驗材料、試劑、設備和購買廠商 86
表3-2. Peptide 3C之胜肽序列及分子量
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
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 87
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
表 3-6. 常用的基質輔助雷射脫附游離基質之結構 88
表 3-7. 細胞培養相關實驗之藥品、試劑、設備及購買廠商 89
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
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90
表3-10. 不同種類的生物感應器(BIAcore 3000)晶片
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91
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 ······92
表 3-13. 配製 Tris-glycine SDS PAGE 之 separating gel
表 3-14. 配製 Tris-glycine SDS PAGE 之 stacking gel
表 3-15. 配製 Tris-glycine SDS PAGE 之 running buffer

表 3-16. 配製 Tris-glycine SDS PAGE 之 sample buffer
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95
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96
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
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 β- actin、Id1
、Bax 和 Bcl-2 之相對含量百分比
表 4-3. 利用表面膜浆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
表 4-4. 利用表面膜浆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
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 cell)中的 Bax 蛋白質濃度 115
表 4-6. 依序利用表面膜浆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
表 4-7. 依序利用表面膜浆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

- 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 …… 118
- 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
- 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119
- 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119