

目錄

目錄.....	1
中文摘要.....	3
英文摘要.....	4
前言.....	5
材料與方法.....	9
一、 穀 胱 轉 移 基.....	9
二、 重組質體之正確性.....	10
三、 重組蛋白質的表達.....	10
四、 重組蛋白質的純化.....	11
五、 Factor Xa 切割 GST-X 重組蛋白質.....	12
六、 蛋白質濃度測定.....	13
七、 蛋白質電泳分析.....	13
八、 西方點墨轉漬法.....	14
九、 酵素連結免疫吸附檢測法.....	15
十、 統計分析.....	16
結果.....	17
討論.....	20

參考文獻.....	24
圖表.....	30
附圖.....	34
附表.....	37
附錄.....	38
個人資料.....	42

摘要

利用重組質體 DNA 的技術，本實驗室已成功的將 B 型肝炎病毒 X 基因，嵌入 穀胱 轉 移 ，並加以表達、純化。純化後的 GST-X 蛋白質，經過單株抗體測試，已確定其正確性。再以 factor Xa 切割 GST-X 蛋白質，分離 GST 及 X 蛋白質，做為偵測抗 B 型肝炎病毒 X 蛋白質抗體（ anti-HBx antibody ）的抗原。以 Western Blotting 及 ELISA 的方法，測試 20 位肝癌病人、20 位慢性肝炎病人、及 20 位正常人的血清，顯示 90 % 肝癌病人，及 5 % 慢性肝炎病人血清，對於重組 X 蛋白質，具 anti-HBx 抗體反應。此結果說明了，肝癌病人血清中有較高力價（ titer ）的 anti-HBx 抗體。

Abstract

Hepatitis B virus X antigen (HBx) expressed in *E. coli* DH5 by recombinant DNA technology was purified to homogeneity by glutathione sepharose beads. Immunological characterizations of the fusion protein were studied by Western blotting immunodetection. The specific bindings between the anti-HBx monoclonal antibody and HBx antigen show the precision of the recombinant HBx fusion protein. The factor-Xa digested GST fusion protein was further purified and used to screen titers of anti-HBx antibody in sera. Titers of anti-HBx of sera from twenty patients with hepatocellular carcinoma (HCC), or twenty patients with chronic hepatitis (CH), or twenty normal individuals were evaluated by Western blotting immunodetection and quantitative ELISA. Results indicate that 90% sera of HCC and 5% sera of CH contain significant titers of antibodies to the recombinant HBx antigen. The titers of anti-HBx antibody in sera of HCC patients were statistically significant.

前言

根據流行病學的研究，東南亞地區為 B 型肝炎的高度傳染區。B 型肝炎病毒的感染者會發生急性肝炎，慢性肝炎，肝硬化，肝癌等不同程度的肝臟病變（Collier and Oxford 1993; Stack *et al.*, 1994; 丁，1995）。B 型肝炎病毒的傳染方式，為體液性的感染，輸血、使用血液製劑及性行為是主要的感染途徑。臨床報告指出，有 5~10% 的成年 B 型肝炎病毒感染者會轉變成慢性肝炎。據統計，這些慢性肝炎病人得到肝癌的機會比正常人高出 100 倍（丁，1995）。

人類 B 型肝炎病毒屬於肝炎 DNA 病毒科（*Hepadnaviridae*），同屬此科的病毒還包括：鴨肝炎病毒（duck hepatitis B virus, DHBV），松鼠肝炎病毒（ground squirrel hepatitis virus, GSHV），鵝肝炎病毒（snow goose hepatitis B virus, sgHBV）及土撥鼠肝炎病毒（woodchuck hepatitis virus, WHV）。而不同病毒對於寄主具專一性（Marion *et al.*, 1980; Mason *et al.*, 1980; Summers *et al.*, 1978）。

B 型肝炎病毒顆粒直徑約 42 nm，呈球形（丁，1985）（附圖 1），其結構為核心抗原（core antigen, HBcAg）外包裹著脂質外套，脂質外套上帶有分子量約 24 kilo Dalton（kD）的表面抗原（surface antigen, HBsAg），核心抗原內則包裹著病毒的基因體（genome）及 DNA 聚合（DNA polymerase）；依表面抗原的特性，可將 B 型肝炎病毒區分為四種主要亞型：adw, adr, ayw, ayr（Collier and Oxford 1993; Stack *et al.*, 1994）。

B 型肝炎病毒（HBV）具有四個開放讀碼區（Open reading

frame), 分別為 S、C、P 和 X (Tiollais and Buendia 1991) (附圖 2)。其中 S 基因合成表面抗原, C 基因合成核心抗原, 兩者為構成病毒的結構性蛋白質; P 基因合成 DNA 聚合酶; X 基因 (HBx) 是由 465 個核苷酸所組成, 為最短的一段開放讀碼區, 能合成一段由 154 個胺基酸組成, 分子量約 17 kD 的非結構性蛋白質, 其功能仍不清楚 (Galibert *et al.*, 1979; Yen, 1996)。

目前已知 X 蛋白質具有轉活化 (transactivation) 的功能。能活化許多基因, 包括 B 型肝炎病毒的四個啟動子 (promoter) 及加強子 (enhancer) (Nakatake *et al.*, 1993) 和其他基因, 例如: 人類免疫缺陷病毒的末端長重複區 (long-terminal repeat of human immunodeficiency virus 1, HIV-1LTR) (Balsano *et al.*, 1994), 及猿猴病毒 40 加強子 (SV40 enhancer) (Twu *et al.*, 1989); 亦可活化細胞內的基因, 例如: 表皮生長因子接受器基因 (epidermal growth factor receptor gene) 以及原致癌基因 (protooncogenes) c-myc、c-jun (Twu *et al.*, 1993)。X 蛋白質的轉活化方式可能是與細胞蛋白質作用而產生活化的功能 (Koike and Takada 1995), 例如: X 蛋白質可能會與抑癌蛋白質 p53 (tumor suppressor protein p53) 形成複合物, 使其停滯於細胞質不進入核內, 而影響 p53 蛋白質的功能 (Bressac *et al.*, 1990; Cromlish 1996; Feitelson *et al.*, 1997)。X 蛋白質的轉活化功能, 也表現在干擾重要的細胞訊號傳遞途徑 (cellular signaling pathways) 中, 例如: apoptosis, DNA repair 及 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), 及 Janus Kinase (JAK)/Signal transducer and activator transcription (STAT) pathways 等 (Yeh 2000)。

X 蛋白質的轉活化功能可能使寄主基因的表達改變，而導致細胞癌化（Murakami, 1999）。在 HBx 基因轉殖老鼠（transgenic mice）實驗中顯示，X 基因的大量表達，會促使老鼠肝細胞病變，進而發生肝癌。而雄鼠發生肝癌和死亡的時期均早於雌鼠（Kim *et al.*, 1991; Koike *et al.*, 1994），且其肝細胞的病變過程與人類肝癌發展相似（Yu *et al.*, 1999）。

針對慢性肝炎及肝癌患者的肝臟組織，進行免疫分析的結果發現，80 % 肝癌患者的肝組織中，發現有 X 蛋白質，而慢性肝炎病人只有 30 % 發現 X 蛋白質（Zentgraf *et al.*, 1990）。以酵素連結免疫吸附法，利用單株抗體及重組蛋白質，偵測急性 B 型肝炎、傳染性肝炎及肝硬化病人血清中的 HBx 及 anti-HBx，結果顯示，23 % 的病人呈現 HBx 陽性反應，而 anti-HBx 呈陽性反應的病人只有 14 %（Kumar *et al.*, 1998）。因此，X 蛋白質在感染者的表現與肝癌的發生有密切的關係，而 B 型肝炎病毒 X 蛋白質在感染者的表現，應可以作為肝癌診斷的參考指標（Wang *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1993）。HBx 蛋白質在血清中的表現，常伴隨著 HBe 抗原及 HBV DNA 的出現。有些慢性感染者的血清中，在病毒複製的高峰期過後，HBx 蛋白質的持續表現，可能是唯一可以被偵測，作為病毒在肝臟中，低量複製的標記（Feitelson *et al.*, 1990）。

另一方面，以人工合成 HBx 蛋白質的部分寡（Oligopeptide）作為抗原，以偵測肝癌病人血清中，抗 B 型肝炎病毒 X 蛋白質抗體（anti-HBx antibody）的結果顯示，肝癌病人有約 73%（8/11）呈陽性反應（Moriarty *et al.*, 1985）；另外的研究亦顯示，有 74 % 肝硬化帶

原者及 54 % 的肝癌帶原者，呈現 anti-HBx 陽性反應，同時 B 型肝炎病毒表面抗原（HBs）亦呈陽性反應（Vitvitski-Trépo *et al.*, 1990）。在慢性肝炎病人的血清中，比起急性或潛伏性帶原者，有較多量的抗 B 型肝炎病毒 X 抗體（Stemler *et al.*, 1990）。當以基因重組的接合蛋白質（Fusion protein）作為抗原，偵測肝癌病人血清中，抗 B 型肝炎病毒 X 抗原之抗體的結果顯示，只有 5 %（8/160）的肝癌病人呈陽性反應（Levreur *et al.*, 1990）。

這些研究顯示，X 蛋白質在感染者的表現與肝癌的發生有密切的關係。而過去對於肝炎病人及肝腫瘤病人血清中 X 抗體的分析，差異很大（Hess *et al.*, 1988；Levreur *et al.*, 1990；Moriarty *et al.*, 1985；Vitvitski-Trépo *et al.*, 1990）。因此，若以經過抗體分析，且純化過的 X 蛋白質，用來偵測血清中的 X 抗體，對於血清中 X 抗體的表現，將可以提供更進一步的說明。

本實驗室已利用穀胱（glutathione S-transferase gene fusion system）重組 B 型肝炎病毒 X 基因，將完整的 X 基因嵌入質體 pGEX-5X-1 中（附圖 3）後，送入大腸桿菌中，以乳糖類似物（IPTG），誘發表達 GST-X 接合蛋白質，並進一步純化 X 蛋白質，作為偵測 X 抗體之抗原。利用西方點墨轉漬法（Western blotting）偵測在 20 位肝腫瘤病人、20 位慢性肝炎病人、及 20 位正常人的血清中的 X 抗體；再以酵素連結免疫吸附檢測法（ELISA），偵測在肝腫瘤病人、慢性肝炎病人、及正常人的血清中 X 抗體之力價（titer）以探討 anti-HBx 抗體在肝癌病人血清中的表現情況。

材料與方法

一、 穀胱 轉 移 基

穀胱 轉 移 基 (glutathione S-transferase gene fusion system) , 是適用於表達基因、純化蛋白質及偵測蛋白質的完整系統 (附圖 3) 。本實驗中 , 利 用 穀 胱 轉 移 接合系統 , 在 pGEX-5X-1 質體的多重選殖區 (multiple cloning site) , 選 擇 適 當 的 限 制 性 鹵型肝炎病毒 ayw 亞型的 X 基因完整序列 , 而形成 GST-X 接合基因 , 並將重組質體以轉型作用 (transformation) 送入大腸桿菌 DH5 α 品系中。位在 GST 基因之前的 tac 啟動子 (tac promoter, Ptac) , 可利用乳糖類似物 Isopropyl - β -D-thiogalactoside (IPTG) 誘發 GST-X 接合蛋白質的大量表達。GST 蛋 白 質 與 穀 (glutathione) 具有親和性 , 利 用 穀 胱 (glutathione sepharose 4 B) 便可純化出 GST-X 接合蛋白質。多重選殖區中具有限制性蛋白質切割 (restriction protease) Factor Xa 的切割點 , 因此能將 GST-X 接合蛋白質進一步切割為 GST 蛋白質及 X 蛋白質 (Carmona *et al.*,1997; Smith and Johnson 1988) 。

二、 重組質體之正確性

本實驗室已建構並選殖完成 B 型肝炎病毒 ayw 亞型的 X 基因重組質體 (pGEX-5X-1-X) (Hwang and Wang, 1997)。其序列的正確性也已被確定 (黃, 1998)。序列的正確性則是以雙去氧法 (dideoxy nucleotide sequencing) 判讀重組質體的序列。所使用的引子 (primer) 位於 B 型肝炎病毒 ayw 亞型 X 基因第 1478 到第 1494 的位置, 其序列為 5'-GGGGACGAGAGAGTCCC-3' (快興科技股份有限公司)。

為了確定長期保存的重組質體的正確性, 分別以限制性內切 *EcoR1* 及 *BamH1* 切割重組質體, 再以 15 % 的聚丙烯醯胺凝膠電泳 (poly acrylamide gel electrophoresis), 在 1 倍濃度的 Tris-Borate-EDTA (TBE buffer) 緩衝液中進行核酸電泳分析。

三、 重組蛋白質的表達

將保存於 -80 , 含有重組質體的菌液取出, 培養於 Luria-bertani (LB) 洋菜膠上 (含 50 µg/ml ampicillin), 在 37 培養 12 小時 (Firstek Scientific S300) 將洋菜膠上的單一菌落, 轉移到 400 ml 的 LB 培養液中, 在 37 以 250 rpm 的速度震盪培養 12 小時後, 加入 450 µl, 0.1 M 的 Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG), 於 30 以 250 rpm 的速度震盪培養 5 小時, 誘發 GST-X

接合蛋白質大量表達。接著以 10000 rpm 的速度，在 4℃ 下離心 10 分鐘 (Sorvall T-21, SL-250T rotor)，收集細菌。將離心下來的細菌，溶於 10 ml 冰的 PBS 緩衝液中清洗，再次以 10000 rpm 的速度，在 4℃ 下離心 10 分鐘 (Sorvall T-21, SL-50T rotor)。收集細菌，溶於 6 ml 含有 100 µg/ml lysozyme 冰的 PBS 緩衝液中，冰浴 10 分鐘。加入最終濃度為 5 mM 的 Dithiothreitol (DTT) (reducing agent)，及溶於 PBS 的 10 % N-lauroylsarcosine (Sarkoyl)，使最終濃度為 1.5 %，混和均勻。在冰浴環境下，以超音波震盪擊碎器震盪 1 分鐘 (Heat system, Sonicator XL-2020)，之後加入溶於 PBS 的 10 % Triton X-100 (nonionic detergent) 使最終濃度為 2 %。混和均勻後，以 10000 rpm 的速度，在 4℃ 下離心 10 分鐘 (Sorvall T-21, SL-50T rotor)，收集上清液，此即為細菌均質液；保留 200µl 細菌均質液於 -20℃，其餘的進行 GST-X 接合蛋白質的純化。依相同的方法，誘發含有載體 pGEX-5X-1 的大腸桿菌，表達 GST 蛋白質。

四、 重組蛋白質的純化

取 1.33 ml 保存於 95 % 酒精溶液中的穀胱 (glutathione sepharose 4B)，以 500 g 的速度離心 5 分鐘。收集醱珠，加入 10 ml 冰的 PBS 緩衝溶液並混勻，以 500 g 的速度離心 5 分鐘。收集醱珠，並加入 1 ml 冰的 PBS 緩衝溶液，使醱

珠和 PBS 緩衝溶液的最終比例為 1:1。

將細菌均質液與準備好的醣珠溶液混和均勻，在 4℃ 搖晃，反應 12 小時。之後，以 500 g 的速度離心 5 分鐘，收集醣珠，並加入 10 ml 冰的 PBS 緩衝溶液，清洗醣珠 4 次。此時 GST-X 接合蛋白質已附著於醣珠上，可 (restriction protease) Factor Xa 的切割，分離 GST 與 X 蛋白質，或是繼續進行接合蛋白質的純化；將醣珠與 1.6 ml 的 elution buffer 混勻，在 4℃ 搖晃，反應 12 小時，再以 500 g 的速度離心 5 分鐘，收集上清液，此時 GST-X 接合蛋白質已存於液態中。測量蛋白質濃度，並保存於-20℃。

五、 Factor Xa 切割 GST-X 重組蛋白質

取接有 GST-X 接合蛋白質的醣珠 1ml, 以 10 ml 的 factor Xa 蛋白質切割 (factor Xa cleavage buffer) 清洗，在 500 g 的速度下離心 5 分鐘，收集醣珠。將 1 ml 的 factor Xa 蛋白質切割緩衝 1 ml 醣珠中，並加入 10 μg 的 factor Xa 蛋白質 (Boehringer mannheim)，混勻後置於 4℃ 搖晃，反應 12 小時。之後以 500 g 的速度離心 5 分鐘，收集上清液，X 蛋白質即存於其中，而 GST 蛋白質仍留在醣珠上。

六、 蛋白質濃度測定

利用雙辛可寧酸 (Bicinchoninic acid, BCA) 蛋白質分析試劑，測定蛋白質的濃度。由於在鹼性環境下 Cu^{2+} 會被蛋白質還原成為 Cu^+ ，而雙辛可寧酸 (Bicinchoninic acid) 與 Cu^+ 反應會產生紫色的化合物。此紫色化合物的量與其在波長 562nm 的吸光值呈線性關係，利用掃描光譜儀 (DU[®] 648 Spectrophotometer, Beckman) 測量其在波長 562nm 的吸光值，即可測得蛋白質濃度 (Smith *et al.*, 1985)。

七、 蛋白質電泳分析 (SDS-PAGE)

經過純化的 X 蛋白質，以 13% 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecylsulfate poly acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 系統進行分析。配置 0.75mm 厚的 discontinuous acrylamide gel，膠體分為兩層，分別為 13% 的下層 running gel，及 5% 的上層 stacking gel。配置完成的膠片置入電泳槽中，加入適量的電泳緩衝液。定量的蛋白質樣品與等體積的 loading buffer 混和，於沸水中水浴 2 分鐘，置於冰上冷卻。依序將蛋白質樣品及標準分子量蛋白質 (protein standard, low range, Biorad) 注入膠片的樣品槽中。開始時通以 10 Volt/cm 電壓，待 loading buffer 進入 running gel 後，提高電壓至 15 Volt/cm，直到 loading buffer

跑到膠片底部為止。

另外，依同樣的方法，準備單一樣品槽（single well）的膠片，以相同的方式，分析 X 蛋白質，以作為篩選病人血清樣品的準備。

八、 西方點墨轉漬法（Western blotting）

剪裁適當大小的硝酸纖維膜（nitrocellulose membrane, Pharmacia Biotech.），及四片等大的濾紙，以轉移緩衝溶液（transfer buffer）浸濕。將跑完電泳的膠片取下，去掉 stacking gel 後，浸泡於轉移緩衝溶液中約 5 分鐘。利用半乾式轉漬儀（Trans-Blot[®] SD, Semi-Dry Transfer Cell, Biorad），將蛋白質從電泳膠轉移至硝酸纖維膜上。依序在正極板上，將兩張濾紙、硝酸纖維膜、電泳膠、及兩張濾紙疊成夾層狀（sandwich），蓋上陰極板及安全蓋，以 20 Volt. 的電壓進行蛋白質轉移 20 分鐘。

轉移完成的硝酸纖維膜，以含有 3% 小牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）的 TBST 緩衝溶液，反應 30 分鐘，將膜上其他未被蛋白質結合的部位填滿，以免產生抗體非專一性結合的情形。再以 TBST 緩衝溶液，清洗 3 次，每次各 10 分鐘。加入以 TBST 緩衝溶液稀釋 1000 倍的一級抗體，在室溫下反應 30 分鐘，之後以 TBST 緩衝溶液，清洗 3 次，每次各 10 分鐘。再加入以 TBST 緩衝溶液稀釋 3000 倍的二級抗體（Goat

anti-mouse Horseradish peroxidase-conjugated IgG, ZYMED Laboratories, Inc.), 在室溫下反應 30 分鐘, 之後以 TBST 緩衝溶液, 清洗 3 次, 每次各 10 分鐘。由於二級抗體上接有 alkaline phosphatase 顯色, 在加入 (color development solution) 後即可顯色。

為了偵測肝癌病人血清中, 抗 X 蛋白質抗體, 將單一樣品槽 (single well) 膠片上的蛋白質, 轉移到硝酸纖維膜後, 切割硝酸纖維膜成為寬度約 0.5 公分的長條狀。依上述步驟, 依序將硝酸纖維膜分別與所測試的血清 (1:500 稀釋) 及二級抗體 (1:1000) (Goat anti-human Alkaline phosphatase-conjugated IgG, ZYMED Laboratories, Inc.) 反應, 經過顯色, 以去離子水終止呈色反應。

九、 酵素連結免疫吸附檢測法 (ELISA)

取定量蛋白質加入 100 μ l 的 coating buffer 中, 在 4 環境下放置 12 小時, 使蛋白質吸附在 polyvinyl plate (Immulon II, Dynatech Lab. Inc.) 上。以 PBST 緩衝溶液沖洗四次, 再加入含有 3% 小牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的 PBST 緩衝溶液 200 μ l, 在室溫下反應 30 分鐘, 將 polyvinyl plate 上其他未被蛋白質結合的部位覆蓋, 之後再以 PBST 緩衝溶液 200 μ l 沖洗二次。加入病人血清稀釋的一級抗體 100 μ l, 在室溫下反應 30 分鐘後, 以 PBST 緩衝溶液 200 μ l 沖洗四次, 之後加入特定稀

釋比例的二級抗體 (Goat anti-human Horseradish peroxidase-conjugated IgG, ZYMED Laboratories, Inc.) 100 μ l , 在室溫下反應 30 分鐘 , 再以 PBST 緩衝溶液 200 μ l 沖洗四次。二級抗體上接有辣 (horseradish peroxidase, HRP), 加入 100 μ l 的 OPD (O-phenylenediamine substrate : 一片 OPD 藥片 (180 mg), 溶於 12 ml 的 HRP buffer 中) 受質溶液後 , 即可顯色。以 ELISA 讀取儀 , 得到樣品在波長 490 nm 下的吸光值。

十、 統計分析

針對 ELISA 測試得到的數值 , 以統計學上多重比較法中的 Tukey test (Steel *et al.*, 1997) , 比較來自肝癌病人、慢性肝炎病人及正常人三群數據之間是否有差異。

結果

利用穀胱 轉移基 glutathione S-transferase gene fusion system) , 將 B 型肝炎病毒 X 基因嵌入質體 pGEX-5X-1 中 (附圖 3) , 經過轉化作用 (transformation) 送入大腸桿菌 DH5 α 品系後 , 再以乳糖類似物 (IPTG) , 誘發 GST-X 接合蛋白質表達 , 並進一步純化 X 蛋白質 , 作為偵測 X 抗體之抗原。利用單株抗體 , 以西方點墨轉漬法 (Western blotting) , 確定了表達重組蛋白質的正確性之後 , 以純化的 X 蛋白質偵測在 20 位肝腫瘤病人、20 位慢性肝炎病人、及 20 位正常人血清中的 X 抗體; 再以酵素連結免疫吸附檢測法 (ELISA) , 偵測與前述相同的血清樣品中的 X 抗體之力價 (titer) , 以探討 X 抗體在肝炎及肝腫瘤病人血清中的表現情況。

純化的 B 型肝炎病毒 X 基因重組質體 (pGEX-5X-1-X) , 分別經過 限制 性 內 切 (restriction enzyme) , *EcoR*1 及 *Bam*H1 的作用 , 再以 15 % 聚丙烯醯胺核酸電泳分析 , 得到如 Fig. 1. 的結果。限制性內切 *EcoR*1 切割的重組質體 , 產生的片段為 0.5 kb 及 4.9 kb 的 DNA 片段; 限 制 性 內 切 *Bam*H1 切割的重組質體 , 產生的片段為 40 bp 及約 5.4 kb 的 DNA 片段。此結果說明了重組質體的正確性。

確定重組質體的正確性後 , 以 IPTG 誘發含有重組質體的大腸桿菌 , 表達接合蛋白質 GST-X。經過穀胱 瓊 脂 醣 珠 糖 酶 (factor Xa 蛋白質切割作用後) 的十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (sodium dodecylsulfate poly acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 系統進行分析 , 得到的結果如 Fig. 2-A ;

圖中可見，GST-X 接合蛋白質的分子量為 43 kD，GST 蛋白質的分子量為 26 kD 而 X 蛋白質的分子量為 17 kD。以 X 單株抗體（MAb 8419, Chemicon, Inc.），進行西方點墨法分析，結果如 Fig. 2-B；X 單株抗體，可辨識 GST-X 接合蛋白質及 X 蛋白質，但對於 GST 蛋白質則無結合反應，說明了表達的 GST-X 接合蛋白質及 X 蛋白質，可被單株抗體辨識的特性。

將純化的 X 蛋白質，經過 13% 的十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳（sodium dodecylsulfate poly acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）系統分離，再將蛋白質轉移至硝酸纖維膜上。將硝酸纖維膜剪裁成寬度約 0.5 公分的長條，每條硝酸纖維膜上的蛋白質量約為 30 μ g。分別將 20 位肝癌病人，20 位慢性肝炎病人，及 20 位正常人的血清，稀釋 500 倍後，與含有 X 蛋白質的硝酸纖維膜反應，進行西方點墨法分析。得到的結果如 Fig. 3.; 20 位肝癌病人的血清中，90 % 明顯含有 X 抗體，而 20 位慢性肝炎病人的血清，只有一位為陽性反應（no. 9），而 20 位正常人的血清則皆為陰性反應。顯示肝癌病人的血清中，含有較高力價的 X 抗體。其中肝癌病人第 8 號的血清，與 X 抗原反應最強，顯示其血清中應含有高量的 X 抗體。而此病人的血清，將可作為辨識 X 蛋白質，且來自人類的血清抗體（Human anti-human IgG）。

將純化的 X 蛋白質，與相同的血清樣品，進行 ELISA 分析後，以 Tukey test 進行統計分析（ $p < 0.05$ ），得到的結果如 Fig. 4。結果顯示，肝癌病人的血清中，X 抗體的力價，顯著高於正常人及慢性肝炎病人；然而慢性肝炎病人 X 抗體的力價，並未高於正常人。

綜合前述結果，本實驗室所表達並純化的 X 蛋白質，經過免疫抗體的測試後，作為抗原，偵測病人血清中的 X 抗體，顯示在肝腫瘤病人的血清中，X 抗體的力價，顯著高於正常人及慢性肝炎病人。

討論

本實驗室所表達並純化的 X 蛋白質，經過免疫定性分析後，確實可被 X 單株抗體及兔子的多株抗體辨識（結果未列）。以純化的 X 蛋白質，在測試病人血清 X 抗體的結果，也顯示了顯著差異。因此，應用此純化的 X 蛋白質，分析肝癌病人血清中，X 抗體的表現量，可提供更確切的說明。

實驗結果顯示，純化的重組質體，分別以限制性內切酶 *EcoR1* 及 *BamH1* 切割後，*EcoR1* 切割的重組質體，得到約 4.9kb 及 500 bp 大小的片段。而 *BamH1* 切割的重組質體，得到的片段約 40 bp。因此，可以確定重組質體中，嵌入的 B 型肝炎病毒 X 基因，其大小與方向是正確的（in frame）。

誘發表達的接合蛋白質（GST-X）方面，SDS-PAGE 及西方點墨法分析的結果顯示，43 kD 的 GST-X 接合蛋白質，及 factor Xa 切割下來，17 kD 的 X 蛋白質，均可被 X 單株抗體辨識，而 GST 蛋白質並未被單株抗體辨識。因此，說明了接合蛋白質的正確性。

本實驗所表達的基因重組 X 蛋白質，雖然在蛋白質的胺基端，較原始的 X 蛋白質多了 5 個胺基酸，但其在結構及等電點的特性上仍相當接近（Hwang and Wang, 1997）。SDS-PAGE 結果發現，經過 factor Xa 切割過的 GST-X 接合蛋白質，雖然可以分離成 GST 蛋白質和 X 蛋白質，但切割下來的 X 蛋白質仍然留在醣珠上。此推論可由 elute 的上清液不含有 X 蛋白質，但醣珠上卻含有 X 蛋白質說明。對於此現象，目前仍無合理解釋，可能是 X 蛋白質的結構，與 GST 蛋

白質被醣珠結合的部位，具相似性，因此被切割下來的 X 蛋白質仍會黏附在醣珠上。

利用純化的 X 蛋白質，以西方點墨法，進行血清中抗 X 蛋白質抗體的偵測，分別分析 20 位肝癌病人，20 位慢性肝炎病人，及 20 位正常人的血清樣本。結果顯示，肝癌病人的血清中，X 抗體的力價 (titer)，明顯高於正常人及慢性肝炎病人。因此，肝癌病人的血清中，X 抗體的量，與正常人有顯著的差異。實驗過程中發現，樣品血清也會與 GST 蛋白質反應，顯示血清中應該含有抗 GST 蛋白質抗體。抗 GST 蛋白質抗體，會造成篩檢血清樣品時的干擾，而無法正確的檢測 anti-X 抗體 (Cartwright *et al.*, 1995)。因此，不適合以接有 GST 的接合蛋白質做為抗原，進行 X 抗體的偵測。實驗中曾經以 GST-X 接合蛋白質作為抗原，進行血清中 X 抗體的偵測，結果在肝癌病人與正常人並無差異 (結果未列)。當以 factor Xa 切割 GST-X 接合蛋白質產生的 X 蛋白質做為抗原，測試血清樣品，可明顯區別肝癌病人的血清中，X 抗體的量，與正常人有明顯的差異。因此，在較純的 X 蛋白質的存在下，能較直接的測試到 X 抗體。由於 GST-X 接合蛋白質，被 factor Xa 切割的效率偏低，不易累積足夠量的 X 蛋白質進行實驗。而先前的研究亦顯示，以 thrombin 切割 GST-X 蛋白質的效率亦偏低 (Park *et al.*, 2000)。因此，如何利用重組 DNA 技術，表達不需要接合蛋白質，就能進行純化的 X 蛋白質，將有其必要性。

過去的文獻顯示，以不同的 X 接合蛋白質 (fusion protein)，或是合成 X 蛋白質的部分寡 (oligopeptide)，偵測 X 抗體在肝炎及肝癌病人血清的表現，不同作者的結果，有很大的差異 (Elfassi *et al.*,

1986; Kumar *et al.*, 1998; Levreor *et al.*, 1991; Moriarty *et al.*, 1985; Vitvitski-Trépo *et al.*, 1990) , 此結果可能是由於所使用的抗原型式的不同所致。但在先前的研究中, 使用接合蛋白質 (fusion protein) , 偵測肝炎及肝癌病人血清的結果, X 抗體正反應的比例均明顯偏低; 而使用寡 的結果則顯示, 肝癌病人血清中 X 抗體正反應的比例, 顯著高於肝炎病人。因此, 以重組的完整 (full length) X 抗原, 用來偵測肝炎及肝癌病人血清中 X 抗體的結果, 較具有意義, 而接合蛋白質的部分, 可能會造成偵測 X 抗體時的干擾 (Cartwright *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2000)。

本實驗的結果, 顯示以大腸桿菌所表達的重組 X 蛋白質, 可有效的被血清中的 X 抗體辨識。在分別以人類胚胎細胞株 (human embryo cell line) 與大腸桿菌 (*E. coli*) , 所表達的 X 蛋白質, 偵測血清中 X 抗體的結果顯示, 原核細胞所表達的 X 蛋白質, 被抗體辨識的效果較佳 (Levreor *et al.*, 1991)。

檢測 20 位慢性肝炎病人的血清中, B 型肝炎病毒 DNA (HBV DNA) (Digene Hybrid Capture™ System, HBV DNA Assay) 的結果 (附表 1.), 顯示 X 抗體表現量較高的 9 號病人, B 型肝炎病毒 DNA 的量亦相對較多, 說明慢性肝炎病人 9 號的血清中有較多量的病毒。在偵測肝癌病人肝組織中, X mRNA 的研究顯示, HBsAg 呈陰性反應的患者, X mRNA 的出現, 也許可以是肝癌發展的參考指標 (Kobayashi *et al.*, 1997)。而 X 抗體在血清中的表現, 常與病毒複製標記 (HBsAg, HBcAg) 的表現一致 (Feitelson and Clayton, 1990; Levreor *et al.*, 1991)。然而 X 抗體在血清中的表現, 在 B 型肝炎病毒

複製過程的意義，仍有待進一步的探討。

在本實驗中，以經過免疫定性分析，並純化的完整 X 蛋白質作為抗原，偵測肝癌及肝炎病人及正常人血清中 X 抗體的結果，顯示肝癌病人血清中具有較高力價（titer）的 X 抗體。然而，比較 B 型肝炎病毒的其他分子標記，例如：anti-HBe 抗體，X 抗體的力價仍然很低（Hwang *et al.*, 1999）。因此，X 抗體在 B 型肝炎病毒感染者血清中的表現，是否可作為診斷的參考指標，仍有待進一步了解 X 抗原在肝臟組織中的表現，及 X 抗原及其抗體的出現，在病毒感染發展過程中所代表的意義，而提供說明。

參考文獻

- 丁令白。1985。B 型肝炎病毒與肝癌。科學月刊。15 (10) : 798-801。
- 丁令白。1995。B 型肝炎病毒深度報導。科學月刊。26 (10) : 805-808。
- 黃俐梅。1998。重組 B 型肝炎病毒 X 抗原之免疫定性。私立東海大學生物學碩士論文。
- Balsano C, Billet O, Bennoun M, Cavard C, Zider A, Grimber G, Natoli G, Briand P, Levrero M. 1994. Hepatitis B Virus X Gene Product Acts as a Transactivator *in vivo*. J Hepatol 21:103-109.
- Bressac B, Gakvin KM, Liang TJ, Isselbacher KJ, Wands JR, Ozturk M. 1990. Abnormal Structure and Expression of p53 Gene in Human Hepatocellular Carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 87:1973-1977.
- Carmona S, Prinz W, Arbuthnot P. 1997. Simplified ELISA for Detecting Antibodies to Recombinant Fusion Proteins. BioTechniques 23:627-630.
- Cartwright GA, Rothel JS, Lightowlers MW. 1995. Conventional Immuno-assays Underestimate anti-GST Antibody Titre. J Immunol Methods 179:31-35.
- Collier L, and Oxford J. 1993. Human Virology. Oxford University Press, New York. pp251-267.
- Cromlish JA. 1996. Hepatitis B Virus-induced Hepatocellular Carcinoma: possible roles for HBx. Trends Microbiol 4(7):270-274.
- Elfassi EE, Haseltine WA, Dienstag JL. 1986. Detection of Hepatitis B

- Virus X Product Using an Open Reading Frame *Escherichia coli* Expression Vector. Proc Natl Acad Sci USA 83:2219-2222.
- Feitelson MA, and Clayton MM. 1990. X Antigen Polypeptides in the Sera of Hepatitis B Virus–Infected Patients. Virology 177:367-371.
- Feitelson MA, Clayton MM, Blumberg BS. 1990. X Antigene/Antibody Markers in Hepadnavirus Infections. Gastroenterology 98:1071-1078.
- Feitelson MA, and Duan LX. 1997. Hepatitis B Virus X Antigen in the Pathogenesis of Chronic Infections and the Development of Hepatocellular Carcinoma. Am J Pathol 150(4):1141-1157.
- Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. 1979. Nucleotide Sequence of the Hepatitis B Virus Genome (subtype ayw) Cloned in *E.coli*. Nature 281:646-650.
- Hess J, Stemler M, Will H, Schröder CH, Kühn J, Braun R. 1988. Frequent Detection of Antibodies to Hepatitis B Virus X Protein in Acute, Chronic and Resolved Infection. Med Microbiol Immunol 177:195-205.
- Hwang GY and Wang YH. 1997. Heterologous Expression of the Hepatitis B Virus X Antigen. Tunghai J 38:197-208.
- Hwang GY, Wang JC, Wu CC. 1999. Immunological Characterization of Two Major Secreted Forms of Recombinant Hepatitis B Virus e Antigens. Virus Res 59:203-210.
- Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. 1991. HBx Gene of

- Hepatitis B Virus Induces Liver Cancer in Transgenic Mice. *Nature* 351:317-320.
- Kobayashi A, Saigoh K-i, Urashima T, Asano T, Isono K. 1997. Detection of Hepatitis B Virus X Transcripts in Human Hepatocellular Carcinoma Tissues. *J Surg Res* 73:97-100.
- Koike K, Moriya K, Iino S, Yotsuyanagi H, Endo Y, Miyamura T, Kurokawa K. 1994. High-level Expression of Hepatitis B Virus HBx Gene and Hepatocarcinogenesis in Transgenic Mice. *Hepatology* 19:810-819.
- Koike K, and Takada S. 1995. Biochemistry and Functions of Hepatitis B Virus X Protein. *Intervirology* 38:89-99.
- Kumar V, Jayasuryan N, Reddi H, Sahal D, Panada SK. 1998. A Monoclonal Antibody Against the X Protein of Hepatitis B Virus: Fine mapping of its epitope and application in a quantitative ELISA of the X protein in sera of hepatitis B patients. *Hybridoma* 17(2):157-164.
- Levreur M, Jean-Jean O, Balsano C, Will H, Perricaudet M. 1990. Hepatitis B Virus (HBV) X Gene Expression in Human Cells and anti-HBx Antibodies Detection in Chronic HBV Infection. *Virology* 174:299-304.
- Levreur M, Stemler M, Pasquinelli C, Alberti A, Jean-Jean O, Franco A, Balsano C, Diop D, Brechot C, Melegari M, Villa E, Barnaba V, Perricaudet M, Will H. 1991. Significance of anti-HBx Antibodies in

- Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology* 13(1):143-149.
- Marion PL, Oshiro LS, Regnery DC, Scullard GH, Robinson WS. 1980. A Virus in Beechey Ground Squirrels that is Related to Hepatitis B Virus of Humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(5):2941-2945.
- Mason WS, Seal G, Summers J. 1980. Virus of Pekin Ducks with Structural and Biological Relatedness to Human Hepatitis B Virus. *J Virol* 62:3832-3839.
- Moriarty AM, Alexander H, Lerner RA. 1985. Antibodies to Peptides Detect New Hepatitis B Antigen: serological correlation with hepatocellular carcinoma. *Science* 227:429-433.
- Murakami S. 1999. Hepatitis B Virus X Protein: Structure, Function, and Biology. *Intervirology* 42:81-99.
- Nakatake H, Chisaka O, Yamamoto S, Matsubara K, Koshy R. 1993. Effect of X Protein on Transactivation of Hepatitis B Virus Promoters and on Viral Replication. *Virology* 195:305-314.
- Park OY, Jin YH, Lee M, Shin HJ, Kim HI, Cho H, Yun CW, Youn JK, Park S. 2000. Characterization and Gene Cloning of Monoclonal Antibody Specific for the Hepatitis B Virus X Protein. *Hybridoma* 19(1):73-80.
- Smith DB, and Johnson KS. 1988. Single-step Purification of Polypeptides Expressed in *Escherichia coli* as Fusion with glutathione S-transferase. *Gene* 67:31-40.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH,

- Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- Stack G and Bove JR. Hepatitis Virus. In: Hsiung GD, Fong CKY, Landry ML. 1994. *Diagnostic Virology*. New Haven and London: Yale University, Inc. p 301-314.
- Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA, editors. 1997. *Principles and Procedures of Statistics*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, Inc. 191 p.
- Stemler M, Weimer T, Tu ZX, Wan DF, Levrero M, Jung C, Pape GR, Will H. 1990. Mapping of B-cell Epitopes of the Human Hepatitis B Virus X Protein. *J Virol* 64(6):2802-2809.
- Summers J, Smolec JM, Snyder R. 1978. A Virus Similar to Human Hepatitis B Virus Associated with Hepatitis and Hepatoma in Woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(9):4533-4537.
- Tiollais P, and Buendia MA. 1991. Hepatitis B virus. *Sci Am* 264:116-120.
- Twu JS, Chu K, Robinson WS. 1989. Hepatitis B Virus X Gene Activates kappa B-like Sequence in the Long Terminal Repeat of Human Immunodeficiency Virus 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5168-5172.
- Twu JS, Lai MY, Chen DH, Robinson WS. 1993. Activation of Protooncogene C-jun by the X Protein of Hepatitis B Virus. *Virology* 192:346-350.

- Vitvitski-Trépo L, Kay A, Pichoud C, Chevallier P, de Dinechin S, Shamooun B-M, Mandart E, Trépo C, Galibert F. 1990. Early and Frequent Detection of HBxAg and/or anti-HBx in Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology* 12:1278-1283.
- Wang W, London WT, Lega L, Feitelson MA. 1991. HBxAg in the liver from Carrier Patients with Chronic Hepatitis and Cirrhosis. *Hepatology* 14:29-37.
- Yeh CT. 2000. Hepatitis B virus X protein: Searching for a role in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol hepatol* 15:339-341.
- Yen TSB. 1996. Hepadnaviral X Protein: Review of Recent Progress. *J Biomed Sci* 3:20-30.
- Yu DY, Moon HB, Son JK, Jeong S, Yu SL, Yoon H, Han YM, Lee CS, Park JS, Lee CH, Hyun BH, Murakami S, Lee KK. 1999. Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Transgenic Mice Expressing the Hepatitis B Virus X-protein. *J Hepatol* 31:123-132.
- Zentgraf H, Herrmann G, Kelin R, Schranz P, Loncarevic I, Herrmann D, Hubner K, Schroder CH. 1990. Mouse Monoclonal Antibody Directed Against Hepatitis B Virus X Protein Synthesized in *Escherichia coli*: detection of reactive antigen in liver cell carcinoma and chronic hepatitis. *Oncology* 47:143-148.
- Zhu M, London WT, Duan LX, Feitelson MA. 1993. The Value of Hepatitis B X Antigen as a Prognostic Marker in the Development of Hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 55:571-576.

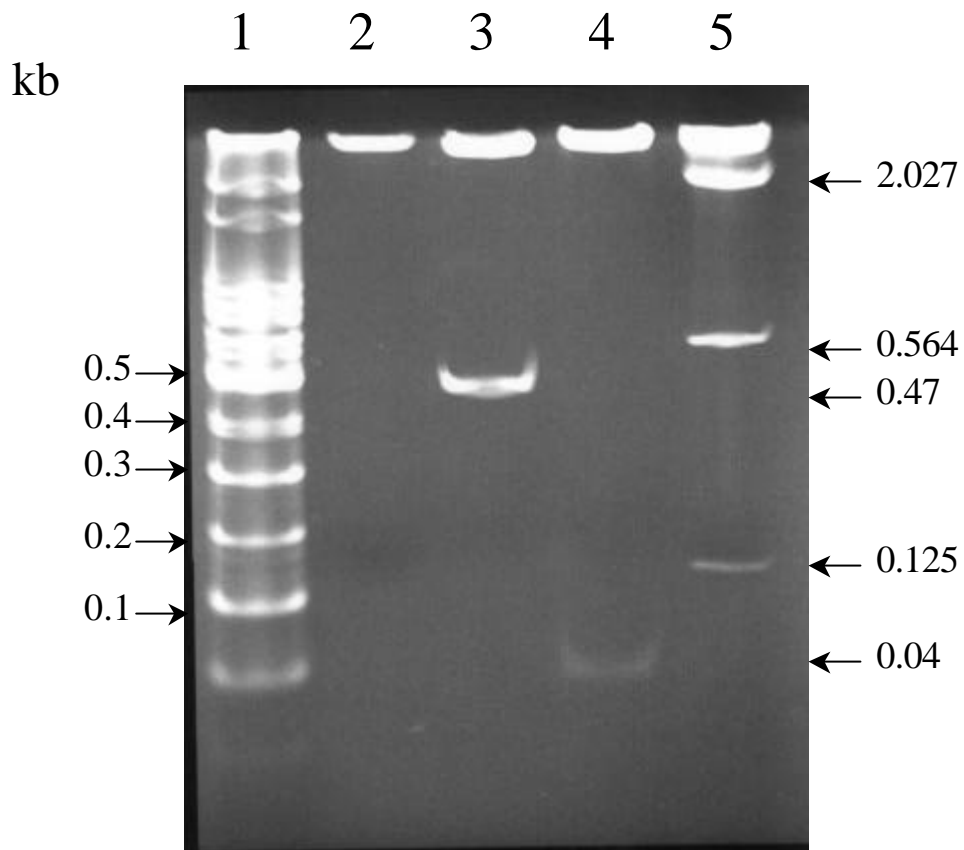


Fig.1. 重組質體 pGEX-5X-1-X 經過 限制 性 *Eco*R1 及 *Bam*H1 切割後，以 15 % 聚丙烯醯胺凝膠電泳 (poly acrylamide gel electrophoresis) 分析的結果。1: DNA 標準分子量; Lane 2: 未經切割的重組質體，分子量約 5.4 kb; Lane 3: 以 限制 性 *Eco*R1 切割過的重組質體，產生約 4.9 kb 的載體 (vector)，以及 0.5 kb 嵌入的 X 基因片段; Lane 4: 以 限制 性 *Bam*H1 切割的重組質體，除了載體以外，產生約 40 bp 的片段; Lane 5: DNA 標準分子量, lambda DNA/*Hind*III digest。

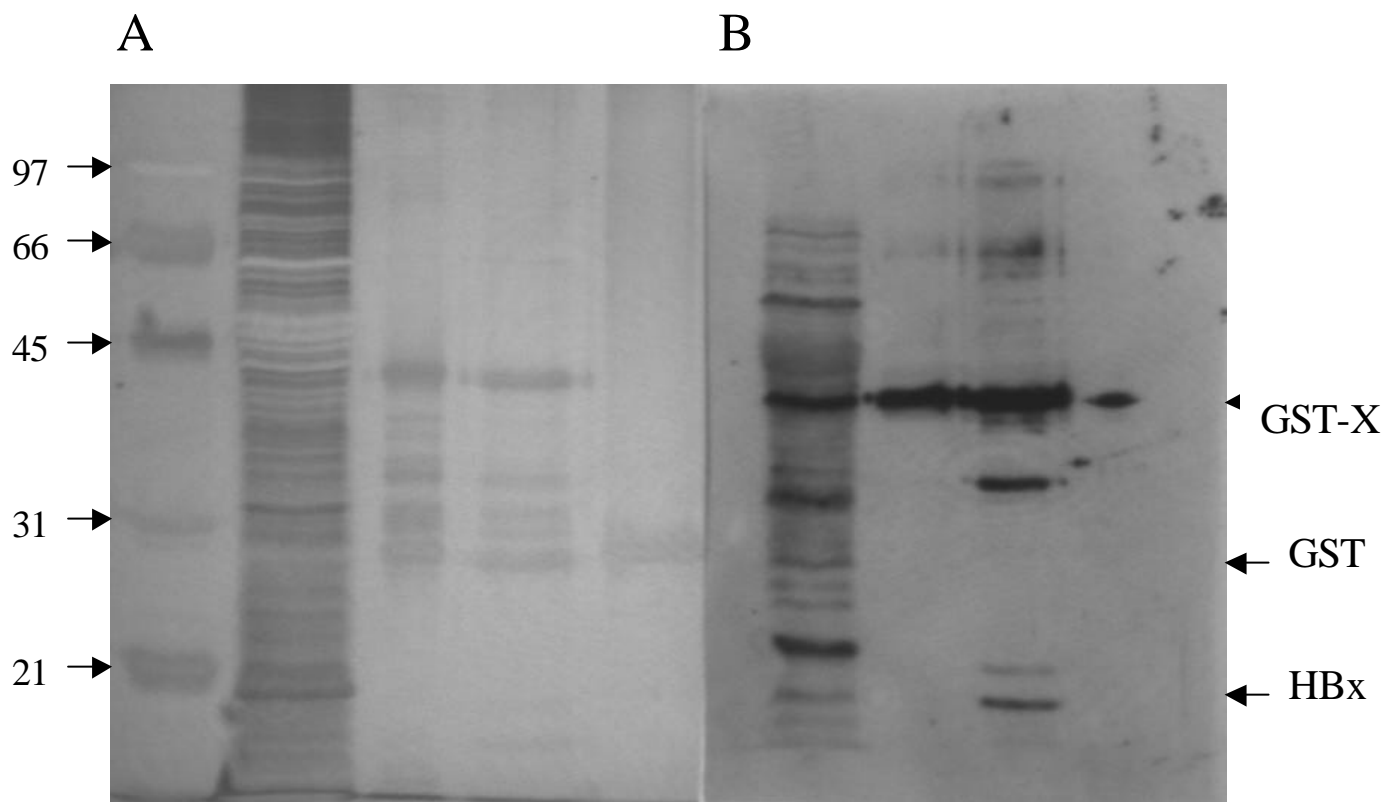


Fig. 2 (A)以 IPTG 誘發重組質體表達的 GST-X 接合蛋白質，經過純化以及 factor Xa 切割後，以 13 % SDS-PAGE 分析的結果；(B)將電泳膠上的蛋白質，轉漬到硝酸纖維膜上，再以 anti-X 單株抗體測試。M: 蛋白質標準分子量; Lane 1: 細菌均質液; Lane 2: 與醣珠結合的 GST-X 接合蛋白質，分子量約 43 kD; Lane 3: factor Xa 切割過的 GST-X 接合蛋白質，產生 26 kD 的 GST 蛋白質及 17 kD 的 X 蛋白質。Lane 4: GST 蛋白質。

Fig. 3 利用西方點墨法 (Western Blotting) , 以 HBx 蛋白質作為抗原 , 偵測肝癌病人、慢性肝炎病人、及正常人的血清中 , anti-HBx 抗體的結果。P: 與單珠抗體反應的結果。(A) 20 位肝癌病人的血清 , 與 HBx 蛋白質反應的結果; (B) 20 位慢性肝炎病人的血清 , 與 HBx 蛋白質反應的結果 (C) 20 位正常人的血清 , 與 HBx 蛋白質反應的結果。在肝癌病人的血清中 , 90 % (18/20) 有 anti-HBx 反應 , 慢性肝炎病人的血清僅一位 (no.9) 有抗體反應 , 而正常人的血清則全無 anti-HBx 反應。

Fig. 4 利用酵素連結免疫吸附檢測法 (ELISA), 以 HBx 蛋白質作為抗原, 分別分析 20 位肝癌病人的血清, 20 位慢性肝炎病人的血清, 及 20 位正常人的血清中 anti-HBx 抗體。結果顯示, 肝癌病人的血清中, anti-HBx 抗體的力價 (titer) 顯著高於正常人及慢性肝炎病人。

附錄

蛋白質表達及純化

LB medium (broth)

For 1 liter (pH 7.0):

Bacto-tryptone	-10 g
Bacto-yeast extract	-5 g
NaCl	-10 g
d.d.H ₂ O	-q.s

PBS (for GST gene fusion system) (pH 7.3)

140 mM NaCl	
2.7 mM KCl	
10 mM Na ₂ HPO ₄	
1.8 mM KH ₂ PO ₄	
d.d.H ₂ O	q.s

Glutathione elution buffer

20 mM reduced glutathione	
100 mM Tris-HCl (pH 8.0)	
120 mM NaCl	

Factor Xa cleavage buffer

50 mM of Tris-HCl (pH 7.5)	
150 mM of NaCl	
1mM of CaCl ₂	
d.d.H ₂ O	q.s

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

30 % acrylamide mix

For 100 ml:

acrylamide	30 g
Bis (N, N' -methylene-bis-acrylamide)	0.75 g
H ₂ O	q.s

13 % acrylamide gel

Running gel : 0.75mm x 2 gels

H ₂ O	3.0 ml
30 % acrylamide mix	4.33 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml
10 % SDS	0.1 ml
10 % ammonium persulfate	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

Stacking gel: 0.75mm x 2 gels

H ₂ O	2.1 ml
30 % acrylamide mix	0.5 ml
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.38 ml
10 % SDS	0.03 ml
10 % ammonium persulfate	0.03 ml
TEMED	0.003 ml

6X sample loading buffer

0.35 M of Tris-HCl (pH 6.8)

10.28 % of SDS

36 % of glycerol

0.6 M of dithiothreitol (or 5 % of β -mercaptoethanol)

0.012 % of bromophenol blue

10X SDS-PAGE Running buffer

For 1 liter:

Tris-Base	30.3 g
glycine	144 g
SDS	10 g
d.d.H ₂ O	q.s

Coomassie Brilliant Blue

For 100 ml:

Coomassie Brilliant Blue	0.25 g
methanol	45 ml
acetic acid	10 ml

Western blotting

Transfer buffer

39 mM Glycine
48 mM Tris-base
0.037 % of SDS
20 % of methanol
d.d.H₂O q.s

TBST (Tris buffered Saline + Tween 20)

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
150 mM NaCl
0.05 % Tween 20

AP buffer (Alkaline phosphatase buffer)

100 mM Tris-HCl (pH 9.5)
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂

Substrate of alkaline phosphatase (AP substrate)

66 µl NBT + 33 µl BCIP in 10 ml AP buffer

NBT

50 mg nitroblue tetrazolium / 1 ml 70 % dimethylformamide
* keep in the dark

BCIP

50 mg 5-bromo-4 chloro-3-indoyl phosphate / 1 ml dimethylformamide
* keep in the dark

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

ELISA coating buffer

10 mM of Na₂CO₃ (pH 9.6)
store at 4

10X PBS-T (Phosphate buffered saline-Tween 20)

For 1 liter:

NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	2.03 g
Na ₂ HPO ₄	11.49 g
NaCl	85 g
Tween 20	5 ml

PBS-T (pH 7.3-7.5)

For 1 liter:

10X PBS-T	100 ml
dH ₂ O	900 ml

HRP buffer (Citrate-phosphate buffer) (pH 5.0)

citric acid (monohydrate)	10.30 g
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	18.16 g
30 % hydrogen peroxide	1 ml
d.d.H ₂ O	q.s

total volume in 1 liter.

OPD substrate

Dissolve each tablet of OPD with 12 ml of HRP buffer.

* Prepare fresh and keep in the dark.

個人基本資料:

姓名: 林壯宇

出生日期: 1977 年 07 月 02 日

出生地: 台灣省花蓮縣

戶籍地址: 高雄市苓雅區林南街 21-3 號

學歷:

東海大學生物學研究所碩士

東海大學生物學系學士

台灣省立鳳山高級中學

經歷:

東海大學生物學系分子生物學實驗室研究助理

東海大學生物學系遺傳學實驗助教

東海大學生物學系分子生物學實驗助教

第七屆細胞及分子生物新知研討會(1999 墾丁冬令營)論文壁報展示

第八屆細胞及分子生物新知研討會(2000 墾丁冬令營)

第十六屆 (九十年度) 生物醫學聯合學術年會論文壁報展示

第一屆國際染色體著絲點研討會(First International Conference on

Mammalian Centromere 1999)

2001 年組織工程國際研討會(International Symposium on Tissue Engineering

2001)