

第三章、材料與方法

第一節、常用藥品與試劑配製

一、化學藥品

Fetal Bovine Serum (FBS)購自美國 Biological industries 公司。bromophenol blue、購自美國 Bio Rad 公司。Bovine Serum Albumin (BSA)、Glycerol、Tween 20、Trizma base、NaCl、 Na_2HPO_4 、Coomassie blue購自美國 Sigma 公司。M-PER (mammalian protein extraction reagent) 購自美國 PIERCE 公司。一級抗體 anti-erbB2、anti-Bcl-2、anti-Bax、anti-Actin皆購自英國 abcam 公司、一級抗體 anti-Grb2購自英國 Abcam公司。二級抗體 anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase conjugated antibody 購自英國 Abcam公司。DMEM Medium 購自美國 Gibco 公司。DMSO、 KH_2PO_4 、KCl、methanol、acetic acid、Doxorubicin購自德國 Merck 公司。

二、試劑配製

Western blot

1. TBST buffer :

0.1 M Tris- base, 0.2M NaCl, 1% Tween20 in deionized water

2. Running buffer :

25 mM Tris-base, 0.2 M Glycine, 0.1% SDS in deionized water

3. Sample buffer :

62.5 mM Tris-HCl, pH6.8, 2%SDS, 5%2-mercaptoethanol, 0.004%
bromophenol blue and 10% glycerol

4. Stain solution :

0.125% Coomassie blue in 50% methanol and 10% acetic acid

5. Destain solution I :

50% methanol and 10% acetic acid

6. Destain solution II :

5% methanol and 7% acetic acid

7. Proteinase and phosphatase inhibitors :

1 mM PMSF, 1 mM DTT, 5 µg/ml Lenptin, 1 mM NaF and
1 mM Na₃VO₄ in M-PER

第二節、合成胜肽之前製備

將從本實驗室合成所得之合成胜肽peptide 1 和peptide 2 (表一) 分別溶於Dimethylsulfoxid (DMSO) 與 DMEM Medium中，使其濃度為100 μ M 作保存，並於每次投藥前稀釋至目標濃度使用。所有合成胜肽皆以微量離心管分裝，並儲存於-80°C 冰箱中備用。

表3.1、合成胜肽之胺基酸序列

| | |
|-----------|--|
| Peptide 1 | Fmoc-<u>Glu-Tyr-Aib-Asn</u>-NH₂ |
| Peptide 2 | Arg-Gly-Asp-<u>Glu-Tyr-Aib-Asn</u>-Arg-Gly-Asp-NH₂ |

第三節、細胞培養及分化

(一) 細胞培養液的配製

將 DMEM 粉末溶於4.5公升已滅菌Mili-Q去離子水中，加入23.5 g 及的NaHCO₃，再用HCl調整pH至7.2~7.4後以Mili-Q已滅菌去離子水補足體積至5公升，再以0.22 μ M過濾器過濾滅菌，儲存於4°C 冰箱備用。

(二) 完全培養液

每100毫升 DMEM 細胞培養液添100 IU青黴素 (penicillin)、100

μg 鏈黴素 (streptomycin)，最後加入10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)。

(三) 細胞株的培養

人類雌激素依賴型乳癌細胞株 (human estrogen-responsive breast cancer cells, MCF-7) 與erbB受器過度表現乳癌細胞株 (human erbB over-expression breast cancer cells, MDA-MB-453) 皆購自新竹食品工業研究所。MCF-7 和 MDA-MB-453 breast cancer cells皆以DMEM完全培養液培養於37 °C、5% CO₂的培養箱中；繼代培養時 (subculture)，以1500 rpm 離心5分鐘，再以PBS清洗1至2次，最後分種於新的細胞培養皿中，每一培養皿注入約 4×10^6 個細胞，細胞培養液每三天更換一次。

第四節、冷凍細胞之活化

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。冷凍的細胞快速解凍的方法為：將冷凍管由液氮或乾冰容器中取出，立即放入 37 °C 水槽中快速解凍，輕搖冷凍管使其在 3 分鐘內全部融化，以 70% 酒精擦拭保存管的外部，移入無菌操作台內。取出解凍之細胞懸浮液，緩緩加入有培養基之培養容器內 (稀釋比例為 1:10~1:15)，混合均勻，放入 CO₂ 培養箱培養。在解凍培養後隔日更換培養基。

第五節、細胞冷凍保存

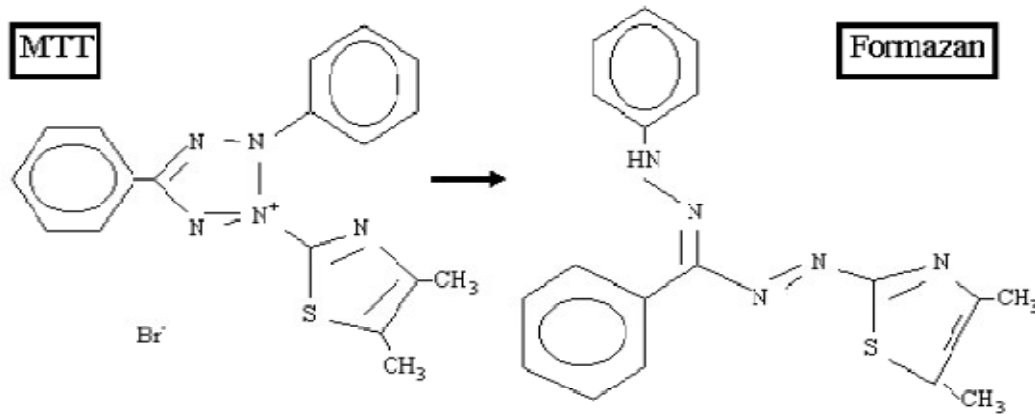
使冷凍保存之細胞應在生長良好且存活率高之狀態，約為 80-90% 緻密度。注意冷凍保護劑之品質。DMSO 應為試劑級等級，無菌且無色（以 0.22 micron FGLP Teflon 過濾或是直接購買無菌產品），以 5-10 mL 小體積分裝，4 °C 避光保存，勿作多次解凍。冷凍保存之細胞濃度： $5 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ cells/mL。冷凍保存劑濃度為 7% DMSO。

細胞冷凍保存之操作步驟為：冷凍前一日更換培養基，觀察細胞生長情形。配製冷凍保存溶液：將 DMSO 加入新鮮培養基中，最後濃度為 7%，混合均勻，置於室溫下待用。取少量細胞懸浮液（約 0.1 mL）計數細胞濃度。之後離心 1500 rpm，5 分鐘，去除上清液，加入適量冷凍保存溶液，使細胞濃度為 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 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：冷凍管置於 -20 °C 4 小時，之後移至 -80 °C overnight 之後隔日置入液氮槽長期儲存。

第六節、人類乳癌細胞存活率之測定

此部分實驗目的在於觀察不同濃度之 Peptide 1 及 Peptide 2 是否會影響人類乳癌細胞 MCF-7 與 MDA-MB-453 細胞存活率。本實驗使利用 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 法判定。MTT 是一種活細胞染色法，其原理是利用細胞內粒腺體中的

dehydrogenase 將 MTT 代謝成藍紫色結晶 Formazan，將此結晶溶於 DMSO (Dimethyl Sulfoxide) 中，以 OD540 的吸光值來量化，形成的顏色深淺與存活的細胞數目成正比。反應式如下：



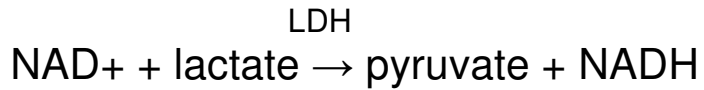
將含有 4×10^5 cells/mL 之人類乳癌細胞以 DMEM 培養液，培養細胞於 24 孔細胞培養盤 (200 μ L/well) 中，加入不同濃度之合成胜肽 (終濃度為 100、75、50、25 與 1 μ M)，在 5% CO₂、37°C 的條件下，分別培養 24、48 與 72 小時後，再加入 200 μ L/well 之 MTT 與細胞共同培養 1 小時後，以 DMSO 溶解其結晶，測量 540 nm 之吸光值。

第七節、人類乳癌細胞毒性之測定

乳酸去氫酶分析法 (Lactate dehydrogenase assay ; LDH assay)

此實驗是採用 Cytotoxicity Assay kit (Promega ; USA) 進行細胞培養上清液 LDH 含量之分析。乳酸去氫酶 (LDH ; lactate dehydrogenase) 是

一種穩定存在於細胞質中的酵素，當細胞膜受到損傷時，LDH 就會快速的釋放至培養液中，因此偵測培養液中的LDH 可作為細胞傷害的指標之一，其偵測原理如下：



將含有 4×10^5 cells/mL之人類乳癌細胞以不含牛血清的DMEM培養液，培養細胞於24孔細胞培養盤(100 μ L/well)中，加入不同濃度之合成胜肽(終濃度為100、75、50、25 與1 μ M)，在5% CO₂、37°C的條件下，分別培養24、48與72小時後，取出上清液50 μ L 至另一96 孔盤中，之後加入50 μ L 之受質混合液，在室溫下避光反應30 分鐘後，加入50 μ L Stop solution 終止反應，測量490 nm 之吸光值。

第八節、細胞內蛋白質萃取及西方點墨法

(一) 蛋白質的萃取

將經過處理的細胞用冰的PBS清洗過三次後加入300 μ l M-PER搖晃10分鐘後，以8,000 rpm離心20分鐘，收集上清液，以Bio-Rad protein assay kit方法測定蛋白質溶液，在波長595 nm下的吸光值，換算成蛋白質濃度(μ g/ μ L)。(以一已知之濃度的BSA做一標準曲線)再以M-PER將樣本調整為同一濃度，接著再加入調整完體積的蛋白質溶液1/3量的4X Sample buffer，以95°C乾浴加熱器加熱變性10分鐘，冰浴冷卻後離心即可置於-80°C中保存。

(二) 聚丙烯醯胺膠體電泳法 (SDS-PAGE assay)

先配置1.5 mm厚的discontinuous acrylamide gel，gel 分上下兩層，下層separating gel 其acrylamide百分比視分析蛋白質分子量而定，上層的stacking gel含4.75% acrylamide。配置完成的膠體放置於電泳槽內，加入電泳緩衝液。將萃取出之蛋白質樣本及標示標準分子量的Marker依序注入膠體的孔槽中，通以電壓100 Volt。視其分子量需要控制電泳的時間，即可將電源關閉。

(三) 西方轉漬法 (Western blotting)

將PVDF membrane 浸於methanol 5分鐘後，接著將PVDF membrane 與裁好之濾紙浸於以transfer buffer 中(transfer buffer : methanol =13:1)。將電泳膠片亦浸泡於transfer buffer 中，搖晃10分鐘後，依序重疊平鋪

2 張濾紙、membrane、gel、2 張濾紙，最後將其放置於充滿 transfer buffer 之 Tank 中，通以 350 mA 電流經 2 小時後將 membrane 取出，浸泡於 5 % non-fat milk/TBST 中，於室溫下搖晃 2 小時。以 TBST 清洗 membrane 5 分鐘共兩次，加入一級抗體，將其置於 4°C 下作用 overnight。隔日先以 TBST 清洗 membrane 5 分鐘共兩次，加入 5% non-fat milk/TBST 中，於室溫下搖晃 2 小時，再以 TBST 清洗 membrane 5 分鐘共兩次，加入二級抗體，於室溫下搖晃 2 小時；再以 TBST 清洗 membrane 15 分鐘共 8 次，接著將 membrane 與 ECL (enhance-chemiluminescence) 反應後，置於壓片夾中，以 X-ray film 感光顯影，再以自動沖片機沖片。

第九節、人類乳癌細胞株 (MCF-7 和 MDA-MB-453) 細胞週期之測定

將 2 mL 含 2×10^6 cells 種植至 6 孔洞平盤之每個孔洞中，放入 37 °C、5% CO₂ 的培養箱進行培養。隔天加入不同濃度的 Peptide 2 (0、25、50、75 和 100 μM) 至 6 孔洞平盤中，放入 37 °C、5% CO₂ 進行培養，於 4、8、16 和 24 小時後檢測細胞週期改變的情形。

利用塑膠吸管從每一個孔洞中的 medium 吸取至離心管，加入 2 mL PBS 緩衝液至平盤中清洗，輕搖晃平盤並吸取 PBS 緩衝液至離心管，加入約 500 μL 的胰蛋白酶 (trypsin-EDTA) 使貼附的細胞從平盤上分離，接著加入 2 mL PBS 緩衝液至平盤並吸取 PBS 緩衝液至離心管，進行 1500 rpm，5 min 離心。倒掉上清液，將細胞完全均勻打散後，再加入 2 mL PBS 緩衝液至離心管，進行 1500 rpm，5 min 的離心。倒掉上清

液，再將細胞完全均勻打散後，以冰的 70% 酒精（4 °C）進行細胞固定步驟（震盪器以速度震盪，一滴一滴緩慢將酒精滴入），隨後將細胞固定步驟完成的樣品置於-20 °C 冰箱存放。

隔天，將樣品從冰箱取出後離心 1500 rpm、5 分鐘以去除酒精，之後將細胞完全打散。加入 2 mL 的 PBS 緩衝液清洗並離心。將完全均勻打散的細胞加入 500 µL 的 PI stain 染劑(表三)，避光培養 40 分鐘 37 °C。以 1 mL pipette 在 15 mL 離心管中抽吸數次後，利用過濾膜過濾，再將細胞移至流式細胞儀專用管，置於冰上及避光。以流式細胞儀(Flow cytometry; FACS)進行分析，數據以 Cell Quest[®]軟體進行處理分析。

表 3. 2、1X phosphate buffer saline, PBS, pH=7.4

| 配 方 | 重 量(g) |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 8.0 |
| KCl | 0.2 |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.44 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.24 |
| 加 DDW 至總體積 1000 mL | |

表 3. 3、PI (propidium iodide) stain

| 組 成 | 最終濃度 | 初濃度 | 體積 (ml) |
|-----------------------|-----------|---------|---------|
| Propidium iodide (PI) | 50 µg/ml | 1 mg/ml | 2.5 |
| Triton-100 | 1 % | 5 % | 0.025 |
| RNase A | 0.1 mg/mL | 2 mg/mL | 2.5 |
| 1X PBS | - | - | 45 |
| 總體積 | | | 50 mL |

*RNase A 儲存於-20°C。

*PI stain 儲存於 4°C。

第十節、統計分析

本研究中所獲得之資料皆以SPSS 8.0版套裝軟體進行統計，以單因子變異數分析(One-way ANOVA) 進行組內之比較，再以Duncan multiple range test 比較各組間之差異顯著性，實驗結果的數值皆以平均值±標準誤差(means±SE)表示，差異之顯著程度訂為 $p < 0.05$ 。