

# 目錄

目錄.....	1
中文摘要.....	3
英文摘要.....	4
前言.....	5
材料與方法.....	11
一、肝組織.....	11
二、抗體.....	11
三、萃取肝組織中的蛋白質.....	12
四、蛋白質濃度測定.....	12
五、以穀胱?? 轉移? (GST)接合系統純化 HBx.....	13
六、重組蛋白質的表達.....	13
七、蛋白質的純化.....	14
八、Factor Xa 切割 GST-X 重組蛋白質.....	15
九、蛋白質電泳分析 (SDS-PAGE).....	16
十、西方點墨法 (Western blotting).....	17
十一、定量分析.....	18
十二、冷凍切片法.....	18
十三、免疫組織化學法 (Immunohistochemistry).....	19

結果.....	21
討論.....	26
參考文獻.....	31
圖表.....	35
附表.....	42
附錄.....	43
個人資料.....	46

## 摘要

在台灣，肝癌為十大死因之一。B 型肝炎病毒所轉錄的 HB<sub>x</sub> 蛋白質是造成肝癌的主要原因。X 基因是最小的一段 B 型肝炎病毒基因組的開放讀碼區，能夠合成 HB<sub>x</sub> 蛋白質。HB<sub>x</sub> 蛋白質是一個多功能蛋白質，且與肝癌的發生有關。但是其功能上的機制卻了解得很少，雖然有幾個細胞核和細胞質間交互作用的蛋白質已於活體外被證實了，但對於 HB<sub>x</sub> 蛋白質於被感染的肝細胞上的分佈卻沒有一致且明確的答案。所以本研究將以 B 型肝炎病毒 HB<sub>x</sub> 蛋白質在人類肝腫瘤組織中的定量及分佈為目標。使用抗 HB<sub>x</sub> 蛋白質的單株抗體，以西方點墨轉漬法（western blotting），來免疫偵測萃取自 20 個 HCC 病人的肝腫瘤組織。其結果顯示有 85% 的肝腫瘤組織中含有專一的 HB<sub>x</sub> 蛋白質，且在電泳膠上會和純化的重組 HB<sub>x</sub> 蛋白質同步移動。為了更進一步了解 HB<sub>x</sub> 蛋白質的角色，故以免疫組織化學染色法來檢測 HB<sub>x</sub> 蛋白質在肝癌組織細胞中的分佈。在 8 個新鮮的肝組織樣品，包括了來自於 4 個肝癌病人身上正常和腫瘤的部分。HB<sub>x</sub> 蛋白質在正常和肝腫瘤組織，以單株和多株的 HB<sub>x</sub> 蛋白質抗體均可以被偵測得到。且 HB<sub>x</sub> 蛋白質幾乎全部分佈於細胞質中。HB<sub>x</sub> 蛋白質分佈的分析，可提供將來 HB<sub>x</sub> 功能研究的一個基礎。

## **Abstract**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the ten major leading death diseases in Taiwan. The causal agent of HCC is hepatitis B virus (HBV) which encodes a protein (HBx). X gene is the smallest open reading frame (ORF) among hepatitis B virus (HBV) genome and it encodes the HBV X protein (HBx). The HBx is a multifunctional protein that is implicated in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. Very little is known about its functional mechanisms although interactions with several nuclear and cytoplasmic proteins have been demonstrated in vitro, there is no clear consensus as to the location of HBx in infected hepatocytes. So quantification and cellular distribution of the hepatitis B virus X protein in human hepatocellular carcinoma were studied. Western immunodetection of HBx antigen in liver extracts of twenty HCC patients was performed using the anti-HBx monoclonal antibody. The results show that 85% liver tissues of HCC contain a specific and comigrated HBx antigen. To further elucidate the role of HBx, the distribution of HBx was also examined by immunohistochemical staining. Eight fresh liver tissue samples, normal and tumor parts of four HCC patients were analysed. HBx was detected in both normal and tumor tissues using anti-HBx monoclonal and polyclonal antibodies. HBx was mainly located in cytoplasm. This distribution analysis of HBx will provide the basis for the study of the functional identification of the HBx.

## 前言

我們所知的 B 型肝炎疾病是由感染 B 型肝炎病毒所引起的，B 型肝炎病毒為人類常見致病原的其中一個。早在 1963 年，當在研究血清蛋白質多型性的時候，Blumberg 發現了一個先前未知的蛋白質存在於澳洲原住民的血液中，而這個蛋白質被指為澳洲抗原，且與肝炎中的 B 型有密切相關 ( Blumberg *et al.*, 1967 )。在 1968 年，其他研究人員 Okochi 和 Murakami 已證明澳洲抗原只有在 B 型肝炎病人的血清中才可出現 ( Prince 1968; Okochi and Murakami 1968 )，現在我們知道這就是 B 型肝炎表面抗原。1973 年，Dane 在感染了 B 型肝炎病毒的病人血清中找到病毒似的顆粒，這些顆粒被指為是 B 型肝炎病毒 ( Dane *et al.*, 1970 ) 而 Kaplan 再次確認病毒顆粒，且在核心發現內生性 DNA 和依賴 DNA 的聚合酶 ( Kaplan *et al.*, 1973 )，此聚合酶的發現使得 Robinson 偵測到 B 型肝炎病毒的基因組 ( Robinson and Greenman 1974 )。

B 型肝炎病毒是藉由接觸血液和體液而傳染的，在被感染之後，潛伏期約 30-180 天，而 90% 的人約在一個月內會痊癒。另外有千分之一的人，通常是女性，會發展成猛暴性肝炎，而 10 天後死於肝昏迷 ( Collier and Oxford 1993 )。除此之外，10% 的人會變成慢性帶原者，他們不會產生 B 型肝炎表面抗體，且 B 型肝炎套膜抗體的出現也會延

遲，這種肝炎對肝臟只有較輕微的傷害（ Collier and Oxford 1993 ）。然而慢性活動性肝炎患者，在他們的血液中會攜帶著具傳染力的病毒顆粒，且可以藉此傳染給他人。此種肝炎對肝細胞有相當明顯的傷害，且有發展成肝硬化的高危險性，有些還會轉變成惡性腫瘤及肝癌，最後導致死亡（ Collier and Oxford 1993 ）。

B 型肝炎病毒是已知 DNA 病毒中最小的一個，只包含了 3,182 bp，屬於肝炎 DNA 病毒科（ hepadnaviridae ）中的一員，為環型部份雙股 DNA 病毒，正股較短，約為負股長度的 50%-100%。而 D 型肝炎病毒為其衛星病毒，因為 D 型肝炎病毒只能在已被 B 型肝炎病毒感染細胞中複製。在臨床診斷上其血清的標誌為 B 型肝炎病毒核心抗體、B 型肝炎病毒表面抗體和 B 型肝炎病毒表面抗原等。現在藉由施打 B 型肝炎病毒重組表面抗原疫苗，可預防 B 型肝炎感染（ Collier and Oxford 1993; Chang *et al.*, 1997 ）。

B 型肝炎病毒進入肝細胞後開始進行複製，先以負股的 DNA 為模板，將不完整的正股 DNA 複製完成後，進入細胞核中，接著進行轉錄（ transcription ）合成正股的 RNA，然後此 RNA 移出細胞核後被新合成的殼膜包住。並以此 RNA 為模板，由反轉錄？複製出完整的負股 DNA 和部分正股的 DNA，若此病毒的 DNA 在細胞中，可回到細胞核中再進行下一次的複製。若病毒要移出細胞，此病毒顆粒就會

被包裹上外套膜 ( Monjardino 1998 )。

B 型肝炎病毒顆粒又稱唐氏顆粒 ( Dane particle )，其直徑約為 42 nm，呈圓球形，結構為脂質外套包含著核心抗原 ( core antigen，HBcAg )，在脂質外套上含有表面抗原 ( surface antigen，HBsAg )，而核心抗原內包裹著病毒的基因組和 DNA 聚合酶。B 型肝炎病毒的基因組具有 4 個開放讀碼區 ( open reading frame, ORF )，分別是 S、C、P 和 X ( Tiollais and Buendia 1991 )。其中 S 基因合成表面抗原，C 基因合成核心抗原，二者均構成病毒的結構性蛋白質。P 基因合成 DNA 聚合酶，和 X 基因同為非結構性蛋白質。而 X 基因是最小的一段開放讀碼區，能夠合成 154 個胺基酸的蛋白質，稱 B 型肝炎病毒 X 蛋白質 ( 之後簡稱 HBx )，分子量約 17 KD，其功能仍不十分清楚 ( Galibert *et al.*, 1979; Yen 1996 )。

目前已知 HBx 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 )。除此之外，HBx 會抑制腫瘤抑癌蛋白質 p53 的功能，抑制細胞凋亡和受損之肝細胞的修復等。HBx 還會活化細胞訊息傳遞，包括了

Mitogen-activated Protein Kinase ( MAPK )和 Janus Kinase( JAK )/Signal transducer and activator transcription( STAT ) pathways 等 ( Yen 2000 )。雖然其調控的機轉仍不完全的了解，但 HB<sub>x</sub> 似乎在肝細胞增生、細胞凋亡過程中扮演重要的角色，並且在調節細胞增生上有重要的影響 ( Arbuthnot *et al.*, 2000 )。

在慢性肝炎和肝硬化的外科活體組織切片上，分別分析 HB<sub>s</sub> 抗原、HB<sub>c</sub> 抗原和 HB<sub>x</sub> 抗原，發現在 HB<sub>x</sub> 抗原陽性的慢性肝炎檢體中，73% 與 HB<sub>s</sub> 抗原或 HB<sub>c</sub> 抗原有關，而有 27% 卻存在於 HB<sub>s</sub> 抗原和 HB<sub>c</sub> 抗原都沒有反應的情況之下。相同的，在 HB<sub>x</sub> 抗原陽性的肝硬化檢體中，有 29.5% 的檢體同樣也出現於 HB<sub>s</sub> 抗原和 HB<sub>c</sub> 抗原都缺乏的情況下 ( Wang *et al.*, 1991 )。除此之外，在 30 個已確定為肝癌病人的腫瘤或非腫瘤之組織切片上看 HB<sub>x</sub> 抗原並和 HB<sub>s</sub> 抗原、HB<sub>c</sub> 抗原做比較。發現在早期非腫瘤的組織上普遍都測得到 HB<sub>x</sub> 抗原，無論 HB<sub>s</sub> 抗原或 HB<sub>c</sub> 抗原是做何種表現，而且在同時測不到 HB<sub>s</sub> 抗原和 HB<sub>c</sub> 抗原的情況下，HB<sub>x</sub> 抗原仍然偵測得到 ( Zhu *et al.*, 1993 )。還有，在 HB<sub>x</sub> 轉殖基因老鼠的實驗中，也證實了 HB<sub>x</sub> 會誘發肝癌的發生 ( Kim *et al.*, 1991 )。

綜合以上的研究顯示，HB<sub>x</sub> 與肝癌形成的過程是有密切相關的，且 HB<sub>x</sub> 的持續存在對於早期 HCC 的致病過程是很重要的，而 HB<sub>x</sub> 在



慢性肝炎中的表現對於發展成 HCC 是一個重要的指標 ( Wang *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1993 )。但是對於 HBx 所扮演的角色仍不十分清楚。

關於 HBx 在細胞中分佈的研究，有許多不同的結果，以間接免疫螢光染色和使用共軛焦顯微鏡觀察後，發現 HBx 會位於細胞核中，並且和細胞萃取物中的 TFIIB 共同形成免疫沉澱( Haviv *et al.*, 1998 )，與 proteasomes 共同分佈於細胞質中 ( Sirma *et al.*, 1998 )。而用雙重螢光染色也發現，被 HBx 感染的細胞其 HBx 分佈於核週邊的細胞質中，和 mitochondria 的位置一致，且會使 mitochondria 聚集並導致細胞死亡( Takada *et al.*, 1999; Rahmani *et al.*, 2000; Henkler *et al.*, 2001 )。而在 Wang 的研究中發現 HBx 在肝細胞中可分佈於任何位置 ( Wang *et al.*, 1991 )，以上結果顯示出 HBx 在細胞中的分佈仍具有爭議 ( Henkler *et al.*, 2001; Hoare *et al.*, 2001 )。有這樣的結果可能是因 HBx 抗體的專一性仍受質疑所造成的 ( Su *et al.*, 1998; Herrmann 1999 )。

綜合以上的研究顯示，HBx 在感染者的表現與肝癌的發生有密切的關係，但直接對於 HBx 於肝腫瘤組織上表現量的研究卻十分缺乏。而 HBx 於肝腫瘤組織上的分佈卻因缺乏專一性的抗體，所以造成結果的分歧。

在本實驗中，利用了三種 HBx 抗體，一為專一的老鼠單株抗體；二為來自於以穀胱甘肽轉移酶基因接合系統 ( 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 HB<sub>x</sub>, 以純化的 GST-X 接合蛋白質為抗原注射兔子後, 兔子經過免疫反應所產生對抗 HB<sub>x</sub> 專一的多株抗體; 三為從已純化的 HB<sub>x</sub> 為抗原, 篩檢 40 位 HCC 病人血清後所測得 Anti-HB<sub>x</sub> 的最高力價之人類多株抗體 其結果顯示第八號病人的血清含有最高力價的 HB<sub>x</sub> 抗體, 拿此病人血清經過純化後可作為人類多株抗體。利用此三種抗體分析來自經過臨床診斷和鑑定的台中榮民總醫院 HCC 病人的肝臟組織, 包括正常及腫瘤的部分。其正常肝組織是取自於同一位 HCC 病人的肝上, 以病理學角度判定為正常的部分。對於肝組織中 HB<sub>x</sub> 的表現和分佈, 將期望能提供更進一步的確認和說明。

故我將利用西方點墨法 (western blotting) 做定性的分析, 並以重組的 HB<sub>x</sub> 為比較的 control 組, 來了解肝腫瘤組織的抗原分子表現。然後以 Image ProPlus 4.0 分析軟體分析西方點墨法的結果以定量肝組織上的 HB<sub>x</sub> 相對於重組 HB<sub>x</sub> 的量。之後以免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry), 利用三種不同的抗體分別於抗原量高的肝組織上探討 HB<sub>x</sub> 的分佈。此三種不同抗體的測試, 若能產生一致的結果, 則更能加強這些抗體對於 HB<sub>x</sub> 抗原專一性的探討!

## 方法及材料

### 一、肝組織

20 個肝腫瘤組織，分別來自於經過臨床診斷和鑑定的台中榮民總醫院 HCC 的病人。和另外 4 位 HCC 病人的肝臟組織，包括正常及腫瘤的部分。其正常組織是指由同一位 HCC 病人身上的肝所取下來，在病理學角度判定為正常的部分。故共有 28 份肝臟組織，分別來自 24 位 HCC 病人，包括 24 個腫瘤組織及 4 個正常組織。

### 二、抗體

利用的三種抗體，分別介紹如下：1、老鼠的單株抗體：來自於合成的 peptide ( MAB8419, Chemicon Inc. )。2、兔子的多株抗體：因其多株抗體是以接有 GST 之全長的 HBx，注射兔子之後，經兔子的免疫反應所產生的抗體。3 人類的多株抗體：來自於本實驗室的研究，以重組的 HBx，篩檢 40 位 HCC 病人血清中 HBx 抗體的結果。取其含抗體量最高的第 8 號病人血清，當作人類的多株抗體使用。

### 三、萃取肝組織中的蛋白質 (Total protein)

將肝組織切下約  $1\text{mm}^3$  的大小，用 4 的 PBS 清洗之後，離心去掉上清液，估計組織的大小所佔的體積，加入 5 倍量的 suspension buffer 【0.1 M NaCl; 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6; 0.001 M EDTA, pH 8.0; 1 ug/ml aprotinin ; 100 ug/ml PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)】，以小的玻棒將其均質化，離心後再加入現在總體積 2 倍量的 2X SDS gel-loading buffer ( 100 mM Tris-HCl ; 200 mM dithiothreitol (DTT) ; 4 % SDS ; 20 % glycerol )，然後放入沸水中煮 10 分鐘後，再用超音波震盪機震盪約 1 分鐘，離心 10 分鐘後，上清液即為蛋白質。

### 四、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  $\text{Cu}^{2+}$  會被蛋白質還原成為  $\text{Cu}^+$ ，而雙辛可寧酸 (Bicinchoninic acid) 與  $\text{Cu}^+$  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<sup>R</sup> 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)。

## 五、以穀胱?? 轉移? ( GST ) 接合系統純化 HB<sub>x</sub>

HB<sub>x</sub> 藉由重組 DNA 技術將 X 基因嵌入質體 pGEX-5X-1 中，再將此重組質體植入大腸桿菌 DH5a 中，並利用乳糖的類似物 Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside ( IPTG ) 誘發表達。由於 GST 蛋白質與穀胱?? ( glutathione ) 具有親和性，所以可利用穀胱?? 瓊脂醣珠( glutathione sepharose 4B ) 純化出 GST-X 接合蛋白質，而在多重選殖區中有蛋白質切割? factor Xa 的切割位置，能將 GST-X 接合蛋白質切割為 GST 蛋白質及 HB<sub>x</sub> ( Pharmacia Biotech. ) ( Smith and Johnson 1998 )。

## 六、重組蛋白質的表達

將儲存於 - 80 含有重組質體的大腸桿菌取出 100  $\mu$  l, 培養於 10 ml 的 Luria-Bertani ( LB medium (pH 7.0) for 1 liter : Bacto-tryptone 10 g ; Bacto-yeast extract 5 g ; NaCl 10 g ) 培養液中 ( 含 50  $\mu$  g/ml ampicillin ), 在 37 下以 300 rpm 的速度震盪培養 16 小時 ( Firstek Scientific S300 ) 取培養後的菌液 100  $\mu$  l 加入 50 ml 的 LB 培養液( 含 50  $\mu$  g/ml ampicillin ), 在 37 下以 300 rpm 的速度震盪培養 16 小時 ( Firstek Scientific S300 ) 加入 400 ml 的 LB 培養液，及 450  $\mu$  l, 0.1

M 的 Isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside ( IPTG ), 於 30 °C 下以 300 rpm 的速度震盪培養 5 小時, 以誘導 X 基因的表達。之後, 將菌液於 4 °C 下以 10000 rpm 的速度離心 10 分鐘( Sorvall T-21, SL-50T rotor ) 收集細菌, 將細菌以 6 ml 4 °C 的 STE 緩衝溶液( 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA ) 清洗。再次於 4 °C 下以 10000 rpm 的速度離心 10 分鐘 ( Sorvall T-21, SL-50T rotor )。收集細菌, 將細菌溶於 6 ml 4 °C 的 STE 緩衝溶液 ( 含有 100  $\mu$ g/ml lysozyme ), 冰浴 15 分鐘。加入 Dithiothreitol ( DTT ) ( reducing agent ), 使濃度達到 5 mM, 再加入溶於 STE 緩衝溶液 10 % 的 N-lauroylsarcosine ( Sarkosyl ) 使濃度達 1.5 %, 混合均勻後, 在冰浴環境下, 用超音波震盪擊碎器震盪 1 分鐘( Heat system, Sonicator XL-2020 ), 加入溶於 STE 緩衝溶液 10 % 的 Triton X-100 使溶液濃度達 2 %, 混合均勻後, 再於 4 °C 下以 10000 rpm 的速度離心 10 分鐘 ( Sorvall T-21, SL-50T rotor ) 收集上清液, 保留 200  $\mu$ l 的均質液於 -20 °C, 其餘的溶液接著進行 GST-X 接合蛋白質的純化 ( Frangioni and Neel, 1993 )。

## 七、蛋白質的純化

將 500  $\mu$ l 的穀胱甘肽 ( glutathione ) 與瓊脂糖珠 ( glutathione sepharose 4B ) 以 1800

rpm 的速度離心 5 分鐘。收集醱珠，加入 10 ml 4 的 PBS 緩衝溶液並混合均勻，再以 1800 rpm 的速度離心 5 分鐘。收集醱珠，最後加入 1 ml 4 的 PBS 緩衝溶液，使醱珠和 PBS 緩衝溶液的體積比為 1 : 1，使用前要先混合均勻（Pharmacia manufacture protocol）。

將細菌均質液加入準備好的穀胱?? 瓊脂醱珠，置於 4 旋轉盤中，反應 12 小時。以 1800 rpm 的速度離心 5 分鐘。收集醱珠，以 10 ml 4 的 PBS 緩衝溶液清洗 4 次。此時，醱珠上已接有 GST-X 接合蛋白質，之後繼續進行 GST-X 接合蛋白質的純化。

將醱珠加入 1.6 ml 的 elution buffer（100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 120 mM NaCl; 20 mM reduced glutathione），置於 4 旋轉盤中反應 12 小時。以 1800 rpm 的速度離心 5 分鐘。收集上清液，即得到 GST-X 接合蛋白質，測量蛋白質濃度，並儲存於 -20 。

## 八、Factor Xa 切割 GST-X 重組蛋白質

將接有 GST-X 接合蛋白質的醱珠，以 10 ml 的 factor Xa 蛋白質酵素切割緩衝溶液（Factor Xa cleavage buffer : 100 mM NaCl ; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 1 mM CaCl<sub>2</sub>）清洗，以 1800 rpm 的速度離心 5 分鐘，之後收集醱珠。在 1 ml 的 factor Xa 蛋白質酵素切割緩衝溶液中，加

入 50  $\mu$ g 的 factor Xa 蛋白質酵素 (Boehringer mannheim), 在將醣珠加入混和均勻後, 置於 4  $^{\circ}$ C 中搖晃反應 12 小時。之後以 1800 rpm 的速度離心 5 分鐘, 收集上清液, 此即為 HB<sub>x</sub>, 而 GST 蛋白質則仍留在醣珠上。

## 九、蛋白質電泳分析 (SDS-PAGE)

經過萃取的肝腫瘤組織之 HB<sub>x</sub>, 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 0.75 mm 厚的 discontinuous acrylamide gel, 膠體分為兩層, 分別為 13 % 的下層 running gel (H<sub>2</sub>O; 30 % acrylamide mix; 1.5 M Tris, pH 8.8; 10 % SDS; 10 % ammonium persulfate; TEMED), 及 5 % 的上層 stacking gel (H<sub>2</sub>O; 30 % acrylamide mix; 1.0 M Tris, pH 6.8; 10 % SDS; 10 % ammonium persulfate; TEMED)。配置完成的膠片置入電泳槽中, 加入適量的 running buffer (10X running buffer for 1 liter: Tris-Base 30.3g; Glycine 144g; SDS 10g)。蛋白質樣品與等體積的 loading buffer (0.35 M Tris-HCl, pH 6.8; 10.28 % SDS; 36 % glycerol; 0.6 M dithiothreitol; 0.012 % bromophenol blue) 混合, 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, Bio-rad) 注入膠片



的樣品槽中。先通以 70 Volt. 電壓，待 loading buffer 進入 running gel 後，提高電壓至 100 Volt.，直到 loading buffer 分離到膠片底部為止。

## 十、西方點墨法 (Western blotting)

將從 HCC 肝組織中所萃取出的總蛋白質進行電泳分離後，將蛋白質電泳膠取出，浸泡於轉移緩衝液 (transfer buffer : 39 mM Glycine ; 48 mM Tris-base ; 0.037 % SDS ; 20 % Methanol) 中。將硝酸纖維膜 (nitrocellulose membrane, Pharmacia biotech. ) 剪裁至與蛋白質電泳膠同樣大小並浸泡於甲醇中約 10 秒鐘，以二次水清洗 5 分鐘，再浸泡於轉移緩衝液中至少 10 分鐘。進行轉移時，先將浸有轉移緩衝液的濾紙置於陽極板上再依序放上硝酸纖維膜、蛋白質電泳膠及另一張濾紙。之後，蓋上陰極板及安全蓋，然後以 20 Volt. 的電壓進行轉移 30 分鐘。取出硝酸纖維膜，然後加入含有 5 % 脫脂奶粉的 PBS-0.05% Tween 20 緩衝溶液 ( 140 mM NaCl ; 2.7 mM KCl ; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0.05 % Tween 20 ; pH 7.4 )，將其他未被蛋白質結合的部位覆蓋抑制住。再加入特定稀釋比例的一級抗體，於室溫下反應 1 小時，以 PBS-0.05% Tween 20 緩衝溶液清洗 4 次，再加入特定稀釋比例的二級抗體，二級抗體接有山葵過氧化酶 ( horseradish peroxidase, HRP )，

於室溫下反應 1 小時後，再經 PBS-0.05% Tween 20 緩衝溶液清洗 4 次，進入暗房內再加入 ECL+Plus 測試試劑並於室溫下反應 1 分鐘，將試劑吸乾，把硝酸纖維膜置於片夾中進行底片感光。

感光後的底片隨即進行沖片。將底片浸泡於 Develop buffer (Kodak) 中，反應約 5 分鐘，以片夾夾起底片於水中沖洗後，放入 Fixer buffer (Kodak) 中，待反應完全後即可用水沖洗後晾乾。

## 十一、定量分析

將沖洗好並晾乾的底片置於掃描器下掃描並儲存成電腦圖片檔案，將此檔案用 Image ProPlus 4.0 分析軟體進行定量分析。

先分別求出各個訊號的密度，再以純化重組的接合蛋白質 GST-X 的訊號密度當作基準值 1，之後即可將 20 位 HCC 病人的 HBx 訊號分別求出相對於基準值的比值。

## 十二、冷凍切片法

先將 HCC 病人的肝臟組織切取約 1-2 mm<sup>3</sup>，放入 4 % 的同質異構甲醛 ( paraformaldehyde ) 中固定至少 4-6 小時，以 1 倍的 PBS 沖洗 4 次，每次 30 分鐘，然後再將組織轉移到 30 % 的 sucrose 中置於 4 反應一個晚上。拿取乾淨的載玻片先粘附上 poly-L-lysin 後 ( 兩片載玻片取 8 μl 的 poly-L-lysin，以製作抹片的方式使其均勻平鋪於上 ) 於加熱台上晾乾備用。之後將肝臟組織置於切片台上，以冷凍培養基 ( frozen medium ) 包埋，待冷凍培養基結凍，便可以拿到冷凍切片機下切片，切下厚度約 10 μm 的組織，以載玻片乘取，可立刻染色或保存於 -20 中。

### 十三、免疫組織化學法 ( Immunohistochemistry )

將切好的玻片以 1 倍的 PBS 沖洗 5 分鐘後，將新鮮配置的 0.05 % sodium borohydride 與其反應 10 分鐘，再以 1 倍 PBS 沖洗 5 分鐘，2 次。加上以 PBS 稀釋 100 倍的抗人類抗體，於室溫下反應 1 小時，用以將組織上非特異性的抗體結合覆蓋抑制住，再以 PBS 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。將 1 級抗體以 PBS 稀釋 50 倍後，每片玻片取約 100 ul 的量反應，並裁剪比載玻片小的 Parafilm 小心覆蓋其上，將玻片置於潮濕的反應槽中，於 4 下反應過夜。

用 1 倍的 PBS 沖洗 4 次，每次 10 分鐘。若要染背景染色，玻片則需先以 RNase 處理過，故先加 RNase( 100  $\mu$  g/ml, PBS 配製 ) 於室溫下作用 40 分鐘，再以 1 倍 PBS 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。之後加上以 PBS 稀釋 50 倍且結合 FITC 的二級抗體，每片玻片取約 100  $\mu$ l 的量反應，並以 Parafilm 小心覆蓋其上，將玻片置於潮濕的反應槽中，於室溫下反應 2 小時，再以 1 倍的 PBS 沖洗 4 次，每次 10 分鐘。加入 5  $\mu$  g/ml 的 PI ( propidium iodide )，於室溫下潮濕的反應槽中作用 30 分鐘，以 1 倍 PBS 沖洗 2 次，每次 10 分鐘。最後將玻片擦乾並以 Mounting solution( Glycerol: PBS = 8:2 )封片後，周圍用指甲油( Ethyl Acetate ) 封住即可於螢光顯微鏡下觀察。

## 結果

將含有重組質體 GST-X 的大腸桿菌 (DH5a), 以 IPTG 誘發表達 GST-X 接合蛋白質後, 藉著穀胱?? (glutathione) 與 GST 蛋白質間的親和性, 利用穀胱?? 瓊脂醣珠( glutathione sepharose 4B)將 GST-X 接合蛋白質純化出。之後分別用 elution buffer 切割 GST-X 接合蛋白質, 與 factor Xa 蛋白質酵素( Boehringer mannheim )切割純化出 HB<sub>x</sub>。此產物以 13 % 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 系統進行分析, 其結果如圖一所示。純化後 43 KD 的 GST-X 接合蛋白質與 17 KD 的 HB<sub>x</sub> 可作為西方點墨法 (Western blotting) 偵測肝組織中 HB<sub>x</sub> 的陽性對照組。

從台中榮民總醫院臨床檢測確定為肝細胞腫瘤 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 的病人身上取得肝腫瘤組織, 經過萃取組織蛋白質後, 以雙辛可寧酸 (Bicinchoninic acid, BCA) 蛋白質分析試劑測定蛋白質的濃度。每位病人取約 100 μg 的總蛋白質, 以 13 % 十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 進行分離後, 將蛋白質轉移到硝酸纖維膜上進行西方點墨法的免疫偵測。使用抗 HB<sub>x</sub> 單株抗體 (MAB8419, chemicon Ins.) 偵測此 20 位 HCC 病人肝腫瘤組織中 HB<sub>x</sub> 蛋白質的有無, 其結果如圖二所示。在分子量 17 KD 的位置可偵測到

一個清楚的訊號，和經過 factor Xa 蛋白質酵素切割純化的重組 HBx 相比較，發現此 17 KD 的訊號與純化後的 HBx 有共同移動的現象。且 17 KD 的分子量和 B 型肝炎病毒基因體預測的分子量相符。如此可更加確定 17 KD 的蛋白質分子為 HBx。

依圖二的結果，將可辨識的抗體反應訊號認定為陽性反應。故編號第 11、16 和 18 號病人則為陰性反應，其餘為陽性反應。所以 20 位 HCC 的病人有 17 人的肝腫瘤組織中有 HBx 的存在，其佔總人數之 85 %。

另外並進行 20 位 HCC 病人肝腫瘤組織中 HBx 的定量。先把西方點墨法的結果用掃描器掃描後存成電腦圖片檔，再於 Image ProPlus 4.0 的分析軟體進行分析。先計算每一 HBx 的密度，再將純化的重組 GST-X 接合蛋白質的密度當作基準值 1 來計算，算出每一 HBx 的相對比值，其結果如圖三所示。HBx 經過 Image ProPlus 4.0 的分析軟體定量之後，HBx 在 HCC 病人身上的含量可大約估計為每 100  $\mu\text{g}$  的細胞蛋白質中含有相對於基準值 GST-X 約 0.06 到 1.54 倍的 HBx。除此之外，編號第 1、3、10 和 13 號病人含有較其他病人為高的 HBx。並且選取這些 HBx 含量較高的組織進行分佈的研究。

在進入分析 HBx 分佈研究之前，先選取 1-2 位病人的肝組織進行切片與染色。發現這些肝組織因為不夠新鮮，以致於切片後造成細胞

破碎且不易辨別。所以再與台中榮民總醫院取了 4 位 HCC 病人的新鮮肝組織。這些組織分別包括有正常與腫瘤組織部分，故共獲得 8 個組織。其中正常組織指的是在同一位 HCC 病人的肝臟組織上，以病理學角度判定為組織正常的部分，而腫瘤組織在病理外觀上，顏色較正常組織為白。在進行 HBx 分佈分析之前，其肝組織中是否含有 HBx 仍須在分子的層次上進一步的確認。所以將此 8 個肝組織分別切下約  $1 \text{ mm}^3$ ，先進行秤重發現，肝腫瘤組織均比正常組織為重。之後進行蛋白質的萃取，以雙辛可寧酸 (BCA) 蛋白質分析試劑測定蛋白質濃度，發現腫瘤組織的蛋白質濃度均高於正常組織。

將這 8 個肝組織所萃取出的總蛋白質，各取  $5 \mu\text{l}$  的量進行西方點墨法的分析。利用 HBx 的單株抗體偵測 HBx 的有無。於圖四的結果我們發現在分子量 17 KD 的地方，在這 4 位 HCC 病人無論是病理學上判定為正常還是肝腫瘤的組織均可以偵測得到 HBx 的存在。故我們隨機選取了第 24 號病人的肝組織進行 HBx 分佈的研究。

使用冷凍切片法將同一位病人的正常與腫瘤部分的肝組織分別切下置於載玻片上，冰凍於  $-20^\circ\text{C}$  中備用。之後以三種不同的抗體對這些組織切片做免疫組織化學染色，結果如圖五、六、七所示。

圖五為病人的腫瘤組織，以 HBx 的單株抗體和兔子產生的多株抗體所做的免疫組織化學染色，在 200 倍的視野下，以 Nikon capture 所

擷取的數位照片。左圖使用單株抗體所做的結果，上方為未經單株抗體染色的空白對照組，二級抗體使用結合有螢光且抗老鼠免疫球蛋白質的抗體 ( FITC-conjugated Goat Anti-Mouse IgG, ZYMED Laboratories Inc. )。右圖是使用兔子的多株抗體所做的結果，上方為未經兔子多株抗體染色的空白對照組，二級抗體使用結合有螢光且抗兔子免疫球蛋白的抗體 ( FITC-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG, ZYMED Laboratories Inc. )。結果可以大致觀察到 HB<sub>x</sub> 在肝腫瘤組織中幾乎都分佈於細胞質。

圖六為 HCC 病人的正常組織，以單株抗體和兔子產生的多株抗體所做的免疫組織化學染色，在 200 倍的視野下，以 Nikon capture 所擷取的數位照片。其處理的方式和肝腫瘤組織完全一樣，結果可觀察到 HB<sub>x</sub> 也分佈於細胞質上。

另外，以人類血清中含有高量的 HB<sub>x</sub> 抗體來偵測肝組織中 HB<sub>x</sub> 的分佈，二級抗體使用結合螢光且抗人類免疫球蛋白質的抗體 ( FITC-conjugated Goat Anti-Human IgG, ZYMED Laboratories Inc. )，其結果如圖七。空白對照組為使用未經人類多株抗體處理，但因二級抗體為抗人類免疫球蛋白，所以會直接和人類的肝組織切片有交叉反應的產生，故陰性對照組仍有螢光的存在。在經過人類血清抗體的純化，及在反應前將人類血清抗體進行反應前吸附處理，將非專一性抗



體去除之後，另外還嘗試使用嬰兒的臍帶血作為陰性對照組，但是效果仍不盡理想。而在陽性反應的結果上，我們發現其 HB<sub>x</sub> 亦多分佈在細胞質上。

經過此三種抗體測試的結果發現，HB<sub>x</sub> 均分佈在細胞質上，且無論是正常或是腫瘤組織均可發現 HB<sub>x</sub> 的存在。

## 討論

本實驗所表達的 HB<sub>x</sub> 重組基因, 經過 SDS-PAGE 分析結果發現, 以 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 HB<sub>x</sub>, 但切割下來的 HB<sub>x</sub> 仍然留在醣珠上。此可由 elute 的上清液中不含有 HB<sub>x</sub>, 但醣珠上卻含有 HB<sub>x</sub> 看出。對於此現象, 目前仍無合理的解釋, 可能是因為 HB<sub>x</sub> 的結構與 GST 蛋白質和醣珠結合的部位具有相似性, 因此被切割下來的 HB<sub>x</sub> 仍會粘附在醣珠上。

在圖二的結果上, 我們發現從這 20 位 HCC 病人的肝組織中所萃取的 HB<sub>x</sub> 和經過 Factor Xa 切割過之穀胱?? 瓊脂醣珠上的 HB<sub>x</sub> 有共同移動的現象。即經過電泳膠和西方點墨法的分析後仍位於同一水平面上, 在此可以確認病人身上所偵測到的確實為 HB<sub>x</sub>。

在同一張結果圖上, 在較高分子量之處有一些清楚的訊號存在。這可能是因為在以 SDS-PAGE 分析時, 是使用萃取後的總蛋白質, 而總蛋白質中分子雜亂且複雜, 所以在以單株抗體偵測時, 其較高分子量的訊號出現可能是交叉反應的結果。而單一條 Lane 之中, 有時會出現上方高分子量的訊號相當清楚, 而下方 17 KD 的 HB<sub>x</sub> 卻呈現陰性反應, 如編號第 11、16 和 18 號病人。此現象可證明單株抗體對 HB<sub>x</sub> 有很高的專一性。

於 20 位 HCC 病人肝組織中 HB<sub>x</sub> 的分析和本實驗室過去的研究做一個比較，整理結果如表一。過去的研究針對這 20 位 HCC 病人血清中抗 HB<sub>x</sub> 抗體的偵測，顯示第 11、16 和 18 號病人血清中的 HB<sub>x</sub> 抗體呈現陰性反應。在此研究中也發現第 11、16 和 18 號病人肝組織中沒有 HB<sub>x</sub> 的存在，此兩種不同檢測方法得到的結果可相互印證！即同一個病人的肝組織若缺乏 HB<sub>x</sub> 則血清中亦無 HB<sub>x</sub> 抗體的存在。此可更加確認實驗的正確性，而且藉由此結果，在 20 位 HCC 病人的檢測中 HB<sub>x</sub> 呈現 85 % 的陽性率。

本實驗室所擁有的肝組織是從民國 85 年取得至今，所以在進行 HB<sub>x</sub> 分佈研究之前，先行以 1-2 個組織進行切片觀察。結果發現細胞大多破碎而難以辨識，故經過與台中榮民總醫院的接洽，我們又取得了 8 個肝組織，分別來自於 4 位臨床上已確認為 HCC 病人，其正常肝組織與肝腫瘤的部分。此正常肝組織和肝腫瘤組織是以病理學上界定的，將取得的正常及腫瘤組織先以外觀做一個比較（如附表一）。以肉眼觀察，發現腫瘤組織於顏色上較正常組織為白，且萃取後的蛋白質濃度也較高，在進行石臘組織切片後，以 Hematoxylin 染色後，在顯微鏡下觀察發現，細胞核為紫色且細胞十分完整，而每單位面積下的細胞數，肝腫瘤組織多於正常組織（如附圖二）。

在以單株抗體偵測這 8 個正常及腫瘤組織後發現，正常及腫瘤組

織中均可以偵測得到 HB<sub>x</sub> 的存在。此結果可做如下的解釋！組織的正常與否是以臨床病理學判定的，但癌化是一個長時間複雜的過程，所以目前看似正常未癌化的組織因取自於同一個肝，所以也有可能已經遭受到 B 型肝炎病毒的侵害。

HB<sub>x</sub> 在肝組織上的分佈研究結果十分分歧，有部分的原因是因為所使用的抗體不專一所造成的。故本實驗中，特地準備 3 種不同的抗體，以求結果的專一性。在此先將此 3 種抗體加以比較如下：1、單株抗體：來自於合成的 peptide，其專一性高，但是仍有交叉反應的可能性。2、兔子的多株抗體：因其多株抗體是接有 GST 之全長的 HB<sub>x</sub>，注射兔子之後，經兔子的其免疫反應所產生的抗體。故其抗體對抗的是全長的 HB<sub>x</sub>，可除去單株抗體交叉反應的發生。3、人類的多株抗體：來自於本實驗室中，以重組的 HB<sub>x</sub> 研究血清中 HB<sub>x</sub> 抗體的結果。取其含抗體量最高的第 8 號病人血清，當作人類的多株抗體使用。因為要直接偵測人類肝組織上的 HB<sub>x</sub>，所以人類抗體的使用有其必要性。因為人類抗體對於人類的組織有物種的特異性，可免除老鼠及兔子血清與人類組織間因物種不同而產生的交叉反應。

因為人類多株抗體的使用，使二級抗體相對的要使用抗人類免疫球蛋白抗體。但又因為是偵測人類的肝組織，所以造成無可避免的二級抗體會直接與人類肝組織反應的現象。為了解決這個問題，嘗試了

純化第 8 號病人之血清和在反應前將人類血清抗體進行反應前吸附處理，將非專一性抗體去除之後再進行反應。或是提高以人類免疫球蛋白抗體先行阻斷非特異性蛋白質反應的濃度，但是效果仍不顯著，二級抗體所造成的干擾，到目前為止仍難以排除。

至於在空白對照組的部分，其他老師建議應使用該抗體來源的物種其未經免疫反應前的血清來作用較為恰當。這部分的實驗我也已經嘗試過了，且經過數次反覆的測試之後，發現其血清所造成的背景值仍會干擾螢光反應的觀察，沒有比我所使用未經任何抗體處理之空白對照組來的清楚。所以此部分仍有待檢討與改進！

從過去到現在，在研究 HB<sub>x</sub> 於肝組織上的分佈中，因使用之 HB<sub>x</sub> 抗體的專一性有所爭議，所以造成結果的分歧。在本實驗中所準備的三種抗體，分別在分子的層次上先以重組的 HB<sub>x</sub> 加以測試，結果顯示此三種抗體均可以專一的偵測到重組 HB<sub>x</sub> 的存在。此在分子層次上的先行確認抗體之專一性，為本研究中首先採用。之後再使用此確認過的抗體，偵測細胞上 HB<sub>x</sub> 的分佈，其可信度就相對的提高了。

除此之外，藉由本實驗室中另外以 Chang 1-8 細胞株研究 HB<sub>x</sub> 分佈的結果顯示，以老鼠免疫反應前的血清作為陰性對照組發現，在同屬於肝細胞的細胞株 Chang 1-8 上，老鼠的單株抗體具有相當高的專一性（結果如附錄三）。

使用三種抗體，以冷凍切片技術，免疫組織化學法（immunohistochemistry）分析 HB<sub>x</sub> 在肝組織上的分佈。並以未經一級抗體染色作為陰性對照組，其結果一致，HB<sub>x</sub> 分佈於細胞質上。這和 Haruna, Wang 和 Su 於 1991 和 1998 年的研究相符。他們在研究 HB<sub>x</sub> 於活體細胞內分佈的結果上發現，HB<sub>x</sub> 主要會分佈於細胞質中（Haruna *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991; Su *et al.*, 1998）。此研究的結果不但能初步的解決抗體專一性與 HB<sub>x</sub> 分佈分歧的結果，更提供了未來在 HB<sub>x</sub> 功能研究上的一個依據。

## Reference

- Arbuthnot, P., Capovilla, A., and Kew, M., 2000. Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: Effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 357-368.
- Blumberg, B.S., Gerstley, B.S.J., Hungerford, D.A., London, W.T., and Sutnick, A.J., 1967. A serum antigen (Australia antigen) in down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Annals of internal medicine* 66,,924-931.
- Chang, M.H., Chen, C.J., Lai, M.S., Hsu, H.M., Wu, T.C., Kong, M.S., Liang, D.C., Shau, W.Y., and Chen, D.S., 1997. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *N. Engl. J. Med.* 336, 1855-1859.
- Collier, L., and Oxford, J., 1993. *Human virology.* Oxford University Press, New York pp251-267.
- Dane, D.S., Cameron, C.H., and Briggs, M., 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet I*, 695-698.
- Frangioni, J.V., and Neel, B.G., 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.* 210, 179-187.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., and Charnay, P., 1979. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli.* *Nature* 281, 646-650.
- Haruna, Y., Hayashi, N., Katayama, K., Yuki, N., Kasahara, A., Sasaki, Y., Fusamoto, H., and Kamada, T., 1991. Expression of X protein and

- hepatitis B virus replication in chronic hepatitis. *Hepatology* 13, 417-421.
- Haviv, I., Shamay, M., Doitsh, G., and Shaul, Y., 1998. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1562-1569.
- Henkler, F., Hoare, J., Waseem, N., Goldin, R.D., McGarvey, M.J., Koshy, R., and King, L.A., 2001. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J. Gen. Virol.* 82, 871-882.
- Herrmann, G., 1999. Immunohistochemical study of HBV antigens in 338 liver cell carcinomas. *Z. Gastroenterol.* 37, 329-342.
- Hoare, J., Henkler, F., Dowling J.J., Errington, W., Goldin, R.D., Fish, D., and McGarvey, M.J., 2001. Subcellular localization of the X protein in HBV infected hepatocyte. *J. Med. Virol.* 64, 419-426.
- Kaplan, P. M., Greenman, R. L., Ggerin, J. L., Purcell, R. H. and Robinson, W. S., 1973. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J. Virology* 12, 995-1005.
- Kim, C. M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., and Gilbert, J., 1991. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 351, 317-320.
- Monjardino, J., 1998. *Molecular biology of human hepatitis viruses.* Imperial College Press pp21-61.
- Nakatake, H., Chisaka, O., Yamamoto, S., Matsubara, K., and Koshy, R., 1993. Effect of X protein on transactivation of hepatitis B virus promoters and on viral replication. *Virology* 195, 305-314.
- Okochi, K. and Murakami, S., 1968. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang* 15, 374-385.
- Prince, A.M., 1968. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc. Natl Acad Sced USA.* 60, 814-821.



- Rahmani, Z., Huh, K.W., Lasher, R., and Siddiqui, A., 2000. Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential. *J. Virology* 74, 2840-2846.
- Robinson, W. S. and Greenman, R. L., 1974. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J. Virology* 13, 1231-1236.
- Sirma, H., Weil, R., Rosmorduc, O., Urban, S., Israel, A., Kremsdorf, D., and Brechot, C., 1998. Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome. *Oncogene* 16, 2054-2063.
- Smith, D.B., and Johnson, K.S., 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson B.J., and Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Su, Q., Schröder, C. H., Hofmann, W. J., Otto, G., Pichlmayr, R., and Bannasch, P., 1998. Expression of hepatitis B virus protein in HBV-infected human liver and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 27, 1109-1120.
- Takada, S., Shirakata, Y., Kaneniwa, N., and Koike, K., 1999. Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death. *Oncogene* 18, 6965-6973.
- Tiollais, P., and Buendia, M. A., 1991. Hepatitis B virus. *Scientific American* Apr., 48-54.
- Twu, J.S., Lai, M.Y., Chen, D.H., and Robinson, W.S., 1993. Activation

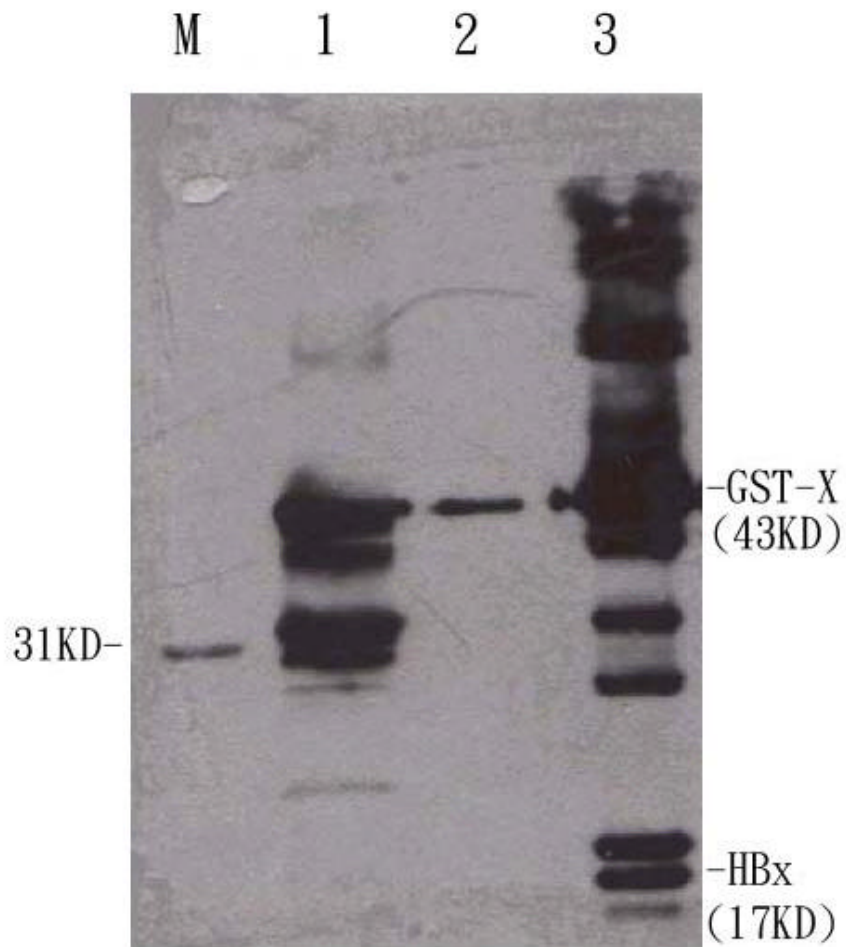
of protooncogene C-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology* 192, 346-350.

Wang, W., London, W. T., Lera, L., and Feitelson, M. A., 1991. HBxAg in the liver from carrier patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology* 14, 29-37.

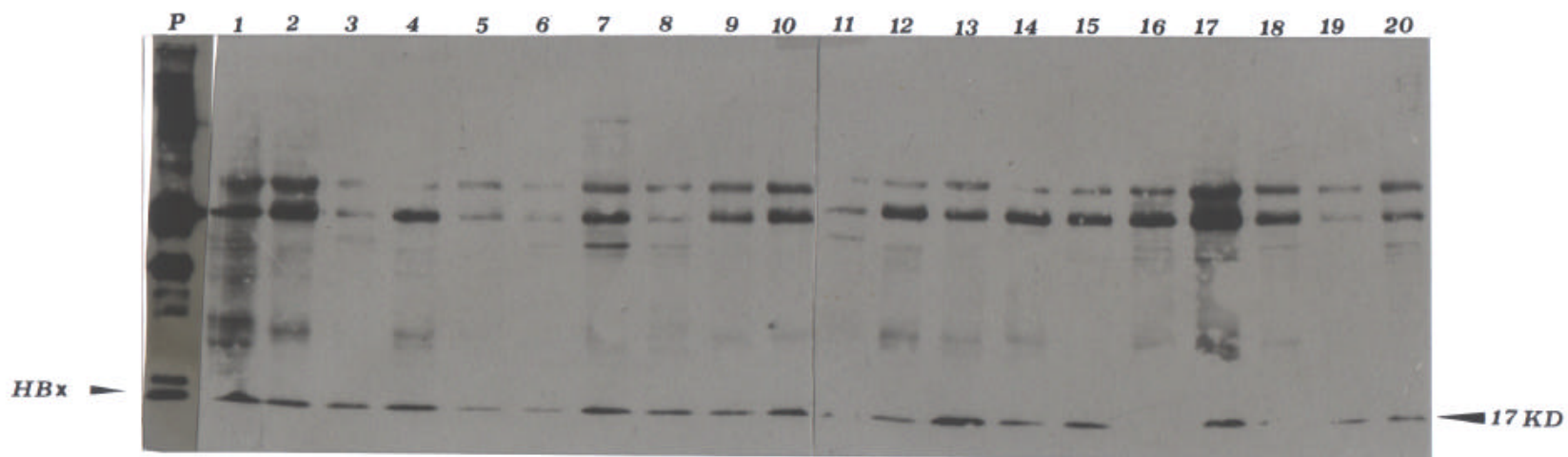
Yen, C.T., 2000. Hepatitis B virus X protein: searching for a role in hepatocarcinogenesis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 339-341.

Yen, T.S.B., 1996. Hepadnaviral X protein: recent progress. *J. Biomed. Sci.* 3, 20-30.

Zhu, M., London, W. T., Duan, L., and Feitelson, M. A., 1993. The value of hepatitis B x antigen as a prognostic marker in the development of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer.* 55, 571-576.

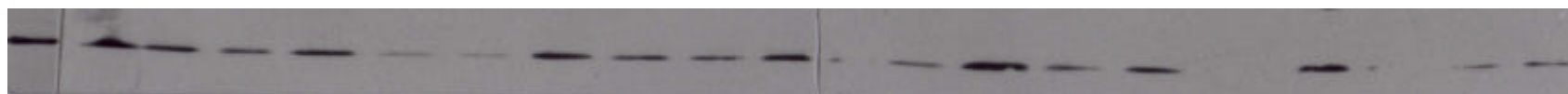


圖一、以 IPTG 誘發重組質體表達的 GST-X 接合蛋白質，經過純化以及蛋白質酵素 Factor Xa 切割後，以抗 HBx 的單株抗體藉由西方點墨法 ( Western Blotting ) 進行測試的結果。M：蛋白質標準分子量；Lane 1：細菌均質液；Lane 2：從醱珠上純化的 GST-X 接合蛋白質，其分子量約 43 KD；Lane 3：Factor Xa 切割 GST-X 接合蛋白質後醱珠，產生 17 KD 的 HBx 蛋白質。



圖二、以單株抗體，編號為 MAB8419 藉由西方點墨法免疫偵測的結果。P：HBx 蛋白質；Lane 1-20：1-20 號 HCC 病人將萃取後約 100  $\mu$ g 的總蛋白質，分別裝填於電泳膠之每一凹槽中。

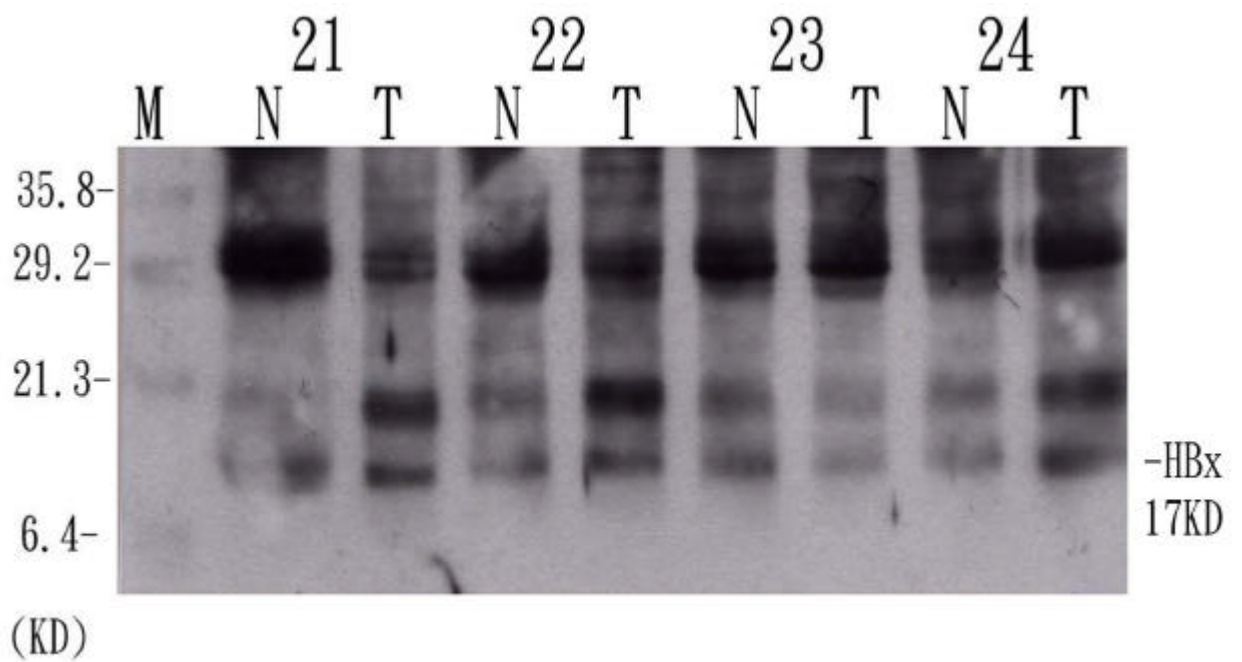
**G-X** 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



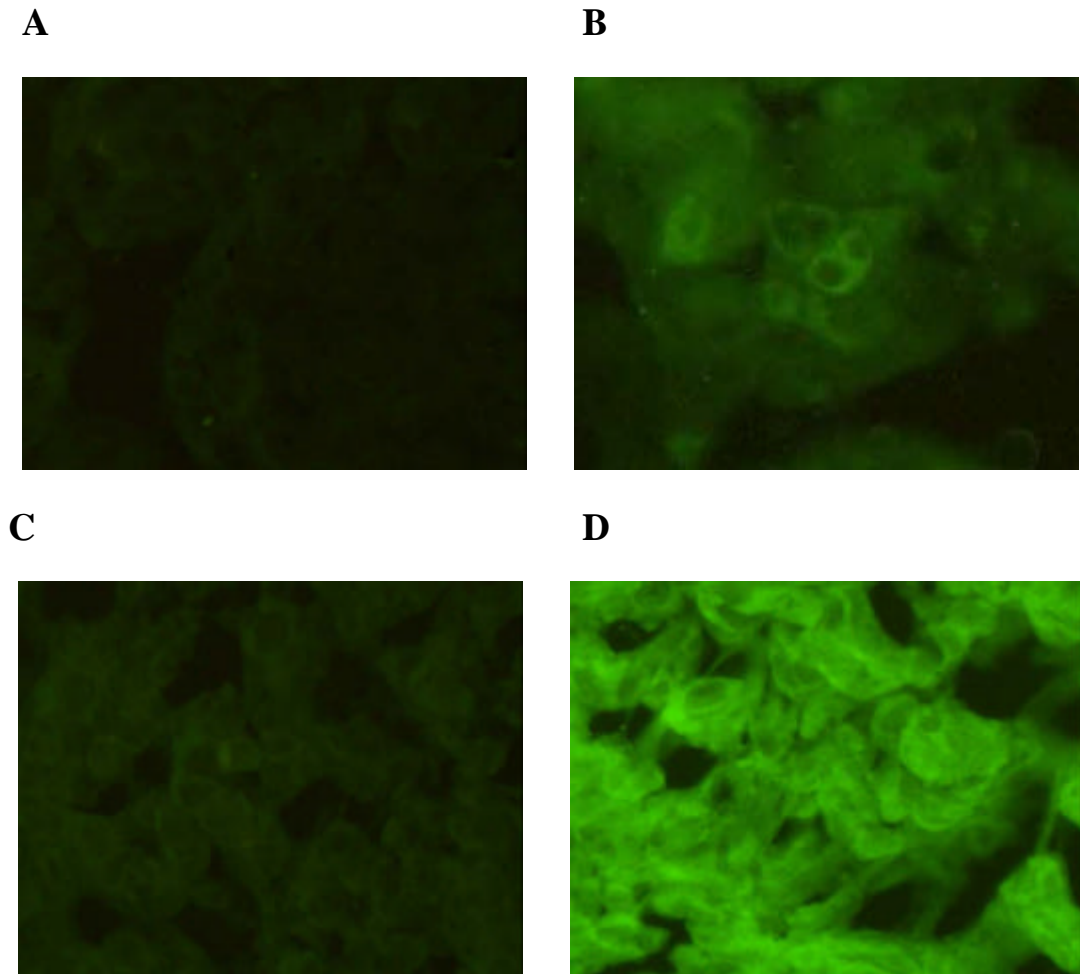
以 GST-X 為基準值 1

病人編號	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
相對比值	1.4	1.16	0.74	1.54	0.68	0.42	1.2	0.88	0.72	1.44
病人編號	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
相對比值	0.19	1.14	1.48	0.94	1.17	0.09	1.02	0.06	0.65	0.71

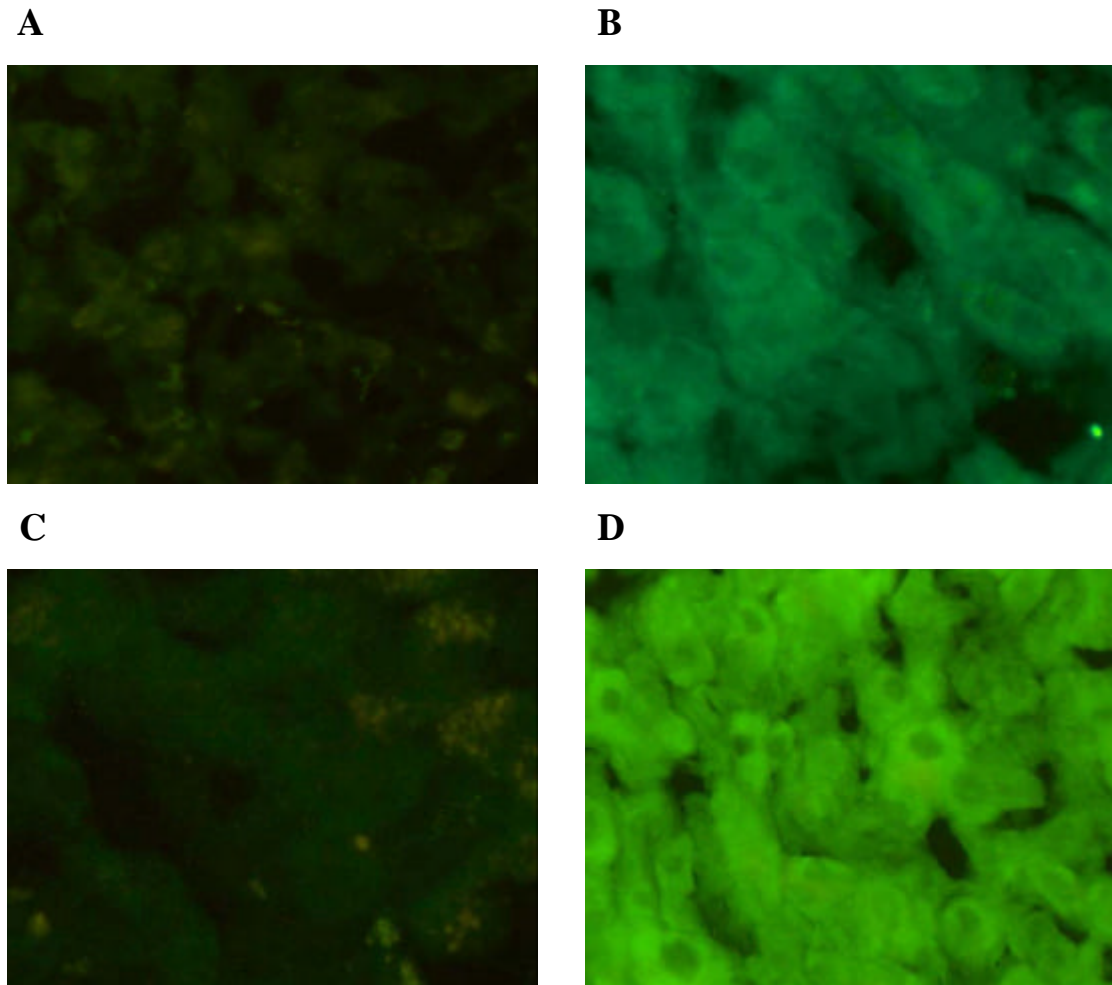
圖三、以 Image ProPlus 4.0 分析軟體，定量 20 位病人的 HBx 蛋白質。以純化重組的 GST-X 接合蛋白質為標準值 1 來做比較。得到 20 位病人 HBx 蛋白質相對於基準值的比值。



圖四、4 位 HCC 病人正常及腫瘤部位的肝組織，經單珠抗體免疫偵測 HBx 的結果。M：蛋白質標準分子量；N：正常部位肝組織；T：肝腫瘤組織。

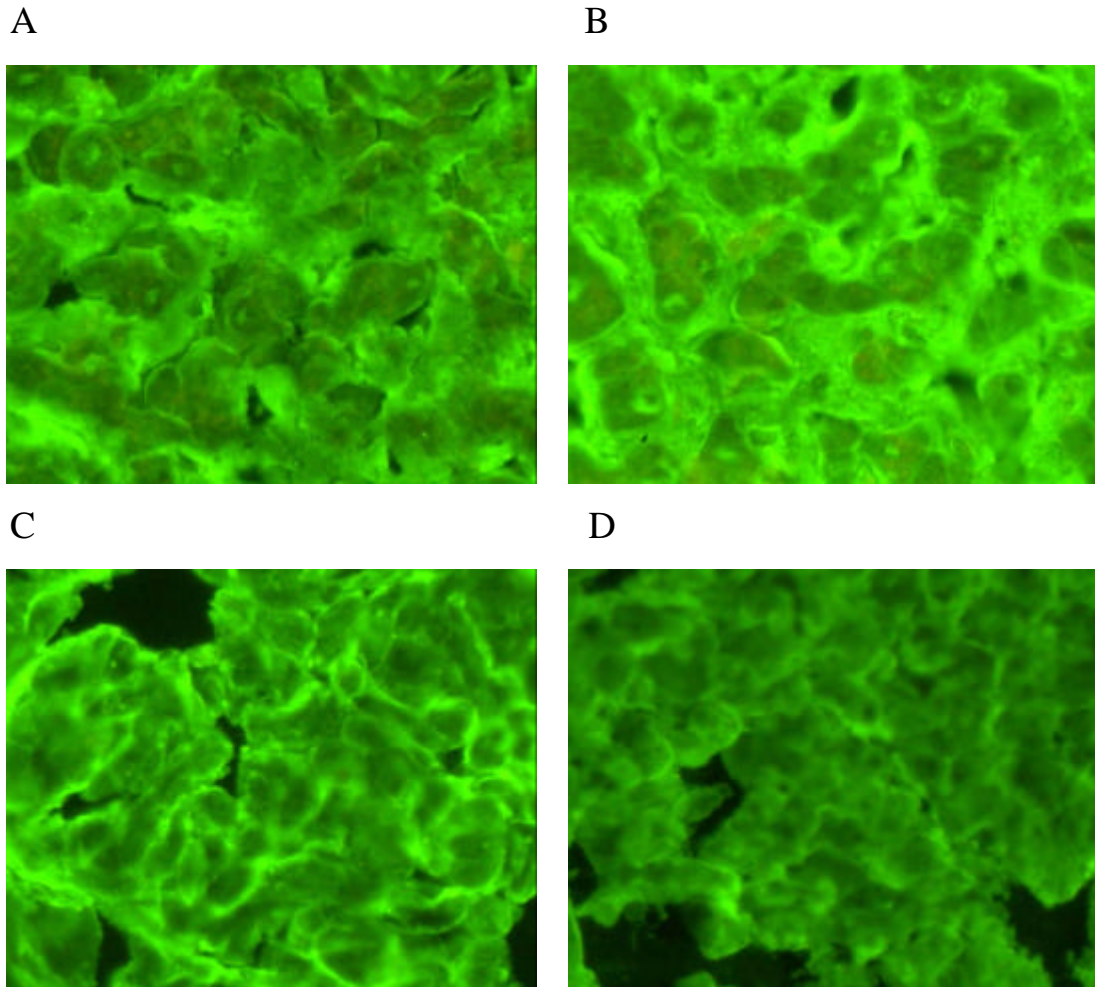


圖五、第 24 號 HCC 病人其肝腫瘤組織以冷凍切片後，使用老鼠的單株抗體及兔子的多株抗體經免疫染色的結果。A：未經老鼠單株抗體染色的陰性對照組；B：一級抗體為老鼠的單株抗體，二級抗體為 FITC-conjugated Goat Anti-Mouse IgG 的陽性反應；C：未經兔子多株抗體染色的陰性對照組；D：一級抗體為兔子的多株抗體，二級抗體為 FITC-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG 的陽性反應。



圖六、第 24 號 HCC 病人其正常肝組織以冷凍切片後，使用老鼠的單株抗體及兔子的多株抗體經免疫染色的結果。A：未經老鼠單株抗體染色的陰性對照組；B：一級抗體為老鼠的單株抗體，二級抗體為 FITC-conjugated Goat Anti-Mouse IgG 的陽性反應；C：未經兔子多株抗體染色的陰性對照組；D：一級抗體為兔子的多株抗體，二級抗體為 FITC-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG 的陽性反應。





圖七、第 24 號病人其正常及肝腫瘤組織，以第 8 號病人血清之多株抗體免疫染色的結果。A：正常肝組織，未經人類多株抗體染色的陰性對照組；B：正常肝組織，一級抗體為人類多株抗體，二級抗體為 FITC-conjugated Goat Anti-Human IgG 的陽性反應；C：肝腫瘤組織，未經人類多株抗體染色的陰性對照組；D：肝腫瘤組織，一級抗體為人類多株抗體，二級抗體為 FITC-conjugated Goat Anti-Human IgG 的陽性反應。

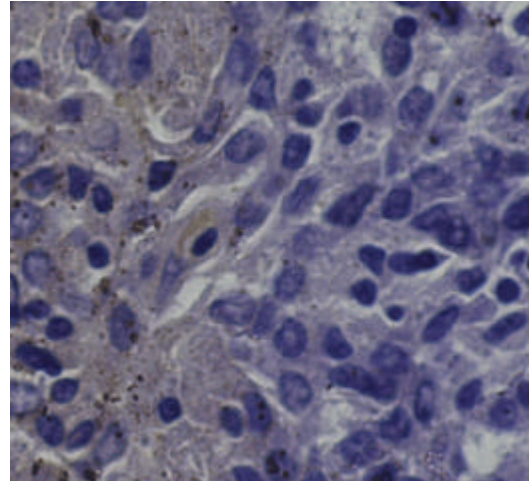
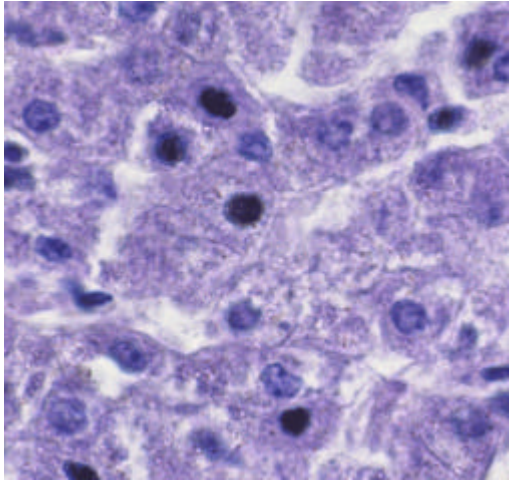
病人編號	手術日期	病人肝組織上 測到 HBx <sup>#</sup>	病人血清中測 到 Anti-HBx*
1	83/05/24	+	+
2	84/05/15	+	+
3	84/06/08	+	+
4	84/07/31	+	+
5	84/08/02	+	+
6	84/08/26	+	+
7	84/12/18	+	+
8	85/04/04	+	+
9	85/02/15	+	+
10	85/02/15	+	+
11	85/02/26	-	-
12	85/03/04	+	+
13	85/03/21	+	+
14	85/03/25	+	+
15	85/05/06	+	+
16	85/05/13	-	-
17	85/08/06	+	+
18	85/08/07	-	-
19	85/08/26	+	+
20	85/09/02	+	+

表一、偵測 20 位 HCC 病人肝組織上之 HBx 蛋白質，與本實驗室過去研究相同 20 位病人血清中，抗 HBx 蛋白質抗體的含量比較表。HBx<sup>#</sup>：以 HBx 蛋白質單株抗體免疫偵測 20 位 HCC 病人肝組織上之 HBx 蛋白質；Anti-HBx\*：以表達的 HBx 重組蛋白質免疫偵測 20 位 HCC 病人血清中 HBx 蛋白質抗體；+：陽性反應；-：陰性反應。

## 附錄

	正常肝組織	肝腫瘤組織
外觀顏色	較紅	較白
等體積大小秤重	較輕	較重
等體積萃取蛋白質	濃度較低	濃度較高
顯微鏡下觀察細胞 (石臘切片)	細胞完整且較鬆散	細胞完整且較致密

附表一、正常肝組織與肝腫瘤組織的比較表。



切片及染色步驟：

一、切下約  $5\text{mm}^3$  的組織

二、固定(以 10% formalin 固定 6-24 小時)

三、以 running water 清洗

四 脫水(從 50% ethanol? 70% ethanol? 80% ethanol? 90% ethanol? 95

% ethanol? 100% ethanol? Xylene : ethanol = 1 : 3? Xylene :

ethanol = 1 : 1? Xylene : ethanol = 3 : 1? Paraffine : Xylene =

1 : 3? Paraffine : Xylene = 1 : 1? Paraffine : Xylene = 3 : 1? 100

% Paraffine)

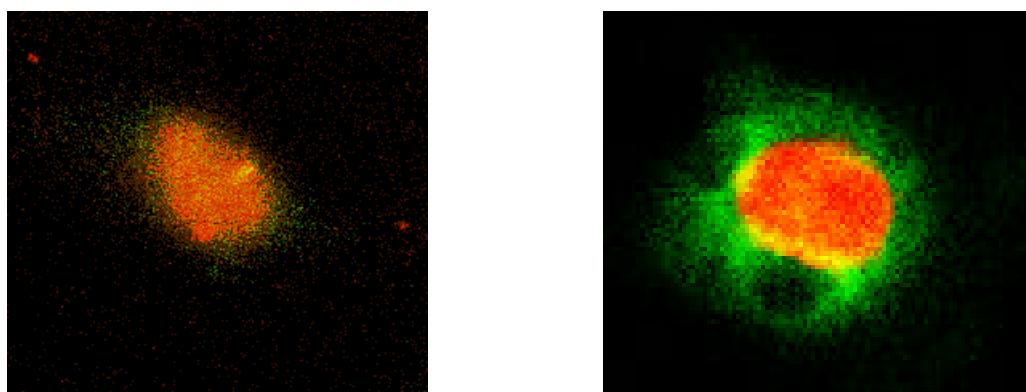
五、包埋(100% Paraffine)

六、切片

七、染色(以 Hematoxlin 染細胞核)

八、顯微鏡觀察

附錄二 正常肝組織與肝腫瘤組織之石臘切片圖及染色方法概略說明



附錄三、Chang1-8 細胞株以老鼠的單株抗體染色的結果。紅色部分為細胞核，左圖為正常之肝細胞株，而右圖為含有 HB<sub>x</sub> 抗原之肝細胞株。

## 個人基本資料

姓名：許靜婷

出生年月日：1976/09/26

住址：406 台中市北屯區新興路 16 巷 5 號

電話：( 04 ) 24264921 或 0930981511

## 學歷

2000-2002 東海大學生物研究所

2001~2003 東海大學教育學程

1994-1998 中山醫學院醫事技術理學士

1991-1994 台灣省立台中女子高級中學

## 證照

醫事檢驗師（檢字第 010976 號）

## 經歷

東海大學生物學系遺傳學實驗助教

東海大學環境科學系普通生物學實驗助教

東海大學教育學程學生研究會總務

2001 年 SCBA 研討會壁報展示

題目：Molecular detection of HBx and anti-HBx antibodies in human hepatocellular carcinoma

1998-2000 中山醫學院研究室研究助理