國 立 成 功 大 學
生 物 科 技 研 究 所
碩 士 論 文

與 GCIP 交互作用的蛋白之探討

Study on the proteins associated with GCIP

研 究 生：葉彥秀
指導教授：張敏政 博士

中 華 民 國 九 十 二 年 七 月

國立成功大學

碩士論文

研究生：葉彥秀

本論文業經審查及口試合格特此證明

論文考試委員 陳虹樺
洪健睿
陳宗嶽

指導教授：張政玫

系(所)主管：楊惠郎

中華民國 92 年 7 月 29 日

摘要

細胞的增生，分化或死亡是決定於細胞膜外的一些刺激像是有絲分裂素或是生長因子，去活化或抑制一些基因的表現。過去，本實驗室研究指出，利用 yeast two hybrid 技術，以 P0 蛋白為餌，於 HeLa cDNA library 篩選到 GCIP (Grap2 and cyclin D interacting protein)。此外也利用 RT-PCR 的方式發現 P0，一個真核生物 60S 核糖體蛋白，在乳癌病患檢體中有過度表現的現象，並且此現象不限於發生在是否有動情素接受器或 Neu 接受器的檢體中。在 2002 年 Xiang 等人提及，在已轉染人類端粒酵素的加速成長晶狀體上皮細胞中過度表現 GCIP 蛋白，此細胞株的生長速率會因此而減緩，這顯示 GCIP 在細胞的生長分化扮演壓抑的角色。

過去，本實驗室已經用哺乳類冷光酵素交互作用及免疫沉澱法證實 P0 與 GCIP 間的確存在有交互作用，同時利用 Mammalian two hybrid 的方法來探討之間的交互作用，發現除了全長 GCIP 與 P0 具有交互作用外，其餘的 GCIP 片段並沒有交互作用。因此本實驗想要了解 P0 和 GCIP 的各片段區域(domain) 在 *in vitro* 是否存在有交互作用，所以採用 GST pull down 實驗，實驗結果指出，除了全長的 GCIP 可和 P0 交互作用外，去掉 N 端 149 個氨基酸及去掉 C 端及 Leucine zipper 的 truncated form GCIP 也會與 P0 交互作用，因此，我們推測 GCIP 可能以 Helix-loop-helix domain、acidic domain 與 P0 結合。

此外，因 GCIP 與 cyclin D1 已證實有交互作用存在，但是對於有關 cyclin D2、D3 與 GCIP 的交互作用並未提及。在 2001 年 Yu 等人指出，在 20 %的乳癌患者當中，有 cyclin D1 過度表現的現象，若將經由 Ras 或 Neu 等訊息傳遞所引起乳癌的下游蛋白 Cyclin D1 阻斷掉，則乳癌即不會發生，可見 Cyclin D1 的確在乳癌的增生中扮演作用標的的角色。因此若能確認 GCIP 與 Cyclin D2、D3 的關係，對於組織中特異性表現 Cyclin D2、D3 所導致的癌症，或許由 P0 的過度表現引起，提供一條可能的路徑。因此，利用免疫沉澱法及細胞內共同

免疫沉澱法實驗結果發現，GCIP 除了與 Cyclin D1 交互作用，亦與 Cyclin D3 有交互作用，並且相較於 Cyclin D1，Cyclin D3 與 GCIP 的結合能力是比較強的。

另外，挑選 MCF7 的 P0 stable clone 後，與送入未表現 P0 的質體以及不送任何質體的 MCF7 細胞相較，發現持續表現 P0 蛋白的細胞株生長速率較快。綜合以上結果，初步推測，在癌症中 P0 的過度表現可能藉由結合在 GCIP 的 HLH domain 或 Acidic domain 傳送，影響下游 Cyclin D1 及 Cyclin D3 的細胞週期變化或細胞增生，至於調控的方式和機轉也是後續值得我們去探究的。

Abstract

The regulation of gene expression of cell prolifiration, cell differentiation, and apoptosis are governed by extracellular stimuli like mitogens or growth factor. P0, a 60S ribosomal protein in eukaryotes, was a crucial component in a ribosomal stalk which plays an important role in polypeptide chain elongation during the translation step.Empolying quantitative RT -PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) experiments, our preliminary studies revealed that overexpression of P0 was observed in breast cancer, which were with the expression of estrogen receptor-positive or negative and with neu receptor-positive or negative.

In addition, using P0 as a bait, a novel gene GCIP (grap2 and Cyclin D interacting protein) was screened by yeast two hybrid method. Xiang *et al.* reported that GCIP overexpression in the pCl-hTERT-HLE (Human lens epithelial) cells slows down the growth rate of the doubled-transfected cells. These suggested a potential repressor of GCIP in cell proliferation and differentiation. Although P0 bound to intact GCIP was confirmed in both yeast two hybrid assay and mammalian two hybrid assays, P0 interacted with which domain of GCIP had not been determined. In this study, *in vitro* GST pull down experiments was performed to investigate whether truncated forms of GCIP interact with P0 or not. The results revealed that P0 interact with truncated form of GCIP lacking leucine zipper domain and N-terminal region 149 amino acids, suggesting that GCIP interact with P0 through binding to HLH domain or acidic domain.

Although GCIP bound to Cyclin D1 in some cell line (Jurkat, COS-7) had been reported, whether GCIP could bind to Cyclin D2 and Cyclin D3 or not were unknown. The cyclin D1 gene was amplied in up to 20% of human breast cancer. Yu *et al.* reported that cyclin D1-deficient mice are resistant to breast cancers

induced by the neu and ras oncogens. It was therefore propose that anti-Cyclin D1 therapy may be highly specific in treating human breast cancers with activated Neu-Ras pathways. If we determine the relationship between GCIP and Cyclin D2, D3, it may provide a possible link between P0 overexpression and Cyclin D2, D3 in specific cancers. In order to investigate wheather GCIP bound to Cyclin D2, D3 or not, Cyclin D1 and D3 were cloned from breast cDNA library, while Cyclin D2 was cloned from HeLa cDNA library, and TNT Quick Coupled transcription / Translation and immunoprecipitation (IP) were performed. Compared to the binding capability of Cyclin D1, that of Cyclin D3 is stronger.

Furthermore, MCF7 cells containing stably expressive P0 showed a significant increase in growth rate compared to MCF7 cells and MCF7 cells only containing pMH vector. In conclusion, our results indicate that P0 overexpression is involved in cancer signal transduction through binding to HLH domain or acidic domain of GCIP, then mediates downstream cyclin D1, D3. However, how GCIP influences cell cycle progression and cell proliferation of cyclin D1 and D3 remains to be further investigated.

誌謝

首先感謝我的指導老師--張敏政老師提供我這樣一個舒適的實驗環境進行實驗，無論在實驗上或生活瑣事上，老師給予我許多自由的發揮空間，此外，老師在實驗上及生活上的諄諄教誨，我會謹記在心。在口試時間，也要感謝陳虹樺老師、陳宗嶽老師以及洪健睿老師抽空審閱我的論文，給予我許多寶貴的建議。

時光荏苒，兩年的時間，不算長亦不算短，想想當初剛進來實驗室的我，對許多事都感到陌生不安，經常跌倒，撞個鼻青臉腫，累積許多失敗挫折經驗，而現在能逐漸上手，從當初作實驗常常手忙腳亂，開始掌握實驗的手感，慢慢體會出作實驗的樂趣，這中間的改變並非一夕之間。想想，這段時光有歡笑，有悲傷，幸好一路上有許多很棒的實驗夥伴，走向科學殿堂的路，其實並不孤單!!

感謝實驗室學長姊昱仲、昭中、瑞陽、鴻泰對我生活上及實驗上的教悔。昱仲學長在文獻上的指導使我的迷津惑然開朗，瑞陽學長在實驗上的討論與幫助更是毫不保留，特別感謝的是我的師父昭中學姊，在實驗中給我的許許多多啟發，她的做人處世方式，都是我值得學習的地方。另外，在我低潮時陪我走過風風雨雨的鋺菁和俐雯，每當我疲憊失落時，鋺菁的笑容和爽朗，對我有如注入一針強心劑，可以重新再出發，而她對實驗的認真謹慎也是我學習上最佳典範。”神經大條”又可愛的俐雯在實驗上的精闢見解，總令人感到折服。佩文的巧思及貼心總會令實驗更加順利。信光在我實驗出現小差錯總能適時提醒我，還有其他的實驗室夥伴榆芳、程耀、長欣，虹婷助理、怡芳都爲平凡無奇的實驗室生活增添不少樂趣。

實驗室的生活就好比一個小型的社會，也是能遇到許許多多學有專精，各有所長的人們。與一群對研究充滿熱誠的人們一同登入學術殿堂，是一件十分享受的事情，對我而言，實驗室的生活有歡笑有淚水，遇到瓶頸時的壓力與挫折，或是獨立尋求解決或是與同學們相互切磋，彼此共勉解決問題，完成一項工作的成就感與實驗過程的點點滴滴充滿了成長與感謝，能夠認識你們大夥，是上天賜給我的禮物!

最後感謝陪伴我走過歡笑與悲傷的男友政龍，有你就好像呼吸空氣般，很自然卻不能沒有，謝謝你在我拗脾氣時，無怨的支持與包容，還有我的父母葉榮華先生及賴淑貞女士，我哥哥葉彥成，無論在外頭受到何種委屈，我都不會驚慌失措，因為我知道，有個屹立不搖的避風港等著庇護我。最後把這本論文獻給我這輩子最敬愛的人—我的外婆賴黃玉線女士，雖然她老人家在前一陣子已仙逝，無緣分享我的喜悅，但在天之靈的她所留下的堅毅精神及幽默風範永遠長存我心。

目錄

授權書

考試合格證明

摘要 I

Abstract III

致謝 V

目錄 VII

圖目錄 IX

縮寫檢索表 X

與 GCIP 交互作用之探討……1

緒論……2

研究目的……12

材料與方法……14

一、cDNA 資料庫質體 DNA 之抽取……15

二、大腸桿菌之形質轉換 (Transformation) ……16

三、製備少量質體 DNA……17

四、質體 DNA 的抽取(Clontech) ……19

五、pET21b-P0 融合蛋白之表現 Protein Expression……20

六、GST-GCIP 融合蛋白之表現 Protein Expression……21

七、 P0 融合蛋白的純化……22

八、GST-GCIP 融合蛋白的純化……24

九、多株抗體的製備……25

十、SDS-PAGE 之蛋白質分子量分析……26

十一、西方點漬法(Western blotting) ……28

十二、抗體的純化(Antibody purification) ……29

十三、GST PULL DOWN……30

十四、GCIP Knockdown(剔除).....32
十五、細胞存活率偵測分析(MTT assay) 34
十六、細胞週期素 Cyclin D Family 的選殖.....35
十七、DNA 的萃取(DNA extraction)及接合反應(DNA Ligation).....36
十八、細胞解凍及細胞繼代培養(附著型細胞 adherent cell).....37
十九、細胞保存.....39
二十、試管內表現放射線標定的重組蛋白(in vitro translation) 40
二十一、蛋白質濃度的定量.....41
二十二、細胞內共同免疫沉澱法.....42
二十三、P0 stable clone 生長曲線.....43
結果與討論.....44
參考文獻.....53
自述.....83

圖目錄

圖一、 在不同imidazole濃度下,利用鎳親合性管柱所純化P0蛋白……...…62
圖二、利用 GST 親合性管柱純化 GST 融合蛋白 GCIP 蛋白……..……63
圖三、利用西方點漬法測試製備抗體的效價.. ……...……64
圖四、將不同片段的 GCIP 構築在 pGEX-5x-3 質體上……...……65
圖五、以西方點漬法偵測 GCIP 與 Refolding P0 交互作用……..……66
圖六、GST Pull Down 原理示意圖……..……..…67
圖七、設計引子構築各片段的 GCIP……..…68
圖八、大量表現融合在 GST 的全長及各片段 GCIP 融合蛋白……..……69
圖九、利用 GST Pull Down 觀察放射線 P0 與 GCIP 與各片段 GCIP 融合蛋白交互作用……..70.
圖十、GCIP 抗體的純化……71
圖十一、偵測轉染入 MCF7 細胞的抗體轉染效率……..……72
圖十二、顯微鏡下觀察轉染入抗體的細胞……..……..73
圖十三、將 GCIP 抗體送入 MCF7 細胞，利用 MTT 觀察細胞增生現象 74
圖十四、以 Pull Down 觀察細胞內 Cyclin D1 與 GCIP 片段交互作用.....75
圖十五、利用 GCIP 抗體偵測免疫沉澱法中 Cyclin D1 與 GCIP 交互作用….76
圖十六、利用 GCIP 抗體偵測免疫沉澱法中 Cyclin D2 與 GCIP 交互作用….77
圖十七、利用 GCIP 抗體偵測免疫沉澱法中 Cyclin D3 與 GCIP 交互作用..78
圖十八、細胞週期素 Cyclin D1、D2、D3 的選殖及構築……79
圖十九、利用免疫沉澱方式觀察 D type cyclins 與 GCIP 交互作用……80
圖二十、利用免疫沉澱法觀察 GCIP 與 D type cyclins 的交互作用……81
圖二十一、含有 P0 stable clone 的 MCF7 細胞生長曲線圖……..……82

縮寫檢索表

Ap	Ampicillin
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
bp	base pair
BSA	Bovine serum albumin
CDK	Cyclin dependent kinase
D.D.	Double distilled water
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleoic acid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	(ethylenedinitrilo) tetraacetic acid
Et-Br	Ethidium Bromide
FBS	Fetal Bovine Serum
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactoside
Kb	Kilobase pair
KDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LiAC	lithium acetate
$MgSO_4$	Magnesium sulfate
MOPS	4-morpholinepropanesulfonic acid solution

OD	Optical density
O.R.F.	open reading frame
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffer saline
PBST	Phosphate buffer saline Tween-20
PEG	polyethylene glycol
PCR	polymerase chain reaction
Rb	Ratinoblastoma
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TE	Tris-HCl-EDTA
TEMED	N,N,N',N',tetramethylethylenediamine
Tris	Tris(hydoroxymethyl)-aminomethane
X-gal	5-Bromo-4-Chliro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

與 GCIP 交互作用之探討

緒論

P0 簡介

GCIP 簡介

Cyclin D 簡介

研究目的

研究方法與材料

結果與討論

緒論

基因表現過程中，由 mRNA 轉譯成蛋白質，核糖體扮演重要的角色。核糖體為蛋白質的工廠，有 50 多種的蛋白質存在於核糖體，這些蛋白質對於核糖體的結構維持，扮演重要的角色。真核細胞的核糖體組合在核仁進行，核糖蛋白在細胞質內合成後，被送入核仁與 rRNA 組合成大次單位及小次單位，之後兩者再分別進入細胞質進行核糖體的組裝。

在不同生物物種中，雖然因演化差異有所不同，但仍有一些具有保留性，而這些保留區則對細胞的生長有一定程度的重要性。核糖體中的 stalk 結構，是最常見的保留性區域之一。

在真核生物中，stalk結構在1982年被證實是由五個蛋白質所形成的五聚體(41)，其成員主要有三個：P0、P1、P2。也就是說Stalk是由四個較小的酸性磷酸化蛋白：P1、P2，及一個較大的蛋白質：P0所組成，即形成為P0-$(P1)_2(P2)_2$ 。P0、P1、P2的分子量分別為38kDa、13kDa、13kDa。目前已證實P1先和P2結合成二聚體$(P1/P2)_2$，之後P0與兩個P1會直接鍵結，形成五聚體，因此P2本身並不會與P0鍵結，而是藉由P1與P0產生關聯 (14)。直到1987年，這三段基因才由人類肝細胞的cDNA基因庫中被選殖出來 (28)，並發現這三段基因的C末端，擁有十分相似的DNA序列，轉譯出相同的胺基酸序列(KEESEESD-DMGFGCFD)。爾後，在許多不同物種中(酵母菌、果蠅、老鼠、原蟲)，也發現 P 核糖蛋白，其碳末端亦為一高度保留區(40)，具有相同的16個氨基酸序列 (30)。因stalk的結構，是最常見的保留性區域之一，因此，在原核中也有相類似的構造，如bacteria中的L10-$(L7/L12)_4$，兩個由L7及L12形成的二聚體，與L10形成一個五聚體 (43)。五聚體以P0的N端和large rRNA的最高度保守區域作用，也就是所謂的GTPase中心，以C端和Elongation factor 作用(42,31)。在真核中，也有相同的情形。在真核生物中的P0與原核生物中的L10相似，P1、P2也相似於原核中的L7/L12。

哺乳細胞生長週期的控制與癌症的形成及發展具有密切的關係，若細胞生長的週期失去調控，會導致細胞不正常的增長而造成腫瘤。幸而在整個生物的演化過程中，細胞已經發展出一套非常嚴謹的管制系統來自我監控分裂的進行，即所謂的檢查點 (checkpoint)，以確保每一個子代細胞都能接受正確無誤的遺傳訊息，當 DNA 受到傷害時，這個檢查點會因應使 cell cycle arresting 避免產生錯誤的遺傳訊息。檢查點是指一個具有調節功能的蛋白質，在此時期檢查點讓細胞週期呈現暫停狀態，讓細胞檢查 DNA 是否受到破壞或有任何的缺陷，並且在進入下一個時期之前進行修補(repair)的工作。假使無法避免錯誤發生，它會引領細胞走向細胞凋亡(apoptosis)。

所以細胞週期的調控機轉是重要的課題，因為正常細胞之所以會轉變成癌細胞的一個重要原因，往往就是這些監控細胞分裂的系統失去了正常功能所造成的後果，因此細胞週期的失控與癌症的發生密切相關。

P0 蛋白的角色:

核糖體中的 stalk 結構，在許多生物體中視常見的保留區之一，同時也是很重要的結構，而 P0 就是此 stalk 中的重要成分之一，是真核生物中 60S ribosomal protein 的一員，在真核生物蛋白質合成轉譯中，扮演絕對的重要角色。 P0 除了和 rRNA 鍵結外，P0 蛋白會和 P1、P2 形成五聚體，以 ribosomal stalk ，此結構影響細胞生長速率。由於 P0 與 P1、P2 進行結合，造成細胞生長速率隨著 C 端 DNA 的切除而減慢。$(P1/P2)_2$ 這四種蛋白質的 C 端都有共同序列 EESDDDMGFGLFD 且和 Elongation factor II 作用，且這兩者作用區大致位在 C 端。

最早發現具有 DNA 修補的功能的 P0 蛋白是果蠅的 P0 蛋白，其具有 AP(apurinic/apyrimidine)活性，並參與 DNA 的修補機制，而此結果起源於 Kelly 在 1989 年發現一個抗人類 DNA 修補蛋白的抗體會和果蠅的一個蛋白進行交互作用。經由 cDNA 的篩選後，發現此段基因具有 apurinic/apyrimidine 活性。進而以此段基因為探針，進行人類 cDNA 的篩選，發現此蛋白與人類的 P0 蛋白具有很高相似性。

P1 與 P2 蛋白的 N 端形成 stalk 中的 tip 結構。所有的蛋白質皆已形成磷酸化的現象。在之前的文獻指出，此磷酸化現象可活化 stalk 的活性。P0 核糖蛋白磷酸化的位置在碳端最後的 serine。

在 yeast 中分析得知，在某些情況下，當 P1 及 P2 缺乏時，細胞只是生長情況緩慢。但當 P0 核糖蛋白缺乏時，卻會造成細胞的死亡。所以 P0 核糖蛋白是維持 stalk 結構的最基本單位(8)，也是細胞生存的基本需求。

雖然，真核與原核之核糖體中的 stalk 基本功能很相似，但是它們卻有很多地方的不同。例如：真核的 P0 核糖蛋白在構造與功能上，比原核的 L10 來的複雜。在真核 P0 核糖蛋白的碳端有一段約 100 個胺基酸的延伸，而這段胺基酸與 P1、P2 的序列很類似；而這個延伸的構造是扮演著和 P1、P2 鍵結的重要角色，也就是幫助其形成五聚體。此外，它能夠在缺乏其它要素的狀態下，執行完整 stalk 的功能。P0 能夠自身形成的最小 stalk，也能提供精準的蛋白質合成，不過速度上會比完整的 stalk 來的慢。P1、P2 也以一種可回收利用的方式，存在於細胞質中，並且會增加核糖體的效率。在演化中，真核的 P0 核糖蛋白多了一些特質，就是可以以核糖體來調節其轉譯流程，這是原核所缺乏的。

在過去實驗室研究指出，真核核糖體蛋白 P0，除了文獻已發表在大腸癌，肝癌都有過度表現的現象，在乳癌中亦有過度表現的現象。故推測 P0 與其他因子作用，影響細胞生理。爲了探究何種分子與 P0 有關，因此利用 yeast-two-hybrid，以 HeLa cDNA Library 篩選出會與 P0 作用的蛋白質---GCIP(grap2 and cyclin D interacting protein)(45)。發現不論在酵母菌或哺乳類細胞中，GCIP 皆會與 P0 結合。再進一步以細胞中螢光酵素分析方法，探討 P0 與 GCIP 這兩種蛋白質的結合。將 P0 之 C 端會磷酸化的 serine 突變，及除去 25 個胺基酸，結果並不會影響 P0 與 GCIP 的結合(54)。GCIP 普遍存在各個組織中，尤其在停止分化、增生的細胞中表現量較多。因為其會與 cyclin D 結合，使 cyclin D 無法磷酸化

RB(retinoblastoma)，造成 E2F 無法與磷酸化之 RB 分離，因此一些有助於 cell cycle 進行的基因，不能受到 E2F 的調控(11)。

此外，因 P0 在癌細胞中有過度表現的現象。推測其可能因為藉由與 GCIP 的結合，而影響細胞的生長及分化。故本論文前半段主要在探討 GCIP 與 P0 之間的作用，對於生理的意義為何。

GCIP 蛋白簡介:

GCIP 全名為 grap2 and cyclin D interacting protein，此外又稱為 D-type cyclin-interacting protein 1; HHM Protein; DIP1; grap2 cyclin interacting protein。2000 年 7 月，Xia 等人以 Grap2 (一個在免疫訊息傳導中針對白血球的 adaptor protein) 為餌，在骨髓 (bone marrow) cDNA library 篩選到 GCIP。若將此蛋白送到細胞中，有報導指出會藉由抑制 cyclin D dependent kinase(Cdk) 活性進而降低 Rb 的磷酸化，抑制 E2F 所引起的下游基因轉錄活化 (45)。此外，GCIP 也會跟 E12(一個 helix-loop-helix 蛋白)具有交互作用，是個對肝具有特異性基因表現的負向調控者 (39)。根據報導，GCIP 會有兩個 Alternatively spliced variants，可轉譯成兩個 isoforms，大小分別為 40 kD、28 kD。

GCIP 全長為 1080 bp，可以轉譯成 360 個胺基酸，大小約 40 kDa。GCIP 在經過二級結構分析後，顯示在蛋白質結構中有五個區域(Domain)，分別為 N 端區域、HLH 區域(helix-loop-helix)、acidic domain、leucine zipper domain 及 C 端區域。HLH motif 位在第 149~190 個胺基酸的位置，但其不帶有鹼性的 DNA 結合部位，而且 GCIP 中的 HLH 區域其第一個 helix domain 與在轉錄過程中與扮演負向調控角色的 Id family 十分相似，推測 GCIP 在轉錄過程中扮演中心角色 (4)。

另外以北方點漬法作實驗發現在心，肌肉，腎，週邊白血球，腦等細胞其 GCIP 的 mRNA 表現量較高，而這些細胞共同特徵，皆為停止生長、分化的細胞。推測 GCIP 在細胞的生長分化上應具有負調節的功能，此外亦發現骨髓中的 GCIP 表現量低於其他免疫組織 (45)。

Xia 等人在 2000 年以 yeast two hybrid assays，*in vitro* binding assays 及

western blotting 分析轉染入 COS-7 細胞株的免疫沉澱物。藉由轉染 HA-GCIP 分析 Cyclin D 及 GCIP 能夠交互作用。在 COS-7 細胞株過度表現 GCIP，會藉由降低 CDK 的活化，而降低 RB 的磷酸化。此外，GCIP 的過度表現也會降低轉染入細胞的 E2F1 質體的轉錄活性 (45)。

根據比對，GCIP 蛋白質與老鼠母性轉錄蛋白 Maid 具有 65%的相似度，最大的不同在於 GCIP 的 N 端比 Maid 多出 50 個胺基酸。而 2000 年 Terai 等人找到人類中的 Maid 類似性蛋白，命名為 HHM (Human Homologue of Maid)，經過比對後發現 HHM 與 GCIP 僅有一個氨基酸的不同。轉錄因子中的 helix-loop-helix family 已具有 200 名成員，Helix-loop-helix family 相關蛋白在生長發育過程中扮演關鍵的調控者。第一類的蛋白 HLH 蛋白如 E12 是獨一無二的被表現出。第二類的 HLH 蛋白如 MyoD 以具有組織特異性的方式表現出。這兩類的蛋白以異偶合(heterodimer) 的方式結合在 E-Boxes (CANNTG)，並且決定胚胎細胞的生死。Terai 等人爲了找尋控制肝細胞發育並且與 E12 蛋白有關聯的分子，利用 Yeast two hybrid，在人類胎兒的肝細胞中篩選到一個蛋白，命名為 HHM。HHM 在構造上與 Id family(inhibitor of differentiation or inhibitor of DNA binding)類似，且在構造上，HHM 與 Id family 具有關聯性，在腦，前列腺，胎盤，胎兒肝臟及骨髓具高度表現量，在生理上，HHM 與 Id family 的 Id2 皆可在 E12/MyoD 結合，並且 HHM 之所以能夠特異性在肝細胞中調控基因，原因是 HHM 為 HLH (Helix-loop-helix) 蛋白質抑制者。此外，HHM 在物理上可以與 E12 在試管內(in vitro)及哺乳細胞(in mammalian cell)進行結合。與 Id2 相較而言，HHM 對 E12/MyoD 有較低的抑制作用，然而，對於 Hepatic nuclear factor (HNF4) promoter 所引發的 luciferase 活化卻較明顯。因此，HHM 蛋白質在細胞生長發育也扮演一個轉錄抑制者的角色 (39)。

此外，由於 GCIP 會與 grap-2 交互作用，而 Grap2 就如同 Grb2，具有兩個 SH3 domain 及一個 SH2 domain。且具有 120 個 glutamine-/proline-rich 的 amino acid 區域，介於 SH2 domain 及 C 端 SH3 domain 之間。grap2 的表現有相當高的組織及細胞特異性，只在免疫細胞及 T 細胞中存在，所以 grap2 在免疫細胞中的訊息傳

導中，應扮演重要的角色，目前機制仍不清楚(29)，但已知 Grap2 在免疫細胞及 T 細胞中，可形成一個 signaling complexes，將膜外訊息傳至細胞核中(51)。其途徑為 grap2 與 SLP-76(SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa)及 LAT (linker of activated T cells)結合(5)，因此達到調節 T 細胞的活化作用 (22)。在 Xia 等人的研究中指出，以 yeast two hybrid 的方法，將全長的 GCIP 與完整的 grap-2，或只有包含 SH2 domain 與 C 端的 SH3 domain 的 grap-2，一同送入酵母菌中，發現 GCIP 與全長和只包含 SH3 domain 的 grap-2 可生長在 SD-3aa 的培養基上。所以 GCIP 會與 grap2 的全長或 C 端的 SH3 domain 結合 (45)。

目前亦有研究指出 grap-2 會與 HPK1 (hematopoietic progenitor kinase 1)交互作用。當 grap-2 與 HPK 1 共同在細胞中大量表現，不僅可活化 HPK 1，同時也會影響 JNK 的活性 (22)。但由於 grap-2 在整個免疫系統中，所扮演的角色仍不清楚，所以 P0、GCIP、grap-2 對於細胞的生理影響仍有待研究。

在 2000 年 Mau-Sun 等人以 GCIP 為餌(bait)，利用 yeast two hybrid 方法篩選到一個新的基因 *P29*。*P29* 帶有 NLS (Nucleus localization signal) 。NLS 的特色有二，第一個特色，具有一個短的 4-8 amimo acid 的鹼姓區域，其二為具有 10-15 amino acids 區隔的兩段鹼性區域。由於 P29 有 NLS，推測 P29 或許為一個核蛋白，藉由此特性可將交互作用的 GCIP 一起帶入細胞核中 (6)。

最近，2002 年 Xiang 等人提及將 p53、p21、GCIP 送入已轉染人類的端粒酵素反轉錄酵素 (hTERT) 的加速成長之人類晶狀體上皮細胞(Human lens epithelial cell line)後，會降低 p53、p21、GCIP 的表現量。隨著 p21 及 GCIP 的表現量下降，RB 會過度磷酸化，因此 E2F 轉錄活性會上升，而 hTERT 的過度表現會加速人類水晶體上皮細胞的成長。透過 mRNA 及蛋白質的層次觀察，GCIP 的過度表現的確可以拮抗轉染 hTERT 的加速成長之人類水晶體上皮細胞 (46)，此外，在此加速成長的人類水晶體上皮細胞中過度表現 GCIP，會使原本的生長速率遲緩下來。此暗示 GCIP 再細胞的生長分化中扮演壓抑的角色。

Cyclin D 的角色:

Cyclin D（D-type 週期素），包含 Cyclin D1，D2，D3，在細胞週期的過程中扮演訊息傳導的角色。隨者細胞外成長因子（growth facoter）或有絲分裂素（mitogenic）的刺激調控，cyclin D 會在細胞分裂的間期(interphase)累積，隨後又在細胞分裂(mitosis)的末期快速地分解，之後又會再度累積，使得此種蛋白質呈現週期性的變動。Cyclin 會與 serine/threonine 相關 kinase 形成複合物以控制細胞週期。這群 serine/threonine 相關 kinase 又稱為 cyclin-dependent kinase(CDKs)，它們的活性與 Cyclin 相關，當 Cyclin 與 Cdk 結合後會形成活化態，Cdks 的活化進而使 Rb 磷酸化。在 early G1 時 cyclin D1 與 CDK4/6 形成複合物，把 G1 期的 Rb 給磷酸化。緊接著 cyclin E 被合成出與 cdk2 結合並活化 Rb 在 late G1 使之磷酸化。在 S 期 cyclin A 與 cdk2 形成複合物繼續 Rb 的磷酸化。

大量合成與累積的 Cyclin 與 Cdk 在 G1 phase 結合後會導引 Cdk 到目標蛋白質上，Cdk 會把磷酸基加在調節 DNA 複製或引發細胞分裂的關鍵蛋白質上，藉由改變蛋白質的功能以進一步控制細胞週期。當外界的刺激訊息促使下游基因活化，如 cyclin D 與 cdk 組合在一塊，此 complex 進入細胞核後，需要 MAP kinase 及 chaperone Hsp90 活化態協助，此時 cyclin D/cdk 被磷酸化接著 Rb 被磷酸化，Rb 原本抑制 E2F 的功能被阻斷，細胞週期從 late G1 進到 S 期造成 cell proliferation，cell differentiation 甚至 apoptosis。

由於 Rb 可以藉由與 E2F 的 Activation domain 結合而去抑制含 E2F binding site 之 promoter (含 TTTCGCGC 序列)所啟動的轉錄，如 c-myc、B-myb、cdc2 等，皆為控制細胞生長的重要因子(1)。造成細胞週期的停留，因此只要將 Rb 磷酸化裁斷 (deletion)、突變 (mutation)或利用 oncoprotein 使之不活化，即可釋放轉錄因子 E2F，促進細胞週期的進行。

1994 年 Muller 等人證明 Cyclin D1 的表現需要有功能性的 RB protein 之存在。缺乏 RB 之 tumor cell lines 及表現 viral oncoprotein 之 cells 鮮少看到 cyclin D1 的表現。因此將 RB gene 轉染到缺乏 RB 的 tumor cell 能夠引發 cyclin D1

表現 (26)。

Cyclin D 之重要性：

Cyclin D1 大小為 36 kDa，屬於細胞週期調節者 cyclin D family 的一員。(47)。Cyclin D1 的功能主要是活化 Cyclin D-dependent kinases (32)，緊接著活化的 Cyclin D1/CDK 複合體使其中重要之下游蛋白磷酸化，Rb 是其中受質之一。低度磷酸化的 Rb 可防止細胞進入 S 期，當 Rb 蛋白被過度磷酸化，Rb 就無法避免使細胞進入 S 期 (44)。Jiang 等人在 1993 年發現在老鼠胚胎纖維母細胞過度表現 Cyclin D1 會縮短 G1 期，使細胞變小，增加致癌性 (17)。

Cyclin D1 在哺乳細胞正常的細胞週期運轉扮演關鍵的角色，在許多腫瘤可以發現由於基因的放大造成 cyclin D1 表現失控而引起乳癌;或因為染色體的轉位造成 cyclin D1 表現失控而引起 B 細胞的惡性淋巴瘤。並且研究發現，相較於只有表現 Cyclin D1 的乳癌患者，在同時表現 cyclin D1 及 EGRF (上皮成長因子接受器) 或 cyclin D1 及 RB protein 的乳癌患者在治療過後會有較差的癒後 (24)。有文獻指出在 20 % 人類乳癌會有 cyclin D1 amplify gene 的現象，而有超過 50 %的人類乳腺癌症會有 cyclin D1 蛋白的過度表現 (2,13,24)。

此外研究指出 D-type cyclins 的作用主要是作用在細胞週期的 mid-G1 (23) ，因為若將 D-type cyclins 的 antisense 的質體或抗體送入細胞中，會使細胞停留在 G1 期。但若在接近 G1/S 期將 antisense 的質體或抗體送入細胞中則對於細胞週期的進行沒有影響 (32)。這指出 cyclin D1 限制在細胞週期進行的 G1 期。

另外 Yu 等人在 2001 年提及，大部份的乳癌都有 cyclin D1 之過度表現的現象，而在缺乏 cyclin D1 的老鼠對經由 neu 和 ras oncogene 訊息傳遞所引起的 breast cancer, 卻不會發生乳癌，然而這只侷限 neu 及 ras 所引發的 pathway，在其他 oncogene 如 c-myc or wnt-1 引起的 pathway 並沒有相同的效應，他們的研究發現，cyclin D1 對於經由 Neu-Ras pathway 所引起的 breast cancer 具有絕對的重要性。因此 Anti-cyclin D1 的治療可能對於 Neu-Ras pathway 所引發的乳

癌具有選擇性 (51)。目前已知癌症的發生為一複雜的過程，breast cancer 位居女性十大癌症死因中的第五位。

cyclin D1 除了乳癌外扮演重要的角色外，也有報告指出在食道癌 (12)中會過度表現。此外 Sicinski 等人在 1995 年利用 gene targeting 的方式送入胚胎幹細胞產生缺乏製造 cyclin D1 能力的 mice，此種 mice 仍可生長然而它們的體型較小，生存率較低，甚至還會出現神經方面的障礙。老鼠的視網膜細胞數目劇烈下降，這是因為在胚胎發育過程中生長的失敗所導致 (35)。而且利用原位雜交法研究正常老鼠的胚胎發現在視網膜中有相當多的 cyclin D1—顯示 cyclin D1 對網膜發育的重要性。

此外，另一會與 GCIP 結合的蛋白質為 cyclin D。D-type cyclin(D1, D2, D3)會在細胞分裂過程中，扮演訊息傳導的角色，且受到生長激素的影響。因為 D-type cyclin 十分容易崩解，所以當生長激素量多時，D-type cyclin 的表現量隨之增加，但若細胞不再受生長激素刺激時，D-type cyclin 的量隨之下降 (32)。Cyclin D 對於細胞的影響是藉由與 cdk4 形成聚合物，而此時 cyclin D-cdk4 聚合物的功能受到 cdk-activating kinase 的調控 (23)，因 cdk-activating kinase 可藉由將 cdk4 的第 172 個胺基酸 threonine 磷酸化，而加強其活化的程度，而活化的 cyclin D-cdk 聚合物可將視網膜胚細胞瘤蛋白質(Retinoblastoma protein--RB)磷酸化，而 RB 磷酸化的位置為 serine 或 threonine (44)。尚未磷酸化之 RB，可藉由與 E2F 活化部位的結合，去抑制含 E2F-binding sites 的 promoter (序列有 TTTCGCGC)的轉錄，而造成細胞週期的停留。因為含有 E2F-binding sites promotor 的基因，如 c-myc、B-myb、cdc2，皆為控制細胞生長的重要因子(1)，所以 E2F 可誘導活化基因的表現，而這些基因在細胞週期的 G1 期進入 S 期中，有著調控的功能。因此，E2F 會參與細胞的生長、分化、細胞凋零、細胞週期的進行。

故將 RB 基因截斷、突變、磷酸化，使其不活化，或病毒的 oncoprotein 造成其釋放或游離，都可恢復 E2F 的活性，使細胞的生

長不受到抑制。所以抑制 cdk-activating kinase，則 RB 的磷酸化、E2F 誘導轉錄活性之能力，都受到影響。細胞的生長、分化，也因此受到調節。

研究目的

由於本實驗室之前利用 yeast two hybrid 方法證實 GCIP 可與 P0 結合，並在 mammalian cell 中以 mammalian two hybrid system 證實兩者在 *in vivo* 中存在有交互作用。但其間的作用是否有其他的蛋白質，或是 GCIP 當作中介者令我們到好奇。因為 P0 在一些癌細胞，如肝癌、大腸癌、乳癌中有過度表現的現象，其過度表現是否由於細胞增生造成核糖體的製造量增加，或是癌症組織誘發其大量產生，是我們想知道的。另外，由於 GCIP 會干擾 Cyclin D 與 Cdk 結合，造成 Rb 無法被磷酸化 (GCIP 抑制 Rb 的磷酸化)，進而使 E2F 被 Rb 緊緊的結合，抑制 E2F 所啟動的轉錄，造成細胞週期無法從 G1 進入 S phase，是否 P0 會藉由此路徑抑制 GCIP，進而造成 E2F 的轉錄活性，使細胞週期啟動甚至細胞增生，不斷增生造成癌化，其中的關係是我們想探究的。

此外，P0 除在癌組織中大量表現外，亦與自體免疫疾病有關，在 12-20%的紅斑性狼瘡病患血液中可發現抗 P 蛋白的自體免疫抗體存在。GCIP 與 P0 具有交互作用，前人在 Yeast two hybrid 系統中也證明 GCIP 與 Grap2 兩者有交互作用。Grap2 是免疫系統中具有特異性的 adaptor protein，主要發生在 C-JUN N-TERMINAL KINASE (JNK) 這個訊息傳導中，且自細胞膜釋放出的 anti-ribosome 及 anti P protein 的自體免疫抗體會和 T 細胞進行結合，但其作用機制仍不清楚，可能是抑制蛋白質合成的延長步驟，導致 T 細胞的細胞凋亡 (apoptosis) ，由於在紅斑性狼瘡病患的 T 細胞中的 interleukin-2 其生產量下降，推測 P0 其可能藉由與 GCIP 的結合，而影響免疫細胞的細胞凋亡。因此我要用 GST pull down 實驗觀察 GCIP 和 P0 兩者在試管內 (*in vitro*) 的關係，並且利用引子 (primers) 擴增出各種含有不同片段區域 (domain) 之 GCIP，藉由這些不同的區域 (Domain) 與 P0 的交互關係探討兩者結合部位，更進一步探討 GCIP 及 P0 之間的相互作用及此作用可能在訊息傳導扮演的角色。若能證實 P0 與 GCIP 間的交互作用能力並找出存在於 GCIP 的有功能的區域，或許能對有關紅斑性狼瘡病患體內

為何會有 P0 自體免疫抗體提供一個可能的答案。

此外，在 2001 年的 Yu 等人指出，在 20% 的 breast cancer 中有 cyclin D1 過度表現的現象，而先前實驗研究，經由 Yeast two hybrid 篩選到的 GCIP 蛋白又稱為 Grap2 and cyclin D interacting prtoein，即 GCIP 和 cyclin D1 有交互作用，然而文獻上並沒有很確切報告 GCIP 是否與 Cyclin D1、D2、D3 具有交互作用，為了釐清 D type cyclins 與 GCIP 的交互作用，我要採取試管內免疫沉澱法及細胞內免疫沉澱法證實兩者間的交互作用，進一步探究 cyclin D2，cyclin D3 與 GCIP 的關係，並進而探討可能在訊息傳導扮演的生理角色。

材料與方法

使用的培養基

液態完全培養基(Luria-Bertani medium)(Manistis et al., 1989)

1% Bacto-tryptone

0.5% Yeast extract

1% NaCl

固態完全培養基

液態完全培養基加 1.5% Agar

【菌株】

E. coli BL21(DE3)

F^-ompT[lon]hsdS$_B$($r_B^-m_B^-$; an E. coli B strain) with DE3, a prophage carring the T7 RNA polymerase gene

E. coli XL1-Blue MRF'

F' Tn*10 proA$^+$B$^+$lacIq △(lacZ)M15/recA1endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 ($r_K^-m_K^-$)supE44 relA1 lac △(mcrA)183 △(mcrCB-hsdSMR-mrr)173*

一、 cDNA 資料庫質體 DNA 之抽取

A. cDNA 資料庫質體濃度之測定：

材料:

Hela cell cDNA library (from clontech)

LB/Ap 固態培養基

LB/Ap 液態培養基

步驟:

取 1μl library 菌加至 1ml LB 中混和均勻--此為 A 溶液。由 A 溶液取 1μl 加入 1ml LB 中混和均勻--此為 B 溶液 。取 50 及 100μl 之溶液 B 均勻加至預先 $37^{O}C$ 加溫之 LB/Ap plate 上。室溫下放置 15-20 分鐘使培養基均勻吸收菌液。$37^{O}C$ 培養隔夜。計算每盤上菌落數以決定其濃度（titer）。

濃度計算公式：

cfu / ml = 長出菌落數 * 10^9 / 取出來塗佈之 B 溶液體積(50 或 100)

B. cDNA 質體之放大及抽取：

依計算出之 titer 結果，取出適量之 stock library 菌液，使得每盤培養基上約可長出 40000 個菌落，將共塗 75 盤，最後 cDNA 資料庫可達 3×10^6 菌落。將取出之菌液分成 75 等分，塗於 LB/Ap 培養基上，並使其吸收 10 分鐘。塗佈好之培養盤，置於 $30^{O}C$ 培養隔夜。次日，每盤長滿菌落之培養基加入 8ml LB，將菌落由培養基上刮洗下來，收集所有洗下之菌液。再加入 LB，使菌液 OD 值達到 0.7 左右，37℃

下，培養 1~2 小時。抽取大量之質體 DNA，此即為後續實驗所使用之子宮頸癌細胞 cDNA 資料庫質體。

二、大腸桿菌之形質轉換 (Transformation)(Dnahan, 1983)

材料:

Low buffer

10 mM MOPS

10 mM RbCl (pH 7.0)

High buffer

10 mM MOPS

10 mM RbCl

50 mM $CaCl_2$ (pH 6.5)

前置作業:

離心管，low buffer，high buffer 需事先滅菌

步驟:

先從自己劃好的 XL1B plate 中挑一顆 colony 養在 3ml LB。取 200 µl 送入 20ml LB flask。在 37˚C 培養震盪機震盪 2-4 小時。在波長等於 600 nm 時測吸光值=0.4-0.6 為理想 competent cell 菌量。取菌液倒入離心管，在 4˚C 下 5000 rpm 離五分鐘。倒上清液，以 low buffer 洗菌體(pellet)，先加一半使 pellet 溶解再加另一半。在 4˚C 下 5000 rpm 離五分鐘。倒上清液，以 high buffer 洗 pellet，先加一半再加另一半，搖晃使 pellet 散開，放在冰上 30 分鐘以上，4˚C 下以 5000 rpm 離五分鐘，倒上清液，加入 1-2 ml high buffer 打散菌體，完成 Competent cell 的製備，XL1B competent cell 貯存 4˚C，約可放五天。若要馬上進行細胞轉型，以每 100 µl Competent cell 與適量 DNA 混合，並在 4℃下靜置 30 分鐘。以 43˚C 加熱 45 秒，加入 1ml

LB，在 37˚C 培養一小時，取適量 DNA/Competent cell 菌液均勻塗抹在濃度為 0.1 mg/ml Ap 之固態完全培養基上，置於 37℃培養。若要抽細菌質體可培養在 20ml LB 加上適量 Ap。

三、製備少量質體 DNA(Birnboim et al., 1980)

試劑:

Solution Ⅰ

50 mM Glucose

10 mM EDTA (pH 8.0)

25 mM Tris-HCl (pH 8.0)

5 mg/ml Lysozyme

Solution Ⅱ

0.2 N NaOH

1% SDS

Solution Ⅲ

60 ml 5 M K-acetate

11.5 ml glactial acetic acid

28.5 ml H_2O

步驟:

將含有質體的菌體接種於 3 ml 液態完全培養基中，加入適當的抗生素，於 37℃下振盪培養過夜。所得之菌液在 4℃下以 5000 rpm 離心 5 分鐘，棄上清液後，把菌體重新溶於 100 μl 的 Solution Ⅰ中，於室溫下靜置 5 分鐘。接著加入 200 μl 的 Solution Ⅱ，於 4℃下靜置 5 分鐘，最後加入 150 μl Solution Ⅲ，4℃下靜置 5 分鐘。以 12000 rpm

離心 10 分鐘後取上清液，加入等體積 phenol/chloroform (1：1) 萃取兩次，取水層。加入 2-3 倍 99% 酒精，-70℃沉澱 DNA，靜置 30 分鐘或過夜。以 13000 rpm 離心 10 分鐘後取沉澱物，沉澱物以 70% 酒精清洗，爾後將 DNA 於真空下抽乾並以 TE buffer 溶解之。

四、質體 DNA 的抽取 (Clontech)

利用購買自 Clontach 的 NucleoSpin plasmid kit 抽取質體

材料:

此 kit 含有:

Nucleospin plasmid spin column

Collection tube

Buffer A1(resuspension buffer)

Buffer A2(lysis buffer)

Buffer A3(binding buffer)

Buffer A4(concentrated wash buffer)

Buffer AW(optional wash buffer)

Buffer AE(elution buffer)

步驟:

將已含有質體DNA的菌株接種在20 ml LB+Ap 液態培養基,並在37˚C 培養震盪機震盪培養過夜 (16-18 小時)。操作前先把 Buffer A3 拿到冰上冷卻。把菌液移至微量離心管，以 5000 rpm 離心五分鐘後去掉上清液。加入 250 µl BufferA1 使菌液的 pellet 溶開。加入 250 Buffer A2，上下轉動 (inversion) 六次混合液體，室溫靜置五分鐘。加入 300 µl 的 Buffer A3，以上下轉動 (inversion) 混合液體，再冰上靜置十分鐘。以 13000 rpm，十分鐘於 4˚C 離心，將上清液移到廠商所附的管柱內。13000 rpm，在 4˚C 以一分鐘離心，去掉下清液。加入 500 µl 的 Buffer AW，以 13000 rpm 在室溫離心一分鐘，去掉下清液。加入 700 µl 的 Buffer A4，以 13000 rpm 在室溫離心五分鐘以去掉殘餘乙醇，把管柱轉移到新的微量離心管。加入 50 µ 的 ddH_2O 或 Buffer AE，靜至五分鐘，以 13000 rpm 在室溫下離心一分鐘以便把 DNA 溶出來。

五、 pET21b-P0 融合蛋白之表現 Protein Expression

A. 原理:

基因表現乃利用選殖的基因在 in vivo 或 in vitro 中表現 RNA 或蛋白質。最常用來表現的系統為 *E.coli*。本實驗把 P0 gene 接在 pET21b，此重組質體含有 T7 Promoter，能夠使插入 promoter 3'端的目標基因受到 T7 轉錄轉譯的控制。因此只要將 RNA polymerase 送到 host，就可以啟動目標基因的表現。pET system 的 host 呈現潛溶狀態(lysogen)，且含有插入噬菌體(DE3)的大腸桿菌 BL21。噬菌體(DE3)含有 T7 RNA polymerase 的基因，此基因表現受到 lacUV5 promoter 控制，因此加入 IPTG 即可誘導 lacUV 的 Promoter，進而誘導 T7 RNA polymerase 的產生，進而轉錄轉譯 pET 的目標基因。

影響到蛋白表現的條件因不同參數的變化而有影響:

1. 不同的 IPTG 濃度
2. renew 的菌量
3. 加 IPTG 時菌的 OD_{600} 值
4. 溶氧量
5. shaker 轉速
6. induction 的溫度
7. induction 的時間

B. 步驟

將含有 P0-pET21b 質體的 *E.coli* BL21 (DE3) 接種於 20ml 加適量抗生素 Ap 之 LB，在 37˚C 震盪培養 10~12 小時，將培養過的 20ml 菌液加入 300ml 含適量 AP 之 LB，大約 2.5 小時(OD260=0.4~0.8) 後加入 IPTG 在 30˚C 培養 4 小時。離心取菌體(pellet)，加入適量一倍體積 6M urea/phosphate 懸浮，並以細胞震碎機 (sonicator)打破細胞。將打破的細胞以 13000 rpm，4˚C 離心後取上清液跑 SDS-PAGE 觀察蛋白質表現情形。

六、GST-GCIP 融合蛋白之表現 Protein Expression

A.原理:

利用 Glutathione-coupled resin 對 GST(Glutathione S-transferase) 本身的親合力，來純化有交互作用的蛋白質。由於在 GST 蛋白質表現系統中在 pGEX-5X-3 融合了一段 GST，將表現的 GST 融合蛋白通過 GST Column，之後再以 reduced glutathione 與 GST-Fusion protein 競爭 resin 之結合位置，以進行純化，沖洗出所要的蛋白。

B. 步驟

將含有 GCIP 質體的 *E. coli* BL21(DE3)接種於 20ml 加適量抗生素 AP 之 LB 在 37˚C 震盪培養 12~16 小時。將培養過的 20ml 菌液加入 300ml 含適量 AP 之 LB，大約 OD260=0.7~0.8 後加入 IPTG 1 mM，培養的條件為 GCIP 全長，及 PGGL6 在加入 IPTG 1 mM 後在 30˚C 培養 8 小時，其它包括 PGDN4，PGDNHA，PGDNC，PGDALC 培養 4.5 小時。離心取菌體，加入適量一倍體積 PBS 懸浮，並以 Sonicator 打破細胞。將打破的細胞以 13000rpm，4˚C 離心後取上清液溶於 PBS buffer，並取上清液蛋白跑 SDS-PAGE，觀察蛋白質表現情形。

七、 P0 融合蛋白的純化

A.原理:

主要利用 pET21b system 將構築在 pET21b 上的 Fusion protein 純化出，由於 pET21b 質體本身含有六個 histidine(His tag)，而 histidine tag 可以和許多二價陽離子進行結合，包括鎳離子、銅離子、鋅離子等，其中以鎳離子的結合能力最強，因此可利用結合鎳離子之樹脂，以親合力(Affinity)的純化方式將所要的 protein 給純化出。

B.材料:

Resin in 20% EtOH

8X Binding buffer

80mM Na_2HPO_4

4 M NaCl

80 mM NaH_2PO_4 (pH 7.4)

4X Elute buffer

4 M imidazole

2 M NaCl

40 mM NaH_2PO_4

40 mM Na_2HPO_4 (pH 7.4)

8X Charge buffer

400 mM $NiSO_4$

8X Wash buffer

4 M imidazole

4 M NaCl

80 mM NaH_2PO_4

80 mM Na_2HPO_4 (pH 7.4)

4X Strip buffer

400 mM EDTA

2 M NaCl

80 mM Tris-HCl (pH 7.9)

C.方法:

下面緩衝液洗滌 column 內 resin：三倍體積的 Strip，五倍體積的 ddH2O，五倍體積的 NiSO4 charge buffer，三倍體積的 ddH20。加入三倍體積的 Binding buffer，本論文採用 1X PBS。將溶於 binding buffer 的菌體以 sonicator 打破，高速離心後取上清液此為 loading sample。以 0.4ml/min 慢速使 sample 通過 column 加入適量的 elution buffer 將所要的蛋白沖提出。以 SDS-PAGE 分析洗出液中純化蛋白的純度。

八、GST-GCIP 融合蛋白的純化

A.原理:

利用 Glutathione-coupled resin 對 GST(Glutathione S-transferase) 本身的親合力，來純化有交互作用的蛋白質。由於在 GST 蛋白質表現系統中在 pGEX-5X-3 融合了一段 GST，將表現的 GST 融合蛋白通過 GST Column，之後再以 reduced glutathione 與 GST-Fusion protein 競爭 resin 之結合位置，以進行純化，沖洗出所要的蛋白。

B.材料:

1x PBS

GST 管柱

沖提緩衝液:(10mM glutathione/50mM Tris-HCl-pH8.0)使用前再配製

C.方法:

先以 1x PBS 清洗 GST column，再加入已表現的 GST-GCIP 融合蛋白，以 1x PBS 清洗管柱洗掉非專一性蛋白，沖提緩衝溶液沖提出純化的蛋白，以 SDS-PAGE 分析洗出液中純化蛋白的純度。

九、多株抗體的製備 (Preparation of polyclonal antibody)

A 材料:

隔離檢疫後健康的紐西蘭大白兔，為實驗動物

弗氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)(Sigama)

弗氏不完全佐劑(Freund's incomplete adjuvant)(Sigama)

B.步驟:

大量收集純化之蛋白，將蛋白與 Freund 完全佐劑以 1:1 混合並均勻乳化當作抗原。在紐西蘭大白兔的背脊兩側以皮下注射方式注射抗原乳劑。第一次注射兩週後，往後每個禮拜追加注射含不完全佐作劑的乳化抗原追加 3~5 劑後可以採血測抗體的效價 (Titer)。取兔血在 4°C 靜置 1 小時以上，使血球沉澱凝血，以慢速 (2500 rpm) 離心 15 分鐘後取上清液，此即澄清淡黃色之多株抗體 (polyclonal antibody)。

十、SDS-PAGE 之蛋白質分子量分析

A.材料

--12% SDS-PAGE 膠體的配置--

解析膠體(separation gel)

30% acrylamide & 0.8% bis-acrylamide	3.3 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
D.D H_2O	4.0 ml
10% ammonium persulfate	0.1 ml
TEMED	0.005 ml

疊層膠體(stacking gel)

30% acrylamide & 0.8% bis-acrylamide	0.67 ml
1.0 M Tris-HCl pH 6.8	0.5 ml
10% SDS	0.04 ml
D.D.	2.7 ml
10% ammonium persulfate	0.04 ml
TEMED	0.004 ml

電泳緩衝液(running buffer)

0.025 M Tris-HCl pH 8.3

0.192 M glycine

0.1% SDS

追蹤染劑(4X Sample buffer)

0.25 M Tris-HCl pH 6.8

8% SDS

0.02% BPB

30% Glycerol

染色液(Stain buffer)

0.25% Coomassie blue R-250

10% acetic acid

45% Ethanol

脫色液(Destain buffer)

7% acetic acid

25% Ethanol

C.步驟:

將解析膠體加入以組合好的電泳裝置，再緩緩加入少許 2-Propanol 於其空氣界面，待凝固後吸掉 2-propanol，再加入疊層膠體並插好齒狀板，加入染 dye 的蛋白，煮沸五分鐘後，以 100 伏特跑 100 分鐘跑完電泳，再將解析膠體取出以 coomassie blue 染色，振搖過夜，再以脫色液除去背景觀察蛋白質誘導情形。

十一、西方點漬法 (Western blotting)

A.材料

轉印緩衝液(transfer buffer)

0.192 M glycine

0.0013 M SDS

10-20% methanol

0.025 M Tris (pH8.3)

染色液

0.1% amido black

45% methanol

10% acetic acid

脫色液

50% methanol

10% acetic acid

PBS

0.8% NaCl

0.02% KCl

0.24% KH_2PO_4 (pH 7.2-7.45)，

PBST

PBS 外加 0.05% Tween 20

B.蛋白質電泳轉印法:

以 100V，100 分鐘跑 SDS-PAGE acrylamide gel electrophoresis (蛋白質電泳) 。之後先將 3M 濾紙、PVDF membrane、PAGE 做預處理。先將 PVDF membrane 浸泡在甲醇中，3M 濾紙浸泡在含有甲醇:轉印緩衝液=1:4 的溶液，PAGE 先浸泡在清水。在半乾轉漬槽內預鋪兩張 3M 濾紙，再加入一張 PVDF

membrane，上面鋪上已跑完電泳的 PAGE，小心趕走氣泡，在上方加上處理過的 3M 濾紙，完成裝置後，以 100mA、1.5hr 之電流將 PAGE 上的蛋白轉印到 PVDF membrane 上，轉印完的 PVDF membrane 之後做免疫染色。

C.封阻步驟(Blocking):

轉印完的 PVDF membrane，以 5%脫脂奶粉/1X PBS 進行封阻，以阻斷分特異性結合。可在 37˚C 中振搖兩小時，亦可在 4˚C 下振搖過夜。

D.免疫染色法:

將 PVDF membrane 以 PBST 清洗三次，每次十分鐘，再加入以 1X PBS 稀釋過的一級抗體，在室溫振搖兩小時，再以 PBST 清洗五次，每次十分鐘，加入以 1X PBS 稀釋過的二級抗體，室溫反應一個半小時。反應完後，以 PBST 清洗五次，每次十分鐘，以 ECL™ 套組(enhanced chemiluminescent)呈色，在室溫反應一分鐘，產生的螢光物質，以 X 光片在暗房壓片。

十二、 抗體的純化(Antibody purification)

抗體的純化一般用 Protein A 及 G 管柱，Protein A 和 Protein G 可以和免疫球蛋白的 Fc 部位結合，之後用 pH 2.7 的酸性溶液沖提出。將 1 ml Protein A 自 Alcohol 中取出，以 PBS 清洗乾淨，注入管柱當中，再用 10 ml PBS 沖洗。將取得 GCIP 多株抗體加入管住，再加入適量 PBS，在室溫靜置 30 分鐘。再加入 10ml 的 PBS，利用自然重力沖出 serum，抗體中的 IgG 與 Protein A 結合而留在管住中。最後利用 3 ml 的 0.1M 的 Glycine-HCl (pH2.7) 沖出管柱中 Protein A 上結合之 IgG，並將之分批收集在 1.5 ml 的微量離心管，每管收集在已加入 100μl pH 8.0 的 Tris-HCl。之後跑蛋白質電泳測試抗體純度。

十三、GST Pull Down

A. 材料

loading buffer

1% Triton X-100

10% glycerol

0.5 M NaCl

1 mM EDTA

50 mM Tris，pH 8.0

Binding buffer

10% glycerol

25 mM NaCl

1 mM EDTA

20 mM Tris，pH 8.0

GST resin (glutathione sepharose 4B) (購買自 Amersham biosciences)的準備

由於 GST-agarose beads 保存在 20% ethanol 內，並且為 50% slurry，因此取適量進行離心沉降後，體積會變成原本的一半，我們用 1X PBS 洗三次，Lysis buffer 洗兩次，最後回溶在 200μl 的 lysis buffer。

B.原理:

GST Pull Down 實驗(Kaelin et al.1991) 利用含有 Glutathione-coupled resi 對 GST 本身的親合力，來純化有交互作用的蛋白質。由於在 GST 蛋白質表現系統中在 pGEX-5X-3 融合了一段 GST (Glutathione S-transferase)，隨者融合蛋白的表現，含有 Glutathione sepharose 4B 的 Beads 會抓下含有 GST 的融合蛋白，之後再以還原態的 glutathione 與 GST 融合蛋白競爭樹脂之結合位置以進行純化沖洗出所要的蛋白。

. C.方法:

嘗試好能夠使蛋白質的大量表現的條件，將已構築好在 pGEX-5x-3 的不同 GCIP 及截短的 GCIP 片段 (包含 GST 本身及融合在 GST 之 GCIP，GCIPΔC，

GST-GCIPΔN，GST-GCIPΔN and ΔC) 轉型進入大腸桿菌 BL21(DE3)，37˚C 震盪搖晃器震盪過夜培養 12~16 小時。將培養過的 20ml 菌液加入 300ml 含適量 AP 之 LB，大約 OD_{260}=0.7~0.8 後加入 IPTG 1mM，GCIP 全長，及 PGGL6 培養 8 小時，其它包括 PGDN4，PGDNC 培養 4.5 小時，培養的溫度為 30˚C。離心取菌體，大約以菌液約十分之一的 PBS buffer 回溶，利用細胞震碎機使細胞膜震碎，在冰上操作，避免產生泡沫。加入適量一倍體積 PBS 懸浮，並以 Sonicator 打破細胞。將打破的細胞以 13000rpm，15 分鐘，4˚C 離心後取上清液，不同片段的 GST fusion protein 表現後，跑蛋白質電泳，染 Coomassie blue 後分析確認表現位置，評估各融合蛋白的蛋白表現量，以等量進行 GST pull down。表現後的 GST fusion protein 加入 glutathione-sepharose 4B beads 進行親和性的純化，於 4˚C 滾動一小時，以 8000 rpm，2 mins 離心去上清液，以 0.5 ml binding buffer wash 三次，再與 S^{35} labeled pET21b-P0* in vitro translation products”共同滾動兩小時。以 8000 rpm，2 mins 離心，去上清液，再用 binding buffer 0.5ml 清洗五次，離心，回溶 20μl protein dye，煮沸後跑蛋白質電泳，將 gel 真空抽氣乾燥，在 IP box 中壓片，壓 over night，之後於 FLA-3000 讀取數值。

註:進行 GST pull down 實驗需要將表現出的各種不同片段的 GST 融合蛋白跑一次蛋白質電泳，以 Coomassie blue 染色觀察蛋白量，依此定等量蛋白進行 GST pull down 實驗。

十四、GCIP knockdown experiment

A.材料

Pro-Ject™ Protein Transfection Reagent Kit (購買自 PIERCE)

TBS (10 mM Tris，150 mM NaCl，pH=7.0)

B.內容物:

protein transfection reagent (dried film)

β-galactosidase control 100 µl,0.1µg/µl

C.原理

-cationic lipid-based carrier system

-deliver biologically active proteins, peptides, antibodys

Pro-Ject™ reagent/protein complex—cell surface (negative charge)

D:前置處理:

試劑加入 250µl 甲醇，高速震盪 10-20 秒，每管分裝 10µl，取至微離心管，靜置於 laminar flow hood 室溫 2-4 小時，以蒸發甲醇。分裝後貯存在-20˚C，使用前取出。

E.步驟:

將純化過並且用 0.22µl filter 過濾的 GCIP 抗體 15µg，溶在 1 倍的 TBS，稀釋的濃度 250µg/ml，將稀釋過的抗體加入已分裝好的 Pro-Ject™ reagent 利用 pipet 混合均勻 3-5 次，室溫靜置五分鐘，震盪器以中速上下震盪 3-5 次 取 15µg 抗體加入 TBS Buffer 補體積到 90µl， 加入不含血清的培養液 1 ml 將細胞以不含血清的培養液洗一次，將混合過抗體的 reagent/serum free media 加入細胞中，在 37˚C 溫箱靜置 3-4 小時， 假如要靜置更久的時間，加入一份含 20% FBS 的 DMEM， 以 MTT 觀察細胞存活率

β-galactosidase(Control) 的做法:

A.方法:

將廠商所附的 β-galactosidase 10μg，溶在 1 倍的 PBS，將稀釋過的抗體加入已分裝好的 Pro-Ject™， 利用 pipet 混合均勻 3-5 次，室溫靜置五分鐘，震盪器以中速上下震盪 3-5 次，取 10μg 抗體加入 TBS Buffer 補體積到 90μl 加入不含血清的培養液 1.0 ml，將細胞以不含血清的培養液(serum free medium)洗一次，將混合過抗體的 reagent 加入細胞中，在 37˚C 溫箱靜置 3-4 小時， 假如要靜置更久的時間，加入一份含 20 % FBS 的 DMEM，固定細胞並觀察細胞是否存活

B. β-galactosidase 的染色

材料:

1X PBS

150mM potassium ferricyanide(-20˚C)

150mM potassium ferrocyanide(-20˚C)

20mg.ml X-gal/DMF(-20˚C，avoid light)

4% paraformaldehyde/PBS(-20˚C)

步驟:

將作用完畢的細胞移除 medium，以一倍的 PBS 清洗兩次，以 4% paraformaldehyde 室溫固定十分鐘，等待的同時準備染劑，染劑配方如下:

Reagent	Volume	Concentration
potassium ferricyanide	250μl	1.5mM
potassium ferrocyanide	250μl	1.5mM
X-gal/DMF	1.25ml	1 mg/ml
PBS	23.25ml	
Final	25ml	

以 1 倍 PBS 清洗細胞兩次，加入染劑，加上錫箔紙避光，37˚C 靜置過夜，以一倍 PBS 清洗細胞，觀察顯微鏡下被染色的細胞。

十五、細胞存活率偵測分析 (MTT assay)

A.試劑:

3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)

DMSO

ELISA Reader

B.步驟:

細胞經過抗體轉染 72 小時後，去除上清液，用 PBS 清洗兩次，吸掉 PBS，加入 1.5 ml/35 mm dish MTT 溶液，MTT 回溶在細胞本身的培養液。培養 4 小時後，加入 0.5 ml DMSO/35 mm dish 溶解細胞內粒線體去氫酵素將 MTT 轉換形成藍紫色結晶，每盤取出 100μl 的藍紫色水溶液，以 ELISA reader 讀取在波長為 540 nm 讀取吸光值，定義控制組的吸光值為 100%，實驗組相對於控制組的比值為相對的細胞存活率。

十六、細胞週期素 cyclin D 的選殖(Cloning of Cyclin D Family)

首先到 NCBI 確定我要插入的片段（cyclin D1、D2、D3），在全長的 cyclin D1、D2、D3 兩端設計引子(primers)，利用 PCR 在 cDNA 基因庫(library)擴增出我要的片段，我選用的基因庫為子宮頸癌基因庫(HeLa cDNA library)及乳房腺體基因庫(breast cDNA library)(clontech)。

PCR（polymerase chain reaction）

cDNA library	0.3 μl
Primer (+)	0.5 μl
Primer (-)	0.5 μl
dNTP	1.0 μl
10X dNTP buffer	2.0 μl
ExTaq enzyme	0.2 μl
ddH2O	15.5 μl
final	20.0 μl

將加好試劑的微離心管在自動溫度循環機進行 PCR 反應。嘗試各種不同的 condition。以 35cycle 進行產物放大循環。反應完畢，取出微離心管，進一步以 1.5% Agarose gel 跑電泳槽 100 伏特，分析產物。

細胞週期素選殖自乳腺及人類子宮頸癌細胞基因庫(from clontech)

PCR condition	DNA denature	DNA annealing	DNA extendation
cyclin D1	96˚C 30”	68˚C 1’	72˚C 1’
Cyclin D2	96˚C 30”	61.5˚C 45”	72˚C 50”
Cyclin D3	96˚C 30”	61˚C 30”	72˚C 1’

Template: Cyclin D1→breast cDNA library

Cyclin D2→HeLa cDNA library

Cyclin D3→breast cDNA library

十七、DNA 的萃取回收及接合反應 (Ligation)

跑完電泳後，浸泡在(EtBr) ethidium bromide 幾分鐘後在 UV 光下照射，確定此條件是否能夠得到所要擴增的 PCR 產物，以此條件大量 run 自動溫度循環機，收集後跑大 well 之電泳膠片，在長波的手持式 UV 燈下照射，割下所要的 band，緊接者進行 elution 的工作，純化膠中的 DNA。分別將 cyclin D1，cyclin D2，cyclin D3 兩端用不同的酵素切，依照 Novagen 上的指示，依據 enzyme 特性施行 double digestion 或 sequential digestion 方式切下 cutting sites。同樣在 pBind vector 做三種不同的處理，將處理過的產物以 gel extraction 的方式純化，之後將 insert 及 vector 兩兩加於同一管中進行接和反應，置於 16℃ over night。

	實驗組	控制組
pBind	2	2
cyclin D	10	0
T4 Ligase	1	1
T4 Ligase buffer	2	2
ddH2O	5	15
final	20	20

Ligation 產物送入 XL1B，塗在含有 Ampicillin plate(AP Plate)上，隔天，

挑取出有長的 colony，養在含有 AP 的 3ml LB tube，養 over night，隔天用 nucleospin kit (clontech)抽取 plasmid DNA。取一點跑電泳確認是否 ligation 成功，利用 PCR 及 Enzyme digestion 的方式確認 insert 大小是否正確，正確無誤後再進一步送到序列分析中心去分析序列。

十八、細胞解凍

A.試劑:

DMEM (high glucose)

4,500 mg/L D-glucose

L-glutamine

Pyridoxine hydrochloride

7g/L sodium bicarbonate

10% FBS

B.步驟:

自液氮或乾冰容器中取出冷凍管，檢查蓋子是否旋緊。將新鮮培養基至於 37℃水槽中回溫，回溫後噴以 75%酒精並擦拭，移入無菌操作台。取出冷凍管，立即放入 37℃水槽中快速解凍，輕搖冷凍管使其在 1 分鐘內全部融化，以 75 % 酒精並擦拭保存管外部，移入無菌操作台。取出 1 ml 解凍之細胞懸浮液，緩緩加入有培養基之培養容器內，混合均勻，放入 CO_2 培養箱培養。解凍後是否立即去除冷凍保護劑(例如 DMSO 或 glycerol)，依細胞種類而異，一般而言，大都不需要立即去除冷凍保護劑。若要立即去除，則將解凍之細胞懸浮液加入含有 5~10 ml 培養液之離心管內，離心 1000 rpm，3 分鐘，移去上清液，加入新鮮培養液，混合均勻，放入 CO_2 培養箱培養。若不需立即去除冷凍保護劑，則在解凍培養後隔日更換培養液。

十九、細胞繼代培養(附著型細胞 adherent cell)

A. 試劑:

DMEM (high glucose) (10% FBS)

Trypsin-EDTA(0.5% Trypsin, 5.3mM EDTA-4Na) 10X

5.0 g/L Trypsin

2.0 g/L EDTA-4Na

8.5 g/L NaCl

PBS

B. 步驟:

吸掉舊培養液。用滅菌過的 PBS 洗滌細胞一至二次。加入 1X Trypsin-EDTA 溶液，37℃作用數分鐘，於顯微鏡下觀察，當細胞將要分離而呈現圓粒狀時，加入適量含血清之新鮮培養液。輕拍培養瓶使細胞自瓶壁脫落，將溶液吸出置於 15 ml 離心管中，離心去上清液。加入適量的含血清之新鮮培養液，混合均勻後，依稀釋比例轉移至新的培養瓶中，以正常培養條件培養。

二十、細胞保存

A.試劑:

DMSO

DMEM (high glucose) (10%　FBS)

Trypsin-EDTA(0.5% Trypsin, 5.3mM EDTA-4Na)　10X

PBS

B.步驟

冷凍前一日更換培養液。將 DMSO 加入新鮮培養液中，10% 的濃度，即為冷凍保存液。將細胞以 PBS 洗滌一至二次，加入 1X Trypsin-EDTA 溶液，使細胞懸浮。2000 rpm 離心，去上清液。加入冷凍保存液，分裝在已標示的冷凍保存管中。將冷凍保存管移入-80℃冷凍保存，或 16 小時後，移入液態氮中，長期保存。

二十一、試管內表現放射線標定的重組蛋白(in vitro translation)

A.材料:

TNT T7 Quick Coupled transcription/translation kit (Promega)

[S^{35}] methionine(10mCi/ml)

nuclease free water

plasmid: po-pET21b，cd1-pET21b，D2-T-10，cd3-3-pET21a，GCIP-T-5

B.原理:

TnT T7 Quick Coupled transcription /translation kit 中含有 rabbit reticulocyte lysate (Promega)，具有所有轉譯出蛋白所需的營養成分，包含 RNA polymerase，nucleotides，salts，recombinant RNasin ribonuclease inhibitor，可在試管內表現平時不易表現的蛋白,但條件為轉譯須 T7、T3、SP6 RNA polymerase 且在[S^{35}]L-methionine 存在下完成,如本論文所用的 P0 是接在含有 T7 promoter 的 pET21b vector，以[S^{35}] 標定，可用來和 GST pull down 所抓下的蛋白進行交互作用分析。

C.步驟:

取出 TNT in vitro transcription/translation kit 之 rabbit reticulocyte 混和液 40μl,加入[S^{35}] methionine 1μl 及 1μg 已構築好的 DNA plasmid,最後補 nuclease water 至 50μl。將上述混合好的液體加入微量離心管，在 30˚C 恆溫槽反應 90 分鐘，進行 in vitro transcription/translation。取 1μl 跑 SDS-PAGE，以顯像板顯影，確定蛋白有表現出，以進行交互作用。

二十二、蛋白質濃度的定量(Bradford, 1976)

A.材料:

Bio-Rad 反應試劑

D.D.

B.步驟:

以 BSA 為 standard soln，分別取不同濃度 1mg/ml，0.5mg/ml，0.25mg/ml，0.125mg/ml 作一 standard curve。分別加入 400 μl D.D.，加入 10 μl 蛋白質樣品，再加入 Bio-Rad 反應試劑 100 μl，待室溫反應 5 分鐘後，以分光光度計，可見光波長為 595 nm 之下，測量其吸光度，假使代測物為 cell lysate，則以 lysis buffer 為 blank。

濃度(μg/μl)	BSA 量
0	D 液加入 10μl D.D，此為 E 液
0.125	C 液加入 10μl D.D，此為 D 液
0.25	B 液加入 10μl D.D，此為 C 液
0.5	A 液加入 10μl D.D，此為 B 液
1.0	取 10μl BSA 加入 10μl D.D，此為 A 液

1. 所得數值即蛋白質的濃度，單位為 mg/ml

二十三、細胞內免疫沉澱(co-immunoprecipitation)

A.試劑:

1X PBS

Lysis buffer(stock soluction)

5mM EDTA

0.5% triton X-100

使用前加入

DTT 0.1mM

Proteinase cocktail inhibitor 1 mM

Leupeptin 10 M

Aprotinin 25g/ml

B.製備細胞溶解液(cell lysates):

將細胞培養 100 mm dish 過夜後，養至 7-8 分滿，收集細胞，先以 1X PBS 清洗兩次，再以 300~500μl 的 lysis buffer 回溶，靜置使細胞脫落。括下細胞取至微量離心管後放在冰上 30 分鐘，以 13000rpm，4˚C 離心機離心，取上清液此即細胞溶解液，加入 10μl Protein A 進行 preclear，4˚C，10000rpm 離心，取上清液，此即 cell lysates，可以立即進行實驗或是貯存在-80˚C 兩個禮拜內進行實驗。

C.步驟:

將 cell lysate 以 Bio-Rad protein essay reagent 定出蛋白質濃度(OD_{595})，定量取 300-500μg 蛋白質，加上接上 protein A agarose bead 的抗體 10μl(2μg)，在

cold room 慢速摩天輪滾動過夜。隔天取出，在 4˚C 離心機以 10000 rpm 離心兩分鐘，去上清液，以 lysis buffer 洗三次，最後一次清洗完畢，去上清液，回溶 15μl 的 SDS loading dye，煮沸五分鐘後，以 8000 rpm 離心兩分鐘後，我們所要的蛋白已溶在上清液中，取上清液進行西方點漬法分析。

二十四、持續表現 P0 細胞株之篩選 (selection of P0 stable clone)

將含有 P0 gene 的真核表現載體利用 lipoFetamine 轉染入 MCF7，以抗生素為 G418 (800μg/ml) 的濃度，經過兩個禮拜篩選出具有抗 G418、含有 P0 的 MCF7。之後取 1 x 10^4 細胞培養至 12 well 的培養皿，培養兩天後開始每天計數細胞，與只含有空的載體 (pMH) 和單純 MCF7 相較，比較細胞數目，測定生長曲線，測量到細胞死亡為止。

結果與討論

1. P0 與 GCIP 重組蛋白的表現、純化

將大量誘導表現的 P0 蛋白以適當的條件表現後，5000 rpm 離下菌體 (pellet) ，回溶 6M Urea/phosphate 後經由細胞打碎機打碎後，通過 0.45μl 的過濾膜，此舉爲了防止打碎的細胞碎片過大，而堵住 chelateing column。由於 pET 系統的蛋白上融合六個 Histidine，而 chelating column 可以和二價陽離子，如鎳、鋅、銅親合的特性，因此隨著融合蛋白的表現，含有鎳離子的管柱可以將 P0-pET21b 蛋白抓下來 (圖一)。

同樣的，將 200 ml 大量誘導表現的 GST-GCIP 融合蛋白經細胞打碎機打破細胞後，將所含的蛋白菌液通過 0.45μl 的過濾膜，此舉爲了防止打碎的細胞碎片過大而堵住 GST column。之後所純化出的 66KDa 之 GST-GCIP 融合蛋白，跑 12 % SDS-PAGE (圖二)，選擇純度及產量符合需求的蛋白進行兔子的誘導免疫。

將正確的大小片段切下，磨碎後加入完全佐劑，磨至乳化完全，再以皮下注射之方式，打入紐西蘭兔背脊二側。由於完全佐劑中有結核菌的存在，可藉此增加兔子免疫能力。兩週後，以同樣的方式處理純化好的蛋白質，但所使用的佐劑為不完全佐劑。經過兩個月的連續處理，我們用口徑為 18G 的針頭抽取耳靜脈血得到血清，即是所謂的多株抗體（polyclonal antibody）。同時為了測試血清內抗體的有效性與專一性，作了西方點漬法（Western blotting blotting）實驗，由結果看來，所製備 P0 抗體效價在 1：6000，GCIP 抗體效價在 1:4000 有良好的效果 (圖三)。抗體是非常穩定的蛋白質，不容易受到一般蛋白質變性的影響，但是在溶液中離子濃度及酸鹼值會干擾抗原與抗體的結合。抗體的保存並不難，只要避免真菌或細菌的污染，將抗體保存在-20˚C，可長期保存，但是蛋白質濃度最好維持在 1 mg/ml 以上，必要時加入 1% BSA 作為蛋白質安定

劑，將大量的抗體以小量分裝冷凍，需要用時再從冷凍櫃中取出，儲存在 4˚C 冷藏櫃中，儘量避免重複解凍再冷凍。

2. GCIP 重組蛋白的構築

將 GCIP 全長，截短 GCIP 以 PCR 反應擴增合成所要的基因，因此使用的引子為 GCIP 全長前向引子為 cggaattcgatggcgagcgcaact，切位為 EcoRI，反向引子為 cctcccgggtcataattcaagttc，切位為 SmaI，將 PCR 產物及載體 pGEX-5X-3 以限制酵素切割後，經過 DNA 電泳的純化，兩兩加入含有接合酵素的微量離心管，之後轉型入大腸桿菌 BL21，挑選在 Ap plate 能夠生長的菌落，37˚C 培養隔夜後抽取質體。以 DNA 電泳或 PCR 確認是否構築成功。同樣的，GCIPΔC (PGGL6) 前向引子為 cacgggatccagatggcgagcgcaac，切位為 BamHI，反向引子為 tgggaattcgagctcttgatcgtcctc，切位為 EcoRI。GCIPΔN (PGDN) 前向引子為 caagaattctatttcctacaacagtctc，切位為 EcoRI，反向引子為 cctcccgggtcataattcaagttc [同 GCIP(-)/pGEX]，切位為 SmaI。GCIPΔN,C 的前向引子為 caagaattctatttcctacaacagtctc，切位為 EcoRI，反向引子為 ctcccgggttacatccgaattttctt，切位為 SmaI。重組蛋白構築示意圖如圖四，圖七所示。

3. GST pull down--P0 與 GCIP 交互作用討論

首先確認 P0 和 GCIP 有交互作用，所用的方法為 GST pull down 方法。先將大量表現的 GST-GCIP 與 glutathione-Sepharose 4B resin 在 4˚C 作用一小時，以 Lysis buffer 洗去非專一性的結合蛋白，8000 rpm 離心兩分鐘，連續洗三次，加入 refoding P0 蛋白。作用在 4˚C 兩小時，之後以 lysis buffer 洗三次，離心去上清液後，加入 15 μl protein dye，煮沸後跑 SDS-PAGE，進行西方點漬法分析(圖五)。之所以使用 Refolding P0，原因為先前大量表現的 P0 蛋白回溶在在 Urea，無法進行功能性分析，因此才要將在 urea 表現的 P0 蛋白進行蛋白質的透析。

4. GST pull down--P0 與 GCIP 交互作用討論

許多文獻記載許多 GST pull down 的作法，原理大同小異，方法卻因實驗有不同須求而有差異，通常所採用的方式是將兩個代測蛋白作用後，再利用物裡性方法把其中一蛋白抓下來，看能否順便將另一代測蛋白抓下來，藉此分辨是否能夠進行結合。

所謂物理性方式可用 Glutathione Sephasrose 4B beads 將 *E. coli* BL21 (DE3) 表現的 GST 的融合蛋白進行結合，之後再以 lysis buffer 洗掉一些非專一性的結合蛋白，最後加上另一代測蛋白作用，最後再洗掉非專一性結合即可。另外一種方式則是類似免疫沉澱方式，先將兩蛋白作用，再加入其中一蛋白的抗體，最後加入 protein A 之後洗掉非專一性蛋白，最後取得離心後的免疫沉澱物，加入 protein dye，煮沸五分鐘，跑 SDS-PAGE，將溼潤的 PAGE 抽乾，以顯像板壓片，利用 FLA-3000 讀取放射線數值。

本論文採用方式為第一種方式由於想探討的 GCIP 蛋白構築在 pGEX-5x-3 質體，其它的 truncated form GCIP 也是構築在此質體上，考慮方便性，故採用此法進行 GST pull down 實驗(圖六)。

此實驗成功的關鍵處，首要在於利用大腸桿菌 BL21 (DE3)大量表現 GST 融合蛋白，且由於利用 Pull Down 方式進行蛋白質交互作用分析實驗，需要有功能性的蛋白，所以需要在菌液上清液 (supernatant) 表現蛋白，捨棄掉包含體 (inclusion body) 所呈現的表現蛋白，雖然表現在包含體的蛋白量較為多。因為包含體的表現蛋白雖比較澄清乾淨，卻需要 urea (變性劑) 才可把包含體的蛋白溶開，而變性後的蛋白質，經過透析後並不能保證回復到原本的構形，因此並不符合本實驗所需。此項要求增加實驗的困難度，相對的準確抓到表現條件時段顯的十分重要。嘗試許多條件表現蛋白，最後除了 PGDNHA，PGDALC 無法取得上清液蛋白外，GCIP 全長蛋白，以及去掉 N 端 148 個氨機酸 (PGDN4)、去掉 C 端及 Leucine zipper domain(PGGL6)，以及同時去掉 N 端、C 端、leucine zipper domain 的 GCIP(PGDNC)都已抓到大量誘導表現的條件 (圖八) ，取大量表現蛋白經定量後進行實驗，發現無論去掉 N 端或是 C 端的 GCIP

蛋白皆能和 P0 結合。

而截自目前的結果發現，無論少了 N 端 149 個氨基酸或是少了 Leucine zipper 的蛋白，仍然可和 P0 交互作用 (圖九) ，推測 GCIP 上的 Helix-loop-helix domain 及 acidic domain 在 GCIP 與 P0 結合上扮演重要的角色。

另外由於尚未表現出同時去掉 Leucine zipper 及 acidic domain 的 GCIP 蛋白，因此還不能確認 acidic domain 是否在結合 P0 也扮演重關鍵角色，未來研究方向除了多方嘗試各種條件將剩下兩個截短片段的 GCIP 蛋白-PGDNHA 及 PGDALC 去大量誘導表現外，也可以找尋別的方式如試管內免疫沉澱法確認兩者關係。

5. GCIP 蛋白 knockout 實驗結果與討論

過去有文獻針對一些細胞內的重要分子進行 knockdown 實驗，曾經有文獻將 cyclin D 抗體以電穿孔的方式送入，再利用 BrdU 或(H^3)-Thymidine 去進行標示，最後細胞跑細胞流式儀，觀察抗體加入細胞對細胞造成的影響。由於操作細胞流式儀分析需要經過專業訓練並且通過認證，不是短時間可以完成學習使用，因此採取較簡單方式，利用 MTT assay 觀察細胞存活率。當 MTT 黃色溶液遇到粒線體去氫酵素會產生藍色結晶，當藍色結晶被 DMSO 溶解後使細胞轉換成藍紫色溶液，染的深代表越多活細胞(因為活細胞才有粒線體)，之後進行波長為 540 nm 的吸光值測試。

之前考慮過將 P0 抗體送到癌化細胞中，觀察其現象，看其是否會經由抑制細胞內 P0 蛋白的過度表現，產生細胞抑制效果。考慮之前文獻提及，P0 為細胞中蛋白質合成的必須分子，一但缺乏 P0 蛋白，蛋白質生合成的延長步驟會因此被抑制下來，引發 T 細胞的死亡程式(apoptosis)，而這點也是為何在紅斑性狼瘡的病患中，其 T 細胞的數目會下降的可能原因之一。

另外，在 Yeast 分析中指出，當 P1 及 P2 缺乏時，細胞只是生長情況緩慢。但當 P0 核糖蛋白缺乏時，卻會造成細胞的死亡。所以 P0 核糖蛋白是維持 stalk 結構的最基本單位(Elkon, 1990) ，也是細胞生存的基本需求。

由於以上兩點原因，最後採取將純化過 GCIP 抗體 (圖十) 送入癌化細胞 MCF7，推測在 GCIP 抗體作用下，會拮抗細胞內生性 GCIP 作用，而 GCIP 又已知會抑制 Cyclin D/CDK 的活化，間接使細胞週期停滯在 G1，抑制細胞進入 S-phase，因此加入 GCIP 抗體後，預期會使進入 S-phase 細胞增加，導致細胞增生。

利用一套 Pro-Ject™ Protein Transfection Reagent Kit (PIERCE) 把 GCIP 抗體及 Pre-immune rabbit IgG 送入 MCF7 細胞，轉染後 72 小時收集細胞，結果先看控制組，相較於未送入送入 β-galactosidase 的細胞，含有 β-galactosidase 的細胞在顯微鏡下，明顯有較深的藍色反應 (圖十一) 。兩者與正常未加入抗體的控制組細胞相比較，都有細胞增生的情況，但並沒有細胞型態上的改變 (圖十二)，唯獨加入 GCIP 抗體的細胞與加入 Pre-immune rabbit IgG 相較並無明顯增加(圖十三)。推測原因，可能是未將 Pre-immune rabbit IgG 進行純化，導致兔血清有許多未知的成分影響實驗。另一個可能原因在 72 小時收取細胞，並不一定是抗體作用的最佳時間點，作用的抗體經過 72 小時亦有可能已經被蛋白酵素消化掉，導致無法看到明顯的細胞增生現象。另外，實驗的 GCIP 的抗體為自己製備的多株抗體，而非商品化的單株抗體，增加實驗的變數。

因此，之後若要再次進行 GCIP 相關實驗探討，可將 GCIP 單株抗體餵食細胞，或是利用 RNAi 原理，送入 Antisense RNA，結合 GCIP 的 mRNA，抑制 GCIP 蛋白的轉錄，降低 GCIP 蛋白的生產量，觀察細胞失去 GCIP 後，對細胞型態或是細胞數目的影響。

6. 細胞與蛋白的免疫沉澱

首先先證明 cyclin D1 與 GCIP 具有交互作用，先確定能夠在 in vitro 看到此現象，因此採取類似 pull down 的做法，先取得 GST-GCIP 融合蛋白，再與細胞萃取液中 Cyclin D1 作用，最後以 Lysis buffer 清洗，以西方點漬法觀察是否有 cyclin D1 的免疫沉澱物被抓下。以 Glutathione sepharose 4B resins 抓下已

構築好的 GST-GCIP 融合蛋白，在 4˚C 滾動 1 小時，以 Binding buffer 清洗三次，再與 HT29 細胞萃取液作用過夜，最後再以 binding buffer 清洗三次，跑蛋白質電泳(SDS-PAGE)，結果可發現被 Bead 抓住的 GCIP 蛋白的確可以將 HT29 細胞萃取液中的 cyclin D1 免疫沉澱 (圖十四) 。並且，利用 Glutathione Sepharose 4B resins 抓下的 GST-GCIPΔC、GST-GCIPΔN 融合蛋白，並無法將 HT29 細胞萃取液中的 cyclin D1 免疫沉澱。

7. 細胞內共同免疫沉澱

確定 GCIP 和 cyclin D1 在 in vitro binding 有交互作用後，接下來進一步需要在細胞內證實兩者在細胞內也有交互作用。初期進行 cyclin D 與 GCIP 細胞內共免疫沉澱，為了與過去實驗室利用哺乳類冷光酵素交互作用(mammalian two hybrid) 進行 P0 與 GCIP 交互作用的材料一致，因此採用 HEK293 細胞，然而經過幾次實驗發現在單純的 HEK293 中並無法用西方點漬法看到 cyclin D1 存在，經過上網查尋文獻後發現 MCF7 (breast adenocarcinoma cell)及 HT29 (Colon cancer cell) 都能以西方點漬法偵測到 cyclin D1，D3 存在，表示這兩株細胞本身即有內生性的 Cyclin D1、D3，故以這兩株細胞為材料進行細胞內免疫沉澱。另外文獻發表過，細胞本身具有內生性 cyclin D2 的細胞株並不多，經過篩選收集到的細胞株發現一株名為 OGS 的骨髓細胞具有 Cyclin D2，因此以 OGS 進行細胞內共免疫沉澱。

結果發現，在 HT29 以 Cyclin D1 抗體免疫沉澱細胞萃取液，再以 GCIP 抗體進行西方點漬法，可發現在 38KD 位置有 GCIP band 存在，對照於細胞內生性 cyclin D1 可確認 HT29 中可見到 GCIP 與 Cyclin D1 交互作用 (圖十五)。

此外在 HT29 進行 Cyclin D3 與 GCIP 交互作用以 Cyclin D3 抗體免疫沉澱細胞萃取液再以 GCIP 抗體進形行西方點漬法可發現在 38KD 位置有 GCIP band 存在，對照於細胞內生性 cyclin D3 可確認 HT29 中可見到 GCIP 與 Cyclin D3 交互作用 (圖十七) ，但由於在此圖利用未施打任何免疫原的老鼠血清作為控制組發現仍有少量的 GCIP 蛋白被免疫沉澱下來，推測可能免疫沉澱物清洗的次數不夠，導致 Beads 上殘存少量的細胞萃取液而被西方點漬法偵測出，此

外亦有可能是當做一級抗體的 GCIP 抗體為多株抗體，不容易在西方點漬法中雜合出專一性的位置，但是由於此自己製備的抗體在細胞中只會雜交到單一位置，理論上應該具備足夠專一性，而 D3 抗體免疫沉澱下的細胞中 GCIP 相對量比未施打免疫原的老鼠血清更多，所以比較有可能是免疫沉澱物沒有清洗乾淨導致。

在 OGS 以 Cyclin D2 抗體免疫沉澱細胞萃取液，再以 GCIP 抗體進形行西方點漬法，並無發現在 38KD 位置有 GCIP band 存在，且單純 OGS 細胞萃取液也無法看到內生性 GCIP 存在，因此究竟是 OGS 本身無 GCIP 存在或是 D2 與 GCIP 無交互作用，這點並無法肯定。可以確定的是 OGS 本身即具有 Cyclin D2，這利用西方點漬法可看見 cyclin D2 抗體可以抓下免疫沉澱物中的 Cyclin D2。對照於細胞內生性 cyclin D1，可確認 HT29 中可見到 GCIP 與 Cyclin D1 交互作用 (圖十六) 。

總結:

在免疫沉澱法中觀察 cyclin D 與 GCIP 交互作用，由於 Cyclin D1，D2，D3 的大小分別為 36kD、34kD、34kD，而 GCIP 的大小為 38kD，位置十分接近，且 GCIP 抗體為自己製備，為 polyclonal antibody，專一性比不上單株抗體，雖然在細胞萃取液中可以雜交到到單一位置，即製備的 GCIP 抗體在細胞萃取液中不會有未專一性的雜交位置，但是在進行免疫沉澱時，由於 GCIP 在細胞中的含量並不是很多，且並非每種細胞同時含有 Cyclin D1、D2 及 D3，因此不容易進行比較，之後未來的人可以將含有 GCIP 的質體轉染送入同一株細胞中，再次進行比較會比較客觀些。然而至今尚未搜尋到同時具備內生性的 Cyclin D1、D2、D3 的細胞，此亦為應解決的問題。

另外，根據免疫沉澱初步結果研判 Cyclin D1 與 Cyclin D3 都可和 GCIP 交互作用，但結果並不十分清晰，將來利用外送含有 GCIP 的質體進行交互作用分析或許能得到更清晰的數據。

8. 以 TNT transcription/translation 觀察試管內(*in vitro*) D type cyclins 與 GCIP 交互作用情形

首先先自 cDNA library 中選殖出 D-type cyclins，將之構築在可以表現 T7、T3 或 SP6 promoter 的質體上 (圖十八) ，最後利用 TNT in vitro translation 將蛋白表現出。分別得到 cyclin D1、D2、D3 的蛋白。çyclin D1、D3 得到 T7 promoter 所驅動的蛋白，cyclin D2 構築在 pGEM-T 載體，此質體正向為 T7 promoter，反向為 SP6 promoter，經過酵素確認抽取的質體後，確定此基因為反向讀取，應使用 SP6 promoter 的 in vitro translation kit，此外，將 GCIP 另外構築在 T-載體上，挑選到的菌落質體經過酵素確認後，亦以 SP6 promote 轉譯蛋白。

將 In Vitro translation kit 所做出含放射線 S^{35} 的 GCIP*與分別與 Cyclin D1*、D2*、D3*於 4˚C 作用過夜，再分別各自加入 D1、D2、D3 抗體作用 4 小時，此實驗所用的負對照組為加入 Protein A 以及 D1、D2、D3 抗體與 GCIP* 作用，藉此分辨 GCIP*與 D-Type cyclins 的連結並非由抗體所導至，另一方面，也可以作為免疫沉澱物是否有清洗乾淨的依據。

最後加入 Protein A 作用兩小時，以 Lysis buffer 1ml 清洗五次，離心後加入 protein dye，煮沸後跑 SDS-PAGE，結果可明顯看出 cyclin D3 抗體除了抓下 Cyclin D3*，此外，GCIP*也可被抓下，證明 Cyclin D3*的確可和 GCIP*作用 (圖十九)。

之後將試管內的免疫沉澱法依相反流程做實驗，看是否 GCIP 仍可抓下 Cyclin D3，此做法為同樣將含有放射線的 Cyclin D1*、D2*、D3*與 GCIP*一起在 4˚C 滾動過夜，接者加入 GCIP 抗體作用四小時，之後加入 Protein A 作用兩小時，以 Lysis buffer 清洗五次，每次十分鐘，之後免疫沉澱物跑 SDS-PAGE，dry 乾 PAGE，以顯像板壓片隔夜，最後 FLA-3000 讀取放射線數值。結果 (圖二十) 發現 GCIP*仍可和 Cyclin D3*交互作用，並且 GCIP 亦可和 Cyclin D1 交互作用，但是結合強度以 cyclin D3*和 GCIP*結合強度大於 Cyclin D1 和 GCIP 的結合強度。而 Cyclin D2 與 GCIP 微弱的結合並無法肯定兩者間確實有交互作用。

9. p0 stable clone 生長曲線結果

將經由形質轉換的細胞以最適當濃度的抗生素 G418 篩選，持續篩選一個月，最後挑選含有 P0 的 Stable clone，由於形質轉換成功的 Stable clone 具有抗藥性，因此篩選存活的細胞理論上應為轉染入 p0/pMH 質體的細胞。篩選出兩個存活的 clone 後，進行細胞生長速度的比較。與單純的 MCF 細胞及轉染 pMH 的 MCF 細胞做比較，發現含有 p0/pMH 的 MCF7 生長速度較快。其中一株 p05b 在第五天細胞數目明顯上升。而 p05a 在第六天細胞數目亦有上升趨勢。

結論:

在 Yeast two hybrid 系統中以 P0 為餌，篩選到的 GCIP 在 GST pull down 實驗中證實兩者間具有交互作用，並且可能藉由 GCIP 的 HLH domain，acidic domain 進行結合。另外，在 cDNA library 選殖到的 cyclin D1、D2、D3 與 GCIP 進行交互作用分析，發現在試管內的免疫沉澱及細胞內免疫沉澱中證實 Cyclin D1、D3 兩者與 GCIP 有交互作用，且 Cyclin D3 與 GCIP 的交互作用能力比 Cyclin D1 強。因此我們推測，或許 P0 的過度表現可藉由抑制 GCIP，影響下游 Cyclin D1、D3 與 CDK 的結合活化，使的細胞週期不斷運行，細胞過度生長、增生形成癌症，這或許針對特異性在 Cyclin D1、D3 過度表現的癌症，由 P0 過度表現所引起，提供我們一條癌症發生的可能路徑，至於 GCIP 如何調控下游的 Cyclin D1、D3 之間的複雜調控機制，這也是日後值得我們去探究的。

參考文獻

1. Agami, R., R. Bernards (2000). "Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage." *Cell* 102(1): 55-66.

2. Bartkova J, Lukas J, Muller H, Lutzhoft D, Strauss M, Bartek J. (1994) " Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer." *Int J Cancer* 57(3):353-61.

3. Bartkova J, Zemanova M, Bartek J. (1996)" Abundance and subcellular localisation of cyclin D3 in human tumours."*Int J Canc*65(3):323-7.

4. Benezra, R., R. L. Davis, D. Lockshon, D. L. Turner, H. Weintraub (1990). "The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins." *Cell* 61(1): 49-59.

5. Berry, D. M., S. J. Benn, A. M. Cheng, C. J. McGlade (2001). "Caspase-dependent cleavage of the hematopoietic specific adaptor protein Gads alters signalling from the T cell receptor." *Oncogene* 20(10): 1203-11.

6. Chang MS, Chang CL, Huang CJ, Yang YC. (2000) "p29, a novel GCIP-interacting protein, localizes in the nucleus."*Biochem Biophys Res Commun* 279(2):732-7.

7. Chen Y, Martinez LA, LaCava M, Coghlan L, Conti CJ.(1998) " Increased cell growth and tumorigenicity in human prostate LNCaP cells by overexpression to cyclin D1."*Oncogene*16(15):1913-20.

8. Elkon, K., H. Weissbach, et al. (1990). "Central nervous system function in systemic lupus erythematosus." *Neurochem Res* 15(4): 401-6.

9. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. (1993) " Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins." *Cell* 73(3):487-97.

10. Fabien, N., A. Moreira, et al. (1999). "Autoantibodies directed against the ribosomal P proteins are not only directed against a common epitope of the P0, P1 and P2 proteins." *J Autoimmun* 13(1): 103-10.

11. Feliers, D., M. A. Frank, et al. (2002). "Activation of cyclin D1-Cdk4 and Cdk4-directed phosphorylation of RB protein in diabetic mesangial hypertrophy." *Diabetes* 51(11): 3290-9.

12. Fujii S, Tominaga O, Nagawa H, Tsuno N, Nita ME, Tsuruo T, Muto T. " Quantitative analysis of the cyclin expression in human esophageal cancer cell lines."*J Exp Clin Cancer Res*. 1998 Dec;17(4):491-6.

13. Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G, Barnes D. " Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer." (1996) *Int J Cancer*69(2):92-9.

14. Gonzalo P, Lavergne JP, Reboud JP.(2001) "Pivotal role of the P1 N-terminal domain in the assembly of the mammalian ribosomal stalk and in the proteosynthetic activity." *J Biol Chem* 276(23):19762-9.

15. Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A, Weinberg RA. " Function of a human cyclin gene as an oncogene." *Proc Natl Acad Sci* U S A. 1994 Jan 18;91(2):709-13.

16. Inaba, T.; Matsushime, H.; Valentine, M.; Roussel, M. F.; Sherr, C. J.; Look, A. T. (1992) "Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes.."*Genomics* 13: 565-574

17. Jiang W, Kahn SM, Zhou P, Zhang YJ, Cacace AM, Infante AS, Doi S, Santella RM, Weinstein IB. .(1993) " Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression." *Oncogene* Dec;8(12):3447-57.

18. Johanet, C., C. Andre, et al. (2000). "Clinical significance of antiribosomal antibodies. Study Group on Autoimmunity (GEAI)." *Rev Med Interne* 21(6): 510-6.

19. Kondoh, N., T. Wakatsuki, A. Ryo, A. Hada, T. Aihara, S. Horiuchi, N. Goseki, O. Matsubara, K. Takenaka, M. Shichita, K. Tanaka, M. Shuda, M. Yamamoto (1999). "Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis." *Cancer Res* 59(19): 4990-6.

20. Koren, E., M. W. Reichlin, M. Koscec, R. D. Fugate, M. Reichlin (1992). "Autoantibodies to the ribosomal P proteins react with a plasma membrane-related target on human cells." *J Clin Invest* 89(4): 1236-41.

21. Lukas J, Pagano M, Staskova Z, Draetta G, Bartek J. (1994) " Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines."*Oncogene*. Mar;9(3):707-18.

22. Ma, W., C. Xia, P. Lin, M. Qiu, Y. Luo, Tse-Hua. Tan, M. Liu (2001). "Leukocyte-specific adaptor protein Grap2 interacts with hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) to activate JNK signaling pathway in T lymphocytes." *Oncogene* 20(14): 1703-14.

23. Matsushime, H., D. E. Quelle, S. A. Shurtleff, M. Shibuya, C. J. Sherr, J-Y. Kato,. (1994). "D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells." *Mol Cell Biol* 14(3): 2066-76.

24. McIntosh GG, Anderson JJ, Milton I, Steward M, Parr AH, Thomas MD, Henry JA,Angus B, Lennard TW, Horne CH (1995)" Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer." *Oncogene*. Sep 7;11(5):885-91.

25. Motokura T, Keyomarsi K, Kronenberg HM, Arnold A. (1992) "Cloning and characterization of human cyclin D3, a cDNA closely related in sequence to the PRAD1/cyclin D1 proto-oncogene." *J Biol Chem*. Oct 5;267(28):20412-5.

26. Muller, H.; Lukas, J.; Schneider, A.; Warthoe, P.; Bartek, J.; Eilers, M.; Strauss, M. (1994) “Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein.” *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 2945-2949

27. Norton JD. (2000) " ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis."*J Cell Sci*. 113 (Pt 22):3897-905. Review.

28. Pogue-Geile, K., J. R. Geiser, et al. (1991). "Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein." *Mol Cell Biol* 11(8): 3842-9.

29. Qiu M, Hua S, Agrawal M, Li G, Cai J, Chan E, Zhou H, Luo Y, Liu M. (1998)" Molecular cloning and expression of human grap-2, a novel leukocyte-specific SH2- and SH3-containing adaptor-like protein that binds to gab-1."*Biochem Biophys Res Commun*. Dec 18;253(2):443-7.

30. Revenkova, E., J. Masson, et al. (1999). "Involvement of *Arabidopsis thaliana* ribosomal protein S27 in mRNA degradation triggered by genotoxic stress." *Embo J* 18(2): 490-9.

31. Schijman AG, Levitus G, Levin MJ.(1992)." Characterization of the C-terminal region of a Trypanosoma cruzi 38-kDa ribosomal P0 protein that does not react with lupus anti-P autoantibodies." Immunol Lett. Jun;33(1):15-20.

32. Sherr, C. J. (1993). "Mammalian G1 cyclins." *Cell* 73(6): 1059-65.

33. Sherr CJ." D-type cyclins." (1995) Trends Biochem Sci. May;20(5):187-90. Review.

34. Shimizu T, Nakagaki M, Nishi Y, Kobayashi Y, Hachimori A, Uchiumi T. (2002) "Interaction among silkworm ribosomal proteins P1, P2 and P0 required for functional protein binding to the GTPase-associated domain of 28S rRNA." *Nucleic Acids Res*. Jun 15;30(12):2620-7.

35. Sicinski, P.; Donaher, J. L.; Parker, S. B.; Li, T.; Fazeli, A.; Gardner, H.; Haslam, S. Z.; Bronson, R. T.; Elledge, S. J.; Weinberg, R. A. (1995) "Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast." *Cell* 82: 621-630

36. Steeg PS, Zhou Q. "Cyclins and breast cancer."(1998) Breast Cancer Res Treat.52(1-3):17-28. Review.

37. Sun KH, Tang SJ, Lin ML, Wang YS, Sun GH, Liu WT.(2001) "Monoclonal antibodies against human ribosomal P proteins penetrate into living cells and cause apoptosis of Jurkat T cells in culture." *Rheumatology (Oxford)*. 40(7):750-6.

38. Tchorzewski M, Krokowski D, Rzeski W, Issinger OG, Grankowski N. " The subcellular distribution of the human ribosomal "stalk" components: P1, P2 and P0 proteins."*Int J Biochem Cell Biol*. 2003 Feb;35(2):203-11.

39. Terai S, Aoki H, Ashida K, Thorgeirsson SS.(2000) "Human homologue of maid: A dominant inhibitory helix-loop-helix protein associated with liver-specific gene expression."*Hepatology.* Aug;32(2):357-66.

40. Towbin H, Ramjoue HP, Kuster H, Liverani D, Gordon J. "Monoclonal antibodies against eucaryotic ribosomes. Use to characterize a ribosomal protein not previously identified and antigenically related to the acidic phosphoproteins P1/P2."*J Biol Chem.* 1982 Nov 10;257(21):12709-15.

41. Uchiumi, T., K. Hori (1999). "Replacement of L7/L12.L10 protein complex in *Escherichia coli* ribosomes with the eukaryotic counterpart changes the specificity of elongation factor binding." *J Biol Chem* 274(39): 27578-82.

42. Uchiumi, T.,R. Kominami (1992). "Direct evidence for interaction of the conserved GTPase domain within 28 S RNA with mammalian ribosomal acidic phosphoproteins and L12." *J Biol Chem* 267(27): 19179-85

43. Vilela C, Ramirez CV, Linz B, Rodrigues-Pousada C, McCarthy JE. (1999) "Post-termination ribosome interactions with the 5'UTR modulate yeast mRNA stability." *EMBO J.* Jun 1;18(11):3139-52.

44. Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." *Cell* 81(3): 323-30.

45. Xia C, Bao Z, Tabassam F, Ma W, Qiu M, Hua S, Liu M.(2000)" GCIP, a novel human grap2 and cyclin D interacting protein, regulates E2F-mediated transcriptional activity." *J Biol Chem* 275(27):20942-8.

46. Xiang H, Wang J, Mao Y, Liu M, Reddy VN, Li DW.(2002)"Human telomerase accelerates growth of lens epithelial cells through regulation of the genes mediating RB/E2F pathway."Oncogene. 21(23):3784-91.

47. Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D.(1991) " Human D-type cyclin." Cell. 1991 May 17;65(4):691-9.

48. Yao Y, Doki Y, Jiang W, Imoto M, Venkatraj VS, Warburton D, Santella RM, Lu B, Yan L, Sun XH, Su T, Luo J, Weinstein IB.(2000) " Cloning and characterization of DIP1, a novel protein that is related to the Id family of proteins." Exp Cell Res. ;257(1):22-32.

49. Yoshio, T., J. I. Masuyama, et al. (1997). "Correlation of serum IgG antibodies to recombinant P0 fusion protein with IgG antibodies to carboxyl-terminal 22 synthetic peptides and carboxyl-terminal 22 amino acid-deleted recombinant P0 fusion protein in patients with systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* 40(7): 1364-5.

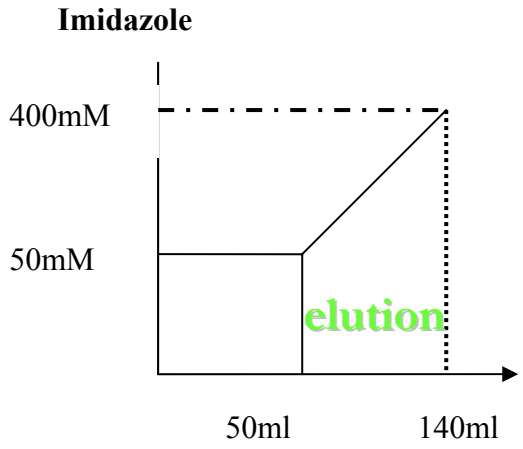
50. Yoshio, T., J. I. Masuyama, et al. (1998). "A close temporal relationship of liver disease to antiribosomal P0 protein antibodies and central nervous system disease in patients with systemic lupus erythematosus." *J Rheumatol* 25(4): 681-8.

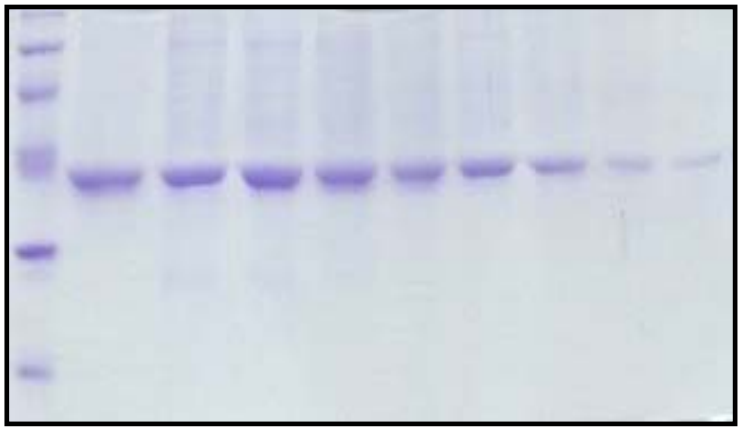
51. Yu, Q.; Geng, Y.; Sicinski, P.(2001) “Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation.” *Nature* 411: 1017-1021.

52. Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R. P. Trible, L. E. Samelson (1998). "LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation." *Cell* 92(1): 83-92.

53. 洪瑞陽 (2000)”與 U 型環狀 RNA 鍵結的核糖蛋白 P0 之研究”國立成功大學理學院生物科技研究所

54. 楊薇儒 (2001) “選與 P0 交互作用之蛋白及研究”，國立成功大學理學院生物科技研究所





圖一、在不同 imidazole 濃度下，利用鎳親合性管柱所純化 P0 蛋白

lane 1:LMW

lane 2:在 imidazole 濃度為 160mM 時所純化的 P0 蛋白

lane 3:在 imidazole 濃度為 168mM 時所純化的 P0 蛋白

lane 4:在 imidazole 濃度為 176mM 時所純化的 P0 蛋白

lane 5:在 imidazole 濃度為 184mM 時所純化的 P0 蛋白

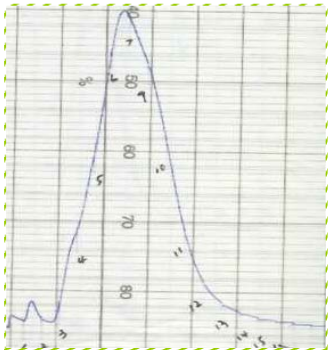
lane 6:在 imidazole 濃度為 192mM 時所純化的 P0 蛋白

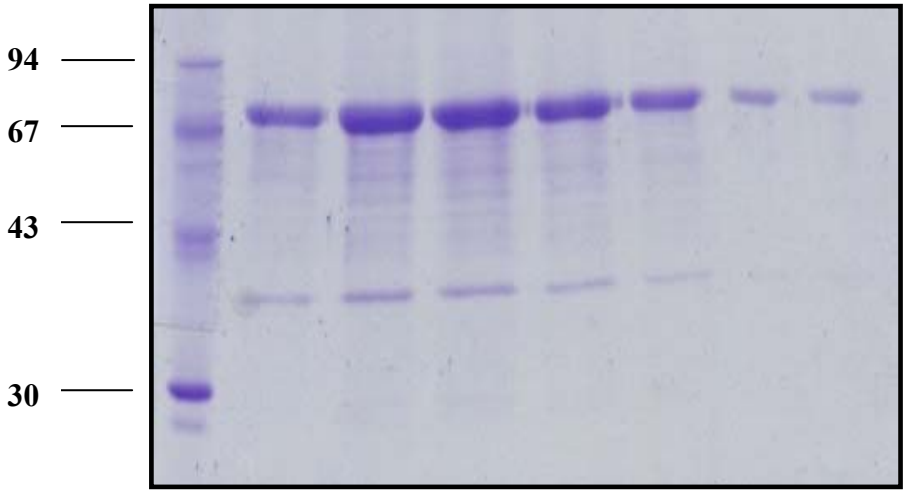
lane 7:在 imidazole 濃度為 200mM 時所純化的 P0 蛋白

lane 8:在 imidazole 濃度為 208mM 時所純化的 P0 蛋白

lane 9:在 imidazole 濃度為 216mM 時所純化的 P0 蛋白

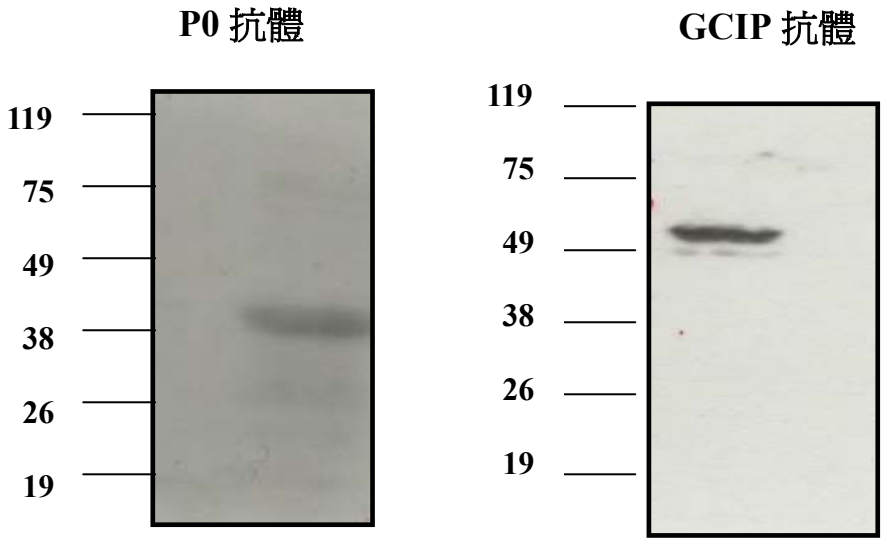
lane 10:在 imidazole 濃度為 224mM 時所純化的 P0 蛋白





圖二、利用 GST 親合性管柱純化 GST 融合蛋白 GCIP 蛋白

分別在不同濃度的 Elution buffer 純化 GCIP 蛋白，此為培養 200ml 菌液，經過離心，回溶 50 ml PBS，打破菌體所得到的上清液通過管柱，再利用不同濃度的 Elution buffer 所收集不同微量離心管的蛋白，跑 SDS-PAGE 所得結果。左上角為 LC 純化蛋白所得 Peak 圖。

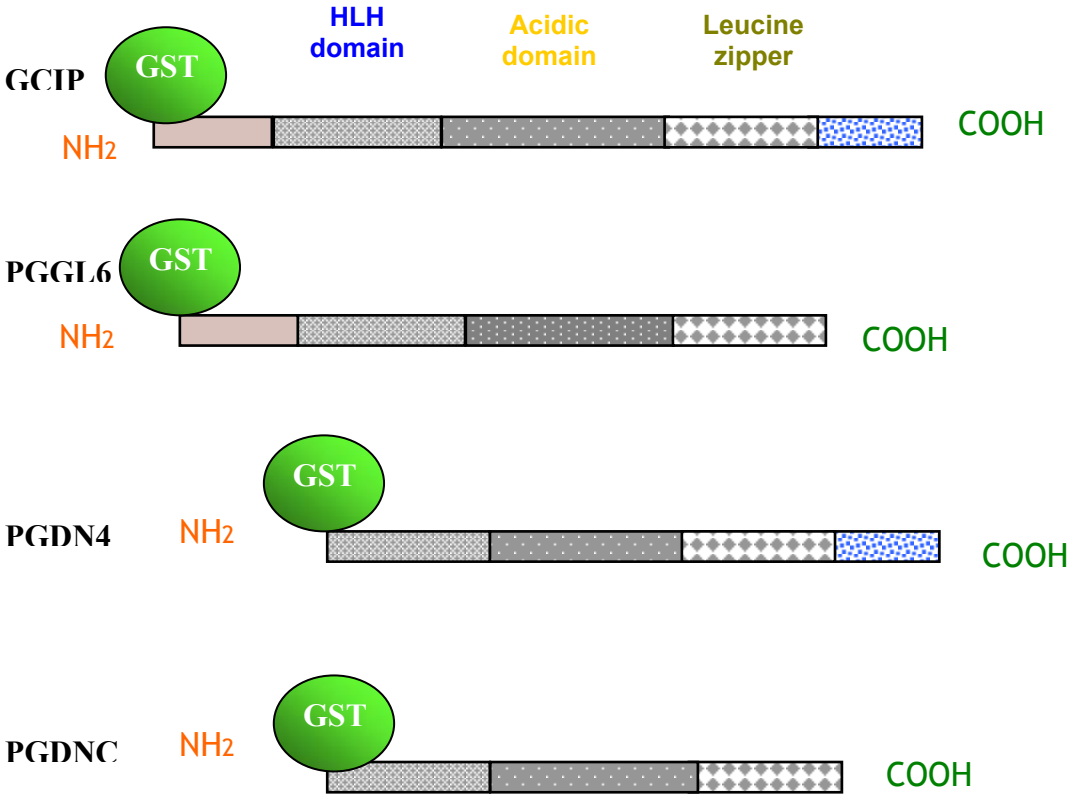


圖三、利用西方點漬法測試製備抗體的效價

左圖為在 1:6000 時測試結果，P0 大小為 38 kD

右圖為 GCIP 抗體在 1:4000 時測試結果，GCIP 大小為 40+26=66kD，GST 本身大小為 26kD。

GCIP Construction



圖四、將不同片段的 GCIP 構築在 pGEX-5x-3 質體上

GCIP 主要由五個 Domain 組成，分別 N 端區域、HLH Helix-loop-helix) domain、acidic domain、Leucine zipper domain、C 端區域。

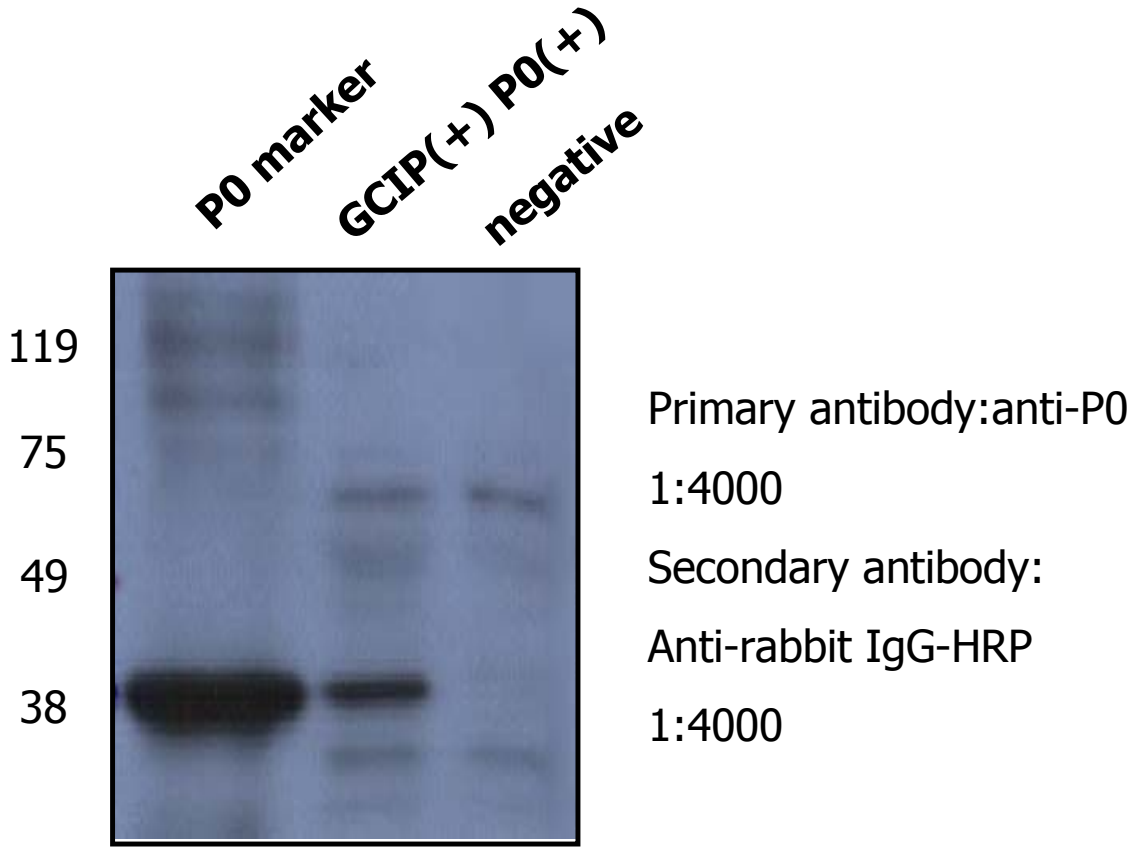
由上到下分別為:

GCIP Full length/ pGEX

PGGL6/ pGEX(GCIPΔN)

PGDN4/ pGEX(GCIPΔC)

PGDNC/ pGEX(GCIPΔN,C)



圖五、以西方點漬法偵測 GCIP 與 Refolding P0 交互作用

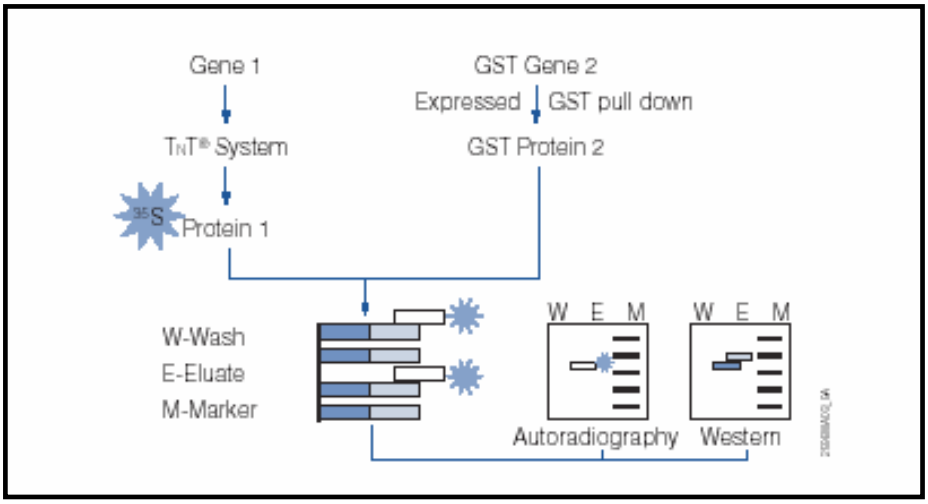
一級抗體:anti-P0 抗體為 1:4000

二級抗體:Anti-rabbit IgG-HRP 抗體 1:4000

Lane 1:純化過的 P0 蛋白

Lane 2:結合在 Glutathione Sepharose beads 的 GCIP 蛋白與 Refolding P0 蛋白作用

Lane 3: 結合在 Glutathione Sepharose beads 與 Refolding P0 蛋白作用



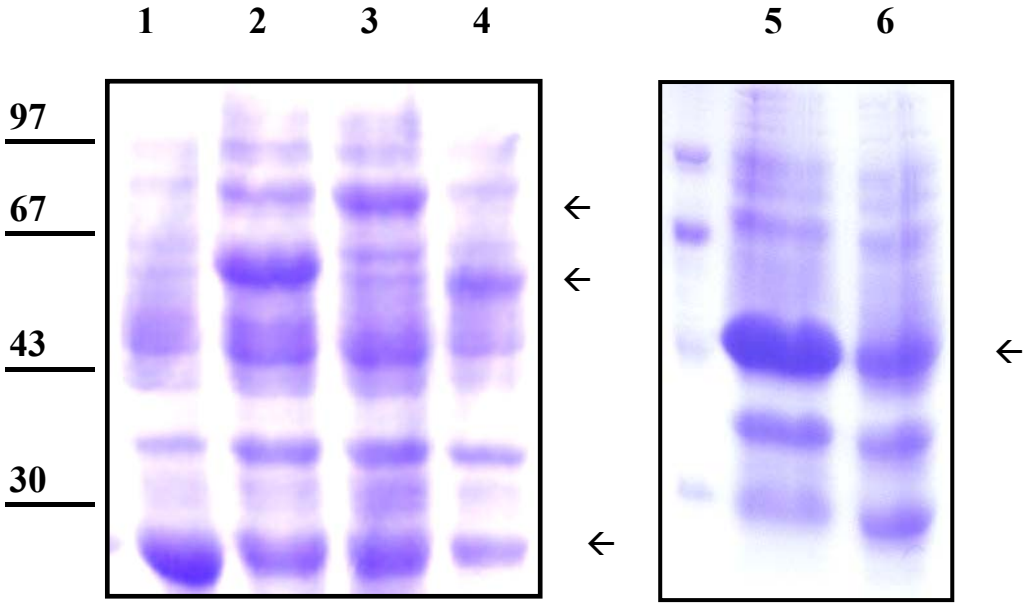
圖六、GST Pull Down 原理示意圖

利用 *E. coli* BL21 (DE3)大量誘導表現融合在 GST 上的基因，以 Glutathione Sepharose 4B 進行純化，再與標示 S^{35} 的 in vitro translation 產物進行結合，以 binding buffer 洗掉非專一性的蛋白結合後跑 SDS-PAGE，最後以顯像板壓片過夜後讀值。

Plasmid	size		primers	cutting site
GCIP	1080 bp	GCIP(+)/pGEX	cggaattcgatggcgagcgcaact	EcoRI
		GCIP(-)/pGEX	cctcccgggtcataattcaagttc	SmaI
GL9	720 bp	GL9(+)/pGEX	cacgggatccagatggcgagcgcaac	BamHI
		GL9(-)/pGEX	tgggaattcgagctcttgatcgtcctc	EcoRI
PGDN	636 bp	PGDN(+)/pGEX	caagaattctatttcctacaacagtctc	EcoRI
		PGDN(-)/pGEX	同 GCIP(-)/PGEX	SmaI
PGDNHA	363 bp	PGDNHA(+)/pGEX	tcagaattccataatcccatgccttgcg	EcoRI
		PGDNHA(-)/pGEX	同 GCIP(-)/PGEX	EcoRI
PGDNC	326 bp	PGDNC(+)/pGEX	同 PGDN(+)/PGEX	EcoRI
		PGDNC(-)/pGEX	ctccccgggttacatccgaattttctt	SmaI
PGDALC	570 bp	PGDNLC(+)/pGEX	同 GCIP(+)/PGEX	EcoRI
		PGDNLC(-)/pGEX	ctccccgggttcttcatgtgcatc	SmaI

圖七、GST-GCIP 融合蛋白各片段的構築

由於實驗室已有 plasmid 含有 GCIP Full length，因此我以 GCIP 全長作為 template，在其兩端設計不同切位 Cutting site 之 primers，擴增出含不同區域(Domain)的 GCIP。同樣在得到之 PCR 產物做切割，將欲接上的 vector (pGEX-5X-3) 做同樣的處理，之後進行 ligation。



圖八、大量表現融合在 GST 的 GCIP 及 Truncated form 的蛋白

Lane 1: GST

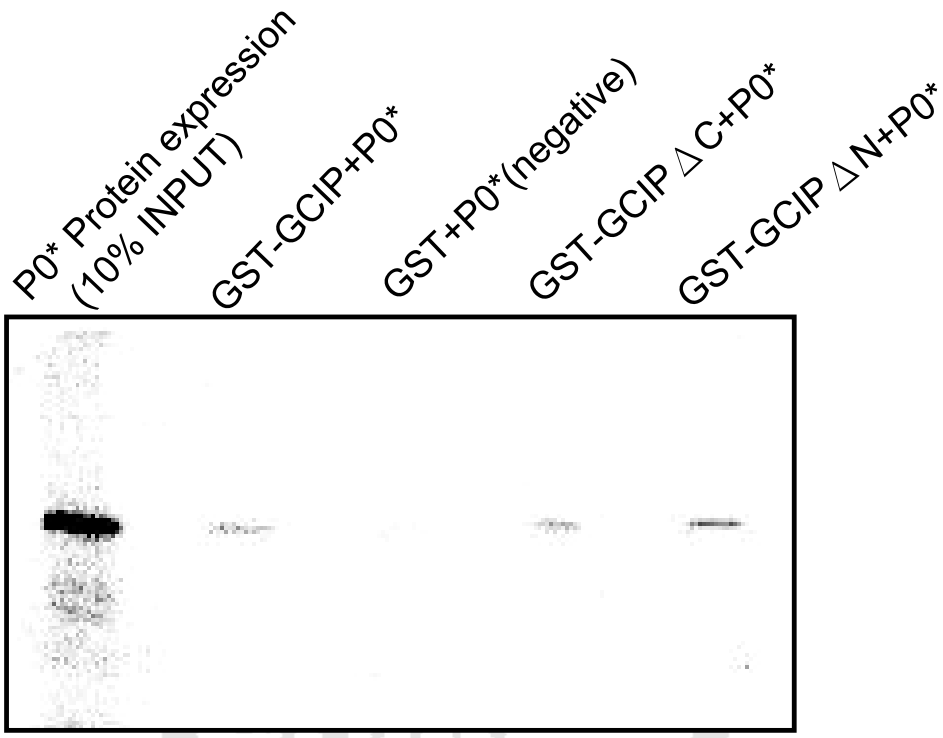
Lane 2: PGDN4(GCIPΔN)

Lane 3: GCIP

Lane 4: PGGL6(GCIPΔC)

Lane 5: PGDNC(GCIPΔN,C)—溶解在 6M urea/PBS

Lane 6: PGDNC(GCIPΔN,C)—溶解在 PBS



圖九、利用 GST Pull down 觀察放射線 P0*與 GCIP 各片段融合蛋白交互作用

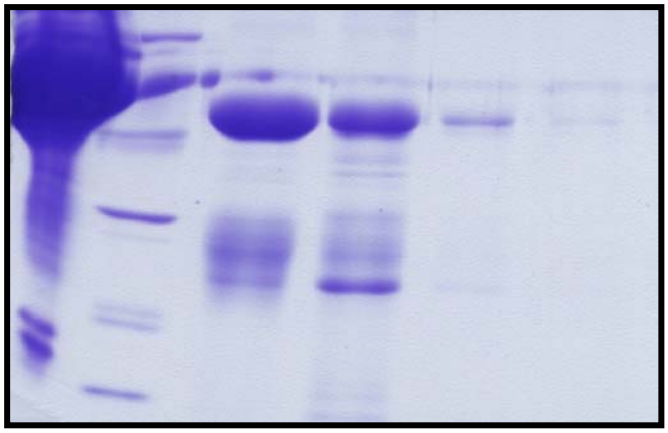
Lane 1:單純 P*0 表現蛋白

Lane 2:P0*與 GCIP 全長交互作用

Lane 3:P0*與 pGEX 交互作用(negative)

Lane 4:P0*與 PGGL6(GCIPΔC)交互作用

Lane 5:P0*與 PGDN4(GCIPΔN)交互作用

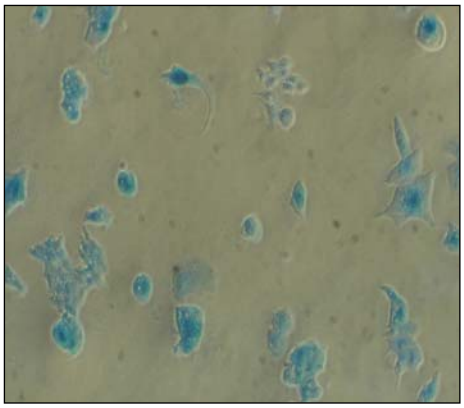


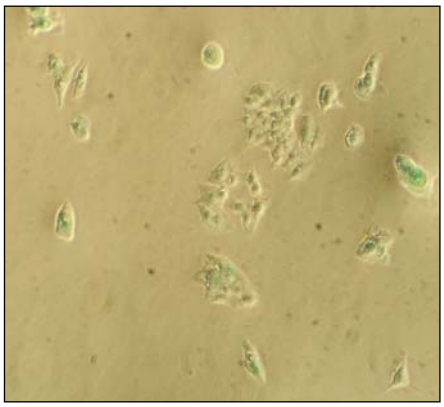
圖十、GCIP 抗體的純化

利用 0.1M 的 Glycine-HCl (pH2.7) 沖出管柱中 Protein A 上結合之 IgG，並將之分批收集在 1.5 ml 的微量離心管，每管收集在已加入 100μl pH 8.0 的 Tris-HCl。之後跑蛋白質電泳測試抗體純度。

Lane 1:未純化的 GCIP 抗體

Lane 2, 3, 4:經由不同批沖提出來的 GCIP 抗體





送入 β-GAL 染 X-Gal (100X)

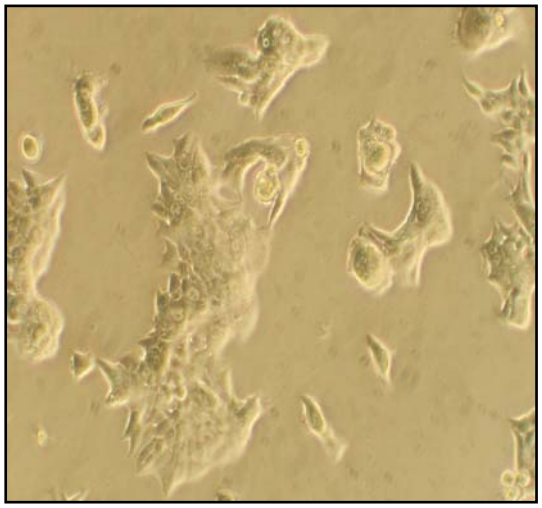
未送入任何東西染 X-Gal (100X)

圖十一、偵測轉染入 MCF7 細胞的抗體轉染效率

左圖: 送入 β-GAL 染 X-Gal

右圖: 未送入任何東西進入 MCF7 且染 X-Gal

(1) GCIP 抗體處理 MCF7



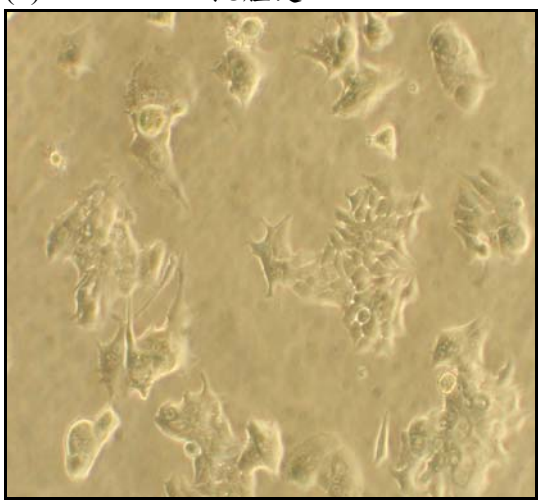
圖十二、顯微鏡下觀察轉染入抗體的細胞

上圖:轉染入 GCIP 抗體

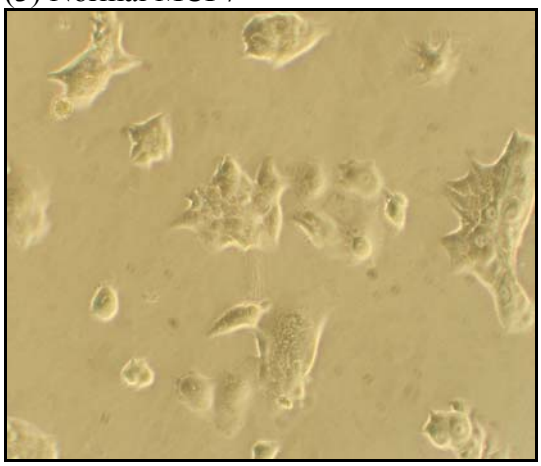
中圖:轉染入 Pre-immune 抗體

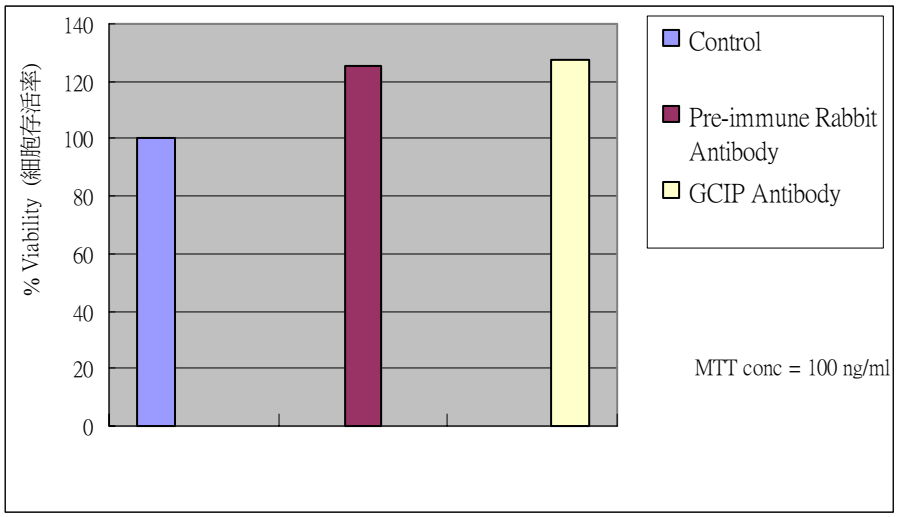
下圖:未經過處理的 MCF7

(2)Pre-immune 抗體處理 MCF7



(3) Normal MCF7



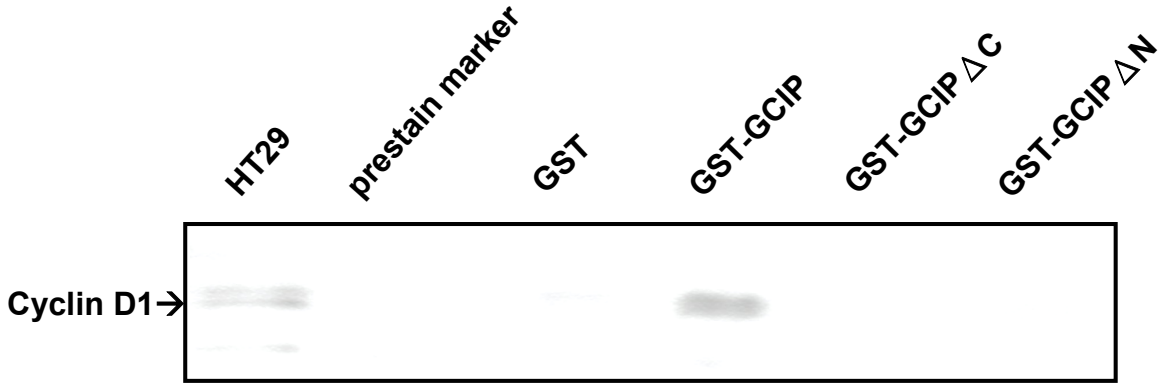


圖十三、GCIP 抗體送入 MCF7 細胞，利用 MTT 觀察細胞增生現象

Lane 1: control 未處理任何抗體，正常的生長的 MCF7

Lane 2:以未純化且未施打任何免疫原的兔血清處理 MCF7

Lane 3:以純化過的 GCIP 抗體處理 MCF7



圖十四、以 Pull Down 觀察細胞內 cyclin D1 與 GST fusion

protein 結合情形

Lane 1 : HT29 細胞萃取液

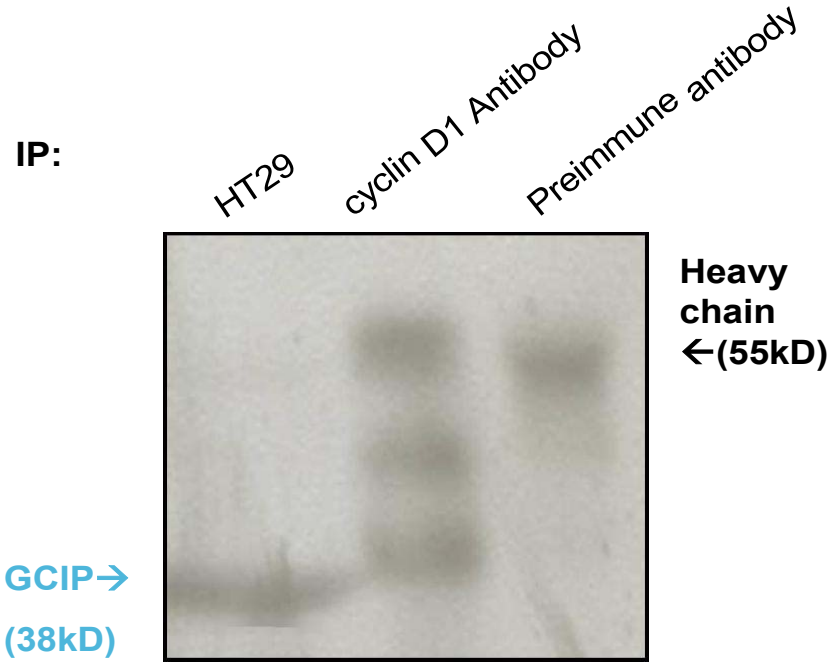
Lane 2 : Prestain marker

Lane 3 : GST 蛋白與 HT29 進行 Pull Down

Lane 4 : GCIP 蛋白與 HT29 進行 Pull Down

Lane 5 : GST-GCIPΔC 與 HT29 進行 Pull Down

Lane 6 : GST-GCIPΔN 與 HT29 進行 Pull Down

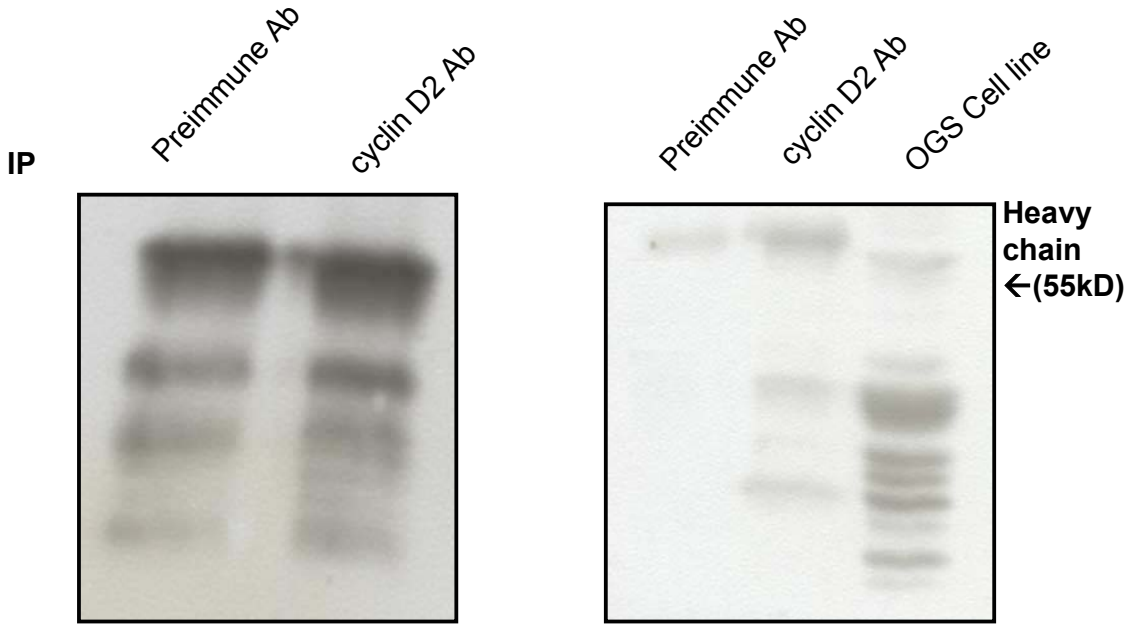


圖十五、利用 GCIP 抗體偵測免疫沉澱法中 Cyclin D1 與 GCIP 交互作用

Lane 1: HT29 細胞萃取液

Lane 2: 以 Cyclin D1 抗體對 HT29 細胞進行作免疫沉澱，並以 GCIP 抗體進行西方點漬法

Lane 3: 以 pre-immune anti-mouse IgG 抗體對 HT29 細胞進行免疫沉澱並以 GCIP 抗體進行西方點漬法



圖十六、利用 GCIP 抗體偵測免疫沉澱法中 Cyclin D2 與 GCIP 交互作用

由左至右分別為 Lane1-5

Lane 1: 以 pre-immune anti-mouse IgG 抗體對 OGS 細胞進行免疫沉澱，再以 Cyclin D2 抗體進行西方點漬法

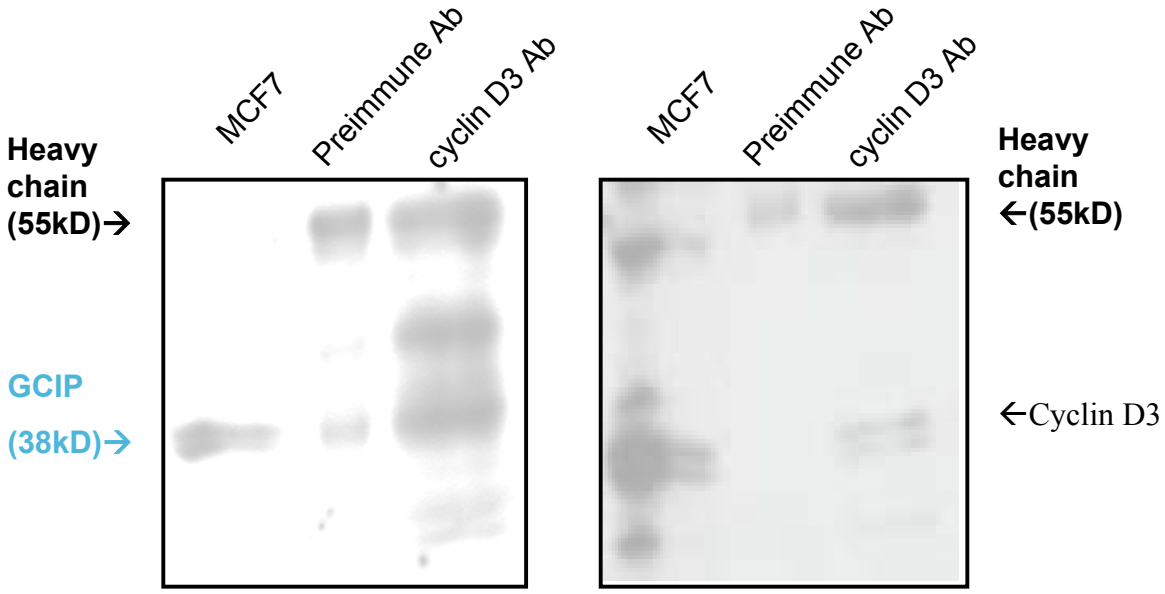
Lane 2: 以 Cyclin D2 抗體對 OGS 細胞進行作免疫沉澱，再以 Cyclin D2 抗體進行西方點漬法

Lane 3: OGS 細胞萃取液

Lane 4: 以 pre-immune anti-mouse IgG 抗體對 OGS 細胞進行免疫沉澱，再以 GCIP 抗體進行西方點漬法

Lane 5: 以 Cyclin D2 抗體對 OGS 細胞進行作免疫沉澱，再以 GCIP 抗體進行西方點漬法

GCIP And Cyclin D3 In Vivo Co-IP



圖十七、利用 GCIP 抗體偵測免疫沉澱法中 Cyclin D3 與 GCIP 交互作用

由左至右分別為是 lane1-6

Lane 1: MCF 細胞萃取液

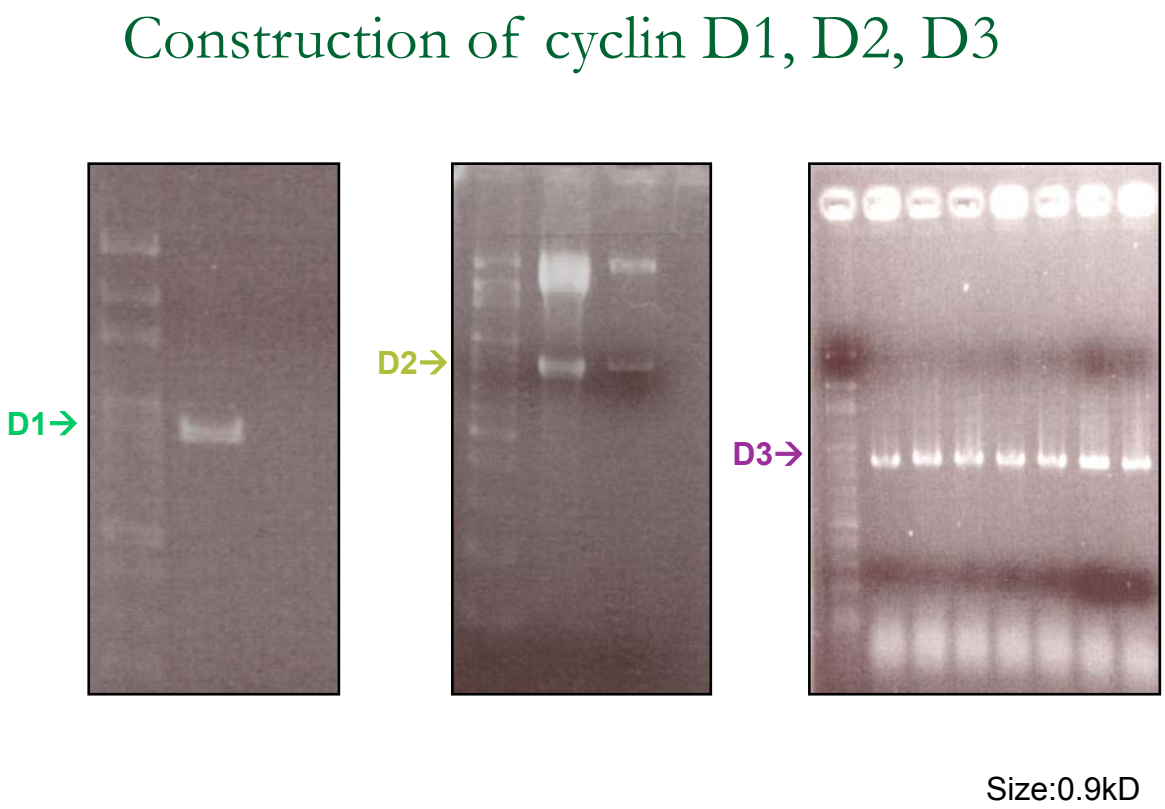
Lane 2: 以 pre-immune anti-mouse IgG 抗體對 MCF7 細胞進行免疫沉澱，Cyclin D2 抗體進行西方點漬法

Lane 3: 以 GCIP 抗體進行西方點漬法以 Cyclin D2 抗體對 MCF7 細胞進行免疫沉澱，以 cyclin D2 抗體進行西方點漬法

Lane 4: MCF7 細胞萃取液

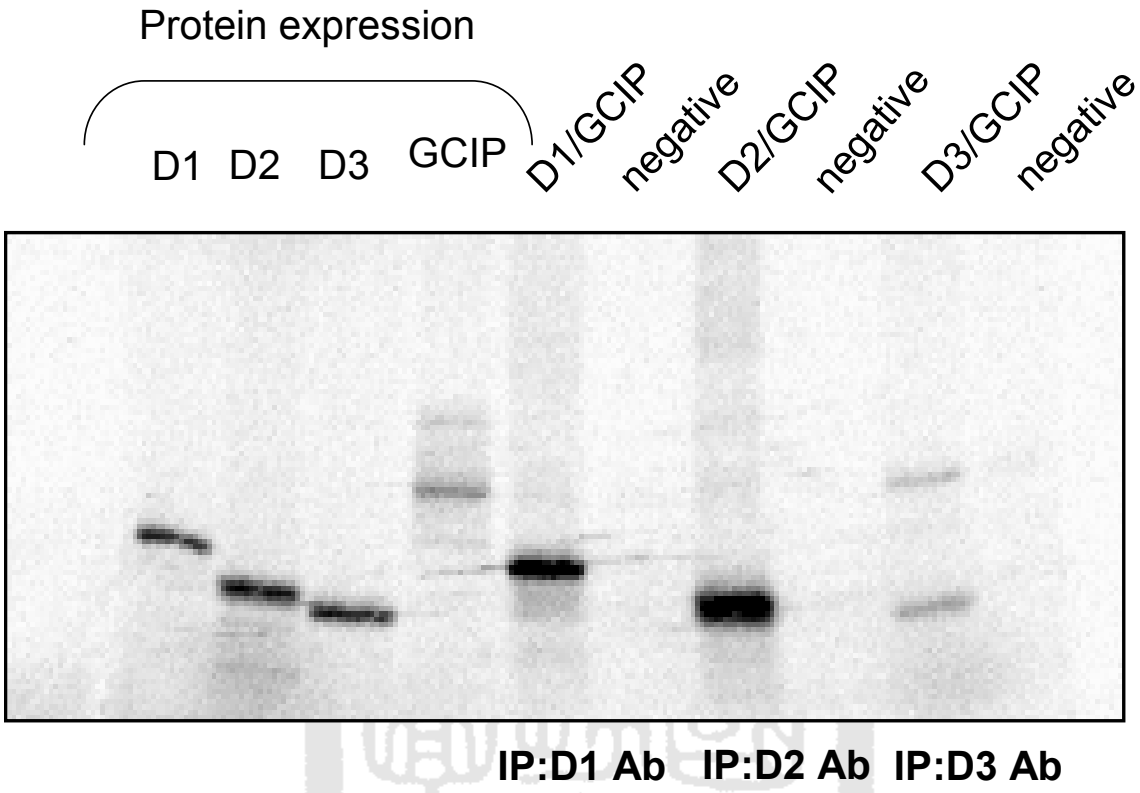
Lane 5: 以 pre-immune anti-mouse IgG 抗體對 MCF7 細胞進行免疫沉澱

Lane 6: 以 GCIP 抗體進行西方點漬法以 Cyclin D2 抗體對 MCF7 細胞進行作免疫沉澱，以 GCIP 抗體進行西方點漬法



圖十八、細胞週期素 Cyclin D1、D2、D3 的選殖及構築

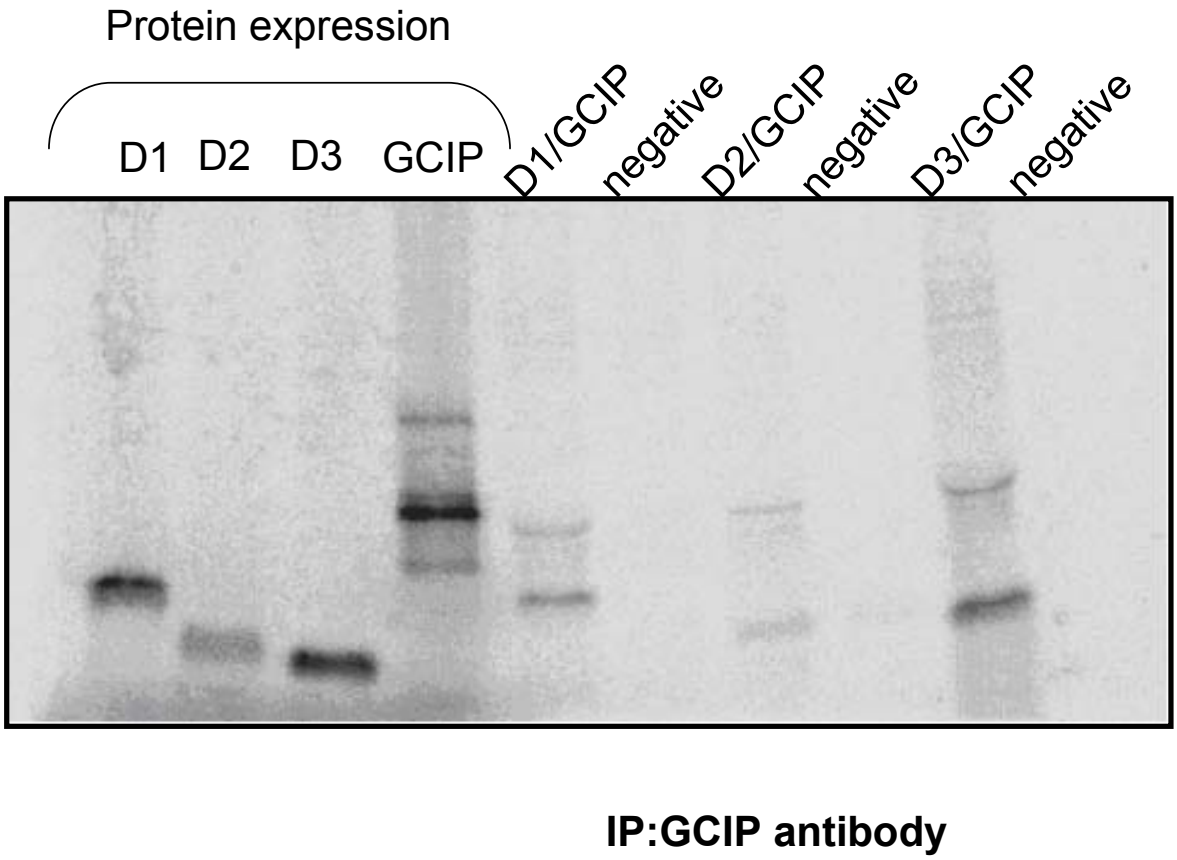
細胞週期素 cyclin D1 接在 pET21b，cyclin D2 接在 pGEM-T-載體，cyclin D3 接在 pET21a 上。左圖為構築為成的 cyclin D1/pET21b 藉由 PCR 方式確認大小。中圖為 cyclin D2/T 載體藉由酵素切割確認大小。右圖為 cyclin D3/pET21a 以 PCR 方式確認大小。cyclin D1、D2、D3 的大小為 0.9 kDa。



圖十九、利用免疫沉澱方式觀察 cyclinＤ１，Ｄ２，Ｄ３**與**

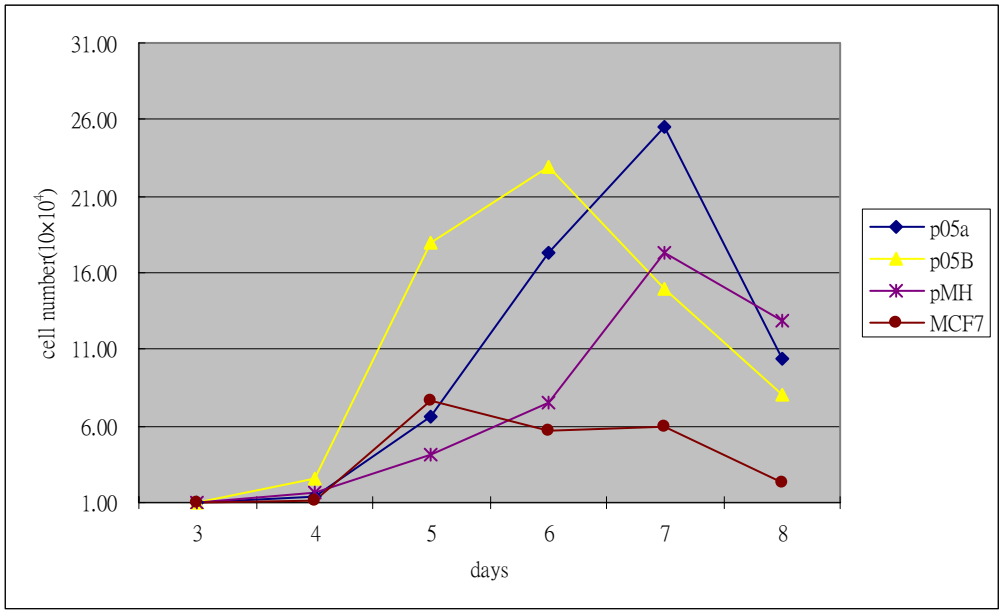
ＧＣＩＰ**交互作用**

利用 TNT Quick Coupled Transcription/Translation System 將有 S35 同位素標定的 Cyclin D1、D2、D3、GCIP 蛋白表現出來，接著分別利用 cyclin D1、D2、D3 抗體進行免疫沉澱，利用 Protein A 進行免疫沉澱法。將 GCIP 與 Cyclin D1、D2、D3 作用後的免疫沉澱物進行清洗，之後跑 SDS-PAGE (10%) 蛋白質電泳，以顯像板(Image plate)壓片並利用 FLA-3000 分析讀取影像。在此結果看到 Cyclin D3 會與 GCIP 交互作用。在此的負對照組分別用 Cyclin D1、D2、D3 抗體與 GCIP*交互作用，之後以 Lysis buffer 進行清洗作用。



圖二十、利用免疫沉澱法觀察 GCIP 與 Cyclin D1、D2、D3 的交互作用

利用 TNT Quick Coupled Transcription/Translation System 將有 S^{35} 同位素標定的 Cyclin D1、D2、D3、GCIP 蛋白表現出來，接著利用 GCIP 抗體進行免疫沉澱，利用 Protein A 進行免疫沉澱法。將 GCIP 與 Cyclin D1、D2、D3 作用後的免疫沉澱物進行清洗，之後跑 SDS-PAGE (8 %) 蛋白質電泳，以顯像板(Image plate)壓片並利用 FLA-3000 分析讀取影像。在此結果看到 CyclinD1、D3 會與 GCIP 交互作用。在此的負對照組分別用 Cyclin D1*、D2*、D3*與 GCIP 抗體交互作用，之後以 Lysis buffer 進行清洗作用。



圖二十一、P0 stable clone growth curve

經 G418 篩選出含有 P0 的 stable clone，挑選兩個 clone 與未送任何東西的 MCF7 及送入空的哺乳細胞表現載體進行生長速率比較，可發現，其中一株 p05b 在第五天細胞數目明顯上升。而 p05a 在第六天細胞數目亦有上升趨勢。

自述

姓名:葉彥秀

姓別:女

籍貫:台灣省高雄市

生日:1977 年 5 月 6 日

住址:高雄市前金區民生二路 139 號 3F-1

學歷: 高雄市凱旋國小

高雄市道明中學

市立高雄女子高級中學

私立高雄醫學大學藥學系

國立成功大學生物科技研究所