

目 錄

摘 要	-----	1
Abstract	-----	3
序 論	-----	5
實驗動機	-----	11
實驗材料	-----	12
實驗方法	-----	22
實驗結果	-----	34
討 論	-----	41
Reference	-----	45
圖 表	-----	54

摘 要

Glutathione S-transferase (GST)是mammalian細胞中的一重要解毒(detoxification)酵素，而GST亦為dimeric cytosolic isoenzyme:包含了alpha、pi、mu、theta、zeta與sigma等6種。之前文獻指出，GST會將xenobiotics與glutathione (GSH)進行conjugation，使得這些偏非極性的xenobiotics的水溶性上升，而能順利排出體外；另一方面，GST也具有抗氧化功能故能避免lipid或核酸受到攻擊。因此GST在細胞中的解毒或防止癌症發生的機制中應扮演一重要的角色。之前關於GST mu的研究有許多方面都是探討mu class與癌症發生機率的關係，更有人認為GST mu可以列為膀胱癌的預測指標(marker) 又因為GST mu在肝細胞受致癌物質刺激下其表現會增加，故我們想觀察當GST mu overexpression時，對肝細胞抵抗致癌物所產生的肝毒性、基因毒性的情形以及對於肝細胞抵抗癌化的指標意義。

本次實驗是利用大白鼠初代培養之肝細胞為實驗工具，並建立短暫轉殖 *gst* 系統(Transient transfection system)，來觀察在肝細胞受Aflatoxin B₁ 攻擊下 rGST mu (Yb1)對肝細胞的保護情形。結果初步發現當轉殖入 rGST mu (Yb1)後，Aflatoxin B₁ 對肝細胞的傷害的確受到抑制。其中在 GST activity 的表現上，不論是轉殖 rGST mu 或是空的載體，其 GST activity 皆隨 Aflatoxin B₁ 處理濃度升高而呈現 dose-dependant 的提升；只是有轉殖 rGST mu 的組別不論做何種情況處理，其 GST activity 皆高於只轉殖空的載體的組別之外，GST

activity 還出現可能被 Aflatoxin B₁ 所 induced 的情況。在 AST (aspartate amino transferase) activity 的表現情況，當轉殖了 rGST mu 後其 AST activity 會隨著 Aflatoxin B₁ 的濃度升高而逐漸降低；而只轉殖空的載體(pcDNA3)時，AST activity 反而逐漸升高(以 0.01mM Aflatoxin B₁ 處理 12 小時後達到最高)。以 0.01mM 的 Aflatoxin B₁ 處理 12 小時後，轉殖了 rGST mu 與轉殖空的載體其 AST activity 的差距最大。最後在 LDH (lactate dehydrogenase) activity 方面也是如此，轉殖了 rGST mu 並處理 Aflatoxin B₁ 處理 12 小時後，LDH 會呈現一 dose-dependant 的下降趨勢而轉殖空的載體反而呈現了一上升的局面；又以 0.01mM Aflatoxin B₁ 處理 12 小時後 LDH activity 達到最高。另外以 0.01mM 的 Aflatoxin B₁ 處理 12 小時後，轉殖了 rGST mu 與轉殖空的載體其 LDH activity 的差距最大。

因此經 Transient transfection rGST mu 的大白鼠初代肝細胞對 Aflatoxin B₁ 的抵抗性的確有提升的表現，至於對 Aflatoxin B₁ 的基因毒性的影響、轉殖的 rGST mu 與 Aflatoxin B₁ 間更詳細的交互關係與其影響癌化能力的則尚待進一步的探討。

Abstract

Glutathione S-transferase (GST), an important detoxification dimeric enzyme in mammalian cells, includes six isoforms: alpha, pi, mu, theta, zeta and sigma classes. Previous investigations showed that GST would conjugate xenobiotics with the sulfhydryl group of GSH (glutathione) to increase the solubility of these xenobiotics. On the other hand, GST has anti-oxidation function, which protect lipid or nucleic acid from the attack of toxins. Therefore, GST plays an important role in the mechanism of detoxification and anti-carcinogenesis. Among the isoforms, GST mu is thought to be related to cancer susceptibility. It is also suggested that GSTM1 could serve as a predictive marker for invasive bladder cancer. After the treatment of carcinogens, the expression of GST mu would increase in the hepatocytes. In order to clarify the role of GST mu, a transient expression system of GST mu was set up to study how the overexpression of GST mu affects the hepatotoxicity and genotoxicity of carcinogen.

We used the primary cultured hepatocytes of SD rat to establish the transient transfection system of rGST mu (Yb1), and challenged the cells with Aflatoxin B₁. We found that the transfected rGST mu would attenuate the damage of hepatocytes caused by Aflatoxin B₁.

The treatment of Aflatoxin B₁ for 12hr increased the cytosolic GST activity in both GST and control vector-transfected cells in a dose-dependent manner. The GST activity in the cells transfected with rGST mu was higher than those transfected with pcDNA3. The releases of AST and LDH activity, from the Aflatoxin B₁-treated cells were inhibited by the transfection of rGST mu as compared to the control.

序 論

隨著工業的發展，人們接觸到各式各樣的化學物質的機會也日趨增加，例如工業製造所伴隨產生的廢氣、廢水或廢棄物；汽機車排放的廢氣；農產品的農藥殘留以及食品中的許多添加物等，而這些化學物質對人體來說皆屬於「異種物質」(Xenobiotics) (1)。

Xenobiotics 包含了有機與無機物如:多環芳香烴化合物、化療藥物、Aflatoxin B₁ 或石棉等，這些非人體自然產生的物質某些經 cytochrome p450 的代謝後其活性會提高而與細胞內的巨分子結合，進一步地產生了 carcinogenic、mutagenic 或 cytotoxic products。此外它們也可能影響了 endogenous hormones、cytokines 與 fatty acids 的氧化代謝(2)。

異種物質經人體攝入後最後都送入肝臟加以代謝以便排出人體，而其代謝過程分為兩階段：

1. Phase I:

主要由單氧 以及 cytochrome p450 所負責，代謝途徑為 Hydroxylation、Reduction 或 Hydrolysis 等。

2. Phase II:

主要由一些特定的酵素如 Glutathione S-transferase 或 Glucuronyl transferase 來進行，使這些異種物質具有極性。

Xenobiotics 最後都須自排泄系統離開人體，否則將停留於人體中的脂肪組織進而危害健康。一般來說 xenobiotics 屬於非極性物質，故

勢必先將這些物質的極性提升以增加溶水性，如此才能順利經尿液或汗水排出，其中 Glutathione S-transferase 在此機制中扮演了重要的角色。(1)

一. Glutathione S-transferase (GST) isoforms 的種類:

GST 是 mammalian cell 中相當重要的一解毒酵素，Mammalian GST 現今一共有 5 種 isoforms 且以 dimeric protein 存在於 cell 中，分別為 alpha、pi、mu、theta 與 zeta (3)。另外還有 sigma GST 但只分佈某些無脊椎動物中(4)。在 1992 年之前 GST 的命名方式並無一個統一規則，因此往往命名方式相當混亂，直到 1992 年才統一規定了其命名(5)。以 mammalian GST 來說以”GST”代表 Glutathione S-transferase; 在 GST 前分別以小寫字母 h(human) r(rat)或 m(mouse) 來代表不同物種的 GST; 接著在 GST 後以大寫字母 A(alpha) P(pi) M(mu)、T(theta)與 Z(zeta)來標示出 isoform；然後再以阿拉伯數字 (1,2,3..)代表 subfamily 以 Rat 來說, alpha class 有 1 至 5 個 subunit; mu class 有 1 至 6 個而 pi class 則只有 1 個，其詳細分類如下:

Rat	
Subunit	Other previous name
Alpha	
rGSTA1	Ya1, subunit 1a
rGSTA2	Ya2, subunit 1b
rGSTA3	Yc1, subunit 2, GST AA
rGSTA4	Yk, subunit 8, GST K, Ya

rGSTA5	Yc2, subunit 10
Mu	
rGSTM1	Yb1, subunit 3, GST A
rGSTM2	Yb2, subunit 4, GST D
rGSTM3	Yb3, subunit 6, Yn1, Yb
rGSTM4	Yb4
rGSTM5	Yn2, subunit 9
rGSTM6	Yo, subunit 11
Pi	
rGSTP1	Yf, Yp, subunit 7, GST P
Theta	
rGSTT1	Subunit 5, GST E
rGSTT2	GST M, subunit 12
rGSTT3	Subunit 13

二. GST isoforms 的特性:

GST 在真核細胞中屬於一重要的解毒酵素並且以 cytosolic 與 membrane-bound 兩種形態存於細胞中。Cytosolic GST 主要有 4 個 isoform: alpha、pi、mu 與 theta(5, 6, 7); 另外還有 sigma 與 zeta ; 只是 zeta 在 1997 年才被發現而 sigma 只存在某些無脊椎動物上。(4, 8)而 membrane-bound GST 則有 microsomal GST (9)與 leukotriene C4 synthetase (10, 11)。

GST 在組織的分佈上是具有特異性的(12, 13, 14, 15), 以老鼠來說 alpha class GST 分佈於肝與腎臟但不分佈於心臟與睪丸(12, 15, 16, 17); mu class GST 分佈於肝、心臟與睪丸但不存於腎臟(12, 13, 15); pi class GST 除了肝臟外皆表現於各個正常組織中(13, 14, 18, 19), 而

這種組織分佈的不同可能與 RNA 的 maturation 有關(20, 21, 22, 23)。

根據之前的文獻指出，human pi class GST(acidic class GST)在 colon、bladder、ovary、lung 與 stomach cancer 中 RNA expression 是正常組織的 2 至 4 倍(24)；而 alpha class GST (basic class GST; Ya and Yc)在對於烷化藥具抗藥性的 cell line 中有明顯的活性(25, 26)。在前腫瘤結節中，alpha、pi、mu class GST 都會明顯的表現，但一旦轉型成腫瘤後以 pi class GST 的表現最明顯。而過去的研究主要以 pi class GST 的基因調節、與癌症關係甚至在訊息傳遞所扮演的角色(27)為主；至於 alpha class GST 則偏重於抗藥性的研究，因為 alpha class GST 會代謝一些抗癌藥，如烷化藥、cisplatin 等，因此會影響了某些化療的初期效果(28, 29, 30)。mu class GST 在肝細胞受致癌物質刺激下其表現會增加，另一方面許多的 cancer 與 mu class GST 基因的缺損或不表現有關係，因此 mu class GST 對於肝細胞避免受到致癌物的攻擊上扮演了重要的角色。

三. Glutathione S-transferase 的活化:

GST family 的 biological control 是一複雜的機制，這往往受到性別、年齡、組織特異性、種族的不同或腫瘤發展程度所影響(7)。而 GST 會受許多不同結構的 xenobiotics 所活化，至少有 100 種的化學物證實會去活化 GST，並且當中多存在自然物中如蔬菜或柑橘

類水果中的非營養物質(7)。

在 GST 的活化物中有些是經影響 GST 基因的 transcription activation 或穩定 RNA、protein 結構及基因的放大來調控 GST 的活性表現。這往往是影響一些 GST 上游基因如 antioxidant-responsive element (ARE) (31, 32, 33)、Xenobiotic-responsive element(34)、GST-P enhancer 1 (GPE)或是 glucocorticoid-responsive element (GRE)；另外，Jun、fos 與 NF-kappa B 也參與了 GST 的活化(7, 35, 36)。

四. GST 參與的反應:

1. Conjugation reaction:

Conjugation 是 Glutathione S-transferase 所催化的典型反應，主要將 xenobiotics 與 glutathione (GSH)的-SH group 進行結合以提高這些物質的極性，最後能溶於尿液而被排出人體外。其反應式為:



R-X 即為 xenobiotics 包含了許多的環境致癌物、毒物如: Benzopyrene、Aflatoxin B₁ 的代謝物 AFB-8,9-epoxide；殺蟲劑如: DDT；藥物如:cisplatin 或 acetaminophen (NAPQI)等。

2. Peroxidase activity:

GST enzyme 也可以催化一些 selenium-independent GSH peroxidase 的活性，使得 lipid 或 nucleic acid 免於受到 H₂O₂ 的

傷害。其反應如下：



五. 黃麴毒素 Aflatoxin B₁ (AFB₁):

黃麴毒素是一種生存於五穀類(特別是花生)上的黴菌 (*Aspergillus flavus*)所分泌出之毒素,屬於真菌毒素(mycotoxin)的一種並在動物實驗中顯示具有強烈的 hepatocarcinogenic activity (38, 39)。而 Aflatoxin B₁-exo-8,9-epoxide 已知是 Aflatoxin B₁ 經 cytochrome P450 所代謝產生的一種物質,它具有基因毒性會攻擊 DNA (40, 41, 42); 但 cytochrome P450 也會將 Aflatoxin B₁ 氧化成去活性(deactivate)的產物如:AFM₁、AFQ 與 Aflatoxin B₁-endo-8,9-epoxide; 而這些物質不會與 DNA 有交互作用(40)。

由之前的文獻指出,物種的不同其 GSH 與 Aflatoxin B₁ 的 conjugation 的情形也會不同,一般來看是 mouse > rat > human (43)。在 mouse 中因為 GSTA3-3 的持續表現,使得 mouse 能有效抵抗 Aflatoxin B₁-exo-8,9-epoxide 所造成的毒害(44); 而 rat GST Yc 則對 Aflatoxin B₁-exo-8,9-epoxide 所造成的毒害其抗性較差(45)。

實驗動機

之前有文獻指出在大白鼠的肝細胞中，rGST mu在致癌物質的作用下其表現情形會有增加；另一方面當GST mu的表現降低時，罹患癌症的機會也跟著上升如：肺癌、結腸癌或是膀胱癌。因此GST mu對於肝細胞的保護作用扮演了相當關鍵的角色。

因此本實驗以大白鼠初代培養之肝細胞為實驗工具，並建立短暫轉殖*gst*系統(Transient transfection system)，來觀察轉殖的rGST mu (GST Yb1)對於大白鼠肝細胞在受到一些致癌物質(Aflatoxin B₁)的攻擊下，對GST activity的變化、臨床值(AST、ALT、LDH)的影響與肝細胞抵抗Aflatoxin所產生的肝毒性、基因毒性的情形。另一方面，當正常的肝細胞受到致癌物的刺激時，GST mu的表現會上升；而也有文獻指出GST mu也會被一些能預防癌化的物質(如S-allylcysteine (SAC); 為大蒜內含的物質)所活化。此外，GST mu gene若有缺陷時，罹患膀胱癌的風險也會提高，因此有文獻指出可作為侵入型膀胱癌發生與否的預測性指標(marker)。因此本實驗也進一步的探討GST mu對於肝細胞抵抗癌化的指標意義。

實驗材料

一. 動物來源:

購自國科會動物實驗中心之 Spraque Dawley 系雄性大白鼠。

二. 藥品試劑:

購自美國 Sigma 公司:

Glucose, EDTA, 2-Mercaptoethanol, N-Lauroylsarcosine, Sodium citrate, Potassium acetate, Sodium acetate, Sucrose, Sodium chloride, Formamide, Ethidium bromide, Lauryl sulfate (SDS), calcium chloride, Glutathione, 37% Formaldehyde.

購自美國 Amersham 公司:

Guanidine thiocyanate (GNTC), Phenol, Tris-HCl, Agarose.

購自德國 GIBCO 公司:

Peptone 140, Yeast extract, Agar, William's E, Fetal calf serum, HEPES, HBSS, penicillin-streptomycin (PS). LipofetAMINE reagent, Sodium bicarbonate, Concert plasmid midiprep system kit.

購自德國 Boehringer Mannheim (BM)公司:

Lysozyme.

購自美國 Promega 公司:

Reverse transcription kit.

購自生工公司:

Ampicillin, IPTG, DNA polymerase.

實驗所需 solution、buffer 與 medium 的配製

一. Isolation of total RNA:

1. Solution D: 100ml

GNTC (Guanidine thiocyanate)	4M	47.28g
Sodium citrate	25mM、pH7.0	0.74g
N-Lauroylsarcosine (Sarcosyl)	0.5%	0.5g

- 需避光，所以先將容器用錫箔紙包起來。
- 倒入 ddH₂O 約 50ml。
- 加入 GNTC 47.28g。(GNTC 溶解時會吸熱)
- 加入 sodium citrate 0.735g，調整至 pH7.0。
- 加入 Sarcosyl 0.5g，補 ddH₂O 至 100ml，加 100ul 的 DEPC 劇烈搖晃後避光靜置 2 小時，再 autoclave。

2. Sodium acetate: 100ml

Sodium acetate	2M、pH4.0	16.41g
----------------	----------	--------

- 倒入 ddH₂O 約 50ml。
- 加入 sodium acetate 16.41g，調整至 pH4.0。
- 補 ddH₂O 至 100ml，加 100ul 的 DEPC 劇烈搖晃後避光靜置 2 小時，再 autoclave。

3. DEPC treated water: 2000ml

取二次水 2 升，加入 2ml 的 DEPC 劇烈搖晃後避光靜置兩小時，

再 autoclave。

4. 10x MOPS: 1000ml

MOPS	2M	41.8g
Sodium acetate	50mM	6.805g
EDTA	10mM、pH7.0	20ml

a. 取 800ml 的 DEPC 水, 加上 41.8g 的 MOPS, 再 6.805g 的 sodium acetate 再加上 20ml 0.5M EDTA 8.0 , 調整 pH=7。

b. 加入 1ml 的 DEPC 劇烈搖晃後避光靜置兩小時 , autoclave。

5. RNA denaturing buffer :

10x MOPS	1ul or 2.25ul
37% formaldehyde	1.78ul or 4ul
Formaldehyde (CH₃NO)	5ul or 11.25ul

6. 1x RNA electrophoresis running buffer:

DEPC treated water	315ml
10x MOPS	35ml

7. TE buffer: 100ml、pH8.0

Tris-HCl	10mM、pH8.0	0.1576g
EDTA	1mM、pH8.0	0.037g
H₂O		補至 100ml

8. 50x TAE buffer: 200ml

Tris-base		242g
Glacial acetic acid		57.1ml
EDTA	0.5M、pH8.0	100ml
H₂O		補至 200ml

9. 0.5M EDTA: 100ml、pH8.0

EDTA	0.5M	18.61g
-------------	-------------	---------------

- 取二次水 50ml , 將 18.61g 的 EDTA 加入水中。
- 以固體顆粒之 NaOH 慢慢調整 pH 值至 8.0。
- 補二次水至 100ml 並 autoclave ; 若用於 RNA 實驗 , 則加入 100ul 之 DEPC 劇烈搖晃後避光靜置兩小時 , autoclave。

10. CaCl₂-Tris-HCl solution: 100ml

CaCl₂ (10x stoke)	500mM、100ml	7.35g
Tris-HCl pH 8.0 (10x stoke)	100mM、100ml	1.576g

- 取已 autoclave 的 500mM CaCl₂ 10ml、100mM Tris-HCl 10ml。
- 補滅菌水至 100ml。(需無菌操作)

11. LB broth 及 LB agar (1000ml):

Peptone	10g
Yeast extract	5g
NaCl	5g

NaOH	1N	適量
Agar		15g

- a. 取二次水 900ml 將 peptone、Yeast extract、NaCl 倒入後混合。
- b. 待完全溶解後，以 1N NaOH 調整 pH 值至 7.0。
- c. 若是配製 LB broth 則直接 autoclave；若配製 LB agar 則另外再加入 15g 的 agar 後再 autoclave。
- d. 滅好菌後，若是 LB agar 則待溫度降至 40 時加 Ampicillin (final conc.: 50ug/ml)；若是 LB broth 則是要培養細菌前再加 Ampicillin (final conc.: 20ug/ml)。

12. Ampicillin stock solution 配製: 20mg/ml

- a. 取 100mg Ampicillin powder 溶於 15ml 的二次水。
- b. 以 millipore 過濾即可。

13. Solution I: 100ml

Tris-HCl (10x stock)	100mM、pH 8	4ml
EDTA (10x stock)	500mM	2ml
Glucose (2x stock)	100mM	50ml

- a. 取 50ml Glucose stock solution 及已 autoclave 之 4ml Tris-HCl、2ml EDTA、在無菌下混合均勻。
- b. 再補無菌水至 100ml 並存於 4 即可。

14. Solution II: 100ml

NaOH	0.2N	0.8g
SDS (10x stock)	10%	10ml

- 取 80ml 之二次水將 0.8g NaOH、10ml 10%SDS 倒入並溶解之。
- 補水至 100ml 並儲存於室溫。

15. Solution III: 100ml

Potassium acetate	29.442g
Glacial acetic acid	11.5ml

- 取二次水 60ml 將 29.442g potassium acetate、11.5ml 冰醋酸倒入混合均勻。
- 補二次水至 100ml 儲存於 4 °C。

16. Homogenized buffer for GST activity assay: 1000ml

Tris-HCl	50mM	7.88g
Sucrose	25mM	85.575g

- 取二次水 800ml，將 7.88g Tris-HCl 及 85.575g sucrose 倒入混合均勻。
- 調整 pH 值至 7.5 再補水至 1000ml，儲存於 4 °C。

17. GSH substrate buffer: 50ml

Glutathione	2mM	0.0307g
Homogenized buffer	50ml	

- GSH substrate buffer 性質不穩定，故需新鮮配製且避光。

18. CDNB substrate buffer: 50ml

CDNB	2mM	0.02025g
Alcohol		0.25ml
Homogenized buffer		50ml

- 將 CDNB 預先溶解於 alcohol 中。
- 將 CDNB-alcohol solution 與 Homogenized buffer 快速混合均勻。
- GSH substrate buffer 性質不穩定，故需新鮮配製且避光。

19. William's E:

- William's E powder (GIBCO)一包溶於 950ml 的二次水。
- 待 William's E 完全溶解後加入 2.2g NaHCO_3 。
- 待 NaHCO_3 完全溶解後調整 pH 值至 7.0，再補水至 1L。
- 以 millipore 過濾並裝瓶儲存於 4 。
- 若之後要加入血清，則每瓶只分裝 450ml 即可。

20. William's E-OK:

William's E	450ml	1 瓶
Fetal calf serum		50ml
Penicillin-streptomycin (PS)		5ml
2-Glutamine		5ml

- The final conc. of serum: 10%
- The final conc. of PS and 2-Glutamine: 1%

c. 2-Glutamine 可不加。

d. 儲存於 4 。

21. Solution A:

HBSS	含 phenol red	1 包
1.9g EDTA/10ml 2N NaOH		1ml
HEPES		5.958g
NaHCO ₃		2.2g

a. 將 HBSS(1 包)溶於 950ml 之二次水。

b. 取 HEPES 5.958g 與 1ml 之 EDTA 加入 HBSS solution。

c. 待其完全溶解後加入 NaHCO₃。

d. 待 NaHCO₃ 完全溶解後調整 pH 值至 7.0 並補水至 1L。

e. 以 millipore 過濾並分瓶儲存於 4 。

22. Solution B:

HBSS	含 phenol red	1 包
250mM CaCl ₂	500mM	0.5ml
HEPES		5.958g
NaHCO ₃		2.2g

a. 將 HBSS 溶於 950ml 的二次水中。

b. 在無菌下取已 autoclave 之 500mM CaCl₂ 0.5ml 與 HBSS solution 混合。

- c. 加入 HEPES 5.958g。
- d. 待其完全溶解後加入 NaHCO_3 2.2g。
- e. 調整 pH 值至 7.0 並補水至 1000ml。
- f. 以 millipore 過濾並分瓶儲存於 4 。

23. 10x HBSS stoke: 100ml

HBSS	含 phenol red	1 包
NaHCO_3		0.22g

- a. 將 HBSS 溶於 100ml 之二次水中。
- b. 加入 NaHCO_3 0.22g。
- c. 待 solution 完全溶解後調整 pH 值 7.0。
- d. 以 millipore 過濾並分瓶儲存於 4 。

\

實驗方法

一. 分離肝細胞與初代培養:

購自國科會動物中心之 SD 系大白鼠，體重約 180 – 250 公克，並根據 Butterworth, B.E. 等人之實驗方法(56), 以灌流方式(perfusion) 分離肝細胞。以 50mg/ml/100g body weigh 劑量的 pentobarbital 麻醉大白鼠，待老鼠麻醉後固定四肢，將腹腔剪開呈 V 字型直達劍突下方。接著以 20 GA I.V. catheter/needle 刺入肝門靜脈並抽出硬針使軟針固定於肝門靜脈上，再將蠕動幫浦開至全速使回溫至 37 的 solution A (125 ml) 注入肝門靜脈，同時立即剪斷下腔靜脈以達完全放血。待 solution A 剩 50ml 時將存於 -20 之 0.03g collgenase (用量依大白鼠重量而定) 取出溶入 solution B, 當 solution A 灌流剩 25 ml 時，暫時停止幫浦，以止血鉗夾住下腔靜脈並剪碎心臟，另外蠕動幫浦速度降為中速，改換含 collgenase 之 solution B (37 , 100ml) 繼續灌流。

待 solution B 用盡後，再改換 solution A 將剩餘的 25ml 完全用盡以中只 collgenase 的作用。取下已被分解呈類黏稠狀的肝臟，將其浸泡在冰的 50ml solution A 中，儘快移至無菌操作臺並剪碎肝臟並以濾網過濾後分裝至 50ml 離心管進行離心，離心條件為 600rpm、4、10 分鐘。回收下層沉澱物並與 solution A-10x HBSS-percoll mix-solution 均勻混合，其混合比例為：(沉澱物體積+solution A) : (HBSS-percoll) = 3 : 2；而 10x HBSS 與 percoll 的混合比例為 9 : 1。其後做第二次離心（條件同第一次離心），移去上清液並加入適量的

William's E (OK) medium 混合均後，取 50ul 的細胞液進行計數與分盤。細胞貼壁 4 至 6 小時後更換新鮮 William's E OK medium。

二. Isolation of total RNA:

取一適當大小的新鮮大白鼠肝臟組織塊與 solution D(含有 2-mercaptoethanol)一起研磨均勻，依次加入 0.1 倍 solution D 體積之 2M sodium acetate (pH 4.0)、0.2 倍 solution D 體積之 chloroform 與 1 倍體積之 phenol (pH 4.0)後，小心地均勻混合 1 分鐘後置於冰上 1 分鐘。反覆混合與靜置冰上約 20 分鐘進行離心，離心條件為：12000 rpm、4、20 分鐘。離心後取上清液，加入 phenol-chloroform (1:1) mix solution 至上清液並充分混合，添加比例為上清液:phenol-chloroform = 1:1，混合 1 分鐘後靜置冰上且重覆此步驟約 20 分鐘後進行離心，離心條件為：12000rpm、4、20 分鐘。若水層(上清液)與有機層界面仍有雜質則再加入等體積 phenol-chloroform 混合均勻後離心，直到水層(上清液)與有機層界面無蛋白質堆積即可吸取上清液

隨後加入 1 倍上清液體積之 isopropanol 混合均勻，靜置於 -20 一小時。以 12000rpm、4、20 分鐘進行離心收集 pellet，將 pellet 以 0.5ml 之 solution D 溶解，再加入 1 倍體積之 isopropanol 混合均勻置於 -20 一小時。接著以 12000rpm、4、20 分鐘進行離心收集 pellet，加入 1ml 75% ethanol 沖洗 pellet 後再以 12000rpm、4、20 分鐘進行離心。而後將 pellet 風乾以適量的 DEPC-treated water

溶解。

三. RT-PCR:

取 5 μ g total RNA 加上適量 DEPC-H₂O , 70 $^{\circ}$ c 預熱 5 分鐘 , 去除 RNA 之 2 $^{\circ}$ 結構 , 馬上置於冰上避免 RNA 之 2 $^{\circ}$ 結構重新產生 , 加入 2 μ l RNAase inhibitor (可不加)、10 μ l 的 5X Reverse Transcription buffer、2.5mM dNTP 4 μ l、2.5 μ l oligo dT 與 3 端、5 端 primer (10 p mole/ μ l)各 5 μ l 後 mix 均勻(此時 final 體積為 49.5 μ l) , 放入溫度循環機 , 以 42 $^{\circ}$ 預熱 5 分鐘 , 再加上 0.5 μ l 的 Reverse Transcriptase (5u/ μ l) 在 42 $^{\circ}$ 下反應 1hr 後 , 再升溫至 99 $^{\circ}$ 反應 5 分鐘 , 將 sample 降溫至 4 $^{\circ}$ 並離心後保存在 -20 $^{\circ}$ 。

取 13.8 μ l DEPC H₂O、4 μ l 10X PCR buffer、3.2 μ l 15mM MgCl₂、3.2 μ l 2.5mM dNTP、5 端及 3 端 primer(10pmole/ μ l)各 5 μ l , 加上 10 μ l 的 cDNA (RT 產物)後使 final 體積為 49 μ l , mix 均勻後加一滴礦物油置於溫度循環機 , 以 94 $^{\circ}$ 預熱 5 分鐘 , 加 Taq(5u/ μ l) 1 μ l , 然後在 94 $^{\circ}$ 2 分鐘、適當 annealing 溫度 1 分鐘、72 $^{\circ}$ 2 分鐘 , 進行 40 cycle , 第 20 cycle 之 94 $^{\circ}$ 補 Taq 1 μ l , 最後以 72 $^{\circ}$ 20 分鐘將仍為單股的 cDNA 修補為雙股、再降溫至 4 $^{\circ}$ 並離心後保存於 -20 $^{\circ}$ 。

四. Preparation of the plasmid:

取固態 LB 培養基上之單一菌落或儲存於 -80 $^{\circ}$ 的菌液少許 , 接種於 2ml 的 LB broth 搖晃培養一夜 , 再將 2ml 的菌液倒入 150ml 的 LB broth 繼續培養 , 待於 600nm 的 O.D.為 1-1.5 之間即可停止培養。

將菌液分裝入 50ml 之離心管，以 4800rpm 離心 10 分鐘後捨棄上清液，加入 3ml 50mM Tris (pH 8.0)將 pellet 完全沖散，再加入 800ul 的 Lysozyme (40mg/ml)，緩慢混合均勻後置於冰上 15 分鐘後，加入 500ul 250mM EDTA (pH 8.0)，小心混合均勻即置於冰上靜置 15 分鐘。而後加入 5ml 之 solution II 小心混合均勻至 solution 變成澄清狀，將其靜置於冰上 5 分鐘。在加入 3.5ml 的 solution III 混合均勻並靜置冰上 5 分鐘。

以 12000rpm、4℃，離心 30 分鐘後收集上清液，加入等體積之 pH 8.0 phenol 於室溫下混合 5 分鐘，以 3500rpm 離心 10 分鐘。回收上清液並與等體積 phenol-chloroform (1:1) mix-solution 共同混合作用 5 分鐘，再以 3500rpm 離心 10 分鐘。回收上清液並加入適量之 3M sodium acetate (pH 8.0)與冰的無水酒精，混合均勻後置於 -20℃ overnight。

之後以 12000rpm、4℃ 離心 30 分鐘，移去上清液並以 70%的酒精清洗 pellet，再以相同的離心條件離心，移去上清液並乾燥 pellet 後溶解於 1ml 的 TE buffer。接著加入 5ul 的 RNAase (10mg/ml) 於 37℃ 作用 1 小時，加入等體積的 phenol (pH 8.0)在室溫下混合 5 分鐘後以 12000rpm 離心 10 分鐘，再收集上清液並與 phenol-chloroform (1:1) solution 等體積混合 5 分鐘，以 12000rpm 離心 10 分鐘。

回收上清液後加入 3M sodium acetate 與無水酒精混合均勻後置於 -20℃ overnight，之後以 12000rpm、4℃ 離心 20 分鐘，以 70%酒

精清洗 pellet , 再以 12000rpm、4 離心 20 分鐘 , 捨棄上清液並乾燥 pellet。

五. Restriction enzyme digests rGST isoforms cDNA and plasmid (pGEM 3Z(f)-, pEGFP or pcDNA3):

取適當濃度之 plasmid 或 rGST isoforms cDNA、restriction enzyme 與 restriction buffer 置入 eppendorf tube 混合均勻 , 其中 enzyme 的體積必需小於總溶液體的 1/10 , 而不足的體積以 DEPC-treated water 或 2 次水補足。將 eppendorf tube 置於 37 的培養箱作用 overnight , 之後取 2ul 之進行 DNA gel 電泳 , 來確定 enzyme 作用的情形。

六. Purification of the rGST isoforms cDNA and plasmid (pGEM 3Z(f)-, EGFP, pcDNA3):

將 rGST isoforms cDNA、pGEM 3Z(f)-、EGFP 及 pcDNA3 以適當的 restriction enzymes 作用後進行電泳 , 所用之 agarose gel 濃度分別為 1.5%、1.2%、1.2%。切下欲回收的 DNA 片斷後 , 以 GENECLAN III kit 將 DNA 片斷回收。其操作過程為:將切下的 gel 進行稱重後置於 eppendorf tube , 加入適量 NaI solution , 加入的體積為 gel 重量的 3 倍(100mg gel = 100ul NaI) , 將 tube 置於 52 的水浴槽加熱約 10 分鐘 , 每 1-2 分鐘搖晃 tube 直到 gel 完全溶解。加入適量的 glassmilk(事先以震盪器充分震散 ; 每 1ug 的 DNA 用 1ug > 5 ng 以上 , 每 0.5ug 的 DNA 用 1ug)並混合均勻後置於冰上 , 每 1-2 分

鐘混合一次待 10 分鐘後以 12000rpm 離心 5 秒，捨棄上清液並加入 New wash solution 沖散 pellet 後以 12000rpm 離心 5 秒，重覆此步驟 2-3 次，接著捨棄上清液將 pellet 自然風乾。待 pellet 乾燥後，加入與 glassmilk 等量或稍多的 Elution solution 或 DEPC-treated water 將 pellet 沖散使其中的 cDNA 或 plasmid 溶出，再以 12000rpm 離心 30 秒，收集上清液即可。

七. Preparation of the competent cells:

由-80 取出適量 JM109 的菌種塗在 LB plate 上，於 37 培養一夜，再挑選一單一菌落到 2ml 的 LB broth，於 37 劇烈搖晃一夜。將菌液倒入 100ml 之新鮮 LB broth 以 37 培養至 560nm O.D.為 0.4-0.5 時停止培養，以 4000rpm、4 離心 10 分鐘，捨棄上清液後加入 10ml 的 50mM CaCl₂-10mM Tris solution 並將 pellet 快速沖散，其後靜置於冰上 30 分鐘。以 4500rpm、4 離心 10 分鐘，倒去上清液再加入 3ml 的 50mM CaCl₂-10mM Tris solution 沖散 pellet，而後加入適量的 87% glycerol 到菌液使 final glycerol concentration 為 10%，再將其分裝至 eppendorf (每管 200ul)。以上步驟皆需無菌操作。

八. Ligation:

1. 用 DNA ligation kit (Takara)。將已經過 restriction enzyme 作用的 cDNA 及 plasmid 各取適當 mole 數比例，再加入等體積 ligation buffer I，使 final 體積為 10 μ l，混合均勻後，放入溫度循環機以

11°C 反應 16 小時以上。

2. 將已經過 restriction enzyme 作用的 cDNA 及 plasmid 各取適當 mole 數比例，再加入 T4 ligation buffer(10x) 1ul 與 T4 ligase 1ul 混合均勻後，使 final 體積為 10ul 置入溫度循環機以 16 反應 16 小時以上。

九. Transformation:

實驗進行前數小時先將適當術量之 LB agar plate 置於培養箱烘乾，待 plate 蒸發多餘的水份後將 X-gal/IPTG mixed solution (2% X-gal 60ul + 25ug/ul IPTG 30ul)平均塗抹在含 ampicillin(100mg/ml)的 LB agar plate 上並放入培養箱烘乾，選一管 competent cell 與將進行 ligation 超過 16 小時的 plasmid(rGST-pGEM、約 10ul)共同混合並靜置於冰上 30 分鐘。之後將 competent cell 移至水浴槽進行 heat shock: 37 3 分鐘，3 分鐘後立即置於冰上一會，儘快添加 0.5ml 的 LB broth (37 、 non-ampicillin)，在 37 下水浴培養 30-45 分鐘。依序取 200ul 的菌液均勻塗抹到含 X-gal-IPTG 的 LB agar plate 上，以 parafilm 封蓋後倒放培養在 37 培養箱 12-16 小時，之後觀察 colony 的顏色變化，以藍色與白色 colony 進行篩選；此外培養時間不宜過長，避免 satellite colony 的形成而影響 colony 的 selection。

若 plasmid 選用 pEGFP 則需用含 kanamycin(100mg/ml)的 LB agar plate，不需塗抹 X-gal-IPTG 而以隨機挑選 colony 來進行 selection。

若 plasmid 選用 pcDNA3 則需用含 ampicillin(100mg/ml)的 LB agar plate , 不需塗抹 X-gal-IPTG 而以隨機挑選 colony 來進行 selection。

十. Purification of plasmid constructs:

由-80 取出含有 rGST Mu-pcDNA3 之 plasmid construct 的 JM109 的菌種挑選少許接種到 2ml 的 LB broth , 於 37 劇烈搖晃一夜。將菌液倒入 20-25ml 之新鮮 LB broth 以 37 培養至 560nm O.D. 為 1-1.5 時停止培養 , 以 4000rpm 4 離心 10 分鐘 , 以 Concert rapid plasmid midiprep system 進行 plasmid 的純化。其操作步驟為:

首先將 10ml 的 Equilibration buffer 倒入 column 中利用 gravity flow 來進行沖洗 , 用含有 RNase A (20mg/ml)的 4ml Cell suspension buffer 將 50ml 離心管中的 pellet 完全沖散 , 再加入 4ml 的 Cell lysis solution 並小心緩慢地翻轉搖晃離心管約 5 次 ; 注意的是不可劇烈震盪離心管避免 chromosome 斷裂且需靜置於室溫下約 4-5 分鐘。接著加入 4ml 的 Neutralization buffer 也是小心緩慢地翻轉搖晃離心管約 5 次左右 ; 同樣地不可劇烈震盪 , 然後以 11000rpm 在室溫下離心 10 分鐘(不可在 4 下離心)後收集上清液。隨後將上清液倒入 column 中利用 gravity flow 使上清液通過 column ; 此步驟不可以離心來進行。待 column 中的液體流盡後以 10ml Wash buffer 沖洗 column 2 次後 , 再以 5ml 的 Elution buffer 利用 gravity flow 將 column 中的 plasmid 沖洗出來並以 15ml 的離心管收集之。加入 3.5ml isopropanol

並混合均勻後置於-20 一晚後，以 11000rpm、4 離心 30 分鐘，離心後捨棄上清液再以 70%酒精沖洗 pellet 再以相同離心條件進行離心 10 分鐘。最後捨棄上清液並風乾 pellet，依 pellet 大小用適量的無菌水在無菌操作臺將 pellet 溶解避免 plasmid 受微生物污染而影響 transfection 的進行。

十一. Transfection: pEGFP transfect into the primary hepatocyte

首先利用 perfusion 將肝細胞分離出來接種於 3cm 寬的 cell culture dish 並作初代培養 36-48 小時後開始進行 transfection。

將欲進行 transfection 的 hepatocyte 先以先用 2ml 的 PBS 清洗一次，在用不含血清、抗生素的 William's E medium 清洗 2 次後，加入 1ml 的 William's E medium 置於無菌培養箱暫時 incubate。取 1ug 的 pEGFP plasmid 與 100ul 的 William's E medium 充分均勻混合；另一方面取 7ul lipofectAMINE 與 William's E medium 充分均勻混合。隨後將上述兩 solution 混合到 1.5ml 的 eppendorf tube 並以 pipetman 協助混合均勻，在室溫下靜置 45 分鐘左右。之後再把 culture dish 中的 1ml medium 抽去並補加 800ul 的 William's E medium 到 1.5ml 的 eppendorf tube，使 final 體積約為 1ml，不需混合均勻直接用 pipetman 將 solution 以 1ml Tip(前端以剪刀剪斷使口徑加大)吸取加到已無 William's E medium 的 culture dish 中，然後置於無菌培養箱 incubate 12 小時。

12 小時後再補加含 20% serum 且無抗生素之 William's E OK

1ml 後繼續培養 12 小時；若此時細胞受 lipofectAMINE 傷害，則可抽去 medium 換上含 10% serum 且無抗生素的 William's E OK medium 2ml 繼續培養 12 小時。在 transfection 24 小時後即可更換新鮮的 William's E OK medium 2ml 並利用倒立式螢光顯微鏡做初步觀察 GFP 的 expression 情形。

在 Transfection 48 小時後，以倒立式螢光顯微鏡來觀察 transfection efficiency，在 100 倍的放大率下隨機挑選 10 個視野進行細胞計數；計算方式為：

表現綠色螢光的細胞數/total 細胞數= transfection efficiency

十二. Glutathione S-Transferase activity assay:

將經藥劑處理的肝細胞用 PBS 清洗 1 至 2 次再加入適量 homogenization buffer 到 3cm cell culture dish，將肝細胞由 dish 上刮下以 homogenization buffer 進行均質，之後將均質液以 12000 rpm、4 離心 30 分鐘收取上清液。

將 GSH substrate buffer (2mM)與 CDNB substrate buffer (2mM)以 37 水浴保溫，各取 1.5ml 置於石英測光管中，然後取 20ul 的 sample 與 substrate buffer 快速混合均勻後，以波長 340nm 掃描 130 秒並以下列公式換算出 GST activity。

$$\frac{\text{單位時間吸光值變化量}}{9.6 \times \text{sample 濃度} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ul}} \right) \times 20 \text{ul}} = \text{GST activity (nmole/min/mg)}$$

十三. Agarose gel (1.2%) electrophoresis of Total RNA:

取 0.96g 的 RNase free agarose gel 溶於 69.6ml 的 DEPC-treated water 並稱重，然後加熱至沸騰以完全融解 agarose。沸騰後即離火靜置並補足蒸發之水份。待瓶子溫度降至 60 左右時，再加入 8ml 10x MOPS 與 2.4ml 37% formaldehyde 混合均勻，等溫度降約雙手勉強可握持即可倒入鑄膠槽中成形，在 30 分鐘後即可使用。

取 1.22ul total RNA，加入 1ul 10x MOPS、5ul formamide 與 1.78ul 37% formaldehyde，震盪均勻，在 55 的水浴槽，作用 15 分鐘後馬上置於冰上，再短暫離心並加上 1ul 的 RNA loading buffer(10X)。

RNase free agarose gel 置於電泳槽中，倒入 350ml running buffer，將處理好的 10ul RNA sample 小心注入至齒槽中，以 100 伏特的電壓跑 25-30 分鐘，經 ethidium bromide 染色後在紫外線燈照射下觀察。

十四. Agarose gel (1.5%)electrophoresis of DNA

取 1.05g 的 DNase free agarose gel 溶於 70ml 的二次水，再加入 1.4ml 50x TAE buffer 混合均勻並稱重，然後加熱至沸騰以完全融解 agarose。沸騰後即離火靜置並補足蒸發之水份。待瓶子溫度降至雙手勉強可握持時即可倒入鑄膠槽中成形，在 30 分鐘後即可使用。

取 5ul 適當濃度 DNA(約 1-3ug)，加入 1ul 的 DNA loading buffer(6X)，混合均勻後即可。

DNase free agarose gel 置於電泳槽中，倒入 350ml TAE running buffer，將處理好的 6ul DNA sample 小心注入至齒槽中，以 100 伏特的電壓跑 30-35 分鐘，經 ethidium bromide 染色後在紫外線燈照射下觀察。

實驗結果

一. Primer 的設計與 RT-PCR:

為了建立 SD 系大白鼠的 rGST isoforms 轉殖系統，因此針對 mammalian cell 中的最主要的三個 isoform: alpha (Ya) pi mu (Yb1) 進行實驗以得到 cDNA sequences。首先從 National center for biotechnology information (NCBI)的 Gene bank 進行搜尋，找出 rGST alpha、pi mu 的 cDNA sequences 後，為了能與 pGEM-3Zf(-) 順利的進行 ligation, 因此需分別設計 5' 與 3' 的 primer; 而這些 primer 必須含有特定的 restriction enzyme site，以便能被特定的 restriction enzyme 所識別並切割，此外 primer 在設計時也不能影響到 start code 或 stop code。因此會改變 1 至 2 個 nucleoside 而與原來的 cDNA sequence 在 5' 與 3' 會有些許的不同(*Figure 1.*)。

另一方面，由 SD 系的大白鼠的正常肝組織中純化出 total RNA，將 RNA 經由 reverse transcription 來產生 cDNA 後，再利用之前所設計的 rGST isoforms 的 primer 進行 PCR，來獲得大量的 rGST alpha、pi、mu cDNA，而 PCR 的進行條件見 *Figure 2.*。經 PCR 所複製出的片段以 1.2%的 DNase free agarose gel 進行電泳，來確認 PCR products 是否正確。結果發現，rGST mu (Yb1)的 cDNA size 應為 745bps，而由 *Figure 3.*可以發現在 700 至 800 bps 間有一明顯的 single band，因此這 band 應該是 rGST mu cDNA。同樣的，rGST alpha 的 cDNA size 應為 720bps，而由 *Figure 4.*可以發現在 700 至 800

bps 間也有一明顯的 single band , 因此這 band 應該是 rGST alpha cDNA。而 rGST pi 的 cDNA size 應為 677bps , 而由 *Figure 5.* 可以發現在接近 700 bps 的位置上有一明顯的 single band , 因此這 band 應該是 rGST pi cDNA。

二. rGST mu (Yb1)的選殖:

為了得到能送入 rGST 轉殖系統的 plasmid construct , 因此將 rGST mu (Yb1) cDNA 以及 pGEM3Zf (-) vector 皆以特定的 restriction enzyme: EcoR I and BamH I 分別作用後(*Figure 3. and 6.*), 從 1.5% agarose gel 中用 GeneClean III kit 純化出來。然後將 rGST mu cDNA 與 pGEM3Zf (-) vector 進行 ligation 並送入 JM109 E. coli , 以 X-gal-IPTG selection system 進行 colony 的篩選。

因為 pGEM3Zf (-) vector 中含有 *lac Z* 基因(*Figure 6.*) , 而 *lac Z* 所表達出的 protein 會分解 X-gal 而產生藍色物質 ; 而 *lac Z* sequence 中含有 polycloning site , 它含有許多 restriction enzyme site 可被 restriction enzyme 所切割 , 因此外來的 insert 如 rGST mu 就是利用這裡與 pGEM3Zf (-) vector 進行 ligation。一旦 ligation 成功則 *lac Z* 便被破壞 , 所以即使以 IPTG 去誘導 *lac Z* 也無法再代謝 X-gal , 因此若含有 pGEM-rGST mu 的 plasmid construct 的 colony , 其顏色應為白色。

將白色的 colonies 挑起重新培養 24-36 小時後 , 將其 plasmid 純化出來用 1.2%或 1.5% DNase free agarose gel 進行電泳 , 以判定是否

有 ligation 成功的 plasmid construct。Plasmid 一般以最穩定的 supercoiled form 存在於 *E. coli* 中；當然也有少數以 open- circular 或 linear form 形式存在。而 supercoiled form 因為結構最緊密，故經電泳後所移動的距離最長；linear form 因為結構最鬆散因此移動的距離最短。由 *Figure 6.*可知 pGEM3Zf (-) vector 的 size 為 3.2kb 而其 supercoiled form 會小於 3.2kb，若 pGEM 成功接上 rGST mu cDNA 則其 supercoiled form 的 band 會有 shift 的現象發生。

*Figure 7.*中虛線所指示的 band 為未接上任何 insert 的 pGEM；而星號所指示的編號 24 號的 band 則是代表編號 24 號的 colony 所含的 plasmid 即為 pGEM-rGST mu。為了進一步的確認，將 pGEM-rGST mu 以 EcoR I 與 BamH I 作用，回收 size 約 740-750 bps 的 DNA 片段進行定序。

因為 pGEM3Zf (-) vector 無法在 mammalian cell 中表現，所以需將 rGST mu cDNA 再轉接至 pcDNA3 或 pEGFP-C1 vector，如此才能作用於 transfection system 中。所以將 pGEM-rGST mu 以及 pcDNA3 以 EcoR I 與 Xba I 作用，分別用 GeneClean III 回收後進行 ligation。pcDNA3 為一種含 neomycin 與 ampicillin 抗藥基因的 vector，其 size 為 5.4kb (*Figure 8.*)，因為不含 *lac Z* 故無法用 X-gal-IPTG selection system 進行 colony 顏色的篩選。將進行 ligation 後的 vector 送入 *E. coli* 中，以含有 ampicillin 的 LB agar plate 進行隨機 selection。將隨機挑選出的 colonies 繼續培養 24 至 36 小時後純

化出 plasmid 用 1.2%或 1.5% DNase free agarose gel 進行電泳，以判定是否有 ligation 成功的 plasmid construct。

*Figure 9*中虛線星號所指示的 band 為未接上任何 insert 的 pcDNA3；而 1 至 5 號的 band 則是代表其對應的 colony 所含的 plasmid 可能為 pcDNA3-rGST mu。為了進一步的確認，將 1 至 5 號的 plasmid 以 EcoR I 與 Xba I 作用，以 1.5% DNase free agarose gel 進行電泳，若切下的片段 size 為 740-750 bps 左右的 DNA 片段，則該 vector 應即為 pcDNA3-rGST mu vector construct (*Figure 10*)。

pEGFP-C1 是一種會表現綠色螢光蛋白的 vector 且含有 kanamycin 抗藥基因，其 size 為 4.7kb(*Figure 11*)。與 pcDNA3 一樣都不含 *lac Z* 基因故也無法利用 X-gal-IPTG selection system 進行 colony 顏色的篩選。所以將 pGEM-rGST mu 以及 pcDNA3 以 EcoR I 與 BamH I 作用，分別用 GeneClean III 回收後進行 ligation。再將進行 ligation 後的 vector 送入 *E. coli* 中，以含有 kanamycin 的 LB agar plate 進行隨機 selection。將隨機挑選出的 colonies 繼續培養 24 至 36 小時後純化出 plasmid 用 1.2%或 1.5% DNase free agarose gel 進行電泳，以判定是否有 ligation 成功的 plasmid construct。

三. Aflatoxin B₁ 的處理對 rGST mu 影響 GST activity 的情形

肝細胞在抵抗 Aflatoxin B₁ 的毒害時往往與 GST activity 以及 Aflatoxin B₁-GSH 的產生情形有關(49)。將 rGST mu 轉殖入 rat

primary cultured hepatocytes 48 小時後，分別以 0.002mM, 0.01mM 與 0.05mM 的 Aflatoxin B₁ 處理 12 小時並以未做任何處理以及 0.2% DMSO 處理的 cell 來作為 control。由 *Figure 13* 可知，當轉殖入 pcDNA3 vector 時，隨著 Aflatoxin B₁ 的濃度上升時，GST activity 也會隨著上升而呈一 dose-dependent 的情況。其中以 0.05mM Aflatoxin B₁ 處理 12 小時後，GST activity 的活性達到最高，為 control 的 2 倍。

而在轉殖 pcDNA3-rGST mu 的情形下，在 60 小時後其 GST activity 與只轉殖 pcDNA3 的 cell 相比較下，GST activity 上升了 1.6 倍；另一方面，以 Aflatoxin B₁ 處理肝細胞 12 小時，隨 Aflatoxin B₁ 的濃度上升 GST activity 提升的情況與只轉殖 pcDNA3 的 cell 相比較下，GST activity 上升的情況更明顯，其中以 0.05mM Aflatoxin B₁ 處理後的 GST activity 會達最高活性，為 control 的 3 倍。

四. Aflatoxin B₁ 的處理對 rGST mu 影響 AST activity 的情形

本實驗室先前證實了如 Geniposide 或藏紅酸(Crocetin)等物質會 induced GST Yb mRNA 的 expression；此外 Geniposide 也會使 GST Yb1 的 protein level expression 上升。而也有文獻指出 Geniposide 或藏紅酸(Crocetin)具有抑制 Aflatoxin 所導致的肝毒性或基因毒性(46, 47, 48)。

因此，本次實驗利用 transient transfection 將 rGST mu 轉殖入大白鼠肝細胞並以不同濃度的 Aflatoxin B₁ 加以處理，來觀察大量表

現的 rGST mu 對於 Aflatoxin B₁ 所導致的肝毒性傷害之影響。首先，我們將 pEGFP-C1 vector 轉殖入 rat primary cultured hepatocytes，使 pEGFP-C1 vector 在 cell 中大量表達 GFP (green fluorescence protein)。故有成功轉殖的 cell 在螢光顯微鏡觀察會呈現綠色螢光 (Figure 12)，而本次實驗皆以 GFP 表現的情形來代表 transfection efficiency。

將 rGST mu 轉殖入 rat primary cultured hepatocytes 48 小時後，分別以 0.002mM, 0.01mM 與 0.05mM 的 Aflatoxin B₁ 處理 12 小時並以未做任何處理以及 0.2% DMSO 處理的 cell 來作為 control。12 小時後將 medium 收集後測量 AST activity。由 Figure 14 可知，當轉殖入 pcDNA3 vector 時，不論是何種濃度的 Aflatoxin B₁，其所造成 medium 中 AST activity 與 control 相比皆有明顯的上升，並以 0.01mM Aflatoxin B₁ 所造成的 AST activity 最高，約為 control 的 2 倍。相反的，若轉殖 pcDNA3-rGST mu vector construct 時，Aflatoxin B₁ 所造成的 AST activity 上升的情況會隨著 Aflatoxin B₁ 處理濃度的上升而出現下降的情況，且以 0.01mM Aflatoxin B₁ 處理時，轉殖 rGST mu 與空的 vector 相較，其 AST activity 的差異最大。

五. Aflatoxin B₁ 的處理對 rGST mu 影響 LDH activity 的情形

肝細胞受到肝毒性傷害的另一指標為 LDH activity 將 rGST mu 轉殖入 rat primary cultured hepatocytes 48 小時後，分別以 0.002mM, 0.01mM 與 0.05mM 的 Aflatoxin B₁ 處理 12 小時並以未做任何處理的

cell 來作為 control, 12 小時後將 medium 收集後測量 LDH activity。由 *Figure 15* 可知, 當轉殖入 pcDNA3 vector 時, 不論是何種濃度的 Aflatoxin B₁, 其所造成 medium 中 LDH activity 與 control 相比皆有明顯的上升, 並以 0.01mM Aflatoxin B₁ 所造成的 LDH activity 最高, 約為 control 的 1.15 倍。相反的, 若轉殖 pcDNA3-rGST mu vector construct 時, Aflatoxin B₁ 所造成的 AST activity 上升的情況會隨著 Aflatoxin B₁ 處理濃度的上升而出現下降的情況, 且以 0.01mM Aflatoxin B₁ 處理時, 轉殖 rGST mu 與空的 vector 相較, 其 LDH activity 的差異最大。

討 論

本實驗利用短暫轉殖 *gst* 系統(Transient transfection system)來探討肝細胞受 Aflatoxin B₁ 攻擊下 rGST mu (Yb1)對肝細胞的保護情形，結果發現 AST activity 與 LDH activity 在轉殖 rGST mu 後，經 Aflatoxin B₁ 處理 12 小時下會呈現 dose-dependant 的下降；而 GST activity 則是呈現 dose-dependant 的上升且與轉殖空的載體相較明顯高出許多。

一. 轉殖 rGST mu 對 GST activity 的影響:

由 *Figure 13* 顯示，轉殖空的載體經 0.002、0.01 與 0.05mM 的 Aflatoxin B₁ 處理 12 小時後 GST activity 與 control 組相比分別上升了約 2.0、2.5、3.5 倍；而轉殖 rGST mu 則是約 1.8、2.4、2.9 倍。表面上看起來，似乎 Aflatoxin B₁ 所 induce 的程度類似，但值得注意的是，control 組轉殖 rGST mu 與空載體的 GST activity 的差距為 4.39 (nmole/min/mg)；0.002、0.01、0.05mM Aflatoxin B₁ 處理 12 小時後則分別相差 7.65、10.26 與 10.85 (nmole/min/mg)。若在將 control 組的差距 4.39 (nmole/min/mg)加以考慮，則我們可以很明顯的發現當以 Aflatoxin B₁ 刺激肝細胞後，轉殖的 rGST mu 除了因轉殖後本身所增加的量外，還額外上升了 3.26、5.87 與 6.46 (nmole/min/mg)。

在這實驗中 pcDNA-GST mu vector construct 是不受調控，因此會持續的進行表現 rGST mu，而這些在 Aflatoxin B₁ 處理 12 小時後所額外增加的活性是因為 transfection 所造成？或是受到 Aflatoxin

B₁ 所誘導而活化則尚需進一步的實驗。本實驗室之前發現，PCA(Proto-catechuic acid)原兒茶酸對 GST mu 的表現並無明顯的影響，因此會利用 PCA 處理轉殖後的鼠肝細胞來釐清這個問題。

比較 *Figure 13、14、15* 發現，當轉殖了 rGST mu 或空的載體並以 Aflatoxin B₁ 處理 12 小時後，GST activity 與 AST、LDH activity 的表現情況是相呼應的；雖然在高濃度下，只轉殖空載體的 AST 或 LDH activity 會異常的下降。但基本上，持續表現的 GST mu 在鼠肝細胞中對於 Aflatoxin B₁ 的抵抗性是具有明顯的幫助的。

二. 轉殖 rGST mu 對 AST、LDH activity 的影響:

AST 又稱天門冬胺酸轉移，存在於肌肉、肝臟與腦中。而 AST 在血液中的濃度若升高則代表了這些組織可能有壞死或發病的情況。由 *Figure 14* 與 *15* 顯示，雖然轉殖 rGST mu 後 Aflatoxin B₁ 所造成的 AST 與 LDH activity 的確會呈 dose-dependant 的下降，而在只轉殖空的載體方面，在以 0.01mM Aflatoxin B₁ 處理 12 小時後 AST 與 LDH activity 皆會上升至最高。但濃度再升至 0.05 mM Aflatoxin B₁ 時，AST 與 LDH activity 確反而明顯的降低。而本次實驗所採用的 Aflatoxin B₁ 濃度是參考之前文獻(46)，而文獻中 Aflatoxin B₁ 所用的濃度只有 0.01mM，故推測除了實驗本身的誤差外，0.05mM 的高濃度也許已對初代鼠肝細胞造成過高的毒性，因此才造成 AST 與 LDH activity 在 0.05mM Aflatoxin B₁ 處理下與 0.002mM Aflatoxin B₁ 的結果相同。

攝取被高濃度 Aflatoxin 污染的食物或料，會導致急性肝毒性 (hepatotoxicity)、致畸形毒(teratogenicity)、免疫毒性，甚致死亡。Aflatoxin B₁、G₁、M₁ 已證實在不同動物中會導致不同類型的癌症，其中 Aflatoxin B₁ 是最具致癌性的(50)，因此 Aflatoxin B₁ 已列為致癌物(carcinogen)的一種。雖然肝功能檢查可以看出肝臟是否有發炎，但是不能顯示是否有肝硬化或肝癌，而我們知道一癌症的形成往往是須一段時間的累積與一定的程序：(1) initiation，(2) promotion 與(3) progression。因此雖然短暫轉殖的 rGST mu 對於 Aflatoxin B₁ 所造成的 AST 與 LDH activity 的提升有明顯的抑制作用，但若以長時期的 Aflatoxin B₁ 處理肝細胞時，轉殖的 rGST mu 對於細胞的保護作用則尚需進一步的研究。另外，對於 Aflatoxin B₁ 的基因毒性實驗則尚以 comet assay 來探討。

三. 轉殖 rGST mu 對 mu class GST 在作為癌症的指標的意義：

Glutathione S-transferase M1 (hGSTM1)其基因表現是屬於多型性(polymorphism) (51)，也就是一基因同時表現出 2 或 2 個以上的表現型。此外各個種族約 10-60%的人口 hGSTM1 的表現是不足甚至是無效的(null) (52)，而許多的研究報告也認為 hGSTM 的表現不足往往提高了罹換癌症如肺癌、結腸癌與膀胱癌的風險(53)；對於吸煙者來說，當 GSTM1 的表現有缺陷時罹患肺癌的風險是比不吸煙的要高，另外膀胱癌與鼻咽癌的發生機率也提升 2 倍(54)。因此，已有報告認為 GSTM1 可作為膀胱癌的一預測性指標(55)。

由上述可知 mu class GST 在預防癌症的作用上是一相當重要的角色，在本實驗中發現了當 GST mu 持續表現時會抑制 Aflatoxin B₁ 對細胞所造成的傷害，因此對於鼠肝細胞的癌化可能具有抑制的效果，且這尚以細胞的轉型實驗才能加以印証。此外，若在肝細胞中持續表現 GST mu 對其癌化作用具有抑制的效用，則可能可以用 GST mu induce 的情況來作一”marker”來觀察一藥物或天然物其預防肝癌的可能效用。



1. Butkiewicz, D., Cole, K., J., Phillips, D., H., Harris, C., C., and Chorazy, M. (1999) GSTM1, GSTP1, CYP1A1 and CYP2D6 polymorphisms in lung cancer patients from an environmentally polluted region of Poland: correlation with lung DNA adduct levels. *European Journal of Cancer Prevention*. 8(4): 315-23,
2. Denison, M., S., and Whitlock, J.P., Jr. (1995) Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *Journal of Biological Chemistry*. 270(31): 18175-8.
3. Eaton, D., L., and Bammler, T., K. (1999) Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences*. 49(2): 156-64.
4. Ji, X., von Rosenvinge, E., C., Johnson, W., W., Tomarev, S., I., Piatigorsky, J., Armstrong, R., N., and Gilliland, G., L. (1995) Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry*. 34(16): 5317-28.
5. Mannervik, B., Awasthi, Y., C., Board, P., G., Hayes, J., D., Di Ilio, C., Ketterer, B., Listowsky, I., Morgenstern, R., Muramatsu, M., and Pearson, W., R., (1992) Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochemical Journal*. 282: 305-6.
6. Coggan, M., Whitbread, L., Whittington, A., and Board, P. (1998) Structure and organization of the human theta-class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. *Biochemical Journal*. 334: 617-23.

7. Hayes, J., D., and Pulford, D., J., (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology*. 30(6): 445-600.
8. Board, P., G., Baker, R., T., Chelvanayagam, G., and Jermini, L., S. (1997) Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochemical Journal*. 328: 929-35.
9. Morgenstern, R., and DePierre, J., W. (1988) In glutathione conjugation: Its mechanism and biological significance. 157-174.
10. Weinander, R., Ekstrom, L., Raza, H., Lundqvist, G., Lindkvist, B., Sun, T., S., Hebert, H., Schmidt-Krey, I., and Morgenstern, R. (1996) In Glutathione S-transferase structure, function and clinical implications. 49-56.
11. Jakobsson, P., J., Mancini, J., A., and Ford-Hutchinson A., W. (1996) Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C4 synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenase-activating protein and leukotriene C4 synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 271(36): 22203-10.
12. Scully, N., C., and Mantle, T., J. (1981) Tissue distribution and subunit structures of the multiple forms of glutathione S-transferase in the rat. *Biochemical Journal*. 193(1): 367-70.
13. Tu, C., P., Weiss, M., J., Li, N., Q., and Reddy, C., C. (1983) Tissue-specific expression of the rat glutathione S-transferases.

Journal of Biological Chemistry. 258(8): 4659-62.

- 14. Satoh, K., Kitahara, A., Soma, Y., Inaba, Y., Hatayama, I., and Sato, K. (1985) Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 82(12): 3964-8.**
- 15. Bhargava, M., M., Ohmi, N., Listowsky, I., and Arias, I., M. (1980) Subunit composition, organic anion binding, catalytic and immunological properties of ligandin from rat testis. Journal of Biological Chemistry. 255(2): 724-7.**
- 16. Tu, C., P., Chang, M., and Reddy, C., C. (1984) The major rat heart glutathione S-transferases are anionic isozymes composed of Yb size subunits. Biochemical & Biophysical Research Communications. 123(3): 981-8.**
- 17. Ishikawa, T., and Sies, H. (1984) The isozyme pattern of glutathione S-transferases in rat heart. FEBS Letters. 169(2): 156-60.**
- 18. Li, N., Q., Reddanna, P., Thyagaraju, K., Reddy, C., C., and Tu, C., P. (1986) Expression of Glutathione S-transferases in rat brains. Journal of Biological Chemistry. 261(17): 7596-9.**
- 19. Suguoka, Y., Kano, T., Okuda, A., Sakai, M., Kitagawa, T., and Muramatsu, M. (1985) Cloning and the nucleotide sequence of rat glutathione S-transferase P cDNA. Nucleic Acids Research. 13(17): 6049-57.**

20. Sugimoto, M. (1995) Glutathione s-transferase. *Nippon rinsho- Japanese journal of clinical medicine*. 53: 1253-1259.
21. Lai, H., C., and Tu, C., P. (1986) Rat glutathione S-transferases supergene family. Characterization of an anionic Yb subunit cDNA clone. *Journal of Biological Chemistry*. 261(29): 13793-9.
22. . Lai, H., C., Grove, G., and Tu, C., P. (1986) Cloning and sequence analysis of a cDNA for a rat liver glutathione S-transferase Yb subunit. *Nucleic Acids Research*. 14(15): 6101-14.
23. Lai, H., C., Qian, B., Grove, G., and Tu, C., P. (1988) Gene expression of rat glutathione S-transferases. Evidence for gene conversion in the evolution of the Yb multigene family. *Journal of Biological Chemistry*. 263(23): 11389-95.
24. Moscow, J., A., Fairchild, C., R., Madden, M., J., Ransom, D., T., Wieand, H., S., O'Brien, E., E., Poplack, D., G., Cossman, J., Myers, C., E., and Cowan, K., H. (1989) Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. *Cancer Research*. 49(6): 1422-8.
25. Lewis, A., D. Hickson, I., D., Robson, C., N., Harris, A., L., Hayes, J., D., Griffiths, S., A., Manson, M., M., Hall, A., E., Moss, J., E., and Wolf, C., R. (1988) Amplification and increased expression of alpha class glutathione S-transferase-encoding genes associated with resistance to nitrogen mustards. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85(22): 8511-5.

26. Buller, A., L., Clapper, M., L., and Tew, K., D. (1987) Glutathione S-transferases in nitrogen mustard-resistant and -sensitive cell lines. *Molecular Pharmacology*. 31(6): 575-8.
27. Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S., Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K., D., Pincus, M., R., Sardana, M., Henderson, C., J., Wolf, C., R., Davis, R., J., and Ronai, Z. (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO Journal*. 18(5): 1321-34.
28. Ahmad, H., Singhal, S., S., Saxena, M., and Awasthi, Y., C. (1993) Characterization of two novel subunits of the alpha-class glutathione S-transferases of human liver. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1161(2-3): 333-6.
29. Waxman, D., J., Sundseth, S., S., Srivastava, P., K., and Lapenson, D., P. (1992) Gene-specific oligonucleotide probes for alpha, mu, pi, and microsomal rat glutathione S-transferases: analysis of liver transferase expression and its modulation by hepatic enzyme inducers and platinum anticancer drugs. *Cancer Research*. 52(20) : 5797-802.
30. Morel, F., Fardel, O., Meyer, D., J., Langouet, S., Gilmore, K., S., Meunier, B., Tu, C., P., Kensler, T., W., Ketterer, B., and Guillouzo, A. (1993) Preferential increase of glutathione S-transferase class alpha transcripts in cultured human hepatocytes by phenobarbital, 3-methylcholanthrene, and dithiolethiones. *Cancer Research*. 53(2): 231-4.
31. Rushmore, T., H., Morton, M., R., and Pickett, C., B. (1991) The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for

- functional activity. *Journal of Biological Chemistry*. 266(18): 11632-9.
32. Nguyen, T., Rushmore, T., H., and Pickett, C., B. (1994) Transcriptional regulation of a rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene. Analysis of the antioxidant response element and its activation by the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Journal of Biological Chemistry*. 269(18): 13656-62.
33. Prester, T., Talalay, P., Alam, J., Ahn, YI., Lee, P., J. and Choi, A., M. (1995) Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase 2 enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE). *Molecular Medicine*. 1(7): 827-37.
34. Rushmore, T., H., King, R., G., Paulson, K., E., and Pickett, C., B. (1990) Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87(10): 3826-30.
35. Friling, R., S., Bergelson, S., and Daniel, V. (1992) Two adjacent AP-1-like binding sites form the electrophile-responsive element of the murine glutathione S-transferase Ya subunit gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89(2): 668-72.
36. Bergelson, S., and Daniel, V. (1994) Cooperative interaction between Ets and AP-1 transcription factors regulates induction of glutathione S-transferase Ya gene expression. *Biochemical &*

Biophysical Research Communications. 200(1): 290-7.

- 37. Waxman, D., J. (1990) Glutathione S-transferases: role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy--a review. Cancer Research. 50(20): 6449-54.**
- 38. Busby, W., F., and Wogan, G., N. (1984) Aflatoxins, in: C.E. searle (Ed.), Chemical carcinogens, 2nd end., Am. Chem. Cos., Washing ton, DC. 945-1136.**
- 39. Gorelick NJ. (1990) Risk assessment for Aflatoxin: I. Metabolism of Aflatoxin B1 by different species. Risk Analysis. 10(4): 539-59.**
- 40. Raney, K., D., Shimada, T., Kim, D., H., Groopman, J., D., Harris, T., M., and Guengerich, F., P. (1992) Oxidation of Aflatoxins and sterigmatocystin by human liver microsomes: significance of Aflatoxin Q1 as a detoxication product of Aflatoxin B1. Chemical Research in Toxicology. 5(2): 202-10.**
- 41. Battista, J., R., and Marnett, L., J. (1985) Prostaglandin H synthase-dependent epoxidation of Aflatoxin B1. Carcinogenesis. 6(8): 1227-9.**
- 42. Liu, L., and Massey, T., E. (1992) Bioactivation of Aflatoxin B1 by lipoxygenases, prostaglandin H synthase and cytochrome P450 monooxygenase in guinea-pig tissues. Carcinogenesis. 13(4): 533-9.**
- 43. Raney KD. Meyer DJ. Ketterer B. Harris TM. Guengerich FP. Glutathione conjugation of Aflatoxin B1 exo- and endo-epoxides by rat and human glutathione S-transferases. Chemical Research in Toxicology. 5(4): 470-8, 1992**

44. Eaton, D., L., and Gallagher, E., P. (1994) Mechanisms of Aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*. 34: 135-72.
45. Buetler, T., M., Slone, D., and Eaton, D., L. (1992) Comparison of the Aflatoxin B₁-8,9-epoxide conjugating activities of two bacterially expressed alpha class glutathione S-transferase isozymes from mouse and rat. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 188(2): 597-603.
46. Wang, C., J., Wang, S., W., Lin, J., K., (1991) Suppressive effect of geniposide on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of Aflatoxin B₁ in rats. *Cancer Letters*. 60(2): 95-102.
47. Wang, S., W., Lai, C., Y., Wang, C., J., (1992) Inhibitory effect of geniposide on Aflatoxin B₁-induced DNA repair synthesis in primary cultured rat hepatocytes. *Cancer Letters*. 65(2): 133-7.
48. Wang, C., J., Shiah, H., S., Lin, J., K., (1991) Modulatory effect of crocetin on Aflatoxin B₁ cytotoxicity and DNA adduct formation in C3H10T1/2 fibroblast cell. *Cancer Letters*. 56(1): 1-10.
49. Neal, G., E., Metcalfe, S., A., Legg, R., F., Judah, D., H., Green, J., A., (1981) Mechanism of the resistance to cytotoxicity which precedes Aflatoxin B₁ hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2(5): 457-61.
50. McMahon, G., Davis, E., F., Huber, L., J., Kim, Y., and Wogan, G., N. (1990) Characterization of c-Ki-ras and N-ras oncogenes in Aflatoxin B₁-induced rat liver tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87(3): 1104-8.

51. Simon, T., Becquemont. L., Mary-Krause. M., de Waziers. I., Beaune. P., Funck-Brentano. C., and Jaillon, P. (2000) Combined glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and tacrine hepatotoxicity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 67(4): 432-7.
52. Katoh, T., Nagata, N., Kuroda, Y., Itoh, H., Kawahara, A., Kuroki, N., Ookuma, R., and Bell, D., A. (1996) Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 17(9): 1855-9.
53. Fontana, X., Peyrotte, I., Valente, E., Rossi, C., Ettore, F., Namer, M., and Bussiere, F. (1997) Glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1): susceptibility gene of breast cancer. *Bulletin du Cancer*. 84(1): 35-40.
54. Lafuente, A., Pujol, F., Carretero, P., Villa, J., P., and Cuchi, A. (1993) Human glutathione S-transferase mu (GST mu) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Letters*. 68(1): 49-54.
55. Aktas, D., Ozen, H., Atsu, N., Tekin, A., Sozen, S., and Tuncbilek, E. (2001) Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism in bladder cancer patients. A marker for invasive bladder cancer? *Cancer Genetics & Cytogenetics*. 125(1): 1-4.
56. Butterwoth, B., E., Ashby, J., Bermudex, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G., and Williams, G. (1987) A protocol and guide for the in vitro rat hepatocytes DNA repair assay. *Mut. Res*. 189: 133.

Oligonucleotides

rGST Mu(Yb1) cDNA primer

5'-CCAAATTGAGAATTCCACAGCGC

EcoR I

3'-TGCCTGCAGGATCCAATGTGGA

BamH I

rGST Pi cDNA primer

5'-TCTGTCTACGCTGCAGCTAT

Pst I

3'-GACAAGGAATTCCTGTCCCT

EcoR I

rGST Alfa(Ya) cDNA primer

5'-TAGACAGTGAAGCTTAGTTGCTGCT

Hind III

3'-CAAGAAATTGGACACTGCAGCTCC

Pst I

Figure 1.

The primer sequences of rGST isoforms and the designed restriction enzyme sites.

Oligonucleotides	/min	cycle
rGST Ya cDNA amplification (720bps)		
5'-TAGACAGTGAAGCTTAGTTGCTGCT	65/1	40
3'-CAAGAAATTGGACACTGCAGCTCC		
rGST Pi cDNA amplification (677bps)		
5'-TCTGTCTACGCTGCAGCTAT	58/1	40
3'-GACAAGGAATTCCTGTCCCT		
rGST Yb1(mu) cDNA amplification (745bps)		
5'-CCAAATTGAGAATTCACAGCGC	61/1	40
3'-TGCCTGCAGGATCCAATGTGGA		

Figure 2.

The primer sequences of rGST isoforms and the cycling conditions used for rGST Ya, Pi, Yb1 by RT-PCR.

rGST Yb1 (rGST Mu) primer sequence:

5' oligonucleotides primer sequence of rGST Yb (rGST Mu):

5' - C C A A A T T G A G A A T T C C A C A G C G C - 3'

EcoR I

3' oligonucleotides primer sequence of rGST Yb (rGST Mu):

5' - T G C C T G C A G G A T C C A A T G T G G A - 3'

BamH I

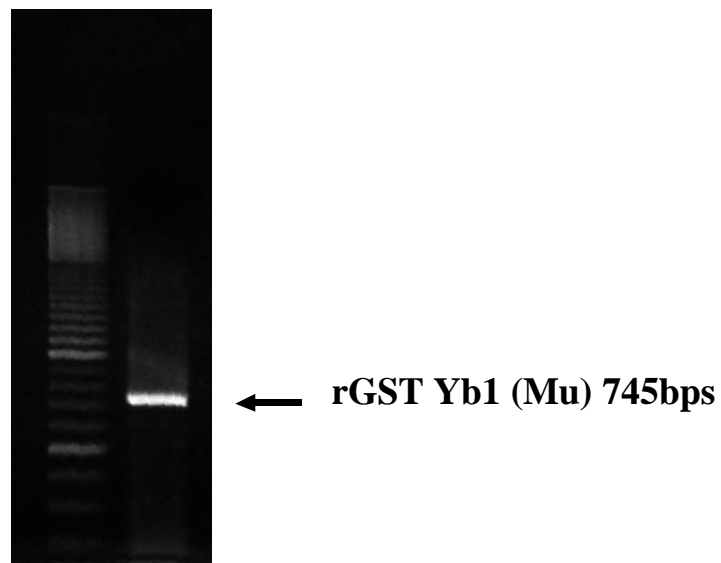


Figure 3.

The 5' and 3' primers of rGST Yb1 (rGST Mu) and the result of RT-PCR. Total RNA (5ug) was reverse-transcribed using oligo dT, then amplified by PCR using both primers for 40 cycles. Product was separated on a 1.2-% agarose gel. The expected 745 bps band was shown.

rGST Ya (rGST Ya1) primer sequence:

5' oligonucleotides primer sequence of rGST Ya (rGST Ya1):

5' - T A G A C A G T G A A G C T T A G T T G C T G C T - 3'

3' oligonucleotides primer sequence of rGST Ya (rGST Ya1):

5' - C A A G A A A T T G G A C A C T G C A G C T C C - 3'

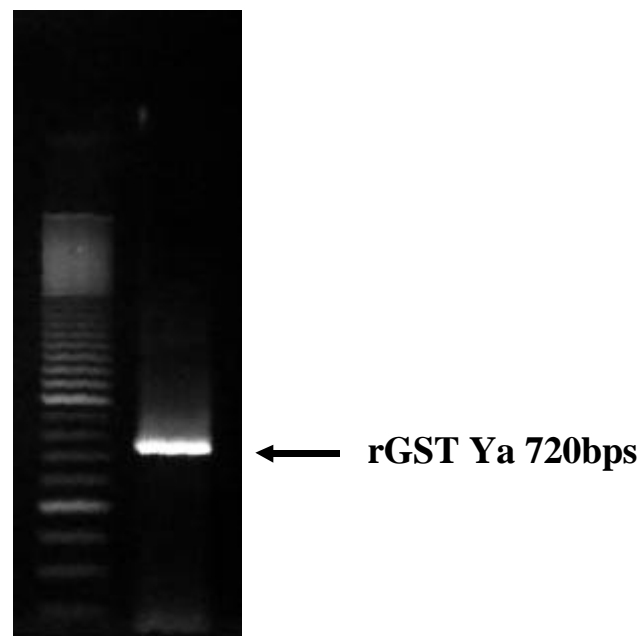


Figure 4.

The 5' and 3' primers of rGST Ya (rGST Ya1) and the result of RT-PCR. Total RNA 5ug was reverse-transcribed using oligo dT, then amplified by PCR using both primers for 40 cycles. Product was separated on a 1.2-% agarose gel. The expected 720 bps band was shown.

rGST Pi primer sequence:

5' oligonucleotides primer sequence of rGST Pi:

5' - T C T G T C T A C G C T G C A G C T A T - 3'

3' oligonucleotides primer sequence of rGST Pi:

5' - G A C A A G G A A T T C C T G T C C C T - 3'

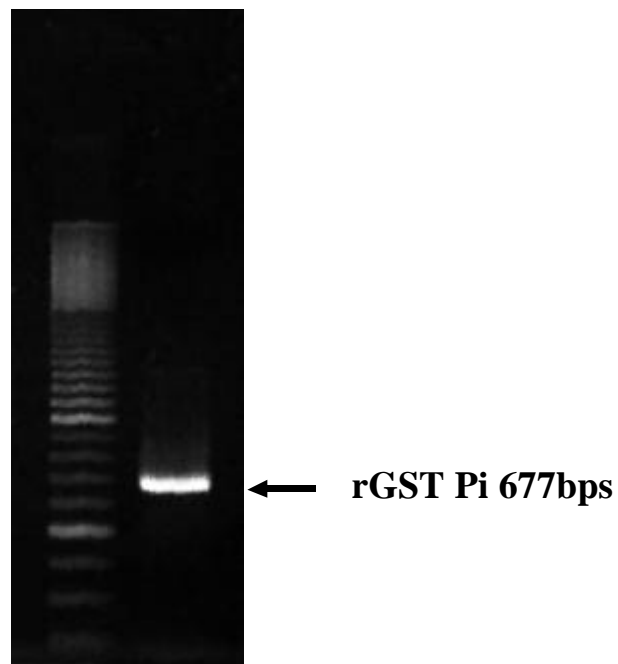


Figure 5.

The 5' and 3' primers of rGST pi and the result of RT-PCR. Total RNA 5ug was reverse-transcribed using oligo dT, then amplified by PCR using both primers for 40 cycles. Product was separated on a 1.2-% agarose gel. The expected 677 bps band was shown.

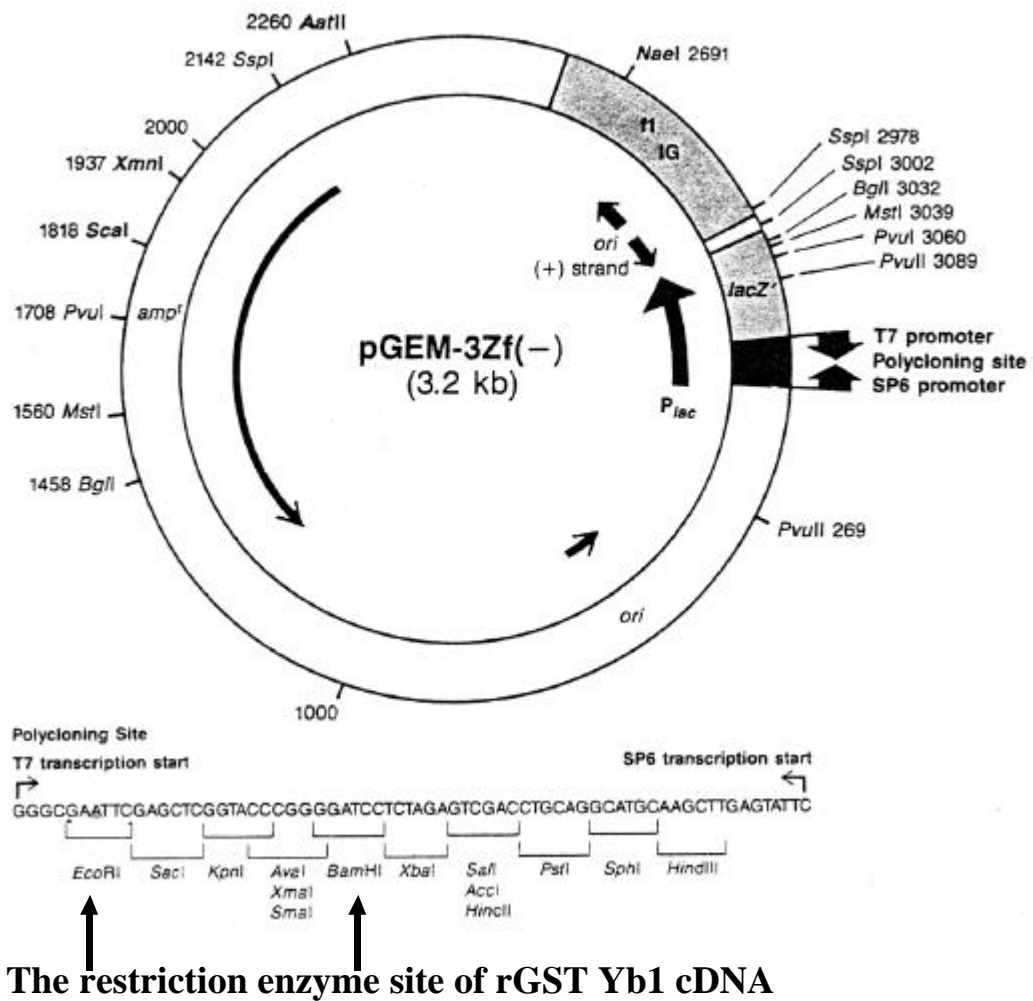
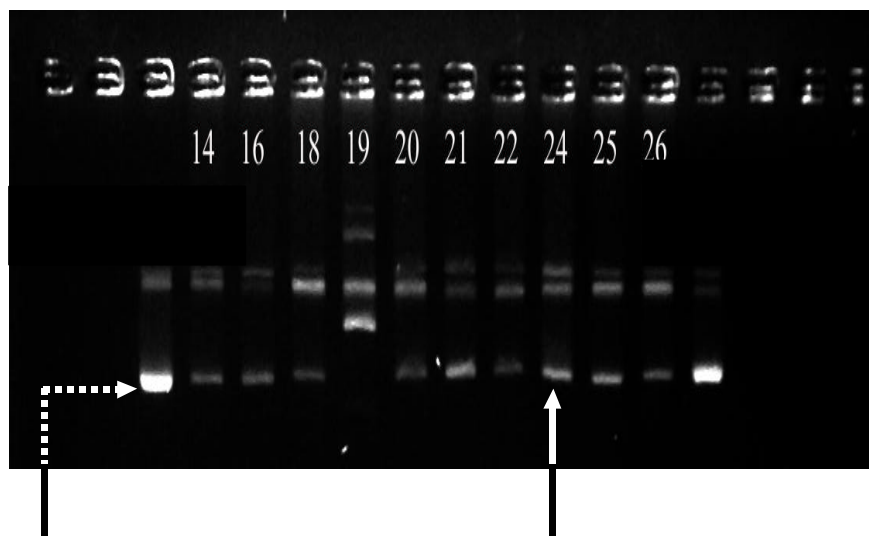


Figure 6.
The map of pGEM-3Zf (-).



Supercoiled form of pGEM

Figure 7.

Screen of the *E. coli* clones transformed with pGEM-rGST Mu plasmid. Plasmids were prepared from the white *E. coli* colonies, and analyzed on a 1.2-% agarose gel. The asterisk indicated that No. 24 colony contained pGEM-rGST Mu plasmid.

The restriction enzyme site of rGST Mu digested from pGEM-rGST Mu

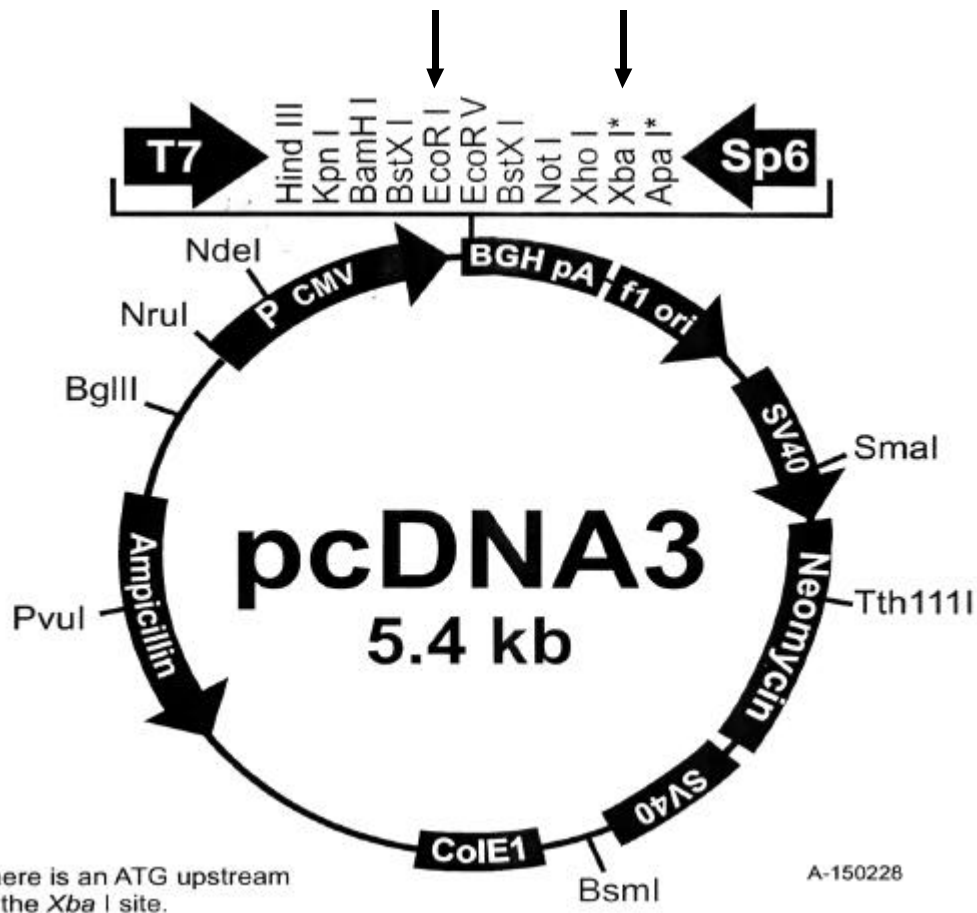


Figure 8.
The map of pcDNA3.

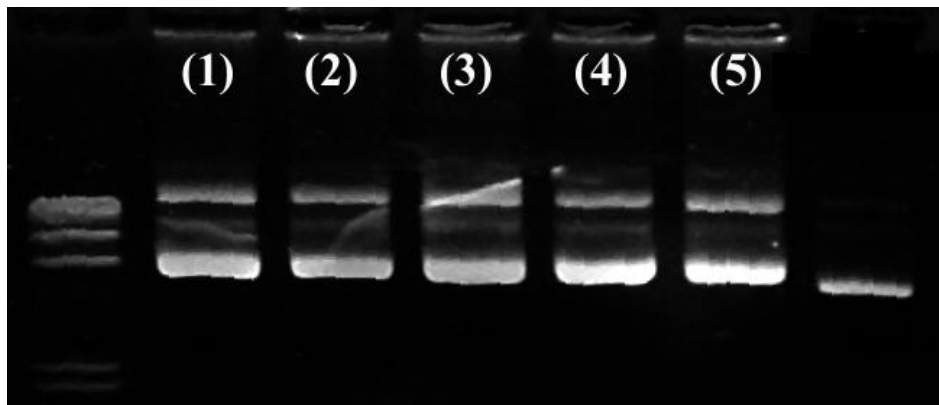


Figure 9.

Screen of the *E. coli* clones transformed with pcDNA3-rGST Mu plasmid. Plasmids were prepared from the *E. coli* colonies, and analyzed on a 1.2-% agarose gel. The asterisk indicated pcDNA3 plasmid.

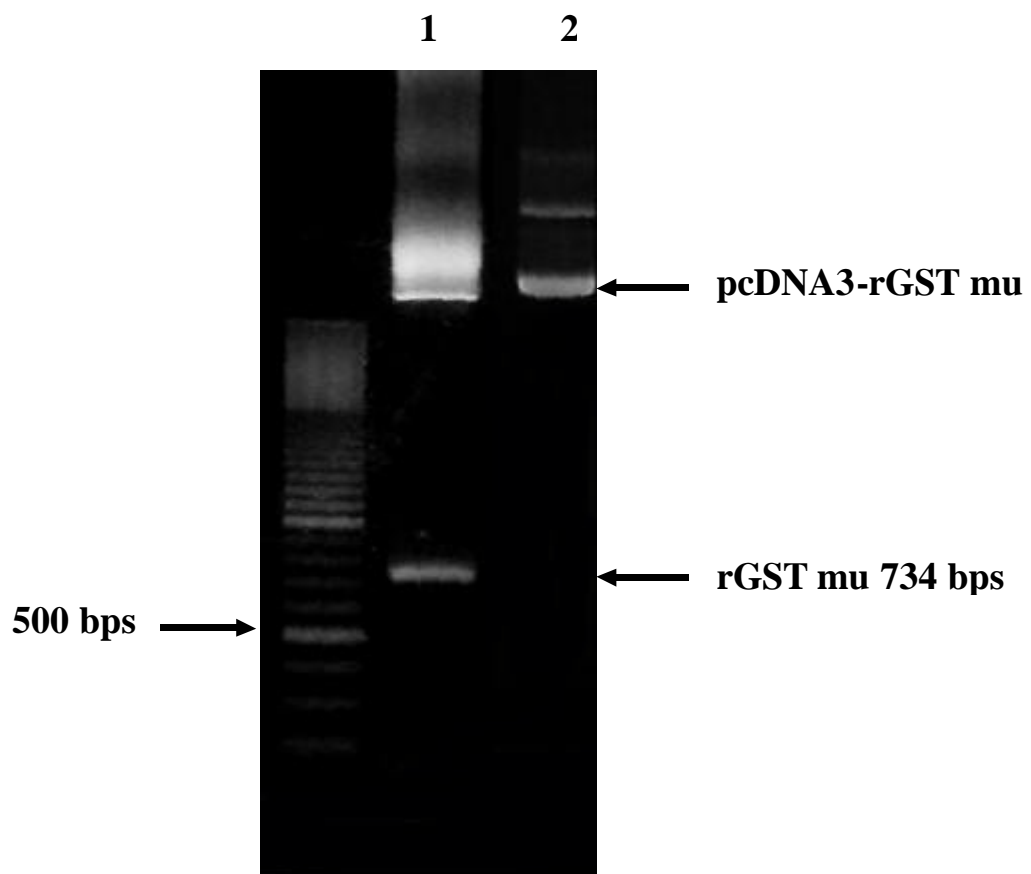
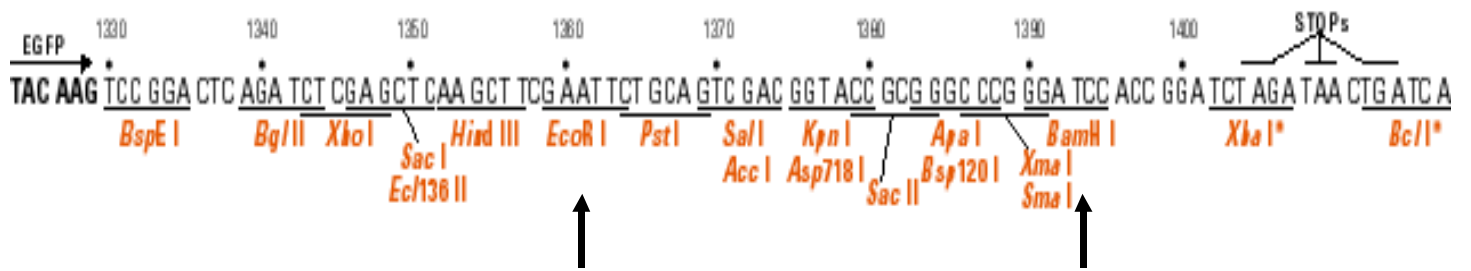
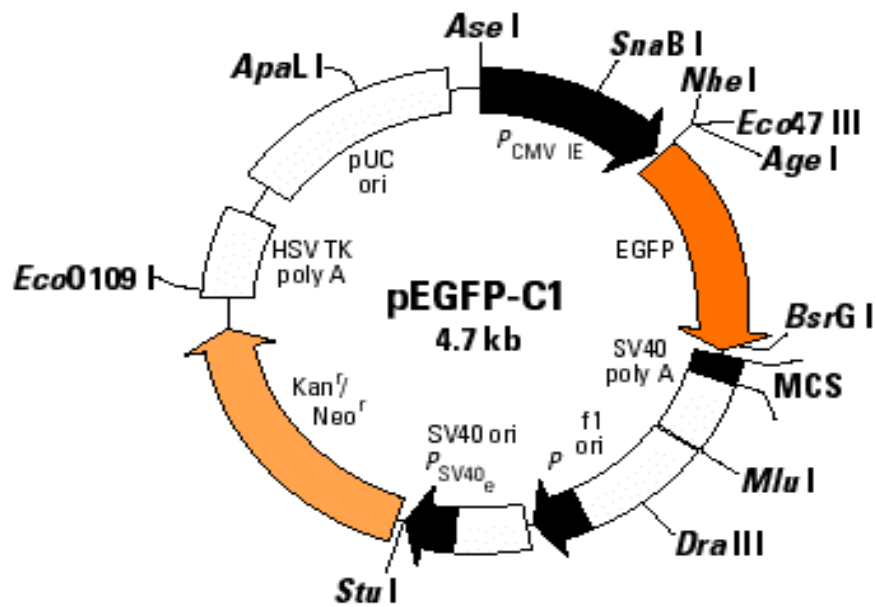


Figure 10
pcDNA3-rGST mu was digested with EcoR I and Xba I.



The restriction enzyme site used to obtain rGST mu from pGEM-rGST Mu

Figure 11.
The map of pEGFP-C1.

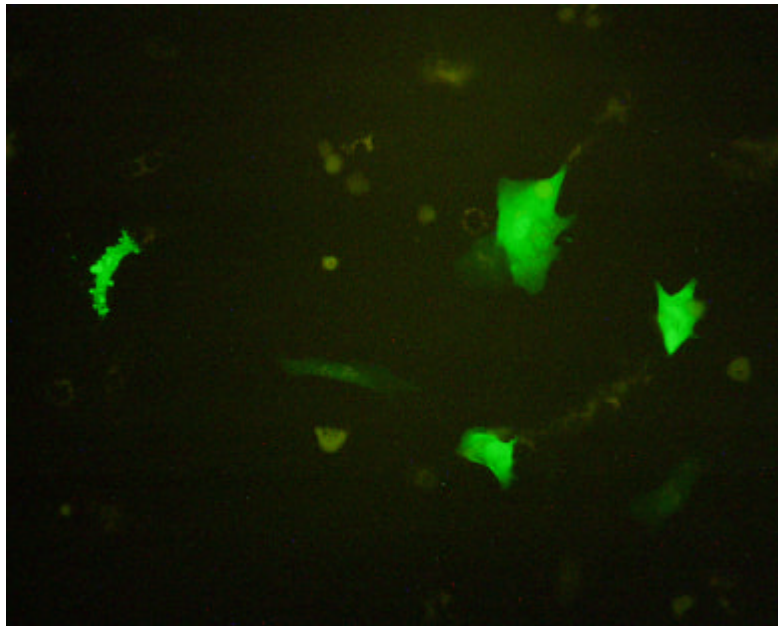


Figure 12

The expression of pEGFP-C1 in the primary cultured hepatocyte. The primary cultured hepatocytes (3×10^5) were pre-cultured for 36-48 hr, and then, transfected with pEGFP-C1. The expression of GFP was observed 48hr after transfection using a fluorescence microscopy.

GST activity

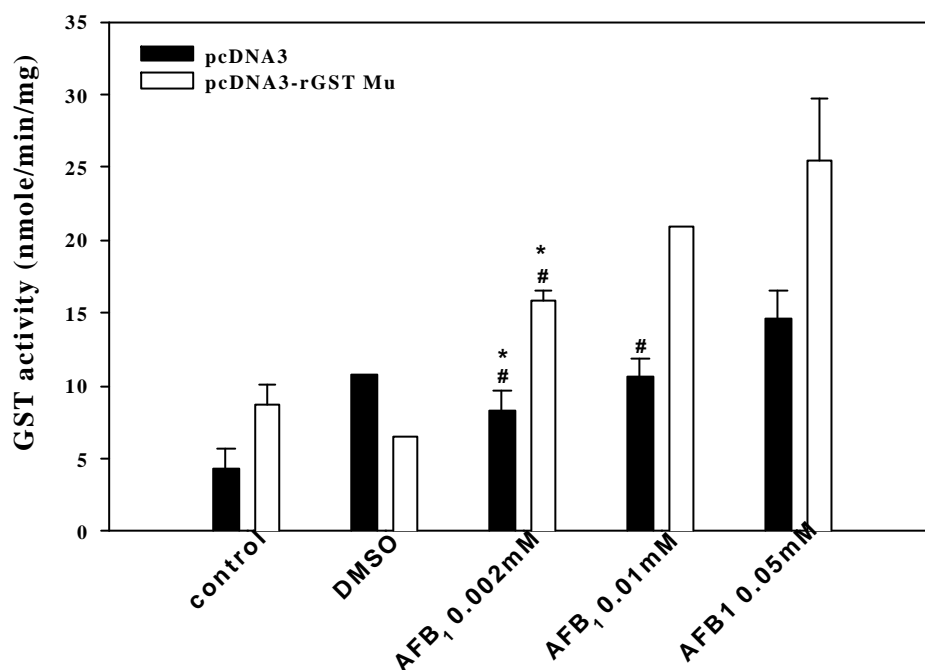


Figure 13.

Cells (3×10^5) were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48hr, cells were treated with Aflatoxin B₁ (AFB₁) or 0.2%DMSO for 12hr, or remained untreated as controls. The transfection efficiency was 38%. Means of five experiments \pm S.D. (# indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.05$; * indicate significant differences between the rGST mu-transfected and control vector-transfected cell under the same treatment condition with $p < 0.05$).

AST activity

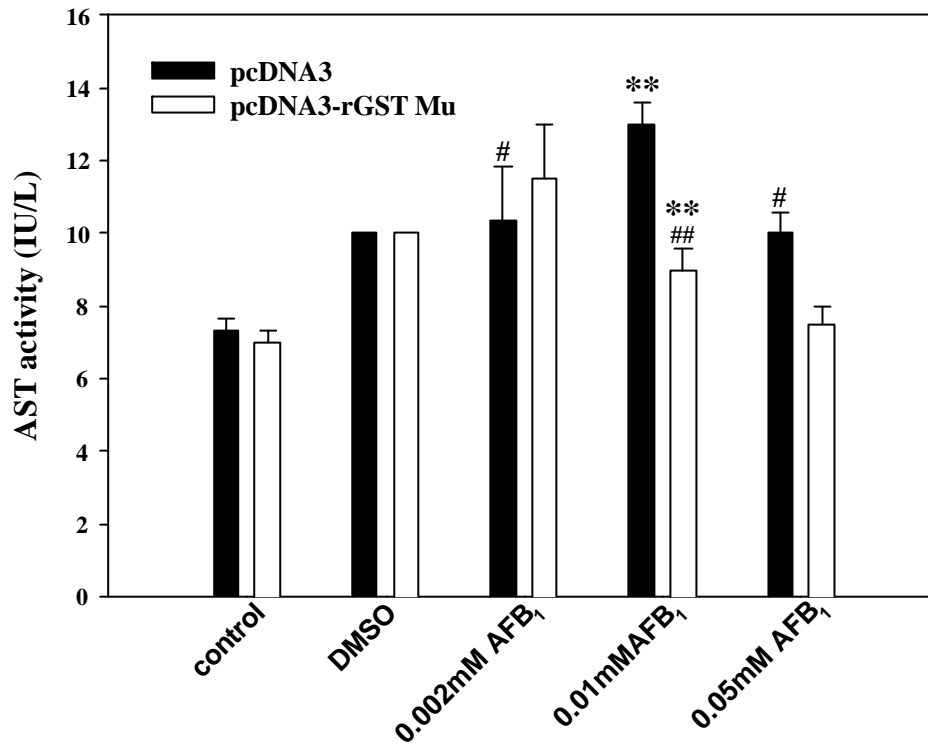


Figure 14.

Cells (3×10^5) were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48hr, cells were treated with Aflatoxin B₁ (AFB₁) or 0.2%DMSO for 12hr, or remained untreated as controls. The transfection efficiency was 38%. Means of five experiments \pm S.D. (# or ## indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.05$ and 0.01 , respectively; ** indicate significant differences between the rGST mu-transfected and control vector-transfected cell under the same treatment condition with $p < 0.01$).

LDH activity

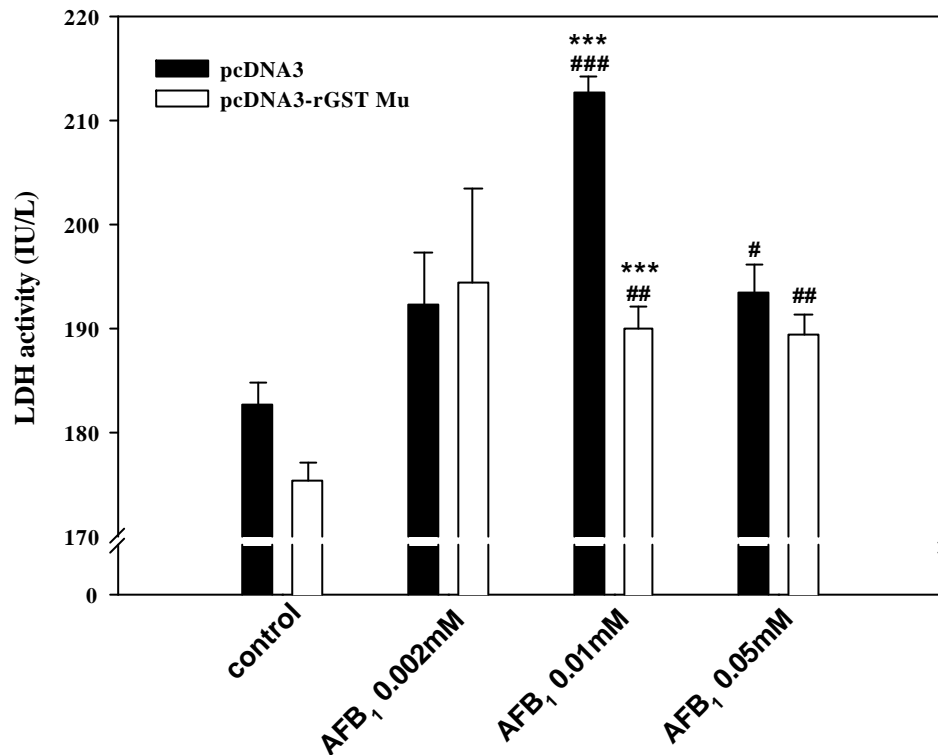


Figure 15.

Cells (3×10^5) were transfected with the indicated plasmids. After transfection for 48hr, cells were treated with Aflatoxin B₁ (AFB₁) for 12hr, or remained untreated as controls. The transfection efficiency was 38%. Means of five experiments \pm S.D. (#, ## or ### indicate significant differences as compared to the control with $p < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively; *** indicate significant differences between the rGST mu-transfected and control vector-transfected cell under the same treatment condition with $p < 0.001$ respectively).