

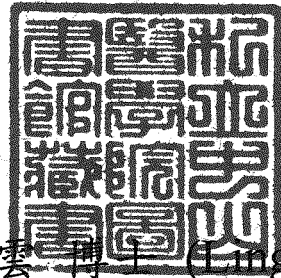
R
008.8
8024

私立中山醫學院生物化學研究所

碩士論文

人類細胞株中不同的d-(CGG/CCG)_n DNA
結合蛋白之分子組成研究

Study on the d-(CGG/CCG)_n DNA binding
proteins from different human cell lines



指導教授：陳凌雲 博士 (Ling-Yun Chen, Ph. D.)
劉德中 博士 (Te-Chung Liu, Ph. D.)

研究生：翁秀如 (Shiow-Ru Ueng)

中華民國八十五年六月

June, 1996

中山醫學院圖書館



C036298

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 生物化學研究所
組 84 學年度第 1 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱：H類細胞株中不同的d-(CGG/CCG)n DNA結合蛋白之分子 組成研究

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：陳凌雲

研究生簽名：翁吉如 學號：R8302109
(親筆正楷)

日期：民國 85 年 8 月 10 日

- 備註：1. 上述同意與不同意之欄立若未鉤選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意的是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名：翁秀如 聯絡電話：(06)2618628
地址：台南市金華路二段63巷8-1號

本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院生物化學研究所論文考試委員審查合格及口試通過。

口試委員

中興大學獸醫系副教授

張伯俊 博士

張伯俊

中山醫學院營養系副教授
(論文指導教授)

劉德中 博士

劉德中

中山醫學院生物化學研究所副教授
(論文指導教授)

陳凌雲 博士

陳凌雲

中華民國八十五年六月

學生翁秀如論文題目為人類細胞株中不同的d-(CGG/CCG)_n DNA結合蛋白之分子組成研究，其論文已經中山醫學院生物化學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授： 陳凌雲 博士

劉德中 博士

簽名：陳凌雲

簽名：Jeddy Li

中華民國85年7月

誌謝

本篇論文得以順利完成，首先要感謝指導教授陳凌雲博士及劉德中博士之悉心指導，對於二位恩師在科學研究及治學諄諄教導，抱以感激之情。論文完成的初稿，感謝中興獸醫研究所張伯俊博士審閱及斧正，並對論文內容提出建設性建議。學習期間，感謝謝易修副教授熱心所提供的藥品，使得實驗得以順利進行。感謝劉哲育副教授與王怡鈞老師在課業與實驗的賜教，及李月君老師在實驗技術的協助。同時，感謝秀芬、昀蓁、耀騰、繆珍、玉美、至凱、孟訓、麗娟、千瑩、麗霜...，互相照顧及幫助。最後最最感謝的是父母親的支持，以及崇宇姨丈與淑真阿姨在這一段在外求學日子裏，對生活上悉心的照顧，得以心無旁騖而致力向學，衷心感謝大家在這一段成長過程的鼓勵。

翁秀如 謹誌於

中山醫學院生物化學研究所

中華民國八十五年八月

目錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
壹、緒論.....	3
貳、材料和方法	
材料.....	8
方法.....	9
參、結果.....	14
肆、討論.....	21
伍、參考文獻.....	25
圖例.....	30
附圖.....	44
附錄一.....	48
附錄二.....	49

摘要：

易脆X染色體徵候群(fragile X syndrome)是一種性聯遺傳疾病，會造成病人智能障礙。目前已知FMR1基因和易脆X染色體徵候群有關，在FMR1之5'-untranslated region有一段(CGG) n 重複序列。在正常人之CGG約重複6-54次，premutation的carrier其CGG重複50-200次，full mutation之病人CGG重複200次以上。易脆X染色體徵候群致病的因素，主要是來自於CGG重複序列遽增，因而造成(CGG) n 重複序列及其上游250 bp處的CpG island甲基化(methylation)，因此減少了FMR1的mRNA表現，進而降低FMRP的表現。(CGG)不正常增生的機制，目前並不瞭解，Richards等人(1993)自HeLa細胞核抽取液中發現有一個DNA結合蛋白，會專一性與ds-(CGG/CCG) n 結合，因此命名為CGG結合蛋白1(CGG-binding protein 1, CGG-BP1)，但對它的生理功能及特性並不清楚。在本論文中，我們對CGG-BP的特性做了進一步探討，結果發現，在分裂中與非分裂中細胞有不同的CGG-BP被表現出。另外又發現，存在於HeLa細胞株的CGG-BP其native state下分子量為200 kDa，且可能由70與50 kDa蛋白共同組成。lymphocyte、glioma、Hep 3B細胞株的CGG-BP與HeLa細胞株的CGG-BP均具有相同的蛋白分子組成。而gingival fibroblast、H460及HUVEC細胞株的CGG-BP則由50及38 kDa蛋白組成，在UASMC細胞株的CGG-BP則由50及31 kDa蛋白組成。綜合上述的結果，推測不同的人類細胞株存在不同的CGG-結合蛋白，且50 kDa蛋白為不同CGG-結合蛋白之共同組成，而70、38、31 kDa蛋白則是由於組織特異性而產生不同之調節蛋白。

Abstract :

Fragile X syndrome is an X-linked heritable disease and is the most common cause of inherited mental retardation. The fragile X syndrome is correlated with the expansion of CGG trinucleotide repeat of FMR1 (fragile X mental retardation 1) gene. In normal subject, the copy number of CGG trinucleotide repeat varies between 6 and 54. In carrier, the copy number of CGG repeat increases to 52-200 with the appearance of normal phenotype. While in fragile X patient, the copy number of CGG repeat expands beyond 200 and shows abnormal methylation. As the consequence, the methylation of FMR1 will shut down the transcription of FMR1 gene and causes the fragile X syndrome. In 1993, Richards et al. reported a specific double-stranded (ds)-(CGG/CCG)_n repeats-binding protein (CGG-BP1) in HeLa cell nuclear extract. In this study, CGG-BP1 was further identified. It was found that different amount of CGG-BPs was expressed in dividing and non-dividing cells. The molecular mass of CGG-BP in HeLa cells was 200 kDa and was composed of two proteins with the molecular mass of 70 and 50 kDa. In lymphocyte, glioma, and Hep 3B cell line, the CGG-BP was also composed of 70 and 50 kDa components. CGG-BP of gingival fibroblast cell line, H460 cell line and HUVEC cell line were composed of two proteins with molecular mass 50 and 38 kDa, while UASMC cell line was composed of two proteins with molecular mass of 50 and 31 kDa. These results indicated that the 50 kDa protein might be a common component of CGG-BP shared by different member of CGG-BPs.

壹、緒論：

易脆X染色體徵候群(fragile X syndrome)亦稱Martin-Bell syndrome，此疾病對患者最大影響是智能障礙，其臨床主要特徵包括：中度到重度智障、長臉、大耳、巨睪症等(Martin and Bell, 1943; Turner et al., 1980)。性聯遺傳是此疾病另一特性，因此男性罹患率為1/1250高於女性1/2500 (Gustavson et al., 1986; Webb et al., 1986; Brown and Jenkins, 1992)，但根據最新文獻報告男性罹患率為1/4000(Turner et al., in press)。利用細胞遺傳學方法，把患者的白血球細胞培養在缺乏葉酸或含有葉酸抑制劑的培養液中，如methotrexate，會誘發fragile X site (Sutherland, 1977)，在顯微鏡下可觀察到X染色體的Xq27.3位置有易脆位置(fragile site)(附圖一)。

在1991年Verkerk等人利用分子生物學技術，已自X染色體的易脆位置選殖出FMR1(fragile X mental retardation 1)基因，此基因會發生alternative splicing，產生一些isoform的FMR蛋白，但以分子量69 kDa的FMR蛋白為主要。Verkerk等人(1993)利用RT-PCR分析不同組織，也發現FMR1基因有alternative splicing作用，形成12種不一樣mRNA產物，且不具組織專一性。FMR1基因具有17個exon(附圖二)，在FMR1基因的5'-untranslated region，位於exon 1，有一段多型態(CGG) n 重複序列(Kremer et al., 1991; Verkerk et al., 1991) (附圖二)，在病人的X染色體上觀察到的易脆位置，便是此位置發生突變所致。一般而言，在正常人的(CGG)重複次數約6-54次(Fu et al., 1991)，平均重複次數為29次。當(CGG)重複50-200次時稱為前突變(premutation)，發生在男性上仍會有正常表現型，其FMR1基因(CGG) n 重複序列不會被甲基化，此男性稱為正常傳遞男性(normal transmitting males, NTMs)，他們會將已突變基因遺傳給他們的女兒，但她們不會發病會變成帶因者(carrier)，不過正常傳遞男性的孫子則就會有很高的發病危險率，即所謂Sherman paradox，換句話說，就是在家族史中愈後代的成員發生智障比率愈高。然

而對女性而言就較為複雜，有30%女性帶因者會表現中度智障，55%女性帶因者在X染色體上會出現易脆位置。當(CGG)重複200次以上，甚至於高達1000次以上，則稱為完全突變(full mutation)，這時會明顯表現易脆X染色體徵候群病徵(Fu et al., 1991; Kremer et al., 1991; Verkerk et al., 1991; Oberle et al., 1991; McConkie-Rosell et al., 1993)，且FMR1上的(CGG) n 重複序列及距離(CGG) n 重複序列上游250 bp的CpG island會產生甲基化(methylation)(Vincent et al., 1991; Homstra et al., 1993; Hansen et al., 1992; Sutcliffe et al., 1992)，使得FMR1基因的mRNA表現減少 (Oberle et al., 1991; Pieretti et al., 1991)。

因此目前認為導致易脆X染色體徵候群的發生，是因為FMR1基因的5'-untranslated region之(CGG) n 重複次數遽增，造成CpG island及FMR1基因上(CGG) n 重複序列產生超甲基化(hypermethylation)，阻礙FMR1基因進行轉錄作用，進而顯著降低FMR1 protein (FMRP)的表現(Devys et al., 1993; Verheij et al., 1993)。不過在臨床上也發現有一些表現易脆X染色體徵候群病徵的病例，在X染色體上沒有表現易脆位置，但他們的FMR1基因產生定點(De Boulle et al., 1993)或刪除突變(Gedeon et al., 1992; Wohrle et al., 1992; Meijer et al., 1994)，因此在在凸顯FMRP和易脆X染色體徵候群密切的關係。

FMRP現被認為是一個RNA-binding protein，因含有兩個sequence motif，分別是位在FMRP之C端的RGG box (Kiledjian and Dreyfuss, 1992)及兩個在FMRP的K homology (KH) domain (Siomi et al., 1993; 1994; Ashley et al., 1993)。RGG box (Arg-Gly-Gly)是一個RNA-binding的motif，在heterogeneous nuclear RNP K (hnRNP K)與核內的RNA-binding protein即具有這樣的motif。由於近來發現一些RNA-binding protein均含有Arginine-及

glycine-rich domain，且在domain內含有一群tripeptide一組的重複序列，因而稱之為RGG box。另外在一些核及核仁中的RNA-binding protein，已證明其RGG box具有與RNA結合的活性(Kiledjian and Dreyfuss, 1992; Dreyfuss et al., 1993)。由於FMRP之amino acids序列的286-321和347-382彼此間有39%類似，但它們與hnRNP protein的KH domain更相似，因此稱FMRP之amino acids序列的286-321和347-382為KH domain。由於有一些含有KH domain的蛋白會結合到RNA，因而認為KH domain含括在ribonucleoprotein (RNP) family。因此基於以上因素，FMRP被認為是一個RNA-binding protein。在in vitro實驗中已證實FMRP的確會和RNA結合(Siomi et al., 1993; Ashley et al., 1993)，且KH domain和RGG box扮演重要角色。另外在臨床病例中亦發現，若KH domain (De Boulle et al., 1993)或RGG box (Lee, unpublsh) 發生突變會造成易脆X染色體徵候群病徵。

利用in situ hybridization或immunohistochemistry方法已證明FMR1的mRNA分佈廣泛，尤其在腦部及睪丸會大量表現，在腦部，主要位於海馬迴的神經細胞與大腦皮質的灰質(Abitbol et al., 1993)，至於在睪丸的正確所在位置則就不清楚，而易脆X染色體徵候群病人在此二器官上正好有病徵出現(Abitbol et al., 1993; Bachner et al., 1993; Devys et al., 1993; Hinds et al., 1993)，即智能障礙與巨睪症。FMRP存在細胞質中(Devys et al., 1993; Verheij et al., 1993)，在神經細胞會大量表現(Hinds et al., 1993; Devys et al., 1993)，同時，spermatagonia亦會大量表現，因此，推測FMR1在精子生成中扮演重要角色。然而其真正生理功能仍未被了解。

dynamic mutation是因為它的突變跟trinucleotide序列重複次數有關，發生突變後，子代和親代的copy number不同，亦即完全是每代皆產生不同copy number (Richard and Sutherland, 1992a)。myotonic dystrophy與易脆X染

色體徵候群一樣，均是dynamic mutation疾病，也就是triplet repeat mutation (Richard and Sutherland, 1992b)。從分子層面觀來，它們具有相似的遺傳特性，而myotonic dystrophy 現已發現有創立者染色體效應(founder chromosome effect)，Harley等人(1992)預測易脆X染色體徵候群可能也具有相同特性。Richards等人(1992)以Haplotype analysis方法對易脆X染色體徵候群病人的X染色體做分析，從受檢的病例中，發現大部份的病人有創立者染色體(founder chromosome)突變，證明易脆X染色體徵候群因有創立者染色體存在而引發疾病。從遺傳學上觀點，fragile X突變基因應恆定消失在基因庫，然而卻一直發現新的病例，意味著有新的突變不斷產生，而創立者染色體效應則可以解釋此現象(Mandel, 1994)。

Richards等人(1992)提出兩個突變模式，來說明導致創立者染色體突變的機制，其中之一假說認為(CGG)重複序列遽增，可能是(CGG)重複序列欲維持一個最佳triple repeat region，即完全只有(CGG)重複序列，因此會產生突變以增加(CGG)重複序列。或是(CGG)重複序列中間穿插的(AGG)(Kunst and Warren, 1994)，將(AGG)的A突變為C，如此即可維持一個最佳triple repeat region。通常在一般人的(CGG)重複序列中，會穿插約2-3個AGG序列在其中(Verkerk et al., 1991)，沒有AGG或只有一個AGG穿插(CGG)重複序列中，具有使(CGG)重複序列增長傾向(Eichler et al., 1995)。現認為(AGG)在DNA複製時可避免DNA發生滑動作用，防止(CGG)重複序列遽增作用(Zhong et al., 1995)。Eichler等人(1994)認為(CGG)重複序列增加，可能是(1)來自於DNA滑動時，使DNA產生配對錯誤所造成的，或是使(CGG)重複序列中的AGG發生缺失突變或A突變為C。而Richards(1992a)等人另一假說認為有一段與trinucleotide無關的DNA突變而變成一個DNA結合位置，導致蛋白結合至此，使得(CGG)重複序列遽增。在人類許多其它基因的5'-untranslated region是p(CCG)n重複序列，BCR基因便是其中一例，並且其

5'-untranslated region的(CCG)_n重複序列會與DNA結合蛋白結合(Zhu et al., 1990)。在1993年Richards從HeLa細胞核抽取液發現一個核蛋白，會專一性和p(CGG/CCG)₁₀鍵結，將此蛋白稱之為CGG結合蛋白1(CG-binding protein 1, CGG-BP 1)，然而其在易脆X染色體徵候群致病過程中，是否扮演何種角色，以及真正生理功能至今尚未被證實。

在本論文中欲進一步探討CGG-BP的特性，結果發現，以gel retardation初步分析病人與正常人白血球細胞核中的CGG-BP未具任何差異。而CGG-BP可能具有2種以上，因為在分裂中與非分裂中細胞表現不同的CGG-BP。另外本研究中發現，存在於HeLa cell的CGG-BP其native form分子量為200 kDa，且可能由70與50 kDa蛋白共同組成。lymphocyte、glioma、Hep 3B細胞株的CGG-BP與HeLa細胞株的CGG-BP具有相同的蛋白分子組成。而gingival fibroblast、H460及HUVEC細胞株的CGG-BP則由50與38 kDa蛋白組合，在UASMC細胞株則由50與31 kDa蛋白組合的CGG-BP。對於這樣的結果，推測50 kDa蛋白為不同CGG-結合蛋白之共同組成，而70、38、31 kDa蛋白則是由於組織特異性所產生不同之調節蛋白。

貳、材料和方法：

材料：

lymphocyte細胞株由中山醫學院生物科李宣佑博士提供。

gingival fibroblast細胞株由中山醫學院李天翎博士提供。

UASMC、glioma、HUVEC、H460、LZET、Hep 3B等細胞株由臺中榮民總醫院醫研部徐士蘭博士提供。

HeLa cell line由中央研究院生醫所林文昌博士提供。

方法：

一、細胞培養：

細胞株培養於含培養液(10% FBS-DMEM) 25 cm²培養瓶，將培養瓶置於37°C，及5%二氧化碳培養箱。待細胞長滿後，把培養液抽乾，以HBSS清洗細胞一次，加入0.5 ml 0.05% Trypsin-0.02% EDTA，把細胞自培養瓶洗下，再加進10 ml培養液，使細胞均勻沖散，5 ml細胞種到新的培養瓶繼續培養。

二、核抽取液製備(Schreiber et al., 1989)：

待細胞在培養瓶中長滿後，倒掉培養液，5 ml TBS (Tris buffered saline)洗細胞去除trypsin inhibitor。加入0.5 ml 0.05% Trypsin-0.02% EDTA，使細胞自培養瓶脫落後。利用10 ml TBS洗細胞，於2500 rpm離心5分鐘，去掉上清液，洗兩次，再將細胞轉移至1.5 ml離心管。讓細胞懸浮於1 ml TBS中，spin down 15秒。加入800 μ l冰涼buffer A (10 mM Tris pH 7.4; 10 mM KCl; 0.1 mM EDTA) 於細胞沉澱物，用微量吸管上下抽吸，置於冰上15分鐘。加入50 μ l 10%現配Nonidet NP-40，震盪10秒鐘，spin down 30秒。加入100 μ l冰冷buffer C (10 mM Tris pH 7.4; 0.4 M NaCl; 1 mM EDTA)於細胞沉澱物內，4°C下劇烈震盪15分鐘。在4°C下以11000 rpm離心10分鐘後取上清液，即是核抽取液，保存於-70°C。

三、primer DNA使用前處理：

人工合成primer DNA使用前，把(CGG)₁₀和(CCG)₁₀相混後。於95°C加熱5分鐘，置於室溫讓其冷卻。利用HPLC純化之，以減低雜質對DNA的影響，經過HPLC純化之後，加上0.5 M MgCl₂，使MgCl₂最後體積濃度為0.01 M，及2-2.5倍體積絕對酒精，使DNA於-20°C沉澱一個晚上。於4°C下以11000 rpm離心15分鐘後，移去上清液，以70% ethanol洗滌沉澱物，接著以11000

溶解。取2 μl DNA+1 ml H_2O 測 OD_{260} ，計算DNA濃度，其吸光值為0.047，代入下列公式 $\text{pmole/ml}=\text{OD}_{260}/0.01\times N$ ，N為nucleic acid數目， $0.047/0.01\times 60=0.078$ pmole/ml， $0.078\times 500=40$ pmole/ml即為(CGG/CCG)₁₀ DNA濃度。

四、Gel retardation：

(1) 探針(probe)製作：

將10 pmole (CGG/CCG)₁₀ oligonucleotide、5 μl 10X kinase buffer、10 μl gamma-³²P-ATP與1 μl T4 polynucleotide kinase相混合，加水至最後總體積為50 μl 。37°C水浴60分鐘，加上2 μl 0.5 M EDTA以終止kinase反應。等量phenol/chloroform萃取oligonucleotide DNA，震盪1分鐘，離心2分鐘。上清液移轉到另一新離心管，加2倍體積絕對酒精，置於-70°C下30分鐘使DNA沉澱。利用11000 rpm離心10分鐘，移除上清液，讓DNA溶解在200 μl buffer C即可，存放在-20°C。

(2) bandshift反應：

(CGG/CCG)₁₀ DNA和核蛋白結合反應(binding reaction)在總體積為15 μl buffer C中進行，取適量核抽取物和1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ salmon sperm DNA於室溫下反應10分鐘。再加50 fmole放射線標幟(CGG/CCG)₁₀，在室溫反應15分鐘之後，加入1.7 μl 10X loading buffer。以5% non-denaturing polyacrylamide gels進行電泳分析，0.5X TBE (44.5 mM Tris base, 44.5 mM boric acid, 0.01 M EDTA pH 8.8) 做為電泳緩衝液，在室溫下，以電壓90 volt進行電泳分析。乾膠後，置於X光片下曝光，在-70°C下自動顯影一晚。

(3) 5% non-denaturing polyacrylamide gels配製：

acrylamide-bisacrylamide (30:0.8)	0.825 ml
1X TBE	2.5 ml
dH ₂ O	1.425 ml
1.5% ammonium persulfate	0.25 ml
TEMED	2.5 μ l

五、Biotinylated (CGG/CCG)₁₀ binding assay :

(1) streptavidin-agarose beads使用前先混合均勻，取50 μ l，以1 ml buffer C洗滌2次。

(2) 2.5 nmole biotin-(CGG)₁₀和2.5 nmole biotin-(CCG)₁₀相混，95°C下水浴5分鐘，置於室溫下使其自行冷卻。

把步驟(1)和(2)相混，讓其於室溫下反應10-15分鐘。使用buffer C洗3次，再加入50 μ l細胞抽取液，在室溫下反應15-20分鐘後。仍以buffer C洗3次，加上20 μ l 3X SDS sample buffer，於95°C煮沸5分鐘，利用10% SDS-PAGE分析，Coomassie blue染色或銀染。

六、SDS-聚丙烯醯氨板膠電泳法(SDS-PAGE) :

10% SDS-PAGE配製 :

	resolving gel (4ml)	stacking gel (2 ml)
acrylamide-bisacrylamide (30:0.8)	1.33 ml	0.25 ml
3M Tris-HCl pH 8.8	0.25 ml	
0.5M Tris-HCl pH 6.8		0.5 ml
10%SDS	0.04 ml	0.02 ml
1.5% ammonium persulfate	0.5 ml	0.1 ml
dH ₂ O	1.63 ml	1.03 ml
TEMED	2 μ l	2 μ l

七、染色：

(1) Coomassie blue 染色：

將SDS-PAGE電泳分析之膠體浸泡染色液(Coomassie blue R 250 (0.1%) 溶於H₂O : methanol : acetic acid (5 : 5 : 2) 之混合溶劑中，以Whatman No. 1濾紙過濾)四小時以上，以去色液(30% methanol, 10% acetic acid)去色。

(2) 銀染(silver stain)：

1. 將SDS-PAGE電泳分析之膠體浸泡在200 ml Fix solution (ddH₂O 80 ml, methanol 100 ml, acetic acid 20 ml) 溶液中，緩慢晃動，室溫下約40分鐘。
2. 取出膠體以ddH₂O浸泡，每15分鐘換水一次，共需換水4次。
3. 加入硝酸銀染色液(silver stain solution) 100 ml (ddH₂O 70 ml, NaOH (0.1134 g/ml) 0.66 ml, NH₄OH 1.4 ml, AgNO₃ 0.8 g)，室溫下緩慢晃動約15分鐘。
4. 倒出硝酸銀染色液silver stain solution以ddH₂O浸泡，每15分鐘換水一次，共需換4次。
5. 加入顯影溶液(develope solution) (ddH₂O 100 ml, citric acid 0.005 g, formalin 0.1 ml)，緩慢晃動，等band出現至所需深度(density)即可。
6. 倒出develope solution，加入200 ml stop solution (ddH₂O 150 ml, methanol 60 ml, acetic acid 10 ml)。

八、陰離子交換層析法(Anion Exchanger chromatography)：

1. DEAE-52陰離子交換層析：

先packing好DEAE-52 1 ml gel的minicolumn，接著以1 M NaCl TE buffer洗管柱，再以3-5倍管柱體積TE buffer平衡管柱。把細胞核抽取液稀釋5倍通過管柱，以3-5倍管柱體積TE buffer洗管柱，再分別以0.1 M、0.15 M、0.2 M、0.25 M與0.5 M NaCl TE buffer把吸附在管柱上的蛋白沖出，每

個濃度約以5 ml沖管柱，流速為1 ml/7.5 min，每個fraction收集1 ml沖出物。利用gel retardation分析CGG-BP活性出現的fraction。

2. Mono-Q陰離子交換層析：

將Mono-Q管柱安裝於FPLC，先以1 M NaCl TE buffer洗 Mono-Q 管柱，再用TE buffer平衡，流速為1.0 ml/min。把細胞核抽取液稀釋5倍，以微量針筒注射到FPLC之injector中，先以TE buffer洗管柱，接著用20 ml 0 M至1.0 M NaCl線性梯度的TE buffer把吸附在管柱上蛋白沖出，每個fraction收集1 ml沖出物。利用gel retardation分析CGG-BP活性出現的fraction，或是進行biotinylated (CGG/CCG)₁₀ binding assay。

九、分子篩濾層析法(Gel-filtration chromatography)

將Superdex HR-200 (size 25 ml, 10-600 kDa)分子篩濾層析管柱安裝FPLC上，以兩倍管柱體積buffer C平衡，流速為0.5 ml/min。取200 µl細胞核抽取液以微量針筒注射到HPLC，收集retention time 13-32 min，總共20管，每管為0.5 ml。利用gel retardation分析CGG-BP1活性出現的時間，或是進行biotinylated (CGG/CCG)₁₀ binding assay。

參、結果：

一、CGG-BP存在於白血球細胞核抽取液中

為了要比較正常人與易脆X染色體徵候群病人的CGG-BP是否不同，首先我們欲了解在白血球細胞是否存在CGG-BP。利用 gel retardation 分析白血球細胞核抽取液中CGG-BP與(CGG/CCG)₁₀的結合，從bandshift的變化，發現有兩條band出現，表示有蛋白會與(CGG/CCG)₁₀ DNA結合(圖(一) lane 3, 箭頭1與箭頭2)。為了分辨何者為專一性結合，分別再以過量之pUC 19 plasmid與cold (CGG/CCG)₁₀ DNA做為競爭物，來進行競爭性反應。結果加了過量之pUC 19 plasmid後，可競爭掉箭頭2的band (圖(一) lane 2)，而加了過量之cold (CGG/CCG)₁₀ DNA則可競爭掉箭頭1的band (圖(一) lane 5)。證實了箭頭1所指才是專一性蛋白CGG-BP與(CGG/CCG)₁₀ DNA 結合所形成的band (圖(一) lane 2,5)。由上述實驗可知CGG-BP存在於白血球細胞核抽取液中。

二、白血球細胞的CGG-BP不會和已甲基化的(CGG/CCG)₁₀ DNA結合

因為Richards等人從HeLa細胞核抽取液中發現的CGG-BP，不會與已甲基化的(CGG/CCG)₁₀ DNA結合。所以緊接著我們欲了解在白血球細胞核抽取液中的CGG-BP是否亦具相同特性。將已被甲基化的(CGG/CCG)₁₀ DNA做為競爭物，對HeLa細胞及白血球細胞核抽取液中的CGG-BP進行競爭性反應。由結果得知，已甲基化的(CGG/CCG)₁₀ DNA會競爭掉CGG-BP與(CGG/CCG)₁₀的結合(圖(二) 比較lane 3, 7)。為了證實此結果反應確實是來自於已甲基化(CGG/CCG)₁₀ DNA的競爭，所以用*Fnu4HI* (BsoFI)來將懷疑含有未甲基化的(CGG/CCG)₁₀ DNA水解，僅留下甲基化的(CGG/CCG)₁₀ DNA，再做競爭性反應。結果顯示CGG-BP與(CGG/CCG)₁₀的結合未被競爭掉(圖(二) lane 4, 8)。由此可知，白血球細胞核抽取液中的CGG-BP與文獻發表之HeLa細胞核抽取液中之CGG-BP相同，它們不會與甲基化的

(CGG/CCG)₁₀ DNA結合。

三、易脆X染色體徵候群病人和正常人白血球細胞中CGG-BP之比較

接下來以相同的分析系統比較易脆X染色體徵候群病人與正常人白血球細胞中CGG-BP是否有差異性。從4個正常人與4個易脆X染色體徵候群病人的bandshift比較，發現其bandshift在高度上均相同(圖(三) lane 1-4, 4位正常人, lane 5-8, 4位易脆X染色體徵候群病人)。再由競爭性反應的結果知，正常人與易脆X染色體徵候群病人的bandshift均為專一性的與(CGG/CCG)₁₀ DNA結合(圖(四))。所以從gel retardation的分析可知，病人和正常人CGG-BP無特別的差異。

接下來比較易脆X染色體徵候群病人與正常人的淋巴球細胞株以及白血球細胞的CGG-BP，結果發現，病人與正常人的淋巴球細胞株之CGG-BP在bandshift的高度上均相同，但卻高於白血球細胞的CGG-BP(圖(五) lane 1, 3)。由此，使我們懷疑淋巴球細胞株和白血球細胞所表現之CGG-BP是否不同，還是由於淋巴球細胞受到EBV (Epstein-Barr virus)轉型成為細胞株，使的CGG-BP的表現發生改變。

四、在各種不同人類細胞株CGG-BP比較

為了排除上述之不同性是來自於淋巴球細胞受到EBV轉型所造成，所以我們比較一些其他人類之非EBV轉型細胞株，計有肝癌細胞、肺癌細胞、腸胃道癌細胞、非轉形細胞等細胞株的CGG-BP。結果顯示癌細胞株的細胞同於淋巴球細胞株所表現的，(圖(六) lane 1-5分別為LZET, Hep3B, Hep 3B(Bcl), Hep 3B(v-ras 15), H460等癌細胞株, lane 6為淋巴球細胞株)。gingival fibroblast是初級培養細胞，屬非轉形細胞株，將之CGG-BP與淋巴球細胞株做比較，則皆有一致bandshift (圖(六)比較lane 9 gingival fibroblast, lane 6淋巴球細胞株)。似乎可以推測CGG-BP表現的不同性不是來自於EBV

將淋巴球細胞轉形為細胞株所造成，而是細胞株本質上就表現如此的蛋白。

為了分辨是否因分裂中與非分裂中細胞的因素，而造成上述不一致的CGG-BP。我們分析了白血球細胞和人類乳房組織細胞的CGG-BP與(CGG/CCG)₁₀結合的band。結果顯示它們的CGG-BP與(CGG/CCG)₁₀結合的band是一致的，並且band表現的高度低於各式細胞株表現的band(圖(六)lane 10 為leukocyte, lane 11為breast tissue)。由於白血球細胞和人類乳房組織細胞均處於停止細胞分裂時期且是已分化完全的細胞，因此猜測具有分裂中細胞與非分裂中細胞會表現不同的CGG-BP，而且可能是兩種不同的CGG-BP。

由於FMR1之基因表現具組織專一性，在腦細胞及睪丸細胞中被發現大量表現，且主要在神經細胞。而Richards等人當初之所以決定HeLa細胞作為研究對象，進而從中發現CGG-BP，是因為以RT-PCR分析HeLa細胞的FMR1基因，發現有FMR1的mRNA表現。因此我們將神經瘤細胞和HeLa細胞的CGG-BP與(CGG/CCG)₁₀ DNA結合形成的band和其它細胞株做比較。結果發現，神經瘤細胞和HeLa細胞的CGG-BP在反應後表現的band相似於細胞株的，但不似白血球細胞和人類乳房組織細胞的band(圖(六)lane 7, 8比較lane 1-5, 10, 11)。

對於分裂中細胞與非分裂中細胞產生不同CGG-BP的結果，讓我們聯想到FMR1基因上(CGG/CCG)_n的倍增可能發生在DNA進行複製時，正是細胞處在cell cycle的S期。因此對分裂中細胞的CGG-BP做研究意義大於對非分裂中細胞的CGG-BP。

五、血癌患者血球細胞中CGG-BP bandshift

基於以上實驗結果使我們聯想到血癌患者之血球細胞，因為它們是癌細胞且未分化完全的細胞，讓我們好奇其CGG-BP與(CGG/CCG)₁₀ DNA結

合形成的band如何。因此自臺北榮總醫院獲得血癌患者血液後，進行gel retardation分析，結果令人興奮的發現，兩個血癌病人中，有一人的bandshift與細胞株是一樣的(圖(七) lane 1, 2)，另一病人bandshift則相似於白血球細胞表現的(圖(七) lane 3, 4)。因此懷疑癌症細胞會表現與細胞株一致的CGG-BP，然而因血癌患者血液得之不易，以及臺北榮總提供意願不高，因此阻礙這方面進一步求證及探討。

六、利用gel filtration初步瞭解CGG-BP native form的分子量

由於神經瘤細胞和HeLa細胞的CGG-BP在反應後表現的bandshift相似，而神經瘤細胞株培養不易，所以我們選擇HeLa細胞株之CGG-BP做為分子組成研究之來源。把HeLa細胞製成的粗核抽取液通過gel filtration後，將所收集的fraction以gel retardation分析CGG-BP的活性，結果發現在fraction 21出現CGG-BP活性(圖(八) B)，將之與標準分子量Marker曲線圖作比對(圖(八) A)，結果發現，CGG-BP的native form分子量約為200 kDa。

七、利用biotinylated (CGG/CCG)₁₀ binding assay進一步

為了瞭解CGG-BP之分子組成，我們設計了一段biotinylated (CGG/CCG)₁₀ DNA，當CGG-BP結合到biotinylated (CGG/CCG)₁₀ DNA後，利用streptavidine-agarose beads會和biotin專一性結合的關係，便可直接將CGG-BP純化出，接著再以SDS-PAGE來分析此蛋白之分子組成。當只讓streptavidine-agarose beads與細胞核抽取液進行反應時，只觀察到一些微弱的band(圖(九) A, lane 2)。在沒有加上細胞核抽取液，只有biotinylated (CGG/CCG)₁₀ DNA和streptavidine-agarose beads進行反應，則沒有觀察到任何band(圖(九) A, lane 4)，表示biotin和streptavidine不會干擾此系統的分析。在細胞核抽取液和biotinylated (CGG/CCG)₁₀ DNA及streptavidine-agarose beads同時出現時，結果出現3條顯而易見的band，估計其分子量分

別為70、58、50 kDa，然而58 kDa表現強度不及70與50 kDa(圖(九) A, lane 3)。

為了證明70及50 kDa蛋白的出現，是因為和biotinylated (CGG/CCG)₁₀ DNA 專一性結合的結果，所以選用不同的DNA取代biotinylated (CGG/CCG)₁₀ DNA作比較。結果發現，使用biotinylated ss-(CGG)₁₀ DNA與biotinylated ss-(CCG)₁₀ DNA皆沒有觀察到任何的band(圖(九) B, lane 2, 3)，意味著沒有任何蛋白與這兩條單鏈DNA結合。當以poly-Guanylic agarose beads作取代時，結果觀察到一些band，表示poly-Guanylic agarose beads與一些未知蛋白進行非專一性結合(圖(九) B, lane 4)。為了加強70與50 kDa蛋白出現的真實性，我們將上述通過gel filtration，證明有CGG-BP活性反應的fraction 21，進行Biotinylated (CGG/CCG)₁₀ binding assay，結果仍出現了70和50 kDa蛋白(圖(九) B, lane 5)。因此將此結果，配合gel filtration的200 kDa結果，似乎可以初步認為CGG-BP可能由70和50 kDa蛋白共同組成。

八、利用Mono Q分析CGG-BP的分子組成

為了更進一步確定CGG-BP可能由70、50 kDa蛋白共同組成，我們將HeLa細胞核粗抽取液通過Mono Q後，以0-1.0 M NaCl線性梯度的Tris buffer 20 ml將吸附在管柱上的蛋白沖出，把收集的fraction亦利用gel retardation分析CGG-BP可能出現的fraction。結果在fraction 11和12出現CGG-BP反應(圖(十) lane 2, 3)，再將它們進行biotinylated (CGG/CCG)₁₀ binding assay，結果二個fraction皆同時出現70、50 kDa的蛋白(圖(十) lane 5, 6)。由此似乎更可確定CGG-BP是由70與50 kDa的蛋白共同組成，這是因為CGG-BP在兩種性質不同的層析管柱分析後，仍能共同出現70與50 kDa的蛋白，表示極有可能70與50 kDa的蛋白彼此在形成複合體情況下，才會共同出現在gel filtration及Mono Q的結果。至於lane 5出現一些70與50 kDa以外的蛋白，可能是操做過程沒有洗乾淨。

九、在biotinylated (CGG/CCG)₁₀ binding assay分析系統比較不同細胞株CGG-BP分子組成

根據上述結果，biotinylated (CGG/CCG)₁₀ binding assay是可用以分析其它的細胞株中CGG-BP蛋白分子組成。比較了lymphocyte、glioma、Hep 3B等細胞株的CGG-BP組成，它們均和HeLa細胞的CGG-BP一致，同時出現70、50 kDa的蛋白(圖(十一) A, lane 1-3, 圖(十一) C, lane 2)。而令人感到有趣的發現是，gingival fibroblast與H460及HUVEC出現50、38 kDa的蛋白組成(圖(十一) B, lane 1-2, 圖(十一) C, lane 3)。UASMC則呈現50、31 kDa蛋白(圖(十一) C, lane 4)。綜合以上結果，50 kDa的蛋白可能是所有細胞株所共有的，包括癌細胞株跟轉形細胞株與非轉形細胞株，且癌細胞株跟轉形細胞株CGG-BP似乎較偏向70、50 kDa的蛋白組合，雖然H460肺癌細胞株例外，而非轉形細胞株CGG-BP除了50與38 kDa組合外還有50跟31 kDa。以此蛋白不同組合的層面觀來，似乎可以肯定CGG-BP的組成有兩種以上，或是還有其它兩種以上不同的CGG-BP。

十、白血球細胞內CGG-BP在DEAE-52陰離子交換層析可用0.25 N NaCl TE buffer沖出

實驗初期預定的目標是希望從白血球細胞核抽取物中將CGG-BP純化出，進而對之做研究。所以取自新鮮血液的buffy coat層製備成核抽取液，通過DEAE-52 chromatography，用含有0.25 N NaCl TE buffer沖掉吸附在管柱上蛋白，利用gel retardation分析CGG-BP活性。結果發現在0.25 N NaCl沖出的fraction中有蛋白具有與(CGG/CCG)₁₀結合的活性(圖(十二) lane 7, 8 箭頭1)，但比原液多出一條band (圖(十二) lane 8, 9 箭頭3)，在flow through亦出現一條band (圖(十二) lane 5, 6箭頭2)。藉由競爭性反應試驗證明(圖(十三))在(圖十二)中箭頭2與箭頭3所指的band為非專一性結合。

十一、HeLa細胞的CGG-BP在DEAE-52陰離子交換層析可用0.25 N NaCl TE buffer沖出

由於配合實驗進展變化，後來的純化目標放在HeLa細胞內CGG-BP。而經由白血球細胞內CGG-BP在DEAE-52層析結果，猜測HeLa細胞的CGG-BP在DEAE-52層析有可能亦會在0.25 N NaCl TE buffer沖出，結果顯示，0.25 N NaCl TE buffer以step by step方式可以將CGG-BP沖出(圖(十四), lane 6-8)。所以在DEAE-52分析下，認為白血球細胞內CGG-BP和HeLa細胞內CGG-BP有相似的物理特性。



肆、討論：

從本實驗中，首先利用 gel retardation 方法比對易脆 X 染色體徵候群病人及正常人的白血球細胞核抽取液中的 CGG-BP，同時比較病人及正常人的淋巴球細胞株細胞核抽取液的 CGG-BP。由 bandshift 實驗結果看來，易脆 X 染色體徵候群病人及正常人的 CGG-BP 並無異差，可能的原因是 gel retardation 分析的解析度不夠，不足以分辨二者差異，或者是易脆 X 染色體徵候群病人及正常人的 CGG-BP 是正常的。

以 gel retardation 對人類細胞株和白血球及乳房組織細胞的 CGG-BP 進行分析，發現在細胞株和白血球及乳房組織細胞於 bandshift 的高度上有明顯的差異，細胞株的 bandshift 高於白血球及乳房組織細胞。此二者細胞之所以不同的原因，可能在於細胞株是正分裂中細胞，而白血球及乳房組織細胞是非分裂且已是分化完全的細胞，由此似乎意味著分裂中與非分裂中細胞可能有不同的 CGG-BP。如果這個推測是正確的，這二種 CGG-BP 之間的關係，可能是 (1) 來自相同基因產物，但彼此進行了不同的轉譯後修飾。(2) 相同基因產物，因不同細胞階段需要，彼此和不同蛋白做交互作用，(3) 或者是基因進行不同的剪裁 (splicing)，產生不同蛋白。(4) 來自不相同基因產物，完全兩種不相同的蛋白。因細胞株處於分裂中，此時出現在細胞株的 binding protein，可能是因應細胞分裂時所需的蛋白。不同於存在白血球及乳房組織細胞的 binding protein。

在圖(二)白血球細胞的 CGG-BP 不會和已甲基化的 (CGG/CCG)₁₀ DNA 結合的實驗中，由結果看來，白血球細胞的 CGG-BP 的確不會與已甲基化的 (CGG/CCG)₁₀ DNA 結合。然而仍有一爭議之處，是當初設計實驗時無周詳考量到，即是未事先確定 (CGG/CCG)₁₀ DNA 是否已完全甲基化，因此產生圖(二) lane 3、4、7、8 的結果，或許是來自於 CGG-BP 和未甲基化

(CGG/CCG)₁₀ DNA的結合。故為了慎重起見，此實驗需要再次重做，並事先確定(CGG/CCG)₁₀ DNA是否已完全甲基化。

從HeLa細胞株核抽取液在gel filtration分析的結果，發現CGG-BP的native form可能是200 kDa。配合biotinylated (CGG/CCG)₁₀ affinity binding assay方法，在SDS-PAGE分析後，出現50和70 kDa蛋白，猜測CGG-BP可能是一個複合體結合蛋白，且由50和70 kDa所共同組成。Aharoni等人(1993)最近發現一個會專一性與ss-d(GA)_n及d(GT)_n結合的DNA結合蛋白，經由glycerol gradient centrifugation分析其分子量，發現此蛋白分子量為190 kDa，UV cross-linking實驗證明只有33.6 kDa蛋白會與d(GA)_n及d(GT)_n結合。Yano-Yanagisawa等人(1995)自老鼠腦細胞純化出一個ss-DNA結合蛋白，其會辨認ss-(AGC)_n、(AGT)_n、(GGC)_n、(GGT)_n，但是不會和(GAC)_n、(AAC)_n、(AAT)_n及ds-(AGC/GCT)_n等DNA結合。這個蛋白是由兩個蛋白組成，分別為TRIP-1(44kDa)與TRIP-2(40kDa)。歸納上述的研究，讓我們聯想到會與dinucleotide和trinucleotide的DNA結合蛋白，至少是由兩個蛋白分子組成，其中一個組成蛋白可能會直接和DNA結合，另一個組成蛋白則會和DNA蛋白複合體結合，或者與DNA結合，加強專一性DNA蛋白複合體的穩定性。

在本實驗所研究的細胞株中，除了發現HeLa細胞株的CGG-BP有50與70 kDa組合模式外，lymphocyte、glioma、Hep 3B具有與HeLa細胞株的CGG-BP相同的蛋白分子組成。而gingival fibroblast、H460及HUVEC細胞株則由50與38 kDa蛋白組合。而在UASMC細胞株是由50與31 kDa蛋白組合的CGG-BP。這樣的結果使我們懷疑，這些不同的結合蛋白是因為具組織特異性，造成不同細胞株產生不同的CGG-BP。而50 kDa蛋白在所有被實驗細胞株皆共同出現，所以認為此蛋白與ds-(CGG/CCG)_n DNA的結合扮演重

要角色功能。而組織專一性蛋白(70, 31, 38 kDa)會調節CGG-BP對ds-(CGG/CCG)_n結合的專一性。

對於以上的實驗結果，或許仍有待把CGG-BP純化出後，對其做進一步研究，才能完全肯定此蛋白是一個複合體的組成，以及真正的組成成份。進而從基因的選殖到製成抗體後，利用免疫方法，方可分辨CGG-BP是否具有組織特異性。但是，Deissler等人(1996)已先從HeLa細胞核抽取液純化出一個會與ds-(CGG)₁₇專一性結合的核蛋白，他們發現此蛋白的分子量為20 kDa，這與我們發現的CGG-BP大大相異。然而Deissler等人的實驗反應條件及使用的(CGG)_n DNA重複次數與我們皆不盡相同，而且根據我們對此實驗的經驗，發現鹽濃度的差異，也會影響細胞核抽取液中的核蛋白與(CGG/CCG)₁₀ DNA結合。或許是諸多因素的結果，使的我們的實驗結果與Deissler等人的結果不同，也或許意味著同時有二種以上CGG-BP存在，而此些猜測則就有待進一步求證。

目前對FMR1基因上(CGG/CCG)_n重複序列遽增的假說有二個，(1)在細胞分裂時，因不平等互換(unequal cross over)造成(CGG)的遽增(Oberle, 1991)(附圖三(A))，假設雖然合理，但未經相關的實驗證明，且對於帶因者由200次(CGG/CCG)_n重複序列致使其子代(CGG/CCG)_n重複序列突變成1000次以上，似乎不易解釋(Ross et al., 1993)，同時隨著在易脆X染色體徵候群病人中發現了創立者染色體，因此對此假說已漸不支持。所以目前較傾向第二個理論，就是滑動(slipping)理論(Kunkel, 1993)(附圖三(B))，即在DNA複製時其primer或template strand形成二級結構，若發生於primer而未被修復，則會延長合成的DNA，若發生於template strand而未被修復，則會縮短合成的DNA。現已有實驗證明在in vitro中，以*E. coli*的polymerase與short primers作用，引起di-和trinucleotide重複序列的遽增。同時在in vivo實驗，當(CTG)_n的leading strand產生二級結構，會讓CTG重複序列增加，若

二級結構發生在lagging strand，會讓CTG重複序列減短(Kang et al., 1995)。近來已發現trinucleotide repeat會形成二級結構(Gacy et al., 1995)，而DNA strand slippage與二級結構有關，似乎說明trinucleotide重複序列的增加可能與滑動理論有關，但以上二個實驗均在原核生物系統下進行，不能完全應用在真核細胞，因此仍有待進一步發現。不過，若滑動理論假說成立，不禁令人聯想，當trinucleotide repeat形成二級結構時，則CGG-BP是否會結合到二級結構，而加速trinucleotide重複序列遽增或是抑制作用，也或許在此過程不具任何作用。雖然至今仍少有文獻報告(CGG/CCG) n 重複序列遽增因素可能來自trans-acting作用，即主要來自蛋白影響。雖如此，仍不能否認CGG-BP存在的意義，或許具有未被發現的功能，而這就有待更進一步的探索。

五、參考文獻：

- Abitbol, M., Menini, C., Delezoide, A. L., Rhyner, T., Vekemans, M., and Mallet, J. (1993). Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are theand major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nature Genet.* **4**, 147-153.
- Aharoni, A., Baran, N., and Manor, H. (1993). Characterization of a multisubunit human protein which selectively binds single stranded d(GA)_n sequence repeats in DNA. *Nucl. Acids Res.* **21**, 5221-5228.
- Ashley, C. T., Jr., Wilkinson, K. D., Reines, D., and Warren, S. T. (1993). FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* **262**, 563-566.
- Bachner, D., Manca, A., Steinbach, P., Wohrle, D., Just, W., Vogel, W., Hameister, H., and Poustka, A. (1993). Enhanced expression of the murine FMR1 gene during germ cell proliferation suggests a special function in both the male and female gonad. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 2043-2050.
- Bell, M. V., Hirst, M. C., Nakahori, Y., Mackinnon, R. N., Roche, A., Flint, T. J., Jacoba, P. A., Tommerup, N., Tranebjaerg, L., Froster-Iskenius, U., Kerr, B., Turner, G., Lindenbaum, R. H., Winter, R., Pembrey, M., Thibodeau, S., and Davies, K. E. (1991). Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell* **64**, 861-866.
- Brown W. T., and Jenkins, E. C. (1992). The fragile X syndrome. *Mol. Genet. Med.* **2**, 39-66.
- De Boulle, K., Verkerk, A. J. M. H., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Van Roy, B., VanDenBos, F., de Graaff, E., Oostra, B. A., and Willems, P. J. A. (1993). Point mutation in the *FMR-1* gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genet.* **3**, 31-35.
- Deissler, H., Behn-Krappa, A., and Doerfler W. (1996). Purification of nuclear proteins from human HeLa cells that binds specifically to the unstable tandem repeat (CGG)_n in the human FMR1 gene. *J. Biol. Chem.* **271**, 4327-4334.
- Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Bellocq, J. P., and Mandel, J. L. (1993). The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. (1993). *Nature Genet.* **4**, 335-340.
- Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Pinol-Roma, S., and Burd, C. G. (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Ann. Rev. Biochem.* **62**, 289-321.
- Eichler, E. E., Kunst, C. B., Lugenbeel, K. A., Ryder, O. A., Davison, D., Warren, S. T., and Nelson, D. L. (1995). Evolution of the cryptic FMR1 CGG repeat. *Nature*

Genet. **11**, 301-308.

Eichler, E. E., Holden, J. J. A., Popovich, B. W., Reiss, A. L., Snow, K., Thibodeau S. N., Richards, C. S., Ward, P. A., and Nelson, D. L. (1994). Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nature Genet.* **8**, 88-94.

Fu, Y-H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Verkerk, A. J. M. H., Holden, J. J. A., Fenwick, R. G., Jr., Warren, S. T., Oostra, B. A., Nelson, D. L., and Caskey, C. T. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* **67**, 1047-1058.

Gacy, A. M., Goellner, G., Juranic, N., Macure, S., and McMurray, C. T. (1995). Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro. *Cell* **81**, 533-540.

Gedeon, A.K., Baker, E., Robinson, H., Partington, M. W., Gross, B., Manca, A., Korn, B., Poustka, A., Yu, S., Sutherland, G. R., and Mulley, J.C. (1992) Fragile-X syndrome without CGG amplification has an FMR1 deletion. *Nature Genet.* **1**, 341-344.

Gustavson, G., Bloomquist, H. K., and Holmgren, G. (1986). Prevalence of the fragile-X syndrome in mentally retarded children in a Swedish county. *Am. J. Med. Genet.* **20**, 280-285.

Hansen, R. S., Gartler, S. M., Scott, C. R., Chen, S-H., and Laird, C. D. (1992). Methylation analysis of CGG sites in the CpG island of the human FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 571-578.

Hansen, R. S., Canfield, T. K., Lamb, M. M., Gartler, S. G. and Laird, C. D. (1993). Association of fragile X syndrome with delayed replication of the FMR1 gene. *Cell* **73**, 1403-1409.

Harley, H. G., Brook, J. D., Rundle, S. A., Crow, S., Reardon, W., Buckler, A. J., Harper, P. S., Housman D. E., and Shaw, D. J. (1992). Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* **355**, 545-546.

Harrison, C.J., Jack, E. M., Allen, T. D. and Harris, R. (1983). The fragile X: a scanning electron microscope study. *J. Med. Genet.* **20**, 280-285.

Heitz, D., Rousseau, R., Devys, D., Saccone, S., Abderrahim, H., LePaslier, D., Cohen, D., Vincent, A., Toniolo, D., Della, V. G., Johnson, S., Schlessinger, d., Oberle, I., and Mandel, J. L. (1991). Isolation of sequences that span the fragile X and identification of a fragile X-related CpG island. *Science* **251**, 1236-1239.

Hinds, H. L., Ashley, C. T., Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Warren, S. T., Housman, D. E., and Schalling, M. (1993). Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nature Genet.* **3**, 36-43.

Homstra, I. K., Nelson, D. L., Warren, S. T., and Yang, T. P., (1993). High resolution methylation analysis of the FMR1 gene trinucleotide repeat region in fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 1659-1665.

Kang, S., Jaworski, A., Ohshima, K., and Wells, R. D. (1995). Expansion and deletion of CTG repeats from human disease genes are determined by the direction of replication in *E. coli*. *Nature Genet.* **10**, 212-218.

Kiledjian, M., and Dreyfuss, G. (1992). Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J.* **11**, 2655-2664.

Kremer, E., J., Pritchard, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Warren, S. T., Schlessinger, D., Sutherland, G. R., and Richards, R. I. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science* **252**, 1711-1714.

Kunkel, T. A. (1993). Slippery DNA and diseases. *Nature* **365**, 207-208.

Kunst, C. B. and Warren, S. T. (1994). Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell* **77**, 853-861.

Mandel J-L. (1994). Trinucleotide diseases on the rise. *Nature Genet.* **7** 453-455.

Martin, J. P., Bell, J. (1943). A pedigree of menyal defect showing sex-linkage. *J. Neurol. Psych.* **6**, 154-157.

McConkie-Rosell, A., Lachiewicz, A. M., Spiridigliozzi, G. A., Tarleton, J., Schoenwald, S., Phelan, M. C., Goonewardena, P., Ding, X., and Brown, W. T. (1993). Evidence that methylation of the FMR-1 locus is responsible for variable phenotypic expression of the fragile X syndrome. *AM. J. Hum. Genet.* **53**, 800-809.

Meijer, H., de Graaff, E., Merckx, D. M. L., Jongbloed, R. J. E., de Die-Smulders C. E. M., Engelen, J. J. M., Fryns, J-P., Curfs, P. M. G., and Oostra B. A. (1994). A deletion of 1.6 kb proximal to the CCG repeat of the FMR1 gene cause the clinical phenotype of the fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 615-620.

Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boue, J., Bertheas, M. F. and Mandel, J. L. (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* **252**, 1097-1102.

Pieretti, M., Zhang, F., Fu, Y.-H., Warren, S. T. Oostra, B. A., Caskey, C. T., and Nelson, D. L. (1991). Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* **66**, 817-822.

Richards, R.I., Holman, K., Friend, K., Kremer, E., Hillen, D., Staples, A., Brown, W.

- T., Goonewardena, P. Tarleton, J., Schwartz, C., and Sutherland, G. R. (1992). Evidence of founder chromosomes in fragile X syndrome. *Nature Genet.* **1** 257-260.
- Richards, R. I., and Sutherland, G. R. (1992a). Dynamic mutation: a new class of mutations causing human disease. *Cell* **70**, 709-712.
- Richards, R.I., and Sutherland, G. R. (1992b). Heritable unstable DNA sequences. *Nature Genet.* **1**, 7-9.
- Richards, R. I., Holman, K., Yu, S. and Sutherland, G. R. (1993). Fragile X syndrome unstable element, p(CCG), and other simple tandem repeat sequences are binding sites for specific nuclear proteins. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 1429-1435.
- Ross, C. A., McInnis, M. G., Margolis, R. L., and Li, S-H. (1993). Genes with triplet repeat: candidate mediators of neuropsychiatric disorders. *TINS.* **7**, 254-260.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller M. M., and Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with mini-extracts, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419.
- Siomi, H., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L., and Dreyfuss G. (1993). The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. (1993). *Cell* **74**, 291-298.
- Siomi, H., Choi, M., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L., and Dreyfuss G. (1994). Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that cause fragile X syndrome. *Cell* **77**, 33-39.
- Strand, M., Polla, T. A., Liskay, R. M., and Petes, T. D. (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* **365**, 274-276.
- Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Zhang, F., Pieretti, M., Caskey, C.Y., Saxc, D., Warren, S. T. (1992). DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 397-400.
- Sutherland, G. R. (1987). Fragile sites on human chromosome: Demonstration of their dependence to the type of tissue culture medium. *Science* **197**, 265-266.
- Turner, G., Daniel, A., and Forst M. (1980). X-linked mental retardation, macroorchidism and the Xq27 fragile site. *J. Pediatr.* **96**, 837-841.
- Turner, G., Webb, T., Wake, S. and Robinson, H. The prevalence of the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* (in press)
- Verheij, C., Bakker, C. E., de-Graaff, E., Keulemans, J., Willemsen, R., Verkerk, A. J.,

Galjaard, H., Reuser, Hoogeveen, A. T., and Oostra, B. A. (1993). Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* **363**, 722-724.

Verkerk, A. J. M. H., de Graaff, E., De Boulle, K., Eichler, E. E., Konecki, D. S., Reyniers, E., Manca, A., Poustka, A., Willems, P. J., Nelson, D. L., and Oostra, B. A. (1993). Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 399-404.

Verkerk, A. J. M. H., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y.-H., Kuhl, D. P. A., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F., Zhang, F., Euessen, B. E., van Ommen, G.-J. B., Blonden, L. A. J. Riggins, G. J., Chastain, J. L., Kunst, C. B., Galjaard, H., Casjey, C. T., Nelson, D. L., Oostra, B. A., and Warren, S. T. (1991). Identification of a gene (FMR1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65**, 905-91.

Vincent, A., Heitz, D., Petit, C., Kretz, C., Oberle, I., and Mandel J. L. (1991). Abnormal pattern detected in fragile-X patients by pulsed-field gel electrophoresis. *Nature* **349**, 624-626.

Webb, T., Bunday, S., Thake, J., and Todd, A. (1986). The frequency of the fragile X chromosome among schoolchildren in Coventry. *J. Med. Genet.* **23**, 396-399.

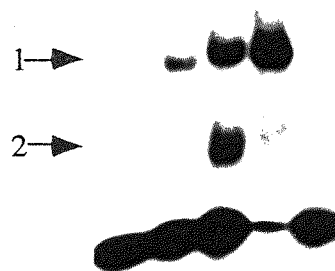
Wohrle, D., Kotzot, D., Hirst, M.C., Manca, A., Korn, B., Schmidt, A., Barbi, G., Rott, H. D., Poustka, A., Davies, K. E., and Steinbach. P. (1992). Amicrodeletion of less than 250 kb, including the proximal part of the FMR-1 gene and the fragile-X-site, in a male with the clinical phenotype of fragile-X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **51**, 299-306.

Yano-Yanagisawa, H., Li, Y., Wang, H., and Kohwi, Y. (1995). Single-stranded DNA binding proteins isolated from mouse brain recognize specific trinucleotide repeat sequences in vitro. *Nucleic acids Res.* **23**, 2654-2660.

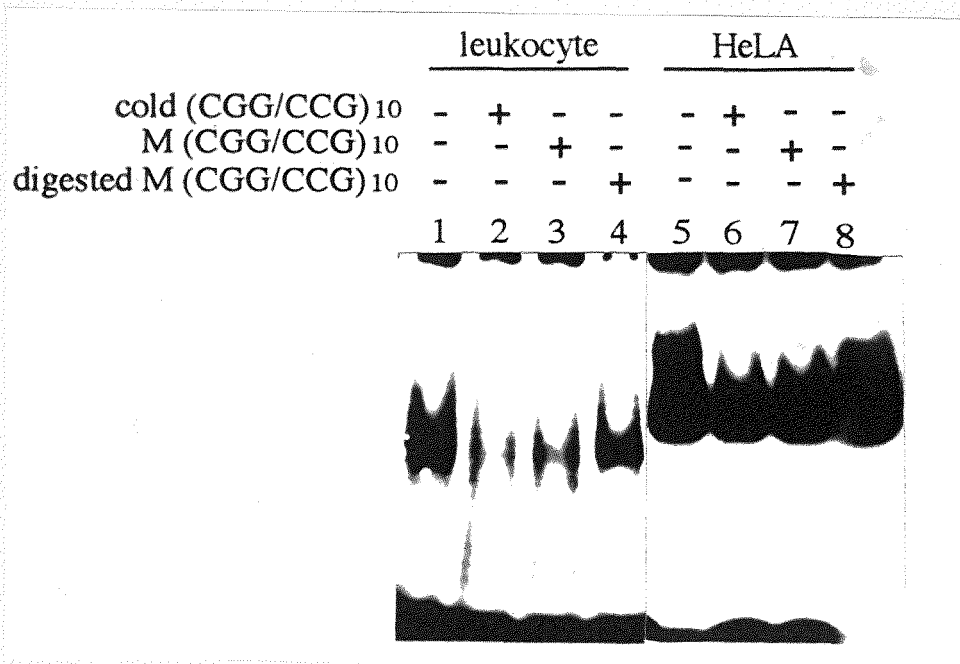
Zhong, N., Yang, W., Dobkin, C., and Brown, W. T. (1995). Fragile X gene instability: anchoring AGGs and linked microsatellites. *Am. J. Hum. Genet.* **57**, 351-36.

Zhu, Q.-S., Heisterkamp, N., and Groffen, J. (1990). Unique organization of the human BCR gene promoter. *Nucl. Acids Res.* **18**, 7119-7125.

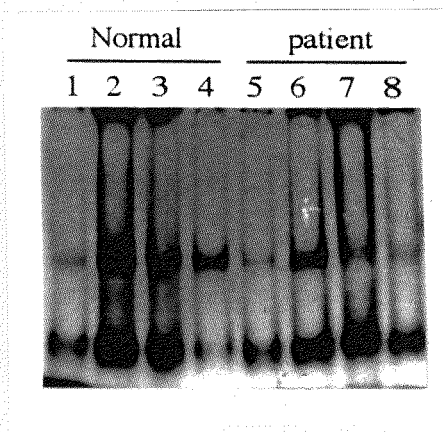
NE(μ l)	-	4	4	15	15
competitor	-	pUC	-	-	cold
	1	2	3	4	5



圖(一)、CGG-BP存在於白血球細胞核抽取液中。利用 gel retardation 方法， 32 P(CGG/CCG) $_{10}$ 做為 probe，進行競爭性反應。lane 1. 沒有加細胞核抽取液，lane 2、3 加 4 μ l 細胞核抽取液，但 lane 2 另含過量 pUC 19 plasmid 做為競爭物，lane 4、5 加 15 μ l 細胞核抽取液，但 lane 5 加入過量 cold (CGG/CCG) $_{10}$ 做為競爭物。

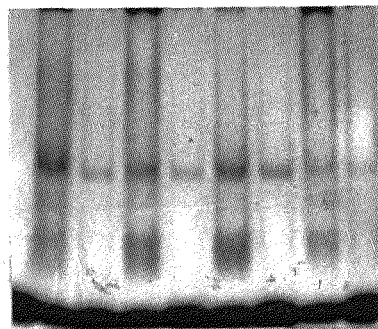


圖(二)、以 gel retardation 分析白血球細胞的 CGG-BP 和已甲基化的 (CGG/CCG)₁₀ DNA 結合反應。DNA 結合反應同圖(一)，lane 1-4 為白血球細胞核抽取液，lane 5-8 為 HeLa 細胞核抽取液。競爭物為 cold (CGG/CCG)₁₀、methyl-(CGG/CCG)₁₀、*Fun4*HI digest methyl-(CGG/CCG)₁₀。"+" 表示有，"-" 表示無。

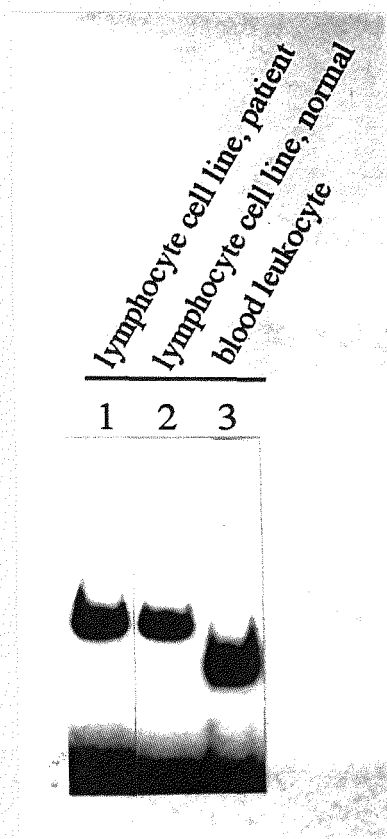


圖(三)、以 gel retardation 分析病人和正常人白血球細胞中 CGG-BP-DNA 結合反應同圖(一) lane 1-4 為 4 個正常人, lane 5-8 為 4 個有 fragile X site 的易脆 X 染色體徵候群病人, 各取 10 μ l 白血球細胞核抽取液進行 gel retardation 反應。

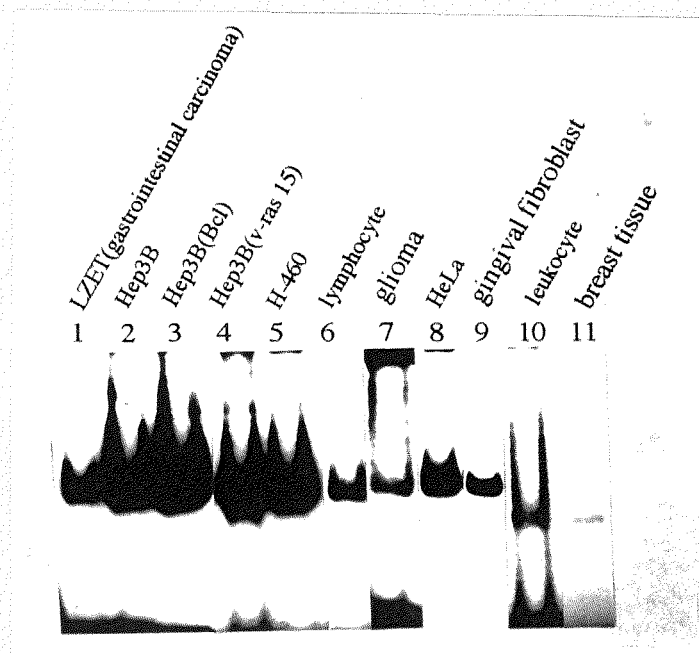
	Normal				Patient			
pUC	-	+	-	+	-	+	-	+
	1	2	3	4	5	6	7	8



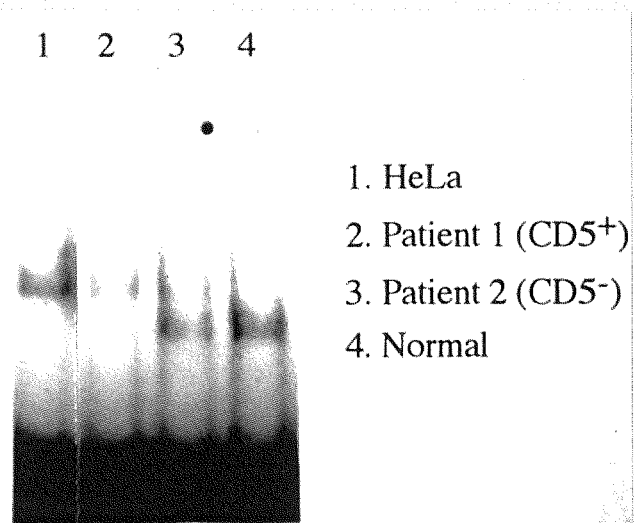
圖(四)、以 gel retardation 進行競爭性反應，比較正常人與易脆X染色體徵候群病人的 CGG-BP。DNA 結合反應同圖(一)，取 15 μ l 白血細胞核抽取液，加入過量 pUC 19 plasmid 當做競爭物，進行競爭反應。lane 1-4 分別是正常人的白血球細胞核抽取液，lane 5-8 分別是易脆X染色體徵候群病人的白血球細胞核抽取液。lane 2、4、6、8 加入過量 pUC 19 plasmid 做為競爭物。



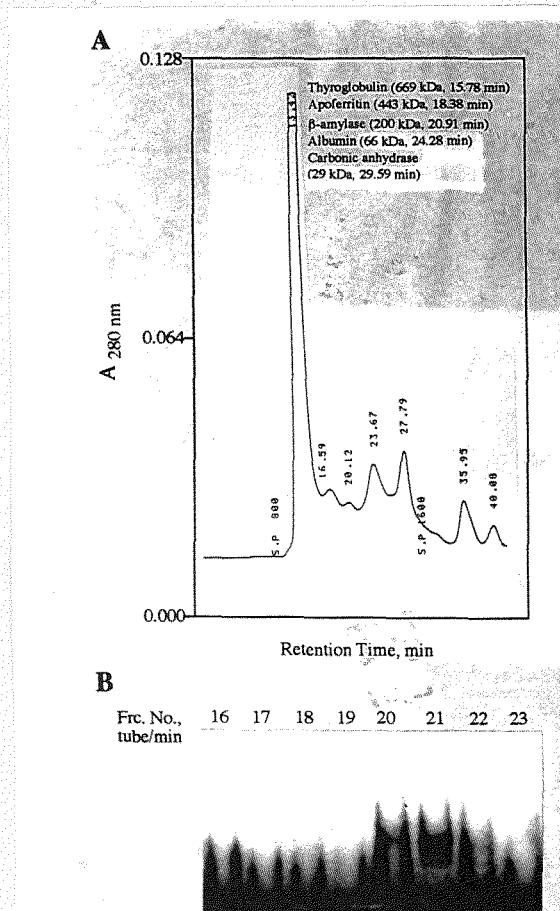
圖(五)、以 gel retardation 分析正常人與 fragile X syndrome 病人的淋巴球細胞株細胞核抽取液 CGG-BP。DNA 結合反應同圖(一)，lane 1 為易脆 X 染色體徵候群病人淋巴球細胞株，lane 2 為正常人淋巴球細胞株，lane 3 為正常人白血球細胞。取淋巴球細胞株細胞核抽取液 10 μ l，白血球細胞核抽取液 10 μ l，加入 0.1 μ g salmon sperm DNA 進行競爭性反應。



圖(六)、比較不同人類細胞株CGG-BP。gel retardation方法分析下列細胞株的細胞核抽取液，DNA結合反應同圖(一)。lane 1為LZET (gastrointestinal carcinoma)，lane 2為Hep 3B，lane 3為Hep 3B(Bcl)，lane 4為Hep 3B(v-ras 15)，lane 5為H460，lane 6為lymphocyte，lane 7為glioma，lane 8為HeLa，lane 9為gingival fibroblast，lane 10為leukocyte，lane 11為breast tissue。lane 1-9取10 μ l細胞核抽取物，lane 10-11取15 μ l細胞核抽取物。加入0.1 μ g salmon sperm DNA以gel retardation方法進行競爭性反應。

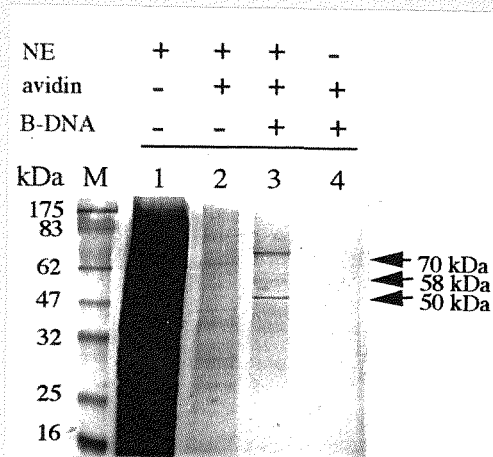


圖(七)、比較血癌患者血球細胞中CGG-BP。DNA結合反應同圖(一)，lane 1為HeLa細胞，lane 2為leukamia病人(1)白血球細胞，lane 3為leukamia病人(2)白血球細胞，lane 4為正常人白血球細胞。分別取細胞核抽取液，lane 1取10 μ l，lane 2-3取13 μ l，lane 4取15 μ l。以0.1 μ g salmon sperm DNA做競爭物，進行gel retardation反應。

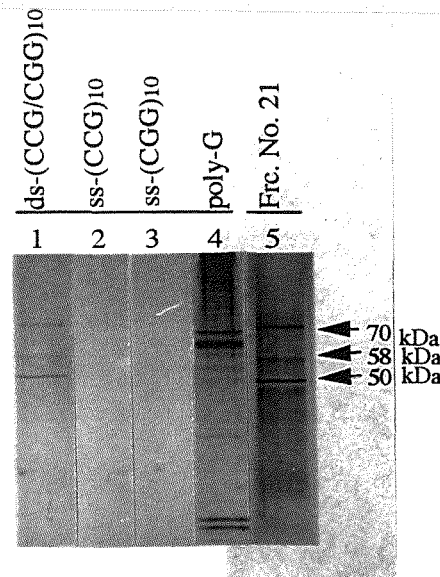


圖(八)、以 gel filtration 層析分析 HeLa 細胞核抽取液之 CGG-BP。以 HPLC Superdex HR-200 column 以 buffer C 做為平衡液，分析 HeLa 細胞核抽取物，利用 280 nm 測吸光值。(A) 標準分子量曲線圖：Thyroglobulin (669 kDa, 15.78 min)、Apoferritin (443 kDa, 18.38 min)、β-amylase (200 kDa, 20.91 min)、Albumin (66 kDa, 24.28 min)、Carbonic Anhydrase (29 kDa, 29.59 min)。(B) HeLa 細胞核抽取液經過 HPLC Superdex HR-200 column 分析後，每個 fraction 取 15 μl 進行 gel retardation 分析，0.1 μg salmon sperm DNA 做為競爭物。

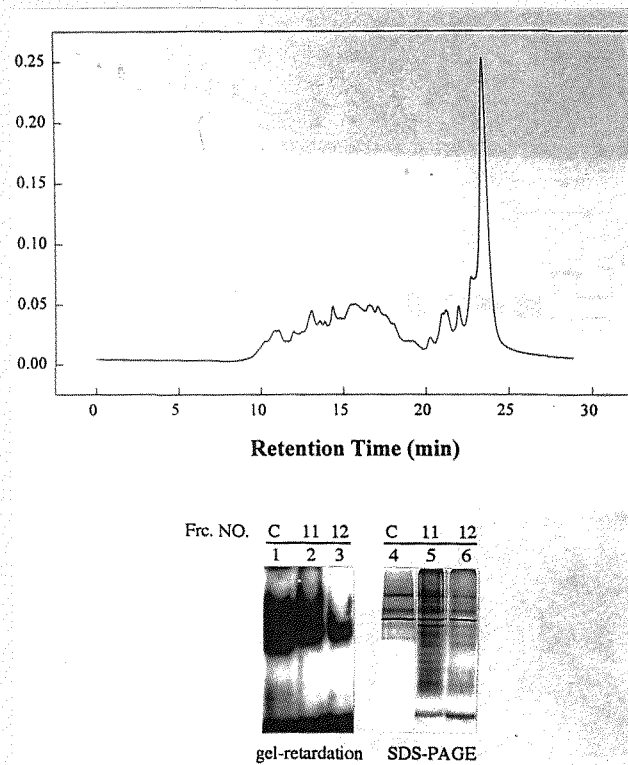
(A)



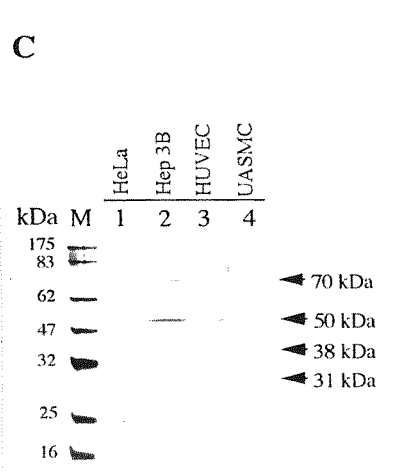
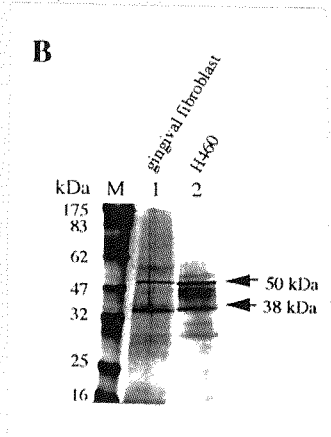
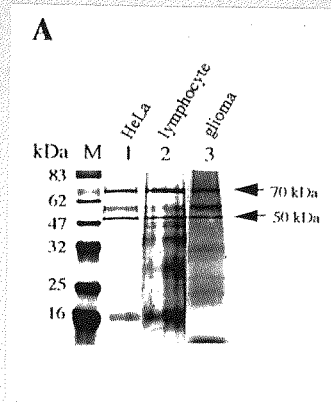
(B)



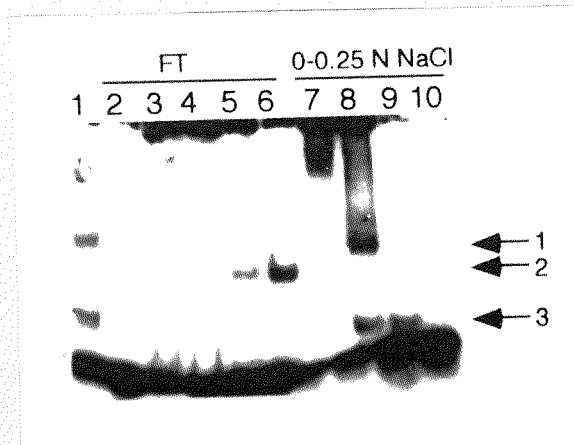
圖(九)、利用 biotinylated (CGG/CCG)₁₀ binding assay 分析 HeLa 細胞核抽取液中 CGG-BP。(A) M 表示分子量 marker, NE 表示 HeLa 細胞核抽取物, avidin 表示 streptavidine-agarose beads, B-DNA 表示 biotinylated ds-(CGG/CCG)₁₀, “+” 表示有, “-” 表示無。(B) lane 1-4 HeLa 細胞核抽取物, 分別與 biotinylated ds-(CGG/CCG)₁₀ streptavidine-agarose beads, biotinylated single-stranded-(CCG)₁₀ streptavidine-agarose beads, single-stranded-(CGG)₁₀ streptavidine-agarose beads, poly-Guanlyc agarose beads 反應。lane 5 經過 gel filtration chromatography 後的第 21 fraction, 與 biotinylated ds-(CGG/CCG)₁₀ streptavidine-agarose beads 反應, 除了圖(B) 中 lane 1、2、3 是 Coomassie blue 染色以外, 其餘皆以銀染呈色。



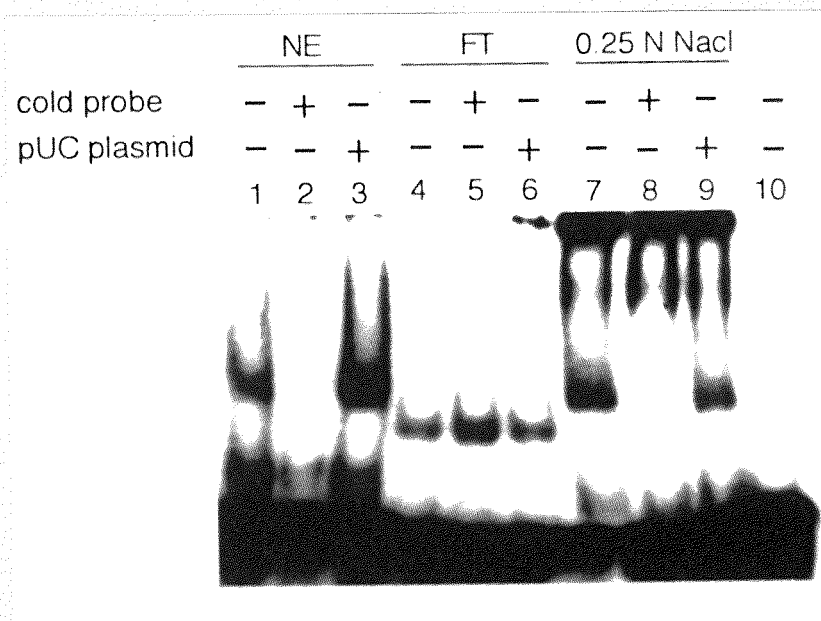
圖(十)、以 Mono Q 陰離子交換層析分析 HeLa 細胞核抽取液中 CGG-BP。1 ml HeLa 細胞核抽取液稀釋 5 倍，通過 Mono Q，以 0-1.0 M NaCl Tris buffer 線性梯度沖管柱，lane 1-3 取 15 μ l 進行 gel retardation 反應，lane 4-6 為 biotinylated ds-(CGG/CCG)₁₀ binding assay 反應。lane 1, 4 為通管柱前的 HeLa 細胞核抽取液，lane 2, 4 為 fraction 11，lane 3, 6 為 fraction 12。



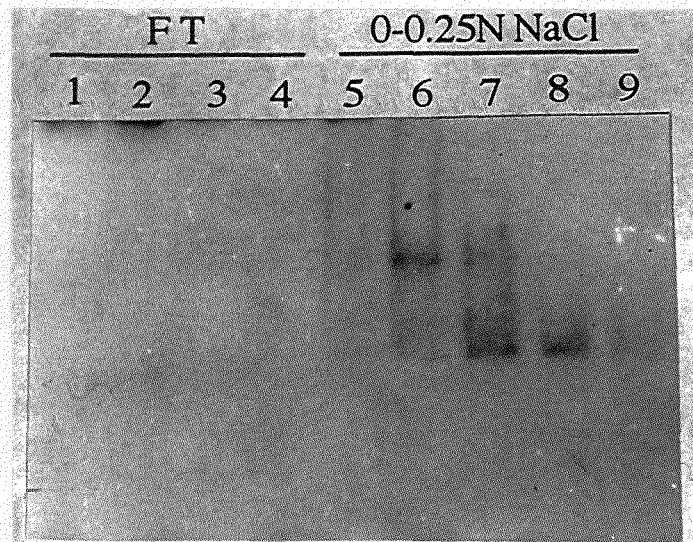
圖(十一)、以 **biotinylated (CGG/CCG)₁₀ binding assay** 方法分析不同細胞株之 **CGG-BP**。(A) lane 1-3 分別為 HeLa, lymphocyte, glioma 細胞株的細胞核抽取液。(B) lane 1-2 分別 gingival fibroblast 細胞株細胞核抽取液。(C) lane 1-4 分別 HeLa、Hep 3B、HUVEC、UASMC 細胞株細胞核抽取液。上述細胞核抽取液 **biotinylated (CGG/CCG)₁₀ binding assay** 方法分析後，再以 **SDS-PAGE** 分析，銀染呈色。



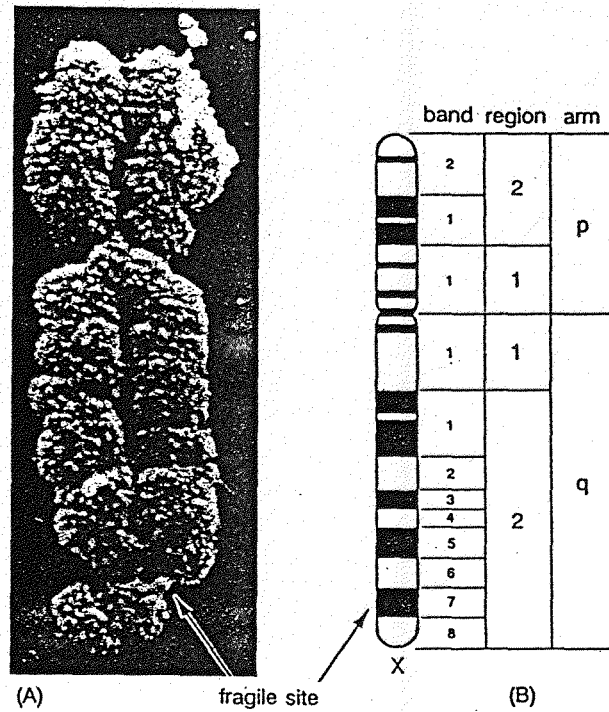
圖(十二)、以DEAE-52陰離子交換層析分析白血球細胞核抽取液中CGG-BP1。白血球細胞核抽取液通過DEAE-52，以gel retardation分析所收集的fraction。lane 1-5為flow through，lane 7-10為0.25 N NaCl TE buffer沖出的fraction。箭頭1、2、3分別為不同的binding band。



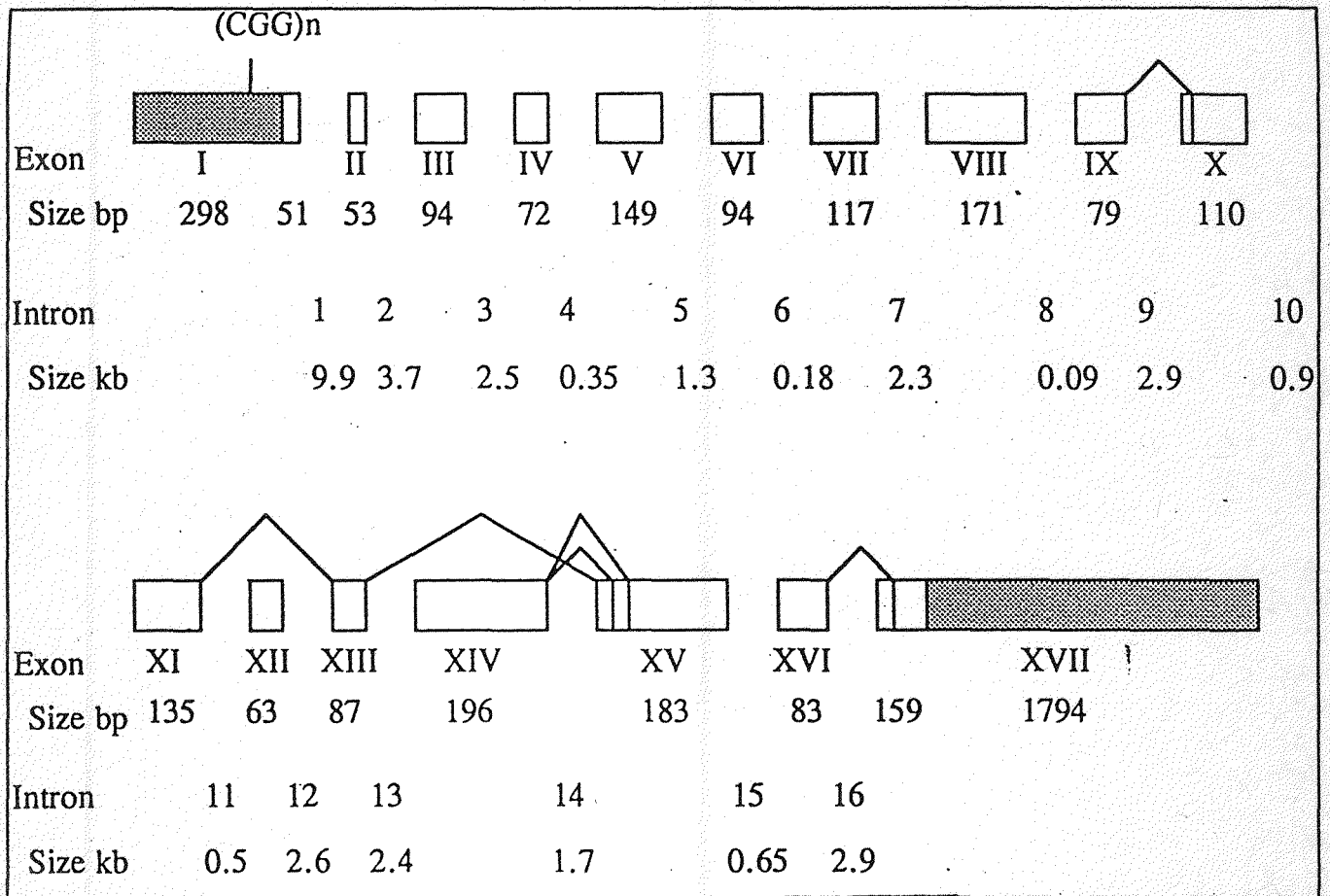
圖(十三)、以競爭性反應分析白血球細胞核抽取液通過 DEAE-52 之流出物。將圖(十二)的 lane 6,8 取 15 μ l 各別加上過量 cold (CGG/CCG)₁₀ DNA 與 pUC 19 plasmid, 以 gel retardation 方式進行競爭性反應。lane 1-3 為白血球細胞核抽取液未通過 DEAE-52 管柱, 取 5 μ l 進行反應。lane 4-6 是 flow through。lane 7-9 是 0.25N NaCl TE buffer 沖出的 fraction。lane 10 未加白血球細胞核抽取液。“+”表示有,“-”表示無。



圖(十四)、以 DEAE-52 陰離子交換層析分析 HeLa 細胞核抽取液中 CGG-BP。HeLa 細胞核抽取液通過 DEAE-52，以 0.25N NaCl TE buffer 沖管柱，以 gel retardation 分析所收集的 fraction。lane 1-4 為 flow through，lane 5-9 為 0.25 N NaCl TE buffer 沖出的 fraction。

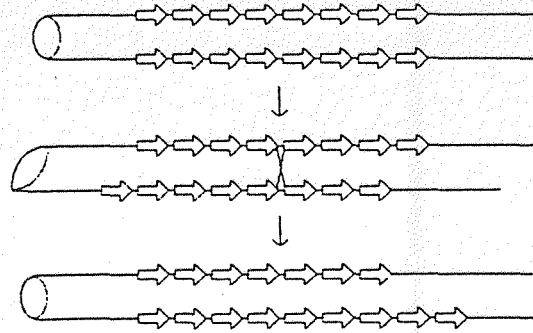


附圖一 (A) The fragile X syndrome. This scanning electron micrograph shows a G-banded fragile X metaphase chromosome. The fragile site on each chromatid appears as a gap or pinched-in region near the tip of the long arm, at region 2, band 7 (arrows). (B) Diagram of banding patterns on the human X chromosome, showing the metaphase Q- and G-positive bands seen in a karyotype of about 550 bands total. (Harrison et al., 1983)

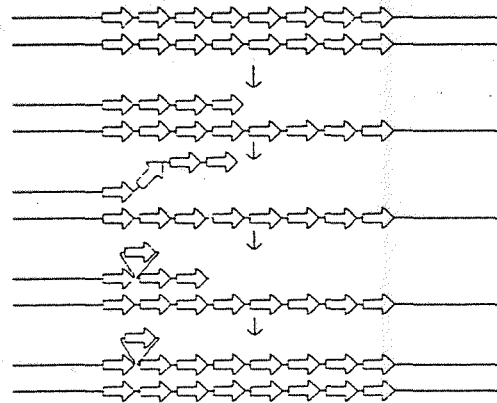


附圖二 Intron/exon distance of FMR-1.(Eichler et al., 1993)

(A)



(B)



附圖三 Mechanisms that cause tract instability. (A) Unequal crossing-over. Crossovers between misaligned repeats result in a deletion from one tract and an addition to another. (B) DNA polymerase slippage. During DNA replication, one strand transiently dissociates from the other, and then reanneals in a misaligned configuration. If the mismatched bases are located in the primer strand (as shown), continued elongation results in an increased tract length. If the unpaired bases are located in the template strand, one of the tracts would contain a deletion. (Strand et al., 1993)

附錄一 儀器設備

儀器名稱	廠牌
CO ₂ incubator	Nuaire
Laminar flow hood	Nuaire
Microscope	Nikon
FPLC	Hitachi
Microfuge	Eppendorf
Superdex 200	Pharmacia
Mono Q HR 5/5	Pharmacia
Power supply	Bio-Rad
Mini-PROTEAM II	Bio-Rad
-70°C Refrigerator	REVCO

附錄二、試劑及緩衝液之配法：

1. acrylamide-bisacrylamide(30:0.8) : Dissolve 30g of acrylamide and 0.8 g bisacrylamide in a total volume of 100 ml water. The solution is filtered through Whatman NO. 1 filter paper, and stored at 4°C in a dark bottle.
2. 1.5% ammonium persulfate : To 0.0225 g ammonium persulfate, add dH₂O to 1.5 ml.
3. 3M Tris-HCl pH 8.8: 36.3 g Tris and 48 ml 1 M HCl are mixed and brought to 100 ml final volume with water.
4. 0.5M Tris-HCl pH 6.8: 6.0 g Tris is dissolved in 40 ml water, titrated to pH 6.8 with 1 M HCl, and brought to 100 ml final volume with water.
5. 10% SDS(sodium dodecyl sulfate) : Dissolve 100 g of SDS in 900 ml of dH₂O. Heat to 68°C to assist dissolution. Adjust the pH to 7.2 by adding a few drops of concentrated HCl. Adjust the volume to 1 liter with H₂O. Dispense into aliquots.
6. SDS-PAGE running buffer : Dissolve 3 g Tris, 14 g glycine, 1 g SDS in dH₂O. Adjust the volume to 1 liter with dH₂O.
7. DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) : To prepare one liter of DMEM, dissolve one package of DMEM powder from GilBOC. Add of NaHCO₃ 3.7 g per liter of medium. Adjust pH to 7.0 with HCl.
8. Complete DMEM : 10 ml Fetal Bovine serum (FBS) and 1 ml Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN) antibiotic mixture (100X) are mixed and brought to 100 ml final volume with DMEM.
9. HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution) : To prepare one liter of HBSS, dissolve one package of HBSS powder from GilBOC. Add of NaHCO₃ 3.5 g per liter of medium. Adjust pH to 7.2 with HCl.
10. 0.5 M EDTA (pH 8.0) : Add 186.1 g of disodium ethylenediaminetetraacetate·2H₂O to 800 ml of H₂O. Stir vigorously on a magnetic stirrer. Adjust the pH to 8.0 with

NaOH (~20g of NaOH pellets). Dispense into aliquots and sterilize by autoclaving.

11. TE buffer : 10mM Tris-HCl pH 7.4 and 1mM EDTA pH 8.0.

12. 5X TBE : Dissolve 54 g of Tris base and 27.5 g of boric acid in 800 ml of ddH₂O. Add 20 ml 0.5 M EDTA. Adjust volume to 1 liter with ddH₂O.