

中山醫學大學生化暨生物科技研究所
Institute of Biochemistry and Biotechnology
Chung Shan Medical University

碩士論文

Master's Thesis

NUDT9 在月經週期不同時期中子宮內膜腺體細胞之表現

**Expression of NUDT9 in human endometrial gland cells
during different phases of menstrual cycle**

指導教授：陳凌雲 博士

Advisor: Dr. Ling-Yun Chen

研究生：溫保英

Graduate student: Pao-Ying Wen

中華民國九十四年七月

July, 2005

誌 謝

此論文得以完成，象徵三年研究所的生涯將劃下完美的句點！回首來時路，真得好辛苦，這一路走來要感謝及感恩的人與事實在太多。

首先是指導老師陳凌雲教授，嚴厲督促我智識技能及思考邏輯的增進，此啟發之恩將永遠感念。同時也要感謝工作單位的前、後主管黃志成醫師及王寶田主任，讓我有再職進修的機會；陳明副主任在專業領域的鼎力相助；諮詢中心美慧的相知相惜；盧博士、婉玲學姐、靖彤、秋雅、東杰、舜評的加油打氣，謝謝你們。

實驗室の瑤玲學姐、淑玲學姐、繆珍學姐、森玲學姐、易醫師、顯益、闊顯及雅琳妹妹的心得分享，尤其是瑤玲學姐指正我課業與實驗的盲點；森玲學姐在染色過程中提供的支援與協助；易醫師在論文彙整的指導；孝勳學弟陪伴我假日做實驗的技術傳承；阿吉學弟諸多指導與幫忙，輔助我突破實驗瓶頸，因為有實驗室的大伙相互切磋才讓論文呈現美好的結果，在此致上最誠摯的感謝！此外，特別感謝中興大學的張伯俊教授與台中榮總教研部的徐士蘭副教授撥冗參加我的論文口試及對論文內容費心審閱，惠予指正。

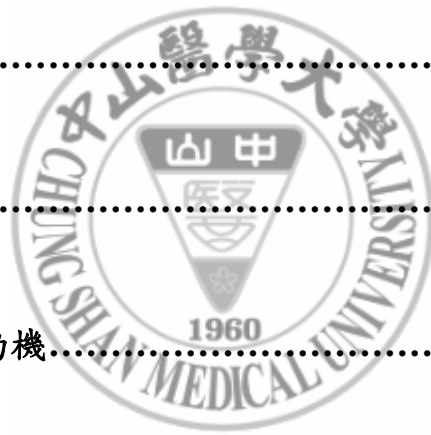
最後要感謝我的家人，婆婆的體諒與獨立，讓我能心無旁貸、無後顧之憂地專心於工作與學業；先生耿奇一路伴我走來，給我許多寶貴意見扮演亦師、亦友角色。這滿載的感動及感恩實在難以言喻，點點滴滴深存我心。

僅以此小小成就，獻給我最摯愛的雙親

保英

目錄

	頁次
縮寫表.....	4
圖次.....	5
附錄說明.....	6
中文摘要.....	7
英文摘要.....	8
背景介紹及實驗動機.....	9
實驗材料及方法.....	19
結果.....	32
討論.....	48
參考文獻.....	52
附錄說明.....	55



縮寫表

NUDT9: Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 9

PAGE: Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

PCR: Polymerase Chain Reaction

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

TEMED: N,N,N,N,-Tertramethyl Ethylene Diamine

Tris: Tris (Hydroxymethyl) aminomethane

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride

IPTG : Isopropyl bD-thiogalactopyranoside

A549: lung carcinoma cell

CH27: human lung squamous carcinoma cell

H460: human lung non-small cell carcinoma cell

Hep3B: human hepatoma cell line

Huh7: Human Hepatoma Cell Line

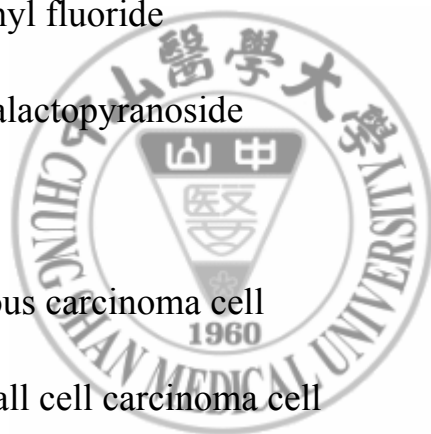
HUVEC: human umbilical vein endothelial cells

OK: Renal Epithelial Cell Line

rk3E: rat kidney epithelial cells

THP1: The human monocytic cell line

rVSMC: rat vascular smooth muscle cell



圖次

圖一、NUDT9 引子的設計

圖二、以 PCR 的方式觀察 NUDT9 的位置結果

圖三、觀察 BL21(DE3)/pET32a/NUDT9 重組蛋白表現情形

圖四、利用鎳離子親和性管柱純化 NUDT9 蛋白

圖五、利用一般成色分析測量 NUDT9 蛋白校價

圖六、利用西方墨點法檢測大鼠組織萃取液中 NUDT9 蛋白

圖七、NUDT9 抗血清專一性確認

圖八、利用小鼠組織萃取液檢測 NUDT9 抗體

圖九、利用西方墨點法觀察 NUDT9 蛋白在不同細胞株表現情形

圖十、利用免疫螢光染色觀察 NUDT9 蛋白在細胞株的表現位置

圖十一、利用免疫組織化學染色法分析 NUDT9 蛋白在不同時期的表現

圖十二、利用 IHC 及 IF 染色觀察 NUDT9 在子宮頸上皮內癌細胞表現的情形

圖十三、利用免疫組織化學染色法分析子宮內膜癌 NUDT9 蛋白表現情形

圖十四、觀察 NUDT9 蛋白在子宮內膜癌(EM cancer)表現的情形

附錄說明

附錄 1：Novagen pET32a

附錄 2：NUDT9 核苷酸及胺基酸序列

附錄 3：DDRT-PCR 找出增殖期及分泌期子宮腺體細胞具表現差異性的基因

附錄 4：培養基與抗生素製備

附錄 5：試劑與緩衝溶液的製備



中文摘要

子宮內膜腺體在月經週期的不同時期會呈現不同的形態，形態的差異可能與某些荷爾蒙或基因的調控有關。在本研究中，首先承接先前實驗室以 DDRT-PCR 去找出子宮腺體細胞增殖期及分泌期具表現差異的基因，再與 NCBI BLAST 網站搜尋比對，發現數個值得繼續分析的基因。本篇研究針對 NUDT9 蛋白的功能及表現做進一步探討。目前已知人類 NUDT9 是 Nudix hydrolase family 的成員之一，它具有 ADP-ribose pyrophosphatase 的活性。本論文首先將 NUDT9 cDNA 部份片斷選殖出來進行定序，接著以 Ni-NTA 純化得到 pET32a(Thioredoxin)/NUDT9 融合蛋白並以此蛋白去免疫兔子得到抗體，再利用免疫組織化學染色對處於月經週期之不同時期的子宮內膜組織細胞做分析，結果發現 NUDT9 蛋白在增殖期表現量較分泌期表現量高。另外，取子宮內膜癌(細胞過度增生)觀察 NUDT9 染色的結果，腫瘤組織與正常組織相比呈現明顯的染色。再者，利用免疫螢光染色法對三株細胞株(A549、Huh7、HUVEC)染色以共軛焦顯微鏡觀察得知，此蛋白除表現在細胞質上，另外也可明顯地看到蛋白在細胞核的表現。綜合本研究之實驗結果可知 NUDT9 確實在細胞增生時明顯表現，至於細胞核內確切的作用機轉仍待進一步研究。

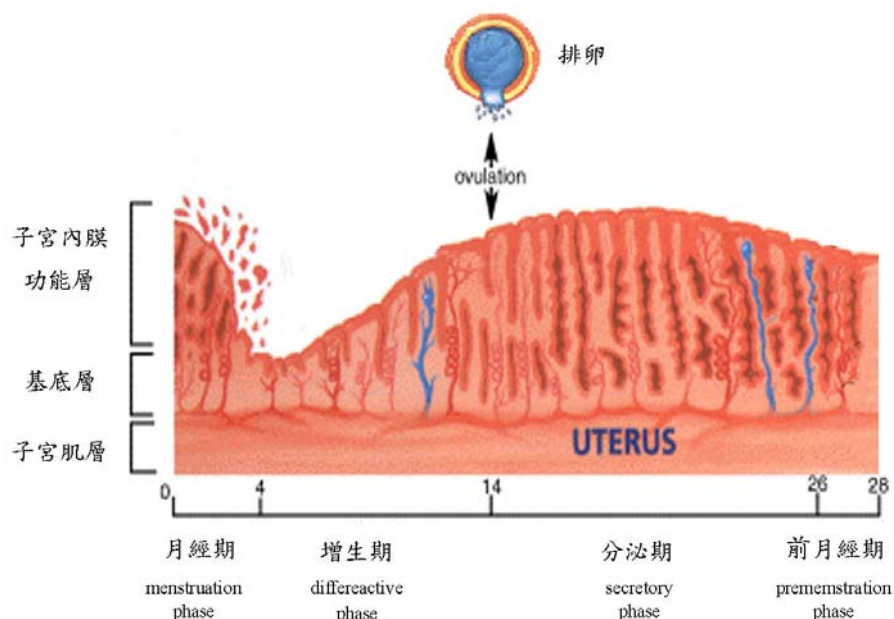
Abstract

The glandular epithelial cells of the endometrium manifest distinct and different morphology during the different phases of the menstrual cycle. The differences may involve many hormones and are regulated by many genes. In our laboratory, we have identified the specific gene, NUDT9 (Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 9), expressed in the early proliferative phase or in the secretory phase. In this study we focused on the function and expression of NUDT9 protein. NUDT9 gene functions as a highly specific ADP-ribose (ADPR) pyrophosphatase. The human NUDT9 gene has been mapped to 4q22 and shown to give rise to two alternatively spliced mRNAs, the NUDT9 α and NUDT9 β , encoding a member of the Nudix hydrolase family. First we performed sequencing on the NUDT9 gene we identified, purified this 33 kDa protein with Ni-NTA, and then used this protein to immunize the rabbit to obtain the polyclonal antibody. We found that NUDT9 protein is differentially expressed in the endometrial gland cell by immunohistochemical stain. Besides, NUDT9 was found to express much more prominently in the endometrial carcinoma cells when compared with the surrounding non-cancer cells. According to the immunofluorescence stain of the three cell lines (A549·Huh7·HUVEC) with the assistance of confocal microscopy, we further demonstrated this protein is expressed in both the cytoplasm and nucleus, suggests that NUDT9 is expressed in cell cycle progression(S phase of DNA synthesis), and subsequently promotes the cellular proliferation. However, the exact mechanism was still largely unknown, and awaits future study.

背景介紹與實驗動機:

根據醫學報導指出，無論是自然懷孕或人工授孕，胚胎能否順利著床於子宮內膜是懷孕成功過程最重要步驟，其中內膜厚度不夠是失敗主要因素。故能夠瞭解子宮內膜腺體細胞為何內膜厚度不夠，那些因素影響其內膜厚度，將有助於提高受孕力。

子宮可分為子宮內膜層 (endometrium)、子宮肌層 (myometrium)和漿膜層 (serosa)。子宮內膜再分為兩層，分別為 (1)基底層(basalis)：此層保持在子宮壁上，月經來潮時子宮內膜功能層脫落，然後從基底層開始增生、修復。任何情況下基底層受到損傷，子宮內膜就失去修復能力。(2)功能層 (Functionalis)：在月經週期中會受荷爾蒙調控 (如 Estrogen、Progesterone、FSH、LH)^{1,2} 而改變其子宮壁的厚度、腺體細胞的型態及數量，可以提供適合受精卵著床及生長的場所。



子宮內膜是一種腺體組織，覆蓋在子宮腔的腔壁上，由管狀的腺體、緻密的纖維組織母細胞的基質和微血管所組成。在青春期前，子宮內膜是呈現不活化狀態的組織；在青春期後，這個組織受週期性的腦下腺和卵巢荷爾蒙活化刺激使得子宮內膜的腺體、基質和血管也呈週期性的型態改變³。

女性的月經週期 (Menstrual cycle)與子宮內膜和荷爾蒙的變化，首先腦下垂體前葉會分泌濾泡刺激素(FSH)，來刺激濾泡發育，此時卵泡分泌雌激素(Estradiol)，刺激子宮內膜基質細胞及腺體細胞生長與增厚。接下來，腦下垂體會再分泌黃體刺激素(LH)，使卵子周圍的細胞裂開，釋放卵子(排卵)。排卵後，卵巢除了分泌雌激素刺激子宮內膜增厚，也分泌黃體素(Progesterone)，使子宮內膜細胞停止生長，隨後子宮內膜腺體開始分泌含有養分的黏液，幫助受精卵著床。如果沒有受孕，卵巢就會停止分泌雌激素與黃體素，子宮內膜細胞就會死亡，並以月經來潮的方式剝離流出，然後整個週期又重新開始。

從月經週期的第一天開始，子宮內膜的週期性變化，主要的步驟包括：

- (1) 月經期 (menstruation)：第 1 至 5 天。
- (2) 增殖期 (proliferation)：第 6 至 14 天。
- (3) 分泌期 (secretary)：第 15 至 26 天。
- (4) 月經前期 (premenstruation)：第 27 至 28 天。

根據顯微鏡的觀察，月經週期中子宮內膜在各個階段的腺體細胞特徵是：

➤ 增殖期早期 Early proliferative phase (圖 A)

在月經停止後的前幾天，子宮內膜薄且均勻，顯微鏡低倍下觀察，腺體是直的，直接從底部到表面。高倍下觀察，上皮是低柱狀，偶而可見有絲分裂。

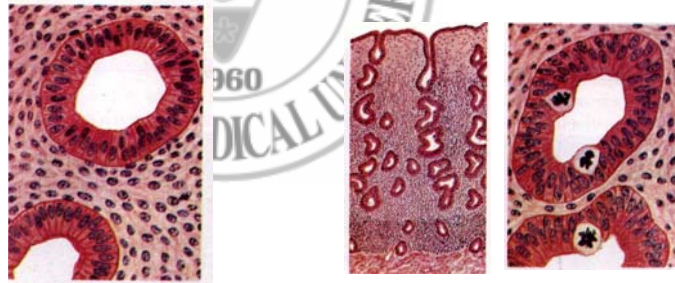
➤ 增殖期晚期 Late proliferative phase (圖 B)

因為腺體及間質顯著的生長，子宮內膜較厚，低倍下觀察，可見腺體是迂曲的，所以在子宮內膜的中間部分，螺旋狀的管腺同時被切到好幾次。高倍下觀察，上皮為高的柱狀，核排列不規則，常可看到有絲分裂。

(圖 A)



(圖 B)



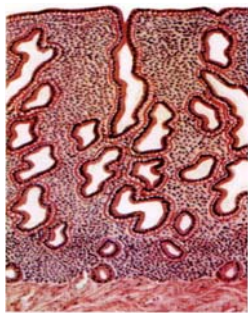
➤ 分泌期早期 Early secretory phase (圖 C)

在排卵後的 2、3 天內出現分泌期的早期表徵；子宮內膜隨著表層水腫的消失，厚度稍微變小，腺體細胞是圓的，細胞核排列成排在細胞的中央，細胞質集中在細胞的上部，富含肝糖的分泌物集中在細胞的底部，H.E. 染色時，形成 subnuclear empty vacuole，有絲分裂已較少。

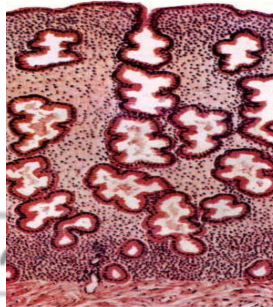
➤ 分泌期中期 Midsecretory phase(圖 D)

子宮內膜分泌活躍，低倍下觀察，所以整個子宮內膜厚度這時達到最高點，腺體成鋸齒狀。高倍下，核沈到細胞底部，分泌物質在上皮的 (lumen margin)形成 bubbles。

(圖 C)



(圖 D)



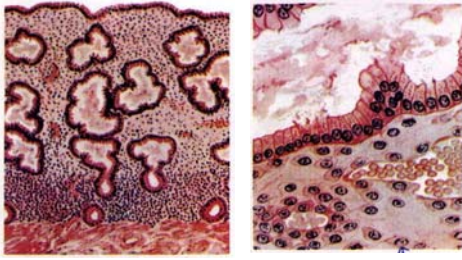
➤ 分泌期晚期 Late secretory phase (圖 E)

在週期的最後兩三天，間質水腫已被吸收，所以子宮內膜厚度縮小，表面的間質細胞，其細胞質聚集，稱為 pre-decidua；腺體擴大，腔內充滿分泌物及細胞殘骸，腺體上皮已不活躍，呈低柱狀，核濃縮，在間質有許多紅血球及白血球滲入。

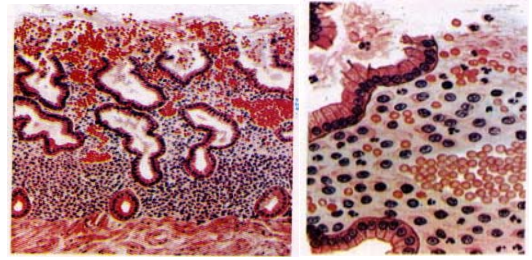
➤ 月經期 Menstruation (圖 F)

月經期開始是紅血球在 surface epithelium 下的細胞間隙內聚積成池，當 surface 破裂發生，間質碎片及破裂腺體被撕下，從頂層脫落到 basalis 要花費 2 至 3 天。在高倍下觀察，可見很多多型核白血球及淋巴球。

(圖 E)



(圖 F)



由以上的子宮內膜組織切片可知，在正常的月經週期中，子宮內膜在增生期時由於腺體、基質和血管的活化，其厚度大約是剝落期的 10 倍以上。子宮內膜官能性的型態變化，主要是受到荷爾蒙的影響，其目的是為了讓受精卵在有功能性的窗口(functional window)植入而做準備⁴。

腺體在月經週期會呈現不同型態，這種不同形態的表現是因為細胞受到卵巢分泌的荷爾蒙如 Estrogen (E2)和 Progesterone (P) 的調控，控制了子宮內膜的生長、分化、脫落及重組。由濾泡所分泌的 estrogen 主要參與在週期的前半段時間，啟動子宮內膜上皮細胞和基質纖維組織母細胞的增生以及肥大；而由黃體所分泌的 progesterone 則負責子宮內膜腺體的分化及糖質生成，意即由增生期轉變至分泌期，使子宮內膜形成適合受精卵植入的環境^{5,6,7}。

回顧過去在子宮內膜研究上的參考文獻可知：Ferency 和 Bergeron 兩位學者觀察人類子宮內膜由出生到老年的組織學變化，也提出了此變化是受到了 estrogen、progesterone 和存在子宮內膜細胞核內個別荷爾蒙接受體的調控⁸。在體外的子宮內膜組織切片培養實驗以及婦女在黃體時期，也就是在 progesterone 增加時，子宮內膜的 oestradiol dehydrogenase 活性分別有六倍及

十倍的上升，而此酵素濃度的改變可能參與著組織中 estrogen 量的控制⁹。以及 progesterone 調節細胞的增生等實驗¹⁰；而 Okulicz 和 Ace 兩位學者歸納出 progesterone 此荷爾蒙可調節不同的子宮內膜基因的表達，包括生長因子及其接受體、細胞外基質蛋白質和參與在細胞代謝的酵素¹¹。

Siegfried 等學者在人類子宮內膜發現，keratinocyte growth factor 的 mRNA 在分泌晚期時表現量最高，似乎受到了 progesterone 的調控；而此 factor 的接受體 mRNA 則在 estrogen 出現的增生肥大期及晚期時，表現量最高，顯示此接受體是接受 estrogen 的調控¹²。

子宮內膜的腺體細胞除了受荷爾蒙的直接調控外，尚有一些酵素或蛋白質分子參與其中如：(1). Matrix Metalloproteinases (MMP): MMP在月經週期中會受到 Progesterone 及其他 Chemokine如 $TNF-\alpha$ 、 $TGF-\beta$ 的調控而維持各 MMP 酵素的含量以保持正常功能。在月經中的增生期，子宮內膜腺體細胞中 MMP7的mRNA表現量比較高，有清除 Luminal debris的功能；而 MMP14 則會在增生期參與活化MMP2活化，破壞 Collagen I，協助子宮內膜的重建。(2). Tissue inhibitorsof metalloproteinases (TIMP): TIMP1-3會在月經週期的增生期中表現來調控MMP酵素的活性維持平衡。(3). Fas ligand protein: 在增殖期晚期或分泌期腺體細胞如果受到 Estrogen 荷爾蒙刺激，Fas ligand protein會過量表現，造成細胞凋亡。但由於子宮內膜腺體細胞株的分離培養並不容易，所以所知的調控方式並不多，目前僅知子宮內膜的調控機轉可以

藉由 MMP、TIMP、Fas ligand protein 或一些 Chemokine 的調控(如 TNF- α 、TGF- β 及 IL-1 β)¹⁵，但是否還有別的分分子來參與控制，則需要有更多的實驗來證明。

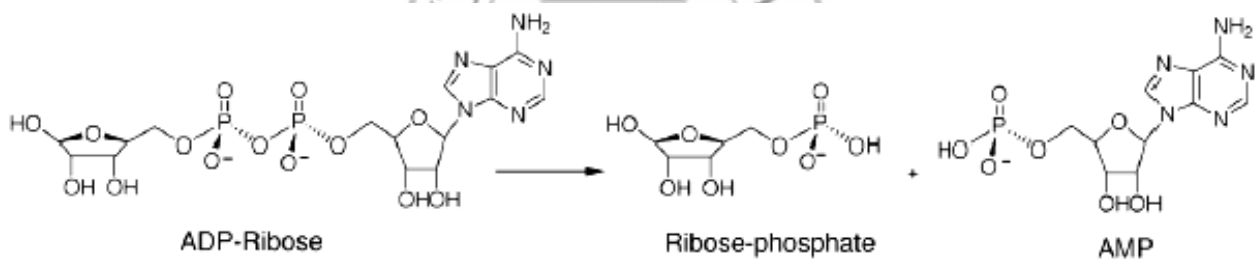
因此，如果能夠有好的方法，將不同的月經週期時段中內膜腺體細胞所有不同的基因表現都陳列出來，再針對不同時期中具特殊表現量的基因作深入分析，可有助於我們對子宮內膜腺體調控機轉的了解。至於基因表現差異性之研究，目前常被使用的方法有 Differential display RT-PCR (DDRT-PCR), two-dimensional gel electrophoresis/MALDI-TOF MS 與 cDNA microarray 等。本篇研究是承接先前實驗室利用 DDRT-PCR 去找出子宮內膜腺體細胞在增殖期及分泌期表現差異的基因，針對在增殖期中具特殊表現量 NUDT9 作深入分析，並探討該基因表現與子宮內膜改變的相關性，或是基因與增生之間的關聯性，藉以瞭解 NUDT9 的表現活性，在正常組織與子宮內膜癌(子宮內膜一直處於增殖狀態，進而使子宮內膜產生病變，形成子宮內膜癌)的差異。

NUDT9 全名為 Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 9，基因位於染色體第4對長臂22.1位置，encodes 350 amino acid 全長39.1kDa的蛋白，由8個exon組成，在exon 1的70 base pairs 之位置會發生alternatively spliced 分別產生 α -form 和 β -form (參考下圖)；NUDT9 β 則encodes 300 amino acid 33.8 kDa的蛋白¹⁶。NUDT9是Nudix hydrolase family的成員之一，

輸，活化磷酯水解酶 D (PLD) 與肌醇磷脂3激酶 (PI3 kinase) 之訊息調控，而影響細胞內物質傳送、細胞分泌、以及胞飲等作用。最近的研究顯示 ARF 參與 insulin 調控 adiponectin 分泌的機制，並且 ARF 的 GTP 交換蛋白有調節淋巴球 integrin 訊息傳遞之功能。

Free ADP-ribose 是一個具有毒性的代謝產物，此游離狀態的ADP-ribose (ADPR)堆積會使histidyl, lysyl和 cysteinyl產生非酵素糖化作用¹⁷，當蛋白被改變時，細胞完整性被破壞導致細胞走向細胞凋亡。

目前已知唯一的分解代謝路徑是經由ADP-ribose pyrophosphatases水解成無毒性的AMP和ribose-5-phosphate^{23,24}

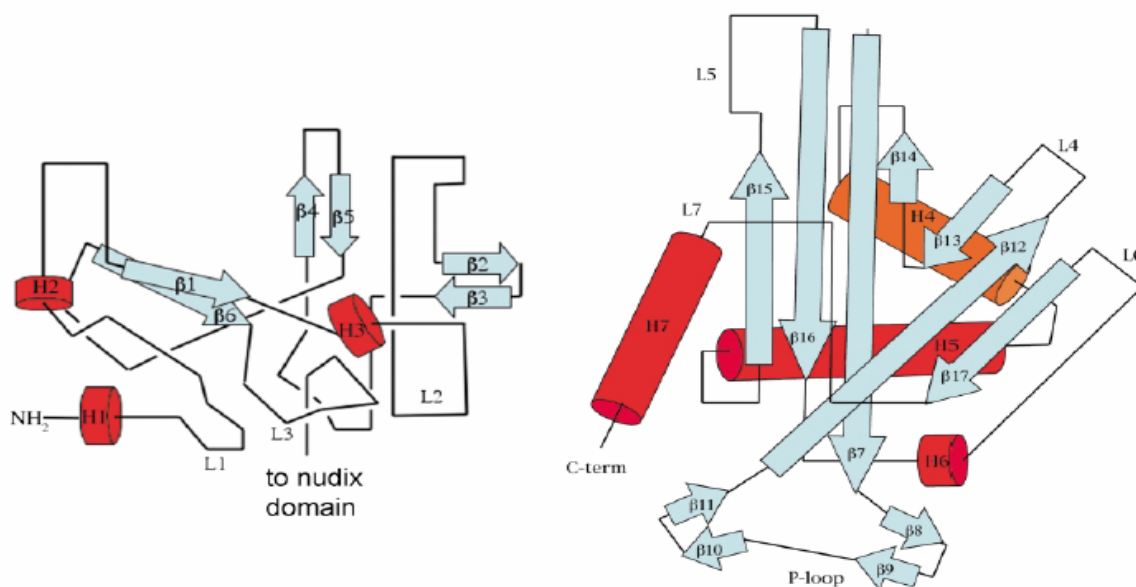


NUDT9 證實具有 ADP-ribose pyrophosphatases(ADPRase)的活性，水解ADP-ribose 的能力，可以控制 PRPP 的生成以減少其毒性反應。目前在人類可區分出 4 種 ADP-ribose pyrophosphatases(ADPRase) 的 isoform，包括表現在細胞質的 ADPRase-I,-II,和-Mn 以及表現在粒線體的 ADPRase-m。經過序列比對與特性描述，在人類只有 NUDT5 和 NUDT9 蛋白具有 ADPRase 的活性，可以水解 ADP-ribose 產生 AMP 和 ribose-5-phosphate，控制 Free ADP-ribose 的生成以減少其毒性反應。NUDT5 是表現在細胞質 ADPRase-II，除水解

ADP-ribose 外，亦水解 ADP-mannose²⁶。

Perraud 等人亦指出在 Long transient receptor potential channel 2 形成的鈣離子通道中，會有 NUDT9 homology domain，進而控管 Free ADP-ribose 進出細胞¹⁹。作者於 2003 年進一步將 NUDT9 三級結構解結晶²⁶，証實 NUDT9 蛋白的 COOH-端序列與 TRPM2(Transient receptor potential channel 2)有 39% 同源性，控管 Free ADP-ribose 進出細胞。具有專一性 ADP-ribose pyrophosphatases 的酵素活性，可避免細胞受損。TRP(transient receptor potential channel)離子通道主要作為細胞傳感器的作用，目前人類瞭解最透徹的 TRP 通道以用來辨別酸甜苦辣等各種味道和溫、熱、冷等各種溫度的瞬時受體為主，其通道作用原理皆是由提高細胞質二價鈣離子(Ca²⁺)濃度來回應不同的刺激。

The Crystal Structure of Human NUDT9



實驗材料及方法

一、實驗材料及常用儀器

子宮組織

於中山醫學大學附設醫院因子宮肌瘤而接受全子宮切除手術的患者，先取得其同意書，同意提供手術後的子宮內膜檢體，作為本研究材料來源(由婦產科應宗和醫師提供)。

材料選取的包含標準為：

有正常月經史，且目前並無月經異常情形發生。

年齡介於 30 至 50 歲之間且尚未停經。

子宮內膜經病理檢查報告為正常。



細胞株的蛋白萃取液

A549 (lung carcinoma cell)

CH27 (human lung squamous carcinoma cell)

H460 (human lung non-small cell carcinoma cell).

Hep3B (human hepatoma cell line)

Huh7 (Human Hepatoma Cell Line)

HUVEC(human umbilical vein endothelial cells)

OK(Renal Epithelial Cell Line)

rk3E (rat kidney epithelial cells)

THP1 (The human monocytic cell line)

rVSMC(rat vascular smooth muscle cell)

(由台中榮總徐士蘭博士提供的檢體)

常用藥品

I .購自 J.T. Baker 公司

1. Sodium Phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
2. Magnesium Sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
3. Potassium Chloride (KCl)
4. Sodium carbonate (Na_2CO_3)
5. Potassium Phosphate Monobasic(KH_2PO_4)
6. Potassium Hydroxide(KOH)
7. Potassium Phosphate Dibasic(K_2HPO_4)
8. Sodium Acetate(CH_3COONa)
9. Glycerol
10. IMIDAZOLE
11. Manganous Chloride,4-Hydrate($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
12. citric acid

II .購自 Sigma 公司

1. Ethidium Bromide
2. Ammonium sulfate
3. TEMED
4. SDS
5. DTT(Dithiothreitol)
6. Albumin from bovine serum (BSA)
7. Bromophenol Blue
8. Brilliant Blue R
9. Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF)
10. ABTs Tablets
11. Nickel(II) sulfate hexahydrate

12. anti-mouse secondary antibody
13. anti-rabbit secondary antibody
14. anti-human IgG secondary antibody
15. Ethylenediamine Tetraacetic acid (EDTA)

III. 購自 Qiagen 公司

1. QIAquick PCR purification kit
2. QIAquick Gel extraction kit
3. QIAprep Spin Miniprep kit
4. Ni-NTA agarose

IV. 購自 PerkinElmer 公司

1. ECLTM Western Blotting Detection reagents
2. Western blot stripping buffer
3. PVDF

V. 購自 AMRESCO 公司

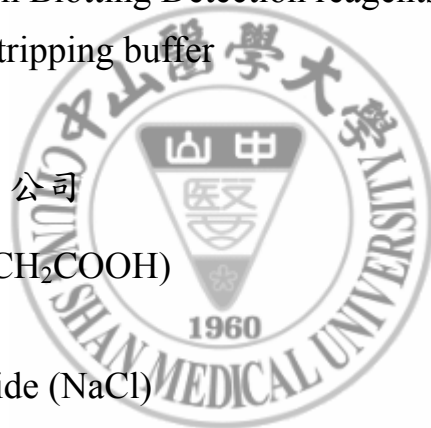
1. Glycine (NH₂CH₂COOH)
2. Tris-Base
3. Sodium Chloride (NaCl)
4. H₂O₂ (30%)

VI. 購自 Promega 公司

1. Bam H I
2. Hind III
3. T4 DNA ligase

VII. 購自 汎泰儀器公司

1. Bio-Rad protein assay Dye reagent



常用儀器

1. 紫外光看片箱 (DyNA Light dualIntenstivy UV transilluminator)
(購自 Labent 公司)
2. 分光光度計 (UV-VIS Sepectrophotometer)
3. 冷光螢光分析儀
4. 數位影像
5. 超高速離心機
6. 高速攪拌器 (Stirrer)
7. 西方墨點法電泳槽 (購自 Biorad 公司)
8. 高速離心機 (購自 Spectrafuge 公司)
9. 微量天平 (購自 MetterToledo 公司)
10. 迴轉式震盪培養箱 (購自 Wisdom 公司)
11. PCR 溫度循環機 (購自 Applied biosystem 公司)
12. 樣品冷卻器 (購自 BOECO Germany 公司)
13. 波浪式震盪器 (購自 Science 公司)
14. 封口機 (購自 Impulse sealer 公司)
15. 超音波破碎機 (購自 Fisher scientific 公司)
16. DNA 電泳槽(Mini gel migration trough) (購自 Cosma Bio co 公司)

17. PH 值測定儀

二、實驗方法

- (一)、 子宮內膜萃取液的備製
- (二)、 NUdT9 重組蛋白之構築
- (三)、 NUdT9 蛋白萃取液的備製
- (四)、 Ni-NTA affinity chromatography
- (五)、 總蛋白量定量
- (六)、 抗原的製備
- (七)、 免疫兔子 NUdT9 抗體備製
- (八)、 Western blot 西方墨點法
- (九)、 一般呈色
- (十)、 免疫螢光染色
- (十一)、 免疫組織化學染色



一、子宮內膜萃取液及 RT cDNA 的製備

將子宮內膜組織溶於 1 ml 的 RNA Lysis buffer 中，加上 10 μ l β -mercaptoethanol，以均質機研磨 15 秒停 10 秒鐘(避免過熱)先將組織中的細胞單一化。以 12000 rpm 離心 2 分鐘取上清液到 RNA spin，再以 12000 rpm 離心 15 秒。接著用 wash buffer (I. II. III)分別清洗、離心一次，最後再離心 1 分鐘。換新的 eppendorf 將 columns 放置抽氣櫃使 membrane 完全乾燥避免影響品質，最後用 elution buffer 將 RNA elution 下來。

* Reverse Transcription

取 3 μ g RNA 加入 3 μ l H-T11A primer (2 μ M)，再用 DEPC-H₂O 將體積加至 19.85 μ l，混合均勻後，於 70°C 加熱 10 分鐘，立即冰浴 1 分鐘，再利用離心的方式將 eppendorf 管壁上的液體帶下，隨後加入 5X buffer 6 μ l、250 μ M dNTP 3.4 μ l、MMLV RTase (200u / μ l) 0.75 μ l，總體積是 30 μ l，並於 37°C 反應 60 分鐘，最後 75°C 反應 5 分鐘，使 RTase 失去活性。

二、NUDT9 重組蛋白之構築

a. PCR (Polymerase chain reaction)

取上述 RT 製備好的 cDNA 5 μ l 進行 PCR 反應。加入 2 μ l 設計的 forward primer (含 *Bam*H I site, CAC TTG GGA TCC TCT GGT TCT AAT GGT TCC)及 2 μ l 設計的 reverse primer (含 *Hind* III site , CAC TTG AAG CTT TCC ACT GCT ATC CCT TTT) 2 μ l 的 25 μ M dNTP、10X buffer 2 μ l, 1.25U DNA polymerase (TaKaRa) 0.5 μ l、PCR water 6.5 μ l。PCR 所使用的條件為 95°C 5 分鐘；95°C 45 秒，50°C 45 秒，72°C 1 分鐘，35 cycles；72°C 10 分鐘。將預期長度的基因片段回收並作第二次 PCR 放大，反應後的產物以含有 Ethidine bromide 的 1% Agarose gel 分析並以 Viogene gel extraction kit 純化。

b. Ligation :

將 PCR 產物以 *Bam* HI 和 *Hind* III 限制酶水解後以 1% agarose gel 分析並以 Qiagen gel extraction kit 純化作為 insert。另外抽取 pET32a 質體亦以限制酶 *Bam* HI 和 *Hind* III 水解，作為 Vector DNA。接著利用含有 Ethidine bromide 的 Agarose gel (1%) 分析 並用 Gel extraction kit 純化。純化後的 Insert 與 Vector DNA 分別取 3:1 與 T4 DNA ligase、10X buffer、ddH₂O 混合均勻後置於 16°C 恆溫器中反應 16 小時。

c. 勝任細胞 (Competent cell)的製備：

先培養 2 ml 的 JM 109 小量菌液過夜後轉至 50 ml 的培養液中，繼續於 37°C 培養至 OD₆₀₀ 大約 0.6 到 0.8，將菌液以 3000 rpm 離心 15 分鐘並去除上清液(須無菌操作)，pellet 以 45 ml 冰浴且無菌的 Tritration buffer (100 mM CaCl₂ buffer) 輕輕回溶，置於冰上 60 分鐘後，再以 3000 rpm 離心 15 分鐘並去除上清液，最後將 Pellet 以 1 ml Tritration buffer 輕輕回溶，再加入 final 40% 的甘油，每管取 100 μl 體積分裝並儲存於 -80°C 冰箱。

d. 轉型作用 (Transformation)：

將 10 μl Ligation 產物加到 50 μl 的勝任細胞中均勻混合後，放置冰上 30 分鐘，再置於水浴槽中以 42 °C 熱休克 2 分 45 秒後立刻置於冰上 5 分鐘，再加 800 μl LB 回養二小時，最後取 200 μl 菌液塗在含有抗生素的 plate 上，培養置 37 °C 中 16-18 小時，挑其生成的單一菌落，抽其質體檢查。

三、NUDT9 蛋白萃取液的備製

3 ml 菌液轉至 400 ml 的 Luria Broth 中，培養至 OD₆₀₀ 0.8-1.0 左右，再加入 4 ml 的 IPTG (100 mM)，4 小時後以 10000 rpm (BECKMAN Rotor JA-14, JA17)各離心一次 10 分鐘。將菌液懸浮於 Lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM PMSF, 0.3 mM NaCl, 10 mM imidazole) 利用高壓破細

胞機處理 6 到 8 次，破菌後以 10000 rpm (BECKMAN JA17) 10 分鐘除去未破細胞及沉澱物，取上清液離心 56000 rpm (BECKMAN Rotor Ti 90)1 小時，取上清液即得可溶性融合蛋白。

四、Ni-NTA affinity chromatography

Ni-NTA resin 先以 buffer (10 mM imdazole, 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl) 平衡後，再將蛋白萃取液與 Ni-NTA resin 1 ml (Qiagen)，混合並至於旋轉器上 4°C 反應 0/N。之後將 resin 回填入 10 cm x 1 cm (diameter) column 中，收集流下來的液體為 flow through (FT) 的部分。接著以 100 ml wash buffer (25 mM Imidazole, 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl) 清洗，收集最後一管，此為 Wf。加入 elution buffer (500 mM Imidazole, 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl)，每 1 ml 收集一管，共收集 9 管，此為 E1 到 E9，所得的結果以 Comassia blue stain 分析。

五、總蛋白量定量

分別取 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 μ l BSA (0.5 mg/ml) 加至 800 μ l ddH₂O，最後加入 200 μ l bradford dye (dye 中含有甘油需緩慢加入) 至 1 ml，在 595 nm 測其吸光值，先以 BSA 製作成標準曲線，再換算出 Sample 濃度。

六、抗原的製備

將純化完的抗原定量至 1 mg/ml 以後，與等體積的 adjuvant complete freund (Sigma)充分乳化以後而成。而第二針以後皆以 0.5 mg/ml 與等體積的 adjuvant incomplete freund (Sigma)充分乳化而成。

七、免疫兔子 NUDT9 抗體備製

將純化的 NUDT9 蛋白定量後，第一次先以 1 mg/ml 的蛋白量和 Freund's Adjuvant-complete agent (Sigma) 1:1 混合，其內含有 Mycobacteria 的粗萃取物，能誘發兔子免疫反應。混合方式為以每次 40 μ l 加入 Freund's Adjuvant-complete agent 中並用震盪器震盪 10 秒使其均勻分散。混合後以 300-500 μ l 注入兔子皮下組織內。第二星期後為追加反應，以 0.5 mg/ml 和 Freund's Adjuvant-incomplete agent (SIGMA)1:1 混合，混合方式和注射方式同上。

八、西方墨點法 (Western blotting)

- (1) 配置 10 % SDS-PAGE
- (2) Sample 與 sample buffer 混合後煮沸 10 分鐘，使蛋白質變性，再 loading 到 polyacrylamide gel，以 110V 80 分鐘進行電泳分析。
- (3) 電泳後的 gel 以 transfer buffer 浸泡，於室溫溫和搖盪 10 分鐘。
- (4) Transfer：將 gel 緊貼於 PVDF 上，置於 mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad)，100V 通電一小時。(PVDF 使用前處理：將 PVDF 以適量甲醇浸泡 5 分鐘，再將 PVDF 浸泡 new transfer buffer 至少 10 分鐘)
- (5) Blocking: 將 PVDF 浸泡於 50 ml TBS buffer (含 6% 脫脂牛奶)，4°C 下溫和搖晃至少二小時。
- (6) 1st-Ab: 將 PVDF 置於夾鏈袋中，加入 8 ml TBS buffer (含 6% 脫脂牛奶)、2 ml pET32a 再加入 100 μ l NUDT9 Ab (1:100) 將氣泡趕走，再將夾鏈袋密封，4°C 搖晃至少兩小時。
- (7) Wash: 以 TBS buffer 浸泡 PVDF，室溫下溫和搖晃至少 10 分鐘，洗 3 次。
- (8) 2nd-Ab: 將 PVDF 置於夾鏈袋中，加入 5 ml TBS buffer (含 6% 脫脂牛奶，再加入 2 Ab (1:3000，anti-rabbit IgG HRP-lable) 最後將氣泡趕走，再將夾鏈袋密封，室溫搖晃一小時。
- (9) Wash: 重複 step 7。

(10) 呈色使用 SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate

Kit，先將第一劑與第二劑以 1:1 的比例混合，再利用冷光螢光數位分析系統進行分析。

九、一般呈色

以不同稀釋倍數的抗血清對 0.1 μg 純化的 NUDT9 組織蛋白萃取液進行 Western blotting 分析，測其抗體校價。使用 Substrate solution: 30 mg 4-chloro-1-naphthol (0.06%) SIGMA 溶解於 10 ml 甲醇(避光)，加入 TBS buffer 至 50 ml，再加入 20 μl 2.5% (0.01% final) H_2O_2 ，二分鐘內可看到呈色反應。



十、免疫染色

先將玻片置於 70°C 烤箱中烤片至少 50 分鐘，同時將兩缸 xylene 放置在室溫，等到玻片上的蠟全熔後馬上放到第一缸 xylene 中 10 分鐘進行脫臘，接著再換到另一缸新的 xylene 中 10 分鐘，隨後以高濃度到低濃度的酒精（包括 100%、100%、95%、80%、75%、50%）逐次進行復水，每一步驟 5 分鐘，最後再換到二次水中 5 分鐘。復水後的組織以 3% H_2O_2 先作用掉內生性的過氧化酵素，減少染色背景的產生。接著用 1X PBS 清洗 10 分鐘後將玻片置於含有 0.1% NP-40 的水中，以電池爐加熱 10 分鐘使底層的蛋白外露 [隨時維持水位及微滾狀態]，放置室溫冷卻 30 分鐘，放涼後將殘餘的 NP-40 洗淨，再利

用 5% FBS/PBS 進行 blocking 30 分鐘，接著將組織以適當稀釋倍數的一級抗體(Dilute NUDT9 Ab 1:100)覆蓋 90 分鐘，再以 1X PBS 清洗 10 分鐘，至少三次。接下來利用 DAKO LSAB2 System, Peroxidase 試劑進行呈色；最後用 Hematoxylin 將組織完全覆蓋 15 秒鐘（對比染色），再以低流速自來水沖洗 10 分鐘後，依序將玻片置於 75%、80%、95%、100%酒精中脫水，再將切片浸泡在 xylene 進行組織透明化作用後，以水溶性封片膠（DAKO GLYCER GEL MOUNTING MEDIUM）封片即可。

十一、免疫螢光染色：

前置作業與酵素染色同，隨後將稀釋後的一級抗體（NUDT9：1/100）完全覆蓋組織並置於 37°C 培養箱中反應 60 分鐘（為了避免非專一性的干擾，取 pET32a 與 NUDT9 抗體先做 pre-clear 動作），再以 1X PBS 清洗 10 分鐘，至少三次，接著將稀釋後的二級抗體（例如 FITC-labeled anti-mouse Ab：1/200）完全覆蓋組織並置於 37°C 培養箱中反應 30 分鐘（需避光），再以 1X PBS 清洗 10 分鐘，至少三次，最後取出玻片用拭鏡紙吸去組織周圍多餘的水分後利用等比例 PBS+甘油（1：1）溶液封片，再以共軛焦顯微鏡觀察染色情形。

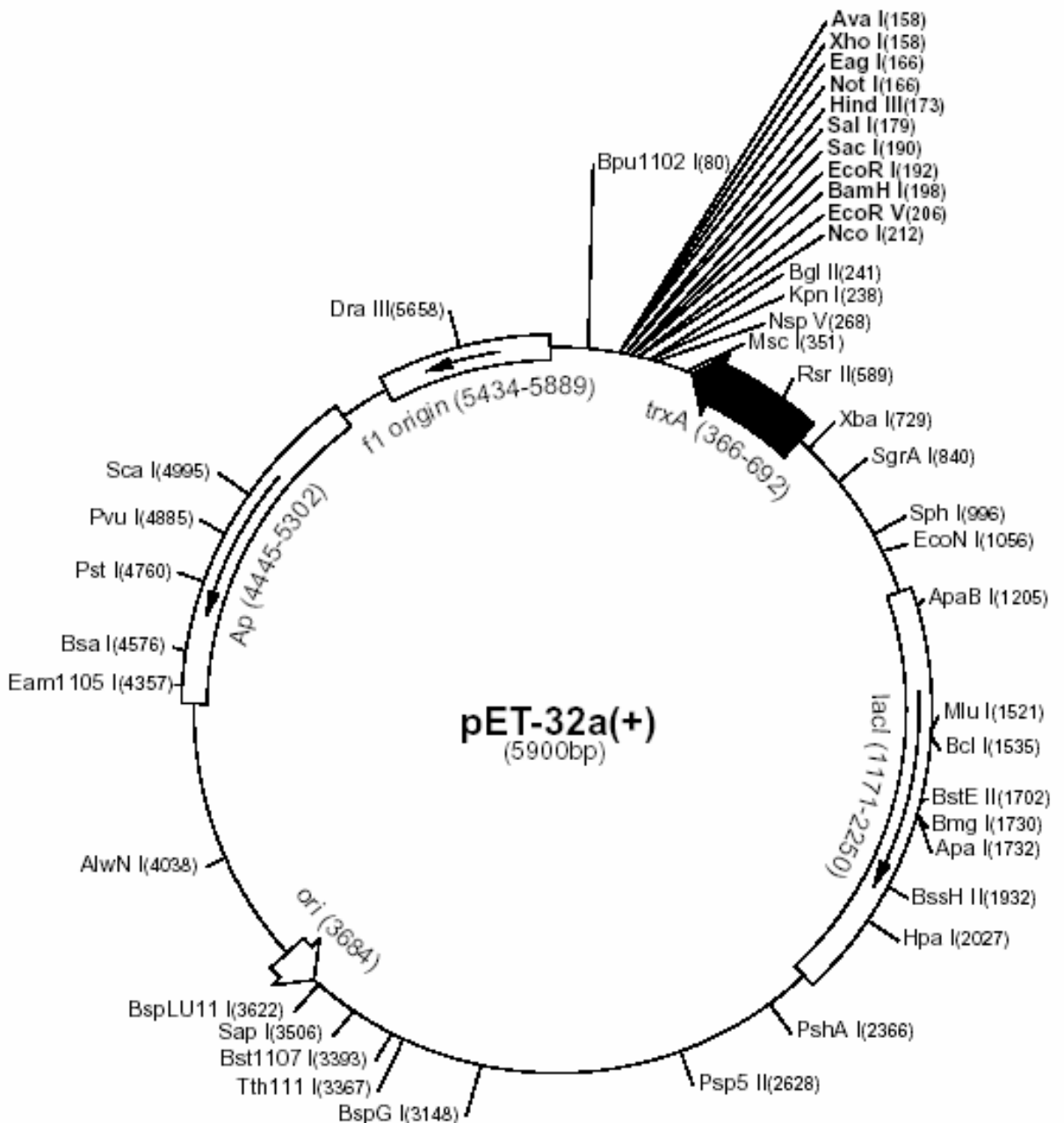


結果:

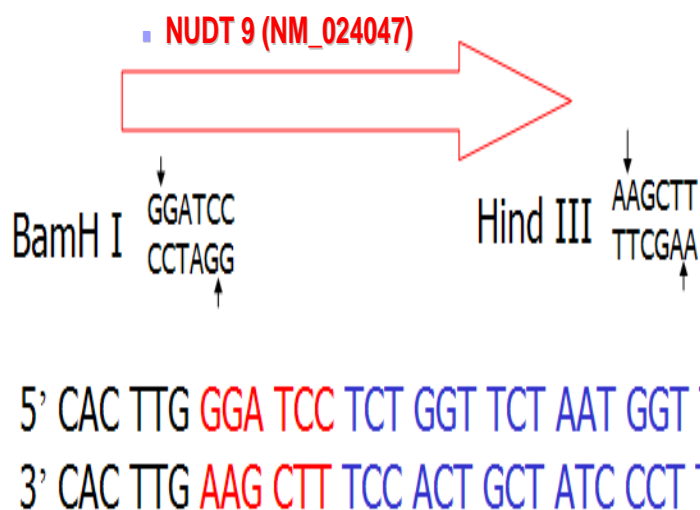
NUDT9 抗原的製備

a. 引子設計

為了免疫兔子得到抗體，我們必須在 *E. coli* 系統大量表現重組的NUDT9 蛋白，為了避免因為疏水性胺基酸過多影響到蛋白質的表達，我們先對NUDT9 的一級結構做疏水性胺基酸的標示。



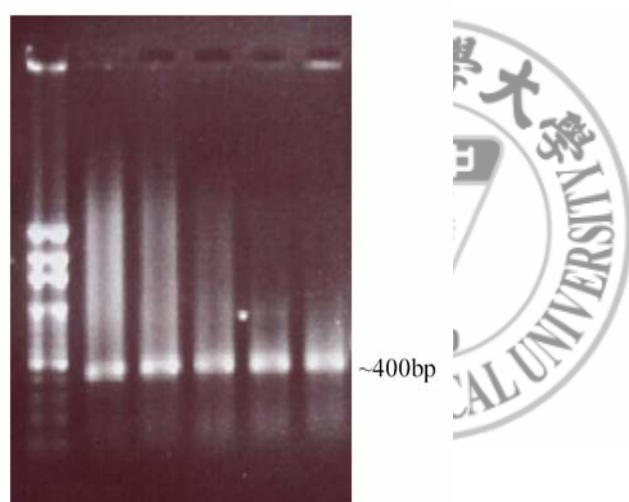
1 MAGRLGKALAAVSLSLALASVTIRSSRCRGIQAFRNSFS SSWFHLNTNVMSGNSGSKEN 51
 61 SHNKARTSPY PGSKVERSQV PNEKVGWLVE WQDYKFEYTA VSVLAGPRW ADPQISESNF
 121 SPKFNEKDGHVERKSKNGLYEIENGRPRNP AGRTGLVGRG LLGRWGPNHA ADPIITRWKR
 181 DSSGNKIMHPVSGKHILQFVAIKRKDCGEWAIPGGMVD PG EKISATLKRE FGEEALNSLQ
 241 K TSAEKREIE EKLHKLFSQD HLMYKGYVD DPRNTIDNAWMETEAVNYHDE TGEIMDNLM
 301 EAGDDAGKVK WVDINDKIKL YASHSQFIKLVAEK RDAHWS EDSEADCHAL 186



圖一、NUDT9 胺基酸序列，引子的設計除盡量避開疏水性胺基酸外，必須吻合載體上酵素切位的核苷酸序列，因此分別於Forward primer末端加上BamH I 限制酶可切割的序列GGATCC以及在Reverse primer末端加上Hind III限制酶可切割的序列AAGCTT，表達蛋白的部份以箭頭表示。

為了盡量避開疏水性胺基酸的序列，引子的設計 NH₂ 端從第 51 個胺基酸 (Met)開始設計直到 COOH 端第 186 個胺基酸 (Gly)的位置(如圖一)所示一共 135 個胺基酸，為了使引子能夠使之跟載體上面的 MCS (multiple cloning site)的限制酶切位 (Restriction enzyme site)吻合，在引子的末端設計了符合載體上適當酵素切位的核苷酸序列，分別於 Forward primer 末端加上

*Bam*H I 限制酶可切割的序列 GGATCC 以及在 Reverse primer 末端加上 *Hind* III 限制酶可切割的序列 AAGCTT 如圖一所示，將設計好的引子，以子宮內膜萃取液製備的 NUDT9 基因為模板 (template) 來作 PCR (polymerase chain reaction) 反應，NUDT9 PCR 反應產物為 400bp，反應完成的產物因為含有限制酶切割位置，所以在膠回收正確位置的產物以後(圖二)，接著繼續以限制酶 (Promega) 切割 4 個小時以後，將切割完畢的核苷酸序列當成 insert 利用 DNA Ligase (Promega) 將 insert DNA 轉殖到表現載體 pET32a 中。

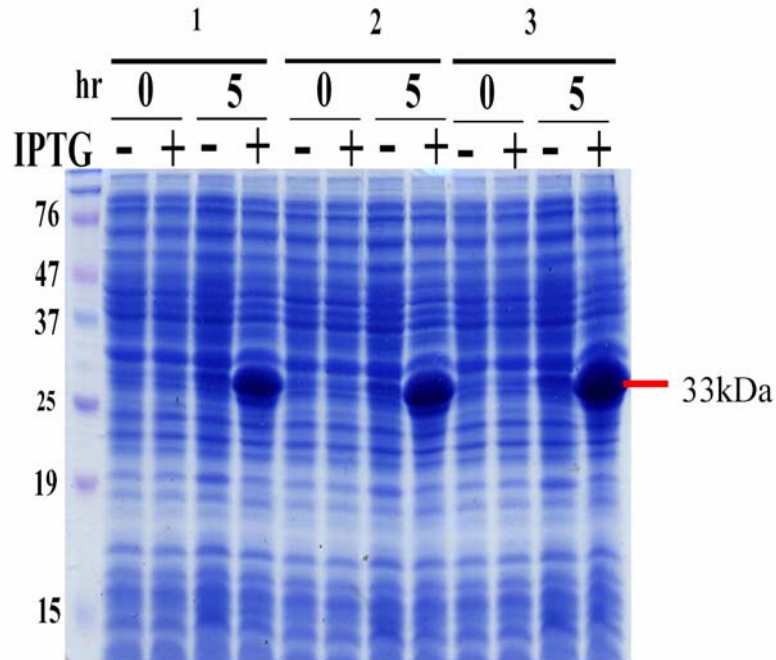


圖二、研磨子宮內膜組織，將設計好的 NUDT9 Forward primer 以及 Reverse primer 作 PCR (polymerase chain reaction) 反應結果。

b. 抗原的大量純化

當 NUDT9 接進去表達載體並且經定序確認無誤後，接著將菌液以小量培養，待 OD_{600} 至 0.8-1.0 以後，加入誘導物 IPTG 於 37 °C 觀察誘導情形，結果發現在分子量約 33 kDa 的位置有一個明顯被誘導出來的訊號，NUDT9 insert

的蛋白為 14 kDa 再加上 pET32a(Thioredoxin)19 kDa，因此與預期分子量相符（圖三）。

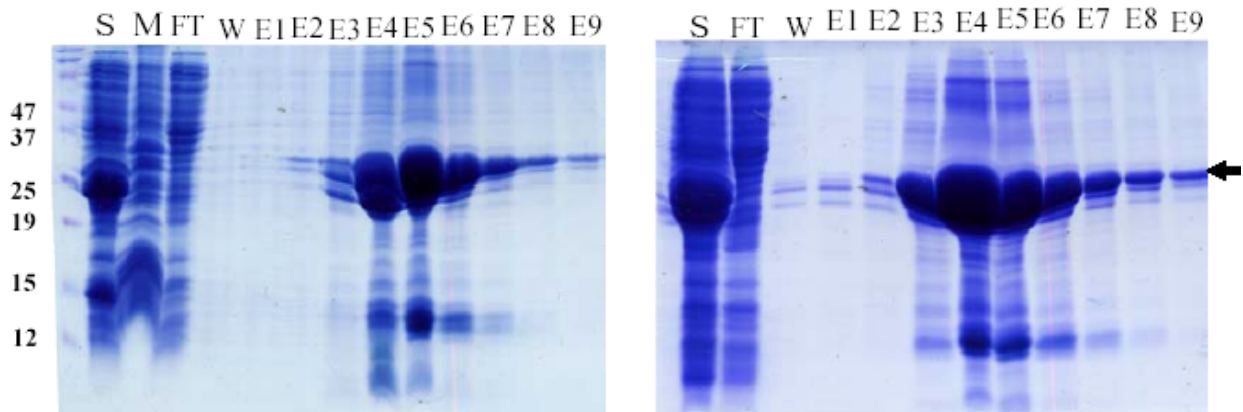


圖三、觀察 BL21(DE3)/pET32a/NUDT9 重組蛋白表現情形。

以 IPTG 為誘導物觀察蛋白質表現：NUDT9 接至 pET32a 質體後，將菌液以小量培養，待 OD600 至 0.8-1.0 後分別以加或不加入 IPTG 做為比較，收取 5 小時菌液離心後以一倍的 sample buffer 回溶後做 SDS-PAGE 染 coomassia blue 分析 NUDT9 的表現情形。

當在 *E. coli* 系統被我們大量表現出蛋白以後，我們接著做進一步的純化，首先選擇鎳離子親和性管柱來做初步純化分析，結果觀察到一個專一性的結合訊號，與之前誘導出來的訊號在 SDS-PAGE 上的分子量相同，所以此訊號應該是屬於 NUDT9 重組蛋白的專一性結合訊號。（圖四）

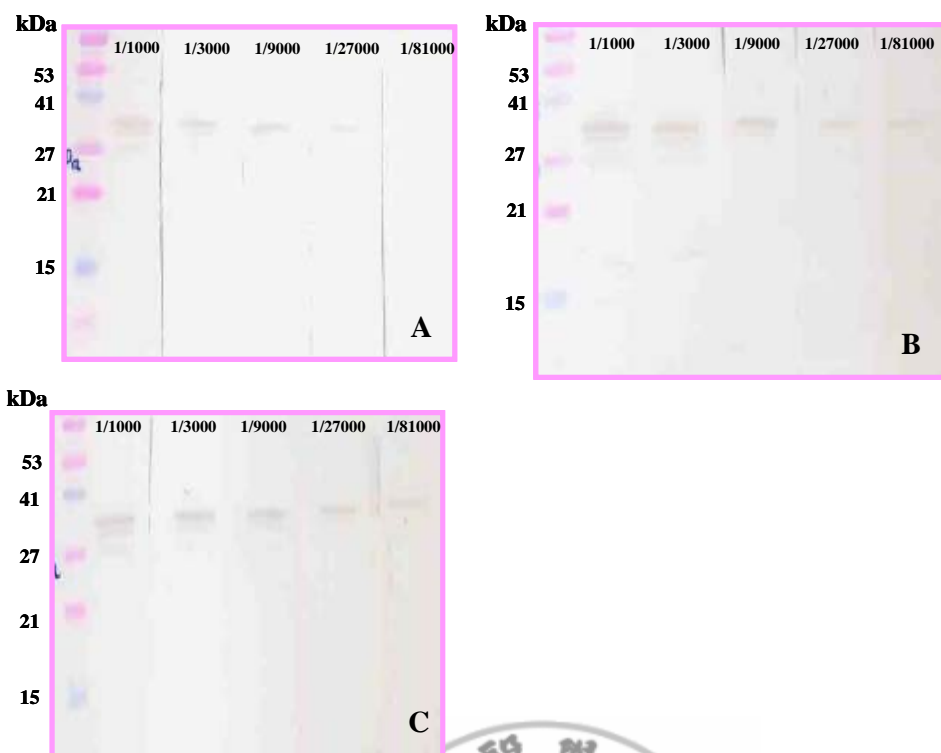
BL21(DE3)/pET32a/NUDT9



圖四、NUDT9 蛋白的純化。

以鎳離子親和性管柱做純化: 400 ml 菌液所得到的可溶性粗萃取液通過鎳離子親和性管柱純化以後分別收集通之前當做 total, 未結合當做 FT: Flow through, 清洗第一管和最後一管為 W1 及 Wn, 沖提五倍 resin 體積共 9 管分別為 E1-E9, 每管取等量體積以 SDS-PAGE 染 Coomassia blue。

將這些純化蛋白收集濃縮至 1 mg/ml 以後, 再將蛋白與佐劑混合後取 300-500 μ l 量以皮下注射的方式施打進兔子體內。第二星期後為追加反應, 以 0.5 mg/ml 和 Freund's Adjuvant-incomplete agent (SIGMA)1:1 混合, 混合方式和注射方式同上。第五星期開始第一次採血 (之後每兩星期一次), 以不同稀釋倍數 1000, 3000, 9000, 27000, 81000 的血清對 0.1 μ g 純化的蛋白進行一般呈色分析, 測其校價(圖五)。



圖五、NUDT9 蛋白的校價分析。

以不同稀釋倍數 1000, 3000, 9000, 27000, 81000 的血清對 0.1 μg 純化的蛋白進行一般呈色分析，測其校價。

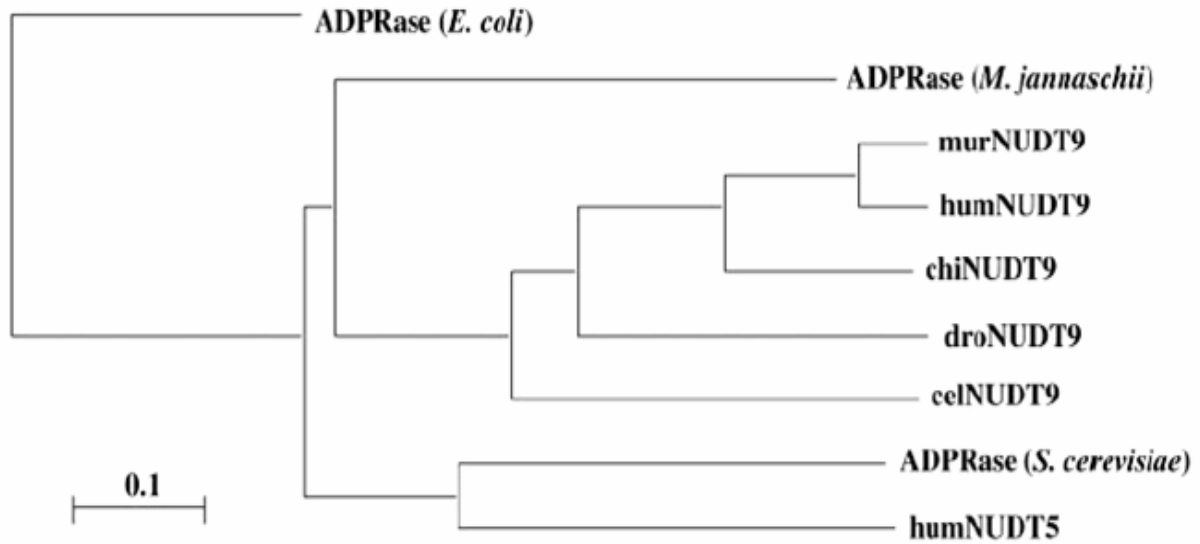
結果發現隨著免疫兔子的時間越長，其抗體效價逐漸增加。圖 A 是第一次採血，並與 NUDT9 蛋白萃取液以 1:1000, 1:3000, 1:9000, 1:27000, 1:81000 等三倍的系列稀釋做抗原抗體效價偵測，測得有反應的最高稀釋倍數為 1/27000 倍，圖 B、圖 C 分別是第二、三次放血，在 1/81000 倍稀釋則可偵測訊號且 NUDT9 抗體效價強度與免疫時間成正比關係。待抗體效價在 1/81000 可清晰看見時，開始大量放血收集。

二、NUDT9 抗體的鑑定:

(一)利用西方點墨法檢測大鼠組織萃取液中 NUDT9 蛋白

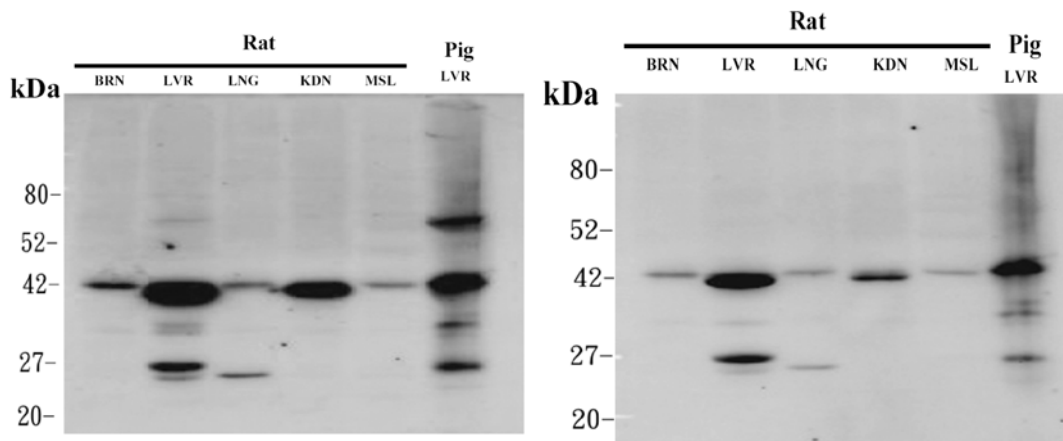
由於子宮內膜組織量少而珍貴，因此我們希望在別的動物中也可找到會

表達出 NUDT9 蛋白的組織以利實驗的進行。NCBI BLAST 網站搜尋比對，發現與老鼠同源性最高(80.6%)。



我們用 1/100 的 NUDT9 抗體檢測大鼠組織萃取液，結果發現在 39 kDa 的地方有偵測到訊號，但在豬肝約 54 kDa 有非專一性蛋白表現；因此我們取 pET32a 與 1/100 NUDT9 抗體先做 pre-clear 動作再對大鼠萃取液做西方點墨法分析，其結果與前面是一致的，且豬肝的 54 kDa 非專一性蛋白也消失。

Pre-clear

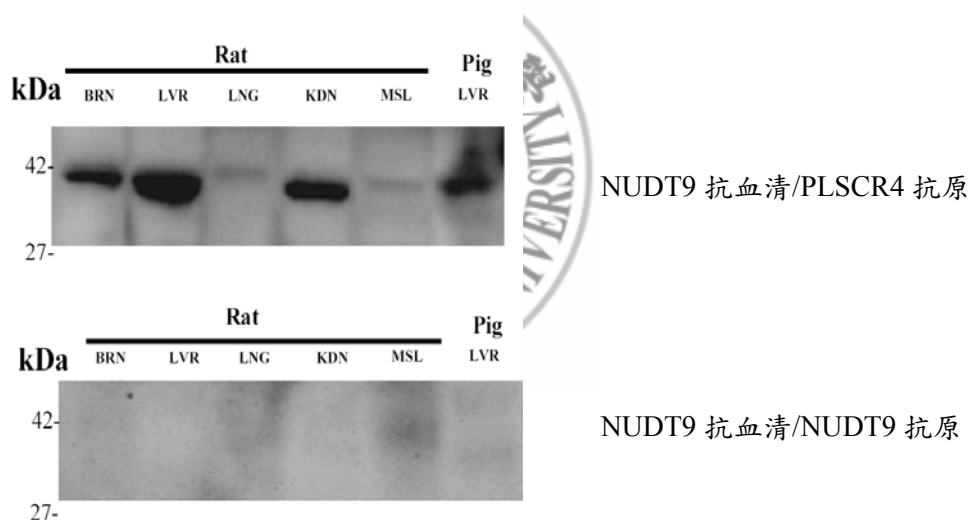


圖六、觀察老鼠組織萃取液中 NUDT9 蛋白表現的情形。

A. 觀察 Rat 中 NUDT9 的表現情形:取 10 μ l 的老鼠各組織萃取液包括 BRN(Brain)、LVR(Liver)、LNG(Lung)、KDN(Kidney)、MSL(Muscle)和豬肝至 10 μ l 的 1 倍 sample buffer 中以取 10 μ l 做 Western Blot 用 NUDT9 抗體偵測訊號。B. 取 pET32a 與 NUDT9 抗體先做 pre-clear 動作再對老鼠萃取液做 Western Blot 分析。

為了解訊號的專一性，因此再分別以 NUDT9 及 Phospholipid Scramblase 4(PLSCR4)抗原確認，預期看見 NUDT9 抗血清與 Phospholipid Scramblase 4 抗原作用依然會辨識到 39 kDa 訊號；NUDT9 抗血清與 NUDT9 抗原作用無法辨識到 39 kDa 訊號(圖七)。

Double check

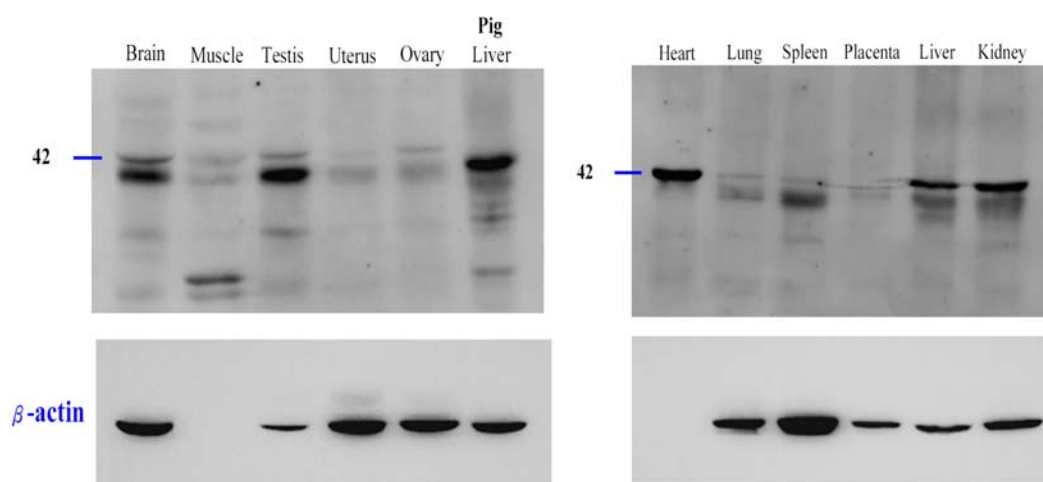


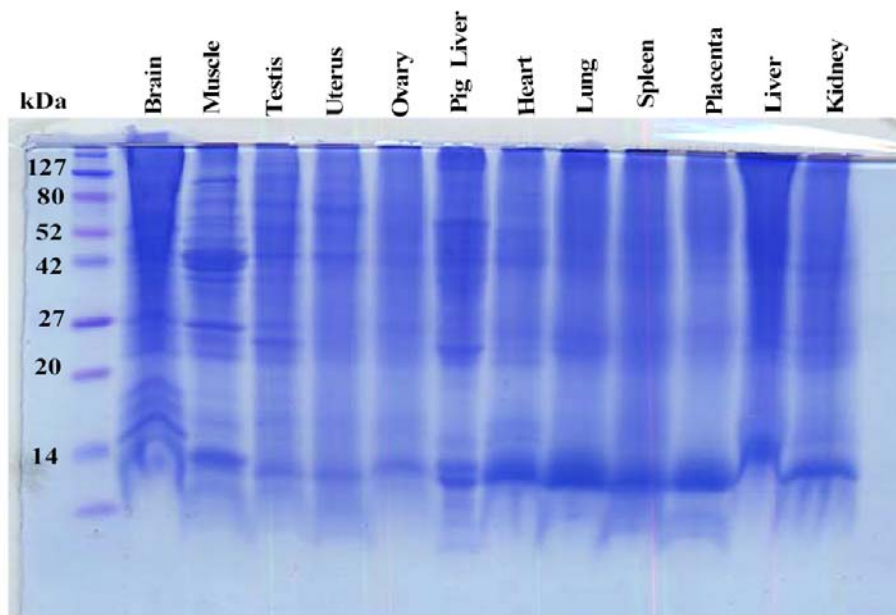
圖七、從老鼠各組織萃取液中觀察 NUDT9 蛋白表現的情形，為了解訊號的專一性，分別以 NUDT9 抗血清/PLSCR4 抗原和 NUDT9 抗血清/NUDT9 抗原 確認。

(二)利用西方墨點法檢測小鼠組織萃取液中 NUDT9 蛋白

為了要對 NUDT9 蛋白作更進一步的分析，首先我們要有充足的檢體來源，可是人類子宮內膜的檢體真的太少，經由實驗印證老鼠組織萃取液觀察

到的分子量都約 39kDa，且同源性高達 80.6 % 的確可暫代人類子宮內膜。因此，我們想嘗試著是否可以在老鼠身上找出組織的專一性，利用免疫組織化學染色法清楚知道 NUDT9 蛋白有表現器官與不表現器官差異的情形；再回歸到不同月經週期觀察 NUDT9 蛋白在子宮內膜組織表現情形。在大鼠的西方墨點法結果指出 NUDT9 蛋白在肝臟與腎臟表現量較高，相對於在肌肉、肺的表現量低；在此實驗結果呈現出所有組織都有表現，在小鼠肌肉、子宮、卵巢、肺和胎盤表現量較低，然而在腦、睪丸、心臟、肝臟與腎臟似乎表現量明顯增加，與前面實驗的結果相符（圖六）。但，有趣的是純化出 NUDT9 蛋白在小鼠組織萃取液所辨識到的非單一 band？經過文獻的搜尋得知：NUDT9 α 在雞 (chicken DT-40 B-cell) 會觀察到 3 個 bands 其分子量分散在 30-40 kDa²⁷。實驗以 β -actin 作為 internal control，然而在老鼠的 Muscle 和 Heart β -actin 卻沒有看到信號，那是因為肌肉和心臟表現 α -form 的 actin，因無法相互辨視所以無法測得。





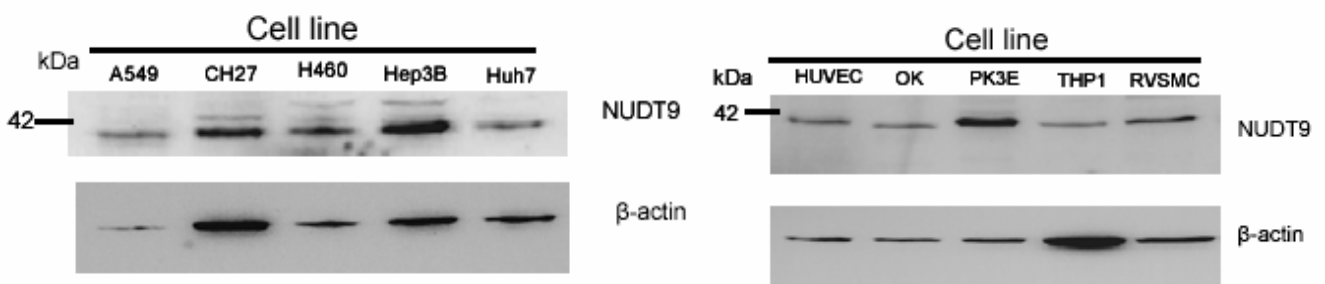
圖八、利用西方墨點法檢測老鼠組織萃取液中 NUDT9 蛋白。

取 10 μ l 的老鼠各組織萃取液至 10 μ l 的 1 倍 sample buffer 中以取 10 μ l 做 Western Blot 用 NUDT9 抗體偵測訊號 (pET32a 與 NUDT9 抗體先做 pre-clear 動作, 避免非專一性的干擾), 及 Coomassie blue stain 分析。

為求實驗的嚴謹, 除了再次重複做西方墨點法外, 還利用 NUDT9 抗血清與 NUDT9 蛋白萃取液作用做 Western Blotting 分析 (抗體-抗原中和反應), 因此無法辨識到 39 kDa 訊號來印證先前看到的確實是 NUDT9 專一訊號。

(三)以 Cell line 檢測 NUDT9 蛋白的表現

在大鼠萃取液中，以 NUDT9 做西方墨點法分析，觀察到在約 39 kDa 處有訊號產生。接著要進一步確認的是否在人體中也會有 NUDT9 蛋白的存在，我們在台中榮總徐士蘭博士的協助下順利取得不同細胞株的蛋白萃取液，包含人類臍靜脈內皮細胞(human umbilical vein endothelial cells)、腎臟上皮細胞(Renal Epithelial Cell Line)、老鼠上皮細胞(rat kidney epithelial cells)、單核球細胞(The human monocytic cell line)、老鼠血管平滑肌細胞(rat vascular smooth muscle cell)等正常的細胞株；以及不正常的細胞株，包括肺臟 A549 (lung carcinoma cell)、CH27 (human lung squamous carcinoma cell)、H460 (human lung non-small cell carcinoma cell)跟肝臟癌化細胞 Hep3B (human hepatoma cell line)、Huh7 (Human Hepatoma Cell Line)，再利用西方點墨法法來分析，結果發現所提供的細胞株蛋白萃取液不論正常與否都可以看到訊號。



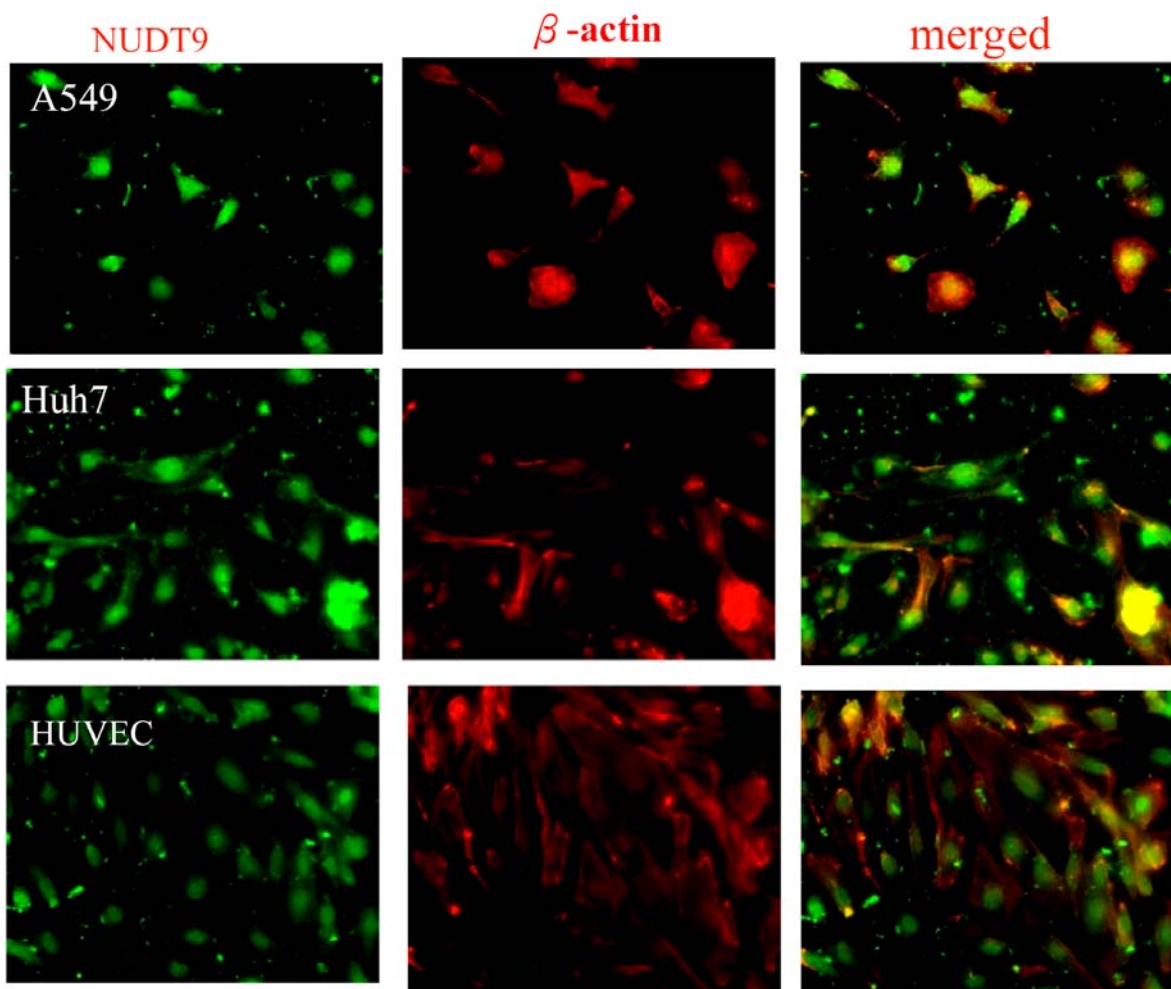
圖九、利用西方墨點法分析 NUDT9 蛋白在不同細胞株的表現情形

分別取不同細胞株包括：A549 (lung carcinoma cell)、CH27 (human lung squamous carcinoma cell)、H460 (human lung non-small cell carcinoma cell)、Hep3B (human hepatoma cell line)、Huh7 (Human Hepatoma Cell Line)、HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)、OK(Renal

Epithelial Cell Line)、RK3E (rat kidney epithelial cells)、THP1 (The human monocytic cell line)、RVSMC (rat vascular smooth muscle cell)，用 10%SDS-PAGE 進行西方墨點法分析。

(四) 利用免疫螢光染色觀察 NUDT9 蛋白在細胞株的表現位置

接下來利用免疫螢光染色進一步地觀察 NUDT9 蛋白在細胞株中表現的情形，首先將徐博士已接種在玻片上細胞株(A549、Huh7、HUVEC)，以 NUDT9 的抗血清進行免疫螢光染色(為了避免非專一性的干擾，取 pET32a 與 NUDT9 抗體先做 pre-clear 動作)後，再用 FITC-conjugated secondary antibody 偵測，最後以共軛焦顯微鏡觀察，結果發現 NUDT9 蛋白可以在細胞質上表現但強度不明顯，在細胞核的表現則可明顯偵測到。

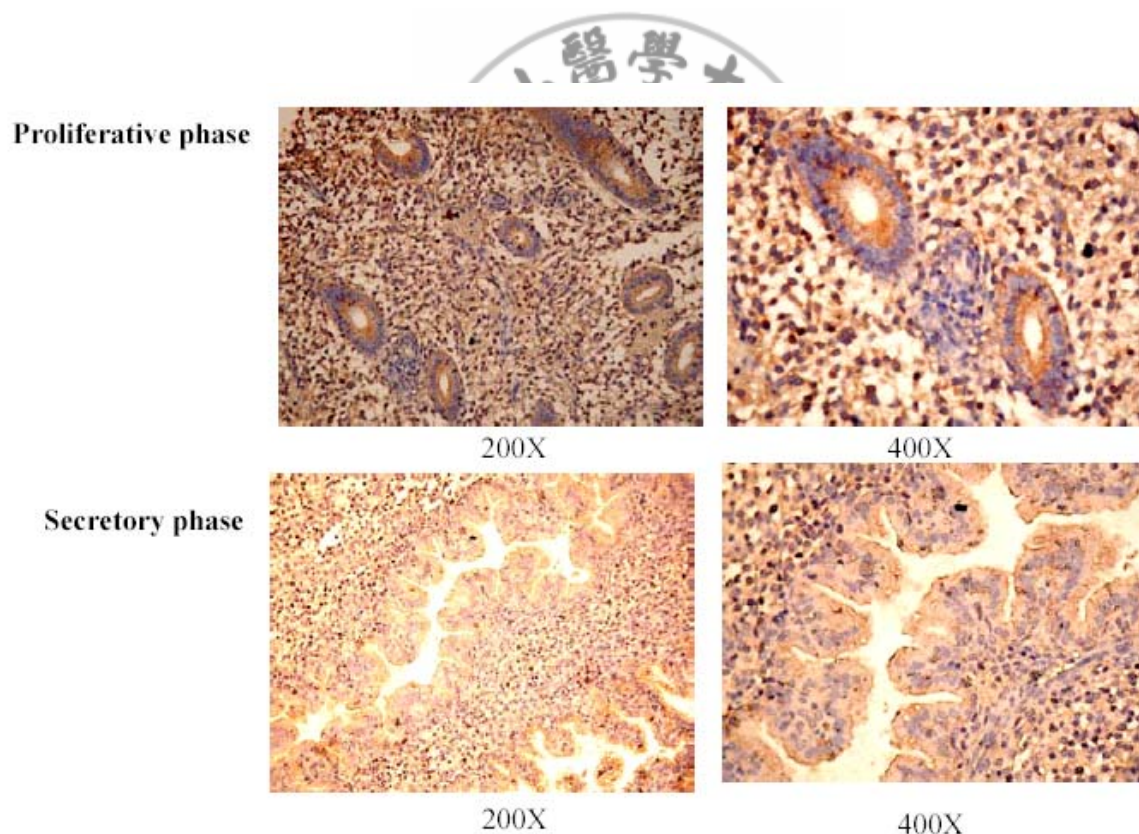


圖十、利用免疫螢光染色分析 NUDT9 蛋白在不同細胞株(A549、Huh7、HUVEC)的表現情形。

以 NUDT9 的抗血清進行免疫螢光染色，再用 FITC-conjugated secondary antibody 偵測，最後以 400 倍共軛焦顯微鏡觀察。

(五)利用免疫組織化學染色法檢測 NUDT9 蛋白在不同時期表現情形

根據先前實驗室研究指出在 DD RT-PCR 的結果中 NUDT9 基因在分泌期與增殖期表現量有所不同；直接取增殖期及分泌期子宮腺體細胞切片以 NUDT9 蛋白進行免疫組織化學染色，隨後利用 Hematoxylin 複染，再以 200 倍及 400 倍顯微鏡觀察，結果發現 NUDT9 蛋白在增殖期(腺體呈圓柱或橢圓狀)表現量較分泌期(腺體皆呈紆曲狀)表現量高。



圖十一、利用免疫組織化學染色法分析不同時期 NUDT9 蛋白表現情形

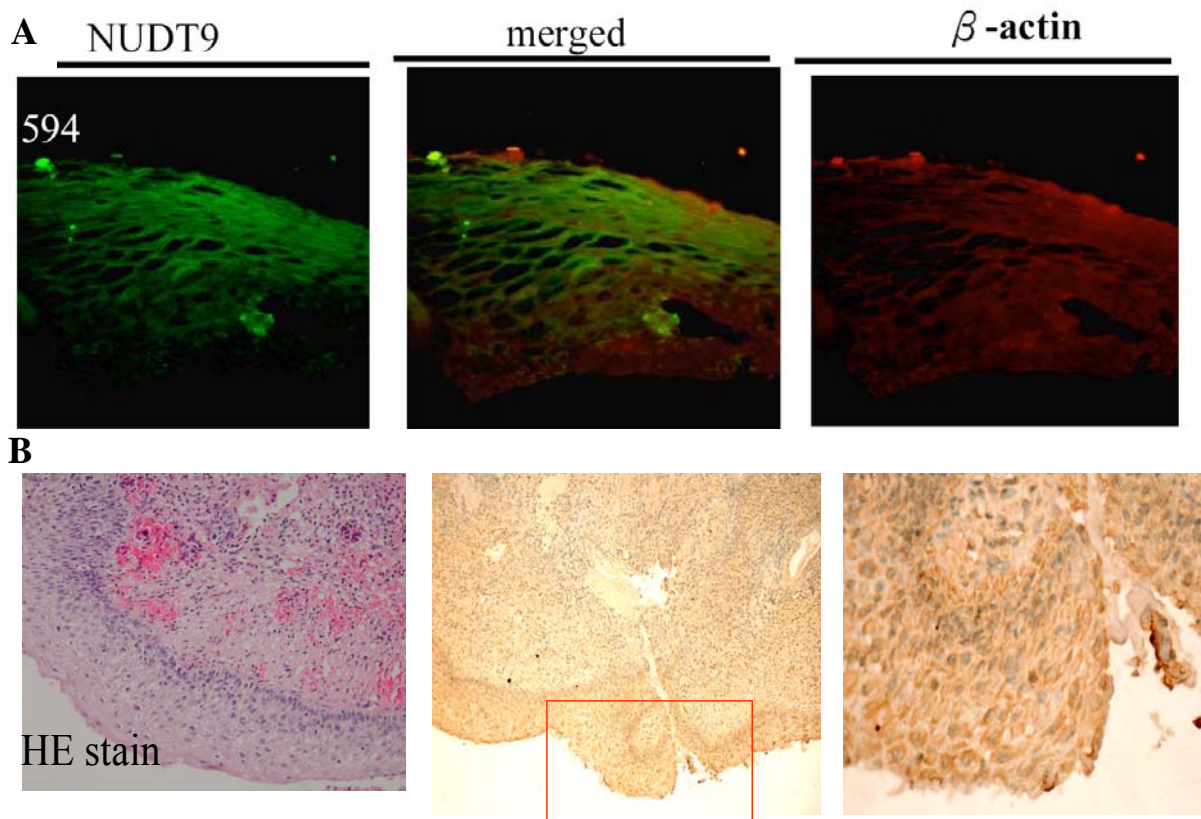
將增殖期(proliferative phase)及分泌期(secretory phase)子宮內膜組織切片以 NUDT9 抗體進行免疫組織化學染色，隨後利用 Hematoxylin 複染，再以 100 倍及 400 倍顯微鏡觀察。

(七)利用螢光及免疫組織化學染色觀察 NUDT9 蛋白在子宮頸內皮贅瘤

(cervical intraepithelial neoplasia; CIN)表現的情形

一般子宮頸上皮內癌多由人類乳頭瘤病毒感染所造成，與性生活史明顯相關，是子宮頸癌的癌前病變。由前面實驗得知：NUDT9 在子宮內膜腺體細胞會表現，進一步想瞭解 NUDT9 蛋白在子宮內頸細胞的表現情形，在森玲學姊的協助下順利取得子宮頸上皮內細胞變性的組織進一步染色觀察，結果發現在子宮頸上皮內細胞變性的組織(CIN)均有 NUDT9 蛋白表現。

CIN2 Moderate dysplasia



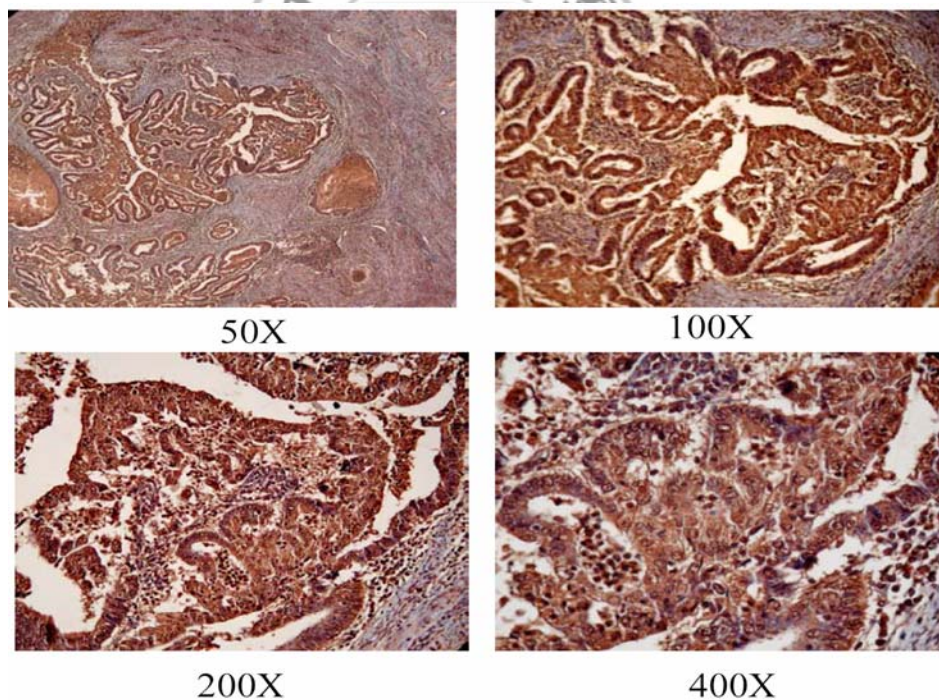
圖十二、利用螢光及免疫組織化學染色觀察 NUDT9 蛋白在子宮頸上皮細胞變性(CIN) 表現的情形。

A：利用 NUDT9 一級抗體及 FITC 標示二級抗體進行免疫螢光染色，再以共軛焦顯微鏡觀察。

B：以 NUDT9 抗體進行免疫組織化學染色，隨後利用 Hematoxylin 複染，再以 100 倍及 400 倍顯微鏡觀察。(HE stain：Hematoxyline and Eosin stain)

(八)觀察 NUDT9 蛋白在子宮內膜癌表現的情形

在台灣子宮內膜癌佔婦科癌症的第二位，僅次於子宮頸癌。成因是雌激素分泌過多，而黃體素分泌過少，使荷爾蒙分泌失去平衡，讓子宮內膜一直處於增殖狀態，進而使子宮內膜產生病變，形成子宮內膜癌。因為在圖十二（組織化學染色）的結果中指出 NUDT9 在增殖期會大量表現，因此取子宮內膜癌（細胞過度增生）觀察 NUDT9 染色的結果：腫瘤組織與正常組織相比呈現明顯的染色。

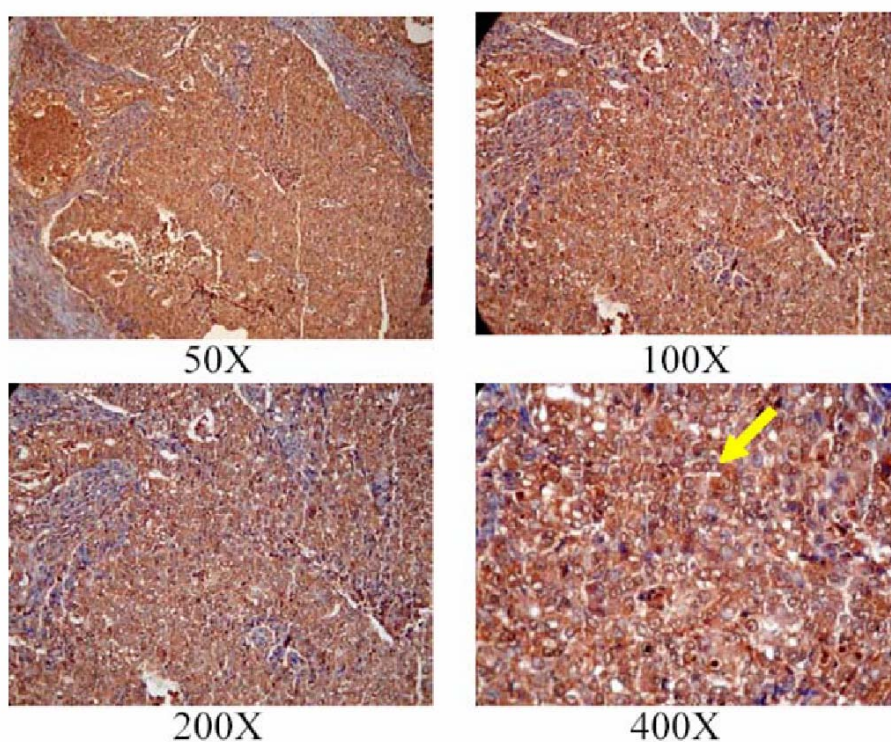


圖十三、利用免疫組織化學染色法分析子宮內膜癌(過度增生) NUDT9 蛋白表現情形

利用 NUDT9 抗體進行免疫組織化學染色，隨後利用 Hematoxylin 複染，再分別以 50 倍、100 倍、200 倍、400 倍顯微鏡觀察。

(九) 利用免疫組織化學染色法分析子宮內膜癌 NUDT9 蛋白表現情形

經由免疫組織化學染色的實驗證實，在子宮內膜癌組織中 NUDT9 蛋白表現量高於正常組織，且在染色的癌組織檢體中可觀察到大部份細胞核有表現(箭頭所指)。



圖十四、利用免疫組織化學染色法分析子宮內膜癌(過度增生) NUDT9 蛋白表現情形
利用 NUDT9 抗體進行免疫組織化學染色，隨後利用 Hematoxylin 複染，
再分別以 50 倍、100 倍、200 倍、400 倍顯微鏡觀察。

討論：

先前實驗室利用 DDRT-PCR 去找出子宮內膜腺體細胞在增殖期及分泌期表現差異的基因，針對差異性的基因探討該基因表現與子宮內膜改變的相關性。在本論文中首先利用重組蛋白技術構築 NUDT9 蛋白，為了避免因為疏水性胺基酸過多影響到蛋白質的表達，因此所設計的重組蛋白 NUDT9 其 NH₂ 端的胺基酸序列由第 51 個胺基酸 (Methionine) 開始，COOH 端則至第 186 個胺基酸 (Glycine) 共 135 個胺基酸，恰巧為 NUDT9 β form 全長 33.8 kDa 的蛋白。接著進一步免疫兔子得到抗體，再對老鼠組織萃取液做檢測，發現有訊號表現出來 (圖六、圖八)。另外，對各種細胞株進行分析，結果看到無論正常或不正常細胞株 NUDT9 β 蛋白都有訊號表現(圖九)。再者，利用免疫螢光染色觀察細胞株(A549、Huh7、HUVEC)表現情形，發現 NUDT9 β 蛋白表現於細胞核內並在細胞質有淡染 (圖十)。再利用免疫組織化學染色觀察到 NUDT9 β 蛋白在增殖期的子宮內膜腺體細胞會明顯表現(圖十一)。最後，根據 NUDT9 β 蛋白在子宮內膜癌(子宮內膜一直處於增殖狀態，進而使子宮內膜產生病變，形成子宮內膜癌)與正常組織相比呈現明顯的染色，印證 NUDT9 β 蛋白在細胞過度增生扮演相當的關鍵角色(圖十三)。

一、NUDT9 β 蛋白在癌組織高度表現？

在子宮頸上皮內癌(CIN)與子宮內膜癌組織(EM cancer)確實看到 NUDT9 β 明顯表現量高於正常組織，為求實驗的嚴謹必須增加癌檢體樣本數；或者取不同癌組織，如果 NUDT9 β 在不同癌組織均會大量表現，則可取代樣本數的不足。

二、NUDT9 β 的生理功能，為何在子宮內膜腺體細胞的分泌期與增殖期有差異？

cyclic ADP ribose 扮演著第二訊號角色，刺激鈣離子湧入細胞內進而活化其他酵素或生理功能的表現，例如 ADP-ribosylation factor (ARF) 會參與細胞內的囊泡運輸，所以在子宮內膜的分泌期，可以觀察到少許的蛋白表現；但在子宮內膜的增殖期，此時不再需要 ARF 參與囊泡的運輸，這也是為何利用免疫組織化學染色，可以觀察到 NUDT9 β 蛋白在子宮內膜增殖期表現量較分泌期表現量高。

三、NUDT9 β 與癌化有何關係？

Free ADP-ribose 經由 TRPM2 (Transient receptor potential channel 2)

可自由進出細胞，因 NUDT9 在體內扮演著 ADP-ribose pyrophosphatases

(ADPRase)角色，會清除 Free ADP-ribose，避免細胞受損¹⁶。Free ADP-ribose 是一個具有毒性的代謝產物，此游離狀態的 ADP-ribose (ADPR)堆積會使 histidyl, lysyl 和 cysteinyl 產生非酵素糖化作用¹⁷，當蛋白改變時會導致細胞發生變化走向細胞凋亡。因此，可以解釋為何在子宮頸上皮內癌(CIN)與子宮內膜癌組織(EM cancer)可以看到 NUDT9 較正常組織表現量高。

四、為何推測NUDT9β蛋白與細胞週期(cell cycle)的調控有關？

利用免疫螢光染色觀察NUDT9β蛋白於不同細胞株的表現，發現三種細胞株(A549、Huh7、HUVEC)均有相同的染色結果，NUDT9β蛋白可以在細胞質上表現但強度不明顯，在細胞核的表現則可明顯偵測到。根據2003年文獻報導指出NUDT9α具有mitochondria targeting sequence (MTS，位於NH₂端)，主要分佈於細胞質內，一般狀況下分佈於細胞質內，但在特殊狀況下會轉移至細胞核工作¹⁶。經由免疫組織化學染色也意外的發現NUDT9β蛋白在細胞核部份會表現、部份不表現，至於為何在細胞核與細胞質間穿梭；我們推測NUDT9β蛋白也可能具有shuttling 的能力，在細胞週期的S期(DNA合成)因為要促進細胞分化，細胞複製須要NUDT9扮演著ADP-ribose pyrophosphatases 角色，減少Free ADP-ribose產生，避免細胞受損或走向apoptosis，此確切的作用機轉仍有進一步研究之必要性。針對NUDT9β進入核內此特性，可以提供一個有趣的研究方向，統計在正常或癌組織進核率的上升與癌化之間關聯性。

五、如果NUDT9 β 蛋白與細胞週期(cell cycle)的調控有關，如何測試Test？

將細胞處理不同的藥物讓細胞週期停留在特定時期，例如處理 Doxycycline 可以使cell cycle arrest在G₁ phase，Thymidine 將cycle arrest在S phase，colcemid 會將cell cycle arrest在M phase，再藉由流式細胞儀(Flow cytometry)測量細胞在細胞週期所在時期，在G₀/G₁時期的細胞有單套染色體(haploid, N)；G₂/M時期的細胞有雙套染色體(diploid, 2N)；S時期的細胞是屬於DNA合成時期，其DNA含量介於G₀/G₁與G₂/M，如果細胞呈現多核情形則會在G₂/M 時期出現連續peak。最後，利用免疫螢光染色和共軛焦顯微鏡觀察NUDT9 β 蛋白在細胞分佈位置 (phollidin 作為 β -actin 一抗，解析品質最佳)。

綜合以上的實驗結果有助於我們了解到NUDT9 β 蛋白在子宮內膜增殖時會明顯表現，可以提供子宮內膜增殖與分化和胚胎著床之相關性研究之參考；以及NUDT9 β 蛋白可能在癌化過程中(細胞過度增生)扮演相當的關鍵角色，也可供作細胞癌化機轉的進一步研究及早期診斷參考依據。

Reference:

1. Charpin, C., Martin, P.M., Lavaut, M.N., Pourreau-Schneider, N., and Toga, M. (1986) Estrogen receptor immunocytochemical assay (ER-ICA) in human endometrium. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **5**, 119-131.
2. Leavitt, W.W., Takeda, A., and MacDonald, R.G. (1986) Progesterone regulation of protein synthesis and steroid receptor levels in decidual cells. *Ann. Acad. Sci.(N. Y.)*. **476**, 136-157.
3. Deligdisch, L. (2000) Hormonal Pathology of the Endometrium. *Mod. Pathol.* **13**, 285–294.
4. Dockery, P., Khalid, J., Sarani, S.A., Bulut, H.E., Warren, M.A., Li, T.C., and Cooke, I.D. (1998) Changes in basement membrane thickness in the human endometrium during the luteal phase of the menstrual cycle. *Human Reproduction Update.* **4**, 486-495.
5. Maslar IA. (1988) The progesterone endometrium. *Semin. Reprod. Endocrinol.* **6**, 115-128.
6. Critchley, H. O. D., Kelly, R. W., Brenner, R. M., Baird, D. T. (2001) The endocrinology of menstruation - a role for the immune system. *Clinical Endocrinology.* **55**, 701-710.
7. Punyadeera, C., Verboost, P., and Groothuis, P. (2003) Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J. Ster. Biochem. Mole. Bio.* **84**, 393-410.
8. Ferenczy, A., and Bergeron, C., (1991) Histology of the human endometrium: from birth to senescence. *Ann. N. Y. Acad Sci.* **622**, 6-27.
9. Tseng, L., and Gurpide, E. (1975) Induction of human endometrial estradiol dehydrogenase by progestins. *Endocrinology.* **97**, 825-833.
10. Clarke, C.L., and Sutherland, R.L. (1990) Progestin regulation of cellular proliferation. *Endocr. Rev.* **11**, 266-301.
11. Okulicz, W.C., and Ace, C.I. (1999) Progesterone-regulated gene expression in the primate endometrium. *Semin. Reprod. Endocrinol.* **17**, 241-255.

12. Siegfried, S., Pekonen, F., Nyman, T., and Ämmälä, M. (1995) Expression of mRNA for keratinocyte growth factor and its receptor in human endometrium. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* **74**, 410-414.
13. Hampton, A.L. & Salamonsen, L.A. (1994) Expression of messenger ribonucleic acid encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors is related to menstruation. *J. Endocrinol.* **141**, R1–R3.
14. Marbaix, E., Kokorine, I., and Henriët P. (1995) The expression of interstitial collagenase in human endometrium is controlled by progesterone and by oestradiol and is related to menstruation. *Biochem. J.* **305**, 1027–1030.
15. Henriët, P., Cornet, P.B., Lemoine, P., Galant, C., Singer, C.F., Courtoy, P.J., Eeckhout, Y., And Marbaix, E., (2002) Circulating Ovarian Steroids and Endometrial Matrix Metalloproteinases (MMPs). *Ann. N. Y. Acad Sci.* **955**, 119-138.
16. Anne-Laure Perraud, Betty Shen, Christopher A. Dunn, Karsten Rippe, Megan K. Smith, Maurice J. Bessman, Barry L. Stoddard, and Andrew M. Scharenberg. (2003) NUDT9, a Member of the Nudix Hydrolase Family, Is an Evolutionarily Conserved Mitochondrial ADP-ribose Pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* **278**, 1794–1801.
17. Jacobson EL, Cervantes-Laurean D, and Jacobson MK. (1997) ADP-ribose in glycation and glyoxidation reactions. *Advances in Experimental Medicine & Biology.* **419**, 371-9.
18. Ribeiro JM, Carloto A, Costas MJ, and Cameselle JC. (2001) Human placenta hydrolases active on free ADP-ribose: an ADP-sugar pyrophosphatase and a specific ADP-ribose pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1526**, 86-94.
19. Perraud, A.L., Fleig, A., Dunn, C.A., Bagley, L.A., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, A.J., Zhu, Q., Bessman, M.J., Penner, R., Kinet, J.P., and Scharenberg, A.M. (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature.* **411**, 595-599.

20. Bessman, M. J., Frick, D. N. & O'Handley, S. F. (1996). The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J. Biol. Chem.* **271**, 25059–25062.
21. Dunn, C. A., O'Handley, S. F., Frick, D. N. & Bessman, M. J. (1999). Studies on the ADP-ribose pyrophosphatase subfamily of the nudix hydrolases and tentative identification of trgB, a gene associated with tellurite resistance. *J. Biol. Chem.* **274**, 32318–32324.
22. Sheikh, S., O'Handley, S. F., Dunn, C. A. & Bessman, M. J. (1998). Identification and characterization of the Nudix hydrolase from the Archaeon, *Methanococcus jannaschii*, as a highly specific ADP-ribose pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* **273**, 20924–20928.
23. Gabelli, S. B., Bianchet, M. A., Bessman, M. J. & Amzel, L. M. (2001). The structure of ADP-ribose pyrophosphatase reveals the structural basis for the versatility of the Nudix family. *Nature Struct. Biol.* **8**, 467–472.
24. Gabelli, S. B., Bianchet, M. A., Ohnishi, Y., Ichikawa, Y., Bessman, M. J. & Amzel, L. M. (2002). Mechanism of the *Escherichia coli* ADP-ribose pyrophosphatase, a Nudix hydrolase. *Biochemistry*, **41**, 9279–9285.
25. Bernet, D., Pinto, R. M., Costas, M. J., Canales, J. & Cameselle, J. C. (1994). Rat liver mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase in the matrix space Structure of NUDT9 Hydrolase 397 with low Km for free ADP-ribose. *Biochem. J.* **299**, 679–682.
26. Betty W. Shen, Anne-Laure Perraud, Andrew Scharenberg & Barry L. Stoddard (2003). The Crystal Structure and Mutational Analysis of Human NUDT9. *J. Mol. Biol.* **332**, 385–398.
27. Lin, S., Gasmi, L., Xie, Y., Ying, K., Gu, S., Wang, Z. et al. (2002). Cloning, expression and characterization of a human Nudix hydrolase specific for adenosine 5'-diphosphoribose (ADP-ribose). *Biochim. Biophys. Acta*, **1594**, 127–135.

附錄 2：NUDT9 核苷酸及胺基酸序列

1 *ggcagagagaaaagttacagaggttcgtggcogcggtttcccaggcagctggcgctggaggcttoggcgtcaogtgcgtggtctgqatTTTT*
 91 *ctcgtatgcaactgggaaaaagcgtggactctttatcgtgggagggctcttgatctctgatttatagataggcacaaggaacccaacggcaga*
 181 *caggtcctagtcccatacagatacccggcggcggactcggagctgtgggtgtgggagggagggcaccactaaagagcgcctagca*
 271 *tcgcaaaagccgctcgggagcctcatggcgggacgctcctgggaaaagcctttagccgaggtctctctctctgaccttgcctctgtg*
 1 *M A G R L L G K A L A A V S L S L A L A S V*
 361 *actatcaggtcctcggcgtcccggcctccaagcgttcagaaaactgTTTTcatctcttggttcatottaataccaacgtcatctct*
 23 *T I R S S R C R G I Q A F R N S F S S S W F H L N T N V M* S*
 451 *ggttotaatggttccaaagaaaattctcacaataaggctoggaogtctccttaccaggttccaaagttgaacgaagccaggttcccta*
 53 *G S N G S K E N S H N K A R T S P Y P G S K V E R S Q V P N*
 541 *gagaaagtgggtggcttgttgagtggcaagactataagcctgtggaatacaactgcagctctctcttggctggaccaggtgggcagat*
 83 *E K V G W L V E W Q D Y K P V E Y T A V S V L A G P R W A D*
 631 *cctcagatcagtgaaagtaatttttctcccagtttaacgaaaaggtgggcatggtgagagaaagagcaagaatggcctgtatgagatt*
 113 *P Q I S E G N F S P K F N E K D G H V E R K S K N G L Y E I*
 721 *gaaaatggaagaccgagaaatcctgcaggacggactggactggtggcgggggcttttggggcagatggggcccaaatcacgctgcagat*
 143 *E N G R P R N P A G R T G L V G R G L L G R W G P N H A A D*
 811 *cccattataaccagatggaaaaggtatgacagtggaataaaaatcctgcatcctgcttctgggaagcatalcttacaatttgttgaata*
 173 *P I I T R W K R D S S G N K I M H P V S G K H I L Q F V A I*
 901 *aaaaggaagactgtggagaatgggcaatcccaggggggatggtggatccaggagagaagattagtgccacactgaaaagagaatttgg*
 203 *K R K D C G E W A I P G G M V D P G E K I S A T L K R E F G*
 991 *gaggaagctctcaactccttacagaaaaccagtgctgagaagagagaaatagaggaaaagttgcacaaactctcagccaagaccaccta*
 233 *E E A L N S L Q K T S A E K R E I E E K L H K L F S Q D H L*
 1081 *gtgatataaagggatggttgatgatoctogaaaactgataatgcattggatggagacagaagctgtgaactaccatgacgaaacaggt*
 263 *V I Y K G Y V D D P R N T D N A W M E T E A V N Y H D E T G*
 1171 *gagataatggataatcctttagctagaagctggagatgctggaaaagtgaaatgggtggacatcaatgataaactgaagctttatgoc*
 293 *E I M D N L M L E A G D D A G K V K W V D I N D K L K L Y A*
 1261 *agtcactctcaattcatcaaaacttggctgagaaacgagatgcacactggagcagggactotgaagctgactgccatgctgtgtgactg*
 323 *S H S Q F I K L V A E K R D A H W S E D S E A D C H A L **
 1351 *atggtctccgtgtaagccaaaggcccacagaggagcatatactgaaaagaagcagatcacagaatttatactataaaaaagggcaggg*
 1441 *aggccacttggcctatcttctcaaaaactttgcatttagagtggttgcacatcagaataacatgagtaagatgaactggaacacaaaa*
 1531 *ttttcagctctttggcctcaaaaggaatataagtaaatcatatctttagatgtattogatttaagcagctttaaattaaatttaaacactaa*
 1621 *tgctcttgaagaatcataatacagaaataaagataaattcttgatca*

The complete nucleotide and amino acid sequences of NUDT9.

- The potential N-terminal mitochondrial targeting signal is italicized.
- The initiating methionine in NUDT9 β(Met51) is marked with an asterisk.
- The Nudix motif is double underlined.
- The probable polyadenylation signal (1645-1650) is italicized.

附錄 3：DDRT-PCR 找出增殖期及分泌期子宮腺體細胞具表現差異性的基因

	D5	D18	類別		D5	D18	類別
A15A-spastin	√		1	A22C	√		4
A15B-SCA1		√	4	A22D-human Iγ		√	3
A16A-XM027541		√	2	A24A-RP11450E9	√		3
A16B-RP11-156P1		√	3	A24B-RP1244G5	√		3
A16C-RP11-156P1		√	3	A24C	√		4
A16D-XM027541		√	2	A24D	√		4
A17A-NUDT10	√		1	A24E	√		4
A17B		√	4	A24F	√		4
A17C-tropomodulin	√		1	A24G	√		4
A18A-spastin	√		1	A24H		√	4
A19B-scramblase 4	√		1	A24I		√	4
A19C-XM027541		√	2	A24J		√	4
A22B-NUDT9	√		1	A24K		√	4

- 第一類:文獻已確定之基因
- 第二類:可在 cDNA 基因庫搜尋到，但功能未知，為推測性基因
- 第三類:無法在 cDNA 基因庫搜尋到，可能是 unidentify gene
- 第四類:實驗污染(ex:Mit DNA 污染)

附錄 4：培養基與抗生素製備

1. LB 液體培養基：25 g LB Broth add ddH₂O water to 1L，autoclave

Immediately

2. LB 固體培養基：400 ml LB medium 加 3 g agar，autoclave

Immediately

3. Ampicillin (Amp)：

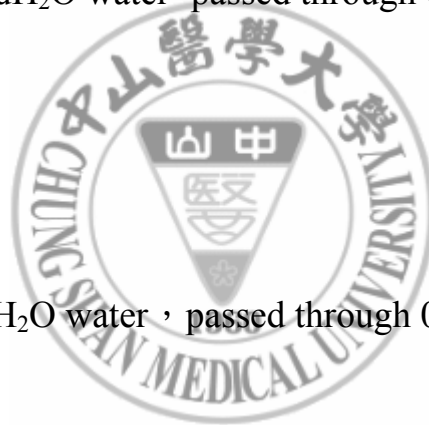
Stock：150 mg/ml in ddH₂O water，passed through 0.22 μm filter，stored at -20 °C

Working：150 μg/ml

4. Kanamycin (Km)：

Stock：50 mg/ml in ddH₂O water，passed through 0.22 μm filter stored at -20 °C

Working：50 μg/ml



附錄 5：試劑與緩衝溶液的製備

Buffer:

1. Buffer of western blot

Resolving gel :

30%acrylamide-bis acrylamide (29 : 1)	1.875 ml
1.5 M Tris-HCl , pH8.8	1 ml
10%SDS	0.04 ml
1.5%ammonium persulfate	0.5 ml
ddH ₂ O water	0.6 ml
TEMED	0.002 ml

Stacking gel :

30%acrylamide-bis acrylamide (29 : 1)	0.25 ml
1.5 M Tris-HCl , pH8.8	0.5 ml
10%SDS	0.02 ml
1.5% ammonium persulfate	0.1 ml
ddH ₂ O water	1.03 ml
TEMED	0.002 ml

Sample buffer (2X)	Tris-HCl (1.5 M PH6.8)	1 ml
	DTT (1.25 M)	0.5 ml
	Glycerol (100 %)	1 ml
	SDS (10 %)	1 ml
	Bromophenol blue (0.002 %)	1 ml

Electro buffer	Tris-base	3 g
	Glycine	14.4 g
	SDS	1 g
	add ddH ₂ O water to final volume	1 L

Transfer buffer:	Tris-base	9.1 g
	Glycine	43.2 g
	Methanol	600 ml
	add ddH ₂ O water to final volume	3 L

Blocking buffer (6%)	脫脂奶粉	6 g
	TBS buffer	100 ml

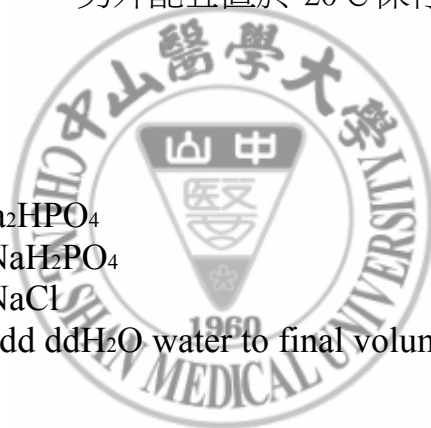
TBS buffer	0.5 M Tris-HCl , PH7.5	20 ml
	NaCl	9 g
	add ddH ₂ O water to final volume	1 L

Protein lysis buffer:

- 15 mM Tris-base (MW : 121.1)
- 250 mM sucrose (MW : 342.3)
- 1 mM EDTA (MW: 372.2)
- 2 mM PMSF (MW : 174.2)

另外配且置於-20℃保存，使用前再加。

Phosphate buffer: (10X pH7.4)	Na ₂ HPO ₄	9.94 g
	NaH ₂ PO ₄	3.6 g
	NaCl	75.972 g
	add ddH ₂ O water to final volume	1 L



Reagent:

1. Clony selection reagent	EDTA	1 ml
	Sucrose	10 g
	SDS	0.25 g
	NaOH (1 M)	10 ml
	KCl	0.447 g
	Bromophenol blue	0.05 g
2. Coomassie blue stain	Coomassie blue R-250	0.625 g
	Amido black	0.5 g
	ddH ₂ O	227 ml
	Acetic acid	46 ml
	Methanol	227 ml
3. Destain	Methanol	150 ml
	Acetic acid	50 ml
	ddH ₂ O	350 ml
4. SDS condense solution	Methanol	175 ml
	Glycerol	8 ml
	ddH ₂ O	317 ml
5. DNA loading dye	Bromophenol blue	0.25% (W/V)
	Xylene cyanol FF	0.25% (W/V)
	Sucrose in H ₂ O	40%

