

蛋白質進入細胞核的祕密

高中組生物科第三名

台北市立第一女子高級中學

作者：陳映嘉

指導教師：鍾邦柱、周芳妃

一、研究動機

現今分子生物是相當熱門的一個科目，做基因的探討和各種這方面的實驗也是非常有趣的，所以藉這個機會先學習這個技術。

自以前所學，蛋白質是在細胞質中製造的，但是細胞核內有許多的反應進行都需要酵素，這些酵素是蛋白質，所以蛋白質必有某種機制使它們進入細胞核中。因為細胞核中的反應很多，且都是和細胞分化後的功能息息相關，所以了解蛋白質如何進入細胞核來影響細胞核中的反應是極為重要的。因此，我想經由這個實驗先來了解這一點。

二、研究目的

1. 學習分子生物的技術。
2. 尋找使蛋白質SF1進入細胞核的基因序列。
3. 了解蛋白質如何進入細胞核。

三、研究設備器材

1. 螢光顯微鏡
2. 桌上型離心機
3. 高速離心機
4. 無菌操作箱（操作細菌用）
5. 軌道式震盪培養箱
6. 無菌操作箱（操作細胞用）
7. 二氧化碳培養箱
8. 光譜儀
9. 電泳槽及電源供應器

四、研究過程或方法

(一) 原理

1. SF1: SF1 (Steroidogenic Factor 1) 這個蛋白是一個轉錄因子，可使合成類固醇的基因轉錄。缺乏SF1的老鼠，腎上腺和生殖腺無法發育，所以了解SF1的作用實在是非常重要的(3)。
2. 綠螢光蛋白：綠螢光蛋白GFP (Green Florescent Protein) 是在僧帽水母中發現的。它會吸收紫外光或藍光，放出綠色螢光而被觀察到。本實驗所使用的是加強型綠螢光蛋白EGFP (Enhanced Green Florescent Protein)，它放射光的強度是野生綠螢光蛋白的35倍，它吸收光的波長範圍約450-500nm，以波長489nm為最佳；放射出來的螢光則是波長507nm，呈綠色(1)。
3. 實驗原理：SF1是在細胞核當中作用的，所以知道必定有一段DNA是控制使此蛋白質能夠進入細胞核(2, 4)。根據文獻(2, 4)，蛋白質進入細胞核和胺基酸序列中的Lysin(K)和Arginin(R)胺基酸有關。所以觀察SF1的K和R胺基酸分布，找到一段K和R分布較密集的部份，大小約35個胺基酸。為了確切知道哪一段序列才是最重要，能讓細胞核辨識而使蛋白進入細胞核，根據一些研究報告(2, 4)和個人想法，從中選了三段，來進行探討。NLS2的胺基酸順序和所選取的段落。NLS2.1、NLS2.2、NLS2.3的胺基酸順序對照表如附表一。

實驗方法是先將三段序列NLS2.1、NLS2.2、NLS2.3合成寡核酸(oligonucleotide)，再將序列接上一個帶有綠色螢光基因的載體(NLS2的質體已由李立安學姊構築完成，可直接取用進行下一步)，然後將質體送入細菌大量製造後，送入哺乳動物的細胞去看它是否表現在細胞核中，也就是是否在藍光照射下，在核的地方發出綠色螢光。如果表現在核，則表示此段基因是把蛋白質帶入細胞核中的基因。

4. 有關於載體的資料如附圖一。

(二) 步驟：實驗流程如附圖二。

1. 設計oligo (寡核酸)
2. Kinase-annealing
3. 載體的準備
4. 連接
5. 轉形

6. DNA的萃取
7. 用限制酶切DNA
8. 電泳檢查
9. DNA的大量萃取
10. 用光譜測光度，換算濃度
11. DNA定序
12. 養細胞株
13. 轉染
14. 螢光顯微鏡觀察

五、實驗結果

(一) 質體構築及其後的電泳檢查

本實驗是將oligo和帶有EGFP的載體接在一起，把構築好的質體，用EcoRI和BamHI切後用電泳檢查，結果如附圖三。第一行是分子大小標準。第二行是原載體pEGFP-C1。第三行是含NLS2.1的質體。第四行含NLS2.2。第五行含NLS2.3。因為這片膠的濃度較高(10% acrylamide)，質體被切成的兩段中，大的那一段載體無法穿過膠前移而留在洞中，只有較小的一段移動了，而顯出一條亮帶。用EcoRI和BamHI切出來的小段序列分別為原載體的一部份、NLS2.1、NLS2.2和NLS2.3，它們的大小依序為31、39、46和50個鹼基對，這和大小順序完全相符合，可以判定這次的確有抽到所要的質體。

(二) 轉染及螢光顯微鏡觀察結果

將所構築的質體送入COS-1細胞看其表現，轉染後細胞用螢光顯微鏡觀察結果如附圖四至圖九。pEGFP-C1是用來當作對照組的，它因為是沒有接任何外來DNA，所以不會進入細胞核當中。拿實驗組和對照組比較，則發現NLS2的螢光完全進入細胞核，而NLS2.1及NLS2.3的螢光並未進入到細胞核中，其中以NLS2.2進入細胞核的狀況最好，細胞核比較亮，代表大部份蛋白質進入核內。

六、討論與應用

NLS2、NLS2.1、NLS2.2、NLS2.3和一些與SF1為同類型的蛋白進入細胞核的胺基酸序列如表1。相比之下，NLS2.1、NLS2.2、NLS2.3兩端的Lysin(K)和Arginin(R)都不夠密集，長度也稍短，使得它們無法進入細胞核。NLS2.3的K和R出現的相當密集，但仍然無法進入細胞核，可能是因NLS2.3密集的分布出現在N端，不像其他蛋白的KR在C端較密集，而使得NLS2.3無法進入細胞核。反而

NLS2.3進入細胞核的狀況比其他段好一些，可能是因為NLS2.2的KR分布比較靠兩端，要能進入細胞核，兩端KR分布中間可能需要有一段空隙。

這幾個可進入細胞核的序列中，只有1個的C端不是5個胺基酸中有4個KR，而NLS2可進入細胞核，其中也只有4個胺基酸中有3個的，所以它進入細胞核的機制應該和那一個最相近。拿這兩個來比較，如果要把NLS2縮的更短但能進入細胞核，RnKfgpmyKRdR（由第9-20）是下次實驗可嘗試的。

了解蛋白質進入細胞核的胺基酸序列後，就可以推測蛋白質是靠什麼使核膜辨識，而進入核中。如此，就可以去設計，讓我們希望放入核內的蛋白質能進入其中。

七、結論

- 1.成功的完成質體構築，並將質體轉染進入COS-1細胞中，可觀察到蛋白質的表現位置。
- 2.發現SF1蛋白中的NLS2可進入細胞核。
- 3.要能讓蛋白質進入細胞核，最好是在N端有連續兩個Lysine(K)或Arginin(R)，在C端5個胺基酸中有3個，其中有約10個胺基酸の間隔。

八、誌謝

完成這份研究報告要感謝的人很多，要不是有這麼多朋友的支持鼓勵，陪我做實驗、寫報告，很難能把這整個實驗完成。首先要感謝周芳妃老師在專題研究的作法、經費的申請和其他各方面的協助。再來要感謝鍾邦柱教授的指導，教我完成整個報告。李立安學姐技術上的指導，教我每一步每一步該怎麼樣去進行。中研院分生所429實驗室的協助。中研院生物資優輔導營的同學的相互切磋、討論，還有幫忙領便當。北一女三溫的同學的關心和討論。爸媽的支持，讓我花那麼多時間在不是學校功課的東西上。最後，我要謝謝科教館的經費，讓我終於能夠完成這份研究報告。

九、參考資料

- 1.ClonTech Catalog 96/97, pp. 91-94.
- 2.Dingwall C and Laskey RA, "Nuclear targeting sequences-a consensus?" TIBS, 16,478-481 (1991)
- 3.Gilbert SF, "Developmental Biology", 5th Edition, Sunauer Associate, Inc., pp. 778-781 (1997)

4.Luo Z, Rouvinen J, and Maenpaa PH, "A peptide C-terminal to the second Zn finger or human vitamin D receptor is able to specify nuclear localization." Eur. J. Biochem. 381-387 (1994)

十、附表與附圖

表一、胺基酸序列表

蛋白質名稱

NLS2

NLS2.1

NLS2.2

NLS2.3

Glucocorticoid Receptor

Progesterone Receptor

Androgen Receptor

Oestrogen Receptor

序列

vRadRmRggRnKfgpmyKRdRalKqqKKAqiR

RadRmRggRnk

RggRnKfgpmyKR

KRdRalKqqKKAqiR

RKclqagmnleaRKtKK

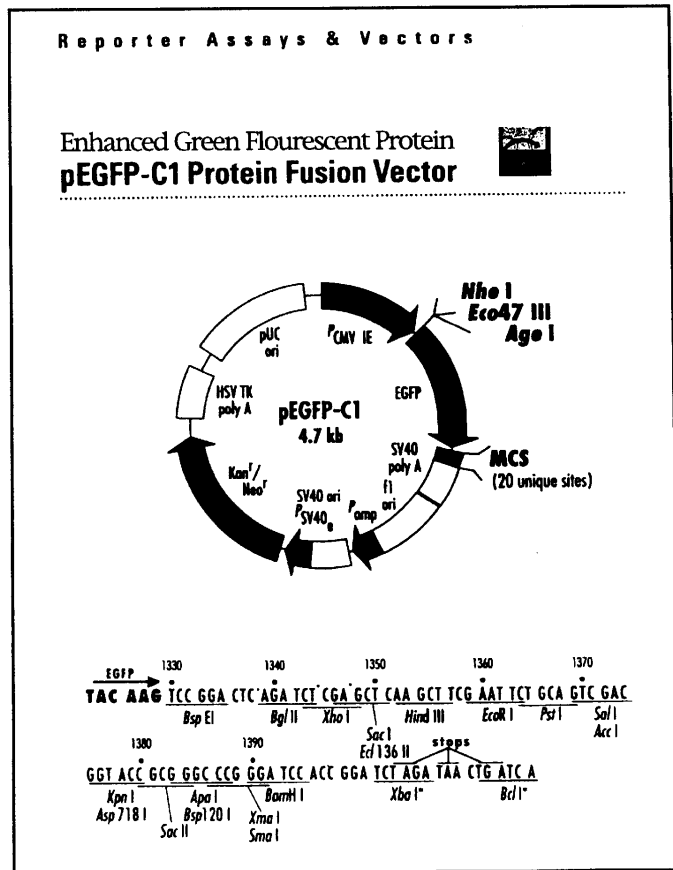
RKccqagmvlggRKfKK

RKcyeagmtlgaRKIKK

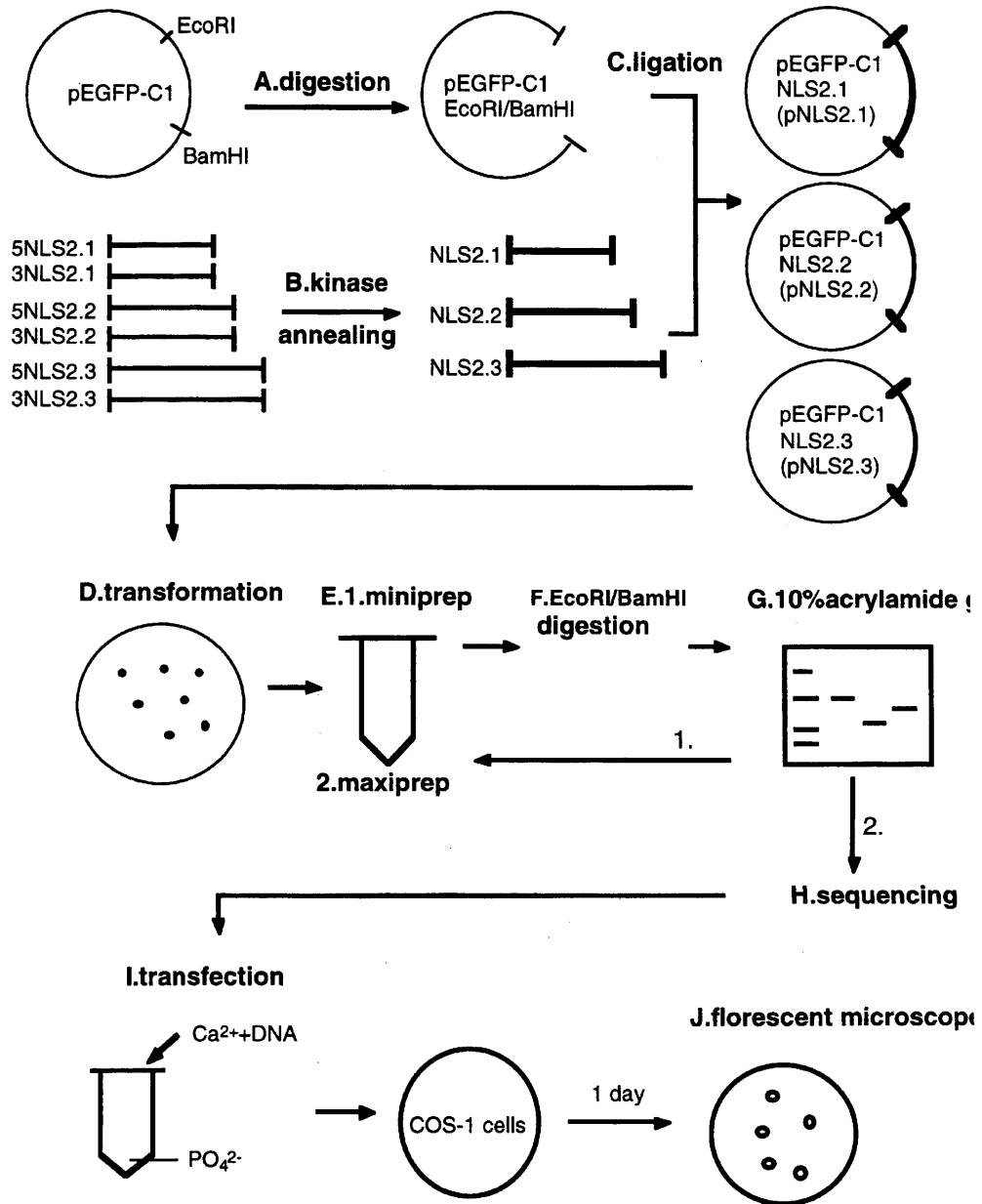
RKcyevgmmKggiRKdR

圖一、載體說明圖

載體pEGFP-C1帶有CMV起動子，可使後面的報導基因EGFP在動物細胞中大量表現。在EGFP之C端，可插入基因和EGFP形成融合蛋白，所以叫做pEGFP-C1。它有20個不同限制酶可以切的地方，包括EcoRI和BamHI的切點。此質體也帶有抗抗生素kanamycin基因，可用以篩選。SV40 origin顯示，在進入含T-Antigen蛋白的COS-1細胞時，質體可由此開始大量複製而被大量表現 (1)。此圖來自ClonTech 96/97 目錄。

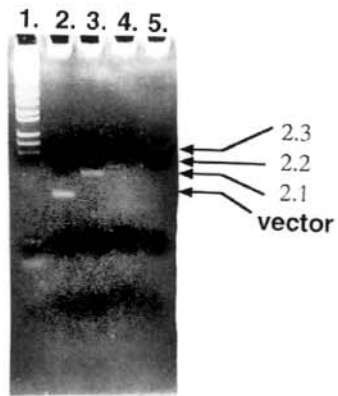


圖二、實驗流程圖

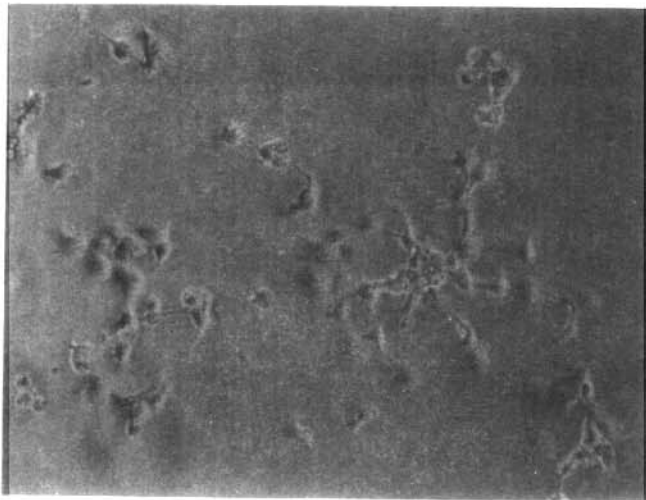


圖三、質體電泳檢驗圖(10% acrylamide gel)

1. pBR322/Hae III
2. pEGFP-C1 EcoRI/BamHI
3. pNLS2.1 EcoRI/BamHI
4. pNLS2.2 EcoRI/BamHI
5. pNLS2.3 EcoRI/BamHI



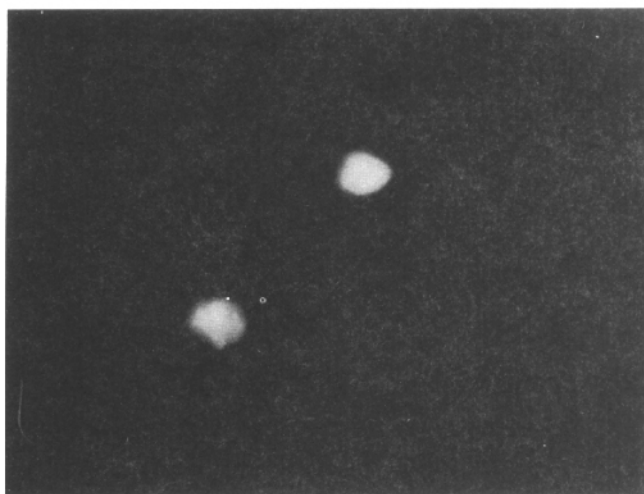
圖四、COS-1細胞在一般顯微鏡之下觀察 放大倍率：200X。



圖五、pEGFP-C1轉染進入COS-1細胞在螢光顯微鏡之下觀察放大倍率：400X。
圖中的螢光出現在細胞質當中。



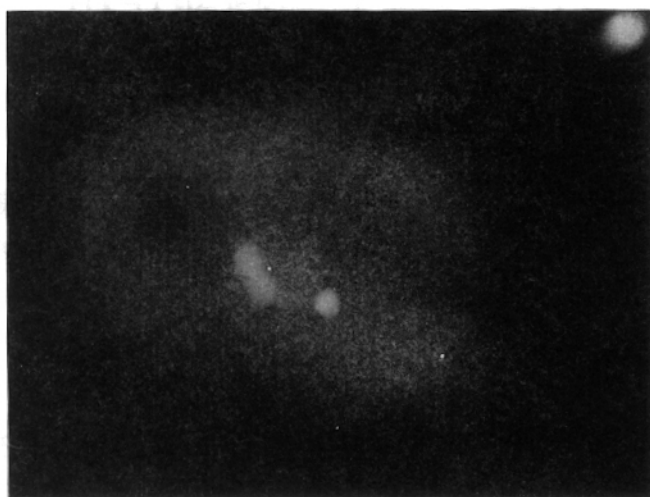
圖六、NLS2轉染進入COS-1細胞在螢光顯微鏡之下觀察放大倍率：400X。圖中的螢光出現在細胞核裡。



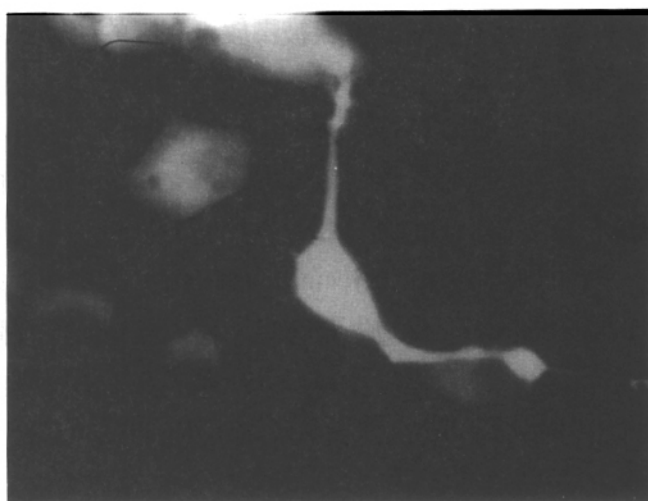
圖七、NLS2.1轉染進入COS-1細胞在螢光顯微鏡之下觀察放大倍率：400X。圖中的螢光大部份出現在細胞質裡。



圖八、NLS2.2轉染進入COS-1細胞在螢光顯微鏡之下觀察放大倍率：400X。圖中的螢光大部分進入了核，但仍有細胞質的部份。



圖九、NLS2.3轉染進入COS-1細胞在螢光顯微鏡之下觀察放大倍率：400X。圖中的螢光大部分在細胞質中。



評語

該作品研究動機、目的、方法等思考方向循序漸進，實驗設計相當完整，對蛋白質如何進入細胞核，有特別清楚的說明。唯科學最重要的是按步就班的踏實基礎，對整個科學研究過程的完整掌握度仍有可加強的地方。雖然對高中生而言，學理方面特別蛋白質與核模三度空間結構之複雜性可能太難，但本件作品已經是難能可貴了。