

中華民國第 53 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

第三名

040709

建立並評估可快速篩選具抗癌潛力物質之生物
技術平台

學校名稱：國立臺灣師範大學附屬高級中學

作者： 高二 林中行	指導老師： 謝育慈 謝淑貞
---------------	---------------------

關鍵詞：細胞平台、p53、螢光酵素分析法

建立並評估可快速篩選 具抗癌潛力物質之生物技術平台

摘要

p53 是一重要且多功能的腫瘤抑制蛋白，在超過 50%的癌症病例中都有發現 p53 的突變，為了快速尋找具有活化 p53 能力的藥物或功能性食物，並改善傳統動物模式或細胞模式的費時、耗工及高成本，本研究設計改良 reporter assay，建立一個可快速、高通量篩選出具有活化 p53 功效之物質的細胞生物技術平台。本實驗利用受 p53 之 DNA 結合位所調控的螢光酵素(Luciferase)報導質體做為基礎，進一步將此質體送入 MCF-7 人類乳癌細胞中，成功挑選並建立出 MCF-7 轉殖細胞株，此細胞能在感受到 DNA 破壞時產生顯著的螢光表現，並精確反映出 p53 的轉錄活性。本生物技術平台，能以迅速、高通量的優點取代傳統細胞模式中所使用之西方墨點法(Western blot)及 RT q-PCR。未來將著手進行橄欖萃取物、羅漢果皂甘等功能性食物的抗癌功效鑑定。

壹、文獻探討

一、癌症(cancer)

細胞癌化可分為 initiation、promotion、progression等三個時期。initiation肇因於人體長期暴露在致癌因子下，導致組織或是器官解毒代謝異常，使DNA受到傷害而造成突變，接著進入promotion，此時不正常的癌細胞會不斷增生，但此期之狀況仍為可逆，最後不正常的癌細胞會持續惡化並侵襲及轉移至其他部位，稱為progression (Surh, 2003)。

長期發炎的環境會不斷刺激白血球與巨噬細胞產生發炎反應並釋出活性氧化物與活性氮化物 (reactive oxygen and nitrogen species) 造成鄰近正常細胞DNA損傷，而此狀況則可能導致 p53 基因產生突變，若細胞修復DNA時發生異常，致使基因突變，細胞便會不正常增生 (Maeda & Akaike, 1998; Yamanishi Y. *et al.*, 2002)。

此外，Mantovani 等人在回顧文獻中也表示長期的慢性發炎會增加罹患膀胱癌、胃炎、子宮頸癌、大腸癌、食道癌、攝護腺癌與甲狀腺癌的風險，若在發炎的期間給予抑制發炎的藥物，可降低癌症的發生率及死亡率(Mantovani *et al.*, 2008)。

二、p53

(一) 簡述

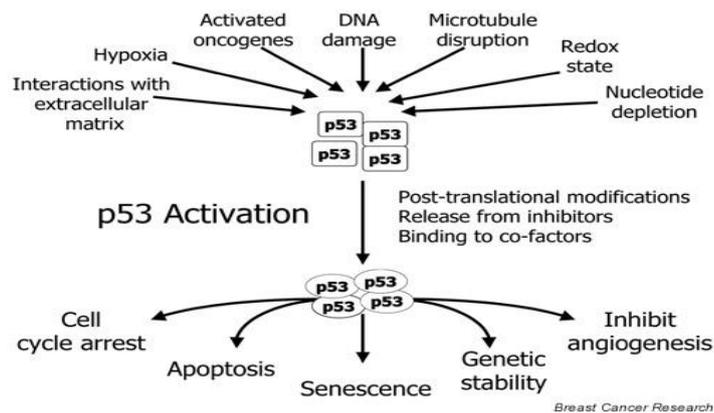
1979年，Lane與Crawford在Simian virus 40 (SV40)所轉型(transform)的細胞萃取物中發現一分子量53kDa的蛋白質，因而命名為p53 (Lane & Crawford, 1979)。

p53為重要的腫瘤抑制蛋白，屬於最早發現的腫瘤抑制基因之一，已知有50%以上的人類腫瘤細胞中含有p53抑癌基因的突變(Hollstein *et al.*, 1991)或未被活化，而在人類癌細胞中，p53基因最常發生的突變類型為錯誤型點突變 (missense point mutation) (Greenblatt *et al.*, 1994)。

(二) 功能

p53 基因位於人類第 17 對染色體短臂(17p13.1)上，全長約為 20 kb，可做為轉錄因子(transcription factor)，以活化其下游基因的表現。已知 p53 蛋白在細胞生長週期的調控(cell cycle arrest)、基因修復(DNA repair)、細胞凋亡(apoptosis)及維持基因體的穩定(genetic stability) 及抑制血管新生(angiogenesis) 等機制中扮演重要的角色，並藉此避免癌症發生(如圖一)(Lane, 1992)，亦有證據顯示 p53 與細胞分化(differentiation)及老化(senescence)有一定程度的關聯性 (Levine, 1997；Rotter *et al.*, 1994)。

當 DNA 受損時，p53 蛋白能活化 DNA 修復蛋白 (DNA repair proteins)，此外 p53 蛋白亦能控制細胞生長週期停留於 G₁/S 的檢查點上，以達成 DNA 損壞辨識。若細胞的 DNA 受損已不能修復，p53 蛋白能起始細胞凋亡程序，避免擁有不正常遺傳資訊的細胞繼續分裂生長(如圖一) (Anneke & Joseph, 2002)。



(Anneke C Blackburn & D Joseph Jerry, 2002)

圖一、p53 功能示意圖

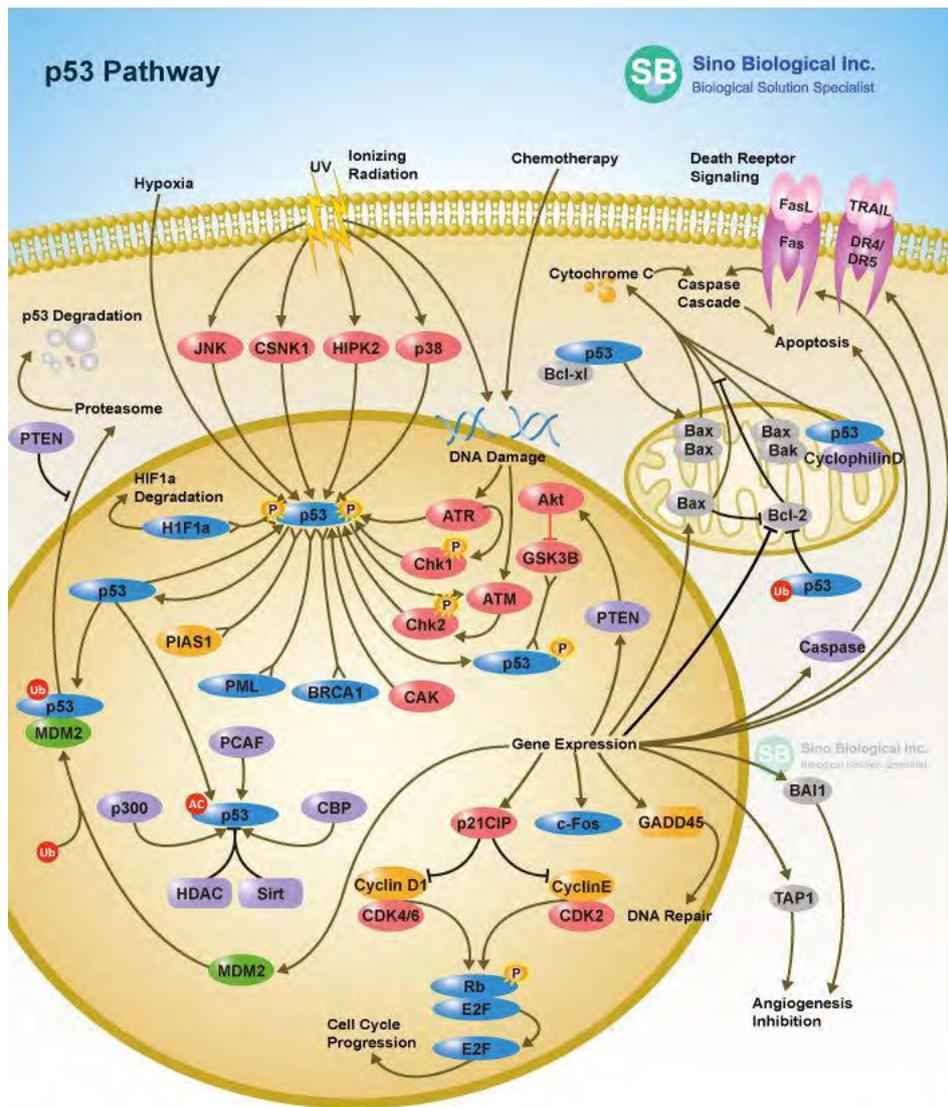
(三) p53 蛋白之調控

人類p53蛋白為53 kDa的磷酸蛋白，由393 個氨基酸所組成(Soussi & May, 1996)。在正常細胞中 p53 的半衰期很短，約只有20分鐘(Levine,1997)，而其主要的分解途徑需要泛素參與ubiquitin-mediated degradation pathway) (Soussi & May, 1996)。

p53蛋白藉由許多不同的壓力形式而激發其活性，其中包括紫外線(UV)、化學物質如過氧化氫(hydrogen peroxide)所造成的DNA損傷、氧化壓力(oxidative stress)、滲透壓力(osmotic stress)、核糖核苷酸缺乏(nucleotide depletion)和喪失調節致癌基因表現能力等(如圖一)(Anneke C Blackburn & D Joseph Jerry,2002)。

p53的活性激發主要可分兩部分造成：首先，在受到壓力的細胞中，p53蛋白的半衰期 (half-life) 會迅速的增加，造成p53蛋白在細胞中的累積，再來則是構型變化(conformational change)，p53蛋白主要以磷酸化(phosphorylation)、乙醯化(acetylation)及泛素化(ubiquitylation)決定其活性，而此構型變化則來自轉譯後修飾作用(post-translational modification)(Waterman *et al.*,1998)。

如圖二所示，p53 蛋白的表現主要受mdm2 (murine double minute)調控，經由蛋白間交互作用(protein-protein interaction)的方式與p53 蛋白結合，以調控p53 之半衰期。mdm2 是一種致癌蛋白(oncoprotein)，對p53 的作用機制有二種：直接與p53 的活化功能區結合，將p53 蛋白自細胞核中轉移至細胞質，並促使蛋白質溶解小體(proteasome)將之分解(Ashcroft & Vousden, 1999)； mdm2 同時也是p53 蛋白之下游標的基因(target gene)，p53 所誘導之mdm2 蛋白會以負回饋方式調節p53 蛋白的功能(autoregulatory feedback loop) (Burns & El Deiry, 1999)，由此則可解釋突變型p53 蛋白活性比正常p53 穩定的原因(Midgley & Lane,1997)。



(This image is downloaded from Sino Biological Inc (www.sinobiological.com))

圖二、p53調控路徑圖

(四) p53與細胞週期

當細胞受到 DNA 傷害時，p53會促使G1期的細胞生長停頓，目的是讓受損的DNA 在進入S 期前進行修補(El-Deiry, 1998)，此外p53也參與了G2/M 檢查點(checkpoint)的運作，避免不正常的遺傳物質進入下一個S期(Levine, 1997)。

p21(WAF1/Cip1)是p53重要的下游基因，能使細胞生長停滯於G1期(El-Deiry *et al.*, 1993)。p21為CDK之抑制者(cyclin dependent kinase inhibitor，CDKI)(圖二)，能藉由其啟動子上的兩個p53 結合區與p53 蛋白結合以達到活化的效能 (El-Deiry *et al.*,1993)。

(五) p53與基因修復

在p53眾多的功能之中，基因的修復是一項重要且不可忽略的功能，當細胞基因嚴重損壞且無法修復時，才會進一步走向細胞凋亡(apoptosis)。p53之C端調節區可偵測受損的DNA，再透過與DNA 非專一性的結合及p53之3'→5'外切酶(exonuclease)的功能來修補受損的DNA (Mummenbrauer *et al.*, 1996)。

(六) p53與細胞凋亡

細胞受到損傷時 p53 所造成的另一個結果是細胞凋亡(apoptosis)。已知大部份p53下游基因之調節區都具有與p53結合的序列，p53 除了透過轉錄活化(transcription-dependent manner)方式使細胞死亡，亦有證據顯示，此過程也可能透過非轉錄的方式進行(transcription-independent manner)(Gottlieb & Oren, 1998)。

p53可透過許多標的基因之活化，如*Bax*、*Fas/APO1*、*Killer/DR5*、*PIG3* (53-induced gene #3)等(圖二)，間接刺激細胞中caspases(凋亡蛋白酶；半胱天冬酶)活化，最終使胞內蛋白水解而導致細胞凋亡(Burns & El-Deiry, 1999)。

貳、研究動機

在南一版基礎生物上冊課本第三章第一節 染色體與細胞分裂中，提及若細胞不再受應有之控制而隨意分裂，則可能產生癌症，癌症已多年蟬聯國人十大死因之首位，相對於其他常見疾病，其低治癒率及高死亡率使其一直是研究人員努力解決的目標之一，而癌症所消耗的醫療資源及成本亦對社會造成不小負擔，因此癌症是一個重要且需要被克服的課題。

在惡性腫瘤形成的分子生物學機制中 p53 一直扮演著重要的角色，p53 是目前所知最重要的腫瘤抑制蛋白之一，在超過 50 % 的惡性腫瘤病例中都發現到 p53 的突變，許多癌症藥物的開發或療法亦是針對 p53 著手。

在找尋有效活化 p53 抑癌蛋白的藥物或功能性食物時，動物模式由於所需成本高時間長、且所需人力眾多，因此並不適合在短時間內得到有效結果。另外，以細胞平台為篩選模式時，對於特定 mRNA 的偵測通常利用 RT-qPCR 進行分析，對於蛋白質表現量的偵測則是利用西方墨點法(Western blot)進行分析，兩者皆需長時間且繁瑣的步驟，並且無法對於大量的樣品進行快速篩檢。而利用 reporter assay 篩選有效藥物的過程，雖然改善了無法進行高通量篩選和所耗時長的缺點，但於每次篩選時，都必須要將報導基因轉殖到細胞當中，所需成本因此提高，且受制於基因轉殖的效力，其敏感度有限。有鑑於上述篩選模式的缺點，所以本實驗室希望利用 reporter assay 的模式，以抗生素挑選保留可穩定表現具有 p53-responsive element 的 reporter gene 轉殖基因細胞株，以在此篩選模式當中，達到低成本且快速並大量的篩選出具有活化 p53 功效之物質的目標。

參、研究目的

建立能取代傳統西方墨點法(Western blot)及 real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)之報導系統，以快速檢測 p53 蛋白是否活化，並進一步評估此生物技術平台的實用性及準確性，以藉此達到高通量篩選具活化 p53 能力之藥物或功能性食物的目標。

肆、材料與方法

一、實驗材料

(一) 化學藥品與實驗設備

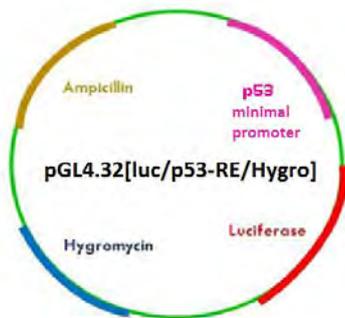
1. 2-Mercaptoethanol (2-Me)購自 Mallinckrodt baker, Inc.
2. 99.8% ethanol 購自 Sigma Cemical Co.
3. Agar、yeast extract、tryptone 購 Bioshop Cemical Co.
4. Ampicillin 購自 USB Cemical Co.
5. Bovine serum albumin (BSA) Sigma-Aldrich Chemical Co.
6. Cell culture 耗材購自 nunc、corning、創世紀和德怡公司
7. Dimethyl sulfoxide (DMSO)、Isopropanol、Sodium hydrogen carbonate 購自 Merk Cemical Co.
8. DMEM、Penicillin/Streptomycin、fetal bovine serum(FBS)、Hygromycin B、Pure agarose 購自德怡(Invitrogene, Taiwan)
9. DNA loading dye (loading dye)
10. DNA Safe nucleic acid stain 購自翰新有限公司
11. dNTP購自北極光protech
12. Liquid Nitrogen購自太乙氣體
13. Luciferin、Lysis buffer 購自 Promega, U.S.A.)
14. NaCl:Sodium chloride (bio-shop,U.S.A.)
15. T-pro transfection reagent 購自 JF 吉豐生技公司
16. Poly-jet transfection reagent 由捷生生技公司提供
17. Doxorubicin(ADR)由國立陽明大學生化暨分子生物研究所 陳芬芳 教授所贈
18. *E. coli* (competent cell)由陽明微生物及免疫學研究所提供
19. Luminometer F-4500: (HITACHI, Japan)
20. 二氧化碳培養箱CO₂ incubator: (ASTECC, Japan)
21. 恆溫水槽 Water bath thermostat: (雙鷹,台灣)
22. 漸凍盒 CoolCell: (BioCision, LLC)
23. 聚合酶連鎖反應器 PCR machine,Model ASTEC PC818: (達灣生化科技有 限公司)
24. 離心機 Centrifuge: (KUBOTA,雙鷹)
25. 離心機Centrifuge : (SARTORIUS,雙鷹)

(二) 酵素與試劑

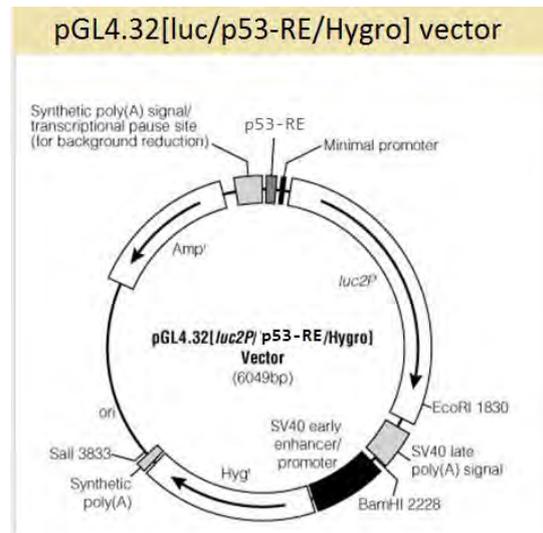
1. 6x DNA loading dye購自德怡(GeneDirex)
2. 10x Taq buffer購自BioLab、Fermentas
3. 100 bp DNA ladder maker購自德怡(GeneDirex)
4. Bio-rad protein assay kit 購Bio-rad(U.S.A.)
5. p53 primers購自友和Sigma-Aldrich Pte Ltd
6. Plasmid DNA midi kit購自Geneaid旭基科技股份有限公司
7. Taq enzyme購自Fermentas
8. WST-1[2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium]reagent 購自Roche, U.S.A.

(三) 質體 DNA

pGL4 [luc/p53-RE/Hygro] 質體
由本實驗室自行剪切而成。



圖三、質體結構示意圖

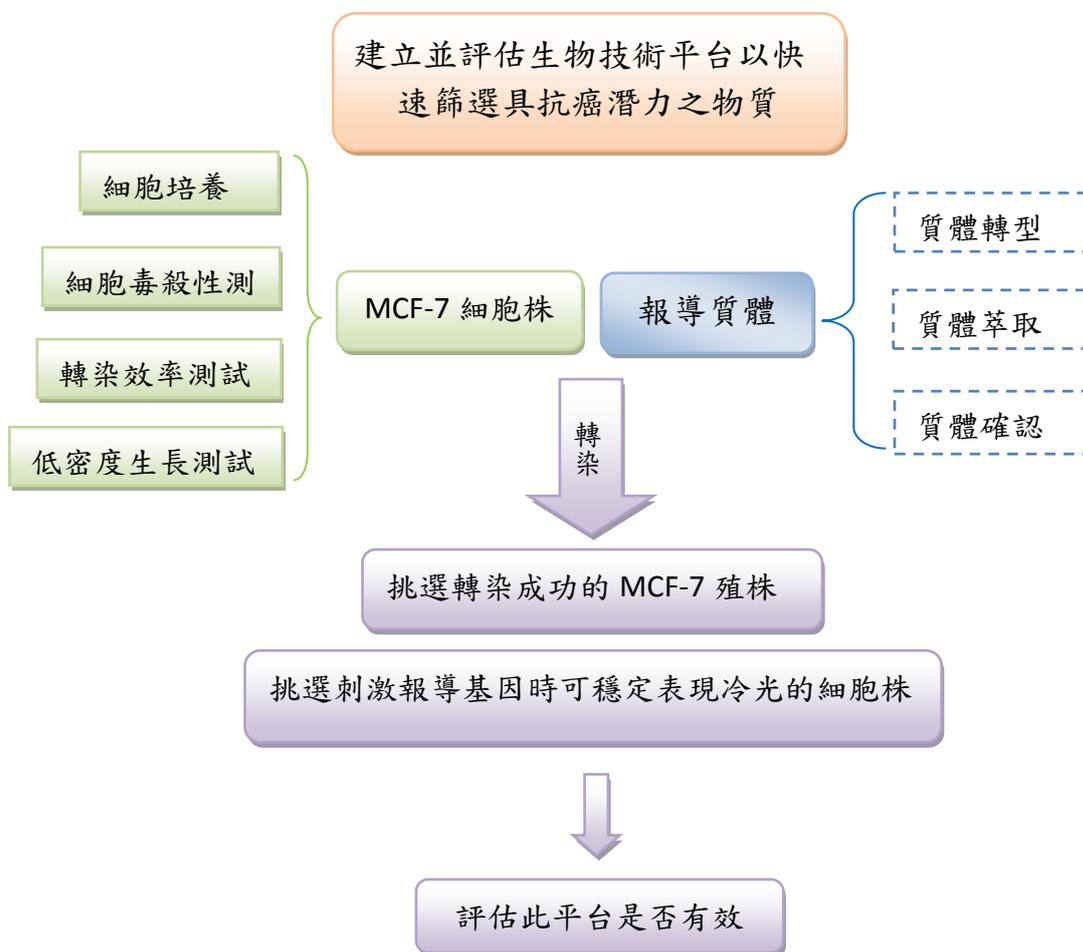


圖四、pGL4 [luc/p53-RE/Hygro]質體

(四) 細胞株

MCF-7 是黏附型人類乳癌細胞株，來源為六十九歲之白人女性，此細胞株由 1973 年密西根大學癌症基金會 Herbert Soule 所建立，其 p53 基因尚未突變，並且可表達雌性激素受體特質，因此常做為 p53 在細胞模式下的研究對象。本實驗所用之 MCF-7 細胞株來源為 ATCC，由國立陽明大學生化暨分子生物研究所陳芬芳教授所贈。

二、實驗架構



圖五、實驗架構圖

本平台主要由報導質體及 MCF-7 細胞株兩部分所構成，在質體的製備上，本實驗首先將其轉型(transform)至勝任細胞(competent cell)中，再進行轉型細胞的放大，之後抽出其質體，並以 PCR 的方式檢驗抽出之質體的正確性。細胞的部分則須先進行細胞毒殺性測試、轉染效率測試及低密度生長測試等，以確認往後實驗的條件。待質體及細胞皆備妥後，本實驗將自行抽出之報導質體轉染(transfect)入 MCF-7 細胞中，再以抗生素及 stable clone 的方式挑選轉染成功的殖株，並以 Luciferase assay 確認其受刺激時螢光的表達，最後評估本平台的準確性及效益。

三、實驗方法

(一) 質體製備

1. Competent cell 的製作

使用 *E. coli* strain top 10 塗盤至 LB agar 於 37°C 培養 16 小時，挑選單一菌落至 5 ml LB broth 於 37°C 培養 1 小時，平均將菌液倒入 250 ml LB broth 於 37°C 培養 16 小時。放置冰上以 7000xg 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 50 ml CM1 buffer 置於冰上 20 分鐘，以 7000xg 離心 5 分鐘，加入 50 ml CM2 buffer 重新懸浮菌體後分裝 100 μ l 至 eppendorf 內，以液態氮迅速冷卻後放入 -80°C 儲藏。

2. 細胞轉型(transformation)

取 20 μ l 的 Competent cell 放於冰上退冰後，加入目標 plasmid DNA 約 1 ng，置於冰上 30 分鐘，於 water bath 中以 42°C 加熱 2 分鐘，加入 1 ml LB Broth 於 37°C 培養 30 分鐘，均勻塗至已吹乾 LB agar plate 上，於 flow 稍微吹乾後放入 37°C 培養箱倒置培養約 16 小時。

3. 質體萃取(Plasmid DNA midi-preparation)

將 1.5 ml LB Broth 加入 15 ml 離心管當中，加入 0.75 μ l Ampicillin(100 mg/ml)，以牙籤挑選在 LB Agar/Amp 長出的單一菌落，沾入 LB/Amp broth 當中，蓋上離心管，於 37°C 震盪培養 8 小時。倒入 250 ml LB broth(含 50 μ g/ml Amp)培養約 14 至 16 小時，並將菌液分裝到 50 ml 離心管，以 4000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液。將收集下來的菌體加入 4 ml PM1 buffer 重新懸浮菌體，再加入 4 ml PM2 buffer 上下震盪 10 次，待溶液再次澄清後，加入 PM3 buffer 並猛烈搖晃，以 4000 rpm 離心 20 分鐘。將上清液加入 midi column，待重力使液體漏至 50 ml 離心管後，加入 12 ml 的 PW buffer。將 midi column 重新置於一乾淨離心管，加入 8 ml PEL buffer 使 column 內的 DNA 溶解流出，以 6 ml isopropanol 沉澱 DNA，將溶液分裝至 eppendorf 中並以 15000 rpm、4°C 離心 30 分鐘。去除上清液，加入 1 ml 的 75% Ethanol 清洗 DNA，以 15000 rpm 於 4°C 離心 10 分鐘，去除上清液以 37°C dry bath 去除殘存酒精，加入二次無菌水回溶 DNA。取 2 μ l DNA 溶液，以 Nano-drop 測定其 OD₂₆₀ 吸光值。

(二) 核酸定量

開啟 Nano-drop (DN-1000)超微量分光光度計後，選擇 DNA 或 RNA 檢測模式，先以二次水或 DEPC 水進行 blank，取 DNA/RNA sample 2 μ l，將 sample 滴入後測量其 230、260、280 讀值，以推算其核酸濃度。當 260/280 吸光值比例介於 1.8 至 2.0 之間代表較純的 DNA 和 RNA，另外，260/230 讀值高於 260/280 介於 1.8 到 2.2 之間表示純化過程殘留污染物較少。經檢測出 DNA 或 RNA 濃度後可推測其整體 Nucleotide 含量。

(三) 以 PCR 方式確認質體正確性

將 PCR 溶液混合均勻後依附表一的量分裝至各個 eppendorf，加入 template DNA 2 ng，PCR 條件則依據附表二。待 PCR 完成後，配置 2% agarose gel，以 20 μ l PCR 產物以及 4 μ l DNA ladder dye 進行電泳分析(內染 DNA safe)，待分子量較小的 dye 跑至適當位置時，至 UV 下觀察已知和預期 DNA 大小之正確性。

表一、PCR 溶液配製表

	Negative control	Positive control	Sample
Sample DNA	0 ng	2 ng	2 ng
10x buffer	3 μ l	3 μ l	3 μ l
Taq enzyme	0.25 μ l	0.25 μ l	0.25 μ l
Primer-F (25 nM)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Primer-R (25 nM)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
dNTP (2.5 μ M)	2 μ l	2 μ l	2 μ l
ddH ₂ O			
Total volumn	30 μ l	30 μ l	30 μ l

(Primer-F: p53 con-F 5'--- GGACA TGCCC GGGCA TGTCC ---3')

(Primer-F: pGL-primer3-L 5'--- TATGC GCGAC GGTAAGGCG ---3')

表二、PCR 條件表

1 cycle	94°C	120 sec
35 cycle	94°C	30 sec
	65°C	30 sec
	72°C	30 sec
1 cycle	72°C	60 sec

(四) 細胞培養

細胞培養液為含 10% FBS 和 1% Penicillin/streptomycin (P/S)的 DMEM。細胞則培養於 37°C、5% CO₂ 中，以每三到四天為週期繼代，繼代時先以 5 ml PBS 洗去培養液，再加入 trypsin-EDTA 潤濕細胞並吸除，於室溫下適當反應後，以 10 ml 培養液 pipette 沖下盤底細胞，將細胞打散後取三分之一懸浮細胞繼代於含 8 ml 培養液之新培養皿中。

(五) 細胞預實驗

1. 低密度生長測試

將細胞以三十分之一的濃度繼代，並每隔 24 小時觀察記錄一次，以確認此細胞是否有能力在極低的細胞密度下生長。

2. 轉染效率測試 (transfection efficiency tests)

實驗前一天，將 MCF-7 細胞種入 12 孔培養盤中，並使實驗當天的細胞滿度介於五成滿左右。實驗前先將 medium 吸乾後加入 1 ml 之 DMEM 培養液。在 eppendorf 加入 60 μ l serum free DMEM 以及 3 μ l RFP，稍作混和後，加入指定量之 T-pro transfection reagent，均勻混和後靜置 15 分鐘。將 eppendorf 中溶液取出並加入 well 中。轉染後 18 至 24 小時後，以螢光顯微鏡觀察紅色螢光表現情形。

3. Hygromycin B 細胞毒殺性測試 (cytotoxicity test)

於實驗前一天先將 MCF-7 細胞種入 6 孔培養盤中，使實驗當天的細胞密度大約為七成。吸乾 medium 後，將各個孔中重新加入 2 ml DMEM，並加入不同體積的 Hygromycin B。每隔 3 天更換一次含抗生素之培養液，並於顯微鏡下記錄細胞生長情形。

4. WST-1 assay

本實驗的目的為測試活細胞的比例。將96孔盤中的細胞培養液置換為含2% WST-1試劑之DMEM培養液。放入二氧化碳培養箱中作用2小時。待作用完畢後，取出 96 孔盤，使用酵素免疫分析測讀儀 (ELISA reader) 於波長450 nm、620 nm 下測量吸光值。以波長450 nm下的數值減去波長620 nm的背景值即得所求。

(六) 轉染(transfection)

實驗前，將 MCF-7 細胞種入 10 公分培養皿中，並使實驗當天的細胞滿度介於六至八成滿左右。實驗前先將medium吸乾後加入 5 ml 之 DMEM 培養液。在 eppendorf 加入 1 ml serum free DMEM 以及 10 µg 報導質體，稍作混和後，加入 25 µl transfection reagent，均勻混和後靜置 15 分鐘。將 eppendorf 中溶液取出並加入培養皿中，並於轉染 4 至 6 小時後更換培養液。

(七) 轉染植株的挑選

1. 抗生素篩選(antibiotics selection)

於細胞轉染約48小時後，更換細胞培養液為含有 500 µg/ml Hygromycin B 之 DMEM，並每三天更換一次抗生素培養液，進行為期七天的抗生素篩選。

2. Stable clone

當細胞完成抗生素篩選並發展成集落後，將培養皿置於顯微鏡下，以 pipetman將欲挑選之集落刮下並吸起，最後迅速加入已事先放入培養液之 96孔盤。

(八) 螢光酵素分析法(Luciferase assay)

1. 蛋白質萃取(protein lysis)

吸去 12 孔盤中的細胞培養液後以 PBS 清洗三次，將 PBS 完全吸乾，並以液態氮澆淋，待液態氮完全蒸發後，加入配置好的 1X lysis buffer 120 µl 以 20 rpm 震盪 5 分鐘後，將溶液裝入 1.5 ml eppendorf 中，以 15000xg 離心 1 分鐘後，將上清液移置另一 eppendorf 中，混合均勻後進行 luciferase assay 活性分析。

2. Luciferase assay

先將 20 μl 細胞萃取物置於 96 孔白盤內，加入 100 μl luciferin 後迅速放入 Thermo Scientific Luminoskan Ascent 樣品槽內，啟動 program 測定。螢光測訂單位為 relative light unit (RLU)。

3. Bio-Rad protein assay

利用 BSA 製作標準曲線(0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)，樣品則使用已處理之細胞萃取物，均勻混合後取 10 μl 加入 96 孔盤底部，每個 BSA 濃度和樣品皆作三重複。加入 200 μl 稀釋 5 倍的 protein assay dye reagent，避光反應 10 分鐘後，以 ELISA reader 於 595 nm 下檢測吸光值。利用 BSA 製作濃度與吸光值曲線和公式後，將樣本三重覆平均吸光值帶入公式計算其蛋白質濃度。

(九) 即時定量聚合酶連鎖反應(RT-qPCR)

1. DEPC 水(diethyl pyrocarbonate H_2O)的製備

取 1 g 之 DEPC 溶於 1 L 二次水中，於 37°C 下搖晃作用一小時以上，以去除水中 RNase，將其送入高溫高壓滅菌釜，以 121°C 滅菌 30 分鐘後，於抽風櫃中分裝至 50 ml 離心管中，並儲藏於-30°C 冰箱內保存。

2. RNA 萃取(RNA extraction)

去除 6 孔培養盤中的培養液，加入 0.5 ml TriPure reagent 於室溫作用 5 分鐘，待細胞完全溶解後，將細胞溶液裝至 eppendorf 中，加入 50 μl BCP phase separation reagent 劇烈震盪 15 至 30 秒，置於室溫 2 到 10 分鐘，以 12000 g, 4°C 離心 15 分鐘。取含 RNA 之上層上清液至新的 eppendorf 中，加入 0.5 ml isopropanol 搖晃 15 次後置於室溫作用 5 到 10 分鐘，以 12000 g, 4°C 的條件離心 10 分鐘，去除上清液。加入 0.5 ml 75% 酒精，強烈震盪清洗 RNA pellet 後，以 7500 g 離心 5 分鐘，吸去酒精，以 air-dry 方式將 RNA pellet 乾燥至 pellet 外

圍呈現透明，加入 30 μ l DEPC 水，於 65 $^{\circ}$ C 乾浴條件下回溶 10 分鐘。取 2 μ l RNA 至新的 eppendorf 中，檢測其 RNA 濃度，並使用 1% agarose gel 確認所抽出之 RNA 是否被分解。

3. 反轉錄作用(reverse transcription, RT)

取 2 μ g RNA 和 2.5 μ l 的 20 μ M random hexamer 加入單管 PCR tube 中，補 DEPC 水至總體積為 11.5 μ l，spin down，於 PCR machine 內以 70 $^{\circ}$ C 作用 3 分鐘後置於冰上，加入已配製好的 buffer mixture (4 μ l 5x First-Strand Buffer、2 μ l 10 mM dNTP Mix、2 μ l 100 mM DTT 和 0.5 μ l 反轉錄酵素 SMART MMLV)，均勻混入先前的 PCR tube，以 PCR machine 在 42 $^{\circ}$ C 作用 60 分鐘、75 $^{\circ}$ C 加熱 15 分鐘後終止反應。

表三、反轉錄溶液配製表

RNA	2 μ g
20 μ M random hexamer	2.5 μ l
DEPC H ₂ O	
5x First-Strand Buffer	4 μ l
10 mM dNTP Mix	2 μ l
100 mM DTT	2 μ l
SMART MMLV	0.5 μ l
Total volumn	20 μ l

4. 即時定量聚合酶連鎖反應(RT-qPCR)

將 20 μ l cDNA 溶液稀釋至 1 ml PCR 水中，均勻混和製成一 template DNA 稀釋溶液，並以 forward 及 reverse primer 與 SYBR[®] 配製 master mix，再依附表與先前稀釋之 cDNA 溶液分裝至 96 孔盤相對應的位置中，離心後，以即時定量聚

合酶連鎖反應器進行分析。待測樣品以 18S rRNA 作為 internal control，所有分析皆以三重複進行。反應條件如下: enzyme activation 95°C，3 分鐘(1 cycle)，denature 95°C，3 秒，anneal and extension 60°C，20 秒(denature、anneal、extension 共 40 cycle)。另外需進行 melting curve test，設定由 60°C 以 0.5°C 梯度上升至 90°C，檢測其 primer 設計是否為特定結合片段。

表四、Primer sequences for human cell line

Name of Oligo	Sequence	Mers
18S forward	5'- TATCCCATGACCCGCC -3'	17
18S reverse	5'- TCGGAACTACGACGGTATC -3'	19
p21 forward	5'- GATGTCCGTCAGAACCC -3'	17
p21 reverse	5'- CCCTCCAGTGGTGTCTC -3'	17

表五、即時定量聚合酶連鎖反應溶液配製表

PCR H ₂ O	2.6 µl
5APA SYBR® FAST qPCR	5 µl
Master Mix(2x) ABI Prim™	0.2 µl
Forward primer (10 mM)	0.2 µl
Reverse primer (10 mM)	2 µl
Template DNA	2 µl
Total volumn	10 µl

表六、即時定量聚合酶連鎖反應條件表

enzyme activation	95°C	180 sec	1 cycle
denature	95°C	3 sec	} 40 cycle
anneal and extension	60°C	20 sec	

伍、研究結果

一、質體製備

本實驗所使用之pGL4 [luc/p53-RE/Hygro]質體是自行剪切，並經過定序及多重確認而成(參見附錄)。本實驗首先將其轉型至competent cell中，並預期利用大腸桿菌複製本質體。

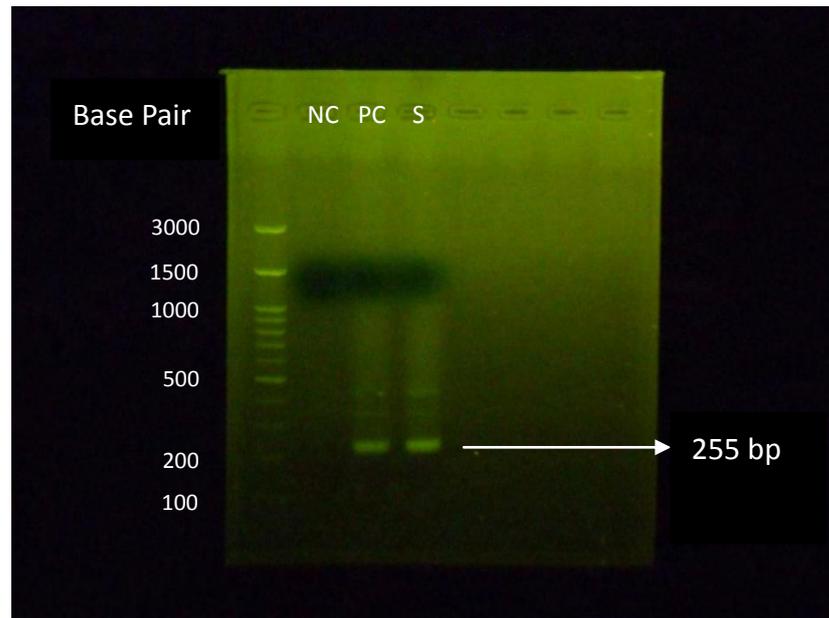
在經過熱刺激(heat shock)使質體進入細胞後，培養 30 分鐘使細菌進行修復，之後便均勻塗至已加入 50 µg/ml Ampicillin 的 LB agar plate 上，培養約 16 小時待單一菌落長出，將菌落挑出並放大培養，於細菌生長之對數期(log phase)時抽取質體。抽取質體時則依序分離 RNA、蛋白質及多餘的雜質等，最後將離心出的質體 DNA 以二次水回溶，便成功得到稀釋的質體溶液，惟此時尚無法確認質體之正確性與純度等，因此以後續的核酸定量確認質體溶液之濃度及純度，並以 PCR 確認質體正確性。

二、核酸定量

將回溶後的質體溶液以 Nano-drop (DN-1000)超微量分光光度計測量其濃度，所得之 260/280 讀值比為 1.95，而 260/230 讀值比則為 2.05，由此比值結果可推知所測量的 DNA 樣品純度高且於純化過程中殘留的雜質少。而最後以吸光值推算出的樣品濃度則為 750 ng/µl。

三、以 PCR 方式確認質體正確性

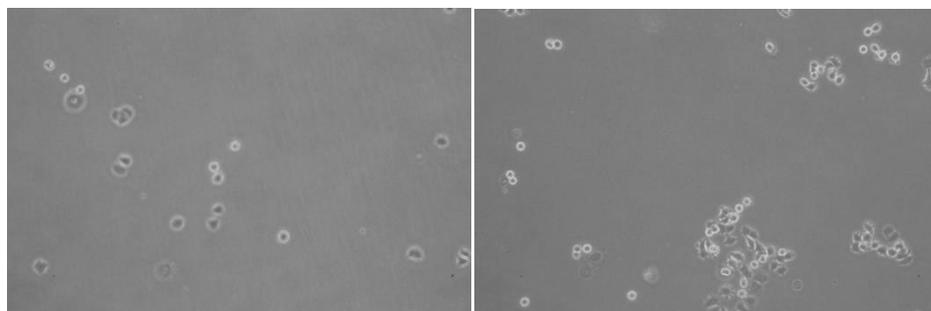
為了確認所抽出質體的正確性，本實驗將所出抽的質體進行 PCR 檢驗，加入自行設計之 p53 引子，若質體正確無誤，PCR 之產物應包含一大小為 255 bp 之片段。DNA 電泳之結果如下圖四，由左至右依序為 NC (negative control)、PC (positive control)、S (sample)，NC 為 PCR 時未加入模板 DNA 之產物，並且如預期般電泳的結果並未顯現出任何 DNA 片段，而 PC 為以經過定序及多重確認的原質體為模板 DNA 之 PCR 產物，S 則是待確認質體的 PCR 產物，PC 與 N 兩者皆出現事先設計之大小為 255 bp 的片段，此結果顯示本實驗自行抽出之質體與原質體以及預期之質體相符。



圖六、DNA 電泳結果圖

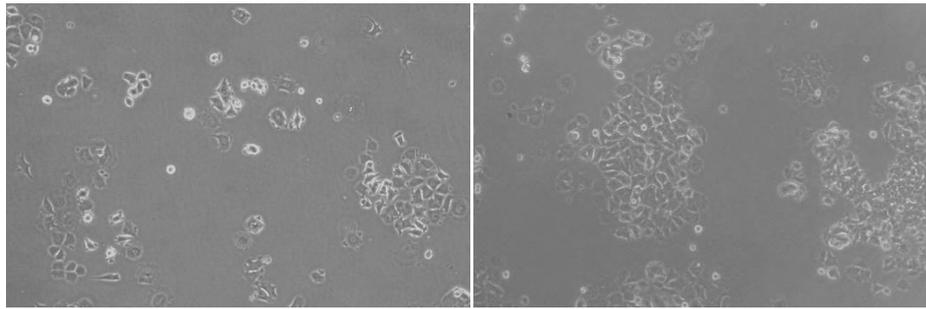
四、低密度生長測試

此測試是將 MCF-7 細胞以三十分之一的濃度繼代，觀察其是否可自行長出完整之細胞集落(cell colony)，目的在於模擬抗生素篩選後 stable clone 時極低密度的細胞狀況。在繼代一天後細胞間幾乎無任何交集(如圖五)，靜置培養至第四天時，已有些許小型集落產生(如圖六)，而培養至第六天時，可觀察到明顯的細胞集落(如圖七)，六天以後，細胞仍持續成長(如圖八)，顯示 MCF-7 細胞株在極低的密度下仍有能力成長成為完整的細胞集落(cell colony)，不需要特殊的生長因子(growth factor)輔助。



圖七、第一天時細胞生長情形

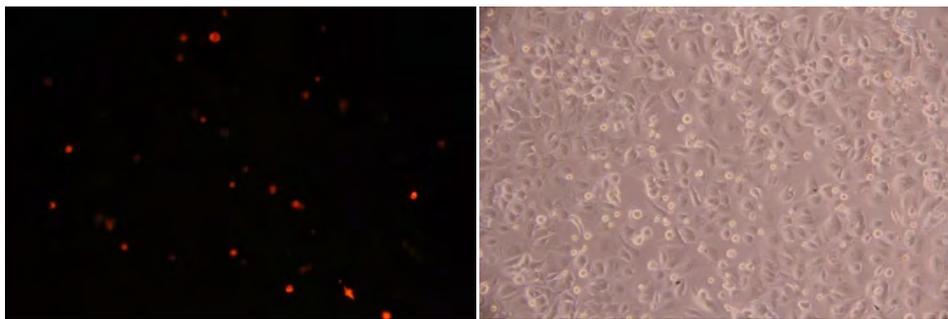
圖八、第四天時細胞生長情形



圖九、第六天時細胞生長情形 圖十、第十一天時細胞生長情形

五、轉染效率測試(transfection efficiency test)

本實驗所用之轉染試劑為 T-pro transfection reagent，T-pro transfection reagent 為一陽離子聚合物，能包覆質體進入細胞中，並被細胞分解。此測試是將紅色螢光質體(RFP)送入目標細胞，以便於以螢光顯微鏡觀察，實驗目的在於粗估 MCF-7 細胞轉染時的效率，並調整 DNA、細胞密度、轉染試劑的多寡，以達到最高的轉染效率。經過多項條件的測試，細胞密度最終決定在七到八成左右，而 DNA:轉染試劑則以 1 μ g:3 μ l 為最佳，以此條件進行轉染，並於轉染 40 小時後觀察，粗估轉染效率約在三成(如圖九)。

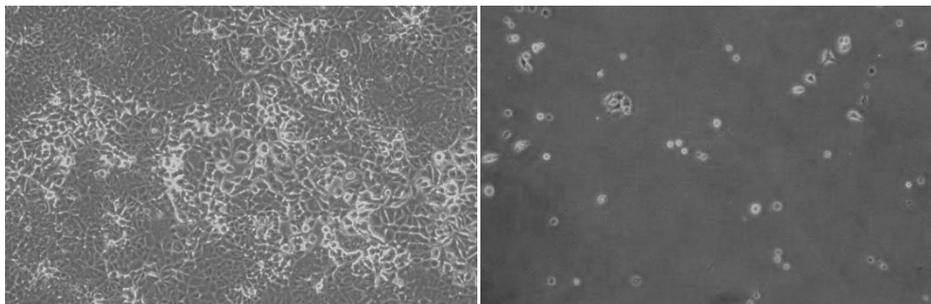


圖十一、螢光轉殖效率觀察圖

圖十二、可見光細胞密度觀察圖

六、 Hygromycin B 細胞毒殺性測試(cytotoxicity test)

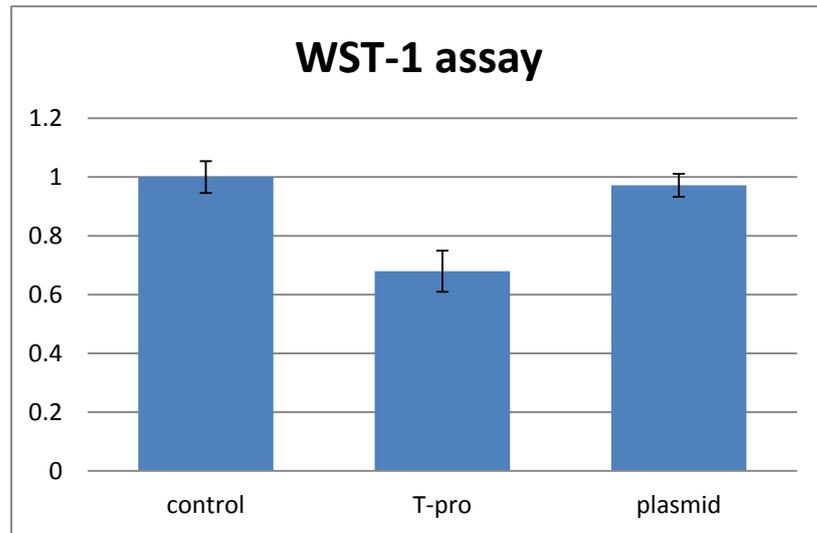
本實驗所用之 PGL4-p53 質體，為一包含抗潮黴素(Hygromycin B)、及抗安比西林(Ampicillin)片段的報導質體，為挑選成功轉染質體的細胞，本實驗旨在找尋適當的潮黴素濃度，以使未獲得報導質體之細胞死亡，卻不影響轉殖細胞的生長。待 MCF-7 細胞在六孔培養盤中滿度約達七成時，分別給予不同濃度的潮黴素 (Hygromycin B) (0 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ 、300 $\mu\text{g/ml}$ 、400 $\mu\text{g/ml}$ 、500 $\mu\text{g/ml}$)，預期以七到十天之間能使細胞全數死亡者最佳，經過給藥八天後，未施予任何潮黴素之細胞持續成長，並充斥整個視野(如圖十一)，而給予 500 $\mu\text{g/ml}$ 潮黴素的細胞，則恰於此時死亡殆盡(如圖十二)，因此本實驗選擇以濃度 500 $\mu\text{g/ml}$ 之潮黴素 (Hygromycin B)作為篩選轉染成功細胞時的依據。



圖十三、細胞生長圖(0 $\mu\text{g/ml}$ Hyg) 圖十四、細胞生長圖(500 $\mu\text{g/ml}$ Hyg)

七、轉染毒性測試

於之前預實驗時發現:細胞在轉染後有嚴重死亡的狀況，因此測試轉染時的毒性，針對轉染時所使用之質體(plasmid)、轉染試劑(T-pro transfection reagent)進行 WST-1 assay，在分別給予質體及轉染試劑十八小時後，將細胞培養液置換成含有 2% WST-1 試劑之 DMEM，並靜置培養兩小時，之後以 ELISA reader 於波長 450 nm、620 nm 下測量其吸光值，將吸光值減去背景質並稍做統計分析後，得到下圖，由此圖可知，加入質體之細胞數量與對照組並無顯著差異，而施予轉染試劑的細胞數量則約只有對照組的 0.6 倍，顯示有四成細胞因轉染試劑而死亡，因此可推斷轉染時細胞的死亡原因主要來自轉染試劑之毒性，為改善此狀況，於轉染四至六小時後，應將含有轉染試劑之培養液置換成正常之細胞培養液。



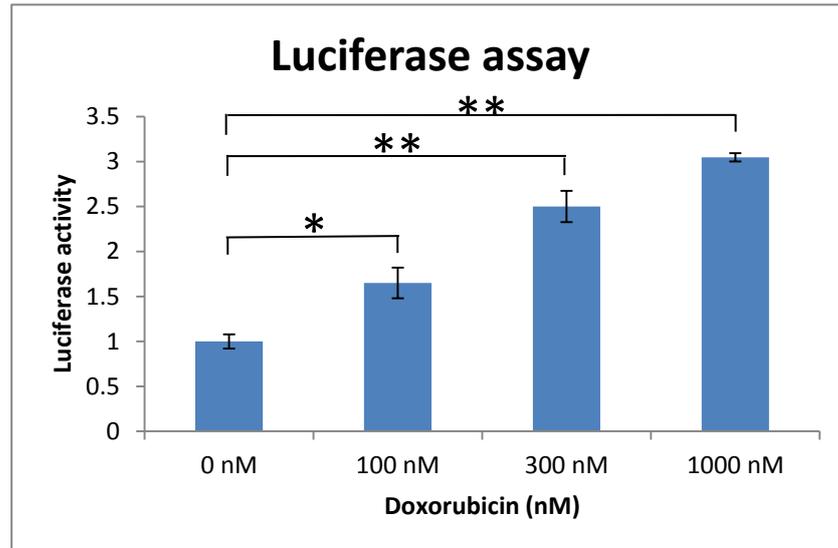
圖十五、WST-1 結果圖

八、建立 MCF-7 轉殖細胞株

MCF-7 在轉染後，經過兩天休息，加入 500 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B 進行抗生素篩選，篩選之初，細胞有大量死亡之情況，但篩選結束並經過約五天培養後，可觀察到為數不少之細胞集落產生，集落之細胞數約在數十至數百不等，型態則有別於野生型(wild type) MCF-7，近乎為正圓形。最後本實驗以 stable clone 的方式，挑選出了九十六個獨立殖株。

九、以阿黴素刺激轉殖細胞進行冷光表現

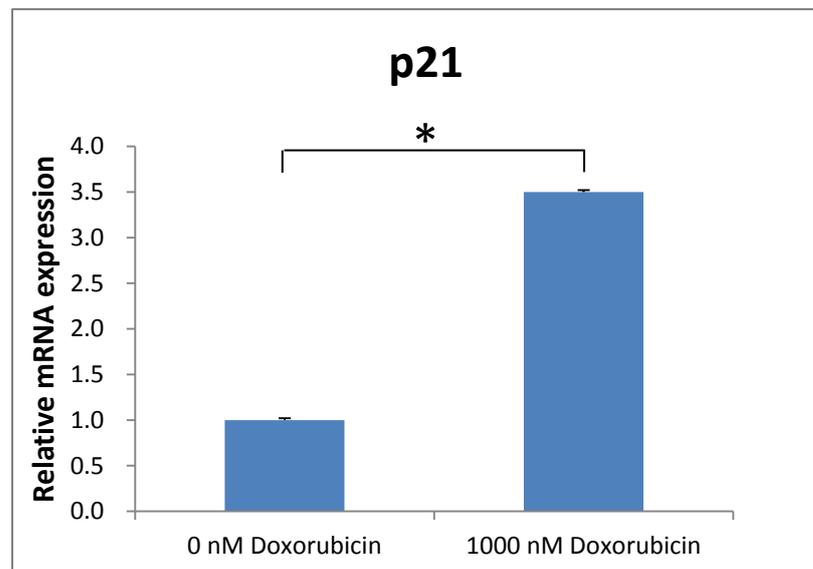
阿黴素(Doxorubicin/Adriamycin)為現今癌症治療上常用的化療藥物之一，因其對心臟之毒性，多搭配脂微體(Liposome)使用，其原理為抑制負責 DNA 解旋之拓撲異構酶 II，造成 p53 的活化。利用此原理，本實驗先將 PGL4-p53 報導質體轉染入 MCF-7 細胞之中，待轉染二十四小時後，給予 0 nM、100 nM、300 nM、1000 nM 的阿黴素九小時，之後便進行 Luciferase assay 分析，經過 protein normalization 後，得圖十六之結果，由圖可知，經給予 300 nM、1000 nM 阿黴素的 MCF-7 轉殖細胞，其冷光讀值分別為對照組之 2.5 倍、3 倍之多，具有顯著差異($p < 0.01$)，而施予 100 nM 阿黴素的轉殖細胞冷光表現與對照組有明顯差異($p < 0.05$)。



圖十六、螢光酵素分析結果圖

十、以 RT-qPCR 方式進行平台確效

為了檢測本平台的準確度及效益，本實驗以阿黴素(Doxorubicin)對轉殖細胞株進行 p53 的活化後，除進行螢光酵素分析(Luciferase assay)外，亦針對 p53 之下由基因 p21(cip1/waf1)之 mRNA 為目標，以 RT-qPCR(real-time quantitative polymerase chain reaction)之方式進行平台確效。轉殖細胞在經過 16 小時藥物刺激後，先以 TriPure 試劑進行 RNA 萃取，接著將 p21 mRNA 及作為標準量之 18S rRNA 反轉錄成對應之 cDNA，進行即時定量聚合酶連鎖反應，並以其結果推算 p21 之 mRNA 表現量。如圖十七所示，有給予阿黴素的轉殖細胞之 p21 表現量約為對照組之 3.5 倍，除有顯著差異($p < 0.01$)外，與本平台之螢光酵素分析結果在相同藥物劑量下，有相似倍數之結果，因此驗證了本平台的準確性。



圖十七、RT-qPCR 結果圖

陸、討論

為了找尋有效的抗癌藥物，傳統細胞模式中利用 Western blot 和 RT q-PCR 方式對特定蛋白質和 mRNA 進行分析。但所需技巧步驟繁瑣、成本高且時間長，無法於短時間內進行高量物質篩選而得到有效結果。近年來，改良傳統細胞模式以 luciferase 報導基因為檢測基礎進行樣品篩選，雖然可以縮短篩選時間，但於篩選前都必須把報導基因送入細胞，因而使的成本和耗費時間增加。此外，細胞經轉殖後若未除去未轉殖成功之細胞，會使得實驗結果因未轉殖細胞影響而降低其敏感性。如先前文獻探討所述，p53 腫瘤抑制蛋白為一重要且多功能的癌症抑制指標，所以我們選擇利用 p53 結合為構築了可反映 p53 轉錄活性的質體，並且使用 luciferase 作為報導基因，架構了可在短時間內對於抗癌藥物進行高通量篩選的平台，此平台能在一分鐘內分析近百個樣品，具高通量偵測的特質，且實驗技巧的需求及成本亦較西方墨點法及 RT-qPCR 為低，因此希望能以此平台取代傳統篩選方法並提高篩選效率。

本研究利用 PCR 的方式確認所使用的質體是否正確，其中 PCR 的條件應視引子 (primer) 的序列而定，PCR 的主要原理是利用高溫(94°C)將 DNA 兩股分離(denaturation)，緩冷(55~65°C)配對(annealing)使 primer 和 template DNA 配對，延長反應(extension，72°C)合成新的 DNA。以上三個原理循環操作每次可使 DNA 增加一倍而藉此放大目標 DNA 片段。若在電泳結果中發現較不明顯且不應出現的片段，則可能是引子與模板 DNA 配對反應時的溫度不夠高，造成引子與非預期的片段結合，放大出不符合實驗設計之片段，針對此問題，應視模板 DNA 與引子結合片段的序列，酌量提高結合時的反應溫度。

綜合以上實驗結果，本實驗已成功建立出可高通量篩選抗癌藥物的 MCF-7 轉殖細胞，此細胞能在阿黴素(Doxorubicin)引起 DNA 破壞時顯著地表現螢光反應，即可以精確反映出 p53 腫瘤抑制蛋白在轉錄層級(transcription level)的活化情形。本實驗所建立之平台是一以報導質體為基礎的細胞平台，能以迅速、高通量的優點取代傳統細胞模式中利用 Western blot 和 RT q-PCR 方式對特定蛋白質和 mRNA 進行的分析。未來將針對 mRNA 層級及蛋白質層級進行平台確效，並開始著手於橄欖萃取物、羅漢果皂甘等功能性食物抗癌功效的鑑定。

柒、結論

為了改善傳統抗癌藥物篩選模式耗時、耗工及效率低的缺點，本實驗設計利用接有 p53 minimal promoter 的 Luciferase 報導基因質體，將其轉染(transfect)至 MCF-7 人類乳癌細胞株中，建立一個能因 p53 腫瘤抑制蛋白在轉錄層級(transcription level)的活化而顯著表達螢光的轉殖細胞株。本實驗首先將報導質體轉型(transform)至勝任細胞(competent cell)中，利用勝任細胞放大質體，抽出質體並確認其正確性。MCF-7 細胞株在經過多項檢驗並測試往後所需實驗條件後，以先前確認之報導質體配合 T-pro transfection reagent 轉染至細胞當中，並以 Hygromycin B、stable clone 及 Luciferase assay 等方式進行轉染植株的挑選，最終建立出在阿黴素(Doxorubicin)引起 DNA 破壞時顯著地表現螢光反應，並可以精確反映出 p53 腫瘤抑制蛋白在轉錄層級(transcription level)的活化情形的轉殖細胞株。綜合上述，本實驗已成功構築一能以迅速、高通量的優點取代傳統篩藥模式中西方墨點法(Western blot)及 RT q-PCR 的生物技術平台。未來將利用本平台針對橄欖萃取物、羅漢果皂甘等功能性食物進行抗癌功效的鑑定。

捌、參考資料

- 林欣雅 (2011)。於高果糖餵食誘導模式下以蛋白質體學方法探討龍眼花水萃物改善大鼠代謝症候群之機制。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文，未出版，台北市。
- 邱詩婷 (2011)。建立並評估生物技術平台篩選具抗發炎效果食品。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文，未出版，台北市。
- 莊惠娟 (2000)。以基因微陣研究 p53 調控之基因表現型態。國立中央大學生命科學研究所碩士論文，未出版，桃園市。
- 陳奕安 (2012)。利用細胞平台的評估進行中國橄欖萃取物中具抗發炎或抗腫瘤功效成分的分析與分離。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文，未出版，台北市。
- 游雅茹 (2012)。利用細胞模式評估 Bracteanolide A 的抗氧化生物功能。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文，未出版，台北市。
- AMBS, S., HUSSA1N, S. P., & HARRIS, C. C. (1997). Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *The FASEB Journal*, 11, 443-448.
- An. WG., Kanekal M., Simon MC. *et al.*, Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature*, 392(6674), 405-408.
- Anneke C. B., D. Joseph Jerry.(2002). Knockout and transgenic mice of Trp53: what have we learned about p53 in breast cancer? *Breast Cancer Research*, 4(3), 101-111.
- Brooks CL., Gu W. The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein Cell*, 2(6), 456-462.
- Caporali S., Falcinelli S., Starace G. *et al.*, DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system. *Mol Pharmacol*, 66(3), 478-491.
- Danielly C. F. C., Fabiana A. C., Julia Q., Maite S. M., Daniel S., Patricia S. S., Eliane F., Jerson L. S.(2012). Transient Transfection of a Wild-Type p53 Gene Triggers
- Debby G., Kristel J.M. Boonen, M.Sc., Cees W.J. Oomens, Frank P.T. BAAIJENS, Carlijn V.C. BOUTEN. (2007). The Influence of Serum-Free Culture Conditions on Skeletal Muscle Differentiation in a Tissue-Engineered Model. *Tissue Engineering*, 14(1), 161-171.
- Eli P., Rinnat M. P., Ilan S., Rinat A., Sharon A., Shafika K., Elena G., Simcha U., Eithan G. & Yinon B.(2004). NF-κB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 431, 461-466.
- Eom TY., Joep RS. (2009). GSK3 beta N-terminus binding to p53 promotes its acetylation. *Mol Cancer*, 5, 8-14. PMID:19265551

- Esposito F., Tornincasa M., Chieffi P., *et al.*, High-mobility group A1 proteins regulate p53-mediated transcription of Bcl-2 gene. *Cancer Res*, 70(13), 5379-5388.
- Feng Z., Kachnic L., Zhang J., *et al.*, DNA damage induces p53-dependent BRCA1 nuclear export. *Biol Chem*, 279(27), 28574-28584.
- GILBERT JAY, GEORGE K., ALBERT B. D., WOLFGANG G. D., LLOYD J. O.(1981). p53 transformation-related protein: Detection of an associated phosphotransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78, (5), 2932-2936.
- Hahnvajanawong C., Ketnimit S., Pattanapanyasat K. *et al.*, Involvement of p53 and nuclear factor- κ B signaling pathway for the induction of G1-phase cell cycle arrest of cholangiocarcinoma cell lines by isomorellin. *Biol Pharm Bull*, PMID:22972485
- Hans Clevers.(2004). At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell*, 118, 671–674.
- Hong Yang, Zoran Filipovic, David Brown.(2003). Macrophage inhibitory cytokine-1: A novel biomarker for p53 pathway activation. *Mol Cancer Ther*, 2, 1023-1029.
- Hsieh, W. J., Chiou, S. T., Pan M. H., & Hsieh, S. C. (2012). Establishment and evaluation of biotechnological platform for screening health food with anti-inflammation ability. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2(1), 76-80.
- Kahyo T, Nishida T, Yasuda H. Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell*, 8(3), 713-718.
- Lisa M. C., & Zena W. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867.
- Matthias D. K., Stephanie P., Richard D. I. (2004). Regulation of p53 Stability and Function in HCT116 Colon Cancer Cells. *Biol Chem*, 279(9), 7598-7605.
- Miyashita T., Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80(2), 293-299.
- Park BS., Song YS., Yee SB., *et al.*, Phospho-ser 15-p53 translocates into mitochondria and interacts with Bcl-2 and Bcl-xL in eugenol-induced apoptosis. *Apoptosis*, 10(1), 193-200.
- Resveratrol-Induced Apoptosis in Cancer Cells. *PLOS ONE*, 7(11), 1-12.
- Schmid T, Zhou J, Brüne B. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med*, 8(4), 423-431.
- Yongqing Liu, Douglas C. Dean. (2010). Tumor initiation via loss of cell contact inhibition versus Ras mutation. Do all roads lead to EMT? *Cell Cycle*, 9(5), 897-900

【評語】 040709

利用 P53 的 response element 接上 Luciferase reporter gene 建立篩選藥物的平台，但是僅看到平台的建立，未有實際利用此平台篩選抗癌藥物的 data，殊屬可惜。建議多選幾種細胞株及抗癌藥物來測試。