

2012 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

編號：080005

作品名稱

轉譯在延長階段所做的調控

得獎獎項

大會獎：二等獎

候補作品：1

作者姓名：李嘉倫、胡鈞

就讀學校：臺北市立建國高級中學

指導教師：黃怡萱、劉翠華

關鍵字：CPEB3、延長階段(elongation)、轉譯減緩

作者簡介



我是李嘉倫。今年十七歲，目前是建國高中數理資優班的高三生。平常空閒的時間喜歡閱讀書籍充實自我，也喜歡和朋友一起運動鍛鍊身體。個性樂觀開朗，興趣廣泛，喜歡了解不知道的新事物。

高一的時候在學校專題課選擇了生物，而後有幸在中研院進行生命科學的研究。收獲良多，也體驗了許多實驗室內的樂趣，以及研究法的步驟和設計方法。



我是胡鈞，目前就讀建國中學。自小學開始即對生物及實驗感到極大的興趣，因此也從那時起就參加科展的比賽，雖然在比賽中的成績並不太亮眼，但是過程中的學習對於我而言是極大的收穫，不論是實驗方法的尋求或者是結果的探討，都能讓我更加了解課本以外的知識以及追求學問的態度，也使我有更嚴謹的邏輯推理能力。

摘要

高中生物課本內對於轉譯機制所舉的例子，通常僅侷限於轉譯起始階段 (initiation) 所受的調控，例如色胺酸調控組。因此，我們想藉此研究更進一步探討：細胞在不同階段是否有調控轉譯的現象。我們利用冷光蛋白測定法 (luciferase reporter assay) 測出 CPEB3 的確對於轉譯有減緩的效果，並利用不同 internal ribosome entry site (IRES) 間接證明轉譯速率的變化主要是根據延長階段的不同而有所改變。另一方面，我們將多組 CPEB3 突變株進行交叉分析，找出 cpeb3 序列中兩百多個鹼基對的重要基因片段，並發現其為不連續的基因，且用 Co-Immunoprecipitation (Co-IP) 驗證我們的實驗結果。未來，我們將繼續探討在延長階段抑制的意義，以助於我們進一步了解細胞轉譯的過程。

Abstract

Examples of translational regulations raised in textbooks are mostly limited to regulations at initiation, for instance, Trp operon. Herein, we hope to study whether cells undergo translational regulations during stages other than initiation. We use luciferase reporter assay to examine repression of translation caused by CEPB3, and we adopt various ribosome entry sites to imply that regulation of CPEB3 mainly occur at elongation. On the other hand, comparing several CPEB3 mutants, we obtained a gene fragment of ~200 bps which is vital to function of CPEB3. Co-Immunoprecipitation (Co-IP) validates our findings. In our next step, we hope to understand the purpose of repression at elongation and further explore the process of translation.

壹、前言

一、研究動機

為何在課堂上提到的轉譯調控總是發生在轉譯開始前？有沒有轉譯的調控是發生在延長階段呢？為了解答這些問題，我們上網查了一些資料。在前人的文獻中，Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein 2(CPEB2)為調控缺氧逆境蛋白 hif1-alpha 的一種蛋白質。另外，有研究指出，CPEB2 會在延長階段與 Eukaryotic translation elongation factor 2 (eEF2)結合，造成 HIF1-alpha 的多肽鏈在核糖體上由 A 位移到 P 位的速率減緩。

因此不禁令人想問：同一家族的 CPEB3 是否也具有調控轉譯延長階段的功能？於是我們想探討 CPEB3 是否會改變轉譯的速度，以及其改變對於生物體所造成的影響。

二、研究目的

(一).研究 CPEB3 是否可在延長階段中減緩轉譯速率。

(二).分析 CPEB3 的哪一段序列會影響其與 eEF2 結合的能力。

貳、研究方法及過程

一、實驗器材

恆溫培養箱	微量離心管(eppendorf tube)
微量吸取器(pipetman)	培養皿
離心機	無菌操作台
微量生物樣品控制偵測儀	分光光度計
冷光測定儀	拋棄式試管
玻璃試管	電泳槽
紫外光觀察箱	乾浴槽

二、實驗藥品

PBS	restriction enzyme (Fermentas)
luciferase assay kit (Promega)	midi kit (Geneaid)
T4 DNA ligase	gel extraction (Viogene)
culture medium	Ampicillin
agarose (Invitrogene)	amino acid (Sigma)

三、研究過程

(一)培養 293T 細胞

- 1.配置含有 10%的胎牛血清(FBS)的 DMEM 培養液
- 2.將已有 293T 細胞的培養皿中的培養液吸乾
- 3.用 PBS 輕輕沖洗細胞，並盡量吸乾多餘的 PBS
- 4.加入 1 ml Trypsin-EDTA (0.25% trypsin, 1 mM EDTA) (以能覆蓋細胞表面為原則)，置入 37 °C 細胞培養箱數分鐘
- 5.用顯微鏡觀察其是否脫落培養皿表面(觀察時用手搖晃)

6.加入 3mL 培養液停止 Trypsin-EDTA 作用，並沖吸細胞多次，以達到細胞均勻分散溶液的目的

7.將含有細胞的培養液分裝到其他培養皿中

(二)Luciferase Reporter Assay 研究 CPEBMs2CP 的抑制效果

1.將 CPEBMs2CP、Fireflies、Renilla 基因分別嵌入載體

2.利用脂質體將載體送入細胞

3.於培養箱置放 16 小時

4.以 PBS 沖洗細胞，並用 lysis buffer 析出細胞中的蛋白質

5.以 lysate 加入 Fireflies Substract 中，測量其冷光值

6.再加入 Renilla Substract，測量其冷光值

7.重複上述步驟，比較同種 lysate 的兩種冷光強度，紀錄比值並製表

(三)Luciferase Reporter Assay 研究突變株抑制效果

1.以 PCR 複製 CPEB3 序列，並剪接不同突變株至不同載體上

2.以 heat shock 將載體送入 *E.Coli*，於培養箱置放 12 小時

3.挑選菌株，以 Mini Prep 抽取 *E.Coli* 內的 DNA，並定序

4.大量培養所選取的 *E.Coli*，並以 Midi Prep 抽取 plasmid

5.利用脂質體將 DNA 送入細胞(293T)並重複步驟 1

6.紀錄兩種冷光比值，以 western blot 比較蛋白質表現量

(四)以 Co-IP 測定 myc-CPEB 突變株與 flag-eEF2 的結合

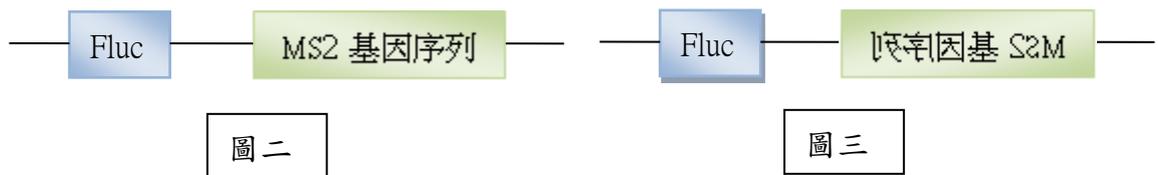
1. 將細胞收下並以 IP buffer 製成 lysate，取 30 μ L 為 input
2. 將剩餘 lysate 加入 α myc 抗體，並加入 protein G sapharose
3. 置於冷房 2 小時，將 beads 離心並以 IP buffer 回溶作為 IP
4. 利用 α myc 和 α flag 不同抗體進行 western blot，並觀察結果

參、研究結果與討論

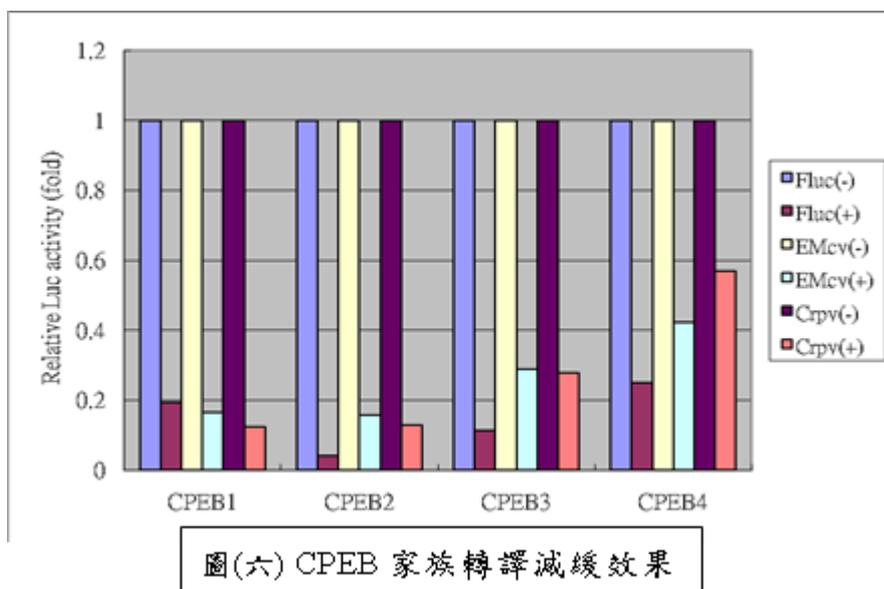
一、Luciferase Reporter Assay 研究 CPEBMs2CP 的抑制效果

(一)在所有突變株中，我們將 CPEB3 蛋白的 C 端(即 RNA binding domain)置換成 MS2-CP。再將 firefly luciferase 基因以不同的形式(正、反向)轉殖入細胞(以下說明)，並共同轉殖入 renilla luciferase 基因作為背景值，再比較兩種冷光蛋白(firefly,renilla)的比值差異，探討 CPEB3 N 端序列對轉譯的影響。

1. CPEB3 C 端的 MS2-CP 可與正接的 firefly luciferase MS2 基因序列結合，使 CPEB3 N 端有調控 firefly luciferase 的作用(反接則否)
2. Luc(+): 將 firefly luciferase (Fluc)後端接上 MS2 基因序列與 CPEB3 的 MS2-CP 結合。(如圖二)
3. Luc(-): 將 firefly luciferase (Fluc)後端接上反向的 MS2 基因序列，以作為 Luc(+)的控制組。(如圖三)



4. EMcv(+/-): 在 Fluc (+/-)前加上髮夾(stem loop)，阻止轉譯從起始密碼子(AUG)進行轉譯，並在髮夾(stem loop)後加上 EMcv 的 IRES 以減少轉譯所需的起始因子。(如圖四)
5. CrPV(+/-): 在 Fluc (+/-)前加上髮夾(stem loop)，阻止轉譯從起始密碼子(AUG)進行轉譯，並在髮夾(stem loop)後加上 CrPV 的 IRES，使其不需要起始因子即可開始轉譯。(如圖五)



(二)在圖(六),我們將 firefly luciferase 的冷光值除以 Renilla luciferase 的冷光值,以作為比值分析。並以 Fluc、EMcv、CrPV 的正接 MS2 的比值除以其個別的反接 MS2 比值,製作成圖表。

(三)從圖(六)可知,當冷光基因後面接上正接 MS2 序列時,CPEB 蛋白便可以用 24 倍 MS2-CP 與 MS2 序列結合,使 firefly luciferase 的冷光值降低。由此證明,CPEB 蛋白會抑制轉譯效果。而反向序列則無法使 CPEB 家族蛋白與冷光基因結合,故以此當作負對照(negative control)。

(四)從本實驗得知,在有 CrPV 的 IRES 情況下,細胞中依然有冷光值(firefly luciferase)的存在。由此可知,即使不需要起使因子,同樣有抑制轉譯的效果,因此間接證明此抑制現象是在轉譯的延長期間所發生。

二、Luciferase Reporter Assay 研究 CPEBMs2CP 的抑制效果

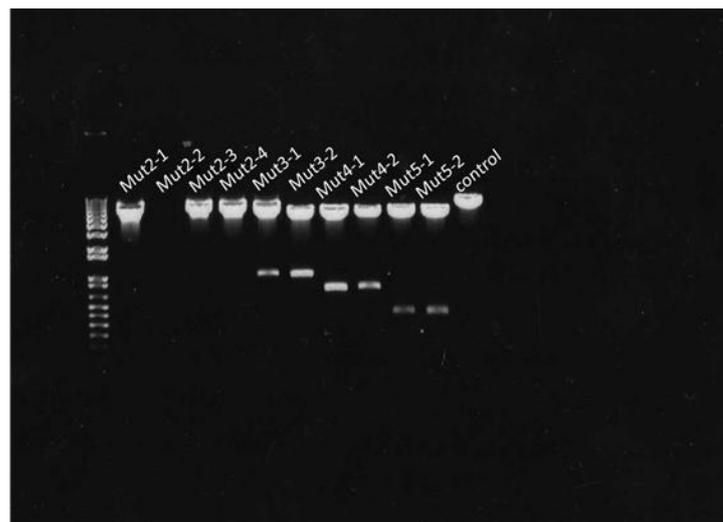
(一)備置

1. 我們利用 NheI 切位和 XbaI 切位分別將 CPEB3 蛋白的 N 端全長剪接至質體。同時，將 C 端置換成 MS2-CP。利用剪接不同長度的基因序列，製作突變株。由圖(七)，我們可得知 Mut5 的基因序列為最短。



圖(七) CPEB3 突變株切位

(二)突變株檢驗

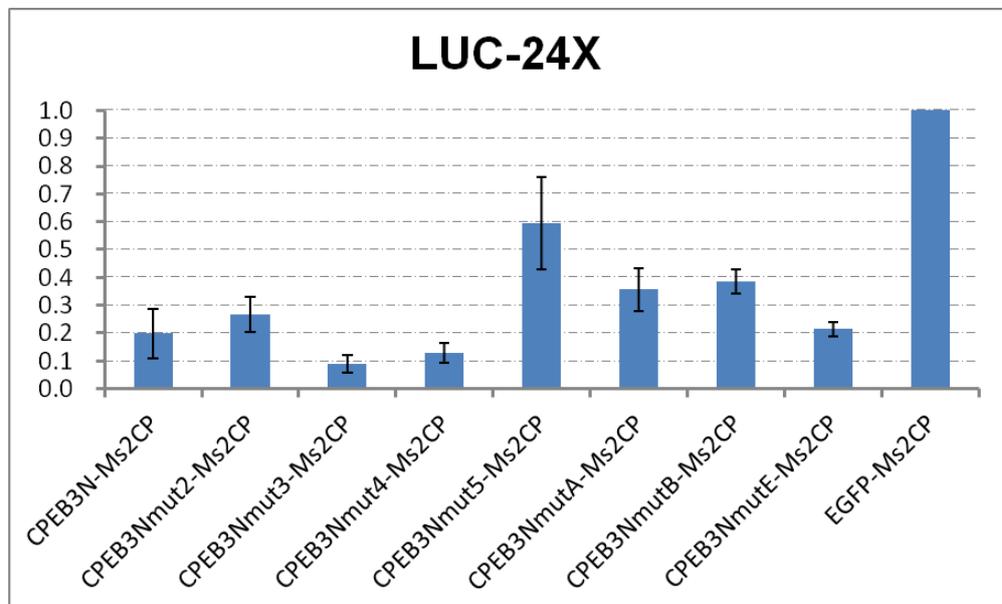


圖(八) CPEB3 突變株跑膠測試

1. 在圖(八)中，我們利用 NheI 和 XbaI 作為限制酶切位，每個突變都挑選兩個菌落來進行突變株檢驗。圖片中訊號較亮的地方為載體，下方較小片段為各突變株剪接之 CPEB3 片段。可看見 mut3,4,5 均有被限制酶剪接，且其大小依序遞減，符合實驗預期。
2. 圖(八)中 mut2 訊號較不明顯，推測是挑到不符合要求的菌落，亦或是該序列較不易被限制酶 NheI 和 XbaI 做剪接。故我們利用 SacII 切位作部分剪接(partial digestion)，將所選選取的 mut2 自載體中分離出。進一步利用大腸桿菌增殖其序列。

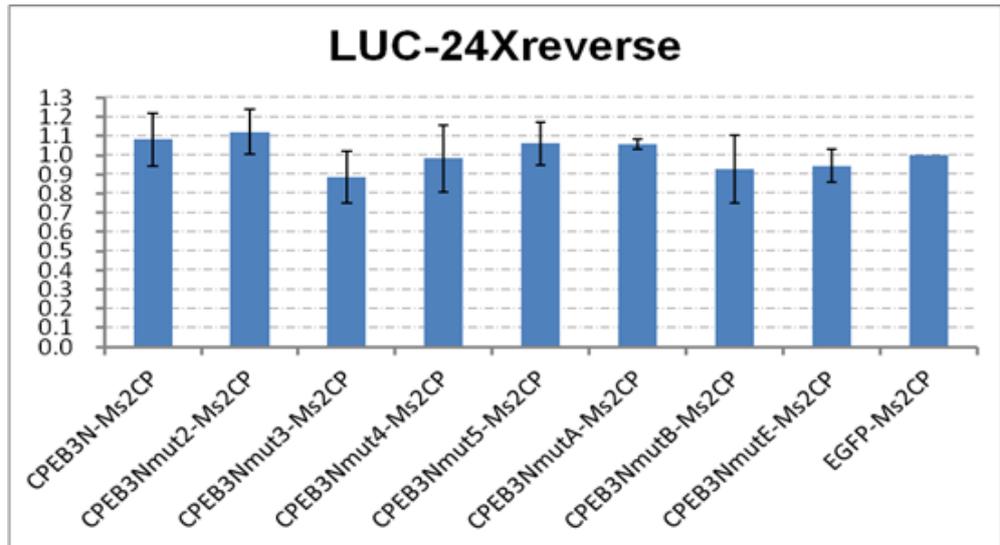
(三)突變株的冷光值測定

1. 由於 EGFP 控制組中未含有抑制轉譯的效果，所以我們將各突變株的冷光比值與 EGFP 作對比。由圖(九)可知，各 mutant 的冷光比值均較 EGFP 低，故都有抑制 firefly luciferase 的效果。但 mut5 的比值較其他突變株高，我們推測 CPEB3 抑制轉譯的功能減弱。



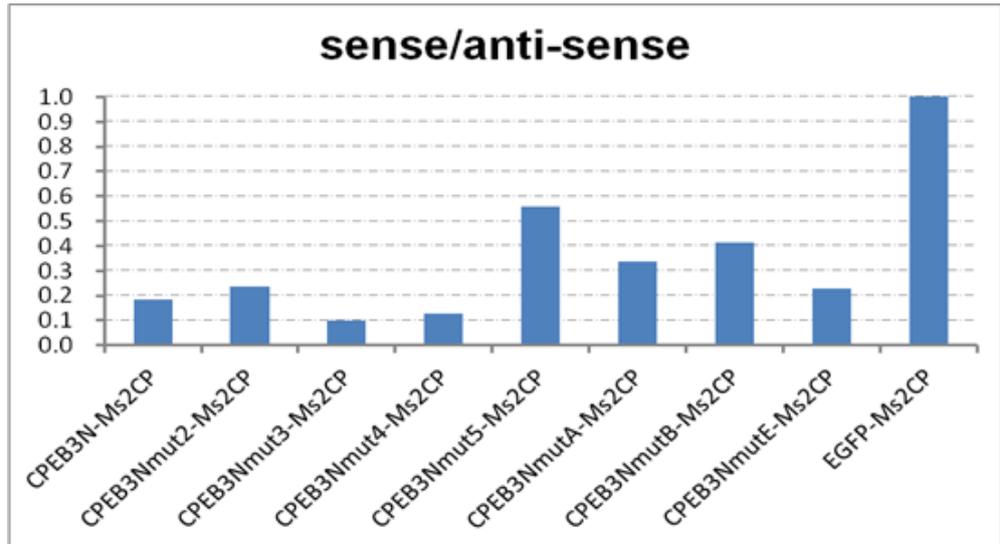
圖(九) 各突變株正接 MS2 基因序列之冷光比值

2. 由圖(十)可知，反接 MS2 序列時，各突變株的冷光比值與對照組相似。因而得知實驗組對於細胞轉譯過程的速率和控制組相近。也說明 CPEB3 未與 MS2 結合時，並不會抑制轉譯速率。但是 mut2,3 仍有 20% 的抑制效果，對於整體而言，我們必須繼續重複實驗以確認他是否具有統計意義。



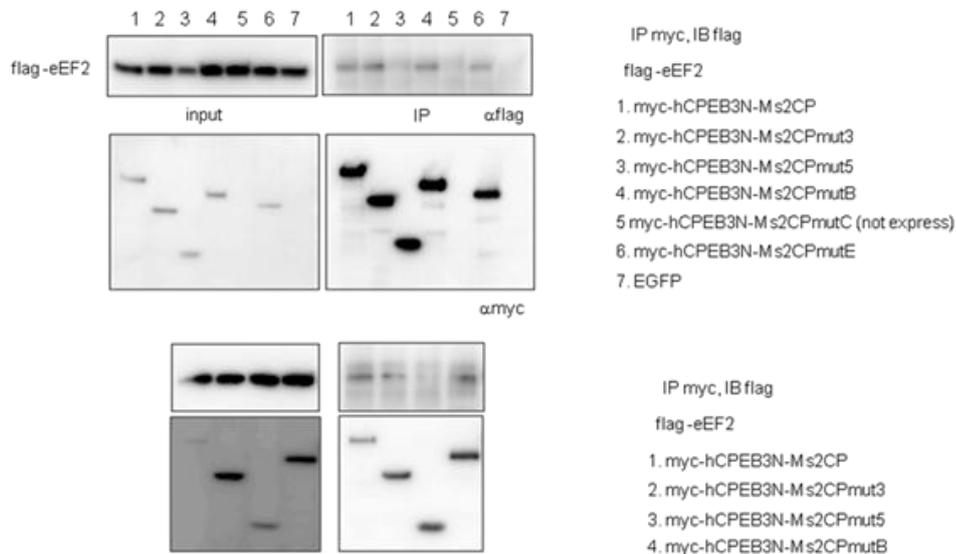
圖(十) 各突變株反接 MS2 基因序列之冷光比值

3. 在圖(十一)中，可發現 mut5 約只有一半的抑制效果，可更加證明 mut4 到 mut5 中有著抑制轉譯的重要序列。於是我們比對 CPEB3 的 mutant5 與前人突變株的序列，得到極大的相似性，推測應是共同的基因序列所造成的結果。但在 mutant 4、5 之間再做剪接的 mutant A~E 抑制的效果反倒較差，因此我們認為 CPEB3 重要的表達基因不只位於一處，是不連續的基因。



圖(十一) 突變株正接/反接 MS2 基因序列之冷光比值

三、以 Co-IP 測定 myc-CPEB 突變株與 flag-eEF2 的結合



1. 由 input 可知，我們可標記 flag-eEF2 和 myc-CPEB 兩種不同的蛋白質。而我們可利用 IP 的結果，檢測兩種蛋白的結合能力。在 IP 結果中，我們發現 mut5 雖然可標記 flag-eEF2 蛋白，但其 myc-CPEB 的信號卻十分微弱，相較於其他突變株，mut5 的兩種蛋白結合能力明顯下降。此結果證明兩種蛋白的結合在 mut5 時較差，意即 CPE3B 蛋白的功能受影響。

肆、結論

一、CPEB3 在轉譯的延長階段有減緩的效果

二、CPEB3 減緩轉譯速率的重要基因是不連續的

伍、未來展望與應用

藉由 CPEB3 的 mutant5 與前人突變株的序列比對，得到極大的相似性，推測應是共同的基因序列所造成的結果，未來會繼續縮小範圍，將其重要的基因序列找出。

確認 CPEB3 的功能之後，未來我們將去了解其機制的意義，例如：增加多肽鏈的正確率、防止利用 SRP 進入內質網時的堵塞、節省細胞所消耗的能量、加快蛋白質的生成(因為停在延長階段，隨時都可以加快)等，以助於我們更加了解細胞轉譯的過程。

陸、參考資料及其他

- 一、趙大衛等編輯(2010年)。選修生物(下)第十三章 主宰生命奧妙的分子(初版)
台北市：翰林
- 二、生物學 第17章(鍾楊聰等編譯)(2009年)。台北市：偉明。
- 三、Röther, S. and Sträßer, K. (2007). The RNA polymerase II CTD kinase Ctk1 functions in translation elongation. *Genes and development*, 21, 1409-1421.
- 四、[Shu-Chun Peng](#), [Yen-Ting Lai](#), [Hsi-Yuan Huang](#), [Hsien-Da Huang](#), and [Yi-Shuian Huang](#), (2010). A novel role of CPEB3 in regulating EGFR gene transcription via association with Stat5b in neurons *Nucleic Acids Research* 38: 7446-7457
- 五、Hägele S, Kühn U, Böning M and Katschinski DM. (2009). Cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein (CPEB)1 and 2 bind to the HIF-1alpha mRNA 3'-UTR and modulate HIF-1alpha protein expression. *Biochem J.* 417:235-246.

評語

1. 能設計明確之實驗流程，發現特定之 CPEB3 蛋白質區段與 eEF2 之作用。
2. 建議加強 CPEB1 ~ 4 蛋白質之生物資訊分析與比對。
3. 建議詳細分析 mnt 5(216-318)之蛋白質序列，並探討其與 eGF2 之分子交互作用機制。