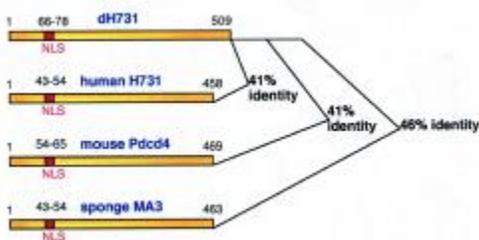




五十一屆國際科技展覽會

作者:

陳昕 就讀學校: 北一女中 指導老師: 林英子 簡正鼎 作者簡介: 我是陳昕, 今年從北一女中畢業, 很幸運的能保送上台大動物系。科展的經驗是我高中生活中最美好而難忘的一部份, 也讓我成長很多, 我會持續我的研究計畫, 希望能在基礎研究的路上繼續學習。一、研究動機: 許多大型的國際計畫正全力解讀生物體的基因密碼, 大量的DNA序列隱藏著生命進行的藍圖, 我們已經邁入Post-genome的時代, 經由結合電腦和分子生物技術, 我們可以快速地從這些DNA序列獲得豐富的生物資訊。身處這股探索基因功能的巨浪中, 我將焦點投注在果蠅體內一個功能未知的蛋白質, 它是人類H731的果蠅同源體, 我們稱它為 *Droso phi la* H731 (dH731)。由酵母菌雙雜交系統(Yeast two-hybrid system)得知dH731和numb蛋白質有交互作用, 而其mRNA大量表現在果蠅胚胎神經母細胞及生殖腺(Fig.12)。dH731蛋白質包含509個胺基酸, 且具有一可能調節染色體濃縮的序列AGAGGAHGASV [Regulator of chromosome condensation (RCC1) signatures]。在人類及老鼠的細胞中皆有dH731的同源體(homologue) (Fig.1), 並且已知人類H731基因和細胞週期有關(Matsushashi et al., 1997; Yoshunaga et al., 1997)。因此我對dH731的功能非常感興趣, 我利用酵母菌雙雜交系統,



經由不同蛋白質間的可能結合, 找出和dH731有交互作用的蛋白質, 再經過網際網路資料庫進行DNA序列及胺基酸序列比對, 搜尋在果蠅及其他物種的同源體, 及分析其蛋白質區塊, 整合相關的文獻資料, 了解和dH731有交互作用的蛋白質之功能, 進而探討dH731在果蠅所扮演的角色。二、研究目的: 利用「酵母菌雙雜交系統」, 經由不同蛋白質間的可能結合, 來探知dH731的功能。酵母菌雙雜交系統可以找出和dH731有交互作用的蛋白質, 再結合網際網路資料庫, 比對DNA序列及胺基酸序列, 了解和dH731有交互作用的蛋白質之功能, 進而探討果蠅胚胎發育上所扮演的角色。三、研究設備器材: 重要實驗儀器 1.高速離心機 DuPont SORVALL 離心機 SORVALL RT 6000D 3.微量離心機 Eppendorf Centrifuge 5417 4.分光光度計 Beckman spectrophotometer DU640B 5.真空乾燥機 Savant Speed-vac SC110 6.紫外光光源 2UV Transilluminator 7.電脈衝轉換器 Eletronics 8.溫震盪器 Shaker 9.恆溫箱 Incubator 10.UV crosslinker 11.位相差顯微鏡 Nikon optiphot-2 12.電腦 Power Macintosh 7300/180, G3 四、研究原理及方法: 研究原理 酵母菌雙雜交系統(Yeast Two Hybrid System) (Fields & Chien, C.-T. et al., 1991) 是一套用來偵察蛋白質與蛋白質間交互作用的系統化工具, 它用遺傳的方法的研究方法更加快速而明確, 這套系統能很快的確認出一個基因產生的蛋白質和其目標蛋白質有交互作用。雙雜交系統的原理建立於一些轉錄因子(transcription activator)的特性可以劃分為DNA-binding

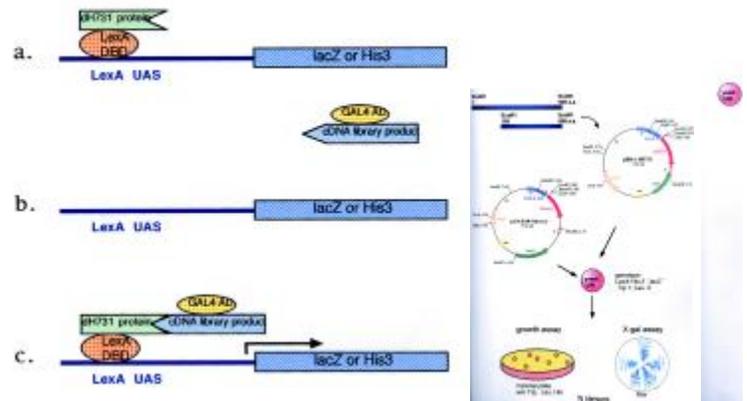
(DBD)和activation domain(AD)兩部分，例如酵母菌中的GAL4和GCN4蛋白質。DNA-binding domain的部份結構，它的功能是在此因子所調控的基因之上游致活位置(UAS, upstream activation site) DNA結合，而activation domain所扮演的角色是開啓轉錄的機制。(Fig.2) 由以上所敘述的幾個特性交系統發展出一套偵測蛋白質之間交互作用的有效辦法。我們可以藉由cloning的方式在DBD接上的蛋白質X，然後在AD接上另一已知的蛋白質Y，將這兩個組合的質體放入酵母菌中表現轉譯蛋白質X和Y有交互作用，則兩者之間會相結合並且啓動轉錄

作用，使報導基因(reporter gene)表現，我們經由篩選酵母菌表現報導基因的能力，來找尋出蛋白質間的結合，也得到蛋白質X和Y功能相關的可能性，進而探討未知蛋白質的功能。這套系統是一項很有價值的應用，能將上述的蛋白質Y用基因庫(library)取代，則我們可以很迅速的找到各種與蛋白質X功能相關的基因，進一步探討它們之間的調控。

Fig.2 酵母菌雙雜交系統示意圖 a. 一個組合的蛋白質包括LexA DNA-binding domain和dH731蛋白質(dH731 protein)，此蛋白能在報導基因lacZ的上游與LexA UAS結合，但它無法啓動基因的轉錄。

b. 一個組合的蛋白質包括GAL4 activation domain和基因庫中某基因產生的蛋白質(cDNA library product)，它不能與報導基因的上游結合，所以也無法進行轉錄。 c. 經由dH731 protein和cDNA library 轉譯產生的某一個蛋白質間的交互作用，使得LexA DBD和GAL4 AD得以結合，並且執行轉錄報導基因的功能。

Yeast Two Hybrid System



步驟 <質體構築> 由於我們在酵母菌雙雜交篩選中使用的以我們必須把dH731基因接到LexA的下游，再者，我們要表現來找尋蛋白質間的可能結合，為了避免dH731基因才生的蛋白質(cDNA library product)，它不能與報導基因的上游結合，所以也無法進行轉錄。 b. 一個組合的蛋白質包括GAL4 activation domain和基因庫中某基因產生的蛋白質(cDNA library product)，它不能與報導基因的上游結合，所以也無法進行轉錄。 c. 經由dH731 protein和cDNA library 轉譯產生的某一個蛋白質間的交互作用，使得LexA DBD和GAL4 AD得以結合，並且執行轉錄報導基因的功能。

(table 1)	質體	篩選基因	插入 DNA
DNA-Binding domain: LexA	pBHA	TRP1	dH731 gene
Activation domain: GAL4 AD	pGAD10	LEU2	果蠅基因庫

使用三種果蠅cDNA基因庫：0-3hr 胚胎, 3-12hr 胚胎, 及幼蟲之cDNA基因庫。在酵母菌轉形實驗 (yeast transformation) 中，我們將pBHA (Fig.4)和pGAD10 (Fig.5)一起送入酵母菌的細胞核中，由於報導基因的表現，轉形成功的酵母菌會具有合成色胺酸 (Tryptophan)和白胺酸(Leucine)兩種胺基酸的能力，把轉形後的酵母菌養在缺少色胺酸和白胺酸的SD-Trp-Leu plates上，就可得到擁有pBHA和pGAD10的酵母菌，並且計算轉形成功數量。當dH731蛋白質與果蠅基因庫中某基因的轉譯蛋白質有交互作用時，HIS3和lacZ就會表現，HIS3基因表現會使酵母菌具有合成組織胺酸(Histidine)的能力，所以這時酵母菌會同時具備合成色胺酸、白胺酸和組織胺酸的能力，可以在缺乏這三種胺基酸的培養皿上生長，而 lacZ基因表現會產生β-galactosidase，這種酵素能讓X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)分解由無色變成藍色，所以我們在SD-Trp-Leu-His plates上挑選出酵母菌，並作三次HIS3及lacZ的assay，以篩選出含有與dH731蛋白質產生交互作用的果蠅蛋白質的酵母菌。接著，我們將具有與dH731蛋白質產生交互作用的果蠅蛋白質的酵母菌養在-Leu cline 培養基中，使酵母菌保有pGAD10質體，然後將質體萃取出來，再轉形入大腸桿菌(E. coli strain: HB101)中，由-Leu cline培養皿上挑

選Leu+大腸桿菌，再萃取質體DNA，將質體重新轉形到酵母菌中，與LexA-lamin做負對照實驗，因為lamin是與dH731基因無關的基因，兩者不會有交互作用，若酵母菌還是表現出報導基因(reporter gene)，就表示啟動報導基因不具專一性，不能代表dH731蛋白質會與果蠅基因庫轉譯的蛋白質發生交互作用，所以將這些clone淘汰，留下確定dH731蛋白質與果蠅基因庫轉譯蛋白質有交互作用且具專一性的 clone，進行DNA定序，然後經由DNA序列比對，了解pGAD10質體上果蠅基因的功能，討論該基因與dH731基因功能相關的可能性，進而探討dH731基因的功能。 Fig.5含GAL4 AD的質體: pGAD10 酵母菌轉形實驗(Yeast transformation) a.酵母菌在YEPD 30°C培養一夜，稀釋成1/50~1/100後再養3~4小時(每一組轉形需 10ml)。 b.離心3000rpm 10分鐘，倒掉上清液。 c.以1×LiOAc(0.1M,pH7.5)/ TE洗沉澱物，再離心，棄上清液。 d.使沉澱溶於1×LiOAc in TE (每一組轉形0.15ml)。 e.加入DNA (包括bait, library, ssDNA)，以水補足20µl，再加2µl 10×LiOAc，混合均勻。 f.加750µl 40% PEG，置於30°C中30分鐘，每10分鐘混合一次。 g.加90µl DMSO，置於42°C中15分鐘。 h.離心10秒，棄上清液，使沉澱物溶於2ml YEPD，在30°C中養2小時。 i.離心，使沉澱物再溶於150µl YEPD，塗在有選擇能力的培養基，於30°C中培養2~3天。 < Candidate Grouping > 完成三次的HIS+和X-gal blue篩選，再經由大腸桿菌(E.coli HB101)LEU+的挑選，尚剩下117個candidates，取部分candidates以洋菜膠電泳分析，發現有許多組相似的DNA長度，於是進行DNA Dot Blotting，



can di dates分組。 < Candidate再次轉型至酵母菌 >

經過三次酵母菌雙雜交篩選及完成 can di dates分組之後，我們將與dH731蛋白質有交互作用之果蠅蛋白的基因重新轉形到酵母菌中，與LexA-lamin做負對照實驗，因為lamin是與dH731基因無關的基因，兩者不會有交互作用，若酵母菌還是表現出報導基因(reporter gene)，就表示啟動報導基因不具專一性，不能代表dH731蛋白質會與果蠅基因庫轉譯蛋白發生交互作用，所以將這些 clone淘汰，留下確定dH731蛋白質會與果蠅基因庫轉譯蛋白發生交互作用且具專一性的 clone，進行DNA定序。 < DNA定序及序列比對 > Candidates經過再次轉型到酵母菌的檢驗，將呈現true positive的clone轉型到大腸桿菌(E.coli DH5α)中，再過mini column (Qiagen) 萃取較純的DNA，送到分生所核酸定序中心進行定序。我們將這些DNA序列透過網路查出其所屬的基因，以及在其他物種中相關的

DNA Strider 1.2 (Written by Christian Mark, CEA company, France) 處理DNA序列，轉換成胺基酸序列，找尋Open reading frame Gene Work 2.0 (Written by Manuel J. Glynias, Apple Company) 比較DNA序列及胺基酸序列 結合電腦軟體及網際網路可以進行DNA序列和胺基酸序列比對，分析可能含有的蛋白質 區塊，以及將片段的cDNA從基因資料庫中找出整段genomic DNA的序列，再以軟體譯為胺基酸序列，便能求得完整的open reading frame。以DNA probe檢驗RNA表達的位置及表現的時期。 五、實驗結果 1.<質體之構築> 因為dH731(1-509a.a.)和dH731(193-509a.a.)接在pBHA的cloning site 兩端都是EcoRI，被限制酵素切後的序列

基因。使用的網站有：**Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP; <http://www.fruitfly.org>)** 以DNA序列及胺基酸序列搜尋在果蠅及其他物種的同源體 **National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)** DNA及蛋白質相關資訊 **WWW BLAST at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)** 比對兩DNA序列或蛋白質序列，搜尋同源體。
Welcome to PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>) 基因的表現型及相關論文摘要 **ISREC ProfileScan Server (<http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN-form.html>)**以胺基酸序列查詢蛋白質區塊的資訊 軟體：

是互補的，所以DNA在嵌入時會有正反兩個方向，需要以限制酵素切割，經電泳分析，選出嵌入正方向dH731基因的質體，這樣進行下一步轉形入酵母菌時，dH731基因轉譯的蛋白質才會正確。

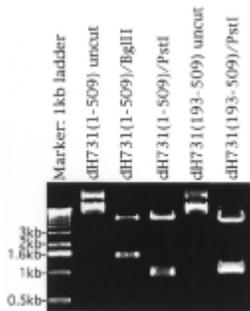
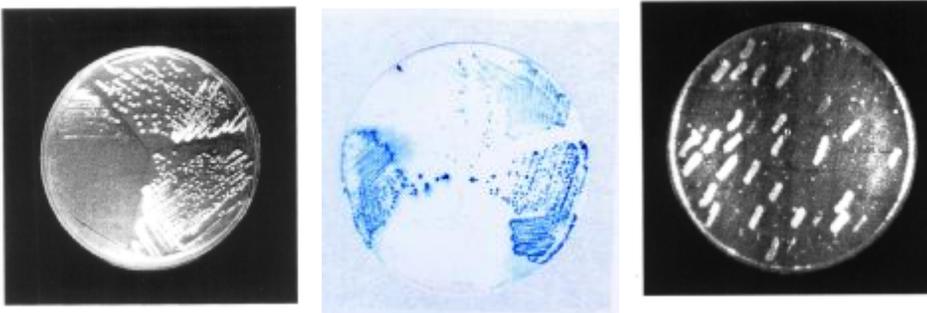


Fig.6洋菜膠電泳分析 顯示dH731(1-509a.a.)和dH731(193-509a.a.) 兩片段DNA插入的方向為正確的方向，以及dH731(1-226)也為正確的片段，這些plas mid 皆經過DNA定序，確定DNA序列正確無誤. **3.** < 酵母菌雙雜交篩選 > **Fig.7.** Histidine生產力篩選 **Fig.8.** β -galactosidase合成能力篩選 **Fig.9.** 大腸桿菌HB101生產Leucine篩選



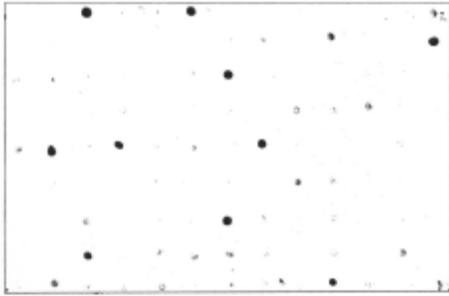
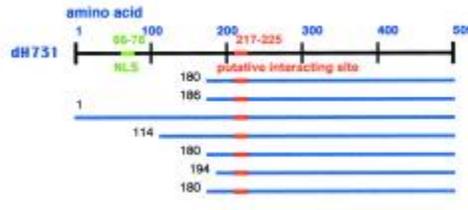


Fig.10. Dot blotting (table 4)

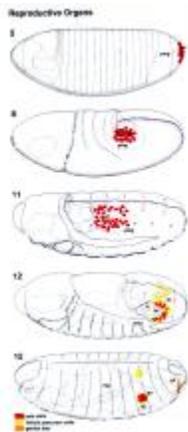
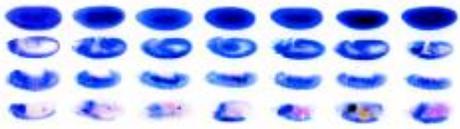
7. (Table 6) 8. dH731形成homodimer: 在這次的酵母菌雙雜交篩選中，我們發現dH731的interacting clone中有34個是dH731自己，也就是說dH731會和自己產生交互作用，形成homodimer。我們在進行酵母菌雙雜交篩選時使用了兩種dH731基因片段，一為

Steps of the yeast two-hybrid screening	Total number of clones
Successful transformants	5,033,600
Interacting clones	245
↓	
First test	196
Second test	176
Third test	133
(Each test includes growth (Fig. 4) and X-gal assay (Fig. 5).)	
↓	
Selection of library plasmids (<i>Leu2^r</i>) in <i>E. coli</i> HB101 (Fig. 6)	117
↓	
Dot blotting for clone grouping (Fig. 7)	26
↓	
Retransformation for selection true positive interactors	18
↓	
DNA sequencing	9

dH731 interacting protein	Potential domains & homologues	Open reading frame (a.a. residues)	Chromosomal localization	Proposed relationship with dH731
1. dH731	Bipartite nuclear localization signal (NLS) (a.a. 57-74)	309	12C	Forming homodimer
2. d.UBC9	Ubiquitin-conjugating enzymes active site	158	21C6-7	Assisting dH731 in entering nucleus
3. Ribosomal protein L23a (96-117)	Bipartite NLS (a.a. 75-92, Ala, Lys, Pro-rich)	269	62B5-10	DNA binding
4. Initiation factor 4a	RNA helicase Vasa	403	67A2-B1	?
5. Nce1 #63	C ₂ H ₂ zinc finger domain (a.a. 287-318)	321	92B-92C	DNA binding
6. Nce1 #148	C ₂ H ₂ zinc finger domain (a.a. 144-166)	210	24C3-D2	DNA binding
7. Nce1 #143	Rat pyrophosphate decarboxylase (DNA sequence identity: 99%)	252	13E-13F	?
8. Nce1 #415	?	152	66A11-12	?
9. Nce1 #111	?	?	42D1-E2	?



dH731基因全長，一為後三分之二(C-terminus)，這兩個片段皆會與dH731 cDNA產物發生親和，且在34個candidate clone中都包含後三分之二的dH731片段(Fig.11)，所以我們推斷dH731形成homodimer的interacting site在後三分之二的片段內。 Fig.11 dH731形成homodimer的不同片段的比較。 9.RNA in situ hybridization: Fig.12. dH731 RNA在果蠅胚胎的表現 Fig.13. 胚胎時期生殖腺發育的過程

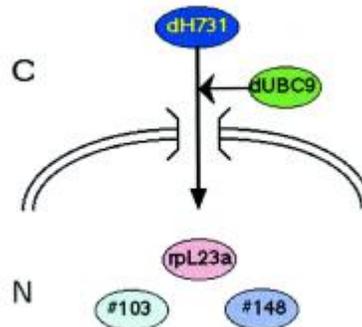


#103, #111 RNA皆在果蠅胚胎的晚期(stage 15)表現在生殖腺(gonad)，和dH731 RNA有相同的表現。在生殖腺發生的過程中(Fig. 13)，stage 5時極細胞位在最尾端(posterior pole)，而後分散開來向頭部移動，到了stage 12極細胞及來自中胚層的支持細胞分佈於胚胎兩側，stage 15之後極細胞及支持細胞聚集於腹部第五節(A5)，並大量分裂形成生殖腺。 #103, #111和dH731 RNA都表現在胚胎晚期生殖腺形成時，所以三者之間可能在生殖腺形成時共同扮演一個角色。 六、討論 1.此實驗的方向是進一步了解一個未知功能的基因，但這不是一件容易的事，要製造該基因的突變種或是做一個很好的抗體，都是需花費很長的時間。以酵母菌雙雜交篩選找尋與該基因功能相關的基因，也是一種了解基因功能的方法，由於結合網路資源，大量的資訊快速取得，整合分子生物與資料庫訊息，便可探討該基因的表達及功能。 2.使用酵母菌雙雜交系統必須讓轉形達到一個很大的量，因為我們拿dH731蛋白質與果蠅cDNA基因庫的轉譯蛋白作用，以找尋出果蠅基因庫中與dH731基因功能相關的基因，但果蠅cDNA基因庫的基因在clone到pGAD10質體時，只有1/6會剛好胺基酸序列正確(in frame)，其中又只有少數的轉譯蛋白會和dH731蛋白質產生交互作用，為了得到較多可能具交互作用的菌落，我們在轉形實驗中，轉形成功的量達到 5×10^6 個菌落。 3.在9個不同的dH731交互作用蛋白質中，

有4個是未知的果蠅基因，我利用這些cDNA序列找出它們的genomic DNA sequence，找出正確的open reading frame，將這段可能的基因片段

翻譯成胺基酸序列，再以網際網路資料庫分析這些序列中所包含的蛋白質區塊，進一步對這些未知果蠅基因的細胞內分佈及可能的功能有所了解。七、結論 透過酵母菌雙雜交篩選，我從5x10⁶個轉型成功的酵母菌中，篩選出9個不同的基因，其轉譯蛋白質和dH731發生交互作用，我再經由網路基因資料庫比對，找出已知的基因及區塊，從它們在細胞中的功能及果蠅胚胎上的分佈，探討dH731基因可能的功能，以下是我歸納出來的結論。1.dH731形成homodimer的interacting site在後三分之二的片段內經由酵母菌雙雜交篩選及電腦軟體DNA Strider1.2的序列比對，我發現dH731基因的轉譯蛋白質會和自己發生交互作用，而形成 homodimer, 在117個dH731的interacting clones中有34個是dH731自己，我將這些clones的DNA序列和dH731基因的全長比對，發現它們都具有後三分之二的片段，所以形成homodimer的interacting site在後三分之二(胺基酸215-509)的片段內(見Fig.11)。2.dH731和神經發育及生殖腺形成有關 dH731和#103, #111的RNA在果蠅胚胎的stage 15，都表達在生殖腺(Fig.12)。果蠅的極細胞(pole cell)在stage 15時才開始聚集在腹部第五節，並大量分裂形成生殖腺(Fig. 13)，所以dH731, #103, #111三者在此時一起表現在生殖腺，可能與生殖腺的形成有關。此外，dH731表達在神經母細胞(stage 9-10)及中樞神經系統(stage 15-17)，表示dH731有參與在整個神經發育的過程中。3.dH731會進入細胞核參與轉錄機制 Drosophila ubiquitin conjugating en

zyme 9 (dUBC9)是dH731的交互作用蛋白質之一，它會和一些ubiquitin-like的蛋白質(如 dsmt3)結合並飾(modification)其他的蛋白質，而不是和ubiquitin結合(Giraud et al., 1998; Lee et al., 1998; Lehembre et 2000)。在人類的cell line中發現UBC9會和一個ubiquitin-like的蛋白質SUMO-1結合，進而控制RanGAP(GTPase-activating protein)的活性，操縱蛋白質進核的機制(Lee, et al., 1998)。果蠅胚胎在dUBC9突變情況下，轉錄因子Bicoid蛋白質無法進核，使得影響體節形成的基因無法轉錄(Epps et al., 1998)。dH731有一段入核序列(nuclear localization signal)，所以dH731能被核膜上的蛋白質辨認而進入細胞核。dUBC9可能在這個過程中扮演促進dH731進核的角色，在細胞核內，dH731再和#103、#148、rpL23a蛋白質發生交互作用，形成一功能複合體，由於#103及#148能和DNA結合，此複合體可能具有調控



機制的功能(Fig.14)。Fig.14 dH731 進核模式

八、參考資料 1.

Matsuhashi,S., Yoshinaga,H., Yatsuki, H.,Tsugita,A. and Hori,K. Isolation of a novel gene from a human cell line with Pr-28 Mab which recognizes a nuclear antigen involved in the cell cycle. (1997) *Research Communications in Biochemistry and Cell & Molecular Biology*, VOL. 1, NO. 1.2. Yoshinaga,H., Matsuhashi,S., Ahan Masaki,Z. and Hori,K. Expression and identification of H731 gene product in Hela cells. (1997) *Research Communications in Biochemistry and Cell & Molecular Biology*, VOL. 1, NOS. 2 & 3.3. Cellular Interactions in Development -A Practical Approach. Ch.7 Two-hybrid system and protein-protein interactions Fields,S. and Song,O.-K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. (1989) *Nature*, 340,24 Chien,C.-T., Bartel,P.L., Sternglanz, R.,and Fields,S. The two-hybrid system: A method to identify and clone for proteins that interact with a protein of interest. (1991) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 88, 9578.6. Epps,J.L.

Tanda,S. The *Drosophila* *semushi* mutation blocks nuclear import of Bicoid during embryogenesis. (1998) *Biology*, 8,1277-7.Ohsako,S. and Takamatsu,Y. Identifi

cation and characterization of a *Drosophila* homologue of the yeast UBC9 and *hus5* genes. (1999)

J. Biochem. 125, 230-235.8.Lee,G.W., Melchior,F., Matunis,M.J., Mahajan,R., Tian,Q. and Anderson,P. Modification of Ran GTPase-activating protein by the small ubiquitin-related modifier SUMO-1 requires UBC9, an E2-type ubiquitin-conjugating enzyme homologue. (1998)

J. Biochem. 273(11), 6503-6507.9.Lehembre,F., Badenhorst,P., Muller, S., Travers,A., Schweisguth,F.,De jean,A. Covalent modification of transcriptional repressor Tramtrack by the ubiquitin-related protein Smt3 in *Drosophila* flies. (2000) *Mol. Cell Biol.* 20(3) 1072-

1082.10.Giraud,M.F., Desterro,J.M. and Naimith J.h. Structure of ubiquitinconjugating enzyme 9 displays significant differences with other ubiquitin-conjugating enzymes which may reflect its specificity for SUMO rather than ubiquitin. (1998) *Acta.Crystallogr. D. Biol. Crystallogr*

54,891-898.九、致謝 謝謝父母和哥哥的包容和支持，容許我花很多時間在實驗上，並且支持我所選擇的這條路，謝謝簡正鼎老師和皮海薇學姊，帶領我進入分子生物的殿堂，很有耐心的從最基礎開始教我，也謝謝實驗室的學長學姐們，經由和你們討論我學到了很多，謝謝崇友基金會的贊助，謝謝科教館精心舉辦科展並且辦理輔導，最後

謝謝三溫的老師和同學們。十、評語 (一)本計畫以果蠅之H731基因使用yeast-two hybride獲8個基因與該蛋白質有親和力，其中四個基因蛋白質與細胞核之功能有關，及細胞質之蛋白質進入細胞核之功能有關。(二)H731基因與果蠅之Gonad功能有關，實驗顯示H731蛋白質集中於Gonad之器官中。(三)本研究具創見性，推舉為參加美國科展之北區代表。

參加加拿大2000年科學展覽會 活動照片

