

二、實驗材料與方法

2-1 實驗材料

2-1-1 菌種與載體及培養基成分

菌種: XL1-Blue、BL21(DE3)RIL

載體: pMAL-c2、pBluescript IISK(+)

培養基(LB media)成分：每升培養液的成分含 10g tryptone、5g yeast extract、5g NaCl、2g glucose，均為滅菌後，於使用前加入抗生素 ampicillin (最後總濃度為 100 $\mu\text{g/ml}$)

SOB 培養液: 10 g tryptone、2.5 g yeast extract、0.25g NaCl、5 mL 250 mM KCl，加至 500 mL 水，滅菌，於使用前加入已滅菌之 0.5 mL 2 M MgCl_2

2-1-2 化學藥品與酵素來源

培養液的成分 tryptone、yeast extract 購自於 DIFCO

建構質體的限制酵素及接合酵素、蛋白質純化管柱 (amylose resin) 以上購自於 New England BioLabs Inc.

洋菜凝膠 (Agarose) 購自於 USB

DNA 染色劑 (SYBR Green I) 購自於 Roche

聚合酵素連鎖反應試劑及 DNA 模板 (template)、引子 (primer) 以上購自於 Biobasic Inc.

GFX Micro Plasmid Prep Kit、Gel Band Purification Kit、acrylamide、methylene-bis-acrylamide 以上購自於 Amersham Pharmacia Biotech
EDTA、sodium phosphate、 β -mercaptoethanol、coomassie brilliant R250、isobutanol、sodium chloride 以上購自於 Merck

Thymidine、lysozyme、methanol、acetic acid 以上皆購自於 Sigma

Ammonium persulfate (APS)、sodium dodecyl sulfate (SDS) 以上購自於 Gibco BRL

Tris-HCl、tris (hydroxymethyl) methylamine、glycine 購自於 BDH

2-1-3 使用儀器

微量旋轉式真空濃縮機 (Amersham Pharmacia Biotech, PSD SpeedVac)
數位照相系統 (Kodak, DC120 Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System 120)
震盪培養箱 (Firstek Scientific, orbital shaking incubator Model-S302R)
PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9700)
紫外光/ 可見光光譜儀 (Beckman, DU 7500 Spectrophotometer)
高速離心機 (Beckman, Allegra 21 Series)
電泳槽 (Amersham Pharmacia Biotech)
DNA 定序儀 (PerkinElmer, ABI Prism 3100 DNA Sequencer)

2-1-4 溶液與緩衝液

2-1-4-1 分生選殖技術所用溶液：

5-bromo, 4-chloro 3-indolyl β -D-galactoside (X-gal)：取 X-gal 溶於 dimethylformamide (DMF)，濃度為 20 mg/mL，避光，儲存於-20 °C
100 mg/mL Ampicillin：將 ampicillin 溶於二次去離子水，再用 0.2 μ m 濾膜過濾，去除雜菌，儲存於-20°C
5 mg/mL Tetracycline：將 tetracycline 溶於酒精，存於-20°C
TB Buffer：0.45 g PIPES、0.24 g CaCl₂、2.8 g KCl，加至 130 mL 水，用 KOH 調 pH 為 6.7
TAE Buffer：40 mM Tris acetate，2 mM EDTA，pH 8.5，存於室溫

2-1-4-2 蛋白質表現及純化所用緩衝液：

840 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside)：取 2g 加水至 10 ml，經 0.22 μ m 濾紙過濾
30% Acrylamide：取 300 g acrylamide，溶於水中，加水至 1 L，以 0.45 μ m 濾紙過濾，避光，儲存於 4 °C
1% Bis-Acrylamide (N,N'-methylene bis-acrylamide)：5g bis-acrylamide 加水至 0.5 L，以 0.45 μ m 濾紙過濾，避光

Separation Gel Buffer-1M Tris pH 8.8 : 24.6 g Tris-HCl (MW158)和 102.6 g Tris-base (MW 121.1), 加水至 1 L, 調整 pH 值為 8.8, 儲存於 4 °C

Stacking Buffer-1M Tris pH 6.8 : 121.1 g Tris base, 加水至 1 L, 以 HCl 調 pH 為 6.8, 儲存於 4 °C

20% SDS : 20 g SDS, 加水至 100 mL, 儲存於室溫

10X Electrode Buffer Stock, pH 8.3 : 144 g glycine, 30 g Tris-base, 10 g SDS, 加水至 1 L, 儲存於 4 °C, 使用時稀釋成 1X

膠片染色液 (Stain Buffer 含 Coomassie Blue R250) : 取 1.5 g coomassie brilliant Blue R250 溶於 500 mL 甲醇(absolute), 再加入 100mL 醋酸, 最後加入 500 mL 二次水, 儲存於室溫

脫色溶液 I (Destain Buffer I) : 甲醇 400 mL 與醋酸 100 mL 混合, 加入 500 mL 二次水, 儲存於室溫

脫色溶液 II (Destain Buffer II) : 甲醇 50 mL 與醋酸 70 mL 混合, 加入二次水至體積 1 L, 儲存於室溫

樣品緩衝液 (5X Sample Buffer) : 取 1 mL 1M Tris-HCl (pH6.8), 加入 0.8 mL 甘油、1.6 mL 10% SDS、0.4 mL 2-mercaptoethanol、0.05% bromophenol blue, 用水補至最後體積 8 mL

2-1-5 電腦軟體與資料庫 :

LigPrep : 能將二維或是三維的化合物結構轉為高品質的三維結構。

Maestro : 為一包含了 Schrodinger 公司所有產品的圖形使用介面, 實驗中主要是利用這個軟體來觀看結構、分割和組合檔案, 以及將入塢試驗的結果依適應值高低有順序地輸出。

GOLD : 利用基因演算法將可扭曲的受體(flexible ligands)置入於蛋白質固定區(protein binding sites)

MDDR3D : 藥物分子資料庫, 包含了已獲得專利的藥物, 或是於期刊中發表的化合物。(http://www.mdl.com/products/knowledge/drug_data_report/)

CMC : 生物活性資料庫, 提供三維結構的化合物, 也提供了化合物的種類以及一些其它的特性。

(http://www.mdl.com/products/knowledge/medicinal_chem/)

2-2 實驗方法(method)

實驗流程設計

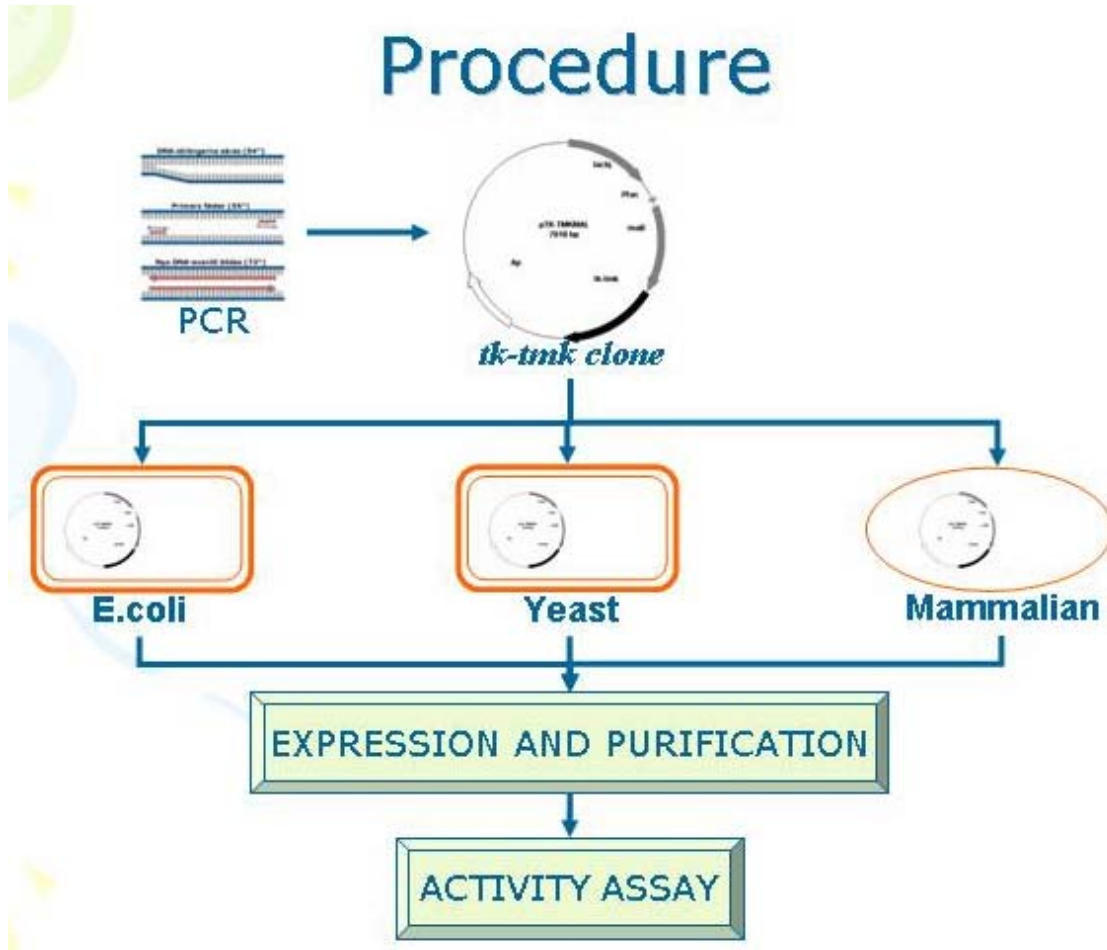


圖 2-1 利用 PCR 的方式由病毒的基因體中大量複製出目標基因，其後將其接合入適合的質體，再轉殖入所選用的表現系統，以期表現及純化所需要的蛋白質，本實驗所使用的是大腸桿菌表現系統。

2-2-1 聚合酶連鎖反應與質體的建構(the construction of plasmid)

利用經設計過的兩段引子(Primer)進行 PCR，將由國朕購得之白點症病毒基因體上的目標 DNA 夾擊放大。兩段引子名稱及序列如下：

wssv-TK-CH1 5' GCTGCAGAAGCTTATTCTTCAACAATATTA 3'

wssv-TK-EN1 5' TCTAGAATTCCATATGCAACTCATTCTTTCTC 3'

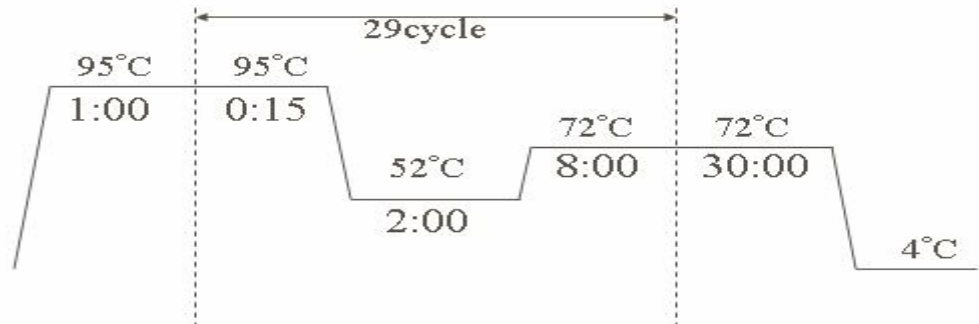


圖 2-2 WSSV—*tktmk* PCR program

反應物	體積(單位 μL)
Template	1
wssv-TK-CH1	0.5
wssv-TK-EN1	0.5
3.3 X XL Buffer	15
MgCl ₂	2.5
dNTP (10 mM)	4
DMSO	2.5
DDW	23
<i>rTth</i> Polymerase	1

表 2-1 WSSV—*tktmk* PCR conditions

WSSV—*tktmk*蛋白質表現質體的建構：設計WSSV—*tktmk*基因 5'與 3'端分別具有限制酵素*EcoR* I和*Hind* III辨識的位置，將WSSV—*tktmk*與目標表現載體(expression vector)pMAL-c2 分別利用限制酵素於 37 °C 中反應 3~4 個小時後，加入 2 μ L 6 倍的Loading Buffer及 2 μ L SYBR Green I，利用 0.8 % 洋菜凝膠 (Agarose gel)以電壓約 120 伏特進行電泳，把經過限制酵素作用後正確大小之載體與欲接入之DNA質帶切下，以Gel Band Purification Kit 純化凝膠中之DNA，以一定比例 (insert: vector=5:1)混合並利用接合酵素 (T4 DNA ligase)於 16 °C 作用 16 小時。

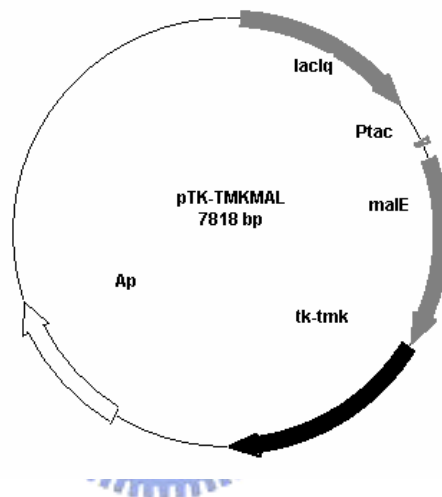


圖 2-3 WSSV—*tktmk* 接入表現載體 pMAL-c2 位置示意圖

2-2-2 大腸桿菌轉殖勝任細胞 (competent cell)之備製

從培養皿中挑BL21(DE3)RIL單一菌落 (colony)於新鮮 3 mL LB培養液中 (需加入抗生素 5 mg/ml Tetracyclin溶於酒精中)，於 37 °C 培養隔夜，再將菌液轉移至 500 mL SOB培養液中，養至OD₆₀₀約 0.5-0.6，先將菌液冰浴 10 分鐘，於 4 °C 離心 2500 g，10 分鐘，去上清液，留下沉澱物並加入 160 mL TB buffer沖洗，充份搖晃，冰浴 10 分鐘，再離心一次，去上清液，加入 40 mL TB buffer 並搖晃之，加入抗凍劑Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 2.8 mL，第三次冰浴 10 分鐘，準備 30-40 個ependrof，每管吸取 200 μ L 菌液，立即丟入液態氮中急速冷凍，保存於-80 °C 冰箱。

2-2-3 DNA 定序 (DNA Sequencing)

依照 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 之手冊進行。於 PCR 微量反應管中加入 2.5 μL 質體 DNA、啟動引子 1 μL 、5X Sequence Buffer 4 μL 、二次無菌水 10.5 μL 、R.R Mix 2 μL 共 20 μL ，以聚合酶連鎖反應定序程式 (圖 2-5) 進行反應。將 PCR 的產物加入 64 μL 95% 酒精與 16 μL 二次無菌水混合均勻後，冰浴 15 分鐘 (或 -20°C 隔夜)，在 4°C 、15,000 rpm 下離心 20 分鐘，小心的去除上清液。加入 200 μL 冰浴之 70% 酒精，混合均勻，同前步驟重覆兩次後，放入微量真空減壓機，在 45°C 下蒸乾 20 分鐘，標示清楚後送測。

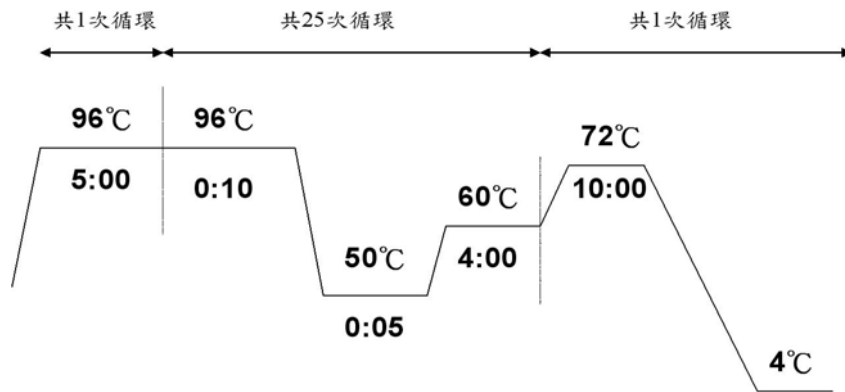


圖 2-4 DNA sequence program

2-2.4 基因序列錯誤修正

利用 DNA 定序的方法得到 DNA 的序列，再與 WSSV—*tktmk* 做序列的比對，可發現序列是否有出現突變的情形。

本實驗發現所得到的序列具有三個突變位置，由於在質體上無法找到適當的限制酵素位置以完成基因片段的置換，我們利用 Stratagene (Merck 代理) 公司所出品的 QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit 及以設計兩對正確的引子對來進行修正。這個方法以殖入 WSSV—*tktmk* 的 pMAL-c2 為模板，加入正確序列的引子對，經 *Pfu* 聚合酶以 PCR 的方式放大而得到產物，再利用 *DpnI* 限制酵素專一切除甲基化 DNA 之特性，去除模板，只留下已修正完全的產物。所設計的二對引子對名稱序列如下：

HCY-TMK-MUN

5' CAGCCCGATCTTGTATTGTTGATGCTTTTAGATGTTGAAAAGTGTTC 3'

HCY-TMK-MUC

5' TGAACACTTTTCAACATCTAAAAGCATCAACAATACAAGATCGGGCTG 3'

WSSV-QC1

5' GGTAATGACAATGATAATAAT 3'

WSSV-QC2

5' ATTATTATCATTGTCATTACC 3'

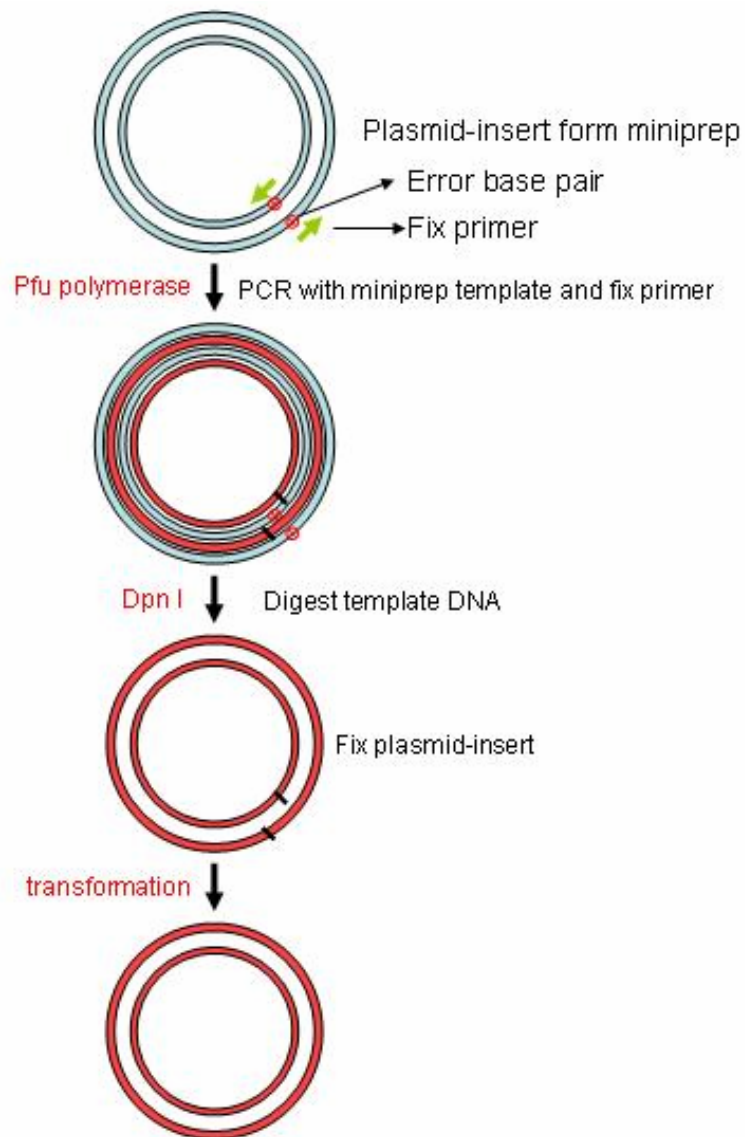


圖 2-5 Quick change 原理示意圖

反應物	體積(單位 μL)
Template	0.5
Primer1 (1000 μM)	0.125
Primer2 (1000 μM)	0.125
10X pfu Buffer	5
dNTP (10 mM)	1
DDW	42
Pfu DNA polymerase	1

表 2-2 Quick change PCR condition

部分	循環次數	溫度	時間
1	1	95 °C	2 分
2	18	95 °C	30 秒
		55 °C 或 50 °C	1 分
		68 °C	16 分
3	1	4 °C	∞

表 2-3 Quick change PCR program

反應物	體積(單位 μL)
PCR 產物	50
10× NE Buffer 4	6
DDW	2
<i>DpnI</i>	2

表 2-4 Quick change remover template condition

2-2-5 質體之轉化作用 (Transformation)

將 BL21(DE3)RIL 的 competent cell 拿出置於冰上，將經接合酵素反應後之樣品與之混合，冰浴 20 分鐘，於 42 °C 反應 1 分鐘，隨即置入冰中 1 分鐘，過程中不可搖晃振動，之後將樣品全部置入 1 mL LB 培養液中，於 37 °C 培養約 1 小時後，取 200 μ L 塗在含 ampicillin 的 LB 培養皿中，培養 12-16 小時之後，挑單一菌落 (colony)，並養於 3 mL LB 培養液至 16-20 小時，並利用 GFX Micro Plasmid Prep Kit 抽質體 DNA，以相同限制酵素 *EcoR* I/*Hind* III 確認含 WSSV-*tktmk* 基因之 DNA 片段已接入載體內。

2-2-6 蛋白質的表現 (Protein Expression)

將建構好之含 WSSV—*tktmk* 基因之 pMAL-c2 質體，培養於 20 mL 的 LB 培養液至隔夜，取 1/50 比例菌液，至新鮮 LB 300 mL 中 (已加入 ampicillin 100 μ g/ml) 於 37 °C shaker 培養至 OD₆₀₀ 約 0.3~0.4 後，將菌液於轉速 4000 g，10 分鐘的時間離心下，除去上清液，用新鮮的 (LB + glucose) 300 mL 回溶後，置於 37 °C shaker 中 30 分鐘後，取出並加入 IPTG 至最後濃度為 0.3 mM，改為溫度 25 °C 培養至 8 小時後，於 4 °C 離心 4000 g，20 分鐘後，除去上清液，取菌液沉澱物。

2-2-7 粗萃液 (Crude Extract) 之製備

用溶菌緩衝液 (Lysis Buffer) 把菌液沉澱物回溶 (沉澱物與緩衝液的比例為 1 g : 10 ml)，於緩衝液中加入溶菌酵素 (Lysozyme, 濃度 1 mg/ml) 於 37°C 反應 30 分鐘。之後進行打破細胞的步驟 (Sonication)，將溶液插於冰上，設定超音波震盪儀的程式為震盪 2 秒，休息 1 秒，最後總共震盪 3~5 分鐘。將溶液離心，於 4 °C 下離心，轉速為 9500 g，30 分鐘後，取上清液 (Crude Extract)，丟棄沉澱物。

2-2-8 蛋白質之純化 (Protein Purification)

利用親合性管柱層析 (Amylose Resin) 來純化此融合蛋白，粗萃液取樣後測 A₂₈₀，約估計粗萃液中蛋白質總量，決定所要填充親合性樹脂之體積。先以 8 倍體積的 Column Buffer (同 sample buffer) 平衡管柱中的樹脂，注入之前得到的粗萃液樣品，收集流出物 (Flow-Through)，再用 12 倍或更多體積

的緩衝液 (Column Buffer)沖提管柱,把雜蛋白質盡量洗去,最後用含 10 mM 麥芽糖的沖提液,利用麥芽糖的競爭作用,將結合在管柱的蛋白質給沖提出,利用微量離心管以每 1 mL收集一管;而後再利用離子性管柱層析(Q Sepharose)進行更進一步的分離,同樣以 8 倍體積的Column Buffer平衡管柱中的樹脂,注入之前得到的粗萃液樣品,收集流出物 (Flow-Through),再用 12 倍或更多體積的緩衝液 (Column Buffer)沖提管柱,把雜蛋白質盡量洗去,之後再利用含有不同鹽濃度的Buffer沖洗(0.1M ~ 1M, 每次增加濃度 0.1M),每管 1cc。

2-2-9 蛋白質純度及濃度判定

SDS-PAGE 是一種最常使用來分析蛋白質純度的方法,尤其是在進行蛋白質純化時,於膠體 (Polyacrylamide gel)中加入 sodium dodecyl sulfate (SDS)用來使蛋白質變性(denature),SDS 會與蛋白質結合使摺疊構形蛋白質拉成直鏈狀之一級結構,此複合體均帶負電,所以在膠體中移動率僅與蛋白質分子量有關。利用製作 separating gel 為 12.5%或 15%, stacking gel 為 5%膠片的 SDS-PAGE 來判斷純化後之蛋白質樣品。

Separating gel 12%, 15 %

	12%	15%
30% acrylamide	3.99 mL	5 mL
1% bis-acrylamide	0.98 mL	0.87 mL
1M Tris pH8.8	3.73 mL	3.75 mL
20% SDS	0.05 mL	0.05 mL
ddH ₂ O	1.16 mL	0.33 mL
10% APS	33.25 (μL)	33.25 (μL)
TEMED	3.33 (μL)	3.33 (μL)

表 2-5 SDS-PAGE 下層膠配方

Stacking gel 5%

	10 ml
30% acrylamide	1.67 mL
1% bis-acrylamide	1.30 mL
1M Tris pH6.8	1.25 mL
20% SDS	0.05 mL
ddH ₂ O	5.7 mL
10% APS	100 (μl)
TEMED	10 (μl)

表 2-6 SDS-PAGE 上層膠配方

將經由親合性管柱層析所得之每管樣品，取適量樣品與樣品緩衝液以 4:1 比例混合，於 95 °C 水浴加熱 10 分鐘，待其冷卻後置入樣品槽內，進行電泳，一開始用 100 伏特電壓，待染劑 (dye) 跑至下層膠片時，電壓可加大至 180 伏特電壓(但以全程利用 100 伏特電壓之效果較佳)，直至染劑移動到膠片下緣，還未完全脫離膠片時即可關掉，取下膠片置於膠片染色液 (Stain Buffer) 中染色 (含 Coomassie brilliant Blue R-250) 30 分鐘，用脫色溶液 I (Destain Buffer I) 去染 20 分鐘，再用脫色溶液 II (Destain Buffer II) 去染至隔天。蛋白質定量則利用 UV 280 來判定。

2-2-10 蛋白質結構之模擬

至 GENO3D 網頁後輸入蛋白質序列，網頁會自動比對接收到的序列，而比對中出現大於 30% 的類似序列才能做為模板，最多可選擇 4 個相似性大於 30% 的序列做為模板，當模擬完成後，網頁會寄信通知下載。得到模擬的結構後，再利用 ERRAT、VERIFY_3D 以及 PROVE 三個方法以驗證所得到的結構是否可接受。這些步驟重覆進行直到得到可接受的結果為止。操作網址及介面如下：<http://shannon.mbi.ucla.edu/DOE/Services/SV/>

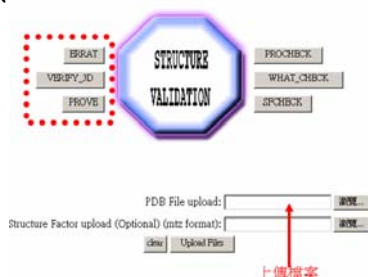


圖 2-6 蛋白質結構合理性確認網頁。介面會將結果以紅黃綠三個顏色呈現：紅色表現結果極差，黃色表示結果不佳，綠色表示結果良好。

2-2-11 Docking

Docking 為現行生物學最熱門的研究工具之一，無論是尋找可利用的藥物、設計新藥物，還是蛋白質與蛋白質間的作用、蛋白質與 DNA 間的作用，都會利用到這個方法，提高篩選率及可行性。在此，我們向國家高速電腦中心申請使用 scorpio 工作站之權限，利用其中 docking 軟體—GOLD 實現這項工作，並取得所需的資料庫 MDDR(MDL Drug Data Report)以及 CMC(Comprehensive Medicinal Chemistry)，也利用 scorpio 工作站上 Maestro 軟體，來觀察分析 docking 後所得到的結果。

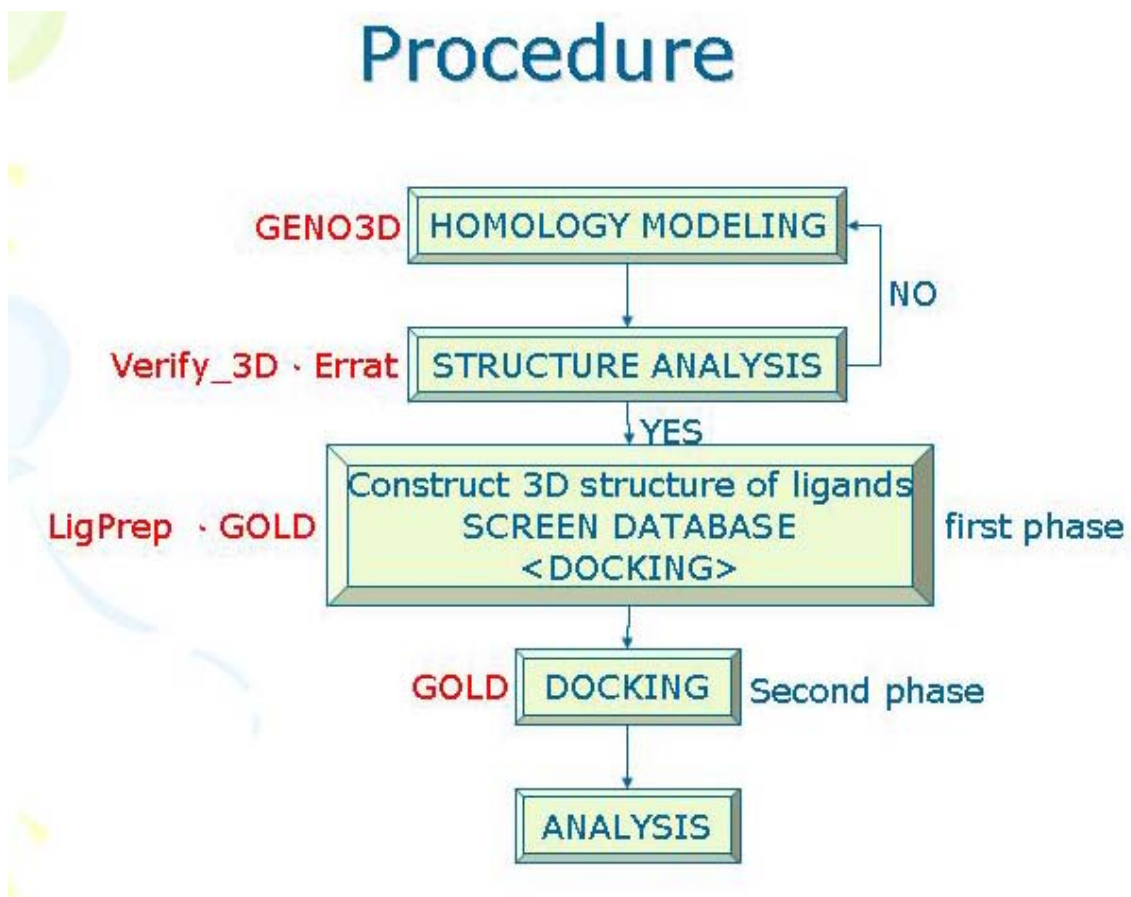


圖 2-7 電腦模擬流程圖

2-2-12 資料庫準備

1. 從國家高速網路與計算中心[<http://www.hcnc.gov.tw>]截取下 MDDR 與 CMC 資料庫，方法如下圖

科學軟體與資料庫

1. 生命科學		
GCG	生物分子序列分析套裝軟體及資料庫集	非工業版
IMRIS	細胞結構生物顯微影像分析軟體	非工業版 Unix版
2. 化學、物理與生物		
化學、物理與生物應用軟體與資料庫		

SD File of ACDS01 [part 20](#) (275MB, 99,962)
SD File of ACDS01 [part 21](#) (294MB, 99,990)
SD File of ACDS01 [part 22](#) (274MB, 99,851)
SD File of ACDS01 [part 23](#) (30MB, 10,598)
SD File of CSD02 (730MB, 339,573)
SD File of DOC3D (164MB, 93,177)
SD File of DPA3D (70MB, 27,239)
SD File of LQ3D (103MB, 41,383)
SD File of MAY3D (122MB, 55,529)
SD File of MDDR3D (417MB, 129,459)
SD File of NCDB (471MB, 229,003)
SD File of NOV02all (1235MB, 624,261)
SD File of WDI3D (130MB, 47386)
SD File of CMC3d (18MB, 7,375)

圖 2-8 化合物資料庫下載示意圖

2. 利用軟體 ligprep 軟體加氫、以及能量最小化
執行下列程式：

ligprep -imae 輸入檔名.mae -omae 輸出檔名.mae-----加氫

premin -s 輸出檔名 輸入檔名-----能量最小化

2-2-13 GOLD 設定

初次篩選參數：

```
population size : 50
select_pressure = 1.125000
n_islands = 1
maxops = 1000
niche_siz = 2
pt_crosswt = 100
allele_mutatewt = 100
migratewt = 0
radius = 18
```

二次篩選設定如下：

```
population size = 100
select_pressure = 1.100000
n_islands = 5
maxops = 150000
niche_siz = 2
pt_crosswt = 95
allele_mutatewt = 95
migratewt = 10
radius = 18
```



設定好參數後以及 docking 來源後，利用指令 `gsub xxx.conf` 將工作送出排序，之後系統會問執行時間(short：12 小時；medium：48 小時；long：120 小時；parall：平行化處理)。(觀看排序情形：`qstat`)

註 1：由於在 work 目錄下雖然沒有空間限制，但檔案只能存放一星期，若一星期沒變動便會被刪除，故每星期必須利用 `touch *.*` 來將每個檔案日期更新，在這個目錄底下的檔案就會被改變日期了，但有時有些檔案不是*.*檔，有可能是.*，這就自行判斷。

註 2: gsub 為 GOLD 特有指令, 一般排序時必須先自行準備排序檔(.cmd)
如下: 程式路徑/執行指令+參數和檔案名。送出排序 bsub < ***.cmd -q
時間 -o 輸出檔。

