


國立交通大學

生物科技學系

碩士論文

去醣基人類濾泡刺激素之菌體表現及其對於
卵巢癌細胞增生影響之研究



**Bacterial Expression of Non-glycosylated Human
Follicle-stimulating Hormone (NG-hFSH) and Study on the
Effect of NG-hFSH on Ovarian Cancer Cell Proliferation**

研究生：黃琮道

指導教授：張 正 博士

中華民國九十四年八月

去醣基人類濾泡刺激素之菌體表現及其對於
卵巢癌細胞增生影響之研究

Bacterial Expression of Non-glycosylated Human Follicle-stimulating
Hormone (NG-hFSH) and Study on the Effect of NG-hFSH on
Ovarian Cancer Cell Proliferation

研究生：黃琮道

Student: Tsung-Tao Huang

指導教授：張 正博士

Advisors: Dr. C. Allen Chang

國立交通大學

生物科技學系



Submitted to Department of Biological Science and Technology
College of Biological Science and Technology
National Chiao Tung University
in partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Master
in
Biological Science and Technology
August, 2005
Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十四年八月

去醣基人類濾泡刺激素之菌體表現及其對於
卵巢癌細胞增生影響之研究

研究生：黃琮道

指導教授：張 正 博士

國立交通大學 生物科技學系 碩士班

中文摘要

人類濾泡刺激素 (hFSH) 對於卵巢癌細胞的增生存在著明確的正向促進關係，因為卵巢癌細胞上大量表現 hFSH 受體與其鍵結後導致訊息傳遞作用而活化癌細胞生長因子，因此 hFSH 與卵巢癌細胞上的受體之鍵結互動扮演著關鍵性的角色。另一方面，已知醣基支鏈對於濾泡刺激素訊息傳遞過程之重要性，若除去醣基之 FSH α - 或 β -次單元體的傳遞活性因此而降低甚多，故醣基存在與否嚴重影響到 FSH 與其受體鍵結後引發的訊息傳遞活性。

本研究之目的為試圖利用大腸桿菌重組去醣基 hFSH 變異體 (NG-hFSH variant)，並和野生型 hFSH 做卵巢癌細胞之增生活性比較，期望去醣基 FSH 變異體對於卵巢癌細胞的訊息傳遞有所影響，因而降低或壓抑癌細胞的增生能力。首先利用聚合酶連鎖反應放大 *hFSHA* 和 *hFSHB* 兩段基因，並將其分別接合到表現載體 pET30a 和 pACYCDuet-1 中，各以大腸桿菌 NovaBlue (DE3) 和 BL21 (DE3) 作為表現宿主，經由純化、再折疊和雙體化過程組合出預期的去醣基 hFSH 變異體。以 MTT 分析法發現到相對於野生型 (wild-type) hFSH 對 SKOV-3 細胞株之增生活性，去醣基 hFSH 變異體有較低吸光值。且去醣基 hFSH 變異體相對於野生型 hFSH 有較強之受體鍵結力並能和野生型 hFSH 競爭受體產生壓抑增生活性之影響。未來期望去醣基濾泡刺激素能扮演卵巢癌抑制劑或壓抑卵巢癌細胞發育之重要角色。

Bacterial Expression of Non-glycosylated Human Follicle-stimulating Hormone (NG-hFSH) and Study on the Effect of NG-hFSH on Ovarian Cancer Cell Proliferation

Student: Tsung-Tao Huang

Advisor: Dr. C. Allen Chang

Institute of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

Abstract

Human follicle-stimulating hormone (hFSH) plays an essential role in mammalian reproduction and ovarian folliculogenesis through interaction with its specific receptor, FSHR. However, epidemiologic data have implicated higher expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in ovarian cancerous tissues compares to normal tissues and reproductive FSH as a probable risk factor for ovarian cancer development. On the other hand, the previous studies have showed that site-directed mutagenesis identified the specific roles of the individual carbohydrate chains of FSH in signal-transducing activity and receptor-binding affinity. The binding affinity of FSH lacking any one of the oligosaccharides was increased over wild-type FSH, while the signal-transducing activity of FSH lacking the oligosaccharide at α Asn52 was markedly reduced, and that of FSH lacking either β oligosaccharide was slightly reduced.

According to these previous studies, the objective of the study is to express and reconstitute Non-glycosylated hFSH in *Escherichia coli* and evaluate the effect of NG-hFSH on ovarian cancer cell proliferation. First, hFSH α cDNA (*hFSHA*) and hFSH β cDNA (*hFSHB*) were amplified by PCR. Then, the products of PCR were inserted into pET30a and pACYCDuet-1, respectively. *Escherichia coli* NovaBlue (DE3) and BL21 (DE3) were transformed for expression hosts of *hFSHA*-pET30a and *hFSHB*-pACYCDuet-1, respectively. Through purification, refolding and dimerization, expected NG-hFSH variants were reconstituted. Using MTT and TMB assay, the proliferative and receptor-binding effects of wild-type hFSH and NG-hFSH variants on ovarian cancer cell line, SKOV-3, were identified. Finally, NG-hFSH variants have been examined that they could indeed suppress the proliferation of SKOV-3 and significantly increase the receptor binding affinity on the SKOV-3.

誌謝

終於，順利完成了碩士班學業。當看到厚厚的碩士論文付印出來時，心裡盡是滿滿地感動和驕傲——這是一本完完全全屬於自己的論文。很開心！真的，這不僅是一本論文的完成，也代表著自己的成長和喜悅。從張老師實驗室的專題生，一位朦朧無知的技術員，直到學會獨立思考、發現問題、尋求解決之道並改進方法，最後成為能夠獨當一面的研究員，如此艱辛的研究歷程使得自己更加的成熟、茁壯。在此，非常感謝我的指導老師——張正教授——在這四年多的日子裡拉拔提攜，並時常教導我做學問的道理和宏觀的思想，而不是閉門造車、以管窺天。此外，更感謝陽明大學生理學研究所黃娟娟教授、交通大學生科系彭慧玲、林志生教授對於論文的指導和建議，三位教授所給予的寶貴意見和研究資源的分讓使得本論文能順利完成。

值得一提的，這兩年研究生涯中遭遇到許多的瓶頸與低潮。但儘管實驗結果不順遂的砲火如何猛烈地落在身上，身旁的伙伴們總是適時的給予鼓勵和幫助：實驗室的大姊頭頭頭小兔學姊，思路清晰的桂添學長、繼鋒學長，對我照顧良多的阿男學長、雅珍學姊、小旻學姊、玉淳學姊、小Q學姊，愛搞笑且充滿傻勁的菜頭，練就一副好身材的型男志祥，大學時代的好同學健誠、小新、祐俊，還有熱情可愛的學弟妹業琳、几兒、翊帆、幸怡、嫩如、萬利，你們的鼓勵在在是我克服失敗最大的原動力。

最後，將此論文呈獻給最摯愛的家人：默默支持的爸爸、擔憂操勞的媽媽、關心我的哥哥和可愛的弟弟，此外，還要特意感謝妍希的陪伴和鼓勵，有妳在身邊使我這些個研究日子裡不再孤獨。

千言萬語無法道盡對你們的感激之情，謝謝。

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
誌謝.....	iii
目錄.....	iv
圖目錄.....	viii
表目錄.....	x
附錄.....	x

第一章 緒論

1-1 人類濾泡刺激素之生理意義.....	1
1-1-1 製造與分泌.....	1
1-1-2 回饋調控 (Feedback control).....	1
1-1-3 對於女性的生理功能.....	3
1-1-4 對於男性的生理功能.....	4
1-2 結構特性與訊息傳遞.....	5
1-2-1 醣蛋白激素家族.....	5
1-2-2 FSH 結構與受體鍵結關係.....	6
1-2-3 訊息傳遞.....	10
1-2-4 醣基支鏈之組成.....	11
1-2-5 醣基支鏈之重要性.....	12
1-3 濾泡刺激素與卵巢癌之關係.....	13
1-3-1 卵巢癌簡介.....	13
1-3-2 FSH 對卵巢癌增生的影響.....	19

1-4 研究動機與目的.....	20
第二章 材料	
2-1 菌株與細胞株.....	22
2-2 培養基.....	23
2-3 人類腦下腺 cDNA 庫 (cDNA library)	25
2-4 轉殖載體.....	25
2-5 藥品試劑.....	25
2-6 溶液與緩衝液.....	27
2-7 儀器.....	31
第三章 方法	
3-1 實驗流程.....	32
3-2 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction).....	33
3-2-1 引子設計.....	33
3-2-2 PCR 材料與程式.....	34
3-3 yT&A 載體構築.....	35
3-3-1 PCR 產物之瓊脂洋菜膠體電泳.....	35
3-3-2 PCR 產物之純化.....	36
3-3-3 與 yT&A 載體進行接合反應 (Ligation)	37
3-3-4 大腸桿菌 DH5 α 之轉形 (Transformation)	37
3-3-5 質體 DNA 之微量製備 (miniprep)	38
3-4 pET30a 和 pACYCDuet-1 載體構築.....	38
3-4-1 質體 hFSHA-yT&A、hFSHB-yT&A 之限制酶切割.....	38
3-4-2 表現載體 pET30a 和 pACYCDuet-1 之限制酶切割.....	39
3-4-3 與表現載體 pET30a 和 pACYCDuet-1 進行接合反應.....	40

3-4-4 大腸桿菌 NovaBlue (DE3) 、BL21 (DE3) 、BL21 trxB (DE3) 和 OrigamiTM (DE3) 之轉形.....	41
3-4-5 選殖鑑定及 DNA 定序 (DNA sequencing).....	41
3-5 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之表現及純化.....	41
3-5-1 去醣基 hFSH α -和 β -次單元體之小量表現.....	42
3-5-2 SDS-PAGE.....	43
3-5-3 西方墨點法.....	45
3-5-4 決定去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之溶解性.....	47
3-5-5 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之大量表現.....	47
3-5-6 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之純化.....	48
3-5-7 蛋白質濃度之測定.....	49
3-6 去醣基 hFSH 變異體 (variant) 之再組成.....	50
3-6-1 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之再折疊.....	50
3-6-2 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之雙體化.....	50
3-6-3 去醣基 hFSH 變異體之純化.....	51
3-7 生物活性測試.....	51
3-7-1 細胞培養.....	51
3-7-2 人類卵巢癌細胞增生之影響.....	52
3-7-3 人類卵巢癌細胞之受體鍵結親和力分析.....	53
第四章 結果與討論	
4-1 放大 <i>hFSHA</i> 和 <i>hFSHB</i>	55
4-2 yT&A 選殖載體之構築.....	56
4-3 pET30a 和 pACYCDuet-1 表現載體之構築.....	57
4-4 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之表現.....	59
4-5 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之純化.....	61

4-6 去醣基 hFSH 變異體之再折疊.....	63
4-7 蛋白質濃度之測定.....	63
4-8 去醣基 hFSH 變異體之雙體化.....	64
4-9 對於卵巢癌細胞株增生之影響.....	65
4-10 對於卵巢癌細胞株之受體鍵結親和力分析.....	69
第五章 結論與未來展望.....	71
第六章 參考文獻.....	75



圖目錄

圖 1. 女性生理之性激素調控網.....	2
圖 2. 類固醇生成作用(steroidogenesis)主要反應路徑圖.....	4
圖 3. hFSH α - 和 β -次單元體的多胜肽鏈序列.....	6
圖 4. hFSH 完整折疊結構的彩色與灰階示意圖.....	7
圖 5. FSH-受體複合物晶體之緞帶示意圖.....	8
圖 6. FSH-受體複合物形成同質雙體 (homodimer) 及其鍵結後活化之 過程.....	9
圖 7. FSH 受體一級結構圖.....	9
圖 8. FSH 訊息傳遞路徑圖.....	11
圖 9. 部分羊、牛和人類腦下垂體 FSH 中被發現的 N-連結寡糖支 鏈.....	12
圖 10. 聚合酶連鎖反應之反應程式.....	35
圖 11. Transfer cassette.....	45
圖 12. <i>hFSHA</i> 和 <i>hFSHB</i> 之聚合酶連鎖反應產物之洋菜膠體電泳 結果.....	82
圖 13. 質體 <i>hFSHA</i> -yT&A 和 <i>hFSHB</i> -yT&A 切割反應之電泳結果...	82
圖 14. 分別以限制酶鑑定構築完成之兩質體： <i>hFSHA</i> -pET30a 和 <i>hFSHB</i> -pACYCDuet-1.....	83
圖 15. <i>hFSHA</i> -pET30a 之 DNA 定序與預期序列之比對結果.....	84
圖 16. <i>hFSHB</i> -pACYCDuet-1 之 DNA 定序與預期序列之比對結果...	85
圖 17. NG-hFSH α -次單元體小量表現和存在形式之 SDS-PAGE 染色 結果.....	86

圖 18. 西方墨點法鑑定 NG-hFSH α -次單元體之小量表現和存在形式.....	87
圖 19. NG-hFSH β -次單元體之 NOVA blue (DE3) 小量表現和存在形式的 SDS-PAGE 染色結果.....	88
圖 20. NG-hFSH β -次單元體之 BL21 (DE3) 小量表現和存在形式的 SDS-PAGE 染色結果.....	89
圖 21. NG-hFSH β -次單元體之 BL21 <i>trxB</i> (DE3) 小量表現和存在形式的 SDS-PAGE 染色結果.....	90
圖 22. NG-hFSH β -次單元體之 Origami (DE3) 小量表現和存在形式的 SDS-PAGE 染色結果.....	91
圖 23. 以 “Anti-His monoclonal antibody” 作為一級抗體的西方墨點法鑑定 NG-hFSH β -次單元體在四種菌株的小量表現和存在形式.....	92
圖 24. 重組 NG-hFSH α -次單元體純化 SDS-PAGE 染色結果.....	93
圖 25. 重組 hFSH β -次單元體純化 SDS-PAGE 染色結果.....	93
圖 26. 重組 NG-hFSH α -次單元體純化西方墨點法結果.....	94
圖 27. 重組 NG-hFSH β -次單元體純化西方墨點法結果.....	94
圖 28. NG-hFSH 變異體之雙體化結果.....	95
圖 29. MTT 細胞增生標準曲線.....	96
圖 30. hFSH 對 SKOV-3 增生活性之影響.....	97
圖 31. 去醣基 hFSH 變異體與野生型 hFSH 競爭受體之增生活性影響.....	98
圖 32. hFSH 野生型、變異體、次單元體和次單元體混合液對 SKOV-3 的受體鍵結親和力分析.....	99

表目錄

表 1. 卵巢癌手術分期表.....	16
表 2. 使用之大腸桿菌品種與其基因型類別.....	22
表 3. SKOV-3 細胞株基本資料表.....	23
表 4. 聚合酶連鎖反應之引子.....	33
表 5. 聚合酶連鎖反應之材料.....	34
表 6. <i>hFSHA</i> -yT&A 和 <i>hFSHB</i> -yT&A 之切割反應材料.....	39
表 7. pET30a 和 pACYCDuet-1 之切割反應材料.....	40
表 8. 轉形後之五種菌株類型.....	41
表 9. SDS-polyacrylamide gel 之藥品配方.....	43
表 10. 各種去醣基 FSH 單體或雙體相對於野生型 hFSH 的相對鍵結活性和相對訊息傳遞活性.....	70



附錄

附錄 A. yT&A 選殖載體之圖譜.....	100
附錄 B. pET30a 表現載體之圖譜.....	101
附錄 C. pACYCDuet-1 表現載體之圖譜.....	102

第一章 緒論

1-1 人類濾泡刺激素之生理意義

1-1-1 製造與分泌

人類濾泡刺激素 (human follicle-stimulating hormone, hFSH) 為一種刺激性腺組織的激素，分類上屬於促性腺激素 (gonadotropic hormone) 之一員。而在內分泌系統中，對於人類性徵與生殖生理扮演著極其重要的地位。然而，提到 FSH 亦同時得介紹促性腺激素的另一個成員：人類黃體生成素 (human luteinizing hormone, hLH)，此兩者除了同屬於醣蛋白激素家族 (glycoprotein hormone family) 的成員外，生理上對於性腺的刺激亦有著相輔相成的密切關係 [1]。

FSH 和 LH 皆由腦下垂體前葉的促性腺激素細胞製造和分泌。當前葉組織的促性腺激素細胞上之促性腺激素釋放素受體 (gonadotropin-releasing hormone receptor, GnRH receptor) 接受到 GnRH 訊息之後經由細胞內一連串的訊息傳遞路徑傳遞到細胞核內，使得促性腺激素細胞最終轉譯出 FSH 和 LH，再分泌至細胞外，至於 GnRH、FSH 和 LH 等激素之調控關係將在下一小節詳加討論。

1-1-2 回饋調控 (Feedback control)

人體內性腺相關激素的調控錯綜複雜，不但彼此間有著垂直的直系關係，甚至接受到訊息後的性腺所分泌的蛋白質產物更會回饋影響到下視丘和腦下腺前葉細胞的分泌，如此之關係交織成一個環環相扣的性激素調控網。

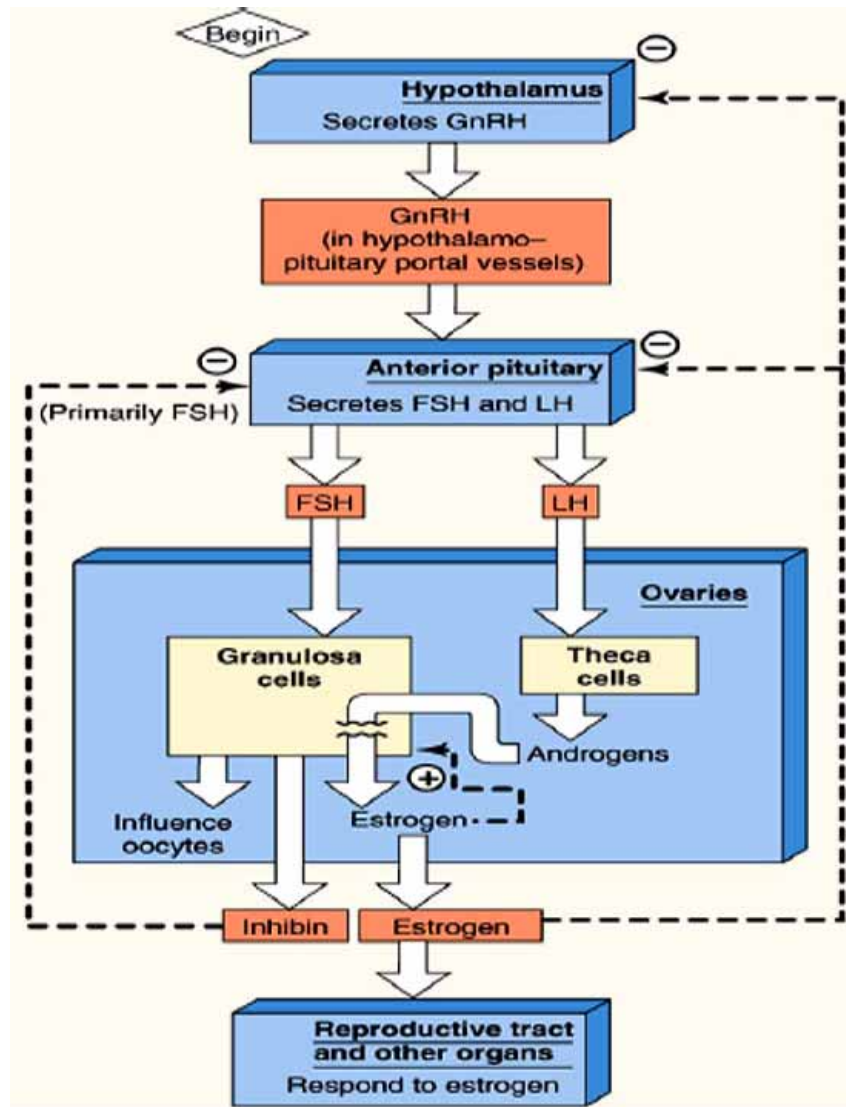


圖 1. 女性生理之性激素調控網

以女性生理為例，圖 1 清楚地說明了整個性激素調控關係 [2]，首先下視丘細胞產生 GnRH，GnRH 再由下視丘細胞分泌出去經由細胞軸索釋放到位在第三腦室底層的中間高地，然後藉由連接中間高地與腦下垂體的莖內血流運送到腦下垂體，正向刺激腦下垂體前葉的促性腺激素細胞製造和分泌 FSH 和 LH。

其兩者經由血液運送到性腺組織-卵巢或睪丸。在女性卵巢中，FSH 和卵巢顆粒細胞 (Granulosa cells) 上的 FSH 受體結合，而 LH 則和卵膜細胞 (Theca cells) 上的受體結合，藉由訊息傳遞分別製造出

雌性素 (estrogen)、黃體素 (progesterone) 和抑制素 (inhibin)。當此三者被分泌至血液中的濃度偏高時便會反向抑制下視丘和腦下腺前葉細胞對於 GnRH、FSH 和 LH 的製造，值得注意的是抑制素的負調控主要作用於 FSH 上，此種調控關係即為負回饋調控系統 (negative-feedback regulatory system) [3-5]。

1-1-3 對於女性的生理功能

FSH 在女性生理上有兩點重要功能：第一點是藉由 LH 作用於卵膜細胞產生雄性素 (androgen) 後，FSH 作用在卵巢顆粒細胞上隨之轉譯出芳香酶 (aromatase)，此酵素能透過一連串的轉化反應使得雄性素轉變成雌性素，此一連串的體內化學反應則稱為類固醇生成作用 (steroidogenesis)。雌性素又稱為動情素，直接刺激女性生殖器官的成熟和第二性徵的發育，圖 2 說明了類固醇生成作用的詳細反應流程 [6]。

第二點即為促進生殖腺體產生卵子，FSH 刺激排卵前卵巢濾泡的成熟和發育，另一方面 LH 則在引發排卵和濾泡轉化成黃體方面扮演相當重要的角色 [7]。大約每隔 28 天，FSH 及 LH 促使卵巢內新的濾泡開始生長，直到週期的第 14 天開始排卵，濾泡早期生長階段會分泌雌性素。排卵之後，留在卵巢內破裂濾泡的顆粒細胞在 LH 的刺激下會轉變成黃體，這過程稱為黃體化 (luteinization)。黃體可分泌大量黃體素，其又稱為助孕素，主要功能為刺激子宮內膜的腺體分泌子宮乳液 (uterine milk) 以作為卵子著床的準備，且同時促進乳房分泌性組織的發育 [8]。

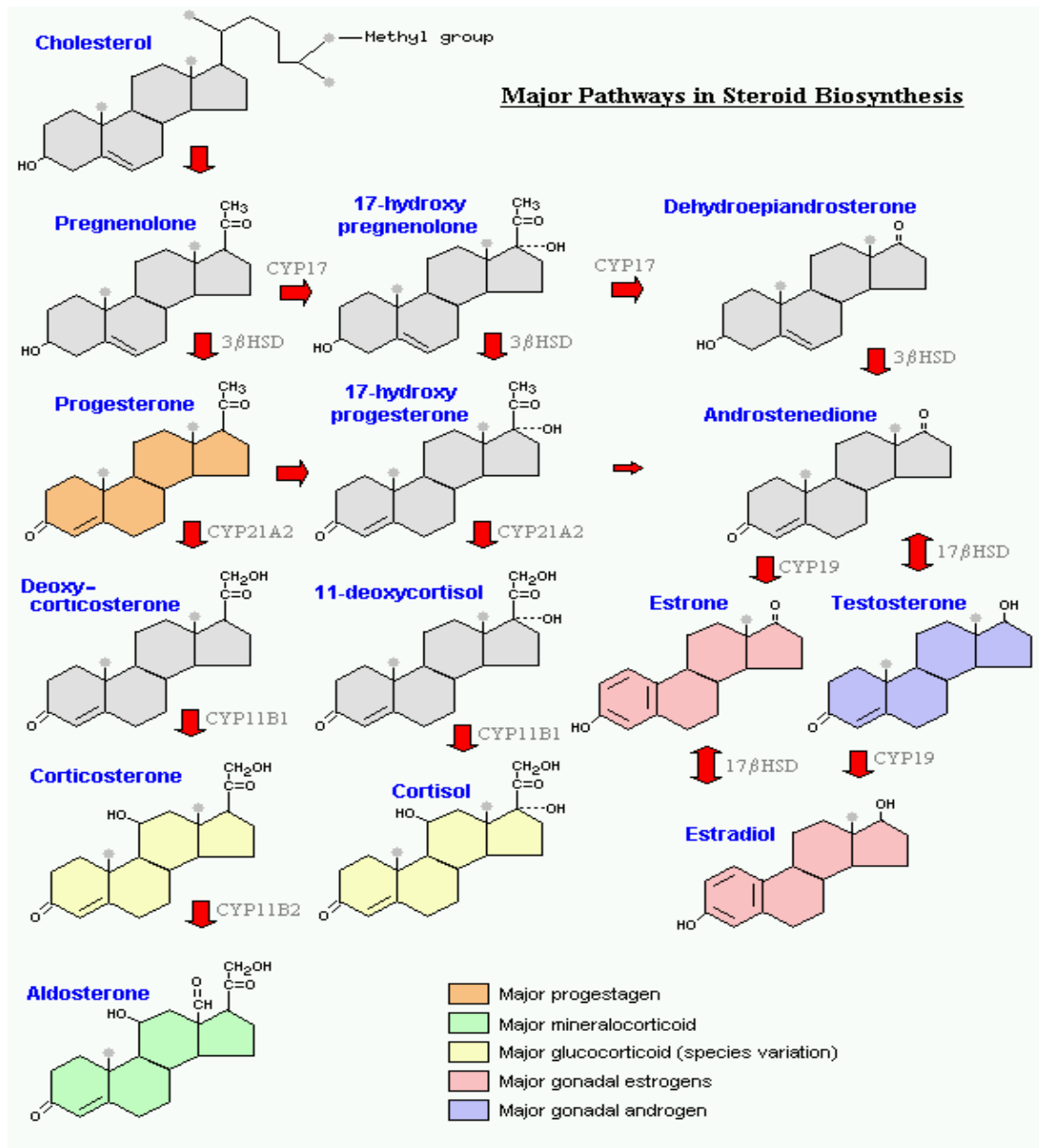


圖 2. 類固醇生成作用 (steroidogenesis) 主要反應路徑圖

1-1-4 對於男性的生理功能

在男性生理上，LH 與睪丸中 Leydig 細胞上的 LH 受體結合而合成分泌出睪固酮 (Testosterone)，其功能可促使男性生殖器官的生長和第二性徵的發育。此外，睪固酮與接受到 FSH 刺激訊號的 Sertoli 細胞一起共同合作，促進精子生成 (spermatogenesis)。Sertoli 細胞作為支持作用，由曲細精管上皮基部一直延伸到曲細精管的管腔中。

精細胞會附著於 Sertoli 細胞上，此時 Sertoli 細胞提供精細胞營養物質、激素和促使精細胞轉變所需要的酵素，並移除精細胞轉換為精蟲時多餘的細胞質，以製造良好之精子 [9]。

1-2 結構特性與訊息傳遞

1-2-1 醣蛋白激素家族

如同前面所提，FSH 屬於醣蛋白激素家族的一員，此家族共有四個成員：濾泡刺激素 (FSH)、黃體生成素 (luteinizing hormone, LH)、甲狀腺刺激素 (thyroid-stimulating hormone, TSH) 和絨毛膜促性腺激素 (chorionic gonadotropin, CG) 等 [1]。此四者同為 α/β 異質雙體 (α/β heterodimer) 之組成，其結構由 α - 和 β -次單元體經由非共價鍵結合而成， α -次單元體部分皆相同 [10]，位於人類第六對染色體：6q12→q21 [11]；而 FSH 的 β -次單元體位於人類第十一對染色體：11p11.2→11pter [12]，雖然醣蛋白激素家族的 α -次單元體部分皆相同，但是 β -次單元體卻完全不一樣，因此具有生物活性專一性指標。

在醣蛋白激素家族中，此兩個次單元體的多胜肽組成皆由一段訊息胜肽 (signal peptide) 加上成熟胜肽 (mature peptide) 所構成。以 FSH 為例，其 α -次單元體由一段 24 個胺基酸的訊息胜肽加上 92 個胺基酸的成熟胜肽所組成 [13]，其中 Asn52 和 Asn78 為 N-連結之醣基化位置 (N-linked glycosylation sites)；FSH β -次單元體則是 18 個胺基酸的訊息胜肽加上 111 個胺基酸的成熟胜肽 [12, 14]，其中 Asn7 和 Asn24 為 N-連結之醣基化位置，圖 3 為 FSH α - 和 β -次單元體的多胜肽鏈一級結構圖，可明顯看出 FSH 的胺基酸組成和醣基化位置，此外更可觀察到 FSH α -次單元體有五個分子內雙硫鍵，而 β -次單元體則由六個分子內雙硫鍵折疊而成 [15]。

在哺乳動物腦下垂體前葉的促性腺激素細胞裡， α 、 β -次單元體之 mRNA 先轉譯出次單元體前趨物 (precursor)，即是先前所提的訊息胜肽加上成熟胜肽之組成。訊息胜肽為疏水特性，位於前趨物的 N 端，其與內質網的膜融合之後便把整段前趨物帶入內質網內，接著內質網中的訊息胜肽酶 (signal peptidase) 便將訊息胜肽切除，成熟胜肽在內質網開始進行一連串的糖化作用 (glycosylation)，之後經由高基氏體再修飾後， α 、 β -次單元體雙體化 (dimerization) 成為一個完整的四級結構異質雙體 FSH，而被分泌至胞外 [16]。

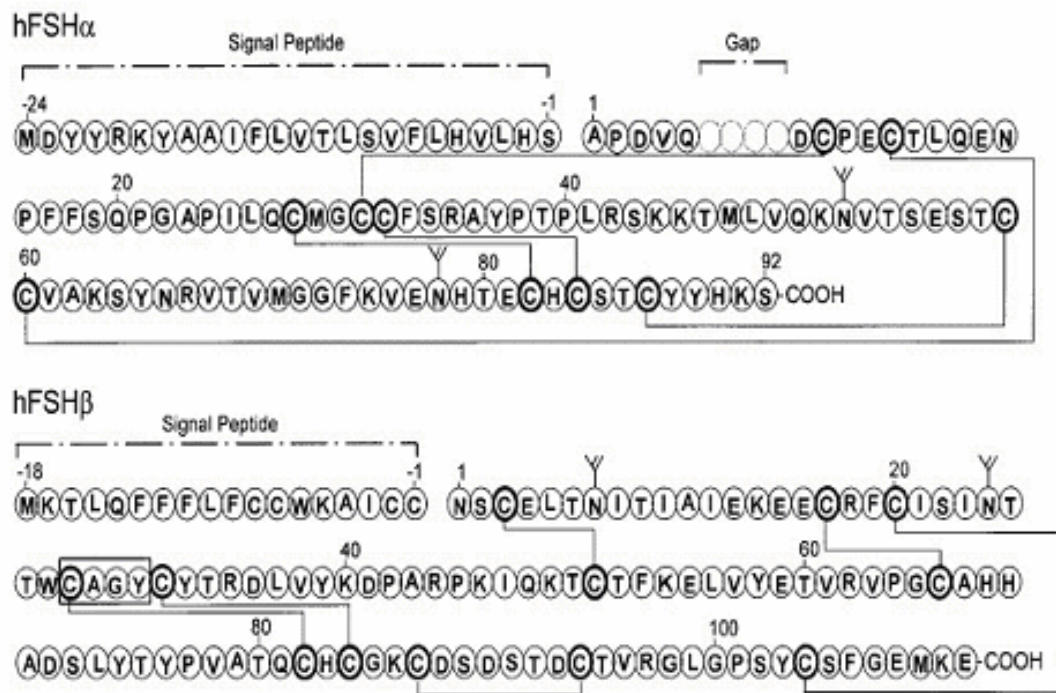


圖 3. hFSH α - 和 β -次單元體的多胜肽鏈序列

1-2-2 FSH 結構與受體鍵結關係

2001 年，Fox 團隊以 3.0 Å 解析度 (resolution) 解出了人類濾泡刺激素 β Thr26Ala 突變體的晶體結構，這也是最早探討 hFSH 3D 立體圖的文獻 [17]。由圖 4 可看出 FSH 中， α 、 β -次單元體兩者非共

價結合之關係，Fox 團隊以桿狀病毒 (baculovirus) 感染 Hi5 昆蟲細胞的表現方式重組出濾泡刺激素 β Thr26Ala 突變體，利用改變 β Thr26 的位置以去除 β Asn24 的醣基化，如此之設計不但不會降低 FSH 訊息傳遞功能和受體結合力，更可增加結晶化過程 (crystallization) 的蛋白質合適性。

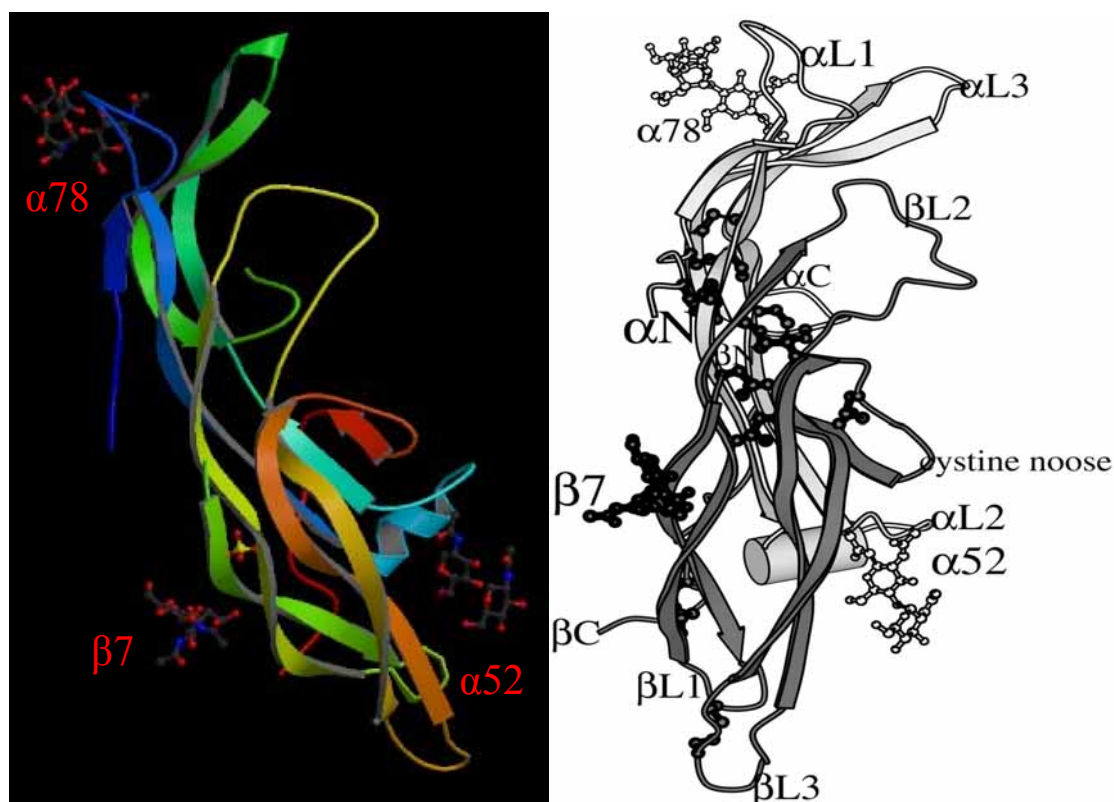


圖 4. hFSH 完整折疊結構的彩色與灰階示意圖 [17]

而在 2005 年，Fan 和 Hendrickson 進一步以 2.9 \AA 解析度解出了 hFSH 和其受體之胞外激素鍵結區域 (extracellular hormone-binding domain) 結合的晶體構造，其結合方式就像是雙手相互緊扣著彼此 (圖 5)。此激素-受體複合物的干擾值相當高 ($2,600 \text{ \AA}^2$) 且有著高電荷密度，此模型可通用在其它三個醣蛋白激素家族上 (LH、TSH 和 CG)，但是其鍵結專一性完全建立在共同的 α -次單元體和激素專一

的 β -次單元體兩者本身之結合。當 FSH 與受體結合之後會經歷 FSH 結構上的改變，伸出突狀的環型構造進而牽連著受體的活化。Fan 和 Hendrickson 還觀察到 FSH-受體複合物會形成同質雙體 (homodimer) (圖 6)，且在蛋白質溶液中佔了極高濃度的比例，這可能扮演著其穿膜結構的訊息傳遞角色 [18]。

FSH 受體包含兩個各約為 330 個胺基酸的區域：N'端胞外激素鍵結區域 (N-terminal extracellular hormone-binding domain) 和膜相關內區域 (membrane-associated endodomain)，其中膜內區域包括了三個外露的環狀結構 (exoloop) 和七個穿膜螺旋結構 (transmembrane helice) (圖七) [19]。當 FSH 與胞外激素鍵結區域產生高親和力結合之後進一步導致膜內區域的活化，其中最重要的是第三個外露環狀結構區域能與 FSH 互動產生一連串的活化作用 [20]。

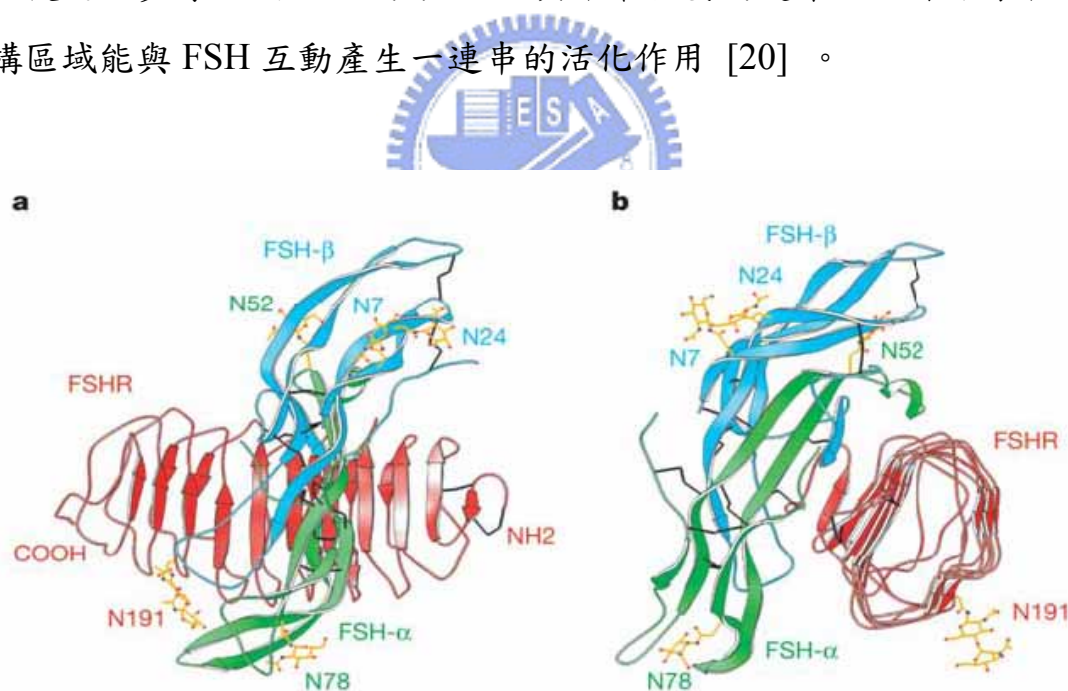


圖 5. FSH-受體複合物晶體之緞帶示意圖。圖 5-a 和 5-b 為縱向旋轉 90° 之視野。FSH α 鏈、FSH β 鏈和 FSHR 各分別以綠色、天藍色和紅色顯示。

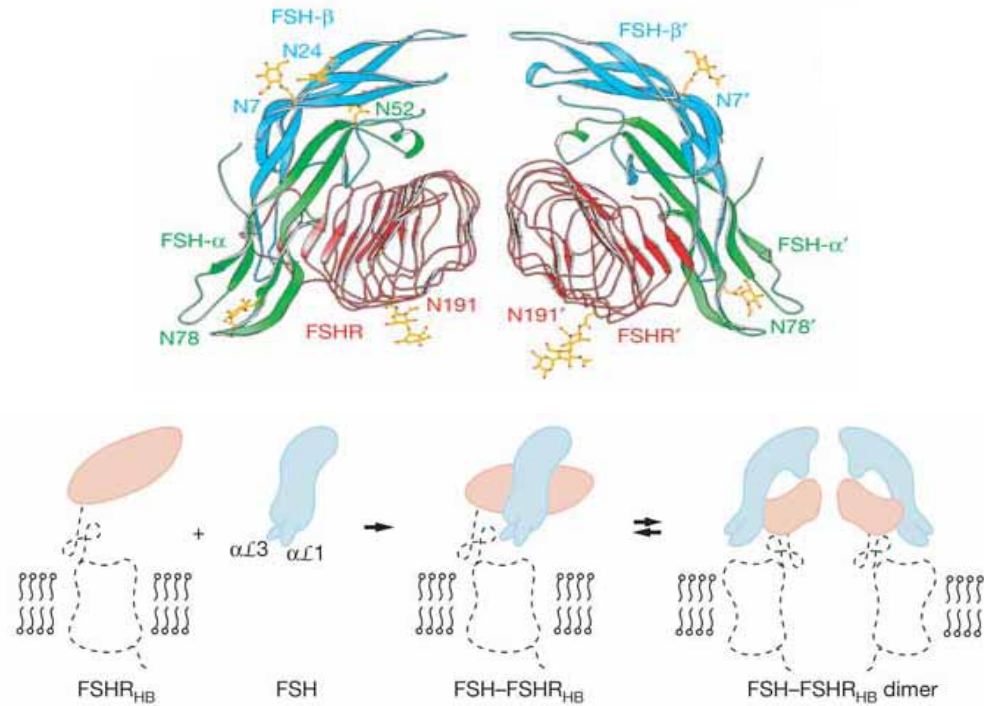


圖 6. FSH-受體複合物形成同質雙體 (homodimer)

及其鍵結後活化之過程

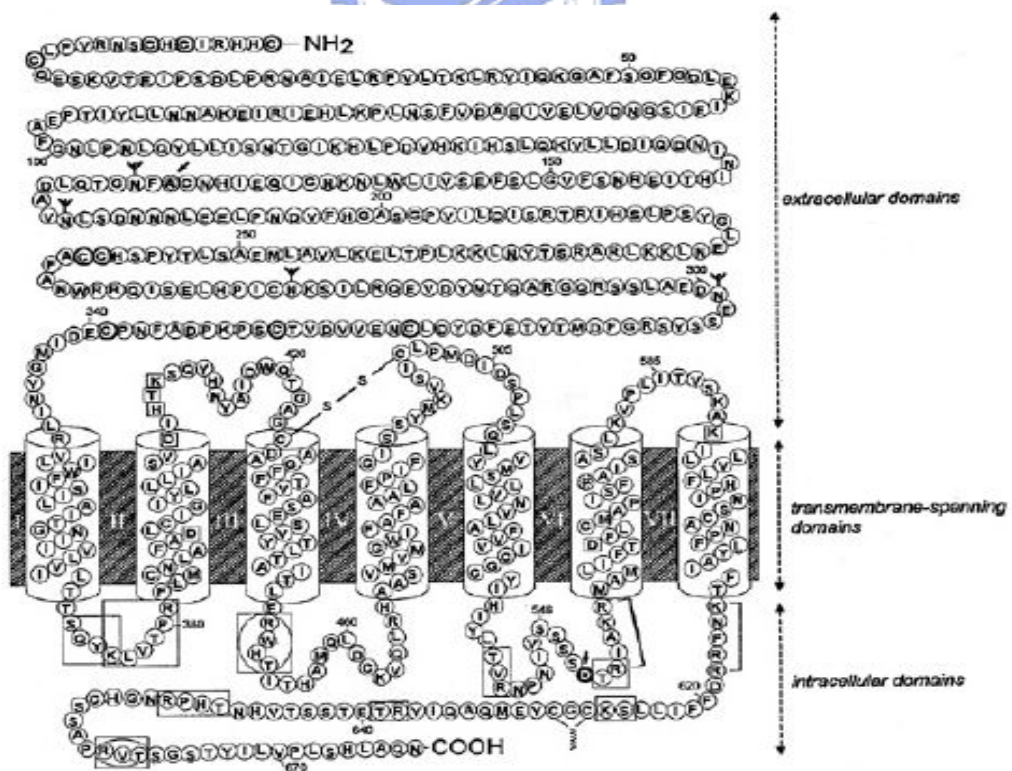


圖 7. FSH 受體一級結構圖

1-2-3 訊息傳遞

FSH 與其受體結合之後會產生一連串複雜的訊息傳遞路徑，圖 8 為 FSH 整體訊息傳遞路徑圖 [21]。首先 FSH 鍵結到 FSH 受體上，造成伴隨著受體的 G 蛋白 (G-proteins) 活化 adenylate cyclase (AC) 因而增加胞內 cAMP 的量。在 Sertoli 細胞內，多數的因子可被 cAMP 進一步活化，這其中包含了可磷酸化胞內的一些蛋白質之 PKA 蛋白，cAMP 也調控了轉錄因子的表現與活化，例如 CREB 因子。FSH 也藉由 cAMP 和 PKA 修飾了 Ca^{2+} 通道的表面而造成 Ca^{2+} 進入 Sertoli 細胞，也因為如此而導致細胞的去極化 (Depolarization)。 Ca^{2+} 濃度的提高可活化 calmodulin 和 CaM kinases，它們對於 CREB 的磷酸化有潛在的影響 [22, 23]。

在青春時期，經由 cAMP 與 guanine nucleotide exchange factors (GEFs) 的交互影響和 Ras-like G 蛋白的活性化，FSH 因而活化 MAP kinases 的一系列催化反應和 ERK。ERK 能夠活化包括 SRF、c-jun 和 CREB 等的轉錄因子 [24, 25]。至於顆粒細胞中，FSH 也活化了 p38 MAP kinase [26]。在顆粒細胞的研究當中因此鑑定出 Forkhead 轉錄因子 (Forkhead)、SGK (glucocorticoid-induced kinase) 和 GSK-3 (glycogen synthase kinase-3)，它們皆作為 PI3-K 系列反應的下游目標蛋白質。FSH 也間接誘導了 PLA2 和花生酸 (arachadonic acid) 的釋放 [27]。

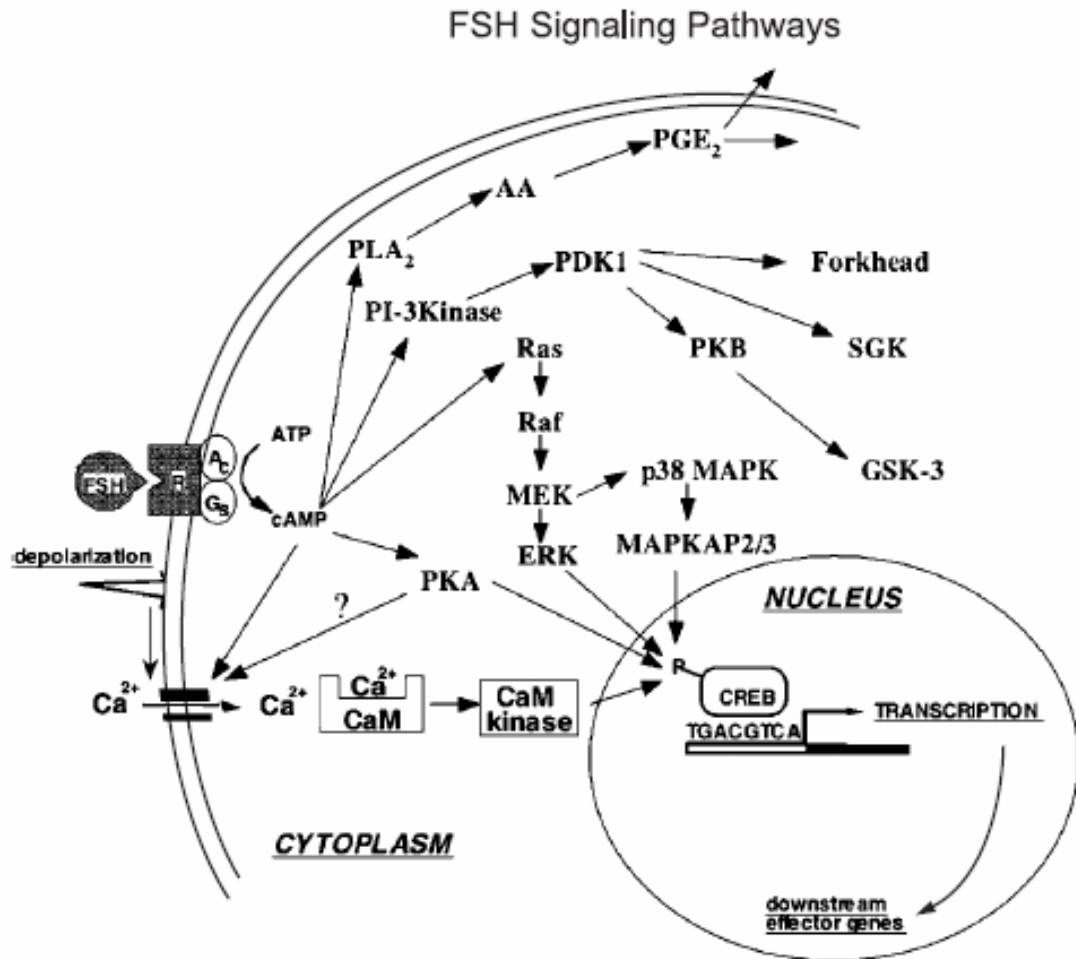


圖 8. FSH 訊息傳遞路徑圖

1-2-4 醣基支鏈之組成

醣基支鏈之主要組成為寡醣單元體 (oligosaccharide)，當轉譯後的 α 、 β -次單元體多胜肽進入到內質網中，便開始一連串的醣基化作用。醣蛋白激素的 N-連結寡醣支鏈 (N-linked oligosaccharide chain) 具有相同之核心單醣部分，包括了兩個 N-acetylgulcosamine 和三個 mannose 殘基 [28] (圖 9)。各物種間的醣基支鏈有著相同的核心部分，但因為後修飾過程中進到內質網和高基氏體中的單醣並不相同，故尾端殘基常有所改變，形成數種異構物 (isoform)。

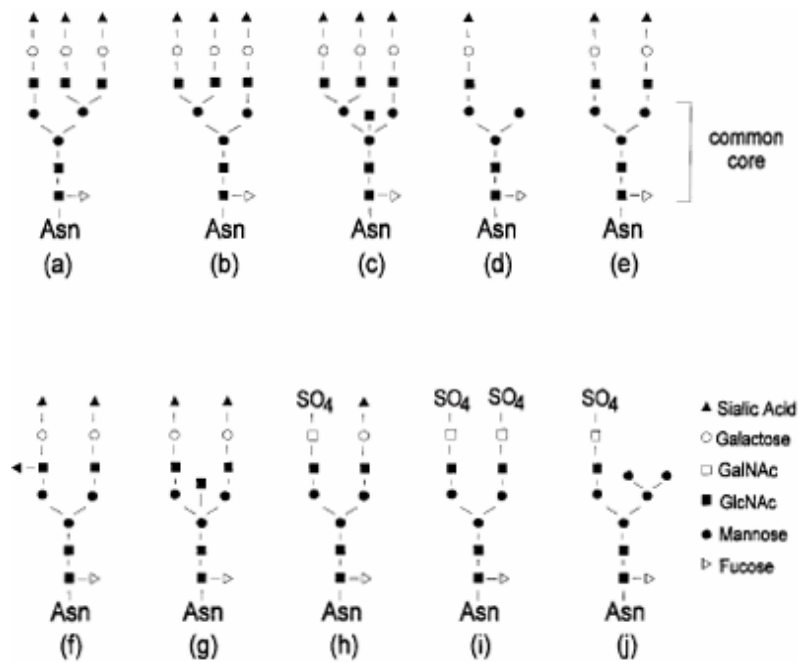


圖 9. 部分羊、牛和人類腦下垂體 FSH 中被發現的 N-連結寡糖支鏈

1-2-5 糖基支鏈之重要性

到底糖基支鏈在整個糖蛋白激素裡扮演著何許功能？這一直是科學家們深感興趣的地方。因此綜合相關文獻後對於糖基的重要性大致上可就訊息傳遞活性 (signal-transducing activity) 和受體鍵結親和力 (receptor-binding affinity) 兩大部分詳加討論。在絕大多數研究 FSH 糖基功能的文獻中，皆說明了 FSH α -次單元體 Asn52 的角色對於訊息傳遞來說最為重要，但對於受體鍵結親和力卻非如此必需 [29-32]。

利用直接點突變之方式加以改變 α -次單元體 Asn52 成為 Asp [29] 或 Gln [30, 31]，如此除去 Asn52 之糖基部分，發現皆會嚴重降低 FSH 的訊息傳遞活性。至於突變掉 α -次單元體 Asn52 和 Asn78 兩個位置亦只剩下 40% 的活性 [31]。此外，雙突變 FSH β -次單元體 Asn7 和 Asn24 亦會減少 30% 的訊息傳遞活性 [31]。由以上文獻綜合之結果可知道突變掉 α Asn52、 α Asn78、 β Asn7 和 β Asn24 皆會降低 FSH 的

訊息傳遞活性。

但相對地，關於突變 α Asn52 之後的受體鍵結親和力卻具有無影響 [33]、降低 [29] 或增加 [30, 32, 34] 之可能性。關於提出增加親和力的文獻方面，Matzuk 持較保留之態度，他指出 α Asn52 突變體只比野生型 (wild-type) CG α -次單元體的受體親和力有著些微的增強 [32]；但 Flack 則認為 α Asn52 突變體比野生型 FSH α -次單元體的受體親和力反而增強到 2~3 倍 [30, 34]。關於突變體的受體親和力影響結果差異甚巨，可能原因為受測細胞種類之不一致，雖然生理上同為 FSH 的作用細胞，但選用大鼠顆粒細胞或大鼠 Steroli 細胞之結果卻有著極大的差異性存在 [35]。但可以確信的是 FSH α 、 β -次單元體之四個醣基對於性腺細胞的訊息傳遞和 FSH 受體的鍵結能力皆有絕對之影響，而以 α -次單元體 Asn52 的影響最為顯著。

1-3 濾泡刺激素與卵巢癌之關係

1-3-1 卵巢癌簡介

根據衛生署「民國 92 年台灣地區主要癌症死亡原因」之統計，卵巢癌共造成 336 人死亡，佔所有女性之癌症死亡人數第十位。此外，衛生署民國 89 年癌症登記年報指出初次診斷為子宮附屬器（卵巢、輸卵管及寬韌帶）惡性腫瘤（大部分為上皮性卵巢癌）之年齡標準化率為每十萬人口中有 6.39 人，發生率佔婦科所有癌症的第九位，年齡中位數為 49 歲。雖然卵巢癌的發生率並不居於首位，但其死亡率卻是婦科癌症中最高的，因此不能小覷。

30 歲以下的女性，大部份卵巢的新生物屬於良性，裡面充滿液狀的囊腫。囊腫可能在女性每個月的週期產生，且通常不需治療就會消失。如果囊腫未消失，醫師會建議將其切除，特別是當它將引起問

題或看起來有所改變時。某些患者，醫師可能會建議一段時間後安排超音波或其它檢查來觀察是否有任何改變。

當腫瘤細胞開始侵犯、損害周圍組織和周圍器官時，即轉變為惡性腫瘤，也就是癌細胞。在卵巢癌方面，卵巢惡性腫瘤會轉移到腹部其它器官而形成新的腫瘤，其最常轉移到結腸、胃和橫隔膜，卵巢癌細胞也會進入血液或淋巴系統，進而擴散到身體其它部位。

致病因素

卵巢癌確切的致病因子至今仍不明確，一般認為卵巢癌的發生與家族遺傳因子有相當大的關連，若有家族病史則為遺傳性高危險群，所謂的家族病史包含了母、女、姊妹、祖母、外婆、姑和姨。環境因素也是卵巢癌致病原因之一，在高度工業化的國家發生率多高於十萬分之十，因此物理或化學物質的污染極可能與其相關。經過子宮切除的婦女，卵巢癌的發生率會降低，可能是陰道上端封閉，阻卻了任何污染及致癌物質侵入腹腔。此外，不孕症與少胎生產之婦女也與卵巢癌的發生有關 [36, 37]，連續使用一年以上的排卵藥亦有增加卵巢癌發生的風險 [38]。

分類與五年存活率

依照組織病理，卵巢癌主要可分為四類：一、上皮細胞型卵巢癌 (epithelial ovarian cancer)，好發於 50~70 歲。二、低惡性度卵巢腫瘤 (ovarian tumor of low malignant potential)，好發於 30~50 歲。三、生殖細胞型卵巢癌 (malignant germ cell tumor of the ovary)，好發於 30 歲前。四、性索-間質細胞型卵巢癌 (malignant sex cord-stromal tumor of the ovary)，無特定好發年齡。

此四類當中，上皮細胞型卵巢癌在所有卵巢癌中佔極大部分，其五年存活率在分化良好的第一期上皮細胞型卵巢癌可達 91 %，但分化不良的第三 C 期上皮細胞型卵巢癌只剩 23 %，平均只有 30 % [39]。早期上皮細胞型卵巢癌往往沒有徵狀，一旦被診斷出來則有 75 % 的患者已達第三、四期，這也更進一步造成卵巢癌的高致死率 [40]。

症狀

卵巢癌早期通常沒有明顯症狀，且因卵巢位於骨盆腔內，假若發生腫瘤，若非大到可由腹部觸摸，實則並不容易察覺。等到症狀發生的時候，往往已經有擴散的情形。患者在感到壓痛或其它問題前，腫瘤可能已生長一段時間。

當腫瘤逐漸成長，患者會感到下腹部腫脹或不舒服，也可能因而食慾減少或是吃了少量的食物就有飽脹感。其它症狀可能包括脹氣、消化不良、噁心和體重減輕，此些徵狀陰部明顯而時常被患者所忽略。更大的腫瘤會壓迫附近的器官，例如腸子或膀胱，造成腹瀉、便秘或頻尿，偶爾卵巢癌亦會造成陰道出血。此外，因為體液堆積於腹腔形成腹水，患者會感到腹脹。體液也可能堆積在肺的周圍，因而感到呼吸短促。

手術分期

卵巢癌採用手術分期，根據手術時的觀察與手術標本的組織病理檢查，作為分期依據 [41]，表 1 為卵巢癌分期之病理依據。

第一期	癌症只限在卵巢。
Stage IA	癌症只限在一側的卵巢；沒有腹水；卵巢的表面完整，且表面處沒有癌症。
Stage IB	癌症只限在兩側的卵巢；沒有腹水；卵巢的表面完整，且表面處沒有癌症。
Stage IC	不管是 1A 或 1B，一側或兩側卵巢的表面已經有了癌症；或者卵巢腫瘤已經破裂；或者腹水或腹腔沖洗液中檢測出癌細胞。
第二期	單側或兩側卵巢癌，且有骨盆腔擴散。
Stage IIA	擴散只限限於子宮或輸卵管。
Stage IIB	擴散至骨盆腔內的其他組織。
Stage IIC	不論 IIA 或 IIB，卵巢表面已經有了癌症者；或卵巢腫瘤已破裂；腹水或腹腔沖洗液裡檢出癌細胞。
第三期	單側或兩側的卵巢癌，有骨盆腔以外的腹膜轉移，或轉移到後腹腔或鼠蹊部的淋巴結。表淺的肝臟轉移視為第三期。癌症雖仍侷限在骨盆腔內，但組織學的檢查，已證實有小腸或大網膜轉移。
Stage IIIA	肉眼看起來，癌症只侷限在骨盆腔內，而且沒有淋巴結的轉移。但是，組織學的檢查已證實有腹腔內腹膜的轉移。
Stage IIIB	組織學檢查證實腹腔內腹膜表面已經有了癌症，但無超過兩公分者。淋巴結沒有轉移。
Stage IIIC	腹腔內之轉移病灶已超過兩公分，或者已有後腹腔或鼠蹊淋巴結的轉移。

第四期	單側或兩側卵巢癌，有遠端轉移。如有胸膜積水，必須有陽性細胞學檢查才能歸類為第四期，肝臟實質部的轉移算是第四期。
-----	---

表 1. 卵巢癌手術分期表

治療：外科手術、化學治療及放射治療

卵巢癌的治療包括手術、化學治療與放射治療，其中手術為最主要也是治療效果最佳的方式，通常較晚期的病灶，手術無法完全切除，將合併使用化學治療。

外科手術

卵巢癌的外科手術，通常將二側卵巢、輸卵管切除和子宮切除，此種方式稱為子宮全切除術，合併雙側卵巢及輸卵管切除術。須保留生育能力的年輕婦女，只有在分化良好的 IA 期卵巢癌可考慮切除單側卵巢，保留子宮與對側卵巢，並作嚴密的追蹤。

一旦癌症已擴散，則盡可能做到最大程度的減積手術 (maximal cytoreduction)，殘餘腫瘤大小與預後有密切關連 [40]。若標準手術無法達到適當摘除病灶 (個別殘存腫瘤最大直徑小於 1 公分)，則宜考慮增加進一步切除部分腸道或臟器的手術以達此目標 [39]。如需施行部分大腸切除，則盡可能做腸道吻合手術 (anastomosis) 或可回復性腸造口術 (reversible colostomy)，因永久性腸造口術 (permanent colostomy) 會負面影響生活品質。

化學治療

大部分卵巢癌患者手術後需輔以化學治療。化學治療是使用藥物殺死癌細胞，卵巢癌的化學治療通常使用組合式藥物，而藥物經由口服或注射給予。目前化學治療的藥物仍以鉑類化合物 (platinum-analogues) 做為第一線化療藥物，如 Cisplatin 或 Carboplatin 等 [42-44]。對於需做化學治療的早期癌症（第一期 IC 和第二期），建議給予 3~6 次；對於晚期癌症（第三、四期）則給予 6 次治療。至於更早期分化良好或中等的卵巢癌（第一期 IA 和 IB）施以手術治療即可，但有時會加上預防性化學治療。

化學治療為全身性的治療，因藥物伴隨著血液循環並流經全身。一般施行化療之後常引發以下幾點副作用：噁心嘔吐、骨髓抑制、血球減少、貧血、感染、異常出血、落髮、疲乏、手腳刺麻、腎臟毒性、耳毒性、皮肉潰爛、藥物過敏、口腔黏膜破損、手掌腳掌病變、殘存卵巢傷害，甚至產生其他癌症。



放射治療

放射線治療使用在少數手術後的患者，用以殺死骨盆腔殘存的癌細胞。放射線治療即利用高能量放射線破壞癌細胞，並抑制其生長。放射線的來源可來自大型機器（體外放射線療法），或將放射性物質直接置入或靠近腫瘤的地方。如同手術一樣，放射線療法亦是局部治療，只能殺死治療區域的癌細胞。

預後與追蹤

卵巢癌的預後與卵巢癌的種類及多項臨床變數有關，其中年齡亦是重要參考，年齡愈大則預後能力愈差。一般說來，第一期和第二期的五年存活率可達 80~100%，第 IIIA 期達 30~40%，而 IIIB 期僅達

20%，至於ⅢC和第四期則只有5%。

部份患者在手術與化學治療後，醫師會建議做「複診」外科手術，直接檢查腹部取得體液或組織樣本以確定治療是否成功。如發現癌細胞，則必須再接受進一步的治療。

當治療結束後，定期檢查通常包括身體檢查、骨盆腔檢查及子宮頸抹片檢查。有時醫師也會安排胸部 X 光、腹部電腦斷層掃描及一些檢驗室檢查，如驗尿、全套血球計數和 CA-125 化驗。通常在外科手術前，患者血液中的 CA-125 數值偏高，而腫瘤切除後的數星期內便恢復到正常值。倘若 CA-125 數值再次升高，則表示癌症可能再次復發。

醫師通常談論癌症的存活率時，常告知患者治療的結果為緩解而非治癒，縱使有許多罹患卵巢癌之女性已被完全治癒，但疾病仍有可能會在數年後復發。



1-3-2 FSH 對卵巢癌增生的影響

近幾年的研究報告顯示 FSH 與卵巢癌的生長發育有直接性的影響，目前已知 FSH 和 FSH 受體是影響卵巢癌增生的危險因子，但其引發的訊息傳遞過程與如何產生生長因子的機制目前尚不明確。

藉由與受體的互動，FSH 對於哺乳動物的生殖和卵巢濾泡的生長發育扮演著基本的角色。1999 年，Zheng 等人首先發現 FSH 受體確實存在於卵巢上皮腫瘤 (ovarian epithelial tumor)。但是由良性囊腺瘤 (benign cystadenoma)、邊緣腫瘤 (borderline tumor) 直到發育成癌細胞 (carcinoma) 的過程中，FSH 受體量卻逐漸遞減，因此卵巢癌發育的早期過程可能需要 FSH 的參與，其可說是促進卵巢上皮細胞生長的重要因子 [45]。此外，經 FSH 處理過的正常卵巢表面上皮細

胞 (ovarian surface epithelial cell) 也因此導致增生 [46] 。

雖然流行病學的數據顯示出 FSH 對於卵巢癌之發育處於危險因子之角色，但是 FSH 促使何種基因表現和其調控機制尚不清楚。在 2004 年，Qing 等人進一步藉由 cDNA 微陣列技術 (microarray) 之方式分析經 FSH 處理過的卵巢表現上皮細胞，發現到 91 個基因被正向調控，另外有 68 個基因被負向調控，此差異有 2 倍之高，而大多數被 FSH 調控的基因皆與細胞代謝、增生和致癌基因有關 [47]。此外藉由觀察顆粒細胞惡性腫瘤 (granulosa cell tumours) 中的 mRNA 之表現情形，發現到 *cycD2*、*R -β*、*sgk*、*COX-2* 和 *LHR* 等基因皆有利於 FSH 受體之表現，因而使得顆粒細胞惡性腫瘤上的 FSH 受體表現量高出於正常的卵巢顆粒細胞 [48]。

除了對於卵巢癌細胞的影響之外，值得一提的是 FSH 甚至對於男性前列腺癌 (prostate) 的發育也有相當之影響。近十年來早已在前列腺組織上發現 FSH 和其受體的存在，此外在前列腺癌細胞中更可以發現 FSH 量的增加和其受體大量被製造，因此推測 FSH 影響了前列腺癌的發病與生長，故改變 FSH 的產生或許可提供另一種有效的治療方式 [49]。

1-4 研究動機與目的

綜合以上所述，已知 FSH 對於卵巢癌細胞的增生存在著明確的正向關係，也因為卵巢癌細胞上大量表現的 FSH 受體與 FSH 鍵結後更加活化了癌細胞生長因子。瞭解整個活化關係後，發現 FSH 與其受體之鍵結扮演關鍵性的角色，也因為其鍵結關係導致了一系列的訊息傳遞和生長因子的產生，於是乎試圖阻斷卵巢癌細胞上 FSH 與 FSH 受體的鍵結和彼此間的訊息傳遞路徑便顯得格外重要。此外根據前面

1-2-5 小節所述，已知道醣基支鏈對於 FSH 訊息傳遞過程之重要性，如去除醣基之 FSH α - 或 β -次單元體的傳遞活性因此降低甚多 [29-32]。

因此本論文的研究目的為試圖製造去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體，加以組合成去醣基 hFSH 變異體 (NG-hFSH variant)，並和野生型 hFSH 做活性比較和競爭作用，期望去醣基 FSH 變異體對於卵巢癌細胞的訊息傳遞有所影響，因而間接降低或抑制癌細胞的增生。為了阻斷或降低訊息傳遞活性，我們利用大腸桿菌系統表現外來的去醣基 hFSH 兩次單元體。利用大腸桿菌系統表現 FSH 有以下幾點益處：一、原核生物無後修飾的醣基化過程，也就是表現出來的 hFSH α - 和 β -次單元體並無醣基支鏈的存在，正符合阻斷訊息路徑之條件。二、比傳統直接點突變去除醣基更有效率，因先前研究 FSH 點突變之文獻皆以真核細胞作為表現宿主，本論文選用大腸桿菌作為表現宿主則有直接表現、生長繁殖快速、易操作和不易受污染等等之優點。三、目前並無大腸桿菌表現 hFSH β -次單元體之文獻記載，故期望以此表現系統順利重組出去醣基的人類濾泡刺激素 α - 和 β -次單元體，如此對於 FSH 的研究將提供另一角度的詮釋和新發現。

第二章 材料

2-1 菌株與細胞株

大腸桿菌株

- *Escherichia coli* DH5 α TM，購自於 Invitrogen 公司。
- *Escherichia coli* NovaBlue (DE3)，購自於 Novagen 公司。
- *Escherichia coli* BL21 (DE3)，購自於 Novagen 公司。
- *Escherichia coli* BL21 *trxB* (DE3)，購自於 Novagen 公司。
- *Escherichia coli* OrigamiTM (DE3)，購自於 Novagen 公司。

品種 (Strain)	基因型 (Genotype)
DH5 α TM	F ⁻ ψ 80dlacZ Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR</i> <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
NovaBlue (DE3)	<i>endA1 hsdR17</i> (<i>rK12</i> - <i>mK12</i> ⁺) <i>supE44 thi-1</i> <i>recA1 gyrA96 relA1 lacF'</i> [<i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacIqZ</i> Δ M15 ::Tn10 (TcR)] (DE3)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)
BL21 <i>trxB</i> (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm trxB15::kan</i> (DE3)
Origami TM (DE3)	Δ <i>ara-leu 7697 Δ<i>lacX74 Δ<i>phoAPvull</i> <i>phoR</i> <i>araD139 galE galK rpsL</i> F' [<i>lac</i>⁺ (<i>lacI^q</i>)<i>pro</i>] <i>gor522::Tn10</i> (Tc^R) <i>trxB::kan</i> (DE3)</i></i>

表 2. 使用之大腸桿菌品種與其基因型類別

細胞株

- 人類卵巢癌細胞株—SKOV-3，獲於陽明大學黃娟娟教授贈與。

名稱	SKOV-3
ATCC 編號	HTB-77
生物體	人種 (<i>Homo sapiens</i>)
器官	卵巢 (ovary)
形態	上皮 (epithelial)
癌症類別	腺癌 (adenocarcinoma)
培養基	90 % DMEM 加上 10 %胎牛血清
培養環境	額外加入 5 % CO ₂ 培養於 37 細胞培養箱
繼代條件	細胞密度介於 10 ⁵ ~10 ⁶ cells/ml 時即刻繼代
凍管保存	95 %培養基加上 5 % DMSO

表 3. SKOV-3 細胞株基本資料表

2-2 培養基

菌株培養

- Luria-Bertani (LB) broth
10 g tryptone、5 g yeast extract 和 10 g NaCl (購自於 Sigma 公司) 溶於 900 ml 二次水，利用 NaOH 調整 pH 值至 7.0，之後補水至最後體積為 1 公升。高壓滅菌 30 分鐘。
- LB agar plate
配法和 LB broth 相同，另多添加 15 g bactoagar (購自 Sigma 公司)。
- Ampicillin，購自於生工公司
將 Ampicillin 溶於二次水，最後濃度達到 50 mg/ml，再以 0.22 μm filter 過濾滅菌，之後分裝儲存於-20 。

- Kanamycin，購自於生工公司
將 Kanamycin 溶於二次水，最後濃度達到 10 mg/ml，再以 0.22 μ m filter 過濾滅菌，之後分裝儲存於-20 。
- Chloramphenicol，購自於生工公司
將 Chloramphenicol 溶於 100 %乙醇，最後濃度達到 34 mg/ml，再以 0.22 μ m filter 過濾滅菌，之後分裝儲存於-20 。
- Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) ，購自於生工公司
將 2.383 g IPTG 溶於 8 ml 二次水，調整至其最後體積為 10 ml。
再以 0.22 μ m filter 過濾滅菌，然後分裝儲存於-20°C。

細胞培養

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ，購自於 Sigma 公司。將 DMEM 培養液粉末溶於 500 ml 的二次水，以二次水反覆沖洗殘留於袋中的粉末，再加入 1.5 g NaHCO₃，加水至 800 ml，調整 pH 值至 7.2，補水到最後體積 900 ml。以 0.22 μ m filter 過濾滅菌並儲存於 4 。
- Fetal Bovine Serum (FBS) ，購自於 GIBCO™ 公司
平時儲存於-20 ，使用前一天先置於 4 冰箱回溫。
- Trypsin/EDTA
Working concentration：以 PBS 稀釋 10 倍
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
開封後若未使用完可冰於 4 儲存，待下次使用時置於室溫回溫，若 DMSO 於 4 狀況下不會凝結成固態，則應丟棄不再使用。

2-3 人類腦下腺 cDNA 庫 (cDNA library)

- Human Pituitary Gland Marathon-Ready cDNA，購自於 CLONTECH 公司。

2-4 轉殖載體

- yT&A cloning vector，購自於益生生技股份有限公司。(附錄 A)
- pET30a，購自於 Novagen 公司。(附錄 B)
- pACYCDuet-1，購自於 Novagen 公司。(附錄 C)

2-5 藥品試劑

PCR 引子

- 引子 (oligonucleotide primer) 製備由生工有限公司和百力生物科技股份有限公司合成。



質體 DNA 微量製備純化套組

- Gene-SpinTM -V²，購自於波士特生物科技股份有限公司。

DNA 瓊脂洋菜膠純化套組

- GFXTM PCR DNA and Gel Band purification kit，購自於 Amersham Biosciences Ltd.。

酵素

- *Taq* DNA polymerase，購自於 Violet 公司。
- Restriction enzyme *BamH I*，購自於 Promega 公司
- Restriction enzyme *EcoR V*，購自於 Promega 公司
- Restriction enzyme *Hind III*，購自於 Promega 公司

- *YEA* T4 DNA Ligase，購自於益生生技開發股份有限公司。
- T4 DNA Ligase，購自於 Promega 公司

DNA ladder 標準品

- 1 kp plus DNA ladder，購自於 Violet 公司
- Gen-100 DNA ladder，購自於 GeneMark 公司

Protein marker 標準品

- Protein molecular weight standards broad range MW 6500-205000，購自於 Amersham Biosciences Ltd.。
- BenchMark™ unstained protein standards，購自於 Invitrogen 公司。
- Prestained protein Ladder, ~10-160 kDa，購自於 Fermentas 公司。

一級抗體

- Rabbit anti-follicle stimulating hormone/lutenizing hormone polyclonal antibody，購自於 CHEMICON international, Inc.。
- Mouse anti-His monoclonal antibody，購自於 Amersham Biosciences Ltd.。

二級抗體

- Goat anti-Rabbit IgG HRP conjugated affinity purified antibody，購自於 CHEMICON international, Inc.。
- Goat anti-Mouse IgG HRP conjugated affinity purified antibody，購自於 CHEMICON international, Inc.。

野生型 (wild-type) 人類濾泡刺激素標準品

- Follicle stimulating hormone from human pituitary, 購自於 Sigma-aldrich CO.

HypercassetteTM 和 HrperfilmTM (Amersham Biosciences Ltd.)

其它用於配製試劑與緩衝液之藥品皆購自於 Sigma-aldrich CO. 或 Merck LTD.。

2-6 溶液與緩衝液

E.coli 勝任細胞 (competent cell) 之製備

- Transformation buffer I (Tfb I)
30 mM CH₃COOK、100 mM KCl、10 mM CaCl₂、50 mM MnCl₂ 和 15 % glycerol，將所有成份混合均勻，利用 0.2 M acetic acid 調整 pH 至 5.8，再以 0.22 μm filter 過濾滅菌，儲存於 4 °C。
- Transformation buffer II (Tfb II)
10 mM MOPS、10 mM KCl、75 mM CaCl₂ 和 15 % glycerol，將所有成份混合均勻，利用 KOH 調整 pH 至 6.5，再以 0.22 μm filter 過濾滅菌，儲存於 4 °C。

DNA 電泳

- 5× Tris-borate-EDTA (TBE) electrophoresis buffer
將 54 g Tris base 和 27.5 g boric acid 溶於 800 ml 的二次水，加入 20 ml 0.5 M EDTA (pH8.0)，以水調整至最後體積為 1 L，儲存於室溫中。使用時稀釋為 0.5×。

- 6× Gel-loading buffer
以二次水配製 0.25 % bromophenol blue、0.25 % xylene cyanol FF 和 30 % glycerol，將所有成份混合均勻後，儲存於 4 °C。
- 0.8 % Agarose gel
取 0.8 g Agarose 粉末溶於 100 ml 二次水加熱沸騰，之後待其冷卻，儲存於 TBE buffer 中備用。

SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

- 4× SDS gel-loading buffer
200 mM Tris-Cl (pH 6.8) 、400 mM dithiothreitol、8 % SDS、0.4 % bromophenol blue 和 40 % glycerol。Dithiothreitol 未添加前可長期儲存於室溫，使用前再添加 Dithiothreitol。
- Bacterial lysis buffer
50 mM Tris-Cl、1 mM EDTA 和 100 mM NaCl，調整 pH 值至 8.0。
- 5× Tris-glycine electrophoresis buffer
125 mM Tris base 和 1.25 M glycine 溶於 900 ml 二次水，加入 0.5 % SDS，調至 pH 值 8.3，最後以水調整至體積 1 公升。
- Coomassie Blue staining solution
將 0.25 g Coomassie Brilliant Blue R-250 溶於 90 ml 的 methanol:H₂O (1:1) 混合液，再加入 10 ml glacial acetic acid。以 Whatman No.1 filter 過濾後儲存於室溫。
- Destain solution
600 ml ddH₂O、300 ml methanol 和 100 ml glacial acetic acid 混合均勻，儲存於室溫。
- Destain solution
800 ml ddH₂O、100 ml methanol 和 100 ml glacial acetic acid 混合均勻，儲存於室溫。

西方墨點法 (Western blotting)

- 1× Transfer buffer
39 mM glycine、48 mM Tris base、0.037 % SDS 和 20 % methanol 混合均勻，調整 pH 值至 8.0。
- Phosphate-buffered saline (PBS)
將 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄ 和 0.24 g KH₂PO₄ 溶於 800 ml 的二次水，用 HCl 調至 pH 值 7.4，加水至最後體積 1 公升。
高壓滅菌 30 分鐘。
- Blocking Solution
5 % skim milk 溶於 PBS 中。
- PBST
取 PBS 溶液加入 0.05 % Tween-20。
- GBX developer and replenisher，購自於 Kodak 公司
取 200 ml “developer and replenisher” 與 718 ml 的二次水混合。
- GBX fixer and replenisher，購自於 Kodak 公司
取 200 ml “fixer and replenisher” 與 718 ml 的二次水混合。

6x His-tag 蛋白質純化 (QIAGEN Ltd.)

- 管柱
Ni-NTA Agarose 和 5 ml bed-volume column (QIAGEN Ltd.)
- Lysis buffer A
100 mM NaH₂PO₄、10 mM Tris-HCl、10 mM imidazole 和 6 M GuHCl 混合均勻，利用 NaOH 調整 pH 值至 8.0。
- Lysis buffer B
100 mM NaH₂PO₄、10 mM Tris-Cl、10 mM imidazole 和 8 M urea 混合均勻，利用 NaOH 調整 pH 值至 8.0。

- Wash buffer C
100 mM NaH₂PO₄、10 mM Tris-Cl、10 mM imidazole 和 8 M urea 混合均勻，利用 NaOH 調整 pH 值至 6.1。
- Elution buffer D
100 mM NaH₂PO₄、10 mM Tris-Cl、250 mM imidazole 和 8 M urea 混合均勻，利用 NaOH 調整 pH 值至 6.1。
- Elution buffer E
100 mM NaH₂PO₄、10 mM Tris-Cl、500 mM imidazole 和 8 M urea 混合均勻，利用 NaOH 調整 pH 值至 6.1。
- Regeneration buffer
6 M GuHCl 和 0.2 M acetic acid 混合均勻。

去糖基 hFSH 變異體 (NG-hFSH variant) 之再組成 (reconstitution)

[50]

- Dialysis buffer
100 mM NaH₂PO₄、10 mM Tris-Cl 和 0~7 M 尿素
- Dimerization buffer
50 mM Tris-HCl (pH 8.7) 和 1 mM EDTA，另外加入 6.4 mM cysteamine 和 3.6 mM cystamine

陽離子交換層析法

- 樹脂
SP-Sepharose 4 Fast Flow ion exchange resin (Amersham Ltd.)
- Equilibrium Buffer
20 mM Tris-HCl 加上 50 mM 醋酸鈉，利用 HCl 調整 pH 至 3.5。

- Elution Buffer

20 mM Tris-HCl 加上不同濃度之醋酸鈉，本實驗採用的濃度分別為 0.7 M、0.9 M、1.2 M、1.5 M、2 M 醋酸鈉，利用 HCl 調整 pH 至 3.5。

生物活性測試

- MTT solution

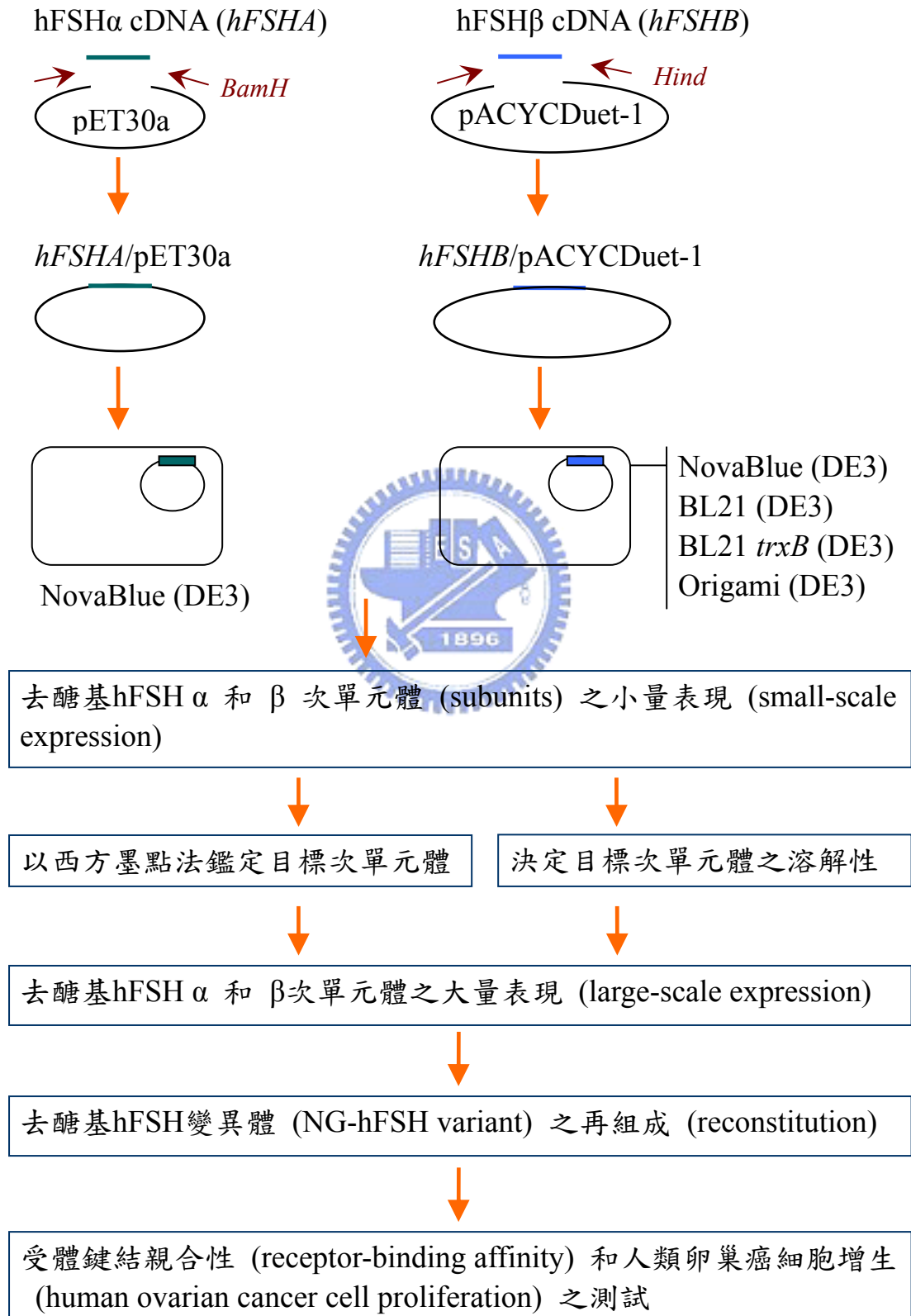
儲存溶液 (5 mg/ml) 為 0.25 g MTT 加上約 50 ml PBS，以 0.22 μ m filter 過濾，避光儲存於 4 °C。待用時則取 10 ml 之儲存溶液加上 40 ml DMEM only 混合均勻，避光儲存於 4 °C。

2-7 儀器

- Polymerase Chain Reaction (PCR) machine : iCycle™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Inc.
- DNA 迷你膠電泳槽 : upid-2, COSMO BIO CO., LTD
- 無菌操作臺 : JW-4NEW, Lian Shen Enterprise Co., LTD
- 桌上型離心機 : Biofuge pico, Heraeus Instruments, Inc.
- 高速離心機 : GS-15R centrifuge, Beckman Coulter, Inc.
- 迴轉式振盪培養箱 : S300D, 一升科技(股)公司
- 迷你垂直電泳槽 : Mini-Protein 3 cell, Bio-Rad Laboratories, Inc.
- 濕式電泳膠轉漬器 : Mini Trans-Blot cell, Bio-Rad Laboratories, Inc.
- 細胞培養箱 : CO₂ water-Jacketed incubator, NuAIR US Autoflow.
- 倒立式顯微鏡 : BI503, OPTIMA.
- 酵素免疫吸附分析儀 : Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Inc.
- 恆溫水浴槽 : B206, 一升科技(股)公司
- 分光光度計 : OPRON-3000 , HANSON TECHNOLOGY Co., LTD

第三章 方法

3-1 實驗流程



3-2 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

hFSH 由腦下腺前葉細胞表現並分泌到血液中，所以實驗設計上以實驗室現有的 commercial “human Pituitary Gland Marathon-Ready cDNA” 作為選殖 hFSH 基因的模版 (template)，利用 PCR 方式分別放大 *hFSHA* 和 *hFSHB*，而 DNA polymerase 在 PCR 產物 3'端會多加一個腺嘌呤 (Adenine)，因此便可將此兩段 cDNA 分別構築到 yT&A 轉殖載體中 [在其間 3'端多一獨立胸腺嘧啶 (Thymidine)，如此形成 A-T 配對]，接著藉由轉形技術 (Transformation) 將 *hFSHA* 和 *hFSHB* 殖入 *E. coli* DH5 α ，作為長期保存和往後實驗上之利用。

3-2-1 引子設計

名稱	寡核苷酸序列	鹼基數
hFSHA (F)	5'- <u>GATATC</u> CCTCCATTCCGCTCCTGA-3'	23
hFSHA (R)	5'-GGGATCC <u>CGCACTT</u> GGTAAAACAT-3'	23
hFSHB (F)	5'- <u>AAGCTT</u> TCTGGATCCCGCAATAG-3'	23
hFSHB (R)	5'- <u>AAGCTT</u> AATGTCCACTGATCT-3'	21

表 4. 聚合酶連鎖反應之引子

- 如表 4 所述，hFSHA (F) 為放大 *hFSHA* 片段之前置引子 (forward primer)，hFSHA (R) 則為反置引子 (reverse primer)；hFSHB (F) 為放大 *hFSHB* 片段之前置引子，hFSHB (R) 同樣為反置引子。
【註：標線處為限制酶切位 (restriction cutting site)，hFSHA (F) 為 *EcoR V*、hFSHA (R) 為 *BamH I*、hFSHB (F) 和 hFSHB (R) 皆為 *Hind III*】

- 如同緒論所提，hFSH α 和 β 次單元體之結構皆由訊息胜肽 (signal peptide) 加上成熟胜肽 (mature peptide) 所組成。但在大腸桿菌表現系統中，並無藉由訊息胜肽將成熟胜肽帶至內質網 (endoplasmic reticulum) 之過程，所以在設計引子上去除訊息胜肽之核苷酸部分，直接從成熟胜肽之 N'端進行放大。
- hFSHA (F)、hFSHA (R) 之限制酶切位分別為 *EcoR V* 和 *BamH I*，接上此切位可利於往後藉由此兩限制酶將 *hFSHA* 構築於表現載體 pET30a；hFSHB (F)、hFSHB (R) 之限制酶切位皆為 *Hind III*，亦設計於往後利於 *hFSHB* 構築於表現載體 pACYCDuet-1。
- 引子儲存濃度配製為 50 μM ，而作用濃度 (working concentration) 則為 5 μM ，平時儲存於 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

3-2-2 PCR 材料與程式

表 5 之藥品混合均勻之後總體積為 50 μl ，置於 0.2 ml “thin walled tube” (ABgene Ltd.)，放入 PCR machine 進行聚合反應，圖 10 為本實驗採用之反應程式。

材料	體積 (μl)
Human Pituitary Gland cDNA library	1
5 μM Forward primer	3.5
5 μM Forward primer	3.5
10x PCR buffer	5
1 mM dNTPs	4
ddH ₂ O	32
Taq DNA polymerase	1
Total volume	50

表 5. 聚合酶連鎖反應之材料

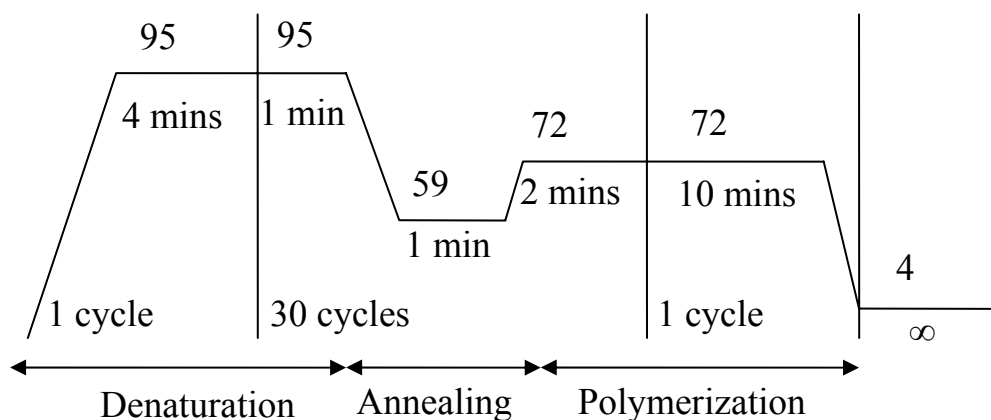


圖 10. 聚合酶連鎖反應之反應程式

3-3 yT&A 載體構築

3-3-1 PCR 產物之瓊脂洋菜膠體電泳 (Agarose gel electrophoresis)

- 配製 0.8 % 瓊脂洋菜膠 (agarose gel) :

將 gel-casting tray 置放於 tape 上，插入 well-forming comb。取 0.8 g agarose 溶於 100 ml 0.5×TBE buffer，搖晃均勻後微波 1 分鐘，拿出搖晃均勻再微波至完全溶解。之後將稍微冷卻的洋菜膠溶液小心倒入 casting trap，避免產生氣泡，靜置 30 分鐘待其凝固。當電泳膠完全凝固後，小心移開 comb 並去除電泳膠下方之 casting tray，電泳膠保存於 0.5× TBE buffer 中。

- 電泳：

將電泳膠放置於 trap 上，再置於電泳槽之平台，此時膠體孔洞 (agarose well) 的一端須在負極的位置。電泳槽注滿 0.5× TBE buffer，將 PCR 產物與 6× gel-loading buffer 混合均勻 (體積比 5:1)，然後立即注入 well 中。打開電源供應器並設定電壓於 100 伏特，約 25-30 分鐘後，關上電源。

- 電泳膠染色：

將跑完電泳後之洋菜膠放入染色用之盒子中。倒入 ethidium bromide solution (1 $\mu\text{g/ml}$) 覆蓋膠體，盒子置於水平迴轉式震盪器 (orbital shaker) 上染色 15 分鐘，之後將 ethidium bromide solution 倒回儲存容器中。接著膠體以二次水搖晃退染，約置於震盪器 30 分鐘以上。便可將膠體置於紫外光光照裝置 (ultraviolet transilluminator) 上觀看。另注意 Ethidium bromide 為有毒污染物質，需全程避免碰觸身體及沾染其它乾淨區域。

3-3-2 PCR 產物之純化

經電泳後染完色的 PCR 產物接著利用 “GFX™ PCR DNA and Gel Band purification kit” 進行純化。首先從洋菜膠上切下所需之 DNA 片段大小 (*hFSHA* 為 316 base pairs; *hFSHB* 為 375 base pairs) 置入微量離心管。之後秤量切下洋菜膠之重量並加入與重量等體積之 capture buffer (1 mg gel slice = 1 μl capture buffer)。置放微量離心管於 60 °C 乾浴加熱器中 10~15 分鐘，每隔 3 分鐘翻轉數次，直到洋菜膠完全溶解。然後將 GFX column 置放於 collection tube 上，並將溶解後之樣品轉注入 GFX column 中，放置室溫 1 分鐘。以 13,000 rpm 離心 30 秒，之後倒掉過濾液，並以 0.5 ml 的 wash buffer 清洗 GFX column，再以 13,000 rpm 離心 30 秒。倒掉過濾液，再重複離心一次，確保殘留的乙醇完全去除。取出 GFX column 並置放於乾淨的 1.5 ml 微量離心管。加入 15~50 μl 二次水復溶 DNA，靜置 1 分鐘後，再以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，最後將沖提 (elute) 下來的 DNA 水溶液儲存於 -20 °C。

3-3-3 與 yT&A 載體進行接合反應 (Ligation)

取 6.5 μl 純化後的 PCR 產物與 1.5 μl 的 yT&A 載體混合，接著加入 1 μl ligation buffer A、1 μl ligation buffer B 以及 1 μl 的 T4 DNA ligase，混合均勻後放置於室溫 1 小時或 4 $^{\circ}\text{C}$ 隔夜反應。

3-3-4 大腸桿菌 DH5 α 之轉形 (Transformation)

- 勝任細胞 (competent *E.coli* DH5 α) 之製備：

以接菌環在 DH5 α 培養皿中挑一單一菌落，養於 5 ml 的 LB 培養基中，隔夜培養於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm 之迴轉式振盪培養箱。取 500 μl 的隔夜菌液接種至 50 ml 的 LB 培養基中繼續培養，直到菌液濃度 OD₅₅₀ 達到 0.6 ~ 0.8。將錐形瓶置於冰上 5 分鐘，然後將菌液轉移至 50 ml 的無菌離心管中，以 2800 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 5 分鐘。小心去除上清液，再將菌塊復溶於 20 ml 的 Tfb I，置於冰上 5 分鐘 (Tfb I 須先置放於 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中)，再以 2800 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 5 分鐘。小心去除上清液，再將菌塊復溶於 3 ml 的 Tfb II，置於冰上 5 分鐘 (Tfb II 亦須先置放於 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中)。稍微混合均勻後，接著每 100 μl 分裝於 1.5 ml 微量離心管，置入液態氮中快速冷卻，之後長期儲存於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

- 大腸桿菌 DH5 α 之轉形：

將 10 μl 的接合反應產物和 50 μl 的勝任細胞 (DH5 α) 混合於 1.5 ml 的無菌微量離心管，置於冰上 30 分鐘。將離心管由冰上移出並迅速置放於 42 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴槽中 90 秒，接著快速將離心管移回冰上靜置 5 分鐘。然後將離心管中的菌液培養於 240 μl 的 LB 培養基中，以 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm 震盪培養 1 小時。分成 20 μl 和 280 μl 的菌液分別塗佈於 LB/Ampicillin 培養皿。之後將培養皿反置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 的迴轉式振盪培

養箱中 12~16 個小時，待菌落生成之後便可用石臘封膜 (parafilm) 密封培養皿並保存於 4 °C 冰箱。

3-3-5 質體 DNA 之微量製備 (miniprep)

本實驗利用波士特公司 “Gene-Spin™ -V²” miniprep kit 製備質體 DNA。首先從轉形後之 DH5 α 培養皿上挑一株單一菌落養於 3 ml 的 LB 培養基中，並加入適量的抗生素 (Ampicillin 50 μ g/ml)，隔夜培養於轉速 200 rpm、37 °C 的迴轉式振盪培養箱。將 1.5 ml 的菌液加到 1.5 ml 微量離心管中，13,000 rpm 離心 1 分鐘，小心移除上清液之後再加入 1.5 ml 的菌液重複離心一次。之後加入冷藏之 200 μ l “Solution I” 反覆震盪復溶菌塊。接著加入 200 μ l 的 “Solution II”，輕微翻轉離心管 5 次，靜置 1 分鐘。再加入 200 μ l 的 “Solution III”，同樣輕微翻轉 5 次混合均勻，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，之後將澄清的 lysate 轉移到置於 collection tube 上的 spin column 中，13,000 rpm 離心 30 秒，倒去 collection tube 中的濾液。加入 700 μ l 的 washing solution 並以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，同樣倒去 collection tube 中的濾液後再次 13,000 rpm 離心 3 分鐘，用以去除多餘乙醇。將 spin column 轉移到另一新的微量離心管上，加入 50 μ l 二次水置於室溫 1 分鐘復溶 DNA，最後以 13,000 rpm 離心 1 分鐘沖提出質體 DNA，並儲存於 -20 °C。

3-4 pET30a 和 pACYCDuet-1 載體構築

3-4-1 質體 *hFSHA*-yT&A、*hFSHB*-yT&A 之限制酶切割 (Digestion)

構築好之質體 *hFSHA*-yT&A 和 *hFSHB*-yT&A 先經由洋菜膠電泳觀察片段大小是否正確，之後 *hFSHA*-yT&A 利用 *BamH I* 限制酶進

行截切，使其成為 *hFSHA* 和 *yT&A* 兩段 DNA；*hFSHB-yT&A* 則利用 *Hind III* 限制酶進行截切，使其成為 *hFSHB* 和 *yT&A* 兩段 DNA，反應藥品如表 6 所述，以 37 °C 水浴反應 3 小時。

hFSHA-yT&A

材料	體積 (μl)
<i>hFSHA-yT&A</i>	15
10× Buffer E	10
Restriction enzyme <i>BamH I</i>	2
ddH ₂ O	73
Total volume	100

hFSHB-yT&A

材料	體積 (μl)
<i>hFSHB-yT&A</i>	15
10× Buffer E	10
Restriction enzyme <i>Hind III</i>	2
ddH ₂ O	73
Total volume	100

表 6. *hFSHA-yT&A* 和 *hFSHB-yT&A* 之切割反應材料

3-4-2 表現載體 pET30a 和 pACYCDuet-1 之限制酶切割

如同質體 *hFSHA-yT&A*、*hFSHB-yT&A* 之切割反應，pET30a 利用 *BamH I* 限制酶進行截切；pACYCDuet-1 則利用 *Hind III* 限制酶進行截切，而反應藥品如表 7 所述，以 37 °C 水浴反應 3 小時。

pET30a

材料	體積 (μl)
pET30a	5
10× Buffer E	1
Restriction enzyme <i>Hind III</i>	1
ddH ₂ O	3
Total volume	10

pACYCDuet-1

材料	體積 (μl)
pACYCDuet-1	5
10× Buffer E	1
Restriction enzyme <i>Hind III</i>	1
ddH ₂ O	3
Total volume	100

表 7. pET30a 和 pACYCDuet-1 之切割反應材料

3-4-3 與表現載體 pET30a 和 pACYCDuet-1 進行接合反應

(Ligation)

切割完之 *hFSHA*、*hFSHB*、pET30a 和 pACYCDuet-1 經由洋菜膠體電泳分離和純化之後，即可進行接合反應。類似前面所提 yT&A 之接合，取 7 μl 純化後的 *hFSHA-BamH I* (經 *BamH I* 切割後之 *hFSHA*) 與 1 μl 的 pET30a-*BamH I* 混合 (insert DNA 與 expression vector 濃度比為 3:1)；同樣取 7 μl 純化後的 *hFSHB-Hind III* 與 1 μl 的 pACYCDuet-1-*Hind III* 混合，接著兩者分別加入 1 μl ligase 10× buffer 以及 1 μl 的 T4 DNA ligase，混合均勻後放置於 4 °C 隔夜反應。

3-4-4 大腸桿菌 NovaBlue (DE3) 、BL21 (DE3) 、BL21 *trxB* (DE3) 和 Origami™ (DE3) 之轉形 (Transformation)

與前述 DH5 α 之轉形相同，但此時需注意的是 *hFSHA*-pET30a 只轉形至 NovaBlue (DE3) ，培養於 LB/Kanamycin 培養基；而 *hFSHB*-pACYCDuet-1 則轉形至四株 *E. coli* 菌株，分別為 NovaBlue (DE3) 、BL21 (DE3) 、BL21 *trxB* (DE3) 和 Origami™ (DE3) ，培養於 LB/Chloramphenicol 培養基，保存於 4 °C 冰箱。

3-4-5 選殖鑑定及 DNA 定序 (DNA sequencing)

上述轉形完帶有表現載體的菌株抽取其微量質體 DNA ，利用限制酶 *EcoR V* 、*BamH I* 和 *Hind III* 切割，之後經由洋菜膠體電泳觀察正反接合情形，選取片段大小正確無誤之單一菌落分別送至生工有限公司和源資國際生物科技股份有限公司進行 DNA 定序進一步確定 insert DNA 序列。



3-5 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之表現及純化

此時轉殖菌株共可分為五種類型，如下表 8 所示。

菌株類型	抗藥性 (antibiotic resistance)
1. <i>hFSHA</i> -pET30a [NovaBlue (DE3)]	Kanamycin
2. <i>hFSHB</i> -pACYCDuet-1 [NovaBlue (DE3)]	Chloramphenicol
3. <i>hFSHB</i> -pACYCDuet-1 [BL21 (DE3)]	Chloramphenicol
4. <i>hFSHB</i> -pACYCDuet-1 [BL21 <i>trxB</i> (DE3)]	Chloramphenicol
5. <i>hFSHB</i> -pACYCDuet-1 [Origami™ (DE3)]	Chloramphenicol

表 8. 轉形後之五種菌株類型

3-5-1 去醣基 hFSH α -和 β -次單元體之小量表現 (small-scale expression)

從上述菌株培養皿中挑單一菌落培養於 3 ml 含有適當抗生素的 LB 培養基中 (LB/Kanamycin 濃度：25 $\mu\text{g/ml}$ 、LB/Chloramphenicol 濃度：34 $\mu\text{g/ml}$)，隔夜培養於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm。取 30 μl 的隔夜菌液接種至 3 ml 含有適當抗生素的 LB 培養基中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm 下培養至 OD_{600} 達 0.6。分別加入 0.5 mM 和 1 mM 的 IPTG，另外取一管 LB 菌液不加 IPTG 作為正對照組 (positive control)，而此時亦需培養一管無 “insert DNA” 只包含表現載體 (pET30a 和 pACYCDuet-1) 轉形進 *E. coli* 的菌液，此菌液同樣加入 0.5 mM 的 IPTG。同時另外培養無轉殖載體的野生型 (wild type) *E. coli* 於 LB 培養基，以上兩者作為負對照組 (negative control) 之用。上述 OD_{600} 皆達 0.6 之菌液繼續培養 4 小時。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，使菌體沈澱下來，移除上清液。菌塊加入 200~500 μl 的 bacterial lysis buffer (視菌塊大小決定適量 buffer)，快速震盪再懸浮菌塊。待溶液澄清後，取 15 μl bacterial lysate 加入 5 μl 4 \times SDS gel-loading buffer，之後以 15% SDS-PAGE 分析蛋白質表現並以西方墨點法進一步確認。

3-5-2 SDS-PAGE

- SDS-polyacrylamide gel 之製備：
 - a. 4 ml 15 % Resolving-gel solution

材料	體積 (ml)
ddH ₂ O	0.88
30 % Acrylamide mixture	2
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.04
10 % SDS	0.04
TEMED	0.0016
10 % APS	0.04

- b. 3 ml 5 % Stacking-gel solution

材料	體積 (ml)
ddH ₂ O	2.1
30 % Acrylamide mix	0.5
1 M Tris (pH 6.8)	0.38
10 % SDS	0.03
TEMED	0.003
10 % APS	0.03

表 9. SDS-polyacrylamide gel 之藥品配方：a. 15 % resolving-gel solution；b. 5 % stacking-gel solution

此 SDS-PAGE 實驗使用 BIO-RAD 迷你垂直電泳槽系統。首先將兩玻璃片依造操作手冊組裝起來，注入 3.5 ml 的 resolving-gel solution 於玻璃間的溝槽，再以 300 μ l 的異丙醇覆蓋其上使之水平凝固，靜置 30 分鐘待其凝結完全。倒去覆蓋的異丙醇並側立等待其完全蒸發。注入適當體積的 stacking-gel solution 於凝結完全的 resolving gel 上，立即將 Teflon comb 斜插入 stacking-gel solution，小心避免產生氣泡。靜置 5~10 分鐘，待其凝結後小心移開 comb，然後立即以二次水清洗以去除殘留未凝結的丙烯醯胺 (acrylamide)。

- 樣品之電泳：

將凝結完全的 SDS-polyacrylamide gel 連同玻璃架設於電泳槽上，小心倒入 Tris-glycine electrophoresis buffer，並去除藏匿於 gel 下方的氣泡。將樣品與 4 \times SDS gel-loading buffer 混合後，以 96 $^{\circ}$ C 沸水中 15 分鐘確保蛋白質完全變性。之後立即插入冰上，靜置 30 秒後，將殘留於管壁上的樣品短暫離心下來，之後將樣品注入膠體孔洞中。以 90 伏特進行蛋白質電泳，當 bromophenol blue 到達 resolving gel 的底部時，關上電源供應器並小心將丙烯醯胺膠自玻璃片中取下。

- 以 Coomassie brilliant Blue 染色：

小心切下 stacking gel，並將 resolving gel 浸泡於 Coomassie Blue 染色液中 30 分鐘，之後回收染色液，並將丙烯醯胺膠以二次水清洗 2 次。然後將丙烯醯胺膠浸泡於 destain solution I，並置放於緩慢擺動的水平迴轉式震盪器 30 分鐘。倒去 destain solution I，再將丙烯醯胺膠浸泡於 destain solution II，並置放於緩慢擺動的水平迴轉式震盪器至隔夜，直到完全去除背景。待退染完成後，將丙烯醯胺膠浸泡於二次水中，之後以玻璃紙密封起來長期儲存。

3-5-3 西方墨點法

- 蛋白質轉漬 (protein transfer) :

剪下一塊與膠體相同大小的 polyvinylidene difluoride (PVDF) 轉漬膜。將剪下的轉漬膜以甲醇潤溼 3 秒，然後浸泡於二次水 1 分鐘，最後置放於 transfer buffer 中。將 2 片 Whatman 3MM paper 及多孔性襯墊 (Porous pad) 浸泡於 transfer buffer 中。當 SDS-PAGE 完成後，將 resolving gel 以二次水清洗，然後同樣浸泡於 transfer buffer 中。之後按照圖 11 將 transfer cassette 組合起來 (本實驗使用 BIO-RAD 濕式電泳膠轉漬器)，組合期間需不時以 transfer buffer 潤溼並避免氣泡產生，注意不可讓 PVDF 轉漬膜乾掉。組合好 cassette 連同冰寶一起放入 transfer apparatus 中並注滿 transfer buffer，打開電源供應器，在 4 °C 中以 400 mA 電流轉漬 1 小時。最後關掉電源供應器並取出 transfer cassette，取出其中的 PVDF 轉漬膜，進行接下來之 blocking。

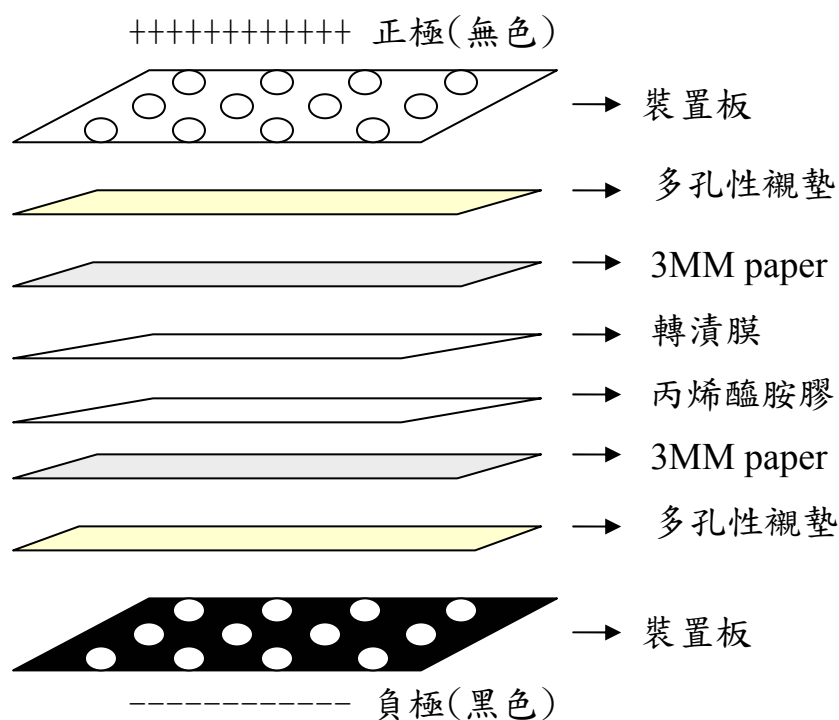


圖 11. Transfer cassette

- 墨點 (blotting) :

取下轉漬膜浸泡於二次水中 1 分鐘，之後浸泡於 PBS buffer。接著浸泡轉漬膜於 blocking buffer 中，並置放於緩慢運轉的迴轉式震盪器上 1 小時。倒去 blocking buffer 後以 PBST buffer 清洗，置放於快速搖晃 (約 150~200 rpm) 的迴轉式震盪器 5 分鐘，以洗去未吸附殘留的 blocking buffer，重複清洗 2 次。之後將轉漬膜浸泡於含有 3 μ l 一級抗體 (anti-FSH 和 anti-His antibody) 的 15 ml PBS buffer (稀釋 5000 倍)，置放於緩慢運轉的迴轉式震盪器 1 小時，以讓抗體得以吸附於目標蛋白質上。之後以 PBST buffer 清洗掉未吸附殘留的抗體，置放於快速運轉的迴轉式震盪器 5 分鐘，重複清洗 2 次。接著浸泡轉漬膜於含有 3 μ l 連結 HRP 之二級抗體 (Goat anti-rabbit IgG 和 Goat anti-mouse IgG) 的 15 ml PBS buffer，置放於緩慢運轉的迴轉式震盪器 1 小時。最後同樣以 PBST buffer 清洗掉未吸附殘留的二級抗體，置放於快速運轉的迴轉式震盪器 5 分鐘，重複清洗 2 次。清洗完成之後利用 ECL 冷光呈現西方墨點法之結果。

- ECL 免疫偵測 (immunodetection) :

整個壓片過程皆於暗房中避光操作。首先將等體積 (1:1) 的 Western lightingTM “Enhanced luminal reagent” 和 “Oxidizing reagent” (PerkinElmer Life Sciences, Inc.) 混合均勻，並將轉漬膜浸泡於 ECL 混合液中，反應 1 分鐘。快速取出轉漬膜並用兩張透明投影片夾住，一併置入 HypercassetteTM 中，其上覆蓋一張裁切好適當大小的 HyperfilmTM 底片，蓋上卡匣數秒至數分鐘 (根據冷光強度決定壓片時間)。取出感光後之 X-ray 底片浸泡於 “GBX developer and replenisher” 溶液中顯色，待黑色暗帶浮現之後用清水來回清洗數次

並移入 “GBX fixer and replenisher” 溶液中，直到完全定影，再以清水清洗並晾乾底片。

3-5-4 決定去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之溶解性 (soluble form 或 inclusion body)

如同前面所提之蛋白質小量表現，當菌液 OD₆₀₀ 達 0.6 之後加入 0.5 mM IPTG 誘導培養 4 小時。在 4 °C 下，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，使菌體沈澱下來，移除上清液。菌塊加入 300 μ l 的 bacterial lysis buffer，置於冰上之後利用超音波細胞震碎機打破菌塊。待 bacterial lysate 澄清之後再以 13,000 rpm 離心 10 分鐘，分別收集離心完之沈澱物和上清液，而沈澱部分另外再加 300 μ l 的 bacterial lysis buffer 復溶，最後各取 15 μ l 的樣本以 SDS-PAGE 和西方墨點法分析之。

3-5-5 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之大量表現 (large-scale expression)

從 *hFSHA*-pET30a [NovaBlue (DE3)] 培養皿中挑選單一菌落接種於 5 ml LB/Kanamycin 培養基中以 37 °C、200 rpm 隔夜培養，之後倒入 500 ml LB/Kanamycin 培養基繼續培養至 OD₆₀₀ =0.6；另外從 *hFSHB*-pACYCDuet-1 [BL21 (DE3)] 培養皿中挑選單一菌落接種於 10 ml LB/Chloramphenicol 培養基中 37 °C、200 rpm 隔夜培養，之後倒入 500 ml LB/Chloramphenicol 培養基繼續培養至 OD₆₀₀ =0.6。之後兩者皆添加 0.5 mM IPTG 繼續培養誘導 4 小時，之後以 4 °C、7000 rpm 離心 20 分鐘，除去上清液，冰至 -80 °C 隔夜凍解。

3-5-6 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之純化 [51]

- 6× His-tag 蛋白質純化：

取出冷凍之 α - 和 β -次單元體菌塊分別加入 Lysis buffer B (LB 培養基：buffer B 體積比=100:1)，室溫攪拌 1 小時。反應完之 bacterial lysate 置於冰上再以超音波細胞震碎機作用 30 分鐘，打 2 秒休息 1 秒以確保菌體完全破碎。之後以 4 °C、7000 rpm 離心 30 分鐘後收集上清液並用 0.45 μ m filter 過濾之。取 3 ml 50 % Ni-NTA slurry 加入過濾完之上清液，置於轉速 200 rpm 的迴轉式震盪器 1 小時，使之得以完全吸附目標蛋白質。將 lysate-resin 混合物小心注入空管柱，靜置數分鐘直到樹脂完全沈澱。移開下方蓋並開始收集 flow-through，取 15 μ l flow-through 加入 5 μ l 4× SDS gel-loading buffer 並儲存於 -20 °C。然後以 6 ml Wash buffer C 清洗並收集之。取 15 μ l 的 buffer C 收集液加入 5 μ l 4× SDS gel-loading buffer 並儲存於 -20 °C。最後將重組之次單元體以 1.5 ml elution buffer D 和 E 分別沖提 6 次並收集之，保存於 -20 °C。以 Ni-NTA 管柱純化完成之後便接著利用 SDS-PAGE 和西方墨點法加以確認之。

- Ni-NTA 樹脂之保存：

沖提結束之 Ni-NTA 管柱需馬上加以清洗以便重複使用。首先以 10 倍體積的 0.2 M 醋酸清洗 1 次。再以 10 倍體積的 30 % 甘油清洗 1 次。最後以 10 倍體積的二次水清洗 1 次。將樹脂保存於 30 % 乙醇中，並長期存放在 4 °C。

- Ni-NTA 樹脂之再恢復：

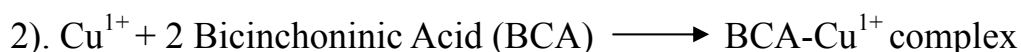
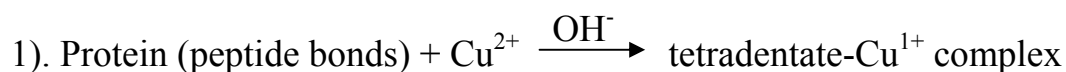
進行蛋白質純化之前，首先得進行樹脂之再恢復。Ni-NTA 樹脂按照以下溶液和順序陸續清洗。

1. 以 2 倍體積的 regeneration buffer 清洗 1 次。
2. 以 5 倍體積的二次水清洗 1 次。
3. 以 3 倍體積的 2 % SDS 清洗 1 次。
4. 以 1 倍體積的 25 % 乙醇清洗 1 次。
5. 以 1 倍體積的 50 % 乙醇清洗 1 次。
6. 以 1 倍體積的 75 % 乙醇清洗 1 次。
7. 以 1 倍體積的 100 % 乙醇清洗 1 次。
8. 以 1 倍體積的 75 % 乙醇清洗 1 次。
9. 以 1 倍體積的 50 % 乙醇清洗 1 次。
10. 以 1 倍體積的 25 % 乙醇清洗 1 次。
11. 以 1 倍體積的二次水清洗 1 次。
12. 以 5 倍體積的 100 mM EDTA (pH 8.0) 清洗 1 次。
13. 以 10 倍體積的二次水清洗 2 次。
14. 以 2 倍體積的 100 mM 硫酸鎳。
15. 以 2 倍體積的二次水清洗 1 次。
16. 以 2 倍體積的 regeneration buffer 清洗 1 次。
17. 加入 2 倍體積的 Lysis buffer B 使之平衡。

3-5-7 蛋白質濃度之測定

本實驗利用 BCA Protein Assay Kit (PIERCE 公司) 進行蛋白質濃度測定。此方法係根據 1985 年 Smith, P. K. 等人利用 bicinchoninic acid 發展之一套蛋白質測定方式，其原理如下之反應方程式所示，最後得到 BCA-Cu¹⁺ complex 紫色產物，測波長 562 nm 之吸光值分析之。首先取 25 μ l 濃度分別為 0.025、0.125、0.25、0.5、0.75、1.0、1.5 mg/ml 的標準品 BSA 和 25 μ l 的待測樣本，加入總體積 200 μ l 的 BCA Reagent

A 和 BCA Reagent B (以 50:1 比例混合均勻) ，經由標準品 BSA 測量結果可得一標準曲線公式：X 軸代表在波長 562 nm 時所測得的吸光值，Y 軸代表 BSA 蛋白質濃度 (mg/ml) 。最後根據待測物測得之吸光值便可反推出樣品濃度 (mg/ml) 。



3-6 去醣基 hFSH 變異體 (variant) 之再組成

3-6-1 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之再折疊 (refolding)

根據 SDS-PAGE 之結果選擇高純度和高濃度之沖提部分混合之後進行透析。首先將沖提出之蛋白質溶液置於 10 倍體積的 100 mM NaH_2PO_4 、10 mM Tris-Cl 和 7 M 尿素溶液當中 4 °C 透析 12 小時，之後置換到 10 倍體積的 100 mM NaH_2PO_4 、10 mM Tris-Cl 和 6 M 尿素溶液當中 4 °C 透析 12 小時，之後以此類推直到置於 10 倍體積的 100 mM NaH_2PO_4 、10 mM Tris-Cl 和 0 M 尿素溶液當中 4 °C 透析 12 小時，最後置於 10 倍體積的 50 mM Tris-HCl (pH 8.7) 和 1 mM EDTA 之溶液當中透析 12 小時，完成之後取出蛋白質溶液加以定量。

3-6-2 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之雙體化 (dimerization) [50]

取相同重量 (mg) 之 α - 和 β -次單元體溶液混合之後，額外加入 6.4 mM cysteamine 和 3.6 mM cystamine，於室溫反應 4 小時之後停止並以 non-reducing SDS-PAGE 和 reducing SDS-PAGE 分析其間之差異並利用西方墨點法確認。

3-6-3 去醣基 hFSH 變異體之純化

因雙聚體化之 hFSH 變異體溶液中尚夾雜著未反應之 α - 和 β -單體，故需進一步加以純化以得到所期望之去醣基 hFSH 變異體。而本實驗利用 Amersham Ltd. 之 SP-Sepharose 4 Fast Flow 陽離子交換層析法 (ion exchange chromatography) 進行 hFSH 變異體之純化。首先將合成樹脂置於三腳錐瓶內去除氣體 (degas) 1 小時，之後將樹脂小心移至空管柱中，過程中避免產生氣泡。以 5 倍體積的 Equilibrium buffer 平衡管柱，之後加入反應完之去醣基 hFSH α 、 β -單體混合液再以 10 倍體積之 Equilibrium buffer 加以清洗，最後以不同濃度之醋酸鈉 (0.9~2M) 沖提出來。

3-7 生物活性測試

3-7-1 細胞培養

- SKOV-3 之培養與繼代：

SKOV-3 平時以 90 % DMEM 加上 10 % 胎牛血清培養於 5 % CO_2 、37 °C 細胞培養箱中。待細胞長至單層八~九分滿後便移除舊的培養基，以 PBS 沖洗兩次，加入 1 ml Trypsin/EDTA 於 37 °C 之後迅速移除多餘 Trypsin，作用 1 分鐘使原本貼附的細胞懸浮。加入適量之 90 % DMEM 和 10 % 胎牛血清再以 10 ml 拋棄式吸管 (disposable pipet) 吸放近十次，將聚集的細胞團打散成單一細胞，以 1:2~1:4 比例將細胞分盤繼代培養。

- 細胞凍管保存：

將細胞培養在 10 cm 細胞培養皿至八~九分滿後，吸淨舊的培養基，並以 PBS 沖洗兩次，加入 1 ml Trypsin/EDTA 於 37 °C 之後迅速



移除多餘 Trypsin，作用 1 分鐘之後加入 PBS 以吸取懸浮出之細胞，於 10,000 rpm 離心 5 分鐘，移去上清液，加入適量 DMEM + 10 % FBS，計算 1×10^6 /ml 所需的培養基體積及 5 % DMSO，將 1 ml 的細胞液 (1×10^6 /ml) 分裝於冷凍小管中，置於 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 半小時，移置 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 隔夜冷凍，之後長期儲存於液態氮中。

- **細胞解凍**

將細胞自液態氮桶取出，馬上置於 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴快速溶解以避免冰晶形成傷害細胞，吸出細胞液加入新鮮的 DMEM + 10 % FBS + 1 % Antibiotics，培養於 $3\text{ }^\circ\text{C}$ 、5 % CO_2 讓細胞貼附於培養皿上，由於 DMSO 尚未移除會影響細胞生長，因此隔日 (約 12 小時) 需再置換新鮮的培養基。約每 2~3 天置換一次培養基，待細胞長至八~九分滿後再繼代培養。一般而言，冷凍細胞解凍後需繼代培養 2~3 代細胞才會恢復原有的特性，此時的細胞才能用來做研究。

3-7-2 人類卵巢癌細胞增生 (human ovarian cancer cell proliferation) 之影響

由前述的文獻已得知，hFSH 能刺激卵巢癌細胞 (ovarian cancer cell) 的增生 (proliferation)，因此在細胞培養液中分別添加不同濃度之“野生型 hFSH”、“去醣基 hFSH 變異體”和“兩者混合液”，以觀測經 hFSH 處理後之卵巢癌細胞增生的影響。

- **MTT cell proliferation assay**

將 2×10^4 cell 種於 6-well 培養皿，以 2 ml 的 DMEM + 10 % FBS + 1 % Antibiotics 培養 16 小時，以確保細胞處於靜止狀態，之後將培養基置換成 DMEM only 讓細胞處於飢餓狀態，使用 DMEM 的目的在

於避免血清中的生長因子干擾實驗結果。待 24 小時後將 DMEM 置換成 DMEM + 0.5 % FBS 並加入不同濃度的野生型 hFSH、去醣基 hFSH 和兩者之混合液，而負向控制組 (negative control) 為 DMEM + 0.5 % FBS，正向控制組 (positive control) 為 DMEM + 20 % FBS) 於 37 °C、5 % CO₂ 下培養 24 小時，之後移除培養基加入 800 µl MTT solution 於 37 °C、5 % CO₂ 下培養 4 小時，移除 MTT solution 後加入 800 µl DMSO 於 37 °C 培養 10 分鐘，轉移至 96-well ELISA 分析盤，最後測 540 nm 吸光值。

- **MTT standard curve**

分別種不同數目的細胞於 24-well 細胞培養皿，以 500 µl 的 DMEM only 培養基培養 3 小時，移除培養基之後加入 200 µl MTT solution，於 37 °C、5 % CO₂ 下培養 4 小時，之後移除 MTT solution 再加入 200 µl DMSO 於 37 °C 下培養 10 分鐘，轉移至 96-well ELISA 分析盤，測 540 nm 吸光值，所得到的標準曲線公式：X 軸代表在波長 540 nm 時所測得之吸光值，Y 軸代表細胞數。

3-7-3 人類卵巢癌細胞之受體鍵結親和力 (receptor-binding affinity) 分析

將 1×10^4 cell 種於 24 well 培養皿，以 0.5 ml 的 DMEM + 10 % FBS + 1 % Antibiotics 培養 3 小時，待細胞平貼於培養皿。每個 well 加入 2 ml 內含 5 % FBS 的 PBS 加以清洗三次並拍乾。之後每個 well 加入 0.4 ml 內含 5 % FBS 的 PBS，且分別添加 10 ng/ml 的野生型 hFSH、NG-hFSH、hFSH α 、hFSH β 和 hFSH α + hFSH β 混合液。另外正向對照組為 0.4 ml 內含 5 % FBS 的 PBS 並添加 10 ng/ml 的野生型 hFSH (此 well 無貼附細胞)。室溫培養 1 小時。同樣以 2 ml 內含 5 % FBS

的 PBS 加以清洗三次並拍乾。每個 well 加入 0.4 ml 內含 0.27 % Triton X-100 的 PBS 室溫培養 1 小時，其目的在於將細胞膜打洞以利於 FSH 一級抗體進入細胞內與吞噬入細胞的 FSH 鍵結。同樣以 2 ml 內含 5 % FBS 的 PBS 加以清洗三次並拍乾。每個 well 加入 0.4 ml blocking buffer (5 % skim milk in PBS) ，室溫培養 1 小時。以 2 ml PBS 加以清洗三次並拍乾。每個 well 加入 0.4 ml 的 anti-FSH antibody ，室溫培養 1 小時。以 2 ml PBS 加以清洗三次並拍乾。每個 well 加入 0.4 ml 的 anti-rabbit antibody ，室溫培養 1 小時。以 2 ml PBS 加以清洗三次並拍乾。每個 well 加入 0.2 ml TMB liquid 和 0.2 ml H₂O₂ 混合均勻，室溫置於暗處 30 分鐘以上，之後加入 0.2 ml 2 M H₂SO₄ 終止反應，並轉移至 96 孔盤後以 ELISA reader 測波長 450 之吸光值。



第四章 結果與討論

4-1 放大 *hFSHA* 和 *hFSHB*

我們欲表現去醣基 hFSH 的首要工作便是放大 *hFSHA* 和 *hFSHB* 此兩段基因，因此本論文利用聚合酶連鎖反應 (PCR) 作為選殖並放大此兩段 cDNA 作為整個架構之啟始。Commercial “human Pituitary Gland Marathon-Ready cDNA” 作為選殖 hFSH 次單元體基因的模版，至於引子設計則以核苷酸資料庫搜尋出 hFSH α - 和 β -次單元體之 cDNA 序列原始文獻 [12-14]，參照其詳細 cDNA 序列當中的成熟胜肽 (mature peptide) 部分之 N'端設計出 PCR 引子，之後此兩對寡核苷酸引子交付廠商進行合成。

當所需材料混合均勻之後便可進行聚合反應。PCR 之反應程式首先以 95 °C、4 分鐘進行一個週期，其目的是確保雙股 DNA 完全變性分離成單股 DNA。之後根據引子之 T_m 值選取適當之緩冷黏合溫度 (annealing temperature) 並進行 1 分鐘共 30 個週期之反應，其目的為使引子黏合到單股 DNA 之正確位置以進行後續之聚合作用，本實驗經由反覆測試則以 59 °C 達到最佳結果。接著便以 72 °C 進行聚合反應，其作用是使 DNA 聚合酶根據單股模版複製放大出所期望之 *hFSHA* 和 *hFSHB* 兩段 cDNA。

實驗五次以上之放大之後的 *hFSHA* 和 *hFSHB* 經由 0.8 %瓊脂洋菜膠體電泳之染色結果如圖 12 所示。此結果可以清楚觀察到放大之後的 DNA 片段存在稍低於 500 bp 的位置，而根據設計之引子所預測的 *hFSHA* 和 *hFSHB* 大小各分別為 316 bp 和 375 bp，雖然電泳之結果顯示比預測之 cDNA 大小稍大了約 100 bp，因此猜測有兩因素影響此結果：一、DNA 迷你膠電泳槽之電壓不穩，導致電泳膠兩端和中央

之電流速度不一致。二、因片段大小不到 400 bp 的 *hFSHA* 和 *hFSHB* 在進行電泳接近至洋菜膠末端時，與 DNA ladder 標準品比較之後預估的位置有如此稍許差異存在是可以接受之範圍。之後反覆電泳驗證及接續之實驗皆能證明放大的 DNA 片段確實為所期望之 *hFSHA* 和 *hFSHB* 兩基因。

另外圖 12-A 和 12-B 比較可以觀察到 *hFSHA* 之亮度比 *hFSHB* 明顯低了許多，意即 *hFSHA* 放大之後的濃度比 *hFSHB* 低，這牽涉到最佳黏合溫度的選擇。經反覆實驗十次之結果 (55~64 °C)，發現選擇 59 °C 對於 *hFSHB* 之引子來說為最適宜溫度，但對於 *hFSHA* 之引子卻不是如此適宜，因此 PCR 結果顯示出如此差異。雖然 59 °C 之黏合溫度對於放大 *hFSHA* 不是如此適宜，但考量到兩段基因同時進行 PCR 需設定相同反應程式且 *hFSHA* 基因 PCR 後的濃度尚夠用於後續的實驗，因此如此之結果可為我們所接受。

4-2 yT&A 選殖載體之構築

放大之後的 *hFSHA* 和 *hFSHB* 因聚合酶之作用可在 3'端多加一個腺嘌呤 (Adenine)，因此可方便地將此兩段 cDNA 分別構築到 3'端多一獨立胸腺嘧啶 (Thymidine) 的 yT&A 選殖載體中。我們利用此特性可簡單地將 “insert DNA” 嵌入選殖載體中，之後以大腸桿菌 DH5 α 之轉形殖入菌體內，如此大腸桿菌 DH5 α 分別大量複製的 *hFSHA* 和 *hFSHB*，並可作為長久保存。

之後經由質體 DNA 之微量製備 (miniprep) 以二次水沖提出 *hFSHA*-yT&A 和 *hFSHB*-yT&A 兩段質體，接著以限制酶切割作為確認是否順利構築。根據圖 13 之切割產物電泳之結果顯示確實順利將 *hFSHA* (316 bp) 和 *hFSHB* (375 bp) 兩段基因構築於 yT&A 選殖載體

中，這也意味著我們已成功利用所設計之引子選殖到 hFSH α -和 β -次單元體之 cDNA。後續實驗便是進一步轉殖到表現載體中，藉由大腸桿菌系統表現去醣基之 hFSH 兩次單元體。

4-3 pET30a 和 pACYCDuet-1 表現載體之構築

首先 *hFSHA*-yT&A 和 pET30a 兩質體皆以 *BamH I* 限制酶進行切割；而 *hFSHB*-yT&A 和 pACYCDuet-1 兩質體則以 *Hind III* 限制酶進行切割反應。選用此兩不同之表現載體有利於往後可同時將此兩質體轉形到同一株大腸桿菌宿主中，此兩載體之基因型分別屬於不同來源，因此在同一桿菌體內並不會隨著宿主數代繁衍而剔除其中的一個載體，但本實驗後來因兩者表現宿主之表現量有所差異而未同時轉形進同一宿主中。待同時表現出來之後經由 T4 DNA ligase 進行接合反應，其產物再轉形至大腸桿菌體內。本論文一開始選擇大腸桿菌 NovaBlue (DE3) 作為 *hFSHA*-pET30a 和 *hFSHB*-pACYCDuet-1 兩質體之表現宿主，亦考慮將此兩段質體同時轉形至同一株 NovaBlue (DE3) 菌體內。此時轉形後之 NovaBlue (DE3) 先進行質體 DNA 微量製備，並分別利用 *BamH I* 和 *Hind III* 限制酶切割確認，其分別之電泳結果如圖 14 所示。

因本論文利用 *BamH I* 作為 *hFSHA* 與 pET30a 表現載體兩端之接合點，因此以 *BamH I* 截切反應作為再確認之用，期望截切完之產物可呈現出 *hFSHA* 與 pET30a 兩段 DNA。同理，我們利用 *Hind III* 作為 *hFSHB* 與 pACYCDuet-1 表現載體兩端之接合點，所以也以 *Hind III* 進行再確認工作。而至於 *hFSHA* 和 *hFSHB* 兩段基因如何構築於表現載體之相關示意圖可參照第三章 3-1 之實驗流程。

圖 14-A 為 *BamH I* 切割 *hFSHA*-pET30a 之產物電泳結果，我們

可清楚觀察到 5422 bp 的 pET30a 表現載體和 316 bp *hFSHA* 的存在。另外以 *EcoRV* 切割 *hFSHA*-pET30a 之結果如圖 14-B 所示，因整個構築好之 *hFSHA*-pET30a 質體其間只有一個 *EcoRV* 切割位 (cutting site)，故我們利用此酵素可將質體切割成線性 DNA，目的為驗證整個質體的大小是否符合兩段 DNA 相加的 5738 bp，而圖 14-B 電泳結果確實如此。

同理可證，在圖 14-C 可觀察到經 *HindIII* 切割 *hFSHB*-pACYCDuet-1 質體產物存在著預期的 4008 bp pACYCDuet-1 和 375 bp *hFSHB* 兩 DNA 片段，而圖 14-D 則以 *BamHI* 切割證明了 4383 bp *hFSHB*-pACYCDuet-1 質體的存在。整合圖 14 四張電泳圖便可明確指出各轉形後之菌體內抽出的質體經由各限制酶切割的產物與預期結果確實相當吻合，到此我們已成功地將 *hFSH* α -和 β -次單元體之 cDNA 轉殖到大腸桿菌表現系統當中，接著便是進行蛋白質表現與純化。另一方面為確保選殖到的 cDNA 序列正確無誤，故將選殖到的菌株交付廠商進行 DNA 定序作為再次確認之用。

本論文將廠商定序完成之序列與我們所預測接合完成的 *hFSHA*-pET30a 序列利用 European Bioinformatics Institute 線上之 Clustal W 軟體進行關係比對 [52]，圖 15 為 *hFSHA*-pET30a 之 DNA 定序與預期序列之比對結果，而圖 16 為 *hFSHB*-pACYCDuet-1 之 DNA 定序與預期序列之比對結果。我們分析比對結果可發現圖 15 在 stop codon 以前之序列兩者毫無誤差，此數據即表示 DNA 定序結果 100% 符合預期之 *hFSHA*-pET30a 序列。此外，圖 16 於預期之 *hFSHB*-pACYCDuet-1 序列第 108 個核苷酸 C 突變成 A，其對應之胺基酸密碼子從 ACC 變成 ACA，但經由胺基酸對照之結果發現 ACC 和 ACA 同樣轉譯成 Threonine (Thr)，所以此核苷酸點突變不影響往後表現出來的蛋白質結構，經由計算得知圖 16 的數據顯示了 DNA

定序結果有 99.73 % 符合預期之 *hFSHB*-pACYCDuet-1 序列。圖 15 和 16 之結果得知轉殖到大腸桿菌表現系統當中的質體胺基酸序列 100 % 符合預期結果，因此可證明確實為 *hFSHA*-pET30a 和 *hFSHB*-pACYCDuet-1。

值得注意的是 *hFSHA*-pET30a 和 *hFSHB*-pACYCDuet-1 當中的 6x His • Tag 序列和次單元體序列之間接合了一胺基酸片段，其為一蛋白酶切位 (thrombin cutting site) 和 S • Tag 序列，可提供另一純化方式且待其蛋白質表現出來之後可利用蛋白酶將前端純化用之多胜肽切除以更符合生物體之狀態。

4-4 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之表現

為了觀察是否確實表現出 hFSH α - 和 β -次單元體之存在，先以大腸桿菌小量表現此兩次單元體。所謂小量表現蛋白質之含意為培養 3 ml 之菌液加以 IPTG 誘導之，本論文在去醣基 hFSH α -次單元體方面先以濃度 0.5 mM 的 IPTG 處理 NovaBlue (DE3) 進行測試，於 37 °C、200 rpm 下培養 4 小時觀察之。之後將菌體分解打破後分為兩部分：水溶性之上清液和包涵體 (inclusion body) 之沈澱再懸浮部分，此兩產物再和正、負對照組進行 SDS-PAGE 和西方墨點法鑑定之，圖 17 為 SDS-PAGE 之結果，圖 18 則呈現出西方墨點法呈色反應之後的數據。首先就 PAGE 圖來看，明顯在 Lane 2：以 0.5 mM 的 IPTG 處理 4 小時之後的破碎菌體全產物和 Lane 3：以 0.5 mM 的 IPTG 處理 4 小時之後的破碎菌體包涵體部分之中觀察到去醣基 hFSH α -次單元體的蛋白質帶存在於約 20 kDa 之位置，至於未加以 IPTG 誘導處理的 Lane 1 和誘導 4 小時的破碎菌體上清液之 Lane 4 也在同樣位置存在著微量之蛋白質。此外負對照組方面，大腸桿菌 NovaBlue (DE3) 本身 (Lane 6) 和只轉殖 pET30a 而不會表現出 hFSH α -次單元體的

NovaBlue (DE3) (Lane 5) 兩菌株則為有約 20 kDa 位置的蛋白質存在著，根據以上各結果都說明了 SDS-PAGE 可看出 α -次單元體的表現情形。圖 18 之西方墨點法結果則提供直接之證據，無論利用抗 6x His 之一級抗體或者抗 FSH 之一級抗體皆顯示著與 SDS-PAGE 同樣之結果，從圖 18 可知抗體已辨識到所期望之目標蛋白質：hFSH α -次單元體。

而 hFSH β -次單元體方面則以濃度 0.5 mM 的 IPTG 處理 NovaBlue (DE3) 進行測試，於 37 °C、200 rpm 下培養 4 小時之後卻無法於 SDS-PAGE 觀察到明顯之蛋白質帶，故 β -次單元體後來多測試了 1.0 mM IPTG 的條件，亦無法觀察到，圖 19 指出了以上之結果，這表示 NovaBlue (DE3) 菌株表現出來 β -次單元體含量的甚為微弱，故將 *hFSHB-pACYCDuet-1* 額外轉殖至其他三種表現型大腸桿菌宿主：BL21 (DE3)、BL21 *trxB* (DE3) 和 Origami (DE3)，試圖尋找出 β -次單元體之最佳表現量。可惜的是如圖 20-22 所示其 SDS-PAGE 結果皆與圖 19 相同無法明確觀察到明顯蛋白質帶，為了證明 β -次單元體確實被大腸桿菌所表現則進一步以西方墨點法鑑定之。利用抗 6x His 作為一級抗體的西方墨點法結果呈現於圖 23，根據此數據正符合了我們假設的 β -次單元體之微量存在，且其位於 18 kDa 左右之位置。

根據小量表現測試的結果，實驗進行到此已證明了兩點事實：第一點是 hFSH α -次單元體可被 NovaBlue (DE3) 表現甚多，最佳表現條件為 0.5 mM 的 IPTG 以 37 °C 誘導 4 小時，又因為 hFSH α -次單元體迅速大量累積在系菌體內導致形成包涵體，故往後 hFSH α -次單元體的大量表現之後序處理將以高濃度的變性劑-8 M 尿素溶解包涵體，得到菌體內全部變性 (denature) 之 α -次單元體後再折疊 (refolding) 恢復之。第二點為 hFSH β -次單元體也可被細菌表現出

來，但其表現量甚微，此問題關係到如此微量的表現是否能夠支持後續的實驗進行。不過根據反覆實驗測試的結果，往後我們選擇以 0.5 mM 的 IPTG 37 °C 誘導 BL21 (DE3) 4 小時之條件，以求跟 α -次單元體處於相同表現環境，但 LB 培養液則提高為 α -次單元體的兩倍 (1000ml)，如此期望獲得更高量的 β -次單元體蛋白質。

有趣的是在之前的研究中表現人類濾泡刺激素 β -次單元體幾乎皆選擇以動物細胞表現系統進行，而利用大腸桿菌表現人類濾泡刺激素 β -次單元體目前尚無文獻報導，此原因我們推測為因為大腸桿菌表現系統會導致去醣基化和低表現量，如此重組之蛋白質不符合哺乳動物體內之生理狀態，但因為本論文的研究目標即為探討修飾過之去醣基 β -次單元體對於卵巢癌細胞之影響，故還是設法以大腸桿菌重組方式研究之。目前我們遇到低表現量的問題已有文獻指出此問題之所在，Samaddar 等人從事牛的 FSH 研究發現 FSH β -次單元體的 mRNA 5'端會形成“Stem-loop”結構因而嚴重影響到大腸桿菌核糖體之轉譯工作，也因此才会有如此低微的表現量 [53]。而 QIAGEN 公司 QIAexpression System 提供的實驗手冊也提到在某些例子的 cDNA 序列 5'端確實會形成“Stem-loop”而干擾到轉譯過程，建議之改善方式為如果必要的話需重新修飾過 DNA 序列或者修飾培養基、誘導條件或改用不同的大腸桿菌表現宿主。但經由圖 19-22 顯示即使改以其他宿主亦無法獲得較高量的蛋白質，在考慮到不重新修改 β -次單元體 cDNA 序列的前提下，最後決定提高培養液到 1000 ml 以試圖提升整體表現量。

4-5 去醣基 hFSH α - 和 β -次單元體之純化

α 、 β 兩個次單元體分別利用 Ni-NTA 方式純化，其純化後進行

SDS-PAGE 結果如圖 24 和圖 25。可明顯觀察到圖 24 之 Lane 10~12 存在著高濃度、純度的蛋白質，意即 α -次單元體可在 Elution buffer E 的第 2~4 管大量沖提出來，所以我們選擇此三管進行透析以除去蛋白質溶液裡高濃度 (8M) 的尿素。同理，圖 25 顯示 β -次單元體之純化結果較不如 α 部分來的理想，各收集管裡至少夾雜著一個其他的蛋白質帶，但相對比較的結果最後選擇 Elution buffer E 的第 2 和第 3 管進行透析 (也就是圖 25 之 Lane 10 和 Lane 11 部分)，此兩部分相對於其他幾管來說較為單純，只額外多出一個雜蛋白質帶，但為確保實驗之正確性，再一次純化得到單一個蛋白質。至於蛋白質大小位置部分，*hFSHA* 加上 pET30a 之 6x His 部分總共為 447 個寡核苷酸，也就是 149 個胺基酸，以每個胺基酸 110 個 Da 大小加以計算的結果去醣基 FSH α -次單元體應為 16 kDa，但 SDS-PAGE 純化圖卻約處於 19 kDa，與期望值有所差異。 β -次單元體部分，*hFSHB* 加上 pACYCDuet-1 之 6x His 共有 423 個寡核苷酸，每 3 個一組則為 141 個胺基酸，所以去醣基 FSH β -次單元體應為 15 kDa，但 SDS-PAGE 純化圖顯示約位於 17 kDa 位置。重組出來的 α 、 β -次單元體皆比期望值大了 2~3 kDa，為何造成蛋白質位移之可能原因或許為大腸桿菌表現系統對此兩個外來基因的蛋白質有所修飾作用，或者構形尚未被完全變性伸展為直線型蛋白質，其立體結構導致了蛋白質電泳速率的不一致性，因此相差了 2~3 kDa 大小是可被接受的。

為了確認純化出來的蛋白質是否真為我們期望的 α 、 β -次單元體，再一次以西方墨點法鑑定之，其結果可參照圖 26 和圖 27，從圖中可以很單純的看出只有單一個位置被呈色出來，對照 SDS-PAGE 圖的結果的確互相吻合，所以在這裡我們可以相信的確純化到專一性的蛋白質，也就是去醣基 hFSH α 、 β -次單元體。

4-6 去醣基 hFSH 變異體之再折疊

為了溶解包涵體取得目標蛋白質，一般使用高濃度的變性劑，如 6~8 M 尿素或 6 M GuHCl 等，其通過離子間的相互作用，可打斷包涵體蛋白質分子內和分子間各種化學鍵，使肽鏈伸展開來。由於包涵體中的重組蛋白質缺乏生物活性，加上劇烈的處理條件，常使得蛋白質的結構被破壞而變性，因此重組蛋白的再折疊特別必要 [54]。本論文利用透析方式緩慢去除 8 M 尿素使目標蛋白質從變性的伸展狀態恢復到正常的折疊結構，一般來說尿素濃度 4 M 左右時再折疊過程開始，直到 2 M 左右時結束，但參考 Huth 等人以大腸桿菌表現人類絨毛膜性腺激素 β -次單元體 (human chorionic gonadotropin β -subunit, hCG β) 的再折疊與 hCG 雙體化之方式，反應環境處於 0 M 尿素時效率最高 [50]，所以我們透析時則持續進行直到完全去除蛋白質環境中的尿素。

透析結束後取出再折疊完成的蛋白質，此時會有少量粒狀沈澱之蛋白質聚集 (aggregation)，將再折疊錯誤的蛋白質沈澱離心之後便可取得我們所要的 hFSH 兩個次單元體。

4-7 蛋白質濃度之測定

將透析完成的兩個次單元體分別以 BCA Protein Assay Kit 定量，先以波長 562 nm 測不同濃度的 BSA 可得到一線性回歸曲線： $y = 1.0681x - 0.1467$ ，再根據測得之 562 nm 吸光值推算出個別之濃度， α -次單元體之吸光值為 0.311，至於 β -次單元體之吸光為 0.184。推算的結果可知 α -次單元體濃度：0.185 mg/ml，而總體積 13.5 ml 的 α -次單元體透析產物裡包含了約 2.5 mg 的蛋白質，換言之由 500 ml LB 培養液共可獲得約 2.5 mg 的純 α -次單元體。而 β -次單元體濃度：0.049

mg/ml，總體積 10.5 ml 的 β -次單元體透析產物裡約有 0.5 mg 的蛋白質，同理在 1000 ml LB 培養液中約只能純化出 0.5 mg 較純的 β -次單元體，兩者表現率相差了十倍 (α -次單元體： β -次單元體 = 2.5 mg/500 ml：0.5 mg/1000 ml)，此數據可以證明大腸桿菌表現 hFSH β -次單元體之低效率及其困難所在，同時印證了前面所提為何無法單純就四種大腸桿菌宿主之分解產物 PAGE 圖看出明顯的蛋白質帶。因此，如此微量的 β -次單元體造成了兩者雙體化比例調配上之困難。

4-8 去糖基 hFSH 變異體之雙體化

根據定量的結果調整相同體積下兩者濃度相等，使得反應環境中 α 、 β -次單元體的比例為一比一混和。因此取 10.5 ml 的 β -次單元體溶液有著 0.5 mg 的蛋白質，則濃度為 0.185 mg/ml 的 α -次單元體應取 2.7 ml。彼此相混和之後緩衝液中額外加入 cysteamine 和 cystamine 開始雙體化過程。此兩藥劑提供氧化還原交換系統，藉由這兩個藥劑促使不正確形成的雙硫鍵快速交換反應，以提高正確配對的雙硫鍵產率。但此氧化還原交換系統只幫助不正確的次單元體分子內雙硫鍵的改善，對於以非共價鍵結合而成的次單元體之雙體實質上幫助不大，主要之結合還得藉由 α 、 β -次單元體在相同環境下彼此碰撞吸附在一起。圖 28 為雙體化之結果，首先可由圖 28-A 的還原態 (reducing) SDS-PAGE 染色圖 (Lane 1~3) 很單純地看出 α -次單元體 (Lane 1)、 β -次單元體 (Lane 2) 和雙體化的 NG-hFSH (Lane 3) 這三者的還原態。因 NG-hFSH 變異體為非共價鍵結合，故經由高溫還原後將分開成 α -次單元體和 β -次單元體兩部分，但圖 28-A 的 Lane 3 或許因其蛋白質量太少，故只能隱約在 20 kDa 以下的位置看出有兩個蛋白質帶存在，不過西方墨點法進一步鑑定的結果 (圖 28-B, Lane 1~3) 卻很

清楚顯示出此兩個蛋白質帶的存在。

圖 28-A 和 28-B 的 Lane 4 部分為非還原態 (non-reducing) SDS-PAGE 和西方墨點法之結果。雙體化的 NG-hFSH 變異體直接進行非還原態的電泳後，雙體化之非共價鍵使得兩次單元體依舊結合在一起，所以可以在 40 kDa 的位置觀察到確實多一個蛋白質帶。但我們期望的 NG-hFSH 變異體應為 31 kDa 大小 (16 kDa + 15 kDa)，但比照圖中的蛋白質 marker 標準品卻對應在 40 kDa 位置，這是因為本實驗室使用的蛋白質 marker 標準品屬於還原態性質，故與非還原態之蛋白質樣品做對照的話將會存在著位置上的差異性，但市面上所販售的非還原態蛋白質標準品數量稀少、選擇性少且價格不匪，所以實驗室並無額外準備此種標準品。不過根據西方墨點法鑑定之後確實可判定其為雙體完成之去醣基 hFSH 變異體 (圖 28-B, Lane 4)。當雙體化完成後，因整個蛋白質溶液裡混雜著 α -次單元體、 β -次單元體和去醣基 hFSH 雙體，所以得經由 SP-Sepharose 4 Fast Flow 陽離子交換層析法純化去醣基 hFSH 變異體，本實驗測試的結果發現 1.2~1.5 M 的醋酸鈉能將其沖提純化出來，之後便取純化完成的去醣基 hFSH 變異體處理卵巢癌細胞株—SKOV-3。

4-9 對於卵巢癌細胞株增生之影響

本實驗主要在於觀察去醣基的 hFSH 是否改變卵巢癌細胞株的訊息傳遞，因而影響其增生效果。本論文選擇 MTT 細胞增生分析法，加以觀察經“野生型 hFSH”、“去醣基 hFSH 變異體”和“兩者混合液”處理過的細胞增殖之改變，在此選用 SKOV-3 (人類上皮性卵巢癌細胞株) 作為測試模型，其特性為其細胞膜上帶有 hFSH 受體，雖 hFSH 受體之分佈屬於較低量，但經由野生型 hFSH 分析活性之結果

發現 SKOV-3 依然能對於 hFSH 產生訊息傳遞之活性 (圖 30)。

MTT 分析法常用於測定細胞存活率的方法。MTT [3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl)- 2, 5- diphenyltetrazolium bromide] 為一種水溶性、呈現黃色的 terazolium 鹽類。此鹽類若與細胞之粒線體中的去氫酶作用，其鹽類結構中的 terazolium ring 會被切斷，形成紫色非水溶性的 Formazan [1- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl)- 2, 5- dphenyformazan] ，其可被酸性溶液溶解，例如 DMSO。在此我們利用酵素連結免疫吸附分析儀 (enzyme-linked immunosorbent assay reader, ELISA reader) 判讀波長 540 nm 的吸光值，若吸光值愈大，則表示細胞存活率愈高。活細胞粒線體才具活性的去氫酶，故測得的吸光值與細胞存活率成正比，因此藉由 Formazan 產量多寡能評估細胞存活率，間接得知細胞之增生情形。

首先以 MTT 分析法分析不同細胞數之吸光值，可得一細胞增生線性回歸曲線： $y = 4.0615x - 0.8996$ (圖 29) ，之後根據實驗測得之吸光值帶入公式可算出增生後之細胞數。接著測試野生型 hFSH 和去醣基 hFSH 變異體對於 SKOV-3 細胞株之增生活性影響，本實驗正對照組為 10 % FBS，負對照組未添加 FBS，而實驗組為添加濃度分別為 0.625、1.25、2.5、5、10、20 ng/ml 的野生型 hFSH 和去醣基 hFSH 變異體。分析圖 30 的三次實驗平均結果可發現濃度 0.625~20 ng/ml 的野生型 hFSH 確實比未添加 FBS 之負對照組吸光值明顯高出 1.1~1.44，其中濃度為 0.625~5 ng/ml 之吸光值平均 2.15，但比添加 10 % FBS 的正對照組 2.35 還低了 0.2，而只有濃度 10 ng/ml 之吸光值 (2.44) 高出正對照組 38 %，濃度 20 ng/ml 之吸光值 (2.22) 反而比正對照組低 5.5 %。綜合以上的結果可知野生型 hFSH 確實對 SKOV-3 具有增生活性，且以濃度 10 ng/ml 之促進增生能力最強，此

結果也符合前述文獻對於 hFSH 促進卵巢癌細胞增生能力之研究 [45, 46]。

證明野生型 hFSH 具有促 SKOV-3 增生活性後，進一步取表現出來的去醣基 hFSH 變異體進行 MTT 分析，測得之吸光值與野生型 hFSH 加以比較可觀察到明顯之差異性 (圖 30)。由圖 30 來看去醣基 hFSH 變異體測得的吸光值明顯地比野生型低了許多，濃度 0.625~5 ng/ml 之吸光值平均為 1.85，比同樣條件之野生型 hFSH 吸光值低了 0.3。在濃度 10 ng/ml 之吸光值為 1.71，與同條件野生型 hFSH 差異性最大，相差了 0.73，足足降低了 30% 之百分比。

雖然圖 30 確實可以觀察到去醣基 hFSH 變異體對於 SKOV-3 的增生能力比野生型 hFSH 來說低了許多，但是吸光值跟負對照組比較還是高了 0.35，即表示去醣基 hFSH 變異體並非對 SKOV-3 完全無生物活性。

本實驗結果與點突變方式去除 FSH 醣基的文獻加以比較，雖然兩者作為活性測試的動物細胞模型、分析方法和劑量皆不一致，不能直接相互對，但依舊可以就各自的實驗數據做相對性的印證。首先，Bishop 團隊分別以 α Asn52、 α Asn78、 β Asn7、 β Asn24、 α Asn52,78、 β Asn7,24 六種突變體處理幼年正常公鼠之 Sertoli 細胞，測其雌二醇 (estradiol) 含量 [31]。因 FSH 能活化芳香酶 (aromatase) 使得 19-hydroxy-androstene-dione 轉化為雌二醇。根據其放射免疫分析法 (radio-immuno assay, RIA) 結果，各突變體 (α Asn52、 α Asn78、 β Asn7、 β Asn24、 α Asn52,78 和 β Asn7,24) 分別為野生型 hFSH 訊息傳遞活性的 26%、122%、69%、75%、41% 和 216%，而以 α Asn52 突變體活性降低 74% 影響最為顯著。此外，Flack 團隊以 β Asn7、 β Asn24、 β Asn7,24 等突變體處理正常母鼠之 Granulosa 細胞，同樣以

放射免疫分析法測其雌二醇含量，各突變體 (β Asn7、 β Asn24、 β Asn7,24) 分別為野生型之訊息傳遞活性的48 %、41 %和38 % [30]。因此利用單一或雙點突變去醣基方式的FSH能造成訊息傳遞活性的降低，約為野生型活性的25~50 %之間。本實驗則以大腸桿菌之無轉譯後修飾特性表現去除四個醣基的FSH，訊息傳遞活性測試則測量SKOV-3之增生情形。與野生型吸光值比較同樣可發現到少了四個醣基的FSH降低了30 %的生長率，雖然活性降低情形並不如單一或雙點突變體那般顯著 (降低50~75 %)，但還是可說明利用大腸桿菌重組去醣基 hFSH 具有降低增生的效果，不過卻不能完全阻斷傳遞路徑，使癌細胞完全停止繁殖。

圖 30 相對地顯示去醣基變異體比野生型 hFSH 具有較低活性，其中在 10 ng/ml 濃度下相對少了 30 %之吸光值。為了直接證實去醣基變異體確實能和野生型 hFSH 競爭受體，因而具有壓抑 SKOV-3 的增生活性，故選擇差異性最大的濃度 10 ng/ml 部分之野生型加入不同劑量之變異體混合液 (10 ng/ml 野生型 + 0.625~20 ng/ml 變異體) 共同處理 SKOV-3 細胞，觀察兩者之競爭效果。三次之平均結果 (圖 31) 顯示兩者混合液比單獨的野生型 hFSH 之吸光值低 0.08~0.5 (以 2.5 ng/ml NG-hFSH 影響最為顯著，降低 0.22 %吸光值)，此結果即說明了額外添加去醣基變異體可使得野生型的細胞增生吸光值降低下來，因此根據本實驗可得知兩點結論：一、NG-hFSH 確實能對 SKOV-3 產生影響，且具有壓抑野生型 hFSH 對其增生的活性效果。二、NG-hFSH 能和野生型 hFSH 競爭受體之結合位，並且與野生型之濃度比等於 1：4 時達到最大受體競爭率。

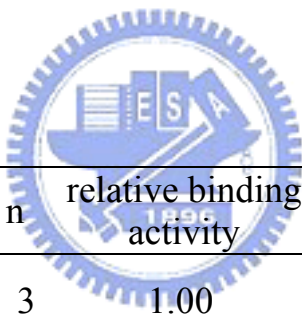
4-10 對於卵巢癌細胞株之受體鍵結親和力分析

證明去醣基變異體降低了 SKOV-3 的訊息傳遞活性且能和野生型 hFSH 競爭受體結合位後，便利用一連串的專一性抗體結合，最後以 TMB 反應分析親和力大小。經由分析波長 450 nm 之三次平均吸光值結果如圖 32 所示，正對照組之吸光值為 0.69，而野生型 hFSH 對於 SKOV-3 的受體結合力吸光為 0.64，並以此當作標準。本實驗發現去醣基變異體對於 SKOV-3 鍵結力 (0.97) 相對於野生型高出了 52%，而 α 、 β 單體也分別增加了 48% 和 34%，甚至同時添加 α 、 β 單體對於 SKOV-3 的鍵結力吸光更提高為 1.17，高出野生型 83%。由此酵素連結免疫吸附分析可得知去醣基變異體對於野生型受體鍵結力的相對關係，證明了去除醣基的 hFSH 兩次單元體或雙體皆可提升與受體的親和力，此數據也與利用突變法去掉 α Asn52 後產生更強的受體鍵結親和力相符合 [30, 32, 34]。

而去醣基的 α 、 β 次單元體對於受體的鍵結力亦因此而相對提高，不僅說明了去除醣基之後的親和力產生變化，其中更間接指出 α 或 β 次單元體皆可單獨和受體發生強烈鍵結，關於單體和受體的鍵結關係之研究已知當 hFSH α 和 β 次單元體兩者相結合之後，會產生構形上的改變：hFSH α 形成一高度親和位 (high affinity site)；hFSH β 則產生一小部分供受體辨認之用的專一結合位 (specificity site)。當 hFSH 遇到受體時首先 α 次單元體上的高度親和位即刻與受體鍵結在一起，而 β 次單元體則進一步扮演鎖匙功能，若是其上之小區域專一結合位與受體密合則能開啟訊息傳遞活性 [55]。此機制說明了四個醣蛋白激素有著相同的 α 次單元體，皆可能和彼此的受體相結合，但唯有正確的 β 次單元體配上正確的受體才能傳遞活性訊息。而本實驗 hFSH α 的受體親和力高於 β 次單元體，此結果可能為 α 次單元體上

的高度親和位與受體的大面積鍵結，而 β 次單元體與受體只有小區域專一結合位的接觸。雖然單獨的 α 或 β 次單元體皆能促使受體親和力的增加，但因為 α 次單元體扮演提供活性區域的角色， β 次單元體則提供激素專一性，因此兩者還是得形成雙體才具意義。

綜合細胞活性測試和鍵結親和力分析，本論文證明了去醣基 hFSH 變異體相對於野生型 hFSH 的壓抑增生活性和更強之受體親和力，總合結果可由表 10 清楚所示。但受體親和力分析方面因不知 SKOV-3 上的 hFSH 受體量，故只能決定彼此之相對結合值，將來可朝受體之絕對值方面加以改進，例如用抗 hFSH 受體之抗體定出細胞膜上的受體量，或者直接經由已知濃度的純 hFSH 受體進行分析，以期更進一步計算出 hFSH 與受體的正確結合常數 (binding constant)，以利後續之探討。



10 ng/ml FSH	n	relative binding activity	n	relative signal-transducing activity
Wild-type	3	1.00	3	1.00
Monomer				
hFSH	3	1.48±0.09	—	—
hFSH	3	1.34±0.16	—	—
hFSH + hFSH	3	1.83±0.10	—	—
Dimer				
NG-hFSH	3	1.52±0.09	3	0.70±0.21
wild-type + NG-hFSH	—	—	3	0.93±0.30

表 10. 各種去醣基 FSH 單體或雙體相對於野生型 hFSH 的相對鍵結活性和相對訊息傳遞活性。n：實驗次數。

第五章 結論與未來展望

1. 本論文之目的為試圖利用大腸桿菌製造去糖基 hFSH α - 和 β -次單元體，加以組合成去糖基 hFSH 變異體，並和野生型 hFSH 做活性比較和競爭作用，期望去糖基 FSH 變異體對於卵巢癌細胞的訊息傳遞有所影響，因而間接降低或抑制癌細胞的增生。因此首要工作為放大 *hFSHA* 和 *hFSHB* 此兩段基因，故利用聚合酶連鎖反應作為選殖並放大此兩段 cDNA 作為整個架構之啟始。以 commercial “human Pituitary Gland Marathon-Ready cDNA” 作為選殖 hFSH 次單元體基因的模版，另設計合適之引子後以最適當的 PCR 反應程式放大之。其結果經由 0.8% 瓊脂洋菜膠體電泳染色後可以清楚觀察到放大之後的 cDNA 片段確實存在。
2. 接著將此兩段 cDNA 分別構築到 yT&A 選殖載體中，之後以大腸桿菌 DH5 α 之轉形殖入載體，作為長久保存。微量製備出的 *hFSHA*-yT&A 和 pET30a 兩質體以 *BamH I* 限制酶進行切割；而 *hFSHB*-yT&A 和 pACYCDuet-1 兩質體則以 *Hind III* 限制酶進行切割反應，之後成功利用 T4 DNA ligase 將 “insert DNA” 和 “表現載體” 接合並轉形到大腸桿菌中。經限制酶和 DNA 定序之鑑定後可以確認 *hFSHA*-pET30a 轉形至 NovaBlue (DE3)，而 *hFSHB*-pACYCDuet-1 轉形至 NovaBlue (DE3)、BL21 (DE3)、BL21 *trxB* (DE3) 和 Origami (DE3) 四株菌體內。
3. 在其個別表現方面，SDS-PAGE 染色結果觀察到去糖基 hFSH α -次單元體的蛋白質帶存在於約 20 kDa 之位置，且無論利用抗 6x

His 之一級抗體或者抗 FSH 之一級抗體皆顯示著與 SDS-PAGE 同樣之蛋白質帶，故已成功表現出去醣基 hFSH α -次單元體。但在 NovaBlue (DE3)、BL21 (DE3)、BL21 *trxB* (DE3) 和 Origami (DE3) 四株菌中皆無法明顯從 SDS-PAGE 染色結果觀察到去醣基 hFSH β -次單元體存在，進一步利用抗 6x His 作為一級抗體的西方墨點法之結果卻能明顯看出 β -次單元體的微量存在，且位於 18 kDa 之位置。

4. α 、 β 兩個次單元體分別利用 Ni-NTA 方式純化，通過 Ni-NTA 管柱的兩次單元體沖提部分進行 SDS-PAGE 和西方墨點法鑑定之。雖然純化完的 SDS-PAGE 結果依舊混雜著其他蛋白質帶，但在西方墨點法呈色後卻可觀察到單一個蛋白質帶，即表示確實有純化到我們所要的 α 、 β 兩次單元體，選擇純度 80% 以上的沖提部分再一次純化並進行透析再折疊。
5. 再折疊完 BCA 定量 α 、 β 兩個次單元體後，可知由 500 ml LB 培養液可獲得約 2.5 mg 的純 α -次單元體，同理在 1000 ml LB 培養液中約只能純化出 0.5 mg 較純的 β -次單元體，兩者表現率相差了十倍。接著便進行次單元體的雙體化反應，根據定量的結果調整相同體積下兩者濃度相等，一比一混和的 α 、 β -次單元體能藉由在相同環境下彼此的碰撞吸附，進行非共價鍵結合。經由還原態與非還原態的 SDS-PAGE 染色和西方墨點法鑑定後可判定去醣基的 hFSH 兩次單元體順利完成雙體化反應，也就是成功重組出去醣基 hFSH 變異體。

6. 另關於原核表現系統製造出的醣蛋白激素可由 hCG 之大腸桿菌表現證實表現出來的激素並無接合醣基支鏈 [50, 51]，且分析圖 26 至圖 28 之西方墨點法和 SDS-PAGE 結果的蛋白質大小可知其分子量單純為多胜肽部分，並無包含醣基支鏈，因此本論文之 hFSH 變異體確為無醣基形式存在。
7. MTT 細胞增生分析活性影響和 TMB 反應分析親和力強度之結果，可與先前研究加以比較，歸納出以下幾點結論。一、訊息傳遞活性方面，利用直接點突變之方式加以改變 α -次單元體 Asn52 成為 Gln [31]，如此除去 Asn52 之醣基部分，發現嚴重降低 FSH 74 % 訊息傳遞活性。至於突變掉 α -次單元體 Asn52 和 Asn78 兩個位置亦只剩下 40 % 的活性 [31]。此外，雙突變 FSH β -次單元體 Asn7 和 Asn24 亦會減少 30 % 的訊息傳遞活性 [31]，另突變 β Asn7、 β Asn24、 β Asn7,24 則為野生型之訊息傳遞活性的 48 %、41 % 和 38 % [30]。二、受體鍵結親和力方面，關於突變 α Asn52 之後的受體鍵結親和力卻是些微增加 [32] 或甚至增強 2~3 倍，但缺少 α Asn78、 β Asn7 或 β Asn24 之醣基對於鍵結強度卻無影響 [30, 34]。不過另一研究顯示單獨缺少 α Asn78 醣基的鍵結強度卻增強 72 %，但移除其它醣基對於鍵結強度則無顯著影響 [31]。三、本論文活性分析結果顯示 NG-hFSH 降低 30 % 活性，若野生型額外添加 NG-hFSH 則可降低 7 % 活性，此結果與直接突變 α Asn52 或兩個以上醣基部分相比，降低能力並非如此強烈。另外 hFSH α 、hFSH β 、「hFSH α + hFSH β 」、NG-hFSH 之受體鍵結親和力則分別增強 48 %、34 %、83 % 和 52 %。以上數據顯示本論文發現去除醣基的重組 hFSH 能對 SKOV-3 產生降低增生之影響，並壓

抑野生型 hFSH 對其增生的活性效果，更間接證實具有抑制卵巢癌細胞的訊息傳遞能力。並且相對於野生型的受體鍵結，去除糖基的 hFSH 兩次單元體或雙體皆可提升與受體的親和力。相較於點突變去糖基方式，直接以菌體重組出 NG-hFSH 有著大量快速製造之優點，另只降低 30 % 活性對於影響正常細胞的副作用來說或許反而有益，不至於如同單獨去除 α Asn52 糖基而嚴重降低 74 % 導致阻斷正常生理活性，但 NG-hFSH 實際對於正常細胞的活性還得進一步探討。

8. 綜合來說，本論文成功利用大腸桿菌表現系統重組出去糖基 hFSH 變異體，發展出原核表現系統製造去糖基人類濾泡刺激素之技術，未來如何克服 β -次單元體表現微量之問題將是研究重點所在，以合成出最適產量的去糖基 hFSH 變異體。之後的研究將可著重於正常卵巢顆粒細胞和其他卵巢癌細胞株的生物活性和受體親和力分析，以深入探討去糖基 hFSH 變異體與野生型 hFSH 對於正常顆粒細胞的受體競爭關係。另其對於男性生殖生理之關係亦是相當有趣的課題，去糖基 hFSH 變異體對於男性正常 Sertoli 細胞和前列腺癌細胞能產生何種影響皆可深入研究。未來期望去糖基濾泡刺激素能發展為卵巢癌抑制劑或扮演壓抑卵巢癌細胞發育之重要角色。

第六章 參考文獻

1. Pierce, J.G. and T.F. Parsons, Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.*, **1981**, 50, 465-95.
2. Vander, A.J., J.H. Sherman, and D.S. Luciano, Human Physiology/the mechanisms of body function. 6 ed, **1994**, 669.
3. Carr, B.R., Williams Textbook of endocrinology. Disorders of the ovary and female reproductive tract. J.D. Wilson and D.W. Foster. **1992**, 733-798.
4. Griffin, J.E. and J.D. Wilson, Williams Textbook of Endocrinology. Disorders of the testes and the male reproductive tract. J.D. Wilson and D.W. Foster. **1992**, 799-852.
5. Thorner, M.O., Vance, M.L., Horvath, E., and Kovacs, K., Williams Textbook of Endocrinology. The anterior pituitary. J.D. Wilson and D.W. Foster. **1992**, 221-310.
6. Colorado state university. <http://www.vivo.colostate.edu/>
7. W.H., D., Textbooks of endocrinology. The anterior pituitary gland. W. J.D. and F. D.W. **1985**. 586-613.
8. Guyton, A.C. and J.E. Hall, Human physiology and mechanisms of disease. Female physiology before pregnancy; and the female hormones. **1997**. 963-976.
9. Guyton, A.C. and J.E. Hall, Human physiology and mechanisms of disease. Male reproductive functions; the male sex hormones, (and the pineal gland). **1997**. 947-962.
10. Boothby, M., et al., A single gonadotropin alpha-subunit gene in normal tissue and tumor-derived cell lines. *J. Biol. Chem.*, **1981**. 256(10), 5121-7.

11. Naylor S.L., Chin W.W., Goodman H.M., Lalley P.A., Sakaguchi A.Y., Chromosome assignment of genes encoding the alpha and beta subunits of glycoprotein hormones in man and mouse. *Somatic. Cell. Genet.*, **1983**. 9(6), 757-70.
12. Watkins P.C., Eddy R., Beck A.K., Vellucci V., Leverone B., Tanzi R.E., Gusella J.F., and Shows T.B., DNA sequence and regional assignment of the human follicle-stimulating hormone beta-subunit gene to the short arm of human chromosome 11. *Dna*, **1987**. 6(3), 205-12.
13. Fiddes, J.C. and H.M. Goodman, Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature*, **1979**. 281(5730), 351-6.
14. Jameson J.L., Becker C.B., Lindell C.M., and Habener J.F., Human follicle-stimulating hormone beta-subunit gene encodes multiple messenger ribonucleic acids. *Mol. Endocrinol.*, **1988**. 2(9). 806-15.
15. Ulloa-Aguirre, A. and C. Timossi, Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum. Reprod. Update.*, **1998**. 4(3), 260-83.
16. Habener, J.F., Molecular Cloning of Hormone Genes. *Glycoprotein hormone genes*. **1987**. 139-142.
17. Fox, K.M., Dias J.A., and P. Van Roey, Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol. Endocrinol.*, **2001**. 15(3), 378-89.
18. Fan, Q.R. and Hendrickson W.A., Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*, **2005**. 433(7023), 269-77.
19. Minegishi T., Nakamura K., Takakura Y., Ibuki Y., Igarashi M., and Minegish T., Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1991**. 175(3), 1125-30.

20. Sohn J., Ryu K., Sievert G., Jeoung M., Ji I., and Ji T.H., Follicle-stimulating hormone interacts with exoloop 3 of the receptor. *J. Biol. Chem.*, **2002**. 277(51), 50165-75.
21. Walker, W.H. and J. Cheng, FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, **2005**. 130(1), 15-28.
22. Walker, W.H., L. Fucci, and Habener J.F., Expression of the gene encoding transcription factor cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element-binding protein (CREB): regulation by follicle-stimulating hormone-induced cAMP signaling in primary rat Sertoli cells. *Endocrinology*, **1995**. 136(8), 3534-45.
23. Zirkin B.R., Santulli R., Awoniyi C.A., and Ewing L.L., Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology*, **1989**. 124(6), 3043-9.
24. Crepieux P., Marion S., Martinat N., Fafeur V., Vern Y.L., Kerboeuf D., Guillou F., and Reiter E., The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene*, **2001**. 20(34), 4696-709.
25. Cottom J., Salvador L.M., Maizels E.T., Reierstad S., Park Y., Carr D.W., Davare M.A., Hell J.W., Palmer S.S., Dent P., Kawakatsu H., Ogata M., and Hunzicker-Dunn M., Follicle-stimulating hormone activates extracellular signal-regulated kinase but not extracellular signal-regulated kinase kinase through a 100-kDa phosphotyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **2003**. 278(9), 7167-79.
26. Maizels E.T., Cottom J., Jones J.C., and Hunzicker-Dunn M., Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, **1998**. 139(7), 3353-6.

27. Nechamen C.A., Thomas R.M., Cohen B.D., Acevedo G., Poulikakos P.I., Testa J.R., and Dias J.A., Human follicle-stimulating hormone (FSH) receptor interacts with the adaptor protein APPL1 in HEK 293 cells: potential involvement of the PI3K pathway in FSH signaling. *Biol. Reprod.*, **2004**. 71(2), 629-36.
28. Baenziger, J.U. and Green E.D., Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1988**. 947(2), 287-306.
29. Keene, J.L., Nishimori, K., Galway, A.B., Matzuk, M.M., Hsueh A.J.W., and Boime, I., Recombinant deglycosylated human FSH is an antagonist of human FSH action in cultured rat granulosa cells. *Endocr. J.*, **1994**. 2, 175-179.
30. Flack M.R., Froehlich J., Bennet A.P., Anasti J., and Nisula B.C., Site-directed mutagenesis defines the individual roles of the glycosylation sites on follicle-stimulating hormone. *J. Biol. Chem.*, **1994**. 269(19), 14015-20.
31. Bishop L.A., Robertson D.M., Cahir N., and Schofield P.R., Specific roles for the asparagine-linked carbohydrate residues of recombinant human follicle stimulating hormone in receptor binding and signal transduction. *Mol. Endocrinol.*, **1994**. 8(6), 722-31.
32. Matzuk, M.M., Keene J.L., and Boime I., Site specificity of the chorionic gonadotropin N-linked oligosaccharides in signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **1989**. 264(5), 2409-14.

33. Lindau-Shepard B., Roth K.E., and Dias J.A., Identification of amino acids in the C-terminal region of human follicle-stimulating hormone (FSH) beta-subunit involved in binding to human FSH receptor. *Endocrinology*, **1994**. 135(3), 1235-40.
34. Valove F.M., Finch C., Anasti J.N., Froehlich J., and Flack M.R., Receptor binding and signal transduction are dissociable functions requiring different sites on follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, **1994**. 135(6), 2657-61.
35. Dias J.A., Lindau-Shepard B., Hauer C., and Auger I., Human follicle-stimulating hormone structure-activity relationships. *Biol. Reprod.*, **1998**. 58(6), 1331-6.
36. Bristow, R.E. and Karlan B.Y., Ovulation induction, infertility, and ovarian cancer risk. *Fertil. Steril.*, **1996**. 66(4), 499-507.
37. Venn A., Watson L., Lumley J., Giles G., King C., and Healy D., Breast and ovarian cancer incidence after infertility and in vitro fertilisation. *Lancet.*, **1995**. 346(8981), 995-1000.
38. Rossing M.A., Daling J.R., Weiss N.S., Moore D.E., and Self S.G., Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *N. Engl. J. Med.*, **1994**. 331(12), 771-6.
39. Standards, options and recommendations: clinical practice guidelines for cancer care from the French National Federation of Cancer (FNCLCC). Ovarian cancer. *Bri. J. Cancer.*, **2001**. 84, 18-23.
40. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, **2000**. 70, 209-262.
41. Shepherd, J.H., Revised FIGO staging for gynaecological cancer. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, **1989**. **96(8)**, 889-92.

42. Muggia F.M., Braly P.S., Brady M.F., Sutton G., Niemann T.H., Lentz S.L., Alvarez R.D., Kucera P.R., and Small J.M., Phase III randomized study of cisplatin versus paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in patients with suboptimal stage III or IV ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *J. Clin. Oncol.*, **2000**. 18(1), 106-15.
43. Paclitaxel plus carboplatin versus standard chemotherapy with either single-agent carboplatin or cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in women with ovarian cancer: the ICON3 randomised trial. *Lancet.*, **2002**. 360(9332), 505-15.
44. Ozols R.F., Bundy B.N., Greer B.E., Fowler J.M., Clarke-Pearson D., Burger R.A., Mannel R.S., DeGeest K., Hartenbach E.M., and Baergen R., Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.*, **2003**. 21(17), 3194-200.
45. Zheng W., Lu J.J., Luo F., Zheng Y., Feng Y., Felix J.C., Lauchlan S.C., and Pike M.C., Ovarian epithelial tumor growth promotion by follicle-stimulating hormone and inhibition of the effect by luteinizing hormone. *Gynecol. Oncol.*, **2000**. 76(1), 80-8.
46. Syed V., Ulinski G., Mok S.C., Yiu G.K., and Ho S.M., Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Cancer. Res.*, **2001**. 61(18), 6768-76.
47. Ji Q., Liu P.I., Chen P.K., and Aoyama C., Follicle stimulating hormone-induced growth promotion and gene expression profiles on ovarian surface epithelial cells. *Int. J. Cancer.*, **2004**. 112(5), 803-14.

48. Chu S., Rushdi S., Zumpe E.T., Mamers P., Healy D.L., Jobling T., Burger H.G., and Fuller P.J., FSH-regulated gene expression profiles in ovarian tumours and normal ovaries. *Mol. Hum. Reprod.*, **2002**. 8(5), 426-33.
49. Porter, A.T., F A.C.R.O., and Ben-Josef E., Humoral mechanisms in prostate cancer: A role for FSH. *Urol. Oncol.*, **2001**. 6(4), 131-138.
50. Huth J.R., Norton S.E., Lockridge O., Shikone T., Hsueh A.J., Ruddon R.W., Bacterial expression and in vitro folding of the beta-subunit of human chorionic gonadotropin (hCG beta) and functional assembly of recombinant hCG beta with hCG alpha. *Endocrinology*, **1994**. 135(3), 911-8.
51. Ren, P., Sairam M.R., and Yarney T.A., Bacterial expression of human chorionic gonadotropin alpha subunit: studies on refolding, dimer assembly and interaction with two different beta subunits. *Mol. Cell. Endocrinol*, **1995**. 113(1), 39-51.
52. European Bioinformatics Institute/Clustal W
<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>.
53. Samaddar M., Babu P.S., Catterall J.F., and Dighe R.R., Identification of an attenuating region in the bovine follicle-stimulating hormone beta subunit mRNA that decreases its expression in E. coli. *Gene*, **1999**. 228(1-2), 253-60.
54. Clark, E.D.B., Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1998**. 9(2), 157-63.
55. Yevs Combarous, Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocrine reviews*, **1992**. 13(4), 670-691

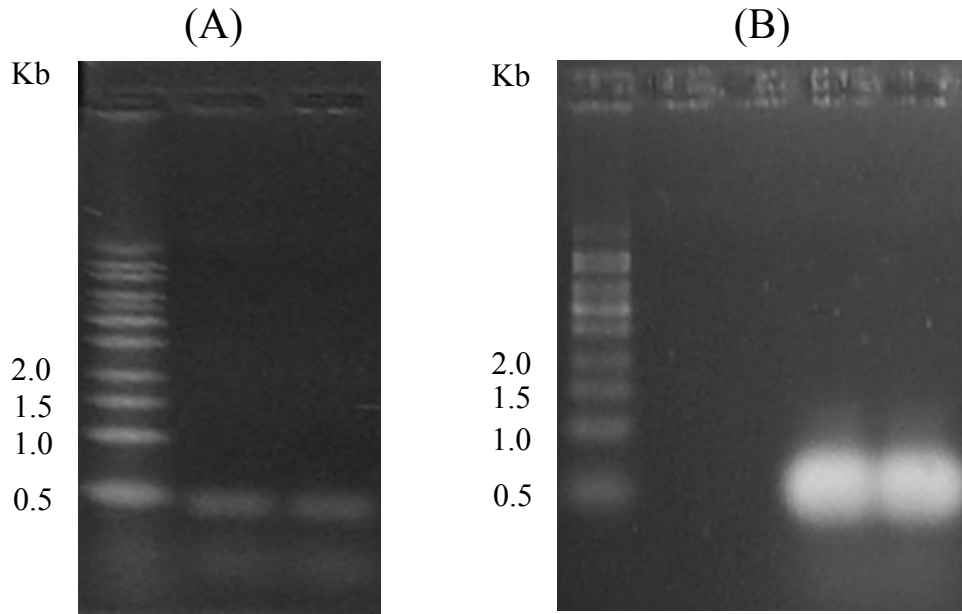


圖 12. *hFSHA* 和 *hFSHB* 之聚合酶連鎖反應產物之洋菜膠體電泳結果。其中圖 A：*hFSHA* 之 PCR 結果。圖 B：*hFSHB* 之 PCR 結果。

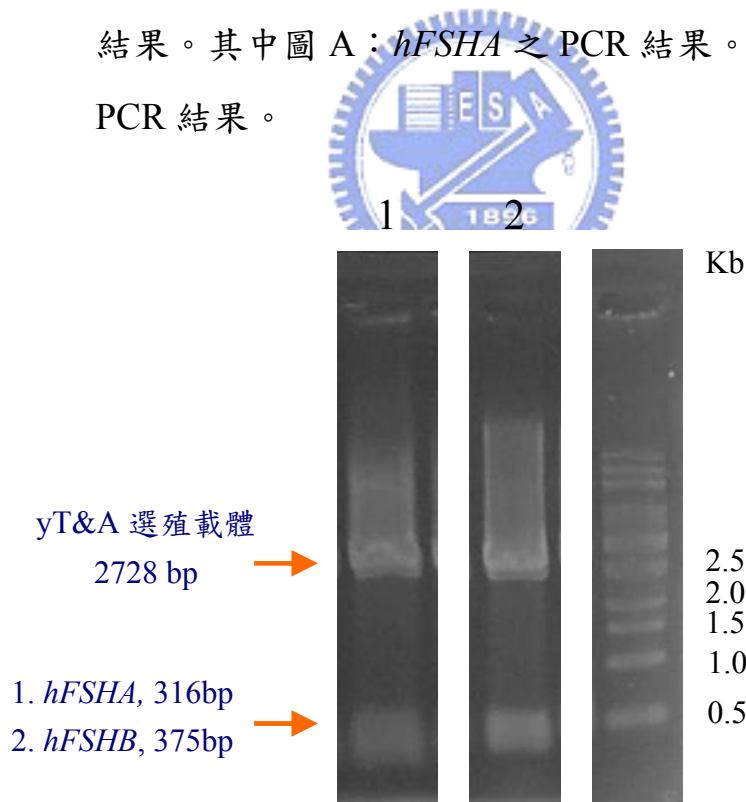


圖 13. 質體 *hFSHA*-yT&A、*hFSHB*-yT&A 切割反應之電泳結果。

Lane 1：*hFSHA*-yT&A 之 *BamH I* 切割產物。

Lane 2：*hFSHB*-yT&A 之 *Hind III* 切割產物。

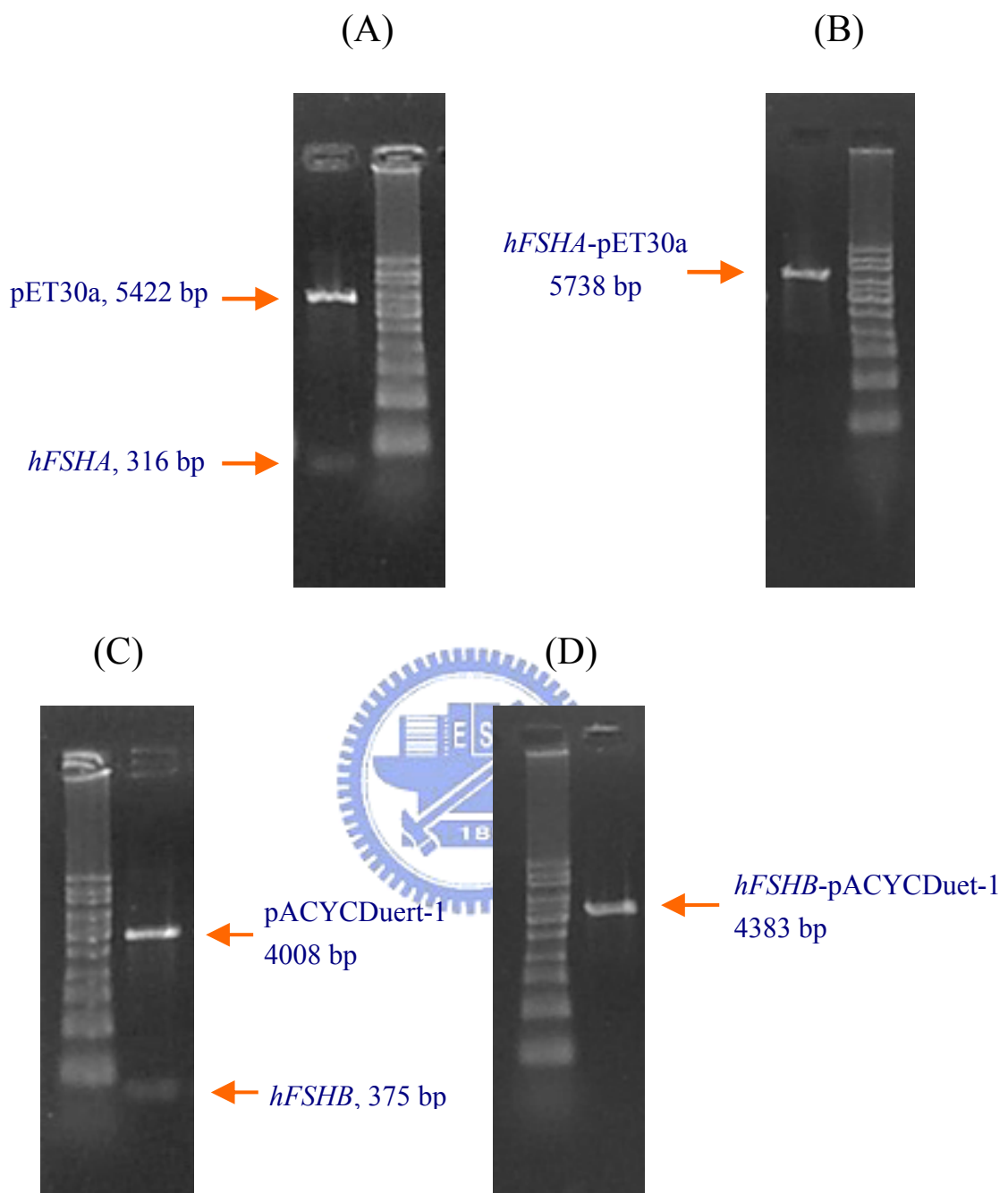


圖 14. 分別以限制酶鑑定轉形進表現宿主 Nova blue (DE3) 之兩質體：*hFSHA*-pET30a 和 *hFSHB*-pACYCDuet-1。圖 A：以 *BamH* 切割 *hFSHA*-pET30a 質體。圖 B：以 *EcoRV* 切割 *hFSHA*-pET30a 質體。圖 C：以 *Hind* 切割 *hFSHB*-pACYCDuet-1 質體。圖 D：以 *BamH* 切割 *hFSHB*-pACYCDuet-1 質體。

a : 預期之 *hFSHA*-pET30a 序列

b : DNA 定序結果

* : 比對相同之核苷酸部分

【註：標記底線部分為 *hFSHα* cDNA (*hFSHA*)】

start codon

a -----A 1
b TGGGGGTAACATTCCCATCTAGAATAATTTTAGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATA 60
*

6x His • Tag

a **TGCACCATCATCATCAT**TCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAA 61
b **TGCACCATCATCATCAT**TCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAA 120

a CCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACG 121
b CCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACG 180

hFSHA

a ACGACAAGGCCATGGCTGATATCGGATCCAGATCTGATATCCTCCATTCCGCTCCTGATG 181
b ACGACAAGGCCATGGCTGATATCGGATCCAGATCTGATATCCTCCATTCCGCTCCTGATG 240

a TGCAGGATTGCCCAGAATGCACGCTACAGGAAAACCCATTCTTCTCCCAGCCGGGTGCC 241
b TGCAGGATTGCCCAGAATGCACGCTACAGGAAAACCCATTCTTCTCCCAGCCGGGTGCC 300

a CAATACTTCAGTGCATGGGCTGCTGCTTCTCTAGAGCATATCCCACTCCACTAAGGTCCA 301
b CAATACTTCAGTGCATGGGCTGCTGCTTCTCTAGAGCATATCCCACTCCACTAAGGTCCA 360

a AGAAGACGATGTTGGTCCAAAAGAACGTCACCTCAGAGTCCACTTGCTGTGTAGCTAAAT 361
b AGAAGACGATGTTGGTCCAAAAGAACGTCACCTCAGAGTCCACTTGCTGTGTAGCTAAAT 420

a CATATAACAGGGTCACAGTAATGGGGGGTTTCAAAGTGGAGAACCACACGGCGTGCCACT 421
b CATATAACAGGGTCACAGTAATGGGGGGTTTCAAAGTGGAGAACCACACGGCGTGCCACT 480

stop codon

a GCAGTACTTGTTATTATCACAAATCA**TAA**ATGTTTTACCAAGTGCGGATCCCGAATTCTGA 481
b GCAGTACTTGTTATTATCACAAATCA**TAA**ATGTTTTACCAAGTGCGGATCC-GAATTCTGA 539
***** *****

圖 15. *hFSHA*-pET30a 之 DNA 定序與預期序列之比對結果。

a : 預期之 *hFSHB*-pACYCDuet-1 序列

b : DNA 定序結果

* : 比對相同之核苷酸部分

【註：標記底線部分為 *hFSHβ* cDNA (*hFSHB*) ；方框為比對相異處】

```

                                start codon      6x His • Tag
a -----ATGGGCAGCAGCCATCACCATCAT 24
b AAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACATGGGCAGCAGCCATCACCATCAT 120
                                *****

a CACCACAGCCAGGATCCGAATTCGAGCTCGGCGCGCCTGCAGGTCGACAAGCTTTCTGGA 84
b CACCACAGCCAGGATCCGAATTCGAGCTCGGCGCGCCTGCAGGTCGACAAGCTTTCTGGA 180
                                *****

                                hFSHB
a TCCCGCAATAGCTGTGAGCTGAC AACATCACCATTGCAATAGAGAAAGAAGAATGTCGT 144
b TCCCGCAATAGCTGTGAGCTGAC AACATCACCATTGCAATAGAGAAAGAAGAATGTCGT 240
                                *****

a TTCTGCATAAGCATCAACACCACTTGGTGTGCTGGCTACTGCTACACCAGGGATCTGGTG 204
b TTCTGCATAAGCATCAACACCACTTGGTGTGCTGGCTACTGCTACACCAGGGATCTGGTG 300
                                *****

a TATAAGGACCCAGCCAGGCCAAAATCCAGAAAACATGTACCTTCAAGGAACTGGTATAC 264
b TATAAGGACCCAGCCAGGCCAAAATCCAGAAAACATGTACCTTCAAGGAACTGGTATAC 360
                                *****

a GAAACAGTGAGAGTGCCCGGCTGTGCTCACCATGCAGATTCCTTGTATACATACCCAGTG 324
b GAAACAGTGAGAGTGCCCGGCTGTGCTCACCATGCAGATTCCTTGTATACATACCCAGTG 420
                                *****

a GCCACCCAGTGTCAGTGTGGCAAGTGTGACAGCGACAGCACTGATTGTAAGTGTGCGAGGC 384
b GCCACCCAGTGTCAGTGTGGCAAGTGTGACAGCGACAGCACTGATTGTAAGTGTGCGAGGC 480
                                *****

                                stop codon
a CTGGGGCCCAGCTACTGCTCCTTTGGTGAAATGAAAGAA TAAAGATCAGTGGACATTAAG 444
b CTGGGGCCCAGCTACTGCTCCTTTGGTGAAATGAAAGAA TAAAGATCAGTGGACATTAAG 540
                                *****

a CTTGCGGCCGCATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAAGTAATCGTATTGTACACGGCC----- 499
b CTTGCGGCCGCATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAAGTAATCGTATTGTACACGGCCGCATA 600
                                *****
```

圖 16. *hFSHB*-pACYCDuet-1 之 DNA 定序與預期序列之比對結果。

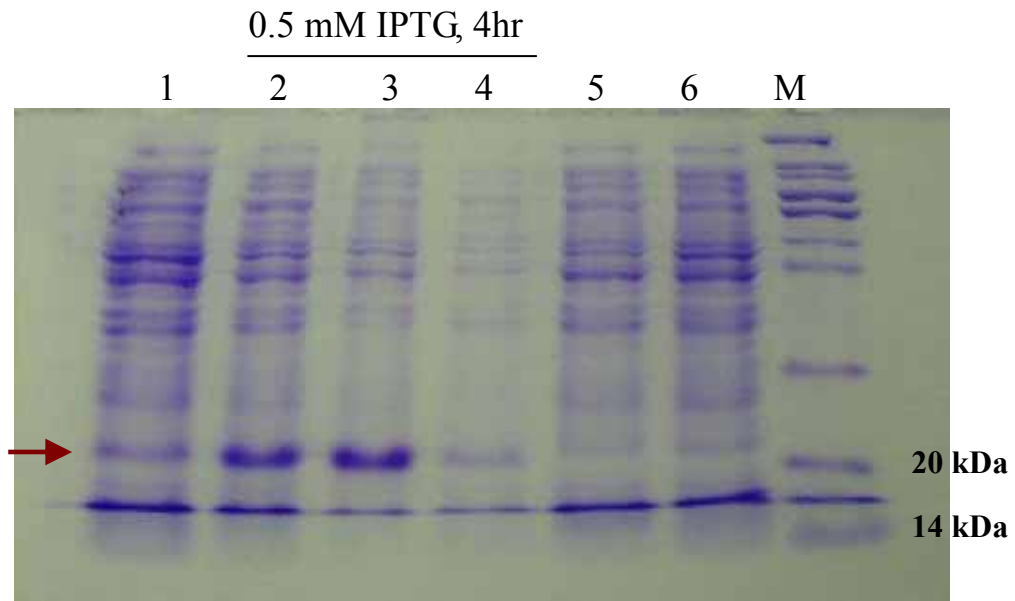


圖 17. NG-hFSH α -次單元體小量表現和存在形式之
SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : *hFSHA*-pET30a [NOVA blue (DE3)], non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 2 : *hFSHA*-pET30a [NOVA blue (DE3)], 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 3 : *hFSHA*-pET30a [NOVA blue (DE3)], 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate pellet
(inclusion body).

Lane 4 : *hFSHA*-pET30a [NOVA blue (DE3)], 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate
supernatant (soluble form).

Lane 5 : pET30a [NOVA blue (DE3)], 0.5 mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 6 : NOVA blue (DE3), non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane M : protein marker.

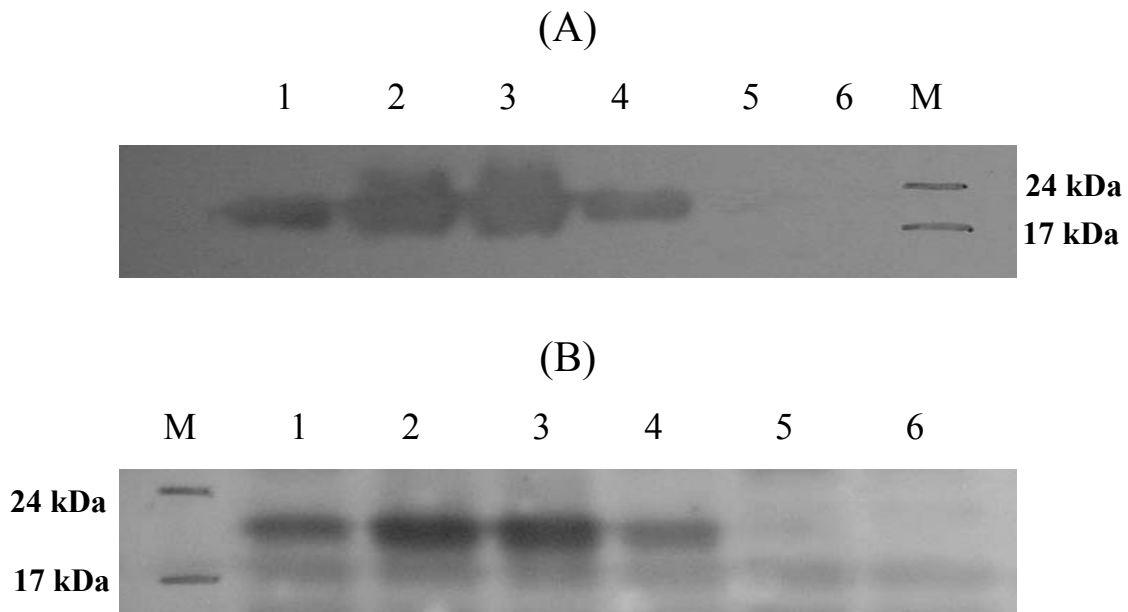


圖 18. 西方墨點法鑑定 NG-hFSH α -次單元體之小量表現和存在形式。圖 A：以“Anti-His monoclonal antibody”作為一級抗體之結果。圖 B：以“Anti-FSH/LH polyclonal antibody”作為一級抗體之結果。

Lane 1 : *hFSHA*-pET30a [NOVA blue (DE3)] , non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 2 : *hFSHA*-pET30a [NOVA blue (DE3)] , 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 3 : *hFSHA*-pET30a [NOVA blue (DE3)] , 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate pellet (inclusion body).

Lane 4 : *hFSHA*-pET30a [NOVA blue (DE3)] , 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate supernatant (soluble form).

Lane 5 : pET30a [NOVA blue (DE3)] , 0.5 mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 6 : NOVA blue (DE3) , non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane M : protein marker.

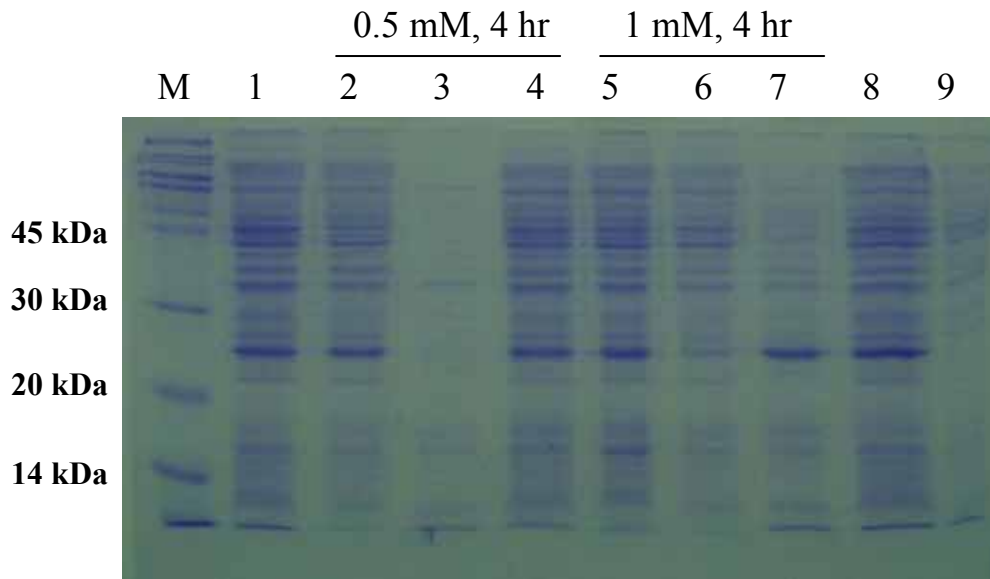


圖 19. NG-hFSH β -次單元體之 NOVA blue (DE3) 小量表現和存在形式的 SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 2 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 3 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate pellet

Lane 4 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5 mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate supernatant

Lane 5 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 1.0 mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 6 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 1.0 mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate pellet

Lane 7 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 1.0 mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate supernatant

Lane 8 : pACYCDuet-1, 0.5 mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 9 : NOVA blue (DE3) , non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane M : protein marker.

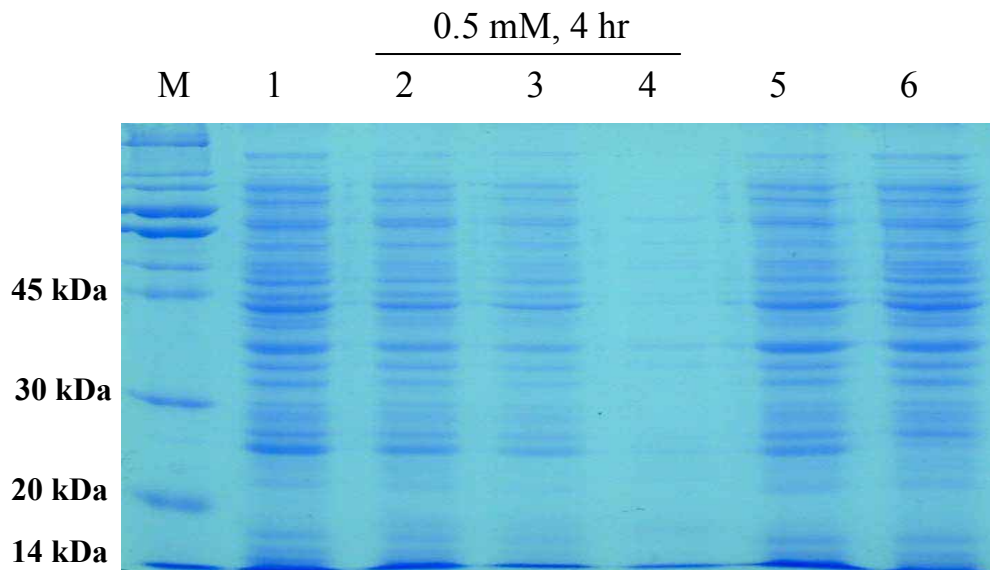


圖 20. NG-hFSH β -次單元體之 BL21 (DE3) 小量表現和存在形式的 SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 2 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 3 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate pellet

Lane 4 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5 mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate supernatant

Lane 5 : pACYCDuet-1, 0.5 mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 6 : BL21 (DE3) , non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane M : protein marker.

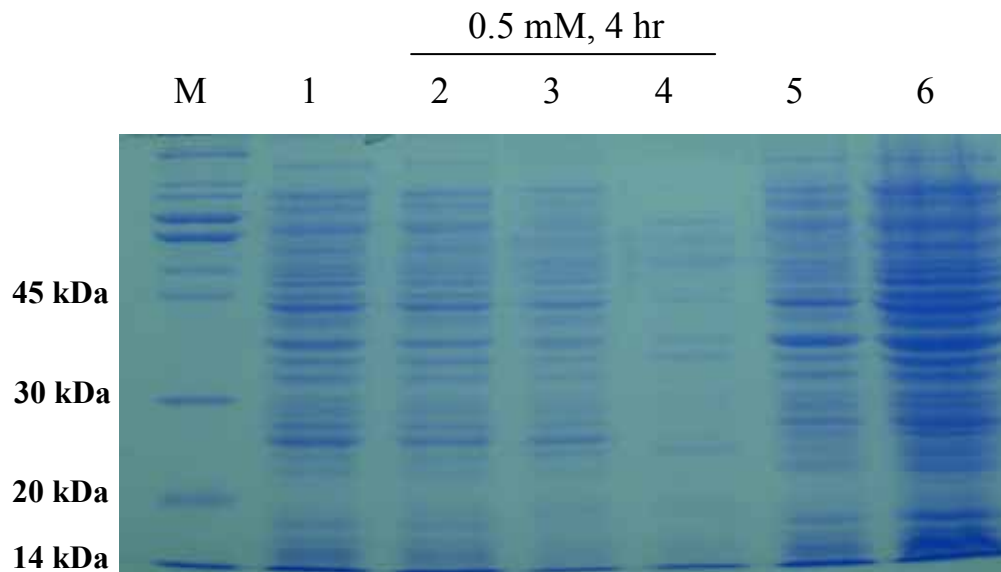


圖 21. NG-hFSH β -次單元體之 BL21 *trxB* (DE3) 小量表現和存在形式的 SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 2 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 3 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate pellet

Lane 4 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5 mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate supernatant

Lane 5 : pACYCDuet-1, 0.5 mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 6 : BL21 *trxB* (DE3) , non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane M : protein marker.

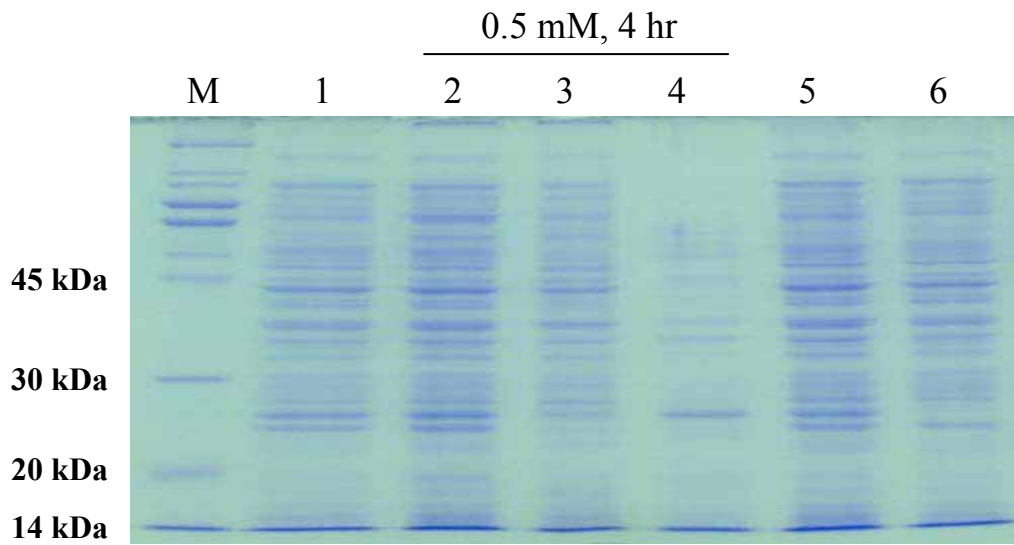


圖 22. NG-hFSH β -次單元體之 Origami (DE3) 小量表現和存在形式的 SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 2 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 3 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate pellet

Lane 4 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5 mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate supernatant

Lane 5 : pACYCDuet-1, 0.5 mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 6 : Origami (DE3) , non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane M : protein marker.

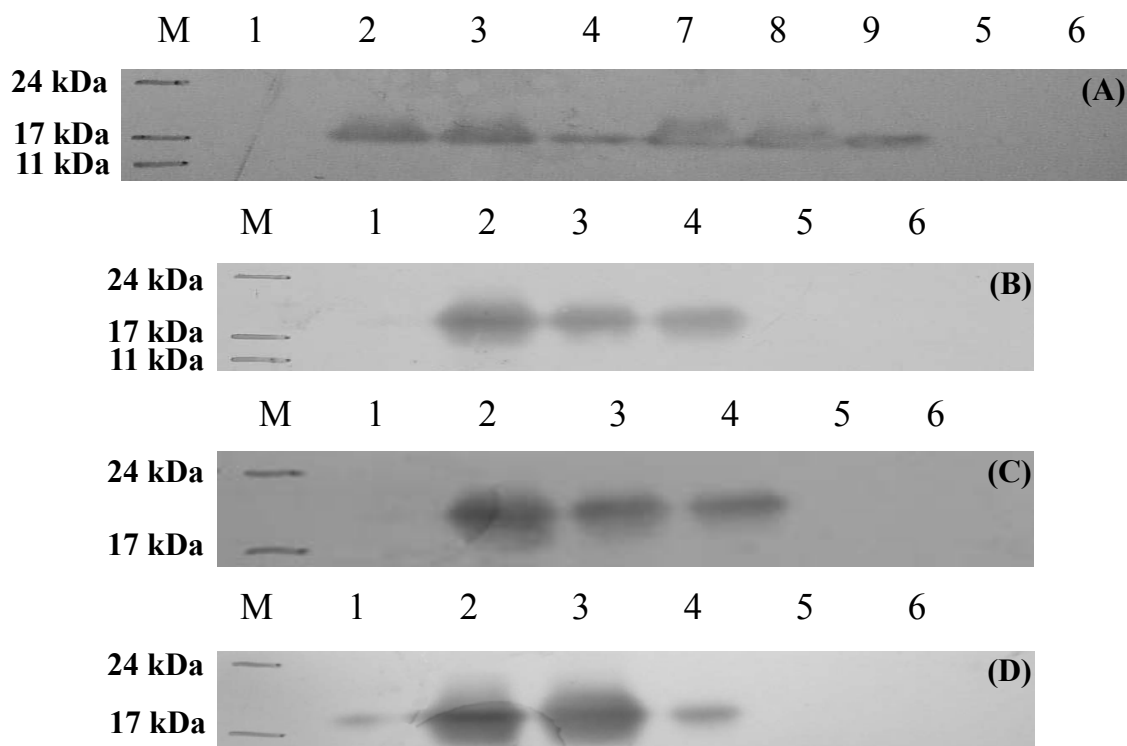


圖 23. 以“Anti-His monoclonal antibody”作為一級抗體的西方墨點法鑑定 NG-hFSH β -次單元體在四種菌株的小量表現和存在形式。圖 A：NovaBlue (DE3) 之結果。圖 B：BL21 (DE3) 之結果。圖 C：BL21 *trx*B (DE3) 之結果。圖 D：Origami (DE3) 之結果。

Lane 1 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 2 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 3 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate pellet

Lane 4 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 0.5 mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate supernatant

Lane 5 : pACYCDuet-1 only, 0.5 mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 6 : *Escherichia coli* only, non-inducing, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 7 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 1.0 mM IPTG, 37 °C 4hr, total lysate.

Lane 8 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 1.0 mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate pellet

Lane 9 : *hFSHB*-pACYCDuet-1, 1.0 mM IPTG, 37 °C 4hr, lysate supernatant

Lane M : protein marker.

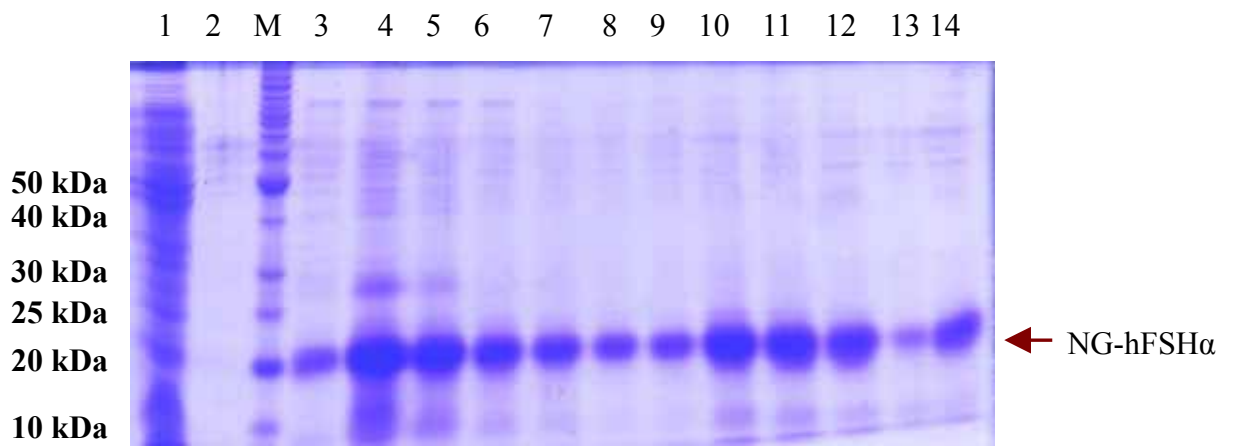


圖 24. 重組 NG-hFSH α -次單元體純化 SDS-PAGE 染色結果

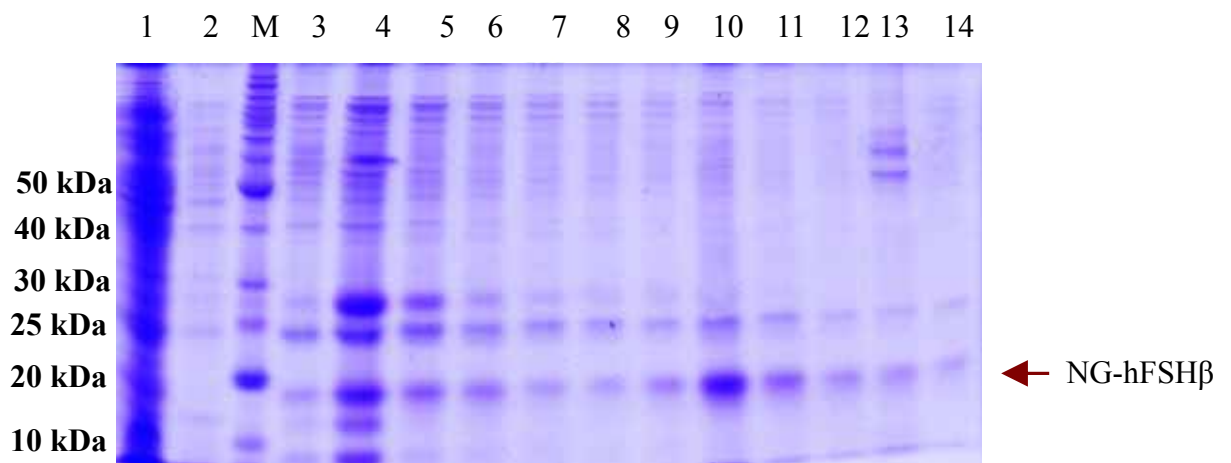


圖 25. 重組 hFSH β -次單元體純化 SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : Flow through

Lane 2 : Wash buffer C

Lane 3 : Elution buffer D, fraction 1

Lane 4 : Elution buffer D, fraction 2

Lane 5 : Elution buffer D, fraction 3

Lane 6 : Elution buffer D, fraction 4

Lane 7 : Elution buffer D, fraction 5

Lane 8 : Elution buffer D, fraction 6

Lane 9 : Elution buffer E, fraction 1

Lane 10 : Elution buffer E, fraction 2

Lane 11 : Elution buffer E, fraction 3

Lane 12 : Elution buffer E, fraction 4

Lane 13 : Elution buffer E, fraction 5

Lane 14 : Elution buffer E, fraction 6

Lane M : protein marker.

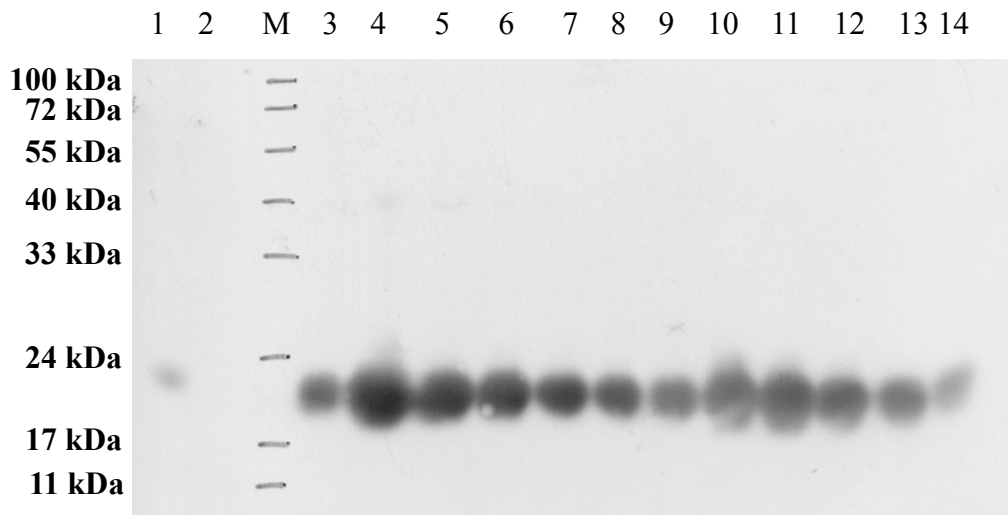


圖 26. 重組 NG-hFSH α -次單元體純化西方墨點法結果。

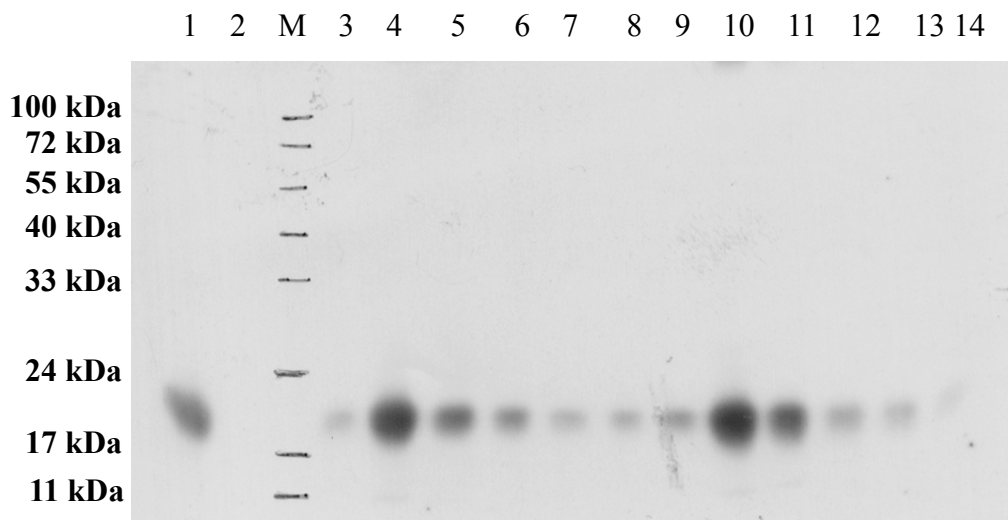


圖 27. 重組 NG-hFSH β -次單元體純化西方墨點法結果

一級抗體：Mouse anti-His monoclonal antibody

Lane 1 : Flow through

Lane 2 : Wash buffer C

Lane 3 : Elution buffer D, fraction 1

Lane 4 : Elution buffer D, fraction 2

Lane 5 : Elution buffer D, fraction 3

Lane 6 : Elution buffer D, fraction 4

Lane 7 : Elution buffer D, fraction 5

Lane 8 : Elution buffer D, fraction 6

Lane 9 : Elution buffer E, fraction 1

Lane 10 : Elution buffer E, fraction 2

Lane 11 : Elution buffer E, fraction 3

Lane 12 : Elution buffer E, fraction 4

Lane 13 : Elution buffer E, fraction 5

Lane 14 : Elution buffer E, fraction 6

Lane M : protein marker.

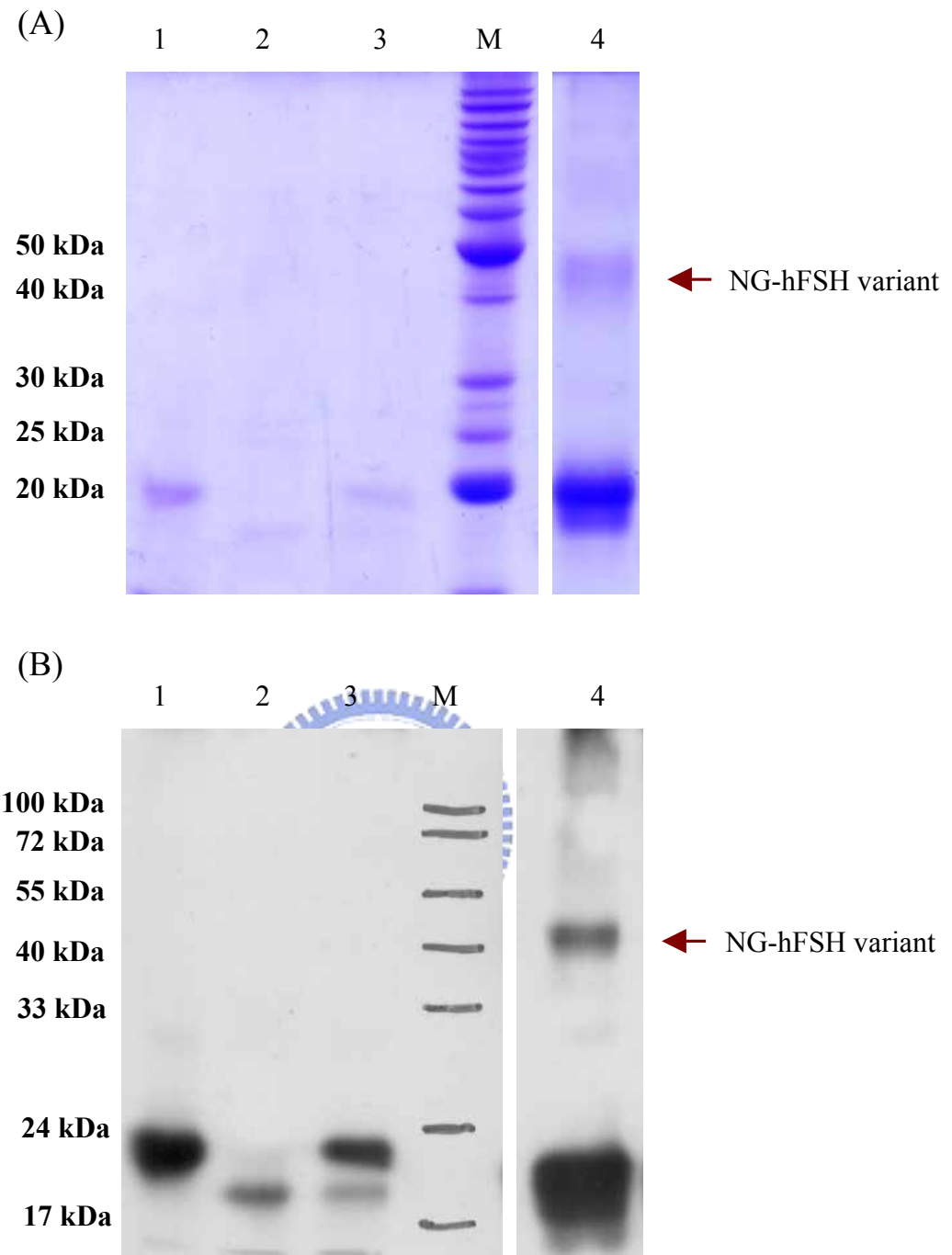


圖 28. NG-hFSH 變異體之雙體化結果。圖 A 為進行

SDS-PAGE 染色結果。圖 B 為西方墨點法鑑定結果。

Lane 1 : Non-glycosylated hFSH α , reducing form

Lane 2 : Non-glycosylated hFSH β , reducing form

Lane 3 : Non-glycosylated hFSH variant (dimer) , reducing form

Lane 4 : Non-glycosylated hFSH variant (dimer) , non-reducing form

Cell numbers (*10 ⁴)	0.5	1	2	3	4	5
OD ₅₄₀	0.27	0.44	0.70	1.08	1.22	1.57

Cell numbers (*10 ⁴)	6	7	8	9	10	11	12
OD ₅₄₀	1.68	1.96	2.07	2.44	2.62	3.00	3.15

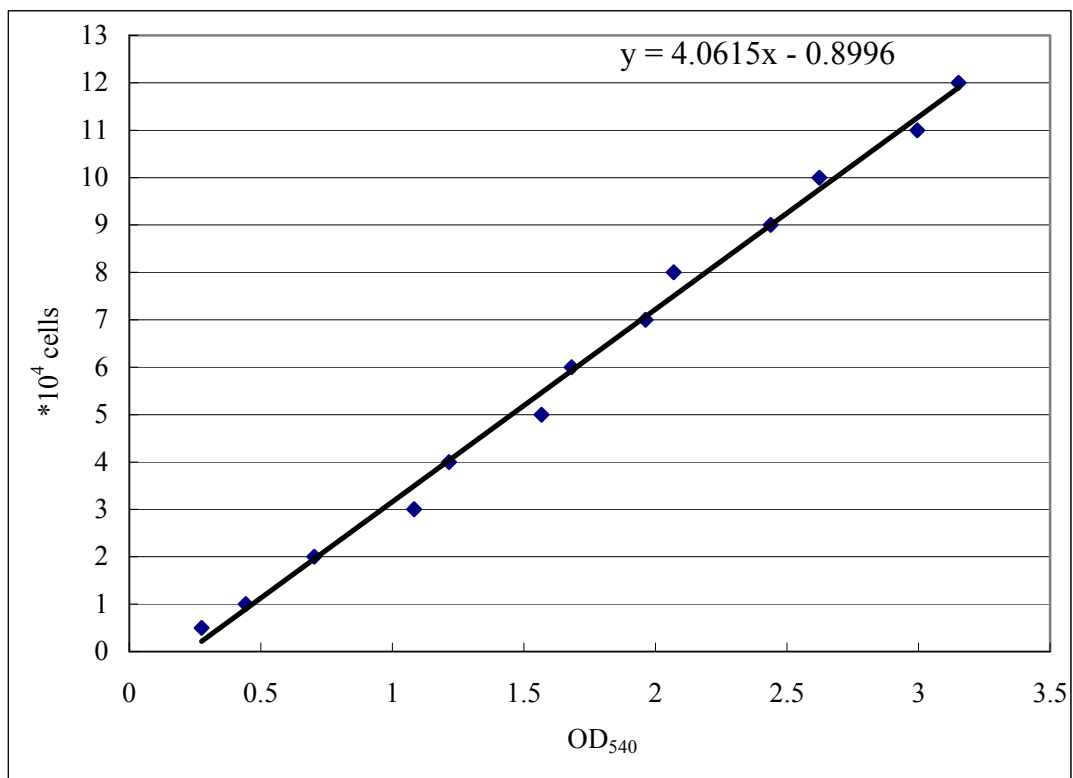


圖 29. MTT 細胞增生標準曲線： $y = 4.0615x - 0.8996$ 。X 軸為經 MTT 處理 SKOV-3 後之波長 540 nm 吸光值，Y 軸為所對應之細胞個數。本實驗以每 10⁴ 個細胞為一單位，測 0.5~12*細胞的吸光值，最後測得之吸光值分佈從 0.27~3.15。

	positive	negative	Wild-type hFSH(ng/ml)				
			0.625	1.25	2.5	5	10
三次之平均 OD ₅₄₀	2.35± 0.26	0.99± 0.22	2.10± 0.11	2.18± 0.20	2.16± 0.21	2.11± 0.16	2.44± 0.17
Cell numbers (*10 ⁴)	8.64	3.12	7.63	7.95	7.87	7.67	9.01
	20	NG-hFSH variant (ng/ml)					
		0.625	1.25	2.5	5	10	20
三次之平均 OD ₅₄₀	2.22± 0.20	1.93± 0.13	1.72± 0.19	1.71± 0.18	2.02± 0.17	1.71± 0.12	1.97± 0.20
Cell numbers (*10 ⁴)	8.12	6.94	6.09	6.05	7.30	6.05	7.10

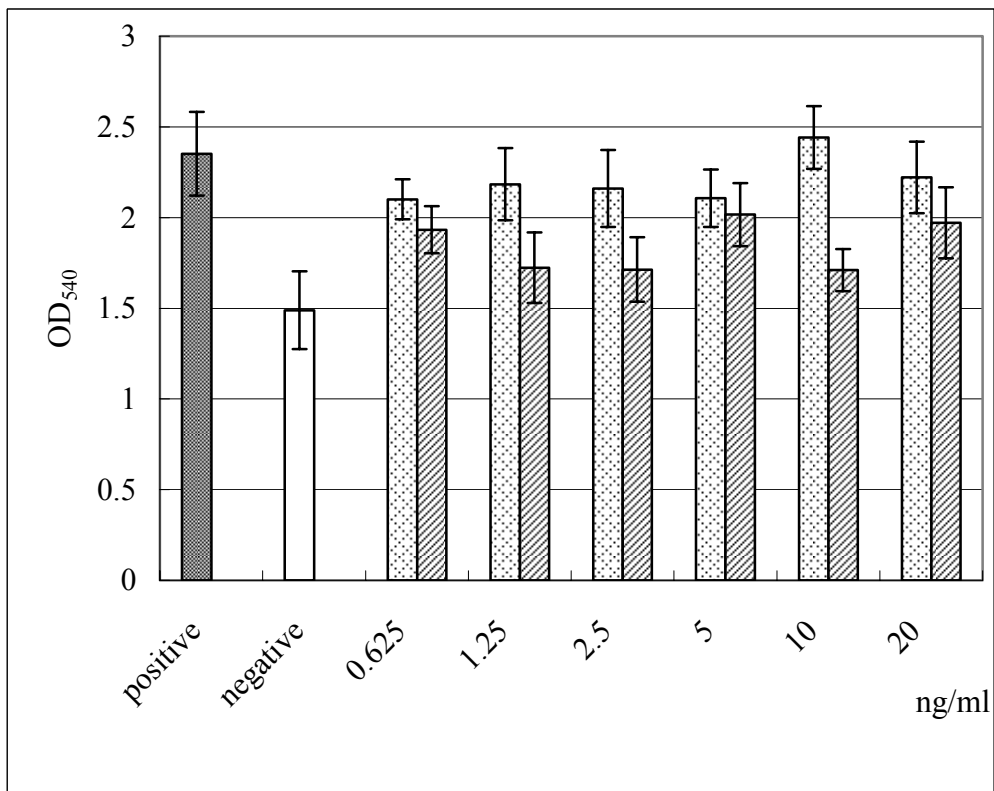


圖 30. hFSH 對 SKOV-3 增生活性之影響

- Positive control : DMEM + 10 % FBS
- Negative control : DMEM only
- Wild-type hFSH : DMEM + 0.625~20 ng/ml proteins
- NG-hFSH variant : DMEM + 0.625~20 ng/ml proteins

	10 ng/ml wild-type hFSH only	10 ng/ml wild-type + X ng/ml NG-hFSH					
		0.625	1.25	2.5	5	10	20
三次之平均 OD ₅₄₀	2.25±0.21	2.08±0.18	1.85±0.20	1.75±0.12	2.17±0.08	2.10±0.15	1.98±0.14
Cell numbers (*10 ⁴)	8.24	7.55	6.61	6.21	7.89	7.61	7.16

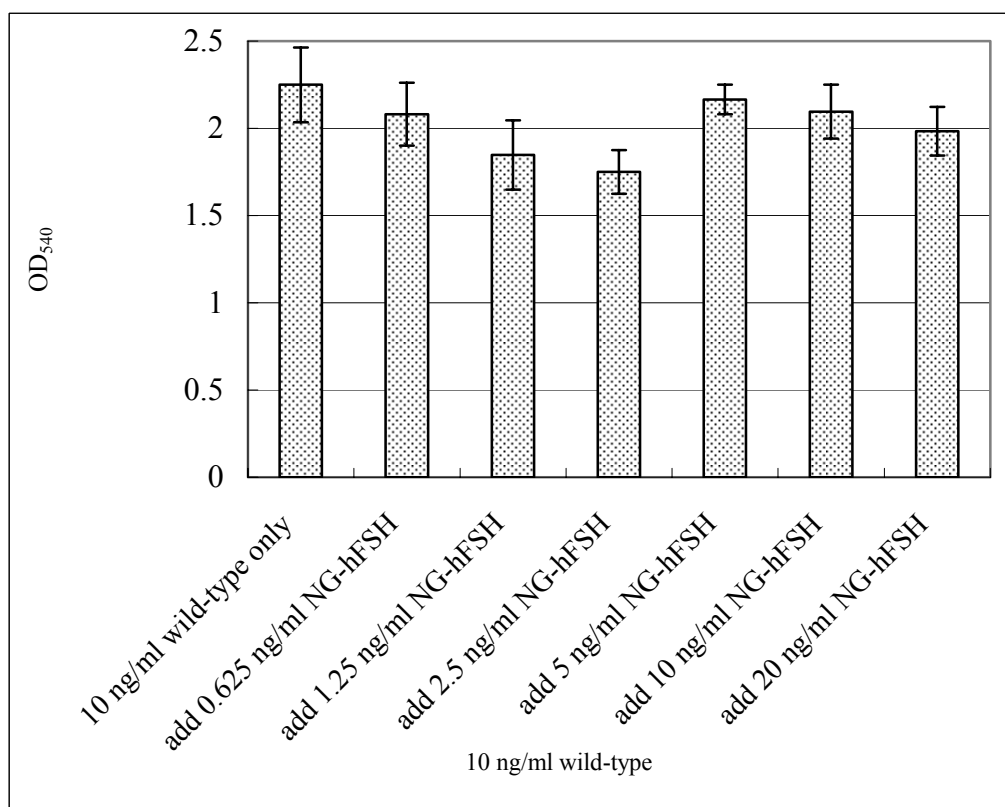


圖 31. 去醣基 hFSH 變異體與野生型 hFSH 競爭受體之增生活性影響。添加之劑量分別為 (10 ng/ml wild-type hFSH only) 與 (10 ng/ml wild-type hFSH + 0.625~20 ng/ml NG-hFSH variants) 。由圖中趨勢可看出單獨添加野生型 hFSH 會造成增生，但若額外添加 NG-hFSH 便可降低野生型 hFSH 的增生活性，而以 2.5 ng/ml NG-hFSH 影響最為顯著，降低 0.22 % 吸光值。

10 ng/ml	positive control	wild-type hFSH	NG-hFSH	hFSH	hFSH	hFSH + hFSH
三次之平均 OD ₄₅₀	0.69±0.06	0.64±0.07	0.97±0.06	0.95±0.06	0.86±0.13	1.17±0.07

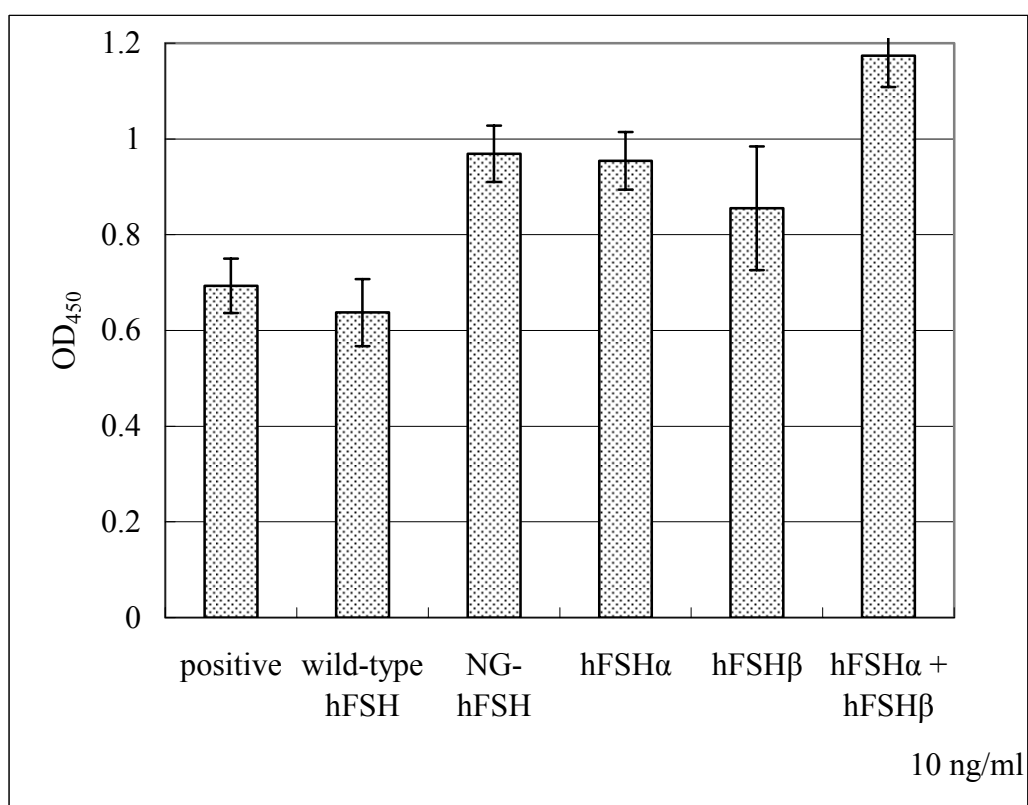
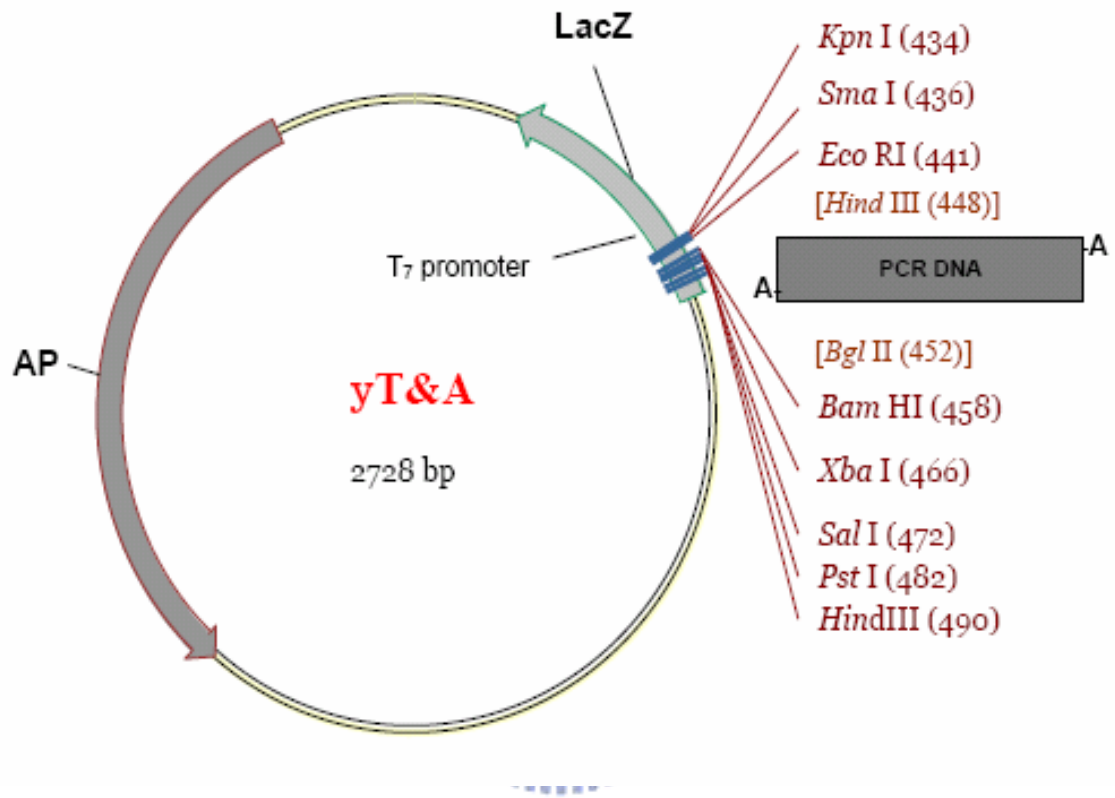


圖 32. hFSH 野生型、變異體、次單元體和次單元體混合液對 SKOV-3 的受體鍵結親和力分析。

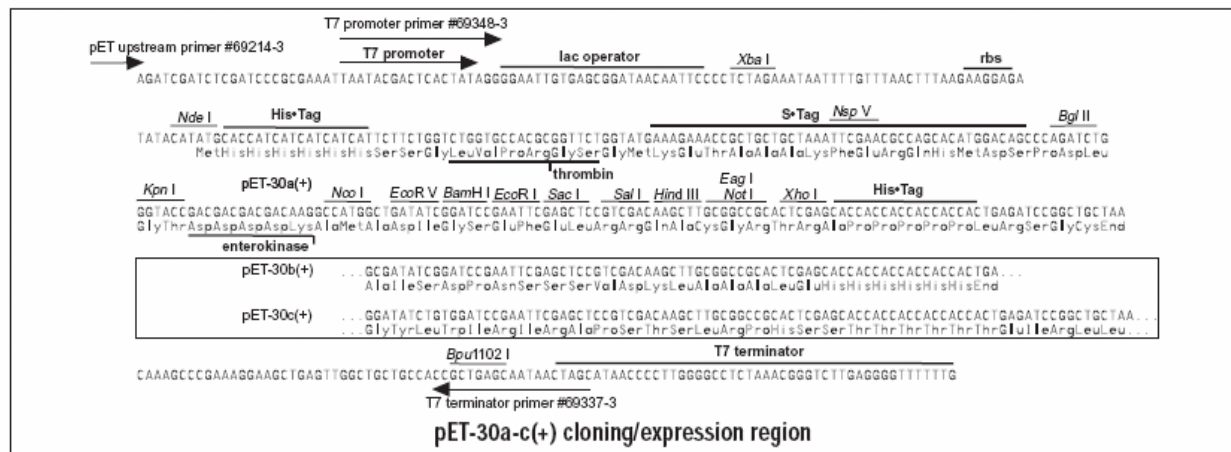
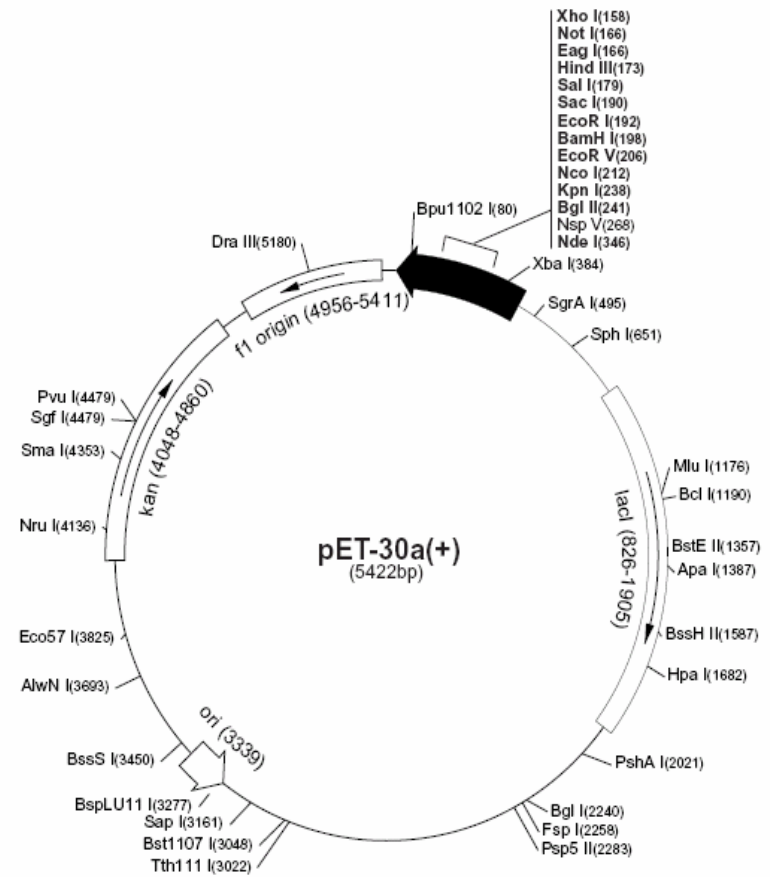
yT&A 選殖載體圖譜



附錄 A. yT&A 選殖載體之圖譜

pET-30a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	419-435
T7 transcription start	418
His•Tag coding sequence	327-344
S•Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	826-1905
pBR322 origin	3339
Kan coding sequence	4048-4860
f1 origin	4956-5411

The maps for pET-30b(+) and pET-30c(+) are the same as pET-30a(+) (shown) with the following exceptions: pET-30b(+) is a 5421bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*HI at 198. pET-30c(+) is a 5423bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*HI at 198.



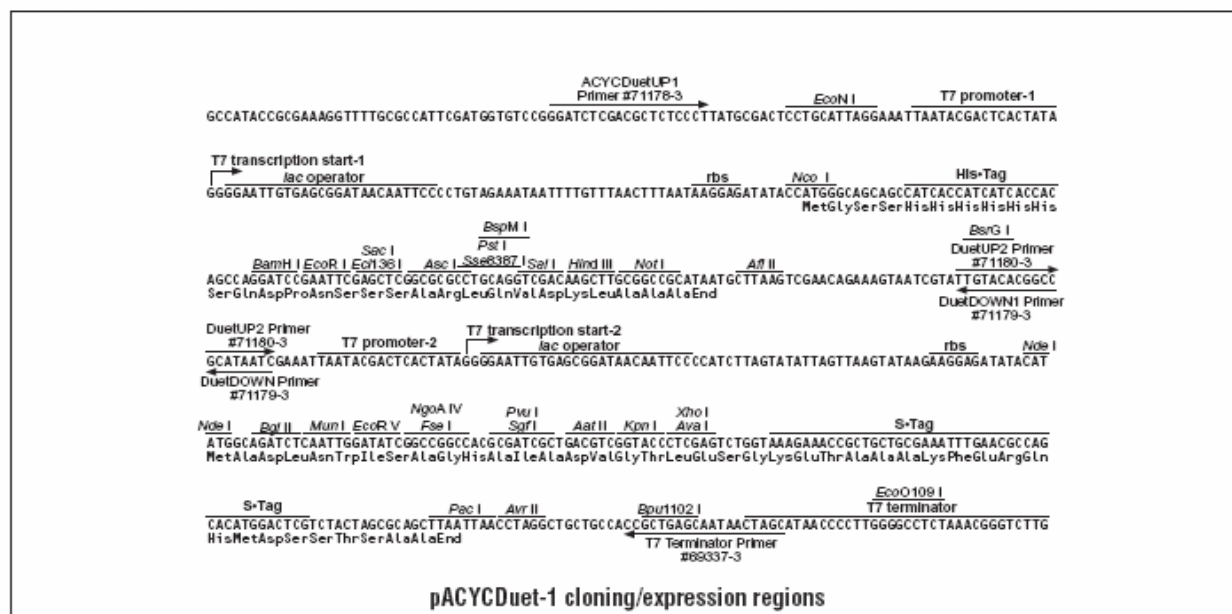
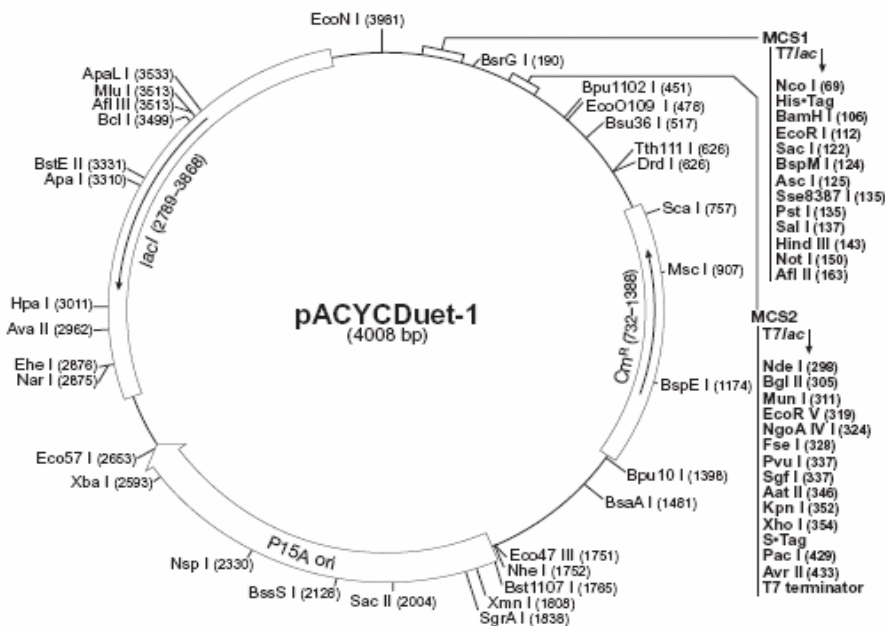
附錄 B. pET30a 表現載體之圖譜

pACYCDuet-1 Vector

TB336 10/02

	Cat. No.
pACYCDuet-1 DNA	71147-3
pACYCDuet-1 sequence landmarks	
T7 promoter-1	3992-4008
T7 transcription start-1	1
His*Tag [®] coding sequence	83-100
Multiple cloning sites-1 (<i>Nco</i> I- <i>Afl</i> II)	69-168
T7 promoter-2	214-230
T7 transcription start-2	231
Multiple cloning sites-2 (<i>Nde</i> I- <i>Avr</i> II)	297-438
S*Tag [™] coding sequence	366-410
T7 terminator	462-509
P15A origin	1750-2662
<i>cat</i> (<i>Cm^R</i>) coding sequence	732-1388
<i>lacI</i> coding sequence	2789-3868

pACYCDuet[™]-1 is designed for the coexpression of two target genes. The vector contains two multiple cloning sites (MCS), each of which is preceded by a T7 promoter/*lac* operator and ribosome binding site (rbs). The vector also carries the P15A replicon, *lacI* gene and chloramphenicol resistance gene. This vector can be used in combination with pETDuet[™]-1 (Cat. No. 71146-3) in an appropriate host strain for the coexpression of up to 4 target genes. Genes inserted into MCS1 can be sequenced using the ACYCDuetUP1 Primer (Cat. No. 71178-3) and DuetDOWN1 Primer (Cat. No. 71179-3). Genes inserted into MCS2 can be sequenced using the DuetUP2 Primer (Cat. No. 71180-3) and T7 Terminator Primer (Cat. No. 69337-3).



附錄 C. pACYCDuet-1 表現載體之圖譜