

國立交通大學

理學院應用科技學程

碩士論文

去醣基人類絨毛膜促性腺 β 次單元體
之菌體表現

Bacterial Expression of Non-glycosylated Human Chorionic
Gonadotropin β -subunit(NG-hCGB)

研究生：李業琳

指導教授：張正博士

中華民國九十六年元月

去醣基人類絨毛膜促性腺 β 次單元體之菌體表現

Bacterial Expression of Non-glycosylated Human Chorionic
Gonadotropin β -subunit(NG-hCGB)

研究生：李業琳

Student : Li Yeh-lin

指導教授：張 正

Advisor : Dr. C. Allen Chang



Degree Program of Applied Science and Technology

January 2007

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十六年元月

去醣基人類絨毛膜促性腺 β 次單元體之菌體表現

研究生：李業琳

指導教授：張 正 博士

國立交通大學理學院應用科技學程碩士論文

中文摘要

人類絨毛膜促性腺激素 β 次單元體 (hCG β) 對於多種癌細胞的增生存在著明確的正向促進關係，因為癌細胞上大量表現 hCG 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 hCG β 與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，已知醣基支鏈對於絨毛膜促性腺激素訊息傳遞過程之重要性，若除去醣基之 hCG 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 hCG β 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 hCG β 變異體 (NG-hCG β variant)，並表現出其蛋白質。期望去醣基 hCG β 變異體對於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 hCG β 和 hCG' B 兩段基因，並將其分別接合到表現載體 pQE-30 中，各大腸桿菌 M15 [pREP4] 作為表現宿主。未來期望去醣基絨毛膜促性腺 β -次單元體能扮演癌細胞的抑制劑或壓抑多種癌細胞發育之重要角色。

Bacterial Expression of Non-glycosylated Human Chorionic Gonadotropin β -subunit(NG-hCGB)

Student:Li Yeh Lin

Advisor: Dr. C. Allen Chang

Applied Science and Technology
National Chiao Tung University

Abstract

Human Chorionic Gonadotropin β -subunit (hCGB) to survive in clear to relation of promoting again many kinds of cancer cell. Because cause information transmission function and activate cancer cell's growth factor after displaying hCG receptor and its key and forming in a large amount on the cancer cell, so the key of the receptor on hCGB and cancer cell forms and plays a key role interdynamically.

On the other hand, the previous studies have showed that site-directed mutagenesis identified the specific roles of the individual carbohydrate chains of CG in signal-transducing activity and receptor-binding affinity.

If remove the carbohydrate chains of hCGB. The activation of transmission of the hCGB is reduced a lot of because of this, so it influences the information transmission activation caused after hCGB is formed instead of the key of the receptor seriously or not whether the carbohydrate chains exists.

The purpose of this research, in order to attempt to utilize the colon bacillus to recombine the decarbohydrate chains of hCG (NG-hCGB variant), and demonstrate its protein. The information transmission to the cancer cell is influenced to some extent to expect NG-hCGB, therefore reduce or inhibit the hyperplasia ability of the cancer cell.

First, hCG β cDNA (*hCGB*) and hCG' β cDNA (*hCG'B*) were amplified by PCR. Then, the products of PCR were inserted into pQE30, respectively. *Escherichia coli* M15[pREP4] were transformed for expression hosts of *hCGB*-pQE30 and *hCG'B*-pQE30, respectively. Through purification. We can take the protein. Expect NG-hCGB to act the inhibitor of the cancer cell or the important role who inhibits many kinds of cancer cell's development in the future.

誌 謝

本論文承蒙指導教授張正老師在實驗上悉心指導與啟發，使得學生得以順利完成碩士論文，在此獻上最誠摯的感謝。

此外，衷心感謝珮菁學姊在實驗上的教導讓我對分子生物有第一步的了解，也謝謝繼鋒學長在實驗上的進一步指導，小玉淳、小萬利、政憲、翊帆、幸怡、郁頻、志祥在實驗室的陪伴，班上同學友二、學妹俐妘、育芳、美雪，在我實驗遇到瓶頸時聽我傾訴，謝謝大家給了我這麼多的美好回憶及愉快的碩士生活，還有湘筵學姐，謝謝你無怨無悔的聽我人生的廢話，沒有妳我想我不會進入交大，由衷地感謝大家，更謝謝大家陪我走這一段人生路程。

最後要感謝我的家人默默地在我背後，支持著我，鼓勵著我，容忍著我，讓我能全心全意投入學業，今日得以有成，僅以此論文獻給我最親愛的家人。

目錄

中文摘要.....	iii
英文摘要.....	iv
誌謝.....	v
目錄.....	vi
圖目錄.....	ix
表目錄.....	xi
附錄.....	xi
第一章 緒論	
1-1 醣蛋白激素家族.....	1
1-1-1 簡介.....	1
1-1-2 結構特性.....	2
1-1-3 醣基支鏈之組成.....	3
1-1-4 醣基支鏈之重要性.....	4
1-2 人類絨毛膜促性腺激素.....	5
1-2-1 人類絨毛膜促性腺激素 β -次單元體.....	5
1-2-2 製造與分泌.....	7
1-2-3 人類絨毛膜促性腺激素之生理功能.....	8
1-3 人類黃體激素.....	9
1-3-1 人類黃體激素 β -次單元體.....	9
1-3-2 製造與分泌.....	10
1-3-3 人類黃體激素之生理功能.....	11
1-4 CG β -次單元體與 LH β -次單元體之關係.....	13

1-4-1 CG β 和 LH β 基因演化分析.....	13
1-4-2 CG 和 LH 與 receptor 的關係.....	14
1-4-3 CG β 和 LH β 臨床上的意義.....	16
1-5 研究動機與目的.....	16
第二章 材料	
2-1 菌株與細胞株.....	19
2-2 培養基.....	19
2-3 人類胎盤 cDNA 庫 (cDNA library)	20
2-4 轉殖載體.....	20
2-5 藥品試劑.....	20
2-6 溶液與緩衝液.....	22
2-7 儀器.....	25
第三章 方法	
3-1 實驗流程.....	26
3-2 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction).....	27
3-2-1 引子設計.....	27
3-2-2 PCR 材料與程式.....	28
3-3 yT&A 載體構築.....	29
3-3-1 PCR 產物之瓊脂洋菜膠體電泳.....	29
3-3-2 PCR 產物之純化.....	30
3-3-3 與 yT&A 載體進行接合反應 (Ligation)	31
3-3-4 大腸桿菌 JM109 之轉形 (Transformation)	31
3-3-5 質體 DNA 之微量製備 (miniprep)	32
3-4 pQE-30 載體構築.....	32

3-4-1 質體 hCGB-yT&A 之限制酶切割.....	32
3-4-2 表現載體 pQE-30 之限制酶切割.....	33
3-4-3 與表現載體 pQE-30 進行接合反應.....	34
3-4-4 大腸桿菌 M15 之轉形.....	34
3-4-5 選殖鑑定及 DNA 定序 (DNA sequencing).....	34
3-5 去醣基 hCG β - 和 hCG' β -次單元體之表現及純化.....	35
3-5-1 去醣基 hCG β - 和 hCG' β -次單元體之小量表現.....	35
3-5-2 SDS-PAGE.....	36
3-5-3 西方墨點法.....	38
3-5-4 決定去醣基 hCG β - 和 hCG' β -次單元體之溶解性.....	40
3-5-5 去醣基 hCG β - 和 hCG' β -次單元體之大量表現.....	40
3-5-6 去醣基 hCG β - 和 hCG' β -次單元體之純化.....	40
第四章 結果與討論	
4-1 放大 hCG β - 和 hCG' β -.....	43
4-2 yT&A 選殖載體之構築.....	44
4-3 pQE-30 表現載體之構築.....	44
4-4 去醣基 hCG β - 和 hCG' β -次單元體之表現.....	46
4-5 去醣基 hCG β - 和 hCG' β -次單元體之純化.....	49
第五章 結論與未來展望.....	51
第六章 參考文獻.....	55

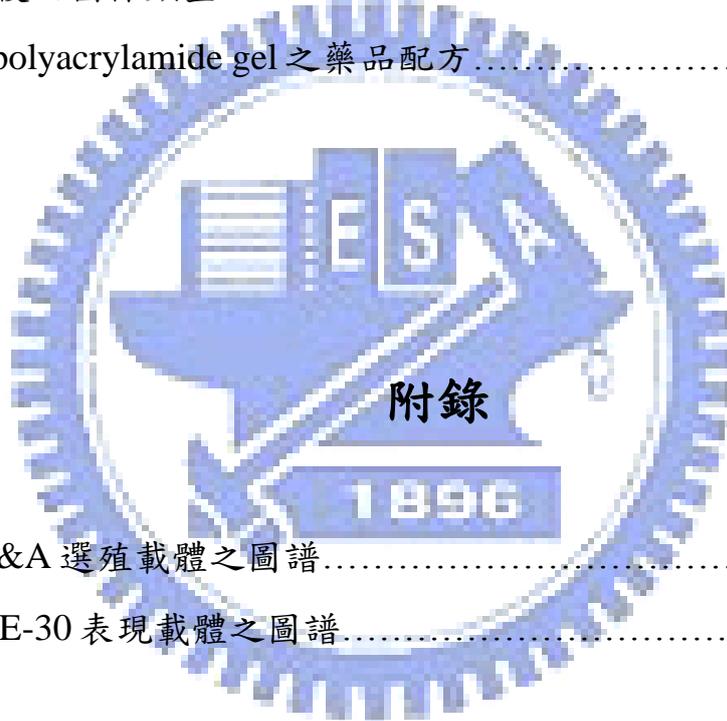
圖目錄

圖 1. 醣蛋白結構示意圖.....	2
圖 2. FSH-受體複合物晶體之緞帶示意圖.....	3
圖 3. TSH 中被發現的 N-連結寡醣支鏈.....	4
圖 4. CG β 和 LH β 基因串之組織和表現.....	6
圖 5. 依據 hCG 的結晶所做的分子模型圖.....	7
圖 6. 懷孕期間胎盤激素之分泌.....	8
圖 7. 女性生理之性激素調控網.....	11
圖 8. 類固醇生成作用(steroidogenesis)主要反應路徑圖.....	12
圖 9. 促性腺醣蛋白激素之演化假想模型.....	13
圖 10. pLH receptor 結構與 cDNA 序列.....	14
圖 11. Receptor 與 Hormone 作用之示意圖.....	15
圖 12. 聚合酶連鎖反應之反應程式.....	29
圖 13. Transfer cassette.....	38
圖 14. hCGB 和 hCG'B 之聚合酶連鎖反應產物之洋菜膠體電泳 結果.....	65
圖 15. 質體 hCGB-yT&A 切割反應之電泳結果.....	66
圖 16. 以限制酶鑑定將轉形進表現宿主 M15[pREP4]之質體： hCGB-pQE30 其切割反應之電泳結果.....	66
圖 17. 以限制酶鑑定將轉形進表現宿主 M15[pREP4]之質體： hCG'B-pQE-30 其切割反應之電泳結果.....	67
圖 18. hCGB-pQE30 之 DNA 定序與預期序列之比對結果.....	68
圖 19. hCG'B-pQE-30 之 DNA 定序與預期序列之比對結果.....	69
圖 20. NG-hCG β -次單元體(IPTG 濃度與時間關係)之小量表現	

SDS-PAGE 染色結果.....	70
圖 21. NG- hCG'β-次單元體(IPTG 濃度與時間關係)之小量表現 SDS-PAGE 染色結果.....	71
圖 22. NG-hCG β-次單元體小量表現和存在形式之 SDS-PAGE 染色結 果.....	72
圖 23. NG-hCG β-次單元體小量表現和使用 Buffer B 溶解其存在形式 之 SDS-PAGE 染色結果.....	73
圖 24. NG- hCG'β-次單元體小量表現和存在形式之 SDS-PAGE 染色結 果.....	74
圖 25. NG- hCG'β-次單元體小量表現和使用 Buffer B 溶解其存在形 式之 SDS-PAGE 染色結果.....	75
圖 26. 西方墨點法鑑定 NG-hCG β-和 NG-hCG'β-次單元體.....	76
圖 27. NG-hCG β-次單元體純化方法 A 之 SDS-PAGE 染色結果.....	77
圖 28. NG- hCG'β-次單元體純化方法 A 之 SDS-PAGE 染色結果....	78
圖 29. NG-hCG β-次單元體純化方法 B 之 SDS-PAGE 染色結果.....	79
圖 30. NG- hCG'β-次單元體純化方法 B 之 SDS-PAGE 染色結果....	80
圖 31. NG- hCGβ-和 NG- hCG'β-次單元體純化 SDS-PAGE 染色結 果.....	81
圖 32. NG- hCG'β-次單元體大量培育後純化 SDS-PAGE 染色結果..	82

表目錄

表 1. 使用之大腸桿菌品種與其基因型類別.....	22
表 2. 聚合酶連鎖反應之引子.....	33
表 3. 聚合酶連鎖反應之材料.....	34
表 4. <i>hCGB-yT&A</i> 之切割反應材料.....	39
表 5. pQE30 之切割反應材料.....	40
表 6. 轉形後之菌株類型.....	41
表 7. SDS-polyacrylamide gel 之藥品配方.....	43



附錄 A. <i>yT&A</i> 選殖載體之圖譜.....	83
附錄 B. pQE-30 表現載體之圖譜.....	84

第一章 緒論

1-1 醣蛋白激素家族

1-1-1 簡介

醣蛋白激素家族成員有 Chorionic gonadotropin hormone (CG)，Follicle-stimulating hormone (FSH)，Thyrotropin (TSH)，Luteinizing hormone (LH)等。它們是由兩個不同的 subunit 所組成，在 α -subunit 部分上這四種醣蛋白幾乎相同，而四種賀爾蒙的差異則來自於 β -subunit 所決定[1~3]。其中 FSH、TSH 和 LH 是由腦下垂體製造與分泌，然後經由細胞內一連串的訊息傳遞路徑傳遞到細胞核內，最終轉譯出蛋白質，再分泌至細胞外。在哺乳動物腦下腺細胞裡， α 、 β -subunit mRNA 先轉譯出 precursor，由一段 signal peptide (leader) 加上一段 apoprotein 組成，signal peptide 為疏水性(hydrophobic)，位於 precursor 的 N-terminal end，與內質網的膜融合之後便把整段 precursor 帶入內質網內，接著 signal peptidase 將 signal peptide 切掉，apoprotein 在內質網內進行一連串的醣化作用(glycosylation)之後，經過 α 、 β 之 dimerization 成一個完整的 heterodimer 四級結構，接著分泌出細胞外。

FSH 及 LH 為促性腺激素，兩者在生理上對於性腺的刺激亦有著相輔相成的密切關係，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 [4~6]。而 TSH 則為甲狀腺促進激素，在甲狀腺活性控制上面扮演著重要的角色 [7]。

但絨毛膜促性腺激素(chorionic gonadotropin hormone, CG) 的製

造分泌處則與其他三種醣蛋白不同，在靈長類動物懷孕期間或是偶蹄動物中為胎盤所製造分泌[8]。

1-1-2 結構特性

如前面所提到醣蛋白激素屬於 α/β 異質雙體 (α/β heterodimer) 之結構，由 α - 和 β -次單元體經由非共價鍵結合而成，非共價鍵結合理論最先被 Li and Starman 所提出[9, 10]。相同的 α -次單元體基因，位於人類第六對染色體：6q12→q21 [11]。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 α -次單元體為例，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 [12,13]，其中 Asn⁵² 和 Asn⁷⁸ 為 N-連結之醣基化位置 (N-linked glycosylation sites)，且有 5 個分子內雙硫鍵。而具有特異性的 β -次單元體，則位於不同的基因上，N-連結之醣基化位置 (N-linked glycosylation sites) 的數目及所在位置也不相同(圖 1) [1]。

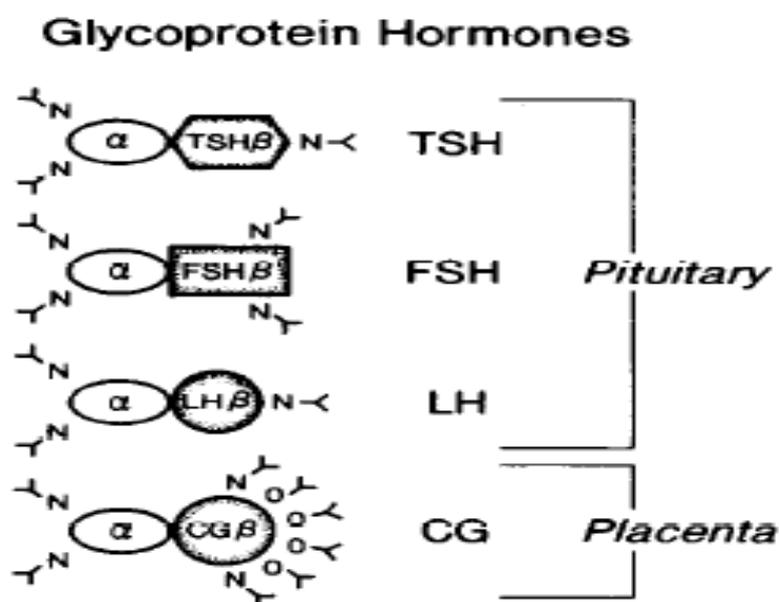


圖 1. 醣蛋白結構示意圖。共同的 α -次單元體和特異性的 β -次單元體，它們的 N-linked 和 O-linked 醣基數目。

關於醣蛋白與受體的鍵結方面，在 2005 年 Fan 和 Hendrickson 進一步地以 2.9 Å 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 2)。此激素-受體複合物的干擾值相當高 (2,600 Å²) 且有著高電荷密度，此模型可通用在其它的醣蛋白激素家族上，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[14]。

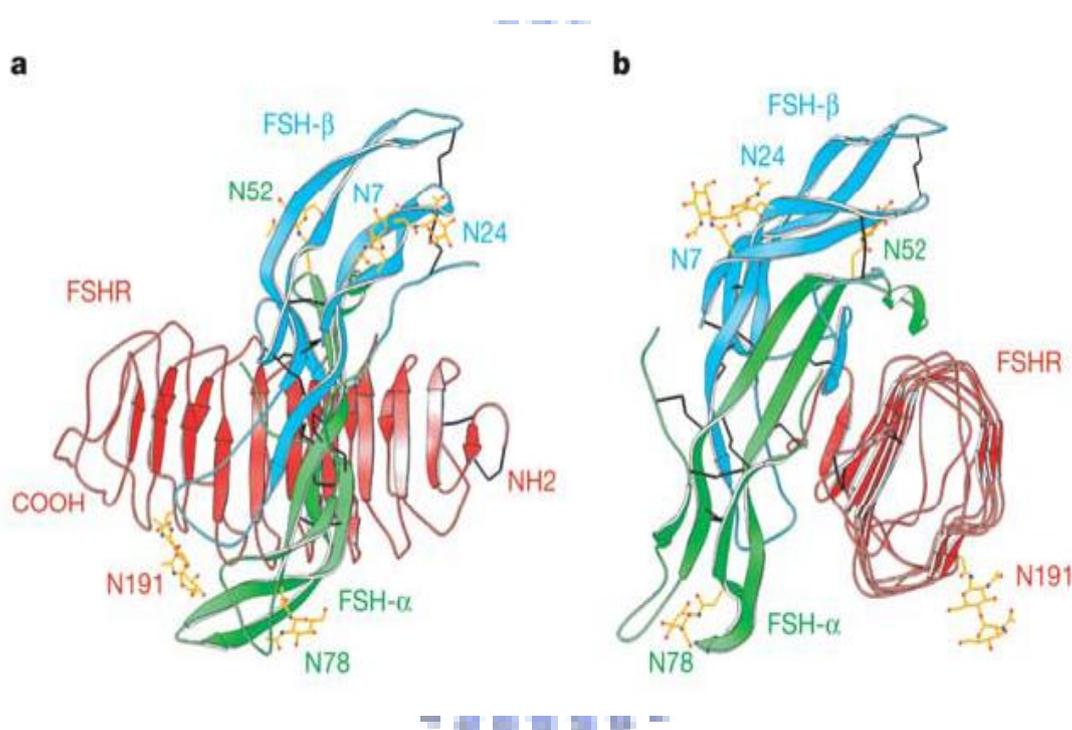


圖 2. FSH-受體複合物晶體之緞帶示意圖。圖 2-a 和 2-b 為縱向旋轉 90°之視野。FSH α 鏈、FSH β 鏈和 FSHR 各分別以綠色、天藍色和紅色顯示。

1-1-3 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(圖 3) [15, 16]。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)。

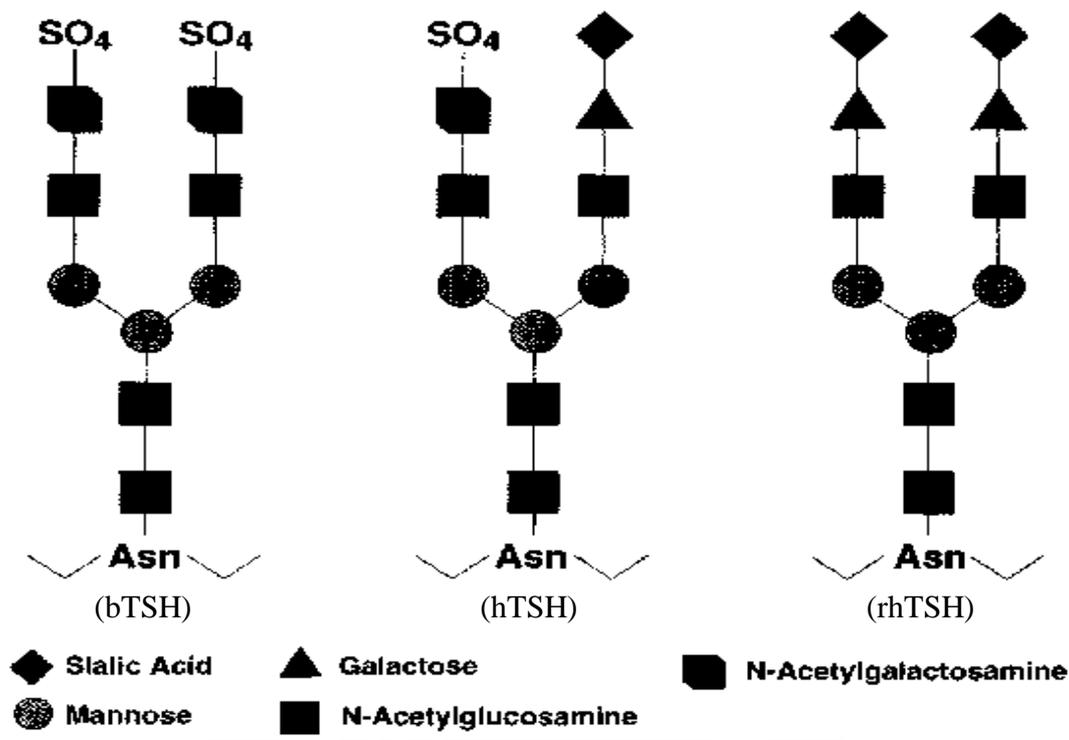


圖 3. TSH 中被發現的 N-連結寡醣支鏈。

1-1-4 醣基支鏈之重要性

到底醣基支鏈在整個醣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醣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。在絕大多數研究醣基功能的文獻中，皆說明了 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 [17~24]。

利用直接點突變之方式加以改變 α -次單元體 Asn52 成為 Asp [17]

或 Gln [18, 19]，如此除去 Asn52 之醣基部分，發現皆會嚴重降低訊息傳遞活性，而 Asn78 的醣基顯示可以防止次單元體的降解[20]。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 [19]。由以上文獻綜合之結果可知道突變掉 α Asn52、 α Asn78 皆會降低訊息傳遞活性。

但相對地，關於突變 α Asn52 之後的受體鍵結親和力，卻沒有特別的可能性。在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 [21]；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 [18, 22]。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，雖然生理上同為醣蛋白的作用細胞，但會因為選用不同的受測細胞，結果卻有著極大的差異性存在 [23]。但可以確信的是醣基會給予 α 、 β -次單元體彈性[24]，因此 α 、 β -次單元體彈性之醣基對於訊息傳遞和受體的鍵結能力皆有絕對之影響，而其中又以 α -次單元體 Asn52 的影響最為顯著。

1-2 人類絨毛膜促性腺激素

1-2-1 人類絨毛膜促性腺激素 β -次單元體

人類絨毛膜促性腺激素(Human Chorionic Gonadotropin ; hCG) β -次單元體基因位於 19q13.3，由一段 20 個胺基酸的 signal peptide 加上 145 個胺基酸的 mature peptide 組成，有兩個 N-linked glycosylation sites 和四個 O-linked glycosylation sites。在這四種醣蛋白中是唯一擁有 29 個延伸的胺基酸於 COOH 端[25]，但發現擁有這一段延伸的胺基酸並不會影響 RNA 的轉錄接合[26]。其實，人類絨毛膜促性腺激

素 β -次單元體的基因是由七個非常相似的基因或偽基因所組成的基因串[27~29]，其中僅有三個在胎盤中被表現出來，分別為CG β 5、CG β 3和CG β 8(圖4)[30]，因為只有這三個基因擁有有功能性的促進子[31]。其中又以CG β 5表現量最大，而CG β 2、CG β 6、CG β 7和CG β 8的表現量合計不到10%，因此即使這四種基因串有功能，它們的功能應該也是很低[32]。

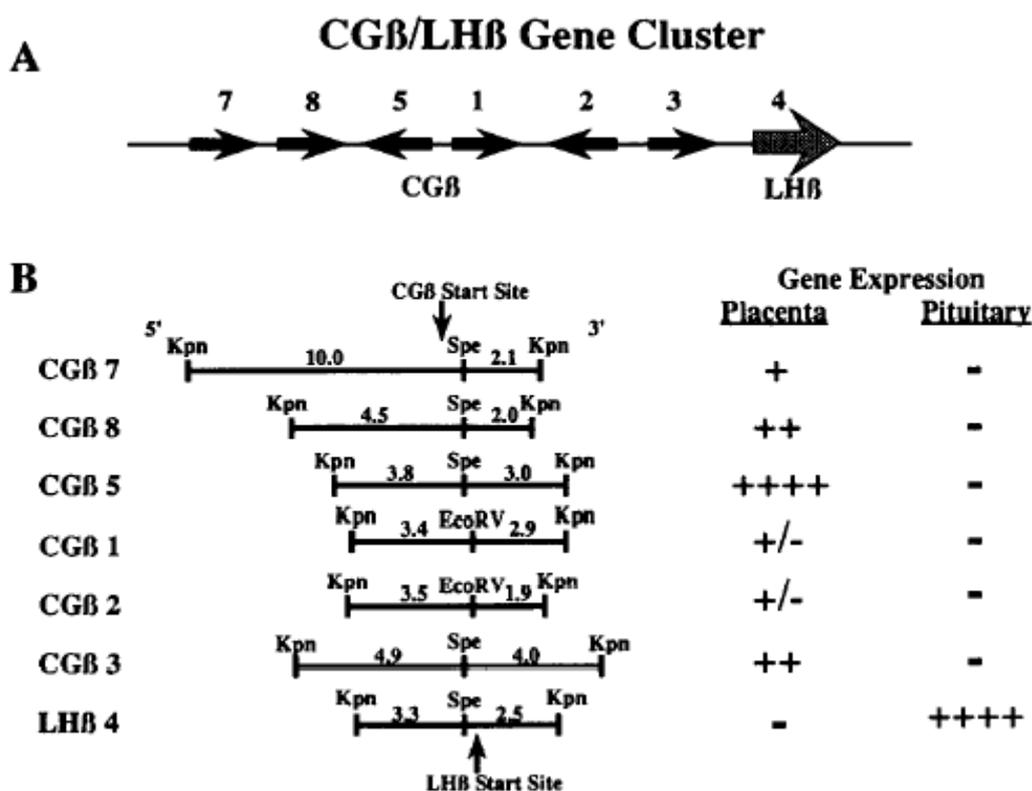


圖4. CG β 和LHB基因串之組織和表現

圖5為依據hCG的結晶所做的分子模型圖[33, 34]，由圖中可以看到位於 β -次單元體Gln54和其鄰近的長環。在鄰近位子的 α -次單元體則只顯現 α L1(12~40)，而旁邊的side-chains被移除乾淨。 β -Gln54從環的東邊橫過且稍微向下進入紙的平面位子， β -Arg43則是在東側的封閉環角度稍稍地朝向讀者[35]。

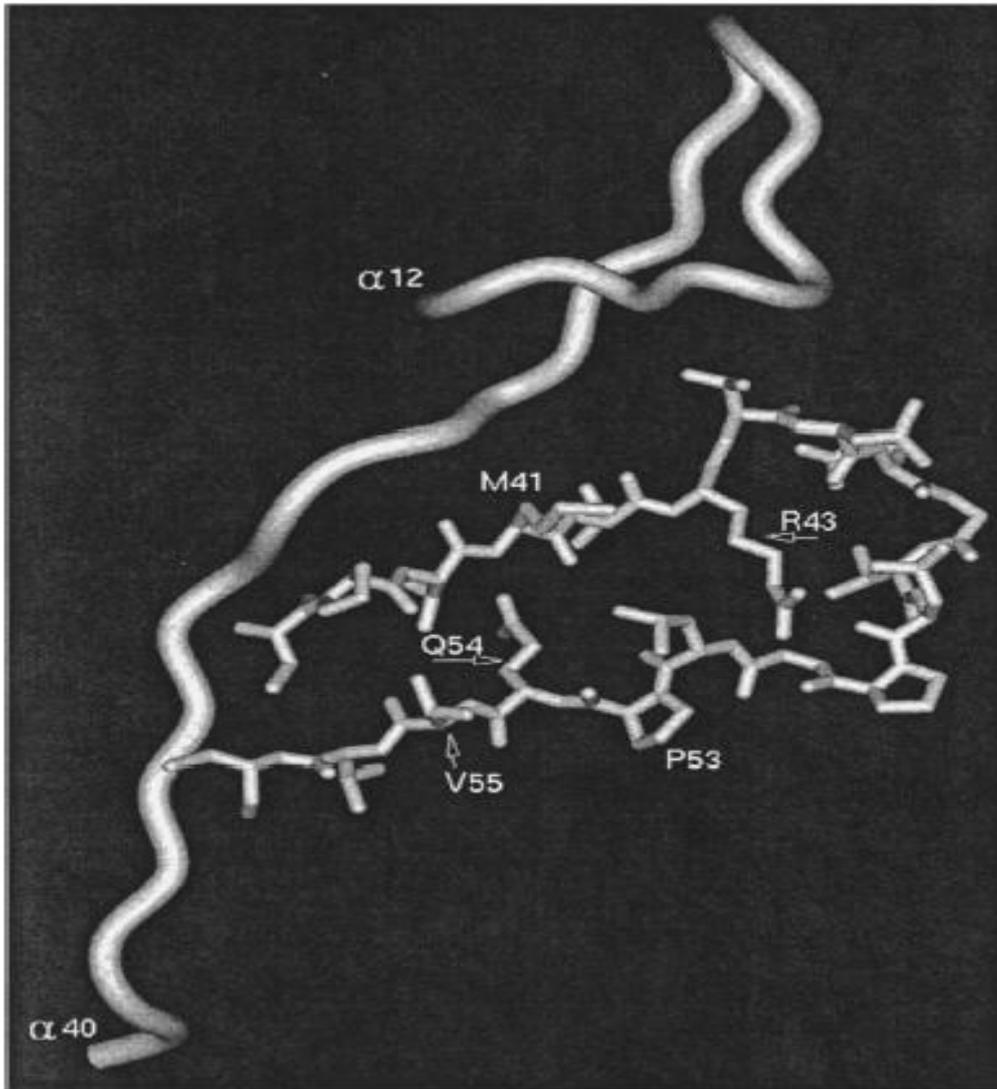


圖 5. 依據 hCG 的結晶所做的分子模型圖

1-2-2 製造與分泌

如同我們前面所提到，在靈長類動物懷孕期間或是偶蹄動物中的胎盤可以找到 CG，因為在正常的狀況下，它是由胎盤的滋養層組織合成，然後分泌進入母體和胎兒的血液中[36]。我們更可以很明確的確定在胎盤中製造分泌的是 CG β 5 和 CG β 3，至於其他的四種基因表現蛋白的影響則不是那麼地清楚。因為與 CG β 5 和 CG β 3 相比，它們雖然在同一條染色體上，但它們的轉譯起始點非常地不同，更因為實驗通常是選用胎盤的 RNA 所做的 cDNA，所以這些微量的表現是否

是利用其他的組織來合成，也是有可能的[32, 37]，只是我們並沒有深入了解。

1-2-3 人類絨毛膜促性腺激素之生理功能

人類絨毛膜促性腺激素在生理上最主要的功能，就是懷孕初期黃體的維持[38]。在受精之後，約 31 小時，絨毛膜促性腺激素會在血漿中快速的增加[39]，促使黃體分泌動情激素(estrogen)和黃體激素(progesterone)，以促使子宮內膜繼續生長，一直到胎盤本身可以分泌足夠的動情激素和黃體激素，差不多過了八週之後會再急速降低濃度(圖 6) [40~43]。

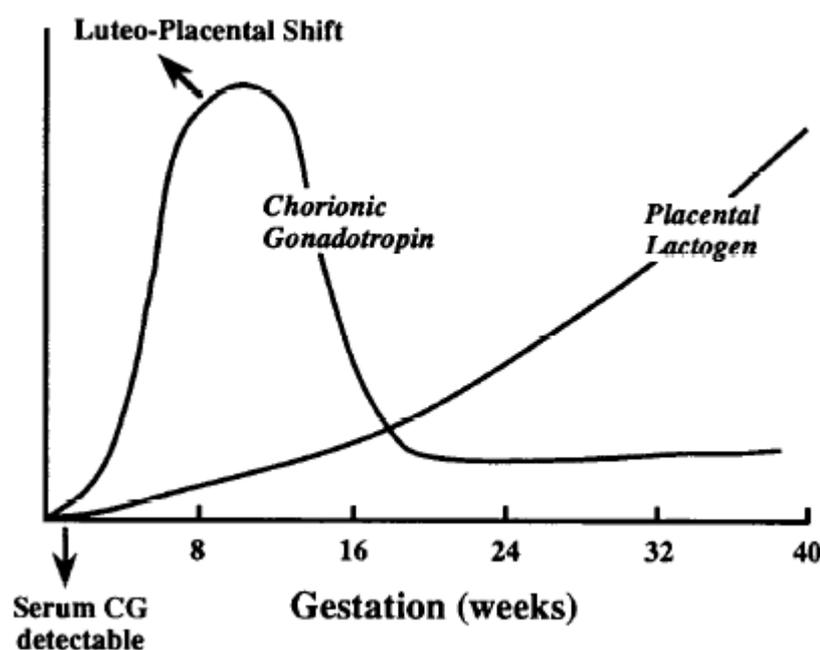


圖 6. 懷孕期間胎盤激素之分泌

因為細胞間作用機制，傾向於攻擊 CG 基因的轉錄作用，但關於這部份並沒有很明確的了解。但此機制的結果，造成在三個月後 CG 濃度的降低，卻是可以看見的。CG 是一種小分子蛋白質(分子量約

38,000)，於血液中半衰期約 1.5 天，在母體中很容易通過腎絲球，進入尿液而被排除體外，因此測定母體尿液中之 CG，可用來作為懷孕與否的一個指標。CG 在進入胎兒血液中，能促使胎兒與胎盤的類固醇生成 (steroidogenesis)，並能刺激男性胎兒睪丸分泌睪固酮 (testosterone)。

另外，除了做懷孕的檢測外，CG 還可以檢測異位懷孕 (ectopic pregnancy)、威脅性流產 (Threatened Abortion) 和滋養層腫瘤 (Trophoblastic Tumors)。

1-3 人類黃體激素

1-3-1 人類黃體激素 β -次單元體

人類黃體激素 (Human Luteinizing Hormone; hLH) β -次單元體，位於第十九對染色體上：19q13.33，由一段 20 個胺基酸的 signal peptide 加上 121 個胺基酸的 mature peptide 組成，有一個 N-linked glycosylation sites [44, 45]。

關於 LH β -的核甘酸序列研究，發現到一個奇特的現象，目前的人種中 LH β -的核甘酸序列有些許的差異，我們稱之為 LH 的多型態現象，目前研究到的差異點分別為 Trp⁸(TGG)→Arg⁸(CGG) 和 Ile¹⁵(ATC)→Thr¹⁵(ACC)，在 Code 8 和 15 分別為 Trp 和 Ile 被我們稱之為正常的 LH，而 Arg 和 Ile 則被我們稱之為突變的 LH [46]。進一步地統計調查，我們發現所謂突變的 LH 基因，大多出現在比較原始一點的人種間，如：Lapps/Northern Finland、澳洲的土著毛利人、Iceland、Faeroe Islands、Jordanians、Greenland、Vascos/Spain、Mayans/Mexico 和 Kotas/South India，再以突變比例而言，在北歐人種中出現的比例比亞洲人種來的高 [47]，這樣的基因突變並沒有造成

LH 與 receptor-binding 的鍵結被破壞，因此不會影響 LH 的正常分泌，卻會因為產生了不同型式的醣蛋白，在生理上有所限制[48~50]。在女性而言，月經週期的混亂是最明顯的，而青春期的延遲發育、第二性徵的不明顯、甚至於身高的高度都會有影響。這是因為突變的基因雖然保有原來的訊息傳遞功能，但改變了蛋白質的結構，還是會造成生理上的差異。

1-3-2 製造與分泌

LH 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)接收到 GnRH 訊息後經細胞內一連串的訊息傳遞路徑到細胞核內，使得促性腺激素細胞最終轉譯出 LH，再分泌至細胞外，至於 GnRH 和 LH 的調控關係，以女性生理為例，圖 7 清楚地說明了整個性激素調控關係 [51]，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 LH。

LH 經由血液運送到性腺組織-卵巢或睪丸。在女性卵巢中，LH 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 LH、FSH 和 GnRH 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) [52~54]。

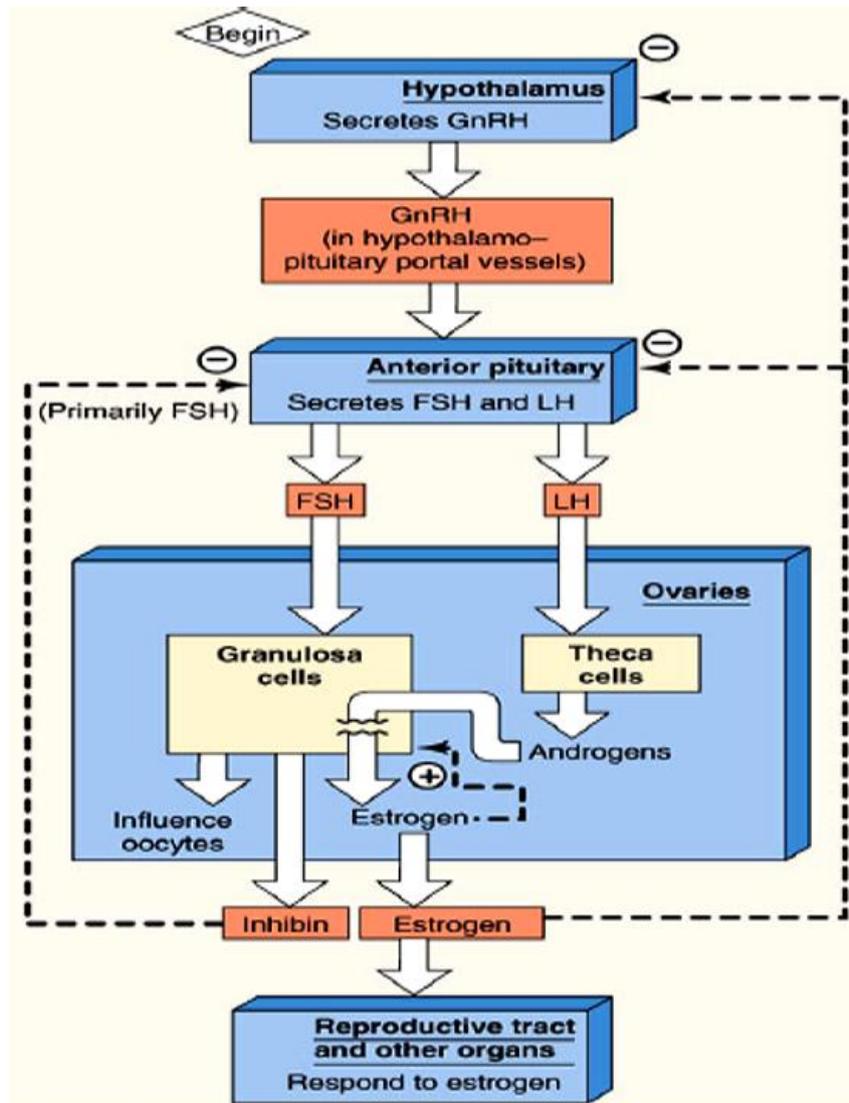


圖 7. 女性生理之性激素調控網

1-3-2 人類黃體激素之生理功能

人類黃體激素在女性生理上扮演著重要的功能，第一個就是 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 8 說明了類固醇生成作用的詳細反應流程 [55]。

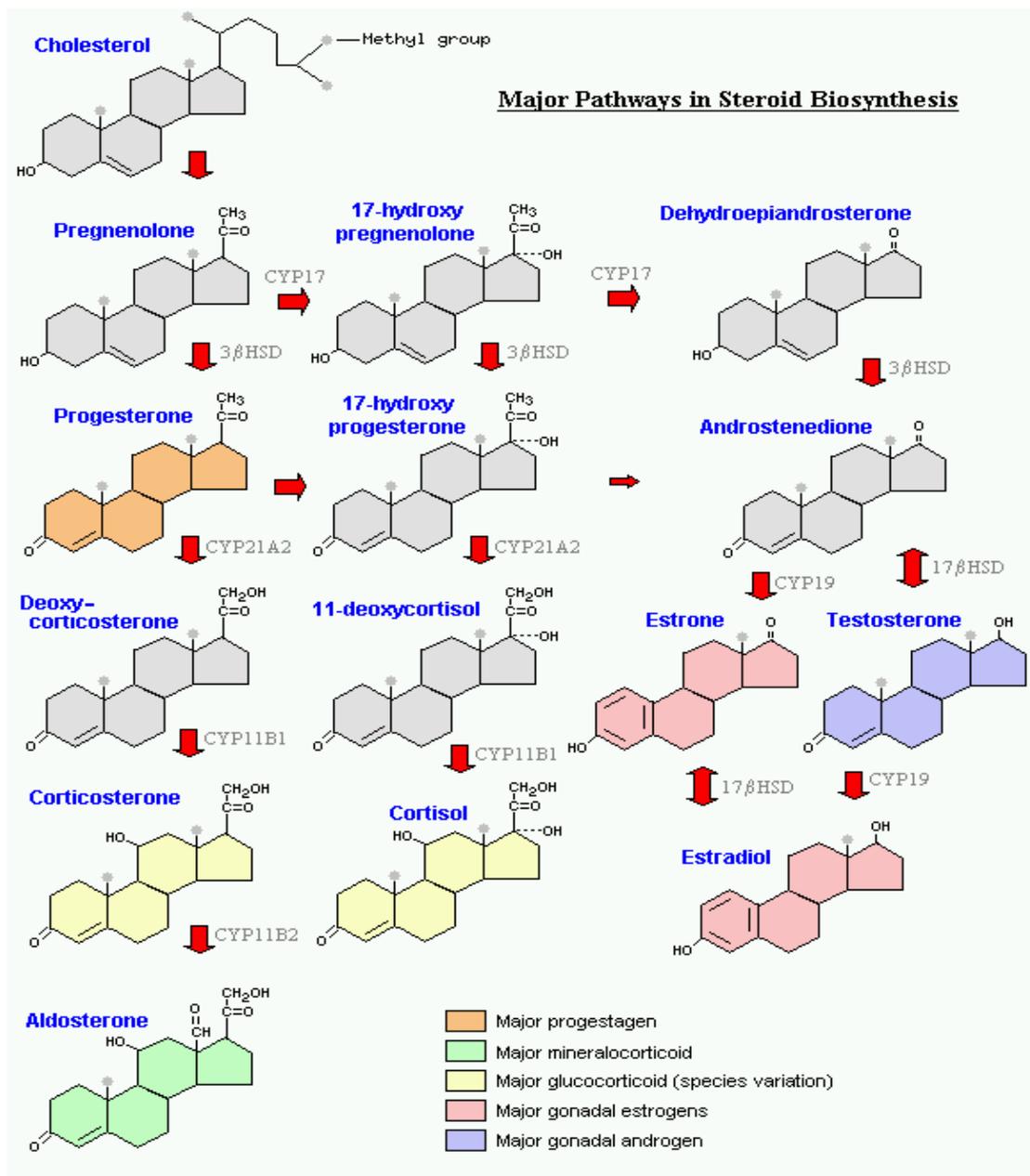


圖 8. 類固醇生成作用 (steroidogenesis) 主要反應路徑圖

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，而 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 [56]。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 [57]。

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[58]。

1-4 CG β -次單元體與 LH β -次單元體之關係

1-4-1 CG β 和 LH β 基因演化分析

根據醣蛋白的核甘酸與胺基酸序列進行演化分析，我們發現到最先出現的是 LH β ，其後是 FSH β 和 TSH β 。雖然在生理上 FSH 和 LH 作用比較有關聯性，但在親源分析上 FSH β 和 TSH β 的關係是比 FSH β 和 LH β 來的近些，因為 FSH β 演化於魚的 GTH- I β ，而 LH β 則演化自魚的 GTH- II β [59~61](圖 9)。

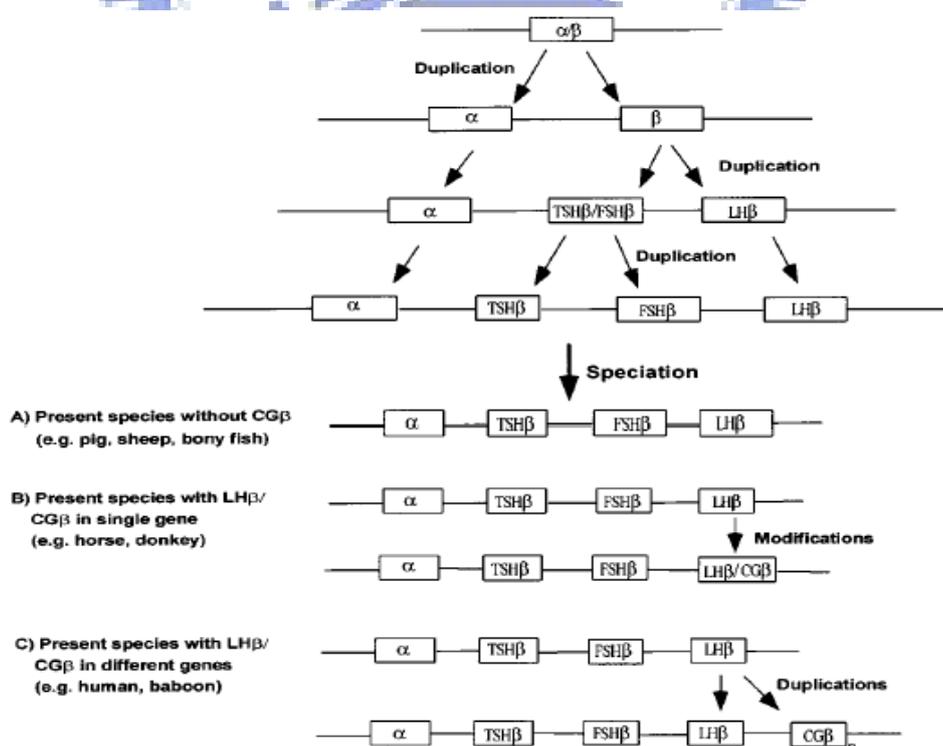


圖 9. 促性腺醣蛋白激素之演化假想模型

在人類胎盤的建立和其他靈長類中，CG 扮演一個關鍵性的角色，但並沒有表現在所有的哺乳動物上，卻可以在所有的哺乳動物上見到 CG β 基因來自於重複 LH β 基因[62]。如同我們前面所言，這兩個基因位於同一條染色體上，而兩者的相似度高達 94%，且在先前的分析上支持 CG β 基因展現正向選擇的策略[63]。

1-4-2 CG 和 LH 與 receptor 的關係

LH/CG 的 receptor 是一種膜蛋白，屬於有七個穿膜區域的 large plasma membrane receptor protein family，與 TSH、FSH receptors 在七個穿膜區域是相類似的，是 G-protein coupled receptor 家族的一員，可以藉由與 Gs protein 作用，活化 adenylyl cyclase 而進行一系列訊息傳遞的過程。Hormone-binding 區域則位於 receptor 細胞外的區域，包含了幾個 leucine-rich 重複[64, 65](圖 10)。

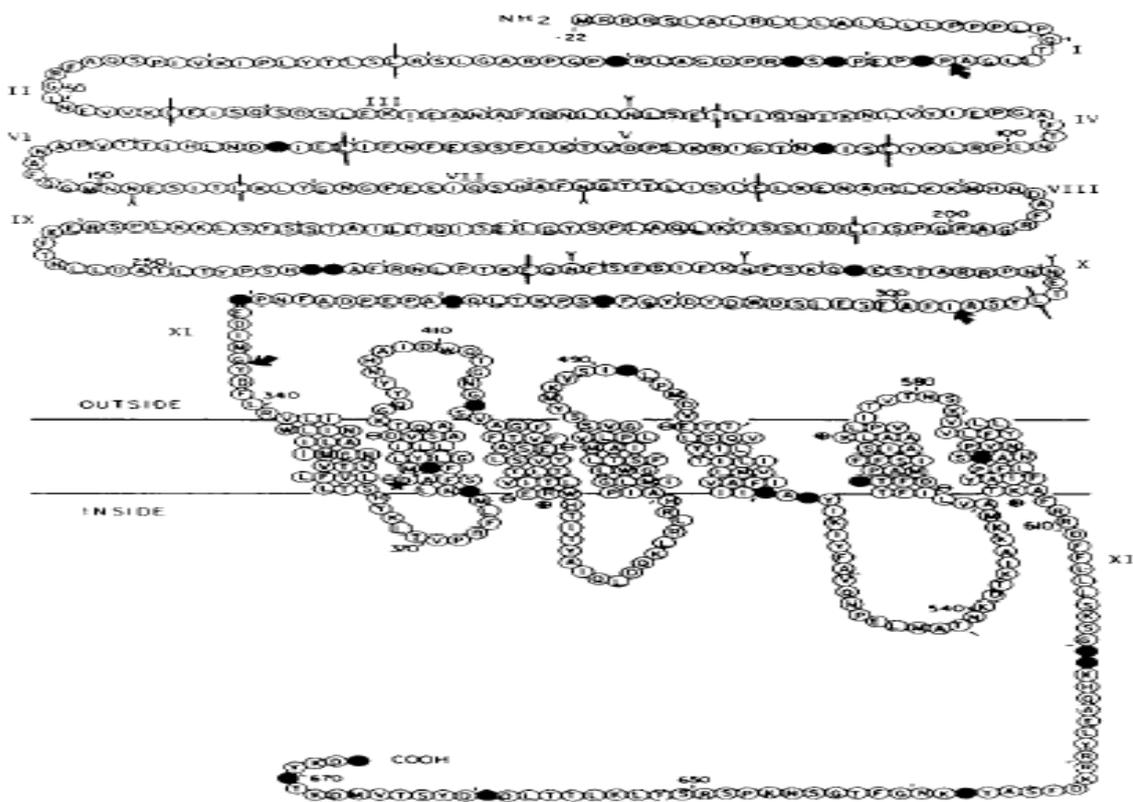


圖 10. pLH receptor 結構與 cDNA 序列

雖然，絨毛膜促性腺激素(CG)和黃體激素(LH)在生理現象中所扮演的角色不同，但兩者均與 LH/CG receptor 作用，以引發後續之生理反應。其實在這四種醣蛋白 receptor 的構形方面都差不多，差異來自於 β -次單元體，因此有研究指出，相同的 α -次單元體與不同的 β -次單元體相結合，在做活性測試時會發現有差異[24, 8]。圖 11 的示意圖可以看出 receptor 與 hormone 之間的關係。

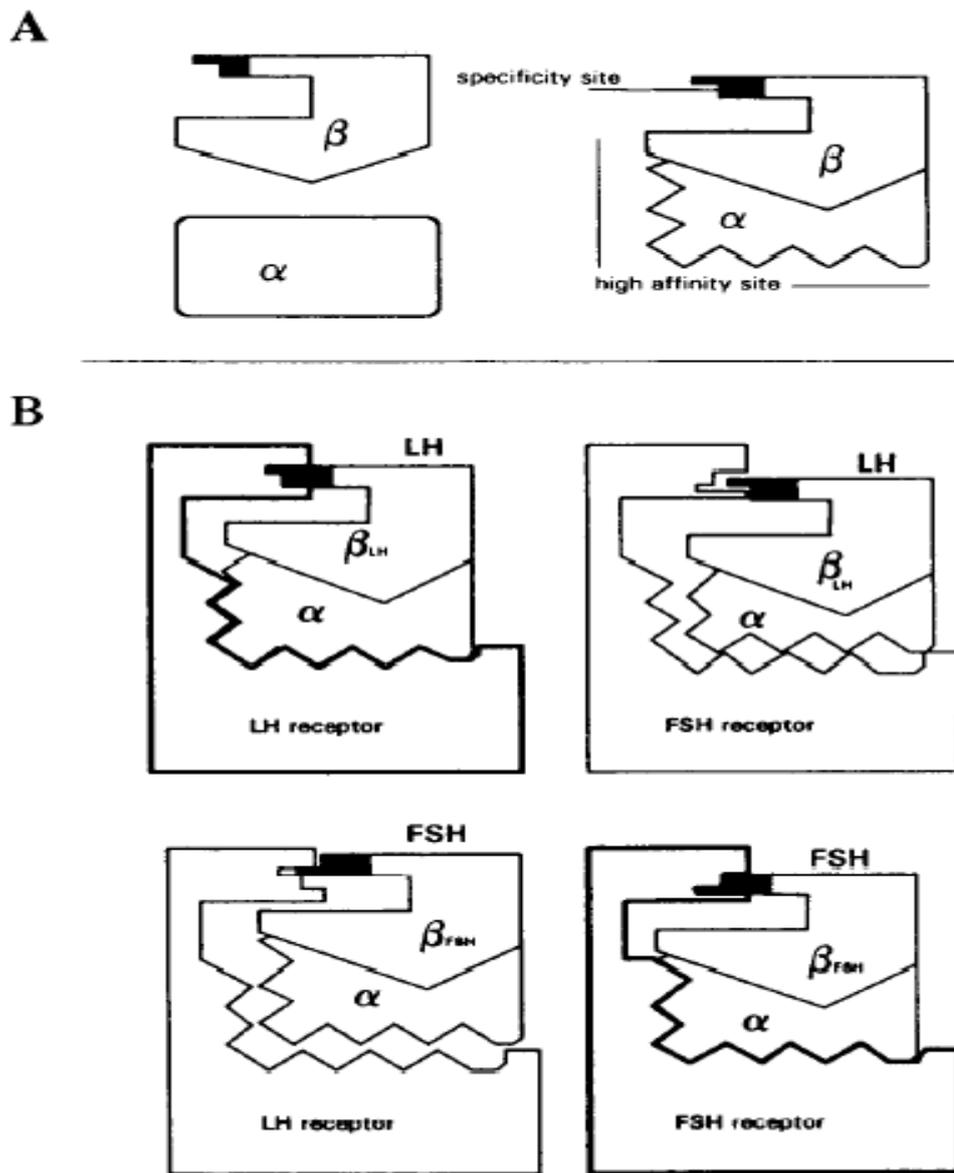


圖 11. Receptor 與 Hormone 作用之示意圖

1-4-3 CG β 和 LH β 臨床上的意義

其實在數種組織中會有微量的 CG 存在，在臨床上，懷孕初期的婦女，CG β 在血液中濃度會快速攀升[39]，其中約有 6% 會由尿液中排出[66]，因此 CG β 常常被用來檢測婦女是否懷孕。另外，對沒有懷孕的女生而言，CG β 被當成婦科癌症之癌細胞變化的腫瘤標記，因為患有婦科癌症的病人，尿液中會有大量的 CG β -次單元體存在[67]。除此之外，根據近年來的研究報告指出，對男性而言，hCG β 對前列腺癌增加轉移性顯型的改變會直接地影響[68]，造成前列腺癌細胞的轉移及侵入。

然而，如我們前面所提，CG 與 LH 不僅基因相似度高達 94%，且作用在相同的 receptor 上，所以 LH β -次單元體應該也可以作為腫瘤標記之用。但因為以下兩個原因，使得 LH β -次單元體並非適合做為腫瘤標記。第一點：LH β -次單元體為腦下垂體前葉分泌，在尿液中含量很低，不易偵測[69]。第二點：LH β -次單元體會隨著年齡的增加而增加[67]。

1-5 研究動機與目的

在近幾年來 CG 的研究著重於癌症醫學方面，綜合之前所提到的，我們了解了 CG β 和 LH β 之間的關連性。也因為在演化上同源性很高，讓我們存有一個假設，假若設計 LH β 的 primer 釣出一段擁有 LH β 大小的 CG β 片段，那它的激素功能會比較傾向於 CG β 還是 LH β 呢？

由文獻中知道，在健康的卵巢、前列腺器官細胞中 LH/CG receptor 的表現量很低，且在正常的組織中並不會出現[70~72]。假若在未懷孕的女性或男性尿液中偵察到 CG β ，在臨床上會判定這些器官可能被

癌化了。更因為 CG β 對於多種癌細胞的增生存在著明確的正向關係，其中包括前列腺癌、乳癌、卵巢癌……等[68, 73~75]，而我們所轉殖出來的基因又沒有做醣的修飾，是會擁有相同的表現，還是會扮演著抑制的角色或者根本沒有作用呢？

在多種癌症研究中，我們發現 E-cadherin 蛋白質與癌症細胞之調控有緊密的關聯，E-cadherin 蛋白質是細胞與細胞間的穿膜蛋白與 LH/CG 受體一樣，都是 Ca²⁺ 依賴的機制[76, 77]。而在上述的癌細胞上有著大量表現的 LH/CG 受體，受體再與 CG β 鍵結後，就會降低 E-cadherin 蛋白質的表現，更加活化了癌細胞，使之遷移或侵入[68]。

在初步的瞭解後，發現 CG β 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，活化了癌細胞。於是乎試圖阻斷癌細胞上 CG β 與 LH/CG 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 1-1-4 小節所述，已知道醣基支鏈對於 CG 訊息傳遞過程之重要性，如去除醣基之 CG β -次單元體的傳遞活性會因此降低甚多 [17~24]。

我們期望去醣基 hCG β - 和 hCG' β -次單元體對於多種癌細胞的訊息傳遞有所影響(包括前列腺癌、乳癌、卵巢癌……等)，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 hCG β - 和 hCG' β -次單元體兩次單元體。利用大腸桿菌系統表現 hCG β - 和 hCG' β -次單元體有以下幾點益處：一、原核生物無後修飾的醣基化過程，也就是表現出來的 hCG β - 和 hCG' 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，因先前研究點突變之文獻大部分是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 hCG β -次單元體做活性測試之文獻記載，故期望以此表現系統順利重組出去醣基的人類絨毛膜促性腺激素 β -次單元體，如此對於 CG 與 LH 的研究將提供另一角度的詮釋和新發現。

工欲善其事，必先利其器。因此本論文的研究目的為試圖製造去醣基 hCG β - 和 hCG' β -次單元體，以供後續的研究與發展。



第二章 材料

2-1 菌株

大腸桿菌株

- *Escherichia coli* JM109，購自於 Novagen 公司。
- *Escherichia coli* M15[pREP4]，購自於 Qiagen 公司。

品種 (Strain)	基因型 (Genotype)
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> $\Delta(lac-proAB)$ F' [<i>traD36 proAB⁺ lacI^f lacZ</i> $\Delta M15$]
M15[pREP4]	<i>nal^s str^s rif^r lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ F⁻ recA⁺ uvr⁺ lon⁺</i>

表 1. 使用之大腸桿菌品種與其基因型類別

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 μ m

filter 過濾滅菌，之後分裝儲存於-20 °C。

- 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 μm filter 過濾滅菌，之後分裝儲存於-20 °C。

- 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 0.22μm filter 過濾滅菌，然後分裝儲存於-20°C。

2-3 人類胎盤 cDNA 庫 (cDNA library)

- Human Placenta 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)
- pQE-30，購自於 Qiagen 公司。(附錄 B)

2-5 藥品試劑

PCR 引子

- 引子 (oligonucleotide primer) 製備由生工有限公司合成。

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

- DNA Clean/Extraction kit，購自於 GeneMark。

酵素

- *Taq* DNA polymerase，購自於 Violet 公司。
- Restriction enzyme *BamH I*，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 Fermentas 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
- GeneRuler™ DNA ladder mix，購自於 Fermentas 公司

Protein marker 標準品

- Prestained protein Ladder, ~10-170 kDa，購自於 Fermentas 公司。
- Unstained protein standards 14.4~116.25，購自於波仕特公司。

一級抗體

- Mouse anti-His monoclonal antibody，購自於 Amersham Biosciences Ltd.。

二級抗體

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

Hyperscassette™ 和 **Hrperfilm™** (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。
- 1 % Agarose gel
取 1 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)

- 1× SDS sample-loading buffer
0.5M Tris-Cl (pH 6.8) 1.2ml、100% glycerol 1ml、10 % SDS 2ml、0.1 % bromophenol blue 0.5ml 和 2-mercaptotethanol 0.5ml，最後用 ddH₂O 補至 10ml 混合均勻。以 0.45 filter 過濾後儲存於-20 °C。
- 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 I
600 ml ddH₂O、300 ml methanol 和 100 ml glacial acetic acid 混合均勻，儲存於室溫。
- Destain solution II
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，利用 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 % (W/V) skim milk

0.2 % Tween 20 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 B**

100 mM NaH₂PO₄、10 mM Tris-Cl 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 和 8 M urea 混合均勻，利用 HCl 調整 pH 值至 6.3。

- **Elution buffer E**

100 mM NaH₂PO₄、10 mM Tris-Cl 和 8 M urea 混合均勻，利用 HCl 調整 pH 值至 4.5。

- **Regeneration buffer**

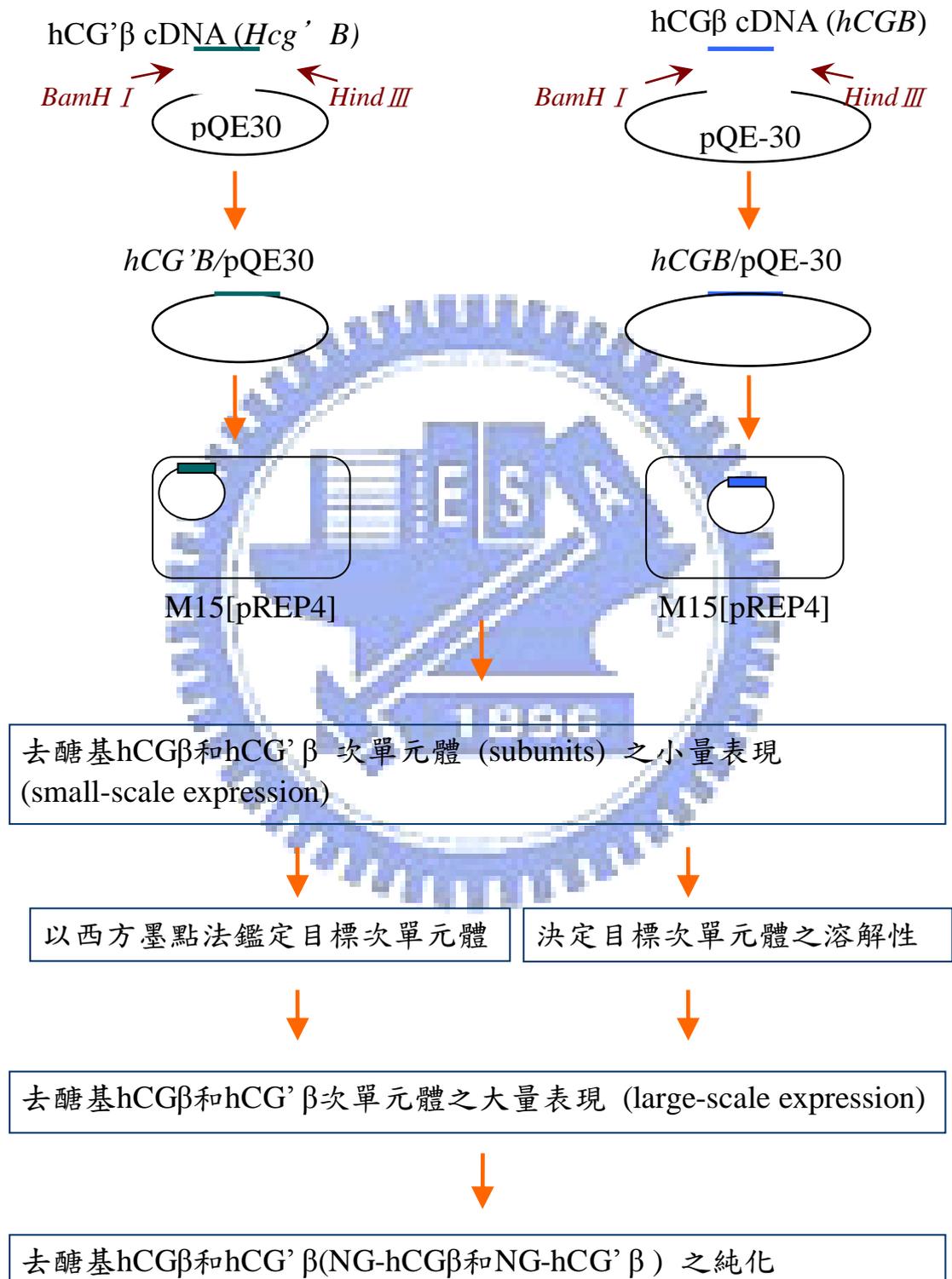
6 M GuHCl 和 0.2 M acetic acid 混合均勻。

2-7 儀器

- Polymerase Chain Reaction (PCR) machine : iCycleTM 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.
- 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)

hCG 由胎盤滋養層所合成並作用於胎盤中，所以實驗設計上以實驗室現有的 commercial “human Placenta Marathon-Ready cDNA ” 作為選殖 hCG 基因的模版 (template) ，利用 PCR 方式分別放大 *hCGB* 和 *hCG'B* ，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 *hCGB* 和 *hCG'B* 殖入 *E. coli* JM109 及 M15 ，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
hCGB (F)	5'-CGGGATCCTCCAAGGAGCCGCTTCGGC-3'	27
hCGB (R)	5'-CCCAAGCTTTTGTGGGAGGATCGGGGTGT-3'	29
hCG'B (F)	5'-CGGGATCCTCCAGGGAGCCGCTTCGG-3'	26
hCG'B (R)	5'-CCCAAGCTTGAGGAAGAGGAGGCCTGAG-3'	28

表 2. 聚合酶連鎖反應之引子

- 如表 4 所述，hCGB (F) 為放大 *hCGB* 片段之前置引子，hCGB (R) 同樣為反置引子；hCG'B (F) 為放大 *hCG'B* 片段之前置引子，hCG'B (R) 同樣為反置引子。【註：標線處為限制酶切位 (restriction cutting site)】
- 如同緒論所提，hCG β 和 hCG' 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。

- hCGB (F)、hCGB (R) 之限制酶切位分別為 *BamH I* 和 *Hind III*，設計於往後利於 hCGB 構築於表現載體 pQE-30；而 hCG'β (F)、hCG'β (R) 之限制酶切位亦分別為 *BamH I* 和 *Hind III*，亦設計於往後利於 hCG'β 構築於表現載體 pQE-30。
- 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 °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 Placenta Marathon-Ready cDNA	0.5
5 μM Forward primer	1.5
5 μM Reversward primer	1.5
10x PCR buffer	5
1 mM dNTPs	5
ddH ₂ O	36
Taq DNA polymerase	0.5
Total volume	50

表 3. 聚合酶連鎖反應之材料

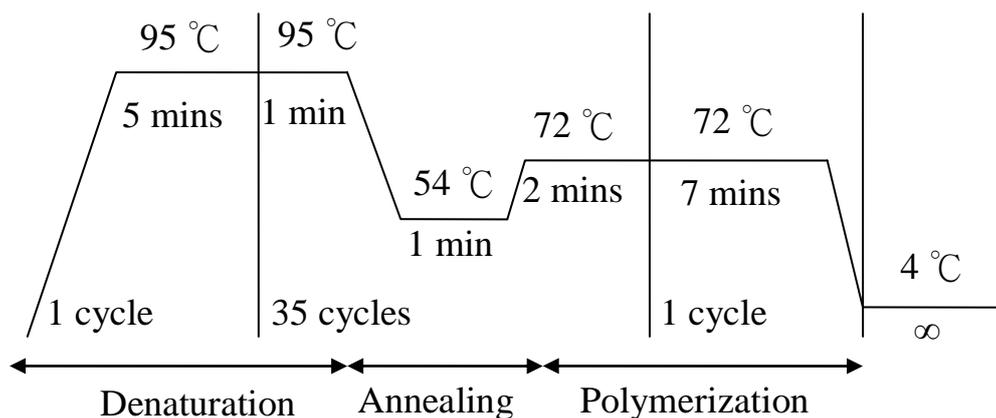


圖 12. 聚合酶連鎖反應之反應程式

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 1 % 瓊脂洋菜膠 (agarose gel) :

將 gel-casting tray 置放於 tape 上，插入 well-forming comb。取 1 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 30-40 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 30 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 10 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 (*hCGB* 為 435 base pairs；*hCG β* 為 363 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 5 μ l 純化後的 PCR 產物與 1 μ l 的 yT&A 載體混合，接著加入 1 μ l ligation buffer A、1 μ l ligation buffer B 以及 1 μ l 的 T4 DNA ligase 和 1 μ l 的 ddH₂O，混合均勻後放置於室溫 2 小時或 4 °C 隔夜反應。

3-3-4 大腸桿菌 JM109 之轉形 (Transformation)

- 勝任細胞 (competent *E.coli* JM109) 之製備：

以接菌環在 JM109 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 °C、200 rpm 之迴轉式振盪培養箱。取 500 μ l 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 °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 °C 冰箱中)，再以 2800 rpm、4 °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 °C 冰箱中)。稍微混合均勻後，接著每 100 μ l 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 °C。

- 大腸桿菌 JM109 之轉形：

將 5 μ l 的接合反應產物和 50 μ l 的勝任細胞 (JM109) 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 °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 800 μ l 的 LB 培養基中，以 37 °C、200 rpm 震盪培養 1 小時。濃縮成 100 μ l~150 μ l 的菌液塗佈於 LB/Ampicillin 培養皿。之後將培養皿反置於 37 °C 的迴轉式振盪培養

箱中 15~17 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 JM109 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 50µg/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 µl “Solution I” 反覆震盪復溶菌塊。接著加入 200 µl 的 “Solution II”，輕微翻轉離心管 5 次，靜置 1 分鐘。再加入 200 µl 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 µl 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 µl 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 pQE30 載體構築

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

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

切，使其成為 *hCGB* 和 *yT&A* 兩段 DNA，反應藥品如表 6 所述，以 37 °C 水浴反應 5 小時。

hCGB-yT&A

材料	體積 (μl)
<i>hCGB-yT&A</i>	14
10× Buffer E	2
Restriction enzyme <i>BamH I</i>	1
Restriction enzyme <i>Hind III</i>	1
ddH ₂ O	2
Total volume	20

表 4. *hCGB-yT&A* 之切割反應材料

3-4-2 表現載體 pQE-30 之限制酶切割

如同質體 *hCGB-yT&A* 之切割反應，pQE-30 則利用 *BamH I* 和 *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 5 小時。

pQE-30

材料	體積 (μl)
pQE-30	5
10× Buffer E	1
Restriction enzyme <i>BamH I</i>	1
Restriction enzyme <i>Hind III</i>	1
ddH ₂ O	2
Total volume	10

表 5. pQE-30 之切割反應材料

3-4-3 與表現載體 pQE-30 進行接合反應 (Ligation)

切割完之 *hCGB*、*hCG'β*、和 pQE-30 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 *BamH I-hCGB-Hind III* 與 1 μl 的 *BamH I-pQE-30-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；而 *hCG'β* 條件與 *hCGB* 相同。

3-4-4 大腸桿菌 M15[pREP4]之轉形 (Transformation)

與前述 JM109 之轉形相同，*hCGB-pQE-30* 和 *hLHB-pQE-30* 轉形至 M15[pREP4]，培養於 LB/Kanamycin/Ampicillin 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 *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 hCG β -及 hCG' β -次單元體之表現[78]及純化

此時轉殖菌類型，如下表 8 所示。

菌株類型	抗藥性 (antibiotic resistance)
1. hCGB-pQE-30 [M15 (pREP4)]	Kanamycin/Ampicillin
2. hCG' β -pQE-30 [M15 (pREP4)]	Kanamycin/Ampicillin

表 6. 轉形後之菌株類型

3-5-1 去醣基 hCG β -和 hCG' β -次單元體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 5 ml 含有適當抗生素的 LB 培養基中 (LB/Kanamycin 濃度：25 $\mu\text{g/ml}$ 、LB/Ampicillin 濃度：50 $\mu\text{g/ml}$)，隔夜培養於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm。取 50 μl 的隔夜菌液接種至 5ml 含有適當抗生素的 LB 培養基中，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm 下培養至 OD₆₀₀ 達 0.6~0.8。加入 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 (pQE-30) 轉形進 *E. coli* 的菌液，此菌液同樣加入 1 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 OD₆₀₀ 皆達 0.6~0.8 之菌液繼續培養 6 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 10 μl bacterial lysate 加入 10 μl 1 \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 7. 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。首先將兩玻璃片依照操作手冊組裝起來，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 1 \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 40 mA 電流轉漬 40 分鐘。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。

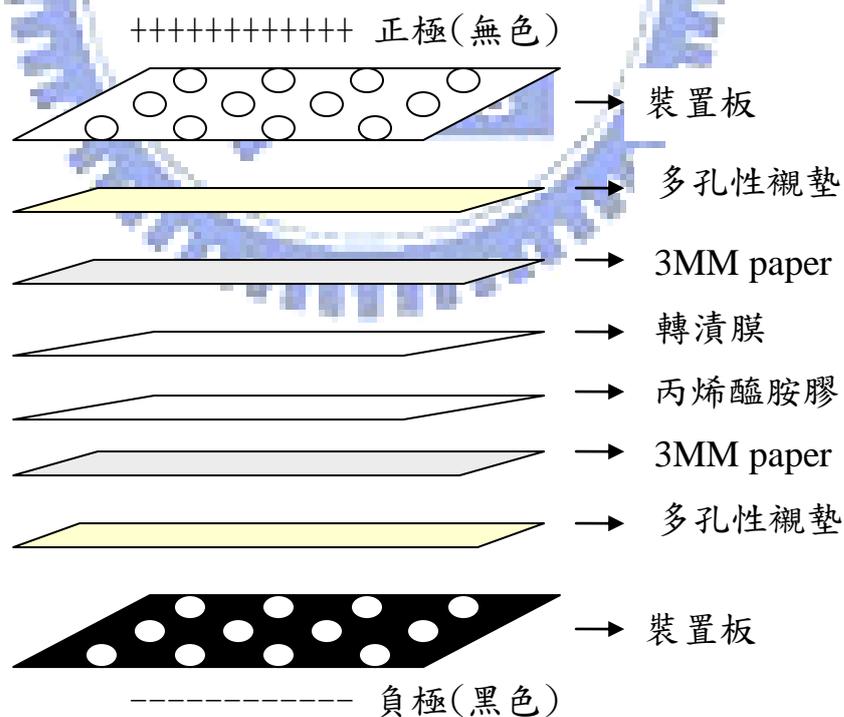


圖 13. Transfer cassette

- 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 6 μ l 一級抗體 (anti-His antibody) 的 15 ml PBS buffer (稀釋 2500 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 6 μ l 連結 HRP 之二級抗體 (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 hCG β -及 hCG' 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 1 mM IPTG 誘導培養 6 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 10 μ l 的樣本以 SDS-PAGE 和西方墨點法分析之。

3-5-5 去醣基 hCG β -及 hCG' β -次單元體之大量表現 (large-scale expression)

從 hCGB-pQE-30(M15[pREP4])和 hCG' β -pQE-30(M15[pREP4])培養皿中挑選單一菌落接種於 5 ml LB/Ampicillin/Kanamycin 培養基中 37 °C、200 rpm 隔夜培養，之後倒入 500 ml LB/Ampicillin/Kanamycin 培養基繼續培養至 OD₆₀₀ =0.6。之後兩者皆添加 1 mM IPTG 繼續培養誘導 6 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 hCG β -及 hCG' β -次單元體之純化[79]

- 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。

- 6× His-tag 蛋白質純化：

取出冷凍之 hCG β -及 hCG' β -次單元體菌塊分別加入 Lysis buffer B (LB 培養基：buffer B 體積比=20:1) ，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 10 μ l flow-through 加入 10 μ l 1 \times SDS gel-loading buffer 並儲存於-20 $^{\circ}$ C。然後以 8ml Wash buffer C 清洗並收集之。取 10 μ l 的 buffer C 收集液加入 10 μ l 1 \times SDS gel-loading buffer 並儲存於-20 $^{\circ}$ C。最後將重組之次單元體以 1.5 ml elution buffer E 沖提 12 次並收集之，保存於-20 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C。



第四章 結果與討論

4-1 放大 *hCGB* 和 *hCG'B*

我們欲表現去醣基 *hCGB* 和 *hCG'B* 的首要工作便是放大 *hCGB* 和 *hCG'B* 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 Placenta Marathon-Ready cDNA” 作為選殖 *hCG* 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 *hCG β*-和 *hCG' β*-(*hLHβ*-) 次單元體之 cDNA 序列原始文獻 [25-26, 44-45]，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、5 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 35 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 54 °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 *hCG β*-和 *hCG' β*-兩段 cDNA。

實驗五次以上之放大之後的 *hCG β*-和 *hCG' β*-經由 1% 瓊脂洋菜膠體電泳之染色結果如圖 14-A 和 14-B 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 *hCG β*-和 *hCG' β*-大小各分別為 435 bp 和 363 bp，電泳之結果顯示 *hCG β*-和 *hCG' β*-大小差不多。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 *hCG β*-和 *hCG' β*-兩

基因。在這裡需要特別注意的是 PCR 反應時 annealing 的溫度，因為 PCR 是否成功取決於此因素。

4-2 yT&A 選殖載體之構築

放大之後的 *hCG β* 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 JM109 之轉形殖入菌體內，如此大腸桿菌 JM109 大量複製 *hCGβ*，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 *hCGβ*-yT&A 質體，接著以限制酶切割作為確認是否順利構築。根據圖 15 之切割產物電泳之結果顯示確實順利將 *hCGβ* (435bp) 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 *hCGβ*-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 *hCG β*-和 *hCG' β*-兩次單元體。

4-3 pQE30 表現載體之構築

首先 *hCGβ*-yT&A 和 pQE30 兩質體皆以 *BamH I* 和 *Hind III* 限制酶進行切割；而 *hCG' β* 和 pQE30 亦用相同的限制酶進行切割反應。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。本論文一開始就選擇大腸桿菌 M15[pREP4] 作為 *hCGβ*-pQE30 和 *hCG' β*- pQE30 兩質體之表現宿主[78]。

因本論文利用 *BamH I* 和 *Hind III* 作為 *hCGβ*-yT&A 與 pQE30 表現載體兩端之接合點，因此以 *BamH I* 和 *Hind III* 截切反應作為再確認

之用，期望截切完之產物可呈現出 *hCG β* 與 pQE30 兩段 DNA。同理，我們亦利用同樣的限制酶作為 *hCG' β* 與 pQE30 表現載體兩端之接合點，所以也以同樣的方法進行再確認工作。而至於 *hCG β* 和 *hCG' β* 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 16 為 *BamH I* 和 *Hind III* 切割 *hCG β -pQE30* 之產物電泳結果，我們可清楚觀察到 3412 bp 的 pQE30 表現載體和 435 bp *hCG β* 的存在。另外亦以相同的切割酵素 *BamH I* 和 *Hind III* 切割 *hCG' β -pQE30* 之結果如圖 17 所示，因整個構築好之 *hCG' β -pQE30* 質體和 *hCG β -pQE30* 一樣有相同的兩個 *BamH I* 和 *Hind III* 切割位 (cutting site)，故我們利用相同的方法可將質體切割成兩個線性 DNA，目的為驗證整個質體的大小是否符合，而由圖 17 中發現電泳結果確實如我們我要的。

本論文將廠商定序完成之序列與我們所預測接合完成的 *hCG β -pQE30* 序列利用 Vector NTI 6 軟體進行比對，圖 18 為 *hCG β -pQE30* 之 DNA 定序與預期序列之比對結果，而圖 19 為 *hCG' β -pQE30* 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 18 在序列 390 的位置由 C 變成 T，亦代表由 AGC code 轉變成 AGT code，查對胺基酸列表我們發現 AGC code 產生的胺基酸為 Serine(Ser 絲胺酸)，而 AGT code 為 AGU code 所產生的胺基酸亦為 Serine(Ser 絲胺酸)，所以此核苷酸點突變不影響往後表現出來的蛋白質結構，此數據即表示 DNA 定序結果 100 % 符合預期之 *hCG β* 的序列。此外，圖 19 為 *hCG' β -pQE30* 之 DNA 定序，此段的 Primer 設計是根據人類黃體激素所設計的，根據文獻我們知道胎盤的 cDNA 不會有 hLH 基因的存在[4-6, 8]。而且於部分人種中 hLH 在第八和第十五的胺基酸可能突變為 CG 的胺基酸[46-47]，更因為 CG 是由 LH

演化而來[59-61]。因此，我們希望能得到 hLH 序列長度的 hCG 基因。比對 *hCG'β* 和 *hCGβ* 基因，我們發現序列 5 及 350 的位子有點突變，序列 5 突變產生的結果為其對應之胺基酸密碼子從 AAG code 變為 AGG code，經由胺基酸對照之結果發現 AAG 為 Lysine(Lys 離胺酸)，但 AGG 卻為 Arginine(Arg 精胺酸)。而序列 350 突變產生的結果為其對應之胺基酸密碼子從 GAC code 變為 GCC code，經由胺基酸對照之結果發現 GAC 為 Asparagine(Asp 天門冬醯胺)，但 GCC 卻為 Alaine(Ala 丙胺酸)。然而序列 5 的突變來自 primer 的設計，所以造成的突變為原本 LH 的胺基酸和序列 350 的突變是不同的。序列 350 的突變來自於 LH 與 CG 位於同一個基因串中[27-29]，致使 primer 在夾的時候，位移所造成的。根據比對結果有 99.45 % 的相似度。雖然目前尚不知道此變異基因對一般的生理有何影響，但在未來應該會是一個很好的研究材料，不論是在演化上或是其他方面的研究。因此可證明確實為 *hCGβ*-pQE30 和突變基因 *hCG'β*-pQE30。

4-4 去醣基 *hCGβ*-和 *hCG'β*-次單元體之表現

為了觀察是否確實表現出 *hCGβ*-和 *hCG'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 5 ml 之菌液加以 IPTG 誘導之，本論文在去醣基 *hCGβ*-和 *hCG'β*-次單元體方面分別先以 0.5 mM 和 1 mM 的 IPTG 濃度處理 *hCGβ*-pQE30-M15[pREP4] 和 *hCG'β*-pQE30-M15[pREP4] 來進行測試，於 37 °C、200 rpm 下分別培養 4 小時、6 小時和 8 小時來觀察。由圖 20 和 21 我們發現。兩種濃度的 IPTG 蛋白質表現量沒有明顯的差別。關於培育的時間方面也僅有 *hCG'β*-pQE30-M15[pREP4] 在 4 小時之蛋白質表現量較差；6 小時和 8 小時的表現量就比較接近。因此我們取 1 mM 的 IPTG 誘導 6 小時，之後將菌體用 Bacterial lysis buffer

復溶，再用超音波打破細胞後，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 22 為 SDS-PAGE 之結果，圖 26 則呈現出西方墨點法呈色反應之後的數據。首先就由圖 22 的 PAGE 圖來看，在 Lane 2：是以 1 mM 的 IPTG 處理 6 小時之後的破碎菌體全產物。而 Lane 4：則以 1 mM 的 IPTG 處理 6 小時之後的破碎菌體包涵體部分之中觀察到去醣基 $hCG\beta$ -次單元體的蛋白質帶存在於約 15 kDa 之位置，至於未加以 IPTG 誘導處理的 Lane 1 和誘導 6 小時的破碎菌體上清液之 Lane 3 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 M15[pREP4]本身 (Lane 6) 和只轉殖 pQE30 而不會表現出 $hCG\beta$ -次單元體的 M15[pREP4] (Lane 5) 兩菌株則在稍微有點距離的地方有蛋白質的存在，根據以上各結果都說明了 SDS-PAGE 可看出 $hCG\beta$ -次單元體的表現情形。圖 26(A)之西方墨點法結果則提供直接之證據，利用抗 6x His 之一級抗體顯示著與 SDS-PAGE 同樣之結果，從圖 26(B)可知抗體已辨識到所期望之目標蛋白質： $hCG\beta$ -次單元體。

圖 23 則顯現另一個結果，假若不使用一般的 Bacterial lysis buffer 改用 Lysis Buffer B(含有 8M 的尿素)，我們發現在 lysate pellet 中幾乎沒有我們想要的蛋白質，這個部分牽涉到下面蛋白質純化的實驗設計。

而 $hCG\beta$ -次單元體方面也以同樣的方式去處理，以濃度 1 mM 的 IPTG 來進行小量培養，於 37 °C、200 rpm 下培養 6 小時，於 SDS-PAGE 上觀察到不明顯之蛋白質帶，同樣為了證明 $hCG\beta$ -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 25，根據此數據正符合了我們假

設的 *hCG*' β -次單元體之微量存在，且其位於 13 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：第一點是對於使用 IPTG 的濃度並不會增加其表現，*hCG*' β -次單元體則對時間上會有些許的差異表現。又因為 *hCG* β -和 *hCG*' β -次單元體在系菌體內導致形成包涵體，故往後 *hCG* β -和 *hCG*' β -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，如此可以得到菌體內全部變性 (denature) 之 *hCG* β -和 *hCG*' β -次單元體。第二點為 *hCG* β -和 *hCG*' β -次單元體雖然可被 M15[pREP4] 表現，但表現量並不理想，甚至可以說其表現量甚微，幾乎看不到。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，以提高 LB 培養液，如此期望獲得更高量的 *hCG* β -和 *hCG*' β -次單元體蛋白質。

有趣的是在之前的研究中表現人類絨毛膜促性腺激素 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絨毛膜促性腺激素 β -次單元體僅有一篇報導，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使用大腸桿菌來表現去醣基 *hCG* β -和 *hCG*' β -次單元體。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[79]。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。在

考慮到不重新修改 *hCG β* -和 *hCG' β* -次單元體 cDNA 序列的前提下，最後決定提高培養液到 500 ml 以試圖提升整體表現量。

4-5 去醣基 *hCG β* -和 *hCG' β* -次單元體之純化

hCG β -和 *hCG' β* -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 26 到圖 31。在此我們分別使用兩種不同的處理方式來純化蛋白質。純化方法 A：以 50ml LB 培養液加入適量的抗生素 Ampicillin 和 Kanamycin，挑一顆菌落於培養液中，用 1mM IPTG 於 37 °C、200 rpm 下培養 6 小時，之後將菌體用 Bacterial lysis buffer 復溶，再用超音波打破細胞，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。上清液保存於-20°C 冰箱中，包涵體(inclusion body) 加入 4ml Lysis Buffer B，於室溫下攪拌一小時，先取 2ml 直接離心，上清液進行 SDS-PAGE 檢驗，見圖 27、28 (B)；另外的 2ml 用超音波振 3 min (打 2 sec、休 1 sec)，離心取上清液進行 SDS-PAGE 檢驗，見圖 27、28 (A)。純化方法 B：同樣以 50ml LB 培養液加入適量的抗生素 Ampicillin 和 Kanamycin，挑一顆菌落於培養液中，用 1mM IPTG 於 37 °C、200 rpm 下培養 6 小時，之後將菌體用 4ml Lysis Buffer B 復溶，於室溫下攪拌一小時，先取 2ml 直接離心，上清液進行 SDS-PAGE 檢驗，見圖 29、30 (A)；另外的 2ml 用超音波振 3 min (打 2 sec、休 1 sec)，離心取上清液進行 SDS-PAGE 檢驗，見圖 29、30 (B)。綜合上述所進行的實驗，我們可以發現以下的結論。第一點：無論是否有用 Bacterial lysis buffer 進行預處理，效果都不明顯。第二點：因為 Lysis Buffer B 本身即可打破細胞，此法為化學破細胞法，因此使用 Lysis Buffer B 時，有沒有再用超音波振，其結果也是一樣地。第三點：使用 Ni-NTA 純化蛋白質

時，應注意濃縮的倍數，雖然 QIAGEN 公司手冊上說最好濃縮 50~100 倍，但假若本身蛋白質表現量不佳的情況下，在復溶時最好可以儘可能地少用溶劑。第四點：初步放大到 50ml 的培養液去培養，我們發現表現的蛋白質還是不明顯，因此我們繼續放大到 150ml 培養，且使用 150:1 的濃縮倍率，發現效果稍微好些，如圖 31 所示。所以我們可以判定在做蛋白質純化時，預先處理其影響純化的效果不大，濃縮倍率的影響會較大一些。

含有 6xHis tag 的 *hCGβ*-和 *hCG'β*-次單元體能在低 pH 值值被沖提出來，這個原理主要是依據 6xHis tag 上的 histidine residue 的 pKa 大約是在 6.0。當 pH 下降(pH 4.5~5.3)，會變成 protonated。在這樣的條件下，*hCGβ*-和 *hCG'β*-次單元體便無法和 nickel ion 繼續鍵結，因此便可從 Ni-NTA resin 上解離(dissociate)下來。更進一步地分析 Ni-NTA 純化結果，發現僅與蛋白質的量有關，目標蛋白越多，可被 nickel ion 抓到的更多，此一部份可以從圖 32 中看出，圖 32 為 *hCG'β*-次單元體蛋白經 Ni-NTA 純化結果，所有的條件都相同，只有其培養液放大到 500ml 培養。以一個競爭反應而言，目標蛋白越多，其他雜的蛋白就比較不容易附著在 nickel ion 內，如此在流洗的時候就很容易被沖提出來，而在更低的 pH 值時，就可以得到高純度的目標蛋白。

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醣基 *hCGB* 和 *hCG'B* 次單元體。因此首要工作為放大 *hCGB* 和 *hCG'B* 此兩段基因，故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。以實驗室現有 commercial “Human Placenta Marathon-Ready cDNA” 作為選殖 *hCGB* 和 *hCG'B* 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 1 % 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 *hCGB* cDNA 構築到 *yT&A* 選殖載體中，之後以大腸桿菌 JM109 之轉形殖入載體，作為長久保存。微量製備出的 *hCGB-yT&A* 和 pQE30 兩質體以 *BamH I* 和 *Hind III* 限制酶進行切割；而 *hCG'B* 則直接以 *BamH I* 和 *Hind III* 限制酶進行切割，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 *hCGB-pQE30* 轉形至 M15[pREP4]，而 *hCG'B-pQE30* 亦轉形至 M15[pREP4] 上。
3. 在其個別表現方面，SDS-PAGE 染色結果觀察到去醣基 *hCGB* 次單元體的蛋白質帶存在於約 15 kDa 之位置，且利用抗 6x His 之一級抗體顯示著與 SDS-PAGE 同樣之蛋白質帶，故已成功表現出去醣基 *hCG β*-次單元體。但 *hCG'B* 在 M15[pREP4] 菌株中無法明顯地從 SDS-PAGE 染色結果觀察到去醣基 *hCG 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較明

顯地看出 β -次單元體的微量存在，且位於 13 kDa 之位置，雖然兩者都是用同樣的表現載體和菌珠，但表現蛋白的結果卻不盡相同，因此，我們初步判定只要基因不同就是一個新的開始，無法套用之前已經建立好的模式。

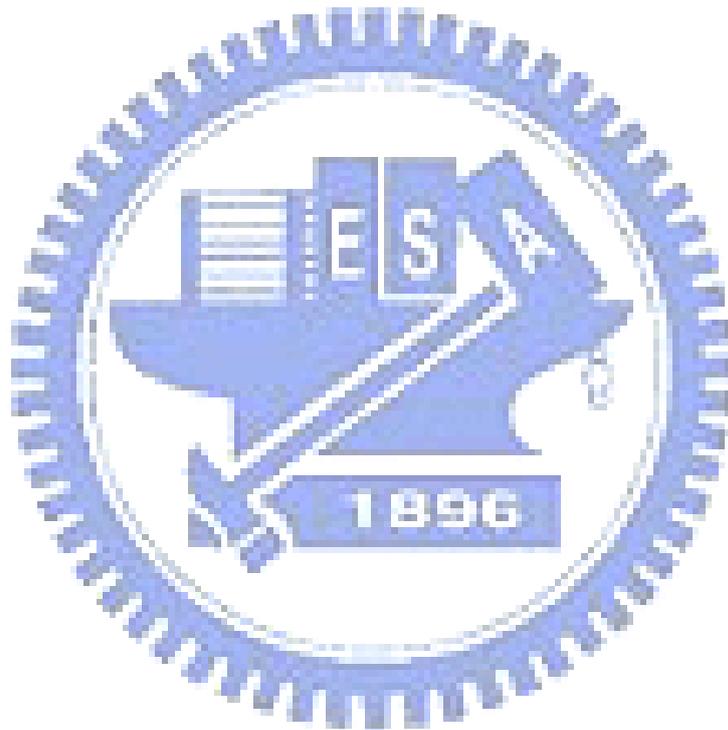
4. 兩個 β 次單元體分別利用 Ni-NTA 方式純化，通過 Ni-NTA 管柱的兩次單元體沖提部分進行 SDS-PAGE 鑑定之。純化完的 SDS-PAGE 結果依舊混雜著其他蛋白質帶，且因為兩個次單元體的表現量不足，所以無法取得高純度的沖提部分。假若我們利用文獻上所報導的方式，使用 HPLC 或 FPLC 來進行純化的動作，依然需要有足夠的蛋白質表現量，才会有較顯著的效果。雖然效果還是不太好，但應該會比一般的管柱分離效果要好些。根據以上的結果，我們可以推論除非放大到足夠的量再進行管柱的純化，否則效果都是不理想的。尤其，我們的蛋白質幾乎都是在內涵體裡，更需要高純度的蛋白質，才可以做復性的工作，不然 refolding 的蛋白質都不是我們要的，就無法繼續做以後的生物活性測試了。
5. 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 hCGB 及 hCG'B 變異體，發展出原核表現系統製造去糖基人類絨毛膜促性腺激素 β -次單元體之技術。
6. 因為生物的表現系統無法建立一個完美共用的模式，所以未來如何克服此兩種 β -次單元體表現微量之問題將是另一個研究重點所在。而利用得到的去糖基 hCGB 及 hCG'B 變異體，我們可以實驗多種不同類型的生物活性測試。例如：在部分癌細胞中 LH/CG receptor 特別多，針對其抗原抗體特有的專一性，進行測試，研究

去醣基 hCGB 及 hCG'B 變異體與多種癌細胞株的生物活性和受體親和力做分析。且可以更加深入地探討去醣基 hCGB 及 hCG'B 變異體與野生型 hCGB 之間的異同。再者我們亦可以深入研究 hCGB 及 hCG'B 分別與有醣基的 α -次單元體和沒有醣基的 α -次單元體結合後的蛋白質變異體在多種癌細胞上的活性表現並比較其差異性。更因 hCGB 及 hLHB 在演化上有其關連性，而在生理上卻發展出不同的作用，製造分泌及作用的組織也不相同，可以比對其功能的差異是由哪些胺基酸突變所產生的變化，加上我們現有的 hCG'B 可以交叉比對，判定在演化初期是先增加胺基酸的 bp 還是先進行突變才增加胺基酸的長度。

7. 由於豬與人的生理狀態相近，因此可探討豬隻 CG 和 LH gene 與人類的 CG 及 LH gene 在功能性的差異。就先前以人類 CG β gene 所設計之 primer 釣出一段豬的序列，看看是否是基因演化上的殘基或是不具任何意義。
8. CG、LH、FSH 或 TSH 均屬於同一個 glycoprotein hormone gene family，因此以 glycoprotein 的角度探討其作用方式的異同，如：不同 proteins 與 receptor 間交互作用或是 signal transduction 方式等等。
9. CG、LH、FSH 或 TSH 亦可以用接上不同的醣基做探討的角度，可以利用不同的細胞培養。例如：轉殖到酵母菌中或是哺乳動物細胞中，以培育出含有不同醣基支鏈的醣蛋白質，看看不同醣基支鏈的醣蛋白質是否與正常醣基支鏈的醣蛋白質有相同的生理活性，比較其訊息傳遞及作用方式的異同。再者；可以交叉比對不

同醣基支鏈的醣蛋白與各個 receptor 間的交互作用或是 signal transduction 方式等等。

10.如此，我們可以建立一個完整的醣蛋白研究，在未來應該可以進一步發展出有醫療用途的醣蛋白藥品。



第六章 參考文獻

1. Pierce J, Parsons TF (1981) Glycoprotein hormones: Structure, function. *Annu Rev Biochem* 50, 465-495
2. Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW (1990) Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev* 11, 177-199
3. Jameson JL, Hollenberg AN (1993) Regulation of Chorionic gonadotropin gene expression. *Endocr Rev* 14, 203-221
4. Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Welsh TH (1994) Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5, 76-128
5. Vanderhyden BC, Armstrong DT (1990) Effects of gonadotropins and granulosa cell secretions on the maturation and fertilization of rat oocytes *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 26, 337-346
6. Davies AG (1981) Role of FSH in the control of testicular function. *Arch Androl* 7, 97-108
7. Magner JA (1990) Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology and bioactivity. *Endocr Rev* 11, 354-381
8. Yves Combaruous (1992) Molecular Basis of the Specificity of Binding of Glycoprotein Hormones to Their Receptors. *Endocr Rev* 13, 670-691
9. Li CH, Starman B (1964) Molecular weight of sheep pituitary interstitial cell-stimulating hormone. *Nature* 202, 291-292
10. Boothby, M., et al. (1981) A single gonadotropin alpha-subunit gene in normal tissue and tumor-derived cell lines. *J Biol Chem* 256(10), 5121-5127
11. Naylor S.L., Chin W.W., Goodman H.M., Lalley P.A., Sakaguchi

- A.Y. (1983) Chromosome assignment of genes encoding the alpha and beta subunits of glycoprotein hormones in man and mouse. *Somatic Cell Genet* 9(6), 757-770
12. Fiddes, J.C. and H.M. (1979) Goodman, Isolation, cloning and sequence analysis of the cDNA for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature* 281(5730), 351-356
 13. Ulloa-Aguirre, A. and C. Timossi (1998) Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod Update* 4(3), 260-283
 14. Fan, Q.R. and Hendrickson W.A. (2005) Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature* 433(7023), 269-277
 15. Baenziger, J.U. and Green E.D. (1988) Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta* 947(2), 287-306
 16. Mariusz W. Szkudlinski, Mathis Grossmann, and Bruce D. Weintraub (1996) Structure-Function Studies of Human TSH. *Trends Endocrinol Mevab* 7(8), 277-286
 17. Keene, J.L., Nishimori, K., Galway, A.B., Matzuk, M.M., Hsueh A.J.W., and Boime, I. (1994) Recombinant deglycosylated human FSH is an antagonist of human FSH action in cultured rat granulosa cells. *Endocr J* 2, 175-179
 18. Flack M.R., Froehlich J., Bennet A.P., Anasti J., and Nisula B.C. (1994) Site-directed mutagenesis defines the individual roles of the glycosylation sites on follicle-stimulating hormone. *J Biol Chem* 269(19), 14015-14020
 19. Bishop L.A., Robertson D.M., Cahir N., and Schofield P.R. (1994) Specific roles for the asparagine-linked carbohydrate residues of

- recombinant human follicle stimulating hormone in receptor binding and signal transduction. *Mol Endocrinol* 8(6), 722-731
20. Matzuk, M. M. and Boime, I. (1988b) The role of the asparagine-linked oligosaccharides of the alpha subunit in the secretion and assembly of human chorionic gonadotrophin. *J Cell Biol* 106, 1049-1059
 21. Matzuk, M.M., Keene J.L., and Boime I. (1989) Site specificity of the chorionic gonadotropin N-linked oligosaccharides in signal transduction. *J Biol Chem* 264(5), 2409-2414
 22. Valove F.M., Finch C., Anasti J.N., Froehlich J., and Flack M.R. (1994) Receptor binding and signal transduction are dissociable functions requiring different sites on follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 135(6), 2657-2661.
 23. Dias J.A., Lindau-Shepard B., Hauer C., and Auger I. (1998) Human follicle-stimulating hormone structure-activity relationships. *Biol Reprod* 58(6), 1331-1336
 24. Ren, P., Sairam M.R., and Yarney T.A. (1995) Bacterial expression of human chorionic gonadotropin alpha subunit: studies on refolding, dimer assembly and interaction with two different beta subunits. *Mol Cell Endocrinol* 113(1), 39-51
 25. Morgan, F. J., Birken, S., and Canfield, R. E. (1975) The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. The alpha subunit and beta subunit. *J Biol Chem* 250, 5247-5258
 26. Paul Policastro, Catherine E. Ovitt, Makoto Hoshina, Hideoki Fukuoka, Mark R. Boothby, and Irving Boime (1983) The β Subunit of Human Chorionic Gonadotropin Is Encoded by Multiple Genes. *J Biol Chem* 258(19), 11492-11499
 27. Talmadge, K., Boorstein, W. R., and Fiddes, J.C. (1983). *DNA* 2, 281-289

28. Boorstein, W. R., Vamvakopoulos, N. C., and Fiddes, J. C. (1982). *Nature* 300, 419-422
29. J. L. Jameson and C. M. Lindell (1988) Isolation and characterization of the human chorionic gonadotropin beta subunit (CG beta) gene cluster: regulation of transcriptionally active CG beta gene by cyclic AMP. *Mol Cell Biol* 8, 5100-5107
30. Masaki Bo and Irving Boime (1992) Identification of the Transcriptionally Active Genes of the Chorionic Gonadotropin beta Gene Cluster *in Vivo*. *J Biol Chem* 267(5), 3179-3184
31. Tetsuo Otani, Fumiko Otani, Malgorzata Krych, David D. Chaplin, and Irving Boime (1988) Identification of a Promoter Region in the CG β Gene Cluster. *J Biol Chem* 263(15), 7322-7329
32. Karen Talmadge, William R. Boorstein, Nikos C. Vamvakopoulos, Mary-Jane Gething and John C. Fiddes (1984) Only three of the seven human chorionic gonadotropin beta subunit genes can be expressed in the placenta. *Nucleic Acids Research* 12, 8415-8436
33. Laphorn A. J., Harris D. C., Littlejohn A., Lustbader J. W., Canfield R. E., Machin K. J., Morgan F. J., Isaacs N. W. (1994) Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 369, 455-461
34. Wu H., Lustbader J. W., Liu Y., Canfield R. E., Hendrickson W. A. (1994) Structure of human chorionic gonadotropin at 2.6Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Structure* 2, 545-558
35. Shuang-Bao Hu, Leslie Johnaon, Patrick C. Roche, and Henry T. Keutmann (1997) A Functional Determinant in Human Luteinizing Hormone and Chorionic Gonadotropin: Differential Effect of Mutations about β -GLN-54. *Endocr* 138(4), 1627-1633
36. Ringler G. E., Strauss J. F. (1990) *In vitro* systems for the study of

- human placental endocrine function. *Endocr Rev* 11, 105-123
37. (1976) *Nature* 260, 480-481
 38. J. Larry Jameson and Anthony N. Hollenberg (1993) Regulation of Chorionic Gonadotropin Gene Expression. *Endocr Rev* 14(2), 203-221
 39. Pittaway D. E., Reish R. L., Wentz A. C. (1995) Doubling Times of Human Chorionic Gonadotropin Increase in Early Viable Intrauterine Pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 152, 299-302
 40. Tulchinsky D, Hobel C. J. (1993) Plasma Human Chorionic Gonadotropin, Estrone, Estradiol, Estriol, Progesterone, 17 alpha-hydroxyprogesterone in Human Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 117, 884-893
 41. Csapo A. I., Pulkkinen M. O., Wiest W. G. (1973) Effects of Lutectomy, Progesterone Replacement Therapy in Early Pregnant Patients. *Am J Obstet Gynecol* 115, 1061-1067
 42. Aspillaga M. O., Whittaker P. G., Taylor A., Lind T. (1983) Some New Aspects of the Endocrinological Response to Pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 90, 596-603
 43. Braunstein G. D., Rasor J., Adler D., Danza H., Wade M. F. (1976) Serum Human Chorionic Gonadotrophin Levels Throughout Normal Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 126, 678-681
 44. Paul F. Policastro, Susan Daniels-McQueen, Georges Carle, and Irving Boime (1986) A Map of the hCG β -LH β Gene Cluster. *J Biol Chem* 261(13), 5907-5916
 45. Madge Y. Graham, Tetsuo Otani, Irving Boime, Maynard V. Olson, Georges F. Carle and David D. Chaplin (1987) Cosmid Mapping of the Human Chorionic Gonadotropin beta Subunit Genes by Field-Inversion Gel Electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 15(11), 4437-4448

46. Nobuhiko Suganuma, Kenji Furui, Fumitaka Kikkawa, Yutaka Tomoda, and Madoka Furuhashi (1996) Effects of the Mutations (Trp⁸→Arg and Ile¹⁵→Thr) in Human Luteinizing Hormone (LH) beta-Subunit on LH Bioactivity *in Vitro* and *in Vivo* *Endocr* 137(3), 831-838
47. Christel Nilsson, Min Jiang, Kim Pettersson, Antti litia, Minna Makela, Henrik Simonsen, Simon Eastal, Rene J. Herrera and Ilpo Huhtaniemi (1998) Determination of a common genetic variant of luteinizing hormone using DNA hybridization and immunoassays. *Clinical Endocr* 49, 369-376
48. Pettersson K. and Soderholm J. R. (1991) Individual differences in LH immunoreactivity revealed by monoclonal antibodies. *Clinical Chem* 37, 333-340
49. Furui K., Suganuma N., Tsukahara S-I., Asada Y., Kikkawa F., Tanaka M., Ozawa T. and Tomoda Y. (1994) Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) β -subunit, associated with immunologically anomalous LH variants. *J Clinical Endocrinology and Metabolism* 78, 107-113
50. Martin-Du-Pan, R. C., Horak M. and Bischof P. (1994) Clinical significance of invisible or partially visible luteinizing hormone. *Human Reproduction* 9, 1987-1990
51. Vander, A.J., J.H. Sherman, and D.S. Luciano, (1994) Human Physiology/the mechanisms of body function. 6 ed 669.
52. 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.
53. 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.

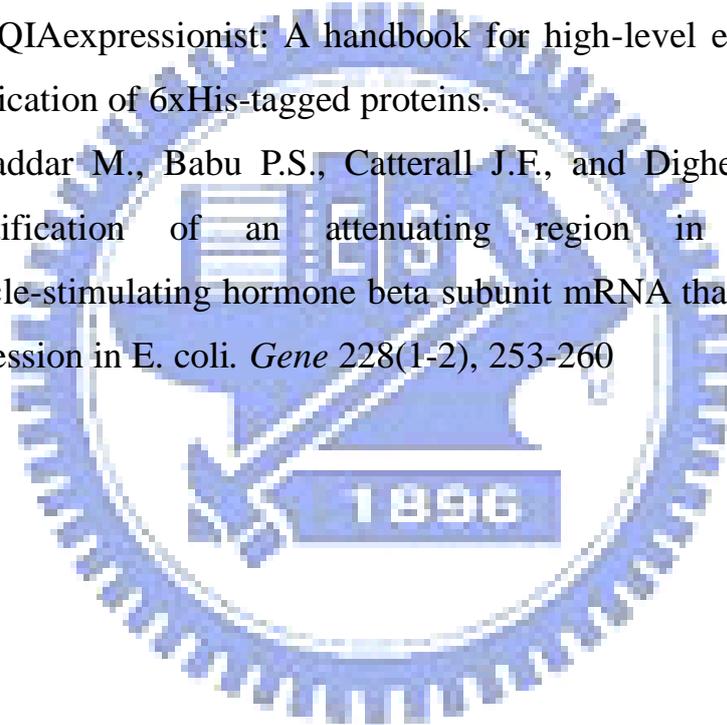
54. Thorner, M.O., Vance, M.L., Horvath, E., and Kovacs, K., Williams Textbook of Endocrinology. The anterior pituitary. J.D. Wilson and D.W. Foster. 1992, 221-310.
55. Colorado state university. <http://www.vivo.colostate.edu/>
56. W.H., D., Textbooks of endocrinology. The anterior pituitary gland. W. J.D. and F. D.W. **1985**. 586-613.
57. Guyton, A.C. and J.E. Hall, Human physiology and mechanisms of disease. Female physiology before pregnancy; and the female hormones. **1997**. 963-976.
58. Herve Lejeune, Pascale Sanchez, Franck Chuzel, Dominique Langlois, Jose Maria Saez (1998) Time-course effects of human recombinant luteinizing hormone on porcine Leydig cell specific differentiated functions. *Molecular and Cellular Endocrinology* 144, 59-69
59. M. D. Li and J. J. Ford (1998) A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of the α - and β -subunits of glycoprotein hormone gene family. *J Endocr* 156, 529-542
60. Prat F., Sumpter J. P. and Tyler C. R. (1996) Validation of radioimmunoassay for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction* 54, 1375-1382
61. Swanson P. (1991) Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. In *Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, pp 2-7, Eds A. P. Scott, Sumpter J. P., Kime D. E. and Rolfe M. S. Sheffield, UK: FishSymp
62. Glenn A. Maston and Maryellen Ruvolo (2002) Chorionic

- gonadotropin has a recent origin within primates and an evolutionary history of selection. *Mol Biol Evol* 19(3), 320-335
63. Talmadge K., N. C. Vamvakopoulos and J. C. Fiddes (1984) Evolution of the genes for the β subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature* 307, 37-40
64. Yan-Bo Xie, Haiyun Wang, and Deborah L. Segaloff (1990) Extracellular Domain of Lutropin/Choriogonadotropin Receptor Expressed in Transfected Cells Binds Choriogonadotropin with High Affinity. *J Biol Chem* 265(35), 21411-21414
65. K. M. J. Menon, Utpal M. Munshi, Christine L. Clouser, and Anil K. Nair (2004) Regulation of Luteinizing Hormone/Human Chorionic Gonadotropin Receptor Expression: A Perspective. *Bio Repr* 70, 861-866
66. Schoroeder H. R., Halter C. M. (1983) Specificity of human beta-choriogonadotropin assays for hormone and for an immunoreactive fragment present in urine during normal pregnancy. *Clin Chem* 29, 667
67. Ray K. Iles, Mohammed K. Javid, Lionel K. Gunn, and Tim Chard (1999) Cross-Reaction with Luteinizing Hormone β -Core is Responsible for the Age-dependent Increase of Immunoreactive β -Core Fragment of Human Chorionic Gonadotropin in Women with Nonmalignant Conditions. *Clin Chem* 45(4), 532-538
68. Wei Wu, Ameae M. Walker (2006) Human Chorionic Gonadotropin β (HCG β) Down-Regulates E-cadherin and Promotes Human Prostate Carcinoma Cell Migration and Invasion. *Cancer* 106, 68-78
69. S. Birken, Y. Chen, M. A. Gawinowicz, G. M. Agosto, R. E. Canfield, and A. S. Hartree (1993) Structure and Significance of Human Luteinizing Hormone- β Core Fragment Purified from

- Human Pituitary Extracts. *Endocr* 133(3), 985-989
70. Tieva A., Stattin P., Wikstrom P., Bergh A., Damber J. E. (2001) Gonadotropin-releasing hormone receptor expression in the human prostate. *Prostate* 47, 276-284
 71. Fekete M., Zaladni A., Comaru-Schally A-M., Schally A. V. (1989) Membrane receptors for peptides in experimental and human pancreatic cancers. *Pancreas* 4, 521-528
 72. Grundker C., Volker P., Griesinger F., Ramaswamy A., Nagy A., Schally A. V., Emons G. (2002) Antitumor effects of the cytotoxic LHRH analog AN-152 on human endometrial and ovarian cancers xenografted into nude mice. *Am J Obstet Gynecol* 187, 528-537
 73. Carola Leuschner and William Hansel (2005) Targeting Breast and Prostate Cancers Through Their Hormone Receptors. *Bio Repr* 73, 860-865
 74. Carola Leuschner, Frederick M. Enright, Barbara Gawronska, and William Hansel (2003) Membrane disrupting lytic peptide conjugates destroy hormone dependent and independent breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Breast Cancer Research and Treatment* 78, 17-27
 75. Gabriel Bodek, Nafis Ahmed Rahman, Monika Zaleska, Rabah Soliymani, Hikka Lankinen, William Hansel, Ilpo Huhtaniemi, and Adam J. Ziecik (2003) A novel approach of targeted ablation of mammary carcinoma cells through luteinizing hormone receptors using Hecate-CG β conjugate. *Breast Cancer Research and Treatment* 79, 1-10
 76. C. Aguirre, F. C. L. Jayes, and J. D. Veldhuis (2000) Luteinizing Hormone (LH) Drive Diverse Intracellular Calcium Second Messenger Signals in Isolated Porcine Intracellular Ca²⁺ Oscillatory Cells by Higher Concentrations of LH. *Endocr* 141(6),

2220-2228

77. Loren K. Mell, Jeffrey J. Meyer, Maria Tretiakova, Andrey Khramtsov, Can Gong, S. Diane Yamada, Anthony G. Montag, and Arno J. Mundt (2004) Prognostic Significance of E-Cadherin Protein Expression in Pathological Stage I-III Endometrial Cancer. *Clinical Cancer Research* 10, 5546-5553
78. Pei Ching Lan, Chi Feng Tseng, Meng Chia Lin, C. Allen Chang (2006) Expression and purification of human placenta lactogen in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 46, 285-293
79. The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.
80. Samaddar M., Babu P.S., Catterall J.F., and Dighe R.R. (1999) Identification of an attenuating region in the bovine follicle-stimulating hormone beta subunit mRNA that decreases its expression in *E. coli*. *Gene* 228(1-2), 253-260



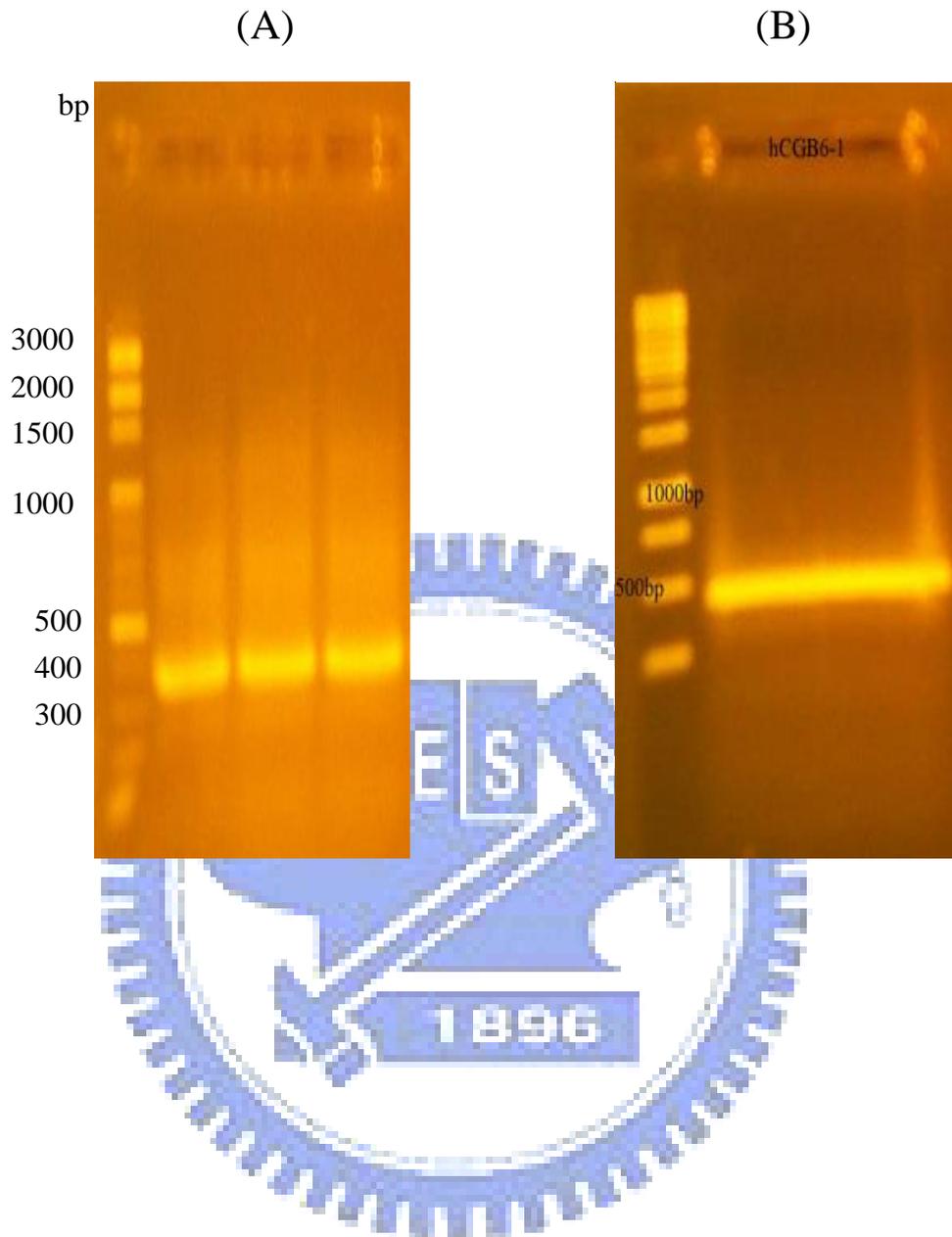


圖 14. $hCG\beta$ 和 $hCG'\beta$ 之聚合酶連鎖反應產物之洋菜膠體電泳結果。其中圖 A: $hCG'\beta$ 之 PCR 結果。圖 B: $hCG\beta$ 之 PCR 結果。

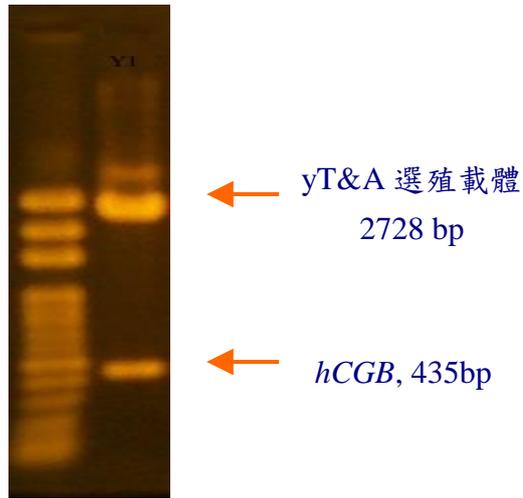


圖 15. 質體 *hCGB-yT&A* 切割反應之電泳結果。

Lane 1 and 2: *hCGB-yT&A* 以 *BamH I* 和 *Hind III* 切割結果。

Lane 3 and 4: *hCGB-yT&A* 未切割結果。



圖 16. 以限制酶鑑定將轉形進表現宿主 M15[pREP4] 之質體

hCGB-pQE30 其切割反應之電泳結果。

Lane 1 and 2: *hCGB-pQE30* 以 *BamH I* 和 *Hind III* 切割結果。

Lane 3 and 4: *hCGB-pQE30* 未切割結果。

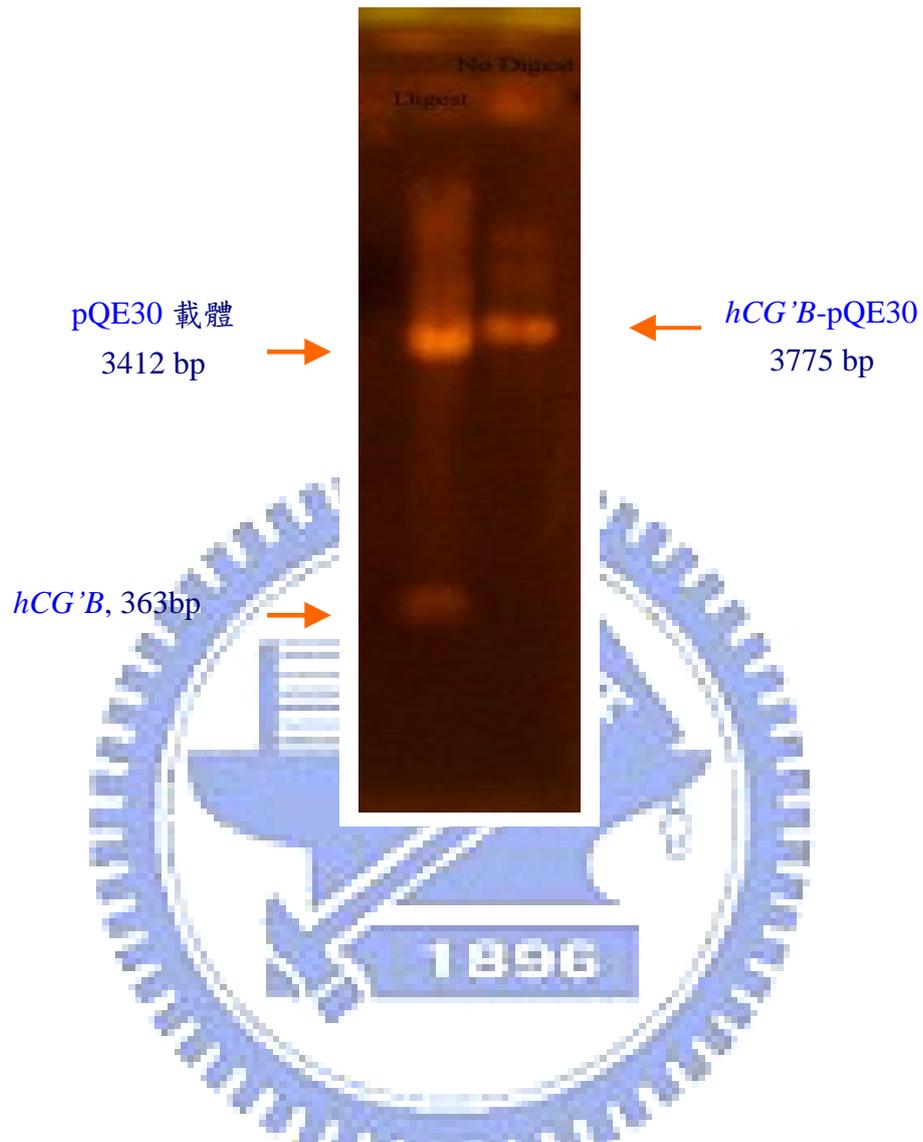


圖 17. 以限制酶鑑定將轉形進表現宿主 M15[pREP4] 之質體 *hCG'*
β-pQE30 其切割反應之電泳結果。

Lane 1 : *hCG'B*-pQE30 以 *BamH I* 和 *Hind III* 切割結果。

Lane 2 : *hCG'B*-pQE30 未切割結果。

		1		50
hCGB Standard	(1)	TCCAAGGAGCCGCTTCGGCCACGGTGCCGCCCCATCAATGCCACCCTGGC		
hCGB	(1)	TCCAAGGAGCCGCTTCGGCCACGGTGCCGCCCCATCAATGCCACCCTGGC		
Consensus	(1)	TCCAAGGAGCCGCTTCGGCCACGGTGCCGCCCCATCAATGCCACCCTGGC		
		51		100
hCGB Standard	(51)	TGTGGAGAAGGAGGGCTGCCCCGTGTGCATCACCGTCAACACCACCATCT		
hCGB	(51)	TGTGGAGAAGGAGGGCTGCCCCGTGTGCATCACCGTCAACACCACCATCT		
Consensus	(51)	TGTGGAGAAGGAGGGCTGCCCCGTGTGCATCACCGTCAACACCACCATCT		
		101		150
hCGB Standard	(101)	GTGCCGGCTACTGCCCCACCATGACCCGCGTGTGCAGGGGGTCTGCCG		
hCGB	(101)	GTGCCGGCTACTGCCCCACCATGACCCGCGTGTGCAGGGGGTCTGCCG		
Consensus	(101)	GTGCCGGCTACTGCCCCACCATGACCCGCGTGTGCAGGGGGTCTGCCG		
		151		200
hCGB Standard	(151)	GCCCTGCCTCAGGTGGTGTGCAACTACCGCGATGTGCGCTTCGAGTCCAT		
hCGB	(151)	GCCCTGCCTCAGGTGGTGTGCAACTACCGCGATGTGCGCTTCGAGTCCAT		
Consensus	(151)	GCCCTGCCTCAGGTGGTGTGCAACTACCGCGATGTGCGCTTCGAGTCCAT		
		201		250
hCGB Standard	(201)	CCGGCTCCCTGGCTGCCCGCGCGGCGTGAACCCCGTGGTCTCCTACGCCG		
hCGB	(201)	CCGGCTCCCTGGCTGCCCGCGCGGCGTGAACCCCGTGGTCTCCTACGCCG		
Consensus	(201)	CCGGCTCCCTGGCTGCCCGCGCGGCGTGAACCCCGTGGTCTCCTACGCCG		
		251		300
hCGB Standard	(251)	TGGCTCTCAGCTGTCAATGTGCACTTGCCGCCGCAGCACCCTGACTGC		
hCGB	(251)	TGGCTCTCAGCTGTCAATGTGCACTTGCCGCCGCAGCACCCTGACTGC		
Consensus	(251)	TGGCTCTCAGCTGTCAATGTGCACTTGCCGCCGCAGCACCCTGACTGC		
		301		350
hCGB Standard	(301)	GGGGTCCCAAGGACCACCCCTTGACCTGTGATGACCCCGCTTCCAGGA		
hCGB	(301)	GGGGTCCCAAGGACCACCCCTTGACCTGTGATGACCCCGCTTCCAGGA		
Consensus	(301)	GGGGTCCCAAGGACCACCCCTTGACCTGTGATGACCCCGCTTCCAGGA		
		351		400
hCGB Standard	(351)	CTCCTCTTCCTCAAAGGCCCTCCCCCAGCCTTCCAAGCCATCCCGAC		
hCGB	(351)	CTCCTCTTCCTCAAAGGCCCTCCCCCAGCCTTCCAAGCCATCCCGAC		
Consensus	(351)	CTCCTCTTCCTCAAAGGCCCTCCCCCAGCCTTCCAAGCCATCCCGAC		
		401		435
hCGB Standard	(401)	TCCCGGGGCCCTCGGACACCCCGATCCTCCCACAA		
hCGB	(401)	TCCCGGGGCCCTCGGACACCCCGATCCTCCCACAA		
Consensus	(401)	TCCCGGGGCCCTCGGACACCCCGATCCTCCCACAA		

圖 18. hCGB-pQE30 之 DNA 定序與預期序列之比對結果。

		1	50
hCGB	(1)	TCCAAGGAGCCGCTTCGGCCACGGTGCCGCCCCATCAATGCCACCCTGGC	
不完全CGB	(1)	TCCAGGGAGCCGCTTCGGCCACGGTGCCGCCCCATCAATGCCACCCTGGC	
Consensus	(1)	TCCA GGAGCCGCTTCGGCCACGGTGCCGCCCCATCAATGCCACCCTGGC	
		51	100
hCGB	(51)	TGTGGAGAAGGAGGGCTGCCCCGTGTGCATCACCGTCAACACCACCATCT	
不完全CGB	(51)	TGTGGAGAAGGAGGGCTGCCCCGTGTGCATCACCGTCAACACCACCATCT	
Consensus	(51)	TGTGGAGAAGGAGGGCTGCCCCGTGTGCATCACCGTCAACACCACCATCT	
		101	150
hCGB	(101)	GTGCCGGCTACTGCCCCACCATGACCCGCGTGCTGCAGGGGGTCTTGCCG	
不完全CGB	(101)	GTGCCGGCTACTGCCCCACCATGACCCGCGTGCTGCAGGGGGTCTTGCCG	
Consensus	(101)	GTGCCGGCTACTGCCCCACCATGACCCGCGTGCTGCAGGGGGTCTTGCCG	
		151	200
hCGB	(151)	GCCCTGCCTCAGGTGGTGTGCAACTACCGCGATGTGCGCTTCGAGTCCAT	
不完全CGB	(151)	GCCCTGCCTCAGGTGGTGTGCAACTACCGCGATGTGCGCTTCGAGTCCAT	
Consensus	(151)	GCCCTGCCTCAGGTGGTGTGCAACTACCGCGATGTGCGCTTCGAGTCCAT	
		201	250
hCGB	(201)	CCGGTCCCTGGCTGCCCCGCGGGCGTGAACCCCGTGGTCTCCTACGCCG	
不完全CGB	(201)	CCGGTCCCTGGCTGCCCCGCGGGCGTGAACCCCGTGGTCTCCTACGCCG	
Consensus	(201)	CCGGTCCCTGGCTGCCCCGCGGGCGTGAACCCCGTGGTCTCCTACGCCG	
		251	300
hCGB	(251)	TGGCTCTCAGCTGTCAATGTGCACTCTGCCGCCGAGCACCCTGACTGC	
不完全CGB	(251)	TGGCTCTCAGCTGTCAATGTGCACTCTGCCGCCGAGCACCCTGACTGC	
Consensus	(251)	TGGCTCTCAGCTGTCAATGTGCACTCTGCCGCCGAGCACCCTGACTGC	
		301	350
hCGB	(301)	GGGGTCCCAAGGACCACCCTTGACCTGTGATGACCCCGCTTCCAGGA	
不完全CGB	(301)	GGGGTCCCAAGGACCACCCTTGACCTGTGATGACCCCGCTTCCAGGC	
Consensus	(301)	GGGGTCCCAAGGACCACCCTTGACCTGTGATGACCCCGCTTCCAGG	
		351	400
hCGB	(351)	CTCCTCTCCTCAAGGCCCTCCCCCAGCCTTCCAAGCCATCCCGAC	
不完全CGB	(351)	CTCCTCTCCTCA-----	
Consensus	(351)	CTCCTCTCCTCA	
		401	435
hCGB	(401)	TCCCGGGGCCCTCGGACACCCCGATCCTCCCACAA	
不完全CGB	(364)	-----	
Consensus	(401)		

圖 19. *hCG'B*-pQE30 之 DNA 定序與預期序列之比對結果。

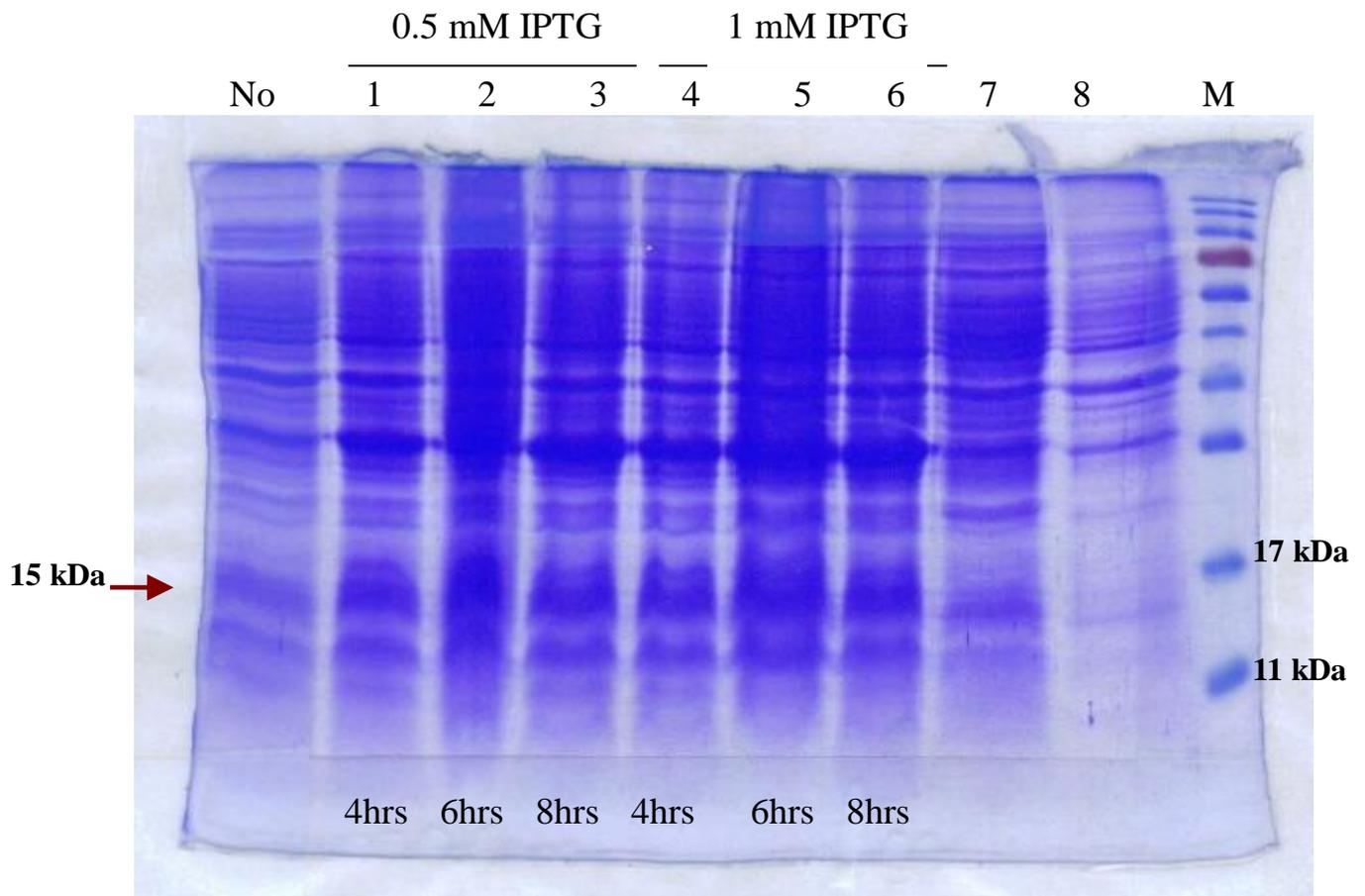


圖 20. NG- hCGB-次單元體(IPTG 濃度與時間關係)之小量表現
SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , non-inducing, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane 2 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 0.5mM IPTG, 37 °C 4hrs, total lysate.

Lane 3 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 0.5mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane 4 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 0.5mM IPTG, 37 °C 8hrs, total lysate.

Lane 5 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 4hrs, total lysate.

Lane 6 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane 7 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 8hrs, total lysate.

Lane 8 : pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane 9 : M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane M : protein marker.

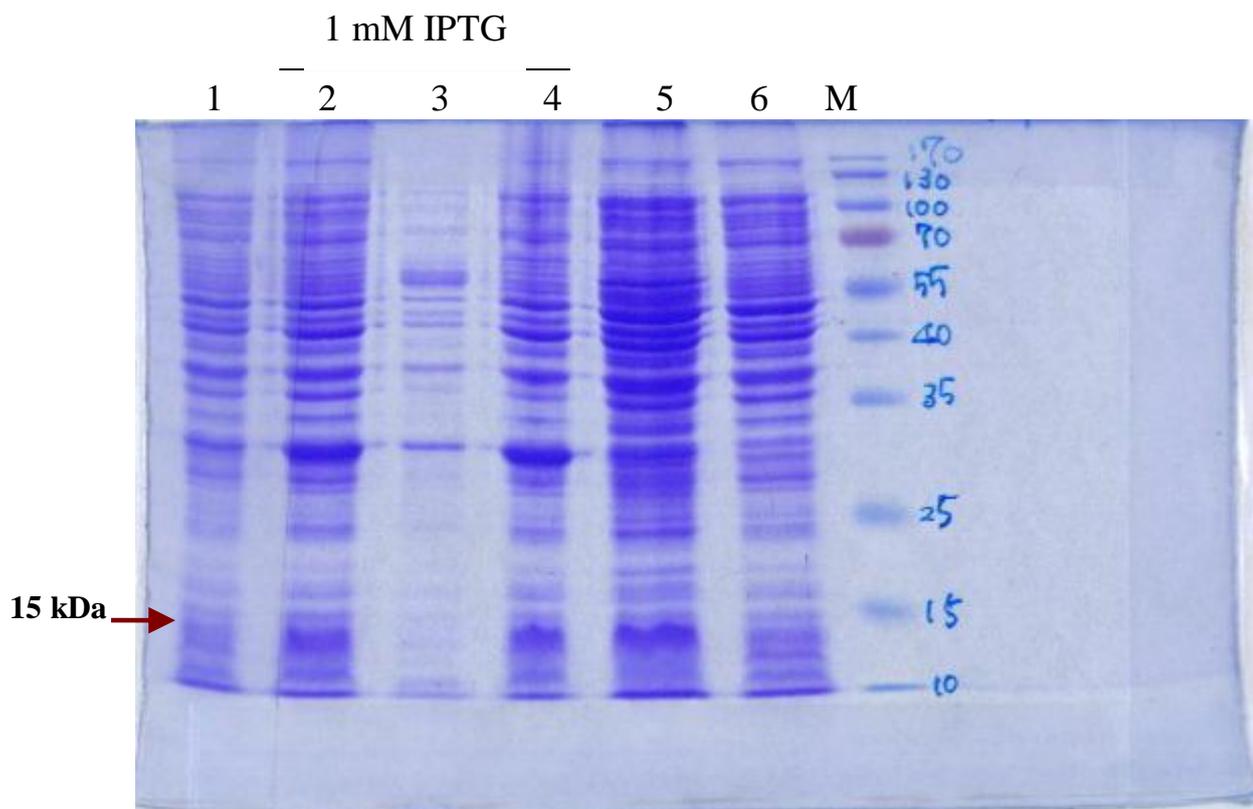


圖 22. NG- hCGB-次單元體小量表現和存在形式之
SDS-PAGE 染色結果

- Lane 1 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , non-inducing, 37 °C 6hrs, total lysate.
- Lane 2 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.
- Lane 3 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, lysate supernatant (soluble form).
- Lane 4 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, lysate pellet (inclusion body).
- Lane 5 : pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.
- Lane 6 : M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.
- Lane M : protein marker.

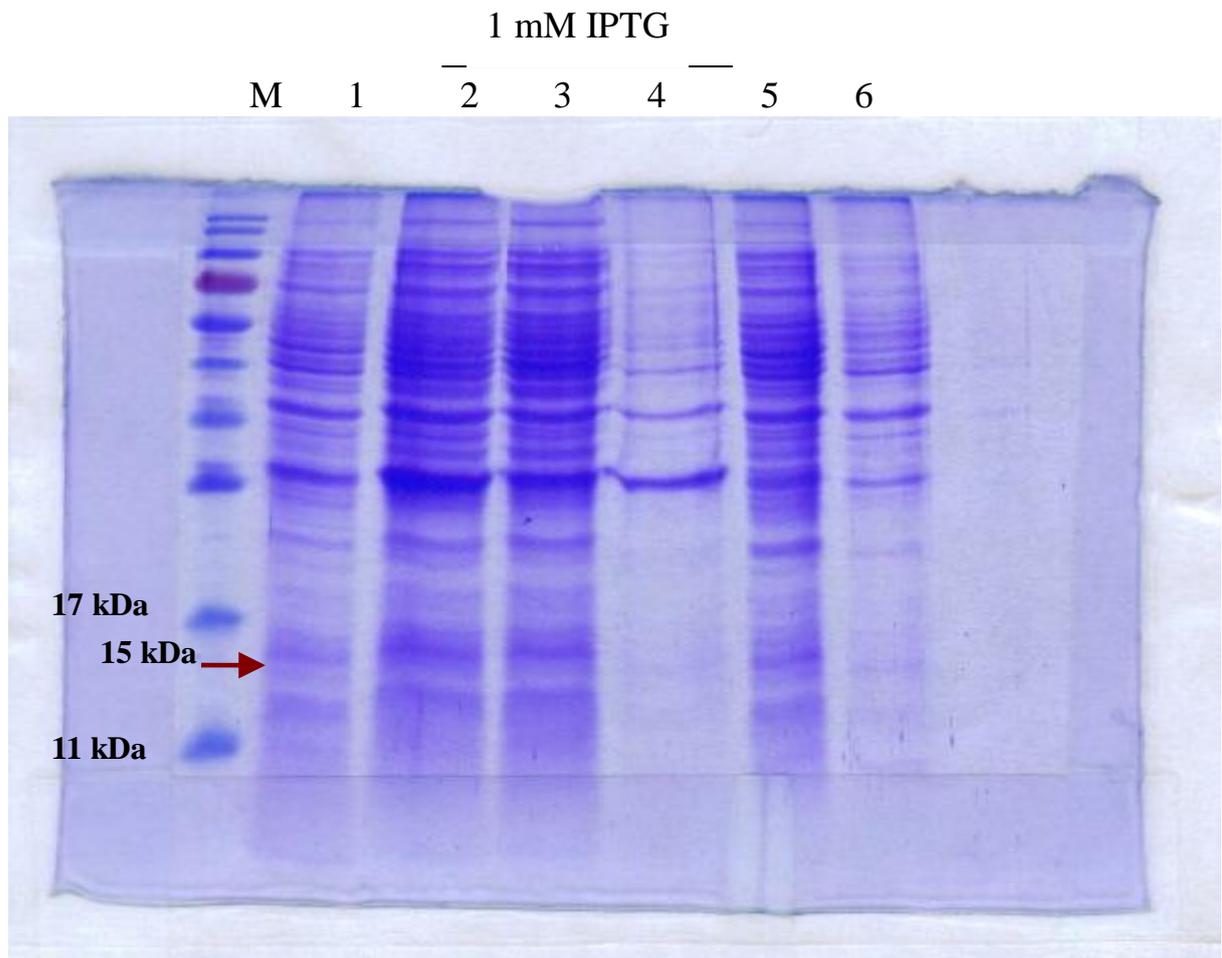


圖 23. NG- hCGB-次單元體少量表現和使用 Buffer B 溶解其存在形式之 SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , non-inducing, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane 2 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane 3 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, lysate supernatant (soluble form), 使用 lysis buffer B 溶解.

Lane 4 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, lysate pellet (inclusion body), 使用 lysis buffer B 復溶.

Lane 5 : pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane 6 : M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane M : protein marker.

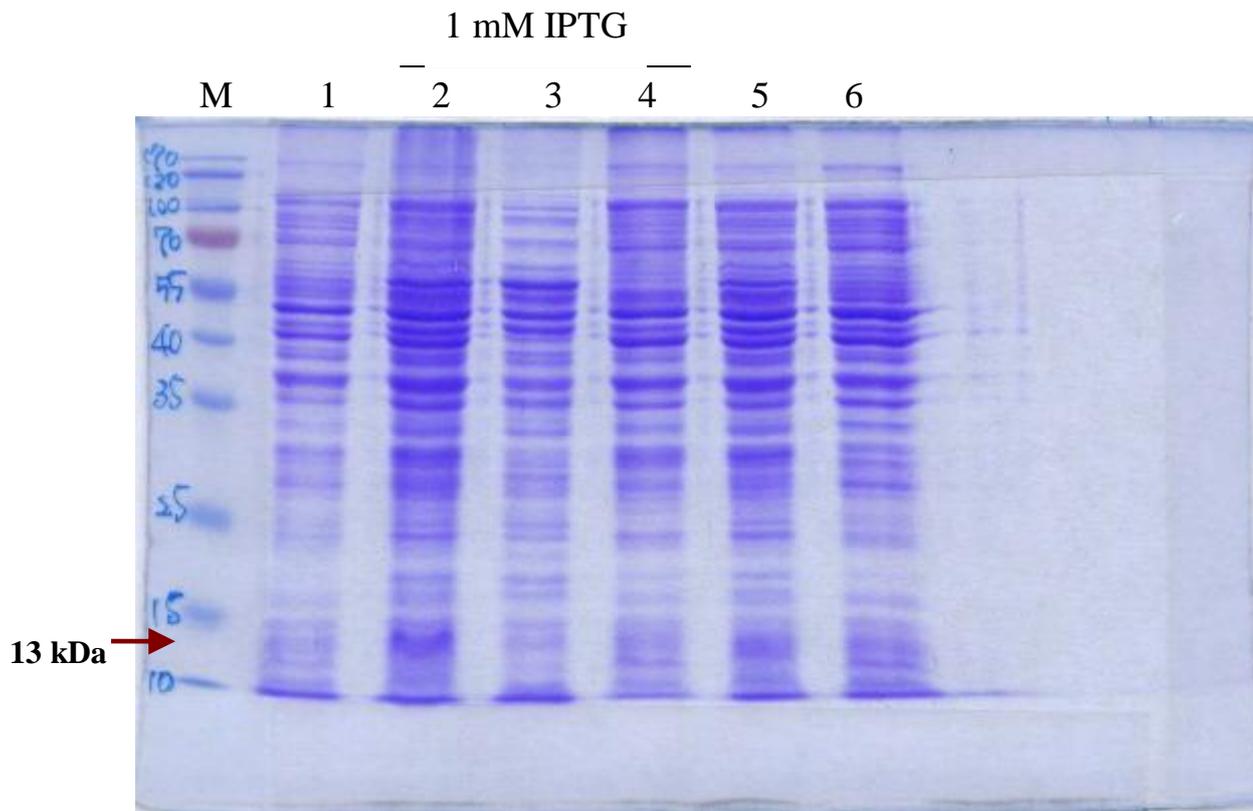


圖 24. NG- hCG' B-次單元體小量表現和存在形式之 SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : *hCG' B-pQE30 [M15[pREP4]]* , non-inducing, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane 2 : *hCG' B-pQE30 [M15[pREP4]]* , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane 3 : *hCG' B-pQE30 [M15[pREP4]]* , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, lysate supernatant (soluble form).

Lane 4 : *hCG' B-pQE30 [M15[pREP4]]* , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, lysate pellet (inclusion body).

Lane 5 : *pQE30 [M15[pREP4]]* , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane 6 : *M15[pREP4]* , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane M : protein marker.

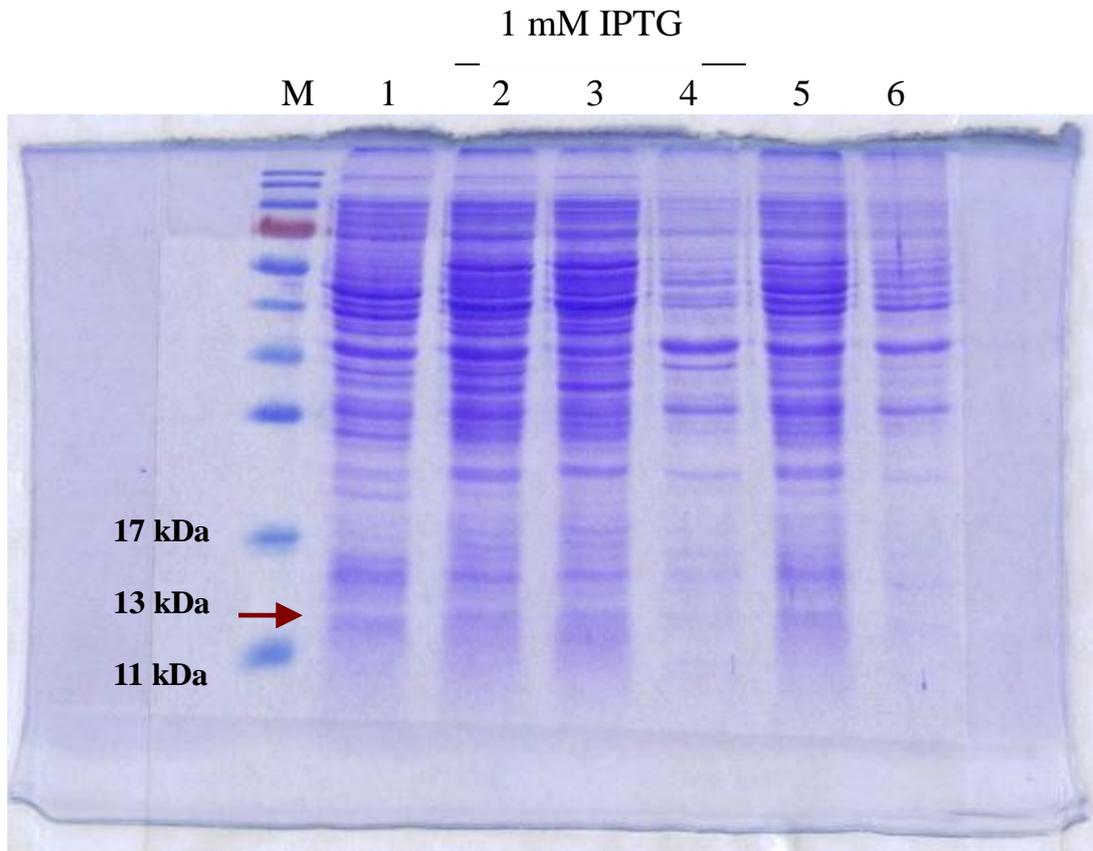


圖 25. NG- *hCG'B*-次單元體小量表現和使用 Buffer B 溶解其存在形式之 SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : *hCG'B*-pQE30 [M15[pREP4]] , non-inducing, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane 2 : *hCG'B*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane 3 : *hCG'B*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, lysate supernatant (soluble form), 使用 lysis buffer B 溶解.

Lane 4 : *hCG'B*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, lysate pellet (inclusion body), 使用 lysis buffer B 復溶.

Lane 5 : pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane 6 : M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

Lane M : protein marker.

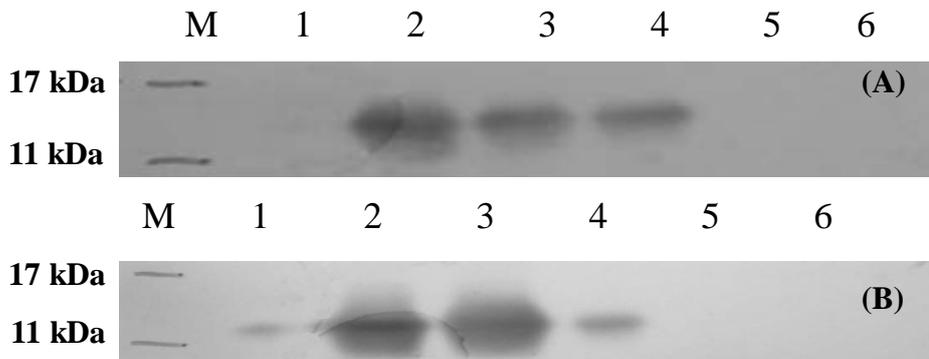


圖 26. 以 “Anti-His monoclonal antibody” 作為一級抗體的西方墨點法鑑定 NG-hCG β -次單元體及 NG- hCG' β -次單元體在 M15 菌株的小量表現和存在形式。圖 A: NG-hCG β -次單元體之結果。圖 B: NG- hCG' β -次單元體之結果。

圖 A :

- Lane 1 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , non-inducing, 37 °C 6hrs, total lysate.
- Lane 2 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.
- Lane 3 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, lysate supernatant (soluble form).
- Lane 4 : *hCGB*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, lysate pellet (inclusion body).
- Lane 5 : pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.
- Lane 6 : M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

圖 B :

- Lane 1 : *hCG'B*-pQE30 [M15[pREP4]] , non-inducing, 37 °C 6hrs, total lysate.
- Lane 2 : *hCG'B*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.
- Lane 3 : *hCG'B*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, lysate supernatant (soluble form).
- Lane 4 : *hCG'B*-pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, lysate pellet (inclusion body).
- Lane 5 : pQE30 [M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.
- Lane 6 : M15[pREP4]] , 1mM IPTG, 37 °C 6hrs, total lysate.

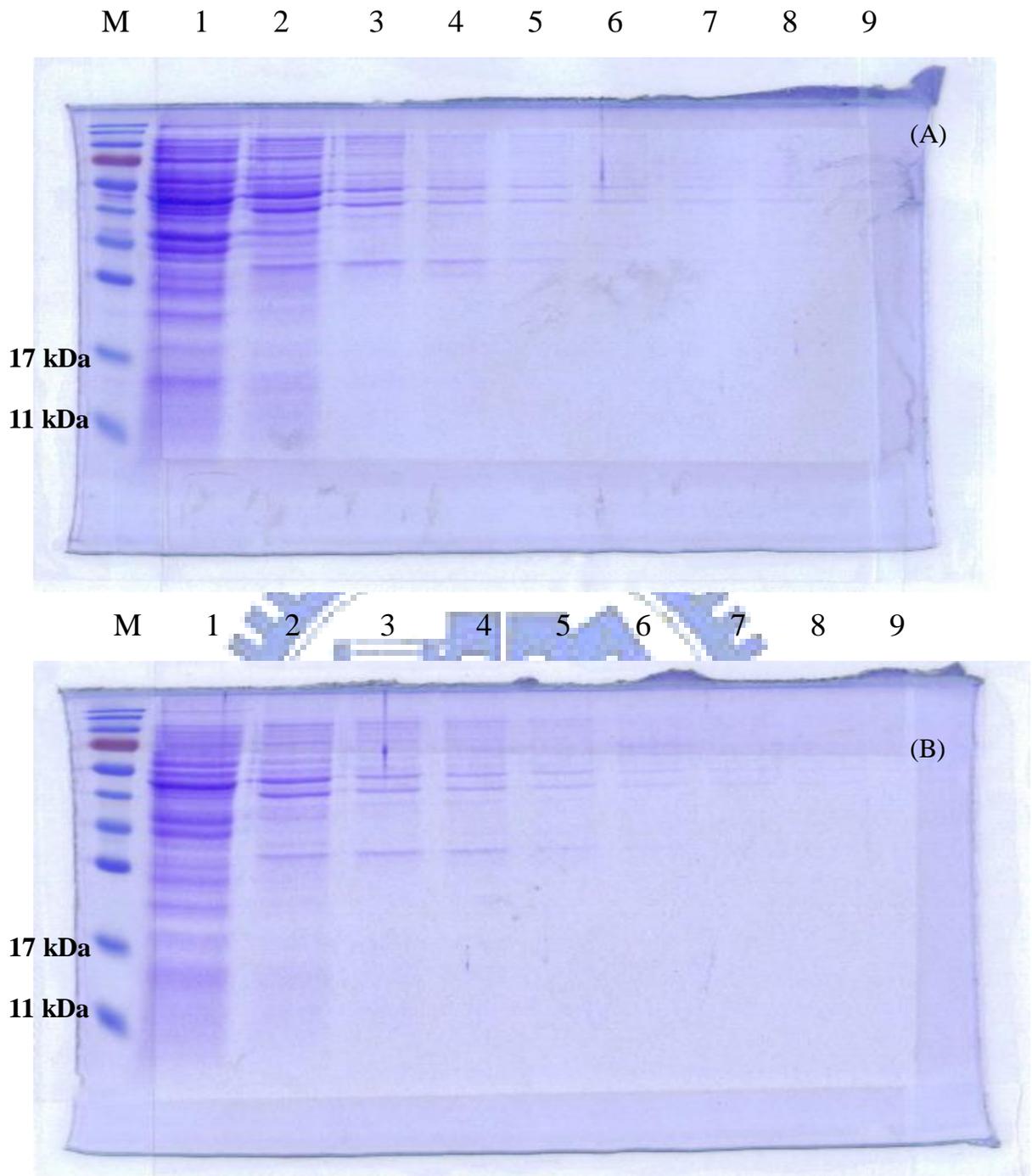


圖 27. NG-hCG β 次單元體純化方法 A 之 SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : Flow through

Lane 2 : Wash buffer C

Lane 3~Lane 9 : Elution buffer E

Lane M : protein marker.

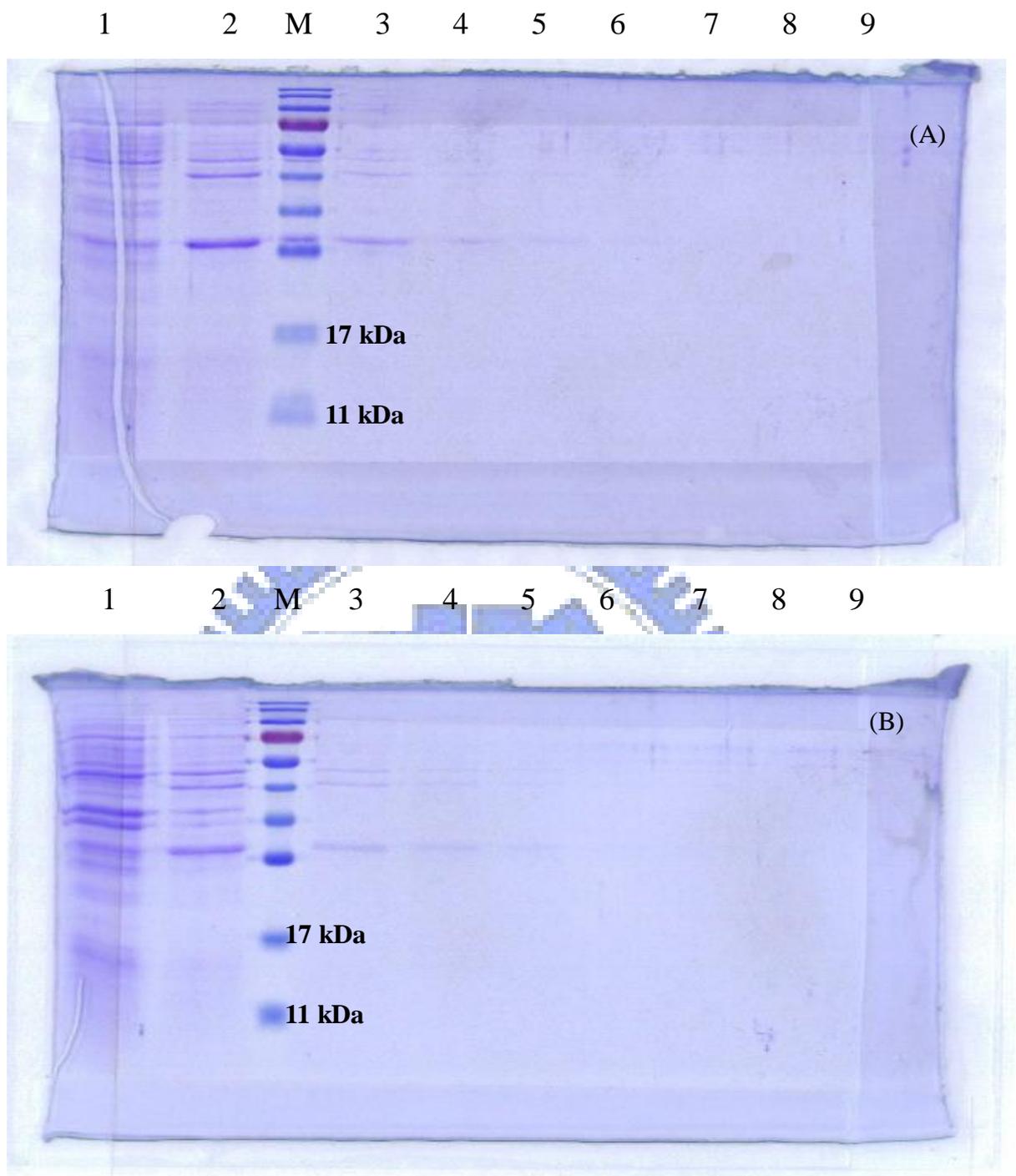


圖 28. NG- hCG' β 次單元體純化方法 A 之 SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : Flow through

Lane 2 : Wash buffer C

Lane 3~Lane 9 : Elution buffer E

Lane M : protein marker.

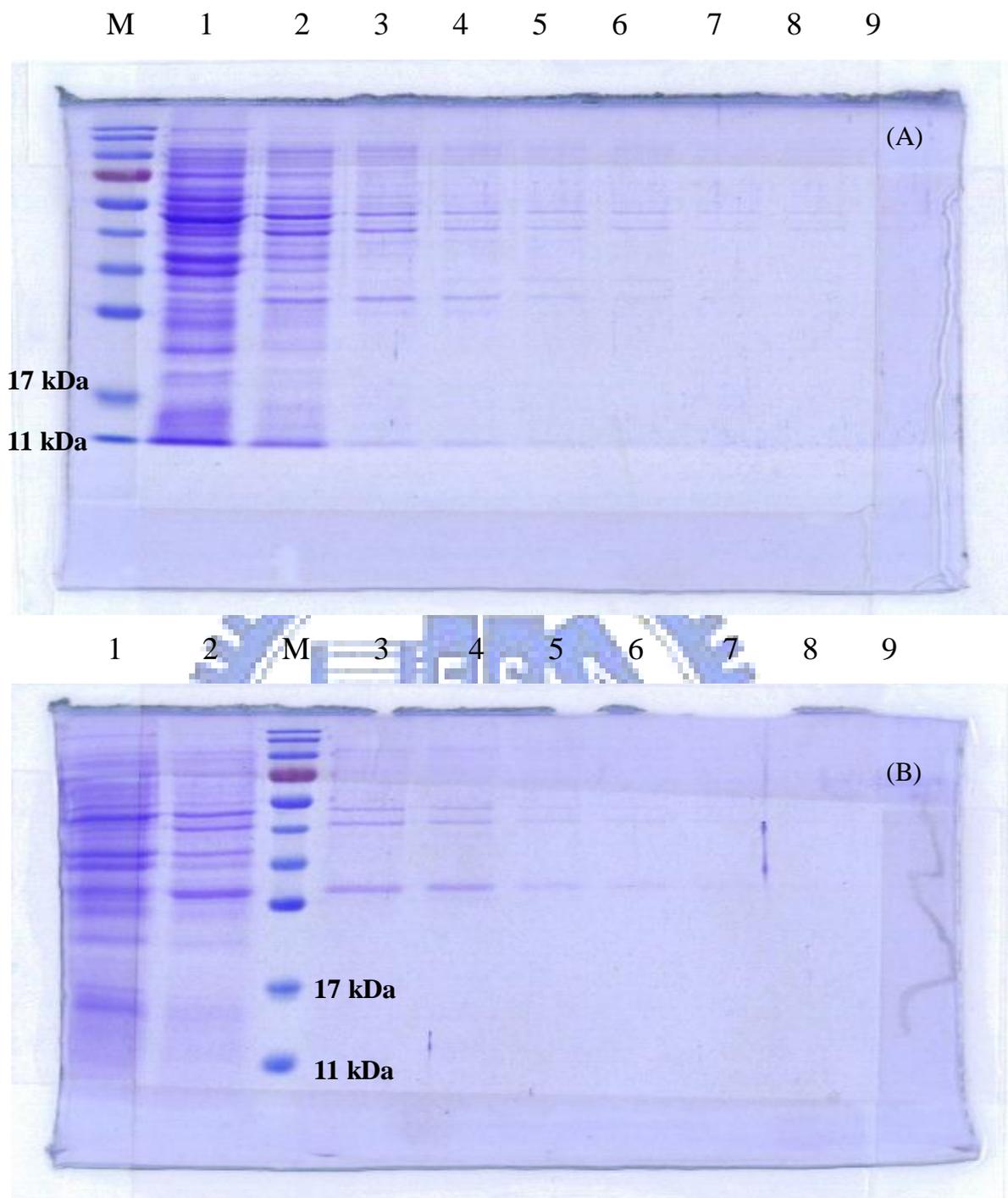


圖 29. NG-hCG β 次單元體純化方法 B 之 SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : Flow through

Lane 2 : Wash buffer C

Lane 3~Lane 9 : Elution buffer E

Lane M : protein marker.

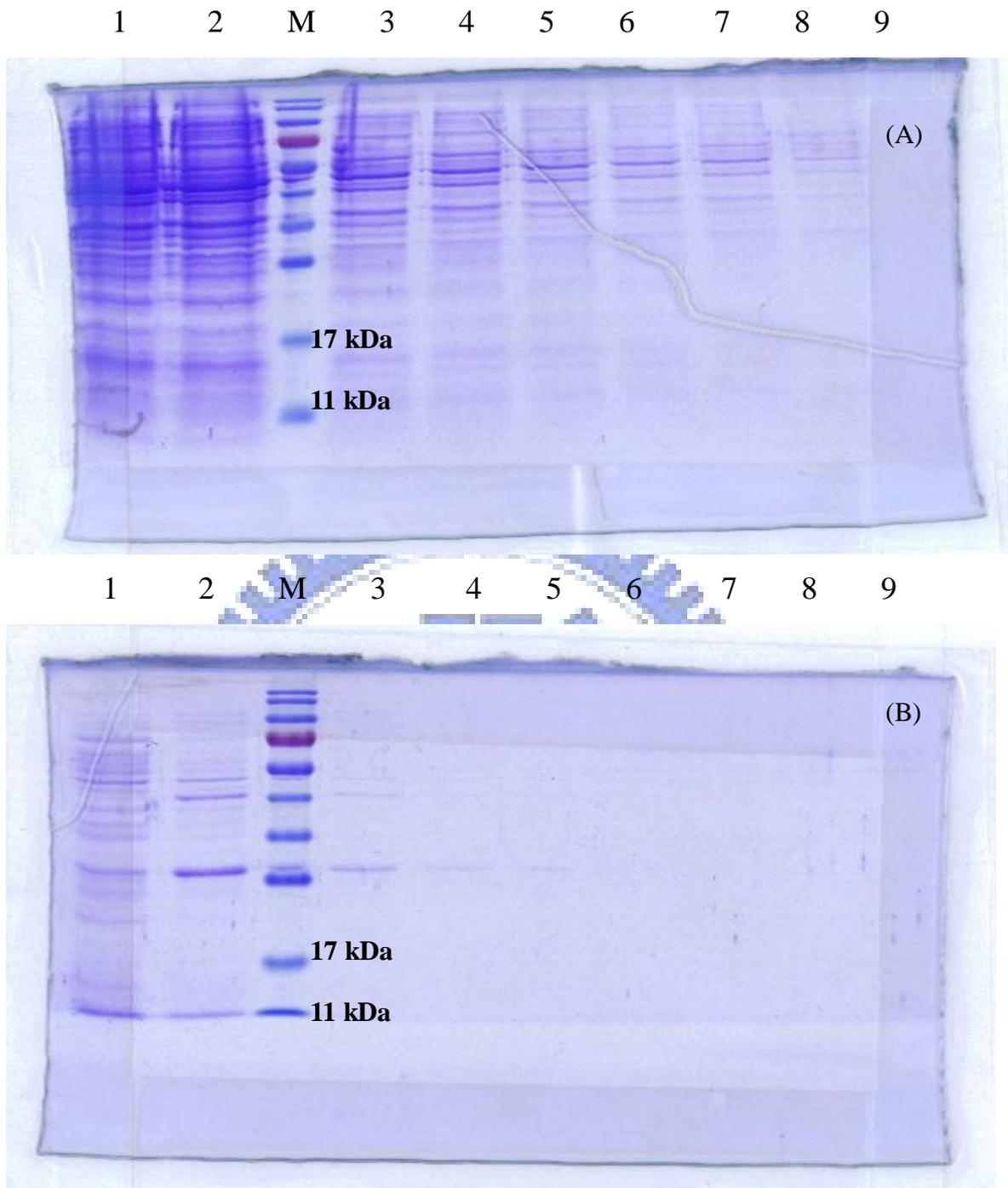


圖 30. NG-hCG' β 次單元體純化方法 B 之 SDS-PAGE 染色結果

Lane 1 : Flow through

Lane 2 : Wash buffer C

Lane 3~Lane 9 : Elution buffer E

Lane M : protein marker.

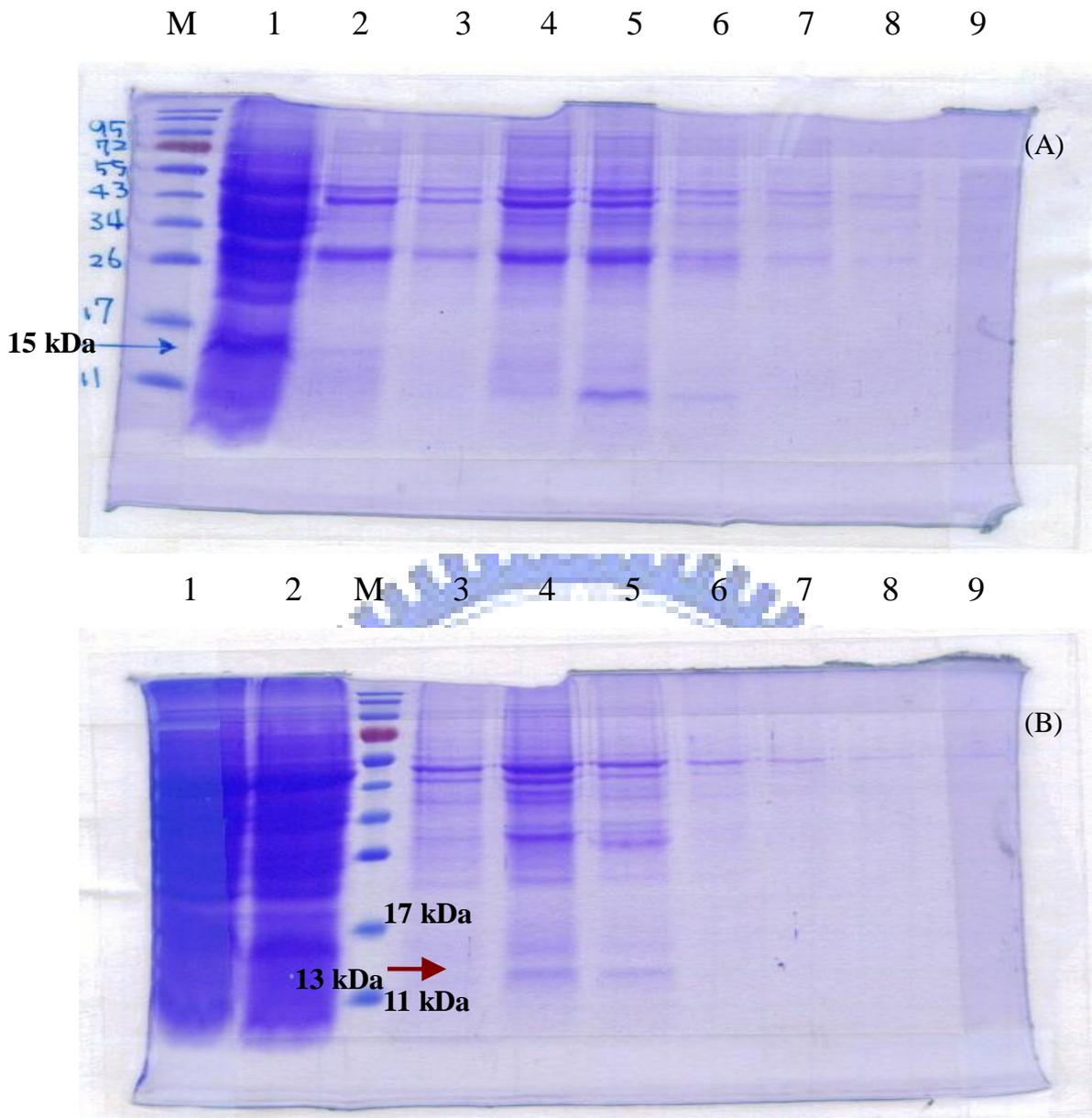


圖 31. NG-hCG β -和 NG-hCG' β -次單元體純化方法 A 之 SDS-PAGE 染色結果；圖 A：NG-hCG β -次單元體之結果；圖 B：NG-hCG' β -次單元體之結果

Lane 1 : Flow through

Lane 2 : Wash buffer C

Lane 3~Lane 9 : Elution buffer E

Lane M : protein marker.

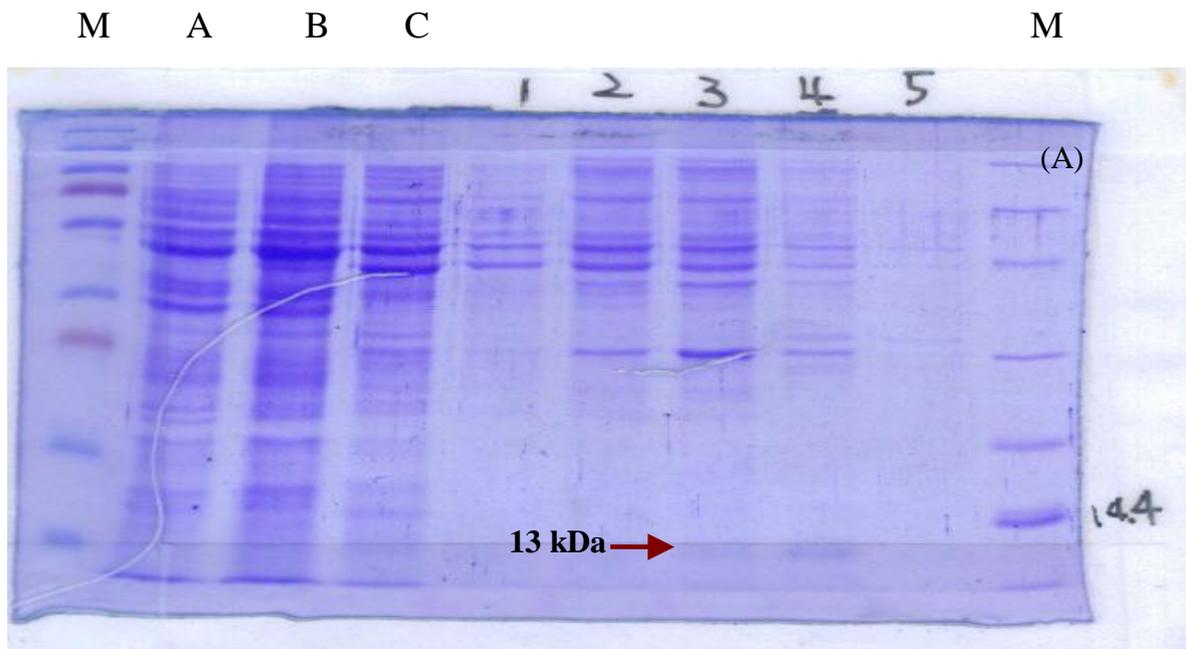


圖 32. NG-hCG' β -次單元體大量培育後純化之 SDS-PAGE 染色結果

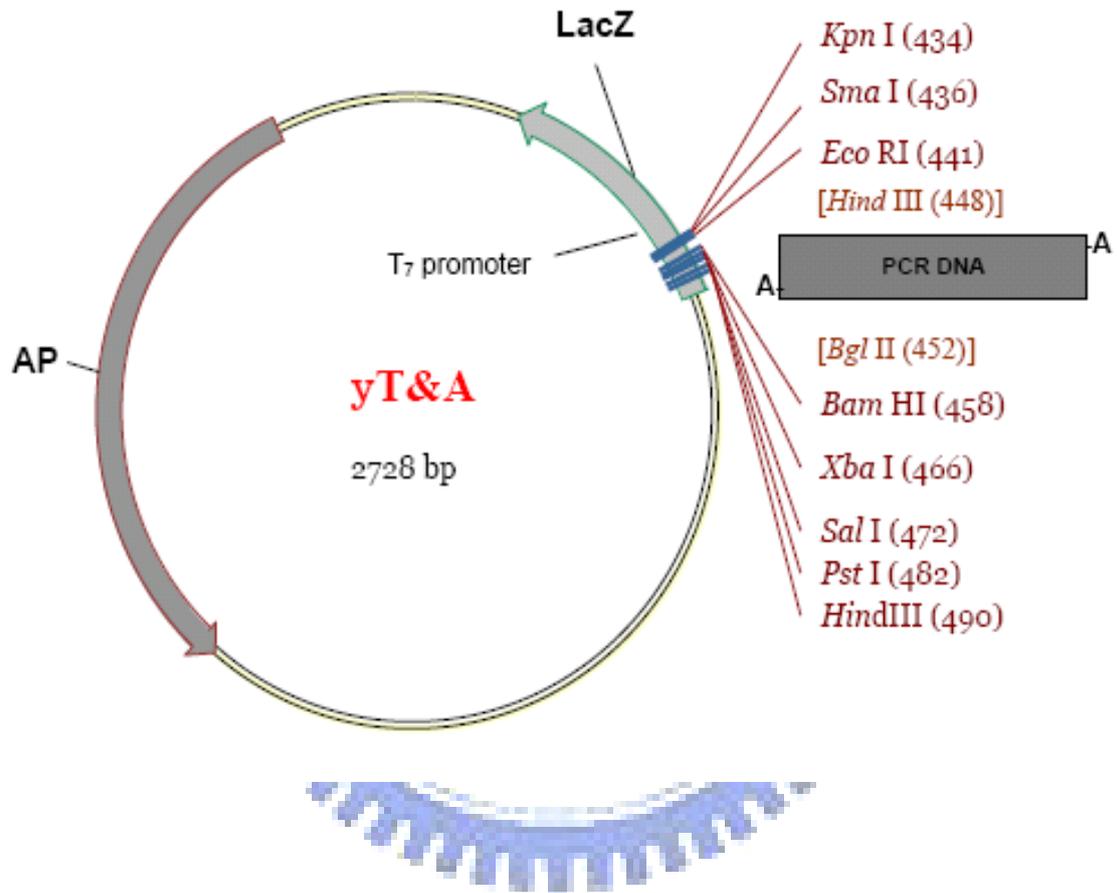
Lane 1 : Flow through

Lane 2 : Wash buffer C

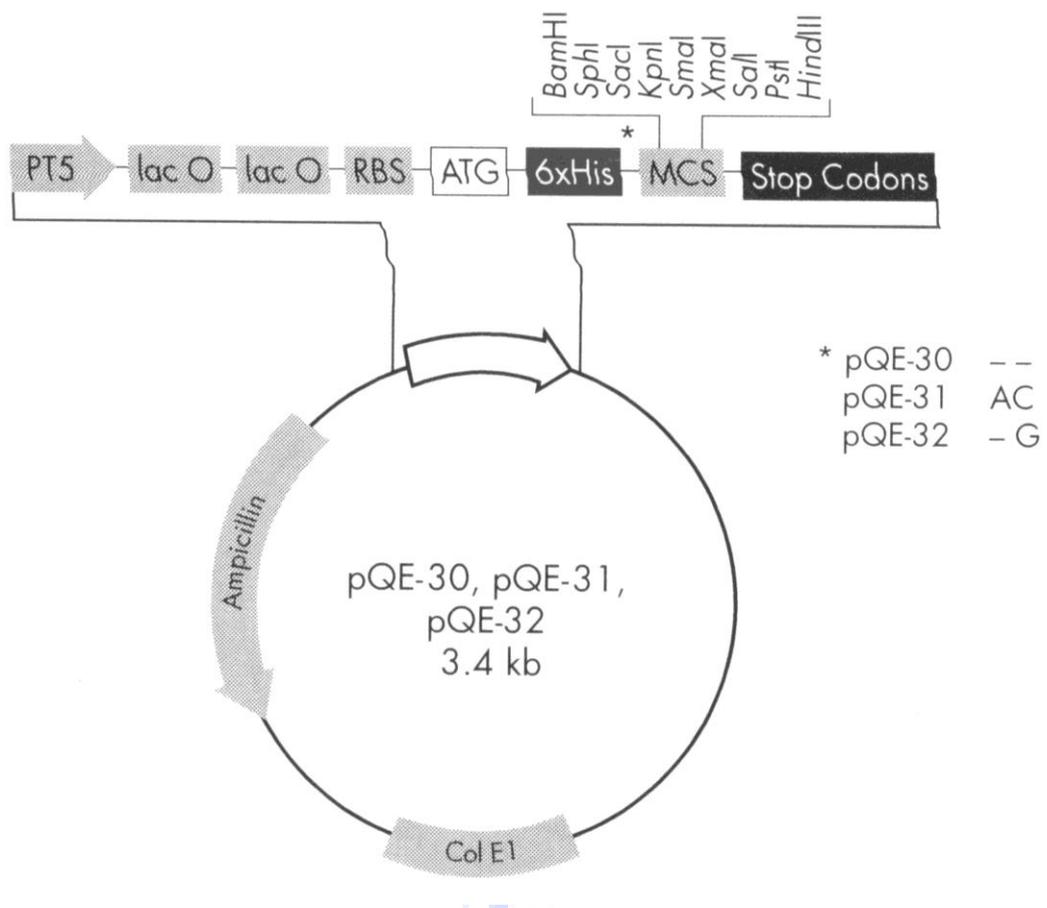
Lane 3~Lane 9 : Elution buffer E

Lane M : protein marker.

yT&A 選殖載體圖譜



附錄 A. yT&A 選殖載體之圖譜



附錄 B. pQE30 表現載體之圖譜