

國立交通大學

生物科技系暨研究所



建立新型微粒子免疫分析法以測定轉錄因子之
活性

**Develop a new microsphere-based immunoassay for
measuring the activities of transcription factors**

研究生：賴韻如

指導教授：廖光文 教授

中華民國九十六年六月

建立新型微粒子免疫分析法以測定轉錄因子之活性

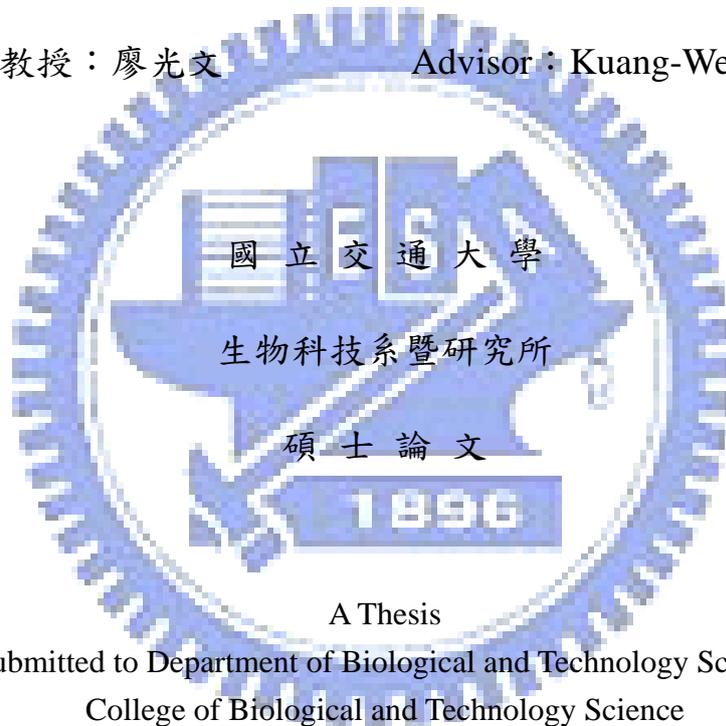
Develop a new microsphere-based immunoassay for measuring
the activities of transcription factors

研究生：賴韻如

Student：Yun-Ju Lai

指導教授：廖光文

Advisor：Kuang-Wen Liao



A Thesis

Submitted to Department of Biological and Technology Science

College of Biological and Technology Science

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master

in

Biological and Technology Science

June 2007

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

建立新型微粒子免疫分析法以測定轉錄因子之活性

學生：賴韻如

指導教授：廖光文 博士

國立交通大學生物科系暨研究所碩士班

摘要

轉錄因子在基因調控方面佔相當重要的地位，藉由偵測細胞內轉錄因子的活化程度，可以判斷細胞的生理狀況、癌化程度或檢視藥物造成的各種反應。傳統上已有許多方式用以偵測轉錄因子活化程度，例如 EMSA、ELISA、報導基因活性分析等，然而各方法仍有其缺失之處，例如背景值過高或是靈敏度差等，因此發展出一個新方法以避免舊有之缺點可使轉錄因子活性分析研究進展更加快速。

我們參考流式細胞儀可偵測微粒子所帶螢光的方法，發展出新型微粒子免疫偵測法 (MIA-TF)，利用 avidin 與 biotin 的鍵結，使結合有目標轉錄因子的核酸片段接合上微粒子，後續利用免疫法標定螢光於目標轉錄因子上，最後使用流式細胞儀偵測。於此研究中使用 HIF-1 α 及 NF- κ B 作為系統之所偵測之目標轉錄因子，實驗結果顯示 MIA-TF 可測得細胞中目標轉錄因子活性並可準確測得細胞在藥物作用下其目標轉錄因子之活性改變，此外 ELISA 及報導基因活性分析與 MIA-TF 相比較；此方法之最大特點為可不經萃取核蛋白而直接偵測到細胞內轉錄因子之活性，可更加簡便且快速的完成分析，其靈敏度高於傳統 ELISA 一百倍，並可發展為多目標偵測之高生產力系統，未來可大量應用至醫療診測、細胞生理研究及藥物篩選平台。由各種方面看來，MIA-TF 為一個相當有前瞻性的轉錄因子活性偵測方法。

Develop a new microsphere-based immunoassay for measuring the activities of transcription factors

Student : Yun-Ju Lai

Advisor : Kuang-Wen Liao, Ph.D

College of biological Science and Technology

National Chiao Yung University

Abstract

Transcription factors play pivotal roles in regulation of gene expression. By measuring the DNA-binding activities of transcription factors, we know the physiology of cells, cancerization or the response to drug treatment. There have been several traditional methods for analyzing activities of transcription factors, such as EMSA、ELISA、reporter gene activity assay. But all of these methods have its own disadvantages like high background or low sensitivity.

For the purpose of developing a new method to avoid those disadvantages, we develop a new microsphere-based immunoassay to measure the activities of transcription factors (MIA-TF). For MIA-TF, NeutrAvidin-labeled microspheres have been used as solid phase to capture the biotin-labeled double-strand DNA. The DNA-bound transcription factors are detected by immunoassay using transcription factor-specific antibody, then analysis by flow cytometry. We use HIF-1 α and NF- κ B individually as target transcription factors. MIA-TF can detect the difference in activities of transcription factors in cells after drug treatment. We compared MIA-TF with ELISA and reporter gene activity assay in sensitivity and optimize time. The distinguishing feature of

MIA-TF is that we can work without the purification of nuclear protein so lead to high-throughput assay. When compared to ELISA method, MIA-TF shows a 100-fold higher sensitivity. Furthermore, MIA-TF can extend to multiplex targets analysis. The development of MIA-TF would make a further progress in clinical analysis and drug screening system. In all respects, MIA-TF is a high potential methods to detect activities of transcription factors.



誌 謝

兩年的光景，在庸庸碌碌中，真的很快就過去了，遙記得當初剛進實驗室時，我還是個連 DNA 電泳怎麼跑都不懂的門外人，今日已經拿到了堂堂國立大學生物科技所的碩士學位；從當初的無措到今日的自信，這之間的轉變，真的要歸功於老師的耐心指導與實驗室伙伴們的大力支持。

雖然老師常常絮絮叨叨，但我由衷感謝，對於您的諄諄教誨，我真的都銘記在心，對於人生規劃也有了更多的想法；

雖然實驗室伙伴們常常在我趕實驗時，在實驗室裡歡樂，但我由衷感謝，看著學弟妹們開始走到了火燒屁股的地步，我同時也有一些因看熱鬧而得來的歡樂；

雖然你們會在我花了三天完成樣品的準備，只在上機的前一刻，把樣品全部打翻，但我由衷感謝，我認真的體會到了重複的實驗會訓練自己的手更為精準；

雖然你們會在我上機到一半時，把 flow 的開關按掉，但我由衷感謝，因為我知道了在當下用紙筆記錄下實驗的電壓條件是多重要的事情；

雖然我不常參與實驗室的活動，但我感謝你們還是每次都記得約我；雖然你們常常取笑我胖腫的臉頰，但我感謝你們會記得這是我的特色；雖然相處只有短短兩年的時間，但我感謝上天，祂讓「認識」這件事情可以變成長久。

目 錄

中文摘要	i
英文摘要	ii
誌謝	iv
目錄	v
表目錄	iiiv
圖目錄	iiiv
簡寫名稱	x
第一章、	緒言.....	1
第二章、	文獻探討.....	3
2.1	轉錄因子.....	3
2.1.1	轉錄因子之介紹與特性.....	3
2.1.2	轉錄因子與癌症相關.....	4
2.1.3	HIF-1 (hypoxia-induced factor-1).....	5
2.1.4	NF- κ B (nuclear factor-kappa B).....	5
2.2	各式轉錄因子偵測方法論述.....	7
2.2.1	西方墨點法 (western blot).....	7
2.2.2	電泳速度變動分析法 (EMSA).....	7
2.2.3	酵素免疫吸附分析法 (ELISA).....	8
2.2.4	報導基因活性分析 (reporter gene activity assay).....	9
2.3	流式細胞儀之粒子分析.....	11
第三章、	實驗策略.....	13
第四章、	實驗流程.....	15
第五章、	材料與方法.....	17
5.1	新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 之材料取得與方法敘述.....	17
5.1.1	微粒子.....	17
5.1.2	核酸片段準備.....	17
5.1.3	細胞核蛋白萃取.....	22
5.1.4	蛋白質濃度測定.....	23
5.1.5	新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF).....	24
5.1.6	流式細胞儀操作分析.....	26
5.2	活體外細胞毒殺測試.....	28
5.2.1	MTT 細胞增殖及細胞毒性檢測.....	28
5.2.2	數據分析.....	28
5.3	報導基因活性分析.....	29
5.3.1	HBS 報導基因質體之構築.....	29

5.3.2	質體轉形	31
5.3.3	菌液 PCR	31
5.3.4	質體 DNA 之小量分離法	32
5.3.5	質體 DNA 之大量分離法	33
5.3.6	質體 DNA 於哺乳類細胞株之轉染	34
5.4	酵素免疫吸附分析法 (ELISA)	37
5.4.1	96 孔盤之前處理	37
5.4.2	實驗流程	37
5.5	新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 應用於 96 孔盤	39
5.5.1	Seeding cells	39
5.5.2	細胞全蛋白萃取	39
5.5.3	新型微粒子免疫分析法之修飾 (modified-MIA-TF)	40
第六章、	結果	42
6.1	新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF)	42
6.1.1	微粒子與 bio-DNA 的結合	42
6.1.2	HeLa cell 於不同大小生長環境內所能抽出核蛋白量	42
6.1.3	新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 之流程設立	45
6.1.4	MIA-TF 於流式細胞儀之散點圖	51
6.2	新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 檢測細胞內轉錄因子之變化	55
6.2.1	MIA-TF 應用於 NF- κ B 核蛋白之檢測	55
6.2.2	MIA-TF 測量 NF- κ B 核蛋白之靈敏度	55
6.2.3	MIA-TF 測量細胞核蛋白內特定轉錄因子之靈敏度	56
6.2.4	活體外細胞毒殺測試	61
6.2.5	檢測細胞於特效藥刺激下致使核內轉錄因子濃度變化	64
6.3	HIF-1 α ELISA	67
6.4	報導基因活性分析	69
6.4.1	HBS 報導基因質體之構築	69
6.4.2	細胞於缺氧環境下之報導基因活性分析	77
6.5	新型微粒子免疫分析法操作於 96 孔盤之應用 (modified-MIA-TF)	79
6.5.1	Modified-MIA-TF 操作於 96 孔盤測試	79
6.5.2	Modified-MIA-TF 應用於 96 孔盤檢測	79
第七章、	討論	83
第八章、	參考文獻	91
附錄一	常見轉錄因子之結合序列	96
附錄二	實驗內使用之核酸片段序列	97
附錄三	質體圖示	99

表 目 錄

表一、	聚合酶連鎖反應相關引子.....	19
表二、	聚合酶連鎖反應相關條件.....	20
表三、	HeLa 細胞於不同大小生長環境內所能收出核蛋白量.....	44

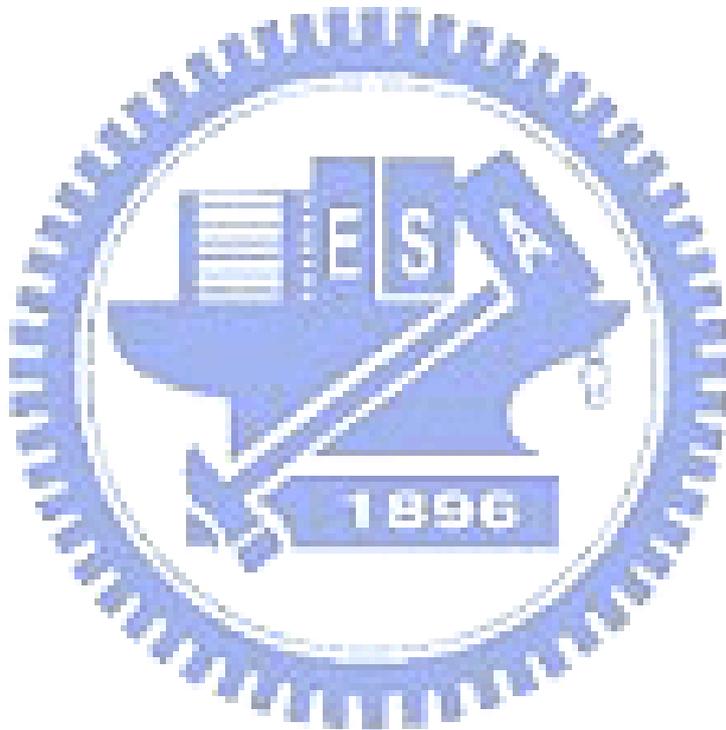


圖 目 錄

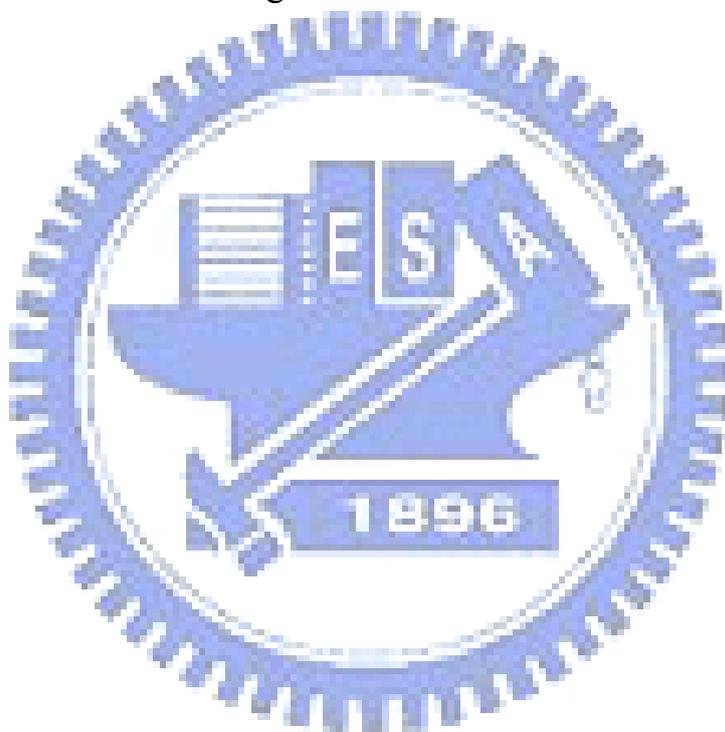
圖一、	新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 概念圖.....	14
圖二、	新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 之基本流程圖.....	16
圖三、	微粒子與 bio-DNA 的結合.....	43
圖四、	流程設立-1.....	48
圖五、	流程設立-2.....	49
圖六、	流程設立-3.....	50
圖七、	MIA-TF 於流式細胞儀之散點圖.....	54
圖八、	MIA-TF 應用於 NF- κ B 核蛋白之檢測.....	57
圖九、	MIA-TF 測量 NF- κ B p50 純蛋白之靈敏度.....	58
圖十、	MIA-TF 測量核蛋白內 HIF-1 之靈敏度.....	59
圖十一、	MIA-TF 測量核蛋白內 NF- κ B 之靈敏度.....	60
圖十二、	HeLa cell 於 DFO 刺激下之細胞存活曲線.....	62
圖十三、	HeLa cell 於 HQ 刺激下之細胞存活曲線.....	63
圖十四、	MIA-TF 偵測 HeLa cell 於 DFO 刺激下之 HIF-1 活性變化	65
圖十五、	MIA-TF 偵測 HeLa cell 於 HQ 刺激下之 NF- κ B 活性變化	66
圖十六、	ELISA 檢測 HeLa cell 於 DFO 刺激下之 HIF-1 活性變化...	68
圖十七、	基因選殖之插入片段及質體準備之電泳圖.....	72
圖十八、	菌液 PCR 之電泳圖.....	73
圖十九、	pCRII-C2-9-hrGFP 之順接及反接可能質體圖示.....	74
圖二十、	pCRII-C2-9-hrGFP 經 BamHI 切割後之電泳圖.....	75
圖二十一、	以細胞轉染方式測試 pCRII-C2-9-hrGFP 的功能.....	76
圖二十二、	以報導基因活性分析檢測 HeLa cell 於 DFO 刺激下之 HIF-1 表現.....	78

圖二十三、 Modified-MIA-TF 操作於 96 孔盤測試.....	80
圖二十四、 Modified-MIA-TF 應用於 96 孔盤之 HIF-1 檢測.....	81
圖二十五、 Modified-MIA-TF 應用於 96 孔盤之 NF- κ B 檢測.....	82



簡 寫 名 稱

EMSA	electrophoretic mobility shift analysis
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
bio-DNA	Biotin-labeled double strand oligonucleotide
HIF	Hypoxia-inducible factor
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
HBS	HIF binding site
NBS	NF- κ B binding site



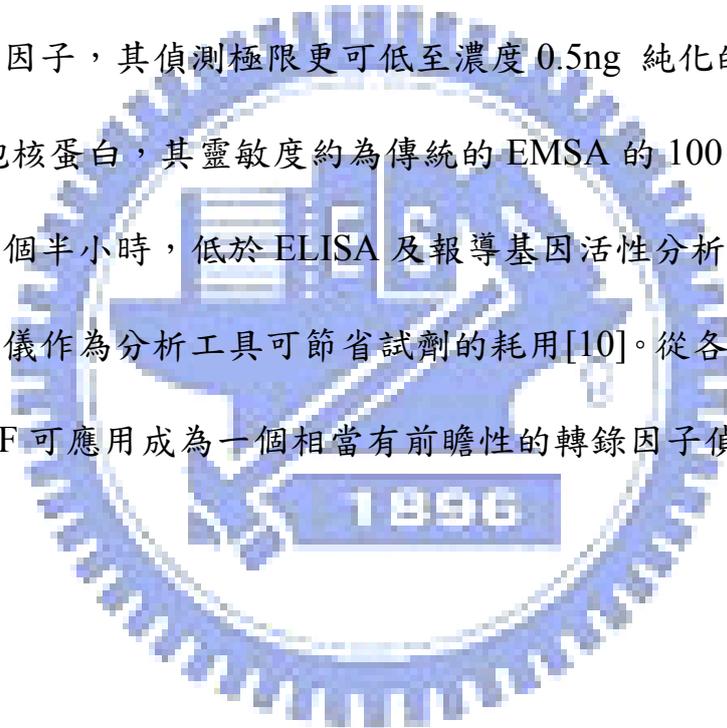
第一章 緒言

轉錄因子 (transcription factor) 被活化後可結合於特定序列，繼而開啟其下游諸多基因的表現，因此轉錄因子在基因調控及細胞生理部分佔有相當重要的地位[1]。於是細胞內轉錄因子的含量及活性便代表著該細胞正進行一些細胞生理反應，可能是增生複製或是老化凋亡[2]，更甚至是細胞的正在癌化[3]；藉由分析細胞內某種特定轉錄因子活性的強弱，我們能夠判斷該細胞的生理狀況或是癌化程度。轉錄因子的分析於癌症的研究上，已是相當重要的一環[4]。

因此，發展出一個合適的轉錄因子分析方法，必然對於癌症及細胞生理學術研究有極大的助益，藉由這樣的一個方法，我們可以分析各種轉錄因子間的交互作用對基因表現的影響，或者得知細胞在不同的環境下，其生理反應機制為何 [5]；再者是藉偵測細胞中的某些轉錄因子含量改變，以判斷細胞是否癌化及其癌化程度 [3]；而轉錄因子的分析方法也能夠提供篩選藥物的平台 [6]，並直接推得該藥物的藥理機制

傳統上已有許多方法可用來偵測轉錄因子的含量，如 electrophoretic mobility shift analysis (EMSA) [7]、Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) [8]、reporter gene activity assay [9]等，但以上方法都有其不同的操作條件上的限制性，例如：可能需要用到放射性物質、偵測靈敏度不佳、或是細胞實驗操作上的問題、整體實驗所需耗費時間太長，在此我們發展

出新型微粒子免疫分析法 (microsphere-based immunoassay for measuring the activities of transcription factors, MIA-TF)，此方法的固相載體為市售已接合 NeutrAvidin 的微粒子，再配合上已標定 biotin 且含目標轉錄因子結合序列的核酸片段 (此後簡稱 bio-DNA)，及相配對的抗體，即可在實驗室內自製偵測各式目標轉錄因子活性的系統。因轉錄因子在細胞內含量極低，偵測方法的靈敏度便極為重要，在我們所開發的方法中，不但可以偵測到具有活性的轉錄因子，其偵測極限更可低至濃度 0.5ng 純化的 NF- κ B p50，或 50ng 的細胞核蛋白，其靈敏度約為傳統的 EMSA 的 100 倍；整體花費時間不需超過三個半小時，低於 ELISA 及報導基因活性分析所耗費的時間，使用流式細胞儀作為分析工具可節省試劑的耗用[10]。從各種方面的考量上看來，MIA-TF 可應用成為一個相當有前瞻性的轉錄因子偵測方法。



第二章 文獻探討

2.1 轉錄因子

2.1.1 轉錄因子之介紹與特性

DNA 的轉錄起始 (transcription initiation) 需要許多因子的參與，這些因子的其中一部份為 RNA polymerase[11]，而其餘的部分則統歸類於轉錄因子[12]。為了能夠讓轉錄作用順利進行，轉錄因子的首要條件便是能辨識特定的 DNA 序列並坐落其上，其次便是與其他的蛋白質（例如：含 RNA polymerase 之 basal apparatus）結合，開啟下游基因的轉錄[13, 14]。細胞為了適應本身的生理改變及各種環境的變化，會表現並活化各式不同的轉錄因子，進一步去調控下游各式基因的表現，因此轉錄因子的種類與活化在細胞訊息傳導中，佔有非常重要的地位 [15]，並且常常是牽一髮而動全身；例如在 Ras-MAPK 路徑中，MAP 激酶 (MAP kinase) 被活化後進入細胞核中，並磷酸化其他多種轉錄因子，其中包含 Jun [16]和 Ets [17]家族中的一些成員，而這些被活化的轉錄因子再進一步去刺激一些早期基因 (early genes) 表現產生出另一群轉錄因子，比如 myc、Fos、Jun [18]，這些被刺激產生的轉錄因子可活化延遲基因 (delayed genes) 的表現，其中一種延遲基因會表現出例如：E2F 轉錄因子，該轉錄因子影響了細胞週期限制點 (restriction point) 的進展 (progression) [19]。因此轉錄因子不僅種類非常多，且其微量的改變將會對細胞造成巨大的影響。

2.1.2 轉錄因子與癌症相關

轉錄因子既然在細胞生理調控方面如此的重要，故轉錄因子的不正常便會造成疾病的產生，已有研究指出，在許多人類及動物的癌症個體中，觀察到致癌基因會產生構形特異或過多量的某種轉錄因子[20]，而在其中最常見的便是產生與調控細胞複製及存活有關的 Myc；例如：在患白血病的公雞體內有著一種反轉錄病毒稱為 *avian leucosis virus*，該病毒會將突變的片段插入體內細胞鄰近表現 Myc 基因的位置，進而造成 Myc 被不正常的大量表現[21]；而 Burkitt's lymphoma 則為另一與人類疾病與 Myc 基因有關的例子[22]。近年來也因而興起了另一類型的癌症療法稱為「transcription therapy」，主張直接阻斷致癌基因使轉錄因子不正常表現的路徑。Pandolfi 等人於 2001 年便發表了相關的文獻[4]，作者於該文章內討論了 M3 型的急性骨髓白血病（APL, M3 subtype of acute myeloid leukemia）的各種以轉錄因子為主的治療機制，因該疾病病因現象複雜，因此便成為如此療法的範例。由此看來，轉錄因子與癌症治療間的關係是越來越被重視。

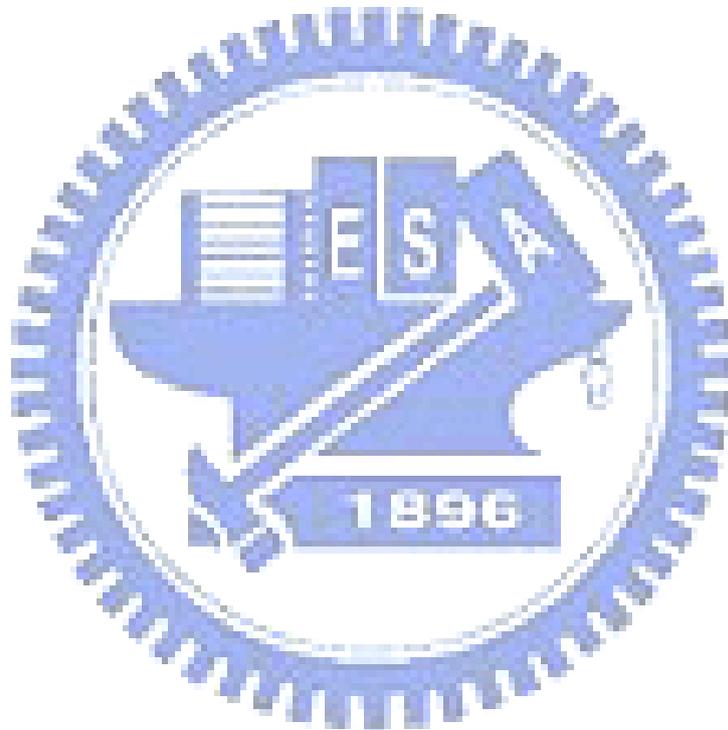
2.1.3 HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1)

HIF-1 的主要功能為調控氧氣平衡[23]，其結構為由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 兩種單體所組成的異源雙聚體；在正常氧氣供應環境中， α 單體經由 VHL ubiquitin ligase 被迅速降解，而當細胞承受缺氧壓力時， α 單體會被大量釋放並和 β 單體結合，進入細胞核且坐落在 HIF binding site (HBS) [24]，其目標下游基因涵蓋相當多範圍，例如血管新生成、紅血球生成、糖解、鐵離子的輸送和細胞複製及生存[23]。而癌細胞因為生長快速，常會承受缺氧的壓力，因此在癌細胞內 HIF-1 會被大量表現[25]，在本實驗中我們採取此轉錄因子作為新系統設立的範例。

2.1.4 NF- κ B (nuclear factor-kappa B)

NF- κ B 於 1986 年被 Sen 和 Baltimore 發現於 B 細胞中和免疫球蛋白輕鏈的增強子結合[26]，因而命名。NF- κ B 主要調控與發炎、免疫、抗凋亡、細胞生長、癌化及病毒感染有關的基因表現[27-29]，常以二聚體的形式存在，其組成單體成員有 p50、p52、p75 (c-Rel)、p65 (ReA)、p68 (RelB)，每個單體均保留 N 端區域稱為 Rel Homology Domain (RHD)，RHD 的 C 端為聚合作用所需，而 RHD 的 N 端則包含有和 DNA 做結合的區域，因此 NF- κ B 為一個相當典型的轉錄因子結構。未活化的 NF- κ B 存在於細胞質中，此時和抑制蛋白 I κ B 結合[30]，當受到發炎反應因子(例如 TNF- α 、IL-1)

刺激後[31, 32]，I κ B 會被迅速降解，導致 NF- κ B 的自由並進入細胞核中結合至目標序列[33]，開啟下游基因例如抗凋亡因子的表現，進而刺激細胞分裂或令細胞不凋亡，這些影響使細胞無限度的複製，而細胞的無限度生長便是癌化的一項重要特徵[34]。因此 NF- κ B 的過量和癌症的發生有密切相關[27]，也被作為藥物開發的重要標的[35]。我們在本實驗中便採取此轉錄因子作為範例之一。



2.2 各式轉錄因子偵測方法論述

2.2.1 西方墨點法 (western blot)

西方墨點法乃是結合膠體電泳的解析和免疫化學專一性所發展出來的偵測生物特性的方法，源自 Stanford ,George Stark 的實驗室，而該方法的命名則是來自於 W. Neal Burnette [36]，其基本原理為先利用 SDS-PAGE(SDS polyacrylamide gel electrophoresis) 將蛋白質變性，並根據分子量與電荷的差異而分離出來，接著將蛋白質自電泳膠中轉印到另一層膜上 (通常為 nitrocellulose 或 PVDF)，後續利用專一性抗體辨識特定的蛋白質分子，再經各種反應如呈色、螢光或放射線等變化來檢測樣品中特定蛋白質的含量。利用西方墨點法，不僅可以偵測到蛋白質的分子量，更可以有效的分離目標抗原蛋白質及判斷其濃度變化。將西方墨點法應用於轉錄因子的偵測，可確實的反映出細胞內該轉錄因子的存在濃度。

2.2.2 電泳速度變動分析法 (Electrophoretic mobility shift analysis; EMSA)

EMSA 為一種研究 DNA 結合蛋白和其相關的 DNA 結合序列相互作用的技術[7]，可用於定性和定量，通常用純化的蛋白或細胞核萃取液與標記的 DNA 探針一同保溫，在非變性的聚丙烯凝膠電泳上，分離複合物和非結合的探針，DNA 複合物移動速度比非結合的探針慢，因此可以分離出來。

EMSA 常用的 DNA 探針標記方法有同位素 ^{32}P 法和非同位素法(化學發光法)，同位素法是最傳統的一種實驗方法，但因實驗需涉及輻射，有無法避免的危險性及需要耗資甚高的防護措施，因此後來發展出化學發光法，利用 DIG 或 biotin 標記核酸片段，後續再經化學呈色觀察[37]。若配合上特定的抗體，則可進行超遷移實驗 (supershift) [21]，因為 DNA 複合物在接上抗體後，其在電泳膠上的遷移會延遲，觀察混合物是否延遲，可加強判斷目標蛋白的特異性，一般所能使用的純化蛋白量約在 20-2000ng 之間，若為細胞核萃取液，則需提高濃度至 1-20 μg 方可被偵測。

2.2.3 酵素免疫吸附分析法 (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA)

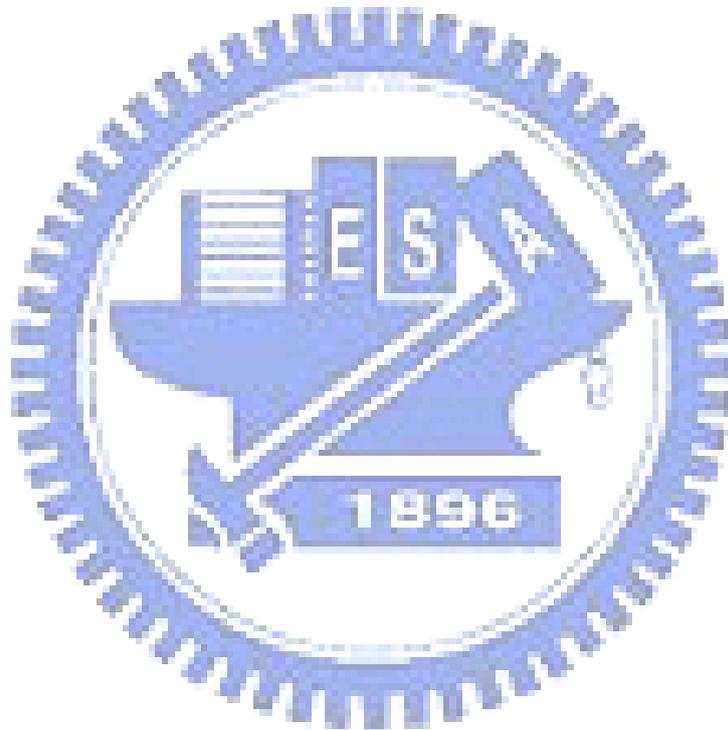
自 Engvall 和 Perlman 於 1971 年利用抗體與抗原間高度專一性的特性發表了酵素免疫結合吸附法應用於 IgG 定量測定的文章 [38]，ELISA 至今已成為最熱門的免疫化學偵測工具，而這項技術的普遍，也令許多免疫與疾病相關基礎研究和醫療檢驗進展迅速；ELISA 的基本原理為利用抗體對抗原的專一性，將抗體固定於某種固相載體表面，加入樣品與相對抗體結合後，再加入與酵素結合的高專一性抗體來偵測目標蛋白，最後加入酵素的受質，經相當時間作用呈色後，經由光學密度測量，可評估目標蛋白的表現量。1996 年 Delage 修改 ELISA 的基本組成，發展出可偵測轉錄因子

的方法[8]，先將會辨識目標轉錄因子的一級抗體接合在盤子上，加入細胞萃取蛋白後，再加入標定有 biotin 並含目標結合序列的核酸片段，接著使用化學法呈色。後來以 ELISA 原理作為基本平台，亦發展出許多他種形式可偵測轉錄因子的方式，例如在盤子上先接合 streptavidin，再加入蛋白質與 biotin-labeled dsDNA probe 的混合物，接著依序加入一級抗體、二級抗體之後呈色 [39]；另一方式為先在核酸片段的第一級胺基團的氮原子上作修飾，將核酸片段以共價性鍵結直接接在盤子上，接下來再加入蛋白質、一級抗體、二級抗體呈色 [40]；同年 Wang 等人利用核酸外切酵素 (exonuclease) 發展出不需特異性抗體的方法 [41]，先將標定有 DIG 的核酸片段共價鍵結上盤子，加入細胞萃取之後，目標轉錄因子會結合上核酸片段，之後再加入核酸外切酵素，此時未被蛋白保護的核酸片段會被切除而失去 DIG，再加入可辨識 DIG 的抗體，便可因此間接的對轉錄因子定量。

2.2.4 報導基因活性分析 (Reporter gene activity assay)

在分子生物研究上，因為不易直接觀察到細胞內基因表現程度，所以選擇容易被觀察及測量的報導基因作為間接證明；將報導基因連接上有興趣的含轉錄因子結合位之核酸片段後，利用轉染的方式將基因送入細胞株，直接觀察報導基因的螢光表現而間接推得該核酸序列的表現程度[9, 42]。可作為報導基因的種類非常多種，例如來自螢火蟲的 luciferase 可催化

luciferin 產生冷光、來自水母的 Green fluorescent proteins(GFP)可於 UV 燈下產生綠色螢光。此種偵測法因敏感度高、可定量、且可一再被分析，被普遍使用在細胞株的基因表現研究中，研究者可利用報導基因定出操縱子與增強子的強度 [9]、定出轉錄因子的角色 [43]、轉染的效率 [44]或偵測分子轉殖是否成功。



2.3 流式細胞儀之粒子分析

(particle-based flow cytometric assay)

流式細胞儀可針對流體內的單一粒子提供一多性狀的光學分析，因其可分析單一細胞的特性，因此普遍應用於學術研究及醫療診測中 [10]；近年來更將該儀器的適用度擴展大至整個有機體[45]小至單一帶螢光分子。

而流式細胞儀與微粒子的相關性始自 1970 年，因流式細胞儀可分析特定大小之粒子，當時使用微粒子作為校正之用 [46]，後來便針對流式細胞儀此特性做出新發展，1977 年便有學者在不同大小微粒子表面標定上不同特定抗原，利用此固相載體可抓下血液中的特異性抗體，使用流式細胞儀便可於一個樣品中同時偵測各項目標分析物 [47]；1981 年使用標定有 FITC 的微粒子測定 neutrophils 和 macrophages 的吞噬作用 [48]；1982 年以 ELISA 原理做為平台，使用微粒子作為固相載體，於其表面固定特定抗體後，用來定量樣品中之 IgG，並使用流式細胞儀分析 [49]，其優點為操作過程中不需經過 wash，可節省下許多時間，改變相對抗體後，更應用於探測 *Helicobacter pylori* [50]、*hepatitis C virus* [51]、immune complex [52]..... 等許多蛋白分子；除此之外，reverse transcriptase、polymerase chain reaction (PCR) 等方式可用於製造具標定記號的核酸序列，將此核酸序列接上微粒子之後，可使用雜交 (hybridization) 的方式抓住樣品中互補的核酸片段，藉以定量 DNA 或 mRNA，應用於基因表現研究上 [53, 54]。微粒子應用於

流式細胞儀的一大進展便是 multiplexed flow cytometric assay[55]，同時使用多種微粒子作偵測，其訴求在於可在一個樣品中同時偵測多種目標分析物，目前已有許多廠商將帶不同螢光的微粒子作為套組（multiplexed bead system）上市，例如 Luminex FlowMetrix™ 套組中便帶有 64 種紅、橙螢光比例不同、並帶有不同的抗體的微粒子，在流式細胞儀上可用 FL2/FL3 去加以分別，因目標分析物上帶綠色螢光染劑 [56]，因此分析數據時先以 FL2/FL3 將不同微粒子先分別開來，再分別去看區塊內綠色螢光量（FL1），便能代表特定目標分析物的含量多寡，因此使用如此套組可在同一個實驗樣品中同時分析 64 種不同的目標分析物。使用流式細胞儀分析微粒子的方式日趨熱門，目前也仍有相當大的進展空間，日後必可成為學術研究及醫療診斷的一重要技術

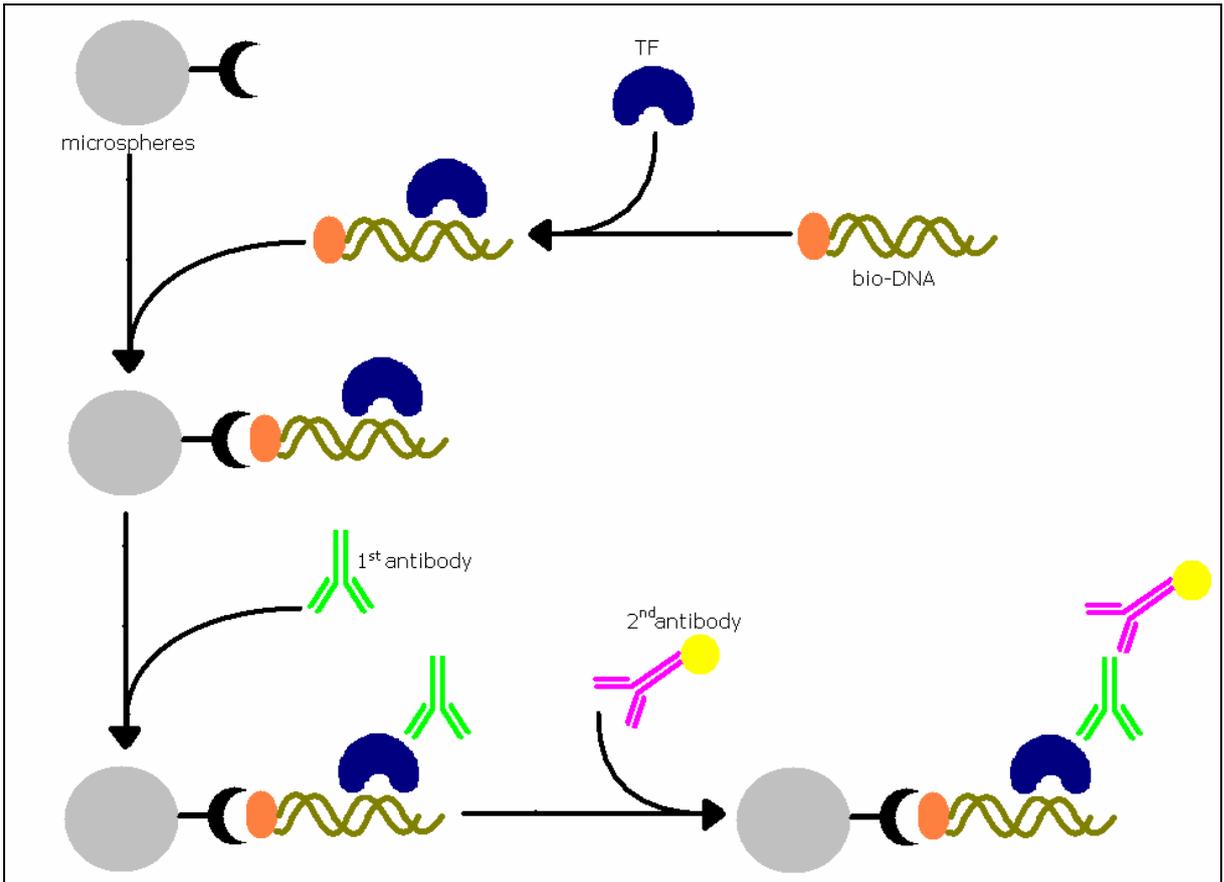


第三章 實驗策略

此新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 採用市售已接合 NeutrAvidin 的微粒子作為固相載體，NeutrAvidin 為去除了醣的 Avidin，可與 biotin 形成極強的非共價性鍵結，相較於其他種類 Avidin，其優點為 pI 值為中性，與目標物所形成的非專一性結合最低，且此微粒子的直徑為 1.0 μ m，可於流式細胞儀中被偵測。

首先使用 bio-DNA 作為探針抓取細胞核蛋白萃取物中的特定轉錄因子，再將微粒子加入混合物，微粒子與 bio-DNA 會經由 NeutrAvidin 與 biotin 間的非共價性鍵結而結合，接續加入對應的一級抗體與二級抗體，便完成接合反應，接著可以流式細胞儀分析 (圖一)。

流式細胞儀分析中，先於散點圖中選取微粒子大小的群落，再觀察該群落內的綠光螢光發亮程度，若是微粒子混合物上所接的轉錄因子越多，則相對應的二級抗體上的螢光 (FITC) mean 值會越高，分析數據時選取區塊內的 events*mean 作為 total mean，再將得到的數值除以微粒子僅和 bio-DNA 作接合、而不含核蛋白的負向控制組，以最後所得倍率數字作圖比較 (relative total mean)。



圖一、新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 概念圖

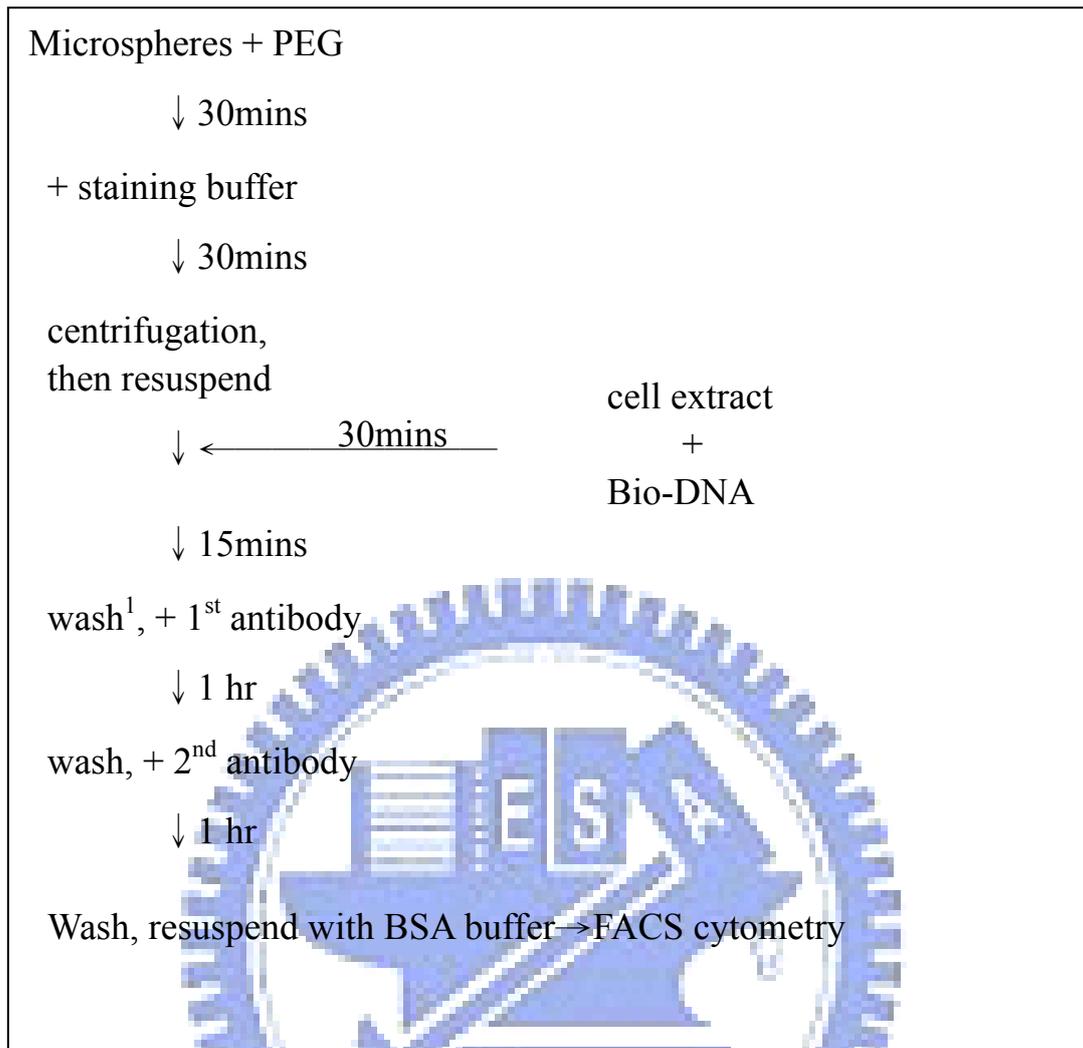
bio-DNA : biotin-labeled dsDNA ;

TF : transcription factor

第四章 實驗流程

本實驗流程圖如(圖二)所示：一開始先將蛋白質萃取與 bio-DNA 混和，等待適當時間後，再加入已 blocking 完成的微粒子，之後再接上針對目標轉錄因子的一級抗體，及尾端接上螢光的二級抗體，在每一次接合步驟完成後，都需加入 wash buffer 混合並離心，去除上清液，以洗去非專一性的鍵結，在最後一次離心後，用 BSA buffer 將微粒子重新懸浮，即可以流式細胞儀分析。

實驗的一開始為先擬定該方法之基本操作步驟，及適合的分析方式，並將該方法試驗到其他種類轉錄因子的偵測上，確立該方法的普遍通用性；接著分別利用純化的 NF- κ B 及細胞核蛋白測試該方法之靈敏度。並與其他傳統上用於偵測轉錄因子活性的方法（例如：ELISA、報導基因活性分析）作比較，討論相互之優缺點及適用範圍。最後將所開發之 MIA-TF 作改良修飾，以求能在不經由核蛋白萃取的程序下於 96 孔盤中偵測，作為高生產力（high-throughput）分析之用途，更能提高此方法的應用價值。



圖二、新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 之基本流程圖

註 1：wash 的程序為先利用 wash buffer 和微粒子混合，轉速 10,000rpm 離心 5 分鐘，小心去除上清液，再使用後述液體將微粒子重新懸浮

第五章 材料與方法

第一節 新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 之材料取得與方法

5.1.1 微粒子

FluoSpheres NeutrAvidinTM labeled microspheres F8777 (Invitrogen, California, United States), 材質為 polystyrene, 直徑 1.0 μ m, 如此大小可於流式細胞儀中被觀測; 此微粒子表面接合有 NeutrAvidin, 且該微粒子不發螢光, 不會在流式細胞儀分析時形成干擾。

5.1.2 核酸片段準備

1. 引子設計

目標轉錄因子結合序列見附錄一, 使用引子將該序列自質體增幅製造出, 並在順向引子前端接有 biotin, 使複製出的核酸在順向端也標定有 biotin, 可於實驗中和 NeutrAvidin 形成非共價式鍵結。作為競爭作用的核酸則選擇無 biotin 的順向引子

2. 聚合酶連鎖反應 (PCR)

取一 0.2ml 的微量離心管, 加入 40.5 μ l 的二次蒸餾水, 5 μ l 之 pfu buffer, 1 μ l dNTP (10 mM), 1 μ l 順向引子 (10 μ M), 1 μ l 之反向引子 (10 μ M), 1 μ l

的含目標結合序列之質體 (50ng/ μ l), 及 0.5 μ l 之 pfu DNA polymerase (5U/ μ l), 混和均勻後短暫離心, 使所有試劑置於離心管底部, 以 Eppendorf MasterCycler personal (Eppendorf, Hamburg, Germany) 進行聚合酶連鎖反應: 其反應循環順序為 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 適當黏合溫度 30 秒 (見表二), 72 $^{\circ}$ C 增幅 0.5~1 分鐘 (見表二), 進行 34 個循環增幅, 最後以 72 $^{\circ}$ C 5 分鐘將未完成之序列完成。

3. 洋菜膠電泳分析

聚合酶連鎖反應產物與 100bp DNA ladder marker, 於 1.5 % 之洋菜膠、1 倍 TAE buffer 進行電泳分析, 使用水平電泳槽 (TOYOBO Gelmate2000, Japan), 電壓 100 伏特 40 分鐘, 電泳結束後將洋菜膠浸泡於 0.5 μ g/ml 之 ethidium bromide 容易中染色 10 分鐘, 再於蒸餾水中退染後, 使用 Uni-photo gel image system (EZ lab, Ohio, United States) 照相系統, 於波長 365nm 之紫外光下觀察, 以判斷增幅產物大小及濃度, 並照相及存檔。

表一、聚合酶連鎖反應相關引子

引子名稱	序列	Tm (°C)
SP6 promoter-5'	attta ggtga cacta tag	42
pCR II -5'	Biotin-gcatc aagct tggtg ccg	56.1
NF-kB5'	Biotin-tcatg tctgg atcca agcta	47.8
5'Mlu-NF-kB	aaata cgcgt tccaa gctag gggac	67.4
VP16-5'	tatcc tgcag tccgc gtaca gccgc gcg	68
T7 promoter-3'	taata cgact cacta taggg	47
NF-kB3'	ccggg gatcc atcta gatta cctc tagag tct	49.9
3'HBSA-ClaI	agcta tcgat atctg cagaa ttcgg	64.1
VP16-3'	tgacc tcgag ctacc caccg taetc gtaa	66
3'NF-kB-XbaI	ggatc tgctt gctca ccatg	60.5

表二、聚合酶連鎖反應相關條件

核酸片段名稱	模板	順向引子	逆向引子	黏合溫度	增幅時間
HBS	pCRII-C2-9	pCR II -5'	3'HBSA-ClaI	59	1min
cHBS ¹	pCRII-C2-9	SP6 promoter-5'	3'HBSA-ClaI	52	1min
NFkB	pNFkB-hrGFP	NF-kB5'	NF-kB3'	47	30 秒
cNFkB	pNFkB-hrGFP	5'Mlu-NF-kB	3'NF-kB-XbaI	60	30 秒
VP16 ²	CMV-ampR-linker-VP16	VP16-5'	VP16-3'	59	1min

核酸片段序列見附錄二

註 1：前端標示「c」字母的核酸表示該片段作為競爭用，序列中含有目標轉錄因子結合

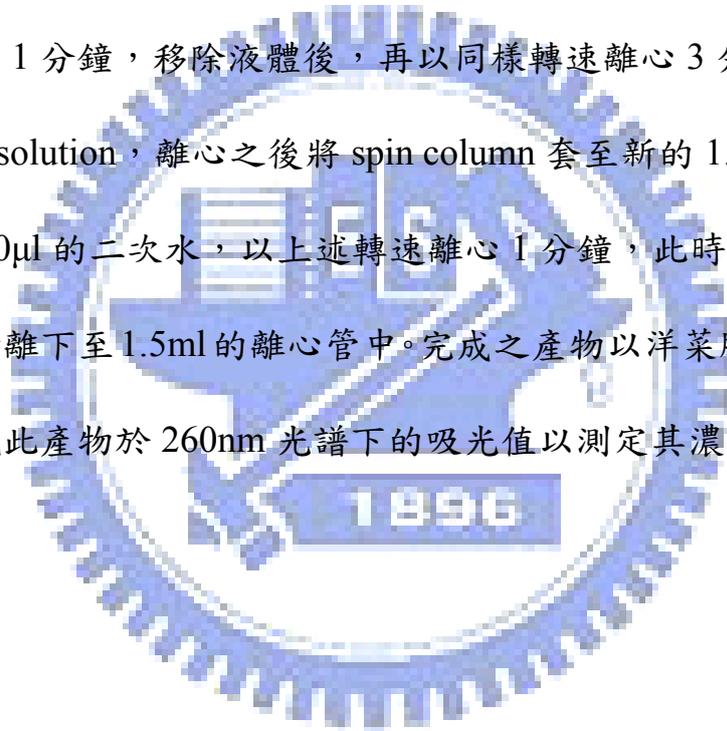
序列，但順向端未包含 biotin

註 2：此片段為用於作非特異性競爭，該核酸片段未標定有 biotin 且未含目標轉錄因子

結合序列

4. PCR 產物之純化

使用 Geneaid Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (Geneaid, Taiwan) 純化 PCR 產物。首先於 PCR 產物中加入 5 倍產物體積量的 binding buffer，混和均勻之後，將此混和物移至套組中的 spin column-collection tube 中，以 12000~14000 rpm 的速度離心 1 分鐘，將離下至 collection tube 中的液體移除，於 spin column 中加入 600 μ l washing solution，靜置 3~5 分鐘，再以同樣轉速離心 1 分鐘，移除液體後，再以同樣轉速離心 3 分鐘，以移除殘留的 washing solution，離心之後將 spin column 套至新的 1.5 ml 微量離心管中，加入 30 μ l 的二次水，以上述轉速離心 1 分鐘，此時已溶於二次水中的 PCR 產物會離下至 1.5ml 的離心管中。完成之產物以洋菜膠電泳分析其 DNA 片段和測試此產物於 260nm 光譜下的吸光值以測定其濃度。



5.1.3 細胞核蛋白萃取

1. 細胞培養

本實驗以人類子宮頸癌 HeLa cell 作為建構系統之 model，使用培養液為含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum) 的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)，培養環境為含 5% CO₂、37°C 的培養箱

2. 使用藥物

於實驗中使用兩種藥物分別為 deferoxamine (DFO) 及 hydroquinone (HQ)，前者為 HIF-1 之活化劑，後者為 NFκB 之抑制劑。

3. seeding cells

以 PBS 潤洗細胞，加入 2 ml EDTA trypsin 懸浮細胞，等待細胞確實懸浮後，加入 5 ml growth medium 以終止反應，以 1,200rpm 轉速離心五分鐘之後，去除上清液，再以 growth medium 重新懸浮細胞，並進行細胞計數，六孔盤中每一孔加入 5×10^5 個細胞，二十四孔盤中則每一孔加入 10^5 個細胞，待培養八小時後加藥，再培養十六小時之後，將細胞以 EDTA trypsin 懸浮後準備抽取細胞核蛋白

4. 細胞核蛋白萃取溶液配製

a. Lysis buffer

10mM HEPES (pH7.9)、1.5mM MgCl₂、10mM KCL、1mM DTT、10% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail、0.1% (v/v) Nonidet P-40

b. Extraction buffer

20mM HEPES (pH7.9)、1.5mM MgCl₂、0.42M NaCl、0.2mM EDTA、
25% (v/v) glycerol、1mM DTT、1% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail

5. 細胞核蛋白萃取 (nuclear extract)

將細胞自培養盤上取下後，以 PBS 潤洗，500g 轉速 5 分鐘離心之後，
去除上清液，再以 PBS 同樣潤洗一次，此時估算 pellet 體積，之後以 5 倍
原 pellet 體積的 lysis buffer 懸浮後，使用微量吸管上下沖洗，以 16,000g 轉
速離心 5 分鐘，在去除上清液後，加入適量體積 extraction buffer (buffer
體積視之後實驗操作步驟而決定)，以 vortex mixer (VM2000, Digisystem,
Taiwan) 震盪至少十秒鐘，靜置於冰上 20 分鐘，以 16,000g 轉速離心 5 分
鐘，取上清液則為細胞核蛋白萃取。儲存於-80°C 冰箱，使用期限不可超過
三週



5.1.4 蛋白質濃度測定

取一 96 孔盤，利用 PBS 將 BSA 由 2000ng/μl 做序列稀釋至 31.25ng/μl，作為標準濃度曲線之用，每一孔加入 10μl 樣品和 290μl coomassie PlusTM protein assay reagent (PIERCE) (每一個樣品皆須做二重複實驗)，等待作用時間 20 分鐘後，以 ELISA reader 測定 595 nm 下之吸光值。取 BSA 各濃度的吸光值做出標準曲線，比對之後得出樣品濃度。

5.1.5 新型微粒子免疫偵測法 (MIA-TF)*

1. 微粒子 blocking

假定實驗設計為 n 個反應，則取 n/2 μl 混和均勻的微粒子溶液 (相當於每個反應 1.5×10^{-11} nmole 個微粒子)，再加入同體積、濃度為 50mM 的 polyethylene glycol (PEG) (混合後最終 PEG 濃度為 25mM)，於室溫下靜置 30 分鐘，此時加入 BSA buffer (1% BSA / PBS) 至體積增為 100nμl，以微量吸管混和均勻，於室溫下放置 30 分鐘後，以 10,000 rpm 轉速離心 5 分鐘，將上清液丟棄後，加入 10n μl 的 PBS，以微量吸管上下沖洗使懸浮，微粒子處理完畢留待備用。

2. 新型微粒子免疫分析 (MIA-TF)

將所準備的蛋白質調整至適當濃度，和 1.5×10^{-8} nmole 的 bio-DNA 混合，(若為競爭試驗，則於此步驟同時加入 1.5×10^{-6} nmole 的競爭核酸片

段),利用 extraction buffer 將最終體積調整為 30 μ l, 於室溫下放置 30 分鐘, 便可加入 10 μ l 處理完畢的微粒子, 利用微量吸管混合後, 室溫下緩和搖晃 15 分鐘, 反應時間完畢後, 每一個反應加入 500 μ l wash buffer (0.02% Tween20/PBS) 混合, 放置轉速 10,000rpm 離心 5 分鐘, 小心將上清液吸出丟棄 (在吸取過程中動作過大可能會導致微粒子的 pellet 漂起), 之後加入以 BSA buffer 稀釋至 2.5 μ g/ml (一般由原液稀釋 400 倍) 的一級抗體溶液 40 μ l 將 pellet 重新懸浮, 室溫下緩和搖晃 1 小時後, 每一個反應加入 500 μ l wash buffer 混合, 放置轉速 10,000rpm 離心 5 分鐘, 小心將上清液吸出丟棄, 再加入 400 倍稀釋的二級抗體溶液 40 μ l 將 pellet 懸浮, 室溫下緩和搖晃 1 小時後, 再以同樣步驟加入 wash buffer 混合, 放置轉速 10,000rpm 離心 5 分鐘, 丟棄上清液後, 以 500 μ l BSA buffer 將 pellet 懸浮, 即可上流式細胞儀分析。

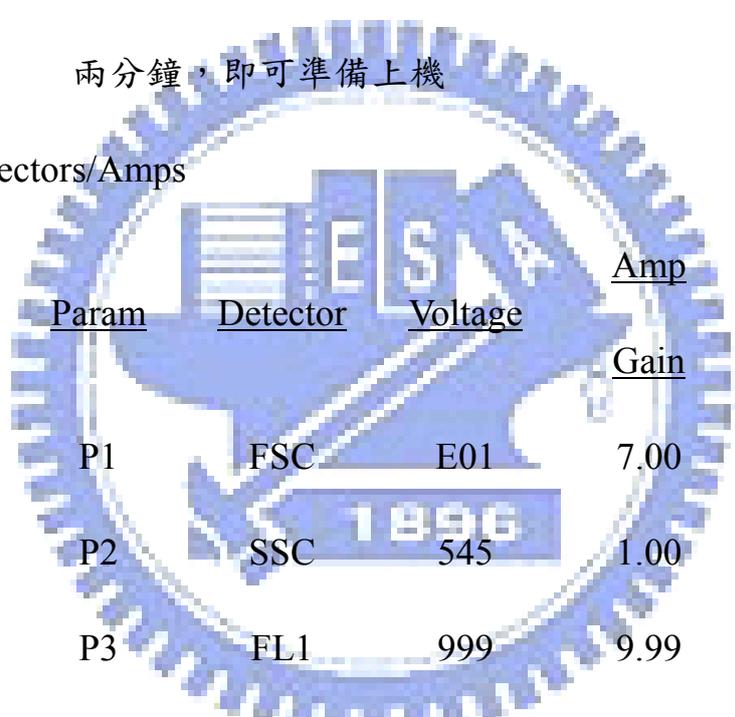
*註：於 MIA-TF 實驗中, 除了一開始需將微粒子原液震盪混勻, 其餘步驟皆使用微量吸管操作混合步驟

5.1.5 流式細胞儀操作分析

1. 儀器開機後處理

- a. 先開啟流式細胞儀，再開啟電腦，若順序相反，可能會造成軟體開啟不正常
- b. 等儀器暖機 5-10 分鐘後，Status 轉為 ready，將氣壓閥加壓，執行“PRIME”功能兩次，排除管線內氣體後，“High Run”PBS 兩分鐘，即可準備上機

2. Detectors/Amps



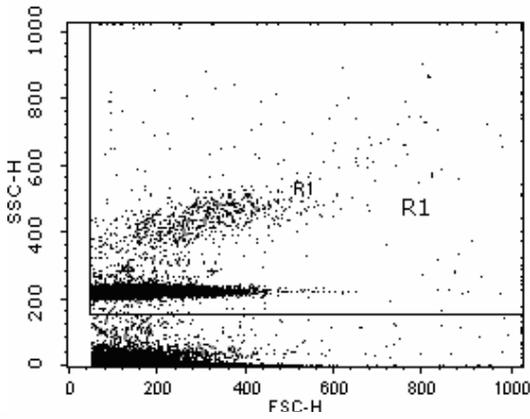
<u>Param</u>	<u>Detector</u>	<u>Voltage</u>	<u>Amp</u> <u>Gain</u>	<u>Mode</u>
P1	FSC	E01	7.00	Lin
P2	SSC	545	1.00	Lin
P3	FL1	999	9.99	Lin

3. 拖曳散點圖圖示為 SSC vs FSC，於圖中選取大於等於微粒子的所有區域（R1）收取 20000 顆，分析數據時則依散點分佈狀況將 R1 縮小範圍，由 R1 作另一 FSC vs. FL1 之散點圖示，圈選 R2 作 events*mean 為 total mean。數據分析圖如下頁所示。
4. 數據刪除原則

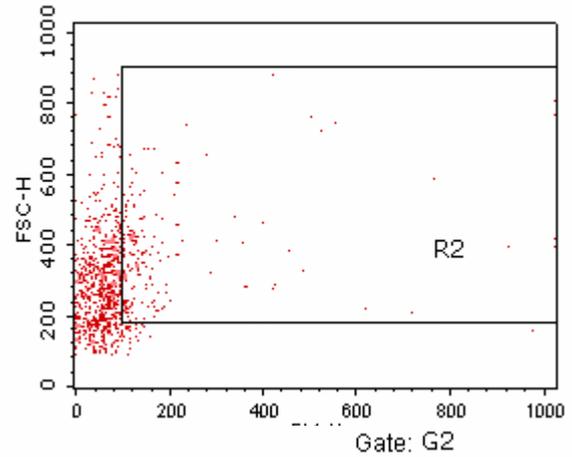
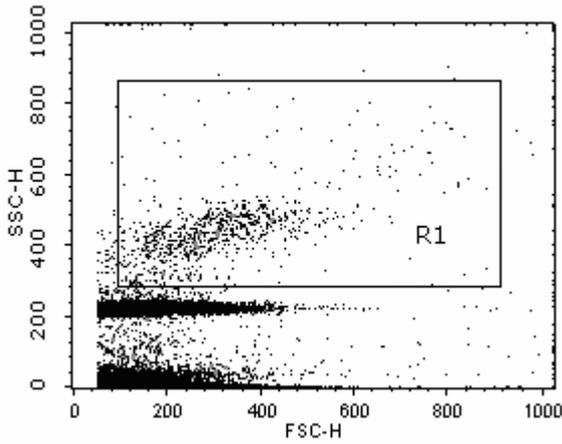
若計算出之 total mean 低於負向控制組，則判斷為接合動作失敗，

放棄此組實驗數值。

收取 R1 20000顆

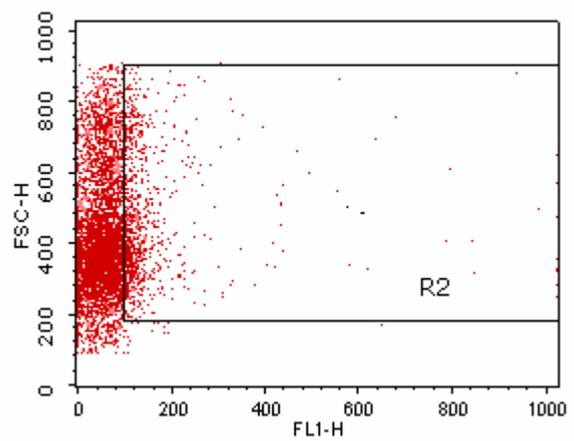
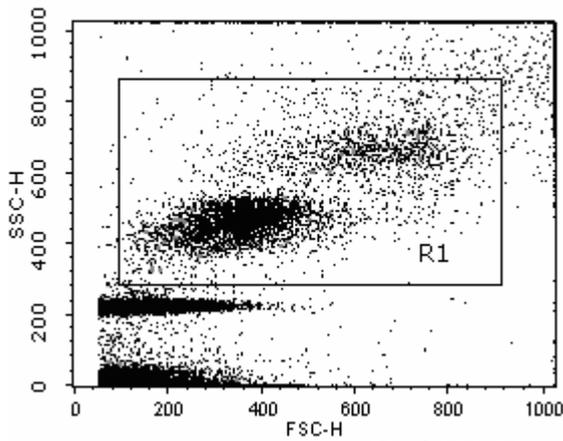


microsphere+bio-DNA



Region	Events	X Mean
R1	822	85.05
R2	178	190.04

microsphere+bio-DNA+nuclear extracts



$$\text{relative total mean} = \frac{931 * 151.06}{178 * 190.04}$$

第二節 活體外細胞毒殺測試

我們利用 MTT 的方法得出細胞對藥物濃度的存活曲線，取細胞所能承受藥物的最高濃度作為其他細胞實驗之用。

5.2.1. MTT 細胞增殖及細胞毒性檢測 (MTT Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay)

Seeding 細胞於 96 孔盤，每一孔加入 2×10^4 個細胞，八個小時之後換置內含序列稀釋藥劑的培養液，再培養 16 小時之後，將細胞培養液吸出，重新加入 100 μ l，內含濃度 500 μ g/ml MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-dimethylphenyltetrazolium bromide) 的細胞培養液，置於室溫下 2 小時後，此時孔內底部會出現紫色結晶 (formazan)，將殘餘液體以針筒小心吸出，再加入 100 μ l 的 DMSO (dimethyl sulfoxide) 溶解紫色結晶，最後以 ELISA reader 觀測 595 nm 下的吸光值

5.2.2 數據分析

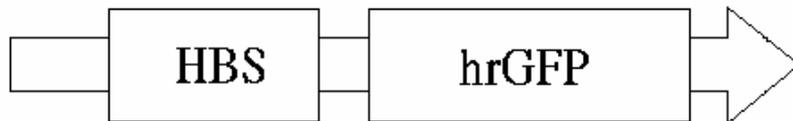
全部組別扣除盤子的背景值後，取培養液不含藥劑的樣品組為存活率 100% (positive control, PC)，其餘組數各除以 PC 的吸光值後，做出細胞毒殺曲線圖。

第三節 報導基因活性分析 (reporter gene activity assay)

此部分實驗主要在質體內 HBS (HIF-binding site) 序列後，構築一報導基因，將該質體經轉染入細胞後，觀察報導基因表現量即可反應 HBS 的表現程度

5.3.1 HBS (HIF-binding site) 報導基因質體之構築

於實驗室質體資料庫中，選擇 pCRII 作為骨幹，並在其內接有七倍 HBS 片段的質體 (見附錄三, pCRII-C2-9)，需再將報導基因 (選擇 hrGFP) 自 pNFkB-hrGFP 質體 (見附錄三, pNF-kB-hrGFP) 上以 PCR 的方式增幅製造，經限制酶於兩端製造切位後，接入 pCRII 質體中的 HBS 後端，並以細胞轉染的方式測試接入的 hrGFP 片段是否具有功能。



1. 嵌入序列 (hrGFP) 準備

使用順向引子 (hrGFP-5'(XbaI))、反向引子 (hrGFP-3'(XbaI))，以 PCR 的方式將 hrGFP 自模版 (pNFkB-hrGFP) 中複製出來，其反應循環順序為 94°C 30 秒，55°C 30 秒 (見表二)，72°C 增幅 2 分鐘，進行 34 個循環增幅，最後以 72°C 5 分鐘將未完成之序列完成，將 PCR 產物以洋菜膠電泳確認片段並進行純化。

引子名稱	序列	Tm (°C)
hrGFP-3'(XbaI)	aatct agagc gtccc gctca gaaga act	60
hrGFP-5'(XbaI)	ctttc cgcgg agact ctaga	56

2. 限制酶切割

前述已準備好之質體 (pCRII-C2-9) 及嵌入片段 (hrGFP) 皆使用 XbaI 限制酶切割出相同切位，以便之後的 ligation 進行，取一 0.5ml 微量離心管，各加入 1 μ g 之 DNA，50 mg/ml 之 BSA 0.2 μ l，2 μ l 之 10X buffer，再加入 1 μ l (5U) 之限制酶 XbaI，以二次水將反應總體積補足為 20 μ l，短暫離心後置於 37°C 水浴加熱器中放置隔夜，反應產物以洋菜膠體電泳進行分析。

3. hrGFP 片段黏合 (ligation)

取一 0.6ml 的微量離心管，加入 10mM 的 ATP 1 μ l、10X T4 ligase buffer 1 μ l、T4 DNA ligase 1 μ l、及前述已準備好之質體及嵌入片段以 1:3 之比例置入，以二次水將總體積調整至 10 μ l，16°C 放置隔夜進行 DNA 黏合反應。

5.3.2 質體轉形 (transformation)

取出 DNA 黏合後的產物約 3-5 μ l，加入預先置於冰上退冰的 competent cell 中 (DH5 α)，用手指輕彈管壁使質體與細菌混合均勻，靜置於冰上 30 分鐘，而後將混合物置於 42 $^{\circ}$ C 水浴加熱器中進行 Heat shock 30 秒，再置於冰上 2 分鐘，然後加入質體與 250 μ l 之 LB 於 37 $^{\circ}$ C 震盪 1 小時，培養完畢之後。取出 100 μ l 菌液均勻塗於含 Kanamycin 之 LB 培養基，於 37 $^{\circ}$ C 保溫器中培養 17-20 小時。

5.3.3 菌液 PCR

挑單一菌落於 3 ml 含 Kanamycin (30 μ g/ml) 之 LB medium 中，置 37 $^{\circ}$ C 震盪保溫器中進行震盪 (200rpm)，培養 17-20 小時後收取菌液。取一 0.2ml 的微量離心管加入 0.1 μ l 菌液做為模板，40.4 μ l 的二次蒸餾水，5 μ l 之 Taq buffer，1 μ l dNTP (10nmole)，1 μ l 順向引子 (hr GFP-5'(XbaI) 10 μ M)，1 μ l 之反向引子 (hrGFP-3'(XbaI) 10 μ M) 及 0.5 μ l 之 Taq DNA polymerase，混和均勻後短暫離心，進行聚合酶連鎖反應，其反應循環為：94 $^{\circ}$ C 10 分鐘 (用以打破細菌之細胞壁，使其基因外露)，94 $^{\circ}$ C 1 分鐘，52 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 增幅 1.5 分鐘，進行 34 個循環增幅，最後以 72 $^{\circ}$ C 5 分鐘將未完成之序列完成。完成之產物進行洋菜膠體電泳，在此進行聚合酶連鎖反應可幫助我們確認目標基因是否成功插入載體中。

5.3.4. 質體 DNA 之小量分離法

使用 Gene-spin™ Miniprep purification kit (Protech, Taiwan, ROC)。取 2.5ml 培養 16 小時之菌液於 1.5ml 之微量離心管中，以轉速 13,000rpm 離心 1.5 分鐘，移除上清液後，以 200 μ l Solution I 懸浮沈澱之菌塊，再加入 200 μ l Solution II，翻轉微量離心管 6-8 次，而後置於室溫 5 分鐘，再加入 200 μ l Solution III，翻轉微量離心管 6-8 次，而後置於冰上作用 5 分鐘。以轉速 13,000rpm 離心 5 分鐘，將套組中所附的交體管柱安插入 1.5ml 之收集管中，將離心所得之上清液小心加入管柱中，以轉速 13,000rpm 離心 1 分鐘，將收集管中之廢液丟棄，再重新和膠體管柱組合。加入 700 μ l 之 Wash solution，以轉速 13,000rpm 離心 1 分鐘，移除廢液後再將此膠體管柱與收集管之組合體，以轉速 13,000rpm 離心 3 分鐘，將管柱中多餘水分一併移除。將膠體管柱移至一新的 1.5ml 微量離心管中，加入 30 μ l 已事先預熱至 65°C 之二次水，以轉速 13,000rpm 離心 1 分鐘，以溶解出質體 DNA，利用分光光度計測量 OD260 之吸光值，以推知其 DNA 濃度。此小量分離之質體 DNA 用以供後續限制酶切割確認及定序之用。

5.3.5 質體 DNA 之大量分離法 (High-copy Plasmid Purification (PC 100))

1. buffer 配製

a. Buffer S1

50mM Tris-CL, 10mM EDTA, 100 μ g/ml RNase A, pH8.0

b. Buffer S2

200mM NaOH, 1% SDS

c. Buffer S3

2.8M KAc, pH5.1

d. Buffer N2

100M Tris, 15% ethanol, 900mM KCl, 0.15% Triton X-100, adjusted to pH6.3 with H₃PO₄

e. buffer N3

100mM Tris, 15% ethanol, 1.15M KCl, adjusted to pH6.3 with H₃PO₄

f. buffer N5

100mM Tris, 15% ethanol, 1M KCl, adjusted to pH8.5 with H₃PO₄

2. 操作

在 LB 培養液中加入適當量細菌培養 12-16 小時，將菌液收至已滅過菌的離心瓶中，以轉速 8,000 轉離心 15 分鐘，丟棄上清液，加入 4ml buffer S1

(已含 RNase A)，將 pellet 震盪打散，加入 4ml buffer S2，緩慢上下倒轉混合 6-8 次，在室溫下靜置 2-3 分鐘，再加入 4ml 預冷於 4°C 的 buffer S3，緩慢的上下倒轉混合 6-8 次直到產生白色凝結物，在冰上靜置 5 分鐘，以 12,000rpm 轉速離心 20 分鐘，在等待期間，以 2.5ml 的 buffer N2 洗管柱，待離心完成後，取上清液注入管柱中，再以 10ml 的 buffer N3 沖洗管柱，加入 5ml 的 buffer N5 將質體 DNA 沖提下來，流下的液體分裝至 1.5ml 的微量離心管中（每一管約 800 μ l），每一個離心管內需再加入 700 μ l 的 isopropanol，混合均勻後，以 15,000rpm 轉速離心 30 分鐘，丟棄上清液後，加入 1ml 70% 的酒精，放置 -20°C 冰箱存放。使用前，先以 14,000rpm 轉速離心 5 分鐘，將上清液充分去除後，加入適量二次水，以分光光度計測量濃度後方可使用。

5.3.6 質體 DNA 於哺乳類細胞株之轉染 (transfection)

1. 細胞培養

Seeding 5×10^5 細胞於 6 孔盤中，待細胞長至七成滿後（約 12~16 小時）開始進行轉染

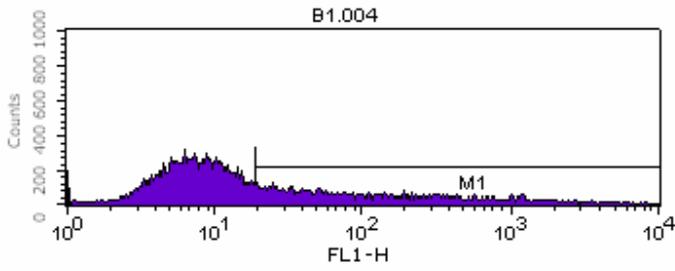
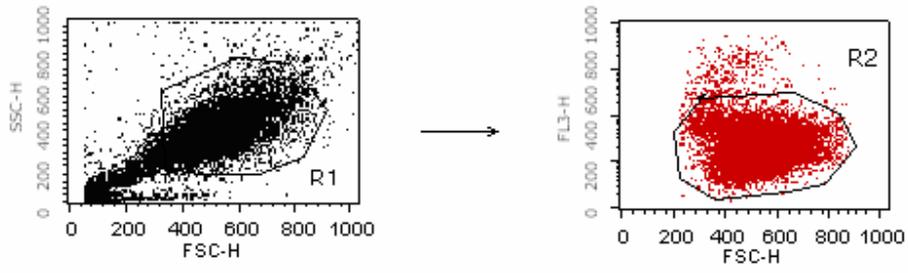
2. 細胞轉染

使用基因傳遞試劑為 lipofectamin 2000 (Invitrogen, California, United states)，先將 3 μ g DNA 和 250 μ l opti-MEM 混合於玻璃管 A，另將 10 μ l

lipofectamin 和 250 μ l opti-MEM 混合於玻璃管 B，待五分鐘之後，將 A 管內混合液加入 B 管內，靜置 20 分鐘；於 20 分鐘結束前，先將細胞的培養液丟棄，以 PBS 潤洗細胞，先加入 200 μ l opti-MEM 於細胞上，再均勻滴入 B 管的混合液，隨即補入 300 μ l opti-MEM，每孔最終總體積為 1ml，置於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中培養六小時後，加入 2ml 培養液，再培養 18 小時後，使用 versine 將細胞懸浮，離心後重新 seeding 至 24 孔盤（此步驟為消除各孔內細胞轉染的效率不同之疑慮），六小時之後，再加入不同濃度的藥劑，培養十六小時後，以 EDTA-trypsin 收取細胞並離心，以 PBS 重新懸浮後，加入 5ng/ml 的 PI，即可以流式細胞儀分析。

2. 數據分析

於 SSC vs.FSC 的散點圖中圈取細胞群落為 R1，再由 R1 作另一 FL3 vs FSC 的散點圖，圈取 FL3 吸光值較低的一群細胞視為活細胞為 R2，由 R2 作另一 counts vs. FL1 的直方圖，取該圖的 total mean 值作為分析數據，Gate M1 則表示該實驗組轉染之效率。圖例如下頁所示，該實驗組之 mean 值則為 108.3，所有實驗組數據除以負向控制組後作圖比較。



Sample ID: B1

Marker	Events	% Gated	Mean	Median
All	10000	100.00	108.30	10.37
M1	3247	32.47	316.92	79.86



第四節 酵素免疫吸附分析法 (ELISA)

使用 DuoSet IC intracellular Human/mouse Active HIF-1 α Activity Assay

套組 (R&D systems, Minneapolis, United States)

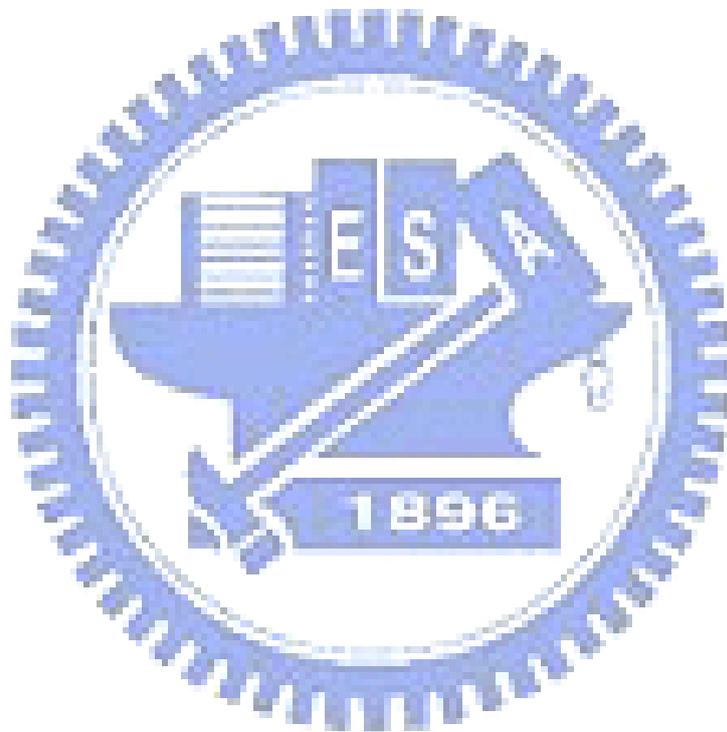
5.4.1 96 孔盤之前處理

將 Capture Antibody 以 PBS 稀釋至 4.0 μ g/ml 後，在 96 孔盤中每孔放入 100 μ l，在室溫下放置隔夜。倒掉液體之後，使用瓶子迅速將每孔倒滿 PBST (0.05% Tween-20/PBS)，再將盤孔朝下甩棄液體，重複三次之後，將液體甩乾，在乾淨的紙巾上用力拍打，直到孔內無殘留液體。每孔加入 300 μ l reagent diluent (5% BSA/PBS)，在室溫下放置 1-2 小時，重複 wash 的動作之後可準備加入樣品。

5.4.2 實驗流程

加入 3 μ l biotin labeled ds Oligonucleotide 至 10-100 μ g 的細胞核蛋白中 (於 1.5ml 微量離心管中操作)，以 extraction buffer 調整至最終體積為 30 μ l，於室溫下放置 30 分鐘(若為競爭試驗也於此步驟加入 3 μ l Unlabeled ds Oligonucleotide)。加入 200 μ l reagent diluent 於每一個樣品中，小心混勻，分裝 100 μ l 至準備好的 96 孔盤中 (每個樣品為二重複)，於室溫下放置 2 小時，重複前述 wash 方法三次，於每孔加入 100 μ l 60 倍稀釋的 Streptavidin-HRP，於室溫下靜置 20 分鐘，再 wash 五次，加入 Substrate

Solution (實驗中使用 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine, TMB) 100 μ l 呈色後，
加入 50 μ l Stop solution (使用 1N HCl)，以 ELISA reader 測量其於 450nm
下之吸光值。



第五節 新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 應用於 96 孔盤

此部分實驗為直接將細胞 seeding 於 96 孔盤，可在盤內直接萃取細胞全蛋白，並同樣於 96 孔盤內操作 MIA-TF

5.5.1 seeding cells

於 96 孔盤內 seeding 每孔 3500 個細胞，培養 24 小時

5.5.2 細胞全蛋白萃取

1. 細胞全蛋白萃取溶液 (whole cell extraction buffer) 配製

20mM HEPES (pH7.9)、20% (v/v) glycerol、1% (v/v) Nonidet P-40、1mM MgCl₂、0.5mM EDTA、0.1mM EGTA、1mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)、1mM DTT、10% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail、

2 細胞全蛋白萃取法

以 100µl PBS 潤洗細胞，1,200 rpm 轉速離心 5 分鐘之後，去除上清液，以 EDTA trypsin 懸浮細胞後，再以 1,200 rpm 轉速離心 5 分鐘，去除上清液後，加入 50µl whole cell extraction buffer，以微量吸管上下沖洗之後，靜置於冰上 20 分鐘，再以 3700 rpm 轉速離心 5 分鐘，取上清液則為細胞全蛋白萃取。

5.5.3. 新型微粒子免疫分析法之修飾 (modified-MIA-TF)

1. 96 孔盤之前處理

於另一個 96 孔盤中加入 300 μ l BSA buffer (5% BSA/PBS) 靜置於室溫 1 小時，倒掉液體之後，使用瓶子迅速將每孔倒滿 PBST (0.05% Tween-20/PBS)，再將盤孔朝下甩離液體，重複三次之後，在乾淨的紙巾上用力拍打將液體甩乾，直到孔內無殘留液體。

2. 實驗流程

將 20 μ l 抽取之細胞全蛋白與 1.5×10^{-8} nmole 的 bio-DNA 混合 (若為競爭試驗，則於此步驟同時加入 1.5×10^{-6} nmole 的競爭核酸片段)，利用 extraction buffer 將最終體積調整為 30 μ l，於室溫下放置 30 分鐘，便可加入 10 μ l blocking 完畢的微粒子 (見 5.1.5)，用微量吸管混合後，室溫下緩和搖晃 15 分鐘，反應時間完畢後，每一個反應加入 200 μ l wash buffer (0.02% Tween-20/PBS) 混合，放置離心機 (轉子 Swing-bucket rotor A-2-DWP, eppendorf, Hamburg, Germany) 轉速 3,500rpm 離心 5 分鐘，小心將上清液吸出丟棄，之後加入以 BSA buffer (1% BSA/PBS) 稀釋至 2.5 μ g/ml (一般由原液稀釋 400 倍) 的一級抗體溶液 40 μ l 將 pellet 重新懸浮，室溫下緩和搖晃 1 小時後，每一個反應加入 200 μ l wash buffer 混合，放置轉速 3,500rpm 離心 5 分鐘，小心將上清液吸出丟棄，再加入 400 倍稀釋的二級抗體溶液 40 μ l 將 pellet 懸浮，室溫下緩和搖晃 1 小時後，再以同樣步驟加入 wash buffer

混合，放置轉速 3500rpm 離心 5 分鐘，丟棄上清液後，以 500 μ l staining buffer 將 pellet 懸浮，即可以流式細胞儀分析（若用於 FACS array，則僅加入 200 μ l buffer）。流式細胞儀分析方法同於未修飾之方法。



第六章 結果

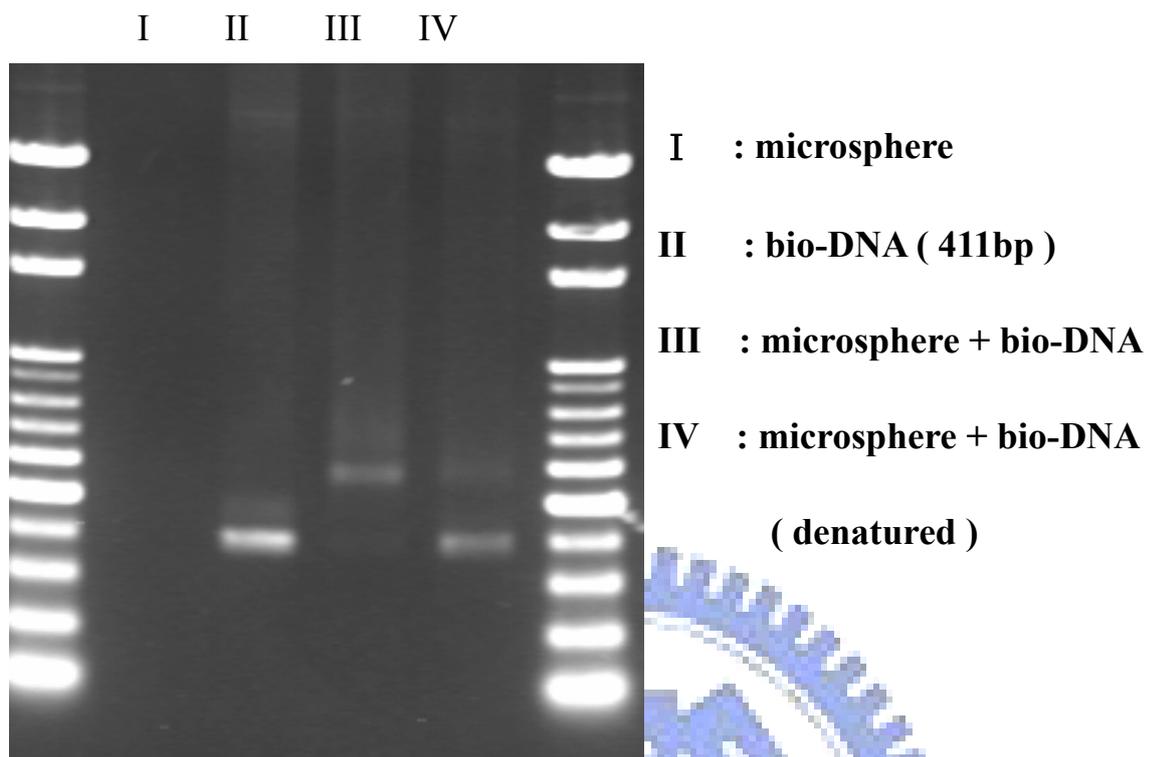
第一節 新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF)

6.1.1 微粒子與 bio-DNA 的結合

為證明微粒子是否可藉由 NeutrAvidin 與 bio-DNA 的 biotin 產生非共價性鍵結，我們使用洋菜膠電泳來分析 (圖三)，與微粒子混和十五分鐘的 bio-DNA，洋菜膠電泳結果 (lane III) 顯示 bio-DNA 與微粒子接合之後，整體大小增加，若使用高溫 95°C 加熱混和物，並待其緩慢降至室溫，則於 lane IV 看到 band 在 DNA 的原始大小位置出現，此表示 NeutrAvidin 經過高溫變性後，失去其構形而喪失與 biotin 的非共價性鍵結能力，DNA 返回原本雙螺旋結構後則出現在原始位置。

6.1.2 HeLa cell 於不同大小生長環境內所能抽出核蛋白量

表三為 HeLa cell 於各種大小不同環境中培養所能萃取出之核蛋白量，於 75T Flask 培養至九成滿所能萃出之核蛋白量為 450 μ g，seeding 5*10⁵ 細胞於六孔盤中培養 24 小時後，每孔能萃出 75 μ g 核蛋白，seeding 10⁵ 細胞於二十四孔盤中培養 24 小時後，每孔能萃出 12 μ g 核蛋白；該數值將作為調整細胞核蛋白濃度至微粒子免疫分析法適用量之參考。



圖三、微粒子與 bio-DNA 的結合

先將微粒子與 bio-DNA (411bp) 混合 15 分鐘後，再以 95°C 高溫持續加熱 15 分鐘，接著使混合物緩慢降至室溫，將各樣品跑洋菜膠電泳

表三、HeLa 細胞於不同大小生長環境內所能抽出核蛋白量

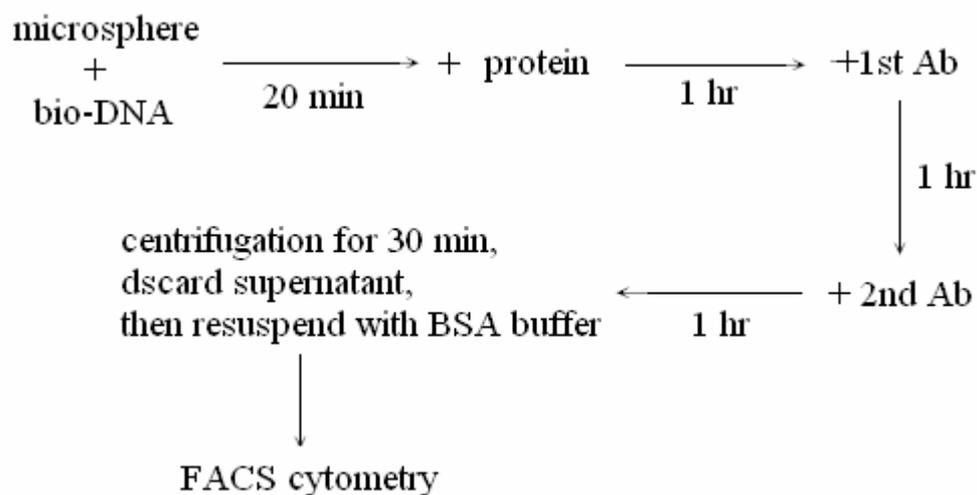
培養盤規格	生長狀況	每單位可萃核 蛋白量 (μg)
75T flask	細胞長至九成滿	450
6 孔盤	5×10^5 細胞培養 24 小時	75
24 孔盤	10^5 細胞培養 24 小時	12

將細胞自培養盤上取下後，以 PBS 潤洗，轉速 500g 離心 5 分鐘，去除上清液後，以 5 倍原 pellet 體積 lysis buffer 懸浮後，以轉速 16,000g 離心 5 分鐘，去除上清液後加入適量體積 extraction buffer 充分震盪 10 秒後，靜置於冰上 20 分鐘，以轉速 16,000g 離心 5 分鐘，取上清液則為細胞核蛋白萃取。以 coomassie PlusTM protein assay reagent 測定濃度。

6.1.3 新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 之流程設立

1. 流程設立-1

初次實驗設計流程如下，將微粒子與 bio-DNA、蛋白質、一級抗體、二級抗體依序作接合



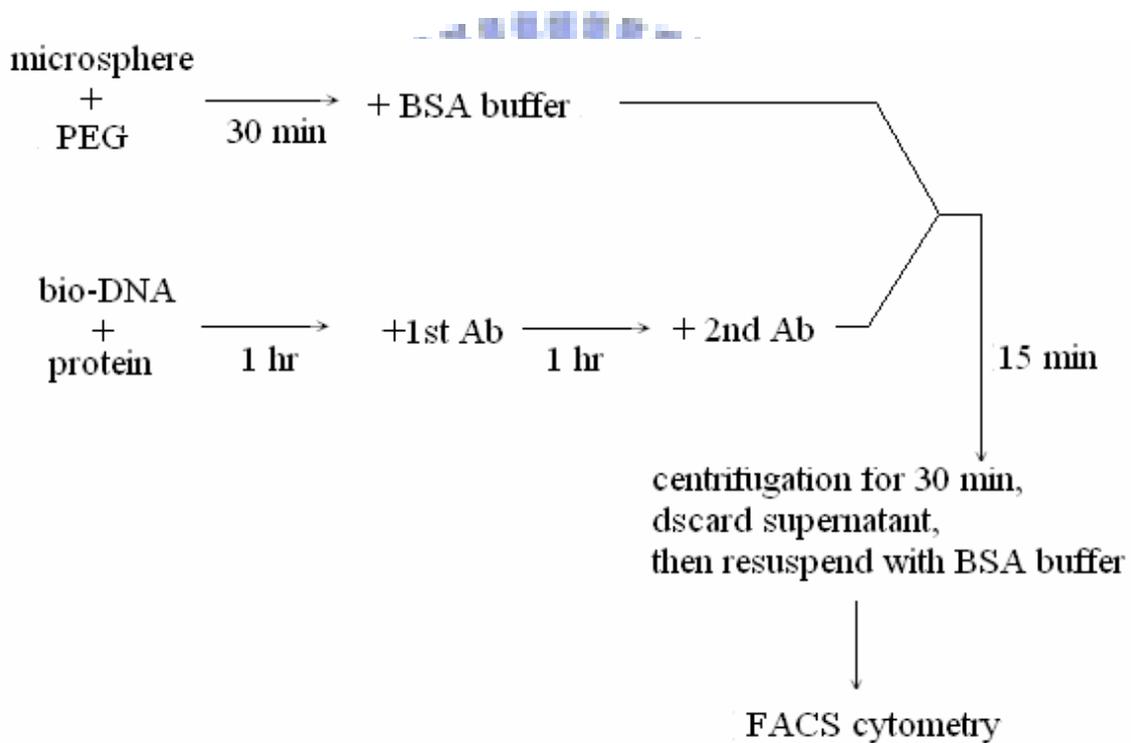
其結果如圖四，顯示不論在 bio-DNA 是否存在的情況下，只要在加入細胞核蛋白的實驗組中，其 relative total mean 均會躍升，表示蛋白質或抗體均會與微粒子形成非專一性的鍵結

2. 流程設立-2

於前次實驗結果顯示，微粒子與蛋白質間的非專一性鍵結會導致假陽性的結果，因此在此階段作兩個部分的流程修飾，

(1) 先加入 PEG 與 BSA buffer 與微粒子混合作為微粒子之前處理
(blocking)

(2) 改變實驗流程如下：



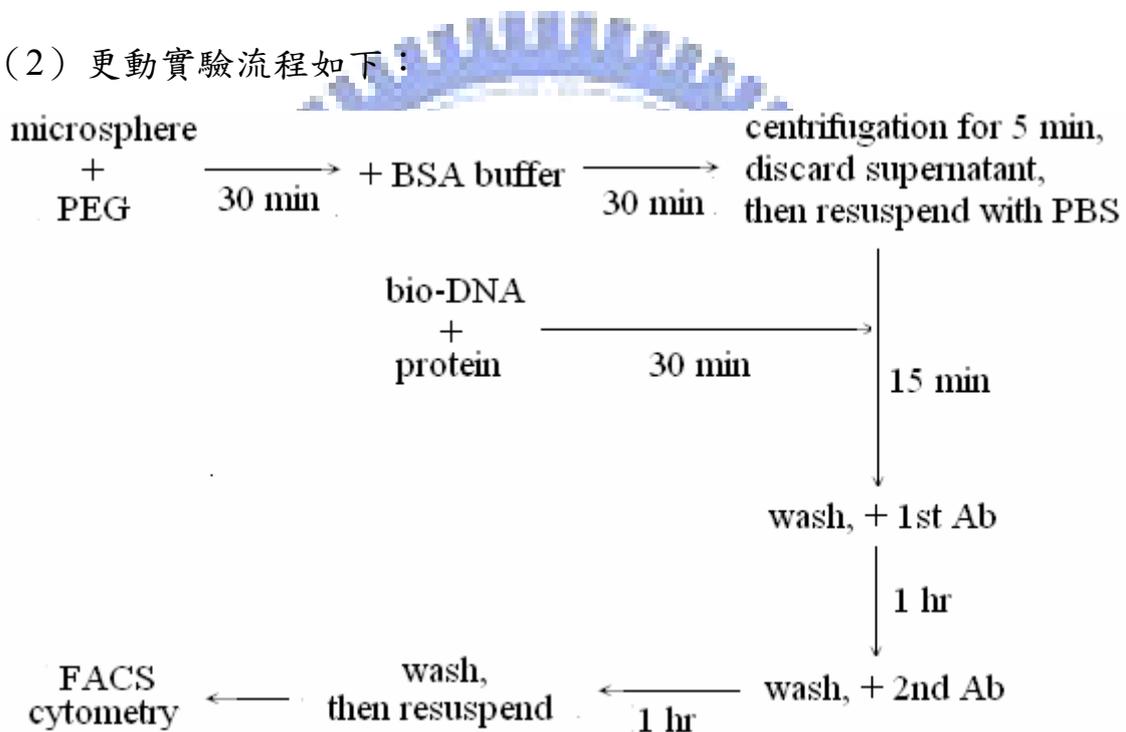
分析結果如圖五，散點圖於圖七表示，相較於沒有 PEG blocking 的組別，在 PEG blocking 的實驗組別中，其實驗組與負向控制組（只有加入蛋白質而無 bio-DNA）之間的差別度明顯，顯示 PEG 可有效達到 blocking 的效果，降低蛋白質與微粒子間的非專一性鍵結。

3. 流程設立-3

經由流程設立-2，雖可明顯降低非專一性鍵結導致的假陽性結果，然而，經過幾次獨立的實驗後，卻發現這樣的系統相當的不穩定，因此參考 ELISA 的步驟，作兩步驟的修正

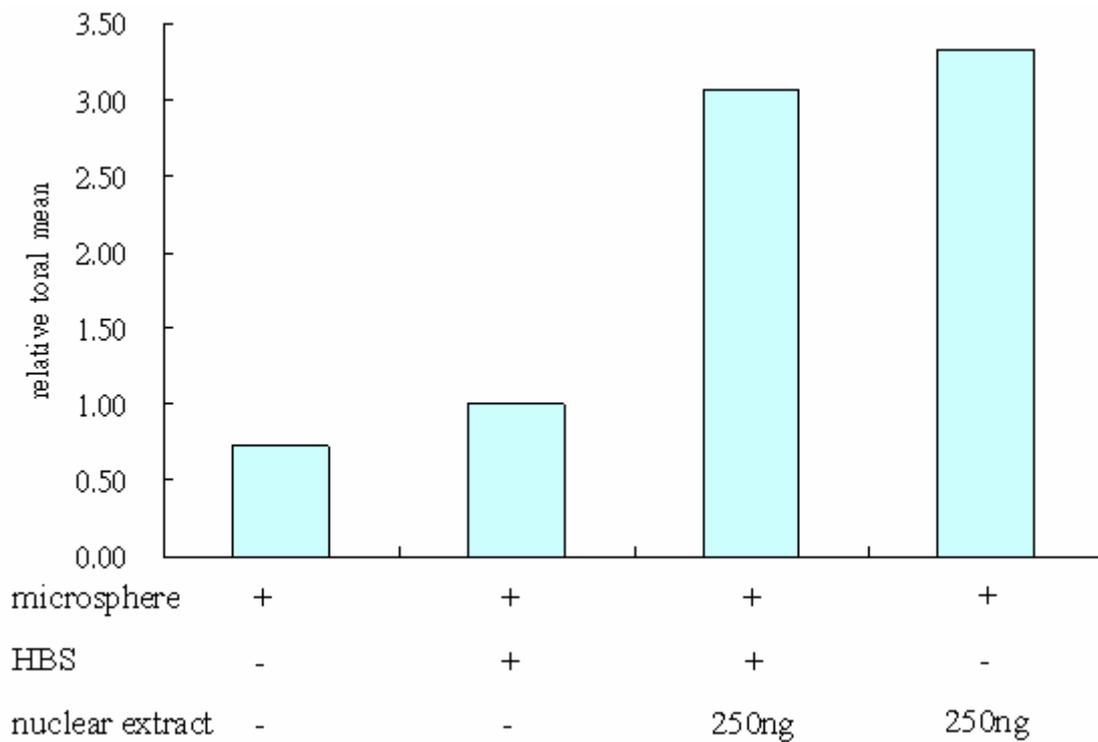
- (1) 在每一次鍵結完成後，加入 wash buffer (0.02% Tween-20/PBS) 混勻，離心後棄置上清液。

- (2) 更動實驗流程如下：



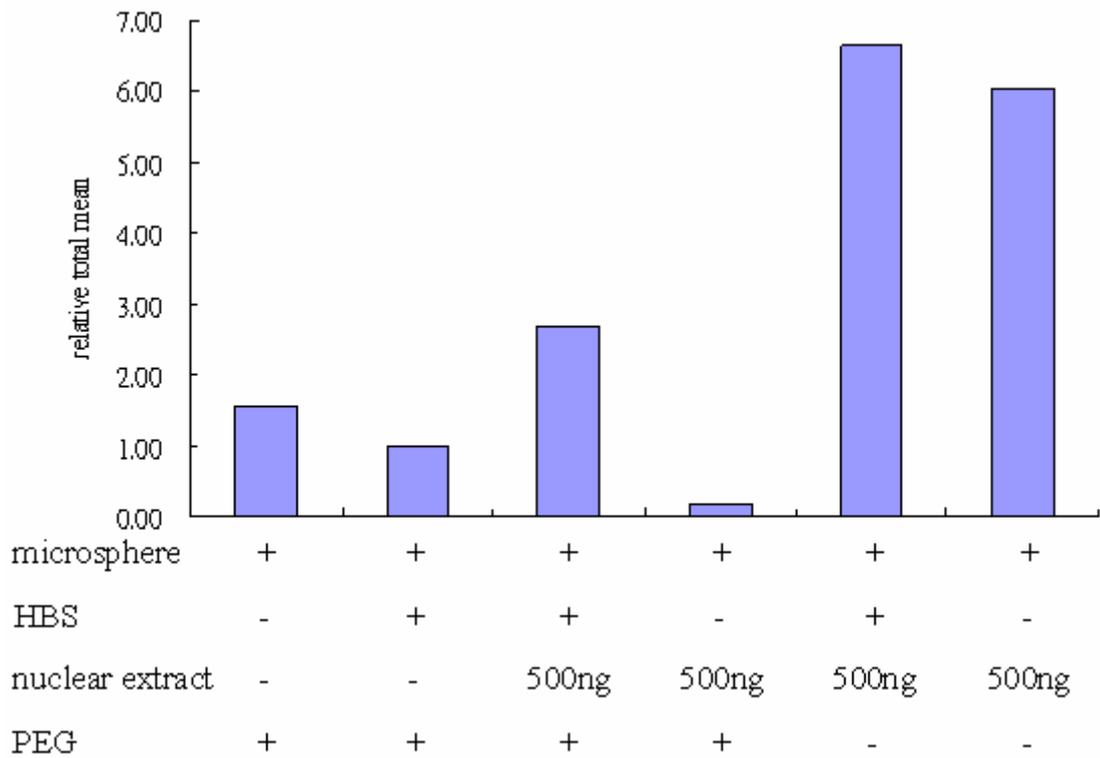
實驗結果圖六顯示，雖然 lane I (microsphere alone)、lane II

(microsphere+bio-DNA) 和 lane III (實驗組別) 的差別度縮小，但加入特异性競爭核酸片段的組別，其值明顯降低，而加入沒有結合序列的競爭核酸片段其值沒有差異，顯示實驗組別的螢光程度上升是因為目標轉錄因子的特異結合導致。



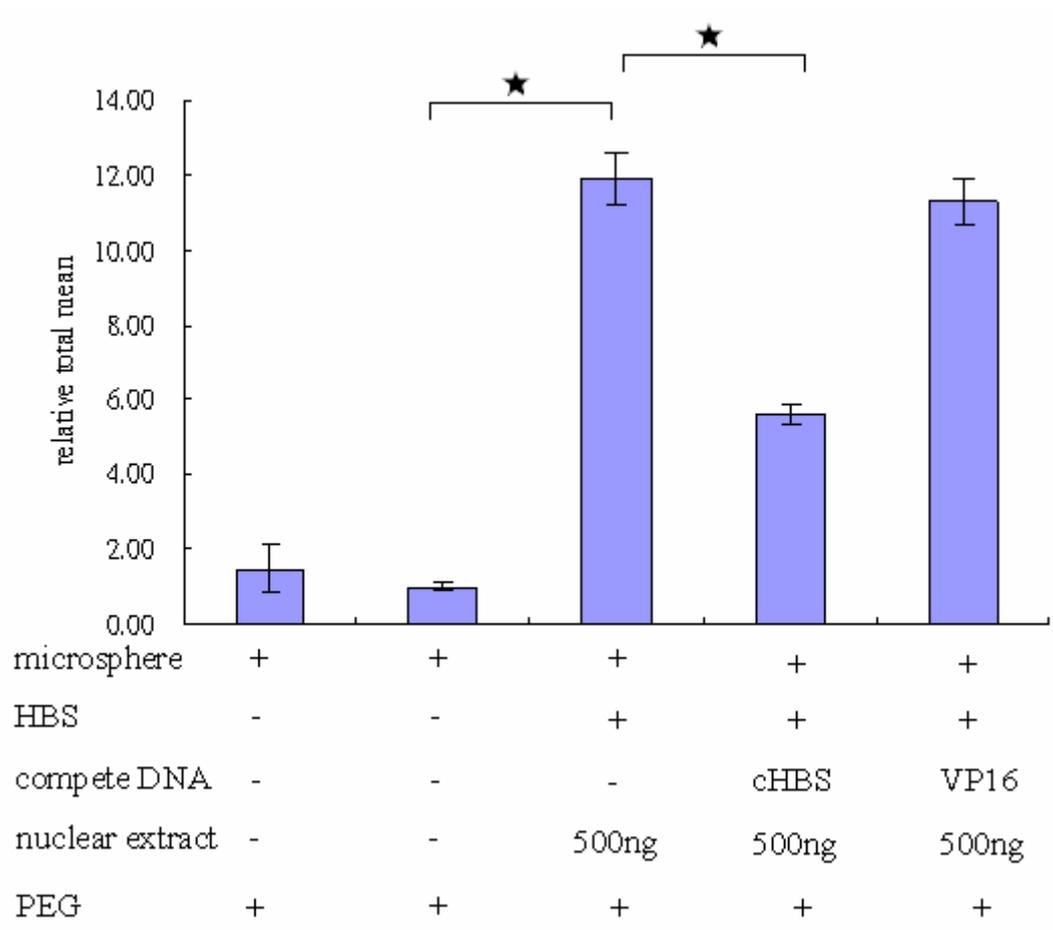
圖四、流程設立-1

將微粒子依序加入 bio-DNA (HBS)、細胞核蛋白 (A431 cell nuclear extract)、一級抗體 (mouse anti human HIF-1 α antibody)、二級抗體 (goat anti mouse IgG conjugate FITC antibody)，每段間隔時間為 1 小時，最後以轉速 10,000rpm 離心 30 分鐘，丟棄上清液後，以 500 μ l BSA buffer 重新懸浮後，以流式細胞儀分析。



圖五、流程設立-2

先將 bio-DNA (HBS) 與細胞核蛋白 (A431 cell nuclear extract) 混和，依序加入一級抗體、二級抗體，再與已 blocking 完成的微粒子混和 15 分鐘，接著以轉速 10,000rpm 離心 30 分鐘後，棄置上清液，以 BSA buffer 重新懸浮，以流式細胞儀分析。實驗分為兩組，一為微粒子與 PEG 作 blocking，另一為單獨只與 BSA buffer 作 blocking 的比較組。



圖六、流程設立-3

將 bio-DNA (*HBS) 與細胞核蛋白 (A431 nuclear extract) 作用之後 (相對於 bio-DNA 100 倍之競爭核酸片段亦於此步驟同時加入)，與 blocking 完成的微粒子作接合，再依序加入一級抗體、二級抗體，在每一次的接合反應之後，先加入 wash buffer 將微粒子懸浮並以轉速 10,000rpm 離心 5 分鐘，丟棄上清液後，再加入後續的抗體溶液，最後以 500µl BSA buffer 懸浮後，以流式細胞儀分析。

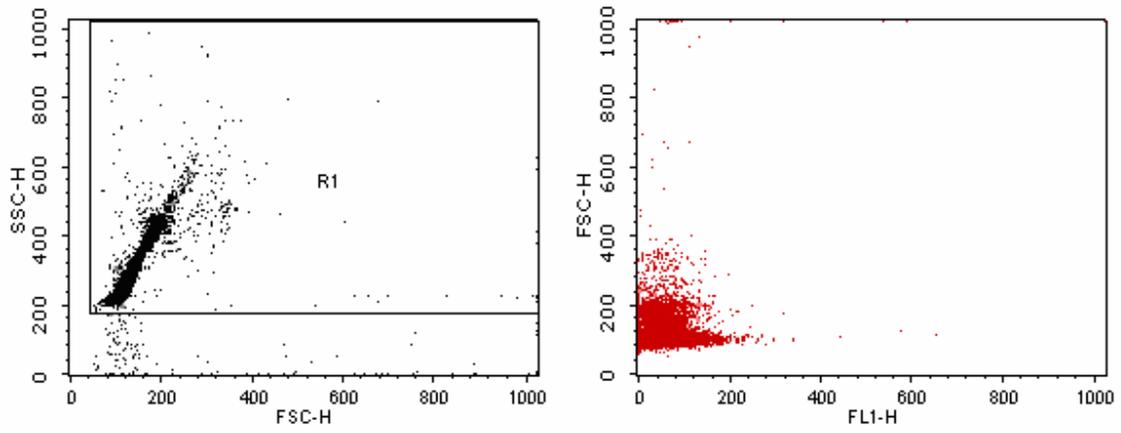
★：具 p<0.05 之顯著性差異

6.1.4 MIA-TF 於流式細胞儀之散點圖

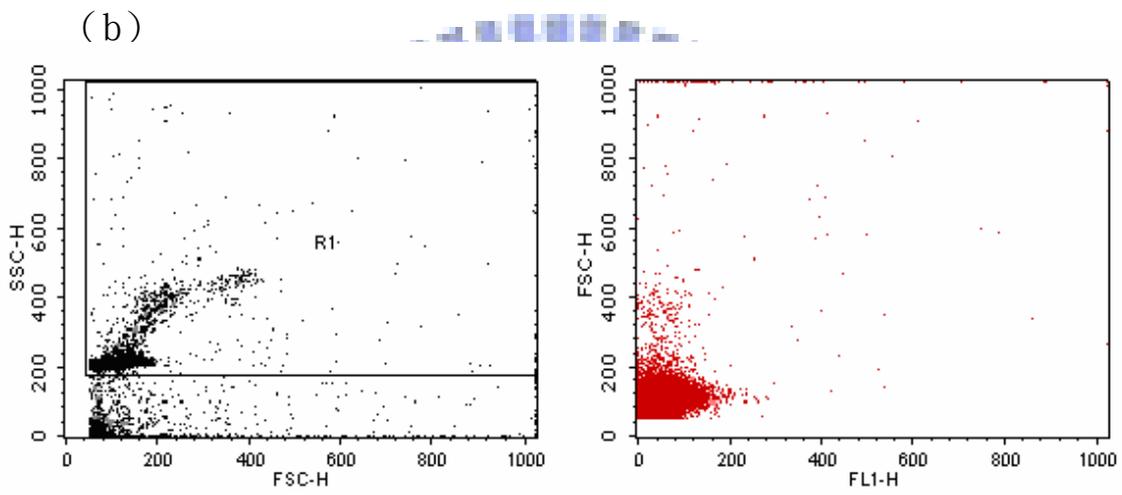
圖七為微粒子經處理之後的散點圖，第一行之散點圖表示微粒子之大小及顆粒性 (SSC vs FSC)，第二行散點圖表示 R1 區塊內之微粒子所帶綠色螢光亮度 (FSC vs FL1)。作分析圖則比較 R2 區塊內的相對 total mean (eventsxmean)。由 (a) 和 (b) 的比較可得知，blocking 的程序會改變微粒子的大小及顆粒性，若再加入 bio-DNA 和抗體 (d)，會在第一行的圖中的右上方多出一群顆粒，隨著加入蛋白量的增加，飄移的顆粒數會增加 (e)，加入核蛋白之後會在偏右上方在出現微弱的一群顆粒 (f)，作圖分析時將 R1 縮小至往右上方散出去的顆粒，且不包含最左下方的顆粒群 (g) (h)，於 FSC vs FL1 圈選 R2，計算 relative total mean 為分析數值。



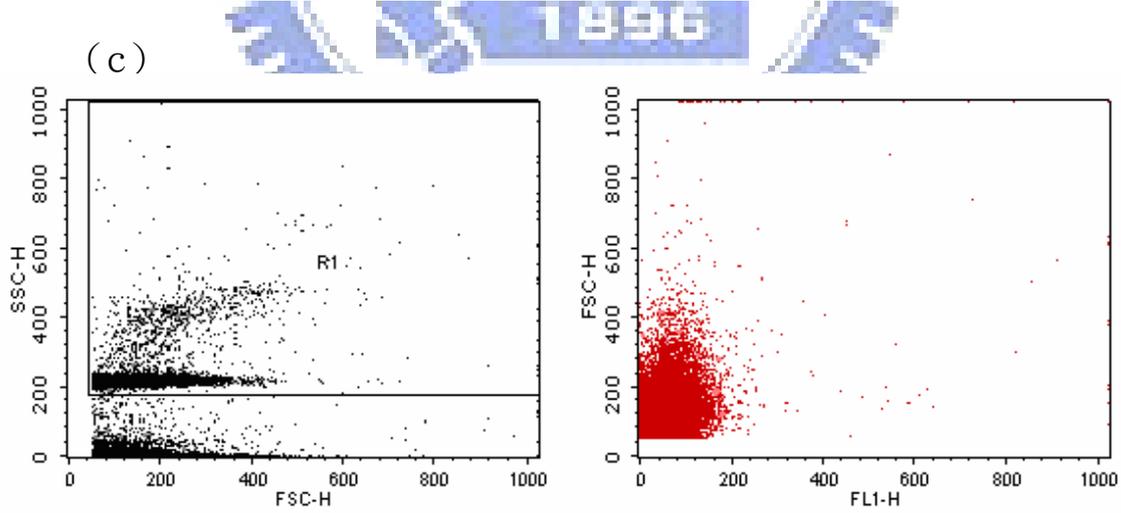
(a)



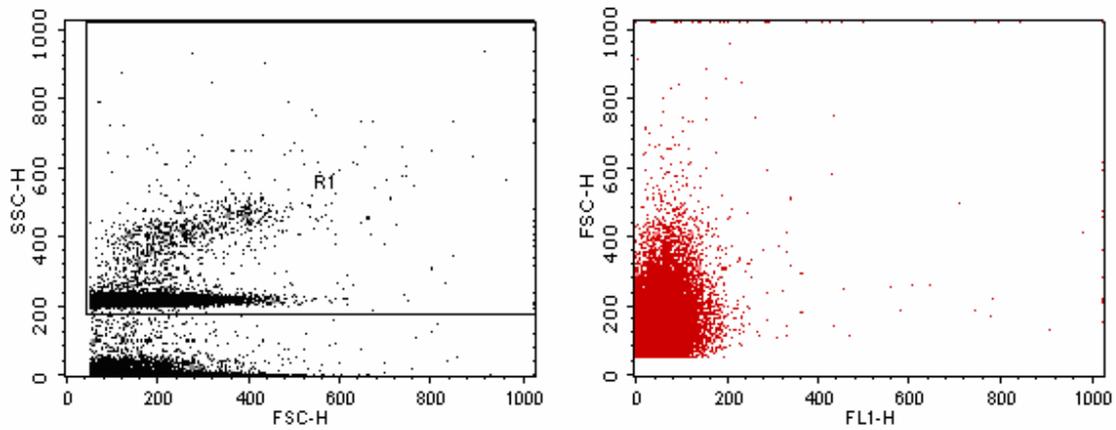
(b)



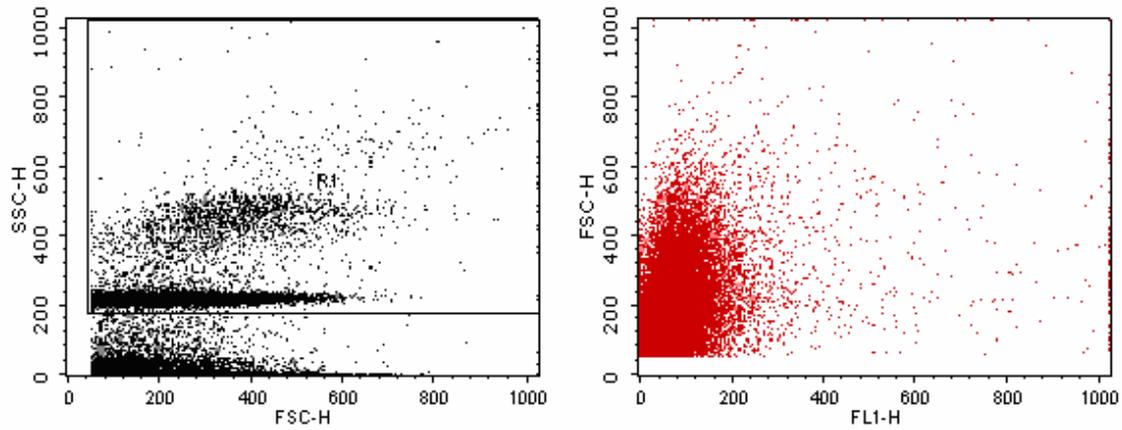
(c)



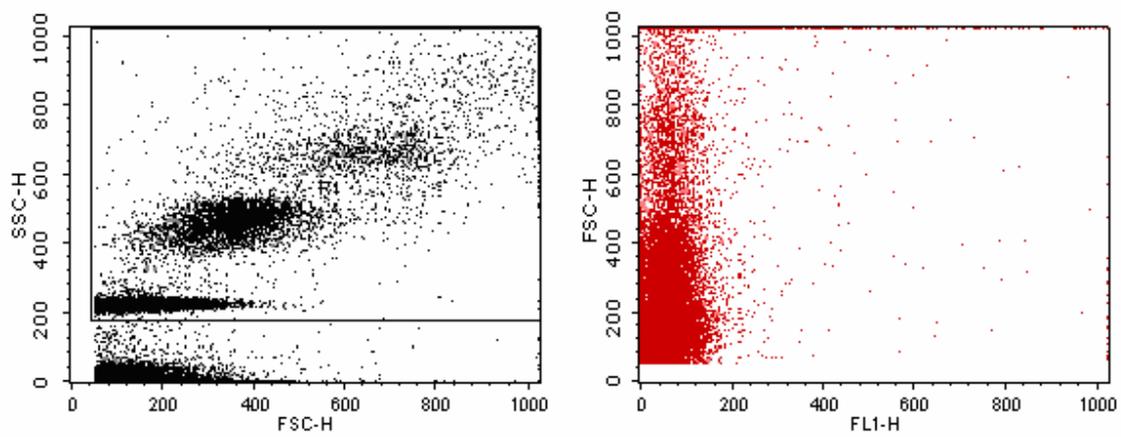
(d)

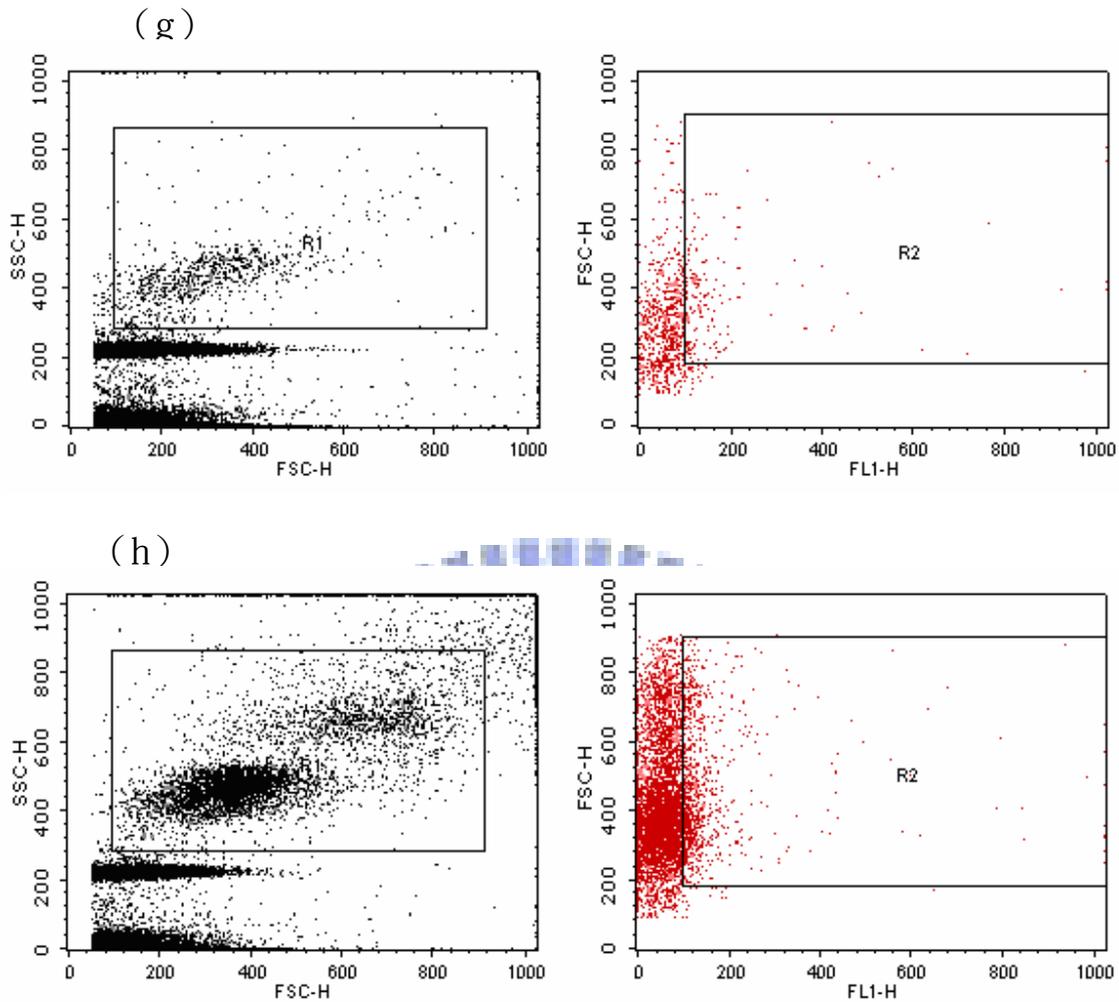


(e)



(f)





圖七、MIA-TF 於流式細胞儀之散點圖

(a) 微粒子經 PBS 靜置 30 分鐘、(b) 微粒子先經 PEG 反應 30 分鐘，再加入 BSA buffer 靜置 30 分鐘、(c) 為 (b) 接續與抗體反應、(d) 為 (b) 加入 bio-DNA 之後與抗體反應、(e) 為 (b) 加入 bio-DNA 和純蛋白之後，與抗體反應、(f) 為 (b) 加入 bio-DNA 和細胞核蛋白之後，與抗體反應、(g) 為 (d) 分析數據時圈選表示圖、(h) 為 (f) 分析數據時圈選表示圖,流式細胞儀之電壓條件 (detector/Voltage/Amp

Gain/Mode) : FSC/E01/7.00/Lin、SSC/545/1.00/Lin、FL1/999/9.99/Lin

第二節 新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 檢測細胞內轉錄因子之變化

6.2.1 MIA-TF 應用於 NF- κ B 核蛋白之檢測

為了檢測 MIA-TF 是否有其普遍通用性，因此使用含 NF- κ B 結合序列的 bio-DNA 做為材料 (NBS)，抗體也改變為對應該轉錄因子之抗體。其結果如圖八，加入蛋白質的 lane III 與未加蛋白質的 lane II 有顯著差異，並在加入競爭核酸片段後，將其值明顯的降低 (lane IV)，然而加入非特異性競爭核酸片段 (lane V) 並沒有造成影響，顯示螢光程度的改變來自於 NF- κ B 特異性的結合上核酸片段。本實驗顯示在更換不同的 bio-DNA 後，配合上相對應的抗體，也能夠確切的偵測到目標轉錄因子，確立了 MIA-TF 之普遍通用性。

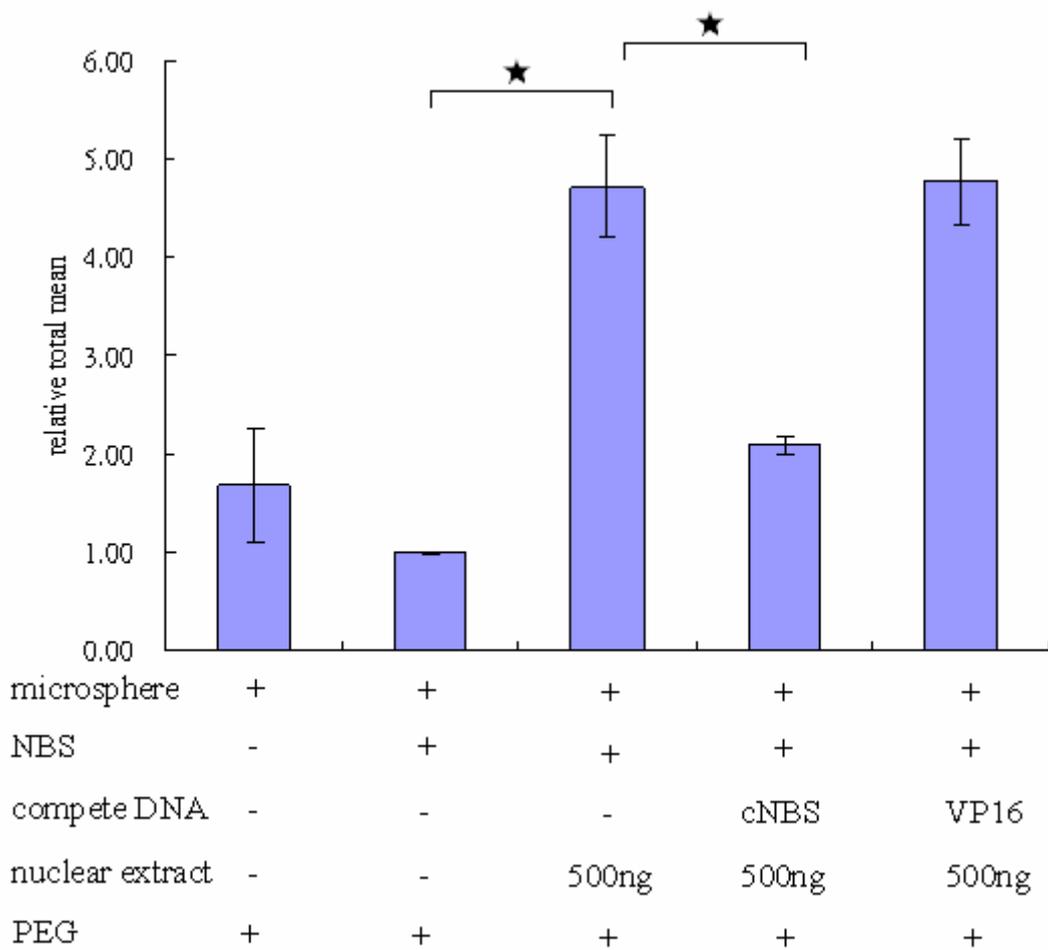
6.2.2 MIA-TF 測量 NF- κ B p50 純蛋白之靈敏度

確立了 MIA-TF 可應用於轉錄因子偵測之後，我們利用 recombinant human NF- κ B p50 (R&D systems) 測試此方法之靈敏度。結果顯示此系統可偵測純轉錄因子蛋白之靈敏度最低可至 0.5ng 而具有顯著差異性 (圖九)。

6.2.3 MIA-TF 測量細胞核蛋白內特定轉錄因子之靈敏度

得知 MIA-TF 測量純轉錄因子蛋白量之靈敏度後，因為檢測時是利用細胞核蛋白作為材料，我們進一步測量此方法應用於細胞核蛋白檢測量時的靈敏度。此部分實驗分別以 HIF-1 與 NF- κ B 作為目標轉錄因子，檢測其靈敏度（圖十、圖十一）。由數據可知，此方法能檢測最低細胞核蛋白量為 50ng，最高可至 2000ng，但 1000ng~2000ng 之間的差距不大，顯示如此量的微粒子適合檢測細胞核蛋白的濃度範圍為 50ng~1000ng。

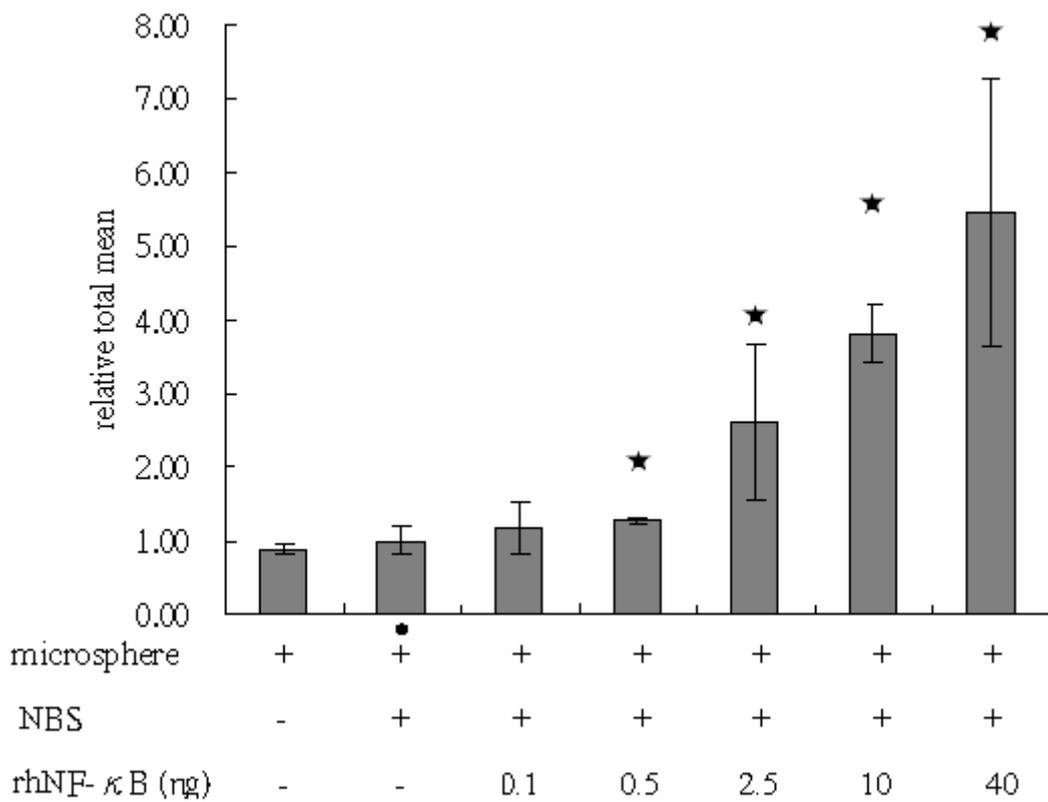




圖八、MIA-TF 應用於 NF-κB 核蛋白之檢測

於 MIA-TF 實驗中，使用 NBS 來抓取細胞核蛋白(HeLa cell nuclear extract) 中 NF-κB 轉錄因子，並在競爭組別分別加入 cNBS 和沒有特異結合序列的 VP16 為控制組，一級抗體為 rabbit anti human NF-κB p50 monoclonal antibody，二級抗體為 mouse anti rabbit IgG conjugate FITC antibody。

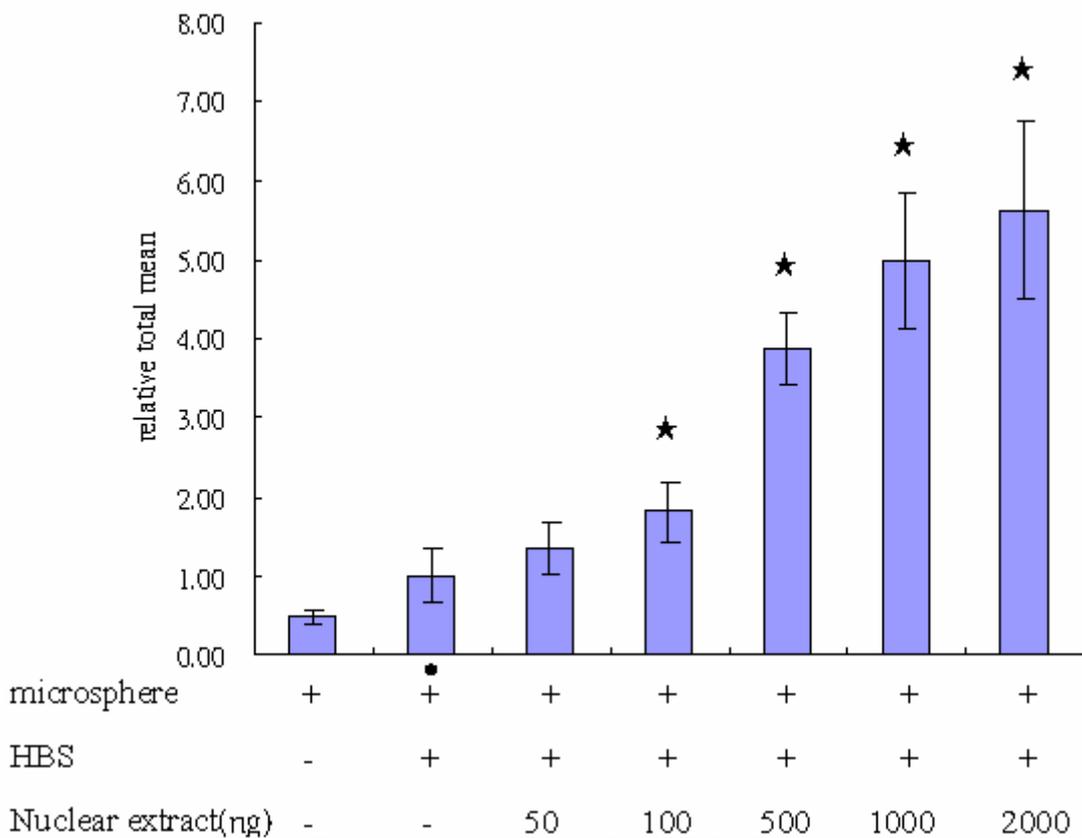
★：具 $p < 0.05$ 之顯著性差異



圖九、MIA-TF 測量 NF-κB p50 純蛋白之靈敏度

於 MIA-TF 實驗中，使用 NBS 抓取 recombinant human NFκB p50 轉錄因子，於實驗組別內分別加入 0.1ng~40ng 不等的 NF-κB p50 純蛋白

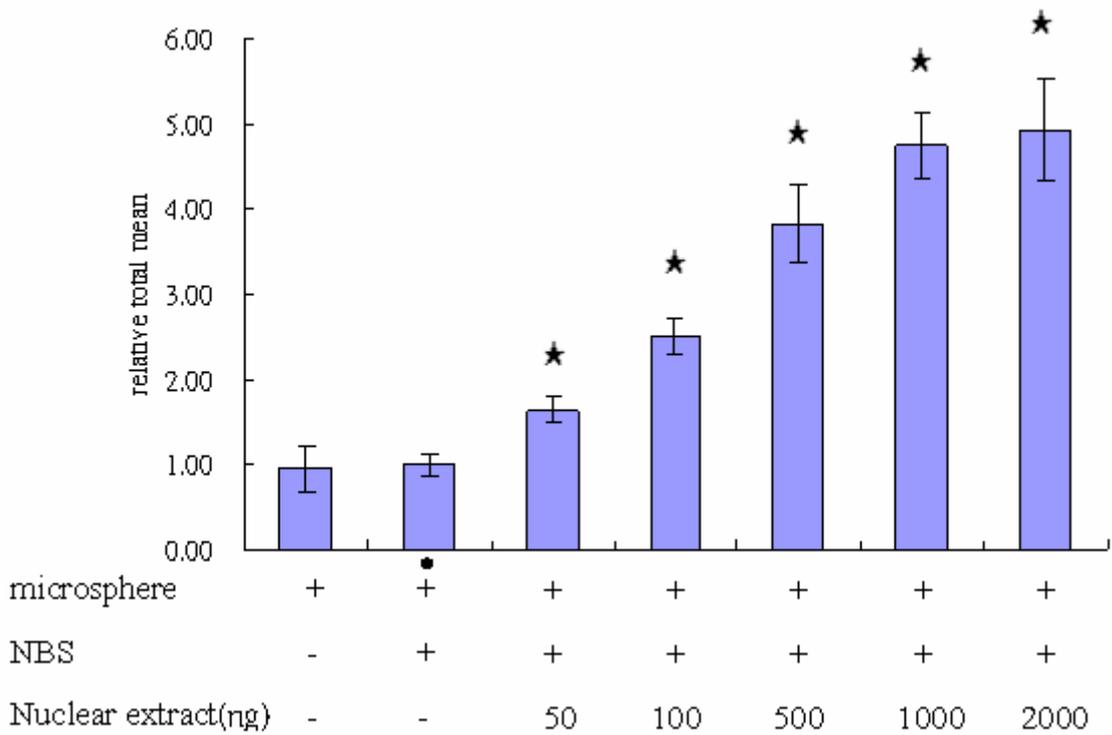
★：與負向控制組（lane II）具 $p < 0.05$ 之顯著性差異



圖十、MIA-TF 測量核蛋白內 HIF-1 之靈敏度

在 MIA-TF 實驗中，使用 HBS 作為 bio-DNA 來測量正常培養之 HeLa cell 內含 HIF-1 之活化量，以 extraction buffer 將細胞核蛋白調整至 50ng~2000ng/reaction

★：與負向控制組（lane II）具 $p < 0.05$ 之顯著性差異



圖十一、MIA-TF 測量核蛋白內 NF-κB 之靈敏度

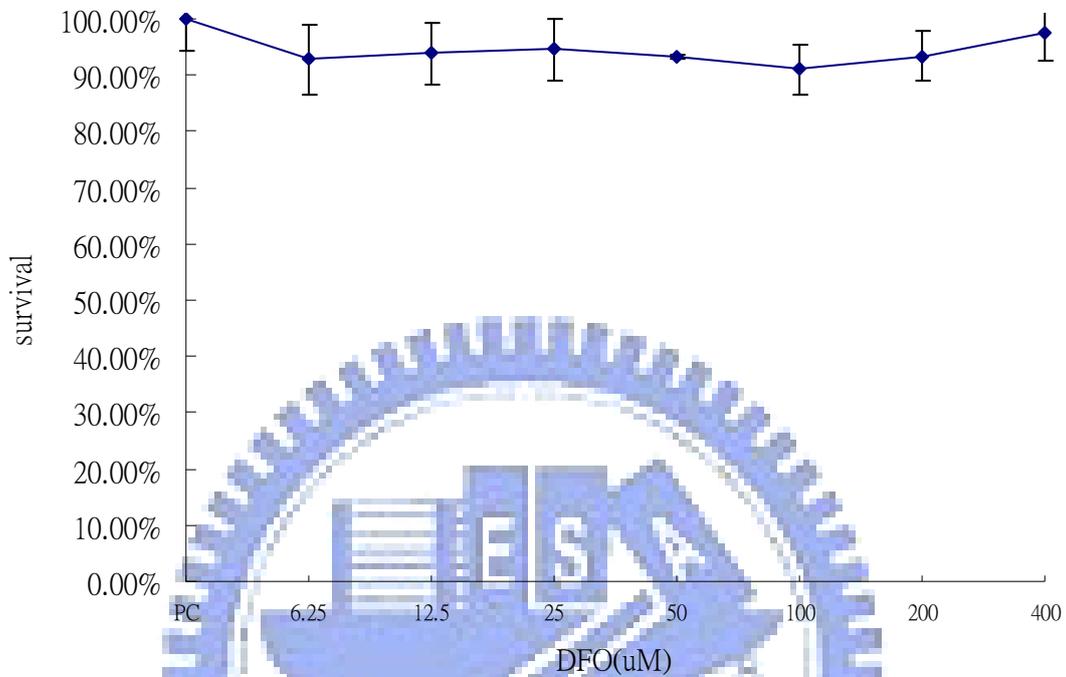
在 MIA-TF 實驗中，使用 NBS 作為 bio-DNA 測量正常培養之 HeLa cell 內含 NF-κB 之活化量，以 extraction buffer 將細胞核蛋白調整至 50ng~2000ng

★：與負向控制組（lane II）具 $p < 0.05$ 之顯著性差異

6.2.4 活體外細胞毒殺測試

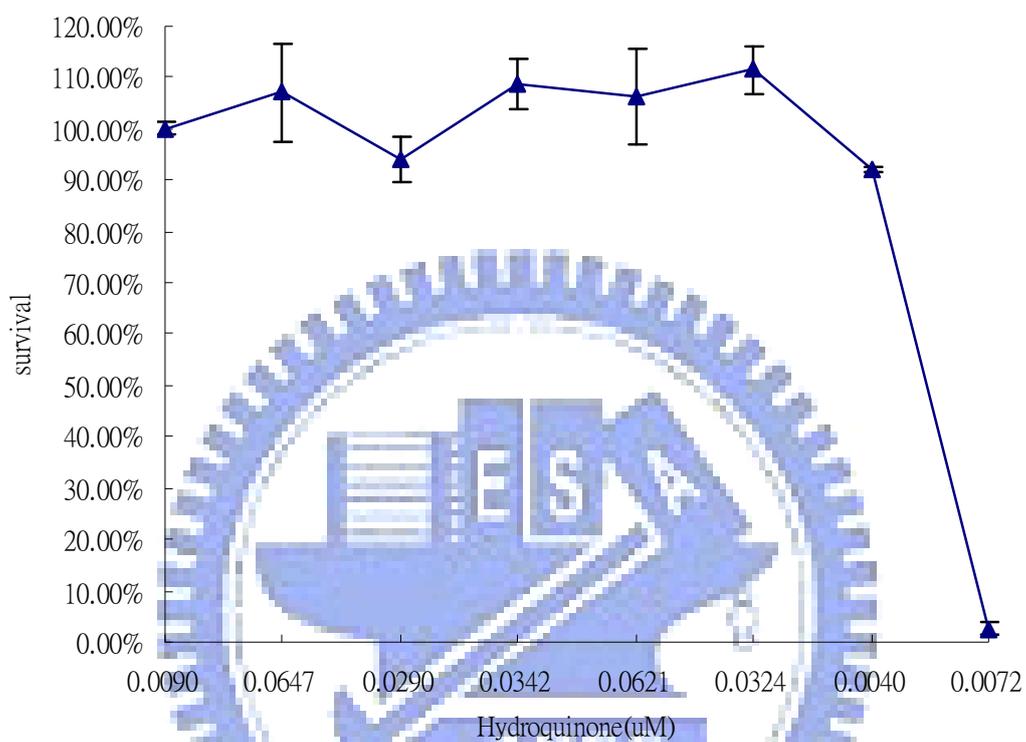
為了測量細胞所能承受最高藥物濃度，我們採用 MTT 細胞增殖及毒性檢測實驗來得出細胞對藥物濃度的存活曲線。檢測 DFO 或 HQ 對 HeLa cell 的存活影響（圖十二、圖十三）。由圖十二發現，DFO 對 HeLa cell 並無顯著毒殺效應，因此我們取濃度 100 μ M 作為後續實驗參考之用；由圖十三可看出 HeLa cell 對 HQ 所能承受最高濃度而不傷害細胞為 50 μ M，因此在後續實驗中我們使用 25 μ M 濃度之 HQ 刺激細胞。





圖十二、HeLa cell 於 DFO 刺激下之細胞存活曲線

Seeding 2×10^4 個細胞於 96 孔盤中後 8 小時，以 DMEM 培養液對 DFO 做 6.25 μ M-400 μ M 之序列稀釋，將含有藥物之新鮮培養液換掉舊有培養液，再培養 16 小時後，以內含 500 μ g/ml MTT 之培養液更換原培養液，靜置 2 小時後，以針頭小心將上清液吸掉，加入 100 μ l DMSO 溶解結晶，再觀察 595nm 下的吸光值



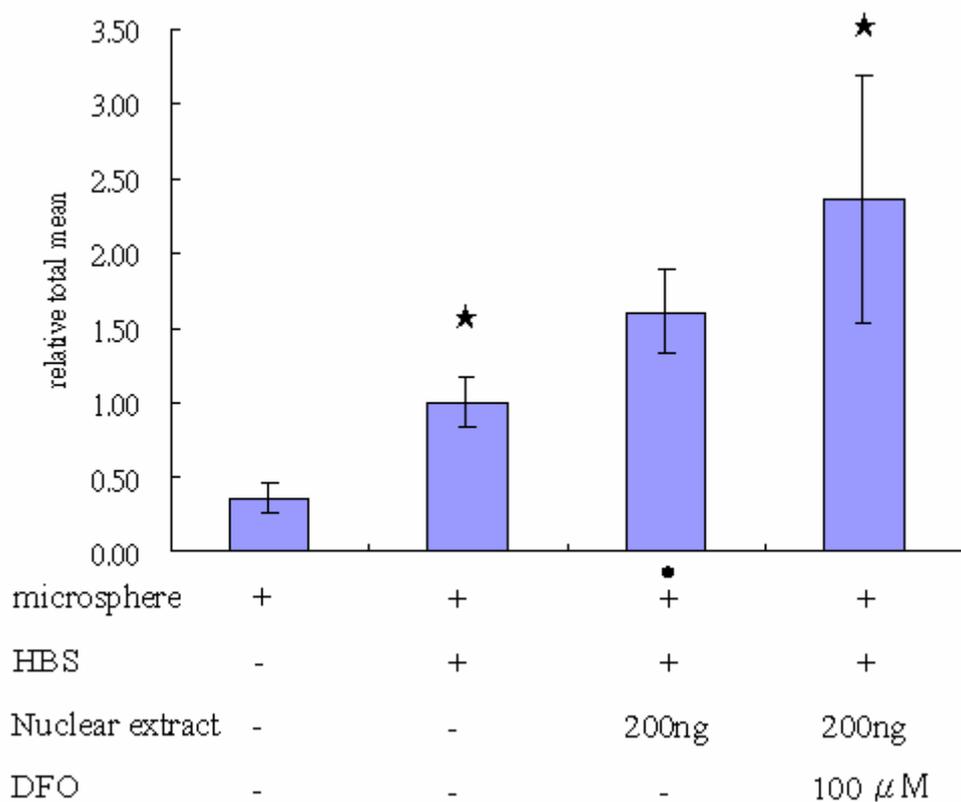
圖十三、HeLa cell 於 HQ 刺激下之細胞存活曲線

Seeding 2×10^4 個細胞於 96 孔盤中後 8 小時，以 DMEM 培養液對 hydroquinone 做 $1.56 \mu\text{M}$ - $100 \mu\text{M}$ 之序列稀釋，將含有藥物之新鮮培養液換掉舊有培養液，再培養 16 小時後，以內含 $500 \mu\text{g/ml}$ MTT 之培養液更換原培養液，靜置 2 小時後，以針頭小心將上清液吸掉，加入 $100 \mu\text{l}$ DMSO 溶解結晶，再觀察 595nm 下的吸光值

6.2.5 檢測細胞於特效藥刺激下致使核內轉錄因子濃度變化

MIA-TF 的開發目的是為了可以直接測量細胞於各種環境下之轉錄因子變化，因此我們於培養細胞時，加入目標轉錄因子的作用藥物，再用 MIA-TF 加以偵測目標轉錄因子的濃度變化。圖十四為 HeLa cell 對 HIF-1 的活化劑 DFO 所呈現的細胞核內活化量變化，可見 HIF-1 的活化量隨著 DFO 的刺激而上升。圖十五為 HeLa cell 對 NF- κ B 的抑制藥物 HQ，也可確實的偵測到 NF- κ B 的活化量隨著 HQ 的增加而相對被抑制

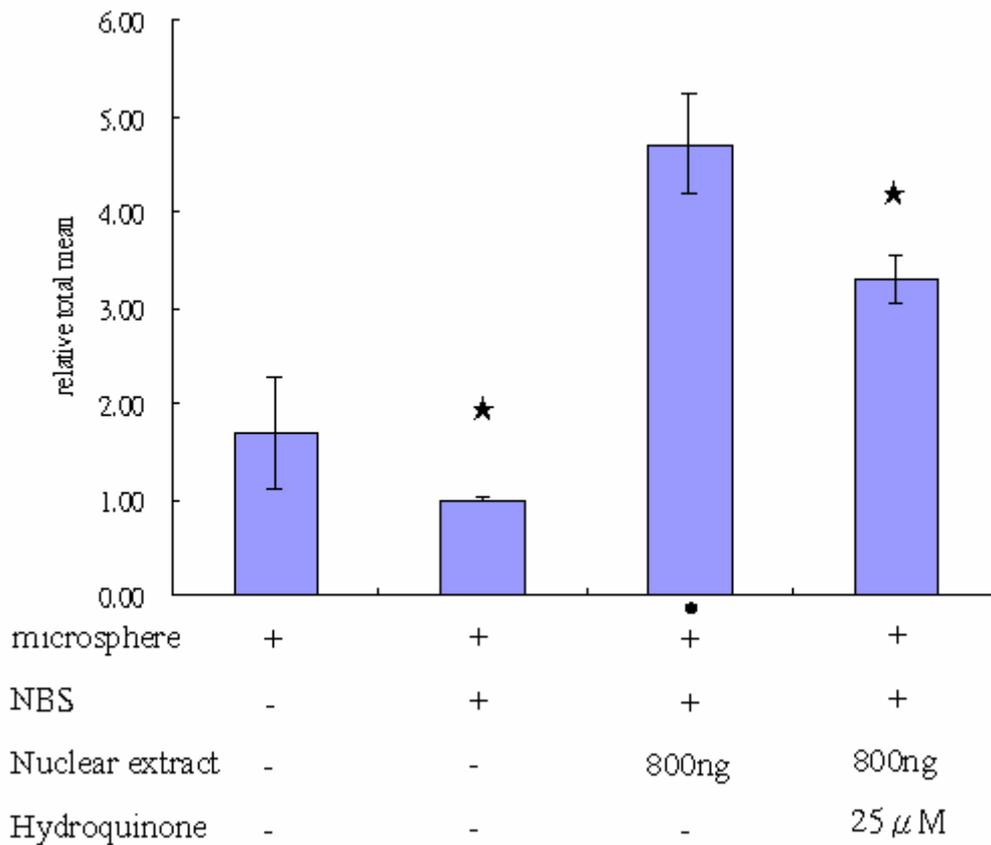




圖十四、MIA-TF 偵測 HeLa cell 於 DFO 刺激下之 HIF-1 活性變化

於 24 孔盤每孔 seeding HeLa cell 10^5 個，待八小時後加入 DFO，培養 16 小時後，收取細胞並抽取細胞核蛋白，測量蛋白濃度後，以 extraction buffer 將核蛋白調整至每個反應加入 200ng，以 MIA-TF 配合 HBS 檢測

★：與檢測正常培養細胞之實驗組（lane III）具 $p < 0.05$ 之顯著性差異



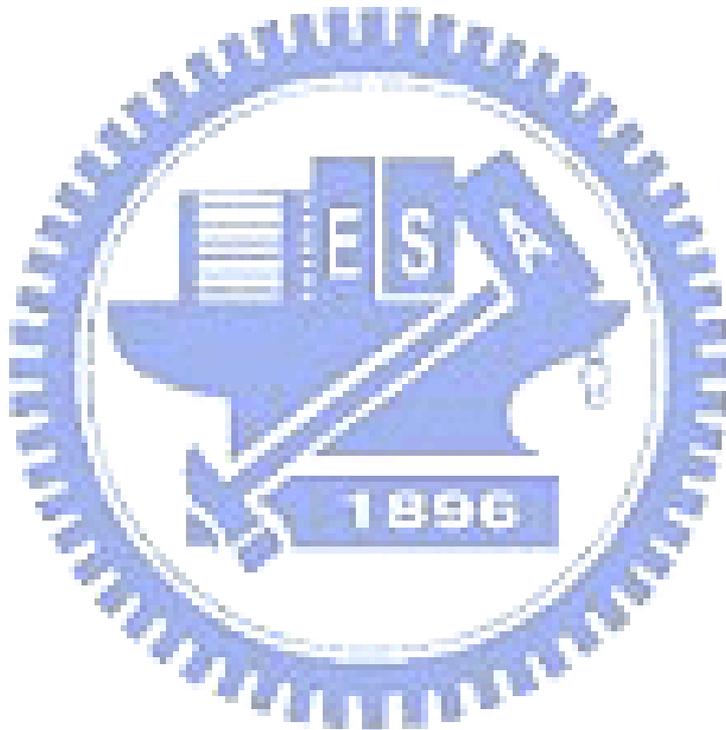
圖十五、MIA-TF 偵測 HeLa cell 於 HQ 刺激下之 NF-κB 活性變化

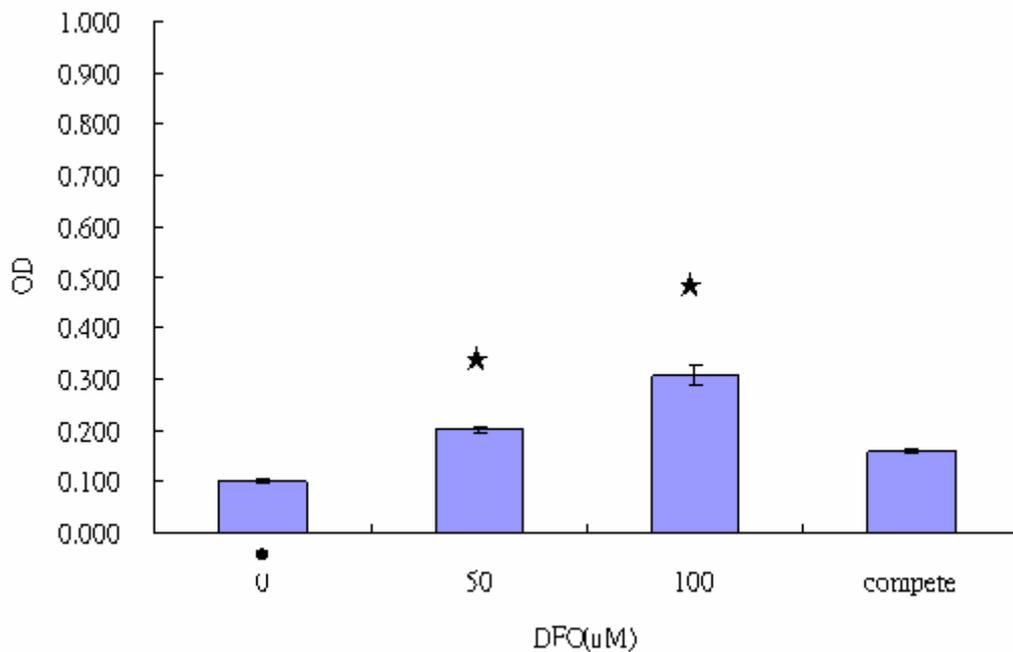
於 24 孔盤每孔 seeding HeLa cell 10^5 個，待八小時後加入 HQ，培養 16 小時後，收取細胞並抽取細胞核蛋白，測量蛋白濃度後，以 extraction buffer 將核蛋白調整至每個反應加入 800ng，以 MIA-TF 配合 NBS 檢測

★：與檢測正常培養細胞之實驗組（lane III）具 $p < 0.05$ 之顯著性差異

第三節 HIF-1 α ELISA

為了與 MIA-TF 互相比較，我們採用市售 HIF-1 α ELISA 套組測量 HeLa cell 於 DFO 刺激下之轉錄因子活性變化。圖十六顯示：隨著 DFO 的濃度上升，HeLa cell 內的 HIF-1 活化量顯著性上升，然而在競爭反應中，卻沒有明顯的競爭效果。





圖十六、ELISA 檢測 HeLa cell 於 DFO 刺激下之 HIF-1 活性變化

於 6 孔盤每孔 seeding HeLa cell 5×10^5 個，待八小時後加入 DFO，培養 16 小時後，收取細胞並抽取細胞核蛋白，測量濃度後，以 ELISA 套組所附標準流程偵測，每個反應加入的核蛋白量為 $30 \mu\text{g}$ ，競爭組為 DFO 濃度為 $0 \mu\text{M}$ 組別的控制組

★：與檢測正常培養細胞之實驗組 (lane I) 比較具 $p < 0.05$ 之顯著性差異

第四節 報導基因活性分析

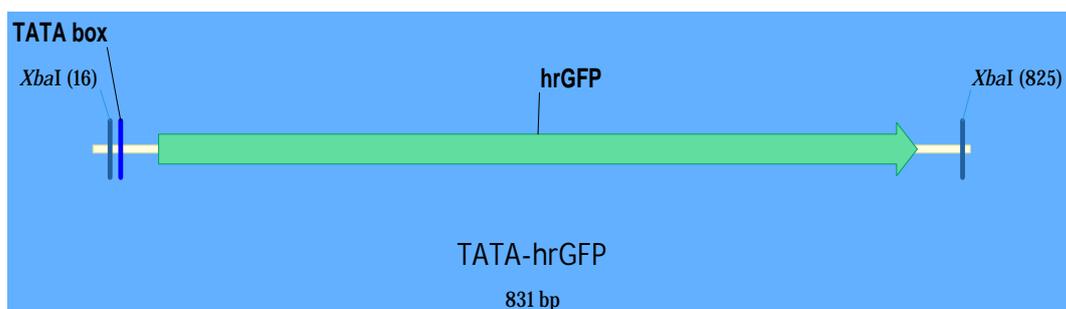
偵測轉錄因子之另一常用方法為報導基因活性分析，為了可與 MIA-TF 互相比較，我們構築出一可反應 HIF-1 活性表現的報導基因活性分析系統，將得到的質體轉染入細胞後，使用 DFO 作用轉染細胞，接下來使用流式細胞儀分析，將細胞螢光量數值化，再加以比較 HIF-1 之活性。

6.4.1 HBS (HIF-binding site) 報導基因質體之構築

1. 基因選殖

a. hrGFP 片段準備

我們使用 PCR 的方法將 hrGFP 自 pNFkB-hrGFP 質體上複製下來該片段來自於質體的 4721 bp~5544 bp 片段，因引子設計於末端嵌入 XbaI 切位，需再加上 7 bp 共 831bp，產物經純化後，其電泳圖如圖十七、a 所示，接下來以限制酶 XbaI 使該片段在末端有適當接位，產生片段應為 809bp，產物經純化後之洋菜膠電泳圖如圖十七、b 所示



b.
以限制酶
XbaI

在 pCRII-C2-9 之 7XHBS 片段後產生切位

在 7X HBS 片段後產生 Xbal 切位，可讓 hrGFP 片段利用此切位接入 pCRII，純化後產物以洋菜膠電泳分析 (圖十七、c)。

2. 菌液 PCR

進行黏合反應之後，我們以菌液 PCR 的方式確定 hrGFP 是否有接入 pCRII-C2-9 內，共挑選 12 個菌落進行，其結果顯示，片段皆出現在約 800bp 的位置 (圖十八)，約等於 hrGFP 的片段長度 (831bp)，因此大致可確定片段確實有接入質體內。

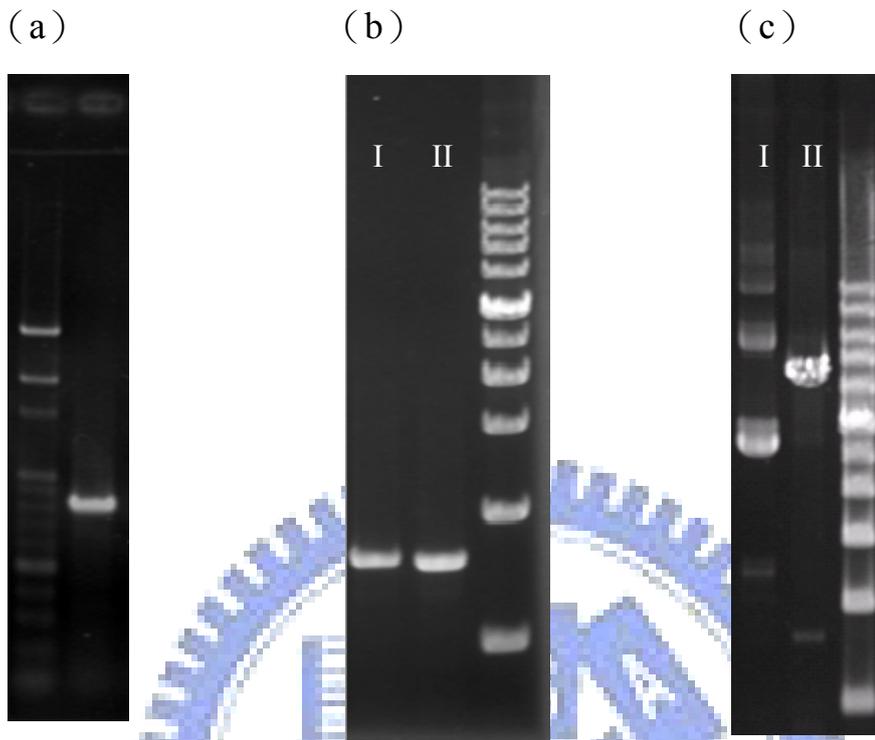
3. 以限制酶 BamHI 確定接入片段為順向或反相

因為使用同一切位將 hrGFP 片段接入 pCRII-C2-9 內，因此接入的片段可能為順向或反相接入，此時利用限制酶 BamHI 做切割，則可出現片段大小判斷接入片段的正反，如圖十九表示：若接入片段為順向，則切割出片段大小應為 4676bp + 367bp (圖十九、a)，若為反相，則切割出片段大小應為 3901bp + 1142bp (圖十九、b)。我們選擇菌液 PCR 實驗中編號 3、6、9 之組別做限制酶切割，其結果顯示所選取組別的切割片段皆出現在大約 300bp 和 400bp 的位置 (圖二十一)，因此可判斷這三組所接入片段皆為順向，選擇編號第 9 作為後續實驗之用。

4. 以細胞轉染方式確知 hrGFP 是否具有功能

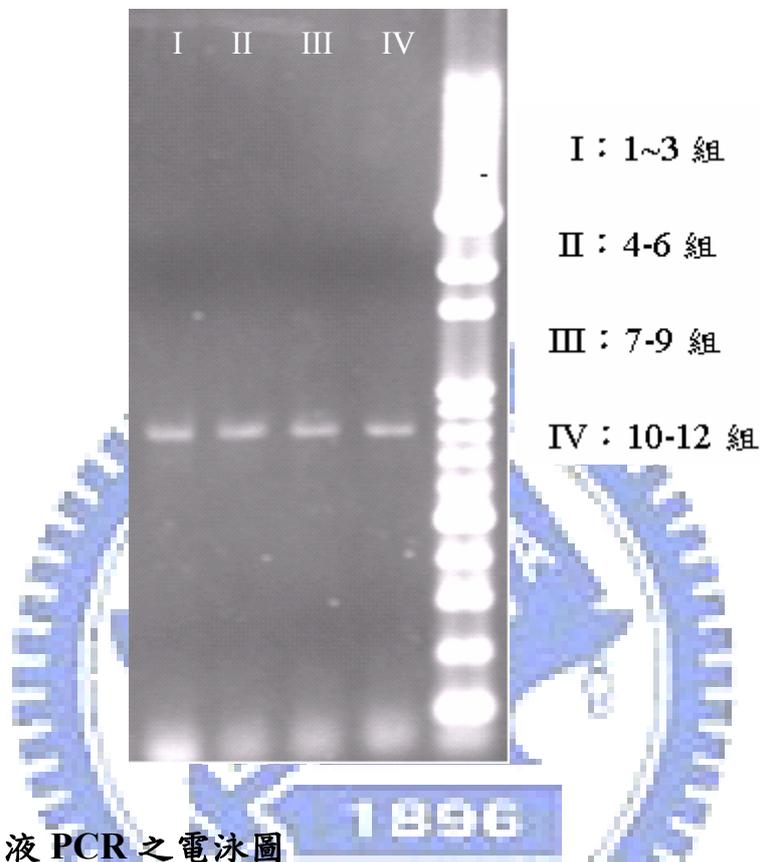
因為接入片段 hrGFP 為 PCR 增幅複製出之產物，有可能會有突變造成報導基因失去功能，因此我們利用細胞轉染來直接測知該 hrGFP 片段接入質體後是否仍具有報導基因的功能。其結果顯示：當於細胞內轉染入 pCRII-C2-9-hrGFP 之後，於螢光顯微鏡下可見細胞發出綠色螢光（圖二十一、a），證實 hrGFP 報導基因於接入質體後仍具有功能。





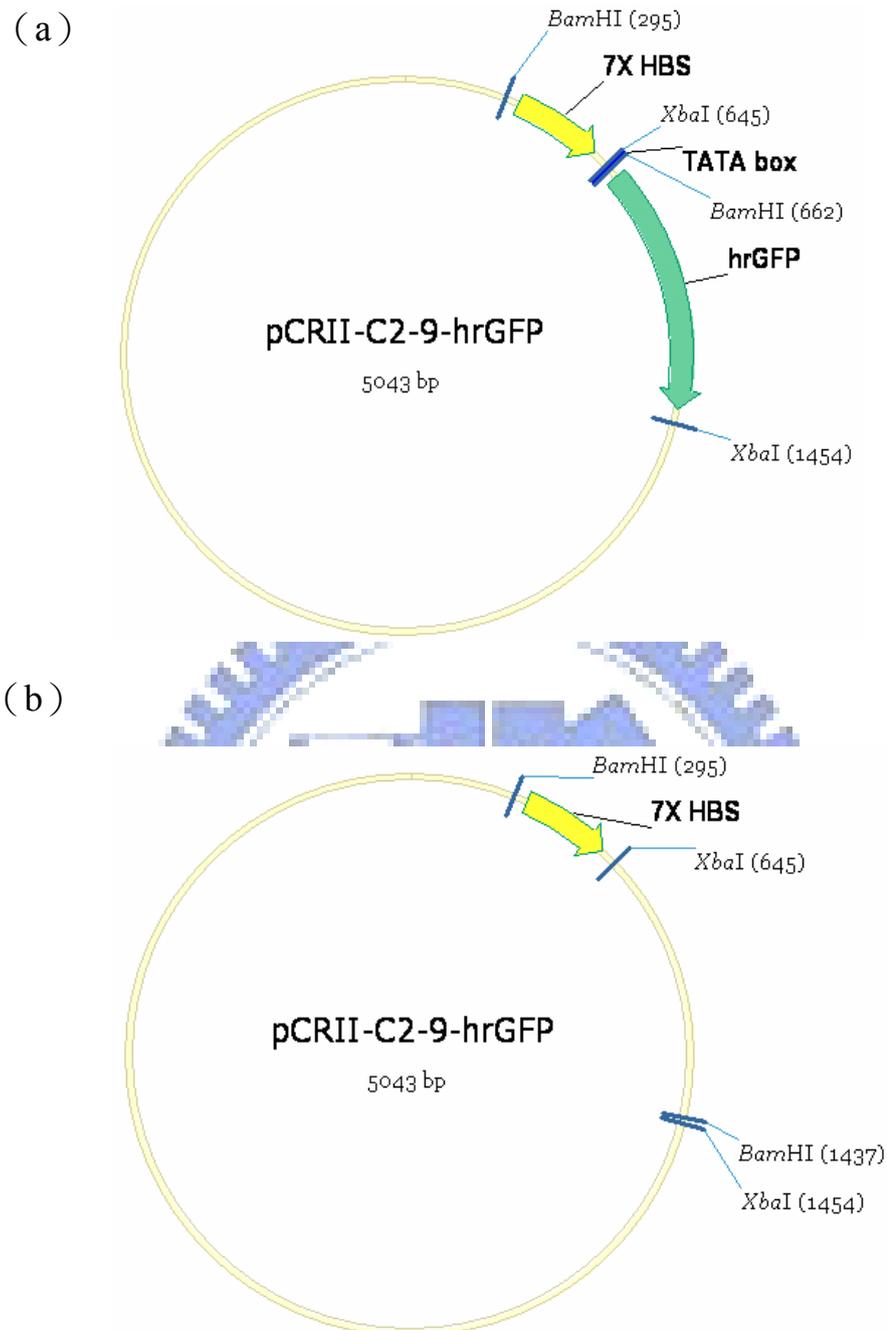
圖十七、基因選殖之插入片段及質體準備之電泳圖

(a) hrGFP 之 PCR 產物。使用引子 hr-GFP-5'、hr-GFP-3' 自模版 pNFκB-hrGFP 增幅複製出；(b) hrGFP 片段經限制酶 XbaI 切割，lane I 為未切割，lane II 為切割後產物；(c) pCRII-C2-9 經限制酶 XbaI 切割後之產物，lane I 為未切割，lane II 為切割後產物



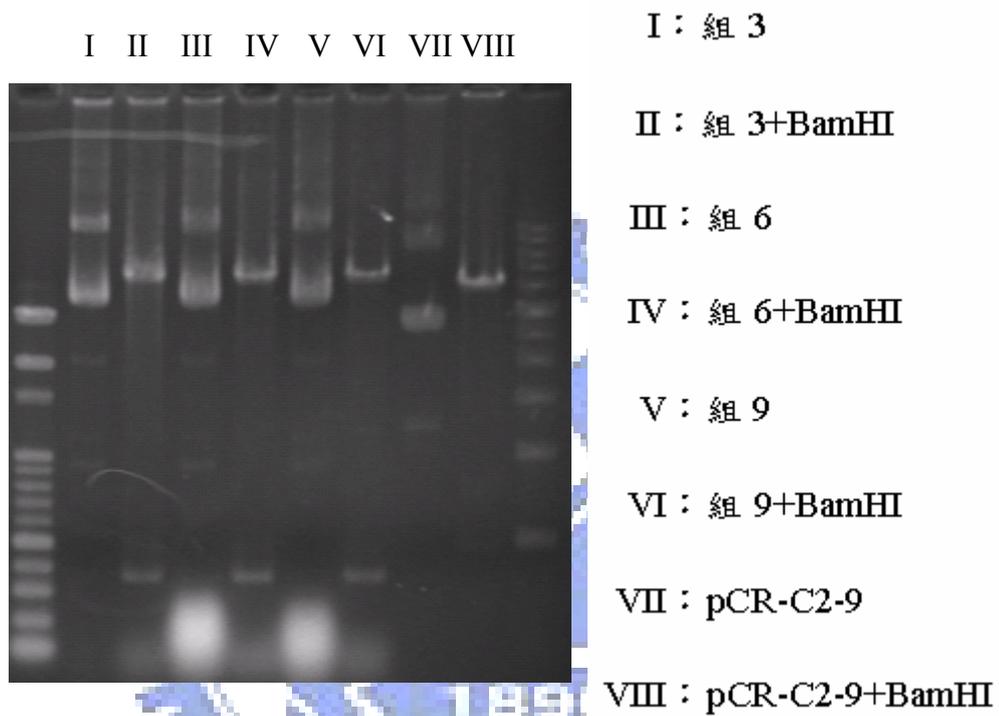
圖十八、菌液 PCR 之電泳圖

由黏合反應的產物，經過質體轉型至 DH5 α competent cell 後，培養 12-16 小時後，選取其中 12 個菌落，加入 3ml 含 kanamycin 的 LB 培養液中培養 17-20 小時，接著選擇 0.1 μ l 菌液作為模版，使用引子 hr-GFP-5'和 hr-GFP-3' 作 PCR 反應，每三組合為一管後，以洋菜膠電泳分析片段。



圖二十、pCRII-C2-9-hrGFP 之順接及反接可能質體圖示

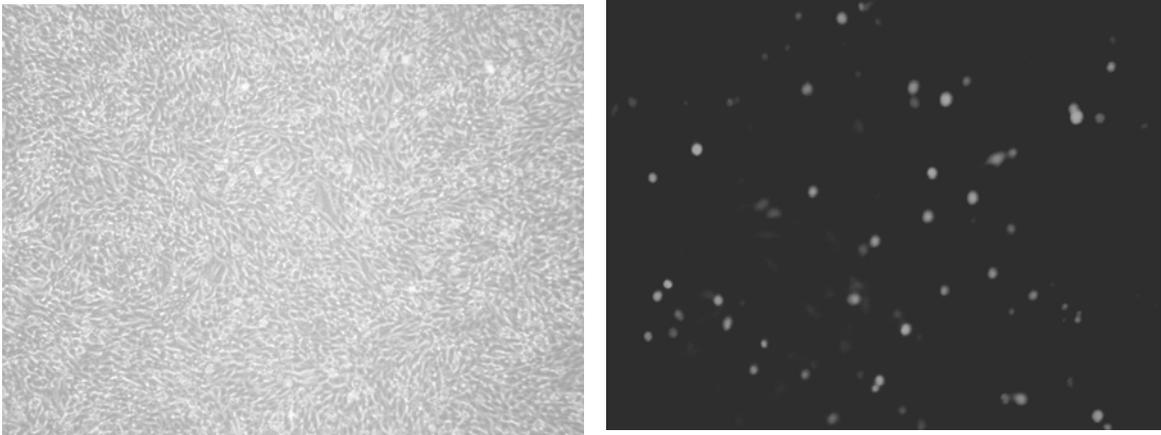
因為接入 hrGFP 使用兩端皆是 *Xba*I 切接位，因此接入時可能為正向或反向，使用限制酶 *Bam*HI 切割後可判斷 (a) 順向接入、(b) 反相接入



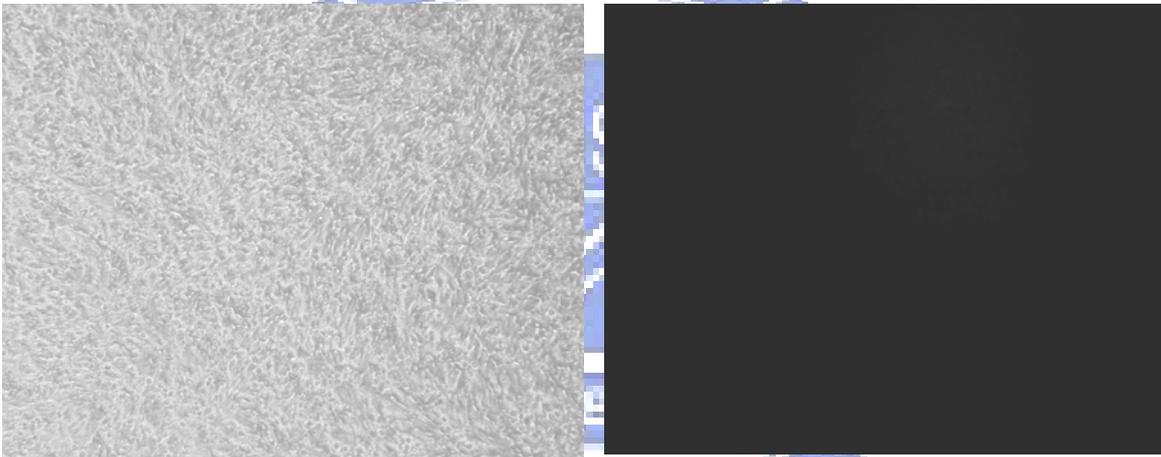
圖二十、pCRII-C2-9-hrGFP 經 BamHI 切割後之電泳圖

選擇菌液 PCR 之 3,6,9 組，以小量分離法純化出質體後，分別以限制酶 BamHI 作切割，切割後產物以洋菜膠電泳分析片段

(a)



(b)



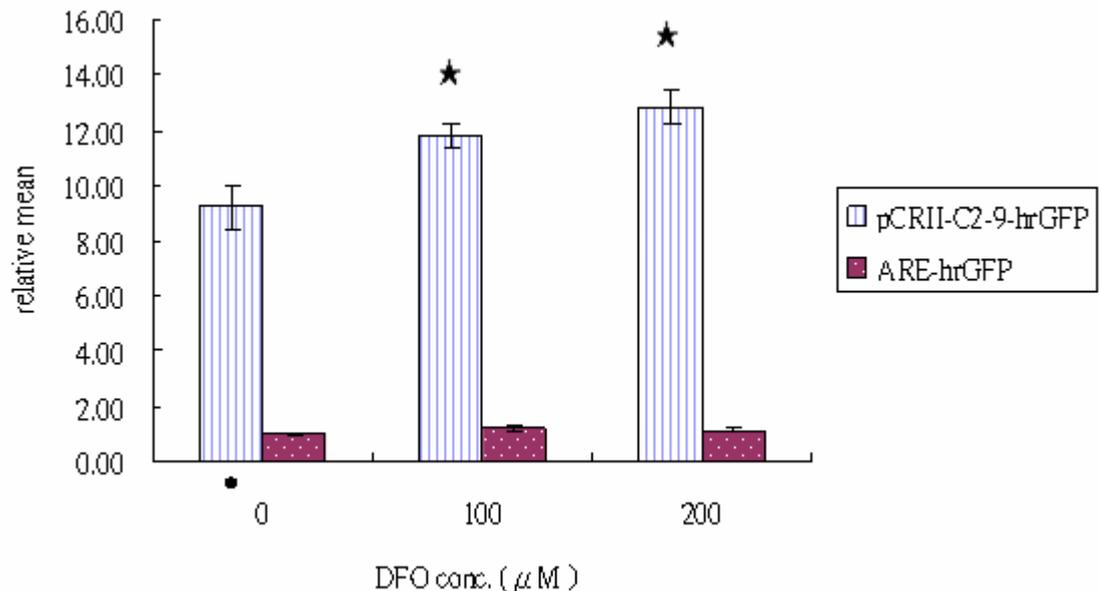
圖二十二、以細胞轉染方式測試 pCRII-C2-9-hrGFP 的功能

選擇第九組產物作質體大量純化後，以 lipofectamine 進行細胞轉染實驗，使用細胞為 Balb/3T3，seeding 5×10^5 個細胞於 6 孔盤中，待細胞長至七成滿後（約 12~16 小時）開始進行轉染。轉染進行後培養 24 小時照相 (a) 轉染入 pCRII-C2-9-hrGFP、(b) 未加入質體，但仍有操作轉染程序

6.4.2 細胞於缺氧環境下之報導基因活性分析

將所選殖出之質體轉染入 HeLa 細胞，使用不同濃度之 DFO 活化 HIF-1 α ，接下來以流式細胞儀分析細胞螢光量，並同時操作一組 ARE-hrGFP 報導基因轉染作為負向控制組（質體圖如附錄三）。結果如所示，加入 DFO 後，細胞螢光量呈現上升，並且具有顯著差異性（圖二十二）。





圖二十二、以報導基因活性分析檢測 HeLa cell 於 DFO 刺激下之 HIF-1 表現

以 lipofectamine 進行細胞轉染實驗，使用細胞為 HeLa cell，seeding 5×10^5 個細胞於 6 孔盤中，待細胞長至七成滿後（約 12~16 小時）開始進行轉染。轉染進行後 24 小時將細胞分至 24 孔盤，待培養八小時後，加入 DFO，再培養 16 小時後，收取細胞以流式細胞儀分析。縱軸為綠光 mean 值除以 ARE-hrGFP 之綠光 mean 值。

★：與檢測正常培養細胞之實驗組（lane I）具 $p < 0.05$ 之顯著性差異

第五節 新型微粒子免疫分析法應用於 96 孔盤 (modified-MIA-TF)

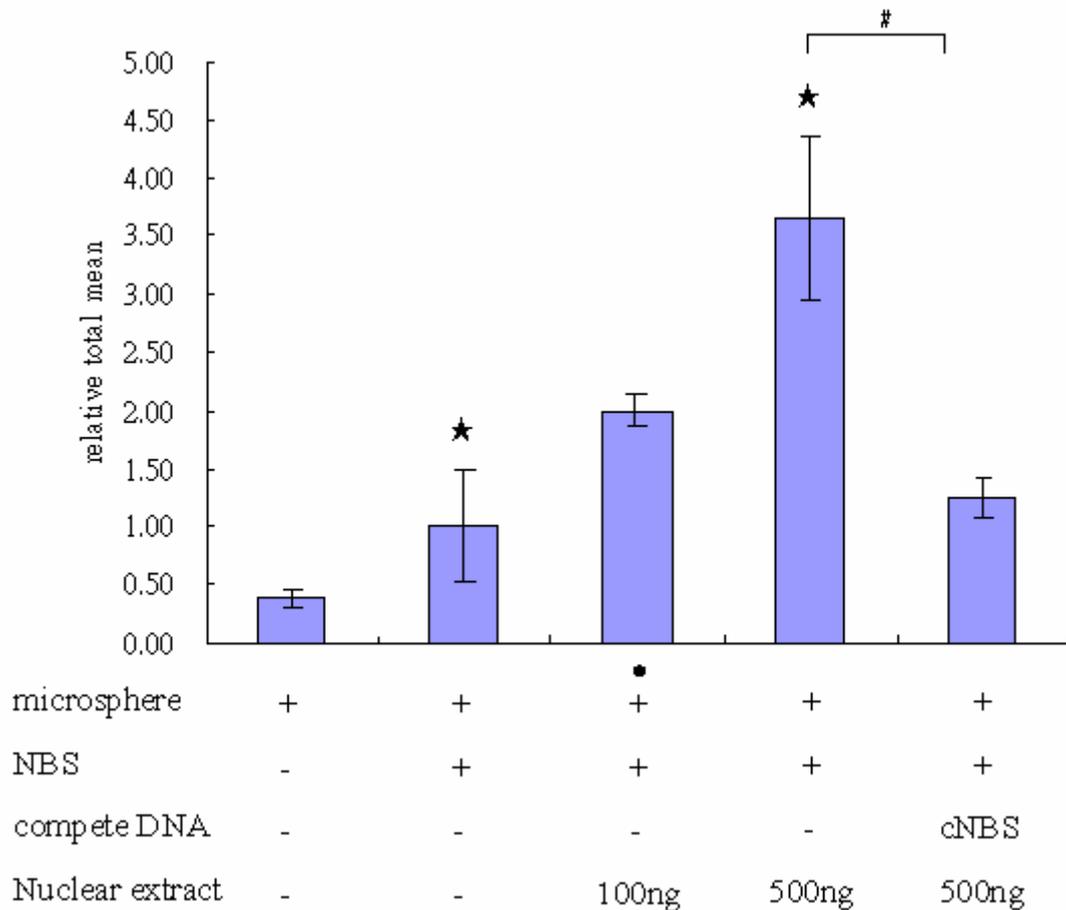
此部分實驗之目標為在 96 孔盤中抽取細胞全蛋白，並且亦可在 96 孔盤中直接操作 MIA-TF，以求將此方法發展為可將細胞培養於 96 孔盤直接進行分析達到高生產力 (high-throughput) 之用。

6.5.1 modified-MIA-TF 操作於 96 孔盤測試

因為方盤適用之離心機無法以 10,000rpm 高速離心，因此我們將轉速調整至 3,500 轉，並測試 MIA-TF 於改變實驗步驟之後是否仍具其偵測功能。結果如所示，隨著加入細胞核蛋白的量增加，測得之綠色螢光量也隨之增加，並在競爭試驗之控制組內，也可看到螢光量降低，由此可見，MIA-TF 可直接利用 96 孔盤操作 (圖二十三)。

6.5.2 modified MIA-TF 應用於 96 孔盤檢測

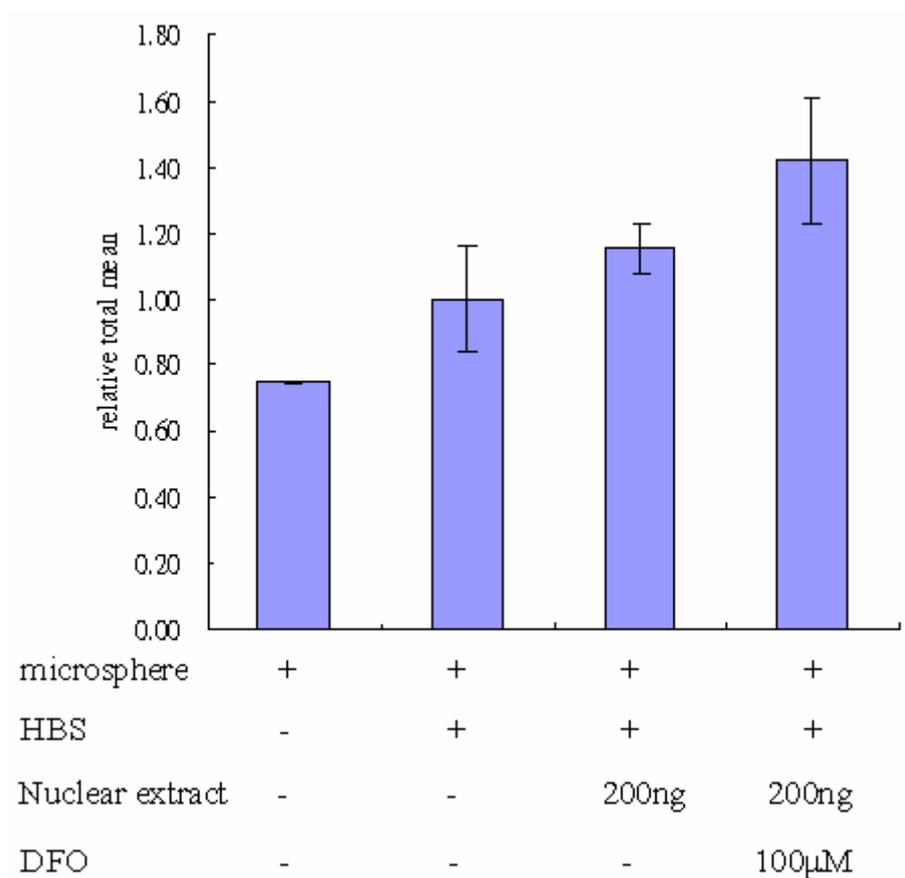
我們將細胞培養於 96 孔盤，經萃取出細胞全蛋白後，於 96 孔盤中操作 modified-MIA-TF，其結果如所示，皆能表現出細胞經不同特效藥刺激後之轉錄因子活化量改變 (圖二十四、圖二十五)。



圖二十三、modified-MIA-TF 操作於 96 孔盤測試

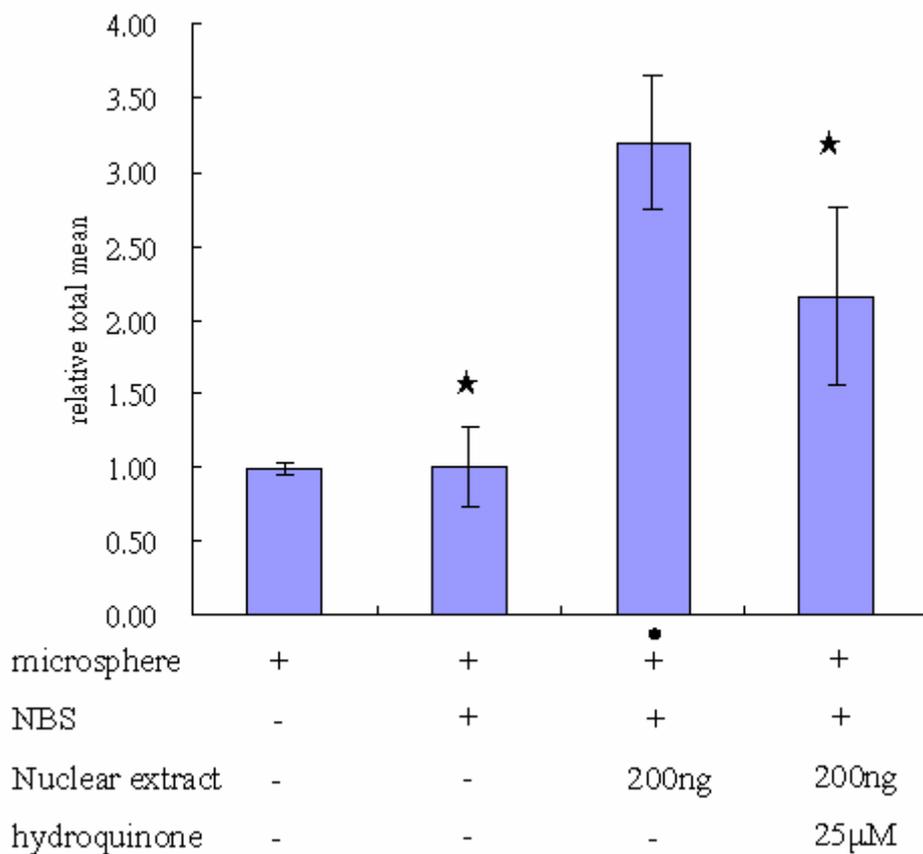
在 MIA-TF 實驗中，將操作環境更改於 96 孔盤中，並將轉速降低至 3,500rpm，於實驗組中分別加入 100ng 及 500ng 之細胞核蛋白 (HeLa cell nuclear extract)，並在競爭組別加入 cNBS 作為特異性的控制組。

★：與實驗組 (lane III) 具 $p < 0.05$ 之顯著性差異



圖二十四、modified-MIA-TF 應用於 96 孔盤之 HIF-1 檢測

於 96 孔盤中每孔培養 3500 個細胞，八小時後加入 DFO，培養 16 小時後於盤內抽取細胞全蛋白，再於 96 孔盤操作 modified-MIA-TF



圖二十五、modified-MIA-TF 應用於 96 孔盤之 NF-κB 檢測

於 96 孔盤中每孔培養 3500 個細胞，八小時後加入 HQ，培養 16 小時後於盤內抽取細胞全蛋白，再使用修飾過之流程於 96 孔盤內操作 MIA-TF

★：與檢測正常培養細胞之實驗組（lane III）具 $p < 0.05$ 之顯著性差異

第七章 討論

本研究主要目的為利用流式細胞儀與微粒子發展出一能快速準確偵測出細胞內轉錄因子活化量的方法 (MIA-TF)，作為判斷細胞癌化程度[3]、細胞生理研究[5]、或是藥物篩選平台[6]的一個系統工具，傳統上已有許多種方式偵測轉錄因子 (如第二章所述)，以下對各方法作論述。

西方墨點法為可以正確的檢測出目標蛋白的含量多寡，但因為該方法是先利用膠體將變性蛋白質展開，並直接使用抗體辨識，所檢測到的是所有目標轉錄因子的含量，而轉錄因子需先被活化之後才會和特定核酸序列做結合[14]，使用西方墨點法無法檢測出被活化的轉錄因子正確的含量[57]。

EMSA 為截至目前而言用於偵測轉錄因子活性最普遍的方法，其可經由標定核酸序列而檢測出被活化而坐落於特定片段的轉錄因子之含量，然而在實驗操作上多需要使用同位素，同位素的輻射作用會危害人體健康，因此便需要更昂貴的花費來做防護措施及管制空間，雖然後期發展出不需使用同位素標定的方法，但 EMSA 仍然因背景值過高且耗時甚長而漸降低其適用性[57]。

報導基因活性分析法能夠確實的得知基因於細胞內的表現狀況，其結果如圖二十二所示，該方法能確切直接顯示細胞因特效藥影響內含轉錄因子之活性變化 ($p < 0.05$)，但整體實驗時間至少需要 64 小時 (細胞培養於 6 孔盤 16 小時、轉染後培養 24 小時、重新培養於 24 孔盤 8 小時、加藥後培

養 16 小時)，約需三天才能完成，實在耗時甚長，且轉染的動作會對細胞造成損傷，分析結果受限於轉染的效率，某些細胞之基因轉染效率甚至趨近於零，故此法有其限制性；另外，因缺乏抗體的辨識，報導基因也可能受到其他非目標轉錄因子的影響而表現，針對專一性方面的考量則甚有疑慮。

起始發展出用於偵測轉錄因子的 ELISA 是將會辨識目標轉錄因子的一級抗體接合在盤子上[8]，但因抗體無法辨識轉錄因子是否活化，因此如此的方式僅能分析細胞中轉錄因子之含量，而造成假陽性誤差，其後又發展出兩種方法，其一為在盤子上接合上 streptavidin，同樣的先將蛋白質與 biotin-labeled dsDNA probe 混合，再加入盤子內，接著再加入一級抗體及可呈色的二級抗體[39]；其二為將核酸片段的第一級胺基團的氮原子上作修飾，將核酸片段直接接在盤子上，接下來再加入蛋白質、一級抗體、二級抗體呈色[40]。此二種方法皆可對目標轉錄因子做出明確的定量，然而，前者未與蛋白質結合的核酸片段在加入盤子內後，會與其他有結合的核酸片段形成競爭，造成靈敏度的降低；而後者則與其他轉錄因子分析方法有同樣的問題，即靈敏度不夠佳。

因轉錄因子在細胞內含量低且易喪失活性，因此需要一靈敏度極佳的測量方法。ELISA 其合適偵測範圍在 $10\mu\text{g}\sim 100\mu\text{g}$ 核蛋白，在我們的實驗中，每一個 ELISA 反應所加入細胞核蛋白量為 $30\mu\text{g}$ ，雖可測得 HIF-1 α 的活化

量在 DFO 存在下有顯著性增加 (圖十六, $p < 0.05$), 然而其整體於 450nm 下之吸光值均偏低 (小於 0.4), 接近於背景值, 可能因差別度均太小導致競爭控制組的失敗, 顯示該方法的靈敏度並不高; 而 2006 年 Wang 等人所發表的方法合適偵測核蛋白量為 $0.625\mu\text{g}\sim 10\mu\text{g}$, 純蛋白則為 3-60ng, 其靈敏度約為 ELISA 的十倍[40], 是近期所發表靈敏度最好的方式之一, 而我們所設立的方法中, 合適偵測核蛋白量為 $0.05\mu\text{g}\sim 2\mu\text{g}$ (圖十、圖十一), 純蛋白為 0.5ng~40ng (圖九), 其靈敏度優於傳統 ELISA 一百倍。在合適偵測範圍內, 亦顯示 MIA-TF 之分析值與蛋白濃度成線性關係, 因此若是需要定出樣品中確切目標轉錄因子的量, 可使用純化過的目標轉錄因子做出濃度標準曲線, 再對照出實驗組之內含轉錄因子濃度。

Jager 於 2006 年探討了傳統 ELISA 與微粒子免疫分析法 (bead-based multiplex immunoassay, MIA) 於細胞激素檢測上的不同 [58], 該份文獻指出, MIA 於檢測細胞激素時其靈敏度優於 ELISA, 因 ELISA 屬於平面結構, 因此當加入 capture antibody 時, 抗體以隨機的位置接於盤子上, 因此可能只有部分的抗體可接上目標蛋白, 也因為反應於平面進行, 因此抗體間可能會產生立體障礙而導致最終靈敏度下降; Li 於 2007 年所發表的文獻中也探討了使用 streptavidin-biotin 系統於傳統 ELISA 的疑慮 [57], biotin 與 streptavidin 於液體中的結合常數 (K_a) 為 10^{15}M^{-1} , 當其中任一個分子被固著在固體表面產生立體障礙, 結合常數便會下降, 造成使用此系統的 ELISA

靈敏度降低，因此當我們將平面固相載體改為立體表面，便減少其立體障礙的發生，相對也能提高其靈敏度。

在具備靈敏度佳及檢測快速等特性之後，MIA-TF 更有多種應用的方式。例如可直接將細胞培養於 96 孔盤中，並於盤子內萃出細胞蛋白，經由修飾過的流程操作，便能不經微量離心管而直接於 96 孔盤測得細胞內轉錄因子含量變化（圖二十四、圖二十五）；另外，倘若能配合上各種不同大小或是螢光特性的微粒子，於不同的微粒子接上含不同轉錄因子結合序列的核酸片段，便能於同一個反應中同時測得多種目標轉錄因子，而在這樣的系統下，若能以 FACS array 作為偵測儀器，便可形成高生產力的系統。

本系統在設立之初，為了解決非專一性鍵結造成的假陽性結果，除了使用 PEG 達到 blocking 的效果之外[59]，另外也嘗試了許多針對緩衝液性質作改變的方法，其一為改變緩衝液的酸鹼度，希望能藉由不同的 pH 值使微粒子表面的電性趨近於中性，因微粒子的材質為 polystyrene，因此我們選擇氮原子的 pI 值（pH=9.6）與正常環境（pH=7.4）作比較，並再另取 pH=8.6 與 pH=6.6 兩組實驗組（數據未展示），結果顯示 pH=9.6 與 pH=7.4 兩組最能表現出控制組間的差別度，然而，當 pH 值越高，其整體測量值也偏低，推測因緩衝液偏鹼而影響到蛋白質的結構，進而降低其互相鍵結能力，因此，雖然調整酸鹼度可以降低微粒子的非專一性鍵結，但卻也影響了蛋白質間正常的鍵結；另一方法為在緩衝液中加入低濃度 Tween-20

(0.05%)，此試劑為介面活性劑，可有效降低 polystyrene 固相載體的非專一性鍵結，常用於 ELISA 洗去非專一性鍵結之用，然而結果顯示（數據未展示），整組實驗的測量值皆趨近於負向控制組，無法顯示出組間的差別度，推測可能樣品經長時間浸泡於含 Tween-20 的緩衝液中，使部分蛋白質降解，造成鍵結能力喪失；從這些經驗中，進一步再去修飾流程，在每一步接合動作完成之後，加入 wash 的動作，使用微量吸管加入大量含 Tween-20 的 PBS，並上下混勻，考量 Tween-20 濃度過高可能造成蛋白質的變性，因此將濃度由一般常用的 0.05% 降為 0.02%，也藉由加入大量體積 wash buffer 將溶液稀釋，降低非專一性鍵結的機率，並利用離心的方式去除液體，留下鍵結完成的微粒子，再接下一步的接合反應。

確立了系統的可行性之後，我們試著將 MIA-TF 應用於 96 孔盤，希望能夠藉由直接操作於 96 孔盤達到高生產力之用，但因懸浮式承盤的離心速度最多只能到達 3,700rpm，因此首先我們要能知道 MIA-TF 是否可在降低轉速之後仍能實行，如圖二十三所示，隨著加入不同濃度的核蛋白量，也能顯示其隨之增減的螢光程度，且競爭控制組確實能將目標蛋白競爭下，表示系統在降低轉速之後仍能維持其偵測能力；接著我們在 96 孔盤中培養細胞，因 5×10^5 個細胞在培養 24 小時後，可收取 75 μ g 核蛋白，我們希望每一個反應需要 200ng 的核蛋白，並且需要做到二重複，再加上可用來測量濃度的量，因此於 96 孔盤中培養 24 小時後，每孔需要收取 500ng 核蛋白，

由計算上得需於 96 孔盤上每孔 seeding 約 3500 個細胞，已有文獻指出細胞全蛋白與細胞核蛋白在 ELISA 的偵測上趨勢相同[39]，因此我們在 96 孔盤中直接抽取細胞全蛋白作檢測，如圖二十四及圖二十五，結果顯示 modified-MIA-TF 可以達到實際的應用，然而在檢測 HIF-1 的數據顯示卻較不明顯，不具有顯著差異，推測可能因 HIF-1 在細胞內含量本身就較低，因此比較起檢測 NF- κ B 的實驗，雖然兩者實驗加入的細胞數相同，但後者因目標轉錄因子含量較多使實驗數據較有差別性。

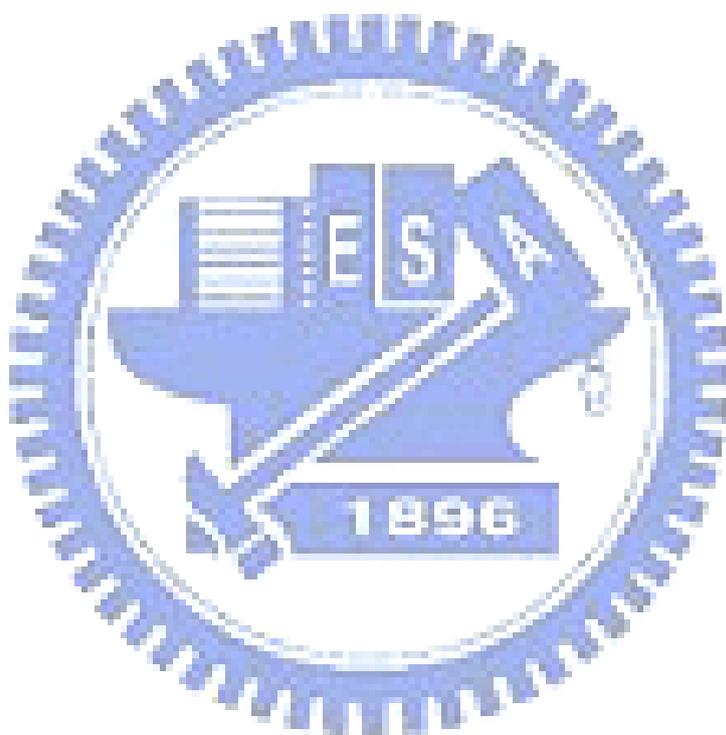
在設立檢測系統的過程中，我們發現有一些實驗程序上的小細節嚴重左右了實驗結果，其一為 wash 的步驟，加入的緩衝液體積相對於原本的液體體積需夠多（至少為五倍體積），如此才可達到將多餘或不需鍵結的蛋白質稀釋，離心後可順利去除，而 wash 的動作需以微量吸管上下沖洗約 3-4 次，需確實沖洗完整，才能將非專一性鍵結去除，但應避免使用震盪的方式；在離心後可發現，未加入蛋白質的微粒子離心後為一顆粒外型完整之白色 pellet 貼在微量離心管之底部，而在加入蛋白質的實驗組中可見到的是略微攤開的白色片狀物貼於底部，但因貼附不緊密，因此需在離心後馬上將上清液吸取丟棄，吸取動作需小心果斷，避免白色物體飄散開來；另一需注意的細節在於緩衝液的部分，BSA buffer 和 wash buffer 皆需在當天新鮮配製，且需經過孔隙 0.22 μ m 之濾器過濾後使用，放置過久的緩衝液容易導致背景值過高，也可能會因受污染而影響物質間的鍵結狀況。

此外在選擇每一個反應所需加入之核蛋白量時，需先考量所預期的實驗結果是轉錄因子活化量增加或降低，因所能偵測之核蛋白範圍極限在 50ng~1000ng (圖十、圖十一)，若預期活化量增加，則每個反應選擇加入 200ng 較合適，若預期活化量下降，則選擇 800ng，若為未知狀況，建議每一個反應選擇加入 500ng 核蛋白量，倘若加入核蛋白量太過或不及，可能造成結果顯示不明顯而無法判斷真實狀況，例如在活化劑反應下，若每個反應加入 800ng 核蛋白，則可能因實際活化量已超過偵測極限而無法判斷。

目標轉錄因子特定結合的核酸序列組成也會影響實驗結果，Wang 於 2003 年所發表的文獻中也針對這部分作了探討[60]，不同的轉錄因子、不同的環境、不同的物種來源可能會有不同的特異結合序列，因此在實驗進行前，應針對目標轉錄因子背景資料作徹底的調查，選擇最適合的序列作為材料；另外蛋白質在抽取過程中，若受到核酸酶或磷酸酶的污染皆會使核酸降解，造成接合的失敗，因此在抽取蛋白質的溶液配製上需注意蛋白酶抑制劑的選擇。抗體的特異性也決定了分析值是否受到非專一性鍵結的影響，因此在抗體的選擇上需選擇單株抗體以避免交互連結作用 (cross-reaction) 的產生。

於本研究中，我們發展出一新型微粒子免疫分析法 (MIA-TF) 用於偵測轉錄因子之活性，此方法不僅具有靈敏度佳及檢測快速等優點，更可發展成為多方偵測目標的高生產力系統，由種種層面看來，MIA-TF 實為一相

當具有潛力的檢測方式，未來可成為學術上研究轉錄因子之一有力的工具。



第八章 參考文獻

1. Latchman, D.S., *Eukaryotic Transcription Factors*. 1995.
2. Evan, G.I., et al., *Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein*. *Cell*, 1992. **69**(1): p. 119-28.
3. Little, C.D., et al., *Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines*. *Nature*, 1983. **306**(5939): p. 194-6.
4. Pandolfi, P.P., *Transcription therapy for cancer*. *Oncogene*, 2001. **20**(24): p. 3116-27.
5. Shen, Z., et al., *Multiple transcription factor profiling by enzyme-linked immunoassay*. *Biotechniques*, 2002. **32**(5): p. 1168, 1170-2, 1174 passim.
6. Liu, P.Q., et al., *Isogenic human cell lines for drug discovery: regulation of target gene expression by engineered zinc-finger protein transcription factors*. *J Biomol Screen*, 2005. **10**(4): p. 304-13.
7. Fried, M. and D.M. Crothers, *Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis*. *Nucleic Acids Res*, 1981. **9**(23): p. 6505-25.
8. Delage, V., et al., *Microtiter plate immunoenzymometric assay for estrogen receptor*. *Clin Chem*, 1996. **42**(12): p. 1955-60.
9. Nordeen, S.K., *Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers*. *Biotechniques*, 1988. **6**(5): p. 454-8.
10. Nolan, J.P. and F. Mandy, *Multiplexed and microparticle-based analyses: quantitative tools for the large-scale analysis of biological systems*. *Cytometry A*, 2006. **69**(5): p. 318-25.
11. Matsui, T., et al., *Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II*. *J Biol Chem*, 1980. **255**(24): p. 11992-6.
12. Mitchell, P.J. and R. Tjian, *Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins*. *Science*, 1989. **245**(4916): p. 371-8.
13. Buratowski, S., et al., *Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II*. *Cell*, 1989. **56**(4): p. 549-61.
14. Lewin, B., *Genes VIII*. 2004: Pearson Education International.
15. Karin, M. and E. Gallagher, *From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance*. *IUBMB Life*, 2005. **57**(4-5): p. 283-95.
16. Pulverer, B.J., et al., *Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases*. *Nature*, 1991. **353**(6345): p. 670-4.

17. O'Hagan, R.C., et al., *The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades*. *Oncogene*, 1996. **13**(6): p. 1323-33.
18. Davis, R.J., *Transcriptional regulation by MAP kinases*. *Mol Reprod Dev*, 1995. **42**(4): p. 459-67.
19. Aliaga, J.C., et al., *Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(3 Pt 1): p. G631-41.
20. Dunn, K.L., et al., *The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling*. *Biochem Cell Biol*, 2005. **83**(1): p. 1-14.
21. Khazaie, K., et al., *EGF promotes in vivo tumorigenic growth of primary chicken embryo fibroblasts expressing v-myc and enhances in vitro transformation by the v-erbA oncogene*. *Oncogene*, 1991. **6**(1): p. 21-8.
22. Rimokh, R., et al., *A chromosome 12 coding region is juxtaposed to the MYC protooncogene locus in a t(8;12)(q24;q22) translocation in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1991. **3**(1): p. 24-36.
23. Semenza, G., *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1*. *Biochem Pharmacol*, 2002. **64**(5-6): p. 993-8.
24. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
25. Thrash-Bingham, C.A. and K.D. Tartof, *aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia*. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(2): p. 143-51.
26. Sen, R. and D. Baltimore, *Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism*. *Cell*, 1986. **47**(6): p. 921-8.
27. Escarcega, R.O., et al., *The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer*. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2007. **19**(2): p. 154-61.
28. Luo, J.L., H. Kamata, and M. Karin, *IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(10): p. 2625-32.
29. Luo, J.L., H. Kamata, and M. Karin, *The anti-death machinery in IKK/NF-kappaB signaling*. *J Clin Immunol*, 2005. **25**(6): p. 541-50.
30. DiDonato, J., et al., *Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(4): p. 1295-304.

31. Beg, A.A. and A.S. Baldwin, Jr., *The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors*. Genes Dev, 1993. **7**(11): p. 2064-70.
32. Osborn, L., S. Kunkel, and G.J. Nabel, *Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2336-40.
33. Karin, M., *The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27339-42.
34. Lewis J, K., *Principles of Cancer Biology*. 2006.
35. Garg, A. and B.B. Aggarwal, *Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development*. Leukemia, 2002. **16**(6): p. 1053-68.
36. Burnette, W.N., "*Western blotting*": *electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
37. Ludwig, L.B., B.J. Hughes, and S.A. Schwartz, *Biotinylated probes in the electrophoretic mobility shift assay to examine specific dsDNA, ssDNA or RNA-protein interactions*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(18): p. 3792-3.
38. Engvall, E. and P. Perlman, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.
39. Jagelska, E., et al., *New ELISA technique for analysis of p53 protein/DNA binding properties*. J Immunol Methods, 2002. **267**(2): p. 227-35.
40. Wang, J.K., et al., *Assay of DNA-binding proteins with a dsDNA-coupled plate*. Clin Biochem, 2006. **39**(2): p. 167-75.
41. Wang, J., et al., *Exonuclease-mediated ELISA-like assay for detecting DNA-binding activity of transcription factors: measurement of activated NF-kappaB*. Biotechniques, 2006. **41**(1): p. 79-88, 90.
42. Brasier, A.R., J.E. Tate, and J.F. Habener, *Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines*. Biotechniques, 1989. **7**(10): p. 1116-22.
43. Drouet, C., A.N. Shakhov, and C.V. Jongeneel, *Enhancers and transcription factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary macrophages*. J Immunol, 1991. **147**(5): p. 1694-700.
44. Smith, D.L. and B.J. Morris, *Transient expression analyses of DNA extending 2.4 kb upstream of the human renin gene*. Mol Cell Endocrinol,

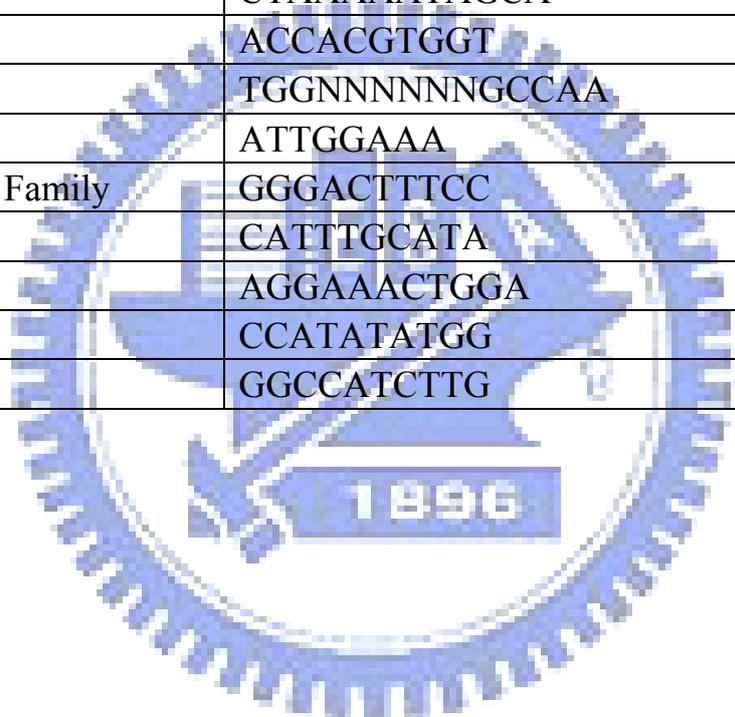
1991. **80**(1-3): p. 139-46.
45. Hertweck, M. and R. Baumeister, *Automated assays to study longevity in C. elegans*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(1): p. 139-45.
46. Vignali, D.A., *Multiplexed particle-based flow cytometric assays*. J Immunol Methods, 2000. **243**(1-2): p. 243-55.
47. Horan, P.K. and L.L. Wheeler, Jr., *Quantitative single cell analysis and sorting*. Science, 1977. **198**(4313): p. 149-57.
48. Dunn, P.A. and H.W. Tyrer, *Quantitation of neutrophil phagocytosis, using fluorescent latex beads. Correlation of microscopy and flow cytometry*. J Lab Clin Med, 1981. **98**(3): p. 374-81.
49. Lisi, P.J., et al., *A fluorescence immunoassay for soluble antigens employing flow cytometric detection*. Clin Chim Acta, 1982. **120**(2): p. 171-9.
50. Best, L.M., et al., *Serological detection of Helicobacter pylori by a flow microsphere immunofluorescence assay*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(9): p. 2311-7.
51. McHugh, T.M., et al., *The sensitive detection and quantitation of antibody to HCV by using a microsphere-based immunoassay and flow cytometry*. Cytometry, 1997. **29**(2): p. 106-12.
52. McHugh, T.M., et al., *Flow cytometric detection and quantitation of immune complexes using human C1q-coated microspheres*. J Immunol Methods, 1986. **95**(1): p. 57-61.
53. Yang, L., D.K. Tran, and X. Wang, *BADGE, Beads Array for the Detection of Gene Expression, a high-throughput diagnostic bioassay*. Genome Res, 2001. **11**(11): p. 1888-98.
54. Fuja, T., S. Hou, and P. Bryant, *A multiplex microsphere bead assay for comparative RNA expression analysis using flow cytometry*. J Biotechnol, 2004. **108**(3): p. 193-205.
55. Carson, R.T. and D.A. Vignali, *Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay*. J Immunol Methods, 1999. **227**(1-2): p. 41-52.
56. Kettman, J.R., et al., *Classification and properties of 64 multiplexed microsphere sets*. Cytometry, 1998. **33**(2): p. 234-43.
57. Li, J.L., et al., *An optimized assay for transcription factor NF-kappaB with dsDNA-coupled microplate*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2007. **55**(1): p. 31-7.
58. de Jager, W. and G.T. Rijkers, *Solid-phase and bead-based cytokine immunoassay: a comparison*. Methods, 2006. **38**(4): p. 294-303.

59. Winblade, N.D., et al., *Sterically blocking adhesion of cells to biological surfaces with a surface-active copolymer containing poly(ethylene glycol) and phenylboronic acid*. J Biomed Mater Res, 2002. **59**(4): p. 618-31.
60. Wang, J., et al., *DNA microarrays with unimolecular hairpin double-stranded DNA probes: fabrication and exploration of sequence-specific DNA/protein interactions*. J Biochem Biophys Methods, 2003. **55**(3): p. 215-32.



附錄一、常見轉錄因子之結合序列

Transcription factor	Core binding sequence
AP-1	TGAGTCA
AP-2 Binding Element	GCCCCAGGC
CRE-ATF1	TGACGTCA
CREB binding Element	TTACGTAA
EGR	GCGTGGGCG
GATA	TCAGATAAGA
HIF	TACGTG
MEF-2	CTAAAAATAGCA
Myc-Max	ACCACGTGGT
NF-1	TGGNNNNNNGCCAA
NFAT	ATTGGAAA
NFkB Gene Family	GGGACTTTCC
Octamer	CATTTGCATA
PPAR	AGGAAACTGGA
SRE	CCATATATGG
YY1	GGCCATCTTG



附錄二、實驗內使用之核酸片段序列

*HBS

Biotin-gcatcaagcttggtagcgcggatccactagtaacggcccgccagtgctggaattcggcttgttg
agtgttacgtgtgtgctccccaggcattggttgttgagtgtacgtgtgtgctccccaggcatggttgttgagtg
tacgtgtgtgctccccaggcatggttgttgagtgtacgtgtgtgctccccaggcatggttgttgagtgtacgtg
gtgctccccaggcatggttgttgagtgtacgtgtgtgctccccaggcatggttgttgagtgtacgtgtgtgctc
ccccagacgtatatacgtatataagccgaattctgcagatatcगतagct

cHBS

atttagtgacactatagaataactcaagctatgcatcaagcttggtagcgcggatccactagtaacggcccgcc
agtgtgctggaattcggcttgttgagtgtacgtgtgtgctccccaggcattggttgttgagtgtacgtgtgtgct
ccccaggcatggttgttgagtgtacgtgtgtgctccccaggcatggttgttgagtgtacgtgtgtgctccccag
gcatggttgttgagtgtacgtgtgtgctccccaggcatggttgttgagtgtacgtgtgtgctccccaggcatgg
ttgttgagtgtacgtgtgtgctccccagacgtatatacgtatataagccgaattctgcagatatcगतagct



***NFκB**

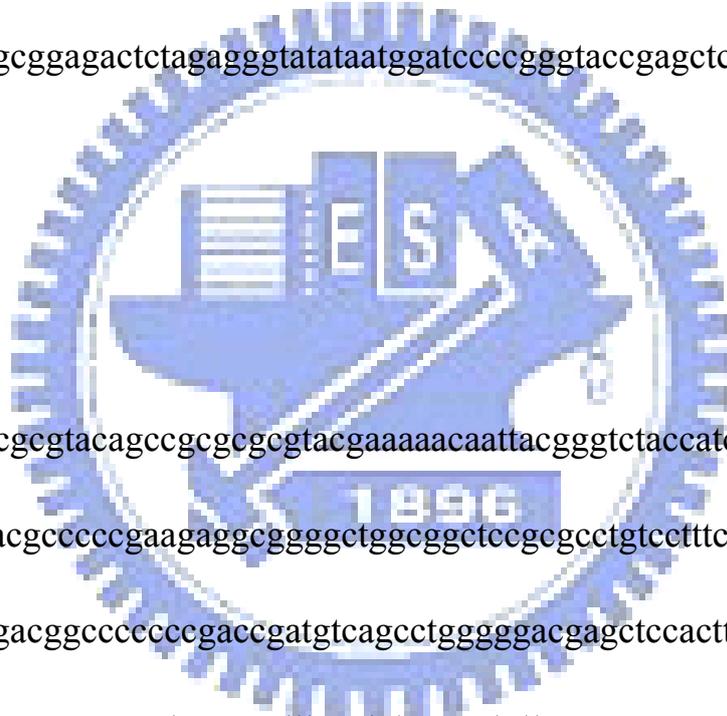
Biotin-tcatgtctggatccaagctaggggactttccgcttgggactttccgctgggactttccgctgggact
ttccgctgggactttccgcgagactctagagggtatataatggatccccgg

cNFκB

aaatacgcgtccaagctaggggactttccgcttgggactttccgctgggactttccgctgggactttccgct
gggactttccgcgagactctagagggtatataatggatccccgggtaccgagctcgaattcaccatggtgagc
aagcagatcc

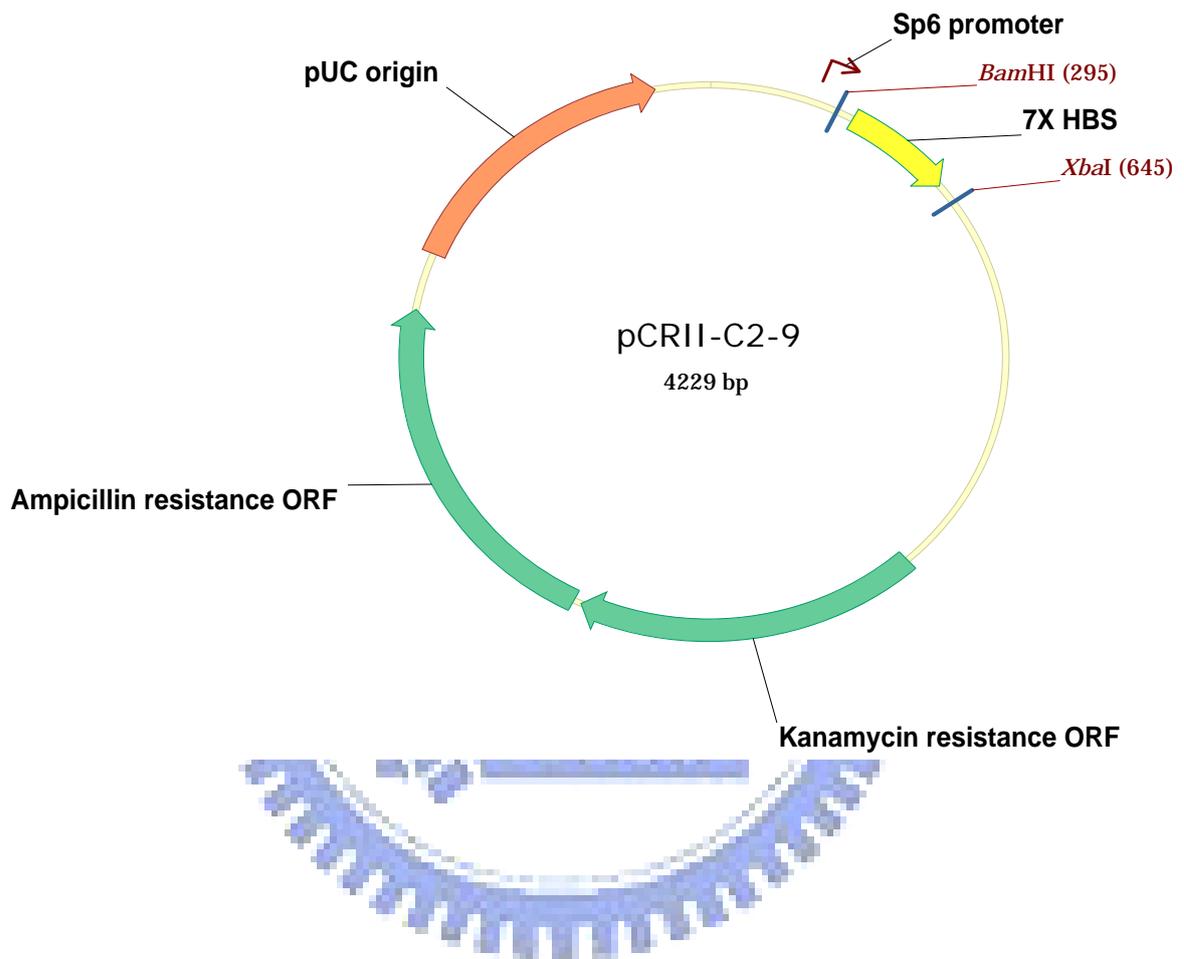
VP16

tatcctgcagtccgcgtacagccgcgcgtacgaaaaacaattacgggtctaccatcgagggcctgctcgatctc
ccggacgacgacgccccgaagaggcgggctggcggctccgcgcctgtccttctccccgcgggacacag
cgcagactgtcagcggccccccgaccgatgtcagcctgggggacgagctccacttagacggcgaggacgtgg
cgatggcgcgatgccgacgcgctagacgatctgatctggacatgttgggggacggggattccccgggtccggga
ttacccccacgactccgccccctacggcgctctggatatggccgacttcgagtttgagcagatgtttaccgatgc
ccttgaattgacgagtacggtgggtagctcgaggta

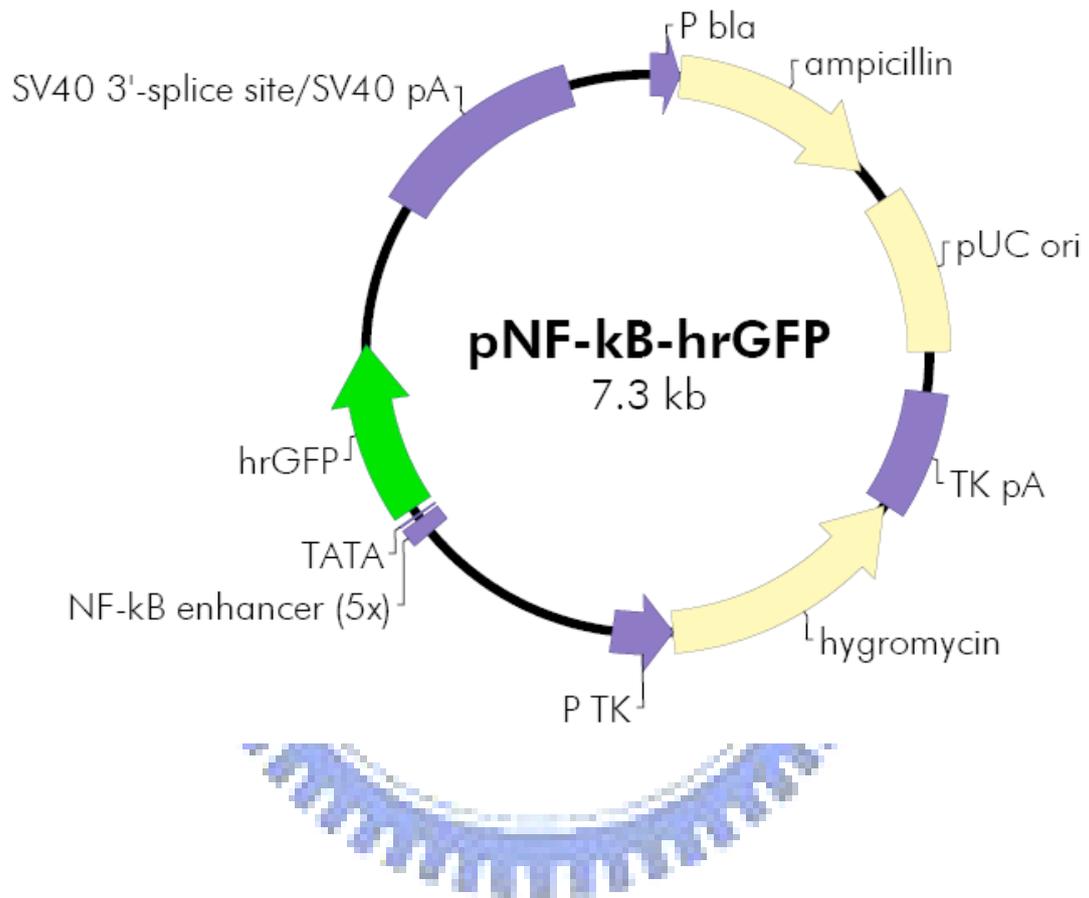


附錄三、質體圖示

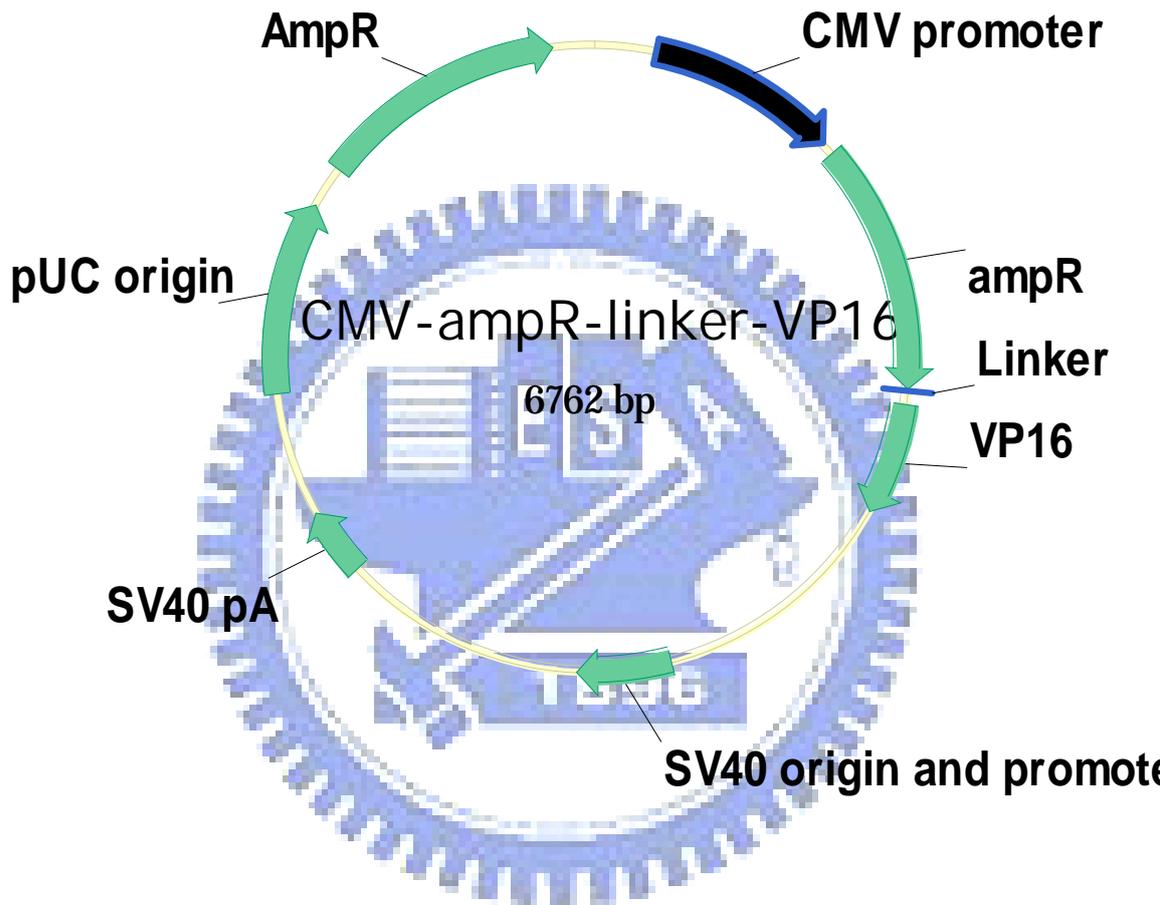
1. pCRII-C2-9



2. pNF-kB-hrGFP



3. CMV-ampR-linker-VP16



4. ARE-hrGFP

