

國立交通大學

分子醫學與生物程研究所

碩 士 論 文

Securin 與細胞週期調控蛋白質之交互作用能力探討

Intermolecular Study of the Interaction between Human
Securin and Cell Cycle Regulator

研究生：何昌翰

指導教授：張家靖 教授

中 華 民 國 一 百 年 七 月

Securin 與細胞週期調控蛋白質之交互作用能力探討
Intermolecular Study of the Interaction between Human Securin and Cell Cycle
Regulator

研究生：何昌翰 Student：Chang-Han Ho

指導教授：張家靖 Advisor：Chia-Ching Chang

國立交通大學

分子醫學與生物工程研究所

碩士論文

A Thesis

1896

Submitted to Institute of Molecular Medicine and Bioengineering

College of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

In partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master in
Molecular Medicine and Bioengineering

July 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一百年七月

中文摘要

人類 Securin 蛋白質是一個具有 202 個胺基酸，無穩定結構的多功能性蛋白質。前人研究顯示，Securin 在細胞內扮演的角色有(1) 調控姐妹染色體正常地分離 (2)參與細胞自我修復 (3)調控細胞自我凋零 (4)調節細胞週期的行進以及 (5)調控細胞分化等。由於 Securin 擁有這樣多重要性的功能，許多的研究也發現，在許多腫瘤細胞中，諸如腦下垂體癌、肺癌、乳癌、大腸癌等等，可發現到 securin 高度表現的現象。Securin 蛋白質有兩種後修飾：分別為磷酸化與泛素化作用。前者目前僅知與細胞分裂調控，以及可能與細胞增生及分化有關聯；後者則與 securin 的降解作用有關。為了釐清 securin 與多種細胞週期相關蛋白質之作用及磷酸化對 securin 的功能之影響，我們利用 Erk2 酵素將 securin 磷酸化，以遠西方墨點法探討磷酸化修飾與未修飾的 securin，與各個細胞週期調控蛋白質交互作用力的變化。結果顯示，磷酸化後的 securin 與數種細胞週期調控蛋白質之交互作用能力降低。此外，我們利用電化學感測的方式，探討 securin 磷酸化對 p53 結合能力變化。我們發現，磷酸化的 securin，亦會因此失去與 p53 交互作用的能力，因而促使 p53 被活化而啟動細胞自我凋零的機制。藉由本研究我們更清楚的解析 securin 在細胞內之功能。



英文摘要

Human securin is an intrinsically disordered, protein with 202 amino acids. Previous studies showed that securin played important roles in separation of sister chromatids, DNA repair, apoptosis, cell cycle progression, and cell differentiation. The overexpression of securin is one of the key issues for cancer development, such as in the case of pituitary tumor, lung cancer, breast cancer, and colon cancer. There are two types of post-translational modification of securin, phosphorylation and ubiquitylation. Securin phosphorylation may participate in the function of cell mitosis, cell proliferation, and cell differentiation, but the details mechanism remain unknown. Ubiquitylation is highly related to the degradation of securin. In order to reveal the binding affinity changes among securin and cell cycles regulatory proteins, securin has been phosphorylated by Erk2 kinases. Meanwhile, six cell cycle related proteins have been cloned and expressed in this study. The binding ability assay has been carried out by far western blot method. Moreover, the binding analysis between specific DNA promoter sequence and p53 has been analysed by impedance spectroscopy (EIS). The results indicated that p53 lost bax promoter binding ability by interacting with securin, but not for the phosphorylated one. In summary, based on study, the intermolecular interaction of securin have been revealed clearly.

誌謝

秋意濃厚的下午，看著這篇臻至完稿的論文，想起過去的點點滴滴，就會了解這兩年碩班旅程中，要感謝的人竟是如此的多。而短短的一篇誌謝文，又怎麼能完全表達心中那訴說不盡的感謝呢？或許就如國小課文說的：「要感謝的人太多了，不如就感謝天吧！」對於一個基督徒來說，我想就是感謝主吧！

首先感謝指導老師，張家靖老師從大學三年級到現在對我的指導與教誨，整整四年中，沒有老師提供的協助，就沒有這本論文。如果從大三準備一本小冊子好好地書寫的話，一定可以將張老師曾說過的話寫成一本語錄。在這裡要對老師致上最真誠的謝意。同時，也要感謝口試委員牟中瑜老師、陳企寧老師、以及李明道老師在口試上給予的指導。

實驗室內，最首要感謝的是朱學亮大學長，真是不好意思兩年內老是扯你後腿，給你添不少麻煩，也感謝你總是有耐心地給予指教與建議，也祝你今年順利畢業！謝謝鄭博士與曾博士給與實驗上的指導，還有茶餘飯後的經驗談，從你們的生活經歷真的學到了很多未來所要面對的課題。謝謝李氏夫婦實驗上的指導，以及每天生活所需的供應以及協助，還有生活上的一些關懷與鼓勵。感謝偉哥、虹瑋學姐、娟姐陪伴這兩年的碩班生活，沒有你們這兩年一定相當枯燥乏味，也祝你們未來的旅程都能順利發展，財源滾滾來。也要謝謝承希學弟的幫忙，一定會請你吃到麥當勞的啦！

實驗室外，感謝弟兄之家的弟兄姊妹們這兩年來的照顧。謝謝遠在澳洲的達恩叔、結婚三年的帝宇叔，當年的晨興餵養至今仍然印象深刻，未來還真期待與你們一同聚餐。感謝彥興、卓誠、建綱、韋任、以及均宇，兩年來給予我不少鼓勵，所謂「跌倒也要跌在你們中間」，我是真心地這樣期許著。感謝弟兄之家其他弟兄姊妹們，這段期間常常去煩你們，真感謝你們耐心地聽著我胡言亂語，哈。感謝社區弟兄姊妹：宗賓弟兄一家人、心桃弟兄一家人、碧杏姐一家人、志光弟兄一家人、逢弟兄一家人、文進弟兄一家人、銀杏姐一家人等等等等，這兩年來給我另一個家的感覺。還有其他的服侍者，也感謝你們的鼓勵。如今想來，或許我們該去拍一部「那些年，我們一起追的主耶穌。」

無論有多少不可知的變因，相信這兩年的牽絆把我們深深的繫在一起，未來某日某月，我們必定還會再遇到彼此。那時，就讓這兩年的點點滴滴，成為我們一起開懷大笑的話題吧。

珍重再見了，大家，珍重再見。

2011/09/13

何昌翰致謝

目錄

中文摘要	I
英文摘要	II
誌謝	III
目錄	IV
表目錄	VI
圖目錄	VII
縮寫表	IX
第一章、緒論	1
1-1 研究動機	1
1-2 細胞週期調控	1
1-3 人類 securin 蛋白質介紹	3
1-3.1 人類 securin 蛋白質的發現	3
1-3.2 人類 Securin 蛋白質的表現與調控	4
1-3.3 人類 securin 蛋白質的結構	4
1-3.4 人類 securin 蛋白質的功能	5
1-4 Securin 降解與磷酸化	6
1-5 與 Securin 交互作用的蛋白質介紹	7
RPS10a	7
PP2A 與 CDC14a	7
Histone 4j	9
CDC20	9
BCL2A1	10
p53	10
第二章、實驗策略與目的	12
第三章、實驗材料及方法	13
3-1 目標基因建構與鑑定	13
3-1.1 基因載體的來源：	13
3-1.2 引子設計	13
3-1.3 表現質體之建構	14
TA cloning	14
限制酶切 cloning (Enzyme Digestion)	15
反轉錄 cloning	15
3-2 目標基因蛋白質製備	16
IPTG 誘導目標蛋白質大量表現	17
蛋白質摺疊	17
His-tag 純化	17

3-3 遠西方墨點法	17
3-4 Securin 磷酸化	18
3-5 圓二色旋光光譜儀 (Circular Dichroism, CD).....	18
3-6 紫外光誘使細胞凋亡實驗：	19
3-7 鎳離子導電 DNA 製備：	19
3-8 電化學感測：	20
循環伏安法 (Cyclic Voltammetry, CV).....	20
電化學阻抗分析頻譜 (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS).....	21
3-9 Bradford 蛋白質偵測技術	24
第四章、實驗結果	26
4-1 表現基因之建構及蛋白質表現.....	26
TA Cloning 結果：	28
Histone 4j:	28
PP2AB55 :	30
CDC20:.....	32
RT Cloning 結果:	34
酵素酶切 cloning 結果：	39
Securin His-tag 純化結果：	42
4-2 Securin 的磷酸化與其結構與其結構變化：	44
4-3 遠西方墨點法 (Far Western)結果:.....	46
4-4 Securin 磷酸化對 p53 鍵結能力的影響.....	53
4-5 EIS 結果—磷酸化與未磷酸化 securin 蛋白質對 p53 鍵結 Bax 啟動子基因的影響	55
第五章、討論	59
5-1 各基因與蛋白質純度、序列之分析.....	59
5-2 Secuirn 磷酸化的結構變化.....	60
5-3 遠西方墨點法蛋白質交互作用	61
Securin 與 RPS10a	62
CDC20	63
BCL2A1	63
PP2AB55 與 CDC14a	63
5-4 p53 蛋白質與 securin 磷酸化對細胞自我凋零的影響	64
5-5 電化學感測量測 securin 磷酸化與 p53 啟動細胞凋亡機制的探討	64
5-6 總結	65
參考文獻	67

表目錄

表 1 Securin 磷酸化位置與其對應之磷酸化酵素、功能性整理表.....	6
表 2 PCR 用量表.....	14
表 3 RT-PCR 用量表.....	16
表 4 Securin 磷酸化試劑用量.....	18
表 5 CD 參數設定.....	19
表 6 所有基因的 clone 方式、表現質體與基因大小對照表.....	27
表 7 各株蛋白質表現分子量大小對照表.....	27
表 8 Securin 與蛋白質 CDC20、p53、RPS10a 與 Histone 4j 交互作用 $V_{\max}$ 、 K_M 值與 n 值 表.....	49
表 9 未磷酸化與磷酸化後的 securin 與各個蛋白質交互作用 n 值表.....	51
表 10 未磷酸化與磷酸化後的 securin 與各個蛋白質交互作用的 K_M 值能力值表.....	51
表 11 未磷酸化與磷酸化後的 securin 與各個蛋白質交互作用的 $V_{\max}$ 值能力表.....	52
表 12 電化學感測—Bax 基因與 securin 反應參數表.....	55
表 13 電化學感測—Bax 基因與 p53 蛋白質反應參數表.....	56
表 14 電化學感測—Bax 基因與 securin + p53 混合液反應參數表.....	57
表 15 電化學感測—Bax 基因與 securin -P + p53 混合液反應參數表.....	57
表 16 電化學感測結果總整理.....	57

圖目錄

圖 1 細胞週期示意圖	2
圖 2 不同週期 SCF、APC/CDC20、APC/Cdh1 活性表與 securin 磷酸化、降解示意圖	3
圖 3 人類 securin 蛋白質的結構圖	5
圖 4 PP2A 結構示意圖	8
圖 5 CDC14a 結構圖	8
圖 6 Securin、PP2A 與 CDC14a 細胞週期調控示意圖	9
圖 7 APC/CDC20 降解 securin，調控細胞週期示意圖	10
圖 8 TA cloning 流程圖	15
圖 9 循環伏安法所施加的電位與時間變化示意圖	21
圖 10 循環伏安法氧化峰與還原峰示意圖	21
圖 11 Bare gold 與 DNA Randles 等校電阻示意圖	22
圖 12 Nyquist 圖譜與其代表之物理量	23
圖 13 裸金電極化學拋光 CV 圖	24
圖 14 TA cloning 可能造成反序的示意圖	26
圖 15 Histone 4j clone 表現質體	28
圖 16 Histone 4j TA cloning 結果	28
圖 17 pET30t-H4j 蛋白質表現膠體圖	29
圖 18 pET30t-PP2AB55 質體	30
圖 19 PP2AB55 TA cloning 結果	30
圖 20 PP2AB55 蛋白質表現—上清液與內涵體	31
圖 21 pET30t-CDC20 質體	32
圖 22 CDC20 TA cloning 結果	33
圖 23 CDC20 蛋白質表現—上清液與內涵體	33
圖 24 CDC14a RT-PCR 結果	34
圖 25 pET30t-CDC14a 質體	35
圖 26 CDC14a TA cloning 結果	35
圖 27 CDC14a 蛋白質表現—上清液與內涵體	36
圖 28 RPS10A RT-PCR 結果	37
圖 29 pET30t-RPS10A 質體	37
圖 30 RPS10A TA cloning 結果	38
圖 31 RPS10A 蛋白質表現—上清液與內涵體	38
圖 32 pET30t-BCL2A1 質體	39
圖 33 EcoR I 與 Xho I 酵素酶切結果	40
圖 34 pET30t-BCL2A1 菌落篩選	40
圖 35 BCL2A1 蛋白質表現—上清液與內涵體	41
圖 36 Securin 蛋白質表現質體圖	42

圖 37 His-tag 純化 securin 蛋白質結果.....	43
圖 38 Erk2 磷酸化 securin 的結果.....	44
圖 39 Mass 鑑定 securin 磷酸化結果圖	44
圖 40 磷酸化 securin 蛋白質與 securin 蛋白質 CD 圖	45
圖 41 點漬法確認與 securin 與 CDC20、p53、與 RPS10 的交互作用	46
圖 42 點漬法確認 securin 與 Histone 4j (H4j)交互作用	46
圖 43 Securin 蛋白質與 H4j 交互作用力偵測圖	47
圖 44 Securin 蛋白質與 CDC20 交互作用力偵測圖	47
圖 45 Securin 蛋白質與 p53 交互作用力偵測圖	48
圖 46 Securin 蛋白質與 p53、CDC20、RPS10a 與 H4j 交互作用力偵測圖	48
圖 47 點漬法探討 securin 與磷酸化後的 securin 對 CDC14a、BCL2A1、PP2A 交互作用的影響	49
圖 48 Erk2 磷酸化後的 securin 蛋白質與 BCL2A1 鍵結能力 Hill Plot 分析圖	50
圖 49 Erk2 磷酸化後的 securin 蛋白質與 CDC14a 鍵結能力 Hill Plot 分析圖	50
圖 50 Erk2 磷酸化後的 securin 蛋白質與 PP2A 鍵結能力 Hill Plot 分析圖	51
圖 51 細胞實驗探討 UV 造成的 p53 細胞凋零機制與 securin 的關係.....	54
圖 52 電化學感測—Bax 基因與 securin 蛋白質反應結果	55
圖 53 電化學感測—Bax 基因與 p53 蛋白質反應結果.....	56
圖 54 電化學感測—Bax 基因與 securin+p53 混合液反應結果.....	56
圖 55 電化學感測—Bax 基因與 securin 磷酸化+p53 混合液反應結果.....	57
圖 56 EIS 檢測各種蛋白質與 Bax 基因作用之比較圖	58
圖 57 Histone 4j 與 securin 交互作用影響細胞週期前進的假設圖	62
圖 58 Histone 4j 與 securin 鍵結影響 DNA 修復的可能機制圖	63
圖 59 p53 結構特性與功能	65
圖 60 Securin 磷酸化與否與各蛋白質交互作用功能性推測圖	66
圖 61 UV 照射誘使細胞走向自我凋零示意圖	66

縮寫表

APC	Anaphase promoting complex	細胞核分裂促進複合體
BCL2A1	BCL2 related protein A1	BCL2 相關蛋白 A1
CD	Circular Dichroism	圓二色旋光光譜儀
CDC20	Cell division cycle protein 20	細胞週期素 20
CDK1 or CDC2	Cyclin-dependent complex 1 or Cell division control protein 2	細胞週期依賴激酶
CDC14a	Cell division cycle 14 homolog A	細胞週期素 14A
CV	Cyclic voltammetry	循環伏安法
D box	Destruction box	降解序列
DTT	Dithiothreitol	二硫代蘇糖醇
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	乙烯二胺四乙酸
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy	電化學阻抗分析頻譜
EMSA	Electrophoretic Gel Shift Assay	電泳凝膠位移測定
Erk2	Extracellular signal-regulated kinase 2	細胞外信號調節激酶
IP	Immunoprecipitation	免疫沉澱法
PP2A	Serine/Threonine Protein phosphatase 2 A	Ser/Thr 蛋白質去磷酸酶
PBF	PTTG Binding factor	PTTG 結合因子
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶連鎖反應
RPS10A	40S Ribosomal protein S10A	核糖體 40S 次單原蛋白 10A
TBST	Tris Buffered Saline with Tween 20	含有 tween 20 的 Tris 緩衝液

縮寫表按英文字母排列

第一章、緒論

1-1 研究動機

癌症是一群不正常增生細胞形成的疾病。目前研究顯示，許多因子皆會造成癌症的形成，比如許多致癌化學物質[1-3]、放射線[4-6]、病毒感染[7, 8]、發炎反應[9]與人體荷爾蒙失調[10]等。研究上指出，這些致癌的因子主要是影響細胞週期的調控，導致細胞過度增生[11]。因此，能夠透徹地洞悉細胞週期蛋白質彼此的調控關係，是治療癌症的重要契機。在人體細胞中，securin 是一個致癌基因 (oncogene)[12-15]，主要功能為調控細胞週期[16, 17]與修復 DNA[18]。而在過去研究中，securin 也被發現在許多癌細胞中有大量表現的跡象，諸如腦下垂體癌[19]、甲狀腺癌[20]、乳癌[21]、卵巢癌[22]或是子宮頸癌[23]等等。我們為了全面性地探討 securin 與細胞週期調控上的機制關係，因而嘗試著建立一個 securin 與細胞週期交互作用蛋白質調控的角色，進一步地探討其分子間動態交互作用情形。我們期許藉由這樣的研究，能夠將此蛋白質與癌症的關聯性更加明朗化。

1-2 細胞週期調控

細胞週期主要可分為兩部分：細胞間期 (interphase)與細胞分裂期 (M phase)，而間期占了整個細胞期百分之九十的時間[24]。而在細胞接受生長因子調控前，大部分細胞接停留在 G_0 期，此時期細胞處於休息狀態。細胞間期可分為三個階段：

- G_1 期：細胞分裂完後細胞所進入的第一期。此時細胞中 RNA 與蛋白質持續地合成，然而 DNA 在此時期並未有複製的跡象。
- S 期：當 DNA 開始複製時，即進入了細胞 S 期。在此時期 DNA 含量由二倍體轉為四倍體。
- G_2 期：DNA 複製完成到細胞分裂之前的這段時間，我們稱為 G_2 期。在此時期細胞具有四倍體的 DNA 含量。

而在 M 期，則是細胞分裂的開始。此時期細胞逐步地將四倍體 DNA 轉移成兩個含有二倍體 DNA 的子細胞。M 期又可細分為前期 (prophase)、中期 (metaphase)、後期 (anaphase)與末期 (telophase)。在分裂前期，細胞的 DNA 逐步地聚集成染色體 (chromosome)，受到 cohesin 蛋白質的连接而彼此成對地配對成姐妹染色體。而此時在接近細胞核附近，中心粒漸漸地形成中心體，並緩慢地移動到細胞核兩端。而在細胞中期，染色體會整齊排在細胞中心，同時兩端中心體的紡錘絲會緩慢地向染色體中心點 centromere 移動。當紡錘絲觸碰到 centromere 的瞬間，即進入了分裂後期。姐妹染色體連接蛋白質 cohesin 受到 separase 的分解，同時紡錘絲逐步地將姐妹染色體分開到細胞兩端。當姊妹染色體移動到細胞兩端，即進入了末期。此時期細胞中隔開始形成，核膜逐步生成，染色體逐漸轉變為較低密度的染色質 (chromatid)，降解細胞分裂時所需的蛋白質等，最後分裂為兩個子細胞。整個細胞週期的時間大約為 18-24 個小時，其中 G_1 期約占了 6-12 小時的時間，S 期約 6-8 小時， G_2 期的停留

時間則相當短，M 期通常小於 1 小時 (圖 1)[25]。

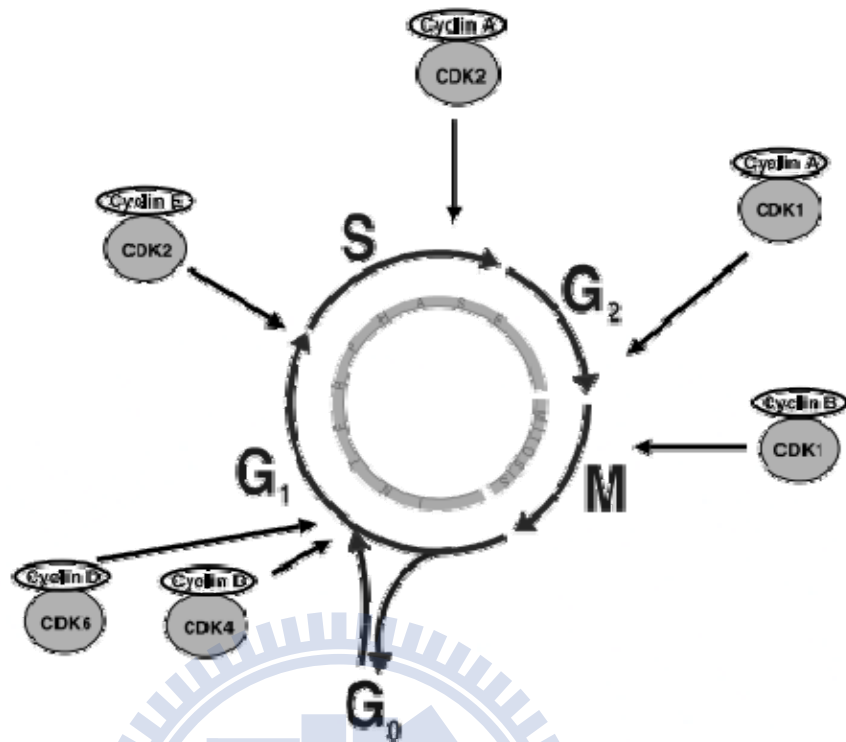


圖 1 細胞週期示意圖 [11]

細胞期可分為休息期 G₀，間期 G₁、S、G₂，與 M 期。調控細胞週期的行進則由不同的 Cyclin 蛋白與 CDK 蛋白所調控。

在許多細胞週期的調控蛋白質上，有兩類蛋白質在調控細胞週期行進扮演重要角色，即為 cyclin dependent kinase (CDK) 與 Cyclin 蛋白質[26]。CDK 是 serine/threonine 蛋白質磷酸化酵素，其中有五種作用於細胞週期：G₁ (CDK4，CDK6 與 CDK2)，S (CDK2)，G₂ 與 M (CDK1)。這類蛋白質穩定存在於細胞週期中，與不同的 cyclin 蛋白質配對而受到活化[27]。在 G₁ 期，Cyclin D 與 CDK4、CDK6 刺激細胞合成蛋白質，當 Cyclin E 與 CDK2 結合後，細胞即進入了 S 期。而在進入 S 期，Cyclin E 的角色會被 Cyclin A 取代。而在細胞 G₂ 後期，Cyclin A 與 CDK1 鍵結促使細胞進入 M 期。而在 M 期的各階段則是由 Cyclin B 與 CDK1 所調控(圖 1)[27]。

細胞週期中，有兩個重要的蛋白質複合體掌管著細胞週期蛋白質的調控—SCF (Skp1/Cul1/F-box complex) 與 APC (Anaphase promoting complex)[28, 29]。在各個週期的轉換，兩複合體存在著「一關一開」的關係。當 M 期進入 G₁ 期時，抑制 APC 的 Emi1 蛋白質受到 SCF 的降解，活化 APC 與 CDC20、Cdh1 鍵結，降解 securin、cyclin B 等蛋白，使細胞由 M 期走向 G₁ 期。而 APC 的活化卻使得 SCF 受到抑制。而在 G₁ 進入 S 期時，APC 再度下降，SCF 活性上升降解 Cyclin E 與其他調控蛋白 p21^{Sik1}、p27^{Kip1}、p57^{Kip2}，原先與 Cyclin E 鍵結的 Cdk2 轉而與 Cyclin A 鍵結，使細胞進入 S 期。在細胞要進入 M 期，APC 活性再次升高，Cyclin A、Cyclin B 逐步接上 Cdk1，使細胞進入 M 期[29]。

而在整個細胞週期中，securin 的降解我們也可以歸納如圖 2：securin 的磷酸化

與非磷酸化都有可能遭受到降解作用，其中降解磷酸化的 securin 蛋白質為 SCF 複合體；而降解未受磷酸化的 securin 則為 APC/CDC20 與 APC/Cdh1 兩複合蛋白質[30, 31]。由前人的研究我們得知，SCF 複合體活躍時機在細胞的週期 G_1 、S 與 G_2 期；而 APC/CDC20 與 APC/Cdh1 的活性則各別在細胞分裂期的前、中期與後期、末期[29]。Securin 在進入細胞分裂期前是未受到磷酸化的，也因此部會受到 SCF 複合體的降解。而在其進入細胞分裂期則有部分受到了磷酸化反應。此部分受到磷酸化反應的蛋白質參與了細胞週期行進的任務，而也因為這樣的磷酸化，使 securin 不受 APC/CDC20 的降解。然而在中期要進入後期時，磷酸化後的 securin 受到 CDC14a 的作用而回復成未受磷酸化的狀態，因而遭受到 APC/CDC20 與後期 APC/Cdh1 的降解反應，使細胞週期向前。

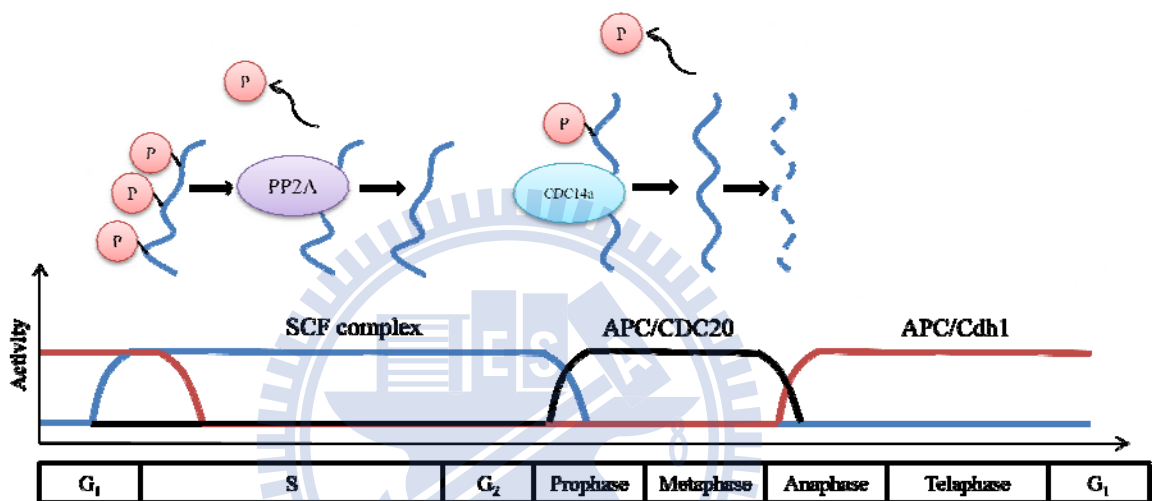


圖 2 不同週期 SCF、APC/CDC20、APC/Cdh1 活性表與 securin 磷酸化、降解示意圖

調控細胞週期行進的兩大複合體—APC 與 SCF。兩者的活性會決定細胞週期的轉換。圖中 securin 的磷酸化修飾與未修飾會決定 securin 的蛋白質是否受 APC 或 SCF 的降解。而 securin 的磷酸化會受 PP2A 與 CDC14a 的調控。

1-3 人類 securin 蛋白質介紹

1-3.1 人類 securin 蛋白質的發現

1997 年 Lin Pei 與 Shlomo Melmed 兩人比較大鼠正常腦下垂體細胞與腦下垂體癌細胞基因的表現時，發現表現於癌細胞內的基因，而將此基因轉殖於裸鼠纖維細胞 (NIH3T3) 細胞並大量表現時，會抑制細胞的增生，造成細胞轉型為腫瘤細胞。此基因因此被命名為 Pituitary Tumor Transforming Gene 1 (PTTG1)[32]。

1999 年，Zou 以人類 Esp1 蛋白質 (hEsp1 即為 separase，調控姐妹染色體) 做免疫沉澱實驗，發現兩株未知蛋白質 EAP1 與 EAP2，其分子量個別為 28 kDa 與 42 kDa。前者蛋白與先前 Lin Pei 所發現的 PTTG1 序列相同，證實了 PTTG1 會與 hEsp1 結合。後續，Zou 等人在序列分析上驗證了 PTTG1 即為人類 securin[12]。

繼 Lin Pei、Shlomo Melmed 與 Zou 等人之後，陸續有許多學者研究 securin 蛋白質。2000 年，Chen 等人利用人類 PTTG cDNA 做為 probe，以 Northern blot 的技術

偵測人類不同染色體是否存在 PTTG 同源性基因。研究上顯示，不只在四號染色體存在同源性基因(PTTG2)，於七號染色體(PTTG3)也有相同的結果。定序比對的結果顯示 PTTG2、PTTG3 與 PTTG1 各別有 91%至 89%的相似度，而兩者過量的表現也與腫瘤的產生有關係[13]。

1-3.2 人類 Securin 蛋白質的表現與調控

在人類正常的細胞組織內，securin 主要表現於腺體內，包括睪丸、胸線、小腸、胎盤以及脾臟。於肺臟、腦或胰臟也有少量表現的跡象[14, 33]。然而許多癌細胞被發現含有大量表現的 securin 蛋白質，諸如：前骨髓白血病細胞 (promyelocytic leukemia HL-60)、子宮頸癌細胞 (HeLa cell)、肺癌細胞 (A549)、肝癌細胞 (Hepatoma HepG2)、乳癌細胞 (MCF7)等[14, 33, 34]。

在 securin 的調控因子方面，雌性激素 (Estrogen)是目前最著名的調控激素。若是以雌性激素處理 NIH3T3 細胞，會促使 securin 蛋白質大量表現，並使得細胞分泌促乳激素 (prolactin)[35-37]。人體胰島素 (Insulin)是另外一個著名的調控因子[38, 39]。前人研究發現在乳癌細胞 (MCF7)加入胰島素，將使得 securin 蛋白質大量表現。其它如鈣離子濃度[40]、表皮細胞生長因子 (Epidermal Growth receptor, EGR)[41]、外來抗原[42]、Sp1 或 NF-Y[43]等，都有學者發現會促使 securin 蛋白質表現。這些研究顯示，securin 的表現會促使細胞走向細胞增生與分化。

1-3.3 人類 securin 蛋白質的結構

人類 securin 蛋白質目前確認為一個無特定構型的蛋白質[44]。其含有 202 個胺基酸，N 端與 C 端各別扮演不同角色。如圖 3 所示，securin 在 N 端含有兩個重要的摧毀訊息：一者為 D-box (序列為 RxxLxxxxN)；一者為 KEN-box (序列為 K-E-N-x-x-x-D/N)。前人研究指出，這兩個位置是「細胞核分裂後期促進複合體」(Anaphase promoting complex, APC)辨認的位置。在細胞分裂中期，APC 會與 Cdc20 蛋白質鍵結而活化功能，辨識任何含有 D-box 的蛋白質，並將之降解。而到了細胞分裂後期，Cdc20 蛋白會被 Cdh1 蛋白取代，此時 APC 會轉而辨識任何含有 D-box (Destruction box，序列為 RXXLXXXXN，為蛋白質降解訊號)或是 KEN-box (K-E-N 三個胺基酸序列，為另一個蛋白質降解訊號)的蛋白質[30, 45]。此項機制與細胞內 separase 活性有關。separase 在細胞中扮演分離姊妹染色體的重要角色，然其活性受到 securin 的抑制。因此，當細胞要由中期進入後期時，APC 會被活化並降解 Securin 蛋白，促使細胞週期向前運行[16, 46, 47]。在 securin 蛋白質的 N 端還有一段 DNA 結合區段 (DNA binding domain)，與 C 端的轉錄因子區段 (Transactivating domain) 擁有相同功能，能夠作用於 DNA 基因的啟動子，用以誘導下游基因的表現，諸如 p53、c-myc、Sp1 等[48, 49]。在 C 端方面，人類 securin 蛋白質含有兩個重要的 Proline-rich 片段，分別位於序列 163-166 (P-P-S-P)，以及 170-173 (P-S-P-P)。學者研究發現此處序列是 SH3 (Src homology binding domain 3)的結合位置。此段序列常出現在許多與訊息傳遞相關的磷酸酶中，如 Src3[50]、PI3 磷酸酶[51]或是 Ras GTPase

活化蛋白質[52]，是許多蛋白質鍵結的位置（如與細胞訊息傳遞以及腫瘤的形成息息相關[14, 53]）。

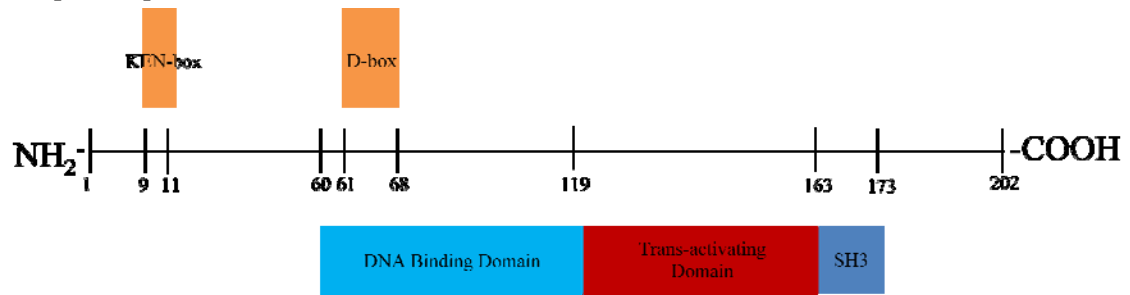


圖 3 人類 securin 蛋白質的結構圖

KEN-box 與 D-box 表示兩個 securin 降解辨識區塊。在 60 – 119 的序列為 securin 與 DNA 鍵結的位置，119-163 則為 securin 轉錄因子區段。

1-3.4 人類 securin 蛋白質的功能

1-3.4.1 Securin 與細胞週期的調控

除了前面所述，securin 調控姐妹染色體分離外[16, 46, 47]，也有學者們發現到 securin 在其它週期也有調控的作用。2007 年由 Melmed 率領的團隊利用 DNA 微陣列 (DNA microarray) 的技術篩選 securin 鍵結的蛋白質。他們發現在細胞 G₁ 期間，securin 會被表現出來，與 Sp1 蛋白質作用後，促使細胞由 G₁ 期進到 S 期[17]。此外，securin 蛋白質在細胞內存在量的多寡，也與 G₂/M 期轉換有所關聯[54, 55]。

1-3.4.2 Securin 與 DNA 修復

Securin 除了參與細胞週期的調控外，亦參與了其它重要的反應。2001 年 Francisco Romero 等人以酵母菌雙雜交 (Yeast Two-Hybrid) 的技術，證明 securin 參與了 DNA 修補機制的調節作用。當細胞內 DNA 雙股螺旋產生斷裂，securin 與 Ku70 蛋白的結合力下降，因而開啟了 Ku70/Ku80 DNA 雙股螺旋修補機制[18]。此表示 securin 的存在會抑制細胞 DNA 修復機制的啟動，讓細胞週期持續前進。

1-3.4.3 Securin 與細胞自我凋零

2000 年 Run 等人在人類胎盤細胞 JEG-3 大量表現 securin，發現到有 67% 的細胞會自我凋零而死亡，推測 securin 與細胞自我凋零機制息息相關[56]。2002 年，Bernal 等人以免疫沉澱法 (Immunoprecipitation, IP) 篩選與 securin 共同作用的蛋白質。他們發現到 securin 會與 p53 鍵結，抑制 p53 啟動下游一連串參與自我凋零基因的轉錄作用 (Transcription)[57]。然而也有人發現到，securin 會與 p53 基因上游的啟動子結合，使得 p53 蛋白質表現出來，造成細胞自我凋零[15, 56]。兩者調控的衝突與矛盾或許來自於表現量的差異，Bernal 所表現的 securin 蛋白質量少於後來學者的表現量，這也指出 securin 表現量多寡與細胞機制的調控相關[58]。

1-3.4.4 Securin 其它功能

近年的研究顯示, securin 也與血管新生 (Angiogenesis) 以及腫瘤轉移 (Metastasis) 有關[59, 60]。血管新生可說是現今研究腫瘤生長相當關切的議題。腫瘤生長達到一定數量時, 由於氧氣、所需之營養與生長因子的缺乏而難以增長[61]。因此, 腫瘤增生與入侵其它組織取決於週遭是否有足夠新生的血管。securin 在許多初期腫瘤被發現有大量表現的現象。此外, 在乳癌[60]、大腸癌[20]、甲狀腺癌[62]等細胞, securin 過度的表現都會造成癌細胞入侵的現象。這些證據都顯示 securin 與腫瘤生成的原因密不可分。

此外, securin 與細胞的分化也有相關聯性。1999 年 Lin Pei 利用酵母菌雙雜交的技術, 發現到 securin 會與 DnaJ 與 RPS10A 進行交互作用, 使細胞進行細胞分化機制[63]。

1-4 Securin 降解與磷酸化

截至目前為止的研究顯示, securin 的磷酸化與其功能性調控可說是息息相關(表 1)。在人類 securin 中, CDK1(或 Cdc2)會磷酸化 securin 第 165 的胺基酸 serine, 激活 securin 與 separase 的鍵結, 避免細胞太早進入細胞後期[64]。而在青蛙 securin 上, 第 3、16、66 號的磷酸化位置, 會抑制 securin 受到 APC/C 的降解作用[65]。另外, 第 165、183、187 也有人指出會受到 Cdc2 的磷酸化, 增加 securin 蛋白質的穩定性[66]。

Securin 的磷酸化除了細胞週期調控外, 也有研究發現 Erk2 與 DNA-PK 也都能磷酸化 securin 蛋白質[18, 67]。Erk2 磷酸化 securin 第 165 的胺基酸, 促使 securin 由細胞質進入細胞核, 並與下游基因的啟動子鍵結, 促使細胞增生。DNA-PK 也會磷酸化 securin 蛋白質, 然而目前僅推測此磷酸化的舉動與 DNA 的修復有關聯性, 實際的磷酸化位置與功能性仍待研究。

磷酸化位置	磷酸化酵素	重要性
3 (Threonine)	Cdc2	穩定 securin
16 (Threonine)	Cdc2	穩定 securin
66 (Threonine)	Cdc2	穩定 securin
165 (Serine)	Cdc2/Erk2	姊妹染色體分離
183 (Serine)	GSK-3 β	穩定 securin
187 (Serine)	CKII	穩定 securin

表 1 Securin 磷酸化位置與其對應之磷酸化酵素、功能性整理表

綜合上面所述, 我們可以統整 securin 會與以下蛋白質有所交互作用: Cyclin B、CDC20、CDC14a、PP2A、p53、DnaJ、RPS10a 與 separase 蛋白質。以下, 我們就本實驗所建構的蛋白質做進一步的介紹。

1-5 與 Securin 交互作用的蛋白質介紹

RPS10a

RPS10a，全名為 Ribosomal S10，為核糖體 40S 蛋白質組成單位之一[68]。過去的研究中指出，RPS10 參與了細胞增生[69-72]、分化[73]、與自我凋零機制[74]。而 RPS10a 被認為是啟動核糖體合成蛋白質的重要次單元[75]。RPS10a 於 1999 年發現會與 securin 有所交互作用[63]。目前僅推測 RPS10a 與 securin 作用功能為促進人體精細胞的發育，然至現今並未有其他學者證明這件事。現階段不清楚 securin 與 RPS10a 交互作用所影響的機制為何。

PP2A 與 CDC14a

PP2A 與 CDC14a 是兩種不同的去磷酸酶。PP2A 是 serine/threonine 去磷酸酶，主要由三個次單元構成，分別為 scaffolding protein (65 kDa), catalytic subunit (36 kDa) 與數種不同的 substrate subunit[76]。Scaffolding protein 如同支架一般，支撐整個 PP2A 酵素的蛋白質。Catalytic subunit 則是酵素催化中心。而 substrate subunit 則使得 PP2A 具有辨識不同受質的能力(圖 4)，而其中 B55 α 、B55 β 為文獻記載上，與 securin 有所交互作用的次單元[31]。PP2A 在細胞週期調控，細胞增生與訊息傳遞上扮演著相當重要的角色[77-79]。CDC14a 是一個 tyrosine 去磷酸酶，結構上分為兩塊區塊：A 區塊位於 N 端，目的為與受質做專一性的鍵結；B 區塊位於 C 端，是主要的酵素催化中心[80]。在 C 端含有一段出核訊息 (Nuclear export signal, NES)，使得 CDC14a 能夠進出核孔(圖 5)。CDC14a 蛋白質功能主要是調控細胞週期。CDC14a 在細胞進入後期前，活性受到 Net1 蛋白質的抑制。細胞進入後期後，Net1 蛋白質受到降解，釋出有活性的 CDC14a，活化 APC/Cdh1 複合體，降解細胞分裂期間參與反應的蛋白質[81]，使細胞回歸 G₁ 期。

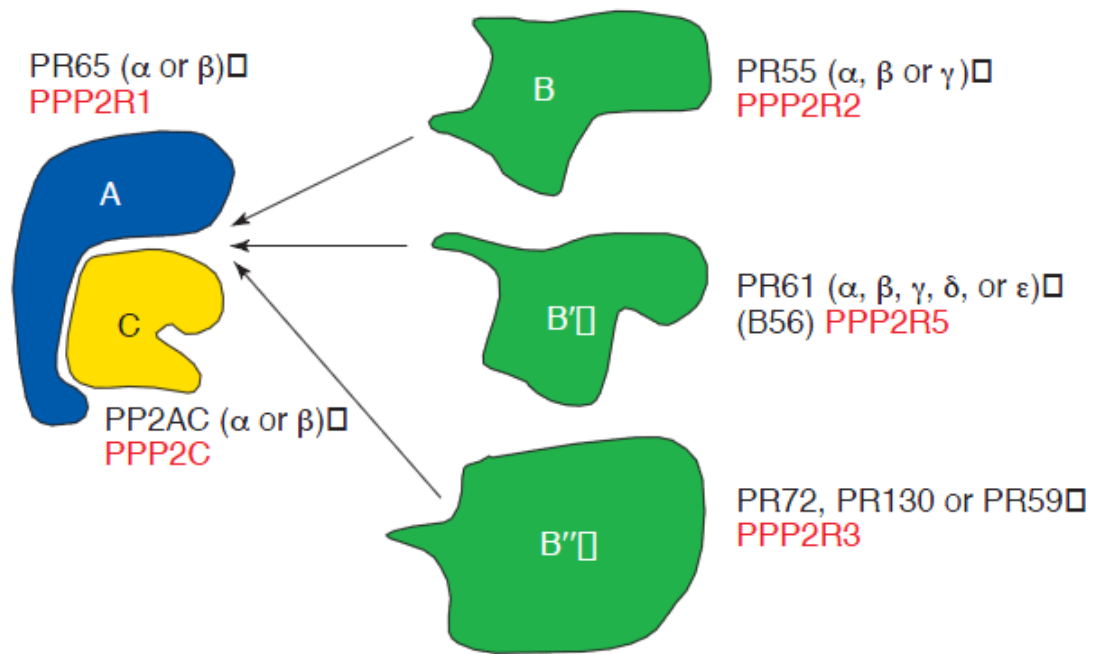


圖 4 PP2A 結構示意圖

A 為 scaffolding subunit，C 為 catalytic subunit，B 則為不同的 substrate subunit。圖中黑色字體表示基因名稱， α 、 β 、 γ 等符號表示同源蛋白質(圖中方框填寫的即為這些符號，加上不同符號表示不同蛋白質名稱)。紅色部分則為基因分類名稱[82]。

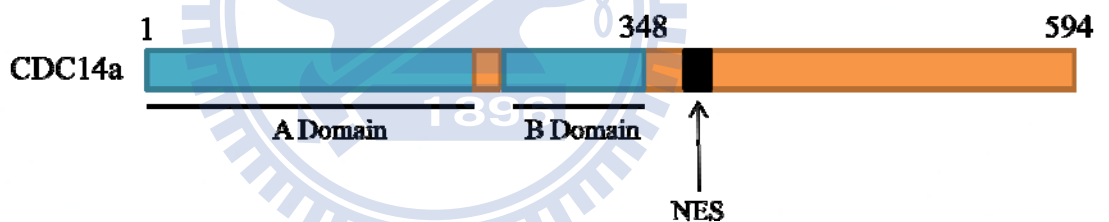


圖 5 CDC14a 結構圖。A 與 B 區塊各別為受質接收區與酵素活化中心，NES 則為出核訊息[80]。

與 securin 的交互作用上，PP2A 與 CDC14a 的作用目的不盡相同。在細胞核內，CDC14a 與磷酸化後的 securin 蛋白質鍵結，使 securin 失去與 separase 蛋白質鍵結的能力，並使得 APC/CDC20 能夠辨識並降解 securin 而促使細胞週期向前推移進入細胞分裂後期[65]。PP2A 主要是避免 securin 於細胞進入分裂中期前過度磷酸化而導致 securin 降解，以確保細胞進入分裂中期前，能保有一定數量的 securin 抑制 separase 蛋白質的反應[31]。

此外，PP2A 與 CDC14a 兩者也有調控的關係。PP2A 會抑制 Net1 的磷酸化，導致 CDC14a 無法被釋放，因而抑制了細胞進入後期。如圖 6 所示，在細胞進入後期前，CDC14a 的活性受到 Net1 蛋白質的抑制而無法發揮功能。而當細胞週期要進入後期時，Net1 將被磷酸化而降解，釋放出 CDC14a，使得 securin 去磷酸化，促使細胞進入細胞後期。

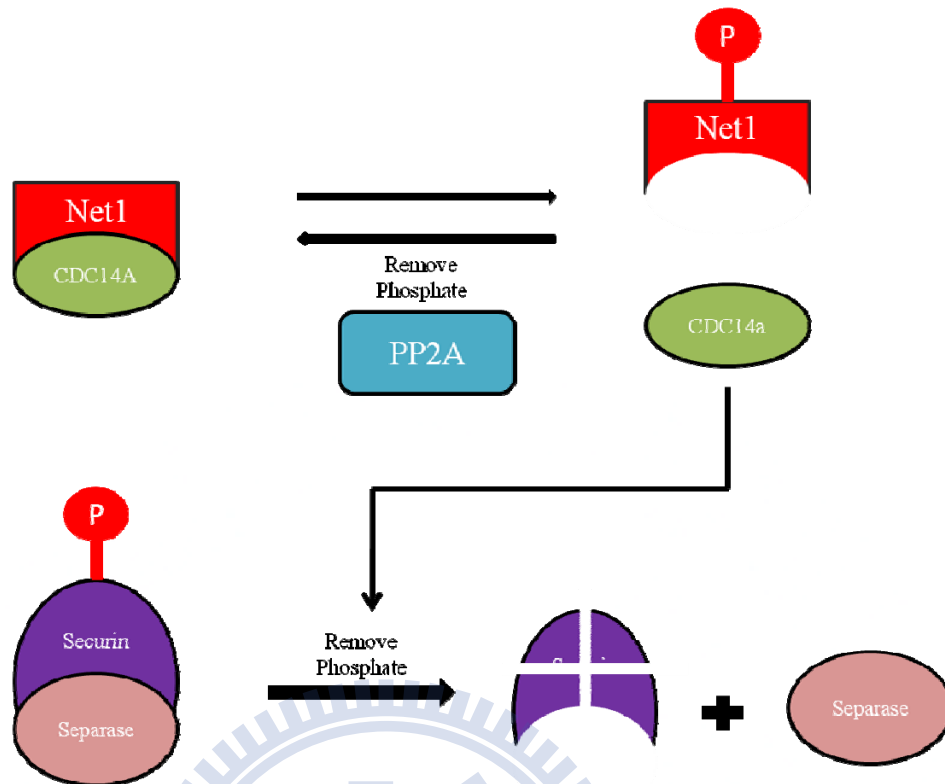


圖 6 Securin、PP2A 與 CDC14a 細胞週期調控示意圖

在細胞週期行進中，CDC14a 的活性與細胞週期的行進有所關聯。而 Net1 蛋白會抑制 CDC14a 的活性。Net1 蛋白的活性又受到 PP2A 的調控。

Histone 4j

Histone 4 (H4)是組成核小體 (nucleosome)結構的重要蛋白質之一，Histone 4j (H4j)是來自 Histone 4 的同源蛋白質。核小體主要由 H2A、H2B、H3 與 H4 所構成。在核小體的形成過程中，會先由 H3 與 H4 形成一個四聚體 (tetramer)，與部分 DNA 進行纏繞後，H2A 與 H2B 的所形成的兩個雙體 (Dimer)才各別接上 DNA，形成一個緊密纏繞的八隅體 (Octamer)[83]。而在核小體形成過程中，Histone 蛋白質的後修飾往往扮演著重要的角色[84, 85]。其中 Histone 4j 在 N 端第 5、8、12、16 的 arginine 胺基酸為主要的後修飾位置，這些位置的乙醯化[86-88]、甲基化[89]、磷酸化[90] 等等，都會影響 Histone 的功能：如 Histone 的轉錄與 DNA 的修復作用[86, 90]。此株蛋白值與 securin 的交互作用為實驗室之前所發現，目前沒有文獻記載 Histone 4j 會與 securin 參與反應。

CDC20

CDC20 是一個細胞週期重要的促進因子。在細胞週期中，APC 會與 CDC20 與另一個受質，Cdh1 鍵結而受到活化，並對不同的受質進行降解反應[28, 30, 91]。而此調控過程中，APC/CDC20 主要在細胞分裂期 (M 期)受到活化；APC/Cdh1 則在 G₁ 期受到活化。Securin 蛋白質的表現量由 S 期開始漸漸升高，至細胞中期 (M 期)

達到顛峰，而在到了細胞後期則完全消失[64]。在細胞進到中期時，紡錘絲尚未抵達姐妹染色體位置前，APC/CDC20 受到 Mad1/Mad2 蛋白質的影響而失去活性，而 securin 此時也由於受到磷酸化，持續地抑制 separase 的活性，使得姐妹染色體連結蛋白質 cohesin 持續地存在，姐妹染色體因而無法分離。而在細胞進入後期，也就是紡錘絲抵達姐妹染色體的瞬間，啟動了一連串的機制反應：抑制 APC/CDC20 的蛋白質 Mad1/Mad2 受到降解作用，活化 APC/CDC20 複合體，同時 securin 受到 CDC14a 去磷酸化的影響，使得 KEN box 與 D-box 的位置裸露而出，因此被 APC/CDC20 辨識而降解消失。一旦 securin 受到降解，separase 活化而切斷姐妹染色體連結蛋白質 cohesin，開啟了細胞分裂的機制。綜合地來說，APC/CDC20 會辨識未受磷酸化的 securin 蛋白質[28, 65, 92]，降解 securin 而促使細胞進入分裂後期(圖 7)。

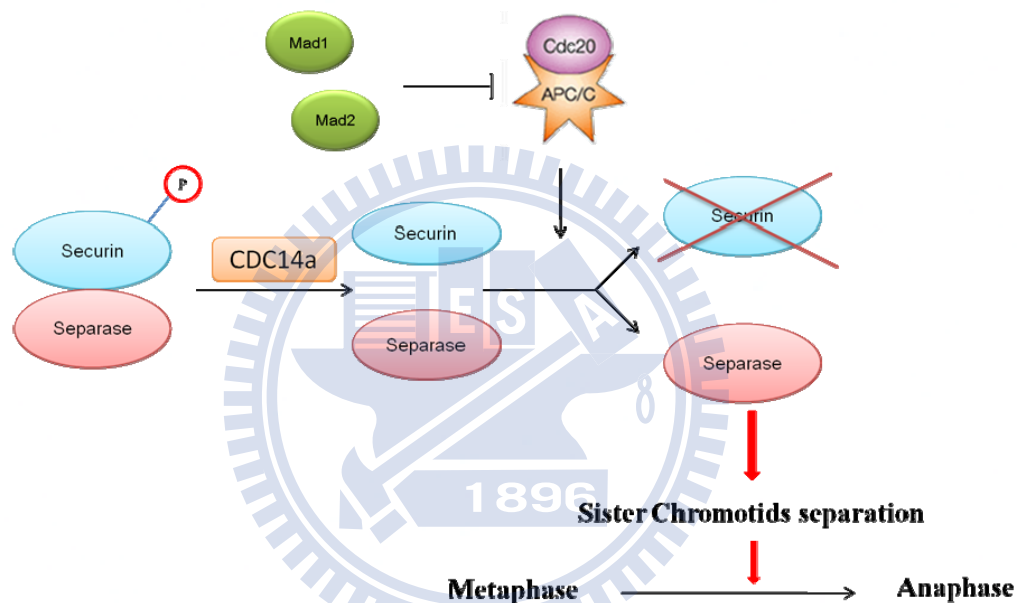


圖 7 APC/CDC20 降解 securin，調控細胞週期示意圖

延續圖 6，與失去抑制 separase 活性的 securin 蛋白質，會受到 APC/CDC20 複合體降解。而在 CDC14a 活化前，Mad1 與 Mad2 蛋白質會抑制 APC/CDC20 的活性。

BCL2A1

BCL2A1 隸屬於 BCL2 家族，是一個調控細胞生與死的家族蛋白之一[93]。目前已知此蛋白質的表現量上升，可以提高胸線器官內細胞的存活率[94]，抑制血癌的產生[95]，以及神經細胞存活的調控[96]。由前人研究顯示，securin 在胸線器官中確實有多量表現的跡象[14]，此株蛋白質與 securin 的交互作用也是實驗室之前所發現，而與 securin 的交互作用所影響的機制目前尚不清楚。

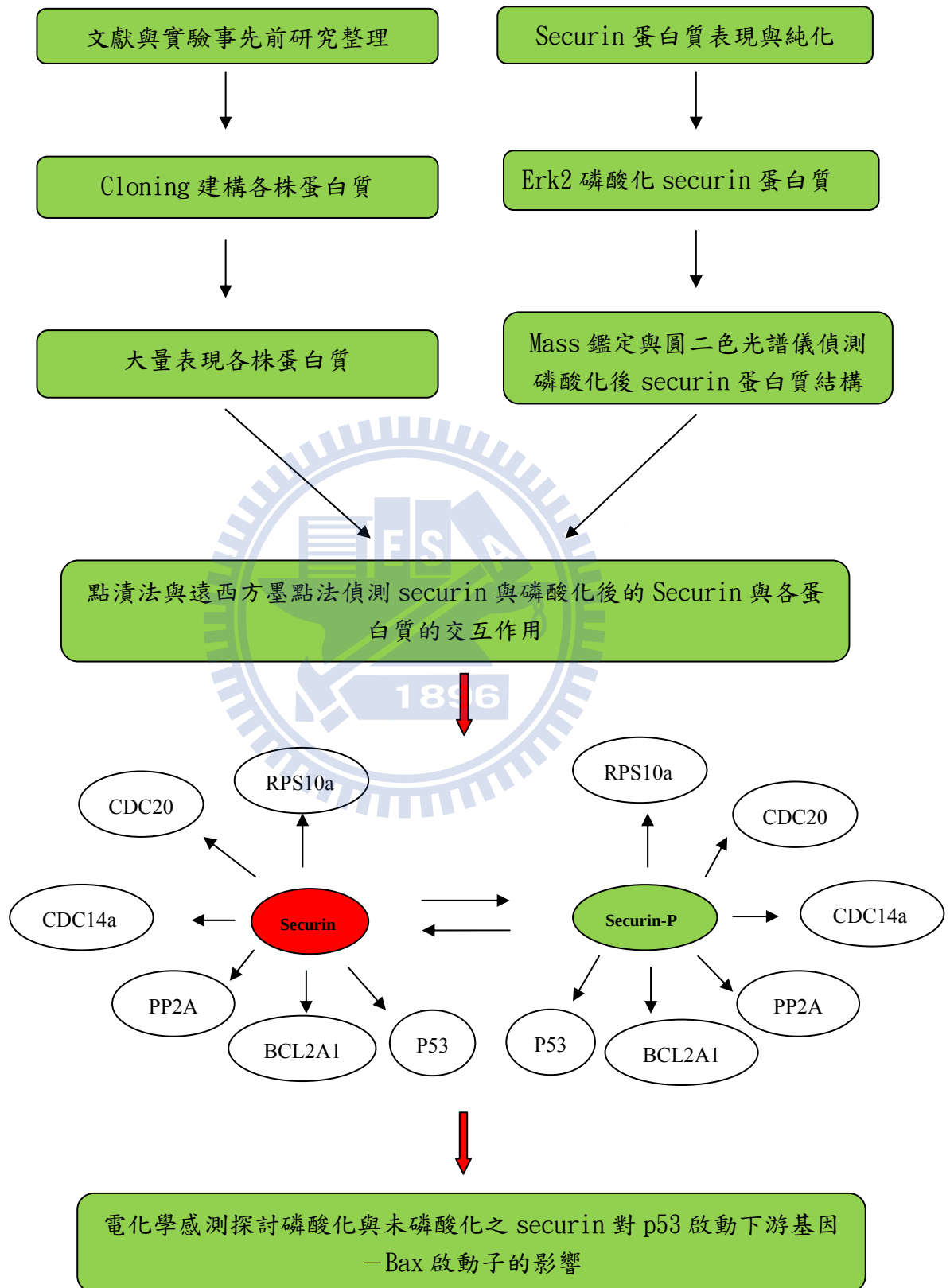
p53

p53 是一個腫瘤抑制蛋白質，其名稱來源來自於蛋白質電泳跑膠所看到的分子量位置位於 53 kDa，而實際的分子量為 43.7 kDa。此處的差異性來自於 p53 含有豐富

的 proline 胺基酸所導致[97]。p53 抗癌功能有二：(1) 阻止細胞週期 G₁/S 的行進。當細胞 DNA 受損，p53 會被活化而促使細胞表現 p21WAF1 蛋白質，使細胞週期停留在 G₁ 期或是 G₂ 期[98, 99]。(2) 啟動細胞自我凋零蛋白的表現，使得細胞走向自我凋零的路徑[100, 101]。p53 的活化因素來自細胞外的因素，如 DNA 損害，氧化壓力 (oxidative stress)，或是滲透壓的改變。而活化 p53 的蛋白質主要分兩族群：一為 MAPK 磷酸酶家族 (JNK, p38, Erk 1-2)，另一個活化族群為某些蛋白質磷酸酶 (ATR, ATM, CHK1, CHK2, DNA-PK, CAK)，皆為活化 p53 的磷酸酶[97, 102]。在這些活化因子當中，Erk2 磷酸酶是細胞受到 280 nm UV 照射下所產生的活化因子[100]，同時也是磷酸化 securin 蛋白質的磷酸酶之一[49]。Securin 與 p53 的作用請參照前文 1-3.4.3 所述。



第二章、實驗策略與目的



第三章、實驗材料及方法

3-1 目標基因建構與鑑定

3-1.1 基因載體的來源：

本實驗所建構的六個基因裡 (CDC20、PP2A substrate B55β、Histone 4j、RPS10A、CDC14A、與 BCL2A1)，CDC20、PP2AB55β與 Histone 4j 三株基因載體來自本學院內的 Gene library。PP2A 來源質體為 pCMV-SPORT6，標記基因 (Selection Marker) 為 Ampicillin 抗體；CDC20 與 Histone 4j 則為 pOTB7，標記基因為 Chloramphenicol。CDC14A 與 RPS10A 則是利用實驗室自行設計的基因引子，由 MCF7 細胞抽取而出的 RNA 反轉錄成我們所需要的基因。最後，BCL2A1，是請廠商為我們合成基因序列後，利用酵素酶切方式 (BCL2A1: EcoRI and XhoI) 接於 pUC57 質體內，標記基因為 Ampicillin。

3-1.2 引子設計

一個好的引子通常需要具備的條件是：長度 17–28 bps；GC 配對比例 50–60%；T_m 值介於 55–80 °C；需避免自我黏結 (self-annealing)、Hairpin 與 False priming 的產生[103]。為了達到以上的要求，我們使用 Primer Premier 5.0 (PREMIER Biosoft) 的軟體輔助我們設計出適合的引子，同時為了達到理想引子的要求，會在某些引子上做 silent mutation。除了注意這方面的問題外，須考慮到接合後的基因片段是否為正確的密碼子排序序列，方能正確讀到表現基因片段的終止密碼子。實驗室設計之引子序列如下，紅色標示為 silent mutation 的部分，標線部分則為起始密碼子。

H4j

Forward primer 5'-CTC CT**A** TTG CTC GT**A** ATG TCC-3'

Reverse primer 5'-GA AAA GGA CGC TCA ACC AC-3'

PP2AB55β fp(466)20: 5'-ACG CAA GT**T** AGC CTG CTG TC-3'

PP2AB55β rp(1827)22: 5'-CTT GTC CAC **TCA** GTT **GAC** CTT G-3'

CDC14a fp(37)18: 5'-TCC CCA GTG CGT AT**T** TCG-3'

CDC14a rp(655)21: 5'-T TTA GCC TCA **CAG** **T**TG CAG TC-3'

CDC20 fp(82)18: 5'-ATG GCA CAG TTC GCT**T** TTC-3'

CDC20 rp(1597)19: 5'-G **A**TG **G**TG GGT TGG TCT TCA-3'

DnaJ fp(40)18: 5'-ATG GCA TCC TAC TAC GAG-3'

DnaJ rp(906)18: 5'-ACT GTG **A**AG CGA TTC **A**GG-3'

BCL2A1 fp (183) 5'- ATG ACT GAC TGT GAG TTC GG-3'

BCL2A1 rp (675) 5'- GTT ACA AAG CCA TTT TCC TG-3'

S10 fp(66) 21 5'-GAG ATG TTG ATG CCG AAT AAG-3'

S10 rp(567) 21 5'-TCT ACT GAG GAG GCT GAC CAC-3'

3-1.3 表現質體之建構

本實驗室利用兩種方式建構各個表現蛋白質：TA cloning 與酵素酶切。TA cloning 主要是利用 Taq 聚合酶特殊性質，能在 72°C 環境下，在合成的基因 3' 尾端加上腺嘌呤 (Adenine) 核苷酸。利用這個特性，只需製造另外一個含有胸腺嘧啶 (Thymidine, T) 尾端質體 (T vector)，就能利用 T4 連接酶將所要建構的基因接到表現的質體上。酵素酶切則是利用酵素對某段 DNA 序列的專一辨識能力，在基因與表現質體創造出互補的切位。如此，同樣利用 T4 連接酶，就能建構出所需的表現質體。

TA cloning

本實驗室建構之 pET30a-EAM 質體，可利用 EAM (New England Biolab) 酶切的方式，在質體 3' 端產生未配對的胸腺嘧啶核苷酸 (Thymidine)，稱為 T vector。接續利用實驗室設計之引子，利用 Taq 聚合酶 (Protech) 的特性，使得在聚合酶連鎖反應之基因片段尾端產生一個未配對的腺嘌呤 (Adenine) 核苷酸。最後以 T4 DNA 連接酶 (Roche) 連接 T vector 與預表現之基因，產生一個可表現目標蛋白質的質體 (詳見圖 8)。實驗上，Histone 4j、PP2A、CDC20、CDC14a、RPS10a 與 BCL2A1 皆是以此方式接到表現的質體上。

*Taq Polymerase Buffer 10X	2 µl
Taq (5 U/µl)	0.5 µl
dNTP (10 mM)	0.4 µl
Forward Primer (10 mM)	0.4 µl
Reverse Primer (10 mM)	0.4 µl
DDW	To final volume 20 µl

溫度	時間	循環數
94°C	3 分鐘	1
94°C	30 秒	30
Note	30 秒	
72°C	30 秒	
72°C	10 分鐘	1

表 2 PCR 用量表

*內容含 100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl, 0.1% gelatin, 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100

Note: 所使用的溫度中, Histone 4j: 51°C; PP2AB55β: 50°C; CDC20: 50°C; CDC14a: 52°C; RPS10a: 50°C; BCL2A1: 50°C

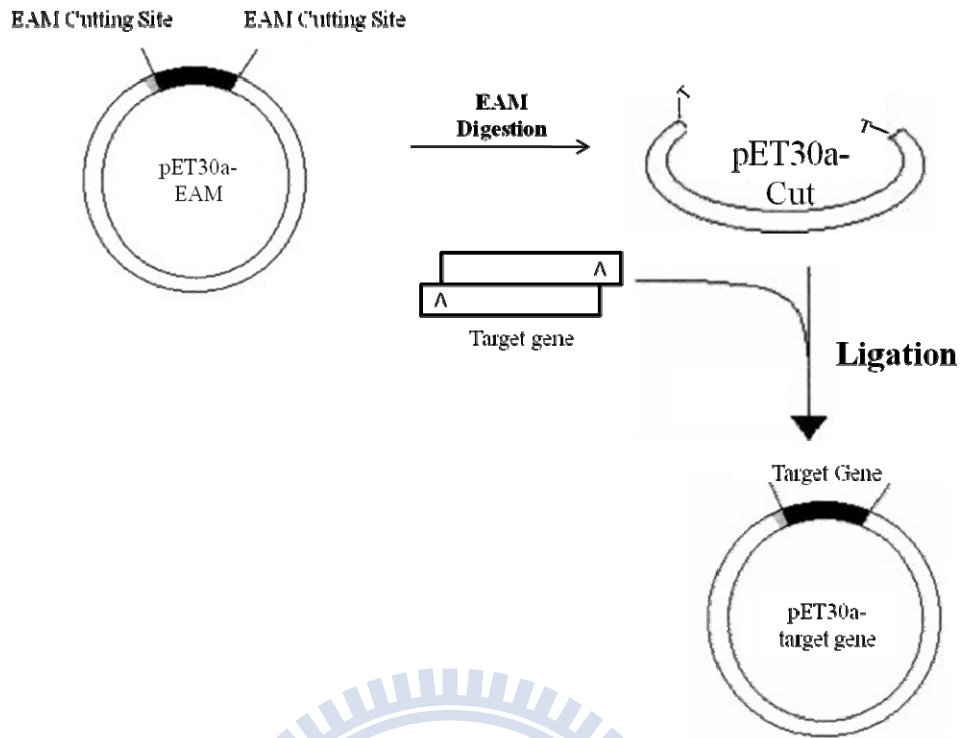


圖 8 TA cloning 流程圖

限制酶切 cloning (Enzyme Digestion)

在我們欲建構的基因中，BCL2A1 是請廠商以基因合成技術為我們合成。其中在 BCL2A1 5'端加上限制酶 EcoRI, 3'端加上 XhoI 切位。廠商將基因序列接於 pUC57 廠商質體中，此質體在大腸桿菌中並無可表現的啟動子，故需做進一步的 sub-cloning 動作。我們利用 5'端與 3'端有的限制酶切位，以特定的限制酶切下所需的基因，並連接在以同樣限制酶切下的表現質體 pET30a 內，轉殖入大腸桿菌 BL21 (DE3) 中培養並表現。

反轉錄 cloning

除了上述的 clone 方式外，CDC14a 與 RPS10 是利用實驗室自行設計的引子，於反轉錄過後的人類 cDNA 上所建構的基因。引子資訊見 3-1.2。

實驗上的流程，我們以 Trizol 試劑 (Invitrogen) 破碎細胞抽取 Total RNA，以 UV 定量計算 260/280 吸光值確認 RNA 純度後，以 MMuLV 反轉錄酵素將 RNA 反轉錄為 cDNA。MMuLV 是取自反轉錄病毒 (reverse-transcribing viruses) 的酵素，會與 RNA 鍵結，將 RNA 序列反轉錄為 DNA 的序列[104]。實驗上所加的成分與量值如下表：

*RNA	2 µg
Poly(dT) ₁₂₋₁₈ (500 ng/µl)	1 µl
MMuLV Buffer 5X	5 µl
MMuLV (200U/µl)	1 µl
dNTP (10 mM)	1.25 µl
RNAse Inhibitor (40U/µl)	0.625 µl (25 U)
RNAse free water	To final volume 25 µL

表 3 RT-PCR 用量表

*RNA 濃度是偵測樣品 260 的吸光值反推回原始濃度。RNA 260 吸光濃度為每 O.D. 40 ng/µl。

將連接反應完成的質體，轉殖到大腸桿菌 BL21 (DE3)培養，挑菌落以基因引子做聚合酶連鎖反應確認是否轉殖成功。

3-2 目標基因蛋白質製備

實驗上使用的表現菌株為大腸桿菌 BL21 (DE3)品系，屬於高表現且易於誘導表現的菌株。為了表現大量的蛋白質，會將大腸桿菌培養至細菌生存力最旺盛時期 (OD 值 0.6)，加入 1 mM IPTG 誘導其表現目標蛋白質，並收取細菌的內涵體 (Inclusion body)。內涵體的形成係於蛋白質表現時錯誤的摺疊，造成蛋白質聚集而成。由於細菌表現蛋白質的速率與環境上的差異，細菌在表現這些基因時，往往摺疊不完全，或是摺疊錯誤，因而產生大量的內涵體[105]。由於蛋白質的結構與其功能性息息相關，收取的內涵體須經過重新摺疊的方式，方能夠得到一個具有功能性的蛋白質。

我們所利用的摺疊方式為本實驗室所建構[106]。首先，要讓聚集的內涵體蛋白質變性 (Denaturation)而溶解，而讓蛋白質變性的試劑，則稱為變性劑。變性主要原理是破壞維持蛋白質三級結構的疏水作用力與穩定二級結構的氫鍵等作用力，使蛋白質回到一級鬆散的結構狀態[107]。本實驗室採取的變性方式包含尿素 (Urea)、二硫代蘇糖醇 (Dithiothreitol, DTT)以及 pH 值。尿素破壞蛋白質結構的原理目前尚未得知，僅推測可能是破壞了蛋白質胺基酸間的分子間的疏水性作用力與離子性作用力，解開蛋白質的結構[108]；二硫代蘇糖醇則能夠打斷蛋白質間的雙硫共價鍵結[109]；在高或低的 pH 值環境則會使蛋白質間產生庫倫作用力，因而互相排斥，使蛋白質無法形成穩定的結構。

重新摺疊的過程中，我們使用透析的方式，逐步地降低變性劑的濃度與調節 pH 值到達一個接近生物體的環境。此方法稱為準靜態熱平衡透析法 (quasi-static thermal equilibrium dialysis)[110]。一般說來蛋白質摺疊的過程中，濃度扮演著相當重要的角色。若是蛋白質濃度過高，容易在摺疊過程裡造成蛋白質疏水性胺基酸彼此鍵結，因而形成聚集體 (aggresome)。而這種逐步透析的方式，讓環境的轉換趨緩，如此蛋白質在接近靜態的情況下進行摺疊，每步環境的轉換在最終態皆能到達能量

最低態，避開相轉變的區間，使蛋白質順利摺回自然態[106, 111]。

IPTG 誘導目標蛋白質大量表現

解凍含有目標基因之 pET30a 質體的 BL21(DE3) 菌種，取出適當體積加入 3 ml 的 LB (含有 20 ng/mL Kanamycin)，於 37°C/200 r.p.m. 震盪培養至隔天以活化菌種。取活化過後的菌種 250 ml 加入 250 ml LB (含 20 ng/ml Kanamycin)，37°C 震盪培養四小時後，加入 1 mM 的 IPTG 持續震盪 16 小時以誘導蛋白質表現。將培養完成的菌液以 12000g/3 分鐘離心以得到沉澱的菌體，以 1 ml 二次水回溶 (含有 0.1 mM Pefabloc)，放入高壓破菌機 (constant cell disruption system)，以 30 kpsi 高壓破碎菌體。將破碎菌液以 13000g/15 分鐘離心，得到的沉澱物即為內涵體 (Inclusion body)，持續以含有 1 mM Pefabloc 的二次水回溶、離心至上清液完全澄清，使內涵體純度提高。

蛋白質摺疊

利用實驗室所開發的摺疊方法，將內涵體摺回自然態[106]。位於內涵體的蛋白質，為數種表現錯誤，或是在摺疊錯誤的蛋白值聚集、堆疊而失去功能。要將此類蛋白質還原成自然態，首先加入高濃度的尿素 (6 M urea、pH=11) 的變性劑，充分溶解蛋白質。將完全溶解的蛋白質以 0.2 μ m PVDF 膜過濾後，裝入事先處理的透析膜 (以 0.1 M EDTA 煮沸透析膜五分鐘以去除金屬離子，再以二次水沖洗透析膜，除去多餘的 EDTA)，置入含有 2.5 L 的 R₁ 緩衝液中，於 4°C 透析 24 小時，共置換兩次。接續置換到 R₂、R₃、R₄、R₅，逐步將變性劑的濃度降低，使蛋白質回到自然態。

His-tag 純化

此蛋白質純化方法最早為 Roche 所開發[112]。純化的原理是在表現的蛋白質 N 端或是 C 端加上六個 Histidine 胺基酸，使表現的蛋白質能被吸附在接有鈷或是鎳離子的樹脂管柱。實驗過程上，在通入含有目標蛋白的細菌萃取物後，會先以低濃度 (20 mM) Imidazole 清洗非專一性的結合蛋白，再以高濃度 (150 – 500 mM) 的 Imidazole 將目標蛋白質清洗下來。此種純化方法優於 GST-tag 的一點是在變性狀態下 (高尿素的環境下) 的蛋白質，也具有吸附在 His-tag 樹脂的能力，可以節省許多摺疊過程造成的可能問題。

3-3 遠西方墨點法

遠西方墨點法是一種篩選蛋白質交互作用的技術[113]。有別於傳統的西方墨點法 (Western Blotting) 利用抗體來辨識蛋白質，遠西方墨點法在加入抗體前，先以感興趣的蛋白質作培養，使得蛋白質能夠抓到與之交互作用的目標蛋白。接續利用一級抗體辨識培養的蛋白質。待一級抗體辨識完，再加入二級抗體辨識一級抗體。由於二級抗體含有呈色酵素 (Horseradish peroxidase, HRP)，能夠催化發光氣與 H₂O₂ 產生冷光，使之能夠在底片上呈色。在蛋白質交互作用中，蛋白質的結構占了非常重

要的因素，因此，遠西方墨點法一般說來會以 Native Gel 來進行實驗。然而此法往往造成蛋白質分離的解析度不佳，故本實驗室採取以 SDS-PAGE 分離蛋白質、轉漬到 PVDF 膜上，再利用實驗室摺疊方式，將膜上蛋白質摺回自然態。後續再加入一級抗體、二級抗體來做呈色。如此，就能解決解析度上面的困擾，又能達到辨識蛋白質的目的。

實驗上，我們使用遠西方墨點法的方式確認 securin 與各個目標蛋白質的交互作用。首先利用 SDS-PAGE 分離目標蛋白質，接續以半乾式轉漬槽 (Semi-dry transfer system) 將蛋白質轉漬到 PVDF 膜上。我們為了使蛋白質摺回自然態，會將轉漬完成的 PVDF 膜依序浸漬於 R1 到 R5 緩衝液中 (每次十分鐘，置換兩次)。摺疊完成後，會先浸漬於脫脂牛奶溶液中 (溶於 TBST 中，濃度 5%)，避免後續抗體物理吸附到 PVDF 膜上。轉漬膜浸泡於牛奶 30 分鐘後，先以溶於 1% TBST 泡製的脫脂牛奶的 securin 蛋白質 (濃度 60 nM，相當於抗體使用濃度)，4°C 浸漬 16 小時。再使用 TBST 清洗五次後 (每次五分鐘)，改浸泡於以 1% TBST 泡製的脫脂奶 1/10000 倍稀釋的 Mouse Anti-securin 一級抗體 (Santa Cruz Biotechnology)，於 4°C 下反應 16 小時，再以 TBST 緩衝液清洗五次 (每次五分鐘)，最後加入稀釋 1/20000 倍的 Goat Anti-Mouse IgG-HRP 二級抗體 (以 1% TBST 泡製的脫脂奶稀釋)，反應五十分鐘。反應完成後，以 TBST 緩衝液清洗五次 (每次五分鐘) 後，添加 HRP 受質 (Millipore Corporation) 於轉漬膜上，以底片呈色。

3-4 Securin 磷酸化

我們利用 Erk2 kinase (New England Biolab) 對 securin 蛋白質做磷酸化。磷酸化使用的條件如表 4。

Erk2 Kinase (10000 U/ml)	0.5 μ l
*10X Erk2 Kinase Buffer	5 μ l
1 mM Pefabloc	1 μ l
10 mM ATP	1 μ l
Securin	6 nmole
Total Volume	50 μ l

表 4 Securin 磷酸化試劑用量。磷酸化條件：30°C/16 小時。

10X Erk2 Kinase Buffer: 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1 % Brij 35, pH 7.5 (25 °C)

3-5 圓二色旋光光譜儀 (Circular Dichroism, CD)

本實驗室使用同步輻射的圓二色旋光光譜儀 (Aviv 410)。影響圓二色光譜儀偵測的因素包含溫度、樣品濃度與 CD cell 寬度等條件。本實驗試樣品的偵測條件如下表 5

CD cell path length	1 mm
Wavelength	260 – 190 nm
Temperature setpoint	25°C
Averaging Time	10 s
Wavelength Step	0.5 nm
Band Width	1 nm

表 5 CD 參數設定

每一次偵測 CD 所用樣品濃度為 10 – 50 μM ，樣品訊號的可信度會參照實驗中的燈壓(high tension, HT)訊號，燈壓的高低受到樣品濃度高低與溶劑的極性強度有關。所以，實驗過程會隨時注意燈壓值，若是超過 800 時，則實驗的結果是不可信的，需重新調整參數、降低樣品濃度，或是改變溶劑。最後實驗得到的結果為 mean residue ellipticity $[\theta]_{\text{MRE}}$ (單位： $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmole}^{-1}/\text{residues}$)，並使用 SELCON3 程式分析蛋白質二級結構的比例。

實驗步驟：

- (1) 調整蛋白質濃度為 10 μM 。
- (2) 打開液態氮氣，使儀器內部降溫二十分鐘，再開水浴槽，設定溫度為 20°C，最後開啟 Xe LAMP power 以及 CPU/INST power。
- (3) 打開 AVIV 程式，設定程式參數。
- (4) 取至少 200 μl 樣品體積加入光徑 1 mm 的石英樣品槽 (quartz cell)

實驗參數：波長 200 – 260 nm，band width 為 0.5 nm，interval time 為 10 秒。

3-6 紫外光誘使細胞凋亡實驗：

本實驗目的是探討細胞照射 UVC 紫外光 (280 nm – 100nm，實驗上常用為 256 nm)後所啟動的自我凋零機制。本實驗參照之前文獻的實驗步驟[100]。實驗上使用人類乳癌細胞 MCF7，將細胞種於含有 10 % 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 的 RPMI-1640 (Invitrogen)培養液的 10 公分培養皿培養至全滿後，分盤於六孔式細胞培養皿內，待細胞長至八分滿，將細胞換至含 0.1 % 胎牛血清培養液，使細胞處於飢餓狀態 24 小時，照射 4 kJ/m^2 的 UVC 紫外光，再以含 10 % FBS 的 RPMI 細胞培養液各別培養 2、4、6 個小時。收取細胞於 Lysis buffer 中，以超音波震盪器裂解細胞。接續以 13000 g 離心 15 分鐘，收取上清液以 Bradford 定量，以西方墨點法辨識 Erk2、磷酸化 Erk2、p53、磷酸化的 p53、與 securin 蛋白質。

3-7 鎳離子導電 DNA 製備：

自 1962 年華生 (James D. Watson)與克立克 (Francis Crick)解開 DNA 雙股螺旋結構[114]，數十年來許多科學家持續探討一個問題：DNA 是否能夠做為一個良好的導電生物材料?截至目前，科學家提出的答案分歧，並沒有一個統合的理論說明

DNA 是否為一個導電良材。有學者認為 DNA 分子間 π - π 鍵結足夠提供電子一個傳導路徑[115]。1996 年，Barton 等人認為 DNA 螢光淬息效應 (Quenching effect) 來自於 DNA 分子間電子傳遞所導致，因而推測 DNA 為導電分子[116]。然而實際上測量的結果卻與這些理論互相違背[117, 118]，甚者，有人認為 DNA 是一個半導體[119]。由於理論與實驗結果並不一致，因而有人嘗試在 DNA 核苷酸配對間接上二價金屬離子 (通常為 Co^{2+} ， Ni^{2+} ，與 Zn^{2+} 離子) [120-122]。這樣的做法不但減少 DNA 每對核苷酸間距長，同時提供一個電子傳遞間帶，使得 DNA 成為一個可以導電的奈米線。

鎳離子導電 DNA 的製備方法為實驗室所開發[123-125]。實驗的原料上，我們請廠商為我們合成 Bax 啟動子的序列，序列如下：

Bax Promoter Gene A: 5'-TCA CAA GTT AGA GAC AAG CCT G-3'

Bax Promoter Gene B: 5'-CAG GCT TGT CTC TAA CTT GTG A-3'

在 Gene A 5'端特別接上了硫氫鍵 (-SH)，如此可與金電極表面硫氫鍵形成雙硫鍵。導電 DNA 製備的方式為各取 5 μM Gene A 與 Gene B 的 DNA 溶於含有 5 mM NiCl_2 pH 9.0 20 mM Tris 緩衝液中，浴熱至 95 $^{\circ}\text{C}$ ，並讓其緩慢冷卻至室溫，如此，即可在 DNA 接合過程中，嵌入鎳離子而形成可導電的 DNA 分子。

3-8 電化學感測：

循環伏安法 (Cyclic Voltammetry, CV)

循環伏安法是一種用來分析溶液所含化學物質的電化學分析法。由於不同的化學分子會因其組成的分子軌域與能階的不同，使得其氧化與還原電位也不盡相同。利用這個特性，我們對分析的溶液中施加一個循環性的三角電波電位 (如圖 9)。透過這樣的循環，可以繪製出一個氧化與還原反應產生的電流 vs 施加電壓的頻譜圖。當由低電位施加到高電位時，分析物因為發生氧化反應而在頻譜圖上產生一個氧化峰值；反之，由高電位掃回低電位，亦可看到分析物在某個電位上的還原峰值 (圖 10)。我們藉由峰值的位置或是變化，可以推測水溶液中所含有可能分析物，或是分析物產生的化學變化[126]。

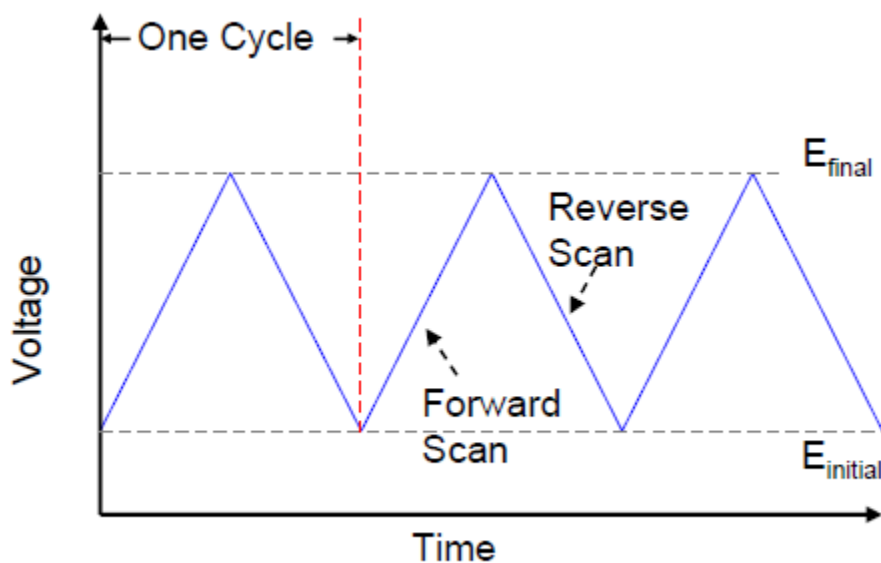


圖 9 循環伏安法所施加的電位與時間變化示意圖[126]

我們對金電極施加一個隨時間改變的三角偏壓。圖中一次 forward scan 加上 reverse scan 即代表一個週期。

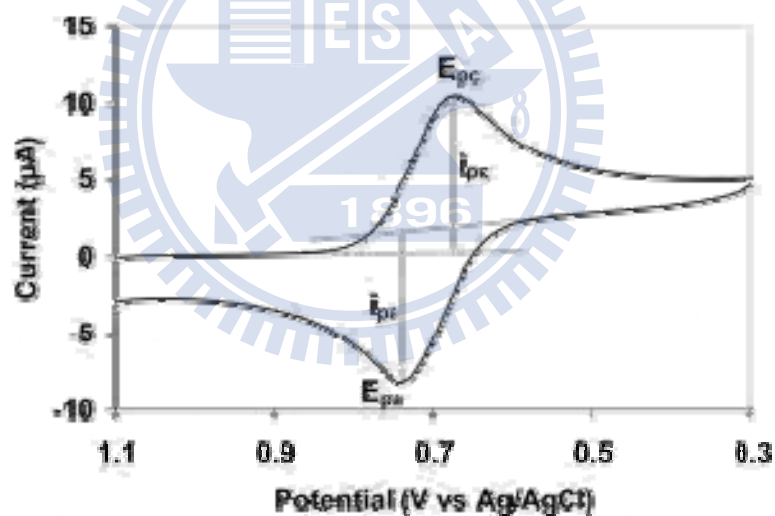


圖 10 循環伏安法氧化峰與還原峰示意圖

循環伏安法圖中，氧化與還原的峰值示意圖。圖中 E_{pc} 與 i_{pc} 表示陰極 (cathode) 的峰電位與電流值；反之， E_{pa} 與 i_{pa} 則表示陽極 (anode) 的峰電位與電流值。

電化學阻抗分析頻譜 (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS)

電化學阻抗分析是個常用來分析電極表面的修飾方法，長期來其應用方面有腐蝕效應 (corrosion)、電解沉積效應 (electro-deposition)、電池 (batteries) 與燃料電池 (fuel cell) 等[127-129]。而在生物感測方面，過去學者常利用此法研究反應電極表面生物分子所覆蓋之厚度與緊密度[130]。此法原理是在電極上面施加一小正弦波電流，由電極所在的溶液特性與電極表面修飾情況，會產生不同振幅與相位的電流。藉由

分析電流上的變化，可以了解溶液氧化還原程度，以及電極上物質覆蓋程度。

關於導體在溶液介面上的電阻特性，則可以由 Randles 等效電路 (Randles' Equivalent Circuit) 來擬合[131]。如圖 11 的電路圖， R_s 表示溶液中的阻抗值， Q_{dl} 為電雙層電容的電阻阻抗值， R_{ct} 則為溶液中離子轉移電子到電極表面上的等效電阻， W_0 則為 Warburg 等效電阻，代表意義為溶液中離子擴散至電極表面的等效阻抗。頻譜分析上，通常會將阻抗的實部值做為 X 軸，虛部值為 Y 軸。首先，施加一頻率的交流電阻抗可由下列式子表示：

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 e^{-j\omega t}}{I_0 e^{-j(\omega t + \varphi)}} = Z_0 e^{j\varphi}$$

其中 V_0 為電壓最大值， I_0 則為電流最大值， Z_0 為阻抗最大值， ω 為角頻率 ($2\pi f$)， φ 則為相位差。而電路上的 Q_{dl} 與 W_0 與頻率的關係式可如下表示：

$$W_t = \frac{1}{W_0 \sqrt{2\omega}} e^{-j\omega}$$

$$Q_{dl} = \frac{1}{Q_0} \omega^{-n} e^{-j\omega n}$$

此處 n 為一介於 0~1 的常數。當 $n=1$ 時，表示電雙層電容為一理想電容。 $n=0$ 時，表示其為一個理想的電阻。若將這些阻抗表示式運算過後，取其實部與虛部做圖，即為一般阻抗頻譜分析常用的 Nyquist 分析圖。理想的分析圖形如圖 12。藉由此頻譜我們可以了解電極上物質吸覆的厚度[132-134]。

而在分析 DNA 電雙層電容的實驗上，我們加入一項參數為 R_s 。此項參數所代表的意義為：未接上 DNA 的裸露金電極所給予溶液離子流通的阻抗值。一般說來，若是在接 DNA 的步驟反應完全，理論上 R_s 值為遠大於 R_{ct} 的電阻大小。如此，我們可以利用 R_s 的大小判斷是否 DNA 反應完全與否[125]。

圖 11 Bare gold 與 DNA Randles 等效電阻示意圖

左圖為 Randles 模擬裸金電極的等效電路圖，右圖則為加上 DNA 分子後的等效電路圖。此圖中， R_{sol} 為溶液中的電阻圖， R_s 為離子經非 DNA 而傳導至電極的阻抗值， Q_{dl} 則為電雙層電容， W_0 為 Warburg 常數[125]。

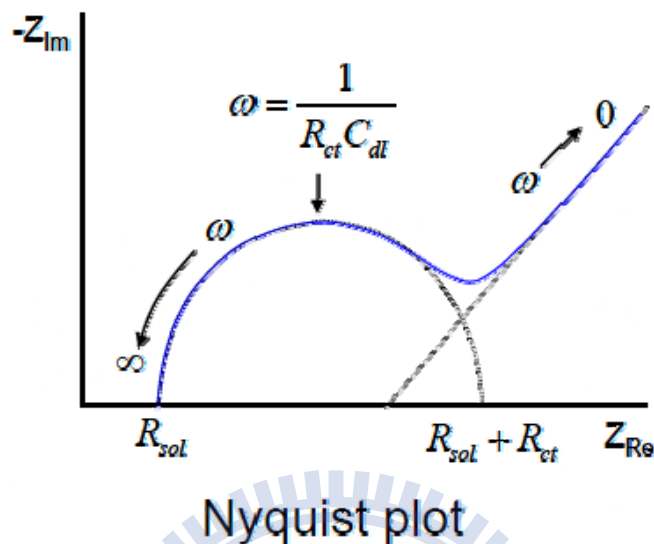


圖 12 Nyquist 圖譜與其代表之物理量

由 Nyquist 圖譜之 x 軸截距可得知溶液之阻抗 (R_{sol})，半圓形的頂點對照頻率值可求得電容值(C_{dl})，而半圓型的直徑可求得 R 值($R_{ct} + R_{sol}$)，而在低頻區可以求得 Warburg 係數。 ω 為角頻率。

我們利用實驗室所研發的金電極感測器，測量 p53 與 Bax 啟動子作用力的關係。製備的過程如下：

金電極製備：

實驗室所用來測量的金電極為直徑為 0.25 mm，長為 3.2 mm 的圓柱體。我們將金電極以高溫 1070 °C 烘烤 40 小時，之後緩慢降至室溫以讓金格排列整齊。接著以 1000、2000、3000、與 5000 的砂紙進行物理性的拋光，直到解剖顯微鏡下看不見任何刮痕為止。接續將金電極放入二次水中超音波震盪 15 分鐘，再以二次水潤洗數次後，放入含有 0.5 M 硫酸溶液中，以循環伏安法 (Cyclic Voltammetry, CV) 進行化學拋光，去除金面雜質。在此步驟，我們會在電壓 1.08 V 與 1.23 V 看到兩個明顯的氧化峰，推測為 Au(1,0,0)與 Au(1,1,1)之氧化還原反應電位。同樣在 0.83 V 與 0.94 V 各別有一個還原電位峰，分別是 Au(1,0,0)與 Au(1,1,1)的還原電位圖 13。由此 CV 圖可以確認金面無雜質，且氧化還原電為縮減為兩者。之後，再以電化學阻抗分析頻譜 (EIS) 確認金面的乾淨度。

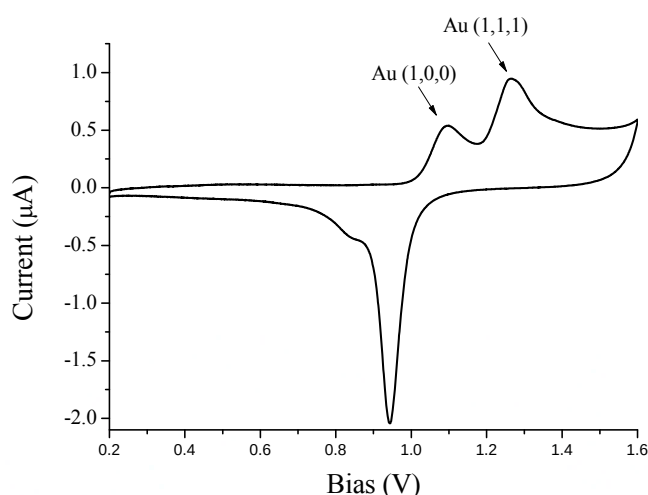


圖 13 裸金電極化學拋光 CV 圖

我們在物理拋光後的金電極加上一個三角循環波，去除吸附在金電極上的雜質，同時會讓金的面向趨向於(1, 1, 1)與(1, 0, 0)，如圖上箭頭所示。

DNA 與蛋白質交互作用檢測：

阻抗頻譜的分析是利用氧化還原的原理偵測離子的流通性來決定電極上覆蓋程度的大小。我們在實驗的條件上以 $\text{Fe}(\text{CN})^{3-/4-}$ 離子的氧化還原反應做偵測，偵測時的電壓為 0.23 V，掃描頻率範圍為 $10^5 - 1$ Hz，交流偏壓設為 10 mV。

我們將製備好的金電極浸入製備好的鎳離子 DNA 溶液中八小時，轉而浸入 20 mM Tris 緩衝液 (pH = 9.0) 十分鐘以清洗自由流動的鎳離子。再以二次水潤洗數次後，浸泡在 50 μM 18 硫醇 (n-Octadecyl mercaptan) 內十五分鐘，以填補未接上鎳離子 DNA 的裸露金電極。再以二次水清洗數次後，接續以 pH 9.0 20 mM 磷酸緩衝液 (Phosphate Buffer, PB) 潤洗後，依序接上不同濃度的 p53 或是 Securin 蛋白質，測量 CV 與 EIS 以了解阻抗的變化，藉以觀測 DNA 與蛋白質交互作用。

3-9 Bradford 蛋白質偵測技術

Bradford 偵測技術原理是利用 Coomassie blue G250 與蛋白質之間的交互作用強弱來做偵測。Coomassie blue G250 其 pK_a 值有三種：1.15、1.82 與 12.4，使其在不同環境下會帶不同電性，而產生不同吸光波長的自由離子。一般說來離子帶正電荷時會呈現紅色與綠色；而帶負電時，也就是與蛋白質相接時，則會顯示藍色。實驗上，偵測 595 nm 的吸光值即可得知多少的染劑與蛋白質相接。此實驗的偵測方式首先要先以一個已知濃度的樣品做吸光曲線圖，再由吸光曲線圖所計算出的吸光質與對應的數值，推出樣品的濃度[135]。

實驗步驟：

- (1) 準備 0.125、0.25、0.5、0.75、1.0、與 1.5 mg/ml 的牛血清蛋白 (BSA)，序列稀釋的樣品。

- (2) 在 ELISA 偵測盤上先各別加入 5 μ l 稀釋的 BSA 與樣品。
- (3) 在每個已加入蛋白的孔內，加入 200 μ l 的 Bradford 試劑 (Sigma)。
- (4) 避光反應四十五分鐘後，以 ELISA Reader 讀取 595 nm 的吸光值。
- (5) 將 BSA 偵測的吸光值做線性曲線： $A = BX + C$ ，其中 A 為吸光值，X 為 BSA 濃度，B 與 C 則為線性常數。
- (6) 將樣品的吸光值帶入(5)所導出的公式，計算樣品的濃度值。



第四章、實驗結果

4-1 表現基因之建構及蛋白質表現

本實驗總共建構了六種蛋白質，各別為 Histone 4j, PP2AB55b, CDC20, CDC14a, RPS10a 與 BCL2A1。實驗室所使用的 clone 技術，包含了兩種：TA cloning 與酵素酶切。我們首先將含有我們目標基因的載體質體，轉殖入 DH5 α 菌體內部，依照各個基因的標記基因做篩選，並利用自行設計的引子做聚合酶反應進行確認。確認完畢的菌株會以液態氮凍入 -80°C 做保存。為了能夠在大腸桿菌裡面大量表現我們所需的蛋白質，我們需將目標基因 sub-clone 到 pET30a 質體內來達到表現目標蛋白的目的。為此，我們利用 TA cloning 與酵素酶切方式，將各個基因接入 pET30a 的質體，並轉殖(transformation)入 BL21(DE3)品系的大腸桿菌。由於 TA cloning 是在基因 3'端處加上 A 核苷酸，也就是說無論在模股版 (Template strand)或是在非模股版 (non-template strand)上皆會有 A 核苷酸接位。然而模股版上的序列與基因序列是互補性質，意即若是此股黏接在 pET30a 質體的非模股板上，基因就會為反向序列(如圖 14)。

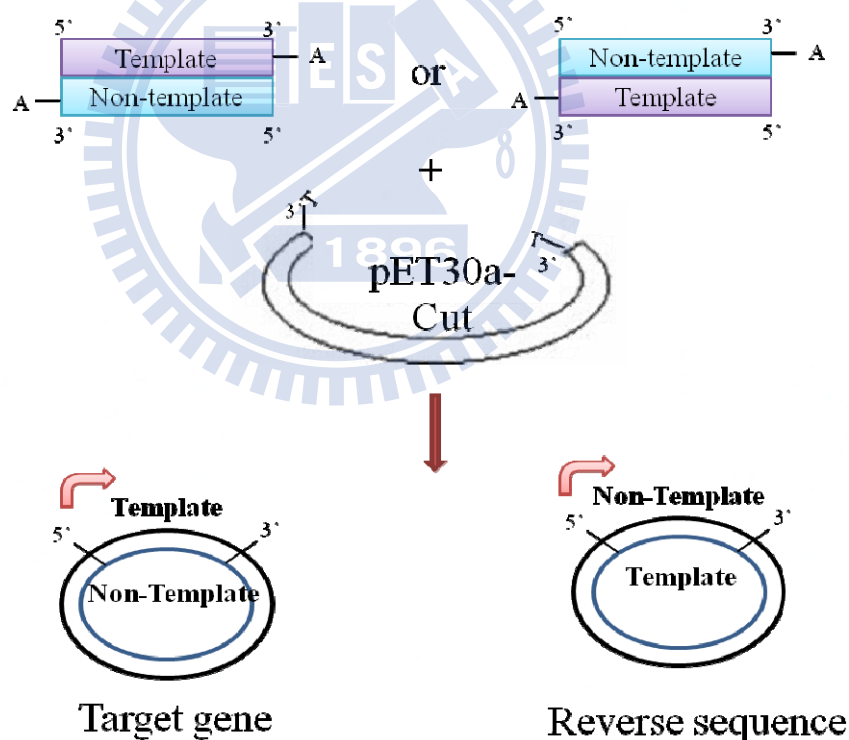


圖 14 TA cloning 可能造成反序的示意圖

為了解決此問題，我們在篩選菌落上，以 pET30a 質體上所具有的 T7 引子與自行設計的引子來做確認是否有轉殖成功。如表 6 所列，我們成功地在各個菌落篩選時得到我們所要的片段大小，而表現的質體 pET30t 表示以 pET30a 為原始 clone 質體，經由 TA cloning 或是酵素酶切過後，黏合所需表現之基因而建構出的新表現質

體。而在定序方面，如附錄所示，六株蛋白質當中，有三株有突變現象產生，各別是 Histone 4j、CDC14a、與 CDC20。其中 Histone 4j 的突變為基因第 47 的位置，由 GTT→GCT，對應的胺基酸突變為 A→V。CDC14a 則為第 215 序列上 GAA 突變為 GAG，但胺基酸序列並未改變，判定為 silent mutation。而 CDC20 有兩個突變點，各別為序列第 861 與 1423，為 T→C 與 A→T 突變，胺基酸則由 Q→L，與 L→M。

基因名稱	Clone 方式	表現質體	基因片段大小	*篩選片段大小
Histone 4j	TA cloning	pET30t (圖 15)	306 bp	456 bp (圖 16)
PP2AB55β	TA cloning	pET30t (圖 18)	1236 bp	1500 bp (圖 19)
CDC20	TA cloning	pET30t (圖 21)	1494 bp	1674 bp (圖 22)
CDC14a	RT + TA cloning (圖 24)	pET30t (圖 25)	594 bp	744 bp (圖 26)
RPS10a	RT + TA cloning (圖 28)	pET30t (圖 29)	498 bp	648 bp (圖 30)
BCL2A1	Gene synthesis + Enzyme digestion	pET30t (圖 32)	500 bp	650 bp (圖 33、圖 34)

表 6 所有基因的 clone 方式、表現質體與基因大小對照表

*篩選片段的大小由於我們是以 T7 引子與各基因引子做 PCR，因此，篩選時所看到的片段大小皆會多出 150 bp。

經過轉殖入基因表現質體的大腸桿菌菌落將被挑選出來，以 1 mM IPTG 誘導蛋白質表現，以 SDS-PAGE 檢測是否有表現出我們所要的蛋白質，同步將菌落送交廠商做定序，以確認序列是否有任何的突變現象。由於我們以 pET30a 為表現質體，故在表現的蛋白質前段會有一段多肽鍊，因此，每株蛋白質表現大小會比預期多上 6 kDa 的分子量。如六株蛋白質中，我們都能夠成功地在預期的位置上看到我們所需要的蛋白質(表 7)。特別地是，這些蛋白質以大腸桿菌系統表現的結果，皆在內涵體內有大量表現。

蛋白質名稱	蛋白質分子量大小	*預期的片段大小
Histone 4j	11 kDa	17 kDa (圖 17)
PP2AB55β	51 kDa	57 kDa (圖 20)
CDC20	54 kDa	60 kDa (圖 23)
CDC14a	29 kDa	35 kDa (圖 27)
RPS10a	19 kDa	25 kDa (圖 31)
BCL2A1	19 kDa	25 kDa (圖 34)

表 7 各株蛋白質表現分子量大小對照表

*預期片段大小是加上位於蛋白質 N 端的多肽鍊片段

TA Cloning 結果：

Histone 4j:

本實驗將 306 bp 長的 Histone 4j 基因，以 TA cloning 的方式，建構一個以 pET30a 為表現中心的質體，pET30t-Histone 4j(圖 15)。為避免反序，篩選時以 T7 forward 引子與 Histone 4j reverse 引子確認 TA cloning 的正確性。見夠成功的基因片段大小為 456 bp(圖 16)。而在蛋白質表現方面，我們可以在內涵體中看到一條 17 kDa 的預期表現片段(圖 17)。

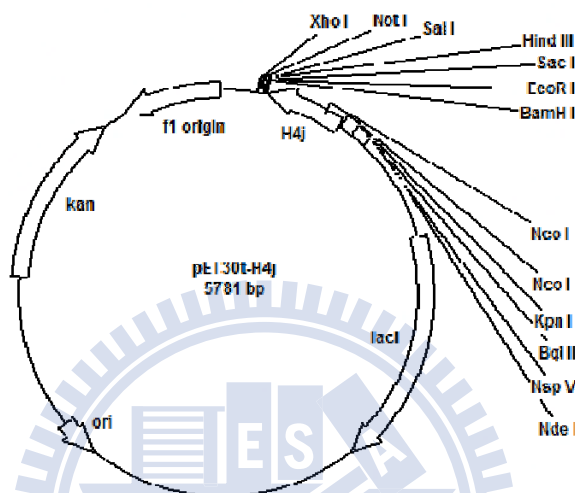


圖 15 Histone 4j clone 表現質體

以 TA cloning 的方式將 Histone 4j 連結到 pET30a 質體後的質體圖。圖中 H4j 即為表現的基因片段位置，pET30t 表示 pET30a 質體經由酶切處理後的質體。

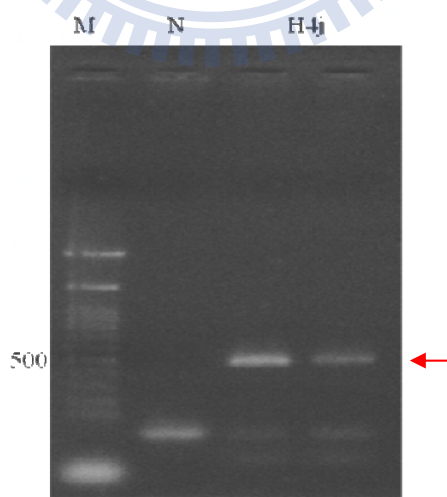


圖 16 Histone 4j TA cloning 結果。

成功黏合後的 pET30t-H4j 質體轉殖到大腸桿菌後，挑選菌落後，以聚合酶反應做篩選。反應中，5' 端以 T7 引子，3' 端以 Histone 4j 引子做 PCR 篩選。M: Marker; N: 不含質體的 PCR 樣品；H4j: 挑選的菌落，共兩株。預期的 Histone 4j 片段為 500 bp (圖箭頭所示)。

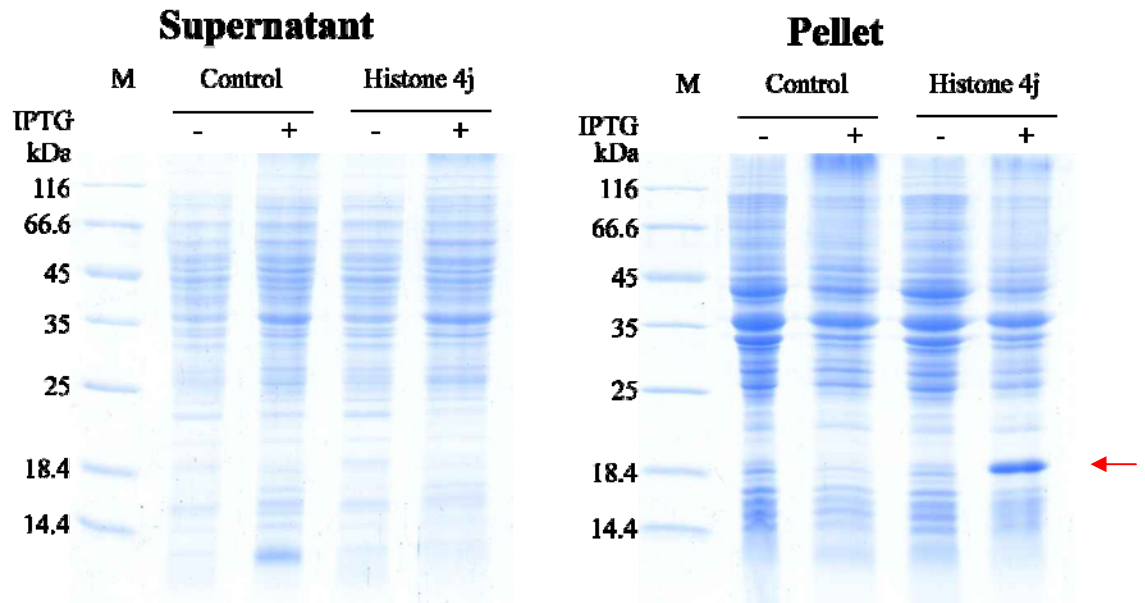


圖 17 pET30t-H4j 蛋白質表現膠體圖。

以 1 mM IPTG 培養 16 小時後，破菌取上清液 (supernatant)與內涵體 (pellet)跑蛋白質電泳後的結果圖。圖中箭頭所指約 18 kDa 的位置即為 Histone 4j 表現後的大小位置。M: Marker，pET30a 為控制組 (control)。可以看到 pET30t-H4j 菌株在加入 IPTG 培養後，會清楚的有表現的片段跑出。

PP2AB55β:

本實驗將 1236 bp 長的 PP2AB55β 基因，以 TA cloning 的方式，建構一個以 pET30a 為表現中心的質體，pET30t-PP2AB55β(圖 18)。為避免反序，篩選時以 T7 forward 引子與 Histone 4j reverse 引子確認 TA cloning 的正確性。見夠成功的基因片段大小為 1500 bp(圖 19)。而在蛋白質表現方面，我們在內涵體中看到一條 57 kDa 的預期表現片段(圖 20)。

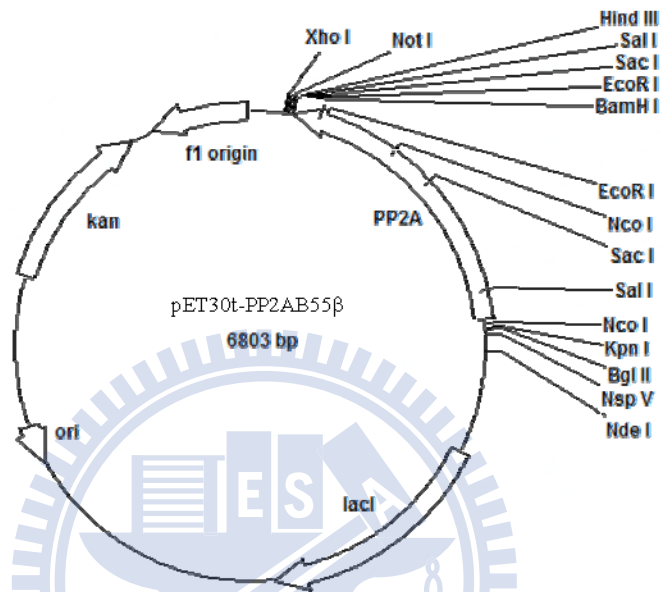


圖 18 pET30t-PP2AB55β質體

以 TA cloning 的方式將 PP2AB55β連結到 pET30a 質體後的質體圖。圖中 PP2AB55β即為表現的基因片段位置，pET30t 表示 pET30a 質體經由酶切處理後的質體。

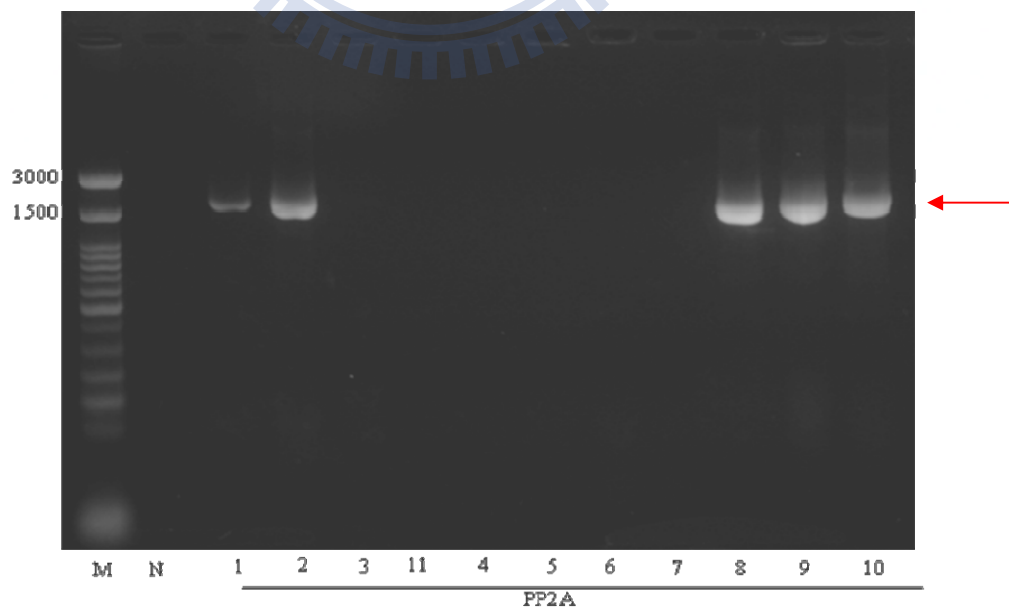


圖 19 PP2AB55β TA cloning 結果

成功黏合後的 pET30t-PP2AB55β質體轉殖到大腸桿菌後，挑選菌落後，以聚合酶反應做篩選。反應

中，5'端以 T7 引子，3'端以 PP2A 引子做 PCR 篩選。M：Marker；N: Negative control，不含質體的 PCR 樣品；1-11:篩選的菌落編號。可以在 1、2、8、9、10 號菌落明顯看到預期的 PP2AB55 β 片段：1500 bp (圖箭頭所示)。

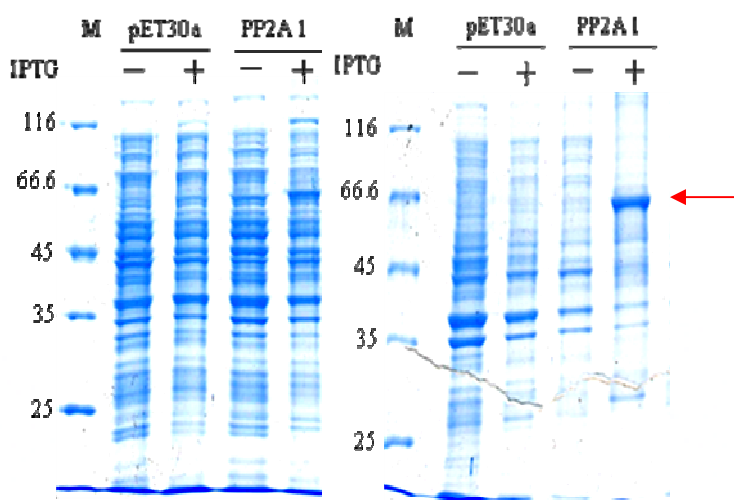


圖 20 PP2AB55 β 蛋白質表現—上清液與內涵體

以 1 mM IPTG 表現 pET30t-PP2AB55 β 菌株後，離心取上清液 (Supernatant)與內涵體 (Pellet)個別觀察蛋白質表現的蛋白質膠圖。M: Marker。可以明顯看到在內涵體菌株看到 60 kDa 附近 (箭頭所示) 看到 PP2A 蛋白質的表現。

CDC20:

本實驗將 1494 bp 長的 CDC20 基因，以 TA cloning 的方式，建構一個以 pET30a 為表現中心的質體，pET30t- CDC20 (圖 21)。為避免反序，篩選時以 T7 forward 引子與 Histone 4j reverse 引子確認 TA cloning 的正確性。見夠成功的基因片段大小為 16740 bp(圖 22)。而在蛋白質表現方面，我們在內涵體中看到一條 60 kDa 的預期表現片段(圖 23)。

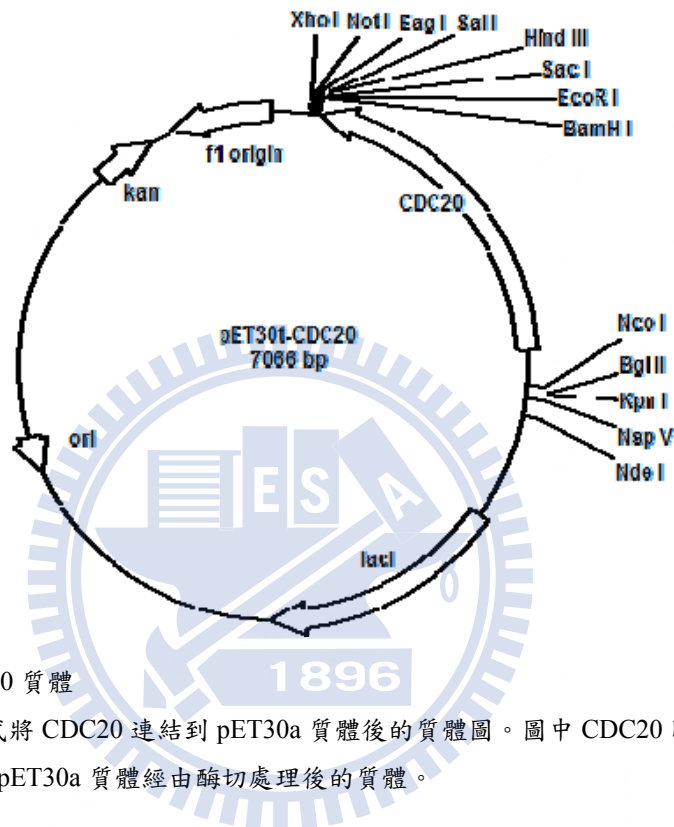


圖 21 pET30t-CDC20 質體

以 TA cloning 的方式將 CDC20 連結到 pET30a 質體後的質體圖。圖中 CDC20 即為表現的基因片段位置，pET30t 表示 pET30a 質體經由酶切處理後的質體。

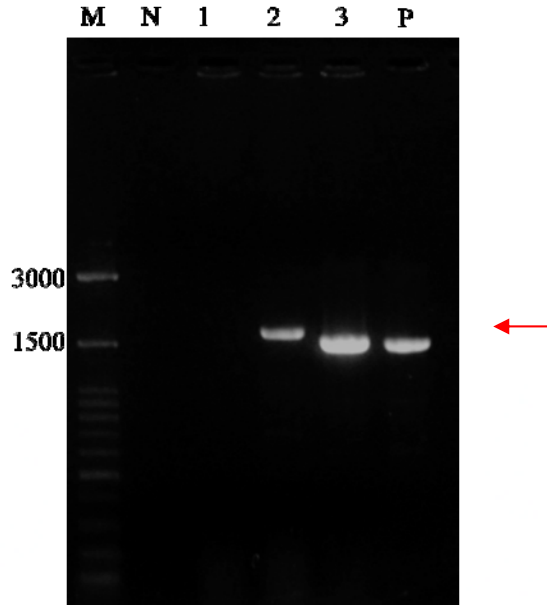


圖 22 CDC20 TA cloning 結果。

成功黏合後的 pET30t-CDC20 質體轉殖到大腸桿菌後，挑選菌落後，以聚合酶反應做篩選。反應中，我們採用不同的 primer 配對來確認質體的正确性。圖中 M：Marker；1：5'端為 T7，3'端為 CDC20；2：5'端為 CDC20，3'端為 T7；3：兩端皆為 CDC20 引子。由於 5'端 T7 引子易與 CDC20 3'端引子黏合，因此未在圖中看到 PCR 片段。然而在其它配對上，都可以清楚看到正确的片段大小。預期片段大小：CDC20 fp and T7 rp：1.6 kbp；CDC20 fp and CDC20 rp：1.5 kbp。圖中 P 為以 CDC20 fp 與 rp 對含有 CDC20 基因的 pOTB7 質體做聚合酶反應的結果，做為 Positive control (預期片段 1.5 kbp，箭頭所示)。

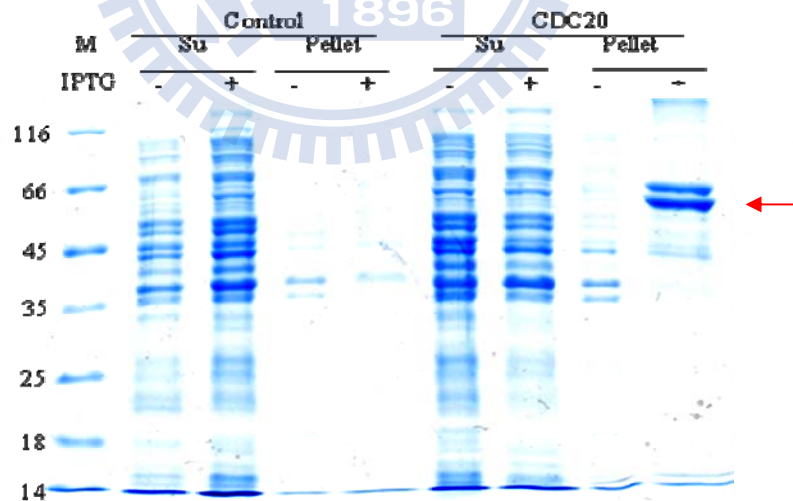


圖 23 CDC20 蛋白質表現—上清液與內涵體

以 1 mM IPTG 表現 pET30t-CDC20 菌株後，離心取上清液 (Supernatant)與內涵體 (Pellet)個別觀察蛋白質表現的蛋白質膠圖。M：Marker；Control 組為含有 pET30a 質體的菌。可以明顯在加入 IPTG 表現後的內涵體 60 kDa 附近看到 CDC20 蛋白質的表現。

RT Cloning 結果:

CDC14a 與 RPS10a 兩個基因片段是以 MMuLV 反轉錄酶反轉錄乳癌細胞 MCF7 RNA 而得到的基因片段。我們將反轉錄所得到的基因，以 PCR 方式放大，再以 TA cloning 的方式接到 pET30a 表現質體內。

CDC14a:

在反轉錄的實驗中，我們會各別確認 Total RNA 量、與細胞內部 positive 基因，GAPDH RNA 的表現，以確保 RNA 的品質。圖 24 中，RNA 會出現兩個片段，分別位於 3000 bp 與 1500 bp，各別為 28S RNA 與 18S RNA。而我們也明顯看到 positive 基因 GAPDH 反轉錄成功 (500 bp 片段)。同時也在圖中看到 CDC14a 預期的片段，594 bp。我們接續以 TA cloning 的方式建構 pET30t-CDC14a 的質體(圖 25)，也在 TA cloning 結果上，可看到篩選的片段 (744 bp，圖 26)。蛋白質表現上，也在內涵體中看到 36 kDa 的表現(圖 27)。

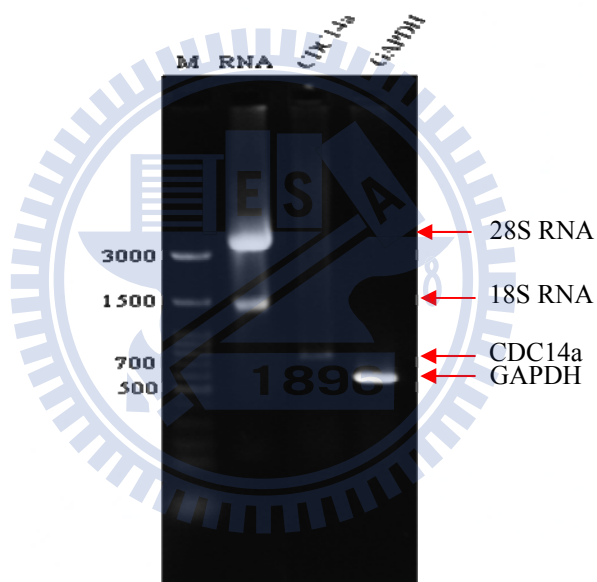


圖 24 CDC14a RT-PCR 結果：

以 Trizol 試劑破碎 MCF7 細胞後，抽取 RNA，再反轉錄為 cDNA 後，以 CDC14a 引子做聚合酶反應的結果。圖表中 M: Marker; RNA: Total RNA 2 μ g，上方約 3000 bp 的 band 為 28S RNA，下方 1500 bp 片段則為 18 S RNA；N: 聚合酶反應控制組，未加入 cDNA；CDC14a: 以 CDC14a 引子做聚合酶反應結果。預期的片段為 700 bp，如圖中箭頭所示；GAPDH: RT-PCR 的 positive control。

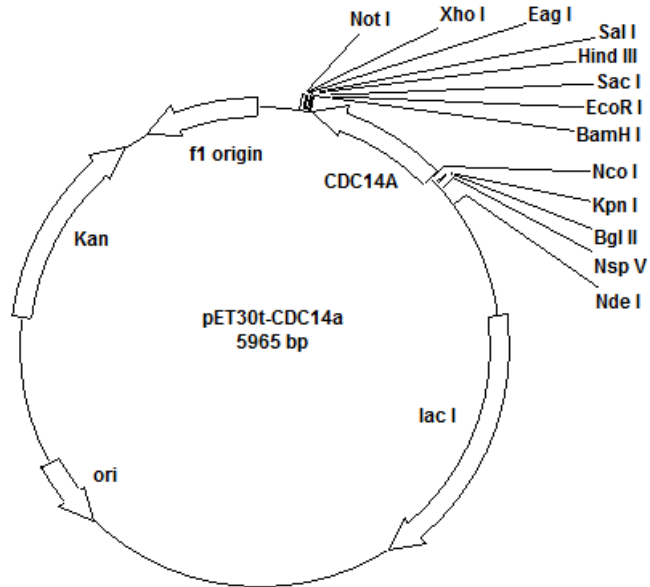


圖 25 pET30t-CDC14a 質體

以 TA cloning 的方式將 RT-PCR 夾出的 CDC14a 片段連結到 pET30a 質體後的質體圖。圖中 CDC14A 即為表現的基因片段位置，pET30t 表示 pET30a 質體經由酶切處理後的質體。



圖 26 CDC14a TA cloning 結果。

成功黏合後的 pET30t-CDC14a 質體轉殖到大腸桿菌後，挑選菌落後，以聚合酶反應做篩選。反應中，5'端以 T7 引子，3'端以 CDC14a 引子做 PCR 篩選。M: Marker; 2-47: 篩選的菌株編號。可以在 31、47 號菌落明顯看到預期的 CDC14a 片段: 950 bp (圖箭頭所示)。

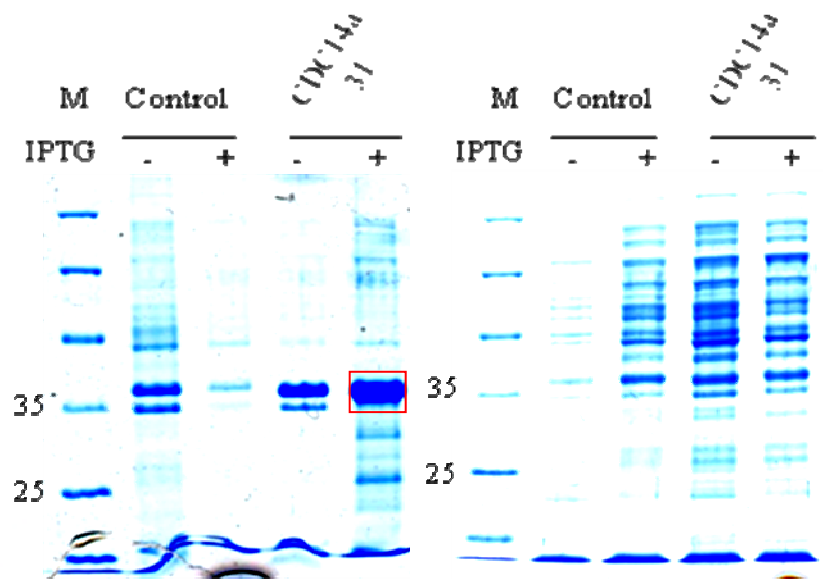


圖 27 CDC14a 蛋白質表現—上清液與內涵體

以 1 mM IPTG 表現 pET30t-CDC14a 菌株後，離心取上清液 (Supernatant, 左圖)與內涵體 (Pellet, 右圖)個別觀察蛋白質表現的蛋白質膠圖。M: Marker; CDC14a 31: 篩選到含有 pET30t-CDC14a 的菌株。可以明顯在加入 IPTG 表現後的內涵體 36 kDa 附近看到 CDC14a 蛋白質的表現。

RPS10A:

我們同樣在 RPS10 的反轉錄過程上，看到 positive 基因 GAPDH (500 bp)，以及目標基因大小片段出現(498 bp，圖 28)。TA cloning 上，也成功地篩選到預期片段 (750 bp)，並建構了 pET30t-RPS10a 的表現質體(圖 29、圖 30)。蛋白質表現上也看到了預期的片段大小 (26 kDa，圖 31)。

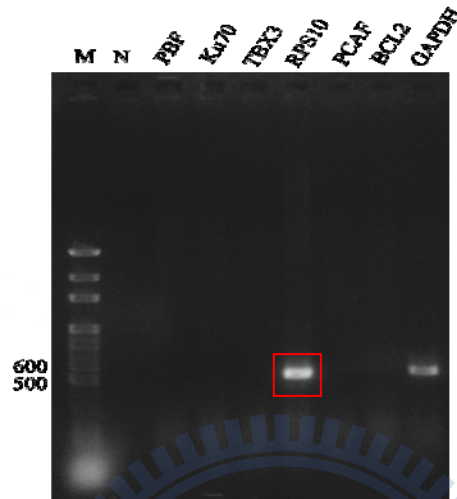


圖 28 RPS10A RT-PCR 結果

以 Trizol 試劑破碎 MCF7 細胞後，抽取 RNA，再反轉錄為 cDNA 後，以各個不同基因引子做聚合酶反應的結果。圖表中 M：Marker；N：聚合酶反應控制組，未加入 cDNA；PBF：以 PBF 引子做聚合酶反應結果；Ku70：以 Ku70 引子做聚合酶反應結果。TBX3：以 TBX3 引子做聚合酶反應結果。RPS10：以 RPS10A 引子做聚合酶反應結果。PCAF：以 PCAF 引子做聚合酶反應結果。BCL2：以 BCL2 引子做聚合酶反應結果。GAPDH：以 GAPDH 引子做聚合酶反應結果，此為 Positive control。紅色框為 RPS10A 引子成功夾出的預期片段，500 bp。

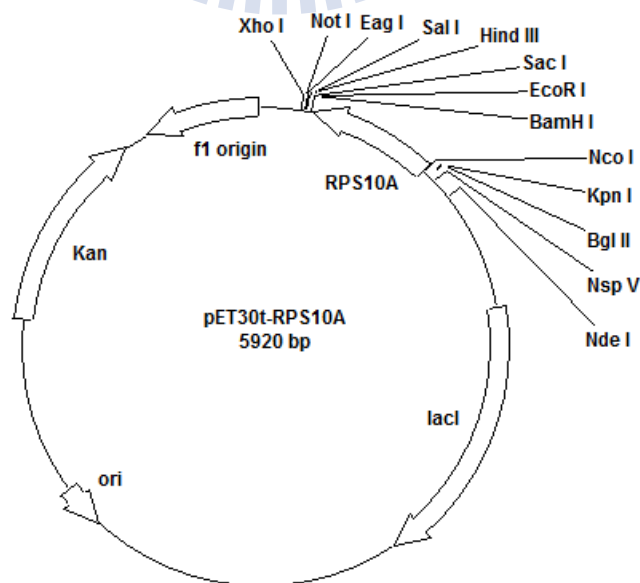


圖 29 pET30t-RPS10A 質體

以 TA cloning 的方式將 RT-PCR 夾出的 RPS10A 片段連結到 pET30a 質體後的質體圖。圖中 RPS10A 即為表現的基因片段位置，pET30t 表示 pET30a 質體經由酶切處理後的質體。

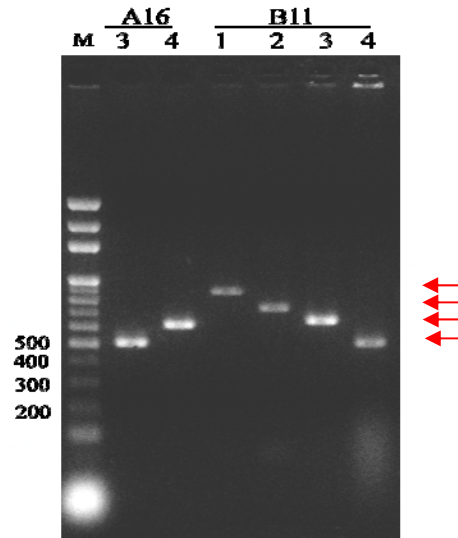


圖 30 RPS10A TA cloning 結果。

成功黏合後的 pET30t-PP2A 質體轉殖到大腸桿菌，以聚合酶反應做篩選所挑的菌落。反應中，我們採用不同的 primer 配對來確認質體的正确性。圖中 M：Marker；1 號：兩端皆為 T7 引子；2 號：5' 端為 T7，3' 端為 RPS10A；3 號：5' 端為 RPS10A 引子，3' 端為 T7；4 號：兩端皆為 RPS10A 引子。A16 與 B11 表示挑選到的菌株編號。預期位置：1 號：900 bp；2 號：750 bp；3 號：700 bp；4 號：500 bp。

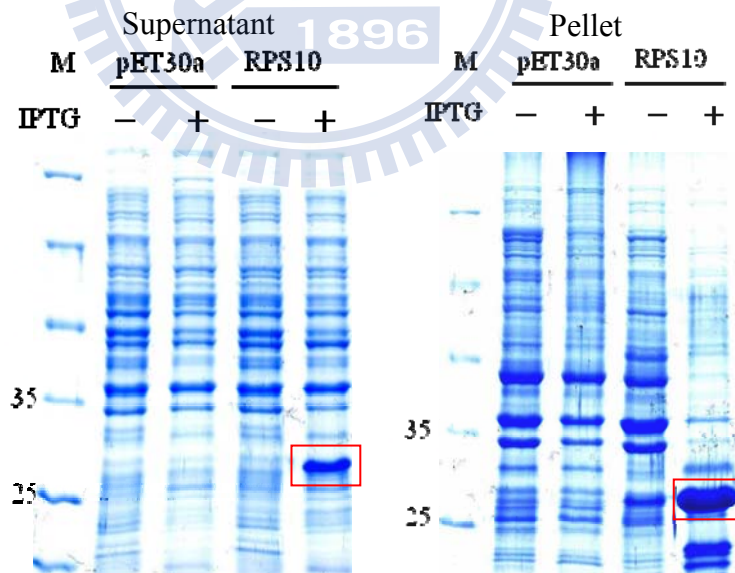


圖 31 RPS10A 蛋白質表現—上清液與內涵體

以 1 mM IPTG 表現 pET30t-RPS10A-A16 菌株 16 小時後，破菌離心取上清液 (Supernatant) 與內涵體 (Pellet) 個別觀察蛋白質表現的蛋白質膠圖。M：Marker；左圖為上清液，右圖為內涵體。加入 IPTG 後，培養 16 小時。可以明顯在加入 IPTG 表現後的上清液與內涵體 26 kDa 附近 (紅色框框) 看到 RPS10A 蛋白質的表現，然而內涵體表現量遠勝過上清液。

酵素酶切 cloning 結果：

BCL2A1 是請廠商為我合成的序列片段。我們請廠商在序列 5'端與 3'端各別加上 EcoRI 與 XhoI 的切位，以便利用酵素酶切方式，將 BCL2A1 切下，黏合到表現質體 pET30a 中。我們成功地建立了 pET30t-BCL2A1 的表現質體，酵素酶切結果中也看到 BCL2A1 與切除成功的 pET30a 質體，各別為 500 bp 與 5400 bp (圖 32、圖 33)。TA cloning 也成功篩選到我們要的片段大小 (650 bp，圖 34)。蛋白質表現也看到預期片段(26 kDa，圖 35)。

BCL2A1:

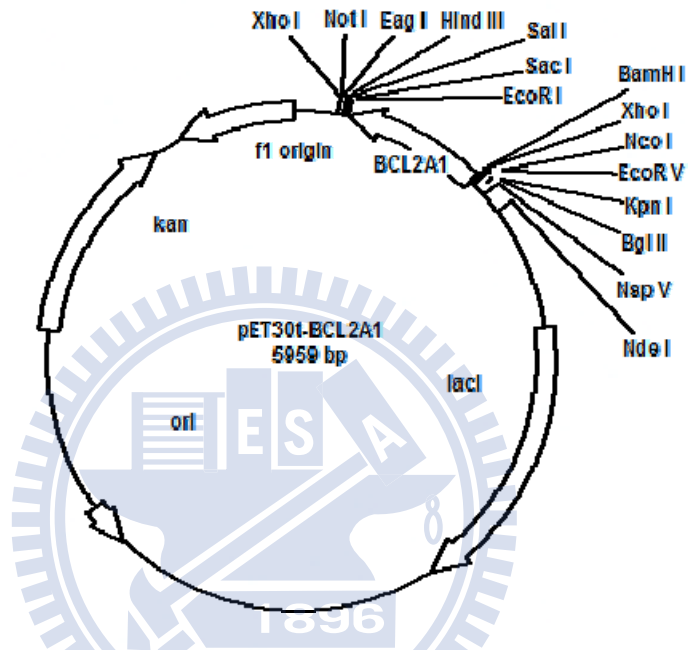


圖 32 pET30t-BCL2A1 質體

以酵素酶切的方式將 BCL2A1 片段連結到 pET30a 質體後的質體圖。圖中 BCL2A1 即為表現的基因片段位置，pET30t 表示 pET30a 質體經由酶切處理後的質體。

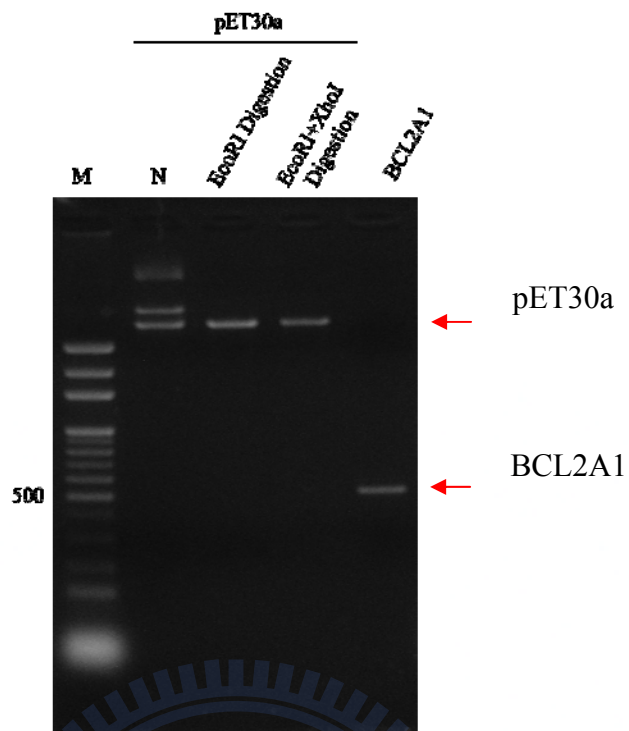


圖 33 EcoR I 與 Xho I 酵素酶切結果

以 EcoR I 與 Xho I 切除 pET30a 質體與位於 pUC57 上的 BCL2A1 基因。M：Marker；N：pET30a 質體；EcoR I：以 EcoR I 切除 pET30a；EcoR I + Xho I：以 EcoR I 與 Xho I 切除 pET30a 質體。BCL2A1：以 EcoR I + Xho I 切除位於 pUC57 上的 BCL2A1 片段。紅色箭頭個別表示 pET30a (5400 bp) 切除成功與 BCL2A1 (500 bp) 切除後的片段大小位置。

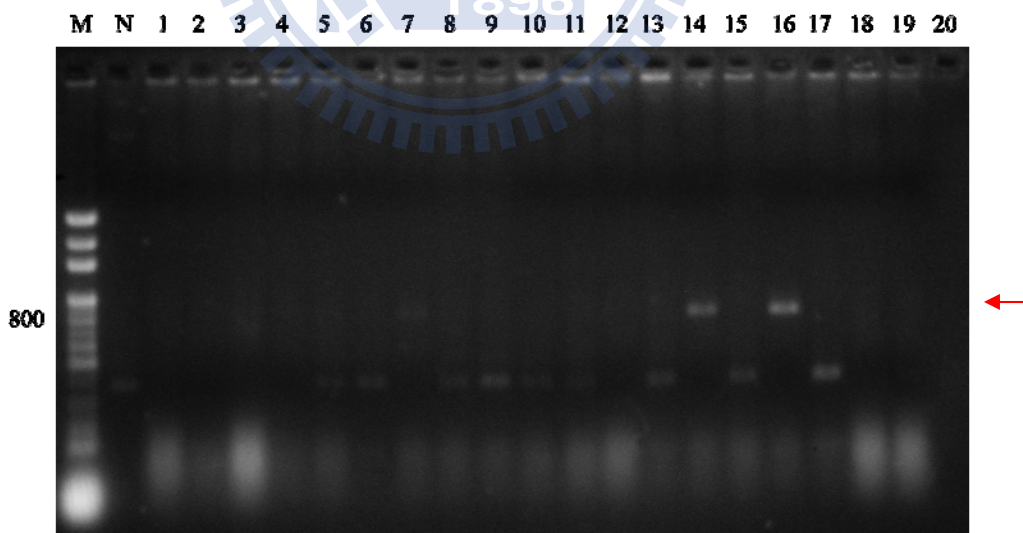


圖 34 pET30t-BCL2A1 菌落篩選

將 EcoR I 與 Xho I 切除過後的 pET30a 與 BCL2A1 片段以 T4 連接酶接合後，轉殖入大腸桿菌，以聚合酶反應篩選菌落的結果。使用的引子是 T7 引子，預期片段為 650 bp，即箭頭所指處。

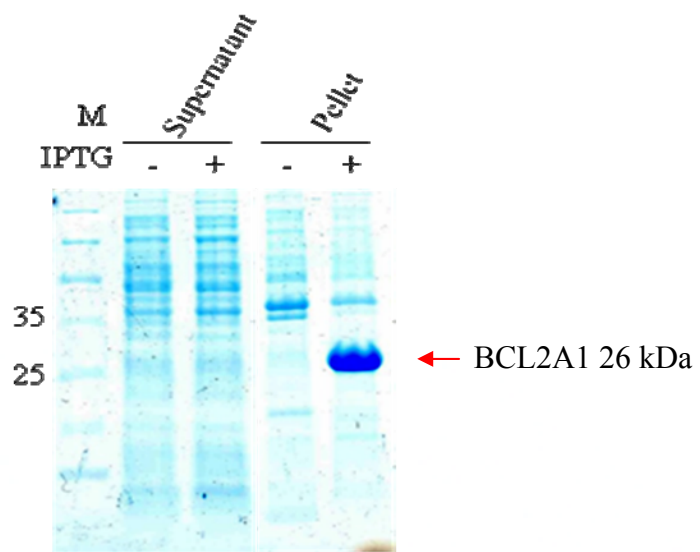


圖 35 BCL2A1 蛋白質表現—上清液與內涵體

以 1 mM IPTG 表現 pET30t-BCL2A1 菌株後，離心取上清液 (Supernatant)與內涵體 (Pellet)個別觀察蛋白質表現的蛋白質膠圖。M：Marker。可以明顯在加入 IPTG 表現後的內涵體 26 kDa 附近看到 BCL2A1 蛋白質的表現 (紅色箭頭)。

Securin His-tag 純化結果：

pET200-securin 是實驗室之前建構完成的表現質體，其前端含有六個 His tag 序列以供純化(圖 36)。我們以 1 mM IPTG 誘使菌株表現 securin 蛋白質，破菌後，取內涵體，以實驗室自行建構的摺疊方式，將含有 securin 蛋白質的內涵體摺回自然態。圖 37 所示之 P 的位置即為摺疊完的內涵體跑膠圖，可以在 26 kDa 附近看到兩條可能的蛋白質電泳帶。然而經過純化過後，可發現上方接近 26 kDa，表現量較少的才是我們所要的蛋白質(圖 37 之 E)。由膠上結果可以看出，His-tag 能夠純化出純度大於 95% 的 securin 蛋白質。

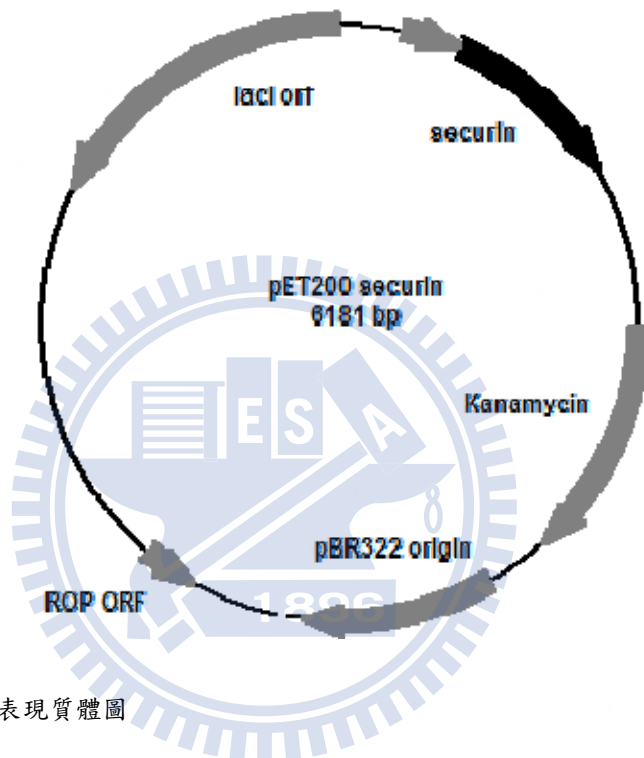


圖 36 Securin 蛋白質表現質體圖

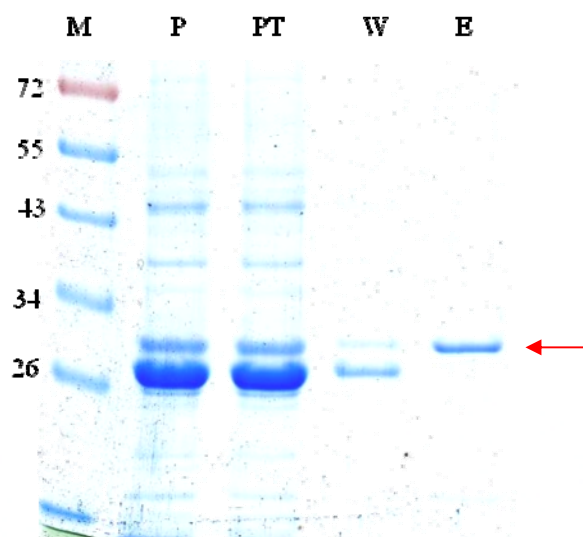


圖 37 His-tag 純化 securin 蛋白質結果

以 His-tag 純化 securin 蛋白質後，跑 SDS-PAGE 確認是否純化成功。圖中 M：Marker；P：摺疊完成後的 securin 內涵體；PT：流過 His-tag 管柱後的 securin 內涵體；W：Wash，緩衝液清洗管柱；E：Elution，以 Imidazole 沖洗管柱流出之樣品。箭頭所指為 securin 蛋白質的位置。



4-2 Securin 的磷酸化與其結構與其結構變化：

我們將大腸桿菌表現出來的 Securin，以 Erk2 細胞外處理 16 小時，以 securin 抗體辨識。磷酸化過後的 securin 會向上移動到 34 kDa 的位置(圖 38)。將此位置的蛋白質膠體取下，請合作的實驗室以 Mass 鑑定的結果，發現有 17 個磷酸化的位置(圖 38)。其中第 3、16、66、165、183、187 的胺基酸位置為前人所發現，其餘位置皆是實驗室此次磷酸化所發現到的，其磷酸化位置集中在 securin 功能性區塊(DNA binding domain、transactivation domain、與 SH3)。詳細的 Mass 結果見附錄。為了探討磷酸化後 securin 蛋白質的結構有否有所變化，我們利用圓二色光譜儀各別偵測 10 μ M 的 securin 蛋白與磷酸化處理的 securin 蛋白質。圖 40 的 CD 結果圖，磷酸化後的 securin 在 200 nm 波長的訊號會有減弱的現象。

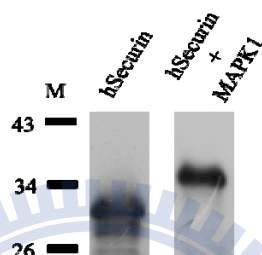


圖 38 Erk2 磷酸化 securin 的結果

磷酸化後的 securin (右圖)會有向上移位的現象。

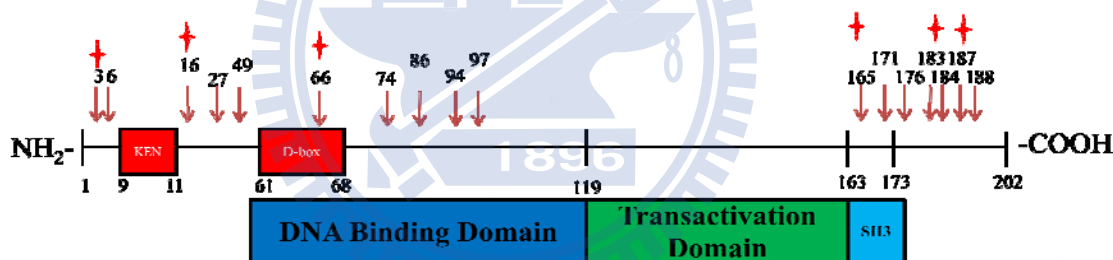


圖 39 Mass 鑑定 securin 磷酸化結果圖

圖上紅色箭頭為 Mass 鑑定結果中，含有磷酸化的位置。打星號的位置為之前學者研究出會受到磷酸化的位置[49, 53]。

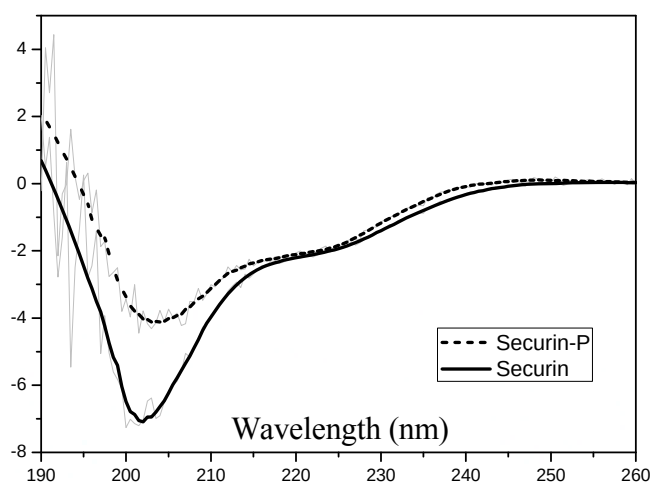


圖 40 磷酸化 securin 蛋白質與 securin 蛋白質 CD 圖

實線為非磷酸化的 securin 蛋白質，虛線則為磷酸化過後的 securin 蛋白質。由圖上可以看到，磷酸化後的 securin 蛋白質於 200 nm 波長位置的訊號有減弱的跡象。



4-3 遠西方墨點法 (Far Western)結果:

我們各別將這些蛋白質表現出來後，以點漬法 (Dot blot)加上遠西方墨點法的方式，以 securin 與磷酸化過後的 securin 蛋白質，個別做鍵結能力上的探討(圖 41、圖 42、圖 47)。我們將所表現出的蛋白質，以 Hill plot 做圖(圖 43、圖 44、圖 45)，並分析各個 K_M 、 n 值與 V_{max} 值(表 8)。結果顯示所有蛋白質皆會與 securin 作用；然而磷酸化後的 securin 蛋白質僅與 CDC14a、PP2AB55 β 、與 BCL2A1 有所交互作用。我們同樣將結果以 Hill plot 做圖(圖 48、圖 49、圖 50)，並計算各個參數值(表 9、表 10、表 11)，列表而出。並在最後，我們將有磷酸化與未磷酸化的數值再做一個表格做比較(表 9、表 10、表 11)。

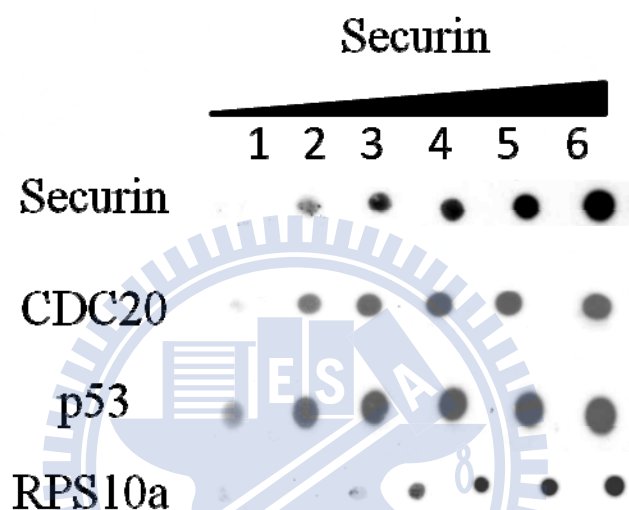


圖 41 點漬法確認與 securin 與 CDC20、p53、與 RPS10 的交互作用

圖為 securin 與各個交互作用蛋白質的結果。Se 表示 securin，圖中 securin 由左而右的濃度為 0.039、0.078、0.156、0.312、0.625、與 1.25 ng，用以做為每片膠片強度的對照組。圖中各個蛋白質濃度由左而右漸增。

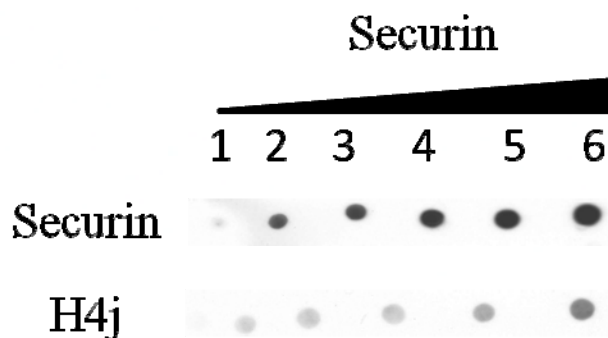


圖 42 點漬法確認 securin 與 Histone 4j (H4j)交互作用

圖為 securin 與各個交互作用蛋白質的結果。圖中 securin 由左而右的濃度為 0.039、0.078、0.156、0.312、0.625、與 1.25 ng，用以做為每片膠片強度的對照組。

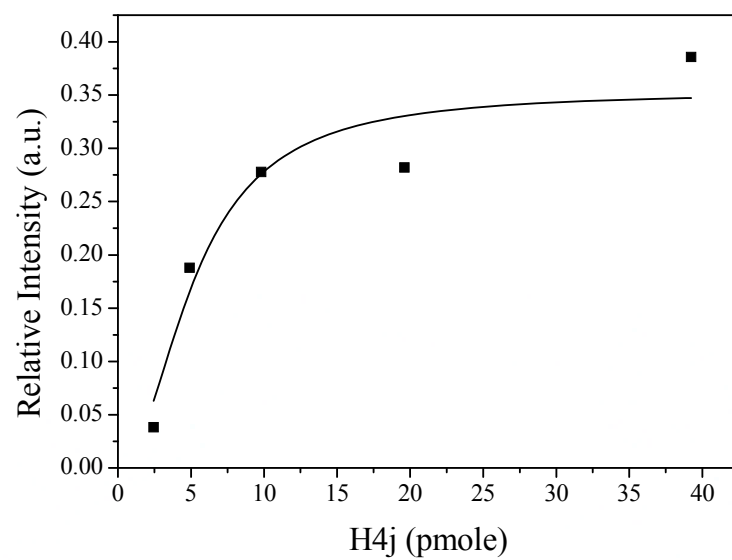


圖 43 Securin 蛋白質與 H4j 交互作用力偵測圖

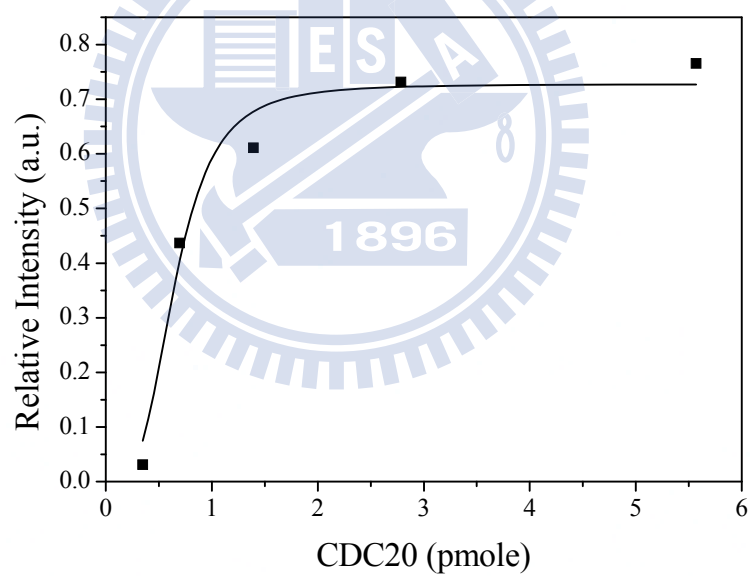


圖 44 Securin 蛋白質與 CDC20 交互作用力偵測圖

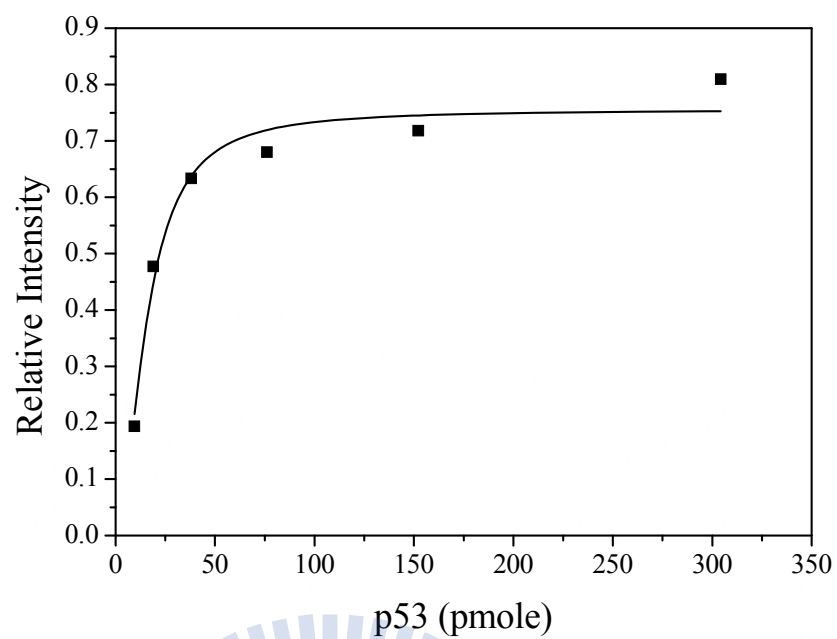


圖 45 Securin 蛋白質與 p53 交互作用力偵測圖

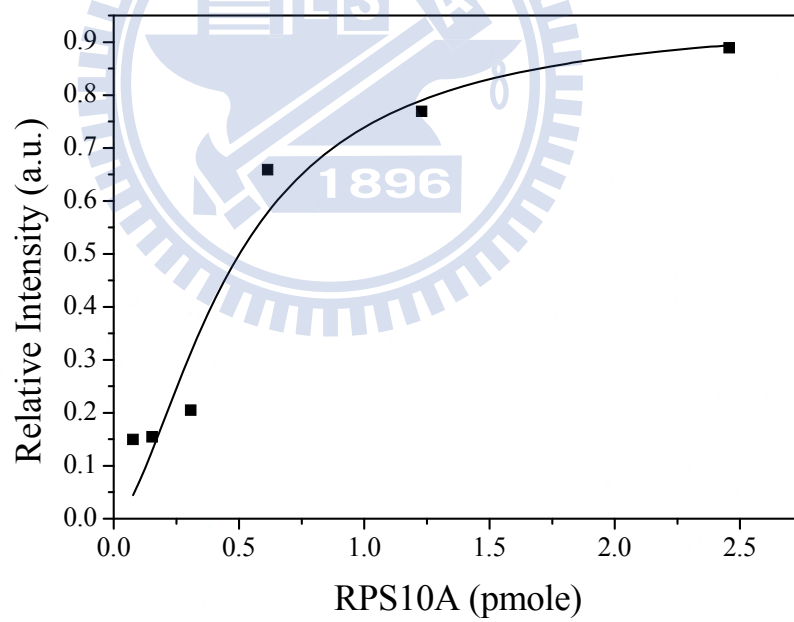


圖 46 Securin 蛋白質與 p53、CDC20、RPS10a 與 H4j 交互作用力偵測圖

蛋白質種類	$V_{\max}$	K_M (mole^{-1})	n 值
CDC20	0.728	6.53×10^{-13}	3.44
p53	0.755	1.5×10^{-11}	1.88
RPS10a	0.952	4.72×10^{-13}	1.66
Histone 4j	0.353	5.22×10^{-12}	2.02

表 8 Securin 與蛋白質 CDC20、p53、RPS10a 與 Histone 4j 交互作用 $V_{\max}$ 、 K_M 值與 n 值表

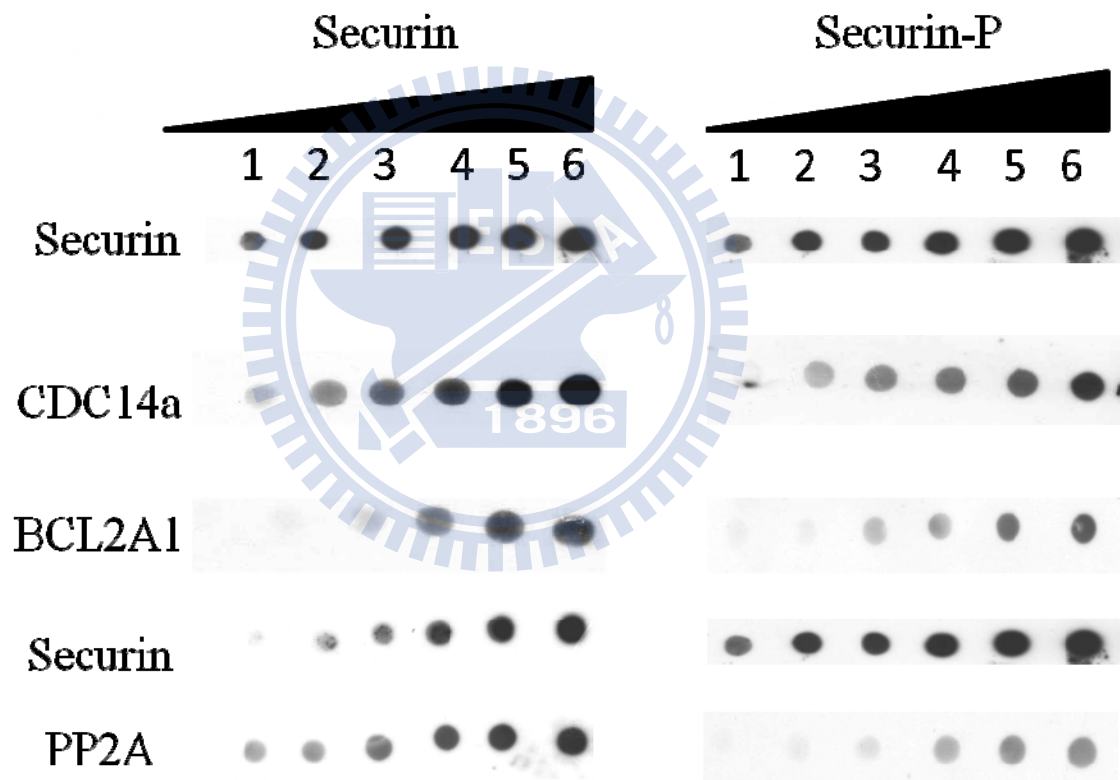


圖 47 點漬法探討 securin 與磷酸化後的 securin 對 CDC14a、BCL2A1、PP2A 交互作用的影響

左圖為未磷酸化 securin 點漬法結果，右圖則為磷酸化的 securin 點漬法結果。圖中 securin 由左而右的濃度為 0.039、0.078、0.156、0.312、0.625、與 1.25 ng，用以做為每片膠片強度的對照組。

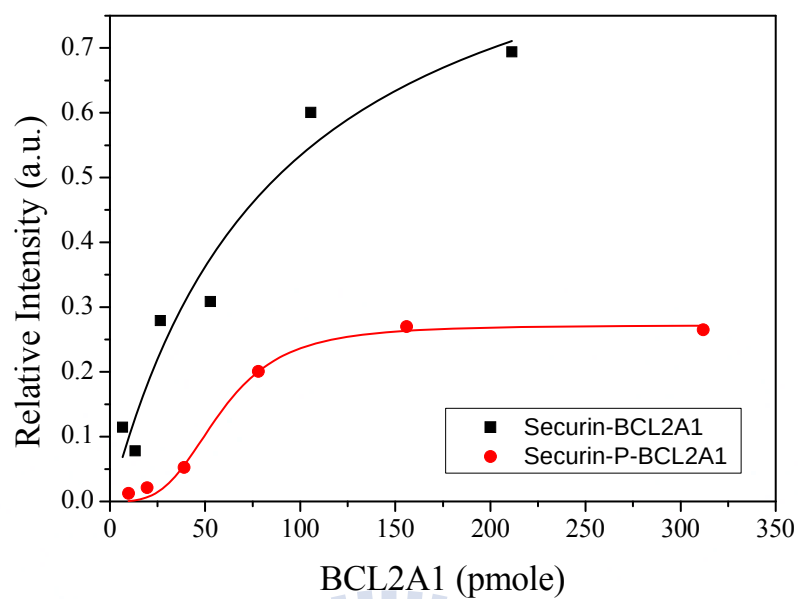


圖 48 Erk2 磷酸化後的 securin 蛋白質與 BCL2A1 鍵結能力 Hill Plot 分析圖

圖中黑色為未磷酸化的 securin 與 BCL2A1 作用圖；紅色則為磷酸化過後的 securin 蛋白質與 BCL2A1 的作用圖。

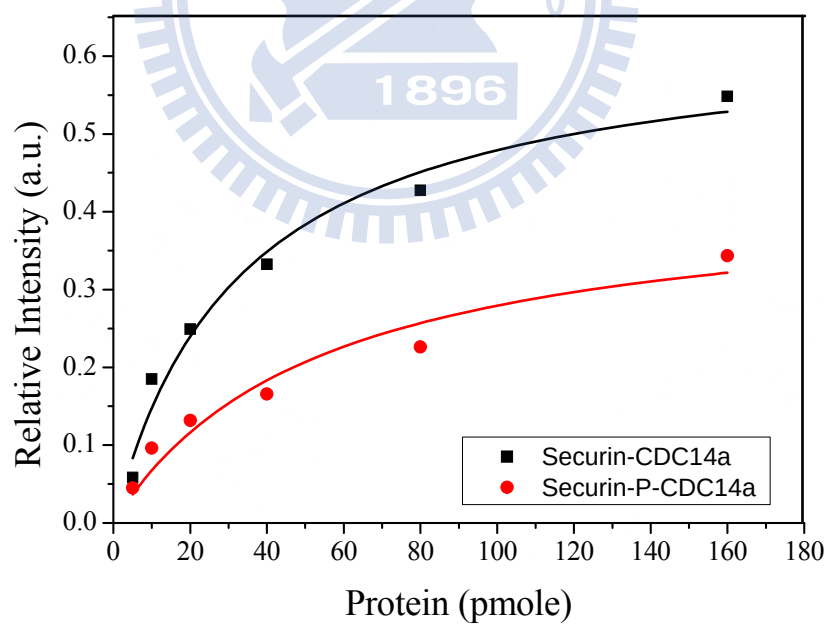


圖 49 Erk2 磷酸化後的 securin 蛋白質與 CDC14a 鍵結能力 Hill Plot 分析圖

圖中黑色為未磷酸化的 securin 與 CDC14a 作用圖；紅色則為磷酸化過後的 securin 蛋白質與 CDC14a 的作用圖。

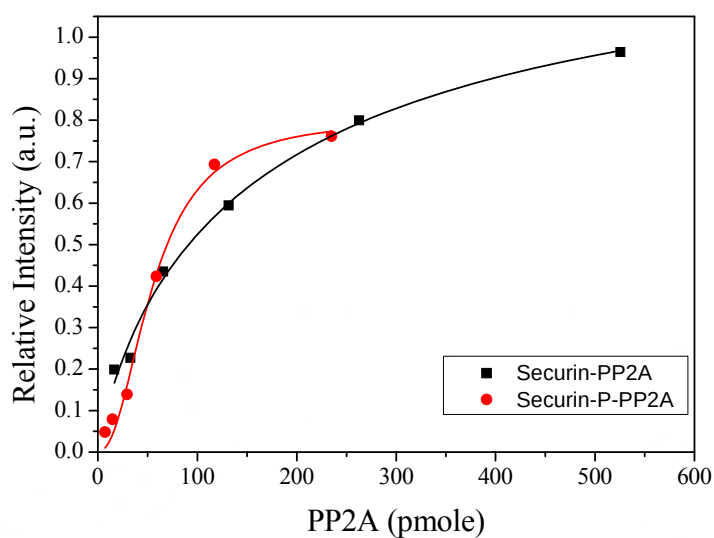


圖 50 Erk2 磷酸化後的 securin 蛋白質與 PP2A 鍵結能力 Hill Plot 分析圖

圖中黑色為未磷酸化的 securin 與 PP2A 作用圖；紅色則為磷酸化過後的 securin 蛋白質與 PP2AB55β 的作用圖。

蛋白質種類	與 securin 交互作用之 n 值	與磷酸化過後的 securin 交互作用之 n 值
PP2AB55β	0.83	2.18
BCL2A1	1.01	3.44
CDC20	3.44	NA
Histone 4j	2.02	NA
CDC14a	0.83	1.00
RPS10a	0.952	NA
p53	0.755	NA

表 9 未磷酸化與磷酸化後的 securin 與各個蛋白質交互作用 n 值表

蛋白質種類	與 securin 交互作用之 K_M 值	與磷酸化過後的 securin 交互作用之 K_M 值
PP2AB55β	1.71×10^{-10}	5.56×10^{-11}
BCL2A1	8.83×10^{-11}	5.8×10^{-11}
CDC20	6.53×10^{-13}	NA
Histone 4j	5.22×10^{-12}	NA
CDC14a	4.97×10^{-11}	5.39×10^{-11}
RPS10a	4.72×10^{-11}	NA
p53	1.5×10^{-11}	NA

表 10 未磷酸化與磷酸化後的 securin 與各個蛋白質交互作用的 K_M 值能力值表

蛋白質種類	與 seucrin 交互作用之 $V_{\max}$ 值	與磷酸化過後的 seucrin 交互作用之 $V_{\max}$ 值
PP2AB55 β	1.35	0.806
BCL2A1	1.00	0.272
CDC20	0.728	NA
Histone 4j	0.353	NA
CDC14a	0.743	0.429
RPS10a	0.952	NA
p53	0.755	NA

表 11 未磷酸化與磷酸化後的 seucrin 與各個蛋白質交互作用的 $V_{\max}$ 值能力表



4-4 Securin 磷酸化對 p53 鍵結能力的影響

我們由先前的點漬法得知磷酸化的 securin 蛋白質並未顯示出與 p53 鍵結的能力 (圖 41)。在此我們進一步以細胞實驗了解 securin 磷酸化與 p53 鍵結能力變化的重要性。我們將 MCF7 細胞分別在未照射 (控制組)與照射 (UV 組)4 kJ/m² 後,培養 0、2、4、6 小時,取細胞萃取物以 p53 serine 15 磷酸化、Erk2、securin 的抗體做西方墨點法。圖 51 結果之圖 A 顯示,當細胞未受到 UV 照射時,p53 serine 15 並未受到磷酸化,securin 蛋白質的變化也有隨細胞培養時間上升;然而當細胞受 UV 照射後,p53 serine 15 磷酸化被抗體所辨識,而 securin 也有降解的現象產生。圖 B 與圖 C,是將各蛋白質相對於 Erk2 作量化的趨勢圖。可以看到隨著培養時間增加,控制組 securin 蛋白質表現量漸增,而 UV 組 securin 表現量則下降。



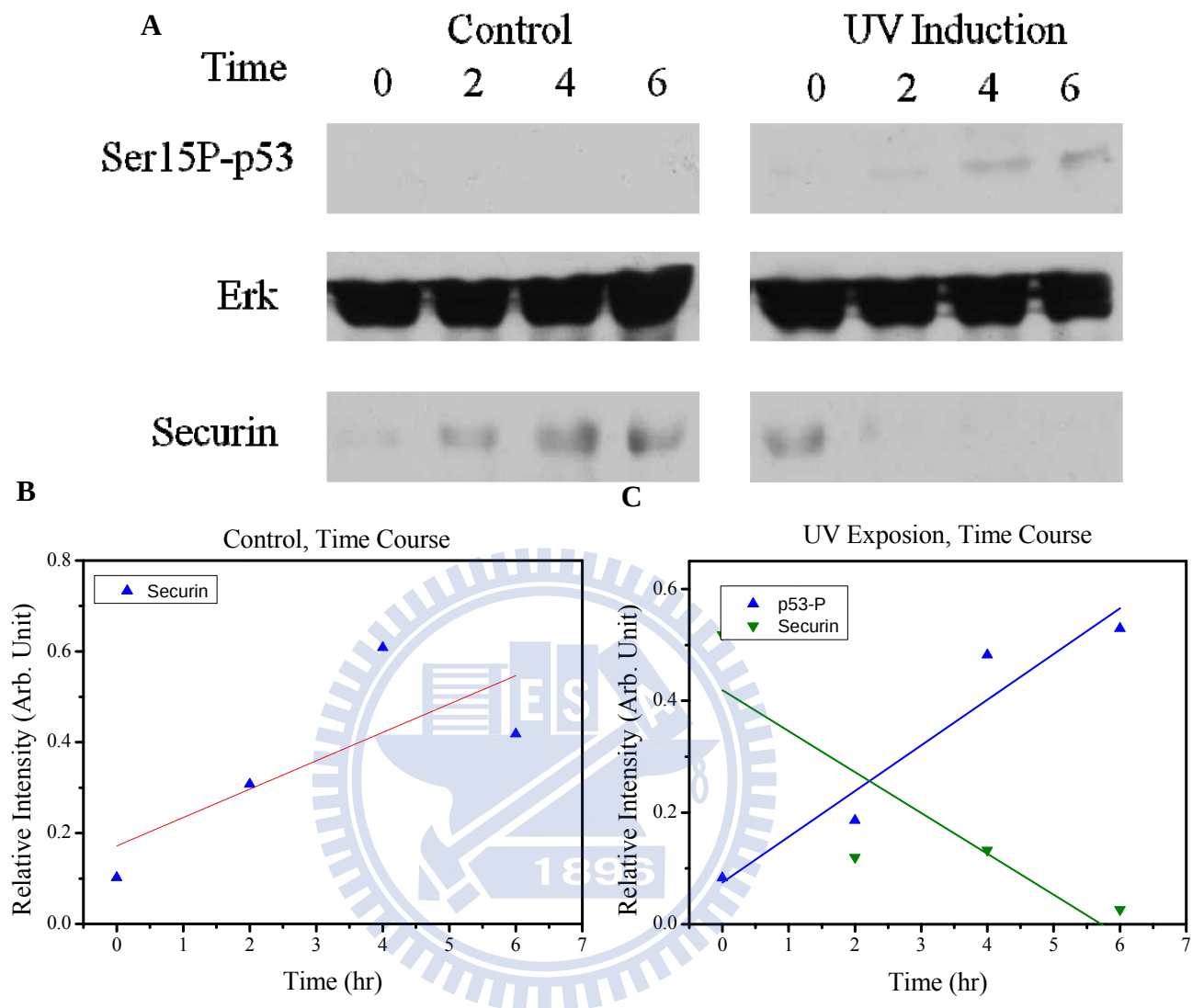


圖 51 細胞實驗探討 UV 造成的 p53 細胞凋零機制與 securin 的關係

A 圖：西方墨點方探討各蛋白質在未照射 UV (control)與照射 UV (UV Induction)後的結果。Ser15P-p53：serine 15 磷酸化 p53。

B 圖：控制組各蛋白質相對 Erk 的對照強度圖。

C 圖：UV 照射組各蛋白質相對 Erk 的對照強度圖。

4-5 EIS 結果—磷酸化與未磷酸化 securin 蛋白質對 p53 鍵結 Bax 啟動子基因的影響

我們利用電化學感測的方式 (EIS)，在金電極上面鍵結一層 Bax 啟動子基因序列，經由 18 硫醇阻擋剩餘的裸露金電極後，接續以 Lysozyme、p53、securin、securin 與 p53 混合液、與磷酸化過後的 securin 與 p53 混合液各別做測試。我們以實驗原理 3-6 所述進行模擬，我們要求模擬的參數值中， χ^2 值是一個模擬的可信度依據。在這些結果中，我們所關注的是 R_{ct} 的變化值，代表電極表面覆蓋物質的變化性。在 securin 反應中，18 硫醇到接 securin 的 R_{ct} 數值由 29.54 k Ω 變為 28.18 k Ω ；securin 與 p53 混合液的則從 28.89 k Ω 變動為 27.52 k Ω 。兩次實驗的 R_{ct} 不無明顯地變化(圖 52、圖 54、表 12、表 14)。在 p53 蛋白質的結果上，我們可以看到 R_{ct} 值由 54.04 k Ω 增加到 81.59 k Ω (圖 53、表 14)，約上升了 1.5 倍多。最後，在 p53 與磷酸化後的 securin 蛋白質反應的結果顯示， R_{ct} 值也是有上升的跡象，由 93.36 k Ω 增為 113.36 k Ω ，上升約 1.2 倍，其上升的幅度並未如 p53 那樣顯著(圖 55 表 15)。我們將這些結果的中，接上各蛋白質的 R_{ct} 值與接上 18 硫醇的 R_{ct} 差值除上 18 硫醇的 R_{ct} 值來做一個比較，數值顯示 securin 與 securin+p53 混合液數值變動約為 0，p53 為 0.51，磷酸化 securin 加上 p53 則為 0.2(圖 56、表 16)。

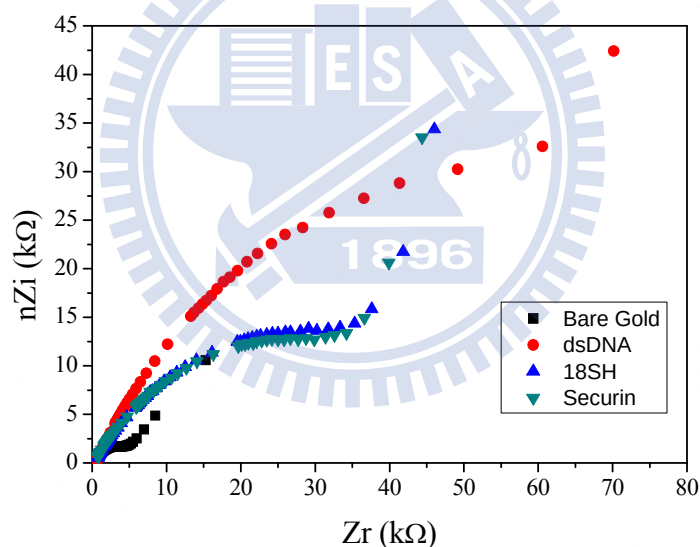


圖 52 電化學感測—Bax 基因與 securin 蛋白質反應結果

Title	bare gold	dsDNA	18 SH	Securin
χ^2	1.28E-03	1.06E-03	2.65E-03	3.07E-03
R_{ct} (KOhm)	3.80	61.86	29.54	28.18

表 12 電化學感測—Bax 基因與 securin 反應參數表

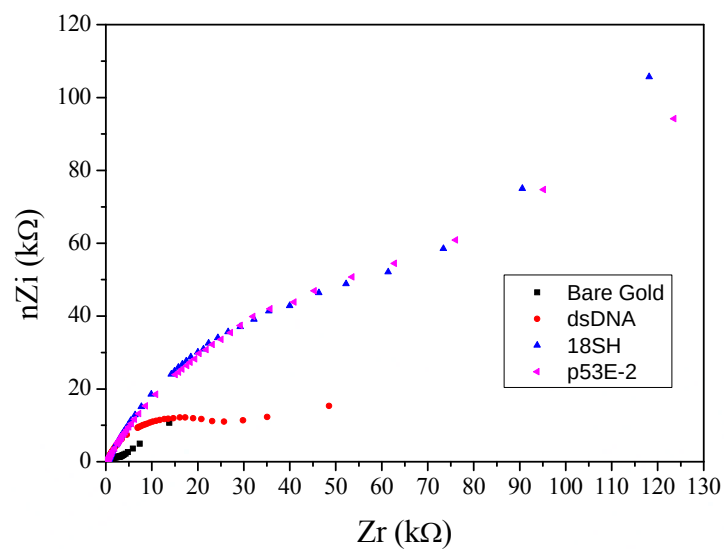


圖 53 電化學感測—Bax 基因與 p53 蛋白質反應結果

Title	bare gold	dsDNA	18SH	p53
χ^2	7.93E-04	1.88E-03	8.59E-03	4.40E-03
R_{ct} (KΩ)	2.20	32.05	54.04	81.59

表 13 電化學感測—Bax 基因與 p53 蛋白質反應參數表

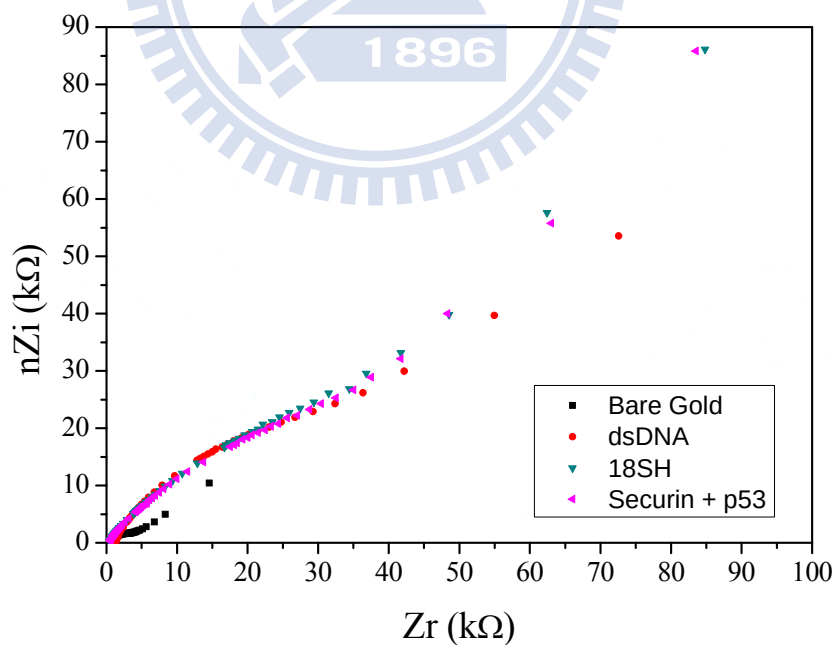


圖 54 電化學感測—Bax 基因與 securin+p53 混合液反應結果

Title	bare gold	dsDNA	18SH	Securin+p53
χ^2	9.99E-04	7.85E-04	1.73E-03	1.96E-03
R_{ct} (K Ω)	2.31	35.96	28.89	27.52

表 14 電化學感測－Bax 基因與 securin + p53 混合液反應參數表

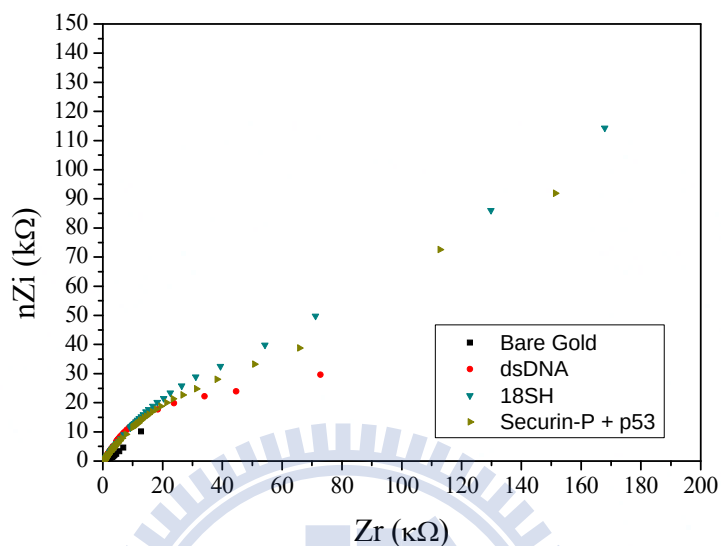


圖 55 電化學感測－Bax 基因與 securin 磷酸化+p53 混合液反應結果

Title	bare gold	dsDNA	18SH	Securin-P+p53
χ^2	9.99E-04	3.54E-03	1.40E-03	3.18E-03
R_{ct} (k Ω)	2.31	68.29	93.66	113.32

表 15 電化學感測－Bax 基因與 securin -P + p53 混合液反應參數表

	Securin	P53	Securin+p53	Securin-P + p53
$R_{ct}\text{-Protein}/R_{ct}\text{-18SH}$	-0.04	0.51	-0.05	0.21

表 16 電化學感測結果總整理

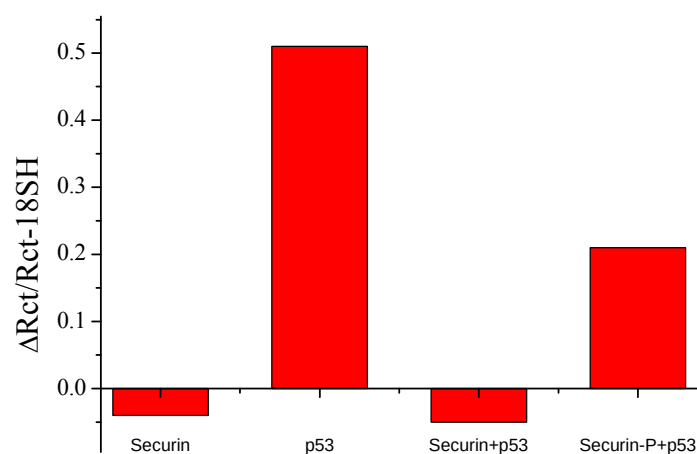


圖 56 EIS 檢測各種蛋白質與 Bax 基因作用之比較圖

Securin、p53、securin 與 p53 混合液、磷酸化 securin 與 p53 混合液相對 18 硫醇 R_{ct} 的變化值。可以看到 securin 與 securin+p53 混合液阻抗質變化不高，而 p53 與磷酸化 securin+p53 的反應卻各別增加了阻抗值 0.51 與 0.21 倍。

第五章、討論

5-1 各基因與蛋白質純度、序列之分析

我們所建構的蛋白質中，以 TA cloning 方式建構的有六株：各別為 CDC14a、CDC20、PP2A、Histone 4j 與 RPS10；以酵素酶切建構的則為 BCL2A1。TA cloning 技術的優點在於速度，只需設計好引子，確認讀框是否正確，即可再做完聚合酶連鎖反應後，直接以 T4 連接酶將目標基因接於預表現的質體上 (pET30a)。不可免俗的，這樣的技術自然也有其缺點。首先，由於目標基因是以聚合酶連鎖反應大量製造所得，容易在此步驟產生一些突變的現象。我們所使用的聚合酶為 Taq，突變機率為二千四百分之一 [136]。也因此，後續需要利用定序的方式，確認是否基因序列完整無誤。其二，則是如前面結果 4-1 所述，會有反序的可能性。而為了避免在後續基因轉殖過程，篩選到反序的片段，我們在篩選過程中，會以引子交互配對的方式來進行篩選。基因 clone 結果內，我們在 5'端以 T vector 上的 T7 引子，3'端則以基因 3'端引子做篩選。若是黏接的基因為反序，聚合酶反應後的片段遠小於基因片段大小，將無法在 agarose 膠上看到預期的基因片段，因而能過濾反序的現象。

在基因定序方面，TA cloning 中，有發現序列突變的有三株：各別為 CDC14a、Histone 4j 與 CDC20。CDC14a 為第 215 序列上，GAA 突變為 GAG。Histone 4j 是基因序列第 47 位置，GTT 突變為 GCT，後續胺基酸序列則是 A 突變為 V。CDC20 擁有兩個突變點：序列第 861 與 1423，各別為 T→C 突變與 A→T 突變。這兩個突變造成後續胺基酸的轉譯上，308 後上的 Q→L，525 L→M。CDC14a 雖有突變，然而在後續轉譯的蛋白質序列中，並未引響其胺基酸序列 C 的轉變，判定為 silent mutation。Histone 4j 與 CDC20 共同有的 T→C 突變，是 Taq DNA 合成酶發生突變頻率最高的[136]。我們在線上資料庫上查詢結果，Histone 4j 在此處未有任何突變前例，而先前基因的來源也鑑定過，並無任何序列突變現象，所以判定為聚合酶連鎖反應時所造成的突變現象。然而胺基酸 V 與 A 的結構差異上並不大，而此處為 Histone 4j 蛋白質結構 N 端，並無特殊結構，屬於鬆散的結構狀態[137]，推測此處的突變或許並不影響 Histone 4j 結構的形成，而是否會有重大功能性改變，此點並不清楚。CDC20 存在著一個不同於 Histone 4j 的突變點：A→T 突變。前人研究顯示，Taq 在 A→T 的突變機率遠小於其他突變的可能性，可能性回歸到 CDC20 基因源頭。然而 CDC20 的來源基因經過定序並未發現任何突變的形成，因此，推測一樣是由聚合酶連鎖反應所造成。而在前人的研究上並未將 CDC20 解出結構，而在資料庫上也並未發現這兩個突變點，因此我們不清楚是否此突變會造成結構的改變。Far Western 的結果(圖 41)中，我們依舊可以看到 securin 與 CDC20 的交互作用，且在其並不與磷酸化過後的 securin 蛋白質反應，可以推測這兩個突變點不影響其對 securin 的功能。

TA cloning 外，另一株 BCL2A1 是以酵素酶切的方式建構。由於我們是利用雙酵素酶切的方式：5'端以 EcoR I 做酶切，3'端以 Xho I 做酶切。因此，在做黏接的

過程中，是不會如 TA cloning 一般出現反序的情形。後續的定序上，我們也確認序列正確，蛋白質表現也在預期的位置。

5-2 Securin 磷酸化的結構變化

蛋白質的後修飾對蛋白質的交互作用具有一定程度上的影響力。過去的文獻記載，securin 含有兩種後修飾作用，分別為磷酸化 (phosphorylation) 與泛素化作用 (ubiquitination)[58]。目前已知對 securin 作用的磷酸化酵素具有 Erk2、CDK1 (or CDC2) 與 DNA-PK[18, 64, 67]。前人研究上，Erk2 能夠磷酸化 securin 第 165 號胺基酸 serine，促使 securin 由細胞質移動到細胞核中。CDK1 則是在細胞分裂期，將 securin 第 3、16、66 號 threonine，與 165 號胺基酸 serine 磷酸化後，使得 securin 抑制 separase 的活性，預防細胞提早進入細胞後期。DNA-PK 目前僅知具有磷酸化 securin 的能力，其位置目前並不清楚，而功能性可能與 DNA 的修復有所相關性。泛素化作用則與 securin 蛋白質降解有關係。在細胞中，扮演 securin 泛素化的角色為細胞核分裂後期促進複合體(anaphase promoting complex, APC)[30]。

我們向廠商購置了 Erk2 酵素，在試管實驗中個別對 securin 做磷酸化。圖 38 Erk2 磷酸化 securin 的結果顯示，Erk2 不僅磷酸化 securin，也可能影響了 securin 的結構或是帶電性，造成磷酸化後的 securin 有 band shift 的現象產生。而在 Mass 的鑑定上，我們發現除了已知的第 3、16、66、165、183 與 187 號胺基酸受到磷酸化外，還有額外的 11 個位置也被偵測到有磷酸化的現象。這幾號磷酸化的胺基酸序列整理如下：

P P P P P

MATLIYVDKE NGEPGTRVVA KDGLKLGS GP SIKALDGRSQ VSTPRFGKTF DAPPALPKAT 60

P P P P P

RKALGTVNRA TEKSVKTKGP LKQKQPSFSA KKMTEKTVKA KSSVPA SDDA YPEIEKFFPF 120

P P P

NPLDFESFDL PEEHQIAHLP LSGVPLMILD EERELEKLFQ LGPPSPVKMP SPPWESNLLQ 180

PP PP

SPSSILSTLD VELPPVCCDI DI 202

序列上的方框依序為 KEN box (9-11)、D box (61-68) 與 proline-rich (160-190) 區間。由前面的文獻我們知道，Erk2 磷酸酶辨識的序列分別為 S/TP、PXS/TP、KIM (Kinase Interacting Motif，或 D domain，主要是由一群受到疏水性胺基酸所圍繞的鹼性胺基酸序列)、FXF、與 FXFP。在 KEN box 附近，除 3、16 號兩個位置為已知的磷酸化位置外，我們發現 6 號也會受到 Erk2 的磷酸化。在 D box 附近，除了 D box 上 (66 號) 外，71 與 74 也是可能影響其功能的胺基酸。而在 Erk2 磷酸化的序列中，有極多數位於 60–120 胺基酸中。securin 在此處的序列有個重要性，他擁有極多的鹼性胺基酸，占了整個序列約 32%。這段序列週遭亦符合 KIM 序列，而此段序列的重

要性在於與 DNA 的交互作用。最後，在 proline-rich 的區間，除了含有大量的 proline 胺基酸外，也有六個 serine 與一個 threonine 胺基酸。其中 165、183 與 187 為已知的位置。由 Erk2 鍵結的序列來看，第 171 號極可能也是 Erk2 磷酸化的目標。

在點漬法的結果中(圖 48、圖 49、圖 50)，磷酸化後的 securin 蛋白質，使得大部份蛋白質的交互作用受到影響。而過去許多學者往往對蛋白質磷酸化與蛋白質交互作用提出疑問：是何種原因造成磷酸化後的蛋白質交互作用力的改變？針對這個問題，我們以圓二色光譜儀 (CD)偵測磷酸化前與磷酸化後蛋白質結構變化。圖 40 磷酸化 securin 蛋白質與 securin 蛋白質 CD 圖顯示，磷酸化後的 securin 蛋白質在 200 nm 波長訊號減弱。根據前人所述，200 nm 訊號所代表的意義為 securin PPII (poly-proline helical like structure II)結構的穩定度[44]。securin 的結構上含有兩個 PPII 的結構，各別位於胺基酸 163–166，170–173 的位置。而 163-166 剛好位於 Erk2 磷酸化的位置，我們推測 CD 訊號上的改變，可能是磷酸化導致 securin 蛋白質此處 PPII 的結構更加鬆散，造成對後續蛋白質作用能力的影響。另外一點的可能性，或許在於 60-120 號之間序列的大量磷酸化。這些磷酸化導致此處鹼性胺基酸的正電性減弱，使得 securin 疏水性提高，導致結構性的改變。

5-3 遠西方墨點法蛋白質交互作用

實驗上，我們利用點漬法加上西方墨點法，各別偵測出 securin 與每個蛋白質的交互作用力(表 8—表 11)。這些交互作用力是以 Hill plot 做模擬。Hill plot 模擬的公式如下：

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]^n}{K_M^n + [S]^n}$$

V_0 表示在某受質濃度下的反應速率， $V_{\max}$ 則為反應最大速率，與酵素的最高濃度有關，可用 $k_{\text{cat}} \times [E_t]$ 表示， k_{cat} 是酵素催化速率常數， E_t 為酵素總濃度。 $[S]$ 為受質濃度， K_M 為所謂的 Michaelis-Menten 常數 (Michaelis-Menten constant)，為二分之一受質濃度時的反應速率值，數值越大，酵素反應效率越差，反之則越佳。在本實驗蛋白質與蛋白質交互作用中，酵素為 securin 蛋白質，而受質則為序列稀釋的蛋白質， K_M 表示兩個蛋白質之間作用力強度，單位通常為 M^{-1} ，但在此實驗中，我們只能知道膜上蛋白質的總量 (莫耳數)，因此單位應為 pmole^{-1} 。 n 值的意思則為協同作用 (cooperative effect)，當 $n=1$ 時，表示蛋白質間的作用為一對一；若是 $n>1$ ，表示有一個 securin 分子會與多個目標蛋白鍵結。

我們以 Hill plot 擬合的結果，未磷酸化的 securin 與 BCL2A1、以及磷酸化過後的 securin 與 CDC14a 兩者位有協同作用的結果外，其餘蛋白質與 securin 的交互作用是具有協同作用的。表示每次的蛋白質鍵結都會影響 securin 的鍵結能力，顯示必須多個蛋白接在 securin 上才會引發細胞機制反應。而在 K_M 常數上，securin 在未受磷酸化之前與大部份蛋白質的鍵結能力均等，然而在磷酸化過後，有些卻喪失了鍵結能力，有的是鍵結能力下降。這顯示磷酸化對 securin 交互作用對象的選擇性具有極大的意義。以下我們各別就這些蛋白質的功能與磷酸化後的 K_M 質的改變做進一

步討論。

Securin 與 RPS10a

Securin 磷酸化後，失去與 Histone 4j 的交互作用力。我們就 Histone 4j 與 securin 的功能性來做推測其意義為何。如 1-5 所述，Histone 4j 主要扮演著核小體的形成與 DNA 修復的功能。核小體的形成與細胞染色體形成有所關聯，若是此功能喪失，細胞將無法存活[84]。同時，Histone 核小體的合成是從 DNA 的複製期開始 (S 期)[137]，這段期間 securin 是維持非磷酸化的狀態，即有機會與 Histone 4j 進行交互作用，可以推測 securin 的表現或許與 Histone 4j 的合成有關。除此之外，在此次實驗上也偵測到 securin 與 RPS10a 有相似的交互作用力。前文 1-5 所述，RPS10a 為核糖體組成次單元之一，功能為細胞蛋白質的核成。如此，細胞內 Histone 4j 的生合成或許與 securin、RPS10a 有相關連。此點如同 securin 穩定 cyclin B 蛋白質，促使細胞進入 M 期[55]的功能，securin 與 RPS10a 的鍵結同時穩定合成後的 Histone 4j，直到 Histone 4j 形成整個核小體(圖 57)。而在另一種可能性上，文獻上得知 Histone 4j arginine 20 的甲基化與會促成細胞停滯在 G₂ 期，使得細胞進行 DNA 修復的工作[138]。而在 1-3.4.2 所述，securin 與 Ku70 的鍵結會抑制細胞 DNA 修復的工作，再綜合 securin 是進入 M 期的推手[55]，可以推測 securin 與 Histone 4j 的結合可能抑制了 Histone 4j 的修飾作用，阻止了 DNA 的自我修復功能(圖 58)。

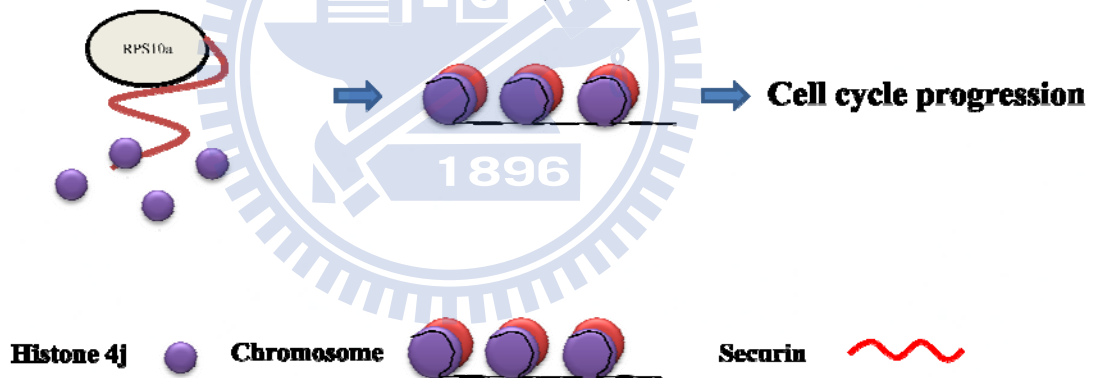


圖 57 Histone 4j 與 securin 交互作用影響細胞週期前進的假設圖

Histone 4j 與 securin、RPS10a 的共同作用，可能使染色體順利生成，促成細胞週期的前進。

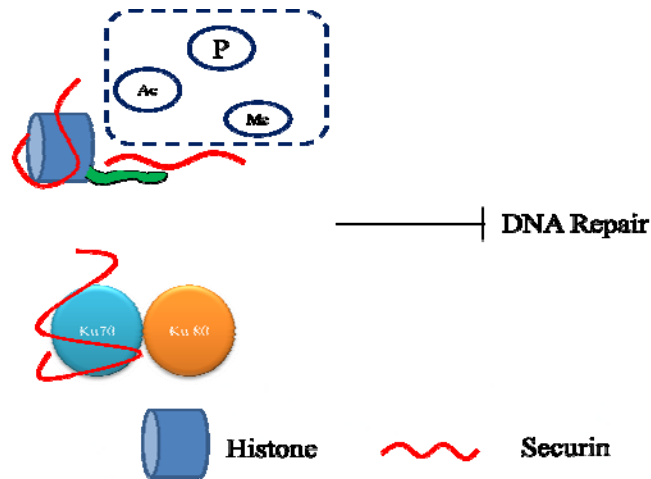


圖 58 Histone 4j 與 securin 鍵結影響 DNA 修復的可能機制圖

Securin 與 Histone 4j 鍵結，阻止了 N 端的修飾作用，如乙酰化 (Ac)、磷酸化 (P) 與甲基化 (Me)，使 DNA 修補機制受到抑制。可能與前人所發表，securin 與 Ku70/Ku80 的作用，抑制 DNA 的修復機制相輔相成[18]。

CDC20

如前文 1-5 所述，CDC20 主要是負責 securin 於中期進入後期的降解反應。此時的 securin 蛋白質是經過 CDC14a 去磷酸化作用，KEN box 裸露而出，因而與 APC/CDC20 複合體相鍵結，導致 securin 的降解。而若是 securin 在 KEN box 受到磷酸化，APC/CDC20 則失去了辨識功能，使得降解作用受阻。此點與本實驗結果中，磷酸化的 securin 喪失與 CDC20 的鍵結力一致(圖 41)。未來期許能夠進一步嘗試將 APC/CDC20 複合體也加入測量與 securin 的交互作用力。

BCL2A1

BCL2A1 與細胞的自我凋零機制有關。前文論述到，他的表現會避免細胞自我凋零。在我們的結果中，securin 無論是有無磷酸化，與 BCL2A1 都有一定的鍵結力。其中未磷酸化的 securin 蛋白質鍵結力較高。由第一章的論述，可以將 securin 的作用分為兩種：穩定蛋白質促使細胞週期向前 (與 cyclin B、Sp1、RPS10a)；抑制蛋白質的作用，避免細胞自我凋零或是 DNA 修復作用產生 (與 p53、ku70)。綜合所述，securin 的表現方向可說是具有促使細胞增生的目的性存在。我們可以因此推測，securin 與 BCL2A1 的交互作用也具有穩定其功能的存在，促使細胞週期向前。而磷酸化則可能降低 BCL2A1 的作用力，促使細胞開啟自我凋零或是 DNA 修復的功能。

PP2A β 55 與 CDC14a

PP2A 與 CDC14a 兩者都是去磷酸酶，然而兩者對 securin 的作用截然不同。在我們的數據上，未磷酸化的 securin 與 PP2A 的作用力 K_M 值為 $1.71 \times 10^{-10} \text{ pmole}^{-1}$ ，與 CDC14a 的作用力為 $4.97 \times 10^{-11} \text{ pmole}^{-1}$ ；而磷酸化後的作用力各別為 $5.56 \times 10^{-11} \text{ pmole}^{-1}$ 與 $5.39 \times 10^{-11} \text{ pmole}^{-1}$ 。當 securin 磷酸化後，與 PP2A 的交互作用力上升，甚

至與 CDC14a 達到均等。由機制上來說(圖 6)，兩者與 securin 的鍵結力顯示彼此是競爭對象。由此點可推斷出細胞週期在行進時，為何需要另一個抑制者—Net1 來抑制 CDC14a 的活性。

5-4 p53 蛋白質與 securin 磷酸化對細胞自我凋零的影響

由實驗室先前的研究成果，未磷酸化的 securin 蛋白質即會與 p53 有所交互作用。而前人的研究指出，這樣的交互作用會抑制 p53 啟動下游細胞自我凋零基因的表現[57]。然而 securin 的磷酸化對 p53 交互作用的影響至今無人探討。針對這個議題，我們使用了兩種方式探討 securin 的磷酸化在細胞自我凋零機制上的影響。首先，我們嘗試在細胞上觀察是否 securin 的磷酸化會影響細胞自我凋零機制 (apoptosis) 的轉變。

圖 51 細胞實驗探討 UV 造成的 p53 細胞凋零機制與 securin 的關係顯示，在未受 UV 照射的細胞，p53 並未被激活 (serine 15 處並未受到磷酸化作用)，而 securin 的表現隨著時間點漸升。而在 UV 照射後的細胞，可以看到 p53 被激活外，securin 的表現在兩小時後即有明顯地下降趨勢，顯示 securin 受到降解而減少蛋白質表現量。我們在這裡雖然沒有實際看到 securin 的磷酸化，然而在過去的學者研究中，securin 磷酸化會導致 securin 無法長期存在於細胞中，會受到降解而消失於細胞內[66]，推測圖中沒有明顯看到 securin 磷酸化，原因或許就在於他降解速率過快，因而無法看到明顯磷酸化的現象。

5-5 電化學感測測量 securin 磷酸化與 p53 啟動細胞凋亡機制的探討

數年來，DNA 阻抗感測器主要運用於點突變的感測[123, 124, 139]或是 DNA 與 DNA 交互作用[140-142]的偵測上。我們在此實驗則是利用此技術偵測 DNA 與蛋白質的交互作用。本實驗我們以 p53 與 Bax 啟動子做實驗設計。圖 59 為 p53 結構特性與功能示意圖，序列 1–355 為 p53 專一性 DNA 鍵結功能區，283–393 則為 p53 非專一性鍵結功能區。前人文獻顯示，p53 在小片段 DNA (序列數量小於 40 bp) 的鍵結上不受尾端非專一性功能區的影響，而在大片段 DNA 序列 (序列數量高於 200 bp) 則會受到此功能性區塊的影響，使得 p53 非專一性的鍵結在 DNA 序列上[143, 144]。由此得知，在我們的實驗中所使用的小片段 DNA (20 bp) 序列與 p53 的鍵結不受到此非專一性鍵結功能區的影響。

在此擬合的模組中，在 p53 與 p53+磷酸化 securin 的混合液中，阻抗值 R_{ct} 各別上升了 0.5 倍與 0.2 倍(表 16)，表示蛋白質與金電極上的 DNA 相黏接。從混合液的鍵結力小於 p53 溶液的結果可以得知：磷酸化修飾過的 securin 參雜在 p53 的混合液中，會影響 p53 對 DNA 的鍵結。而在未經修飾的 securin 與 p53 的混合液結果中，觀察到電雙層阻抗並未有上升的現象(表 14)，而純 p53 溶液卻使得阻抗上升了 0.5 倍，顯示 p53 與 DNA 的鍵結力受到了 securin 的抑制。由此得知，磷酸化後的 securin

與 p53 的混溶液阻抗上升的原因，係因磷酸化的 securin 與 p53 鍵結能力下降，抑制 p53 與 Bax 啟動子基因的鍵結能力也因此降低。此實驗結果顯示，我們可以利用電化學阻抗的技術來偵測蛋白質與 DNA 的鍵結能力變化。

2000 年後，許多學者發現到 p53 的乙醯化與 DNA 專一性鍵結息息相關。這些乙醯化的位置主要集中在 p53 非專一性鍵結的序列 (圖 59 所示 355–393 序列片段)，主要目的是中和這段序列胺基酸的電性，避免非專一性的鍵結產生[145]。除此之外，細胞實驗上發現，p53 的乙醯化會降低 p53 與 Mdm2 蛋白質的鍵結能力，避免 p53 被降解[146]。由於我們所使用的 DNA 片段僅有 20 bp，如前文所述，並不受到此非專一性功能區的影響[143, 144]，換言之，乙醯化並不影響本實驗 p53 鍵結 DNA 的能力。而由 EIS 的結果可以得知，securin 的鍵結影響到 p53 與 DNA 交互作用的能力，而 securin 的磷酸化則促使 securin 失去抑制能力，由此結果得知，securin 會抑制 p53 專一性鍵結 DNA 的功能區的功能。未來我們期望能夠探討 p53 乙醯化，是否對 DNA 鍵結與 securin 的抑制能力有所影響，並提高在此技術的應用性。

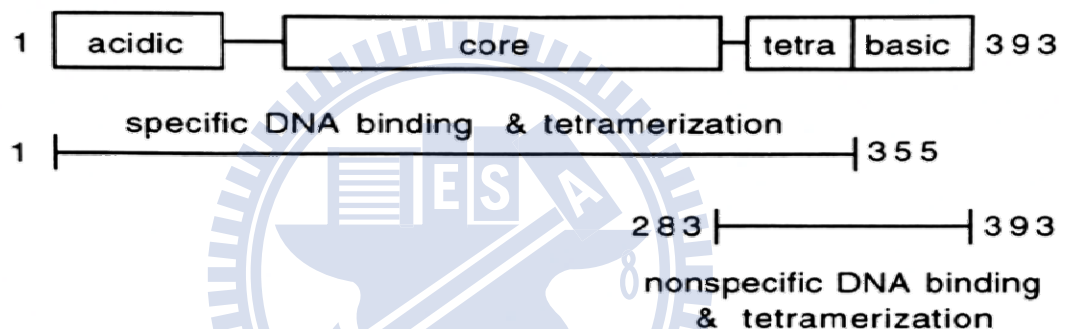


圖 59 p53 結構特性與功能[143]

圖為 p53 結構功能示意圖。圖上 1–355 序列為 p53 專一性鍵結的位置，在 340–355 的序列為 p53 形成四聚體 (tetramer) 的功能區，而在 355 到 393 則為 p53 非專一性 DNA 鍵結功能區。Acidic：含大量酸性胺基酸的序列片段；core：DNA 專一性鍵結功能區；tetra：p53 形成四具體的功能區；basic：含大量鹼性胺基酸的序列片段，DNA 非專一性鍵結功能區。

5-6 總結

總結以上，我們探討 securin 與六種蛋白值得鍵結能力，可以得知 Erk2 磷酸化 securin，可能調控了各個蛋白質間機制的轉換。我們將這些結果與其功能性探討總結為圖 60，securin 受到 Erk2 磷酸化，抑制了與 RPS10a、CDC20 與 Histone 4j 各自的反應。而受磷酸化修飾的 securin 蛋白質，皆可經由 CDC14a 或是 PP2A 兩種酵素，回歸到未受修飾的 securin 狀態。Securin 的磷酸化能夠抑制細胞 M 期姊妹染色體的分離，而 CDC14a 的去磷酸化可以使得細胞週期向前。若細胞處於間期，因 CDC14a 活性受到抑制，去磷酸化的功能轉由 PP2A 執行。而在此期，securin 必須保持在未磷酸化的狀態方能穩定參與 Histone 4j、RPS10a、p53、與 BCL2A1 的反應，使細胞週期持續向前。

EIS 的結果上，我們可以了解到 securin 與 p53 的鍵結會抑制 p53 的活性。而在

UV 的刺激下，Erk2 會被活化，促使 securin 磷酸化而降低抑制 p53 活性的能力，促使 p53 進一步受到 Erk2 的活化，啟動下游細胞自我凋零路徑，促使細胞走向自我凋零(圖 61)。我們在此次實驗上，僅測試了 p53 下游基因其中一段路徑。而在前人研究上，p53 與 securin 的鍵結也會抑制 p21 與 SFN 兩種蛋白質的表現。我們未來期望也能利用 EIS 的方式，偵測類似的蛋白質與 DNA 交互作用，並且能夠將這些反應量化，繪出另外的基因調控機制，進一步探討核酸與蛋白質之間的調控。

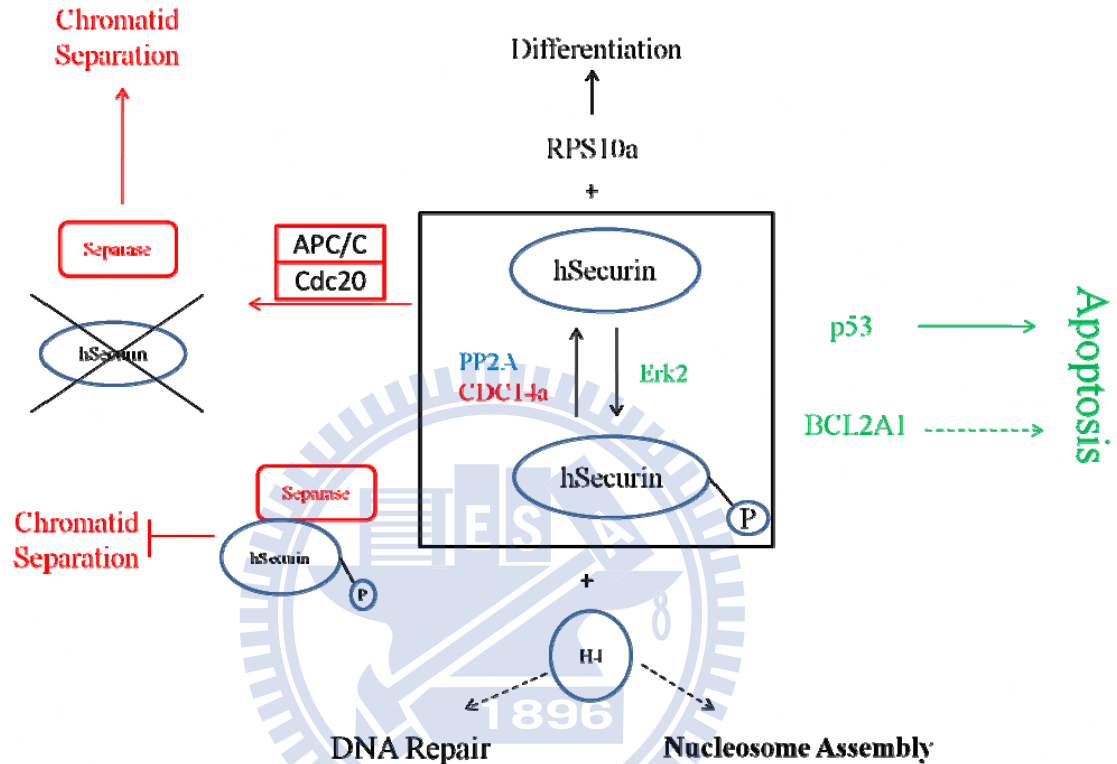


圖 60 Securin 磷酸化與否與各蛋白質交互作用功能性推測圖

Erk2 的磷酸化與 PP2A、CDC14a 的去磷酸化促使 securin 在細胞週期角色的轉變。

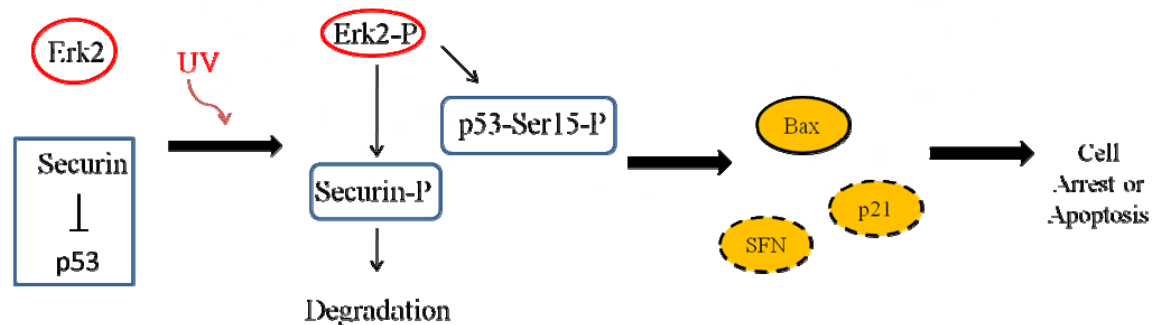


圖 61 UV 照射誘使細胞走向自我凋零示意圖

UV 激發 Erk2 的活化，使磷酸化的 securin 失去抑制 p53 的能力並被降解，因而活化 p53，啟動下游細胞凋零基因，促使細胞走向自我凋零。圖中 Bax 為本次研究的主題，為確認的實驗對象。SFN 與 p21 為 Bernal 所發現另外兩株受到 securin 鍵結而影響 p53 活性的下游蛋白質，然而本次實驗並未確認，故以虛線表示[57]。

参考文献

1. Sasco, A., M. Secretan, and K. Straif, *Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence*. Lung cancer, 2004. **45**: p. S3-S9.
2. Tomatis, L., et al., *Evaluation of the carcinogenicity of chemicals: a review of the Monograph Program of the International Agency for Research on Cancer (1971 to 1977)*. Cancer Research, 1978. **38**(4): p. 877.
3. Blair, A. and N. Kazerouni, *Reactive chemicals and cancer*. Cancer Causes & Control, 1997. **8**(3): p. 473-490.
4. Bast, R., D. Kufe, and R. Pollock, *Ionizing Radiation*.
5. Berrington de Gonzalez, A., et al., *Projected cancer risks from computed tomographic scans performed in the United States in 2007*. Archives of internal medicine, 2009. **169**(22): p. 2071.
6. Bast, R., D. Kufe, and R. Pollock, *Ultraviolet Radiation Carcinogenesis*.
7. Lanier, A., et al., *Nasopharyngeal carcinoma in alaskan eskimos, indians, and aleuts: A review of cases and study of epstein barr virus, HLA, and environmental risk factors*. Cancer, 1980. **46**(9): p. 2100-2106.
8. Marur, S., et al., *HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic*. The lancet oncology. **11**(8): p. 781-789.
9. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. NATURE-LONDON-, 2002: p. 860-867.
10. Henderson, B.E., L. Bernstein, and R. Ross, *Hormones and the etiology of cancer*. Cancer Medicine, 1993: p. 225-227.
11. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell proliferation, 2003. **36**(3): p. 131-149.
12. Zou, H., et al., *Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis*. Science, 1999. **285**(5426): p. 418-22.
13. Chen, L.L., et al., *Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization*. Gene, 2000. **248**(1-2): p. 41-50.
14. Zhang, X., et al., *Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG)*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(1): p. 156-66.
15. Hamid, T. and S.S. Kakar, *PTTG/securin activates expression of p53 and modulates its function*. Mol Cancer, 2004. **3**: p. 18.
16. Uhlmann, F., F. Lottspeich, and K. Nasmyth, *Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1*. Nature, 1999. **400**(6739): p. 37-42.

17. Tong, Y., et al., *Pituitary tumor transforming gene interacts with Sp1 to modulate G1/S cell phase transition*. *Oncogene*, 2007. **26**(38): p. 5596-5605.
18. Romero, F., et al., *Human securin, hPTTG, is associated with Ku heterodimer, the regulatory subunit of the DNA-dependent protein kinase*. *Nucleic Acids Research*, 2001. **29**(6): p. 1300-1307.
19. Zhang, X., et al., *Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1999. **84**(2): p. 761-767.
20. Heaney, A.P., et al., *Transforming events in thyroid tumorigenesis and their association with follicular lesions*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001. **86**(10): p. 5025-5032.
21. Solbach, C., et al., *PTTG mRNA expression in primary breast cancer: a prognostic marker for lymph node invasion and tumor recurrence*. *Breast*, 2004. **13**(1): p. 80-81.
22. Puri, R., et al., *Molecular cloning of pituitary tumor transforming gene 1 from ovarian tumors and its expression in tumors*. *Cancer Letters*, 2001. **163**(1): p. 131-139.
23. Tsai, S.J., et al., *Expression and functional analysis of pituitary tumor transforming gene-1 in uterine leiomyomas*. (vol 90, pg 3715, 2005). *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2005. **90**(9): p. 5233-5233.
24. Lodish, H., et al., *Molecular cell biology*. New York, 1995.
25. Lewin, B., *Gene VIII*. New Jersey: Prentice Hall, 2004.
26. Pavletich, N.P., *Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdk, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors* 1, 2. *Journal of Molecular Biology*, 1999. **287**(5): p. 821-828.
27. Battaglia, D., N. Klein, and M. Soules, *Cell cycle regulation*. *Molecular Human Reproduction*, 1996. **2**(11): p. 845.
28. Kramer, E.R., et al., *Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1*. *Molecular Biology of the Cell*, 2000. **11**(5): p. 1555.
29. Vodermaier, H.C., *APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle*. *Current Biology*, 2004. **14**(18): p. R787-R796.
30. Hagting, A., et al., *Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1*. *Journal of Cell Biology*, 2002. **157**(7): p. 1125-1137.
31. Gil-Bernabe, A.M., et al., *Protein phosphatase 2A stabilizes human securin, whose phosphorylated forms are degraded via the SCF ubiquitin ligase*. *Molecular and Cellular Biology*, 2006. **26**(11): p. 4017-4027.
32. Pei, L. and S. Melmed, *Isolation and characterization of a pituitary*

- tumor-transforming gene (PTTG)*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(4): p. 433-41.
33. Dominguez, A., et al., *hpttg, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG*. Oncogene, 1998. **17**(17): p. 2187-2193.
 34. Lee, I.A., C. Seong, and I.S. Choe, *Cloning and expression of human cDNA encoding human homologue of pituitary tumor transforming gene*. Biochemistry and Molecular Biology International, 1999. **47**(5): p. 891-897.
 35. Heaney, A.P., et al., *Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis*. Nature Medicine, 1999. **5**(11): p. 1317-1321.
 36. Heaney, A.P., M. Fernando, and S. Melmed, *Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis*. Journal of Clinical Investigation, 2002. **109**(2): p. 277-283.
 37. Yin, H., et al., *Strain difference in regulation of pituitary tumor transforming gene (PTTG) in estrogen-induced pituitary tumorigenesis in rats*. Japanese Journal of Cancer Research, 2001. **92**(10): p. 1034-1040.
 38. Chamaon, K., et al., *Regulation of the pituitary tumor transforming gene by insulin-like-growth factor-I and insulin differs between malignant and non-neoplastic astrocytes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **331**(1): p. 86-92.
 39. Thompson, A.D. and S.S. Kakar, *Insulin and IGF-I regulate the expression of the pituitary tumor transforming gene (PTTG) in breast tumor cells*. Febs Letters, 2005. **579**(14): p. 3195-3200.
 40. Tfelt-Hansen, J., et al., *Calcium-sensing receptor induces messenger ribonucleic acid of human securin, pituitary tumor transforming gene, in rat testicular cancer*. Endocrinology, 2003. **144**(12): p. 5188-5193.
 41. Tfelt-Hansen, J., et al., *Expression of pituitary tumor transforming gene (PTTG) and its binding protein in human astrocytes and astrocytoma cells: Function and regulation of PTTG in U87 astrocytoma cells*. Endocrinology, 2004. **145**(9): p. 4222-4231.
 42. Stoika, R., R. Yu, and S. Melmed, *Expression and function of pituitary tumour transforming gene for T-lymphocyte activation*. British Journal of Haematology, 2002. **119**(4): p. 1070-1074.
 43. Clem, A.L., T. Hamid, and S.S. Kakar, *Characterization of the role of Sp1 and NF-Y in differential regulation of PTTG/securin expression in tumor cells*. Gene, 2003. **322**: p. 113-121.
 44. Sanchez-Puig, N., D.B. Veprintsev, and A.R. Fersht, *Human full-length Securin is a natively unfolded protein*. Protein Science, 2005. **14**(6): p. 1410-1418.

45. Zur, A. and M. Brandeis, *Securin degradation is mediated by fzy and fzf, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis*. Embo Journal, 2001. **20**(4): p. 792-801.
46. Hornig, N.C.D., et al., *The dual mechanism of separase regulation by securin*. Current Biology, 2002. **12**(12): p. 973-982.
47. Waizenegger, I.C., et al., *Regulation of human separase by securin binding and autocleavage*. Current Biology, 2002. **12**(16): p. 1368-1378.
48. Pei, L., *Identification of c-myc as a down-stream target for pituitary tumor-transforming gene*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8484-91.
49. Pei, L., *Activation of mitogen-activated protein kinase cascade regulates pituitary tumor-transforming gene transactivation function*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 31191-8.
50. Stratford, A.L., et al., *Pituitary tumor transforming gene binding factor: A novel transforming gene in thyroid tumorigenesis*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2005. **90**(7): p. 4341-4349.
51. Musacchio, A., et al., *SH3--an abundant protein domain in search of a function*. Febs Letters, 1992. **307**(1): p. 55-61.
52. Mayer, B.J. and D. Baltimore, *Signalling through SH2 and SH3 domains*. Trends in Cell Biology, 1993. **3**(1): p. 8-13.
53. Boelaert, K., et al., *PTTG's C-terminal PXXP motifs modulate critical cellular processes in vitro*. Journal of Molecular Endocrinology, 2004. **33**(3): p. 663-677.
54. Tsou, T.C., et al., *ATM/ATR-related checkpoint signals mediate arsenite-induced G2/M arrest in primary aortic endothelial cells*. Arch Toxicol, 2006. **80**(12): p. 804-10.
55. Marangos, P. and J. Carroll, *Securin regulates entry into M-phase by modulating the stability of cyclin B*. Nature Cell Biology, 2008. **10**(4): p. 445-U151.
56. Yu, R., et al., *Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy and p53-dependent and p53-independent apoptosis*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(47): p. 36502-36505.
57. Bernal, J.A., et al., *Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis*. Nature Genetics, 2002. **32**(2): p. 306-311.
58. Vlotides, G., T. Eigler, and S. Melmed, *Pituitary tumor-transforming gene: physiology and implications for tumorigenesis*. Endocr Rev, 2007. **28**(2): p. 165-86.
59. Ramaswamy, S., et al., *A molecular signature of metastasis in primary solid tumors*. Nature Genetics, 2003. **33**(1): p. 49-54.
60. Malik, M.T. and S.S. Kakar, *Regulation of angiogenesis and invasion by human*

- pituitary tumor transforming gene (PTTG) through increased expression and secretion of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2).* Molecular Cancer, 2006. 5: p. -.
61. Rak, J. and J.L. Yu, *Oncogenes and tumor angiogenesis - The question of vascular 'supply' and vascular 'demand'.* Seminars in Cancer Biology, 2004. 14(2): p. 93-104.
 62. Boelaert, K., et al., *Pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor-2 expression: Potential prognostic indicators in differentiated thyroid cancer.* Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2003. 88(5): p. 2341-2347.
 63. Pei, L., *Pituitary tumor-transforming gene protein associates with ribosomal protein S10 and a novel human homologue of DnaJ in testicular cells.* J Biol Chem, 1999. 274(5): p. 3151-8.
 64. Ramos-Morales, F., et al., *Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg proto-oncogene product.* Oncogene, 2000. 19(3): p. 403-409.
 65. Holt, L.J., A.N. Krutchinsky, and D.O. Morgan, *Positive feedback sharpens the anaphase switch.* Nature, 2008. 454(7202): p. 353-357.
 66. Chao, T.Z., *Effects of phosphorylation on the functions of hSecurin.* 2008.
 67. Wilfinger, W.W., K. Mackey, and P. Chomczynski, *Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity.* Biotechniques, 1997. 22(3): p. 474-6, 478-81.
 68. Collatz, E., et al., *Isolation of Eukaryotic Ribosomal-Proteins - Purification and Characterization of 40 S Ribosomal-Subunit Proteins Sa, Sc, S3a, S3b, S5', S9, S10, S11, S12, S14, S15, S15', S16, S17, S18, S19, S20, S21, S26, S27', and S29.* Journal of Biological Chemistry, 1977. 252(24): p. 9071-9080.
 69. Barnard, G.F., et al., *Increased Expression of Human Ribosomal Phosphoprotein P0 Messenger-Rna in Hepatocellular-Carcinoma and Colon-Carcinoma.* Cancer Research, 1992. 52(11): p. 3067-3072.
 70. Pogue-Geile, K., et al., *Ribosomal protein genes are overexpressed in colorectal cancer: isolation of a cDNA clone encoding the human S3 ribosomal protein.* Mol Cell Biol, 1991. 11(8): p. 3842-9.
 71. Kondoh, N., et al., *Differential expression of S19 ribosomal protein, laminin-binding protein, and human lymphocyte antigen class I messenger RNAs associated with colon carcinoma progression and differentiation.* Cancer Res, 1992. 52(4): p. 791-6.
 72. Chiao, P.J., et al., *Elevated expression of the ribosomal protein S2 gene in human tumors.* Mol Carcinog, 1992. 5(3): p. 219-31.
 73. Maheshwari, Y., et al., *Changes in ribosomal protein and ribosomal RNA*

- synthesis during rat intestinal differentiation*. Cell Growth Differ, 1993. **4**(9): p. 745-52.
74. Goldstone, S.D. and M.F. Lavin, *Isolation of a cDNA clone, encoding the ribosomal protein S20, downregulated during the onset of apoptosis in a human leukaemic cell line*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **196**(2): p. 619-23.
 75. Westermann, P. and O. Nygard, *The spatial arrangement of the complex between eukaryotic initiation factor eIF-3 and 40 S ribosomal subunit. Cross-linking between factor and ribosomal proteins*. Biochim Biophys Acta, 1983. **741**(1): p. 103-8.
 76. Xu, Y., et al., *Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1239-1251.
 77. Janssens, V. and J. Goris, *Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling*. Biochemical Journal, 2001. **353**(Pt 3): p. 417.
 78. Lechward, K., et al., *Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions*. ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION-, 2001. **48**(4): p. 921-934.
 79. Virshup, D.M., *Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes*. Current opinion in cell biology, 2000. **12**(2): p. 180-185.
 80. Gray, C.H., et al., *The structure of the cell cycle protein Cdc14 reveals a proline-directed protein phosphatase*. The EMBO journal, 2003. **22**(14): p. 3524-3535.
 81. Stegmeier, F. and A. Amon, *Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation*. Annual review of genetics, 2004. **38**: p. 203.
 82. Millward, T.A., S. Zolnierowicz, and B.A. Hemmings, *Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A*. Trends in biochemical sciences, 1999. **24**(5): p. 186-191.
 83. Verreault, A., *De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle*. Genes & Development, 2000. **14**(12): p. 1430-1438.
 84. Ling, X., et al., *Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation*. Genes & Development, 1996. **10**(6): p. 686.
 85. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
 86. Bird, A.W., et al., *Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 411-415.
 87. Vettese-Dadey, M., et al., *Acetylation of histone H4 plays a primary role in*

- enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro*. The EMBO journal, 1996. **15**(10): p. 2508.
88. Shogren-Knaak, M., et al., *Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions*. Science, 2006. **311**(5762): p. 844.
89. Wang, H., et al., *Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor*. Science, 2001. **293**(5531): p. 853.
90. Utley, R.T., et al., *Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4*. Molecular and Cellular Biology, 2005. **25**(18): p. 8179.
91. Visintin, R., S. Prinz, and A. Amon, *CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis*. Science, 1997. **278**(5337): p. 460.
92. Zachariae, W. and K. Nasmyth, *Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex*. Genes & Development, 1999. **13**(16): p. 2039-2058.
93. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(9): p. 647-656.
94. Mandal, M., et al., *The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival*. The Journal of experimental medicine, 2005. **201**(4): p. 603.
95. Vogler, M., et al., *Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2009. **113**(18): p. 4403.
96. Crosio, C., et al., *Bcl2a1 serves as a switch in death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis*. Cell Death & Differentiation, 2006. **13**(12): p. 2150-2153.
97. May, P., *Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein*. Oncogene, 1999. **18**: p. 7621-7636.
98. Di Leonardo, A., et al., *DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts*. Genes & Development, 1994. **8**(21): p. 2540.
99. Bunz, F., et al., *Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage*. Science, 1998. **282**(5393): p. 1497.
100. She, Q.B., N. Chen, and Z. Dong, *ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(27): p. 20444.
101. Levine, A.J., J. Momand, and C.A. Finlay, *The p53 tumour suppressor gene*.

- Nature, 1991. **351**: p. 453-456.
102. Han, E.S., et al., *The in vivo gene expression signature of oxidative stress*. Physiological genomics, 2008. **34**(1): p. 112.
 103. Innis, M.A., *PCR protocols : a guide to methods and applications*. 1990, San Diego: Academic Press. xviii, 482 p.
 104. Telesnitsky, A. and S.P. Goff, *4 Strong-stop Strand Transfer during Reverse Transcription*. Cold Spring Harbor Monograph Archive, 1993. **23**(0): p. 49-83.
 105. Baneyx, F. and M. Mujacic, *Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli*. Nature biotechnology, 2004. **22**(11): p. 1399-1408.
 106. Chang, C.C., et al., *Refolding of lysozyme by quasistatic and direct dilution reaction paths: A first-order-like state transition*. Physical Review E, 2004. **70**(1): p. -.
 107. Arakawa, T. and S.N. Timasheff, *Protein Stabilization and Destabilization by Guanidinium Salts*. Biochemistry, 1984. **23**(25): p. 5924-5929.
 108. Vanzi, F., B. Madan, and K. Sharp, *Effect of the protein denaturants urea and guanidinium on water structure: A structural and thermodynamic study*. Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(41): p. 10748-10753.
 109. Cleland, W., *Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups**. Biochemistry, 1964. **3**(4): p. 480-482.
 110. Chang, C.C., et al., *A first-order-like state transition for recombinant protein folding*. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2003. **21**(2): p. 247-255.
 111. Chang, C.C., et al., *Protein folding by a quasi-static-like process: A first-order state transition*. Physical Review E, 2002. **66**(2): p. -.
 112. Hochuli, E., et al., *Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent*. Bio-Technology, 1988. **6**(11): p. 1321-1325.
 113. Hall, R.A., *Studying protein-protein interactions via blot overlay or Far Western blot*. Methods Mol Biol, 2004. **261**: p. 167-74.
 114. Watson, J.D. and F.H.C. Crick, *Molecular-Structure of Nucleic-Acids - a Structure for Deoxyribose Nucleic-Acid*. Jama-Journal of the American Medical Association, 1993. **269**(15): p. 1966-1967.
 115. Eley, D. and D. Spivey, *Semiconductivity of organic substances. Part 9.—Nucleic acid in the dry state*. Trans. Faraday Soc., 1962. **58**: p. 411-415.
 116. Hall, D.B., R.E. Holmlin, and J.K. Barton, *Oxidative DNA damage through long-range electron transfer*. 1996.
 117. De Pablo, P., et al., *Absence of dc-conductivity in λ -DNA*. Physical review letters, 2000. **85**(23): p. 4992-4995.
 118. Beratan, D.N., S. Priyadarshy, and S.M. Risser, *DNA: insulator or wire?*

- Chemistry & Biology, 1997. **4**(1): p. 3-8.
119. Porath, D., et al., *Direct measurement of electrical transport through DNA molecules*. Nature, 2000. **403**(6770): p. 635-637.
120. Aich, P., et al., *M-DNA: A complex between divalent metal ions and DNA which behaves as a molecular wire*. Journal of Molecular Biology, 1999. **294**(2): p. 477-485.
121. Alexandre, S.S., et al., *Geometry and electronic structure of M-DNA (M=Zn²⁺, Co²⁺, and Fe²⁺)*. Physical Review B, 2006. **73**(20): p. -.
122. Lee, J.S., L.J.P. Latimer, and R.S. Reid, *A Cooperative Conformational Change in Duplex DNA Induced by Zn²⁺ and Other Divalent Metal-Ions*. Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire, 1993. **71**(3-4): p. 162-168.
123. Jangjian, P.C., et al., *Room temperature negative differential resistance in DNA-based molecular devices*. Applied Physics Letters, 2009. **94**(4): p. -.
124. Tseng, S.H., et al., *Ni²⁺-Enhanced Charge Transport via pi-pi Stacking Corridor in Metallic DNA*. Biophysical Journal, 2011. **100**(4): p. 1042-1048.
125. Jian, P.C.J., et al., *Ni²⁺ doping DNA: a semiconducting biopolymer*. Nanotechnology, 2008. **19**(35): p. -.
126. Wang, J., *Analytical electrochemistry*. 2006: LibreDigital.
127. Yang, H. and A.J. Bard, *The application of fast scan cyclic voltammetry. Mechanistic study of the initial stage of electropolymerization of aniline in aqueous solutions*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 1992. **339**(1-2): p. 423-449.
128. Brett, C., *The application of electrochemical impedance techniques to aluminium corrosion in acidic chloride solution*. Journal of applied electrochemistry, 1990. **20**(6): p. 1000-1003.
129. Jayashree, R., et al., *Characterization and application of electrodeposited Pt, Pt/Pd, and Pd catalyst structures for direct formic acid micro fuel cells*. Electrochimica acta, 2005. **50**(24): p. 4674-4682.
130. Sun, Y.Y., et al., *Multilayered construction of glucose oxidase and silica nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment*. Biomaterials, 2006. **27**(21): p. 4042-4049.
131. Randles, J. and K. Somerton, *Kinetics of rapid electrode reactions. Part 3.-Electron exchange reactions*. Transactions of the Faraday Society. Vol. 48. 1952. 937-950.
132. Lisdat, F. and D. Schafer, *The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(5): p. 1555-1567.
133. Suni, I.I., *Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008. **27**(7): p. 604-611.

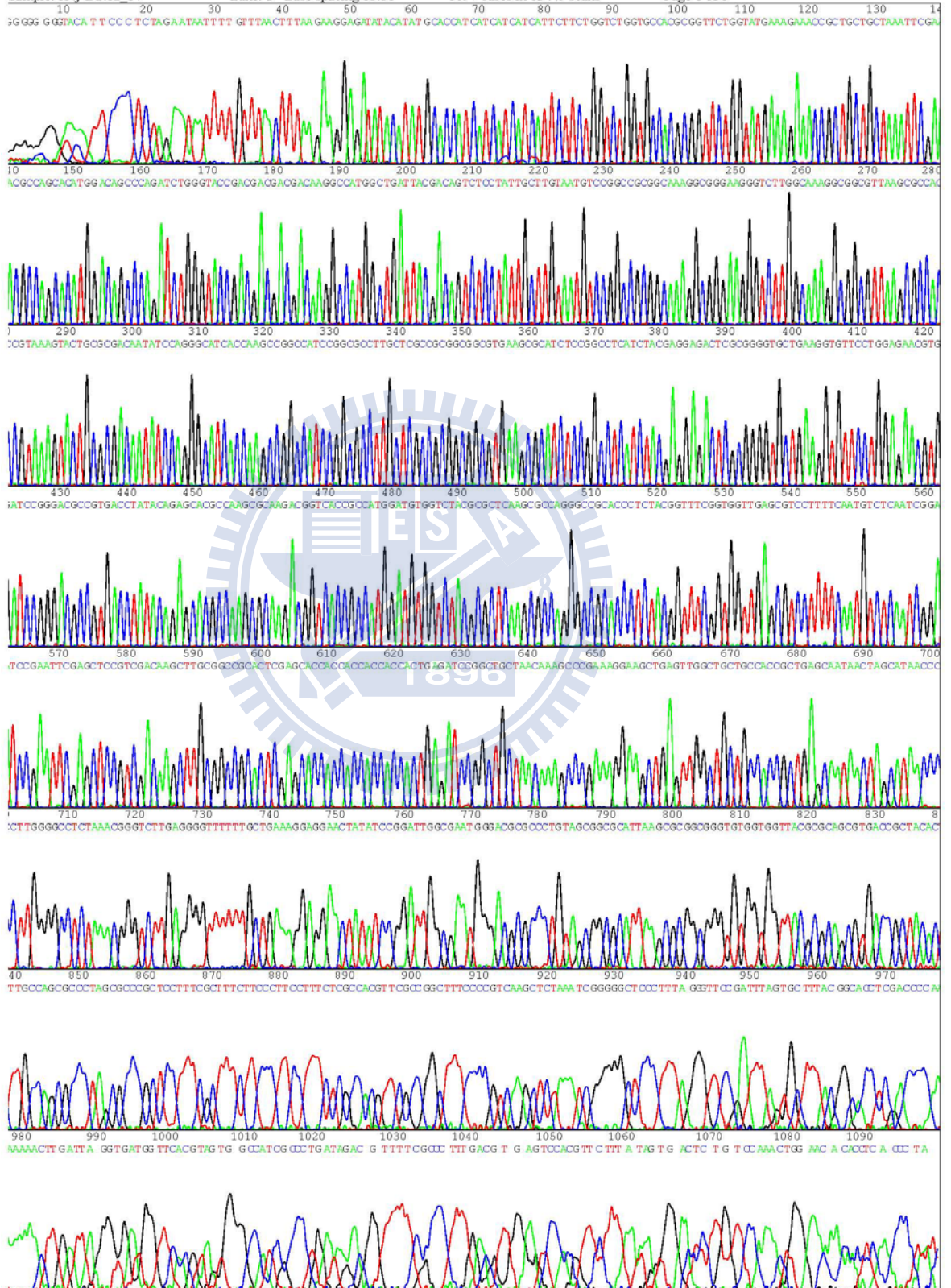
134. Zoski, C.G., *Handbook of electrochemistry*. 2007: Elsevier Science.
135. Walker, D.D., et al., *Rugged adaptive telescope secondaries: experience with a demonstrator mirror*. Adaptive Optical System Technologies, Parts 1 and 2, 1998. **3353**: p. 872-878 1228.
136. Tindall, K.R. and T.A. Kunkel, *Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase*. Biochemistry, 1988. **27**(16): p. 6008-6013.
137. Ramakrishnan, V., *Histone structure and the organization of the nucleosome*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 1997. **26**(1): p. 83-112.
138. Sanders, S.L., et al., *Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage*. Cell, 2004. **119**(5): p. 603-614.
139. Long, Y.T., et al., *Electrochemical detection of single-nucleotide mismatches: application of M-DNA*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(14): p. 4059-4065.
140. Gautier, C., et al., *Label-free detection of DNA hybridization based on EIS investigation of conducting properties of functionalized polythiophene matrix*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2006. **587**(2): p. 276-283.
141. Fu, Y., et al., *Indicator free DNA hybridization detection via EIS based on self-assembled gold nanoparticles and bilayer two-dimensional 3-mercaptopropyltrimethoxysilane onto a gold substrate*. Biochemical Engineering Journal, 2005. **23**(1): p. 37-44.
142. Li, W.F., J. Zhang, and W. Wang, *Understanding the folding and stability of a zinc finger-based full sequence design protein with replica exchange molecular dynamics simulations*. Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 2007. **67**(2): p. 338-349.
143. Anderson, M.E., et al., *Reciprocal interference between the sequence-specific core and nonspecific C-terminal DNA binding domains of p53: implications for regulation*. Molecular and Cellular Biology, 1997. **17**(11): p. 6255.
144. Wang, Y., et al., *p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions*. Genes & Development, 1993. **7**(12b): p. 2575.
145. Luo, J., et al., *Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(8): p. 2259.
146. Tang, Y., et al., *Acetylation is indispensable for p53 activation*. Cell, 2008. **133**(4): p. 612-626.

附錄

基因定序結果：

H4j

File: 003_G01_H4j-David_T7.ab1 Run Ended: Jan 5, 2010, 22:05:43 Signal G:245 A:143 T:153 C:214
Sample: H4j-David_T7 Lane: 3 Base spacing 15.51 1097 bases in 13449 scans Page 1 of 1



Score = 597 bits (323), Expect = 6e-175
 Identities = 333/338 (98%), Gaps = 0/338 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 209 CTCCTATTGCTTGTAATGTCCGCCGCGCAAAGGCGGGAAGGGTCTTGGCAAAGGCGGC 268
          ||||| ||||| || ||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 5 CTCCTCTTGCTCGTCATGTCTGGCCGCGCAAAGGCGGGAAGGGTCTTGGCAAAGGCGGC 64

Query 269 GTTAAGCGCCACCGTAAAGTACTGCGCGACAATATCCAGGGCATCACCAAGCCGGCCATC 328
          | |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 65 GCTAAGCGCCACCGTAAAGTACTGCGCGACAATATCCAGGGCATCACCAAGCCGGCCATC 124

Query 329 CGGCGCCTTGCTCGCCGCGGCGGCGTGAAGCGCATCTCCGGCCTCATCTACGAGGAGACT 388
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 125 CGGCGCCTTGCTCGCCGCGGCGGCGTGAAGCGCATCTCCGGCCTCATCTACGAGGAGACT 184

Query 389 CGCGGGGTGCTGAAGGTGTTCTGGAGAACGTGATCCGGGACGCCGTGACCTATACAGAG 448
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 185 CGCGGGGTGCTGAAGGTGTTCTGGAGAACGTGATCCGGGACGCCGTGACCTATACAGAG 244

Query 449 CACGCCAAGCGCAAGACGGTCACCGCCATGGATGTGGTCTACGCGCTCAAGCGCCAGGGC 508
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 245 CACGCCAAGCGCAAGACGGTCACCGCCATGGATGTGGTCTACGCGCTCAAGCGCCAGGGC 304

Query 509 CGCACCTCTACGGTTTCGGTGGTTGAGCGTCCTTTTC 546
          |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 305 CGCACCTCTACGGTTTCGGTGGTTGAGCGTCCTTTTC 342

```

Score = 198 bits (503), Expect = 2e-56, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 102/103 (99%), Positives = 102/103 (99%), Gaps = 0/103 (0%)

```
Query 1  MSGRGKGGKGLGKGGVKRHRKVLRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGVLK 60
          MSGRGKGGKGLGKGG KRHRKVLRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGVLK
Sbjct 1  MSGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEETRGVLK 60

Query 61  VFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG 103
          VFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG
Sbjct 61  VFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFGG 103
```



PP2A

Forward

File: 003_G01_pp2A-1_T7.ab1

Run Ended: Jun 24, 2010, 0:50:29

Signal G:786 A:667 T:523 C:604

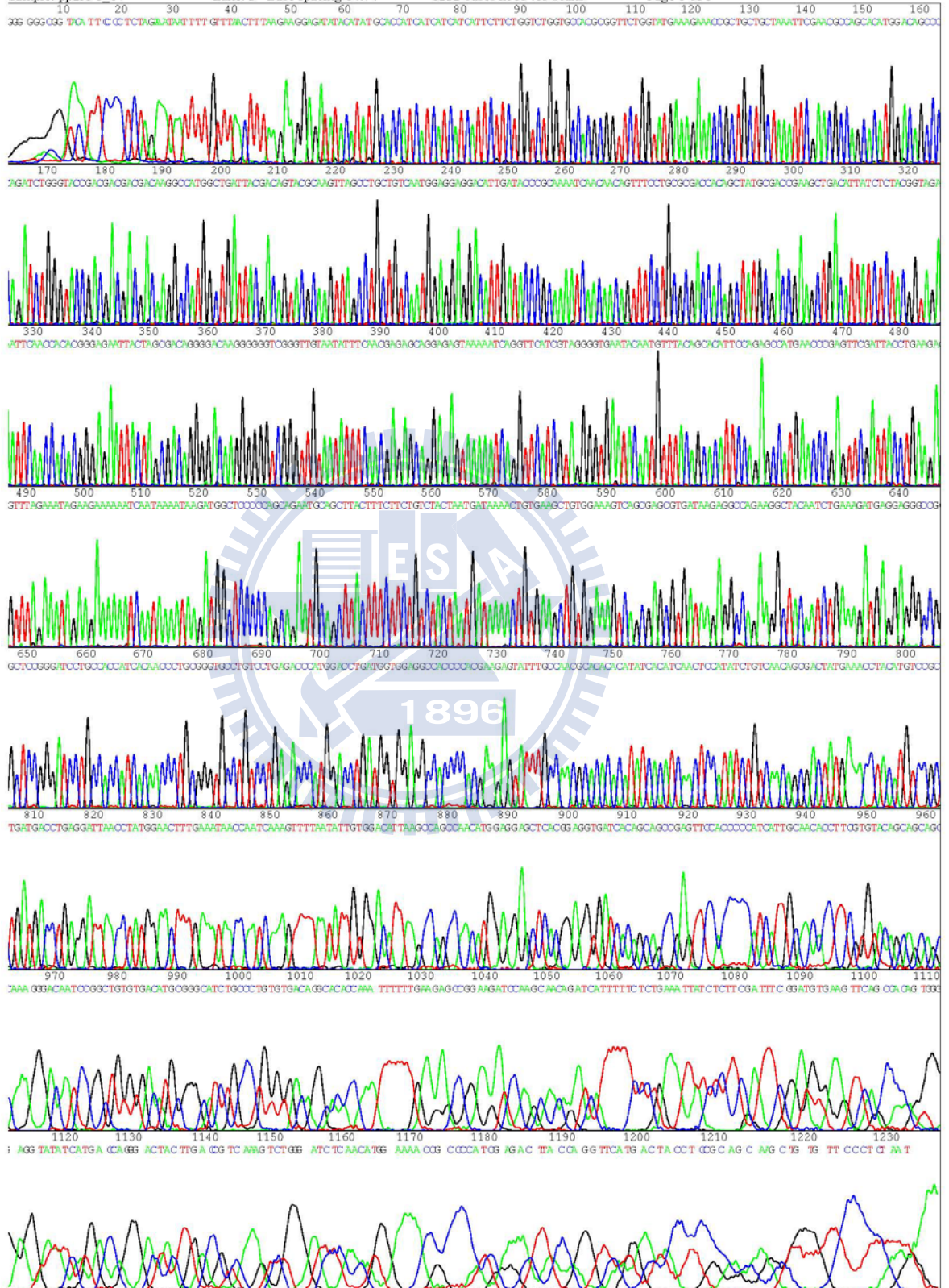
Comment:

Sample: pp2A-1 T7

Lane: 3 Base spacing 14.74

1232 bases in 15415 scans

Page 1 of 1



>lc1150617
Length=1600

Score = 2250 bits (1218), Expect = 0.0
Identities = 1218/1218 (100%), Gaps = 0/1218 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	13	ATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCATCA	72
Sbjct	40	ATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCATCA	99
Query	73	TCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGC	132
Sbjct	100	TCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGC	159
Query	133	TAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACACAAGGC	192
Sbjct	160	TAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACACAAGGC	219
Query	193	CATGGCTGATTACGACAGTACGCAAGTTAGCCTGCTGTCAATGGAGGAGGACATTGATAC	252
Sbjct	220	CATGGCTGATTACGACAGTACGCAAGTTAGCCTGCTGTCAATGGAGGAGGACATTGATAC	279
Query	253	CCGCAAAATCAACAACAGTTTCCTGCGCGACCACAGCTATGCGACCGAAGCTGACATTAT	312
Sbjct	280	CCGCAAAATCAACAACAGTTTCCTGCGCGACCACAGCTATGCGACCGAAGCTGACATTAT	339
Query	313	CTCTACGGTAGAATTCAACCACACGGGAGAATTACTAGCGACAGGGGACAAGGGGGGTCG	372
Sbjct	340	CTCTACGGTAGAATTCAACCACACGGGAGAATTACTAGCGACAGGGGACAAGGGGGGTCG	399
Query	373	GGTTGTAATATTTCAACGAGAGCAGGAGAGTAAAAATCAGGTTTCATCGTAGGGGTGAATA	432
Sbjct	400	GGTTGTAATATTTCAACGAGAGCAGGAGAGTAAAAATCAGGTTTCATCGTAGGGGTGAATA	459
Query	433	CAATGTTTACAGCACATTCCAGAGCCATGAACCCGAGTTCGATTACCTGAAGAGTTTAGA	492
Sbjct	460	CAATGTTTACAGCACATTCCAGAGCCATGAACCCGAGTTCGATTACCTGAAGAGTTTAGA	519

Query	493	AATAGAAGAAAAATCAATAAAATAAGATGGCTCCCCAGCAGAATGCAGCTTACTTTCT	552
Sbjct	520	AATAGAAGAAAAATCAATAAAATAAGATGGCTCCCCAGCAGAATGCAGCTTACTTTCT	579
Query	553	TCTGTCTACTAATGATAAAACTGTGAAGCTGTGGAAAGTCAGCGAGCGTGATAAGAGGCC	612
Sbjct	580	TCTGTCTACTAATGATAAAACTGTGAAGCTGTGGAAAGTCAGCGAGCGTGATAAGAGGCC	639
Query	613	AGAAGGCTACAATCTGAAAGATGAGGAGGGCCGGCTCCGGGATCCTGCCACCATCACAAAC	672
Sbjct	640	AGAAGGCTACAATCTGAAAGATGAGGAGGGCCGGCTCCGGGATCCTGCCACCATCACAAAC	699
Query	673	CCTGCGGGTGCCTGTCCTGAGACCCATGGACCTGATGGTGGAGGCCACCCACGAAGAGT	732
Sbjct	700	CCTGCGGGTGCCTGTCCTGAGACCCATGGACCTGATGGTGGAGGCCACCCACGAAGAGT	759
Query	733	ATTTGCCAACGCACACATATCACATCAACTCCATATCTGTCAACAGCGACTATGAAAC	792
Sbjct	760	ATTTGCCAACGCACACATATCACATCAACTCCATATCTGTCAACAGCGACTATGAAAC	819
Query	793	CTACATGTCCGCTGATGACCTGAGGATTAACCTATGGAACTTTGAAATAACCAATCAAAG	852
Sbjct	820	CTACATGTCCGCTGATGACCTGAGGATTAACCTATGGAACTTTGAAATAACCAATCAAAG	879
Query	853	TTTTAATATTGTGGACATTAAGCCAGCCAACATGGAGGAGCTCACGGAGGTGATCACAGC	912
Sbjct	880	TTTTAATATTGTGGACATTAAGCCAGCCAACATGGAGGAGCTCACGGAGGTGATCACAGC	939
Query	913	AGCCGAGTTCCACCCCATCATTTGCAACACCTTCGTGTACAGCAGCAGCAAAGGGACAAT	972
Sbjct	940	AGCCGAGTTCCACCCCATCATTTGCAACACCTTCGTGTACAGCAGCAGCAAAGGGACAAT	999
Query	973	CCGGCTGTGTGACATGCGGGCATCTGCCCTGTGTGACAGGCACACCAAATTTTTTGAAGA	1032
Sbjct	1000	CCGGCTGTGTGACATGCGGGCATCTGCCCTGTGTGACAGGCACACCAAATTTTTTGAAGA	1059

Query 1033 GCCGGAAGATCCAAGCAACAGATCATTTTTCTCTGAAATTATCTCTTCGATTTCCGGATGT 1092
 |||||

Sbjct 1060 GCCGGAAGATCCAAGCAACAGATCATTTTTCTCTGAAATTATCTCTTCGATTTCCGGATGT 1119

Query 1093 GAAGTTCAGCCACAGTGGGAGGTATATCATGACCAGGGACTACTTGACCGTCAAAGTCTG 1152
 |||||

Sbjct 1120 GAAGTTCAGCCACAGTGGGAGGTATATCATGACCAGGGACTACTTGACCGTCAAAGTCTG 1179

Query 1153 GGATCTCAACATGGAAAACCGCCCCATCGAGACTTACCAGGTTCATGACTACCTCCGCAG 1212
 |||||

Sbjct 1180 GGATCTCAACATGGAAAACCGCCCCATCGAGACTTACCAGGTTCATGACTACCTCCGCAG 1239

Query 1213 CAAGCTGTGTTCCCTCTA 1230
 |||||

Sbjct 1240 CAAGCTGTGTTCCCTCTA 1257



File: 001_H01_pp2A-1_T7.tab1 Run Ended: Jun 24, 2010, 0:50:29 Signal G:1174 A:574 T:785 C:663 Comment:
Sample: pp2A-1_T7t Lane: 1 Base spacing 14.90 1189 bases in 14555 scans Page 1 of 1



Score = 1940 bits (1050), Expect = 0.0

Identities = 1050/1050 (100%), Gaps = 0/1050 (0%)

Strand=Plus/Minus

Query 137 CTTGTCCTGGAATATATATAGGTTATTTGTAGCCGCCACTGCTATAATATTTTCTGAAGG 196
|||||
Sbjct 1582 CTTGTCCTGGAATATATATAGGTTATTTGTAGCCGCCACTGCTATAATATTTTCTGAAGG 1523

Query 197 ATGCCAAGCTGTATGCAAGATCTTTTGTCTAAAGTCCAGACTGTGACACTGATCTCGTC 256
|||||
Sbjct 1522 ATGCCAAGCTGTATGCAAGATCTTTTGTCTAAAGTCCAGACTGTGACACTGATCTCGTC 1463

Query 257 TTTTCTCCGCTTGCCCCCACACACACTTTTCGGGGTTTGAGGATAGCCCGGGGCTTGCT 316
|||||
Sbjct 1462 TTTTCTCCGCTTGCCCCCACACACACTTTTCGGGGTTTGAGGATAGCCCGGGGCTTGCT 1403

Query 317 GTTTTCCCTCGAAGCCTCAAGGGTCACATCACGCTTGGTGTCTCTGCGAACATCCTGAA 376
|||||
Sbjct 1402 GTTTTCCCTCGAAGCCTCAAGGGTCACATCACGCTTGGTGTCTCTGCGAACATCCTGAA 1343

Query 377 GAAGTTGTTGTAGGAGCCTGTCATGATGACACTGTCTGACCCATTCCACACACACTCAAA 436
|||||
Sbjct 1342 GAAGTTGTTGTAGGAGCCTGTCATGATGACACTGTCTGACCCATTCCACACACACTCAAA 1283

Query 437 TTTATCAAAAATGCAGTCATTTTCATAGAGGGAACACAGCTTGCTGCGGAGGTAGTCATG 496
|||||
Sbjct 1282 TTTATCAAAAATGCAGTCATTTTCATAGAGGGAACACAGCTTGCTGCGGAGGTAGTCATG 1223

Query 497 AACCTGGTAAGTCTCGATGGGGCGGTTTTCATGTTGAGATCCCAGACTTTGACGGTCAA 556
|||||
Sbjct 1222 AACCTGGTAAGTCTCGATGGGGCGGTTTTCATGTTGAGATCCCAGACTTTGACGGTCAA 1163

Query 557 GTAGTCCCTGGTCATGATATACCTCCCACTGTGGCTGAACTTCACATCCGAAATCGAAGA 616
|||||
Sbjct 1162 GTAGTCCCTGGTCATGATATACCTCCCACTGTGGCTGAACTTCACATCCGAAATCGAAGA 1103

Query 617 GATAATTTTCAGAGAAAAATGATCTGTTGCTTGGATCTTCCGGCTCTTCAAAAAATTTGGT 676
 |||

Sbjct 1102 GATAATTTTCAGAGAAAAATGATCTGTTGCTTGGATCTTCCGGCTCTTCAAAAAATTTGGT 1043

Query 677 GTGCCTGTCACACAGGGCAGATGCCCGCATGTCACACAGCCGATTGTCCCTTTGCTGCT 736
 |||

Sbjct 1042 GTGCCTGTCACACAGGGCAGATGCCCGCATGTCACACAGCCGATTGTCCCTTTGCTGCT 983

Query 737 GCTGTACACGAAGGTGTTGCAATGATGGGGGTGGAAC TCGGCTGCTGTGATCACCTCCGT 796
 |||

Sbjct 982 GCTGTACACGAAGGTGTTGCAATGATGGGGGTGGAAC TCGGCTGCTGTGATCACCTCCGT 923

Query 797 GAGCTCCTCCATGTTGGCTGGCTTAATGTCCACAATATTAAAACTTTGATTGGTTATTTT 856
 |||

Sbjct 922 GAGCTCCTCCATGTTGGCTGGCTTAATGTCCACAATATTAAAACTTTGATTGGTTATTTT 863

Query 857 AAAGTTCCATAGGTTAATCCTCAGGTCATCAGCGGACATGTAGGTTTCATAGTCGCTGTT 916
 |||

Sbjct 862 AAAGTTCCATAGGTTAATCCTCAGGTCATCAGCGGACATGTAGGTTTCATAGTCGCTGTT 803

Query 917 GACAGATATGGAGTTGATGTGATATGTGTGTGCGTTGGCAAATACTCTTCGTGGGGTGGC 976
 |||

Sbjct 802 GACAGATATGGAGTTGATGTGATATGTGTGTGCGTTGGCAAATACTCTTCGTGGGGTGGC 743

Query 977 CTCCACCATCAGGTCCATGGGTCTCAGGACAGGCACCCGAGGGTTGTGATGGTGGCAGG 1036
 |||

Sbjct 742 CTCCACCATCAGGTCCATGGGTCTCAGGACAGGCACCCGAGGGTTGTGATGGTGGCAGG 683

Query 1037 ATCCCGGAGCCGGCCCTCCTCATCTTTTCAGATTGTAGCCTTCTGGCCTCTTATCACGCTC 1096
 |||

Sbjct 682 ATCCCGGAGCCGGCCCTCCTCATCTTTTCAGATTGTAGCCTTCTGGCCTCTTATCACGCTC 623

Query 1097 GCTGACTTTCCACAGCTTCACAGTTTTATCATTAGTAGACAGAAGAAAGTAAGCTGCATT 1156
 |||

Sbjct 622 GCTGACTTTCCACAGCTTCACAGTTTTATCATTAGTAGACAGAAGAAAGTAAGCTGCATT 563

Query 1157 CTGCTGGGGGAGCCATCTTATTTTATTGAT 1186
|||||
Sbjct 562 CTGCTGGGGGAGCCATCTTATTTTATTGAT 533



Forward

88

Score = 998 bits (540), Expect = 0.0
 Identities = 542/543 (99%), Gaps = 0/543 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query 119 TCCCCAGTGCCTATTTTCGCTTAAGATGGCAGCGGAGTCAGGGGAAC TAATCGGGGCTTGT 178
 |||
 Sbjct 1 TCCCCAGTGCCTATTTTCGCTTAAGATGGCAGCGGAGTCAGGGGAAC TAATCGGGGCTTGT 60

Query 179 GAGTTCATGAAAGATCGGTTATATTTTGTCTACTTTAAGGAATAGACCAAAAAGCACAGTA 238
 |||
 Sbjct 61 GAGTTCATGAAAGATCGGTTATATTTTGTCTACTTTAAGGAATAGACCAAAAAGCACAGTA 120

Query 239 AATACCCACTATTTCTCCATCGATGAGGAGCTGGTCTATGAGAATTTCTATGCAGATTTT 298
 |||
 Sbjct 121 AATACCCACTATTTCTCCATCGATGAGGAGCTGGTCTATGAAAATTTCTATGCAGATTTT 180

Query 299 GGACCGCTGAACTTGGCAATGGTGTACAGATATTGCTGCAAACTAAACAAGAACTAAAA 358
 |||
 Sbjct 181 GGACCGCTGAACTTGGCAATGGTGTACAGATATTGCTGCAAACTAAACAAGAACTAAAA 240

Query 359 TCATACAGTTTGTCAAGAAAGAAAATAGTGCCTACACCTGTTTTGACCAACGAAAAGA 418
 |||
 Sbjct 241 TCATACAGTTTGTCAAGAAAGAAAATAGTGCCTACACCTGTTTTGACCAACGAAAAGA 300

Query 419 GCAAAATGCAGCATTTTGTAGGTGCCTATGCAGTAATCTATTTAAAGAAGACACCAGAA 478
 |||
 Sbjct 301 GCAAAATGCAGCATTTTGTAGGTGCCTATGCAGTAATCTATTTAAAGAAGACACCAGAA 360

Query 479 GAAGCCTACAGAGCACTCCTGTCTGGCTCAAAccccccTATCTTCCATTTCAGGGATGCT 538
 |||
 Sbjct 361 GAAGCCTACAGAGCACTCCTGTCTGGCTCAAAACCCCCCTATCTTCCATTTCAGGGATGCT 420

Query 539 TCCTTTGGAAATTGCACTTACAATCTCACCATTCTCGACTGTTTGCAGGGAATCAGAAAG 598
 |||
 Sbjct 421 TCCTTTGGAAATTGCACTTACAATCTCACCATTCTCGACTGTTTGCAGGGAATCAGAAAG 480

Query 599 GGATTACAACATGGATTTTTTGGACTTTGAGACATTTGATGTGGATGAATATGAACATTAT 658
 |||
 Sbjct 481 GGATTACAACATGGATTTTTTGGACTTTGAGACATTTGATGTGGATGAATATGAACATTAT 540

Query 659 GAG 661
 |||
 Sbjct 541 GAG 543



File: 027_C03_pET30a-CDC14a_T7.tab1 Run Ended: Sep 29, 2010, 21:23:17 Signal G:2102 A:1668 T:1782 C:1516 Comment:
Sample: pET30a-CDC14a T7t Lane: 27 Base spacing 13.56 1236 bases in 16298 scans Page 1 of 1



Score = 998 bits (540), Expect = 0.0
 Identities = 542/543 (99%), Gaps = 0/543 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query 208 TCCCCAGTGCCTATTTTCGCTTAAGATGGCAGCGGAGTCAGGGGAAC TAATCGGGGCTTGT 267
 |||
 Sbjct 1 TCCCCAGTGCCTATTTTCGCTTAAGATGGCAGCGGAGTCAGGGGAAC TAATCGGGGCTTGT 60

Query 268 GAGTTCATGAAAGATCGGTTATATTTTGTACTTTAAGGAATAGACCAAAAAGCACAGTA 327
 |||
 Sbjct 61 GAGTTCATGAAAGATCGGTTATATTTTGTACTTTAAGGAATAGACCAAAAAGCACAGTA 120

Query 328 AATACCCACTATTTCTCCATCGATGAGGAGCTGGTCTATGAGAATTTCTATGCAGATTTT 387
 |||
 Sbjct 121 AATACCCACTATTTCTCCATCGATGAGGAGCTGGTCTATGAAAATTTCTATGCAGATTTT 180

Query 388 GGACCGCTGAACTTGGCAATGGTGTACAGATATTGCTGCAAACTAAACAAGAACTAAAA 447
 |||
 Sbjct 181 GGACCGCTGAACTTGGCAATGGTGTACAGATATTGCTGCAAACTAAACAAGAACTAAAA 240

Query 448 TCATACAGTTTGTCAAGAAAGAAAATAGTGCACTACACCTGTTTTGACCAACGAAAAGA 507
 |||
 Sbjct 241 TCATACAGTTTGTCAAGAAAGAAAATAGTGCACTACACCTGTTTTGACCAACGAAAAGA 300

Query 508 GCAAAATGCAGCATTTTTGATAGGTGCCTATGCAGTAATCTATTTAAAGAAGACACCAGAA 567
 |||
 Sbjct 301 GCAAAATGCAGCATTTTTGATAGGTGCCTATGCAGTAATCTATTTAAAGAAGACACCAGAA 360

Query 568 GAAGCCTACAGAGCACTCCTGTCTGGCTCAAAccccccTATCTTCCATTTCAGGGATGCT 627
 |||
 Sbjct 361 GAAGCCTACAGAGCACTCCTGTCTGGCTCAAACCCCCCTATCTTCCATTTCAGGGATGCT 420

Query 628 TCCTTTGGAAATTGCACTTACAATCTCACCATTCTCGACTGTTTGCAGGGAATCAGAAAG 687
 |||
 Sbjct 421 TCCTTTGGAAATTGCACTTACAATCTCACCATTCTCGACTGTTTGCAGGGAATCAGAAAG 480

Query 688 GGATTACAACATGGATTTTTTGGACTTTGAGACATTTGATGTGGATGAATATGAACATTAT 747
 |||
 Sbjct 481 GGATTACAACATGGATTTTTTGGACTTTGAGACATTTGATGTGGATGAATATGAACATTAT 540

Query 748 GAG 750
 |||
 Sbjct 541 GAG 543

Score = 412 bits (1058), Expect = 3e-120, Method: Compositional matrix adjust.
 Identities = 199/199 (100%), Positives = 199/199 (100%), Gaps = 0/199 (0%)

Query 1 SPVRISLKMAAESGELIGACEFMKDRLYFATLRNRPKSTVNTHYFSIDEELVYENFYADF 60
 SPVRISLKMAAESGELIGACEFMKDRLYFATLRNRPKSTVNTHYFSIDEELVYENFYADF
 Sbjct 1 SPVRISLKMAAESGELIGACEFMKDRLYFATLRNRPKSTVNTHYFSIDEELVYENFYADF 60

Query 61 GPLNLAMVYRYCCKLNKKLSYSLSRKKIVHYTCFDQKRANAFLIGAYAVIYLKKTPE 120
 GPLNLAMVYRYCCKLNKKLSYSLSRKKIVHYTCFDQKRANAFLIGAYAVIYLKKTPE
 Sbjct 61 GPLNLAMVYRYCCKLNKKLSYSLSRKKIVHYTCFDQKRANAFLIGAYAVIYLKKTPE 120

Query 121 EAYRALLSGSNPPYLPFRDASFGNCTYNLTILDCLQGIRKGLQHGFDFETFDVDEYEHY 180
 EAYRALLSGSNPPYLPFRDASFGNCTYNLTILDCLQGIRKGLQHGFDFETFDVDEYEHY
 Sbjct 121 EAYRALLSGSNPPYLPFRDASFGNCTYNLTILDCLQGIRKGLQHGFDFETFDVDEYEHY 180

Query 181 EVILFTPLKPTFLISKSIM 199
 EVILFTPLKPTFLISKSIM
 Sbjct 181 EVILFTPLKPTFLISKSIM 199

Forward

94

Score = 2041 bits (1105), Expect = 0.0
 Identities = 1178/1209 (98%), Gaps = 21/1209 (1%)
 Strand=Plus/Plus

Query	13	CCTCTAG-AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCATCATCATC	71
Sbjct	45	CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCATCATCATC	104
Query	72	ATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAAT	131
Sbjct	105	ATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAAT	164
Query	132	TCGAACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGGTACCGACGACGACACAAGGCCATGG	191
Sbjct	165	TCGAACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGGTACCGACGACGACACAAGGCCATGG	224
Query	192	CTGATTACGACAGTATGGCACAGTTCGCTTTTCGAGAGTGACCTGCACTCGCTGCTTCAGC	251
Sbjct	225	CTGATTACGACAGTATGGCACAGTTCGCTTTTCGAGAGTGACCTGCACTCGCTGCTTCAGC	284
Query	252	TGGATGCACCCATCCCAATGCACCCCTGCGCGCTGGCAGCGCAAAGCCAAGGAAGCCG	311
Sbjct	285	TGGATGCACCCATCCCAATGCACCCCTGCGCGCTGGCAGCGCAAAGCCAAGGAAGCCG	344
Query	312	CAGGCCCGGCCCCCTACCCATGCGGGCCGCCAACCGATCCCACAGCGCCGGCAGGACTC	371
Sbjct	345	CAGGCCCGGCCCCCTACCCATGCGGGCCGCCAACCGATCCCACAGCGCCGGCAGGACTC	404
Query	372	CGGGCCGAACTCCTGGCAAATCCAGTTCCAAGGTTTCAGACCACTCCTAGCAAACCTGGCG	431
Sbjct	405	CGGGCCGAACTCCTGGCAAATCCAGTTCCAAGGTTTCAGACCACTCCTAGCAAACCTGGCG	464
Query	432	GTGACCGCTATATCCCCATCGCAGTGCTGCCAGATGGAGGTGGCCAGCTTCCTCCTGA	491
Sbjct	465	GTGACCGCTATATCCCCATCGCAGTGCTGCCAGATGGAGGTGGCCAGCTTCCTCCTGA	524

Query 492 GCAAGGAGAACCAGCCTGAAAAAGCCAGACGCCCACCAAGAAGGAACATCAGAAAGCCT 551
 |||

Sbjct 525 GCAAGGAGAACCAGCCTGAAAAAGCCAGACGCCCACCAAGAAGGAACATCAGAAAGCCT 584

Query 552 GGGCTTTGAACCTGAACGGTTTTGATGTAGAGGAAGCCAAGATCCTTCGGCTCAGTGGAA 611
 |||

Sbjct 585 GGGCTTTGAACCTGAACGGTTTTGATGTAGAGGAAGCCAAGATCCTTCGGCTCAGTGGAA 644

Query 612 AACCACAAAATGCGCCAGAGGGTTATCAGAACAGACTGAAAGTACTCTACAGCCAAAAGG 671
 |||

Sbjct 645 AACCACAAAATGCGCCAGAGGGTTATCAGAACAGACTGAAAGTACTCTACAGCCAAAAGG 704

Query 672 CCACTCCTGGCTCCAGCCGGAAGACCTGCCGTTACATTCCCTTCCTGCCAGACCGTATCC 731
 |||

Sbjct 705 CCACTCCTGGCTCCAGCCGGAAGACCTGCCGTTACATTCCCTTCCTGCCAGACCGTATCC 764

Query 732 TGGATGCGCCTGAAATCCGAAATGACTATTACCTGAACCTTGTGGATTGGAGTTCTGGGA 791
 |||

Sbjct 765 TGGATGCGCCTGAAATCCGAAATGACTATTACCTGAACCTTGTGGATTGGAGTTCTGGGA 824

Query 792 ATGTACTGGCCGTGGCACTGGACAACAGTGTGTACCTGTGGAGTGCAAGCTCTGGTGACA 851
 |||

Sbjct 825 ATGTACTGGCCGTGGCACTGGACAACAGTGTGTACCTGTGGAGTGCAAGCTCTGGTGACA 884

Query 852 TCCTGCAGCCTTTTGCAAATGGAGCAGCCTGGGGAATATATATCCTCTGTGGGCTGGATC 911
 |||

Sbjct 885 TCCTGCAGCCTTTTGCAAATGGAGCAGCCTGGGGAATATATATCCTCTGTGG-CCTGGATC 943

Query 912 AAAGAGGGCAACTACTTGGCTGTGGGGCACTAGCAGTGCTGAGGTGCAGCTATGGGATGT 971
 |||

Sbjct 944 AAAGAGGGCAACTACTTGGCTGTGGG-CACCAGCAGTGCTGAGGTGCAGCTATGGGATGT 1002

Query 972 GCAGCAGCAGAA-CGGCTTCGAAATATGACCAGTCACTCTGCCCAGTGGGCTCCCTAAG 1030
 |||

Sbjct 1003 GCAGCAGCAGAAACGGCTTCGAAATATGACCAGTCACTCTGCCCAGTGGGCTCCCTAAG 1062

Reverse

File: 060_C08_CDC20-David-ccc_T7.tab1

Run Ended: Sep 21, 2010, 7:45:39

Signal G:1770 A:947 T:1229 C:1189

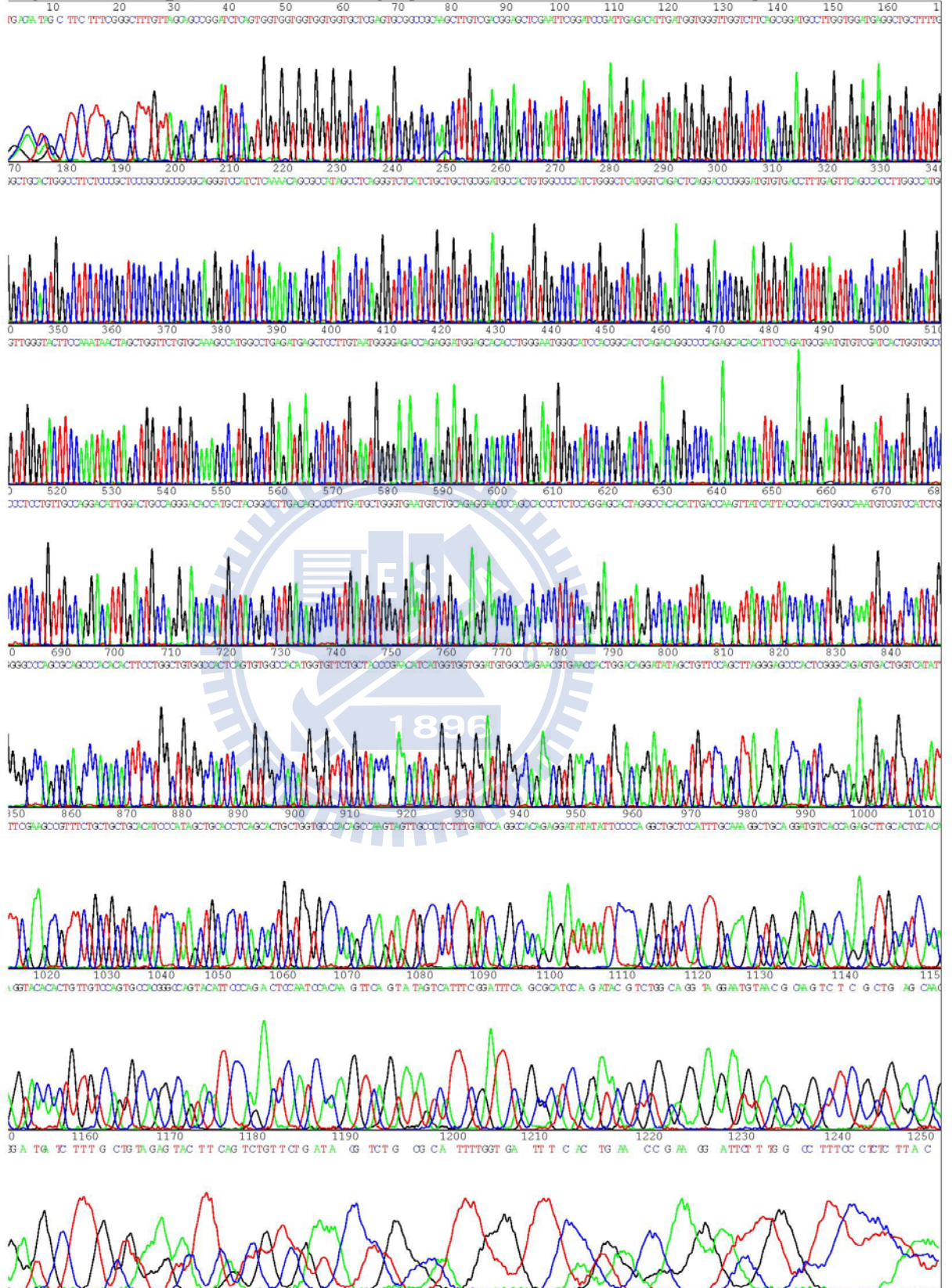
Comment

Sample: CDC20-David-ccc_T7t

Lane: 60 Base spacing 14.30

1250 bases in 16303 scans

Page 1 of 1



Score = 1881 bits (1018), Expect = 0.0
 Identities = 1103/1139 (96%), Gaps = 26/1139 (2%)
 Strand=Plus/Minus

Query	119	GATGGTGGGTTGGTCTTCAGCGGATGCCTTGGTGGATGAGGCTGCTTTTGGCTGCACTGG	178
Sbjct	1516	GATGGTGGGTTGGTCTTCAGCGGATGCCTTGGTGGATGAGGCTGCTTTTGGCTGCACTGG	1457
Query	179	CCTTCTCCCGCTCCCGCCCGCGCAGGGTCCATCTCAAAACAGCGCCATAGCCTCAGGG	238
Sbjct	1456	CCTTCTCCCGCTCCCGCCCGCGCAGGGTCCAACTCAAAACAGCGCCATAGCCTCAGGG	1397
Query	239	TCTCATCTGCTGCTGCGGATGCCACTGTGGCCCCATCTGGGCTCATGGTCAGACTCAGGA	298
Sbjct	1396	TCTCATCTGCTGCTGCGGATGCCACTGTGGCCCCATCTGGGCTCATGGTCAGACTCAGGA	1337
Query	299	CCCGGGATGTGTGACCTTTGAGTTTCAGCCACCTTGGCCATGGTTGGGTACTTCCAAATAA	358
Sbjct	1336	CCCGGGATGTGTGACCTTTGAGTTTCAGCCACCTTGGCCATGGTTGGGTACTTCCAAATAA	1277
Query	359	CTAGCTGGTTCTGTGCAAAGCCATGGCCTGAGATGAGCTCCTTGTAATGGGGAGACCAGA	418
Sbjct	1276	CTAGCTGGTTCTGTGCAAAGCCATGGCCTGAGATGAGCTCCTTGTAATGGGGAGACCAGA	1217
Query	419	GGATGGAGCACACCTGGGAATGGGCATCCACGGCACTCAGACAGGCCCCAGAGCACACAT	478
Sbjct	1216	GGATGGAGCACACCTGGGAATGGGCATCCACGGCACTCAGACAGGCCCCAGAGCACACAT	1157
Query	479	TCCAGATGCGAATGTGTGATCACTGGTGCCCCCTCCTGTTGCCAGGACATTGGACTGCC	538
Sbjct	1156	TCCAGATGCGAATGTGTGATCACTGGTGCCCCCTCCTGTTGCCAGGACATTGGACTGCC	1097
Query	539	AGGGACACCATGCTACGGCCTTGACAGCCCCCTTGATGCTGGGTGAATGTCTGCAGAGGAA	598
Sbjct	1096	AGGGACACCATGCTACGGCCTTGACAGCCCCCTTGATGCTGGGTGAATGTCTGCAGAGGAA	1037

Query 599 CCCAGCCACCCCTCTCCAGGAGCACTAGGCCACACATTGACCAAGTTATCATTACCACCAC 658
 |||

Sbjct 1036 CCCAGCCACCCCTCTCCAGGAGCACTAGGCCACACATTGACCAAGTTATCATTACCACCAC 977

Query 659 TGGCCAAATGTCGTCCATCTGGGGCCCAGCGCAGCCCACACACTTCCTGGCTGTGGCCAC 718
 |||

Sbjct 976 TGGCCAAATGTCGTCCATCTGGGGCCCAGCGCAGCCCACACACTTCCTGGCTGTGGCCAC 917

Query 719 TCAGTGTGGCCACATGGTGTCTGCTACCCGAACATCATGGTGGTGGATGTGGCCAGAAC 778
 |||

Sbjct 916 TCAGTGTGGCCACATGGTGTCTGCTACCCGAACATCATGGTGGTGGATGTGGCCAGAAC 857

Query 779 GTGAACCACTGGACAGGATATAGCTGTTCCAGCTTAGGGAGCCCACTCGGGCAGAGTGAC 838
 |||

Sbjct 856 GTGAACCACTGGACAGGATATAGCTGTTCCAGCTTAGGGAGCCCACTCGGGCAGAGTGAC 797

Query 839 TGGTCATATTTTGAAGCCGTTTCTGCTGCTGCACATCCCATAGCTGCACCTCAGCACTGC 898
 |||

Sbjct 796 TGGTCATATTTTGAAGCCGTTTCTGCTGCTGCACATCCCATAGCTGCACCTCAGCACTGC 737

Query 899 TGGTGCCCAAGCAAGTAGTTGCCCTCTTTGATCCAGGCCACAGAGGATATATATTCCC 958
 |||

Sbjct 736 TGGTGCCCAAGCAAGTAGTTGCCCTCTTTGATCCAGGCCACAGAGGATATATATTCCC 677

Query 959 CAGGCTGCTCCATTTGCAAAGGCTGCAGGATGTCACCAGAGCTTGCACTCCACAGGTACA 1018
 |||

Sbjct 676 CAGGCTGCTCCATTTGCAAAAGCTGCAGGATGTCACCAGAGCTTGCACTCCACAGGTACA 617

Query 1019 CACTGTTGTCCAGTGCCACGGGCCAGTACATTCCCAGA-CTCCAATCCACAAG-TTCAG- 1075
 |||

Sbjct 616 CACTGTTGTCCAGTGCCACGG-CCAGTACATTCCCAGAACTCCAATCCACAAGGTTTCAGG 558

Query 1076 TA-TAGTCATTTTCGATTTCAG-CGCATCCAG-ATACG-TCTGGCAGGTA-GGAATGTAA 1130
 |||

Sbjct 557 TAATAGTCATTTTCGATTTCAGGCGCATCCAGGATACGGTCTGGCAGGGAAGGAATGTAA 498

Query 1131 CG-CAAGTCT-C-G-CTG-AGCAAGGA-TGATCTTT-G-CTGTAGAGTACTT-CAGTCTG 1181
 || || |||| | | ||| ||| |||| || |||| | ||||| ||||| |||||
 Sbjct 497 CGGCAGGTCTTCCGGCTGGAGCCAGGAGTGGCCTTTTGGCTGTAGAGTACTTTCAGTCTG 438

Query 1182 TTCTGATA-CG-TCTG-CGCATTTTGGTGATTT-C-ACTGAACCGAAGGATTCTTTGGC 1235
 ||||| || | |||| ||||| || ||| | |||| ||||| || |||
 Sbjct 437 TTCTGATAACCCTCTGGCGCATTTTG-TGGTTTTCCACTGAGCCGAAGGAT-CTT-GGC 382

Score = 1145 bits (2963), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
 Identities = 553/555 (99%), Positives = 554/555 (99%), Gaps = 0/555 (0%)

Query 1 MHHHHHSSGLVPRGSGMKETAATAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADYDSMAQFAFESDL 60
 MHHHHHSSGLVPRGSGMKETAATAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADYDSMAQFAFESDL
 Sbjct 1 MHHHHHSSGLVPRGSGMKETAATAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADYDSMAQFAFESDL 60

Query 61 HSLLQLDAPIPNAPPARWORKAKEAAGPAPSPMRAANRSHSAGRTPGRTPGKSSSKVQTT 120
 HSLLQLDAPIPNAPPARWORKAKEAAGPAPSPMRAANRSHSAGRTPGRTPGKSSSKVQTT
 Sbjct 61 HSLLQLDAPIPNAPPARWORKAKEAAGPAPSPMRAANRSHSAGRTPGRTPGKSSSKVQTT 120

Query 121 PSKPGGDRYIPHRSAQMEVASFLLSKENQPENSQTPTKKEHQAWALNLNGFDVEEAKI 180
 PSKPGGDRYIPHRSAQMEVASFLLSKENQPENSQTPTKKEHQAWALNLNGFDVEEAKI
 Sbjct 121 PSKPGGDRYIPHRSAQMEVASFLLSKENQPENSQTPTKKEHQAWALNLNGFDVEEAKI 180

Query 181 LRLSGKPQNAPEGYQNLKVLYSQKATPGSSRKTCRYIPSLPDRILDAPEIRNDYYLNLV 240
 LRLSGKPQNAPEGYQNLKVLYSQKATPGSSRKTCRYIPSLPDRILDAPEIRNDYYLNLV
 Sbjct 181 LRLSGKPQNAPEGYQNLKVLYSQKATPGSSRKTCRYIPSLPDRILDAPEIRNDYYLNLV 240

Query 241 DWSSGNVLAVALDNSVYLWSASSGDILQLLQMEQPGEYISSVAWIKEGNYLAVGTSSAEV 300
 DWSSGNVLAVALDNSVYLWSASSGDILQLLQMEQPGEYISSVAWIKEGNYLAVGTSSAEV
 Sbjct 241 DWSSGNVLAVALDNSVYLWSASSGDILQLLQMEQPGEYISSVAWIKEGNYLAVGTSSAEV 300

Query 301 QLWDVQQLKRLRNMTSHSARVGSLSWNSYILSSGSRSGHIIHHHDVRVAEHHVATLSGHSQ 360
 QLWDVQQ KRLRNMTSHSARVGSLSWNSYILSSGSRSGHIIHHHDVRVAEHHVATLSGHSQ
 Sbjct 301 QLWDVQQKRLRNMTSHSARVGSLSWNSYILSSGSRSGHIIHHHDVRVAEHHVATLSGHSQ 360

Query 361 EVCGLRWAPDGRHLASGGNDNLVNVWPSAPGEGGWVPLQTFTQHQGAVKAWAWCPWQSNV 420
EVCGLRWAPDGRHLASGGNDNLVNVWPSAPGEGGWVPLQTFTQHQGAVKAWAWCPWQSNV

Sbjct 361 EVCGLRWAPDGRHLASGGNDNLVNVWPSAPGEGGWVPLQTFTQHQGAVKAWAWCPWQSNV 420

Query 421 LATGGGTSDRHIRIWNVCSGACLSAVDAHSQVCSILWSPHYKELISGHGFAQNQLVIWKY 480
LATGGGTSDRHIRIWNVCSGACLSAVDAHSQVCSILWSPHYKELISGHGFAQNQLVIWKY

Sbjct 421 LATGGGTSDRHIRIWNVCSGACLSAVDAHSQVCSILWSPHYKELISGHGFAQNQLVIWKY 480

Query 481 PTMAKVAELKGHTSRVLSLTMSPDGATVASAAADETLRLWRCFEMDPARRREREKASAAK 540
PTMAKVAELKGHTSRVLSLTMSPDGATVASAAADETLRLWRCFE+DPARRREREKASAAK

Sbjct 481 PTMAKVAELKGHTSRVLSLTMSPDGATVASAAADETLRLWRCFELDPARRREREKASAAK 540

Query 541 SSLIHQGIRLPPNQK 555
SSLIHQGIRLPPNQK

Sbjct 541 SSLIHQGIRLPPNQK 555



File: 010_D02_C5ADnaJ_T7tab1	Run Ended: Jun 17, 2010, 22:12:26	Signal G:618 A:327 T:333 C:382	Comment:
Sample: C5ADnaJ T7t	Lane: 10 Base spacing 14.40	1303 bases in 16301 scans	Page 1 of 1



Score = 2025 bits (1096), Expect = 0.0
 Identities = 1105/1105 (100%), Gaps = 0/1105 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query	120	ACTGTGCAGCGATTCTGGAACCCGGCATCCAGCTCAGAACACATCTGCGGGTTTCTTCCC	179
Sbjct	1105	ACTGTGCAGCGATTCTGGAACCCGGCATCCAGCTCAGAACACATCTGCGGGTTTCTTCCC	1046
Query	180	AGCTGCCTCCATCTCTGACAGGCTGTAGGCCATGGCCAGCTGCAGGTCCTCATCCTCAGA	239
Sbjct	1045	AGCTGCCTCCATCTCTGACAGGCTGTAGGCCATGGCCAGCTGCAGGTCCTCATCCTCAGA	986
Query	240	GAGGTCGCTGTCCAAGGGGCATGAGGCAGGGGTCTGCTGGACCTGAGTGCCCCCAGACCT	299
Sbjct	985	GAGGTCGCTGTCCAAGGGGCATGAGGCAGGGGTCTGCTGGACCTGAGTGCCCCCAGACCT	926
Query	300	GGAAGTGACTGACGGCTGCTGCTCGCGACGGCTCAGCTCCAAGCCCAGTGCCAGGTCATC	359
Sbjct	925	GGAAGTGACTGACGGCTGCTGCTCGCGACGGCTCAGCTCCAAGCCCAGTGCCAGGTCATC	866
Query	360	TGGGACACCATTGATTGTGACTGACTTCAGCTGCCATCCTCCTCCACTTCCACCCGCTC	419
Sbjct	865	TGGGACACCATTGATTGTGACTGACTTCAGCTGCCATCCTCCTCCACTTCCACCCGCTC	806
Query	420	CTGCCCCGTTCTCCATGATTCTGCGTGTGGTGATGCGGCGTCCTTGGACAAAGGTGGTAGA	479
Sbjct	805	CTGCCCCGTTCTCCATGATTCTGCGTGTGGTGATGCGGCGTCCTTGGACAAAGGTGGTAGA	746
Query	480	TGTAGAAACAGAGCGAAAAGCACCAGCCCCAGGACTgaaggagaaagatgaggaggagaa	539
Sbjct	745	TGTAGAAACAGAGCGAAAAGCACCAGCCCCAGGACTGAAGGAGAAAGATGAGGAGGAGAA	686
Query	540	atcggagtgccaggggaaggaggaagagaaggtaagaaaggGGCCTGAGTGTGCGGAACC	599
Sbjct	685	ATCGGAGTGCCCAGGAAGGAGGAAGAGAAGGTAAAGAAGGGCCTGAGTGTGCGGAACC	626

Query 600 CCGGTTCTGAAGCTCTGAGAAGGGGCCAGGTCATCAAAGAGCTCTGCAAAAGGGTCTCC 659
 |||

Sbjct 625 CCGGTTCTGAAGCTCTGAGAAGGGGCCAGGTCATCAAAGAGCTCTGCAAAAGGGTCTCC 566

Query 660 ACTCCCAAAGAATTCCCGGAAGACCTCCTCGGGGCTGCGGAAGGTGAAGGTGAAGCCAGG 719
 |||

Sbjct 565 ACTCCCAAAGAATTCCCGGAAGACCTCCTCGGGGCTGCGGAAGGTGAAGGTGAAGCCAGG 506

Query 720 CCCACCACTGCCAGCTTCTGCCCAGATGGGCCAGTTCCTGTCCCTGTCAGCCCTTCCCG 779
 |||

Sbjct 505 CCCACCACTGCCAGCTTCTGCCCAGATGGGCCAGTTCCTGTCCCTGTCAGCCCTTCCCG 446

Query 780 GCCATAGCGGTCGTAAATCTCCCGCTTGTGCTTGTGTCAGACAGCACTTCATATGCCTCGGC 839
 |||

Sbjct 445 GCCATAGCGGTCGTAAATCTCCCGCTTGTGCTTGTGTCAGACAGCACTTCATATGCCTCGGC 386

Query 840 CACCTCCTTAAATTTCTTCTCAGAACTCTTTATTATCTGGGTTTTGTCTGGGTGCCA 899
 |||

Sbjct 385 CACCTCCTTAAATTTCTTCTCAGAACTCTTTATTATCTGGGTTTTGTCTGGGTGCCA 326

Query 900 CTGGAGAGCCTTGCGCCGATACGCCTTCTTGATGTCATCAGCGGACGCACTTCGCGGCAC 959
 |||

Sbjct 325 CTGGAGAGCCTTGCGCCGATACGCCTTCTTGATGTCATCAGCGGACGCACTTCGCGGCAC 266

Query 960 GTCTAGGATCTCGTAGTAGGATGCCATACTGTGCGTAATCAGCCATGGCCTTGTGTCGTC 1019
 |||

Sbjct 265 GTCTAGGATCTCGTAGTAGGATGCCATACTGTGCGTAATCAGCCATGGCCTTGTGTCGTC 206

Query 1020 GTCGGTACCCAGATCTGGGCTGTCCATGTGCTGGCGTTCGAATTTAGCAGCAGCGGTTTC 1079
 |||

Sbjct 205 GTCGGTACCCAGATCTGGGCTGTCCATGTGCTGGCGTTCGAATTTAGCAGCAGCGGTTTC 146

Query 1080 TTTTCATACCAGAACCGGTGGCACCAGACCAGAAGAATGATGATGATGATGGTGCATATG 1139
 |||

Sbjct 145 TTTTCATACCAGAACCGGTGGCACCAGACCAGAAGAATGATGATGATGATGGTGCATATG 86

Query 1140 TATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAATTGTTATCCGCTCAC 1199
 |||
 Sbjct 85 TATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAATTGTTATCCGCTCAC 26

Query 1200 AATTCCCCTATAGTGAGTCGTATTA 1224
 |||
 Sbjct 25 AATTCCCCTATAGTGAGTCGTATTA 1



[illegible]

Score = 1197 bits (648), Expect = 0.0
Identities = 648/648 (100%), Gaps = 0/648 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 60 ATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAA 119
|||||
Sbjct 1 ATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAA 60

Query 120 ACCGCTGCTGCTAAATTCTGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGAC 179
|||||
Sbjct 61 ACCGCTGCTGCTAAATTCTGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGAC 120

Query 180 GACGACAAGGCCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCATGACAGACTGTGAATTTGGATAT 239
|||||
Sbjct 121 GACGACAAGGCCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCATGACAGACTGTGAATTTGGATAT 180

Query 240 ATTTACAGGCTGGCTCAGGACTATCTGCAGTGCGTCCTACAGATACCACAACCTGGATCA 299
|||||
Sbjct 181 ATTTACAGGCTGGCTCAGGACTATCTGCAGTGCGTCCTACAGATACCACAACCTGGATCA 240

Query 300 GGTCCAAGCAAAACGTCCAGAGTGCTACAAAATGTTGCGTTCTCAGTCCAAAAAGAAGTG 359
|||||
Sbjct 241 GGTCCAAGCAAAACGTCCAGAGTGCTACAAAATGTTGCGTTCTCAGTCCAAAAAGAAGTG 300

Query 360 GAAAAGAATCTGAAGTCATGCTTGGACAATGTTAATGTTGTGTCCGTAGACACTGCCAGA 419
|||||
Sbjct 301 GAAAAGAATCTGAAGTCATGCTTGGACAATGTTAATGTTGTGTCCGTAGACACTGCCAGA 360

Query 420 ACACTATTCAACCAAGTGATGGAAAAGGAGTTTGAAGACGGCATCATTAACCTGGGAAGA 479
|||||
Sbjct 361 ACACTATTCAACCAAGTGATGGAAAAGGAGTTTGAAGACGGCATCATTAACCTGGGAAGA 420

Query 480 ATTGTAACCATATTTGCATTTGAAGGTATTCTCATCAAGAACTTCTACGACAGCAAATT 539
|||||
Sbjct 421 ATTGTAACCATATTTGCATTTGAAGGTATTCTCATCAAGAACTTCTACGACAGCAAATT 480
```

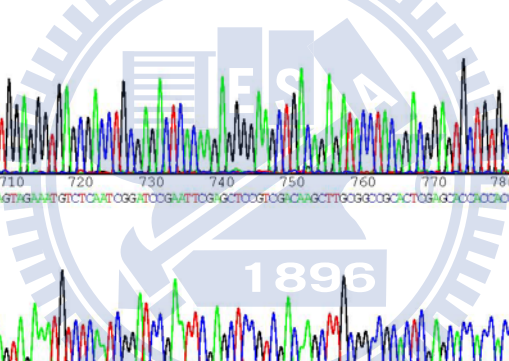
Query 540 GCCCCGGATGTGGATACCTATAAGGAGATTTTCATATTTTGTGCGGAGTTCATAATGAAT 599
 |||
 Sbjct 481 GCCCCGGATGTGGATACCTATAAGGAGATTTTCATATTTTGTGCGGAGTTCATAATGAAT 540

Query 600 AACACAGGAGAATGGATAAGGCAAAACGGAGGCTGGGGGAAATGGCACAATCACACACCT 659
 |||
 Sbjct 541 AACACAGGAGAATGGATAAGGCAAAACGGAGGCTGGGGGAAATGGCACAATCACACACCT 600

Query 660 ATGCTGGTAGAGTCAGTGGCCCAACAAGAAGAGGAAAATGGCTTTGTAA 707
 |||
 Sbjct 601 ATGCTGGTAGAGTCAGTGGCCCAACAAGAAGAGGAAAATGGCTTTGTAA 648



File: 041_D05_CCC-RPS10-B11_T7.ab1 Run Ended: Dec 16, 2010, 20:10:14 Signal G:1261 A:780 T:733 C:787 Comment:
Sample: CCC-RPS10-B11_T7 Lane: 41 Base spacing 14.57 1243 bases in 16107 scans Page 1 of 1



Score = 1236 bits (669), Expect = 0.0
 Identities = 695/695 (100%), Gaps = 0/695 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query	17	CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCATCATCAT	75
Sbjct	44	CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCATCATCAT	103
Query	76	CATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAA	135
Sbjct	104	CATCATTCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAA	163
Query	136	TTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATG	195
Sbjct	164	TTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCCATG	223
Query	196	GCTGATTACGACAGTGAGATGTTGATGCCGAATAAGAACCGGATTGCCATTTATGAACTC	255
Sbjct	224	GCTGATTACGACAGTGAGATGTTGATGCCGAATAAGAACCGGATTGCCATTTATGAACTC	280
Query	256	CTTTTAAAGGAGGGAGTCATGGTGGCCAAGAAGGATGTCCACATGCCTAAGCACCCGGAG	315
Sbjct	281	CTTTTAAAGGAGGGAGTCATGGTGGCCAAGAAGGATGTCCACATGCCTAAGCACCCGGAG	340
Query	316	CTGGCAGACAAGAATGTGCCCAACCTTCATGTCTGAAGGCCATGCAGTCTCTCAGGTCC	375
Sbjct	341	CTGGCAGACAAGAATGTGCCCAACCTTCATGTCTGAAGGCCATGCAGTCTCTCAAGTCC	400
Query	376	CGAGGCTACGTGAAGGAACAGTTTGCCTGGAGACATTTCTACTGGTACCTTACCAATGAG	435
Sbjct	401	CGAGGCTACGTGAAGGAACAGTTTGCCTGGAGACATTTCTACTGGTACCTTACCAATGAG	460
Query	436	GGTATCCAGTATCTCCGTGATTACCTTCATCTGCCCCGGAGATTGTGCCTGCCACCCTA	495
Sbjct	461	GGTATCCAGTATCTCCGTGATTACCTTCATCTGCCCCGGAGATTGTGCCTGCCACCCTA	520

Query 496 CGCCGTAGCCGTCCAGAGACTGGCAGGCCTCGGCCTAAAGGTCTGGAGGGTGAGCGACCT 555
 |||

Sbjct 521 CGCCGTAGCCGTCCAGAGACTGGCAGGCCTCGGCCTAAAGGTCTGGAGGGTGAGCGACCT 580

Query 556 GCGAGACTCACAAGAGGGGAAGCTGACAGAGATACCTACAGACGGAGTGCTGTGCCACCT 615
 |||

Sbjct 581 GCGAGACTCACAAGAGGGGAAGCTGACAGAGATACCTACAGACGGAGTGCTGTGCCACCT 640

Query 616 GGTGCCGACAAGAAAGCCGAGGCTGGGGCTGGGTCAGCAACCGAATTCCAGTTTAGAGGC 675
 |||

Sbjct 641 GGTGCCGACAAGAAAGCCGAGGCTGGGGCTGGGTCAGCAACCGAATTCCAGTTTAGAGGC 700

Query 676 GGATTTGGTCGTGGACGTGGTCAGCCTCCTCAGTA 710
 |||

Sbjct 701 GGATTTGGTCGTGGACGTGGTCAGCCTCCTCAGTA 735



蛋白質摺疊時程表

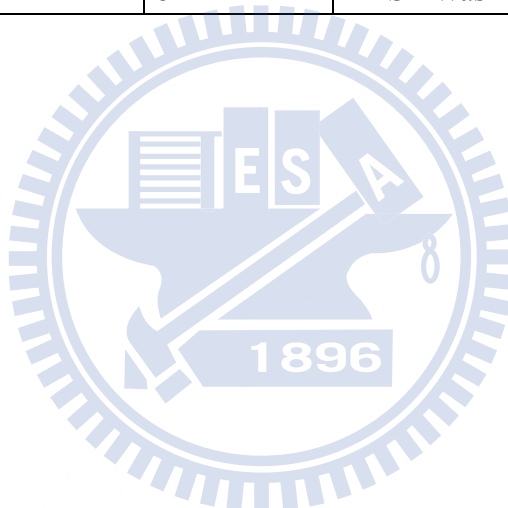
Folding State	Buffer component	pH	Refolding Time
*Denature	Urea 4.5 M Tris-base 10 mM Mannitol 0.1% DTT 0.1M pefabloc 0.1mM	11	24 hr x 2
R1	Urea 2 M Tris-base 10 mM Mannitol 0.1% DTT 0.1mM pefabloc 0.5μM	11	12 hr x 2
R2	Urea 1 M Tris-base 10 mM Mannitol 0.1% DTT 0.1mM pefabloc 0.5μM	11	12 hr x 2
R3	Tris-base 10 mM Mannitol 0.1% DTT 0.1mM pefabloc 0.5μM	8.8	12 hr x 2
R4	Tris-base 10 mM Mannitol 0.1% DTT 0.1mM pefabloc 0.5μM	8.8	12 hr x 2
R5	Tris-base 10 mM DTT 0.1mM pefabloc 0.5μM	8.8	12 hr x 2

*Hitone 2A, 2B, 3D 與 4j 所使用的 urea 濃度為 8 M → 4 M → 2 M → 1 M → 0 M，同時溶液中含有 250 mM NaCl。

Histone 2A, 2B, 3D, 4j, CDC20, RPS10 這幾株蛋白質在鹼性環境不穩定，故使用 10 mM phosphate buffer 取代 Tris，pH 值則調為 3 → 5。

Far Western 與抗體培養時程表

Far Western		Western (對照組)	
5% 脫脂奶/TBST	30 Min	5% 脫脂奶/TBST	30 Min
Securin(0.8 μ g/ml)/1%脫脂奶 TBST	4°C/16 h or 37°C/4 h	無	
TBST Wash	5 Min x 4		
一級抗體/1%脫脂奶 TBST	4°C/16 h or 37°C/4 h	一級抗體/1%脫脂奶 TBST	4°C/16 h or 37°C/4 h
TBST Wash	5 Min x 4	TBST Wash	5 Min x 4
二級抗體/1%脫脂奶 TBST	1 h	二級抗體/1%脫脂奶 TBST	1 h
TBST Wash	5 Min x 4	TBST Wash	5 Min x 4



電化學實驗總參數表

Bax 基因與 securin

Title	bare gold	dsDNA	18 SH	Securin
χ^2	1.28E-03	1.06E-03	2.65E-03	3.07E-03
Rsol (k Ω)	0.36	0.55	0.53	0.50
Q ₀ (μ F)	0.35	0.28	0.17	0.16
nq	0.80	0.70	0.68	0.68
Rct (kOhm)	3.80	61.86	29.54	28.18
W ₀ (μ F)	26.00	3.71	4.45	4.66
Rs (k Ω)	NA	1.12E+08	6.08E+07	4.94E+06

Bax 基因與 p53

Title	bare gold	dsDNA	18SH	p53
χ^2	7.93E-04	1.88E-03	8.59E-03	4.40E-03
Rsol (k Ω)	0.39	0.48	0.98	0.75
Q ₀ (μ F)	0.20	0.13	0.04	0.08
nq	0.88	0.89	0.93	0.84
Rct (k Ω)	2.20	32.05	54.04	81.59
W ₀ (μ F)	25.52	5.53	1.31	1.47
Rs (k Ω)	NA	100.07	1.94E+07	1.76E+07

Bax 基因與 securin + p53

Title	bare gold	dsDNA	18SH	Securin+p53
χ^2	9.99E-04	7.85E-04	1.73E-03	1.96E-03
Rsol (k Ω)	0.44	1.23	0.39	0.43
Q ₀ (μ F)	0.70	0.13	0.12	0.10
nq	0.77	0.80	0.75	0.76
Rct (k Ω)	2.31	35.96	28.89	27.52
W ₀ (μ F)	26.90	2.30	1.45	1.50
Rs (k Ω)	NA	2.8E3	1.21E+06	3.93E+07

Bax 基因與 securin-P + p53

Title	bare gold	dsDNA	18SH	Securin-P+p53
χ^2	9.99E-04	3.54E-03	1.40E-03	3.18E-03
Rsol (k Ω)	0.44	0.41	0.41	0.06
Q ₀ (μ F)	0.70	0.55	0.51	0.85
nq	0.77	0.75	0.67	0.60
Rct (k Ω)	2.31	68.29	93.66	113.32
W ₀ (μ F)	26.90	3.79	2.69	4.00
Rs (k Ω)	NA	180.27	1.00E+05	1.00E+05

