

Graduate Institute of Biological Science and
Technology

利用酵母菌表現重組人類 SCF¹⁻¹⁶⁵ 和
SCF¹⁻¹⁴¹ 分析其生物功能上之差異性

**Analysis of variants biological function of
recombinant human SCF¹⁻¹⁶⁵ and SCF¹⁻¹⁴¹ produced
by the yeast expression system**

研 究 生：蔡雅吏 (Ya-Li Tsai)

指 導 教 授：翁育萍 博士(Yui-Ping Weng)

中華民國 九十九年 七月



中華醫事科技大學 碩士論文全文電子檔案上網授權書

本授權書所授權之論文全文電子檔案，為本人於中華醫事科技大學，撰寫之碩士學位論文。(以下請擇一勾選)

- 同意立即開放
- 同意一年後開放，原因是：_____
- 同意二年後開放，原因是：_____ 尚未發表期刊 _____
- 同意三年後開放，原因是：_____

以非專屬、無償授權中華醫事科技大學圖書館和國家圖書館。基於推動「資源共享、互惠合作」之理念，於回饋本校與社會作為學術研究目的之用，得不限地域、時間與次數，以紙本、光碟、學位論文全文系統、網路或其他各種方法收錄、重製、與發行，或再授權他人以各種方法重製與利用，以提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

研究生：_____ 蔡雅吏 _____

論文名稱：利用酵母菌表現重組人類 SCF¹⁻¹⁶⁵ 和 SCF¹⁻¹⁴¹ 分析其生物功能上之差異性

指導教授：_____ 翁育萍 博士 _____

系所：生物醫學研究所

學號：A97030074

日期：民國 99 年 9 月 7 日

中文摘要

人類幹細胞生長因子(human Stem cell factor; hSCF)，為一種糖蛋白，可廣泛運用在基礎、臨床研究、生物科技與工業製程之發展。SCF藉由結合 *KIT* 胞外的部份，導致酪氨酸激酶的活化，進而起始了很多細胞內的反應，包括造血、器官生成、黑色素生成、細胞增生、分化、遷移、生存等功能。為了進一步探討 SCF 結構與功能的關係，本研究乃利用酵母菌表現系統誘導表現重組 SCF¹⁻¹⁶⁵(wild type) 與 SCF¹⁻¹⁴¹(truncated)，並分析兩者間生物活性與熱穩定性差異。SCF¹⁻¹⁴¹ 為 SCF¹⁻¹⁶⁵ 之接受器結合功能區(receptor binding domain)，是 SCF¹⁻¹⁶⁵ 在 C-terminus 處短缺一段序列(STLSPEKDSRVSVTKKPFMLPPVA)，兩者皆屬可溶式幹細胞生長因子(soluble stem cell factor; sSCF)。結果顯示，利用酵母菌表現系統可成功地大量表現 rhSCF¹⁻¹⁶⁵ 或 rhSCF¹⁻¹⁴¹。在純化重組 SCF 蛋白質的過程中，我們選擇疏水性交互作用層析法(Hydrophobic interaction chromatography)及陰離子交換樹脂層析法(Anion exchange chromatography)。利用 Alamar blue 測定 TF-1 細胞存活率實驗中，發現在加入不同濃度的重組 SCF¹⁻¹⁴¹ 或 SCF¹⁻¹⁶⁵ 具有 dose-dependent 增生的效果。在固定濃度(100 ng/ml)、固定時間(十分鐘)及不同溫度(25, 50, 70, 90, 110°C)條件下各加熱十分鐘，可觀察到重

組 SCF¹⁻¹⁶⁵ 生物活性均優於 SCF¹⁻¹⁴¹。再者，固定濃度(100 ng/ml)、固定溫度(90°C)，在加熱不同時間(0、2、10、30、60、150 分鐘)，則觀察到重組 SCF¹⁻¹⁶⁵ 分別在 90°C 加熱 0 分鐘、2 分鐘、10 分鐘與 30 分鐘，生物活性都高於 SCF¹⁻¹⁴¹。若測定 SCF¹⁻¹⁴¹ 和 SCF¹⁻¹⁶⁵ 二者在不同溫度(25、50、70、90°C)及不同濃度(500、100、10 ng/ml)下加熱十分鐘後細胞存活率之分析，結果顯示，SCF¹⁻¹⁴¹ 及 SCF¹⁻¹⁶⁵ 兩者在高濃度(500、100 ng/ml)及不同溫度(25、50、70、90°C)下，生物活性雖有下降趨勢，但均較控制組高。

Abstract

Human stem cell factor (hSCF), as a glycoprotein, can be widely used in basic and clinical research, biotechnology and the development of industrial processes. It has been shown that SCF initiated diverse cellular responses including hematopoiesis, organogenesis, melanin pigmentation, and development of proliferation, differentiation, migration and survival of cells. To further explore the relationship between structure and function of SCF, we produced rhSCF¹⁻¹⁶⁵ (wild type) or rhSCF¹⁻¹⁴¹ (truncated) by yeast expression system and compared their differences between their biological activity and thermal stability. Recombinant hSCF¹⁻¹⁴¹, which is truncated form of rhSCF¹⁻¹⁶⁵ in its C-terminus (STLSPEKDSRVSVTKKPFMLPPVA), is the receptor binding domain of rhSCF¹⁻¹⁶⁵. Both of them are soluble-type stem cell factor (sSCF). In this study, we showed that overexpression of rhSCF¹⁻¹⁶⁵ or rhSCF¹⁻¹⁴¹ can be successfully performed by yeast expression systems in a large amount. In the purification processes of rhSCF, we use hydrophobic interaction chromatography and anion exchange resin chromatography. The biological function study of rhSCF¹⁻¹⁶⁵ or rhSCF¹⁻¹⁴¹ was measured by using Alamar blue in TF-1 cell survival assay. We found that it has a dose-dependent proliferation manner at the different concentrations of rhSCF¹⁻¹⁴¹ or rhSCF¹⁻¹⁶⁵. At the concentration of 100 ng/ml and different temperatures (25, 50, 70, 90, 110 °C) under the conditions of the heat 10 minutes, we can observed that the biological activity of rhSCF¹⁻¹⁶⁵ are better than rhSCF¹⁻¹⁴¹. Moreover, we found that the biological activity of rhSCF¹⁻¹⁶⁵ is higher than rhSCF¹⁻¹⁴¹ when they were

heated at 90 °C for 0, 2, 10 or 30 minutes at the concentration of 100 ng/ml under the different heating time conditions for 0, 2, 10, 30, 60, or 150 minutes. If the determination of rhSCF¹⁻¹⁴¹ or rhSCF¹⁻¹⁶⁵ both at different temperatures (25, 50, 70, 90 °C) and different concentrations (500, 100, 10 ng/ml) after heating 10 minutes, it showed that both has decline in their biological activity but still be higher than control group in high concentration (500, 100 ng/ml) and under different temperature condition(25, 50, 70, 90 °C).

致謝

在研究所的生活裡，讓我成長盛多，若在這兩年裡，有一些成就，也歸功於好多好多人的幫助，這兩年的生活真是令我滿載而歸。

首先，要感謝我的指導教授，翁育萍、辜文彥老師。在實驗方面，他們提供我一個資源充足的實驗環境，讓我不用無後顧之憂的做實驗。然而在態度方面，因為老師的嚴謹督促，更讓我精益求精。很感謝兩位老師的深深付出，讓我有兩年充足的歲月。

其次，要感謝生醫所的老師們，特別是張文騰老師。在我這兩年做實驗的過程裡，他也教會了我很多實驗該注意的細節，並且提供我一些資源，讓我在進行實驗上，更佳的順利。還有抽空幫我修改論文的成大生科所黃玲惠老師，因為您的建議，讓此本論文更加的完整。

第三，感謝陪伴我渡過兩年研究所日子的同學，珊珊、瑊瑊、記寧、香儀、秋樺、偉信、承憲、宏仁，我們一起努力的日子，令我難忘。還有實驗室裡陪我一起做實驗的同伴們，雁尹、昱至、凱琪、茂華，那些快樂的時光、一起做實驗的日子，總是過得特別快！感謝明翰、祈祐在發酵槽及純化方面的幫忙，使我更加順利。

最後，感謝我的家人，爸爸、媽媽、及兩位姐姐佳靜、佩蓉。在我忙碌時，為我分擔解勞，在我失落時，聽我訴苦，現在我終於完成我的碩士論文了，真的好快樂呀！

目錄

授權書	-ii-
中文摘要	-iii-
英文摘要	-v-
致謝	-vi-
目錄	
圖表附錄	
一、前言及文獻探討	1
1. 幹細胞生長因子(human Stem cell factor)	1
2. 幹細胞生長因子的產生	2
3. SCF在造血生成及調節細胞發育之角色	4
4. SCF 之結構	5
5. 幹細胞生長因子各種不同的訊息路徑	6
6. 嗜甲醇酵母菌(<i>Pichia pastoris</i>) 真核表現系統	10
二、研究動機	11
三、實驗材料	13
1. 物品	13
2. 酵素(Enzyme)	14
3. 抗體(Antibody)	15

4. 菌株.....	15
5. 細胞株(Cell lines)	15
6. 儀器.....	15
7. 實驗套組件(Commercial kits)	17
8. 本論文所使用之質體 (Plasmids)	17
9. 引子(primers)	17
四、 實驗方法.....	18
1. SCF基因之選殖.....	18
1.1 利用PCR分別倍增SCF cDNA.....	18
1.2 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR).....	18
1.3 PCR產物之回收(PCR clean up kit; Protech).....	19
1.4 Agarose之膠體回收(Gel extraction kit; Protech).....	19
1.5 利用T-vector選殖SCF ¹⁻¹⁴¹ 及SCF ¹⁻¹⁶⁵ 片段.....	20
1.6 大腸桿菌之轉型實驗(Transformation).....	21
1.7 以Colony PCR及限制酶酵素 <i>Cla</i> I 確認有insert的菌株...21	
1.8 利用限制酶酵素 <i>Cla</i> I及 <i>Xba</i> I確認insert片段長度.....	22
1.9 製備含DNA序列正確的T-vector/SCF ¹⁻¹⁴¹ ws、 T-vector/SCF ¹⁻¹⁴¹ 6His、T-vector/SCF ¹⁻¹⁴¹ 6His、 T-vector/SCF ¹⁻¹⁶⁵ ws及SCF ¹⁻¹⁶⁵ 6His 質體DNA.....	24

1.10 Phenol / chloroform Extraction.....	26
1.11 將SCF ¹⁻¹⁴¹ 及SCF ¹⁻¹⁶⁵ DNA片段選殖至pPICZαC表現 載體.....	27
1.12 大腸桿菌之轉型實驗(Transformation into <i>E.coli</i>)	27
1.13 利用限制酶酵素 <i>Cla</i> I及 <i>Xba</i> I 確認SCF接入表現載體...	28
1.14 利用限制酶酵素 <i>Sac</i> I 切成liner form.....	28
1.15 X-33 勝任細胞(<i>Pichia</i> competent cell)製備.....	29
1.16 <i>Pichia pastoris</i> 轉型實驗 (Transformation).....	30
1.17 轉型株表現型的篩選.....	32
1.18 以即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction, 簡稱Real-time PCR) 篩選High copy number 菌株.....	33
1.19 即時定量PCR標準曲線的製備.....	34
1.20 抽取酵母菌的genomic DNA.....	35
1.21 即時定量聚合酶連鎖反應配置.....	36
1.22 即時定量PCR的流程.....	37
1.23 重組蛋白質之小量表現與確認.....	38
2.蛋白質表現分析.....	40
2.1 SDS-PAGE.....	40

2.2 西方點墨法 (Western blot).....	42
2.3 重組蛋白質之大量表現(發酵槽批次發酵 <i>Pichia pastoris</i>)	44
2.4 蛋白質濃度測定(Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay).....	44
3. 重組蛋白質的純化.....	45
3.1 Phenyl Sepharose (Amersham Bioscience) Butyl Sepharose (Amersham Bioscience)	45
3.2 Q Sepharose (Amersham Bioscience)	46
4. 細胞培養暨活性測定.....	47
4.1 細胞培養液之配置.....	47
4.2 細胞解凍.....	48
4.3 Stock solution recombinant IL-3 之配置.....	49
4.4 細胞繼代培養(懸浮性細胞 Suspension cells).....	50
4.5 細胞保存.....	50
4.6 細胞數目測定.....	51
4.7 Alamar blue 細胞分析法.....	52
五、實驗結果.....	54
1. 製備SCF ¹⁻¹⁴¹ 及SCF ¹⁻¹⁶⁵ 的基因.....	54
2. 建構不同基因片段至pPICZαC載體及定序.....	54

3. 嗜甲醇酵母菌轉殖株篩選及小量誘導表現.....	55
4. 利用Real-time PCR定量high copy number菌株.....	56
5. 大量表現及純化重組之SCF.....	57
6. 利用TF-1細胞分析並比較SCF ¹⁻¹⁴¹ 和SCF ¹⁻¹⁶⁵ 二者之生物活性	58
7. 利用TF-1細胞分析比較SCF ¹⁻¹⁴¹ 和SCF ¹⁻¹⁶⁵ 二者之熱穩定性 差異.....	58
六、討論.....	61
七、結論.....	66
八、參考文獻及附錄.....	73

圖表附錄

圖一、本研究中所構築的四種不同重組SCF蛋白質示意圖.....	73
圖二、本研究所使用之選殖載體 yT&A的圖譜.....	74
圖三、本研究所使用之表現載體 pPICZαC之圖譜.....	75
圖四、以洋菜膠電泳法檢視利用PCR倍增SCF ¹⁻¹⁴¹ 基因片段.....	76
圖五、以洋菜膠電泳法檢視利用PCR倍增SCF ¹⁻¹⁶⁵ 基因片段.....	77
圖六、以限制酶酵素切割以確定選殖載體內之SCF基因正反接....	78
圖七、構築不同片段SCF基因至表現載體的流程.....	79
圖八、以colony PCR檢視SCF ¹⁻¹⁴¹ ws DNA片段是否接入pPICZαC 表現載體.....	80
圖九、以colony PCR檢視SCF ¹⁻¹⁴¹ 6His DNA片段是否接入 pPICZαC 表現載體.....	81
圖十、以colony PCR檢視SCF ¹⁻¹⁶⁵ ws DNA片段是否接入 pPICZαC表現載體.....	82
圖十一、以colony PCR檢視SCF ¹⁻¹⁶⁵ 6His DNA片段是否接入 pPICZαC表現載體.....	83
圖十二、以限制酶酵素 <i>Cla</i> I與 <i>Xba</i> I確認SCF ¹⁻¹⁴¹ ws DNA片段 是否接入pPICZαC表現載體.....	84
圖十三、以限制酶酵素 <i>Cla</i> I與 <i>Xba</i> I確認SCF ¹⁻¹⁴¹ 6His DNA片段	

是否接入pPICZαC表現載體.....	85
圖十四、以限制酶酵素 <i>Cla</i> I 與 <i>Xba</i> I 確認 SCF ¹⁻¹⁶⁵ ws 或	
SCF ¹⁻¹⁶⁵ 6His DNA 片段是否接入 pPICZαC 表現載體.....	86
圖十五、以 colony PCR 確認 SCF ¹⁻¹⁴¹ 6His DNA 片段是否已	
嵌入嗜甲醇酵母菌基因體中.....	87
圖十六、以 colony PCR 確認 SCF ¹⁻¹⁴¹ ws DNA 片段是否已	
嵌入嗜甲醇酵母菌基因體中.....	88
圖十七、以 colony PCR 確認 SCF ¹⁻¹⁶⁵ 6His DNA 片段是否已	
嵌入嗜甲醇酵母菌基因體中.....	89
圖十八、以 colony PCR 確認 SCF ¹⁻¹⁶⁵ ws DNA 片段是否已	
嵌入嗜甲醇酵母菌基因體中.....	90
圖十九、利用 SDS-PAGE 分析重組 SCF ¹⁻¹⁴¹ ws 小量誘導	
表現情形.....	91
圖二十、利用 SDS-PAGE 及 Western blot 分析重組	
SCF ¹⁻¹⁴¹ 6His 小量誘導表現情形.....	92
圖二一、利用 SDS-PAGE 分析重組 SCF ¹⁻¹⁶⁵ ws 小量誘導表現.....	93
圖二十二、利用 SDS-PAGE 及 Western blot 分析重組	
SCF ¹⁻¹⁶⁵ 6His 小量誘導表現情形.....	94

圖二十三、利用 Real-time PCR 定量重組 $rhSCF^{1-141}$ ws	
的 Copy number.....	95
圖二十四、利用 Real-time PCR 定量重組 $rhSCF^{1-165}$ ws 的	
Copenumber	98
圖二十五、利用 Fermentor 大量表現重組 SCF^{1-141} ws 蛋白質.....	99
圖二十六、利用 Fermentor 大量表現重組 SCF^{1-165} ws 蛋白質.....	100
圖二十七、利用 Phenyl column 層析法純化重組 SCF^{1-141} 及	
SCF^{1-165}	101
圖二十八、利用陰離子交換樹脂層析法來純化重組蛋白 SCF^{1-141}	
或 SCF^{1-165}	102
圖二十九、以 15% SDS-PAGE 檢視純化後重組 SCF^{1-141} 及	
SCF^{1-165}	103
圖三十、利用 TF-1 細胞分析並比較二者 SCF^{1-141} 和 SCF^{1-165} 之	
活性.....	104
圖三十一、利用 TF-1 細胞分析二者 SCF^{1-141} 和 SCF^{1-165} 在固	
定時間及濃度下之熱穩定性.....	105
圖三十二、利用 TF-1 細胞分析二者 SCF^{1-141} 和 SCF^{1-165} 在固	
定溫度及濃度下之熱穩定性.....	106
圖三十三、利用 TF-1 細胞分析二者 SCF^{1-141} 和 SCF^{1-165} 在不	

同溫度及不同濃度下加熱十分鐘後細胞活性之分析.....108

一、前言及文獻探討

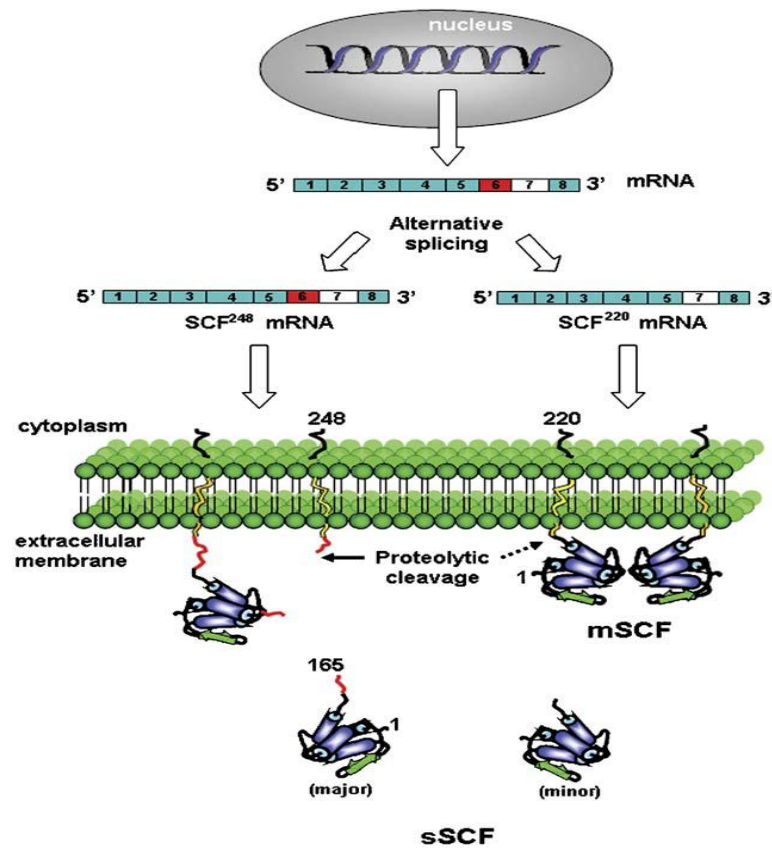
1、人類幹細胞生長因子(human Stem cell factor)

人類幹細胞生長因子(human stem cell factor; 以下簡稱hSCF)又稱為KIT ligand，序列相似性隸屬SCF family，全長有248個胺基酸，具有三段結構功能區(domain)，包含細胞外功能區、穿膜功能區、細胞質功能區，在參與細胞訊息傳遞(signal transduction)方面，屬於class III Receptor tyrosine kinase(RTK)。SCF 與KIT (SCF receptor)結合、磷酸化作用後，可經由許多的訊息傳遞蛋白傳遞至細胞核內，調節許多不同的生物功能。包括胚胎發育時期的造血(hemopoiesis)(Pick et al., 2007)、(Pick et al., 2007)、造血幹細胞與造血前驅細胞的流動(hematopoietic stem and progenitor cells mobilization)(Herbert et al., 2010; Yan et al., 1995)器官生成(organogenesis)、毛囊或皮膚黑色素生成(melanogenesis)(Broudy, 1997; Kunisada et al., 1998a)、細胞增生(Proliferation)、分化(differentiation)、遷移(migration)、生存(survive)、尤其在細胞移植(cell transplantation)、幹細胞生物工程研究和應用，SCF佔有與其它細胞因子不可替代的重要地位。先前文獻指出，soluble stem cell factor(sSCF)與granulocyte colony-stimulating factor (GCSF)協同處理在具有心肌梗塞的老鼠下，可以改善心肌功能及存活率(improved cardiac function and survival rate after MI)；反之，若只有單獨處理sSCF，則無法改善此效果(Kanellakis et al., 2006; Ohtsuka et al., 2004)。而Xiang等人於2009年提出，從老鼠的心肌細胞大量表現人類

膜蛋白型幹細胞生長因子(membrane-associated isoform of human stem cell factor)，可能是藉由增加微血管及內皮的前驅細胞、降低心肌細胞的凋亡來幫助心肌的重塑(Xiang et al., 2009)。

2、幹細胞生長因子(以下簡稱SCF)的產生

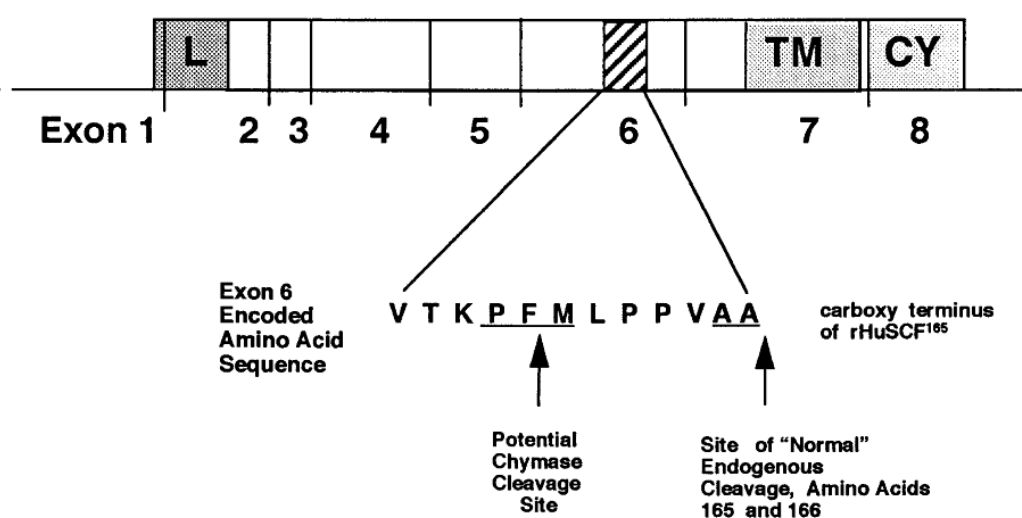
SCF gene最早的發現是從murine *steel*(*Sl*) locus所編碼出來，hSCF的編碼基因是位於染色體12q22-12q24的(*Sl*)地方。SCF receptor 又稱KIT，最早在老鼠顯性的*white spotting* (*W*) locus發現(Bernstein et al., 1990; Copeland et al., 1990; Flanagan and Leder, 1990; Huang et al., 1990; Tan et al., 1990)，而人類的KIT編碼基因是位於染色體的4q11-34(Smith et al., 2001)。SCF gene是由8個exons與7個introns所構成，經由mRNA選擇性剪接與蛋白酶切割後會存在兩種形式，一種為可溶形式(soluble forms，以下簡稱為sSCF)，另一種是膜鑲嵌式(membrane-associate forms，以下簡稱為mSCF)。mSCF有248或220個胺基酸殘基(amino acid residues)兩種形式，此乃因不同的mRNA選擇性剪接結果(包括或不包括exon 6)(Arakawa et al., 1991; Galli et al., 1994)。



圖一、不同形式 SCF 產生過程。SCF 具有兩種不同的穿膜蛋白，包括或不包括 exon 6，會產生 220 或 248 個胺基酸殘基的 SCF，經由 mRNA 選擇性剪接及蛋白酶切割後，會形成 sSCF 及 mSCF。(Reber et al., 2006)

sSCF¹⁻¹⁶⁵，其前驅物為248個胺基酸殘基，其Exon 6轉譯後具有蛋白酶的切割位(Val-Ala-Ala-Ser, residues 163–166)，而residues 166-189是與細胞膜相繫的部份，residues 190-221是厭水性穿膜功能區，residues 222-248是細胞質功能區。每個SCF單體包含兩個內雙硫鍵 (intramolecular disulfide bond) Cys4–Cys89與Cys43–Cys138 (Arakawa et al., 1992; Reber et al., 2006)。而第二種SCF isoform具220個胺基酸殘

基，因缺乏蛋白酶切割部分Exon 6，所以為膜結合型(mSCF or SCF220)，但這個型式佔微小的部份(Jiang et al., 2000; Reber et al., 2006)。一般，存在生理狀態的SCF以單體形式存在，然而在執行功能時，是為非共價的雙體所執行。



圖二、SCF 蛋白質與 cDNA 的圖示，劃斜線部分為 exon 6，箭頭表示蛋白酶切割位。L, leader; TM, putative transmembrane region; CY, cytoplasmic domain.(Loveland and Schlatt, 1997)

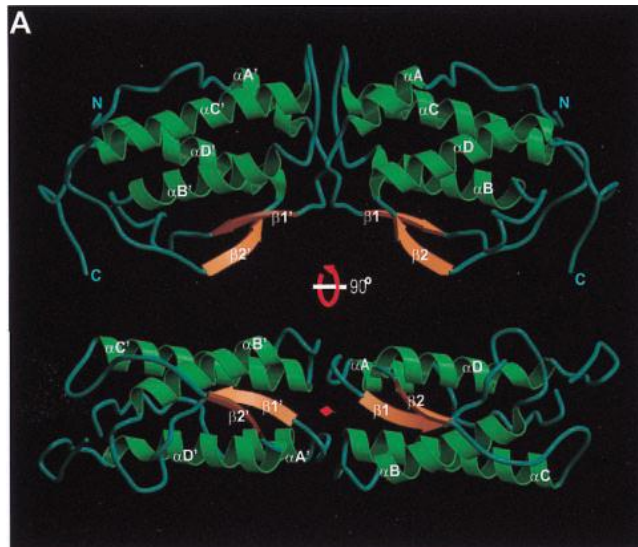
3、SCF在造血生成及調節細胞發育之角色

在胚胎發育造血時期，SCF就占一個重要的角色，在胎兒的肝臟及骨髓裡，會表現出SCF。從*in vivo*實驗證實，胚胎時期的小鼠若是缺乏SCF的表現，會因為無法造血而引發貧血作用，導致胎死腹中(Broudy, 1997)。若是SCF Receptor(KIT)發生缺少功能性的突變(Loss-of-function mutations)，也會引起貧血、降低生育能力及黑色素無法生成(Kimura et al., 2004)。黑色素的生合成中，因為黑色素母細

胞會表現SCF Receptor(KIT)，所以當黑色素母細胞從神經脊遷移到表皮的此過程裡，SCF會扮演一個領導的角色，指引此細胞遷移到適當的位置。另外，SCF也可以調節黑色素細胞的生存及增生(Kunisada et al., 1998b; Yoshida et al., 2001)。在配子生成裡，生殖母細胞、精原細胞、卵母細胞會表現SCF Receptor(KIT)(Besmer et al., 1993)，因此，SCF也參予生殖細胞的訊息調控(Rossi et al., 2000)。然而，在一些發炎類的細胞，如肥大細胞、嗜伊紅性白血球，也發現SCF有表現。SCF本身是肥大細胞的生長因子，它可以促進肥大細胞的生存、分化、遷移、活性。因此，此蛋白可以拿來當發炎疾病預測指標之一(Da Silva et al., 2004; Da Silva et al., 2002)。

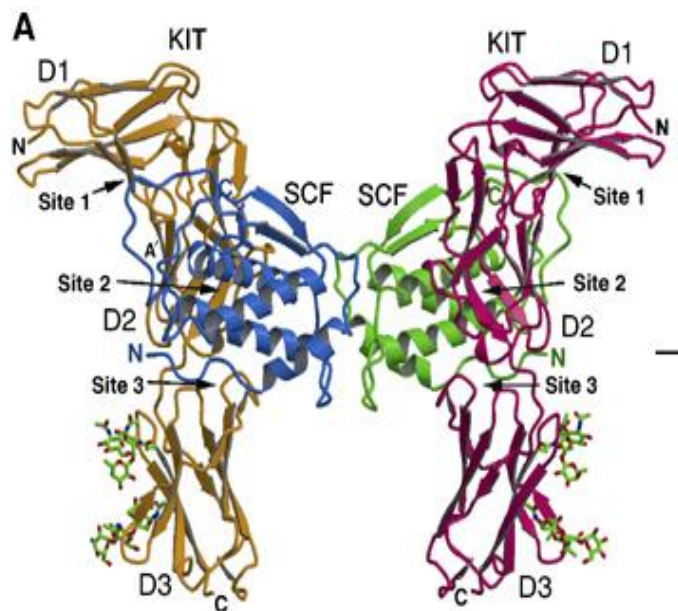
4、SCF 之結構

從結構學的角度來看，SCF是long-chain four-helix bundle ligand，屬於helical cytokine structural superfamily的成員之一。SCF是非共價結合的雙體分子，由兩個protomer輕微的契合著。每個SCF protomer 是由四個非平行的helix bundle所構成(Zhang et al., 2000)。



圖三、利用綵帶圖(Ribbon)展現SCF 結構樣式(Zhang et al., 2000)

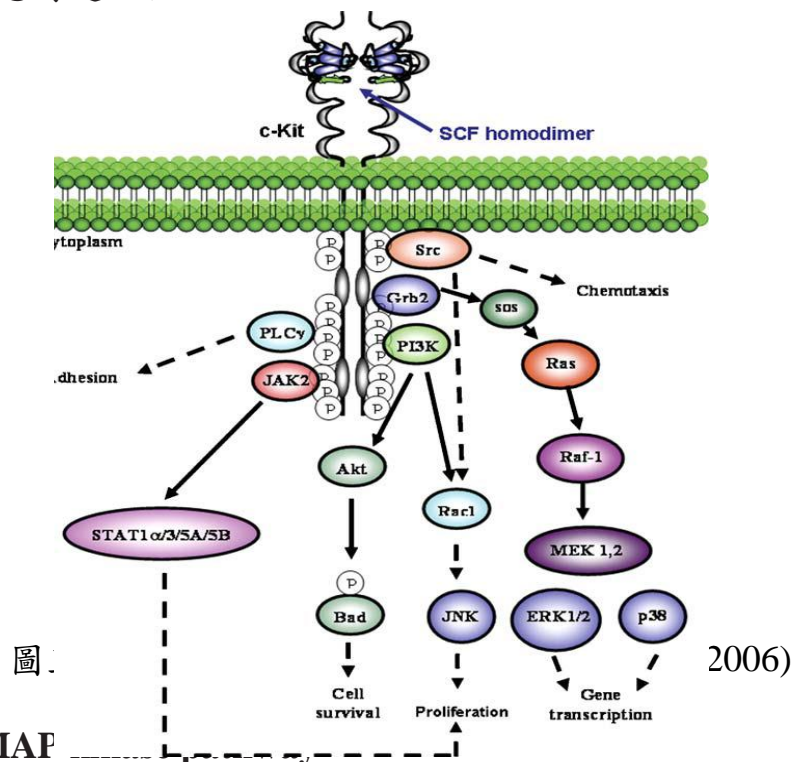
當SCF單體聚合成雙體，可以將兩個KIT連繫在一起。每個KIT只會與單個SCF交互作用，而不是KIT 對 KIT交互作用。



圖四、SCF¹⁻¹⁴¹/KIT複合體的結構，SCF¹⁻¹⁴¹分子是藍色和綠色，KIT分子是橘色和粉紅色(Liu et al., 2007)

5、幹細胞生長因子各種不同的訊息路徑

KIT receptor 屬於第三型酪氨酸激酶的成員，此家族成員還包括 Platelet derived growth factor receptor (PDGF receptor)和Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor (M-CSFR)。KIT gene全長超過80 kb，由21個外顯子(exons)所組成。5'不轉譯區(5'UTR)跟訊息胜肽(signal peptide)是由exon 1所轉譯出來，細胞外部分是由exon 2-9所轉譯出來，穿膜部分是由exon 10所轉譯出來，exon 11-20是轉譯細胞內的部分，其中，細胞外部分構成了五個immunoglobulin(Ig)-like domain的構型。有很多文獻指出，SCF雙體會跟KIT前三個Ig-like domain做結合，促使KIT形成雙聚體後而自體磷酸化，產生出至少有四條以上不同的訊息傳遞路徑。



首先，接合器蛋白(adaptor protein)為Growth factor receptor-bound

protein-2 (Grb2)會結合到KIT已磷酸化的Y703與Y936的地方。Grb2會與下游的*sos* protein做聯結，形成一複合體。此複合體再活化下游的small G-protein Ras、引起Raf-1的活化，最後，活化MAP kinases p38、ERK1/2和c-Jun N-terminal kinase (JNK)，啟動轉錄因子活性，起始了基因轉錄。

5-2 The PI3-kinase pathway :

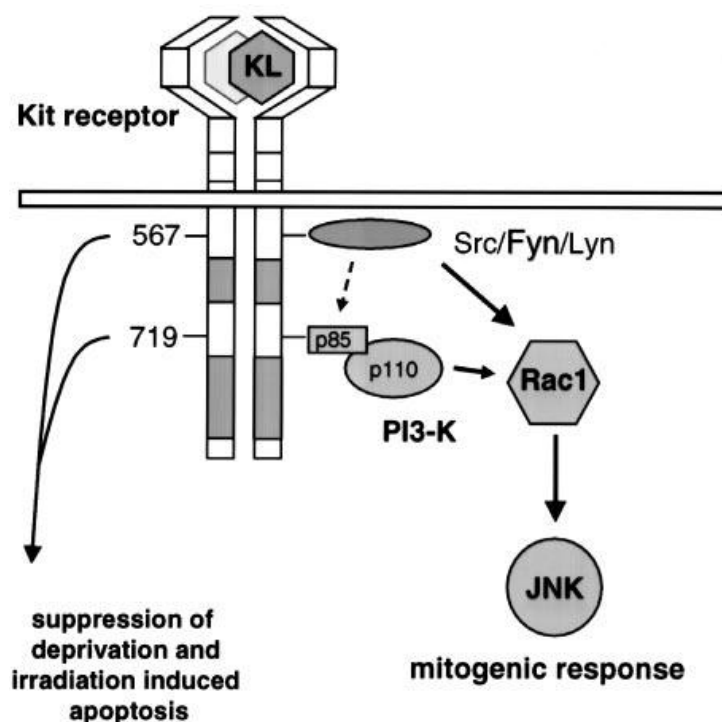
Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-kinase)是與KIT的Y721交互作用(Reber et al., 2006; Yee et al., 1994)，當SCF誘發出PI3-kinase的活性，會導致Akt的活化，隨後，促使pro-apoptotic factor Bad的磷酸化，因此，可以調控細胞的存活。

5-3 The PLC- γ pathway :

已有研究發現，phospholipase C- γ (PLC- γ)路徑的活化，主要是由mSCF所調控(而不是經由sSCF)，表示SCF所產生的形式不同，就會引起不同的訊息傳遞路徑(Gommerman et al., 2000)。PLC- γ 的活化會刺激PIP₂被水解成inositol tris-phosphate (IP₃) 和 diacylglycerol (DAG)。IP₃會與內質網的鈣離子通道結合，使之構型改變，促使Ca⁺⁺離子釋出到細胞質，與細胞膜內側DAG一起作用到PKC蛋白，使PKC由非活化態轉為活化態，進一步調節了細胞的遷移。

5-4 The *Src* pathway :

SCF誘導*Src* 活化KIT的Y568及Y570，*Src* kinase和 PI3-kinase會走向同一個方向的訊息路徑。bone marrow-derived mast cells (BMMC) 接收到SCF的刺激後，活化了下游Rac1 and JNK，促進細胞增生。



圖六、骨髓衍生之肥大細胞經由Kit receptor調節PI3-kinase和*Src*激酶路徑圖 (Timokhina et al., 1998)

5-5 The JAK/STAT pathway

經SCF刺激後，Janus kinase (JAK)和 STAT 路徑被誘發。當KIT被磷酸化後，JAK2會與之結合，形成活化態的JAK2，進而磷酸化下游的STAT1 α , 3, 5A and 5B。SCF誘導 JAK/STAT路徑可以幫助胎兒肝臟造血前驅細胞以及人類骨髓瘤白血病細胞MO7e增生。

6、嗜甲醇酵母菌 (*Pichia pastoris*) 真核表現系統

本實驗使用的嗜甲醇酵母菌，具有真核表現系統的優點：(1) 可進行蛋白質切割 (protein processing)、蛋白質折疊 (protein folding) 及後轉譯修飾 (posttranslational modification) 等，所修飾後的醣蛋白與哺乳類細胞所產生出的天然蛋白質幾乎難以區別，比 *E. coli* 更適合表達研究較複雜之蛋白質結構及性質，並且在培養時所需的培養基及儀器都比培養哺乳類細胞花費節省 (Cereghino and Cregg, 2000; Higgins, 2001)。酵母菌蛋白質表現系統又有分很多種，本研究所選用的是 *Pichia pastoris*，它優於 *Saccharomyces cerevisiae* 的原因主要多兩個優點。第一個是 *Pichia pastoris* 有 methanol-inducible alcohol oxidase I gene (AOX I)。這是一個緊密調節的基因，以甲醇為碳源的特性，調控酵母菌於甲醇加入後始誘導目標蛋白之表現且避免有毒蛋白產生，基因操作上與 *E. coli* 相似並且擁有一條與哺乳類細胞相似的真核類分泌途徑。第二個優點是 *Pichia* 生長的密度高於 *Saccharomyces*，而分泌所產出的蛋白與細胞密度有關係，*Pichia* 可以達到 100 g / L (dry weight)，這是 *Saccharomyces* 難達到的數量，並且可以避免掉出芽酵母菌的過度糖基化。

二、研究動機

隨著幹細胞再生醫學越趨發達，許多研究學者開始著力於研究重組人類生長因子各方面的潛力，希望能充分運用在醫學領域中。然而，回顧過去，生長因子一直著重運用在臨床或基礎研究。近年來，重組生長因子已開始運用於開發高附加價值保養品，藉由生長因子之添加，使得產品價值提升。然而，於產品製造過程中，常因某些劑型的需求，有些步驟必需加熱提高溫度，若此蛋白對熱的穩定性較差，會使產品功效下降，因此熱穩定性對生長因子應用於保養品製成過程，扮演重要角色。於本研究中所探討的兩個主角—SCF¹⁻¹⁶⁵ 和 SCF¹⁻¹⁴¹皆屬於sSCF，為了深入了解SCF結構與功能的關係，因此，於實驗策略上設計SCF¹⁻¹⁴¹，其是在SCF¹⁻¹⁶⁵的C-terminus地方短缺一段序列(STLSPEKDSRVSVTKKPFMLPPVA)。我們參考前人文獻中探討原始長度及C-terminus短缺一段序列之酵素，發現在熱穩定性實驗分析中，經由90°C，加熱十分鐘後，反而在C-terminus短缺之酵素的熱穩定性比原始長度之酵素還要好並且穩定。於是我們也想了解SCF¹⁻¹⁶⁵和SCF¹⁻¹⁴¹兩者之間的關係(Wen *et al.*, 2005)。過去已有文獻指出SCF¹⁻¹⁴¹是SCF¹⁻¹⁶⁵的receptor binding domain，具有functional core的部份。包含dimer interface與接受器KIT結合和活化的部份(Jiang *et al.*, 2000; Langley *et al.*, 1994)，但經由蛋白酶切割出來的sSCF¹⁻¹⁶⁵，它擁有與SCF¹⁻¹⁴¹一樣的執行功能區外，是否，SCF¹⁻¹⁶⁵只需有SCF¹⁻¹⁴¹片段，即具有相同生物功能；多出的片段只是扮演結構支持角色，或此

段序列可加強或降低SCF生物功能及熱穩定性，至目前為止，尚未有文獻探討。另一方面，本研究主旨主要利用酵母菌表現系統大量表現並純化SCF¹⁻¹⁶⁵和SCF¹⁻¹⁴¹，進一步分析比較重組SCF¹⁻¹⁶⁵和SCF¹⁻¹⁴¹生物功能及熱穩定性之差異。

三、實驗材料

物品	Catalog
BD	
Difco™ LB Broth Miller	244620
Bacto™ Peptone	211677
Bacto™ Yeast Extract	212750
Difco™ LB Broth Miller	244620
Difco™ YPD Broth	242820
Bacto™ Agar	214050
Bacto™ Agar	214010
Difco™ Agarose	212272
Difco™ Yeast Nitrogen Base without Amino Acids & Ammonium Sulfate	233520
Sigma	
Sorbitol	S1876
Ampicillin	A9393
Ammonium sulfate	A4418
Sodium pyruvate	P2256
Glucose	G7021
Methyl Sulfoxide (DMSO)	W387509
APS(Ammonium Persulfate)	A3678
Ethidium Bromide	E8751
Bromophenol blue	B5525
J.T.Baker	
Tris-base	4099-02
HEPES	7365-45-9
Sodium bicarbonate	144-55-8
Sodium Phosphate (Na ₂ HPO ₄)	4062-01
Sodium Phosphate NaH ₂ PO ₄)	3818-01
MERCK	
SDS	822050
Tween-20	S23348 738
DTT	k22733574
Methanol	1.06009.9025
Chloroform	1.02445.2500
Sodium Hydroxide	1064825000
GIBCO	
RPMI 1640 Medium	3180-022

Trypsin (1:250) BRL	27250-018
Bovine calf serum	12483-020
Recombinant Human IL-3	PHC0034
Ammonium persulfate	BRL 5523UA
Millipore	
Immobilon TM PVDF Transfer Membranes	
0.22 μm filter	SLGV033RS
0.22 μm GP Express PLUS Membrane	SCGPT05RE
ECL reagent	17-373
Centricon Plus-20 (Amicon)	UFC2LGC08
Promega	
dNTP	U1515
Bioman	
Prestain marker	PREP0625
TAE buffer(Tris-acetate-EDTA)	501000
Riedel-deHaen	
Glucose	16325
Fluka	
Acryamide/Bis 37.5:1 40% Sol	01709
Kodra	
BioMax Light Film	178 8207
Anchor	
Non-fat milk powder	9415007601098
GE Healthcare	
Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)	17-1313-01
Invitrogen	
Zeocin TM	R250-05
Alamar blue	DAL1100

1. 酵素(Enzyme)

Takara	
<i>Cla</i> I	1034A
<i>Xba</i> I	1093A
<i>Sac</i> I	1078A
Alkaline Phosphatase (Calf intestine)	2250A
Promega	
T4 DNA Ligase	M180B
SYBR Green I	A6001

Protech

ProTaq™ DNA Polymerase - PTM525 125 µL, 2 U/µL

2. 抗體 (Antibody)

Clontech

6 His (1:5000)

3. 菌株

Host strain	Genotype	Source
<i>Escherchia coli</i> DH 5α	<i>F-(80d lacZ M15)</i> <i>(lacZYA-argF)U169</i> <i>hsdR17(rm+)recA1 endA1</i> <i>relA1 deoR</i>	Bioman
Yeast <i>Pichia</i> <i>pastoris</i> X-33	Wild type	Invitrogen

4. 細胞株 (Cell lines)

食品工業研究所

Human Leuckemia TF-1 cell line

5. 儀器

高壓蒸氣滅菌鍋

HL-340 HUXLEY

無菌操作台

炬安儀器行

醱酵槽

B.E.Marubishi Bioneer-5L

氧氣質流控制器

Firstek HAS-HFC-202

迷你型電泳槽

EIDONA-1010

大型高壓滅菌鍋	ALP 日本CL-40M
大型低溫震盪培養箱	Deng Yng E700L
二氧化碳培養箱	MCO-15AC
電泳膠片螢光數位影像系統	GelCatcher1500
聚合酶連鎖反應儀	Applied Biosystems 2720
小型微量離心機	CM-620
電穿孔儀	Eppendorf multiporator Bacterial
ELISA reader	Bio-tek μ Quant
Real-Time PCR System	Roche LightCycler® 480
冷凍微量離心機	HERMLE Z233 MK-2
位相差顯微鏡	Olympus CX41 Biological microscope
34 公升液態氮容器	TAYLOR-WHARTON XT34
電源供應器	Bio-Rad PowerPac Basic 300 V
CO ₂ 氣體鋼瓶	弘曜氣體
精巧式電子天平	Mettler KMC 1300V
電磁加熱攪拌器	SP131325
去離子水製造機	Millipore-RO 10(18.2M Ω -cm)
蛋白質純化系統	ÄKTA prime plus
精密恆溫循環水槽	YJ-A2
直立式冷凍離心機	KUBOTA 5922
試管振盪器	MODEL KMC-1300V
平板型轉漬器	日本EEDD

6. 實驗套組件(Commercial kits)

Protech

Gene-Spin™-V² Miniprep Purification Kit PT-MP530XL-V2

Gene-Spin™-V² DNA Gel Extraction Kit PT-DNA143XL-V2

Roche

High Pure PCR Template Preparation Kit 11 796 828 001

Yeastern Biotech

yT&A cloning vector kit YC001

Invitrogen

Pichia Expression Kit K1710-01

GE Healthcare

PlusOne Silver Staining Kit, Protein 17-1150-01

Amersham Bioscience

7. 本論文所使用之質體 (Plasmids)

Yeastern Biotech

yT&A (圖表附錄二)

Invitrogen

pPICZ α C (圖表附錄三)

8. 引子(primers)

SCF¹⁻¹⁴¹ Primer design

5'ClaISCF 5'ATC GATG GAA GGG ATC TGC AGG AAT CGT 3'

3'SCF¹⁻¹⁴¹_{ws} 5'TCA AGA AAC CAC ACA ATC ACT AGT TTC 3'

3'SCF¹⁻¹⁴¹_{6His} 5'TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG AGA AAC
ACA ATC ACT AGT TTC 3'

SCF¹⁻¹⁶⁵ Primer design

5'ClaISCF 5'ATC GATG GAA GGG ATC TGC AGG AAT
CGT 3'

3'SCF¹⁻¹⁶⁵_{ws} 5'TCA GGC TGC AAC AGG GGG TAA CAT
AAA 3'

3'SCF¹⁻¹⁶⁵_{6His} 5'TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG GGC TGC
AAC AGG GGG TAA CAT AAA 3'

四、實驗方法

1.SCF基因之選殖

1.1利用PCR分別倍增SCF cDNA

1.各在5'端與3'端分別設計可轉譯出SCF N端及C端8個胺基酸的引子(primers)，進行PCR倍增。

2.經測試後，PCR步驟如下：

Step	Temperature (°C)	Time (minutes)	Cycles
Denaturation	95	5	1
Denaturation	95	1	
Annealing	55	1	30
Extension	72	1	
Final Extension	72	15	1
Cooling	4	∞	∞

3.爾後，皆以此表作為PCR之標準。

1.2聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction，PCR)

反應物	所需之體積(μl)
10 X PCR buffer	5.0
SCF Forward Primer(10 μM)	1.5
SCF Reverse Primer(10 μM)	1.5
dNTP	2.0
Milli-Q H ₂ O	39.0

Template(SCF cDNA)	1.0
Total volume	50.0

1.3 PCR產物之回收(PCR clean up kit; Protech)

1. 將PCR產物分別置入微量離心管，加入5倍量DF buffer，並mix均勻後取至DF column，離心(13,000 xg，30秒)，並標示好名稱(SCF¹⁻¹⁴¹ ws、SCF¹⁻¹⁴¹ 6His、SCF¹⁻¹⁶⁵ ws及SCF¹⁻¹⁶⁵ 6His)，去除廢液。
2. 加入600 µl Washing solution，離心(13,000 xg，30 秒)，去除廢液，並開蓋離心(13,000 xg，10 min)使酒精揮發
3. 把spin column移至滅菌微量離管，加入50 µl無菌Milli-Q H₂O (60°C)，反應2 min後離心(13,000 xg，2 min)後，將微量離心管名稱標示清楚後，將溶液儲存於-20 °C備用。

1.4 Agarose之膠體回收(Gel extraction kit; Protech)

1. 跑膠後的Gel，將所要的DNA切割下來，放入微離心管(eppendorf tube)，利用天平稱重，100 mg agarose gel就加入100 µl的binding buffer。
2. 放入預先加熱於60°C的加熱板中，每兩分鐘去反轉一次，直到Gel完全溶解為止。
3. 將均勻後的液體取至DF column，離心(13,000 xg，30秒)，並

標示好名稱 (SCF¹⁻¹⁴¹ ws、SCF¹⁻¹⁴¹6His、SCF¹⁻¹⁶⁵ ws、SCF¹⁻¹⁶⁵6His)。

4. 去除廢液，再各加入500 µl的binding buffer至DF column，離心(13,000 xg，30秒)。
5. 去除廢液，加入600 µl Washing solution，離心(13,000 xg，30秒)，去除廢液，並開蓋離心(13,000 xg，10 min)使酒精揮發乾淨。
6. 把spin column移至滅菌微量離管，加入50 µl Milli-Q H₂O (60 °C)，反應2 min後離心(13,000 xg，2min)後，將微量離心管名稱標示清楚後，將溶液儲存於-20 °C備用。

1.5 利用T-vector選殖SCF¹⁻¹⁴¹及SCF¹⁻¹⁶⁵片段：

- 1.將PCR倍增後的SCF¹⁻¹⁴¹及SCF¹⁻¹⁶⁵片段經1.5 % agarose gel進行大小確認，正確後，把PCR產物與T-vector做ligation反應16 °C，overnight

反應物	所需之體積(µl)
10 X Ligase Buffer A	1.0
10 X Ligase Buffer B	1.0
T-vector	0.5
T4 DNA ligase	1.0
Insert	6.5

Total volume 10.0

1.6 大腸桿菌之轉型實驗 (Transformation)

Transformation into *E. coli*

1. 將ligation mixture(SCF¹⁻¹⁴¹ ws、SCF¹⁻¹⁴¹6His、SCF¹⁻¹⁶⁵ ws及SCF¹⁻¹⁶⁵6His DNA)各取3 µl後加30 µl至competent cell(Bioman)，於滅菌微量離心管內均勻混合。置於冰上20 min後，放入42 °C乾溼加熱板1 min，迅速置於冰上10 min，將33 µl全塗在LB plate (含100 µg/ml Amp⁺)上，放入37 °C的incubator中培養16-18小時。

1.7 以Colony PCR及限制酶酵素*Cla* I 確認有insert的菌株

以Colony PCR確認有insert的菌株

1. 從四盤 (SCF¹⁻¹⁴¹ ws 及 SCF¹⁻¹⁴¹6His 及 SCF¹⁻¹⁶⁵ ws 及 SCF¹⁻¹⁶⁵6His DNA)Transformation 後的plate挑 single colony 取至20 µl的LB broth(含100 µg/ml Amp⁺)，並mix均勻後取5 µl當template。
2. 並以M13F及M13R (vector sequence)，做為colony PCR primer。

反應物	所需之體積(µl)
10 X PCR buffer	5.0
M13 Forward Primer (10 µM)	1.5

M13 Reverse Primer (10 μ M)	1.5
dNTP	2.0
Milli-Q H ₂ O	35.0
Template(菌液)	5.0
<hr/>	
Total volume	50.0
<hr/>	

3. 最後各run 1.5 % agarose確認size是否正確。

此步驟所需溶液之配方

液態完全培養基(Luria-Bertani medium)

1 % Bacto-tryptone

0.5 % Yeast extract

1 % NaCl

固態完全培養基

1 % Bacto-tryptone

0.5 % Yeast extract

1 % NaCl

2.5 % Agar

1.8 利用限制酶酵素*Cla* I及*Xba* I確認insert片段長度

抽取少量質體DNA，做酵素切割確認

【試劑】 Miniprep purification kit

Solution I

50 mM Glucose

10 mM EDTA (pH 8.0)

25 mM Tris-HCl (pH 8.0)

5 mg/ml Lysozyme

Solution II

0.2 N NaOH

1% SDS

Solution III

60 ml 5M K-acetate

11.5 ml Glacial acetic acid

28.5 ml H₂O

1. 將含有質體的菌種接種於 3 ml LB broth(含100 µg/ml Amp⁺) 中，於 37 °C 下震盪培養過夜。
2. 所得的 3 ml 菌液以微離心管於13,000 xg離心1分鐘，丟棄上清液，此步驟重複三次。
3. 把菌體回溶於200 µl的 Solution I中，利用試管震盪器將菌體充份混合均勻。
4. 接著加入200 µl的 Solution II中，輕輕的將微離心管 eppendorf 上下翻轉10次，於室溫下靜置2分鐘。
5. 接著加入300 µl的 Solution III，輕輕的將微離心管 eppendorf 上下翻轉10次，於室溫下靜置2分鐘。
6. 以13,000 xg離心10分鐘後取上清液至新的spin column中。
7. 以13,000 xg離心1分鐘，爾後將下清液倒掉。

8. 加入 Washing buffer 700 μ l 至 spin column 中，以 13,000 \times g 離心 1 分鐘，爾後將下清液倒掉。將 spin column 於 13,000 \times g 離心抽乾並以滅過菌的 Milli-Q H₂O 溶解。
9. 初步以限制酶 *Cla* I 及 *Xba* I 檢視 insert 是否以確定接入 vector 後，即可送生技公司作 DNA 序列分析。

1.9 製備含 DNA 序列正確的 T-vector/SCF¹⁻¹⁴¹ ws、T-vector/SCF¹⁻¹⁴¹6His、T-vector/SCF¹⁻¹⁴¹6His、T-vector/SCF¹⁻¹⁶⁵ ws 及 SCF¹⁻¹⁶⁵6His 質體 DNA:

1. 使用 EasyPure 套組 Plasmid Mini Kit，將定序正確後之菌株養在含 LB 之培養基(含 100 μ g/ml Amp⁺) 3 ml 中，於 incubator 37 °C、200 \times g 培養 16 hrs 後，抽其質體並以限制酶酵素 *Cla* I 把 Insert (SCF¹⁻¹⁴¹ ws 及 SCF¹⁻¹⁴¹6His DNA 片段) 從 T-vector 切下。

反應物 (insert)	所需之體積(μ l)
Insert	40.0
10X M buffer	5.0
<i>Cla</i> I	2.0
<i>Xba</i> I	2.0
Milli-Q H ₂ O	1.0
Total volume	50.0

製備pPICZ α C表現載體

反應物 (vector)	所需之體積(μ l)
pPICZ α C	35.0
10X M buffer	5.0
<i>Cla</i> I	2.0
<i>Xba</i> I	2.0
Milli-Q H ₂ O	6.0
Total volume	50.0

1. 37 °C，反應3 hrs。

2. 製備0.8 % agarose gel跑膠確認vector是否已被限制酶作用完全。

3. 將gel置於UV box，切割所要之vector片段。

4. 先剪取一段適當長度的透析膜，夾取一端，預留一端先測漏。

5. 確認夾緊後，將切割下來之vector片段的膠，至入透析膜內，並加入200 μ l的TAE buffer，並將剩餘的另一端夾緊，夾緊過程中盡量避免泡泡在液體內影響傳導。

6. 以100 V的電壓，跑30分鐘後，拿去UV box觀察是否DNA已經析出在TAE buffer中。

7. 若以析出，則將液體吸出，準備做Phenol / chloroform extraction

此步驟所需溶液之配方

50 X TAE buffer (Tris-acetate-EDTA) /1 L

2M Tris-acetate

50mM Na₂EDTA

將pH調整成8.5

1.10 Phenol / chloroform Extraction

1. 將透析出來的 180 μ l vector 與 180 μ l Phenol / chloroform 以 1:1 比例，利用試管震盪器 30 秒後，靜置 5 分鐘後，以 13,000 xg，15 °C，離心 10 分鐘，離心後取上層至另一微離心管中。
2. 重複步驟(1)一次。
3. 進行 CIP(calf intestin phosphatase)

反應物	所需之體積(μ l)
pPICZ α C	150.0
CIP	2.0
10 X CIP buffer	17.0
Milli-Q H ₂ O	1.0
Total volume	170.0

4. Total volume 170 μ l，37 °C/1.5 hrs

5. 放置到加熱板 70 °C，15 分鐘。

6. 將 170 μ l vector 與 170 μ l Phenol / chloroform 以 1:1 的比例，vortex 30 秒後，靜置 5 分鐘後，以 13,000 xg 離心 10 分鐘，離心

後取上層至DNA濃縮管 (Microcon from Millipore)濃縮。

7.將vector濃縮到剩20 μl ，放置到-20 $^{\circ}\text{C}$ 備用。

將DNA片段選殖至pPICZ α C表現載體:

1.11 將SCF¹⁻¹⁴¹及SCF¹⁻¹⁶⁵DNA片段選殖至pPICZ α C表現載體:

將四個SCF insert及pPICZ α C做分子數比，分別計算出來後再做

ligation反應，16 $^{\circ}\text{C}$ ，overnight

反應物	所需之體積(μl)
10 X Ligase Buffer	1.0
pPICZ α C	3.0
T4 DNA ligase	1.0
Insert	5.0
Total volume	10.0

1.12大腸桿菌之轉型實驗(Transformation into *E. coli*)

1. 將 ligation mixture(pPICZ α C 與 SCF¹⁻¹⁴¹ ws、SCF¹⁻¹⁴¹ 6His、SCF¹⁻¹⁶⁵ ws或SCF¹⁻¹⁶⁵ 6His DNA)取10 μl 後，加至100 μl competent cell，於滅菌微量離心管內均勻混合。

2. 置於冰上 20分鐘後，放入42 $^{\circ}\text{C}$ 乾溼加熱板1分鐘，迅速置於冰上10分鐘，將110 μl 全塗在LB plate (含100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amp⁺) 上，放入37 $^{\circ}\text{C}$ 的incubator，培養16-18小時。

3. 以colony PCR確認insert是否有接進pPICZ α C vector中。

反應物	所需之體積(μl)
10 X PCR buffer	5.0
AOX I Forward Primer (10 μM)	1.5
AOX I Reverse Primer (10 μM)	1.5
dNTP	2.0
Milli-Q H ₂ O	35.0
Template(菌液)	5.0
Total volume	50.0

4. 最後各run 1.5 % agarose確認size是否正確。

1.13 利用限制酶酵素*Cla* I及*Xba* I 確認SCF接入表現載體

1.以限制酶*Cla* I及*Xba* I檢視insert是否以確定接入vector後，即可送生技公司作DNA序列分析。

1.14 利用限制酶酵素*Sac* I 切成liner form

1. 取30 μg含有pPICZαC/SCF¹⁻¹⁴¹ ws、SCF¹⁻¹⁴¹ 6His、SCF¹⁻¹⁶⁵ ws或SCF¹⁻¹⁶⁵ 6His之DNA片段，以*Sac* I 切割，其反應如下：

反應物	所需之體積(μl)
pPICZαC/SCF ¹⁻¹⁴¹ ws、 SCF ¹⁻¹⁴¹ 6His、SCF ¹⁻¹⁶⁵ ws 或 SCF ¹⁻¹⁶⁵ 6His	40

<i>Sac</i> I	2
10 X L buffer	5
Mini-Q H ₂ O	3
Total volume	50

2. 反應37 °C，2 hrs後，以agarose 電泳確認是否切割完全。
3. 將反應完全的微離心管放置在70 °C，15分鐘。
4. 將100µl Sample與100µl Phenol/chloroform以1:1的比例，vortex 30 秒後，靜置5分鐘後，以13,000 xg，15 °C，離心10分鐘，離心後取上層至DNA濃縮管去濃縮。
5. 將DNA濃縮到剩20 µl，測量其OD₂₆₀，換算得到DNA濃度，調整並分裝至每管為10 µg的濃度後，放置到-20 °C備用。

X-33酵母菌裡的表現：

1.15 X-33 勝任細胞(*Pichia* competent cell)製備

1. 挑一single colony X-33養至3 ml的YPD medium中，以30 °C，120 rpm震盪培養隔夜。
2. 再將3 ml的X-33菌液加入100 ml的YPD medium中，持續培養，直到OD₆₀₀約為0.6~1.0。
3. 離心3,000 xg，4 °C，10分鐘，倒掉上清液。
4. 加入45 ml cold- Milli-Q H₂O，將pellet均勻打散，一切過程皆在冰上操作。

5. 離心3,000 xg，4 °C，10分鐘，倒掉上清液。
6. 加入25 ml cold- Milli-Q H₂O，將pellet均勻打散，一切過程皆在冰上操作。
7. 離心3,000 xg，4 °C，10分鐘，倒掉上清液。
8. 加入5 ml 1 M sorbitol，將pellet均勻打散。
9. 離心3,000 xg，10分鐘，倒掉上清液。
10. 加入2 ml 1 M sobitol，將pellet均勻打散。
11. 將X-33勝任細胞加入適量的冷凍保護劑甘油，以100 1分裝，放-80°C冰箱備用。

此步驟所需溶液之配方

YPD medium :

1% yeast extract

2% Peptone

加Milli-Q H₂O至98 ml

高壓滅菌鍋121°C，20分鐘。

待溫度降到60°C以下，再加入

100%葡萄糖溶液：2 ml(先以0.22 μm filter過濾)

1.16 *Pichia pastoris* 轉型實驗 (Transformation)

1. 將在 -20 °C 製備好的 DNA(含有 pPICZαC/SCF¹⁻¹⁴¹ ws、SCF¹⁻¹⁴¹ 6His、SCF¹⁻¹⁶⁵ ws或SCF¹⁻¹⁶⁵ 6His之DNA片段)，以 Sac I 切

割後所形成的liner form 各取10 µg，加入100 µl的X-33勝任細胞，混合均勻，置於冰上5分鐘。

2.將混合物放置到2 mm gap cuvette，立刻用電穿孔儀以1500伏特電壓電擊5毫秒。

3.馬上加入1 ml的1 M sorbitol，混合均勻，再將樣本取置養菌管中，放置30 °C細菌培養箱培養1小時，。

4.分別取100、200、300 µl 剛完成電擊的菌液分別塗到YPDS plate (含100 µg/ml zeocine)，放到30 °C，培養3~4天。

此步驟所需溶液之配方

YPDS plate含100 µg/ml zeocine配置300 ml

1% yeast extract

2% Peptone

1 M Sorbitol

2% Agar

加入Milli-Q H₂O至294 ml

高壓滅菌鍋121°C，20分鐘。

待溫度降到60°C以下，再加入

100%葡萄糖溶液：6 ml(0.22 µm filter過濾)

再加入300 µl zeocine (stock solution為100 mg/ml)

1.17 轉型株表現型的篩選

篩選出具有轉殖株表現型的菌株且為high copy number:

1. 將長在plate上的colony塗在含100 µg/ml zeocine的YPDS後，放置在30°C的細菌培養箱培養約2至3天後，將生長速度較快的菌株經篩選後先做MM medium測試。
2. 加入2 µl 菌液入100 µl MM medium(YPDS+100 µg/ml zeocine)，每24小時加入甲醇(methanol)，整管濃度維持為0.5 % methanol。
3. 生長較快速的菌株即可能是具high copy number菌株，而能於MM medium生長快速之菌株即表示為轉殖株表現型之菌株。
4. 以 Colony PCR 確認是否 pPICZαC/SCF¹⁻¹⁴¹ ws 、 pPICZαC/SCF¹⁻¹⁴¹6His 、 pPICZαC/SCF¹⁻¹⁶⁵ ws 或 pPICZαC/SCF¹⁻¹⁶⁵6His 已嵌入*Pichia*基因體中。
5. 從四盤 (pPICZαC/SCF¹⁻¹⁴¹ ws 、 pPICZαC/SCF¹⁻¹⁴¹6His 、 pPICZαC/SCF¹⁻¹⁶⁵ ws 或 pPICZαC/SCF¹⁻¹⁶⁵6His)的plate挑 single colony取至20 µl的YPDS培養基(含100 µg/ml zeocine)，並mix均勻後取5 µl菌液與5 µl 無菌水並混合均勻，再加入5 U/λ的5 µl lyticase混合均勻後，放入30 °C細菌培養箱反應10分鐘後，放入-86 °C冰箱、經由凍、解凍兩次，使菌體細胞破裂，並以5'AOX I primer及3'AOX I primer做colony PCR分析。

Step	Temperature (°C)	Time (minutes)	Cycles
Denaturation	95	5	1
Denaturation	95	1	
Annealing	55	1	30
Extension	72	1	
Final Extension	72	15	1
Cooling	4	∞	∞

再run 1 % agarose確定size後，將有送入target gene的菌種保存起來。

此步驟所需溶液之配方

YPDS medium 含100 µg/ml zeocine

1% yeast extract

2% Peptone

1 M Sorbitol

加入Milli-Q H₂O至98 ml

高壓滅菌鍋121°C，20分鐘。

待溫度降到60 °C以下，再加入

100%葡萄糖溶液加2 ml(先以0.22 µm filter過濾)

再加入100 µl zeocine (stock solution為100 mg/ml)

1.18 以即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction, 簡稱Real-time PCR) 篩選High copy number 菌株。

即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 其原理是：針對有特異性的核酸設計探針 (probe)、並在PCR反應中加入螢光染劑，利用螢光信號的累積即時監測整個PCR過程，利用所偵測到的Cp值，去計算出起始的濃度。所謂的C代表循環 (Clossing)，p代表閾值(Point)，Cp值是指每個反應管內的螢光信號到達設定的閾值時所經歷的循環數，每個樣本 (sample) 的Cp值與該cDNA起始濃度的對數存在線性關係，起始濃度越多，Cp值越小，即Cp值與起始濃度成反比，利用已知起始濃度的標準品可做出標準曲線，因此，只要獲得未知樣品的Cp值，即可從標準曲線上計算出該樣本的起始濃度。

使用購自Promega公司的SYBR Green PCR Master Mix，先將SYBR Green PCR Master Mix，實驗室設計的引子 (SCF¹⁻¹⁴¹的 primer和SCF¹⁻¹⁶⁵的 primer) 和滅菌過的Milli-Q水配成stock混合液備用。

1.19 即時定量PCR標準曲線的製備

【步驟】

1. 先做標準曲線，標準曲線的做法是先抽取已經定序正確之 pPICZαC/SCF¹⁻¹⁶⁵ ws質體，以OD₂₆₀測量該質體濃度，計算出每 l裡所含的 g，

公式：

$$\frac{\text{g} / \mu\text{l} \times 1515}{\text{gene length}(\text{bp})} = X \text{ p mol}$$

分子數 = N (所算出來的X p mol $\times 6 \times 10^{23}$)

1 mole = 6×10^{23}

2. 設SCF¹⁻¹⁶⁵測得85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，故

$$\frac{0.085 \mu\text{g} / \mu\text{l} \times 1515}{495 \text{ (bp)}} = 0.26 \text{ p mol}$$

$0.26 \times 10^{-12} \times 6 \times 10^{23} = 1.56 \times 10^{11}$ 分子數。

3. 將得到的分子數以連續10倍的稀釋做出Cp值標準曲線。

4. 分別取 10^{10} 、 10^8 、 10^6 、 10^4 、 10^2 當標準液。

1.20 抽取酵母菌的genomic DNA

1. 先取菌液200 μl 放入eppendorf，離心8,000 x g，1分鐘。
2. 去掉上清液，留下菌體後，加入200 μl PBS，混合均勻。
3. 加入10 μl Lyticase，放置37 $^{\circ}\text{C}$ ，30分鐘。
4. 加入100 μl Isopropanol後，再加入40 μl Protease K，放置70 $^{\circ}\text{C}$ ，10分鐘。
5. 加入200 μl Binding buffer後混合均勻。
6. 將此全部液體吸入spin column中，離心8,000 x g，1分鐘。

- 7.將spin column放入新的收集管後，加入500 µl Inhibit remove buffer，離心8,000 x g，1分鐘。
8. .將spin column放入新的收集管後，加入500 µl Washing buffer，離心8,000 x g，1分鐘。
9. 將spin column放入新的收集管後，加入500 µl Washing buffer，離心8,000 x g，1分鐘。
- 10.倒掉下清液，離心8,000 x g，1分鐘。
- 11.加入Milli Q H₂O 50 µl，靜置2分鐘，離心8,000 x g，1分鐘。
- 12.抽取已嵌入在酵母菌基因 (SCF¹⁻¹⁴¹ 和SCF¹⁻¹⁶⁵)之genomic DNA，標示好各基因的名稱及日期，即未知溶液，待測定用。
- 13.測量上述(3)的各管genomic DNA OD₂₆₀值，並將其稀釋成20 ng/ 1 DNA。
- 14.依下表液體配置好加至real time PCR專用的96 well plate中，進行即時定量聚合酶連鎖反應。

1.21 即時定量聚合酶連鎖反應配置

Negative control

反應物	體積(µl)
SYBR Green PCR Master Mix	10.0
SCF Forward Primer(10 µM)	1.0
SCF Reverse Primer(10 µM)	1.0
Milli-Q H ₂ O	8.0

Total volume	20.0
<hr/>	
Sample	
反應物	體積(μl)
<hr/>	
SYBR Green PCR Master Mix	10.0
SCF Forward Primer(10 μM)	1.0
SCF Reverse Primer(10 μM)	1.0
Milli-Q H ₂ O	3.0
DNA	5.0
<hr/>	
Total volume	20.0

1.22 即時定量PCR的流程：

Program	Temperature (°C)	Time (mm : ss)	Cycles
Pre-incubation	95	10 : 00	1
Amplification	95	00 : 10	45
	55	00 : 15	
	72	00 : 30	
Melting curve	95	00 : 05	1
	65	01 : 00	
	97	continunous	

Cooling	40	00 : 10	1
---------	----	---------	---

挑選篩選High copy number 進行小量蛋白質表現

1.23 重組蛋白質之小量表現與確認：

1. 由colony PCR及Real time PCR 雙重確認有(pPICZ α C/SCF¹⁻¹⁴¹ws及pPICZ α C/SCF¹⁻¹⁴¹6His及pPICZ α C/SCF¹⁻¹⁶⁵ws、pPICZ α C/SCF¹⁻¹⁶⁵6His)送入酵母菌之數個菌株分別養在BMGY medium 中
2. 置於30°C incubator 120 rpm，震盪培養48小時，再以OD₆₀₀值推算菌數並取相同菌數分別養在BMMY medium中，在每一個sample都取出1 ml當做0小時。
3. 每24小時都加入1 %的甲醇做誘導物。
4. 接下來收集12，24，36，48，60，72，84，96小時的菌液，並將每個時間點所收集之菌液離心13,000 xg，1分鐘，取上清液加入TCA(三氯醋酸)沉澱蛋白質。
5. 利用SDS-PAG及以西方墨點法分析，確認蛋白質是否有表現。

此步驟所需溶液之配方

Stock solution

10 X YNB (Yeast Nitrogen Base Ammonium without amino acids)

(13.4% Yeast Nitrogen Base Ammonium without amino acids)

將134 g之Yeast Nitrogen Base溶於1000 ml Milli-Q H₂O，以0.22

µm filter過濾。

500 X Biotin (0.02%Biotin)

將20 mg之Biotin 溶於100 ml Milli-Q H₂O，以0.22 µm filter過濾。

10 X Dextrose

將200 g之 D-Glucose溶於1000 ml MilliQ H₂O，以0.22 µm filter
過濾

BMGY/1L

1% yeast extract

2% Peptone

補滅過菌的Milli-Q H₂O至 700 ml

高壓滅菌，待溫度降到60°C以下，再加入以下試劑

2% 葡萄糖溶液(先以0.22 µm filter過濾)

1.34% YNB

0.02% Biotin

100 mM Potassium phosphate buffer (pH 6.0)

1% Glycerol

BMMY/1L

1% yeast extract

2% Peptone

補滅過菌的Milli-Q H₂O至 700 ml

高壓滅菌，待溫度降到60°C以下，再加入以下試劑

2% 葡萄糖溶液(先以0.22 μm filter過濾)

1.34% YNB

0.02% Biotin

100 mM Potassium phosphate buffer (pH 6.0)

1% Methanol

2. 蛋白質表現分析

2.1 SDS-PAGE

解析膠體 (separation gel)

30% acrylamide

0.8% bis-acrylamide

1.5 M Tris-HCl pH 8.8

0.4% SDS

10% Ammonium persulfate

TEMED

Milli-Q H₂O

疊層膠體(stackin gel)

30 % acrylamide

0.8 % bis-arcylamide
0.5 M Tris-HCl pH 6.8
0.4 % SDS
10 % Ammonium persulfate
TEMED
Milli-Q H₂O

電泳緩衝液 (running buffer)

0.025 M Tris-HCl (pH 8.3)
0.192 M glycine
0.1 % SDS

追蹤染劑 (protein dye)

0.25 M Tris-HCl (pH 6.8)
4 % SDS
0.02 % Bromophenol blue
20 % Glycerol
10 % β-MSH

染色劑 (coomassie blue staining buffer)

0.25 % Coomassie blue R-250
7 % acetic acid
25 % Methanol

脫色劑 (destain buffer)

7 % acetic acid
25 % Methanol

【步驟】

1. 將解析膠體取6 ml加入已組合好的電泳裝置，再緩緩加入純水，隔絕與空氣的介面。
2. 待解析膠體凝集後，倒掉上方的純水。
3. 加入疊層膠體，插入齒梳板，盡量避免氣泡產生。
4. 將待分析的蛋白質溶液與等比例的追蹤染劑混合後，放到加熱板，於100 °C加熱10分鐘。
5. 通電於解析膠體為15 mA，疊層膠體為20 mA，1.5小時後電泳析出。
6. 電泳完成後，將解析膠體取出以染色劑染色，於室溫搖晃過夜，隔日再以脫色劑脫色去除背景。

2.2 西方點墨法 (Western blot)

【試劑】

轉印緩衝液(Transfer buffer)

25 mM Tris-base

150 mM Glycine

10 % Methanol

將pH 值調至8.3後，再補水至1 L。

PBS

0.8 % NaCl

0.02 % KCl

0.2 % KH_2PO_4

1.14 % Na_2HPO_4

將pH 值調至7.4後，再補水至1 L。

PBST

PBS外加0.05 % Tween 20

PVDF membrane

3 MM paper

顯影劑

定影劑

【步驟】

1. 先將PVDF膜浸於Methanol 10分鐘。
2. 再將PVDF與3 MM paper浸於轉印緩衝液(Transfer buffer)10分鐘。
3. 將完成的SDS-PAGE與PVDF與3 MM paper正確的疊放於電泳轉印槽裡，以10 V通電轉印一小時。
4. 將PVDF膜取出後，浸於10 %脫脂奶粉(PBST為溶劑)，Blocking 1小時。
5. 取出PVDF膜，以PBST清洗三次，每次10分鐘。
6. 加入溶於10 %脫脂奶粉(PBST為溶劑)經適當稀釋的一級抗體(anti-6His)，4°C下shake過夜。
7. 將PVDF膜以PBST清洗三次，每次10分鐘。
8. 加入溶於10 %脫脂奶粉(PBST為溶劑)經適當稀釋的二級抗體(anti-mouse)，4°C下反應一小時。

9. 將PVDF膜以PBST清洗三次，每次10分鐘。

10. 以ECL Reagent kit 呈色。

2.3 重組蛋白質之大量表現(發酵槽批次發酵*Pichia pastoris*)

1. 在10 ml試管中，加入3 ml之YPDS + 100 µg/ml zeocine培養液。

2. 從YPDS + 100 µg/ml zeocine固態培養基中挑選單一菌株 (Single colony)，加入試管中的培養液中，混合均勻，以30°C、120 rpm震盪培養3天。

3. 放大體積至搖瓶 500 ml BMGY+ 100 µg/ml zeocine培養液培養三天。

4. 測定OD₆₀₀並記錄之，計算OD₆₀₀為5，並加入體積為5 L之發酵槽中。

5. 轉速180 rpm、溫度25°C，培養到發酵槽OD₆₀₀為10以上時，開始加入50 ml之methanol誘導。

6. 培養至72小時，收集菌體，離心(3000 xg，4°C，10分鐘)取其上清液。

2.4 蛋白質濃度測定(Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay)

1. 稀釋白蛋白標準品(Albumin Standard，BSA)

濃度分別稀釋為2000 µg/ml、1500 µg/ml、1000 µg/ml、750

μg/ml、500 μg/ml、250 μg/ml、125 μg/ml、25 μg/ml BSA。

2. 取10 μl不同濃度之BSA置入96 well plate中，當Standard。

3. 在打入一格10 μl的PBS，當Blank。

4. 將待測之檢體每個也都取10 μl置入96 well plate中。

5. 先拿一個盒子混合kit中的Reagent A(200μl/sample)+Reagent B(4μl/sample)反應一分鐘。

6. 取混合物200μl進去每個含有standsrđ及sample的well中，37 °C反應30分鐘。

7. 測定OD₅₆₂吸光值，繪出蛋白質標準曲線。

8. 對照標準曲線，可推測出待測樣品所含之蛋白質濃度。

3. 重組蛋白質的純化

【材料】

膠體種類

3.1 Phenyl Sepharose (Amersham Bioscience)

Butyl Sepharose (Amersham Bioscience)

沖提液：

Binding buffer：0.01 M potassium phosphate buffer, 1.5 M ammonium sulfate, pH 6.0

Elution buffer：0.01 M potassium phosphate,pH 6.0

【方法】

1. 將已誘導表現的蛋白，以Centricon Plus-10 (Amicon)先換buffer (換成0.01 M potassium phosphate buffer, 1.5 M ammonium sulfate, pH 6.0)兼濃縮。
2. 先將膠體phenyl Sepharose和butyl Sepharose分別填充至管柱中，並接上Ä KTA Explorer。
3. 先以5倍管柱體積的Milli-Q H₂O先清洗column。
4. 先以10倍管柱體積的Binding buffer：1 M potassium phosphate (pH 6.0)平衡column。
5. 將已誘導表現的蛋白之sample以1 ml/min的流速通入管柱中，先以5倍管柱體積的Binding buffer：0.01 M potassium phosphate buffer, 1.5 M ammonium sulfate, pH 6.0)洗去未結合之蛋白。
6. 再以5倍管柱體積的Elution buffer：10 mM potassium phosphate (pH 6.0)沖提出結合在sepharose上的蛋白。
7. 將收集液進行蛋白質電泳分析(SDS-PAGE)。

3.2 Q Sepharose (Amersham Bioscience)

沖提液：

Binding buffer：10 mM potassium phosphate, pH 8.0)

Elution buffer：10 mM potassium phosphate, 1M NaCl, pH 8.0)

【方法】

8. 將已過Phenyl Sepharose和Butyl Sepharose純化過的蛋白，以

Centricon Plus-10 (Amicon)換buffer(換成10 mM potassium phosphate)。

9. 再將膠體Q Sepharose分別填充至管柱中，並接上Ä KTA prime plus。
10. 先以5倍管柱體積的Milli-Q H₂O先清洗column。
11. 先以10倍管柱體積的Binding buffer：10 mM potassium phosphate, pH 8.0)平衡column。
12. 將已過Phenyl Sepharose和Butyl Sepharose純化過的之蛋白以2 ml/min的流速通入管柱中。
13. 先以5倍管柱體積的Binding buffer：10 mM potassium phosphate (pH 8.0)洗去未結合之蛋白。
14. 再以5倍管柱體積的Elution buffer(10 mM potassium phosphate with 1M NaCl)(pH 8.0)沖提出結合在Sepharose上的蛋白，因為含有高鹽，在elution時一邊拉階段梯度(Step gradient)。
15. 收集不同階段梯度所沖提出來的蛋白。
16. 將收集液進行蛋白質電泳分析(SDS-PAGE)。

4. 細胞培養暨活性測定

4.1細胞培養液之配置

RPMI-1640

2 mM L-glutamine
1.5 g/L sodium bicarbonate
4.5 g/L glucose
10 mM HEPES
1.0 mM sodium pyruvate
10 % fetal bovine serum

【步驟】

1. 將購買自Gibco公司的RPMI-1640 powder 先溶入800毫升的Milli-Q H₂O配置，於室溫下攪拌待其溶解。
2. 加入 1.5 g/L sodium bicarbonate 的碳酸氫鈉，4.5 g/L glucose， 2.83 g/L HEPES，0.11 g/L sodium pyruvate，於室溫下攪拌待其溶解。
3. 以氫氯酸（HCl）將培養液的酸鹼值（pH 值）校正為 7.2，並補足 Milli-Q H₂O 總體積 900 毫升，接著將培養液經由孔徑為 0.22 μm 的無菌過濾膜（Millipore）過濾。
4. 將已過濾好的細胞培養液再加入100 ml FBS，然後將細胞培養液儲存在4 °C 中分裝備用。

4.2 細胞解凍

【試劑】

RPMI-1640
2 mM L-glutamine
1.5 g/L sodium bicarbonate

4.5 g/L glucose
10 mM HEPES
2.0 mM sodium pyruvate
10 % fetal bovine serum
2 ng/ml recombinant G-CSF (IL-3)
TF-1 cells

【步驟】

1. 培養基先行於恆溫水槽中預熱。
2. 回溫後的培養基以75 %酒精噴瓶身並擦拭乾淨，移入無菌操作台中備用。
3. 將冷凍之細胞置於恆溫水槽中快速解凍至冰塊完全融化，期間可以輕搖冷凍管，使其在1分鐘內解凍完畢。
4. 完全解凍後以75 %酒精消毒擦拭冷凍管表面並移入無菌操作台內。
5. 取出剛解凍的細胞懸浮液至培養皿中，再以緩慢速度加入適量之新鮮培養基，再加入適量的IL-3 (2 ng/ml)，混合均勻後放入培養箱中培養。
6. 解凍後隔日，於倒立顯微鏡下觀察細胞生長情形，更換新鮮培養基，已移除含有冷凍保護劑之培養基。

4.3 Stock solution recombinant IL-3 之配置

【步驟】

1. 先精稱0.05 g BSA，加入1 X PBS 5ml，使其完全溶解。
2. 再取上述(1)裡的PBS 1 ml加入自Gibco公司所購買的10 µg/ml recombinant IL-3小管中，使其完全溶解。
3. 再將(2)的 1 ml與剛剛的4 ml PBS，充分混合，使其最後濃度為 2 µg/ml。
4. 將stock solution 分裝成50管，儲存於-20°C，每次細胞培養時再行解凍1管，依培養的體積加入所需的IL-3。

4.4 細胞繼代培養(懸浮性細胞 Suspension cells)

【步驟】

1. 培養基先行於恆溫水槽中預熱。
2. 回溫後的培養基以75 %酒精噴瓶身並擦拭乾淨，移入無菌操作台中備用。
3. 培養皿中先加入適量含有細胞的培養基後再以1:3的比例加入新鮮培養基中 (1×10^5 / ml)，混合均勻。
4. 加入適量的IL-3 (2 ng/ml)，混合均勻，進行細胞繼代培養，再將細胞放入細胞培養恆溫箱中，維持 37 °C，5 % CO₂ / 95% air 培養。

4.5 細胞保存

【試劑】

DMSO

【步驟】

1. 吸取懸浮性細胞培養液至15 ml離心管，離心1,000 rpm，5分鐘。
2. 移除上清液，加入新鮮培養基，以9：1混合DMSO。
3. 分裝到已標示好的凍菌管，每管分裝成1 ml (1×10^7 cells / tube)。
4. 將冷凍保存管移入 -80°C 冷凍保存，一天後，再放入液態氮中長期保存。

4.6 細胞數目測定

【試劑】

Trypan blue

血球計數器 (Hemocytometer)

【步驟】

1. 吸取懸浮性細胞培養液至15 ml離心管，離心1,000 rpm，5分鐘。
2. 倒掉上清液，加入4 ml新鮮培養基，充份混合均勻。
3. 取0.1 ml細胞懸浮液並加入0.1 ml Trypan blue充份混合，以血球計數器計數細胞數目
4. 於顯微鏡下，計數九宮格之外角四格，計數四大格細胞總數(N)

公式如下：

$$\frac{N/4(\text{四大格})}{0.1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 10^{-4} \text{ cm}^3} \times 2(\text{Trypan blue 稀釋倍數})$$
$$= N \times 10^4 \text{ cells/ml}$$

取所需的細胞數，進行各實驗。

4.7 Alamar blue 細胞分析法

【方法】

1. 計數TF-1細胞後，將它種到96 well plate，每個well種100 μ l (1 \times 10⁴ cells/ml)。
2. 再加入不同濃度1 μ l SCF (最後濃度分別為10 ng/ml、100 ng/ml、1000 ng/ml)。
3. 置於37 $^{\circ}$ C培養箱培養6天，每三天換一次培養基，在培養結束前24小時加入10% alamarBlue (BioSource International Inc.;Camarillo, CA)培養24小時，alamarBlue(原為深藍色、無螢光性液體)會將細胞體內的環境由氧化變成還原，呼吸鏈中的NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN和NADH/NAD的比值升高，最後釋出到細胞外，成為粉紅色、高螢光性的resorufin，因此，以ELISA reader偵測其在570nm(還原態)和600nm(氧化態)吸收光

值，並以下列公式計算細胞存活率：

$$\text{細胞存活率(\%)} = \frac{\text{實驗組 (OD}_{570}\text{-OD}_{600})}{\text{對照組 (OD}_{570}\text{-OD}_{600})} \times 100$$

算出每一個實驗組對控制組的吸收光值百分率。

五、實驗結果

1. 製備SCF¹⁻¹⁴¹及SCF¹⁻¹⁶⁵的基因

首先依SCF基因設計5'端及3'端引子，以PCR倍增SCF¹⁻¹⁴¹或SCF¹⁻¹⁶⁵ DNA片段，其中5'端引子帶有*Cla* I限制酶切位，3'端設計兩種引子，一為直接帶有終止密碼(stop codon)，一為帶有6-His密碼後再加上終止密碼，各將其產物命名為SCF¹⁻¹⁴¹ws、SCF¹⁻¹⁶⁵ws、SCF¹⁻¹⁴¹6His及SCF¹⁻¹⁶⁵6His。並將上述4種 DNA片段選殖至yT&A vector。

由於yT&A vector於5'端多T，我們利用taq DNA polymerase會在DNA片段3'端尾多加A特性及TA互補原理，將倍增的基因接入T-vector，並篩選以基因正接方式接入T-vector之菌株(圖六)。再利用限制酶酵素*Cla* I及*Xba* I將基因從T-vector切下後，接入表現載體pPICZαC。由於pPICZαC上帶有起始密碼子(start codon)，我們為了接入insert之後，能夠在轉譯時順利的在終止密碼停止，因此在5'端primer多加了一個氮鹼基，並且設計*Cla* I 限制酶切位，而3'端的primer設計終止密碼子(stop codon)，轉譯後蛋白如(圖一)所示，其不包括幹細胞生長因子的signal peptide片段。

2. 建構不同基因片段至pPICZαC載體及定序

我們將含有四個各帶不同基因片段的pPICZαC載體轉型到DH5α中，利用*E. coli*的高繁殖力幫我們大量生產。首先，以pPICZαC載體上的限制酶切位(*Cla* I及*Xba* I)當作不同基因片段的cloning site。利用

圖五的流程，將含有四個各帶不同基因片段的pPICZ α C載體轉型到DH5 α 中，並利用含有25 g/ml Zeocine的LB plate做初步篩選，然後以colony PCR (primer為5'AOX I及3'AOX I，此為vector上序列，故除了基因本身size外，應再加上588 bp)(圖八~十一)及限制酶酵素切割(restriction enzyme digestion)，選擇*Cla I*及*Xba I*將insert切下，判斷轉殖株是否有成功接入各片段基因(圖十二~十四)，確認無誤之後，送生技公司做DNA定序分析。

3. 嗜甲醇酵母菌轉殖株篩選及小量誘導表現

將定序成功帶有正確基因片段的pPICZ α C載體，以*Sac I*酵素切割成直線狀(linearized)，利用電穿孔(electroporation)的方式，以同源互換(homologous recombination)原理轉型至X33 competent cell，並利用含有100 g/ml Zeocine的YPDS plate做初步篩選，從中挑選3~7株轉殖株，然後以colony PCR 挑選已有insert插入X33染色體之菌株(primer 為5'AOX I及3'AOX I，此為vector上序列，故除了基因本身size外，應再加上588 bp)(圖十五~十八)，再經由兩次連續稀釋，篩出更純種的菌株來做小量蛋白質誘導試驗。因為pPICZ α C載體上帶有 α -factor，它是源自*Saccharomyces cerevisiae* α -factor 之signal peptide，可使目標蛋白分泌至細胞外，所以我們在收集誘導菌株表現重組蛋白質樣本時，只要收集菌體以外的上清液即可，將收取之上清液，以SDS-PAGE 分析 pPICZ α C/SCF¹⁻¹⁴¹_{ws}、pPICZ α C/SCF¹⁻¹⁶⁵_{ws}、

pPICZ α C/SCF¹⁻¹⁴¹6His及pPICZ α C/SCF¹⁻¹⁶⁵6His (圖十九~二十二)。接著再以 Western blot 確認菌株表現之重組蛋白質是否確定為 SCF¹⁻¹⁴¹6His和SCF¹⁻¹⁶⁵6His。故我們收集SCF¹⁻¹⁴¹6His和SCF¹⁻¹⁶⁵6His誘導菌株表現重組蛋白質樣本，分別為0、12、24、36、48、60、72、84、94小時收集菌體以外的上清液，再以TCA (trichloroacetic acid) 沉澱。最後取0、36、60小時樣本run SDS-PAGE，並以Anti-6His抗體做Western blot分析 (圖二十、圖二十二)。

4.利用Real-time PCR定量high copy number 菌株

本研究建立以Real-time PCR偵測SCF copy number，包括SCF¹⁻¹⁴¹及SCF¹⁻¹⁶⁵嗜甲醇酵母菌轉殖菌株，希望篩選出重組SCF蛋白質表現最大產量之菌種。故依據我們所設計之引子參數及反應結果找出最適合偵測SCF¹⁻¹⁴¹或SCF¹⁻¹⁶⁵之real-time PCR條件，成功增幅出SCF之Cp值 (圖二十三、二十四)。本次實驗的靈敏度可經由將所增殖含插入SCF¹⁻¹⁴¹或SCF¹⁻¹⁶⁵核酸之質體的大腸桿菌來計算，線性曲線數值越接近2，表示精準度越好。標準物製備是由細菌中純化質體後，利用10倍連續稀釋，將核酸濃度調整成 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^2$ 條分子數，作為即時聚合酶鏈反應之溶液。以SYBR Green 為螢光方法中同時進行dissociation curve 程式，結果證實SCF¹⁻¹⁴¹或SCF¹⁻¹⁶⁵核酸產物具不同之Tm 值，分別為84°C與82°C，陰性對照組(未加template)於real-time PCR SCF¹⁻¹⁶⁵反應40個循環時，螢光強度皆無顯著上升(圖二十三、二十四)。從SCF¹⁻¹⁴¹轉殖菌株1-3號的Cp值得之，SCF¹⁻¹⁴¹轉殖菌株3號Cp值最低；而從

SCF¹⁻¹⁶⁵轉殖菌株1-7號的Cp值得之，SCF¹⁻¹⁶⁵轉殖菌株7號Cp值最低，表示其copy number最高，所以我們選擇此二菌株來做發酵槽大量表現(圖二十五、二十六)。另外在SCF¹⁻¹⁴¹在Melting curve在78°C位置出現peak，乃為引子(primer)會形成dimer之緣故(圖二十三 B)。

5.大量表現及純化重組之SCF

先利用Real-time PCR 分別定量SCF¹⁻¹⁴¹ ws及SCF¹⁻¹⁶⁵ ws在酵母菌內的copy number數量後，挑選已做過小量誘導，並確定其會表現重組SCF蛋白質及high copy number的菌株後，利用發酵槽大量生產該菌株表現之重組SCF蛋白質(圖二十五、二十六)。發酵後的菌體利用離心去除後，收集含有蛋白質之上清液。

在純化重組SCF¹⁻¹⁴¹ 和SCF¹⁻¹⁶⁵策略上，依序選擇疏水作用層析法(Hydrophobic Interaction Chromatography;簡稱HIC)及陰離子交換樹脂層析法(Q Sepharose; Amersham Bioscience)。首先，先將上清液利用濃縮管(Millipore Centricon Plus-20)置換緩衝液，含有0.01M potassium phosphate、1.5 M ammonium sulfate，pH 6.0，接著再將置換過緩衝液的樣本通入(apply) phenyl column，並以0.01 M potassium phosphate buffer, pH 6.0沖提(elution)樣本。重覆以上步驟，將沖提出含有SCF¹⁻¹⁴¹或SCF¹⁻¹⁶⁵樣本收集，利用濃縮管置換緩衝液成0.01M potassium phosphate, pH 8.0，並將樣本再通入Q Sepharose column，以0.01M potassium phosphate, pH 8.0, 1M NaCl沖提SCF¹⁻¹⁴¹ 或SCF¹⁻¹⁶⁵ (圖二十七、二十八)。最後，將純化後的蛋白質以15% SDS-PAGE檢視其純度

(圖二十九)。

6.利用TF-1細胞分析並比較SCF¹⁻¹⁴¹和SCF¹⁻¹⁶⁵二者之生物活性

藉由前人Lu(Lu et al., 2005)的資料參考，我們選擇TF-1 cell line 作SCF¹⁻¹⁴¹及SCF¹⁻¹⁶⁵活性分析試驗。先配置重組SCF¹⁻¹⁴¹和SCF¹⁻¹⁶⁵蛋白質原倍溶液(stock solution)，分別為50 µg/ml、20 µg/ml、10 µg/ml及1 µg/ml，將TF-1 cell培養在96 well plate(1x10⁴/well)中，每個well分別加入不同濃度的1 µl stock solution做100倍稀釋。培養五天後加入Alamar blue，經過24 hrs後偵測OD₅₇₀ 及OD₆₀₀以分析重組蛋白質生物活性(即細胞增生活性)。經由六天實驗結果，可觀察到，在加入不同濃度的重組SCF蛋白質的TF-1 cell 具有dose-dependent增生的效果(圖三十)。再者，分別比較SCF¹⁻¹⁴¹處理不同濃度下，皆具有統計學上顯著差異(p< 0.0001)(圖三十)，而 SCF¹⁻¹⁶⁵處理不同濃度下，亦具有統計學上顯著差異(p< 0.0001)(圖三十)，故 SCF¹⁻¹⁴¹與SCF¹⁻¹⁶⁵二者之生物活性，無論是10 ng/ml、20 ng/ml、100 ng/ml或500 ng/ml的情況下，均具細胞增生效果。

7.利用TF-1細胞分析比較SCF¹⁻¹⁴¹和SCF¹⁻¹⁶⁵二者之熱穩定性差異

7.1首先測定固定濃度(100 ng/ml)、固定時間(十分鐘)，在不同溫度(25, 50, 70, 90, 110 °C)各加熱十分鐘。固定濃度的挑選是依據圖二十八，於100 ng/ml 下，SCF¹⁻¹⁴¹和SCF¹⁻¹⁶⁵兩者活性有最大的差異。將純化後的重組SCF¹⁻¹⁴¹ 及SCF¹⁻¹⁶⁵加熱後，分別加入TF-1

cells，培養4天後加入Alamar blue，經過24 hrs後偵測OD₅₇₀ 及 OD₆₀₀，觀察兩者SCF¹⁻¹⁴¹ 及SCF¹⁻¹⁶⁵經高溫短暫加熱後的細胞生存情況並分析細胞增生活性。其六天之結果，可觀察到SCF¹⁻¹⁶⁵不管在何者溫度加熱十分鐘下，生物活性均優於SCF¹⁻¹⁴¹(圖三十一)。

7.2再者，我們固定濃度(100 ng/ml)、固定溫度(90 °C)，在加熱不同時間(0、2、10、30、60、150分鐘)，觀察重組SCF¹⁻¹⁴¹ 及SCF¹⁻¹⁶⁵兩者細胞生存情況。將重組SCF¹⁻¹⁴¹ 及SCF¹⁻¹⁶⁵分別加熱不同時間後，加入TF-1 cells，培養五天後加入Alamar blue，經過24 hrs後偵測OD₅₇₀ 及OD₆₀₀ 分析細胞增生活性。其五天之結果，可觀察到SCF¹⁻¹⁶⁵分別在90 °C加熱0分鐘、2分鐘、10分鐘與30分鐘，生物活性都高於SCF¹⁻¹⁴¹，且具有統計學上顯著差異(p< 0.05)(圖三十二A)。若是單比較SCF¹⁻¹⁴¹在固定溫度(90 °C)，加熱(0、2、10、30、60、150分)後，結果顯示在加熱十分鐘後，生物活性開始下降，具有統計學上顯著差異(p< 0.001)，熱穩定性較不持久(圖三十二B)。反觀SCF¹⁻¹⁶⁵在固定溫度(90 °C)，加熱(0、2、10、30、60、150分鐘)後，結果顯示在加熱三十分鐘後，活性才開始下降，具有統計學上顯著差異(p< 0.0001)，熱穩定性較SCF¹⁻¹⁴¹持久(圖三十二C)。

7.3 第三、我們換測定重組 SCF¹⁻¹⁴¹ 和 SCF¹⁻¹⁶⁵ 二者在不同溫度(25、50、70、90 °C)及不同濃度(500、100、10 ng/ml)下加熱十分鐘後細胞增生活性之分析。將重組 SCF¹⁻¹⁴¹ 及 SCF¹⁻¹⁶⁵，分別加入 TF-1

cells，培養五天後加入 Alamar blue，經過 24 hrs 後進行 OD₅₇₀ 及 OD₆₀₀ 分析細胞增生活性，觀察重組 SCF¹⁻¹⁴¹ 及 SCF¹⁻¹⁶⁵ 兩者在不同濃度及溫度加熱十分鐘後的細胞生存情況。其六天之結果顯示，SCF¹⁻¹⁴¹ 及 SCF¹⁻¹⁶⁵ 兩者在高濃度(500、100 ng/ml)及不同溫度(25、50、70、90°C)下，生物活性雖有下降趨勢，但均較控制組高(圖三十三)。

六、討論

幹細胞生長因子的功能主要是可以幫助細胞的增生跟分化，尤其是造血幹細胞、生殖細胞、肥大細胞及黑色素細胞。從 1994 年(Langley et al., 1994)等人發表利用 *E.coli* 選殖表現出不同片段的 sSCF，他們試著去找尋 SCF 結構與執行活性功能的關係。由於每個 SCF 單體的部分有兩個分子內雙硫鍵 Cys4-Cys89、Cys43-Cys138，所以他們分別研究從 N-terminus 部分刪除(truncate or delete)或 C-terminus 部分刪除，對於 SCF 的活性影響為何。其結果發現，若是在此二個雙硫鍵(Cys4-Cys89、Cys43-Cys138)附近開始有缺少片段，所表現出來的蛋白質，其細胞增生試驗的結果活性都大幅下降。若是 SCF¹⁻¹⁴¹ 和 SCF¹⁻¹⁶⁵ 整段藉由利用 *E. coli* 表現的蛋白來兩相比較，SCF¹⁻¹⁴¹ 也具有不亞於 SCF¹⁻¹⁶⁵ 的活性。未來，我們將利用 LC-MS/MS 偵測重組 SCF¹⁻¹⁴¹ 或 SCF¹⁻¹⁶⁵ 分子量，並鑑定其為重組 SCF¹⁻¹⁴¹ 或 SCF¹⁻¹⁶⁵ 之準確度，因為蛋白質是由二十種胺基酸分子以不同數目及排序聚合而成，分析時需先用蛋白酵素處理蛋白質樣品，促使蛋白質被切割為一群特別的、大小不同、質量不一的 peptides，而每種蛋白質所產生的 peptides 具有獨特性，重複的機會非常小。希望可以藉此得知我們利用酵母菌所表現出來的 SCF¹⁻¹⁴¹ 和 SCF¹⁻¹⁶⁵ 所加醣基之分子量為何。

利用 Real-time PCR 來定量酵母菌的 copy number，是屬於絕對定量，因此我們要控制好 Standard 的線性係數，最好越接近 2 越好，而

Sample DNA 濃度，都要控制到 10~20 ng/ μ l 較好，避免在超過 standard 範圍。而在 Real-time PCR 定量重組 *pichia-derived* SCF¹⁻¹⁴¹ ws 中，Melting Peaks 的地方(圖二十三 B)，NTC (Negative control)在 Tm 值 78.33 的地方也出現 peak，表示此次實驗所使用的 primer 會形成 dimer form。並在此次實驗中發現，當 standard 所使用的量漸少時(分子數為 10⁴、10²)，primer 就會開始形成 dimer form，就連在樣本 SCF¹⁻¹⁴¹-1、SCF¹⁻¹⁴¹-2 也可發現相同情況，欲改善此狀況之解決方法可以嘗試更換另一組新引子 primers 或提高 Annealing 時的溫度，但是此二種解決方式我們都嘗試過很多次，情況還是無法得到改善。

利用 Western Blotting 可分析酵母菌所表現的重組 SCF¹⁻¹⁴¹6His 與 SCF¹⁻¹⁶⁵6His，其轉譯出來之胺基酸序列是否正確，利用 Anti-6His 抗體，我們發現 SCF¹⁻¹⁴¹6His 呈現的結果是 double band，而 SCF¹⁻¹⁶⁵6His 是 single band，分析其可能的原因，可能與酵母菌表現系統有關，因產生醣基化的程度不一所致，所以會出現 double band 的結果，但此需以切割醣基的酵素(deglycoprotein enzymes)進一步證明。

本研究中所使用測定 SCF 生物活性的方法，是選擇 Trypan blue 和 Alamar blue 來評估 SCF¹⁻¹⁴¹ 或 SCF¹⁻¹⁶⁵ 二者對於細胞是否有增生活性之差異。結果顯示，SCF¹⁻¹⁴¹ 與 SCF¹⁻¹⁶⁵ 兩者生物活性相當(圖三十)。因此，我們進一步想探討，是否，二者在熱穩定性上有差異。此外，於文獻探討中，我們發現 SCF 可促進黑色素細胞之黑色素生合成，未來研究將可利用測定黑色素生合成的方式來測定 SCF 的活性，從

(Mouriaux et al., 2001)等人發表的研究中發現，作者將黑色素細胞離心收集完pellet後，使用1N NaOH溶解細胞，再利用ELISA測定OD₄₇₅觀察黑色素的增加與否作為判斷SCF是否有活性的方法之一。近年來，利用冷光偵測生長因子的活性越來越普遍，因為其反應時間短，可省略等待時間的天數，故此方法也成為我們未來實驗考慮偵測方法之一。

在蛋白質純化方面，於陰離子交換樹脂Q Sepharose小量測試中，由於SCF¹⁻¹⁴¹及SCF¹⁻¹⁶⁵本身的pI值為4.8及5.0左右，所以我們找尋純化時buffer之最適化條件，分別測試buffer在pH 6.0、7.0及8.0與SCF的鍵結能力，發現SCF¹⁻¹⁴¹及SCF¹⁻¹⁶⁵皆在pH 8.0時，與Q sepharose結合能力最強，促使一些雜蛋白可與目標蛋白SCF具有分離效果。

在SCF¹⁻¹⁴¹及SCF¹⁻¹⁶⁵兩者的熱穩定性實驗中，我們挑選測定兩者SCF活性的分析中(圖三十)，活性差異最大的濃度—100 ng/ml，做為熱穩定性的固定濃度，接著我們設計一連串實驗，首先包括固定濃度(100 ng/ml)、固定時間(十分鐘)，在不同溫度(25, 50, 70, 90, 110 °C)各加熱十分鐘，觀察兩者SCF¹⁻¹⁴¹及SCF¹⁻¹⁶⁵細胞生存情況，兩者皆發現25 °C~70 °C加熱十分鐘，不會降低細胞的生存能力趨勢，而當溫度高達90 °C~110 °C，趨勢就會慢慢下滑。然而SCF¹⁻¹⁶⁵不管在任何溫度、加熱十分鐘的條件下，細胞的生存能力皆比SCF¹⁻¹⁴¹具有顯著性差異，表示在加熱過程中，SCF¹⁻¹⁶⁵似乎具有比SCF¹⁻¹⁴¹更優勢的熱穩定性。其次，我們換固定濃度(100 ng/ml)、固定溫度(90 °C)，在加

熱不同時間(0、2、10、30、60、150分鐘)，觀察兩者SCF¹⁻¹⁴¹ 及SCF¹⁻¹⁶⁵細胞生存情況。兩者SCF皆發現在90 °C加熱0~30分鐘期間，仍具有與不加熱狀態相似的細胞存活率趨勢，而當加熱時間拉長到30~150分鐘，趨勢就會慢慢下滑到與沒加入SCF的控制組一樣高(控制組細胞生存能力換算為100%)。將SCF¹⁻¹⁶⁵加熱不同時間(0、2、10、30、60分)分別與加熱150分鐘後做比較，前四個加熱時間(0、2、10、30)皆具有三顆Star mark的顯著性差異。將SCF¹⁻¹⁴¹加熱不同時間(0、2、10、30、60分)分別與加熱150分鐘後做比較，只有前三個加熱時間(0、2、10)具有兩顆Star mark以上的顯著性差異。如果，兩兩加熱時間做比較，只有在固定濃度(100 ng/ml)、固定溫度(90 °C)的時間點(加熱0分鐘和加熱30分鐘)較長時間，具有顯著性差異，SCF¹⁻¹⁶⁵似乎具有比SCF¹⁻¹⁴¹更高的熱穩定性。最後，測定二者SCF¹⁻¹⁴¹和SCF¹⁻¹⁶⁵在不同溫度(25、50、70、90 °C)及不同濃度(500、100、10 ng/ml)下加熱十分鐘後細胞活性之分析。其結果顯示SCF¹⁻¹⁶⁵(500、100 ng/ml)和SCF¹⁻¹⁴¹(500 ng/ml)在溫度(25、50 °C)時，細胞生存活性有明顯上升；反之，在70、90 °C時，各濃度的SCF皆生存能力下降(圖三十三)。總結而言，對於SCF¹⁻¹⁴¹和SCF¹⁻¹⁶⁵熱穩定性的比較，兩者在25~50°C時，提升細胞的生存能力，經由溫度漸漸升高到(70~90 °C)下，細胞生存能力會開始下降，持續到加熱90 °C半小時，細胞生存能力才會漸漸消失到與控制組相同，熱穩定實驗來說，大抵上是SCF¹⁻¹⁶⁵比SCF¹⁻¹⁴¹來的穩定。我們推測，可以維持此二者SCF抵抗高溫後還具有細胞生

存能力的原因，是因為每個SCF單體具有兩個分子內雙硫鍵，促使其生物活性功能不易因加熱而消失。

回顧文獻，本研究為第一例探討於*pichia*中表現rhSCF為主題的論文。比較過去文獻(利用*E.coli*表現SCF¹⁻¹⁴¹及SCF¹⁻¹⁶⁵蛋白質)與本論文中測定sSCF的生物活性方式，前人是使用^[3H]thymidine方法測定，SCF¹⁻¹⁴¹於10 ng/ml濃度其活性略高於SCF¹⁻¹⁶⁵(102:100)(Langley et al., 1994)；而本論文乃利用Alamar blue氧化還原法來做分析，在10 ng/ml時，SCF¹⁻¹⁴¹與SCF¹⁻¹⁶⁵細胞增生活性並不明顯，在高濃度500 ng/ml時，是SCF¹⁻¹⁴¹活性高於SCF¹⁻¹⁶⁵，而在100 ng/ml時，則SCF¹⁻¹⁶⁵活性高於SCF¹⁻¹⁴¹，但其實兩者活性差異並不大。探討其原因，可能測定方法靈敏度不同，一般而言，^[3H]thymidine比Alamar blue氧化還原法的靈敏度佳。

七、結論

- 1.利用酵母菌表現系統，確實可以表現出 rhSCF¹⁻¹⁴¹ 及 rhSCF¹⁻¹⁶⁵
- 2.利用酵母菌經誘導表現出來的 SCF¹⁻¹⁴¹ ws 及 SCF¹⁻¹⁶⁵ ws，皆有雙 band 現象產生，於是利用 Western Blotting 確認是否 SCF¹⁻¹⁴¹ 6His 及 SCF¹⁻¹⁶⁵ 6His 是否也具有雙 band 現象，結果顯示 SCF¹⁻¹⁴¹ 6His 也具有雙 band 現象，表示可能是因為糖基化不一的結果，必須進一步利用 MASS 及切割糖基酵素分析確認。
- 3.利用發酵槽，每 24 小時加入 1 % (v/v)Methanol 誘導物，順便收 Time course，發現 SCF¹⁻¹⁴¹ 及 SCF¹⁻¹⁶⁵ 在第 72 小時表現量最多。
- 4.利用疏水作用層析法純化時，條件控制在 pH 6，純化效果最好。
- 5.利用陰離子交換樹脂層析法 Q sepharose 純化時，條件控制在 pH 8，純化效果最好。
- 6.酵母菌所表現出來的 rhSCF，測定其對細胞生存之生物活性分析，利用 Alamar blue assay，在高濃度(500 ng/ml)的情況下，SCF¹⁻¹⁴¹ 活性略高於 SCF¹⁻¹⁶⁵；若是再(100 ng/ml) 的情況下，SCF¹⁻¹⁶⁵ 活性略高於 SCF¹⁻¹⁴¹。
- 7.比較兩者 SCF¹⁻¹⁴¹ 及 SCF¹⁻¹⁶⁵ 之熱穩定性，若在固定時間(十分鐘)及濃度(100 ng/ml)、而不同溫度下之熱穩定性來說，SCF¹⁻¹⁶⁵ 穩定性略高於 SCF¹⁻¹⁴¹。若在固定溫度(90°C)及濃度下(100 ng/ml)之熱穩定性、而不同時間下之熱穩定性來說，SCF¹⁻¹⁶⁵ 穩定性(加熱前 30 分鐘)略高

於 SCF¹⁻¹⁴¹，但加熱 30 分鐘後，兩者的熱穩定性就消失了。若 SCF¹⁻¹⁴¹ 及 SCF¹⁻¹⁶⁵ 在不同溫度、不同濃度、加熱十分鐘的情況下之熱穩定性來說，SCF¹⁻¹⁶⁵ 還是優於 SCF¹⁻¹⁴¹。

八、參考文獻：

Arakawa, T., Langley, K.E., Kameyama, K., and Takagi, T. (1992). Molecular weights of glycosylated and nonglycosylated forms of recombinant human stem cell factor determined by low-angle laser light scattering. *Anal Biochem* 203, 53-57.

Arakawa, T., Yphantis, D.A., Lary, J.W., Narhi, L.O., Lu, H.S., Prestrelski, S.J., Clogston, C.L., Zsebo, K.M., Mendiaz, E.A., Wypych, J., *et al.* (1991). Glycosylated and unglycosylated recombinant-derived human stem cell factors are dimeric and have extensive regular secondary structure. *J Biol Chem* 266, 18942-18948.

Bernstein, A., Chabot, B., Dubreuil, P., Reith, A., Nocka, K., Majumder, S., Ray, P., and Besmer, P. (1990). The mouse W/c-kit locus. *Ciba Found Symp* 148, 158-166; discussion 166-172.

Besmer, P., Manova, K., Duttlinger, R., Huang, E.J., Packer, A., Gyssler, C., and Bachvarova, R. (1993). The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Development* 119, 125-137.

Broudy, V.C. (1997). Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 90, 1345-1364.

Cereghino, J.L., and Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24, 45-66.

Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Cho, B.C., Donovan, P.J., Jenkins, N.A., Cosman, D., Anderson, D., Lyman, S.D., and Williams, D.E. (1990). Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell* 63, 175-183.

Da Silva, C.A., Kassel, O., Lebouquin, R., Lacroix, E.J., and Frossard, N. (2004). Paradoxical early glucocorticoid induction of stem cell factor (SCF) expression in inflammatory conditions. *Br J Pharmacol* 141, 75-84.

Da Silva, C.A., Kassel, O., Mathieu, E., Massard, G., Gasser, B., and Frossard, N. (2002). Inhibition by glucocorticoids of the interleukin-1beta-enhanced expression of the mast cell growth factor SCF.

Br J Pharmacol 135, 1634-1640.

Flanagan, J.G., and Leder, P. (1990). The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. *Cell* 63, 185-194.

Galli, S.J., Zsebo, K.M., and Geissler, E.N. (1994). The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* 55, 1-96.

Gommerman, J.L., Sittaro, D., Klebasz, N.Z., Williams, D.A., and Berger, S.A. (2000). Differential stimulation of c-Kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential. *Blood* 96, 3734-3742.

Herbert, K.E., Prince, H.M., Ritchie, D.S., and Seymour, J.F. (2010). The role of ancestim (recombinant human stem-cell factor, rhSCF) in hematopoietic stem cell mobilization and hematopoietic reconstitution. *Expert Opin Biol Ther* 10, 113-125.

Higgins, D.R. (2001). Overview of protein expression in *Pichia pastoris*. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 5, Unit5 7*.

Huang, E., Nocka, K., Beier, D.R., Chu, T.Y., Buck, J., Lahm, H.W., Wellner, D., Leder, P., and Besmer, P. (1990). The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* 63, 225-233.

Jiang, X., Gurel, O., Mendiaz, E.A., Stearns, G.W., Clogston, C.L., Lu, H.S., Osslund, T.D., Syed, R.S., Langley, K.E., and Hendrickson, W.A. (2000). Structure of the active core of human stem cell factor and analysis of binding to its receptor kit. *EMBO J* 19, 3192-3203.

Kanellakis, P., Slater, N.J., Du, X.J., Bobik, A., and Curtis, D.J. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve endogenous repair after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 70, 117-125.

Kimura, Y., Jones, N., Kluppel, M., Hirashima, M., Tachibana, K., Cohn, J.B., Wrana, J.L., Pawson, T., and Bernstein, A. (2004). Targeted mutations of the juxtamembrane tyrosines in the Kit receptor tyrosine kinase selectively affect multiple cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*

101, 6015-6020.

Kunisada, T., Lu, S.Z., and Yoshida, H. (1998a). Murine cutaneous mastocytosis and epidermal melanocytosis induced by keratinocyte expression of transgenic stem cell factor. *J Exp Med* 10, 1565-1573.

Kunisada, T., Yoshida, H., and Yamazaki, H. (1998b). Transgene expression of steel factor in the basal layer of epidermis promotes survival, proliferation, differentiation and migration of melanocyte precursors. *Development* 125, 2915-2923.

Langley, K.E., Mendiaz, E.A., Liu, N.L., Narhi, L.O., Zeni, L., Parseghian, C.M., Clogston, C.L., Leslie, I., Pope, J.A., Lu, H.S., *et al.* (1994). Properties of Variant Forms of Human Stem Cell Factor Recombinantly Expressed in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 311, 55-61.

Liu, H., Chen, X., Focia, P.J., and He, X. (2007). Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 26, 891-901.

Loveland, K.L., and Schlatt, S. (1997). Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *J Endocrinol* 153, 337-344.

Lu, H., Zang, Y., Ze, Y., Zhu, J., Chen, T., Han, J., and Qin, J. (2005). Expression, refolding, and characterization of a novel recombinant dual human stem cell factor. *Protein Expr Purif* 43, 126-132.

Mouriaux, F., Chahud, F., Maurage, C.A., Malecaze, F., and Labalette, P. (2001). Implication of stem cell factor in the proliferation of choroidal melanocytes. *Exp Eye Res* 73, 151-157.

Ohtsuka, M., Takano, H., Zou, Y., Toko, H., Akazawa, H., Qin, Y., Suzuki, M., Hasegawa, H., Nakaya, H., and Komuro, I. (2004). Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J* 18, 851-853.

Pick, M., Azzola, L., Mossman, A., Stanley, E.G., and Elefanty, A.G. (2007). Differentiation of human embryonic stem cells in serum-free medium reveals distinct roles for bone morphogenetic protein 4, vascular

endothelial growth factor, stem cell factor, and fibroblast growth factor 2 in hematopoiesis. *Stem Cells* 25, 2206-2214.

Reber, L., Da Silva, C.A., and Frossard, N. (2006). Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 533, 327-340.

Rossi, P., Sette, C., Dolci, S., and Geremia, R. (2000). Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J Endocrinol Invest* 23, 609-615.

Smith, M.A., Court, E.L., and Smith, J.G. (2001). Stem cell factor: laboratory and clinical aspects. *Blood Rev* 15, 191-197.

Tan, J.C., Nocka, K., Ray, P., Traktman, P., and Besmer, P. (1990). The dominant W42 spotting phenotype results from a missense mutation in the c-kit receptor kinase. *Science* 247, 209-212.

Timokhina, I., Kissel, H., Stella, G., and Besmer, P. (1998). Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *EMBO J* 17, 6250-6262.

Wen, T.N., Chen, J.L., Lee, S.H., Yang, N.S., and Shyur, L.F. (2005). A truncated *Fibrobacter succinogenes* 1,3-1,4-beta-d-glucanase with improved enzymatic activity and thermotolerance. *Biochemistry* 44, 9197-9205.

Xiang, F.L., Lu, X., Hammoud, L., Zhu, P., Chidiac, P., Robbins, J., and Feng, Q. (2009). Cardiomyocyte-specific overexpression of human stem cell factor improves cardiac function and survival after myocardial infarction in mice. *Circulation* 120, 1065-1074, 1069 p following 1074.

Yan, X.Q., Hartley, C., McElroy, P., Chang, A., McCrea, C., and McNiece, I. (1995). Peripheral blood progenitor cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor plus recombinant rat stem cell factor contain long-term engrafting cells capable of cellular proliferation for more than two years as shown by serial transplantation in mice. *Blood* 85, 2303-2307.

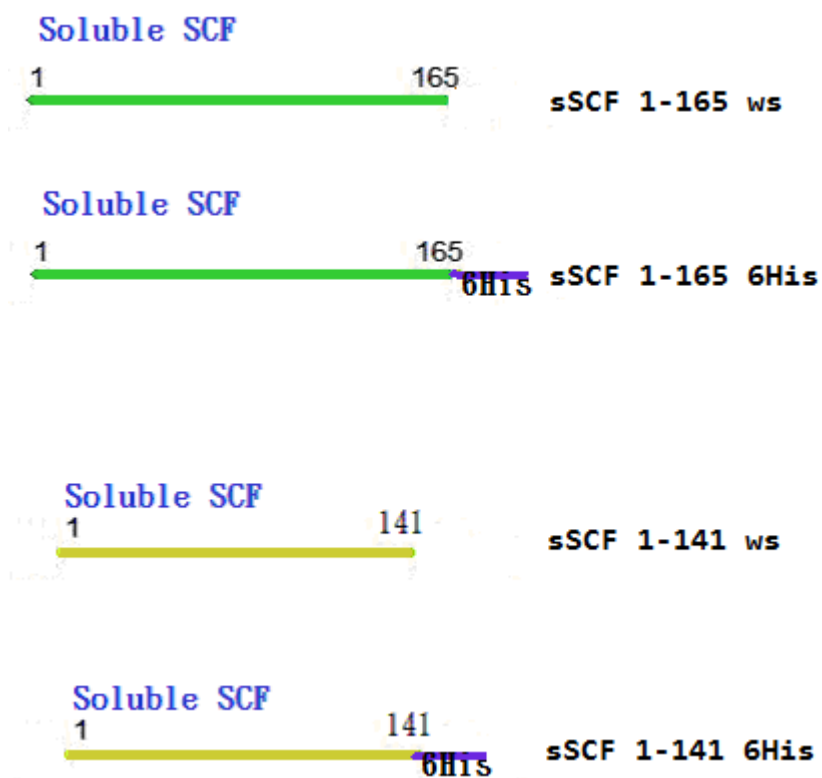
Yee, N.S., Hsiau, C.W., Serve, H., Vosseller, K., and Besmer, P. (1994). Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor

tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *J Biol Chem* 269, 31991-31998.

Yoshida, H., Kunisada, T., Grimm, T., Nishimura, E.K., Nishioka, E., and Nishikawa, S.-I. (2001). Review: Melanocyte Migration and Survival Controlled by SCF//c-kit Expression. *J Investig Dermatol Symp Proc* 6, 1-5.

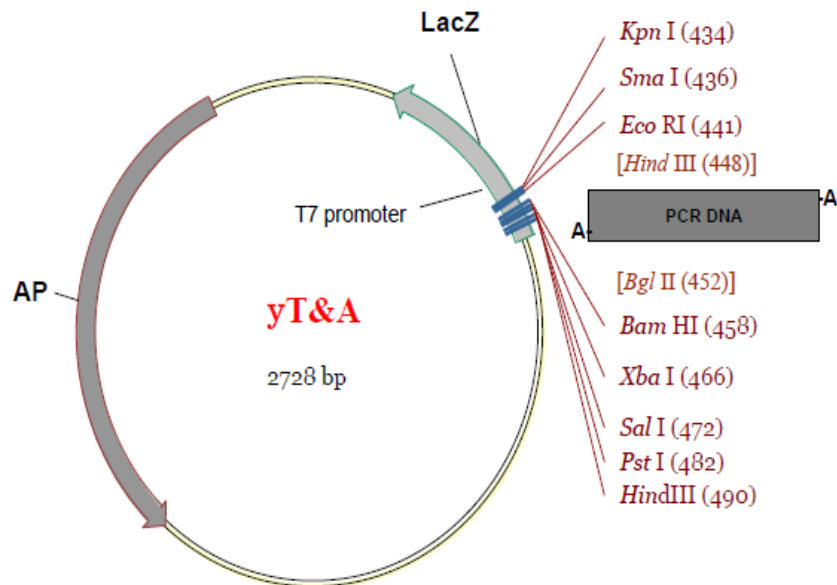
Zhang, Z., Zhang, R., Joachimiak, A., Schlessinger, J., and Kong, X.P. (2000). Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7732-7737.

九、圖表附錄



圖一、本研究中所構築的四種不同重組SCF蛋白質示意圖

yT&A 選殖載體圖譜



Multiple Cloning region 434 to 490

lac Z gene 511 to 149

Ampr gene 2528 to 1671

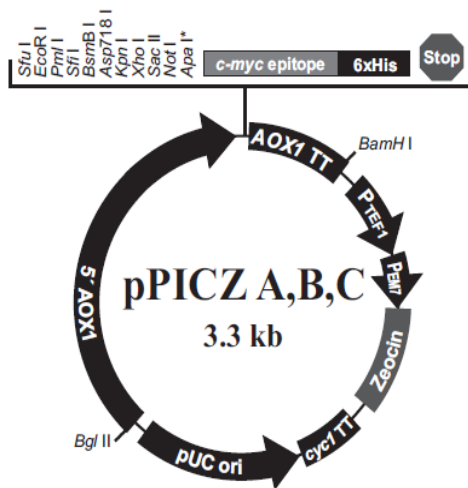
T7 promoter 402 to 439

M13 universal primer 359 to 375

M13 reverse primer 528 to 507

The map and sequence reference point of the yT&A cloning vector
(copyright Yeastern Biotech Co., 2010, All Rights Reseved)

圖二、本研究所使用之選殖載體 yT&A的圖譜



* The restriction site between *Not* I and the *myc* epitope is different in each version of pPICZ:

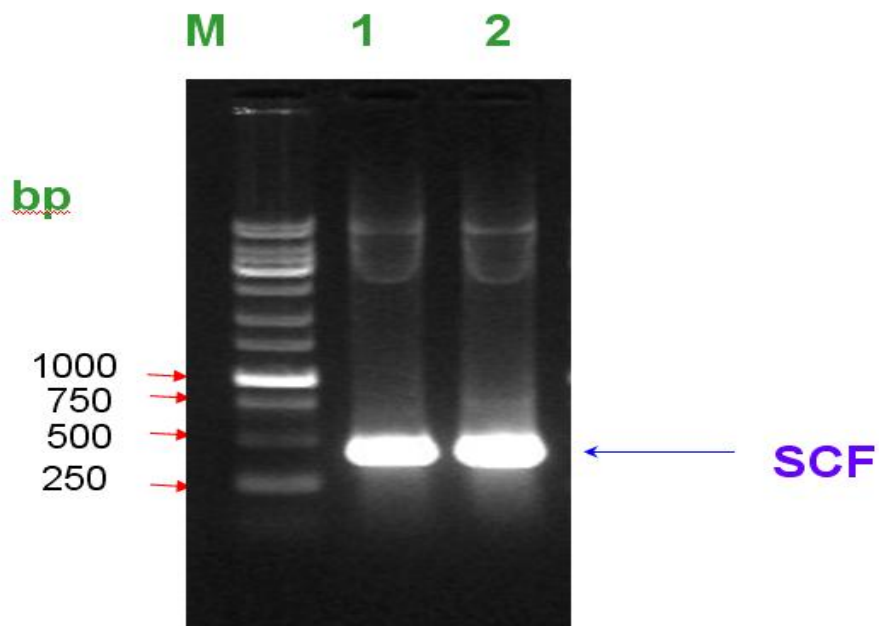
Apa I in pPICZ A
Xba I in pPICZ B
*Sna*B I in pPICZ C

(copyright Invitrogen)

質體pPICZ α C 可分為以下區域：

1. 5' AOX1：含AOX1 啟動子，經甲醇誘導後可大量表現目標基因。此區域也含特殊單一限制酶切位，可使目標基因嵌入*Pichia* 基因體。
2. α -factor：取自 *Saccharomyces cerevisiae* α -factor 之 signal peptide，使目標蛋白可以分泌至細胞外。
3. *c-myc* epitope：一癌蛋白的抗原決定基，使表現出之蛋白可以商用抗體辨認、純化。
4. AOX1 TT：AOX1 的終止子。
5. PETF1：酵母菌中 *Sh ble* 的基因啟動子。
6. PEM7：*E.coli* 中 *Sh ble* 基因啟動子。
7. *Sh ble* 基因：可抗ZeocineTM，供*E.coli* 與酵母菌篩選。
8. CYC1 TT：人為酵母菌中 *Sh ble* 基因終止子。

圖三、本研究所使用之表現載體 pPICZ α C之圖譜

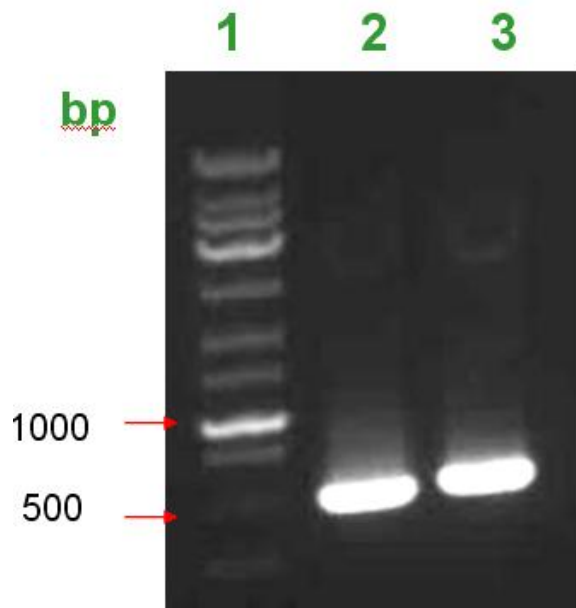


Lane M: 1 kb. marker

Lane 1: The PCR product of SCF¹⁻¹⁴¹ DNA fragment (~423 bp)

Lane 2: The PCR product of SCF¹⁻¹⁴¹6His DNA fragment (~441 bp)

圖四、以洋菜膠電泳法檢視利用PCR倍增SCF¹⁻¹⁴¹基因片段



Lane 1: 1 kb. marker

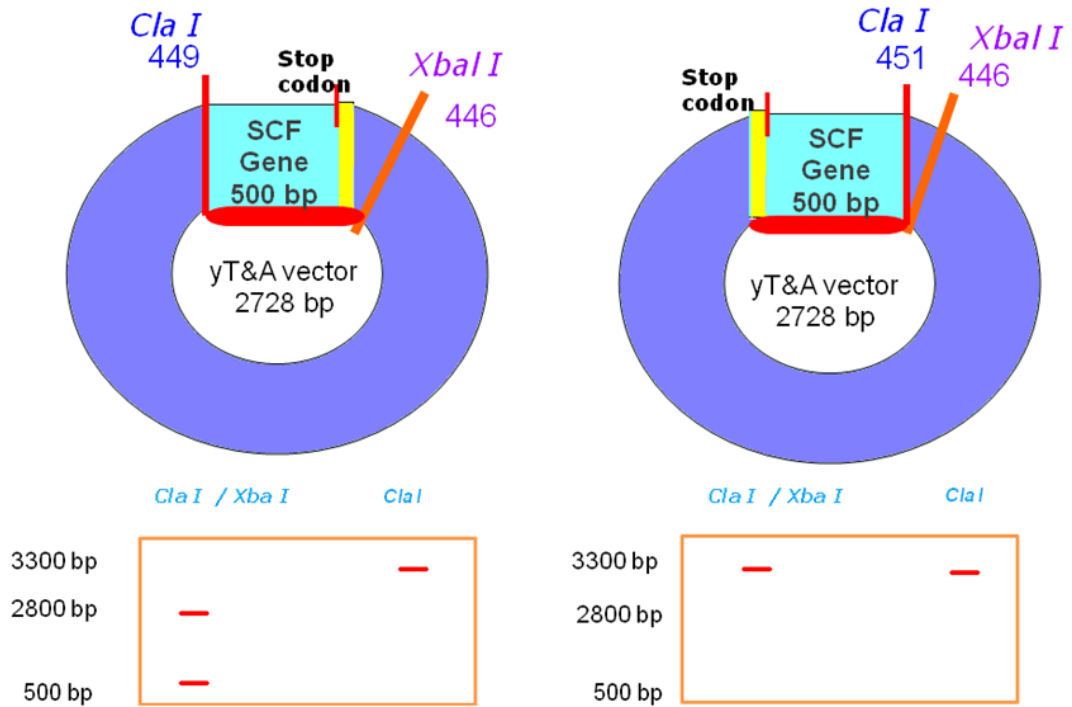
Lane 2: The PCR product of SCF¹⁻¹⁶⁵ws DNA fragment(~495 bp)

Lane 3: The PCR product of SCF¹⁻¹⁶⁵6His DNA fragment(~513 bp)

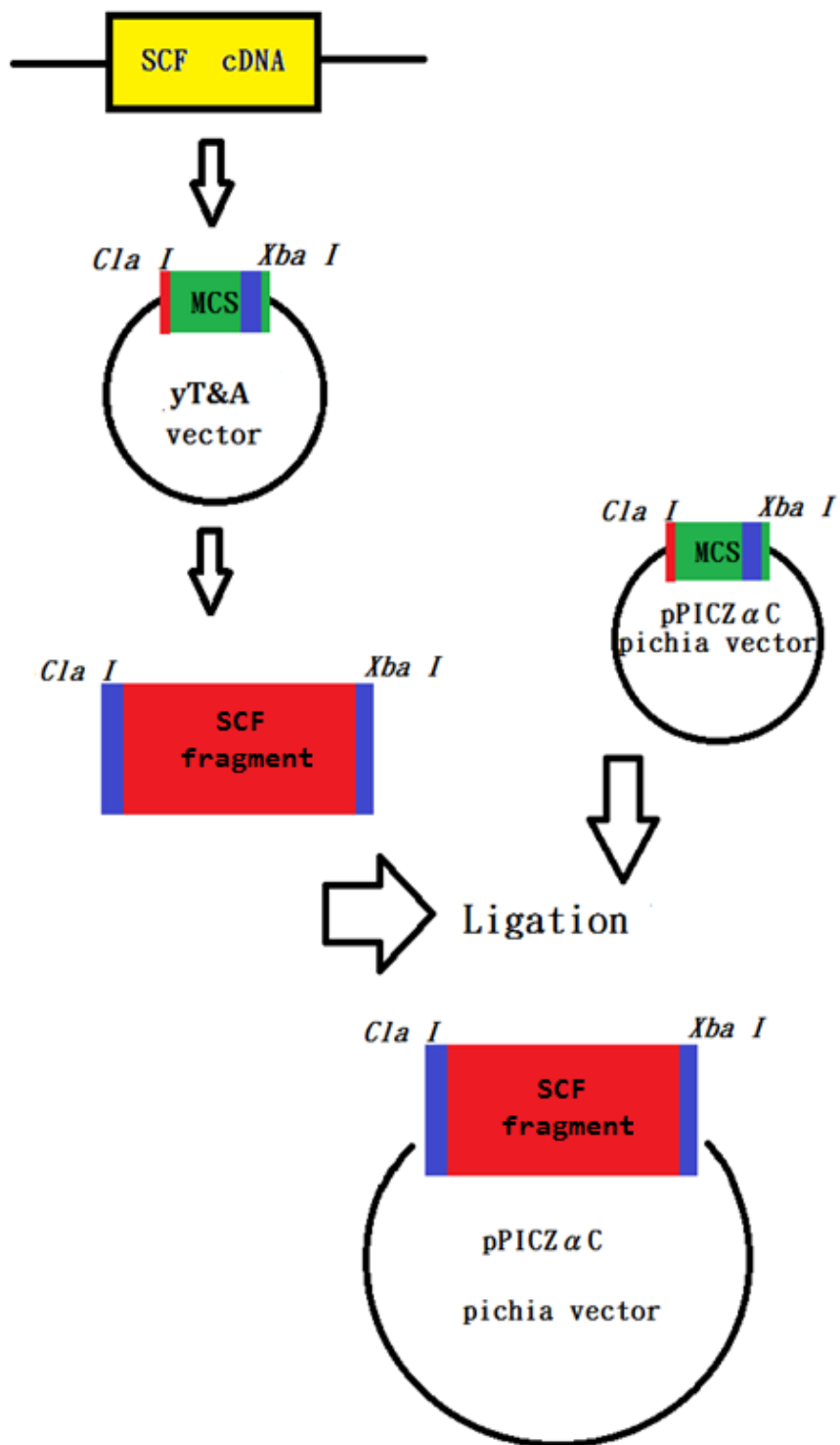
圖五、以洋菜膠電泳法檢視利用PCR倍增SCF¹⁻¹⁶⁵基因片段

正接

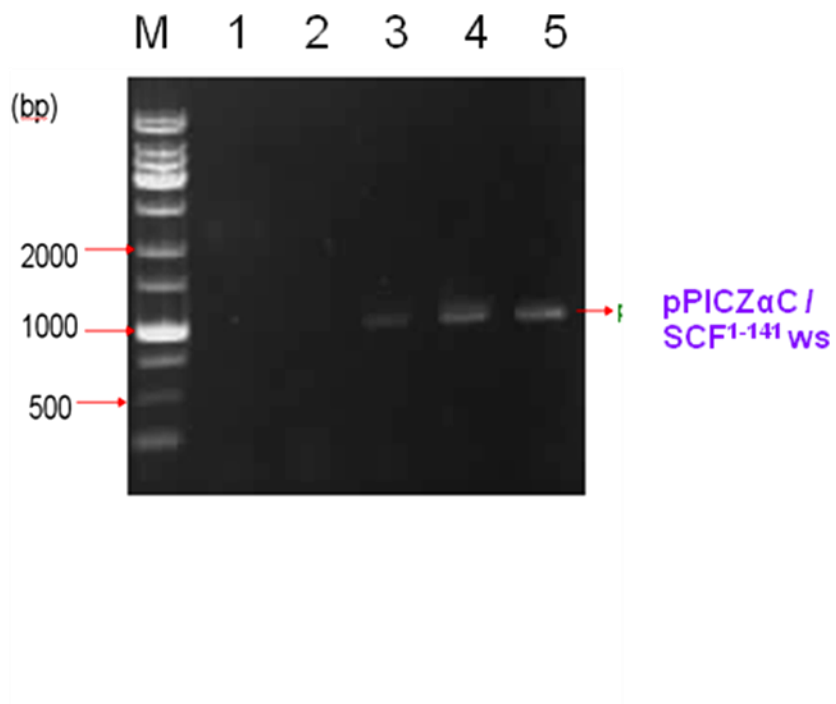
反接



圖六、以限制酶酵素切割以確定選殖載體內之SCF基因正反接



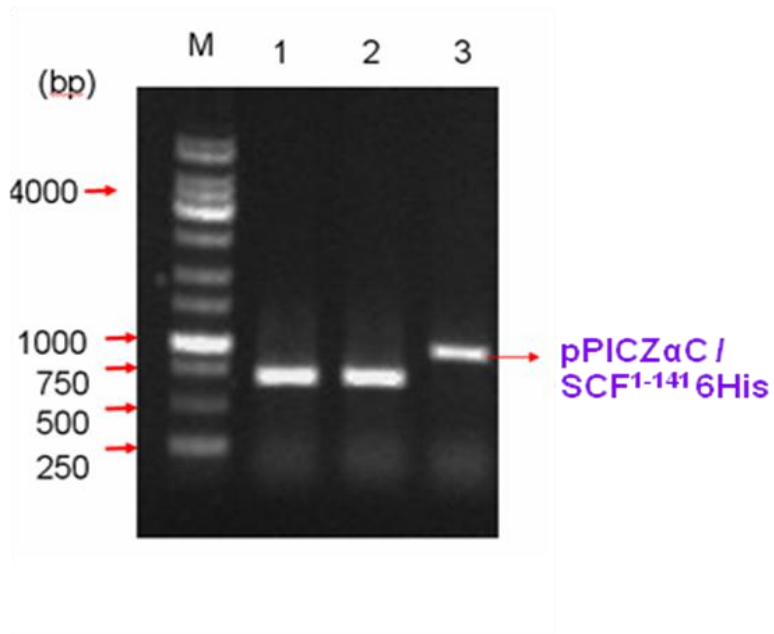
圖七、構築不同片段SCF基因至表現載體的流程



Lane M : 1 kb Marker

Lane 1~5: Colony PCR result of pPICZαC/SCF¹⁻¹⁴¹ws amplified by 5'*AOXI* and 3'*AOXI* primers(~1011 bp)

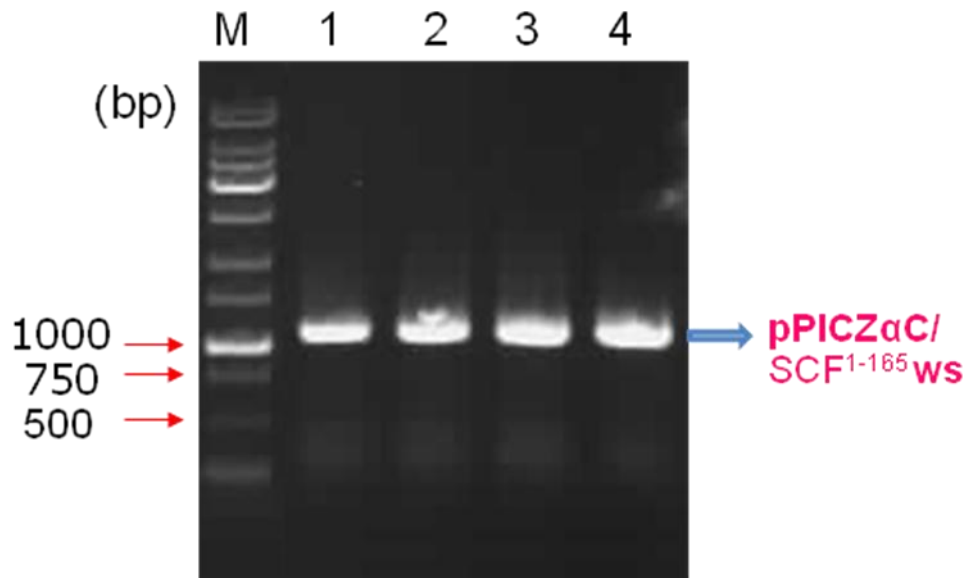
圖八、以colony PCR檢視SCF¹⁻¹⁴¹ws DNA片段是否接入pPICZαC表現載體



Lane M: 1 kb Marker

Lane 3: Colony PCR result of pPICZαC/SCF¹⁻¹⁴¹ 6His DNA fragment results amplified by 5'*AOX I* and 3'*AOX I* primers (~1029 bp)

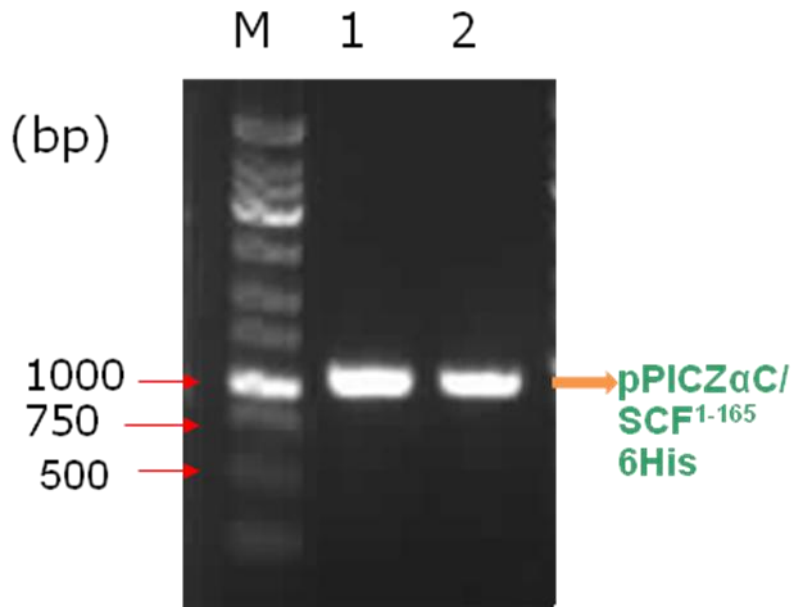
圖九、以colony PCR檢視SCF¹⁻¹⁴¹ 6His DNA片段是否接入pPICZαC表現載體



Lane M: 1 kb Marker

Lane 1 to 4: Colony PCR result of pPICZ α C/SCF¹⁻¹⁶⁵ws amplified by 5'AOXI and 3'AOXI primers (~1083 bp)

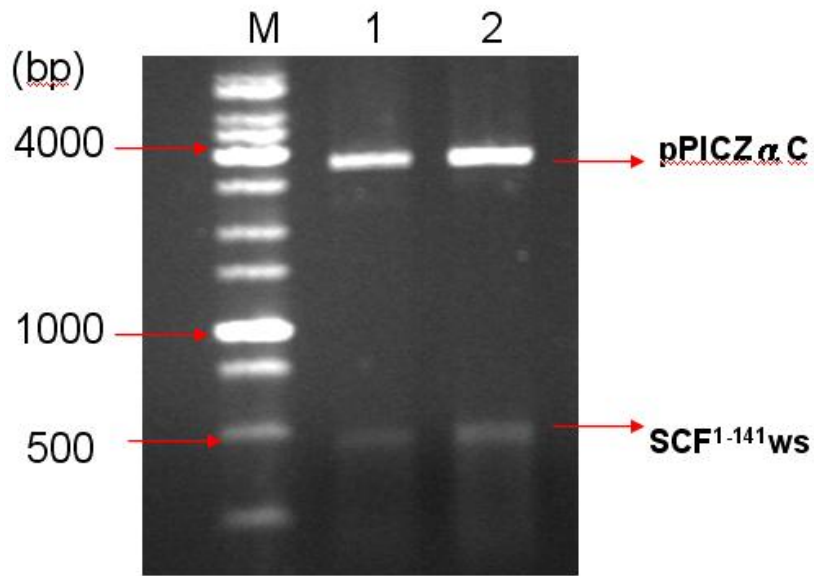
圖十、以colony PCR檢視SCF¹⁻¹⁶⁵ws DNA片段是否接入pPICZ α C表現載體



Lane M: 1 kb Marker

Lane 1 and 2: Colony PCR result of pPICZαC/SCF¹⁻¹⁶⁵ 6His amplified by 5'AOXI and 3'AOXI primers (~1101 bp)

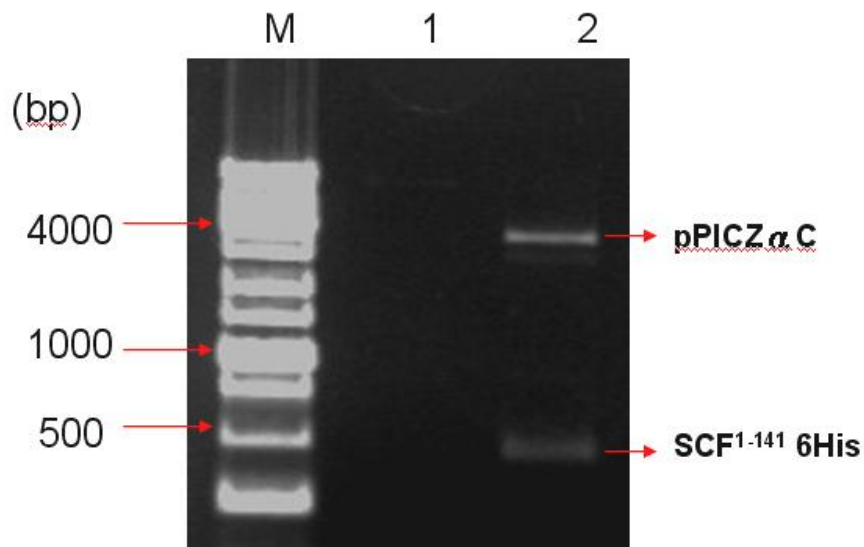
圖十一、以colony PCR檢視SCF¹⁻¹⁶⁵ 6His DNA片段是否接入pPICZαC表現載體



Lane M: 1 kb marker

Lane 1 and 2: Restriction enzyme digestion of pPICZαC/SCF¹⁻¹⁴¹ws with *Cla I* and *Xba I*

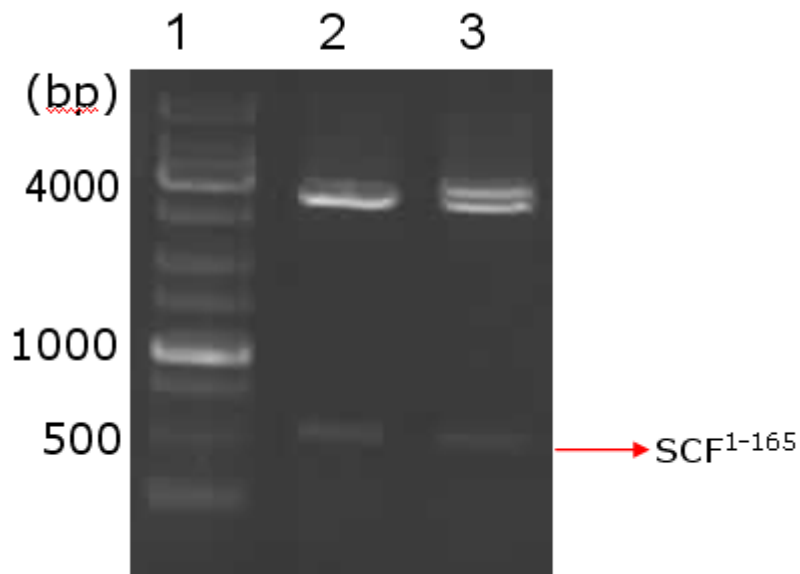
圖十二、以限制酶酵素 *Cla I* 與 *Xba I* 確認 SCF¹⁻¹⁴¹ ws DNA 片段是否接入 pPICZαC 表現載體



Lane M: 1 kb marker

Lane 2: Restriction enzyme digestion of pPICZ α C/SCF¹⁻¹⁴¹6His with *Cla* I and *Xba* I

圖十三、以限制酶酵素 *Cla* I 與 *Xba* I 確認 SCF¹⁻¹⁴¹6His DNA 片段是否接入 pPICZ α C 表現載體

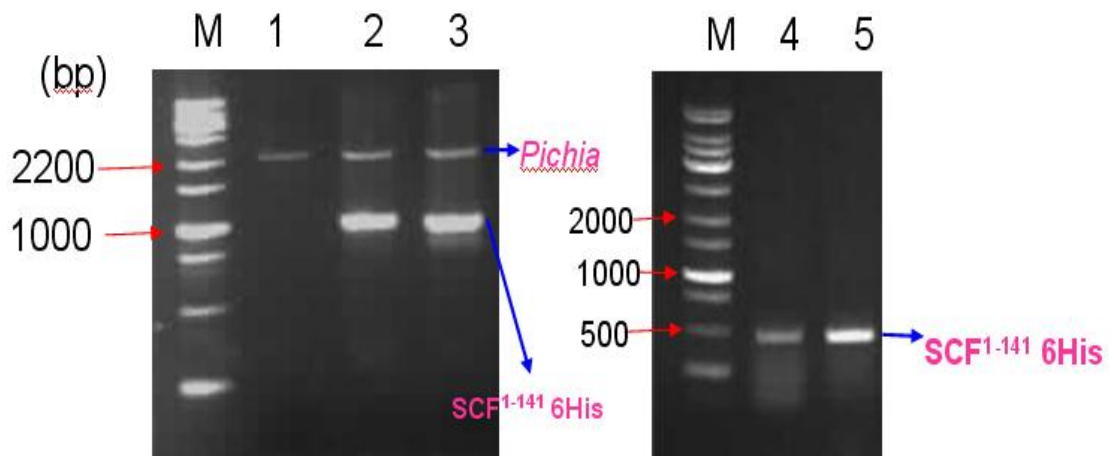


Lane 1: 1 kb marker

Lane 2: Restriction enzyme digestion of pPICZ α C/SCF¹⁻¹⁶⁵ 6His with *Cla I* and *Xba I*

Lane 3: Restriction enzyme digestion of pPICZ α C/SCF¹⁻¹⁶⁵ ws with *Cla I* and *Xba I*.

圖十四、以限制酶酵素 *Cla I* 與 *Xba I* 確認 SCF¹⁻¹⁶⁵ ws 或 SCF¹⁻¹⁶⁵ 6His DNA 片段是否接入 pPICZ α C 表現載體



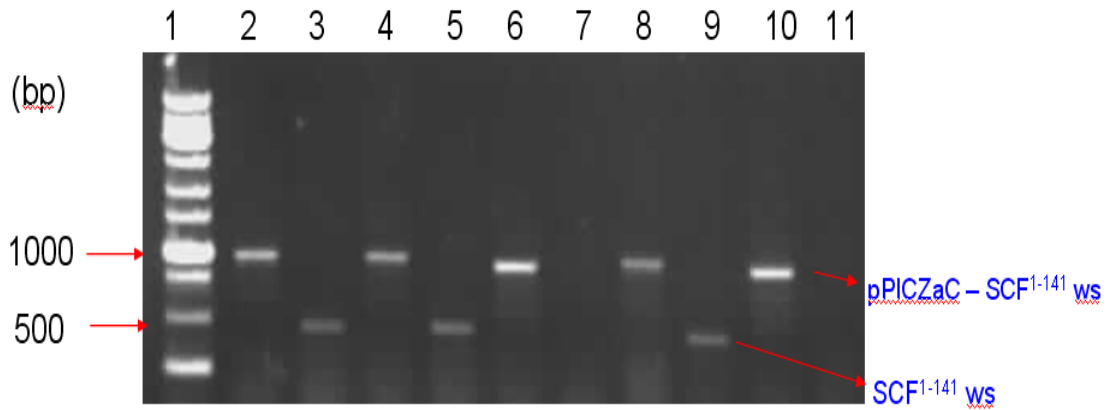
Lane M: 1Kb marker

Lane 1: Positive control of X33, *AOX I* gene is approximately 2.2 Kb.

Lane 2-3: Colony PCR results of transformants amplified by 5'*AOX I* and 3'*AOX I* primers. Add 588 of these products to the size of SCF¹⁻¹⁴¹ 6His to verify the PCR results (~1029 bp)

Lane 4-5 : Colony PCR result of transformants amplified by 5'*Cla I* SCF and 3'SCF¹⁻¹⁴¹ 6His (~441 bp) primers .

圖十五、以 colony PCR 確認 SCF¹⁻¹⁴¹ 6His DNA 片段是否已嵌入嗜甲醇酵母菌基因體中

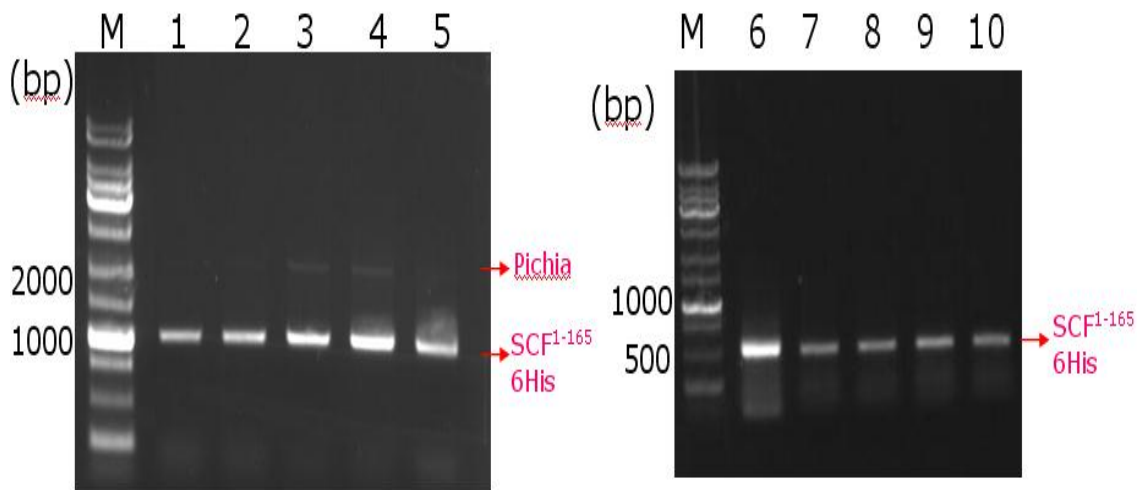


Lane 1 1kb marker

Lane 2、4、6、8、10 : Colony PCR results of transformants amplified by 5'*AOX I* and 3'*AOX I* primers. Add 588 of these products to the size of SCF¹⁻¹⁴¹ ws to verify the PCR results (~1011 b.p.).

Lane 3、5、7、9、11 : Colony PCR results of transformants amplified by 5'*Clal* SCF / 3' SCF ws (~423 bp) primers .

圖十六、以 colony PCR 確認 SCF¹⁻¹⁴¹ ws DNA 片段是否已嵌入嗜甲醇酵母菌基因體中



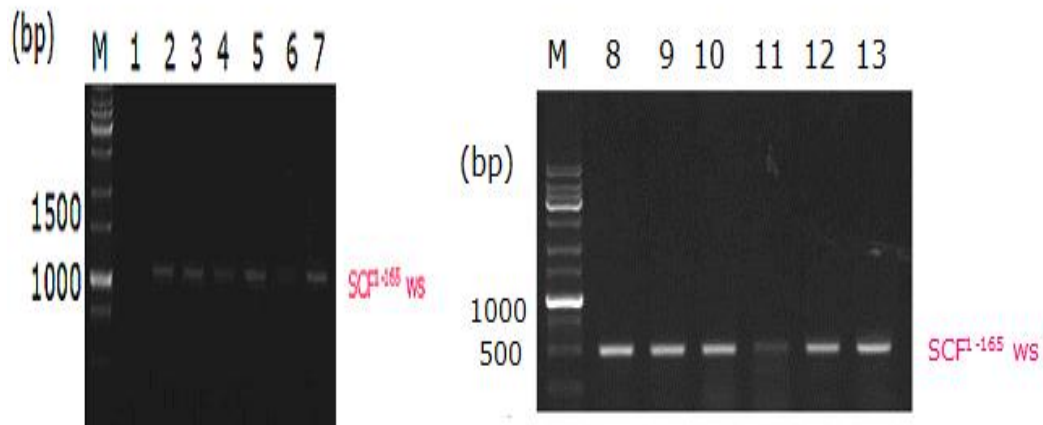
Lane M: 1Kb marker

Lane 1-5: Five colonies PCR results of transformants amplified by 5'*AOX I* and 3'*AOX I* primers. Add 588 of these products to the size of SCF¹⁻¹⁶⁵ 6His to verify the PCR results (~1101 bp).

Lane 6-10 : Five colonies PCR of transformants amplified by 5'*Cla I* SCF and 3'*SCF* 6His (~513 bp) primers.

圖十七、以 colony PCR 確認 SCF¹⁻¹⁶⁵ 6His DNA 片段

是否已嵌入嗜甲醇酵母菌基因體中

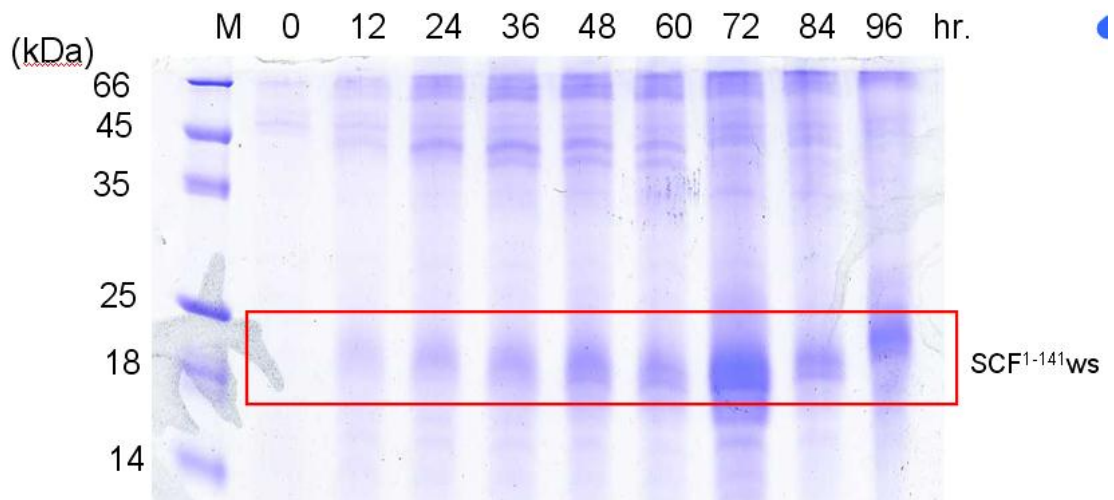


Lane M: 1Kb marker

Lane1-7: seven colonies PCR results of transformants amplified by 5'*AOX I* and 3'*AOX I* primers. Add 588 of these products to the size of SCF¹⁻¹⁶⁵ ws to verify the PCR results (~1083 bp).

Lane8-13: Five colonies PCR of transformants amplified by 5'*Cla I* SCF and 3'SCF ws primers (~495 bp).

圖十八、以 colony PCR 確認 SCF¹⁻¹⁶⁵ ws DNA 片段是否已嵌入嗜甲醇酵母菌基因體中

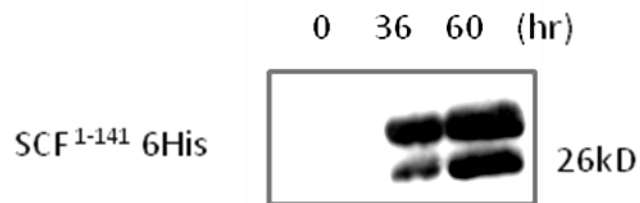
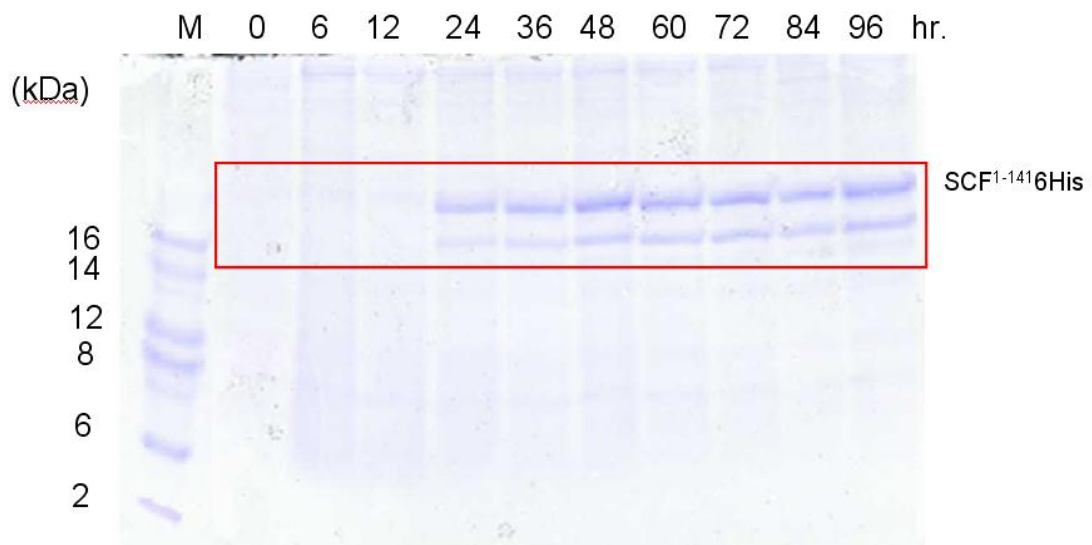


Culture supernatant aliquots were subjected to SDS-PAGE.

Lane M: protein marker

Other lane are samples were taken at 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 culture time (h) after methanol induction, respectively. Gel was stained by coomassie blue. Red frame indicates the SCF¹⁻¹⁴¹ws had integrated into the alcohol oxidase promoter (*AOX I*) locus on *Pichia* chromosome genome.

圖十九、利用 SDS-PAGE 分析重組 SCF¹⁻¹⁴¹ws 小量誘導表現情形



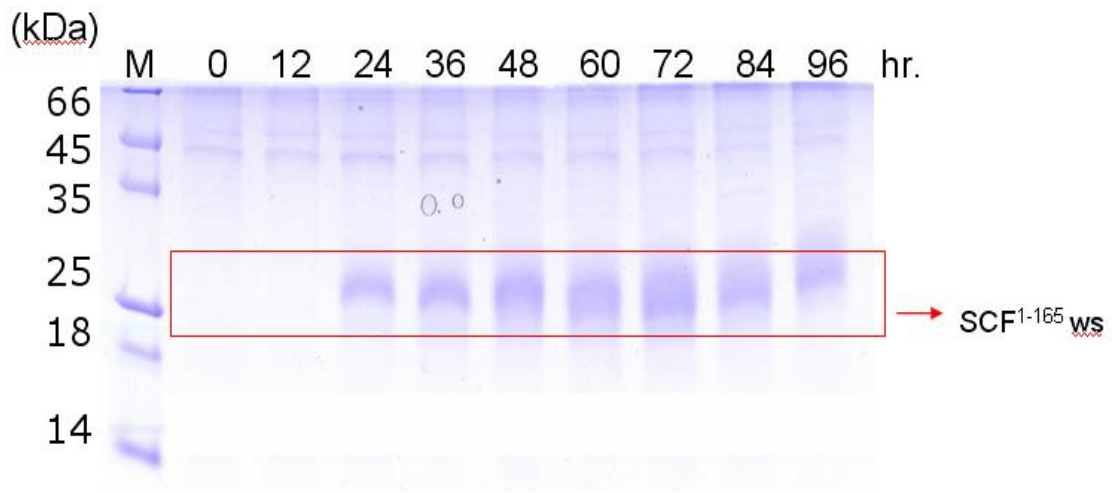
Culture supernatant aliquots were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis.

Lane M: protein marker

Other lane are samples were taken at 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 culture time (h) after methanol induction, respectively. Upper was stained by coomassie blue staining. Lower was analyzed by Western blot.

Red frame indicates the **SCF¹⁻¹⁴¹ 6His** had integrated into the alcohol oxidase promoter (*AOX 1*) locus on *Pichia* chromosome genome.

圖二十、利用 SDS-PAGE 及 Western blot 分析重組 SCF¹⁻¹⁴¹ 6His 小量誘導表現情形

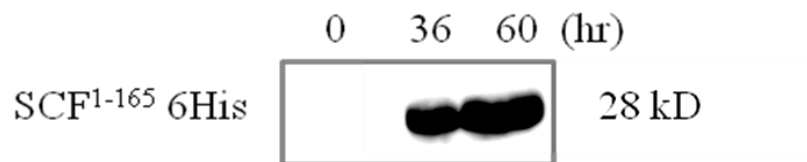
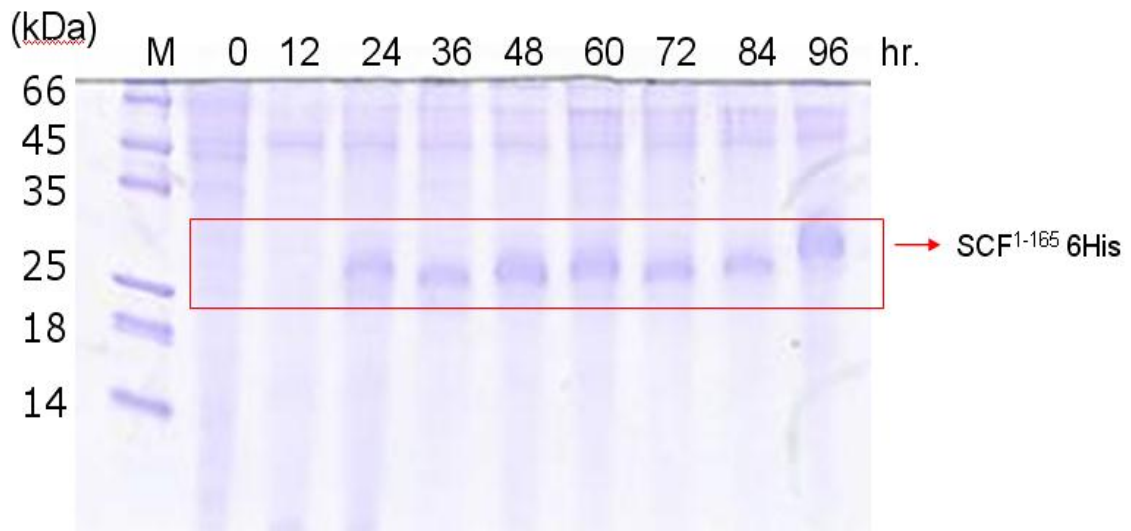


Culture supernatant aliquots were subjected to SDS-PAGE.

Lane M : protein marker

Other lanes are samples were taken at 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 culture time (h) after methanol induction, respectively. Gel was stained by coomassie blue staining. Red frame indicates the SCF¹⁻¹⁶⁵ ws had integrated into the alcohol oxidase promoter (*AOX I*) locus on *Pichia* chromosome genome.

圖二十一、利用 SDS-PAGE 分析重組 SCF¹⁻¹⁶⁵ ws 小量誘導表現情形



Culture supernatant aliquots were subjected to SDS-PAGE.

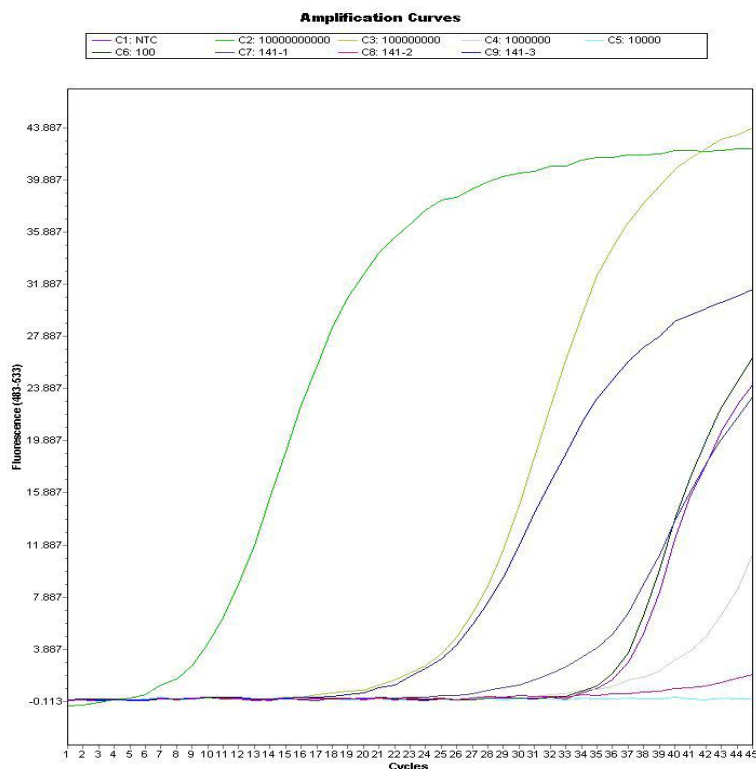
Lane M: protein marker

Other lanes are samples were taken at 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 culture time (h) after methanol induction, respectively. Upper was stained by coomassie blue staining. Lower was analyzed by Western blot.

Red frame indicates the **SCF¹⁻¹⁶⁵ 6His** had integrated into the alcohol oxidase promoter (*AOXI*) locus on *Pichia* chromosome genome.

圖二十二、利用 SDS-PAGE 及 Western blot 分析重組 SCF¹⁻¹⁶⁵ 6His 小量誘導表現情形

(A)



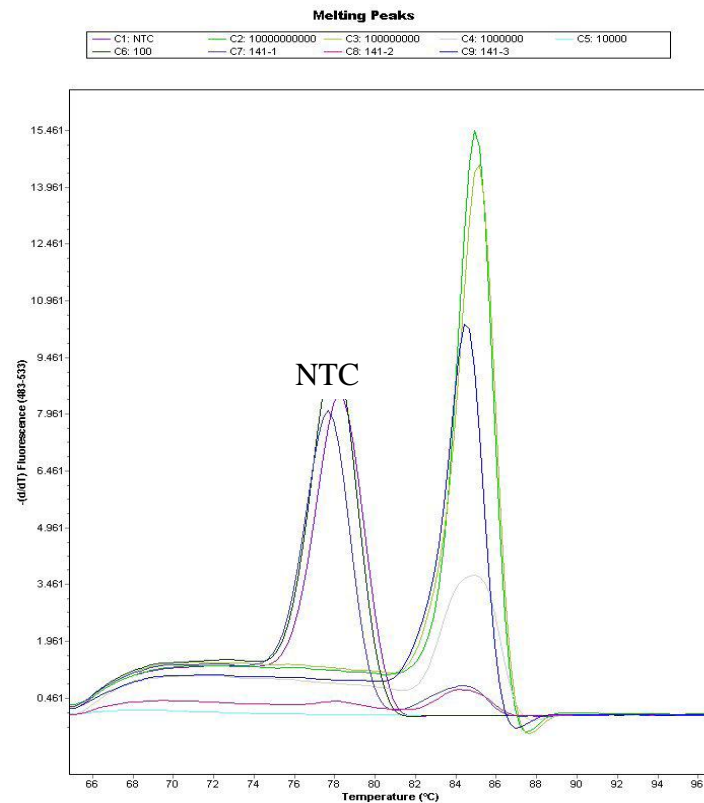
Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	NTC	Unknown	36.52		
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	10000000000	Standard	10.27		1.00E10
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	1000000000	Standard	27.28		1.00E8
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	1000000	Standard	>40.00		1.00E6
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	10000	Standard			1.00E4
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	100	Standard	36.16		1.00E2
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	141-1	Unknown	35.88		
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	141-2	Unknown	>40.00		
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	141-3	Unknown	26.43		

(A) Quantification of SCF^{1-141} gene amplification by a SYBR-Green I assay.

Genomic DNA was assayed for copy number of the SCF^{1-141} gene and non-template controls (background at the bottom of the graph) using the SYBR-Green I real-time PCR assay. SCF^{1-141} from the *Pichia* cell was used for this experiment. The lies in the log-linear phase of both PCR reactions, were 35.88 , >40.00 and 26.43 for sample 1~3, respectively.

(B)



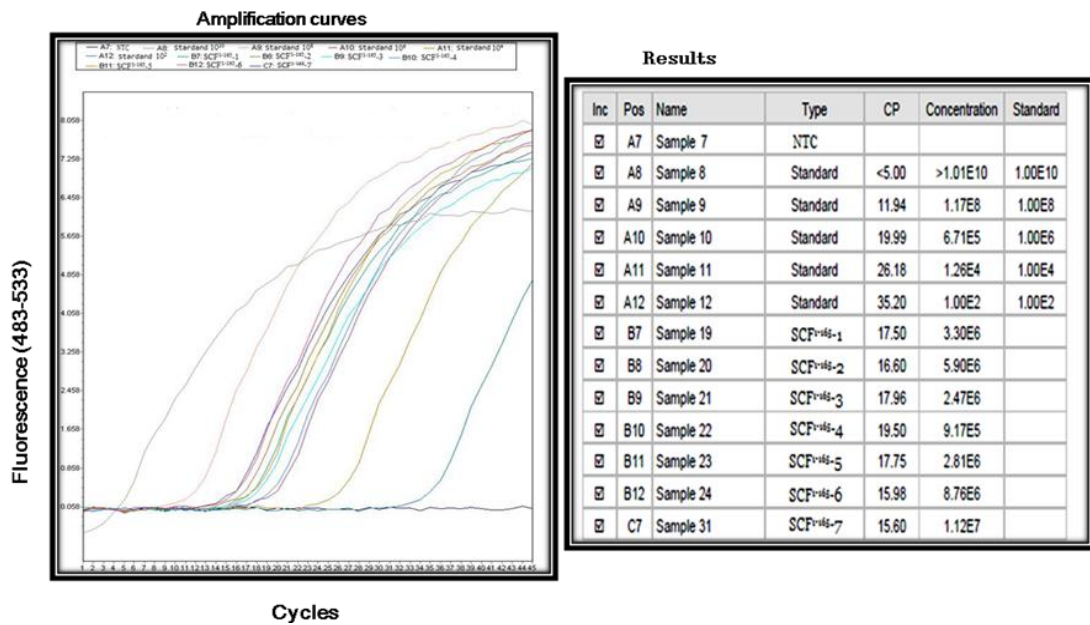
Results

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1				Peak 2			
			Tm	Area	Wide	High	Tm	Area	Wide	High
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	NTC	78.33	21.94	2.86	7.67				
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	10000000000	84.98	30.69	2.07	14.86				
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	100000000	85.06	30.45	2.22	13.74				
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	1000000	84.98	11.36	2.85	3.99				
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	10000								
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	100	78.06	23.94	2.77	8.65				
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	141-1	77.69	23.31	3.21	7.25				
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	141-2	74.58	0.74	3.76	0.20	84.63	2.13	2.53	0.84
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	141-3	84.48	21.31	2.19	9.72				

(B) PCR reactions. Dissociation curves provide a graphical representation of the PCR product after the amplification process. Behind of the peak in positive samples (SCF^{1-141}) suggests a single size product. In front of the peak in the negative control sample (NTC) indicates the primer will be dimer form. The melting temperature of each PCR product varies and is dependent on its sequence and size. A melting temperature of 84°C was observed for the SCF^{1-141} product.

圖二十三、利用 Real-time PCR 定量重組 $rhSCF^{1-141}$ ws 的 Copy number

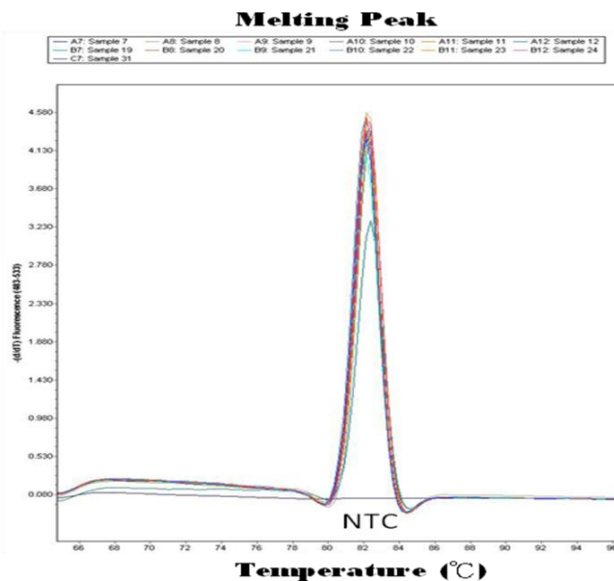
(A)



(A) Quantification of SCF¹⁻¹⁶⁵ gene amplification by a SYBR-Green I assay.

Genomic DNA was assayed for copy number of the SCF¹⁻¹⁶⁵ gene and No-template controls (background at the bottom of the graph) using the SYBR-Green I real-time PCR assay. SCF¹⁻¹⁶⁵ from the *Pichia* cell was used for this experiment. The lies in the log-linear phase of both PCR reactions, were 17.50 , 16.60 ,17.96 ,19.50 ,17.75 ,15.98 and15.50 for sample 1~7 respectively.

(B)

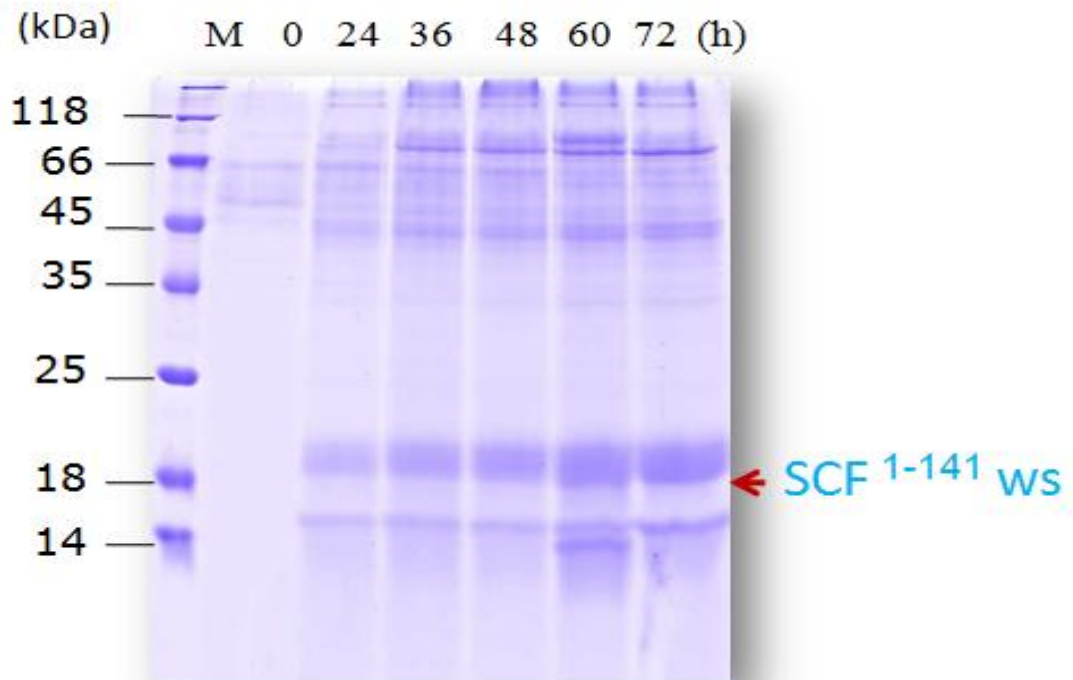


Results

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1				
			Tm	Area	Wide	High	
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	Sample 7	NTC				
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	Sample 8	10 ¹⁰	82.31	6.70	1.60	4.19
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	Sample 9	10 ⁸	82.22	7.55	1.64	4.60
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	Sample 10	10 ⁶	82.26	6.92	1.59	4.35
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	Sample 11	10 ⁴	82.26	7.03	1.69	4.16
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	Sample 12	10 ²	82.35	4.88	1.37	3.56
<input checked="" type="checkbox"/>	B7	Sample 19	SCF ¹⁻¹⁶⁵ -1	82.14	6.92	1.61	4.31
<input checked="" type="checkbox"/>	B8	Sample 20	SCF ¹⁻¹⁶⁵ -2	82.15	7.11	1.62	4.38
<input checked="" type="checkbox"/>	B9	Sample 21	SCF ¹⁻¹⁶⁵ -3	82.10	6.68	1.62	4.11
<input checked="" type="checkbox"/>	B10	Sample 22	SCF ¹⁻¹⁶⁵ -4	82.07	7.40	1.63	4.55
<input checked="" type="checkbox"/>	B11	Sample 23	SCF ¹⁻¹⁶⁵ -5	82.13	7.38	1.61	4.57
<input checked="" type="checkbox"/>	B12	Sample 24	SCF ¹⁻¹⁶⁵ -6	82.23	7.39	1.64	4.50
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	Sample 31	SCF ¹⁻¹⁶⁵ -7	82.11	6.95	1.60	4.33

(B) **PCR reactions.** Dissociation curves provide a graphical representation of the PCR product after the amplification process. A single peak in positive samples (SCF¹⁻¹⁶⁵) suggests a single size product. An absence of peak in the negative control sample (NTC) indicates the lack of primer dimer. The melting temperature of each PCR product varies and is dependent on its sequence and size. A melting temperature of 82°C was observed for the SCF¹⁻¹⁶⁵ product.

圖二十四、利用 Real-time PCR 定量重組 *rhSCF¹⁻¹⁶⁵*ws 的 Copy number

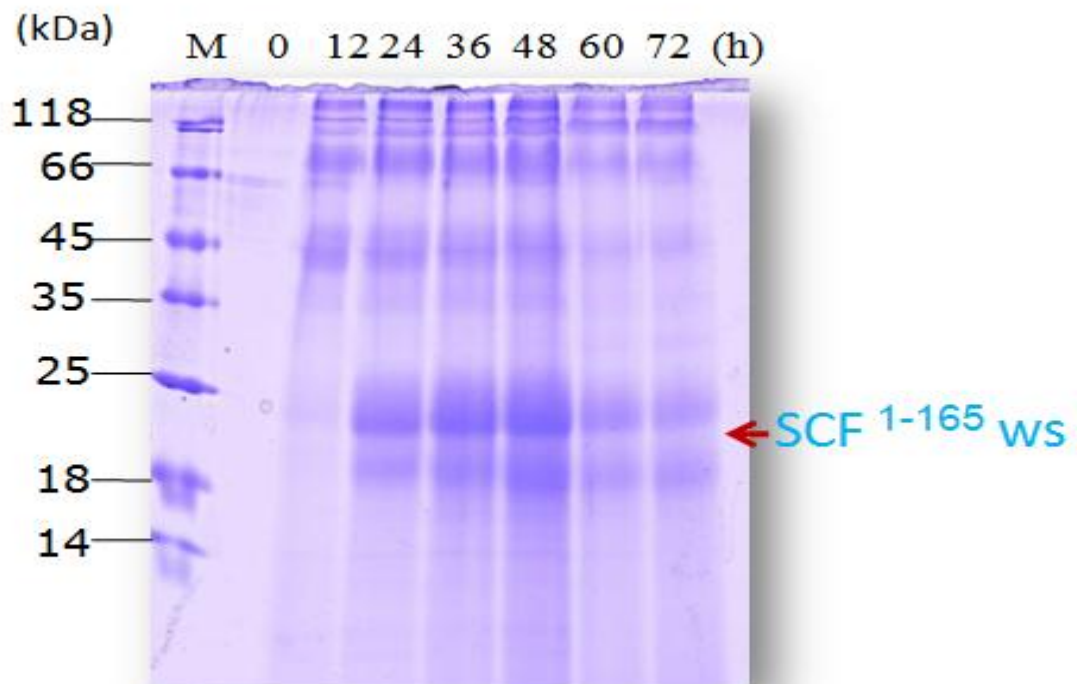


Culture supernatant aliquots were subjected to SDS-PAGE.

Lane M: protein marker

Other lanes are samples were taken at 0, 24, 36, 48, 60, 72 culture time (h) after methanol induction, respectively. Gel was stained by coomassie blue staining. Arrow indicates the **SCF¹⁻¹⁴¹** ws had integrated into the alcohol oxidase promoter (*AOXI*) locus on *Pichia* chromosome genome.

圖二十五、利用 Fermentor 大量表現重組 SCF¹⁻¹⁴¹ ws 蛋白質



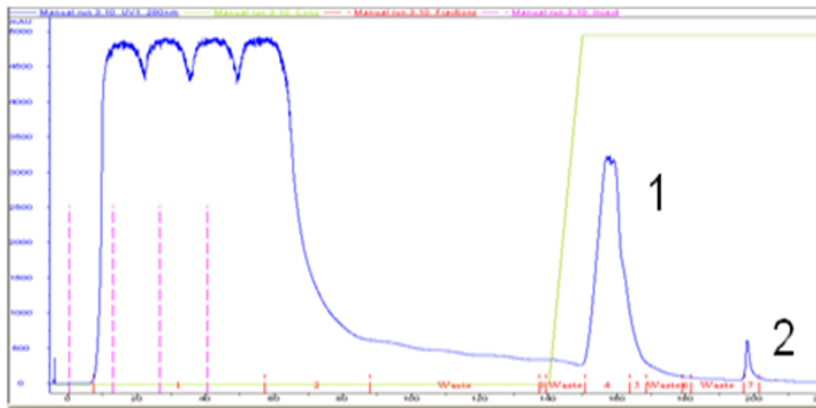
Culture supernatant aliquots were subjected to SDS-PAGE.

Lane M: protein marker

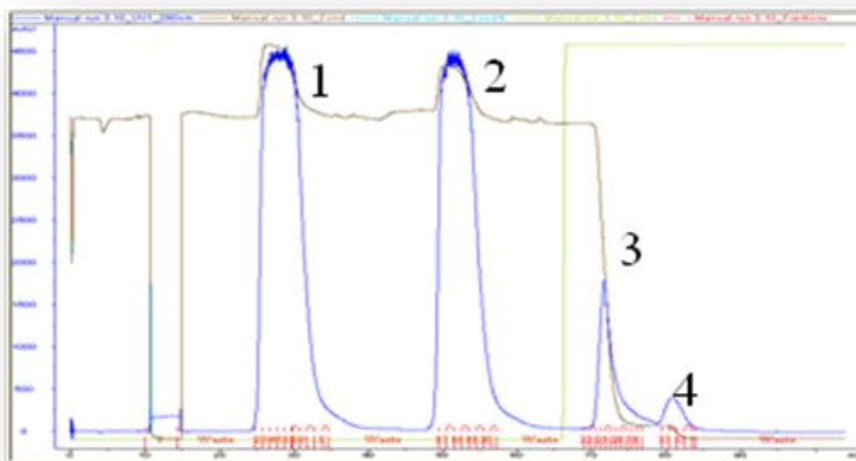
Other lanes are samples were taken at 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 culture time (h) after methanol induction, respectively. Gel was stained by coomassie blue staining. Arrow indicates the **SCF¹⁻¹⁶⁵** ws had integrated into the alcohol oxidase promoter (*AOXI*) locus on *Pichia* chromosome genome.

圖二十六、利用 Fermentor 大量表現重組 SCF¹⁻¹⁶⁵ ws 蛋白質

(A) Phenyl column chromatography of SCF¹⁻¹⁴¹



(B) Phenyl column chromatography of SCF¹⁻¹⁶⁵



Sample: Supernatant collection of recombinant SCF¹⁻¹⁴¹ or SCF¹⁻¹⁶⁵ expressed in *Pichia pastoris*

Column: Phenyl Sepharose column (2.6 x 20 cm)

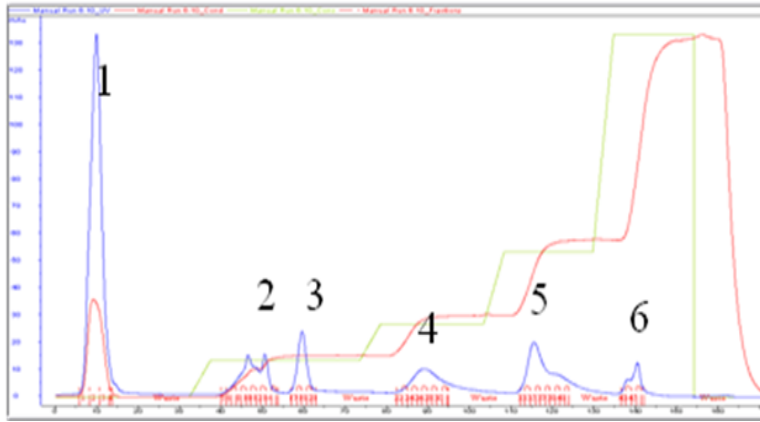
Flow rate: 1 ml/min

Binding buffer: 0.01 M sodium phosphate buffer, 1.5 M ammonium sulfate, pH 6.0

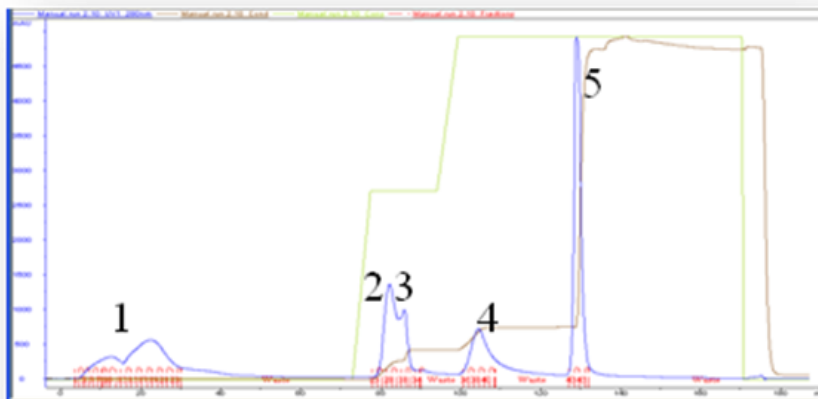
Elution buffer: 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 6.0

圖二十七、利用 Phenyl Sepharose 層析法純化重組 SCF¹⁻¹⁴¹ 及 SCF¹⁻¹⁶⁵

(A) Q Sepharose chromatography of SCF¹⁻¹⁴¹



(B) Q Sepharose chromatography of SCF¹⁻¹⁶⁵



Sample: Active fractions of recombinant SCF¹⁻¹⁴¹ or SCF¹⁻¹⁶⁵ eluted from Phenyl Sepharose chromatography

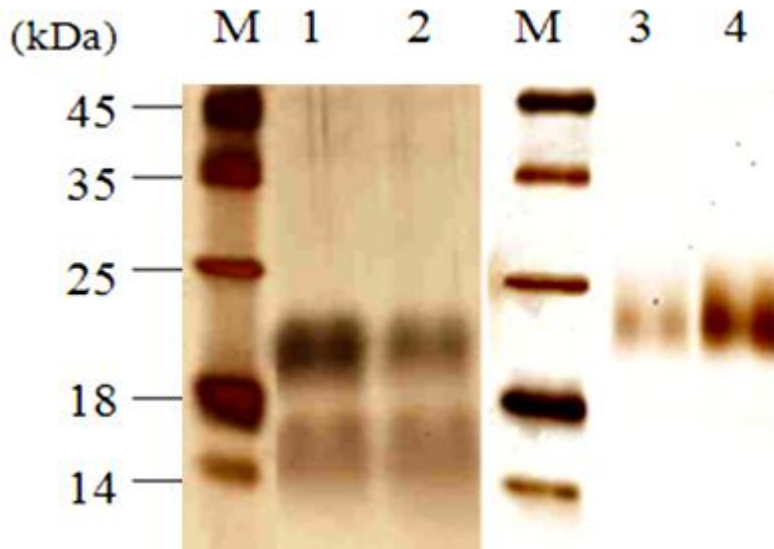
Column: Q Sepharose column (2.6 x 20 cm)

Flow rate: 2 ml/min

Binding buffer: 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 8.0

Elution buffer: 0.01 M sodium phosphate buffer with the same buffer containing 1 M NaCl, pH 8.0

圖二十八、利用陰離子交換樹脂層析法來純化重組蛋白 SCF¹⁻¹⁴¹ 或 SCF¹⁻¹⁶⁵



Lane M: LM marker

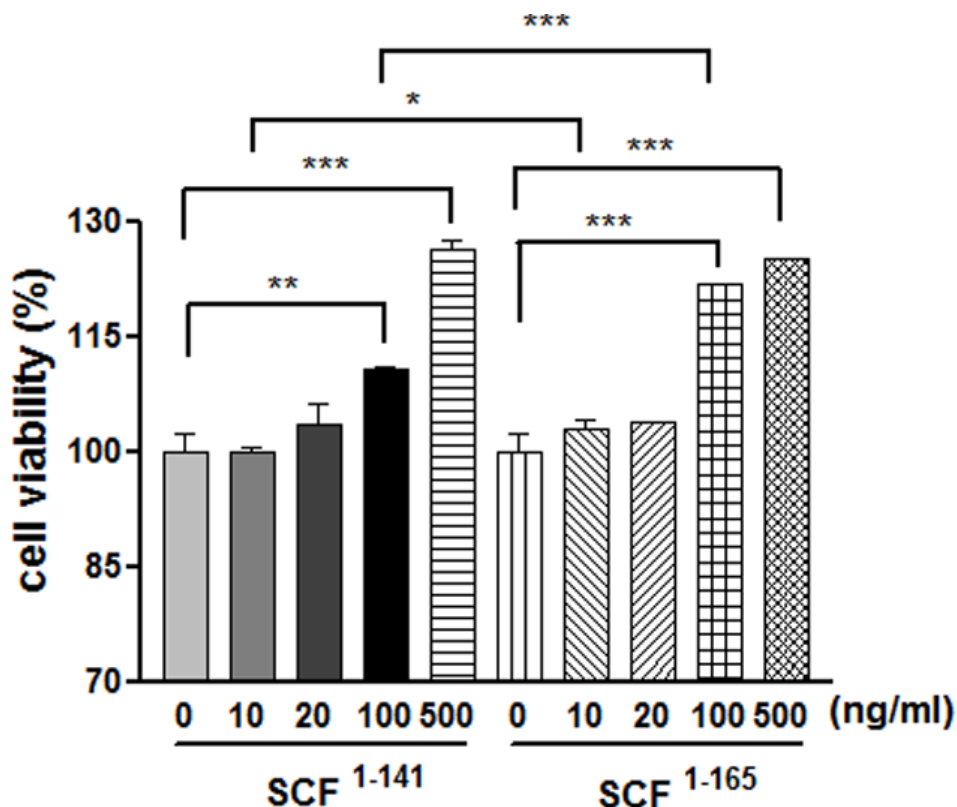
Lane 1 and 2: purified recombinant SCF¹⁻¹⁴¹

Lane 3 and 4: purified recombinant SCF¹⁻¹⁶⁵

Gel was stained by silver staining.

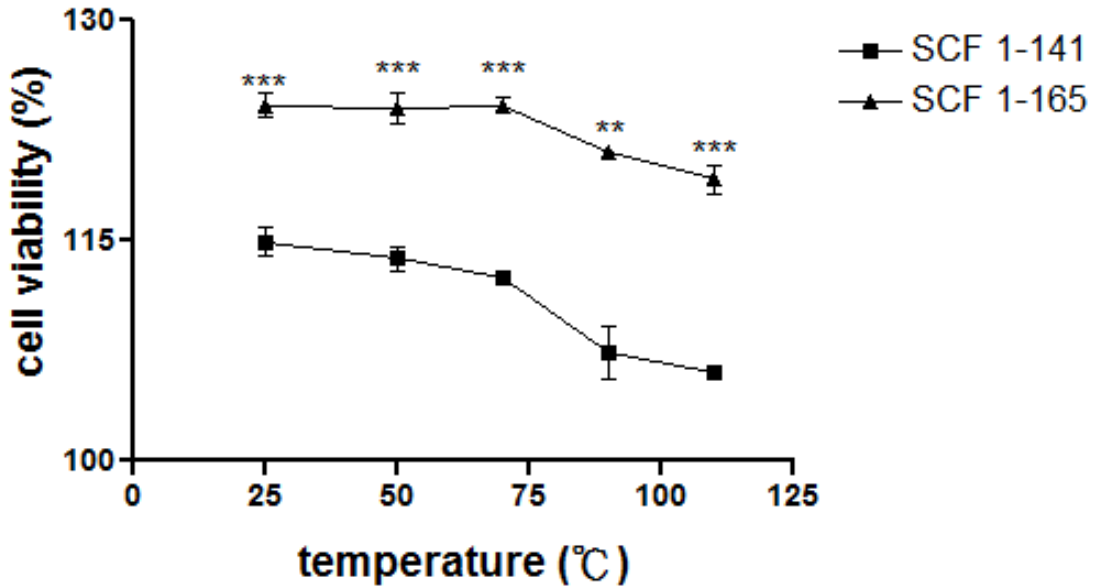
圖二十九、以 15% SDS-PAGE 檢視純化後重組 SCF¹⁻¹⁴¹ 及 SCF¹⁻¹⁶⁵

(A)



Effect of rhSCF¹⁻¹⁴¹ or rhSCF¹⁻¹⁶⁵ on TF-1 cell proliferation. The TF-1 cells were incubated with various concentrations of 10, 20, 100 or 500 ng/ml rhSCF¹⁻¹⁴¹ or rhSCF¹⁻¹⁶⁵ and change medium every 3 days. After incubation, the cell viability was assayed as described in Materials and methods. The effect of rhSCF¹⁻¹⁴¹ or rhSCF¹⁻¹⁶⁵ is dose-dependent, respectively. Results are expressed by mean±SEM (n>6). The cell viability was expressed as 100× (Sample OD570 — Sample OD600)/(Control OD570 — Control OD600). No treatment of SCF sample is defined as control group and the percentage of cell viability is set as 100 %. ((*P<0.05 , ***P<0.0001)

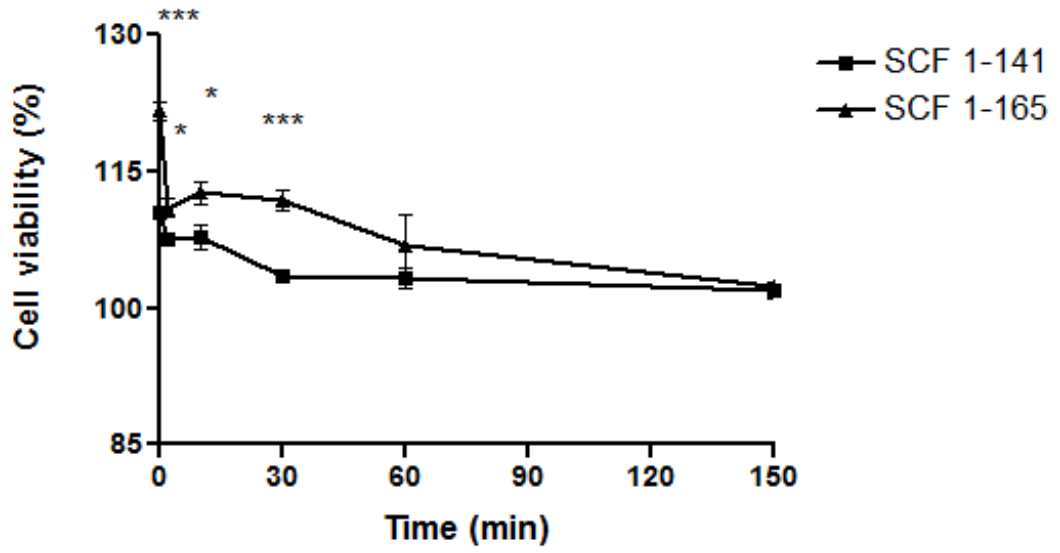
圖三十、利用 TF-1 細胞分析並比較二者 SCF¹⁻¹⁴¹ 和 SCF¹⁻¹⁶⁵ 之生物活性



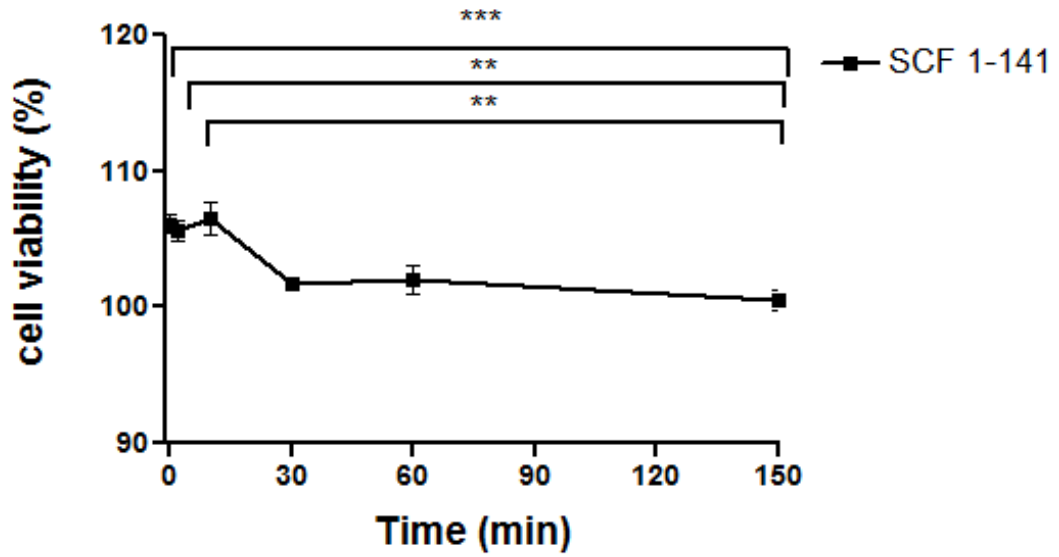
Thermostability assay of rhSCF¹⁻¹⁴¹ or rhSCF¹⁻¹⁶⁵ on TF-1 cell proliferation. The TF-1 cells were incubated with rhSCF¹⁻¹⁴¹ (■) or rhSCF¹⁻¹⁶⁵ (▲) heated for ten minutes at the concentration of 100 ng/ml. After incubation, the cell viability was assayed as described in Materials and methods. The thermostability effects of rhSCF¹⁻¹⁶⁵ are better than rhSCF¹⁻¹⁴¹, respectively. Results are expressed by mean±SEM (n>6). The cell viability was expressed as 100× (Sample OD570 – Sample OD600)/(Control OD570 – Control OD600). No treatment of SCF sample is defined as control group and the percentage of cell viability is set as 100 %. (*P<0.05 , **P<0.001 , ***P<0.0001)

圖三十一、利用 TF-1 細胞分析二者 SCF¹⁻¹⁴¹ 和 SCF¹⁻¹⁶⁵ 在固定時間及濃度下之熱穩定性

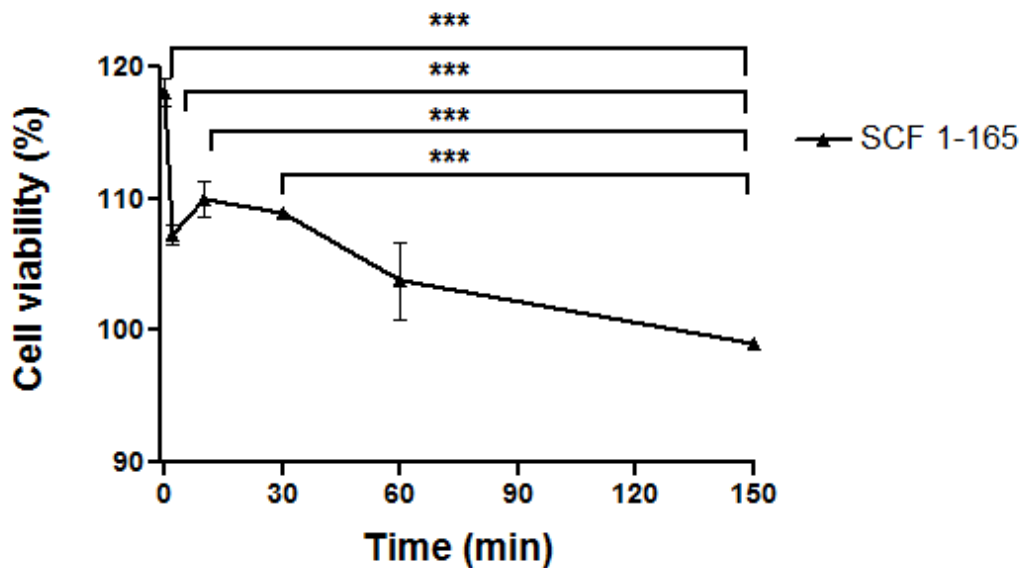
(A)



(B)



(C)

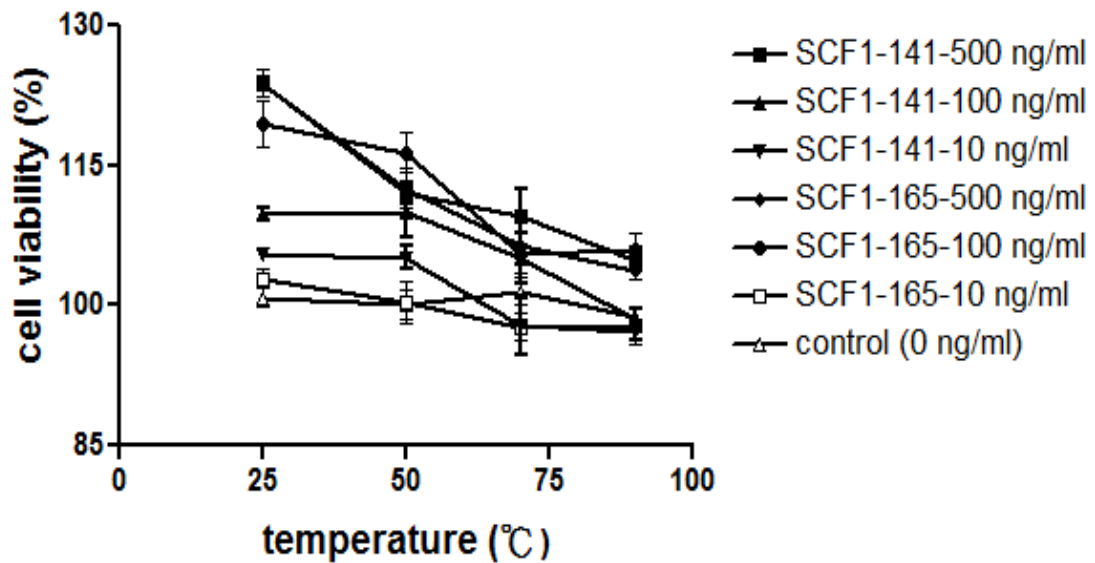


Time course of thermostability effects of rhSCF¹⁻¹⁴¹ and rhSCF¹⁻¹⁶⁵ on TF-1 cell proliferation. The TF-1 cells were incubated with rhSCF¹⁻¹⁴¹ (■) or rhSCF¹⁻¹⁶⁵ (▲) both heated at 90 °C and at the concentration of 100 ng/ml. After incubation, the cell viability was assayed as described in Materials and methods. The thermostability effect of rhSCF1-165 at 90 °C, 150 min is significantly different with 0, 5, 10, and 30 min, respectively. At the same condition, rhSCF1-141 is significantly different with 0, 5 and 10 min, respectively. Results are expressed by mean±SEM (n>6).

The cell viability was expressed as $100 \times (\text{Sample OD570} - \text{Sample OD600}) / (\text{Control OD570} - \text{Control OD600})$. No treatment of SCF sample is defined as control group and the percentage of cell viability is set as 100 %. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$)

圖三十二、利用 TF-1 細胞分析二者 SCF¹⁻¹⁴¹ 和 SCF¹⁻¹⁶⁵ 在固定溫度、

濃度及不同加熱時間下之熱穩定性



Thermostability assay of rhSCF¹⁻¹⁴¹ or rhSCF¹⁻¹⁶⁵ on TF-1 cell proliferation. The TF-1 cells were incubated with various concentrations of rhSCF¹⁻¹⁴¹ and rhSCF¹⁻¹⁶⁵ at different temperatures. After incubation, the cell viability was assayed as described in Materials and methods. Results are expressed by mean±SEM (n>6). The cell viability was expressed as 100× (Sample OD570—Sample OD600)/(Control OD570—Control OD600). No treatment of SCF sample is defined as control group and the percentage of cell viability is set as 100 %. (**P*<0.05 , ***P*<0.001 , ****P*<0.0001)

圖三十三、利用 TF-1 細胞分析二者 SCF¹⁻¹⁴¹ 和 SCF¹⁻¹⁶⁵ 在不同溫度及不同濃度下加熱十分鐘後細胞活性之分析