

嘉南藥理科技大學

100 年度教師專題研究計畫成果報告書

計畫主持人:李國榮

計畫名稱:抗凋亡蛋白治療大鼠股骨壞死之研究

計畫編號: 120600-CN10024

計畫類型:個人型研究

執行期限: 100 年 1 月 1 日至 100 年 12 月 31 日

中華民國 101 年 3 月 2 日



(一) 摘要

近年的研究指出，Com-1 亦可能會藉由抑制凋亡小體(apoptosome)的形成來阻止細胞進行細胞凋亡。PA-1 亦會藉著與一個具有抵抗細胞凋亡的 RNA 結合蛋白及 Com-1 蛋白結合形成複合體來調節細胞凋亡的進行。根據研究顯示，Com-1 及 PA-1 形成複合體後其抑制細胞凋亡的效果遠大於 Com-1 或 PA-1 單獨的抑制效果。

由於細胞凋亡在的股骨壞死的過程中是主要的致病機制之一，對類固醇使用所引發的股骨壞死而言，抑制細胞凋亡是一種可行性極高的治療方法。目前為止，Com-1 已被證實可藉由阻止細胞壞死及細胞凋亡來改善大鼠缺氧性中風腦細胞的受損程度，且 Com-1 亦被證實可藉由阻止細胞壞死及細胞凋亡來改善大鼠視網膜缺血所造成的損害。因此本研究計劃目的是以純化的重組 Com-1 對類固醇使用所引發的股骨壞死進行治療。

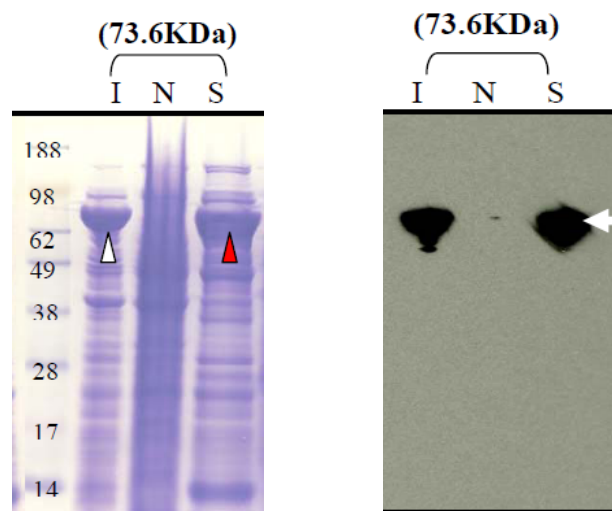
(二) 方法：

為了製備治療股骨壞死所需的 Com-1，本計劃將利用**基因重組技術**建構可轉譯含有各式標幟的 Com-1 重組蛋白之表現載體，再以原核表現系統進行蛋白質表現，重組蛋白經**蛋白質電泳**及 **Western blotting analysis** 確認後再行大量表現，並以**親和管柱層析**及**超過濾**進行純化濃縮。



(三)結果：

本實驗室已順利將Com-1 cDNA 構築至含有taq之蛋白質表現載體內，並進行表現測試及蛋白質檢測，首先將受測樣品分成 (1) I：誘導表現之細胞裂解液、(2) N：未誘導表現之細胞裂解液、(3) S：誘導表現之發酵液，並將上述三樣品進行蛋白質電泳，結果重組蛋白在預期的位置均出現大量蛋白質的訊號(圖一)，為確認這些訊號是我們所要的蛋白質，於是我們分別以識別Com-1及6xHis tag 之抗體進行免疫轉漬分析，結果Nus/Com-1能表現於宿主細胞內，Nus/Com-1甚至於誘導表現之發酵液即可收集得到。本計劃將採用Nus/Com-1 進行大量表現及純化，用以治療股骨壞死之動物。



圖一、蛋白質誘導表現之細胞裂解液(I : cell extract of induction)、未誘導表現之細胞裂解液(N: cell extract of no-induction)及蛋白質誘導表現之發酵液(S : soluble fraction of induction)之膠體電泳圖

