

國立台灣大學生物資源暨農學院

園藝暨景觀學研究所

碩士論文



Graduate Institute of Horticulture and Landscape Architecture

College of Bio-Resources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

FIP-*fve* 蛋白之 N 端序列對其免疫活性之必要性

N-terminal of FIP-*fve* is essential for its immune activity

林瑜珊

Yu-Shan Lin

指導教授：許 輔 博士

Advisor: Fuu Sheu, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

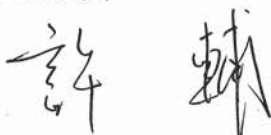
國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書



FIP-*fve* 蛋白之 N 端序列對其免疫活性之必要性
N-terminal of FIP-*fve* is essential for its immune activity.

本論文係林瑜珊 (R01628205) 在國立臺灣大學園藝暨景觀學系、所完成之碩士學位論文，於民國一百零三年七月十一日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

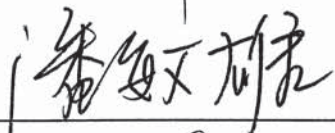
口試委員：



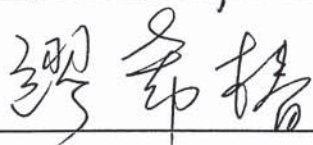
許 輔 博士
國立臺灣大學園藝暨景觀學系 教授
本論文指導教授



周志輝 博士
國立中興大學食品暨應用生物科技學系 特聘教授



潘敏雄 博士
國立臺灣大學食品科技研究所 教授



繆希椿 博士
國立臺灣大學醫學院免疫學研究所 副教授

致謝



本論文能順利完成首先要感謝恩師 許輔 博士，老師除了在研究上提供了許多想法及方向外，也讓學生有自我發揮的空間，給了學生良好的學習與實驗環境，非常感恩。此外，老師的話語引導我們在做人處事方面更為成長，且您也不忘關懷學生之生活，提供許多生活上之協助，於此由衷感謝老師。

感謝口試委員 周志輝 博士、潘敏雄 博士、繆希椿 博士能夠撥冗審閱本論文，並於學生口試時給予許多寶貴建議與鼓勵，使本論文能夠更加完善，於此敬上誠摯謝意，感恩老師們的幫助。

謝謝實驗室的大學長志良，進來一研的四年時光不管是生活還是實驗上都受到學長許多照顧，尤其最後趕實驗的時候真的麻煩你了很多，希望往後有機會能再和學長喝一杯；感謝多才多藝小白學姐在生活上許多經驗的分享以及實驗上的各種協助；感謝冠宏學長在質譜試驗的協助；感謝辛苦的立於學長接手協助實驗室的各項事務，也謝謝你在實驗時聊天相伴，祝福各位學長姐一切順利。特別感謝胃藥師傅在我剛進實驗室的時候，耐心的教了我許多實驗並放手讓我自己操作，幫助我能快速的了解實驗室，至此我一直很感謝師傅的教學方針。一研的學長姐佑敏、雅婷、婉慈、阿官、蘇暄、糖糖和美如同樣在生活上以及實驗的學習上給了許多協助，感謝你們的付出！謝謝同屆的戰友柏羽、季霖和雅玲，很開心能夠有你們的相伴與提醒，讓我們的碩士生涯順利結束，各位我們做到了！特別是常陪我一起在半夜聊天順便趕論文的雅玲，非常感謝。感謝實驗室好夥伴育靈、靜郁、宛真及偉齊，有你們在的實驗室真是令人安心，和你們度過的任何點滴都是我珍貴的回憶，也感謝大家的讓我的生活有新的體會，願畢業後友誼依舊。下一屆可愛的映柔與佳琳，謝謝妳們幫忙論文修改，也感謝在最後實驗衝刺時期妳們維持實驗室的運作順利，祝福妳們（和偉齊）論文及實驗都大順利！感謝學弟妹曄翰、詠順、家郁、英誌、香萍、思晨、伊茹和沛樺，有大家在的實驗室就是

充滿歡笑聲，謝謝你們的陪伴！謝謝淑幸姐姐、晶姐和璨哥協助大家處理實驗室的大小事，常常享受到姐姐和晶姐的好手藝，真的非常由衷感謝，祝福各位身體健康、一切平安。感謝植微所陳正恩學長與沃特斯公司陳順莉小姐於實驗上的建議與協助，若沒有你們這本論文可能還在卡關當中。另外，也感謝實驗中犧牲的小鼠，於此至上最深的敬意。

感謝惠曦、ECHO、婷萱、胖爸、稚鈞這一路上來的陪伴，抱歉常常讓你們聽我吐苦水，偶爾的相聚讓我更充滿勇氣的繼續走下去，願情誼長在。

感謝爸、媽、哥哥和妹妹在這幾年來的陪伴與包容，讓我無後顧之憂的完成了碩士學歷，偶爾實驗太晚麻煩你們接送，或是心情沮喪時你們的愛與關懷，都是讓我繼續努力前進的力量，感謝你們！謝謝關心我的長輩們以及林家兄弟姐妹，期望能不辜負你們期待的繼續走向人生下個階段。

最後，感謝潘家弘一路上的支持，若沒有你我可能會錯過進入一研這個溫馨大家庭的機會，也可能在半途而廢、無法取得碩士學歷。這些年，實驗上與生活上的照顧都感激於心，願未來我們都能繼續成長，一起一直行、向前行！祝福美好的未來。

謹於此分享本論文給所有的家人與朋友，獻上我最誠摯的祝福。

林瑜珊 謹誌於

國立台灣大學園藝暨景觀學研究所

中華民國 103 年 7 月

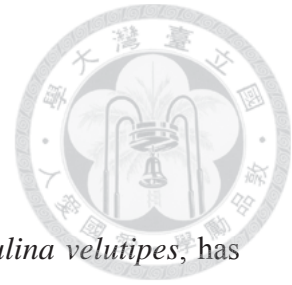


摘要

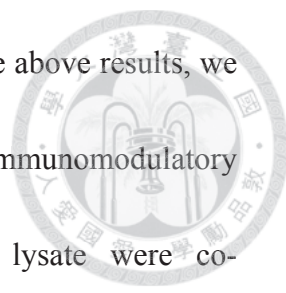
金針菇免疫調節蛋白 FIP-*fve* 萃取自金針菇子實體，文獻指出其具有免疫調節、抗癌、抗過敏及減緩發炎反應等功效。二級結構分析顯示，FIP-*fve* 透過兩個單元體 N 端 α -helix 以疏水性鍵結形成雙元體。本實驗室前人研究指出 FIP-*fve* 不需經過抗原呈獻細胞修飾，而是透過與 MHC 及 TCR 分子鍵結活化 T 細胞，因此推測 FIP-*fve* 作用方式類似超抗原。本研究目的有二，一為證實雙元體結構對於 FIP-*fve* 的免疫調節活性是必要的，二為找出 FIP-*fve* 與 MHC 和 TCR 具交互作用之證據。為探討雙元體結構對 FIP-*fve* 免疫調節活性之影響，將 1-13 胺基酸缺失或全長 FIP-*fve* cDNA 構築於 pET-32a(+) 載體，並透過大腸桿菌系統表現得分子量皆約 26 kDa 之 His-FIP-*fve* 1-114 和 His-FIP-*fve* 14-114 蛋白。以 enterokinase 切除 His-tag 後，經質譜比對確認成功取得 rFIP-*fve* 1-114 以及 rFIP-*fve* 14-114。免疫調節活性試驗方面，片段缺失 rFIP-*fve* 14-114 刺激小鼠脾臟細胞分泌 IFN- γ 能力較 rFIP-*fve* 1-114 弱，且無法刺激小鼠脾臟細胞 IFN- γ 及 IL-2 基因表現。綜合以上結果，推測失去雙元體結構造成 FIP-*fve* 免疫調節活性降低。在 FIP-*fve* 類超抗原性質探討上，透過共同免疫沉澱法可知 FIP-*fve* 與表面分子 MHC class II 具交互作用，另外發現 FIP-*fve* 可被 MHC class I 及其 Isotype IgG2a 抗體捕捉。然而，本研究尚未透過共同免疫沉澱法看見 FIP-*fve* 與 TCR 連結之證據，因此僅能證實 FIP-*fve* 能連結 APCs 表面分子 MHC class II。

關鍵字：超抗原、His 融合蛋白、同型雙元體、免疫調節蛋白、共同免疫沉澱

Abstract



FIP-*fve*, an immunomodulatory protein isolated from *Flammulina velutipes*, has been demonstrated to have activities of immunomodulatory, anti-cancer, anti-allergic and suppression of inflammation. Based on a secondary structure analysis, we know that two FIP-*fve* monomers form homodimer through the hydrophobic interaction between N-terminal α -helices. Previous studies suggested that FIP-*fve* can mediate T cells activation through the linkage between T cell receptors (TCR) on T cells and MHC molecules on antigen present cells (APCs) without processing procedure of APCs. This process is similar to the mechanism of superantigen-mediated immune response. The aim of this study was to demonstrate the necessity of dimer structure for FIP-*fve* immunomodulatory activity and to prove the directly binding of FIP-*fve* with MHC and TCR. To study the relationship between the dimer structure and immunomodulatory activity of FIP-*fve*, we constructed the full length 1-114 FIP-*fve* cDNA and truncated 14-114 FIP-*fve* cDNA on pET-32a(+) vector and expressed the His-fusion protein His-FIP-*fve* 1-114 and His-FIP-*fve* 14-114. After digested by enterokinase to remove the His-tag residue, rFIP-*fve* 1-114 and rFIP-*fve* 14-114 were purified with FPLC system. The ability of rFIP-*fve* 14-114 to stimulate IFN- γ production on murine splenocytes was lower than rFIP-*fve* 1-114. Incubating murine splenocytes with rFIP-*fve* 14-114 could



not elevate the gene expression of IFN- γ and IL-2. According to the above results, we suggested that the dimerization might be critical for FIP-*fve* immunomodulatory activity. On the other hand, FIP-*fve* and RAW 264.7 cell lysate were co-immunoprecipitated to determine superantigen-like characterization of FIP-*fve*. Results indicated that FIP-*fve* could interact with MHC class II molecule directly. Interestingly, we also found that FIP-*fve* was pulled down by both anti-MHC class I antibody and IgG2a which was isotype of anti-MHC class I antibody. However, no co-immunoprecipitated evidence showed that FIP-*fve* bound with TCR in this study. In conclusion, we proved that FIP-*fve* directly bind with MHC class II molecule.

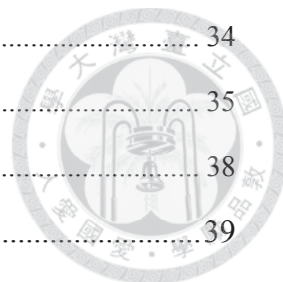
Key words: superantigen, His-fusion protein, homodimer, immunomodulatory protein, co-immunoprecipitation

目錄



口試委員會審定書.....	I
致謝.....	II
摘要.....	IV
Abstract.....	V
目錄.....	VII
圖目錄.....	IX
縮寫表.....	X
第一章 前人研究.....	1
第一節 金針菇簡介.....	1
第二節 其他金針菇成分與功效介紹.....	2
第三節 金針菇免疫調節蛋白 FIP- <i>fve</i> 簡介.....	5
第四節 超抗原簡介.....	10
第二章 研究動機與目的.....	12
第三章 材料與方法.....	13
第一節 金針菇免疫調節蛋白 FIP- <i>fve</i> 純化.....	14
第二節 變性膠體電泳分析 (SDS-PAGE).....	17
第三節 蛋白質濕式轉印.....	19
第四節 西方轉漬法 (western blotting).....	20
第五節 重組蛋白 rFIP- <i>fve</i> 1-114 及 truncated rFIP- <i>fve</i> 14-114 基因選殖與構築.....	21
第六節 重組蛋白 rFIP- <i>fve</i> 1-114 及 truncated rFIP- <i>fve</i> 14-114 表現與純化.....	25
第七節 膠體內水解 (In gel digestion).....	27
第八節 小鼠脾臟細胞取得.....	28
第九節 酵素連結免疫吸附分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).....	30
第十節 細胞總 RNA 抽取與反轉錄.....	31
第十一節 即時定量聚合酶鏈鎖反應 (Real-time PCR).....	32

第十二節	巨噬細胞株 RAW 264.7 細胞培養.....	34
第十三節	共同免疫沉澱法 (Co-immunoprecipitation).....	35
第十四節	統計分析.....	38
第四章	研究結果.....	39
第一節	重組蛋白 rFIP- <i>fve</i> 1-114 及 truncated rFIP- <i>fve</i> 14-114 選殖與純化.....	39
第二節	重組蛋白 rFIP- <i>fve</i> 1-114 及 truncated rFIP- <i>fve</i> 14-114 於小鼠脾臟細胞之免疫活性.....	42
第三節	以共同免疫沉澱法探討 FIP- <i>fve</i> 之類超抗原特性.....	43
第五章	討論.....	46
第一節	重組蛋白 rFIP- <i>fve</i> 1-114 及 truncated rFIP- <i>fve</i> 14-114 蛋白純化探討.....	46
第二節	片段缺失 truncated rFIP- <i>fve</i> 14-114 蛋白功能探討.....	47
第三節	FIP- <i>fve</i> 與表面分子親和性之探討.....	48
第六章	結論與未來展望.....	51
參考文獻	52



圖目錄



圖一、金針菇免疫調節蛋白 FIP- <i>fve</i> 之純化.....	58
圖二、構築 pET-32a(+)- <i>fve</i> 1-114 及 pET-32a(+)- <i>fve</i> 14-114 表現載體.....	59
圖三、 <i>fve</i> 1-114 與 <i>fve</i> 14-114 引子擴增 DNA 產物電泳圖.....	60
圖四、pGM-T- <i>fve</i> 1-114、pGM-T- <i>fve</i> 14-114 與 pET-32a(+) 限制酶反應產物..	61
圖五、生產 His-FIP- <i>fve</i> 1-114 最佳誘導時間與濃度之西方轉漬結果.....	62
圖六、重組蛋白 His-FIP- <i>fve</i> 1-114 之純化.....	63
圖七、重組蛋白 His-FIP- <i>fve</i> 14-114 之純化.....	64
圖八、以 enterokinase 切除 His-FIP- <i>fve</i> 1-114 及 His-FIP- <i>fve</i> 14-114 之 His-tag 產物分析.....	65
圖九、rFIP- <i>fve</i> 1-114 以及 rFIP- <i>fve</i> 14-114 之西方轉漬分析.....	66
圖十、rFIP- <i>fve</i> 1-114 以及 rFIP- <i>fve</i> 14-114 質譜分析蛋白序列比對結果.....	67
圖十一、rFIP- <i>fve</i> 1-114 以及 rFIP- <i>fve</i> 14-114 刺激小鼠脾臟細胞分泌 IFN- γ 之效 果.....	68
圖十二、rFIP- <i>fve</i> 14-114 無法刺激小鼠脾臟細胞 IFN- γ 和 IL-2 基因表現....	69
圖十三、FIP- <i>fve</i> 與表面分子 MHC class II 有交互作用.....	70
圖十四、FIP- <i>fve</i> 與表面分子 TCR V α 未見有交互作用.....	71
圖十五、FIP- <i>fve</i> 與表面分子 TCR V β 未見有交互作用.....	72
圖十六、小鼠脾臟細胞破碎液與 FIP- <i>fve</i> 共同免疫沉澱產物 SDS-PAGE 分析圖	73
圖十七、小鼠脾臟細胞破碎液與 FIP- <i>fve</i> 共同免疫沉澱產物質譜分析比對結果	74

縮寫表

Abbreviations



APC	antigen presenting cell
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BSA	bovine serum albumin
DC	dendritic cell
FIP	fungal immunomodulatory proteins
hPBMC	human peripheral blood mononuclear cells
IFN- γ	Interferon gamma
IL-2	Interleukin-2
LC-MS	liquid chromatography–mass spectrometry
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MHC	major histocompatibility complex
OVA	ovalbumin
TCR	T cell receptor
T-bet	T-box transcription factor

第一章 前人研究



第一節 金針菇簡介

菇類因營養價值極高，且具獨特鮮美風味和口感，自古以來即作為重要食材使用，而近年來食用菇類因其三大機能：營養特性、嗜好特性以及生物活性而受矚目。在營養特性方面，菇類中水分含量約 80-90%，蛋白質與醣類含量差異較大，大致上可分為富於蛋白質 (20-50%)、富於醣類 (40-70%) 以及兩成分各半的菇菌三種。菇類的醣質以海藻糖 (trehalose)、甘露醇、阿拉伯醣醇等人類腸道較難吸收之低分子醣，而另含有 β -葡聚糖和幾丁質等不消化性膳食纖維，因此屬於熱量較低之食品。灰份含量約在 10% 以下，而脂質含量極低 (1-8%)，多是以不飽和脂肪酸為主。除上述提到含有多醣、三萜類和蛋白等活性成分外，菇類中含有豐富的維生素 B1、維生素 B2、菸鹼酸、生物素以及經麥角固醇轉換之維生素 D2，可作為營養補充之來源。就嗜好特性來說，菇類的風味來自於成分中的 GMP、AMP 等核苷酸以及麩胺酸、蘋果酸等，另也有屬於每種菇類獨有的香味如松茸的松茸醇、香菇乾燥後生成的香菇精等。菇類的口感則來自幾丁質和葡聚醣組成的細胞壁，不同菇類細胞壁組成不同，因而造就了獨特的軟脆口感。近年來，許多研究指出菇類中多醣 (polysaccharide)、三萜類 (triterpene) 和蛋白具有抗腫瘤、免疫增強、抗發炎、避免心血管疾病等活性，因醫療與藥用功效使菇類具有高的經濟價值 (水野卓、川合正允，1997)。

金針菇 (*Flammulina velutipes*) 又名金菇、火菇、冬菇、絨柄金錢菇，英文俗名 Golden needle mushroom，或稱 Enoki mushroom，為常見食用菇之一，其分類上屬於真菌門 (Eumycota)、擔子菌亞門 (Basidiomycotina)、層菌綱 (Hymenomycetes)、同擔子菌亞綱 (Homobasidiomycetes)、傘菌目 (Agaricales)、

口蘑科 (Tricholomataceae)、小火菇屬 (*Flammulina*) (葉, 2006)。金針菇子實體中含有 89.8% 水分，而乾重中含 58.0% 碳水化合物、27.5% 粗蛋白質、7.4% 灰分以及 7.0% 脂質 (Ko, *et al.*, 2007)。胺基酸組成上，每克金針菇以含有 30 毫克 lysine 和 28 克 glycine 兩者為最多；礦物質含量則是以鉀含量最高，其次是磷、鎂 (Smiderle, *et al.*, 2008)。

第二節 其他金針菇成分與功效介紹

近年來許多金針菇活性物質相繼被發現，具有抗癌、免疫調節等保健功效，包括冬菇素 (flammulin)、抗病毒蛋白、核糖體失活蛋白和金針菇多醣等。此外，金針菇子實體萃取物火菇細胞毒素 (flammutoxin, FTX) 則是一具有細胞溶解作用之毒蛋白。

2.1. 冬菇素

冬菇素為一自金針菇子實體以水萃方式取得之蛋白，最早是由 Komatsu 等人於 1963 年以硫酸銨沉澱、乙醇分化後再經 DEAE-Sephadex 和 CM-Sephadex 等陰陽離子層析管柱純化而得 (Komatsu, *et al.*, 1963)。其沉澱常數為 2.5 S，等電點 8.9，由 SDS-PAGE 分析分子量為 23.7 kDa (Zhang, *et al.*, 1999)，而 2003 年有學者利用電噴灑離子化質譜 (ESIMS) 更精確的計算其分子量為 19891.13 Da (周等人, 2003)。冬菇素的胺基酸組成已分析完成，以丙胺酸 (alanine) 含量最高而不含甲硫胺酸 (methionine) (周等人, 2003)。冬菇素被認為是具有抗癌能力之蛋白，其可抑制小鼠肉瘤 S180 (sarcoma 180) 及艾氏腹水瘤 (Ehrlich ascites tumor) 之生長，提升罹癌小鼠存活率，並增加罹癌小鼠的器官重量，顯示冬菇素具有抗癌的潛力。另有研究指出，冬菇素的 N 端序列與植物核糖體失活蛋白 (ribosome-inactivating proteins, RIPs) 相似，也是被視為具有抗癌、抗病毒

的可能證據之一 (Wang and Ng, 2000)。



2.2. 火菇毒素

火菇毒素萃取自金針菇子實體，其分子量約為 31 kDa，等電點為 5.4，在胺基酸組成中有大量的色氨酸，絲氨酸和甘氨酸 (Bernheimer and Oppenheim, 1987)。1974 年，Lin 團隊以 60% 飽和硫酸銨於金針菇子實體破碎液中鹽析出火菇毒素，此團隊在前一年於草菇 (*Volvariella volvaceae*) 中純化出一毒蛋白 (Lin, *et al.*, 1973)，因此同樣於 NMR 1 品系小鼠腹腔中注射火菇毒素檢測其毒性，並得到 LD50 為 2.45 mg/kg，不過火菇毒素之毒性可經 100°C 加熱處理後完全去除，且並無口服毒性；另外在後續研究中發現火菇毒素其餘性質，包含：1. 於濃度 25 µg/mL 時可溶解人類 O 型紅血球，而鈣離子在生理濃度時可以部分逆轉溶血作用。2. 造成小鼠局部水腫或因疼痛產生扭體反應 (writhing reaction)，然此反應可部分被抗組織胺藥抑制。3. 抑制艾氏腹水瘤細胞的呼吸且造成細胞腫脹，而鈣離子同樣能抑制火菇毒素造成的艾氏腹水瘤細胞呼吸速率下降 (Lin, *et al.*, 1975; Lin, *et al.*, 1974)。

1998 年，日本 Tomita 團隊深入探討火菇毒素溶血機制，發現火菇毒素會先引起人類紅細胞整脹後而溶血，使紅血球鉀離子外流；另外也發現經火菇毒素處理之紅血球在電子顯微鏡觀察下，可於細胞表面出現外徑 10 nm、內徑 5 nm 之環狀結構，因此認為火菇毒素透過於細胞表面形成一個環狀的低聚物，並產生 4 ±5 nm 的親水性孔洞因而使紅血球溶解 (Tomita, *et al.*, 1998)。1999 年，Watanabe 等人選殖出一預測分子量大小與火菇毒素相同之 cDNA 片段 (Watanabe, *et al.*, 1999)，而 Tomita 等人將之與火菇毒素 N 端基因定序結果比對，確認選殖出的是含有 272 胺基酸的火菇毒素 cDNA 片段，並生產重組火菇毒素 (rFTX)。此外，他們發現透過質譜定序取得之胺基酸序列僅有 251 個，與基因選殖結果得 272 個結果不同，因此生產了缺乏 N 端 Met 和 C 端 20 個胺基酸之

rFTX251 以及全長 rFTX271，發現 rFTX251 依然具有溶血能力；然而 rFTX271 因形成雙元體而無法於血球上形成孔洞，若需恢復溶血能力則需使用胰蛋白切除第 252 個胺基酸以後的片段，因此認為火菇毒素原是雙元體結構，然因第 251 個胺基酸 Lys 和 252 個胺基酸 Met 之連結對胰蛋白高度敏感，易被水解成只含 251 個胺基酸之單體火菇毒素，因此具有溶血毒性 (Tomita, *et al.*, 2004)。目前火菇毒素之研究尚未闡明其 C 端 20 個胺基酸如何使之形成雙元體，此部分有待更進一步探討；而火菇毒素能提升腸道細胞 CaCo-2 的細胞膜通透性，具有開發成藥品吸收劑之潛力 (Watanabe *et al.*, 1999)。

2.3. 金針菇多醣

金針菇多醣主要來自於子實體與菌絲體的水萃物，平均分子量約在 50~200 萬間，主自金針菇中萃取之多醣種類繁多，以成份上看來，可分為蛋白結合多醣、以 β -(1 \rightarrow 3)-D 葡聚醣為結構之多醣…等。

1968 年 Kamasuka 等人針對多種單子菌門真菌萃取多醣，而金針菇多醣 (*F. velutipes* polysaccharide, FVP) 也於此時首度被純化而出 (Kamasuka, *et al.*, 1968)，陸續被純化出來的金針菇多醣則還有 EA₃、EA₅、EA₆、FVP1、FVP2…等。在 EA₃ 的研究中，Ikekawa 透過酸水解 (acid hydrolysis) 和乙醯水解 (acetolysis) 等化學方法分析 EA₃，發現其為 β -(1 \rightarrow 3)-D 葡聚醣，且總體含 92.5% 葡萄糖，具有良好的抗癌活性 (Ikekawa, *et al.*, 1969; Ikekawa, *et al.*, 1973; Yoshioka, *et al.*, 1973)；EA₅ 是由 45% 葡萄糖、32% 半乳糖、13.4% 甘露糖以及 7.2% 的阿拉伯糖所組成，進一步透過 concanavalin A-Sepharose 4B 親和性管柱劃分 EA₅，可得不同組成之 EA₅₀₀、EA₅₀₅ 和 EA₅₁₀，發現葡萄糖含量最高之 EA₅₀₀ 有最好的抗癌活性，因此再透過 Sephadex G-200 管柱再次劃分 EA₅₀₀ 得 EA₅₀₁、EA₅₀₂、EA₅₀₃ 三種多醣，而其中分子量最大的 EA₅₀₁ 有最好的抗癌活性，其組成為 42.3% 葡萄糖、17.3% 半乳糖、12.2% 甘露糖、6.7% 木糖以及 14.7% 阿拉伯糖

(Ikekawa, *et al.*, 1982)。

1983 年，Otagiri 從金針菇子實體水萃得另一蛋白結合多醣並命名為 EA₆，透過以注射疫苗後再給予 EA₆ 的試驗，發現其有助於延長 L1210 血癌模式中罹癌小鼠的壽命，且並不影響小鼠免疫系統中對 L1210 癌細胞的特異性 (Otagiri, *et al.*, 1983)；另外，Ikekawa 也發現靜脈注射 EA₆ 與羊紅血球細胞 (sheep red blood cell) 於 ICR 小鼠，取出脾臟細胞透過溶血實驗分析發現 EA₆ 可提升抗羊紅血球 IgM 抗體產生，並抑制注射羊紅血球細胞所引起的小鼠足掌腫脹 (Ohkuma, *et al.*, 1982)。綜合以上結果，得知 EA₆ 為一具抗癌、免疫調節及抗發炎之蛋白結合多醣。

第三節 金針菇免疫調節蛋白 FIP-*fve* 簡介

2.1. FIP 家族介紹

菇類中免疫調節蛋白 (immunomodulatory protein) 最早發現於 1989 年，是由日本學者自靈芝中純化之 LZ-8 (Lin Zhi-8)，其後自金針菇中萃取之 FIP-*fve*、松杉靈芝 (*Ganoderma tsugae*) 中萃取之 FIP-*gts* 以及草菇中萃取出之 FIP-*vvo* (*Volvariella volvacea*)，發現此四種蛋白的胺基酸序列相似度達 44%，且具有 42% 之同源性 (Lin, *et al.*, 1997)，因此歸類為真菌免疫調節蛋白質 (fungal immunomodulatory proteins, FIP) (Ko, *et al.*, 1997)。FIP 家族被認為是一種 BRMs (biological response modifiers)，透過結合細胞表面專一性受器的方式，達到調節免疫系統的目的 (胡，2006; 唐，1993)。

2.2. FIP-*fve* 之分子與生化特性

金針菇免疫調節蛋白 FIP-*fve* 萃取自金針菇子實體，其分子量為 12.7 kDa，由 114 個胺基酸所組成。FIP-*fve* 蛋白質序列已解出，N 端具有乙醯化修飾，胺

基酸序列中缺乏甲硫胺酸 (methionine)、半胱胺酸 (cysteine) 以及組胺酸 (histidine)，因此不含雙硫鍵 (Ko, *et al.*, 1995)。二級結構預測上，FIP-*fve* 由 6 個 β -strands、一個 β -turn 以及 3 個 α -helices 組成，其中兩個 α -helices 位於 N 端，一個在 C 端，FIP-*fve* 蛋白質 N 端相對 C 端較疏水，此性質與免疫球蛋白重鏈可變區相似 (Kino, *et al.*, 1989; Ko *et al.*, 1997)。在 2003 年，Paaventhana 等人透過蛋白質結晶與 X-ray 繞射分析技術，進一步瞭解 FIP-*fve* 在自然中以非共價鍵結之同型雙元體 (homodimer) 存在，其結構是以單元體中 N 端 α -helix 疏水性殘基 Ala2, Leu5, Leu9, Leu12 和 Val13 與另一相對單元體之 α -helices 形成，而在 α -helix 後接著由兩個 β -sheet 所組成的第三型纖維連結蛋白 (fibronectin III, FNIII)。於此，FIP-*fve* 為 FIP 家族中首位已解析結構之蛋白 (Paaventhana, *et al.*, 2003; Seow, *et al.*, 2003)。

近年來研究指出，利用點突變的方式破壞 FIP-*fve* 結構中預測與哺乳類免疫細胞醣類之結合位 W24, T28, D34, T90, I91, and W111，使得 FIP-*fve* 刺激人類血周邊細胞分泌 IFN- γ 能力下降，推測 FIP-*fve* 結構上的醣類結合模組和人類周邊血單核球的醣化受器對免疫反應具關聯性 (Liu, *et al.*, 2012)。

2.3. FIP-*fve* 之免疫調節活性

在體外試驗中，使用 2 μ g/mL FIP-*fve* 能使人類四種血型之紅血球凝結，且其能力並不會被 0.1 M D-glucose, D-galactose, D-fucose, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine 及 lactose 等醣類抑制。另外，FIP-*fve* 可刺激人類周邊血淋巴細胞 (human peripheral blood mononuclear cells, hPBMCs) 之增生，誘導 hPBMC 從 G1/G0 期進入 S 期，促進轉錄因子 T-bet (T-box transcription factor) 的表現 (胡, 2006)，亦可刺激 hPBMC 分泌 IFN- γ (Ko *et al.*, 1995)。若預先使用 p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) 抑制劑處理 hPBMC，則 FIP-*fve* 無法促使其分泌 IFN- γ ，因此推測 FIP-*fve* 是透過 p38 MAPK 途徑調節 T 細胞

產生 IFN- γ (Wang, *et al.*, 2004)。透過 GST pull-down assay 結合 LC-MS/MS 分析，結果顯示 FIP-*fve* 與 hPBMC 中的 integrin beta-3 有可能具交互作用，且與 FIP-*fve* 共培養之 hPBMC 其蛋白質酪胺酸磷酸化明顯的增加，以上結果顯示 FIP-*fve* 可能作用於 CD4⁺ T 細胞，並走向 Th1 調節之免疫反應 (唐，2003)。

FIP-*fve* 能夠降低 IL-5 所調節之嗜酸性白血球增生的情形，並減低 IL-5R α 基因表現。另外，當 FIP-*fve* 與嗜酸性白血球共培養時，能提高 CD95 的表現、降低 Bcl-xL 及 pro-caspase 3 的表現量，使其發生細胞凋亡 (apoptosis) 的現象，顯示 FIP-*fve* 能夠改善與嗜酸性球相關的過敏發炎反應 (Hsieh, *et al.*, 2007)。另有研究利用 250 mM glutaraldehyde 使 FIP-*fve* 形成多元體，結果指出 FIP-*fve* 形成三元體及四元體的能力較 FIP-*gts* 弱，且這些多元體無法刺激 hPBMCs 之增生 (Ou, *et al.*, 2009)。

FIP-*fve* 可刺激小鼠脾細胞分泌 IFN- γ 並提高 IL-2 和 IFN- γ 基因轉錄表現 (Ko *et al.*, 1995)，然而 FIP-*fve* 單獨與小鼠 T 細胞共培養的情況下，無法刺激 T 細胞增生；但若在經 paraformaldehyde 固定、以 mitomycin-C 處理 (童，2008) 或輻照過 (Hsieh, *et al.*, 2003) 之全脾細胞存在的情形下，則可促進 T 細胞的增生，表示 FIP-*fve* 刺激小鼠 T 細胞增生需要抗原呈獻細胞 (antigen presenting cell, APC) 存在。FIP-*fve* 能夠促進小鼠 T 細胞受器 (T-cell receptor, TCR) Va 19 mRNA 的表現量達原本六倍，且若使用主要組織相容性複合體 (major histocompatibility complex, MHC) 之中和性抗體與小鼠腹腔巨噬細胞以及小鼠脾臟細胞共培養，則抑制 T 細胞受 FIP-*fve* 促進的增生情形，亦降低原本可由 FIP-*fve* 刺激的小鼠腹腔巨噬細胞 IL-12 p35, IL-12 p40 以及 IL-18 的基因表現量 (童，2008)。另外，FIP-*fve* 也可以刺激腸繫膜淋巴結 (mesenteric lymph node, MLN) 及培耶氏斑 (Peyer's patches, PP) 細胞產生 IFN- γ (劉，2013)。


體內試驗方面，前人研究發現 FIP-*fve* 具有抗過敏、抗癌以及降血糖之潛力。在抗過敏功效上，研究指出透過預先於腹腔注射 FIP-*fve* 可抑制由 BSA 引起的

BALB/c 小鼠系統性過敏反應 (systemic anaphylaxis)；在 compound 48/80 誘導的小鼠足掌腫脹試驗中，同樣預先腹腔注射 FIP-*fve* 可減少足掌腫脹體積至 49.3% (Ko *et al.*, 1995)。經由腹腔注射雞卵白蛋白 (ovalbumin, OVA) 再以口服 OVA 致敏的動物模式中，餵食 FIP-*fve* 之小鼠無明顯過敏反應的表現，且血清中 OVA 專一性抗體 IgE 亦無顯著增加，而 IgG2a 有上升的情形；其脾細胞與 OVA 共同培養後，上清中 IFN- γ 含量增加，而 IL-5 減少，顯示餵食 FIP-*fve* 可透過使免疫反應轉為以 Th1 為主，而減低 Th2 型過敏反應症狀 (Hsieh *et al.*, 2003)。在降低血糖研究上，由 Streptozotocin 誘發第一型糖尿病的 ICR 小鼠中，給予 FIP-*fve* 無法降低血糖的濃度，不過在第二型糖尿病的 ICR 小鼠中，給予 FIP-*fve* 能降低血糖的濃度，其效果較同屬於 FIP 家族之 FIP-*gts* 顯著 (胡, 2006)。

透過小鼠肝癌模式研究 FIP-*fve* 抗癌潛力，發現餵食 FIP-*fve* 能夠延長罹癌 (BNL 1MEA.7R.1 cell) 小鼠的壽命、抑制腫瘤大小並抑制肝癌組織的血管新生，且小鼠周邊血單核球的 CD80, MHC class I, MHC class II 的表現量皆有提高的現象，推論 FIP-*fve* 可活化先天及適應型免疫反應達到抗癌效果，且 IFN- γ 扮演極重要角色 (Chang, *et al.*, 2010)。將 FIP-*fve* 作為佐劑與人類乳頭狀病毒 (HPV)-16 E7 癌基因蛋白質同時免疫小鼠，可提高罹癌小鼠存活率達 60%，並提升小鼠體內對 HPV-16 E7 具有專一性抗體含量以及對 (HPV)-16 E7 具專一性的 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 細胞 IFN- γ 分泌量；透過細胞移殖試驗，確認抗腫瘤特性與 IFN- γ 、CD4⁺ 及 CD8⁺ T 細胞相關。再者，FIP-*fve* 可於體內試驗中刺激樹突細胞 (dendritic cells, DCs) 之成熟並誘導抗原專一性的 CD8⁺ T 細胞免疫反應 (Ding, *et al.*, 2009)。

2.4. FIP-*fve* 之安定性

在加工過程中，食物原料不乏經低溫冷凍、高溫烹煮或是強酸強鹼等極端條件處理，因此若樣品安定不易受溫度、酸鹼值或儲藏時間等條件影響其活性，則



有較大潛力做為日後保健食品之應用。目前試驗大多以細胞增生或 IFN- γ 分泌量判斷 FIP-*fve* 經加工或消化處理後之安定性。在耐溫方面，以 100°C 高溫處理 FIP-*fve* 60 分鐘後，還保有一半刺激小鼠脾細胞增生能力，然 90 分鐘後則大部分活性已遭破壞，而處理 2 小時後，FIP-*fve* 也失去了刺激 hPBMC 分泌 IFN- γ 之能力。不過 FIP-*fve* 則可忍受在 121°C 殺菌 15 分鐘以及 -80°C 冷凍 12 小時。在耐酸鹼部分，於 pH 2 的環境兩小時或 pH 4-10 的環境四小時 FIP-*fve* 皆能保有其活性，但當 pH 13 時 FIP-*fve* 刺激小鼠脾細胞增生能力減為約 72%，刺激 IFN- γ 分泌量也降為 67%。若是給予真空乾燥處理，FIP-*fve* 雖可刺激小鼠脾細胞增生，但細胞分泌 IFN- γ 的效果卻降低為原本的一半 (Ou *et al.*, 2009; Tong, *et al.*, 2008)。為了評估食品中所添加 FIP-*fve* 的保存期限，將 FIP-*fve* 以不同殺菌條件處理並測試其保存期限，透過電泳分析發現 FIP-*fve* 以中性環境 121°C 處理 20 分鐘或以 138°C 處理 18 秒後，至少能夠於室溫下保存半年，若以 130°C 處理 12 秒或以 121°C 處理 20 分鐘，則至少可在 4°C 冷藏下保存半年 (張，2011)。

FIP-*fve* 在模擬胃、腸兩階段各別消化中，經過含胃蛋白酶之模擬胃消化液處理，顯示 FIP-*fve* 並不會有所降解，而若是以含有胰酶之消化液模擬腸道消化，FIP-*fve* 雖少部分被消化並產生兩片段，但大部分仍未被消化。而經模擬腸胃道消化後的 FIP-*fve* 可刺激培耶氏斑細胞分泌 IFN- γ ，因此證明消化後之 FIP-*fve* 仍具有調節腸道免疫之活性 (劉，2013)。

2.5. 重組 FIP-*fve* 之異體表現

在研究蛋白質特性時，若需取得大量且質純的蛋白，或得到不同於天然蛋白之片段時，則可利用基因重組技術取得蛋白樣品。先將欲表達標之蛋白基因建構於載體上，將載體轉入寄主細胞後，經此大量表達出目標蛋白，再純化則可得之。前人以 pGEX-2T expression vector 構築 pGEX-FIP-*fve*，將之轉入大腸桿菌 TG1

並以 IPTG 誘導重組蛋白大量表現後，接者利用 Glutathione-Sepharose 4B 親和性管柱純化含 GST-FIP-*fve* 融合蛋白。得到 GST 融合蛋白後，以辨認專一性切位之酵素 thrombin 切下 GST-tag，即可再次純化得到 reFIP-*fve* (柯，1995)。研究結果發現 reFIP-*fve* 對人類紅血球凝集能力與 native *fve* 相同，然刺激 hPBMC 增殖的能力較 native *fve* 低三倍。另外柯也構築了四種缺失突變種蛋白質 reFIP-*fve* 14-114、reFIP-*fve* 1-103、reFIP-*fve* 14-103、reFIP-*fve* 28-103，發現 reFIP-*fve* 14-114 與 reFIP-*fve* 1-114 對於 hPBMC 增殖能力最接近，而 reFIP-*fve* 1-103 刺激 hPBMC 增生能力降為 75%，reFIP-*fve* 14-103 則降為 40%。reFIP-*fve* 14-114 與 reFIP-*fve* 1-114 對於人類紅血球凝集能力也最接近，但 reFIP-*fve* 14-103 紅血球凝集能力下降至 25%，而 FIP-*fve* 28-103 刺激 hPBMC 增生能力與凝血活性完全喪失，顯示 FIP-*fve* 之 N 端 14-28 之胺基酸與 C 端 103-114 之胺基酸對其免疫增強作用有關 (柯，1995)。亦有前人使用 pGEX-4T-1 載體構築並表現 GST-FIP-*fve*，結果顯示 GST-FIP-*fve* 1-114 及 GST-FIP-*fve* 1-103 可刺激 hPBMC 分泌 IFN- γ ，但唯有 GST-FIP-*fve* 1-114 具紅血球凝集能力 (胡，2006)。本研究室曾利用 pGEX-4T-1 系統純化出 reFIP-*fve* 28-103，結果顯示其與巨噬細胞的結合能力較 native *fve* 低，且不與 T 細胞結合，且也失去活化小鼠脾臟細胞產生 IFN- γ 之能力，推測 FIP-*fve* 若無法形成雙元體結構，則其免疫調節活性降低 (張，2011)。

第四節 超抗原簡介

超抗原為是種透過結合 MHC 與 TCR 而刺激大量 T 細胞的毒蛋白。目前已知的超抗原約有 40 種，主要是由金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 分泌的金黃色葡萄球菌腸毒素 (*Staphylococcus enterotoxin*, SE) A, B, C1-3, D, E, G-R, U 和中毒性休克綜合症毒素 (toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1)，化膿性鏈

球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 分泌的鏈球菌熱原性外毒素 (streptococcal pyrogenic exotoxin, SPE) A, C, G-M 和 SMEZ、SSA，亦有少數分類為黴漿菌裂殖素 (*Mycoplasma arthritidis* mitogen, MAM) 以及假性結核病耶氏桿菌裂殖素 (*Yersinia pseudotuberculosis* mitogen, YPM)。血液中少量的超抗原即可刺激 T 細胞的增生，其半增生劑量 (P₅₀) 在 0.02-50 pg/mL，並促使 T 細胞分泌 IL-2, IFN- γ 和 TNF- α ，進而引起免疫症狀如中毒性休克、過敏性鼻炎、猩紅熱、發燒甚至是死亡 (Baker and Acharya, 2004; Fraser and Proft, 2008; Proft and Fraser, 2003)。

超抗原的分子量除了 YPM 為 14.5 kDa 外，其餘約在 20-30 kDa。不像傳統抗原必須先被 APC 吞噬並修飾後，再經由 MHC 分子呈獻給 T 細胞，超抗原並不需要被 APC 修飾，即可直接結合 APC 表面上 MHC class II 與 T 細胞上的 TCR，並使 T 細胞增生。在 10^5 - 10^6 的 naïve T 細胞中，傳統抗原呈獻方式只能活化其 1%，而超抗原可使 20% 的 naïve T 細胞活化。

表面分子 MHC class II 上有兩個與超抗原結合位置，第一個 generic site 位於 α -chain 上；另一個 zinc-dependent site 則在 β -chain 上，其與超抗原的親和性為 generic site 的百倍。目前研究中發現，超抗原中 SPE-A, SSA, SEB, SEC1-3, SEG 以及 TTST-1 等是以 N 端疏水區與 α -chain 之 generic site 鍵結，而 SPE-C, SPE-G, SPE-H, SMEZ, SEH (Hakansson, *et al.*, 2000) 等則是與 β -chain 上 zinc-dependent site 結合，但也有同時與 α , β -chain 同時鍵結之超抗原，如 SEA, SED, SEE, MAM 等 (Proft and Fraser, 2003)。

超抗原首要結合目標為 CD4⁺ T 細胞，並使其活化成第一型輔助型 T 細胞 (Bavari and Ulrich, 1995)。大多數的超抗原如 SEB (Swaminathan, *et al.*, 1992) 是透過 TCRV β 與 T 細胞結合，但 SHE 則是與 TCRV α 鍵結，並透過 real-time 證據證明其辨認位為 V α 27 (Pumphrey, *et al.*, 2007)。

第二章 研究動機與目的



在實驗室前人童曼華研究中，發現 FIP-*fve* 活化 T 細胞的機制可能類似超抗原，原因有三：1. FIP-*fve* 不需要抗原呈獻細胞修飾，只需以經 paraformaldehyde 處理過之脾臟細胞做為抗原呈獻細胞即可活化 T 細胞。2. FIP-*fve* 可活化 TCR V α 19 基因表現達 6 倍，因此推測是藉由 TCR V α 19 作為活化 T 細胞之受器。3. 若使用 MHC class I 與 MHC class II 中和性抗體，則可抑制由 FIP-*fve* 引起的 T 細胞增生與抗原呈獻細胞基因表現。綜合上述結果，推測 FIP-*fve* 活化機制與 MHC class I、MHC class II 有關，且可能是透過與 TCR 連結而活化 T 細胞，而如此作用機制極似超抗原，因此以 FIP-*fve* 為類超抗原做為假說 (童，2008)。另有前人以共同免疫沉澱法，搭配西方墨點結果得知 FIP-*fve* 與 MHC II 之間具交互作用，與 MHC I 則否；而在 TCR V α 以及 TCR V β 試驗中，只得到部分證據確認兩者與 FIP-*fve* 具交互作用 (潘，2012)。

另外，前人嘗試純化片段缺失重組蛋白，透過去除 FIP-*fve* 胺基酸 N 端 1-13 部分，使之失去 α -helix 因而無法透過疏水性鍵結形成雙元體結構。另外也生產了缺失 1-27、104-114 以及 13-27 部分之蛋白共 8 組，預期能見各個片段對免疫活性之影響，然以 pGEX 4T-1 作為載體並轉入大腸桿菌中表現之重組蛋白生產不易，唯能取得 reFIP-*fve* 28-103，因此建議後人更換載體再次純化片段缺失重組蛋白 (張，2011)。

本論文之第一部分為透過 pET-32a(+) 載體重新轉殖並純化 rFIP-*fve* 1-114 及片段缺失 rFIP-*fve* 14-114，後續測試其免疫活性，以瞭解雙元體結構於 FIP-*fve* 之重要性。第二部分，為求 FIP-*fve* 與 MHC 交互作用更直接的證據，先將 RAW 264.7 細胞或小鼠全脾細胞破碎後與 FIP-*fve* 進行共同免疫沉澱法，Pull-Down 之產物以 LC-MS/MS 分析，預期能以更直接的證據看見與 FIP-*fve* 具交互作用之蛋白。



第三章 材料與方法

【藥品】

- NaCl, KCl, NH₄Cl, EDTA, KHCO₃, Na₂HPO₄, β-mercaptoethanol, acetic acid, HCl, SDS, APS, TEMED, glycine, coomassie brilliant blue R250, DTT(1,4-dithiothreitol), bromophenol blue, methanol, Lysozyme, Trypan blue, Albumin from bovine serum (BSA), concanavalin A (ConA) 購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- 硫酸銨購自台灣肥料股份有限公司 (新竹市, 台灣)
- NaOAc(CH₃COONa) 購自 Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, USA)
- Tris-base, Glycerol, polysorbate 20 (Tween 20)、H₂SO₄ 購自 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
- KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaN₃ 購自 Riedel-deHaën® (Seelze, Germany)
- 40% Acrylamide/Gly 購自 Bio Basic Inc. (Ontario, Canada)
- BlockPRO™ Blocking Buffer 購自 Visual protein (新北市, 台灣)
- IPTG 購自 BioShop Canada Inc. (Ontario, Canada)
- FBS 購自 GIBCO® Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
- RPMI-1640 medium, 89% High-glucose DMEM 購自 Hyclone (Logan, UT, USA)
- Taq DNA Polymerase Master Mix Red 購自 Ampliqon (Copenhagen, Denmark)
- HealthView Nucleic Acid Stain 購自 Genomics BioSci & Tech Corp. (新北市, 台灣)
- 95% ethanol 購自友和貿易股份有限公司 (新北市, 台灣)



【耗材】

- Vivaspin 6 (3 kDa MWCO), vivaspin 20 (5 kDa MWCO) 購自 GE Healthcare (UK)
- 25 T、75 T、48 孔細胞培養盤、50 mL 與 15 mL 離心管購自 Corning Life Science (Tewksbury, MA, USA)

第一節 金針菇免疫調節蛋白 FIP-*fve* 純化

【材料】

(1) 樣品：

- 金針菇：2012 年 5 月 24 購自頂好超市（臺北市，台灣）

(2) 試劑

- 萃取液：取 90 g NaCl、5 mL β -mercaptoethanol、250 mL acetic acid，溶解於去離子水後定量至 5 L。
- CM52 carboxymethyl cellulose 購自 Whatman Inc. (New Jersey, USA)
- 0.01 M NaOAc (pH 5.2)：取 4.1 g NaOAc 以去離子水溶解後，以 CH₃COOH 調整 pH 值至 5.2，定量至 5 L。
- 0.5 M NaOAc (pH 5.2)：取 10.25 g NaOAc 以去離子水溶解後，以 CH₃COOH 調整 pH 值至 5.2，定量至 250 mL。
- 含 0.5 M NaCl 之 0.01 M NaOAc：取 4.4 g NaCl 溶於 0.01M NaOAc 溶液中，調整 pH 值至 5.2 後，定量至 150 mL。
- PBS 緩衝液：取 8.01 g NaCl、0.2 g KH₂PO₄、0.2 g KCl、1.15 g Na₂HPO₄ 以去離子水回溶後，調整 pH 值為 7.2 再定量至 1 L。

(3) 器材

- 果汁機 Water blender 購自 Royal Dutch Philips Electronics Ltd. (Amsterdam,



Holland)

- 超音波破碎機 Heat system Sonicator XL2020 購自 Qsonica (Melville, NY, USA)
- 低溫離心機 Allegra™ X-22R Centrifuge 購自 Beckman Coulter, Inc. (CA, USA)
- 減壓幫浦 DOA-P104-A4 購自 Gast Manufacturing, Inc. (Europe)
- 1 號濾紙購自 Toyo Roshi Kaisha, Ltd. (Japan)
- Glass-microfiber discs, PESU membrane (0.2 μm , 0.45 μm)購自 Sartorius Stedim Biotech. (Germany)
- Cellu Sep 3,500 MWCO 透析膜購自 Membrane Filtration Products, Inc. (Seguin, TX, USA)
- 0.2 mm 玻璃珠購自慶發玻璃儀器商行 (新竹市, 台灣)
- Gradient Mixer 購自 Amersham Pharmacia Biotech, Inc. (Piscataway, NJ, USA)
- HPLC fraction collector 購自 Advantec MFS, Inc. (CA, USA)
- NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer 購自 NanoDrop Technologies, Inc. (Wilmington, DE, USA)
- PB-10 pH 測定儀購自 Sartorius (Goettingen, Germany)

【方法】

(1) 金針菇破碎與硫酸銨沉澱

將新鮮金針菇去雜質秤重後，洗淨切碎並於 4°C 浸置萃取液中。隔天以果汁機及超音波震盪機破碎處理 (破碎 10 秒停 10 秒，總破碎時間 10 分鐘)，並將破碎液低溫離心 (4°C, 9,500 rpm, 20 分鐘) 收集上清液。上清液通過兩片相疊之 1 號濾紙去除雜質後，加入硫酸銨達 90% 沉澱蛋白，於 4°C

放置隔夜。第二天以低溫離心 (4°C, 9500 rpm, 10 分鐘) 收集蛋白沉澱後，回溶蛋白至 0.01 M NaOAc (pH 5.2) 緩衝液，並裝入透析模在 4°C 下透析三天，途中多次更換緩衝液，讓蛋白完全置換在 0.01 M NaOAc (pH 5.2) 緩衝液中。收集透析膜內樣品，以 glass fibre 和 0.45 μm 濾紙過濾，於 4°C 下保存待後續純化。

(2) CM-52 膠體管柱層析

將 0.5 M NaOAc (pH 5.2) 溶液加入 CM-52 膠體中，攪拌均勻後靜置 30 分鐘。小心倒掉上清後，再加入 0.01 M NaOAc (pH 5.2)，同樣攪拌均勻靜置，重複以 0.01 M NaOAc (pH 5.2) 平衡膠體後，將膠體倒入架好之層析管柱中。轉開管柱下方活栓使多餘液體流出，待膠體壓實，倒入玻璃珠於其頂端，以緩衝液體流洗時的衝擊。以幫浦注入 0.01 M NaOAc (pH 5.2) 流洗管柱至流出液 pH 5.2 時即完成準備。

使用幫浦抽取已透析且過濾之金針菇粗萃液至管柱，調整流速約每分鐘 30 mL，維持液面高度避免膠體乾掉。粗萃液完全通入膠體後，以 0.01 M NaOAc (pH 5.2) 洗去未鍵結之蛋白，直到流出液之蛋白質濃度小於 0.1 mg/mL 停止。最後，以 0.01 M NaOAc (pH 5.2) 及含 0.5 M NaCl 之 0.01 M NaOAc (pH 5.2) 進行梯度流洗，以收集器每 4 mL 收成一管，收集至沖提液全部通入管柱為止。透過 SDS-PAGE 確認目標蛋白位置，取較純之管數將蛋白濃縮並透析至 PBS 溶液中，保存在 4°C 待後續實驗使用或放於 -20°C 保存。

(3) 蛋白質濃度測定

使用 NanoDrop[®] ND-100 全波長分光光度計測量。測量前先取 2 μL 去離子水清潔測量基座，以拭鏡紙拭去水珠，再取 2 μL 溶劑校正背景值，同樣以拭鏡紙擦拭基座。後取 2 μL 樣品於基座，以波長 280 nm 偵測其蛋白質濃度。

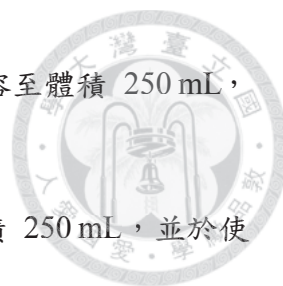


第二節 變性膠體電泳分析 (SDS-PAGE)

【材料】

(1) 試劑

- Tri-base (pH 8.8) : 18.17 g Tris-base 加入去離子水後，以 HCl 調至 pH 8.8，定量至 100 mL。
- Tri-base (pH 6.8) : 6.0 g Tris-base 加入去離子水後，以 HCl 調至 pH 6.8，定量至 100 mL。
- 10% SDS : 取 10 g SDS 粉末加入去離子水至 100 mL。
- 10% APS : 取 0.1 g APS 粉末加入去離子水至 1 mL。
- 5 X SDS sample dye : 取 2.5 mL 0.5 M Tris-base (pH 6.8), 4 mL 10% SDS, 2 mL glycerol, 1 mL β -mercaptoetnanol, 2 mL 1% bromophenol blue 以及 2 mL 1 M DTT 混合均勻，置於 -20°C 備用。
- Tank buffer : 取 3 g Tris-base, 14.4 g glycine 和 10 mL 10% SDS, 以去離子水回溶並定量至 1 L。
- CBR 染劑 1% stain stock : 取 2 g coomassie brilliant blue R250 加去離子水至 200 mL。
- CBR 染劑 : 取 62.5 mL 1% stain stock, 250 mL methanol, 50 mL acetic acid 加去離水至 500 mL。
- 退染劑 : 取 500 mL methanol, 100 mL acetic acid 以及 400 mL 去離子水混合。
- 銀染固定液 : 取 105 mL 95% Ethanol 和 25 mL Acetic acid，以去離子水定量至 250 mL。
- 銀染敏化液 : 取 79 mL 95% Ethanol、0.78 g Sodium thiosulphate 和 17 g Sodium acetate，以去離子水定量至 250 mL。



- 銀染反應液：取 0.625 g Silver nitrate 加入去離子水回溶至體積 250 mL，並於使用前加入 0.1 mL Formaldehyde。
- 銀染發展液：取 6.25 g Na_2CO_3 以去離子水回溶至體積 250 mL，並於使用前加入 0.05 mL Formaldehyde。
- 銀染停止液：取 12.5 mL Acetic acid，加去離子水定量至 250 mL。

(2) 器材

- Mini-protein III 蛋白質電泳系統購自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
- Thermomixer comfort 1.5 mL 購自 Eppendorf (Hamburg, Germany)
- PXi 4 Image analysis system 購自 SYNGENE (Cambridge, UK)

【方法】

(1) 變性膠體製備

鑄膠玻片先以 70% 酒精清潔並擦拭乾淨，置於固定架上夾緊並確保不漏液後，配好 15% running gel 注入玻片間約八分滿，於上方加入 methanol 將溶液壓平。約 30 分鐘後凝膠，倒去 methanol 並將配好之 4% stacking gel 注入玻片間，迅速插入齒梳，靜置 30 分鐘後凝膠。將齒梳拆下後，膠片即可跑膠分析，或浸泡在 tank buffer 中於 4°C 保存一週。

(2) 膠體電泳與染色

欲分析之蛋白質樣品調整至目標濃度後，取 20 μL 與 5 μL 之 5X SDS sample dye 混合均勻，以 99°C 加熱 10 分鐘使蛋白變性，加熱後取出置冰。將鑄好之膠片架在電泳槽中，倒入足量 tank buffer，並注入已降溫的樣品於膠片凹槽中，蓋上電泳槽上蓋。連接電源供應器，固定電壓 60 伏特進行電泳，待 sample dye 從 stacking gel 跑至 running gel，改電壓為 110 伏特繼續電泳。約 2 小時電泳可完

成，小心將膠體自玻片取下後，以 CBR 染劑染色 30 分鐘，回收染劑後再以去離子水或退染劑退至背景透明，即可以照膠系統保存和分析影像。



(3) 銀染

銀染一種極度靈敏的蛋白質染色法，透過蛋白質上的酸基與銀銨離子結合，銀離子在酸性環境中被還原為金屬銀，可使膠體上的蛋白質呈現深棕色。將跑好之 SDS-PAGE 自鑄膠玻璃取下放入染色盒後，加入銀染固定液 (fixation) 搖晃反應 30 分鐘。倒掉固定液後，加入銀染敏化液 (sensitizing) 同樣搖晃反應 30 分鐘。敏化完成後，倒掉液體並以去離子水洗去多餘液體，每次五分鐘，總共進行三次。洗完後將液體倒乾，加入銀染反應液反應 20 分鐘。回收銀染反應液，再次以去離子水洗去多餘銀離子，每次一分鐘，共洗兩次。倒掉剩餘液體，加入銀染發展液 (developing) 等待深棕色條帶出現，即可加入停止液結束反應。10 分鐘後，膠體染色即完成，可進行後續試驗或以去離子水保存。

第三節 蛋白質濕式轉印

【材料】

(1) 試劑：

- 10 倍 CAPS：取 22.13 g CAPS 以去離子水回溶並調整至 pH 11 後，定量至 1 L 待用。
- Transfer buffer：取 200 mL 10 倍 CAPS 和 500 mL methanol，以去離子水定量至 2500 mL，置於 4 °C 預冷。

(2) 器材：

- BioRed 濕式轉印器材購自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
- Hybond ECL Nitrocellulose membrane (0.22 μm) 購自 GE Healthcare (UK)

- 3MM Chr Chromatography Paper 購自 Whatman Inc. (New Jersey, USA)



【方法】

取兩片濾紙、跑完電泳之膠片以及 NC 膜浸泡於 transfer buffer 平衡 10 分鐘，將上述物件以濾紙、膠片、NC 膜、濾紙等順序組合，使電流方向為 NC 膜至膠片，以轉印匣夾好後放入轉印槽並倒入 transfer buffer 於其中，在 4°C 環境下以 400 mA 轉印 1.5 小時。

第四節 西方轉漬法 (western blotting)

【材料】

(1) 抗體：

- Anti-FIP-*fve* (D1 株)：由實驗室前人製備，5000 倍稀釋使用。
- Anti-TCR alpha antibody (ab18861), Anti-TCR beta antibody (ab18862) 購自 abcam plc. (Cambridge, UK)
- AP conjugated goat anti-mouse IgG antibody, AP conjugated goat anti-rabbit IgG antibody 購自 Kirkegaard & Perry Laboratories (KPL), Inc. (MD, USA)

(2) 試劑：

- 10 倍 TBS：取 2.42 g Tris-base 和 29.2 g NaCl 以去離子水定量至 1000 mL。
- TTBS：取 100 mL 10 倍 TBS 加入 1 mL Tween-20，以去離子水定量至 1000 mL。
- TMB membrane peroxidase substrate 購自 Kirkegaard & Perry Laboratories (KPL), Inc. (MD, USA)
- ImmobilonTM Western Millipore Chemiluminescent HRP Substrate 購自

Millipore corporation (MA, USA)



【方法】

轉印後的 NC 膜以 Blocking buffer 於 4°C 環境下反應一晚，隔天將一抗以 blocking buffer 適量稀釋後，於室溫下搖晃反應 1 小時。倒掉一抗後，倒入 TTBS 洗去未鍵結之抗體，每次 10 分鐘，共三次。取 TTBS 試量稀釋二抗後，與 NC 膜於室溫下搖晃反應 1 小時。倒掉二抗後，同樣以 TTBS 洗去未鍵結之抗體，每次 10 分鐘，共三次。將殘餘 TTBS 去除後，加入 1 mL TMB membrane peroxidase substrate 呈色，待膜上出現藍色條帶後，加入去離子水停止反應。若欲進行冷光呈色，則去除 TTBS 後，於暗室下加入 1 mL 等體積混合之 Chemiluminescent HRP Substrate，反應約 30 秒後移去多餘液體，將 NC 膜放入照膠系統中呈色。呈色時以累加方式每曝光 30 秒儲存影像乙次，直到冷光訊號不再增強為止。

第五節 重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 及 truncated rFIP-*fve* 14-114 基因選殖與構築

【材料】

- (1) cDNA 來源：已將 FIP-*fve* 基因全長構築於 pGEX4T-1 vector，並轉型至大腸桿菌 XL-10 中，取得自中山醫學大學柯俊良老師實驗室。
- (2) 質體來源：pET-32a(+) 轉型至大腸桿菌 DH-5 α 中，實驗室保存菌種。
- (3) 試劑：
 - pGM-T PCR Cloning Kit 購自 GMbiolab (台中市，台灣)
 - QIAquick Gel Extraction Kit 購自 Qiagen Sciences (Maryland, USA)
 - Plasmid Miniprep Purification Kit 購自 GMbiolab (台中市，台灣)
 - 5 X TBE Buffer：取 54 g Tris base、27.5 g boric acid 以及 20 mL 0.5 M EDTA，調整 pH 8.0 後，定量至 1 L。



- LBA：取 10 g Tryptone、10 g NaCl、5 g Yeast extract 以及 15 g Bacto Agar 以去離子水定容至 1 L，滅菌後使用。
- LB 培養液：取 10 g Tryptone、10 g NaCl 以及 5 g Yeast extract 以去離子水定容至 1 L，滅菌後使用。

(4) FIP-*fve* 表現基因引子設計：

- *fve* 1-114 forward primer (AAA + *Kpn* I + Enterokinase + S¹ A² T³ S⁴) :
5'-AAAGGTACCGACGACGACGACAAGTCCGCCACGTCG-3'
- *fve* 1-114 reverse primer (W K K T + stop codon + *Xho* I + AAA) :
5'-AAACTCGAGTCAAGTCTTCTTCCA-3'
- *fve* 14-114 forward primer (AAA + *Kpn* I + Enterokinase + K¹⁴ K¹⁵ I¹⁶ D¹⁷) :
5'-AAAGGTACCGACGACGACGACAAGAAGAAGATCGAT-3'
- *fve* 14-114 reverse primer (W K K T + stop codon + *Xho* I + AAA) :
5'-AAACTCGAGTCAAGTCTTCTTCCA-3'

(5) 器材

- GeneAmp® PCR System 2700 購自 Applied Biosystems (CA, USA)
- Mupid2-plus DNA gel electrophoresis system 購自 ADVANCE Co., Ltd. (Japan)

【方法】

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

以含有 FIP-*fve* 全長基因之大腸桿菌 XL-10 作為模板 DNA，取 4.6 μL 菌液加入 0.2 μL forward primer、0.2 μL reverse primer 以及 5 μL Taq DNA Polymerase Master Mix Red，混勻後將管壁液體離心後，以 GeneAmp® PCR System 進行 colony PCR，其條件為 94°C 反應 2 分鐘後，接者 94°C 反應 30 秒、55°C 反應 30 秒、72°C 反應 40 秒共 24 個循環，後以 72°C 反應 10



分鐘後，降溫至 4°C 暫存。

(2) DNA 瓊脂膠體電泳 (Agarose Gel Electrophoresis)

於膠體電泳進行半小時前，先鑄膠待用。以小片 DNA 膠體為例，取 20 mL 0.5 X TBE buffer，依欲分析之 DNA 片段大小不同加入 1-3% 之 agarose，最後加入 0.75 μ L HealthView Nucleic Acid Stain 搖勻放入微波爐加熱，待沸騰 2-3 次後拿出。將煮好膠體倒入鑄膠裝置，插上齒梳後避光待其凝固。將凝膠完成之膠片齒梳拔起，放入電泳槽中，並倒入 0.5 X TBE buffer 蓋過膠體。將 PCR 產物注入膠片，並以全電壓進行電泳。電泳結束後，以 UV 燈確認條帶位置，再以 PXi 4 Image analysis system 記錄影像。

(3) DNA 膠體純化

使用 QIAquick Gel Extraction Kit 進行純化。首先，切下含有目標 DNA 部分之膠體放入 1.5 mL 為量離心管中，加入 3 倍體積的 QG buffer，於 50°C 反應 10 分鐘。確認膠體溶解後，加入 1 倍體積之 isopropanol 後混勻。取 700 μ L 微量離心管中液體加入 QIAquick colume 中，以最高轉速離心 1 分鐘。離心完後除去濾液，重複步驟直到微量離心管中液體取完。加入 500 μ L QG buffer 於 colume 中洗去殘餘膠體，以最高轉速離心 1 分鐘。接者加入 750 μ L PE buffer，以最高轉速離心 1 分鐘。去除濾液後，再次以最高轉速離心 3 分鐘，以確認完全去除 PE buffer 中 ethanol。離心完後，將 QIAquick colume 移至新的 1.5 mL 微量離心管，取 30 μ L 去離子水於 colume 上，靜置 1 分鐘後，再次以最高轉速離心 1 分鐘即可於下液取得純化之 DNA 片段。

(4) T-A cloning 和 藍白篩

以載體與插入 DNA 取量為 1:3 之比例，依 pGM-T cloning kit 建議配方加入 1 μ L T4 ligase 和 1 μ L 10 X buffer，加入去離子水調整體積至 10 μ L 後，於 16°C 下反應 10 小時進行載體與 DNA 之接合 (ligation)。

於接合時可準備藍白篩培養皿，首先取滅菌後之 LBA 待降溫至 55°C，於無菌操作台中加入 100 μ g/mL ampicillin 後倒於培養皿中。降溫後 LBA 凝固，先將培養皿倒蓋曬盤，約半小時培養皿水氣收乾後，加入 50 μ L X-gal (50 mg/mL) 以及 20 μ L 0.5 M IPTG 於培養皿中，在暗室下以 0.5 mm 玻璃珠塗盤，並置於 37°C 培養半小時。培養皿準備好後可進行塗盤，取 10 μ L 接合完成之質體與 50 μ L DH-5 α 菌液於 1.5 mL 微量離心管中混合，以 45°C、45 秒為條件進行 heat shock，heat shock 完成立刻置冰 10 分鐘。於無菌操作台中加入 40 μ L LB 培養液，並取出菌液均勻塗布於準備好之藍白篩培養皿，以 0.5 mm 玻璃珠塗盤後，置於培養箱中以 37°C 培養隔夜。第二天，挑選白色菌落，小量培養後將菌液送至基龍米克斯生物科技公司進行核酸定序分析。

(5) 質體 DNA 製備

將含有 pET-32a(+) 空質體之 DH-5 α 大腸桿菌小量培養約 10 mL，以最高轉速離心取得菌塊至微量離心管後，加入 200 μ L Solution I 於離心管中，以 vortex 方式混合破菌後，加入 200 μ L Solution II 並輕輕來回翻轉 10 次，此時細胞懸浮液逐漸澄清。接者加入 200 μ L Solution III，來回翻轉 10 次混合均勻，此時會出現白色沉澱物，以最高轉速離心 5 分鐘。將 Spin column 裝入 Collection tube 中，取澄清之上清液小心移至 spin column，以最高轉速離心 1 分鐘。移除 collection tube 中的濾液，加入 700 μ L Wash Solution，以最高轉速離心 1 分鐘，重複此清洗步驟一次。移除 collection tube 中的濾液，再次以最高轉速離心 3 分鐘，以確認完全去除 PE buffer 中 ethanol。將 spin column 移至新的 1.5 mL 微量離心管，取 50 μ L 去離子水於 column 上，靜



置 1 分鐘後，再次以最高轉速離心 1 分鐘即可於下液取得純化之質體，可保存在 -20°C 待用。

(6) 限制酶切反應 (restriction enzyme reaction) 和接合反應 (ligation)

以質體 DNA 製備方法取得含完整或缺失之 FIP-*fve* DNA 片段之 pGM-T 質體後，取 5 μg 質體加入 0.2 μL BSA、2 μL NEB buffer 1 和 0.5 μL *Xho* I，補去離子水至總體積 20 μL 後，於 37°C 下反應 1 小時，再加入 0.15 μL *Kpn* I，於 37°C 下反應 15 分鐘，即完成限制酶切反應。pET-32a(+) 空質體限制酶切反應則是取 10 μg 質體加入 0.5 μL BSA、5 μL NEB buffer 1、0.5 μL *Xho* I 和 0.5 μL *Kpn* I，補去離子水至總體積 50 μL 後，於 37°C 下反應 75 分鐘。將限制酶切反應完之 DNA 以瓊脂膠體電泳分析後，切下含目標 DNA 之膠體後，以 DNA 膠體純化方法即可取得為 sticky end 之 DNA 片段及 linear 質體。


將純化後之 pET-32a(+) 質體與 DNA 片段以 1:3 之比例取量，再加入 1 μL T4 ligase 和 1 μL 10 X buffer，加入去離子水調整體積至 10 μL 後，於 16°C 下反應 10 小時進行載體與 DNA 之接合。10 小時後，依前述方法將接合完成之質體轉形 (transform) 至 DH-5 α 大腸桿菌，塗盤挑菌小量培養後將菌液送至基龍米克斯生物科技公司進行核酸定序分析。確認核酸序列無誤，再將質體自菌中取出，轉形至適合蛋白表現之大腸桿菌菌株 BL-21，塗盤挑菌後再次進行核酸定序分析，比對序列正確後，即完成重組蛋白之選殖與構築。

第六節 重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 及 truncated rFIP-*fve* 14-114 表現與純化

【材料】

(1) 試劑：

- 0.5 M IPTG：於無菌環境下以 0.22 μm 孔徑濾膜過濾，於 4°C 保存。

- 
- Lysozyme stock：取 0.1 g Lysozyme 回溶於 10 mL 去離子水，分裝後冰 -20°C 待用。
 - Binding buffer：取 7.6 g Na₃PO₄•12H₂O、29.22 g NaCl 和 0.34 g imidazole 加去離子水回溶後，調整 pH 值為 7.4，再定量至 1 L。
 - Elution buffer：取 7.6 g Na₃PO₄•12H₂O、29.22 g NaCl 和 34 g imidazole 加去離子水回溶後，調整 pH 值為 7.4，再定量至 1 L。
 - EKMax™ Enterokinase 購自 Invitrogen (CA, USA)

(2) 器材：

- ÄKTA purifier FPLC system, fraction collector frac 900, HiTrap IMAC FF 5 mL 購自 GE Healthcare (UK)

【方法】

(1) 菌株培養與 His-tag 融合蛋白表現

取 50 µl 菌液培養於含 100 µg/mL ampicillin 之 5 mL LB 液態培養基中 (37°C, 130 rpm)，約 6 小時後即完成小量放大。取活化之菌液 1 mL 加於含 100 µg/mL ampicillin 之 1L LB 液態培養基中，待菌液培養至吸光值達 0.6~0.8 後，加入 IPTG 誘導 His-tag 融合蛋白表現，取菌液跑膠後以西方墨點法確認表現時間和誘導濃度後，最終以 0.4 mM IPTG 誘導約 4 小時，以低溫高速離心 10 分鐘 (4°C, 9,500 rpm) 去除培養基，收集菌塊並以去離子水清洗後，離心去除殘餘培養基，將菌塊存於 -80°C 待用。

(2) 菌液樣品上機前處理

菌塊解凍後，將 1 L 菌液收集之菌塊以 40 mL Binding buffer 懸浮後，加入 200 µL lysozyme stock 於 4°C 攪拌 30 分鐘溶菌，再以超音波震盪機破碎處理 (破碎 10 秒停 10 秒，總破碎時間 10 分鐘)。破碎後菌液以低溫高速離心 10 分鐘 (4°C, 9,500 rpm)，收集上層澄清液，將之以 0.45 µm 和 0.22



μm 孔徑濾膜過濾，濾液冰 4°C 待用。

(3) 以 FPLC (Fast protein liquid chromatography) 系統純化 His-tag 融合蛋白

將 FPLC 系統管線以去離子水清洗乾淨後，裝上管柱並注入 0.1 M NiSO_4 ，使鎳離子與膠體結合，於 4°C 下作用 30 分鐘後。先以去離子水清洗管柱，再注入 binding buffer 平衡，將經過前處理之菌液以 3 mL/min 流速注入管柱。待菌液全數注入管柱後，以 binding buffer 洗去未鍵結蛋白，設定三階段流洗：1. 固定 15% elution buffer 流洗 10 C.V. 。2. 梯度 $15\sim 60\%$ Elution buffer 流洗 10 C.V. 。3. 固定 100% Elution buffer 流洗 4 C.V. 。收集每階段流出液，透過 SDS-PAGE 確認 His-tag 融合蛋白流洗出的位置。

(4) His-tag 切除

以濃縮管濃縮經 FPLC 純化之 His-tag 融合蛋白，並將之透析至 PBS 緩衝溶液中。測試 EK 酵素切除 His-tag 之條件，最終以 0.1 uL 酵素與 $20\text{ }\mu\text{L}$ 融合蛋白比例於 4°C 下反應 2~4 天。切除完 His-tag 之樣品，經濃縮並以 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 孔徑濾膜過濾後，可用於後續細胞試驗中。

第七節 膠體內水解 (In gel digestion)

【材料】

(1) 試劑：

- $0.1\text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ ：取 $7.9\text{ g NH}_4\text{HCO}_3$ 回溶於去離子水中，調整 $\text{pH } 8.0$ 後定量至 1 L 。
- 0.1 M DTT stock ：取 0.15 g DTT 以 $10\text{ mL } 0.1\text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ 回溶。



【方法】

取已完成 CBR 染色並退染之膠體，用手術刀切下目標條帶並切碎後，將膠體裝入 1.5 mL 微量離心管中，加入 1 mL 40% ACN/0.1M NH₄HCO₃ 震盪 10 分鐘，離心取上清，重複此步驟直到膠體退為無色。加入 1 mL 去離子水震盪三分鐘洗去多餘 ACN，離心取出液體。重複以去離子水清洗兩次後，抽出液體，加入 100% ACN 振盪脫水至膠粒變白，並以真空離心機抽去溶劑。待膠體乾燥後，加入 50 μL 10 mM DTT/0.1M NH₄HCO₃ 蓋過膠體，振盪混勻至膠塊泡脹透明後，置於 56°C 下反應一小時。取出微量離心管，離心後去除上清液，加入 1 mL 去離子水震盪三分鐘，離心取出液體。重複以去離子水清洗兩次後，抽出液體並於真空下去溶劑 30 分鐘。待膠體乾燥後，快速加入 50 μL 55mM IAM/0.1M NH₄HCO₃ 蓋過膠塊，振盪混勻後放置暗處反應 45 分鐘。去除上清液，加入 1 mL 40% ACN/0.1 M NH₄HCO₃ 洗兩次，取出液體後加入 1 mL 去離子水震盪三分鐘，離心取出液體。重複以去離子水清洗兩次後，抽出液體並於真空下去溶劑 30 分鐘。加入回溶於 0.1M NH₄HCO₃ 之 trypsin，調整酵素與蛋白質含量比為 1:20-1:100 之間，並加入 0.1M NH₄HCO₃ 至淹過膠體後，於 37°C 下反應一晚。第二天，將微量離心管混勻並且離心後，收集液相至新的微量離心管中，並加入 50%ACN/0.1%FA 萃取膠體 3 次，每次 30 分鐘，並吸出液相後與先前液相合併。加入 80% ACN/0.1% FA 進行最後萃取，10 分鐘後吸出液相與先前液相合併。將所有合併的液相真空離心乾燥。待液體完全乾燥後，加入 10 μL 0.1% FA 溶解蛋白片段，並至於 -20°C 保存待分析。

第八節 小鼠脾臟細胞取得

【材料】

(1) 實驗動物：



- BALB/cByJNarl 小鼠購自國家實驗動物中心 (臺北市，台灣)

(2) 試劑：

- RBC lysis buffer：155 mM NH₄Cl、10 mM KHCO₃、0.1 mM EDTA 以去離子水溶解混合後，於無菌環境下使用 0.22 μm Minisart 孔徑濾膜過濾，於 4°C 保存。
- 細胞培養液：含 10 % FBS 之 RPMI-1640 medium。
- 0.4% (w/v) trypan blue 染劑：稱取 2 g trypan blue 溶於 500 mL 去離子水中混勻。

(3) 器材：

- 剪刀、鑷子購自信德 (臺北市，台灣)
- 細胞計數器購自 Reichert Inc., (NY, USA)
- 細胞培養箱 Hera、離心機 Labofuge 400 購自 Heraeus (Hanau, Germany)

【方法】

將小鼠以二氧化碳犧牲後，以酒精將其全身噴濕消毒，送進無菌操作臺。自小鼠左側背部位置剪下小塊外皮，撕開外皮後再以另副剪刀剪開內皮，將脾臟取出放置 PBS 中。使用磨砂玻片先以按壓方式輕輕取出細胞並回溶於 PBS 中，將細胞液移入離心管，以 1,500 rpm 離心五分鐘去除上清。拍散細胞團塊後，加入 1 mL RBC lysis buffer 溶解紅血球，輕拍離心管 1 分鐘後靜置 2 分鐘使其反應完全，加入 9 mL PBS 停止反應。再次以 1,500 rpm 離心五分鐘去除上清，加入培養液懸浮細胞，並以 trypan blue 染劑染色計算細胞數量，以培養液調整置適當濃度，即可與樣品共培養。



第九節 酵素連結免疫吸附分析 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

【材料】

(1) 試劑：

- IFN- γ ELISA DuoSet® 購自 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
- Wash buffer：於 PBS 中加入 0.05% (v/v) 之 Tween 20。
- Block buffer：1% BSA 溶於 pH 7.2 之 PBS 緩衝液中。
- Tris-buffered Saline (TBS)：取 3.02 g Tris 和 4.38 g NaCl 回溶於去離子水中，調整 pH 值為 7.2 後，定量至 500 mL。
- Reagent diluent：取 0.1% BSA 和 0.05% Tween 20 溶於 Tris-buffered Saline 中。
- Stop solution：1M H₂SO₄ 溶液。

(2) 器材：

- Costar 96-Well Half-Area Plates 購自 Corning Life Science (Tewksbury, MA, USA)
- EnSpire® Multimode Plate Readers 購自 PerkinElmer Inc. (MA, USA)

【方法】

試驗前一天於 96 孔盤中每格加入 50 μ L 以 PBS 稀釋至適當濃度之 capture antibody，於室溫下 coating 隔夜。第二天將液體倒除，每格加入 150 μ L wash buffer 洗去未吸附於盤上之 capture antibody，共洗三次。將盤中液體拍乾後，每格加入 100 μ L block buffer，於室溫培養 1 小時。倒掉盤中液體，同樣以 wash buffer 清洗三次後，將盤中液體拍乾，以 reagent diluent 將標準品序列稀釋後，每孔加入 50 μ L 標準品或細胞培養上清液，於室溫下培養 2 小時。倒掉盤中液體，用 wash buffer 清洗三次並將盤中液體拍乾，每格加入 50 μ L 以 assay diluent 稀釋

至適當濃度之 capture antibody，於室溫下培養 2 小時。倒掉盤中液體，用 wash buffer 清洗三次並將盤中液體拍乾，每格加入 50 μL 以 assay diluent 稀釋至適當濃度之 Streptavidin-HRP，於室溫下避光培養 20 分鐘。倒掉盤中液體，用 wash buffer 清洗五次並將盤中液體拍乾，每格加入 50 μL TMB substrate，於室溫下避光培養至呈色完全時，每孔加入 25 μL stop solution 以中止呈色反應。以 ELISA reader 測定其在 450 nm 的吸光值，並以 540 nm 之吸光值作為參考值，計算細胞培養上清液中細胞激素含量。

第十節 細胞總 RNA 抽取與反轉錄


【材料】

(1) 試劑：

- Total RNA Miniprep kit 購自 GMbiolab (台中市，台灣)
- RNA to cDNA EcoDry™ Premix (Oligo dT) 購自 Clontech Laboratories, Inc. (CA, USA)

【方法】

收取培養後細胞於 1.5 mL 微量離心管中，以 PBS 緩衝液洗去培養液，離心去除所有液體後，加入 600 μL RNA lysis/2-ME solution，反覆沖散細胞後，保存於 -80°C 冰箱待用。將所有時間點之細胞裂解液置於室溫下解凍，於細胞裂解液中加入 600 μL 70% 酒精並震盪均勻後，取出 700 μL 混合液移到 RNA spin column 中，以最高轉速離心一分鐘。離心完成後，去除濾液再將剩餘混合液移到 spin column 中，同樣離心一分鐘後去濾液。將 RNA spin column 放回原本的濾液收集管中，加入 500 μL 之 RNA wash solution I，以最高轉速離心一分鐘後去濾液。此時新鮮配置 80 μL DNase incubation buffer 與 2 μL DNase I 之混合液，並取 80 μL 混合



液於 spin column 濾膜的中心，靜置 10 分鐘待酵素去除 DNA。加入 500 μ L RNA wash solution I 到 RNA spin column 中，以最高轉速離心一分鐘去除濾液。將 RNA spin column 組裝到新的濾液收集管，加入 600 μ L RNA wash solution II，以最高轉速離心一分鐘去除濾液。再重複此步驟一次。將 RNA spin column 置入新的 1.5 mL 微量離心管，加入 30 μ L Nuclease-free water 到 RNA spin column 濾膜中心，室溫靜置 10 分鐘，以最高轉速離心 1 分鐘回收 RNA。以 NanoDrop® ND-100 檢測 RNA 濃度及品質，若不接續試驗則將 RNA 保存於 -80°C 冰箱。

反轉錄時使用 Clontech 的 RNA to cDNA EcoDry™ Premix 套組，內容包含 reverse transcriptase、oligo(dT) primers、 MgCl_2 、BSA、DTT 以及 dNTP Mix，並混合於一個反應管中。取抽出之全 RNA 1-5 μ g 並以 Nuclease-free water 調整體積至 20 μ L 後，混合均勻並將管壁上液體離心下來，以 GeneAmp® PCR System 進行反轉錄反應，條件為 42°C 反應 60 分鐘，接續改以 70°C 下 10 分鐘停止反應，並降至 4°C 。以 NanoDrop® ND-100 檢測 cDNA 濃度及品質，並保存於 -20°C 冰箱待用。

第十一節 即時定量聚合酶鏈鎖反應 (Real-time PCR)

【材料】

(1) 試劑：

- iQ™ SYBR® Green Supermix 購自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
- iQ™ 96-Well PCR Plates 購自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
- Microseal® 'B' Adhesive Seals 購自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)

(2) 器材：



- MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System 購自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)

(3) 使用實驗室前人設計並測試條件之引子，序列如下：

- Mouse β -actin forward primer :
5'- TCC TTC TTG GGT ATG GAA T -3'
- Mouse β -actin reverse primer :
5'- GGA GCC AGA GCA GTA ATC -3'
- Mouse IFN- γ forward primer :
5'- TGA GAC AAT GAA CGC TAC AC -3'
- Mouse IFN- γ reverse primer :
5'- CTT CCA CAT CTA TGC CAC T -3'
- Mouse IL-2 forward primer :
5'- GTA AAA CTA AAG GGC TCT GAC -3'
- Mouse IL-2 reverse primer :
5'- TTG AGG GCT TGT TGA GAT -3'

【方法】

(1) Real-time PCR 操作：

在試驗設計上須包含目標表現基因引子以及 housekeeping gene 引子，參考 iQ™ SYBR® Green Supermix 使用說明，於每孔盤中依序加入總量為 100 ng 之 cDNA、最終濃度各別為 100 nM forward primer 和 reverse primer，補去離子水至體積 10 μ L 後，加入 10 μ L 2X iQ™ SYBR® Green Supermix。在加入各液體時小心勿產生氣泡，待所有反應物皆加入於 PCR 用 96 孔盤後，以封膜將有膠之部份朝向孔盤密封，稍稍離心使孔盤壁上殘留液體離下，避免在加熱反應時體積改變。將離心好之 PCR 用 96 孔盤 放入 MyiQ™ Single-



Color Real-Time 儀器中，蓋上儀器上蓋，設定反應條件如下：

Step 1：95°C 反應 10 分鐘，共 1 循環

Step 2：95°C 反應 15 秒後，改為 55°C 反應 30 秒，共 60 循環

Step 3：95°C 反應 1 分鐘，共 1 循環

Step 4：55°C 反應 1 分鐘，共 1 循環

Step 5：55°C 反應 10 秒，共 81 循環

待反應結束後，系統會自動記錄並計算 Ct 值。

(2) 基因表現結果計算

本實驗不使用標準曲線，而是以相對定量法計算與空白組 (0 小時) 間基因表現量差異，本試驗以 β -actin 做為 housekeeping gene 做為組間之對照。計算時，假設反應效能 (efficiency) 為 100%，在此條件下 cDNA 產物會以 2^n 增加，得結果並透過以下公式計算基因相對表現量：

$$A. \text{ 相對表現量} = 2(-\Delta\Delta Ct)$$

$$B. \Delta Ct = Ct_{(\text{處理組基因})} - Ct_{(\text{housekeeping gene})}$$

$$C. \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{處理組基因})} - \Delta Ct_{(\text{空白組基因})}$$

第十二節 巨噬細胞株 RAW 264.7 細胞培養

【材料】

(1) 試劑：

- 70% ethanol：取 740 mL 之 95% 酒精以去離子水定量至 1 L。
- 細胞培養液：含 10 % FBS 之 89% High-glucose DMEM medium。

(2) 器材

- 載玻片 76 × 20 mm 購自 KIMBLE (Gerresheimer group, USA)

- 0.1 mm deep 細胞計數器購自 Reichert Inc (NY, USA)
- 液態氮筒 HC-34 購自有立 (Taylor Wharton, AL, USA)



【方法】

(1) 細胞解凍：

將 RAW 264.7 小鼠腹腔細胞株保存管自液態氮統中取出，以 37°C 水浴迅速解凍細胞後，移至無菌操作台中，吸出細胞液加入含 9 mL ice-cold PBS 緩衝液中，以 1,500 rpm 離心 5 分鐘。倒掉上液後，拍散細胞並以 10 mL 回溫之 medium 回溶細胞後，吸出細胞液移至 10 公分培養皿，並將培養皿置於培養箱中，以 37°C、5% CO₂ 為培養條件。

(2) 細胞繼代：

待 RAW 264.7 細胞生長至九分滿盤，將培養皿移至無菌操作台中，吸去培養液後，取 10 mL 回溫之 PBS 緩衝液清洗殘於培養液後，加入 1-2 mL trypsin 於培養皿，置於生長箱 1 分鐘。吸去部份 trypsin 後，輕拍培養皿使細胞脫落，接著加入 9 mL 培養液中中止 trypsin 反應。將細胞液全數吸出至 15 mL 離心管中，以 1,500 rpm 離心 5 分鐘。倒掉上液後，拍散細胞並以 10 mL 回溫之 medium 回溶細胞後，吸出細胞液分別移至兩個 10 公分培養皿，並補滿培養液至 10 mL。將培養皿置於培養箱中，以 37°C、5% CO₂ 為培養條件。

第十三節 共同免疫沉澱法 (Co-immunoprecipitation)

【材料】

(1) 抗體：

- Anti-FIP-five (D1 株)：由實驗室前人製備。

- Purified anti-mouse MHC Class I (H-2), Purified Rat IgG2a (κ isotype ctrl antibody), Purified Rat IgG2b (κ isotype ctrl antibody) 購自 BioLegend
- Anti-Mouse MHC Class II (I-A/I-E) Purified 購自 ebioscience

(2) 試劑：

- Non-denature lysis buffer：參考 current protocols 配方，配置 50 mM Tris-Base、300 mM NaCl、1% Triton X-100，並以 HCl 調整至 pH7.4。
- Wash buffer：取 0.5% Tween-20 於 PBS 緩衝液中，混勻後置冰使用。
- Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free 購自 Calbiochem
- ProteoExtract™ native membrane protein extraction kit 購自 EMD Millipore (MA, USA)

(3) 器材


- Magna GriP™ Rack (8 well) 購自 EMD Millipore (MA, USA)
- Protein G Mag Sepharose Xtra 購自 GE Healthcare (UK)
- Rotator/Mixer RM-2 購自 ELMI Ltd. (Latvia)

【方法】

(1) 細胞破碎液與膜蛋白製備

細胞破碎液為 Co-IP MHC class I 和 MHC class II 時所用。首先，取 500 μ L PBS 潤洗 RAW 264.7 細胞後吸出細胞液至 1.5 mL 微量離心管中，以 300 xg 離心 5 分鐘，吸去上清後拍散細胞，加入 500 μ L non-denature lysis buffer 和 5 μ L protease inhibitor 於 4°C 下震盪 30 分鐘。待破碎完成後，以最高轉速離心 10 分鐘，吸出上清即為細胞破碎液樣品。

膜蛋白則為 Co-IP TCR V α 及 TCR V β 時所用。首先，取出小鼠脾臟細胞後，將細胞回溶至 PBS 當中，調整濃度後取細胞至 2 mL 微量離心管中，使得細胞數量為每管 2.5×10^7 顆，接著以 300 xg 於 4°C 離心 10 分鐘。離



心完成後，小心去除上液，以 EMD Millipore 的 ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction 套組萃取膜蛋白。使用套組所附的 2 mL Wash Buffer 小心沖洗並彈散細胞團塊後，再次以 300 xg 離心 10 分鐘。小心去除上清後，加 10 μ L Protease Inhibitor Cocktail 至管壁，立刻加入 2 mL Buffer I 小心沖散團塊，以 Rotary Shaker 於 4°C 旋轉 10 分鐘。10 分鐘後，將微量離心管以 16,000 xg 於 4°C 離心 15 分鐘，仔細去除上清，此為胞內水溶性蛋白。再加入 2.5 μ L Protease Inhibitor Cocktail 於微量離心管管壁，立刻加入 0.5 mL Buffer II 小心沖散團塊，以 Rotary Shaker 於 4°C 旋轉 30 分鐘。30 分鐘後，以 16,000 xg 於 4°C 下離心 15 分鐘，取上清為 membrane fraction。後續要使用時，將 membrane fraction 濃縮至目標體積後，於 -20°C 冷凍保存待用。

(2) 共同免疫沉澱法

磁珠震盪混勻後，吸取 20 μ L 至 1.5 mL 微量離心管中，置於磁座並吸去保存液後，加入 500 μ L non-denature lysis buffer 潤洗磁珠，同樣置於磁座吸去液體，接著取 500 μ L 細胞破碎液於微量離心管中，於 4°C 混合 1 小時去除其與磁珠非專一性鍵結之蛋白。於磁座上吸出 pre-clear 之細胞液至新的微量離心管後，分別加入抗體、10 μ L 10% BSA 及 80 μ g FIP-*fve* 於 4°C 下混合一晚進行共同免疫沉澱。第二天，取 20 μ L 磁珠至新的微量離心管，並以 500 μ L non-denature lysis buffer 潤洗去上清後，將共同免疫沉澱完之樣品加入其中，在 4°C 下反應使抗體接上磁珠。一小時後，將微量離心管置於磁座上，吸去液體至新的離心管後，先以 500 μ L non-denature lysis buffer 潤洗磁珠一次，再以 Wash buffer 潤洗三次，仔細去除所有液體後，即可供後續實驗分析。



第十四節 統計分析

試驗中各個處理將進行三重複，且所有試驗進行兩次以上以確保試驗結果的再現性，並從中擇一表示且試驗數據以平均值 \pm SD 表示。試驗數據以統計軟體 SAS (statistics analysis system, SAS Institute Inc., USA) 進行 one-way ANOVA 組間差異分析 (least significant difference, LSD)，當兩組數據相同之機率若小於 0.001 ($p < 0.001$)，則表示此兩組數據彼此之間有顯著差異。



第四章 研究結果


第一節 重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 及 truncated rFIP-*fve* 14-114 選殖與純化

1.1. 金針菇免疫調節蛋白 FIP-*fve* 純化

將 1 kg 市售新鮮金針菇浸泡於萃取液一夜，第二天將之與萃取液一同均質後，收集上清液並加入 95% 飽和濃度硫酸銨，使蛋白沉澱。將米白色蛋白質沉澱脫鹽並以 CM-52 管柱進行層析。以 0-0.5 M NaCl 梯度流洗，可於 0.1-0.2 M NaCl 區間得蛋白質濃度波峰一，而大於 0.3 M NaCl 時可得蛋白質濃度波峰二 (Fig. 1A)。以 SDS-PAGE 分析脫鹽後全蛋白與兩蛋白質濃度波峰，結果顯示以硫酸銨沉澱取得之全蛋白主要有兩條帶，分別位於 10-17 kDa 以及 26-34 kDa 間。經 CM-52 管柱層析後，波峰一為單一蛋白質條帶，即是為分子量 12.7 kDa 的 FIP-*fve* (Fig. 1B)。此次純化 1 kg 新鮮金針菇，得約 60 mg 之 FIP-*fve* 蛋白。

1.2. 重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 及 truncated rFIP-*fve* 14-114 基因選殖

實驗室前人曾經純化融合蛋白 GST-*fve* 以取得全長及各片段缺失之重組蛋白 rFIP-*fve* (張, 2011)，然而融合蛋白 GST-tag 切除不易，尤其以 N 端未缺失者更難，因此建議更換載體生產重組蛋白。本論文實驗方法將載體更換為 His-tag 系統之 pET-32a(+), 期能純化出重組蛋白以利後續試驗進行。為得到與天然純化 FIP-*fve* 相似度最高之重組蛋白而不含多餘胺基酸，因此設計策略為 enterokinase 酵素切位後接上 *fve* 1-114 或 *fve* 14-114 基因，待生產重組蛋白時，即可利用 enterokinase 酵素切除前方含 His-tag 之蛋白，取得 rFIP-*fve* 1-114 等蛋白。選定切位為 *kpn* I 和 *Xho* I，設計專一性引子 (Fig. 2)，以前人留下已將 FIP-*fve* 基因全長構築於 pGEX4T-1 vector，轉形至大腸桿菌之菌株做為模板進行 colony PCR。



又因 *fve* 基因序列中亦含有 *kpn*I 切位，若直接將 PCR 產物與限制酶反應，因反應後 DNA 其大小與未切相差不大，無法透過 DNA 瓊脂膠體電泳純化，且若限制酶反應時間過久則 *fve* 基因亦被切斷，因此將 PCR 產物先進行 T-A cloning，轉入菌株後再從 pGM-T-*fve* 載體切下 *fve* 基因。

分別以 *fve* 1-114 forward primer + reverse primer 與 *fve* 14-114 forward primer + reverse primer 經 colony PCR 後，增殖出長度分別為 372 bp 之 *fve* 1-114 基因片段以及 333 bp 之 *fve* 14-114 基因片段 (Fig. 3)，接著以 T-A cloning ligation 方式分別接合基因於 pGM-T 載體上，並轉形至大腸桿菌 DH-5 α 中，透過藍白篩篩選白色菌株，將之小量培養於 5 mL LB 培養液後，送至生技公司定序。比對定序結果，選擇與理論序列相似度為 100% 之菌株小量培養，抽取 pGM-T-*fve* 1-114 以及 pGM-T-*fve* 14-114 質體後，先加入 *Xho*I 於 37°C 下反應 1 小時，再加入 *Kpn*I 反應 15 分鐘。反應完之產物經 DNA 膠體電泳分析，可於 372 bp 以及 333 bp 長度處看見經限制酶反應完之 *fve* 1-114 與 *fve* 14-114 基因片段，另外於約 290 bp 位置可見一被切下之 *fve* 基因碎片 (Fig. 4A)。另外將含有 pET-32a(+) 空質體之大腸桿菌小量培養後抽取質體，加入 *Xho*I 和 *Kpn*I 限制酶同時於 37°C 下反應 75 分鐘。以 DNA 膠體電泳分析限制酶切處理後之 pET-32a(+) 質體，可見限制酶切後質體長度變小 (Fig. 4B)。

將經限制酶反應完之 *fve* 1-114、*fve* 14-114 基因片段與 pET-32a(+) 質體自膠中純化出，並以 T4 ligase 將兩基因分別與質體接合，轉形至大腸桿菌 DH-5 α 中，隔天挑選菌株小量培養後，送至生技公司定序。比對序列無誤後，將質體抽出，轉形至大腸桿菌 BL-21 中，再次進行基因定序，挑選基因相似度為 100% 之菌株，置於 -80°C 保存。綜合以上結果，確認已將 FIP-*fve* 基因全長以及 FIP-*fve* N 端第 1-13 胺基酸片段缺失之基因成功選殖並構築於 pET-32a(+) 質體中，且已轉形至適合表現蛋白之大腸桿菌菌株 BL-21，可進行後續重組蛋白純化。

1.3. 重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 及 truncated rFIP-*fve* 14-114 表現與純化

為測試重組蛋白以 IPTG 誘導表現條件，將選殖成功之 rFIP-*fve* 1-114 菌株以 LB 培養液培養至吸光值達 0.6-0.8 後，加入最終濃度 0.4、0.6、0.8 以及 1 mM IPTG 誘導 3-6 小時後收菌。各條件皆取 3 mL 菌液離心，將菌塊加入 SDS sample dye 並以 99 °C 加熱，接著以 SDS-PAGE 以及西方轉漬法分析。由於 SDS-PAGE 分析結果顯示菌中蛋白多且複雜，無法直接判斷誘導條件，因此以 anti-FIP-*fve* 為偵測抗體進行西方轉漬法，可見於 26 kDa 有一明顯條帶，且在 4 小時之後條帶訊號增強，而各濃度表現上並無太大差異 (Fig. 5)。由此結果選擇以 IPTG 最終濃度 0.4 mM 誘導 4-6 小時。

取 rFIP-*fve* 1-114 菌株以上述條件培養，離心收集 1 L 菌液約可得 3 g 菌塊。將菌塊以 Hitrap IMAC binding buffer 回溶，並經超音波破碎後，通入 Hitrap IMAC 親和性管柱。第一階段以 15% elution buffer 流洗時可得波峰一，而第二階段 15-60% elution buffer 梯度流洗則可得波峰二 (Fig. 6A)。分析兩波峰組成，發現波峰二約 26 kDa 有一主要條帶，是為目標融合蛋白 (Fig. 6B)。以相同方法純化 His-FIP-*fve* 14-114，同樣可得兩個波峰 (Fig. 7A)，而經 SDS-PAGE 分析，His-FIP-*fve* 14-114 也位於約 26 kDa 位置 (Fig. 7B)。

濃縮並透析 His-FIP-*fve* 蛋白於 PBS 緩衝液中，加入 enterokinase 於 4°C 下反應切除 His-tag。His-FIP-*fve* 14-114 蛋白約兩天即可完成 His-tag 切除，而 His-FIP-*fve* 1-114 蛋白則較難將 His-tag 切下，因此需多兩天反應時間方可將大多數融合蛋白切除 His-tag。待 enterokinase 反應完成後，再次通過 Hitrap IMAC 管柱移除 His-tag，收集流洗液，即可得分子量大小約 12.7 kDa 之重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 以及預測分子量約 11.3 kDa 之片段缺失 rFIP-*fve* 14-114 蛋白 (Fig. 8)。

為證實純化所得重組蛋白之身分，首先以 anti-FIP-*fve* 抗體作為偵測抗體進行西方轉漬法，而由圖九中可見 lane 2 也就是 rFIP-*fve* 1-114 組別，可於 FIP-*fve* 位置辨認到一訊號，而 lane 3 rFIP-*fve* 1-114 組別則在低於 FIP-*fve* 位置可辨識到訊

號，而此與 SDS-PAGE 上所見蛋白條帶位置相符。另外，我們更進一步將兩蛋白條帶自 SDS-PAGE 切下並經膠體內水解後，送至美商沃特斯以 LC-MS/MS 鑒定胺基酸序列。胺基酸序列比對結果得知，rFIP-*fve* 1-114 比對到第一名為 *FVE_FLAVE*，也就是 FIP-*fve*，其覆蓋率 (coverage) 為 50%。而 rFIP-*fve* 14-114 同樣也比對到 *FVE_FLAVE*，其覆蓋率為 65% (Fig. 10)。於此，除了分子量證據外，亦可透過質譜分析再次證明純化出 rFIP-*fve* 1-114 與 rFIP-*fve* 14-114 蛋白。

第二節 重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 及 truncated rFIP-*fve* 14-114 於小鼠脾臟細胞之免疫活性

2.1. 片段缺失 rFIP-*fve* 14-114 刺激小鼠脾臟細胞分泌 IFN- γ 之能力較 rFIP-*fve* 1-114 弱

在前人研究中發現，FIP-*fve* 可作用於 CD4⁺ T 細胞，使其趨向 Th1 調節之免疫反應，並刺激小鼠脾臟細胞分泌 IFN- γ 。為了解兩重組蛋白之免疫活性，將小鼠脾臟細胞分別與 0-40 $\mu\text{g/mL}$ rFIP-*fve* 1-114 以及 rFIP-*fve* 14-114 共培養 72 小時，收集培養液後以 ELISA 套組分析 IFN- γ 含量。由圖十一可知，重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 可刺激小鼠脾臟細胞分泌 IFN- γ ，且在 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 時具有最好的效果，然 truncated rFIP-*fve* 14-114 僅可刺激小鼠脾臟細胞分泌少量的 IFN- γ ，因此認為 N 端第 1-13 胺基酸對於 FIP-*fve* 免疫活性非常重要。

2.2. rFIP-*fve* 14-114 無法刺激小鼠脾臟細胞 IFN- γ 和 IL-2 基因表現

1995 年 Ko 發現 FIP-*fve* 可提高小鼠脾細胞 IL-2 和 IFN- γ 基因轉錄表現 (Ko *et al.*, 1995)，另外也可促進 hPBMC 之 T-bet 表現 (胡, 2006)，進而誘導 Th1 相關免疫反應。為了解失去雙元體結構是否會影響 FIP-*fve* 刺激 Th1 相關基因表

現，取出小鼠脾臟細胞後分別與 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rFIP-*fve* 1-114 以及 rFIP-*fve* 14-114 共培養，並於 0、6、12、18 以及 24 小時收集細胞，統一抽取 RNA 後，將 RNA 反轉錄成 cDNA 保存，並使用專一性引子進行 real-time PCR 檢測基因表現量。由結果知 rFIP-*fve* 1-114 可刺激小鼠脾臟細胞 IFN- γ 基因轉錄表現，並於 24 小時提升為 0 小時之 2.6 倍 (Fig. 12A); 亦可刺激 IL-2 基因表現，於 18 及 24 小時表現量達 10 倍左右 (Fig. 12B)。然不管是 IFN- γ 還是 IL-2, rFIP-*fve* 14-114 都無法刺激其基因表現。

第三節 以共同免疫沉澱法探討 FIP-*fve* 之類超抗原特性

3.1. FIP-*fve* 與 MHC class II 具特異性結合力

將 RAW 264.7 細胞株活化並繼代數代後，以 non-denature lysis buffer 破碎並收取上清細胞液。上清細胞液先與 protein G 磁珠共培養去除非專一性鍵結，再加入抗體和 FIP-*fve* 與之共培養。分別以 anti-mouse MHC Class I (H-2)、Anti-Mouse MHC Class II (I-A/I-E) 以及 anti-FIP-*fve* 三種抗體與 FIP-*fve*、細胞破碎液共培養，若細胞破碎液中 MHC Class I 或 MHC Class II 與 FIP-*fve* 具交互作用，則可透過其專一性抗體以免疫聯結方式將兩者拉下，並利用西方轉漬法於 FIP-*fve* 位置觀察訊號。結果如圖十三，可見以 anti-FIP-*fve* 進行免疫沉澱，可於西方轉漬時在分子量 12.7 kDa 位置見到一訊號條帶，確認免疫沉澱與西方轉漬試驗條件適用。而以 MHC Class II 抗體與 FIP-*fve*、細胞破碎液進行共同免疫沉澱之組別，亦可於 12.7 kDa 位置見到 FIP-*fve* 訊號條帶，表示細胞破碎液中的細胞表面分子 MHC Class II 確實與 FIP-*fve* 具交互作用。

另外，共同免疫沉澱 MHC Class I 組雖亦可見結合 FIP-*fve* 之訊號，但在 MHC Class I 抗體的 Isotype IgG2a 組同樣也可見結合 FIP-*fve* 之訊號，兩者訊號強度相似，但都比 MHC Class II 組訊號弱 (Fig. 13)。




3.2. 無法得到 FIP-*fve* 與 TCR V 具交互作用之證據

自兩隻 BALB/c 小鼠將脾臟細胞取出後，以 EMD Millipore 的 ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction 套組萃取脾臟細胞膜蛋白，將萃出液濃縮，加入 FIP-*fve* 後分別與 anti-mouse TCR V α 以及 anti-FIP-*fve* 兩種抗體進行共同免疫沉澱。將 pull down 產物以 SDS-PAGE 依分子量分離後，轉印至膜上並分別以 anti-mouse TCR V α 以及 anti-FIP-*fve* 做為一抗進行西方轉漬。由圖十四可見，以 anti-FIP-*fve* 做為一抗，可以於 Co-IP anti-FIP-*fve* 組在 12.7 kDa 見到 FIP-*fve* 訊號，但卻無法於 Co-IP anti-mouse TCR V α 組見到其訊號；若是以 anti-mouse TCR V α 做為一抗進行西方轉漬，Co-IP anti-FIP-*fve* 組在並無得到 16 kDa 之 TCR V α 訊號。改以 anti-mouse TCR V β 進行上述實驗，則結果相似，無法得到 FIP-*fve* 與 TCR V β 具交互作用之證據 (Fig. 15)。

3.3. Co-IP 產物經 LC-MS/MS 分析與 FIP-*fve* 具交互作用之蛋白

由於上述試驗中，透過西方轉漬法分析 Co-IP pull down 產物之方法受限於 cell lysate 中目標分子含量多寡、抗體訊號干擾等問題，因此擬以 LC-MS/MS 分析比對 Co-IP 產物，以解決西方轉漬時遇到之限制。將 BALB/c 小鼠脾臟細胞取出後，混合並以 non-denature lysis buffer 破碎，將細胞液分為兩管，各別於細胞加入 FIP-*fve* 與 anti-FIP-*fve* 抗體進行共同免疫沉澱。隔日，以 Protein G Mag Sepharose 結合抗體後，藉由收集磁珠連同抗體與 Co-IP 產物一起拉下。取得磁珠後，其中一管以 SDS-PAGE 電泳後進行銀染，確認 Co-IP 效果。另一管加入 8 M urea 使抗體失去與磁珠鍵結後，接續以 in solution digestion 方式水解 Co-IP 產物，以利後續 LC-MS/MS 分析。

透過銀染結果，可看見在 12.7 kDa 處有明顯的 FIP-*fve* 條帶，因此確認實驗操作無誤；除此之外，因銀染染色極為靈敏，故染到許多蛋白質條帶，推測 FIP-*fve* 可能與小鼠脾臟細胞許多分子具有交互作用 (Fig. 16)。Co-IP 產物經 LC-



MS/MS 分析後，將結果以 MASCOT 軟體以 SwissProt 為資料庫，並設定比對物種為家鼠 (*Mus musculus*) 後進行比對。比對結果如圖十七，除了角蛋白 (keratin) 外，其他可能與 FIP-*fve* 具交互作用之分子有 Mediator of RNA polymerase II、Glutamate receptor ionotropic、StAR-related lipid transfer protein 等，然此結果並未比對到目標表面分子 MHC 或 TCR (Fig. 17)。

第五章 討論



第一節 重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 及 truncated rFIP-*fve* 14-114 蛋白純化探討

金針菇免疫調節蛋白 FIP-*fve* 是自金針菇子實體中萃取而得、分子量為 12.7 kDa 之蛋白。前人研究指出，金針菇免疫調節蛋白 FIP-*fve* 會刺激人類周邊血淋巴細胞和小鼠脾臟細胞中的 Th1 反應，並誘導 Th1 特異性的細胞激素 IFN- γ 產生。FIP-*fve* 由 β -strands、 β -turn 和 α -helices 組成，其 N 端相對 C 端較疏水；透過 X-ray 晶體繞射分析技術，進一步瞭解 FIP-*fve* 在自然中透過 N 端的 α -helices 以疏水性之非共價鍵結形成同型雙元體。在前人童曼華研究中指出 FIP-*fve* 極有可能以類超抗原方式與 APC 及 T 細胞結合，以達免疫調節功效 (童, 2008)，因此實驗室前人曾試著純化 N 端 α -helix 以及 β -strand 缺失之 FIP-*fve*，並透過測量其與小鼠脾臟細胞共培養後之上清 IFN- γ 含量，確認其類超抗原之活性；另外也透過螢光物質標定片段缺失蛋白，以了解 FIP-*fve* 與 APC、T 細胞之親和性，然自 GST 融合蛋白以 thrombin 酵素切除 GST-tag 並不容易，因此建議後人改以其他載體重新構築片段缺失 rFIP-*fve* (張, 2011)。


本試驗中以 pET-32a(+) 為表現載體，選殖並構築 FIP-*fve* 蛋白質全長基因以及第 1-13 胺基酸缺失 FIP-*fve* 基因於表現載體 (Fig. 2)，成功構築基因後，接續進行重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 以及片段缺失 rFIP-*fve* 14-114 之生產。先以 rFIP-*fve* 1-114 菌株測試條件，將誘導濃度定為 0.4 mM IPTG 並誘導 4-6 小時後 (Fig. 5)，開始大量生產重組蛋白。每次實驗自 3 L 菌液取得菌塊後，經純化約可得 10 mg His 融合蛋白，將融合蛋白透析至 PBS 緩衝液並加入 enterokinase 切除 His-tag，發現全長也就是 N 端未缺失的 His-FIP-*fve* 1-114 較不容易反應完全，需耗時多日才可將 His-tag 完全切除，此現象與前人張佑敏所見相同。又若是為求反應速率而

提升將溫度設定在 37 到 16°C 之間，則發現無法在 SDS-PAGE 分析時，見到 rFIP-*fve* 之蛋白條帶，懷疑溫度太高使 rFIP-*fve* 容易降解，或是菌液中含有蛋白分解酵素，高溫時提升了其水解蛋白反應速率，因此決定採用低溫長時之策略切除 His-tag。

經 2-4 天切除酵素後，跑膠確認可得分子量大小約 12.7 kDa 之重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 以及分子量約 11.3 kDa 之 rFIP-*fve* 14-114 缺失蛋白 (Fig. 8)，但也發現溶液中產生大量白色沉澱，而蛋白質濃度也遽降，推測是在 His-tag 前端有一增加水溶性之 Trx-tag 隨著 His-tag 同時被切下，因此 rFIP-*fve* 蛋白質水溶性降低，故產生白色蛋白沉澱。切除 His-tag 後，反應液理論上含有 His-tag、rFIP-*fve* 以及 enterokinase 酵素，曾透過 Hitrap 陰離子交換管柱進行二次純化試圖將三者分離，然切除 His-tag 後能取得之蛋白質總量約只有 3 mg，除了因二次純化而損耗部分蛋白外，Hitrap 陰離子交換管柱無法將三者完全分離，因此僅能得到少量高純度的 rFIP-*fve*。有了以上實驗結果，決定在切除 His-tag 後不經二次純化，而是去除白色沉澱後將含有 His-tag 和 rFIP-*fve* 的蛋白混合濃縮保存，並轉形一組不含 insert 基因之 pET-32a(+) 空質體於 BL-21 大腸桿菌表現菌株中，透過此菌株純化 His-tag 作為後續實驗之對照組，並確認 His-tag 並不影響免疫調節活性。

第二節 片段缺失 truncated rFIP-*fve* 14-114 蛋白功能探討

為確認各片段對 FIP-*fve* 免疫活性之影響，前人曾以 pGEX-2T 表現載體構築並純化 reFIP-*fve* 14-114、reFIP-*fve* 1-103、reFIP-*fve* 14-103、reFIP-*fve* 28-103 等四種片段缺失蛋白，發現失去 N 端 1-13 胺基酸使 reFIP-*fve* 14-114 凝血活性降低，但刺激人類淋巴球增生能力不變，而 reFIP-*fve* 1-103、reFIP-*fve* 14-103、reFIP-*fve* 28-103 刺激淋巴球增生能力降低甚至完全喪失 (柯，1995)。實驗室前人張佑敏也證實了 truncated *fve* 28-103 不具刺激小鼠脾臟細胞分泌 IFN- γ 能力外，亦無法結

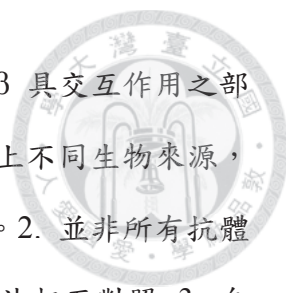


合小鼠腹腔巨噬細胞與小鼠脾臟中 T 細胞 (張, 2011)。為了更深入了解 FIP-*fve* 雙元體結構對其類超抗原活性之影響, 將前述純化所得 rFIP-*fve* 1-114 以及 rFIP-*fve* 14-114 與小鼠脾臟細胞共培養, 發現 rFIP-*fve* 14-114 刺激小鼠脾臟分泌 IFN- γ 之能力較 rFIP-*fve* 1-114 弱 (Fig. 11)。以 real-time PCR 技術分析其基因層級表現, 由圖十二可知 rFIP-*fve* 14-114 無法刺激小鼠脾臟細胞 IFN- γ 和 IL-2 mRNA 表現。除了文獻中指出 FIP-*fve* 可刺激小鼠脾細胞分泌 IFN- γ 並提高 IL-2 和 IFN- γ 基因轉錄表現外 (柯, 1995), 超抗原也會刺激 T 細胞增生而釋出 TNF- β 、IL-2 以及 IFN- γ (Pumphrey *et al.*, 2007)。本實驗中證實重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 具有與 native FIP-*fve* 相似的免疫調節能力, 但失去 N 端 α -helix 結構之 rFIP-*fve* 14-114 則失去免疫調節活性, 此結果與張 (2011) 實驗結果相符。

本試驗中構築 rFIP-*fve* 14-114 是為了去除 FIP-*fve* N 端之 α -helices 結構, 以使其失去雙元體結構。然而, 雖然取得了重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 以及片段缺失 rFIP-*fve* 14-114 蛋白, 且試驗證實 rFIP-*fve* 14-114 免疫活性較低, 但本試驗中尚未確認 rFIP-*fve* 1-114 是否保有雙元體結構, 或是 rFIP-*fve* 14-114 是否無法形成雙元體, 因此僅能說明 FIP-*fve* 蛋白之 N 端序列對其免疫活性是必要的。

第三節 FIP-*fve* 與表面分子親和性之探討


童 (2008) 於實驗中證實 FIP-*fve* 不需要抗原呈獻細胞加工, 只需在有經 paraformaldehyde 處理過之脾臟細胞做為抗原呈獻細胞的狀態下即可活化 T 細胞, 且可使 TCR V α 19 基因表現提升 6 倍; 又若使用 MHC class I 與 MHC class II 中和性抗體, 則可抑制由 FIP-*fve* 引起的 T 細胞增生與抗原呈獻細胞基因表現, 因此推測 FIP-*fve* 活化免疫機制與 MHC class I、MHC class II 有關, 且可能是透過與 TCR V α 19 連結而活化 T 細胞。為了探討 FIP-*fve* 與表面分子 MHC class I、MHC class II、TCR V α 及 TCR V β 之間的親和性, 潘 (2012) 透過共同免



疫沉澱法看到了 FIP-*fve* 與 MHC class II、TCR V α 及 TCR V β 具交互作用之部分證據，然共同免疫沉澱法受限於：1. 同株抗體需備有兩種以上不同生物來源，才能避免二抗結合共同免疫沉澱時所用抗體而造成的訊號誤判。2. 並非所有抗體皆適合使用於免疫沉澱法或西方轉漬法，因此只能有部分證據無法相互對照。3. 自細胞表面萃取膜蛋白需要超高速離心機才能分離，且含量少；若使用市面上所販售的套組，多以油性溶劑萃取膜蛋白，除了影響免疫沉澱反應外，SDS-PAGE 分析上也容易糊掉，看不見訊號。有鑑於此，本實驗決定透過共同免疫沉澱法將可能與 FIP-*fve* 具交互作用之表面分子沉澱下後，進一步將 pull down 產物透過 in solution digestion 後再以 LC-MS/MS 鑑定身分。

首先為證明本論文所使用之共同免疫沉澱條件可行，曾取小鼠脾臟細胞以 non-denature lysis buffer 破碎後，加入 FIP-*fve* 分別與 anti-mouse MHC Class I (H-2)、Anti-Mouse MHC Class II (I-A/I-E) 以及 anti-FIP-*fve* 三種抗體進行共同免疫沉澱，然無法於西方轉漬時得到 FIP-*fve* 與 MHC 具親和性之證據，推測是脾臟細胞中所含抗原呈獻細胞比例少。因此將 MHC 分子來源改為 RAW 264.7 小鼠巨噬細胞株，將之破碎後取其細胞破碎液，同樣依上述進行共同免疫沉澱，再以 anti-FIP-*fve* 抗體做為西方轉漬之一抗判斷 FIP-*fve* 對於 MHC Class I 與 MHC Class II 之親和性差異。由圖十三結果知，MHC Class II 確實與 FIP-*fve* 具有交互作用；另外，共同免疫沉澱 MHC Class I 組雖亦可見抓下 FIP-*fve* 之訊號，但在 MHC Class I 抗體的 Isotype IgG2a 組同樣也可見抓下 FIP-*fve* 之訊號，兩者訊號強度相似，但都比 MHC Class II 組訊號弱。推測可能是 FIP-*fve* 本身與 IgG2a 此種 Isotype 具有一定的結合力，而非對於 MHC Class I 分子有親和性。綜合以上結果，確認 MHC Class II 確實與 FIP-*fve* 具有交互作用，而 MHC Class I 則否，此研究結果與潘 (2012) 相符。尚未有文獻指出 FIP-*fve* 本身與 IgG2a 有結合力，因此未來這部分可再做進一步的探討。

在本論文中，不管是使用市售萃取膜蛋白套組或是參考 current protocol 配方



配成 non-denature lysis buffer 取得小鼠脾臟細胞破碎液，皆無法在 Co-IP 後西方轉漬時看到 TCR V α 及 TCR V β 和 FIP-*fve* 具有交互作用之證據 (Fig. 14, 15)，此部分與潘 (2012) 結果不盡相同。

另一方面，質譜分析 Co-IP 產物之結果於本試驗中未得到預期之結果，由圖十六結果看來，共同免疫沉澱細胞破碎液、FIP-*fve* 以及 anti-FIP-*fve* 抗體三者所得到的產物極多；本試驗採取的方式是將 Co-IP 總產物全數以 In-solution digestion 方式水解，原預想能比對到表面分子外，另外可得知小鼠脾臟細胞內尚與 FIP-*fve* 具交互作用之蛋白。然此次比對結果並無比對到表面分子 MHC 或 TCR (Fig. 17)，因此無法以質譜分析結果佐證前述試驗結果，亦無法解決本論文中未能取得 FIP-*fve* 與 TCR 具交互作用結果，因此對於 TCR 與 FIP-*fve* 之親和性，目前僅有潘 (2012) 之部份證據顯示 TCR V α 及 TCR V β 皆與 FIP-*fve* 具交互作用。



第六章 結論與未來展望

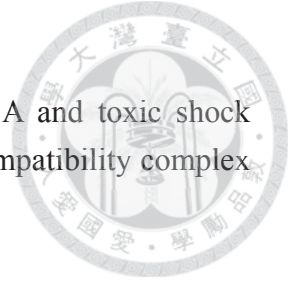
為探討 FIP-*fve* 雙元體結構對其免疫調節活性影響，以及得到更確切 FIP-*fve* 為超抗原之證據，前人曾以 GST 系統純化 truncated *fve*，也曾利用共同免疫沉澱法探討 FIP-*fve* 與表面分子之交互作用。本實驗基於前人經驗，將重組蛋白 rFIP-*fve* 1-114 及片段缺失 rFIP-*fve* 14-114 蛋白基因改為構築於 pET-32a(+) 質體，成功純化出分子量為 12.7 kDa 之 rFIP-*fve* 1-114 以及 11.3 kDa 之 rFIP-*fve* 14-114，並透過細胞免疫活性測試，確認 rFIP-*fve* 14-114 不具有免疫調節活性，但因重組蛋白純化效率不高且易降解，尚未進行更全盤的免疫活性確認，因此此部分還需後人補足。考量到生產效率、enterokinase 酵素昂貴等因素，建議後人重新構築基因於不含 tag 之質體，直接從表現菌中取得重組蛋白及片段缺失 *fve*，並透過陰陽離子交換樹脂純化之；或是不構築片段缺失 *fve* 而是透過點突變方式變更 N 端疏水性胺基酸，進而達到使蛋白質失去雙元體結合功能之目的，卻又不改變胺基酸序列長度。另外，本試驗尚未確認 rFIP-*fve* 1-114 和 rFIP-*fve* 14-114 是否為雙元體結構，建議後人可以 Gel Filtration 管柱確認其分子量，或以 Native PAGE 確認條帶位置，以取得重組蛋白為單元體或雙元體之證據。

為得到 FIP-*fve* 與抗原呈獻細胞和 T 細胞表面分子具交互作用之證據，本實驗將共同免疫沉澱後 pull down 產物以質譜比對，然此次實驗結果並無比對到表面分子 MHC 或 TCR。目前僅憑本試驗並綜合前人研究推斷 FIP-*fve* 是以類超抗原形式，透過與抗原呈獻細胞上表面分子 MHC class II 以及 T 細胞上 TCR V 結合，進而引發下游 T 細胞免疫反應。未來若對 FIP-*fve* 活化 T 細胞機制更深入的了解，則不論是在開發保健產品或是基礎科學的應用上有更好的掌握，也能有更廣的運用。

參考文獻



- 水野卓、川合正允。(1997)。菇類的化學、生化學。臺北市：國立編譯館。
- 葉怡真 (2006)。金針菇在醫學上的應用。食品工業，38 (5):11-24。
- 周凱松、薛久剛、張晗星、陳暢和張長鎧。(2003)。火菇素的分離純化及其分子量的測定。菌物學報，22 (2):259-263。
- 周凱松、彭俊峰、常甯、張晗星、宮峰和張長鎧。(2003)。火菇素提取新工藝及其生物活性測定。中國生物化學與分子生物學報，19 (2):234-239。
- 柯俊良。(1995)。由金針菇分離免疫調節功能蛋白質及分析其胺基酸序列與進行基因選殖和表現。國立台灣大學醫學院生化學研究所博士論文。臺北。
- 胡哲榮。(2006)。研究真菌類免疫調節蛋白質之免疫調節活性。中山醫學大學醫學分子毒理學研究所碩士論文，台中。
- 唐賽文。(1993)。真菌類免疫調節蛋白 FIP-*five* 作用機制之研究。國立台灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所碩士論文。臺北。
- 童曼華。(2008)。金針菇免疫調節蛋白 FVE 活化小鼠 T 淋巴細胞機制之研究。國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。臺北。
- 張佑敏。(2011)。製備片段缺失 *five* 蛋白及其功能分析。國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。臺北。
- 潘家弘。(2012)。FIP-*five* 類超抗原特性之探討。國立台灣大學園藝暨景觀學研究所碩士論文。臺北。
- 劉育靈。(2013)。金針菇免疫調節蛋白 FIP-*five* 生物可及性之研究。國立台灣大學園藝暨景觀學研究所碩士論文。臺北。
- Baker, M. D., and Acharya, K. R. (2004). Superantigens: structure-function relationships. *Int J Med Microbiol*, 293(7-8):529-537.



Bavari, S., and Ulrich, R. G. (1995). Staphylococcal enterotoxin A and toxic shock syndrome toxin compete with CD4 for human major histocompatibility complex class II binding. *Infect Immun*, 63(2):423-429.

Bernheimer, A. W., and Oppenheim, J. D. (1987). Some Properties of Flammutoxin from the Edible Mushroom *Flammulina-Velutipes*. *Toxicon*, 25(11):1145-1152.

Chang, H. H., Hsieh, K. Y., Yeh, C. H., Tu, Y. P., and Sheu, F. (2010). Oral administration of an Enoki mushroom protein FVE activates innate and adaptive immunity and induces anti-tumor activity against murine hepatocellular carcinoma. *Int Immunopharmacol*, 10(2):239-246.

Ding, Y., Seow, S. V., Huang, C. H., Liew, L. M., Lim, Y. C., Kuo, I. C., and Chua, K. Y. (2009). Coadministration of the fungal immunomodulatory protein FIP-Fve and a tumour-associated antigen enhanced antitumour immunity. *Immunology*, 128(1 Suppl):e881-894.

Fraser, J. D., and Proft, T. (2008). The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev*, 225:226-243.

Hakansson, M., Petersson, K., Nilsson, H., Forsberg, G., Bjork, P., Antonsson, P., and Svensson, L. A. (2000). The crystal structure of staphylococcal enterotoxin H: implications for binding properties to MHC class II and TcR molecules. *J Mol Biol*, 302(3):527-537.

Hsieh, C. W., Lan, J. L., Meng, Q., Cheng, Y. W., Huang, H. M., and Tsai, J. J. (2007). Eosinophil apoptosis induced by fungal immunomodulatory peptide-fve via reducing IL-5alpha receptor. *J Formos Med Assoc*, 106(1):36-43.

Hsieh, K. Y., Hsu, C. I., Lin, J. Y., Tsai, C. C., and Lin, R. H. (2003). Oral administration of an edible-mushroom-derived protein inhibits the development of food-allergic reactions in mice. *Clin Exp Allergy*, 33(11):1595-1602.

Ikekawa, T., Ikeda, Y., Yoshioka, Y., Nakanishi, K., Yokoyama, E., and Yamazaki, E. (1982). Studies on antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing.II. The structure of EA3 and further purification of EA5. *J*

Pharmacobiodyn., 5(8):576-581.

Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M., and Fukuoka, F. (1969). Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Res*, 29(3):734-735.

Ikekawa, T., Yoshioka, Y., Emori, M., Sano, T., and Fukuoka, F. (1973). Studies on the antitumor activity of polysaccharides from *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. *Cancer Chemother Rep*, 57(1):85-86.

Kamasuka, T., Momoki, Y., and Sakai, S. (1968). Antitumor Activity of Polysaccharide Fractions Prepared from Some Strains of Basidiomycetes. *Gann*, 59(5):443-&.

Kino, K., Yamashita, A., Yamaoka, K., Watanabe, J., Tanaka, S., Ko, K., Shimizu, K., and Tsunoo, H. (1989). Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidium*. *J Biol Chem*, 264(1):472-478.

Ko, J. L., Hsu, C. I., Lin, R. H., Kao, C. L., and Lin, J. Y. (1995). A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *Eur J Biochem*, 228(2):244-249.

Ko, J. L., Lin, S. J., Hsu, C. I., Kao, C. L., and Lin, J. Y. (1997). Molecular cloning and expression of a fungal immunomodulatory protein, FIP-fve, from *Flammulina velutipes*. *J Formos Med Assoc*, 96(7):517-524.

Ko, W. C., Liu, W. C., Tsang, Y. T., and Hsieh, C. W. (2007). Kinetics of winter mushrooms (*Flammulina velutipes*) microstructure and quality changes during thermal processing. *Journal of Food Engineering*, 81(3):587-598.

Komatsu, N., Terakawa, H., Nakanishi, K., and Watanabe, Y. (1963). Flammunlin, a basic protein of *Flammulina velutipes* with antitumor activities. *J Antibiot (Tokyo)*, 16:139-143.

Lin, J. L., Wu, H. L., and Shi, G. Y. (1975). Toxicity of the cardiotoxic protein, flammutoxin, isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Toxicon*, 13(5):323-326.



Lin, J. Y., Jeng, T. W., Chen, C. C., Shi, G. Y., and Tung, T. C. (1973). Isolation of a new cardiotoxic protein from the edible mushroom, *Volvariella volvacea*. *Nature*, 246(5434):524-525.

Lin, J. Y., Lin, Y. J., Chen, C. C., Wu, H. L., Shi, G. Y., and Jeng, T. W. (1974). Cardiotoxic protein from edible mushroom. *Nature*, 252:235-237.

Lin, W. H., Hung, C. H., Hsu, C. I., and Lin, J. Y. (1997). Dimerization of the N-terminal amphipathic alpha-helix domain of the fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* (Fip-gts) defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 272(32):20044-20048.

Liu, Y. F., Chang, S. H., Sun, H. L., Chang, Y. C., Hsin, I. L., Lue, K. H., and Ko, J. L. (2012). IFN-gamma induction on carbohydrate binding module of fungal immunomodulatory protein in human peripheral mononuclear cells. *J Agric Food Chem*, 60(19):4914-4922.

Ohkuma, T., Otagiri, K., Ikekawa, T., and Tanaka, S. (1982). Augmentation of antitumor activity by combined cryo-destruction of sarcoma 180 and protein-bound polysaccharide, EA6, isolated from *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. in ICR mice. *J Pharmacobiodyn*, 5(6):439-444.

Otagiri, K., Ohkuma, T., Ikekawa, T., and Tanaka, S. (1983). Intensification of antitumor-immunity by protein-bound polysaccharide, EA6, derived from *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. combined with murine leukemia L1210 vaccine in animal experiments. *J Pharmacobiodyn*, 6(2):96-104.

Ou, C. C., Hsiao, Y. M., Wang, W. H., Ko, J. L., and Lin, M. Y. (2009). Stability of fungal immunomodulatory protein, FIP-gts and FIP-fve, in IFN- γ production. *Food and Agricultural Immunology*, 20(4):319-332.

Paaventhana, P., Joseph, J. S., Seow, S. V., Vaday, S., Robinson, H., Chua, K. Y., and Kolatkar, P. R. (2003). A 1.7 Å Structure of Fve, a Member of the New Fungal Immunomodulatory Protein Family. *J Mol Biol*, 332(2):461-470.

Proft, T., and Fraser, J. D. (2003). Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol*, 133:299–



- Pumphrey, N., Vuidepot, A., Jakobsen, B., Forsberg, G., Walse, B., and Lindkvist-Petersson, K. (2007). Cutting edge: Evidence of direct TCR alpha-chain interaction with superantigen. *J Immunol*, 179:2700-2704.
- Seow, S. V., Kuo, I. C., Paaventhana, P., Kolatkar, P. R., and Chua, K. Y. (2003). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on the fungal immunomodulatory protein Fve from the golden needle mushroom (*Flammulina velutipes*). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59(Pt 8):1487-1489.
- Smiderle, F. R., Carbonero, E. R., Sasaki, G. L., Gorin, P. A. J., and Iacomini, M. (2008). Characterization of a heterogalactan: Some nutritional values of the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Food Chemistry*, 108(1):329-333.
- Swaminathan, S., Furey, W., Pletcher, J., and Sax, M. (1992). Crystal-Structure of Staphylococcal Enterotoxin-B, a Superantigen. *Nature*, 359(6398):801-806.
- Tomita, T., Ishikawa, D., Noguchi, T., Katayama, E., and Hashimoto, Y. (1998). Assembly of flammutoxin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Flammulina velutipes*, into a pore-forming ring-shaped oligomer on the target cell. *Biochem. J.*, 333:129-137.
- Tomita, T., Mizumachi, Y., Chong, K., Ogawa, K., Konishi, N., Sugawara-Tomita, N., Dohmae, N., Hashimoto, Y., and Takio, K. (2004). Protein sequence analysis, cloning, and expression of flammutoxin, a pore-forming cytolysin from *Flammulina velutipes*. Maturation of dimeric precursor to monomeric active form by carboxyl-terminal truncation. *J Biol Chem*, 279(52):54161-54172.
- Tong, M. H., Chien, P. J., Chang, H. H., Tsai, M. J., and Sheu, F. (2008). High processing tolerances of immunomodulatory proteins in Enoki and Reishi mushrooms. *J Agric Food Chem*, 56(9):3160-3166.
- Wang, H. X., and Ng, T. B. (2000). Flammulin: a novel ribosome-inactivating protein from fruiting bodies of the winter mushroom *Flammulina velutipes*. *Biochem Cell Biol*, 78(6):699-702.

Wang, P. H., Hsu, C. I., Tang, S. C., Huang, Y. L., Lin, J. Y., and Ko, J. L. (2004). Fungal immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes* induces interferon-gamma production through p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Agric Food Chem*, 52(9):2721-2725.

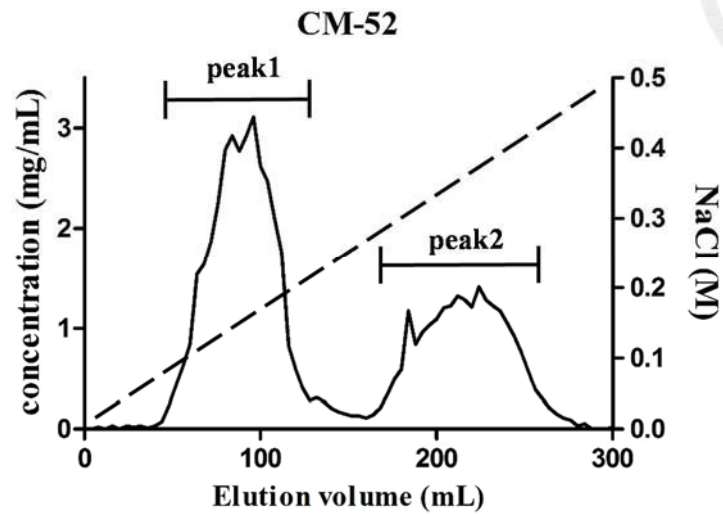
Watanabe, H., Narai, A., and Shimizu, M. (1999). Purification and cDNA cloning of a protein derived from *Flammulina velutipes* that increases the permeability of the intestinal Caco-2 cell monolayer. *European Journal of Biochemistry*, 262(3):850-857.

Yoshioka, Y. , Sano, T. , and Ikekawa, T. (1973). Studies on antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. I. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 21(8):1772-1176.

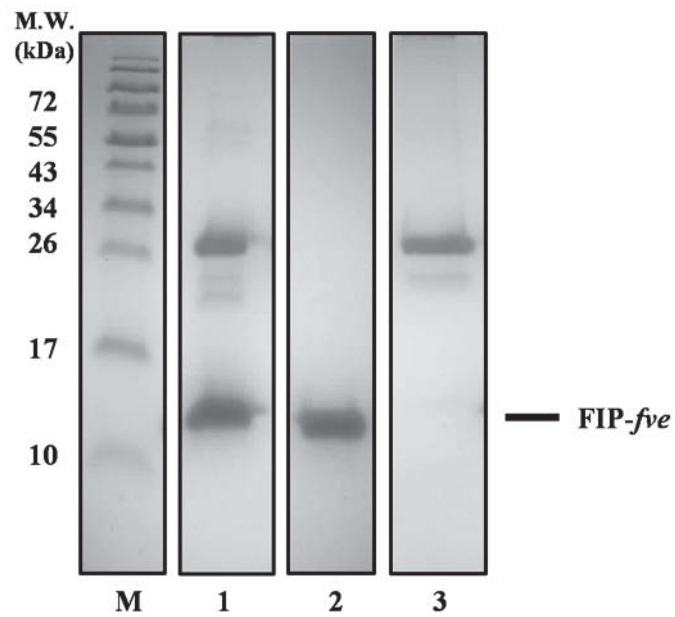
Zhang, H., Gong, F., Feng, Y., and Zhang, C. (1999). Flammulin Purified from the Fruit Bodies of *Flammulina velutipes* (Curt.:Fr.) P.Karst. 1(1):89-92.



(A)



(B)

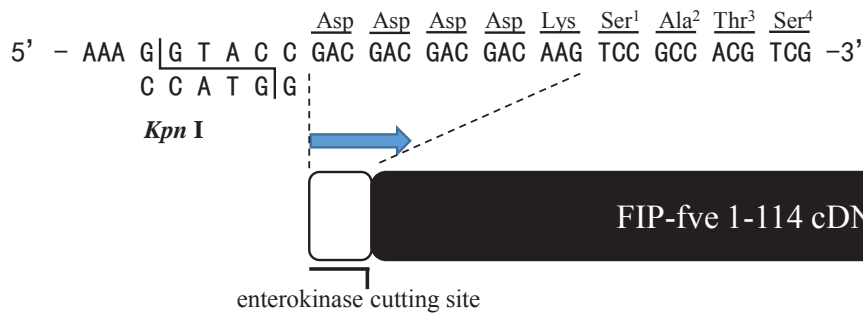


圖一、金針菇免疫調節蛋白 FIP-*fve* 之純化

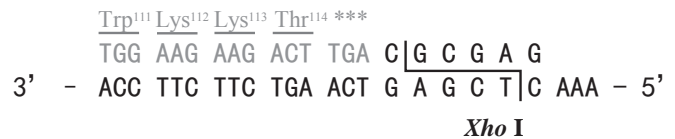
Figure 1. The purification of FIP-*fve* from *F. velutipes*.

(A) The elution profile of FIP-*fve* using CM-52 chromatography. (B) SDS-PAGE analysis of total protein (lane 1), peak 1 (lane 2), peak 2 (lane 3), and molecular weight marker (lane M).

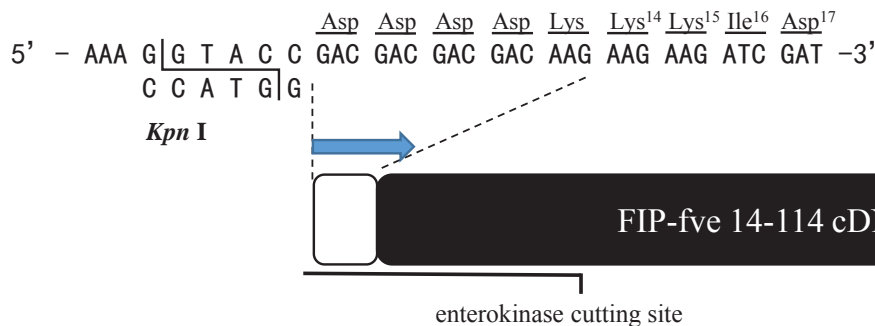
fve 1-114 forward primer



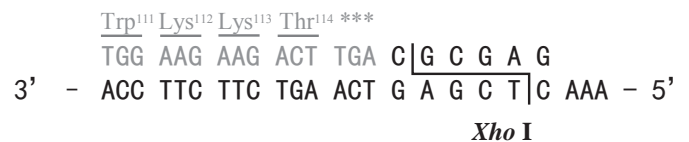
fve 1-114 reverse primer



fve 14-114 forward primer

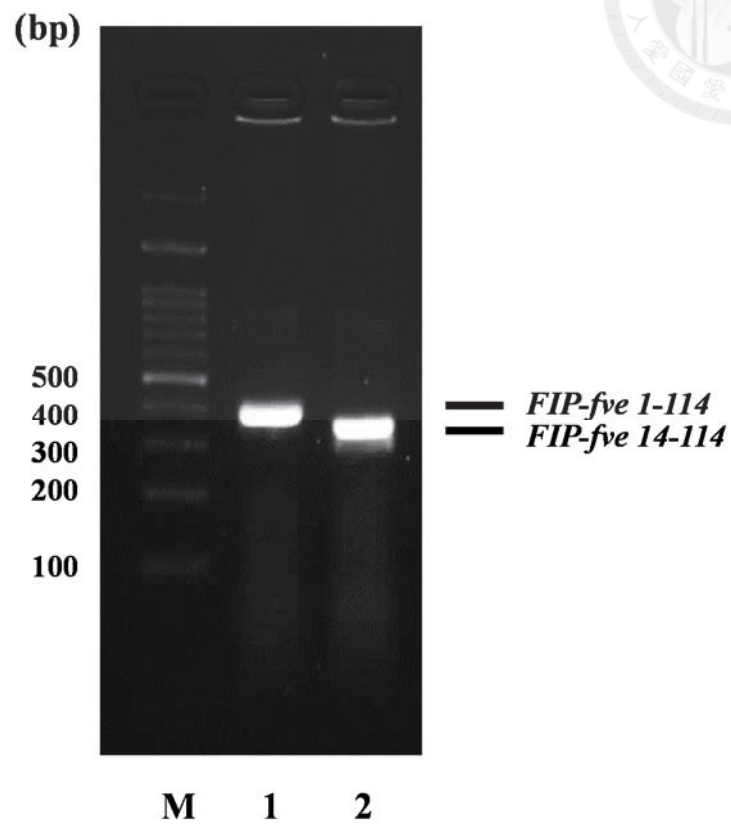


fve 14-114 reverse primer



圖二、構築 pET-32a(+)-fve 1-114 及 pET-32a(+)-fve 14-114 表現載體

Figure 2. Construction of pET-32a(+)-fve 1-114 and pET-32a(+)-fve 14-114 expression vector.



圖三、*fve 1-114* 與 *fve 14-114* 引子擴增 DNA 產物電泳圖

Figure 3. Products of PCR with *fve 1-114* primers and *fve 14-114* primers.

Lane M: 100 bp DNA marker, lane 1: Product of PCR with *fve 1-114* primers, lane 2:

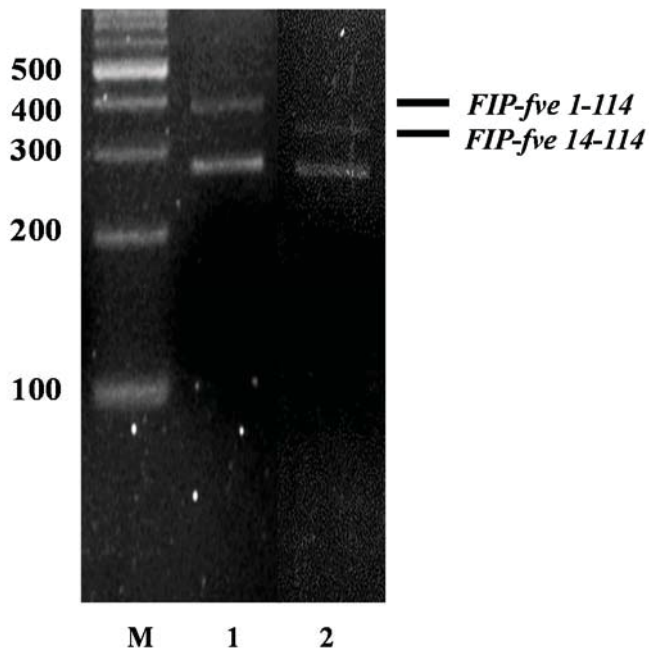
Product of PCR with *fve 14-114* primers.

(A)

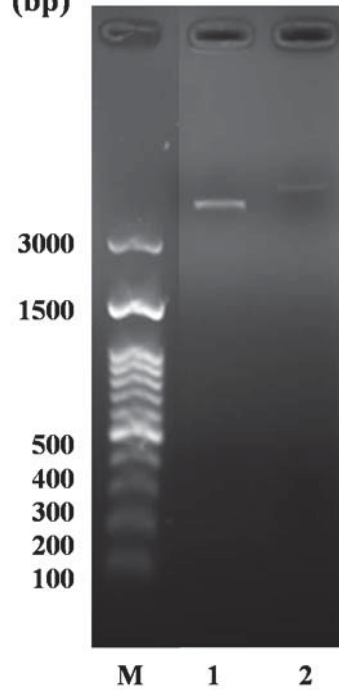
(B)



(bp)



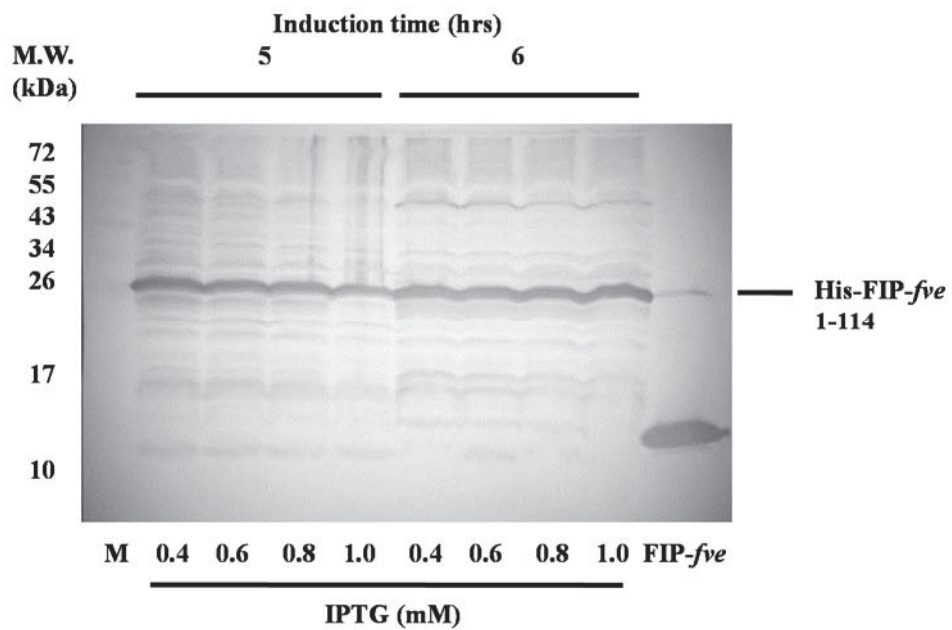
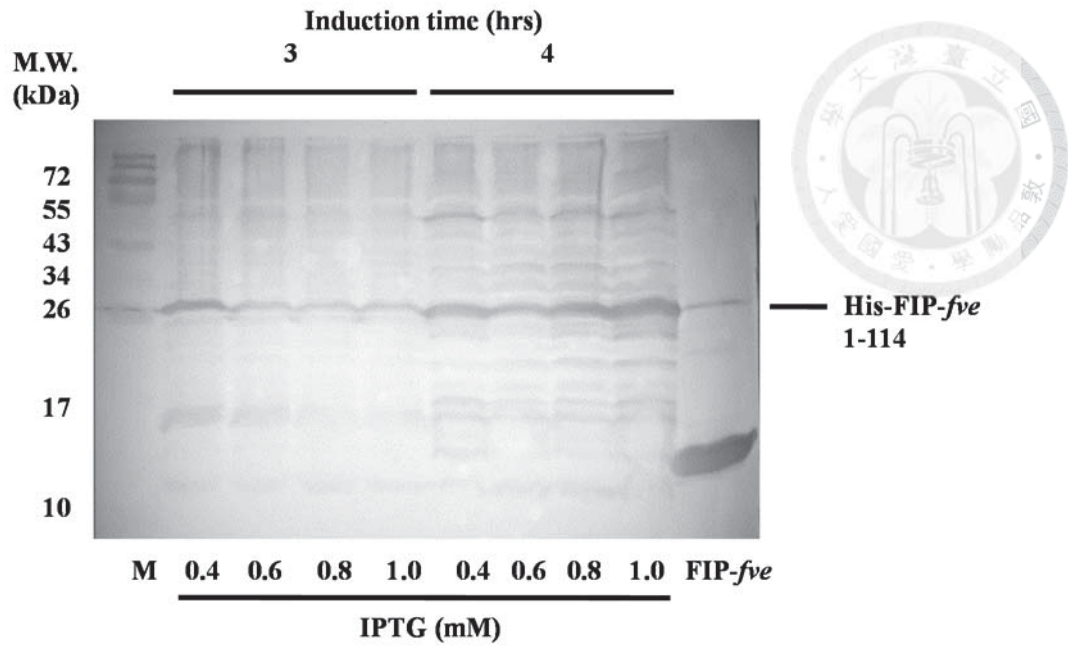
(bp)



圖四、pGM-T-*fve 1-114*、pGM-T-*fve 14-114* 與 pET-32a(+) 限制酶反應產物

Figure 4. Products of pGM-T-*fve 1-114*、pGM-T-*fve 14-114*, and pET-32a(+) after digesting with restriction enzymes.

(A) Lane M: 100 bp DNA marker, lane 1: *Kpn I/Xho I* double digested pGM-T-*fve 1-114*, lane 2: *Kpn I/Xho I* double digested pGM-T-*fve 14-114*. (B) Lane M: 100 bp DNA marker, lane 1: *Kpn I/Xho I* double digested pET-32a(+) vector, lane 2: pET-32a(+) vector.

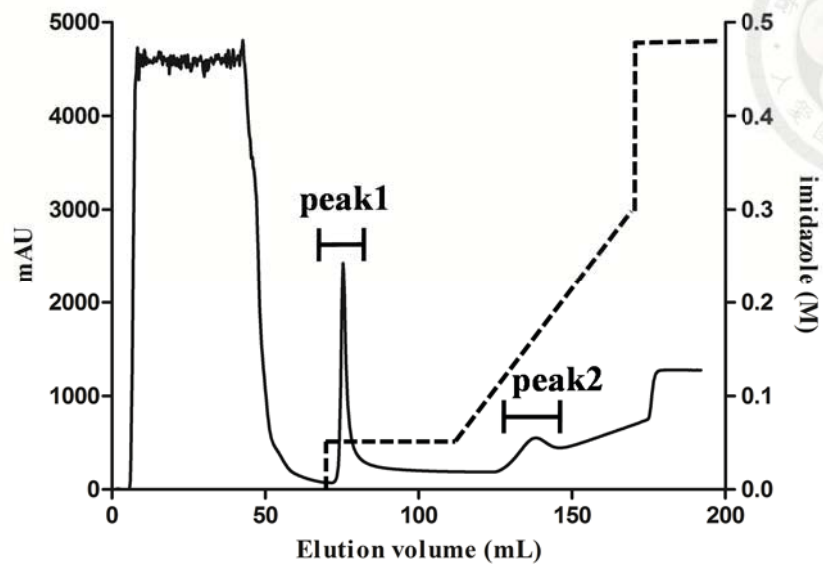


圖五、生產 His-FIP-fve 1-114 最佳誘導時間與濃度之西方轉漬結果

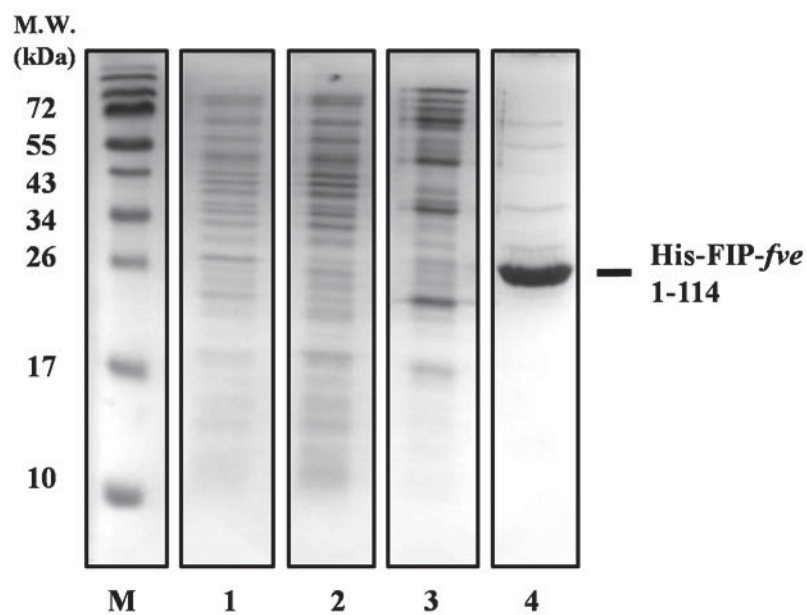
Figure 5. Western blotting of expression of His-FIP-fve 1-114 with different incubation time and IPTG concentration.

His-FIP-fve 1-114 expression of 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mM IPTG at different time points (3-6 hours). Anti-FIP-fve antibody was used as detection antibody.

(A)



(B)



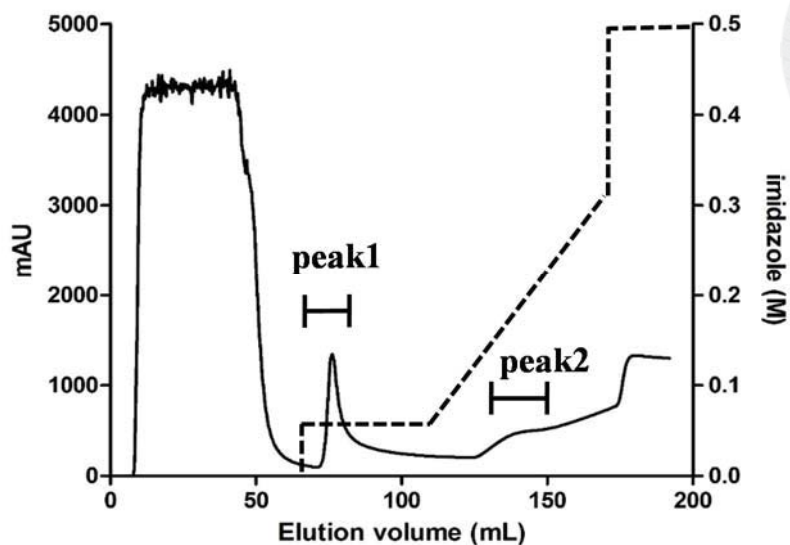
圖六、重組蛋白 His-FIP-fve 1-114 之純化

Figure 6. The purification of His-FIP-fve 1-114.

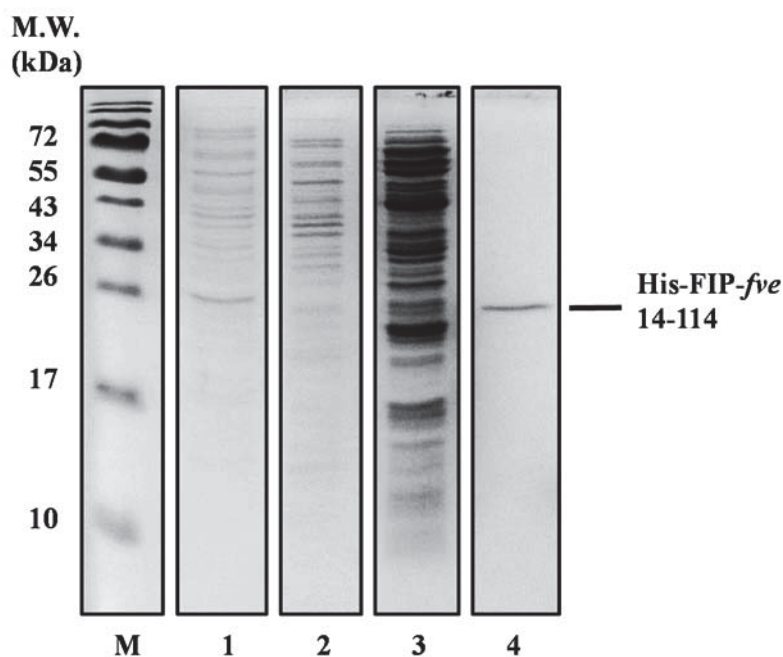
(A) The elution profile of His-FIP-fve 1-114 using Hitrap IMAC FF chromatography. (B) SDS-PAGE analysis of total protein (lane 1), unbound fraction (lane 2), peak 1 (lane 3), peak 2 (lane 4), and molecular weight marker (lane M).



(A)



(B)

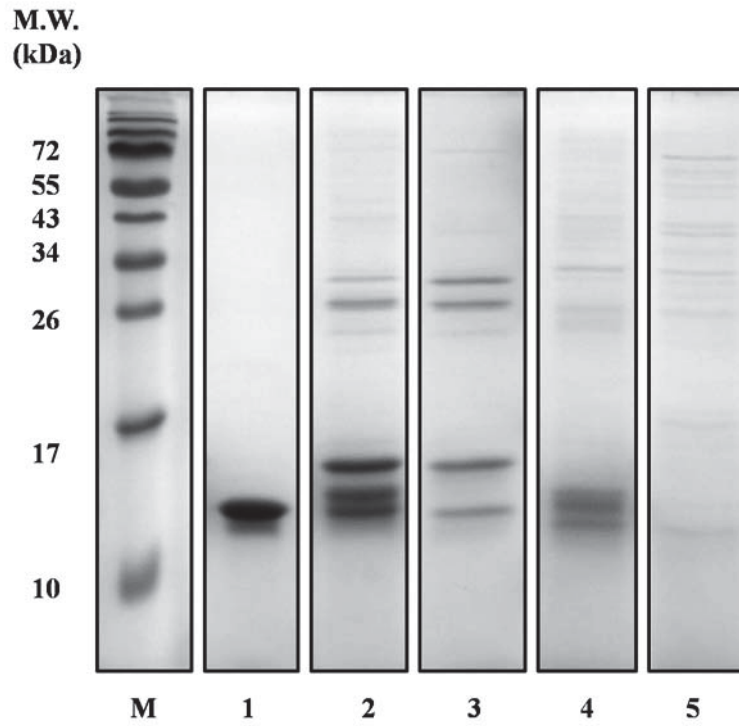


圖七、重組蛋白 His-FIP-*fve* 14-114 之純化

Figure 7. The purification of His-FIP-*fve* 14-114.

(A) The elution profile of His-FIP-*fve* 14-114 using Hitrap IMAC FF chromatography.

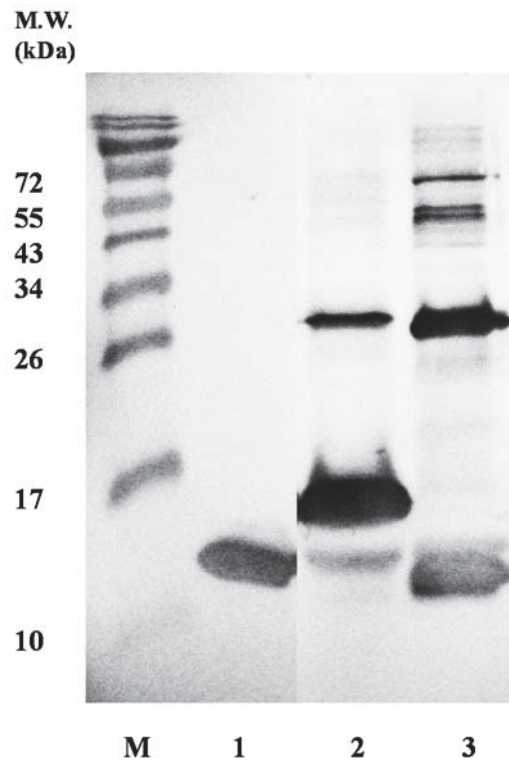
(B) SDS-PAGE analysis of total protein (lane 1), unbound fraction (lane 2), peak 1 (lane 3), peak 2 (lane 4), and molecular weight marker (lane M).



圖八、以 enterokinase 切除 His-FIP-*fve* 1-114 及 His-FIP-*fve* 14-114 之 His-tag 產物分析

Figure 8. Cleavage of fusion His-tag from His-FIP-*fve* 1-114 and His-FIP-*fve* 14-114 by enterokinase.

SDS-PAGE analysis of FIP-*fve* (lane 1), His-FIP-*fve* 1-114 after enterokinase digestion for 4 days (lane 2) and further purified using Hitrap IMAC FF column (lane 3), His-FIP-*fve* 14-114 after enterokinase digestion for 2 days (lane 4) and further purified using Hitrap IMAC FF column (lane 5).



圖九、rFIP-*fve* 1-114 以及 rFIP-*fve* 14-114 之西方轉漬分析

Figure 9. Western blotting analysis of rFIP-*fve* 1-114 and rFIP-*fve* 14-114.

Lane 1: FIP-*fve* (0.25 mg/mL), lane 2: rFIP-*fve* 1-114 (0.5 mg/mL), lane 3: rFIP-*fve* 14-114 (0.5 mg/mL), lane M : molecular weight marker, using anti-FIP-*fve* antibody as detection antibody.



(A) rFIP-*fve* 1-114

▼1		FVE_FLAVE		392 Immunomodulatory protein FIP-Fve OS=Flammulina velutipes PE=1 SV=1			
		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI	
1.1		392	12696	13 (12)	6 (6)	2.70	Immunomodulatory protein FIP-Fve OS=Flammulina velutipes PE=1 SV=1

Variable modifications: Carbamidomethyl (C),Carboxymethyl (C),Acetyl (N-term)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 50%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 **SATSLTFQLA YLVKKIDFDY TPNWGRGTPS SYIDNLTFPK VLTDKKYSYR**
51 VVNGSDLGV ESNFAVTPSG GQTINFLQYN KGYGVADTKT IQVFVVIPDT
101 GNSEYYIIAE WKKT

(B) rFIP-*fve* 14-114

▼2		FVE_FLAVE		381 Immunomodulatory protein FIP-Fve OS=Flammulina velutipes PE=1 SV=1			
		Score	Mass	Matches	Sequences	emPAI	
2.1		381	12696	12 (11)	6 (6)	3.40	Immunomodulatory protein FIP-Fve OS=Flammulina velutipes PE=1 SV=1

Variable modifications: Carbamidomethyl (C),Carboxymethyl (C),Acetyl (N-term)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 65%

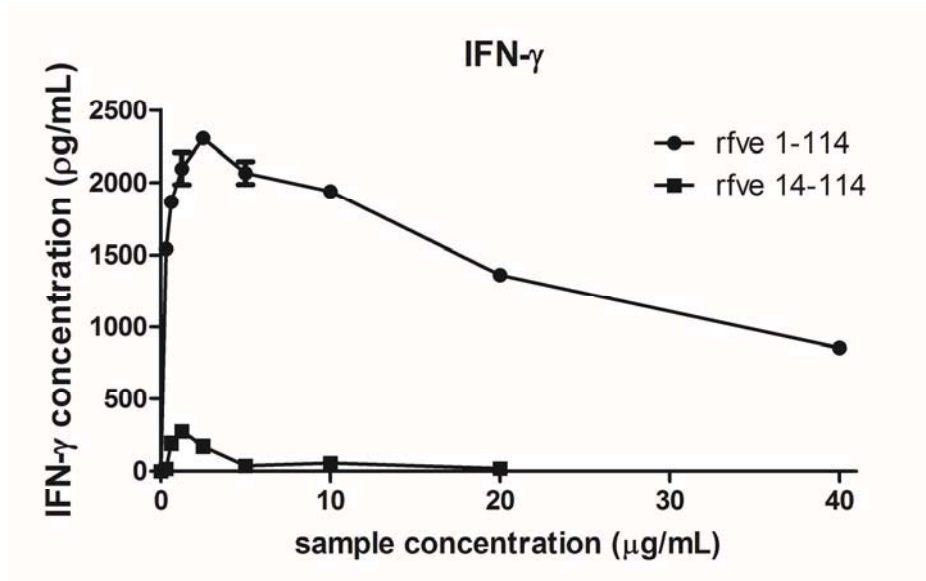
Matched peptides shown in **Bold Red**

1 **SATSLTFQLA YLVKKIDFDY TPNWGRGTPS SYIDNLTFPK VLTDKKYSYR**
51 **VVNGSDLGV ESNFAVTPSG GQTINFLQYN KGYGVADTKT** IQVFVVIPDT
101 GNSEYYIIAE WKKT

圖十、rFIP-*fve* 1-114 以及 rFIP-*fve* 14-114 質譜分析蛋白序列比對結果

Figure 10. Protein sequencing results of rFIP-*fve* 1-114 and rFIP-*fve* 14-114 by mass spectrometry.

The protein sequencing results of rFIP-*fve* 1-114 (A) and rFIP-*fve* 14-114 (B), mated peptides were shown in Bold Red.



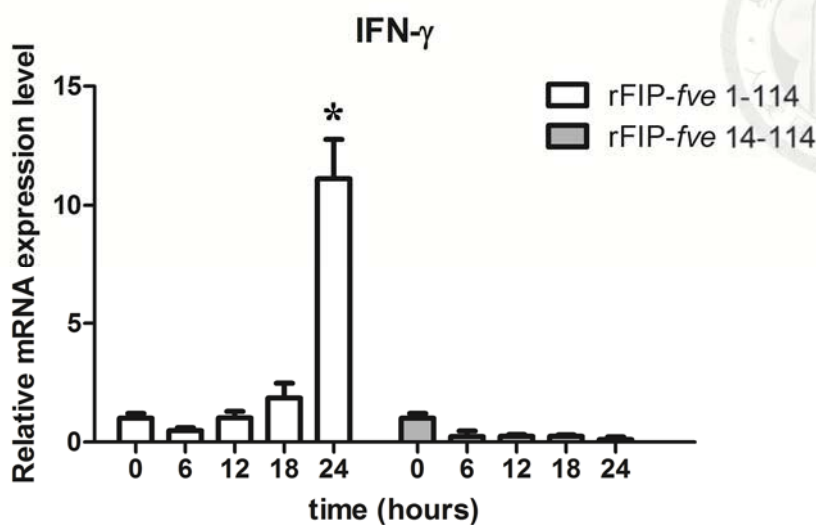
圖十一、rFIP-*fve* 1-114 以及 rFIP-*fve* 14-114 刺激小鼠脾臟細胞分泌 IFN- γ 之效果

Figure 11. Activity of rFIP-*fve* 1-114 and rFIP-*fve* 14-114 on the IFN- γ production of murine splenocytes.

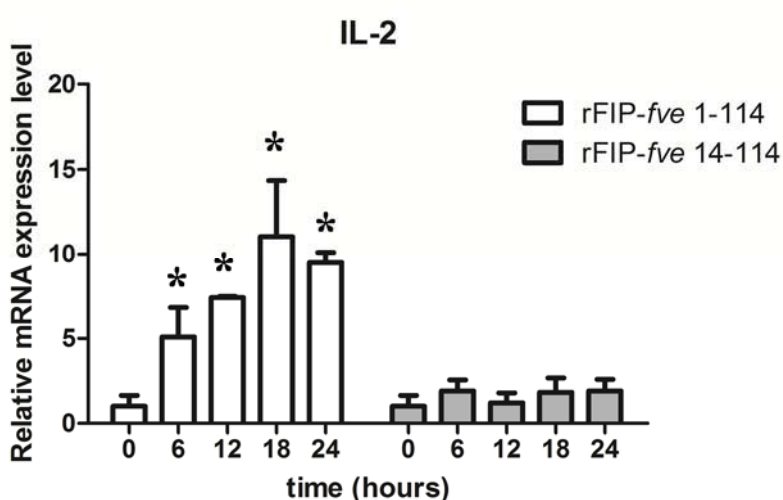
Splenocytes from BALB/c murine were incubated with rFIP-*fve* 1-114 and rFIP-*fve* 14-114 at 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, and 0.31 $\mu\text{g/mL}$ for 72 hours and the IFN- γ level in culture supernatant was determined by ELISA. Results were expressed as means \pm SD, $n=3$.



(A)



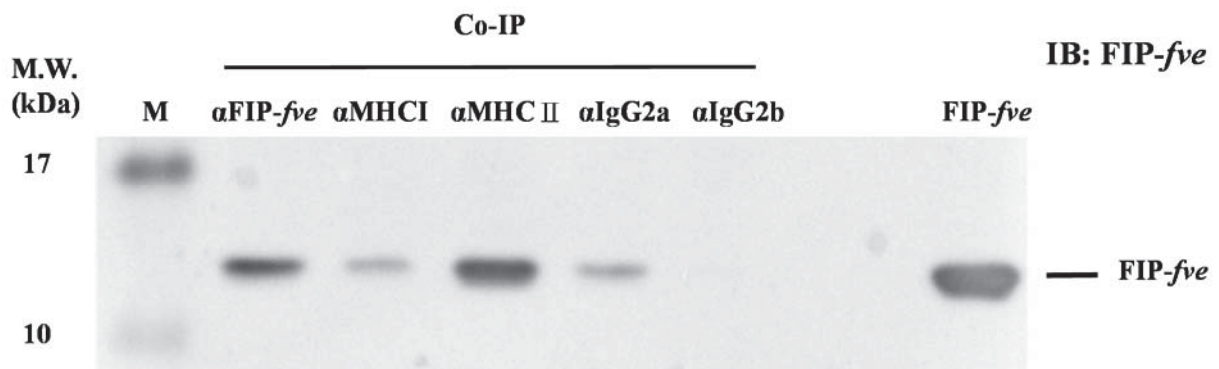
(B)



圖十二、rFIP-fve 14-114 無法刺激小鼠脾臟細胞 IFN- γ 和 IL-2 基因表現

Figure 12. The gene expression levels of IFN- γ and IL-2 could not elevate by incubate with rFIP-fve 14-114 in mouse splenocytes.

Total mRNA of mouse splenocytes were extracted after treating with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rFIP-fve for 0, 6, 12, 18, and 24 hours. The gene expression levels of IFN- γ (A) and IL-2 (B) were measured by real-time PCR. Values showed the relative mRNA expression levels normalized to β -actin. * $p < 0.001$ versus the gene expression at 0 hour.



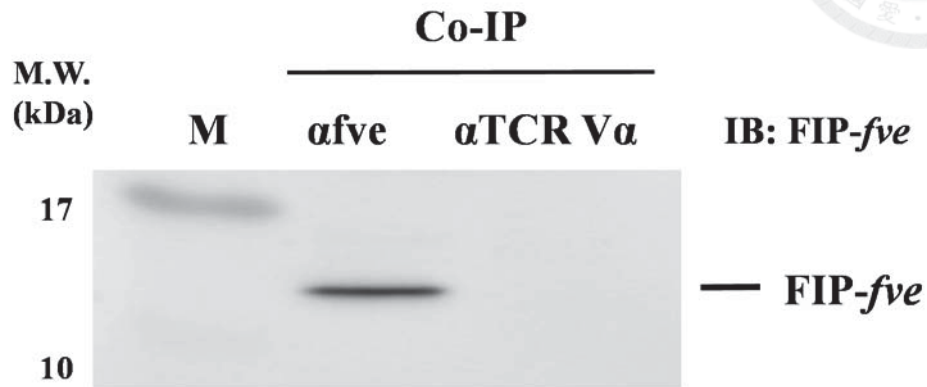
圖十三、FIP-*fve* 與表面分子 MHC class II 有交互作用

Figure 13. The protein-protein interaction between FIP-*fve* and MHC class II.

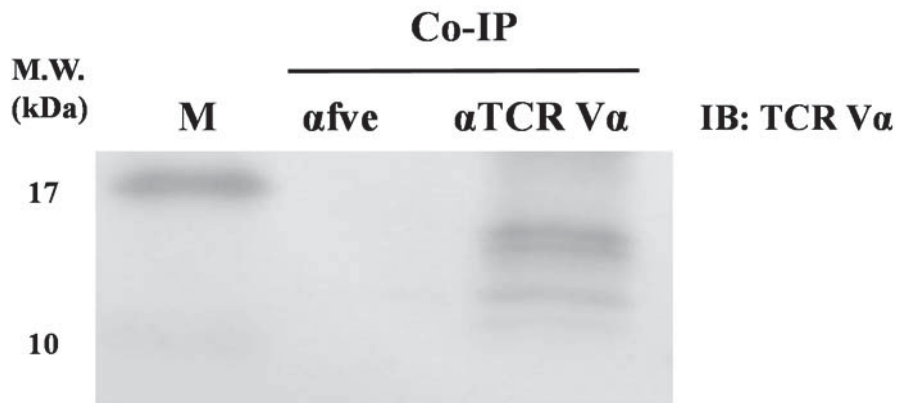
FIP-*fve* 140 μ g/mL was pre-incubated with RAW 264.7 cell lysate and Co-IP antibody overnight. Anti-FIP-*fve* antibody was used as detection antibody.



(A)



(B)



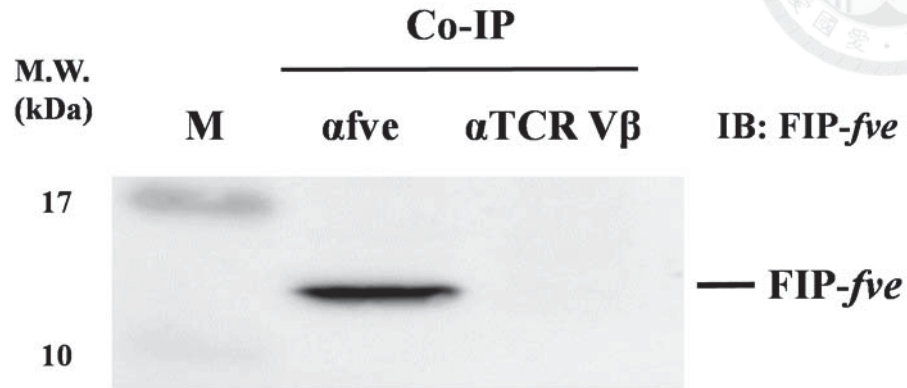
圖十四、FIP-*fve* 與表面分子 TCR V α 未見有交互作用

Figure 14. No co-immunoprecipitated evidence showed that FIP-*fve* bound with TCR V α .

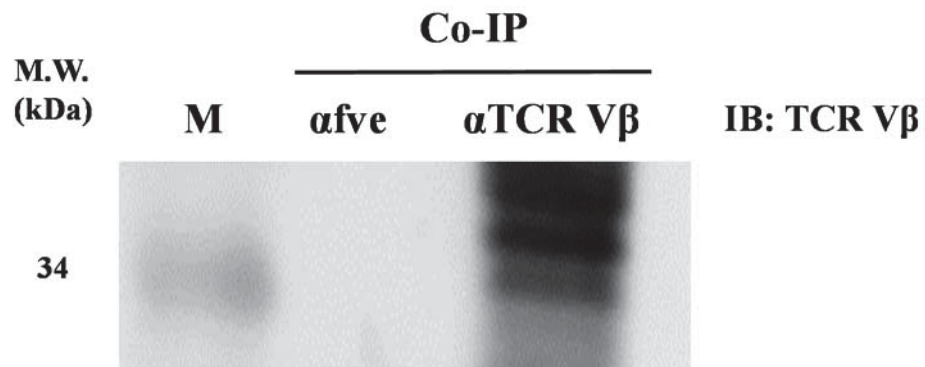
FIP-*fve* 140 μ g/mL was pre-incubated with membrane protein of murine splenocytes and Co-IP antibody overnight. Anti-FIP-*fve* antibody (A) or anti-TCR V α antibody (B) were used as detection antibody. Predicted TCR V α size : 16 kDa.



(A)



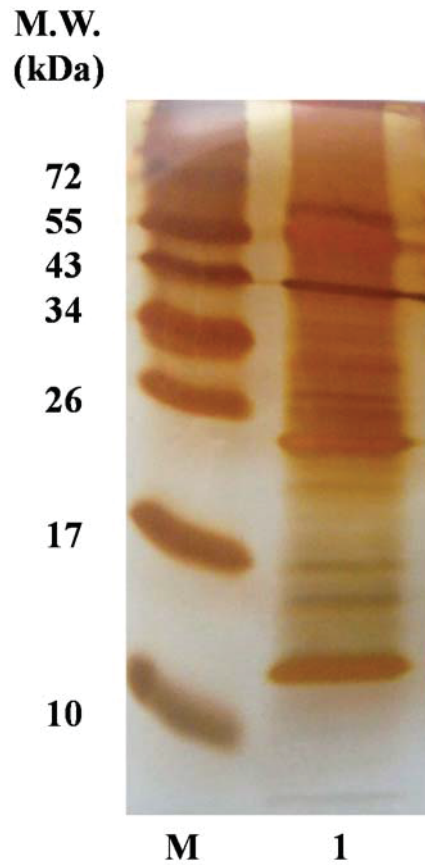
(B)



圖十五、FIP-*fve* 與表面分子 TCR V β 未見有交互作用

Figure 15. No co-immunoprecipitated evidence showed that FIP-*fve* bound with TCR V β .

FIP-*fve* 140 μ g/mL was pre-incubated with membrane protein of murine splenocytes and Co-IP antibody overnight. Anti-FIP-*fve* antibody (A) or anti-TCR V β antibody (B) were used as detection antibody. Predicted TCR V β size : 34 kDa.



圖十六、小鼠脾臟細胞破碎液與 FIP-*fve* 共同免疫沉澱產物 SDS-PAGE 分析圖

Figure 16. Co-IP products of FIP-*fve* with murine splenocyte lysate.

Lane 1: FIP-*fve* 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was pre-incubated with murine splenocyte lysate and Co-IP anti-FIP-*fve* antibody overnight, lane M: molecular weight marker. After analysing the products of Co-IP by SDS-PAGE, gel was stained by silver staining.



Re-search All Non-significant Unassigned [\[help\]](#) Export As XML

Not what you expected? Try [the select summary](#).

▶ Search parameters

▶ Score distribution

▶ Legend

Protein Family Summary

Filter Significance threshold p < Max. number of families [\[help\]](#)
Ions score or expect cut-off Dendrograms cut at

Proteins (10) [Quantitation \(10\)](#) [Unassigned \(1110\)](#)

Protein families 1-10 (out of 10)

10 per page 1

Accession Match case

▶ 1	K1C13_MOUSE	97	Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Mus musculus GN=Krt13 PE=1 SV=2
▶ 2	MED12_MOUSE	42	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12 OS=Mus musculus GN=Med12 PE=1 SV=1
▶ 3	K2C5_MOUSE	37	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Mus musculus GN=Krt5 PE=1 SV=1
▶ 4	NMDE2_MOUSE	37	Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B OS=Mus musculus GN=Grin2b PE=1 SV=3
▶ 5	STA13_MOUSE	36	StAR-related lipid transfer protein 13 OS=Mus musculus GN=Stard13 PE=1 SV=5
▶ 6	N42L2_MOUSE	35	NEDD4-binding protein 2-like 2 OS=Mus musculus GN=N4bp2l2 PE=2 SV=2
▶ 7	HELQ_MOUSE	29	Helicase POLQ-like OS=Mus musculus GN=Helq PE=2 SV=2
▶ 8	KV5A1_MOUSE	26	Ig kappa chain V19-17 OS=Mus musculus GN=Igk-V19-17 PE=1 SV=1
▶ 9	K2C73_MOUSE	25	Keratin, type II cytoskeletal 73 OS=Mus musculus GN=Krt73 PE=1 SV=1
▶ 10	RASL3_MOUSE	14	RAS protein activator like-3 OS=Mus musculus GN=Rasal3 PE=2 SV=1

10 per page 1

Not what you expected? Try [the select summary](#).

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

圖十七、小鼠脾臟細胞破碎液與 FIP-*fve* 共同免疫沉澱產物質譜分析比對結果

Figure 17. Protein sequencing results of Co-IP products of FIP-*fve* with murine splenocyte lysate.