



國立陽明交通大學

NATIONAL YANG MING CHIAO TUNG UNIVERSITY

出國報告（出國類別： A類、學研訪問
 B類、出國短期研究
 C類、國際會議）

學習分子生物技術

服務機關：藥理所

姓名職稱：林柔伸 博士生

派赴國家：美國 密蘇里

出國期間：112.10.13~112.11.27

報告日期：12.11.30（報告繳交日）

摘要

蛋白質分析是對於細胞生理相當重要的一個環節，尤其是對於藥物作用於蛋白質的機制探討更為重要。本實驗室研究以 Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator(CFTR) 為主軸，為探討其突變與新藥之間的作用機制並致力於 Cystic fibrosis(CF)這棘手且無法治癒的遺傳性疾病研究，期盼不斷改善治療藥物並有效提升患者生活水平與質量。目前實驗室均以電生理紀錄來分析藥物(增強劑或促效劑)對 CFTR 的效果。此次短期研究的行程為提升研究水平而至 Dalton Cardiovascular research center 進行為期一個月多的蛋白質製作、純化與初步分析的實驗技術學習。此技術的應用與電生理紀錄的結果結合，可以有效針對藥物與 CFTR 之間蛋白質的合成、產生到功能的影響進行全方位的探索。可以使我們對細胞膜蛋白的研究更進一步。

目次

一、目的	01
二、過程	01
三、心得及建議	02

本文

一、目的

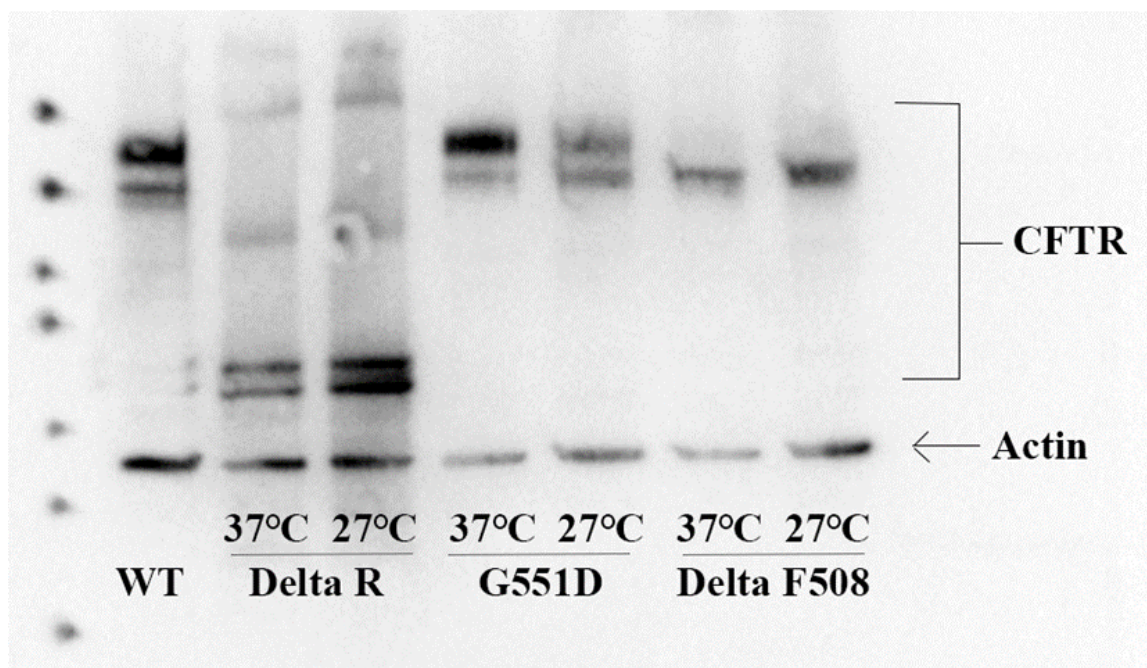
此行目的是學習在離體環境下蛋白質製作與純化技術並加以分析蛋白表現。CFTR 有上千種突變，所以必須學習一套簡單操作且能短時間製作蛋白質的技術。該技術可套用於不同的 CFTR 突變且產生之蛋白質容易純化分析。此技術系統的建構具備必要性與應用性。

二、過程

蛋白質製作到分析可分為以下幾個部分。首先是必須了解 DNA 質體的應用，我們不同的質體攜帶不同的 CFTR DNA。將質體送入 E.coli 中使其大量複製質體的表達，重要的是每個不同的質體都帶有相對應的篩選標記，會以其篩選用的抗生素來篩選帶有質體的菌株。接著以 LB 培養基擴大挑選的菌株，隔日便遵照 mini-prep 質體純化套組的步驟提取 DNA 質體。下一步是委外定序以確認所提取的 DNA 質體正確，如正確的話便重新以更大體積的 LB 培養 E.coli 並在隔日以 midi-prep 質體純化套組提取足夠大量的 DNA 質體來進行後續的實驗。在獲得足夠濃度的 DNA 質體後，使用轉染試劑將 DNA 質體送入 CHO 細胞中表達，等待轉染的細胞生長一段時間後可以分為兩部分進行實驗，一是可進行電生理紀錄以觀察其蛋白的功能，另一個是用細胞裂解液將細胞裂解，以西方點墨法進行蛋白質電泳分析其轉染後細胞的 CFTR 的蛋白表現量，西方點墨法除可以觀察到蛋白表現量之外還可以判斷 CFTR 的成熟與否以及不同突變所產生的 CFTR 蛋白大小的差異。

實驗過程中有幾點須特別注意，第一是需格外注意所使用質(載)體名稱，須備妥其序列圖譜。再來是以 LB 培養 E.coli 隔夜須保持在16~18小時為佳，如培養過久會提升.coli 本身的突變率進而降低 DNA 質體的品質。三是提取 DNA 質體時的各種試劑是否乾淨無汙染。四是操作西方點墨法時因步驟繁瑣，故須特別注意每個步驟的正確性。

下圖是熟悉完整操作後的結果圖：



三、心得及建議

(一) 心得

起初在被通知可以申請短期出國進修時既興奮又擔心，在很短的時間內交出了申請等待審核，結果出來後又立即處理各種出國事宜，如：手機、護照、換匯以及各種食衣住行的問題。在匆匆忙忙之下就出國了，到美國後，短短兩天讓我安頓以及調整心情、思緒，接著便開始到實驗室學習，在有限的時間內盡可能完整學習到該學習的實驗技術並利用時間進行充分的練習。本身不會分子生物的實驗技術且分生的知識淺薄，但本次行程是非常難得的機會，我竭盡所能努力學習，包含了解質體的製作與應用及實驗過程中各個步驟的細節，我都盡力去弄清楚。像是不同試劑的作用、每個步驟的意義、訊問他人實驗操作的技巧與訣竅等等，我無所不用其極的想在這段時間內將蛋白質製作與純化分析的技術學習好並讓自己足夠熟悉以便可以在回台灣之後獨立操作完成。

這次的短期研究不僅讓我學習到過去沒接觸過的實驗技術，也讓我體驗了美國的生活，這些對我都是非常寶貴的經驗。

(二) 建議

1. 透過深耕計畫使我可以出國體驗國外研究生活，讓我清楚了解國外的研究態度與實驗技術，讓我對於未來的規劃更明瞭，希望之後類似這樣的計畫可以更多，可以出國去國外的實驗室學習，時間短不會影響到課程規劃，又可以體驗國際研究，這是出國參加研討會無法有的經驗，進一步可以評估自己是否要申請長時間出國學習，我覺得夠過深耕計畫先短期出國，了解國外生活與研究，再規劃以及評估自己未來的研究生涯奠定很好的基礎。