

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Dially sulfide, dially disulfide 和 diallyl trisulfide
會誘發 cyclooxygenases 和相關基因的訊息傳導而抑制大腸
癌細胞的侵襲和轉移

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-039-018-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：中國醫藥大學微生物學科

計畫主持人：鍾景光

共同主持人：陳光偉

計畫參與人員：鍾景光, 陳光偉

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 25 日

檢測蛋白的過程和方法

將大腸癌細胞分別加入不同濃度的 DAS、DADS 和 DATS 經過 24 小時收集細胞、分解細胞及定量蛋白質，再利用 Western blotting 分析相關蛋白質之結果。

方法如下所示：

Western blotting

製備電泳：

↓以 95% 的 alcohol 擦拭玻璃

↓配置 separating gel

10% SDS PAGE	
H ₂ O	9.6 ml
40% Acrylamide	5 ml
Running buffer	5 ml
10% SDS	0.2 ml
10% APS	0.2 ml
TEMED	30 μ l

* TEMED 的量決定凝固的速度

↓由左至右快速加入二次水壓平

* 不可單點加入，否則會不平

* 等瓶中剩餘的 gel 凝固後即可將二次水倒出、吸乾，並加入 stacking gel

↓配置 stacking gel

H ₂ O	4.06 ml
40% Acrylamide	1.02 ml
Running buffer	1.66 ml
10% SDS	66 μ l
10% APS	33.4 μ l
TEMED	12 μ l

↓插上 comb

↓將 SDS PAGE 移至電泳槽中（小片玻璃朝內）

↓加入 running buffer 約半滿

- ↓將 gel 中間以 buffer 補滿後拔掉 comb
- ↓以 110 V 預跑（可穩定 gel 結構），同時處理 sample
- ↓將 sample 及 marker load 入 gel
- ↓83 volt 跑 stacking gel 至交界處再以 110 volt 跑 separating gel

處理 sample :

- ↓每一個 well 內所 load 的 protein 總量約為 30~35 μ g/20 μ l
- ↓每一個 sample 加入 sample 1/3 量的 dye，其餘體積以 1% SDS 補齊
- ↓將 sample 混合均勻後在 100 $^{\circ}$ C 煮 10 分鐘

Transfer :

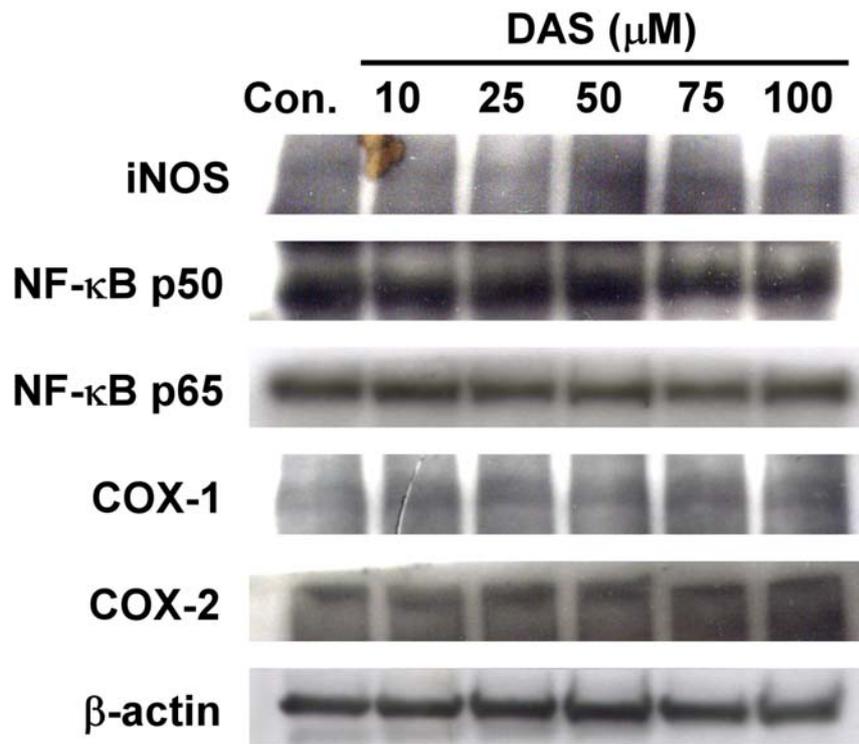
- ↓在桶內加入冰，並在內槽中加冰備用。
- ↓將 PVEF membrane 以 methanol 浸泡 5 秒
- ↓將 PVEF membrane 及菜瓜布、3 M paper 浸泡於 transfer buffer 至少 5 min
- ↓將 PVEF membrane 及菜瓜布、3 M paper 依上圖組合
- ↓將 sandwich method 放入電泳槽，加入 transfer buffer 及內冰槽
- ↓以冰將電泳槽覆蓋，以 80 volt 跑約 2 hr

抗體 :

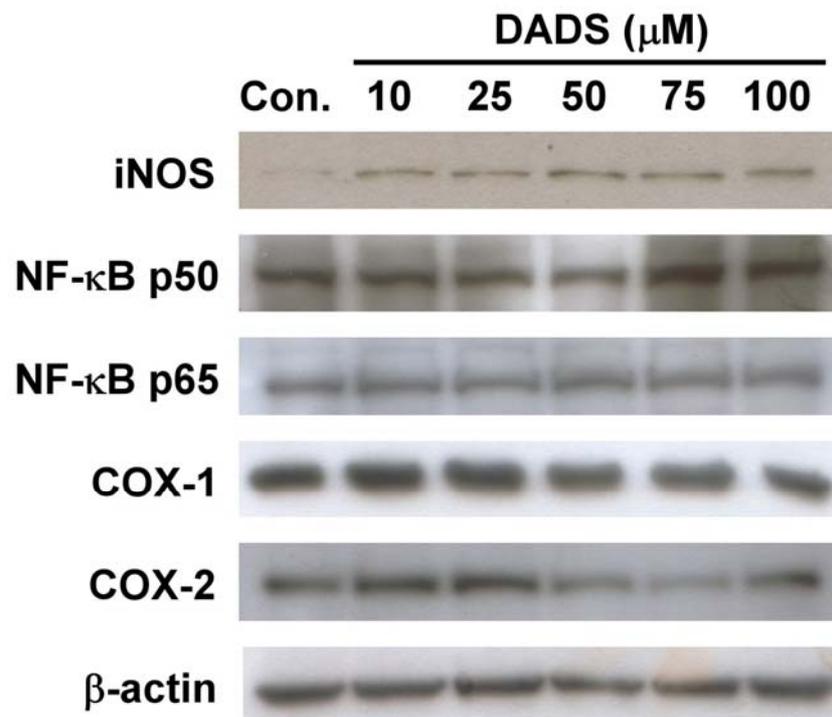
- ↓放入 PBS-tween-20 泡 10 min
- ↓換 milk-PBS-tween-20 泡 30 min
- * 20 ml 的 PBS-tween-20 加 1g 的 milk
- ↓以 PBS-tween-20 wash 5 min 3 次
- ↓加入 1 $^{\circ}$ Ab (1 : 500) 於 4 $^{\circ}$ C overnight
- ↓以 PBS-tween-20 wash 5 min 3 次
- ↓加入 2 $^{\circ}$ Ab (1 : 500) 1hr
- ↓以 PBS-tween-20 wash 5 min 3 次
- ↓以 ECL kit 將 HRP 激光，利用感光片，進行暗房壓片動作

結果如下面 6 個圖所示：

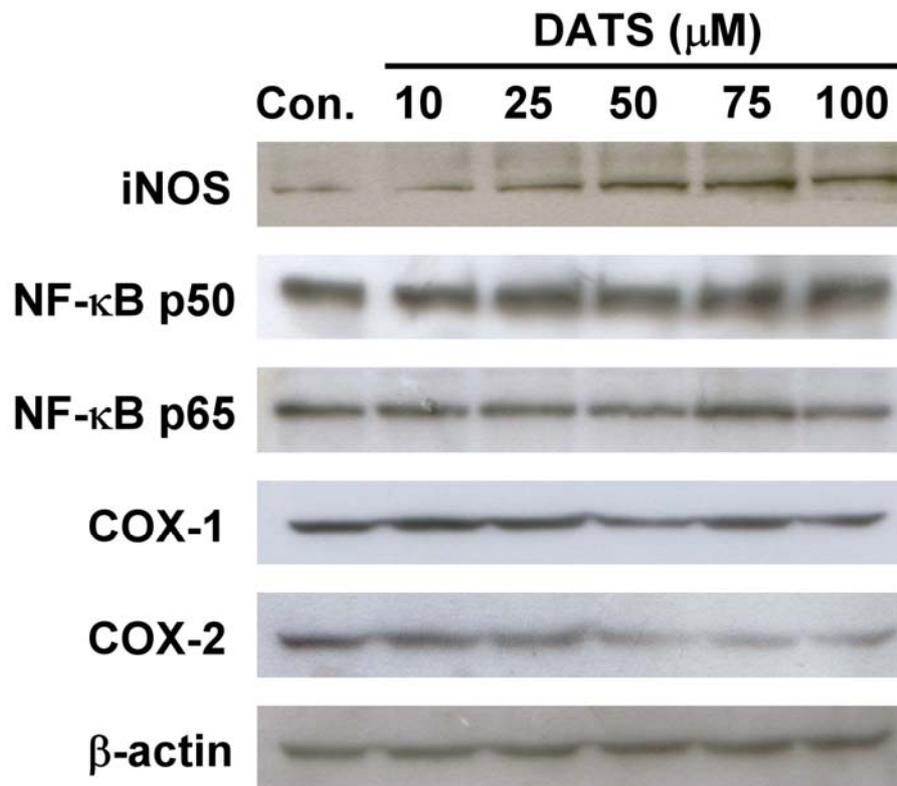
[圖一]



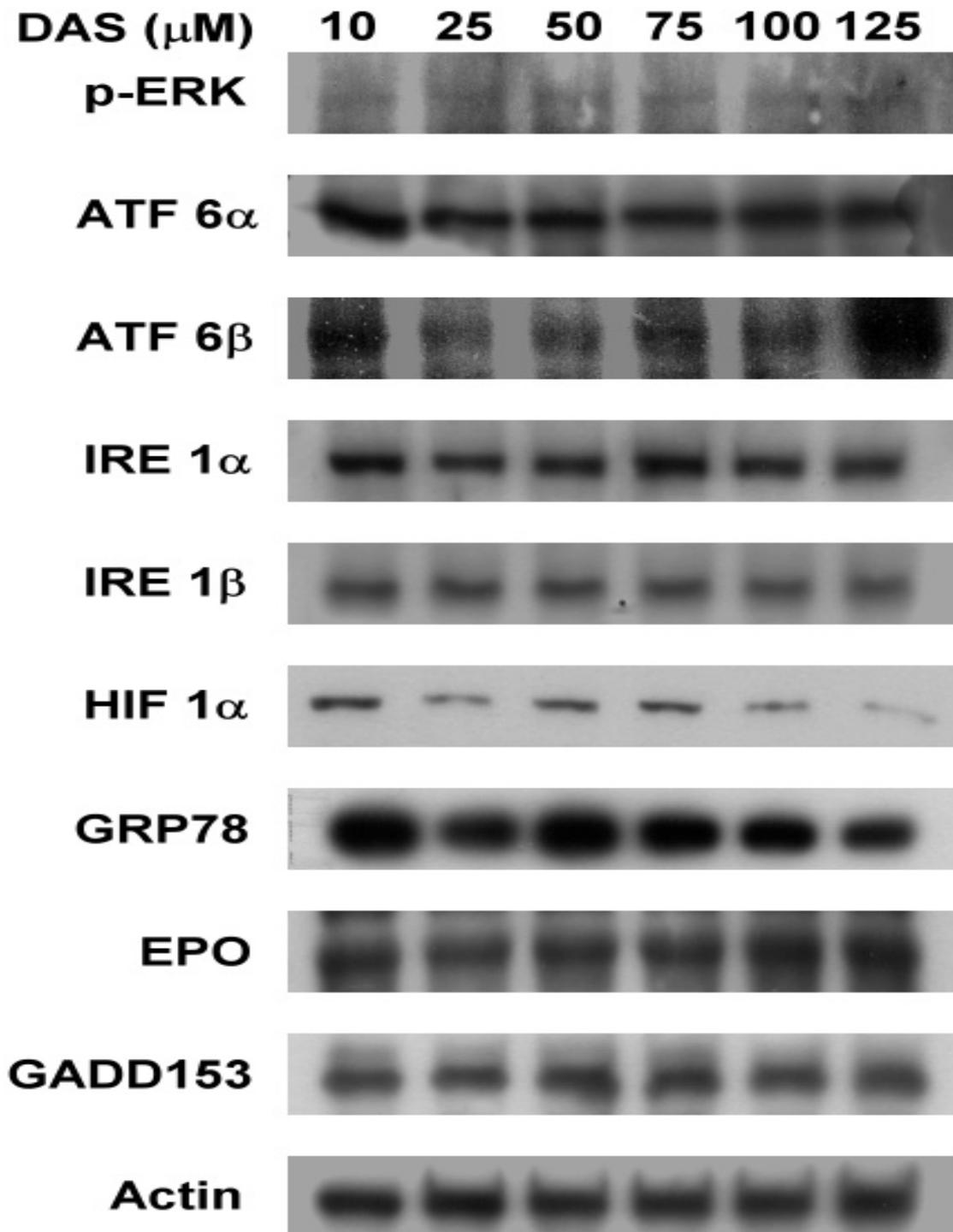
[圖二]



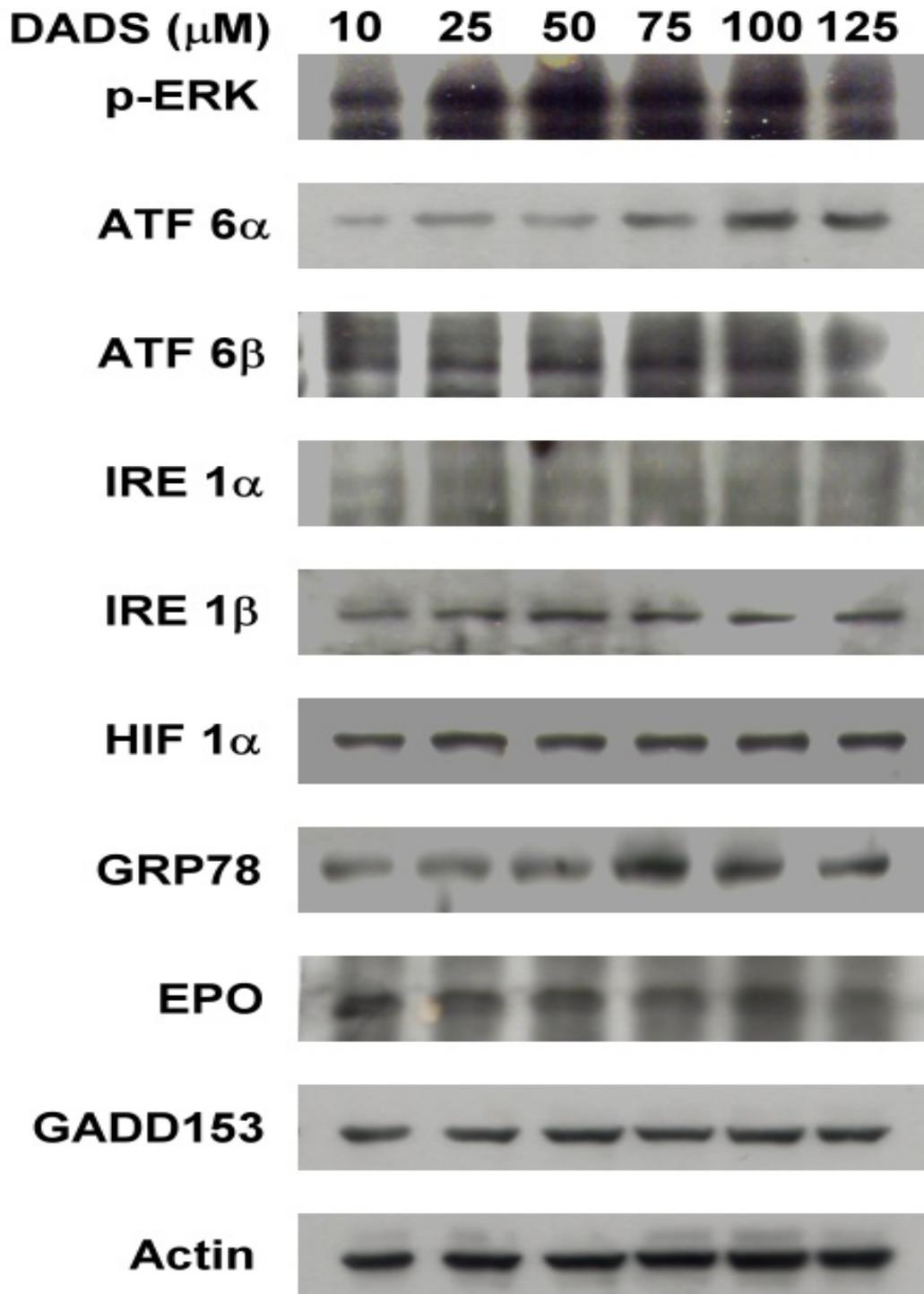
[圖三]



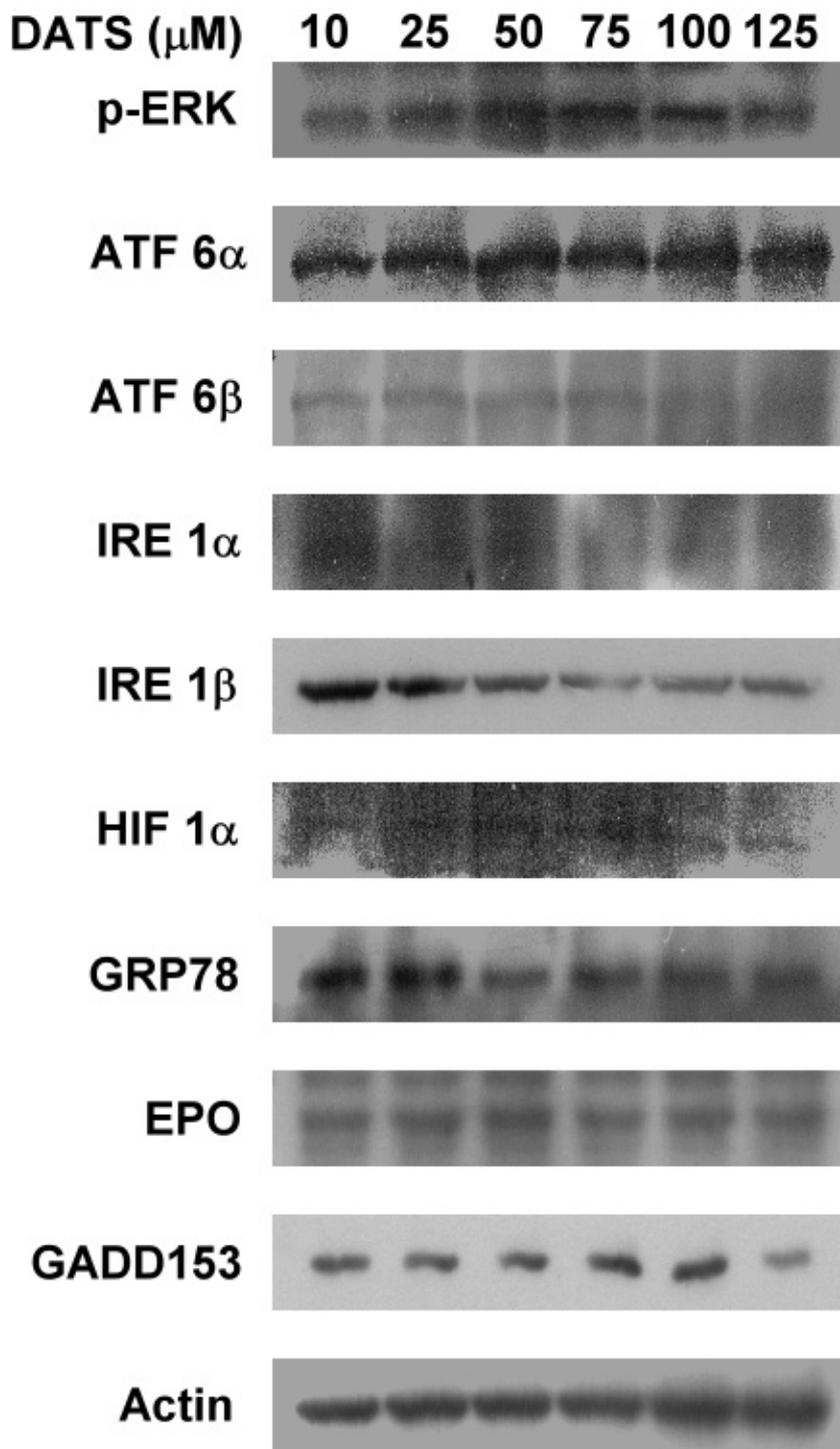
[圖四]



[圖五]



[圖六]



結論：

1. DAS、DADS 和 DATS 抑制人類大腸癌細胞的 NF- κ B p65 和 COX-2 的表現，DAS、DADS 和 DATS 促進人類大腸癌細胞 iNOS 的表現
2.
 - a. DAS、DADS 和 DATS 促進人類大腸癌細胞，ATP6 α 和 ATP6 β 的表現
 - b. DAS 和 DATS 促進 Grp78 的表現，但 DADS 卻抑制 Grp78 的表現
 - c. DAS 促進 GADD153 的表現，但 DADS 和 DATS 卻抑制 GADD153 的表現
 - d. DAS 抑制 HIF-1 α ，但 DADS 和 DATS 卻促進 HIF-1 α 的表現
 - e. DAS 促進 EPO 的表現，DADS 沒有影響，DATS 卻抑制 EPO 的表現