

第三章 材料與方法

第一節 實驗材料

1、 藥品試劑

- [1]. RPMI Medium 1640 (購自 GIBCO)
- [2]. Fetal Bovine serum (購自 GIBCO)
- [3]. Penicillin-Streptomycin (購自 GIBCO)
- [4]. L-glutamine (購自 GIBCO)
- [5]. Dimethyl Sulfoxide (購自 Sigma)
- [6]. Trypan blue (購自 Sigma)
- [7]. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4 ; 購自 Merck)
- [8]. Sodium chloride (NaCl ; 購自 Merck)
- [9]. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4 ; 購自 Merck)
- [10]. Potassium chloride (KCl ; 購自 Merck)
- [11]. Aloe-emodin (購自 Sigma)
- [12]. PI (Propidium iodide; 購自 Sigma)
- [13]. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-terazolium bromide; 購自 Sigma)
- [14]. RNase A (Ribonuclease A; 購自 CLONTECH)
- [15]. Triton X-100 (購自 Sigma)
- [16]. Ethanol (購自 TEDIA)

- [17]. APS (Ammonium persulfate; 購自 Amresco).
- [18]. Acrylamide/Bis 40% solution (ACRYL/BIS™29:1;
購自 Amresco)
- [19]. Bovine serum albumin (BSA; 購自 Merck)
- [20]. Glycine (購自 Amresco)
- [21]. Methanol (購自 TEDIA)
- [22]. formaldehyde (購自 Merck)
- [23]. ECL kit (Enhanced chemiluminescent kit ; 購自 Amersham)
- [24]. GelCodeR commassie blue (購自 PIERCE)
- [25]. Glycerol (購自 Scharlau)
- [26]. Hydrochloric acid (購自 Merck)
- [27]. Protein assay-Dye reagent concentrate (購自 Bio-Rad)
- [28]. Protein maker (購自 Femantas)
- [29]. SDS (Sodium dodecyl sulfate; 購自 Amresco)
- [30]. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine; 購自
Amresco)
- [31]. Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane; 購自 Amresco)
- [32]. Tween 20 (購自 Amresco)
- [33]. 脫脂奶粉 (安佳)
- [34]. 顯影劑 (購自 Kodak)

- [35]. 定影劑 (購自 Kodak)
- [36]. BioMax Flim (購自 Kodak)
- [37]. 10X BlueJuice (Gel loading buffer; 購自 Invitrogen)
- [38]. Agarose I (購自 Amresco)
- [39]. 核酸純化試劑組 (G-NOME DNA KIT; 購自 Bio101 Inc)
- [40]. 蛋白質萃取試劑 (PRO-PREP protein extraction solution;
購自 iNtRON Biotechnology)
- [41]. 5X TBE buffer (購自 Amresco)
- [42]. 10X SDS-PAGE running buffer (TG-SDS buffer;
購自 Amresco)
- [43]. 4X Protein loading dye (購自 Amresco)
- [44]. TE buffer (購自 Amresco)
- [45]. 人類血癌細胞株 (HL-60:Acute Promyelocytic leukemia
cell line; 購自新竹食品工業研究院)
- [45]. 一級抗體 :
- (a). anti-Cyclin A (#05-374; 購自 Upstate)
 - (b). anti-Cyclin B1 (#05-373; 購自 Upstate)
 - (c). anti-cdk1/cdc2 (#06-923; 購自 Upstate)
 - (d). anti-cdk2 (#05-596; 購自 Upstate)
 - (e). anti-actin (MAB1501; 購自 Chemicon)

- (f). anti-p27^{Kip1} (MS-256-P0; 購自 NeoMarkers)
- (g). anti-p21^{WAF1} (MS-891-P0; 購自 NeoMarkers)
- (h). anti-caspase 8 (RB-1200-P0; 購自 NeoMarkers)
- (i). anti-caspase 9 (RB-1205-P0; 購自 NeoMarkers)
- (j). anti-caspase 3 (RB-1197-P0; 購自 NeoMarkers)

[46]. 二級抗體

- (a). goat anti-mouse IgG (HRP) horseradish peroxidase
conjugated antibody (AP124P; 購自 Chemicon)
- (b). goat anti-rabbit IgG (HRP) horseradish peroxidase
conjugated antibody (購自 Chemicon)
- (c). goat anti-mouse IgG (FITC) fluorescein 5-isothiocyanate
conjugated antibody (購自 Chemicon)

2、設備、器材

- [1]. 無菌操作台 (購自 Lian Shen)
- [2]. 細胞培養箱 (購自 Nuair)
- [3]. 細胞培養皿 (購自 FALCON)
- [4]. 細胞培養盤 (購自 FALCON)
- [5]. 細胞計數器 (Haemocytometer; 購自 Boeco)
- [6]. 倒立式位像差顯微鏡 (phase-contrast microscope; 購自 Olympus)
- [7]. 冷凍管 (購自 TPP)
- [8]. 離心機 (購自 Beckman)
- [9]. Dispensor (購自 TPP)
- [10]. 微量離心管 (購自 季勗)
- [11]. Pipetment (購自 Costar)
- [12]. 熱板 (購自 Lab-Line)
- [13]. 酵素免疫分析儀 (anthos 2020; 購自 Anthos Labtec, Australia)
- [14]. 微量天平 (GR-200; 購自 A&D)
- [15]. 去離子水製造機 (購自 Minipore)
- [16]. 乾浴槽 (Model 110001; 購自 Boekel)
- [17]. 電源供應器 (購自 Amersham)

- [18]. 酸鹼值測定計 (C831; 購自 Consort)
- [19]. PVDF membrane (購自 Minipore)
- [20]. Mini-3D Shaker (購自 Boeco)
- [21]. SDS-PAGE 電泳槽套組 (購自 Bio-Rad)
- [22]. Transfer Cell Blot 套組 (購自 Bio-Rad)
- [23]. 流式細胞儀 (Flow cytometry; 購自 Becton Dickinson)
- [24]. DNA 電泳槽 (購自 Mupid-2)
- [25]. 高速離心機 (購自 Labnet)

第二節 實驗方法

1、 冷凍細胞活化

冷凍細胞之活化原則為快速解凍，以避免冰晶重新結晶而對細胞造成傷害，導致細胞之死亡。細胞活化後，約需數日，或繼代一至二代，其細胞生長或特性表現才會恢復正常（例如產生單株抗體或是其他蛋白質）。

步驟：將新鮮培養基置於 37 °C 水槽中回溫，回溫後噴以 70% 酒精並擦拭之，移入無菌操作台內。自液氮或乾冰容器中取出冷凍管，檢查蓋子是否旋緊，由於熱脹冷縮過程，此時蓋子易鬆掉。取出冷凍管，立即放入 37 °C 水槽中快速解凍，輕搖冷凍管使其在 3 分鐘內全部融化，以 70% 酒精擦拭保存管外部，移入無菌操作台內。取出解凍之細胞懸浮液，緩緩加入有培養基之培養容器內（稀釋比例為 1:10 或 1:15），混合均勻，放入 CO₂ 培養箱培養。在解凍培養後隔日更換培養基。

2、 細胞冷凍保存

注意事項：欲冷凍保存之細胞應在生長良好（log phase）且存活率高之狀態，約為 80% -90% 緻密度。注意冷凍保護劑之品質。DMSO 應為試劑級等級，無菌且無色（以 0.22 micron

FGLP Teflon 過濾或是直接購買無菌產品) , 以 5~10 ml 小體積分裝 , 4 °C 避光保存 , 勿作多次解凍。冷凍保存之細胞濃度 : 5~10 x 10⁶ cells/ml。冷凍保護劑濃度為 5% DMSO。

步驟 : 冷凍前一日前更換半量或全量培養基 , 觀察細胞生長情形。配製冷凍保存溶液 (使用前配製) : 將 DMSO 加入新鮮培養基中 , 最後濃度為 5% , 混合均勻 , 置於室溫下待用。取少量細胞懸浮液 (約 0.1ml) 計數細胞濃度及凍前存活率。離心 , 去除上清液 , 加入適量冷凍保存溶液 , 使細胞濃度為 1-5 x 10⁶ cells/ml , 混合均勻 , 分裝於已標示完全之冷凍保存管中 , 1 ml/vial。冷凍保存方法 : 冷凍管置於 4 °C 10 分鐘 ? -20 °C 30 分鐘 ? -80 °C 16 18 小時 (或隔夜) ? 液氮槽長期儲存

3、人類血癌細胞培養

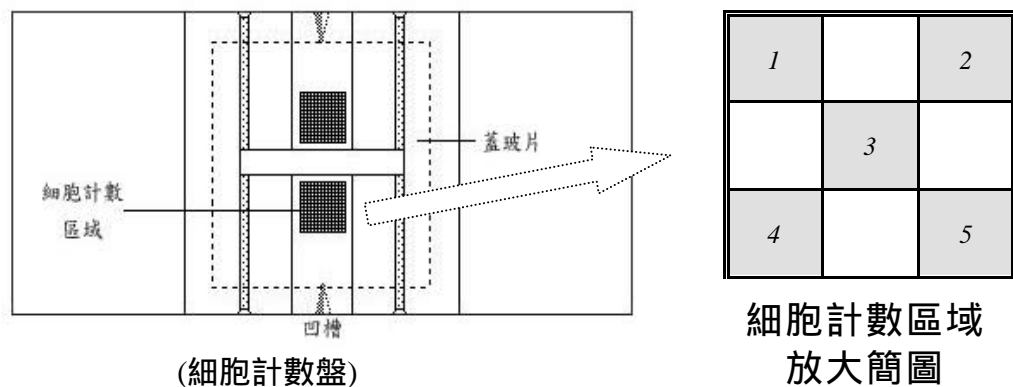
無菌操作台使用前先讓其抽氣運轉 10 分鐘 , 再以 70% 酒精擦拭台面。所有進入無菌操作台的器物均需先噴灑 70% 酒精 , 有蓋容器旋開瓶蓋前均需先過火。培養基若使用量小 , 則盡量置於室溫下回溫 , 以避免 pH 值變化。

HL-60 培養在 RPMI-1640 培養基中 (含 10% fetal bovine serum、100 units/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、2 mM L-glutamine) , 置於 37 °C 、 5% CO₂ 的培養箱中培養。定期以

Trypan blue 染色，利用血球計數盤 (Hemocytometer) 計數細胞數目及存活率，並控制持續培養的數目，使其細胞密度維持在 $2-5 \times 10^5$ cells/ml。

4、細胞數目計數及存活測試

計算細胞數目是用血球計數盤，血球計數盤一般有二 chambers，每個 chamber 中細刻 9 個 1 mm^2 大正方形，其中 4 個角落之正方形再細刻 16 個小格，深度均為 0.1 mm 。當 chamber 上方蓋上蓋玻片後，每個大正方形之體積為 $1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 1.0 \times 10^{-4} \text{ ml}$ 。使用時，計數每個大正方形內之細胞數目，乘以稀釋倍數，再乘以 10^4 ，即為每 ml 中之細胞數目。（如下圖所示）



存活測試之原理為 dye exclusion，利用染料會滲入死細胞中而呈色，而活細胞因細胞膜完整，染料無法滲入而不會呈色。一般使用藍色之 trypan blue 染料。

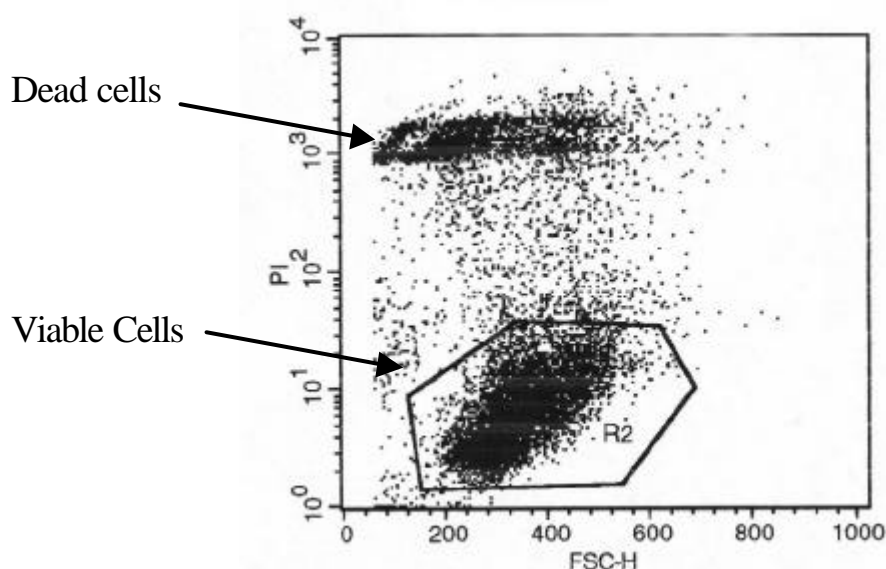
步驟：取 50 μ l 細胞懸浮液與 50 μ l trypan blue (0.4% w/v trypan blue)等體積混合均勻於 1.5ml 小離心管中。取少許混合液 (約 15 μ l) 自血球計數盤 chamber 上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，於 100 倍倒立顯微鏡下觀察，活細胞不染色，死細胞則為藍色。計數四個大方格之細胞總數，再除 4，乘以稀釋倍數 (至少乘以 2，因與 trypan blue 等體積混合)，最後乘以 10^4 ，即為每 ml 中細胞懸浮液之細胞數。若細胞位於線上，只計上線與右線之細胞 (或計下線與左線之細胞)。如所含細胞密度過高，則算出的數目誤差較大 (每一大格過 50 個細胞)，需再加入更多的培養液稀釋。

5、 檢測 aloe-emodin 對人類血癌細胞株 (HL-60) 細胞增生的影響

A、 利用流式細胞儀計數存活的細胞數

利用流式細胞儀評估存活細胞數和存活率其原理如下：無論細胞是進行細胞壞死 (Necrosis) 或細胞凋亡 (Apoptosis) 的路徑，只要細胞死亡，其細胞膜就會失去完整性 (membrane integrity)⁸⁶。Propidium iodine (PI) 是一個核酸染劑，進行 PI 染色時，若細胞死亡，細胞膜破裂，PI 會進入細胞內和核酸結合。若細胞存活，細胞膜完整，PI 則無法和細胞內的核酸結合。PI 染色完成的細胞經由流式細胞儀 488 nm 的雷射光激發後，

若死亡的細胞會有較高的紅色螢光，而存活的細胞則有較弱的紅色螢光⁸⁷。再用 CellQuest 軟體分析細胞增殖率。(如下圖所示)



細胞增殖率以下列公式計算：

$$\left(\frac{\text{實驗組存活細胞數目}}{\text{對照組存活細胞數目}} \right) \times 100\%$$

實驗組：血癌細胞加入待測的蘆薈大黃素

對照組：血癌細胞加入待測蘆薈大黃素相同體積的溶媒 (DMSO)

於實驗進行的前一天，血癌細胞需以離心去除上清液後加入新鮮的培養基，並使細胞密度在 $2-4 \times 10^5$ cells / ml。

在給予藥物時，首先利用細胞計數盤，求出其準確的細胞密度，至少二重複，接著加入培養基把細胞密度稀釋至 5×10^4 cells / ml。

接著取六個 50 ml 無菌離心管，每個加入 35 ml 含血癌細胞的培養基，接著依序加 35 μ l 的 DMSO 和 5、10、15、20 及 25 mM 的蘆薈大黃素混合均勻。取八個 12 孔洞平盤，兩個 12 孔洞平盤為一組，總共四組進行不同時間點的實驗。每種濃度作四重複。每個孔洞加入 2 ml 含血癌細胞的培養基，其最終濃度為 0、5、10、15、20 及 25 μ M 的蘆薈大黃素，其濃度分配如下：

C	C	C	C
5	5	5	5
10	10	10	10

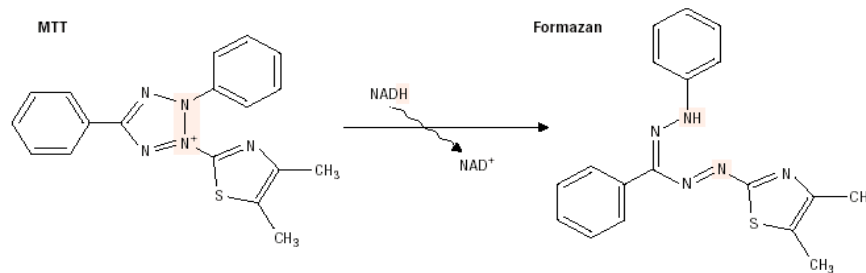
15	15	15	15
20	20	20	20
25	25	25	25

把種好的血癌細胞的 12 孔洞平盤，擺進 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培養箱 (incubator) 進行培養，在培養 12、24、48 和 72 小時後各取一組細胞來檢測細胞生長的情形。

利用流式細胞儀檢測細胞生長情形的方法如下，每個孔洞取 500 μ l 的培養基，至 5 ml 的流式細胞儀專用管，接著加入 5 μ l 的 PI Stock Solution (400 μ g/ml)，混合均勻後，即可進行流式細胞儀分析，固定計數秒數 (20 秒) 及流速 (35 μ l/min)，計數細胞增殖率。

B、MTT 分析法

MTT assay 是一種應用常見於分析細胞增生 (cell proliferation)、存活率 (percent of viable cells) 和細胞毒性 (cytotoxicity) 之的分析方法⁸⁸。此種分析方式是利用檢測細胞之粒腺體內的酵素 (succinate-tetrazolium reductase) 活性來測定細胞的生長狀態，進而得知相對的細胞比例。只有正常存活的細胞可將 MTT 代謝成水不溶性的 formazan，其反應是如下：



將已給予不同濃度蘆薈大黃素 (0-25 μM) 的血癌細胞種入 96 孔洞平盤，擺進 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培養箱進行培養，在培養 72 小時後，於避光的環境中加入 10 $\mu\text{l/wells}$ 的 MTT (添加量為培養液總體積的 1/10)，再經過 3 小時後加入 100 $\mu\text{l/wells}$ 的 solubilization solution 終止反應並溶解 formazan 鹽類。再放於培養箱中經過隔夜 (overnight) 反應，以酵素免疫分析儀在 570 nm 下測定其吸光值。

MTT 試劑：(避光-20 儲存)

組成	最終濃度	初濃度	體積/重量
MTT	5 mg/ml	-	250 mg
PBS (pH 7.4)	-	-	50 ml
總體積 50 ml			

Solubilization solution：(室溫儲存)

組成	最終濃度	初濃度	體積/重量
SDS	10 %	-	10 g
HCl	0.01 N	1 N	1 ml
加 DDW 到 總體積 100 ml			

6、 檢測 aloe-emodin 對人類血癌細胞株 (HL-60) 細胞型態的影響

A、 利用流式細胞儀檢測細胞型態的影響

給予不同濃度蘆薈大黃素 (0-25 μ M) 的血癌細胞種入 12 孔洞平盤，擺進 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培養箱進行培養，在培養 48 小時後，每個孔洞取 500 μ l 的培養基，至 5 ml 的流式細胞儀專用管，混合均勻後，即可進行流式細胞儀分析。

B、 利用倒立式位像差顯微鏡檢測細胞型態的影響

給予不同濃度蘆薈大黃素 (0-25 μ M) 的血癌細胞種入 12 孔洞平盤，擺進 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培養箱進行培養，在培養 48 小時後，於倒立式位像差顯微鏡下照相。

7、 檢測 aloe-emodin 對人類血癌細胞株 (HL-60) 細胞週期的影響

給予不同濃度蘆薈大黃素 (0-25 μM) 的血癌細胞種入 12 孔洞平盤，擺進 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培養箱進行培養，12、24、48 和 72 小時後各取一組細胞來檢測細胞週期改變的情形。

將不同組別的細胞懸浮液分別移到 15 ml 離心管中離心 (1500 rpm、5 分鐘)。倒掉上清液，再將細胞完全打散後加入 2 ml/wells 的 PBS 緩衝液離心 (1500 rpm、5 分鐘)。倒掉上清液，將細胞完全打散後，以 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰的 70% 酒精進行細胞固定步驟 (以 "SHAKE 3" 速度震盪，一滴一滴緩慢將酒精滴入)，隨後將細胞固定步驟完成的樣品置於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱隔夜存放。隔天，將樣品從冰箱取出後離心 (1500 rpm、5 分鐘) 以去除酒精，之後將細胞完全打散。加入 2 ml 的 PBS 緩衝液清洗 1 次後將細胞完全打散。最後在每個試管中加入 500 μl 的 PI stain 染劑 (其量可視細胞數目增減)，避光反應 30 分鐘。在檢查 FACS 專用管是否破損後，於管子外標上樣品編號備用。以 1 ml pipette 在 15 ml 離心管中抽吸次後，將細胞移到 FACS 專用管後避光置於冰上。最後以流式細胞儀 (Flow cytometry; FACS) 進行樣品分析，一秒細胞數不超過 300 顆細胞，每個數據收集 12000 顆細胞，數據以 Modfit LT[®] 軟體進行處理分析⁸⁹。

1X Phosphate buffer saline (PBS) : (pH=7.4)

組成	重量(g)
NaCl	8.0
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	1.44
KH ₂ PO ₄	0.24
加 DDW 到總體積 1000 ml	

PI stain 染劑配製 : (4 保存)

組成	最終濃度	初濃度	體積 (ml)
Propidium iodide (PI)	0.4 mg/dl	2 mg/dl	5
Triton	1 %	5 %	5
RNase A	0.1 mg/ml	2 mg/ml	1.25
1X PBS	-	-	13.75
總體積			25 ml

*RNase A 配好後需以 70 °C 加熱 20 分鐘處理後分裝。

8、 檢測 aloe-emodin 對人類血癌細胞株細胞內與細胞週期相關蛋白質的影響

A、 西方墨點法 (Western Blotting)

a、 細胞蛋白質抽取

給予不同濃度蘆薈大黃素的血癌細胞種入 10 cm 細胞培養盤，擺進 37 °C、5% CO₂ 的培養箱進行培養，於不同時間從培養箱中取出後，將不同組別的細胞懸浮液分別移到 15 ml 離心管中離心(1500 rpm、5 分鐘)。倒掉上清液，再將細胞完全打散後加入 2 ml/wells 的 PBS 緩衝液離心(1500 rpm、5 分鐘)。倒

掉上清液，將細胞完全打散後，加入 200 μ l 的 Lysis buffer。劇烈震盪後置於冰上 30 分鐘處理樣品，再經離心(4、10,000 rpm、10 分鐘)取出上清液即含細胞蛋白質。

b、蛋白質定量

蛋白質標準品檢量線製作：

以胎牛血清白蛋白(Bovine serum albumin; BSA)為蛋白質

標準品，依照下面表格製作蛋白質標準品樣品：

組成 \ 濃度(ug/ml).	0	5	10	15	20	25
0.1 mg/ml BSA (μ l)	0	50	100	150	200	250
DDW (μ l)	800	750	700	650	600	550
Bradford 染劑	200 μ l					
總體積 1000 μ l						

將配製好的蛋白質標準品樣品以每個樣品放在 3 個 wells 的方式依序放入 96 孔細胞培養盤中，利用酵素免疫分析儀(ELISA reader)在 590 nm 測定各蛋白質標準品吸光值之平均值。以蛋白質標準品吸光值與濃度畫出標準品檢量線，並求出趨勢線方程式及 R^2 值。(R^2 值必須有 ≥ 0.99 以上的準確度，否則需重新製作檢量線)

樣品蛋白質定量：

取 10 μ l 的蛋白質樣品與 790 μ l 的二次水混合，再加入 200 μ l 的 Bradford 染劑，混勻 5 分鐘後以每個樣品放在 3 個 wells

的方式依序放入 96 孔細胞培養盤中，利用酵素免疫分析儀在 590 nm 測定其吸光值平均值。將樣品吸光值平均值代入趨勢線方程式，則可算出稀釋後樣品之蛋白質濃度，最後再乘上稀釋倍數，則可求得實際蛋白質樣品濃度。

c、變性電泳 (SDS-PAGE)

依照下面表格依序配製下層膠和上層膠：

組 成	下層膠 (10% Separation gel)		上層膠 (5% Stacking gel)	
	一片量	兩片量	一片量	兩片量
DDW	4.75 ml	9.5 ml	3.04 ml	6.08 ml
1.5 M Tris (pH8.8)	2.5 ml	5.0 ml	-	-
0.5 M Tris (pH6.8)	-	-	1.25 ml	2.5 ml
10% SDS	100 μ l	200 μ l	50 μ l	100 μ l
40% Acrylamide/Bis (29:1)	2.5 ml	5.0 ml	610 μ l	1.22 ml
10% Ammonium persulfate (APS)	50 μ l	100 μ l	50 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	20 μ l	6 μ l	12 μ l

下層膠注入鑄膠台後，緩緩加滿二次水去除氣泡並壓平下層膠之上緣，等約 30 分鐘待膠體凝固。隨後，將上層膠注入後小心地插入樣品槽梳子(comb)到未凝固的膠體中，避免氣泡出現於樣品槽(wells)下緣。等待約 30 分鐘上層膠凝固後拔出樣品槽梳子，並以二次水小心沖洗樣品槽內避免雜質殘留。將鑄好的膠體放入電泳槽中，加入 Running buffer。用塑膠滴管以抽吸方式去除膠體下緣殘留的氣泡。鑄好的膠體先以 100 v、300 mA 為

條件預跑 15 分鐘。將樣品與樣品緩衝液(Sample buffer)混合後總體積為 20 μ l (蛋白質濃度約為 2 μ g/ μ l), 經加熱 5 分鐘後立刻冰上冷卻 30 秒以上。取 5 μ l 分子量標準品(maker)和配製好的樣品由左至右分別 loading 到樣品槽中。跑膠先以 100 v 跑 30 分鐘, 再以 120 v 跑 30 分鐘, 最後以 150 v 跑 30 分鐘。

1x Running buffer :

組成	重量(g)
Tris	30
Glycine	144
SDS	10
加 DDW 到 10 L	

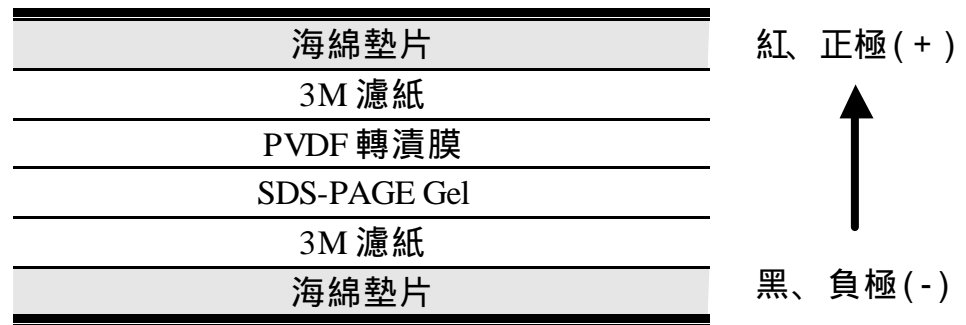
6X Sample buffer :

組成	最終濃度	初濃度	體積 (ml)
Tris-HCl、pH6.8	62.5 mM	0.5 M	5
SDS	2 %	10 %	8
Glycerol	60 %	100 %	24
Bromophenol blue	0.6%	-	0.24 g
加 DDW 到總體積			40 ml

d、西方墨點法 (Western Blotting)

轉漬步驟：

將轉漬夾打開後黑色面朝下放, 取出一片海綿墊片浸泡轉漬緩衝液(Transfer buffer)後放於其上面, 並依序在海綿片上放上 3M 濾紙、SDS-PAGE gel、PVDF 轉漬膜 (先用 100 % 甲醇濕潤 15 秒、再放於轉漬緩衝液中浸泡 1 分鐘以上)、3M 濾紙, 最後再放上一片海棉墊片後夾上轉漬夾(夾層中間夾切勿有氣泡), 形成類似三明治夾層的構造。



將轉漬夾放入電泳槽中後放入冰盒並加滿轉漬緩衝液。於電泳槽外圍放入足夠的冰塊，使整個系統保持低溫狀態。以 100 v、300 mA、2 小時為條件，進行蛋白質轉漬步驟。轉漬完成後取出轉漬膜裁去多餘部分，以 3M 濾紙壓乾並在正面(與膠體接觸面)右上角截角做記號。緊接將轉漬膜以 5 % 脫脂奶(溶於 0.1 % PBS/Tween 中)進行 blocking 步驟，以室溫 1 小時為條件進行。取出轉漬膜後於小盒中以 0.1 % PBS/Tween 清洗 5 分鐘共 3 次。取封口袋放入 2 ml 的一級抗體(溶於 0.1 % PBS/Tween 中)，再將轉漬膜以鑷子放入，並將封口袋中的汽泡趕去後用封口機封住，以 4 隔夜進行。隔天取出轉漬膜後置於小盒中以 0.1 % PBS/Tween 清洗 5 分鐘共 3 次。取封口袋加入 2 ml 的二級抗體溶於 1 % PBS/Tween 中)，用鑷子將轉漬膜放入其中，再將封口袋中的汽泡趕去後用封口機封住，於室溫下搖盪進行 1 小時，最後取出轉漬膜後以 0.1 % PBS/Tween 於小盒中清洗 5 分鐘共 3 次。

壓片步驟：(暗室中進行)

將轉漬膜浸泡於 ECL 試劑之混合液(每瓶各取 500 μ l 等比例混合)中 1 分鐘反應。以保鮮膜平整包覆好轉漬膜並正面朝上放置於壓片卡匣 (Cassette) 內，再用膠帶固定保鮮膜。以 Hyperfilm 軟片進行壓片，感光時間依轉漬膜上螢光亮度決定時間長短，約 5 秒至 1 小時不等。感光完成後放入顯影劑進行顯影步驟(時間依實際觀察決定)，再以清水沖洗 30 秒後放入定影劑中，過 30 秒後再以清水沖洗 30 秒，底片經晾乾後以 Kodak digital science 1D 分析軟體進行結果分析。

轉漬緩衝液配製如下：

組成	重量 (g)
Tris	12.1
Glycine	72
100% Methanol	750 ml
加 DDW 到總體積 5000 ml	

* 配製試劑先加二次水到 4000 ml，待完全溶解後再加入 750 ml 的 100% 甲醇，最後加二次水到達 5000 ml 即可。

B、利用流式細胞儀檢測蘆薈大黃素對人類血癌細胞株細胞內細胞週期素的影響⁹⁰

給予不同濃度蘆薈大黃素 (0、25 μ M) 的血癌細胞種入 12 孔洞平盤，擺進 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培養箱進行培養，48 小時

後來檢測細胞週期素改變的情形。

培養 48 小時後收集離心，除去培養基，將細胞拍散並加入 100 μ l PBS，再把細胞移入 96well 培養皿中，離心，小心倒掉上清液，加入 100 μ l 1% formaldehyde 並置於冰上 15 分鐘，再加入 100 μ l 100% methanol 置於冰上 30 分鐘，離心去除 formaldehyde 及 methanol 並用含 0.1% BSA 的 PBS 離心於 1500 rpm 3 分鐘清洗兩次後，加入 100 μ l 含 0.1% Triton X-100 及 0.1% Sodium citrate 的 PBS 於冰上 45 分鐘，離心並以含 0.1% BSA 的 PBS 離心於 1500 rpm 3 分鐘清洗兩次後，加入 50 μ l anti-cyclins 單株抗體並於室溫下反應 2.5 小時，離心並以含 0.1% BSA 的 PBS 離心於 1500 rpm 3 分鐘清洗兩次，加入 50 μ l 二次抗體（FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody）並於室溫下避光反應 0.5 小時，離心並以含 0.1% BSA 的 PBS 離心於 1500 rpm 3 分鐘清洗兩次後，加入 200 μ l 含 4 μ g/ml PI 及 0.1 mg/ml RNase A 的 PBS 於室溫下再避光反應 0.5 小時，接著用流式細胞儀分析細胞內 cyclins 的變化。此實驗用的抗體均用含 0.1% FBS 及 0.1% sodium azide 的 PBS 稀釋。每個數據收集 10000 顆細胞，數據以 Cell Quest[®]軟體進行處理分析⁸⁹。

7、 檢測蘆薈大黃素對人類血癌細胞株是否會產生細胞凋亡的情形

A、 利用流式細胞儀檢測蘆薈大黃素對人類血癌細胞株產生細胞凋亡的情形

給予不同濃度蘆薈大黃素的血癌細胞種入 12 孔洞平盤，擺進 37 °C、5% CO₂ 的培養箱進行培養，72 小時後檢測細胞凋亡的情形。

將不同組別的細胞懸浮液分別移到 15 ml 離心管中離心(1500 rpm、5 分鐘)。倒掉上清液，再將細胞完全打散後加入 2 ml/wells 的 PBS 緩衝液離心(1500 rpm、5 分鐘)。倒掉上清液，將細胞完全打散後，以 4 °C 冰的 70%酒精進行細胞固定步驟(以"SHAKE 3"速度震盪，一滴一滴緩慢將酒精滴入)，隨後將細胞固定步驟完成的樣品置於-20 °C 冰箱隔夜存放。隔天，將樣品從冰箱取出後離心(1500 rpm、5 分鐘)以去除酒精，之後將細胞完全打散。加入 2 ml 的 PBS 緩衝液清洗 1 次後將細胞完全打散。最後在每個試管中加入 500 µl 的 PI stain 染劑(其量可視細胞數目增減)，避光反應 30 分鐘。在檢查 FACS 專用管是否破損後，於管子外標上樣品編號備用。以 1 ml pipette 在 15 ml 離心管中抽吸數次後，將細胞移到 FACS 專用管後避光置於冰上。最後以流式細胞儀(Flow cytometry; FACS)進行樣品分析，

一秒細胞數不超過 300 顆細胞，每個數據收集 12000 顆細胞，數據以 Cell Quest[®]軟體進行處理分析。

B、利用電泳法來檢測蘆薈大黃素對人類血癌細胞株產生細胞凋亡的情形

給予不同濃度蘆薈大黃素的血癌細胞種入 10cm 細胞培養盤，擺進 37℃、5% CO₂ 的培養箱進行培養，72 小時後收集離心並移除培養液，利用 DNA 抽取 KIT(G-NOME BIO101 Inc.) 將 DNA 抽取出來。首先將細胞收集放在 15 ml 離心管中並小心將 PBS 吸乾淨，接著加入 1.85 ml Cell Suspension Solution 左右搖晃使細胞完全均勻分散，加入 50 μl RNase Mix. 搖晃均勻，再加入 100 μl Cell Lysis/Denaturing Solution 搖晃均勻，放入 55℃ 水浴鍋中 30 分鐘，取出加入 25 μl Protease Mix. 搖晃均勻，再放入 55℃ 水浴鍋中 90 分鐘，加入 500 μl Salt-Out Mixture 小心混合均勻並將檢體分裝到 2ml 離心管中，置於冰上 10 分鐘，接著離心 15000 rpm 10 分鐘後小心吸取上清液放入 15ml 離心管中，加入 2 ml TE-buffer 混合均勻，接著加入 8 ml 100% 酒精，小心緩慢混合均勻。此時若 DNA 抽取成功，經輕輕搖晃會出現白色絲狀棉絮。接著離心 1500 rpm 10 分鐘，小心倒掉上清液後，將 15 ml 離心管倒立放置自然風乾。風乾後 15 ml 離心管底

部會有透明狀 pellet，即為 DNA，用 50 μ l TE buffer，若不易溶解時，可以加熱促進溶解。

將處理完成的 DNA 與 10x DNA loading dye 混合，接著用 100 mV agarose (0.5x TBE buffer ; 2% agarose) 進行電泳，以 EtBr(Eithidium bromide)染色，最後放入 UV 燈下檢查並照相。

8、數據分析

數據結果以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)表示，各組與對照組間之數據分析以 *paired-t* test 進行統計比較。當 $p<0.05$ 表示在統計學上具有差異。