

國立台東大學生命科學系所
碩士論文

指導教授：廖尉岑 博士

運用生物資訊分析工具及蛋白質體學技術
來建立一個整合性藥物篩選開發平台

**To establish an integrated drug screening
platform by using bioinformatics and
proteomic technologies**

研究生：王沛懿 撰

中華民國九十六年六月

國立台東大學

學位論文考試委員審定書

系所別：生命科學研究所

本班 王沛懿 君

所提之論文：運用生物資訊分析工具及蛋白質體學技術來
建立一個整合性藥物篩選開發平台

業經本委員會通過合於 碩士學位論文 條件
 博士學位論文

論文學位考試委員會：李景欽

(學位考試委員會主席)

黃建宏

廖尉岑

(指導教授)

論文學位考試日期：96年 6月 1日

國立台東大學

附註：1. 本表一式二份經學位考試委員會簽後，送交系所辦公室及註冊組或進修部存查。

2. 本表為日夜學制通用，請依個人學制分送教務處或進修部辦理。

博碩士論文授權書

本授權書所授權之論文為本人在 國立臺東大學 生命科學 系(所)

組 九十五 學年度第 二 學期取得 碩 士學位之論文。

論文名稱：運用生物資訊分析工具及蛋白質體學技術來建立一個整合性藥物篩選開發平台

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予下列單位：

同意	不同意	單位
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	國家圖書館
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	本人畢業學校圖書館

得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或其他各種數位化方式重製後散布發行或上載網站，藉由網路傳輸，提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利(未申請者本條款請不予理會)的附件之一，申請文號為：_____，請將全文資料延後半年再公開。

公開時程

立即公開	一年後公開	二年後公開	三年後公開

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：廖耐考 (親筆簽名)

研究生簽名：王沛懿 (親筆正楷)

學號：9400805 (務必填寫)

日期：中華民國 96 年 6 月 12 日

1. 本授權書(得自 <http://www.lib.nttu.edu.tw/theses/> 下載)請以黑筆撰寫並影印裝訂於書名頁之次頁。

2. 依據 91 學年度第一學期一次教務會議決議:研究生畢業論文「至少需授權學校圖書館數位化，並至遲於三年後上載網路供各界使用及校內瀏覽。」

誌謝

2005年春天，院子裡的鐵樹開花了，而且開得比往年還要大，婆婆說：『今年會有不只一樁的喜事哦！』結果，那年暑假我先生考上了教師甄試，而我考上了研究所，同時也懷孕了，這可真是三喜臨門。於是帶著雀躍不已的心情，我開始準備再次迎接我的學生生活。工作了三年，如今能重返大學校園，當個單純的學生是多麼令人興奮的事，因為我可以暫時不用為備課而煩惱，卻能坐享老師們給予我的豐富知識，但是化學系畢業的我卻對生命科學這門學問有如門外漢一般，而身懷六甲的我要在兩年內通徹這門學問，並做出研究報告，實在壓力很大，幸好我的指導教授廖老師非常有耐心的教導我，除了生物資訊方面的知識外，老師更不惜花費了資金與時間與我共同做實驗，直到讓我熟悉每一個實驗步驟的程序，同時老師也會適時的關心我並提醒我：『不要太勞累，若沒有健康的身體則家庭、工作、學業三者要如何兼顧？』而師母也在我生產後提供了我許多哺乳、養身的寶貴經驗。要我多休息，不要讓自己太勞累的叮嚀更是每次與師母見面時師母必定對我說的話，這些溫暖的言語不得不讓我覺得自己是上輩子修來的福氣，能遇上如此好的老師與師母，如今我有了這樣小小的成果最要感謝的也莫過於老師與師母了！

回想這兩年來，學業、家庭工作真的有時會讓我學的身心俱疲，但是有了老公的支持，婆家全員的強力支援，及父母每天長途電話的鼓勵和兄嫂們的關心，讓我能有信心的，毫無後顧之憂的在學業及工作上全力以赴，在此要對所有關心、照顧我的家人們致上十二萬分的謝意，謝謝你們，有你們真好！雖然說讀書是自己的事，但是由於自己是在職進修，對同事們造成的不便卻也不容忽略，所以我要特別感謝新生國中陳勝發校長的支持，教學組長辛勞的排課及所有必須遷就我課務調動的老師們，尤其更要感謝學長楊茂雄念在我身兼數職的情分上義務幫我上了數理班的專題課，讓我省下了不少備課的時間，讓我能有更多的時間把心思放在課業上，另外也要感謝我的學生及家長們總能體恤我的辛勞，適時的為我加油打氣，這一切的一切都打從心裡感動著我，同時也鞭策著我要更加的努力於各方面。

最後，我要感謝我疑難雜症的私人顧問，那就是系辦小姐惠嵐，由於在職生的我很少在學校出現，即使去了學校也總是來去匆匆，於是同學們有事情時總找不到我，這時惠蘭總會記得特別打電話提醒我，或是，當我有麼行政流程的問題時，惠蘭都會細心的為我解答，實在很謝謝他，而伴隨著我一起學習的還有好朋友們：玫伶、青苓、乃萍、以及實驗室的學弟妹一儒、思穎等，感謝他們一路相伴，閒暇時間的玩笑嬉鬧，抒解了我的種種壓力，課後的切磋討論更使我能有所精進，謝謝你們所給予我的一切。

短短的兩年，小小的一篇研究論文，其中所經歷的人、事、物都是我心裡想要感謝的對像，只是礙於文字有限、文筆不佳，無法一一詳述，所以就套一句老話：『得之於人者太多、出之於己者太少，那不如就謝天吧！』感謝上天這個巧

妙的安排，讓我的生活更加的充實，讓我的人生多添加了幾分色彩，謝謝您，老天爺！



中文摘要

有效率地從成千上萬的天然萃取物或化學合成化合物中，篩選出具有生物活性的藥物，一直是生醫研究的重大課題。本研究希望運用生物資訊分析工具及蛋白質體學技術來建立一個整合性藥物篩選開發平台，如此便能夠有效、快速且經濟地達成篩選藥物的目的。近年來，由於質譜儀技術的突破，配合原有的二維蛋白質電泳，形成極具研究潛力的蛋白質體學技術，可以分析細胞整體蛋白質的表現，對藥物作用或是生長發育等領域，提供全面性的研究策略。在本研究中，我們以大腸桿菌及其他模式生物為研究材料，以幾種作用機制已被深入探究的藥物，如 Vitamin k3、Adriamycin、Cisplatin、Mitomycin C、Sodium butyrate、及 2-Aminopurine 等為測試標準物，分析藥物處理及對照組之二維蛋白質電泳膠片，比較其蛋白質表現的差異，使用質譜儀技術鑒定蛋白質種類及數量。藥物的處理方式有單一使用、合併使用及時間序列處理等藥理研究模式。我們運用生物資訊工具分析實驗數據，建立加值資料庫，找出基因藥物作用網路，建立其藥物作用的機制模式。本研究成功發展出一個可以解讀藥物作用機制的數據分析及模式化系統，這個系統可以作為整合性藥物篩選開發平台，有效地進行藥物篩選工作，對開發新藥、基因藥物調控機制及環境毒理交互作用等領域將有基礎性的貢獻。

關鍵詞：生物資訊、蛋白質體學、藥物篩選開發平台

Abstract

The effective screening for novel active natural or synthetic compounds is always an important issue in biomedical research. Our study is going to establish an integrated drug screening platform by using bioinformatics and proteomic technologies. Recently the utilization of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis coupled with mass spectrometry is effective in profiling protein expression. Proteomic analysis greatly enriches our global view of the dynamic changes of cellular proteins during the embryo development or chemicals stimulation. In this study, the total cellular proteins from the standard chemicals (such as Vitamin k3 , Adriamycin , Cisplatin , Mitomycin C , Sodium butyrate , and 2-Aminopurine)treated E coli. cells were separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and analyzed by PDQuest Advanced 8.01 analysis software to screen the differential protein spots. Differentially expressed spots were analyzed by mass spectrometry for peptide mass finger data and identified by Mascot software and SWISS-PROT protein database. Anaysis of drug-perturbed cellular proteomes can identify genomic patterns of chemosensitivity and provides valuable information for target validation. By comparing to other model system, especially the database of the drug discovery program from the National Cancer Institute (NCI) of U.S., we will establish a multidimensional (expression, location, time course and drug effects) secondary database. The new development should serve as a model to find novel drug candidates and provides a possible cue to improve the integrated large databases on pharmacology.

Key word : Bioinformatics , Proteomics , Drug screen platform

目錄

	頁次
目錄	III
『圖表』目錄.....	V
專有名詞對照表	VI
中文摘要	I
英文摘要.....	II
第一章 緒論	
I、模式生物與藥物篩選平台.....	1
壹、細胞毒性篩選平台.....	1
貳、生化活性篩選平台.....	2
參、高通量篩選平台.....	2
II、蛋白質體學與生醫研究.....	3
壹、基因體.....	3
貳、生物資訊.....	3
參、二維蛋白質電泳、質譜分析與蛋白質體學.....	4
III、研究動機與實驗目的.....	4
第二章 材料與方法	
I、實驗材料.....	5
壹、大腸桿菌.....	5
貳、其他模式生物.....	5
II、實驗方法.....	5
壹、菌株的培養.....	5
貳、藥物處理.....	6
參、蛋白質收集.....	6
肆、蛋白質定量.....	6
伍、等電焦電泳分析.....	6
陸、十二硫酸脂鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳.....	7
柒、電泳圖譜掃瞄及比對(PDQuest).....	8
捌、質譜分析.....	10
玖、生物資訊分析.....	12
第三章 結果	
壹、藥物對大腸桿菌的毒性.....	16
貳、藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	16
參、藥物合併使用對大腸桿菌的毒性及蛋白質表現的影響.....	17
肆、藥物處理時間對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	20
伍、2-Aminopurine 處理對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	20

陸、大腸桿菌蛋白質表現的質譜分析.....	86
第四章 討論.....	23
壹、藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	23
貳、藥物合併使用對大腸桿菌的毒性及蛋白質表現的影響.....	24
參、藥物處理時間對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	25
肆、2-Aminopurine 處理對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	26
伍、藥物對大腸桿菌蛋白質表現影響的生物資訊分析.....	26
第五章 結論.....	28
參考文獻.....	90
附錄.....	100



『圖表』目錄

	頁次
圖 1 實驗設計流程.....	29
圖 2 藥物對大腸桿菌的毒性.....	30
圖 3 VK ₃ 對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	31
圖 4 Sodium butyrate 對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	35
圖 5 Adriamycin 對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	39
圖 6 Cisplatin 對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	42
圖 7 VK ₃ 兩倍劑量使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	46
圖 8 VK ₃ 及 Sodium butyrate 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	52
圖 9 VK ₃ 及 Adriamycin 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	59
圖 10 VK ₃ 藥物處理時間對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	63
圖 11 2-Aminopurine 對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	70
圖 12 VK ₃ 及 2-Aminopurine 對大腸桿菌蛋白質表現的影響.....	74
圖 13 使用不同藥物時增加的蛋白質表現模式.....	83
圖 14 使用不同藥物時減少的蛋白質表現模式.....	84
圖 15 藥物對大腸桿菌蛋白質表現影響的模式化.....	85
表 1 SDS 膠片取點質譜分析結果.....	86

專有名詞對照表

ACN	Acetonitrile
APS	ammonium persulfate
bis	N · N' -methylene-bisacrylamide
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cm	centimeter
DTT	dithiothreitol
DNA	deoxyribonucleic acid
IAA	indole-3-acetic acid
IEF	isoelectric focusing
IPG	immobilize pH gradient
g	gram
hr	hour
L	liter
μl	microliter
μm	micrometer
M	molar
mg	milligram
min	minute
ml	millimeter
mM	millimolar
MS	mass spectrometry
mRNA	messenger ribonucleic acid
PBS	phosphate buffer saline
SDS	sodium dodecyl sulfate
TCA	trichloroacetic acid
TEMED	N · N · N' · N' -tetramethylethylenediamine
V	voltage
v/v	volume:volume ratio
VK ₃	Vitamin k3
2D	two dimension

第一章 緒論

有效率地從成千上萬的天然萃取物或化學合成化合物中，篩選出具有生物活性的藥物，一直是生醫研究的重大課題。本研究希望運用生物資訊分析工具及蛋白質體學技術來建立一個整合性藥物篩選開發平台，如此便能夠有效、快速且經濟地達成篩選藥物的目的。

I、模式生物與藥物篩選平台

大部分藥物篩選的目的是尋找能夠治療或預防人類疾病的藥物，但是除了臨床試驗，也就是到了藥物篩選的最後階段外，在科學倫理的要求之下，我們必須尋找適當的模式生物作為藥物篩選前期的平台及標準。模式生物的選擇主要是根據研究目的、研究資源、實驗方法的配合及實驗結果的解釋延伸性等因素而決定(Lindon, Holmes, & Nicholson, 2007)。目前在藥物活性、毒性及作用機制測試階段(Blumenthal & Goldenberg, 2007)，常用的模式生物有細菌(Hsiao & Siebert, 1999)、酵母菌(Sturgeon, Kemmer, Anderson, & Roberge, 2006)、線蟲(Artal-Sanz, de Jong, & Tavernarakis, 2006)、斑馬魚(A. L. Rubinstein, 2003)(Zon & Peterson, 2005)(Sood et al., 2006)、大鼠、小鼠(Mahadeva & Shapiro, 2005)以及人類細胞株(Firsov et al., 2000)等。每種模式生物都有其優缺點，例如大腸桿菌及酵母菌，有生長快速、容易測試等優點，此外酵母菌有 2300 種蛋白質(佔 38%左右)與已知的哺乳動物蛋白質相似，因此酵母菌成為一種不錯的癌症研究模式生物(Sturgeon et al., 2006)(Gegan et al., 2006)，但是不易直接推演至人類其他多細胞代謝疾病(如糖尿病)的作用機制上；斑馬魚目前是一種在國際上受廣泛關注的模式生物，可用於建立基因功能研究、人類疾病基因型/表型的研究、藥物篩選和鑑定等領域(A. L. Rubinstein, 2003)(Zon & Peterson, 2005)(Sood et al., 2006)。至於最接近人類的黑猩猩，則是來源缺乏、價格昂貴，僅能在人體試驗前，做為藥物毒性的確認檢驗。

壹、細胞毒性篩選平台

細胞毒性篩選平台就是以藥物對細胞或菌株的毒殺作用，這種篩選方式可以大量進行，甚而可以半自動、全自動地來進行篩選工作(Liao, Wu, & Wu, 2000; Monks et al., 1991; Perez, Godwin, Handel, & Hamilton, 1993; Voigt, 2005; Wu, Liao, & Chang, 1993)。就抗菌藥物開發而言，傳統方法是利用培養基上的細菌為目標，尋找能殺死細菌或抑制細菌生長的藥物，這種方式的缺點包括需要足夠的藥量來進行篩選，而且無法找到具有部分制菌活性的藥物(Faessel, Levasseur, Slocum, & Greco, 1999; Zhang et al., 2007)。另一方面，利用細胞株來進行細胞毒性篩選，是目前尋找抗癌藥物的主要方式，以美國國家癌症研究所主導的 NCI60 計畫規模

最大(R. Huang, Wallqvist, & Covell, 2006)。大部分的細胞株毒性篩選試驗是利用染劑呈色法，如常見的-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay(L. V. Rubinstein et al., 1990)(Wu et al., 1993)，根據粒線體中琥珀酸去氫酵素(Succinate dehydrogenase)會將 tetrazolium 轉為藍色 formazan 的原理，來算出細胞的相對活性。另外也使用流式細胞儀來檢定藥物是否經由細胞凋亡(apoptosis)的方式來毒殺細胞。由於許多神經組織及細胞病變是經由細胞凋亡的方式，因此目前也有許多篩藥平台是反向進行，建立細胞凋亡試驗，尋找可以保護神經細胞的藥物(Zhang et al., 2007)。

貳、生化活性篩選平台

生化活性篩選平台是以單一或少數幾個生化代謝途徑、酵素基質反應、及生物分子特性等作為偵測標準(C. Smith, 2007)。這種篩選方式有時可以大量進行，甚而可以完全自動地來進行篩選工作，但樣品大多需要純化，否則偵測靈敏度會降低。例如有實驗室發展出「固定化蛋白質動態擷取技術」來篩選中草藥，利用 CD28 接受器 (T-cell membrane receptor)固定於晶片上，來篩選得到一抗過敏藥物小分子(Dong, Chuang, Forrest, Lin, & Chen, 2006)；也有實驗室發展抑制各種病毒的篩選平台(C. F. Huang, Lin, Ho, Chen, & Yang, 2006; J. C. Lee et al., 2003; J. C. Lee, Chang, Chi, Hwang, & Hsu, 2004; J. C. Lee et al., 2005; J. C. Lee, Yu, Lien, Chang, & Hsu, 2005; Yang et al., 2005)；也有利用生物發光細菌，進行環境汙染物毒性篩選的平台，或是利用生物感測器系統檢測細胞基因毒性(Loo, Wu, & Altschuler, 2007; Nadanaciva, Bernal, Aggeler, Capaldi, & Will, 2007; Polte et al., 2007)。

參、高通量篩選平台

高通量藥物篩選(high throughput screening)是近年興起的高科技，配合先進的自動機電及電腦技術，各大藥廠及國家級研究機構運用其於藥物先導物的篩選。高通量藥物篩選是一組平台，包括化合物庫、標靶選擇、標靶和化合物反應的測試方法的建立(Senisterra et al., 2006; Severson et al., 2007)(Yan, King, He, Caldwell, & Zhou, 2006b)。近年來由於大量基因體計畫的完成，利用生物資訊工具配合微陣列等功能基因體學技術，可以有效率地找出開發新藥物的作用目標(Edwards et al., 2007)，以基因工程建立細胞外的測定方法，類似生物感測器的方式，結合自動化機器，建立平台做高通量篩選(Lundholt, Heydorn, Bjorn, & Praestegaard, 2006)(Shigaki et al., 2007)。另一方面，在成效上比較有爭議的是組合化學(combinatorial chemistry)的使用，合成大量小分子有機化合物為藥物庫(drug libraries)，然後進行篩選。等到找出具活性的藥物 (leads)後，再用有機合成進行官能基或分子形狀的修飾，希望得到具有穩定性及專一性之理想的藥物。

目前已經有藥物利用此策略開發而並進入臨床實驗的階段(Brana & Sanchez-Migallon, 2006; Forstner, Leder, & Mayr, 2007; M. Y. Lee & Dordick, 2006)。

II、蛋白質體學與生醫研究

蛋白質體學 (Proteomics)，是考慮結構和功能層次上，對整體蛋白質進行的研究，也是在 90 年代初期，所謂體學(Omics)風潮下的產物(Walgren & Thompson, 2004; Wang, Chiu, & He, 2006)。藉助質譜儀的高靈敏度及其樣本處理方式上的突破，蛋白質體學技術能在短時間內大規模分析特定樣品內的蛋白質。生物醫學研究上的許多問題，包括基礎及臨床醫學都可利用此技術探討。實驗設計上可以比較兩種樣本之間(如腫瘤與非腫瘤)、或是同一樣本在不同條件下(如處理不同藥物)，整體蛋白質表現之狀況及其相關的標誌分子(biomarker)(Gunawardana & Diamandis, 2007; Kikuchi & Carbone, 2007)。

壹、基因體

公元二〇〇〇年六月二十六日，人類基因體的序列圖譜草稿宣佈完成，生命科學研究登上有史以來的發展高峰，從此人類科技文明步入後基因體時代。隨著大量基因體的定序及微陣列基因分析的應用，產生了許多生物學的新領域，如功能性基因體(Functional genomics)，蛋白質體(Proteome)，轉錄體(Transcriptome)，代謝體(Metabolome)等，整合了生理、藥理、遺傳和演化等各層面資源的研究(Cowell & Hawthorn, 2007; Sequeira & Turecki, 2006)。在這些領域中，基因體學主要是探討各別基因在染色體上的分佈、有無變異及其在不同生理狀況下表現的情形，配合微陣列基因晶片(一種革命性的技術，可以同時定量成千上萬個基因的表現)，能夠瞭解細胞內基因之間是如何互相調控，並可為一些疾病提供新的診斷，治療方法。然而基因體學只能瞭解組織細胞中 DNA 轉錄為 mRNA 的情形，而 mRNA 的表現量並不等於真正具功能的蛋白質表現量。因此，蛋白質體(Proteome)開始成為主要的研究方法(Heidecker & Hare, 2007; Jaluria, Konstantopoulos, Betenbaugh, & Shiloach, 2007; O'Hara, Ding, Bernat, & Franken, 2007)。

貳、生物資訊

由於電腦技術的精進與網路的普及，面對基因體解碼後的龐大序列資料，生物資訊學(Bioinformatics)便應運而生(Ettema, de Vos, & van der Oost, 2005; Gatenby & Frieden, 2007)。生物資訊，在早期的定義專指應用電腦在貯存及分析核酸和胺基酸序列和蛋白質結構數據；目前大家的認定是只要是應用計算機科學來處理生物學數據資料，進而提供解釋或建構模型的，都算是生物資訊的範疇。

生物資訊工具的種類包括資料庫、序列相似性尋找工具、序列和結構分析工具、立體結構分析、顯像工具、結構預測工具、血緣分類分析工具及代謝分析工具等 (T. L. Lee, Alba, Baxendale, Rennert, & Chan, 2006; Yan, King, He, Caldwell, & Zhou, 2006a)。重要的生物資訊網站有美國國家生物技術資訊中心(NCBI - The National Center for Biotechnology Information)；歐洲分子生物實驗室(EMBL - The European Molecular Biology Laboratory)；瑞士生物資訊研究所(ExPASy, at Swiss Institute of Bioinformatics)等。

參、二維蛋白質電泳、質譜分析與蛋白質體學

蛋白質二維電泳在四十年前便已發展完備，其原理是蛋白質混合物經二維電泳分離。在取出細胞內的蛋白質後，第一維先將蛋白質樣品以帶電量不同來分離，接著第二維以分子量不同來分離，電泳膠片經染劑染洗後，可在膠片上辨識大部分蛋白質的位置。然而由於蛋白質無法大量鑑定，在應用上便受到限制，直到質譜儀的突破性改進與生物資訊學的出現，蛋白質二維電泳方才重新受到重視，與質譜儀、生物資訊形成蛋白質體學的核心。目前蛋白質二維電泳使用特製電泳儀與電泳膠片，可以輕易操作，再現性也不錯(Barrett, Brophy, & Hamilton, 2005; Bradshaw & Burlingame, 2005)。

早期質譜儀主要應用於分析化學領域。其運作原理是讓化學分子先離子化(帶上正或負電荷)，然後使其在強大電場驅動下，於真空管路內飛行一定距離後，撞擊偵測標靶，產生光電訊號。分子質量不同，則飛行到達標靶時間即不同；因此只要分析數種已知質量的化學分子在同一質譜儀飛行時間的長短，即可得知待測分子之質量。最近在樣品離子化的技術突破性增進後，質譜儀開始應用於分析 DNA 或蛋白質等生物大分子。在二維電泳膠片上所分離之上千種蛋白質，可以分別取出並利用胰蛋白酶切割成胺基酸片段，接著送入質譜儀分析這些胺基酸片段的各別質量。質量決定出來後，直接將這些質量數目組合輸入資料庫(胰蛋白酶切割所有已知蛋白質成所形成胺基酸片段的質量數目組合資料庫)內比對，立刻可以得知蛋白質的身份(Elrick, Walgren, Mitchell, & Thompson, 2006; Hoorn, Hoffert, & Knepper, 2006; Nagele, Vollmer, Horth, & Vad, 2004; Stephens, Quach, & Harry, 2005)。

III、研究動機與實驗目的

由於有效率地從成千上萬的天然萃取物或化學合成化合物中，篩選出具有生物活性的藥物，一直是生醫研究的重大課題。本研究希望運用生物資訊分析工具及蛋白質體學技術來建立一個整合性藥物篩選開發平台，如此便能夠有效、快速且經濟地達成篩選藥物的目的。實驗設計流程如圖 1 所示。

第二章 材料與方法

I、實驗材料

壹、大腸桿菌

實驗中主要材料是 *Escherichia coli*. BCRC NO.11509，購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，菌株的培養及保存依照生物資源保存及研究中心的建議([http:// www.bcrc.firdi.org.tw/wwwbcrc/main.jsp](http://www.bcrc.firdi.org.tw/wwwbcrc/main.jsp))。BCRC11509 是一株測試抗生素耐受性的標準菌株，相關資料文獻充分，而且對實驗室操作人員無感染性。來源是 FDA strain Seattle 1946，全名是 *Escherichia coli*. (Migula) Castellani and Chalmers (BCRC NO.11509=ATCC 25922 =CIP 76.24 =DSM 1103 =JCM 5491 =NCIMB 12210)(Fan, Fett, & Mitchell, 2007; Fass & Barnishan, 1979; Fuchs, Barry, & Brown, 1997; Koseki & Yamamoto, 2006; Lin, Lee, Sheu, & Lin, 2004)。

貳、其他模式生物

本研究也嘗試檢測其他模式生物包括酵母菌、豐年蝦、斑馬魚等。

II、實驗方法

壹、菌株的培養

BCRC11509 使用培養基為 Medium 66, TRYPTIC SOY BROTH OR TRYPTIC SOY AGAR (DIFCO 0369) 配製 1 L 所需的藥品:

藥品名稱	重量(克重)
Tryptone	15.0 g
Soytone	5.0 g
NaCl	5.0 g
Agar	15.0 g

最後調整 pH 值到 7.3，然後放入高壓滅菌鍋 (autoclave) 中，於高溫 121 °C，蒸汽壓 15 Psi 狀態下，滅菌 20 分鐘。

貳、藥物處理

我們選擇幾種常用的藥物作為標準處理，包括 VK₃(medadione sodium bisulfite)、Adriamycin、Cisplatin、Mitomycin C、Sodium butyrate、及 2-Aminopurine 等，大腸桿菌以不同濃度之藥物處理 4hr，然後利用洋菜擴散法分析其抑菌作用。實驗重複至少三次以上，每次每處理濃度至少三盤以上，若各稀釋倍數中僅有一種稀釋倍數培養皿之菌落數為 10~150 個，則以該稀釋倍數之三個培養皿之菌落數平均值成其稀釋倍數，得其菌數。在後續的蛋白質體實驗，藥物濃度選擇其 IC₅₀ 值。

參、蛋白質收集

將實驗室培養的大腸桿菌以 6000G 的轉速離心 15 分鐘，蒐集上層澄清液，並以 0.22 μ m 的過濾網過濾，之後，加入 20%(v/v)的 TCA(trichloroacetic acid;Sigma Chemical CO.)，然後分裝在四支微量離心管中，放入-20 $^{\circ}$ C 的冰箱靜置 30 分鐘。將其取出後在 4 $^{\circ}$ C 的環境下以 13000G 的轉速離心 10 分鐘，倒掉上層液體，得到的沉澱物加入丙酮後再放入-20 $^{\circ}$ C 的冰箱保存備用。

肆、蛋白質定量

蛋白質定量:(Biorad assay)

以 bovine serum albumin (BSA) 作為定量的標準蛋白質。各取 800 μ l 的標準液 (各含 0、5、10、15、20 μ g 的 BSA) 和 200 μ l 的 Bio-Rad protein dye 混合。用分光光度計測其在 595 nm 時的吸光值，畫出一條標準曲線。測樣品在 595 nm 時的吸光值，和標準曲線進行比對。

伍、等電焦電泳分析

1. 蛋白質裝填：至 4 $^{\circ}$ C 冰箱取出一支微量離心管。以 13000G 離心 10 分鐘後，倒掉上層澄清液，在室溫下乾燥 30 分鐘，接著加入 300 μ l Rehydration Buffer (8M urea, 2%CHAPS, 50mM dithiothreitol; Bio-Rad) 均勻混和後，將此蛋白質樣品平均注入一條 Focusing Tray (Bio-Rad) 中，取兩片 wicks，分別置於正負兩極上方。再使用夾子將 17 公分的 IPG (Bio-rad) strip 撕開，膠體面朝下，對準 Tray 上的正負極，小心的放下膠條，避免有任何氣泡產生，然後以大約 2.5ml 的礦物油均勻覆蓋在膠條上，以免 buffer 蒸發而乾掉燒焦，最後蓋上蓋子，把此 Focusing Tray 放入 IEF Cell 中。

2. 等電膠電泳分析

Protean IEF Cell(Bio-Rad)設計程式如下：

R (Rehydration)：20°C，50V，12 小時，此一步驟的目的是讓 Rehydration buffer 和樣本混和並吸入 IPG strip 膠條中。

S₁ (condition Step)：250V，200min，linear，目的是移去鹽類離子及污染物。

S₂ (Voltage Reagent)：10000V，2.5hrs，linear。

S₃ (Final Focusing)：10000V，40000V-hr，linear。

S₄ (Hod step)：500V，以避免過度反應發生。

3. 平衡

配製 Equilibration Buffer：

Equilibration Buffer I：取 13.5ml 的 30%Glycerol(Bio-Rad)，加進 Equilibration Buffer I (Bio-Rad) (6M urea,0.375 M Tris-HCl,pH 8.8,2% SDS,20% glycerol,2%(w/v)DTT; Bio rad) 的瓶子中，放在磁石攪拌器上攪拌，直到溶解為止。

Equilibration Buffer II：取 13.5ml 的 30%Glycerol(Bio-Rad)，加進 Equilibration Buffer II (Bio-Rad) (6M urea,0.375 M Tris-HCl,pH 8.8,2% SDS,20% glycerol,2.5%(w/v)iodoacetamide;Bio rad) 的瓶子中，放在磁石攪拌器上攪拌，直到溶解為止。

1. 將 strip 自 focusing tray 取出後，把膠條先過去離子水兩次，然後將膠面朝上，把底部的水及礦物油以廚房用的紙巾大致吸除。再將 strip 放入裝有 Equilibration Buffer I 的長玻璃管中，以震盪器調低轉速搖盪 15-20 分鐘（在搖盪過程中膠面要朝上）。
2. 取出膠條，過去離子水兩次，將膠面朝上，把底部的水用廚房專用紙巾大致吸除，然後把 strip 放入裝有 Equilibration Buffer II 的長玻璃管中，以震盪器調低轉速搖盪 15-20 分鐘（在搖盪過程中膠面要朝上）。

陸、十二硫酸脂鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳

先將大小玻璃以清潔劑清洗乾淨，再用 70% 的酒精消毒後擦拭並乾燥，然後架於注膠台上。

a. 注膠：

配製一片 12% 的 gel 所需的藥品

藥品	體積
40%acrylamide,0.8%bis-acrylamid(Bio-rad)	10.6ml
MillQ	15.4ml
1.5M Trip PH8.8	8.8ml
10% ammonium persulfate(sigma)	350µl
TEMED(Bio-rad)	14µl

小心的將配好的溶液加入大小玻璃的夾縫中，之後覆上一層去離子水，目的在將未乾的膠壓平，靜置約 15 分鐘後膠片即可使用。

b. 封膠：

先將洋菜膠用微波爐預熱，使其融化，置於一旁稍後封膠時使用。然後將膠片上的水甩乾，並小心地將 IPG strip 置於膠片之上緣，使其與膠面接觸密合，但須注意接合處不能有氣泡，否則蛋白質將無法向下至膠片，之後取適量的洋菜膠注滿整片膠片上緣，待洋菜膠凝固時即可進行第二維電泳。

c. 配製 running buffer

配製 3L 所需藥品：

藥品	重量(克重)
glycine	43.2g
Tris-base	3.05g
SDS	3g

d. 第二維電泳

將 Running buffer 加入電泳槽內至少蓋滿膠片玻璃下緣附近的白金線，而上層 buffer 的量亦是需高過白金線。蓋上電泳槽上蓋，插上電源，使用 16V 跑 40 分鐘後，改為 24V，直到藍色的線下降至距離玻璃下緣 5cm 處即停止。

柒、電泳圖譜掃瞄及比對(PDquest 之運用)

膠體染色

1. 銀染：

依據 Bio-rad 出產的 silver Stain Plus，過程主要分成四大步驟：

a. 固定步驟-20 分鐘

固定溶液的製備（針對 17 公分的膠片）

試劑	體積	體積百分比
Reagent Grade Methanol	200ml	50% V/V
Reagent Grade Acetic acid	40ml	10% V/V
Fixative Enhancer concentration	40ml	10% V/V
Deionized Distilled Water	120ml	30% V/V

將電泳之後的膠片放入此固定液中，並以低轉速搖盪 20 分鐘。

b.潤洗步驟 -20 分鐘

將固定後的膠片拿起放入另一裝有 500 毫升去離子水的容器中潤洗，低轉速的搖盪 10 分鐘後在換新的去離子水，重複此步驟一次。

c.染色步驟 -20 分鐘

染色劑的製備

順序	試劑	體積
1	去離子蒸餾水	35ml
2	銀錯合物溶液	5ml
3	還原調節溶液	5ml
4	影像顯影劑	5ml
5	影像加速顯現劑	50ml

步驟：

在燒杯中依序加入上表的試劑，並加入磁石攪拌，此試劑需在五分鐘內配製完成且立即使用。染色時以震盪器調低轉速搖盪，並讓膠片沒入溶液中，否則背景會有污點。時間大約為 20 分鐘，但實際所需的染色時間要依據蛋白質的量而定。

此步驟所需的試劑除了影像加速顯現劑需在 4°C 下冷藏保存外，其餘皆可在室溫下保存。不過，需特別注意的是在配製前須讓影像加速顯現劑的溫度回到室溫才可進行配製。

d.停止步驟-15 分鐘

將膠拿起，放入裝有 5% 的醋酸溶液的容器內，以震盪器調低轉速搖盪至少 15 分鐘，之後再以蒸餾水潤洗，再搖盪 10 分鐘即可完成銀染。

完成 a~d 步驟後，若對於結果不滿意，可以用 1% 的雙氧水進行去染工作，然後再重複步驟 a~d 重染一次。

2.Coomassie blue R-250

將電泳完畢的膠片浸入 coomassie blue(sigma) (0.125%，Coomassie blue R-250, 50%methanol, 10%Acetic acid) 中，以震盪器調低轉速搖盪至少 24 小時。染色後的膠片先浸入 destain I buffer (50%Methanol, 10%acetic acid) 以震盪器調低轉速搖盪，直到看出最靠近膠片末端的藍線，接著再將膠體繼續浸入 destain II buffer (5%methanol, 7%acetic acid)，同樣以震盪器調低轉速搖盪直至看清最靠近膠片末端的藍線為止，若一直得不到滿意的結果，可更換 destain II buffer 數次，直到染色的結果滿意。

膠片掃描、軟體比對(PDQuest 使用)

將二維電泳圖譜通過掃描器掃描成 TIF 檔，運用二維分析軟體 PDQuest 8.0.1 可對數位化的圖譜進行各種圖像分析，包括蛋白質在圖譜上的定位。

捌、質譜分析

在將樣品置入 mass 前，需有兩天的前置作業，且所有程序皆必須在無菌下操作。

第一天

1. 蛋白質取點

用 70% 酒精清洗過的剪刀將 100 μ l 或 200 μ l 之 tip 尖端剪出直徑約 1mm~2mm 大小的圓孔，然後在 laminar flow 下，用 tip 將所欲觀察的膠點挖起，並放入 650 μ l 的試管中。

2. 去染

加入 100 μ l 的去染溶液(用 30mM 的鐵氰化鉀及 100mM 的硫代硫酸鈉以 1:1 的體積混合配置而成)

3. 還原/烷化

a. 加入 50mM 的 DTT/25mM 的碳酸氫銨混合溶液(pH8.5)100 μ l 至試管中，浸泡樣品 1hr。

b. 以 10000G 離心 1 min，然後去除 DTT。

c. 加入 100mM 的 IAA/25mM 的碳酸氫銨混合溶液(pH8.5)100 μ l 至試管中，並在室溫下陰暗處浸泡樣品 1hr。

d. 以 10000G 離心 1 min，然後去除 IAA。

4. 加入 50% 的氰化甲烷/25mM 的碳酸氫銨混合溶液(pH8.5)100 μ l~200 μ l 至試管中，浸泡樣品 15mins，並重複一次。(此目的在將 Coomassie blue 的染劑洗出)

5. 去除上述的溶液，並加入適量 100% 的氰化甲烷，然後以 10000G 離心 1min，且在 5mins 後移除之。(此步驟蛋白質會膨脹變為白色)

6. 在室溫下利用真空離心抽氣裝置乾燥膠片 5mins。

7. 將 0.1g 的胰蛋白酶溶於碳酸氫銨水溶液(pH8.5)配成 10 μ l 的胰蛋白酶溶液，並將此溶液加入該試管中。

8. 用玻棒對膠直接旋轉，使膠成碎片(太厚或太碎都不好)。若胰蛋白酶溶液沒有覆蓋過膠片，則再加入 25mM 的碳酸氫銨水溶液直至覆蓋過膠片。

9. 以 10000G 離心後並放於 37 $^{\circ}$ C 的水浴至少 16 小時。

第二天

1. 取一支 650 μ l 的試管至於燒杯中，並在燒杯中加入足以覆蓋過試管的甲醇，接著用玻棒持續撥動試管 20mins，以趕出試管內的空氣。倒掉甲醇，加入 DDH₂O，然後繼續用玻棒撥動 10 分鐘，以確保可以完全趕出試管內的空氣，

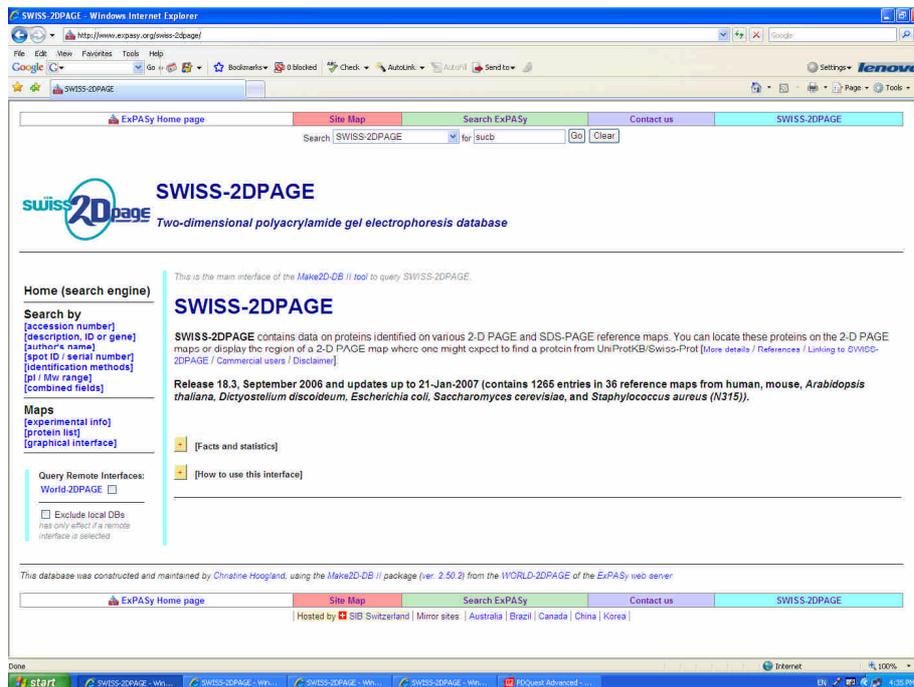
接著將清洗過的試管攤平置於烘箱烘乾備用。

2. 將前一天放入水浴的試管拿起，加入 50 μ l 的 50% 的氰化甲烷/5% 的甲酸混合溶液，並用超音波震盪 1min，再停 1min，重複 10 次。(避免連續震盪太久造成高溫而破壞蛋白質)
3. 以 10000G 離心 15~20mins，使膠沉澱方便取上層液，吸取上層液至已消毒烘乾過的試管。(須注意千萬不可取到底部的膠)
4. 重複步驟 2 和 3，並將取得的上層液結合，然後將試管在 35 $^{\circ}$ C 下真空抽氣離心乾燥至少 1.5hrs。

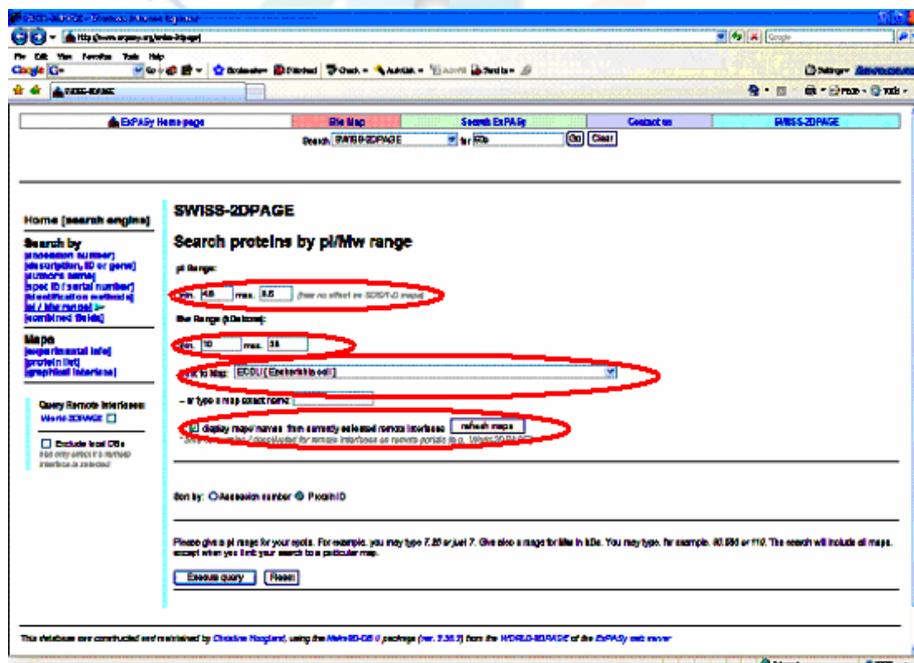
蛋白質膠內水解 (in-gel digestion)

將膠點泡於 200 μ l 50% Acetonitrile (ACN, 配製於 25mM 之 NH_4HCO_3 , pH8.0)，輕拍並放置十分鐘，然後吸掉 ACN，重複 2~3 次；接著用 100% ACN 將膠點脫水，置於室溫五分鐘後移除 100% ACN，用蛋白質抽乾機(Speed-Vac)將膠體抽乾，約 30 分鐘。為了得到膠體中的 peptide 片段，利用胰蛋白酶水解膠體。用 5~10 μ l 的胰蛋白酶 (10 μ g/ml，配製於 25mM NH_4HCO_3 , pH8.0) 處理退染後且抽乾的膠體，置於室溫約十分鐘，然後放置在 37 $^{\circ}$ C 的培養箱中約 16~24 小時，以充分進行膠內分解 peptide 片段的作用。接著先將與膠體作用的胰蛋白酶溶液收集到一支新的微量離心管。再用含有 50% ACN 和 5% formic acid 的溶液 5 μ l 再次萃取，靜置於室溫三十分鐘至一小時後，收集萃取後的溶液，此步驟進行兩次。之後將所有收集到的萃取物 (約 25 μ l) 用 Speed-Vac 抽乾，約三至四個小時。樣品委託譜德公司進行質譜儀分析(Peptide Mass Fingerprinting Analysis)，樣品經 Q-TOF ESI/MS/MS 分析後，於 MASCOT 資料庫比對的蛋白質 ID 鑑定結果。

玖、生物資訊分析



1. 進入全球最早也最完整的蛋白質資訊網站 SWISS-2DPAGE，並在視窗的左方找到 search proteins by pI/ Mw range，點選進入畫面。



2. 鍵入 pI 值及蛋白質分子量的範圍，並選擇為 ECOLI map，按下 refresh maps 便開始搜尋。

Home (search engine)

Search by [accession number] [description, ID or gene] [author's name] [spot ID / serial number] [identification methods] [pI / Mw range] [combined fields]

Maps [experimental info] [protein list] [graphical interface]

Query Remote Interfaces: World 2DPAGE

Exclude local DBs has only effect if a remote interface is selected

Searching in 'SWISS-2DPAGE' for proteins identified in the following range of pI (4.0-5.5) - Mw (10000-20000)
Search limited to the Escherichia coli 'ECOLI' (Escherichia coli) map.

Query Result: 30 matches

ID (AC)	Spot ID	pI	Mw
AHP_C_ECOLI (P0A088)	2D-000LKZ	5.01	21579
AROK_ECOLI (P0A087)	2D-000LJO	5.29	17936
ATPE_ECOLI (P0A086)	2D-000LSH	5.48	14937
BCP_ECOLI (P0A085)	2D-000LQ2	5.02	15874
CH10_ECOLI (P0A084)	2D-000LP9	4.92	16087
CH10_ECOLI (P0A084)	2D-000LQL	5.15	15660
DKSA_ECOLI (P0A081)	2D-000LIR	5.01	17828
DKSA_ECOLI (P0A081)	2D-000LNZ	4.89	18709
DSBA_ECOLI (P0A084)	2D-000LKW	5.31	21973
DSBA_ECOLI (P0A084)	2D-000LKK	5.34	22464
DUT_ECOLI (P08988)	2D-000LOR	5.03	16155
DYS_ECOLI (P0A084)	2D-000LM1	5.01	19992
GPCA_ECOLI (P08066)	2D-000LUC	5.13	11775
GPCA_ECOLI (P08066)	2D-000LTS	5.00	12496
GPCA_ECOLI (P08066)	2D-000LSC	5.01	15083
HDIB_ECOLI (P0A082)	2D-000LUE	4.85	11521
HIS_ECOLI (P0A083)	2D-000LV7	5.02	10782
HIS_ECOLI (P0A083)	2D-000LTS	5.00	12496
HIS_ECOLI (P0A083)	2D-000LQS	5.45	15616
HIS_ECOLI (P0A083)	2D-000LQK	5.38	15560
IPVY_ECOLI (P0A084)	2D-000LKZ	5.01	21579
IYV_ECOLI (P0A085)	2D-000LSD	5.46	15083
RSS_ECOLI			

3. 依 pI 值及子分量的大小會出現數個符合上述條件的蛋白質，選擇其一有興趣的蛋白質點選便可進入單一蛋白質介紹。

Home (search engine)

Search by [accession number] [description, ID or gene] [author's name] [spot ID / serial number] [identification methods] [pI / Mw range] [combined fields]

Maps [experimental info] [protein list] [graphical interface]

Query Remote Interfaces: World 2DPAGE

Exclude local DBs has only effect if a remote interface is selected

View entry in simple text format

Entry name: AHP_C_ECOLI
Primary accession number: P0A088
Secondary accession number(s): P05627
Incorporated into SWISS-2DPAGE on: August 1, 1996 (release 2)
3D Annotations available until: March 31, 2004 (version 3)
General Annotation version last updated on: December 1, 2010 (version 14)

Description: A high hydrophobic redoxin subunit C [EC 5.1.1.1] (Peroxidase) (Thioredoxin peroxidase) (Aldol dehydrogenase reductase protein C2) (SMP-2) (Sulfite dehydrogenase-related protein 2) (SDS)

Gene name: hsdR
Ordered accession number: A01290

Accession species: Escherichia coli (TaxID: 833)

taxonomy: Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Betaproteobacteria; Epsilonclasserales; Desulfococcaceae

[1] MAPPING ON GEL
SHELVE-SPELIER: Published online [NCBI Expasy, EB, Intnl, Japan]
Piquelot C, Paganon S, Wilton M Jr, Hughes G, Aguilard D, Bouché A, Schirmer D, Borchers J-C, Hochstrasser D-P.
"The 2D proteome of the model organism Escherichia coli resequenced: the Escherichia coli SWISS-2DPAGE database"
Electrophoresis 17:45-51 (1996)

[2] MAPPING ON GEL
Verborgles RA, Abelson KZ, Papanicolaou A, Oak RL, Waldner F-D.
"Gene product database of Escherichia coli K12: edition 5"
J Mol Biol 191:329-341 (1986)

[3] MAPPING ON GEL
Published online [NCBI Expasy, EB, Intnl, Japan]
Tardif L, Rangoni C, Bize P-A, Aguilard D, Hochstrasser D-F, Borchers J-C.
"New perspectives in the Escherichia coli proteome investigation"
Proteomics 1:114-122 (2001)

[4] MAPPING ON GEL
Published online [NCBI Expasy, EB, Intnl, Japan]
Van J, Demich A-Y, Weil R, Bore F, Lenoir B, Faurio B.
"The proteomic 2D database of the model organism Escherichia coli: a proteomic analysis of E. coli"
Proteomics 2:1842-1848 (2002)

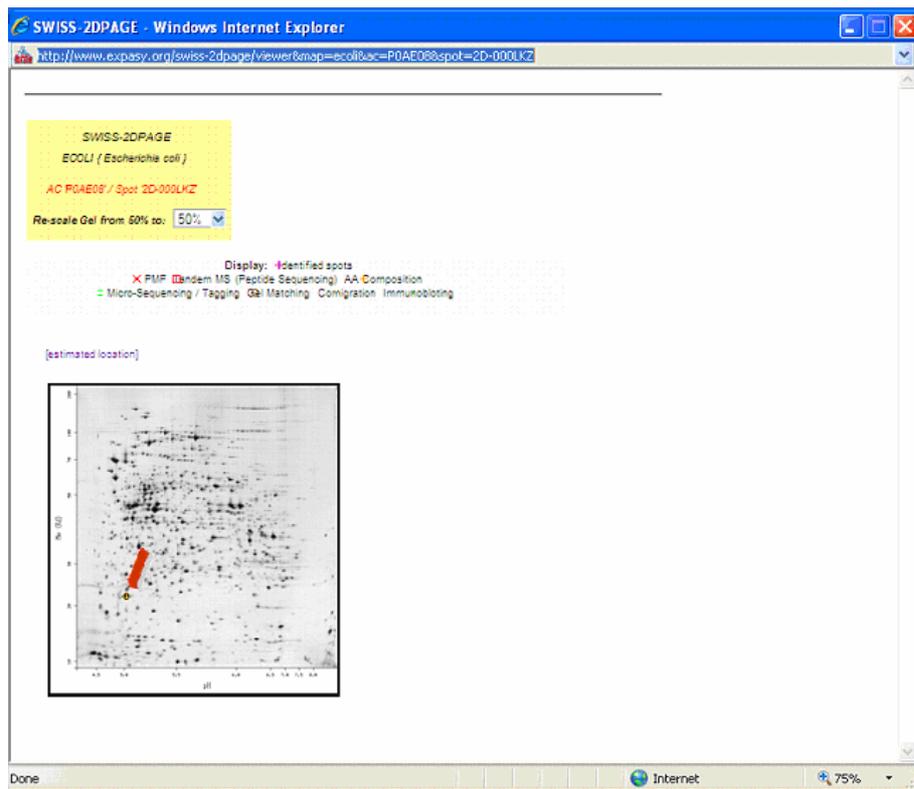
How to interpret a protein

ECOLI (Escherichia coli)

MAP LOCATIONS:
AHP_C_ECOLI pI 5.01 Mw 21579

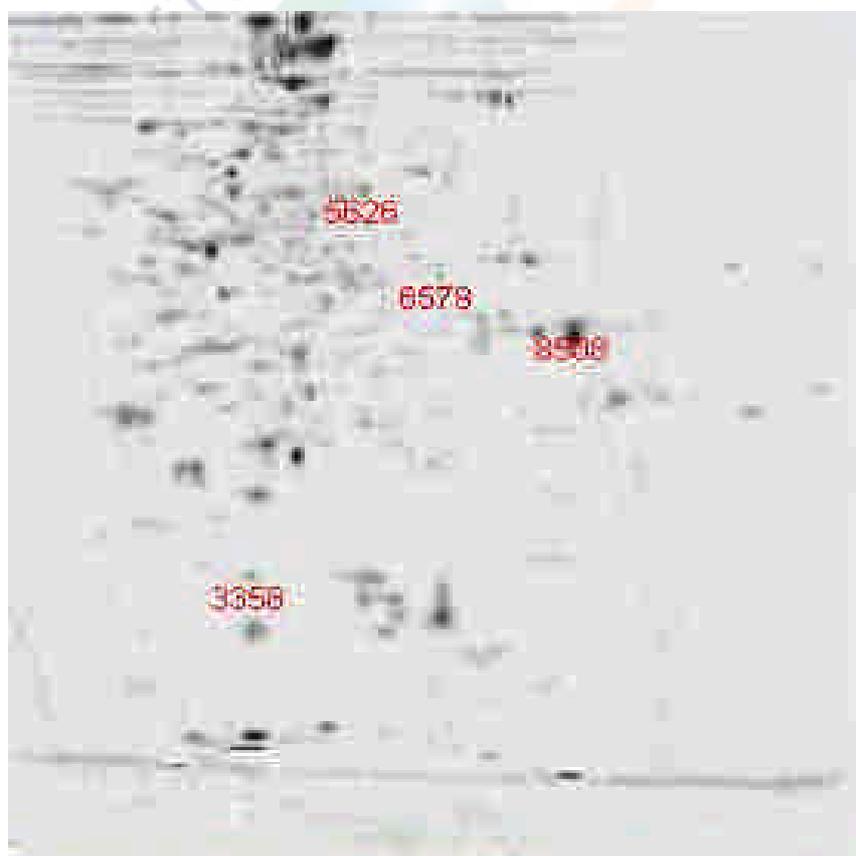
MAPPING (Mass spectrometry)
ANALYSIS COMPOSITION AND MICROSEQUENCE ANALYSIS

4. 進入此畫面後點選 MAP LOCATIONS，便會開啟另一視窗。



5. 由此可得知該蛋白質在 2D-PAGE 上的相對位置。
6. 運用上述方法找出下表中蛋白質的位置，並將其相對位置與本實驗中對照組的大腸桿菌蛋白質表現和以 VK₃ 處理四小時後大腸桿菌蛋白質表現的兩膠片比對時所產生的主膠比對，訂出已知蛋白質的 ssp 相對座標值，以做為每次不同膠片比對時所需觀察蛋白質的參考座標位置。

Protein name	Full name	pI	Mw	ssp
AhpC (7)	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (EC 1.11.1.15) (Peroxiredoxin) (Thioredoxin peroxidase) (Alkyl hydroperoxide reductase protein C22) (SCRIP-23) (Sulfate starvation-induced protein 8) (SSI8)	5.01	21579	3358
CheY (6)	Chemotaxis protein cheY	4.59	9749	?
SucB (4,5)	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex (EC 2.3.1.61) (E2) (Dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex)	5.4	52658	5626
LysA(1)	Diaminopimelate decarboxylase (EC 4.1.1.20) (DAP decarboxylase)	5.76	45059	6579
G3p1(2,3)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A (EC 1.2.1.12) (GAPDH-A)	6.28	32860	8508



第三章 結果

壹、藥物對大腸桿菌的毒性

針對每一種藥物或藥物的組合，我們利用洋菜擴散法測試其抑菌濃度，圖 1 是大腸桿菌以不同濃度之 VK₃ 處理 4hr 後，計算洋菜膠上菌落數而得到的數據。由於實驗目的是觀察藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響，因此要進行二維蛋白質電泳實驗時，藥物濃度選擇低於抑菌濃度 IC₅₀，避免收集到細胞死亡後降解的蛋白質。有鑑於實驗上的品質管控，除了抽取蛋白質進行二維電泳實驗外，藥物處理的大腸桿菌也重複進行洋菜擴散法實驗，作為控制實驗，確認菌種的一致性。

貳、藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響

1. VK₃ 對大腸桿菌蛋白質表現的影響

大腸桿菌先以 VK₃ 藥物處理過，收集其蛋白質，定量後進行二維蛋白質電泳，將膠片染色後掃描，再以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析，與未加藥物處理的大腸桿菌蛋白質膠片比對結果如圖 3-1、3-2、3-3。由圖 3-2 可知加入 VK₃ 藥物處理後的大腸桿菌，其蛋白質：RecA、GroES、Zwf、UspF 的濃度都有增加兩倍以上的變化，而蛋白質：DnaK、UspA、UspE、SodB、TrxA 的濃度則有減少兩倍以上的變化，蛋白質 Tpx 的濃度則是減少但並未達到減半的情形。另外從影像分析的結果中選擇其濃度變化有遞增或遞減的幾點蛋白質，並用 ExPasy 蛋白質體資料庫找出其可能的名稱，如圖 3-3，發現蛋白質：Odp2、ClpB、PflB 的濃度都有增加兩倍以上的變化，而蛋白質：GltD、Syn 的濃度則有減少兩倍以上的變化，蛋白質 Syr 的濃度則是增加但並未達到兩倍的情形。

2. Sodium butyrate 對大腸桿菌蛋白質表現的影響

大腸桿菌先以 Sodium butyrate 藥物處理過，收集其蛋白質，定量後進行二維蛋白質電泳，將膠片染色後掃描，再以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析，與未加藥物處理的大腸桿菌蛋白質膠片比對結果如圖 4-1、4-2、4-3。由圖 4-2 可知加入 Sodium butyrate 藥物處理後的大腸桿菌，其蛋白質：DnaK、RecA、GroEL、UspE 的濃度都有增加兩倍以上的變化，而蛋白質：UspA、SodB、Tpx、TrxA 的濃度則有減少兩倍以上的變化。另外從影像分析的結果中選擇其濃度變化有遞增或遞減的幾點蛋白質，並用 ExPasy 蛋白質體資料庫找出其可能的名稱，如圖 4-3，發現蛋白質：Sym、GroEL、ClpB、MurE 的濃度都有增加兩倍以上的變化，而蛋白質：FucK、TalB、Tig、Kad 的濃度則有減少兩倍以上的變化，蛋白質 HypB、OmpA 的濃度則是減少但並未達到減半的情形。

3. Adriamycin 對大腸桿菌蛋白質表現的影響

大腸桿菌先以 Adriamycin 藥物處理過，收集其蛋白質，定量後進行二維蛋白質電泳，將膠片染色後掃描，再以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析，與未加藥物處理的大腸桿菌蛋白質膠片比對結果如圖 5-1、5-2、5-3。由圖 5-2 可知加入 Adriamycin 藥物處理後的大腸桿菌，其蛋白質：DnaK、RecA、Gor、UspA、UspE、SodB、Tpx、TrxA 的濃度都有減少兩倍以上的變化。另外從影像分析的結果中選擇其濃度變化有遞增、遞減或沒有變化的幾點蛋白質，並用 ExPasy 蛋白質體資料庫找出其可能的名稱，如圖 5-3，發現蛋白質：NlpD、DegP 的濃度都有增加兩倍以上的變化，蛋白質 YliB 的濃度則是增加但並未達到兩倍的現象，而蛋白質 GlyA 的濃度則是沒有變化。

4. Cisplatin 藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響

大腸桿菌先以 Cisplatin 藥物處理過，收集其蛋白質，定量後進行二維蛋白質電泳，將膠片染色後掃描，再以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析，與未加藥物處理的大腸桿菌蛋白質膠片比對結果如圖 6-1、6-2、6-3。由圖 6-2 可知加入 Cisplatin 藥物處理後的大腸桿菌，其蛋白質：RecA、GroES、GroEL 的濃度都有增加兩倍以上的變化，而蛋白質：DnaK、UspA、UspE、SodB、Tpx、TrxA 的濃度則有減少兩倍以上的變化。另外從影像分析的結果中選擇其濃度變化有遞增或遞減的幾點蛋白質，並用 ExPasy 蛋白質體資料庫找出其可能的名稱，如圖 6-3，發現蛋白質 HtpG 的濃度有增加兩倍以上的變化；蛋白質：GlnA、FtsZ、Syd、NusA 的濃度則有減少兩倍以上的變化，而蛋白質 GlpK 的濃度則是增加但並未達到兩倍；蛋白質 K6pF2、IlvC 的濃度則是減少但並未達到減半的情形。

參、藥物合併使用對大腸桿菌的毒性及蛋白質表現的影響

1. VK₃ 對大腸桿菌蛋白質表現的影響

大腸桿菌先以兩倍劑量的 VK₃ 處理過，收集其蛋白質，定量後進行二維蛋白質電泳，將膠片染色後掃描，再以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析，與未加藥物處理和加 VK₃ 一倍劑量處理的大腸桿菌蛋白質膠片比對，結果如圖 7-1、7-2、7-3。

由圖 7-2 可知：

以 VK₃ 兩倍劑量處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質表現比較，發現蛋白質：RecA、GroEL、PflB、Ygin、SodA 的濃度有增加兩倍以上的變化，但蛋白質：DnaK、UspA、PyrI、UspE、SodB、Tpx、TrxA、Syr、GltD、HypB 的濃度則有減少兩倍以上的變化；蛋白質：Odp2、ClpB、Syn 的濃度則是減少但並未達到減半，蛋白質 Zwf 的濃度則是增加但並未達到兩倍，而蛋白質 GroES 和 UspF 的濃度則是不變。

以 VK₃ 兩倍計量處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 VK₃ 一倍劑量處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較，發現蛋白質：RecA、Syn、Ygin、GroEL、SodA

的濃度有增加兩倍以上的變化，但蛋白質：GroES、Zwf、UspF、PyrI、Tpx、Odp2、Syr、ClpB、GroES 的濃度則有減少兩倍以上的變化;蛋白質：GltD、PflB、DnaK、HypB 的濃度則是減少但並未達到減半，蛋白質：TrxA、UspA、PflB 的濃度則是增加但並未達到兩倍，而蛋白質 UspE、GroES 和 SodB 的濃度則是不變。

另外從影像分析的結果中選擇其濃度變化有遞增或遞減的幾點蛋白質，並用 ExPasy 蛋白質體資料庫找出其可能的名稱，如圖 7-3，發現：

以 VK₃ 兩倍劑量處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較，其蛋白質 Syn 的濃度有增加兩倍以上的變化，但蛋白質：CysK、DgaL、DapA 的濃度則有減少兩倍以上的變化;蛋白質 OpgG、AtpA、RL9 的濃度則是增加但並未達到兩倍。

以 VK₃ 兩倍劑量處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 VK₃ 一倍計量處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較，發現蛋白質：CysK、OpgG 的濃度則有減少兩倍以上的變化;蛋白質：DgaL、DapA 的濃度則是減少但並未達到減半，蛋白質：R19、Syn 的濃度則是增加但並未達到兩倍，而蛋白質 AtpA 的濃度則是不變。

2. VK₃ 和 Sodium butyrate 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響

大腸桿菌先以 VK₃ 和 Sodium butyrate 藥物處理過，收集其蛋白質，定量後進行二維蛋白質電泳，將膠片染色後掃描，再以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析，與未加藥物、只加 VK₃ 藥物處理和只加 Sodium butyrate 藥物處理的大腸桿菌蛋白質膠片比對，結果如圖 8-1、8-2、8-3。

由圖 8-2 可知：

以 VK₃ 和 Sodium butyrate 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較，發現蛋白質：UspE、MurE、GltD 的濃度有增加兩倍以上的變化，但蛋白質：DnaK、UspA、FucK、TalB、HypB、TrxA、Syr 的濃度則有減少兩倍以上的變化;蛋白質：Tpx、Kad、OmpA、PpsA、PflB、Sym、GroEL、Odp2、Syn 的濃度則是減少但並未達到減半，蛋白質 RecA 的濃度則是增加但並未達到兩倍，而蛋白質 Zwf、GroES、UspF 和 Tig 的濃度則是不變。

以 VK₃ 和 Sodium butyrate 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與只以 VK₃ 處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較，發現蛋白質：UspE、Tig、GltD 的濃度有增加兩倍以上的變化，但蛋白質：RecA、Kad、OmpA、PpsA、PflB、Sym、GroES、Zwf、UspF、Odp2、Syr 的濃度則有減少兩倍以上的變化;蛋白質：DnaK、Syn 的濃度則是減少但並未達到減半，蛋白質：MurE、ClpB、TrxA、Tpx Tpx 的濃度則是增加但並未達到兩倍，而蛋白質 FucK、UspA 和 HypB 的濃度則是不變。

以 VK₃ 和 Sodium butyrate 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與只以 Sodium butyrate 處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較，發現蛋白質：UspE、Tpx、Tig、GltD 的濃度有增加兩倍以上的變化，但蛋白質：RecA、GroEL、HypB、Sym、ClpB、

Syr 的濃度則有減少兩倍以上的變化;蛋白質:FucK、TalB、Kad、OmpA、PpsA、PflB、MurE、Syn 的濃度則是減少但並未達到減半,蛋白質:TrxA 的濃度則是增加但並未達到兩倍,而蛋白質 DnaK、Zwf、GroES、UspF、Odp2 和 UspA 的濃度則是不變。

另外從影像分析的結果中選擇其濃度變化有遞增或遞減的幾點蛋白質,並用 ExPASy 蛋白質體資料庫找出其可能的名稱,如圖 8-3,發現:

以 VK₃ 和 Sodium butyrate 處理後的大腸桿菌蛋白質表現,與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較,發現蛋白質 Syk1 的濃度有增加兩倍以上的變化,但蛋白質:MurE、Syq、FabD、K6pF2、DhsA、G3p1 的濃度則有減少兩倍以上的變化。

以 VK₃ 和 Sodium butyrate 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與只以 VK₃ 處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較,發現蛋白質:Syk1、DhsA 的濃度有增加兩倍以上的變化,但蛋白質:FabD、K6pF2、MurE、G3p1 的濃度則有減少兩倍以上的變化;蛋白質 Syq 的濃度則是增加但並未達到兩倍。

以 VK₃ 和 Sodium butyrate 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與只以 Sodium butyrate 處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較,發現蛋白質:Syk1 的濃度有增加兩倍以上的變化,但蛋白質:Syq、MurE 的濃度則有減少兩倍以上的變化;蛋白質:FabD、K6pF2 的濃度則是減少但並未達到減半,蛋白質:DhsA、G3p1 的濃度則是增加但並未達到兩倍。

3. VK₃ 和 Adriamycin 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響

大腸桿菌先以 VK₃ 和 Adriamycin 藥物處理過,收集其蛋白質,定量後進行二維蛋白質電泳,將膠片染色後掃描,再以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析,與未加藥物、只加 VK₃ 藥物處理和只加 Adriamycin 藥物處理的大腸桿菌蛋白質膠片比對,結果如圖 9-1、9-2、9-3。

由圖 9-2 可知:

以 VK₃ 和 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較,發現蛋白質:RecA、Gor、UspA、UspE、SodB、Tpx、TrxA、YliB、GlyA 的濃度則有減少兩倍以上的變化,蛋白質:NlpD、DegP 的濃度則是減少但並未達到減半。

以 VK₃ 和 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與只以 VK₃ 處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較,發現蛋白質 DnaK 的濃度有增加兩倍以上的變化,但蛋白質:RecA、Gor 的濃度則有減少兩倍以上的變化;蛋白質:UspA、UspE、SodB、Tpx、TrxA 的濃度則是增加但並未達到兩倍,而蛋白質 YliB 和 NlpD、DegP 的濃度則是不變。

以 VK₃ 和 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與只以 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較,發現蛋白質 DnaK 的濃度有增加兩倍以上的變化,但蛋白質:GlyA、YliB、NlpD、DegP 的濃度則有減少兩倍以上的變化;蛋

白質：UspA、UspE、SodB、Tpx、TrxA 的濃度則是增加但並未達到兩倍，而蛋白質 RecA 的濃度則是不變。

另外從影像分析的結果中選擇其濃度變化有遞增或遞減的幾點蛋白質，並用 ExPasy 蛋白質體資料庫找出其可能的名稱，如圖 9-3，發現：

以 VK₃ 和 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較，發現蛋白質：OpgG、Syq 的濃度有增加兩倍以上的變化。

以 VK₃ 和 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與只以 VK₃ 處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較，發現蛋白質：OpgG、Syq 的濃度有增加兩倍以上的變化。

以 VK₃ 和 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現，與只以 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較，發現蛋白質：OpgG、Syq 的濃度有增加兩倍以上的變化。

肆、藥物處理時間對大腸桿菌蛋白質表現的影響

大腸桿菌先以 VK₃ 藥物處理，並分別在 1、1.5、2、2.5、3 小時後收集其蛋白質，定量後進行二維蛋白質電泳，將膠片染色後掃描，再以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析，與未加藥物的大腸桿菌蛋白質膠片比對，結果如圖 10-1、10-2、10-3。根據圖 10-2 和 10-3 中的長條圖，以蛋白質最大的表現量當作基準，依序算出每個蛋白質在 VK₃ 藥物處理的不同時間下，蛋白質的相對量，繪出 VK₃ 藥物處理時間與蛋白質相對量的折線圖，如圖 8-4。Type a 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加而大腸桿菌蛋白質的量減少；Type b 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加而大腸桿菌蛋白質的量先增加後減少；Type c 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加而大腸桿菌蛋白質的量也增加；Type d 代表特定 VK₃ 藥物處理的時間下會有表現的大腸桿菌蛋白質；Type e 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加，大腸桿菌蛋白質的量有震盪式的表現。屬於 Type a 的蛋白質有：DnaK、UspA、FtsZ、TalB、TrpG；屬於 Type b 的蛋白質有：GlpK 或 ThrC、Syr；屬於 Type c 的蛋白質有：PpsA；屬於 Type d 的蛋白質有：GroES、SodA、Gor、UspF、UspG、Tpx、YgiN；屬於 Type e 的蛋白質有：RecA、GroEL、Zwf、UspE、SodB、TrxA。

伍、2-Aminopurine 處理對大腸桿菌蛋白質表現的影響

大腸桿菌先以 2-Aminopurine 藥物處理過，收集其蛋白質，定量後進行二維蛋白質電泳，將膠片染色後掃描，再以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析，與未加藥物處理的大腸桿菌蛋白質膠片比對結果如圖 11-1、11-2、11-3。由圖 11-2 可知加入 2-Aminopurine 藥物處理後的大腸桿菌，其蛋白質：GroES、GroEL、UspE、UspF 的濃度都有增加兩倍以上的變化，而蛋白質：DnaK、RecA、UspA、

SodB、Tpx、YgiN、TrxA 的濃度則有減少兩倍以上的變化。另外從影像分析的結果中選擇其濃度變化有遞增或遞減的幾點蛋白質，並用 ExPasy 蛋白質體資料庫找出其可能的名稱，如圖 11-3，發現蛋白質：DnaB、Eno、ClpB、FkbA 的濃度都有增加兩倍以上的變化，而蛋白質：AtpB、PpiB、Syr、AroG 的濃度則有減少兩倍以上的變化；蛋白質 Pt1 的濃度則是增加但並未達到兩倍，蛋白質：DhsA、Odp2 的濃度則是減少但並未達到減半的情形，而蛋白質 ThrC 的濃度則是不變。

VK₃ 和 2-Aminopurine 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響

大腸桿菌先以 VK₃ 和 2-Aminopurine 藥物處理過，收集其蛋白質，定量後進行二維蛋白質電泳，將膠片染色後掃描，再以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析，與未加藥物、只加 VK₃ 藥物處理和只加 2-Aminopurine 藥物處理的大腸桿菌蛋白質膠片比對，結果如圖 12-1、12-2、12-3。

由圖 12-2 可知：

以 VK₃ 和 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較，發現蛋白質：UspF、DnaB、Eno、PflB 的濃度有增加兩倍以上的變化，但蛋白質：DnaK、RecA、UspA、SodB、Tpx、TrxA、AtpB、Odp2、PpiB、ThrC、AroG、DhsA、GltD、Syn 的濃度則有減少兩倍以上的變化；蛋白質：UspE、Syr、ClpB、FkbA 的濃度則是減少但並未達到減半，蛋白質 Pt1 的濃度則是增加但並未達到兩倍，而蛋白質：YgiN、GroES、GroEL、Zwf 的濃度則是不變。

以 VK₃ 和 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與只以 VK₃ 處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較，發現蛋白質：Tpx、DnaB、PflB 的濃度有增加兩倍以上的變化，但蛋白質：GroES、GroEL、UspE、YgiN、Odp2、PpiB、ClpB、AroG、FkbA、GltD 的濃度則有減少兩倍以上的變化；蛋白質：DnaK、UspF、TrxA、Pt1、AtpB、Eno、DhsA 的濃度則是減少但並未達到減半，蛋白質：Syr、SodB、RecA、Syn 的濃度則是增加但並未達到兩倍，而蛋白質 UspA、Zwf 的濃度則是不變。

以 VK₃ 和 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與只以 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較，發現蛋白質：DnaK、UspF、Pt1、DnaB、Eno、Syr 的濃度有增加兩倍以上的變化，但蛋白質：RecA、UspE、Tpx、AtpB、Odp2、ThrC、AroG、Zwf 的濃度則有減少兩倍以上的變化；蛋白質：SodB、DhsA 的濃度則是增加但並未達到兩倍，蛋白質：GltD、Syn 的濃度則是減少但並未達到減半；而蛋白質：FkbA、ClpB、PpiB、YgiN、TrxA、GroEL、UspA、GroES 的濃度則是不變。

另外從影像分析的結果中選擇其濃度變化有遞增或遞減的幾點蛋白質，並用 ExPasy 蛋白質體資料庫找出其可能的名稱，如圖 12-3，發現：

以 VK₃ 和 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較，發現蛋白質：DgaL、MetK 或 Idh、K6pF2、AroG 的

濃度則有減少兩倍以上的變化;蛋白質 PpsA 的濃度則是減少但並未達到減半,蛋白質:Syh、PflB 的濃度則是增加但並未達到兩倍。ssp 座標為 4502 的蛋白質經生物資訊的方式比對結果找到兩種可能的蛋白質,由於此兩種蛋白質 pI 值和 Mw 都非常接近,所以認為這兩種蛋白質都有存在的可能。

以 VK₃和 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與只以 VK₃處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較,蛋白質:DgaL、MetK 或 Idh、K6pF2、AroG 的濃度則有減少兩倍以上的變化;蛋白質:PflB、PpsA 的濃度則是減少但並未達到減半,蛋白質:Syh、AroG 的濃度則是增加但並未達到兩倍。ssp 座標為 4502 的蛋白質經生物資訊的方式比對結果找到兩種可能的蛋白質,由於此兩種蛋白質 pI 值和 Mw 都非常接近,所以認為這兩種蛋白質都有存在的可能。

以 VK₃和 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與只以 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現比較,發現蛋白質:K6pF2 的濃度則有減少兩倍以上的變化;蛋白質 PpsA、PflB、AroG 的濃度則是減少但並未達到減半,蛋白質:Syh 的濃度則是增加但並未達到兩倍,而蛋白質 MetK 或 Idh 的濃度則是不變。ssp 座標為 4502 的蛋白質經生物資訊的方式比對結果找到兩種可能的蛋白質,由於此兩種蛋白質 pI 值和 Mw 都非常接近,所以認為這兩種蛋白質都有存在的可能。



第四章 討論

壹、藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響

我們選擇幾種常用的藥物作為標準處理，包括 Vitamin k3(medadione sodium bisulfite)、Adriamycin、Cisplatin、Mitomycin C、Sodium butyrate、及 2-Aminopurine 等，大腸桿菌以不同濃度之藥物處理 4hr，然後收集其蛋白質，定量後進行二維蛋白質電泳。有些藥物(如 Mitomycin C)處理後，蛋白質電泳膠片無法用 PDQuest Advanced 8.0.1 進行分析，其電泳膠片圖則列於附錄中。

VK₃ 對大腸桿菌蛋白質表現的影響

維他命 K 又稱氫化甲茶甙〔Menadione〕，屬脂溶性維他命，維他命 K 共有三種，K1、K2 可由腸內菌製造，K3 則是合成物質。維他命 K 屬於 Quinone 類的物質，對於人體的功效是幫助凝血。VK₃ 曾進入第三期的癌藥試驗，其作用機制可能是造成細胞氧化壓力，導致細胞凋亡。以 VK₃ 藥物處理過的大腸桿菌蛋白質膠片比對結果顯示 RecA、GroES、Zwf、UspF 的濃度都有增加兩倍以上的變化，而 DnaK、UspA、UspE、SodB、TrxA 的濃度則有減少兩倍以上的變化，GroES、Zwf、DnaK、UspF 這些蛋白質變化與文獻報告相同(Han & Lee, 2006; Lasserre et al., 2006; Nystrom, 2006; Oishi et al., 2006)(Dwyer, Kohanski, Hayete, & Collins, 2007); 而 RecA、UspA、UspE、SodB 則與文獻報告相反(Han & Lee, 2006; Lasserre et al., 2006; Righetti & Boschetti, 2007; Weber, Kogl, & Jung, 2006)。一般來說 DnaK 或壓力相關蛋白質 UspA、UspE 等，在細胞受到氧化壓力時，會增量表現來保護細胞，蛋白質變化與文獻不同的地方，可能與菌種及培養狀態有關(Dwyer et al., 2007; Easton, Thompson, & Crowder, 2006; Han & Lee, 2006)。

另外從數據分析的結果中選擇其濃度變化有遞增或遞減的幾點蛋白質，並用生物資訊找出其可能的名稱，如 Odp2、ClpB、PflB GltD、Syn 等變化，則是本研究的發現。

Sodium butyrate 對大腸桿菌蛋白質表現的影響

丁酸鈉(sodium butyrate)原是抗氧化物質，最近發現有許多用途。例如可改變 SMN2 基因的 splicing pattern 進而治療脊髓肌肉萎縮症(Li, Wang, Cui, Chen, & Zhang, 2006)。丁酸鈉也是組織蛋白去乙酰醯基酶(HDAC; histone deacetylase)的抑制劑，有調控基因轉錄的效果進而使得外來基因表現量提升(Balakrishnan & Milavetz, 2007; Kumar, Sonnemann, & Beck, 2006; Vlasakova et al., 2007)。所以在這我們設計一組實驗，大腸桿菌先以 Sodium butyrate 藥物處理過，收集其蛋白質，定量後進行二維蛋白質電泳，蛋白質膠片比對結果如圖 4-1、4-2、4-3。

Sodium butyrate 會增加 DnaK、RecA、GroEL、UspE 的表現，而使 UspA、SodB、Tpx、TrxA 的濃度下降。另外從數據分析的結果發現蛋白質 Sym、GroEL、

ClpB、MurE、FucK、TalB、Tig、Kad、HypB、OmpA 的濃度發生變化。蛋白質變化與文獻互有異同(Arnold, McElhanon, Lee, Leonhart, & Siegele, 2001; Biard, Maratrat, Thybaud, Melcion, & Sarasin, 1992; Li et al., 2006)。由於組織蛋白去乙酰醯酶(HDAC; histone deacetylase)的抑制劑目前是重要的篩選藥物標的，因此蛋白質變化圖譜可以用來尋找新的 HdaC 抑制劑。

Adriamycin 對大腸桿菌蛋白質表現的影響

Adriamycin(俗稱為「小紅莓」，其藥物為紅色之故)是非常重要的抗癌藥物。其作用機制被深入研究，可能在 DNA，自由基，甚至蛋白質後轉譯修飾等層次發生作用(Abramov, Aronovitch, & Ramu, 1996; Amash, Brown, & Padron, 1995; Gelvan, 1997; Kaur & Russell, 1998)。大腸桿菌先以 Adriamycin 藥物處理過，二維蛋白質電泳蛋白質膠片比對結果如圖 5-1、5-2、5-3。

Adriamycin 藥物處理後的大腸桿菌，其蛋白質 DnaK、RecA、Gor、UspA、UspE、SodB、Tpx、TrxA 的濃度都有減少兩倍以上的變化。比較文獻的結果，可能是 Adriamycin 實驗劑量稍高，造成細胞受損嚴重。另外從數據分析的結果中找出蛋白質 NlpD、DegP、YliB、GlyA 的變化情形。可作為篩選藥物的參考圖譜。

Cisplatin 對大腸桿菌蛋白質表現的影響

順鉑(Cisplatin)也是非常重要的抗癌藥物，是唯一被使用於抗腫瘤藥物的重金屬物質，其作用機制之一為阻斷 DNA 的合成(Arner et al., 2001; Bhattacharya & Beck, 2002; Nimonkar, Le Gac, Villani, & Boehmer, 2006; Nowosielska & Marinus, 2005; Zdraveski, Mello, Marinus, & Essigmann, 2000)。大腸桿菌先以 Cisplatin 藥物處理過，二維蛋白質電泳蛋白質膠片比對結果如圖 6-1、6-2、6-3。

Cisplatin 降低 DnaK、UspA、UspE、SodB、Tpx、TrxA 的濃度，另外從數據分析的結果找出蛋白質 HtpG、GlnA、FtsZ、Syd、NusA、GlpK、K6pF2、IlvC 的濃度變化。可作為篩選藥物以及偵測重金屬物質的參考圖譜。

貳、藥物合併使用對大腸桿菌的毒性及蛋白質表現的影響

VK₃ 兩倍劑量對大腸桿菌蛋白質表現的影響

在此實驗，我們觀察 VK₃ 兩倍劑量的影響。二維蛋白質電泳蛋白質膠片比對結果如圖 7-1、7-2、7-3。

由結果可知高劑量 VK₃ 處理後，RecA、PflB、Zwf 的濃度增加，其他與壓力相關的蛋白質都大量減少。不同劑量的蛋白質表現圖譜，顯示在複雜的細胞環境下，不同劑量的藥物有偏好的作用途徑機制。從數據分析的結果中找出一些文獻上未注意到的蛋白質，其變化圖譜可作為篩選藥物，預測作用途徑機制的參考(Chen, 2006; Eisenstein, 2006; Han & Lee, 2006)。

VK₃ 和 Sodium butyrate 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響

VK₃ 和 Sodium butyrate 在氧化壓力機制的兩端上作用(Arnold et al., 2001; Bore et al., 2007; Grebenova et al., 2006)。在大腸桿菌上檢驗這兩種藥物處理後的蛋白質表現差異，可以提供氧化壓力機制的深入探討及理論建模的數據(Chen, 2006; Dwyer et al., 2007; Maillet et al., 2007)。合併藥物處理的大腸桿菌蛋白質膠片比對，結果如圖 8-1、8-2、8-3。部分結果如預期，有些壓力蛋白質 UspE、MurE 持續增加，有些下降，如果要進一步分析，則可以增加 VK₃ 和 Sodium butyrate 不同濃度比的實驗。從數據分析的結果及 ExPASy 蛋白質體資料庫，找出一些與氧化壓力機制可能有關的蛋白質，如 MurE、Syq、FabD、K6pF2、DhsA、G3p1 等，都可作為監測藥物處理效果的標的物。

VK₃ 和 Adriamycin 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響

VK₃ 和 Adriamycin 在藥理作用上有許多相同機制，同樣會造成氧化壓力(Gelvan, 1997; Nystrom, 2006)，但 Adriamycin 會直接作用到 DNA 上，而 VK₃ 則與細胞週期蛋白質磷酸化有影響(Kaur & Russell, 1998)。蛋白質膠片比對結果顯示以 VK₃ 和 Adriamycin 處理後，大腸桿菌受損嚴重，大部分蛋白質表現皆下降，而與 VK₃ 合併 Adriamycin 使用特定相關的蛋白質有 DnaK、RecA、UspA、UspE、SodB、Tpx、TrxA 等，其間的關係提供進一步的探討背景。另外從數據分析的結果中找出 OpgG、Syq 蛋白質的變化也值得注意。

參、藥物處理時間對大腸桿菌蛋白質表現的影響

在藥理作用機制研究上，觀察藥物處理時間與藥物效果之間的關係是很重要的實驗，因為藥物進入細胞後會反應、分解、代謝甚而排除。了解不同藥物處理時間的蛋白質表現變化，對基因調控及藥效才有更進一步的認識(Kuznetsov et al., 2007)。數據分析結果如圖 10-1、10-2、10-3。由不同時間的蛋白質表現變化，根據圖 10-2 和 10-3 中的長條圖，以蛋白質最大的表現量當作基準，依序算出每個蛋白質在 VK₃ 藥物處理的不同時間下，蛋白質的相對量，繪出 VK₃ 藥物處理時間與蛋白質相對量的折線圖。蛋白質變化的型態可分為五種：Type a 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加，而大腸桿菌蛋白質的量減少有 FtsZ、DnaK、TrpG、TaiB、UspA 等；Type b 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加，而大腸桿菌蛋白質的量先增加後減少，有 GlpK 及其他 10 個未鑑定蛋白質；Type c 代表隨著 Vitamin k3 藥物處理的時間增加，大腸桿菌蛋白質的量也增加，有 PpsA；Type d 代表特定 VK₃ 藥物處理的時間會有表現的大腸桿菌蛋白質，有 UspF、YgiN、GroES、SodA、GorR、UspG、和 Tpx 等；Type e 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加，大腸桿菌蛋白質的量有震盪式的表現，有 RecA、GroEL、UspE、SodB、TrxA、和 Zwf。結合時間序列實驗結果及原有藥物作用模式，可以更完整分析此藥物之作用機制

(Govorun & Archakov, 2002; Weinstein, 2001)。

肆、2-Aminopurine 處理對大腸桿菌蛋白質表現的影響

2-氨基嘌呤(2-aminopurine)是嘌呤的氨基化衍生物,細菌以 2-Aminopurine 藥物處理過,會減少 DNA 合成(Hong, Yeung, Funchain, Slupska, & Miller, 2005; Matic, Babic, & Radman, 2003; Matic, Ekiert, Radman, & Kohiyama, 2006; Pitsikas, Patapas, & Cupples, 2004; B. T. Smith, Grossman, & Walker, 2001)。選擇藥理機制單純的 2-氨基嘌呤進行藥物合併實驗,希望藥物合併處理後蛋白質表現也單純,易於分析。蛋白質質膠片比對結果如圖 11-1、11-2、11-3。

2-Aminopurine 藥物處理後的大腸桿菌,與 DNA 合成相關蛋白質 GroES、GroEL、DnaB、Eno、ClpB 如預期地增加(Matic et al., 2003; Matic et al., 2006; Miller et al., 1999; B. T. Smith et al., 2001)。

VK₃ 和 2-Aminopurine 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響

VK₃ 和 2-Aminopurine 藥物處理的大腸桿菌蛋白質膠片比對,結果如圖 12-1、12-2、12-3。

由圖 12-2 可知,VK₃ 對蛋白質 UspF、Pt1、DnaB、Eno 有增加濃度的影響。而 2Aminopurine 對蛋白質 Tpx、DnaB 的濃度有增加兩倍以上的影響,另外從數據分析的結果中找出蛋白質 DgaL、MetK 或 Idh、K6pF2、AroG 與此兩種藥物的交互作用機制可能有關。

伍、藥物對大腸桿菌蛋白質表現影響的生物資訊分析

為了更清楚了解藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現變化,將各種藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現數據加以整理,比較增加的或減少的蛋白質表現變化如圖 13 及圖 14。實驗室未來將增加處理藥物的種類,累積足夠數量數字後,再用類神經網路程式進行模式辨識的分析。

另一個分析數據的方式如圖 15,將蛋白質表現變化數據輸入 Pathway 分析軟體,針對藥物作用路徑做生物資訊分析。Pathway 是一個具備圖像化的系統生物學工具,利用數學運算,模擬、建模、及分析生化路徑(biochemical pathway)(Andersen & Mann, 2006; Ettema et al., 2005; Gatenby & Frieden, 2007; Herrera et al., 2007)。生化路徑分析在於研究生物內元素間化學反應的關係。由於生化路徑的複雜度極高,利用數學運算模型化工具分析實驗及模擬資料後,以使用者較方便(drag-and-drop)的圖像介面,描繪出整個生化路徑,是目前比較為人接受的表現方式。除此之外,可進行敏感度分析,評估參數改變所帶來的影響,並標示出在生化路徑內可能的藥物標地。藉由實驗數據,細胞試驗的層級轉而對細胞訊息傳遞及調控層級的了解,進而辨識藥物或基因在生物功能上所能影響的

程度和機制。加上整合比較各種模式生物在網路上的微陣列基因分析數據，運用多層次自我組織圖神經網路，建立加值資料庫，找出具有代表性的基因藥物作用網路；建立一個基因藥物協同作用的機制模式。(T. L. Lee et al., 2006; Yamada et al., 2007; Yan, King, He, Caldwell, & Zhou, 2006a)



第五章 結論

運用生物資訊分析工具及蛋白質體學技術，本研究建立了一個整合性藥物篩選開發平台。以 VK₃、Adriamycin、Cisplatin、Mitomycin C、Sodium butyrate、及 2-Aminopurine 等幾種作用機制已被深入探究的藥物作為測試標準物，分析藥物處理及對照組之二維蛋白質電泳膠片。藉由質譜儀技術將膠片上之蛋白質點予以鑒定，我們可利用二維影像軟體進行全膠蛋白質定位，進而能比較不同條件下，其蛋白質表現的差異。

綜合藥物研究的結論如下：

- 1.不同的藥不只對單一蛋白質會有影響，一種藥物所影響的層面是很廣的。
- 2.同一種藥物在不同的時間會對細胞有不同程度上的影響。
- 3.合併藥物使用時，對相同的蛋白質可能會表現出加成或拮抗的效果。

本研究中的蛋白質體學實驗數據將整合其它資料庫，發展出一個跨模式生物，可以解讀分析藥物作用機制的數據並將其模式化的生物資訊系統。未來這個系統可以有效地進行藥物篩選工作，對開發新藥、基因藥物調控機制及環境毒理交互作用等領域將有基礎性的貢獻。



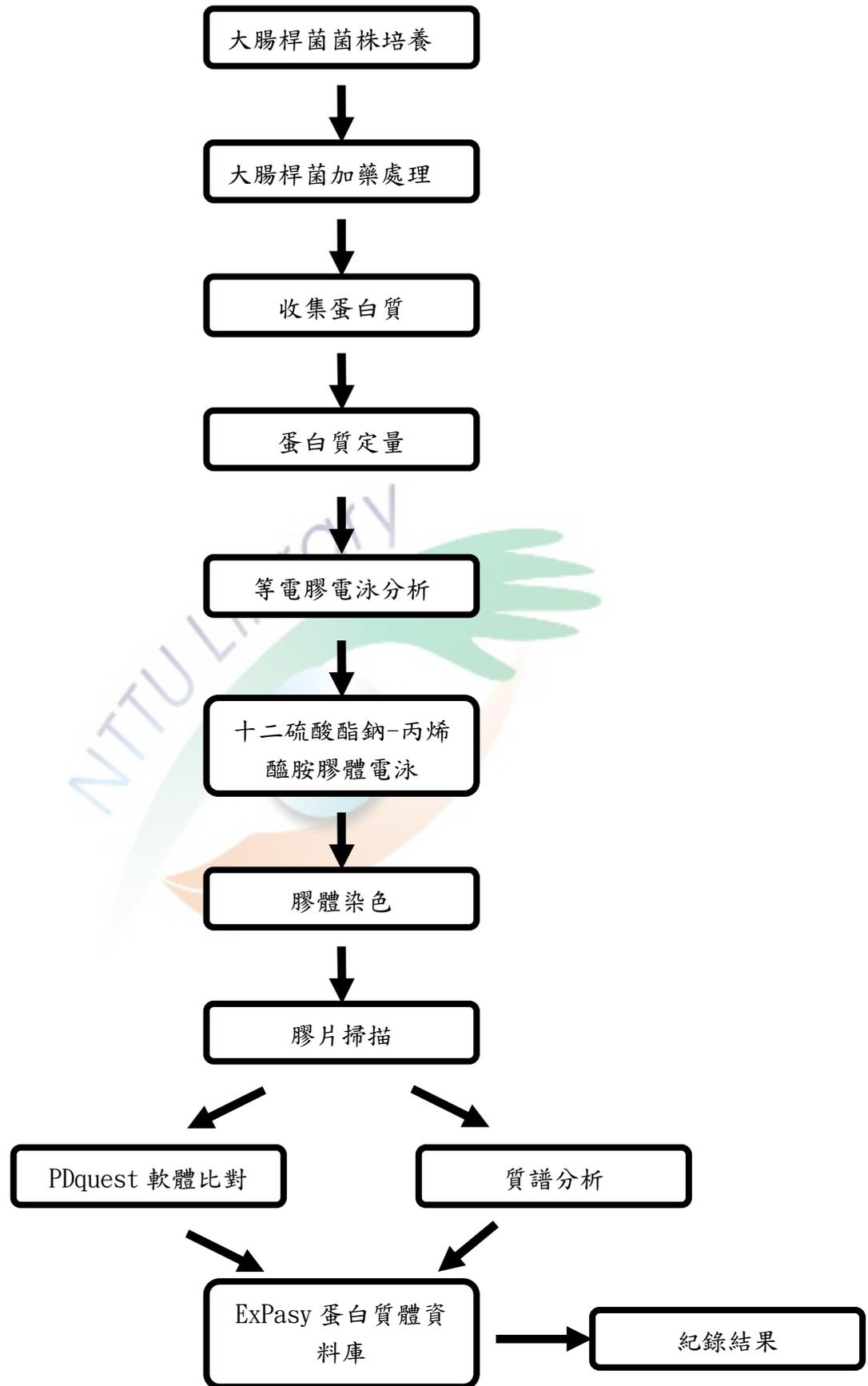


圖 1 實驗設計流程

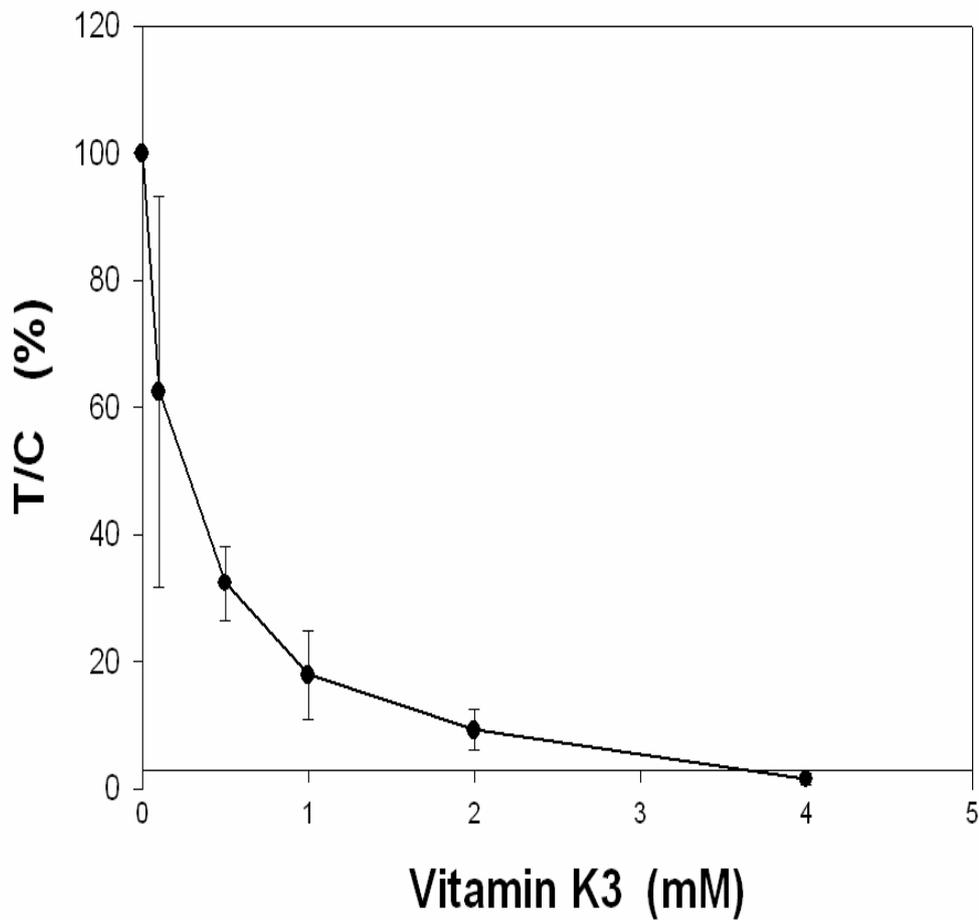


圖 2 VK_3 對大腸桿菌的毒性。

大腸桿菌以不同濃度之 VK_3 處理 4hr，然後利用洋菜擴散法分析其抑菌作用。實驗重複至少三次以上，每次每處理濃度至少三盤以上，若各稀釋倍數中僅有一種稀釋倍數培養皿之菌落數為 10~150 個，則以該稀釋倍數之三個培養皿之菌落數平均值成其稀釋倍數，得其菌數。

貳、藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響

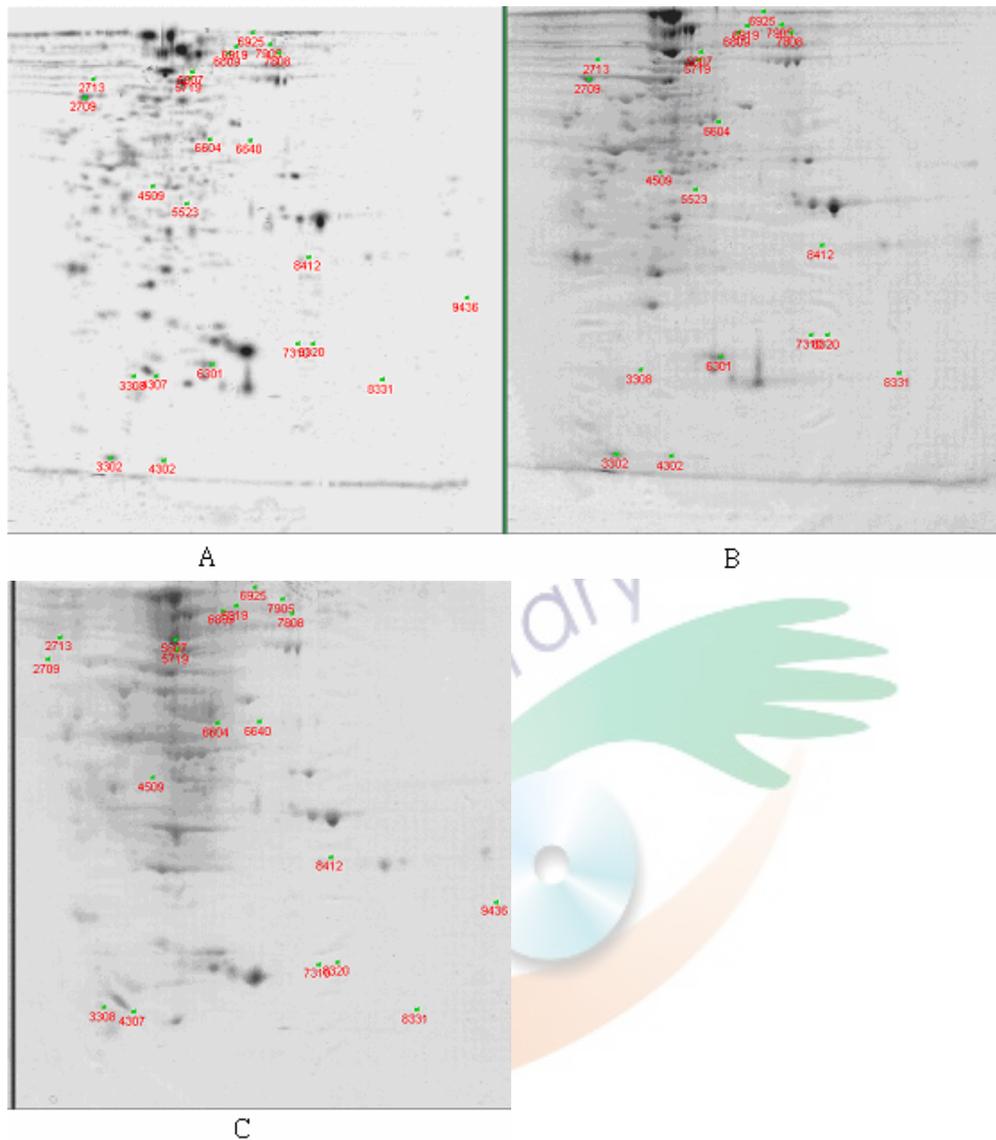
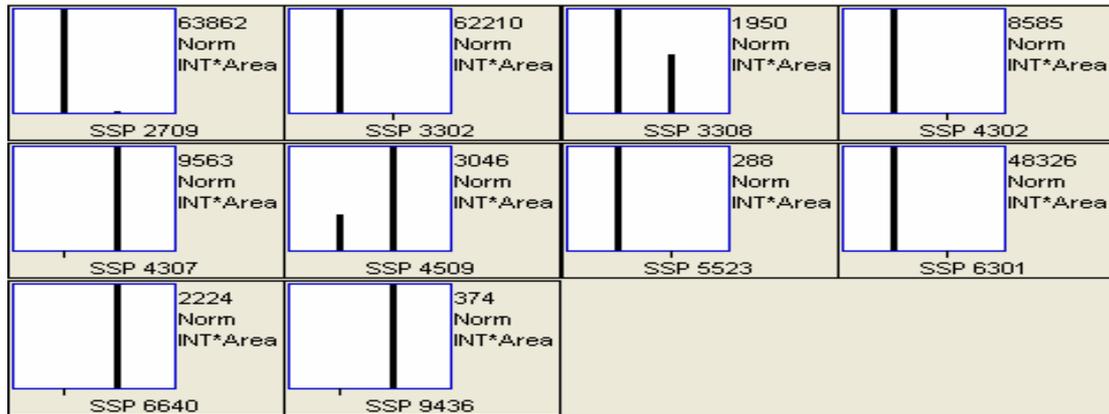


圖 3-1 VK₃ 藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

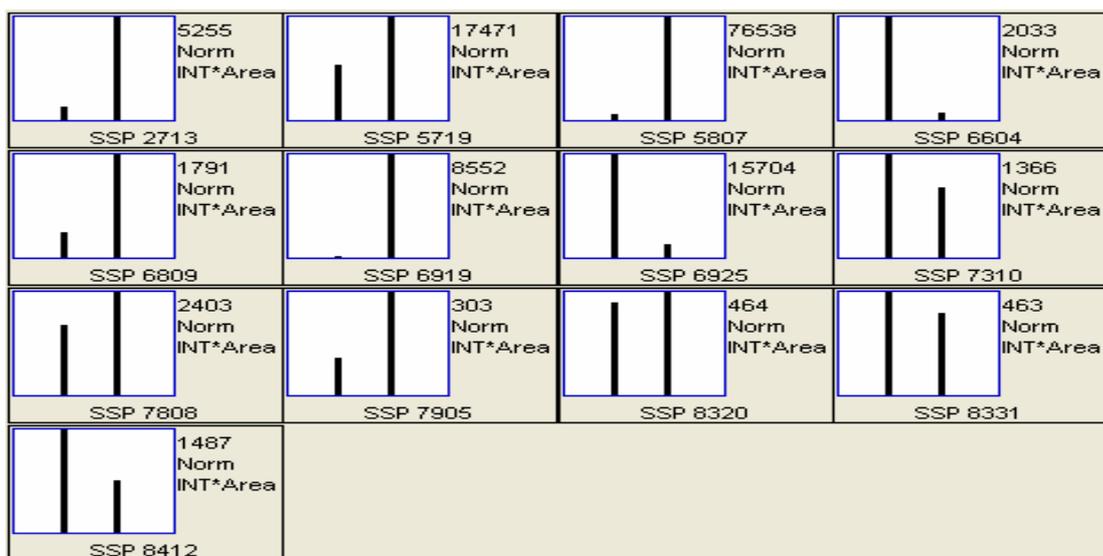
(A)為主膠是(B)和(C)膠片經影像處理後加成的結果;(B)為對照組;(C)為 VK₃ 處理後,大腸桿菌的蛋白質表現。膠片上出現的紅色數字代表蛋白質在膠片上的相對座標,前面兩個數字是以 X 軸座標分為 0 到 9 共十區,每一區再細分十小格,所形成的位置編碼,後面兩個數字則是以 Y 軸座標分為 0 到 9 共十區,每一區再細分十小格,所形成的位置編碼,於是構成了四位數字的 ssp 座標。



Protein name	Full name	effect	pI	Mw	ssp
DnaK	Chaperone protein DnaK	--	4.8	69647	2709
RecA	Recombinase A	++	5.08	41219	4509
GroES	10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein)	++	5.15	15660	4307
Zwf	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC 1.1.1.49) (G6PD)	++	5.61	51633	6640
UspA	Universal stress protein A	--	5.14	15125	4302
UspE	Universal stress protein E	--	5.3	34492	5523
UspF	Universal stress protein F	++	7.37	30778	9436
SodB	Superoxide dismutase [Fe] (EC 1.15.1.1)	--	5.53	22150	6301
Tpx	Thiol peroxidase (EC 1.11.1.-) (Scavengase P20)	-	4.89	18709	3308
TrxA	Thioredoxin 1 (Trx1) (Trx)	--	4.67	11675	3302

圖 3-2 VK₃ 藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 VK₃ 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 VK₃ 對大腸桿菌蛋白質表現的影響；以“++”代表蛋白質濃度增加二倍以上，“+”代表蛋白質濃度增加不到二倍，“--”代表蛋白質濃度減少二倍以上，“-”代表蛋白質濃度減少不到二倍。



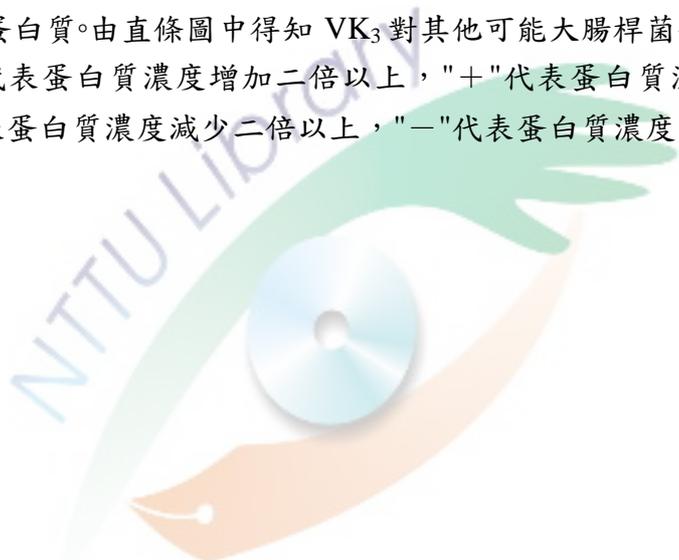
Protein name	Full name	effect	pI	Mw	ssp
Odp2	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (EC 2.3.1.12) (E2) (Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex)	++	5.01	77450	2713
Syr	Arginyl-tRNA synthetase	+	5.32	60427	5719
ClpB	Chaperone clpB	++	5.38	73900	5807
GltD	Glutamate synthase [NADPH] small chain (EC 1.4.1.13) (Glutamate synthase subunit beta) (NADPH-GOGAT) (GLTS beta chain)	--	5.40	52658	6604
PflB	Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1)	++	5.61	82279	6809
PflB	Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1)	++	5.61	82279	6919
Syn	Asparaginyl-tRNA synthetase	--	5.64	92858	6925
?		-			7310

圖 3-3 VK₃ 藥物對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響。

?		+			7808
?		++			7905
?		+			8320
PyrI	Aspartate carbamoyltransferase regulatory chain	-	6.84	16989	8331
HypB	Hydrogenase isoenzymes nickel incorporation protein hypB	--	6.32	32269	8412

圖 3-3 續 VK₃ 藥物對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 VK₃ 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 VK₃ 對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響；以“++”代表蛋白質濃度增加二倍以上，“+”代表蛋白質濃度增加不到二倍，“--”代表蛋白質濃度減少二倍以上，“-”代表蛋白質濃度減少不到二倍。



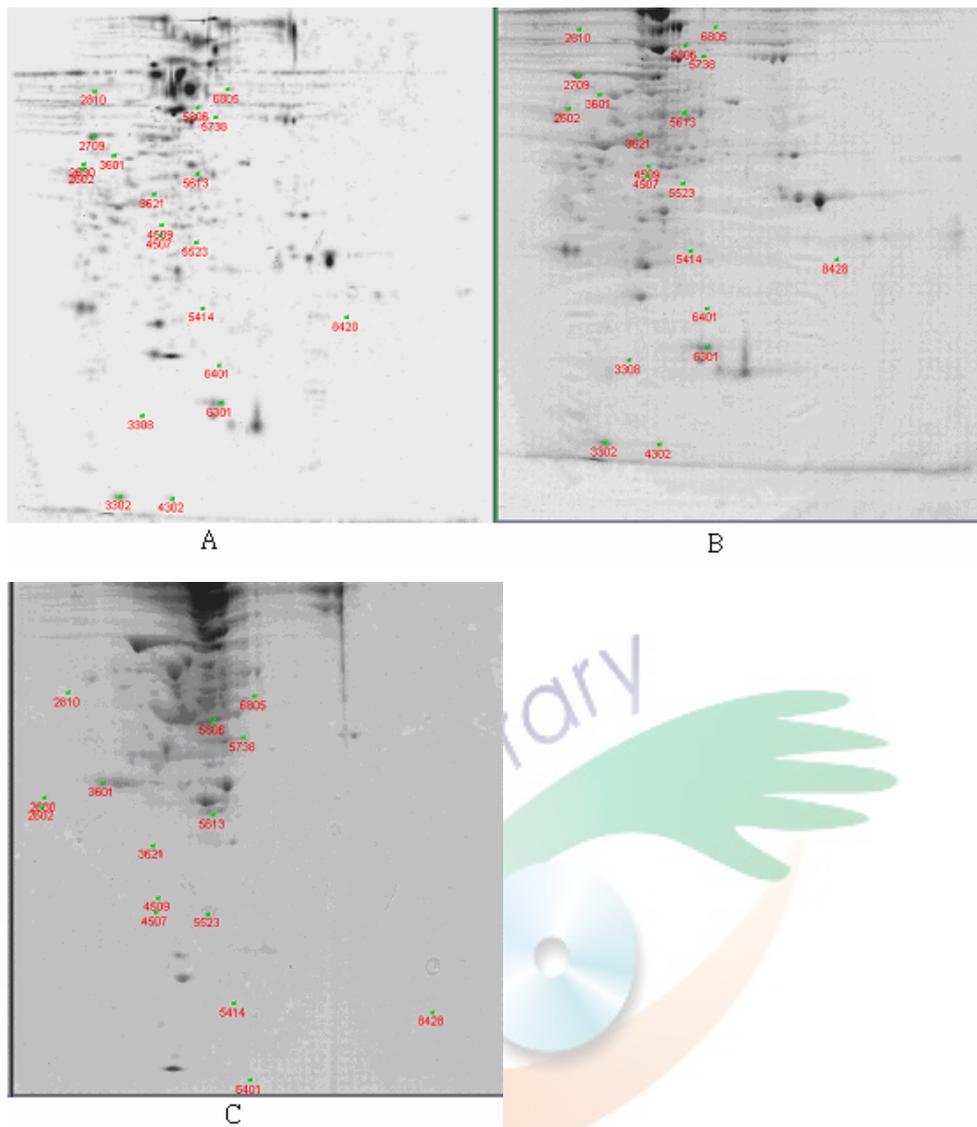
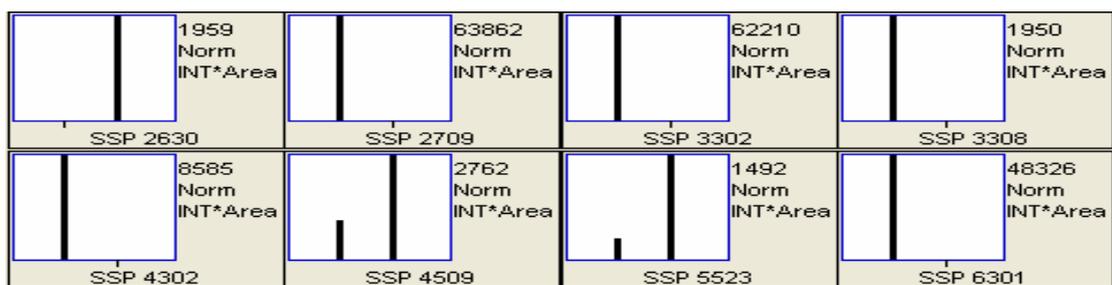


圖 4-1 Sodium butyrate 藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

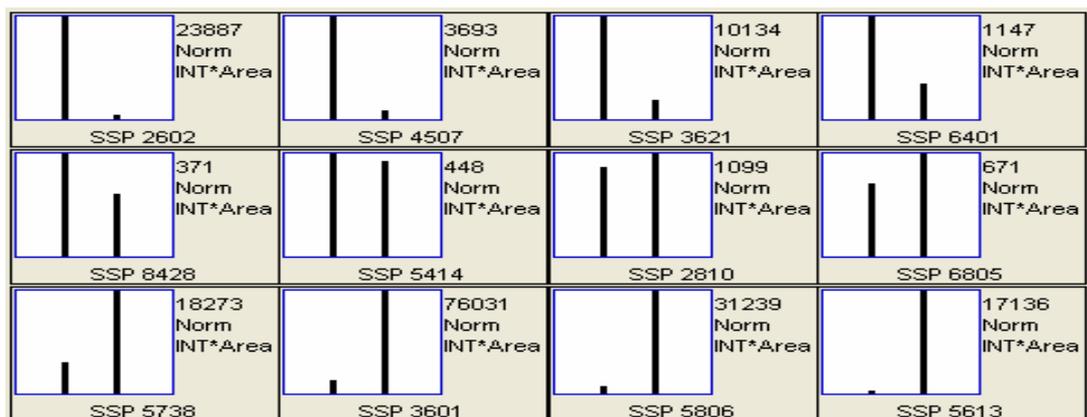
(A)為主膠是(B)和(C)膠片經影像處理後加成的結果;(B)為對照組;(C)為Sodium butyrate 處理後，大腸桿菌的蛋白質表現。膠片上出現的紅色數字代表蛋白質在膠片上的相對座標，前面兩個數字是以 X 軸座標分為 0 到 9 共十區，每一區再細分十小格，所形成的位置編碼，後面兩個數字則是以 Y 軸座標分為 0 到 9 共十區，每一區再細分十小格，所形成的位置編碼，於是構成了四位數字的 ssp 座標。



Protein name	Full name	effect	pI	Mw	ssp
DnaK	Chaperone protein DnaK	++	4.8	69647	2709
RecA	Recombinase A	++	5.08	41219	4509
GroEL	60 kDa chaperonin (Protein Cpn60) (groEL protein)	++	4.85	56743	2630
UspA	Universal stress protein A	--	5.14	15125	4302
UspE	Universal stress protein E	++	5.3	34492	5523
SodB	Superoxide dismutase [Fe] (EC 1.15.1.1)	--	5.53	22150	6301
Tpx	Thiol peroxidase (EC 1.11.1.-) (Scavengase P20)	--	4.89	18709	3308
TrxA	Thioredoxin 1 (Trx1) (Trx)	--	4.67	11675	3302

圖 4-2 Sodium butyrate 藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 Sodium butyrate 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 Sodium butyrate 對大腸桿菌蛋白質表現的影響；以“++”代表蛋白質濃度增加二倍以上，“+”代表蛋白質濃度增加不到二倍，“--”代表蛋白質濃度減少二倍以上，“-”代表蛋白質濃度減少不到二倍。



Protein name	Full name	effect	pI	Mw	ssp
FucK	L-fuculokinase (EC 2.7.1.51) (L-fuculose kinase)	--	4.72	55202	2602
TalB	Transaldolase B (EC 2.2.1.2)	--	5.01	35885	4507
Tig	Trigger factor (TF).	--	4.83	51128	3621
Kad	Adenylate kinase (EC 2.7.4.3) (ATP-AMP transphosphorylase) (AK)	--	5.60	22509	6401
HypB	Hydrogenase isoenzymes nickel incorporation protein hypB	-	6.32	32269	8428
OmpA	Outer membrane protein A (Outer membrane protein II*).	-	5.55	34492	5414
PpsA	Phosphoenolpyruvate synthase (EC 2.7.9.2) (Pyruvate, water dikinase) (PEP synthase)	+	4.94	86407	2810
PflB	Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1)	+	5.61	82279	6805
Sym	Methionyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.10) (Methionine--tRNA ligase) (MetRS)	++	5.56	76123	5738

圖 4-3 Sodium butyrate 藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

GroEL	60 kDa chaperonin (Protein Cpn60) (groEL protein)	++	4.85	56743	3601
ClpB	Chaperone clpB	++	5.38	73900	5806
MurE	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase (EC 6.3.2.13) (UDP-N-acetylmuramyl-tripeptide synthetase) (Meso-diaminopimelate-adding enzyme) (UDP-MurNAc-tripeptide synthetase)	++	5.44	54555	5613

圖 4-3 續 Sodium butyrate 藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 Sodium butyrate 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 Sodium butyrate 對大腸桿菌其他可能蛋白質表現的影響；以“++”代表蛋白質濃度增加二倍以上，“+”代表蛋白質濃度增加不到二倍，“--”代表蛋白質濃度減少二倍以上，“-”代表蛋白質濃度減少不到二倍。

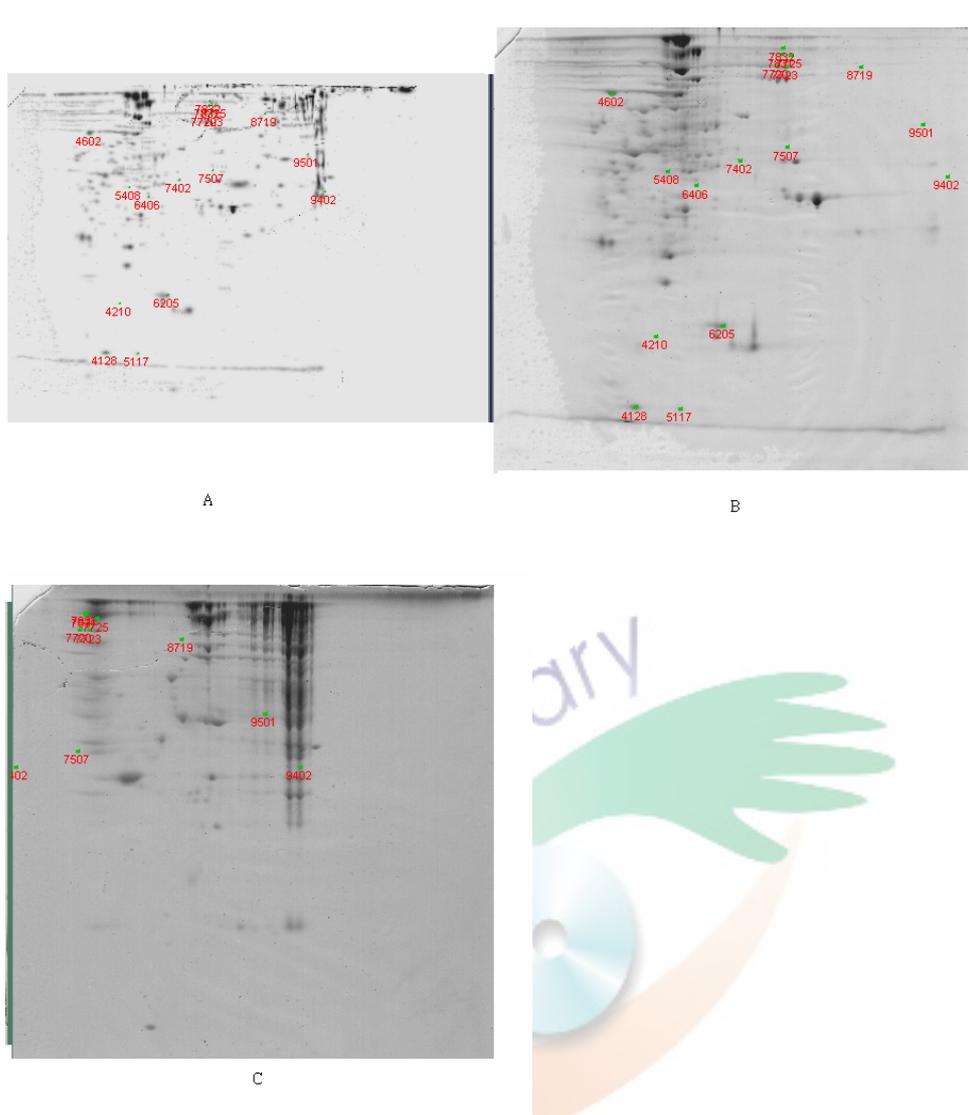
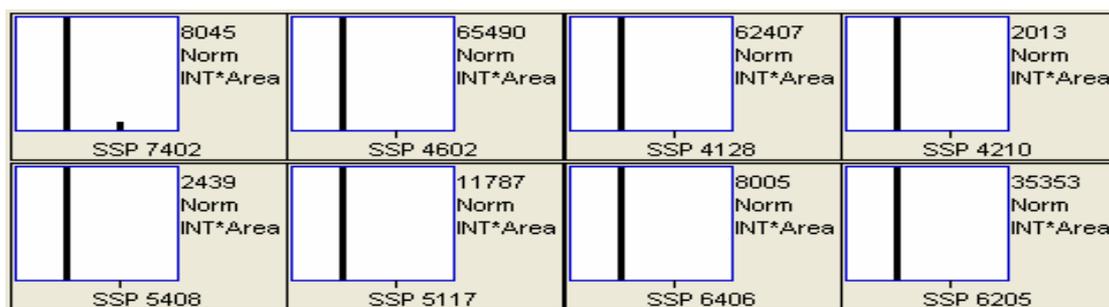


圖 5-1 Adriamycin 藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

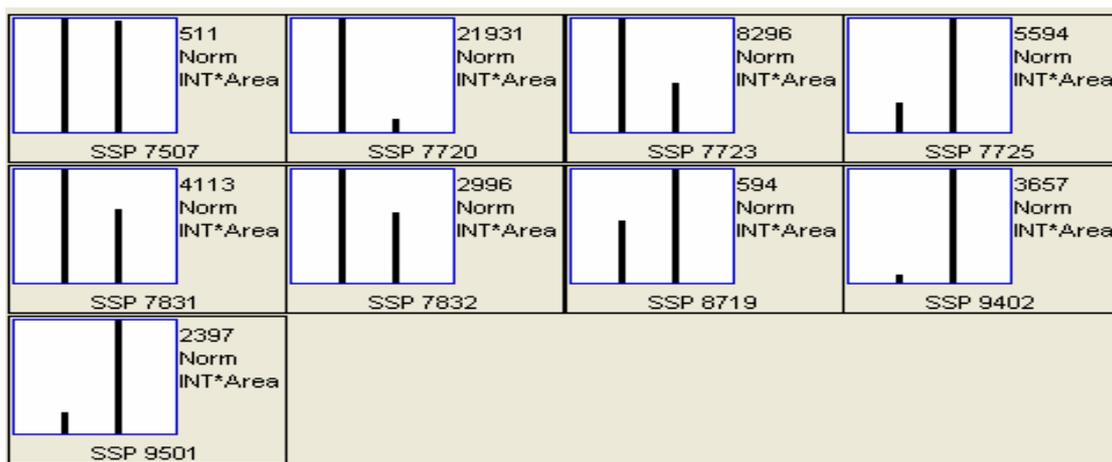
(A) 為主膠是(B)和(C)膠片經影像處理後加成的結果;(B)為對照組;(C)為 Adriamycin 處理後，大腸桿菌的蛋白質表現。膠片上出現的紅色數字代表蛋白質在膠片上的相對座標，前面兩個數字是以 X 軸座標分為 0 到 9 共十區，每一區再細分十小格，所形成的位置編碼，後面兩個數字則是以 Y 軸座標分為 0 到 9 共十區，每一區再細分十小格，所形成的位置編碼，於是構成了四位數字的 ssp 座標。



Protein name	Full name	effect	pI	Mw	ssp
DnaK	Chaperone protein DnaK	— —	4.8	69647	4602
RecA	Recombinase A	— —	5.08	41219	5408
Gor	Glutathione reductase (EC 1.8.1.7)	— —	5.65	48772	7402
UspA	Universal stress protein A	— —	5.14	15125	5117
UspE	Universal stress protein E	— —	5.3	34492	6406
SodB	Superoxide dismutase [Fe] (EC 1.15.1.1)	— —	5.53	22150	6205
Tpx	Thiol peroxidase (EC 1.11.1.-) (Scavengase P20)	— —	4.89	18709	4210
TrxA	Thioredoxin 1 (Trx1) (Trx)	— —	4.67	11675	4128

圖 5-2 Adriamycin 藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 Adriamycin 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 Adriamycin 對大腸桿菌蛋白質表現的影響；以“++”代表蛋白質濃度增加二倍以上，“+”代表蛋白質濃度增加不到二倍，“--”代表蛋白質濃度減少二倍以上，“-”代表蛋白質濃度減少不到二倍。



Protein name	Full name	effect	pI	Mw	ssp
GlyA	Serine hydroxymethyltransferase (EC <u>2.1.2.1</u>) (Serine methylase) (SHMT)	N	6.04	46051	7507
?		--			7720
?		--			7723
?		++			7725
?		-			7831
?		-			7832
YliB	Putative binding protein yliB	+	7.32	73914	8719
NlpD	Lipoprotein nlpD	++	8.84	3879	9402
DegP	Protease do (EC 3.4.21.-)	++	8.01	6640	9501

圖 5-3 Adriamycin 藥物對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 Adriamycin 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 Adriamycin 對其他可能大腸桿菌其他可能蛋白質表現的影響；以“++”代表蛋白質濃度增加二倍以上，“+”代表蛋白質濃度增加不到二倍，“--”代表蛋白質濃度減少二倍以上，“-”代表蛋白質濃度減少不到二倍，“N”代表蛋白質表現沒有差異。

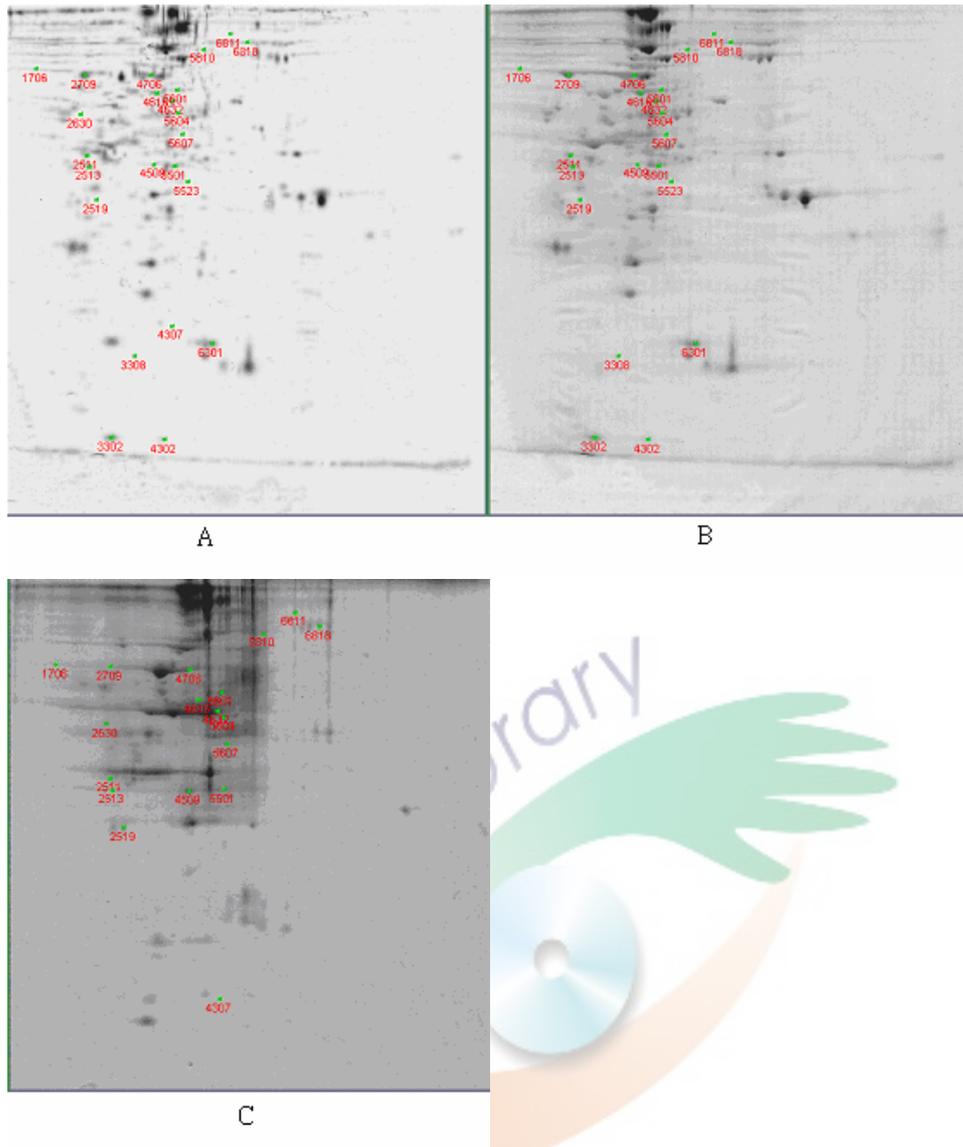
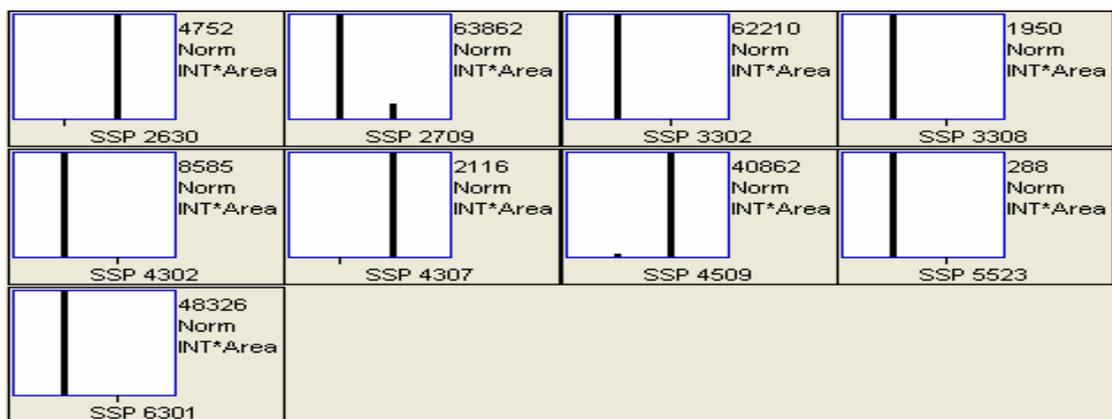


圖 6-1 Cisplatin 藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

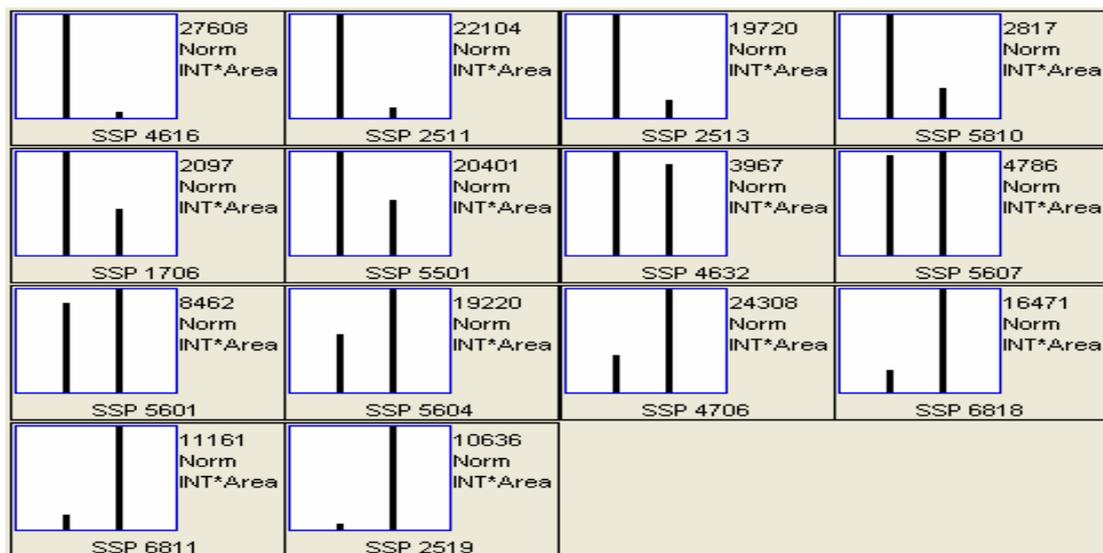
(A) 膠是(B)和(C)膠片經影像處理後加成的結果;(B)為對照組;(C)為 cisplatin 處理後,大腸桿菌的蛋白質表現。膠片上出現的紅色數字代表蛋白質在膠片上的相對座標,前面兩個數字是以 X 軸座標分為 0 到 9 共十區,每一區再細分十小格,所形成的位置編碼,後面兩個數字則是以 Y 軸座標分為 0 到 9 共十區,每一區再細分十小格,所形成的位置編碼,於是構成了四位數字的 ssp 座標。



Protein name	Full name	effect	pI	Mw	ssp
DnaK	Chaperone protein DnaK	--	4.8	69647	2709
RecA	Recombinase A	++	5.08	41219	4509
GroES	10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein)	++	5.15	15660	4307
GroEL	60 kDa chaperonin (Protein Cpn60) (groEL protein)	++	4.85	56743	2630
UspA	Universal stress protein A	--	5.14	15125	4302
UspE	Universal stress protein E	--	5.3	34492	5523
SodB	Superoxide dismutase [Fe] (EC 1.15.1.1)	--	5.53	22150	6301
Tpx	Thiol peroxidase (EC 1.11.1.-) (Scavengase P20)	--	4.89	18709	3308
TrxA	Thioredoxin 1 (Trx1) (Trx)	--	4.67	11675	3302

圖 6-2 Cisplatin 藥物對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 Cisplatin 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 Cisplatin 對大腸桿菌蛋白質表現的影響；以“++”代表蛋白質濃度增加二倍以上，“+”代表蛋白質濃度增加不到二倍，“--”代表蛋白質濃度減少二倍以上，“-”代表蛋白質濃度減少不到二倍。



Protein name	Full name	effect	pI	Mw	ssp
GlnA	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2) (Glutamate--ammonia ligase).	--	5.18	53809	4616
FtsZ	Cell division protein ftsZ	--	4.62	40571	2511
FtsZ	Cell division protein ftsZ	--	4.62	40571	2513
Syd	Aspartyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.12) (Aspartate--tRNA ligase) (AspRS)	--	5.42	61626	5810
NusA	Transcription elongation protein nusA (N utilization substance protein A) (L factor)	--	4.54	61144	1706
K6pF2	6-phosphofructokinase isozyme 2 (EC 2.7.1.11) (Phosphofructokinase-2)	-	5.30	38081	5501
IlvC	Ketol-acid reductoisomerase (EC 1.1.1.86) (Acetohydroxy-acid isomeroreductase) (Alpha-keto-beta-hydroxylacil reductoisomerase)	-	5.25	52143	4632

圖 6-3 Cisplatin 藥物對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響。

ThrC	Threonine synthase (EC 4.2.3.1)	N	5.29	48676	5607
?		++			5601
GlpK	Glycerol kinase (EC 2.7.1.30) (ATP:glycerol 3-phosphotransferase) (Glycerokinase) (GK)	+	5.30	50728	5604
HtpG	Chaperone protein htpG (Heat shock protein htpG) (High temperature protein G) (Heat shock protein C62.5)	++	5.06	65639	4706
PflB	Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1)	++	5.61	82279	6818
PflB	Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1)	++	5.61	82279	6811
FabD	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (EC 2.3.1.39) (MCT)	++	4.95	33469	2519

圖 6-3 續 Cisplatin 藥物對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 Cisplatin 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 Cisplatin 對其他可能大腸桿菌其他可能蛋白質表現的影響；以“++”代表蛋白質濃度增加二倍以上，“+”代表蛋白質濃度增加不到二倍，“--”代表蛋白質濃度減少二倍以上，“-”代表蛋白質濃度減少不到二倍，“N”代表蛋白質表現沒有差異。

參、藥物合併使用對大腸桿菌的毒性及蛋白質表現的影響

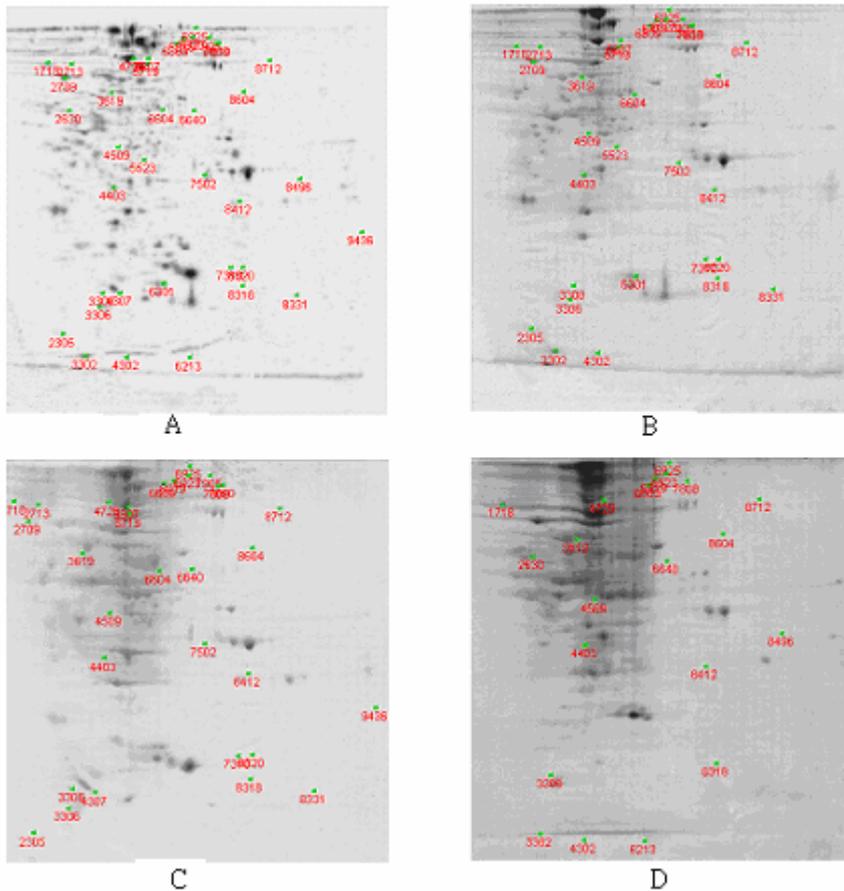
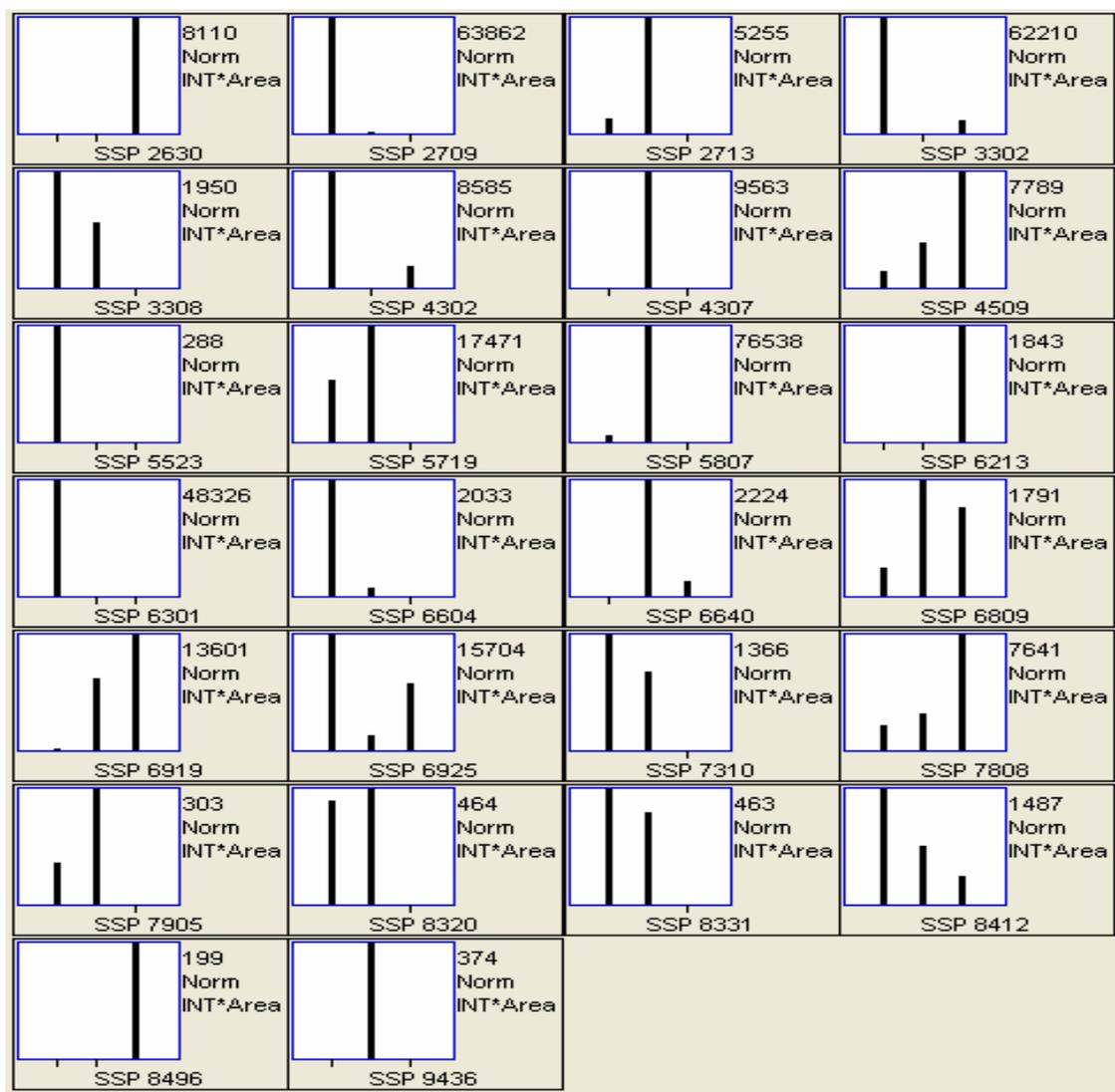


圖 7-1 VK₃ 兩倍劑量使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

(A)主膠是(B)(C)(D)膠片經影像處理後加成的結果;(B)為對照組;(C)為 VK₃ 處理後,大腸桿菌的蛋白質表現;(D)為 VK₃ 兩倍劑量處理後,大腸桿菌的蛋白質表現。膠片上出現的紅色數字代表蛋白質在膠片上的相對座標,前面兩個數字是以 X 軸座標分為 0 到 9 共十區,每一區再細分十小格,所形成的位置編碼,後面兩個數字則是以 Y 軸座標分為 0 到 9 共十區,每一區再細分十小格,所形成的位置編碼,於是構成了四位數字的 ssp 座標。



Protein name	Full name	effect		pI	Mw	ssp
		a	b			
DnaK	Chaperone protein DnaK	--	-	4.80	69647	2709
RecA	Recombinase A	++	++	5.08	41219	4509
GroES	10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein)	N	--	5.15	15660	4307
Zwf	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC1.1.1.49) (G6PD)	+	--	5.61	51633	6640
UspA	Universal stress protein A	--	+	5.14	15125	4302

圖 7-2 VK₃ 兩倍劑量使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

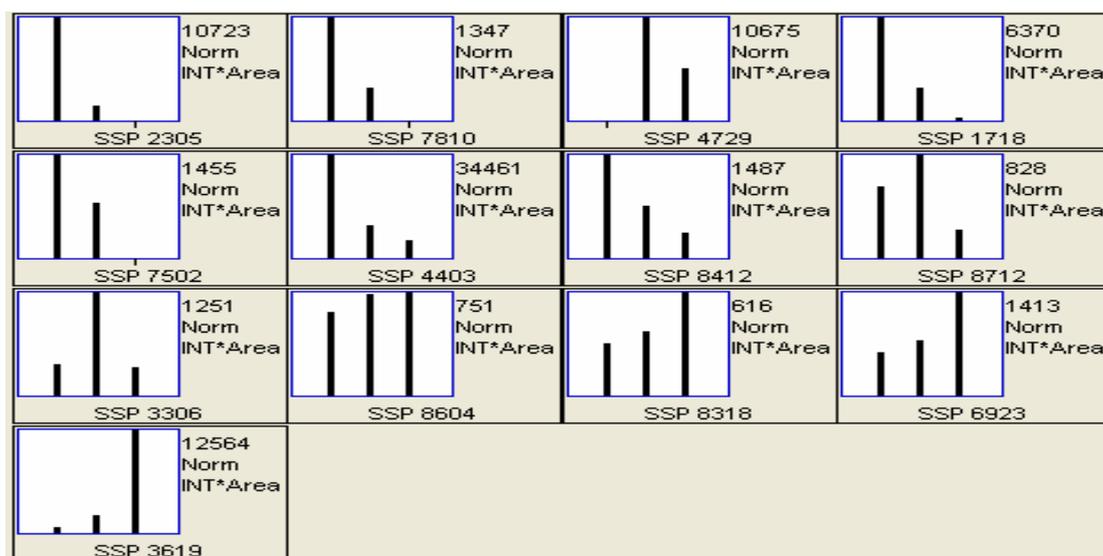
UspE	Universal stress protein E	--	N	5.3	34492	5523
UspF	Universal stress protein F	N	--	7.37	30778	9436
SodB	Superoxide dismutase [Fe] (EC 1.15.1.1)	--	N	5.53	22150	6301
Tpx	Thiol peroxidase (EC 1.11.1) (Scavengase P20)	--	--	4.89	18709	3308
TrxA	Thioredoxin 1 (Trx1) (Trx)	--	+	4.67	11675	3302
Odp2	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (EC 2.3.1.12) (E2) (Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex)	-	--	5.01	77450	2713
Syr	Arginyl-tRNA synthetase	--	--	5.32	60427	5719
ClpB	Chaperone clpB	-	--	5.38	73900	5807
GltD	Glutamate synthase [NADPH] small chain (EC 1.4.1.13) (Glutamate synthase subunit beta) (NADPH-GOGAT) (GLTS beta chain)	--	-	5.40	52658	6604
PflB	Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1)	++	-	5.61	82279	6809
PflB	Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1)	++	+	5.61	82279	6919
Syn	Asparaginyl-tRNA synthetase	-	++	5.64	92858	6925
?		--	--			7310
GroEL	60 kDa chaperonin (Protein Cpn60) (groEL protein)	++	++	4.85	56743	2630
GroES	10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein)	N	--	5.15	15660	4307
Ygin	Protein ygiN	++	++	5.57	10734	6213
?		++	++			7808

圖 7-2 續 VK₃ 兩倍劑量使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

?		--	--			7905
?		--	--			8320
PyrI	Aspartate carbamoyltransferase regulatory chain	--	--	6.84	16989	8331
HypB	Hydrogenase isoenzymes nickel incorporation protein hypB	--	-	6.32	32269	8412
SodA	Superoxide dismutase [Mn] (EC 1.15.1.1) (MnSOD)	++	++	6.44	22966	8496

圖 7-2 續 VK₃ 兩倍劑量使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 VK₃ 一倍劑量處理後的大腸桿菌蛋白質，第三點代表的是以 VK₃ 兩倍劑量處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 VK₃ 兩倍劑量使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響；a 欄代表以 VK₃ 兩倍劑量使用處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較；Type b 代表以 VK₃ 兩倍劑量使用處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 VK₃ 一倍劑量處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較；以“++”代表蛋白質濃度增加二倍以上，“+”代表蛋白質濃度增加不到二倍或增加的量極少，“--”代表蛋白質濃度減少二倍以上，“-”代表蛋白質濃度減少不到二倍或減少的量極少，“N”代表蛋白質表現沒有差異。



Protein name	Full name	effect		pI	Mw	Ssp
		a	b			
?		--	-			2305
?		--	-			7810
?		++	--			4729
?		--	--			1718
CysK	Cysteine synthase A (EC 2.5.1.47) (O-acetylserine sulfhydrylase A) (O-acetylserine (Thiol)-lyase A) (CSase A) (Sulfate starvation-induced protein 5) (SSI5)	--	--			7502
DgaL	D-galactose-binding periplasmic protein (GBP) (D-galactose/D-glucose-binding protein) (GGBP)	--	-	5.80	36099	4403
DapA	Dihydrodipicolinate synthase (EC 4.2.1.52) (DHDPS)	--	-	6.09	32408	8412
OpgG	Glucans biosynthesis protein G	+	--	6.51	82963	8712
?		N	--			3306

圖 7-3 VK₃ 兩倍劑量使用對大腸桿菌的毒性及蛋白質表現的影響。

AtpA	ATP synthase subunit alpha (EC 3.6.3.14) (ATPase subunit alpha) (ATP synthase F1 sector subunit alpha)	+	N	5.84	53178	8604
R19	50S ribosomal protein L9	+	+	6.20	19832	8318
Syn	Asparaginyl-tRNA synthetase	++	+	5.64	92858	6923
?		++	++			3619

圖 7-3 續 VK₃ 兩倍劑量使用對大腸桿菌的毒性及蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 VK₃ 一倍劑量處理後的大腸桿菌蛋白質，第三點代表的是以 VK₃ 兩倍劑量使用處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 VK₃ 兩倍劑量使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響; Type a 代表以 VK₃ 兩倍劑量使用處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較; Type b 代表以 VK₃ 兩倍劑量使用處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 VK₃ 一倍劑量處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較; 以 "++" 代表蛋白質濃度增加二倍以上， "+" 代表蛋白質濃度增加不到二倍或增加的量極少， "--" 代表蛋白質濃度減少二倍以上， "-" 代表蛋白質濃度減少不到二倍或減少的量極少， "N" 代表蛋白質表現沒有差異。

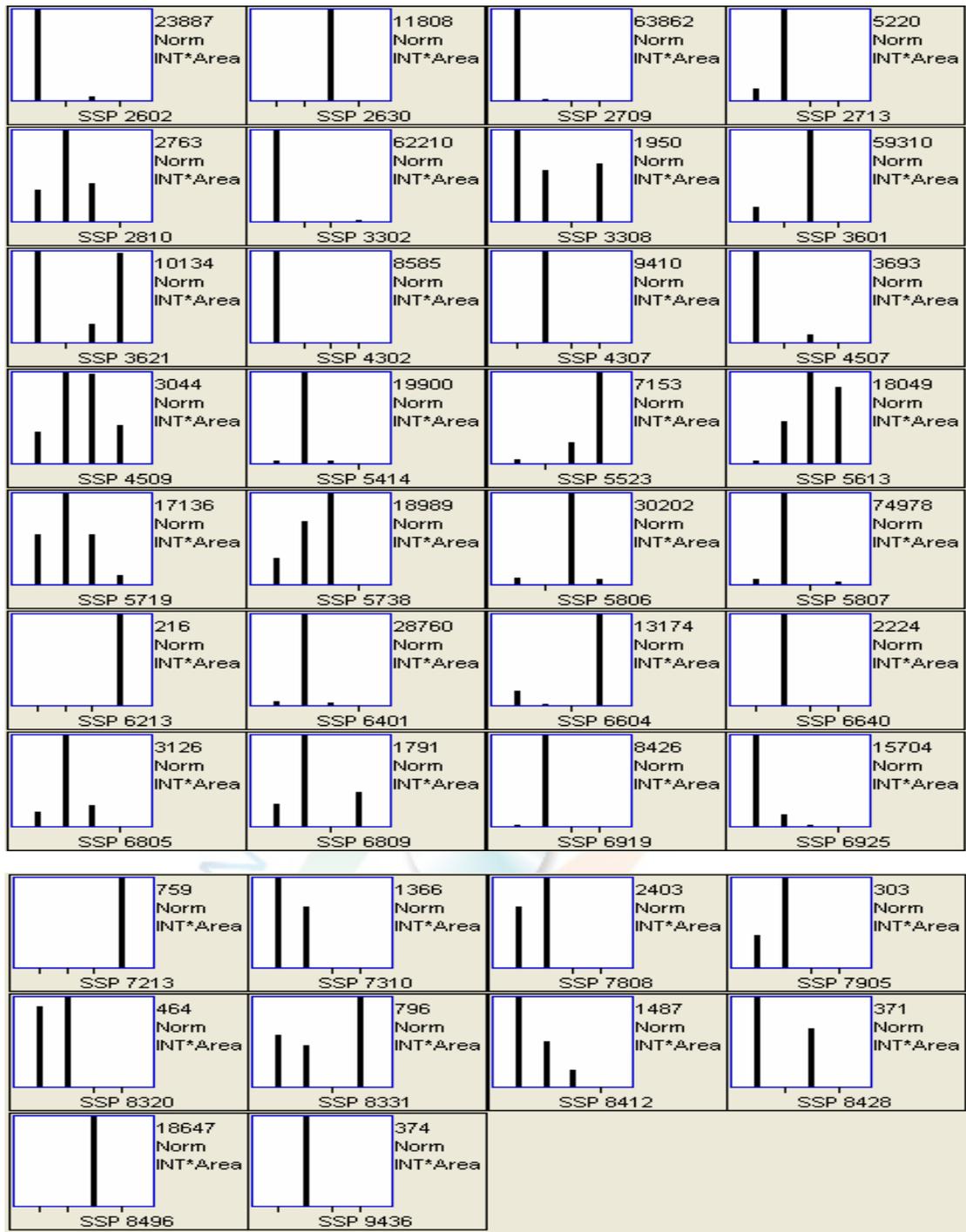


圖 8-2 VK₃和 Sodium butyrate 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

Protein name	Full name	effect			pI	Mw	Ssp
		a	b	c			
DnaK	Chaperone protein DnaK	---	-	N	4.80	69647	2709
RecA	Recombinase A	+	---	---	5.08	41219	4509
GroEL	60 kDa chaperonin (Protein Cpn60) (groEL protein)	N	N	---	4.85	56743	2630
UspA	Universal stress protein A	---	N	N	5.14	15125	4302
UspE	Universal stress protein E	++	++	++	5.3	34492	5523
Tpx	Thiol peroxidase (EC 1.11.1.-) (Scavengase P20)	-	+	++	4.89	18709	3308
TrxA	Thioredoxin 1 (TRX1) (TRX)	---	+	+	4.67	11675	3302
FucK	L-fuculokinase (EC 2.7.1.51) (L-fuculose kinase)	---	N	-	4.72	55202	2602
TalB	Transaldolase B (EC 2.2.1.2)	---	N	-	5.01	35885	4507
Tig	Trigger factor (TF).	N	++	++	4.83	51128	3621
Kad	Adenylate kinase (EC 2.7.4.3) (ATP-AMP transphosphorylase) (AK)	-	---	-	5.60	22509	6401
HypB	Hydrogenase isoenzymes nickel incorporation protein hypB	---	N	---	6.32	32269	8428
OmpA	Outer membrane protein A (Outer membrane protein II*).	-	---	-	5.55	34492	5414
PpsA	Phosphoenolpyruvate synthase (EC 2.7.9.2) (Pyruvate, water dikinase) (PEP synthase)	-	---	-	4.94	86407	2810
PflB	Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1)	-	---	-	5.61	82279	6805

圖 8-2 續 VK₃ 和 Sodium butyrate 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

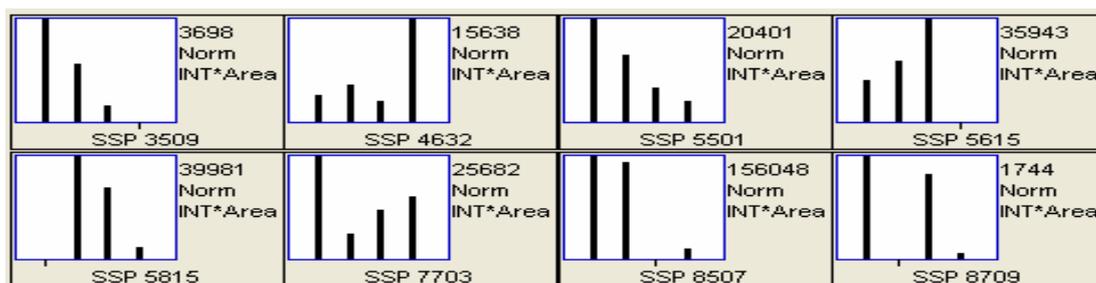
Sym	Methionyl-Trna synthetase (EC 6.1.1.10) (Methionine--tRNA ligase) (MetRS)	—	— —	— —	5.56	76123	5738
GroEL	60 kDa chaperonin (Protein Cpn60) (groEL protein)	—	N	— —	4.85	56743	3601
ClpB	Chaperone clpB	N	+	— —	5.38	73900	5806
MurE	UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase (EC 6.3.2.13) (UDP-N-acetylmuramyl-tripeptide synthetase) (Meso-diaminopimelate -adding enzyme) (UDP-MurNAc-tripeptide synthetase)	++	+	—	5.44	54555	5613
GroES	10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein)	N	— —	N	5.15	15660	4307
Zwf	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC 1.1.1.49) (G6PD)	N	— —	N	5.61	51633	6640
UspF	Universal stress protein F	N	— —	N	7.37	30778	9436
GltD	Glutamate synthase [NADPH] small chain (EC 1.4.1.13) (Glutamate synthase subunit beta) (NADPH-GOGAT) (GLTS beta chain)	++	++	++	5.40	52658	6604
Odp2	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (EC 2.3.1.12) (E2) (Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex)	—	— —	N	5.01	77450	2713

圖 8-2 續 VK₃ 和 Sodium butyrate 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

Syr	Arginyl-tRNA synthetase	--	--	--	5.32	60427	5719
PflB	Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1)	+	--	++	5.61	82279	6809
PflB	Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1)	-	--	N	5.61	82279	6919
Syn	Asparaginyl-tRNA synthetase	--	-	-	5.64	92858	6925
?		--	--	N			7310

圖 8-2 續 VK₃ 和 Sodium butyrate 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 VK₃ 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質，第三點代表的是以 Sodium butyrate 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質，第四點代表的是以 VK₃ 和 Sodium butyrate 合併使用處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 VK₃ 和 Sodium butyrate 合併使用對大腸桿菌其他可能蛋白質表現的影響；Type a 代表以 VK₃ 和 Sodium butyrate 合併使用處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較；Type b 代表以 VK₃ 和 Sodium butyrate 合併使用處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 VK₃ 處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較；Type c 代表以 VK₃ 和 Sodium butyrate 合併使用處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 Sodium butyrate 處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較；以 "++" 代表蛋白質濃度增加二倍以上，"+" 代表蛋白質濃度增加不到二倍或增加的量極少，"--" 代表蛋白質濃度減少二倍以上，"-" 代表蛋白質濃度減少不到二倍或減少的量極少，"N" 代表蛋白質表現沒有差異。



Protein name	Full name	effect			pI	Mw	ssp
		a	b	c			
FabD	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (EC 2.3.1.39) (MCT)	--	--	-	4.95	33469	3509
Syk1	Lysyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.6) (Lysine--tRNA ligase) (LysRS)	++	++	++	5.14	58671	4632
K6pF2	6-phosphofructokinase isozyme 2 (EC 2.7.1.11) (Phosphofructokinase-2)	--	--	-	5.30	38081	5501
MurE		--	--	--	5.44	54555	5615
?		+	--	--			5815
DhsA	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (EC 1.3.99.1)	--	++	+	5.82	64101	7703
G3p1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A (EC 1.2.1.12) (GAPDH-A)	--	--	+	6.28	36820	8507
Syq	Glutaminyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.18) (Glutamine--tRNA ligase) (GlnRS)	--	+	--	5.88	63346	8709

圖 8-3 VK₃ 和 Sodium butyrate 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點

代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 VK_3 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質，第三點代表的是以 Sodium butyrate 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質，第四點代表的是以 VK_3 和 Sodium butyrate 合併使用處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 VK_3 和 Sodium butyrate 合併使用對大腸桿菌其他可能蛋白質表現的影響; Type a 代表以 VK_3 和 Sodium butyrate 合併使用處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較; Type b 代表以 VK_3 和 Sodium butyrate 合併使用處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 VK_3 處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較; Type c 代表以 VK_3 和 Sodium butyrate 合併使用處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 Sodium butyrate 處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較; 以 "++" 代表蛋白質濃度增加二倍以上，"+" 代表蛋白質濃度增加不到二倍或增加的量極少，"--" 代表蛋白質濃度減少二倍以上，"-" 代表蛋白質濃度減少不到二倍或減少的量極少。



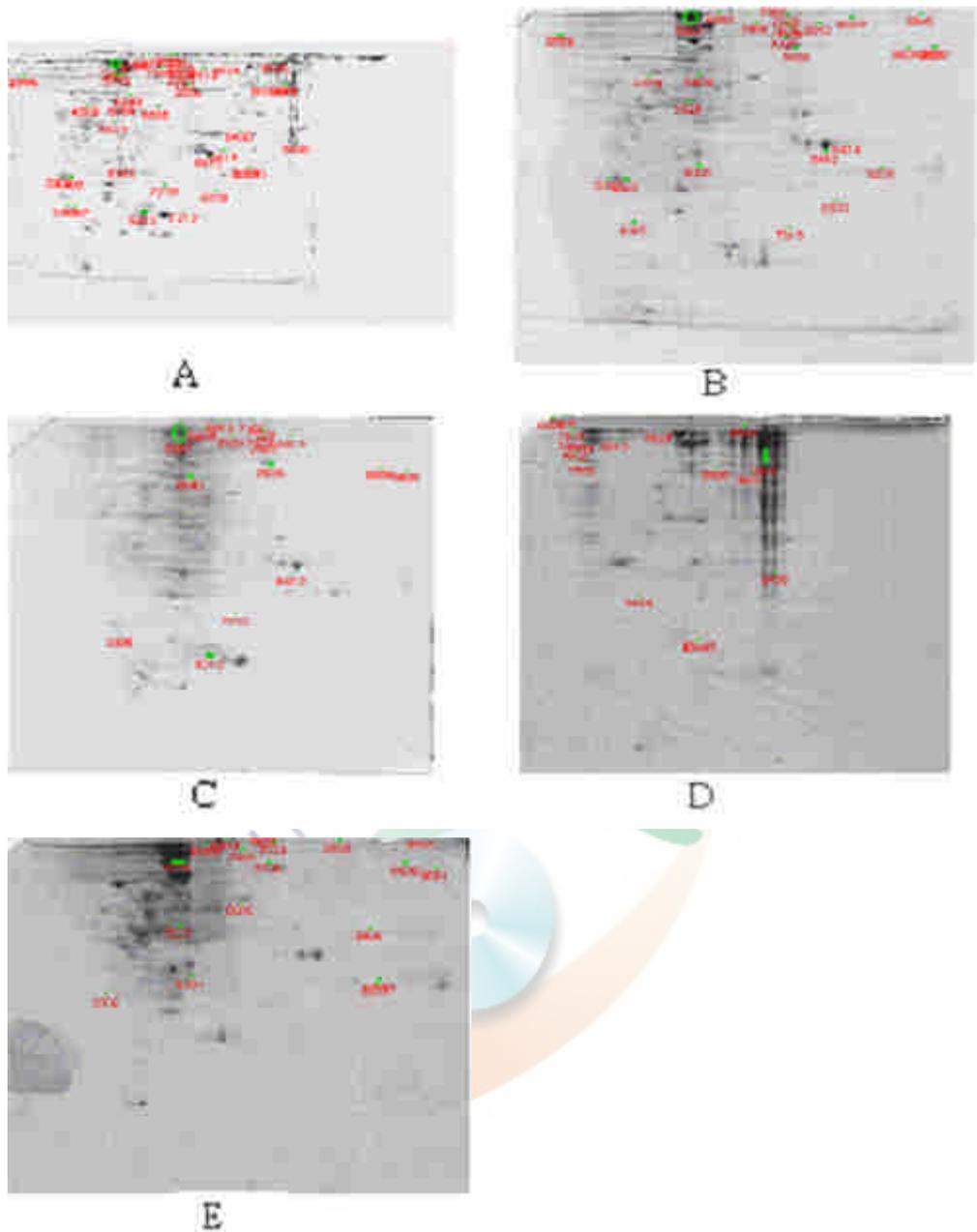
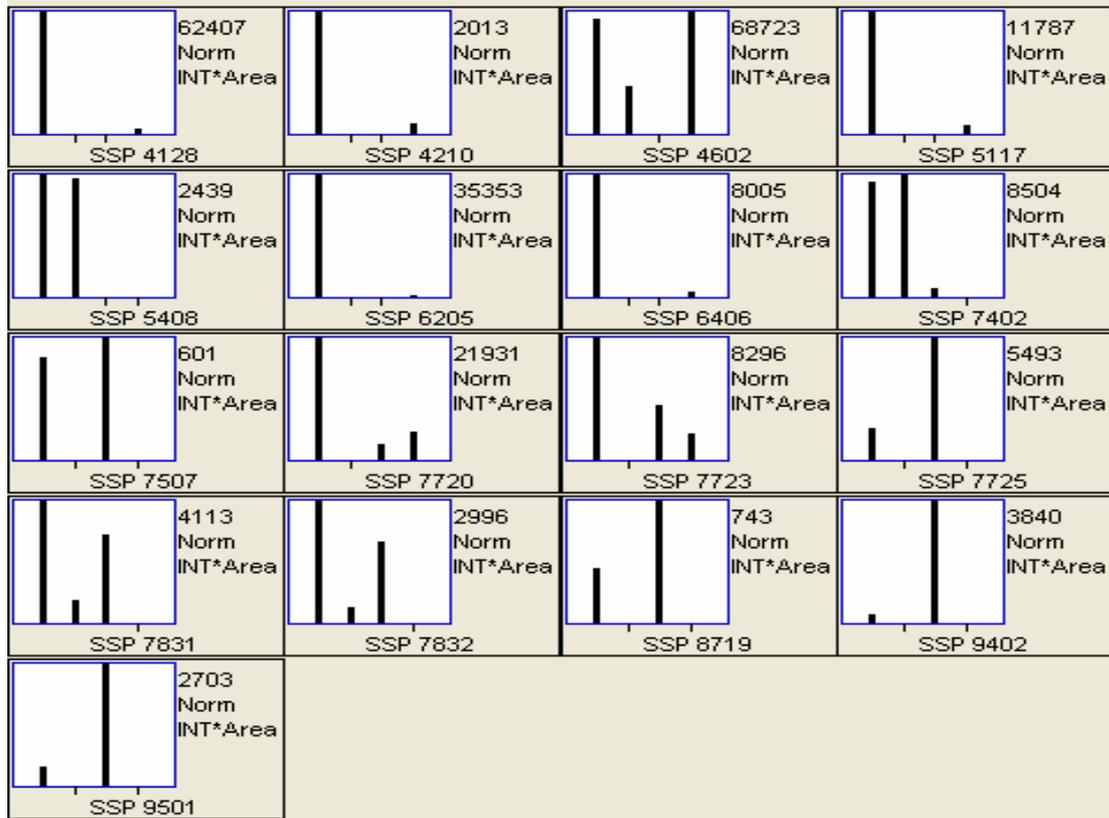


圖 9-1 VK₃ 和 Adriamycin 合併使用對大腸桿菌的毒性及蛋白質表現的影響。

(A)為主膠是(B)(C)(D)(E)膠片經影像處理後加成的結果;(B)為對照組;(C)為VK₃處理後，大腸桿菌的蛋白質表現;(D)為Adriamycin處理後，大腸桿菌的蛋白質表現;(E)為VK₃和Adriamycin處理後，大腸桿菌的蛋白質表現。膠片上出現的紅色數字代表蛋白質在膠片上的相對座標，前面兩個數字是以X軸座標分為0到9共十區，每一區再細分十小格，所形成的位置編碼，後面兩個數字則是以Y軸座標分為0到9共十區，每一區再細分十小格，所形成的位置編碼，於是構成了四位數字的ssp座標。



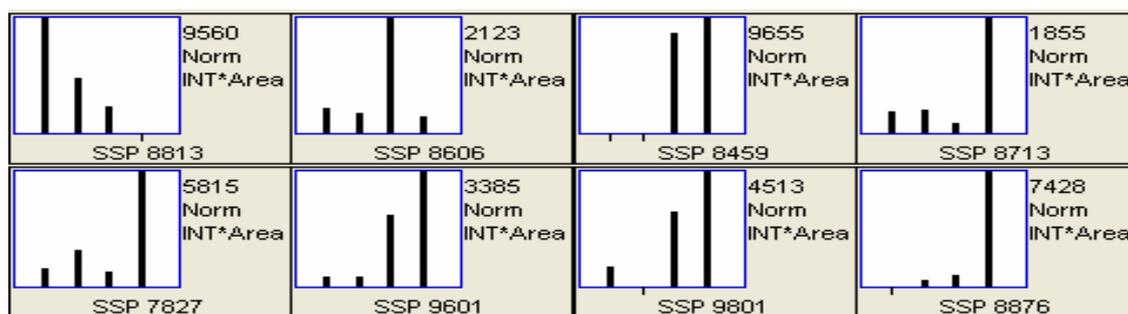
Protein name	Full name	effect			pI	Mw	ssp
		a	b	c			
DnaK	Chaperone protein DnaK	+	++	++	4.8	69647	4602
RecA	Recombinase A	--	--	N	5.08	41219	5408
Gor	Glutathione reductase (EC 1.8.1.7)	--	--	-	5.65	48772	7402
UspA	Universal stress protein A	--	+	+	5.14	15125	5117
UspE	Universal stress protein E	--	+	+	5.3	34492	6406
SodB	Superoxide dismutase [Fe] (EC 1.15.1.1)	--	+	+	5.53	22150	6205

圖 9-2 VK₃和 Adriamycin 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

Tpx	Thiol peroxidase (EC 1.11.1.-) (Scavengase P20)	--	+	+	4.89	18709	4210
TrxA	Thioredoxin 1 (Trx1) (Trx)	--	+	+	4.67	11675	4128
GlyA	Serine hydroxymethyltransferase (EC <u>2.1.2.1</u>) (Serine methylase) (SHMT)	--	N	--	6.04	46051	7507
?		--	++	+			7720
?		--	++	--			7723
?		--	N	--			7725
?		--	--	--			7831
?		--	-	--			7832
YliB	Putative binding protein yliB	--	N	--	7.32	73914	8719
NlpD	Lipoprotein nlpD	-	N	--	8.84	3879	9402
DegP	Protease do (EC 3.4.21.-)	-	N	--	8.01	6640	9501

圖 9-2 續 VK₃ 和 Adriamycin 藥物合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 VK₃ 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質，第三點代表的是以 Adriamycin 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質，第四點代表的是以 VK₃ 和 Adriamycin 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 VK₃ 和 Adriamycin 對大腸桿菌其他可能蛋白質表現濃度的影響；Type a 代表以 VK₃ 和 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較；Type b 代表以 VK₃ 和 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 VK₃ 處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較；Type c 代表以 VK₃ 和 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較；以“++”代表蛋白質濃度增加二倍以上，“+”代表蛋白質濃度增加不到二倍或增加的量極少，“--”代表蛋白質濃度減少二倍以上，“-”代表蛋白質濃度減少不到二倍或減少的量極少，“N”代表蛋白質表現沒有差異。



Protein name	Full name	effect			pI	Mw	ssp
		a	b	c			
		--	--	-			8813
		-	-	--			8606
		++	++	+			8459
OpgG	Glucans biosynthesis protein G	++	++	++	6.51	8296	8713
Syq	Glutaminyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.18) (Glutamine--tRNA ligase) (GlnRS)	++	++	++	5.91	74850	7827
		++	++	+			9601
		++	++	+			9801
		++	++	++			8876

圖 9-3 VK₃ 和 Adriamycin 合併使用對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 VK₃ 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質，第三點代表的是以 Adriamycin 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質，第四點代表的是以 VK₃ 和 Adriamycin 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 VK₃ 和 Adriamycin 對大腸桿菌其他可能蛋白質表現的影響；Type a 代表以 VK₃ 和 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較；Type b 代表以 VK₃ 和 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 VK₃ 處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較；Type c 代表以 VK₃ 和 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 Adriamycin 處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較；以“++”代表蛋白質濃度增加二倍以上，“+”代表蛋白質濃度增加不到二倍或增加的量極少，“--”代表蛋白質濃度減少二倍以上，“-”代表蛋白質濃度減少不到二倍或減少的量極少。

肆、藥物處理時間對大腸桿菌蛋白質表現的影響

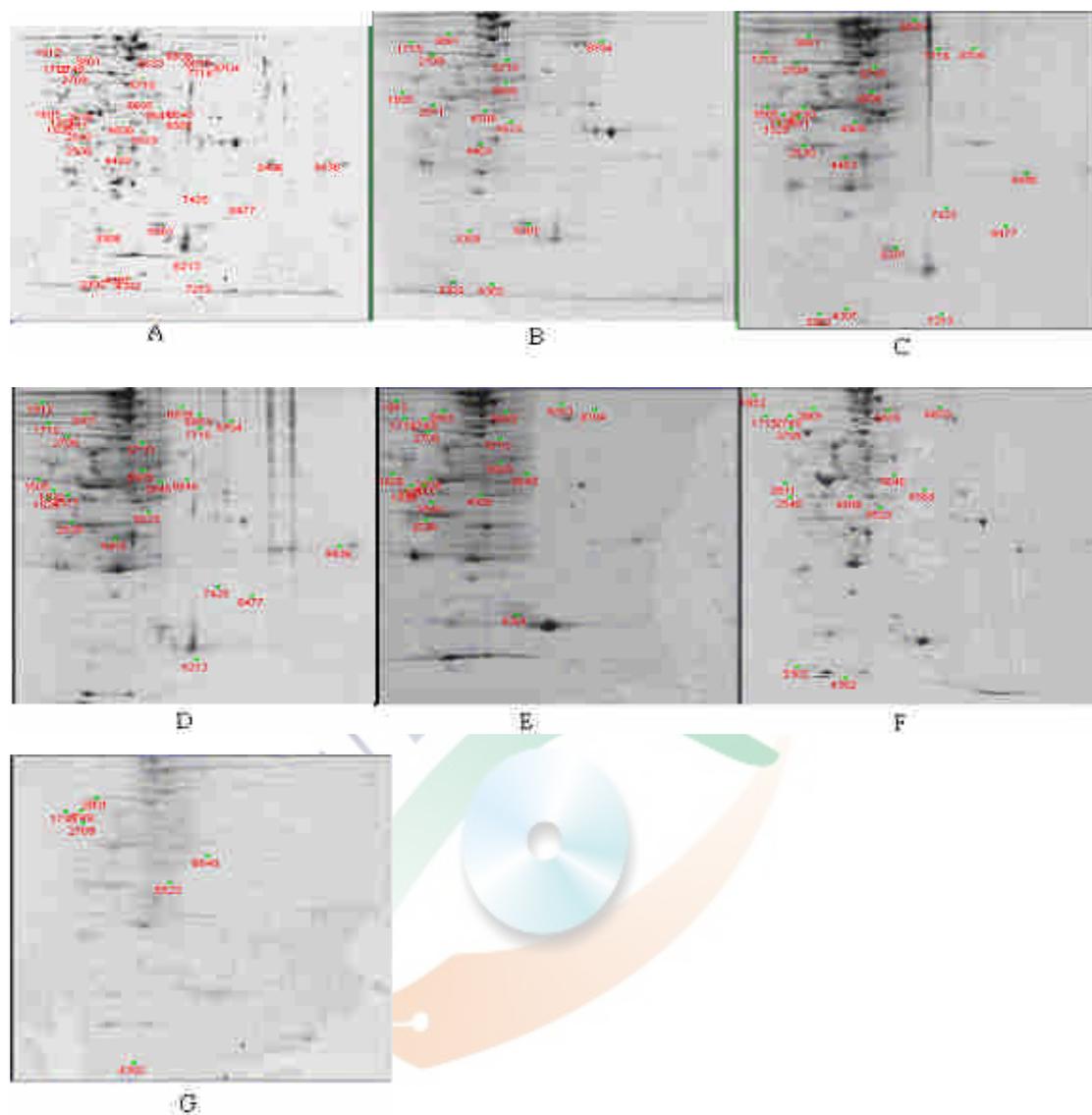
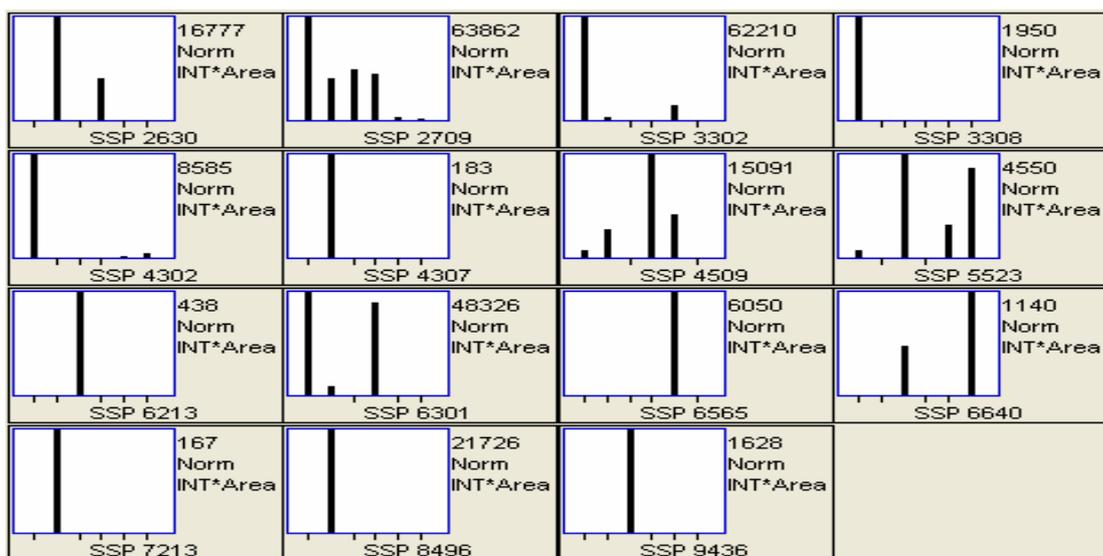


圖 10-1 VK₃ 藥物處理時間對大腸桿菌蛋白質表現的影響

(A)為主膠是(B)(C)(D)(E)(F)(G)膠片經影像處理後加成的結果;(B)為對照組;(C)為VK₃處理1小時後,大腸桿菌的蛋白質表現;(D)為加入VK₃處理1.5小時後,大腸桿菌的蛋白質表現;(E)為VK₃處理2小時後,大腸桿菌的蛋白質表現;(F)為VK₃處理2.5小時後,大腸桿菌的蛋白質表現;(G)為VK₃處理3小時後,大腸桿菌的蛋白質表現。膠片上出現的紅色數字代表蛋白質在膠片上的相對座標,前面兩個數字是以X軸座標分為0到9共十區,每一區再細分十小格,所形成的位置編碼,後面兩個數字則是以Y軸座標分為0到9共十區,每一區再細分十小格,所形成的位置編碼,於是構成了四位數字的ssp座標。



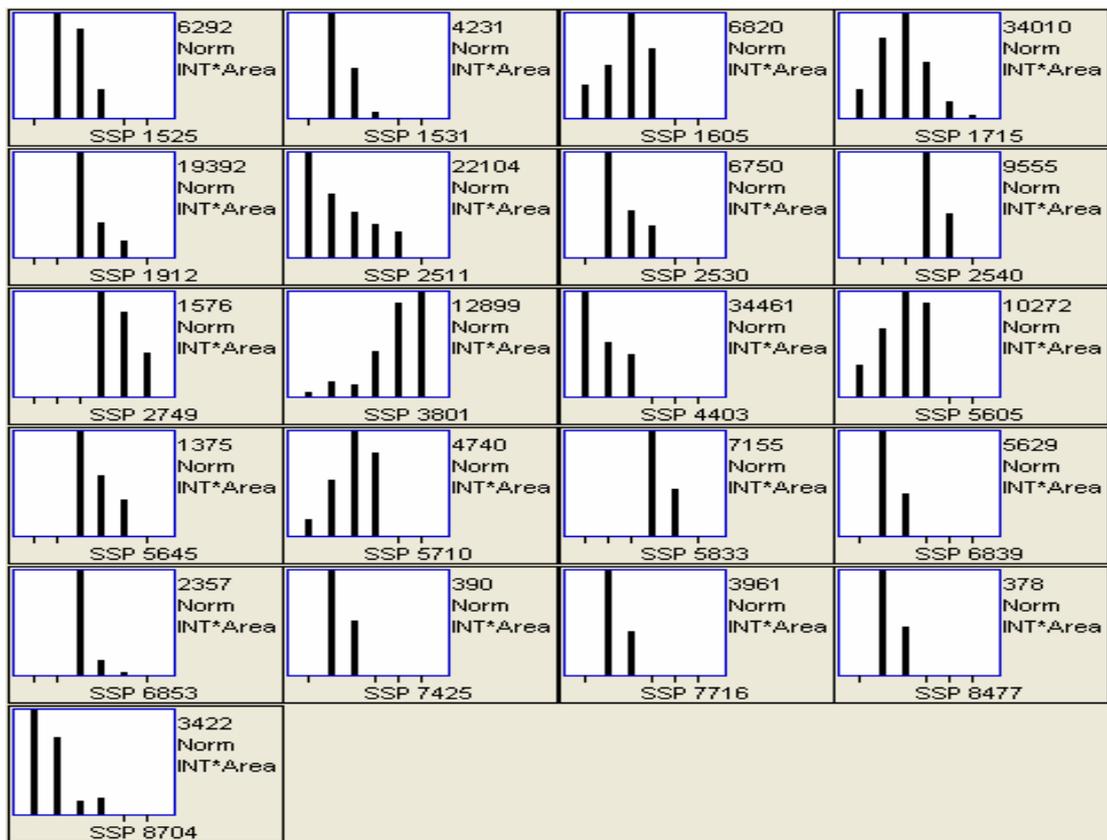
Protein name	Full name	effect	pI	Mw	ssp
DnaK	Chaperone protein DnaK	a	4.8	69647	2709
RecA	Recombinase A	e	5.08	41219	4509
GroES	10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein)	d	5.15	15660	4307
GroEL	60 kDa chaperonin (Protein Cpn60) (groEL protein)	e	4.85	56743	2630
SODA	Superoxide dismutase [Mn] (EC 1.15.1.1) (MnSOD)	d	6.44	22966	8496
Gor	Glutathione reductase (EC 1.8.1.7)	d	5.65	48772	6565
Zwf	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC 1.1.1.49) (G6PD)	e	5.61	51633	6640
UspA	Universal stress protein A	a	5.14	15125	4302
UspE	Universal stress protein E	e	5.3	34492	5523
UspF	Universal stress protein F	d	7.37	30778	9436
UspG	Universal stress protein G	d	6.08	15530	7213
SodB	Superoxide dismutase [Fe] (EC 1.15.1.1)	e	5.53	22150	6301
Tpx	Thiol peroxidase (EC 1.11.1.-) (Scavengase P20)	d	4.89	18709	3308
YgiN	Protein ygiN	d	5.57	10734	6213
TrxA	Thioredoxin 1 (Trx1) (Trx)	e	4.67	11675	3302

圖 10-2 VK₃ 藥物處理時間對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現

量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 VK_3 藥物處理 1 小時後的大腸桿菌蛋白質，第三點代表的是以 VK_3 藥物處理 1.5 小時後的大腸桿菌蛋白質，第四點代表的是以 VK_3 藥物處理 2 小時後的大腸桿菌蛋白質，第五點代表的是以 VK_3 藥物處理 2.5 小時後的大腸桿菌蛋白質，第六點代表的是以 VK_3 藥物處理 3 小時後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 VK_3 藥物的處理時間不同會對大腸桿菌蛋白質的表現造成影響。Type a 代表隨著 VK_3 藥物處理的時間增加而大腸桿菌蛋白質的量減少；Type b 代表隨著 VK_3 藥物處理的時間增加而大腸桿菌蛋白質的量先增加後減少；Type c 代表隨著 VK_3 藥物處理的時間增加而大腸桿菌蛋白質的量也增加；Type d 代表特定 VK_3 藥物處理的時間下會有表現的大腸桿菌蛋白質；Type e 代表隨著 VK_3 藥物處理的時間增加，大腸桿菌蛋白質的量有震盪式的表現。





Protein name	Full name	effect	pI	Mw	ssp
?		b			1525
?		b			1531
?		b			1605
?		b			1715
?		b			1912
FtsZ	Cell division protein ftsZ	a	4.62	40571	2511
?		b			2530
?		b			2540
?		b			2749
PpsA	Phosphoenolpyruvate synthase (EC 2.7.9.2) (Pyruvate, water dikinase) (PEP synthase)	c	4.94	86407	3801
TalB	Transaldolase B (EC 2.2.1.2)	a	5.01	35885	4403

圖 10-3 VK₃ 藥物處理時間對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響。

GlpK 或 ThrC	Glycerol kinase (EC 2.7.1.30) (ATP:glycerol 3-phosphotransferase) (Glycerokinase) (GK)或 Threonine synthase (EC 4.2.3.1)	b	5.30 或 5.29	50728 或 52143	5605
?		b			5645
Syr	Arginyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.19) (Arginine--tRNA ligase) (ArgRS)	b	5.32	60427	5710
?		b			5833
?		b			6839
?		b			6853
?		b			7425
?		b			7716
?		b			8477
TrpG	Anthranilate synthase component II (EC 4.1.3.27) [Includes: Glutamine amidotransferase; Anthranilate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.18)]	a	6.08	55967	8704

圖 10-3 續 VK₃ 藥物處理時間對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 VK₃ 藥物處理 1 小時後的大腸桿菌蛋白質，第三點代表的是以 VK₃ 藥物處理 1.5 小時後的大腸桿菌蛋白質，第四點代表的是以 VK₃ 藥物處理 2 小時後的大腸桿菌蛋白質，第五點代表的是以 VK₃ 藥物處理 2.5 小時後的大腸桿菌蛋白質，第六點代表的是以 VK₃ 藥物處理 3 小時後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 VK₃ 藥物的處理時間不同會對大腸桿菌蛋白質的表現造成影響。Type a 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加而大腸桿菌蛋白質的量減少；Type b 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加而大腸桿菌蛋白質的量先增加後減少；Type c 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加而大腸桿菌蛋白質的量也增加；Type d 代表特定 VK₃ 藥物處理的時間下會有表現的大腸桿菌蛋白質；Type e 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加，大腸桿菌蛋白質的量有震盪式的表現。ssp 座標為 5605 的蛋白質經生物資訊的方式比對結果找到兩種可能的蛋白質，由於此兩種蛋白質 pI 值和 Mw 都非常接近，所以認為這兩種蛋白質都有存在的可能。

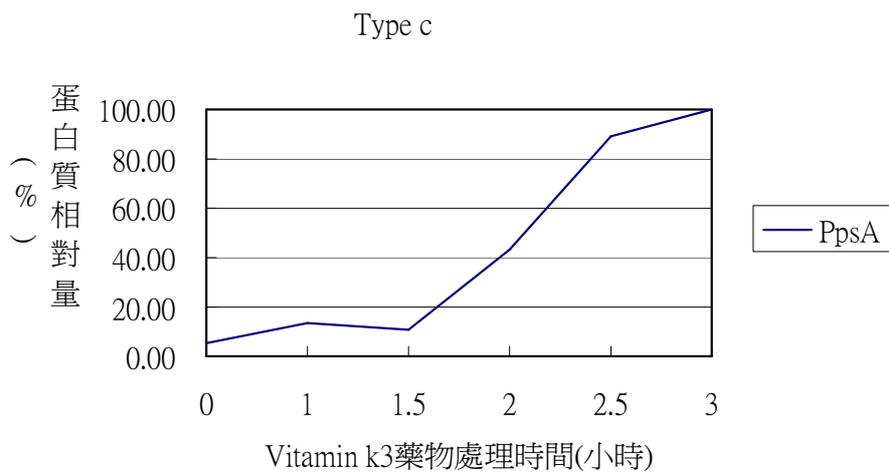
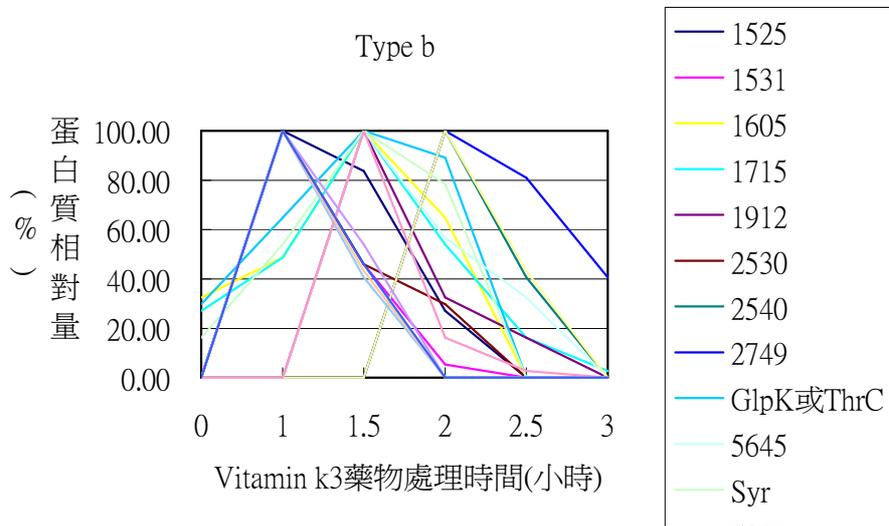
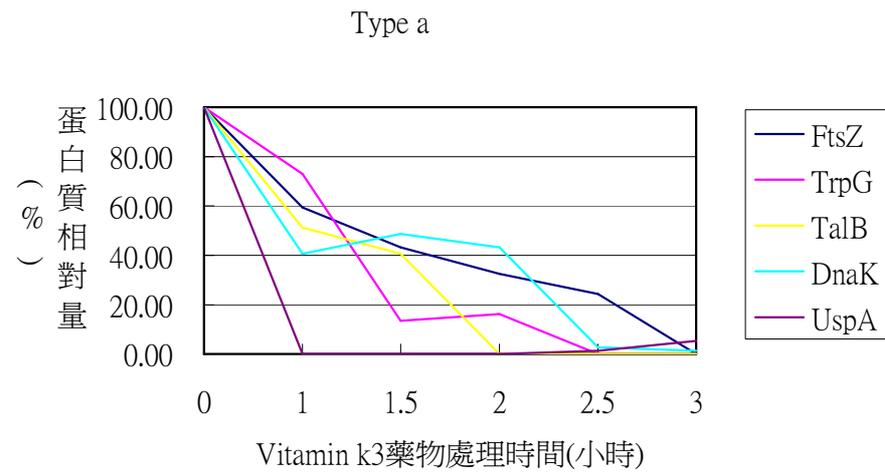


圖 10-4 VK₃ 藥物處理時間對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

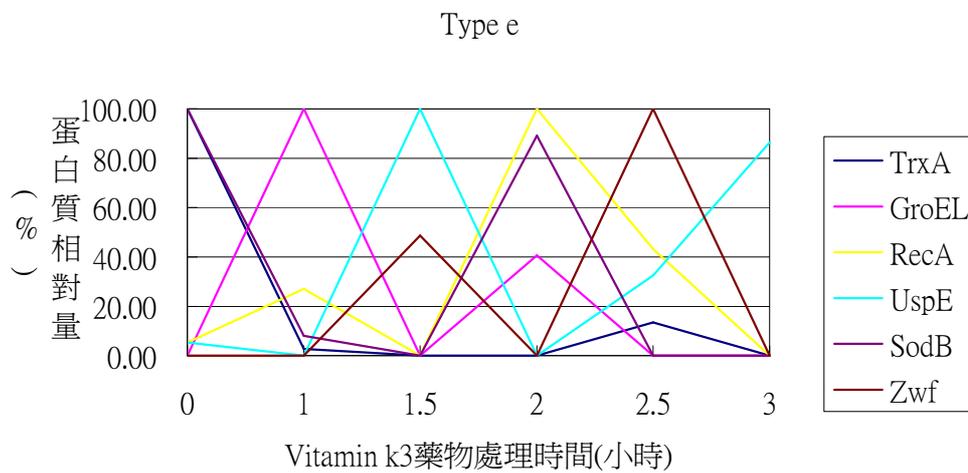
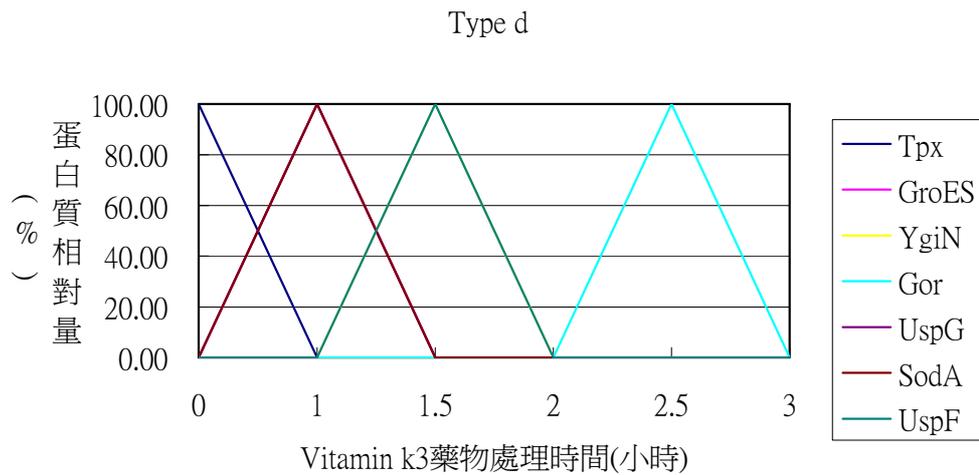


圖 10-4 續 VK₃ 藥物處理時間對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

根據圖 8-2 和 8-3 中的長條圖，以蛋白質最大的表現量當作基準，依序算出每個蛋白質在 VK₃ 藥物處理的不同時間下，蛋白質的相對量，繪出 VK₃ 藥物處理時間與蛋白質相對量的折線圖。Type a 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加，而大腸桿菌蛋白質的量減少；Type b 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加，而大腸桿菌蛋白質的量先增加後減少；Type c 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加，大腸桿菌蛋白質的量也增加；Type d 代表特定 VK₃ 藥物處理的時間會有表現的大腸桿菌蛋白質；Type e 代表隨著 VK₃ 藥物處理的時間增加，大腸桿菌蛋白質的量有震盪式的表現。

伍、2-Aminopurine 處理對大腸桿菌蛋白質表現的影響

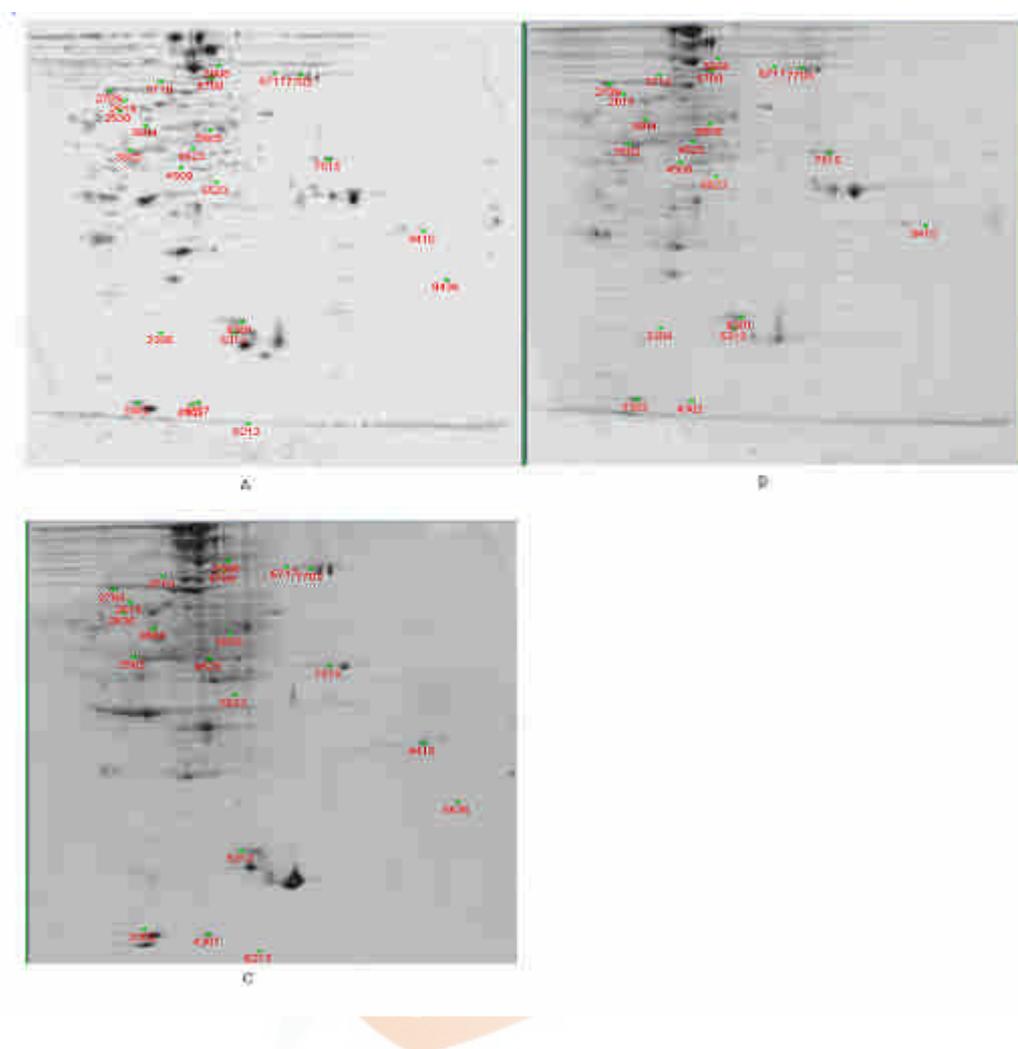
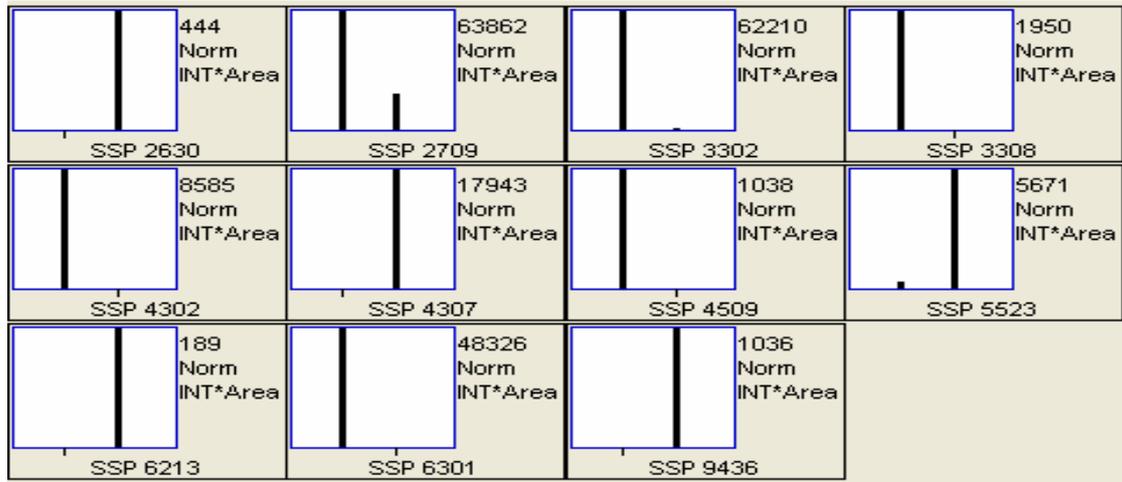


圖 11-1 2-Aminopurine 處理對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

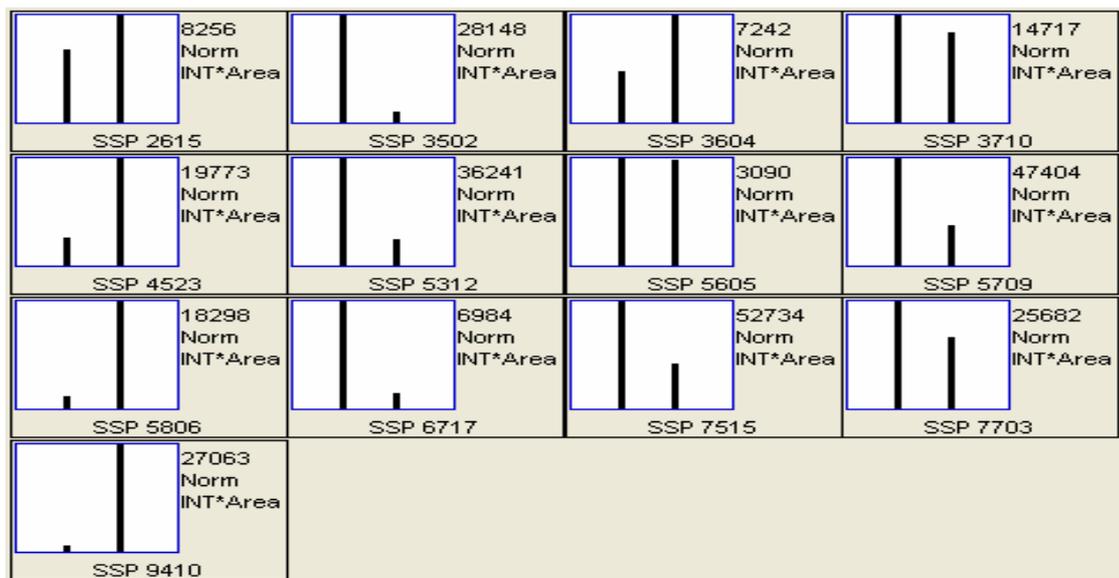
(A)為主膠是(B)和(C)膠片經影像處理後加成的結果;(B)為對照組;(C)為2-Aminopurine 處理後，大腸桿菌的蛋白質表現的大腸桿菌。膠片上出現的紅色數字代表蛋白質在膠片上的相對座標，前面兩個數字是以 X 軸座標分為 0 到 9 共十區，每一區再細分十小格，所形成的位置編碼，後面兩個數字則是以 Y 軸座標分為 0 到 9 共十區，每一區再細分十小格，所形成的位置編碼，於是構成了四位數字的 ssp 座標。



Protein name	Full name	effect	pI	Mw	ssp
DnaK	Chaperone protein DnaK	--	4.8	69647	2709
RecA	Recombinase A	--	5.08	41219	4509
GroES	10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein)	++	5.15	15660	4307
GroEL	60 kDa chaperonin (Protein Cpn60) (groEL protein)	++	4.85	56743	2630
UspA	Universal stress protein A	--	5.14	15125	4302
UspE	Universal stress protein E	++	5.3	34492	5523
UspF	Universal stress protein F	++	7.37	30778	9436
SodB	Superoxide dismutase [Fe] (EC 1.15.1.1)	--	5.53	22150	6301
Tpx	Thiol peroxidase (EC 1.11.1.-) (Scavengase P20)	--	4.89	18709	3308
YgiN	Protein ygiN	--	5.57	10734	6213
TrxA	Thioredoxin 1 (Trx1) (Trx)	--	4.67	11675	3302

圖 11-2 2-Aminopurine 處理對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 2-Aminopurine 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 2-Aminopurine 對大腸桿菌蛋白質表現的影響；以“++”代表蛋白質濃度增加二倍以上，“+”代表蛋白質濃度增加不到二倍，“--”代表蛋白質濃度減少二倍以上，“-”代表蛋白質濃度減少不到二倍。



Protein name	Full name	effect	pI	Mw	ssp
Pt1	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (EC 2.7.3.9) (Phosphotransferase system, enzyme I)	+	4.78	59836	2615
AtpB	ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14) (ATPase subunit beta) (ATP synthase F1 sector subunit beta)	--	4.90	47816	3502
DnaB	Replicative DNA helicase (EC 3.6.1.-)	++	4.94	49448	3604
Odp2	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (EC 2.3.1.12) (E2) (Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex)	-	5.01	77450	3710
Eno	Enolase (EC 4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase)	++	5.29	46325	4523

圖 11-3 2-Aminopurine 處理對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響。

PpiB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (EC 5.2.1.8) (PPIase B) (Rotamase B)	--	5.51	17721	5312
ThrC	Threonine synthase (EC 4.2.3.1)	N	5.29	48676	5605
Syr	Arginyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.19) (Arginine--tRNA ligase) (ArgRS)	--	5.32	60427	5709
ClpB	Chaperone clpB (Heat-shock protein F84.1)	++	5.38	73900	5806
?		--			6717
AroG	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, Phe-sensitive (EC 2.5.1.54) (Phospho-2-keto-3-deoxyheptonate aldolase) (DAHP synthetase) (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase)	--	6.13	38081	7515
DhsA	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (EC 1.3.99.1)	-	5.82	64101	7703
FkbA	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase fkpA (EC 5.2.1.8) (PPIase) (Rotamase)	++	7.06	33326	9410

圖 11-3 續 2-Aminopurine 處理對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 2-Aminopurine 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 2-Aminopurine 對大腸桿菌其他可能蛋白質表現的影響；以“++”代表蛋白質濃度增加二倍以上，“+”代表蛋白質濃度增加不到二倍，“--”代表蛋白質濃度減少二倍以上，“-”代表蛋白質濃度減少不到二倍，“N”代表蛋白質表現沒有差異。

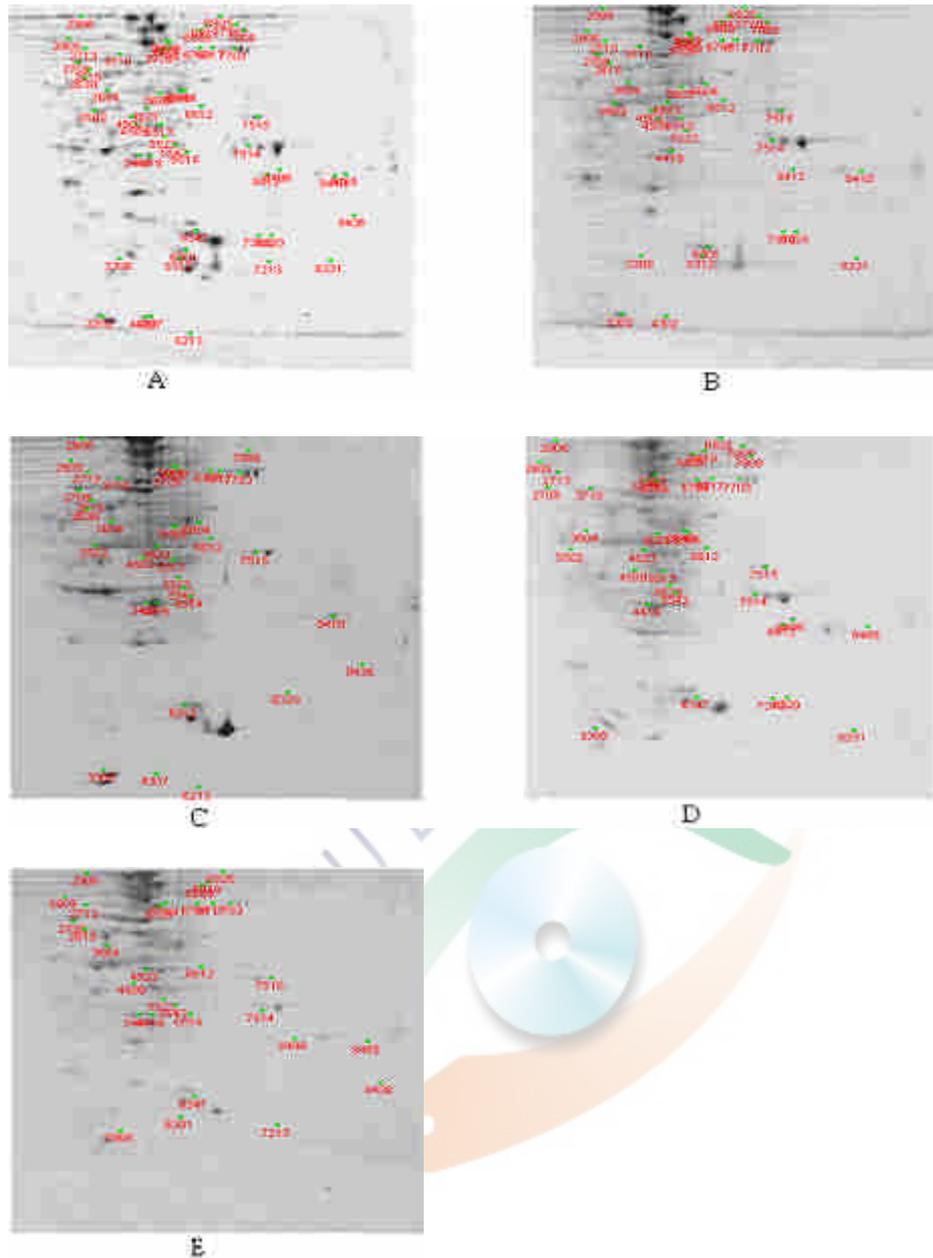


圖 12-1 VK₃ 和 2-Aminopurine 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

(A)為主膠是(B)(C)(D)(E)膠片經影像處理後加成的結果;(B)為對照組;(C)為VK₃處理後，大腸桿菌的蛋白質表現的大腸桿菌;(D)為2-Aminopurine處理後，大腸桿菌的蛋白質表現;(E)為VK₃和2-Aminopurine處理後，大腸桿菌的蛋白質表現。膠片上出現的紅色數字代表蛋白質在膠片上的相對座標，前面兩個數字是以X軸座標分為0到9共十區，每一區再細分十小格，所形成的位置編碼，後面兩個數字則是以Y軸座標分為0到9共十區，每一區再細分十小格，所形成的位置編碼，於是構成了四位數字的ssp座標。

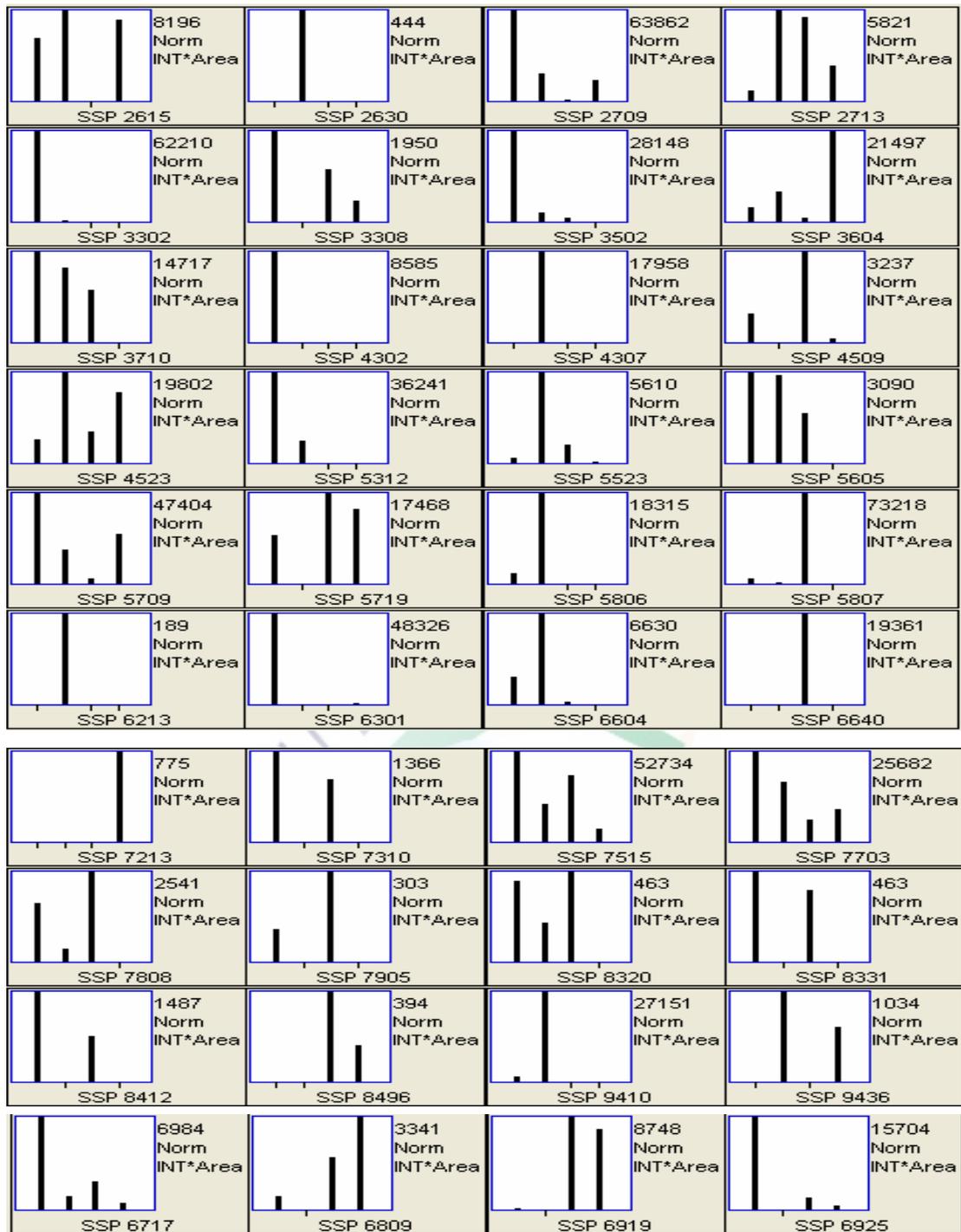


圖 12-2 VK₃ 和 2-Aminopurine 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的

影響。

Protein name	Full name	effect			pI	Mw	ssp
		a	b	c			
DnaK	Chaperone protein DnaK	--	-	++	4.8	69647	2709
RecA	Recombinase A	--	+	--	5.08	41219	4509
GroES	10 kDa chaperonin (Protein Cpn10) (groES protein)	N	--	N	5.15	15660	4307
GroEL	60 kDa chaperonin (Protein Cpn60) (groEL protein)	N	--	N	4.85	56743	2630
UspA	Universal stress protein A	--	N	N	5.14	15125	4302
UspE	Universal stress protein E	-	--	--	5.3	34492	5523
UspF	Universal stress protein F	++	-	++	7.37	30778	9436
SodB	Superoxide dismutase [Fe] (EC 1.15.1.1)	--	+	+	5.53	22150	6301
Tpx	Thiol peroxidase (EC 1.11.1.-) (Scavengase P20)	--	++	--	4.89	18709	3308
YgiN	Protein ygiN	N	--	N	5.57	10734	6213
TrxA	Thioredoxin 1 (TRX1) (TRX)	--	-	N	4.67	11675	3302
Pt1	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (EC 2.7.3.9) (Phosphotransferase system, enzyme I)	+	-	++	4.78	59836	2615
AtpB	ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14) (ATPase subunit beta) (ATP synthase F1 sector subunit beta)	--	-	--	4.90	47816	3502
DnaB	Replicative DNA helicase (EC 3.6.1.-)	++	++	++	4.94	49448	3604

圖 12-2 續 VK₃ 和 2-Aminopurine 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

Odp2	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (EC 2.3.1.12) (E2) (Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex)	--	--	--	5.01	77450	3710
Eno	Enolase (EC 4.2.1.11) (2-phosphoglycerate dehydratase) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase)	++	-	++	5.29	46325	4523
PpiB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (EC 5.2.1.8) (PPIase B) (Rotamase B)	--	--	N	5.51	17721	5312
ThrC	Threonine synthase (EC 4.2.3.1)	--	--	--	5.29	48676	5605
Syr	Arginyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.19) (Arginine--tRNA ligase) (ArgRS)	-	+	++	5.32	60427	5709
ClpB	Chaperone clpB (Heat-shock protein F84.1)	-	--	N	5.38	73900	5806
?		--	--	--			6717
AroG	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, Phe-sensitive (EC 2.5.1.54) (Phospho-2-keto-3-deoxyheptonate aldolase) (DAHP synthetase) (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase)	--	--	--	6.13	38081	7515

圖 12-2 續 VK₃ 和 2-Aminopurine 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

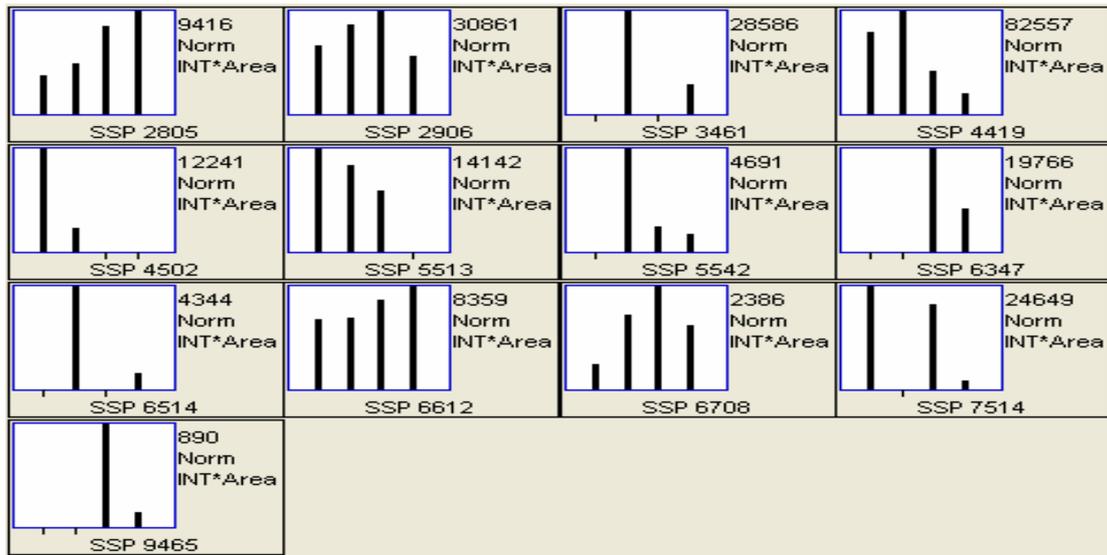
Zwf	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC 1.1.1.49) (G6PD)	N	N	--	5.61	51633	6640
FkbA	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase fkpA (EC 5.2.1.8) (PPIase) (Rotamase)	-	--	N	7.06	33326	9410
DhsA	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (EC 1.3.99.1)	--	-	+	5.82	64101	7703
TrxA	Thioredoxin 1 (TRX1) (TRX)	--	N	N	4.67	11675	3302
Syr	Arginyl-tRNA synthetase	+	++	-	5.32	60427	5719
GltD	Glutamate synthase [NADPH] small chain (EC 1.4.1.13) (Glutamate synthase subunit beta) (NADPH-GOGAT) (GLTS beta chain)	--	--	-	5.40	52658	6604
PflB	Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1)	++	++	+	5.61	82279	6809
PflB	Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1)	++	++	-	5.61	82279	6919
Syn	Asparaginylyl-tRNA synthetase	--	+	-	5.64	92858	6925
?		--	N	--			7310

圖 12-2 續 VK₃ 和 2-Aminopurine 合併使用對大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 VK₃ 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質，第三點代表的是以 2-Aminopurine 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質，第四點代表的是以 VK₃ 和 2-Aminopurine 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 VK₃ 和 2-Aminopurine 對大腸桿菌蛋白質表現的影響; Type a 代表以 VK₃ 和 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較; Type b 代表 VK₃ 和 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 VK₃ 處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較; Type c 代表 VK₃ 和

2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較;以"++"代表蛋白質濃度增加二倍以上,"+"代表蛋白質濃度增加不到二倍或增加的量極少,"--"代表蛋白質濃度減少二倍以上,"-"代表蛋白質濃度減少不到二倍或減少的量極少,"N"代表蛋白質表現沒有差異。





Protein name	Full name	effect			pI	Mw	ssp
		a	b	c			
?		++	+	+			2805
PpsA	Phosphoenolpyruvate synthase (EC 2.7.9.2) (Pyruvate, water dikinase) (PEP synthase)	-	-	-	4.94	86407	2906
?		++	--	++			3461
DgaL	D-galactose-binding periplasmic protein (GBP) (D-galactose/D-glucose-binding protein) (GGBP)	--	--	-	5.16	31379	4419
MetK 或 Idh	S-adenosylmethionine synthetase (EC 2.5.1.6) (Methionine adenosyltransferase) (AdoMet synthetase) (MAT) 或	--	--	N	5.03 或 5.02	45059 或 46142	4502

圖 12-3 VK₃ 和 2-Aminopurine 合併使用對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響。

K6pF2	6-phosphofructokinase isozyme 2 (EC 2.7.1.11) (Phosphofructokinase-2)	--	--	--	5.30	38081	5513
?		++	--	-			5542
?		++	++	--			6347
?		++	--	++			6514
Syh	Histidyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.21) (Histidine--tRNA ligase) (HisRS)	+	+	+	5.59	50728	6612
PflB	Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1)	+	-	-	5.61	82279	6708
AroG	Phospho-2-dehydro-3-deoxy heptonate aldolase, Phe-sensitive (EC 2.5.1.54) (Phospho-2-keto-3-deoxyheptonate aldolase) (DAHP synthetase) (3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase)	--	+	-	6.13	38081	7514
?		++	++	--			9465

圖 12-3 續 VK₃ 和 2-Aminopurine 合併使用對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響。

以 PDQuest Advanced 8.0.1 做影像分析時，影像中點的密度與蛋白質的表現量成正比，軟體將其蛋白質的相對量繪製成直條圖。直條圖中 X 軸座標的第一點代表的是未以藥物處理的大腸桿菌蛋白質，第二點代表的是以 VK₃ 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質，第三點代表的是以 2-Aminopurine 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質，第四點代表的是以 VK₃ 和 2-Aminopurine 藥物處理後的大腸桿菌蛋白質。由直條圖中得知 VK₃ 和 2-Aminopurine 對其他可能大腸桿菌蛋白質表現的影響；Type a 代表以 VK₃ 和 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與未以藥物處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較；Type b 代表以 VK₃ 和 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 VK₃ 處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較；Type c 代表以 VK₃ 和 2-Aminopurine 處理後的大腸桿菌蛋白質表現與以 2-Aminopurine

處理後的大腸桿菌蛋白質表現之比較; 以"++"代表蛋白質濃度增加二倍以上,"+"代表蛋白質濃度增加不到二倍或增加的量極少,"--"代表蛋白質濃度減少二倍以上,"-"代表蛋白質濃度減少不到二倍或減少的量極少,"N"代表蛋白質表現沒有差異。ssp 座標為 4502 的蛋白質經生物資訊的方式比對結果找到兩種可能的蛋白質, 由於此兩種蛋白質 pI 值和 Mw 都非常接近, 所以認為這兩種蛋白質都有存在的可能。



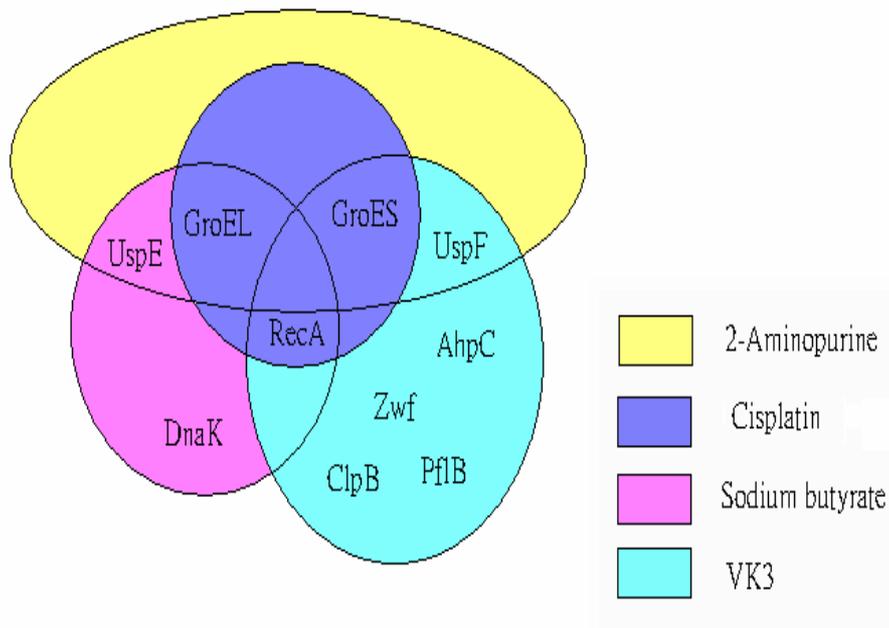


圖 13 使用不同藥物時增加的蛋白質表現模式

黃色集合代表的是以 2-Aminopurine 藥物處理後增加的大腸桿菌蛋白質；淺藍色集合代表的是以 VK₃ 處理後增加的大腸桿菌蛋白質；紫色集合代表的是以 Cisplatin 處理後增加的大腸桿菌蛋白質；紅色集合代表的是以 Sodium butyrate 處理後增加的大腸桿菌蛋白質。由集合圖中得知 VK₃ 和 2-Aminopurine 共同增加表現的蛋白質有 UspF 及 GroES；VK₃ 和 Cisplatin 共同增加表現的蛋白質有 RecA 及 GroES；VK₃ 和 Sodium butyrate 共同增加表現的蛋白質有 RecA；Sodium butyrate 和 2-Aminopurine 共同增加表現的蛋白質有 UspE 及 GroEL。

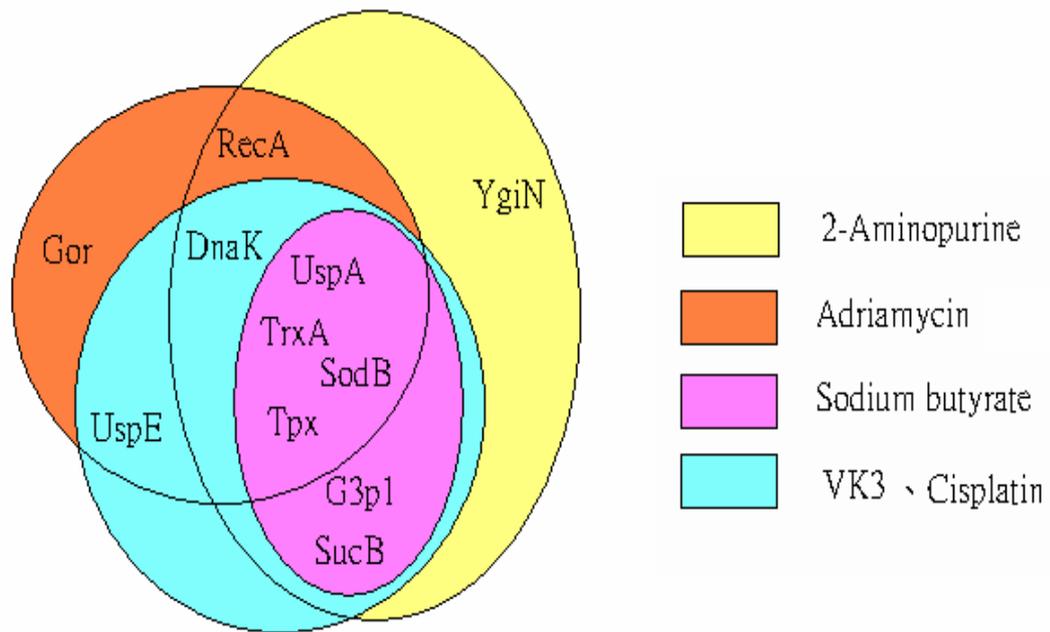


圖 14 使用不同藥物時減少的蛋白質表現模式

黃色集合代表的是以 2-Aminopurine 藥物處理後減少的大腸桿菌蛋白質；淺藍色集合代表的是以 VK₃ 或 Cisplatin 處理後減少的大腸桿菌蛋白質；橘色集合代表的是以 Adriamycin 處理後減少的大腸桿菌蛋白質；紅色集合代表的是以 Sodium butyrate 處理後減少的大腸桿菌蛋白質。由集合圖中得知 VK₃ 和 2-Aminopurine 共同減少表現的蛋白質有 DnaK, UspA, TrxA, SodB, Tpx, G3p1, 及 SucB；VK₃ 和 Sodium butyrate 共同減少表現的蛋白質有 UspA, TrxA, SodB, Tpx, G3p1, 及 SucB；VK₃ 和 Adriamycin 共同減少表現的蛋白質有 DnaK, UspA, TrxA, SodB, Tpx, 及 UspE；Sodium butyrate 和 2-Aminopurine 共同減少表現的蛋白質有 UspA, TrxA, SodB, Tpx, G3p1, 及 SucB。

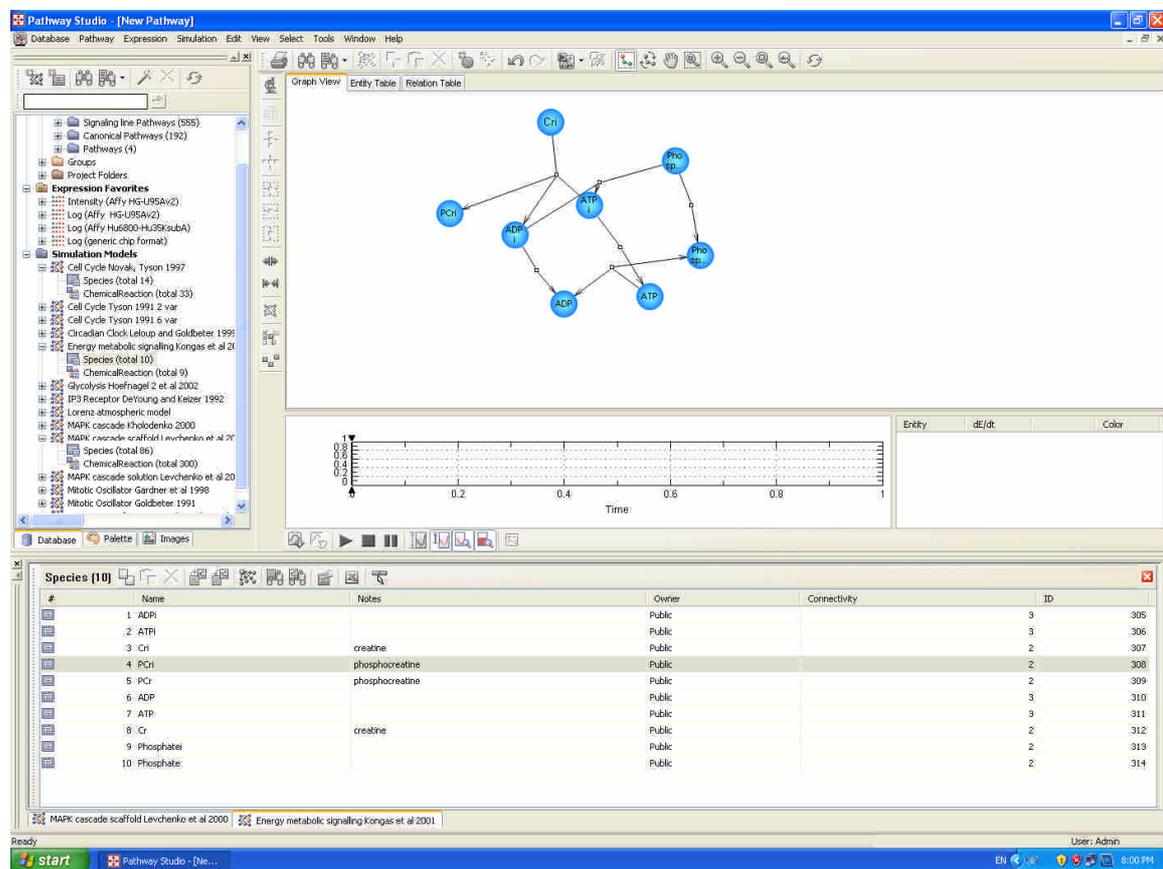


圖 15 藥物對大腸桿菌蛋白質表現影響的模式化

Pathway 是一個具備圖像化的系統生物學(systems-biology)工具，利用數學式的運算引擎，能夠模擬、建模、及分析生化路徑(biochemical pathway)。在本研究，我們運用 Pathway 這套軟體建構生化路徑與藥物交互作用的關係。以圖像方式描繪出整個生化路徑，經由拖放功能(drag-and-drop)的使用者界面，可檢視藥物作用模式。

陸、大腸桿菌蛋白質表現的質譜分析

表 1. SDS 膠片取點質譜分析結果

spots	Protein hits	
1	gi 50843580	putative lysophospholipase
	gi 50842906	putative lysophospholipase
	gi 21241626	ABC transporter oligopeptide binding protein .
	gi 119355877	DNA polymerase B region
2	gi 50843580	putative lysophospholipase
	gi 23098524	two-component response regulator
	gi 54295726	hypothetical protein lpl2814
3	gi 50843580	putative lysophospholipase
	gi 86749590	Aminodeoxychorismate lyase
	gi 15893990	Predicted lipoprotein, Med/BMP family
4	gi 5822331	Chain B, Crystal Structure Of Pseudomonas Putida 2-Oxoisovalerate Dehydrogenase
	gi 15891465	hypothetical protein AGR_L_2718 [Agrobacterium tumefaciens str. C58]
	gi 28378766	pyruvate dehydrogenase complex, E1 component, beta subunit [Lactobacillus plantarum WCFS1]
	gi 4928922	hypothetical multidrug resistance protein [Pseudomonas aeruginosa]
	gi 17545694	PROBABLE ATP-BINDING ABC TRANSPORTER PROTEIN [Ralstonia solanacearum GMI1000]
	gi 23016561	COG1251: NAD(P)H-nitrite reductase [Magnetospirillum magnetotacticum MS-1]
	gi 27376143	putative C4-dicarboxylate binding protein [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]
	gi 81428518	Diphosphomevalonate decarboxylase [Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K]
	gi 116268541	glutathione S-transferase-like [Polynucleobacter sp. QLW-P1DMWA-1]
	gi 24375499	hypothetical protein SO4012 [Shewanella oneidensis MR-1]
	gi 27468271	50S ribosomal protein L20 [Staphylococcus epidermidis ATCC 12228]
gi 32030454	COG0576: Molecular chaperone GrpE (heat shock protein)	

		[Haemophilus somnus 2336]	
	gi 117924417	cyclic nucleotide-binding [Magnetococcus sp. MC-1]	
	gi 32475823	probable threonine/tyrosine-specific protein kinase [Rhodopirellula baltica SH 1]	
	gi 68055976	Spermine synthase [Exiguobacterium sibiricum 255-15]	
5	gi 5822331	Chain B, Crystal Structure Of Pseudomonas Putida 2-OxoisovalerateDehydrogenase(Branched-Chain Alpha-Keto Acid Dehydrogenase E1b)	
	gi 27468271	50S ribosomal protein L20 [Staphylococcus epidermidis ATCC 12228]	
	gi 29346178	hypothetical protein BT_0768 [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]	
	gi 117924417	cyclic nucleotide-binding [Magnetococcus sp. MC-1]	
	gi 28378766	pyruvate dehydrogenase complex, E1 component, beta subunit[Lactobacillus plantarum WCFS1]	
	gi 4928922	hypothetical multidrug resistance protein [Pseudomonas aeruginosa]	
	gi 17545694	PROBABLE ATP-BINDING ABC TRANSPORTER PROTEIN [Ralstonia solanacearum GMI1000]	
	gi 23016561	COG1251: NAD(P)H-nitrite reductase [Magnetospirillum magnetotacticum MS-1]	
	gi 27376143	putative C4-dicarboxylate binding protein [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]	
	gi 38233841	formyltetrahydrofolate synthetase [Corynebacterium diphtheriae NCTC 13129]	
	gi 81428518	Diphosphomevalonate decarboxylase [Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K]	
	gi 116268541	glutathione S-transferase-like [Polynucleobacter sp. QLW-P1DMWA-1]	
	gi 50843469	fructose-bisphosphate aldolase [Propionibacterium acnes KPA171202]	
gi 15891465	hypothetical protein AGR_L_2718 [Agrobacterium tumefaciens str.C58]		
6	gi 118443689	bifunctional purine biosynthesis protein PurH [Clostridium novyi NT]	
	gi 23099034	chemotaxis protein [Oceanobacillus iheyensis HTE831]	
	gi 21244911	hypothetical protein XAC4194 [Xanthomonas	

		axonopodis pv. citri str. 306]	
	gi 91770354	hypothetical protein PsycPRwfDRAFT_1195 [Psychrobacter sp. PRwf-1]	
	gi 42559428	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase mraW	
	gi 82777045	YdiS [Shigella dysenteriae Sd197]	
	gi 108801631	hypothetical protein Mmcs_4668 [Mycobacterium sp. MCS]	
7	gi 50843436	alkyl hydroperoxide reductase C22 protein [Propionibacterium acnes KPA171202]	
	gi 15615756	thioredoxin peroxidase [Bacillus halodurans C-125]	
	gi 56421322	thiol peroxidase (superoxide-inducible protein 8) [Geobacillus kaustophilus HTA426]	
	gi 68055940	Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Malallergen [Exiguobacterium sibiricum 255-15]	
	gi 15924703	probable thiol peroxidase [Staphylococcus aureus subsp. Aureus Mu50]	
	gi 56964507	thiol peroxidase [Bacillus clausii KSM-K16]	
	gi 22536405	hypothetical protein SAG0221 [Streptococcus agalactiae 2603V/R]	
	gi 71066653	initiation factor 3 (IF-3) [Psychrobacter arcticus 273-4]	
	gi 91769942	Exopolyphosphatase [Psychrobacter sp. PRwf-1]	
	gi 90589343	TonB-dependent receptor [Flavobacterium johnsoniae UW101]	
	gi 23100687	hypothetical protein OB3232 [Oceanobacillus iheyensis HTE831]	
	gi 89072122	Sco1-related protein [Photobacterium sp. SKA34]	
	gi 52841726	hypothetical protein lpg1496 [Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Philadelphia 1]	
	gi 90414109	L-sulfolactate dehydrogenase [Photobacterium profundum 3TCK]	
	gi 92908736	Acetate--CoA ligase [Mycobacterium sp. JLS]	
	gi 33860577	DnaJ protein [Prochlorococcus marinus subsp. pastoris str. CCMP1986]	
gi 92909436	AMP-dependent synthetase and ligase [Mycobacterium sp. JLS]		

	gi 125974850	tRNA modification GTPase TrmE [Clostridium thermocellum ATCC 27405]
--	--------------	---

做完 digestion 之樣品抽乾後，寄送鐸德科技進行已知蛋白質鑑定 (Protein ID)，樣品經 Q-TOF ESI/MS/MS 分析後，於 MASCOT 資料庫比對的蛋白質 ID 鑑定結果如表。



參考文獻

- Abramov, Y., Aronovitch, J., & Ramu, A. (1996). Verapamil increases the bacteriostatic and bactericidal effects of adriamycin on escherichia coli. *Drugs under experimental and clinical research*, 22(6), 295-300.
- Amash, H. S., Brown, O. R., & Padron, V. A. (1995). Protection by selective amino acid solutions against doxorubicin induced growth inhibition of escherichia coli. *General pharmacology*, 26(5), 983-987.
- Andersen, J. S., & Mann, M. (2006). Organellar proteomics: Turning inventories into insights. *EMBO reports*, 7(9), 874-879.
- Arner, E. S., Nakamura, H., Sasada, T., Yodoi, J., Holmgren, A., & Spyrou, G. (2001). Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex. *Free radical biology & medicine*, 31(10), 1170-1178.
- Arnold, C. N., McElhanon, J., Lee, A., Leonhart, R., & Siegele, D. A. (2001). Global analysis of escherichia coli gene expression during the acetate-induced acid tolerance response. *Journal of Bacteriology*, 183(7), 2178-2186.
- Artal-Sanz, M., de Jong, L., & Tavernarakis, N. (2006). Caenorhabditis elegans: A versatile platform for drug discovery. *Biotechnology journal*, 1(12), 1405-1418.
- Balakrishnan, L., & Milavetz, B. (2007). Histone hyperacetylation in the coding region of chromatin undergoing transcription in SV40 minichromosomes is a dynamic process regulated directly by the presence of RNA polymerase II. *Journal of Molecular Biology*, 365(1), 18-30.
- Barrett, J., Brophy, P. M., & Hamilton, J. V. (2005). Analysing proteomic data. *International journal for parasitology*, 35(5), 543-553.
- Bhattacharya, R., & Beck, D. J. (2002). Survival and SOS induction in cisplatin-treated escherichia coli deficient in pol II, RecBCD and RecFOR functions. *DNA repair*, 1(11), 955-966.
- Biard, D. S., Maratrat, M., Thybaud, V., Melcion, C., & Sarasin, A. (1992). Flow cytometric detection of drugs altering the DNA methylation pattern. *Cancer research*, 52(19), 5213-5218.

- Blumenthal, R. D., & Goldenberg, D. M. (2007). Methods and goals for the use of in vitro and in vivo chemosensitivity testing. *Molecular biotechnology*, 35(2), 185-198.
- Bore, E., Hebraud, M., Chafsey, I., Chambon, C., Skjaeret, C., Moen, B., et al. (2007). Adapted tolerance to benzalkonium chloride in escherichia coli K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 4), 935-946.
- Bradshaw, R. A., & Burlingame, A. L. (2005). From proteins to proteomics. *IUBMB life*, 57(4-5), 267-272.
- Brana, M. F., & Sanchez-Migallon, A. (2006). Anticancer drug discovery and pharmaceutical chemistry: A history. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 8(10), 717-728.
- Chen, W. L. (2006). Chemoinformatics: Past, present, and future. *Journal of chemical information and modeling*, 46(6), 2230-2255.
- Cowell, J. K., & Hawthorn, L. (2007). The application of microarray technology to the analysis of the cancer genome. *Current Molecular Medicine*, 7(1), 103-120.
- Dong, G. C., Chuang, P. H., Forrest, M. D., Lin, Y. C., & Chen, H. M. (2006). Immuno-suppressive effect of blocking the CD28 signaling pathway in T-cells by an active component of echinacea found by a novel pharmaceutical screening method. *Journal of medicinal chemistry*, 49(6), 1845-1854.
- Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., Hayete, B., & Collins, J. J. (2007). Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in escherichia coli. *Molecular systems biology*, 3, 91.
- Easton, J. A., Thompson, P., & Crowder, M. W. (2006). Time-dependent translational response of E. coli to excess zn(II). *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 17(5), 303-307.
- Edwards, R. J., Moran, N., Devocelle, M., Kiernan, A., Meade, G., Signac, W., et al. (2007). Bioinformatic discovery of novel bioactive peptides. *Nature chemical biology*, 3(2), 108-112.
- Eisenstein, M. (2006). Sorting out the best targets. *Nature methods*, 3(7), 498.

- Elrick, M. M., Walgren, J. L., Mitchell, M. D., & Thompson, D. C. (2006). Proteomics: Recent applications and new technologies. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 98(5), 432-441.
- Ettema, T. J., de Vos, W. M., & van der Oost, J. (2005). Discovering novel biology by in silico archaeology. *Nature reviews.Microbiology*, 3(11), 859-869.
- Faessel, H. M., Levasseur, L. M., Slocum, H. K., & Greco, W. R. (1999). Parabolic growth patterns in 96-well plate cell growth experiments. *In vitro cellular & developmental biology.Animal*, 35(5), 270-278.
- Fan, X., Fett, W. F., & Mitchell, B. W. (2007). Effect of negative air ions on escherichia coli ATCC 25922 inoculated onto mung bean seed and apple fruit. *Journal of food protection*, 70(1), 204-208.
- Fass, R. J., & Barnishan, J. (1979). Minimal inhibitory concentrations of 34 antimicrobial agents for control strains escherichia coli ATCC 25922 and pseudomonas aeruginosa ATCC 27853. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16(5), 622-624.
- Firsov, A. A., Lubenko, I. Y., Vostrov, S. N., Kononenko, O. V., Zinner, S. H., & Portnoy, Y. A. (2000). Comparative pharmacodynamics of moxifloxacin and levofloxacin in an in vitro dynamic model: Prediction of the equivalent AUC/MIC breakpoints and equiefficient doses. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 46(5), 725-732.
- Forstner, M., Leder, L., & Mayr, L. M. (2007). Optimization of protein expression systems for modern drug discovery. *Expert review of proteomics*, 4(1), 67-78.
- Fuchs, P. C., Barry, A. L., & Brown, S. D. (1997). Is escherichia coli ATCC 25922 useful for monitoring broth microdilution tests of fluoroquinolones? *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 39(4), 549-550.
- Gatenby, R. A., & Frieden, B. R. (2007). Information theory in living systems, methods, applications, and challenges. *Bulletin of mathematical biology*, 69(2), 635-657.
- Gelvan, D. (1997). Enhancement of adriamycin toxicity by iron chelates is not a free radical mechanism. *Biological trace element research*, 56(3), 295-309.
- Govorun, V. M., & Archakov, A. I. (2002). Proteomic technologies in modern biomedical science. *Biochemistry.Biokhimiia*, 67(10), 1109-1123.

- Grebenova, D., Kuzelova, K., Pluskalova, M., Peslova, G., Halada, P., & Hrkal, Z. (2006). The proteomic study of sodium butyrate antiproliferative/cytodifferentiation effects on K562 cells. *Blood cells, molecules & diseases*, 37(3), 210-217.
- Gregan, J., Rabitsch, P. K., Rumpf, C., Novatchkova, M., Schleiffer, A., & Nasmyth, K. (2006). High-throughput knockout screen in fission yeast. *Nature protocols*, 1(5), 2457-2464.
- Gunawardana, C. G., & Diamandis, E. P. (2007). High throughput proteomic strategies for identifying tumour-associated antigens. *Cancer letters*, 249(1), 110-119.
- Han, M. J., & Lee, S. Y. (2006). The escherichia coli proteome: Past, present, and future prospects. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 70(2), 362-439.
- Heidecker, B., & Hare, J. M. (2007). The use of transcriptomic biomarkers for personalized medicine. *Heart failure reviews*,
- Herrera, G., Diaz, L., Martinez-Romero, A., Gomes, A., Villamon, E., Callaghan, R. C., et al. (2007). Cytomics: A multiparametric, dynamic approach to cell research. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 21(2), 176-182.
- Hong, E. S., Yeung, A., Funchain, P., Slupska, M. M., & Miller, J. H. (2005). Mutants with temperature-sensitive defects in the escherichia coli mismatch repair system: Sensitivity to mispairs generated in vivo. *Journal of Bacteriology*, 187(3), 840-846.
- Hoorn, E. J., Hoffert, J. D., & Knepper, M. A. (2006). The application of DIGE-based proteomics to renal physiology. *Nephron.Physiology*, 104(1), p61-72.
- Hsiao, C. P., & Siebert, K. J. (1999). Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International journal of food microbiology*, 47(3), 189-201.
- Huang, C. F., Lin, S. S., Ho, Y. C., Chen, F. L., & Yang, C. C. (2006). The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cellular & molecular immunology*, 3(2), 97-106.
- Huang, R., Wallqvist, A., & Covell, D. G. (2006). Assessment of in vitro and in vivo activities in the national cancer institute's anticancer screen with respect to

- chemical structure, target specificity, and mechanism of action. *Journal of medicinal chemistry*, 49(6), 1964-1979.
- Jaluria, P., Konstantopoulos, K., Betenbaugh, M., & Shiloach, J. (2007). A perspective on microarrays: Current applications, pitfalls, and potential uses. *Microbial cell factories*, 6, 4.
- Kaur, P., & Russell, J. (1998). Biochemical coupling between the DrrA and DrrB proteins of the doxorubicin efflux pump of streptomyces peucetius. *The Journal of biological chemistry*, 273(28), 17933-17939.
- Kikuchi, T., & Carbone, D. P. (2007). Proteomics analysis in lung cancer: Challenges and opportunities. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 12(1), 22-28.
- Koseki, S., & Yamamoto, K. (2006). Recovery of escherichia coli ATCC 25922 in phosphate buffered saline after treatment with high hydrostatic pressure. *International journal of food microbiology*, 110(1), 108-111.
- Kumar, K. S., Sonnemann, J., & Beck, J. F. (2006). Histone deacetylase inhibitors induce cell death in supratentorial primitive neuroectodermal tumor cells. *Oncology reports*, 16(5), 1047-1052.
- Kuznetsov, N. A., Koval, V. V., Zharkov, D. O., Vorobjev, Y. N., Nevinsky, G. A., Douglas, K. T., et al. (2007). Pre-steady-state kinetic study of substrate specificity of escherichia coli formamidopyrimidine--DNA glycosylase. *Biochemistry*, 46(2), 424-435.
- Lasserre, J. P., Beyne, E., Pyndiah, S., Lapaillerie, D., Claverol, S., & Bonneu, M. (2006). A complexomic study of escherichia coli using two-dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 27(16), 3306-3321.
- Lee, J. C., Chang, C. F., Chi, Y. H., Hwang, D. R., & Hsu, J. T. (2004). A reporter-based assay for identifying hepatitis C virus inhibitors based on subgenomic replicon cells. *Journal of virological methods*, 116(1), 27-33.
- Lee, J. C., Shih, Y. F., Hsu, S. P., Chang, T. Y., Chen, L. H., & Hsu, J. T. (2003). Development of a cell-based assay for monitoring specific hepatitis C virus NS3/4A protease activity in mammalian cells. *Analytical Biochemistry*, 316(2), 162-170.
- Lee, J. C., Wu, T. Y., Huang, C. F., Yang, F. M., Shih, S. R., & Hsu, J. T. (2005).

- High-efficiency protein expression mediated by enterovirus 71 internal ribosome entry site. *Biotechnology and bioengineering*, 90(5), 656-662.
- Lee, J. C., Yu, M. C., Lien, T. W., Chang, C. F., & Hsu, J. T. (2005). High-throughput cell-based screening for hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitors. *Assay and drug development technologies*, 3(4), 385-392.
- Lee, M. Y., & Dordick, J. S. (2006). High-throughput human metabolism and toxicity analysis. *Current opinion in biotechnology*, 17(6), 619-627.
- Lee, T. L., Alba, D., Baxendale, V., Rennert, O. M., & Chan, W. Y. (2006). Application of transcriptional and biological network analyses in mouse germ-cell transcriptomes. *Genomics*, 88(1), 18-33.
- Li, W., Wang, G. J., Cui, J. W., Chen, X. F., & Zhang, X. M. (2006). The proteomics study of apoptotic NB4 cells induced by sodium butyrate. *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi*, 27(7), 436-440.
- Liao, W. C., Wu, F. Y., & Wu, C. W. (2000). Binary/ternary combined effects of vitamin K3 with other antitumor agents in nasopharyngeal carcinoma CG1 cells. *International journal of oncology*, 17(2), 323-328.
- Lin, L. H., Lee, L. W., Sheu, S. Y., & Lin, P. Y. (2004). Study on the stevioside analogues of steviolbioside, steviol, and isosteviol 19-alkyl amide dimers: Synthesis and cytotoxic and antibacterial activity. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 52(9), 1117-1122.
- Lindon, J. C., Holmes, E., & Nicholson, J. K. (2007). Metabonomics in pharmaceutical R&D. *The FEBS journal*, 274(5), 1140-1151.
- Loo, L. H., Wu, L. F., & Altschuler, S. J. (2007). Image-based multivariate profiling of drug responses from single cells. *Nat. Methods*,
- Lundholt, B. K., Heydorn, A., Bjorn, S. P., & Praestegaard, M. (2006). A simple cell-based HTS assay system to screen for inhibitors of p53-Hdm2 protein-protein interactions. *Assay and drug development technologies*, 4(6), 679-688.
- Mahadeva, R., & Shapiro, S. D. (2005). Animal models of pulmonary emphysema. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, 4(6), 665-673.
- Maillet, I., Berndt, P., Malo, C., Rodriguez, S., Brunisholz, R. A., Pragai, Z., et al.

- (2007). From the genome sequence to the proteome and back: Evaluation of *E. coli* genome annotation with a 2-D gel-based proteomics approach. *Proteomics*, 7(7), 1097-1106.
- Matic, I., Babic, A., & Radman, M. (2003). 2-aminopurine allows interspecies recombination by a reversible inactivation of the *Escherichia coli* mismatch repair system. *Journal of Bacteriology*, 185(4), 1459-1461.
- Matic, I., Ekiert, D., Radman, M., & Kohiyama, M. (2006). Generation of DNA-free *Escherichia coli* cells by 2-aminopurine requires mismatch repair and nonmethylated DNA. *Journal of Bacteriology*, 188(1), 339-342.
- Miller, J. H., Suthar, A., Tai, J., Yeung, A., Truong, C., & Stewart, J. L. (1999). Direct selection for mutators in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181(5), 1576-1584.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., et al. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), 757-766.
- Nadanaciva, S., Bernal, A., Aggeler, R., Capaldi, R., & Will, Y. (2007). Target identification of drug induced mitochondrial toxicity using immunocapture based OXPHOS activity assays. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*.
- Nagele, E., Vollmer, M., Horth, P., & Vad, C. (2004). 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert review of proteomics*, 1(1), 37-46.
- Nimonkar, A. V., Le Gac, N. T., Villani, G., & Boehmer, P. E. (2006). *Escherichia coli* RecA promotes strand invasion with cisplatin-damaged DNA. *Biochimie*, 88(5), 535-542.
- Nowosielska, A., & Marinus, M. G. (2005). Cisplatin induces DNA double-strand break formation in *Escherichia coli* dam mutants. *DNA repair*, 4(7), 773-781.
- Nystrom, T. (2006). Oxidation of bacterial proteome in response to starvation. *Methods of biochemical analysis*, 49, 89-95.
- O'Hara, B. F., Ding, J., Bernat, R. L., & Franken, P. (2007). Genomic and proteomic approaches towards an understanding of sleep. *CNS & neurological disorders*

drug targets, 6(1), 71-81.

- Oishi, Y., Yunomura, S., Kawahashi, Y., Doi, N., Takashima, H., Baba, T., et al. (2006). Escherichia coli proteome chips for detecting protein-protein interactions. *Proteomics*, 6(24), 6433-6436.
- Perez, R. P., Godwin, A. K., Handel, L. M., & Hamilton, T. C. (1993). A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 29A(3), 395-399.
- Pitsikas, P., Patapas, J. M., & Cupples, C. G. (2004). Mechanism of 2-aminopurine-stimulated mutagenesis in escherichia coli. *Mutation research*, 550(1-2), 25-32.
- Polte, T. R., Shen, M., Karavitis, J., Montoya, M., Pendse, J., Xia, S., et al. (2007). Nanostructured magnetizable materials that switch cells between life and death. *Biomaterials*, 28(17), 2783-2790.
- Righetti, P. G., & Boschetti, E. (2007). Sherlock holmes and the proteome--a detective story. *The FEBS journal*, 274(4), 897-905.
- Rubinstein, A. L. (2003). Zebrafish: From disease modeling to drug discovery. *Current opinion in drug discovery & development*, 6(2), 218-223.
- Rubinstein, L. V., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Skehan, P., et al. (1990). Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1113-1118.
- Senisterra, G. A., Markin, E., Yamazaki, K., Hui, R., Vedadi, M., & Awrey, D. E. (2006). Screening for ligands using a generic and high-throughput light-scattering-based assay. *Journal of Biomolecular Screening : the official journal of the Society for Biomolecular Screening*, 11(8), 940-948.
- Sequeira, A., & Turecki, G. (2006). Genome wide gene expression studies in mood disorders. *Omics : a journal of integrative biology*, 10(4), 444-454.
- Severson, W. E., Shindo, N., Sosa, M., Fletcher, T., 3rd, White, E. L., Ananthan, S., et al. (2007). Development and validation of a high-throughput screen for inhibitors of SARS CoV and its application in screening of a 100,000-compound library. *Journal of Biomolecular Screening : the official journal of the Society for*

Biomolecular Screening, 12(1), 33-40.

- Shigaki, S., Yamaji, T., Han, X., Yamanouchi, G., Sonoda, T., Okitsu, O., et al. (2007). A peptide microarray for the detection of protein kinase activity in cell lysate. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 23(3), 271-275.
- Smith, B. T., Grossman, A. D., & Walker, G. C. (2001). Visualization of mismatch repair in bacterial cells. *Molecular cell*, 8(6), 1197-1206.
- Smith, C. (2007). Tools for drug discovery: Tools of the trade. *Nature*, 446(7132), 219-222.
- Sood, R., English, M. A., Jones, M., Mullikin, J., Wang, D. M., Anderson, M., et al. (2006). Methods for reverse genetic screening in zebrafish by resequencing and TILLING. *Methods (San Diego, Calif.)*, 39(3), 220-227.
- Stephens, A. N., Quach, P., & Harry, E. J. (2005). A streamlined approach to high-throughput proteomics. *Expert review of proteomics*, 2(2), 173-185.
- Sturgeon, C. M., Kemmer, D., Anderson, H. J., & Roberge, M. (2006). Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Biotechnology journal*, 1(3), 289-298.
- Vlasakova, J., Novakova, Z., Rossmeislova, L., Kahle, M., Hozak, P., & Hodny, Z. (2007). Histone deacetylase inhibitors suppress IFN α -induced up-regulation of promyelocytic leukemia protein. *Blood*, 109(4), 1373-1380.
- Voigt, W. (2005). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods in Molecular Medicine*, 110, 39-48.
- Walgren, J. L., & Thompson, D. C. (2004). Application of proteomic technologies in the drug development process. *Toxicology letters*, 149(1-3), 377-385.
- Wang, Y., Chiu, J. F., & He, Q. Y. (2006). Proteomics approach to illustrate drug action mechanisms. *Current drug discovery technologies*, 3(3), 199-209.
- Weber, A., Kogl, S. A., & Jung, K. (2006). Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7165-7175.
- Weinstein, J. N. (2001). Searching for pharmacogenomic markers: The synergy between omic and hypothesis-driven research. *Disease markers*, 17(2), 77-88.

- Wu, F. Y., Liao, W. C., & Chang, H. M. (1993). Comparison of antitumor activity of vitamins K1, K2 and K3 on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell viability assays. *Life Sciences*, 52(22), 1797-1804.
- Yamada, T., Furusawa, C., Nagahisa, K., Kashiwagi, A., Yomo, T., & Shimizu, H. (2007). Analysis of fluctuation in protein abundance without promoter regulation based on escherichia coli continuous culture. *Bio Systems*,
- Yan, S. F., King, F. J., He, Y., Caldwell, J. S., & Zhou, Y. (2006a). Learning from the data: Mining of large high-throughput screening databases. *Journal of chemical information and modeling*, 46(6), 2381-2395.
- Yan, S. F., King, F. J., He, Y., Caldwell, J. S., & Zhou, Y. (2006b). Learning from the data: Mining of large high-throughput screening databases. *Journal of chemical information and modeling*, 46(6), 2381-2395.
- Yang, Y. Y., Huang, C. F., Wei, J. C., Ho, M. S., Wang, L. N., Lin, S. J., et al. (2005). The study of IgG subclass profiles of anti-hbc in populations with different status of HBV infection. *Cellular & molecular immunology*, 2(5), 393-398.
- Zdraveski, Z. Z., Mello, J. A., Marinus, M. G., & Essigmann, J. M. (2000). Multiple pathways of recombination define cellular responses to cisplatin. *Chemistry & biology*, 7(1), 39-50.
- Zhang, M., Aguilera, D., Das, C., Vasquez, H., Zage, P., Gopalakrishnan, V., et al. (2007). Measuring cytotoxicity: A new perspective on LC50. *Anticancer Research*, 27(1A), 35-38.
- Zon, L. I., & Peterson, R. T. (2005). In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature reviews. Drug discovery*, 4(1), 35-44.

附錄

附錄(A)

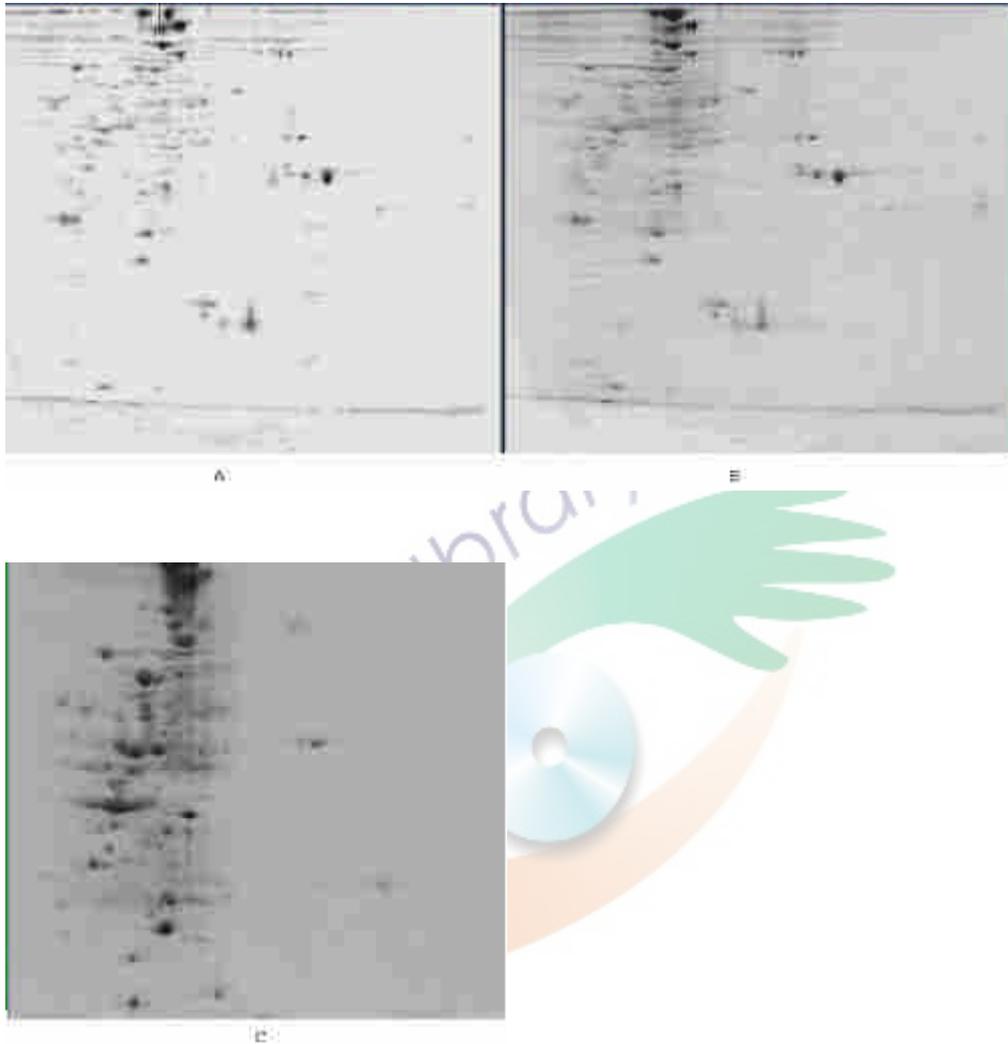


圖 16 (A)為主膠是(B)和(C)膠片經影像處理後加成的結果;(B)為對照組;(C)為 mitomycin C 處理後，大腸桿菌的蛋白質表現。由於 mitomycin C 處理的大腸桿菌進行二維蛋白質電泳後蛋白質的表現與其他膠片差異甚大，造成 PDQuest 影像分析時無法比對出相似程度，所以無法得知分析數據。

附錄(B)

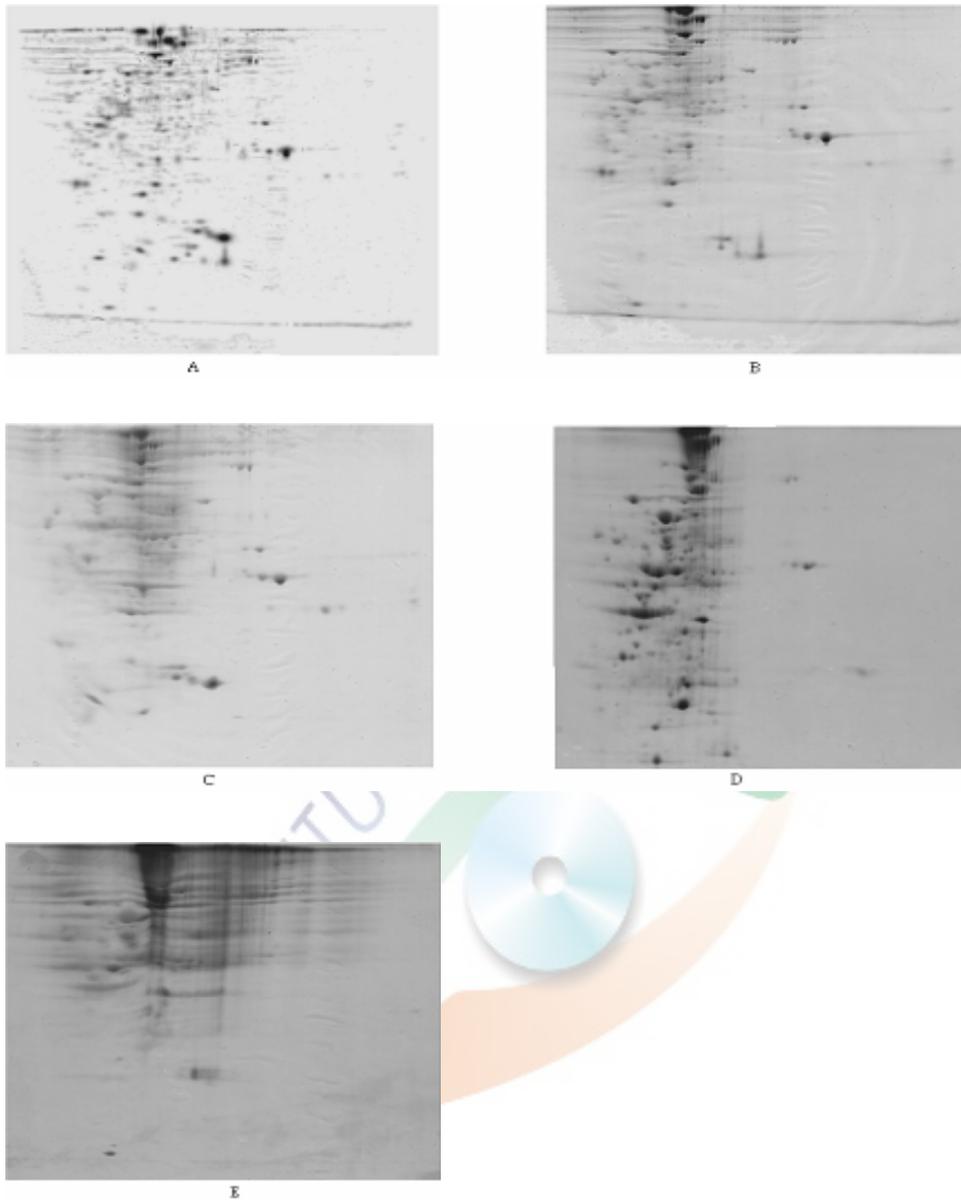


圖 17 (A)為主膠是(B)和(C)膠片經影像處理後加成的結果;(B)為對照組;(C)為VK₃處理後，大腸桿菌的蛋白質表現;(D)為 Mitomycin C 處理後，大腸桿菌的蛋白質表現;(E)為 VK₃ 和 Mitomycin C 處理後，大腸桿菌的蛋白質表現。由於 Mitomycin C 處理的大腸桿菌進行二維蛋白質電泳後蛋白質的表現與其他膠片差異甚大，造成 PDQuest 影像分析時無法比對出相似程度，所以無法得知分析數據。

附錄(C)

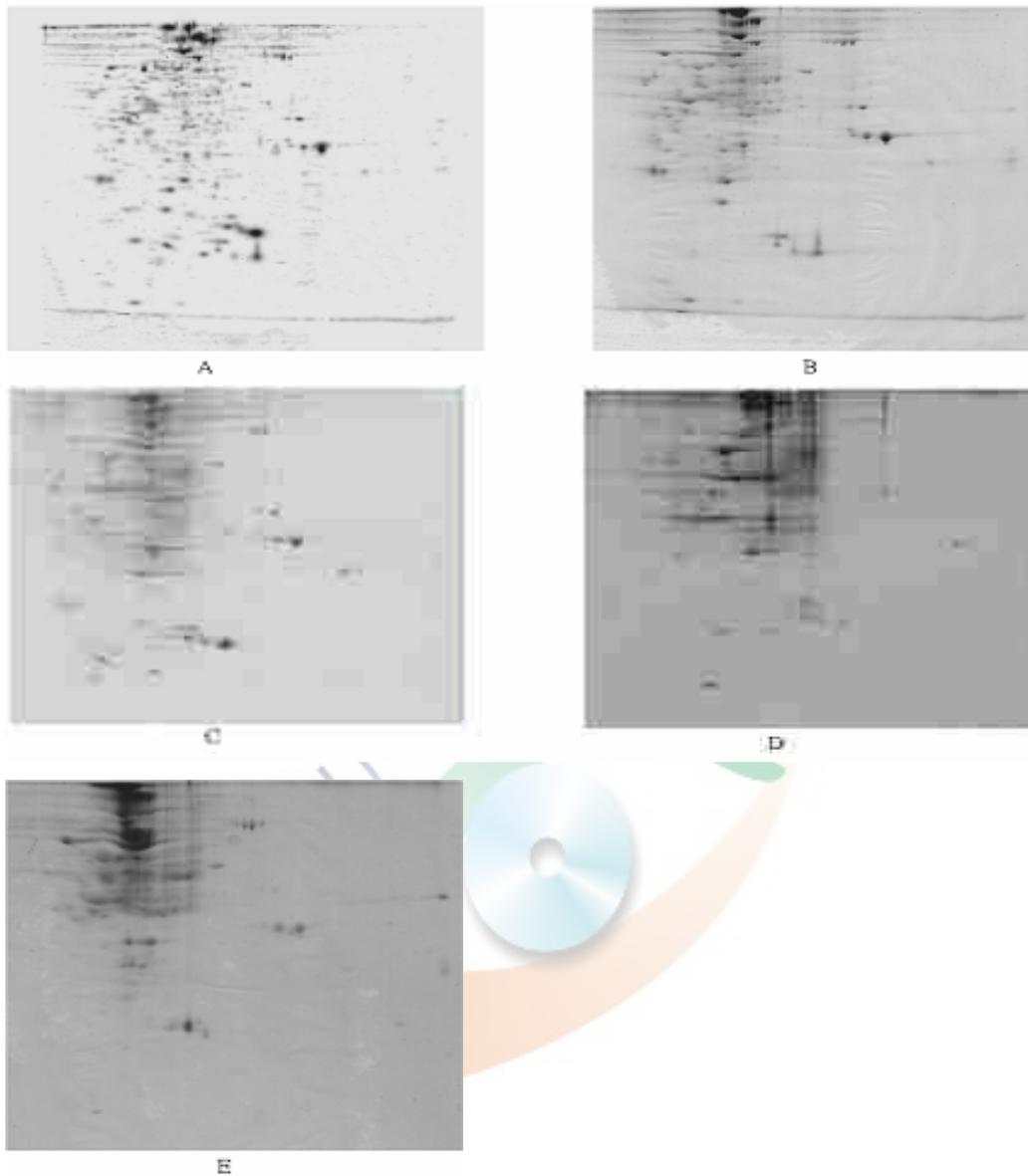


圖 18 (A)為主膠是(B)和(C)膠片經影像處理後加成的結果;(B)為對照組;(C)為VK₃處理後，大腸桿菌的蛋白質表現;(D)為 Cisplatin 處理後，大腸桿菌的蛋白質表現;(E)為 VK₃ 和 Cisplatin 處理後，大腸桿菌的蛋白質表現。由於 Cisplatin 處理的大腸桿菌進行二維蛋白質電泳後蛋白質的表現與其他膠片差異甚大，造成 PDQuest 影像分析時無法比對出相似程度，所以無法得知分析數據。