

台北醫學大學
保健營養學系碩士論文

Master Thesis
School of Nutrition & Health Sciences
Taipei Medical University

以蛋白質體學法分析短鏈脂肪酸代謝異常 ENU 突變鼠

**Proteomic analysis of ENU mice with abnormal defect of short
chain fatty acid**

研究生：黃小珍 撰
(Hsiao-Chen Huang)

指導教授：李信昌 博士
(Sing-Chung Li, Ph.D.)

中華民國九十五年七月
July 2006

中文摘要

本研究目的為利用二維電泳法 (Two-dimensional electrophoresis ; 2-DE) 以找出 ENU (ethyl-nitrosourea) 突變小鼠表現差異的蛋白質點並進行質譜分析，以瞭解突變小鼠短鏈脂肪酸代謝異常原因，並且希望能應用此一模式動物於脂肪酸的代謝研究及探討人類相關臨床疾病。我們利用 ENU 注射動物方法藉以誘發大量基因突變小鼠的產生，經由繁殖配對至第三代後，再以串聯式質譜儀篩得血漿短鏈脂肪酸 (C4-OH) 代謝異常突變小鼠。實驗小鼠 (C57BL/6J) 分為正常小鼠及血漿 C4-OH 含量較正常小鼠高 4 倍標準差的 ENU 突變小鼠，兩組小鼠分別犧牲後取其肝臟、肌肉組織，進行粒線體蛋白質萃取後以 SDS-PAGE 進行一維電泳，然而突變小鼠和正常小鼠粒線體蛋白質表現量並無差異。因此，更進一步利用二維電泳法進行突變小鼠和正常小鼠粒線體蛋白質表現的比較。研究結果顯示突變小鼠和正常小鼠的肌肉粒線體存有差異的蛋白質點，經由介質輔助雷射脫附游離-飛行式質譜儀 (Matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry; MALDI-TOF) 鑑定出差異蛋白質點的身份。在突變小鼠表現量增加的蛋白質為磷酸化的 myosin regulatory light chain 2、tropomyosin 1 α chain、myosin light chain 1，表現量減少的蛋白質為非磷酸化的 myosin regulatory light chain 2、calsequestrin-1 precursor、adenylate kinase isoenzyme 1、ATP synthase D

chain。然而這些蛋白質表現的消長是否與突變鼠體內 C4-OH 含量上升有關，仍有待更進一步的研究加以驗證。

關鍵詞：致突變劑 (ethyl-nitrosourea; ENU)、串聯質譜儀、短鏈脂肪酸、二維電泳法(Two-dimensional electrophoresis ; 2-DE)、介質輔助雷射脫附游離-飛行式質譜儀(Matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass Spectrometry; MALDI-TOF)

Abstract

The purpose of this study was to develop a 2-DE coupling with MALDI-TOF analysis to find the differential proteins in ENU mouse which could explore the cause of genetic defect of short chain fatty acid in mice. We hope that the C4-OH animal model can provide us to investigate fatty acid metabolism related to human genetic disease. We generated ENU-mutagenized mouse and applied to MS/MS tandem mass spectrometry to screen third generation progeny of ENU-mutagenized mouse for abnormalities in the pathway of fatty acid metabolism. The short chain fatty acid (C4-OH) level in ENU mice was three to four folds than normal mice. After protein evaluation, there was no differential protein in mitochondria fraction between normal and ENU mice by SDS-PAGE. Surprisingly, there were eleven differential proteins between normal and ENU mice in muscle in 2-DE approach. These protein spots were applied to MALDI-TOF for further identification. In results, ENU mouse showed higher protein expressions in phosphorylated myosin regulatory light chain 2, myosin light chain 1 and tropomyosin 1 α chain and lower expressions in myosin regulatory light chain 2, adenylate kinase isoenzyme, ATP synthase D chain and calsequestrin-1 precursor in ENU mouse to normal control. These differential proteins expression whether involve to increase C4-OH value in mice needs further study to verify.

Key words : Two-dimensional electrophoresis, ethyl-nitrosourea, C4-OH, MS/MS tandem mass, MALDI-TOF

致謝

終於碩士班兩年生涯到了尾聲，這兩年裡，自己從實驗一竅不通到慢慢累積一點點的實驗技巧，最終還是完成屬於自己的碩士論文，這兩年裡經歷過了一些挫折與不順，總覺得自己不適合作實驗，每每想到就有股休學的衝動，但最終還是清醒了，逃避並不是辦法，這些問題都是必須去面對的。這一路走來謝謝很多人對我的幫助，讓我有這個能力完成這個實驗。

首先感謝我的指導教授李信昌老師，或許是因為我是您的第一個碩士班學生，比較沒有先例可以依循帶我，又遇上了個性比較剛硬的我，這兩年裡難免有過一些爭執，但我們彼此都在學習，也都學習到了，還是很謝謝您實驗上的資助跟協助讓我完成了我的碩士論文。也謝謝口試委員溫端南老師，謝謝您不吝嗇的讓我在您們實驗室學習二維電泳這個技術，也每每幫我解決了不少問題，當然也謝謝您百忙之中抽空來指導我的論文口試給我意見。最後謝謝系主任黃士懿老師，雖然平常會害怕您那雙盯著人看時的大眼睛，但是真的很謝謝您幫我很多，替我開導了一些事，也謝謝你仔細的幫我修改論文初稿。

再來要感謝的是永遠把我當作是自家學妹看待的惠婷學姐和欣如學姐，你們真的對我很好，坐在 655 室受你們很多照顧，課業實驗上有問題，你們總會不吝嗇的幫我解答，在我心情不好時總是聽我訴苦給我安

慰，有好東西吃也總不會忘了與我分享，能有你們真的很好，總是給我很大的支持和勇氣，謝謝你們。也要謝謝欣儀學姐和湘琦學姐，你們的加油跟打氣都是維持我繼續走下去的原動力。另外也要謝謝小朱學長，認識你真的是我研究所的一道曙光，找到了一樣喜歡運動玩樂的人，真的很謝謝你總是跟我分享著你美麗的作品，以後有機會還是要一起運動玩樂去，也謝謝你總是給我一些意見為我打抱不平，你真的是一位好學長，不要再自己亂想囉！當然也要謝謝佩璇學姐，這一年裡你也幫我很多，謝謝你。另外也要謝謝中研院的證言學長及瑾玟學姊，謝謝你們教我二維電泳的技術及在植物所的照顧和幫助。

當然這兩年走來，同學們一起的扶持更是重要，謝謝好姐妹邱和修致，這兩年我們總是一起打氣、玩樂、吃飯和訴苦著，這些時光是我很難忘記的，有你們真好，要做一輩子的好姐妹喔！也謝謝美琳總是為我張羅一些事提醒關心我；謝謝 keini 總是帶給我歡樂為我打氣；謝謝佩霓的搞笑及平時在 Lab 655 的聊天、關心我；謝謝雅惠每天充滿元氣的打招呼及微笑；謝謝亦品、柏姍總是聽我訴苦及給我打氣；最後也謝謝又禎、美子和怡里這兩年的陪伴與打氣，只能說有你們這群人真的很好，大家一起支持打氣完成碩士論文。也要謝謝柏方、倩瑤、佳妤、小可愛、阿布、宇薇和明樺這群可愛的學妹們，謝謝你們精心製作的畢業光碟及平常的打氣。

最後我最要感謝的是我的家人，我的爸爸媽媽總是這樣的付出著，雖然辛勞但是總是不輕易說出苦，每次總說著『學歷就是你們給我們這些小孩子最大的財產』，謝謝你們栽培我到現在，從小到大總是不會給我太多的壓力，有自己發展的空間，讓我隨著自己喜愛的路走，在我遇到不順時，你們總是這樣的安慰我，給我支持。雖然我的脾氣很拗，但是你們總是這樣包容我、疼愛我，真的謝謝你們。另外，也要謝謝我的姐姐惠君，從小你總是有姐姐的風範，禮讓著我們，從小你買衣服或是一些小東西，要是我很喜歡，你總是到最後都會把東西讓給我，雖然我口裡很難說出感謝的字眼，但是真的很感動。也謝謝你總在我遇到挫折時給我安慰及意見，當然也謝謝你的榮富總是請我吃大餐，真的很謝謝你們。再來要謝謝我的哥哥中一，雖然我們常鬥嘴打鬧著，但是我們的感情還是一樣好，謝謝你在媽媽不在家時，總是煮美味的東西給我吃，電腦有問題一定會盡力的幫我解決。最後要謝謝我的弟弟中鴻，你總是偶爾從花蓮帶我愛吃的麻糬給我吃。謝謝你們，在這個家庭真的很幸福。

總之，謝謝我週遭的每個人，因為有你們才有今天的我。

小珍 謹誌

2006. 7

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
致謝.....	IV
目錄	VII
圖目次.....	IX
表目次.....	X
縮寫表.....	XI
第一章 緒論.....	1
第一節 研究動機與目的.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
第一節 ENU 突變劑的致突變力.....	2
第二節 脂肪酸代謝及相關性的代謝疾病.....	4
第三節 蛋白質體學法的應用.....	7
第三章 實驗材料與方法.....	8
第一節 實驗流程.....	8
第二節 動物來源及飼養環境.....	8
第三節 串聯式質譜儀篩選.....	9
第四節 實驗分組.....	9
第五節 粒線體萃取.....	10
第六節 總蛋白質含量測定.....	12
第七節 膠體電泳	13
第八節 二維電泳	16
第四章 結果.....	26
第一節 串聯式質譜儀脂肪酸代謝物(C4-OH)含量.....	26

第二節	SDS-PAGE 實驗結果.....	26
第三節	二維電泳實驗結果.....	26
第四節	蛋白質身份鑑定結果.....	27
第五章	討論.....	29
第一節	Adenylate kinase isoenzyme.....	30
第二節	ATP synthase D chain.....	32
第三節	Muscle contraction related proteins.....	33
第六章	結論.....	35
第七章	參考文獻.....	36
附錄一	61

圖目次

圖一	ENU 結構式.....	43
圖二	ENU 誘發鹼基對置換的機制.....	44
圖三	ENU 處理小鼠隱性模式鼠繁殖.....	45
圖四	粒線體脂肪酸 β 氧化作用流程圖.....	46
圖五	基因體和蛋白質體的生化相關性.....	47
圖六	蛋白質體學研究的基本方法.....	48
圖七	正常小鼠與突變小鼠肌肉及肝臟組織粒線體蛋白質 SDS-PAGE 電泳圖.....	49
圖八	正常小鼠肝臟組織粒線體蛋白質二維電泳結果圖.....	50
圖九	突變小鼠肝臟組織粒線體蛋白二維電泳結果圖.....	51
圖十	正常小鼠肌肉組織粒線體蛋白二維電泳結果圖.....	52
圖十一	突變小鼠肌肉組織粒線體蛋白二維電泳結果圖.....	53
圖十二	正常小鼠肌肉組織粒線體蛋白二維電泳結果圖.....	54
圖十三	突變小鼠肌肉組織粒線體蛋白二維電泳結果圖.....	55
圖十四	AMP 活化 AMPK 的機制圖.....	56
圖十五	脂肪酸生合成途徑.....	57
圖十六	ATP synthase 構造圖.....	58

表目次

表一 ENU 突變鼠血漿中脂肪酸代謝物含量.....	59
表二 差異蛋白質點質譜鑑定結果及差異量.....	60

縮寫表

2-DE	two-dimensional electrophoresis
AMPK	AMP activated protein kinase
APS	ammonium persulphate
BSA	bovine serum albumin
BPB	bromophenol blue
C4-OH	hydroxyl butylcarnitine
CBR	Coomassie Blue R-250
DMD	Duchenne Muscular Dystrophy
DTT	dithiothreitol
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
FAOD	fatty acid oxidation disorder
IAA	iodoacetamide
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight
pI	isoelectric point
SCAD	short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SPF	specific pathogen free
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TFA	trifluoroacetic acid

第一章 緒論

第一節 研究動機與目的

小鼠由於生理、解剖學及生化代謝途徑和人類極為相近，藉由感染或誘發小鼠特定疾病可以用來瞭解人類代謝，並闡明哺乳動物從胚胎發育、代謝疾病、生物學、病理學，乃至於人類癌症型態學上的研究。利用 ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) 突變劑誘發小鼠突變，藉此得到大量不同表現型的突變鼠，進而成為全基因體探討功能性基因的利器。本實驗室先前的研究以 MS/MS 『串聯式質譜儀法』分析平台篩得短鏈脂肪酸 (C4-OH) 代謝異常的 ENU 突變鼠，其特徵為鼠體血漿 C4-OH 含量較正常小鼠平均高約 4 倍標準差，由於從脂肪酸代謝途徑並無找到任何突變的基因，而後基因體學時代，許多研究學者將蛋白質體學法應用於差異蛋白質功能性的研究。

因此，本研究目的為利用二維電泳法以找出 ENU 突變鼠表現差異的蛋白質點並進行質譜分析，以瞭解突變鼠短鏈脂肪酸代謝異常原因，並希望能應用此一模式動物於脂肪酸的代謝研究。

第二章 文獻回顧

第一節 ENU 突變劑的致突變力

ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) 為一烷化劑，為造成小鼠突變最有效的合成化合物 (Russell et al., 1979)，會造成許多生物體隨機的單一鹼基對突變 (圖一)。其主要是直接造成核苷酸的烷化，無需藉由代謝活化作用 (Justice et al., 1999)，可將 ENU 的乙烷基轉移至氧或氮自由基反應位置上，包括腺嘌呤 (adenine) 的 N1、N3 和 N7 上；鳥糞嘌呤 (guanine) 的 O6、N3 和 N7 上；胸腺嘧啶 (thymine) 的 O2、O4 和 N3 上；胞嘧啶 (cytosine) 的 O2 和 N3 上 (Justice et al., 1999; Shibuya and Morimoto 1993)。這些經過乙烷基轉移的 DNA 化合物會在 DNA 複製時造成錯誤的訊息，而導致鹼基錯誤配對及取代 (圖二)。ENU 最常造成的突變為核苷酸 AT 至 TA 的置換 (transversion) 及 AT 至 GC 的轉換 (transition) (Popp et al., 1983)，其突變機率約千分之一，所以在一隻小鼠體內會造成 25-40 個突變基因點 (Balling, 2001)。

ENU 可以造成許多組織的突變，但現在研究重點主要放在其對睪丸、肝臟、脾臟和骨髓的影響 (Noveroske et al., 2000)，其在小鼠睪丸方面，主要是造成精原母細胞突變，ENU 所導致的點突變，會導致 missense, nonsense 和 splice-site 的突變 (Balling, 2001)。

在 ENU 致突變實驗中的突變機率主要是依據 ENU 使用劑量，小鼠種類，基因特性，基因篩選，表現行評估 (Noveroske et al., 2000)。而 ENU 最有效的使用劑量主要受基因篩選和小鼠種類影響 (Justice et al., 1999)。一般而言，許多種類小鼠所能忍受的標準劑量為 300 mg ENU/kg body weight，分三個禮拜注射，一次 100 mg ENU/kg body weight。

ENU 鼠與一般基因剔除鼠 (gene knock out mouse) 不同處在於基因剔除鼠通常是針對特定基因進行功能研究的利器，然而研究者如果擬進行全基因體突變 (Genome-wide mutagenesis) 時，使用 ENU 突變劑處理後的小鼠，可以得到大量不同表現型的突變鼠，或是小鼠含有多重基因突變交互影響的突變鼠，使得突變鼠基因群的表現有強弱上的差別，而一般隱性遺傳模式鼠，通常於 ENU 鼠繁殖三代後就可以產生 (Nelms et al., 2001) (圖三)。因此利用 ENU 誘發小鼠突變平台，以研究人類新穎致病基因的策略具有以下優點：(1) 降低外來轉殖基因位置效應 (position effect) (2) 提供蛋白質功能分析的良好結構 (3) 突變鼠表現型具有從強到弱的表型特徵 (4) 闡明生化代謝過程中變異基因的功能與角色，及尋找新的生化代謝途徑 (Justice et al., 1999)。ENU 突變鼠雖然有以上研究優點，然而篩選與遺傳疾病相關的 ENU 突變鼠數目龐大，所費不貲，因此如何利用外型表徵或是一些較普遍的方法找出突變的原因是現今很重要的課題。

第二節 脂肪酸代謝及相關性的代謝疾病

脂肪酸的 β 氧化作用為許多生物體中重要的代謝過程，在哺乳動物中，脂肪酸的 β 氧化作用主要發生於粒線體及過氧化質體 (Kim & Battaile, 2002; Sim et al., 2002)，為人體最大能量來源。至於細胞如何攝入脂肪酸及脂肪酸在細胞內如何運送仍不是很清楚，短鏈 (C4-C6)及中鏈 (C8-C12) 脂肪酸可藉由擴散作用通過血漿及粒線體膜進入粒線體基質內進行 β 氧化作用，相對的長鏈脂肪酸 (C14-C20) 需藉由被動運輸及細胞膜轉運蛋白質協助以進入細胞膜內(Berk and Stump, 1999; Stump et al., 2001)。脂肪酸藉由 β 氧化作用產生 acetyl-CoA 及還原當量-NADH 與 FADH₂，還原當量可進一步代謝進入克氏循環 (Krebs cycle) 與粒線體呼吸鏈結合，透過氧化磷酸化作用以產生 ATP (圖四)。哺乳動物於禁食過程中，脂肪酸氧化供應細胞 80-90% 能量來源，過程中產生的酮體，可提供腦部能量來源，然而過多酮酸堆積，會造成酮酸中毒 (Sim et al., 2002)。

脂肪酸氧化障礙 (fatty acid oxidation disorder, FAOD) 會導致能量不足及代謝酸中毒產生腦病變、心肌病變、肌肉病變等症狀。我們從食物中攝取的脂肪酸大多是長鏈脂肪酸，長鏈脂肪酸代謝異常(Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency) 的患者會有脂肪肝、低血糖、心肌病變及肌肉病變 (Kim & Battaile, 2002)，患者如果改攝取中鏈脂

肪酸，病情即會改善。中鏈脂肪酸去氫酵素缺乏症 (Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency) 為最常發生的脂肪酸代謝異常疾病，其發生的機率約為 1/15000，患者會有低血糖昏迷、缺乏酮生成作用和有雙羧基酸尿症，也可能於嬰兒期或新生兒期產生類似雷氏症候群症狀，而導致死亡 (Kim & Battaile, 2002; Wilcken et al., 2003)。短鏈脂肪酸代謝異常是最近才發現的疾病，其臨床表現較多樣化，可包含腦病變及代謝異常，診斷相當不容易，近來一些大規模的篩檢工作指出這種發生率可能比想像中高。一般而言，acylcarnitines 為脂肪酸氧化障礙重要的診斷指標 (Costa et al., 1997; Wiley et al., 1999)。1989 年 Wood PA 就已經建立了 BALB/cByJ 突變鼠模式，實驗證明突變鼠並無 short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase (SCAD) 活性，且有嚴重高尿酸血症，經禁食或高脂肪酸餵食時有脂肪肝產生。突變鼠經過 18 小時禁食後，突變鼠有低血糖現象發生，而且肌肉和尿液中 butylcarnitine 濃度上升，亦就是血漿中 C4 濃度值提高 (Wood et al., 1989)，此突變鼠生成原因為 SCAD 3'端結構基因少了 278 個核苷酸，造成 missplicing mRNA，因而造成 mRNA 不穩定 (Hinsdale et al., 1993)，此一 SCAD 突變鼠成了學者研究短鏈脂肪酸代謝的良好模式 (Wood et al., 1990; Hinsdale et al., 1996)。

從文獻回顧得知，血漿中 C4-OH 上升原因通常和 short-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (SCHAD) 基因缺失有關 (Sim et al., 2002;

Chace et al., 2002) ，從病人 *SCHAD* 基因缺失，造成胺基酸序列改變，使得病人 *SCHAD* 蛋白質失去活性，並且伴隨著胰島素分泌增加，然而其機制並不清楚 (Clayton et al., 2001)。而本實驗所篩選出的 C4-OH 脂肪酸代謝異常小鼠和 BALB/cByJ 突變鼠缺失基因並不相同，因此值得更進一步探討短鏈脂肪酸代謝過程中，突變基因的功能與角色。

第三節 蛋白質體學法的應用

“Proteome”之學門，是以於蛋白質層次討論生命全體之現象；包括特定之細胞、組織、臟器中的基因經轉錄及轉譯產生全部蛋白質(圖五)。蛋白質體會因個體發生分化，環境因素，疾病或老化等影響而變化 (Lam et al., 2006)。利用二維凝膠電泳法分離這些蛋白質，並分析個別蛋白質之結構、量及轉譯後修飾等稱為蛋白質體學(圖六)。蛋白質體學為探討基因體學最終目標，可了解基因表現，提供疾病診斷，動植物之新育種，新藥開發等新興科學之生物技術 (Gygi et al., 1999)。在後基因體時代，利用蛋白質體學法分析差異的蛋白質點廣泛應用於腎和肝衰竭、營養不良、癌症、AIDS、糖尿病、心血管疾病和神經系統疾病等研究 (Jungblut et al., 1999; Noel-Georis et al., 2001; Petricoin et al., 2002; Mills et al., 2001)。而至今國內外尚未有文獻以此法應用於ENU突變鼠的探討，因此本研究利用蛋白質體學法，尋找短鏈脂肪酸代謝異常小鼠與正常小鼠粒線體差異蛋白質表現，以釐清 C4-OH 小鼠生成原因。

第三章 實驗材料與方法

第一節 實驗流程

本實驗主要為將由串聯式質譜儀法篩得的短鏈脂肪酸代謝異常 ENU 突變小鼠飼養至八週大成鼠後，將小鼠犧牲後取其肝臟及肌肉組織，萃取出粒線體蛋白，先以膠體電泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 觀察突變小鼠與正常小鼠的粒線體蛋白表現是否有差異，若無差異，則進一步以二維電泳法 (2-DE) 來觀察突變小鼠與正常小鼠表現差異的粒線體蛋白質點。之後再將二維電泳方面展現差異的蛋白質點用酵素膠內分解 (in-gel digestion) 後做質譜的分析，鑑定出此差異蛋白質的身份，以找出 ENU 突變小鼠其短鏈脂肪酸代謝異常的原因。

第二節 動物來源及飼養環境

本實驗小鼠由中研院分生所基因突變鼠核心實驗室以 ENU 誘發基因產生突變的 C57BL/6J 品系小鼠。此模式小鼠主要產生的方式為將 ENU 此突變劑 (300 mg/kg body weight) 分次打到公鼠腹腔中，以造成精原母細胞基因突變，再和野生種母鼠交配產生第一代(G1)小鼠，第一

代公鼠再跟野生種母鼠交配產生第二代 (G2) 小鼠，第二代母鼠再和第一代公鼠逆交就會產生第三代 (G3) 小鼠，而第三代小鼠就有機會產生同型核子 (homologous) 隱性突變小鼠，可從外觀表型或血液生化檢測值篩選隱性疾病模式動物。而此突變小鼠飼養在具備 12 小時光暗循環，溫濕度和通風控制良好及無特定病原菌 (specific pathogen free , SPF) 的環境下，其飲食為自由進食。實驗期間紀錄小鼠體重並觀察其生長情形。

第三節 串聯式質譜儀篩選

第三代 G3 的突變小鼠養至 2 至 3 個月大後，取小鼠尾靜脈 25 μ l 全血，點於血卡乾燥後，送交杜克大學醫學中心以串聯式質譜儀分析脂肪酸代謝物含量。串聯式質譜儀分析的原理主要為將血液中混合的化合物經酯化處理後，透過第一個質譜儀擊碎各個分子成為離子，再由串聯一起的第二個質譜儀進行更精細的離子化，經由電腦分析這些離子化物質，以判讀脂肪酸代謝物的含量。而在本實驗由中研院生醫所協助，藉由此法篩選出血液中 C4-OH (hydroxyl butylcarnitine) 含量平均較正常小鼠高約 4 倍標準差的 ENU 突變小鼠。

第四節 實驗分組

小鼠主要分為兩組，一組為血液中 C4-OH 值較正常鼠高出 4 倍標準差的 ENU 突變鼠 (-/-)，其 C4-OH 值為 0.564 μM ；一組為正常 C57BL/6J 鼠 (+/+)，其 C4-OH 值為 0.082 μM 。兩組小鼠分別飼養至成鼠後，犧牲取其肝臟、肌肉組織，置於-80 $^{\circ}\text{C}$ 儲存備用。

第五節 粒線體萃取

由於粒線體為代謝短鏈脂肪酸的主要胞器，本研究以商業試劑組抽取肝臟及肌肉組織的粒線體。

甲、實驗試劑耗材與儀器：

Mitochondria isolation kit (Sigma, USA)

Urea (Usb, USA)

Thiourea (Amersham, UK)

CHAPS (Usb, USA)

DTT (Sigma, Germany)

RC-DC assay kit (Bio-Rad, USA)

Polytron (Ultra Violet, Taiwan)

Sonicator (Sonics, USA)

Mixer (Ultra Violet, Taiwan)

乙、實驗方法：

肌肉組織：

稱取組織重 100 mg，將樣品放於 1.5 mL 微量離心管裡，加入 10

倍體積量的萃取緩衝液 (20 mM MOPS , pH 7.5, 110 mM KCl , 1 mM EGTA) 內含 0.25 mg/mL trypsin , 放在冰上反應 3 分鐘後去掉上清液 , 再加入 8 倍體積量的上述萃取緩衝液內含 0.25 mg/mL trypsin , 放於冰上反應 20 分鐘後 , 加入 10 mg/mL albumin 充分混合 , 去掉上清液再加入 8 倍體積量的上述萃取緩衝液 , 重覆上述步驟兩次 , 之後用均質機 (polytron) 將組織均質直到沒有顆粒 , 均質後的組織液 , 先在 600 xg 離心 5 分鐘 , 將上清液移至另一個已標示好的 1.5 mL 微量離心管中 , 再將這些上清液以 11,000 xg 離心 10 分鐘 , 此沉澱物即為粒線體。

初製備的粒線體 , 再加入適量的溶離緩衝液 (7 M urea , 2 M thiourea , 4% CHAPS , 1% DTT , 10 mM spermine) , 用 Mixer 震盪一小時及超音波震盪 2 分鐘後 , 將蛋白質溶離出來 , 以 100,000xg 離心一小時後取出上清液 , 再用 Bio-Rad RCDC assay kit 進行蛋白質定量。

肝臟組織：

稱取組織重 100 mg , 將樣品放於 1.5 mL 微量離心管裡 , 加入 10 倍體積量的萃取緩衝液 (10 mM HEPES , pH 7.5 , 200 mM mannitol , 70 mM sucrose , 1 mM EGTA) 及 2 mg/mL albumin 。之後用均質機 (polytron) 將組織均質直到沒有顆粒。均質後的組織液 , 先在 600 xg 離心 5 分鐘 , 將上清液移至另一個已標示好的 1.5 mL 微量離心管中 , 再用 11,000 xg 離心 10 分鐘後 , 將上清液去除 , 再以 10 倍體積量的萃取

緩衝液 (10 mM HEPES, pH 7.5, 200 mM mannitol, 70 mM sucrose, 和 1 mM EGTA) 使顆粒再懸浮後，再一次的 600 xg 離心 5 分鐘，並將上清液移至另一個已標示好的 1.5 mL 微量離心管中，再將上清液以 11,000 xg 離心 10 分鐘後去除上清液，此沉澱物即為粒線體。

完成製備的粒線體，再加入適量的溶離緩衝液 (7 M urea , 2 M thiourea , 4% CHAPS , 1% DTT , 10 mM spermine)，以 Mixer 震盪一小時及超音波震盪 2 分鐘後，將蛋白質溶離出來，以 100,000xg 離心一小時後取出上清液，再用 Bio-Rad RCDC assay kit 進行蛋白質定量。

第六節 總蛋白質含量測定

臟器中粒線體蛋白總蛋白質含量測定使用 Bio-Rad RCDC 試劑組進行分析，利用已知濃度的 Bovine Serum Albumin (BSA) 作為標準品做出一標準曲線，濃度分別為 BSA 濃度 0、5、10、15、20、25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，而樣品各取 2 μL 作定量，且做二重複，每個樣品先加入 125 μL 的 Reagent I 後 vortex，放在室溫反應一分鐘，之後加入 125 μL 的 Reagent II 後 vortex，1,5000 xg 離心 5 分鐘，去掉上清液，再次加入 125 μL 的 Reagent I 後 vortex，放在室溫反應一分鐘，之後加入 40 μL Reagent II 後 vortex，1,5000 xg 離心 5 分鐘，去掉上清液，每管加入 127 μL 的 Reagent A' (5 μL DC Reagent S + 250 μL DC Reagent A)vortex，放在室溫

反應 5 分鐘後 vortex，加入 1 mL Reagent B，隨即 vortex，放於室溫反應 15 分鐘，用分光光度計於波長 750 nm 測量其吸光值，並利用標準曲線對應算出正確的蛋白質含量。

第七節 膠體電泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

甲、 實驗試劑耗材與儀器：

Tris-base (Usb, USA)

2-Mecaptoethanol (Amersham, Sweden)

Sodium dodecyl sulfate, SDS (Amersham, Sweden)

Glycerol (Sigma, USA)

Bromophenol blue (Amersham, Sweden)

Coomassie Blue R-250 (Amersham, Sweden)

Methanol (Fluka, Germany)

Acetic acid (Fluka, Germany)

N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine ,TEMED (Amersham, Sweden)

Ammonium persulphate, APS (Amersham, Sweden)

Acrylamide (PRO TECH, Taiwan)

Glycine (Usb, USA)

LMW protein marker (Amersham, UK)

甲、 實驗方法：

分別取突變小鼠與正常小鼠肝臟及肌肉的粒線體蛋白質樣品液 20 μ

g，加入 5 μ L 的 4x 膠體電泳樣品緩衝液 (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 20% 2-Mercaptoethanol, 4% SDS, 40% Glycerol, 8 mg bromophenol blue)使最終體積濃度為一倍，補二次水到 20 μ L，混合液注入樣品槽中，另外在其中一個樣品槽注入 10 μ L 的 LMW protein marker，並於電泳槽內外注入適量的 1x running buffer，接著以 10% SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 於 4 °C 下以固定伏特 100V 進行 3 小時的電泳分離，之後以新配製的 Coomassie Blue R-250 溶液染色一小時，之後加入退染液 (20% Methanol + 10% Acetic acid)，以觀察其結果。

丙、試劑配方：

(1) SDS-PAGE (適用於 Amersham Hofer Mini-SE 260 兩片膠的量)

	<u>10% resolving gel (mL)</u>	<u>4% stacking gel (mL)</u>
40% acrylamide mix	5	1
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	5	-
1.0 M Tris-HCl (pH 6.8)	-	2.5
10% SDS	0.2	0.1
10% APS	0.2	0.1
dd H ₂ O	9.6	6.3

(2) 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)

Tris-base (FW= 121.1)	90.9 g
dd H ₂ O	350 mL (用 HCl 調整 pH 值到 8.8)

TEMED	1.8 mL
dd H ₂ O	加到 500 mL

(3) 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)

Tris-base (FW= 121.1)	30 g
dd H ₂ O	350 mL (用 HCl 調整 pH 值到 6.8)
TEMED	2 mL
dd H ₂ O	加到 500 mL

(4) 10% (W/V) SDS

將 1 g SDS 溶於 10 mL 水中。

(5) 10% (W/V) APS

將 1 g APS 溶於 10 mL 水中。

(6) 4x SDS 膠體電泳樣品緩衝液

Tris-HCl 緩衝液 (2M , pH 6.8)	5 mL
SDS	0.8 g
Glycerol	8 mL
BPB	4 mg
2-Mercaptoethanol	4 mL
dd H ₂ O	加至 20 mL

之後分裝至 1.5 mL 微量離心管，冰於-20 °C 保存。

(7) 10x SDS running buffer (使用時稀釋為一倍)

Tris-base (FW= 121.1)	30.3 g
Glycine (FW =75)	144 g

SDS (FW=288.4)	10 g
dd H ₂ O	加至 1000 mL

(8) 染色液

Coomassie Blue R-250	2.7 g
Methanol	454 mL
Acetic acid	90 mL
dd H ₂ O	加至 1000 mL

(9) 退染液

Methanol	200 mL
Acetic acid	100 mL
dd H ₂ O	加至 1000 mL

(10) 低分子量標準蛋白組 (LMW protein marker)

Protein	MW
Phosphorylase b	94,000
BSA	67,000
Ovalbumin	43,000
Carbonic anhydrous	30,000
Trypsin inhibitor	20,100
α -Lactalbumin	14,400

一小瓶加入 150 μ L 二次水，加入 50 μ L 的 4x SDS 膠體電泳樣品緩衝液，100 °C 煮沸 10 分鐘即可使用。

第八節 二維電泳法 (Two-dimensional electrophoresis)

甲、實驗試劑耗材與儀器：

IPG buffer (Amersham, Sweden)

Immobiline Drystrip Reswelling Tray (Amersham, Sweden)

pH 3-10, pH 4-7 strip (Amersham, Sweden)

Immobiline DryStrip Cover Fluid (Amersham, Sweden)

Ettan IPG phor II (Amersham, Sweden)

PROTEAN II XL 2-D cell (Bio-Rad, USA)

PROTEAN II Multi-Gel Casting Chamber (Bio-Rad, USA)

LE Agarose (Seakem, USA)

Dithiothreitol, DTT (Amersham, Sweden)

Iodoacetamide, IAA (Amersham, UK)

Silver staining kit (Amersham, UK)

Q-TOF Ultima MALDI instrument (Micromass, Manchester, UK)

乙、實驗方法：

(1) 水合作用 (rehydration)

突變小鼠和正常小鼠肝臟及肌肉的粒線體蛋白質各取 240 μg 加入 rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 0.005% BPB) 及 IPG buffer (2% v/v) 混合後共 340 μL ，置於室溫反應一小時後，將樣品注入凹狀平盤 (Immobiline DryStrip Reswelling Tray)，用 pH 3-10 及 pH 4-7 的 strip，膠面朝下平整的使之完全接觸

樣本體並排除可見的氣泡，並且再用 Immobiline DryStrip Cover Fluid 覆蓋，避免樣本液揮發及高濃度尿素析出，以進行水合步驟 20 小時。

(2) 等電點聚焦 (Isoelectric Focusing, IEF)

水合作用後，依等電點的不同於 Ettan IPG phor II 跑第一維電泳。將水合作用完的 strip 用二次水將其上面的 Immobiline DryStrip Cover Fluid 沖洗掉，膠面朝上放置在乾淨的陶瓷板上，將沾些許二次水的墊片放置於 strip 的兩端，蓋上電極板，在 strip 上面及兩端的陶瓷板加滿 Immobiline DryStrip Cover Fluid，即可於室溫 20 °C 下進行 IEF。其機器設定程式如下：

0-300V 1 分鐘

300V 3 小時

300-1500V 4 小時

1500V 4 小時

1500-4000V 3 小時

4000V 2 小時

4000-8000V 2 小時

8000V 16 kV:Hr

最後共跑 54.75 kV:Hr

(3) 鑄膠

將玻璃片及 1 mm spacer 用拭鏡紙及酒精擦拭乾淨，組裝完成即可配置鑄膠的溶液，溶液配方如試劑配方 (3)，配完後先將 16% 的溶液倒入離出口管遠的容器，將中間的閥打開，使溶液充滿中間的孔後關起，之後再將 10% 的溶液倒入離出口管近的容器，倒入前需確定出口管是關閉的，倒完 10% 的溶液之後打開出口管使溶液充滿管子，在裝 10% 溶液的容器中放入攪拌子，轉的速度不可太快，隨著液面和攪拌子越接近，則將速度調慢。通常 10% 溶液會比 16% 溶液多，當兩邊液面高度一樣時再把中間的閥打開。另外出口管溶液的流速也不可太快，否則膠體梯度不易形成。當膠體溶液鑄到一定高度時，停 3-5 分鐘，再用 500 μ L iso-propanol 將膠體壓平，之後用保鮮膜封起避免異物進入，靜置隔夜使膠體完全凝膠備用。

(4) 平衡 (equilibration)

IEF 進行完後取出 strip，將 strip 放於螺紋管平衡。每條 strip 平衡步驟如下：

先加 SDS equilibration buffer (50 mM Tris-HCl , pH 8.8 , 6 M Urea , 30% v/v Glycerol , 2% w/v SDS , 0.002% w/v BPB) 10 mL 及 0.1 g DTT 平衡 20 分鐘後，將此溶液倒掉，並用二次水沖洗一下。之後再加 SDS equilibration buffer 10 mL 及 0.25 g iodoacetamide 平衡 20 分鐘，即可進行第二維電泳。

(5) 膠體電泳 (SDS-PAGE)

◎ 將 strip 放到膠台上所需的器具：

- a. 鑷子
- b. 剪刀
- c. 0.75 mm spacer
- d. 1x SDS running buffer
- e. 1% LMP agarose

strip 平衡完後，依分子量大小進行第二維 SDS 梯度電泳，膠片濃度為 10-16%。平衡後的 strip 先用 1x SDS running buffer 浸濕，再用拭鏡紙將 strip 上的氣泡吸掉，將 strip 兩端的塑膠片剪掉，取 500 μ L 的 1% LMP agarose 注入膠片上緣，將 strip 放入使塑膠面貼住玻璃，再加入 50 μ L 的 1x SDS running buffer，用 0.75 mm spacer 將 strip 往下輕推，排除氣泡的產生。將膠片裝至電泳槽倒入 400 mL 的 1x SDS running buffer，在 15 $^{\circ}$ C 下先以 12 mA 跑 30 分鐘後，再調至 24 mA 跑 5 小時。電泳完畢後以

Coomassie Blue R-250 進行膠片染色 1 小時，再以退染液退染，之後將突變小鼠和正常小鼠兩片膠體作比對，尋找差異的蛋白質點。

(6) 膠內酵素消化 (In-gel digestion)

將比對差異的蛋白質點用 yellow tip 挖取下來放於 1.5 mL 微量離心管中，加入 100 μ L 的 50 mM Dithioerythritol (DTE) / 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5)，放於 37 $^{\circ}$ C 反應 1 小時，10,000 xg 離心 1 分鐘，將 DTE 溶液完全移除。再加入 100 μ L 的 100 mM Iodoacetamide (IAA) / 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5)，放於室溫暗處反應一小時，10,000 xg 離心 1 分鐘，將 IAA 溶液完全移除。加入 100 μ L 的 50% acetonitrile / 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5) 反應 15 分鐘，10,000 xg 離心 1 分鐘，將溶液完全移除。加入 100 μ L 的 100% acetonitrile 反應 5 分鐘，10,000 xg 離心 1 分鐘，將 acetonitrile 完全移除。將膠片真空乾燥 5 分鐘，再用 0.1 μ g trypsin / 10 μ L 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5) 將膠片做再水合作用，用乾淨的 PP 微量離心管杵將膠片磨碎，放於 37 $^{\circ}$ C 反應至少 16 小時。加入 50 μ L 的 50% acetonitrile / 5% TFA 至每個微量離心管，用超音波震盪 10 秒，停止 10 秒，重複 10 次。10,000 xg 離心 1 分鐘，將上清液移至另一個標示好的 650 μ L 微量離心管中，再一次加入 50 μ L 的 50% acetonitrile / 5% TFA

至含有膠片的微量離心管，用超音波震盪 10 秒，停止 10 秒，重複 10 次。10,000 g 離心 1 分鐘，將上清液再次取至標示好的 650 μ L 微量離心管中，再用真空乾燥至樣品剩 1-2 μ L 即可。

(7) 質譜儀分析

將膠內酵素消化處理完的樣品送至中研院生化所蛋白質體及結構生物學研究及核心設施作分析，這些蛋白質點以 Q-TOF Ultima MALDI instrument 或是 4700 Proteomics Analyzer 進行蛋白質身份鑑定，分析出來的 MALDI peptide mass fingerprinting (PMF) 及 CID MS/MS 結果再用 Mascot、SwissProt 或 NCBI 資料庫比對分析，確認蛋白質的身份。

(8) 銀染

利用商業試劑作銀染。每片膠加入 fixing solution 250 mL，置於 shaker 搖 30 分鐘，將溶液倒掉，用 dd H₂O 250 mL 洗 5 分鐘，重複 3 次。加入 sensitizing solution 250 mL，置於 shaker 搖 30 分鐘，將溶液倒掉，用 dd H₂O 250 mL 洗 5 分鐘，重複 3 次。加入 silver solution 250 mL，置於 shaker 搖 20 分鐘，將溶液倒掉，用 dd H₂O 250 mL 洗 5 分鐘，重複 2 次。加入 developing solution 250 mL，置於 shaker 搖 5 分鐘，將溶液倒掉，再加入 stopping solution 250 mL，置於 shaker 搖 10 分鐘，將

溶液倒掉，用 dd H₂O 250 mL 洗 5 分鐘，重複 3 次。再加入 preserving solution 置於 shaker 搖 20 分鐘即完成。

丙、試劑配方：

(1) Rehydration buffer (先將 7 M urea, 2 M thiourea, 4% W/V CHAPS, 1% W/V DTT 混合，BPB 則配置 1% stock，每次使用時再加)

Urea (FW=60.06)	8.4 g
Thiourea (FW=76.12)	3.0 g
CHAPS (FW=614.88)	0.8 g
DTT (FW=154.25)	0.2 g
ddH ₂ O	加水至 20 mL

(2) SDS equilibration buffer

Tris-HCl 緩衝液 (1.5 M, pH 8.8)	16.7 mL
Urea (FW= 60.06)	180.2 g
Glycerol (87% v/v)	172.4 mL
SDS (FW=288.38)	10 g
BPB	0.01 g
ddH ₂ O	加水至 500 mL

BPB 不要先加，加水到 400 mL 等全溶再加。

(3) SDS-PAGE (適用於 Bio-Rad 四片膠的量)

	<u>10% (mL)</u>	<u>16% (mL)</u>
40% acrylamide mix	30	44
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	30	27.5
10% SDS	1.2	1.1

10% APS	0.3	0.3
dd H ₂ O	58.5	37.1
Glycerol 86%	0	11.5

(4) 1% LMP agarose

Agarose	0.1 g
SDS running buffer	100 mL
BPB	200 μ l

(5) 50 mM Dithioerythritol (DTE) / 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5)

Dithioerythritol (DTE)	7.7 mg
25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5)	1000 μ l

(6) 100 mM Iodoacetamide (IAA) / 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5)

Iodoacetamide (IAA)	18.2 mg
25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5)	1000 μ l

(7) Fixing solution

Ethanol	100 mL
Acetic acid	25 mL
ddH ₂ O	加水至 250 mL

(8) Sensitizing solution

Ethanol	75 mL
Glutardialdehyde (25% w/v)	1.25 mL
Sodium thiosulphate (5% w/v)	10 mL
Sodium acetate	17 g

ddH₂O 加水至 250 mL

(9) Silver solution

Silver nitrate solution (2.5% w/v) 25 mL

Formaldehyde (37% w/v) 0.1 mL

ddH₂O 加水至 250 mL

(10) Developing solution

Sodium carbonate 6.25 g

Formaldehyde (37% w/v) 0.05 mL

ddH₂O 加水至 250 mL

(11) Stopping solution

EDTA-Na₂·2H₂O 3.65 g

ddH₂O 加水至 250 mL

(12) Preserving solution

Ethanol 75 mL

Glycerol (87% w/w) 11.5 mL

ddH₂O 加水至 250 mL

第四章 結果

第一節 串聯式質譜儀脂肪酸代謝物 (C4-OH) 含量

突變小鼠飼養至 8-10 週大後，採其尾靜脈全血 25 μ L 點於血卡送到杜克大學及中國醫學大學，以串聯式質譜儀作脂肪酸代謝物含量 (acylcarnitine) 分析，其 C3-C5 短鏈脂肪酸的分析結果整理於表一，結果顯示 ENU 突變小鼠其體內 C4-OH 含量較正常小鼠高約 4 倍標準差，而其他 C3-C5 的短鏈脂肪酸的值皆為正常。此外，突變小鼠外觀與正常小鼠並無差異，可正常繁衍後代，裸鼠存活率、小鼠不同週數成長重量及最終壽命，兩組間亦無統計上的差異。

第二節 SDS-PAGE 實驗結果

萃取出正常小鼠及突變小鼠肝臟及肌肉組織的粒線體蛋白質，利用 SDS-PAGE 觀察其差異表現的蛋白質，結果顯示正常小鼠及突變小鼠，其不論是在肝臟組織或是肌肉組織的粒線體蛋白質，在此部分的實驗中並沒有差異的蛋白質表現，其結果如圖七。

第三節 二維電泳實驗結果

以正常小鼠及突變小鼠肝臟及肌肉組織的粒線體蛋白質進行 SDS-PAGE，並沒有得到差異的蛋白質表現。因此進一步利用二維電泳法 (2-DE) 尋找差異的蛋白質點。在二維電泳 (2-DE) 的部分，先以 pH 3-10 的等電點聚焦膠條，觀察其差異表現的蛋白質點。結果顯示正常小鼠與突變小鼠肝臟組織的粒線體蛋白質之間，在此實驗中沒有顯著差異的蛋白質點表現，其結果如圖八、圖九。而在肌肉組織方面，結果顯示正常小鼠與突變小鼠在此實驗中有顯著差異的蛋白質點，其結果如圖十、圖十一。然而因為這些差異的蛋白質點，其範圍比較偏近 pI 值較低的區域部分，因而針對正常小鼠及突變小鼠肌肉組織的粒線體蛋白質部份，再進一步的窄縮等電點聚焦膠條的範圍至 pH 4-7，將蛋白質點分離的更開，更易觀察，其結果如圖十二、十三。

第四節 蛋白質身份鑑定結果

針對正常小鼠及突變小鼠的肌肉組織粒線體蛋白質二維電泳結果圖，重複多次實驗，先利用肉眼觀察，不管是蛋白質點的數目或者是點分布情況具有再現性後，續將這些 2-D gel 做影像處理及分析，找出差異較明顯的 11 個蛋白質點，且差異蛋白質量皆在兩倍以上，經量化後的數據見表二。比對分析 11 個差異的蛋白質點中發現，強度增加的蛋白質點有 5 個，強度減少的蛋白質點有 6 個。將這 11 個差異的蛋白質點以

MALDI-Q-TOF 或是 MALDI-TOF-TOF 做蛋白質的身份鑑定，其比對出來的蛋白質點身份如表二所示，其原始資料見附錄一。依據各個蛋白質點其等電點的理論值和測得的分子量，對照其實際在二維電泳膠片的位置，結果吻合。鑑定出的結果 spot 4-6 依序為 myosin regulatory light chain 2 (phosphorylatable)，spot 7 為 tropomyosin 1 α chain，spot 9 為 myosin light chain 1，以上 5 個蛋白質點為在突變鼠表現量是增加的。spot 1-3 為 Calsequestrin-1 precursor，spot 8 為 myosin regulatory light chain 2，spot 10 為 adenylate kinase isoenzyme 1，spot 11 為 ATP synthase D chain，以上 6 個蛋白質點為在突變鼠表現量是減少的。

第五章 討論

此次實驗所使用的方法，首先以 SDS-PAGE 看是否有差異蛋白質點改變，實驗結果顯示並無顯著差異。接著進行二維電泳(2-DE)，它是利用等電點和分子量大小不同的原理來分離蛋白質，再以質譜儀鑑定蛋白質身份。而在本次實驗中，鑑定出 5 個表現量增加的蛋白質點，這些蛋白質身份分別 myosin regulatory light chain 2 (phosphorylatable)、tropomyosin 1 α chain、myosin light chain 1，及 6 個表現量減少的蛋白質點，這些蛋白質身份分別為 calsequestrin-1 precursor、myosin regulatory light chain 2、ATP synthase D chain 及 adenylate kinase isoenzymes。而本次實驗所使用的粒線體萃取商業試劑，根據結果顯示萃取出蛋白質並非為純的粒線體蛋白質，其包含一部份的細胞質內蛋白質，因此蛋白質鑑定結果會有非粒線體蛋白質點的出現。之後針對這些鑑定出的蛋白質點與短鏈脂肪酸代謝異常突變小鼠間的關係，以下將作進一步討論。

第一節 Adenylate kinase isoenzyme

Adenylate kinase isoenzyme 為參與 $ADP+ADP \longleftrightarrow ATP+AMP$ 此一反應的關鍵酵素。增加體內細胞 AMP 的表現量，可以藉由異位調節或由上游激酶磷酸化作用影響而促進 AMP activated protein kinase (AMPK) 活化 (Corton et al., 1994; HARDIE et al., 1999) (圖十四)，而 AMPK 為脂肪酸合成酶抑制劑，且亦會抑制 acetyl CoA carboxylase 活性 (Carlson & Kim, 1973)。AMPK 的活化，會造成與 ATP 消耗相關的合成代謝途徑的不活化，例如：藉由 acetyl CoA carboxylase 磷酸化的脂肪酸合成及藉由 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 磷酸化的固醇類合成 (Corton et al., 1995; Henin et al., 1995)；另外也會造成至少一個與 ATP 生成相關代謝途徑活化，例如：藉由抑制 malonyl-CoA 的表現量的脂肪酸氧化 (Merrill et al., 1997; Velasco et al., 1997)。

在先前的研究發現在裘馨氏肌肉失養症 (Duchenne Muscular Dystrophy, 簡稱 DMD) 病人體內，其 adenylate kinase isoenzyme 表現量是增加的 (Hamada et al., 1981)，可能為體內代償作用所造成。另外在 2005 年 Carvajal 的研究中也發現以蔗糖餵食引發高三酸甘油酯血症小鼠，其體內 creatine kinase 及 adenylate kinase 表現量下降，因而造成高三酸甘油酯血症的小鼠心臟能量缺乏 (Carvajal et al., 2005)。

而在本次實驗中，發現 ENU 突變小鼠其 adenylate kinase isoenzyme

表現量降低，因而使體內 AMP 含量減少。我們推測此結果和突變小鼠體內 C4-OH 值增加的相關性，可能是 AMP 減少，因而降低 AMPK 的活性，使鼠體走向脂肪酸合成的途徑。而在短鏈脂肪酸合成至長鏈脂肪酸的途中，可能有阻礙，因而使 C4-OH 值增加，推測有可能為脂肪酸合成過程中相關酵素 3-hydroxyacyl-ACP dehydrase 此酵素（圖十五）發生突變，而造成此結果，仍有待進行該基因突變分析。

第二節 ATP synthase D chain

ATP synthase 包含 F1 和 F0 兩部份，其又有 8 個不同的 subunits，為 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、a、b 和 c (Senior, 1988; Fillingame 1990)，總分子量為 530 kDa (圖十六)。此酵素的催化中心由 c_3 構成，ATP 的合成及水解反應發生在此催化位置上 (Leslie et al., 2000)。而質子的運輸主要受 a 和 c 兩個 subunits 影響。ATP synthase D chain 即為 c subunit，主要功能為將 ADP 催化成 ATP。

在先前的研究發現帕金森氏症 (Parkinson's disease) 病人，其 ATP synthase D chain 此蛋白質表現量增加，作者認為是代償性作用所造成 (Basso et al., 2004)。而在 2004 年 Jugdutt 和 Sawicki 的研究也發現心肌梗塞再灌流病人，其 ATP synthase D chain 此蛋白質表現量增加，是因為其體內能量需求增加所造成 (Jugdutt & Sawicki et al., 2004)。

在本次實驗中，發現 ENU 突變小鼠其 ATP synthase D chain 此蛋白質表現量降低，我們推測可能因為小鼠體內能量足夠，因而使 ATP synthase D chain 表現量降低。

第三節 Muscle contraction related proteins

一般而言，肌肉收縮機制為橫橋與肌動蛋白 (actin) 結合，橫橋上為肌凝蛋白 (myosin) 頭部具有 ATPase 的活性，可以將 ATP 水解，使橫橋與肌動蛋白結合，釋出磷酸根，使肌動蛋白會往中間收縮，而產生肌肉收縮，如此循環下去。而旋轉肌球素 (tropomyosin) 亦為和肌肉收縮相關的蛋白質，若其阻擋住肌動蛋白上的肌凝蛋白結合位置，則肌肉不收縮。而肌肉的收縮也要有鈣離子的存在，鈣離子如果與旋轉素 (troponin) 結合，將拖動旋轉肌球素，使肌動蛋白露出與橫橋結合位置，使橫橋活化，肌肉收縮。

在先前的研究發現在直腸癌小鼠實驗中，使其蔬菜攝取量增加，會造成其體內 myosin regulatory light chain 2 表現量增加，作者認為是要增加其肌肉收縮活性所造成 (Breikers et al., 2006)。而在 1997 年研究指出 myosin light chain 1 表現量降低，會使得橫橋形成時的酵素活性降低 (Ho&Chisholm, 1997)。另外也有研究發現在心室肥大的病人，其 myosin light chain 1 表現量增加，主要是為了增加心臟收縮所造成的 (Abdelaziz et al., 2005)。2006 年研究中也發現鈣離子濃度降低，會降低平滑肌收縮 (Zheyu et al., 2005)。

在本次實驗中，發現 ENU 突變小鼠，其和肌肉收縮相關的蛋白質

myosin light chain 1、磷酸化的 myosin light chain 2 和 tropomyosin 1 chain 表現量增加，我們推測可能為其體內代償性作用所造成的結果。另外在 ENU 突變小鼠，也發現其 calsequestrin-1 precursor 表現量降低，calsequestrin 此一蛋白質，主要為一鈣儲存蛋白，可以與許多鈣離子結合 (MacLennan & Wong, 1971)，並且為鈣通道的調控者，並且協助鈣離子從肌漿網釋放，而肌漿網鈣離子的釋放為肌肉收縮的重要因素。因此在本實驗中，此蛋白質表現量降低，會降低其鈣離子從肌漿網釋放，因而降低肌肉收縮。

第六章 結論

在本次二維電泳實驗部份，經由質譜儀對蛋白質做身份鑑定，於 C4-OH 突變小鼠鑑定出 5 個表現量增加的蛋白質點，這些蛋白質身份分別 myosin regulatory light chain 2 (phosphorylatable) 、tropomyosin 1 α chain 及 myosin light chain 1，及 6 個表現量減少的蛋白質點，這些蛋白質身份分別為 calsequestrin-1 precursor、myosin regulatory light chain 2、ATP synthase D chain 及 adenylate kinase。然而這些蛋白質表現的消長是否與鼠體內 C4-OH 值上升有關，仍有待更進一步相關基因突變點的分析加以驗證。

第七章 參考文獻

- Abdelaziz AI, Pagel I, Schlegel WP, Kott M, Monti J, Haase H, Morano I. (2005) Human atrial myosin light chain 1 expression attenuates heart failure. *Adv Exp Med Biol.* 565: 283-92
- Berk PD, Stump DD. (1999) Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. *Mol Cell Biochem.* 192: 17-31.
- Balling R. (2001) ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2: 463-92.
- Basso M, Giraud S, Corpillo D, Bergamasco B, Lopiano L, Fasano M. (2004) Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics.* 4: 3943-52.
- Breikers G, van Breda SG, Bouwman FG, van Herwijnen MH, Renes J, Mariman EC, Kleinjans JC, van Delft JH. (2006) Potential protein markers for nutritional health effects on colorectal cancer in the mouse as revealed by proteomics analysis. *Proteomics.* 6: 2844-52.
- Carlson CA, Kim KH. (1973) Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem.* 248: 378-80.
- Corton JM, Gillespie JG, Hardie DG. (1994) Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol.* 4: 315-24.
- Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. (1995) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem.* 229: 558-65.
- Costa CG, Struys EA, Bootsma A, ten Brink HJ, Dorland L, Tavares de Almeida I, Duran M, Jakobs C. (1997) Quantitative analysis of plasma acylcarnitines using gas chromatography chemical ionization mass fragmentography. *J Lipid Res* 38: 173-82.

Clayton PT, Eaton S, Aynsley-Green A, Edginton M, Hussain K, Krywawych S, Datta V, Malingre HE, Berger R, van den Berg IE. (2001) Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of beta-oxidation in insulin secretion.

J Clin Invest. 108: 457-65.

Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. (2002) The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. Annu Rev Genomics Hum Genet. 3: 17-45.

Carvajal K, El Hafidi M, Marin-Hernandez A, Moreno-Sanchez R. (2005) Structural and functional changes in heart mitochondria from sucrose-fed hypertriglyceridemic rats. Biochim Biophys Acta. 1709: 231-9.

Cavedon CT, Bourdoux P, Mertens K, Van Thi HV, Herremans N, de Laet C, Goyens P. (2005) Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. Clin Chem. 51: 745-52.

Fillingame RH. (1990) Molecular mechanics of ATP synthesis by F1F0-type H⁺-transporting ATP synthases. The Bacteria 12: 345-391

Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Mol. Cell. Biol. 19: 1720-1730

Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics. 4: 3665-85.

Hamada M, Okuda H, Oka K, Watanabe T, Ueda K, Nojima M, Kuby SA, Manship M, Tyler FH, Ziter FA. (1981) An aberrant adenylate kinase isoenzyme from the serum of patients with Duchenne muscular dystrophy. Biochim Biophys Acta. 660: 227-37.

Hinsdale ME, Kelly CL, Wood PA. (1993) Null allele at Bcd-1 locus in BALB/cByJ mice is due to a deletion in the short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene and results in missplicing of mRNA. Genomics. 16: 605-11.

Henin N, Vincent MF, Gruber HE, Van den Berghe G. (1995) Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *FASEB J.* 9: 541-6.

Hinsdale ME, Hamm DA, Wood PA. (1996) Effects of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency on development expression of metabolic enzyme genes in the mouse. *Biochem Mol Med.* 57: 106-15.

Ho G, Chisholm RL. (1997) Substitution mutations in the myosin essential light chain lead to reduced actin-activated ATPase activity despite stoichiometric binding to the heavy chain. *J Biol Chem.* 272: 4522-7.

Hardie DG, Salt IP, Hawley SA, Davies SP. (1999) AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem J.* 338: 717-22.

Hrabe de Angelis MH, Flaswinkel H, Fuchs H, Rathkolb B, Soewarto D, Marschall S, Heffner S, Pargent W, Wuensch K, Jung M, Reis A, Richter T, Alessandrini F, Jakob T, Fuchs E, Kolb H, Kremmer E, Schaeble K, Rollinski B, Roscher A, Peters C, Meitinger T, Strom T, Steckler T, Holsboer F, Klopstock T, Gekeler F, Schindewolf C, Jung T, Avraham K, Behrendt H, Ring J, Zimmer A, Schughart K, Pfeffer K, Wolf E, Balling R. (2000) Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet.* 25: 444-7.

Justice MJ, Noveroske JK, Weber JS, Zheng B, Bradley A. (1999) Mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet.* 8: 1955-63.

Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, Stulik J, Koupilova K, Pleissner KP, Otto A, Muller EC, Sokolowska-Kohler W, Grabher G, Stoffler G. (1999) Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases. *Electrophoresis.* 20: 2100-10.

Jugdutt BI, Sawicki G. (2004) AT1 receptor blockade alters metabolic, functional and structural proteins after reperfused myocardial infarction: detection using proteomics. *Mol Cell Biochem.* 263: 179-88.

Koeberl DD, Young SP, Gregersen NS, Vockley J, Smith WE, Benjamin DK Jr, An Y, Weavil SD, Chaing SH, Bali D, McDonald MT, Kishnani PS, Chen

YT, Millington DS. (2003) Rare disorders of metabolism with elevated butyryl- and isobutyryl-carnitine detected by tandem mass spectrometry newborn screening. *Pediatr Res.* 54: 219-23.

Kim JJ, Battaile KP. (2002) Burning fat: the structural basis of fatty acid beta-oxidation. *Curr Opin Struct Biol.* 12: 721-8.

Kim N, Lee Y, Kim H, Joo H, Youm JB, Park WS, Warda M, Cuong DV, Han J. (2006) Potential biomarkers for ischemic heart damage identified in mitochondrial proteins by comparative proteomics. *Proteomics.* 6: 1237-49.

Leslie AG, Walker JE. (2000) Structural model of F1-ATPase and the implications for rotary catalysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355: 465-71.

Li D, Sun F, Wang K. (2004) Protein profile of aging and its retardation by caloric restriction in neural retina. *Biochem Biophys Res Commun.* 318: 253-8.

Lam L, Lind J, Semsarian C. (2006) Application of proteomics in cardiovascular medicine. *Int J Cardiol.* 108: 12-9.

MacLennan DH, Wong PT. (1973) Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 68: 1231-5.

Merrill GM, Kurth E, Hardie DG, Winder WW (1997) AICAR decreases malonyl-CoA and increases fatty acid oxidation in skeletal muscle of the rat. *Am J Physiol* 273: E1107-E1112.

Mills GB, Bast RC Jr, Srivastava S. (2001) Future for ovarian cancer screening: novel markers from emerging technologies of transcriptional profiling and proteomics. *J Natl Cancer Inst.* 93: 1437-9.

Molven A, Matre GE, Duran M, Wanders RJ, Rishaug U, Njolstad PR, Jellum E, Sovik O. (2004) Familial hyperinsulinemic hypoglycemia caused by a defect in the SCHAD enzyme of mitochondrial fatty acid oxidation. *Diabetes.* 53: 221-7.

Noveroske JK, Weber JS, Justice MJ. (2000) The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse. *Mamm Genome*. 11: 478-83.

Nolan PM, Peters J, Strivens M, Rogers D, Hagan J, Spurr N, Gray IC, Vizor L, Brooker D, Whitehill E, Washbourne R, Hough T, Greenaway S, Hewitt M, Liu X, McCormack S, Pickford K, Selley R, Wells C, Tymowska-Lalanne Z, Roby P, Glenister P, Thornton C, Thaung C, Stevenson JA, Arkell R, Mburu P, Hardisty R, Kiernan A, Erven A, Steel KP, Voegeling S, Guenet JL, Nickols C, Sadri R, Nasse M, Isaacs A, Davies K, Browne M, Fisher EM, Martin J, Rastan S, Brown SD, Hunter J. (2000) A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. *Nat Genet*. 25: 440-3.

Nelms KA, Goodnow CC. (2001) Genome-wide ENU mutagenesis to reveal immune regulators. *Immunity*. 15: 409-18.

Noel-Georis I, Bernard A, Falmagne P, Wattiez R. (2001) Proteomics as the tool to search for lung disease markers in bronchoalveolar lavage. *Dis Markers*. 17: 271-84.

Popp RA, Bailiff EG, Skow LC, Johnson FM, Lewis SE. (1983) Analysis of a mouse alpha-globin gene mutation induced by ethylnitrosourea. *Genetics*. 105: 157-67.

Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. (2002) Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 359: 572-7.

Quero C, Colome N, Prieto MR, Carrascal M, Posada M, Gelpi E, Abian J. (2004) Determination of protein markers in human serum: Analysis of protein expression in toxic oil syndrome studies. *Proteomics*. 4: 303-15.

Russell WL, Kelly EM, Hunsicker PR, Bangham JW, Maddux SC, Phipps EL. (1979) Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5918-22.

Rolinski B, Arnecke R, Dame T, Kreisler J, Olgemoller B, Wolf E, Balling R, Hrabe de Angelis M, Roscher AA. (2000) The biochemical metabolite screen in the Munich ENU Mouse Mutagenesis Project: determination of

amino acids and acylcarnitines by tandem mass spectrometry. *Mamm Genome*. 11: 547-51.

Senior AE. (1988) ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol Rev*. 68: 177-231.

Shibuya T, Morimoto K. (1993) A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. *Mutat Res*. 297: 3-38.

Stump DD, Fan X, Berk PD. (2001) Oleic acid uptake and binding by rat adipocytes define dual pathways for cellular fatty acid uptake. *J Lipid Res*. 42: 509-20.

Sim KG, Hammond J, Wilcken B. (2002) Strategies for the diagnosis of mitochondrial fatty acid beta-oxidation disorders. *Clin Chim Acta*. 323: 37-58.

Velasco G, Geelen MJ, Guzman M. (1997) Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. *Arch Biochem Biophys*. 337: 169-75.

Wood PA, Amendt BA, Rhead WJ, Millington DS, Inoue F, Armstrong D. (1989) Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in mice. *Pediatr Res*. 25: 38-43.

Wood PA, Amendt BA, Rhead WJ, Armstrong D, Millington DS, Inoue F. (1990) A murine model for short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Prog Clin Biol Res*. 321: 427-34.

Wiley V, Carpenter K, Wilcken B. (1999) Newborn screening with tandem mass spectrometry: 12 months' experience in NSW Australia. *Acta Paediatr* 88: 48-51.

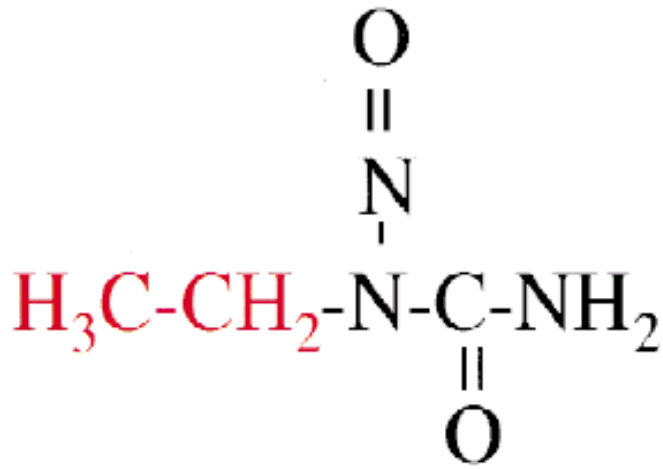
Wilcken B. (2003) An introduction to nutritional treatment in inborn errors of metabolism--different disorders, different approaches. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 3: 198-201.

Wulfschuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. (2003) Proteomic applications

for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer*. 3: 267-75.

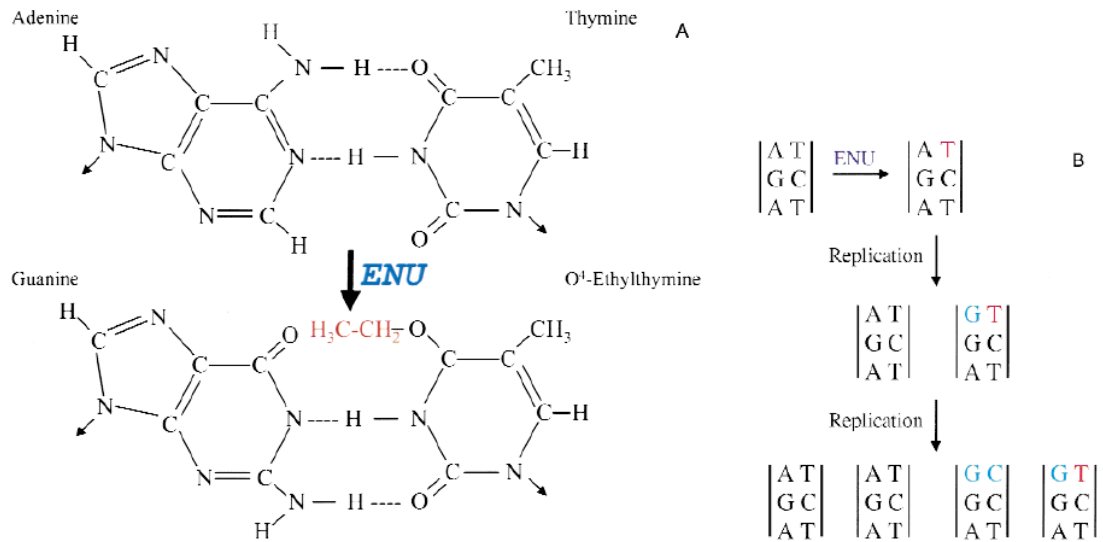
Wu JY, Kao HJ, Li SC, Stevens R, Hillman S, Millington D, Chen YT. (2004)
ENU mutagenesis identifies mice with mitochondrial branched-chain
aminotransferase deficiency resembling human maple syrup urine disease. *J.
Clin. Invest.* 113: 434-440

Zheyu C, Qinghui QI, Lixin L, Tao MA, Xu J, Zhang L, Lunan Y.(2005)
Effects of emodin on Ca^{2+} signal transduction of smooth muscle cells in
multiple organ dysfunction syndrome. *J Surg Res*. 131: 80-5.



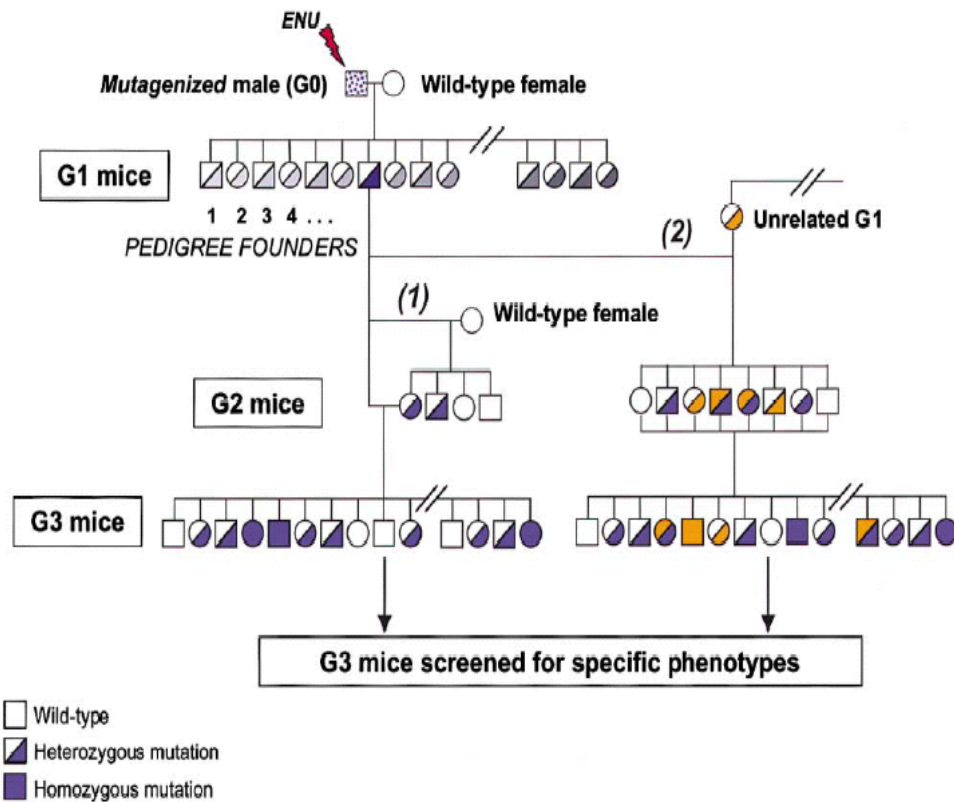
圖一、ENU 結構式。紅色部分為轉移的乙烷基。

Fig. 1. Structure of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). Transferable ethyl group is highlighted in red.



圖二、(A) ENU 加合物形成及 O4-ethylthymine 的錯誤配對。箭頭為去氧核酸結合位置。(B) ENU 誘發鹼基對置換的機制。紅色的 T 為有 O4-ethyl 衍生物存在的胸腺嘧啶，綠色文字為鹼基置換。

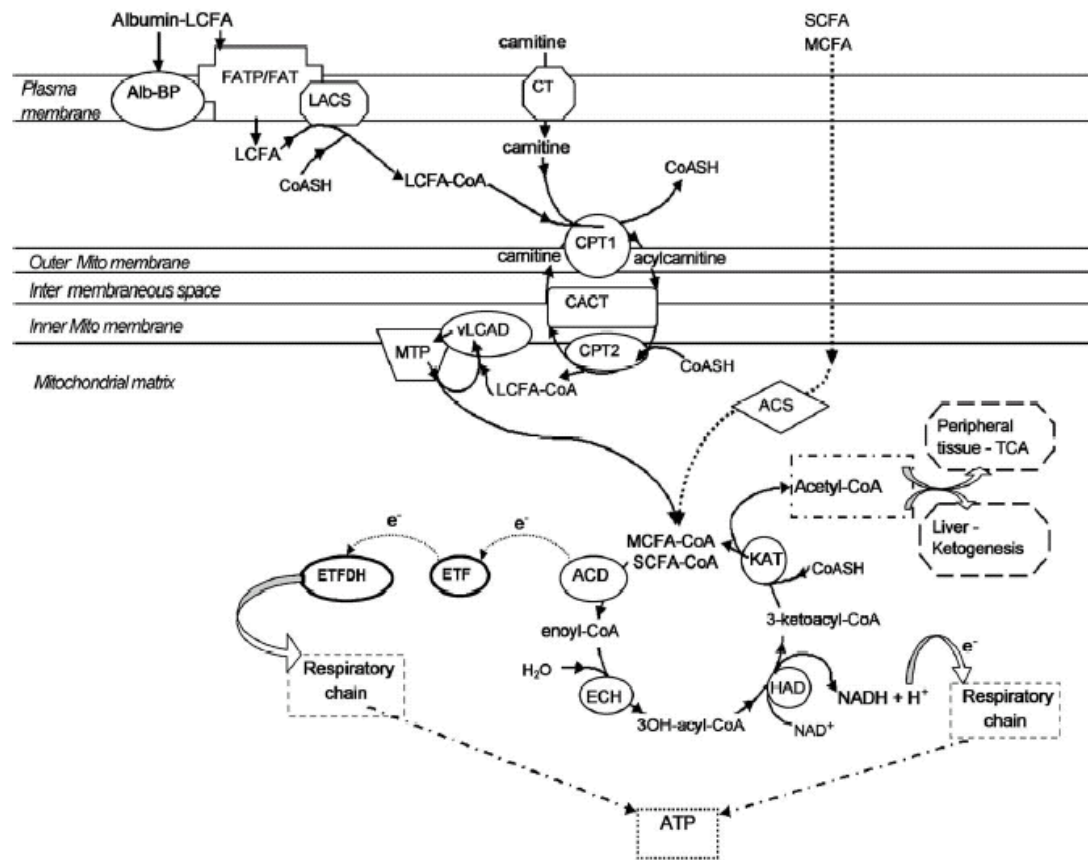
Fig.2. A) ENU adduct formation and mispairing of O4-ethylthymine. Arrows indicate deoxyribose attachment sites. B) Mechanism of ENU-induced base pair substitution. Thymine is in red to indicate the presence of the O4-ethyl adduct. Green letters indicate base substitutions. (Noveroske et al., 2000)



圖三、ENU處理小鼠隱性模式鼠繁殖。(1) G1公鼠和野生種母鼠交配，或(2) 和非相關的G1突變鼠交配。隱性同型核子在G3產生，這些小鼠再篩選出特異的表現型。

Figure 3. Breeding of ENU-Treated Mice to Reveal Recessive Mutations on Wild-Type Genetic Background G1 mice carrying approximately 100 independent loss-of-function mutations become the founders of independent pedigrees by outcrossing G1 males to wild-type females (1) or intercrossing unrelated mutagenized G1 mice. (2) Recessive mutations become homozygous in G3 mice, and these mice are screened for specific immunological phenotypes.

(Nelms et al., 2001)

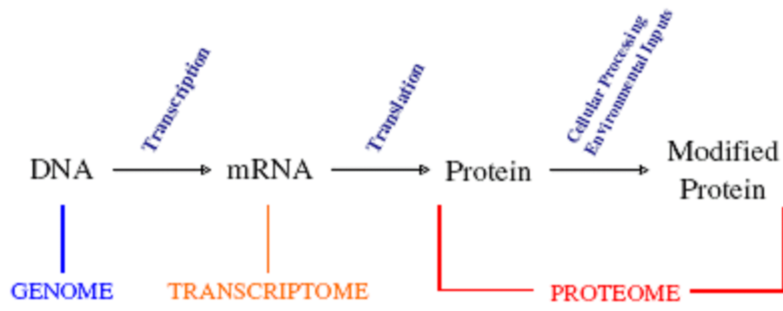


圖四、粒線體脂肪酸 β 氧化作用流程圖。

Fig. 4. Schematic representation of mitochondrial fatty acid β -oxidation pathway.

Abbreviations: ACD: acyl-CoA dehydrogenases, ACS: acyl-CoA synthetase, Alb-BP: albumin-binding protein, CACT: carnitine acylcarnitine translocase, CPT1: carnitine palmitoyltransferase I, CPT2: carnitine palmitoyltransferase II, CT: plasma membrane carnitine transporter, ECH: enoyl-CoA hydratases, ETF: electron transfer flavoprotein, ETFDH: electron transfer flavoprotein dehydrogenase, FAT: fatty acid translocase, FATP: long-chain fatty acid transporter protein, HAD: hydroxyacyl-CoA dehydrogenases, KAT: ketoacyl-CoA thiolases, LACS: long chain acyl-CoA synthetase, LCFA: long-chain fatty acid, LCFACoA: long-chain fatty acyl-CoA ester, MCFA: medium-chain fatty acid, MCFA-CoA: medium-chain fatty acyl-CoA ester, MTP: mitochondrial trifunctional protein, SCFA: short-chain fatty acid, SCFA-CoA: short-chain fatty acyl-CoA ester, VLCAD: very long chain acyl-CoA dehydrogenase, Mito: mitochondrial.

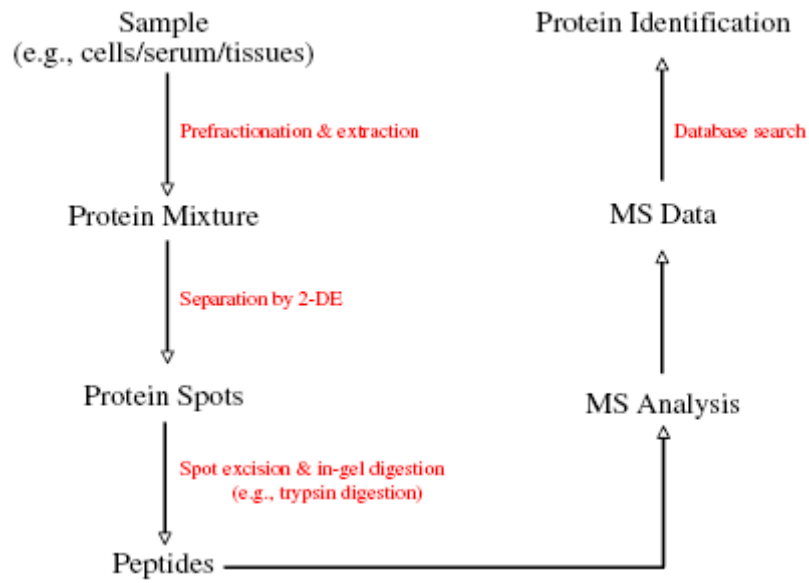
(Sim et al., 2002)



圖五、基因體和蛋白質體的生化相關性

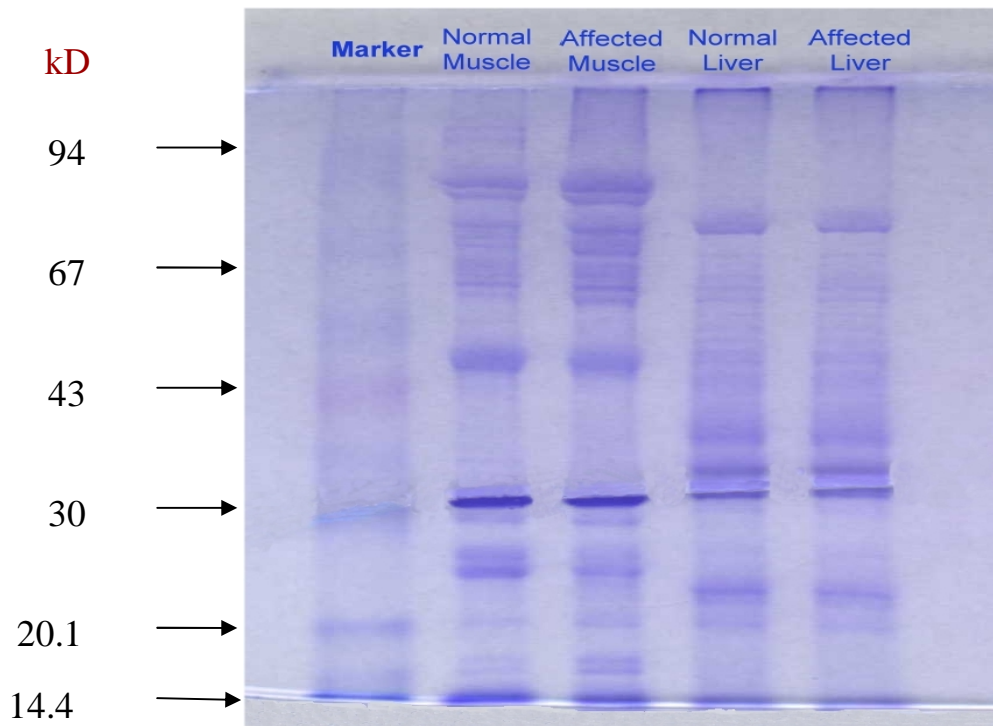
Fig. 5. Biochemical relationship of the genome and the proteome.

(Lam et al., 2006)



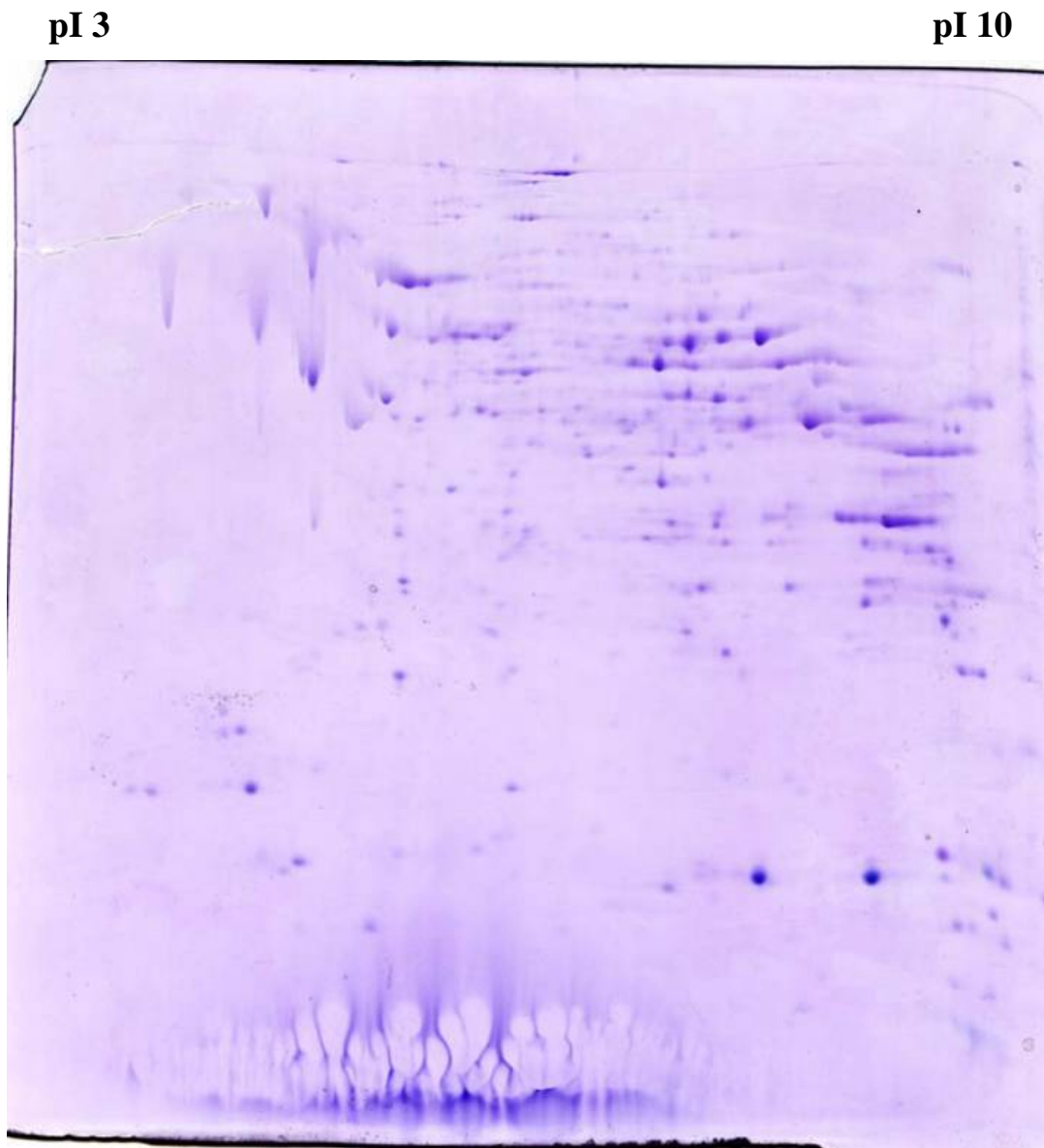
圖六、蛋白質體學研究的基本方法

Fig. 6. Basic approach of proteomics-based research. MS: mass spectrometry.
(Lam et al., 2006)



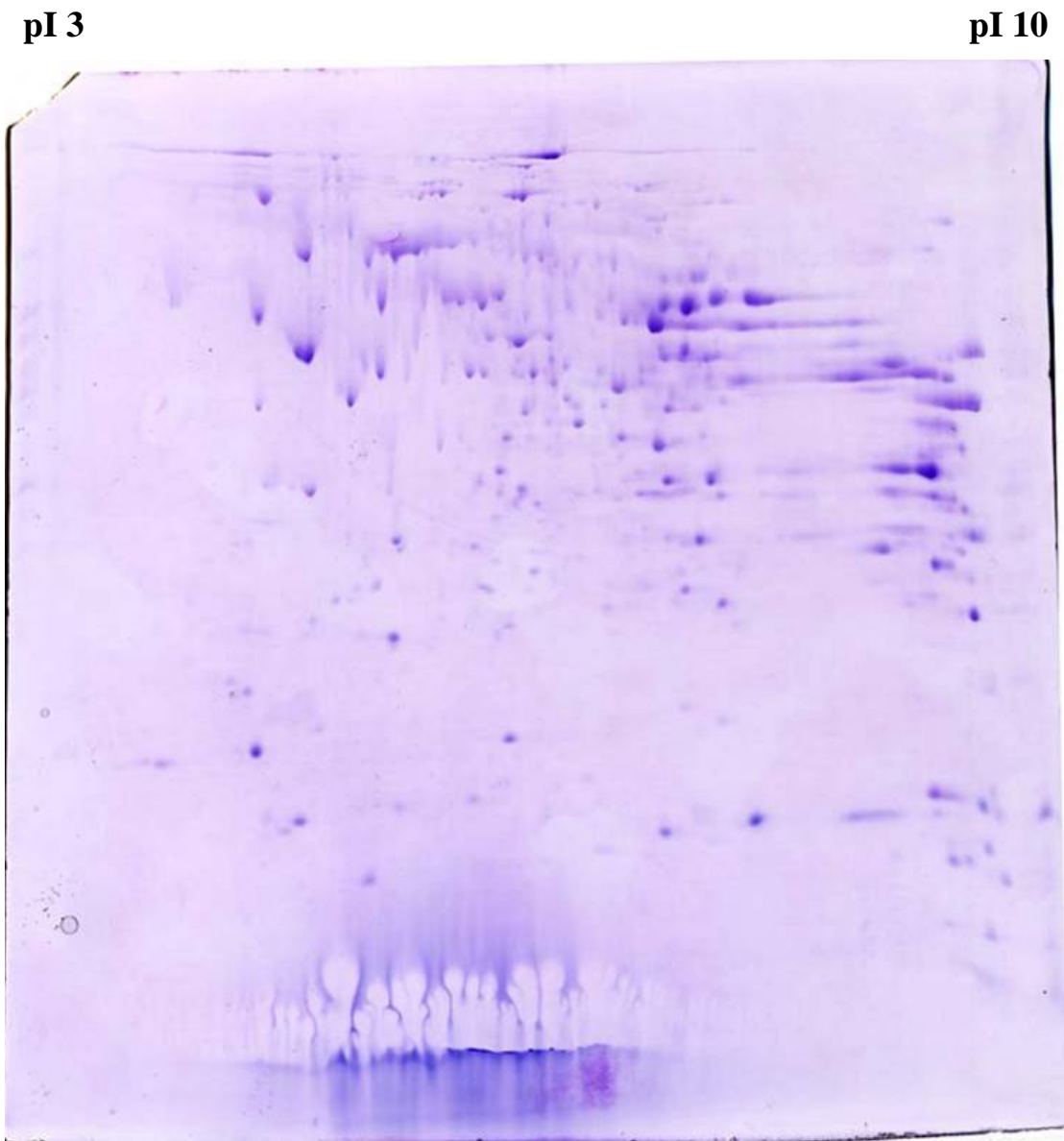
圖七、正常小鼠與突變小鼠肌肉及肝臟組織粒線體蛋白質 SDS-PAGE 電泳圖(總蛋白質量 20 μ g；100 伏特 3 小時；CBR 染色)

Fig 7. SDS-PAGE analysis of mitochondrial proteins . (total protein 20 μ g; 100 V 3 hrs; CBR stain)



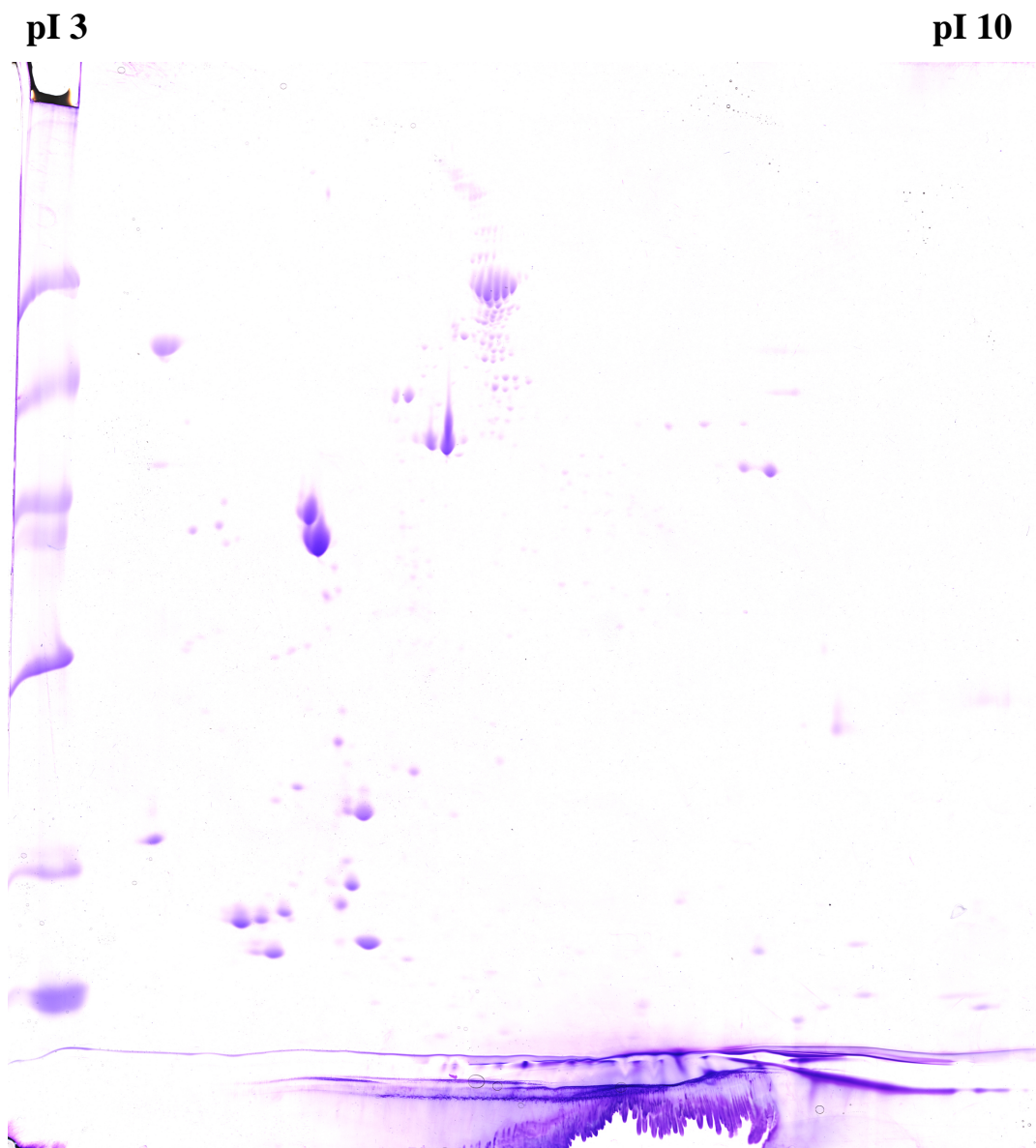
圖八、 正常小鼠肝臟組織粒線體蛋白質二維電泳結果圖 (IPG strip pH 3-10; total protein 200 μ g; 54.7 kv:hr; 12 mA/gel 30 min; 24 mA/gel 5 hrs; CBR stain)

Fig 8. 2-DE analysis of mitochondrial proteins in liver of control mice. (IPG strip pH 3-10; total protein 200 μ g; 54.7 kv:hr ;12 mA/gel 30 min; 24 mA/gel 5 hrs; CBR stain)



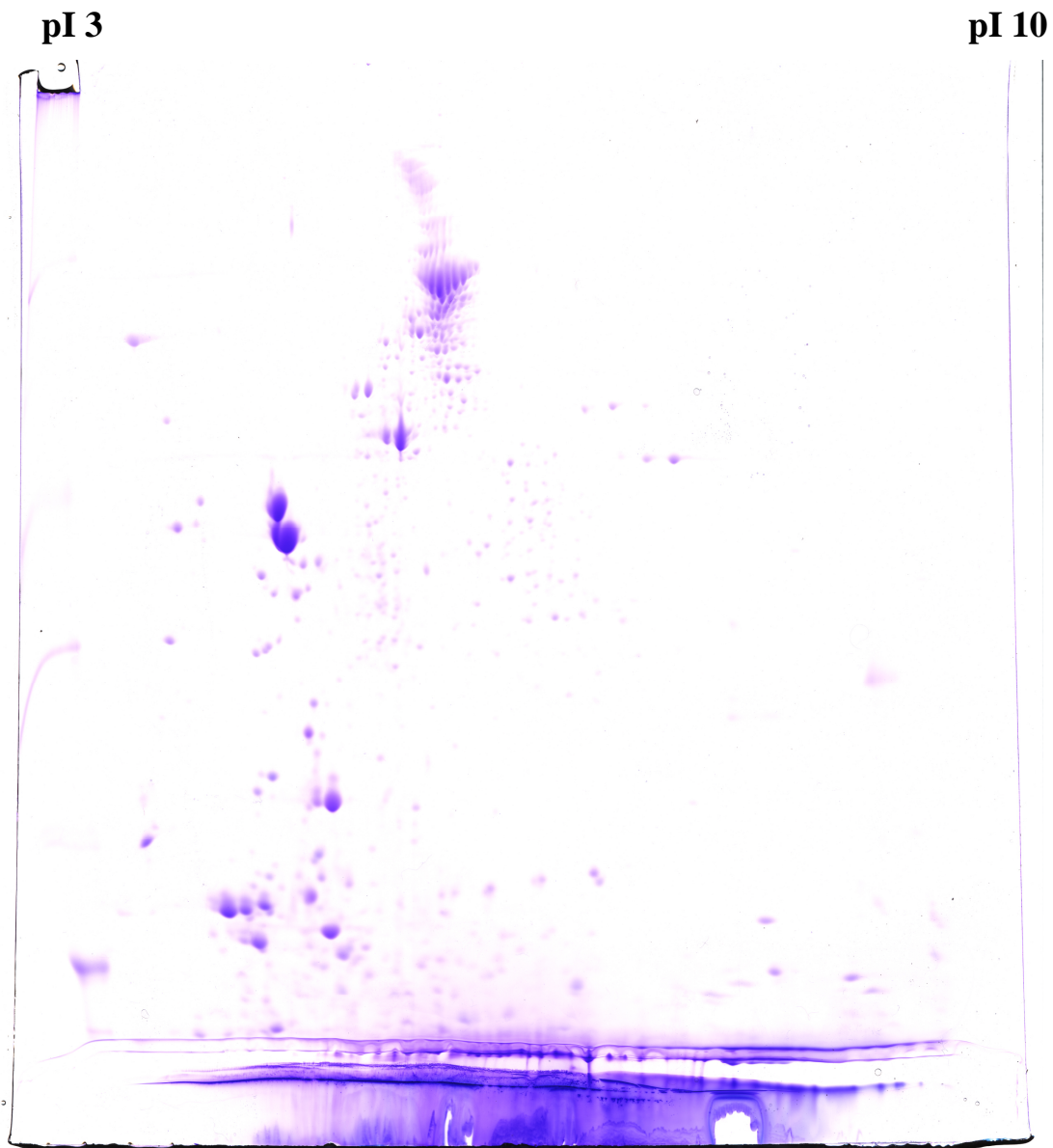
圖九、突變小鼠肝臟組織粒線體蛋白二維電泳結果圖 (IPG strip pH 3-10; total protein 200 μ g; 54.7 kv:hr; 12 mA/gel 30 min; 24 mA/gel 5 hrs; CBR stain)

Fig 9. 2-DE analysis of mitochondrial proteins in liver of ENU mice. (IPG strip pH 3-10; total protein 200 μ g; 54.7 kv:hr; 12 mA/gel 30 min; 24 mA/gel 5 hrs; CBR stain)



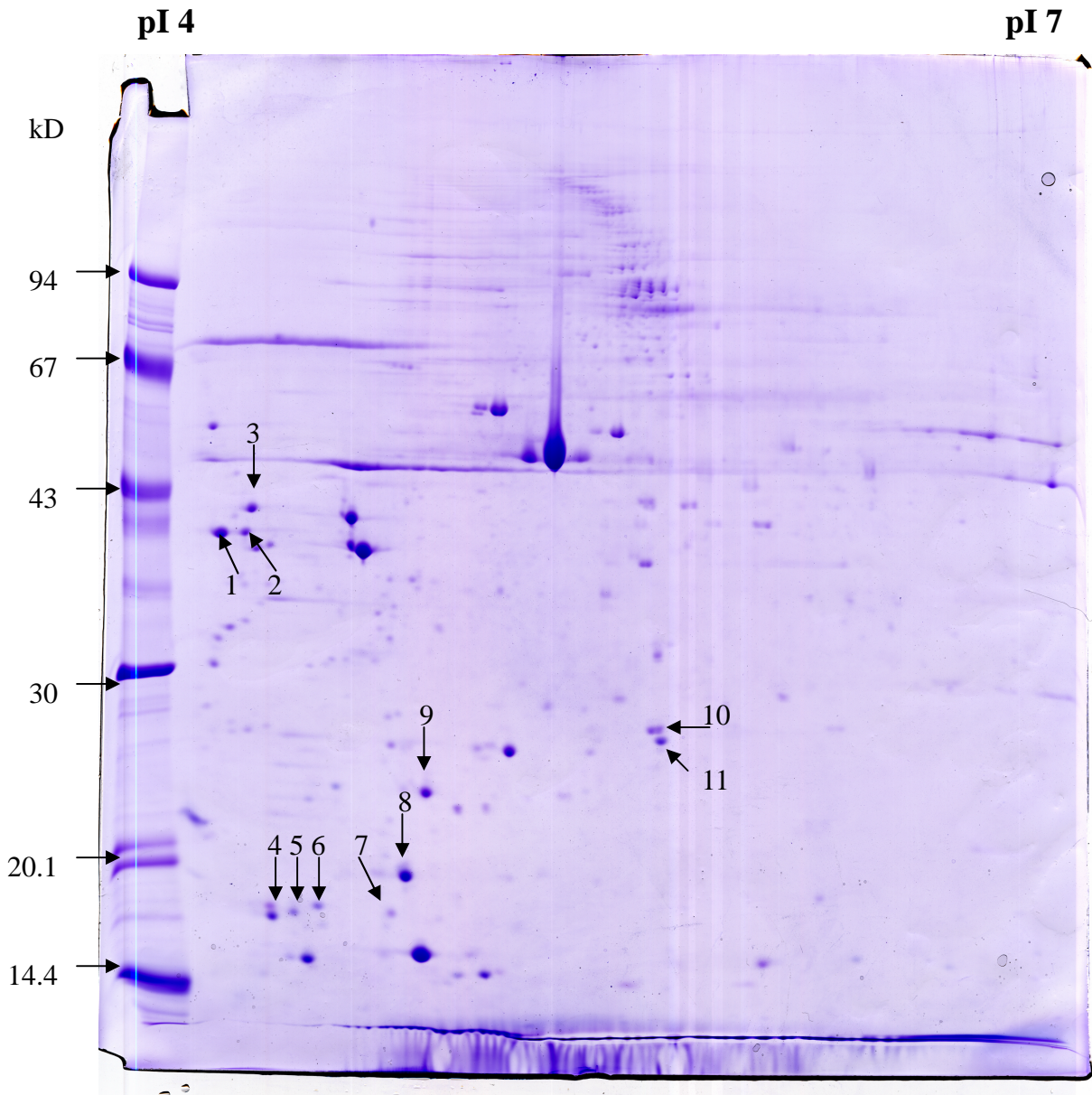
圖十、正常小鼠肌肉組織粒線體蛋白二維電泳結果圖 (IPG strip pH 3-10; total protein 240 μ g; 54.7 kv:hr; 12 mA/gel 30 min; 24 mA/gel 5 hrs; CBR stain)

Fig 10. 2-DE analysis of mitochondrial proteins in muscle of control mice. (IPG strip pH 3-10; total protein 240 μ g; 54.7 kv:hr; 12 mA/gel 30 min; 24 mA/gel 5 hrs; CBR stain)



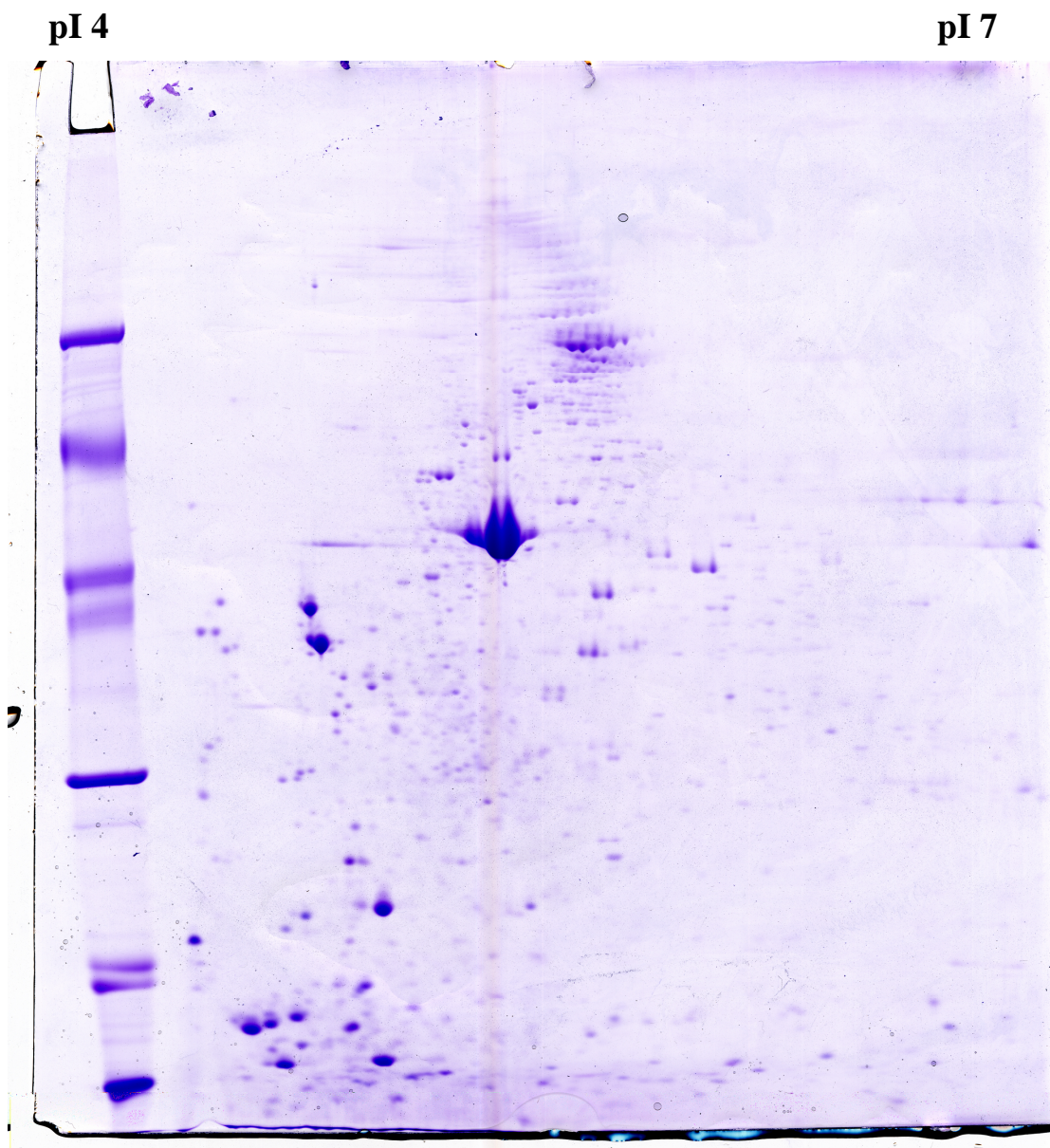
圖十一、突變小鼠肌肉組織粒線體蛋白二維電泳結果圖 (IPG strip pH 3-10; total protein 240 μ g; 54.7 kv:hr; 12 mA/gel 30 min; 24 mA/gel 5 hrs; CBR stain)

Fig 11. 2-DE analysis of mitochondrial proteins in muscle of ENU mice. (IPG strip pH 3-10; total protein 240 μ g; 54.7 kv:hr; 12 mA/gel 30 min; 24 mA/gel 5 hrs; CBR stain)



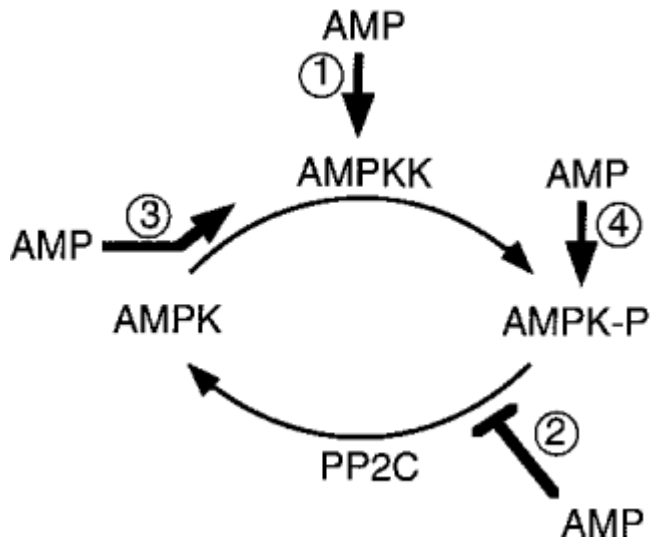
圖十二、正常小鼠肌肉組織粒線體蛋白二維電泳結果圖 (IPG strip pH 4-7; total protein 240 μ g; 54.7 kv:hr; 12 mA/gel 30 min; 24 mA/gel 5 hrs; CBR stain)

Fig 12. 2-DE analysis of mitochondrial proteins in muscle of control mice. (IPG strip pH 4-7; total protein 240 μ g; 54.7 kv:hr; 12 mA/gel 30 min; 24 mA/gel 5 hrs; CBR stain)



圖十三、突變小鼠肌肉組織粒線體蛋白二維電泳結果圖 (IPG strip pH 4-7; total protein 240 μ g; 54.7 kv:hr; 12 mA/gel 30 min; 24 mA/gel 5 hrs; CBR stain)

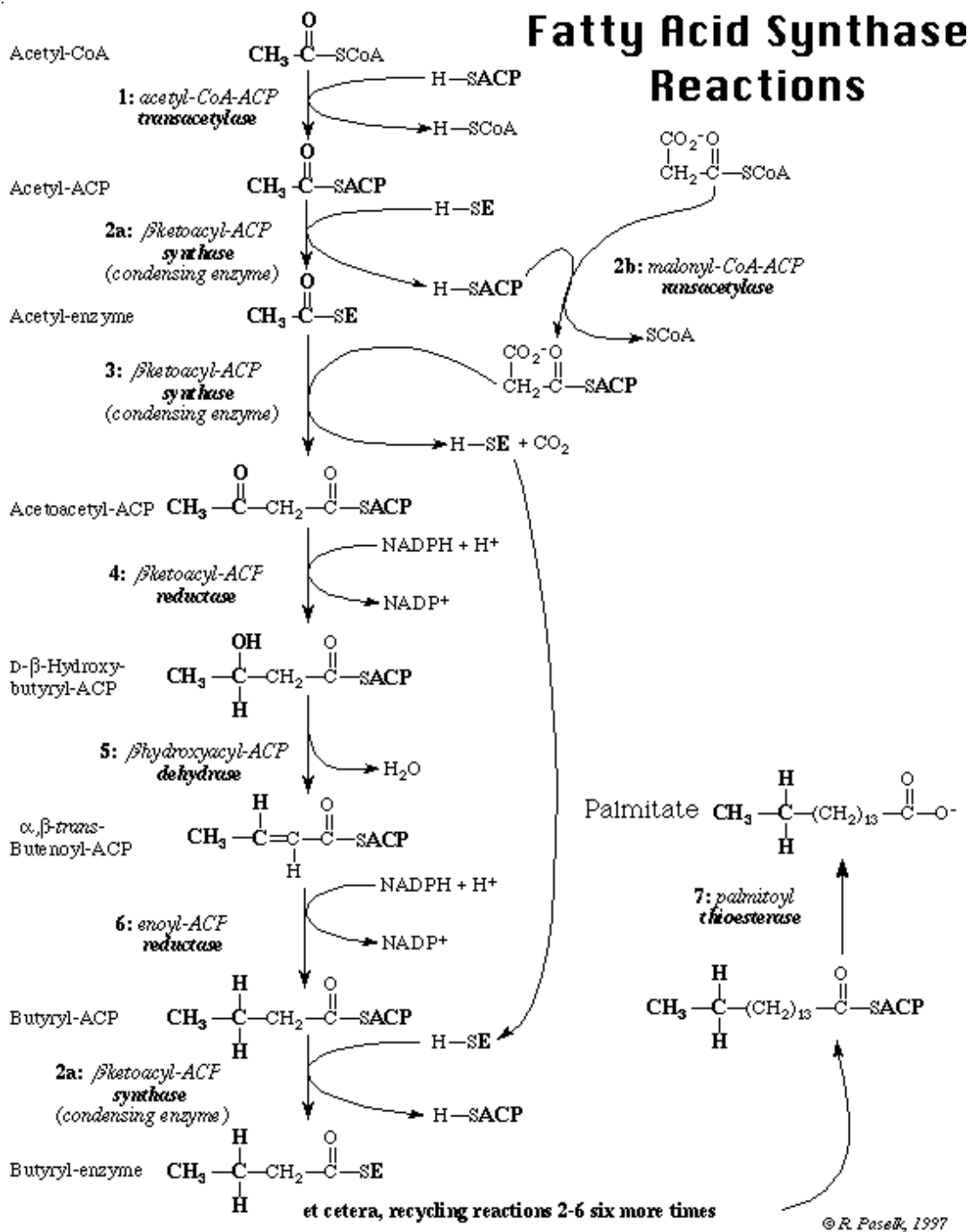
Fig 13. 2-DE analysis of mitochondrial proteins in muscle of ENU mice. (IPG strip pH 4-7; total protein 240 μ g; 54.7 kv:hr; 12 mA/gel 30 min; 24 mA/gel 5 hrs; CBR stain)



圖十四、AMP 活化 AMPK 的機制。

Fig.14 The AMPK cascade is activated by AMP via four mechanisms
 (1) Allosteric activation of AMPKK; (2) binding of AMP to AMPK, rendering it a poorer substrate for protein phosphatases ; (3) binding of AMP to AMPK, making it a better substrate for the upstream kinase, AMPKK; and (4) allosteric activation of AMPK.

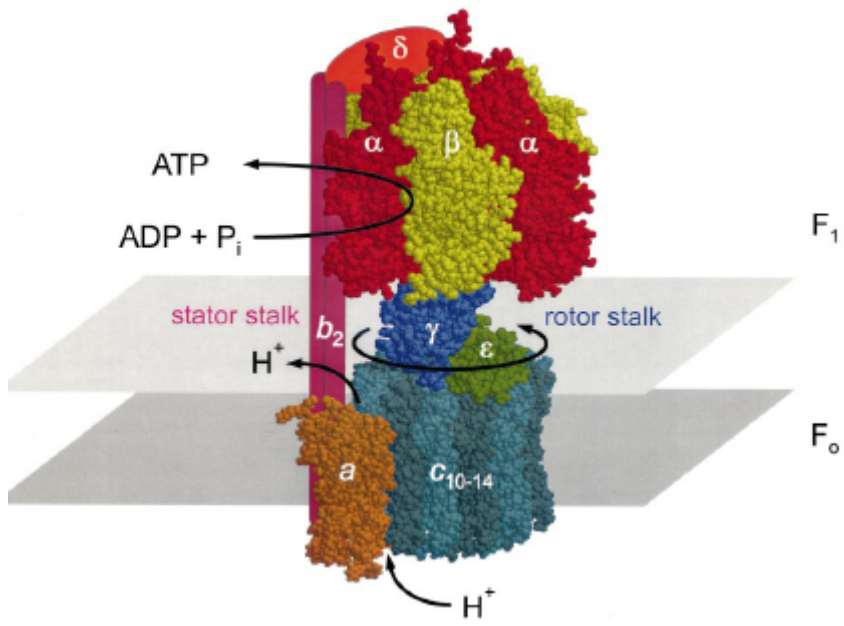
(HARDIE et al., 1999)



圖十五、 脂肪酸生合成途徑

Fig.15 The pathway of fatty acid biosynthesis.

(圖來自 <http://www.humboldt.edu/>)



圖十六、ATP synthase 構造圖

Fig.16 Structural model of ATP synthase.

(Senior et al., 2002)

表一、 ENU 突變鼠血漿中脂肪酸代謝物含量

Table 1. Blood acylcarnitine concentrations in ENU mice

Acylcarnitine concentration(μ M)				
Mouse	C3	C4	C4-OH	C5
ENU control (n=328)	0.65 \pm 0.19	0.28 \pm 0.07	0.10 \pm 0.04	0.10 \pm 0.03
Affected 1	0.65	0.12	0.56	0
Affected 2	0.64	0.26	0.90	0.13

表二、差異蛋白質點質譜鑑定結果及差異量

Table 2. Differentiation proteins identification and quantification of C4-OH ENU mice to control mice.

Spot	Protein identity	NCBI Accession No.	Theoretical pI/molecular weight (kD)	Fold change
1	Calsequestrin-1 precursor	O09165	3.9/45.6	-5.2
2	Calsequestrin-1 precursor	O09165	3.9/45.6	-2.4
3	Calsequestrin-1 precursor	O09165	3.9/45.6	-2.7
4	Myosin light chain (phosphorylatable)	gi 33585570	4.8/18.9	+2.2
5	Myosin regulatory light chain 2	P97457	4.8/18.9	+2.4
6	Myosin regulatory light chain 2	P97457	4.8/18.9	+ 4
7	Tropomyosin 1 chain	P04692-00-00-00	4.7/32.7	+4.1
8	Myosin regulatory light chain 2	P97457	4.8/18.9	-3.2
9	Myosin light chain 1	MLE1_MOUSE	5.0/20.5	+2.2
10	Adenylate kinase isoenzyme	Q9R0Y5	5.7/21.5	-4
11	ATP synthase D chain	Q9DCX2	5.5/18.6	-2.1

附錄一 質譜鑑定結果

Spot 1 質譜分析結果

MATRIX
SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: 009165 Score: 104

(CASQ1_MOUSE) Calsequestrin-1 precursor (Calsequestrin, skeletal muscle isoform)
Calsequestrin-1 precursor (Calsequestrin, skeletal muscle isoform)

Nominal mass (Mr): 45619; Calculated pI value: 3.93

NCBI BLAST search of [009165](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Mus musculus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 10%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MGARAVSELR LALLFVLVLG TPRLGVQGED GLDFPEYDGV DRVINVNAKN
51 YKNVFKKYEV **LALLYHEPPE DDKASQRQFE** MEELILELAA QVLEDKGVGF
101 GLVDSEKDAA VAKKLG LTEE DSVYVFKGDE VIEYDGEFSA DTLVEFLLDV
151 LEDPVELIEG ERELQAFENI EDEIKLIGYF KSKDSEHYKA **YEDAAEEFHP**
201 **YIPFFATFDS** KVAKKLTCLK NEIDFYEAFM EEPMTIPDKP NSEEEIVSFV
251 EEHRRSTLRK LKPESMYETW EDDLGIHIV AFAEEADPDG YEFLETCLKAV
301 AQDNTENPDL SIIWIDPDDF PLLVPYWEKT FDIDLAPQI GVVNVTDADS
351 IWMEMDNEED LPSADELEDW LEDVLEGEIN TEDDDDDDDDD DDDDDDDDD

Spot 2 質譜分析結果

MATRIX
SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: 009165 Score: 45

(CASQ1_MOUSE) Calsequestrin-1 precursor (Calsequestrin, skeletal muscle isoform)
Calsequestrin-1 precursor (Calsequestrin, skeletal muscle isoform)

Nominal mass (M_r): 45619; Calculated pI value: 3.93

NCBI BLAST search of [009165](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Mus musculus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 5%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MGARAVSELR LALLFVLVLG TPRLGVQGED GLDFPEYDGV DRVINVNAKN
51 YKNVFKKYEV LALLYHEPPE DDKASQRQFE MEELILELAA QVLEDKGVGF
101 GLVDSEKDAA VAKKLG LTEE DSVYVFKGDE VIEYDGEFSA DTLVEFLLDV
151 LEDPVELIEG ERELQAFENI EDEIKLIGYF KSKDSEHYKA **YEDAAEEFHP**
201 **YIPFFATFDS** KVAKKLTCLK NEIDFYEAFM EEPMTIPDKP NSEEEIVSFV
251 EEHRRSTLRK LKPESMYETW EDDLGIHIV AFAGEADPDG YEFLETCLKAV
301 AQDNTENPDL SIIWIDPDDF PLLVPYWEKT FDIDL SAPQI GVVNVTDADS
351 IWMEMDNEED LPSADELEDW LEDVLEGEIN TEDDDDDDDDD DDDDDDDDD

Spot 3 質譜分析結果

MATRIX
SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: 009165 Score: 45 Expect: 0.65

(CASQ1_MOUSE) Calsequestrin-1 precursor (Calsequestrin, skeletal muscle isoform)
Calsequestrin-1 precursor (Calsequestrin, skeletal muscle isoform)

Nominal mass (Mr): 45619; Calculated pI value: 3.93

NCBI BLAST search of [009165](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Mus musculus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: 50

Number of mass values matched: 7

Sequence Coverage: 24%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MGARAVSELR LALLFVLVLG TPRLGVQGED GLDFPEYDGV DRVINVNAKN
51 YKNVFKKYEV **LALLYHEPPE DDKASQRQFE MEELILELAA QVLEDKGVGF**
101 **GLVDSEKDAA VAKKLG LTEE** DSVYVFKGDE VIEYDGEFSA DTLVEFLLDV
151 LEDPVELIEG ERELQAFENI **EDEIKLIGYF KSKDSEHYKA YEDAAEEFHP**
201 **YIPFFATFDS KVAKKLT LKL** NEIDFYEAFM EEPMTIPDKP NSEEEIVSFV
251 EEHRRSTLRK LKPESMYETW EDDLGIHIV AFAEEADPDG YEFLET LKAV
301 AQDNTENPDL SIIWIDPDDF PLLVPYWEKT FDIDL SAPQI GVVNVTDADS
351 IWMEMDNEED LPSADELEDW LEDVLEGEIN TEDDDDDDDDD DDDDDDDDD

Spot 4 質譜分析結果

MATRIX
SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: [gil33585570](#) Score: 61 Expect: 2.7

Myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle [Mus musculus]

Nominal mass (Mr): 18943; Calculated pI value: 4.82

NCBI BLAST search of [gil33585570](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Mus musculus](#)

Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:

[gil1699320](#) from [Mus sp](#)

[gil12845963](#) from [Mus musculus](#)

[gil7949078](#) from [Mus musculus](#)

[gil12833636](#) from [Mus musculus](#)

[gil2829841](#) from [Mus musculus](#)

[gil1675396](#) from [Mus musculus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: 19

Number of mass values matched: 6

Sequence Coverage: 37%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MAPKKAKRRA **GAEGSSNVFS MFDQTQIQEF KEAFTVIDQN** RDGIIDKEDL
51 RDTFAAMGRL NVKNEELDAM MKEASGPINF **TVFLTMFGEK** LKGADPEDVI
101 TGAFKVLDP E GKGTIK**KQFL EELLTTQCDR** FSQEEIKNMW AAFPPDVGGN
151 VDYKNICYVI THGDAKDQE

Spot 5 質譜分析結果

MATRIX
SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: **P97457** Score: 41 Expect: 24

(MLRS_MOUSE) Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MLC2F) Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MLC2F)

Nominal mass (M_r): **18943**; Calculated pI value: **4.82**

NCBI BLAST search of [P97457](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Mus musculus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **26**

Number of mass values matched: **5**

Sequence Coverage: **38%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MAPKKAKRRA **GAEGSSNVFS MFDQTQIQEF KEAFTVIDQN** RDGIIDKEDL
51 RDTFAAMGRL NVKNEELDAM MKEASGPINF **TVFLTMFGEK** LKGADPEDVI
101 TGAFKVLDP E GKGTIKKQFL **EELLTTQCDR** FSQEEIKNMW AAFPPDVGGN
151 VDYKNICYVI THGDAKDQE

Spot 6 質譜分析結果

MATRIX
SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: **P97457** Score: **45** Expect: **0.45**

(MLRS_MOUSE) Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MLC2F) Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MLC2F)

Nominal mass (Mr): **18943**; Calculated pI value: **4.82**

NCBI BLAST search of [P97457](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Mus musculus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **39**

Number of mass values matched: **7**

Sequence Coverage: **37%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MAPKKAKRRA **GAEGSSNVFS MFDQTQIQEF KEAFTVIDQN** RDGIIDKEDL
51 RDTFAAMGRL NVKNEELDAM MKEASGPINF **TVFLTMFGEK** LKGADPEDVI
101 TGAFKVLDPG GKGTIKKQFL **EELLTTQCDR** FSQEEIKNMW AAFPPDVGGN
151 VDYKNICYVI THGDAKDQE

-

Spot 7 質譜分析結果

MATRIX
SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: P04692-00-00-00 Score: 34

(TPM1_RAT) Splice isoform 1; Variant Displayed; Conflict Displayed; from P04692
Tropomyosin 1 alpha chain (Alpha-tropomyosin)

Nominal mass (M_r): 32661; Calculated pI value: 4.69

NCBI BLAST search of [P04692-00-00-00](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Rattus norvegicus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 4%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MDAIKKKMQM LKLDKENALD RAEQAEADKK AEEDRSKQLE DELVSLQKKL
51 KGTEDELDKY SEALKDAQEK LELAEEKATD AEADVASLNR **RIQLVEEELD**
101 **RAQER**LATAL QKLEEAekAA DESERGMKVI ESRAQKDEEK MEIQEIQLKE
151 AKHIAEDADR KYEEVARKLV IIESDLERAE ERAELSEGKC AELEEEELKTV
201 TNNLKSLEAQ AEKYSQKEDK YEEEIKVLSL KLKEAETRAE FAERSVTKLE
251 KSIDDLEDEL YAQKLKYKAI SEELDHALND MTSI

Spot 8 質譜分析結果

MATRIX
SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: **P97457** Score: 132 Expect: 1.4e-09

(MLRS_MOUSE) Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MLC2F) Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MLC2F)

Nominal mass (Mr): **18943**; Calculated pI value: **4.82**

NCBI BLAST search of [P97457](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Mus musculus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C),Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **50**

Number of mass values matched: **15**

Sequence Coverage: **72%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MAPKKAKRRA **GAEGSSNVFS MFDQTQIQEF KEAFTVIDQN RDGIIDKEDL**
51 **RDTFAAMGRL NVKNEELDAM MKEASGPINF TVFLTMFGEK LKGADPEDVI**
101 **TGAFKVLDP E GKGTIKKQFL EELLTTQCDR FSQEEIKNMW AAFPPDVGGN**
151 **VDYKNICYVI THGDAKDQE**

Spot 9 質譜分析結果

MATRIX
SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: **MLE1_MOUSE** Score: **75** Expect: **0.0033**

Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform (MLC1F) (A1 catalytic) (Alkali myosin light chain 1).- Mus musculus (Mouse).

Nominal mass (Mr): **20450**; Calculated pI value: **4.98**

NCBI BLAST search of [MLE1_MOUSE](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Mus musculus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **29**

Number of mass values matched: **7**

Sequence Coverage: **45%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 **APK**KDVKK**PA AAPAPAPAPA PAPA**KPK**KEEK** IDLSA**IKIEF** **SKEQQEDFKE**
51 **AFL**LFDR**TGE** CKITLSQ**VG**D **VL**RALGT**NPT** NAEV**KKVLGN** PSNEEM**NAKK**
101 **IEF**EQ**FLPMM** QAIS**NNKDQ**G **GYEDFVEGLR** VFDKEG**NGTV** MGAEL**RHVLA**
151 **TLG**E**KMK**EEEE VEALLAG**QED** SNGCIN**YEAF** VKH**IMSV**

Spot 10 質譜分析結果

MATRIX
SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: [Q9ROY5](#) Score: 56 Expect: 0.061

(KAD1_MOUSE) Adenylate kinase isoenzyme 1 (EC 2.7.4.3) (ATP-AMP transphosphorylase) (AK1)

(Myokinase) Adenylate kinase isoenzyme 1 (EC 2.7.4.3) (ATP-AMP transp

Nominal mass (Mr): 21526; Calculated pI value: 5.67

NCBI BLAST search of [Q9ROY5](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Mus musculus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: 24

Number of mass values matched: 7

Sequence Coverage: 40%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MEEKLKKAKI IFVVGPGSG KGTQCEKIVQ KYGYTHLSTG **DLLRAEVSSG**
51 SERGKKLSAI MEKGELVPLD **TVLDMLRDAM LAKVDSSNGF LIDGYPREVK**
101 QGEEFEQKIG **QPTLLLYVDA GAETMTQRLL KRGETSGRVD DNEETIKKRL**
151 **ETYYNATEPV ISFYDKRGIV RKVNAEGTVD TVFSEVCTYL DSLK**

Spot 11 質譜分析結果

MATRIX
SCIENCE Mascot Search Results

Protein View

Match to: [Q9DCX2](#) Score: 121

(ATP5H_MOUSE) ATP synthase D chain, mitochondrial (EC 3.6.3.14) ATP synthase D chain, mitochondrial (EC 3.6.3.14)

Nominal mass (M_r): **18607**; Calculated pI value: **5.52**

NCBI BLAST search of [Q9DCX2](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Mus musculus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **24%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 AGRKLALKTI DWVSFVEVMP QNQAIGNAL **KSWNETFHAR LASLSEKPPA**
51 **IDWAYYRANV** AKPGLVDDFE KYNALKIPV PEDKYTALVD QEEKEDVKSC
101 AEFVSGSQLR IQEYEQLEK MRNIIPFDQM TIDDLNEIFP ETKLDK**KKYP**
151 **YWPHQPIENL**