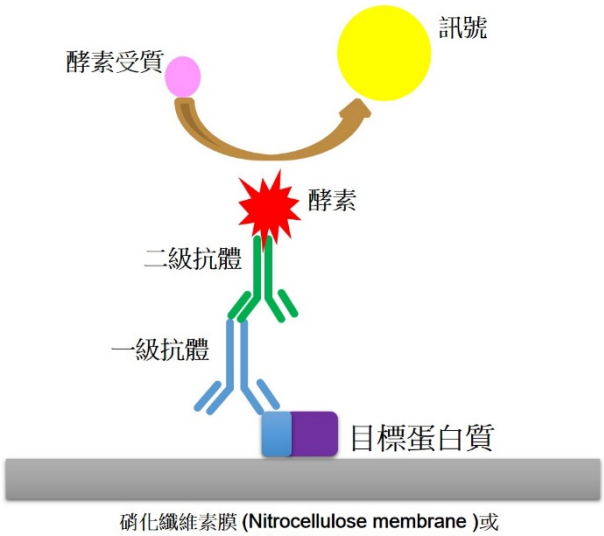
※細胞自噬機制-控制組的選擇

細胞自噬是一種細胞分解、回收、再利用的機制。對細胞生長、代謝、死亡關係重大。半胱胺酸蛋白酶(ATG4B)在細胞自噬過程(autophagy)中扮演關鍵角色，其切割一種稱為 LC3 的蛋白，移去 C-端的四個氨基酸後，剩下的蛋白稱為 LC3-I，此 LC3-I 被磷脂醯乙醇胺(phosphatidylethanolamine)修飾後會形成細胞自噬體(autophagosome)外殼的一部分，進而促進細胞自噬。近來實驗證明在癌細胞中抑制 ATG4B 的表現會大大減緩癌細胞的發展，但在小鼠中剔除 ATG4B 的基因後卻不會造成小鼠有明顯的表型改變(如：體重，活動力及壽命)，這讓 ATG4B 被認為是相當具有潛力的抗癌標的分子。

在 ATG4B 的蛋白結構被科學家解出後，研究員在電腦上透過分子對接及模擬軟體設計出了數種 ATG4B 活性位的抑制劑(小分子藥物)後，再進行生化實驗來驗證這些藥是否有效。

在生物科技上，科學家常利用免疫的專一性來進行檢測，原理為將待測物視為抗原，並針對此抗原設計特定的抗體來檢測是否有該待測物存在。故甲研究員先將 LC3 蛋白質(圖一藍色部分)利用分子生物技術的方法在 N 端接上 c-Myc 抗體的抗原(圖一之粉橘部分)，和在 C 端接上 S-tag 抗體的抗原(圖一灰色部分)後，形成 LC3-chimera，所以當 ATG4B 切割 LC3-chimera 後，會形成 N 端帶有 c-Myc tag 的 LC3-I(粉橘＋藍)和帶有 S-tag 的片段(藍+灰)。c-Myc tag 和 S-tag 均是一種短鏈的胜肽。好的抑制劑將使得 ATG4B 無法好好切割 LC3。

圖一



硝化纖維素膜 (Nitrocellulose membrane)或
聚(二氟亞乙烯)膜 (PVDF membrane)

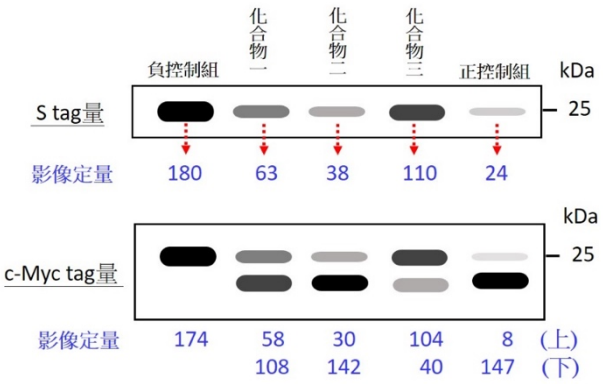
圖二 西方墨點法原理 (Western Blotting)

研究員給定三種實驗條件：(如圖三和圖四)

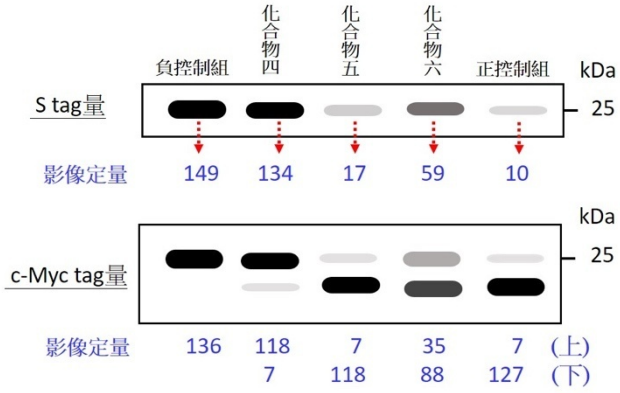
正控制組：反應溶液中有 ATG4B 和 LC3，但沒有任何抑制劑。

負控制組：反應溶液中僅有 LC3。

抑制劑添加組：反應溶液中有 ATG4B、LC3 及六種抑制劑(化合物一~六)。



圖三 西方墨點法結果



圖四 西方墨點法結果

註：圖三、四中 S-tag 量和 c-Myc tag 量為不同的兩塊電泳膠裁切下來的結果。

這三種情況進行一定時間的反應後，可以蛋白質電泳的方式幫助分離反應物及產物。蛋白質電泳是將蛋白質樣品注入十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠體(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis，簡稱 SDS-PAGE)後，施加一電壓，這些帶電荷的蛋白質，被負離子帶著在電場中往正極泳動，並依其分子量大小在膠體泳動的過程中被分開，小的蛋白質泳動速度快，會先跑到膠體下緣(見圖三)。將蛋白質樣品依不同分子量大小以電泳分離後，研究員再利用蛋白質轉印法將 SDS-PAGE 上樣品先轉印到硝化纖維素膜 (Nitrocellulose membrane)上，再進行西方點墨法(Western blot)。如圖二所示，目標蛋白轉印到膜上後利用專一性的抗體(又稱一級抗體(圖二之藍色部分)，去辨認目標蛋白上之抗原，在此例中為 c-Myc tag 或 S-tag，此種專一性抗體可被另一種二級抗體(圖二之綠色部分)所辨認、結合，在二級抗體上有一種酵素，加入酵素受質後會得到化學冷光訊號。發光越多會造成底片曝光高而有黑色的墨點，此墨點可用影像軟體分析密度，墨點越濃則代表該處的蛋白量越多。在此例中墨點越濃即代表帶著 c-Myc tag 或帶著 S-tag 的蛋白越多。

請依據實驗結果回答下述問題:

（C）1.圖三和圖四西方點墨法結果分別是甲研究員及乙研究員在同一週的不同天所得到，並將結果中所得到 S-tag 量和 c-Myc 量利用影像分析軟體進行定量。甲研究員測試抑制劑 1,2,3(圖三中的化學物一~三)，而乙研究員測試抑制劑 4,5,6(圖四中的化學物四~六)。在多半的科學實驗中，為了消弭不同人為操作手法的差異而造成實驗結果誤判，所以在此處當抑制劑 1,2,3 的結果要與抑制劑

4,5,6 的結果來比較時，甲、乙研究員將影像分析定量所得的初始數據，參考正負控制組後，作標準化(normalization)的處理，然後再來比較。所以將圖三和圖四影像分析定量初始數據經由標準化方法後，S-tag 量應是下列何者呢?

(A) 圖三 156, 39, 14, 86, 0 (由左而右)，圖四 139,124, 7, 49, 0 (由左而右)

(B) 圖三 7.5, 2.6, 1.6, 4.6, 1 (由左而右)，圖四 14.9, 13.4, 1.7, 5.9, 1(由左而右)

(C) 圖三 1.00, 0.25, 0.09, 0.55, 0.00 (由左而右)，圖四 1.00, 0.89, 0.05, 0.35, 0.00 (由左而右)

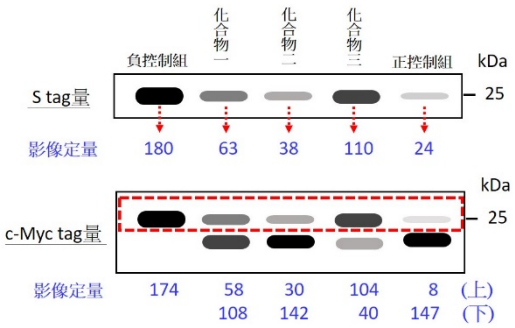
(D) 圖三 1.00, 0.35, 0.21, 0.61, 0.13 (由左而右)，圖四 1.00, 0.90, 0.11, 0.40, 0.07 (由左而右)

（C）2.何種藥是最有效的抑制劑？

(A)化合物二 (B)化合物三 (C)化合物四 (D)化合物五 (E)化合物一

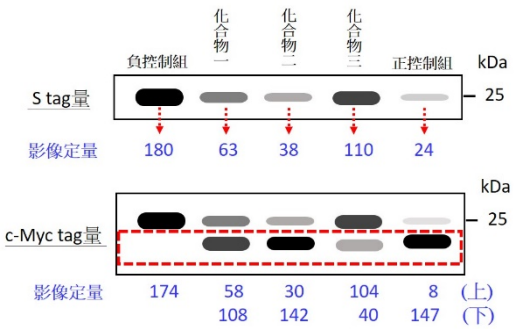
（A）3.c-Myc-tag 的引入是作為一種加入量的控制組(loading control)，請判斷圖三 S-tag 的結果應相對於 c-Myc-tag 哪個位置的結果呢? (見虛線圈起處)

(E)



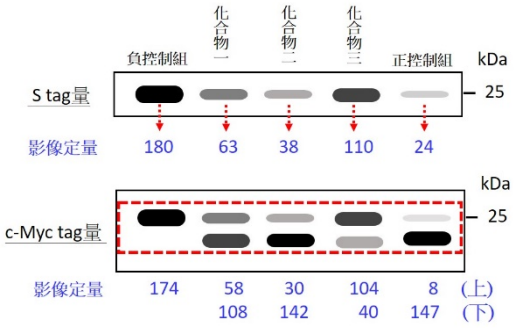
圖三 西方墨點法結果

(F)



圖三 西方墨點法結果

(G)



圖三 西方墨點法結果

(H)均無法對應 S-tag 結果。