行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

利用雙向電泳、西方免疫轉漬法及微量蛋白定序分析技術探討靜脈麻醉劑對老鼠肝及腦中蛋白質特徵及變化

計畫類別：個別型計畫(二年期)

計畫編號:NSC 89-2314-B-002-524

執行期間:第二年：八十九年八月至九十年

計畫主持人:范守仁

摘要

Ketamine 是作用在 N-methyl-D-aspartate (NMDA)具有獨特的止痛作用。這個化合物在肝中主要是由 Cytochrome P-450 酵素代謝。因為在腦中，它可以和 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 接受體、Opioid 接受體和 NO 合成酵素作用，所以它的麻醉作用機制和對神經性的影響與大多數的麻醉劑不同。在高劑量和長時間的 Ketamine 麻醉處理下，對肝及腦中如 Cytochrome P-450 酵素、熱休克蛋白質 70 及 72、NMDA 接受器和 Type 1 NOS 等蛋白質的變化是非常有影響的。在肝中 Ketamine 會間接抑制 Cytochrome P-450 enzyme 及 Glucuronosyltransferase 系統，發生熱休克反應製造堆積 HSP72 蛋白質。在腦中，ketamine 與蛋白質的作用，除了會與腦神經元的 Opiate receptor、NMDA receptor 作用並抑制 NOS 活性外，也引起 c-fos 蛋白質表現以及 HSP72 及 HSP70 的表現。所以這個計畫的主要目的就是想利用現有的老鼠實驗模式，在使用不同時間的 ketamine 注射後以雙向蛋白電泳、西方免疫轉漬及微量蛋白定序技術找到直接的證據，觀察其肝內及腦中蛋白質的變化，希望能了解和肝內 cytochrome P-450 enzymes 之間的關係，並嘗試探討腦內蛋白質的變化是否和其特殊止痛作用有何相關。，以了解被 Ketamine 處理過的老鼠肝及腦中蛋白質的變化

進度及結果

第一期：飼養及麻醉處理實驗動物並犧牲動物，分離出肝臟均質液成份。

A. 實驗動物的處理：

1. ketamine 之配製：將 1%(w/v)的 ketamine 溶在 Intralipid (內含 10 %(w/v)之 Soybean oil、1.2 %(w/v)之 Egg phosphatide 及 2.25 %(w/v)之 Glycerol)。

2. 實驗動物的處理：本實驗所使用的動物為大白鼠，由台大醫院實驗動物中心繁殖後供應。選取鼠齡約 6 到 8 週大的老鼠，飼養在籠子兩週以適應環境。實

驗組經靜脈(iv)注射 ketamine，對照組則只打入 Intralipid。大白鼠最後犧牲掉.

Group	Loading dose	Infusing dose	Body weight
KA1 (Control)	0.375 ml Intralipid	1 ml/hr Intralipid	210 gm
KA2 (Control)	0.375 ml Intralipid	1 ml/hr Intralipid	202 gm
KB1 (2 hr,麻醉)	0.40 ml ketamine	1.25ml/hr ketamine	240 gm
KB2 (2 hr,麻醉)	0.40 ml ketamine	1.25ml/hr ketamine	250 gm
KC1 (2 hr,鎮靜)	0.125 ml ketamine	0.425ml/hr ketamine	256 gm
KC2 (2 hr,鎮靜)	0.125ml ketamine	0.425ml/hr ketamine	208 gm
KD1 (4 hr,麻醉)	0.80 ml ketamine	1.3ml/hr ketamine	260 gm
KD2 (4 hr,麻醉)	0.80 ml ketamine	1.2ml/hr ketamine	250 gm
KE1 (8 hr,麻醉)	1.20 ml ketamine	1.45ml/hr ketamine	290 gm
KE2 (8 hr,麻醉)	1.20 ml ketamine	1.45ml/hr ketamine	240 gm
KF1 (8 hr,鎮靜)	0.1 ml ketamine	0.425ml/hr ketamine	200 gm
KF2 (8 hr,鎮靜)	0.11 ml ketamine	0.425ml/hr ketamine	230 gm

B 肝臟均質液的準備：

200-250g Liver (Weight)

↓

Mortar (Liquid N2)

↓

1.15% KCl (8Vol= 2.5mL ; 體積要固定。)

↓

Homogenizer(60 S)

↓

Centrifuged 9000 x g 20 min (4500 rpm)

↓

沉澱(P)丟棄 | 上清 (S)

↓

Centrifuged 100000 x g 40 min (45000 rpm)

↓

上清 (S1) | 沉澱(P1) +1.15% KCl

↓

Homogenizer (60 S)

↓

Centrifuged 100000 x g 1 hr (45000 rpm)

↓

上清 (S2) | 沉澱(P2) +1.15% KC

↓

Desalt

↓

冷凍乾燥

↓

Store At - 80℃

C 腦均質液的準備：

100-150g Brain (Weight)

↓

Mortar (Liquid N2)

↓

1.15% KCl (8Vol= 2.5mL ; 體積要固定。)

↓

Homogenizer(60 S)

↓

Centrifuged **9000 x g** **20 min** **(4500 rpm)**

↓

沉澱(P)丟棄 | 上清 (S)

↓

Centrifuged **100000 x g** **40 min** **(45000 rpm)**

↓

上清 (S1) | 沉澱(P1) +1.15% KCl

↓

Homogenizer (60 S)

↓

Centrifuged **100000 x g** **1 hr** **(45000 rpm)**

↓

上清 (S2) | 沉澱(P2) +1.15% KC

↓

desalt

↓

冷凍乾燥

↓

Store At - 80℃

後期：以第一次元的 IEF 及第二次元的 SDS-PAGE 的 2-DE 設備分析肝中細胞蛋白質。

A 進行 2-DE 的分析：

1. 決定蛋白質的濃度：

蛋白質的濃度先以 Bio-Rad Lab(USA)的染料染過後，以 Egg ovalbumin 當做標準蛋白決定之。然後將濃度調到 1.5-2.0 mg/ml，取 400 ul 點到 2-DE gel 準備做第一次元的 IEF 及第二次元的 SDS-PAGE 的分析。

2. 第一次元的 IEF 分析：

將 11 cm 的 IPG(Immobilized pH gradient)，pH 範圍在 3.0-10.0 或 4.0-7.0-的電泳片放在 Multiphor II(Pharmacia Co., Seweden)的水平電泳槽，以 Millipore (USA)電源供應器調整電源到起始電壓在 3 小時內達到 500V 之後，其直線增加率為 5 小時內由 500 V 增加到 3500V，維持此高電壓 15 小時，實驗前後使總電壓為 64 KV。待跑完 IEF 後，電泳片浸於含有 PH 6.8，50 mM Tris-HCl、6 M Urea、30 % (v/v) Glycerol、1 % (w/v) SDS、16 mM DTT 及 0.01 % Bromophenol blue(BPB)的緩衝液中。

3. 第二次元的 SDS-PAGE 的分析：

用 Millipore 垂直電泳系統依據 Lalmmli 報告，將完成第一次元電泳的 IPG 電膠片，轉移到 SDS-PAGE 電泳片，跑第二次元的 SDS-PAGE。其 Separating gel 濃度為 12.5 %，電泳以垂直方式進行，以每片 16 瓦特的固定電功進行電泳，待 BPB 指示到底部使可結束。