

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 在大腸桿菌中建構哺乳動物蛋白質精胺酸甲基化系統
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 賴至中
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-040-003-B
研究期間： 99年07月01日至100年02月28日止，計8個月
指導教授： 李娟

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 100年03月31日

行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

計畫名稱: 在大腸桿菌中建構哺乳動物蛋白質精胺酸甲基化系統

執行計畫學生：賴至中

學生計畫編號：NSC 99-2815-C-040 -003-B

研究期間：99年7月1日至100年2月底止，計8個月

指導教授：李娟

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系

中華民國100年3月31日

摘要

精胺酸甲基轉移酶 (Protein arginine methyltransferase, PRMT) 在蛋白質的轉譯後修飾作用扮演一重要的角色，而此轉譯後修飾作用只存在真核生物體中，想要從自然界的真核生物中取出被甲基化作用的蛋白質實際上困難度相當高。本研究將利用原核生物容易培養且產生大量標的蛋白的優勢，在大腸桿菌建立產生甲基化蛋白質的系統；根據之前李娟老師實驗室的研究發現 CNBP 可被 PRMT 作用，本實驗以 PRMT1 和 PRMT5 作為甲基化 CNBP 的主要酵素。此系統將在 pET-28b 中同時表現 CNBP 及 PRMT，以 T7 promoter 作為調控誘導表現 His₆-tagged CNBP；另由 Methionine aminopeptidase promoter (MAP_P) 調控持續表現 PRMT1 和 PRMT5。CNBP 又稱為 ZNF9 (zinc finger 9)，含有七個 CCHC type zinc-finger 序列，第一個 zinc-finger 到第二個 zinc-finger 之間有 arginine-glycine rich (RG-rich)，第三個 zinc-finger 上胺基酸第 72 到 74 的位置為 RGG 的序列。本實驗將這些可能會被甲基化的精胺酸及 RG-rich 片段進行點突變和刪除，產生七種不同的 CNBP，與 PRMT1 或 PRMT5 在同一載體中而產生十四種重組蛋白表達系統。這一 PRMT1 / CNBP 和 PRMT5 / CNBP 系統的建立，可利用原核生物取得不對稱型甲基化和對稱型甲基化受質，進一步探討不同甲基型態的受質功能差異；此系統更可成為真核蛋白質的轉譯後修飾作用建立亦可於大腸菌中大量表現的酵素/受質模式。

研究動機與研究問題

精胺酸甲基轉移酶 (Protein arginine methyltransferase, PRMT) 為常見的蛋白轉譯後修飾的酵素，在真核細胞中扮演重要的角色，功能包括：細胞的訊息傳遞、轉錄的調節、細胞分化...等。要從真核生物中取出欲觀察的甲基化蛋白量不多也不易，更重要的是養細胞和養菌的成本相差很多，因此利用真核生物研究甲基化作用對於生物體所產生重要的影響在實驗上有難度。本實驗的研究目的是在沒有轉譯後修飾作用的原核生物中建構含有 PRMT 序列的質體，使之表現受質蛋白的同時也能表現 PRMT，進而大量製造含有甲基化的蛋白，而可為相關精胺酸甲基化蛋白質的功能研究，提供充份材料。

文獻回顧與探討

蛋白質的轉譯後修飾作用有甲基化 (methylation) 、醣化 (glycosylation)、乙醯化 (acetylation)、磷酸化 (phosphorylation)、泛素化 (ubiquitination) ...等，其中甲基化作用在特定的精胺酸上，對生物體產生重要的影響，包含訊息傳遞、轉錄的調節、細胞分化...等 (1)，催化這種甲基化反應的酵素稱為蛋白質精胺酸甲基轉移酶 (Protein arginine methyltransferase, PRMT)。PRMT 會將甲基提供者 Ado-Met (S-adenosylmethionine) 的甲基轉移到標的蛋白上，形成單甲基、對稱型或不對稱型雙甲基，大部分的 PRMT 會催化含有 glycine and arginine-rich (GAR) domain 的受質。目前已有十一種甲基轉移酶被發現，依照不同的催化形式主要分成三種，第一型 PRMT 催化受質形成單甲基化及不對稱型雙甲基化，包含了 PRMT1、PRMT3、PRMT4 (CARM1)、PRMT6、PRMT8、PRMT10 和 PRMT11 (2-8)；第二型 PRMT 催化受質形成單甲基化及對稱型雙甲基化，包含了 PRMT5、PRMT7 和 PRMT9 (9-11)，至於 PRMT2 目前尚未歸類 (12)；第三型會催化精胺酸形成 δ -monomethylarginine，這一類型的 PRMT 目前只發現於酵母菌中 (Fig. 1)。哺乳動物中 PRMT 第一型甲基化作用以 PRMT1 為主 (3)，第二型以 PRMT5 為主。

CNBP 分子量為 19 kDa，其胺基酸序列是被高度保留的，人類的 CNBP 序列和非洲爪蟾有 94.1 % 的相似性 (13)，和雞有 99 % 的相似性 (14)，和小鼠則有高達 100 % 的相似性，它的功能目前還不是很了解。CNBP 又稱 ZNF9 (zinc finger 9)，胺基酸序列含有七個 CCHC type zinc-finger (15)，第一個 zinc-finger 到第二個 zinc-finger 之間有

arginine-glycine rich (RG-rich) 和第三個 zinc-finger 上胺基酸第72 到 74 的位置有 RGG 的序列 (Fig. 2)。

譚明輝老師實驗室曾利用大腸菌同時表達酵母菌精胺酸甲基轉移酶 HMT1 以及受質 Sbp1p 和 Stm1p，並成功表現甲基化受質 (16)。本實驗預定以 CNBP 作為主要研究的甲基化受質，在同一個載體中同時表現 PRMT1 或 PRMT5 和 CNBP，以 Methionine aminopeptidase promoter (MAP_P) 在大腸桿菌持續表現 PRMT，以 T7 promoter 作為調制誘導 CNBP 的表現。利用這一系統可以取得受到對稱型甲基化和非對稱型甲基化的蛋白，因此以 pET-28b 當載體分別製作了七種不同序列改變的 CNBP (Fig. 3)：CNBP (全長 CNBP)、Del (胺基酸序列第 25-35 刪除)、R72K (胺基酸序列第 72 的 R 突變成 K)、Del-R72K (胺基酸序列第 25-35 刪除及72的 R 突變成 K)、RK1 (胺基酸序列第 25 和 27 的 R 突變成 K)、RK2 (胺基酸序列第 30、32 和 34 的 R 突變成 K)、RK (胺基酸序列第 25、27、30、32 和 34 的 R 突變成 K) (Fig. 2)。本實驗建構了 PRMT1 / CNBP 和 PRMT5 / CNBP 兩大系統後，可在原核生物中大量取得這七種不同的甲基化 CNBP，進一步研究甲基化對於 CNBP 功能的影響。

研究方法及步驟

一、建構 CNBP / pET-28b 質體:

利用 Table 1.的引子建構出 CNBP、Del、R72K、RK1、RK2 五種序列；在以 Del 和 RK1 為模板，分別以 Del 的引子和 RK1 的引子 PCR 出 Del-R72K 及 RK。

PCR 所需的材料包含 50 ng 質體 CNBP / pET-28b，125 ng primer，250 mM dNTP，2.5 U *PfuUltra*TM High-Fidelity DNA 聚合酶 (STRATAGENE®)，總體積為 50 μ L。PCR 的條件為，95 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘，變性反應 95 $^{\circ}$ C 作用 30 秒，黏合反應溫度 55 $^{\circ}$ C 作用 1 分鐘，延長反應溫度 68 $^{\circ}$ C 作用時間為 2 分鐘 / kb，總共的循環數為 16 次。PCR 完的產物以 20 U 的 *Dpn* I 37 $^{\circ}$ C 反應 20 小時，最後將製備完成的 PCR 產物轉型到勝任細胞 ECOSTM101 (*Yeastern Biotech*)，即可得到製備完成的七種 CNBP。

二、建構 yT&A-MAP_P-PRMT1 和 yT&A-MAP_P-PRMT5 質體:

精胺酸甲基轉移酶的前端需有 Methionine aminopeptidase promoter (MAP_P) 調控精胺酸甲基轉移酶在 *E.coli* 持續表現。由中研院譚明輝老師所提供的 pBS-MP 質體為模板，以 PCR 的方式 (引子如Table 2.) 取得帶有酵素切位的 MAP_P，並接入 yT&A (*Yeastern Biotech*) 載體中 (Fig. 4A, 4B)；以人類子宮頸癌細胞 HeLa 的 cDNA 為模板，PCR 的方式取得帶有酵素切位的 PRMT1 和 PRMT5，並接入 yT&A 載體中 (Fig. 4C, 4D)。接著將 PRMT1 和 PRMT5 以不同的酵素接入 MAP_P / yT&A 中 MAP_P 序列的後方，產生 yT&A-MAP_P-PRMT1 和 yT&A-MAP_P-PRMT5 (Fig. 4E, 4F)。

三、建構共同表現的 PRMT1 / CNBP 和 PRMT5 / CNBP 質體:

將 yT&A-MAP_P-PRMT1 和 yT&A-MAP_P-PRMT5 質體，以限制酶 *Sal* I 及 *Xho* I 把含有 MAP_P 的 PRMT1 或 PRMT5 基因接入 CNBP / pET-28b 質體中，即可得到 pET-CNBP-MAP_P-PRMT1 和 pET-CNBP-MAP_P-PRMT5 質體 (Fig. 5)。

四、His₆-tag CNBP 重組蛋白表現:

分別將帶有載體 yT&A-MAP_P-PRMT1 和 CNBP / pET-28b 或 yT&A-MAP_P-PRMT5 和 CNBP / pET-28b 的大腸桿菌，各別接種於含有 25 µg/ml Kanamycin 和 50 µg/ml Ampicillin 抗生素 4 ml Luria-Bertani 培養液 (LB ; Kan medium) 中，於 37 °C 培養箱中以 200 rpm 搖晃培養過夜，再將此 500 µl 菌液加入含有 25 µg/ml Kanamycin 和 50 µg/ml Ampicillin 的 50 ml 培養液 (菌液：培養液體積比 = 1 : 100) 中以 37 °C 200 rpm 培養，直到菌液生長濃度達到 OD_{600 nm} 約 0.6~0.7 之間時加入 1 mM IPTG 誘導蛋白的表現，接著放回培養箱中搖晃，2.5 小時後取出菌液，並以 7000 g (Histachi CR21)，4 °C 環境下，離心 10 分鐘，去除上清液，留下菌體。菌體以同體積的 PBS (phosphate-buffered saline : 10 mM、1.8 mM monobasic potassium phosphate、140 mM NaCl、2.7 mM KCl pH 7.4)，以洗去殘留的培養液，以相同的條件離心一次。再將菌體重新懸浮於 10 ml 的緩衝溶液 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.5) 中。

五、純化His₆-CNBP融合蛋白:

菌體懸浮於 10 ml 的緩衝溶液 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 7.5) 中，用超音波震盪器 (SONICS Uibra cell™) 震盪，其設定為：ON 20 秒、OFF 30 秒，總處理時間為 3 分鐘，強度 30 %，以打破菌體。觀察菌體被打破的程度，可視情況再進行一次超音波震盪。最後在 4 °C 環境下以 12000 rpm 離心 20 分鐘 (Beckman AVANTI30,USA)，回收上清液和沉澱物且利用 10 ml 的緩衝溶液 A (8 M Urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) 回溶沉澱物，各取 15 µl 上清液與液狀沉澱物做 SDS-PAGE 分析，確認蛋白表現在沉澱物，利用不同濃度的 pH 值純化沉澱物中 CNBP 蛋白。

Ni-NTA 樹脂 (Qiagen) 在使用前先搖勻，再將樹脂填充於垂直管柱 (Bio-Rad, Hercules, CA) 中，待樹脂沉降且累積高度至 1 cm 高，打開管柱下蓋將廢液進行滴漏除去並避免樹脂間的空隙產生氣泡，再滴漏上清液，依序以緩衝溶液 B-D (B：8 M Urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, 0.01 M 2-mercaptoethanol, 10 % glycerol, pH 7.5；C：8 M Urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, 0.01 M 2-mercaptoethanol, 10 % glycerol, pH 6.4；D：8 M Urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, 0.01 M 2-mercaptoethanol, 10 % glycerol, pH 5.9) 注入管柱，使 His₆-tag 融合蛋白與樹脂上的 Ni-NTA 結合且進行滴漏以收取管柱的上清液，再以 10 ml 緩衝溶液 E (8 M Urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, 0.01 M 2-mercaptoethanol, 10 % glycerol, pH 4.5) 析出 His₆-CNBP 融合蛋白，一次以 1 ml 收取一管，完成純化。

結果

先前實驗室之李宜蓁學姐已將 MAP_p 成功的接入 yT&A 載體上，定序後正確無誤。後續我將已建構好的 PRMT1 接到 yT&A-MAP_p 載體上，經由定序結果確定 PRMT1 序列正確無誤，但 MAP_p 在 TATA Box (一般正常序列 TATAA) 的序列卻產生點突變，由 TATAA 變成 TATAT；另外建構 yT&A-MAP_p-PRMT5 質體的部份，實驗進行到以不同引子 PCR 取得帶有切位的 PRMT5，再以為切點接入 yT&A 載體中，經由定序結果顯示該片段易突變或刪除，所以後續實驗中沒有 PRMT5 進一步的載體建構。

為確定 MAP_p 點突變的 yT&A-MAP_p-PRMT1 質體能持續表現 PRMT1，進一步以含有 50 µg/ml Ampicillin 抗生素 100 ml Luria-Bertani 培養液 37 °C 培養 12 到 16 小時，再以超音波震盪器震破菌體後離心取得蛋白，藉由 PRMT1 抗體 (Abcam ; Lot # DAM1661075) 以西方點墨法分析帶有 yT&A-MAP_p 和 yT&A-MAP_p-PRMT1 質體的菌液 (Fig. 6A)，發現只有在含 yT&A-MAP_p-PRMT1 質體的菌液有 PRMT1 表現。

ASYM24 (Minipore ; Lot # 634995) 此抗體可辨識單甲基化及不對稱型雙甲基化在精胺酸，用以檢測產生之 PRMT1 是否有功能，可將 *E. coli* 中原先不會被甲基化修飾之蛋白甲基化，由西方點墨法分析 (Fig. 6B)，結果可發現相較 yT&A-MAP_p 質體的菌液，yT&A-MAP_p-PRMT1 質體的菌液有許多不對稱型甲基化修飾的蛋白產生，推論此修飾可能由外送入的 PRMT1 所催化，所以 yT&A-MAP_p-PRMT1 質體所表現的 PRMT1 為有功能性的蛋白。

本計畫原先預定在大腸菌中大量表現的酵素 / 受質模式: pET-CNBP-MAP_P-PRMT1, 但多次實驗結果顯示 yT&A-MAP_P-PRMT1 送入 CNBP / pET-28b 不容易, 所以改變實驗方法以 20 ng yT&A-MAP_P-PRMT1 和 CNBP / pET-28b, 以共同轉型的方式送入勝任細胞 ECOSTM21 (*Yeastern Biotech*) 中 (Fig. 7), 即可得到共同表現酵素 / 受質模式的大腸桿菌。利用含有 25 µg/ml Kanamycin 和 50 µg/ml Ampicillin 兩種抗生素 Luria-Bertani 培養液 37 °C 培養, 再將 500 µl 菌液置入含有相同濃度抗生素 50 ml Luria-Bertani 培養液, 以 IPTG 誘導, 過程中 PRMT1 藉由 MAP promoter 調控持續表現, 甲基化受質 CNBP 在 37 °C 2.5 小時條件下誘導表現 (Fig. 8A)。為取得 His₆-tag CNBP, 以緩衝溶液溶解離心下來的沉澱物, 再以超音波震盪離心取得上清液和沉澱物, 緩衝溶液 A 溶解沉澱物後經 Coomassie Blue 染色分析 (Fig. 8B), 發現 His₆-tag CNBP 大多在沉澱物中, 所以用 Ni-NTA 樹脂吸附 CNBP, 通透不同 pH 值緩衝溶液 B-D 去除殘留的雜蛋白, 再藉由緩衝溶液 E 洗下結合在樹脂上的 CNBP, 由 Coomassie Blue 染色分析 (Fig. 8C), 確實得到純化 His₆-tag CNBP 蛋白。

在大腸桿菌中, 甲基轉移酶 MT (*S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferase) 藉由甲基提供者 Ado-Met (*S*-adenosylmethionine) 將受質甲基化, 本實驗利用同一顆大腸桿菌中同時表達 yT&A-MAP_P-PRMT1 和 CNBP / pET-28b, 經由純化得到含精胺酸甲基化的 CNBP, 由西方點墨法分析 (Fig. 9), 結果可發現 CNBP 確實有被甲基化的現象。

討論

三十年前 PRMT 已被發現，在蛋白質的轉譯後修飾作用中扮演重要的角色，然而其功能影響卻在近年來才有相關文獻，PRMT 的受質很多，其中 CNBP 為 PRMT 重要的受質之一，McGrath CF 等人的研究指出 CNBP 的 CCHC zinc finger 可取代 HIV-1 核外套模蛋白的 zinc knuckles，而不影響其功能 (17)，顯示這兩者在蛋白結構上有高度的保留性，可能可藉由甲基化作用影響 HIV-1 的感染能力；另外 Chen W 等人的研究發現在第二型肌肉萎縮症 (DM2) 的病人，其 CNBP 第一個 CCHC zinc finger 到第二個 CCHC zinc finger 間有 CCTG 大量重複的序列 (18)，且在 CNBP^{+/-} 的老鼠有第二型肌肉萎縮症現象 (19)，故 CNBP 在第二型肌肉萎縮症的病人扮演一重要的角色，且 CNBP 胺基酸第 25 到 35 及胺基酸第 72 到 74 被推測可能為甲基化作用的位置，為了進一步研究 CNBP 被甲基化與否產生的功能影響，我們預定建構 CNBP / PRMT1 和 CNBP / PRMT5 質體製備甲基化 CNBP 蛋白。

精胺酸甲基轉移酶只作用在真核生物體中，限制於成本及實驗上的難度，本計劃將 PRMT 及其受質轉移到原核生物 *E. coli* 表現。實驗中分別建構 CNBP 各突變的質體已於實驗室李宜蓁學姊協助設計及操作下完成。將七種 CNBP: CNBP、Del、R72K、Del-R72K、RK1、RK2、RK，和 PRMT1 或 PRMT5 送入大腸桿菌 ECOSTM21 中持續表現，期待可以大量得到在特定精胺酸帶有甲基及沒有甲基的 CNBP 蛋白，以利於後續有關於此蛋白質精胺酸甲基化功能的分析。為了取得能夠持續表現精胺酸甲基轉移酶，把 PRMT1 或 PRMT5 接於 yT&A-MAP_p 的

質體，然而 PRMT5 的部分因為定序結果經常出現突變或刪除所以沒有進一步的實驗操作。以 PRMT1 抗體做西方點墨法分析 (Fig. 6A)，確實 yT&A-MAP_p-PRMT1 質體可持續表現出 PRMT1，再以 ASYM24 可辨識單甲基化及不對稱型雙甲基化，用以檢測產生之 PRMT1 是否有功能，分析帶有 yT&A-MAP_p 和 yT&A-MAP_p-PRMT1 質體的菌液，結果顯示 PRMT1 具有甲基化的功能，而 yT&A-MAP_p 的結果顯示很多訊號產生，推論可能原因為過多的蛋白量造成非專一性辨識，亦有可能是因為 ASYM24 抗體為兔子的多株抗體，所辨識到的訊號為血清中的其他抗體辨識到的細菌蛋白 (Fig. 6B)。

為建構 pET-CNBP-MAP_p-PRMT1 得到甲基化的 CNBP，多次嘗試不同核苷酸接合作用的比例 insert (MAP_p-PRMT1) : vector (pET-CNBP) = 6:1、5:1、2:1 和 1:1，以及測試去磷酸化反應再進行 ligation 仍然無法成功，所以改變實驗方法把成功建構且持續表達 PRMT1 的質體和全長的 CNBP 質體共同送入大腸桿菌 BL21 (DE3) 中，以 Coomassie Blue 染色分析 (Fig. 8A-C)，顯示 His₆-tag CNBP 蛋白在 1 mM IPTG 37 °C 條件下即可誘導表現及純化，再利用 ASYM24 抗體做西方點墨法分析 (Fig. 9)，確定 His₆-tag CNBP 蛋白能夠藉由大腸桿菌中的甲基提供者 SAM 及持續表現的 PRMT1，將其特定的精胺酸作甲基化作用，未來可藉由大量純化甲基化 His₆-tag CNBP 蛋白，進一步以 Mass 分析推估其甲基化作用在哪些精胺酸上，再利用甲基化作用於不同的突變點 CNBP 確定甲基化的位置，由結論可分析甲基化作用對 CNBP 所造成的功能影響。

參考文獻

1. Lee YH, Stallcup MR. (2009). Minireview: protein arginine methylation of nonhistone proteins in transcriptional regulation. *Mol Endocrinol.* 23 ; 425-433.
2. Abramovich, C., Yakoboson, B., Chebath, J., and Revel, M. (1997). A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor. *The EMBO journal.* 16 ; 260-266.
3. Tang, J., Gary, J. D., Clarke, S., and Herschman, H. R. (1998). PRMT3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *The Journal of biological chemistry.* 273 ; 16,935-16,945.
4. Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Asward, D. W., and Stallcup, M. R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science (New York, N.Y).* 284 ; 2,174-2,177.
5. Frankel, A., Yadav, N., Lee, J., Branscombe, T. L., Clarke, S., and Bedford, M. T. (2002). The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *The Journal of biological chemistry.* 277 ; 3,537-3,543.
6. Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J., Clarke, S., and Bedford, M. T. (2005). PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *The Journal of biological chemistry.* 280 ; 32,890-32,896.
7. Niu L., Lu F., Pei Y., Liu C., Cao X. (2007). Regulation of flowering time by the protein arginine methyltransferase AtPRMT10. *The EMBO journal.* 8 ; 1,190–1,195.
8. Scebba F., De Bastiani M., Bernacchia G., Andreucci A., Galli A., Pitto L. (2007) PRMT11: a new Arabidopsis MBD7 protein partner with arginine methyltransferase activity. *The Plant journal.* 52 ; 210-222.
9. Rho, J., Choi, S., Seong, Y. R., Cho, W. K., Kim, S.H., and Im, D. S. (2001). Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family. *The Journal of biological chemistry.* 276 ; 11,393-11,401.
10. Miranda, T. B., Miranda, M., Frankel, A., and Clarke, S. (2004). PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity. *The Journal of biological chemistry.* 279 ;

22,902-22,907.

11. Cook, J. R., Lee, J. H., Yang, Z. H., Krauae, C.D., Herth, N., Hoffmann, R., and Pestka, S. (2006). FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochemical and biophysical research communications*. 342 ; 472-481.
12. Scott, H. S., Antonarakis, S. E., Lalioti, M. D., Rossier, C., Silver, P. A., and Henry, M. F. (1998). Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2). *Genomics*. 48 ; 330-340.
13. Flink, I. L., Blitz, I. and Morkin, E. (1998). Characterization of cellular nucleic acid binding protein from *Xenopus laevis*: expression in all three germ layers during early development. *Dev. Dyn.* 211 ; 123-130.
14. Van Heumen, W. R., Claxton, C. and Pickles, J. O. (1997). Sequence and tissue distribution of chicken cellular nucleic acid binding protein cDNA. *Mol. Biol.* 118 ; 659-665.
15. Covey, S. N. (1986). Amino acid sequence homology in gag region of reverse transcribing elements and the coat protein gene of cauliflower mosaic virus. *Nucl. Acids Res.* 14 ; 623-633.
16. Hsieh C. H., Huang S. Y., Wu Y. C., Liu L. F., Han C. C., Liu Y. C., Tam M. F. (2006). Expression of proteins with dimethylarginines in *Escherichia coli* for protein-protein interaction studies. *Protein Science*. 16 ; 919-928.
17. McGrath CF, Buckman JS, Gagliardi TD, Bosche WJ, Coren LV, Gorelick RJ. (2003). Human cellular nucleic acid-binding protein Zn²⁺ fingers support replication of human immunodeficiency virus type 1 when they are substituted in the nucleocapsid protein. *J Virol* 77:8,524-8,531.
18. L.P. Ranum, P.F. Rasmussen and K.A. Benzow. (1998) Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus, *Nature Genetics* 19 ; 196-198.
19. Chen W, Wang Y, Abe Y, Cheney L, Udd B, Li YP. (2007). Haploinsufficiency for Znf9 in Znf9^{+/-} mice is associated with multiorgan abnormalities resembling myotonic dystrophy. *Journal of molecular biological*. 368:8-17.

圖表

Table 1. Cloning CNBP 用到的primer:

Primer		Sequence
CNBP	Foreword	5'-ggatcccatgagcagcaatgagt-3'
	Reverse 1	5'-gtcgacttaggctgtagcctca-3'
	Reverse 2	5'-gtttaacatgttctgtccatcagcg-3'
Del	Foreword	5'- ctactggtggaggcttccagttgtttcc-3'
	Reverse	5'- gaaacaaactggaagcctccaccagtagg-3'
R72K	Foreword	5'-gctataactgcggtaaaggtggccacattgcc-3'
	Reverse	5'-ggcaatgtggccaccttaccgcagttatagc-3'
RK1	Foreword	5'-cctactggtggaggcaagggaagggaatgagaagccgtgg-3'
	Reverse	5'-ccacggcttctcattcccttacccttgcctccaccagtagg-3'
RK2	Foreword	5'-ggtaagggaatgaaaagcaagggaagggttccagttgtttcc-3'
	Reverse	5'-ggaaacaaactggaaccttgccttgccttgccttccctacc-3'

Table 2. Cloning 用到的primer:

Primer		Sequence
MAP _p	Foreword	5'-tctagatgtgatataccattgacggc-3'
	Reverse	5'-cggccgatgttctgtccatcag-3'
PRMT1	Foreword	5'-gtttaacatggcggcagccgag-3'
	Reverse	5'-ctcgagttagcgcacccggtag-3'
PRMT5	Foreword	5'-cggccgagaaagatggcggcgat-3'
	Reverse	5'-ctcgagttagatgatgacggcc-3'

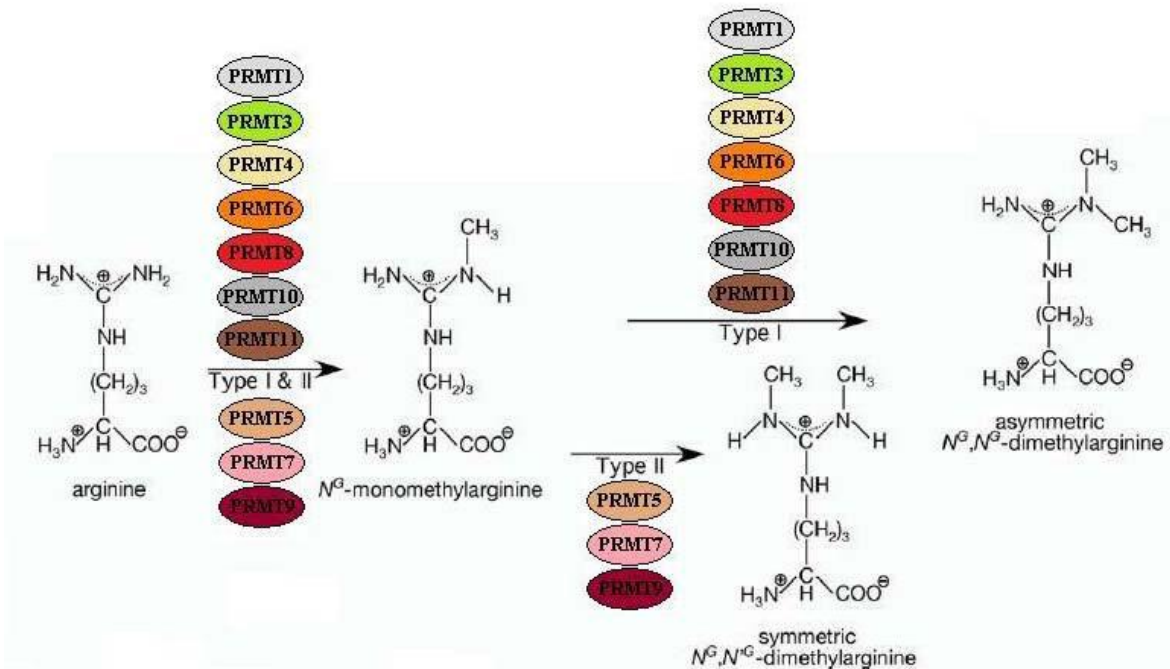


Figure 1. 蛋白質精胺酸甲基化作用和 PRMT 家族:

PRMT 家族分成第一型和第二型，精胺酸經由第一型 PRMT 催化產生 ω -monomethylarginine (MMA) 和不對稱型雙甲基化 (ω -asymmetric NG, NG-dimethylarginine (aDMA))；第二型甲基轉移酶催化產生對稱型雙甲基化 (ω -symmetric NG, NG-dimethylarginine (sDMA))。

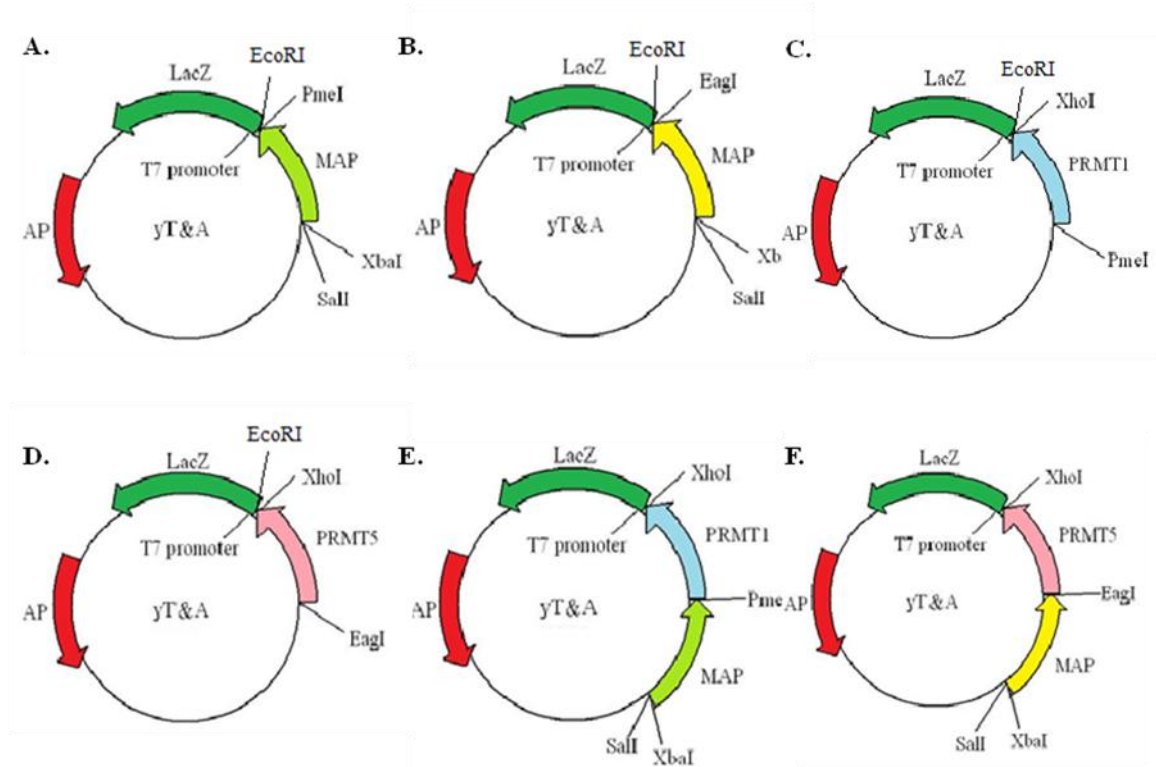


Figure 4. 以 yT&A 為載體建構 PRMT1 和 PRMT5:

(A) MAPp 3'設計為切點 *Pme* I。 (B) MAPp 3'設計為切點 *Eag* I。 (C) PRMT1 5'設計為切點 *Pme* I, 3' 設計為切點 *Xho* I。 (D) PRMT5 5'設計為切點 *Eag* I, 3' 設計為切點 *Xho* I。 (E) yT&A-MAPp-PRMT1。 (F) yT&A-MAPp-PRMT5。

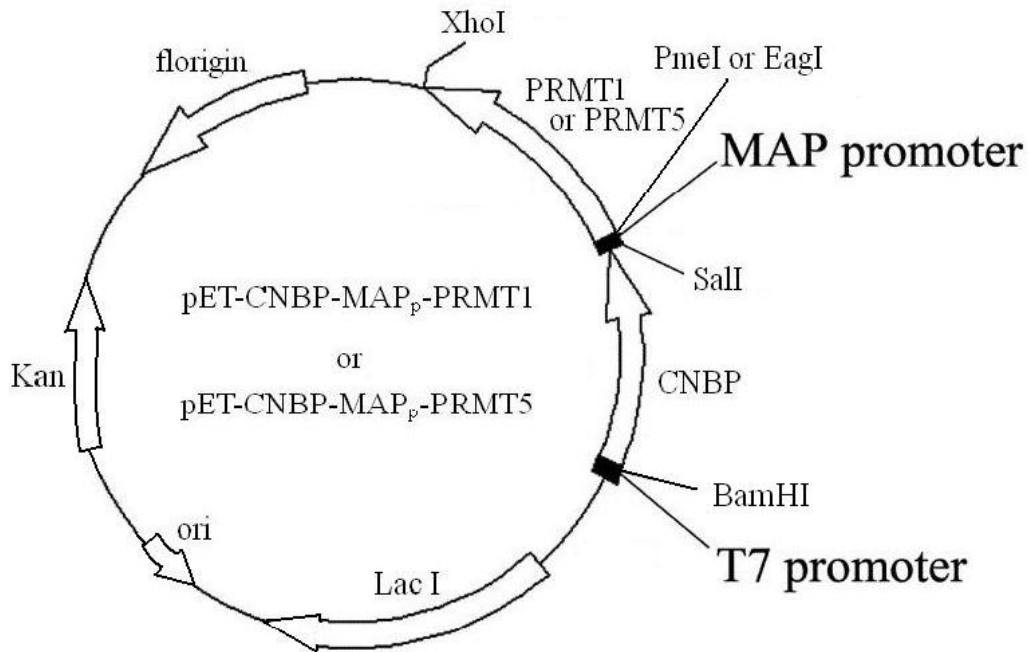


Figure 5. PRMT1 / CNBP 和 PRMT5 / CNBP 兩大系統的建立:

MAP_p 調控 PRMT 在 pET-28b 中持續表現，CNBP 以 T7 promoter 誘導表現，在這兩個條件下建立 PRMT1 / CNBP 和 PRMT5 / CNBP 系統。

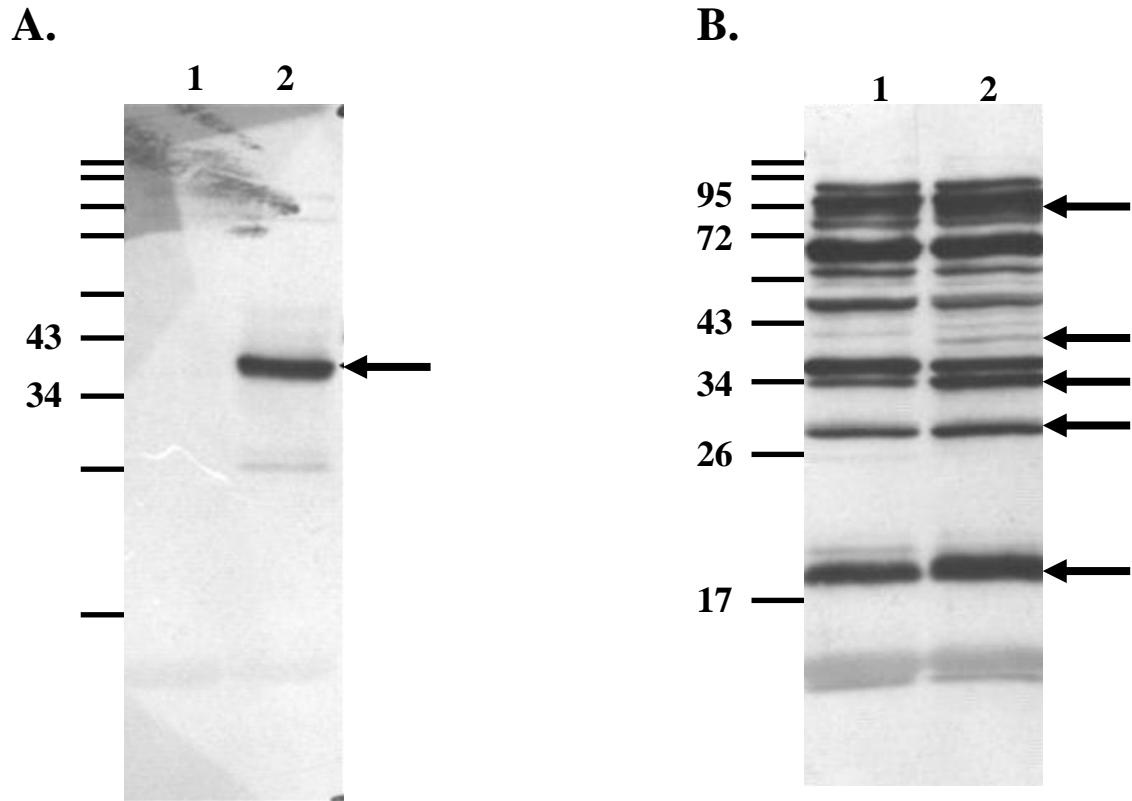


Figure 6. 分析 yT&A-MAP_P 和 yT&A-MAP_P-PRMT1 質體之 PRMT1 表現與不對稱型雙甲基化修飾蛋白表現:

(A) 利用濃度稀釋 1000 倍的 PRMT1 抗體和 (B) 利用濃度稀釋 1000 倍的 ASYM24 抗體，以西方點墨法分析不同檢體。(1: yT&A-MAP_P 質體的菌液；2: yT&A-MAP_P-PRMT1 質體的菌液) (A 圖箭頭: 40 kDa PRMT1)。(B 圖箭頭: 不對稱型甲基化修飾之蛋白)。

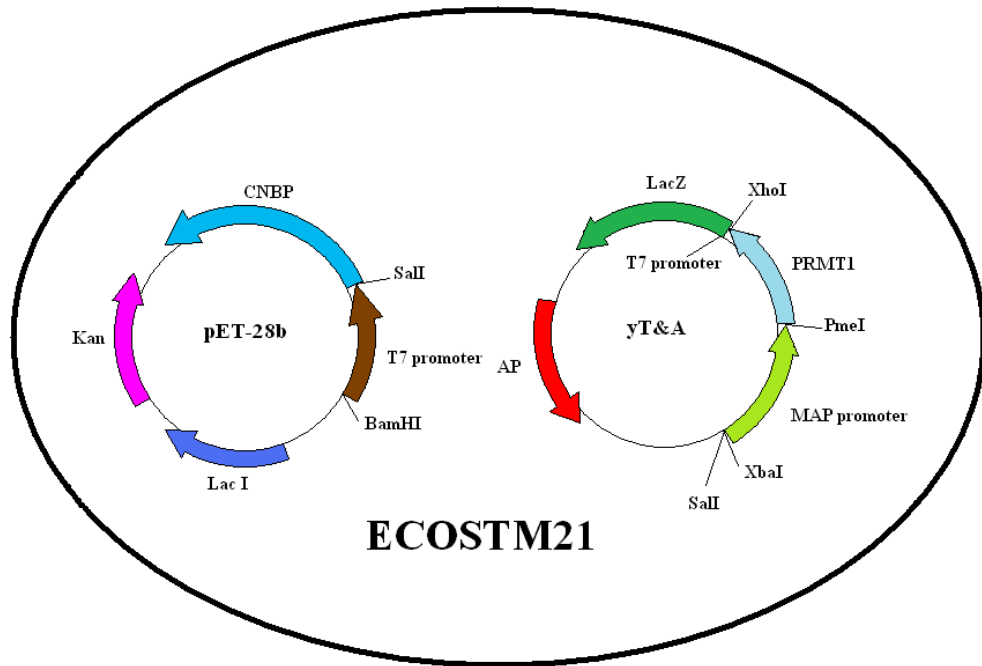


Figure 7. PRMT1 / CNBP 系統的建立:

MAP_p 調控 PRMT 在 yT&A 中持續表現，CNBP 以 T7 promoter 誘導表現，在這兩個條件下建立 PRMT1 / CNBP 系統。

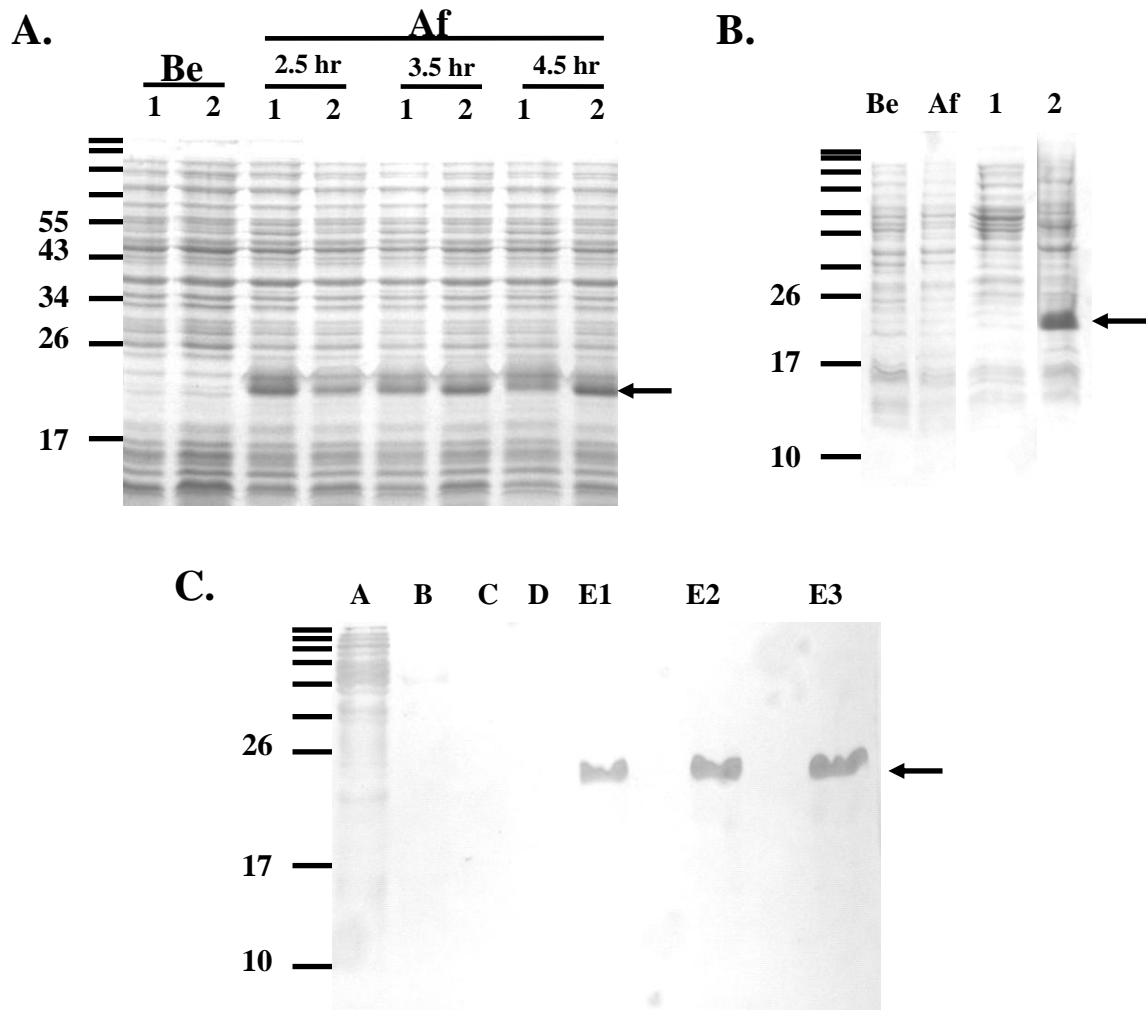
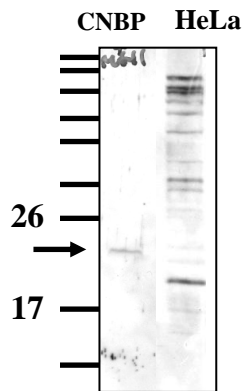


Figure 8. 誘導 CNBP 表現及純化:

(A) 以 1 mM IPTG 分別在 25 °C (1) 和 37 °C (2) 測試 CNBP 蛋白表現的條件 (Be: 未加 IPTG ; Af: IPTG 誘導後)。(B) CNBP 蛋白表現在沉澱物中 (1: 上清液 ; 2: 沉澱物)。(C) 緩衝溶液 A-E 通透 Ni-NTA 樹脂後的溶液 (A-D: 緩衝溶液 A-D ; E1-E3: 緩衝溶液 E 通透樹脂後 1-3 管)。(箭頭: 22 kDa CNBP 蛋白)。

A.



B.

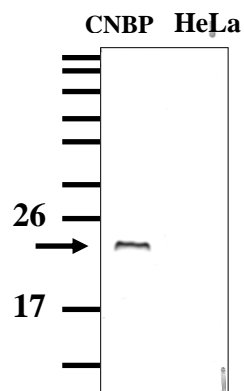


Figure 9. 分析純化的不對稱型甲基化修飾CNBP蛋白質：

(A) 利用濃度稀釋 1000 倍的 ASYM24 抗體和 (B) 濃度稀釋 500 倍的 CNBP 抗體以西方點墨法分析 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 CNBP 蛋白和 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ HeLa 細胞萃取液。