

R
008.8
4613

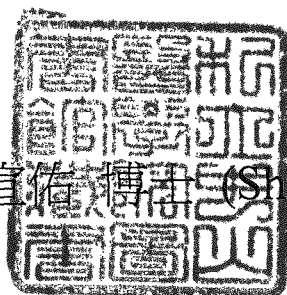
中山醫學院醫學研究所

碩士論文

易脆 X 染色體症候群蛋白質功能與結構之研究

(Study of functional-structural relationship of FMRP)

指導教授：李宜侑 博士 (Shuan-Yow Li, Ph. D)



研究生：楊建洲 (Jiann-Jou Yang)

中華民國八十六年六月

June, 1997

參考書恕不外借

中山醫學院圖書館



C046074

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 醫學研究所
_____ 組 85 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱: 易脆 X 染色體症候群蛋白質功能與結構之研究

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限時間與地域，惟每人以一份為限。

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。

指導教授姓名: 李宣佑

研究生簽名: 楊建洲 學號: R84120
(親筆正楷)

日期: 民國 86 年 6 月 19 日

- 備註: 1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在三種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予 UMI 公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金 45 元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入 10% 的權利金約美金 20 元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣 500 元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第 5 項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片整合計畫的宏觀效益：
在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。
5. 本案聯絡電話: (02)7377746 江守田、王淑貞
地址: 台北市和平東路二段 106 號 17 樓 1702 室

研究生姓名: 楊建洲 聯絡電話: (04) 8870568

地址: 彰化縣北斗鎮公所街 52 號

本論文為中山醫學院授予以理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

中央研究院分子生物研究所研究員

鍾邦柱 博士

鍾邦柱

中山醫學院醫學研究所副教授

李娟 博士

李娟

中山醫學院醫學研究所教授

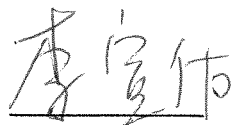
李宣佑 博士

(論文指導教授)

李宣佑

中華民國八十六年五月

學生楊建洲論文題目為易脆 X 染色體症候群蛋白質功能與結構之研究，其論文已經中山醫學院醫學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：李宣佑 博士 簽名：

中華民國八十六年六月

誌 謝

光陰似箭兩年的研究生活將在這本碩士論文完成後劃下句點，但我相信這不是一個結束而是一個開始，在這兩年裡不管在學業上或生活上都受到許多人的關懷與鼓勵，在此滿懷感激的心致上十二萬分的謝意。

記得兩年前剛從獸醫學系畢業，一心想讀研究所的我在一個偶然的機會裡考上中山醫學院醫學研究所，並且受到我的指導教授李宣佑教授的青睞讓我進入細胞及分子遺傳研究室當兩年的研究生，讓我從一個完全不懂分生到現在完成了這本碩士論文，實在很感謝我的指導教授李宣佑教授給予我很大的空間、充裕的經費支援及精神上的鼓舞讓我可以成長如此的快速。此外極為感謝中研院分生所鍾邦柱教授與本校醫研所李娟副教授在百忙之中對本論文的審閱與提出建議使本論文更趨完美。另外還要感謝在我剛進中山醫學院教導我實驗技術的陳凌雲教授和劉德中副教授，特別要感謝陪伴我兩年不管在實驗上或生活上的良師或益友王怡鈞老師。再則要感謝陳凌雲教授、張德卿教授、李娟副教授、李天翎副教授和謝明麗副教授在實驗設備和藥品的支援。感謝蕭光明副教授對於本論文的指點。謝謝蔡姐、謝姊、淑卿姊、月君老師、蓉錦老師、細胞及分子遺傳室全體同仁、貴重儀器室的全體同仁給予的鼓勵和幫助。另外謝謝我的好友孟訓及我的同學們翠蓮、千瑩、麗霜、玫伶、瓊慧、嘉仁學弟、秀美學妹在實驗和生活上的相互支持與照顧。說不盡的謝意，道不盡的感激，謹對所有幫助過我的人說聲"謝謝你(妳)們"。

最重要的是要感謝我父母親讓我無後顧之憂順利完成學業，還要

感謝我的四姐夫提攜我進入這領域，還要感謝我的家人及女友景虹給我鼓勵、為我加油打氣。最後謹將本論文獻給我的父母親、家人、女友及所有關心和鼓勵過我的人。

楊建洲 謹誌於
中山醫學院醫學研究所
中華民國八十六年六月

目 錄

第一章 文獻回顧(Review).....	1
圖例.....	6
第二章 各段 FMRP 蛋白及抗體的製備 (Expression of FMRP and antibody preparation).....	9
第一節 中文摘要.....	10
第二節 英文摘要(Abstract).....	11
第三節 序論(Introduction).....	12
第四節 方法(Methods).....	15
第五節 結果(Results).....	28
第六節 討論(Discussion).....	36
圖例.....	41
第三章 FMR-1 蛋白(FMRP)功能與結構之研究 (Study of functional-structural relationship of FMRP).....	70
第一節 中文摘要.....	71
第二節 英文摘要(Abstract).....	72
第三節 序論(Introduction).....	73
第四節 方法(Methods).....	75
第五節 結果(Results).....	83
第六節 討論(Discussion).....	89
圖例.....	93
第四章 總結(Conclusion).....	108
第五章 參考文獻(References).....	111
第六章 附錄(Appendixes).....	121
附錄一 實驗步驟(Procedures).....	122
附錄二 實驗材料(Materials).....	131

第一章

文獻回顧

(Review)

在 1969 年 Lubs，首先在一個家族的研究中發現，在家族中患有智能障礙的男性成員，其 X 染色體的長臂末端都有一細桿的小結 (knob) 出現，Lubs 將此種 X 染色體稱為 "A marker X chromosome" [Lubs, 1969]，但是當時這個理論並沒有引起大家的注意。直到 1977 年 Harvey 等人的報告才進一步的證實 Lubs 的發現。此種有標記的 X 染色體就是現在所稱的 "易脆 X 染色體 (fragile X chromosome)"，其所引起的遺傳性疾病被稱為 "易脆 X 染色體症候群 (fragile X syndrome)"。此症候群在細胞遺傳學上可在 X 染色體長臂 27.3 的位置 (Xq27.3)，利用低葉酸含量的培養液誘發出葉酸敏感的易脆位置 (Folate-sensitive fragile site) [Brown, et al., 1990; Sutherland, et al., 1977]。(附圖 1-1) 此種遺傳性疾病在臨床上的表徵包括：1. 輕度到重度的智能障礙 (IQ 平均在 20~60)；2. 男性在青春期末具有大的睪丸；3. 臉部伸長並且上顎凸出；4. 大且外翻的耳朵；5. 語言方面的障礙；6. 過動的行為 [Hagerman, et al., 1991]。

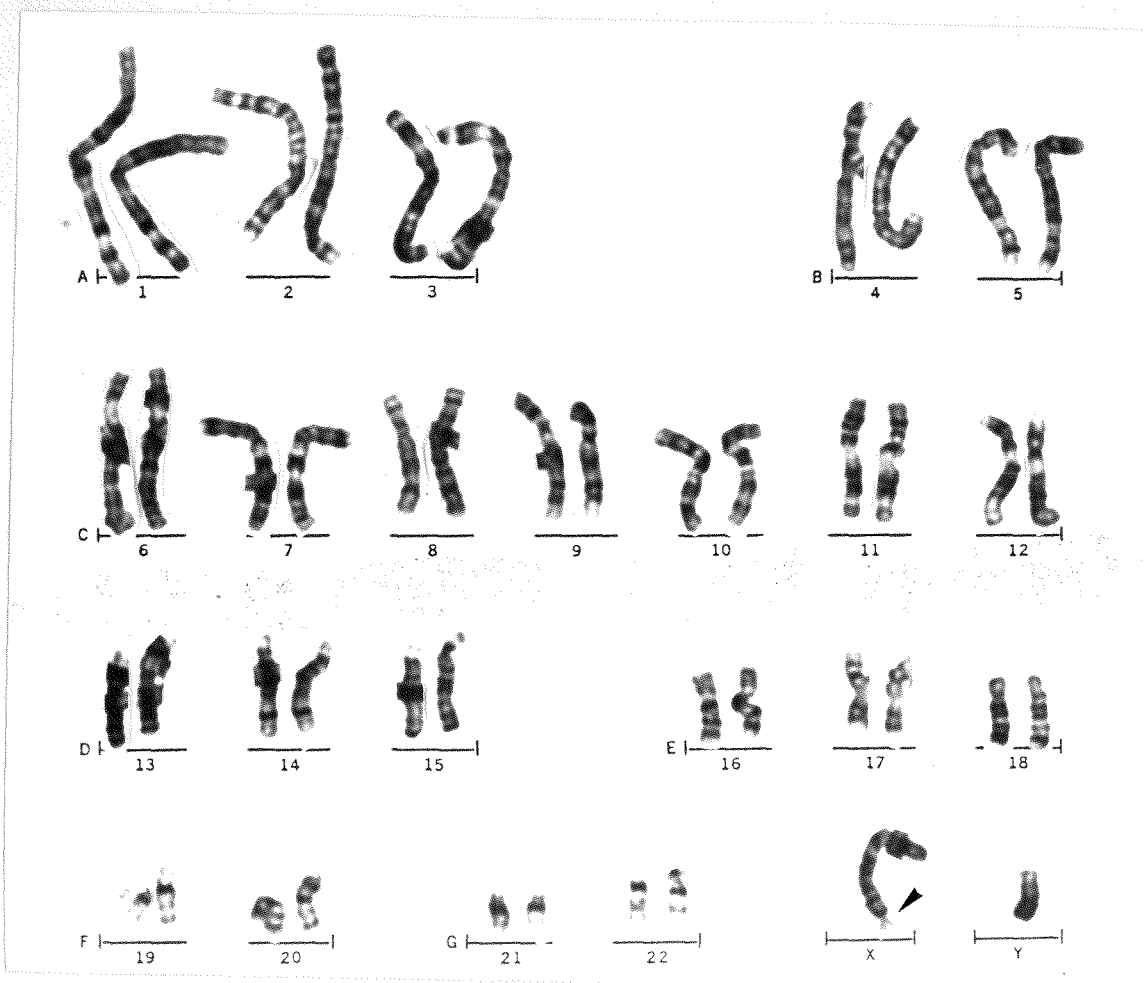
易脆 X 染色體症候群是最常見的遺傳性智能障礙性疾病，其發生的頻率僅次於唐氏症 (Down syndrome) [Gustavson et al., 1986; Webb et al., 1986; Li et al., 1988; Brown et al., 1990]。易脆 X 染色體症候群發生的比例在男性族群中大約 1250 分之 1，在女性族群中大約 2500 分之 1 [Sutherland et al., 1986; Nussbaum and Ledbetter, 1986; Richards and Sutherland, 1992]。但是唐氏症多為偶發性 (sporadic)，而易脆 X 染色體症候群是一種家族性遺傳的疾病，因此本症候群要比唐氏症來的重要。

隨著分子生物學技術的進步，從 1991 年開始接連有幾個實驗室宣佈選殖到一個和易脆 X 染色體症候群有關的基因——Fragile X

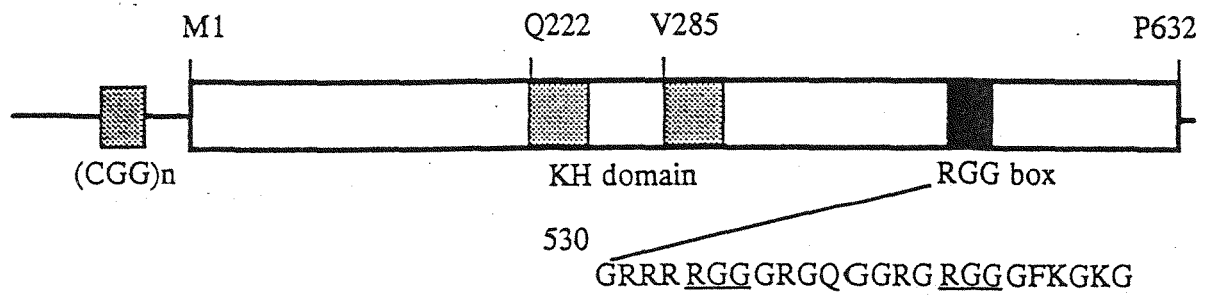
Mental Retardation-1 (*FMR-1*) gene [Heitz et al., 1991; Kremer et al., 1991, Oberle et al., 1991; Verkerk et al., 1991]。從此對於易脆 X 染色體症候群的診斷由細胞遺傳的方法進入了 DNA 分析的診斷技術。進一步的研究顯示，*FMR-1* 基因延伸 38 kb，含有 17 個 exons，且從這基因的第 10 個 exon 開始有改變接合 exon (alternative splicing) 的現象發生(附圖 1-2)，因此此基因所表現出來的蛋白質(FMRP)最大含有 631 個氨基酸，而最小含有 436 個氨基酸[Eichler et al., 1993; Verkerk et al., 1993; Devys, et al., 1993]。目前所知造成易脆 X 染色體症候群的大多數原因都是位於 *FMR-1* 基因 5'端不轉譯區(5' untranslated region, 5' UTR)內的 CGG trinucleotide tandem repeat [p(CGG)n]發生倍增突變(expansion mutation)，使得在 *FMR-1* 基因轉錄起點上游的 CpG island 發生超甲基化(hypermethylation)，因而導致 *FMR-1* 基因無法表現而造成疾病的發生[Bell et al., 1991; Pieretti et al., 1991; Sutcliffe et al., 1992]。這 CGG 的重複次數在正常人是一種多形性(polymorphic)的存在，一般正常的族群 CGG 的重複次數在 6~54 次，平均大約 30 次重複[Fu et al., 1991; Verkerk et al., 1991]。在帶因者(carriers)，或稱為 "premutation" 的族群中，這 CGG 重複的次數介於 52~200 次的重複，但是在發病的病人(full mutation)其 CGG 的重複次數超過 200 次 [Oberle et al., 1991; Kremer et al., 1991; Rousseau et al., 1991; Fu et al., 1991]。另外還有少數造成此疾病的原因，如基因的缺失(deletion)[Gedeon et al., 1992; Wohrle et al., 1992; Mornet et al., 1993;; Tarleton et al., 1993; Meijer et al., 1994; Mannermaa et al., 1996]和點突變(point mutation)[Boulle et al., 1993; Wang et al., 1997]，這些突變的原因不是使得 *FMR-1* 基因無法表現，不然就是使得 *FMR-1* 基因表現出

來的蛋白失去了正常的功能，因此造成易脆 X 染色體症候群的發生。*FMR-1* 基因所轉錄和轉譯出來的蛋白被稱為 FMRP，FMRP 在結構上含有兩個 KH domain (KH₁ 和 KH₂)及一個 RGG box (附圖 1-3)，此種蛋白質為一 RNA 結合蛋白(RNA binding protein) [Ashley et al., 1993; Gibson et al., 1993; Siomi et al., 1993 and 1994]。FMRP 是一種廣泛表現在各種組織的蛋白，尤其在睪丸和腦組織中的表現量最高，在腦組織中，主要位於海馬角(hippocampus)和大腦皮質的灰質區(gray matter of the cortex)的神經元(neuron) [Hinds, et al., 1993; Abitbol, et al., 1993; Verheij et al. 1995]。而且也發現 FMRP 在細胞內的位置主要位於細胞質 [Devys, et al., 1993; Verheij, et al., 1993]。到 1996 年多位學者的研究證實 FMRP 可以經由 RNA 和 ribosomes 60s subunit 結合 [Khandjian, et al., 1996; Tamanini, et al., 1996]，而且會和 ribosomes 一起附著到內質網(endoplasmic reticulum) [Willemsen et al., 1996; Feng et al., 1997]，同時有研究者發現 FMRP 含有 nuclear localiztion signal (NLS)和 nuclear export signal (NES)兩個區域[Eberhart, et al., 1996; Fridell, et al., 1996; Sittler et al., 1996]，並且在核內 FMRP 可和核仁的顆粒成份連結在一起 [Willemsen et al., 1996]。另外，有兩個和 *FMR-1* 基因高度相似性的基因已經被證實---*FXR-1* 和 *FXR-2*---[Siomi et al., 1995; Zhang et al., 1995]，且這兩個基因所表現出來的蛋白已經被證實和 FMRP 之間有交互作用，且其在細胞內的位置也是位於細胞質 [Zhang et al., 1995]。稍後進一步的證明 FMRP 和 FXR 蛋白可一起和 ribosome 60s subunits 結合[Siomi et al., 1996]，由以上的結果顯示到目前為止 FMRP 可能的生理功能與 ribosome 的功能有關，包括轉譯的調控(translational regulation)和 mRNA 的穩定(mRNA stability)；另外

也可能控制著 posttranscription processing、transportation 和 mRNAs 的位置(localization)。



附圖 1-1 帶有易脆 X 染色體的男性染色體核型圖(Karyotype of a male with fragile X chromosome)。在 X 染色體上箭頭所指的部位是一個 fragile site。



附圖 1-3 *FMR-1* cDNA 和 protein (FMRP) 的結構圖

在最左邊灰色的 box 所指的是 (CGG) repeat 的區域，中間兩個灰色 box 分別是 KH₁ 和 KH₂ domain。黑色的 box 是指 RGG box 所在區域，且下方有其部份的氨基酸序列。上方的英文字母和數字所指的是氨基酸位置。

第二章

各段 FMRP 蛋白及抗體的製備

(Expression of FMRP and antibody preparation)

第一節

中文摘要

易脆 X 染色體症候群是一種很常見引起人類智能障礙的原因之一。造成易脆 X 染色體症候群的主要原因是由於 *FMR-1* 基因不表現，使得 FMRP 缺乏而產生疾病。至於 FMRP 在這疾病上所扮演的角色和致病機轉目前還不是很清楚。已知 FMRP 是一種 RNA 結合蛋白且可以和 ribosome 結合，此外也發現兩種和 FMRP 相關的蛋白，"*FXR-1*"和"*FXR-2*"所表現的蛋白，可以和 FMRP 形成複合體。為了探討 FMRP 真正生理上的功能，我們實驗室想要發展 FMRP 的抗體。

為了製造 FMRP 抗體，我們利用大腸桿菌的蛋白表現系統(pQE system)表現出三種含有不同 FMRP 區域的蛋白質(全長、N端和中段的 FMRP)，並且利用這些蛋白質製造出三種 polyclonal 抗體 (anti-E、anti-H 和 anti-M)。這三種抗體經實驗證明力價很高且具有專一性。我們也利用西方轉漬法(Western blot)和免疫沈澱-西方轉漬法(Immunoprecipitation-Western blot)兩種技術成功的偵測到 HeLa cell 中的 FMRP。由於這些蛋白表現系統、抗體和偵測技術的建立將使我們在探討 FMRP 的功能、致病機轉上和臨床上診斷易脆 X 染色體症候群更為方便。

第二節

英文摘要 (Abstract)

Fragile X syndrome is the most common form of inherited mental retardation and usually results from the absence of FMRP (*FMR-1* protein) expression. FMRP is an RNA binding protein and it have been indicated that the RNA can mediate the association of FMRP and ribosomes. Recently, it have been demonstrated that FMRP and FMRP-related proteins, *FXR-1* protein and *FXR-2* protein (FXRPs), can interact with each other to form a dimer and a trimer. As a first step to gain insight into the FMRP function and the molecular mechanism causing the fragile X syndrome, we raised antibodies again different regions of FMRP.

To make antibodies, three polypeptides covering N-terminal, middle, or full-length FMRP were expressed using an *E. coli* protein expression system (pQE system), and then injected into rabbits to induce immune reaction. Three antibodies raised against different regions of FMRP, anti-E, anti-H, and anti-M were then tested for the titer and specificity. Using HeLa cell extract in an immunoprecipitation coupled or Western blot analysis, we demonstrated that all of these antibodies are very efficient in precipiting down and recognizing FMRP.

Hopefully, there reagents will be helpful in detecting the presence of FMRP, in studying the FMRP-associated proteins, and finally, in elucidating the FMRP function.

第三節

序論 (Introduction)

目前已知造成易脆 X 染色體症候群的主要原因，主要是位於 *FMR-1* 基因的第一個 exon 內 5'端不轉譯區(untranslated region) CGG 三聯核苷酸發生擴增突變(expansion mutation) [Fu et al., 1991; Kremer et al., 1991; Nakahori et al., 1991; Verkerk et al., 1991; Yu et al., 1992]，造成起動區(promoter)的 CpG island 發生超甲基化(hypermethylation) [Oberle et al., 1991; Rousseau et al., 1991; Steinbach et al., 1993]，使得 *FMR-1* 基因的不表現，導致 FMR-1 蛋白(FMRP)無法產生而造成疾病的發生[Bell et al., 1991; Pieretti et al., 1991; Sutcliffe et al., 1992]。

早期診斷易脆 X 染色體的傳統方法是利用細胞遺傳學的方法，檢示分裂中期染色體(metaphase chromosome)有無易脆 X 染色體(fragile X chromosome; fra(X))的顯現。由於細胞培養時須要使用葉酸含量低的培養液來誘發易脆位置(fragile site)的產生來診斷，但不是每一分裂中期染色體(metaphase chromosome)均能看到[Sutherland, et al., 1977; 1979a; 1979b]，因此有時會有假陰性或假陽性的結果出現，且在帶有前突變基因(premutation)的男性在外表上是正常的，稱為"正常傳遞男性(normal transmitting males; NTMs)"，此種 NTMs 的男性在細胞遺傳學上是誘發不出易脆 X 染色體，但 NTMs 所帶的前突變基因可以傳給他的女兒，使她們成為外表正常的女性帶因者(female carrier)，在細胞遺傳學上同樣是誘發不出易脆 X 染色體，但是 NTMs 的孫子往往會發病[Jacobs, et al., 1991]。所以傳統診斷易脆 X 染色體

的方法不但很費時、須培養大量細胞而且結果也不是百分之百正確，也無法診斷出 NTMs 男性和女性帶因者。然而隨著與易脆 X 染色體症候群有關的基因 "*FMR-1* 基因" 的被選殖出來，這個困擾獲得轉機 [Heitz et al., 1991; Kremer et al., 1991; Oberle et al., 1991; Verkerk et al., 1991]。因此對於易脆 X 染色體症候群的診斷由細胞遺傳的方法進入了 DNA 分析的診斷技術，包括南方氏轉漬法(Southern analysis)和聚合酶連鎖反應(PCR)等方法。雖然南方氏轉漬法(Southern analysis)可以更容易的診斷出前突變的帶因者，然而此種方法須要約 10 μ g DNA，如此大量的 DNA 很難直接從產前診斷的樣本中獲得，除非細胞再經過培養，但這也相對的降低診斷的時效性，而且南方氏轉漬法(Southern analysis)對於 CGG 重複次數只增加一點點的前突變基因，很難作正確診斷。

利用聚合酶連鎖反應(PCR)來診斷易脆 X 染色體症候群確實是一個快速、經濟的方法，特別是應用在產前診斷上。1991 年 Fu 等人及 1992 年 Pergolizzi 等人，已成功的利用此法來診斷易脆 X 染色體症候群，並且確定出正常人的 CGG 三聯核苷酸之重複次數介於 6~54 次之間，前突變基因則介於 52~200 次之間[Fu et al., 1991; Pergolizzi et al., 1992]。但是由於 CGG 三聯核苷酸序列本身不易複製，當 CGG 重複次數太大也無法被 PCR 複製，使得 PCR 反應不易成功，使得在診斷上出現困擾，且 PCR 的方法常須要用 α -³²p-dCTP 來標定 DNA，最後以放射顯影的方法得知產物的大小，使得實驗上多了一項放射性廢棄物要處理，因此增加了實驗室的負擔及實驗危險性。1994 年 Pai 等人進一步的利用 RT-PCR 的方法來看 *FMR-1* 基因的表現[Pai et al., 1994]，而我們實驗室也已成功的利用此方法在易脆 X 染色體症候群

的產前診斷上，但是如果運用在大量的篩檢，也是很浪費時間的。最近的研究報告顯示已經成功的運用 FMRP 的抗體來大量的篩檢易脆 X 染色體症候群[Willemsen, et al., 1995; 1997]。加上最近也已經發現 FMRP 和細胞間的組成之間有交互作用，如 ribosome 等[Khandjian, et al., 1996; Tamanini, et al., 1996; Siomi et al., 1996]，另外也發現和兩個相關的蛋白質(FXR-1 and FXR-2 基因所表現出來的蛋白)之間有交互作用[Siomi et al., 1995; Zhang et al., 1995]，基於以上的種種理由我們實驗室製造 FMRP 的抗體：在診斷技術上，可利用抗體來發展一個更快速、更簡便的、更安全的大量篩檢易脆 X 染色體症候群的方法；在研究方面，使我們更容易去瞭解 FMRP 的真正生理上的功能為何？FMRP 與那些細胞內的組成和那些蛋白質之間有交互作用？本章將詳細描述抗體的製備過程及製造的抗體是否具有專一性。

第四節

方法 (Methods)

一、pBSHAF27XE 質體的建構： (Construction of pBSHAF27XE)

取 10 μg 含有全長 *FMR-1* 基因 cDNA 的質體(pHHSI-F27X ; Siomi et al., 1993)，經由 *Bst* XI 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，將含有 *FMR-1* cDNA 的環形質體切成線形，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，再使用 Klenow 酵素(Promega)在 30 °C 下作用 30 分鐘，將線形質體的兩端修補成平端(blunt end)，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，最後經由 *Apa* I 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，將全長的 *FMR-1* cDNA 切下，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電泳分離後，將全長的 *FMR-1* cDNA 從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN ; 方法參照附錄一)將全長的 *FMR-1* cDNA 回收，大約 2.0 Kb (insert)。

取 10 μg pBluescript KS(+) phagemid (pBSKS+)，經由 *Bst* XI 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，將環形的 pBS KS+ 切成線形，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，再使用 Klenow 酵素(Promega)在 30 °C 下作用 30 分鐘，將線形 pBSKS+的兩端修補成平端(blunt end)，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，最後經由 *Apa* I 限制酶(New England BioLab) 在 37 °C 下作用 60 分鐘，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電泳分離後，將處理好的載體從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN ; 方法參照附錄一)回收大約

2.85 Kb (vector)。

將處理好的 *FMR-1* cDNA(insert)和 pBSKS+ phagemid (vector)，以約 3:1 的分子數比，利用 T₄ DNA 連接限制酶(New England BioLab)在 16 °C 下作用過夜，將兩者連接起來形成 pBSHLAF27XE 質體(圖 2-1)。取連接好的質體 5 μl 送到經由 100 mM CaCl₂ 處理的大腸桿菌菌株 JM109 內(方法參照附錄一)，並且塗抹在含 ampicillin(10 mg/ml)的 Luria-Bertani 培養基(LB agar)上，在 37 °C 下過夜培養(Transformation；方法參照附錄一)，再從培養基上挑選單一菌落到含 ampicillin(10 mg/ml)的 Luria-Bertani 培養液 (LB Medium)中在 37 °C 下過夜次培養，再將過夜次培養的菌液離心，使用 Plasmid minipreparation kit (QIAGEN；方法參照附錄一)將質體抽出，最後利用限制酶切點定位 (enzyme mapping) 和核苷酸定序 (DNA sequencing；方法參照附錄一)等方法來檢測質體是否正確。

二、*FMR-1* 蛋白表現質體的建構: (Construction of expression plasmid)

在 *FMR-1* 蛋白表現質體的製備上，我們共設計了 4 段含有不同 *FMR-1* cDNA 片段的質體(如圖 2-2)：A. 含全長 *FMR-1* cDNA (*Sac* I-*Apa* I；pQEF27XE)；B. 含 N-端的 *FMR-1* cDNA，即 *Sac* I-*Hind* III 之片段(pQEF27XH)；C. 含中段的 *FMR-1* cDNA，只包含兩個 KH domain (*Xho* I-*Kpn* I 之片段；pQEF27XM)；D. 含 C-端的 *FMR-1* cDNA，只包含 RGG box (*Kpn* I-*Apa* I 之片段；pQEF27XT)，其製備過程敘述如下：

A. pQEF27XE 蛋白表現質體的建構： (Construction of pQEF27XE)

取 10 μg 含有全長 *FMR-1* cDNA 的質體(pBSHAF27XE)，經由 *Apa* I 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，將環形的 pBSHAF27XE 切成線形，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，再使用 Klenow 酵素(Promega) 在 30 °C 下作用 30 分鐘將此線形的 pBSHAF27XE 的兩端修補成平端(blunt end)，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，最後經由 *Sac* I 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘將全長的 *FMR-1* cDNA 切下，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電泳分離後，將全長的 *FMR-1* cDNA 從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN；方法參照附錄一)將全長的 *FMR-1* cDNA 回收，大約 2.0 Kb (insert)。

取 10 μg pQE30 (QIAGEN)，經由 *Pst* I 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，將環形的 pQE30 切成線形，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，再使用 Klenow 酵素(Promega)在 30 °C 下作用 30 分鐘將線形的 pQE30 的兩端修補成平端(blunt end)，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，最後經由 *Sac* I 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電泳分離後，將處理好的載體從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN；方法參照附錄一)回收大約 3.4 Kb 的片段(vector)。

將處理好的 *FMR-1* cDNA(insert)和 pQE30(vector)，以約 3:1 的分子數比，利用 T_4 DNA 連接限制酶(New England BioLab)在 16 °C 下

作用過夜，將兩者連接起來形成 pQEF27XE 質體(圖 2-3)。取連接好的質體 5 μ l 送到經由 100 mM CaCl_2 處理的大腸桿菌菌株 JM109 內(方法參照附錄一)，並且塗抹在含 ampicillin(10 mg/ml)的 Luria-Bertani 培養基 (LB agar)上，在 37 $^\circ\text{C}$ 下過夜培養(Transformation；方法參照附錄一)，再從培養基上挑選單一菌落到含 ampicillin(10 mg/ml)的 Luria-Bertani 培養液 (LB Medium)中在 37 $^\circ\text{C}$ 下過夜次培養，再將過夜次培養的菌液離心，使用 Plasmid minipreparation kit (QIAGEN；方法參照附錄一)將質體抽出，最後利用限制酶切點定位(enzyme mapping)和核苷酸定序(DNA sequencing；方法參照附錄一)等方法來檢測質體是否正確。

B. pQEF27XH 蛋白表現質體的建構： (Construction of pQEF27XH)

取 10 μ g 含有全長 *FMR-1* cDNA 的質體(pBSHAF27XE)，經由 *Sac* I 限制酶(New England BioLab)在 37 $^\circ\text{C}$ 下作用 60 分鐘，將環形的 pBSHAF27XE 切成線形，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，再經由 *Hind* III 限制酶(New England BioLab)在 37 $^\circ\text{C}$ 下作用 60 分鐘將 N 端的 *FMR-1* cDNA 切下，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電泳分離後，將 N-端的 *FMR-1* cDNA 從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN；方法參照附錄一)回收大約 900 bp 的片段(insert)。

取 10 μ g pQE30 (QIAGEN)，經由 *Sac* I 限制酶(New England BioLab)在 37 $^\circ\text{C}$ 下作用 60 分鐘，將環形的 pQE30 切成線形，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，再經由 *Hind* III 限制酶(New England BioLab)在 37 $^\circ\text{C}$ 下作用 60 分鐘，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電

泳分離後，將處理好的載體從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN；方法參照附錄一) 回收大約 3.4 Kb 的片段 (vector)。

將處理好的 N 端 *FMR-1* cDNA(insert)和 pQE30(vector)，以約 3:1 的分子數比，利用 T_4 DNA 連接限制酶(New England BioLab)在 16 °C 下作用過夜，將兩者連接起來形成 pQEF27XH 質體。(圖 2-4) 取連接好的質體 5 μ l 送到經由 100 mM $CaCl_2$ 處理的大腸桿菌菌株 JM109 內 (方法參照附錄一)，並且塗抹在含 ampicillin(10 mg/ml)的 Luria-Bertani 培養基 (LB agar)上，在 37 °C 下過夜培養(Transformation；方法參照附錄一)，再從培養基上挑選單一菌落到含 ampicillin(10 mg/ml)的 Luria-Bertani 培養液 (LB Medium)中在 37 °C 下過夜次培養，再將過夜次培養的菌液離心，使用 Plasmid miniprep kit (QIAGEN；方法參照附錄一)將質體抽出，最後利用限制酶切點定位(enzyme mapping)和核苷酸定序(DNA sequencing；方法參照附錄一)等方法來檢測質體是否正確。

C. pQEF27XM 蛋白表現質體的建構： (Construction of pQEF27XM)

取 10 μ g 含有全長 *FMR-1* cDNA 的質體(pBSHAF27XE)，經由 *Xho* I 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，將環形的 pBSHAF27XE 切成線形，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，再使用 Klenow 酵素(Promega) 在 30 °C 下作用 30 分鐘將此線形的 pBSHAF27XE 的兩端修補成平端(blunt end)，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，最後經由 *Kpn* I 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作

用 60 分鐘將中段的 *FMR-1* cDNA(只含 2 個 KH domain)切下，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電泳分離後，將中段的 *FMR-1* cDNA 從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN；方法參照附錄一)回收大約 530 bp 的片段(insert)。

取 10 μ g pQE32 (QIAGEN)，經由 *Bam* HI 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，將環形的 pQE32 切成線形，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，再使用 Klenow 酵素(Promega)在 30 °C 下作用 30 分鐘將線形的 pQE32 的兩端修補成平端(blunt end)，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，最後經由 *Kpn* I 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電泳分離後，將處理好的載體從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN；方法參照附錄一)回收大約 3.4 Kb 的片段(vector)。

將處理好的中段 *FMR-1* cDNA(insert)和 pQE32(vector)，以約 3:1 的分子數比，利用 T_4 DNA 連接限制酶(New England BioLab)在 16 °C 下作用過夜，將兩者連接起來形成 pQEF27XM 質體(圖 2-5)。取連接好的質體 5 μ l 送到經由 100 mM $CaCl_2$ 處理的大腸桿菌菌株 JM109 內(方法參照附錄一)，並且塗抹在含 ampicillin(10 mg/ml)的 Luria-Bertani 培養基 (LB agar)上，在 37 °C 下過夜培養(Transformation；方法參照附錄一)，再從培養基上挑選單一菌落到含 ampicillin(10 mg/ml)的 Luria-Bertani 培養液(LB Medium)中在 37 °C 下過夜次培養，再將過夜次培養的菌液離心，使用 Plasmid miniprep kit (QIAGEN；方法參照附錄一)將質體抽出，最後利用限制酶切點定位(enzyme mapping)和核苷酸定序(DNA sequencing；方法參照附錄一)等方法來檢測質體是否正確。

D. pQEF27XT 蛋白表現質體的建構： (Construction of pQEF27XT)

取 10 μg 含有全長 *FMR-1* cDNA 的質體(pBSHAF27XE)，經由 *Apa* I 限制酶(New England BioLab)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 60 分鐘，將環形的 pBSHAF27XE 切成線形，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，再使用 Klenow 酵素(Promega) 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 30 分鐘將此線形的 pBSHAF27XE 的兩端修補成平端(blunt end)，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，最後經由 *Kpn* I 限制酶(New England BioLab)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 60 分鐘將 C 端的 *FMR-1* cDNA 切下(含 2 個 RGG box)，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電泳分離後，將 C-端的 *FMR-1* cDNA 從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN；方法參照附錄一)回收大約 890 bp 的片段(insert)。

取 10 μg pQE31 (QIAGEN)，經由 *Hind* III 限制酶(New England BioLab)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 60 分鐘，將環形的 pQE31 切成線形，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，再使用 Klenow 酵素(Promega)在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 30 分鐘將線形的 pQE31 的兩端修補成平端(blunt end)，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，最後經由 *Kpn* I 限制酶(New England BioLab)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 60 分鐘，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電泳分離後，將處理好的載體從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN；方法參照附錄一)回收大約 3.4 Kb 的片段(vector)。

將處理好的 C 端 *FMR-1* cDNA(insert)和 pQE 31(vector)，以約 3:1 的分子數比，利用 T_4 DNA 連接限制酶(New England BioLab)在 16 $^{\circ}\text{C}$ 下作用過夜，將兩者連接起來形成 pQEF27XT 質體(圖 2-6)。取

連接好的質體 5 μ l 送到經由 100 mM CaCl_2 處理的大腸桿菌菌株 JM109 內(方法參照附錄一)，並且塗抹在含 ampicillin(10 mg/ml)的 Luria-Bertani 培養基 (LB agar) 上，在 37 $^\circ\text{C}$ 下過夜培養 (Transformation；方法參照附錄一)，再從培養基上挑選單一菌落到含 ampicillin(10 mg/ml)的 Luria-Bertani 培養液 (LB Medium) 中在 37 $^\circ\text{C}$ 下過夜次培養，再將過夜次培養的菌液離心，使用 Plasmid minipreparation kit (QIAGEN；方法參照附錄一) 將質體抽出，最後利用限制酶切點定位 (enzyme mapping) 和核苷酸定序 (DNA sequencing；方法參照附錄一) 等方法來檢測質體是否正確。

三、*FMR-1* 蛋白的表現： (Expression of FMRP)

取 3 μ l 先前製備好的蛋白質表現質體 (protein express plasmid) 送入經 100 mM CaCl_2 處理的大腸桿菌菌株 M15 中(方法參照附錄一)，將其塗抹在含有抗生素(10 mg/ml ampicilline 和 25 mg/ml kanamycine) 的 Luria-Bertani 培養基 (LB agar) 中在 37 $^\circ\text{C}$ 過夜培養。然後挑單一菌落到含抗生素(10 mg/ml ampicilline 和 25 mg/ml kanamycine) 的 Luria-Bertani 培養液 (LB Medium) 中過夜次培養，取過夜次培養的菌液轉殖在新鮮的含抗生素(10 mg/ml ampicilline 和 25 mg/ml kanamycine) 的 Luria-Bertani 培養液 (LB Medium) 中培養，直到菌液的濃度達到 OD_{600} 約 0.6 - 0.7 左右，加入 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 最後濃度達 1 mM 誘導蛋白的表現，經過在 37 $^\circ\text{C}$ 培養箱中培養二小時後，取出菌液並將菌液離心，離下的菌體以滅過菌的 $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ 洗掉殘留的培養液，再將 pellet 懸浮在 cell extract buffer (buffer A：50 mM Tris，

10 mM β -mercaptoethanol , 1 mM PMSF , 1% Nonidet P-40)中,以超音波震盪器將細胞震碎,直到菌液澄清為止,離心後將上清液轉移到新的離心管,取部份上清液跑 12.5% SDS PAGE , SDS-polyacrylamide gel 經由 Coomassie blue 染色和西方轉漬法(Western Blot ; 1st Ab anti-histidine 1:5000 ; 2nd Ab peroxidase-labelled goat-anti-mouse IgG 1:5000) 以確定蛋白是否有表現。

四、FMRP 蛋白的純化： (Purification of FMRP)

取 2 ml Ni-NTA resin (QIAGEN) 放入 column 中,並且加入 2 ml buffer B (20 mM Tris, 100 mM KCl, 10 mM β -mercaptoethanol , 10 % (v/v) glycerol, 20 mM imidazole, pH 8.5 at 4 °C)平衡 column,然後將溶在 bufferA(50 mM Tris , 10 mM β -mercaptoethanol , 1 mM PMSF , 1 % Nonidet P-40)中的上清液加入 column 中,收取通過 column 後的液體(Flow through),再利用含有不同 imidazole 濃度的 buffer (20 mM Tris, 100 mM KCl, 10 mM β -mercaptoethanol , 10 % (v/v) glycerol, pH 8.5 at 4 °C)來清洗 column ,收取清洗 column 後的液體 (Wash 1 : 3 ml 含 20 mM imidazole and 3 ml 含 30 mM imidazole ; Wash 2 : 3 ml 含 40 mM imidazole and 3 ml 含 50 mM imidazole),最後以含有 100 mM imidazole 的 buffer C (20 mM Tris, 100 mM KCl, 10 mM β -mercaptoethanol , 10 % (v/v) glycerol, 100 mM imidazole, pH 8.5 at 4 °C) 4 ml 將結合在 Ni-NTA resin 的 FMRP 蛋白洗下來,每管收取 1 ml (Elute 1 ; Elute 2 ; Elute 3 ; Elute 4)。

各取 20 μ l 收下來的 Flow through ; Wash 1 ; Wash 2 ; Elute

1 ; Elute 2 ; Elute 3 ; Elute 4 液體，跑 12.5% SDS PAGE ， SDS-polyacrylamide gel 經由 Coomassie blue 染色和西方轉漬法(Western Blot ; 1st Ab anti-histidine 1:5000 ; 2nd Ab peroxidase-labelled goat-anti-mouse IgG 1:5000)以確定蛋白是否被 Ni-NTA resin 純化出來。

五、抗體的製備(Preparation of antibody)：

將 Ni-NTA resin 純化的各段 FMRP 蛋白，利用呈色反應(sample 取 10 μ l 純化的蛋白，加 200 μ l Bradford，補 d_2H_2O 至 1000 μ l)與標準蛋白[(Bovine serum albumin, BSA) 取 0, 5, 10 μ l BSA 蛋白(1 μ g/1 μ l)，加 200 μ l Bradford，補 d_2H_2O 至 1000 μ l]做比較，經由測其可見光 595 的吸光質(OD_{595})，來決定蛋白質的含量。

依據測得之蛋白質濃度計算，取 500 μ g 的蛋白質來免疫兔子，在免疫兔子前先抽取 5 ml 的血液靜置 4~5 小時，離心抽取血清(pre-immune)。取出免疫兔子的蛋白質與 adjuvant complete freund 以 1:1(體積比)的比例均勻混合，再將混合均勻的液體注射入兔子的皮下(first immune)。注射後 2 星期，抽取 5 ml 的血液靜置 4~5 小時，離心抽取血清測其抗體力價(titer)的情況，同時再追加注射蛋白質，取 300 μ g 的純化蛋白質與 adjuvant incomplete freund 以 1:1(體積比)的比例混合均勻，再將混合均勻的液體注射到兔子的皮下(second immune)，2 星期後抽取血液測其抗體力價(antibody title)的高低。

六、西方轉漬法(Western Blot):

12.5 % SDS-PAGE

resolving gel (4 ml):	Stacking gel (2 ml):
1.66 ml Acrylamide-bisacrylamide(30:0.8)	0.25 ml Acrylamide-bisacrylamide(30:0.8)
1.0 ml 1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	0.5 ml 0.5 M Tris-HCl (pH6.8)
0.04 ml 10 % SDS	0.02 ml 10 % SDS
1.11 ml d ₂ H ₂ O	1.03 ml d ₂ H ₂ O
0.15 ml 10 % ammonium persulfate	0.1 ml 10 % ammonium persulfate
3 µl TEMED	3 µl TEMED

1. **Sample** : 加入 3x Sample buffer 之後，在加入之前先煮沸五分鐘，使蛋白變性，用 120 V 跑上層 stacking gel，下層 resolving gel 則改成 150 V。
2. **Wash** : 將跑完電泳之 SDS-polyacrylamide gel，浸泡於 50 ml blotting buffer，溫和搖晃五分鐘。(blotting buffer : 9.1 g Tris-HCl，43.2 g Glycine，600 ml methanol，加水到 3000 ml)
3. **Transfer** : 將膠緊貼於 Nitrocellulose 或 plus-PVDF 濾紙上，置於 mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad)，100 V 通電一小時或 30 V 過夜。
4. **Blocking** : 將濾紙浸泡於 50 ml TBS buffer(含 3% skim milk)，室溫溫和搖晃三十分鐘或 4 °C 放置過夜。(TBS buffer : 1.33 g Tris-HCl，9.0 g NaCl，加水至 1000 ml，調 pH 7.4)
5. **1st -Ab** : 將濾紙置於塑膠袋中，加入 10 ml TBS buffer (含 1% skim milk)，再加入 2 µl anti-6x His Ab 1/5000，將塑膠袋密封搖晃一小時。
6. **Wash** : 以 50 ml TBS buffer 浸泡 paper，室溫溫和搖晃五分鐘，

洗三次。

7. **2nd-Ab**：將濾紙置於塑膠袋中，加入 10 ml TBS buffer(含 1% skim milk)，再加入 2 μ l peroxidase-labelled goat anti-mouse Ig G (1/5000)，將塑膠袋密封搖晃一小時。
8. Wash：重複步驟 6。
9. Substrate：配製新鮮 substrate solution：30 mg 4-chloro-1-naphthol(0.06 % g/ml)(Merk)溶解於 10 ml methanol 中，加入 TBS buffer 至 50 ml。將濾紙置於 substrate solution 中，再加入 20 μ l H_2O_2 ，即呈色；或使用 ECL kit (Amershem)呈色。

七、免疫沈澱--西方轉漬法(Immunoprecipitation--Western blot)

本實驗方法主要參考 Verheij et al., 1993 年的報告稍加修改。首先取 10 ml HeLa cell 培養液在 1500 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後加入 1 ml cell homogenized buffer (10 mM HEPES，30 mM KCl，100 μ M $CaCl_2$ ，5 mM $MgCl_2$ ，0.05 % Tween 20，0.45 % Triton X 100) 使細胞破裂，離心 2500 rpm 10 分鐘後將上清液轉移到新的小離心管(micro-centrifuge tube)，存放在 $-20^\circ C$ ，並取 2 μ l total lysate 利用呈色反應，加 200 μ l Bradford，補 d_2H_2O 至 1000 μ l)與標準蛋白(Bovine serum albumin, BSA,) 取 0，5，10 μ l BSA 蛋白(1 μ g/1 μ l)，加 200 μ l Bradford，補 d_2H_2O 至 1000 μ l 做比較，經由測其可見光 595 的吸光質(OD_{595})，來決定蛋白質的濃度。

取 30 μ l protein A agarose (BRL) 和自製的 polyclonal antibody 20 μ l (anti-E、anti-H、anti-M)，在總反應體積 100 μ l TBS buffer (20

ml 1 M Tris pH 7.4、9.0 g NaCl、加 d_2H_2O 至 1000 ml)，且在 4 °C 下以 end-over-end 方式旋轉作用 2 小時，離心 6000 rpm 5 分鐘去除上清液，用 200 μ l TTBS(20 ml 1 M Tris pH 7.4、9.0 g NaCl、0.05 % Tween 20，加 d_2H_2O 至 1000 ml)洗三次。

取 350 μ g total lysate 加到已和 polyclonal antibody 作用後的 protein A agarose 在 4 °C 下以 end-over-end 方式旋轉作用 2 小時，離心 6000 rpm 5 分鐘將上清液轉移到新的小離心管 (micro-centrifuge tube)，"supernatant ; S"，用 200 μ l TTBS(20 ml 1 M Tris pH 7.4、9.0 g NaCl、0.05 % Tween 20，加 d_2H_2O 至 1000 ml)洗三次和用 200 μ l TBS (20 ml 1 M Tris pH 7.4、9.0 g NaCl，加 d_2H_2O 至 1000 ml)洗二次，"pellet ; P"。

分別取 20 μ l supernatant (S) 和 pellet (P) 分別加入 10 和 30 μ l SDS sample buffer (NEB)，在 95 °C 下煮 5 分鐘，跑 10 % SDS PAGE，然後進行西方轉漬法 (方法同六)(1st Ab anti-FMRP monoclonal antibody IC3 1:5000、2nd Ab peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG 1:5000)。

第五節

結果(Results)

一、檢測 pBSHAF27XE 質體：

為證實抽出的 pBSHAF27XE 質體(參照實驗方法一)是否正確，利用限制酶切點定位(enzyme mapping)和核苷酸定序(DNA sequencing)兩個方法來確認。

對於 pBSHAF27XE 質體的限制酶切點定位(enzyme mapping)方法，我們設計了4種不同限制酶--*Apa* I (New England BioLab)、*Eco* RI (New England BioLab)、*Eco* RV (Promega)、*Nco* I (New England BioLab) --分別位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)上。每一樣本取 3 μ l 的質體 DNA，取 10 U 的限制酶於 1X 限制酶專用 buffer 的濃度下，總反應體積在 10 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘，經由 1X TAE buffer 0.7% 的洋菜膠電泳分析。(如圖 2-7)

Apa I 限制酶的切點位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)的交接處，因此只有一個切點，可被切成一大小約 4.8 Kb 的線形 DNA (如圖 2-7 Lane 3)。而 *Eco* RI 和 *Nco* I 的切點位於 insert 上且只有一個切點，因此線形 DNA 的位置也在 4.8 kb (如圖 2-7 Lane 4、6)。*Eco* RV 限制酶的切點雖然位於 pBSKS+ 上，但是經過限制酶處理過的 vector 並不含這切點，所以正確的 pBSHAF27XE 質體並不會被 *Eco* RV 切成線形 (如圖 2-7 Lane 5)。

經過初步限制酶切點定位的確認後，更進一步的利用核苷酸定序

法(DNA sequencing)來確認(方法參照附錄一)。使用兩個引子(primers), 順向為 T₇ 引子--- 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'; 逆向為 Reverse 引子---5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3', 其結果如圖 2-8 可見全長 *FMR-1* cDNA 被正確的接在 pBSKS+載體上。圖 2-9 也指出 pBSHAF27XE 質體的 cDNA 序列和氨基酸序列。

二、含有不同片段 *FMR-1* cDNA 質體(pQEF27XE、pQEF27XH、pQEF27XM、pQEF27XT)的檢測：

為證實抽出含不同 *FMR-1* cDNA 片段的質體(參照實驗方法二)是否正確，利用限制酶切點定位(enzyme mapping)和核苷酸定序(DNA sequencing)兩個方法來確認。

限制酶切點定位(enzyme mapping)，我們分別各設計了 4 種不同限制酶(enzyme)來檢測含不同 *FMR-1* cDNA 片段的質體：

檢測 pQEF27XE 質體，利用 *Bam* HI (New England BioLab)、*Hind* III (New England BioLab)、*Kpn* I (Promega)、*Sac* I (New England BioLab)等切點分別位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)上的 4 種不同限制酶來檢測。每一樣本 DNA 取 3 μ l 的質體 DNA，取 10 U 的限制酶於 1X 限制酶專用 buffer 的濃度下，總反應體積在 10 μ l，在 37 °C 下作用 30 分鐘，經由 1X TAE buffer 0.7 % 的洋菜膠電泳分析(如圖 2-10)。 *Bam* HI 限制酶的切點同時位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)上，因此有二個切點，可被切成一大一小約 1.9 kb 和 3.5 kb 的片段(圖 2-10 Lane 3)。 *Hind* III 限制酶的切點也同時位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)上，因此有二個切點，可被切成一大一小約 1.3 kb 和 4.1 kb 的片段(圖 2-10 Lane 4)。 *Kpn* I 限制酶的切點只位

於 *FMR-1* cDNA(insert)上，且 *Sac* I 限制酶的切點位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)的交接處，因此兩者都只有一個切點，可被切成一大小約 5.4 kb 的線形 DNA 片段(圖 2-10 Lane 5、6)。

檢測 pQEF27XH 質體，利用 *Eco* RI (New England BioLab)、*Hind* III (New England BioLab)、*Sac* I (New England BioLab)、*Xho* I (New England BioLab)等切點分別位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)上的 4 種不同限制酶來檢測。每一樣本取 3 μ l 的質體 DNA，取 10 U 的限制酶於 1X 限制酶專用 buffer 的濃度下，總反應體積在 10 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘，經由 1X TAE buffer 0.7 % 的洋菜膠電泳分析(如圖 2-11)。 *Eco* RI 限制酶的切點同時位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)上，因此有二個切點，可被切成一大小約 100 bp 和 4.2 kb 的片段(如圖 2-11 Lane 3)。且 *Xho* I 限制酶的切點也同時位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)上，因此有二個切點，可被切成一大小約 800 bp 和 3.5 kb 的片段(如圖 2-11 Lane 6)。而 *Hind* III 和 *Sac* I 限制酶的切點同時位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)的交接處，因此兩者都只有一個切點，可被切成一大小約 4.3 kb 的線形 DNA 片段(如圖 2-11 Lane 4、5)。

檢測 pQEF27XM 質體，利用 *Bag* II (Promega)、*Hind* III (New England BioLab)、*Kpn* I (Promega)、*Sac* I (New England BioLab)等切點分別位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)上的 4 種不同限制酶來檢測。每一樣本取 3 μ l 的質體 DNA，取 10 U 的限制酶於 1X 限制酶專用 buffer 的濃度下，總反應體積在 10 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘，經由 1X TAE buffer 0.7 % 的洋菜膠電泳分析(如圖 2-12)。 *Bag* II 限制酶的切點只位於 insert 內且只有一個切點，因此可被切成一大小約

4.0 kb 的線形 DNA 片段(如圖 2-12 Lane 3)。 *Hind* III 限制酶的切點同時位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)上，因此有二個切點，可被切成一大小約 400 bp 和 3.6 kb 的片段(如圖 2-12 Lane 4)。 *Kpn* I 限制酶的切點位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)的交接處，因此只有一個切點，可被切成一大小約 4.0 kb 的線形 DNA 片段(如 2-12 Lane 5)。而 *Sac* I 限制酶的切點雖然原本存在 pQE32 載體上，但是經過限制酶處理過的載體並不含這切點，所以正確的 pQEF27XM 質體並不會被 *Sac* I 切成線形(如圖 2-12 Lane 6)。

檢測 pQEF27XT 質體，利用 *Bam* HI (New England BioLab) 、 *Kpn* I (Promega)、 *Sac* I (New England BioLab) 、 *Pst* I (New England BioLab)等切點分別位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)上的 4 種不同限制酶來檢測。每一樣本取 3 μ l 的質體 DNA，取 10 U 的限制酶於 1X 限制酶專用 buffer 的濃度下，總反應體積在 10 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘，經由 1X TAE buffer 0.7 % 的洋菜膠電泳分析(如圖 2-13)。 *Sac* I 限制酶的切點只位於載體內且只有一個切點，因此可被切成一大小約 4.3 kb 的線形 DNA 片段(如圖 2-13 Lane 5)。 *Bam* HI 限制酶的切點同時位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)上，因此有二個切點，可被切成一大小約 600 bp 和 3.7 kb 的片段(如圖 2-13 Lane 3)。 *Kpn* I 限制酶的切點位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)的交接處，因此只有一個切點，可被切成一大小約 4.3 kb 的線形 DNA 片段(如圖 2-13 Lane 4)。而 *Pst* I 限制酶的切點雖然原本存在 pQE31 載體上，但是經過限制酶處理過的載體並不含這切點，所以正確的 pQEF27XM 質體並不會被 *Pst* I 切成線形(如圖 2-13 Lane 6)。

這些含不同 *FMR-1* cDNA 片段的質體經過初步的限制酶切點定位

(enzyme mapping) 確認無誤後，進一步的利用核苷酸定序法(DNA sequencing)來確認(方法參照附錄一)。分別使用兩個引子(primers)，順向引子(pQE 1)--- 5'-CGGATAACAATTTTCACACAG-3'；逆向為 Reverse 引子---5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3'，其結果 4 個含不同 *FMR-1* cDNA 片段的質體(pQEF27XE、pQEF27XH、pQEF27XM、pQEF27XT)依序如圖 2-14、2-15、2-16 和 2-17，可以明顯看到在 insert 和載體的交接處都確定無誤。

三、各段 FMRP 蛋白的檢測：

各段 FMRP 蛋白經由 IPTG 的誘導而在大腸桿菌菌株 M15 中表現(參照實驗方法三)，經由 Ni-NTA resin column 純化出來(參照實驗方法四)，分別各取 10 μ l 或 20 μ l 純化過程中通過 column 出來的各部分收集液，加上 10 μ l 3x SDS sample buffer (New England BioLab)，在 95 $^{\circ}$ C 下煮 5 分鐘，跑 12.5 % SDS PAGE 後經 Coomassie blue 染色 30 分鐘以上，再用 destain buffer (10 % glacial acetic acid，30 % methanol) 使非特異性結合的染料洗掉來檢測，同時也利用西方轉漬法(Western blot)進一步的檢測(參照實驗方法六)。西方轉漬法(Western blot)所使用的第一抗體(first antibody)是 anti-Histidine antibody，其稀釋的比例為 1:5000，第二抗體為 peroxidase-labelled goat-anti-mouse IgG，其稀釋的比例為 1:5000。

全長的 FMRP(pQEF27XE；圖 2-3)在 Coomassie blue 染色(圖 2-18 Elute 1~Elute 4)和西方轉漬法(Western blot)(圖 2-19 Elute 1~ Elute 4)都呈現一個大小約 70 kDa 的主要 band，還有一些比 70 kDa 小的

band，這些小的 band 是 FMRP 的降解形式(degradation form)。N 端的 FMRP(pQEF27XH；圖 2-4) 在 Coomassie blue 染色 (圖 2-20 Elute 1~ Elute 4)和西方轉漬法(Western blot) (圖 2-21 Elute 1~ Elute 4)都呈現一個大小約 35 kDa 的主要 band，和在下方有一個大小 30 kDa 的降解形式(degradation form)。中段的 FMRP(pQEF27XM；圖 2-5) 在 Coomassie blue 染色 (圖 2-22 Elute 1~ Elute 4)和西方轉漬法(Western blot) (圖 2-23 Elute 1~ Elute 4)都呈現一個大小約 23 kDa 的主要 band，和在下方有一些降解形式(degradation form)。C 端的 FMRP (pQEF27XT；圖 2-6)雖然所製備出來的質體經限制酶切點定位 (enzyme mapping)和核苷酸定序(DNA sequencing)兩個方法的確認都無誤，可是蛋白質還未被誘導表現出來，目前正進一步的在克服困難誘導蛋白的表現。

四、各個抗體(anti-E、anti-H、anti-M)力價(titer)的測定：

將各段 FMRP 蛋白打入兔子皮下之前，先抽取 5 ml 的血液，靜置後離心 2500 rpm 10 分鐘收取血清，成為免疫前的血清(pre-immune)。在各段 FMRP 蛋白作第一次免疫(參照實驗方法五)打入兔子皮下後二星期抽取 5 ml 的血液，靜置後離心 2500 rpm 10 分鐘收取血清，測定抗體力價上升的情況。

為了測定各個抗體(anti-E、anti-H、anti-M)力價，分別利用純化出來的各段蛋白(pQEF27XE、pQEF27XH、pQEF27XM)來偵測，每條 lane 分別加入 5 μ g 的蛋白量，跑 12.5% SDS PAGE 後轉印到 NC paper 上，分別檢定各種抗體(anti-E、anti-H、anti-M)力價，其稀釋

的比例為 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200，與免疫前稀釋 1:1000(陰性對照組)和 monoclonal antibody IC3(陽性對照組)稀釋 1:5000 作比對，結果發現 anti-H 抗體的力價在 1:200 的稀釋可以清楚的看到 N 端 FMRP 的 band，1:400 的稀釋比例下看到的是較模糊 N 端 FMRP 的 band。同樣的 anti-E 抗體的力價在 1:400 的稀釋可以清楚看到全長 FMRP 的 band。而 anti-M 抗體的力價更高在 1:1200 的稀釋比例下就可看到中段 FMRP 的 band。

為使抗體力價更高又作第二次免疫(參照實驗方法五)，同樣的在注入蛋白二星期後抽取 5 ml 兔子的血液靜置後離心 2500 rpm 10 分鐘收取血清，測定抗體力價是否再上升。同上面的方法，以每兩條 Lane 為一組分別加入 5、10 μ g 的蛋白量，分別檢定各種抗體(anti-E、anti-H、anti-M)力價，其稀釋的比例為 1:1000、1:3000、1:5000，結果發現三種抗體(anti-E、anti-H、anti-M)的力價都可達到 1:5000 的稀釋比例。(資料未附)

因此為更確定抗體的力價及其專一性，分別拿各個不同的抗體來彼此偵測各個不同的 FMRP 片段。我們分別以三種不同稀釋倍數來偵測(1:1250、1:2500、1:5000)，並且也拿免疫前血清當陰性對照組稀釋倍數為 1:1250 及 monoclonal antibody IC3 當陽性對照組稀釋倍數為 1:5000。結果同樣的發現三種抗體的力價確實達到 1:5000 倍以上，而且可以彼此偵測到各個不同大小的 FMRP 片段(如圖 2-24、2-25、2-26)。而且也拿這三種抗體(anti-E、anti-H、anti-M)去偵測 HeLa cell 內的 FMRP，首先直接拿 HeLa cell 之 total lysate 每二條 Lane 一組分別加入不同的蛋白量(70 μ g、140 μ g total protein)分別使用三種不同抗體(anti-E、anti-H、anti-M)和免疫前血清(陰性對照組)及

monoclonal antibody IC3(陽性對照組)去作西方轉漬法(Western blot)，三種抗體和免疫前血清稀釋比例為 1:1000，monoclonal antibody IC3 稀釋比例為 1:5000，結果在陽性對照組和 anti-E、anti-H、anti-M 三種抗體，可在 70~80 Kda 之間看到微弱 FMRP 的 band (資料未附)。另外我們還利用免疫沈澱-西方轉漬法(Immunoprecipitation-Western blot)的技術來偵測 HeLa cell 中的 FMRP(參照實驗方法七)，並且拿免疫前血清當對照組。結果顯示在免疫前的血清組中 FMRP 的訊號出現在上清液(supernatant；S)，並沒有出現在 pellete (P)。而在 anti-E、anti-H、anti-M 這三組中 FMRP 的訊號一致的出現在 pellete (P)，並沒有出現在上清液(S)中(如圖 2-27)。因此證實這三種抗體確實可以偵測到細胞內的 FMRP。由這一連串的實驗證實我們所合成的三種抗體確實可以偵測到 FMRP 且具有專一性。

第六節

討論(Discussion)

從結果知道我們已經成功的在大腸桿菌內誘導出不同片段的 FMRP，包括全長的 FMRP、N 端的 FMRP 和 Middle FMRP，而且已經從兔子體內獲得各段 FMRP 的 polyclonal 抗體 (anti-E、anti H、anti-M)，這些抗體對從大腸桿菌表現出來的各段 FMRP 蛋白其力價達 1:5000，且也成功的偵測到 HeLa cell 內的 FMRP。

至於我們為何要製備含全長 FMR-1cDNA 的 pBSHAF27XE 質體？因為含全長 FMR-1cDNA 的 pHHSI-F27XE 質體 (Siomi et al. 提供)，需在特殊的菌種內進行複製，此種菌種不好培養且 pHHSI-F27XE 質體在培養的過程中常會造成突變的菌種，因此我們將含全長 FMR-1 cDNA 從 pHHSI-F27XE 質體中切下轉接到 pBluescript KS+質體內 (pBSHAF27XE；參照方法)，以方便我們複製全長 FMR-1 cDNA 用來從事更多的實驗，結果也顯示我們已經成功的製備好 pBSHAF27XE 質體。

我們製備的 pBSHAF27XE 質體雖然含有 T₇ promoter 且含有 ATG 轉譯(translation)的起始密碼，因此可以利用 in vitro 轉錄(transcription)和轉譯(translation)的方法將全長的 FMRP 表現出來，但是在 in vitro 轉錄(transcription)和轉譯(translation)出來的 FMRP 並無法被純化出來，且對於合成不同片段的 FMRP 有一點困難，所以我們又設計了一些能在大腸桿菌內表現的質體(參照方法二)，我們所採用的是 pQE type IV 系統(含 pQE30、pQE31、pQE32 三種載體)，此系統是利用 *E. coli* phage T5 promoter 來進行轉錄，另外在這系統中的所有載體在

表現出我們所要蛋白前面都含有 6 個 Histidine，因此我們可以利用 Ni-NTA resin 純化出我們所需的蛋白。而且此系統所含的三個質體有多個限制酶切點和分別含有多餘的核苷酸(base) (多 0、1、2 個 base)，所以可讓我們接任何片段的 cDNA 不會改變其氨基酸的順序，由結果顯示我們也成功的利用這個系統表現出三種含有不同 FMRP 片段的蛋白。

原本設計要表現四種不同大小片段的 FMRP 蛋白，而在結果中可以明顯的看出我們只表現出三種不同大小片段的 FMRP 蛋白(全長的 FMRP 蛋白、N 端的 FMRP 蛋白和中段的 FMRP 蛋白)，唯獨缺少 C 端的 FMRP 蛋白。由結果我們可以清楚的知道表現 C 端 FMRP 蛋白的質體(pQEF27XT)在限制酶切點定位和核苷酸定序兩種檢測方法都是正確的，那為何無法表現？我們認為可能在 cell 內或破 cell 後存在著某種特定的 protease 使這段的 FMRP 蛋白被降解(degradation)。由全長 FMRP 的純化情形(如圖 2-18、2-19)，可以明顯的看出全長 FMRP 被降解(degradation)的情形，且我們對全長 FMRP 在作西方轉漬法(Western blot)時，除了使用 anti-Histidine 抗體外，我們還另外使用 anti-FMRP monoclonal 抗體 IC3 作比對其結果都一樣(資料未附)，此種抗體是偵測 FMRP 的 N 端，因此更加深我們對 C 端 FMRP 蛋白被某些 protease 降解(degradation)的推論。另外我們也認為這些 protease 是存在於 cell 內並不在破 cell 的過程中，因為我們曾經作過在破 cell 的過程中額外加入 protease 抑制劑(如 EDTA、Aprotinin、Leupeptin、Berzamidine、Pepstin 等)，其降解(degradation)的情形並沒有改善跟不加入 protease 抑制劑是相同的結果(資料未附)，這結果也進一步證實我們的推論。

另外，在全長 FMRP 表現蛋白的純化情形中，我們發現用 Coomassie blue 染色偵測時在誘導和不誘導兩個 Lane 中並無法清楚的區分有無 FMRP 的表現(圖 2-18)，但用西方轉漬法(Western blot)可以明顯的區分(圖 2-19)。另外和 N 端 FMRP 及中段 FMRP 表現的蛋白作比較(圖 2-20、2-22)，可見全長 FMRP 蛋白的表現量不是很高。我們認為這全長 FMRP 蛋白表現量不高的原因可能：一、表現的 FMRP 蛋白被 protease 降解(degradation)；二、由於 1993 年 Ashley 等人已經證明 FMRP 可以和自己的 mRNA 結合，所以我們推論在細菌內表現的 FMRP 和自己的 mRNA 結合，因而造成 FMRP 表現量不高。

在三種抗體製備的過程中，我們發現在進行第一次免疫後，所得抗體的力價不一樣，尤其是 anti-M polyclonal 抗體達到 1:1250 的稀釋，而在 anti-H polyclonal 抗體僅達到 1:400 的稀釋，雖然三者最後皆可達到 1:5000 稀釋(圖 2-24、2-25、2-26)，但在 anti-H polyclonal 抗體的製備過程是經過免疫三次，我們推論這是兔子間個體的差異性。

我們所製備的是一種 polyclonal 抗體，再加上在純化蛋白的過程中有少數的蛋白會隨著主要蛋白(各段 FMRP 蛋白)一起被純化出來，因此我們所製造出來的抗體去偵測大腸桿菌表現的各段蛋白時，在低倍數的稀釋比例下會出現一些非特異性的 band (圖 2-24 Lane 6、8 和 10 比較)，但在偵測 cell 內的 FMRP 並沒有發現此種現象。當我們製備的三個 polyclonal 抗體(anti-E、anti-H、anti-M)在偵測從大腸桿菌表現的各段蛋白時，皆可達到 1:5000 稀釋(圖 2-24、2-25、2-26)。然而我們使用這三個抗體去偵測 HeLa cell 中的 FMRP 時，並不像偵測從大腸桿菌表現的各段蛋白時可達到 1:5000 稀釋，僅達到 1:1000

或 1:2000 稀釋條件下可偵測到 FMRP，而且其訊號很弱(資料未附)。我們推論這跟 FMRP 蛋白量有直接的關係。在偵測從大腸桿菌表現各段蛋白的實驗中我們所加入的蛋白量達 10 μg ，而在偵測 HeLa cell 中的 FMRP 時我們所加入的蛋白量在 70~140 μg ，雖然加入的量很高可是這是 HeLa cell 總蛋白量，而 FMRP 在 HeLa cell 中的量我們並無法估計，不過由這個結果我們可以提出一個推論，FMRP 在 HeLa cell 總蛋白量中所佔的比例還是少數。我們也拿 monoclonal 抗體 IC3 1:5000 的稀釋來偵測 HeLa cell 中的 FMRP，獲得同樣的結果訊號也不強(資料未附)。另外，我們也拿這三種抗體來偵測不同的 HeLa cell 總蛋白量(70、140 和 210 μg)，其結果發現確實隨著蛋白的量增加，其訊號強度也會隨著增加。這些證據就可以解釋這三種抗體為何在偵測從大腸桿菌表現的各段蛋白和偵測 HeLa cell 中的 FMRP 時，其稀釋的比例不一樣。因此我們設計一個免疫沈澱-西方轉漬法(Immunoprecipitation-Western blot；參照方法七)來偵測 cell 內的 FMRP，而且也成功的利用此方法偵測到 HeLa cell 內的 FMRP。另外在西方轉漬法(Western blot)中的呈色方法也對抗體的偵測能力有極大的差別，我們使用兩種呈色方法：一、利用 4-chloro-1-naphthol 泡在甲醇和 TBS buffer (10 mM Tris pH 7.4、9.0 g NaCl 加 $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ 到 1000 ml)，再加入 H_2O_2 呈色；二、用 ECL Kit (Amersham)來呈色。在免疫沈澱-西方轉漬法(Immunoprecipitation-Western blot)中，我們同時使用這兩種呈色方法，結果發現用"一"的方法只看到一個弱的訊號，而使用"二"的方法可以很明顯的看出 FMRP 的 band (圖 2-26)。

綜合以上的結果我們作一個結論，我們合成的三種抗體(Anti-E、anti-H、anti-M)確實能偵測到 cell 內的 FMRP，如能配合上免

疫沈澱-西方轉漬法(Immunoprecipitation-Western blot)和 ECL kit 呈色法，將能夠有效的應用來偵測 cell 內有無 FMRP 蛋白的表現。由於這些技術的建立，將可以使我們在大量篩檢易脆 X 染色體症候群上更快速、更簡便和更安全。如再加上我們實驗室原本有的診斷技術--- 南方氏轉漬法(Southern blot)、聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction)、 RT-PCR---將使我們更能準確的診斷易脆 X 染色體症候群。

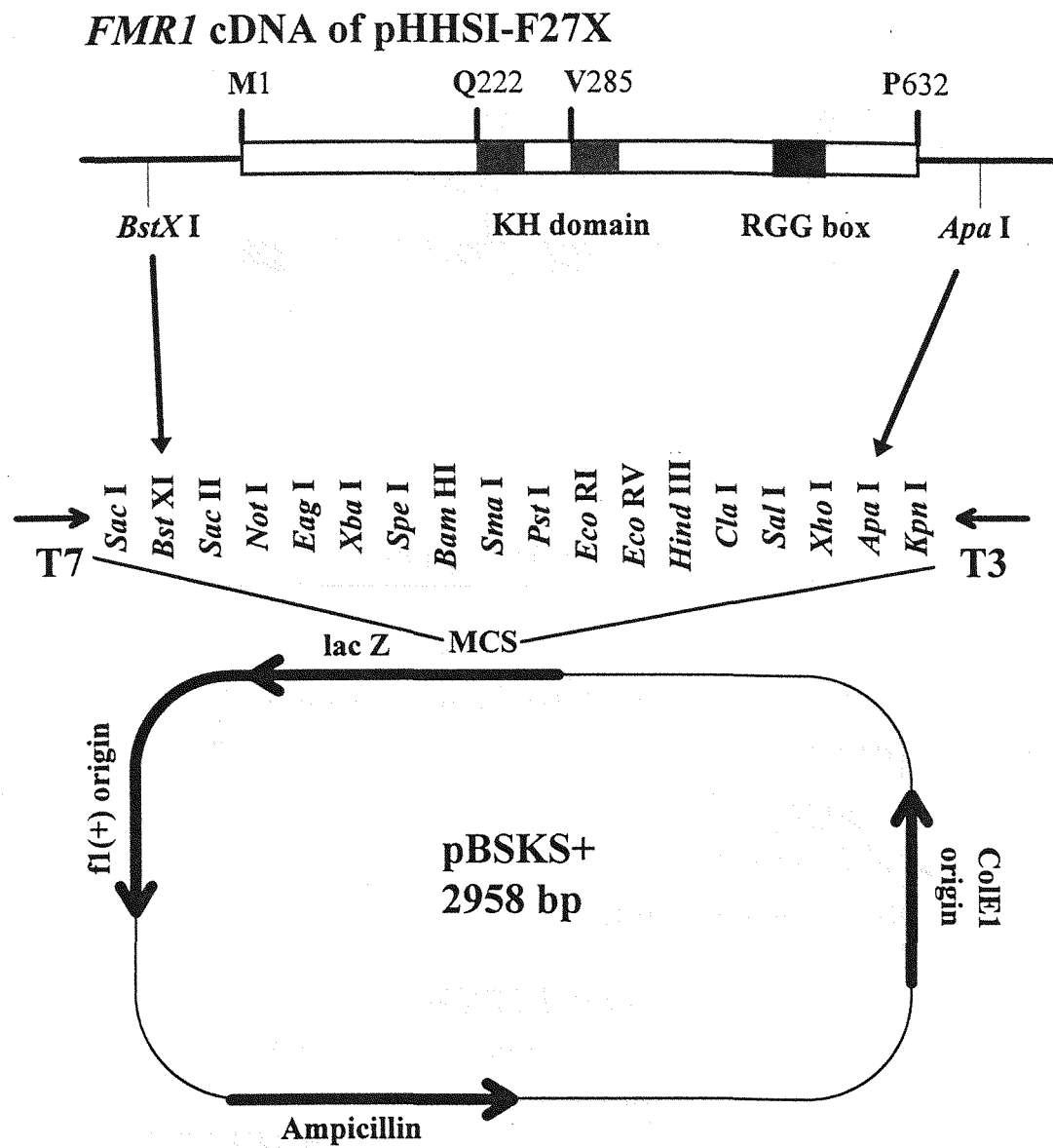


圖 2-1 pBSHAF27XE 質體的建構(Construction of pBSHAF27XE)

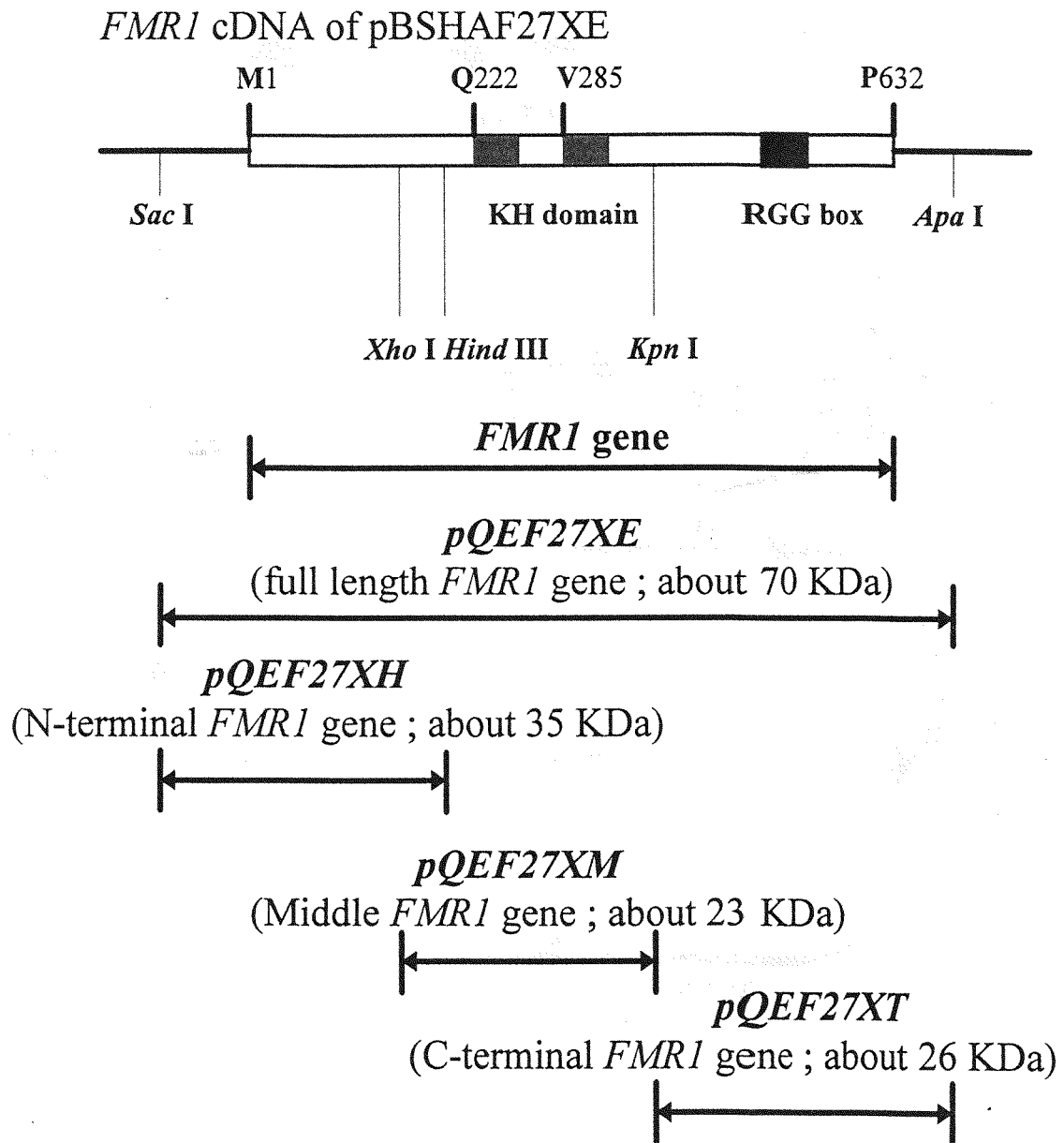


圖 2-2 各段蛋白表現質體建構(Construction of expression plasmid)

FMRI cDNA of pBSHAF27XE

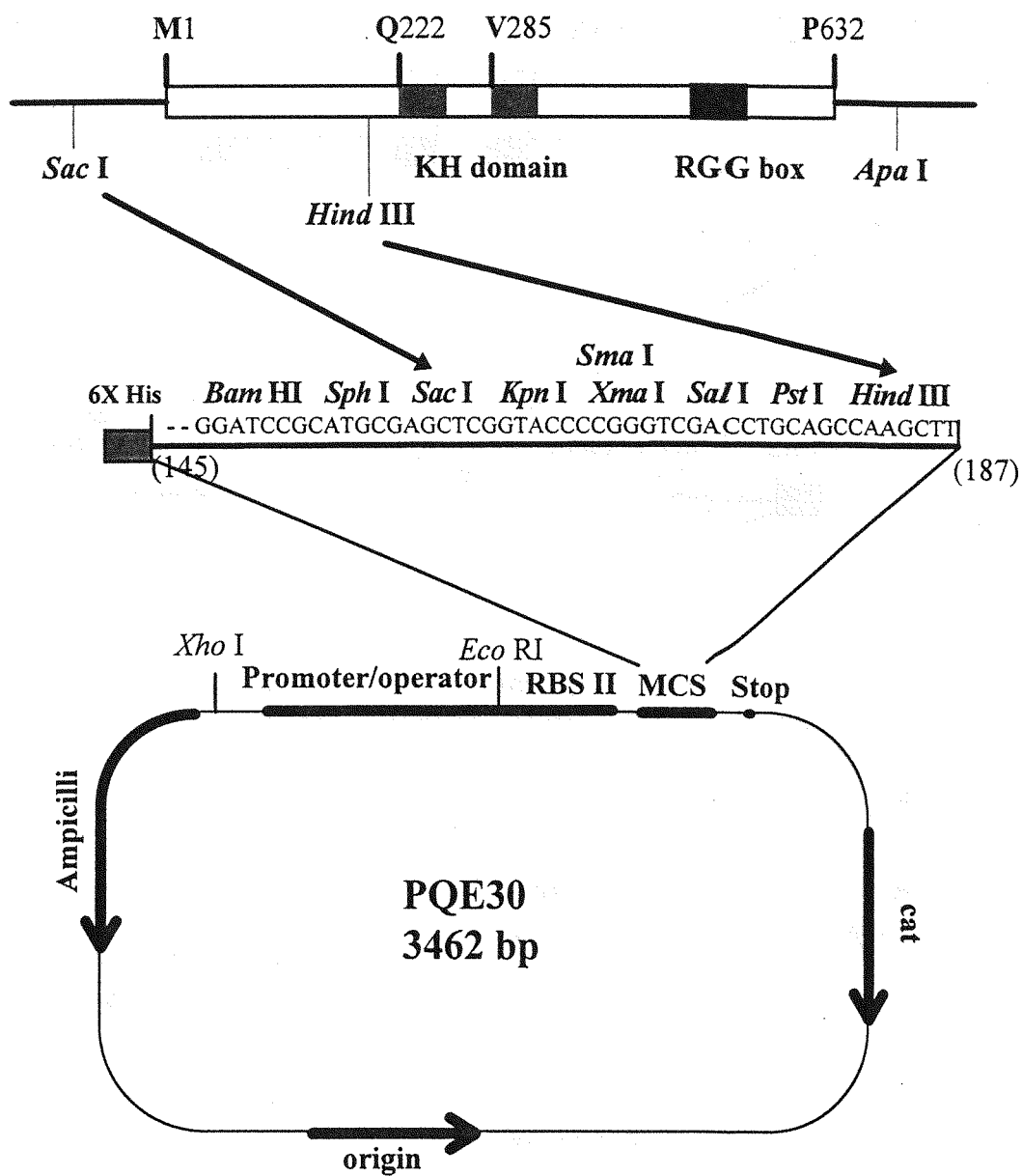


圖 2-4 pQEF27XH 蛋白表現質體的建構(Construction of pQEF27XH)

FMR1 cDNA of pBSHAF27XE

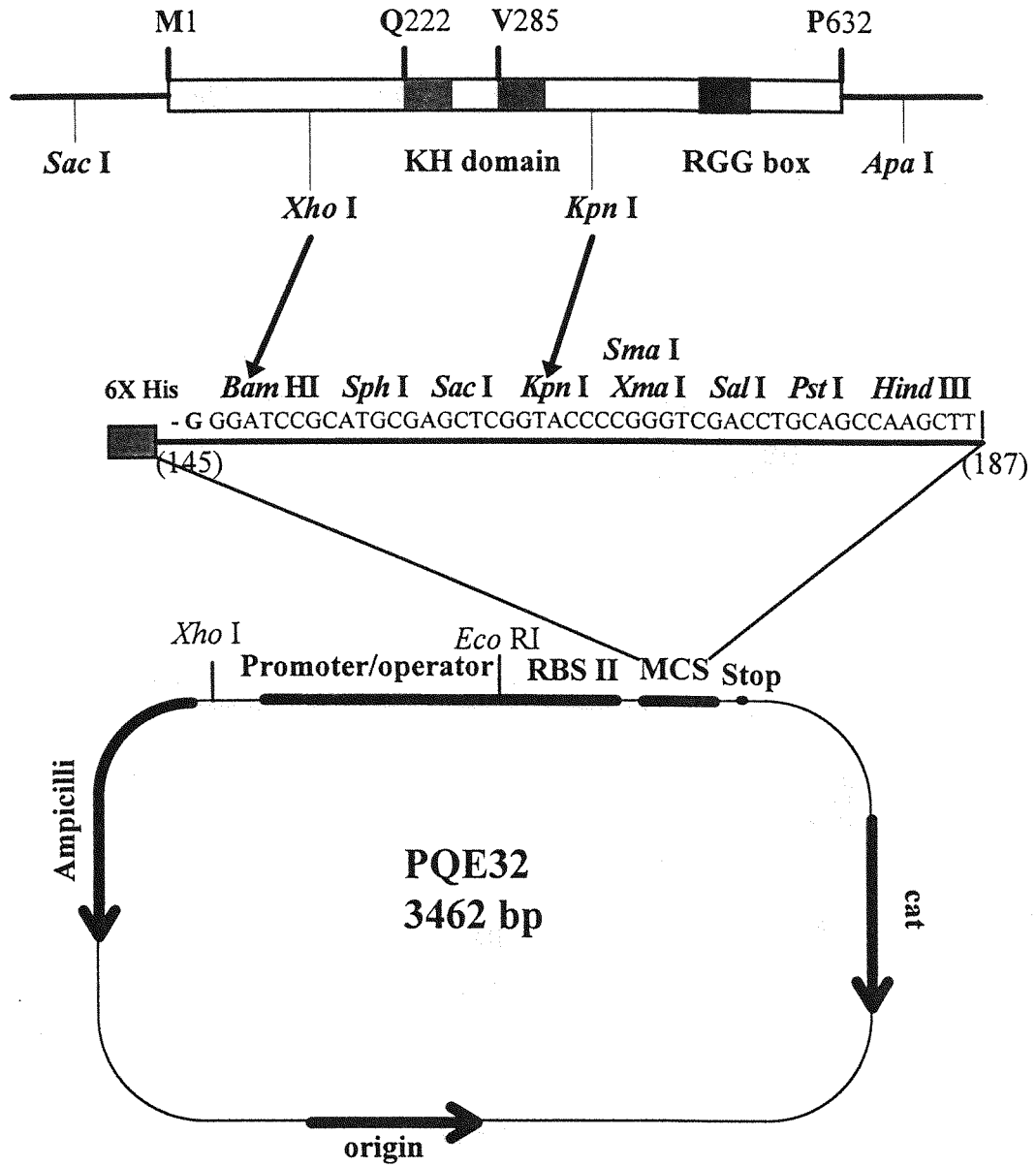


圖 2-5 pQE32 蛋白表現質體的建構(Construction of pQE32)

FMRI cDNA of pBSHAF27XE

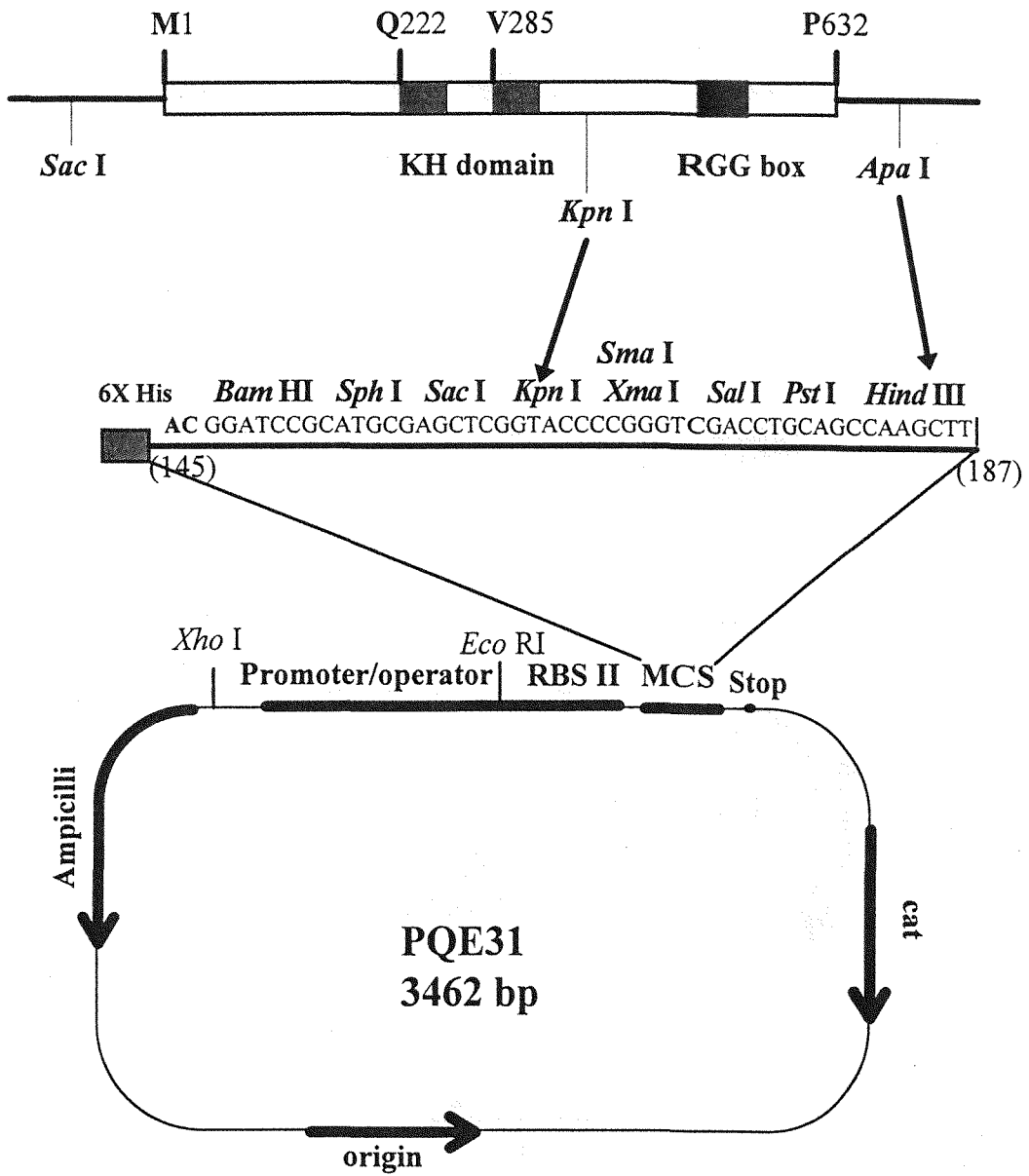


圖 2-6 pQE31 蛋白表現質體的建構(Construction of pQE31)

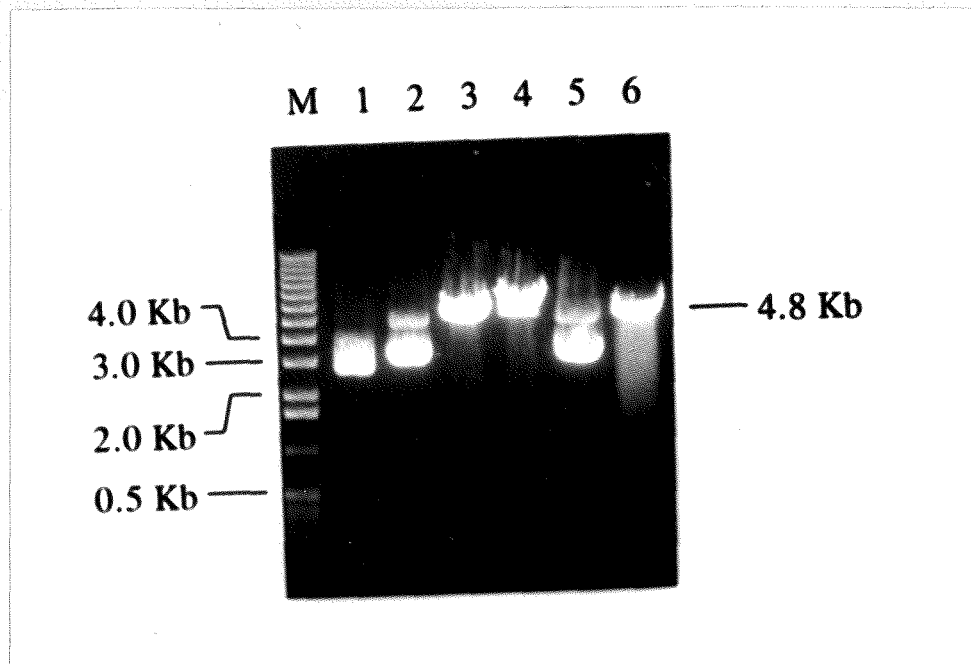
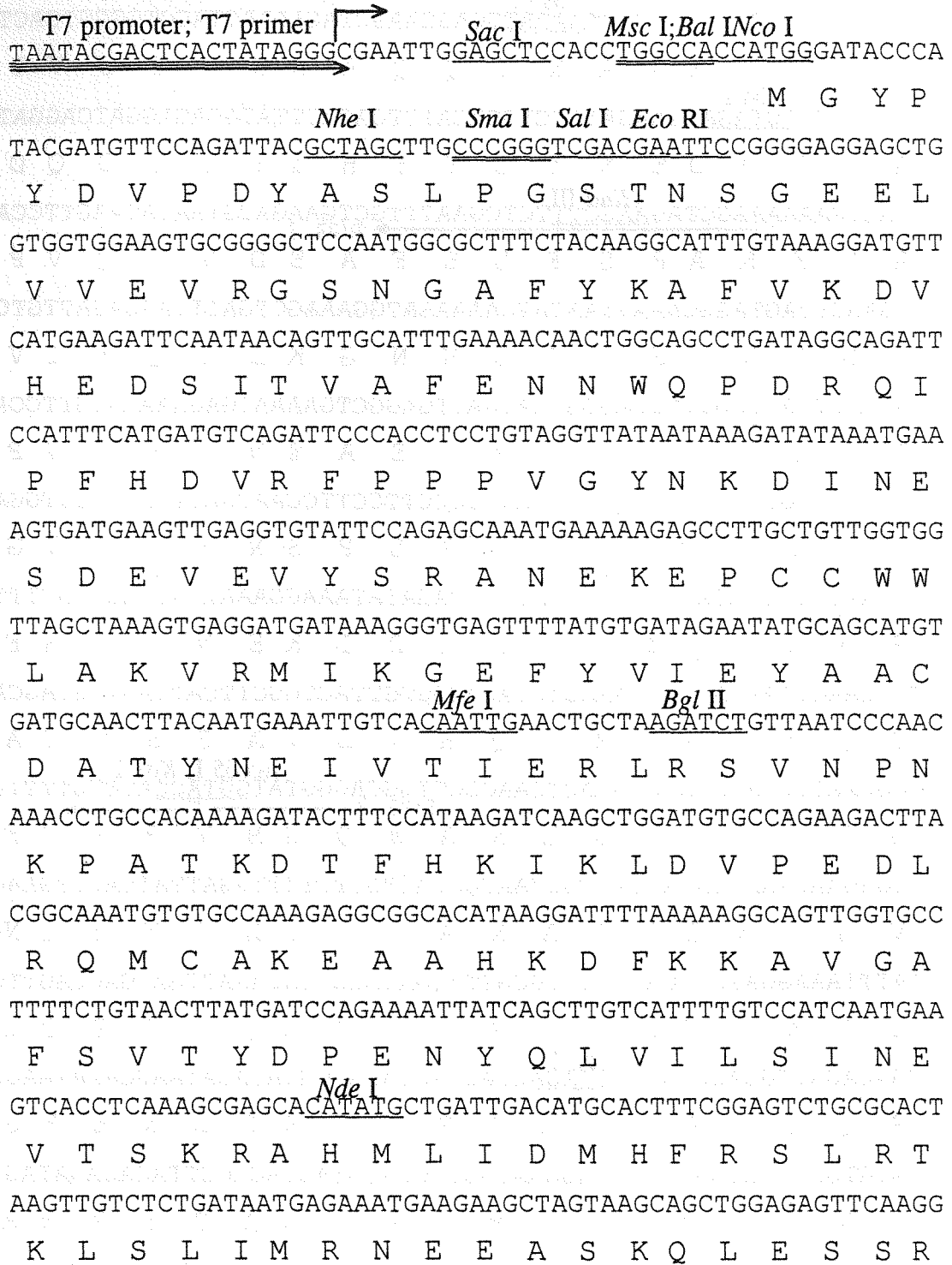


圖 2-7 pBSHAF27XE 質體限制酶切點定位(enzyme mapping) 經洋菜膠電泳分析情形

分別取 3 μ l pBSHAF27XE 質體 DNA 經不同限制酶 (enzyme) 在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘後，加 2 μ l DNA 加入 dye，分別加入到不同 Lane，跑 1x TAE buffer 0.7% agarose gel 分析。M 是指 1 kb DNA marker，其 size 大小被指示在左邊。其餘的 lane 依序為-- Lane 1：pBluescript KS+ vector 的 DNA；Lane 2：pBSHAF27XE 質體未經限制酶(enzyme)作用的 DNA；Lane 3：pBSHAF27XE 質體經 *Apa* I 限制酶 (enzyme) 作用後的 DNA；Lane 4：pBSHAF27XE 質體經 *Eco* RI 限制酶(enzyme) 作用後的 DNA；Lane 5：pBSHAF27XE 質體經 *Eco* RV 限制酶(enzyme) 作用後的 DNA；Lane 6：pBSHAF27XE 質體經 *Nco* I 限制酶(enzyme) 作用後的 DNA。右邊所指的是各限制酶(enzyme) 作用後各 DNA 片段 size 大小。

圖 2-9 *FMR-1* cDNA sequence of pBSHAF27XE

The pBSHAF27XE is a plasmid that based on pBlues--cript KS(+). The insert is an HA-tagged sequence followed by *FMR-1* cDNA sequence under the control of T7 promoter. The fine map of this cloning region is showing below:



Xho I *Bgl* II
 CAGCTTGCCTCGAGATTTTCATGAACAGTTTATCGTAAGAGAAGATCTGATGGGTCTA
 Q L A S R F H E Q F I V R E D L M G L
 GCTATTGGTACTCATGGTGCTAATATT *Ssp* I CAGCAAGCTAGAAAAGTACCTGGGGTCACT
 A I G T H G A N I Q Q A R K V P G V T
 GCTATTGATCTAGATGAAGATACCTGCACATTTTCATATTTATGGAGAGGATCAGGAT
 A I D L D E N T C T F H I Y G E D Q D
 GCAGTGAAAAAAGCTAGAAAGCTTTCTCGAATTTGCTGAAGATGTAATACAAGTTCCA
 A V K K A R S F L E F A E D V I Q V P
 AGAACTTAGTAGGCAAAGTAATAGGAAAAAATGGAAAGCTGATTCAGGAGATTGTG
 R N L V G K V I G K N G K L I Q E I V
 GACAAGTCAGGAGTTGTGAGGGTGAGGATTGAGGCTGAAAATGAGAAAAATGTTCCA
 D K S G V V R V R I E A E N E K N V P
 CAAGAAGAGGAAATTATGCCACCAAATCCCTTCCTTCCAATAATTCAAGGGTTGGA
 Q E E E I M P P N S L P S N N S R V G
 CCTAATGCCCCAGAAGAAAAAAAACATTTAGATATAAAGGAAAACAGCACCCATTTT
 P N A P E E K K H L D I K E N S T H F
 TCTCAACCTAACAGTACAAAAGTCCAGAGGGTGTTAGTGGCTTCATCAGTTGTAGCA
 S Q P N S T R V Q R V L V A S S V V A
 GGGGAATCCCAGAAACCTGAACTCAAGGCTTGGCAGGGTATGGTACCATTGTTTTT
 G E S Q K P E L K A W Q G M V P F V F
 GTGGGAACAAAGGACAGCATCGCTAATGCCACTGTTCTTTTGGATTATCACCTGAAC
 V G T K D S I A N A T V L L D Y H L N
 TATTTAAAGGAAGTAGACCAGTTGCGTTTGGAGAGATTACAAATTGATGAGCAGTTG
 Y L K E V D Q L R L E R L Q I D E Q L
 CGACAGATTGGAGCTAGTTCTAGACCACCACCAAATCGTACAGATAAGGAAAAAAGC
 R Q I G A S S R P P P N R T D K E K S
 TATGTGACTGATGATGGTCAAGGAATGGGTTCGAGGTAGTAGACCTTACAGAAATAGG
 Y V T D D G Q G M G R G S R P Y R N R
 GGGCACGGCAGACGCGGTCCTGGATATACTTCAGGAACTAATTCTGAAGCATCAAAT
 G H G R R G P G Y T S G T N S E A S N

GCTTCTGAAACAGAATCTGACCACAGAGACGAACTCAGTGATTGGTCATTAGCTCCA
 A S E T E S D H R D E L S D W S L A P
 ACAGAGGAAGAGAGGGAGAGCTTCCTGCGCAGAGGAGACGGACGGCGGCGTGGAGGG
 T E E E R E S F L R R G D G R R R G G
 GGAGGAAGAGGACAAGGAGGAAGAGGACGTGGAGGAGGCTTCAAAGGAAAACGACGAT
 G G R G Q G G R G R G G G F K G N D D
 CACTCCCGAACAGATAATCGTCCACGTAATCCAAGAGAGGCTAAAGGAAGAACAACA
 H S R T D N R P R N P R E A K G R T T
 GAT ^{*Bam*H I} GATCCCTTCAGATCAGAGTTGACTGCAATAATGAAAGGAGTGTCCACACTAAA
 D G S L Q I R V D C N N E R S V H T K
 ACATTACAGAATACCTCCAGTGAAGGTAGTCGGCTGCGCACGGGTAAAGATCGTAAC
 T L Q N T S S E G S R L R T G K D R N
 CAGAAGAAAGAGAAGCCAGACAGCGTGGATGGTCAGCAACCA ^{*Bss*S I} CTCGTGAATGGAGTA
 Q K K E K P D S V D S Q Q P L V N G V
 CCCTAAACTGCATAATTCTGAAGTTATATTTCCCTATACCATTTCCGTAATTCTTATT
 ← RGG 5
 P ter
 CCATATTAGAAAACCTTTGTTAGGCCAAAGACAAATAGTAGGCAAGATGGCACAGGGC

 ATGAAATGAACACAAATTATGCTAAGAATTTTTTATTTTTTGGTATTGGGGGTTCGA

^{*Apa* I *Acc*65 I; *Kpn* I}
 AATCGCTAGAGGGCCCGGTACCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTTTCGAG
 CTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC ← T3 primer
 ← Reverse primer

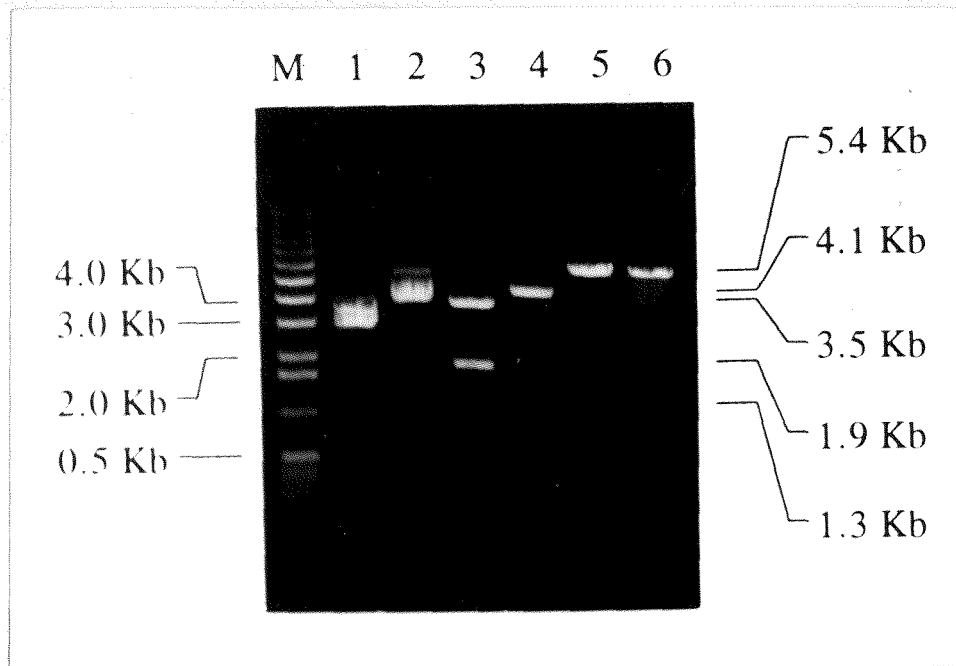


圖 2-10 pQEF27XE 質體限制酶切點定位(enzyme mapping)經洋菜膠電泳分析情形

分別取 3 μ l pQEF27XE 質體 DNA 經不同限制酶(enzyme)在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘後，加 2 μ l DNA 加入 dye，分別加入到不同 Lane，跑 1x TAE buffer 0.7 % agarose gel 分析。M 是指 1 kb DNA marker，其 size 大小被指示在左邊。其餘的 lane 依序為-- Lane 1：pQE30 vector 的 DNA；Lane 2：pQEF27XE 質體未經限制酶(enzyme)作用的 DNA；Lane 3：pQEF27XE 質體經 *Bam* HI 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 4：pQEF27XE 質體經 *Hind* III 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 5：pQEF27XE 質體經 *Kpn* I 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 6：pQEF27XE 質體經 *Sac* I 限制酶(enzyme)作用後的 DNA。右邊所指的是各限制酶(enzyme)作用後各 DNA 片段 size 大小。

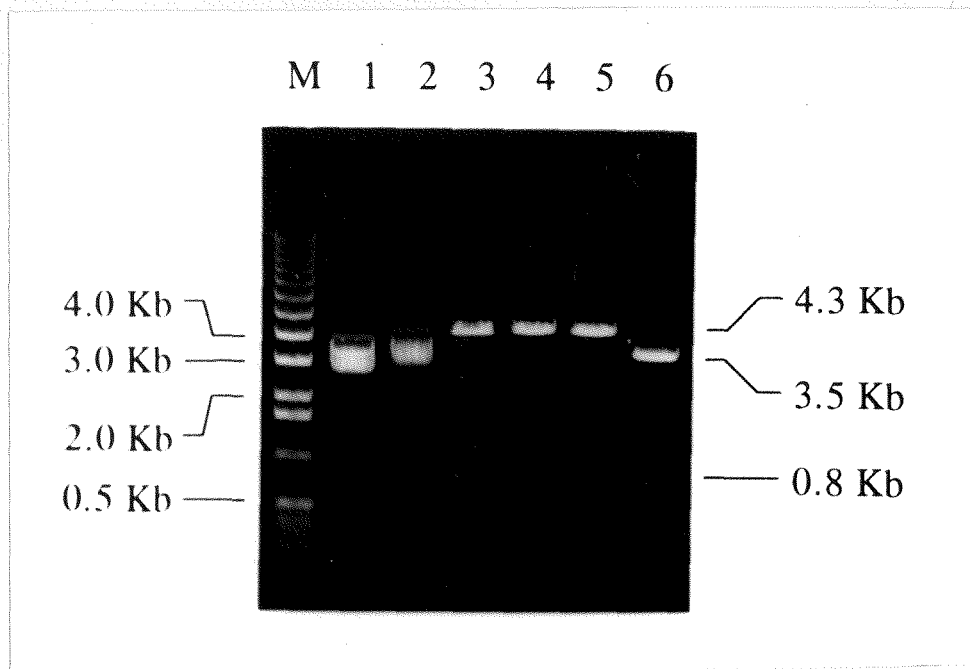


圖 2-11 pQEF27XH 質體限制酶切點定位(enzyme mapping)經洋菜膠電泳分析情形

分別取 3 μ l pQEF27XH 質體 DNA 經不同限制酶(enzyme)在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘後，加 2 μ l DNA 加入 dye，分別加入到不同 Lane，跑 1x TAE buffer 0.7% agarose gel 分析。M 是指 1 kb DNA marker，其 size 大小被指示在左邊。其餘的 lane 依序為-- Lane 1：pQE30 vector 的 DNA；Lane 2：pQEF27XH 質體未經限制酶(enzyme)作用的 DNA；Lane 3：pQEF27XH 質體經 *Eco* RI 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 4：pQEF27XH 質體經 *Hind* III 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 5：pQEF27XH 質體經 *Sac* I 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 6：pQEF27XH 質體經 *Xho* I 限制酶(enzyme)作用後的 DNA。右邊所指的是各限制酶(enzyme)作用後各 DNA 片段 size 大小。

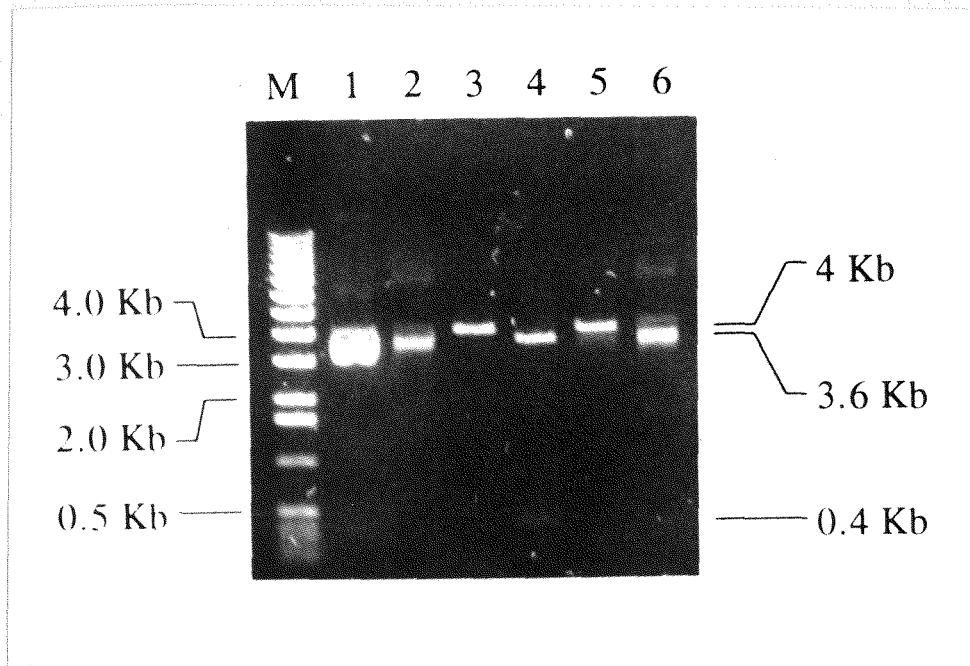


圖 2-12 pQEF27XM 質體限制酶切點定位(enzyme mapping)經洋菜膠電泳分析情形

分別取 3 μ l pQEF27XM 質體 DNA 經不同限制酶(enzyme)在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘後，加 2 μ l DNA 加入 dye，分別加入到不同 Lane，跑 1x TAE buffer 0.7 % agarose gel 分析。M 是指 1 kb DNA marker，其 size 大小被指示在左邊。其餘的 lane 依序為-- Lane 1：pQE32 vector 的 DNA；Lane 2：pQEF27XM 質體未經限制酶(enzyme)作用的 DNA；Lane 3：pQEF27XM 質體經 *Bag* II 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 4：pQEF27XM 質體經 *Hind* III 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 5：pQEF27XM 質體經 *Kpn* I 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 6：pQEF27XM 質體經 *Sac* I 限制酶(enzyme)作用後的 DNA。右邊所指的是各限制酶(enzyme)作用後各 DNA 片段 size 大小。

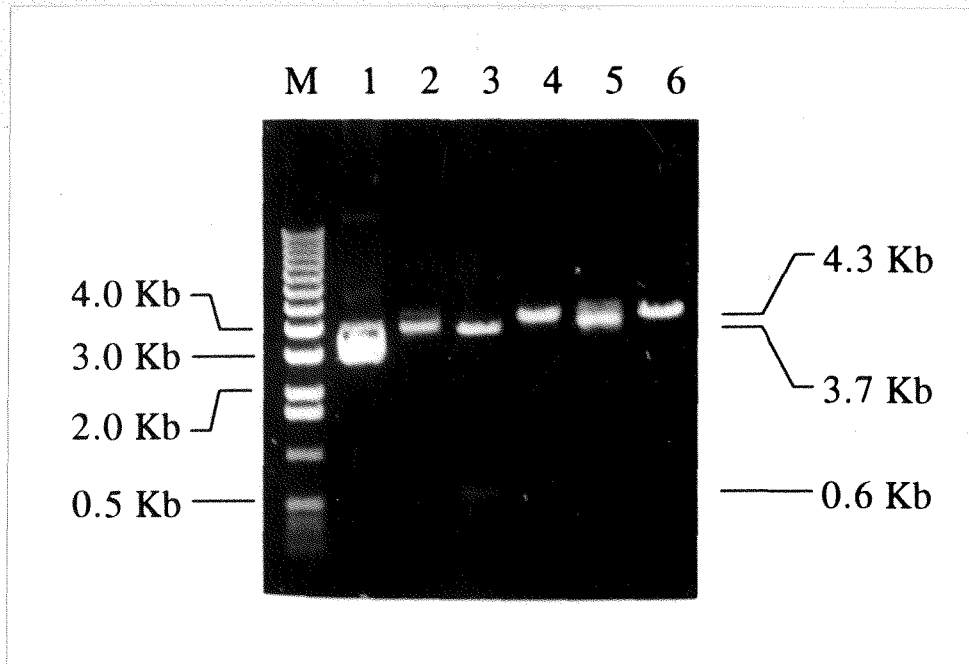


圖 2-13 pQEF27XT 質體限制酶切點定位(enzyme mapping)經洋菜膠電泳分析情形

分別取 3 μ l pQEF27XT 質體 DNA 經不同限制酶(enzyme)在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘後，加 2 μ l DNA 加入 dye，分別加入到不同 Lane，跑 1x TAE buffer 0.7% agarose gel 分析。M 是指 1 kb DNA marker，其 size 大小被指示在左邊。其餘的 lane 依序為-- Lane 1：pQE31 vector 的 DNA；Lane 2：pQEF27XT 質體未經限制酶(enzyme)作用的 DNA；Lane 3：pQEF27XT 質體經 *Apa* I 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 4：pQEF27XT 質體經 *Eco* RI 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 5：pQEF27XT 質體經 *Eco* RV 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 6：pQEF27XT 質體經 *Nco* I 限制酶(enzyme)作用後的 DNA。右邊所指的是各限制酶(enzyme)作用後各 DNA 片段 size 大小。

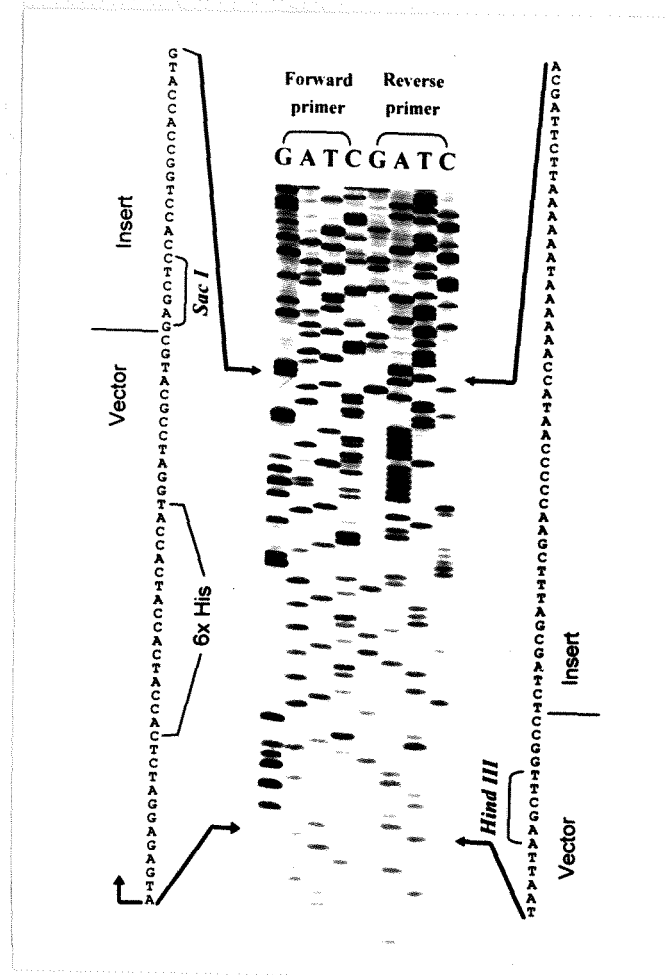


圖 2-14 pQEF27XE 質體核苷酸定序(DNA sequencing)

分別使用兩個引子(primers)來進行核苷酸定序(DNA sequencing)，順向引子(Forward primer)為 pQE 1 引子--- 5'-CGGATAACAATTTACACAG-3'；逆向引子(Reverse primer)為 pQE 2 引子--- 5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3'來確認 pQEF27XE 質體，兩個引子順序分別被指示在上方。左邊下方 ATG 所指的是轉譯(translation)起始位置；左邊中間 6x His 所指的是此區域可表現出 6 個 Histidine；左邊上方 Sac I 限制酶切點是 insert 和 vector 交接處。右邊下方橫線所指的是 insert 和 vector 交接處。跑 6% sequencing gel。

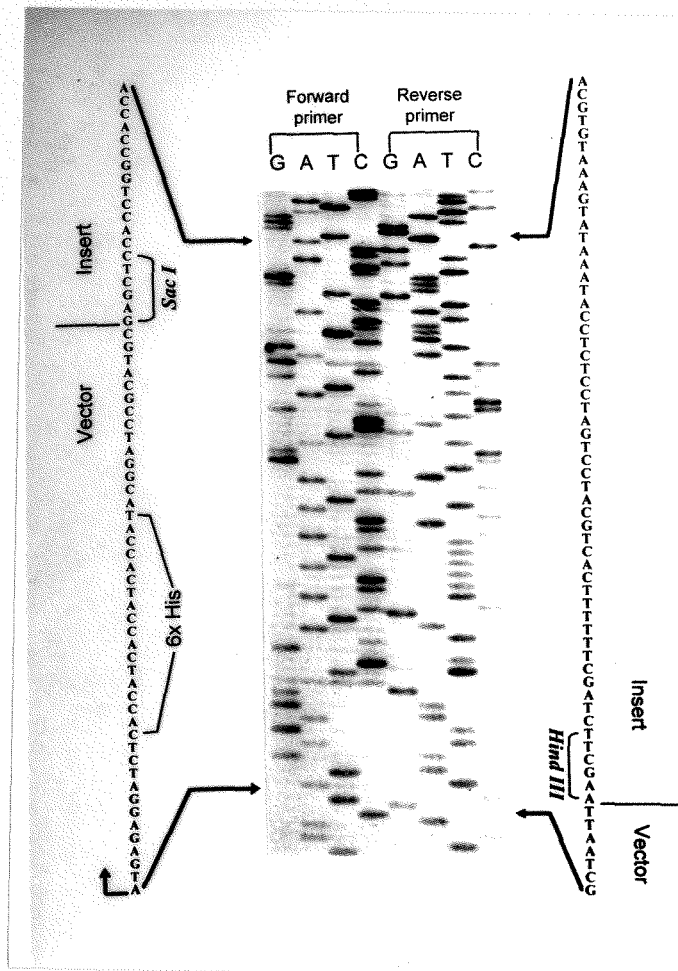


圖 2-15 pQEF27XH 質體核苷酸定序(DNA sequencing)

分別使用兩個引子 (primers) 來進行核苷酸定序 (DNA sequencing)，順向引子 (Forward primer) 為 pQE 1 引子 --- 5'-CGGATAACAATTTTCACACAG-3'；逆向引子 (Reverse primer) 為 pQE 2 引子 --- 5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3' 來確認 pQEF27XH 質體，兩個引子順序分別被指示在上方。左邊下方 ATG 所指的是轉譯 (translation) 起始位置；左邊中間 6x His 所指的是此區域可表現出 6 個 Histidine；左邊上方 *Sac* I 限制酶切點是 insert 和 vector 交接處。右邊下方 *Hind* III 限制酶切點是 insert 和 vector 交接處。跑 6% sequencing gel。

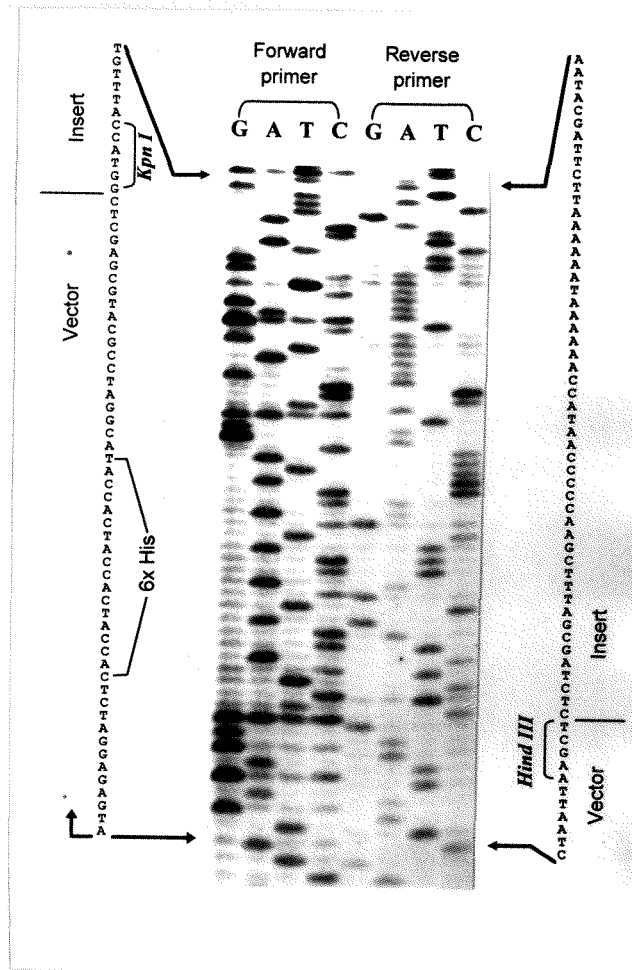


圖 2-17 pQEF27XT 質體核苷酸定序(DNA sequencing)

分別使用兩個引子(primers)來進行核苷酸定序(DNA sequencing)，順向引子(Forward primer)為 pQE 1 引子--- 5'-CGGATAACAATTCACACAG-3'；逆向引子(Reverse primer)為 pQE 2 引子--- 5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3'來確認 pQEF27XT 質體，兩個引子順序分別被指示在上方。左邊下方 ATG 所指的是轉譯(translation)起始位置；左邊中間 6x His 所指的是此區域可表現出 6 個 Histidine；左邊上方 *Kpn I* 限制酶切點是 insert 和 vector 交接處。右邊下方 *Hind III* 限制酶切點是 insert 和 vector 交接處。跑 6% sequencing gel。

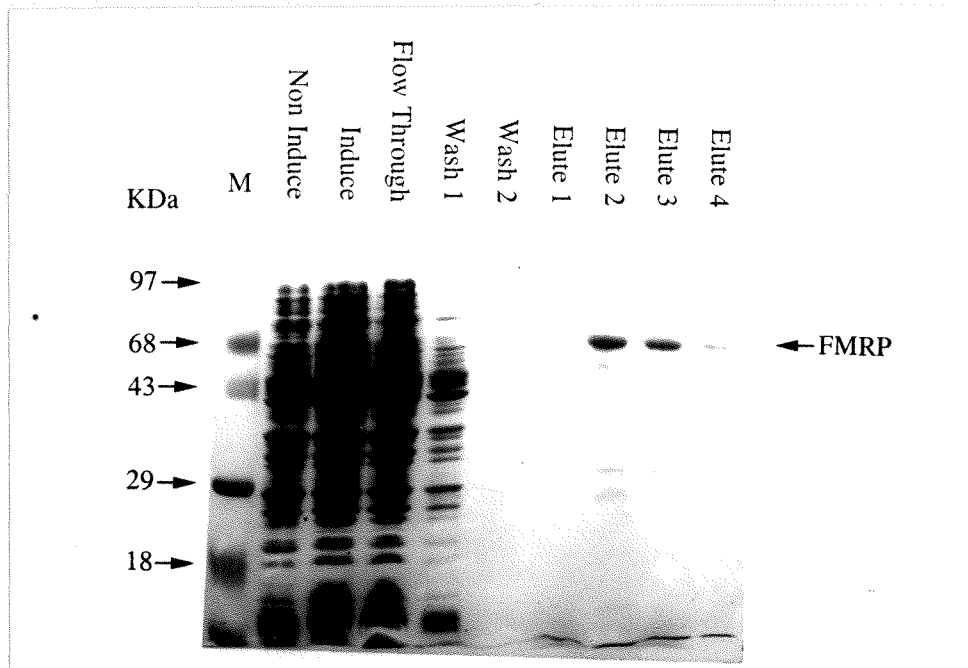


圖 2-18 全長 FMRP 蛋白(pQEF27XE)經 Ni-NTA resin 純化情形

pQEF27XE 蛋白表現質體在 1 mM IPTG 誘導 2 小時，表現出全長的 FMRP 經 Ni-NTA resin 純化。純化過程中各部份收取物標示在圖的上方，其每條 Lane 所加入的量由左至右依序為 2, 10, 10, 10, 10, 10, 20, 20, 20, 20 μ l 的 sample，再加上 10 μ l SDS sample buffer。在 95 $^{\circ}$ C 下煮 5 分鐘，跑 12.5 % SDS PAGE。M 所指的是 pre-stain protein marker，其 size 大小被指出在左邊，右邊 FMRP 所指的是全長 FMRP 蛋白位置，size 大小約 70 kDa。本圖是 Coomassie blue 染色的結果。

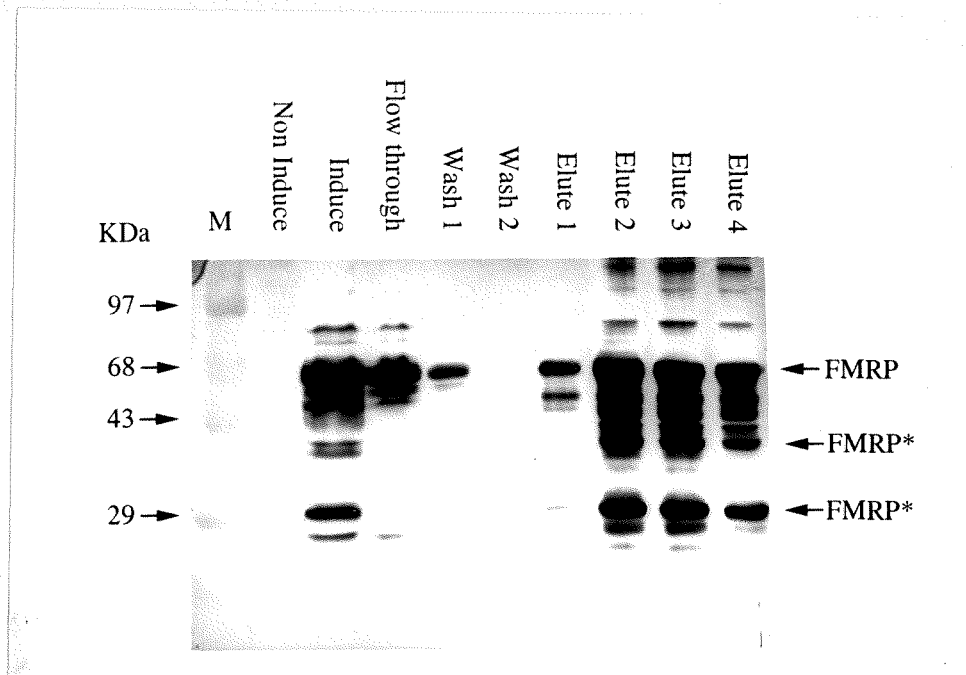


圖 2-19 全長 FMRP 蛋白(pQE27XE)經 Ni-NTA resin 純化情形

pQE27XE 蛋白表現質體在 1 mM IPTG 誘導 2 小時，表現出全長的 FMRP 經 Ni-NTA resin 純化。純化過程中各部份收取物標示在圖的上方，其每條 Lane 所加入的量由左至右依序為 2, 10, 10, 10, 10, 10, 20, 20, 20, 20 μ l 的 sample，再加上 10 μ l SDS sample buffer。在 95 $^{\circ}$ C 下煮 5 分鐘，跑 12.5 % SDS PAGE。M 所指的是 pre-stain protein marker，其 size 大小被指出在左邊，右邊 FMRP 所指的是全長 FMRP 蛋白位置，size 大小約 70 kDa。FMRP* 所指的是 FMRP 的 degradation form。本圖是西方轉漬法(Western blot)的結果(1st Ab anti-Histidine antibody 1:5000；2nd Ab peroxidase-labelled goat-anti-mouse-IgG 1:5000)。

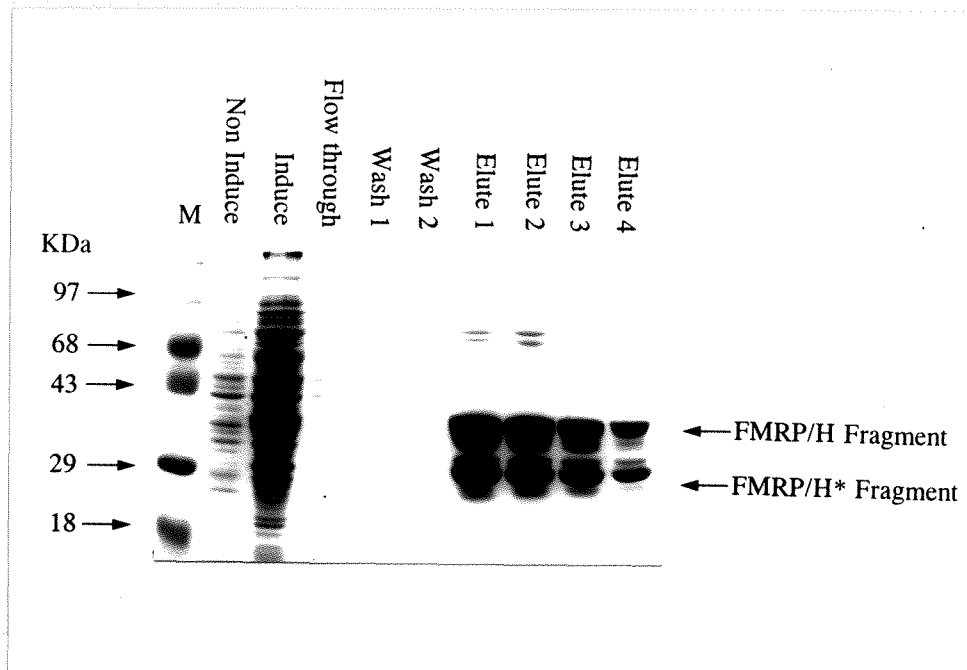


圖 2-20 N 端 FMRP 蛋白(pQEF27XH)經 Ni-NTA resin 純化情形

pQEF27XH 蛋白表現質體在 1 mM IPTG 誘導 2 小時，表現出全長的 FMRP 經 Ni-NTA resin 純化。純化過程中各部份收取物標示在圖的上方，其每條 Lane 所加入的量由左至右依序為 2, 10, 10, 10, 10, 10, 20, 20, 20, 20 μ l 的 sample，再加上 10 μ l SDS sample buffer。在 95 $^{\circ}$ C 下煮 5 分鐘，跑 12.5 % SDS PAGE。M 所指的是 pre-stain protein marker，其 size 大小被指出在左邊，右邊 FMRP/H fragment 所指的是 N 端 FMRP 蛋白位置，大小約 35 kDa，FMRP/H* size 所指的是 degradation form，大小約 30 kDa。本圖是 Coomassie blue 染色的結果。

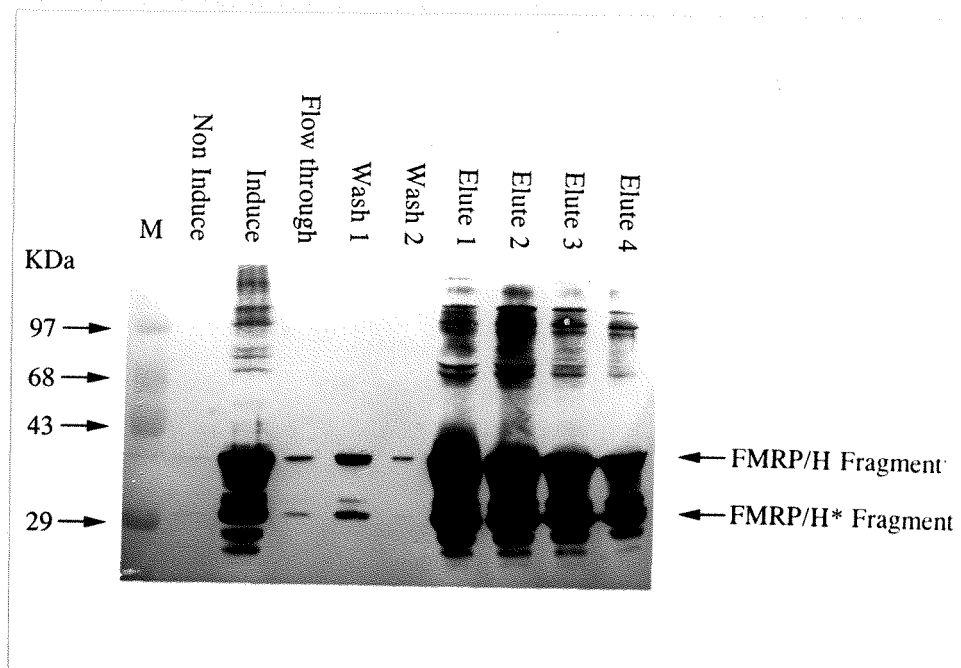


圖 2-21 N 端 FMRP 蛋白(pQEF27XH)經 Ni-NTA resin 純化情形

pQEF27XH 蛋白表現質體在 1 mM IPTG 誘導 2 小時，表現出全長的 FMRP 經 Ni-NTA resin 純化。純化過程中各部份收取物標示在圖的上方，其每條 Lane 所加入的量由左至右依序為 2, 10, 10, 10, 10, 10, 20, 20, 20, 20 μ l 的 sample，再加上 10 μ l SDS sample buffer。在 95 $^{\circ}$ C 下煮 5 分鐘，跑 12.5 % SDS PAGE。M 所指的是 pre-stain protein marker，其 size 大小被指出在左邊，右邊 FMRP/H fragment 所指的是 N 端 FMRP 蛋白位置，大小約 35 kDa，FMRP/H* 所指的是 degradation form，大小約 30 kDa。本圖是西方轉漬法(Western blot)的結果(1st Ab anti-Histidine antibody 1:5000；2nd Ab peroxidase-labelled goat-anti-mouse-IgG 1:5000)。

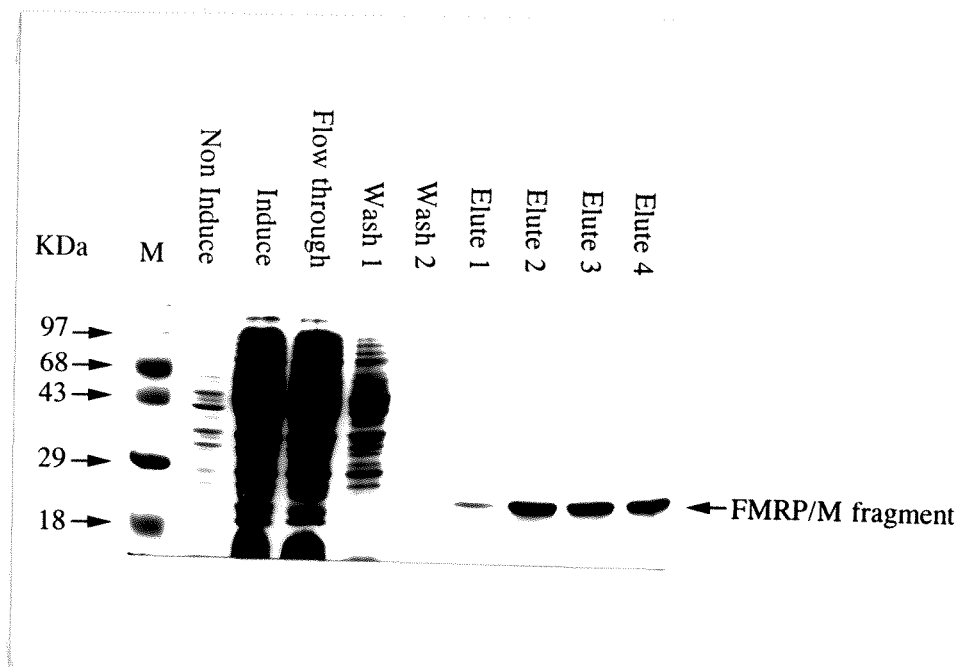


圖 2-22 中段 FMRP 蛋白(pQEF27XM)經 Ni-NTA resin 純化情形

pQEF27XM 蛋白表現質體在 1 mM IPTG 誘導 2 小時，表現出全長的 FMRP 經 Ni-NTA resin 純化。純化過程中各部份收取物標示在圖的上方，其每條 Lane 所加入的量由左至右依序為 2, 10, 10, 10, 10, 10, 20, 20, 20, 20 μ l 的 sample，再加上 10 μ l SDS sample buffer。在 95 $^{\circ}$ C 下煮 5 分鐘，跑 12.5 % SDS PAGE。M 所指的是 pre-stain protein marker，其 size 大小被指出在左邊，右邊 FMRP/M 所指的是中段 FMRP 蛋白位置，size 大小約 23 kDa。本圖是 Coomassie blue 染色的結果。

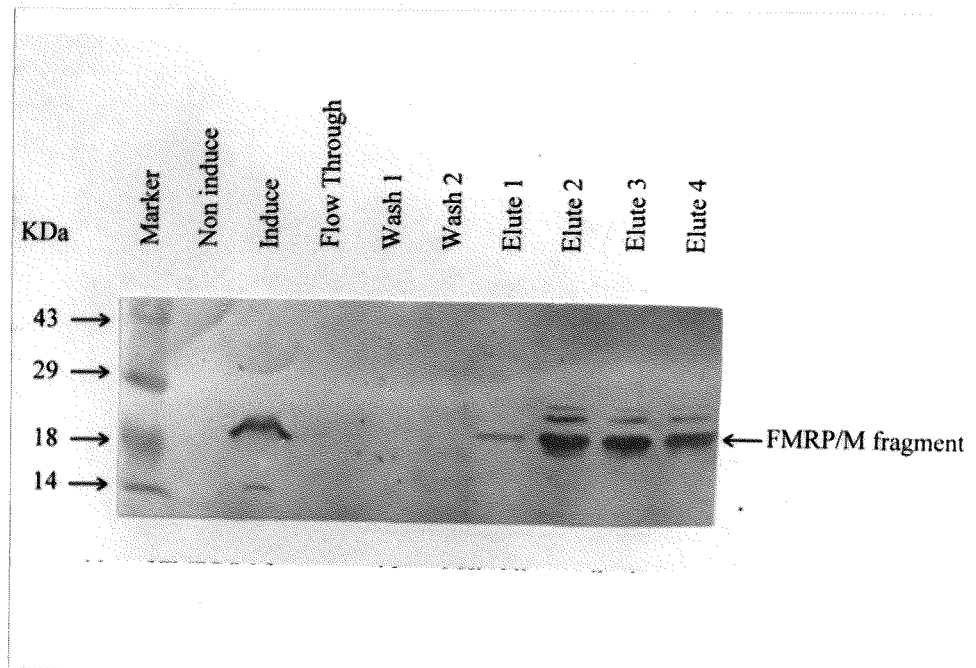


圖 2-23 中段 FMRP 蛋白(pQEF27XM)經 Ni-NTA resin 純化情形

pQEF27XM 蛋白表現質體在 1 mM IPTG 誘導 2 小時，表現出全長的 FMRP 經 Ni-NTA resin 純化。純化過程中各部份收取物標示在圖的上方，其每條 Lane 所加入的量由左至右依序為 2, 10, 10, 10, 10, 10, 20, 20, 20, 20 μ l 的 sample，再加上 10 μ l SDS sample buffer。在 95 $^{\circ}$ C 下煮 5 分鐘，跑 12.5 % SDS PAGE。M 所指的是 pre-stain protein marker，其 size 大小被指出在左邊，右邊 FMRP/M 所指的是中段 FMRP 蛋白位置，size 大小約 23kDa。本圖是西方轉漬法(Western blot)的結果 (1st Ab anti-Histidine antibody 1:5000；2nd Ab peroxidase-labelled goat-anti-mouse-IgG 1:5000)。

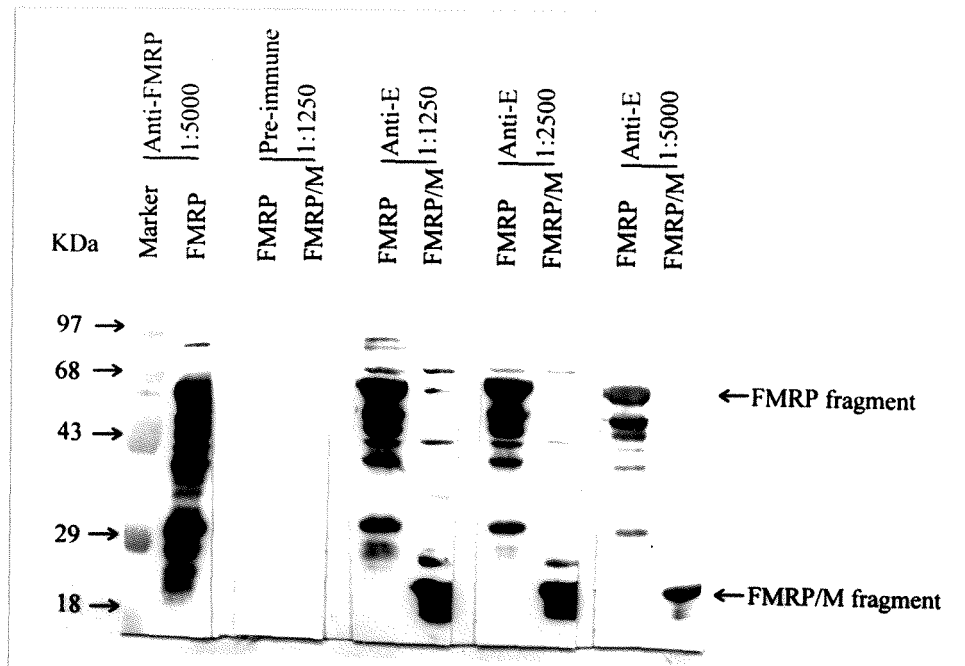


圖 2-24 anti-E polyclonal antibody 力價(titer)的偵測

以每兩個 Lane 為一組分別加入全長(FMRP)和中段(FMRP/M)的 FMRP 蛋白。拿 monoclonal antibody IC3(anti-FMRP)當陽性對照組，只有一條 lane 加入全長的 FMRP。並且拿 pre-immune 的 serum 當陰性對照組，三種抗體的稀釋倍數被指示在上方。每條 Lane 所加入的蛋白量都是 $10\mu\text{g}$ ，加上 $10\mu\text{l}$ SDS sample buffer。在 95°C 下煮 5 分鐘，跑 12.5% SDS PAGE。M 所指的是 pre-stain protein marker，其 size 大小被指出在左邊，右邊 FMRP 和 FMRP/M 所指的分別是全長和中段 FMRP 蛋白的位置。本圖是西方轉漬法(Western blot)的結果(anti-FMRP 所使用的 2nd Ab 是 peroxidase-labelled goat-anti-mouse-IgG 1:5000；其餘抗體所使用的 2nd Ab 是 peroxidase-labelled goat-anti-rabbit-IgG 1:5000)。

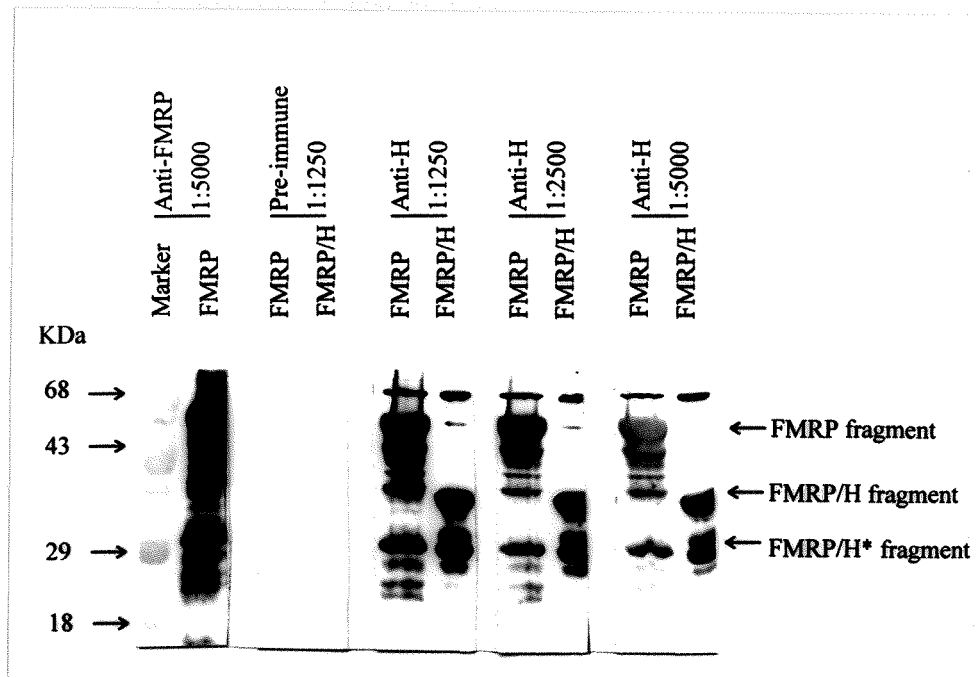


圖 2-25 anti-H polyclonal antibody 力價(titer)的偵測

以每兩個 Lane 為一組分別加入全長(FMRP)和 N 端 (FMRP/H)的 FMRP 蛋白。拿 monoclonal antibody IC3(anti-FMRP)當陽性對照組，只有一條 lane 加入全長的 FMRP。並且拿 pre-immune 的 serum 當陰性對照組，三種抗體的稀釋倍數被指示在上方。每條 Lane 所加入的蛋白量都是 $10\mu\text{g}$ ，加上 $10\mu\text{l}$ SDS sample buffer。在 95°C 下煮 5 分鐘，跑 12.5% SDS PAGE。M 所指的是 pre-stain protein marker，其 size 大小被指出在左邊，右邊 FMRP 和 FMRP/H 所指的分別是全長和 N 端 FMRP 蛋白的位置，FMRP/H* 所指的 N 端 FMRP 蛋白的 degradation form。本圖是西方轉漬法(Western blot)的結果(anti-FMRP 所使用的 2nd Ab 是 peroxidase-labelled goat-anti-mouse-IgG 1:5000；其餘抗體所使用的 2nd Ab 是 peroxidase-labelled goat-anti-rabbit-IgG 1:5000)。

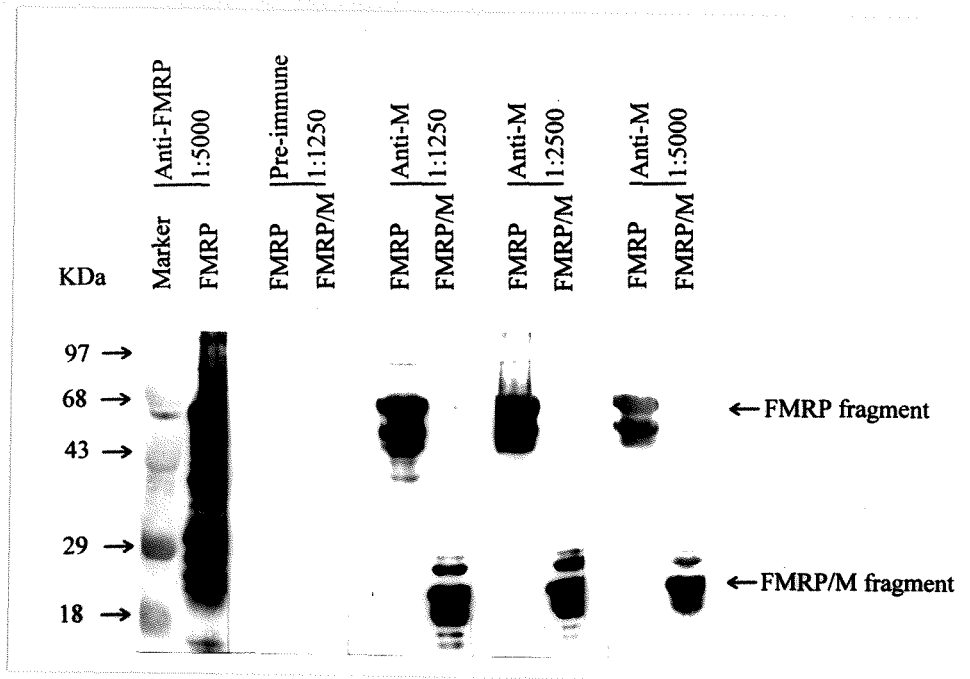


圖 2-26 anti-M polyclonal antibody 力價(titer)的偵測

以每兩個 Lane 為一組分別加入全長(FMRP)和中段(FMRP/M)的 FMRP 蛋白。拿 monoclonal antibody IC3(anti-FMRP)當陽性對照組，只有一條 lane 加入全長的 FMRP。並且拿 pre-immune 的 serum 當陰性對照組，三種抗體的稀釋倍數被指示在上方。每條 Lane 所加入的蛋白量都是 $10\mu\text{g}$ ，加上 $10\mu\text{l}$ SDS sample buffer。在 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下煮 5 分鐘，跑 12.5 % SDS PAGE。M 所指的是 pre-stain protein marker，其 size 大小被指出在左邊，右邊 FMRP 和 FMRP/M 所指的分別是全長和中段 FMRP 蛋白的位置。本圖是西方轉漬法(Western blot)的結果(anti-FMRP 所使用的 2nd Ab 是 peroxidase-labelled goat-anti-mouse-IgG 1:5000；其餘抗體所使用的 2nd Ab 是 peroxidase-labelled goat-anti-rabbit-IgG 1:5000)。

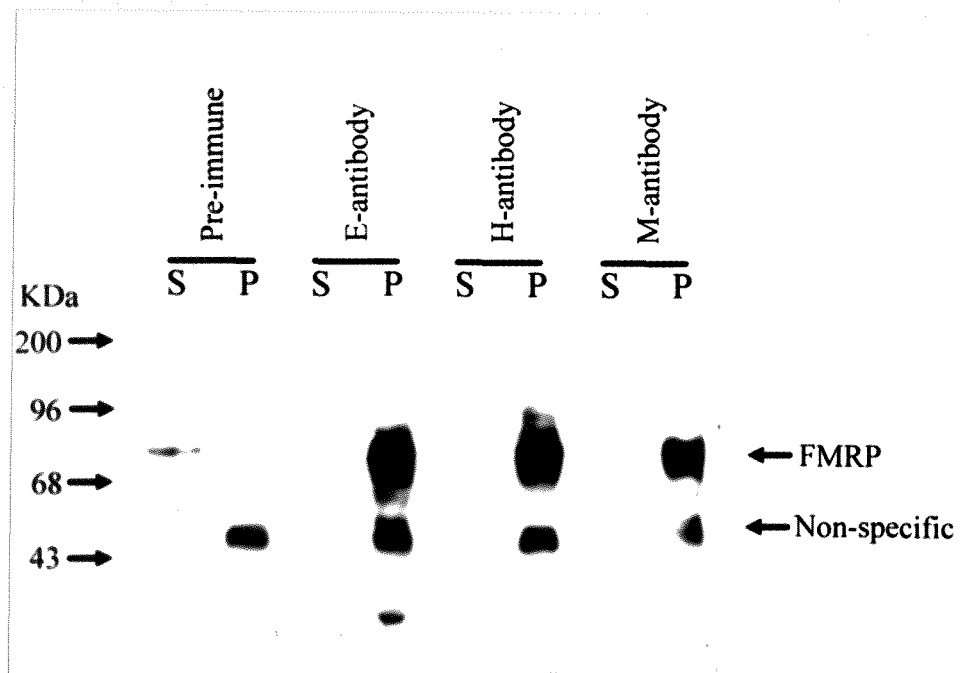


圖 2-27 用三種 polyclonal antibody 偵測 HeLa cell 內 FMRP 的情形

利用免疫沈澱-西方轉漬法(Immunoprecipitation-Western blot)來偵測 HeLa cell 內的 FMRP(參照方法七)。每條 Lane 加入量分別是取 20 μ l supernatant (S) 和 pellet (P) ，加入 10 和 30 μ l SDS sample buffer (NEB) ，在 95 $^{\circ}$ C 下煮 5 分鐘，跑 10% SDS PAGE ，然後進行西方轉漬法(1st Ab 是 monoclonal antibody ； 2nd Ab 是 peroxidase-labelled at-anti-mouse-IgG 1:5000)。蛋白質 Marker 的 size 大小被指示在左邊，右邊分別指出 FMRP 和一個 non-specific band 的位置。S 是指上清液 (supernatant) ； P 是指 Pellet 。

第三章

FMR-1 蛋白(FMRP)功能與結構之研究

(Study of functional-structural relationship of FMRP)

第一節

中文摘要

易脆 X 染色體症候群是一種人類的遺傳性疾病，主要引起人類遺傳性的智能障礙。隨著 *FMR-1* 基因的發表，從 *FMR-1* 的產物(FMRP)的氨基酸序列發現，FMRP 含有兩個 heterogeneous nuclear RNP K homology (KH) domain 和 RGG box。因此 FMRP 被認為是一種 RNA binding protein。並且在 in vitro 的實驗中已被證實和 RNA 有結合能力。

我們已經成功的在大腸桿菌內表現出全長的 FMRP 蛋白和突變的 FMRP^{R546H} 蛋白，而且也根據已知的實驗方法加以修改，證明了正常的全長 FMRP 在 in vitro 的實驗中可以 and poly G 及 *FMR-1* 本身的 mRNA 結合。而在不同 NaCl 的濃度下，全長 FMRP 蛋白和突變的 FMRP^{R546H} 蛋白與 poly G 的結合能力同樣會隨著 NaCl 的濃度提高而有減弱的現象。當 NaCl 的濃度達到 0.5 M 時正常 FMRP 和 poly G 的結合幾乎已不存在，而突變的 FMRP^{R546H} 蛋白在 NaCl 濃度達到 0.25 M 時即已失去與 poly G 的結合能力，這結果使我們認為 RGG box 的突變(R546H)在易脆 X 染色體症候群上可能扮演著很重要的角色。另外這技術的建立將有助於我們將來對 FMRP 結構和功能上的研究有極大的幫助。

第二節

英文摘要 (Abstract)

Fragile X syndrome is one of the most common human genetic diseases and the most common cause of hereditary mental retardation. The gene that causes fragile X syndrome, *FMR-1*, have been identified and sequenced. The *FMR-1* encoded protein, FMRP, contains two types of structural motifs: two heterogeneous nuclear RNP K homology (KH) domains and a RGG box. Therefore, it was suggested that FMRP is an RNA binding protein. In vitro, it has been shown that FMRP could bind RNA.

To establish the methodology used to detect the RNA binding ability of FMRP in our laboratory, we have successfully expressed the full-length FMRP and mutant FMRP^{R546H} in an *E. Coli*. protein expression system and demonstrated that FMRP can bind to poly G and in vitro transcribed *FMR-1* RNA. We found that the binding affinity of FMRP and FMRP^{R546H} to poly G decreases with increasing NaCl concentrations. The binding of FMRP to poly G was still stable in NaCl concentrations up to 0.25 M. However, the binding of this mutant protein (FMRP^{R546H}) to poly G is severely impaired in 0.25 M NaCl. These results demonstrate an essential role for RGG box in RNA binding. Hopefully, the establishment of this methodology will enable us to study the structural and functional relationship of FMRP.

第三節

序論 (Introduction)

易脆 X 染色體症候群(Fragile X Syndrome)是一種遺傳性的智能障礙疾病。目前所知造成易脆 X 染色體症候群的大多數原因都是 CGG trinucleotide tandem repeat [p(CG_n)n]發生倍增突變(expansion mutation)，使得 *FMR-1* 基因的轉錄起點上游的 CpG island 發生超甲基化(hypermethylation)，因而導致 *FMR-1* 基因無法表現，使得 *FMR-1* 的蛋白(FMRP)缺乏，而造成疾病的發生[Bell et al., 1991; Pieretti et al., 1991; Sutcliffe et al., 1992]。還有少數造成此疾病的原因，如基因的缺失(deletion)[Gedeon et al., 1992; Wohrle et al., 1992; Mornet et al., 1993; Tarleton, et al., 1993 ; Meijer et al., 1994; Mannermaa, et al., 1996; Wiegers, et al., 1994]和點突變(point mutation)[Boulle et al., 1993; Wang, et al., 1997]，這些突變的原因不是使得 *FMR-1* 基因無法表現缺乏 FMRP，不然就是使得 *FMR-1* 基因表現出來的蛋白(FMRP)失去了正常的功能，因此造成易脆 X 染色體症候群的發生。由此可發現 FMRP 在易脆 X 染色體症候群中扮演很重要的角色。

隨著 FMRP 的氨基酸序列(amino acid sequence)被發表[Verkerk et al., 1991]揭開了 FMRP 在易脆 X 染色體症候群中扮演何種角色的一連串研究。在 1993 年 Siomi 等人發現 FMRP 在結構上帶有 K homology (KH) domain 和 RGG box (是一個 arginine- and glycine-rich domain)兩個區域，如同一些已經知道的 RNA binding protein 如 Fibrillarin [Aris and Blobel et al., 1991 和 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein

(hnRNP) [Buvoli et al., 1988]一樣含有這兩個區域，所以 FMRP 被認為是一種 RNA binding protein，並且在 in vitro 的 RNA homopolymer binding assay 實驗中發現正常的 FMRP 確實可以和 poly G、poly U 強力的結合，但是不能和 poly A、poly C 結合，而 Ile-304-Asn 點突變(point mutation；位於 KH domain 上)和不同片段缺失(deletion)的突變蛋白(mutate protein)在 poly G、poly U 的實驗中，發現其結合的能力確實減弱[Siomi et al., 1993]。同年 Ashley 等人證明 FMRP 可以和 *FMR-1* 基因本身的 mRNA 及與 4% 人類胎兒腦內的 mRNA 結合[Ashley et al., 1993]。這些實驗更加的證明 FMRP 是一種 RNA binding protein，且 KH domain 和 RGG box 在 FMRP 結構上扮演著很重要的角色。

由於我們實驗室在患有易脆 X 染色體症群的病人的 *FMR-1* 基因發現一個 point mutation (G → A)，其位置再 RGG box 上，這個點突變導至 RGG box 上的一個氨基酸由 Arginine 變成 Histidine，因此本章將探討這個突變所表現的突變蛋白和正常的 FMRP 在功能上的有何差異？另外，在 1996 年的研究證實 FMRP 可以經由 RNA 和 ribosomes 60s subunit 結合[Khandjian, et al., 1996; Tamanini, et al., 1996]因此本章也將建立一個 FMRP 和 mRNA 結合的模式(model) 好將來可以進一步的瞭解 FMRP 可以和那些 mRNA 結合，藉以找出和那些基因或其產物之間的關係。

第四節

方法(Methods)

一、兩步驟-PCR 的方法製造點突變： (Two-step PCR-based targeted mutagenesis)

我們主要是利用聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)來製造點突變(site-directed mutagenesis) [Ito et al., 1990 ; Good and Nazar et al., 1992]。其過程如圖 3-1 所示。主要是利用兩組引子 (primers)：RGG 1 和帶有我們要製造突變點的引子 RGG 3 為一組；另一組為帶有將原有限制酶切點改變的引子 RGG 2 和 RGG 5。將這兩組引子分別以 pBSHAF27XE 當模板進行第一次 PCR 放大，PCR 的反應條件為：95 °C 5 分鐘 denature ； 95 °C 1 分鐘、50 °C 30 秒、72 °C 1 分鐘經過 35 次的循環； 72 °C 10 分鐘； 4 °C soke。這兩組 PCR 產物有一段重疊的 DNA 序列，所以將第一次 PCR 反應後的產物混合作為第二次 PCR 的模板，第二次 PCR 所使用的引子是 RGG 1 和 RGG 5，其反應條件同第一次 PCR 的條件。第二次 PCR 的產物中含有我們所要製造的單一突變 DNA、限制酶切點被改變的 DNA、完全沒改變的 DNA 和含有兩種突變點的 DNA。

二、突變質體的製備： (Mutant plasmid construction)

將第二次 PCR 產物在純化後(方法參照附錄一)，用限制酶 *Hind*

III (New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，將反應後的產物純化(方法參照附錄一)，再用限制酶 *Bam* HI (New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，使 PCR 產物兩端都形成尖端(sticky end)，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電泳分離後，將處理好的 PCR 產物從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN ; 方法參照附錄一)回收大約 850 bp 的片段(insert)。

取 10 µg pBSHAF27XE 質體 DNA ，用限制酶 *Hind* III (New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，將反應後的產物純化(方法參照附錄一)，再用限制酶 *Bam* HI (New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，使 pBSHAF27XE 質體兩端都形成尖端(sticky end)，且切成大小約 3.95 kb 和 850 bp 兩個片段，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電泳分離後，將處理好的 pBSHAF27XE 質體從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN ; 方法參照附錄一)回收大約 3.95 bp 的片段(vector)。

將處理好的 PCR 產物(insert)和 pBSHAF27XE (vector)，以約 3:1 的分子數比，利用 T₄ DNA 連接限制酶(New England BioLab)在 16 °C 下作用過夜，將兩者連接起來形成 pBSHAF27XE-M 質體。取連接好的質體 5 µl 送到經由 100 mM CaCl₂ 處理的大腸桿菌菌株 JM109 內(方法參照附錄一)，並且塗抹在含 ampicillin(10mg/ml)的 Luria-Bertani 培養基 (LB agar)上，在 37 °C 下過夜培養(Transformation ; 方法參照附錄一)，再從培養基上挑選單一菌落到含 ampicillin(10mg/ml)的 Luria-Bertani 培養液 (LB Medium)中在 37 °C 下過夜次培養，再將過夜次培養的菌液離心，使用 Plasmid miniprep kit (QIAGEN ; 方法參照附錄一)將質體抽出，最後利用限制酶切點定位(enzyme mapping)和核

苷酸定序(DNA sequencing ; 方法參照附錄一)等方法來檢測質體是否正確。

二、突變蛋白表現質體的建構:

(Construction of mutate protein expression plasmid)

取 10 μ g 突變質體(pBSHAF27XE-M)，經由 *Apa* I 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，將環形的 pBSHAF27XE-M 切成線形，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，再使用 Klenow 酵素(Promega) 在 30 °C 下作用 30 分鐘將此線形的 pBSHAF27XE-M 的兩端修補成平端(blunt end)，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，最後經由 *Sac* I 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘將全長的 *FMR-1* cDNA 切下，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電泳分離後，將全長的 *FMR-1* cDNA 從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN ; 方法參照附錄一)將全長的 *FMR-1* cDNA 回收，大約 2.0 Kb (insert)。

取 10 μ g pQE30 (QIAGEN)，經由 *Pst* I 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，將環形的 pQE30 切成線形，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，再使用 Klenow 酵素(Promega)在 30 °C 下作用 30 分鐘將線形的 pQE30 的兩端修補成平端(blunt end)，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，最後經由 *Sac* I 限制酶(New England BioLab)在 37 °C 下作用 60 分鐘，經由 1X TAE buffer 1.0 % 洋菜膠電泳分離後，將處理好的載體從膠上切下，再利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN ; 方法參照附錄一)回收大約 3.4 Kb 的片段(vector)。

將處理好的 *FMR-1* cDNA(insert)和 pQE30(vector)，以約 3:1 的分子數比，利用 T₄ DNA 連接限制酶(New England BioLab)在 16 °C 下作用過夜，將兩者連接起來形成 pQEF27XE-M 質體。取連接好的質體 5 µl 送到經由 100 mM CaCl₂ 處理的大腸桿菌菌株 JM109 內(方法參照附錄一)，並且塗抹在含 ampicillin(10mg/ml)的 Luria-Bertani 培養基 (LB agar)上，在 37 °C 下過夜培養(Transformation；方法參照附錄一)，再從培養基上挑選單一菌落到含 ampicillin(10mg/ml)的 Luria-Bertani 培養液 (LB Medium)中在 37 °C 下過夜次培養，再將過夜次培養的菌液離心，使用 Plasmid miniprep kit (QIAGEN；方法參照附錄一)將質體抽出，最後利用限制酶切點定位(enzyme mapping)和核苷酸定序(DNA sequencing；方法參照附錄一)等方法來檢測質體是否正確。

三、突變蛋白的表現: (Expression of mutant FMRP^{R546H})

取 3 µl 先前製備好的突變蛋白表現質體(mutant protein expression plasmid)送入經 100 mM CaCl₂ 處理的大腸桿菌菌株 M15 中(方法參照附錄一)，將其塗抹在含有抗生素(10 mg/ml ampicilline 和 25 mg/ml kanamycine)的 Luria-Bertani 培養基 (LB agar)中在 37 °C 過夜培養。然後挑單一菌落到含抗生素(10 mg/ml ampicilline 和 25 mg/ml kanamycine)的 Luria-Bertani 培養液 (LB Medium)中過夜次培養，取過夜次培養的菌液轉殖在新鮮的含抗生素含抗生素(10 mg/ml ampicilline 和 25 mg/ml kanamycine)的 Luria-Bertani 培養液 (LB Medium)中培養，直到菌液的濃度達到 OD₆₀₀ 約 0.6 - 0.7 左右，加入 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)最後濃度達 1 mM 誘導蛋白

的表現，經過在 37 °C 培養箱中培養二小時後，取出菌液並將菌液離心，離下的菌體以滅過菌的 d_2H_2O 洗掉殘留的培養液，再將 pellet 懸浮在 cell extract buffer (buffer A : 50 mM Tris , 10 mM β -mercaptoethanol , 1 mM PMSF , 1 % Nonidet P-40) 中，以超音波震盪器將細胞震碎，直到菌液澄清為止，離心後將上清液轉移到新的離心管，取部份上清液跑 12.5% SDS PAGE , SDS-polyacrylamide gel 經由 Coomassie blue 染色和西方轉漬法(Western Blot ; 1 Ab anti-histidine 1:5000 ; 2 Ab peroxidase-labelled goat-anti-mouse IgG 1:5000) 以確定蛋白是否有表現。

四、突變蛋白的純化：(Purification of mutant FMRP^{R546H})

取 2 ml Ni-NTA resin (QIAGEN) 放入 column 中，並且加入 2 ml buffer B (20 mM Tris, 100 mM KCl, 10 mM β -mercaptoethanol, 10 % (v/v) glycerol, 20 mM imidazole, pH 8.5 at 4 °C) 平衡 column，然後將溶在 buffer A (50 mM Tris , 10 mM β -mercaptoethanol , 1 mM PMSF , 1 % Nonidet P-40) 中的上清液加入 column 中，收取通過 column 後的液體(Flow through)，再利用含有不同 imidazole 濃度的 buffer (20 mM Tris, 100 mM KCl, 10 mM β -mercaptoethanol, 10 % (v/v) glycerol, pH 8.5 at 4 °C) 來清洗 column，收取清洗 column 後的液體 (Wash 1 : 3 ml 含 20 mM imidazole and 3 ml 含 30 mM imidazole ; Wash 2 : 3 ml 含 40 mM imidazole and 3 ml 含 50 mM imidazole)，最後以含有 100 mM imidazole 的 buffer C (20 mM Tris, 100 mM KCl, 10 mM β -mercaptoethanol , 10 % (v/v) glycerol, 100 mM imidazole, pH 8.5 at 4 °C)

4 ml 將結合在 Ni-NTA resin 的 FMRP 蛋白洗下來，每管收取 1 ml (Elute 1 ; Elute 2 ; Elute 3 ; Elute 4)。

各取 20 μ l 收下來的 Flow through ; Wash 1 ; Wash 2 ; Elute 1 ; Elute 2 ; Elute 3 ; Elute 4 液體，跑 12.5% SDS PAGE，SDS-polyacrylamide gel 經由 Coomassie blue 染色和西方轉漬法(Western Blot ; 1 Ab anti-histidine 1:5000 ; 2 Ab peroxidase-labelled goat-anti-mouse IgG 1:5000)以確定蛋白是否被 Ni-NTA resin 純化出來。

五、 poly G 結合分析(poly G binding assay)：

此方法主要參考 Siomi et al., 1993 所發表的方法加以修改。主要是取 poly G agarose (Sigma)和在大腸桿菌菌株 M15 所表現出來的全長 FMRP 蛋白，加 binding buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.4、2.5 mM MgCl₂、0.5 % Triton X 100 和含不同 NaCl 的濃度 0 M、0.1 M、0.25 M、0.5 M、1.0 M)總反應體積 0.5 ml，在 25 °C 下作用 2 小時，離心 6000 rpm 2 分鐘，將上清液(supernatant, "S")轉移到新的小離心管 (micro-centrifuge)，再用 binding buffer 洗五次，每次加 0.5 ml。最後加 40 μ l 3x SDS sample buffer，在 95 °C 下煮 5 分鐘，跑 10 % SDS PAGE 再利用西方轉漬法(Western blot)加以偵測，1 Ab 分別使用兩種作比較 (monoclonal antibody IC3 1:5000 和 anti-E polyclonal antibody 1:5000)。

六、 Biotin-labelled *FMR-1* mRNA 的製備： (Preparation of biotin-labelled *FMR-1* mRNA)

首先取 10 μg pBSHAF27XE 質體用 *Apa* I 限制酶((New England BioLab)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 60 分鐘，將環形的 pBSHAF27XE 切成線形，將 DNA 純化後(方法參照附錄一)，取 3 μg 線形的 pBSHAF27XE DNA 當模板，利用 T_7 RNA polymerase (BRL)作 in vitro transcription 反應，其反應條件如下：NTP mix (2.5 mM ATP、UTP、GTP 和 12.5 mM biotin-14-CTP (BRL) 及 12.5 mM CTP) 20 μl ；10 X T_7 polymerase 反應 buffer 20 μl ；10 mM DTT 5 μl ；placental Rnase inhibitor (10 u / μl) 5 μl ；3 μg 線形的 pBSHAF27XE DNA； T_7 RNA polymerase (10 u / μl) 總反應體積 50 μl ，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 60 分鐘，然後加 5 μl 3 M sodium acetate 和 50 μl isopropanol，放在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 30 分鐘將 RNA 沈澱，離心 12000 rpm 10 分鐘(室溫)，倒掉上清液用 200 μl 70 % 的酒精洗掉殘留的鹽類離心 5 分鐘，再用 200 μl 98 % 的酒精洗一次，風乾後加 100 μl DEPC-treated 的 $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ ，取 2 μl 去測 OD_{260} 決定 RNA 的濃度。

七、Biotin-labelled mRNA 結合實驗 (Biotin-labelled mRNA binding assay)：

本實驗方法主要參考 Ashley et al., 1993 年的報告稍加修改。首先取主要是取 biotin-labelled mRNA 160 ng 和在大腸桿菌菌株 M15 所表現出來的全長 FMRP 蛋白，加 binding buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.4、2.5 mM MgCl_2 、0.5 % Triton X 100 和含不同 NaCl 的濃度 0 M、0.1 M、0.25 M、0.5 M、1.0 M)總反應體積 0.2 ml，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 2 小時。然後加入 30 μl strepavidine agarose (BRL)和 biotin-labelled

mRNA 結合在 25 °C 下作用 2 小時，離心 6000 rpm 2 分鐘，將上清液 (supernatant, "S") 轉移到新的小離心管 (micro-centrifuge)，再用 binding buffer 洗五次，每次加 0.5 ml。最後加 40 μ l 3x SDS sample buffer，在 95 °C 下煮 5 分鐘，跑 10 % SDS PAGE 再利用西方轉漬法 (Western blot) 加以偵測。1 Ab 分別使用兩種作比較 (monoclonal antibody IC3 1:5000 和 anti-E polyclonal antibody 1:5000)。

第五節

結果(Results)

一、檢測突變 pBSHAF27XE-M 質體：

為證實含點突變的 pBSHAF27XE-M 質體(參照實驗方法二)是否正確含有我們所要的突變，利用限制酶切點定位(enzyme mapping)和核苷酸定序(DNA sequencing)兩個方法來篩選。

對於突變的 pBSHAF27XE-M 質體限制酶切點定位(enzyme mapping)方法，我們用 2 種不同限制酶--*Apa* I (New England BioLab)、*Kpn* I (Promega) --分別位於載體(vector)和突變的 *FMR-1* cDNA(insert) 上。每一樣本取 3 μ l 的質體 DNA，以各 10 U 的限制酶於 1X 限制酶專用 buffer 的濃度下，總反應體積在 10 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘，經由 1X TAE buffer 0.7 % 的洋菜膠電泳分析。

Apa I 限制酶的切點位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)的交接處，因此只有一個切點，可被切成一大約 4.8 Kb 的線形 DNA。而 *Kpn* I 的切點位於 insert 上且原本有一個切點，但是在突變的過程中此限制酶的切點不存在，因此突變的 pBSHAF27XE-M 質體並不會被 *Kpn* I 切成線形 (資料未附)。

經過初步限制酶切點定位的診斷後，更進一步的利用核苷酸定序法(DNA sequencing)來確認(方法參照附錄一)。總共使用三個引子(primers)來確認：一、為 FMRUS#1 引子--- 5'-CTTGCCTCGAGATTT CATGAACAG-3'來確定 insert 和 vector 的接點是否正確，結果如圖 3-2；二、為 RGG 5 引子---5'-CAGAATTATGCAGTTTTAGGG-3'來確

定我們在 RGG box 上的突變點，其結果如圖 3-3；三、為 RGG 1 引子--- 5'-AAGCTAGAAGCTTTCTCGAATTTGCTG-3'來確定 *Kpn* I 限制酶被改變的突變點，其結果如圖 3-4，並且利用 RGG 1、RGG 2、RGG 3 和 RGG 5 等四個引子將雙突變點的 PCR 產物整個核苷酸序列確定無誤，只含有設計的兩個突變點。

二、含有突變 *FMR-1* cDNA (pQEF27XE-M) 表現質體的檢測：

為證實抽出的突變 *FMR-1* cDNA (pQEF27XE-M) 表現質體(參照實驗方法)是否正確，利用限制酶切點定位(enzyme mapping)和核苷酸定序(DNA sequencing)兩個方法來確認。

限制酶切點定位(enzyme mapping)，我們分別設計了 4 種不同限制酶來檢測突變 *FMR-1* cDNA (pQEF27XE-M) 表現質體，利用 *Bam* HI (New England BioLab)、*Hind* III (New England BioLab)、*Kpn* I (Promega)、*Sac* I (New England BioLab) 等切點分別位於載體(vector) 和 *FMR-1* cDNA(insert) 上的 4 種不同限制酶來檢測。每一樣本 DNA 取 3 μ l 的質體 DNA，以各 10 U 的限制酶於 1X 限制酶專用 buffer 的濃度下，總反應體積在 10 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘，經由 1X TAE buffer 0.7 % 的洋菜膠電泳分析(圖 3-5)。 *Bam* HI 限制酶的切點同時位於載體(vector) 和 *FMR-1* cDNA(insert) 上，因此有二個切點，可被切成一大小約 1.9 kb 和 3.5 kb 的片段(圖 3-5 Lane 3)。 *Hind* III 限制酶的切點也同時位於載體(vector) 和 *FMR-1* cDNA(insert) 上，因此有二個切點，可被切成一大小約 1.3 kb 和 4.1 kb 的片段(圖 3-5 Lane 4)。 *Kpn*

I 限制酶的切點原本位於 *FMR-1* cDNA(insert)上，但是在製造突變的過程中此限制酶的切點已不存在，因此正確的 pQEF27XE-M 質體並不會被 *Kpn* I 切成線形(圖 3-5 Lane 5)，且 *Sac* I 限制酶的切點位於載體(vector)和 *FMR-1* cDNA(insert)的交接處，因此兩者都只有一個切點，可被切成一大約 5.4 kb 的線形 DNA 片段(圖 3-5 Lane 6)。

這含有突變 *FMR-1* cDNA (pQEF27XE-M)表現質體經過初步的限制酶切點定位(enzyme mapping)診斷後，更進一步的利用核苷酸定序法(DNA sequencing)來確認(方法參照附錄一)。分別使用兩個引子(primers)，順向引子(pQE 1)---5'-CGGATAACAATTTACACAG-3'；逆向為 Reverse 引子---5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3'，其結果如圖 3-6。

三、突變的 FMRP^{R546H} 蛋白檢測：

前面已經利用限制酶切點定位(enzyme mapping)和核苷酸定序(DNA sequencing)等兩個方法都確認此含有突變 *FMR-1* cDNA (pQEF27XE-M)表現質體是正確的。進一步的將含有突變 *FMR-1* cDNA (pQEF27XE-M)表現質體送到大腸桿菌菌株 M15 中，而 FMRP^{R546H} 蛋白可經由 IPTG 的誘導而在大腸桿菌菌株 M15 中表現，經由 Ni-NTA resin column 純化出來(參照實驗方法三)，分別取 20 μ l 純化出來的蛋白加上 10 μ l 3x SDS sample buffer (New England BioLab)，在 95 $^{\circ}$ C 下煮 5 分鐘，跑 12.5% SDS PAGE 後經 Coomassie blue 染色 30 分鐘以上，再用 destain buffer (10% glacial acetic acid，30% methanol)使非特異性結合的染料洗掉來檢測，同時也利用西方轉漬法

(Western blot)進一步的檢測(參照第二章實驗方法六)。西方轉漬法(Western blot)所使用的第一抗體(first antibody)是 anti-FMRP monoclonal antibody IC3，其稀釋的比例為 1:5000，第二抗體為 peroxidase-labelled goat-anti-mouse IgG，其稀釋的比例為 1:5000。

其結果突變的 FMRP^{R546H} 蛋白都可在 Coomassie blue 染色(圖 3-7)和西方轉漬法(Western blot)(圖 3-8)中明顯看到 FMRP^{R546H} 蛋白被 Ni-NTA column 所純化出來，其大小約為 70 kDa，在 70 kDa 下方還有一些 FMRP^{R546H} 的降解形式(degradation form)。

四、poly G 結合實驗 (poly G binding assay):

1993 年 Siomi et al. 已經在 in vitro 的實驗中證實了 FMRP 可以和 poly G 和 poly U 有結合能力，且會隨著 NaCl 濃度的增加而結合能力減弱(Siomi et al., 1993)。本實驗主要是探討在大腸桿菌中所表現出來的正常 FMRP 與 poly G 結合的情形，由實驗中我們發現當 poly G 的量固定(30 μ l)，正常 FMRP 蛋白量依等差數列的增加(2 μ g、4 μ g、6 μ g、8 μ g)，其與 poly G 結合的蛋白除了在加入 2 μ g 和 4 μ g 的 FMRP 蛋白時，在 poly G 和 FMRP 的結合量上有少許的變化外(圖 3-9 Lane 3 和 lane 5)，其餘並沒有很明顯的差異(圖 3-9 Lane 7 和 Lane 9)。當正常 FMRP 蛋白量固定(6 μ g)，而 poly G 依序的增加(20 μ l、30 μ l、40 μ l、50 μ l)，可以發現正常 FMRP 和 poly G 的結合量，隨著 poly G 的增加而增加(圖 3-10)。前面兩個實驗都在不含 NaCl 的情況下作的，因此我們想進一步的去瞭解在不同 NaCl 濃度下 poly G 和正常 FMRP 的結合情形，所以我們取正常 FMRP 的蛋白 4 μ g 和 poly G 40 μ l，分

別在含不同 NaCl 濃度(0 M、0.1 M、0.25 M、0.5 M 和 1.0 M)的 binding buffer 下進行結合實驗。結果發現在 NaCl 的濃度增加時其 FMRP 與 poly G 的結合能力相對的減弱(圖 3-11、3-12)，甚至於到含 0.5 M NaCl 的濃度以上時幾乎看不到 poly G 與正常的 FMRP 有結合能力(圖 3-11、3-12 Lane 5 和 Lane 6)。

另外我們也取突變的 FMRP^{R546H} 的蛋白 4 μg 和 poly G 40 μl，分別在含不同 NaCl 濃度(0 M、0.1 M、0.25 M、0.5 M 和 1.0 M)的 binding buffer 下進行相同的結合實驗。結果發現在 NaCl 的濃度增加時其 FMRP^{R546H} 與 poly G 的結合能力相對的減弱(圖 3-13)，甚至於到含 0.25 M NaCl 的濃度以上時幾乎看不到 poly G 與突變的 FMRP^{R546H} 有結合能力(圖 3-13 Lane 3)。

五、Biotin-labelled mRNA 結合實驗 (Biotin-labelled mRNA binding assay):

1993 年 Ashley 等人發表正常的 FMRP 在 *in vitro* 的實驗中可以和本身的 mRNA 及 4% 人類胎兒腦細胞的 mRNA 有結合能力(Ashley et al., 1993)。本實驗主要是建立在大腸桿菌中所表現出來的正常 FMRP 與 mRNA 結合的情形。在預備實驗中我們固定正常 FMRP 的蛋白量(6 μg)和 streptavidin agarose (BRL) 30 μl，然後依序增加 biotin-labelled mRNA 的量(160 ng、320 ng、480 ng、640 ng)。這個實驗我們主要分為兩個方法來作：一、先取正常的 FMRP 和 biotin-labelled mRNA 作結合反應，再加入 streptavidin agarose 作結合反應，結果發現 FMRP 和 biotin-labelled mRNA 的結合隨著 mRNA 的量而增加(圖

3-14)；二、改以 biotin-labelled mRNA 和 streptavidin agarose 先進行結合反應，再加入正常的 FMRP 作結合反應得到相同的結果(圖 3-15)。但是二的反應中其 FMRP 和 biotin-labelled mRNA 的結合量比一的反應來的少，因此接下來的實驗我們採用一的方法。我們取固定量的 biotin-label mRNA (160 ng)，然後依序增加正常 FMRP 的量，從 0 μ g 開始以 0.5 μ g 等差級數的增加至最高蛋白量為 2.5 μ g，從結果我們可以發現當正常 FMRP 的量增加時，與等量的 biotin-labelled mRNA 結合的量相對增加。

第六節

討論(Discussion)

我們成功利用聚合酶連鎖反應(PCR)的技術製造出 RGG box 上的點突變(point mutation；圖 3-3、圖 3-4)，並且將含有點突變的 FMR-1 cDNA 轉接到大腸桿菌蛋白表現系統的質體(pQE30)中，進一步在大腸桿菌中將突變的 FMRP^{R546H} 蛋白利用 IPTG 誘導產生。然而對於正常的 FMRP 蛋白與 RNA 的結合能力，我們已經成功的建立 poly G binding assay 和 biotin-labelled mRNA binding assay 等兩個系統(參照方法五、方法七)，並且成功的利用 poly G binding assay 系統比較出正常的 FMRP 蛋白和突變的 FMRP^{R546H} 蛋白在含不同 NaCl 濃度下其蛋白和 poly G 的結合能力。

在正常 FMRP 蛋白和 poly G agarose 的結合實驗中，當在不含 NaCl 的情況下我們固定 poly G agarose 的量逐漸增加正常 FMRP 蛋白的量時，除了在加入 2 μ g 和 4 μ g 的 FMRP 蛋白在結合量上有少許的變化外，其餘並無明顯變化(圖 3-9)，而在固定 FMRP 蛋白量，逐漸增加 poly G 的量時，確可看到 poly G agarose 和 FMRP 的結合逐漸增加(圖 3-10)，不過我們也可以清楚的看到在這兩個反應後的上清液(supernatant；S)中還有很強的 FMRP 訊號(圖 3-9 和圖 3-10)，我們認為在這兩個結合實驗中我們加了太多的正常 FMRP 蛋白。所以我們降低 FMRP 蛋白量到 0.5 μ g 做相同的實驗同樣可以看到 poly G 和 FMRP 還是有結合反應只是訊號較弱(資料未附)，因此為避免實驗過程的誤差我們選擇固定正常 FMRP 和突變 FMRP^{R546H} 的蛋白量在 4 μ g 和 poly G agarose 的量在 40 μ l 進行含不同 NaCl 濃度下的結合實驗。

當我們同時固定正常 FMRP 和突變 FMRP^{R546H} 和 poly G agarose 的量時，來改變 binding buffer 中 NaCl 濃度，我們發現正常 FMRP 和 poly G 結合的結果(圖 3-11)和 Siomi 等人在 1993 年發表的結果很類似。即隨著 NaCl 的濃度增加其結合能力相對減弱，尤其在含 NaCl 濃度達到 0.5 M 時幾乎看不到正常 FMRP 和 poly G 的結合，而在突變 FMRP^{R546H} 蛋白和 poly G 的結合能力的實驗中，結果也是隨著 NaCl 的濃度增加其結合能力相對減弱，與正常 FMRP 和 poly G 結合實驗結果不同的是當含 NaCl 濃度達到 0.25 M 時突變的 FMRP^{R546H} 蛋白和 poly G 的結合能力就減弱很多(圖 3-13)，由圖 3-11 和圖 3-13 的比較我們可以推論這 RGG box 上的點突變可能影響 FMRP 和 RNA 的結合能力，我們將進一步的加以分析這 RGG box 上的點突變在易脆 X 染色體症候群上所扮演的角色。另外我們也可以比較在 poly G agarose 和正常 FMRP 結合實驗中上清液(supernatant)、pellet 的 band，我們可以發現在 pellet 的部份只有全長 FMRP 的訊號才會出現，一些 degradation 的 FMRP 片段並不會出現(圖 3-9、3-10)，這結果可能符合 Siomi 等人 1993 年所發表的在 C 端的 deletion 片段只要 deletion 超過 RGG box 就失去與 RNA 結合的能力。由於 Siomi 等人在作 poly G 結合實驗時，FMRP 的獲得是利用 in vitro 轉錄(transcription)和轉譯(translation)的方法，且在合成的 FMRP 蛋白上 label 上放射性同位素(³⁵S-methionine)，最後再以自動放射顯影的方法得知結果。由於放射性同位素的使用，使得實驗上多了一項放射性廢棄物要處理，增加實驗室的負擔和實驗上的危險性，而且時間上也比較久通常需要二~三天甚至於一星期。所以為避免上述的缺點，我們已成功的發展一項較快速且較無危險性的方法來進行 poly G binding 的實驗(參照實驗方法

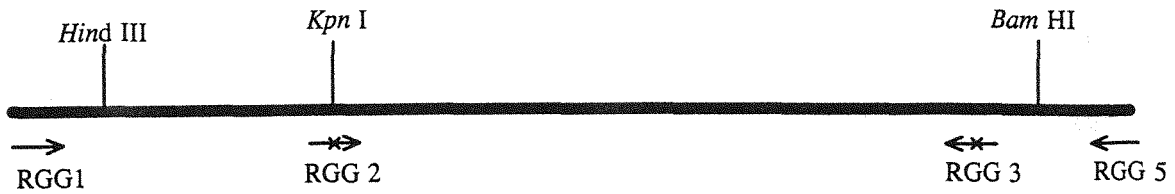
五)，我們所使用的 FMRP 是從大腸桿菌內表現出來，再利用西方轉漬法(Western blot)，利用抗體來偵測 FMRP 和 poly G agarose 結合情形。此種方法只要大約一天的時間就可獲得結果，是一個很經濟又省時的方法。

在 FMRP 與 biotin-labelled mRNA 結合實驗方面，我們使用兩種方法來作實驗(參照實驗方法七和結果五)，在相同的條件下 "方法二" 比 "方法一" 其正常的 FMRP 和 biotin-labelled mRNA 的結合量來的少(圖 3-14 和圖 3-15)，我們推論可能造成這差異的原因：是由於我們是利用 T₇ RNA polymerase 在 in vitro 下合成 biotin-labelled 的 *FMR-1* mRNA，且我們是將 biotin-labelled 好的 CTP 加入反應的 buffer 中(參照實驗方法六)。因此在合成的 mRNA 上 biotin-labelled 的位置是任意的，因此如果把 biotin label 的 mRNA 和 strepavidine agarose 作結合反應，可能發生 mRNA 和正常 FMRP 蛋白的結合位置被 strepavidine agarose 佔據了而造成上述的原因。

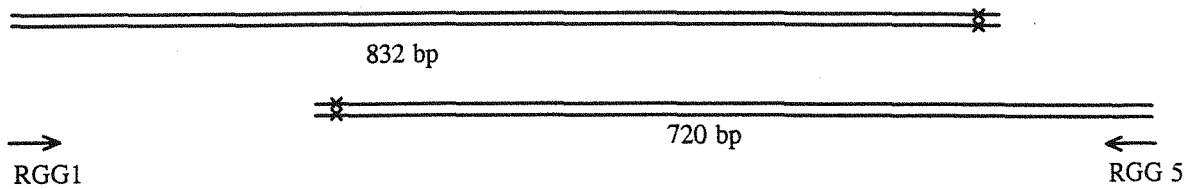
在 poly G 或 mRNA 和正常 FMRP 蛋白的結合實驗中，我們都同時使用兩種抗體(monoclonal antibody IC3 和 anti-E polyclonal antibody)來偵測，其結果都是一致的(圖 3-11、3-12)，這結果更進一步證明了我們製造的抗體是可用的。不過仔細比較(圖 3-11、3-12)我們可以發現 anti-E polyclonal antibody 的 single 較弱，我們推論是因為我們兩種抗體的偵測是使用同一張 membrane，我們先用 monoclonal antibody IC3 來偵測，再利用 stripping buffer (2% SDS、62.5 mM Tris-Cl pH 6.8、100 mM β -Mecarptoethanol)將上面的抗體 strip 掉，重新使用 anti-E polyclonal antibody 來偵測，因此可能在 stripping 的過程中將部份的蛋白一起 stripping 掉，而造成上面的結果。

另外，在 poly G 或 mRNA 和正常 FMRP 蛋白的結合實驗中有一個很重要的問題也是必須特別要小心注意的，就是在取 poly G agarose 和 streptavidine agarose 時，由於這兩種都是 agarose 的樹脂很難取和在 wash 的過程中也很容易 lose 常造成實驗結果的誤差，如圖 3-15 Lane 9 原本其 signal 應最強，可是 signal 卻變的很弱。

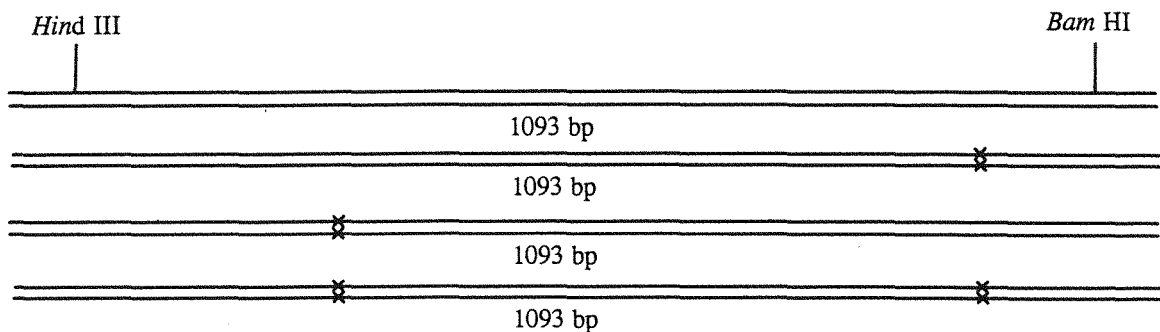
綜合以上的結果，我們確實已經建立了 FMRP 和 RNA (homopolymer 或 mRNA) 結合分析系統，並且已經應用在瞭解 RGG box 上的點突變對 FMRP 功能的影響，而且這系統和前人的系統最大的不同是免去放射性同位素的困擾和縮短反應的時間，將有助於我們往後對 FMRP 功能的瞭解。



1. DNA amplified by using RGG1/RGG 3 primer set and RGG 2/ RGG 5 primer set, separately



2. Mix the PCR products and amplified by RGG 1/RGG 5 primer set



3. Cut this fragment with *Hind* III and *Bam* HI (850 bp) . Then subclone this fragment into *Hind* III and *Bam* HI double digested pBSHAF27XE.
4. 利用限制酶切點定位(enzyme mapping)和核苷酸定序法(DNA sequencing)來確認。

圖 3-1 兩步驟-PCR 的方法製造點突變(Two-step PCR-based targeted mutagenesis)

兩組引子(primer- RGG 1 和 RGG 3 ; RGG 2 和 RGG 5)的位置請參照圖 2-9 。

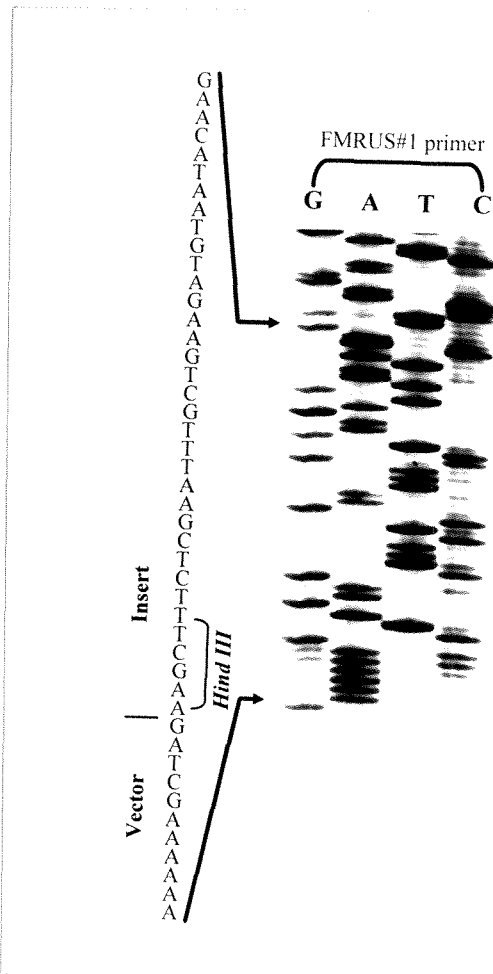


圖 3-2 pBSHAF27XE-M 質體核苷酸定序(DNA sequencing)(一)

使用 FMRUS#1 引子(primer)--- 5'-CTTGCCTCGA GATT TCATGAACAG-3'來確定 insert 和 vector 的接點是否正確。FMRUS#1 引子(primer)的位置請參照圖 2-9。左下方所標示的 *Hind* III 限制酶切點位置是 insert 和 vector 的接點。6 % sequencing gel。

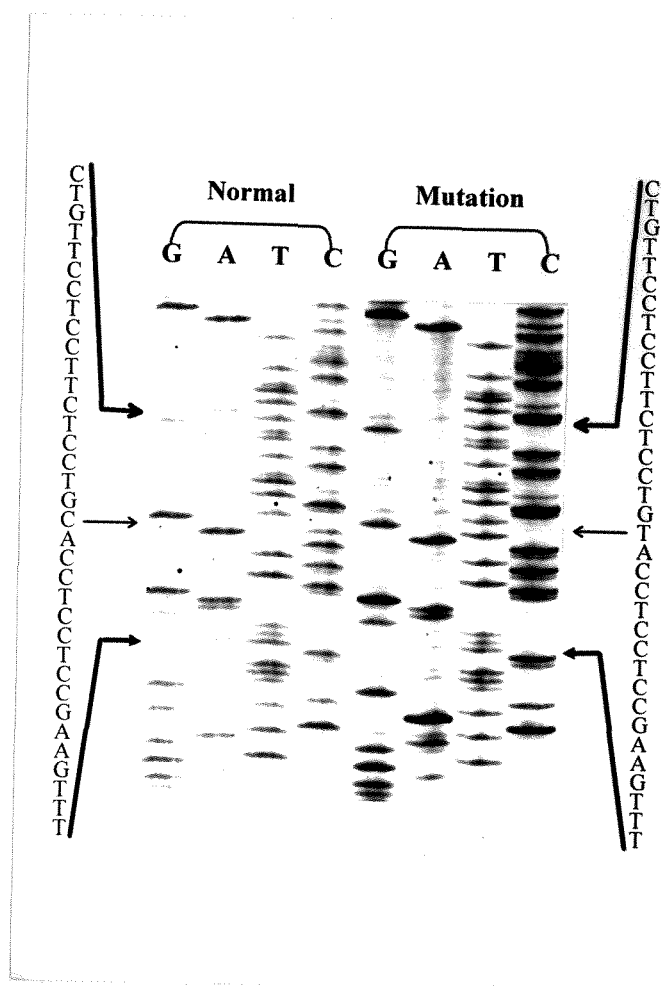


圖 3-3 pBSHAF27XE-M 質體核苷酸定序(DNA sequencing)(二)

使用 RGG 5 引子(primer)---5'-CAGAATTATGCAGTTTT
AGGG-3'來確定我們在 RGG box 上的突變點。RGG 5 引子
(primer)的位置請參照圖 2-9。左邊 G、A、T、C 四個 Lane
是正常的核苷酸序列，右邊 G、A、T、C 四個 Lane 是突
變的核苷酸序列。中間箭頭所指的是突變的位置(C→T)。6
% sequencing gel。

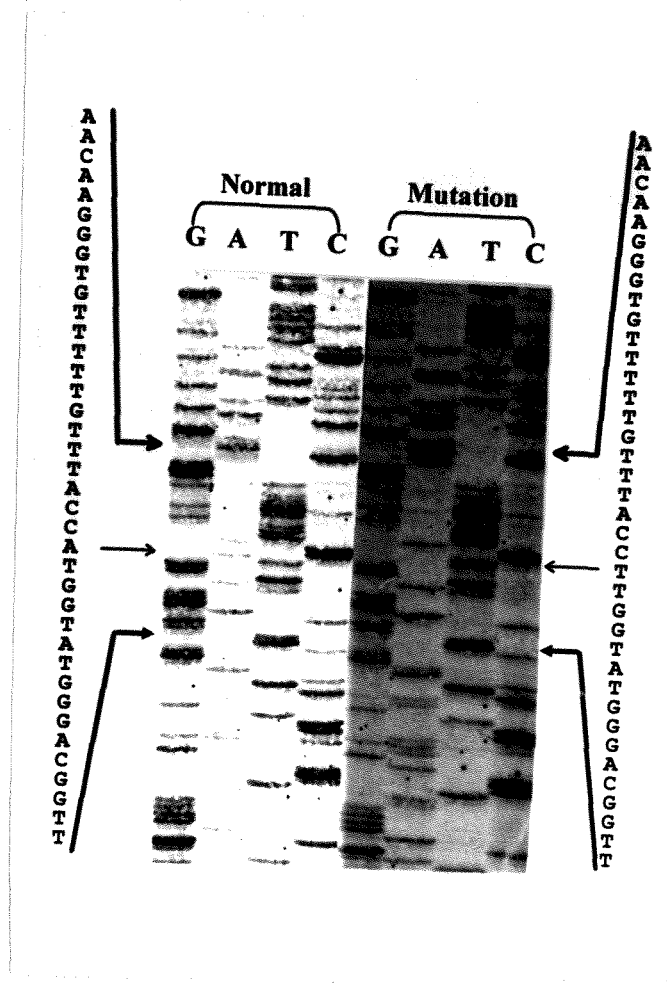


圖 3-4 pBSHAF27XE-M 質體核苷酸定序(DNA sequencing)(三)

使用 RGG 1 引子(primer)--- 5'-AAGCTAGAAGCTTTCTCGAATTTGCTG-3'來確定 *Kpn* I 限制酶被改變的突變點。RGG 1 引子(primer)的位置請參照圖 2-9。左邊 G、A、T、C 四個 Lane 是正常的核苷酸序列，右邊 G、A、T、C 四個 Lane 是突變的核苷酸序列。中間箭頭所指的是突變的位置 (A → T)。4% sequencing gel。

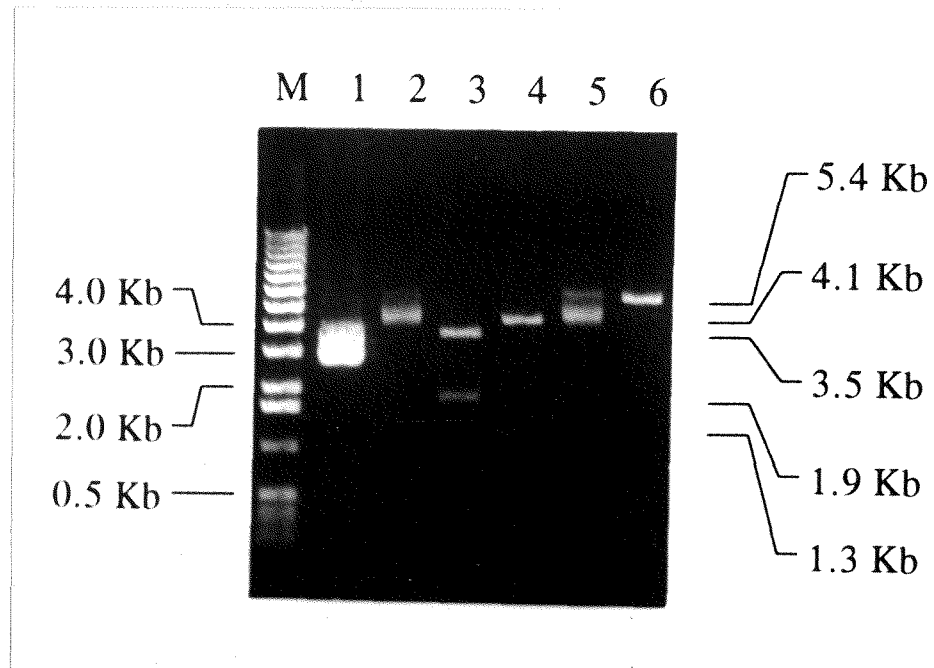


圖 3-5 pQEF27XE-M 質體限制酶切點定位(enzyme mapping) 經洋菜膠電泳分析情形

分別取 3 μ l pQEF27XE-M 質體 DNA 經不同限制酶 (enzyme) 在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘後，加 2 μ l DNA 加入 dye，分別加入到不同 Lane，跑 1x TAE buffer 0.7% agarose gel 分析。M 是指 1 kb DNA marker，其 size 大小被指示在左邊。其餘的 lane 依序為-- Lane 1：pQE 30 vector 的 DNA；Lane 2：pQEF27XE-M 質體未經限制酶(enzyme)作用的 DNA；Lane 3：pQEF27XE-M 質體經 *Bam* HI 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 4：pQEF27XE-M 質體經 *Hind* III 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 5：pQEF27XE-M 質體經 *Kpn* I 限制酶(enzyme)作用後的 DNA；Lane 6：pQEF27XE-M 質體經 *Sac* I 限制酶(enzyme)作用後的 DNA。右邊所指的是各限制酶(enzyme)作用後各 DNA 片段 size 大小。

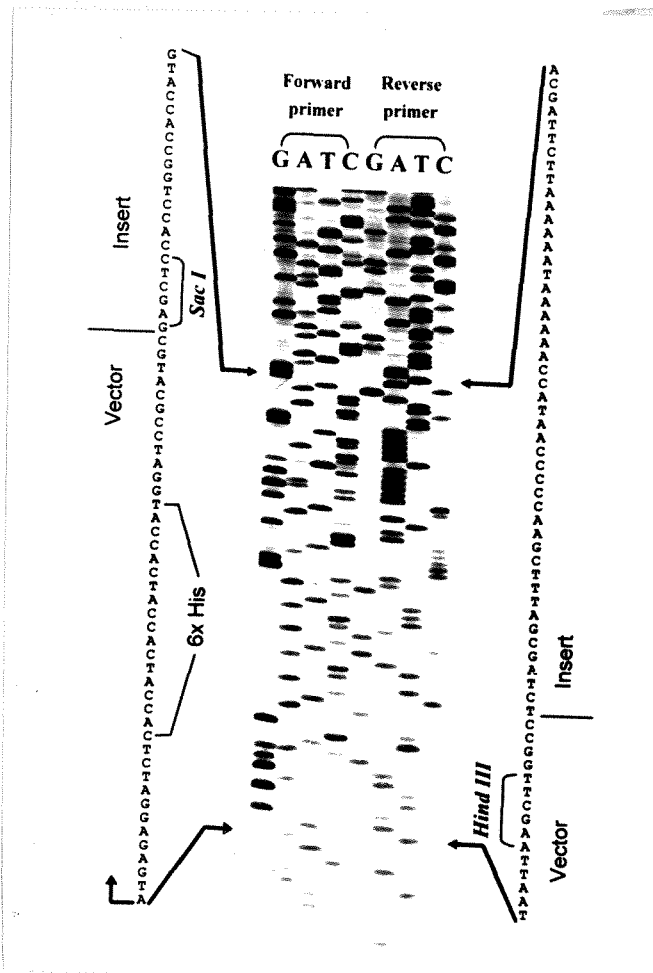


圖 3-6 pQEF27XE-M 質體核苷酸定序(DNA sequencing)

分別使用兩個引子(primers)來進行核苷酸定序(DNA sequencing)，順向引子(Forward primer)為 pQE 1 引子--- 5'-CGGATAACAATTTACACAG-3'；逆向引子(Reverse primer)為 pQE 2 引子--- 5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3'來確認 pQEF27XE-M 質體，兩個引子順序分別被指示在上方。左邊下方 ATG 所指的是轉譯(translation)起始位置；左邊中間 6x His 所指的是此區域可表現出 6 個 Histidine；左邊上方 *Sac I* 限制酶切點是 insert 和 vector 交接處。右邊下方橫線所指的是 insert 和 vector 交接處。跑 6% sequencing gel。

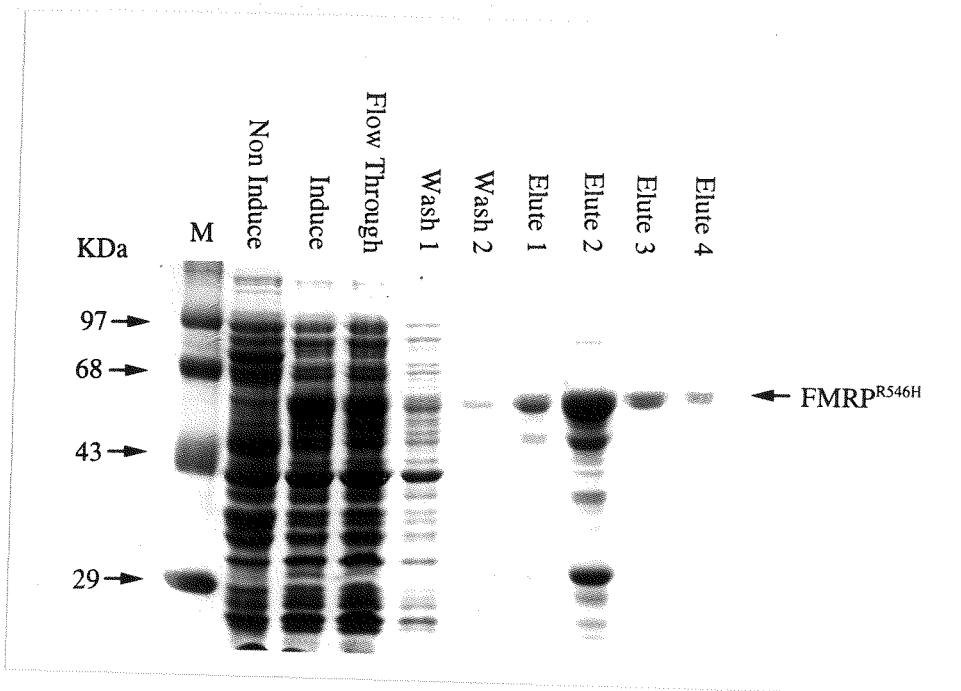


圖 3-7 變異 FMRP^{R546H} 蛋白(pQEF27XE-M)經 Ni-NTA resin 純化情形

pQEF27XE-M 蛋白表現質體在 1 mM IPTG 誘導 2 小時，表現出變異的 FMRP^{R546H} 經 Ni-NTA resin 純化。純化過程中各部份收取物標示在圖的上方，其每條 Lane 所加入的量由左至右依序為 2, 10, 10, 10, 10, 10, 20, 20, 20, 20 μ l 的 sample，再加上 10 μ l SDS sample buffer。在 95 $^{\circ}$ C 下煮 5 分鐘，跑 12.5 % SDS PAGE。M 所指的是 pre-stain protein marker，其 size 大小被指出在左邊，右邊 FMRP 所指的是變異 FMRP^{R546H} 蛋白位置，size 大小約 70 kDa。本圖是 Coomassie blue 染色的結果。

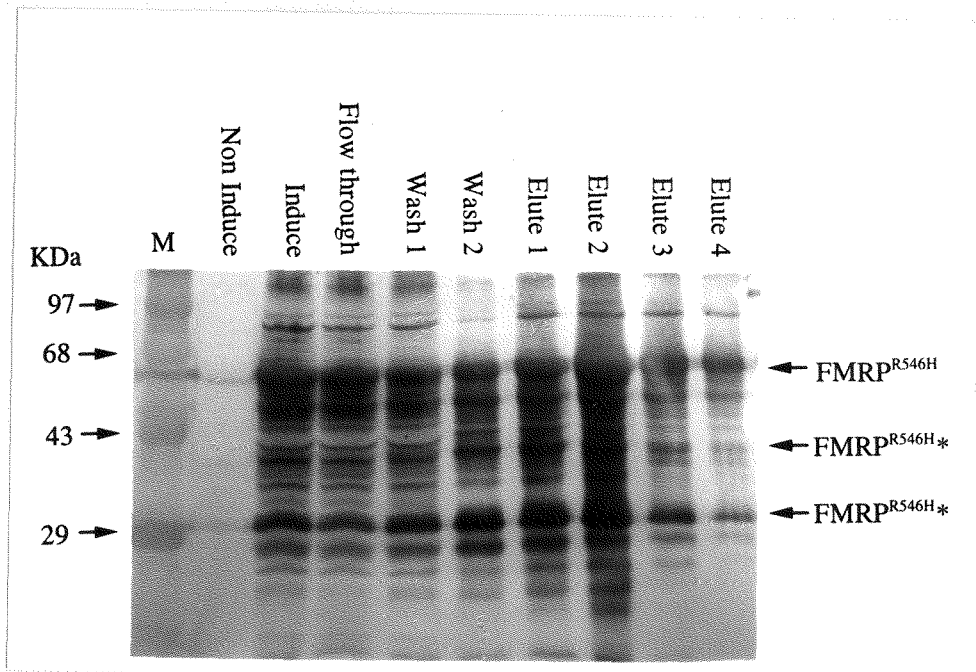


圖 3-8 變異 FMRP^{R546H} 蛋白(pQEF27XE-M)經 Ni-NTA resin 純化情形

pQEF27XE-M 蛋白表現質體在 1 mM IPTG 誘導 2 小時，表現出變異的 FMRP^{R546H} 經 Ni-NTA resin 純化。純化過程中各部份收取物標示在圖的上方，其每條 Lane 所加入的量由左至右依序為 2, 10, 10, 10, 10, 10, 20, 20, 20, 20 μ l 的 sample，再加上 10 μ l SDS sample buffer。在 95 $^{\circ}$ C 下煮 5 分鐘，跑 12.5 % SDS PAGE。M 所指的是 pre-stain protein marker，其 size 大小被指出在左邊，右邊 FMRP 所指的是變異 FMRP^{R546H} 蛋白位置，size 大小約 70 kDa。本圖是西方轉漬法(Western blot)的結果(1st Ab anti-Histidine antibody 1:5000 ; 2nd Ab peroxidase-labelled goat-anti-mouse-IgG 1:5000)。

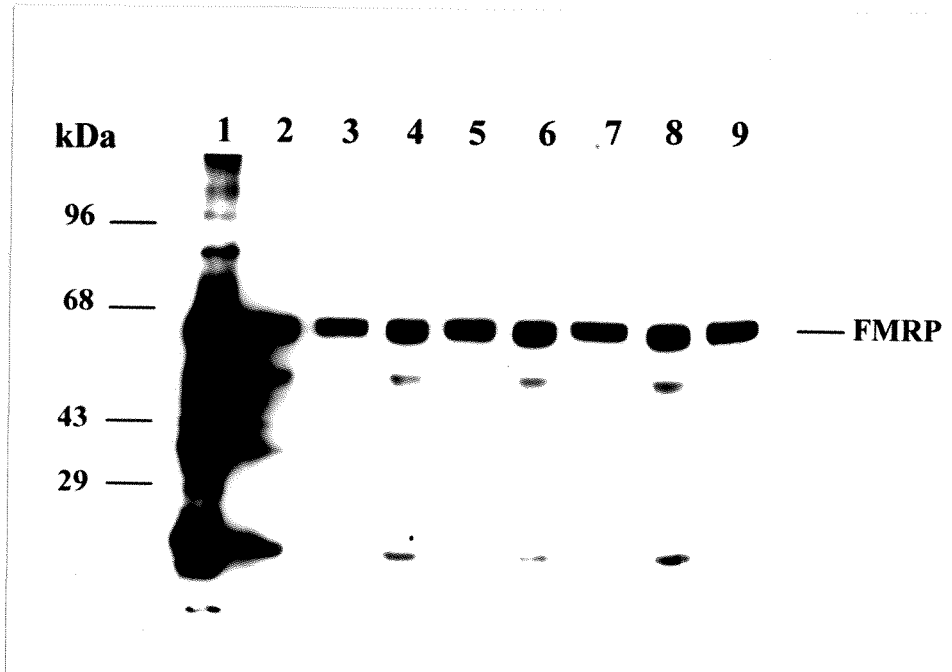
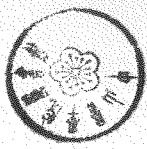


圖 3-9 正常 FMRP 蛋白和 poly G agarose 結合實驗(一)

在 binding buffer 中不含 NaCl 的情況下，把 poly G agarose 的量固定在 30 μ l，正常 FMRP 蛋白的量是由左至右依等差數列的增加(2 μ g、4 μ g、6 μ g、8 μ g)，Lane 1 單獨加入全長的 FMRP 蛋白 2 μ g 當陽性對照組。除 Lane 1 外每兩個 Lane 一組，分別代表 Supernatant (Lane 2、4、6、8)和 pellet (Lane 3、5、7、9)，每條 Lane 加入 40 μ l sample buffer(參照方法五)。95 $^{\circ}$ C 煮 5 分鐘跑 10% SDS PAGE，利用西方轉漬法(Western blot)偵測(1st Ab 使用 monoclonal antibody IC3 1:5000；2nd Ab 使用 peroxidase-labelled goat-anti-mouse-IgG 1:5000)。protein marker size 大小被標示在右邊。左邊箭頭所指的是全長 FMRP 的位置。

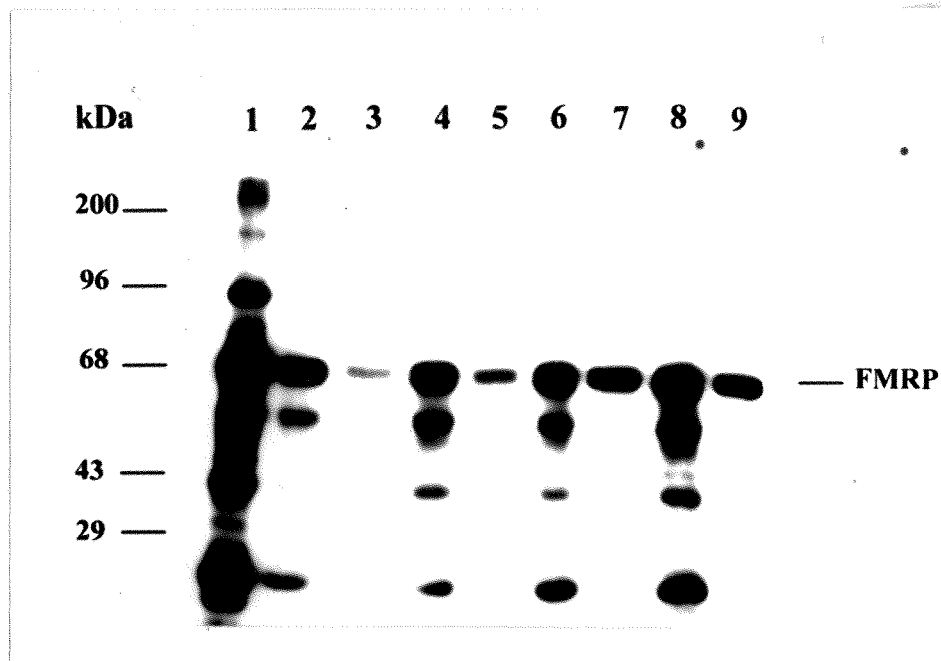


圖 3-10 正常 FMRP 蛋白和 poly G agarose 結合實驗(二)

在 binding buffer 中不含 NaCl 的情況下，把正常 FMRP 蛋白的量固定在 $6 \mu\text{g}$ ，poly G agarose 的量是由左至右依等差數列的增加($20 \mu\text{l}$ 、 $30 \mu\text{l}$ 、 $40 \mu\text{l}$ 、 $50 \mu\text{l}$)，Lane 1 單獨加入全長的 FMRP 蛋白 $2 \mu\text{g}$ 當陽性對照組。除 Lane 1 外每兩個 Lane 一組，分別代表 Supernatant (Lane 2、4、6、8) 和 pellet (Lane 3、5、7、9)，每條 Lane 加入 $40 \mu\text{l}$ sample buffer(參照方法五)。95 °C 煮 5 分鐘跑 10 % SDS PAGE，利用西方轉漬法(Western blot)偵測(1st Ab 使用 monoclonal antibody IC3 1:5000；2nd Ab 使用 peroxidase-labelled goat-anti-mouse-IgG 1:5000)。protein marker size 大小被標示在右邊。左邊箭頭所指的是全長 FMRP 的位置。

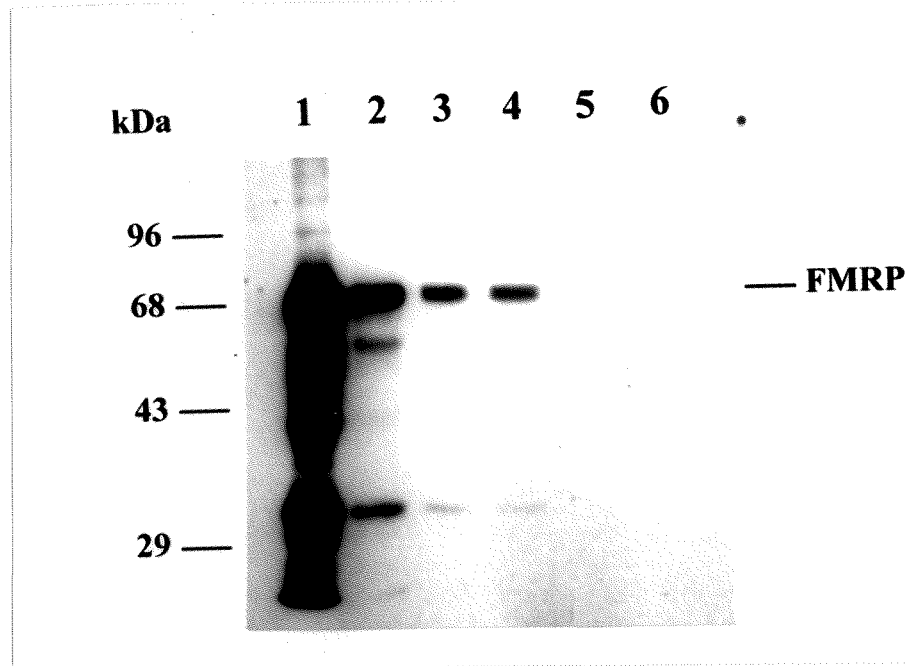


圖 3-11 正常 FMRP 蛋白和 poly G agarose 結合實驗(三)

把正常 FMRP 蛋白的量固定在 $4 \mu\text{g}$ ，poly G agarose 的量固定在 $40 \mu\text{l}$ ，由左至右依序改變 buffer 中含 NaCl 的濃度 (0 M 、 0.1 M 、 0.25 M 、 0.5 M 、 1.0 M)。Lane 1 單獨加入全長的 FMRP 蛋白 $2 \mu\text{g}$ 當陽性對照組。每條 Lane 加入 $40 \mu\text{l}$ sample buffer(參照實驗方法五)。 95°C 煮 5 分鐘跑 10 % SDS PAGE，利用西方轉漬法(Western blot)偵測(1st Ab 使用 monoclonal antibody IC3 1:5000；2nd Ab 使用 peroxidase-labelled goat-anti-mouse-IgG 1:5000)。protein marker size 大小被標示在右邊。左邊箭頭所指的是全長 FMRP 的位置。

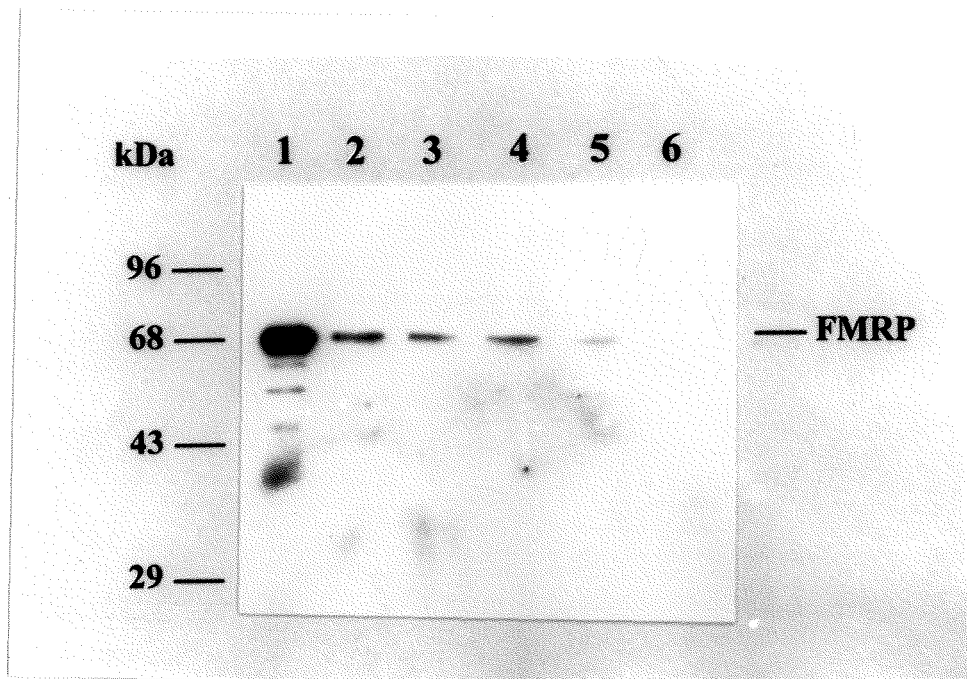


圖 3-12 正常 FMRP 蛋白和 poly G agarose 結合實驗(三)

把圖 3-9 的 membrane 經 stripping buffer(參照材料)在 65 °C 下作用 30 分鐘，用 TBS buffer wash 2 次，重新 blocking 後 1st Ab 使用 anti-E polyclonal antibody 1:5000；2nd Ab 使用 peroxidase-labelled goat-anti-rabbit-IgG 1:5000 來偵測結合情形。protein marker size 大小被標示在右邊。左邊箭頭所指的是全長 FMRP 的位置。

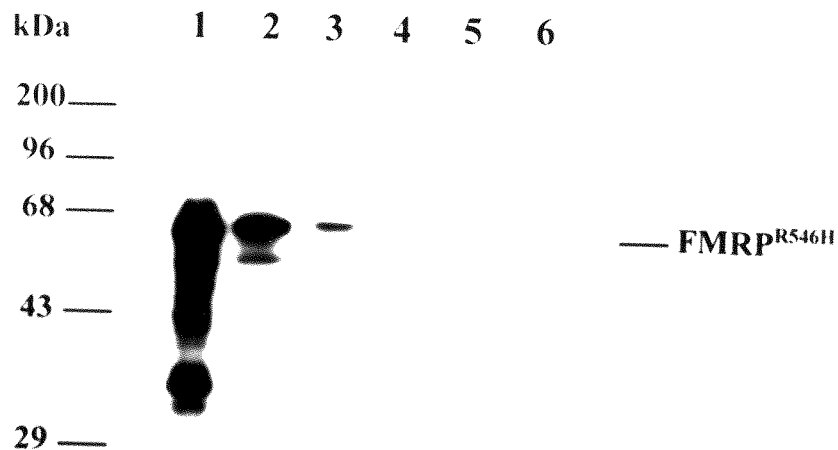


圖 3-13 變異 FMRP^{R546H} 蛋白和 poly G agarose 結合實驗

把變異 FMRP^{R546H} 蛋白的量固定在 4 μg ，poly G agarose 的量固定在 40 μl ，由左至右依序改變 buffer 中含 NaCl 的濃度(0 M、0.1 M、0.25 M、0.5 M、1.0 M)。Lane 1 單獨加入全長的 FMRP 蛋白 2 μg 當陽性對照組。每條 Lane 加入 40 μl sample buffer(參照實驗方法五)。95 $^{\circ}\text{C}$ 煮 5 分鐘跑 10% SDS PAGE，利用西方轉漬法(Western blot)偵測(1st Ab 使用 monoclonal antibody IC3 1:5000；2nd Ab 使用 peroxidase-labelled goat-anti-mouse-IgG 1:5000)。protein marker size 大小被標示在右邊。左邊箭頭所指的是變異 FMRP^{R546H} 的位置。

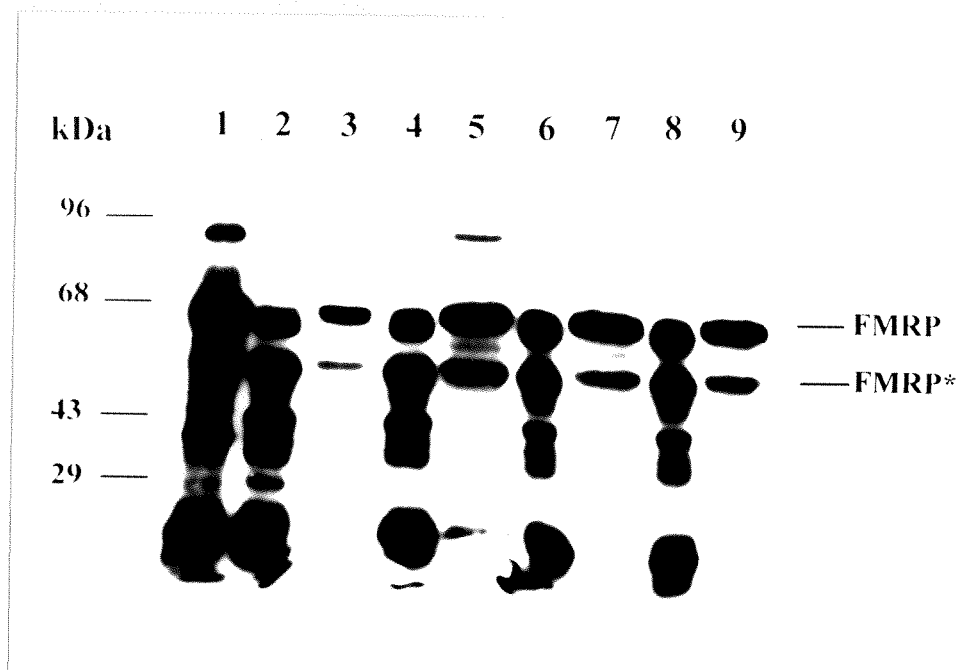


圖 3-14 正常 FMRP 蛋白和 biotin-labelled mRNA 結合實驗(一)

固定正常 FMRP 的蛋白量(6 μ g)和 streptavidin agarose (BRL) 30 μ l，然後由左至右依序增加 biotin-labelled mRNA 的量(160 ng、320 ng、480 ng、640 ng)。先取正常的 FMRP 和 biotin-labelled mRNA 作結合反應，再加入 streptavidin agarose 作結合反應。Lane 1 單獨加入全長的 FMRP 蛋白 2 μ g 當陽性對照組。除 Lane 1 外每兩個 Lane 一組，分別代表 Supernatant (Lane 2、4、6、8)和 pellet (Lane 3、5、7、9)，每條 Lane 加入 40 μ l sample buffer(參照方法五)。95 $^{\circ}$ C 煮 5 分鐘跑 10% SDS PAGE，利用西方轉漬法(Western blot)偵測(1st Ab 使用 monoclonal antibody IC3 1:5000；2nd Ab 使用 peroxidase-labelled goat-anti-mouse-IgG 1:5000)。protein marker size 大小被標示在右邊。左邊 FMRP 箭頭所指的是全長 FMRP 的位置，FMRP*箭頭所指的是 FMRP 的 degradation form。

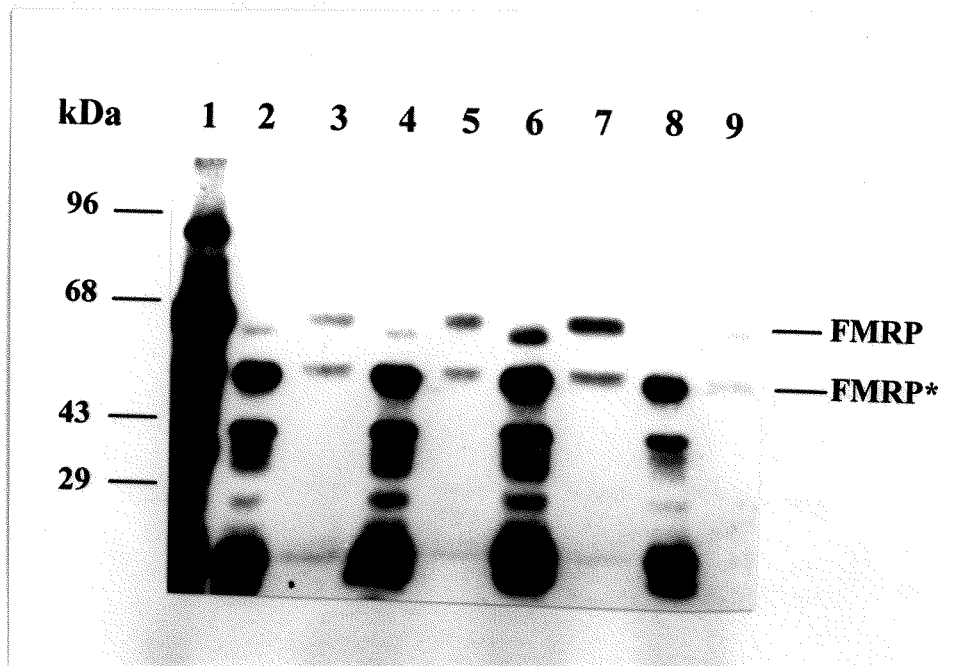


圖 3-15 正常 FMRP 蛋白和 biotin-labelled mRNA 結合實驗(二)

固定正常 FMRP 的蛋白量(6 μ g)和 streptavidin agarose (BRL) 30 μ l，然後由左至右依序增加 biotin-labelled mRNA 的量(160 ng、320 ng、480 ng、640 ng)。以 biotin-labelled mRNA 和 streptavidin agarose 先進行結合反應，再加入正常的 FMRP 作結合反應。Lane 1 單獨加入全長的 FMRP 蛋白 2 μ g 當陽性對照組。除 Lane 1 外每兩個 Lane 一組，分別代表 Supernatant (Lane 2、4、6、8)和 pellet (Lane 3、5、7、9)，每條 Lane 加入 40 μ l sample buffer(參照方法五)。95 $^{\circ}$ C 煮 5 分鐘跑 10% SDS PAGE，利用西方轉漬法(Western blot)偵測(1st Ab 使用 monoclonal antibody IC3 1:5000；2nd Ab 使用 peroxidase-labelled goat-anti-mouse-IgG 1:5000)。protein marker size 大小被標示在右邊。左邊 FMRP 箭頭所指的是全長 FMRP 的位置，FMRP*箭頭所指的是 FMRP 的 degradation form。

第四章

總結

Conclusion

本論文從蛋白表現質體的設計和製備開始，已經成功的將四種蛋白表現質體(pQEF27XE、pQEF27XH、pQEF27XM和pQEF27XT)製備完成，更進一步的在大腸桿菌內表現出三種不同片段的 FMRP 蛋白(全長、N端和中段的 FMRP 蛋白)，尤其在全長 FMRP 的表現，將使將來研究 FMRP 的功能有很大的幫助。可惜 C 端的 FMRP 尚未表現出來，我們將進一步克服困難來表現 C 端的 FMRP 蛋白。表現出來的蛋白我們也已經獲得三種不同 polyclonal 的抗體，並且對其 FMRP 有專一性(論文第二章)。

我們也已經將我們實驗室從病人身上所發現的 RGG box 上的點突變(G→A；R546H)成功的利用 PCR 的方法製造出來並且也將其轉接到蛋白表現質體中(pQEF27XE-M)，並且在大腸桿菌內表現這突變蛋白(FMRP^{R546H})。另外，我們已經成功的利用正常的 FMRP 蛋白建立了 RNA 結合分析系統，其得到的結果和前人研究的結果相似，同時我們也拿突變的蛋白(FMRP^{R546H})做 RNA 結合的實驗。在與 poly G 結合的實驗中在不同 NaCl 的濃度下，全長 FMRP 蛋白和突變的 FMRP^{R546H} 蛋白與 poly G 的結合能力同樣會隨著 NaCl 的濃度提高而有減弱的現象。當 NaCl 的濃度達到 0.5 M 時正常 FMRP 和 poly G 的結合幾乎已不存在，而突變的 FMRP^{R546H} 蛋白在 NaCl 濃度達到 0.25 M 時即已失去與 poly G 的結合能力，這結果使我們認為 RGG box 的突變(R546H)在易脆 X 染色體症候群上可能扮演著很重要的角色。(論文第三章)。

隨著在大腸桿菌內表現蛋白系統的建立、抗體的合成和 RNA binding assay 系統的建立，將使我們將來在對於突變蛋白的製備和 FMRP 蛋白結構和功能關係的研究或在診斷易脆 X 染色體的診斷上

將有很大的助益。

未來我們實驗室將朝向製備 monoclonal antibody 和去找出被 FMR-1 基因產物所調控的下游基因發展，如能順利達成將使我們對於 FMR-1 基因的功能和調節機制有更進一步的瞭解和在臨床上診斷易脆 X 染色體症候群將會更快速、準確。

第五章

參考文獻

(References)

- Abitbol, M., Menini, C., Delezoide, A.L., Rhyner, T., Vekemans, M., Mallet, J. (1993). Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major site of *FMR-1* expression in the human fetal brain. *Nat. Genet.* 4:147-153
- Aris, J.P., and Blobel, G. (1991) cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:931-935
- Ashley Jr., C. T., Wilkinson, K. D., Reines, D., and Warren, S. T. (1993). FMR1 protein: Conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* 262: 563-566.
- Bell, M. V., Hirst, M. C., Nakahori, Y., MacKinnon, R. N., Roche, A., Flint, T. J., Jacobs, P. A., Tommerup, N., Tranebjaerg, L., Froster-Iskenius, U., Kerr, B., Turner, G., Lindenbaum, R. H., Winter, R., Pembrey, M., Thibodeau, S., and Davies, K. E. (1991). Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell* 64: 861-866.
- Brown, W. T. (1990). The fragile X: progress towards solving the puzzle. *Am. J. Hum. Genet.* 47:175-180.
- Buvoli, M., Biamonti, G., Tsoultas, P., Bassi, M. T., Ghritti, A., Riva, S., and Morandi, C. (1988). cDNA cloning of human hnRNP protein A1 reveals the existence of multiple RNA isoforms. *Nucl. Acids. Res.* 15:3751-3770.
- De Boulle, K., Verkerk, A. J. M. H., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Van Roy, B., Van Den Bos, F., de Graaff, E., Oostra, B. A., and Willems, P. J. (1993). A point mutation in the *FMR-1* gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genet.* 3: 31-35.

- Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Bellocq, J-P., and Mandel, J-L. (1993) The *FMR-1* protein is cytoplasmic, most abundant in nervous and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nature Genet.* 4:335-340
- Eberhart, D.E., H.E. Malter., Y. Feng., and S.T. warren. (1996). The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum. Mol. Genet.* Vol.5 No.8:1083-1091.
- Eichler, E. E., Richards, S., Gibbs, R. A., and Nelson, D. L. (1993). Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1147-1153.
- Feng, Y., Gutekunst, C.A., Eberhart, D.E., Yi, H., Warren, S. T., Hersch, S. M. (1997). Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J. Neurosci* 17 (5):1539-1547.
- Fridell, R.A., R. E. Benson., J. Hua., H.P. Bogerd., and B.R. Cullen. (1996). A nuclear role for the Fragile X mental retardation protein. *EMBO. J. Vol.15 No.19:5408-5414.*
- Fu, Y.-H., Kuhl, D. P. A., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Richards, S., Verkerk, A. J. M. H., Holden, J. J. A., Fenwick Jr., G. R., Warren, S. T., Oostra, B. A., Nelson, D. L., and Caskey, C. T. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67: 1047-1058.
- Gedeon, A. K., Baker, E., Robinson, H., Partington, M. W., Gross, B., Manca, A., Korn, B., Poustka, A., Yu, S., Sutherland, G. R., and Mulley, J. C. (1992). Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion. *Nature Genet.* 1: 341-344.

- Gibson, T. J., Rice, P. M., Thompson, J. D., and Heringa, J. (1993). KH domains within the FMR1 sequence suggest that fragile X syndrome stem from a defect in RNA metabolism. *TIBS* 18:331-333
- Good, L., and N. Nazar, R. (1992). An improved thermal cycle for two-step PCR-based targeted mutagenesis. *Nucleic Acid Res.* 20:4934.
- Gustavson, K.-H., Blomquist, H., and Holmgren, G. (1986). Prevalence of fragile-X syndrome in mentally retarded children in a Swedish county. *Am. J. Med. Genet.* 23: 581-588.
- Hagerman, R. J. (1992). Physical and behavioral phenotype, P. 1-68. In R. J. Hagerman and A. C. Silverman (ed.), *Fragile X syndrome: diagnosis, treatment, and research*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Harvey, J., Judge, C., and Wiener, S. (1977). Family X-linked mental retardation with an X chromosome abnormality. *J. Med. Genet.* 14: 46-50.
- Heitz, D., Rousseau, F., Devys, D., Saccone, S., Abderrahim, H., Le Paslier, D., Cohen, D., Vincent, A., Toniolo, D., Valle, G. D., Johnson, S., Schlessinger, D., Oberle, I., and Mandel, J.-L. (1991). Isolation of sequences that span the fragile X and identification of a fragile X-related CpG island. *Science* 251: 1136-1139.
- Hinds, H.L., Ashley, C.T., Sutcliffe, J.S., Nelson, D.L., Warren, S.T., Housman, D.E., Schalling, M. (1993). Tissue specific expression of the *FMR-1* provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat. Genet.* 3:36-43.
- Ito, W., Ischiguro, H., and Kurosawa, Y. (1991) A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene* 102:67-70.

- Khandjian, E. W., F. Corbin., S. Woerly., and F. Rousseau. (1996). The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nat. Genet.* 12:91-93.
- Kremer, E. J., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Warren, S. T., Schlessinger, D., Sutherland, G. R., and Richards, R. I. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science* 252: 1711-1714.
- Li, S.-Y., Tsai, C.-C., Chou, M.-Y., Lin, J.-K. (1988). A cytogenetic study of mentally retarded school children in Taiwan with special reference to the fragile X chromosome. *Hum. Genet.* 77: 292-296.
- Lubs, H. A. (1969). A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 21: 231-244.
- Mannermaa, a. (1996). Deletion in the *FMR-1* gene in a fragile X male. *Am. J. Med. Genet.* 64:293-295.
- Meijer, H. (1994) A deletion of 1.6 kb proximal to the CGG repeat of the *FMR-1* gene causes the clinical phenotype of the fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 3:615-620.
- Mornet, E., Bogyo, A., Deluchat, C., Simon-Bouy, B., Mathieu, M., Thepot, F., Grisard, M.-C., Leguern, E., Boue, J., and Boue, A. (1993). Molecular analysis of a ring chromosome X in a family with fragile X syndrome. *Hum. Genet.* 92: 373-378.
- Nakahori, Y., Knight, S. J. L., Holland, J., Schwartz, C., Roche, A., Tarleton, J., Wong, S., Flint, T. J., Froster-Iskenius, U., Bentley, D., Davies, K. E., and Hirst, M. C. (1991). Molecular heterogeneity of the fragile X syndrome. *Nucl. Acids Res.* 19: 4355-4359.

- Nussbaum, R.L., Ledbetter, D.H. (1986). Fragile X syndrome: a unique mutation in man. *Annu. Rev. Genet.* 20:109-145
- Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boue, J., Bertheas, M. F., and Mandel, J.-L. (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252: 1097-1102.
- Pai, J.-T, Tsai, S.-F., Horng, C.-J., Chiu, P.-C., Cheng, M.-Y., Hsiao, K.-J., and Wu, K.-D. (1994). Detection of *FMR-1* mutation with RNA extracted from dried blood specimens collected on newborn screening filter papers. *Hum. Genet.* 93: 488-493.
- Pergolizzi, R. G., Erster, S. H., Goonewardena, P., and Brown, W. T. (1992). Detection of full fragile X mutation. *Lancet* 339:271-272.
- Pieretti, M., Zhang, F., Fu, Y.-H., Warren, S. T., Oostra, B. A., Caskey, C. T., and Nelson, D. L. (1991). Absence of expression of the *FMR-1* gene in fragile X syndrome. *Cell* 66: 817-822.
- Richards, R. I., and Sutherland, G. R. (1992). Fragile X syndromes: the molecular picture comes into focus. *Trends Genet.* 8:249-254.
- Rousseau, F., Heitz, D., Biancalana, V., Blumenfeld, S., Kretz, C., Boue, J., Tommerup, N., Van Der Hagen, C., DeLozier-Blanchet, C., Croquette, M.-F., Gilgenkrantz, S., Jalbert, P., Voelckel, M.-A., Oberle, I., and Mandel, J.-L. (1991). Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *New Engl. J. Med.* 325: 1673-1681.
- Siomi, H., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L., and Dreyfuss, G. (1993). The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* 74: 291-298.

- Siomi, H., Choi, M., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L., and Dreyfuss, G. (1994). Essential role for KH domains in RNA binding: Impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that cause fragile X syndrome. *Cell* 77:33-39.
- Siomi, M. C., H. Siomi., W. Sauer., S. Srinivasan., R. L. Nussbaum., and G. Dreyfuss. (1995). *FXR-1*, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *EMBO. J.* 14:2401-2408.
- Siomi, M. C., Y. Zhang., H. Siomi., and G. Dreyfuss. (1996). Specific sequences in the Fragile X syndrome protein *FMR-1* and the FXR proteins mediate their binding to 60s ribosomal subunits and the interactions among them. *Mol. Cell. Bio. Vol.16 No.7*:3825-3832.
- Sittler A., D. Devys., C. Weber., and J-L Mandel. (1996). Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of *FMR-1* protein isoforms. *Hum. Mol. Genet. Vol.5 No.1*:95-102.
- Steinbach, P., Wohrle, D., Tariverdian, G., Kennerknecht, I., Barbi, G., Edlinger, H., Enders, H., Gotz-Sothmann, M., Heilbronner, H., Hosenfeld, D., Kircheisen, R., Majewski, F., Meinecke, P., Passarge, E., Schmidt, A., Seidel, H., Wolff, G., and Zankl, M. (1993). Molecular analysis of mutations in the gene *FMR-1* segregating in fragile X families. *Hum. Genet.* 92: 491-498.
- Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Zhang, F., Pieretti, M., Caskey, C. T., Saxe, D., and Warren, S. T. (1992). DNA methylation represses *FMR-1* transcription in fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 1: 397-400.
- Sutherland, G. R. (1977). Fragile sites on human chromosome: Demonstration of their dependence to the type of tissue culture medium. *Science* 197:265-266.

- Sutherland, G. R. (1979a). Heritable fragile sites on human chromosome. I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Am. J. Hum. Genet.* 31: 125-135.
- Sutherland, G. R. (1979b). Heritable fragile sites on human chromosome. III. Detection of fra(X)(q27) in males with X-linked mental retardation and in their female relatives. *Hum. Genet.* 53: 23-27.
- Sutherland, G. R., and Baker, E. (1986). Induction of fragile sites in fibroblasts. *AM. J. Hum. Genet.* 38: 573-575.
- Tamanini, F., N. Meijer., C. Verheij., P. J. Willems., H. Galjaard., B. A. Oostra., and A. T. Hoogeveen. (1996). FMRP is associated to the ribosomes via RNA. *Hum. Mol. Genet. Vol.5 No.6*:809-813.
- Tarleton, J., Richie, R., Schwartz, C., Rao, K., Aylsworth, A. S., and Lachiewicz, A. (1993). An extensive de novo deletion removing *FMR-1* in a patient with mental retardation and the fragile X syndrome phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1973-1974.
- Verheij, C., Bakker, C.E., de Graaff, E., Keulemans, J., Willemsen, R., Verkerk, A.J.M.H., Galjaard, H., Reusser, A.J.J., Hoogeveen, A.T., and Oostra, B.A. (1993). Characterization and localization of the *FMR-1* gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* 363:722-724.
- Verheij, C., E. de Graaff., C. E. Bakker., R. Willemsen, P. J. Willems., N. Meijer., H. Galjaard., A. J.J. Reuser., B. A. Oostra and A. T. Hoogeveen. (1995) Characterization of *FMR-1* proteins isolated from different tissues. *Hum. Mol. Genet. Vol.4 No.5*:805-901.

- Verkerk, A. J. M. H., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y.-H., Kuhl, D. P. A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F., Zhang, F., Eussen, B. E., van Ommen, G.-J. B., Blonden, L. A. J., Riggins, G. J., Cha 染色, J. L., Kunst, C. B., Galjaard, H., Caskey, C. T., Nelson, D. L., Oostra, B. A., and Warren, S. T. (1991). Identification of a gene (*FMR-1*) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65: 905-914.
- Verkerk, A. J. M. H., de Graaff, E., De Boule, K., Eichler, E. E., Konecki, D. S., Reyniers, E., Manca, A., Poustka, A., Willems, P. J., Nelson, D. L., and Oostra, B. A. (1993). alternative splicing in the fragile X gene *FMR1*. *Hum. Mol. Genet.* 2:399-404.
- Wang, Y-C., M-L Lin., S-J. Lin., Y-C Li., and S-Y Li. (1997). A novel point mutation within intron 10 of *FMR-1* gene causing Fragile X syndrome. in press.
- Webb, T. P., Bunday, S. E., Thake A. I., and Todd, J. (1986). Population incidence and segregation ratios in the Martin-Bell syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 23:573-580.
- Willemsen, R., Mohkamsing, S., de Vries, B., Devys, D., van den Ouweland, A., Mandel, J.L., Galjaard, H., Oostra, B. (1995) Rapid antibody test for fragile X syndrome. *Lancet* 345:1147-1148.
- Willemsen, R., Bonte Koe C., Tamanini. F., Galjaard H., Hoogeveen A., Oostra B. (1996) Association of FMRP with ribosomal precursor particles in the nucleolus. *Biochem Biophys Res Commun* 225 (1):27-33

- Willemsen, R., Smits, A., Mohkamsing, S., van Beerendonk, H., de Haan, A., de Vires, B., van den Ouweland, A., Sistermans, E., Galijaard, H., Oostra, B. A. (1997). Rapid antibody test for diagnosing fragile X syndrome : a validation of the technique. *Hum. Genet.* 99 (3):308-311.
- Wohrle, D., Kotzot, D., Hirst, M. C., Manca, A., Korn, B., Schmidt, A., Barbi, G., Rott, H.-D., Poustka, A., Davies, K. E., and Steinbach, P. (1992). A microdeletion of less than 250 Kb, including the proximal part of the *FMR-1* gene and the fragile-X site, in a male with the clinical phenotype of fragile-X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 299-306.
- Yu, S., Mulley, J., Loesch, D., Turner, G., Donnelly, A., Gedeon, A., Hillen, D., Kremer, E., Lynch, M., Pritchard, M., Sutherland, G. R., and Richard, R. I. (1992). Fragile-X syndrome: Unique genetics of the heritable unstable element. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 968-980.
- Zhang, Y., J.P. O'Conner., M.C. Siomi., S. Srinivasan., A. Dutra., R.L. Nussbaum., and G. Dreyfuss. (1995) The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs *FXR-1* and *FXR-2*. *EMBO. J.* 14:5358-5366.

第六章

附錄

Appendixes

附錄 一、實驗步驟 (Procedures)

一、核苷酸定序法 (DNA sequencing) :

甲、fmol sequence reaction:

1. Add G, A, T, C, to eppendorf, each tube 2 μ l , then store on ice.
2. reaction sample prepare:

Sterile H ₂ O	8 μ l
fmol sequencing 5x buffer	5 μ l
Primer (5 pmole)	1 μ l
Template DNA(about 50 ng)	1 μ l
α -S ³⁵ -dATP	1 μ l

Final	16 μ l
-------	------------

3. Add 1 μ l of sequencing Grade Taq DNA polymerase(5u/ μ l)
4. Add 4 μ l to G, A, T, C, each tube
5. Add one drop of mineral oil to each tube and PCR machinery
6. PCR cycle:
95 °C 5 min.
95 °C 1 min. 55 °C 30 sec. 72 °C 1 min. 35 cycles
soak file 4 °C
7. Add 4 μ l sequencing stop solution, then spin down.
8. Heat the reaction at 75 °C for 3 min.
9. Load 3 μ l of each reaction on the each lane.
10. run 6% acrylamind with 7 M urea, 2500V, 100mA, 60W, about 150 min.
11. Fix (methanol 100 ml add acitic acid 100 ml add d₂H₂O to 2000 ml) about 30 min.

12. Dry gel in 75 °C 1 hr.
13. Exposure X-ray slice about 2-5 day.

乙、Sequence reaction: Sequencing by "Sequenase"

A. Primer annealing:

1. To 2 µg (20 µl) of template, add 2 µl of 2N NaOH, incubate at room temperature for 5 min.
2. Add 3 µl primer (5 pmol/µl) mix gently by pipetting up and down.
3. Immediately add 3 µl of 3M NaOAc (pH 4.5), mix well.
4. Add 75 µl of 100% EtOH, which have been pre-cooled at -20 °C.
5. Invert 40 times, stored at -70 °C for 10 min.
6. Thaw the solution at room temperature for 10 min before spin.
7. Spin down the DNA at 12.5Krpm for 20 min.
8. Wash once with 70% EtOH, spin down for 10 mins.
9. Dry, resuspend in 10 µl 1x sequenase Rx. buffer. (8 µl H₂O + 2 µl sequenase Rx. buffer).

B. Labelling reaction:

1. Dilute proper amount of the labelling mix with H₂O. (Labelling mix:H₂O=1:4)
2. Finish step C1-C3 before going to the next steps.
3. Dilute the sequenase enzyme in ice cold dilute sequenase buffer. (enzyme : dilute sequenase buffer=1:7)
4. Add followings to the annealed template solution:

DTT	1 µl
diluted labelling mix	2 µl (Sequencing mix)

α - ³⁵ S-dATP	0.5 μ l
diluted sequenase	2 μ l

Mix and incubate at room temp for 5 min, and put it back on ice immediately after reaction.

C.Termination reaction:

1. Precool tubes that labelled G,A,T,C on ice.
2. Add 2.5 μ l of the appropriate termination mix (dideoxy-nucleotide mix) to each of the four tubes.
3. Cap the tubes immediately after addition of this termination mix above. And put them back on ice.
4. Prewarm the tube above at 37 °C water bath for at least one min.
5. Add 3.5 μ l of sequencing mix into each termination mix. Mix it by pipetting up and down for several times. Put it into water bath. Incubate for 5 min.
6. Add 4 μ l of stop solution into each tube, mix well, store on ice.
7. Before 加入, heat the samples at 75-80 °C for 2 min. then load immediately on the gel. Use 2-3 μ l in each lane.
8. Run 6% acrylamind with 7M urea, 2500V, 100mA, 60W, about 150 min
9. Fix (methanol 100 ml add acitic acid 100 ml add d₂H₂O to 2000 ml) about 30 min.
- 10.Dry gel in 75 °C 1 hr.
- 11.Exposure X-ray slice about 2-5 day.

二、DNA 純化(Purification of DNA)

甲、Manual :

1. Extract with 1x Volume phenol (one times).
2. Centrifuge, 12000 rpm, 10 min.
3. Transfer supernatant to new microtube.
4. Extract with 1x Volume phenol/choloroform (one times).
5. Centrifuge, 12000 rpm, 10 min.
6. Transfer supernatant to new microtube.
7. Extract with 2x Volume choloroform (two times).
8. Centrifuge, 12000 rpm, 10 min.
9. Transfer supernatant to new microtube.
10. Ppt. with 100% EtOH, -70 °C, 10min.
11. Centrifuge, 12000 rpm, 10 min.
12. Pour off supernatant. Wash pellet with 70% EtOH, air dry.
13. Dissolve DNA in 30 μ l 10 mM Tris-HCl ,pH 8.5.

乙、PCR purification Kit (QIAGEN) :

1. Add 5 volumes of buffer PB to 1 volume of the PCR reaction and mix
2. Place a QIAquick spin column in a 2 ml collection tube and apply the sample
3. Centrifuge 60 sec, 6000 rpm.
4. Discard flow-through and place QIAquick column back into the same tube
5. To wash, add 0.75 ml buffer PE to QIAquick column and centrifuge 60 sec, 6000 rpm.

6. Discard flow-through and place QIAquick column back in the same tube. Centrifuge QIAquick column for an additional 1 min at maximum speed
7. Place QIAquick column in a clean 1.5 ml microfuge tube
8. To elute, add 30 μ l 10 mM Tris-HCl ,pH 8.5 to the center of the QIAquick column and centrifuge 1 min.

丙、Purification use QIAEX II agarose gel extraction Kit (QIAGEN)

1. Excise the DNA band from the agarose gel (1% TAE agarose gel).
2. Add 3 volumes of buffer QX I to 1 volume of gel.
3. Add 30 μ l of QIAEX II and mix. Incubate at 50 $^{\circ}$ C for 10 min.
4. Centrifuge 30 sec and remove the supernatant.
5. Wash the pellet with 500 μ l of buffer QX I.
6. Wash the pellet twice with 500 μ l of buffer PE. Completely remove supernatant.
7. Air-dry the pellet for 10-15 min.
8. Add 30 μ l of 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 and incubate according to the following table.
9. Incubate at 50 $^{\circ}$ C 10 min.
10. Centrifuge for 30 sec and collect supernatant containing pure DNA.
11. Optional: repeat steps 9 and 10 and combine elutes.

三、質體的純化(Purification of plasmids)

甲、Minipreparation of Plasmid DNA

1. Take 2 ml of overnight culture of transformed E. coli strain JM109
2. Centrifuge at 12Krpm for 10 sec.

3. Pour off supernatant as clean as possible.
 4. Resuspend cell in 100 μ l of solution I, vortex.
 5. Add 200 μ l of solution II. Invert the tube gently and quickly.
 6. Add 150 μ l of solution III. Invert the tube gently and quickly until the solution becomes fluidity.
 7. Centrifuge at 12000 rpm for 10 min.
 8. Transfer the supernatant into a new tube.(discard the pellet)
 9. Add 1 ml of 98% ethanol, -70 $^{\circ}$ C for 10 min.
 10. Centrifuge at 12000 rpm for 10 min.
 11. Pour off supernatant.
 12. Wash pellet with 1 ml of 70% ethanol, twice.
 13. Air dry.
 14. Resuspend in 30 μ l of 10mM Tris buffer. (pH 8.5)
- * Solution I : 50 mM glucose, 10 mM EDTA pH 8.0, 25 mM Tris-Cl
pH 8.0
- * Solution II : 0.2 N NaOH, 1% SDS
- * Solution III : 3 M Sodium acetate pH 4.8

乙、Minipreparation of Plasmid DNA (QIAGEN miniprept kit)

1. Take 2 ml of overnight culture of transformed E. coli strain JM109
2. Centrifuge at 12Krpm for 10 sec.
3. Pour off supernatant as clean as possible.
4. Resuspend the bacterial pellet in 0.3 ml of buffer P1.
5. Add 0.3 ml of buffer P2, mix gently, and incubate at room temperature for 5 min.
6. Add 0.3 ml of chilled buffer P3, mix immediately but gently, and

- incubate on ice for 10 min.
7. Centrifuge at for 15 min at 10000 rpm in a minifuge. Remove supernatant promptly.
 8. Equilibrate a QIAGEN-tip 20 by applying 1 ml buffer QBT, and allow the column to empty by gravity flow.
 9. Apply the supernatant from step 4 onto the QIAGEN-tip 20 and allow it to enter the resin by gravity flow.
 10. Wash the QIAGEN-tip 20 with 4x1 ml buffer QC.
 11. Elute DNA with 0.8 ml buffer QF.
 12. Precipitate DNA with 0.7 volumes of isopropanol, previously equilibrated to room temperature. Centrifuge immediately at 10000 rpm in a microfuge for 30 min, and carefully remove the supernatant.
 13. Wash DNA with 1 ml of cold 70% ethanol, air dry for 5 min, and redissolve in 30 μ l 10mM Tris buffer. (pH 8.5)

四、Competent cell 的製備(Preparation of competent cell)

1. Take a single colony JM109(in LB plate) into 2 ml LB broth, 37 °C overnight. (no antibiotic).
2. Take 2 ml overnight culture into 50 ml LB broth 37 °C shake for 2.5 hours (OD_{600} about 0.6~0.7).
3. Take cell 50 ml, centrifuge 5000rpm 4 °C 10 min. (roter d tube need pre-cold)
4. Pour off solution then add 15 ml 100 mM $CaCl_2$.
5. Vortex 30 second, then put on 0 °C 30 min.

6. Centrifuge at 5000 rpm 4 °C 10 min. then pour off solution.
7. Add 3 ml 100 mM CaCl₂, vortex 30 second, store in 4 °C.

五、Transformation :

1. Add the 3 μ l DNA into 200 μ l competent cells, Mixed, iced for 30 min.
2. Heat shock at 42 °C water bath for 2 mins and shake,
3. Quickly put into ice box, and shake 10 sec. put on ice 2 mins.(add water in iced, and shake several sec.)
4. Add 2ml LB broth, incubated at 37 °C for 60 min.
5. Plating to LB/amp plates.(took 200 μ l /plate; 3 plates)
6. Cultured overnight in 37 °C incubator.

六、Ni-NTA resin 的再生(Regeneration of the Ni-NTA resin) :

1. Wash the column with 2 volumes of 6 M guanidine hydrochloride/
0.2 M acetic acid.
2. Wash the column with 2 Volumes of water.
3. Wash the column with 3 Volumes of 2 % SDS.
4. Wash the column with 1 Volumes of 25 % ethanol.
5. Wash the column with 1 Volumes of 50 % ethanol.
6. Wash the column with 1 Volumes of 75 % ethanol.
7. Wash the column with 5 Volumes of 100 % ethanol.
8. Wash the column with 1 Volumes of 75 % ethanol.
9. Wash the column with 1 Volumes of 50 % ethanol.
10. Wash the column with 1 Volumes of 25 % ethanol.

11. Wash the column with 1 Volumes of water.
12. Wash the column with 5 Volumes of 100 mM EDTA, pH 8.0.
13. Wash the column with 2 Volumes of water.
14. Recharge column with 2 volumes of 100 mM NiSO₄.
15. Wash the column with 2 Volumes of water.
16. Wash the column with 2 volumes of 6 M guanidine hydrochloride/
0.2 M acetic acid.
17. Equilibrate the column in buffer (20 mM Tris pH 8.5 (at 4 °C) ,
100 mM KCl, 20 mM imidazole, 10 mM β-mercaptoethanol, 10 %
glycerol).

附錄 二 實驗材料(Materials)

1. 酵素(enzyme) :

名 稱	廠 牌	名 稱	廠 牌
<i>Apa I</i>	New England BioLab	Klenow	Promega
<i>Bag II</i>	New England BioLab	<i>Kpn I</i>	New England BioLab
<i>BamH I</i>	New England BioLab	<i>Nco I</i>	New England BioLab
<i>Bst XI</i>	New England BioLab	<i>Pst I</i>	New England BioLab
<i>EcoR I</i>	New England BioLab	<i>Sac I</i>	New England BioLab
<i>EcoR V</i>	Promega	T ₄ DNA <i>ligase</i>	New England BioLab
<i>Hind III</i>	New England BioLab	<i>Xho I</i>	New England BioLab
<i>RNA inhibitor</i>	BRL	T ₇ RNA <i>polymerase</i>	BRL

2. 試藥(Drugs) :

名 稱	廠 牌	名 稱	廠 牌
Postassium chloride (KCl)	E. Merck	Glacial acetic acid	E. Merck
Tris	E. Merck	EDTA	E. Merck
Methanol	E. Merck	NaCl	E. Merck
β-Mercaptoethanol	E. Merck	MgCl ₂	E. Merck
SDS (Natriumlauryl-	Bio-rad	isopropyl-β-D-thiogala-	BRL

sulfat)		ctopyranoside(IPTG)	
Ethidium Bromide	Sigma	2-propanol	E. Merck
Phenol	Sigma	Chloroform	E. Merck
Agarose (ultrapure)	E. Merck	Nonidet P-40	Sigma
PMSF	BRL	Glycine	Bio-rad
Acrylamide	BRL	bisacrylamide	Biotech
HCl	E. Merck	TEMED	E. Merck
Glycerol	Sigma	bromophenol blue	E. Merck
Coomassie blue	E. Merck	Tritone-100X	Sigma
Ampicillin	Sigma	Kanamycin	Sigma
3 x SDS sample buffer	New England BioLab	Pre 染色 ed protein Molecular Weight standards	BRL
Imidazole	Sigma	Tween 20	E. Merck
Protein A agarose	BRL	polyguanylic acid agarose	Sigma
Streptavidine agarose	BRL	Monoclonal anti-FMRP IC3 1a	Euromedex -Strasbourg
Peroxidase-Labeled affinity purified antibody to rabbit IgG (H+L)	Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.	Peroxidase-Labeled affinity purified antibody to mouse IgG (H+L)	Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.
Broadford	Bio-rad	PVDF-PLUS membrane	Micron separations Inc.
Cellulosenitrate(E)	Schleicher & Shuell	3MM Chr 46x57 cm	Whatman
Agarose	BRL	Bacto-agar	DIFCO
Yeast extract	DIFCO	Tryptone	DIFCO
4-chloro-1-napyhol	E. Merck		

3. 藥品的製備 (Preparation of reagents and buffers) :

Solution	Method of preparation								
10% Ammonium persulfate	To 1g of ammonium persulfate, add H ₂ O to 10 ml.								
1 M Tris-Cl	<p>溶 121.1 g Tris base 於 800 ml 蒸餾水中，然後以濃鹽酸調 pH 值</p> <table> <tr> <td>pH 值</td> <td>濃鹽酸大概的用量</td> </tr> <tr> <td>7.4</td> <td>70 ml</td> </tr> <tr> <td>7.6</td> <td>60 ml</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>42 ml</td> </tr> </table> <p>上述溶液於達室溫後，再調整其正確 pH 值。然後再加蒸餾水至 1 L，分裝後高溫滅菌。</p>	pH 值	濃鹽酸大概的用量	7.4	70 ml	7.6	60 ml	8.0	42 ml
pH 值	濃鹽酸大概的用量								
7.4	70 ml								
7.6	60 ml								
8.0	42 ml								
0.5 M EDTA pH8.0	186.1 g 的 disodium ethylene diamine tetraacetate 2H ₂ O 與 800 ml 的蒸餾水混合，再以 NaOH 調整 pH 至 8.0 (~20 g)。高溫滅菌。								
5 M NaCl	溶解 292.2 g 的 NaCl 於 800 ml 蒸餾水中，再加水至 1 L。分裝後高溫滅菌。								
1 M MgCl ₂	溶 203.3 g 的 MgCl ₂ · 6H ₂ O 於 800 ml 蒸餾水中，然後加水至 1 L。分裝後高溫滅菌。								
10 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)	取 100 g 電泳級的 SDS 於 900 ml 蒸餾水中，加熱至 68 °C 使其溶解。以濃鹽酸調整 pH 至 7.2，再加水至 1 L。								
10X TBE	取 108 g 的 Tris base 和 55 g boric acid 溶於 800 ml 的蒸餾水，再加 40 ml 的 0.5 M EDTA pH8.0。最後加水至 1 L。								
10X DNA 加入 dye	50% glycerol、12.5 mM Tris-Cl pH8.0、60 mM EDTA pH8.0、0.01% bromophenol blue、0.01% xylene cyanol FF。								
Ethidium bromide (10 mg/ml)	取 0.1 g ethidium bromide 於 10 ml 蒸餾水中，以電磁攪拌器攪拌數小時使其溶解。將溶液保存於不透光的容器中。								
phenol 之再蒸餾	phenol 以 163 °C 蒸餾，冷凝管以 70 °C 熱水冷凝，								

	以防止 phenol 結晶。收集瓶先稱重(W1)，收集後的瓶子再稱重(W2)，求出 phenol 體積 $[(W2-W1)/1.071]$ 後，加入 1/10 倍體積的蒸餾水，標示好製備日期，保存於-80 °C 冰箱。
buffer saturate phenol	蒸餾過的 phenol 以 68 °C 水浴溶解，以等體積的 1 M Tris-Cl pH8.0 萃取一次，再以等體積的 0.1 M Tris-Cl pH8.0 萃取二次。利用 pH 試紙測定上層溶液直到 pH > 7.6 即可使用。加 β -mercaptoethanol (β -MSH) 至終濃度為 0.2 %，並保留部份 buffer 複蓋 phenol
phenol/Chloroform	68 °C 水浴溶解的 phenol，分裝至 50 ml 的離心管每管 15 ml，加 chloroform 14.4 ml，isoamyl alcohol 600 μ l，加 β -mercaptoethanol (β -MSH) 至終濃度為 0.2 %。
Luria-Bertani medium (LB broth)	取 bacto-tryptone 10 g、bacto-yeast extract 5 g、NaCl 5 g 溶於 950 ml 的去離子水中，以 5 N NaOH 調整 pH 至 7.0。加水至 1 L，高溫滅菌。
1 M CaCl ₂	Dissolve 54 g of CaCl ₂ ·6H ₂ O in 200 ml of pure H ₂ O (Milli-Q or equivalent). Sterilize the solution by passage through a 0.22-micron filter. Store in 1 ml aliquots at -20 °C.
50X TAE	取 242 g 的 Tris base 溶於 800 ml 的蒸餾水，再加 57.1 ml glacial acetic acid 及 100 ml 的 0.5 M EDTA pH8.0。最後加水至 1 L。
TE buffer (pH 8.0)	10 mM Tris Cl (pH 8.0)，1 mM EDTA (pH 8.0)
0.1 M IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)	取 1.41 g IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)，然後加 d ₂ H ₂ O 到 50 ml，混合均勻後經 filter 過濾，儲存在-20 °C。
Western blot gel solution	1. Acrylamide-Methylenebisacrylamide (30:0.8)： 取 Acrylamide 30 g 和 Methylenebisacrylamide 0.8 g，加 d ₂ H ₂ O 至 100 ml，混合均勻後經 filter 過濾，儲存在 4 °C。

	<p>2. Stacking gel solution :</p> <p>取 6.0 g Tris , 加 d_2H_2O 40 ml , 調 pH 值至 6.8(1M HCl) , 最後加 d_2H_2O 至 100 ml 混合均勻後經 filter 過濾 , 儲存在 4 °C 。</p> <p>3. Resolving gel buffer stock :</p> <p>取 18.15 g Tris , 加 1 M HCl 48 ml , 調 pH 值至 8.8 (1M NaOH) , 最後加 d_2H_2O 至 100 ml 混合均勻後經 filter 過濾 , 儲存在 4 °C 。</p>
RNA binding buffer	<p>1. 0 M NaCl :</p> <p>取 1 M Tris (pH 7.4) 0.5 ml 和 1 M $MgCl_2$ 0.125 ml 和 100% Tritox-100 0.25 ml 混合 , 然後補 d_2H_2O 至 50 ml 。</p> <p>2. 0.1 M NaCl :</p> <p>取 1 M Tris (pH 7.4) 0.5 ml 和 1 M $MgCl_2$ 0.125 ml 和 100% Tritox-100 0.25 ml 混合 , 加 5 M NaCl 1ml , 然後補 d_2H_2O 至 50 ml 。</p> <p>3. 0.25 M NaCl :</p> <p>取 1 M Tris (pH 7.4) 0.5 ml 和 1 M $MgCl_2$ 0.125 ml 和 100% Tritox-100 0.25 ml 混合 , 加 5 M NaCl 2.5 ml , 然後補 d_2H_2O 至 50 ml 。</p> <p>4. 0.5 M NaCl :</p> <p>取 1 M Tris (pH 7.4) 0.5 ml 和 1 M $MgCl_2$ 0.125 ml 和 100% Tritox-100 0.25 ml 混合 , 加 5 M NaCl 5 ml , 然後補 d_2H_2O 至 50 ml 。</p> <p>5. 1 M NaCl :</p> <p>取 1 M Tris (pH 7.4) 0.5 ml 和 1 M $MgCl_2$ 0.125 ml 和 100% Tritox-100 0.25 ml 混合 , 加 5 M NaCl 10 ml , 然後補 d_2H_2O 至 50 ml 。</p>
Blotting buffer	<p>取 3.03 g Tris 和 14.4 g glycine , 加 methanol 200 混合均勻 , 再加 d_2H_2O 至 1000 ml , 儲存在 4 °C 。</p>
5 X Electro buffer	<p>取 15 g Tris 和 5 g SDS (Natriumlauryl-sulfat) 和 72 g glycine , 加 d_2H_2O 至 1000 ml 。</p>

Coomassie blue 染色 solution	取 208 ml methanol 和 208 ml d_2H_2O 和 84 ml glacial acetic acid 混合均勻後，加入 0.5 g coomassie blue powder，然後經 filter 過濾。
De 染色 solution	取 150 ml methanol 和 50 ml glacial acetic acid 混合，再加 d_2H_2O 至 500 ml。
Sequence gel solution	. 4% sequence gel : 取 Acrylamide 3.18 g 和 Methylenebisacrylamide 0.16 g 和 Urea 40 g，加 10 X TBE 8 ml，然後補 d_2H_2O 至 80 ml，混合均勻後經 filter 過濾。 . 6% sequence gel : 取 Acrylamide 4.55 g 和 Methylenebisacrylamide 0.25 g 和 Urea 40 g，加 10 X TBE 8 ml，然後補 d_2H_2O 至 80 ml，混合均勻後經 filter 過濾。
100 mM Phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF)	取 1.742 g PMSF 加 isopropanol 至 100 ml。
2 M KCl	取 14.91g KCl 加 d_2H_2O 至 100 ml，autoclaved。
1 M Dithiothreitol (DTT)	Dissolve 3.09 g of DTT in 20 ml of 0.01 M sodium acetate (pH 5.2). Sterilize by filtration. Dispense into 1 ml aliquots and store at $-20^{\circ}C$.
Protein purification buffer	1. Buffer A : 50 mM Tris，10 mM β -mercaptoethanol，1mM PMSF (fresh)，1% Nonidet P-40。 . Buffer B : 20 mM Tris，100 mM KCl，10 mM β -mercaptoethanol，10% (V/V) glycerol，20 mM imidazole。 . Buffer C : 20 mM Tris，100 mM KCl，10 mM β -mercaptoethanol，10% (V/V) glycerol，100 mM imidazole。
Alkaline lysis	Solution I :

buffers for minipreparations of plasmid DNA	50 mM glucose , 25 mM Tris Cl (pH 8.0) , 10 mM EDTA (pH 8.0) . Autoclaved for 15 minutes at 10 lb/sq. in. on liquid cycle, and store at 4 °C. olution II : 0.2 N NaOH (freshly) , 1% SDS olution III 3 M potassium acetate 60 ml , glacial acetic 11.5 ml , H ₂ O 28.5 ml
Fixative solution	取 100 ml methanol 加 100 ml glacial acetic acid , 然後補 d ₂ H ₂ O 至 2000 ml 。
Cell homogenized buffer	10 mM HEPES , 300 mM KCl , 100 μM CaCl ₂ , 0.05% Tween 20 , 0.45% Triton X 100
TBS buffer	取 9.0 g NaCl 加 10 ml 1 M Tris pH 7.4 , 補 d ₂ H ₂ O 至 1000 ml 。
3% Milk	取 1.5 g 脫脂奶粉加 TBS buffer 至 50 ml 。
Stripping buffer	2 % SDS 、 62.5 mM Tris-Cl pH 6.8 、 100 mM β-Mecarptoethanol 。

4. 儀器設備：

儀器名稱	廠牌
CO ₂ incubator	Nuaire
Laminar flow hood	Bellco Glass Inc.
Centrifuge	Kubota
Microfuge	Eppendorf
Power supply	Pharmacia LKB Inc.
Horizontal gel electrophoresis tank	BRL
Water bath	Toyo
Spectrophotometer DU-640	Beckman
-70 °C refrigerator	Revco scientific Inc.

DNA thermal cycler	Perkin-Elmer <i>Cetus</i> Inc.
-20 °C refrigerator	Kelvinator
U.V. box	Vilber Lourmat
MP-4 Land camera system	Polaroid
Electrophoresis transfer: Mini-Cell	Bio-red
Vertical Gel Electrophoresis Tank	BRL
Microfuge with refrigerator	Hitachi
Supercentrifuge	Beckman
Sequencing Electrophoresis Tanks	BRL
Gel dryer	Heto Dry GD-1
Mighty small II SE260	Hofer
pH meter	Hanner