

後轉譯修飾-

甲基轉移酶活性測試與醣蛋白純化的救星

撰文：謝馨慧

有人說愛美是女人的天性，為了吸引眾人的目光，每當出門時總是細心打扮，後轉譯修飾（**post-translational modification, PTM**）就是蛋白質修飾加工，讓自己發揮最大的價值。當蛋白質被轉譯出來後，需要經過加工處理，才會有功能或活性，進而發揮功效。許多作用都屬於PTM，包含磷酸化、甲基化、醣基化或是乙酰化等等，實驗過程相當繁複，因此多數實驗人員希望不要被指定做這一類的實驗，所以本文要跟大家簡單介紹偵測甲基化與醣蛋白的大救星。

甲基化 Methylation

甲基化在生物體之作用牽涉範圍相當廣泛，包含訊息傳遞、生物合成、蛋白質修復、轉譯修飾、染色體的調控，都需藉由甲基化的作用進行其下游之路徑調控，也因為甲基化參與體內許多生化反應，因此也有許多文獻指出不正常的甲基化會導致疾病的產生。例如：體內不正常的甲基化會增加動脈粥狀硬化發生之機率，另外若在啟動子(Promoter)上之胞嘧啶(C)和鳥嘌呤(G)大量重複序列的區域(CpG island)過度甲基化，也會促使抑癌基因不活化而導致癌症的生成。陸續發現許多疾病也跟甲基化相關，雖然甲基化並不是體內唯一重要的生化反應，但也是值得重視和注意的議題。

S-腺苷基甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)又名AdoMet，在DNA或蛋白質修飾作用中為甲基捐贈者，帶有一分子的活化甲基，故在甲基化機制中常藉由甲基轉移酶(methyltransferases)作用轉移其甲基，為常見輔酶。其重要性可從轉錄或轉譯作用即可窺探，在mRNA上加蓋作用(Capping)主要是為了保護mRNA並增加轉譯能力，而在加蓋作用中，SAM利用甲基轉移酶幫忙轉移甲基進而達到其效果。當SAM異常時，會嚴重影響生理層面，阿茲海默症、帕金森氏症、憂鬱症、肝功能硬化或是癌症目前都證實會受到其影響調控，因此也越來越多這方面的研究，早期都是用放射性或是終點法去做測試，然而越來越多人質疑，SAM甲基作用為動態的酵素反應，應該要連續性監控才能準確判斷其SAM-甲基轉移酶之反應，且放射性的實驗對環境與實驗操作者相當不利，因此G-Biosciences研發出非放射性的方式去偵測甲基轉移酶活性。

已知甲基轉移酶會從SAM移除甲基而形成腺同半胱氨酸(adenosylhomocysteine, AdoHcy) (圖1)，早期做相關實驗的時候會在SAM上標定C14或是H3，但在後續反應還需花費時間純化腺同半胱氨酸；此外，腺同半胱

胺酸會對甲基轉移酶有負迴饋的作用，其關鍵在於腺同半胱氨酸會受到核苷酸酶(nucleosidase)催化而釋出腺嘌呤(adenine)，進而對甲基轉移酶產生負迴饋，導致常常的誤判實驗結果。

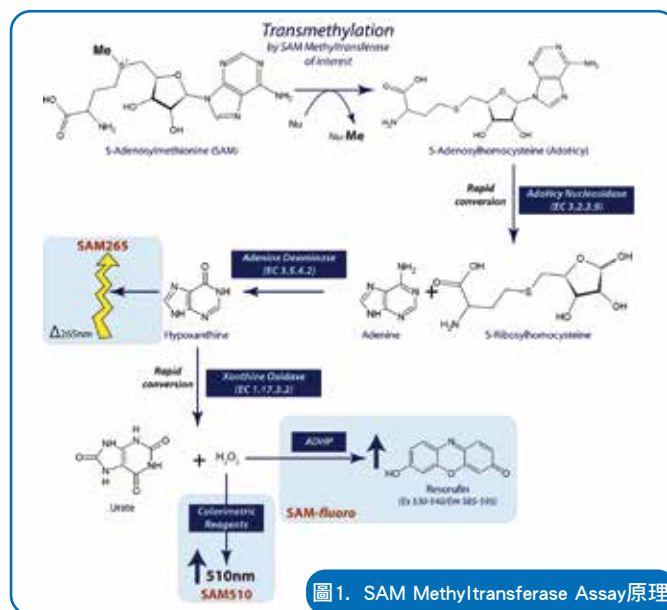


圖1. SAM Methyltransferase Assay原理

SAM265: SAM Methyltransferase Assay

為了解決這樣的問題，G-Biosciences利用腺甘脫胺酶(adenine deaminase)幫忙，將腺嘌呤轉換成亞黃嘌呤(hypoxanthine)，利用波長265nm間接得到其酵素活性，例如SAM265: SAM Methyltransferase Assay。

當腺嘌呤轉換成越多的亞黃嘌呤時，吸光值會下降，藉由這樣的方式去回推S-腺苷基甲硫氨酸-甲基轉移酶的活性(圖2)。但是此方法也有一些實驗上的限制，例如波長為265nm，易受到DNA的干擾，且也會有儀器上的限制，必須要有265nm之波長才能判讀；例如：搭配Thermo Multiskan GO酵素免疫分析儀及Thermo Nunc UV微量盤，效果更佳。

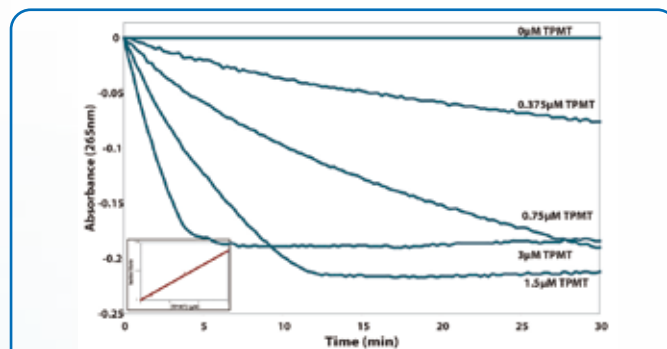


Figure 2: SAM265™ methyltransferase assay quantitatively assays Thiopurine S-methyltransferase (EC 2.1.1.67) (TPMT). 0-3µM TPMT was assayed with SAM265, using thiophenol as a substrate. Inset graph shows linear correlation between absorbance and TPMT concentration.

圖2. S-腺苷基甲硫氨酸-甲基轉移酶之活性

SAM510™: SAM Methyltransferase Assay

G-Biosciences 另外推出 SAM510: SAM Methyltransferase Assay 的方式去測試活性，其原理為從SAM移除甲基而形成腺同半胱胺酸，並經由一連串反應快速形成亞黃嘌呤，利用黃嘌呤氧化酵素 (xanthine oxidase) 將亞黃嘌呤轉成尿酸和過氧化氫(H₂O₂)，並利用 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid (DHBS) 會與H₂O₂結合的特性，在波長510nm測吸光值，當結合力越強，吸光值會越高，間接偵測甲基轉移酶之酵素活性。

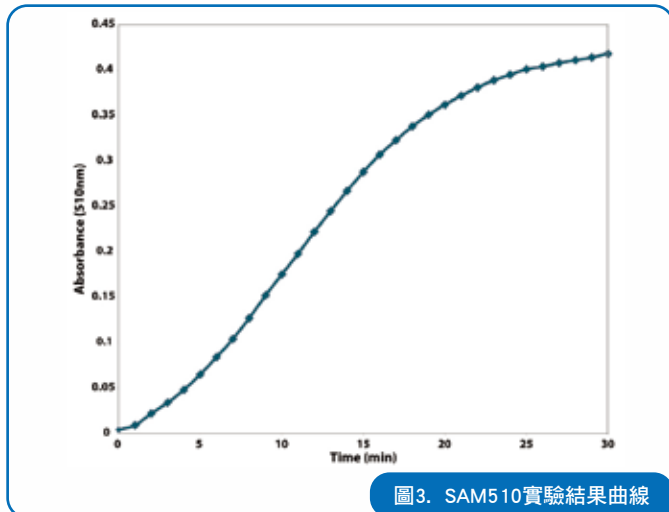


圖3. SAM510實驗結果曲線

SAMfluoro: SAM Methyltransferase Assay

實驗原理與SAM510相同，藉由黃嘌呤氧化酵素 (xanthine oxidase) 將亞黃嘌呤轉成尿酸和過氧化氫(H₂O₂)，藉由過氧化氫與 ADHP (10-acetyl-3,7,-dihydroxyphenoxazine) 作用產生螢光，而判讀其結果。其激發光 (excitation) 為530-540nm，散射光 (emission) 為 585-595nm。圖4是測試組蛋白甲基化 (histone methyltransferase) 的結果；此產品亦可搭配Thermo Nunc 96孔黑盤 (Cat#237108) 使用喔。

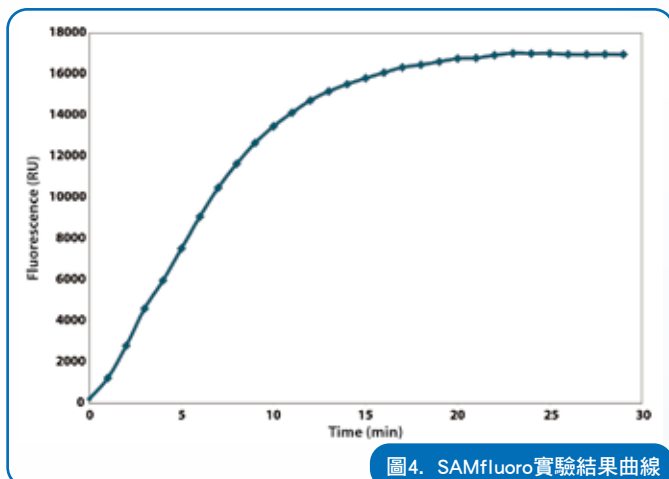


圖4. SAMfluoro實驗結果曲線

除了測試甲基轉移酶活性之外，也可以利用核苷酸酶生成SAM或是甲硫腺苷 (5'-methylthioadenosine) 的反應進行活性測試 (表1)，且無論哪種方式都相當方便且快速喔!這麼好的東西你還在等什麼!趕快拿起電話打給岑祥業務吧!!

訂購資訊

| Cat. # | Description/ size |
|---------|----------------------------------------------------|
| 786-425 | SAM265™: SAM Methyltransferase Assay/ 100 Assays |
| 786-430 | SAM510™: SAM Methyltransferase Assay/ 100 Assays |
| 786-431 | SAMfluoro: SAM Methyltransferase Assay/ 100 Assays |

表1. 其他可利用此方式測試之反應

| EC # | Official Name | Reaction Catalysed |
|--------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.16.1.8 | [methionine synthase] reductase | [Methionine synthase]-cob(II) alamin + NADPH + S-adenosyl-L-methionine = [Methionine synthase]-methylcob(II)alamin + AdoHcy + NADP+ |
| 2.1.1.1-157* | S-Adenosylmethionine dependent methyltransferases | S-adenosyl-L-methionine + substrate = AdoHcy + methylated substrate |
| 2.5.1.4 | Adenosylmethionine cyclotransferase | S-adenosyl-L-methionine = MTA + 2-aminobutan-4-olide |
| 2.5.1.16 | Spermidine synthase | S-adenosyl-(5')-3-methylthio-1-propylamine + 1,4-diaminobutane = MTA + spermidine |
| 2.5.1.22 | Spermine synthase | S-adenosylmethioninamine + spermidine = MTA + spermine |
| 2.5.1.23 | Sym-norspermidine synthase | S-adenosylmethioninamine + propane-1,3-diamine = MTA + N-(3-aminopropyl)-1,3-diaminopropane |
| 2.5.1.24 | Discadenine synthase | S-adenosyl-L-methionine + N6-(delta2-isopentenyl)-adenine = MTA + discadenine |
| 2.5.1.25 | tRNA-uridine aminocarboxypropyltransferase | S-adenosyl-L-methionine + tRNA ^{Phe} = MTA + tRNA 3-(3-amino-3-carboxypropyl) uridine |
| 2.5.1.38 | Isonocardicin synthase | S-adenosyl-L-methionine + nocardicin E = MTA + isonocardicin A |
| 2.3.1.161 | Lovastatin nonaketide synthase | acetyl-CoA + malonyl-CoA + NADPH + H ⁺ + S-adenosyl-L-methionine = dihydrononacolin L + CoA + CO ₂ + NADP ⁺ + AdoHcy |
| 3.3.1.2 | Adenosylmethionine hydrolase | S-adenosyl-L-methionine + H ₂ O = MTA + L-homoserine |
| 4.4.1.14 | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase | (-)-S-adenosyl-L-methionine = MTA + 1-aminocyclopropane-1-carboxylate |

糖蛋白 Glycoproteins

糖蛋白(Glycoproteins)主要是蛋白質後轉譯修飾的產物，碳水化合物會與天門冬胺(Asparagine)殘基形成N-linked或是與絲胺酸(Serine)、蘇胺酸(Threonine)殘基形成O-linked進而形成糖蛋白，其反應主要發生於高基氏體與內質網中。它們主要在細胞膜表面或是胞外基質，另外也會存在於血液裡。這種糖基化的蛋白在細胞傳遞、發炎免疫反應，甚至細胞貼附與移動都扮演相當重要的角色。但是要純化糖蛋白一直是個很大的工程，其純化步驟相當繁複。為了簡化實驗流程，G-Biosciences推出純化糖蛋白之產品FOCUS™ Glycoprotein(Cat.#786-253)，內含有凝集素(lectin)的Concanavalin A管柱，此蛋白可與糖蛋白的a-D-mannosyl and a-D glycosyl殘基結合，並用離心的方式純化，簡單並快速在90分鐘內沖提出所需要的糖蛋白。

實驗方式

取得 2×10^7 Jurkat 細胞，加入Glyco-Loading Buffer和蛋白酶抑制劑，均質後再進行離心，其上清液進行管柱純化之試驗。鋅(Zinc)染色膠片後，經由實驗結果可以得知(圖5)經由不同的沖提液(Elution Buffer I-III)去清洗，其可得到大量Glycoproteins之表現量(圖5, E1-E4)。進一步將E1-E3的產物去除易干擾物質後跑2D膠片(圖6)。在2D膠片中可明顯地看到利用Glycoproteinkit純化Glycoproteins效率相當不錯，此外FOCUS™ Glycoprotein套組也有放大糖蛋白之作用，因此可清楚看見其訊號十分地強烈。避免純化是否成功之疑慮。

FOCUS™ Glycoprotein套組中每1ml的resin含有10-16mg Con A，且能抓住20-50mg thyroglobulin，利用離心的方式，實驗速度快，無論是細胞、動物組織或是血清，都可以簡單輕鬆地純化糖蛋白喔!

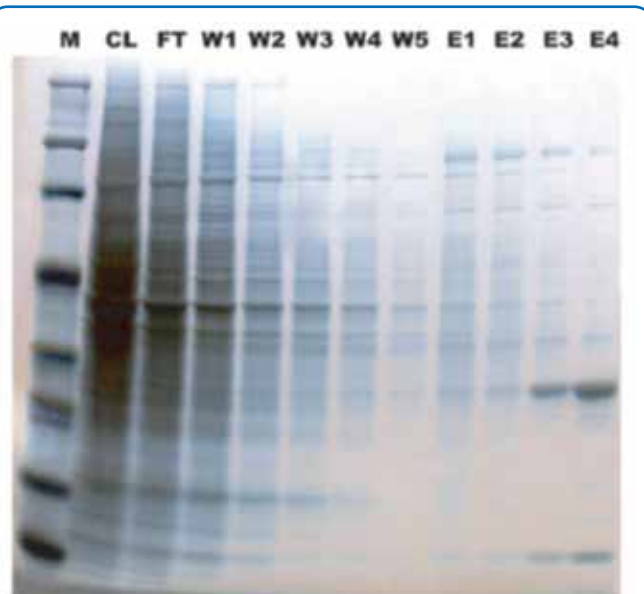
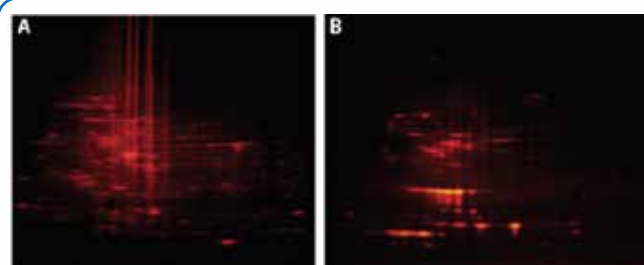


Figure 1: FOCUS™ Glycoprotein isolates a large number of glycoproteins. Jurkat cells were lysed by sonication, centrifuged and the supernatant (CL) loaded onto a FOCUS™ Glycoprotein column. Following incubation the column was centrifuged and the flow through (FT) was collected. The column was washed 5 times (W1-5) and the glycoproteins were sequentially eluted with Glyco Elution Buffer I (E1-2), Glyco Elution Buffer II (E3) and Glyco Elution Buffer III (E4).

圖5



Comparison of crude Jurkat cell lysate (A) and glycoproteins (B) isolated with FOCUS™ Glycoprotein.

圖6

訂購資訊

| Cat. # | Description/ size |
|---------|--------------------------------|
| 786-253 | FOCUS™: Glycoprotein/ 10 Preps |

