

行政院國家科學委員會補助
大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計畫：利用螢光共振能量轉移法高速篩選金黃色葡萄球菌 *
* 名稱：DnaB 與 PriA 解旋?的抑制劑 *
* ***** *

執行計畫學生：林欣賢
學生計畫編號：NSC 101-2815-C-040-024-B
研究期間：101年07月01日至102年02月28日止，計8個月
指導教授：黃晟洋

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 102年03月29日

目錄

第一章：緒論(introduction)	1
1.1 金黃色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) 介紹及致病機制 ...	1
1.2 DNA 複製系統.....	2
1.2.1 解旋酶(helicase).....	2
1.2.2 DNA 複製再啟動 (DNA replication restart)	4
1.3 類黃酮介紹及醫療用途	5
1.4 研究動機	5
第二章：材料與方法(Materials and Methods)	7
2.1 實驗材料	7
2.2 蛋白質取得與處理相關之技術	9
2.2.1 聚合酶連鎖反應	9
2.2.2 PCR 產物的純化.....	10
2.2.3 質體抽取及質體製備	11
2.2.4 細菌大量培養與蛋白質表現	12
2.2.5 蛋白質純化	13
2.2.6 蛋白質透析	14
2.2.7 蛋白質濃縮	14
2.3 電泳遲滯法 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)	14
2.3.1 電泳遲滯法分析蛋白質與 DNA 的交互作用	14
2.3.2 結合常數的計量	16
2.4 蛋白質-小分子交互作用之螢光淬滅	16
2.4.1 用螢光淬滅偵測蛋白在不同 dNTP 的情況下：	16
2.4.2 用螢光淬滅偵測蛋白在不同 NTP 的情況下：	17
2.4.3 用螢光淬滅偵測蛋白在不同類黃酮的情況下：	17

2.5 SaDnaB 解旋活性分析	17
2.5.1 雙股 DNA 黏合操作步驟：	17
2.5.2 螢光偵測解旋活性之實驗條件：	18
第三章：實驗結果 (Result)	19
3.1 以螢光光譜偵測 SaDnaB 與小分子之交互作用	19
3.1.1 以螢光淬滅實驗觀察 SaDnaB 與 dNTP 的結合情形.....	19
3.1.2 以螢光淬滅實驗觀察 SaDnaB 與 NTP 的結合情形.....	20
3.1.3 以螢光淬滅實驗觀察 SaDnaB 與類黃酮的結合情形 ...	20
3.1.4 以螢光淬滅實驗觀察 SaDnaB 與 ATP 結合時，類黃酮結 合情形	21
3.2 電泳遲滯分析 (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	22
3.2.1 核苷酸對 SaDnaB 與單股 DNA 結合能力之影響.....	22
3.2.2 類黃酮對 SaDnaB 與單股 DNA 結合能力之影響.....	22
3.3 優化類黃酮 myricetin.....	23
3.3.1 以螢光淬滅實驗觀察 SaDnaB 與 myricetin 相似物的結合 情形	23
3.3.2 以螢光淬滅實驗觀察 SaDnaB 與 ATP 結合時， myricetin 相似物結合情形	24
3.4 SaDnaB 解旋活性分析	25
3.4.1 SaDnaB 解旋活性測定，並使用電泳遲滯分析	25
3.4.2 SaDnaB 解旋活性測定，並使用螢光光譜儀分析	25
3.5 以電泳池至技術計算 SaPriA 與 DNA 之交互作用	27
3.5.1 核苷酸對 SaPriA 與單股 DNA 結合能力之影響	27
3.5.2 類黃酮對 SaPriA 與單股 DNA 結合能力之影響	28
3.5.3 類黃酮干擾 ADP 對 SaPriA 與單股 DNA 結合能力之影..	29

3.5.4 ADP 對 SaPriA 與單股 DNA 結合能力之影響	29
第四章：討論 (Discussion)	31
參考文獻	38

第一章：緒論(introduction)

1.1 金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 介紹及致病機制

金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一種革蘭氏染色陽性球型 (gram-positive) 細菌。在顯微鏡下觀察呈葡萄串狀排列。金黃色葡萄球菌無芽孢、鞭毛，大多數無莢膜，是常見的引起食物中毒的致病菌，也常見於皮膚表面及上呼吸道黏膜。金黃色葡萄球菌可以適應含高濃度氯化鈉的培養基，因此選擇這種培養基可將該菌分離出來。為表皮之正常菌叢，常造成伺機性感染 (opportunistic)。細菌常引起不同程度的化膿性炎症擴散疾病，如癰和癤、中耳炎、鼻竇炎骨髓炎、膿毒病等¹。

金黃色葡萄球菌的感染常造成嚴重的症狀，甚至死亡。先前雖然可用抗生素治療，但由於抗生素過度的氾濫使用，造成其發展出可水解抗生素之酵素。例如：MRSA(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 或 Multiple-resistant *Staphylococcus aureus*) 是金黃色葡萄球菌中的一個獨特菌株，能抵抗所有 β -內醯胺類 (β -lactam) 抗生素，其中包括了青黴素及其他種 β 內醯胺酶的抗生素。MRSA 首次發現於 1961 年的英國，而現在已廣泛散播於全世界，在醫院中更被稱之為「超級細菌」。在先前 MRSA 感染一般會使用萬古黴素 (Vancomycin) 來治療，但現在也發現到亦有具備對抗萬古黴素的金黃色葡萄球菌¹。

金黃色葡萄球菌一般都是植菌在鼻前孔或是皮膚表皮上，但當宿主其免疫系統低下，或皮膚上有傷口時，可能會伺機性的入侵人體，造成呼吸道、傷口、靜脈導管及尿道的皮膚及軟組織感染，引致膿瘡、紅腫、發熱及流膿，嚴重時會發生壞死筋膜炎²。目前已知的致病機轉為：(1) 金

黃色葡萄球菌內毒素(sta-enterotoxin)，其屬與超級抗原(super-antigen)，會無專一性的使免疫細胞 T 細胞與 B 細胞相互結合，造成免疫系統大亂，並產生大量的細胞激素，誘發強烈的發炎反應使組織受到傷害。(2) TSST-1 毒素，與內毒素相同為超級抗原，會造成發燒等全身性過敏反應之外，會使患者生成瀰漫性紅斑 (diffuse macular erythematous rash) 促使皮膚壞死²。(3)當細菌發展出可逃脫宿主免疫系統的能力時，便會在身體中其他軟組織增生，造成感染性心內膜炎(endocarditis)、肺炎、骨髓炎 (osteomyelitis) 和化膿性關節炎³。

1.2 DNA 複製系統

1.2.1 解旋酶(helicase)

解旋酶是一類可解開氫鍵的酶，藉由水解 ATP 供給能量來解開雙股螺旋 DNA (unwinding DNA)。本計畫會研究兩種解旋酶，分別為 DnaB 與 PriA。

1.2.1.1 DnaB 解旋酶

DnaB 解旋酶是所有生物體維持生命所必需的酵素，其主要的功能是能將緊密黏合的雙股螺旋 DNA 進行解旋，並形成兩條單股 DNA，以利於 DNA 聚合酶 (polymerase) 的結合，促使 DNA 的複製。不管在一般 DNA 的複製，又或者是進行 DNA 修復 (DNA repair) 時，都是不可或缺的⁴。在先前的研究提出，DnaB 會事先的與單股 DNA 進行結合，而後再將 ATP 進行水解反應，以獲取能量並進行移動與解旋。由於先前一連串蛋白質交互作用，進而吸引 DnaB 結合到 DNA 上使雙股 DNA 解旋，並將 DNA 模板 (DNA template) 所裸露出來，此時引子合成蛋白 DnaG 便會合成引子 (primer) 在模板 DNA 上，並引導 DNA 聚合酶

複製出另外一股 DNA，已完成 DNA 的複製或修復⁴。

DnaB 依照解旋酶家族的分類，可區分出許多不同的家族，依照其解旋的方向性，分為 3'-5' 方向解旋的 A 型解旋酶，以及 5'-3' 的 B 型解旋酶，而 DnaB 為 B 型解旋酶。另外 DnaB 在其結構上，分為三個主要區域，分別為 α β γ ，其這三個區域皆存在於大部份的細菌解旋之中，其中 β 區域只要為核苷酸 (nucleotide) 結合位並對核苷酸進行水解反應以獲得能量，而 γ 區域是吸引單股 DNA 與其結合，並可與其他 DnaB 進行交互作用，使 DnaB 形成六套體 (hexamer) 結構。 α 區域主要是解旋酶對 DNA 進行解旋的主要功能區域，但經由與其他菌種進行序列比對時其相似並不高，這還待其他學家進行研究⁵。

1.2.1.2 PriA 解旋酶

在眾多的解旋酶之中，PriA 是被分類在 3'-5' 方向解旋的 A 型解旋酶。PriA 解旋酶為引子合成體 (primosome) 中的一員，對於 DNA 的複製相當重要，且已証證時當 DNA 的複製叉 (replication fork) 受到外在環境破壞，造成 DNA 無法繼續進行複製時，為主要因子去重新開啟 DNA 的複製⁶。它可辨識受到損害的 DNA 所形成的特殊二級結構

(second structure)，並且與之結合並延長展露出單股 DNA 區域，並吸引單股 DNA 結合蛋白 (single strand DNA binding protein) 抓住裸露的 DNA，等待其它蛋白前來進行換手動作。假使將其去除，細菌在充滿 UV 光的照射下，其存活率會大大的下降⁷。

在先前的研究發現到，PriA 解旋酶內含有兩個區域，為單股結合區以及 nucleotide 結合區。而 PriA 的 DNA 結合區分為兩個，一個對 DNA 有微弱的結合能力，另一個對 DNA 有強力的結合反應。在無 ADP 存在

的環境下，DNA 只會被 PriA 的強力 DNA 結合區進行結合，但當 ADP 與 PriA 相互結合時，便會改變 PriA 的蛋白質構型，使微弱 DNA 結合區打開，幫助 PriA 與 DNA 作結合，大大增強育 DNA 結合的能力⁸。

1.2.2 DNA 複製再啟動 (DNA replication restart)

引子合成體，其最早的機制是在嗜菌體中被發現。在嗜菌體 DNA 上有特殊的 DNA 序列 ψ X174，會吸引引子合成體靠近並進行 DNA 複製，因此被發現到⁹。在原核生物體中，其 DNA 模板受到細菌體中的氧化壓力或紫外線照射等外在化學性傷害時，其 DNA 複製便會暫停，等到 DNA 修復完成之後，才會重新進行 DNA 的複製。要將其以停止的 DNA 複製重新啟動，便需要引子合成體來合成引子，以便於 DNA 複製繼續進行。引子合成體是由一連串的蛋白質相互結合而形成的蛋白質複合體，其組成的蛋白質為：PriA、DnaD、DnaB、DnaC、DnaI、DnaG。一開始 PriA 會結合到 DNA 目標區域上，DnaD、DnaI 與 DnaC 會先後的與 PriA 進行結合，其中的機制雖然還不清楚，但可以確定的是 DnaD 會先與 PriA 先行結合，其 DnaI 與 DnaC 會相互結合形成復合物 DnaI₆-DnaC₆，並與 DnaD 進行結合，後再吸引 DnaB 與之結合。DnaI-DnaC 複合物會幫助 DnaB 結合裝載 (loading) 到 DNA 上，當 DnaB 結合在 DNA 上時，其 DnaG 便會一同的結合上來，並在模板 DNA 上合成新的引子，最終 DNA 聚合酶結合上來繼續未完成的複製。在先前的研究指出，DnaI 會先與 ATP 進行結合，後與 DnaB 進行交互作用並一同與 DnaB 形成六聚體 (DnaB₆-DnaI₆)，同時 DnaI 的蛋白構形發生改變，以易於將 DnaB 結合組裝到 DNA 上，後再進行 ATP 水解反應，使其蛋白構行回復到先前未與 ATP 結合時的狀態，並從 DnaB 身上離開完成 DnaB 與 DNA 的組裝¹⁰。

1.3 類黃酮介紹及醫療用途

類黃酮是個獨特卻又常見於光合作用植物中，常現在水果、蔬菜、花、茶、酒、蜂蜜當中被分離出，目前科學家鑑定出約 4000 種不同的類黃酮。在幾世紀以來，他常被用於治療人類的疾病，並且發現這天然的產物，具有抗人類感染 (anti-infection) 的效用。依照其結構上分類，可分為：黃酮類(flavones)、黃酮醇類(flavonol)、黃烷酮類(flavanone)、異黃酮類(isoflavone)、新類黃酮(neoflavonoid)，並依照其種類，具有可抗菌 (anti-bacterial)，抗黴 (anti-fungal)，抗病毒 (anti-viral) 等活性¹¹。它也具有抗發炎與抗氧化反應，例如在抗發炎方面，黃酮類化合物能夠抑制轉錄因子 NF κ B 的和 AP-1 與上游的傳遞路徑進行結合，如：MAPK，IKK 和 PI3K/Akt 訊息傳遞路徑，使降低發炎性物質的產生或使降低促發炎性物質 (TNF，IL-A，PGE2) 和降低發炎酵素 (COX-2 和 iNOS) 的活動，達到消除發炎的效果¹²。在抗氧化方面，也有論文指出，類黃酮具有抑制 NADPH oxidase 的活性，以避免身體產生過多的過氧化物¹³。另外，也發現到類黃酮具有直接抑制 DNA 的生成、影響細胞膜穩定性與能量代謝的能力。結構上類黃酮有三個六角環的構造，其為基本結構，並在 A 環與 C 環上依不同種類在不同位置接上數量不同的氫氧基，這與類黃酮有抗氧化能力息息相關，也會在 B 環上接上不同數量的氫氧基，使其產生不同的化學和物理特性¹¹。

1.4 研究動機

近年來，因為過於氾濫的使用抗生素，已導致細菌演化出了可以抵抗多種抗生素的能力，使形成多重抗藥性。“超級細菌”一詞頻頻出現

於新聞媒體的報導，除之前印度所傳出的腸道菌（克雷白氏菌與大腸桿菌）已蔓延至各地，最近在英國亦爆發出”超級金黃色葡萄球菌”¹。這些細菌所引發的感染症原可以使用青黴素或頭孢菌素等抗生素來治療且效果顯著，然由於這些細菌經由突變或交換基因等方式亦發展出對抗這些傳統抗生素的能力，尤其是以其細胞壁合成或核糖體蛋白質為標靶的藥物，且已有多重抗藥性的細菌不斷被發現與報導，成為臨床治療時甚面臨無藥可醫的情況；因此若能開發出新的標靶，也許對感染症的治疗能有幫助。我們在之前的研究發現，在細菌 DNA 複製時所必需的解旋酶與高等動物的解旋酶其結構與功能有顯著的不同，因此解旋酶是否可能為一新的標靶⁵。另外，我們已發現部分類黃酮物質對克雷白氏肺炎桿菌 DnaB 解旋酶的 dNTP 結合能力有明顯的抑制效果¹；也許有其他更多的天然物或經化學合成的化合物有此能力，值得被篩選出來。因此此計劃不但要先測試類黃酮物質對金黃色葡萄球菌的 PriA 與 DnaB 解旋酶有效力外，更進一步的，我們欲發展一套能即時偵測解旋酶活性的方法，以便高速篩選出可能的抑制劑。

第二章：材料與方法

(Materials and Methods)

2.1 實驗材料

- (1) 聚合酶連鎖反應(PCR)中所使用的 buffer 以及 *Taq* polymerase 購買自 MDBio (Frederick, MD, USA)。
- (2) PCR 產物純化,所使用的 kit 購買自 VIOGENE (Taipei, Taiwan)。
- (3) 質體抽取所使用的 kit 購買自 MDBio (Frederick, MD, USA)。
- (4) Gel extraction 所使用的 kit 購買自 GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)。
- (5) 製備 Clone 的限制酶購買自 NEB (Ipswich, MA, USA)。
- (6) 所使用的勝任細胞 (competent cell) 為 *ECOS*TM 21、*ECOS*TM 101 購買自 YEASTERN (Taipei, Taiwan)。
- (7) 接合反應所使用的 T4 DNA ligase 和 buffer 購買自 Promega (Madison, WI, USA)。
- (8) 細菌生長所使用的 LB 購買自 BD (Franklin Lakes, NJ, USA)。
- (9) 抗生素 Ampicillin 購買自 MDBio (Frederick, MD, USA)。
- (10) 蛋白質表現是使用 isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), 購買自 MDBio (Frederick, MD, USA)。
- (11) 純化所使用的膠體管柱為 HisTrapTM HP 購買自 GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA)。
- (12) SDS-PAGE 所使用的 SDS、TEMED、Tris-HCl (pH 8.8)、Tris-HCl (pH 6.8)、30% Acrylamide/Bis、APS、Stain buffer 皆購買自 BIO-RAD (Hercules, CA, USA)。

- (13) 螢光偵測實驗所使用的六種類黃酮: myricetin、quercetin、galangin、kaempferol、myricitrin、dihydromyricetin 皆購買自Sigma (St. Louis, MO, USA)
- (14) 螢光偵測解旋活性實驗所使用的DNA購買自 Thermo (Rockford, IL, USA)
- (15) Bacterial agar 購買自 AMRESCO (Solon, OH, USA)。
- Ampicillin LB 培養盤製作：
12.5 g 的 LB 和 7.5 g 的 bacterial agar 加入 500 ml 的 ddH₂O，高溫高壓滅菌，冷卻至 55 °C，加入 250 μl 的 100 mg/ml ampicillin，之後倒盤。
- (16) DNA 電泳使用的 Agarose I™ 購買自 AMRESCO (Solon, OH, USA)。
- 1% 瓊脂膠製作配方：
12.5 g 的 agarose 加入 70 ml 的 0.5X TAE 中，沸騰至透明呈清狀，冷卻至 55 °C 後倒入鑄膠槽中。
- (17) SDS PAGE 製作配方：
- Stacking gel (4%)：

1. ddH ₂ O	1.50 ml
2. 30 % Acrylamide/Bis	0.33 ml
3. 1.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.63 ml
4. 10 % SDS	25 μl
5. 10 % APS	25 μl
6. TEMED	1 μl

● Resolving gel (12 %) :

1. ddH ₂ O	1.65 ml
2. 30 % Acrylamide/Bis	2.00 ml
3. 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.25 ml
4. 10 % SDS	50 μ l
5. 10 % APS	50 μ l
6. TEMED	1.5 μ l

● 10X running buffer (1 L) 製作配方 (使用時稀釋為 1X) :

1. Tris	32.3 g	(final concentration = 250 mM)
2. Glycine	144 g	(final concentration = 1.92 M)
3. SDS	20 g	(final concentration = 1 %)

● Destain buffer (1 L) 製作配方 :

1. Methanol	200 ml
2. Acetic acid	100 ml
3. ddH ₂ O	700 ml

2.2 蛋白質取得與處理相關之技術

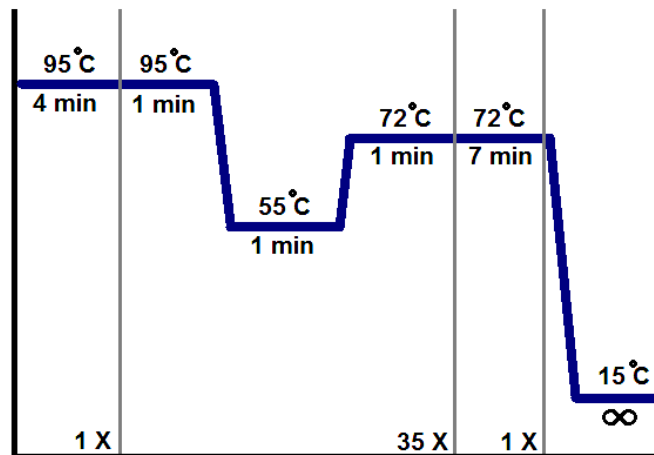
2.2.1 聚合酶連鎖反應

加入下列之 PCR 實驗反應物至200 μ l 微量離心管中並混和均勻，使用的儀器是 BIO-RAD Thermocycler，反應條件如下所示。

Reagent :

1. Template DNA	0.5ul
2. Primer-forward	1ul
3. Primer-revers	1ul
4. 10mM dNTP mix	1ul
5. 10X Taq buffer	5ul

- | | | |
|----|-------------------------|--------|
| 6. | Taq DNA Polymerase | 0.7ul |
| 7. | Sterile deionized water | 40.8ul |



取 4 μ l 反應後混合液產物與 1 μ l 的 6X loading dye 混合後，將其注入到 1 % 瓊脂膠 (0.5X TAE buffer and 1 % agarose) 並進行電泳 (electrophoresis)，於 0.5X TAE buffer 中給予電流 110 mV 分離產物約 20 分鐘，經 EtBr 染色 10~15 分鐘後用紫外光照膠確認反應後產物大小是否正確。

2.2.2 PCR 產物的純化

- (1) 將PCR產物 (總體積50 μ l) 加入 500 μ l PX buffer 混合均勻。
- (2) 將混合好產物加入 Clean up column，13000 rpm 離心，1分鐘。
- (3) 去掉下層液，加入500 μ l WF Buffer，以13000 rpm 離心，1分鐘。
- (4) 去掉下層液，加入500 μ l WS Buffer，以13000 rpm 離心，1分鐘。
- (5) 再以 13000 rpm 離心2分鐘 (使WS buffer 內的 ethanol 加以去除乾淨)。
- (6) 換至新的 tube 後加入 50 μ l 的 ddH₂O，放置室溫約10分鐘，再以 13000 rpm 離心2分鐘，並保存至-20 $^{\circ}$ C。

2.2.3 質體抽取及質體製備

質體抽取步驟為：

- (1) 將含有 pET21b 質體之單一菌落挑起，加入含有 4 μ l 100 mg/ml ampicillin 的 4 ml LB 培養液中，置於 37°C 培養箱，搖晃培養到 OD₆₀₀ 約為 1.0 。
- (2) 後在 Tube 中分次加入 1000 μ l 菌液，離心 12000 rpm，1 分鐘，去除上清液，並重覆 4 次。
- (3) 加入 250 μ l 的 Solution I，並將離心下來的菌塊溶散，後在冰上反應 2 分鐘。
- (4) 加入 250 μ l Solution II，用手緩慢搖晃均勻，室溫反應 1 分鐘。
- (5) 加入 250 μ l Solution III，用手緩慢搖晃均勻，室溫反應 1 分鐘。
- (6) 離心 11000 rpm，10 分鐘，並將其上清液取出（勿吸取到細胞碎片的白色沉澱物）。
- (7) 將 750 μ l 上清液吸至 Collect tube 中，在室溫靜置 2 分鐘，離心 6400 rpm，1 分鐘。
- (8) 除去 column 之過濾液，加入 500 μ l Wash Solution，離心 7200 rpm，1 分鐘，重複兩次。
- (9) 再以 8800 rcf 離心 2 分鐘（將 Wash Solution 中的 ethanol 加以去除乾淨）。
- (10) 最後加入 50 μ l 的 elution buffer 放置 37°C 反應 5 分鐘，以 8800 rcf 離心 2 分鐘，完成質體抽取。

2.2.3 蛋白質表現測試與蛋白質表現菌體儲存

- (1) 將定序結果正確的質體轉型至 (ECOSTM 21) 中。
- (2) 用挑菌棒取出 plate 中的單一菌落，種入含 4 μ l 100 mg/ml ampicillin 的 4 ml LB 培養液中，置 37 °C，搖晃培養至 OD₆₀₀=1.0。

- (3) 將 O.D 1.0 的菌液平分成兩管，一管做蛋白表現測試，一管做菌液儲存，各加入 2 ml LB 培養液，搖晃培養至 $OD_{600}=1.6$ 。
- (4) 從蛋白表現測試管中取 200 μ l 菌液至 eppendorf 中，原菌液加入 1 M isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 4 μ l，再培養 4 小時後取 150 μ l 表現後菌液至 eppendorf 中。
- (5) 用 12000 rpm 離心，1 分鐘，用 20 μ l ddH₂O 回溶菌塊後跑 SDS-PAGE 進行確認，步驟如下：
 1. 加入 4X loading dye 10 μ l 混合均勻，以 98 °C 加熱 1 小時。
 2. 將 marker 與 sample 注入 SDS-PAGE 之後，以 70 mV 跑膠約 2 小時。
 3. 跑膠完成後，將膠片置於 stain solution (coomassie blue) 中染色 1 小時。
 4. 染色完後以 destain solution，退染約 1 小時。
 5. 最後以玻璃紙封膠，風乾後確認結果。
- (6) 取菌液儲存管，在 tube 中分次加入 1000 μ l 菌液，離心 12000 rpm，1 分鐘，去除上清液，重覆 4 次。
- (7) 加入 400 μ l LB 培養液回溶菌塊，再加入 50% glycerol 100 μ l 後，保存至 -80°C，完成菌液儲存。

2.2.4 細菌大量培養與蛋白質表現

- (1) 取出儲存菌液 10 μ l，加入含 4 μ l 100 mg/ml ampicillin 的 4 ml LB 培養液中，置於 37 °C 培養箱，搖晃培養至菌液濃度達到 $OD_{600}=1.2$ 。
- (2) 將培養至 $OD_{600}=1.2$ 的菌液加入含 200 μ l 100 mg/ml ampicillin 的 500 ml LB 培養液中，此次共培養 2 瓶共 1 L 細菌培養液，置於

37 °C 培養箱，搖晃培養至菌液濃度達到 $OD_{600}=1.6$ (時間約 4~6 小時)。

- (3) 於濃度約為 $OD_{600}=1.6$ 時加入 1 M IPTG 125 μ l 誘導表現蛋白生成，在 25 °C 環境下繼續培養 8 小時。

2.2.5 蛋白質純化

- (1) 將培養好的菌液分置於 250 ml 離心瓶，以高速冷凍離心機 (Beckman) 12000 rpm 於 4 °C 低溫離心 20 分鐘。
- (2) 除去上清液，每瓶以 10 ml 的 binding buffer (5 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH 7.4) 將底部菌塊重新回溶，將回溶的菌液放入 50 ml 離心管。
- (3) 使用超音波破碎機 (sonicator) 將溶於 binding buffer 內的菌體均勻震碎。
- (4) 之後以 14000 rpm 於 4 °C 低溫離心 20 分鐘，收集上清液。
- (5) 將純化用 column His TrapTM HP 依序通入 30 ml 的 ddH₂O、30 ml 的 50 mM NiSO₄、30 ml 的 ddH₂O 及 30 ml 的 5 mM imidazole, 500 mM NaCl, pH 7.4) buffer。
- (6) 接著將含有蛋白質之上清液以慢速通入 column 中。
- (7) 通完上清液後，依序使用含有 500 mM NaCl pH 7.4 的不同濃度 imidazole (5 mM、60 mM、100 mM、200 mM、500 mM) 通入 column。並收集洗出之蛋白質各 50 ml。
- (8) 最後使用 100 mM EDTA pH 8.00 清洗 column，並用 20 % EtOH 通入 column 保存。後以 SDS-PAGE 確認蛋白質狀況，至此蛋白質純化完成。

2.2.6 蛋白質透析

實驗使用之透析膜為 Thermo Snake Skin[®] Pleated Dialysis Tubing。

- (1) 剪下適當長度後，將透析膜浸濕於蛋白質要置換之 buffer(此實驗使用之 buffer 為 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0)，大約 2 分鐘。
- (2) 將浸濕的透析膜拉平，以長型夾子夾住下端密封，放入欲置換 buffer 之蛋白質約 20ml，將上端也以長型夾子夾住密封，並預留約 1 公分之置換空間。
- (3) 將蛋白質懸掛於欲置換之 buffer 中，體積約為 1000ml，以磁石攪動 buffer，轉速約 160 rpm，置於 4 °C 環境下置換 6 小時，即完成蛋白質透析。

2.2.7 蛋白質濃縮

● 實驗使用之濃縮管為 Millipore Amicon ultra-10K。

- (1) 取出濃縮管後，以酒精和 ddH₂O 小心沖洗 (以免破壞過濾膜)。
- (2) 清洗完畢後，加入 10 ml 透析完的蛋白質溶液，3000 rpm 於 4 °C 低溫離心 30 分鐘，重覆此步驟至蛋白質濃度達到實驗條件為止 (需注意蛋白質狀態是否有聚集沉澱)。
- (3) 使用完畢後，以 ddH₂O 和酒精小心沖洗，保存至 20 % 酒精中。

2.3 電泳遲滯法 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

2.3.1 電泳遲滯法分析蛋白質與 DNA 的交互作用

- (1) 放射性標定不同長度的單股 DNA 之配方如下：

1. 10X T4 kinase buffer 1 μ l

2. T4 polynucleotide kinase 1 μ l
3. γ -³²P ATP 0.5 μ l
4. 1 μ M 單股 DNA 1 μ l
5. ddH₂O 6.5 μ l
6. 反應 6 小時後，加入 90 μ l 之 ddH₂O。

(2) 6 % Native gel 之配方如下 (4 片) :

1. ddH₂O 15.8 ml
2. 5X TBE buffer 2.4 ml
3. 30 % Acrylamide/Bis 4.8 ml
4. Glycerol 600 μ l
5. 10 % APS 400 μ l
6. TEMED 12 μ l

(3) 8 % Native gel 之配方如下 (4 片) :

7. ddH₂O 14.2 ml
8. 5X TBE buffer 2.4 ml
9. 30 % Acrylamide/Bis 6.4 ml
10. Glycerol 600 μ l
11. 10 % APS 400 μ l
12. TEMED 12 μ l

(4) 蛋白質-DNA 混合物之比例如下 :

1. 蛋白質 3 μ l
2. 已標定之單股 DNA 1 μ l
3. ddH₂O 1 μ l
4. 100uM flavonal 1ul

- (5) 將蛋白質-DNA 混合物置於室溫下反應 1 小時。
- (6) 加入 3 μl negative dye 至混合物中，以 110 V 進行電泳 40 分鐘
- (7) 後將膠體黏置於圖畫紙上，並覆上一層保鮮膜後放置負壓式乾膠系統上，蓋上塑膠膜，打開抽氣幫浦抽真空，設定乾膠時間 40 分鐘。
- (8) 乾膠完成後使用磷光分析感光片壓膠 4-6 小時。
- (9) 使用磷光分析儀照膠。

2.3.2 結合常數的計量

以 *SaDnaB* 為例：

- (1) 在膠電泳分析後，將 *SaDnaB*-DNA 形成的複合體 band 及 free DNA 的 band 進行掃描及量化。
- (2) 由可結合 50% DNA 的蛋白質濃度，估算出複合體的結合解離常數 (K_d)。

2.4 蛋白質-小分子交互作用之螢光淬滅

本計畫所使用的螢光偵測儀器為 Hitachi-2700，實驗條件如下：

2.4.1 用螢光淬滅偵測蛋白在不同 dNTP 的情況下：

- (1) 環境 buffer：HEPES 50mM、PH 7
- (2) 蛋白濃度約為 1 μM
- (3) dNTP 濃度：為 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} M
- (4) 偵測時間間隔為 2 min
- (5) 反應環境溫度為：25 $^{\circ}\text{C}$
- (6) 偵測波長為(ex/em)：280/330 nm

2.4.2 用螢光淬滅偵測蛋白在不同 NTP 的情況下：

- (1) 環境 buffer：HEPES 50mM、PH7
- (2) 蛋白濃度約為 1uM
- (3) NTP 濃度：為 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} M
- (4) 偵測時間間隔為 2 min
- (5) 反應環境溫度為：25 °C
- (6) 偵測波長為(ex/em)：280/330 nm

2.4.3 用螢光淬滅偵測蛋白在不同類黃酮的情況下：

- (1) 環境 buffer：HEPES 50mM PH7
- (2) 蛋白濃度約為 1uM
- (3) 類黃酮濃度：為 1-20 uM，每間隔為 1uM
- (4) 偵測時間間隔為 2 min
- (5) 反應環境溫度為：25 °C
- (6) 偵測波長為(ex/em)：280/330 nm

2.5 SaDnaB 解旋活性分析

我們所採用的 DNA 之螢光標定物質為 Alexa 488 和 BHQ1。

將其中一股的 5'端標定上 Alexa 488

將其中一股的 3'端標定上 BHQ1

2.5.1 雙股 DNA 黏合操作步驟：

- (1) 先將以標訂好的兩股 DNA，用 Alexa 488：BHQ1 為 1：2 的比例互相混合。
- (2) 將以混和好的 DNA 放置加熱器上，用 99°C 加熱 5 分鐘，後關閉加熱器並將其自然的回到室溫，使 DNA 自動的進行黏合。

(3) 完成之後使用鋁箔紙包覆避光，存於 4°C 環境下

2.5.2 螢光偵測解旋活性之實驗條件：

- (1) 環境 buffer：HEPES 50mM PH7
- (2) 蛋白濃度約為 200nM
- (3) 螢光標定 DNA 濃度為 50nM
- (4) ATP 濃度：5mM
- (5) MgCl₂ 濃度：3mM
- (6) 偵測時間間隔為 60 min
- (7) 反應環境溫度為：25 °C
- (8) 偵測波長為(ex/em)：495/519 nm

第三章：實驗結果 (Result)

3.1 以螢光光譜偵測 SaDnaB 與小分子之交互作用

3.1.1 以螢光淬滅實驗觀察 SaDnaB 與 dNTP 的結合情形

SaDnaB 為一種解旋酶，利用與核甘酸的結合並加以水解以得到能量，並進行雙股螺旋 DNA 解旋以利於 DNA 複製的進行，因此，DnaB 與核甘酸的結合情形便變得非常重要。我們利用螢光淬滅實驗，來觀察核甘酸與 SaDnaB 的結合情形。當核甘酸與 SaDnaB 結合的同時，會遮蔽到蛋白質內部的芳香環類氨基酸：tryptophan、tyrosine、phenylalanine，以至於降低接受到吸收波的波長，減少激發波的產生，使致光譜訊號產生下降，藉由此下降的趨勢，我們可以觀察到核甘酸與 SaDnaB 的結合情況。我們選用了 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 這四種 deoxynucleotide 進行實驗，並經由計算 K_d 值並相互比較，X 軸為 deoxynucleotide 的濃度變化，Y 軸為 $(F_0-F)/F_0$ ，表示螢光強弱的比例變化， F_0 為單純 SaDnaB 的螢光數值，而 F 為 SaDnaB 與 deoxynucleotide 進行結合時所產生的螢光數值。圖一至圖四為 SaDnaB 與不同 dNTP 作用所畫出的螢光圖，圖五則為圖一到圖四的光譜分析整理。經由實驗結果並做圖後發現，發現 dCTP 與 dGTP 和 SaDnaB 具有較強力的結合。其 K_d 值分別為：dATP 之 K_d 值為： $101.1 \pm 10.23 \mu\text{M}$ 、dCTP 之 K_d 值為： $57.2 \pm 6.24 \mu\text{M}$ 、dGTP 之 K_d 值為： $53.7 \pm 5.22 \mu\text{M}$ 、dTTP 之 K_d 值為： $62.0 \pm 6.19 \mu\text{M}$ 。其結合強弱比較為：dGTP > dCTP > dTTP > dATP。

3.1.2 以螢光淬滅實驗觀察 SaDnaB 與 NTP 的結合情形

在上一個實驗結果中，可以觀到 dCTP 與 dGTP 和 SaDnaB 的結合能力強，對此我們想試試看，deoxynucleotide 與 nucleotide 之間是否會因為差一個氧原子，造成與 SaDnaB 的結合有差異性。我們選用了 ATP、UTP、CTP、GTP、ADP 這五種 nucleotide 進行實驗，並經由計算 K_d 值並相互比較，X 軸為 nucleotide 的濃度變化，Y 軸為 $(F_0-F)/F_0$ ，表示螢光強弱的比例變化， F_0 為單純 SaDnaB 的螢光數值，而 F 為 SaDnaB 與 nucleotide 進行結合時所產生的螢光數值。圖六至圖十為 SaDnaB 與不同 NTP 作用所畫出的螢光圖，圖十一則為圖六到圖十的光譜分析整理。經由實驗結果並做圖後發現得知，deoxynucleotide 與 nucleotide 和 SaDnaB 的結合情況相差不大，CTP 和 SaDnaB 具有較強力的結合。其 K_d 值分別為：ATP 之 K_d 值為： $123 \pm 17.1 \mu\text{M}$ 、CTP 之 K_d 值為： $83 \pm 8.4 \mu\text{M}$ 、GTP 之 K_d 值為： $131 \pm 13.3 \mu\text{M}$ 、UTP 之 K_d 值為： $127 \pm 13.4 \mu\text{M}$ 、ADP 之 K_d 值為： $113 \pm 10.1 \mu\text{M}$ 。其結合強弱比較為：CTP > ADP > ATP > UTP > GTP。

3.1.3 以螢光淬滅實驗觀察 SaDnaB 與類黃酮的結合情形

由於核甘酸可藉由水解反應釋放能量，以用來提供 SaDnaB 解旋時所需要的能量，而扮演著能量提供的角色，因此假使有一種小型化合物，可以有效結合在 SaDnaB 水解核甘酸的區域上，便可以有效的抑制 SaDnaB 的活性，以達到抗細菌複製生長的目。我們利用所選出的四種類黃酮，利用螢光淬滅的方式觀察其與 SaDnaB 結合的情況。我們選用了 myricetin、quercetin、kaempferol、galangin 這四種類黃酮進行實驗，並經由計算 K_d 值並相互比較，X 軸為類黃酮的濃度變化，Y 軸為 $(F_0-F)/F_0$ ，表示螢光強弱的比例變化， F_0 為單純 SaDnaB 的螢光數值，而 F 為 SaDnaB 與類黃酮進行結合時所產生的螢光數值。圖十二至圖十五為 SaDnaB 與不同類黃酮作用所畫出的螢光圖，圖十六則為圖十二到圖十

五的光譜分析整理。經由實驗結果並做圖後發現得知，myricetin 和 SaDnaB 具有較強力的結合。其 K_d 值分別為：myriceti 之 K_d 值為： $10.7 \pm 1.66 \mu\text{M}$ 、galangin 之 K_d 值為： $20.6 \pm 1.6 \mu\text{M}$ 、quercetin 之 K_d 值為： $24.3 \pm 2.55 \mu\text{M}$ 、kaempferol 之 K_d 值為： $14.1 \pm 0.803 \mu\text{M}$ 。其結合強弱比較為：myricetin > kampferol > galangin > quercetin。

3.1.4 以螢光淬滅實驗觀察 SaDnaB 與 ATP 結合時，類黃酮結合情形

分析完核甘酸與類黃酮和 SaDnaB 的結合能力之後，我們想要了解當 SaDnaB 身上已經帶有 ATP 時，與類黃酮的結合能力是否與接上 ATP 時的情況相同。我們選用了 myricetin、quercetin、kaempferol、galangin 這四種類黃酮進行實驗，並在要進行實驗之前，是先將 SaDnaB 與 ATP 進行混合，使 ATP 可結合在 DnaB 上。X 軸為類黃酮的濃度變化，Y 軸為 $(F_0 - F)/F_0$ ，表示螢光強弱的比例變化， F_0 為單純 SaDnaB 的螢光數值，而 F 為 SaDnaB 與類黃酮進行結合時所產生的螢光數值，並計算出 K_d 值且加以相互比較。圖十七至圖二十為 SaDnaB 與 ATP 結合時，和不同類黃酮作用所畫出的螢光圖，圖二十一則為圖十七到圖二十的光譜分析整理。經由實驗結果並做圖後發現得知，myricetin 在 SaDnaB 以合 ATP 結合時，仍然具有較強力的結合，反觀 quercetin 則完全無法進行結合。其 K_d 值分別為：myricetin 之 K_d 值為： $20.0 \pm 2.47 \mu\text{M}$ 、galangin 之 K_d 值為： $54.9 \pm 13.5 \mu\text{M}$ 、quercetin 之 K_d 值為： $8.64 \times 10^{+6} \pm 1.72 \times 10^{+12} \mu\text{M}$ 、kaempferol 之 K_d 值為： $75.3 \pm 56.5 \mu\text{M}$ 。其結合強弱比較為：myricetin > galangin > kampferol > quercetin。

3.2 電泳遲滯分析 (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

3.2.1 核苷酸對 SaDnaB 與單股 DNA 結合能力之影響

在先前的研究指出，當 DnaB 解旋酶進行解旋時，會水解核苷酸獲得足夠的能量，以用來進行在 DNA 上的移動與解旋反應，因此我們想觀察在 ATP，ADP 與 dATP 存在的情形下，是否對 SaDnaB 與 DNA 的結合反應是否有影響。我們在 SaDnaB 最高濃度為 1 μ M 時製作濃度梯度，並加入 166 μ M 的核苷酸，藉由 DNA 在膠體中泳動時，因 SaDnaB 與 DNA 一同形成復合物，造成泳動速率下降，使其在感光板上產生新的訊號。我們觀察是否 DnaB 與 DNA 所一同形成的復合物，會因為外加的核苷酸，產生量的變化或是提前或延後形成的情況發生。之後我們對所做出的結果，進行定量分析，並用內插法計算其 K_d 值。圖二十二至圖二十五為不同核苷酸影響 SaDnaB 與單股 DNA 結合能力的 EMSA 膠圖，圖二十六則為圖二十二到圖二十五的 EMSA 膠圖定量分析整理。相互比較之後發現 ATP 與 dATP 對 DnaB 與 DNA 的結合有些微的抑制作用。其 K_d 值分別為：SaDnaB 之 K_d 值為：0.095 μ M、SaDnaB+ADP 之 K_d 值為：0.0903 μ M、SaDnaB+dATP 之 K_d 值為：0.137 μ M、SaDnaB+ATP 之 K_d 值為：0.120 μ M。其抑制 SaDnaB 與 DNA 結合強弱分別為 dATP>ATP>ADP

3.2.2 類黃酮對 SaDnaB 與單股 DNA 結合能力之影響

在先前的實驗發現，類黃酮是藉由結合在 DnaB 核苷酸的結合區域附近，造成與核苷酸結合時所生成的效果一樣，改變了 DnaB 的構型，使結合 DNA 的能力造成變化。我們使用實驗室所選出的四種類黃酮 myricetin、quercetin、kaempferol、galangin 進行 SaDnaB 與 DNA 結合

的實驗，觀察這四種類黃酮是否對 SaDnaB 與單股 DNA 的結合有其影響，進而達到抑制 SaDnaB 的解旋能力。我們在 SaDnaB 最高濃度為 1uM 時製作濃度梯度，並加入 16uM 的類黃酮，觀察是否 SaDnaB 與 DNA 所一同形成的復合物，會因為外加的核苷酸，產生量的變化或是提前或延後形成的情況發生。之後我們對所做出的結果，進行定量分析，並用內插法計算其 K_d 值。圖二十七至圖三十一為不同類黃酮影響 SaDnaB 與單股 DNA 結合能力的 EMSA 膠圖，圖三十二則為圖二十七到圖三十一的 EMSA 膠圖定量分析整理。其結果發現，在這四種類黃酮之中，myricetin 對 DnaB 與 DNA 的結合能力有明顯的抑制。其 K_d 值分別為：SaDnaB 之 K_d 值為：0.155uM、SaDnaB+galangin 之 K_d 值為：0.125uM、SaDnaB+ kaempferol 之 K_d 值為：0.108uM、SaDnaB+myricetin 之 K_d 值為：0.342uM、SaDnaB+quercetin 之 K_d 值為：0.168uM。其抑制 SaDnaB 與 DNA 結合強弱分別為 myricetin>quercetin>galangin>kaempferol

3.3 優化類黃酮 myricetin

3.3.1 以螢光淬滅實驗觀察 SaDnaB 與 myricetin 相似物的結合情形

再先前的實驗可以發現 myricetin 可以與以接上 ATP 的 SaDnaB 進行很好的結合，並且在先前的研究指出，之所以 myricetin 具以與 SaDnaB 結合的能力，是因為在其結構上，B 還具有較多的 OH 基之外，其本身基本結構也很重要，在 C 環的結構上似乎對與 SaDnaB 的結合也有十足的關係。因此我們選用了類似於 myricetin 的化合物，分別為 myricitrin 以及 dihydromyricetin，我們利用螢光淬滅實驗來看其是否可以增強或是降低與 SaDnaB 結合的能力。X 軸為類黃酮的濃度變化，Y 軸為 $(F_0-F)/F_0$ ，表示螢光強弱的比例變化， F_0 為單純 SaDnaB 的螢光數值，而 F 為 SaDnaB 與類黃酮進行結合時所產生的螢光數值，並計算出 K_d 值且加以

相互比較。圖三十三至圖三十五為 SaDnaB 與不同類黃酮作用所畫出的螢光圖，圖三十六則為圖三十三到圖三十五的光譜分析整理。經由實驗結果並做圖後發現得知，myricetin 比起其他兩種我們所選出了類黃酮，仍然具有和 SaDnaB 較好的結合能力。其 K_d 值分別為：myricetin 之 K_d 值為： $4.15 \pm 0.247 \mu\text{M}$ 、dihydromyricetin 之 K_d 值為： $11.61 \pm 0.704 \mu\text{M}$ 、myricitrin 之 K_d 值為： $5.49 \pm 0.318 \mu\text{M}$ 。其結合強弱比較為：myricetin > myricitrin > dihydromyricetin。

3.3.2 以螢光淬滅實驗觀察 SaDnaB 與 ATP 結合時， myricetin 相似物結合情形

另外，我們也觀察當 SaDnaB 與 ATP 結合時，我們所選出來的 myricetin 類似物是否可以較強的去與 SaDnaB 進行結合。X 軸為類黃酮的濃度變化，Y 軸為 $(F_0 - F)/F_0$ ，表示螢光強弱的比例變化， F_0 為單純 SaDnaB 的螢光數值，而 F 為 SaDnaB 與類黃酮進行結合時所產生的螢光數值，並計算出 K_d 值且加以相互比較。圖三十七至圖三十九為 SaDnaB 和 ATP 結合時，與不同類黃酮作用所畫出的螢光圖，圖四十則為圖三十七到圖三十九的光譜分析整理。經由實驗結果並做圖後發現得知，myricetin 與之前實驗，在沒有 ATP 存在的情況下與 SaDnaB 進行結合，其趨勢大為相同，myricetin 仍然比其他兩種類黃酮 myricitrin 與 dihydromyricetin 具有和 SaDnaB 較好的結合能力。其 K_d 值分別為：myricetin 之 K_d 值為： $16.9 \pm 1.78 \mu\text{M}$ 、dihydromyricetin 之 K_d 值為： $39.1 \pm 9.87 \mu\text{M}$ 、myricitrin 之 K_d 值為： $49.9 \pm 9.38 \mu\text{M}$ 。其結合強弱比較為：myricetin > dihydromyricetin > myricitrin。

3.4 SaDnaB 解旋活性分析

3.4.1 SaDnaB 解旋活性測定，並使用電泳遲滯分析

DnaB 在所有生物體中皆會被發現到，但其依照不同菌種，而有不同的反應條件，例如：時間的長短，輔酶的種類...等。因此先利用電泳遲滯法，利用雙股螺旋 DNA 與單股 DNA 的大小差異，導致用動速率產生差異，便可以觀察出在 SaDnaB 的解旋效力。我們先選用 20uM 的蛋白質濃度進行觀察，依條件不同分別為：3'端雙股 DNA、5'端雙股 DNA、加入 ATP、加入 Mg、加入 ATP 和 Mg 以及都不加入，總共 6 種條件，反應 24 小時跑膠觀察。圖四十一至圖四十四為 SaDnaB 在不同條件下，解旋雙股 DNA 膠圖。結果發現，SaDnaB 在缺乏 ATP 時便不具有解旋的能力，而在缺乏 Mg 離子存在的環境下，SaDnaB 也只對雙股 DNA 有些微的解旋，只有在 ATP 與 Mg 離子共同存在下，才使 SaDnaB 完整的發揮解旋反應。而 SaDnaB 對 3'端、5'端雙股 DNA 其解旋則無明顯影響。而後，我們使用 1.5mM ATP 與 30mM Mg，來參與 SaDnaB 的解旋反應，並觀察當 SaDnaB 濃度在 5、10、20uM 中，其解旋效果如何。我們觀察到隨著蛋白質濃度增加，其解旋效果會越明顯。

3.4.2 SaDnaB 解旋活性測定，並使用螢光光譜儀分析

由於利用電泳遲滯法觀察 SaDnaB 的解旋反應，往往只能觀察到最終的結果，卻不能即時的觀察到蛋白在解旋 DNA 時的情形，因此我們利用螢光分析，對 SaDnaB 的解旋反應做即時的偵測。我們分別在雙股螺旋 DNA 上標定上螢光物質 Alexa 488 以及遮蔽物質 BHQ1，當 DNA 被解旋時，因為螢光物與遮蔽物分開，使之 Alexa 488 受到光波的刺激，經由電子能階的跳躍進而放出發出螢光，由此可達到即時偵測的效果。

X 軸為時間的長短，其以每秒為單位，Y 軸為 Fluorescence intensity，表示螢光強弱。圖四十五為 SaDnaB 在不同濃度下，解旋雙股 DNA 的螢光圖。我們使用了 200nM 以及 400nM 這兩種濃度進行測量，偵測了約 60 分鐘發現 SaDnaB 在 200nM 和 400nM 會隨著時間的增加，其光譜訊號會隨之增強，與 control 組未加入 SaDnaB 比較，推斷確實會進行解旋反應。

為了確定 SaDnaB 是位於哪一個區域來進行解旋的，我們利用分生，製作出 SaDnaB N 端 (1~164) 進行解旋活性的偵測。我們分別在雙股螺旋 DNA 上標定上螢光物質 Alexa 488 以及遮蔽物質 BHQ1，當 DNA 被解旋時，便會放出發出螢光，由此可達到偵測效果。X 軸為時間的長短，其以每秒為單位，Y 軸為 Fluorescence intensity，表示螢光強弱。圖四十六為 SaDnaB N 端在不同濃度下，解旋雙股 DNA 的螢光圖。經由實驗便可發現發現 SaDnaB N 端，其濃度至少要增加到 mM 的濃度才有明顯的解旋反應。因此，我們初步的推斷，SaDnaB 的解旋區域估計主要是靠近在 C 端的位置。

在先前的論文顯示出 SaDnaB 再進行解旋時，需要其他輔助因子來幫助其解旋效率。其中包含了 SaDnaI、SaDnaD。因此我們也一樣利用螢光光譜去觀察 SaDnaB 在有 SaDnaI 和 SaDnaD 存在時，其解旋反應有無變化。利用螢光光譜儀偵測，當 DNA 被解旋時，便會放出發出螢光，由此可達到偵測解旋活性的效果。X 軸為時間的長短，其以每秒為單位，Y 軸為 Fluorescence intensity，表示螢光強弱。圖四十七至圖五十為加入 SaDnaI 與 SaDnaD 後，SaDnaB 解旋雙股 DNA 的螢光圖。偵測結果發現 SaDnaB 與 SaDnaI 一同存在時，相較只有 SaDnaB 存在，其光譜訊號有增加的情形，我們以此推斷 SaDnaI 似乎會幫助 SaDnaB 進行解旋，以增加其解旋效率。但當 SaDnaB 與 SaDnaD 共同存在時，相較只有

SaDnaB 存在，兩者的光譜數值之間並沒有認何的差別，SaDnaB 的解旋效率並沒有增加。因此，從結果中可觀察出，SaDnaI 會幫助 SaDnaB 進行解旋反應，但 SaDnaD 並沒有此現象發生。另外我們也將 SaDnaI 與 SaDnaD 個別加入，觀察其這兩個輔助因子是否與 SaDnaB 一樣對 SaDnaB N 端有結果，其結果發現 SaDnaI 一樣會增強 SaDnaB N 端的解旋反應，而 SaDnaD 對 SaDnaB N 端也與先前結果相同，並不會增強 SaDnaB N 端的解旋反應。

3.5 以電泳池至技術計算 SaPriA 與 DNA 之交互作用

3.5.1 核苷酸對 SaPriA 與單股 DNA 結合能力之影響

SaPriA 與 SaDnaB 一樣皆為一種解旋酶，主要是誘發一連串有序的蛋白質組合，稱之為 primosome(引子合成體)，藉由促發引子的合成，並開啟 DNA 複製。在生物體 DNA 合成中扮演著極為重要的角色。由於 SaPriA 與 SaDnaB 皆為解旋酶，因此我們想觀察 nucleotide 與類黃酮是否也對 SaPriA 有一定程度的影響力。我們選用了 ATP、dATP、ADP 這三種核苷酸進行實驗。使用最終濃度為 20uM 的 SaPriA，並製作濃度梯度，並加入 166uM 的 nucleotide，藉由 SaPriA 與 DNA 一同形成複合物，造成泳動速率下降，使其在感光板上產生新的訊號，並觀察其複合物是否有量的變化以及提前或延後形成的情況發生。而後進行定量分析，並用內插法計算其 K_d 值。圖五十一至圖五十四為 SaPriA 與不同核苷酸作用所跑的膠圖，圖五十五則為圖五十一到圖五十四的膠圖分析整理。相互比較之後發現 ATP 和 ADP 對 SaPriA 與 DNA 的結合能力具有增強作用，且觀察發現 ADP 對 SaPriA 與 DNA 的結合能力更為顯著。其 K_d 值分別為：SaPriA 之 K_d 值為：7.609uM、SaPriA+ADP 之 K_d 值為：1.319uM、SaPriA+dATP 之 K_d 值為：9.492uM、SaPriA+ATP 之 K_d 值為：4.538uM。

其 SaPriA 與 DNA 結合強弱分別為 ADP>ATP>control>dATP

3.5.2 類黃酮對 SaPriA 與單股 DNA 結合能力之影響

在之前的實驗發現，myricetin 對 SaDnaB 與 DNA 的結合能力有明顯的抑制，因此我們想觀察，同為解旋酶的 SaPriA 是否也與 SaDnaB 一樣會因為類黃酮的干擾而影響與 DNA 的結合。

我們事先對 myricetin 進行實驗。使用最終濃度為 20uM 的 SaPriA，並製作濃度梯度，並加入 16uM 的類黃酮，藉由 SaPriA 與 DNA 一同形成復合物，並觀察其復合物是否有量的變化以及提前或延後形成的情況發生。而後進行定量分析，並用內插法計算其 K_d 值。圖五十六至圖五十七為 SaPriA 與 myricetin 作用所跑的膠圖，圖五十八則為圖五十六到圖五十七的膠圖分析整理。相互比較之後發現，myricetin 對 SaPriA 與 DNA 的結合能力並沒有影響。其 K_d 值分別為：SaPriA 之 K_d 值為：7.609uM、SaPriA+Myricetin 之 K_d 值為：7.987uM

之後，我們也對其他三種類黃酮 kaempferol、quercetin、galangin 進行實驗。進行定量分析，並用內插法計算其 K_d 值。圖五十九至圖六十二為 SaPriA 與不同類黃酮作用所跑的膠圖，圖六十三則為圖五十九到圖六十二的膠圖分析整理。相互比較之後發現，這三類黃酮對 SaPriA 與 DNA 的結合能力也只有些微的抑制。其 K_d 值分別為：SaPriA 之 K_d 值為：11.79uM、SaPriA+galangin 之 K_d 值為：16.23uM、SaPriA+kaempferol 之 K_d 值為：21.54uM、SaPriA+quercetin 之 K_d 值為：16.57uM。其 SaPriA 與 DNA 結合強弱分別為 control>galangin>quercetin>kaempferol

這顯示 SaPriA 雖然與 SaDnaB 一樣是解旋酶，但是用完全不同的機制去進行其本身的生理作用。

3.5.3 類黃酮干擾 ADP 對 SaPriA 與單股 DNA 結合能力之影響

在先前的兩個實驗觀察到，ADP 會明顯的增強 SaPriA 與 DNA 的結合能力，且類黃酮對其 DNA 的結合能力只有些微的抑制。對此我們假設，類黃酮可能並不是藉由結合在 nucleotide 結合位附近，而是直接的與 nucleotide 進行競爭，已達到抑制 ADP 增強 SaPriA 與 DNA 結合的效果。我們選用了兩種類黃酮 galangin、myricetin 行實驗，並在進行實驗同時加入 ADP，後觀察其與 DNA 所形成的複合物。結果發現類黃酮無法抑制 ADP 增強與 DNA 的結合能力，在有無類黃酮存在的情況下，ADP 還是能很有效的增強與 DNA 的結合。圖六十四至圖六十七為 SaPriA 與 ADP 和不同類黃酮作用所跑的膠圖，圖六十八則為圖六十四到圖六十七的膠圖分析整理。其 K_d 值分別為：SaPriA 之 K_d 值為：5.66 μ M、SaPriA+ADP 之 K_d 值為：1.389 μ M、SaPriA+ADP+ galangin 之 K_d 值為：1.51 μ M、SaPriA+ADP+myricetin 之 K_d 值為：1.56 μ M。其 SaPriA 與 DNA 結合強弱分別為 ADP> galangin> myricetin> control

這也更加的說明了 SaPriA 是用完全不同於 SaDnaB 的機制去進行其本身的生理作用。

3.5.4 ADP 對 SaPriA 與單股 DNA 結合能力之影響

為了更精確的了解 ADP 對 SaPriA 所增強與 DNA 結合的程度，我們設計了一連串的 ADP 濃度進行觀察，分別為 16.66mM、1.66mM、833 μ M、166.6 μ M、83.33 μ M、16.66 μ M、8.33 μ M、1.66 μ M 與 0.166 μ M 進行觀察。利用電泳遲滯技術進行實驗，並計算其 K_d 值。圖六十九至圖七十八為 SaPriA 與不同 ADP 濃度作用所跑的膠圖，圖七十九則為圖六十九到圖七十八的膠圖分析整理。發現當 ADP 濃度愈來愈高時，SaPriA 與 DNA 的結合能力會越來越好，最強似乎可增強至 10 倍左右。但當 ADP 濃度升高到 16.66mM 和 1.66mM 時，反而會抑制 DNA 與

SaPriA 的結合能力，這可能是因為過高的 ADP 開始任意的卡入蛋白質表面，造成蛋白質的結構發生變化，使蛋白質的不穩定。其 K_d 值分別為：SaPriA 之 K_d 值為：1.04uM、SaPriA+ADP 16.66mM 之 K_d 值為：15.58uM、SaPriA+ADP 1.666mM 之 K_d 值為：1.616uM、SaPriA+ADP 833uM 之 K_d 值為：0.136uM、SaPriA+ADP 166.6uM 之 K_d 值為：0.346uM、SaPriA+ADP 83.33uM 之 K_d 值為：0.55uM、SaPriA+ADP 16.66uM 之 K_d 值為：0.53uM、SaPriA+ADP 8.33M 之 K_d 值為：0.816uM、SaPriA+ADP 1.66uM 之 K_d 值為：0.736uM、SaPriA+ADP 0.1666mM 之 K_d 值為：0.82uM、SaPriA 之 K_d 值為：1.04uM。其 SaPriA 與 DNA 結合強弱分別為：833uM > 166.6uM > 83.33uM > 16.66uM > 8.33uM > 1.66uM > 0.166uM > control > 1.66mM > 16.66mM

第四章：討論 (Discussion)

近年來，因為過於氾濫的使用抗生素，已導致細菌演化出了可以抵抗多種抗生素的能力，使形成多重抗藥性。這些細菌所引發的感染症原可以使用青黴素或頭孢菌素等抗生素來治療且效果顯著，然由於這些細菌經由突變或交換基因等方式亦發展出對抗這些傳統抗生素的能力，成為臨床治療時甚面臨無藥可醫的情況；因此若能開發出新的標靶，也許對感染症的治疗能有幫助¹。我們在之前的研究發現，在細菌 DNA 複製時所必需的解旋酶與高等動物的解旋酶其結構與功能有顯著的不同，藉由此不同，我們便可以找出具有抑制其細菌解旋酶而並不會影響到高等動物解旋酶的小分子化合物，來當新一代的抗生素。類黃酮為植物多分類的其中一類物質，它大量的存在於植物之中，以被知道其有抗氧化的能力，並且也被發現具有抗細菌生長的能力，再更進一步的了解，其具有抑制 ATP 水解酵素的活性。本計劃不但要先測試這些具有抑制 ATP 水解酵素活性的類黃酮物質，對金黃色葡萄球菌 PriA 與 DnaB 解旋酶有效力是否有影響之外，也針對金黃色葡萄球菌 DnaI 與 nucleotide 的結合是否有影響。希望可以藉由本計畫，可篩選出其他更多的天然物或經化學合成的化合物，具有明顯抑制細菌生長的效果。

一開始，我們先對 SaDnaB 與其他核苷酸的結合能力進行分析。我們先使用 deoxynucleotide，觀察與 SaDnaB 的結合能力，藉由計算 K_d 值後發現，dGTP 與 dCTP 比較 dTTP 與 dATP 有和 SaDnaB 較強的結合能力。觀察 dCTP 與 dGTP 的相同之處可以發現到，其在環狀結構上皆帶有一個氧原子，推測可能是這氧原子與 SaDnaB 中的氨基酸形成氫鍵，以至於增強其結合的能力，約多出 dATP 的 2 倍，dTTP 的 1.2 倍。dTTP 雖然有氧原子，但其身上多帶了一個，可能稍微的妨礙氫鍵的形成，以

至於減弱了與 SaDnaB 結合的能力，另外 dATP 並無氧原子，所以無法形成足夠的氫鍵，而大大的降低與 SaDnaB 的結合能力。之後我們也對 nucleotide 進行結合能力的分析，其趨勢與 deoxynucleotide 相似，不同的是 GTP 其結合能力降至最低，這可能是因為 GTP 所帶的雜環體積過大，與 SaDnaB 所形成的氫鍵區域也較廣，當多出一個氫氧基時，便會影響擾亂其氫鍵的合成，以至於降低其結合能力。

先前提到類黃酮具有抑制 ATP 水解酵素的活性，對此我們想觀察類黃酮與 SaDnaB 的結合情形，依照 K_d 值分析，得知 myricetin 與 SaDnaB 具有很好的結合能力，雖然其他三種類黃酮也與 SaDnaB 有程度不一的結合能力，但 myricetin 是最為突出的，這可能是因為 myricetin 在 B 環上有較多的氫氧基，容易與蛋白質中的氨基酸形成氫鍵，以致加強其結合能力。

在觀察完 SaDnaB 與各類小分子化合物的結合情況後，我們想要了解 SaDnaB 與 DNA 結合是，是否會被上述所提到的小分子化合物影響其結合能力。利用電泳遲滯法觀察並計算 K_d 值，顯示出 ATP 與 dATP 會稍微的減低 DnaB 與 DNA 的結合，而 ADP 則沒有影響，從結構上分析 ATP 與 dATP 的相同處在於有三個磷酸根，當 SaDnaB 與其結合時，相較 ADP 有較長的磷酸可與 SaDnaB 形成氫鍵，以至於使蛋白的構型發生變化，進而影響了與 DNA 的結合。而在類黃酮方面，myricetin 具有明顯抑制 SaDnaB 與 DNA 相互結合的能力。綜合以上的實驗結果，我們可以推斷，可能是類黃酮具有直接結合到核苷酸結合位，與核苷酸競爭形成競爭性抑制，或者是結合在其他區域形成調節性抑制。

為了確定這兩種假設是否正確，我們在加入類黃酮時先加入 ATP，並計算其 K_d 值，假使為調節性抑制，其 K_d 值並不會與在無 ATP 的情形下有太多的差異。其結果顯示， K_d 值遠比在無 ATP 的情形下還要來的

高，最低也多出了兩倍。依照實驗結果可以推論出，類黃酮可能可直接的與 SaDnaB 上核苷酸結合位進行結合，以妨礙 ATP 的結合。再細部分析，發現 myricetin 在有 ATP 的環境下，與 SaDnaB 仍然有好的結合能力，則 Quercetin 因為 ATP 占據了 nucleotide 結合位，加上 SaDnaB 似乎無其他可使 Quercetin 結合的區域，使 Quercetin 完全的喪失與 SaDnaB 結合的能力。則 myricetin 可能因為在其 B 環上有較多的氫氧基，可與在核苷酸結合位上較多的氨基酸形成氫鍵，以達到與 ATP 相互競爭的效果。

由上述實驗可觀察出 myricetin 不管是在與 SaDnaB 有較好了結合效力之外，對 SaDnaB 與 DNA 的結合也有較好的抑制。因此，我們嘗試著對 myricetin 進行結構上的調整，我們保留 B 環的氫氧基，對 C 環的結構與官能基進行調整，選出了兩種 myricetin 類似物，其中一個為 myricitrin，它利用一個糖分子取代在 C 環上的氫氧基，觀察是否會因為這多出來的糖分子，使其最佳的與 SaDnaB 進行結合，增強其抑制與 nucleotide 的結合。另外，我們也選出了 dihydromyricetin，同樣保留了 B 環的構造，對 C 環上的雙鍵取代為單鍵，看是否可以因增加其彈性，使其最佳的與 SaDnaB 作結合。其結果發現，myricetin 對 SaDnaB 仍然具有較好的結合力。dihydromyricetin 相較 myricetin，其 K_d 值高出了約 2.5 倍，這顯示出 B 環在與 SaDnaB 的結合扮演了重要的角色之外，其 C 環的結構上也相當的關鍵，可能因為 dihydromyricetin 在 C 環失去了平整性，造成無法有效的與氨基酸形成氫鍵，使結合能力下降。

我們也對這兩種 myricetin 類似物，嘗試在有 ATP 的環境下與 SaDnaB 進行結合，結果也呈現出 myricetin 在有 ATP 的情況下仍保有結合力。myricitrin 相較 myricetin，其 K_d 值高出了約 2.7 倍，推測可能是因為糖類分子太大，使的當有 ATP 的情況下，與 SaDnaB 結合時發生立

體障礙。Myricitrins 那過大的糖分子官能基，無法如 myricetin 那單獨一個氫氧基一樣，在與 ATP 進行競爭時順利的擠入 nucleotide 結合位，使結合能力下降。

綜合以上的結果可得知，CTP 對 SaDnaB 有很好的結合能力，這符合先前論文所觀察到的結果，且也提到說雖然 DnaB 與 CTP 有很好的結合能力，但其水解能力為 ATP 最好，這顯示了核苷酸的結合與水解能力是分開處理的。另外先前的研究發現，當核苷酸結合在 SaDnaB 時會進而影響到蛋白質內的結構，使的蛋白與 DNA 的結合區域發生改變，降低 SaDnaB 與 DNA 的結合能力。針對這個情形，我們發現當加入類黃酮時，其 SaDnaB 與 DNA 的結合能力也有被抑制下來，且實驗室先前的研究也指出類黃酮會結合在核苷酸結合區域附近，這可說明類黃酮可能是結合到核苷酸結合位上或是結合位附近，使產生與 ATP 結合到 SaDnaB 所產生的效果一樣，藉由改變蛋白構型影響與 DNA 結合的能力。但類黃酮是直接的與核苷酸結合位進行結合，以達到競爭型抑制，又或者是結合在核苷酸結合位附近，以達到調節性抑制，目前還尚未了解。因此我們在類黃酮與 SaDnaB 結合之前，先加入 ATP 與 SaDnaB 先做結合，並與未加入 ATP 時類黃酮的結合能力做比較，假如為調節效抑制的話，其 K_d 值便不會有太大的變化。結果發現大部分的類黃酮，其結合能力有很明顯的下降，甚至是不結合，這說明了類黃酮是直接的與 ATP 進行競爭，產生競爭性抑制。

我們發現 myricetin 不管在有無 ATP 的情況下，與 SaDnaB 都有好的結合能力，因此我們嘗試的在 C 環上改變其結構，看是否能增強其抑制。但結果發現 myricetin 的 C 環結構似乎已是最好的選擇。我們在 C 環上設計了兩種結構變化，其一是加上了糖基，另一個是改變成單鍵，但這兩種改變似乎會影響與蛋白內的氨基酸形成氫鍵，使之無法增強其結合

能力，反而稍微的降低了其結合作用。這顯示 myricetin 上的 B 環結構對於結合在 SaDnaB 上很重要之外，其 C 環也占據了重要了一部份。

為了更確定這些類黃酮是否真正具有抑制 SaDnaB 的解旋能力，我們欲建立一套可即時觀測到 SaDnaB 解旋狀況的系統，以使用來進行即時的觀測。在建立此系統之前，我們先對 SaDnaB 解旋所需要的物質進行制定。在不同條件下，可觀察到 SaDnaB 必須在有 ATP 時才會展現出解旋活性，並且當加入 Mg 離子時，更能增強其解旋效力。後便開始對 SaDnaB 的活性進行測量，我們分別在雙股螺旋 DNA 上標定上螢光物質 Alexa 488 以及遮蔽物質 BHQ1，當 DNA 被解旋時，因為螢光物與遮蔽物分開，使之 Alexa 488 受到光波的刺激，經由電子能階的跳躍進而放出發出螢光，由此可達到即時偵測的效果。經過實驗觀察到，SaDnaB 的濃度越高，其所產生的光便會增加。在先前的論文提到，DnaB 其主要的解旋區域是靠近 C 端區域，為了證實此事，我們一樣利用螢光光譜偵進行偵測，觀察是位於哪一個區域來進行解旋的。我們利用分生，製作出 SaDnaB N 端 (1~164) 與 SaDnaB C 端 (165~413) 進行解旋活性的偵測。在這裡，我們只有純化出 SaDnaB N 端，而 SaDnaB C 端因在純化時大部分皆聚集而沉澱在沉澱物中，因此我們只針對 SaDnaB N 端進行測量。其結果發現 SaDnaB N 端必須要增加至 mM 的程度，才有明顯對雙股 DNA 進行解旋的反應，其解旋效率極差，這間接說明了其 SaDnaB C 端才是解旋 DNA 主要的區域位置。

SaPriA 與 SaDnaB 一樣皆為一種解旋酶，其蛋白質大小大約在 81~85kDa 之間，它可結合到 DNA 上的特殊序列或特殊二級結構上。主要是誘發一連串有序的蛋白質組合，稱之為 primosome(引子合成體)。藉由與 DNA 的結合解旋，並與其他蛋白質進行轉位和催化反應，促發引子的合成，並開啟 DNA 複製。在生物體 DNA 合成中扮演著極為重

要的角色。SaPriA 可辨識到因 DNA 損傷時所產生的不正常特殊結構，並將其解旋並吸引其他的引子合成體聚集，最終吸引 SaDnaB 解旋酶和聚合酶重新啟動 DNA 複製。由於 SaPriA 與 SaDnaB 皆為解旋酶，其必有一個區域是提供給核甘酸進行結合水解的區域，因此我們想觀察核甘酸與類黃酮是否也對 SaPriA 結合到單股 DNA 上某程度上的影響力。利用電泳遲滯技術觀察，發現 ATP 與 ATP 皆可增強與 DNA 的結合，這與 SaDnaB 的情形不同，尤其是 ADP，與 control 相互比較後得知其與 DNA 結合的能力增強了約 7 倍的能力。另外我們加入了類黃酮觀察，其結果也只有些微的抑制了 SaPriA 與 DNA 的結合能力，就連在之前的實驗，myricetin 展現出傑出的結合抑制能力，在 SaPriA 中也絲毫沒有作用。對此，我們換一個想法，在先前的實驗推論中提到，類黃酮是直接的結合在核甘酸結合位上，是否類黃酮會事先的結合在 SaPriA 的核甘酸結合位上，進而影響抑制 ADP 增強與 DNA 結合的能力。其結果顯示就算加入了類黃酮，也無法抑制住 ADP 增強 SaPriA 與 DNA 結合的能力。推測，可能是因為 SaPriA 其本身是一個初始的引子合成體蛋白，有如一一個開關，假使這個開關過於容易被啟動的話，便會造成 DNA 複製的不穩定，使細菌內的基因無法穩定的進行複製，才發展出與 SaDnaB 不同的核甘酸結合機制。因此這上述的實驗結果發現，就算 SaPriA 與 SaDnaB 皆為解旋酶，SaPriA 也是用完全不同於 SaDnaB 的機制去進行核甘酸的結合與水解反應，以配合各自本身生理作用的不同，來達到生理上的穩定調控與平衡。

為了精確的了解 ADP 對 SaPriA 所增強與 DNA 結合的程度，我們使用了一連串的 ADP 濃度梯度來進行觀察，並觀察到當 ADP 濃度愈來愈高時，SaPriA 與 DNA 的結合能力會越來越好，與 control 相比可增強至 10 倍左右。但當 ADP 濃度升高到 16.66mM 和 1.66mM 時，反而會

抑制 DNA 與 SaPriA 的結合能力，這可能是因為過高的 ADP 開始任意非專一性的卡入蛋白質表面，造成蛋白質的結構發生變化，使蛋白質的不穩定。由此實驗可得知 ADP 確實可以增強 SaPriA 與 DNA 的結合能力，並推測可能是因為當 SaPriA 水解 ATP 使其 DNA 解旋之後，ADP 隨即的在次結合上 SaPriA，增強 SaPriA 與 DNA 的結合力，使其解旋的 DNA 有更多的空間讓其他引子合成體蛋白前後的接合在 DNA 上，並開始一連串的 DNA 解旋複製反應。

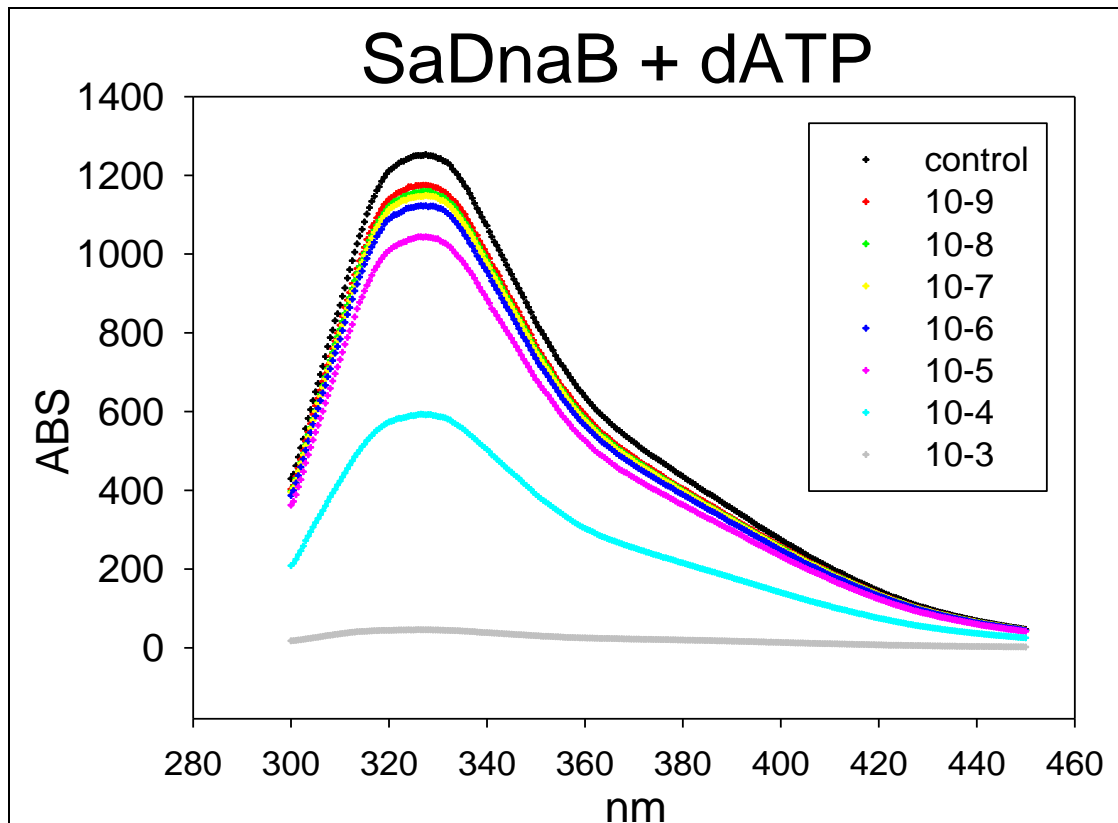
我們從上述所有實驗可觀察到 myricetin 具有好的與 SaDnaB 結合能力，並且在結構上 B 環與 C 環是極度重要的，不可進行取代。另外 SaPriA 是採用與 SaDnaB 完全不同的核苷酸結合機制，來進行水解核苷酸。

未來我們會繼續探討 myricetin 抑制 SaDnaB 的解旋活性，並尋找其更優化的 myricetin 類似物，並且建立完整的引子合成體的機制。

參考文獻

1. Cimolai N (July 2008). "MRSA and the environment: implications for comprehensive control measures". *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27 (7): 481–93.
2. Curran JP, Al-Salihi FL (1980). "Neonatal staphylococcal scalded skin syndrome: massive outbreak due to an unusual phage type". *Pediatrics* 66 (2): 285–90.
3. Cenci-Goga BT, Karama M, Rossitto PV, Morgante RA, Cullor JS (September 2003). "Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows". *Journal of food protection* 66 (9): 1693–6
4. Baker, T.A. and Bell, S.P. (1998). Polymerase and the replisome: machines within machines. *Cell* 92:295-305
5. Biswas EE, Barnes MH, Moir DT, Biswas SB. (2009 Jan) An essential DnaB helicase of *Bacillus anthracis*: identification, characterization, and mechanism of action. *J Bacteriol.* 191(1):249-60
6. Patrice Polard, Stéphanie Marsin, Stephen McGovern, Marion Velten, Dale B. Wigley,¹ S. Dusko Ehrlich, and Claude Bruand^a (2002) April Restart of DNA replication in Gram-positive bacteria: functional characterisation of the *Bacillus subtilis* PriA initiator *Nucleic Acids Res.* 1; 30(7): 1593–1605.
7. Kozlov AG, Jezewska MJ, Bujalowski W, Lohman TM. (2010 May) Binding specificity of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein for the chi subunit of DNA pol III holoenzyme and PriA helicase.

- Biochemistry. 4;49(17):3555-66.
8. Michal R. Szymanski, Maria J. Jezewska, and Wlodzimierz Bujalowski*
 9. Author information, Copyright and License information, Published online (2010 July) The Escherichia coli PriA Helicase–Double-Stranded DNA Complex: Location of the Strong DNA-Binding Subsite on the Helicase Domain of the Protein and the Affinity Control by the Two Nucleotide-Binding Sites of the Enzyme J Mol Biol.; 402(2): 344–362.
 10. Ng JY, Marians KJ. Jun (1996) The ordered assembly of the phiX174-type primosome. II. Preservation of primosome composition from assembly through replication. J Biol Chem. ;271(26):15649-55.
 11. Ioannou C, Schaeffer PM, Dixon NE, Soultanas P. (2006) Helicase binding to DnaI exposes a cryptic DNA-binding site during helicase loading in Bacillus subtilis. Nucleic Acids Res. ;34(18):5247-58. Epub 2006 Sep 26.
 12. T.P Tim Cushnie, Andrew J. Lamb (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. International journal of antimicrobial agent 26 (2005) 343-356
 13. Davide Grassi, Giovambattista Desideri, and Claudio Ferri (2010) Flavonoids: Antioxidants Against Atherosclerosis Nutrients. 2010 August; 2(8): 889–902.
 14. Silvina B. Lotito, Wei-Jian Zhang, Chung S. Yang, Alan Crozier, and Balz Frei Author information , Copyright and License information , (2011) Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatoy and antioxidant properties. Free Radic Biol Med. 2011 July 15; 51(2): 454–463.



SaDnaB 濃度：1uM

dATP 濃度：由上至下為 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} M

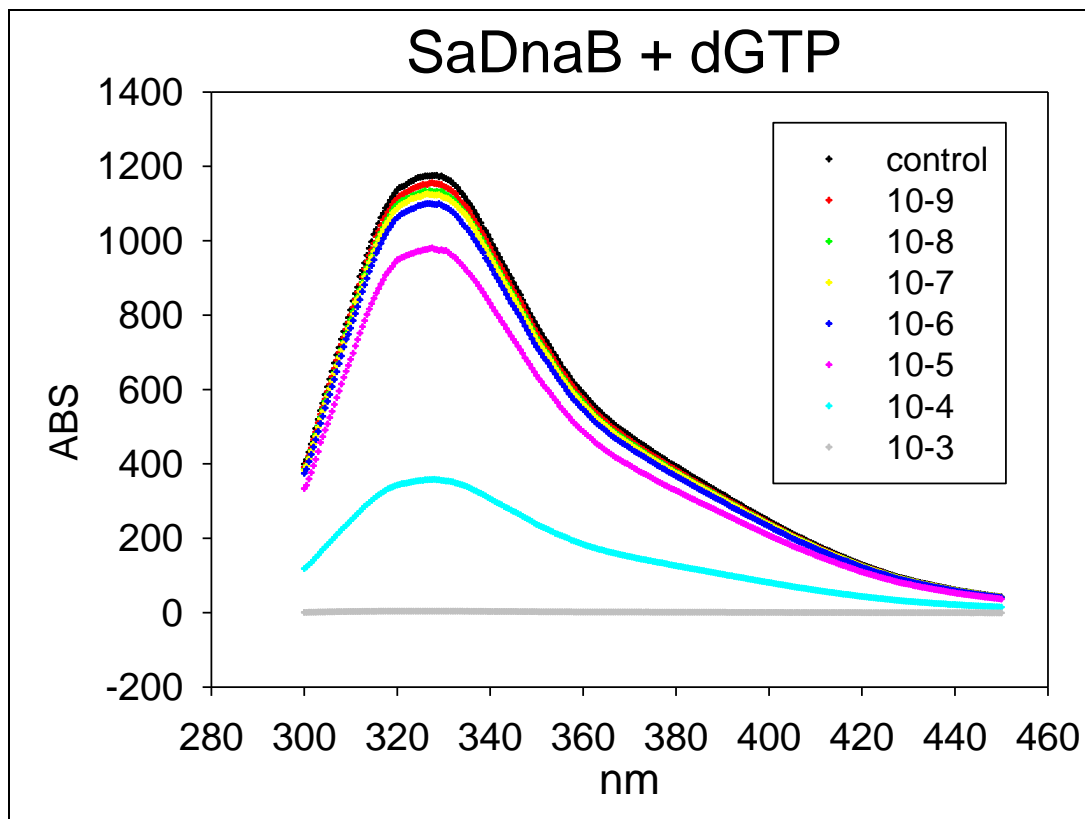
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖一：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與核苷酸 dATP 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

dGTP 濃度：由上至下為 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} M

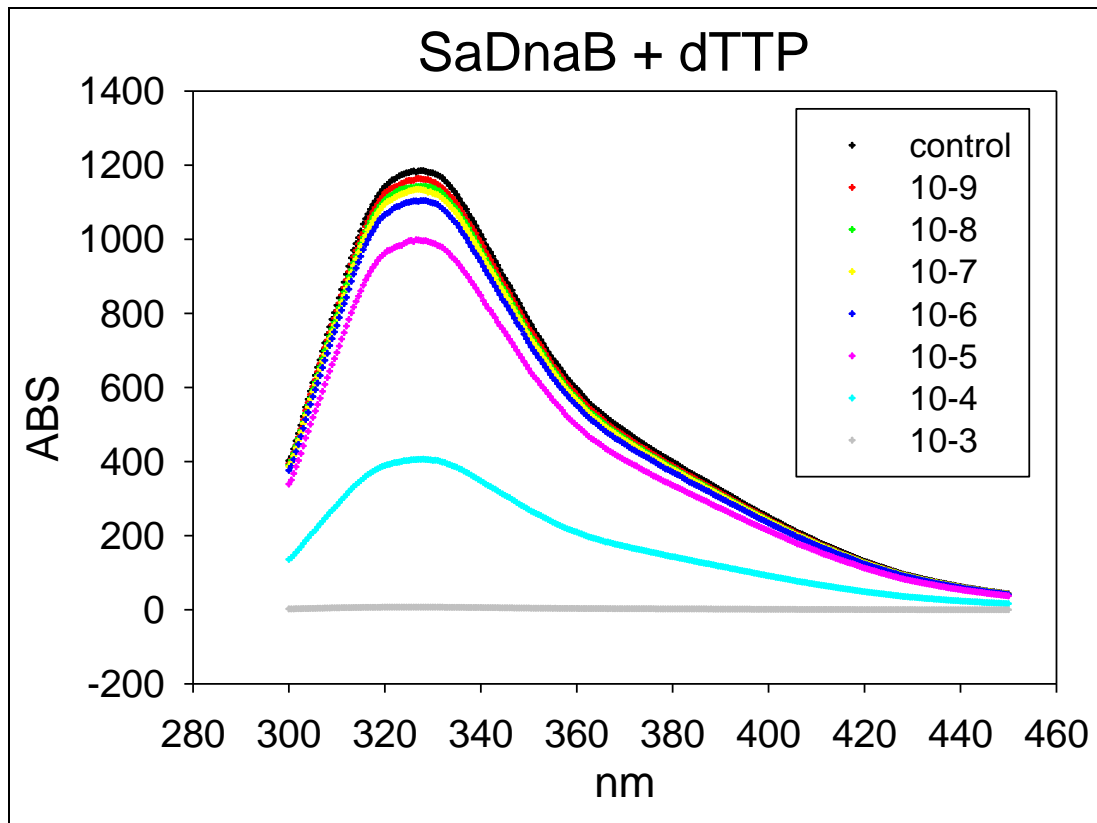
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖二：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與核苷酸 dGTP 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

dTTP 濃度：由上至下為 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} M

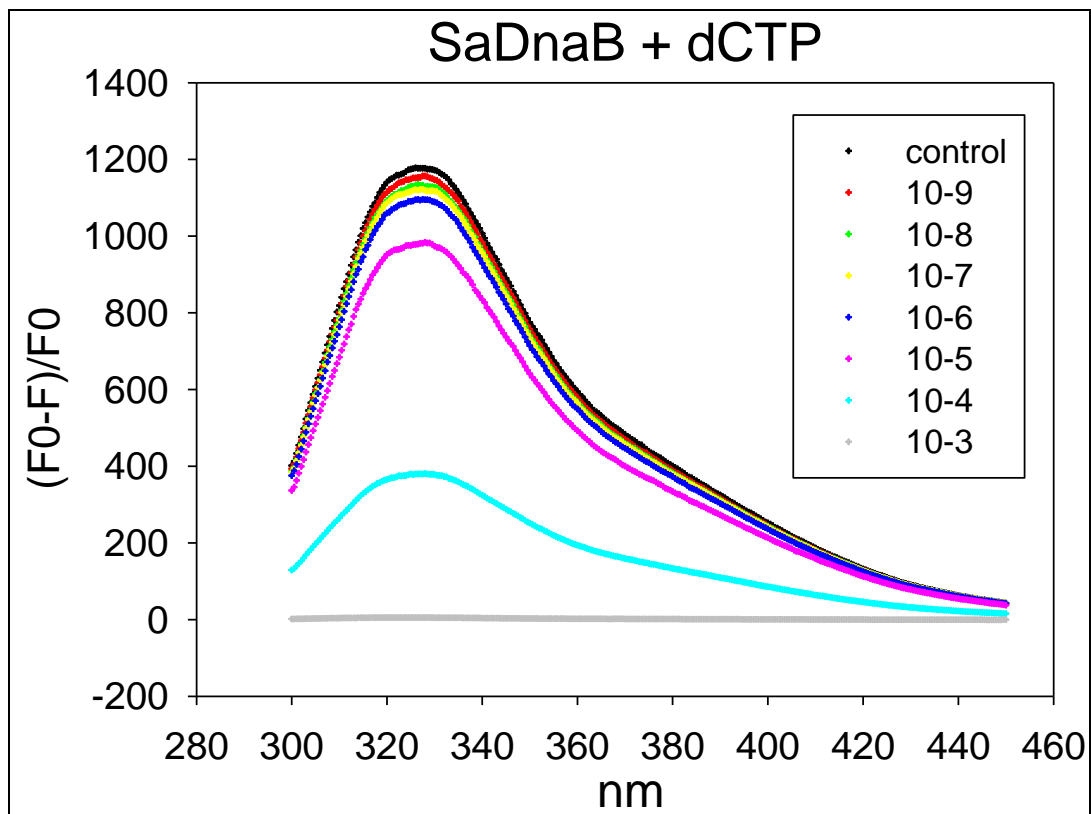
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖三：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與核苷酸 dTTP 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

dCTP 濃度：由上至下為 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} M

buffer：HEPES 50uM，PH7

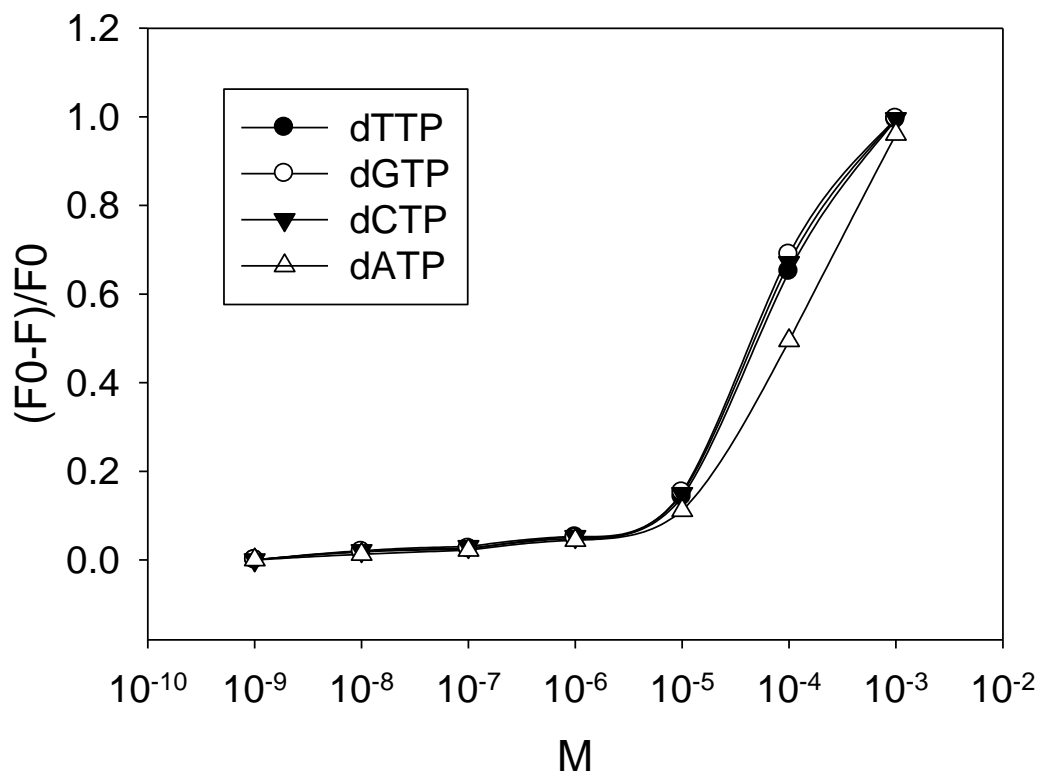
ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖四： 以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與核苷酸 dCTP 之交互作用。

SaDnaB + dNTP

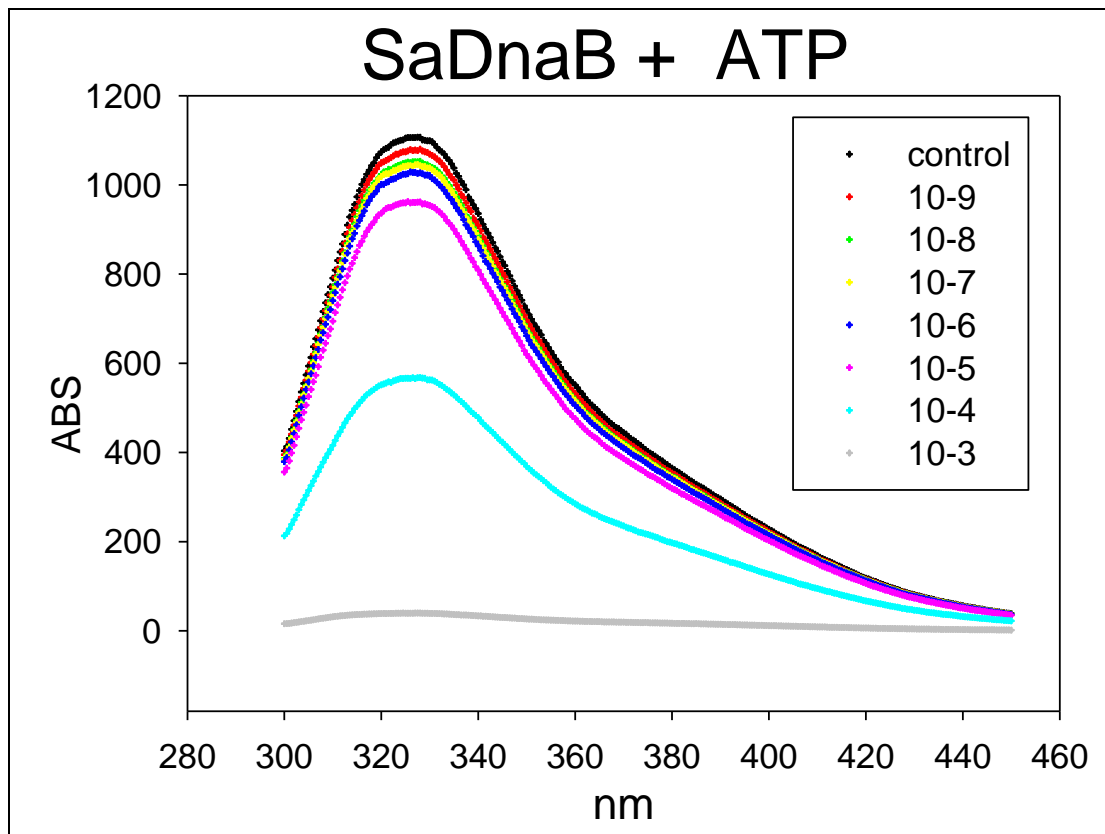


圖五：將螢光數值變化進行做圖，並分析其解離常數 K_d 值。

以下為四種 dNTP 之 K_d 常數：

nucleotide	K_d (uM)	StdErr (uM)
dATP	101.1	10.23
dCTP	57.2	6.24
dGTP	53.7	5.22
dTTP	62.0	6.19

由計算結果得知 dGTP 和 SaDnaB 具有較強力的結合。



SaDnaB 濃度：1uM

ATP 濃度：由上至下為 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} M

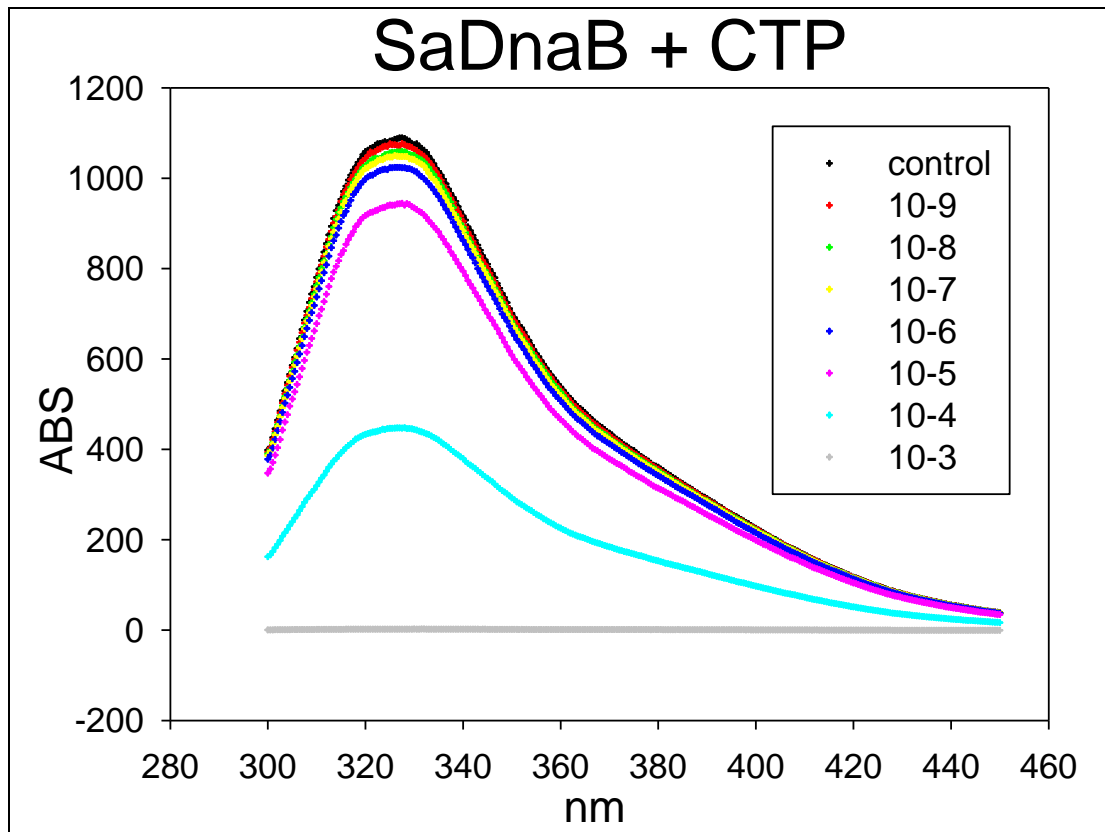
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖六：以螢光淬滅實驗（quenching）分析 SaDnaB 與核苷酸 ATP 之交互作用。



SaDnaI 濃度：1uM

CTP 濃度：由上至下為 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} M

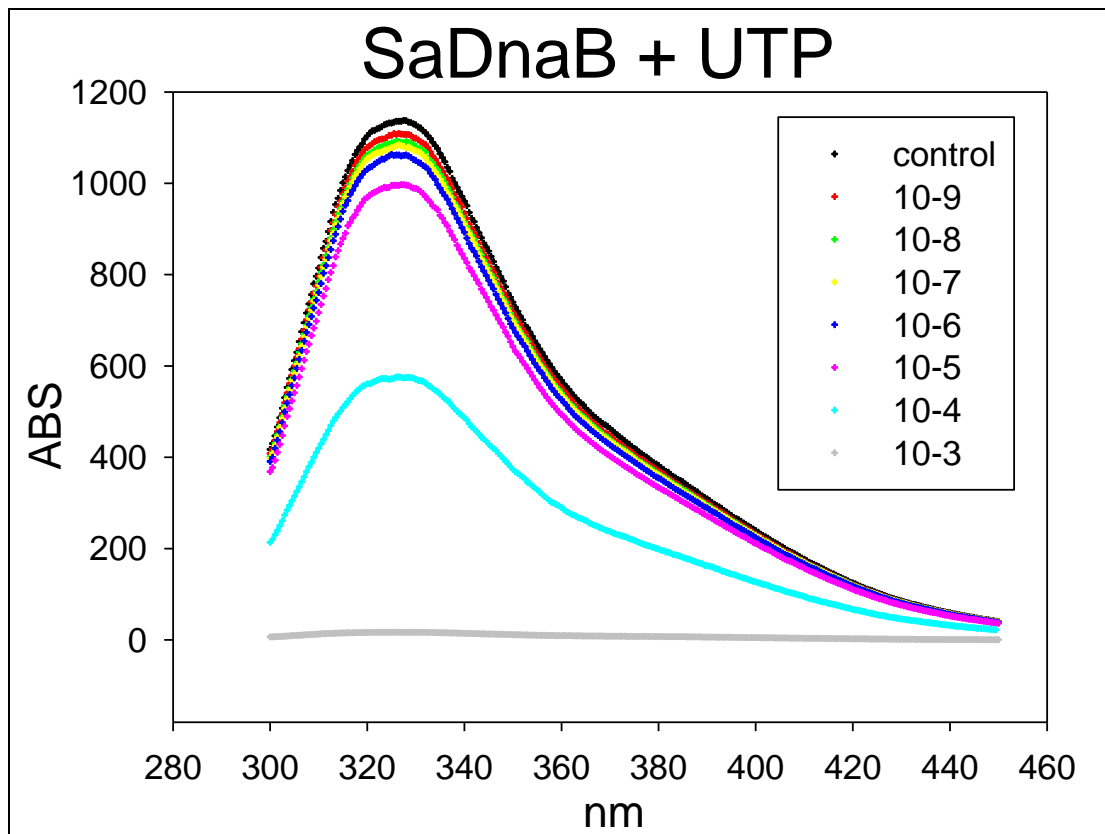
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖七：以螢光淬滅實驗（quenching）分析 SaDnaB 與核苷酸 CTP 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

UTP 濃度：由上至下為 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} M

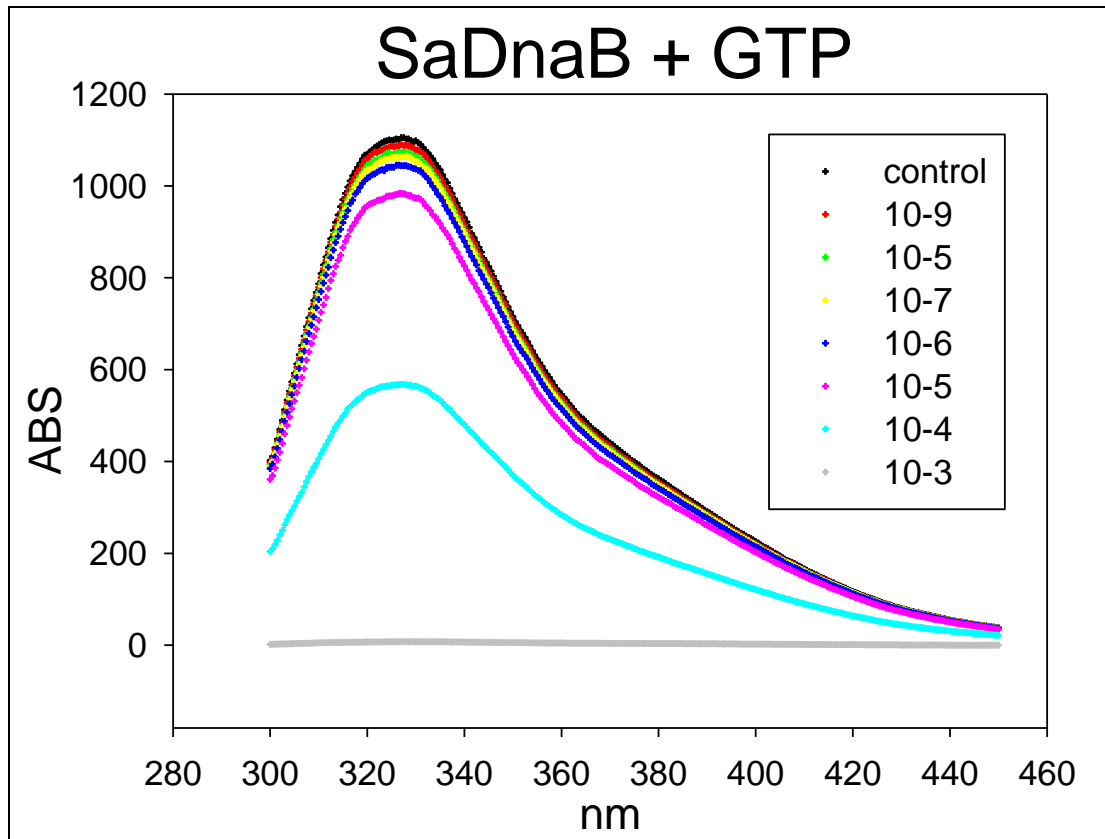
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖八：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與核苷酸 UTP 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

GTP 濃度：由上至下為 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} M

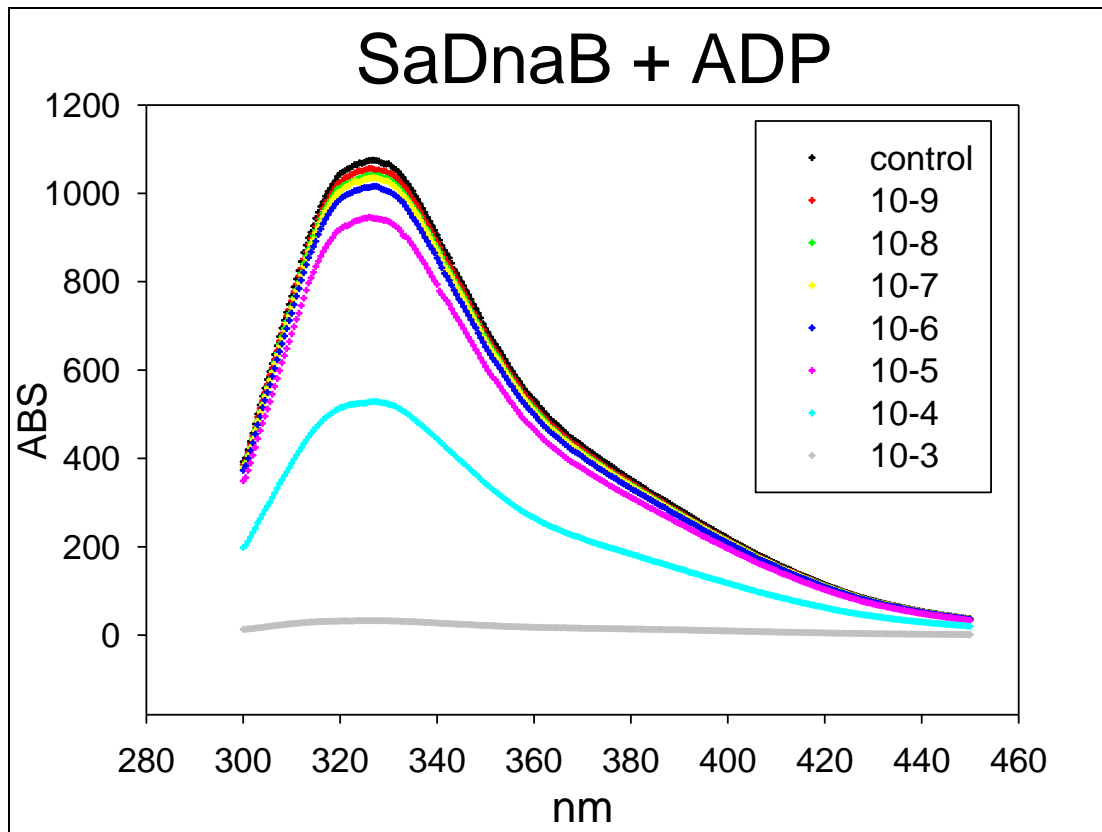
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖九：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與核苷酸 GTP 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

ADP 濃度：由上至下為 10^{-9} 10^{-8} 10^{-7} 10^{-6} 10^{-5} 10^{-4} 10^{-3} M

buffer：HEPES 50uM，PH7

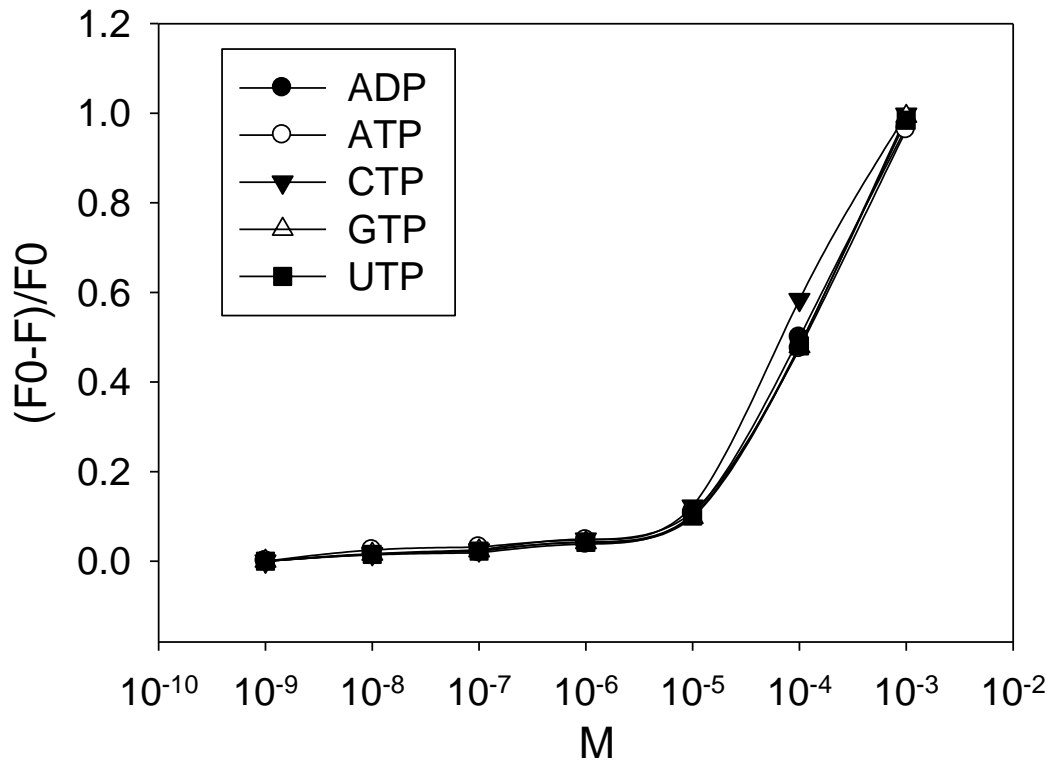
ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖十：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與核苷酸 ADP 之交互作用。

SaDnaB + NTP

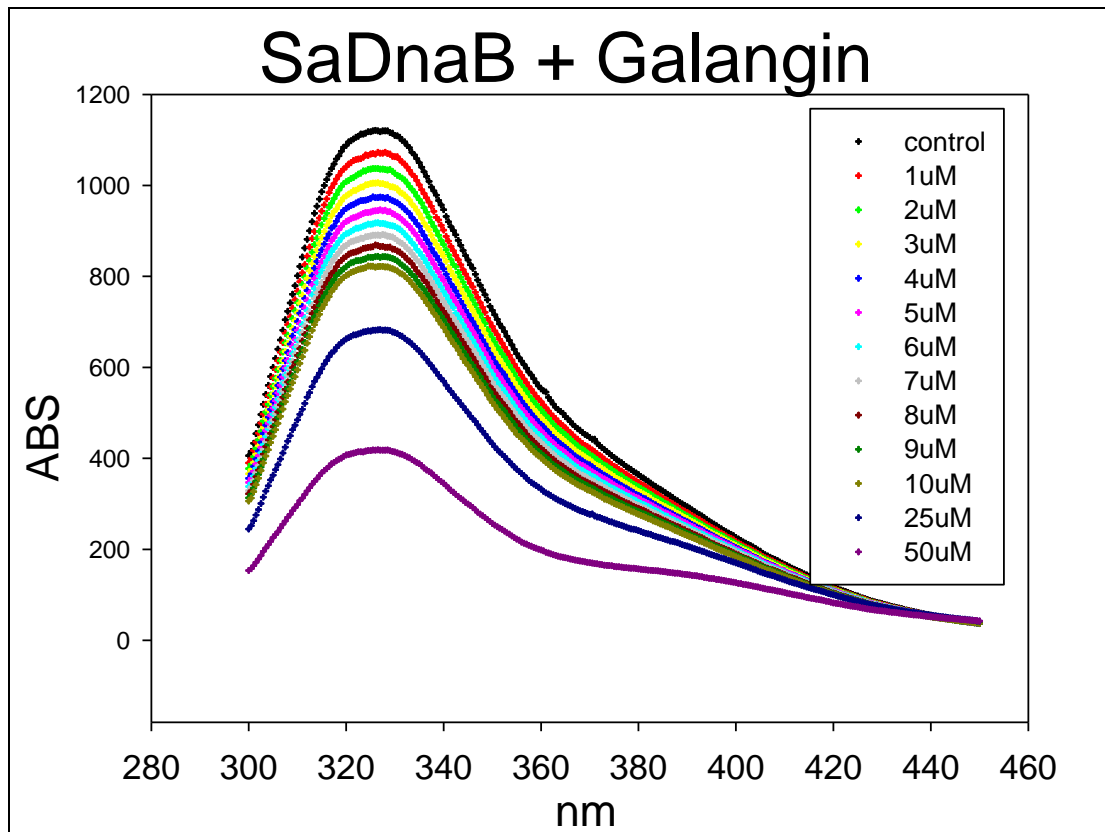


圖十一：將螢光數值變化進行做圖，並分析其解離常數 K_d 值。

以下為五種 NTP 之 K_d 常數：

nucleotide	K_d (uM)	StdErr (uM)
ADP	113	10.1
ATP	123	17.1
CTP	83	8.4
GTP	131	13.4
UTP	127	13.3

由計算結果得知 CTP 和 SaDnaB 具有較強力的結合。



SaDnaB 濃度：1uM

galangin 濃度：由上至下為 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50 uM

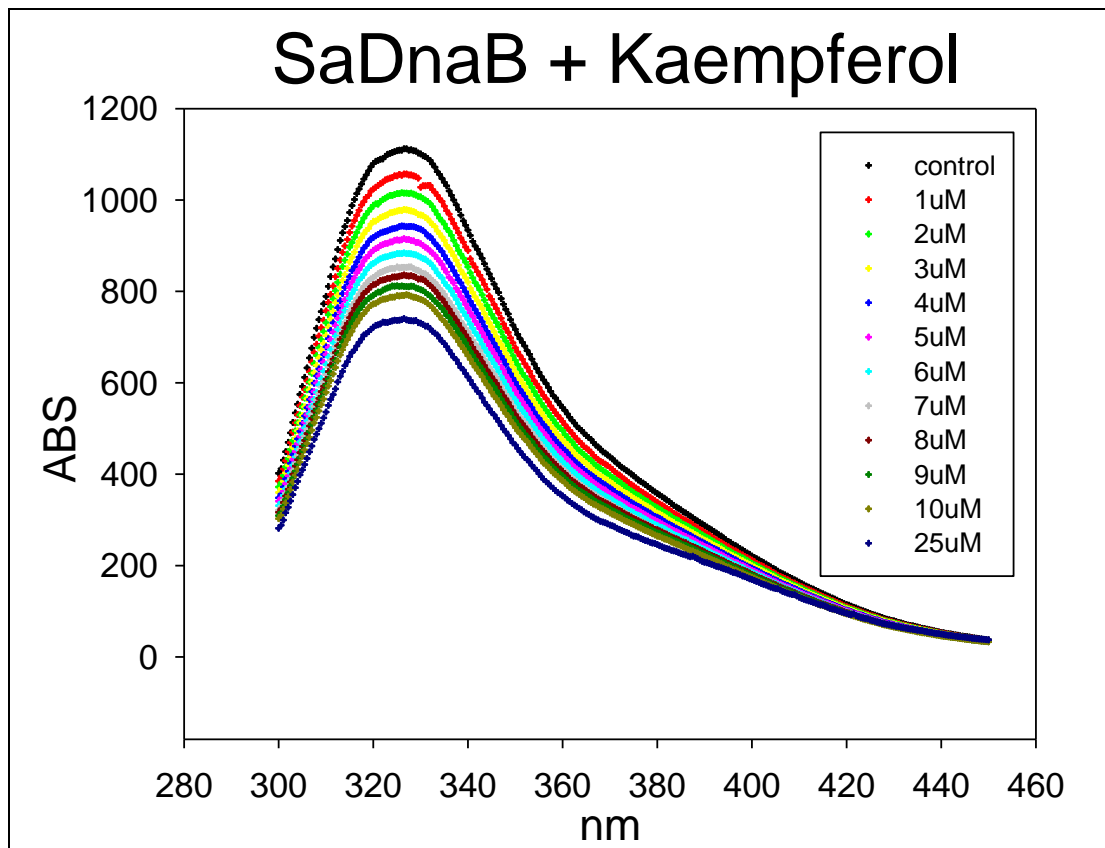
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖十二：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與 galangin 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

kaempferol 濃度：由上至下為 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25 uM

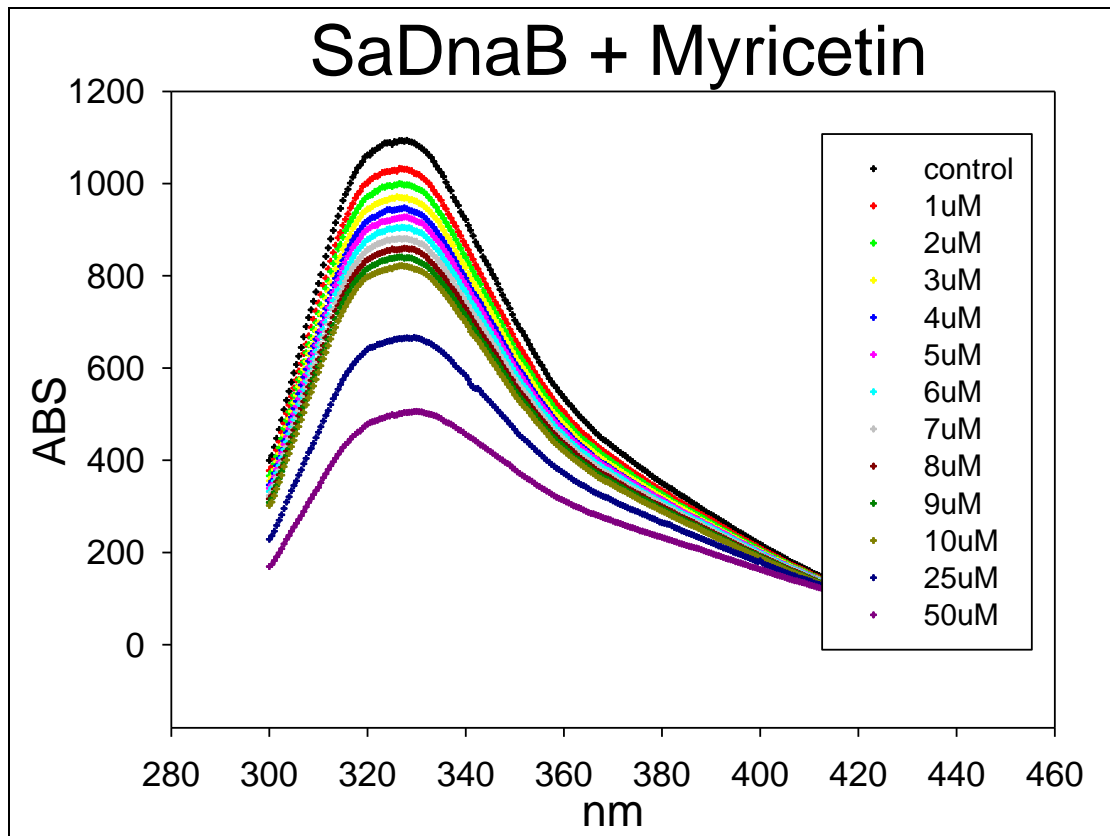
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖十三：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與 kaempferol 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

myricetin 濃度：由上至下為 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50 uM

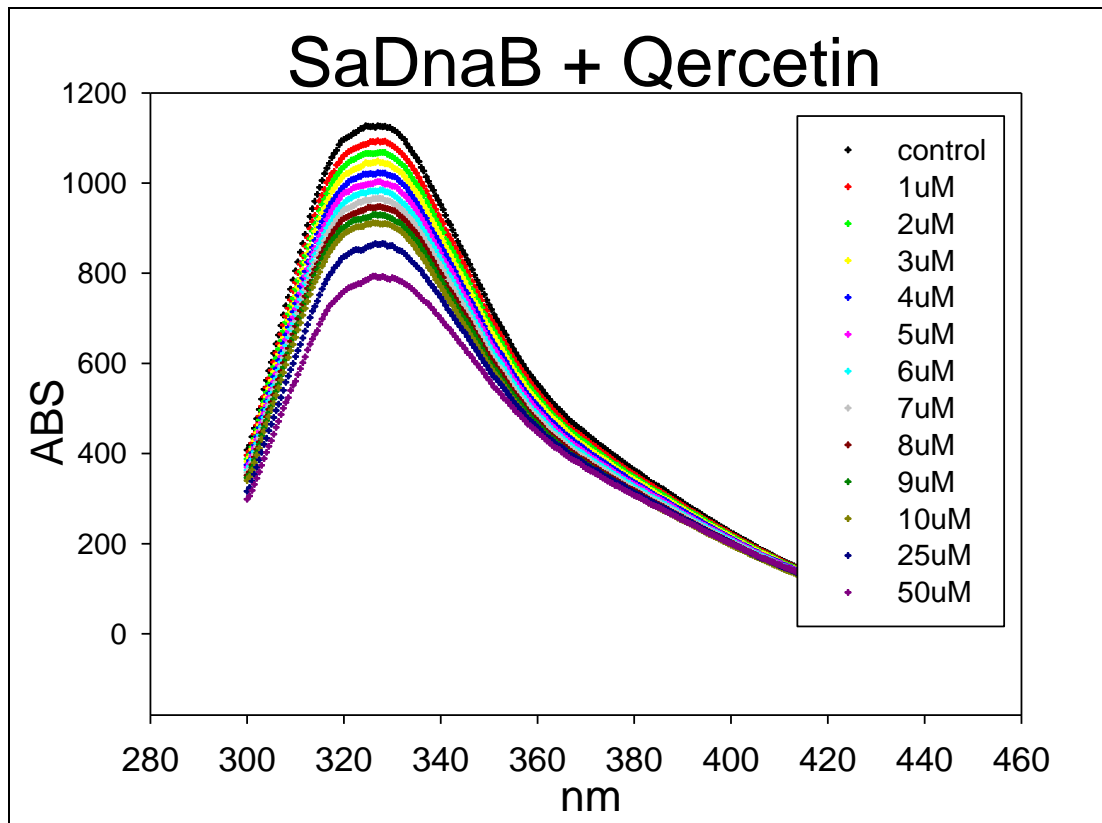
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖十四：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與 myricetin 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

quercetin 濃度：由上至下為 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50 uM

buffer：HEPES 50uM，PH7

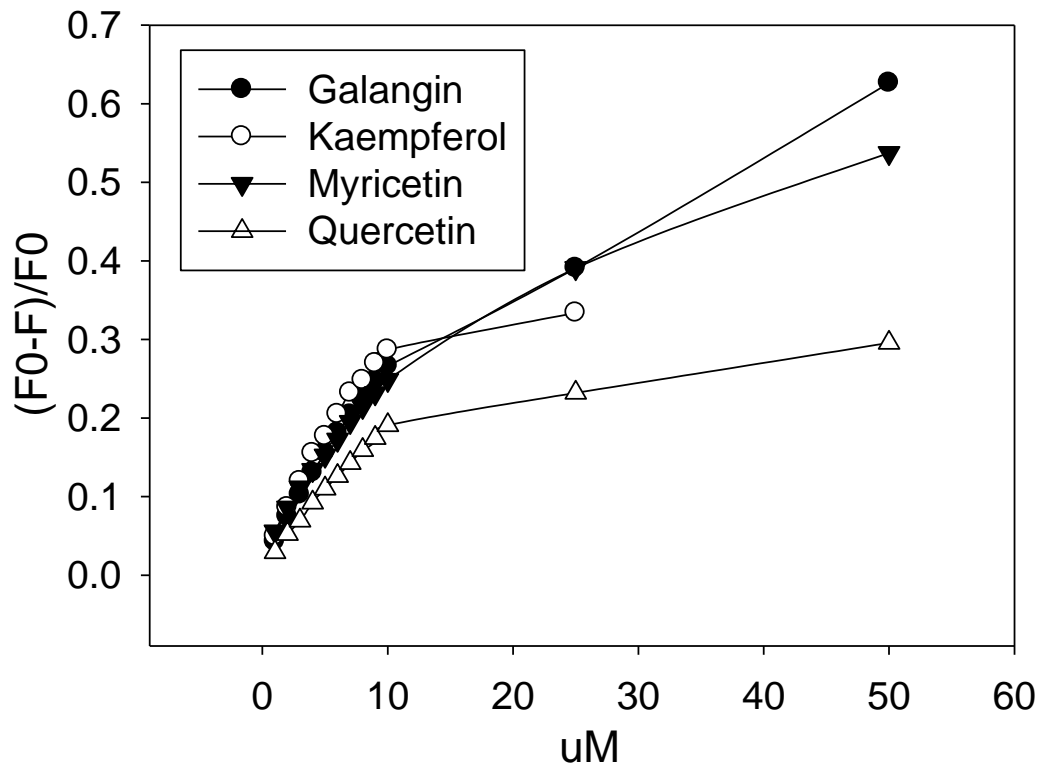
ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖十五：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與 quercetin 之交互作用。

SaDnaB + Flavonal

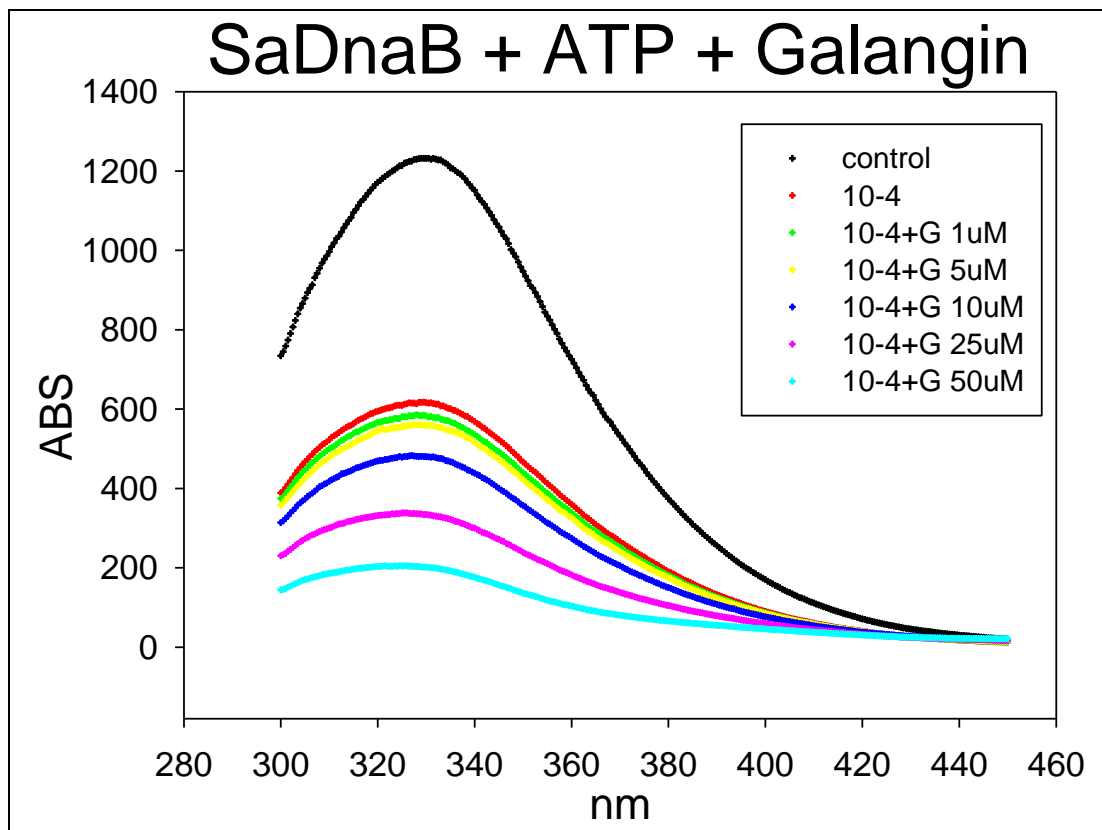


圖十六：將螢光數值變化進行做圖，並分析其解離常數 K_d 值。

以下為四種類黃酮之 K_d 常數：

flavonal	K_d (uM)	StdErr (uM)
Glangin	20.6	1.60
Kaempferol	14.1	0.803
Myricetin	10.7	1.66
Quercetin	24.3	2.55

由計算結果得知 myricetin 和 SaDnaB 具有較強力的結合。



SaDnaB 濃度：1uM

ATP 濃度：10⁻⁴ M

galangin 濃度：由上至下為 1、5、10、25、50 uM

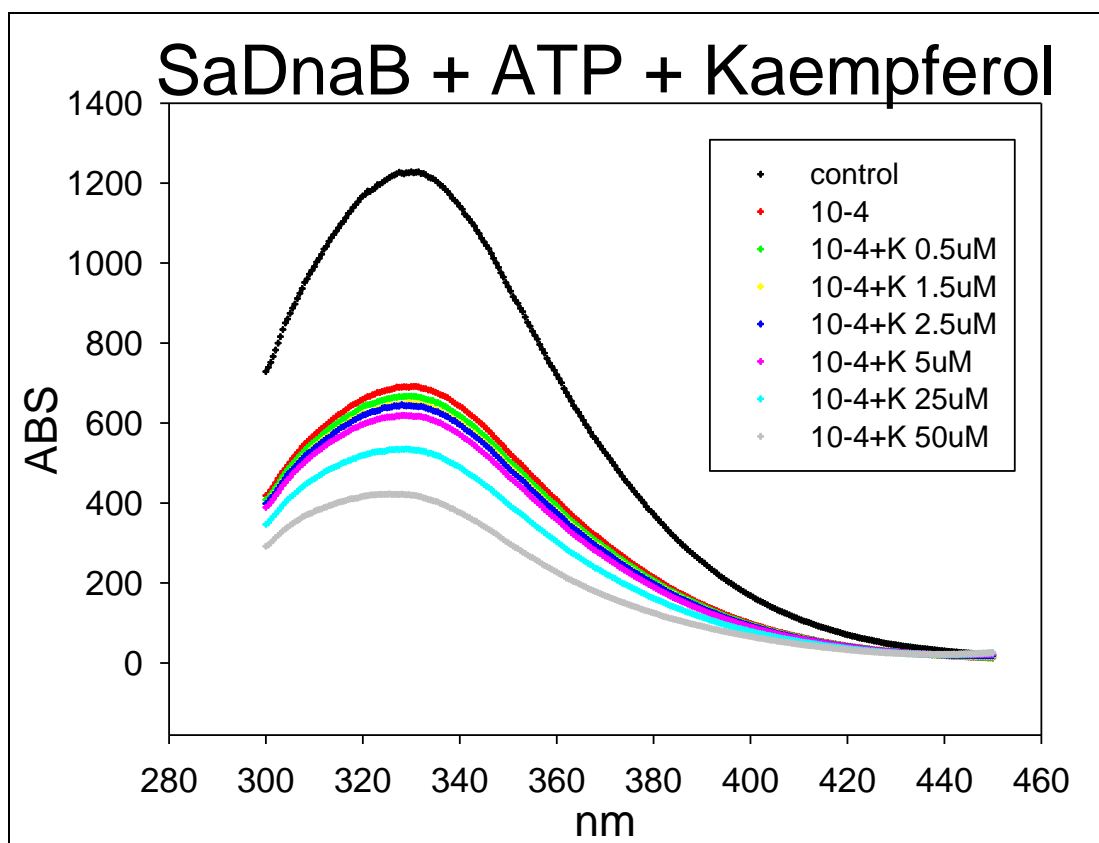
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖十七：以螢光淬滅實驗(quenching)分析 SaDnaB 與 ATP 結合時，galangin 與 SaDnaB 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

ATP 濃度：10⁻⁴ M

kaempferol 濃度：由上至下為 0.5、1.5、2.5、5、25、50 uM

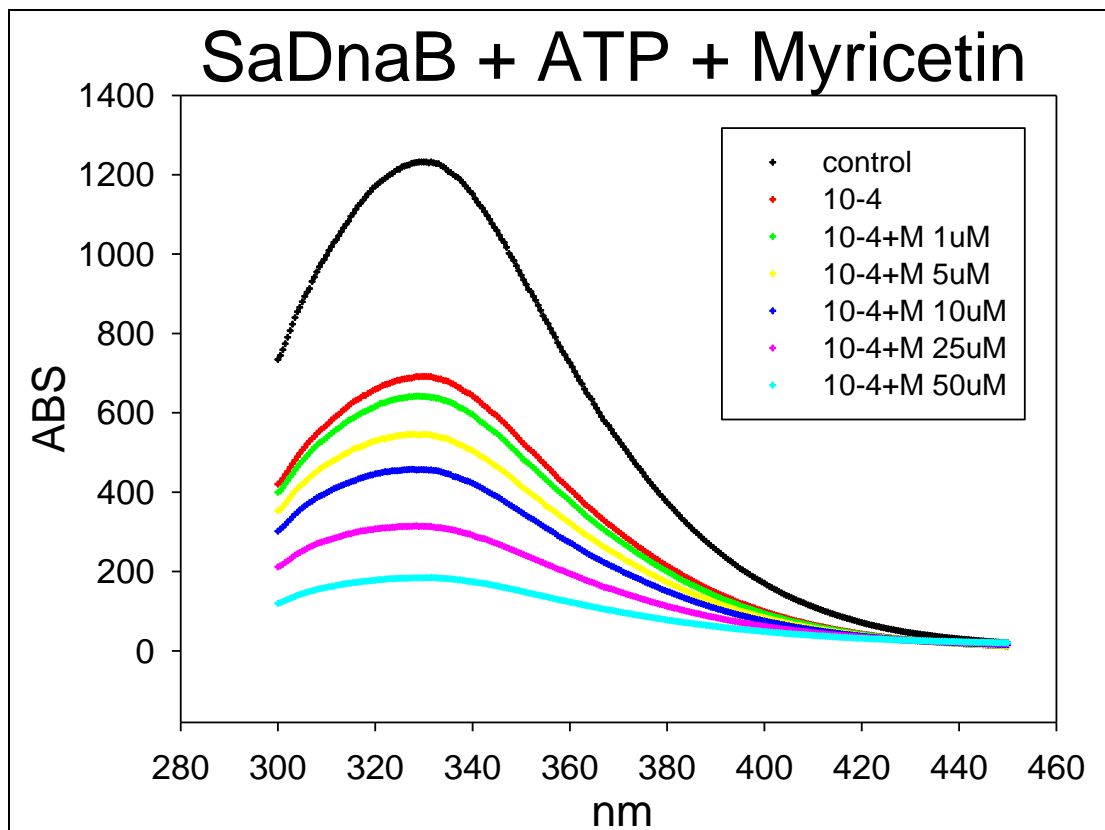
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖十八：以螢光淬滅實驗(quenching)分析 SaDnaB 與 ATP 結合時，kaempferol 與 SaDnaB 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

ATP 濃度：10⁻⁴ M

myricetin 濃度：由上至下為 1、5、10、25、50 uM

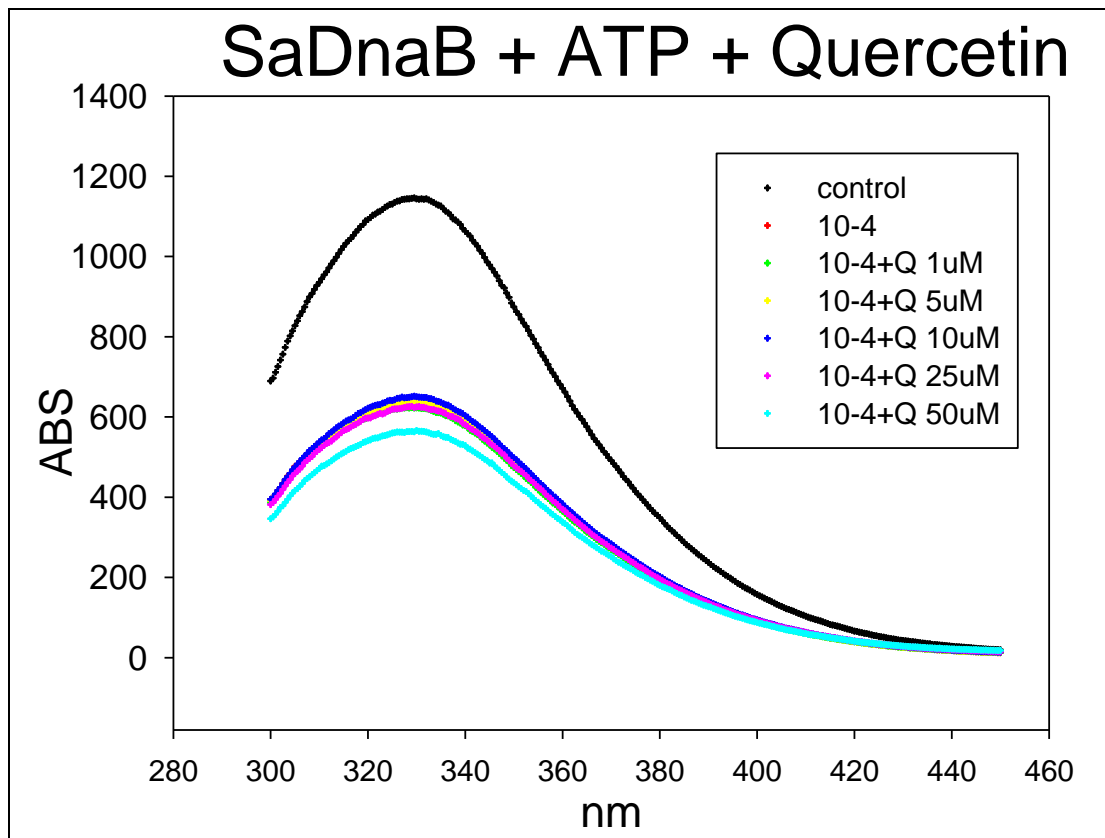
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖十九：以螢光淬滅實驗(quenching)分析 SaDnaB 與 ATP 結合時，myricetin 與 SaDnaB 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

ATP 濃度：10⁻⁴ M

quercetin 濃度：由上至下為 1、5、10、25、50 uM

buffer：HEPES 50uM，PH7

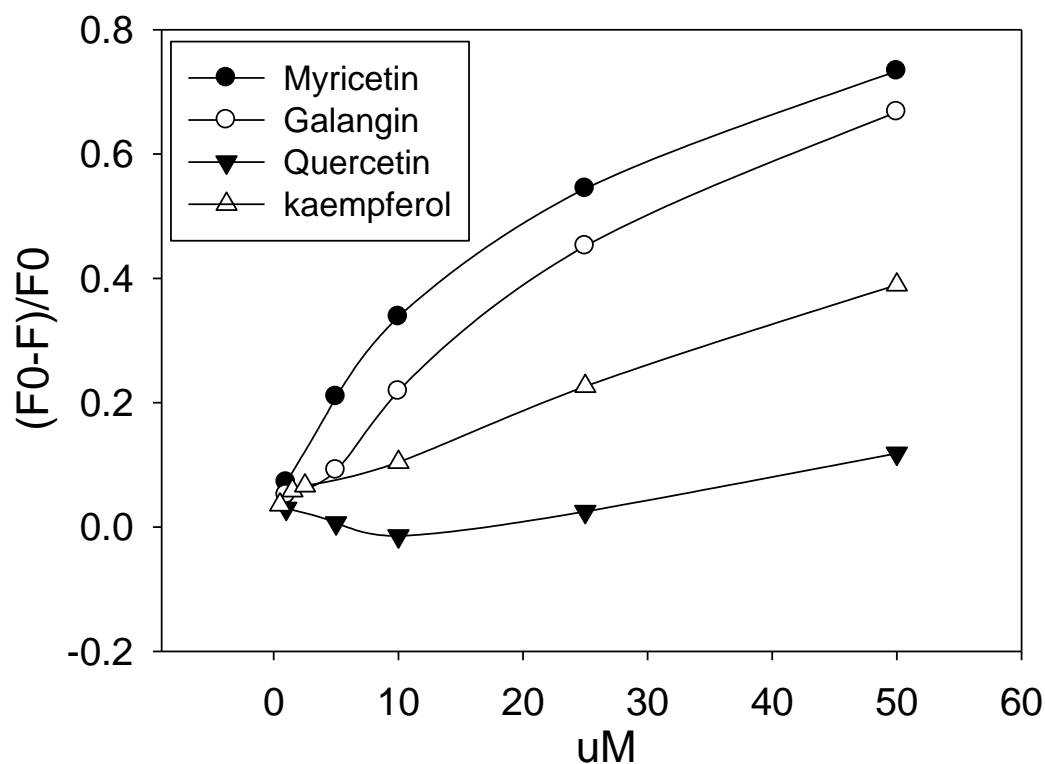
ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖二十：以螢光淬滅實驗(quenching)分析 SaDnaB 與 ATP 結合時，quercetin 與 SaDnaB 之交互作用。

SaDnaB + ATP + Flavonal

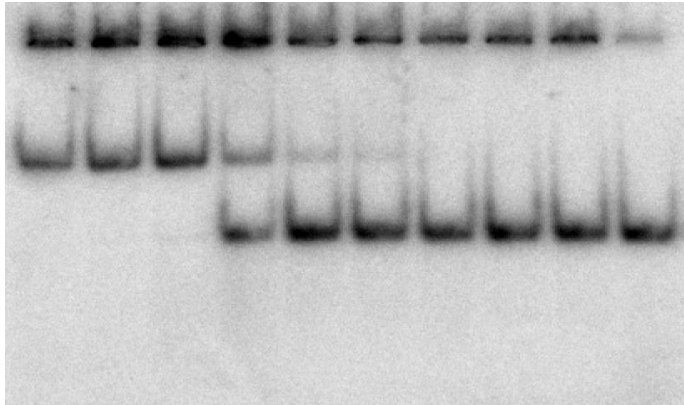


圖二十一：將螢光數值變化進行做圖，並分析其解離常數 K_d 值。

以下為四種 dNTP 之 K_d 常數：

ATP + flavonal	K_d (uM)	StdErr (uM)
ATP + Galangin	54.9	13.5 ¹
ATP + Kaempferol	75.3	56.5
ATP + Myricetin	20.0	2.47
ATP + Quercetin	$8.64 \times 10^{+6}$	$1.72 \times 10^{+12}$

由計算結果得知 myricetin 在 SaDnaB 與 ATP 結合時，具有與 SaDnaB 較強力的結合。

SaDnaB										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss
										1. 1uM
										2. 0.5uM
										3. 0.25uM
										4. 0.125uM
										5. 62.5nM
										6. 31.25nM
										7. 15.63nM
										8. 7.8nM
										9. 3.9nM
										10. 0nM

SaDnaB 濃度：

1uM、0.5uM、0.25uM、0.125uM、62.5nM、31.25nM、15.63nM、7.8nM、
3.9nM、0uM

核苷酸濃度：0 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖二十二： 以電泳遲滯法分析 SaDnaB 與單故 DNA 結合時，是否受到核苷酸影響。此為不加核苷酸之對照組

SaDnaB 166uM ATP										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-SS

SaDnaB 濃度：

1uM、0.5uM、0.25uM、0.125uM、62.5nM、31.25nM、15.63nM、7.8nM、
3.9nM、0uM

核苷酸 ATP 濃度：166 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖二十三：以電泳遲滯法分析 SaDnaB 與單股 DNA 結合時，是否受到 ATP 影響。

1uM SaDnaB 166uM dATP										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C -ss

SaDnaB 濃度：

1uM、0.5uM、0.25uM、0.125uM、62.5nM、31.25nM、15.63nM、7.8nM、
3.9nM、0uM

核苷酸 dATP 濃度：166 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖二十四：以電泳遲滯法分析 SaDnaB 與單股 DNA 結合時，是否受到 dATP 影響。

1uM SaDnaB 166uM ADP										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										1. 1uM 2. 0.5uM 3. 0.25uM 4. 0.125uM 5. 62.5nM 6. 31.25nM 7. 15.63nM 8. 7.8nM 9. 3.9nM 10. 0nM
										-C
										-ss

SaDnaB 濃度：

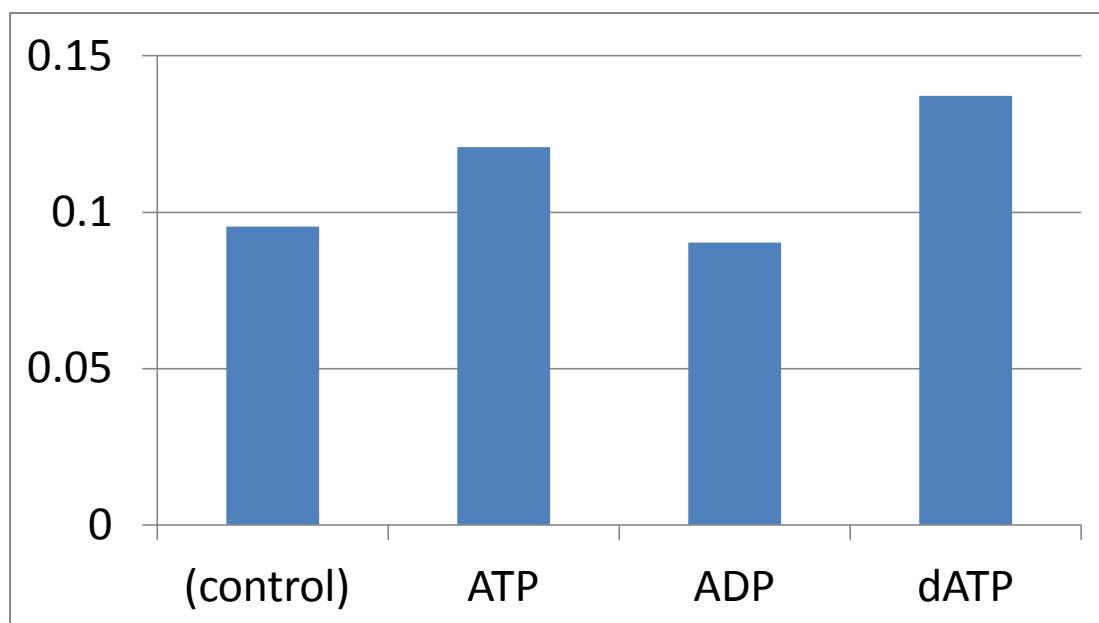
1uM、0.5uM、0.25uM、0.125uM、62.5nM、31.25nM、15.63nM、7.8nM、
3.9nM、0uM

核苷酸 ADP 濃度：166 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖二十五：以電泳遲滯法分析 SaDnaB 與單股 DNA 結合時，是否受到 ADP 影響。



圖二十六：將其定量結果進行做圖，Y 軸為不同種核苷酸，X 軸為 K_d 常數。以下為三種核苷酸之 K_d 常數：

	K_d (uM)
(control)	0.095331
ATP	0.120738
ADP	0.090346
dATP	0.137226

由計算結果得知 ATP 與 dATP 會影響 SaDnaB 與單股 DNA 的結合。

SaDnaB control										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										1. 1uM 2. 0.5uM 3. 0.25uM 4. 0.125uM 5. 62.5nM 6. 31.25nM 7. 15.63nM 8. 7.8nM 9. 3.9nM 10. 0nM

SaDnaB 濃度：

1uM、0.5uM、0.25uM、0.125uM、62.5nM、31.25nM、15.63nM、7.8nM、
3.9nM、0uM

類黃酮濃度：0 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖二十七： 以電泳遲滯法分析 SaDnaB 與單股 DNA 結合時，是否受到類黃酮影響。此為不加類黃酮之對照組

SaDnaB 16uM Quercetin										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss

SaDnaB 濃度：

1uM、0.5uM、0.25uM、0.125uM、62.5nM、31.25nM、15.63nM、7.8nM、
3.9nM、0uM

類黃酮 Quercetin 濃度：16 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖二十八：以電泳遲滯法分析 SaDnaB 與單股 DNA 結合時，是否受到 Quercetin 影響。

SaDnaB 16uM Galangin										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										1. 1uM 2. 0.5uM 3. 0.25uM 4. 0.125uM 5. 62.5nM 6. 31.25nM 7. 15.63nM 8. 7.8nM 9. 3.9nM 10. 0nM

SaDnaB 濃度：

1uM、0.5uM、0.25uM、0.125uM、62.5nM、31.25nM、15.63nM、7.8nM、
3.9nM、0uM

類黃酮 Galangin 濃度：16 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖二十九：以電泳遲滯法分析 SaDnaB 與單股 DNA 結合時，是否受到 Galangin 影響。

SaDnaB 16uM Kaempferol										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss
										1. 1uM
										2. 0.5uM
										3. 0.25uM
										4. 0.125uM
										5. 62.5nM
										6. 31.25nM
										7. 15.63nM
										8. 7.8nM
										9. 3.9nM
										10. 0nM

SaDnaB 濃度：

1uM、0.5uM、0.25uM、0.125uM、62.5nM、31.25nM、15.63nM、7.8nM、
3.9nM、0uM

類黃酮 Kaempferol 濃度：16 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖三十：以電泳遲滯法分析 SaDnaB 與單股 DNA 結合時，是否受到 Kaempferol 影響。

1uM SaDnaB 16uM Myricetin										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-ds
										-ss

SaDnaB 濃度：

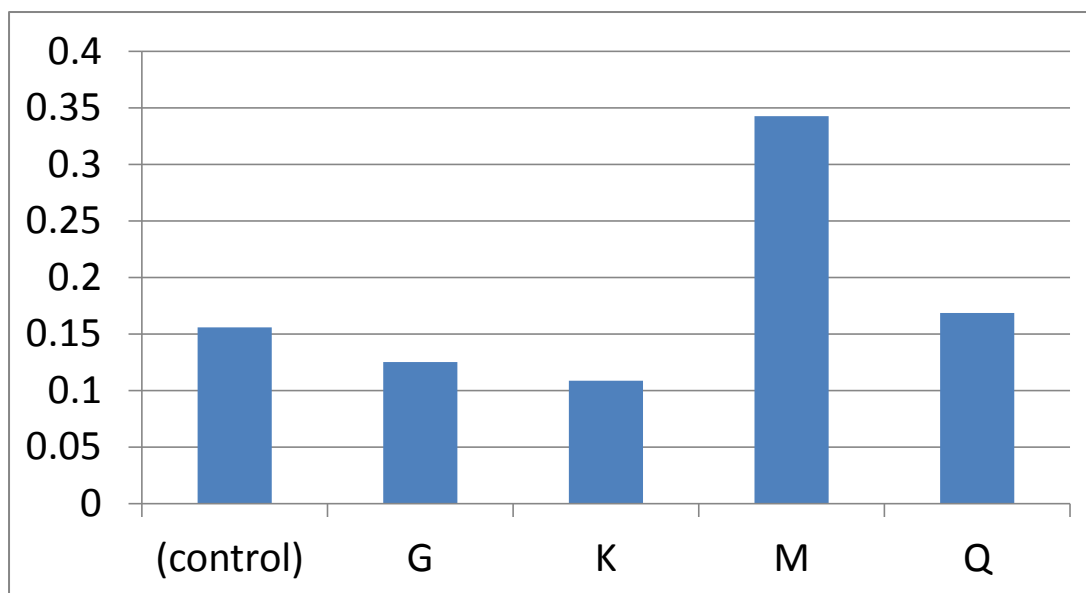
1uM、0.5uM、0.25uM、0.125uM、62.5nM、31.25nM、15.63nM、7.8nM、
3.9nM、0uM

類黃酮 Myricetin 濃度：16 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

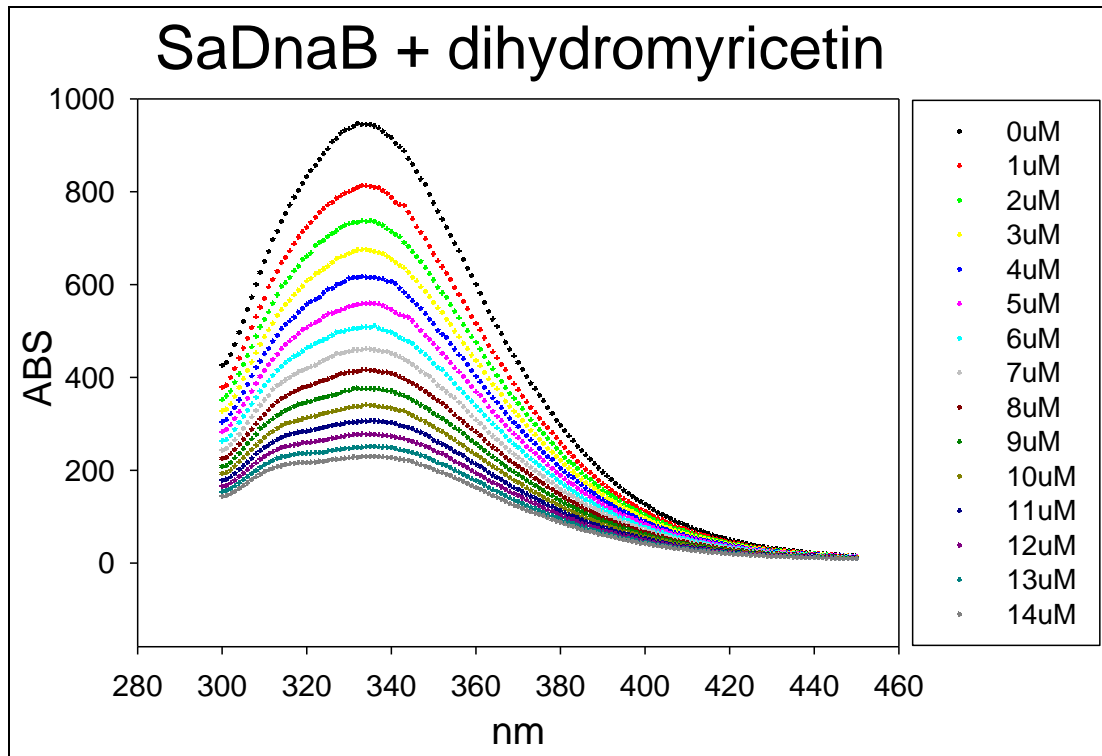
圖三十一：以電泳遲滯法分析 SaDnaB 與單股 DNA 結合時，是否受到 Myricetin 影響。



圖三十二：將其定量結果進行做圖，Y 軸為不同種類黃酮，X 軸為 K_d 常數。以下為四種類黃酮之 K_d 常數：

flavonal	K_d (uM)
(control)	0.155806
Galangin	0.125449
Kaempferol	0.108809
Myricetin	0.34281
Quercetin	0.168633

由計算結果得知 myricetin 會影響 SaDnaB 與單股 DNA 的結合。



SaDnaB 濃度：1uM

dihydromyricetin 濃度：由上至下為 1-14 uM，間隔為 1uM

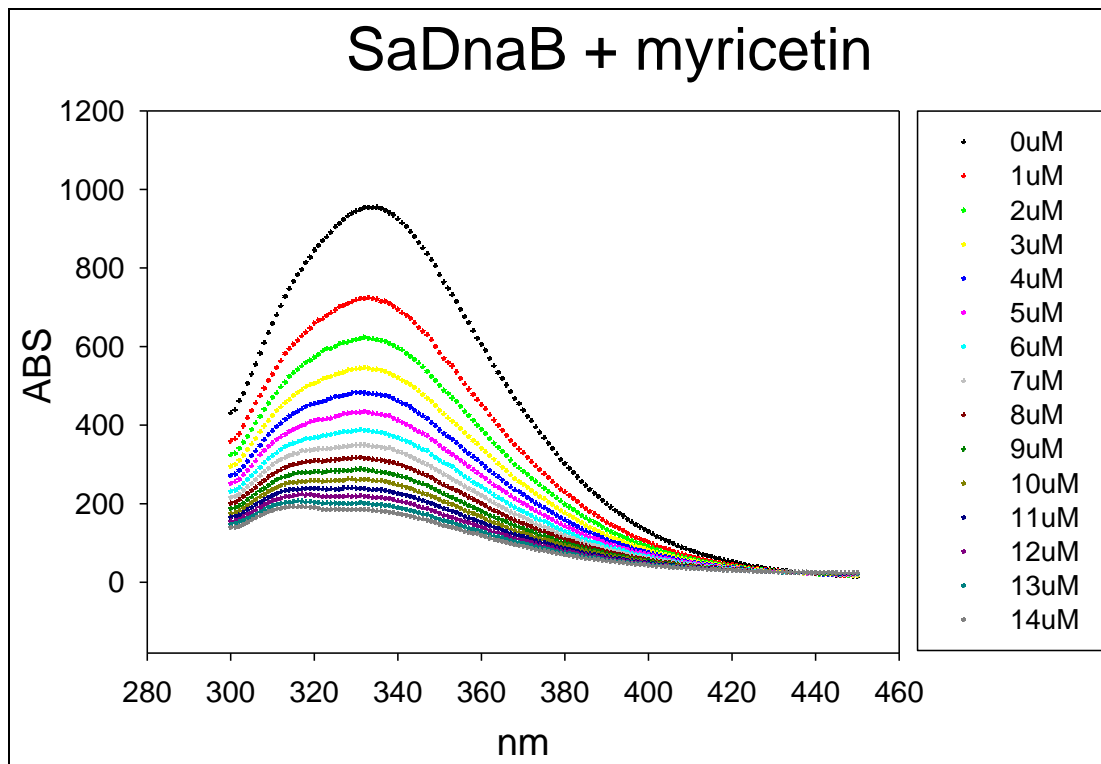
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖三十三：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與 dihydromyricetin 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

myricetin 濃度：由上至下為 1-14 uM，間隔為 1uM

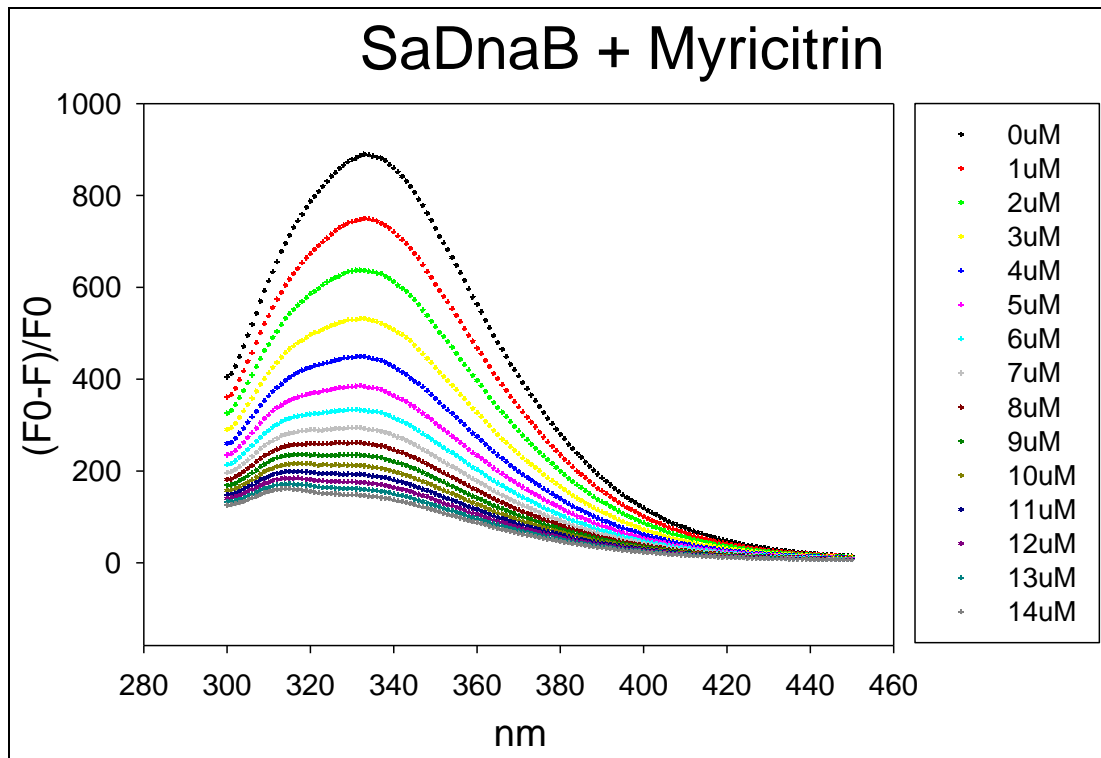
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖三十四： 以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與 myricetin 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

myricitrin 濃度：由上至下為 1-14 uM，間隔為 1uM

buffer：HEPES 50uM，PH7

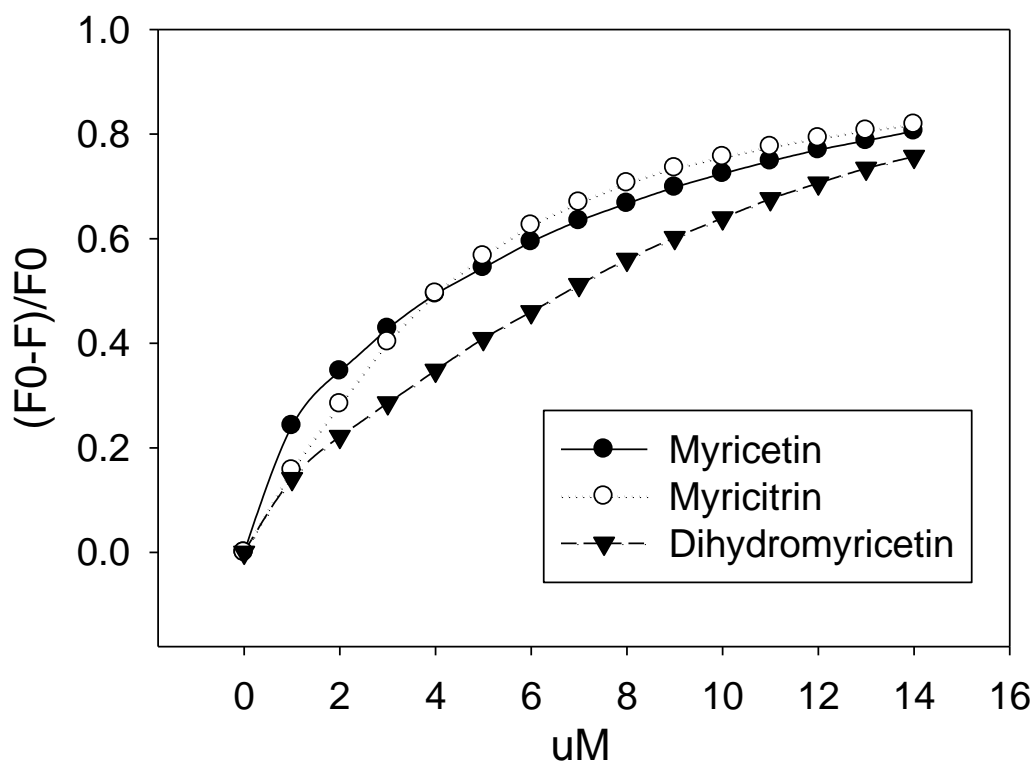
ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖三十五： 以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 與 myricitrin 之交互作用。

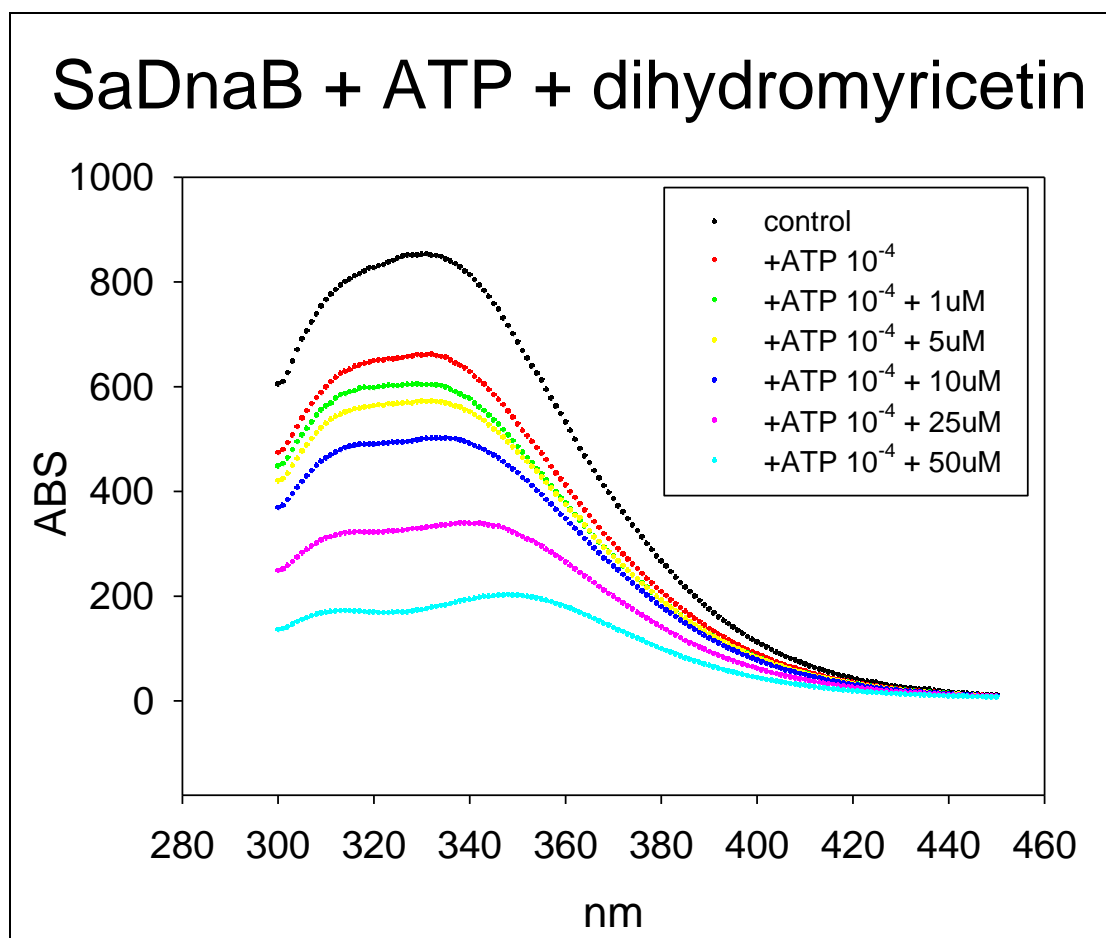
SaDnaB + Flavonal



圖三十六：將螢光數值變化進行做圖，並分析其解離常數 K_d 值。
以下為三種類黃酮 myricetin 類似物之 K_d 常數：

flavonal	K_d (uM)	StdErr(uM)
Myricetin	4.15	0.247
Dihydromyricetin	11.61	0.704
Myricitrin	5.49	0.318

由計算結果得知 myricetin 類似物和 SaDnaB 具有較強力的結合。



SaDnaB 濃度：1uM

ATP 濃度： 10^{-4} M

dihydromyricetin 濃度：1、5、10、25、50uM

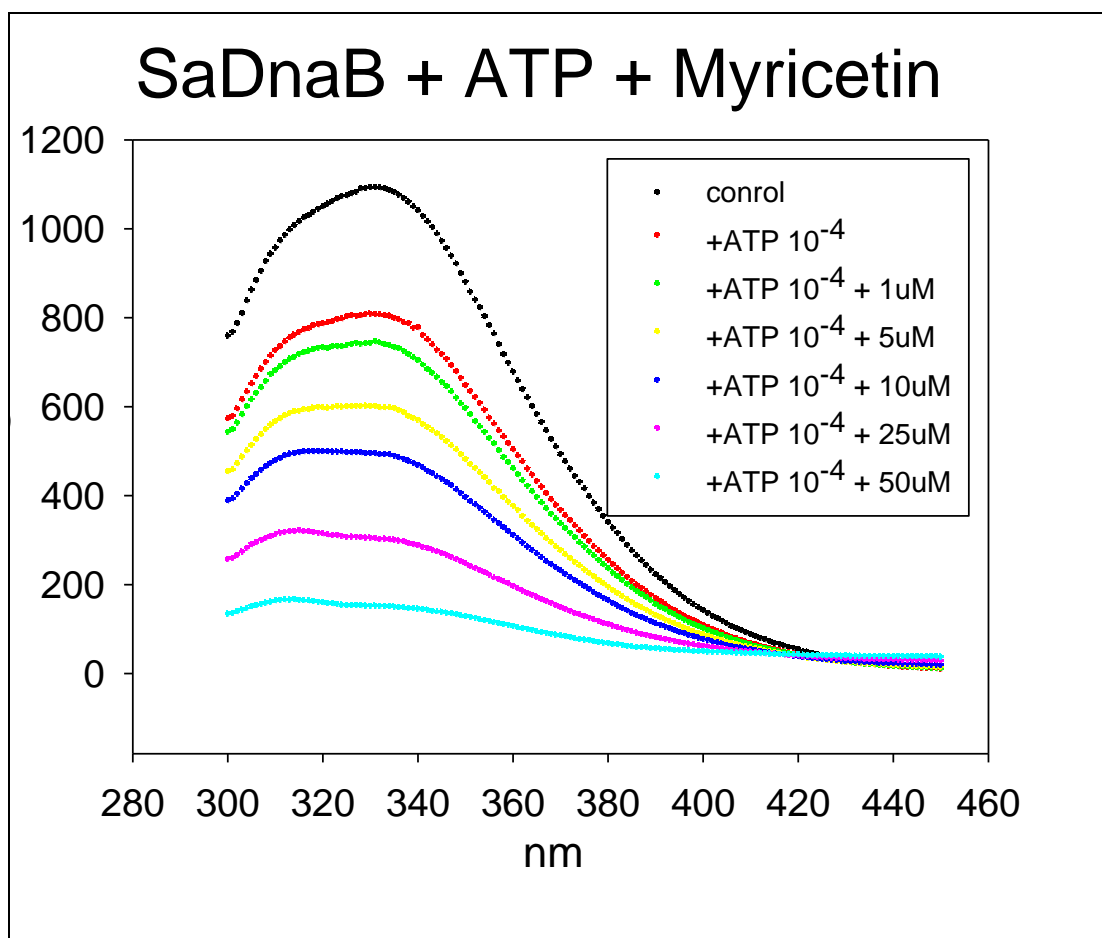
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖三十七：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 和 ATP 結合時，與 dihydromyricetin 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

ATP 濃度： 10^{-4} M

myricitrin 濃度：1、5、10、25、50uM

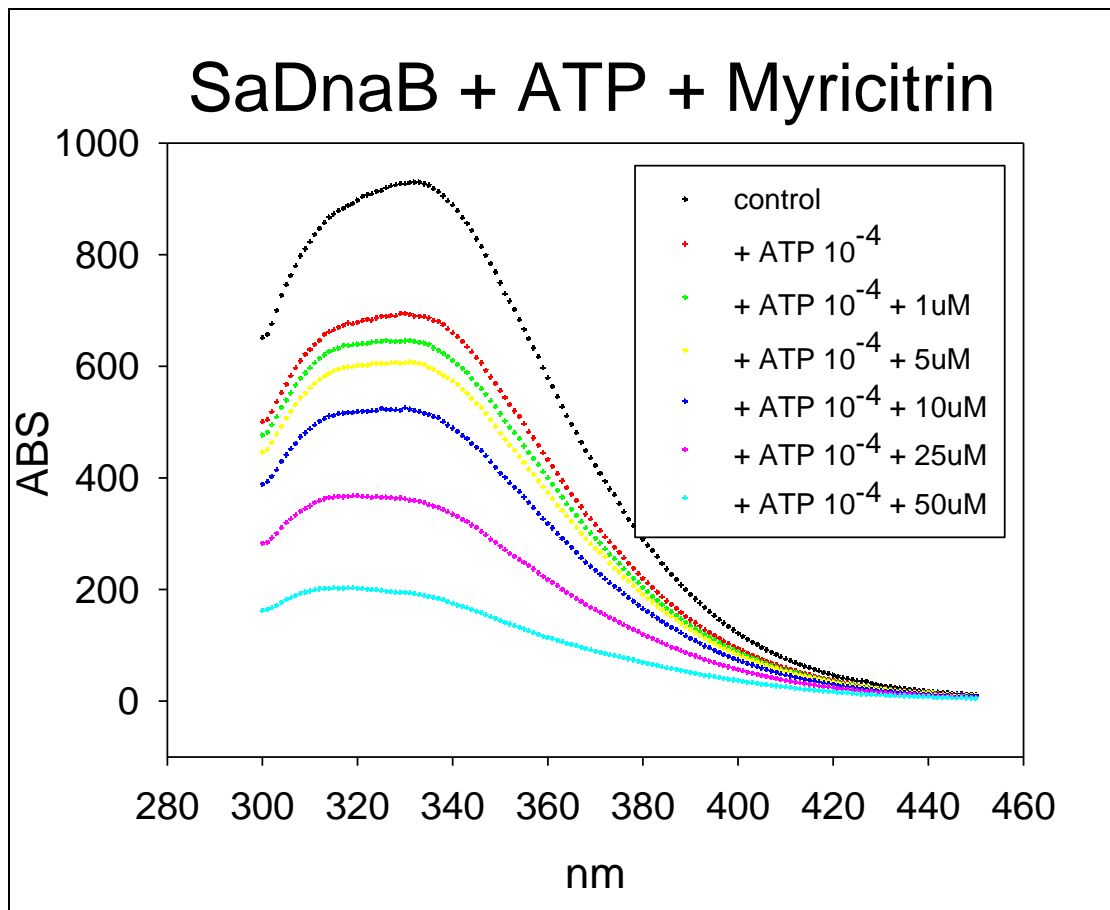
buffer：HEPES 50uM，PH7

ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖三十八：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 和 ATP 結合時，與 myricitrin 之交互作用。



SaDnaB 濃度：1uM

ATP 濃度： 10^{-4} M

myricitrin 濃度：1、5、10、25、50uM

buffer：HEPES 50uM，PH7

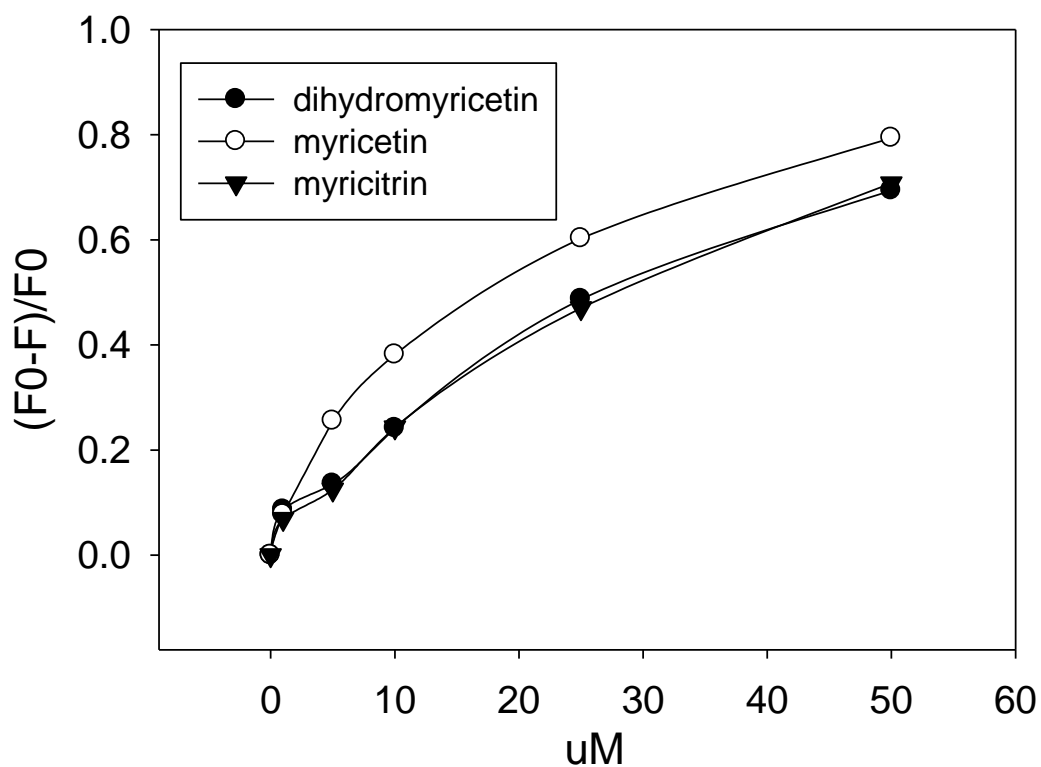
ex/em：280/330nm

環境溫度：25°C

偵測間隔時間：2 分鐘

圖三十九：以螢光淬滅實驗 (quenching) 分析 SaDnaB 和 ATP 結合時，與 myricitrin 之交互作用。

SaDnaB + ATP + Flavonal



圖四十：將螢光數值變化進行做圖，並分析其解離常數 K_d 值。

以下為三種類黃酮 myricetin 類似物之 K_d 常數：

flavonal	Kd(uM)	StdErr(uM)
Myricetin + ATP	16.9	1.78
Dihydromyricetin + ATP	39.1	9.87
Myricitrin + ATP	49.9	9.31

由計算結果得知 myricetin 在 SaDnaB 與 ATP 結合時，具有較強力的結合。

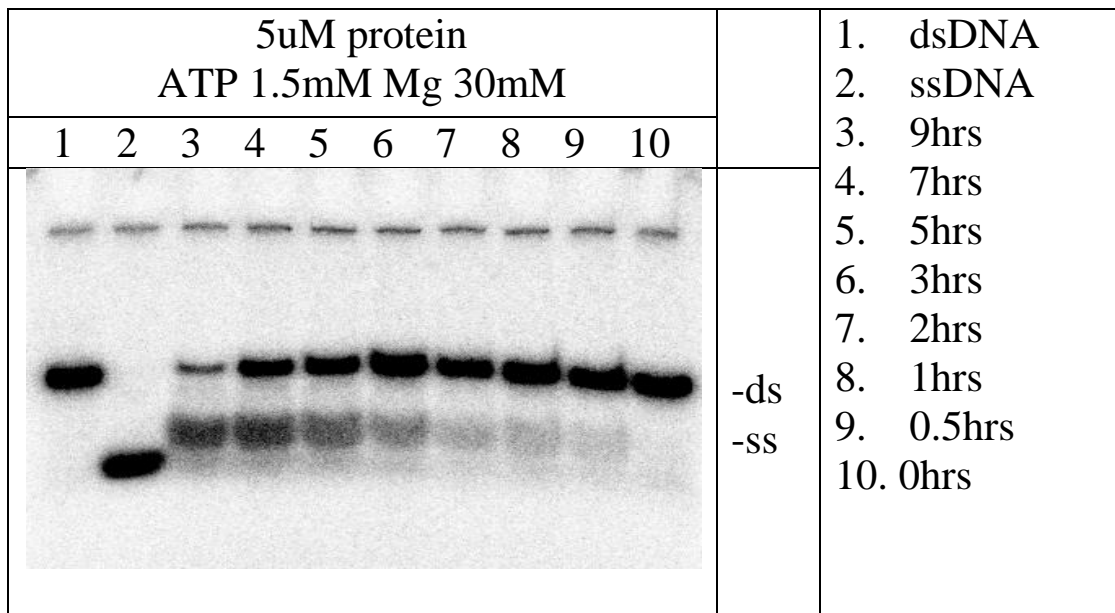
20uM protein								
1	2	3	4	5	6	7	8	
								1. 3' dsDNA 2. 5' dsDNA 3. -ATP -Mg 4. -ATP 5. -Mg 6. +ATP +Mg 7. ssDNA 8. dsDNA

SaDnaB 濃度：20uM

雙股 DNA：1.6nM

室溫反應 24 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖四十一： 以電泳遲滯法分析 SaDnaB 解旋雙股 DNA 時，
其反應條件為何。



SaDnaB 濃度：5uM

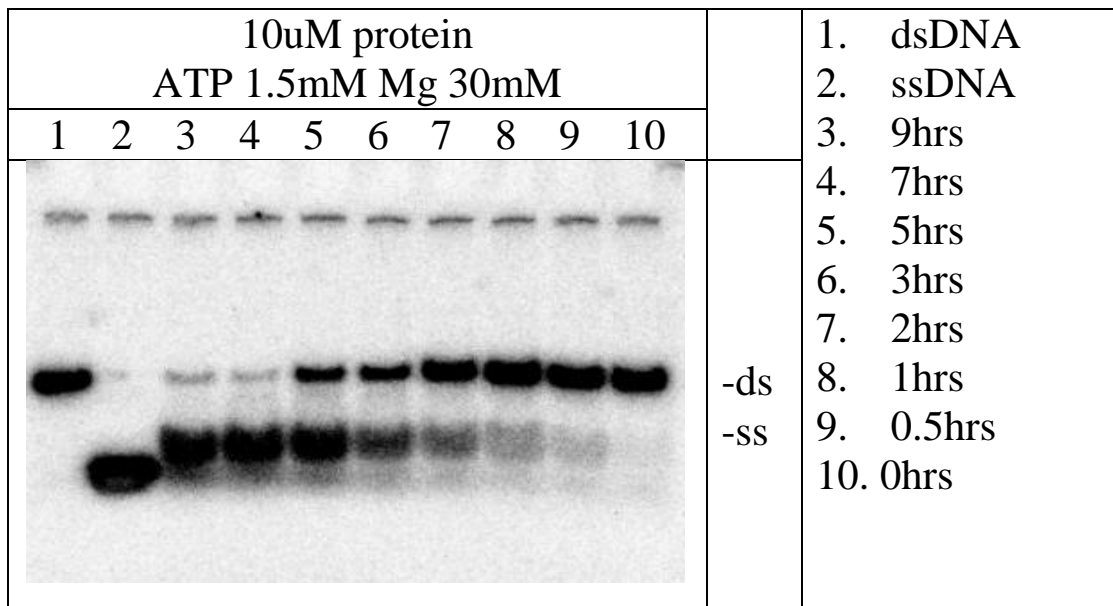
核甘酸 ATP 濃度：1.5mM

MgCl₂ 濃度：30mM

雙股 DNA：1.6nM

室溫反應 9、7、5、3、2、1、0.5、0 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖四十二： 以電泳遲滯法分析 SaDnaB 5uM 時，解旋雙股 DNA 其花費時間長短為何。



SaDnaB 濃度：10uM

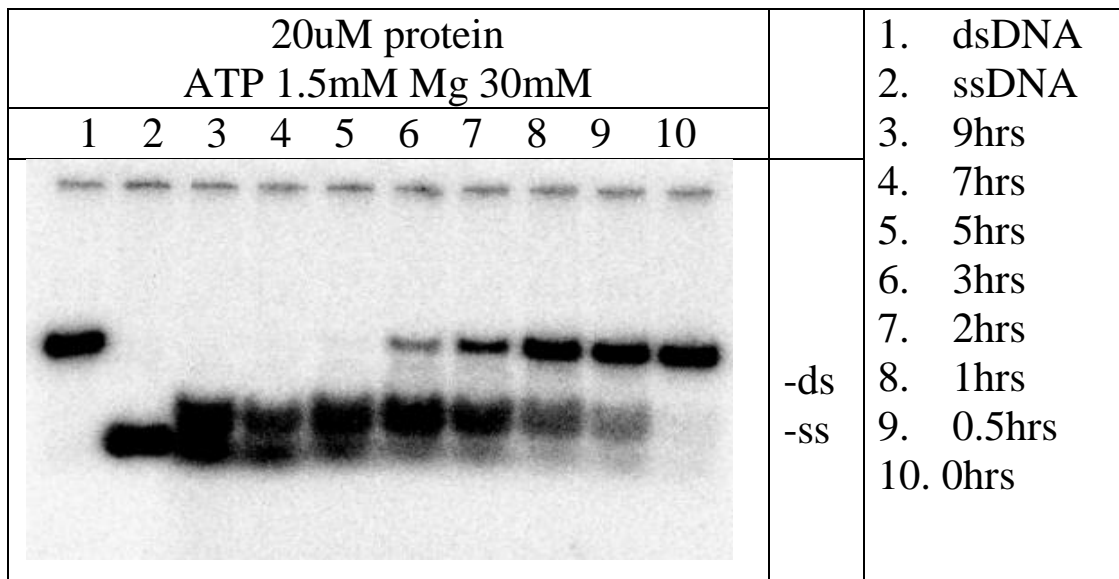
核苷酸 ATP 濃度：1.5mM

MgCl₂ 濃度：30mM

雙股 DNA：1.6nM

室溫反應 9、7、5、3、2、1、0.5、0 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖四十三：以電泳遲滯法分析 SaDnaB 10uM 時，解旋雙股 DNA 其花費時間長短為何。



SaDnaB 濃度：20uM

核苷酸 ATP 濃度：1.5mM

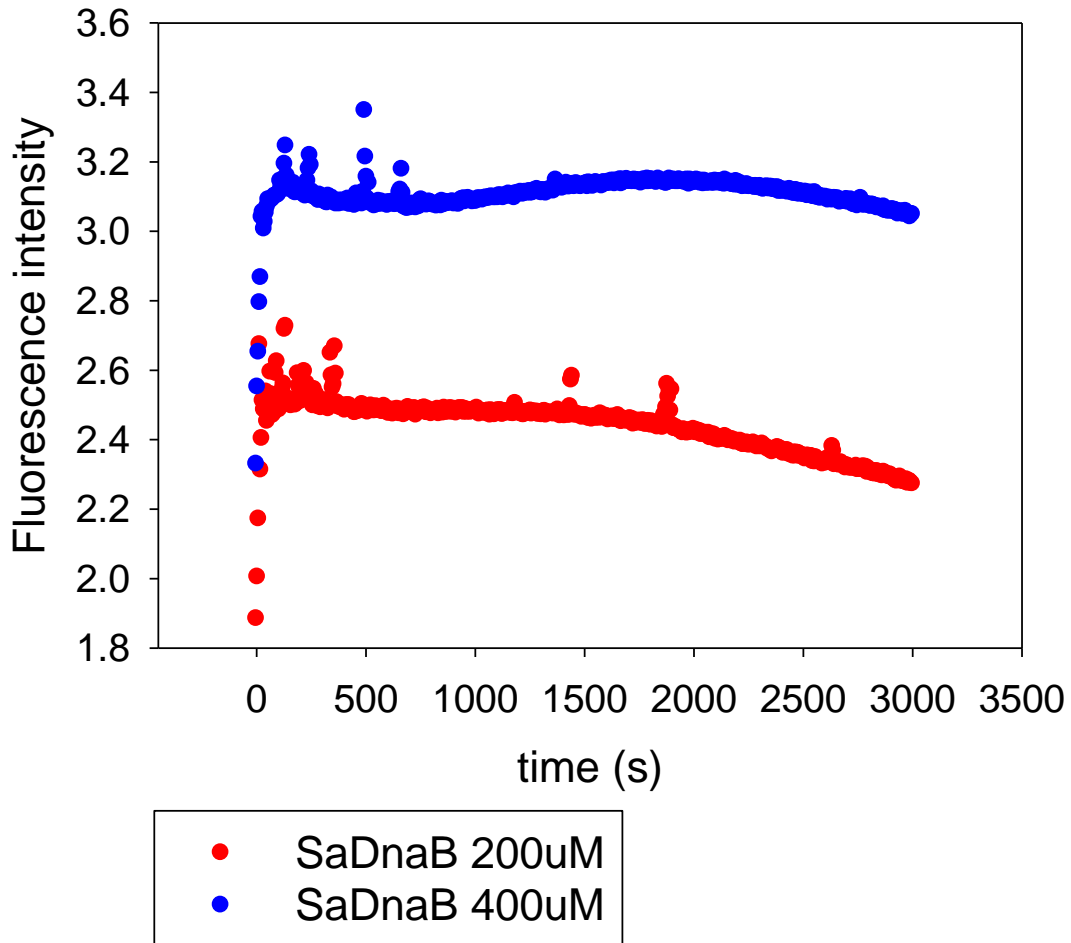
MgCl₂ 濃度：30mM

雙股 DNA：1.6nM

室溫反應 9、7、5、3、2、1、0.5、0 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖四十四： 以電泳遲滯法分析 SaDnaB 20uM 時，解旋雙股 DNA 其花費時間長短為何。

SaDnaB



SaDnaB 濃度：200 、 400 nM

雙股 DNA：1.6nM

室溫反應 1 小時

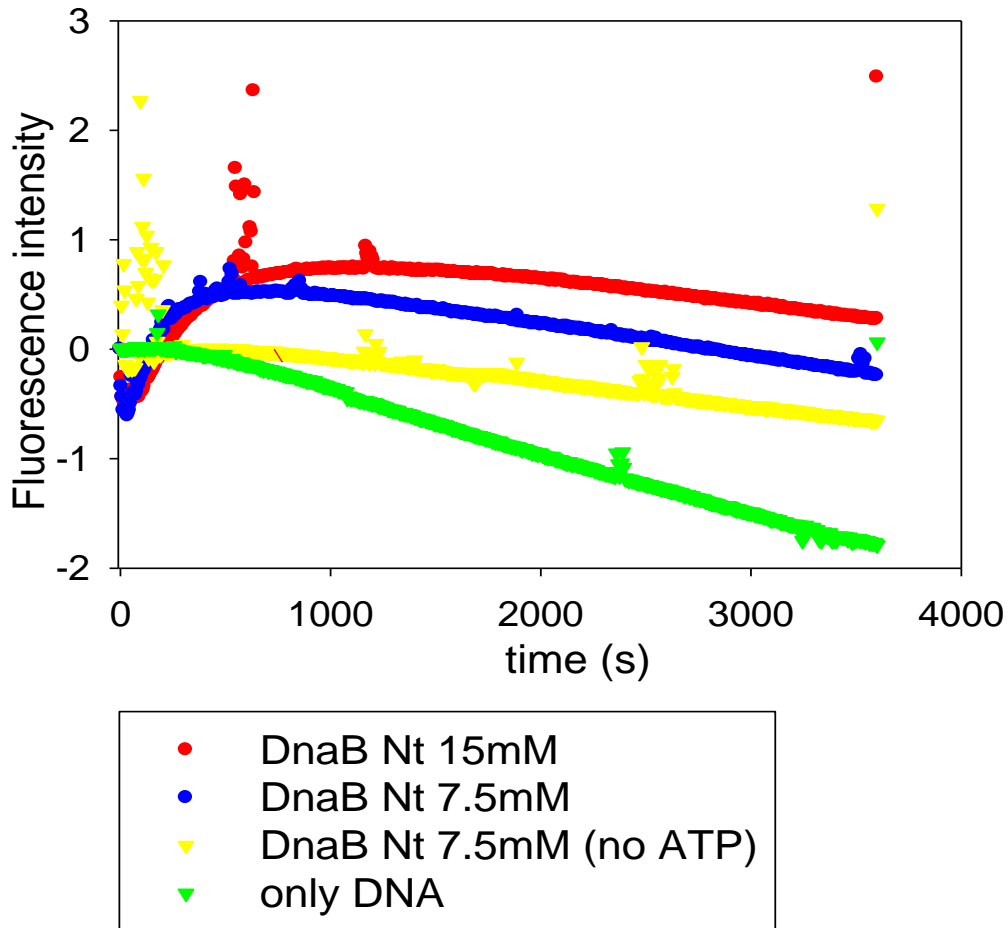
核苷酸 ATP 濃度：1.5mM

MgCl₂ 濃度：30mM

圖四十五： 使用螢光能量共振的雙股 DNA 觀察 SaDnaB 的活性。

此圖為不同濃度的 SaDnaB。

SaDnaB Nt



SaDnaB N-ter 濃度：15、7.5 mM

雙股 DNA：1.6nM

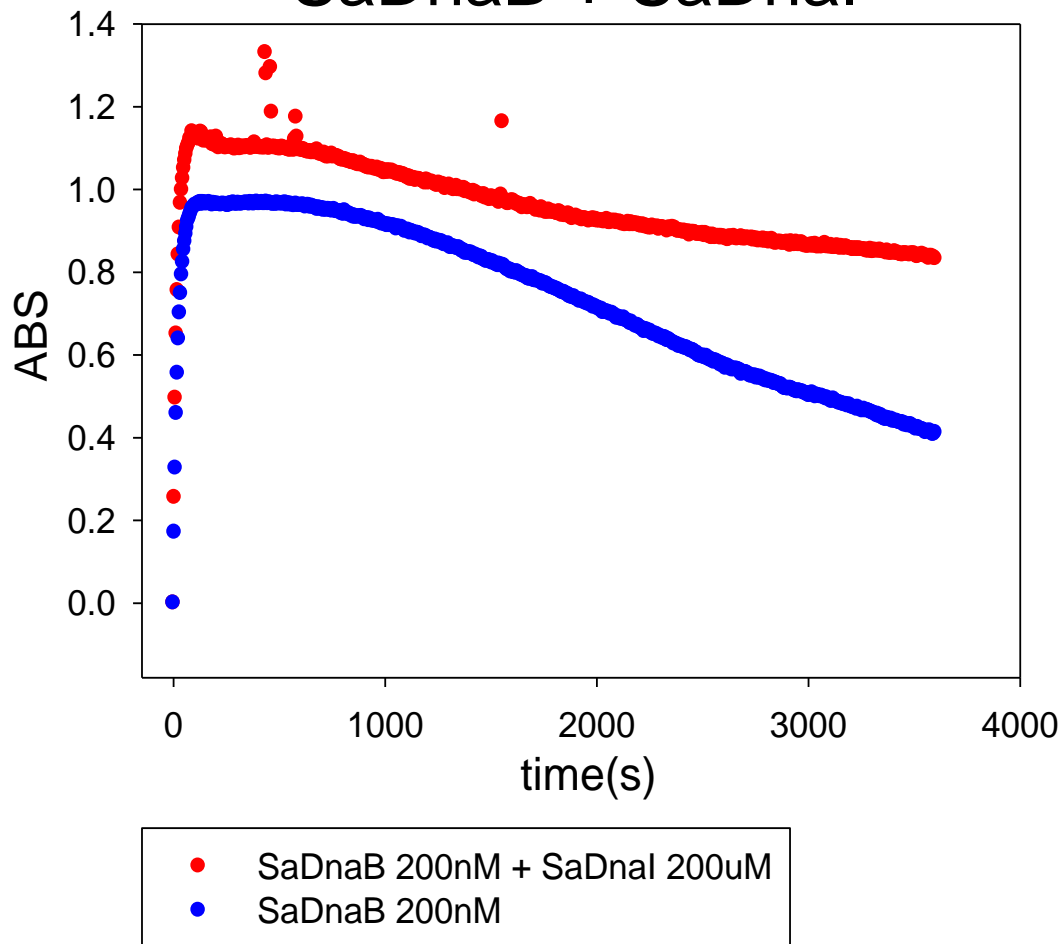
室溫反應 1 小時

核苷酸 ATP 濃度：1.5mM

MgCl₂ 濃度：30mM

圖四十六： 使用螢光能量共振的雙股 DNA 觀察 SaDnaB N-ter 的活性。此圖為不同濃度的 SaDnaB N-ter。

SaDnaB + SaDnaI



SaDnaB 濃度：200nM

SaDnaI 濃度：200nM

雙股 DNA：1.6nM

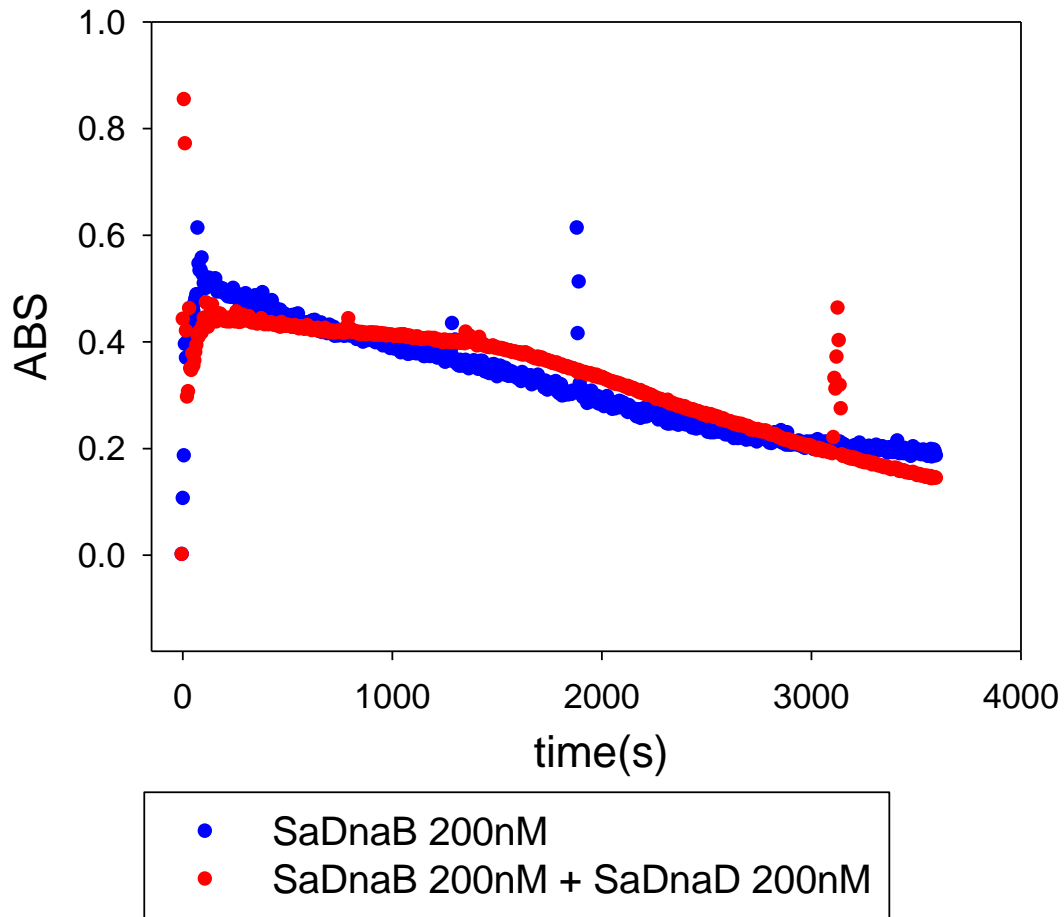
室溫反應 1 小時

核苷酸 ATP 濃度：1.5mM

MgCl₂ 濃度：30mM

圖四十七： 使用螢光能量共振的雙股 DNA 觀察 SaDnaI 影響 SaDnaB 的解旋活性。

SaDnaB + SaDnaD



SaDnaB 濃度：200nM

SaDnaD 濃度：200nM

雙股 DNA：1.6nM

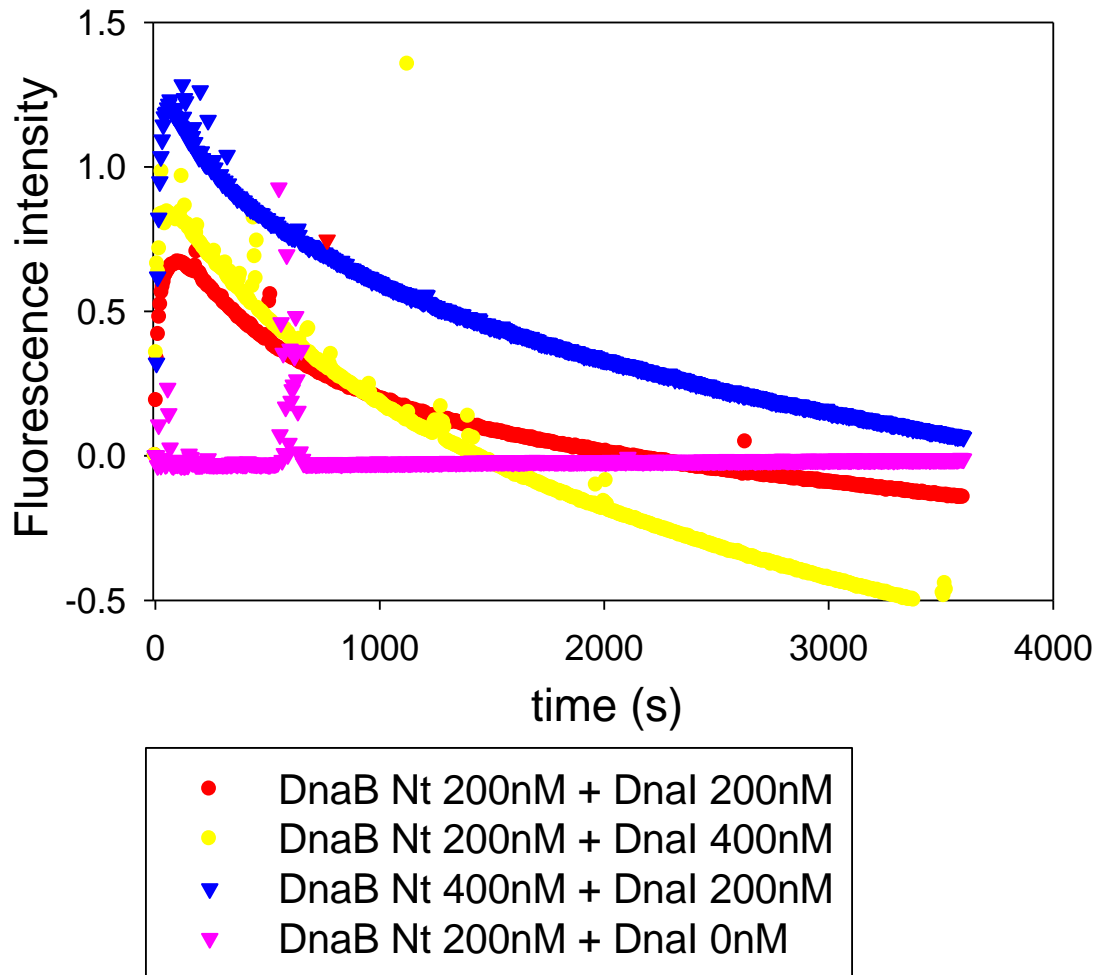
室溫反應 1 小時

核苷酸 ATP 濃度：1.5mM

MgCl₂ 濃度：30mM

圖四十八： 使用螢光能量共振的雙股 DNA 觀察 SaDnaD 影響 SaDnaB 的解旋活性。

SaDnaB Nt + SaDnaI



SaDnaB N-ter 濃度：200nM

SaDnaI 濃度：200nM

雙股 DNA：1.6nM

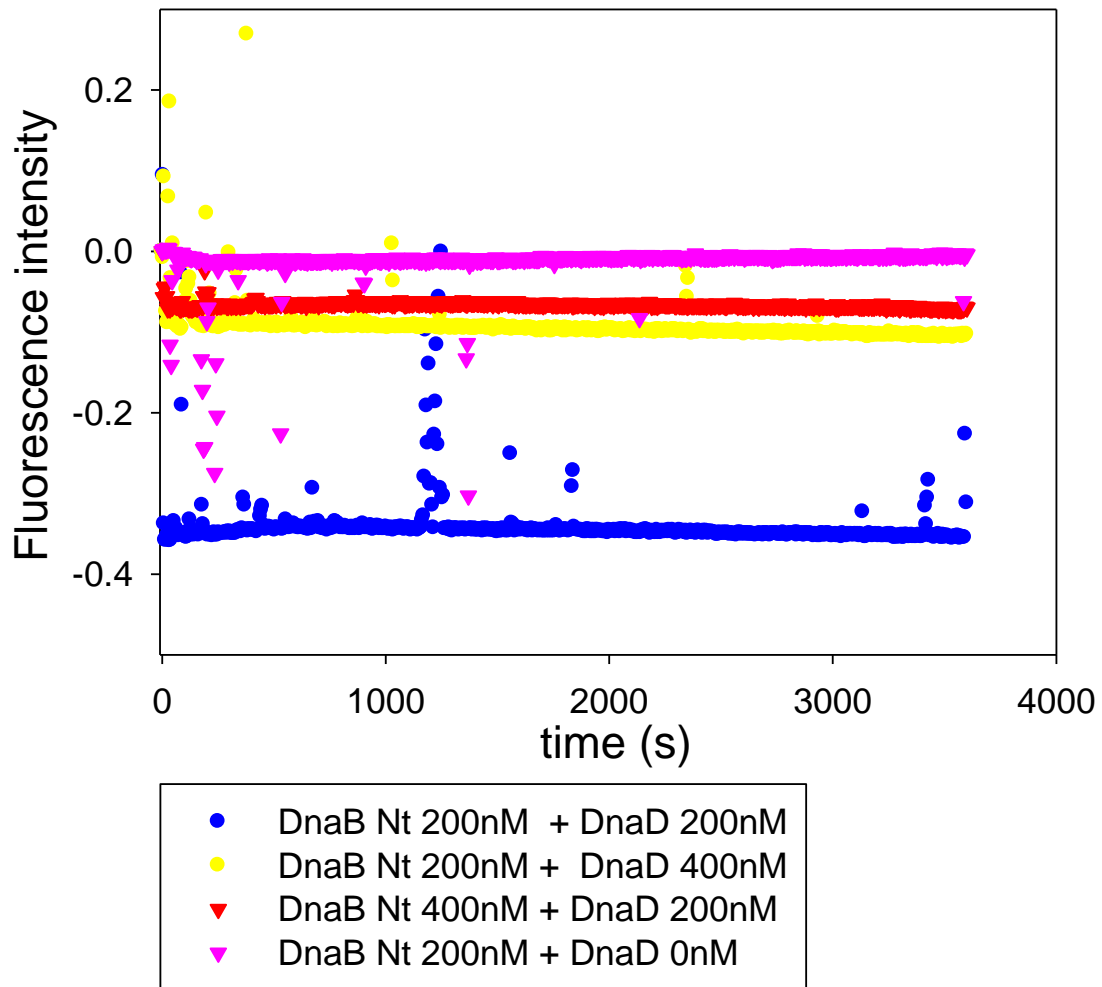
室溫反應 1 小時

核苷酸 ATP 濃度：1.5mM

MgCl₂ 濃度：30mM

圖四十九： 使用螢光能量共振的雙股 DNA 觀察 SaDnaI 影響 SaDnaB N 端的解旋活性。

SaDnaB Nt + SaDnaD



SaDnaB N-ter 濃度：200nM

SaDnaD 濃度：200nM

雙股 DNA：1.6nM

室溫反應 1 小時

核苷酸 ATP 濃度：1.5mM

MgCl₂ 濃度：30mM

圖五十： 使用螢光能量共振的雙股 DNA 觀察 SaDnaD 影響

SaDnaB N 端的解旋活性。

20uM SaPriA control										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-SS

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸濃度：0 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖五十一： 以電泳遲滯法分析 SaPriA 與單股 DNA 結合時，是否受到核苷酸影響。此為不加核苷酸之對照組。

20uM SaPriA 166uM dATP										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-SS

SaPriA 濃度：20uM

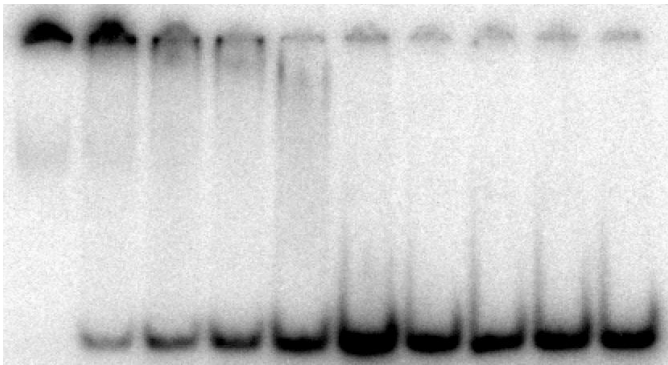
20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸 dATP 濃度：166 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖五十二：以電泳遲滯法分析 dATP 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合時。

20uM SaPriA 166uM ATP										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸 ATP 濃度：166 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖五十三：以電泳遲滯法分析 ATP 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合時。

20uM SaPriA 166uM ADP										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss

SaPriA 濃度：20uM

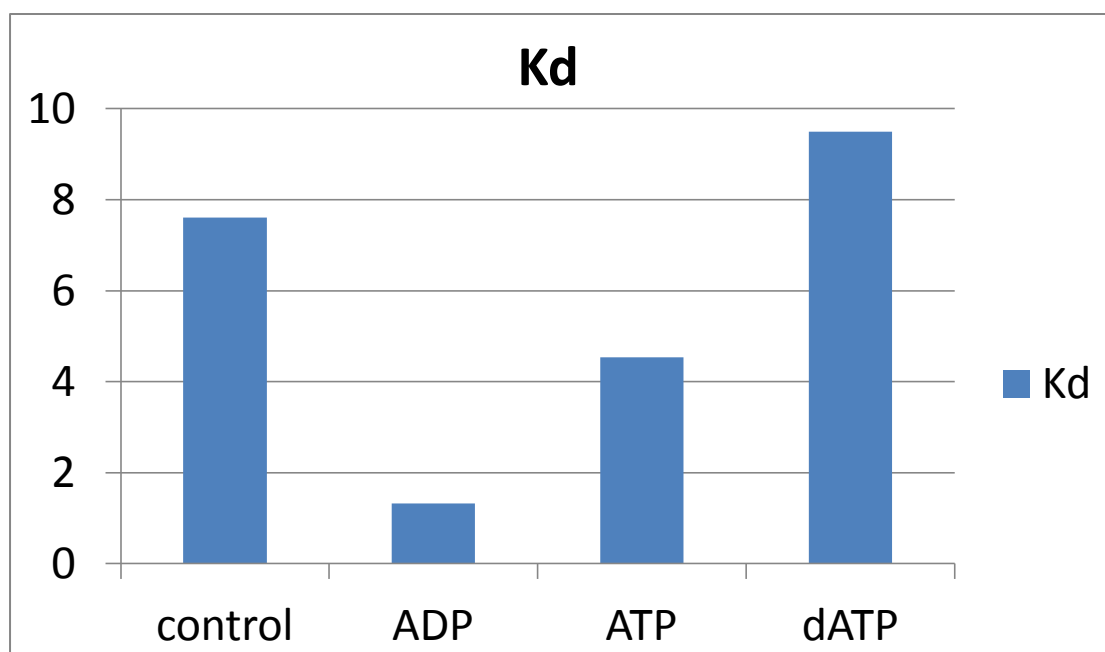
20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸 ADP 濃度：166 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖五十四：以電泳遲滯法分析 ADP 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合時。



圖五十五：將其定量結果進行做圖，Y 軸為不同種核苷酸，X 軸為 K_d 常數。以下為三種核苷酸之 K_d 常數：

	Kd (uM)
(control)	7.609293
ADP	1.319864
ATP	4.538062
dATP	9.492838

由計算結果得知 ATP 與 ADP 會影響 SaDnaB 與單股 DNA 的結合。

20uM SaPriA control										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-SS

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

類黃酮濃度：0 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖五十六： 以電泳遲滯法分析 SaPriA 與單股 DNA 結合時，是否受到類黃酮影響。此為不加類黃酮之對照組。

20uM SaPriA 16uM Myricetin										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss

SaPriA 濃度：20uM

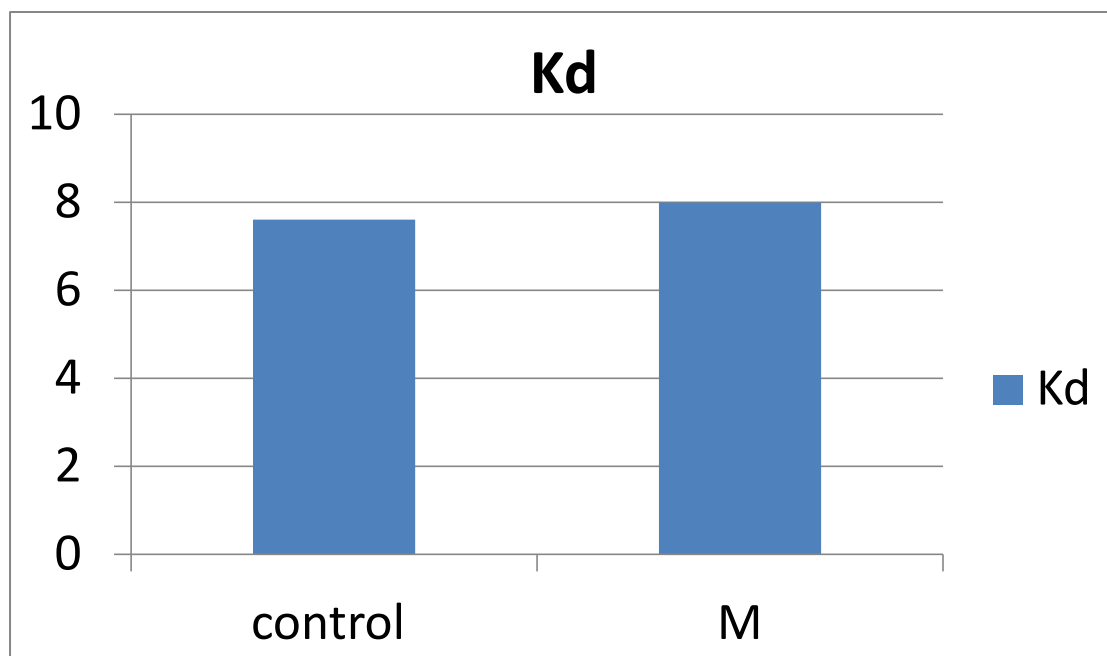
20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

myricetin 濃度：16 uM

dT₄₀：1.6nM

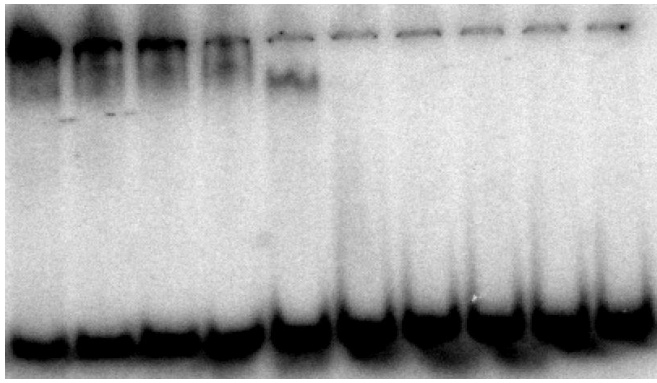
室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖五十七：以電泳遲滯法分析 myricetin 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。



圖五十八：將其定量結果進行做圖，Y 軸為不同種核苷酸，X 軸為 K_d 常數。以下為 control 和 myricetin 之 K_d 常數：

	Kd (uM)
(control)	7.609293
myricetin	7.987239

20uM SaPriA control										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

類黃酮濃度：0 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖五十九： 以電泳遲滯法分析 SaPriA 與單股 DNA 結合時，是否受到類黃酮影響。此為不加類黃酮之對照組。

20uM SaPriA 16uM Galagin										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										1. 20uM 2. 10uM 3. 5uM 4. 2.5uM 5. 1.25uM 6. 625nM 7. 312.5nM 8. 156nM 9. 78nM 10. 0nM

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

galangin 濃度：16 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖六十：以電泳遲滯法分析 galangin 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。

20uM SaPriA 16uM Quercetin										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-SS

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、0uM

quercetin 濃度：16 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖六十一：以電泳遲滯法分析 quercetin 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。

20uM SaPriA 16uM Kaempferol										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-SS

SaPriA 濃度：20uM

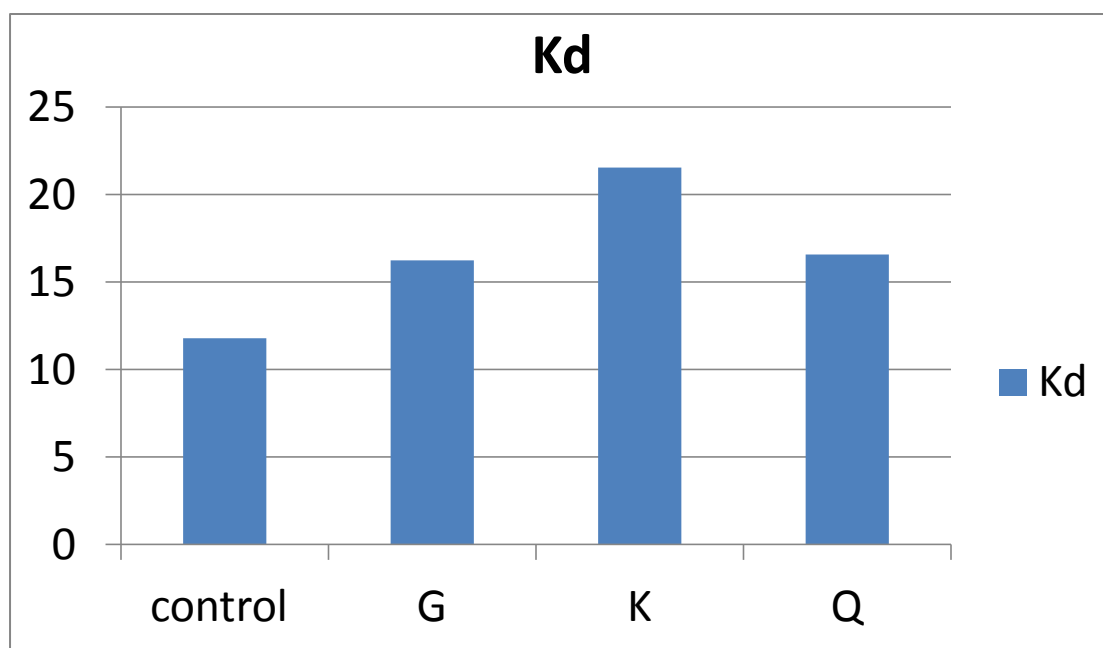
20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

kaempferol 濃度：16 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖六十二：以電泳遲滯法分析 kaempferol 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。



圖六十三：將其定量結果進行做圖，Y 軸為不同種類黃酮，X 軸為 K_d 常數。以下為三種類黃酮之 K_d 常數：

	Kd (uM)
(control)	11.79017
Galangin	16.23577
Kaempferol	21.54477
quercetin	16.57231

20uM SaPriA control										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

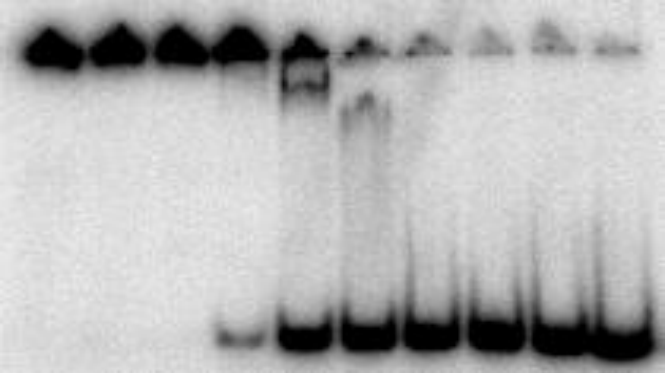
類黃酮濃度：0 uM

核苷酸 ADP 濃度：0 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖六十四： 以電泳遲滯法分析 SaPriA 與單股 DNA 結合時，是否
類黃酮會干擾 ADP 的影響。此為不加核苷酸之對照組。

20uM SaPriA 166uM ADP										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

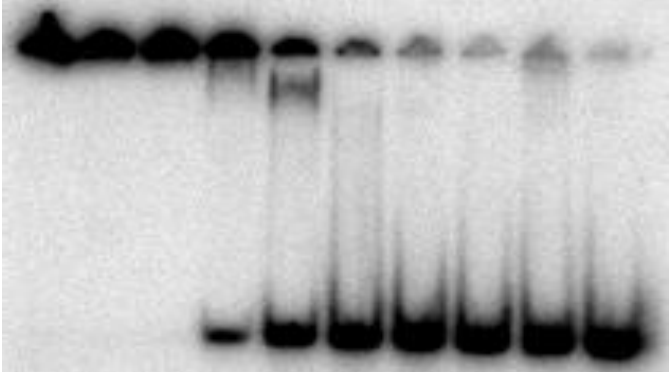
類黃酮濃度：0 uM

核苷酸 ADP 濃度：166 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖六十五：以電泳遲滯法分析 ADP 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。

20uM SaPriA 166uM ADP 16uM Myricetin										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss
										1. 20uM 2. 10uM 3. 5uM 4. 2.5uM 5. 1.25uM 6. 625nM 7. 312.5nM 8. 156nM 9. 78nM 10. 0nM

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

myricetin 濃度：16 uM

核甘酸 ADP 濃度：166 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖六十六：以電泳遲滯法分析 myricetin 影響 SaPriA 與 ADP
單股 DNA 結合。

20uM SaPriA 166uM ADP 16uM Galangin										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										1. 20uM 2. 10uM 3. 5uM 4. 2.5uM 5. 1.25uM 6. 625nM 7. 312.5nM 8. 156nM 9. 78nM 10. 0nM
										-ss

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

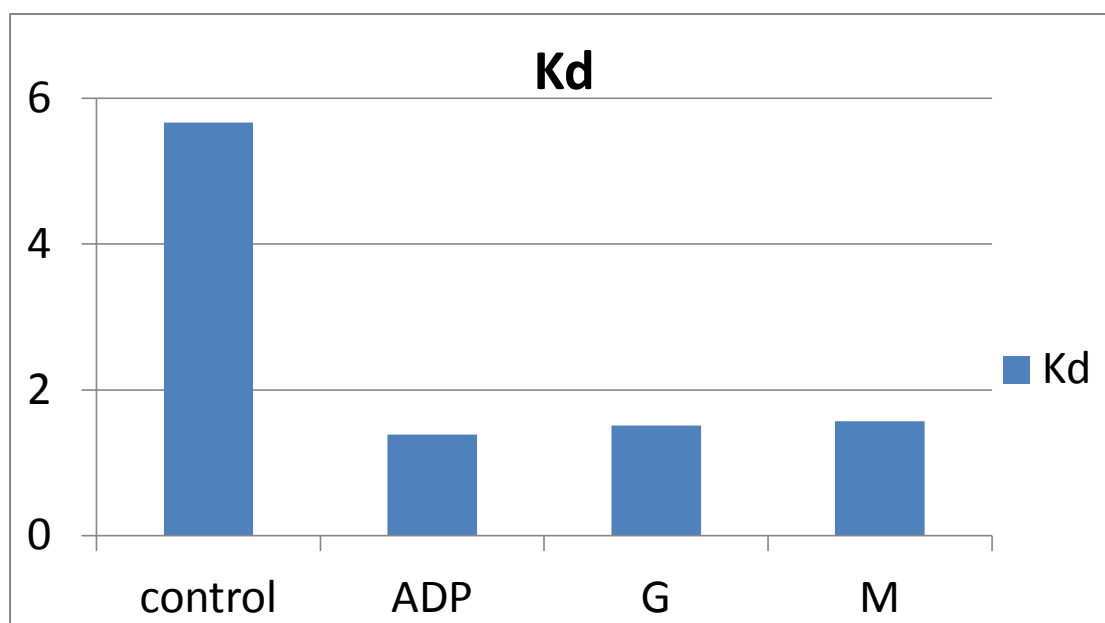
galangin 濃度：16 uM

核甘酸 ADP 濃度：166 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖六十七：以電泳遲滯法分析 galangin 影響 SaPriA 與 ADP
單股 DNA 結合。



圖六十八：將其定量結果進行做圖，Y 軸為 ADP 以及外加兩種類黃酮，X 軸為 K_d 常數。以下為 control、ADP 和外加兩種類黃酮之 K_d 常數：

	Kd (uM)
(control)	5.669348
ADP	1.389055
ADP+Galangin	1.51281
ADP+Myricetin	1.566241

20uM SaPriA control										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-SS

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸 ADP 濃度：0 uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖六十九： 以電泳遲滯法分析 SaPriA 與單股 DNA 結合時，是否受到 ADP 影響。此為不加 ADP 之對照組。

20uM SaPriA ADP 16.66mM										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										1. 20uM
										2. 10uM
										3. 5uM
										4. 2.5uM
										5. 1.25uM
										6. 625nM
										7. 312.5nM
										8. 156nM
										9. 78nM
-ss	10. 0nM									

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸 ADP 濃度：16.6 mM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖七十：以電泳遲滯法分析 ADP 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。

20uM SaPriA ADP 1.666mM										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-SS

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸 ADP 濃度：1.66 mM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖七十一：以電泳遲滯法分析 ADP 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。

20uM SaPriA ADP 833uM										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss

SaPriA 濃度：20uM

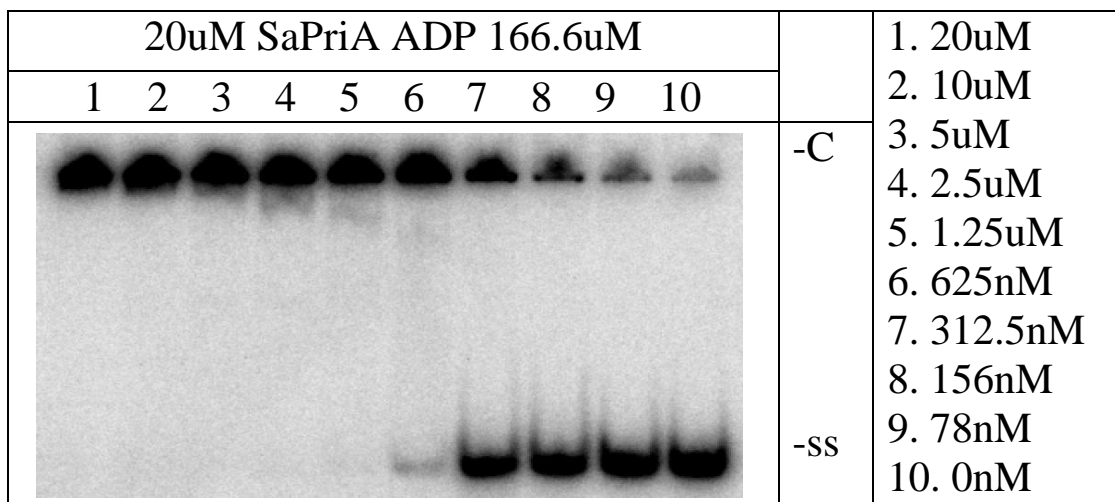
20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸 ADP 濃度：833uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖七十二：以電泳遲滯法分析 ADP 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。



SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸 ADP 濃度：166.6uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖七十三：以電泳遲滯法分析 ADP 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。

20uM SaPriA ADP 83.33uM										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss

SaPriA 濃度：20uM

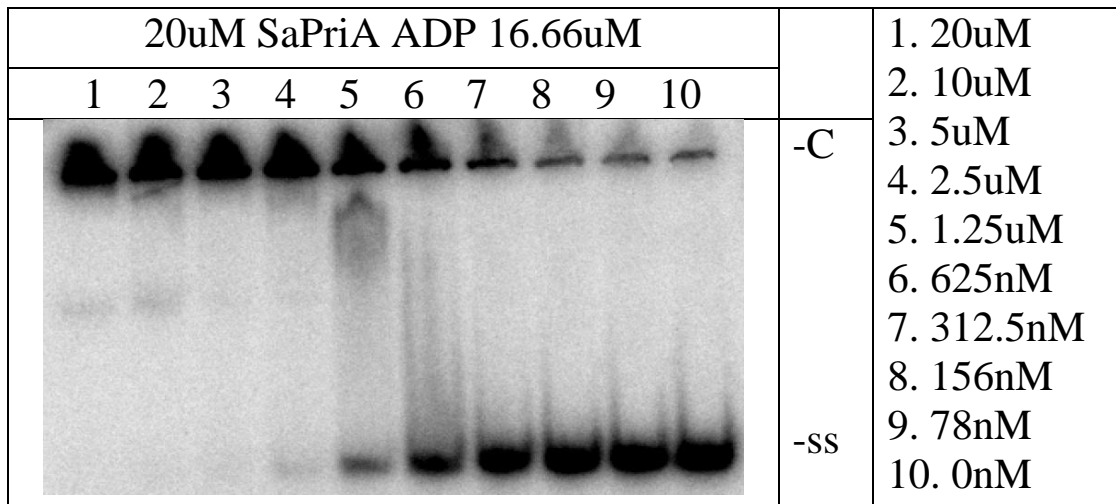
20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸 ADP 濃度：83.33uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖七十四：以電泳遲滯法分析 ADP 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。



SaPriA 濃度：20uM

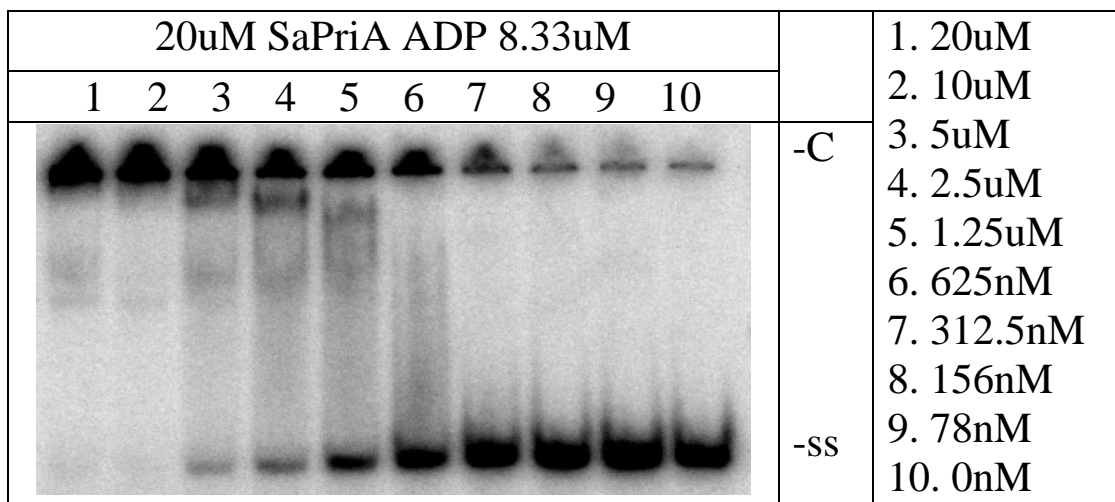
20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸 ADP 濃度：16.66uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖七十五：以電泳遲滯法分析 ADP 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。



SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸 ADP 濃度：8.33uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖七十六：以電泳遲滯法分析 ADP 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。

20uM SaPriA ADP 1.66uM										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss

SaPriA 濃度：20uM

20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸 ADP 濃度：1.66uM

dT₄₀：1.6nM

室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖七十七：以電泳遲滯法分析 ADP 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。

20uM SaPriA ADP 0.166uM										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
										-C
										-ss

SaPriA 濃度：20uM

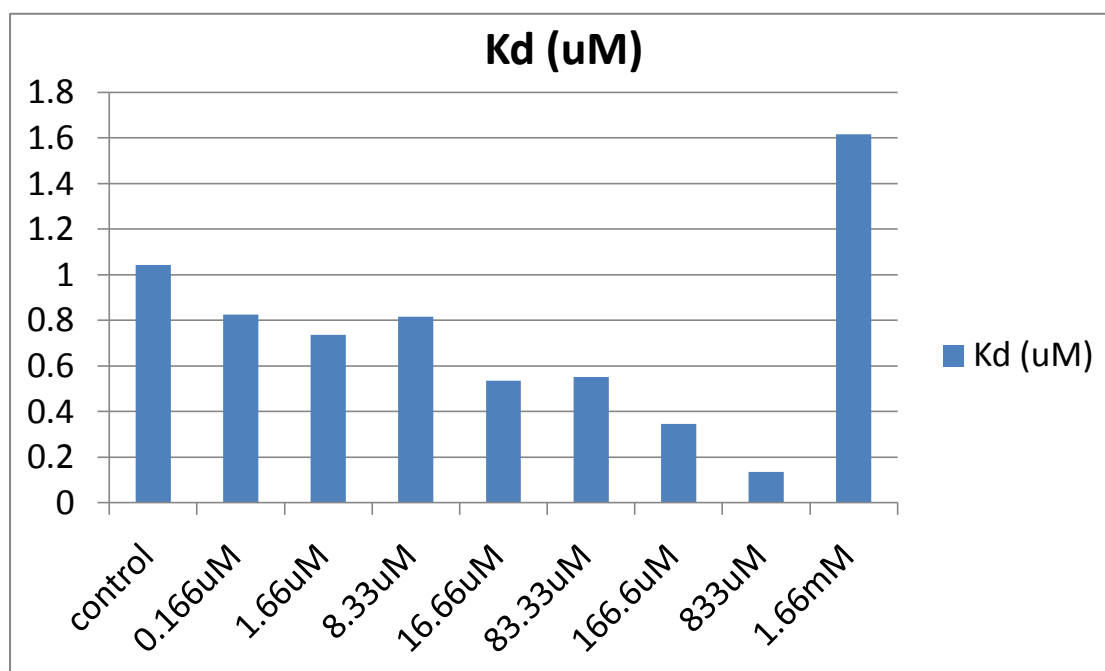
20uM、10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、625nM、312.5nM、156nM、78nM、
0uM

核苷酸 ADP 濃度：0.166uM

dT₄₀：1.6nM

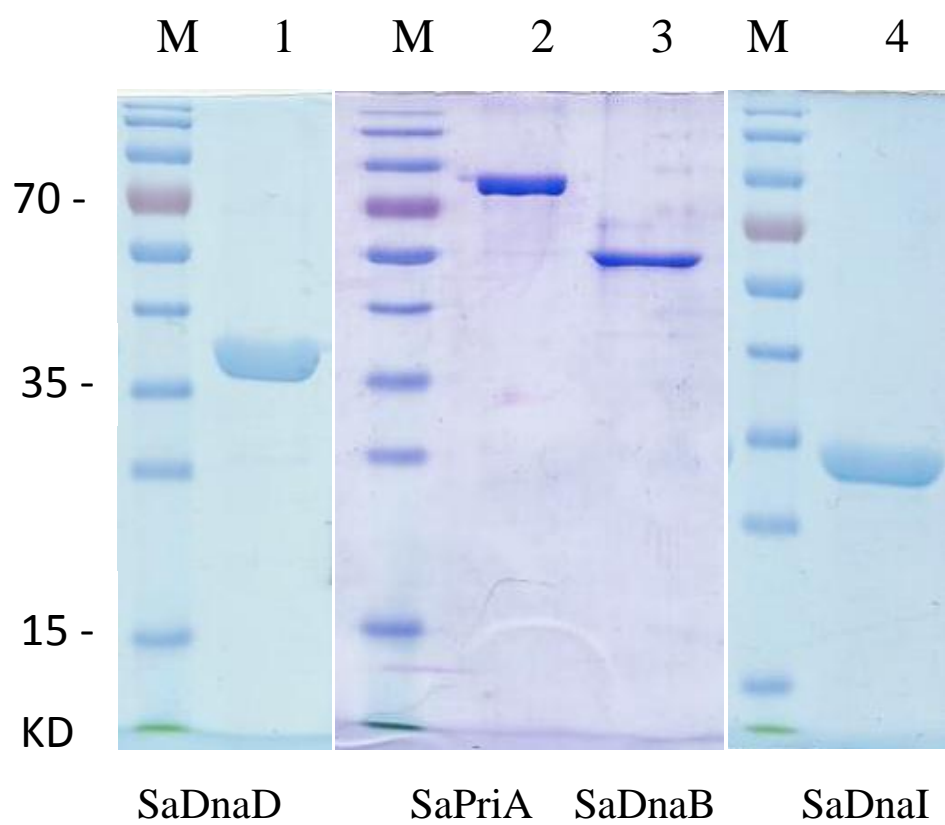
室溫反應 1 小時，後跑膠 110V，40 分鐘

圖七十八：以電泳遲滯法分析 ADP 影響 SaPriA 與單股 DNA 結合。



圖七十九：將其定量結果進行做圖，X 軸為不同濃度的 ADP，Y 軸為 K_d 常數。以下為三種核苷酸之 K_d 常數：

ADP	K_d (uM)
control	1.043382
0.166uM	0.826351
1.66uM	0.736949
8.33uM	0.816141
16.66uM	0.535375
83.33uM	0.550662
166.6uM	0.346097
833uM	0.13662
1.66mM	1.616057
16.66mM	15.58627



M : Marker

KD : 分子量大小

附一：為金黃色葡萄球菌 DnaD、PriA、DnaB、DnaI 之 SDS-PAGE。