

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫 : 沙門氏菌的引子合成體組裝-PriA 與 PriB 間的交互作用 *
* 名 稱 : 用 *
* *****

執行計畫學生： 林宜加
學生計畫編號： NSC 99-2815-C-040-014-B
研究期間： 99年07月01日至100年02月28日止，計8個月
指導教授： 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 100年04月07日

行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

計畫名稱：沙門氏菌的引子合成體組裝- PriA 與 PriB 間的交互作用

執行計畫名稱：林宜加

學生計畫編號：NSC99-2815-C-040-014-B

研究時間：自 99/07/01 至 100/02/28 止，計 8 個月

指導教授：黃晟洋

摘要

沙門氏菌 (*Salmonella*) 屬腸桿菌科，革蘭氏陰性腸道桿菌，是可以引起傷寒的一種常見重要致病菌。為有效對抗該菌的感染威脅，本計劃欲研究其引子合成體蛋白質群 (primosomal proteins) 組裝過程之中，PriA 解旋酶如何辨認不同的 DNA 受質結構並進而有序組合引子合成體，以作為新型抗生素的研發基礎之一。引子合成體是一個核酸與蛋白質群的複合體 (DNA-protein complex)，包含了 SSB、PriA、PriB、PriC、DnaB、DnaC、DnaG、DnaT 等八個相關蛋白質，其功能是在 DNA 複製叉 (replication forks) 上聚集並組裝，以重新啟動 DNA 複製。我們首先利用基因選殖與蛋白質純化技術來得到 PriA 與 PriB 重組蛋白質，接著將利用電泳遲滯法與膠體過濾法來分析沙門氏菌 PriA 與 PriB 間的交互作用或 PriA 與不同結構的 DNA 結合性質，並可進一步對 PriB 利用「雙定點突變」的方式找出最關鍵性的結合區域為何。目前我已初步利用聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 增幅出 PriA 與 PriB 基因、選殖入 pET21 表現載體上與完成大量表現，並且業已經由層析方法純化出量大且質純的 PriA 與 PriB 蛋白質。初步以電泳遲滯法來分析 PriB 具有單股 DNA (dT30) 結合能力。後續的研究將持續利用「雙定點突變」與不同 DNA 受質來分析 PriA 如何辨識不同受質 DNA 結構並結合 PriB 以持續組裝引子合成體下去。本計劃執行結

果預期將可解答 PriA 與 PriB 是否可作為標靶來進行下一步抗生素研發工作。

材料和方法

壹、 聚合酶鏈鎖反應

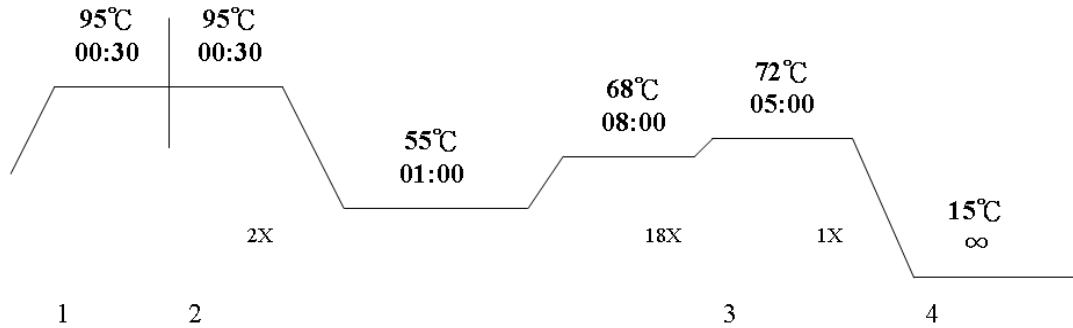
我們設計含有 Nde I 與 Xho I 限制切點的引子，以 DNA 為模板，加入 0.2ml 的微量離心管中，之後分別加入 10X 的 PCR 反應緩衝溶液 5 μ l、一對 10mM 的引子各 1 μ l、10 mM dNTP 1 μ l、Pfu Turbo polymerase 1 μ l，以及無菌水，使最後反應體積為 100 μ l。如表一所示依序加入上述成分。

	Final Concentration	Quantity for 50 μ l of reaction mixture
ddH ₂ O		variable
10X buffer	1X	5 μ l
dNTP	10 mM	1 μ l
primer1	10 mM	1 μ l
primer2	10 mM	1 μ l
plasmid	100 ng/ μ l	variable
Pfu Turbo polymerase		1 μ l

表一

將此微量離心管放置於 Bio-Rad My Cyclor Thermal cyclor PCR machine 進行反應。PCR 反應溫度梯度為 95 $^{\circ}$ C 加熱 30 秒，95 $^{\circ}$ C 加熱 30 秒、55 $^{\circ}$ C 加熱 1 分鐘以及 68 $^{\circ}$ C 8 分鐘的 35 次熱循環反應，72 $^{\circ}$ C 5

分鐘。如表二所示。



表二

待反應結束後，取出 PCR 產物，利用瓊脂凝膠電泳來分析產物。

表三 為使用之 primer 序列

S.ty PriBb T2A, N3A-N	GATATACATATG GCCGCC CGTCTGGCG
S.ty PriBb T2A, N3A-C	CGCCAGACGGGCGGCCATATGTATATC
S.ty PriBb R4A, L5A-N	CATATGACCAAC GCTGCG GCGTTGTCC
S.ty PriBb R4A, L5A-C	GGACAACGCCGCAGCGTTGGTCATATG
S.ty PriBb L7A, S8A-N	AACCGTCTGGCG GCA CTGGCACCGTG
S.ty PriBb L7A, S8A-C	CACGGTGCCAGCTGCCGCCAGACGGTT
S.ty PriBb G9A, T10A-N	CTGGCGTTGTCC GCA GAAGTGTGCAGG
S.ty PriBb G9A, T10A-C	CCTGCACACTGCTGCGGACAACGCCAG
S.ty PriBb V11A, C12A-N	TTGTCCGGCACCC GCA CTAGGGCCCCC
S.ty PriBb V11A, C12A-C	GGGGGCCCTAGCTGCGGTGCCGGACAA
S.ty PriBb R13A, P15A-N	ACCGTGTGC GCA GCC GCA CTTCGAAAG
S.ty PriBb R13A, P15A-C	CTTTCGAAAGTGCGGCTGCGCACACGGT
S.ty PriBb L16A, R17A-N	TGCAGGGCCCC GCTGCA AAAGGTCAGT
S.ty PriBb L16A, R17A-C	ACTGACCTTTGACGCGGGGCCCTGCA
S.ty PriBb K18A, V19A-N	GCCCCCTTCG GCA CTAGTCCATCA
S.ty PriBb K18A, V19A-C	TGATGGACTAGCTGCTCGAAGGGGGGC
S.ty PriBb S20A, P21A-N	CTTCGAAAGGTC GCTGCA TCAGGAATT
S.ty PriBb S20A, P21A-C	AATTCCTGATGCAGCGACCTTTCGAAG

S.ty PriBb S22A, G23A-N	AAGGTCAGTCCA GCAGCA ATTCCGCAT
S.ty PriBb S22A, G23A-C	ATGCGGAATTGCTGCTGGACTGACCTT
S.ty PriBb I24A, P25A-N	AGTCCATCAGGA GCTGCG CATTGCCAG
S.ty PriBb I24A, P25A-C	CTGGCAATGCGCAGCTCCTGATGGACT
S.ty PriBb H26A, C27A-N	TCAGGAATTCCG GCTGCG CAGTTCGTG
S.ty PriBb H26A, C27A-C	CACGAACTGCGCAGCCGGAATTCCTGA
S.ty PriBb Q28A, F29A-N	ATTCCGCATTGC GCAGCA GTGCTTGAG
S.ty PriBb Q28A, F29A-C	CTCAAGCACTGCTGCGCAATGCGGAAT
S.ty PriBb V30A, L31A-N	CATTGCCAGTTC GCGGCT GAGCATCGT
S.ty PriBb V30A, L31A-C	ACGATGCTCAGCCGCAACTGGCAATG
S.ty PriBb E32A, H33A-N	CAGTTCGTGCTT GCGGCT CGTTCTGTG
S.ty PriBb E32A, H33A-C	CACAGAACGAGCCGCAAGCACGAACTG
S.ty PriBb R34A, S35A-N	GTGCTTGAGCAT GCTGCT GTGCAAGAG
S.ty PriBb R34A, S35A-C	CTCTTGACAGCAGCATGCTCAAGCAC
S.ty PriBb V36A, Q37A-N	GAGCATCGTTCT GCAGCA GAGGAAGCC
S.ty PriBb V36A, Q37A-C	GGCTTCCTCTGCTGCAGAACGATGCTC
S.ty PriBb E38A, E39A-N	CGTTCTGTGCAA GCTGCA GCCGGCTTT
S.ty PriBb E38A, E39A-C	AAAGCCGGCTGCAGCTTGCACAGAACG
S.ty PriBb G41A, F42A-N	CAAGAGGAAGCC GCTGCT CACCGGCAG
S.ty PriBb G41A, F42A-C	CTGCCGGTGAGCAGCGGCTTCCTCTTG
S.ty PriBb H43A, R44A-N	GAAGCCGGCTTT GCAGCT CAGGCGTGG
S.ty PriBb H43A, R44A-C	CCACGCCTGAGCTGCAAAGCCGGCTTC
S.ty PriBb Q45A, W47A-N	TTTACC GGCA GC GCTT GGCCAAATG
S.ty PriBb Q45A, W47A-C	CATTTGGCAAGCCGCTGCCCCGGTGAAA
S.ty PriBb C48A, Q49A-N	CGGCAGGCGTGG GCAGCA ATGCCCGTT
S.ty PriBb C48A, Q49A-C	AACGGGCATTGCTGCCCACGCCTGCCG
S.ty PriBb M50A, P51A-N	GCGTGGTGCCAA GCTGCA GTTATTGTT
S.ty PriBb M50A, P51A-C	AACAATAACTGCAGCTTGGCACACGC
S.ty PriBb V52A, I53A-N	TGCCAAATGCC GCTGCT GTTAGCGGA
S.ty PriBb V52A, I53A-C	TCCGCTAACAGCAGCGGGCATTGGCA
S.ty PriBb V54A, S55A-N	ATGCCCGTTATTGCTGCCGGACACGAA
S.ty PriBb V54A, S55A-C	TTCGTGTCCGGCAGCAATAACGGGCAT
S.ty PriBb G56A, H57A-N	GTTATTGTTAGCGCAGCCGAAAACCAG
S.ty PriBb G56A, H57A-C	CTGGTTTTTCGGCTGCGCTAACAATAAC
S.ty PriBb E58A, N59A-N	GTTAGCGGACACGCAGCTCAGGCCATT
S.ty PriBb E58A, N59A-C	AATGGCCTGAGCTGCGTGTCCGCTAAC
S.ty PriBb Q60A, I62A-N	CACGAAAACGCTGCCGCTACTCACAGT
S.ty PriBb Q60A, I62A-C	ACTGTGAGTAGCGGCAGCGTTTTTCGTG

S.ty PriBb T63A, H64A-N
S.ty PriBb T63A, H64A-C
S.ty PriBb S65A, I66A-N
S.ty PriBb S65A, I66A-C
S.ty PriBb T67A, V68A-N
S.ty PriBb T67A, V68A-C
S.ty PriBb G69A, S70A-N
S.ty PriBb G69A, S70A-C
S.ty PriBb R71A, I72A-N
S.ty PriBb R71A, I72A-C
S.ty PriBb T73A, V74A-N
S.ty PriBb T73A, V74A-C
S.ty PriBb Q75A, G76A-N
S.ty PriBb Q75A, G76A-C
S.ty PriBb F77A, I78A-N
S.ty PriBb F77A, I78A-C
S.ty PriBb S79A, C80A-N
S.ty PriBb S79A, C80A-C
S.ty PriBb H81A, K82A-N
S.ty PriBb H81A, K82A-C
S.ty PriBb K84A, N85A-N
S.ty PriBb K84A, N85A-C
S.ty PriBb G86A, L87A-N
S.ty PriBb G86A, L87A-C
S.ty PriBb S88A, K89A-N
S.ty PriBb S88A, K89A-C
S.ty PriBb M90A, V91A-N
S.ty PriBb M90A, V91A-C
S.ty PriBb L92A, H93A-N
S.ty PriBb L92A, H93A-C
S.ty PriBb E95A, Q96A-N
S.ty PriBb E95A, Q96A-C
S.ty PriBb I97A, E98A-N
S.ty PriBb I97A, E98A-C
S.ty PriBb L99A, I100A-N
S.ty PriBb L99A, I100A-C
S.ty PriBb D101A, S102A-N
S.ty PriBb D101A, S102A-C

AACCAGGCCATTGCTGCCAGTATAACG
CGTTATACTGGCAGCAATGGCCTGGTT
GCCATTACTCACGCTGCAACGGTCCGGC
GCCGACCCTGTCAGCGTGAGTAATGGC
ACTCACAGTATAGCTGCAGGCAGCCGC
GCGGCTGCCTGCAGCTATACTGTGAGT
AGTATAACGGTCGCAGCTCGCATAACC
GGTTATGCGAGCTGCGACCGTTATACT
ACGGTCGGCAGCGCTGCAACCGTTCAG
CTGAACGGTTGTCAGCGCTGCCGACCGT
GGCAGCCGCATAGCTGCTCAGGGGTTT
AAACCCCTGAGCAGCTATGCGGCTGCC
CGCATAACCGTTGCGGCGTTTATTCT
AGAAATAAACGCCGAACGGTTATGCG
ACCGTTCAGGGGCTGCTTCTTGCCAC
GTGGCAAGAAGCAGCCCCCTGAACGGT
CAGGGGTTTATTGCTGCCACAAGGCA
TGCCCTGTGGGCAGCAATAAACCCCTG
TTTATTTCTTGCGCCGCAAGAAAGAAC
GTTCTTTGCCGCGCGCAAGAAATAAA
TGCCACAAGGCACTGCAAGGTCTGAGC
GCTCAGACCTGCAGCTGCCTTGTGGCA
AAGGCAAAGAAGCTGCGAGCAAAATG
CATTTTGCTCGCAGCGTTCTTTGCCTT
AAGAACGGTCTGCGCCCAATGGTTCTG
CAGAACCATTGCGGCCAGACCGTTCTT
GGTCTGAGCAAACTGCTCATGCC
GGCATGCAGAGCAGCTTTGCTCAGACC
AGCAAAATGGTTGCTGCGGAGCAG
CTGCTCGGCAGCTGCAACCATTTTGCT
GTTCTGCATGCCCGCGGATTGAATTG
CAATTCAATCGCCGCGGCATGCAGAAC
CATGCCGAGCAGCTGCAATTGATAGAT
ATCTATCAATGCAGCCTGCTCGGCATG
GAGCAGATTGAACTGCGGCAATTCTGGA
TCCAGAATCTGCCGCTTCAATCTGCTC
ATTGAATTGATACTGCTGGAGACCTC
GAGGTCTCCAGCAGCTATCAATTCAAT

S.ty PriBb G103A, D104A-N

TTGATAGATTCTGCAGCCCTCGAGCAC

S.ty PriBb G103A, D104A-C

GTGCTCGAGGGCTGCAGAATCTATCAA

貳、 DNA 的酵素處理(enzyme digestion)

依序加入適量的 DNA、10X enzyme cutting buffer 和 enzyme，如下表所示，並置入 Dry Bath Incubator (溫度設置為 37°C)，4~6 小時。

PCR product	39.4	單位：μl
10X buffer	4.6	
Dpn I	2	
Total : 46 37°C , 4~6hr		

參、 質體的小量製備 (small-scale preparation)

實驗室用的是 BioLabs 公司的 GeneKlean Plasmid Miniprep Kit (Product Code:21003)，使用步驟如下：

- A. 將經 colony PCR 檢視重組基因成功的單一菌落，接種於 4 ml 含適當抗生素的 LB 培養基，37°C，培養 12~16 小時，隔天取出菌液。
- B. 在微量離心管置入 1420μl 菌液，以 13000 rpm 離心 1 min，離心完倒掉上清液，此步驟重複兩次。
- C. 加入 250μl 的 Solution I，刷至溶解，以微量離心機將管壁液體

離下來。

- D. 加入 250 μ l 的 Solution II，翻轉微量離心管 8~10 次，使之均勻混合，以微量離心機將管壁液體離下來。
- E. 加入 250 μ l 的 Solution III，利用 pipetman mix 液體 3~4 次，以 13000 rpm 離心 4.5 min。
- F. 離完取上清液至 column，以 13000 rpm 離心 1 min，倒掉廢液。
- G. 加入 500 μ l 的 Wash Solution，以 13000 rpm 離心 0.5 min，倒掉廢液，此步驟重複一次，再離心 0.5 min 一次，排除殘留的 Wash Solution。
- H. 將 column 移入新的微量離心管，在 column 中心加入 50 μ l 的 Elution Buffer，以 13000 rpm 離心 2 min。

肆、DNA 電泳分析

- A. 取 1x TAE buffer，配置 1% agarose gel (2% 分析 0.1~2kb DNA，0.8% 分析 0.5~10kb DNA)。
- B. 將 agarose 溶液配好後，用微波爐加熱至沸騰，使 agarose 完全溶解，等溶液溫度降至約 60 $^{\circ}$ C 時，鑄膠。
- C. 將做好的膠體放入充滿 1x TAE buffer 的電泳槽中，並將 PCR 產物 5 μ l 與 6X loading dye 1 μ l 互相混合後，注入膠體內。

- D. 以電壓 100 V 來進行電泳約 35 分鐘。
- E. 跑完電泳後，將膠體浸泡於 0.01% ethidium bromide 溶液中染色 20~40 分鐘，在 Ultraviolet transilluminator 上照射以得到電泳圖照片。

伍、細胞轉形(transformation)

- A. 將勝任細胞 BL21、質體 pET21b-DnaC 從冰箱拿出後，置於冰上解凍約 3 分鐘。
- B. 抽 0.5 μ l 的質體 DnaC 放入 BL21 中，置於冰上 30 分鐘。
- C. Heatshock 熱休克 42 $^{\circ}$ C 2 分鐘，熱脹可能使細胞壁不穩定而張開，讓質體進入。
- D. 放回冰上 3 分鐘，冷縮可能使細胞壁關閉。
- E. 加入 LB 500~1000 μ l，置於震盪培養 1 小時(視溫度而改變時間、轉速 125 ras)。
- F. 菌液呈混濁狀即可離心 1.5 分鐘 (5500~7000rpm)，pellet 沈澱，抽去上清液，但不要全部抽掉，剩餘一些以利 mix。
- G. 溶 pellet mix (吸放吸放)，即完成欲塗盤的菌液。
- H. 塗盤：
地點：無菌操作台。

用具：酒精燈、培養皿、塗盤棒(放入酒精浸泡加蓋)、Tip、Pipetman、手套(註：所有器材均需消毒再置入操作台)。先開紫外光燈殺菌約10分鐘，開抽氣開關，即可開始操作。

步驟：(1) 先點燃酒精燈。

(2) 抽菌液 100 μ l 置入培養皿中，蓋起來均勻搖晃。

(3) 開始塗盤，先將塗盤棒置於酒精燈上烤過消毒

(4) 待其冷卻後塗盤。

I. 拿去 37 $^{\circ}$ C 的培養箱約 16 小時。

J. 隔天去收回並放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱等待下個步驟。

陸、挑菌

A. 地點：無菌操作台。

B. 器材：(1) 酒精燈 (2) Pipetman (3) Tip (4) LB 管 \times 2 (5)

手套 (6) Amp。

C. 將 Amp (濃度 50 mg/ml) 從 -20 $^{\circ}$ C 冰箱取出解凍至液態。

D. 到無菌操作台後，將 4 μ l 的 Amp 加入 LB 管中。

E. 用 Tip (最小的) 將菌沾起。

F. 挑選條件—單獨、完整、大小適中、不要在邊緣。

G. 將整支 Tip 按到 LB 管中，1 支 LB 管養一顆菌。

H. 拿去震盪培養 8 小時 (37°C)。

柒、 Competent cell 製備

A. 製備前日，取-80°C 菌種 1 μ l，培養在 4ml LB 培養液中，置於 37°C Incubator 培養過夜。

B. 分 10 管 LB 培養液 (一管 4ml)，加入 200 μ l 上述菌液，置於 37°C Incubator 培養 4 hr (約)，控制其 O.D₅₉₅ = 0.7 ~ 0.9。

C. 分裝菌液至 1.5 ml microcentrifuge tube，分別離心 1 minutes (14000rpm)，2 ml 菌液濃縮為一管。

D. 把上清液倒掉，用冰 CaCl₂ (0.1M) 1000 μ l 將之混勻，放置冰箱 12-24 hr。

E. 冷凍離心 14000rpm 1 minutes。

F. 把上清液倒掉，加入 50 μ l 冰 CaCl₂ 混勻，冰至-80°C 保存。

捌、 蛋白質表現

大腸桿菌重組蛋白質 (PriB 及其突變株) 的製備

含重組質體的大腸桿菌 BL21 (內含質體 pET21-PriB) 菌落生長於含 100 ug/ml ampicillin 的 LB 培養液。經過 4 小時，取菌液以

1:2000 稀釋倍數加入新的含 100 ug/ml ampicillin 的 LB 培養液，培養於 37°C 的溫箱 12 小時(濁度約 OD_{595nm} = 1.7)後，再加入 1mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 至培養液培養在 37°C 的溫箱約三小時為誘導表現最大量。最後將培養液經離心(11000rpm, 4°C, 10min)，取得細菌沉澱物。將細菌沉澱物溶解在 binding buffer 內，在冰上利用超音波震盪法將大腸桿菌打破，然後在 4°C 以 14000rpm 離心 20min，取上清液，再進行重組蛋白純化。

玖、 製備 His-trap 親和管柱及純化方式

首先用去離子水清洗管柱約 12 分鐘，幫浦的流速定為 2.5ml/min，利用 charge buffer 將連接子-鎳和膠體結合，再用去離子水清洗管柱約 12 分鐘，最後利用 binding buffer (pH7.8)來平衡管柱，此時已置備好 His-trap 親和管柱。將含有大腸桿菌表現的重組蛋白 (*S.tyPriB*) 溶液通過先前置備好的 His-trap 親和管柱，利用不同濃度的 imidazole elution buffer (5mM. 60mM. 80mM. 100mM. 150mM. 200mM. 300mM. 500mM) 把重組蛋白沖提出來，以 SDS-PAGE 鑑定 *S.tyPriB* 在哪個濃度被沖提出來。

壹拾、聚丙醯氨膠體電泳分析重組蛋白 (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)

1. 做膠

(1) 準備材料

- ddH₂O
- 30%Acrylamide/Bis
- 0.5M Tris-HCl(PH=6.8)
- 1.5M Tris-HCl(PH=8.8)
- 10%SDS
- 10%APS
- TEMED

(2) 將電泳玻璃片用ddH₂O、酒精洗乾淨，並用試鏡紙擦拭乾淨

(3) 將洗好的玻璃片放入電泳座中

(4) 於2玻璃縫隙間注滿水，等約5min(要確定裝置是否有放好)

(5) 檢查完畢後將水倒掉

(6) 先做下層膠(Resolving gel 12%)

成分	1片	2片	3片	4片
ddH ₂ O	1.65ml	3.35ml	5.00ml	6.70ml
30% Acrylamide/Bis	2.00ml	4.00ml	6.00ml	8.00ml
1.5M Tris-HCl(PH=8.8)	1.25ml	2.50ml	3.75ml	5.00ml
10%SDS	50μl	100μl	150μl	200μl
10% APS	50μl	100μl	150μl	200μl
TEMED	2.5μl	5μl	7.5μl	10μl

- 依上表比例加各種材料於大離心管中

note: APS, TEMED, Acrylamide/Bis要放在冰內

- 將配好的膠用1000µl micropipet 注入縫隙內至離頂端1/4
- 將剩餘1/4用酒精注滿(要沿縫隙.平均施力)，等約20~30min
- 膠凝固後將酒精倒乾淨

(7) 做上層膠(Stacking gel 4%)

成分	1片	2片	3片	4片
ddH2O	1.50ml	3.00ml	4.50ml	6.00ml
30% Acrylamide/Bis	0.33ml	0.66ml	0.99ml	1.32ml
0.5M Tris-HCl(PH=6.8)	0.63ml	1.26ml	1.89ml	2.50ml
10% SDS	25µl	50µl	75µl	100µl
10% APS	25µl	50µl	75µl	100µl
TEMED	2.5µl	5µl	7.5µl	10µl

- 依上表比例加各種材料於大離心管中(配好的膠要Mix)

※APS, TEMED, Acrylamide/Bis要放在冰內

- 將配好的膠用1000µl micropipet 注入縫隙內，注滿
- 插入電泳梳(不可有氣泡)，待膠凝固，抽出電泳梳(若不立即使用要先用保鮮模包起來拿去冰)

2. Sample的製作

將前述之大腸桿菌重組蛋白20 λ 和non-reducing protein loading buffer 10 λ 混合後，98.5 $^{\circ}$ C加熱10分鐘，再把此sample加進電泳槽中

3. 跑膠

- (1) 將配好之整組電泳玻璃膠體置入電泳槽中
- (2) 倒running buffer於電泳槽內槽
- (3) 將maker、sample依序加入各個well中
- (4) 於內槽將buffer加至蓋過內側玻璃之上緣，外槽加至蓋過導線
- (5) 連接電源(正接正，負接負)
- (6) 先以70V跑到separating gel與stacking gel界面處再改以120V，直到Bromophenol blue染劑跑到膠體下方邊緣為止
- (7) 取出跑完的膠，用staining solution染膠
- (8) 將染完之膠取出，用 destain solution退染
- (9) 封膠

壹拾壹、 蛋白質定量

- A. 加入200 μ l 之Bio- Rad protein Assay Dye Reagent 試劑、800 μ l ddH₂O至比色管中，並以振盪 (Vortex) 混合均勻。

- B. 加入1 μ l 沖提出的重組蛋白質，上下翻轉均勻混合。
- C. 利用分光光度計測定其在595 nm 波長的吸收值。(數值在0.4~0.6 之間為穩定，若不在此範圍，則再加入1 μ l 沖提出的重組蛋白質，直到數值穩定。)
- D. 利用實驗室求出的標準曲線換算出重組蛋白質的濃度。

壹拾貳、 膠體遲滯分析 (Electrophoresis mobility shift assay)

EMSA(Electrophoretic mobility shift assay)是 DNA 與 protein 的結合實驗。通常將純化的蛋白和 ^{32}P 同位素標記的 DNA 探針一同保溫，在非變性的聚丙烯凝膠電泳上，分離複合物和非結合的探針。DNA-複合物或 RNA-複合物會比非結合的探針移動得慢。由於解旋酶可結合單股 DNA，因此可將 DNA 標定同位素後，在加入解旋酶後慢慢少量加入引子合成酶或其片段，並觀察有無交互作用所發生的遲滯現象。若有多個顯色帶出現，則可能有多個結合型態。

1. 6%、8%或10% Native Acrylamide Gel

成分	6%	8%	10%
ddH ₂ O	3.95ml	3.55ml	3.15ml
5X TBE	0.6ml	0.6ml	0.6ml
30% Acrylamide/Bis(29:1)	1.2ml	1.6ml	2ml
Glycerol	0.15ml	0.15ml	0.15ml
TEMED	3 μ l	3 μ l	3 μ l
10% APS	100 μ l	100 μ l	100 μ l

2. Label oligo-ssDNA

10X T4 kinase buffer(NEB)	1
T4 polynucleotide kinase	1
1 μ M shorter ssDNA	1
ddH ₂ O	6.5
γ -P ³² ATP(250 μ Ci/mmol)	0.5
Total Volume	10 μ l

將上述物品加入 eppendorf 試管中，於室溫下反應一天

3. Sample 的製作

(1)將 2 μ l ddH₂O、3 μ l protein、1 μ l dT 依序加入 eppendorf 試管中，

於室溫下反應一小時

註：protein 已事先用 QFF buffer 稀釋成 3.15 μ M, 6.3 μ M, 12.61 μ M, 25.22 μ M。

4. 製作 8 % 的非變性聚丙烯酰胺膠體，待膠體凝固完成後，將樣本進行 loading，進行 110V 跑膠 45 分鐘。跑膠完成後，利用磷光影像分析儀偵測其放射量。

實驗動機

沙門氏菌 (Salmonella) 屬腸桿菌科，革蘭氏陰性腸道桿菌，是可以引起傷寒的一種常見重要致病菌。罹患傷寒會持續性發燒、頭痛不適、相對性心律減慢、脾臟腫大，最後造成小腸出血或穿孔而致死。雖可投以抗生素治療，然目前多數的分離株都為多重抗藥性的菌種，因此嚴重的沙門氏菌抗藥性成為必須盡快解決的問題¹⁻³。過去的研究發現，在革蘭氏陰性菌中負責於重啟複製叉的蛋白質群，稱之為”重啟複製之引子合成體” (replication restart primosome)⁴⁻⁸，包括 PriA, PriB, PriC, DnaT, DnaC, DnaB, DnaG，與 SSB 蛋白質，他們有次序的相互結合在特定 DNA 結構上並啟動 DNA 複製，對細菌的生長扮演重要角色，因此我們想到若是能直接抑制並阻斷 DNA 複製，是否可以作為發展對抗沙門氏菌的一新型有潛力的抗生素藥物。更值得注意的是，

以此構想書所提之 PriA 解旋酶為例，目前已知共超過 1000 種以上的解旋酶，但其功能、活性調控與結構均不相同，尤其在高等生物中均未發現具有 PriA 與 PriB 基因。既然解旋酶在複製上扮演必要角色但其功能與結構又不保留於人類，因此這些蛋白質也許相當適合做為研發抗生素的標靶，因較不易對人類產生副作用。為了要達到這個目標，第一步就是要研究 PriA 與 PriB 是如何參與此引子合成體的組裝，以便了解這些蛋白質是如何的在複製叉上有次序的相互辨識並重新啟動 DNA 的複製。

實驗結果

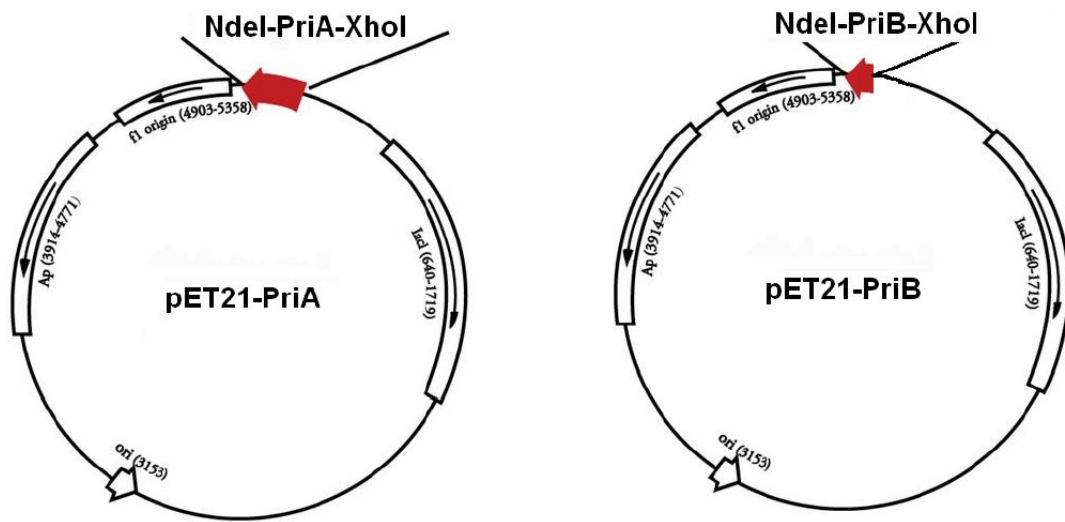
1. 在基因體資料庫中找出沙門氏傷寒桿菌(*Salmonella typhimurium* LT2)的引子合成體的PriA與PriB基因³，接著設計合適的寡核甘酸引子並加上限制酶切點 (NdeI與XhoI)，並利用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase-chain reaction, PCR) 增幅出PriA與PriB基因。電泳的結果發現其與預期的大小相符合(如圖一所示)。
2. 已將沙門氏傷寒桿菌的PriA與PriB基因接上pET21表現載體上，並經基因定序無誤(如圖二所示)。

3. 已大量表達PriA與PriB蛋白質於大腸桿菌(如圖三SDS-PAGE所示)。
4. 已利用親和管柱層析法得到質純的PriA蛋白質(如圖四所示)。
5. 已利用親和管柱層析法得到質純且量大的PriB蛋白質(如圖五所示)。
6. 目前純化後的PriA與PriB蛋白質將送往位於中央研究院的蛋白質結晶篩選中心做進一步的結晶測試。
7. 利用T4 kinase先將單股DNA dT60標定上³²P，再與不同濃度純化後的PriB反應，發現電泳有遲滯的現象，判斷有PriB-dT30有交互作用(如圖六所示)。

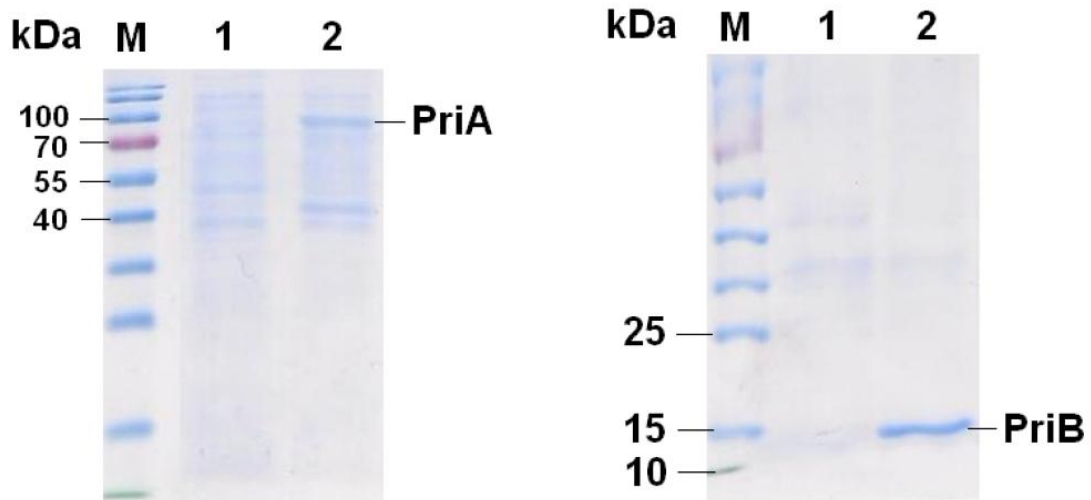
圖表



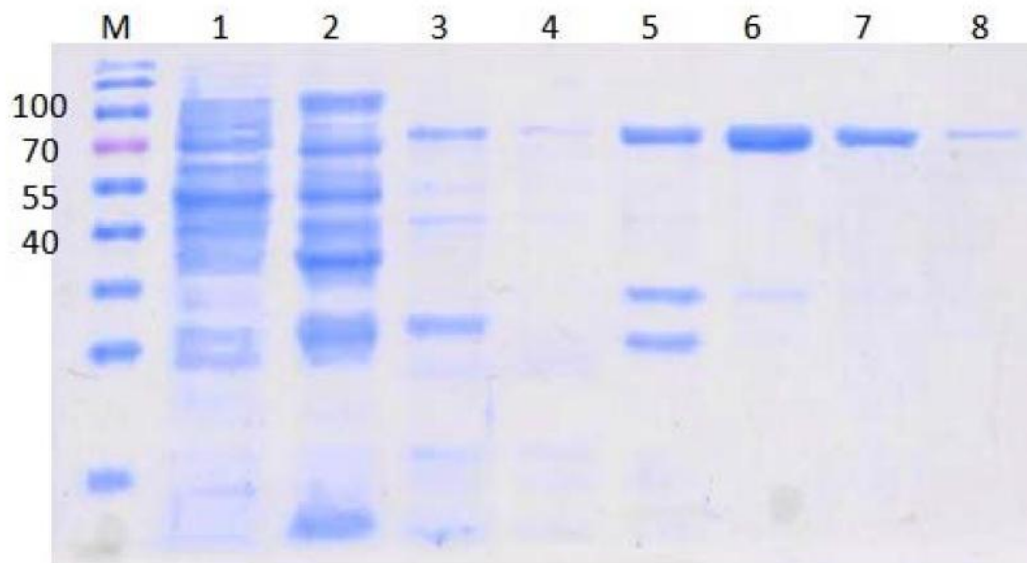
圖一：沙門氏傷寒桿菌的PriA (2199 bp) 與PriB (315 bp) 經由聚合酶鏈鎖反應增幅出。電泳結果顯示PCR產物與預期的大小相符合。



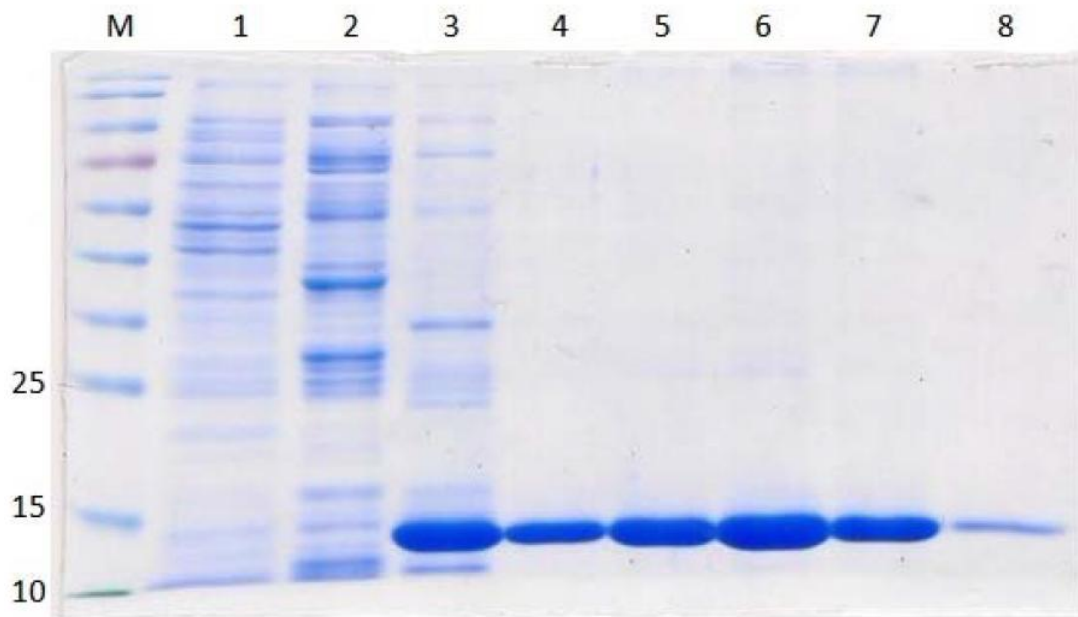
圖二：克雷白氏肺炎桿菌的PriA與PriB已經由酵素接合反應接上表現載體pET21的選殖區中並經定序確認無誤。



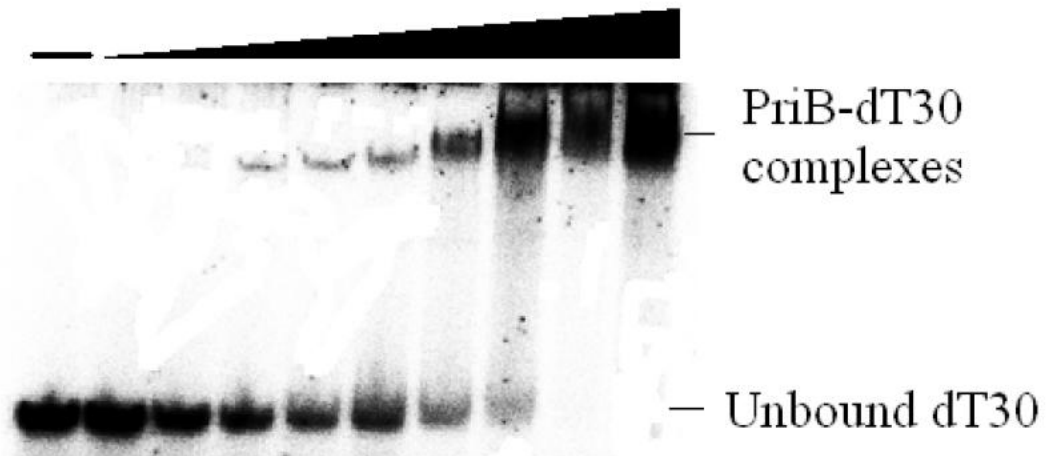
圖三：利用SDS-PAGE 分析蛋白質的表現。M, marker. Lane 1, 未添加誘導劑IPTG 的大腸桿菌 Ecos21 (內含質體 pET21-PriA 或 pET21-PriB)。 Lane 2, 已添加誘導劑IPTG (1 mM) 的大腸桿菌 Ecos21 (內含質體pET21- PriA或pET21-PriB)。由圖可知添加誘導劑均有蛋白質大量表現(PriA約佔總量60%；PriB約佔總量的90%)，然在PriA表現時伴隨另一蛋白質的表現(左圖)。



圖四：利用SDS-PAGE 分析在 PriA 純化過程中蛋白質的純度。此次是使用金屬螯合 Ni^{2+} -NTA 的親和管柱層析法。M, marker。Lane 1, 利用內含有5 mM imidazole 的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液。Lane 2, 60 mM imidazole ; Lane 3, 80 mM imidazole ; Lane 4, 100 mM imidazole ; Lane 5, 150 mM imidazole ; Lane 6, 200 mM imidazole ; Lane 7, 300 mM imidazole ; Lane 8, 500 mM imidazole。在大約150 mM imidazole 緩衝溶液可開始沖滌出目標蛋白質 (lane 5)，但仍有相當多的雜蛋白質。以 200 mM imidazole (含以上；lane 6-8) 的緩衝溶液沖下時，可得到純度高的蛋白質。



圖五：利用SDS-PAGE 分析在 PriB 純化過程中蛋白質的純度。此次是使用金屬螯合 Ni^{2+} -NTA 的親和管柱層析法。M, marker。Lane 1, 利用內含有5 mM imidazole 的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液。Lane 2, 60 mM imidazole ; Lane 3, 80 mM imidazole ; Lane 4, 100 mM imidazole ; Lane 5, 150 mM imidazole ; Lane 6, 200 mM imidazole ; Lane 7, 300 mM imidazole ; Lane 8, 500 mM imidazole。在大約 80 mM imidazole 緩衝溶液可開始沖滌出目標蛋白質 (lane 3)，但仍有相當多的雜蛋白質。以 100 mM imidazole (含以上；lane 4-8) 的緩衝溶液沖下時，可得到純度極高的蛋白質。



圖六：利用單股DNA與純化後不同濃度的PriB初步進行反應。首先將單股DNA dT30利用T4 kinase 額外標定同位素³²P，以便追蹤DNA。如電泳後DNA位置發生偏移，可能有相互作用產生。在加入PriB後多出的色帶，推測有核酸-蛋白質複合體(complexes)產生。其大致的解離常數經計算約在200 nM。

參考文獻

1. Swanson SJ, Snider C, Braden CR, *et al.* (2007) Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with pet rodents. *New England Journal of Medicine* **356** (1): 21–28.
2. Parkhill J *et al.* (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**, 848-52.
3. McClelland M *et al.* (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**, 852-6.
4. Heller, R.C., Marians, K.J. (2006) Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 932-943.
5. Baker, T.A., Bell, S.P. (1998) Polymerases and the replisome: machines within machines. *Cell* **92**, 295-305.
6. McGlynn, P., Lloyd, R.G.. (2002) Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 859-870.
7. Cox, M.M., Goodman, M.F., Kreuzer, K.N., Sherratt, D.J., Sandler, S.J., Marians, K.J. (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**, 37-41.
8. Heller, R.C., Marians, K.J. (2005) The disposition of nascent strands at stalled replication forks dictates the pathway of replisome loading during restart. *Mol. Cell* **17**, 733-743.
9. Huang, C.Y., Hsu, C.H., Sun, Y.J., Wu, H.N., Hsiao, C.D. (2006) Complexed crystal structure of replication restart primosome protein PriB reveals a novel single-stranded DNA-binding mode. *Nucleic Acids Res.* **34**, 3878-3886.

10. Liu, J.H., Chang, T.W., Huang, C.Y., Chen, S.U., Wu, H.N., Chang, M.C., Hsiao, C.D. (2004) Crystal structure of PriB, a primosomal DNA replication protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**, 50465-71.
11. Huang, C.Y., Chang, Y.W., Chen, W.T. (2008) Crystal structure of the N-terminal domain of *Geobacillus kaustophilus* HTA426 DnaD protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **375**, 220-224.
12. Lo, Y.H., Tsai, K.L., Sun, Y.J., Chen, W.T., Huang, C.Y., Hsiao, C.D. (2009) The crystal structure of a replicative hexameric helicase DnaC and its complex with single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 804-814.