

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
* : 解旋酶與引子合成酶間交互作用之研究
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 楊姿筠
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-043-B
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授： 黃晟洋

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 99年03月31日

目錄

摘要.....	1
一、前言.....	2
二、材料和方法.....	4
實驗動機.....	17
實驗結果.....	18
討論.....	22
圖表.....	24
文獻參考.....	44

摘要

細菌DNA的複製需要一個由三種酵素所組成的複製體(replisome)，包括聚合酶(DNA polymerase)、解旋酶(DNA helicase)與引子合成酶(DNA primase)。在原核生物中，解旋酶的結構大約可以分為兩種：一種是六個單套體所組合成的六套體；另一種則是由三個雙套體所組成的六套體結構。為了了解這兩種結構差異性究竟對於原核生物DNA複製機制產生什麼影響，本計劃欲研究由三個雙套體所組成的六套體解旋酶與引子合成酶間的交互作用為何。我們首先選定革蘭氏陽性菌中的耐熱菌*Geobacillus kaustophilus*作為研究標的，並利用聚合酶鏈鎖反應將其解旋酶與引子合成酶的基因增幅出，且選殖入表現載體。目前解旋酶與引子合成酶的重組蛋白質已可在大腸桿菌中大量表現，且解旋酶已利用金屬螯合的親和管柱層析法純化出純度高的蛋白質。接下來的工作將是找出引子合成酶的純化最適化條件、使用各種突變法來得到不同片段的解旋酶與引子合成酶並利用分析蛋白質複合體分子量的方法來探討這兩個酵素間的作用方式。本計劃執行結果將可能解答不同的四級結構的解旋酶是否使用不同於大腸桿菌系統的DNA複製機轉

前言

細菌 DNA 的複製需要相當多的蛋白質有次序的在DNA 上作用，所以需要像由聚合酶(DNA polymerase)、解旋酶(DNA helicase)和引子合成酶(DNA primase)組成的複製體(replisome)幫忙。在此過程中，單套體的引子合成酶會與六套體的解旋酶相互作用，並製造一段短的RNA 片段用來合成「岡崎片段」(Okazaki fragments)，是聚合酶合成DNA 所必需。目前絕大部分已知的DNA 複製機制都是以大腸桿菌作為模型，其中引子合成酶稱為DnaG，含有三個功能區：鋅原子結合區、RNA 轉移酵素功能區與解旋酶DnaB 結合區。至於大腸桿菌的解旋酶稱之為DnaB，是一個多功能的ATP 水解酶，可與多個蛋白質結合，如DnaA、DnaC、DnaG、SSB 與聚合酶等。DnaG和DnaB的週期性循環可以作為引發新的岡崎片段合成和抑制片段合成重要的驅使力。然而在其他的物種如噬菌體T7 卻顯示引子合成酶與解旋酶是同一條多肽鏈而共價鍵相連的。在革蘭氏陽性菌，引子合成酶稱為DnaG 而解旋酶稱為DnaC (非革蘭氏陰性菌系統如大腸桿菌的DnaB)，其中解旋酶的結構最近被發現是兩兩相對的單套體所組成的六套體，與普遍為六個獨立飛鏢狀的四級結構相當不同

解旋酶 (Helicases) 是所有生物體維持生命所必需的一類酵素，

可分為多種類型。這類酵素是能夠依循核酸磷酸雙酯骨架（phosphodiester backbone）的方向性，而往特定方向移動的馬達蛋白（motor protein）。移動過程中可將相連的兩條核酸長鏈（如DNA、RNA或兩者的混合分子）解開，作用時所需能量來自核苷酸水解。解旋酶可以利用三磷酸腺苷（ATP）或三磷酸鳥苷（GTP）水解產生的能量，將DNA雙股螺旋或自我黏合的RNA分子解開。此種酵素會依循其中一股核酸長鏈的方向（3'→5'或5'→3'）而移動

各類型的helicase具有不同的結構和寡聚(oligomerization)性質，例如DnaB與相似的類型，是以環狀排列的六聚體（hexamer）產生作用；而其他類型則可能是單體或二聚體。所有helicase都含有包含核酸的鍵結、水解NTP和NTP依賴水解解開雙股核酸等生化特性。

DNA引子合成酶（primase）是一種RNA聚合酶酵素，由一條多肽鏈組成，MW為60KD，每個細胞中有50-100個分子由大腸桿菌的dnaG基因編碼。引子合成酶催化引物RNA分子的合成，可以與ssDNA模板配對。引子合成酶在DNA複製是重要的，因為DNA聚合酶沒有起始RNA或DNA引子是無法起始DNA的合成，且引子合成酶只在複製起始點處合成RNA引子而引發DNA的複製。在細菌內，引子合成酶與DNA解旋酶結合形成一個叫引子合成體的複合物。DNA解旋酶活

化引子合成酶，使引子合成酶合成約11個核苷酸長的RNA引子，而之後由DNA解旋酶增加新的核苷酸。

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 1 μ l 的 DNA 為模板，加入 0.2ml 的微量離心管中，之後分別加入 10X 的 PCR 反映緩衝溶液 10 μ l、一對 10mM 的引子各 1 μ l、10 mM dNTP 1 μ l、Taq DNA polymerase 1 μ l，以及 85 μ l 的無菌水，最後反應體積為 100 μ l。

將此微量離心管放置於 Bio-Rad My Cycler Thermal cycler PCR machine 進行反應。PCR 反應溫度梯度為 95 $^{\circ}$ C 加熱 3 分鐘，95 $^{\circ}$ C 加熱 30 秒、55 $^{\circ}$ C 加熱 30 秒以及 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘的 35 次熱循環反應，72 $^{\circ}$ C 7 分鐘。反應結束後，取出 PCR 產物，利用瓊脂凝膠電泳來分析產物

貳、 質體的小量製備 (small-scale preparation)

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，用 14000rpm 的轉速離心 1 分鐘，再將上清液去掉，重複 4 次後，加入 250 μ l 的 solution I，回溶 cell pellet 後，室溫下靜置 5 分鐘，然後加入 250 μ l 的 solution II，溫和翻轉數次後，室溫下靜置 5 分鐘，再加入 250 μ l 的 solution III，此時會有白色雲霧狀沈澱產生，利用 13000rpm 離心 15 分鐘；再將上清液取至收集管中，9000rpm 離心 1 分鐘，倒掉置於收集管之廢液後，加入 500 μ l wash buffer 9000rpm 離心 1 分鐘，重複兩步驟。13000rpm 離心 1 分鐘來移除殘留酒精，將收集管移至一個 1.5mL 微量離心管上，在在管柱裡膜的中心處加入 50 μ L 之滅菌二次水，靜置 10 分鐘，之後 13000 rpm 離心 2 分鐘 以沖提 plasmid DNA

參、 DNA 電泳分析

1.取 1x TAE buffer，配置 1% agarose gel(2%分析 0.1~2kb DNA，0.8%分析 0.5~10kb DNA)。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°C 時，鑄膠。

2.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，以電壓 100 V 來進行電泳約 35 分鐘。跑完電泳後，將膠體浸泡於 0.01% ethidium bromide 溶液中染色 15 分鐘，在 Ultraviolet transilluminator 上照射以得到電泳圖照片

肆、 DNA 的酵素處理(enzyme digestion)

在construct方面，insert DNA 利用PCR分離出DNA 片段，且創造5'端和3'端有Nde I 與Xho I的限制酶DNA 序列。而載體 (vector) 則以抽取少量質體的方式獲得DNA。在接合反應 (ligation) 之前，必須要分別將insert DNA 及載體 (vector) 進行以下的限制酶處理：取出少量的 DNA 溶液(insert DNA或載體)，加入適量的限制酵素 (1 μ g DNA/ unit 的限制酵素)及加入0.1X 總體積的酵素反應緩衝液(reaction buffer)，再以去離子水(ddH₂O)補足總體積，然後於37 $^{\circ}$ C 加熱板中反應2 小時;2 小時後，利用PCR purification kit 回收insert DNA並保存於4 $^{\circ}$ C的冰箱中。而經限制酶處理的載體 (vector)，則利用 gel extraction kit 回收DNA 片段

伍、 DNA 的回收(Elution of DNA)

1. Viogene Gel-MTM Gel Extraction System :

將DNA樣品 (insert DNA, plasmid) 依據大小不同，可使用不同濃度的gel來進行膠體電泳分析。在 EtBr 之染色後，將gel 置於紫外燈下，切下欲回的DNA 片段。放入一個1.5 ml的微量離心管，然後依DNA的重量加入等量的GEX buffer；置於60°C加熱板中加熱10分鐘，每隔2~3 分鐘再取出混勻；10分鐘後，將之取出並使之冷卻至室溫，然後將溶液加到置於Gel-MTM Column 上的收集管，以13000rpm 的轉速離心1分鐘，倒掉flow-through，再加入0.5 ml WF buffer，13000 rpm 離心1 分鐘，倒掉flow-through；再加入0.7 ml WS buffer 13000rpm 離心1 分鐘，倒掉flow-through，然後再以13000 rpm離心3 分鐘；然後將收集管移至另一個1.5 ml 的微量離心管上，加入30-50 μ l 的Elution buffer，靜置5 分鐘，然後以13000 rpm 轉速離心3 分鐘，最後利用電泳分析、用於DNA 連接實驗，或保存於4°C冰箱中。

2. PCR 產物純化法(PCR product purification)

將 PCR 產物或是經限制酶處理的反應，與5 倍體積的PX buffer 混合均勻。將混合好的反應物加至 column 內，以12000 rpm 離心約1分鐘。倒掉flow-through後，加入500 μ l WF buffer。以 12000 rpm 離心約1分鐘。倒掉flow-through後，加入700 μ l WS buffer。以12000 rpm 離心約1分鐘。倒掉flow-through後，以12000 rpm 離心15-30秒。然後將收集管移至另一個1.5 ml 的微量離心管上，加入30-50 μ l 的Elution buffer，靜置10分鐘，然後以13000 rpm 轉速離心3 分鐘，最後利用電泳分析

陸、 DNA 黏合實驗(ligation)

將切好的PCR產物與質體黏合。將濃縮的PCR產物6 μ l與質體2 μ l，10x反應體積的ligation buffer，及1 unit T4DNA ligase混勻，置於4 $^{\circ}$ C 反應一天後，作為細胞轉型實驗用。

柒、 細胞轉形(transformation)

從-80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出E. coli competent cell 放置冰上回溶。加入要 transform的plasmid DNA (約1 ng/ μ l) 或接合反應產物 (ligation) 到菌

管內，放置冰上約30分鐘。將離心管放在 42°C 加熱板中約30秒(heat shock)，再放回冰上45秒。將溶液均勻塗抹於含適當抗生素的 LB plate 上。將 plate 放置於37°C 培養箱中約12~16 小時。挑起白色菌落 (colony) 進行篩選，進行colony PCR 檢視是否有DNA insert。

捌、蛋白質表現

大腸桿菌重組蛋白質 (DnaG 和 DnaC) 的製備

含重組質體的大腸桿菌 BL21(內含質體 pET21-DnaG 或 pET21-DnaC)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 OD595nm = 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。將已經純化好的重組蛋白 (GkDnaC) 稀釋 20 倍，並注入 His-trap 親和管柱，當作與 GkDnaG 結合的觸手。將含有大腸桿菌表現的重組蛋白 (GkDnaG) 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 (GkDnaG 結合 GkDnaC) 沖提出來，以 SDS-PAGE 鑑定 GkDnaG 是否與 GkDnaC 結合在一起

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
ddH ₂ O	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	25 μ l	50 μ l	75 μ l	100 μ l
10% APS	25 μ l	50 μ l	75 μ l	100 μ l
TEMED	2.5 μ l	5 μ l	7.5 μ l	10 μ l

•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1000 μ l 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膜包起來拿去冰)

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

1. 將10 μ L 待測試樣，加入990 μ L 之Bio- Rad protein Assay Dye Reagent 試劑中以振盪 (Vortex) 混合均勻。
2. 置於室溫作用10分鐘後，於一個小時內，利用分光光度計測定其在595 nm 波長的吸收值。

3. 以不同濃度 (0、5、10、15、20 mg / mL) 之BSA，加入Bio-Rad 試劑中，測其595 nm 波長之吸光值，即可求出標準曲線，再由標準曲線換算出被測樣本之濃度。

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³²P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 8.5 μ l GkDnaC 或 GkDnaG、0.5 μ l ssDNA(ssDNA，10nM)和

1 μ l H₂O 加入 eppendorf 試管中，於室溫下反應一小時

(2) 將 GK DnaC 4.25 ml、72.2 mM GK DnaG 5 ml、1 mM ADP 0.5 ml 和 10 nM dT60 0.25 ml 加入 eppendorf 試管中，於室溫下反應一小時

4. 製作 6 % 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 30 分鐘，之後以 90V 跑 30-45 分鐘。跑膠完成後，利用 FLA3000(Fujifilm)偵測其螢光量，並將檔案儲存成 TIF 檔。

實驗動機

生物雖具有如此高的多樣性，但DNA 複製機制一般來說差異並不十分巨大，但這些差異性卻造成在各種DNA 複製與調控機轉上產生根本的不同，例如真核生物與原核生物的DNA 複製所需要參與的蛋白質在數量與種類都不相同。今年我們實驗室與合作者所共同解出的革蘭氏陽性菌*Geobacillus kaustophilus* 解旋酶的結構發現，其與一般所認知的四級結構相異：以前普遍的是六個單套體所組合成的六套體；但新發現的則是由三個雙套體所組成的六套體結構。

這使得我產生很大的興趣欲從結構的差異性去重新探討革蘭氏陽性菌的DNA 複製機制是否與革蘭氏陰性菌(如大腸桿菌等)或甚其他生物有何不同，而第一步就是先研究會與解旋酶相結合的引子合成酶。既然解旋酶的四級結構有這麼大的差異，那後續引子合成酶的結合位置與比例到底會不會改變，很直接的疑問就是：幾個引子合成酶結合一個六套體的解旋酶，並啟動幾條單股DNA 的岡崎片段生成是我在本計畫最想研究出的問題。

實驗結果

1. 我們利用革蘭氏陽性菌*Geobacillus kaustophilus* 的引子合成酶與解旋酶的基因設計合適的寡核苷酸引子，並加上限制酶切點 (Nde I 與Xho I)，利用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase-chainreaction, PCR) 增幅出這兩個基因。並將這兩個基因分別接上pET21 表現載體上，並經基因定序無誤(圖一)

2. 添加誘導劑**IPTG** 誘導大腸桿菌大量表現重組蛋白(GkDnaG或GkDnaC)

將PET21e-DnaC 或 PET21e-DnaG轉殖至大腸桿菌，在菌液OD600 為1.6時利用IPTG 誘導，實驗結果顯示：相較於未加IPTG 誘導的，有加IPTG 的在3小時有最大量蛋白表現 (圖二)。

3. 重組蛋白之純化 (GkDnaG或GkDnaC)

大量培養經IPTG 誘導之BL21/PET21e-DnaC或 PET21e-DnaG菌液，利用Ni²⁺ 親和性管柱進行純化，以不同濃度的imidazole 將重組蛋白(GkDnaG或GkDnaC)沖提出來，初步以濃度5-500 mM (5mM. 60mM. 80mM. 100mM. 150mM. 200mM. 300mM. 500mM) 進行實

驗。在大約100 mM 的imidazole 緩衝溶液可開始沖提出GkDnaC，但仍有大量的雜蛋白質。以200 mM imidazole 的緩衝溶液沖下時，可得到純度相當高的蛋白質。收集各fraction，以12% SDS-PAGE 確定重組蛋白含量最高之fraction 是在200 mM (圖三)。

4. 重組蛋白之BSA 定量

所獲得之重組蛋白採用Bradford 方式進行定量，以不同濃度 (0、5、10、15、20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 之BSA，加入Bio-Rad 試劑中，測其595 nm 波長之吸光值，即可求出標準曲線，再由標準曲線換算出重組蛋白之濃度為0.09 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

5.重組蛋白(GkDnaG 或GkDnaC)之EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)分析

(1)為了要研究GkDnaG和GkDnaC是否與ssDNA結合與GkDnaG和GkDnaC是否會結合在一起形成複合物，於是我們利用EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)的實驗特性，來研究GkDnaC分別

與dT6、dT20、dT30、dT40、dT50和dT60作用，在dT6時，沒有形成複合物(圖七)；但dT25與GkDnaC開始結合形成複合物，隨著dT(0 μ M、0.0255 μ M、0.031 μ M、0.038 μ M、0.76 μ M、1.51 μ M、2.28 μ M、3.03 μ M、6.07 μ M、12.14 μ M)濃度越高，形成的複合物也越來越多(圖八)；在dT40中，可以發現有第二個複合物形成(圖十)；隨著寡核苷酸大小的增加，此兩個複合物也越來越多(圖十二)，由此可以知道，每25個寡核苷酸與GkDnaC作用會形成一個複合物

(2)我們研究GkDnaG分別與dT6、dT20、dT30、dT40、dT50和dT60作用，在dT6時，沒有形成複合物(圖十四)；但dT20與GkDnaG開始結合形成複合物，隨著dT(0 μ M、0.059 μ M、0.116 μ M、0.232 μ M、0.47 μ M、0.94 μ M、1.89 μ M、3.76 μ M、7.55 μ M、15.11 μ M)濃度越高，形成的複合物也越來越多(圖八)；在dT50中，可以發現有第二個複合物形成(圖十八)；隨著寡核苷酸大小的增加，此兩個複合物也越來越多(圖十九)，由此可以知道，每20個寡核苷酸與GkDnaG作用會形成一個複合物

(3)由於解旋酶(GkDnaC)可以與單股 DNA結合，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(GkDnaG)或其片段，並觀察有無交互作用所發生的遲滯現象。我們可以發現在固定GK DnaG量後加入不同濃度的GkDnaC(0mM, 0.89mM, 1.78mM, 2.68mM, 3.57mM, 5.36mM, 7.14mM, 10.71mM, 14.28mM)，在10.71mM和14.28mM濃度下可以發現顯色帶有向上移的傾向，代表解旋酶與引子合成酶可能有結合。

討論

我們在基因體資料庫中找出革蘭氏陽性菌 *Geobacillus kaustophilus* 的引子合成酶與解旋酶的基因，接著設計合適的寡核苷酸引子並加上限制酶切點 (Nde I 與 Xho I)，利用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase-chainreaction, PCR) 增幅出這兩個基因，並將這兩個基因分別接上 pET21 表現載體上，並經基因定序得到 pET21-DnaG 或 pET21-DnaC

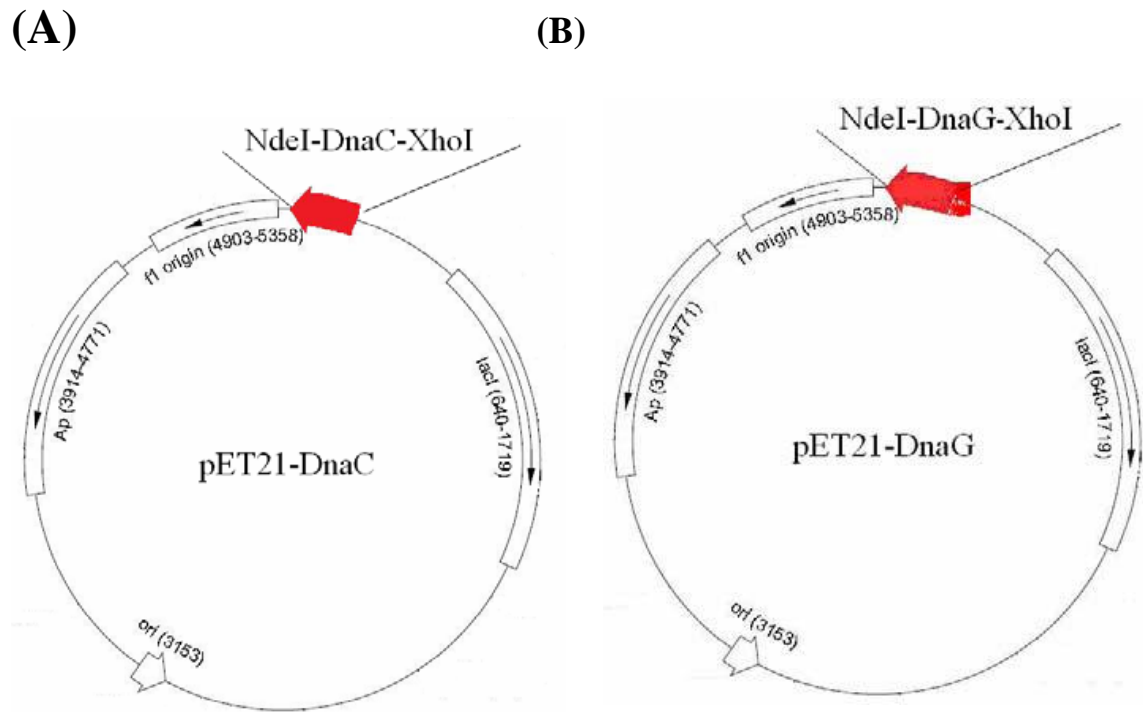
接下來我們為了得到引子合成酶與解旋酶的蛋白質，首先利用含重組質體的大腸桿菌 BL21，大量表達引子合成酶與解旋酶蛋白質，確認有添加誘導劑 IPTG 的大腸桿菌 BL21 (內含蛋白質表現質體) 皆有明顯額外的色帶產生，分別位於 50 KDa 的上方與 70 KDa 的下方 (圖二)，極有可能就是 *Geobacillus kaustophilus* 解旋酶 (DnaC, 56 KDa) 與引子合成酶 (DnaG, 67 KDa) 蛋白質被大量表現。

將解旋酶的蛋白質純化，利用金屬螯合的親和管柱層析法得到純的解旋酶蛋白質 (圖三)，選擇以 200 mM imidazole 的緩衝溶液沖下，可得到純度相當高的解旋酶蛋白質。將已經純化好的解旋酶蛋白質稀釋 20 倍，並注入 His-trap 親和管柱，當作與 GkDnaG 結合的觸手。將含有大腸桿菌表現的重組蛋白 (GkDnaG) 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 把重

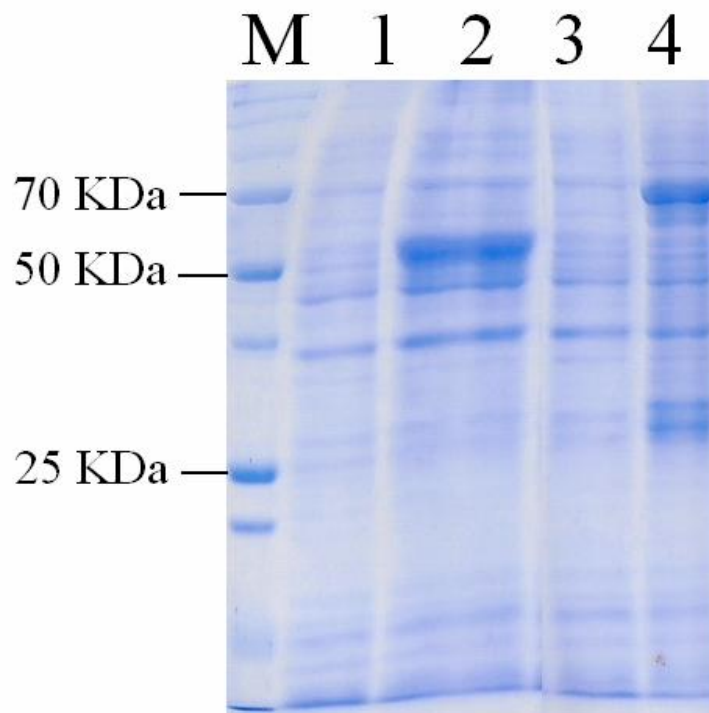
組蛋白 (GkDnaG結合GkDnaC) 沖提出來(圖五)，可以發現在200mM、300mM和500mM 中GkDnaG- GkDnaC複合物有純化出來

利用His-trap親和管柱沖提下來的GkDnaG- GkDnaC複合物與GkDnaG加上GkDnaC利用SDS-PAGE分析(圖六)，可以發現兩者沒有太大的差異。為了更確定GkDnaC和GkDnaG可以形成複合物，我們利用EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)作解旋酶是否結合單股 DNA與引子合成酶是否結合單股 DNA，發現解旋酶與引子合成酶都能與單股DNA形成複合物。因此我們將DNA 標定同位素後，加入解旋酶後慢慢少量加入引子合成酶或其片段，觀察解旋酶與引子合成酶有因互相作用而產生遲滯現象，代表解旋酶與引子合成酶可能有結合。

圖表

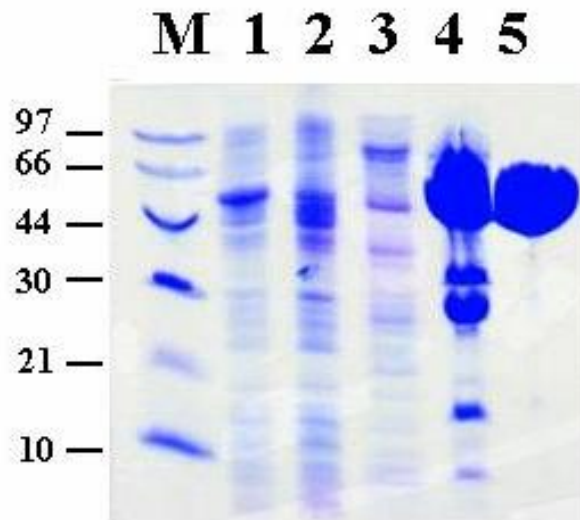


圖一：利用分子生物的技术分别得到具有可表达
Geobacillus kaustophilus 解旋酶(DnaC)与引子合成酶(DnaG)的质
体。



圖二：利用SDS-PAGE 分析蛋白質的表現。

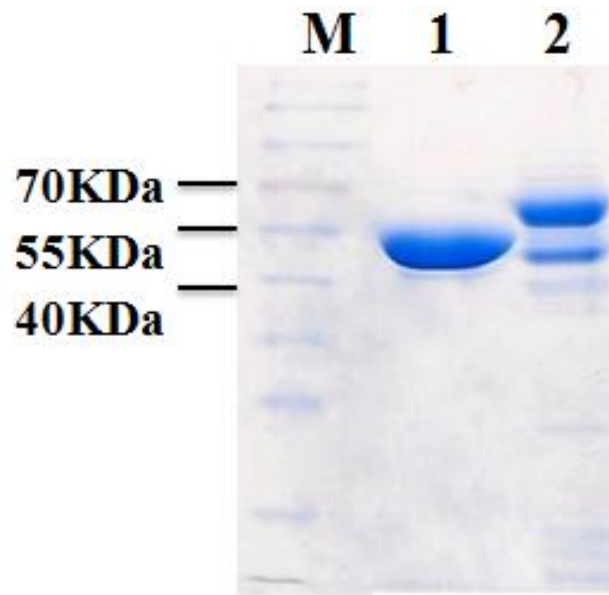
M, marker. Lane 1, 未添加誘導劑IPTG 的大腸桿菌BL21(內含質體 pET21-DnaC). Lane 2, 已添加誘導劑IPTG (1 mM) 的大腸桿菌 BL21(內含質體pET21-DnaC). Lane 3,未添加誘導劑IPTG 的大腸桿菌 BL21(內含質體pET21-DnaG). Lane 4, 已添加誘導劑IPTG (1 mM) 的大腸桿菌BL21(內含質體pET21-DnaG).



圖三：利用SDS-PAGE 分析在解旋酶DnaC 純化過程中，蛋白質的純度

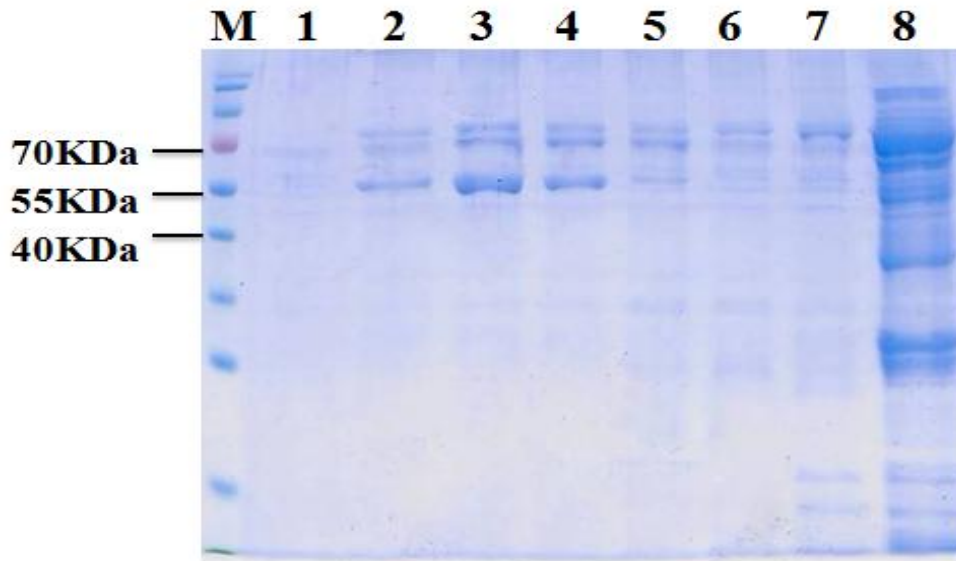
此次是使用金屬螯合的親和管柱層析法。M, marker. Lane 1, 經超音波破碎儀破菌後經離心的上清液，並加以通入管柱。Lane 2, 利用內含有5 mM imidazole 的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液。Lane 3, 利用內含有60mM imidazole 的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液。Lane 4, 利用內含有100mM imidazole 的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液。Lane 5, 利用內含有200mM imidazole 的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液

由上圖的結果可知，解旋酶 DnaC 有相當程度為可溶 (lane 1)，在大約100 mM 的imidazole 緩衝溶液可沖下(lane 4)，但仍有大量的雜蛋白質。以200 mM imidazole 的緩衝溶液沖下時，可得到純度相當高的蛋白質。



圖四：利用 SDS-PAGE 分析 GkDnaC 和 GkDnaG。

M , marker. Lane 1 , GkDnaC. Lane 2 , 為 GkDnaG



圖五：利用SDS-PAGE 分析將在200mM沖提下來的GkDnaC (30ml) 稀釋20倍，通入已經有NiSO₄的column內，而GkDnaG通入已經有GkDnaC結合的column內，將GkDnaG-GkDnaC複合物純化出來的過程中，蛋白質的純度。此次是使用金屬螯合的親和管柱層析法。

M, marker. Lane 1, 利用內含有EDTA的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液。

Lane 2, 利用內含有500mM imidazole 的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液。

Lane 3, 利用內含有300mM imidazole 的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液。

Lane 4, 利用內含有200mM imidazole 的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液。

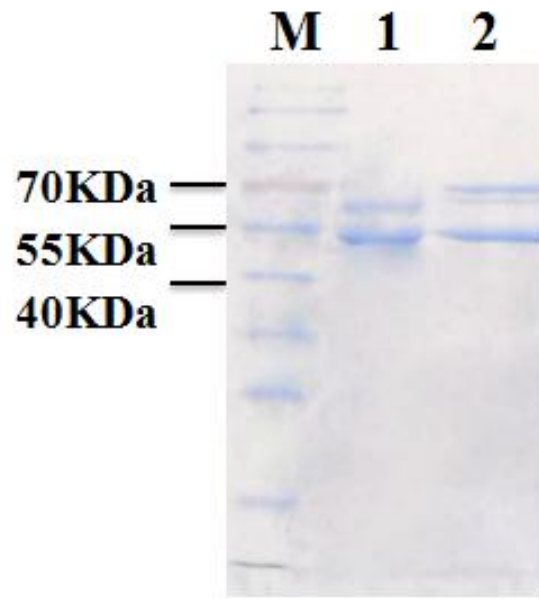
Lane 5, 利用內含有150mM imidazole 的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液。

Lane 6, 利用內含有100mM imidazole 的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液。

Lane 7, 利用內含有80mM imidazole 的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液。

Lane 8, 利用含有60mM imidazole 的緩衝溶液通入管柱沖出的溶液。

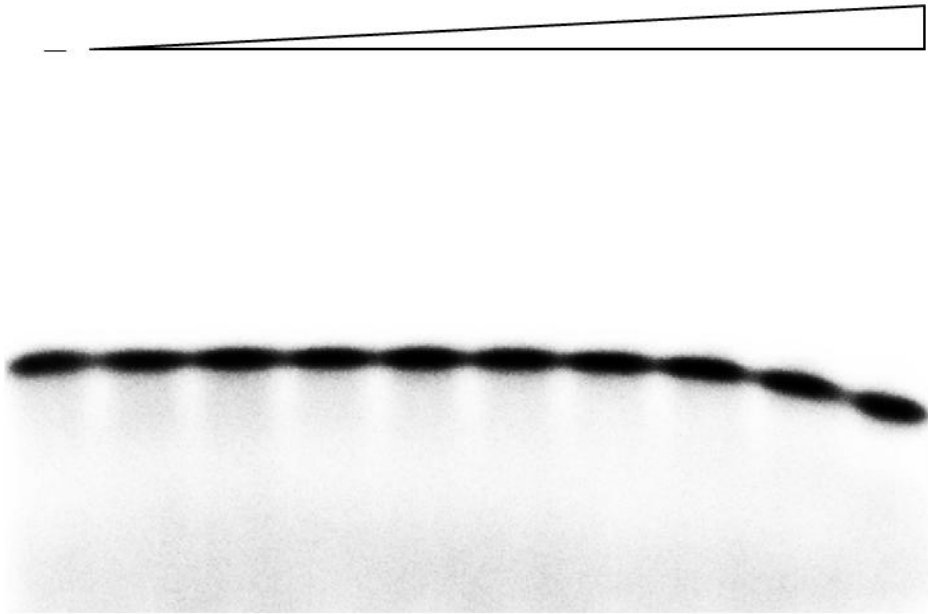
液通入管柱沖出的溶液 28



圖六：利用 SDS-PAGE 分析 GkDnaC 和 GkDnaG 是否可以形成 GkDnaG-GkDnaC 複合物。

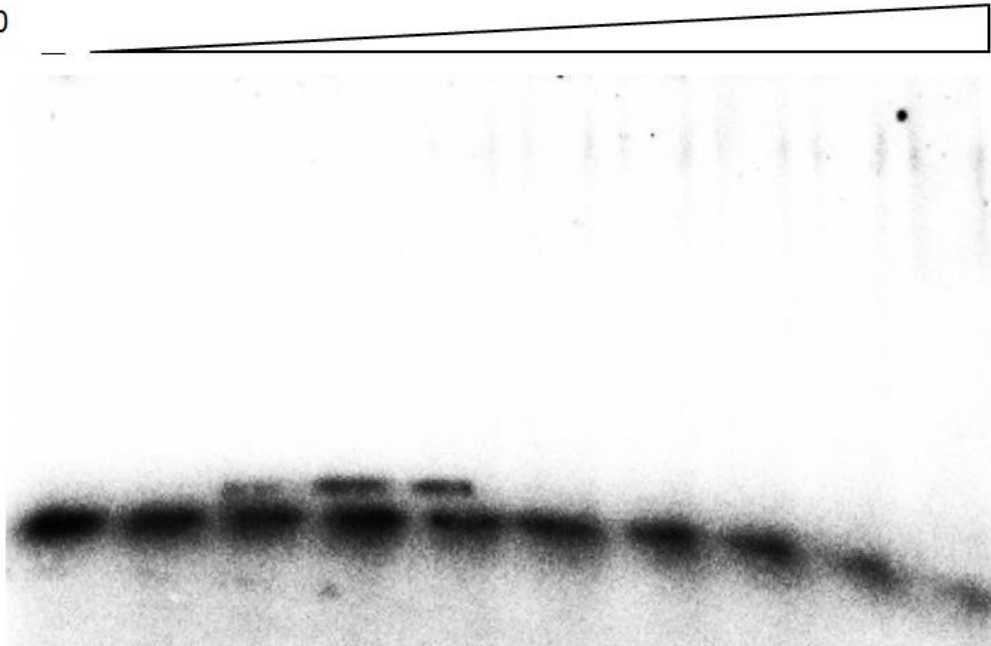
M, marker. Lane 1, GkDnaC 加上 GkDnaG. Lane 2, 為 GkDnaG-GkDnaC 複合物

dT6



圖七：不同的 dT 6 濃度(0 μM 、0.0255 μM 、0.031 μM 、0.038 μM 、0.76 μM 、1.51 μM 、2.28 μM 、3.03 μM 、6.07 μM 、12.14 μM)與 GkdnaC 之 EMSA 分析

dT20

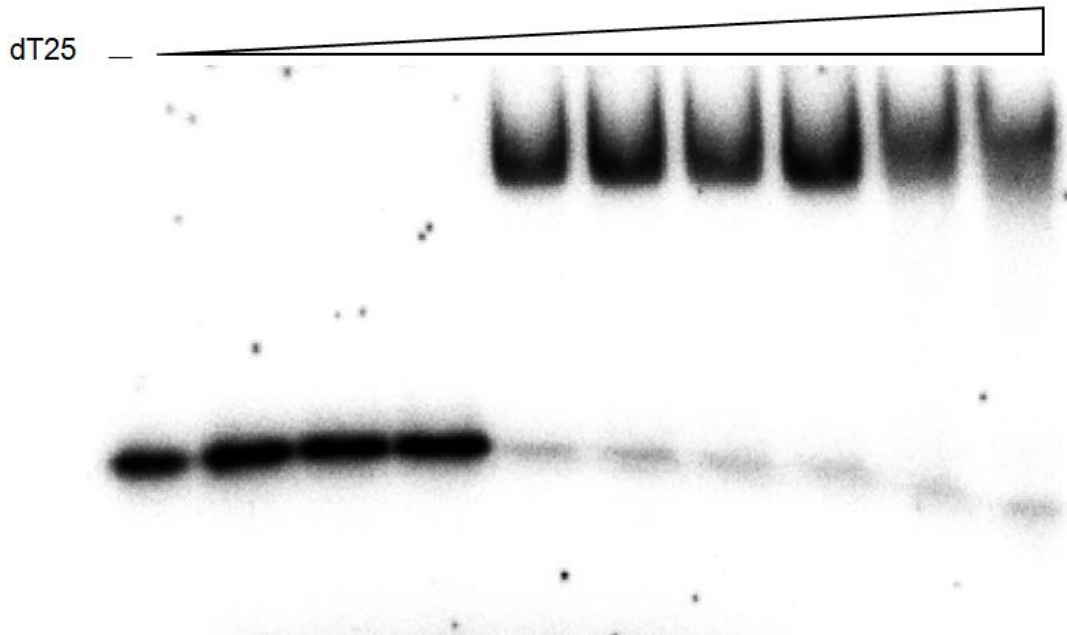


dT20	0 μM	0.0255 μM	0.031 μM	0.038 μM	0.76 μM	1.51 μM	2.28 μM	3.03 μM	6.07 μM	12.14 μM
free	11100	13310	14570	15550	12290	12030	12450	11070	11200	6723
complex					1415	1898	2105	2124	2127	2622
%					10.32%	13.63%	14.46%	16.10%	15.96%	28.06%

圖八：不同的 dT 20 濃度與 GkDnaC 之 EMSA 分析

dT20 濃度為 0.76 μM 、1.51 μM 、2.28 μM 、3.03 μM 、6.07 μM 、

12.14 μM 時，GkDnaC 與 ssDNA 有結合

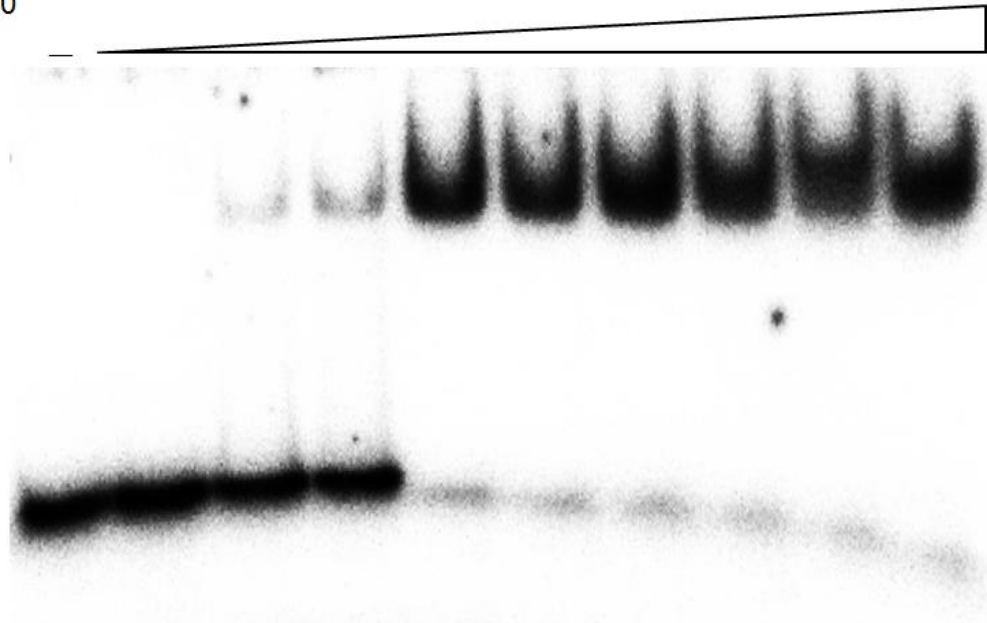


dT25	0 μM	0.0255 μM	0.031 μM	0.038 μM	0.76 μM	1.51 μM	2.28 μM	3.03 μM	6.07 μM	12.14 μM
free	6381	10610	10030	10860	1739	1693	1642	1460	1505	1290
complex	441.3	303.5	403.8	529.3	9918	12060	9766	13760	9570	8924
%	6.47%	2.78%	3.87%	4.65%	85.08%	87.69%	85.61%	90.41%	86.41%	87.37%

圖九：不同的 dT 25 濃度與 GkDnaC 之 EMSA 分析

dT25 濃度為 0 μM 、0.0255 μM 、0.031 μM 、0.038 μM 、0.76 μM 、
1.51 μM 、2.28 μM 、3.03 μM 、6.07 μM 、12.14 μM 時，GkDnaC
與 ssDNA 有結合

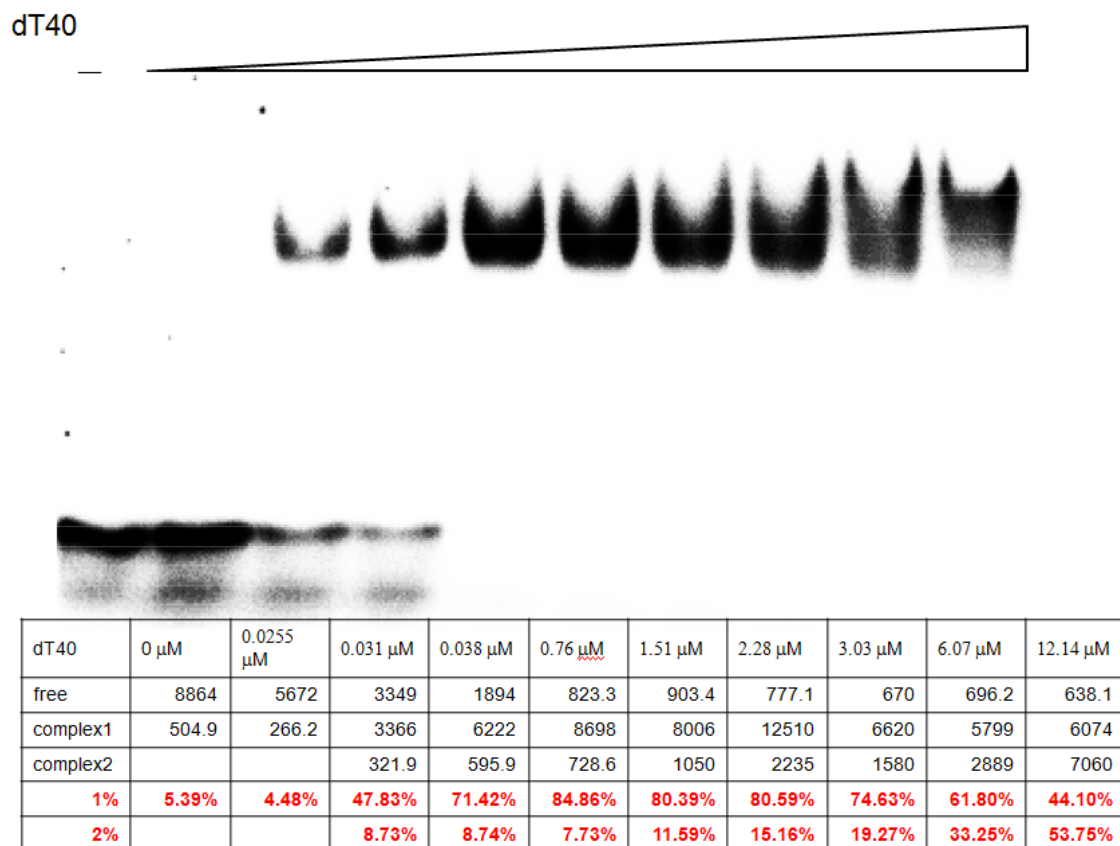
dT30



dT30	0 μM	0.0255 μM	0.031 μM	0.038 μM	0.76 μM	1.51 μM	2.28 μM	3.03 μM	6.07 μM	12.14 μM
free	6012	7284	5601	4991	1239	1133	1165	1030	964.2	630.7
complex	108.7	160.1	920.6	1455	6633	6277	8488	6791	6760	7986
%	1.78%	2.15%	14.12%	22.57%	84.26%	84.71%	87.93%	86.83%	87.52%	92.68%

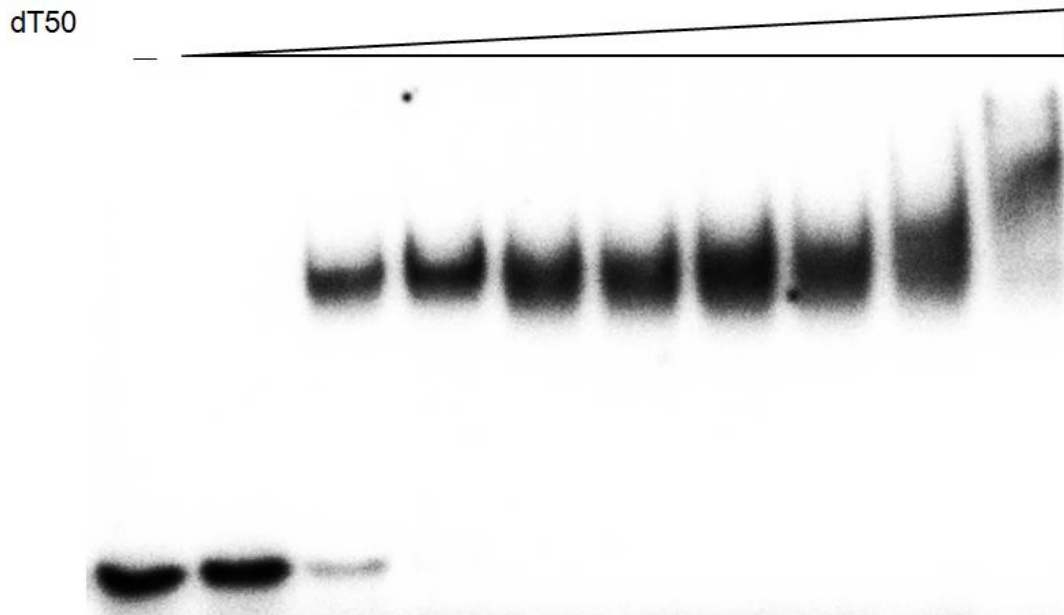
圖十：不同的 dT 30 濃度與 GkDnaC 之 EMSA 分析

dT30 濃度為 0 μM 、0.0255 μM 、0.031 μM 、0.038 μM 、0.76 μM 、
1.51 μM 、2.28 μM 、3.03 μM 、6.07 μM 、12.14 μM 時，GkDnaC
與 ssDNA 有結合產生複合物



圖十一：不同的 dT 6 dT 40 濃度與 GkDnaC 之 EMSA 分析

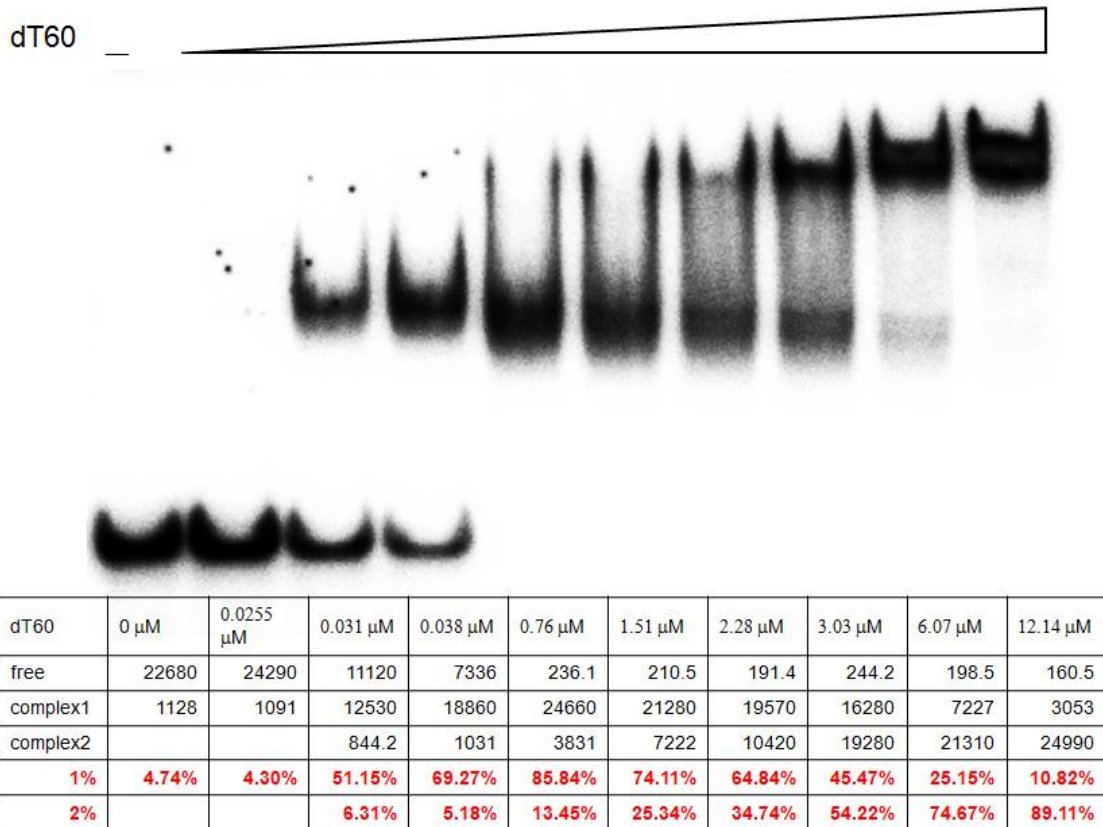
dT40 濃度為 0 μM 、0.0255 μM 、0.031 μM 、0.038 μM 、0.76 μM 、1.51 μM 、2.28 μM 、3.03 μM 、6.07 μM 、12.14 μM 時，產生第一個複合物；在 dT40 濃度為 0.031 μM 、0.038 μM 、0.76 μM 、1.51 μM 、2.28 μM 、3.03 μM 、6.07 μM 、12.14 μM 時，產生第二個複合物



dT50	0 μM	0.0255 μM	0.031 μM	0.038 μM	0.76 μM	1.51 μM	2.28 μM	3.03 μM	6.07 μM	12.14 μM
free	11760	11480	2135	839	454.9	444.7	530	543.2	621.9	449.1
complex1	188	285	6576	9237	10360	10430	13060	10120	7477	2411
complex2			1615	3179	3244	3568	5505	5718	8768	13330
1%	1.57%	2.42%	63.68%	69.69%	73.69%	72.22%	68.39%	61.78%	44.33%	14.89%
2%			19.72%	25.60%	23.85%	25.49%	29.65%	36.10%	53.97%	84.68%

圖十二：不同的 dT 50 濃度與 GkDnaC 之 EMSA 分析

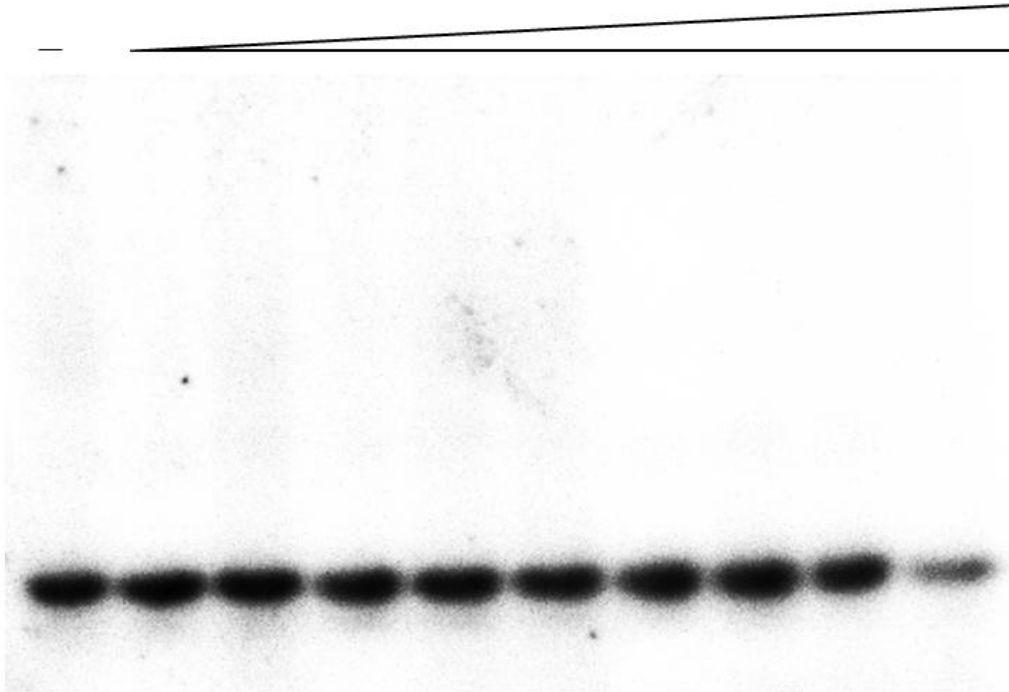
dT50 濃度為 0 μM 、0.0255 μM 、0.031 μM 、0.038 μM 、0.76 μM 、1.51 μM 、2.28 μM 、3.03 μM 、6.07 μM 、12.14 μM 時，產生第一個複合物；在 dT40 濃度為 0.031 μM 、0.038 μM 、0.76 μM 、1.51 μM 、2.28 μM 、3.03 μM 、6.07 μM 、12.14 μM 時，產生第二個複合物



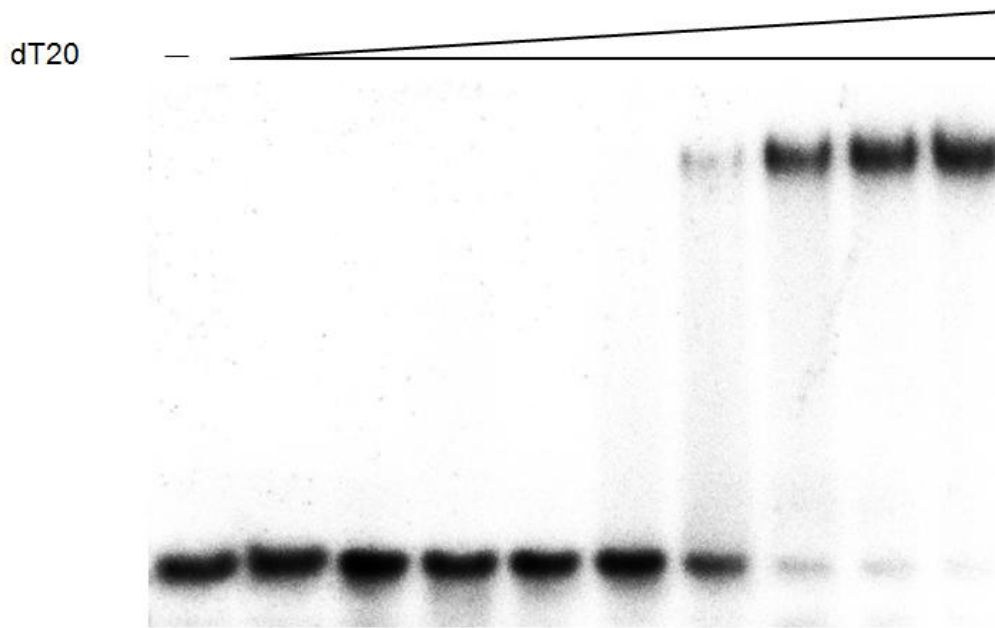
圖十三：不同的 dT 60 濃度與 GkDnaC 之 EMSA 分析

dT60 濃度為 0 μM 、0.0255 μM 、0.031 μM 、0.038 μM 、0.76 μM 、1.51 μM 、2.28 μM 、3.03 μM 、6.07 μM 、12.14 μM 時，產生第一個複合物；在 dT40 濃度為 0.031 μM 、0.038 μM 、0.76 μM 、1.51 μM 、2.28 μM 、3.03 μM 、6.07 μM 、12.14 μM 時，產生第二個複合物

dT6



圖十四：不同的 dT 6 濃度(0 μM 、0.059 μM 、0.116 μM 、0.232 μM 、0.47 μM 、0.94 μM 、1.89 μM 、3.76 μM 、7.55 μM 、15.11 μM)與 GkDnaG 之 EMSA 分析

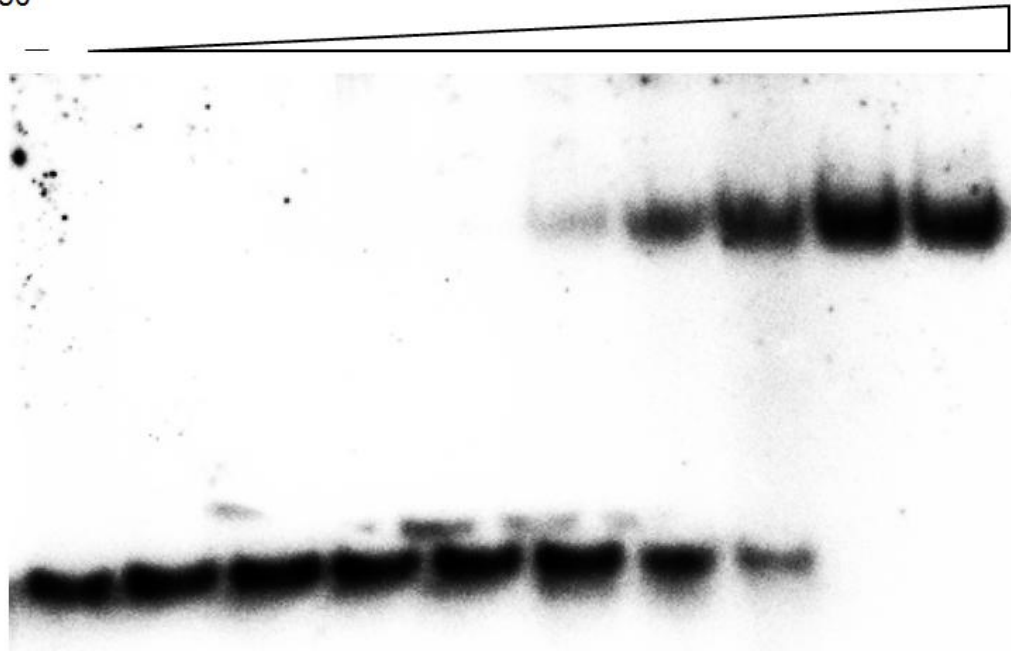


dT20	0 μM	0.059 μM	0.116 μM	0.232 μM	0.47 μM	0.94 μM	1.89 μM	3.76 μM	7.55 μM	15.1 μM
free	5080	5773	7155	4976	4950	5511	2811	930.6	583.9	349
complex	141.1	129.1	191.4	247.4	168.8	306.7	1069	3438	4366	4280
%	2.70%	2.19%	2.61%	4.74%	3.30%	5.27%	27.55%	78.70%	88.20%	92.46%

圖十五：不同的 dT 20 濃度與 GkDnaG 之 EMSA 分析

dT 20 濃度為 0 μM 、0.059 μM 、0.116 μM 、0.232 μM 、0.47 μM 、0.94 μM 、1.89 μM 、3.76 μM 、7.55 μM 、15.11 μM 時，GkDnaG 與 ssDNA 有一些結合

dT30

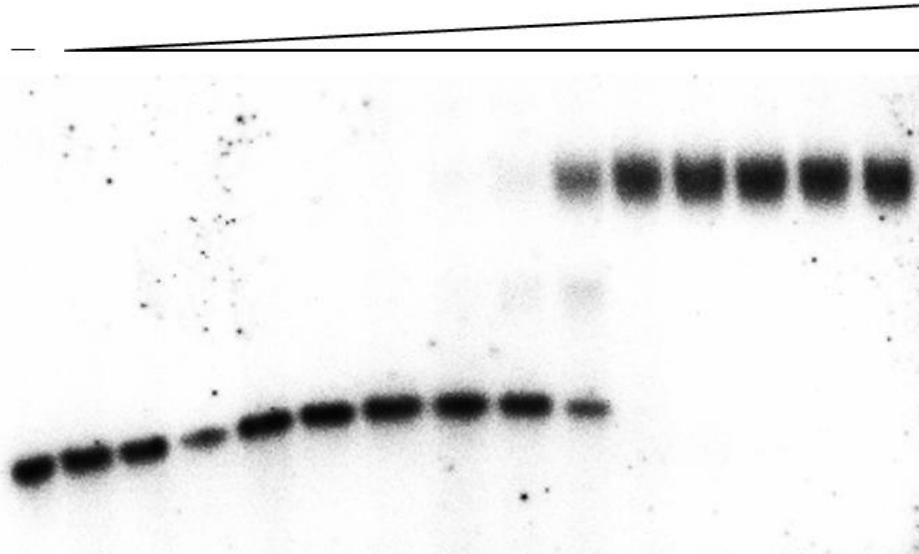


dT30	0 μM	0.059 μM	0.116 μM	0.232 μM	0.47 μM	0.94 μM	1.89 μM	3.76 μM	7.55 μM	15.1 μM
free	25600	29590	31500	31660	29810	29500	19710	12940	4029	2474
complex	2083	1028	1879	2636	3013	9833	18540	26280	37350	35580
%	7.52%	3.36%	5.63%	7.69%	9.18%	25.00%	48.47%	67.01%	90.26%	93.50%

圖十六：不同的 dT 30 濃度與 GkDnaG 之 EMSA 分析

dT 30 濃度為 0 μM 、0.059 μM 、0.116 μM 、0.232 μM 、0.47 μM 、0.94 μM 、1.89 μM 、3.76 μM 、7.55 μM 、15.11 μM 時，GkDnaG 與 ssDNA 有結合

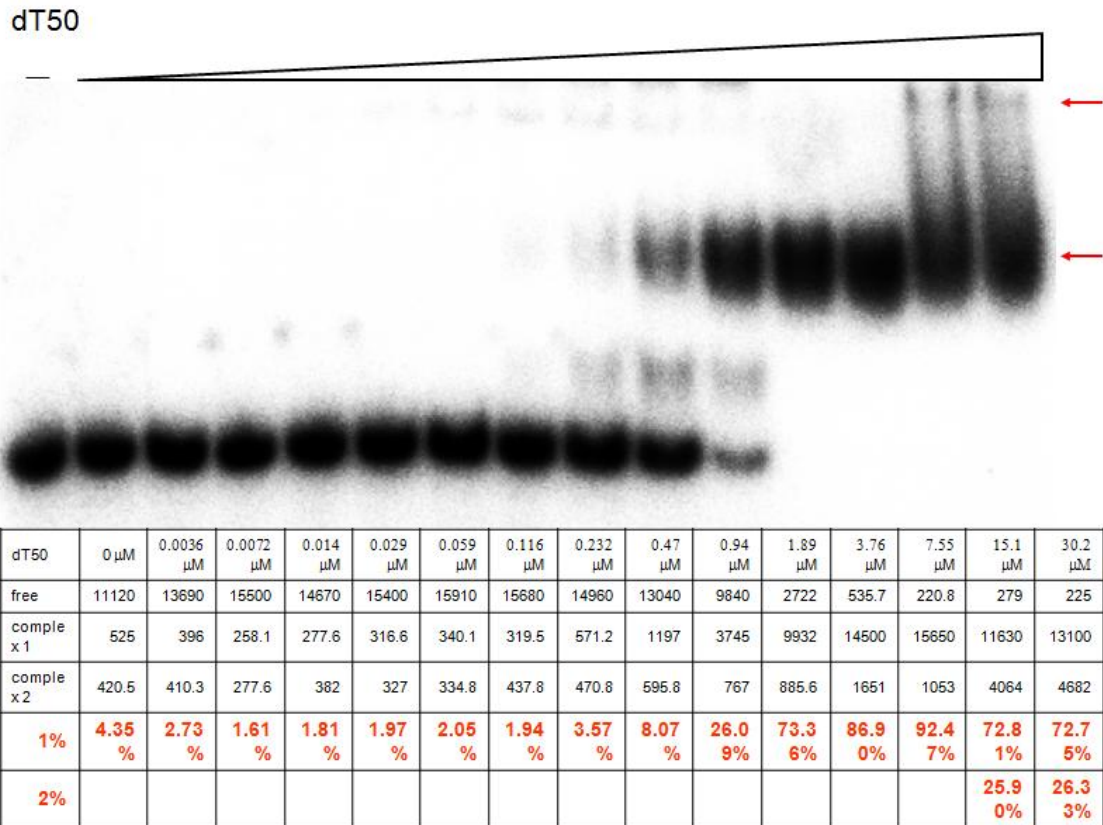
dT40



dT40	0 μ M	0.0036 μ M	0.0072 μ M	0.014 μ M	0.029 μ M	0.059 μ M	0.116 μ M	0.232 μ M	0.47 μ M	0.94 μ M	1.89 μ M	3.76 μ M	7.55 μ M	15.1 μ M	30.2 μ M
free	2112	2534	2148	1277	2988	2776	2846	2714	2455	1274	401.7	195.3	166.9	139.5	170.5
compl ex	142	202.6	230.6	210	290.9	204.5	270.2	307.3	583.5	1442	2399	2634	2933	2907	2841
%	6.30 %	7.40 %	9.69 %	14.1 2%	8.87 %	6.86 %	8.67 %	10.1 7%	19.2 0%	53.0 9%	85.6 6%	93.1 0%	94.6 2%	95.4 2%	94.3 4%

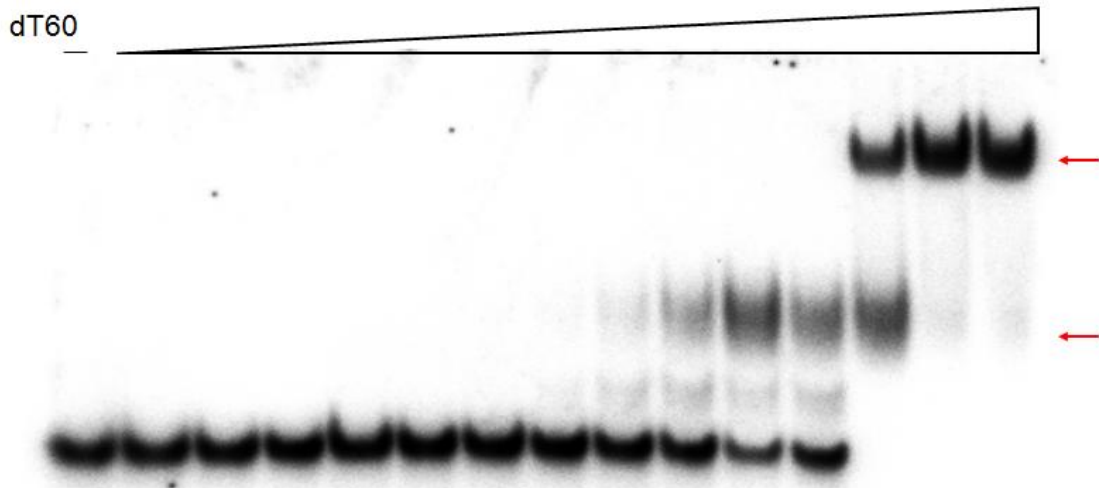
圖十七：不同的 dT 40 濃度與 GkDnaG 之 EMSA 分析

dT 40 濃度為 0 μ M、0.059 μ M、0.116 μ M、0.232 μ M、0.47 μ M、0.94 μ M、1.89 μ M、3.76 μ M、7.55 μ M、15.11 μ M、30.2 μ M 時，GkDnaG 與 ssDNA 有結合



圖十八：不同的 dT 50 濃度與 GkDnaG 之 EMSA 分析

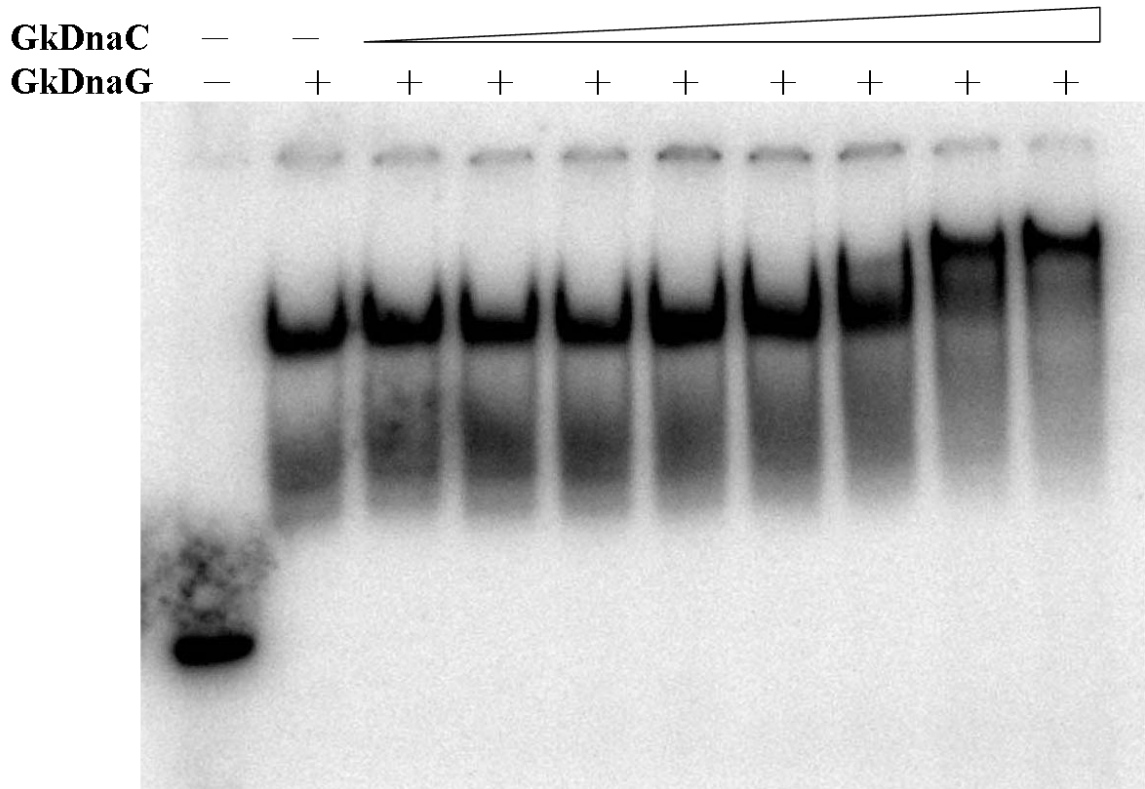
dT50 濃度為 0 μM 、0.059 μM 、0.116 μM 、0.232 μM 、0.47 μM 、0.94 μM 、1.89 μM 、3.76 μM 、7.55 μM 、15.11 μM 、30.2 μM 時，產生第一個複合物；在 dT50 濃度為 15.11 μM 、30.2 μM 時，產生第二個複合物



dT60	0 μM	0.0036 μM	0.0072 μM	0.014 μM	0.029 μM	0.059 μM	0.116 μM	0.232 μM	0.47 μM	0.94 μM	1.89 μM	3.76 μM	7.55 μM	15.1 μM	30.2 μM	
free	20200	19750	17770	21540	23180	23060	26100	22760	18620	17130	7426	13330	608.9	511.3	665.4	
compl ex1	1285	1355	1186	735.6	1102	1459	1719	1979	3774	7521	14660	7857	15570	3139	2555	
compl ec2	1268	1444	1477	1053	736.4	1027	923.3	841.7	1200	1200	1222	2002	12890	26660	24710	
1%		5.65 %	6.01 %	5.80 %	3.15 %	4.40 %	5.71 %	5.98 %	7.74 %	16.0 %	29.0 %	62.9 %	33.8 %	53.5 %	10.3 %	9.15 %
2%												7.69 %	20.3 %	45.2 %	89.4 %	90.6 %

圖十九：不同的 dT 60 濃度與 GkDnaG 之 EMSA 分析

dT60 濃度為 0 μM 、0.059 μM 、0.116 μM 、0.232 μM 、0.47 μM 、0.94 μM 、1.89 μM 、3.76 μM 、7.55 μM 、15.11 μM 、30.2 μM 時，產生第一個複合物；在 dT50 濃度為1.89 μM 、3.76 μM 、15.11 μM 、30.2 μM 時，產生第二個複合物



圖二十：固定 GkDnaG 量，加入不同濃度的 GkDnaC(0mM, 0.89mM, 1.78mM, 2.68mM, 3.57mM, 5.36mM, 7.14mM, 10.71mM, 4.28mM) ，以 EMSA 分析之

在 GkDnaC 濃度為 10.71mM, 4.28Mm 時，GkDnaG 與 GkDnaC 有結合

文獻參考

- Johnson DS, Bai L, Smith BY, Patel SS, Wang MD (2007),
"Single-molecule studies reveal dynamics of DNA unwinding by the
ring-shaped t7 helicase", *Cell* **129** (7): 1299-309, PMID 17604719,
DOI:10.1016/j.cell.2007.04.038
- Dumont S, Cheng W, Serebrov V, Beran RK, Tinoco Jr I, Pylr AM,
Bustamante C, "RNA Translocation and Unwinding Mechanism of HCV
NS3 Helicase and its Coordination by ATP", *Nature*. 2006 Jan 5; 439:
105-108
- Bird L, Subramanya HS, Wigley DB, "Helicases: a unifying structural
theme?", *Current Opinion in Structural Biology*. 1998 Feb; 8 (1): 14-18
- Betterton MD, Julicher F, "Opening of nucleic-acid double strands by
helicases: active versus passive opening.", *Physical Review E*. 2005 Jan;
71 (1): 011904
- Griep, Mark A. (1995). "Primase Structure and Function". *Indian Journal
of Biochemistry & Biophysics* **32**.

Keck, James L. , and Daniel D. Roche, A. Simon Lynch, James M. Berger. (2000). "Structure of the RNA Polymerase Domain of E. coli Primase". *Science* **282**: 2482-6

Lee, Jong-Bong , and Richard K. Hite, Samir M. Hamdan, et. al. (2006). "DNA primase acts as a molecular brake in DNA replication". *Nature* **436**: 621-4.

Cavanaugh, Nisha A., and Robert D. Kuchta (2009). "Initiation of New DNA Strands by the Herpes Simplex Virus-1 Primase-Helicase Complex and Either Herpes DNA Polymerase or Human DNA Polymerase alpha.". *J. Biol. Chem* **284**: 1523-32

Roychowdhury A, Szymanski MR, Jezewska MJ, Bujalowski W. "Escherichia coli DnaB helicase-DnaC protein complex: allosteric effects of the nucleotides on the nucleic acid binding and the kinetic mechanism of NTP hydrolysis. 3. " *Biochemistry*, **2009**, 48 (29), pp 6747–6763

Benkovic SJ, Valentine AM, Salinas F. Replisome-mediated DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* (2001) 70:181–208.

Bailey S, Eliason WK, Steitz TA. Structure of hexameric DnaB helicase and its complex with a domain of DnaG primase. *Science* (2007) 318:459–463.

Enemark EJ, Joshua-Tor L. Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature* (2006) 442:270–275.

Wang G, Klein MG, Tokonzaba E, Zhang Y, Holden LG, Chen XS. The structure of a DnaB-family replicative helicase and its interactions with primase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2008) 15:94–100.

Bailey S, Eliason WK, Steitz TA. The crystal structure of the *Thermus aquaticus* DnaB helicase monomer. *Nucleic Acids Res.* (2007) 35:4728–4736.

Tanner NA, Hamdan SM, Jergic S, Loscha KV, Schaeffer PM, Dixon NE, van Oijen AM. Single-molecule studies of fork dynamics in *Escherichia coli* DNA replication. *Nat Struct Mol Biol.* 2008 Feb;15(2):170-6

Scott Bailey, William K. Eliason, Thomas A. Steitz. Structure of Hexameric DnaB Helicase and Its Complex with a Domain of DnaG Primase. *Science.* 2007 Oct 19;318(5849):459-63.