

國立交通大學

分子醫學與生物工程研究所
碩士論文

三葉型扭結蛋白-YbeA 之摺疊機制與功能分析

Folding and function analysis of trefoil knot

protein-YbeA

1896

研究生：張毓娟

指導教授：張家靖 教授

中華民國一百年七月

三葉型扭結蛋白-YbeA 之摺疊機制與功能分析

Folding and function analysis of trefoil knot protein-YbeA

研究生：張毓娟

Student: Yu-Chuan Chang

指導教授：張家靖

Advisor : Chia-Ching Chang



A Thesis

Submitted to Institute of Molecular Medicine and Bioengineering

College of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

In partial Fulfillment of Requirement for the Degree of Master in Molecular

Medicine and Bioengineering

July 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一百年七月

誌謝

碩班生活終於告了段落，感謝一路上許多人的支持，首先最先感謝的是我的家人們，他們支持與鼓勵，是我努力前進的動力，此外十分感謝老師這兩年來的悉心指導，教會我許多知識以及讓我學習到追求知識的該有的態度，另外，感謝實驗室同伴的陪伴，讓我的研究生活更加有趣，我會永遠記得大伙們一起在實驗室裡說著非常有慧根的奇怪笑話，談論的最新的社會八卦新聞，以及在實驗室裡頭做的所有蠢事。

在這裡首先感謝喜歡請我喝咖啡的鄭博，感謝您非常耐心地教我實驗的技術，不過不要再給你兒子推薦媳婦了，這樣他會很困擾的。再來是長得很像壞人，不過實際上卻是個大好人的學亮學長，常常在實驗上麻煩到你，還讓你要非常有耐心的跟我解釋實驗，而延誤你回家的時間，真是歹勢，不過念在我常常跟你說最新八卦消息的份上，學長你以後成功應該還是會好好提拔我吧。還有總是忙進忙出、跑來跑去的憲儀姊，雖然很忙卻還是常常幫我們想中午要吃什麼，還常開車帶我們出門，真是太感謝你了，還有我不得不對你的開車技術加以讚賞，真是好到沒話說，真是太令我佩服了。感謝我的最佳飯友虹瑋，跟你吃飯真是最快樂的時候了，害我不知不覺胖了好幾斤，我一定要好好瘦下來。感謝偉賢的專業電腦教學，讓我在碩班生涯的電腦功力成為人生中最巔峰的時刻了，雖然常常你講一講我就忘記了，不過我想你已經習慣了。還有昌翰，雖然我常嗆你，不過說實在如果不嗆你還真是對不起我的良心。學弟維邦，你真的是一個很有趣的人，我覺得我的搞笑功力真的差你一大截喔，希望你可以繼續保持下去，實驗室有你應該會越來越熱鬧，還有不要再說學姊很想跟你說話，或是你唱歌超級好聽。

最後希望在未來的日子裡，大家都能夠朝著自己的目標，逐漸一一實現自己的夢想。

三葉型扭結蛋白-YbeA 之摺疊機制與功能分析

學生:張毓娟

指導教授:張家靖 教授

國立交通大學分子醫學與生物工程研究所 碩士班

摘要

近年來隨著蛋白結構隨著X光晶體繞射以及核磁共振技術的進步，有越來越多的蛋白質結構逐漸被解析與發表，造成蛋白資料庫越來越完整。此外人們發現在自然環境底下，某些蛋白胜肽鏈會自我交錯產生結。在這裡我們以YbeA為對象來研究扭結蛋白摺疊機制，其中YbeA本身為大腸桿菌內的核糖體的核糖核酸甲基化酶，其本身蛋白胜肽鏈會自我交錯產生三葉型扭結，其扭結型式較為簡單，且分子量較小。然而細胞內蛋白質生成的過程本身是一個非常複雜的過程，因此我們希望透過體外重新摺疊的方式來探討扭結的生成。在這裡我們透過圓二色光譜以及螢光光譜儀分析蛋白質的二級結構以及疏水性核心在摺疊過程中的變化。此外我們透過胰蛋白酶分別對YbeA的摺疊態以及未摺疊態反應，依據不同時間點收集產物，然後透過MALDI-TOF分析水解產物序列，結果顯示，其結構中最晚被切下來的部份與pKNOT-環結蛋白質結構資料庫及分析工具所模擬的扭結區域重疊，表示扭結部分在整個蛋白裡頭是最穩定，就算在高濃度尿素環境底下，也無法使其裸露出來被酵素水解。此外我們透過螢光能量共振轉移來分析扭結區位分子間的螢光能量轉移現象，結果顯示不論是在摺疊態或是未摺疊態其扭結區域的距離都沒有改變，根據MALDI-TOF以及螢光能量共振轉移的結果，我們推測YbeA得扭結部分為一個無法打開的結，此外我們透過動力學截流儀結合圓二色光譜來分析YbeA的摺疊機制，結果顯示，不論是在摺疊或是變性的過程的速率都是相當緩慢的，且整個變化都是相當緩慢的，我們推測可能扭結區域穩定蛋白構性變化所造成。

Folding and function analysis of trefoil knot protein-YbeA

Advisee: Yu-Chuan Chang

Adviser: Dr. Chia-Ching Chang

Institute of Molecular Medicine and Bioengineering

National Chiao Tung University

Abstract

Knotted proteins are more commonly observed in recent years due to the growing number of structures dissolved by x-ray and NMR in the Protein Data Bank(PDB).A small number of natural proteins have knot configurations in its polypeptide backbone. We select YbeA as a model for its small size and simple knot configurations.YbeA is a RNA methyltransferase that contains a deep embedded trefoil knot in its backbone structure. It is a challenge to reveal the knot formation mechanism during the protein biosynthesis process. For exploring those questions,we use trypsin digested matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectroscopy technique to analyze the digested intermediates of YbeA indicated the knotted region is the most compact in overall structure, both in unfolded and folded state. That revealed the knotted structure can't be opened even in high concentration denaturant environment. The similar result was observed by fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement. Meanwhile,folding kinetic of YbeA analyszed by stopped -flow assistted with CD demonstrate it gently changes both in the folding and unfolding process .It reveals that the knot structure may stabilize the protein conformation.

目錄

摘要	i
Abstract	ii
表目錄	viii
圖目錄	ix
縮寫表	xii
第一章 緒論	1
1-1 蛋白質結構與性質	1
1-2 蛋白摺疊	1
1-3 蛋白質摺疊的相關問題	1
1-4 蛋白質錯誤摺疊相關疾病	1
1-5 蛋白質摺疊相關研究	1
1-6 蛋白質的變性方法	2
1-7 蛋白質的摺疊方法	2
1-7-1 直接稀釋法(direct dilution)	2
1-7-2 階段性熱平衡透析法(stepwisethermal equilibrium dialysis)	2
1-8 蛋白質的摺疊速率	2
1-9 蛋白質摺疊理論模型	3
1-9-1 Framework model	3
1-9-2 The nucleation and growth mechanism	3
1-9-3 The diffution-collision model	3
1-9-4 Hydrophobic collapse model	3
1-9-5 The hierarchical model	3

1-9-6	First-order-like phase transition.....	4
1-10	研究動機	4
1-11	YbeA 蛋白的簡介.....	5
1-11-1	YbeA 的結構.....	5
1-11-2	YbeA 的功能.....	5
1-12	23S rRNA 的功能	6
1-13	扭結蛋白(knotted protein)簡介	7
1-13-1	扭結蛋白的分類	7
1-13-2	扭結蛋白生物物理性質研究	8
1-13-3	扭結蛋白質結構對蛋白穩定性的影響	8
1-13-4	扭結蛋白之摺疊研究	9
1-14	實驗策略	10
第二章	實驗原理與方法.....	11
2-1	基因構築	11
2-1-1	ybeA wild type 基因構築.....	12
2-1-2	ybeA \triangle 73-75 基因構築	13
2-1-3	ybeA \triangle 1-8 基因構築	15
2-1-4	ybeA \triangle 1-70 基因構築	15
2-1-5	ybeA \triangle 118-155 基因構築	16
2-2	蛋白的製備	17
2-2-1	蛋白質小量表現.....	17
2-2-2	蛋白質大量表現.....	17
2-2-3	蛋白摺疊	17
2-3	圓二色光譜(Circular Dichroism Spectroscopy).....	18
2-4	螢光光譜儀(Fluorescence Spectroscopy).....	18

2-4-1	螢光原理	18
2-4-2	蛋白質螢光原理	19
2-5	恆溫滴定微卡計(Isothermal Titration Calorimetry)	19
2-6	介質輔助雷射脫附游離飛行式質譜儀 (MALDI-TOF-MS)	20
2-7	螢光共振能量轉移(Förster resonance energy transfer)	20
2-8	力學截流儀(stopped -flow)結合圓二色光譜(CD Spectroscopy).....	21
第三章	實驗結果.....	22
3-1	基因構築結果	22
3-1-1	pET30a-ybeA 質體構築	22
3-1-2	pET30a-ybeA \triangle 73-75 質體構築	24
3-1-3	pET30a -ybeA \triangle 1-8 質體構築	26
3-1-4	pET30a-ybeA \triangle 1-70 質體構築	28
3-1-5	pET30a-ybeA \triangle 118-155 質體構築	30
3-2	蛋白質表現結果	32
3-3	螢光分析摺疊中間產物的疏水性核心變化	33
3-3-1	YbeA 摺疊中間產物疏水性核心分析.....	33
3-3-2	YbeA \triangle 73-75 摺疊中間產物疏水性核心分析	33
3-3-3	YbeA \triangle 1-8 摺疊中間產物疏水性核心分析	33
3-3-4	YbeA \triangle 1-70 摺疊中間產物疏水性核心分析	33
3-3-5	YbeA \triangle 118-155 摺疊中間產物疏水性核心分析	33
3-4	圓二色光譜分析 YbeA 與其他突變株蛋白摺疊中間產物的二級結構變化.....	38
3-4-1	YbeA 摺疊中間產物二級結構分析	38
3-4-2	YbeA \triangle 73-75 摺疊中間產物二級結構分析	38
3-4-3	YbeA \triangle 1-8 摺疊中間產物二級結構分析	38
3-4-4	YbeA \triangle 1-70 摺疊中間產物二級結構分析	38

3-4-5	YbeA Δ 118-155 摺疊中間產物二級結構分析	39
3-4-6	YbeA 與其他突變株蛋白摺疊態之二級結構比較.....	39
3-5	YbeA 摺疊產物功能分析.....	48
3-6	YbeA 酵素水解穩定性分析.....	49
3-6-1	YbeA 摺疊態酵素水解穩定性分析.....	49
3-6-2	YbeA 非摺疊態酵素水解穩定性分析.....	51
3-7	YbeA 扭結區域分子間距離分析.....	53
3-8	蛋白熱穩定性分析	54
3-8-1	螢光光譜儀分析熱穩定性	54
3-8-1-1	YbeA 蛋白螢光變溫.....	55
3-8-1-2	YbeA Δ 73-75 蛋白螢光變溫.....	56
3-8-1-3	YbeA Δ 1-8 蛋白螢光變溫.....	57
3-8-1-4	YbeA Δ 1-70 蛋白螢光變溫.....	58
3-8-1-5	YbeA Δ 118-155 蛋白螢光變溫	59
3-8-2	圓二色光譜儀分析熱穩定性	60
3-8-2-1	YbeA 二級結構熱穩定性分析	61
3-8-2-2	YbeA Δ 73-75 二級結構熱穩定性分析	62
3-8-2-3	YbeA Δ 1-8 二級結構熱穩定性分析	63
3-8-2-4	YbeA Δ 1-70 二級結構熱穩定性分析	64
3-8-2-5	YbeA Δ 118-155 二級結構熱穩定性分析	65
3-9	摺疊速率分析	66
3-9-1	靜態平衡摺疊及變性分析	66
3-9-2	動態摺疊速率分析	68
第四章	討論	70
4-1	基因構築	70

4-2 蛋白質定性分析	70
4-2-2 摺疊產物結構及功能分析	71
4-2-3 热穩定性分析	73
4-2-4 摺疊速率分析	74
4-2-5 酵素結構穩定性分析	75
4-2-6 扭結的距離分析	75
第五章 結論	76
第六章 參考文獻	77



表目錄

表 1 E. coli strain. K-12 substn. DH10B 的 ybeA 基因序列	12
表 2 重組 ybeA 基因序列	14
表 3 蛋白質二級結構特徵	18
表 4 YbeA 及其突變株之螢光圖譜數據	36
表 5 SELCON3 分析 YbeA 摺疊中間產物二級結構數據	46
表 6 SELCON3 分析 YbeA Δ 73-75 摺疊中間產物二級結構數據	46
表 7 SELCON3 分析 YbeA Δ 1-8 摺疊中間產物二級結構數據	46
表 8 SELCON3 分析 YbeA Δ 1-70 摺疊中間產物二級結構數據	46
表 9 SELCON3 分析 YbeA Δ 118-155 摺疊中間產物二級結構數據	47
表 10 SELCON3 分析 YbeA 及其突變株摺疊態之二級結構數據	47
表 11 YbeA 蛋白分子內部螢光能量轉移	53
表 12 螢光光譜儀分析熱相變數據	59
表 13 YbeA 變性摺疊平衡熱力學參數	66
表 14 YbeA 及 Δ 1-8 變性摺疊動力學參數	69
表 15 ITC 實驗數據表	73
表 16 靜態平衡摺疊及變性比較表	74
表 17 動態速率分析比較	75

圖 目 錄

圖 1 蛋白質摺疊自由能漏斗型模型	3
圖 2 蛋白質摺疊似一階轉變示意圖	4
圖 3 YbeA 結構模型	5
圖 4 23S rRNA 二級結構上 helix loop 69(H69)的 $m_3\Psi 1915$ 示意圖	6
圖 5 $m_3\Psi 1915$ 的甲基化示意圖	6
圖 6 23S rRNA 甲基化示意圖	6
圖 7 扭結蛋白種類	7
圖 8 基因構築實驗流程圖	11
圖 9 $ybeA\Delta 73-75$ 基因 megaprimer PCR 流程圖	13
圖 10 螢光原理	19
圖 11 動力學截流儀結合圓二色光譜儀裝置	21
圖 12 質體 pET30a-ybeA 的建構圖	22
圖 13 pET30a-ybeA 質體構築結果	23
圖 14 重組 $ybeA$ 基因與 NCBI 公布之 $ybeA$ 基因的比較結果。	23
圖 15 質體 pET30a-ybeA $\Delta(73-75)$ 的建構圖	24
圖 16 pET30a-ybeA $\Delta(73-75)$ 基因建構結果	25
圖 17 重組 $ybeA$ 與重組 $ybeA\Delta(73-75)$ 基因序列比較結果。	25
圖 18 質體 pET30-ybeA $\Delta 1-8$ 的建構	26
圖 19 $ybeA\Delta 1-8$ 基因建構結果。	27
圖 20 重組 $ybeA$ 與重組 $ybeA\Delta(1-8)$ 基因序列比較結果。	27
圖 21 質體 pET30-ybeA $\Delta 1-70$ 的建構圖	28
圖 22 $ybeA\Delta 1-70$ 基因建構結果。	29
圖 23 重組 $ybeA\Delta 1-70$ 與重組 $ybeA$ 基因序列比較結果	29
圖 24 質體 pET30-ybeA $\Delta 118-155$ 的建構圖	30
圖 25 $ybeA\Delta 118-155$ 基因建構結果。	31
圖 26 重組 $ybeA$ 與重組 $ybeA\Delta 118-155$ 基因序列比較結果。	31
圖 27 YbeA 以及其突變株 IPTG 誘導後 SDS PAGE 分析結果	32
圖 28 YbeA 摺疊中間物螢光圖譜	34
圖 29 $ybeA\Delta 73-75$ 摺疊中間物螢光圖譜	34
圖 30 $ybeA\Delta 1-8$ 摺疊中間物螢光圖譜	35
圖 31 $ybeA\Delta 1-70$ 摺疊中間物螢光圖譜	35
圖 32 $ybeA\Delta 118-155$ 摺疊中間物螢光圖譜	36

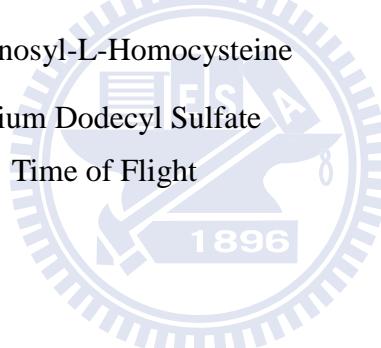
圖 33 YbeA 摺疊中間產物圓二色圖譜.....	40
圖 34 YbeA 摺疊中間產物圓二色圖譜 SELCON3 分析結果	40
圖 35 YbeA Δ 73-75 摺疊中間產物圓二色圖譜	41
圖 36 YbeA Δ 73-75 摺疊中間產物圓二色圖譜 SELCON3 分析結果	41
圖 37 YbeA Δ 1-8 摺疊中間產物圓二色圖譜	42
圖 38 YbeA Δ 1-8 摺疊中間產物圓二色圖譜 SELCON3 分析結果	42
圖 39 YbeA Δ 1-70 摺疊中間產物圓二色圖譜	43
圖 40 YbeA Δ 1-70 摺疊中間產物圓二色圖譜 SELCON3 分析結果	43
圖 41 YbeA Δ 118-155 摺疊中間產物圓二色圖譜	44
圖 42 YbeA Δ 118-155 摺疊中間產物圓二色圖譜 SELCON3 分析結果	44
圖 43 YbeA 與其他突變株蛋白的 CD 圖譜	45
圖 44 SELCON3 軟體分析 YbeA 及其突變株之二級結構比例	45
圖 45 ITC 之 AdoMet 滴定 YbeA 的原始圖	48
圖 46 AdoMet 滴定 YbeA 之作用力圖.....	48
圖 47 YbeA 摺疊態胰蛋白酶水解反應圖	50
圖 48 YbeA 非摺疊態胰蛋白酶水解反應圖	52
圖 49 YbeA 摺疊態以及非摺疊態和 AMCA 的螢光能量轉移圖	53
圖 50 YbeA 蛋白變溫螢光光譜.....	55
圖 51 YbeA 蛋白螢光變溫波峰變化圖	55
圖 52 YbeA Δ 73-75 蛋白變溫螢光光譜	56
圖 53 YbeA Δ 73-75 蛋白螢光變溫波峰變化圖	56
圖 54 YbeA Δ 1-8 蛋白變溫螢光光譜	57
圖 55 YbeA Δ 1-8 蛋白螢光變溫波峰變化圖	57
圖 56 YbeA Δ 1-70 蛋白變溫螢光光譜	58
圖 57 YbeA Δ 1-70 蛋白螢光變溫波峰變化圖	58
圖 58 YbeA Δ 118-155 蛋白變溫螢光光譜.....	59
圖 59 YbeA Δ 118-155 蛋白螢光變溫波峰變化圖	59
圖 60 YbeA 蛋白 α 螺旋二級結構熱變化.....	61
圖 61 YbeA 蛋白 β 平板二級結構熱變化.....	61
圖 62 YbeA Δ 73-75 蛋白 α 螺旋二級結構熱變化.....	62
圖 63 YbeA Δ 73-75 蛋白 β 平板二級結構熱變化.....	62
圖 64 YbeA Δ 1-8 蛋白 α 螺旋二級結構熱變化.....	63
圖 65 YbeA Δ 1-8 蛋白 β 平板二級結構熱變化.....	63

圖 66 YbeA Δ 1-70 蛋白 α 螺旋二級結構熱變化.....	64
圖 67 YbeA Δ 1-70 蛋白 β 平板二級結構熱變化.....	64
圖 68 YbeA Δ 118-155 蛋白 α 螺旋二級結構熱變化.....	65
圖 69 YbeA Δ 118-155 蛋白 β 平板二級結構熱變化.....	65
圖 70 螢光光譜儀分析 YbeA 靜態平衡之摺疊及變性.....	67
圖 71 圓二色光譜儀分析 YbeA 靜態平衡之摺疊及變性.....	67
圖 72 Chevelon plot of YbeA	69
圖 73 Chevelon plot of YbeA Δ 1-8	69
圖 74 YbeA 摺疊螢光圖譜.....	71
圖 75 YbeA 摺疊圓二色圖譜.....	72
圖 76 ITC 實驗結果比較.....	73



縮寫表

縮寫	英文全寫	中文
ATP	Adenosine Triphosphate	三磷酸腺苷
CD	Circular Dichroism	圓二色光譜
DTT	Dithiothreitol	2-4 二硫代蘇糖醇
ETTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
FRET	Förster Resonance Energy Transfer	螢光共振能量轉移
ITC	Isothermal Titration Calorimetry	恆溫滴定熱卡計
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization	基質輔助雷射去吸附離子化
MTase	Methylase	甲基化酶
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶連鎖反應
SAM	S-Adenosyl Methionine	S-腺苷甲硫氨酸
SAM	S-Adenosyl-L-Homocysteine	S-腺苷-L-半胱氨酸
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	十二烷基硫酸鈉
TOF	Time of Flight	質能測得飛行時間



第一章 緒論

1-1 蛋白質結構與性質

蛋白質主要成分為碳、氫、氧、氮這四種元素，而胺基酸為蛋白質的組成的基本單位，其中每一個胺基酸分子都有一個羧基(-COOH)與胺基(-NH₂)，蛋白質可由一條或多條多肽鏈組成，因此其結構可依次分為四級，蛋白質一級結構指的是組成蛋白質胜肽鏈的線性胺基酸序列。而二級結構依據不同胺基酸之間的C=O和N-H基團間的勝肽鍵形成的穩定結構，主要為 α 螺旋和 β 平板。三級結構指的是多個二級結構在三維空間的排列所形成的一個蛋白質分子的三維結構。四級結構指的是由不同多肽鏈間相互作用形成具有功能的蛋白質複合物分子。

1-2 蛋白摺疊

從多肽鏈的線性胺基酸序列到具有三維空間構型的過程就被稱為蛋白質摺疊。特定序列在蛋白摺疊時，有時可以摺疊為一種以上的構型。在真核細胞內，許多蛋白質的正確摺疊往往需要分子輔佐子的幫助摺疊或是將錯誤摺疊的蛋白重新變性後再摺疊以防止錯誤發生。細胞處在逆境環境下時，一種叫做熱休克因子(heat shock factor)的蛋白質會察覺到環境的改變，然後啟動分子輔佐蛋白(molecular chaperone)的製造。分子輔佐蛋白在身體內的工作是負責監督蛋白質的摺疊，防止摺疊失敗的蛋白質在體內堆積(1)。

1-3 蛋白質摺疊的相關問題

蛋白質摺疊問題在於蛋白質如何從一條勝肽鏈，摺疊回具有三維結構的蛋白構型？以及蛋白質啟動摺疊的關鍵在於什麼？另外蛋白質真的在摺疊過程不會出錯嗎？這些問題成為科學界欲探討的重要課題，為了解釋這些問題，陸陸續續有許多理論先後被提出，這些理論中包含了蛋白質透過分子間交互作用來進行摺疊的理論。

1-4 蛋白質錯誤摺疊相關疾病

蛋白質在摺疊過程之中可能會產生錯誤摺疊或是沉澱聚集的現象，如狂牛症以及阿茲海默症。Prion為1997年諾貝爾醫學獎的得主Stanley Prusiner所致力研究的主體，他在人類以及動物身上發現傳染性海綿狀腦病變(transmissible spongiform encephalopathy)，例如從牛身上的狂牛症(BSE)(2, 3)、羊的搔癢病(scrapie)(4, 5)、人類的庫賈氏症(CJD)(6)都是由於體內Prion錯誤摺疊所導致，腦組織從電腦斷層上看起來就會有一個一個空洞，所以稱之為海綿腦。PrP有兩種isoform，一種是正常的PrP^c(cellular PrP)，一種為不正常PrP^{sc}(PrP scrapie)，PrP^c與PrP^{sc}兩者最大的差異就是在結構上，而不是在共價鍵的修飾上。PrP^c主要以 α -螺旋結構為主，幾乎沒有 β -板狀結構，而PrP^{sc}則是以 β -板狀結構為主，此形式蛋白會有自動聚集的傾向。

阿茲海默症(Alzheimer's disease)俗稱為老年癡呆症(7, 8)，是一個神經退化性的疾病，由阿茲海默醫生在1907年發表的。這種病會造成記憶的失去，認知的失調，還有不正常的行为，他在阿茲海默症病患腦內觀察到斑塊(plaques)現象，斑塊主要由名為乙型一澱粉樣蛋白(beta amyloid)的蛋白質所組成，此種蛋白質很容易聚集形成沈澱物，阻斷神經彼此溝通和傳遞訊息的功能。

1-5 蛋白質摺疊相關研究

1972年諾貝爾化學獎得主Christian Bohrmer Anfinsen等人(9)以核糖核酸水解酶(RNase)為研究對象，利用還原劑破壞雙硫鍵以及尿素破壞分子間共價作用力讓RNase

變性後失去水解RNA的能力，然而當環境中的還原劑以及變性劑移除時，RNase即可恢復其活性，且物理化學性質均與未變性前相同，不論試驗幾次，蛋白質都僅此一種立體結構。由於實驗中並無破壞氨基酸間的共價鍵結，因此可說蛋白質胺基酸序列決定其特定結構。

1-6 蛋白質的變性方法

蛋白質的變性方法可以分成物理:如加熱(10)，加壓(11)，冷凍(12)或化學:極端 pH 變化(13)，有機溶劑(11)方法，以及生物方法:如酵素水解(14).....等。

一般常用的化學變性劑有尿素(urea)(15)、鹽酸胍(Guanidine HCl)(15, 16)、硫氫乙醇、(Mercaptoethanol)(17)、十二烷基硫酸鈉(SDS)(18) 二硫蘇糖醇(DTT).....等。其中尿素以及鹽酸胍的作用在於破壞蛋白內氫鍵，以及疏水性作用力等一些非共價還原力。而硫氫乙醇以及二硫蘇糖醇為有效的還原劑可以將蛋白質內雙硫鍵打斷。而十二烷基硫酸鈉能在蛋白表面包覆上一層負電荷。

1-7 蛋白質的摺疊方法

1-7-1 直接稀釋法(direct dilution)

就是單一步驟溶液置換或所謂之直接反應模式(off-path)(19)，將含有高濃度變性劑的蛋白質直接置換至去除變性劑的環境底下，使蛋白質進行摺疊。此外根據 1996 年 Rudolph 等人的實驗結果，蛋白質濃度須維持在 0.01-0.05 mg/ml 才有較佳的摺疊效果(20)，蛋白質的摺疊效率會隨著蛋白質的濃度增加而大幅降低。

1-7-2 階段性熱平衡透析法(stepwise thermal equilibrium dialysis)

透過逐步透析去除變性劑，整體溶液交換擴散反應是緩慢的，蛋白質摺疊可以視為近乎靜止的狀態，在這種透析方法中，蛋白每一階段均遵守著準靜熱力學平衡原理，蛋白質的構型能量都會達到最低態，最後達到自然構型的能量，階段性溶液置換準靜過程，蛋白質摺疊反應中並未碰觸到態轉變區間，讓蛋白可以順利摺疊回摺疊態(21, 22)。

1-8 蛋白質的摺疊速率

根據實驗技術的進步，可以測到不同範圍的摺疊速率，目前針對蛋白質摺疊速率大多利用 stopped-flow 或 continuous-flow 技術，透過改變蛋白質外在環境溶液，測量其光學訊號如螢光光譜儀或圓二色光譜儀變化來決定蛋白質的摺疊速率。其中 stopped-flow 偵測極限在 10^{-3} 秒左右(23)，continuous-flow(24)偵測速率提升至 10^{-5} 秒左右。此外 laser flash photolysis(25)新穎技術可測到 ns 級的解析度。根據文獻指出二級結構 α 螺旋的形成時間約 100ns(26)， β 平板的形成時間約 6 秒(27)，而三級結構約需要毫秒的時間(23)。

蛋白質摺疊從變性狀態到自然狀態，所需的時間依照序列長短而有所不同，其中越長的序列需要越長的時間，根據前人的研究指出蛋白質的摺疊時間約需 $10^{-9} \sim 10^{-3}$ 秒(26, 28)。蛋白質在未摺疊態有多種構型，如果蛋白質在摺疊的過程為系統性地搜尋所有可能構形，這樣一來需要花費的時間是相當驚人的。1995 年 Peter Wolynes(29)所提出的蛋白摺疊漏斗模型(funnel model)解釋了這個現象，這為蛋白質摺疊提出新的見解，利用蛋白質的自由能與其構型之間的關係，透過 energy landscape 的方式解釋蛋白質如何從未摺疊態到自然態的過程，構型能量變化往能量譜中能量最低處進行尋找其最穩定的狀態，如圖 1 所示(30)

。

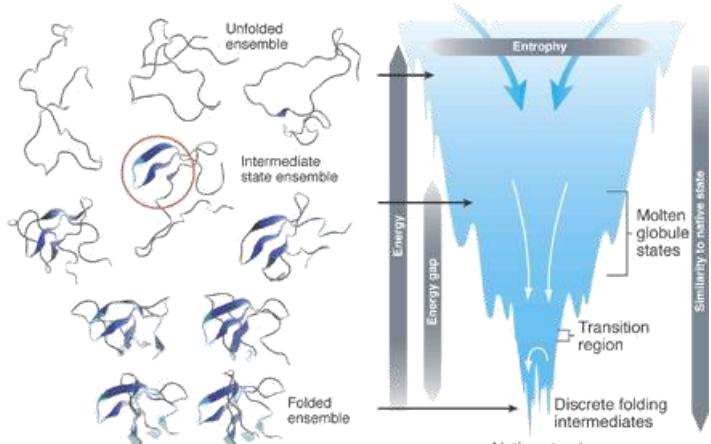


圖 1 蛋白質摺疊自由能漏斗型模型

1-9 蛋白質摺疊理論模型

1-9-1 Framework model

Framework model 指出蛋白質在摺疊初期會因為氫鍵的交互作用力先形成二級結構，而三級結構再由這些二級結構組合而成(31)，並指出若是在二級結構形成前即產生三級結構，如蛋白質內雙硫鍵錯誤鍵結，便會造成蛋白質無法摺疊回自然態。

1-9-2 The nucleation and growth mechanism

在蛋白質摺疊的過程之中，某些特定胺基酸之間的殘基會產生交互作用，形成類似核(nucleus)的結構，然後再逐漸形成穩定的結構，蛋白質其他部分再將之前的核結構包覆起來，最後完成摺疊形成三級結構。這些核形成時常常伴隨著二級結構的產生(32, 33)，因此若是在摺疊過程中核結構不穩定，或是缺乏長距離交互作用力時，其摺疊反應會較緩慢(33)。

1-9-3 The diffusion-collision model

1976 年由 Karplus 以及 Weaver 提出(34, 35)，他們將蛋白質視為許多微小區間(micro-domain)的組合。在摺疊初期為混亂的結構，許多微小區間快速擴散碰撞尋找最合適的結構，最後在慢慢調整至自然態的構型。

1-9-4 Hydrophobic collapse model

1954 年由 Kauzmann 提出(36)，認為在蛋白質摺疊過程中，非極性胺基酸受到疏水性效應(hydrophobic effect)後，造成彼此之間互相吸引聚集。疏水作用力是蛋白質摺疊過程中的強作用力，蛋白質受到如此強的作用力後會快速崩縮至近似自然態大小，才有其他分子內交互作用力而形成二級結構(37, 38)。

1-9-5 The hierarchical model

1981 年 G.D. Rose 提出在蛋白質摺疊過程中，蛋白質由區塊間的交互作用力形成一些三級結構的區塊，然後在這些區塊包含了疏水效應崩縮形成部分的結構，這些結構在彼此間產生交互作用(如靜電作用、凡得瓦力……)組成蛋白質的自然結構。其中區塊分子之間的交互作用力包含了疏水性作用力、靜電作用力以及凡得瓦力等等(39)。

1-9-6 First-order-like phase transition

由 Chang,et al 於 2002, 2004 年提出的蛋白摺疊過程之模型(40, 41)，主要研究蛋白質在準靜態熱力學平衡過程中之摺疊模型，此模型與 Landau 的一階相變(first-order phase transition)相似，一階相變指出系統相圖(phase diagram)中的相變線(transition line)為有限長的線段，如果此一線段出現一次微分不連續，此相變我們稱之為一階相變，通常一次微分不連續出現在其端點，此點稱為特異點(critical point)。

一階相變將線兩旁的相區分開來，在此線上處於兩相共存的狀態，如果繞過此特異點(over-critical point)，儘管相已經改變，仍然不會觀察到相轉變現象。蛋白質摺疊視為一階相變轉變，未摺疊態與摺疊態中間存在著相轉變線或區間，此區間為一相轉變區間，在此轉變區間可以看到摺疊態以及未摺疊態共存的現象，透過 stepwise thermal equilibrium dialysis (TED)的摺疊方法，蛋白質摺疊時可以繞過此有限區間到達自然態。圖 2 為 stepwise thermal equilibrium dialysis (TED)摺疊方法，透過此一方法可以繞過轉變有限區得到不同中間體 M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_4 、 M_5 ，若是直接穿過相轉變區，蛋白質會發生沉澱或是產生玻璃態的未摺疊態。

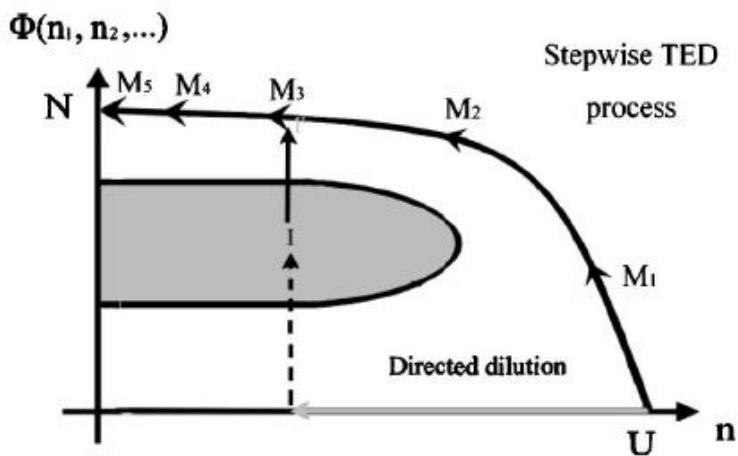


圖 2 蛋白質摺疊似一階轉變示意圖

1-10 研究動機

蛋白質的結構與其功能息息相關，然而蛋白質如何從一條胜肽鏈摺疊成具有立體結構的蛋白質，一直是科學家們想要想要了解的課題。然而近年來隨著許多蛋白質分子結構逐漸解析與發表，其中某些蛋白質的胜肽骨架結構會自我交錯產生扭結。蛋白質摺疊本來就是一個複雜的過程，然而扭結又是如何在摺疊過程中形成呢？成為了一個相當有趣的課題。因此我們透過 pKNOT 扭結蛋白資料庫(42)找到一個大腸桿菌所擁有的扭結蛋白 YbeA(PDB:1NS5)，其本身結的形式較簡單且分子較小，基因來源取得方便且容易表現取得，為研究扭結蛋白摺疊機制極佳的研究對象。本研究希望透過基因重組蛋白重新摺疊的方式，了解此一扭結蛋白結構的變化並嘗試解析其摺疊機制，並嘗試建立數個扭結結構相關突變株以瞭解扭結結構對蛋白摺疊的影響，並和已知之蛋白質摺疊機制比對，以求建立普適性蛋白摺疊機制模型。

1-11 YbeA 蛋白的簡介

1-11-1 YbeA 的結構

YbeA 本身大腸桿菌裡頭的蛋白質，為雙聚體的結構，根據 YbeA(PDB 1NS5)的電腦模擬圖(圖 3)，每個單體由內部五個 β 平板，以及外部的五個 α 螺旋所組成，兩個單體間的 α_1 螺旋以及 α_5 螺旋以反相平行方式緊密靠在一起(43, 44)。其中每個單體由 155 個胺基酸所組成，其 C 端的 35 個胺基酸(121-155)肽鏈穿過中間 51 個胺基酸構成的肽鏈環(70-120)形成了一個三葉型扭結(trefoil knot) (43)，為一個 α 螺旋、 β 平板交錯排列的蛋白，因此又稱為 α/β knot。

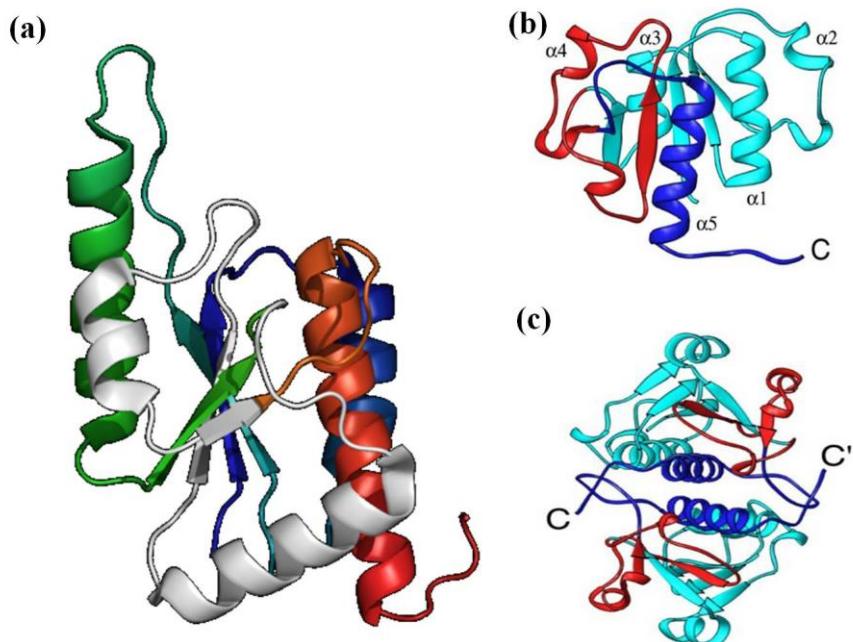


圖 3 YbeA 結構模型

圖(a)為 YbeA 單體 圖(b)、(c)為 YbeA 雙體，兩個單體互相反平行(43)，其中 α 代表 α 螺旋， β 代表 β 平板，C 代表蛋白勝肽鏈之羧酸端，而 C'為另一個單體的羧酸端。

1-11-2 YbeA 的功能

YbeA 屬於大腸桿菌內核糖體的核糖核酸甲基化轉移酶，當缺乏 ybeA 基因時會影響大腸桿菌生長，其作用主要在對 70S 核糖體複合體內的 50S 大次單元體的 23S rRNA 螺旋環 69(helix loop 69)的 Ψ 1915 位置甲基化(圖 4 圖 5)當 70S 核糖體複合體解離時，YbeA 即失去甲基化的功能。於是 YbeA 蛋白又叫做 RlmH(rRNA large subunit methyltransferase H)(45, 46)，是目前為止發現唯一能針對 pseudouridine 甲基化(45-47)的甲基化酶，若是 1915 位置的 U 沒有被 RluD pseudouridine sythase(48)作用生成 pseudouridine，YbeA 即無法對 1915 這個位置甲基化(45, 46)。

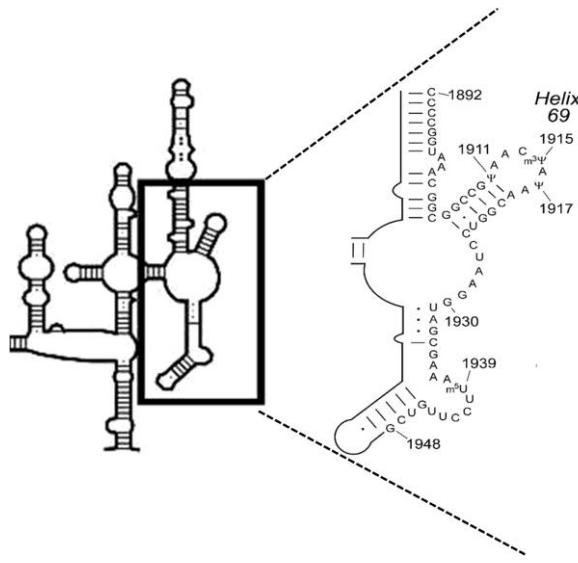


圖 4 23S rRNA 二級結構上 helix loop 69(H69)的 $m_3\Psi^{1915}$ 示意圖
其中插圖為 H69 的放大圖

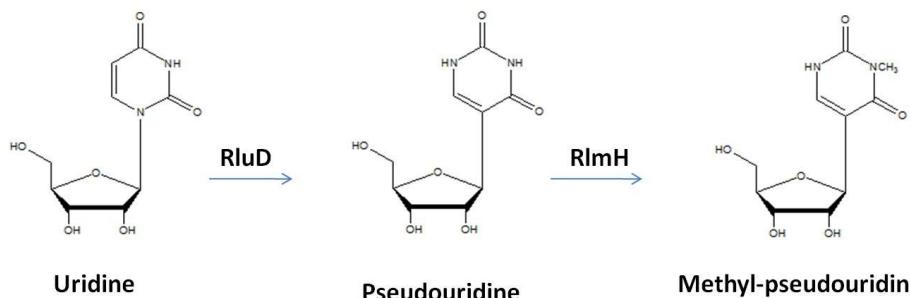


圖 5 $m_3\Psi^{1915}$ 的甲基化示意圖

圖中 RluD 為 pseudouridine synthase，負責催化 uridine 的 pseudo 化，而 RlmH 即為 YbeA 負責 pseudouridine 的甲基化

1-12 23S rRNA 的功能

原核生物的 70S 核糖體由 30S 以及 50S 次單位所組成，其成分主要為蛋白質以及核糖體 rRNA。30S 次單元體由 16S rRNA 以及 21 種蛋白質所組成，50S 次單元體由 23S 核糖體 rRNA 以及 34 種蛋白質所組成。其中 23S rRNA 本身由 2904 個核苷酸所組成，23S rRNA 具有核糖酶(ribozyme)的能力，能催化胺基酸之間肽鍵(peptide bond)生成，因此稱之為勝肽轉移酶(peptidyl transferase)，(49)其作用機制如圖 6 所示。

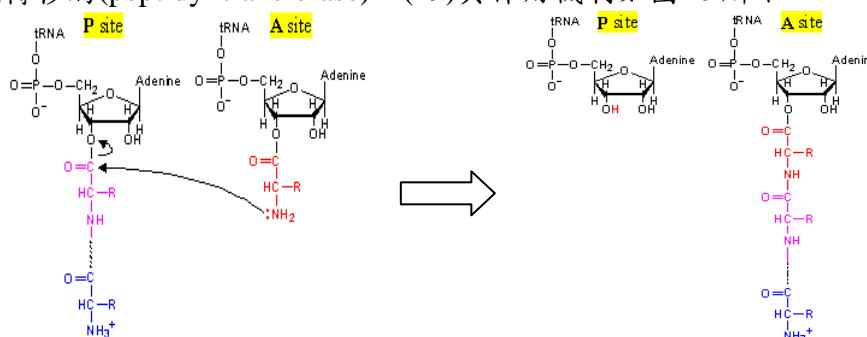


圖 6 23S rRNA 甲基化示意圖

圖中 A site 代表核糖體上胺基酸進入位置，P site 代表核糖體上肽鏈轉移位

1-13 扭結蛋白(knotted protein)簡介

扭結在日常生活中雖然很常見(50, 51)，甚至在 1976 年，人們在 DNA(52)、RNA(53)上都發現了打結的構型，近年來隨著許多蛋白質分子結構逐漸解析與發表，人們發現某些蛋白質的肽骨架結構會自我交錯產生扭結，於是確認確實有扭結蛋白的存在。從第一個扭結蛋白被發現到現在，結構資料庫中約有 273 個扭結蛋白，佔已知結構蛋白中的百分之一(54)，此外，扭結蛋白廣泛分布於各物種，從原核生物、古菌一直到真核生物以至於到人類(55, 56)身上也都有發現，然而蛋白質為何發展出這樣的構型，是否具有演化上的意義，目前仍然不是很清楚，有說法指出扭結可能對結構的穩定性以及功能上有助益(57)。

扭結蛋白的深度隨著蛋白的種類而有所不同，有些扭結非常淺就像是蛋白質肽鏈末端晃動到附近的肽鏈，只要移除兩三個胺基酸即失去扭結的構型，或是必須在特定的角度才看得到(58)。隨著電腦科技的進步，讓許多一剛開始被歸類為非扭結蛋白可以正名為扭結蛋白，讓扭結蛋白資料庫越來越完整。

1-13-1 扭結蛋白的分類

根據相同平面上多肽鏈的接觸點數目分為 3_1 knot、 4_1 knot、 5_2 knot，以及 6_1 knot。圖 7 蛋白依序分別為 3_1 knot、 4_1 knot、 5_2 knot，以及 6_1 knot。以下將分別對其做介紹(59)。

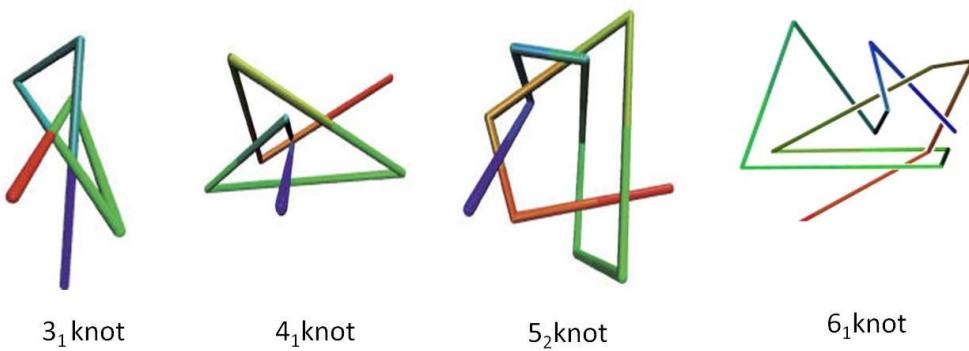


圖 7 扭結蛋白種類

§ 3_1 knot

3_1 knot 又稱為三葉型扭結(trefoil knot)，其同一平面上的接觸點數目為三，佔扭結蛋白裡頭數目的最大宗，其例子有甲基化酶(Methyltrasferase)(44, 60)、(甲醯基轉移酶)Transcarbamylase(42, 60)、碳酸酐酶(Carbonic anhydrase)(61, 62)……等等。

S-腺昔甲硫氨酸合成酶(S-adenosylmenthione synthase)為第一個被發現的三葉型扭結蛋白，其作用在於負責催化蛋氨酸(methione)以及三磷酸腺苷(ATP)合成 S-adenosylmenthione(63, 64)。而碳酸酐酶(Carbonic anhydrase)(64)是最早被證實的三葉型扭結蛋白，作用在於催化 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ 。而 α/β 扭結摺疊(α/β knot fold)為最常被研究的三葉型扭結蛋白，是由一群核糖核酸甲基化轉移酶(RNA methyltrasferase)所組成，如大腸桿菌(Escherichia coli)的 YbeA(43)以及流感嗜血桿菌(Haemophilus influenza)的 Yibk 都屬於這一類(43, 44, 65)。此外早年由於儀器以及技術上的限制，讓許多扭結蛋白被誤判為非扭結蛋白，像是在 2000 年發現的 N-琥珀鳥氨酸轉胺甲酰酶(N-succinylornithine transcarbamylase)(66)在剛開始並不被認為是扭結蛋白，一直到後來

分析程式發展進步，才確定其三葉型扭結的存在。

§ 4₁ knot

4₁ knot 又稱為八字結(figure eight knot)，其同一平面上的接觸點數目為四(67)，如植物的乙酰羥酸還原異構酶(ace-tohydroxy acid isomeroeductas)就屬於這一類，其功能為合成胺基側鏈，為目前為止發現扭結深度最深的蛋白，當同時從其 N 端移除 300 個胺基酸以及從 C 端移除 60 個胺基酸後並不會破壞扭結(68)。而另外一個例子是耐輻射奇異球菌野生型菌株(*Deinococcus radioduran*)內光敏色素(phytochrome)的發光團接合區(chromophore binding region)(67)，phytochrome 扮演了感應紅光與紅外線的雙重角色。

§ 5₂ knot

5₂ knot 其同一平面上的接觸點數目為五。其例子有泛素羧基末端水解酶(ubiquitin carboxyl-terminal hydroxylase, UCH-L)中的 UCH-L1(56, 69)以及 UCH-L3(66, 70, 71)，其中泛素羧基末端水解酶在泛素—降解體路徑(ubiquitin proteasome)反應中負責水解泛素(ubiquitin)與被標記蛋白之間的鍵結，協助泛素的回收利用，維持生理系統的平衡。UCH 成員中 UCH-L1 在腦內約佔重量比(1-2%)，此外有研究指出 UCH-L1 與腦內一些疾病如阿茲海默症以及帕金森氏症有關，他們在病患腦內發現到有大量的 UCH-L1 蛋白，另外在某些癌細胞上常會發現 UCH-L1 蛋白過度表現增生的現象(72)。

§ 6₁ knot

6₁ knot 又稱為雙八字結(stevedire knot)，其中唯一的例子為α-haloacid dehalogenase，他是目前為止發現到最複雜的結，科學家發現土壤中戀臭假單胞菌(*Pseudomonas putida*)的α-haloacid dehalogenase可以將水解haloacid的碳齒鍵(73)。



1896

1-13-2 扭結蛋白生物物理性質研究

2002 年 Mohammad Taufiq Alam 透過原子力顯微鏡觀察三葉型扭結蛋白-牛碳酸酐酶 B(bovine carbonic anhydrase B)受機械力後情形，透過固定蛋白兩端後用力往兩邊拉扯，發現扭結蛋白被拉扯後的實際距離來得比預估距離要來的短(74)。此外在 2009 年 Thomas Bornschlögl 等人也同樣利用原子力顯微鏡來拉扯八字結蛋白-光敏色素(phytochrome) (75)，其實驗結果和 Bargia A 相輔，八字結在被拉扯後的距離比預估距離來的短。

1-13-3 扭結蛋白質結構對蛋白穩定性的影響

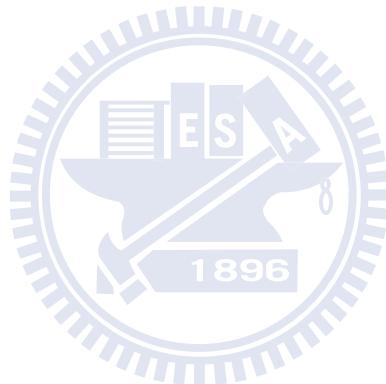
蛋白質的降解是細胞運作中重要的一環，主要在於清除過多或者錯誤的蛋白，避免在真核生物中造成細胞的毒性，首先有待降解的蛋白質被一種多泛素(ubiquitin)所標記，接著這些蛋白質進入細胞的蛋白酶複合體進行水解。其中蛋白酶體是在真核生物和古菌中普遍存在，在真核生物中，蛋白酶體位於細胞核和細胞質中，蛋白酶複合體是一個上下有蓋的圓桶狀酵素，其結構上包括一個由四個堆積在一起的環所組成的核心(nucleus)，其中空直徑約為 13nm，如同細胞的垃圾桶，專門負責蛋白質的分解及再循環利用，泛素在這一過程中釋出訊號，讓蛋白酶複合體分辨出有待降解的蛋白質，一旦蛋白質被標記上一個泛素分子，就會引發接上更多的泛素分子，從而標記的蛋白質帶到蛋白酶體開始降解。因此結構穩定的蛋白就算泛素標定，再送往蛋白酶體水解過程其立體上的障礙，使得很難被蛋白酶體拉進去阻礙水解作用，挽救蛋白被降解的命運(56)。

1-13-4 扭結蛋白之摺疊研究

2007 年 Anna L. Mallam 以及 Sophie Jackson 以三葉型扭結蛋白 Yibk、YbeA 以及八字結蛋白 UCH-3 為對象，透過化學變性後將這些扭結蛋白構過透析重新摺疊，然後透過螢光光譜儀以及圓二色光譜譜儀分別觀察其變性前以及復性後的疏水性結構以及二級結構差異，結果顯示扭結蛋白在化學變性後可以重新摺疊回原來的構型，屬於可逆的反應(43, 76)。

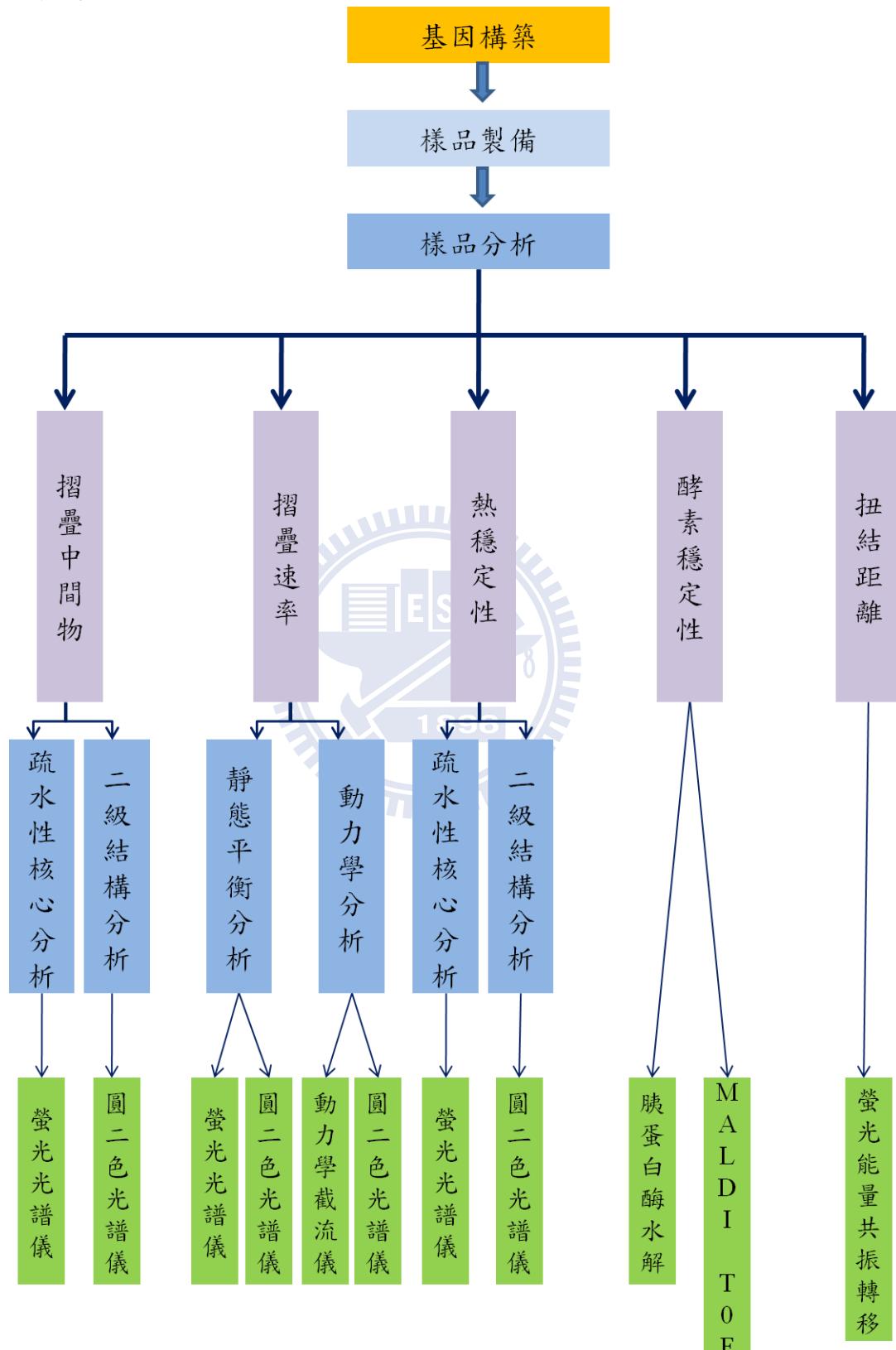
此外 2008 年他們在 Yibk 以及 YbeA 的 N 端、C 端以及兩端分別連接 ThiS 小蛋白試圖阻礙結的生成。其中 ThiS 為嗜高溫古生菌(*Archaeoglobus fulgidus*)的蛋白質，本身由 92 個胺基酸所構成，在這裡 ThiS 做為一個阻止蛋白肽鏈穿過環生成扭結的立體障礙，根據 x 光立體繞射結晶以及受質接合力分析結果指 ThiS-Yibk/ThiS-Yibk-ThiS/Yibk-ThiS 以及 ThiS-YbeA/ThiS-YbeA-ThiS/YbeA-ThiS 均有扭結的構型，表示接合 ThiS 不阻礙扭結生成，於是他們推測扭結可能在蛋白摺疊生成二、三級結構初期就形成(44, 77)。

因此我們希望透過基因重組蛋白摺疊的方式，了解此一扭結的結構的變化，並嘗試解析其摺疊機制並嘗試建立數個扭結相關突變株，以了解扭結結構對蛋白摺疊的影響。因此本研究特別針對扭結蛋白的熱穩定性、酵素水解穩定性以及扭結在摺疊過程的變化，以了解扭結區域對整體蛋白結構影響。



1-14 實驗策略

實驗流程圖

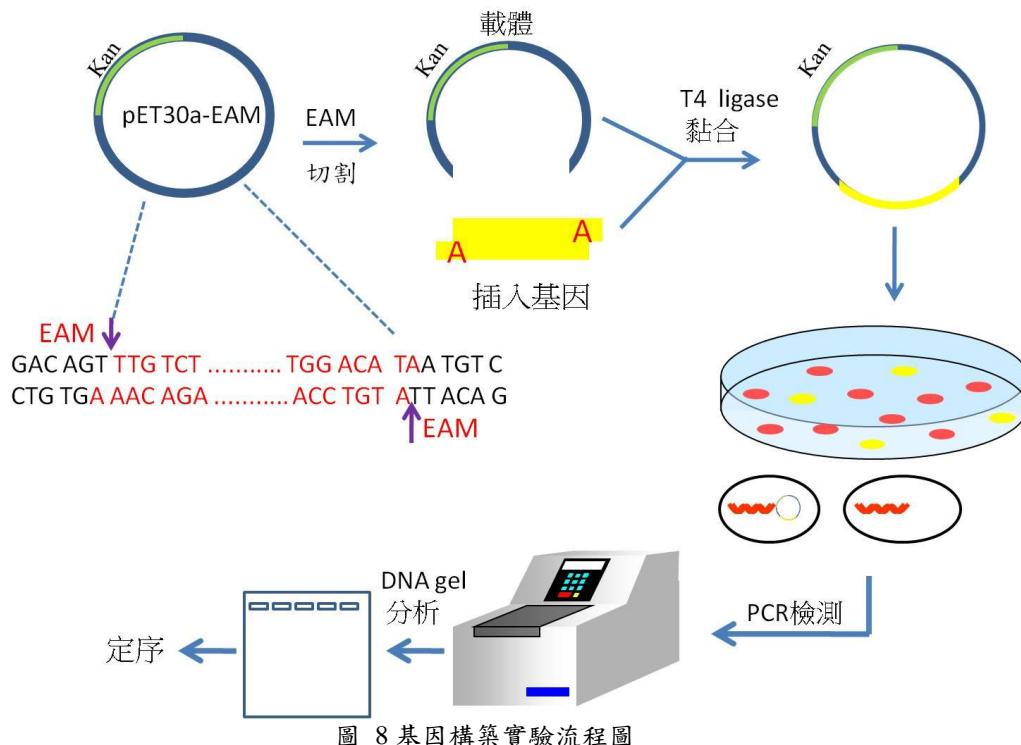


第二章 實驗原理與方法

2-1 基因構築

PCR 技術是一個普遍的不可缺少的技術，目前廣泛運用於醫學和生物學(78)。是由 1983 年科學家 Kary Mullis 發明，其做法是在欲擴增的 DNA 片段兩端分別設計一個前置引子(forward primer)和反置引子(reverse primer)透過高溫使雙股 DNA 打開雙股，再透過降溫讓單股 DNA 和設計的單股 primer 黏合配對(annealing)後，利用 DNA 聚合酵素(DNA polymerase)，以目標 DNA 的兩股分別做為模板(template)來合成新的 DNA 股。經由變性反應(denaturation)，使 DNA 的兩股分離。緩冷配對反應(annealing)，使引子與目標 DNA 配對。延長反應(extension)，合成新的 DNA 股。

在這裡我們以 PCR 的方式放大目標基因後，然後和表現載體 pET30a EAM 進行黏合，在將黏合後基因送入大腸桿菌 *BL21 DE3* 宿主細胞後，透過 PCR 以及定序做最後基因確認(圖 8)。



2-1-1 ybeA wild type 基因構築

YbeA 本身為 *E. coli* 中的蛋白質。我們選擇使用 *E. coli* strain K-12 substn *DH10B* (GI code,169887498) 的染色體作為模版，該基因序列如

表 1 所示，灰底部分為 ybeA 基因序列。在這裡我們以引子 ybeA 4 fp 及 ybeA 4 rp 擴大 ybeA 基因，再透過 ybeA start fp 以及 ybeA 4 進行 nest PCR，其中在 nest PCR 時使用 pro-*taq* DNA polymerase(PROTECH®；Miao-Li, TW)，利用 dATP 在 ybeA 的 3' 端接上 A，然後將 PCR 產物 clean up 後接進載體 pET30a EAM 內，送入大腸桿菌 *BL21 DE3* 宿主細胞後，透過 PCR 以及定序做最後基因確認。其中在 pET30a EAM 切位有多一個 T 可以和 TA colony 的 ybeA 的 3'A 末端做黏合，因此重組後的 ybeA 基因除了原本的基因以外，還多了載體本身 150 個核甘酸。

PCR 實驗條件：

Primer	Sequence	T_m	bp
YbeA 4 fp	5'-GGATTGTCGTGGATTGG-3'	42.9°C	18
YbeA 4 rp	5'-CTCTGCCGTATAGTCGC-3'	44.3°C	19
YbeA start fp (1~24)	5'- GTGAAGCTGCAACTTGT CGC -3'	60.7°C	20

PCR 條件				
Buffer	Volume(μl)	Temperature	Time	Cycle
dd H ₂ O	40.5	94°C	2 mins	1
1 mM dNTP	1	94°C	30 secs	30
YbeA 4 fp	1	42°C	30 secs	
YbeA 4 rp	1	72°C	30 secs	
10x buffer	5	72°C	5 mins	1
pfx	0.5			
Template DH10B	1			
Total volume	50			

表 1 E. coli strain K-12 subtn. DH10B 的 ybeA 基因序列

1 ccagcatcac cgactgcata atcatctgtat cgggtacgta cagccgtat gttatgtcca

61 ttgctgacca cggttgtcag gagtctcgcg cagcgggcct gttaccgctc ggcgtagaag

121 gtgaaaacag cgccgactgg attgtcgtgg atttgggcga tgtgattgtc catgtcatgc

181 aggaagagag ccgtcgccctg tatgaactgg aaaaactctg gagttaatgc gtgaagctgc

241 aacttgtcgc cgtggaaacg aaaatgccgg actgggtaca aaccggttt accgagtaacc

301 tgcgtcgttt tccgaaagat atgcccttg agctgattga aattccggcc ggaaaacgcg

361 gcaagaatgc ggacatcaag cgcatactcg acaaagaggg tgagcagatg ttggcggccg

421 caggcaaaaa ccgcattgtc accctcgata ttccaggcaa gccctggat acgcccgcagt

481 tagccgctga gctggAACgc tggaagctgg atggTCgcga cgtcagtcta ctgattggcg

541 ggcctgaagg gttgtcgct gcctgtaaag cggcggctga gcagagctgg tcgctgtcgg

601 cgcttacccct cccccatccg ctgggtcgcg tgctggtcgc agagagtctg taccgggcgt

661 ggagcatcac caccaaccat ctttatcacc gtgagtgata agggagctt gagtagaaaa

2-1-2 ybeA Δ 73-75 基因構築

ybeA Δ 73-75 突變株基因構築是以先前構築好的 ybeA 基因為模板，其中 ybeA 的基因序列如表 2 所示，灰底的部分為 fusion 片段，ATG 為起始密碼子，TGA 為終止密碼子。在這裡我們利用 megaprimer 方式將 ybeA 的 73~75 號(DIP)胺基酸所對應的 DNA 序列去除掉，其實驗流程如圖 9 所示。其中 megaprimer PCR 擴增可分為兩部分，先以 asymmetry PCR 方式擴增包含突變位置的 megaprimer (220~468)，以作為下一步 PCR 的 primer，其中 megaprimer 的 5' 端至 3' 端的單股 DNA 必須較多，以作為第二次 PCR 的 reverse primer。

因此 asymmetry PCR 的步驟時，我們將 ybeA DIP forward primer (220~240 bp)濃度增加，讓 forward primer 的濃度高於 reverse primer(444~468 bp)20 倍，第一次 PCR 完後，須先 cleanup 後去除多餘的 oligonucleotide，再進行第二次 PCR，利用 TA clony 方式將 ybeA DIP del gene 接進 pET30a EAM 輽體然後利用 PCR 進行篩選，所選用之 primer 為 ybeA DIP del fp(220~248)及 T7 rp。我們之所以選擇 ybeA DIP del fp(220~248)作為 forward primer，是因為該 primer 可以鍵結在 ybeA DIP del gene 上卻無法鍵結在 ybeA wt gene 上，故可以利用此點來區別 ybeA DIP del gene 與 wt gene 之間的區別。

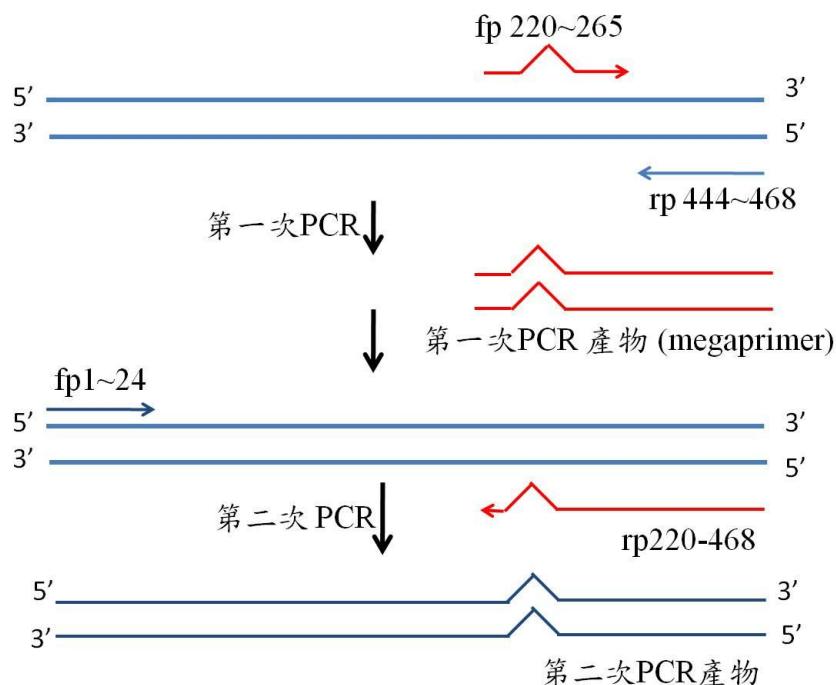


圖 9 ybeA Δ 73-75 基因 megaprimer PCR 流程圖

圖中 fp(220-265)為第一次 PCR 的 forward primer，rp444-468 為第一次 PCR 的 reverse primer，而第二次 PCR 的 forward primer 為第一次 PCR 產物 megaprimer 而 reverse primer 和第一次 PCR 的 reverse primer 相同。

PCR 實驗條件：

Primer	Sequence	T _m	bp
YbeA DIP fp (220~248)	5'-ACCCCTCGGCAAGCCCTGGGAT-3'	60°C	21
YbeA DIP rp (440~468)	5'-TCACTCACGGTGATAAGGATGGTTG-3'	57°C	25
YbeA start fp (1~24)	5' - GTGAAGCTGCAACTTGTGCGC -3'	60.7°C	20

第一次 PCR 條件				
Buffer	Volume(μl)	Temperature	Time	Cycle
d.d H2O	40.5	94°C	1 min	1
1 mM dNTP	1	94°C	30 secs	25
YbeA 4 fp	1	57°C	30 secs	
YbeA 4 rp	1	72°C	30 secs	
10x buffer	5	72°C	7 mins	1
pfx	0.5			
Template DH10B	1			
Total volume	50			

第二次 PCR 條件				
Buffer	Volume(μl)	Temperature	Time	Cycle
d.d H2O	23	94°C	1 min	94°C
1 mM dNTP	1	94°C	30 secs	94°C
5 μM fp1~24	1	60°C	30 secs	
220~468 bp megaprimer	18	72°C	30 secs	
10x buffer	5	72°C	7 mins	72°C
Pro-taq	1			
Template (ybeA pET 30a)	1			
Total vol	50			

表 2 重組 ybeA 基因序列

1atgcaccatc atcatcatca ttcttcgtt ctgggtccac gcggttctgg tatgaaagaa
 61accgctgctg ctaaattcga acgccagcac atggacagcc cagatctggg taccgacgac
 121gacgacaagg ccatggctga ttacgacagt gtgaagctgc aacttgtcgc cgtggaaacg
 181aaaatgccgg actgggtaca aaccggtttt accgagtacc tgcgtcgaaa tccgaaagat
 241atgccctcg agctgattga aattccggcc ggaaaacgcg gcaagaatgc ggacatcaag
 301cgactactcg acaaagaggg tgagcagatg ttggcggccg caggaaaaa ccgcattgtc
 361accctcgata ttccaggcaa gccctggat acgccgcagt tagccgctga gctggaaacgc
 421tggaagctgg atggtcgcga cgtcagtcta ctgattggcg ggcctgaagg gttgtgcct
 481gcctgtaaag cggcggctga gcagagctgg tcgctgtcgg cgcttaccct cccccatccg
 541ctggttcgcg tgctggtcgc agagagtctg taccggcgt ggagcatcac caccaaccat
 601ccttattcacc gtgag**tga**

2-1-3 ybeA Δ 1-8 基因構築

ybeA Δ 1-8 突變株構築是以先前構築好的 YbeA 基因為模板，透過引子 ybeA(175) fp 及 ybeA (627) rp 進行 TA cloning 來擴增 ybeA Δ 1-8 基因，然後將 PCR 產物 clean up 與 pET 30a EAM 做黏合，再利用 primer T7 fp 及 ybeA (627) rp 進行 PCR 篩選。

PCR 實驗條件：

Primer	Sequence	T _m	bp
ybeA (175)fp	5'-GGAACCTAAAATGCCTGACTGG-'	52.3°C	21
ybea (627)rp	5'-GCTCCCTTATCACTCACGG-3'	53.2°C	19

PCR 條件				
Buffer	Volume(μ l)	Temperature	Time	Cycle
dd H ₂ O	20	94°C	1 min	1
1 mM dNTP	0.5	94°C	30 secs	30
ybeA (175)fp	0.5	53°C	30 secs	
ybea (627)rp	0.5	72°C	30 secs	
10x buffer	2.5	72°C	5mins	1
Pro-taq	0.5			
Template(pET 30a- ybeA)	1			
Total volume	25			

2-1-4 ybeA Δ 1-70 基因構築

以先前實驗室建構好的 ybeA 基因為模板，透過 ybeA(361)fp 及 ybeA(627)rp primer 進行 TA cloning 擴增 ybeA Δ 1-70 基因，然後將 PCR 產物經過 clean up 與 pET30a EAM 做黏合，再利用 primer 為 T7 fp 及 ybeA (627)rp 利用進行 PCR 篩選。

PCR 實驗條件：

Primer	Sequence	T _m	bp
ybeA (361)fp	5'-ACACTAGATATTCCAGGCAAGC-3'	53°C	22
ybea (627)rp	5'-GCTCCCTTATCACTCACGG-3'	53.2°C	19

PCR 條件				
Buffer	Volume(μ l)	Temperature	Time	Cycle
dd H ₂ O	20	94°C	1 min	1
1 mM dNTP	0.5	94°C	30 secs	30
ybeA (361)fp	0.5	53°C	30 secs	
ybea (627)rp	0.5	72°C	30 secs	
10x buffer	2.5	72°C	5mins	1
Pro-taq	0.5			
Template (ybeA pET 30a EAM)	1			
Total volume	25			

2-1-5 ybeA \triangle 118-155 基因構築

以先前實驗室建構好的 ybeA 基因為模板，透過 ybeA(151)fp 及 ybeA(501)rp 進行 TA cloning，將 PCR 產物經過 clean up 與載體 pET30a EAM 進行黏合再利用 T7 fp 與 ybeA(627) rp 進行篩選。

PCR 實驗條件：

Primer	Sequence	T _m	bp
ybeA (151)fp	5'-GTGAAACTGCAACTTGTAGCC-3'	52.4°C	21
ybeA (504)rp	5'-CGACAAAGTTGCAGCTTCAC-3'	54.5°C	19

PCR 條件				
Buffer	Volume(μl)	Temperature	Time	Cycle
dd H ₂ O	20	94°C	1 min	1
1 mM dNTP	0.5	94°C	30 secs	30
ybeA (151)fp	0.5	53°C	30 secs	
ybeA (501)rp	0.5	72°C	30 secs	
10x buffer	2.5	72°C	5mins	1
Pro-taq	0.5			
Template (ybeA pET 30a EAM)	1			
Total volume	25			

2-2蛋白的製備

將所需的基因接合在 pET30a EAM 載體後，送入大腸桿菌 *BL21 DE3* 中以乳糖異構物 IPTG 誘導 16 小時以求獲得大量表現的蛋白質內含體。其中 IPTG 可以誘導乳糖對照組 (lac peron) 活化表現下游基因。其表現原理在於在大腸桿菌 *BL21 DE3* 的乳糖對照組可以產生大量的 T7 RNA polymerase 表現，然後 T7 RNA polymerase 再去活化 pET30a 上的 T7 promoter，使得我們建構的基因得以大量表現，而誘導物-乳糖會被乳糖對照組所產生的 β -galatosidase 會分解終止反應；然而 IPTG 却不會被分解，因此可以不斷的產生大量的蛋白。

2-2-1 蛋白質小量表現

實驗步驟：

- (1) 從 -80°C 取 *BL21 DE3* 菌種含有 pET30a 帶有 ybeA 基因或突變株基因的菌，待溶化後取出 60 μ l 加入 3 ml 的 LB 培養液(含 20 ng/mL Kanamycin)，於 37°C，200 rpm 震盪隔天培養活化菌株。
- (2) 取活化菌液 3 μ l 加入 3 mL LB 培養液(含抗生素 Kanamycin 20 ng/mL)，37°C，200 rpm 震盪培養至 OD 0.6-0.8 後加入 IPTG，使 IPTG 最終濃度為 1 mM，持續震盪培養 12-16 小時。
- (3) 抽取 1 ml 菌液，以 12000 rpm 離心 1 分鐘，將沉澱的菌體以 100 μ l 的 sample buffer(10 mM Tris-HCl，pH6.8，4 % SDS，0.2 % Bromophenol Blue，20 % Glycerol，200 mM DTT)回溶。以超音波震盪器(UP200s, Hielsher, Teltow, Germany)打破細胞壁，透過 15 % SDS-PAGE 確認是否有目標蛋白大量表現。

2-2-2 蛋白質大量表現

實驗步驟：

- (1) 從 -80°C 取 *BL21 DE3* 菌種含有 pET30a 帶有 ybeA 基因或突變株基因的菌，待溶化後取出 60 μ l 加入 3 ml 的 LB 培養液(含 20 ng/mL Kanamycin)，於 37°C、200 rpm 震盪隔天培養活化菌株。
- (2) 取活化菌液 250 μ l 加入 250 mL LB 培養液(含抗生素 Kanamycin 20 ng/mL)，37 °C、200 rpm 震盪培養至 OD 0.6-0.8 後加入 IPTG，IPTG 最終濃度為 1 mM，持續震盪培養 12-16 小時，離心獲得菌體，使用二次水回溶菌體，利用破菌機打破細胞壁。
- (3) 將破碎菌液以(10000 rpm 4 °C 離心 10 分鐘)後，移除上清液，收集蛋白沉澱物持續以二次去離子水回溶、離心、去除上清液，清洗至上清液完全澄清。

2-2-3 蛋白摺疊

在這裡我們透過實驗室建構的準靜態摺疊法(Quasi-static-like thermal equilibrium dialysis)將蛋白質摺疊回自然態。

實驗步驟：

- (1) 將內含體 (Inclusion body) 透過 denature buffer 回溶，再將回溶的蛋白透過離心移除沉澱物，再將離心後蛋白溶液，透過孔徑為 0.22 μ m PVDF 濾膜進行過濾。然後將過濾好的蛋白溶液置入孔徑為 3.5 kDa 的透析膜後，置入 R₁ 緩衝液做透析，此時摺疊中間物稱為 M₁。
- (2) 將摺疊中間物 M₁ 置入 R₂ 緩衝液透析，此時摺疊中間物稱為 M₂。
- (3) 將摺疊中間物 M₂ 置入 R₃ 緩衝液透析，此時摺疊中間物稱為 M₃。

- (4) 將摺疊中間物 M_3 置入 R_4 緩衝液透析，此時摺疊中間物稱為 M_4 。
(5) 將摺疊中間物 M_4 置入 R_5 緩衝液透析，此時摺疊中間物稱為 M_5 或摺疊態。

2-3 圓二色光譜(Circular Dichroism Spectroscopy)

圓二色光譜是一種特殊的吸收光譜，它對手相分子的構型相當敏感，其中手相分子具有光學活性，當單色左旋光及右旋光偏振光通過樣品時，對左旋光及右旋光偏振光有不同吸收就叫做圓二色性。圓二色光譜技術(Circular Dichroism)，早在 1969 年就由 Greenfield 利用來估計蛋白質的二級結構，是一種快速簡單且相當準確的方法。圓二色光譜可以用來分析生物樣品的結構像是蛋白質以及核酸分子，在遠紫外線旋光光譜波段(180-250 nm)主要用於偵測蛋白質二級結構，而在近紫外線旋光光譜波段(250-350 nm)主要偵測蛋白質胺基酸的殘基，蛋白質二級結構特徵峰如表 3 所示。

表 3 蛋白質二級結構特徵峰

	-band(nm)	+band(nm)
α 螺旋	222	192
	208	
β sheet	216	195
turn	220(weak)	
	203(strong)	205
Polypro II 螺旋	190	210-230
Random coil	200	212

實驗步驟:

- (1) 調整蛋白質濃度為 0.5 mg/ml。
 - (2) 打開氮氣持續吹 20 分鐘以上，設定水浴槽溫度為 20 °C，開啟 Xe LAMP power 以及 CPU/INST power
 - (3) 打開 AVIV 程式，設定實驗參數
 - (3) 取體積 250 μ l 的樣品加入光徑為 1 mm 的石英樣品槽(quarz cell)
- 實驗參數:掃描波長為 200~260 nm，band width 是 0.5 nm，interval time 是 10 秒。

2-4 螢光光譜儀(Fluorescence Spectroscopy)

2-4-1 螢光原理

螢光分子吸收外界光原能量 hv_{EX} 使其能量跳至 S_1' 後，受激螢光分子產生一些變化，並與外在環境產生許多化學反應，使能量從 S_1' 掉到 S_1 再掉到 S_0 ，放出能量 hv_{EM} ，其中 hv_{EX} 的能量相較於 hv_{EM} 其能量較低且波長也較激發光源長(圖 10)。

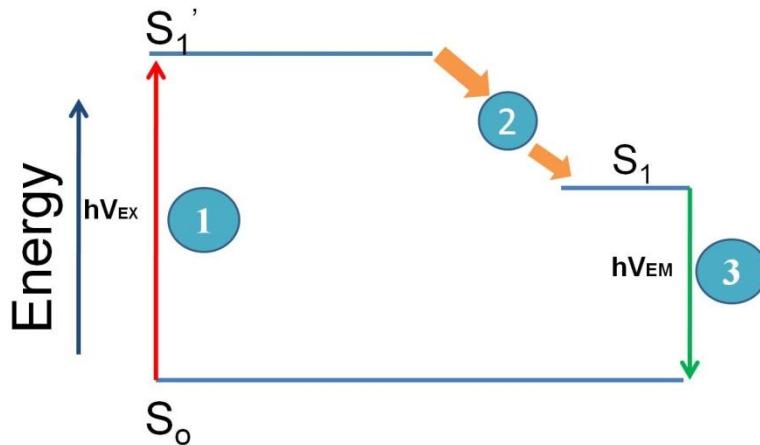


圖 10 螢光原理

2-4-2 蛋白質螢光原理

蛋白質內部主要由疏水性胺基酸所構成，在這些胺基酸中的芳香族類胺基酸 Trp、Tyr、Phe 有著特殊的光學性質可以吸收波長為 280 nm 的光，其中 Trp 更可以吸收 295 nm 的光，屬於蛋白質分子內的螢光基團。當這些螢光基團分子受到光激發後會造成內部電子躍遷釋放出螢光；倘若這些螢光基團處於疏水性環境底下，其分子內部共振結構相當穩定，在受到光激發後能量不容易以熱能型式發散；然而當處於親水性環境底下，其螢光基團結構相當不穩定，在受到光激發之後，分子內部共振相當明顯，造成釋放出的螢光相當微弱。根據這些螢光基團的螢光強度可以用來分析其所處的蛋白質的摺疊狀態，當蛋白質內部核心於疏水性環境底下環境底下，這些螢光基團受光激發後仍相當穩定；然而若是受到一些變性因子如高溫、酸鹼等外在因素影響，造成螢光基團暴露在水溶性環境，則會導致讓螢光能量下降，以及波峰發生紅位移現象。

實驗步驟：

- (1) 調整蛋白質濃度為 0.1 mg/ml。
 - (2) 水浴槽溫度為 25 °C。
 - (3) 打開程式連結電腦與儀器(Hitachi F-4000, Scientific Equipment Source Inc, Canada)，設定實驗參數。
 - (4) 取體積 700-800 μl 的樣品加入光徑為 1 cm 的石英樣品槽(quartz cell)
- 實驗參數：掃描波長為 310~450 nm，延遲時間(delay time)為 10 秒，EX Slit:5.0 nm, EM Slit: 5.0 nm，波長間隔為 0.2 nm，掃瞄速度是 1200 nm/min。

2-5 恆溫滴定微卡計(Isothermal Titration Calorimetry)

透過恆溫滴定微卡計可以得知生化反應或分子間交互作用力的大小，如酵素以及受質間的交互作用力以及核酸分子間的交互作用力。恆溫滴定微卡計其原理是在恆溫環境下觀察生化反應或分子間交互作用，將欲觀察的反應物透過滴定的方式滴入另一欲觀察反應的反應系統中，分析在恆溫環境底下反應熱的變化。在這裡我們利用 ITC 偵測 YbeA 蛋白與其受質 S-Adenosyl methionine(AdoMet)之間的交互作用力。

實驗步驟：

- (1) 樣品偵測前要先用孔徑為 0.22 μm 過濾膜過濾樣品，並透過抽真空幫浦以及超音波震盪器去除氣泡。
- (2) 在樣品端加入 2.8 ml 的樣品溶液，而參考端的反應槽加入 3 ml 和樣品端相同的緩衝液，緩慢將參考端以及樣品端放進反應槽內。

- (3)在外部注射器加入約為 $300 \mu\text{l}$ 的反應物，將前端細管插入反應槽內，打開攪拌器，等待平衡穩定後開始做測定。
- (4)設定實驗參數(注射器以每個十分鐘滴入 $10 \mu\text{l}$ 的樣品，共二十次，最終滴入 $200 \mu\text{l}$ ，最後樣品槽的體積達 3ml 和參考端相同)

2-6 介質輔助雷射脫附游離飛行式質譜儀 (MALDI-TOF-MS)

基質輔助雷射脫附-飛行時間質譜法(MALDI-time of flight, TOF)，即為結合基質輔助雷射脫附離子化技術與飛行時間質譜分析的應用。

MALDI 採用短的脈衝鐳射 ($1\sim10 \text{ ns}$)與高電壓使樣品分子離子化並加速之後進入飛行管後以進行質譜儀分析。將處於固相或粘稠的液相狀態樣品與基質的混和物經由雷射脈衝的撞擊，激發基質分子並將能量與電荷轉移至樣品分子，樣品分子接受能量與電荷之後使得接近表面的分子相斥分離，釋出帶電的氣態離子，然後藉由電場加速後進入飛行管中進行自由飛行(free flight)，透過其飛行時間的長短可得到其精確的質荷比(m/z)。最常被使用的基質(matrix)有三種: α -氰基-4-羥基肉桂(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)、2,5-二羥基苯甲酸 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)與芥子酸 sinapinic acid (SA)。

在這裡我們透過胰蛋白酶分別對 YbeA 摺疊態以及未摺疊態進行水解作用，然後將水解產物透過(MALDI-TOF-MS)來進行分析。

樣品前處理

- (1)取適量 YbeA 樣品於 1.5 ml eppendorf 中後加入 trypsin(promega) 使之莫耳比例為 $25:1$ 及 $50:1$ 。
- (2)置於 37°C 恒溫水槽中進行酵素消化反應。
- (3)每 $1, 2, 3\dots\dots$ 分鐘取一次 (約取 $5 \mu\text{l}$) 開始消化之 YebA，將其注入裝有等體積之 $50 \% \text{ ACN} + 0.1 \% \text{ TFA}$ 的 eppendorf 中終止消化反應。(各取出每一個時間點取出的消化產物 $0.5 \mu\text{l}$ 混合 $0.5 \mu\text{l}$ 基質點於 384 well 的 ground target 上)。
- (4)待乾燥結晶後，推入 MALDI-TOF-MS 分析。
- (5)根據質譜圖，使用 MASCOT 軟體線上搜尋 YebA，根據其及格分數及 cover 到之片段進行結果判斷。

2-7 螢光共振能量轉移(Förster resonance energy transfer)

螢光共振能量轉移可以用來比較分子距離以及分子內直徑的有效工具，廣泛的應用於涉及分子間距離變化的生物現象，可以用來測量兩個發光基團間的距離及蛋白質蛋白質間的交互作用關係以及核酸分子及蛋白間的交互作用。當螢光基團被光照時，被激發的分子可以透過散發能量回到基態，其中釋出的光能可被發光基團在 10^{-15} 秒內吸收而在 10^{-9} 秒內再發射出來。然而也有可能被激發分子並不發光，而將能量傳遞另外的螢光基團，這些螢光基團可以在相同的時間內發螢光，稱為螢光共振能量轉移 (FRET)。其中產生螢光共振能量轉移 (FRET) 要具備三個要素，以下將分別做說明。

- (1)供體和受體的距離必須在 $10\text{-}100 \text{ \AA}$ 之間
- (2)受體的吸收光譜與供體的發射光譜重疊
- (3)供體和受體能量轉移偶極子的方向必須近似地平行

在這裡我們透過 FRET 的方式分析 YbeA 扭結區域在摺疊過程中的距離的變化。其中 YbeA 扭結區域分子內有三個 Trp 以及一個 cysteine 分子，透過在 cysteine 接上螢光基團 AMCA 以波長 295 nm 的激發光來激發 Trp 分子，然後計算 Trp 與 AMCA 的螢光能量轉移率進而推得螢光基團在摺疊過程中距離的變化。

其中 AMCA 的激發波長在 340-350 nm 而發射波長在 440-460 nm。而 Trp 的激發光波長在 295 nm，而發射光波長為 345-350 nm 左右。

實驗步驟:

- (1)取適量 YbeA 樣品溶於 10mM Tris-HCl (pH 8.8)置於 1.5 ml eppendorf 中，後加入 AMCA-HPDH 使之莫耳比例為 10:1，於室溫底下避光靜置 1 個半鐘頭，待其反應完全。將 YbeA 及 AMCA-HPDH 混和物置入 3.5 kDa 的透析膜，置入 10mM Tris -HCl (pH 8.8) 做透析，去除多餘未接合的 AMCA-HPDH 分子。
- (2)藉由紫外光可見光譜儀來計算 YbeA 以及 AMCA-HPDH 的濃度來計算接和率。
- (3)利用波長 295 nm 的光源激發 Trp 分子，分析 Trp 以及 AMCA 之螢光能量轉移效率來分析扭結區域的距離變化。

2-8 力學截流儀(stopped -flow)結合圓二色光譜(CD Spectroscopy)

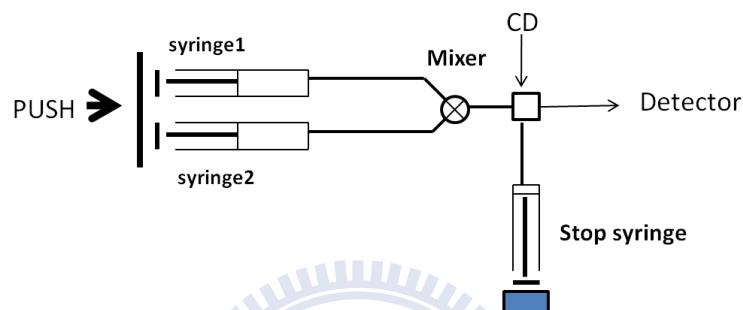


圖 11 動力學截流儀結合圓二色光譜儀裝置

動力學截流儀可以偵測溶液中非常快速的反應，將兩種溶液經注射流入混合室中迅速地混合，透過活塞來控制流入的體積，結合光學儀器來分析反應速率的變化。在這裡我們透過在這裡我們透過動力學截流儀結合圓二色光譜儀快速混合，來分析蛋白在摺疊以及變性的反應速率變化。

實驗步驟:

- (1)配置蛋白質濃度為 22 mg/ml。
- (2)樣品偵測前用孔徑為 0.22 μm 過濾膜過濾樣品。
- (3)開啟液態氮氣鋼瓶，打開水浴槽設定溫度 19 °C，待液態氮開啟後 20 分鐘，開啟 Xe LAMP power。
- (4)開啟 CPU 控制閥，打開電腦，開啟 AVIV stopped-flow CD 程式。
- (5)開啟 stopped-flow 程式，將注射器歸位(home syringe)，設定 syringe 體積(syringe1:1 ml, syringe 2:2 ml, syringe 3: 5 ml)。
- (6)利用二次去離子水清洗樣品注射器。
- (7)將蛋白溶液放入 syringe 1，而將欲混和之緩衝液置入 syringe 3。
- (8)設定實驗參數(平衡 200 秒，混和時間 50 秒，偵測時間 2 分鐘，偵測波長 222 nm，掃描次數四次，系統溫度 25 度)
- (9)將分析得數據利用 Exponential decay 來做 fitting，根據數據計算反應速率。

第三章 實驗結果

3-1 基因構築結果

3-1-1 pET30a-ybeA 質體構築

此基因由本實驗室所構築，圖 12 為質體 pET30a-ybeA 的建構圖，在這裡我們選用大腸桿菌 *K-12 DH10B* 的染色體為模板來擴增 ybeA 基因，*DH10B* 染色體本身有 4686137 bp，而 ybeA 基因則位在 *DH10B* 染色體基因 607270 bp 之間，我們透過 nest PCR 方式來擴增 ybeA 基因，圖 13(A)為 *DH10B* 染色體為模板，透過引子 ybeA 4 fp 及 ybeA 4 rp 擴增含 ybeA 基因的結果，在 lane1 部分 600~700bp 位置有單一片段，其大小與 ybeA 4 fp 及 ybeA 4 rp PCR 擴增預計長度 592bp 符合；圖 13(B)為 ybeA start fp 以及 ybeA rp 進行 PCR 結果，lane1 在 400-500bp 位置有單一片段其大小與預期片段大小 461 bp 吻合。

再將我們擴增好的 ybeA 基因與 pET30a EAM 輽體進行黏合，送入大腸桿菌 *BL21 DE3* 菌株，圖 13(C)為透過 T7 fp 以及 ybeA 4 rp PCR 篩選挑選出來的菌株凝膠電泳結果，在 lane 3 部分 800~900 bp 位置有單一片段，其大小與預計片段 811 bp 吻合，因此菌落 3 可能有 ybeA 基因，於是我們將菌落 3 送定序，而圖 14 為定序結果與 NCBI 上公布的 ybeA 基因比對，其序列相符，我們確定菌落 3 確實含 pET30a-ybeA 基因。

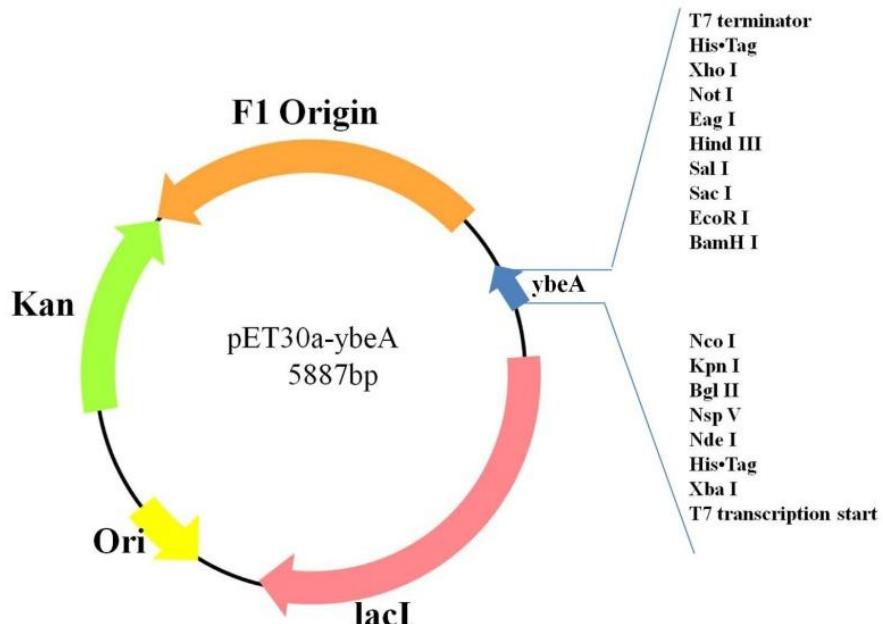


圖 12 質體 pET30a-ybeA 的建構圖

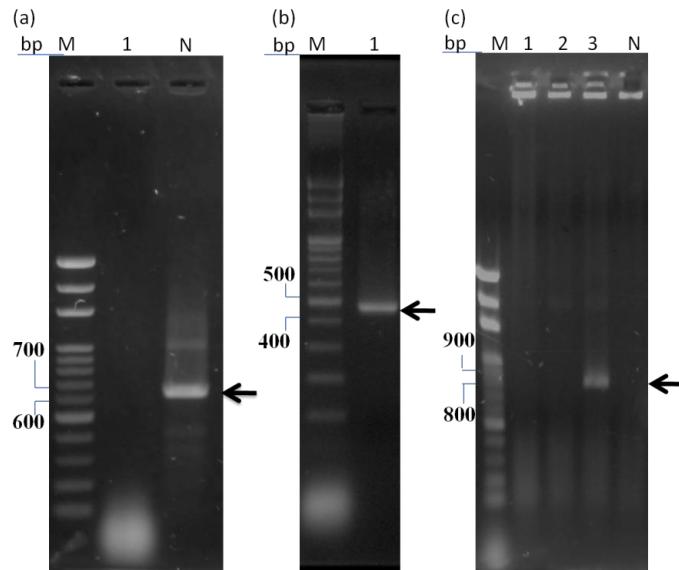


圖 13 pET30a-ybeA 質體構築結果

圖中以菌株 *DH10B* 的染色體作為模版，利用引子 *ybeA* 4 fp 及 *ybeA* 4 rp 來擴增 *ybeA* 基因結果，lane M 為 DNA ladder，lane N 為負對照組，lane 1 為 *DH10B* 的染色體，利用引子 *ybeA* 4 fp 及 *ybeA* 4 rp 擴增結果，箭頭所指為預期片段位置。圖(b)是以 start fp 以及 *ybeA* 4 rp 擴增結果，箭頭所指為預期片段位置。圖(c)為透過 T7 fp 及 *ybeA* 4 rp 引子來 PCR 檢測挑出來的菌落是否有 *ybeA* 基因，lane M 為 DNA ladder，lane N 為 negative control，lane 1-3 是挑出來菌落，箭頭所指為預期片段位置，DNA 電泳使用 1.5% Agarose gel 及 0.5x TBE buffer。

r_ybeA NCBI_ybeA	ATGCACCACATCATCATCATCATTCTCTGGTCTGGTGCACCGGGTTCTGGTATGAAAGAA 60
r_ybeA NCBI_ybeA	ACCGCTGCTGCTAAATTCAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGTACCGACGAC 120
r_ybeA NCBI_ybeA	GACGACAAGGCCATGGCTGATTACGACAGTGTGAAGCTGCAACTTGTGCGCGTGGGAACG 180
r_ybeA NCBI_ybeA	-----GTGAAGCTGCAACTTGTGCGCGTGGGAACG 30
r_ybeA NCBI_ybeA	AAAAATGCCGACTGGGTACAAACCGGTTTACCGAGTACCTGCGTCGTTTCCGAAAGAT 240
r_ybeA NCBI_ybeA	AAAAATGCCGACTGGGTACAAACCGGTTTACCGAGTACCTGCGTCGTTTCCGAAAGAT 90
r_ybeA NCBI_ybeA	ATGCCCTTCGAGCTGATTGAAATTCCGGCGGAAACCGGGCAAGAATGCGGACATCAAG 300
r_ybeA NCBI_ybeA	ATGCCCTTCGAGCTGATTGAAATTCCGGCGGAAACCGGGCAAGAATGCGGACATCAAG 150
r_ybeA NCBI_ybeA	CGCATACTCGACAAAGAGGGTGAGCAGATGTTGGCGCGCAGGCCAAAACCGCATTGTC 360
r_ybeA NCBI_ybeA	CGCATACTCGACAAAGAGGGTGAGCAGATGTTGGCGCGCAGGCCAAAACCGCATTGTC 210
r_ybeA NCBI_ybeA	ACCCCTCGATATTCCAGGCAAGCCCTGGGATACGCCGCACTGAGCTGGAACGC 420
r_ybeA NCBI_ybeA	ACCCCTCGATATTCCAGGCAAGCCCTGGGATACGCCGCACTGAGCTGGAACGC 270
r_ybeA NCBI_ybeA	TGGAAAGCTGGATGGTCGCGACGTCAGTCTACTGATTGGCGGGCTGAAGGGTTGTCGCCT 480
r_ybeA NCBI_ybeA	TGGAAAGCTGGATGGTCGCGACGTCAGTCTACTGATTGGCGGGCTGAAGGGTTGTCGCCT 330
r_ybeA NCBI_ybeA	GCCTGTAAAGCGCGCGCTGAGCAGAGCTGGTCGCTGCGCGCTTACCCCTCCCCATCCG 540
r_ybeA NCBI_ybeA	GCCTGTAAAGCGCGCGCTGAGCAGAGCTGGTCGCTGCGCGCTTACCCCTCCCCATCCG 390
r_ybeA NCBI_ybeA	CTGGTTCGCGCTGGTCGAGAGAGTCTGTACCGGGCGTGGAGCATCACCAACCAT 600
r_ybeA NCBI_ybeA	CTGGTTCGCGCTGGTCGAGAGAGTCTGTACCGGGCGTGGAGCATCACCAACCAT 450
r_ybeA NCBI_ybeA	CCTTATCACCGTGAGTGA 618
r_ybeA NCBI_ybeA	CCTTATCACCGTGAGTGA 468

圖 14 重組 *ybeA* 基因與 NCBI 公布之 *ybeA* 基因的比較結果。

圖中 NCBI -ybeA 為 NCBI 上所登錄的 *ybeA* DNA 序列，而 r-ybeA 為我們所構築的 *ybeA* 基因定序結果，其中星號部份為有對應到的基因序列，我們所擴增的 *ybeA* 除了前面多了載體的 his-taq 融和片段外，其餘序列完全符合 NCBI 所登錄的資料。

3-1-2 pET30a-ybeA Δ (73-75) 質體構築

此基因由本實驗室所構築，圖 15 為質體 pET30a-ybeA Δ (73-75)的建構圖，我們以 pET30a-ybeA 為模板，透過 megaprimer PCR 方式來去除 DIP 氨基酸對應核甘酸，其中 ybeA Δ (73-75) 的 PCR 主要分成兩部分，第一個部份我們先以 ybeA DIP del fp (220~248) 以及 ybeA DIP del rp (440~468)為引子，擴增含突變位置的 megaprimer (220~468)以作為下一步 PCR 的 reverse primer。而第二次 PCR 時以 pET30a-ybeA 為模板以 ybeA start fp(1~24)做為 forward primer 而第一次 PCR 的 megaprimer (220~468)做為 reverse primer，擴增 ybeA Δ (73-75)基因。

圖 16 (a)為 ybeA Δ (73-75)基因擴增結果，lane1 在 400~500bp 位置有單一片段其大小與預計長度 492bp 符合，將我們擴增好的 ybeA Δ (73-75)基因與 pET30a EAM 輽體進行黏合，再送入大腸桿菌 BL21 DE3 菌株，圖 16 (b)為利用 ybeA DIP del fp (220~248)及 T7 rp 塞選挑出來菌落，菌落 7、8、17 在 400-500bp 位置有單一片段其大小與預期片段大小 485 bp 吻合，因此菌落 7、8、17 可能有 ybeA Δ (73-75)基因，於是我們將菌落送定序，而圖 17 為重組 YbeA 與重組 ybeA Δ (73-75) 基因序列比較結果，綜合以上結果，我們確定菌落確實含 pET30a-ybeA Δ (73-75)基因。

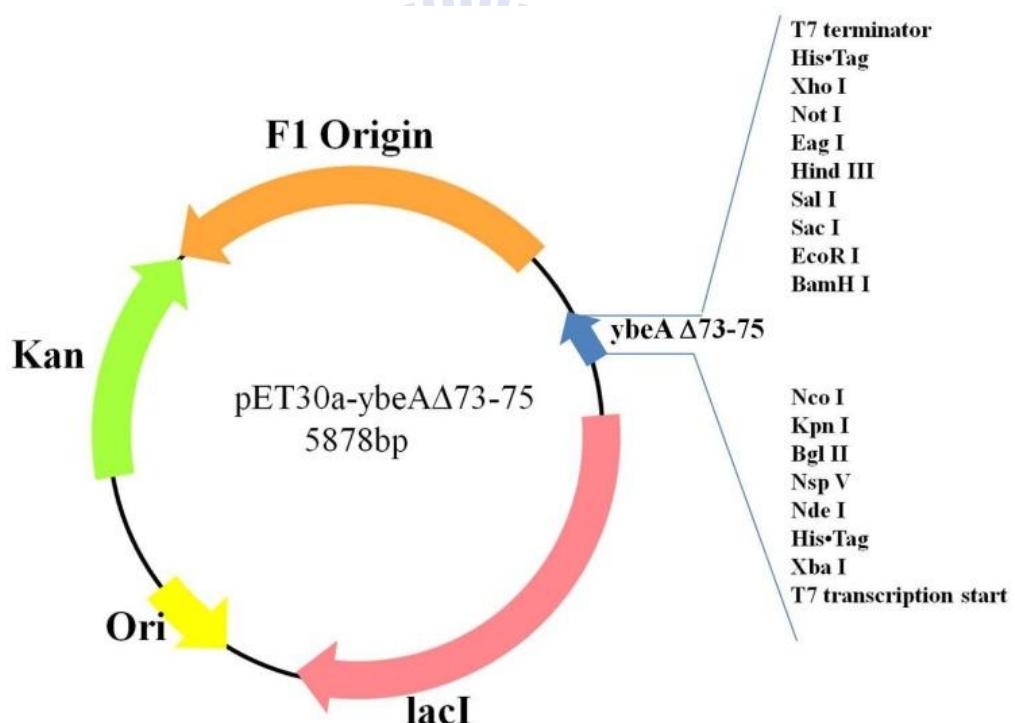


圖 15 質體 pET30a-ybeA Δ (73-75)的建構圖

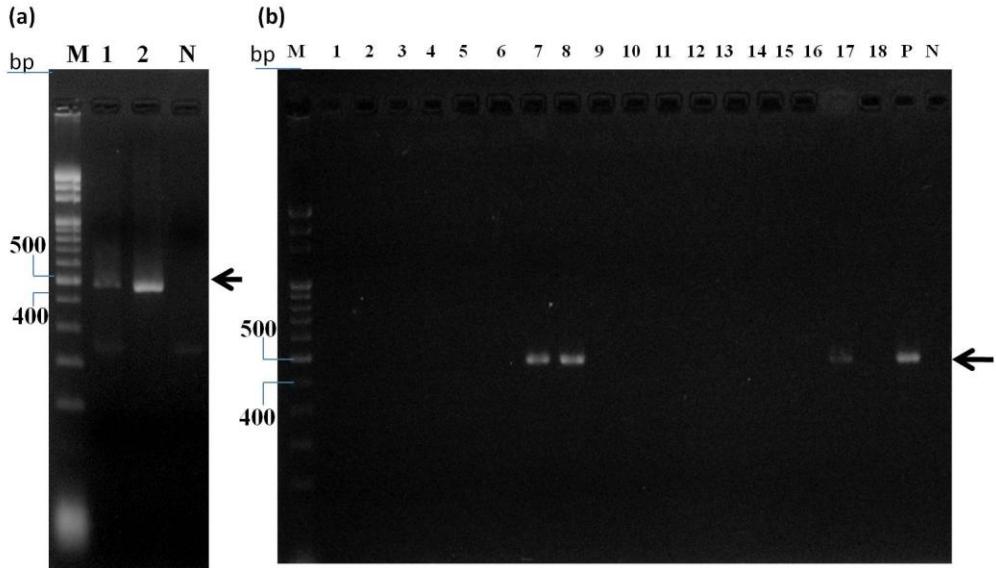


圖 16 pET30a-ybeA Δ (73-75)基因建構結果

(a)圖為利用 megaprimer 方式擴增 ybeA 去除胺基酸 DIP 相對基因結果，lane M 為 DNA ladder，lane 1 為 ybeA Δ (73-75)，lane P 為正對照組，lane N 為負對照組，箭頭所指處為預計片段大小位置，在這裡 DNA 電泳使用 1.5 % 瓊脂膠體及 0.5 x TBE buffer；圖(b)為透過引子 ybeA DIP del fp(220~248)以及 T7 rp PCR 篩選挑選出來的 17 個菌落，lane M 為 DNA ladder，lane 1-17 為挑選出來的挑選 17 顆菌落，lane P 為正對照組，而 lane N 為負對照組，箭頭所指處為預計片段大小位置，在這裡 DNA 電泳使用 1.5 % 瓊脂膠體及 0.5 x TBE buffer。

ybeA	GTGAAGCTGCAACTTGTGCCGTGGAACGAAAAATGCCGACTGGTACAAACGGTTT
ybeADIP	GTGAAGCTGCAACTAGTCGCCGTGGAACGAAAATGCCGACTGGTACAAACGGTTT
*****	*****
ybeA	ACCGAGTACCTGCGTCTTCCGAAAGATATGCCCTTCGAGCTGATTGAAATTCCGCC
ybeADIP	ACCGAGTACCTGCGTCTTCCGAAAGATATGCCCTTCGAGCTGATTGAAATTCCGCC
*****	*****
ybeA	GGAAAACCGCGCAAGAATGCCGACATCAAGCGCATACTCGACAAAGGGTGAGCAGATG
ybeADIP	GGAAAACCGCGCAAGAATGCCGACATCAAGCGCATACTCGACAAAGGGTGAGCAGATG
*****	*****
ybeA	TTGGCGGCCGCAGGCAGAACCGCATTGTGACCCCTCGATATTCCAGS
ybeADIP	TTGGCGGCCGCAGGCAGAACCGCATTGTGACCCCTCGATATTCCAGS
*****	*****
ybeA	ACGCCGCAGTTAGCCGCTGAGCTGGAACGCTGGAAAGCTGGATGGTCGCGACGTCAGTC
ybeADIP	ACGCCGCAGTTAGCCGCTGAGCTGGAACGCTGGAAAGCTGGATGGTCGCGACGTCAGTC
*****	*****
ybeA	CTGATTGGCGGCCCTGAAGGGTTGTCGCCCTGCTTAAGCGGCCGCTGAGCAGAGCTGG
ybeADIP	CTGATTGGCGGCCCTGAAGGGTTGTCGCCCTGCTTAAGCGGCCGCTGAGCAGAGCTGG
*****	*****
ybeA	TCCGCTGCGCGCTTACCTCCCCCATCCGCTGGTTCGCGTGTGGTCGAGAGAGTC
ybeADIP	TCCGCTGCGCGCTTACCTCCCCCATCCGCTGGTTCGCGTGTGGTCGAGAGAGTC
*****	*****
ybeA	TACCGGGCGTGGAGCATCACCAACCAACCATCCTTATCACCGTGAGTGA
ybeADIP	TACCGGGCGTGGAGCATCACCAACCAACCATCCTTATCACCGTGAGTGA
*****	*****

圖 17 重組 ybeA 與重組 ybeA Δ (73-75)基因序列比較結果。

星號部份為有對應到的基因序列，方塊圈選位置為基因序列上不同處，在第一個方塊中的密碼子 CTT 靜默突變為 CTA，此突變不影響轉譯結果，而在第二個方塊部分，ybeA Δ (73-75)相較於 ybeA 少了 3 個密碼子，其相對應的胺基酸分別為 D.I.P，綜合以上結果，得知獲得 ybeA Δ (73-75)基因。

3-1-3 pET30a -ybeA Δ 1-8 質體構築

圖 18 為質體 pET30 -ybeA Δ 1-8 的建構圖，我們以 pET30a-ybeA 為模板，ybeA(175)fp 以及 ybeA(627)rp 做為引子擴增 ybeA Δ 1-8 基因，圖 19(a)為 ybeA Δ 1-8 基因擴增的凝膠電泳結果，lane1 在 400~500 bp 位置有單一片段，其大小與 ybeA(175)fp 以及 ybeA(627)rp 預計擴增長度 477 bp 符合，將我們擴增 ybeA Δ 1-8 基因與 pET30a EAM 輽體進行黏合，再送入大腸桿菌 BL21 DE3 菌株。圖 19(b)為利用引子為 T7 Fp 以及 ybeA(627)rp PCR 篩選挑出來的菌落，其中預計擴增片段大小為 811 bp，而我們挑選出來的菌落 1、2、4、5、6、7、8、9 在 700~800 bp 位置都有單一片段，其大小與 T7 fp 及 ybeA(627)rp 預計擴增片段大小吻合，綜合以上結果，菌落 1、2、4、5、6、7、8、9 可能有 ybeA Δ (1-8)基因。於是我們將菌落送定序。圖 20 為重組 ybeA 與重組 ybeA Δ (1-8)基因序列比較結果，綜合以上結果，我們確定挑出來的菌落確實含 pET30a -ybeA Δ 1-8 基因。

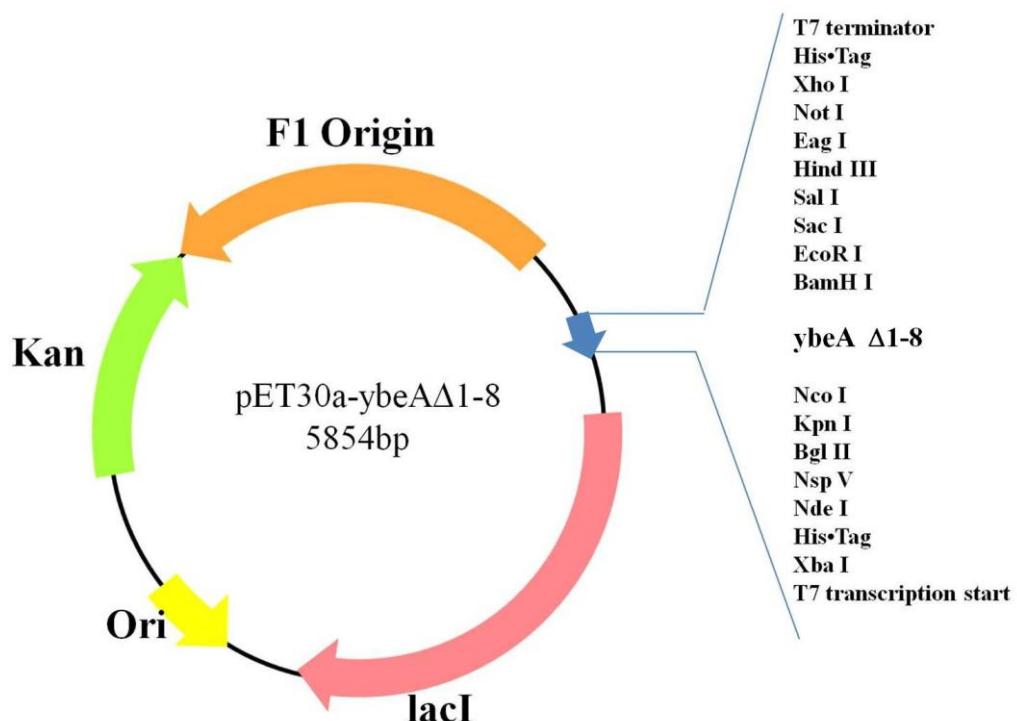


圖 18 質體 pET30-ybeA Δ 1-8 的建構

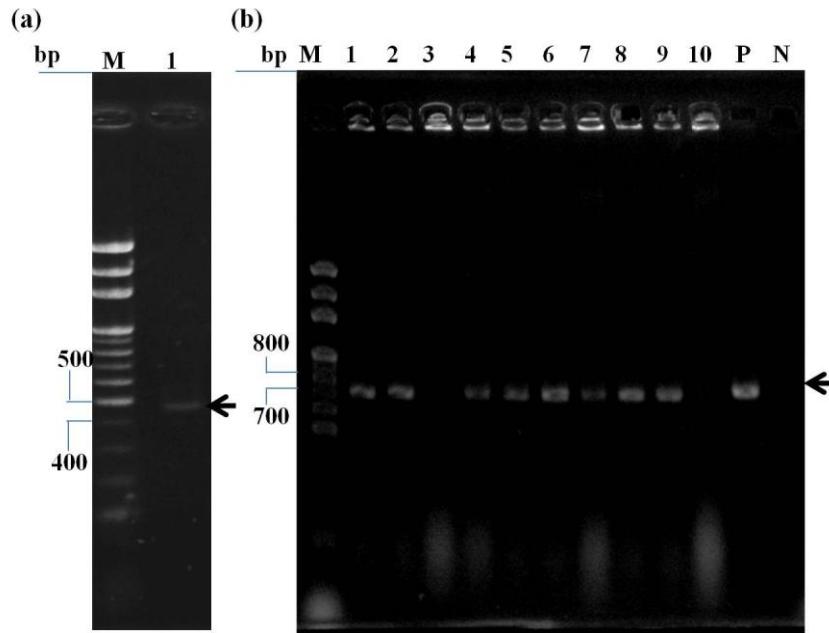


圖 19 *ybeA* Δ 1-8 基因建構結果。

圖(a)為利用引子 *ybeA* (175) fp 以及 *ybeA*(627) rp 擴增 *ybeA* Δ 1-8 結果，lane M 為 DNA ladder，lane 1 為以 pET30a-*ybeA* 質體為模板 PCR 擴增結果，而箭頭所指處為預計片段位置，在這裡 DNA 電泳使用 1.5 % 琼脂膠體及 0.5 x TBE buffer；圖(b)為利用引子以 T7 fp 及 *ybeA* (501) rp 引子來 PCR 檢測挑出來的 10 顆菌落，lane M:DNA ladder，lane 1-10 是挑出來的 10 顆菌落，lane P 為正對照組，lane N 為負對照組。箭頭所指處為預計片段大小位置，在這裡 DNA 電泳使用 1.5 % 琼脂膠體及 0.5 x TBE buffer。

<i>ybeA</i>	GTGAAGCTGCAACTTGTGCGCGTGGGAACGAAAATGCCGACTGGGTACAAACCGGTTTT	60
<i>ybeA</i> <i>ybeA</i> Δ 1-8	-----GGAACTAAAATGCCGACTGGGTACAAACCGGTTTT	36
	*****	*****
<i>ybeA</i>	ACCGAGTACCTGCGTCGTTTCCGAAAGATATGCCCTCGAGCTGATTGAAATTCCGGCC	120
<i>ybeA</i> <i>ybeA</i> Δ 1-8	ACCGAGTACCTGCGTCGTTTCCGAAAGATATGCCCTCGAGCTGATTGAAATTCCGGCC	96
	*****	*****
<i>ybeA</i>	GGAAAACGCGGCAAGAATGCGGACATCAAGCGCATACTCGACAAAGAGGGTGAGCAGATG	180
<i>ybeA</i> <i>ybeA</i> Δ 1-8	GGAAAACGCGGCAAGAATGCGGACATCAAGCGCATACTCGACAAAGAGGGTGAGCAGATG	156
	*****	*****
<i>ybeA</i>	TTGGCGGCCGCAGGCAAAAACCGCATTGTCAACCCCTCGATATTCCAGGAAGCCCTGGGAT	240
<i>ybeA</i> <i>ybeA</i> Δ 1-8	TTGGCGGCCGCAGGCAAAAACCGCATTGTCAACCCCTCGATATTCCAGGAAGCCCTGGGAT	216
	*****	*****
<i>ybeA</i>	ACGCCGCAGTTAGCCGCTGAGCTGGAACGCTGGAGCTGGATGGTCGCGACGTCAGTCTA	300
<i>ybeA</i> <i>ybeA</i> Δ 1-8	ACGCCGCAGTTAGCCGCTGAGCTGGAACGCTGGAGCTGGATGGTCGCGACGTCAGTCTA	276
	*****	*****
<i>ybeA</i>	CTGATTGGCGGCCCTGAAGGGTGTGCGCTGCCTGTAAAGCGCGCGCTGAGCAGAGCTGG	360
<i>ybeA</i> <i>ybeA</i> Δ 1-8	CTGATTGGCGGCCCTGAAGGGTGTGCGCTGCCTGTAAAGCGCGCGCTGAGCAGAGCTGG	336
	*****	*****
<i>ybeA</i>	TCGCTGTGGCGCTTACCCCTCCCCATCCGCTGGTCGCTGGTCGCAGAGAGCTG	420
<i>ybeA</i> <i>ybeA</i> Δ 1-8	TCGCTGTGGCGCTTACCCCTCCCCATCCGCTGGTCGCTGGTCGCAGAGAGCTG	396
	*****	*****
<i>ybeA</i>	TACCGGGCGTGGAGCATACCACCAACCATCCTTATCACCGTGAGTGA	468
<i>ybeA</i> <i>ybeA</i> Δ 1-8	TACCGGGCGTGGAGCATACCACCAACCATCCTTATCACCGTGAGTGA	444
	*****	*****

圖 20 重組 *ybeA* 與重組 *ybeA* Δ (1-8)基因序列比較結果。

其中星號部份為有對應到的基因序列，方塊部分為靜默突變不影響轉譯結果，此外重組 *ybeA* Δ (1-8)除了最前端少 8 個密碼子以外其他序列和 *ybeA* 完全相同，而不見的基因的對應胺基酸分別為 V.K.L.Q.L.V.A.V. 這八個胺基酸，這與我們預期要去除的胺基酸相同，綜合以上結果，得知我們得到所需的 *ybeA* Δ (1-8)基因。

3-1-4 pET30a-ybeA Δ 1-70 質體構築

圖 21 為質體 pET30 -ybeA Δ 1-70 的建構圖，ybeA(361) fp 以及 ybeA(627) rp 做為引子擴增 ybeA Δ 1-70 基因，圖 22(a)為 ybeA Δ 1-70 基因擴增的凝膠電泳結果，lane1 在 200-300 bp 位置有單一片段，其大小與 ybeA(361) fp 以及 ybeA(627) rp 擴增預計長度 267 bp 符合，再將我們所擴增 ybeA Δ 1-70 基因與 pET30a EAM 輽體進行黏合，再送入大腸桿菌 BL21 DE3 菌株。圖 22(b)為利用引子為 T7 fp 以及 ybeA(627) rp PCR 篩選挑出來的菌落，利用 PCR 篩選挑出來的菌落，菌落 2、3、4、6、7、8、9 在 500~600 bp 位置有單一片段，其大小與 T7 fp 及 ybeA(627) rp 預計擴增片段 514 bp 吻合，菌落 2、3、4、6、7、8、9 可能有 ybeA Δ (1-70)基因，所選用之 primer 為 T7 fp 以及 ybeA(627) rp，預計擴增片段大小為 514 bp，而我們的 PCR 擴增結果的片段大小與預期大小符合，於是我們將菌落送定序，而圖 23 重組 ybeA Δ 1-70 與重組 ybeA 基因序列比較結果，綜合以上結果，我們確定挑出來的菌落確實含 ybeA Δ 1-70 基因。

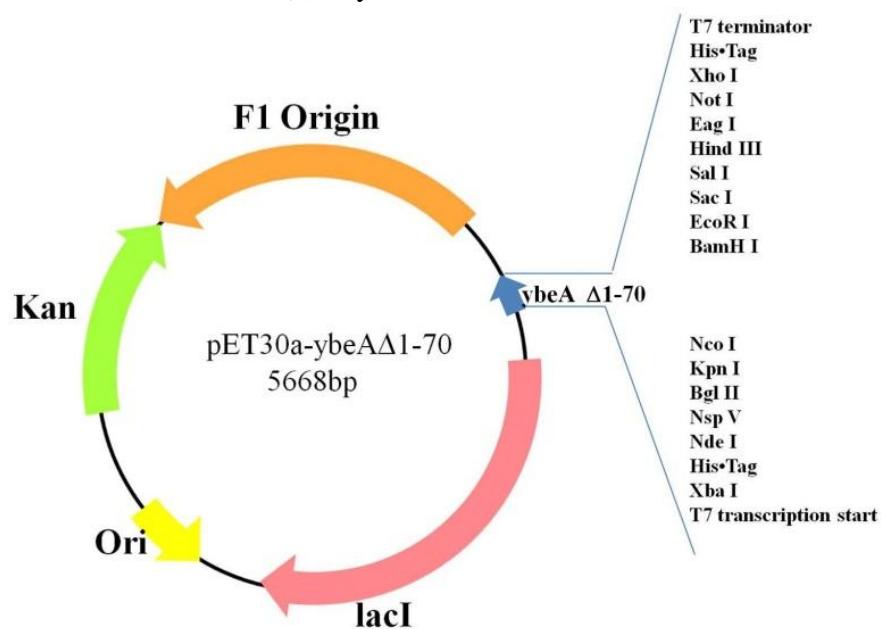


圖 21 質體 pET30-ybeA Δ 1-70 的建構圖

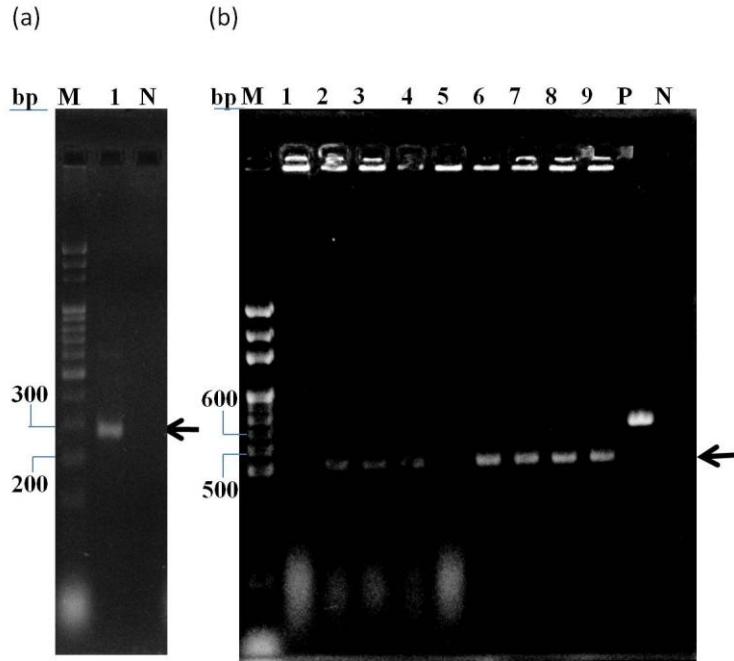


圖 22 ybeA Δ 1-70 基因建構結果。

圖(a) lane M 為 DNA ladder, lane 1 為以 pET30a-ybeA 質體為模板, 利用引子 ybeA (361) fp 及 ybeA (501) rp 擴增結果, 箭頭所標示位置為預計片段大小位置, lane N 為負對照組; 圖(b)利用引子以 T7 fp 及 ybeA (627) rp 引子來 PCR 篩選挑出來的菌落是否含有 ybeA Δ (1-70)基因, lane M 為 DNA ladder, lane 1-9 是挑出來的菌落, lane P 為正對照組, lane N 為負對照組, 箭頭所指處為預計片段大小位置, 在這裡 DNA 電泳使用 1.5 % 琼脂糖體及 0.5 x TBE buffer。

		1896
ybeA	GTGAAGCTGCAACTTGTGCCGTGGAACGAAATGCCGACTGGTACAAACCGTTT	60
ybeA1-70	-----	
ybeA	ACCGAGTACCTGCGTCGTTCCGAAAGATATGCCCTTCGAGCTGATTGAAATTCCGCC	120
ybeA1-70	-----	
ybeA	GGAAAACGCGGCAAGAATGCGGACATCAAGCGCATACTCGACAAAGAGGGTGAGCAGATG	180
ybeA1-70	-----	
ybeA	TTGGCGCCGCAGGCAGGCAAAACCGCATTGTCACCCCTGATATTCCAGGCAAGCCCTGGGAT	240
ybeA1-70	-----	
	ACACTAGATATTCCAGGCAAGCCCTGGGAT	30
	*** *****	
ybeA	ACCGCGCAGTTAGCCGCTGAGCTGGAACGCTGGAAAGCTGGATGGTCGCGACGTCAGTCTA	300
ybeA1-70	ACGCCGCAGTTAGCCGCTGAGCTGGAACGCTGGAAAGCTGGATGGTCGCGACGTCAGTCTA	90

ybeA	CTGATTGGCGGGCCTGAAGGGTTGTCGCCCTGCTAAAGCGCGGCTGAGCAGAGCTGG	360
ybeA1-70	CTGATTGGCGGGCCTGAAGGGTTGTCGCCCTGCTAAAGCGCGGCTGAGCAGAGCTGG	150

ybeA	TCGCTGTGCGCGCTTACCCCTCCCCATCCGCTGGTTCGCGCTGCTGGTCGCGAGAGCTG	420
ybeA1-70	TCGCTGTGCGCGCTTACCCCTCCCCATCCGCTGGTTCGCGCTGCTGGTCGCGAGAGCTG	210

ybeA	TACCGGGCGTGGAGCATCACCAACCACCATCCTTATCACCGTGAGTGA	468
ybeA1-70	TACCGGGCGTGGAGCATCACCAACCACCATCCTTATCACCGTGAGTGA	258

圖 23 重組 ybeA Δ 1-70 與重組 ybeA 基因序列比較結果

星號部份為有對應到的基因序列，方塊部分為靜默突變密碼子，其不影響轉譯結果，而重組 ybeA Δ 1-70 除了最前端少 70 個密碼子以外，其他序列和重組 ybeA 完全相同，綜合以上結果，得知我們得到所需的 ybeA Δ 1-70 基因。

3-1-5 pET30a-ybeA Δ 118-155 質體構築

圖 24 為質體 pET30 -ybeA Δ 118-155 的建構圖，我們以 pET30a-ybeA 為模板，ybeA(151) fp 及 ybeA(501) rp 做為引子擴增 ybeA Δ 118-155 基因，圖 25(a)為 ybeA Δ 118-155 基因擴增的凝膠電泳結果，lane1 在 300-400 bp 位置有單一片段，其大小與 ybeA(151) fp 及 ybeA(501) rp 擴增預計 351 bp 符合，再將我們所擴增 ybeA Δ 118-155 基因與 pET30a EAM 載體進行黏合，再送入大腸桿菌 BL21 DE3 菌株。

圖 25(b)為利用引子為 T7 fp 以及 ybea (501) rp PCR 篩選挑出來的菌落，菌落 1、2、3、4、5、6、10、12 在 500~600 bp 位置有單一片段，其大小與 T7 fp 及 ybeA (627) rp 預計擴增片段 592 bp 吻合，因此這些菌落可能有 ybeA Δ 118-155 基因，於是我們將菌落送定序，而圖 26 為重組 ybeA Δ 118-155 與重組 ybeA 基因序列比較結果，綜合以上結果，我們確定挑出來的菌落確實含 pET30a-ybeA Δ 118-155 基因。

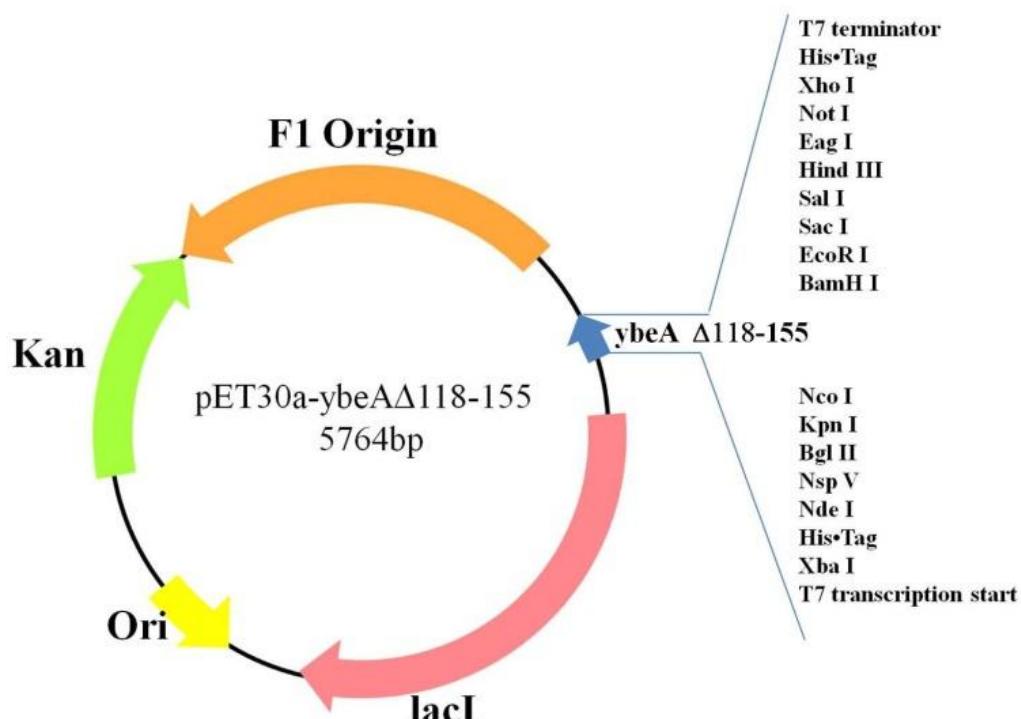


圖 24 質體 pET30-ybeA Δ 118-155 的建構圖

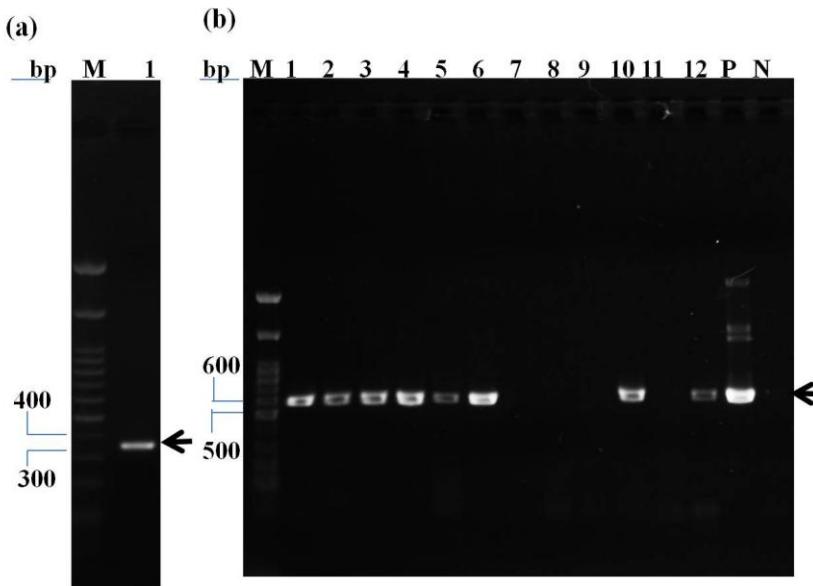


圖 25 $ybeA\Delta 118-155$ 基因建構結果。

圖(a) laneM 為 DNA ladder, lane1 為以含 $ybeA$ 基因的 pET30a- $ybeA$ 為模板, 利用引子 $ybeA$ (151) fp 及 $ybeA$ (501) rp 擴增的結果, 箭頭所指方向為預期片段大小位置; 圖(b)利用引子 T7 fp 及 $ybeA$ (501) rp PCR 篩選挑出來的菌落是否含有 $ybeA\Delta 118-155$ 基因, laneM 為 DNA ladder, lane1-9 是挑出來的 9 顆菌落, lane P 為正對照組, lane N 為負對照組, 箭頭所標示位置為預計片段大小位置, 在這裡 DNA 電泳使用 1.5 % 琼脂膠體及 0.5 x TBE buffer。

$ybeA$	GTGAAGCTGCAACTTGTCCGGTGGAAACGAAAATGCCGACTGGGTACAAACCGGTTT	60
$ybeA\Delta 118-155$	GTGAAGCTGCAACTTGTCCGGTGGAAACGAAAATGCCGACTGGGTACAAACCGGTTT	60
	*****	*****
$ybeA$	ACCGAGTACCTGCGTCGTTTCCGAAAGATATGCCCTCGAGCTGATTGAAATTCCGGCC	120
$ybeA\Delta 118-155$	ACCGAGTACCTGCGTCGTTTCCGAAAGATATGCCCTCGAGCTGATTGAAATTCCGGCC	120
	*****	*****
$ybeA$	GGAAAACGCGCAAGAATGCGGACATCAAGCGCATACTCGACAAAGAGGGTGAGCAGATG	180
$ybeA\Delta 118-155$	GGAAAACGCGCAAGAATGCGGACATCAAGCGCATACTCGACAAAGAGGGTGAGCAGATG	180
	*****	*****
$ybeA$	TTGGCGGCCGCAGGCAAAAACCGCATTGTCACCCCTCGATATTCCAGGCAAGCCCTGGGAT	240
$ybeA\Delta 118-155$	TTGGCGGCCGCAGGCAAAAACCGCATTGTCACCCCTCGATATTCCAGGCAAGCCCTGGGAT	240
	*****	*****
$ybeA$	ACGCCGCAGTTAGCCGCTGAGCTGGAACGCTGGAAGCTGGATGGTCGCGACGTCACTTA	300
$ybeA\Delta 118-155$	ACGCCGCAGTTAGCCGCTGAGCTGGAACGCTGGAAGCTGGATGGTCGCGACGTCACTTA	300
	*****	*****
$ybeA$	CTGATTGGCGGCCCTGAAGGGTTGTCGCCCTGCTGTAAGCGGGCTGAGCAGAGCTGG	360
$ybeA\Delta 118-155$	CTGATTGGCGGCCCTGAAGGGTTGTCGCCCTGCTGTAAGCGGGCTGAGTAG-----	354
	*****	*****
$ybeA$	TCGCTGTCGGCGCTTACCCCTCCCCATCCGCTGGTTCGCGTGGTCGAGAGAGTCTG	420
$ybeA\Delta 118-155$	-----	-----
	*****	*****
$ybeA$	TACCGGGCGTGGAGCATCACCAACCAACCACCTTATCACCGTGAGTGA	468
$ybeA\Delta 118-155$	-----	-----

圖 26 重組 $ybeA$ 與重組 $ybeA\Delta 118-155$ 基因序列比較結果。

其中星號部份為有對應到的基因序列，方塊位置表示無意義突變（nonsense mutation）位置，除了胺基酸的密碼變成轉譯的終止密碼提前終止以外，前面序列完全相同，其序列與我們預期構築的基因序列相同，於是得知我們所需的 $ybeA\Delta 118-155$ 基因。

3-2 蛋白質表現結果

透過基因構築獲得含有 YbeA、YbeA Δ 73-75、YbeA Δ 1-8、YbeA Δ 1-70、YbeA Δ 118-155 基因的菌株後，為了確定我們建構的基因確實可以透過 IPTG 的誘導大量表現，此外我們以不含插入基因的 BL21 pET30a 為對照組，以相同條件誘導蛋白表現，在這裡的誘導條件為 37 度 16 個小時。

誘導完後透過離心沉澱菌體，以二次水覆溶菌體後，透過超音波破菌機打破細胞壁，再以 SDS PAGE 分析目標蛋白在上清液以及沉澱物的分布情形，YbeA 的分子量為 23.17kDa，YbeA Δ 73-75 的分子量為 22.52 kDa，YbeA Δ 1-8 的分子量為 21.99 kDa，YbeA Δ 1-70 的分子量 14.93 kDa，YbeA Δ 118-155 蛋白的分子量為 18.43 kDa，圖 27(a)為 15 % SDS 蛋白質電泳膠片分析破菌後離心上清液，其順序如圖所示，可以看到除了蛋白質 YbeA 在上清液部分有表現，而其他突變株在上清液部分並無表現；圖 27(b)為 15 % SDS 蛋白質電泳膠片分析破菌後離心沉澱體結果，其順序如圖所示。

目標蛋白 YbeA、YbeA Δ 73-75、YbeA Δ 1-8、YbeA Δ 1-70 以及 YbeA Δ 118-155，在沉澱體部分不論在純度上或是表現量上都是很高的，在純度方面約為 90~95 %，而在產量方面 YbeA、YbeA Δ 73-75 以及 YbeA Δ 1-8 的產量約為 100-150 mg/L 而 YbeA Δ 1-70 的產量約為 50-60 mg/L，YbeA Δ 118-155 的產量約為 80 mg/L。

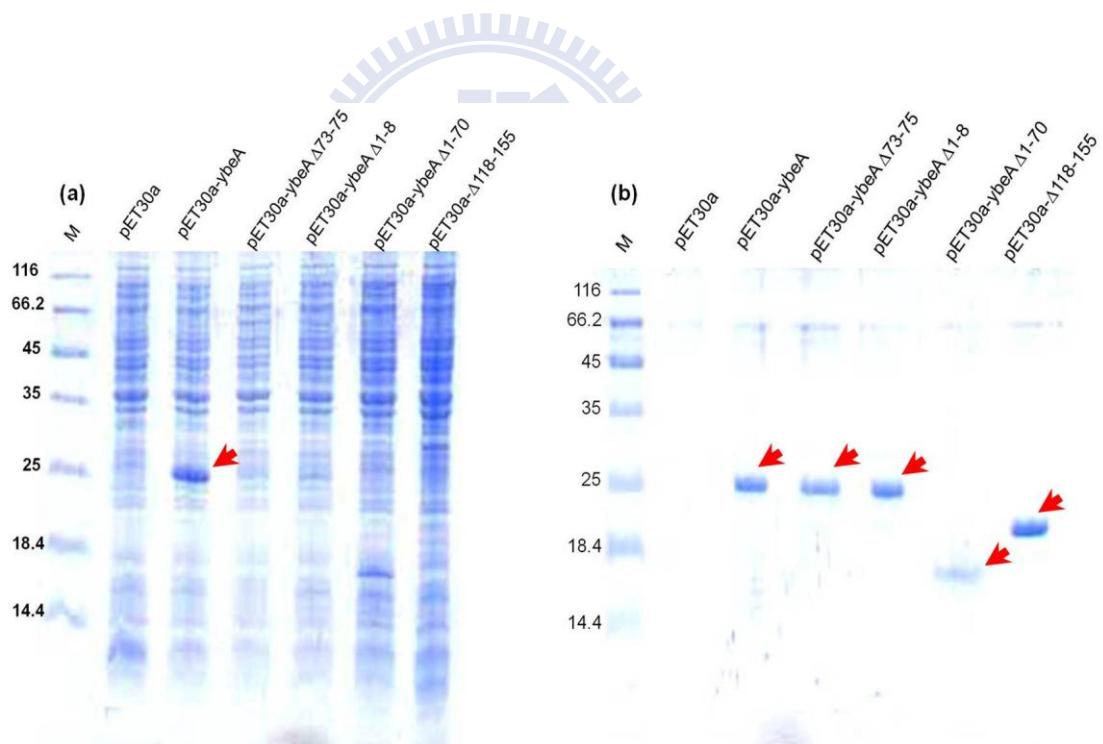


圖 27 YbeA 以及其突變株 IPTG 誘導後 SDS PAGE 分析結果

(a)為打破細胞壁的菌體上清液，圖(b)為打破細胞壁的菌體沉澱物，樣品的順序如圖所示，圖中箭頭所示為 YbeA 蛋白以及其他突變蛋白的位置，本實驗的膠體染色是用 Coomassie blue 染色法。

3-3 螢光分析摺疊中間產物的疏水性核心變化

蛋白質在摺疊的過程中受到疏水性作用力的影響，可以逐漸形成穩定的疏水性核心，造成螢光強度增強且波峰位置往短波長處位移。

3-3-1 YbeA 摺疊中間產物疏水性核心分析

圖 28 為 YbeA 蛋白摺疊中間物螢光圖譜，其中 U 的 λ_{max} 為 350.4 nm，螢光強度為 63.1(a.u)；M₁ 的 λ_{max} 為 349.4 nm，螢光強度為 940.6(a.u)；M₂ 的 λ_{max} 為 346 nm，螢光強度為 1035(a.u)；M₃ 的 λ_{max} 為 342.4 nm，螢光強度為 1285(a.u)；M₄ 的 λ_{max} 為 342 nm，螢光強度為 1343(a.u)；M₅ 的 λ_{max} 為 340 nm，螢光強度為 1348(a.u)。

3-3-2 YbeA△73-75 摺疊中間產物疏水性核心分析

圖 29 為 YbeA△73-75 蛋白摺疊中間物螢光圖譜，其中 U 的 λ_{max} 為 351.6 nm，螢光強度為 87.69(a.u)；M₁ 的 λ_{max} 為 347.4 nm，螢光強度為 1318(a.u)；M₂ 的 λ_{max} 為 346.2 nm，螢光強度為 1447(a.u)；M₃ 的 λ_{max} 為 347.2 nm，螢光強度為 1609.4(a.u)；M₄ 的 λ_{max} 為 340.8 nm，螢光強度為 1917(a.u).；M₅ 的 λ_{max} 為 342.2 nm，螢光強度為 1914(a.u)。

3-3-3 YbeA△1-8 摺疊中間產物疏水性核心分析

圖 30 為 YbeA△1-8 蛋白摺疊中間物螢光圖譜，其中 U 的 λ_{max} 為 350 nm，螢光強度為 80.93(a.u)；M₁ 的 λ_{max} 為 348 nm，螢光強度為 1206(a.u)；M₂ 的 λ_{max} 為 347 nm，螢光強度為 1354.6(a.u)；M₃ 的 λ_{max} 為 347 nm，螢光強度為 1458.6(a.u)；M₄ 的 λ_{max} 為 341.6 nm，螢光強度為 1657(a.u)；M₅ 的 λ_{max} 為 341.6 nm，螢光強度為 1677(a.u)。

3-3-4 YbeA△1-70 摺疊中間產物疏水性核心分析

圖 31 為 YbeA△1-70 蛋白摺疊中間物螢光圖譜，其中 U 的 λ_{max} 為 350.8 nm，螢光強度為 45.06(a.u)；M₁ 的 λ_{max} 為 347.8 nm，螢光強度為 569.7(a.u)；M₂ 的 λ_{max} 為 346.2 nm，螢光強度為 611.2(a.u)；M₃ 的 λ_{max} 為 347 nm，螢光強度為 639.8(a.u)；M₄ 的 λ_{max} 為 341.6 nm，螢光強度為 745.3(a.u)；M₅ 的 λ_{max} 為 342.6 nm，螢光強度為 788.7(a.u)。

3-3-5 YbeA△118-155 摺疊中間產物疏水性核心分析

圖 32 為 YbeA△118-155 蛋白摺疊中間物螢光圖譜，其中 U 的 λ_{max} 為 352.4 nm，螢光強度為 53.2(a.u)；M₁ 的 λ_{max} 為 349 nm，螢光強度為 670.4(a.u)；M₂ 的 λ_{max} 為 347.2 nm，螢光強度為 761.3(a.u)；M₃ 的 λ_{max} 為 346.4 nm，螢光強度為 799.12(a.u)；M₄ 的 λ_{max} 為 341.6 nm，螢光強度為 1003(a.u)；M₅ 的 λ_{max} 為 342 nm，螢光強度為 1033(a.u)。

從圖 32-36 可以看到在蛋白質摺疊過程，U 到 M₅ 的過程螢光強度逐漸增強，且 λ_{max} 往短長處藍位移，表示疏水性胺基酸往疏水性環境移動，蛋白質疏水性核心逐漸形成，表 4 為 YbeA 以及突變株之螢光圖譜數據。

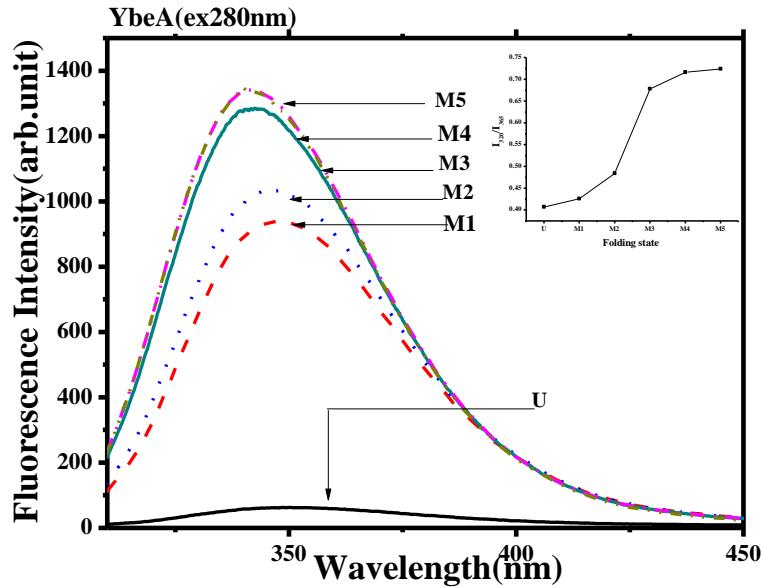


圖 28 YbeA 摺疊中間物螢光圖譜

U 為(solid line) , M₁ 為(dash line) , M₂ 為(dot line) , M₃ 為(dash dot line) , M₄ 為(dash dot dot line) , M₅ 為(short dash line) , 右上角為 U-M₅ 和 λ_{max} 的對應圖

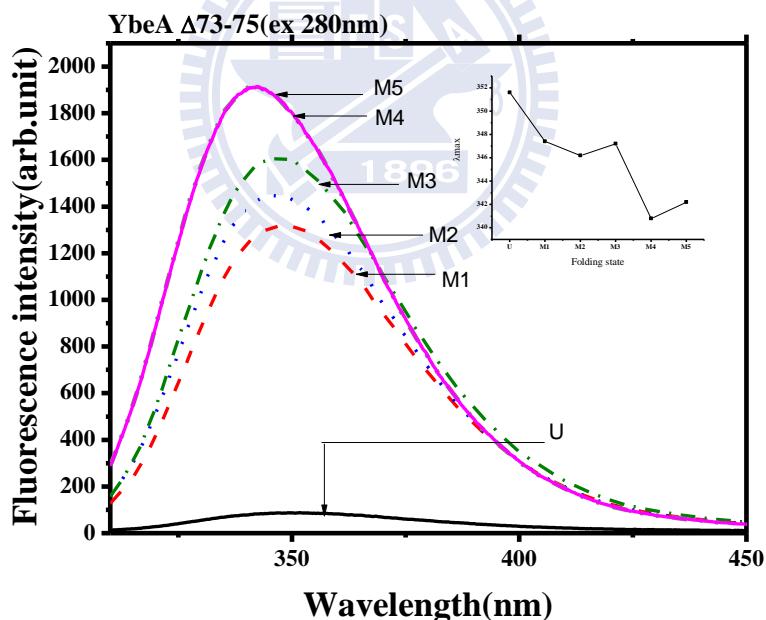


圖 29 YbeA△73-75 摺疊中間物螢光圖譜

U 為(solid line) , M₁ 為(dash line) , M₂ 為(dot line) , M₃ 為(dash dot line) , M₄ 為(dash dot dot line) , M₅ 為(short dash line) , 右上角為 U-M₅ 和 λ_{max} 的對應圖

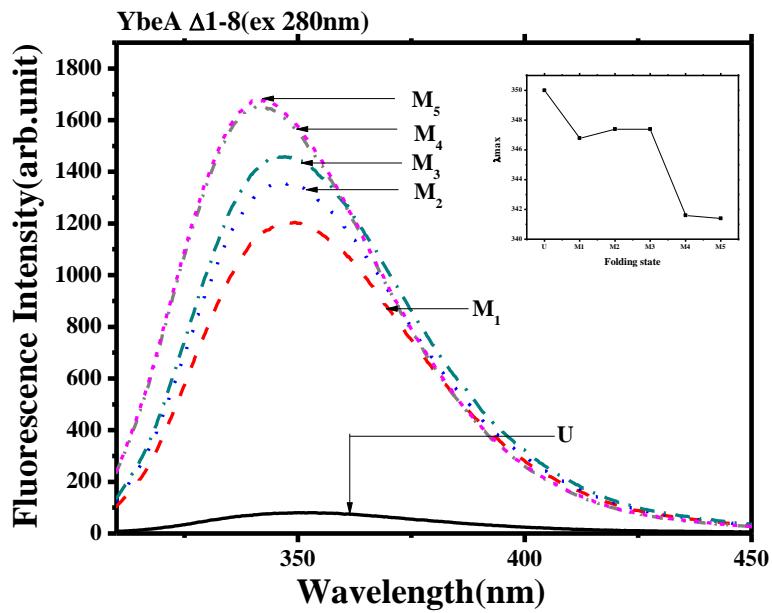


圖 30 YbeA Δ 1-8 摺疊中間物螢光圖譜

U 為(solid line) , M_1 為(dash line) , M_2 為(dot line) , M_3 為(dash dot line) , M_4 為(dash dot dot line) , M_5 為(short dash line) , 右上角為 U- M_5 和 λ_{max} 的對應圖

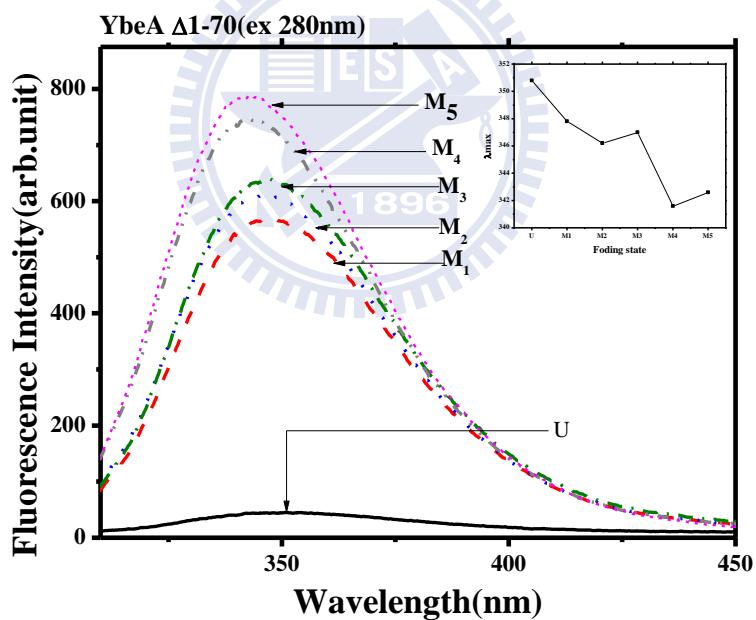


圖 31 YbeA Δ 1-70 摺疊中間物螢光圖譜

U 為(solid line) , M_1 為(dash line) , M_2 為(dot line) , M_3 為(dash dot line) , M_4 為(dash dot dot line) , M_5 為(short dash line) , 右上角為 U- M_5 和 λ_{max} 的對應圖

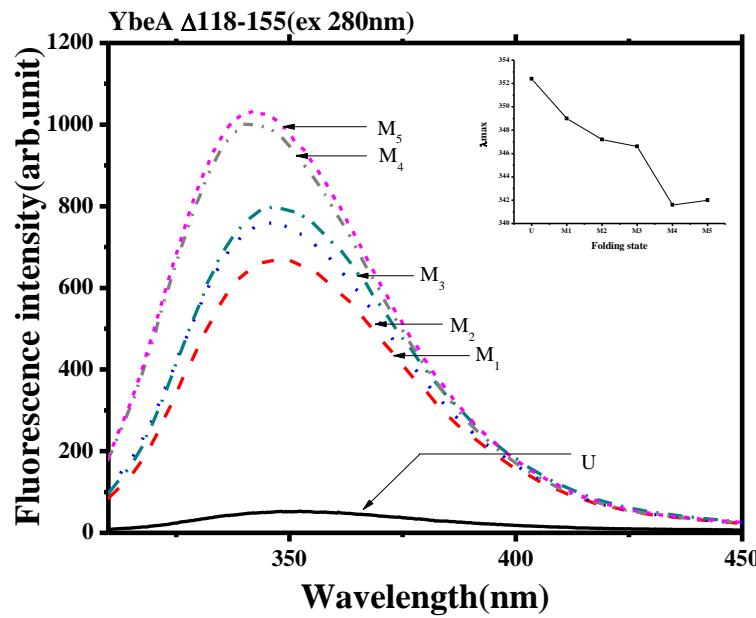


圖 32 YbeA Δ 118-155 摺疊中間物螢光圖譜

U 為(solid line) , M₁ 為(dash line) , M₂ 為(dot line) , M₃ 為(dash dot line) , M₄ 為(dash dot dot line) , M₅ 為(short dash line) , 右上角為 U-M₅ 和 λ_{max} 的對應圖

表 4 YbeA 及其突變株之螢光圖譜數據

YbeA		
Folding state	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	Intensity(arb.unit)
U	350	10
M ₁	350	834.29
M ₂	340	923.76
M ₃	340	966.27
M ₄	340	1388.65
M ₅	338	1414.61

YbeA Δ 73-75		
Folding state	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	Intensity(arb.unit)
U	354	17.99
M ₁	350	739.281
M ₂	348	812.73
M ₃	346	899.40
M ₄	338	1499.68
M ₅	342.2	1914

YbeA Δ1-8		
Folding state	λmax(nm)	Intensity(arb.unit)
U	349	85.66
M ₁	343	481.72
M ₂	344	536.76
M ₃	342	548.34
M ₄	339	731
M ₅	340	771.98
YbeA Δ1-70		
Folding state	λmax(nm)	Intensity(arb.unit)
U	349	121
M ₁	347	895
M ₂	347	1011
M ₃	349	1038
M ₄	342	1199
M ₅	343	1232
YbeA Δ118-155		
Folding state	λmax(nm)	Intensity(arb.unit)
U	356	27.87
M ₁	346	853
M ₂	346	839
M ₃	342	876
M ₄	340	1158.5
M ₅	342	1207.5

3-4 圓二色光譜分析 YbeA 與其他突變株蛋白摺疊中間產物的二級結構變化

3-4-1 YbeA 摺疊中間產物二級結構分析

圖 33 為 YbeA 摺疊中間產物 CD 圖譜，其掃描波段在 190-260 nm，圖 34 為利用 SELCON3 軟體分析二級結構比例結果，表 5 為 SELCON3 分析數據。M₁ 二級結構比例(H(r) 27.1 %, H(d) 22.9 %, S(r) 7.2 %, S(d) 13.9 %, Turn 14.6 %, Unrd 14.3 %), M₂ 的二級結構比例(H(r) 38.7 %, H(d) 23.6 %, S(r) 6.2 %, S(d) 11.7 %, Turn 10.7 %, Unrd 9.1 %), M₃ 摺疊態的二級結構比例為(H(r) 31.2 %, H(d) 22.8 %, S(r) 8.7 %, S(d) 12.6 %, Turn 13.6 %, Unrd 11.1 %), M₄ 二級結構比例為(H(r) 22.5 %, H(d) 20.1 %, S(r) 11.4 %, S(d) 15.4%, Turn 15.9 %, Unrd 14.7 %), M₅ 的二級結構比例為(H(r) 29.5 %, H(d) 22.3 %, S(r) 10.7%, S(d) 13.7 %, Turn 15.7 %, Unrd 8.1 %)。其中 H(r)為 regular α -helix, H(d)為 distorted α -helix, S(r) regular β -sheet 為 S(d)為 distorted β -sheet, Unrd 為 random coil。

3-4-2 YbeA Δ 73-75 摺疊中間產物二級結構分析

圖 35 為 YbeA Δ 73-75 摺疊中間產物 CD 圖譜，其掃描波段在 190-260 nm，圖 36 為利用 SELCON3 軟體分析二級結構比例結果，表 6 為 SELCON3 分析數據，其中 M₁ 的二級結構比例(H(r) 39.6 %, H(d) 21 %, S(r) 6.7 %, S(d) 10.9 %, Turn 9.3 %, Unrd 12.5 %), M₂ 的二級結構比例 (H(r) 30 %, H(d) 19.8 %, S(r) 9.6 %, S(d) 14%, Turn 12.8 %, Unrd 13.8 %), M₃ 的二級結構比例為(H(r) 38.6 %, H(d) 24.2 %, S(r) 7.5 %, S(d) 11.7 %, Turn 8.6 %, Unrd 9.4 %), M₄ 二級結構比例為(H(r) 29.9 %, H(d) 24.3 %, S(r) 7.8 %, S(d) 12.8 % , Turn 13.1 %, Unrd 12.1 %), M₅ 的二級結構比例為(H(r) 29.5 %, H(d) 24.3 %, S(r) 9.6 %, S(d) 13.7 %, Turn 13.7 %, Unrd 9.2 %)。

3-4-3 YbeA Δ 1-8 摺疊中間產物二級結構分析

圖 37 為 YbeA Δ 1-70 摺疊中間產物 CD 圖譜，其掃描波段在 190-260 nm，圖 38 為利用 SELCON3 軟體分析二級結構比例結果，表 7 為 SELCON3 分析數據，其中 M₁ 的二級結構比例(H(r) 44.1 %, H(d) 11.5 %, S(r) 11.5 %, S(d) 9.1 %, Turn 3.2 %, Unrd 22.6 %), M₂ 的二級結構比例(H(r) 37.8 %, H(d) 8.3 %, S(r) 16.6 %, S(d) 11.2 %, Turn 6.3 % , Unrd 19.8 %), M₃ 的二級結構比例為(H(r) 47.5 %, H(d) 12.6 %, S(r) 8.5 %, S(d) 9.3 %, Turn 3.5 % , Unrd 18.6 %), M₄ 二級結構比例為(H(r) 50.7 %, H(d) 16.6 %, S(r) 5.5 %, S(d) 6.5 % , Turn 4.4 %, Unrd 16.3 %), M₅ 的二級結構比例為(H(r) 52.2 %, H(d) 18.6 %, S(r) 3.4 %, S(d) 3.8 %, Turn 3.9 %, Unrd 18.1 %)。

3-4-4 YbeA Δ 1-70 摺疊中間產物二級結構分析

圖 39 為 YbeA Δ 1-70 摺疊中間產物 CD 圖譜，其掃描波段在 190-260 nm，圖 40 為利用 SELCON3 軟體分析二級結構比例結果，表 8 為 SELCON3 分析數據，其中 M₁ 的二級結構比例(H(r) 42.8 %, H(d) 10.3 %, S(r) 13.7 %, S(d) 9.9 %, Turn 1.3 %, Unrd 22 %), M₂ 的二級結構比例(H(r) 42.1 %, H(d) 16.5 %, S(r) 11.8 %, S(d) 8.3 %, Turn 7.6 % , Unrd 13.7 %), M₃ 摺疊態的二級結構比例為(H(r) 41.6 %, H(d) 16.3 %, S(r) 12.2 %, S(d) 10.6 % , Turn 5.4 %, Unrd 13.9 %), M₄ 二級結構比例為(H(r) 42.9 %, H(d) 16.4 %, S(r) 11.7 %, S(d) 8.5 %, Turn 7.8 %, Unrd 12.7 %), M₅ 的二級結構比例為(H(r) 44 %, H(d) 10.2 % , S(r) 12.3 %, S(d) 9.6 %, Turn 1.4 %, Unrd 22.5 %)。

3-4-5 YbeA \triangle 118-155 摺疊中間產物二級結構分析

圖 41 為 YbeA \triangle 118-155 摺疊中間產物 CD 圖譜，其掃描波段在 190-260 nm，圖 42 為利用 SELCON3 軟體分析二級結構比例結果，表 9 為 SELCON3 分析數據，其中 M₁ 的二級結構比例(H(r) 50 %, H(d) 23.1 %, S(r) 4 %, S(d) 7 %, Turn 6.1 %, Unrd 10 %)，M₂ 的二級結構比例為(H(r) 52.1 %, H(d) 18.7 %, S(r) 5.8 %, S(d) 7.2 %, Turn 3.2 %, Unrd 13 %)，M₃ 的二級結構比例 (H(r) 49.2 %, H(d) 19.6 %, S(r) 4.5 %, S(d) 6.4 %, Turn 4.1 %, Unrd 16.2 %)，M₄ 二級結構比例為(H(r) 43.5 %, H(d) 10.7 %, S(r) 11.7 %, S(d) 10.6 %, Turn 4.4 %, Unrd 19.1 %)，M₅ 的二級結構比例為(H(r) 47 %, H(d) 12.4 %, S(r) 6.4 %, S(d) 9 %, Turn 5.3 %, Unrd 19.9 %)。

3-4-6 YbeA 與其他突變株蛋白摺疊態之二級結構比較

圖 43 為 YbeA 與其他突變株蛋白的 CD 圖譜，其掃描波段在 190-260 nm，圖 44 為利用 SELCON3 軟體分析二級結構比例結果，表 10 為 SELCON3 分析數據，其中 YbeA 摺疊態的二級結構比例(H(r) 29.5 %, H(d) 22.3 %, S(r) 10.7 %, S(d) 13.7 %, Turn 15.7 %, Unrd 8.1 %)，YbeA \triangle 73-75 摺疊態的二級結構比例(H(r) 29.5 %, H(d) 24.3 %, S(r) 9.6 %, S(d) 13.7 %, Turn 13.7 %, Unrd 9.2 %)，YbeA \triangle 1-8 摺疊態的二級結構比例為(H(r) 52.2 %, H(d) 18.6 %, S(r) 3.4 %, S(d) 3.8 %, Turn 3.9 %, Unrd 18.1 %)，YbeA \triangle 1-70 摺疊態的二級結構比例為(H(r) 46.6 %, H(d) 24.6 %, S(r) 6 %, S(d) 5 %, Turn 5.3 %, Unrd 12.5 %)，YbeA \triangle 118-155 的二級結構比例為(H(r) 48.3 %, H(d) 11.7 %, S(r) 6.5 %, S(d) 9.4 %, Turn 5.6 %, Unrd 19.3 %)。



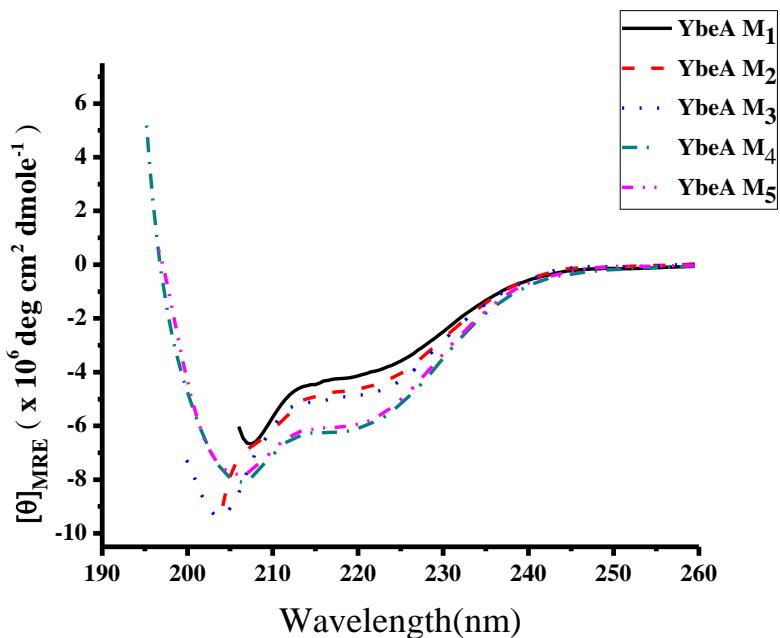


圖 33 YbeA 摺疊中間產物圓二色圖譜

M_1 為(solid line)， M_2 為(dash line)， M_3 為(dot line)， M_4 為(dash dot line)， M_5 為(dash dot dot line)

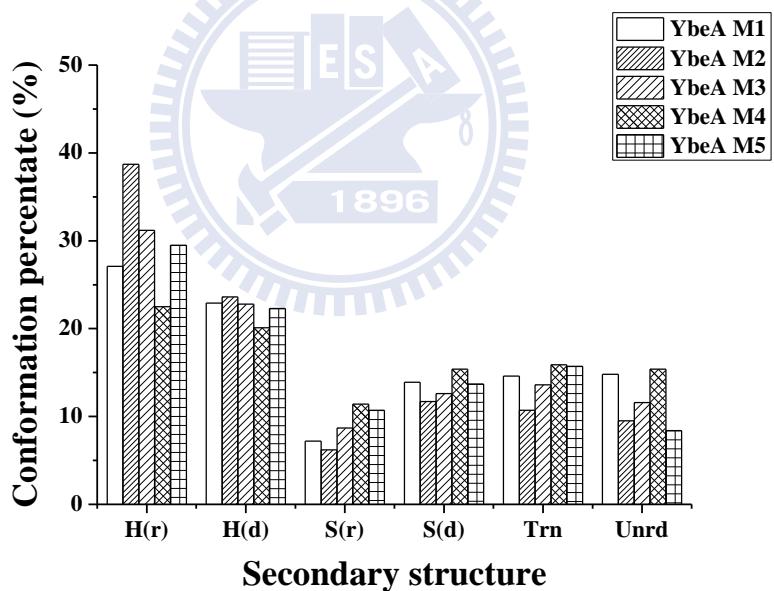


圖 34 YbeA 摺疊中間產物圓二色圖譜 SELCON3 分析結果

$YbeA M_1$ 為□， $YbeA M_2$ 為▨， $YbeA M_3$ 為▨▨， $YbeA M_4$ 為▨▨▨， $YbeA M_5$ 為▨▨▨▨

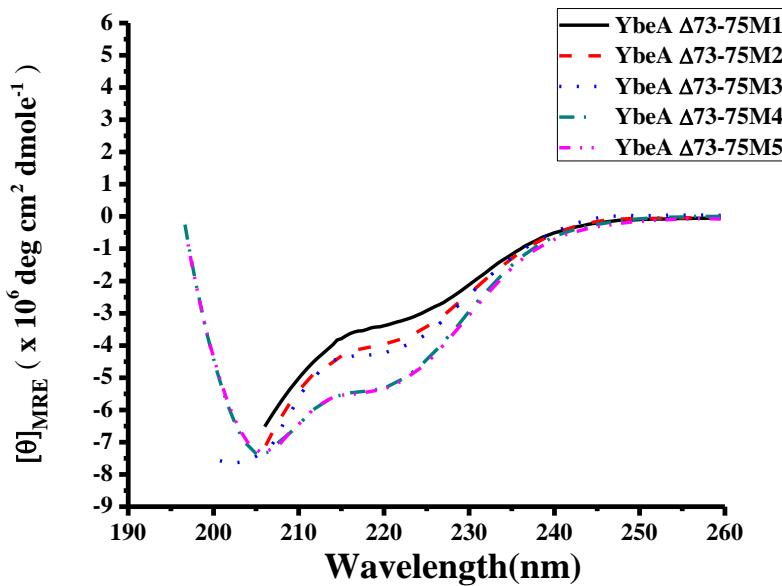


圖 35 YbeA Δ 73-75 摺疊中間產物圓二色圖譜

M₁ 為(solid line) , M₂ 為(dash line) , M₃ 為(dot line) , M₄ 為(dash dot line) , M₅ 為(dash dot dot line)

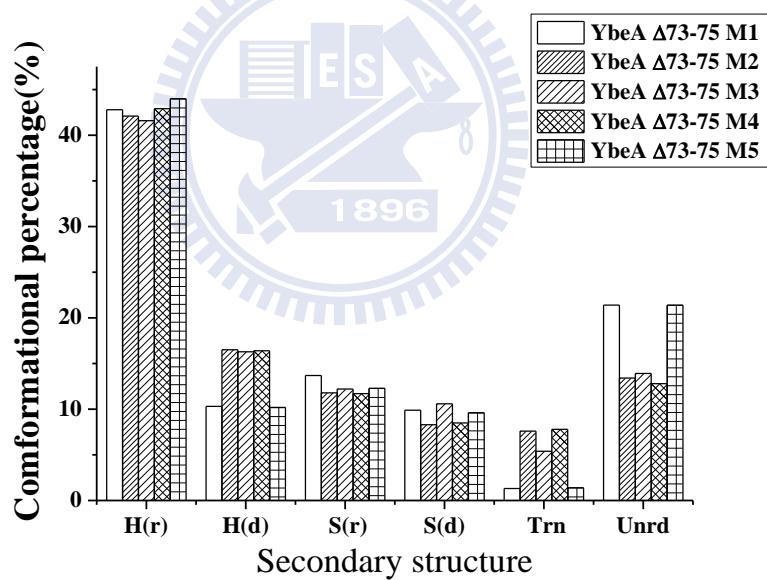


圖 36 YbeA Δ 73-75 摺疊中間產物圓二色圖譜 SELCON3 分析結果

YbeA Δ 73-75 M₁ 為□，YbeA Δ 73-75 M₂ 為▨，YbeA Δ 73-75 M₃ 為▨▨，YbeA Δ 73-75 M₄ 為▨▨▨，YbeA Δ 73-75 M₅ 為▨▨▨▨

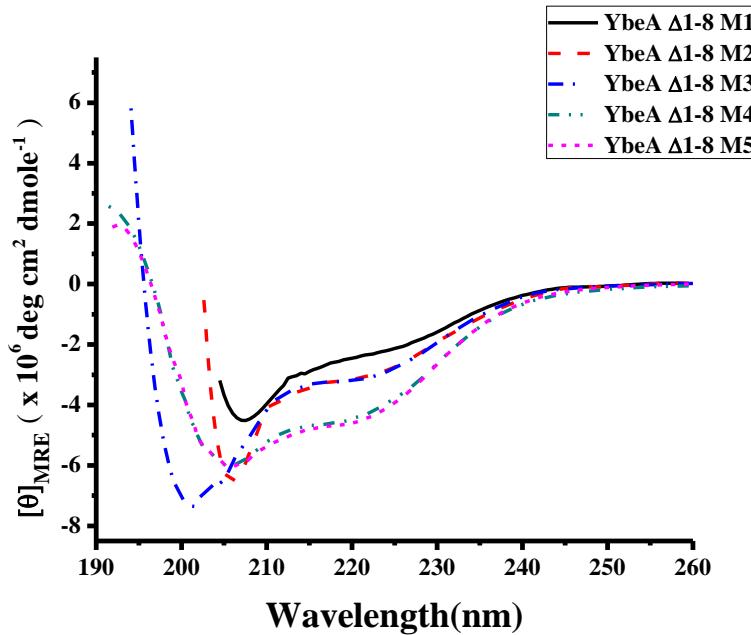


圖 37 YbeA Δ 1-8 摺疊中間產物圓二色圖譜

M₁ 為(solid line) , M₂ 為(dash line) , M₃ 為(dot line) , M₄ 為(dash dot line) , M₅ 為(dash dot dot line)

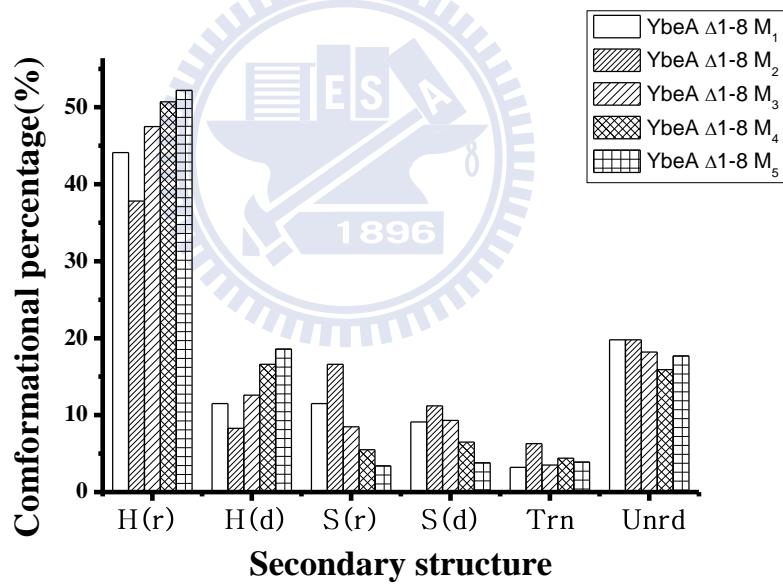


圖 38 YbeA Δ 1-8 摺疊中間產物圓二色圖譜 SELCON3 分析結果

YbeA Δ 1-8 M₁ 為□，YbeA Δ 1-8 M₂ 為▨，YbeA Δ 1-8 M₃ 為▨，YbeA Δ 1-8 M₄ 為▨，YbeA Δ 1-8 M₅ 為▨

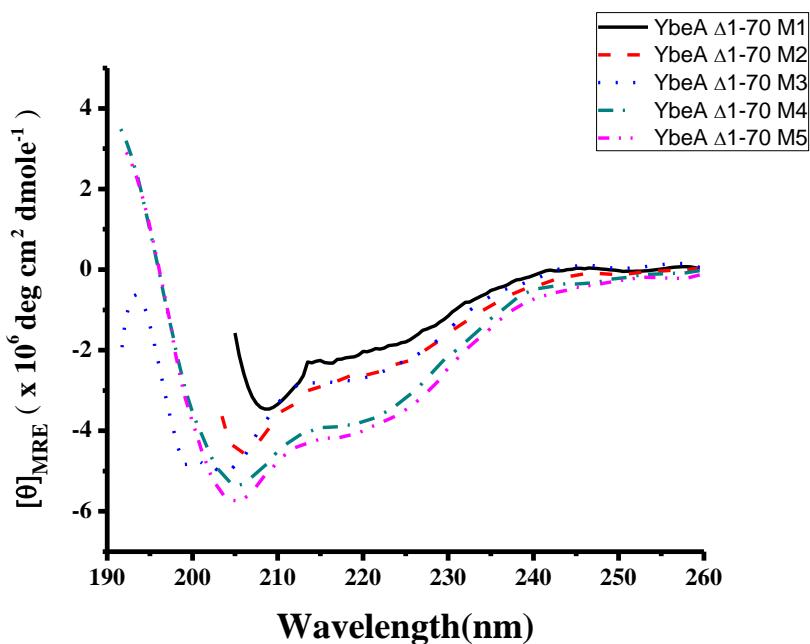


圖 39 YbeA Δ 1-70 摺疊中間產物圓二色圖譜

M₁ 為(solid line) , M₂ 為(dash line) , M₃ 為(dot line) , M₄ 為(dash dot line) , M₅ 為(dash dot dot line)

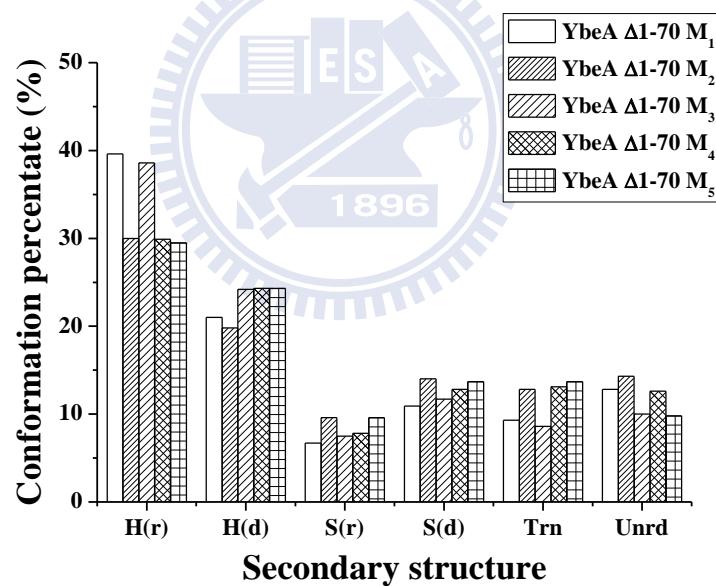


圖 40 YbeA Δ 1-70 摺疊中間產物圓二色圖譜 SELCON3 分析結果

YbeA Δ 1-70 M₁ 為□, YbeA Δ 1-70 M₂ 為▨, YbeA Δ 1-70 M₃ 為▨▨, YbeA Δ 1-70 M₄ 為▨▨▨, YbeA Δ 1-70 M₅ 為▨▨▨▨

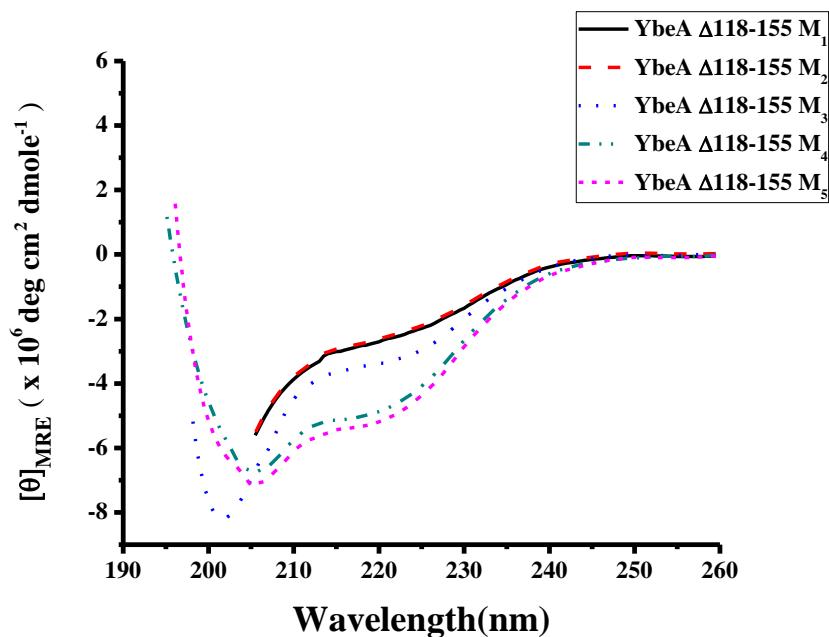


圖 41 YbeA Δ 118-155 摺疊中間產物圓二色圖譜
 M_1 為(solid line) , M_2 為(dash line) , M_3 為(dot line) , M_4 為(dash dot line) , M_5 為(dash dot dot line)

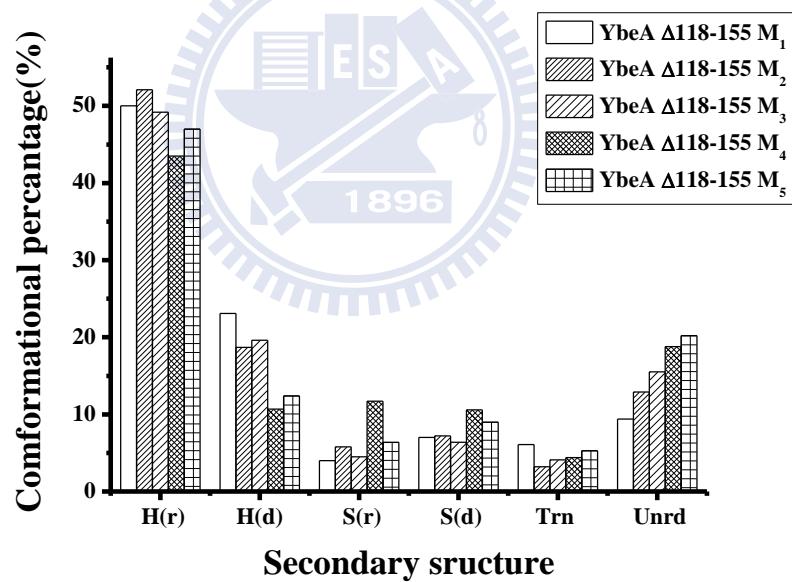


圖 42 YbeA Δ 118-155 摺疊中間產物圓二色圖譜 SELCON3 分析結果
YbeA Δ 118-155 M_1 為□, YbeA Δ 118-155 M_2 為▨, YbeA Δ 118-155 M_3 為▨▨, YbeA Δ 118-155 M_4 為▨▨▨, YbeA Δ 118-155 M_5 為▨▨▨▨

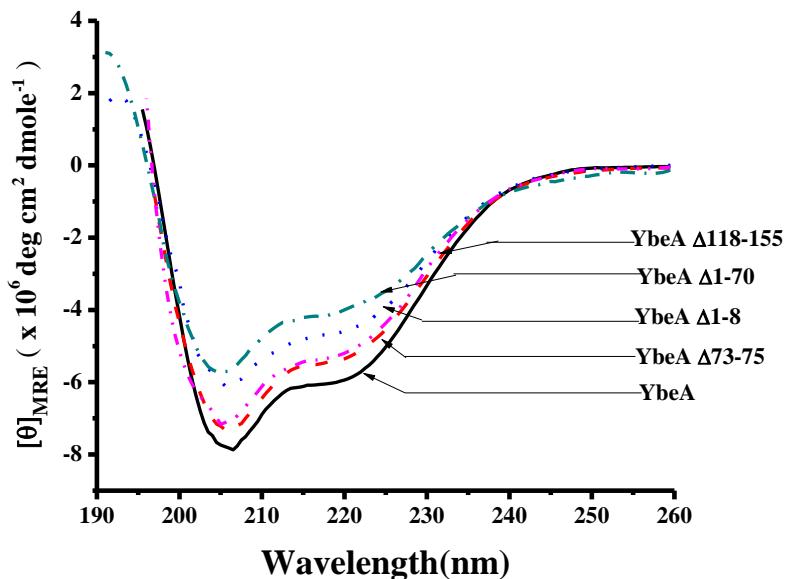


圖 43 YbeA 與其他突變株蛋白的 CD 圖譜

YbeA(M_5)為(solid line) , YbeA $\Delta 73-75(M_5)$ 為(dash line) , YbeA $\Delta 1-8(M_5$ 為(dot line) , YbeA $\Delta 1-70(M_5)$ 為(dash dot line) , YbeA $\Delta 118-155(M_5)$ 為(dash dot dot line)

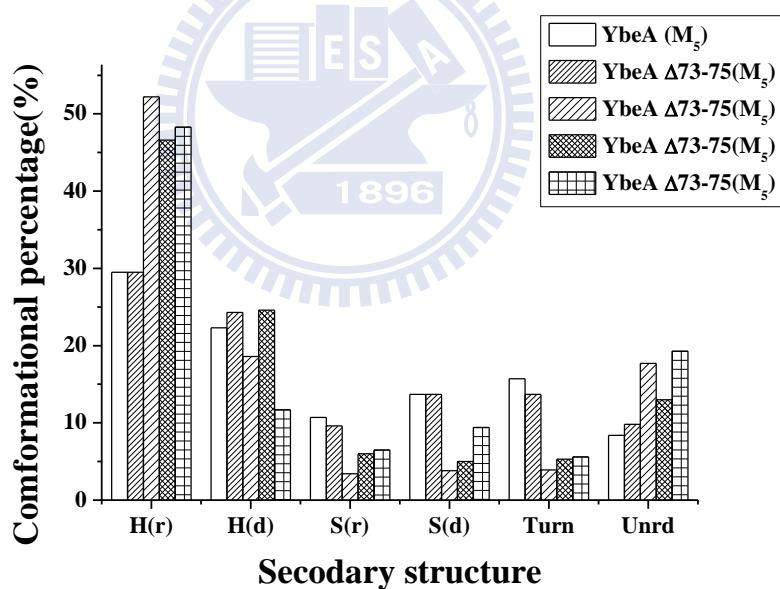


圖 44 SELCON3 軟體分析 YbeA 及其突變株之二級結構比例

YbeA M_5 為□，YbeA $\Delta 73-75 M_5$ 為▨，YbeA $\Delta 1-8 M_5$ 為▨▨，YbeA $\Delta 1-70 M_5$ 為▨▨▨，YbeA $\Delta 118-155 M_5$ 為▨▨▨▨

表 5 SELCON3 分析 YbeA 摺疊中間產物二級結構數據

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
H(r) %	27.1	38.7	31.2	22.5	29.5
H(d) %	22.9	23.6	22.8	20.1	22.3
S(r) %	7.2	6.2	8.7	11.4	10.7
S(d) %	13.9	11.7	12.6	15.4	13.7
Turn %	14.6	10.7	13.6	15.9	15.7
Unrd %	14.3	9.1	11.1	14.7	8.1

表 6 SELCON3 分析 YbeA△73-75 摺疊中間產物二級結構數據

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
H(r) %	39.6	30	38.6	29.9	29.5
H(d) %	21	19.8	24.2	24.3	24.3
S(r) %	6.7	9.6	7.5	7.8	9.6
S(d) %	10.9	14	11.7	12.8	13.7
Turn %	9.3	12.8	8.6	13.1	13.7
Unrd %	12.8	14.3	10	12.6	9.8

表 7 SELCON3 分析 YbeA△1-8 摺疊中間產物二級結構數據

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
H(r) %	44.1	37.8	47.5	50.7	52.2
H(d) %	11.5	8.3	12.6	16.6	18.6
S(r) %	11.5	16.6	8.5	5.5	3.4
S(d) %	9.1	11.2	9.3	6.5	3.8
Trn %	3.2	6.3	3.5	4.4	3.9
Unrd%	19.8	19.8	18.2	15.9	17.7

表 8 SELCON3 分析 YbeA△1-70 摺疊中間產物二級結構數據

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
H(r) %	42.8	42.1	41.6	42.9	44
H(d) %	10.3	16.5	16.3	16.4	10.2
S(r) %	13.7	11.8	12.2	11.7	12.3
S(d) %	9.9	8.3	10.6	8.5	9.6
Trn%	1.3	7.6	5.4	7.8	1.4
Unrd%	21.4	13.4	13.9	12.8	21.4

表 9 SELCON3 分析 YbeA \triangle 118-155 摺疊中間產物二級結構數據

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
H(r) %	50	52.1	49.2	43.5	47
H(d) %	23.1	18.7	19.6	10.7	12.4
S(r) %	4	5.8	4.5	11.7	6.4
S(d) %	7	7.2	6.4	10.6	9
Trn %	6.1	3.2	4.1	4.4	5.3
Unrd%	9.4	12.9	15.5	18.8	20.2

表 10 SELCON3 分析 YbeA 及其突變株摺疊態之二級結構數據

	H(r) %	H(d) %	S(r) %	S(d) %	Turn %	Unrd %
YbeA	29.5	22.3	10.7	13.7	15.7	8.4
YbeA \triangle 73-75	29.5	24.3	9.6	13.7	13.7	9.8
YbeA \triangle 1-8	52.2	18.6	3.4	3.8	3.9	17.7
YbeA \triangle 1-70	46.6	24.6	6	5	5.3	13
YbeA \triangle 118-155	48.3	11.7	6.5	9.4	5.6	19.3



3-5 YbeA 摺疊產物功能分析

YbeA是大腸桿菌(E. Coli)內唯一可以針對pseudouridine做甲基化的酵素，他可以對核糖體大次單元體上的23S rRNA的Ψ1915鹼基N3位置的做甲基化，為了確認我們摺疊完成的YbeA還和自然態一樣具有功能，可以和甲基化來源S-Adenosyl methionine進行接合。在這裡我們利用ITC偵測YbeA蛋白與其受質S-Adenosyl methionine之間的交互作用，將受質S-Adenosyl methionine滴定到摺疊好的YbeA蛋白溶液中，共20滴，每滴為 $10\mu\text{l}$ YbeA的濃度為 $118\mu\text{M}$ 體積為 2.8ml ，S-Adenosyl methionine的濃度為 2.14mM ，體積為 $200\mu\text{l}$ ，圖 45為AdoMet滴定YbeA的原始圖，圖 46為S-Adenosyl methionine滴定YbeA之作用力圖，得知且兩者之間的結合屬於放熱作用， $\Delta H = -13.12\text{kJ/mol}$ ，平衡常數 K_a 值為 $1.35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ， $n=0.37$ ，根據ITC的結果證實摺疊完的重組YbeA確實具有功能，此實驗由偉賢同學協助完成。

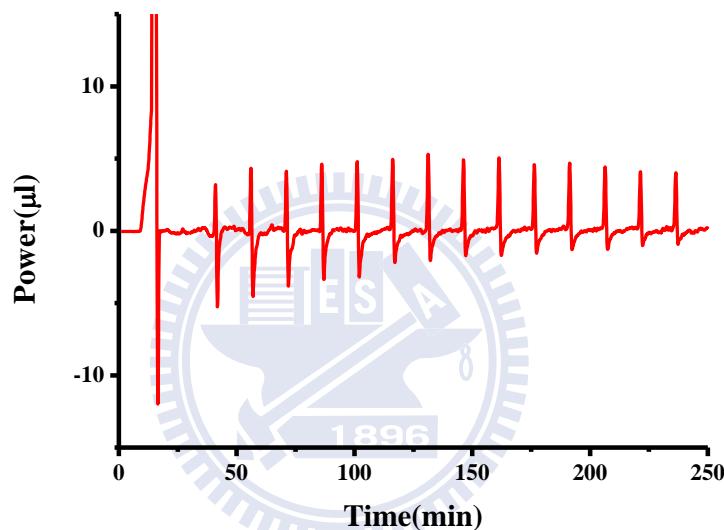


圖 45 ITC 之 AdoMet 滴定 YbeA 的原始圖

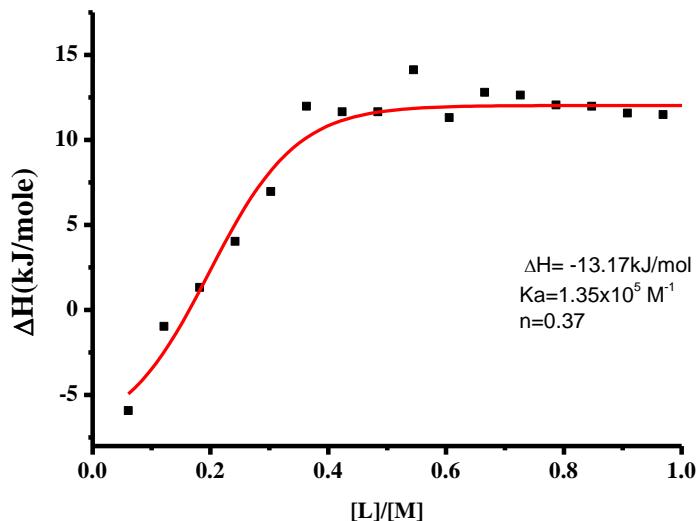


圖 46 AdoMet 滴定 YbeA 之作用力圖

3-6 YbeA 酵素水解穩定性分析

MALDI-TOF MS 設備用於蛋白質體學的質譜儀（MS）實驗，同時結合胰蛋白酶水解蛋白後的勝肽片段產物的質譜分析，可獲得肽鏈質量的資訊，在這裡我們使用胰蛋白酶分別和摺疊態以及非摺疊態的 YbeA 反應，根據不同時間收集反應產物，利用 MALDI-TOF MS 分析水解片段氨基酸序列，其中水解的速度和片段在蛋白質的穩定性有關，越晚被切下來的部分代表序列相對的穩定性越高，此實驗為東華大學何彥鵬老師實驗室協助完成。

3-6-1 YbeA 摺疊態酵素水解穩定性分析

在這裡我們使用胰蛋白酶分別和摺疊態 YbeA 反應，根據不同時間收集反應產物，利用 MALDI-TOF MS 水解片段氨基酸序列，下列序列為各個時間產物被 MALDI-TOF MS 所辨認的序列，其結果如圖 47 所示。

- 0 分鐘：(12-25)、(27-43)、(52-68)、(134-155)。
- 1 分鐘：(3-25)、(12-26)、(51-66)、(67-90)、(62-92)、(134-155)。
- 2 分鐘：(3-25)、(27-43)、(52-68)、(67-90)、(69-90)、(69-92)、(91-113)、(134-155)。
- 3 分鐘：(12-25)、(27-43)、(30-42)、(30-43)、(52-68)、(67-90)、(69-92)、(93-113)、
(114-133)、(134-142)、(134-155)、(143-154)、(143-155)。
- 4 分鐘：(12-25)、(12-26)、(27-43)、(30-43)、(67-90)、(69-90)、(69-92)、(91-113)、
(93-113)、(97-113)、(114-133)、(134-142)、(134-142)、(143-154)、(143-155)。
- 5 分鐘：(3-11)、(12-25)、(12-26)、(30-43)、(52-66)、(69-90)、(93-133)、(114-133)、
(134-142)、(134-155)、(143-154)、(143-155)。
- 10 分鐘：(3-11)、(3-25)、(12-25)、(12-26)、(30-42)、(30-43)、(69-90)、(114-133)、
(134-142)、(143-152)、(143-154)、(143-155)。
- 15 分鐘：(3-25)、(12-25)、(12-26)、(27-43)、(30-42)、(69-90)、(97-133)
、(134-142)、(143-154)、(143-155)。
- 20 分鐘：(3-11)、(12-25)、(30-43)、(52-66)、(114-133)、(134-142)、(134-155)、
(143-154)、(143-155)。
- 25 分鐘：(12-25)、(30-43)、(69-90)、(97-113)、(114-133)、(134-142)、(143-154)、
(143-155)。
- 30 分鐘：(12-25)、(30-42)、(30-43)、(51-66)、(52-66)、(69-90)、(114-133)、
(134-142)、(143-154)、(143-155)。
- 35 分鐘：(3-25)、(12-25)、(30-42)、(30-43)、(69-90)、(134-142)、(143-154)、
(143-155)。

下列圖為根據 MALDI-TOF 結果所描繪出來的圖，其中越晚出現的部分表示越穩定，在這裡我們根據結構的穩定性分成深藍色、淺藍色、灰色、紅色表示，如圖 47(a) 所示，深藍色為最穩定的序列，其肽鏈序列为(97-113)，淺藍色為穩定的序列，其肽鏈序列为(3-11)、(44-50)、(113-133)，灰色為中間值，其肽鏈序列为(12-16)、(69-90)，淡紅色為不穩定區，其肽鏈為(27-42)、(51)、(67-69)，深紅色為最不穩定的序列，其肽鏈為(43)、(52-66)、(133-155)，綠色部分為沒被 MALDI-TOF MS 辨認的序列，其肽鏈為(1-2)，序列上的橘色直線為胰蛋白酶水解切位，而黃底部分為 YbeA 蛋白的結區域序列。圖 47(b)為根據 MALDI-TOF MS 結果所描繪出得電腦模擬圖，其中橢圓圈起來部分為扭結區域，而扭結區域主要為深藍色以及淺藍色分布，為結構中較穩定的。

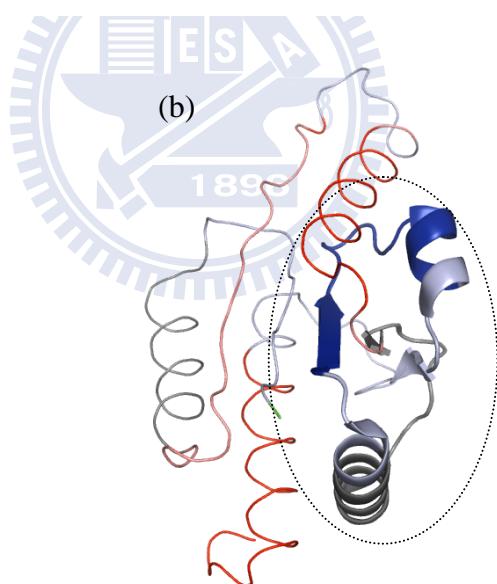
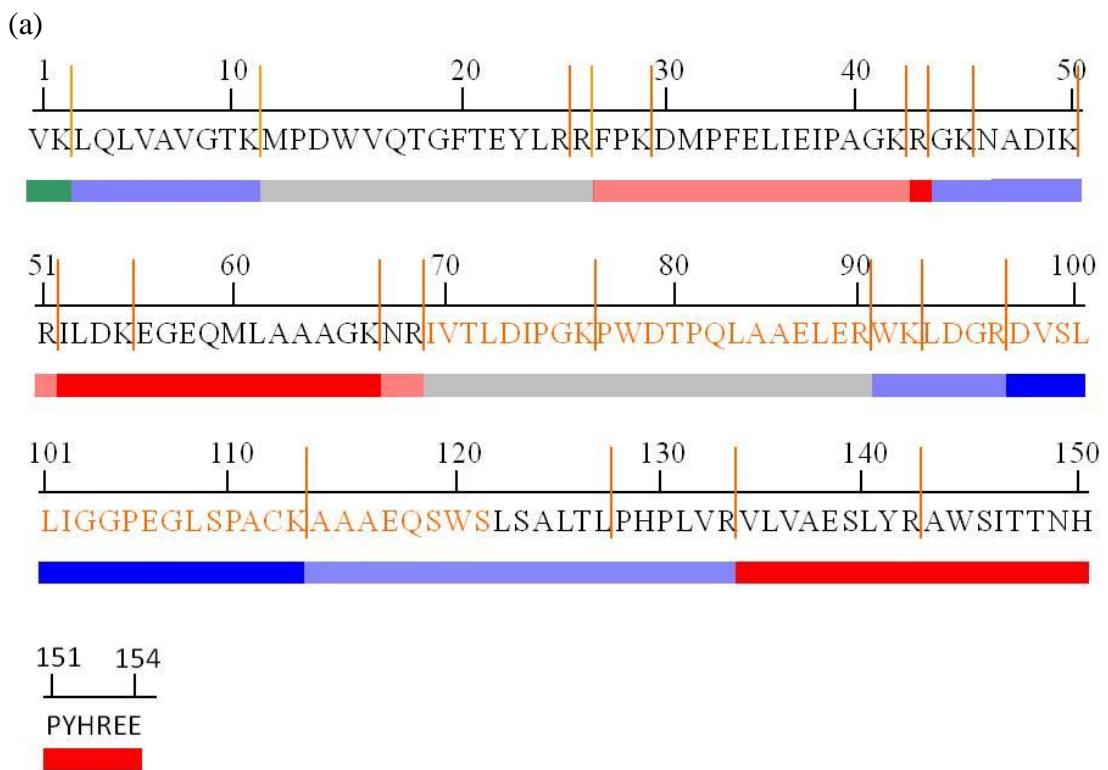


圖 47 YbeA 摺疊態胰蛋白酶水解反應圖

(a) 胰蛋白酶消化水解 YbeA 未摺疊態之反應圖，■最穩定區，■穩定區，■中間區，■不穩定區，■最不穩定區，■為無法判讀區。(b)圖圈選處為扭結區域，主要包含最穩定區以及穩定區。

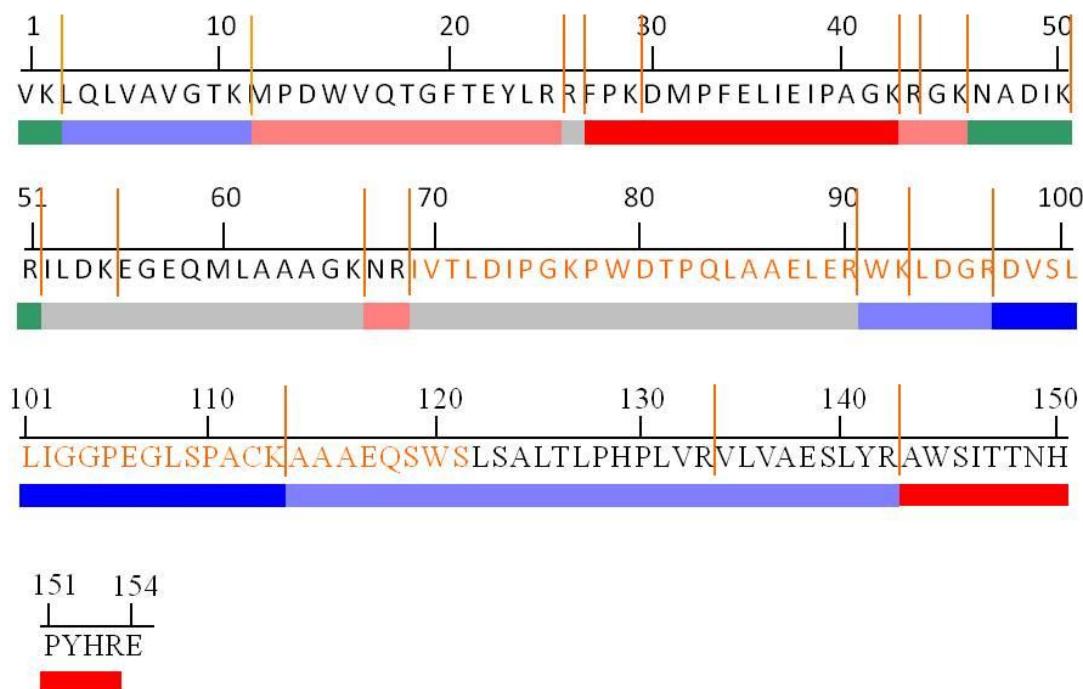
3-6-2 YbeA 非摺疊態酵素水解穩定性分析

在這裡我們使用胰蛋白酶分別和非摺疊態 YbeA 反應，根據不同時間收集反應產物，利用 MALDI-TOF MS 分析水解片段胺基酸序列，下列序列為各個時間產物被 MALDI-TOF MS 所辨認的序列，其結果如圖 48 所示。

- 1 分鐘: (12-25)、(27-43)、(30-43)、(52-68)、(134-155)、(143-154)、(143-155)。
- 2 分鐘: (12-25)、(30-43)、(30-45)、(44-51)、(69-90)、(69-92)、(69-96)、(134-142)、(143-154)、(143-155)。
- 3 分鐘: (12-25)、(27-43)、(30-43)、(52-68)、(69-90)、(114-133)。
- 4 分鐘: (3-125)、(12-25)、(12-26)、(27-43)、(30-43)、(52-68)、(67-90)、(69-90)、(69-92)、(91-113)、(93-113)、(134-142)、(134-155)、(143-154)、(143-155)。
- 5 分鐘: (3-25)、(12-25)、(12-26)、(27-43)、(30-43)、(52-68)、(67-90)、(91-113)、(93-113)、(114-133)、(134-142)、(134-142)、(134-155)、(143-154)、(143-155)。
- 10 分鐘: (12-25)、(12-26)、(27-43)、(30-43)、(67-90)、(92-113)、(93-113)、(114-133)、(134-142)、(134-155)、(143-154)、(143-155)。
- 15 分鐘: (12-25)、(12-26)、(27-43)、(30-43)、(52-66)、(67-90)、(69-90)、(69-92)、(91-113)、(93-113)、(114-133)、(134-142)、(143-154)、(143-155)。
- 20 分鐘: (12-25)、(12-26)、(27-43)、(30-43)、(67-90)、(69-90)、(69-92)、(91-113)、(93-113)、(114-133)、(134-142)、(143-154)、(143-155)。
- 16 小時: (3-11)、(12-25)、(30-42)、(69-90)、(114-133)、(134-142)、(143-154)、(143-155)。

下列圖為根據 MALDI-TOF 結果所描繪出來的圖，依據結構的穩定性來描繪，其中越晚出現的部分表示越穩定，在這裡我們根據結構的穩定性分成深藍色、淺藍色、灰色、紅色表示，如圖 48(a)所示，深藍色為最穩定的序列，其肽鏈序列为(97-113)，淺藍色為穩定的序列，其肽鏈序列为(3-11)、(91-96)、(113-142)，灰色為中間值，其肽鏈序列为(26)、(52-66)、(69-90)，淡紅色為不穩定區，其肽鏈為(12-25)、(43-45)、(67-68)，深紅色為最不穩定的序列，其肽鏈為(27-42)、(143-154)，綠色部分為未被 MALDI-TOF MS 辨認的序列，其肽鏈為(1-2)、(46-51)，而序列上的橘色直線為胰蛋白酶水解位，而黃底部分為 YbeA 蛋白的扭結區域序列。圖 48(b)為根據 MALDI-TOF MS 結果所描繪出的電腦模擬圖，其中橢圓圈起來部分為扭結區域，而扭結區域有深藍色、淺藍色以及灰色分布都是胰蛋白酶水解反應比較慢的區域。

(a)



(b)

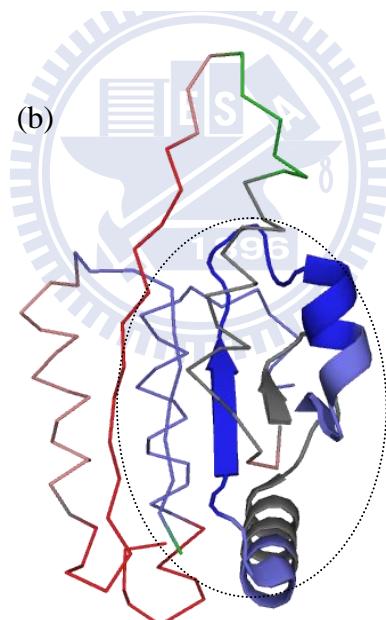


圖 48 YbeA 非摺疊態胰蛋白酶水解反應圖

(a) 胰蛋白酶消化水解 YbeA 未摺疊態之反應圖，■最穩定區，■穩定區，■中間區，■不穩定區，■最不穩定區，■為無法判讀區。(b) 圖圈選處為扭結區域，包含最穩定區、穩定區以及中間區。

3-7 YbeA 扭結區域分子間距離分析

此實驗為本實驗室先前完成，在這裡使用 295 nm 激發 Trp 分子，觀察 Trp 與 AMCA 分子的螢光能量轉移現象。如圖 49 所示，黑色部分摺疊態的螢光圖譜，紅色部分為摺疊態接合上 AMCA 後的螢光圖譜，藍色部分為未摺疊態螢光圖譜，綠色部分為未摺疊態接合上 AMCA 後的螢光圖譜，從表 11 看到 YbeA 摺疊態在未接合 AMCA 分子前，340-350nm 的螢光強度為 291.9(a.u)，而接上 AMCA 分子後其螢光強度為 122.55(a.u)，其能量轉移率為 0.58，而非摺疊態部分在未接合 AMCA 分子前 340-350 nm 的螢光強度 203.1(a.u)，而接合 AMCA 分子後為 84.48(a.u)，其能量轉移率為 0.58，其中 AMCA 與 Trp 的 R_0 為 18.9 Å，AMCA 分子與 YbeA 蛋白內 Cys-112 的接合率為 82 %，而 Trp 與 Cys 112 的距離為 16.35 Å。

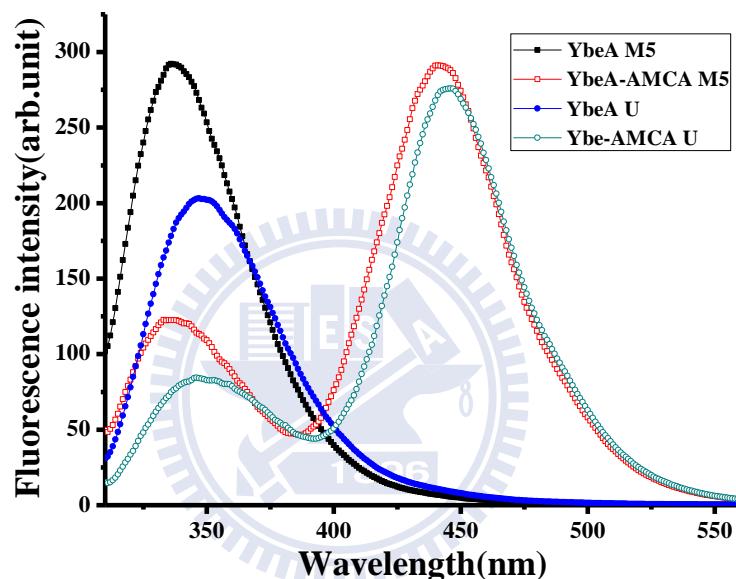


圖 49 YbeA 摺疊態以及非摺疊態和 AMCA 的螢光能量轉移圖
表 11 YbeA 蛋白分子內部螢光能量轉移

狀態	螢光強度(arb.unit)	能量轉移率	接合率	距離(Å)
M ₅	291.9(F _D)	0.58	82%	16.35
	122.55(F _{DA})			
U	203.1 (F _D)	0.58	82%	16.35
	84.48(F _{DA})			

3-8 蛋白熱穩定性分析

蛋白質內分子間作用力受到熱破壞會導致蛋白結構發生變化，在這裡我們分別透過螢光光譜儀分析其疏水性核心變化以及圓二色光譜分析二級結構變化。在加熱過程隨著穩固蛋白質核心的疏水性作用力變弱，造成疏水性胺基酸裸露，導致螢光強度下降以及波峯位移，此外加熱時導致分子間氫鍵斷裂導致二級結構被破壞，可以透過 α 螺旋以及 β 平板的訊號變化來分析二級結構受熱破壞的程度，進而分析蛋白二級結構的穩定性。

3-8-1 螢光光譜儀分析熱穩定性

在這裡我們使用波長 295nm 的光源來激發 YbeA 蛋白質分子內的 Trp 胺基酸，透過水浴槽加溫提升溫度觀察蛋白質受熱後的螢光圖譜，收集波長範圍為 310-450 nm 訊號來分析蛋白的熱相變化，根據蛋白質在各溫度底下 λ_{max} 數據點，透過 Boltzmann equation

$$y = \frac{A1 - A2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A2 \text{ 做曲線擬合線，再透過一次微分取得轉折點，為熱相變點。}$$

圖 50 為 YbeA 蛋白在各溫度底下螢光圖譜，其中從最低溫到最高溫的過程螢光強度由 543.3(a.u)下降至 158.9(a.u)， λ_{max} 從 340 nm 變成 342 nm， T_m 值為 317.07 K， K_D 為 0.15 K $^{-1}$ ， $\Delta G=4.7 \text{ kJmole}^{-1}$ 。圖 51 為 YbeA $\triangle 73-75$ 蛋白在各溫度底下螢光圖譜，其最低溫到最高溫的過程螢光強度 774(a.u)下降至 146.8(a.u)， λ_{max} 從 341 nm 變成 344 nm，其 T_m 值為 323.49 K， K_D 為 0.12 K $^{-1}$ ， $\Delta G=5.16 \text{ kJmole}^{-1}$ 。圖 52 為 YbeA $\triangle 1-8$ 蛋白在各溫度底下螢光圖譜，其從低溫到高溫過程，螢光強度由 789.46(a.u)下降至 219.31(a.u)， λ_{max} 從 340 nm 變成 343 nm，其 T_m 值為 319.47 K， K_D 為 0.313 K $^{-1}$ ， $\Delta G=2.87 \text{ kJmole}^{-1}$ 。圖 53 為 YbeA $\triangle 1-70$ 蛋白在各溫度底下螢光圖譜，從低溫到高溫的過程，螢光強度從 467.68(a.u)下降至 160.90(a.u)， λ_{max} 從 342 nm 到 340.5 nm。圖 54 為 YbeA $\triangle 118-155$ 蛋白在各溫度底下螢光圖譜，從低溫到高溫的過程，螢光強度從 631.69(a.u)下降至 178.99(a.u)， λ_{max} 從 346 nm 到 348 nm，其 T_m 值為 305.80 K， K_D 為 0.86， $\Delta G=0.35 \text{ kJmole}^{-1}$ 。

3-8-1-1 YbeA 蛋白螢光變溫

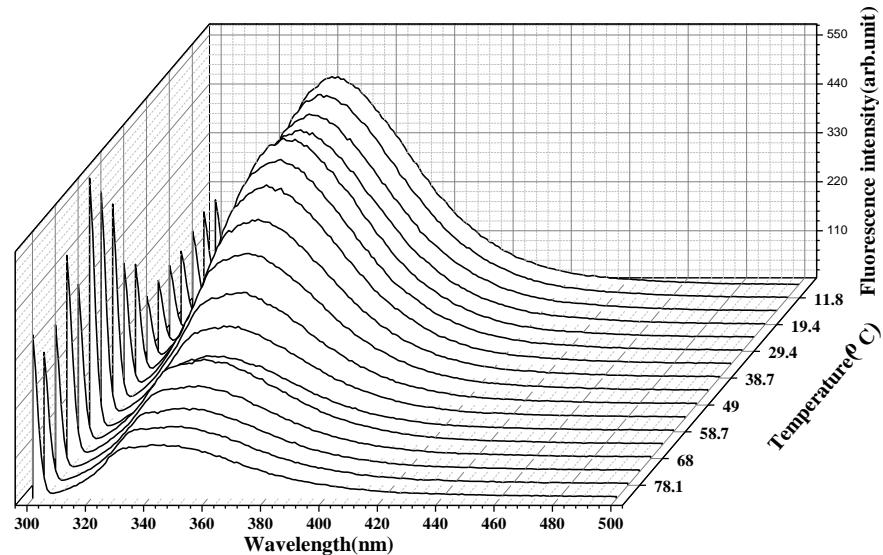


圖 50 YbeA 蛋白變溫螢光光譜

各線條代表各溫度底下的螢光圖，其中 X 軸代表掃描的波長範圍，而 Y 軸代表樣品溫度，而 Z 軸表示樣品的螢光強度。

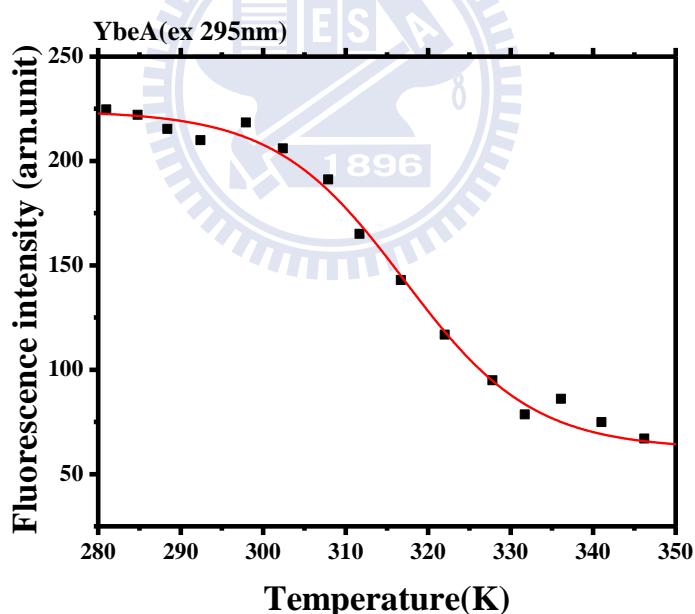


圖 51 YbeA 蛋白螢光變溫波峰變化圖

其橫軸表示溫度而縱軸表示螢光強度，每個點代表每個溫度底下 λ_{max} 數據點，透過 Boltzmann equation 曲線擬合，再透過一次微分結果。

3-8-1-2 YbeA Δ 73-75 蛋白螢光變溫

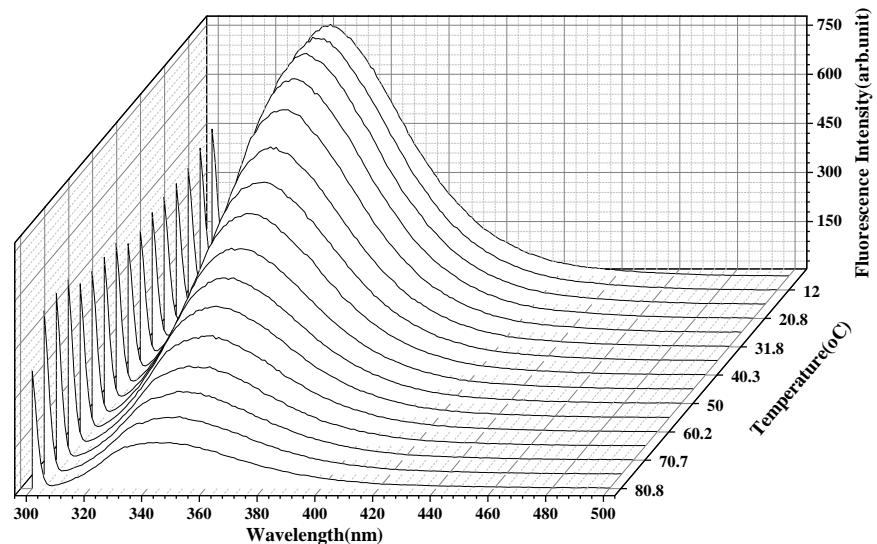


圖 52 YbeA Δ 73-75 蛋白變溫螢光光譜

各線條代表各溫度底下的螢光圖，其中 X 軸代表掃描的波長範圍，而 Y 軸代表樣品溫度，而 Z 軸表示樣品的螢光強度。

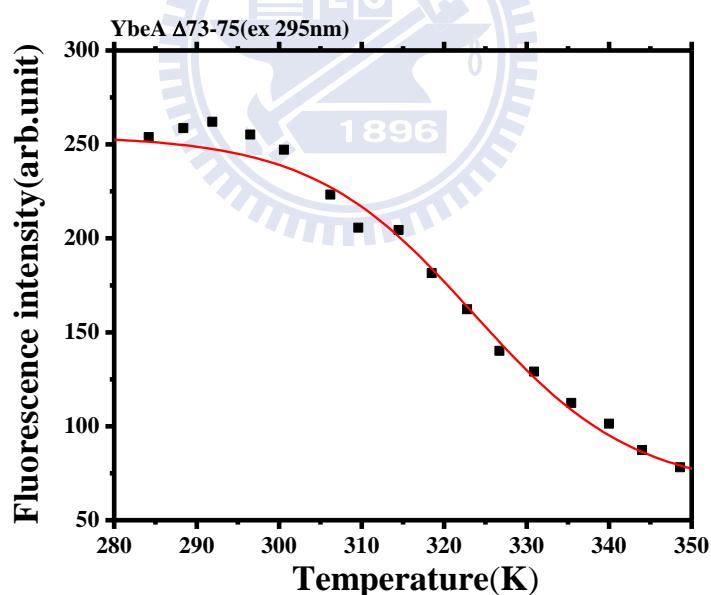


圖 53 YbeA Δ 73-75 蛋白螢光變溫波峰變化圖

其橫軸表示溫度而縱軸表示螢光強度，每個點代表每個溫度底下 λ_{max} 數據點，透過 Boltzmann equation 曲線擬合，再透過一次微分結果。

3-8-1-3 YbeA Δ 1-8 蛋白螢光變溫

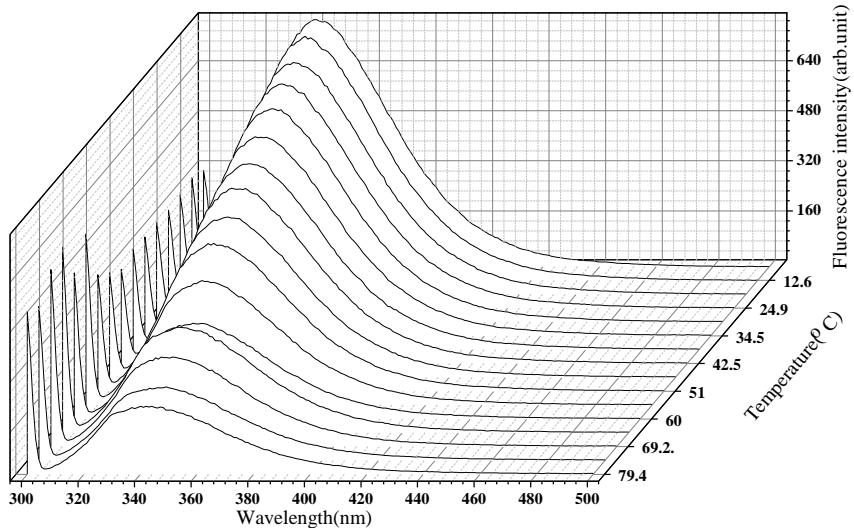


圖 54 YbeA Δ 1-8 蛋白變溫螢光光譜

各線條代表各溫度底下的螢光圖，其中 X 軸代表掃描的波長範圍，而 Y 軸代表樣品溫度，而 Z 軸表示樣品的螢光強度。

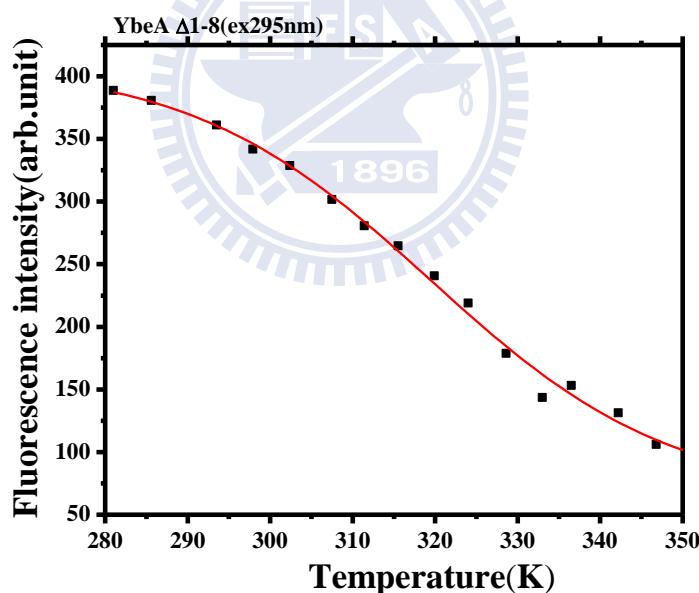


圖 55 YbeA Δ 1-8 蛋白螢光變溫波峰變化圖

其橫軸表示溫度而縱軸表示螢光強度，每個點代表每個溫度底下 λ_{max} 數據點，透過 Boltzmann equation 曲線擬合，再透過一次微分結果。

3-8-1-4 YbeA Δ 1-70 蛋白螢光變溫

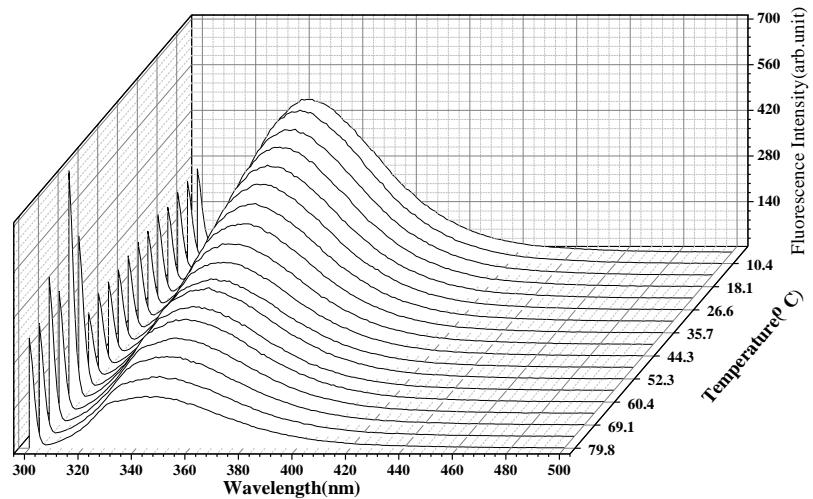


圖 56 YbeA Δ 1-70 蛋白變溫螢光光譜

各線條代表各溫度底下的螢光圖，其中 X 軸代表掃描的波長範圍，而 Y 軸代表樣品溫度，而 Z 軸代表樣品的螢光強度

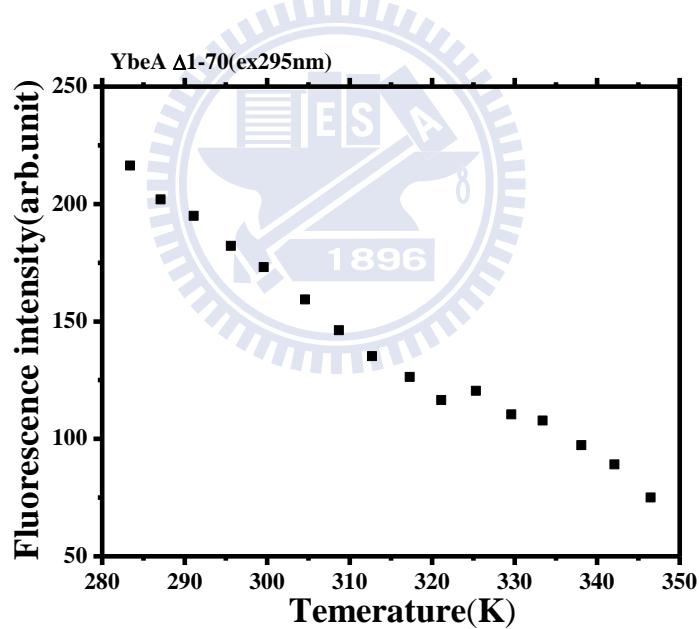


圖 57 YbeA Δ 1-70 蛋白螢光變溫波峰變化圖

其橫軸表是溫度而縱軸表示螢光強度，每個點代表每個溫度底下 λ_{max} 數據點，透過 Boltzmann equation 曲線擬合，再透過一次微分結果。

3-8-1-5 YbeA Δ 118-155 蛋白螢光變溫

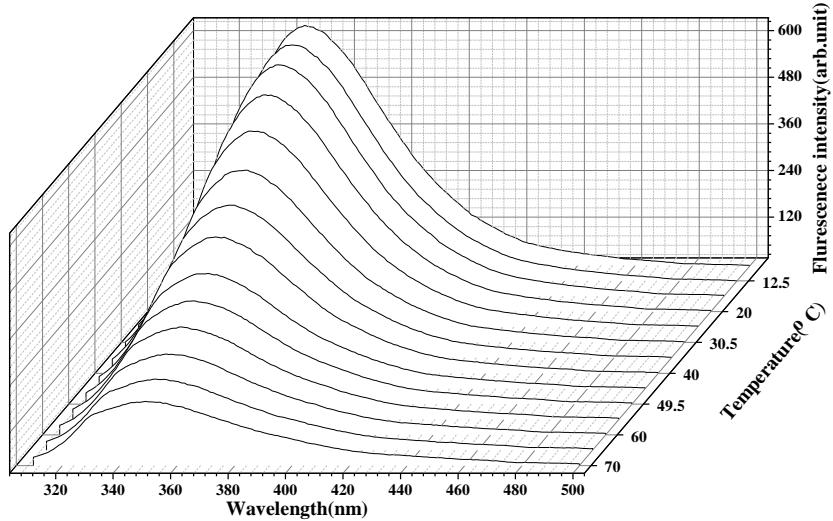


圖 58 YbeA Δ 118-155 蛋白變溫螢光光譜

各線條代表各溫度底下的螢光圖，其中 X 軸代表掃描的波長範圍，而 Y 軸代表樣品溫度，而 Z 軸代表樣品的螢光強度。

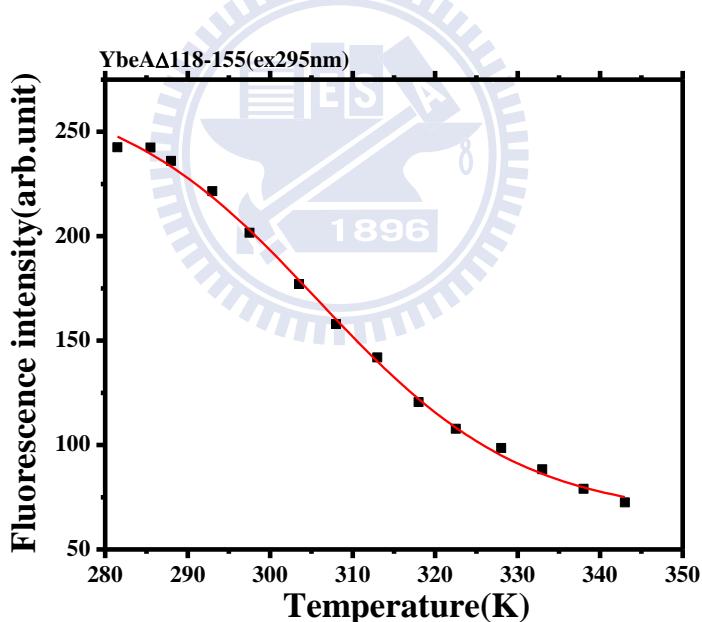


圖 59 YbeA Δ 118-155 蛋白螢光變溫波峰變化圖

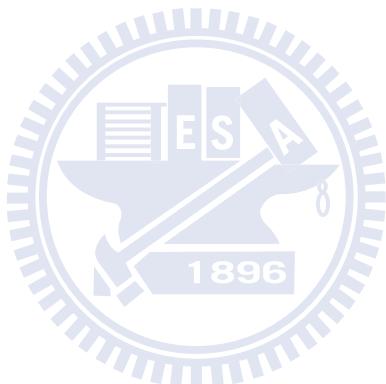
其橫軸表是溫度而縱軸表示螢光強度，每個點代表每個溫度底下 λ_{max} 數據點，透過 Boltzmann equation 曲線擬合，再透過一次微分結果。

表 12 螢光光譜儀分析熱相變數據

	Intensity arb.unit	λ_{max} nm	T _m K	K _D K ⁻¹	ΔG kJ/mole
YbeA	543.30→158.90	340→342	317.07	0.15	4.7
YbeA Δ 73-75	774.00→146.80	341→344	323.49	0.12	5.16
YbeA Δ 1-8	789.46→219.31	340→343	319.47	0.313	2.87
YbeA Δ 1-70	467.68→160.90	342→345			
YbeA Δ 118-155	631.69→178.99	346→348	305.80	0.86	0.35

3-8-2 圓二色光譜儀分析熱穩定性

在這裡我們透過圓二色光譜儀來分析蛋白受熱後的二級結構變化，在這裡我們分別收集 α 螺旋訊號(222 nm)以及 β 平板訊號(215 nm)，以每分鐘升溫 2 K，量測範圍從 278 K 到 368 K。圖 60、圖 61 分別為 YbeA α 螺旋以及 β 平板二級結構的變化，如圖所示其訊號變化一直到 368 K 仍未達飽和變性，圖 62、圖 63 分別為 YbeA Δ 73-75 蛋白的 α 螺旋以及 β 平板訊號，其受熱後 α 螺旋以及 β 平板訊號受熱後均呈現不具規律性跳動；圖 64、圖 65 為 YbeA Δ 1-8 蛋白 α 螺旋以及 β 平板二級結構的變化，受熱後不論是 α 螺旋以及 β 平板訊號其訊號均隨著隨著溫度而線性上升；圖 66、圖 67 為 YbeA Δ 1-70 蛋白 α 螺旋以及 β 平板二級結構的變化，受熱後不論是 α 螺旋以及 β 平板訊號和 YbeA Δ 1-8 一樣均隨著隨著溫度而線性上升；圖 68、圖 69 分別為 YbeA Δ 118-155 蛋白的 α 螺旋訊號，以及 β 平板訊號變化，從圖 68 中可以看到其 α 螺旋訊號上升到 340 K 左右即達飽和不再上升，此時透過 Boltzmann equation 曲線擬合，透過一次微分得到該反曲點，在這裡 YbeA Δ 118-155 α 螺旋的的 T_m 值為 321.17 K, K_D 值為 1.21 K^{-1} , $\Delta G = -0.537\text{ kJ mole}^{-1}$ 。圖 69 為 YbeA Δ 118-155 蛋白的 β 平板加溫後的訊號變化，和 α 螺旋一樣在 340 K 左右即達飽和不再上升，微分後取反曲點， T_m 值為 325.63 K, K_D 值為 1.16 K^{-1} , $\Delta G = -0.27\text{ kJ mole}^{-1}$ 。



3-8-2-1 YbeA 二級結構熱穩定性分析

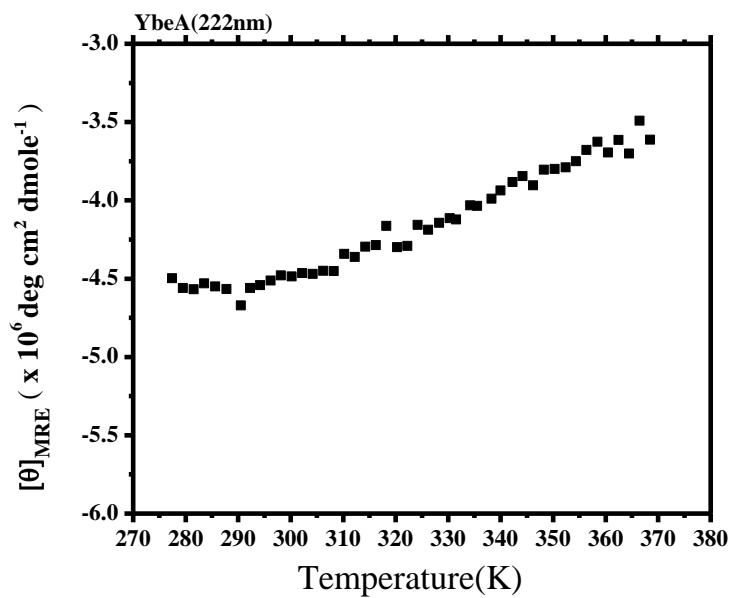


圖 60 YbeA 蛋白 α 螺旋二級結構熱變化

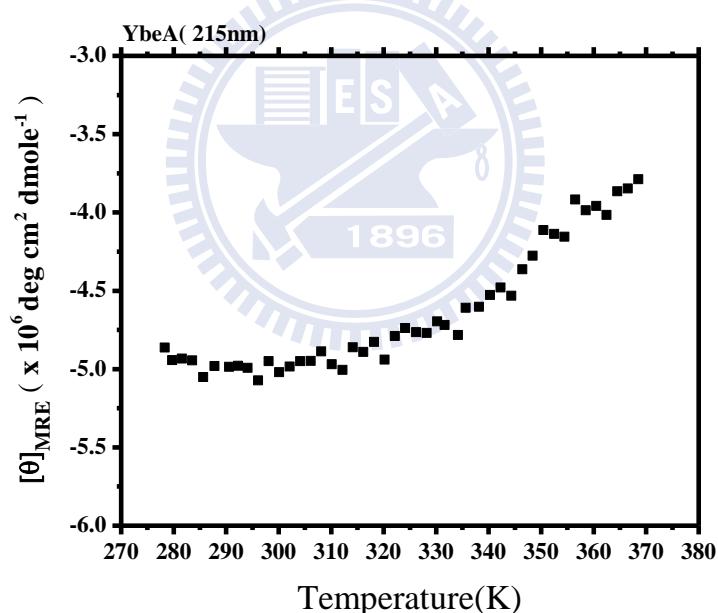


圖 61 YbeA 蛋白 β 平板二級結構熱變化

3-8-2-2 YbeA Δ 73-75 二級結構熱穩定性分析

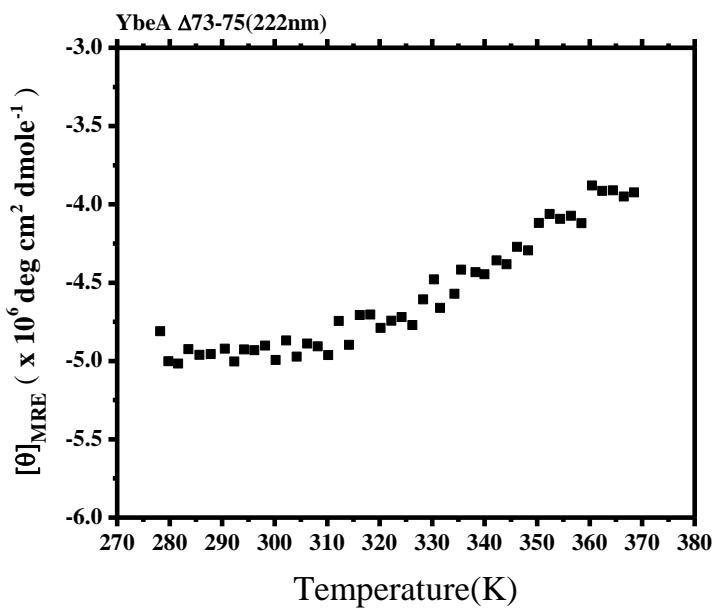


圖 62 YbeA Δ 73-75 蛋白 α 螺旋二級結構熱變化

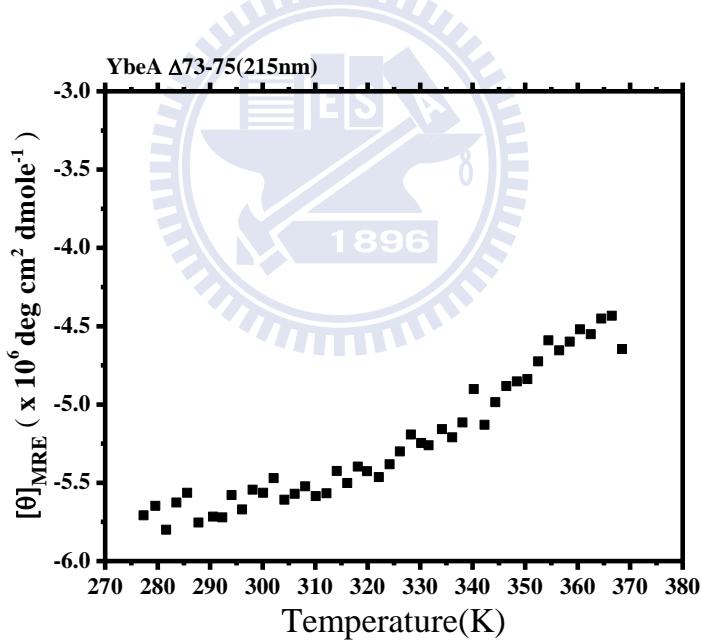


圖 63 YbeA Δ 73-75 蛋白 β 平板二級結構熱變化

3-8-2-3 YbeA Δ 1-8 二級結構熱穩定性分析

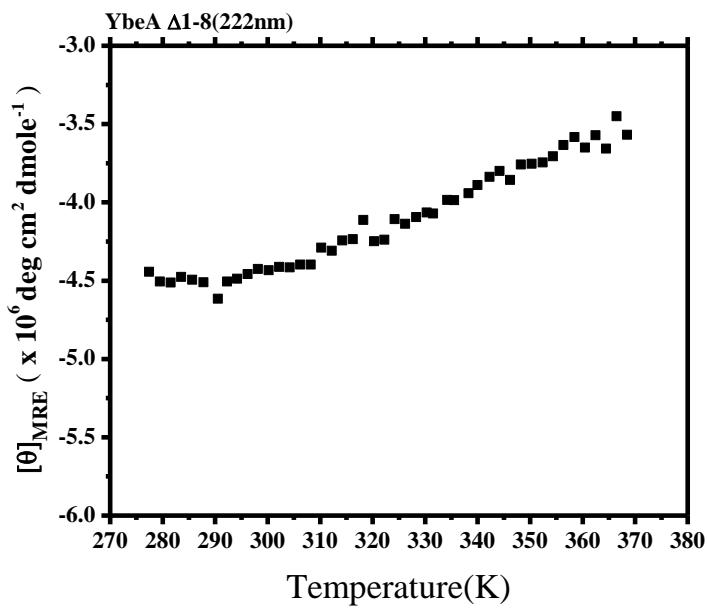


圖 64 YbeA Δ 1-8 蛋白 α 螺旋二級結構熱變化

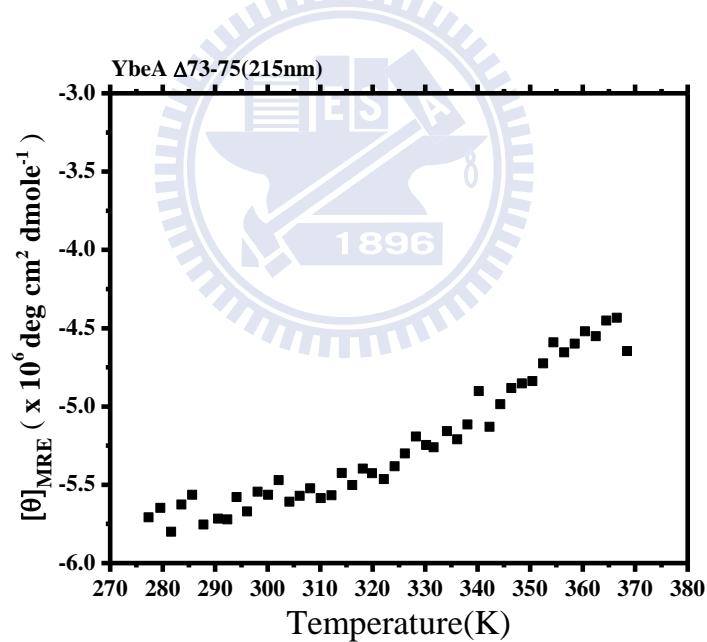


圖 65 YbeA Δ 1-8 蛋白 β 平板二級結構熱變化

3-8-2-4 YbeA Δ 1-70 二級結構熱穩定性分析

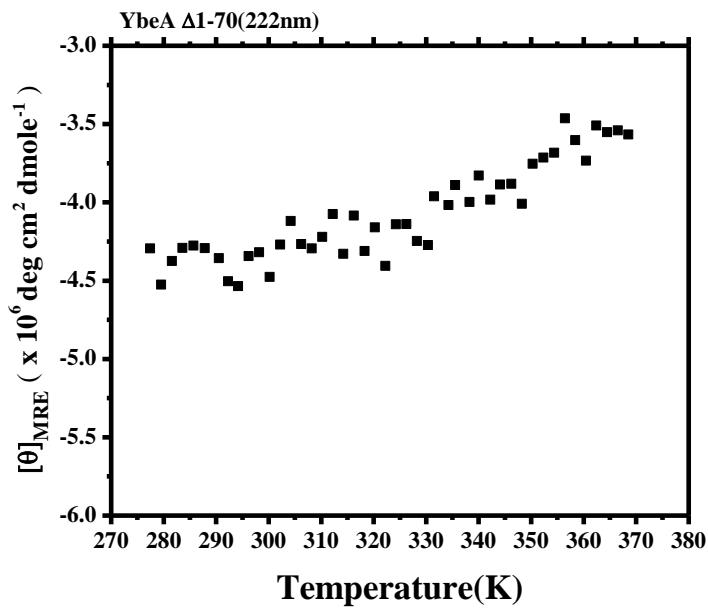


圖 66 YbeA Δ 1-70 蛋白 α 螺旋二級結構熱變化

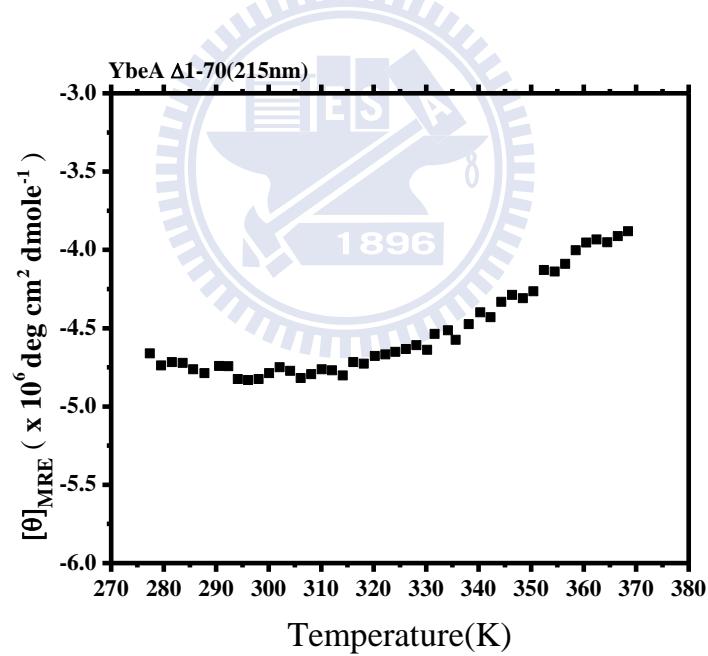


圖 67 YbeA Δ 1-70 蛋白 β 平板二級結構熱變化

3-8-2-5 YbeA Δ 118-155 二級結構熱穩定性分析

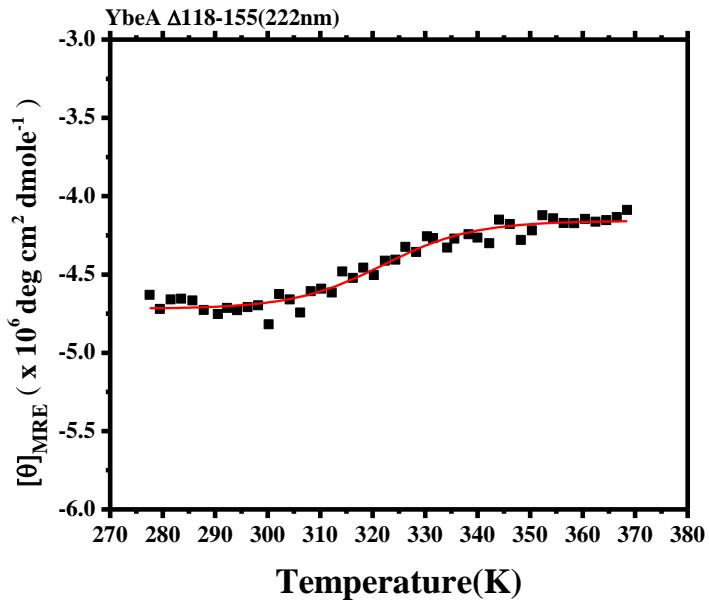


圖 68 YbeA Δ 118-155 蛋白 α 螺旋二級結構熱變化

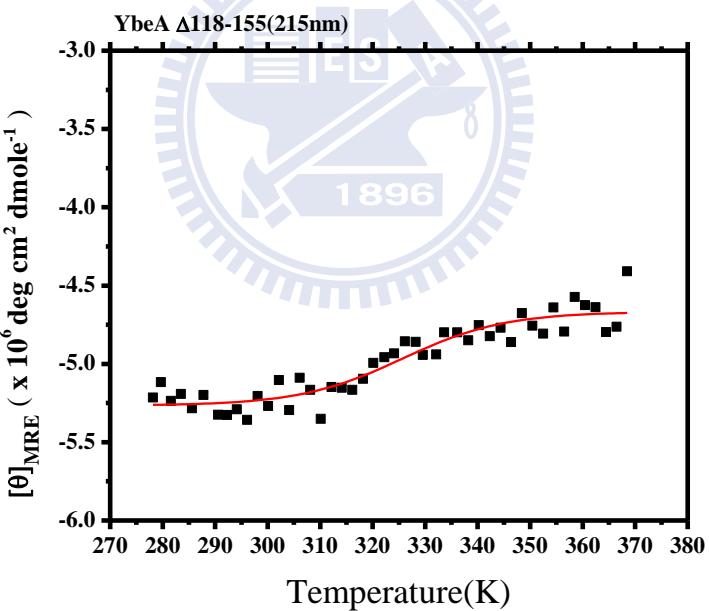


圖 69 YbeA Δ 118-155 蛋白 β 平板二級結構熱變化

3-9 摺疊速率分析

3-9-1 靜態平衡摺疊及變性分析

一般常用來分析化學變性有尿素(urea)以及鹽酸胍素(GuHCl)，在這裡我們以尿素為變性劑，在變性反應將蛋白置於不含尿素條件底下的 Tris 緩衝液內，然後將自然態蛋白溶液與含不同尿素濃度的 Tris 緩衝液混合。而摺疊反應時，我們將蛋白溶於 8M urea Tris 緩衝液底下的環境，將蛋白和不同濃度的 Tris 緩衝液以一比十的體積比混和，然後透過光學儀-螢光光譜儀以及圓二色光譜儀分析蛋白質觀察其疏水性核心以及二級結構的變化。由於訊號的變化趨勢呈符合 S 型曲線函數(*Sigmoidal function*)，於是我們將不同濃度底下的數據點透過 **Boltzmann equation** 做曲線擬合(fitting)。其中 χ_0 為 $[D]_{50\%}$ 即為 Cm 值，而 $m = \frac{(RT)}{dt}$ ， $\Delta G_{H_2O} = -m[D]_{50\%}$

$$\text{Boltzmann equation } y = \frac{A1 - A2}{1 + e^{(x-x0)/dx}} + A2$$

圖 70(a)為透過螢光光譜儀分析 YbeA 尿素變性($N_2 \rightarrow 2D$)螢光 330 nm 數據圖，(b)為螢光訊號 normalize 的圖，其中 χ_0 為 2.79， dx 為 0.75， $[D]_{50\%}$ 為 2.79M 而 m 值為 3.303 $kJmole^{-1}M^{-1}$ ， $\Delta G_{H_2O}^{N_2 \rightarrow 2D}$ 為 $-9.29 kJmole^{-1}$ 。圖 70(c)為利用為透過螢光光譜儀分析 YbeA 尿素摺疊 330 nm 的螢光數據圖，(d)為螢光訊號 normalize 的圖，其中 χ_0 為 2.73， dx 為 0.30， $[D]_{50\%}$ 為 2.73 M 而 m 值為 $8.28 kJmole^{-1}M^{-1}$ ， $\Delta G_{H_2O}^{2D \rightarrow N_2}$ 為 $-22.6 kJmole^{-1}$ 。

圖 71(a)為透過圓二色光譜以分析 YbeA 變性($N_2 \rightarrow 2D$)222 nm 的訊號，(b)為圓二色光譜訊號 normalize 的圖，其中 χ_0 為 3.70， dx 為 2.62， $[D]_{50\%}$ 為 3.70 M 而 m 值為 0.948 $kJmole^{-1}M^{-1}$ ， $\Delta G_{H_2O}^{N_2 \rightarrow 2D} = -3.50 kJmole^{-1}$ 。圖 71(c)為透過圓二色光譜分析 YbeA 復性 222 nm 的訊號，(d)為圓二色光譜訊號 normalize 的圖， $[D]_{50\%}$ 為 3.88 M，而 m 值為 1.51 $kJmole^{-1}M^{-1}$ ， $\Delta G_{H_2O}^{N_2 \leftrightarrow 2D}$ 為 $-5.85 kJmole^{-1}$ 。表 13 為 YbeA 靜態平衡之摺疊及變性熱力學參數。

表 13 YbeA 變性摺疊平衡熱力學參數

$N_2 \rightarrow 2D$	P_t	$[D]_{50\%}$	$m_{N_2 \rightarrow 2D}$	$\Delta G_{H_2O}^{N_2 \rightarrow 2D}$
	μM	M	$kJmole^{-1}M^{-1}$	$kJmole^{-1}$
Flu	5	2.79	3.30	-9.20
CD	20	2.73	8.28	-22.6
$2D \rightarrow N_2$	P_t	$[D]_{50\%}$	$m_{2D \rightarrow N_2}$	$\Delta G_{H_2O}^{2D \rightarrow N_2}$
	μM	M	$kJmole^{-1}M^{-1}$	$kJmole^{-1}$
Flu	5	3.70	0.948	-3.50
CD	20	3.88	1.51	-5.85

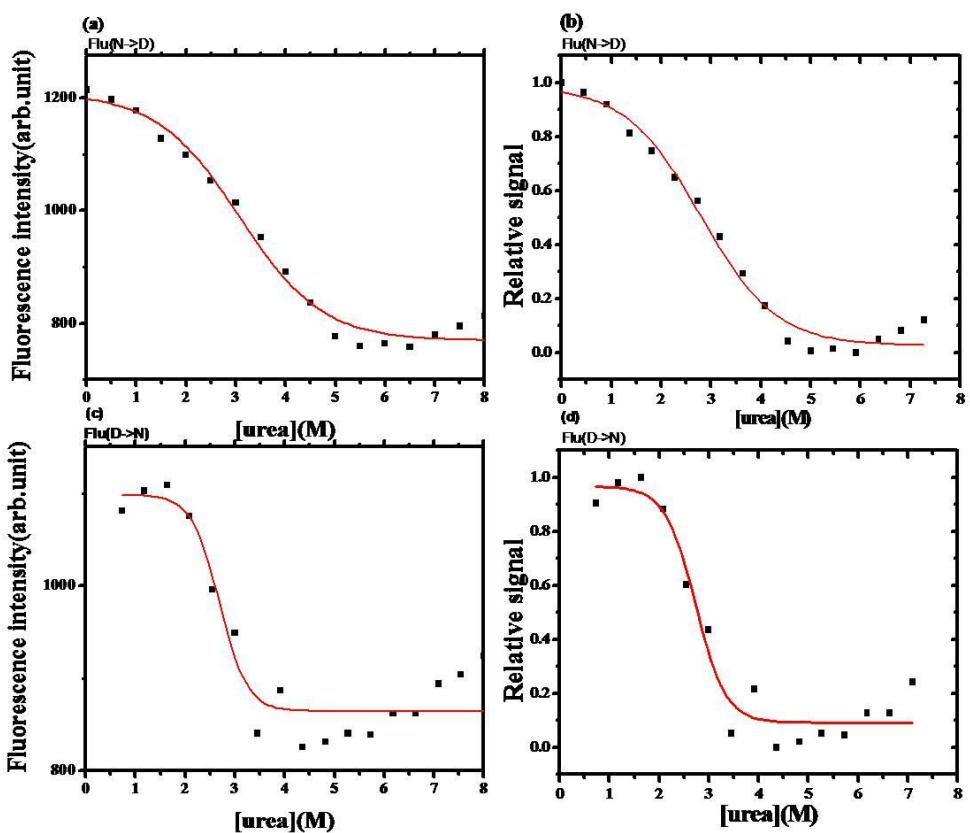


圖 70 螢光光譜儀分析 YbeA 靜態平衡之摺疊及變性

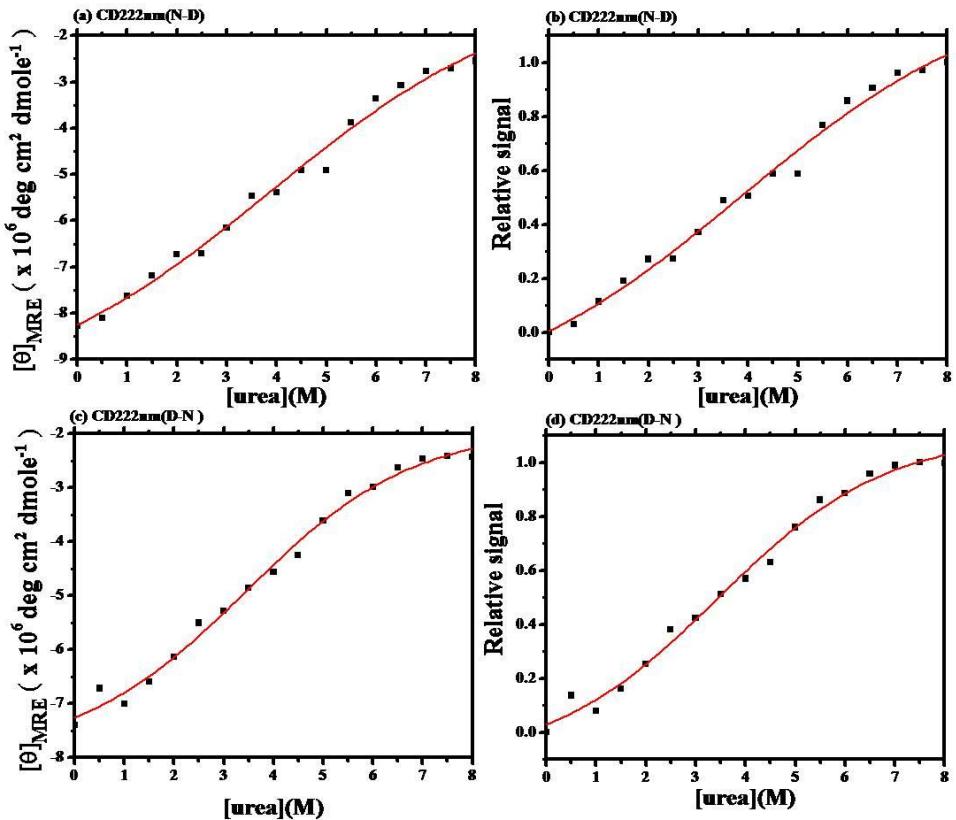


圖 71 圓二色光譜儀分析 YbeA 靜態平衡之摺疊及變性

3-9-2 動態摺疊速率分析

在這裡我們透過快速動力學截流裝置 (stopped-flow) 結合圓二色光譜儀(CD spectroscopy)分析蛋白質摺疊以及變性的反應速率常數。在這裡和靜態平衡實驗一樣我們以尿素作為變性劑，將自然態的蛋白溶液和含變性劑之緩衝溶液，以 stopped-flow 快速混和後透過圓二色光譜蛋白分析蛋白質二級結構變化，在這裡我們的偵測點為 α 螺旋特徵峰 222 nm 位置，然後根據時間和 α 螺旋的特徵峰 222 nm 相對的數據點。其中 222 nm 訊號呈現指數型升降，因此我們透過 **Exponential Decay1** 方程式進行數據曲線擬合。

$$\text{Exponential Decay1} \quad y = y_0 + Ae^{-x/t}$$

在這裡的 x 的倒數即速率，於是我們可以得到該濃度下摺疊或變性的速率，然後將各濃度底下的 k_{obs} 描繪出來，即可描繪出該蛋白質 chevelon plot，以瞭解其摺疊機制。其中 $k_{obs} = k_f^{H_2O} \exp(-m_{kf}[\text{urea}]) + k_d^{H_2O} \exp(m_{kd}[\text{urea}])$ ，

$$\ln k_{obs} = \ln(k_f^{H_2O} \exp(-m_{kf}[\text{urea}]) + k_d^{H_2O} \exp(m_{kd}[\text{urea}]))$$

m_{kf} =slope of folding of cheveron plot ; m_{kd} =slope of unfolding of cheveron plot

$$m_{kin} = m_{kf} + m_{kd}$$

$$\Delta G_{H_2O} = -RT \ln(k_f^{H_2O} / k_d^{H_2O})$$

在這裡 YbeA 的 $k_f^{H_2O}$ 為 $6.4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ，而 $k_d^{H_2O}$ 值為 $1.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ， m_{kf} 為 $1.67 \text{ kJ mole}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ， m_{kd} 為 $2.07 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ， ΔG_{H_2O} 為 $-2.72 \text{ kJ mole}^{-1}$ ， $C_m = 3.07 \text{ M}$ 。而 YbeAΔ1-8 的 $k_f^{H_2O}$ 為 $1.9 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 而 $k_d^{H_2O}$ 值為 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ， m_{kf} 為 $1.34 \text{ kJ mole}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ， m_{kd} 為 $1.27 \text{ kJ mole}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 而 ΔG_{H_2O} 為 $-2.17 \text{ kJ mole}^{-1}$ ， $C_m = 3.44 \text{ M}$ 。

為了瞭解 YbeA Δ 1-8 與 YbeA 兩個蛋白之間摺疊上的差異，我們透過計算 Φ 值的方式來分析其摺疊上的差異，其中 $0 < \Phi < 1$ ，當 Φ -value 越接近 1，表示此突變對摺疊影響非常大，在這裡我們透過 YbeAΔ1-8 以及 YbeA 的 $k_f^{H_2O}$ 以及 $k_d^{H_2O}$ 求其 Φ 值，經過計算兩者之間的 Φ 值為 0.55。

$$\text{在這裡假設} \begin{cases} k_f = k_1 \\ k_d = k_{-1} \end{cases}$$

$$\Phi_{\#} = \frac{\Delta\Delta G_{\#-\text{U}}}{\Delta\Delta G_{\text{F-U}}} \quad , \quad \Phi_{\#} = 1 - \frac{\Delta\Delta G_{\text{F}-\#}}{\Delta\Delta G_{\text{F-U}}}$$

$$\Delta\Delta G_{\text{F-U}} = \Delta\Delta G_{\#-\text{U}} + \Delta\Delta G_{\text{F}-\#}$$

$$\Delta\Delta G_{\text{F}-\#} = RT \times \ln \left(\frac{k_{-1,mt}}{k_{-1,wt}} \right)$$

$$\Delta\Delta G_{\#-\text{U}} = -RT \times \ln \left(\frac{k_{-1,mt}}{k_{-1,wt}} \right)$$

$$\Phi - \text{value} = \frac{-RT \ln \left(\frac{k_{1,mt}}{k_{1,wt}} \right)}{-RT \ln \left(\frac{k_{1,mt}}{k_{1,wt}} \right) + RT \ln \left(\frac{k_{-1,mt}}{k_{-1,wt}} \right)} = \frac{\ln \left(\frac{k_{1,mt}}{k_{1,wt}} \right)}{\left(\ln \left(\frac{k_{1,mt}}{k_{1,wt}} \right) - \ln \left(\frac{k_{-1,mt}}{k_{-1,wt}} \right) \right)}$$

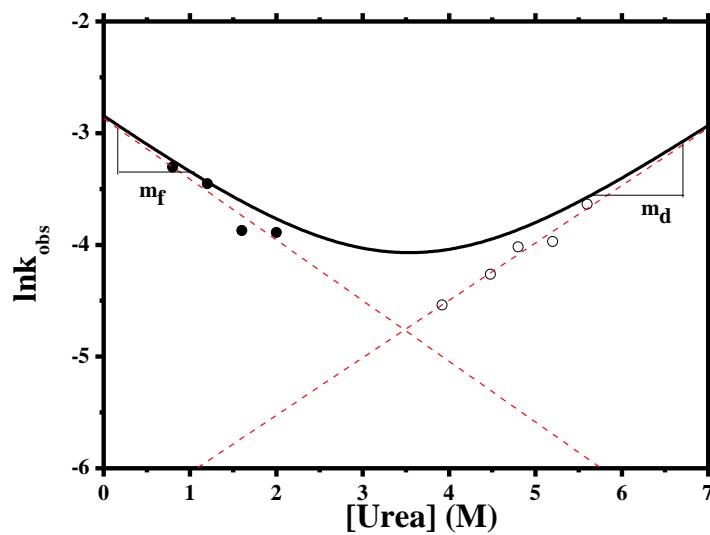


圖 72 Chevelon plot of YbeA

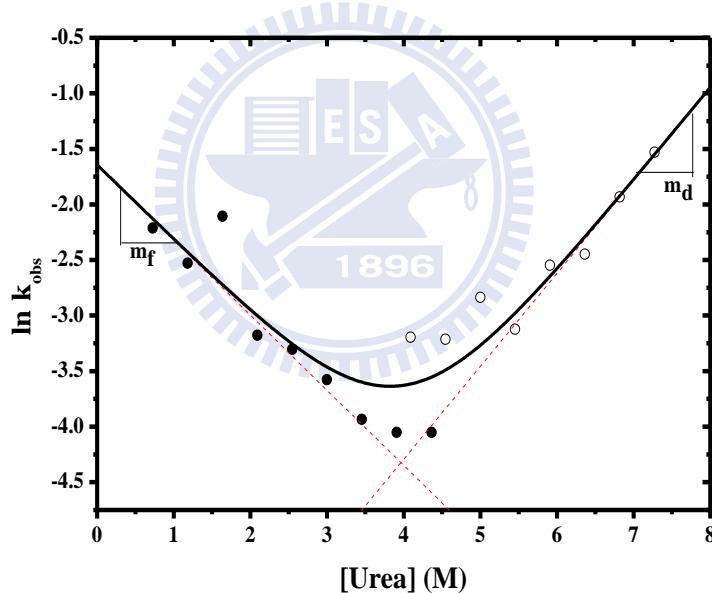


圖 73 Chevelon plot of YbeA Δ 1-8

表 14 YbeA 及 Δ 1-8 變性摺疊動力學參數

	$k_f^{H_2O}$ (S ⁻¹)	$k_d^{H_2O}$ (S ⁻¹)	m_{kf} $\text{kJmole}^{-1}\text{M}^{-1}$	m_{kd} $\text{kJmole}^{-1}\text{M}^{-1}$	m_{kin} $\text{kJmole}^{-1}\text{M}^{-1}$	ΔG_{H_2O} (M)	C_m
YbeA	6.4×10^{-2}	1.2×10^{-3}	1.67	2.07	3.74	-2.72	3.07
YbeA Δ 1-8	1.9×10^{-1}	5×10^{-4}	1.34	1.27	2.61	-2.17	3.44

第四章 討論

4-1 基因構築

首先為了獲得 YbeA 蛋白質，我們透過基因重組的方式從取得 *ybeA* 的基因然後透過蛋白宿主表現系統獲得所需的蛋白。在這裏我們以大腸桿菌菌株 *K-12 DH10B*(GI code, 169887498)的染色體作為模版，透過引子和它們要擴增的 DNA 片斷的起始和終止區域完全雜膠黏合，DNA 聚合酶結合到這兩個位置，開始合成新的 DNA 鏈擴大該基因。其中引子和欲擴增基因的黏合和引子的熔點(T_m)值有關，熔點(T_m)指的是 50 %的引子與模板結合的溫度，如果高於這個溫度引子與模板就不能結合。此外當兩端引子相差太多，會造成無法黏合或是錯誤黏合比例增加的機會。

在這裡由於 *ybeA* 基因起始區的 GC % 比較高，造成引子 T_m 值在 60.7 °C，而終止區域部分，熔點(T_m)在 44.3 °C，兩端引子之間的熔點(T_m)約差 14-15 °C，如果單純只使用一對引子來做 PCR，很容易產生不專一或錯誤的 PCR 產物。於是我們採用所謂的 nest PCR 利用兩對引子進行 PCR，一開始以第一對引子(primer)先進行 PCR，然後用第二對引子對第一對引子的 PCR 產物進行第二次 PCR，這樣的做法可以避免只用一對引子和模板雜合的地方是錯誤的，而產生不專一和錯誤的 PCR 產物，此時不專一或錯誤的 PCR 產物就不會被放大，這樣一來可以更專一的擴增放大特定片段。

此外除了構築 *ybeA* 基因以外，我們也構築了 $\triangle 73-75$ 、 $\triangle 1-8$ 、 $\triangle 1-70$ 、 $\triangle 118-155$ 缺損基因。在擴增該基因時，為了讓 PCR 的專一性提高，我們在設計引子時會利用靜默突變方式降低 GC % 比例，降低兩端引子間的(T_m)差異，提高 PCR 成功的機率。

在構築 *ybeA* $\triangle 73-75$ 時，我們選擇 mega-primer 方式擴增該基因，一般而言，在構築中間片端缺損的基因時，常用的方法是將片段缺損前後兩段基因設計酵素切位，透過酵素水解再將兩端黏性末端 (sticky end) 黏合。然而在設計兩端的引子時需考慮酵素水解後，鹼基是否可以互相黏合的問題。在這裡採用的 mega-primer 方式只需兩次 PCR 即可得到欲擴增片段，增加了基因構築的效力。

4-2 蛋白質定性分析

4-2-1 樣品製備

此外為了確認我們送入的基因卻確實能在宿主表現系統大量表現，我們以 IPTG 誘導插入基因(insert gene)表現，然後分別收集水溶性以及非水溶型式蛋白，透過 SDS PAGE 分析表現結果，結果顯示 YbeA 能同時存於水溶以及非水溶部份。然而非水溶部分相較於水溶性部份，不論是在產量以及純度均比水溶性來的好，其純度已經高達 95 %，毋須再透過後續的純化步驟，大大增加實驗的方便性。

此外由於我們建構的蛋白大量表現在內含體，其本身為沒有活性的蛋白。為了使不具活性的內含體摺疊回有功能的結構，我們需要以含變性劑的溶液將內含體溶解，再透過後續有效摺疊回具有功能的蛋白。

根據我們之前的實驗經驗，如果直接將未摺疊態蛋白，透過直接稀釋以及直接透析均會造成蛋白質發生沉澱聚集，表示 YbeA 在透過直接稀釋法以及直接透析法摺疊時，蛋白質摺疊過程直接穿過相轉變區間，造成蛋白質發生交互作用力而產生沉澱。為了克服這點，我們採用實驗室建構的準靜態平衡透析法，順利將 YbeA 蛋白重新摺疊回自然態。可見本實驗建構的過臨界點摺疊方法為一個極佳的蛋白質復性方法，此外由於 YbeA 本身只溶於偏鹼的環境底下，在蛋白摺疊的過程全採用鹼性環境下做摺疊。

4-2-2 摺疊產物結構及功能分析

為了確認準靜態平衡透析法摺疊後 YbeA 的內部疏水性核心位置以及二級結構的與我們自然態下的 YbeA 是否相同，在此我們以螢光光譜儀以及圓二色光譜儀分析其疏水性核心以及二級結構的差異。摺疊好的蛋白質其內部由疏水性胺基酸構成疏水性核心，而暴露在蛋白表面則為帶電或極性胺基酸側鏈。這些極性胺基酸和周圍的水分子之間產生分子間交互作用，提供蛋白質穩定的重要作用力。其中分子間氫鍵的強度和所處的環境有關，當氫鍵籠罩在疏水性核心外部時具有穩定蛋白質的作用。

在蛋白質摺疊的過程，疏水性作用力是蛋白摺疊很重要的驅動力，這些疏水性胺基酸受到疏水性作用力的影響，逐漸向核心推擠。透過螢光光譜儀可以看到蛋白質在摺疊過程螢光強度逐漸上升，波峰藍位移。從我們的 YbeA 摺疊中間物的螢光圖譜，可以看到蛋白質確實有螢光強度上升且波峯藍位移現象(圖 74)。

此外為了確認我們摺疊好的 YbeA 的疏水性核心強度和摺疊態相同，我們比較摺疊後的 YbeA 與自然態下的 YbeA 的螢光圖譜，結果顯示摺疊後的 YbeA 的螢光波峯位置以及螢光強度都和自然態相同，此外根據文獻指出某些蛋白指出在摺疊過程有些已經出現二級結構(41)，在這裡我們也透過圓二色光譜儀來分析 YbeA 以及其他突變株蛋白在摺疊過程的二級變化，從蛋白質的圓二色光譜圖可以看到，在摺疊初期即形成二級結構，然後在慢慢的做微調(圖 75)。此結果符合蛋白質摺疊分子間交互作用力模型-Framework model 的說法，指出蛋白質在摺疊初期會因為氫鍵的交互作用力先形成二級結構，根據這一點我們可以運用圓二色光譜儀分析蛋白質摺疊過程的二級結構變化(79)。

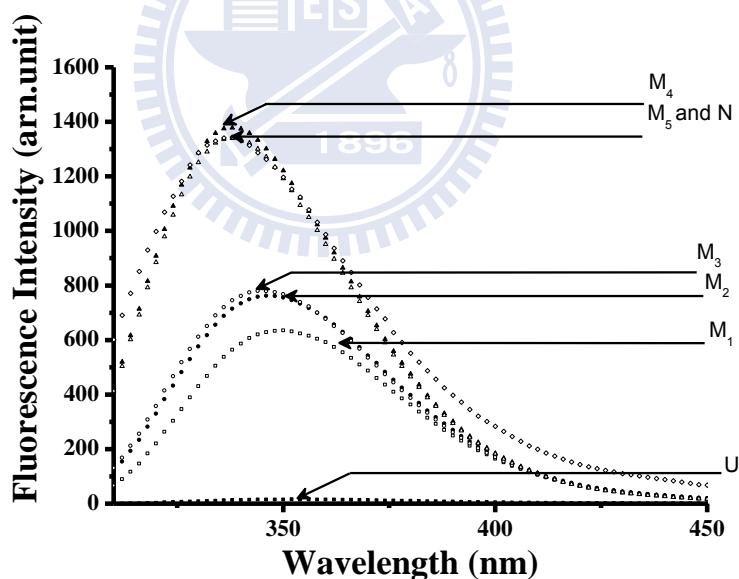


圖 74 YbeA 摺疊螢光圖譜

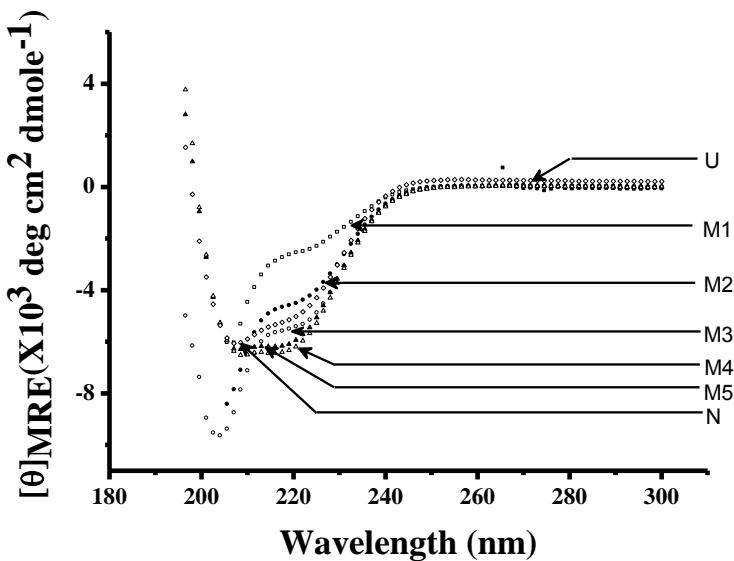


圖 75 YbeA 摺疊圓二色圖譜

此外為了確定我們摺疊好的 YbeA 和自然態底下的二級結構相同，我們也同時分析自然態的 YbeA，在這裡所使用的自然態 YbeA 取自於上清液，結果顯示，摺疊好的 YbeA 和自然態的二級結構比例相同。綜合上述的螢光光譜以及圓二色光譜圖譜結果，證實透過我們的過臨界點摺疊反應，確實可以將 YbeA 蛋白疏水性核心(圖 74)以及二級結構(圖 75)摺疊至自然態相同，此部分實驗由本實驗室先前完成。

此外為了驗證我們摺疊完的 YbeA 蛋白確實和自然態底下一樣具有酵素功能，我們透過 ITC 來分析 YbeA 蛋白與其受質 S-Adenosyl methionine 之間的交互作用力。根據我們 ITC 的實驗結果，摺疊完的 YbeA 與 S-Adenosyl methionine 以二比一方式做接合，其 K_a 值為 $1.35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 而 ΔH 為 -3.24 Kcal/mol。此外我們將實驗數據與 2010 年 Sophie E Jackson 的 ITC 實驗結果做比較，如圖 76 所示，而表 15 為我們的實驗數據與 Jackson 的 ITC 實驗數據比較，顯示我們的反應熱較小而解離常數 k_d 較大(77)，其原因可能是因為所使用的受質不相同，在這裡我們所使用的為自然環境下 YbeA 真正的受質 S-Adenosyl methionine(SAM)，而 Sophie E.Jackson 的實驗，他們所使用的為 S-Adenosyl-L-homocysteine(SAH)，其中(SAH)是(SAM)去甲基化的衍伸物，其結構可能可能更吻和酵素催化區，可能是造成彼此間實驗數據上差異的原因。然而自然環境下 YbeA 的真正受質為 SAM，因此我們的實驗環境條件應當更符合 YbeA 在細胞體內的情形，此外在 Jackson 的 ITC 實驗中所使用的反應條件在 pH 為 7.5 的 Tris 緩衝液，而在這裡我們所使用的 Tris 緩衝液 pH 值為 8.8。綜合上述螢光、圓二色光譜以及 ITC 的結果證明透過本實驗室的過臨界點摺疊反應(over-critical reaction ,on-path)，確實能將的 YbeA 蛋白摺疊回具有功能蛋白。

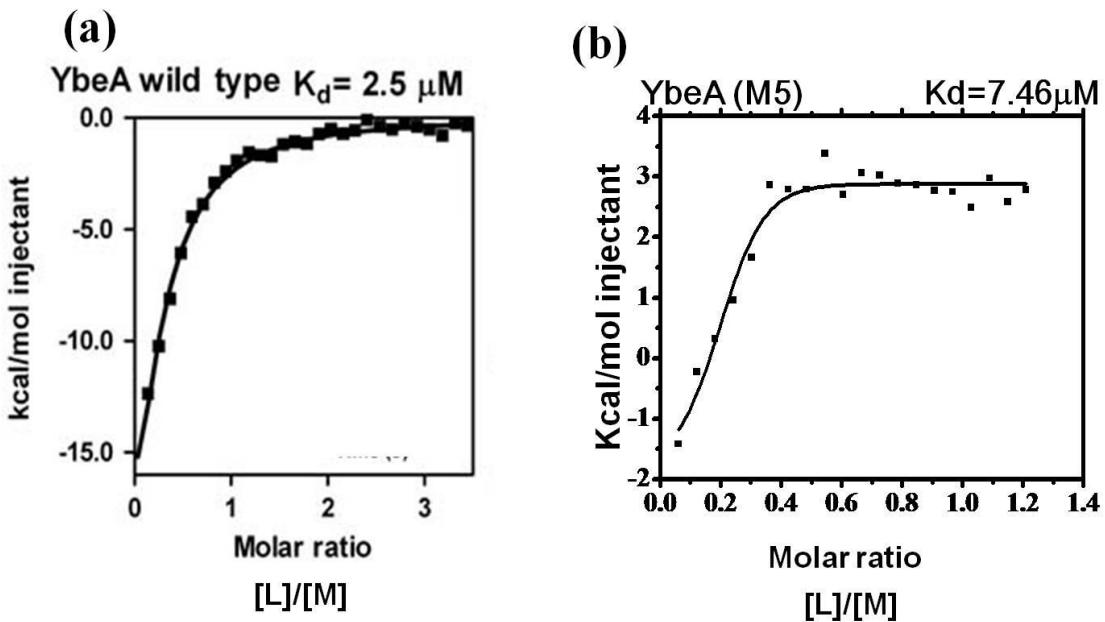


圖 76 ITC 實驗結果比較

表 15 ITC 實驗數據表

	K_d	Ratio
Jackson	$2.5 \mu M$	0.5
mine	$7.46 \mu M$	0.37

此外根據 YbeA 以及其他突變株蛋白摺疊中間產物的二級結構可以得知，這些蛋白在摺疊過程初期其二級結構幾乎已經達穩定與摺疊態之間的位能差很小，其二級結構以相當緩慢的速度抵達摺疊態，此一結果與我們動態反應速率分析相符。

此外為了得知這些突變株與 YbeA 的二級結構差異(表 10)，我們比較這些蛋白質的圓二色光譜圖譜以及二級結構比例，發現在這些突變株中 YbeA Δ 73-75 與 YbeA 摺疊態的二級結構幾乎完全相同，表示在扭結環前移除 73-75 氨基酸幾乎對其二級結構沒有影響，然而其他突變株部分其二級結構與 YbeA 的差異更大，完全是另外的蛋白構型。

4-2-3 熱穩定性分析

蛋白質的構型會受到周圍環境(pH 值、溫度、鹽濃度……)的影響產生變化，可以透過掃描式熱差分儀以及光學儀器如圓二色光譜儀以及螢光光譜儀來分析結構熱穩定性。當加溫時會破壞分子間氫鍵、靜電作用力以及疏水性作用力，導致其內部核心疏水性氨基酸暴露到水溶性環境底下，造成螢光強度下降以及波峯位置紅位移的現象。透過分析螢光強度以及波峯位置可以用來分析蛋白變性狀況。在這裡我們分析 λ_{max} 隨著溫度變化的螢光值來分析蛋白質受熱後的疏水性核心變化趨勢，來作為判斷蛋白熱穩定性的方法。

我們預計扭結可能有穩定結構的作用。在受到熱變性時內部扭結的核心可以穩定結構的功能。從實驗結果我們看到具有扭結 YbeA 的 T_m 值在 317.0 K，而 YbeA Δ 73-75 的 T_m 值在 323.5 K，在 YbeA Δ 1-8 的 T_m 值為 319.5 K 而 YbeA Δ 1-70 的部分，受熱後其螢光強度呈現現性變化，無法透過 Boltzmann equation 進行微分，此外 YbeA Δ 118-155，的熱相變溫度為 305.8 K。此外我們透過圓二色光譜來分析蛋白相變過程的二級結構變化，在這裡我們分別觀察二級結構 α 螺旋以及 β 平板的特徵峰位置，從實驗結果顯示 YbeA 以及 Δ (73-75)、 Δ (1-8)、 Δ (1-70)部分其二級結構在加熱到 95 度時都還一直在變化

而未達完全飽和變性，而在 YbeA Δ 118-155 部份，蛋白質約在 70 度左右二級結構即達完全變性，我們推測 YbeA Δ 118-155 本身的熱穩定性較不好的原因可能是因為失去扭結的構型所導致。

4-2-4 摺疊速率分析

在進行蛋白質摺疊速率分析前我們必須要先進行靜態平衡分析確保蛋白質的摺疊是可逆的，在混和樣品時，樣品必須不會發生沉澱現象才能使用 stopped-flow 來分析蛋白質摺疊以及變性的速率。此外由於我們所使用的 stopped-flow 儀器只有偵測圓二色光譜的功能，於是我們需要準備濃度更高的蛋白才能看到訊號差異，然而蛋白質的濃度越高，分子間碰撞的機會增加，就更容易產生沉澱。

在靜態平衡部分，我們主要觀察 YbeA 蛋白，其 $m_{N_2 \leftrightarrow 2D}$ 以及 $m_{2D \rightarrow N_2}$ 不論是螢光以及圓二色光譜部分均很小，表示蛋白質構型變化過程屬於相當緩慢過程，且在摺疊態與化學變性態之間的構型沒有做太大的變化，在這裡我們和 Jackson 的實驗數據做比較，如表 16 所示，我們的 m 值和他們相比是比較小的，表示蛋白摺疊及變性過程是更緩慢的。

表 16 靜態平衡摺疊及變性比較表

Sophies data				
$N_2 \leftrightarrow 2D$	Pt	$[D]_{50\%}$	$m_{N_2 \leftrightarrow 2D}$	$\Delta G_{H_2O}^{N_2 \leftrightarrow 2D}$
	μM	(M)	$k J mol^{-1} M^{-1}$	$k J mol^{-1}$
Flu	5	2.46	22.176	84.84
CD		Data not show		
My data				
$N_2 \rightarrow 2D$	Pt	$[D]_{50\%}$	$m_{N_2 \rightarrow 2D}$	$\Delta G_{H_2O}^{N_2 \rightarrow 2D}$
	μM	(M)	$k J mol^{-1} M^{-1}$	$k J mol^{-1}$
Flu	5	2.79	3.30	-9.20
CD	20	2.73	8.28	-22.6
$2D \rightarrow N_2$	Pt	$[D]_{50\%}$	$m_{2D \rightarrow N_2}$	$\Delta G_{H_2O}^{2D \rightarrow N_2}$
	μM	(M)	$k J mol^{-1} M^{-1}$	$k J mol^{-1}$
Flu	5	3.70	0.948	-3.50
CD	20	3.88	1.51	-5.85

此外我們也在動力速率分析蛋白值的摺疊及變性速率變化，在這裡我們所構築的 YbeA 不論是在 $k_f^{H_2O}$ 以及 $k_d^{H_2O}$ 部分均非常小，表示蛋白處於平衡狀態，其中 YbeA 在摺疊以及化學變性的過程速率變化斜率(m value)非常低，不論是變性或是摺疊過程速率都是非常緩慢的，表示蛋白處於一個平衡的狀態，如果蛋白質的摺疊以熱力學的方式來解釋，蛋白質結構的差異決定反應的進行。因此我們推測 YbeA 摺疊態以及化學變性態彼此間的狀態差異很小，於是我們推測扭結蛋白在摺疊態以及化學變性時，構型並沒有做太大的變化，其原因可能是因为扭結構型，而不容易被化學變性所造成。

此外我們將實驗數數據與 Jackson 的實驗結果做比較(表 17)我們的 $k_f^{H_2O}$ 以及 $k_d^{H_2O}$ 值均較小，此外在我們的 m_{kf} 以及 m_{kd} 均比他們的數據來得小，表示蛋白質的速率變化越緩慢，表示蛋白在處環境底下越接近跟更接近平衡態，此外在 ΔG_{H_2O} 也較小，表示處於較低能量的狀態，其原因可是我們的樣品與他們的實驗條件不同，在這裡我們所用的緩

衝液條件為 pH 值為 8.8 的 10 mM Tris，而他們所使用的緩衝液條件為 pH 值為 7.5, 50 mM Tris-HCl，其中根據我們先前的實驗經驗，我們的 YbeA 只溶於偏鹼的環境底下，當處於 pH 值為 7.5 的環境時，會發生沉澱聚集的現象，然而他們的蛋白卻沒有如此現象，其原因可能是因為我們的樣品多了前面 fusion 片段，造成蛋白 PI 值的差異所造成。

表 17 動態速率分析比較

	$k_f^{H_2O}$	$k_d^{H_2O}$	m_{kf}	m_{kd}	m_{kin}	ΔG_{H_2O}
	(s^{-1})	(s^{-1})	$kJmol^{-1}M^{-1}$	$kJmol^{-1}M^{-1}$	$kJmol^{-1}M^{-1}$	$kJmol^{-1}$
Jackson	0.2	1.8	3.612	1.72	5.33	11.76
mine	6.4×10^{-2}	1.2×10^{-3}	1.67	2.07	3.74	2.72

在這裡我們透過 Φ 值的計算來來分析 YbeA 以及 YbeA \triangle 1-8 對摺疊的影響的影響，其中 1-8 號胺基酸本身為 YbeA 疏水性核心內的一個 β 平板二級結構，失去此一結構可能導致核心內部疏水性作用力減弱，而導致結構容易鬆散開來，根據計算 Φ 結果，其值為 0.55 如表 14 所示，表示這一突變株蛋白與 YbeA 蛋白之間摺疊的差異是很大的。

4-2-5 酶素結構穩定性分析

根據我們蛋白質摺疊動力學的研究，我們得知 YbeA 在摺疊以及變性過程均屬於相當緩慢的過程，可能是由於其扭結結構穩定蛋白質的作用。在這裡我們透過胰蛋白酶水解反應結合 MALDI-TOF 分析水解片段序列。根據我們酵素水解分析結果，YbeA 的扭結部分不論是在摺疊態以及未摺疊態，其結構中最穩定的部分均在(97-113)號胺基酸，與 pKNOT 公布的扭結區域(70-120)重疊，表示扭結部分都是結構中最穩定的部份。

目前 MALDI-TOF 廣泛的運用於 2D gel 上分析未知蛋白間的交互作用(80)，將未知蛋白與蛋白資料庫做比對，獲得該蛋白資訊。在文獻上還未有人提過利用胰蛋白酶水解來分析蛋白穩定性，在這裡我們是首創，實驗結果也符合預期，扭結區域確實是結構中最穩定的地方。

4-2-6 扭結的距離分析

扭結是在蛋白質摺疊過程中如何形成的呢？一直是我們想要探討的問題。我們在這裡我們透過螢光能量共振能量轉移來分析 YbeA 摺疊過程中的構型變化，其中螢光能量共振轉移廣泛運用於研究分子間的距離變化(81)以及蛋白質間的交互作用(82, 83)，此外目前也廣泛的運用於蛋白質摺疊過程的分析，其中能量轉移效率和螢光發光基團的距離有關，當距離越近其能量轉移效率越高。在這裡我們透過 FRET 現象來分析扭結區域在摺疊過程中的距離變化。我們透過螢光基團 AMCA 與扭結區域中胺基酸 Cys-112 形成雙硫鍵共價鍵結，其中 Trp 分子與 AMCA 的距離在螢光能量轉移範圍內 $10\text{-}100\text{ \AA}$ 內，然後透過波長 295 nm 的特定光源激發 Trp 螢光分子。當 Trp 受到光源激發除了部分會以熱能的形式散失以外，其餘的部分會以發射光的形式釋放出來，在這裡 Trp 受到光激發後會產生波長約為 345-350 nm 的發射光，剛好與 AMCA 螢光基團的發射光波長 440-460 nm 重疊。我們分別計算摺疊態與未摺疊態和 AMCA 螢光基團之間的能量轉移率，其中摺疊態部分其轉移率為 0.58，而未摺疊態部分和摺疊態部分一樣其摺疊效率也是 0.58，表示 YbeA 蛋白質的扭結區域在摺疊前後其距離沒有做改變，結本身為一個未打開的結。綜合 mass 以及 FRET 的結果，我們得知結為結構中較穩定的部分，且結的距離並不會隨著蛋白質摺疊而做改變，YbeA 的扭結是一個打不開的結，於是我們推測結應當是在蛋白生成時即形成。

第五章 結論

透過 MOLDI-TOF 分析胰蛋白酶水解摺疊態底以及未摺疊的 YbeA，得知整個扭結是結構中最為穩定的部分，為一個緊實的結構，此外根據螢光能量轉移儀分析扭結蛋白的扭結區域距離變化得知在摺疊過程中，扭結的距離不隨著摺疊而做改變，表示整個扭結部位可能是在蛋白生成時即產生，非經由後續摺疊所造成。此外根據螢光以及圓二色光譜儀分析熱穩定的結果，扭結構型有助於穩定內部疏水性核心以及整體蛋白二級結構改變的功能，其結果與動態摺疊變性分析結果相符，YbeA 很難被化學因子影響，只有產生小幅度的變化。此外在扭結後端缺損的突變株其熱穩定相較於 YbeA 更差，在扭結前端缺損的突變株在其結構可能相當鬆散導致其無法看到其熱相變化，綜合以上結果，我們推測扭結具有穩定結構的作用。



第六章 參考文獻

1. Schlesinger MJ (1990) Heat shock proteins. *J Biol Chem* 265:12111-12114.
2. Brown P, Will RG, Bradley R, Asher DM, & Detwiler L (2001) Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns. *Emerging Infectious Diseases* 7:6-16.
3. Cooper BE (BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY. *Section 1: Group Projects*:12111-12114.
4. Prusiner SB, *et al.* (1983) Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35:349-358.
5. O'Rourke KI, Zhuang D, Truscott TC, Yan H, & Schneider DA (2011) Sparse PrP-Sc accumulation in the placentas of goats with naturally acquired scrapie. *BMC Veterinary Research* 7:7.
6. Stolsmark T & Tysnes O (2010) New knowledge about Creutzfeldt-Jakob disease can yield therapeutic possibilities]. *Tidsskrift for den Norske lageforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny række* 130:601-604.
7. Chiti F & Dobson CM (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry* 75:333-366.
8. Ross CA & Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. 10:10-17.
9. Kresge N, Simoni RD, & Hill RL (2006) The thermodynamic hypothesis of protein folding: The work of Christian Anfinsen. *Journal of Biological Chemistry* 281:1839-1844.
10. Thanassoulas A, *et al.* (2011) Thermal and chemical denaturation of the BRCT functional module of human 53BP1. *International Journal of Biological Macromolecules* 49:297-304.
11. Sirotnik VA & Winter R (2010) Volume Changes Associated with Guanidine Hydrochloride, Temperature, and Ethanol Induced Unfolding of Lysozyme. *The Journal of Physical Chemistry B* 114:16881-16886.
12. Chen BL & Schellman JA (1989) Low-temperature unfolding of a mutant of phage T4 lysozyme. 1. Equilibrium studies. *Biochemistry* 28:685-691.
13. Jahromi RRF, Morris P, Martinez-Torres RJ, & Dalby PA (2011) Structural stability of *E. coli* transketolase to temperature and pH denaturation. *Journal of Biotechnology* 10:209-216.
14. Van Der Vaart A, Ma J, & Karplus M (2004) The unfolding action of GroEL on a protein substrate. *Biophysical journal* 87:562-573.

15. Heyda J, *et al.* (2011) Urea and Guanidinium Induced Denaturation of a Trp-Cage Miniprotein. *The Journal of Physical Chemistry B* 115:8910-8924.
16. Wafer LNR, Streicher WW, & Makhatadze GI (2010) Thermodynamics of the Trp cage miniprotein unfolding in urea. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78:1376-1381.
17. Anfinsen CB & Haber E (1961) Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem* 236:1361-1363.
18. Nielsen MM, Andersen KK, Westh P, & Otzen DE (2007) Unfolding of [beta]-Sheet Proteins in SDS. *Biophysical journal* 92:3674-3685.
19. Chang CC, *et al.* (2005) Protein folding stabilizing time measurement: A direct folding process and three-dimensional random walk simulation. *Biochemical and biophysical research communications* 328:845-850.
20. Rudolph R & Lilie H (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *The FASEB journal* 10:49-56.
21. Liu YL, Lee HT, Chang CC, & Kan LS (2003) Reversible folding of cysteine-rich metallothionein by an overcritical reaction path. *Biochemical and biophysical research communications* 306:59-63.
22. Chang CC, Su YC, Cheng MS, & Kan LS (2002) Protein folding by a quasi-static-like process: A first-order state transition. *Physical Review E* 66:021903.
23. Kuwajima K, Yamaya H, Miwa S, Sugai S, & Nagamura T (1987) Rapid formation of secondary structure framework in protein folding studied by stopped-flow circular dichroism. *FEBS letters* 221:115-118.
24. Shastry M, Luck SD, & Roder H (1998) A continuous-flow capillary mixing method to monitor reactions on the microsecond time scale. *Biophysical journal* 74:2714-2721.
25. Jones CM, *et al.* (1993) Fast events in protein folding initiated by nanosecond laser photolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:11860-11864.
26. Clarke DT, Doig AJ, Stapley BJ, & Jones GR (1999) The α -helix folds on the millisecond time scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:7232-7237.
27. Williams S, *et al.* (1996) Fast events in protein folding: Helix melting and formation in a small peptide. *Biochemistry* 35:691-697.
28. Hansen KC, Rock RS, Larsen RW, & Chan SI (2000) A method for photoinititating protein folding in a nondenaturing environment. *Journal of the American Chemical Society* 122:11567-11568.
29. Bryngelson JD, Onuchic JN, Soccia ND, & Wolynes PG (1995) Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *Proteins-Structure*

- Function and Genetics* 21:167-195.
30. Brooks CL, Onuchic JN, & Wales DJ (2001) Taking a Walk on a Landscape. *Science* 293:612-613.
 31. Kim PS & Baldwin RL (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annual Review of Biochemistry* 59:631-660.
 32. Fersht AR (1997) Nucleation mechanisms in protein folding. *Current Opinion in Structural Biology* 7:3-9.
 33. Wetlaufer DB (1973) Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70:697-701.
 34. Karplus M & Weaver DL (1994) Protein folding dynamics: The diffusion collision model and experimental data. *Protein science* 3:650-668.
 35. Karplus M & Weaver DL (1979) Diffusion-collision model for protein folding. *Biopolymers* 18:1421-1437.
 36. Kauzmann W (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv Protein Chem* 14:1-63.
 37. Dill KA (1985) Theory for the folding and stability of globular proteins. *Biochemistry* 24:1501-1509.
 38. Dill KA (1990) Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* 29:7133-7155.
 39. Lesk AM & Rose GD (1981) Folding units in globular proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78:4304-4308.
 40. Chang CC, Cheng MS, Su YC, & Kan LS (2003) A first-order-like state transition for recombinant protein folding. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 21:247-256.
 41. Chang C-C, Yeh X-C, Lee H-T, Lin P-Y, & Kan L-S (2004) Refolding of lysozyme by quasistatic and direct dilution reaction paths: A first-order-like state transition. *Physical Review E* 70:011904.
 42. Lai YL, Yen SC, Yu SH, & Hwang JK (2007) pKNOT: the protein KNOT web server. *Nucleic acids research* 35:420-424.
 43. Mallam AL & Jackson SE (2007) A Comparison of the Folding of Two Knotted Proteins: YbeA and YibK. *Journal of Molecular Biology* 366:650-665.
 44. Mallam AL, Onuoha SC, Grossmann JG, & Jackson SE (2008) Knotted fusion proteins reveal unexpected possibilities in protein folding. *Molecular cell* 30:642-648.
 45. Purta E, Kaminska KH, Kasprzak JM, Bujnicki JM, & Douthwaite S (2008) YbeA is the m3fZ methyltransferase RlmH that targets nucleotide 1915 in 23S rRNA. *RNA* 14:2234.
 46. Ero R, Leppik M, Liiv A, & Remme J (2010) Specificity and kinetics of 23S rRNA modification enzymes RlmH and RluD. *RNA* 16:2075-2084.

47. Ero R, Peil L, Liiv A, & Remme J (2008) Identification of pseudouridine methyltransferase in Escherichia coli. *RNA* 14:2223-2233.
48. Raychaudhuri S, Conrad J, Hall BG, & Ofengand J (1998) A pseudouridine synthase required for the formation of two universally conserved pseudouridines in ribosomal RNA is essential for normal growth of Escherichia coli. *RNA* 4:1407-1417.
49. Lang K, Erlacher M, Wilson DN, Micura R, & Polacek N (2008) The Role of 23S Ribosomal RNA Residue A2451 in Peptide Bond Synthesis Revealed by Atomic Mutagenesis. *Chemistry & biology* 15:485-492.
50. Virnau P, Kantor Y, & Kardar M (2005) Knots in Globule and Coil Phases of a Model Polyethylene. *Journal of the American Chemical Society* 127:15102-15106.
51. Mansfield ML (1994) Knots in Hamilton Cycles. *Macromolecules* 27:5924-5926.
52. Depew RE, Liu LF, & Wang J (1978) Interaction between DNA and Escherichia coli protein omega. Formation of a complex between single-stranded DNA and omega protein. *Journal of Biological Chemistry* 253:511.
53. Wang H, Di Gate RJ, & Seeman NC (1996) An RNA topoisomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:9477.
54. Andersson FI, Pina DG, Mallam AL, Blaser G, & Jackson SE (2009) Untangling the folding mechanism of the 52-knotted protein UCH-L3. *FEBS Journal* 276:2625-2635.
55. Misaghi S, et al. (2005) Structure of the Ubiquitin Hydrolase UCH-L3 Complexed with a Suicide Substrate. *Journal of Biological Chemistry* 280:1512-1520.
56. Virnau P, Mirny LA, & Kardar M (2006) Intricate Knots in Proteins: Function and Evolution. *PLoS Comput Biol* 2:e122.
57. Mallam AL (2009) How does a knotted protein fold? *FEBS Journal* 276:365-375.
58. Alam MT, Yamada T, Carlsson U, & Ikai A (2002) The importance of being knotted: effects of the C-terminal knot structure on enzymatic and mechanical properties of bovine carbonic anhydrase II. *FEBS letters* 519:35-40.
59. Virnau P, Mallam A, & Jackson S (2011) Structures and folding pathways of topologically knotted proteins. *Journal of Physics: Condensed Matter* 23:033101.
60. Virnau P, Mirny LA, & Kardar M (2006) Intricate knots in proteins: Function and evolution. *PLoS Comput Biol* 2:1074-1079.
61. Saito R, Sato T, Ikai A, & Tanaka N (2004) Structure of bovine carbonic anhydrase II at 1.95 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 60:792-795.
62. Alam MT, Yamada T, Carlsson U, & Ikai A (2002) The importance of being knotted: effects of the C-terminal knot structure on enzymatic and mechanical properties of bovine carbonic anhydrase II. *FEBS letters* 519:35-40.
63. Takusagawa F, Kamitori S, Misaki S, & Markham GD (1996) Crystal Structure of

- S-Adenosylmethionine Synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 271:136-147.
- 64. Michel G, *et al.* (2002) The Structure of the RlmB 23S rRNA Methyltransferase Reveals a New Methyltransferase Fold with a Unique Knot. *Structure (London, England : 1993)* 10:1303-1315.
 - 65. Mallam AL, Morris ER, & Jackson SE (2008) Exploring knotting mechanisms in protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:18740–18745.
 - 66. Virnau P, Mallam A, & Jackson S (2011) Structures and folding pathways of topologically knotted proteins. *Journal of Physics: Condensed Matter* 23.
 - 67. Wagner JR, Brunzelle JS, Forest KT, & Vierstra RD (2005) A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature* 438:325-331.
 - 68. Taylor WR (2007) Protein knots and fold complexity: Some new twists. *Computational Biology and Chemistry* 31:151-162.
 - 69. Jackson SE (2010) The Effect of Parkinson's-Disease-Associated Mutations on the Deubiquitinating Enzyme UCH-L1.261-272
 - 70. Andersson FI, Pina DG, Mallam AL, Blaser G, & Jackson SE (2009) Untangling the folding mechanism of the 52 knotted protein UCH L3. *FEBS Journal* 276:2625-2635.
 - 71. Yeates TO, Norcross TS, & King NP (2007) Knotted and topologically complex proteins as models for studying folding and stability. *Current opinion in chemical biology* 11:595-603.
 - 72. Das C, *et al.* (2006) Structural basis for conformational plasticity of the Parkinson's disease-associated ubiquitin hydrolase UCH-L1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:4675–4680.
 - 73. Bölinger D, *et al.* (2010) A Stevedore's Protein Knot. *PLoS Comput Biol* 6:e1000731.
 - 74. Alam MT, Yamada T, Carlsson U, & Ikai A (2002) The importance of being knotted: effects of the C-terminal knot structure on enzymatic and mechanical properties of bovine carbonic anhydrase II1 1 Representative data have been presented in part at the NC-AFM 2000 meeting held in Hamburg, Germany and appeared in the proceedings of that meeting (Alam, M.T. and Ikai, A., Appl. Phys. A 72 (2001) S121–S124). *FEBS letters* 519:35-40.
 - 75. Bornschlogl T, *et al.* (2009) Tightening the knot in phytochrome by single-molecule atomic force microscopy. *Biophysical journal* 96:1508-1514.
 - 76. Mallam AL & Jackson SE (2005) Folding studies on a knotted protein. *Journal of Molecular Biology* 346:1409-1421.
 - 77. Mallam AL, Rogers JM, & Jackson SE (2010) Experimental detection of knotted

- conformations in denatured proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:8189-8194.
- 78. Bartlett JM & Stirling D (2003) A Short History of the Polymerase Chain Reaction.), Vol 226, pp 3-6.
 - 79. Brems DN, Plaisted SM, Dougherty JJ, & Holzman TF (1987) The kinetics of bovine growth hormone folding are consistent with a framework model. *Journal of Biological Chemistry* 262:2590-2596.
 - 80. Figeys D, McBroom LD, & Moran MF (2001) Mass spectrometry for the study of protein-protein interactions. *Methods* 24:230-239.
 - 81. Schuler B & Eaton WA (2008) Protein folding studied by single-molecule FRET. *Current Opinion in Structural Biology* 18:16-26.
 - 82. Truong K & Ikura M (2001) The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Current Opinion in Structural Biology* 11:573-578.
 - 83. You X, et al. (2006) Intracellular protein interaction mapping with FRET hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:18458-18463.

