探討*Halobacterium* sp. NRC-1轉錄因子 TBP與TFB之相互關係及轉錄起始機制

Study the Relationships of *Halobacterium* sp. NRC-1 TBP-TFB Combinatorial Partnerships and Transcription Initiations

研究生：林書如 (Shu-Ju Lin)
指導教授：吳韋訥 博士 (Wailap Victor Ng, Ph.D.)

國立陽明大學
醫學生物技術研究所
碩士論文

National Yang Ming University
Institute of Biotechnology in Medicine
Master Thesis

中華民國九十六年七月
July 2007

目錄

中文摘要.....6

英文摘要.....7

第一章 背景介紹.....8

1.1 *Halobacterium* sp. NRC-1.....8

1.2 轉錄起始機制.....9

1.3 *Halobacterium* sp. NRC-1轉錄起始因子TBP.....13

1.4 *Halobacterium* sp. NRC-1轉錄起始因子TFB.....13

1.5 TBP-TFB-DNA 之間的交互作用.....14

1.6 質譜技術.....15

第二章 研究架構.....17

2.1 研究動機與目的.....17

2.2 實驗流程設計.....18

第三章 研究材料與實驗方法.....20

3.1 NRC-1 TBP和TFB轉譯起始點確認.....20

3.2 *Halobacterium* sp. NRC-1的培養.....20

3.3 大量製備*Halobacterium* sp. NRC-1 genomic DNA.....21

3.4 *Halobacterium* sp. NRC-1 *tbp*與*tfb*基因的構築.....22

3.5 *Halobacterium* sp. NRC-1轉形實驗.....27

3.6 以西方轉漬偵測融合蛋白表現.....28

3.7 Pull down NRC-1 TBP-pA與TFB-pA之蛋白質複合物.....31

3.8 質譜樣品前處理與結果分析.....37

3.9 特異性啟動子 DNA 親和純化實驗 38
第四章 實驗結果.....42
4.1 NRC-1 TBP和TFB轉譯起始點確認.....42
4.2 構築及表現13個*tbp*和*tfb*基因protein A融合蛋白.....43
4.3 Pull down TBP/TFB-protein A 蛋白質複合體.....45
4.4 增加樣品間的清洗時間可避免質譜樣品污染問題.....52
4.5 特異性啟動子 DNA 親和純化實驗結果.....53
第五章 討論.....56
5.1 融合蛋白表現量之差異.....56
5.2 不同實驗條件之影響探討.....56
5.3 質譜結果討論.....57
參考文獻.....61
圖.....66
表.....85
附圖.....99
附表.....101

圖

圖一、實驗中所用到的載體基因圖..66
圖二、NRC-1 TBP和TFB與其他物種相同蛋白之轉譯起始位置比對.....67
圖三、PCR反應放大13個*tbp*和*tfb*基因.....73
圖四、以PCR確認各質體成功轉形*E. coli* DH5α.....74
圖五、以PCR確認各質體成功轉形NRC-1.....76
圖六、以西方轉漬法偵測NRC-1 TBP/TFB-protein A的表現.....78
圖七、比較電動式高壓破碎或超音波粉碎方式製備細胞萃取液.....79
圖八、銀染偵測pull down的蛋白質複合物.....80
圖九、NRC-1 *bop*及*gvpA1*基因之啟動子區域構築資訊.....81
圖十、*gvpA1*及*bop*啟動子區域構築.....82
圖十一、Streptavidin磁珠能與biotin-DNA有效的結合.....83
圖十二、NRC-1基礎轉錄因子TBP/TFB可能的作用關係.....84

附圖

附圖一、六個*Halobacterium* TBPs蛋白序列之多重比對.....99
附圖二、七個*Halobacterium* TFBs蛋白序列之多重比對.....100

表

表一、NRC-1各*tbp*及*tfb*基因相關資訊及其蛋白質分子量.....85
表二、用於此研究之NRC-1之*tbp*及*tfb*基因引子序列.....86
表三、本研究中，除*tbp*和*tfb*引子對之外所用到的其他引子資訊.....87
表四、pull down實驗所用的不同條件之詳細步驟.....88
表五、比較電動式高壓破碎或超音波粉碎方式製備細胞萃取液之
pull down結果.....89
表六、質譜樣品之交叉污染情形呈現.....90
表七、各個NRC-1轉形株pull down實驗找到的相關蛋白.....91
表八、質譜樣品之污染情形改善.....97
表九、特異性啟動子DNA親和純化實驗經質譜分析之部分結果.....98

附表

附表一、已定序之古生菌基因體中，其基礎轉錄因子的個數.....101
附表二、NRC-1 TBP和TFB與其他物種轉譯起始位置比對之相關資訊...102
附表三、部分質譜結果，經*SEQUEST*搜尋匯出後呈現蛋白質代號註解..107

中文摘要

Halobacterium sp. NRC-1為嗜鹽古生菌(halophilic archaea)，分析其基因體組成(Ng et al., 2000)找到其擁有6個TBP (TATA-box binding proteins)及7個TFB (transcription factor B proteins)，分別類似於真核生物之TFIID (transcription initiation factor II D)及TFIIB (transcription initiation factor II B)，故推斷可能是藉由不同的TBP-TFB組合以調控各種類型的啟動子序列。本實驗構築此13個質體送入NRC-1使其表現TBP/TFB-protein A融合蛋白，在不同鹽濃度的條件下，以IgG pull down可能與TBP/TFB結合的蛋白複合物，利用LC-MS/MS分析其中組成。結果顯示，在高鹽情況下，找到TbpF-TbpD、TfbE-TbpE、TbpF-TbpB、TbpD-TbpB和TbpC-TbpB配對，且在多數的蛋白複合物中都能找到TbpE的存在，包括TbpA、TbpB、TbpD、TbpF、TfbB、TfbC、TfbD、TfbE、TfbF和TfbG，暗示了NRC-1基因調控中或許存在的是以TbpE為主搭配TFB轉錄因子的組合對，甚至可能參與TBP-TBP或TFB-TFB的組合，這是從宏觀的角度著手分析。但是為了找出調控特定啟動子序列(promoter)的轉錄因子配對，在此利用streptavidin磁珠結合具有biotin標示的*gvpA1*及*bop*啟動子DNA片段，找出可能結合的調控蛋白(transcription regulators) SirR及Trh5的存在，顯示除了基礎轉錄因子TBP/TFB之外，還需要其他調控子的作用以應付大量的啟動子。

Abstract

Halobacterium sp. NRC-1 is an extremophiles that grow under condition of high salinity. The complete genome sequence was available in year 2000, contained six copies of TBP (TATA-box binding proteins) and seven copies of TFB (transcription factor II B) that are homologous to the eukaryotic TFIID ((transcription factor II D) and TFB, respectively. It is possible various kinds of promoters are regulated by up to 42 combinations of TBP and TFB. Here 13 NRC-1 clones that expressed TBP/TFB-protein A fusion proteins were estabilished. The fusion proteins complexes were captured by IgG sepharose beads under different experimental conditions. The protein complexes were analysed by tendem mass spectrometry. The results suggested TbpF-TbpD, TfbE-TbpE, TbpF-TbpB, TbpD-TbpB and TbpC-TbpB pairs might be identified under high salt condition. TbpE existed in many protein complex, including TbpA, TbpB, TbpD, TbpF, TfbB,TfbC, TfbD, TfbE, TfbF and TfbG, implied that TbpE might be the major transcription factor in NRC-1 gene regulation. We even found that TBP-TBP and TFB-TFB pair together in our experiential conditions. On the other hand, to find out whether each promoter is recognized by a specific or multiple pairs of TBP/TFB, streptavidin beads were used to capture the biotin-labeled promoter region of *gvpA1* and *bop* respectively, and incubated with *Halobacterium* cell lysates.We found that transcription regulators sirR and trh5 presest in the elution by mass spectrometry. These results showed that not only basal transcription factors TBP and TFB were needed, other factors might also participate in regulating the complicated mechanism of transcription in NRC-1.

第一章 背景介紹

1.1 *Halobacterium* sp. NRC-1

嗜鹽古生菌(halophilic archaea)生長於3-5 M的高鹽環境[1]，它們存在的環境常會隨著鹽度、pH、光照、溫度、壓力和氧氣等而改變，故它們含有多種分子及構造上的特性，例如細胞質內有和細胞外相等鹽濃度而造成特殊生理特性。*Halobacterium* sp. NRC-1是一生存於含4.3 M高鹽環境下的古生菌，它在分類學上位於Archaea界，Euryarchaeota門，Halobacteria綱，Halobacteriales目，Halobacteriaceae科，Halobacterium屬。優點在於在實驗室易於培養(42℃下，6小時產生一代[2])，分子層級上與真核生物有一定的相似性，只要處在低鹽溶液細胞就會裂解(lyse)，也具有相當高的轉形(transformation)效率[3]，在基因的構築(cloning)上，目前已有適用的載體(vector)和篩選基因(selection marker) [4]，種種特性，使得*Halobacterium* sp. NRC-1在古生菌中成為一種相當好的研究對象。

西元2000年，*Halobacterium* sp. NRC-1之基因體序列已全被解碼出來[5]，是由一個2,014,239 bp的染色體(含68% G+C)和一個365,425 bp (pNRC200)及一個191,346 bp (pNRC100)微染色體(minichromosome)(含58-59% G+C)所構成。會稱pNRC100及pNRC200為微染色體，乃因其上約有40個可被轉譯成蛋白質的基因，而這些蛋白質很可能為細胞生存不可或缺的，例如DNA聚合酶(DNA polymerase)，多個轉錄因子TBP (TATA- box binding protein)及TFB (transcription factor B)和arginyl-tRNA synthetase等。分析*Halobacterium* sp. NRC-1的基因體序列，共得到2630個可能的蛋白質基因(putative protein-coding gene) [5, 6]。其中41%的基因可以被資料庫比對得到，是已知功能的蛋白質，而22%是屬於與其他物種有高度保留性(conserved hypothetical proteins)的未知功能蛋白質，36%的基因所轉譯出的蛋白質則無法比對到資料庫的蛋白質，屬未知功能蛋白質(hypothetical proteins)，故NRC-1還有一大部分未知的領域期待可以進一步開發研究。大體來說，這些蛋白質多偏酸性[7]，此特性或許與維持NRC-1蛋白質在高

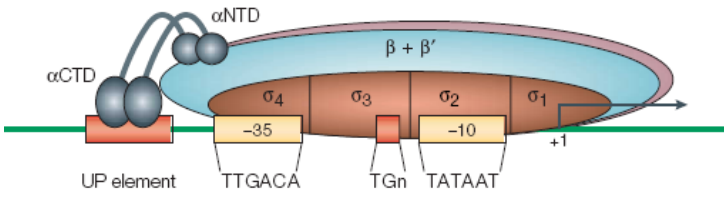
鹽的環境下的穩定性和功能有關[8]。

在基礎轉錄機制層面上，古生菌類似於真核生物，但趨於簡單，真核生物約需40個以上的分子來進行蛋白質基因(protein-coding genes)的轉錄起始(transcription initiation) [9, 10]，古生菌只需大約16種[11]。但有趣的是，一些幫助轉錄的調控子(regulators)反而與細菌較類似，例如轉錄抑制子(transcriptional repressor) Mrd-1。

1.2 轉錄起始機制(transcription initiation system)

1.2.1 原核生物轉錄起始機制(prokaryotic transcription initiation)

在原核生物中沒有細胞核，轉錄與轉譯機制可同時在細胞質中進行，其轉錄只由一個多單元(multiple subunits)的RNA聚合酶(RNA polymerase (RNAP))負責，稱為一個完整的全酶(holoenzyme)，由核心酵素(core enzyme)和σ因子(σ factor)構成，核心酵素又包括5個單元(subunit): $\alpha_2\beta\ \beta'$和ω。原核生物的基本的啟動子(promoter)包括-10(稱為Pribnow box)和-35區域，核心酵素藉由聯合σ因子的幫助找到上游的-10及-35[12](如下圖)。當RNA聚合酶結合至啟動子時，起始轉錄(transcription initiation)便開始進行，延長轉錄(transcription elongation)時σ因子會離開RNA聚合酶，且同一條DNA上的轉錄可包含多個RNA聚合酶同時作用。終止轉錄(transcription termination)則分為兩種，一種稱為Rho-independent termination，即藉由RNA形成髮夾(hairpin loop)之二級構造(secondary structure)造成RNA-DNA雜交體(hybrid)的不穩定而終止轉錄反應，另一種為Rho-dependent termination，乃由Rho factor將mRNA與RNA聚合酶分離，而終止轉錄反應。

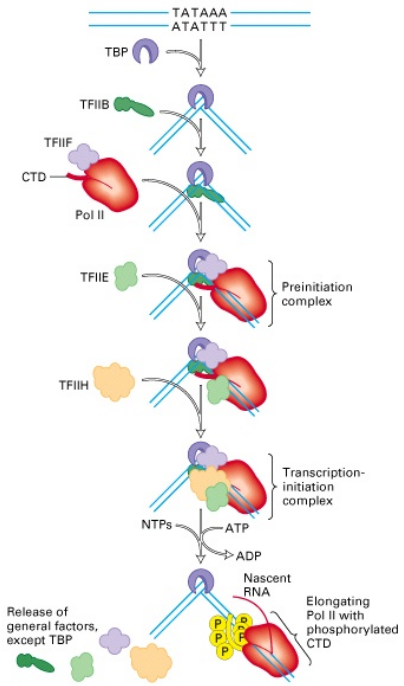


(Browning and Busby 2004)

原核生物可能有多個σ因子的存在，例如σ^{70}為*E. coi*最普遍存在的σ因子，其他尚有σ^{32}，σ^{54}和σ^{23}等，因此原核生物調控基因表現的方式乃利用RNA聚合酶結合不同類型的σ因子[13]，以辨認不同的啟動子，選擇當時需要表現的基因。

1.2.2 真核生物轉錄起始機制(eukaryotic transcription initiation)

在真核生物中，轉錄機制要較原核生物來得複雜。利用三種不同的RNA聚合酶(RNA polymerase I, II和III)來轉錄三種類型的RNA(rRNA, hnRNA和small RNA)，這些RNA聚合酶都是由10個以上的單元體所構成的。在此針對RNA聚合酶II轉錄做介紹，根據不同轉錄因子的結合可辨認構造不同的class II啟動子，這些啟動子可能有以下特徵：1) 核心啓動子元件(core promoter elements)包括:位於上游-25的TATA box、轉錄起始點、鄰近TATA box上游的TFIIB辨認序列(TFIIB-recognition elements(BRE))[14]和位於+30的下游啟動子要素DPE (downstream promoter element(DPE))(較常出現於無TATA box的啟動子序列，為TFIID辨識的地方) 2) proximal elements:包括-40到-100之間的GC box和CAAT box，可做為其他因子(例如:活化子(activators))辨認的地方，進行更大量的轉錄[15]。



(圖片來源: http://bioweb.wku.edu/courses/biol566/L4EukPolymerases.html)

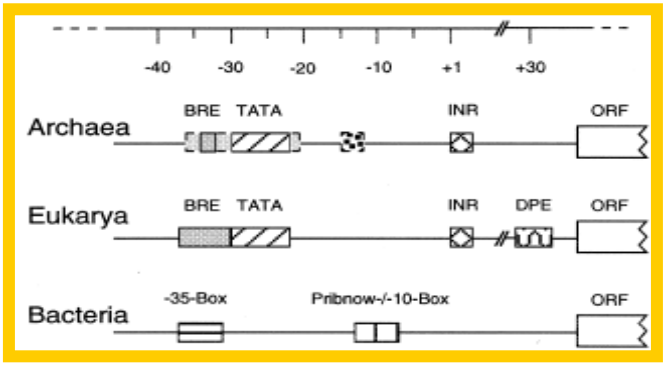
目前已知至少有六種基本轉錄因子(general transcription factors)包括TFIIA、TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF和TFIIH來幫助RNA聚合酶II之轉錄起始反應。TFIID包括TBP (TATA box binding proteins)和TBP附著因子(TBP associated factors(TAFs))。

轉錄起始時TFIID辨認TATA box並結合上去(如上圖)，再由TFIIA幫助穩定TFIID的結合後，招喚(recruit)TFIIB結合在TATA box的上下游位置，至此形成TFIIB-TBP-DNA複合體，再吸引RNA聚合酶-TFIIF到轉錄起始點附近與此複合體結合，接著TFIIE、TFIIH再依序結合，形成完整的轉錄起始複合物(transcription initiation complex)[16, 17]，TFIIH的結合會促使RNA聚合酶的最大單元之C端區域(C-terminal domain)磷酸化，進入轉錄延長階段(elongation)。

1.2.3 古生菌轉錄起始機制(archaeal transcription initiation)

古生菌和細菌一樣可轉錄出單基因性(monocistronic)與多基因性(multicistronic) mRNA(即多個基因在同一條mRNA上)，且缺乏核膜(nuclear membrane)，使轉錄與轉譯(translation)可同時發生。過去有多個研究顯示，古生菌的轉錄的分子機制較類似於真核生物而與細菌相去較遠，古生菌只擁有一個多單元的DNA-dependent RNA聚合酶，由10-14個的單元(subunits)所構成，這些單元與構成真核生物的RNA聚合酶II的單元有高度的同源性[18]，明顯的較細菌要來得複雜。與真核生物相似的是，此RNA聚合酶無法單獨辨認啟動子，在細胞外(in vitro)下，至少要有RNA聚合酶和基礎轉錄因子(basal transcription factors)的存在才能進行轉錄[19, 20]。這些基礎轉錄因子包括TATA-box binding protein (TBP)和 transcription factor B (TFB)兩大類，分別與真核生物的轉錄因子TBP和TFIIB有高度的同源性，但在古生菌中並無發現可能的TBP附著因子(TBP associated factors (TAFs))存在[21]。另外還有與真核RNAP II基礎轉錄因子TFIIE同源的TFE也存在古生菌中，但在細胞外情況下，此TFE並非轉綠必需的因子。在DNA進行轉錄時，TBP先與TATA box結合，並吸引TFE來幫助此反應，接著TFB專一性辨認BRE序列，結合TBP-DNA複合物，並藉著TFB之N端區域(N-terminal domain)吸引RNA聚合酶並與之結合形成起始前複合體(pre-initiation complex(PIC))，於是轉錄反應開始進行。

核心啟動子序列(core promoter element)包括了位於-26/-27附近之TATA box(或稱Box A)，位於+2的Inr (initiator element或稱Box B)，與緊接在TATA box上游富含嘌呤(purine-rich)之BRE (TFIIB-recognition elements)。另外，不同於真核生物的是在古生菌中並無發現下游啟動子要素DPE (downstream promoter element)存在，或許也可以解釋



(Soppa 1999)

目前並未發現TBP附著因子(TAFs)的原因。比較真核生物，細菌和古生菌的啟動子構成，古生菌與真核生物有較高的相似程度[22] (上圖)。統計分析顯示，TATA box、BRE和Inr之相似序列(consensus sequence)，在不同古生菌子群組(archaea subgroups)中仍略顯差異，或許代表著TBP-TATA box或TFB-BRE之間的交互作用是有許多變異的，也顯示為什麼有些古生菌有多個TBPs/TFBs，可能是為了調控不同基因的表現[23]。在目前已定序的古生菌基因體中，TBP和TFB的數目列於附表一[24]。除了基礎轉錄因子外，還有其他調節蛋白可調控轉錄起始作用，例如抗轉錄終止因子(transcription anti-terminators)---NusA和NusG，轉錄活化子(transcription activator)---LysM，轉錄抑制子(transcription repressor)---Mdr1等，更能襯托出轉錄機制的多變和豐富。

1.3 *Halobacterium* sp. NRC-1轉錄起始因子TBP (TATA box binding protein)

古生菌TBP與真核生物之TBP胺基酸序列上有20%至40%的相同(identifies)，真核生物的TBP之N端區域在古生菌中已不復見，而古生菌TBP較類似於真核TBP之C端區域，而在不同種的古生菌之間，TBP的相同程度也達40%至55%。此TBP由兩段不完美的重複序列(一段約90個胺基酸)構成類似沙漏般(saddle-shaped)的形狀，與真核生物相同的是古生菌TBP也與8bp長的TATA box結合，而其相似序列(consensus sequence)為(T/C)TTA(T/A)ANN。古生菌兩段重複蛋白序列之平均相似度為42%，相較於真核生物的24%，顯示有更佳的對稱性(symmertry)[22]。

將*Halobacterium* sp. NRC-1基因體定序[5]，找出共可能存在6個TBP，包括TbpA、TbpB、TbpC、TbpD、TbpE和TbpF。其核酸長度，蛋白質大小和座落位置經整理成表(表一)。若將6個TBP胺基酸序列排列對齊起來(附圖一)[25]，其中5個TBP蛋白從N到C端階有兩段重複區域(repeat domains)存在，而TbpA只具有單一個C端區域，大小只有其他Tbp的一半而已，故推論TbpA或許需藉由雙聚體化(dimerization)來執行其功能。

1.4 *Halobacterium* sp. NRC-1轉錄起始因子TFB (transcription factor B)

TFB由三個domain構成，分別為位於N端domain之100-120個胺基酸，及含有兩個具90個胺基酸重複序列之C端domain。古生菌彼此TFB蛋白的保守性約50%-60%(高出TBP 10%)，而古生菌TFB與真核生物之TFB蛋白質序列上有20%至30%的相同程度(略低於TBP)。古生菌的TFB也較真核生物有較佳的對稱性(古生菌的C端兩段重複序列之相似度為25-37%，真核生物為11-25%)[22]，或許此結果反應出真核生物需要更多不同的基礎轉錄因子來或調節子幫助轉錄起始反應。

古生菌TFB之N端區域具有50%-60%的高度保守性，根據古生菌*Pyrococcus furiosus* TFB的結構顯示[26]，此區域形成一個zinc ribbon，為一個金屬結合區(metal binding motif)，可能與調控DNA結合的能力有關，又有基因剔除分析(deletion analyse)

實驗顯示TFB之N端區域對於吸引RNA聚合酶的前來進行轉錄作用，是一必要的條件[27]，RNA聚合酶可藉由此區域與TFB結合。近來越來越多研究表示TFIIB特別是其C端之helix-turn-helix (HTH) motif，可專一辨認TFIIB辨認序列(TFIIB-recognition elements (BRE)，BRE之相似序列為-38 SSRCGCC -32 (S=C or G，R=A or G)，突變會影響TFB的結合和轉錄的進行[14]，故對於轉錄起始是相當重要的。TFB在轉錄起始方面可能具有多項功能:第一、專一性辨認BRE序列，結合TBP-DNA複合體；第二、N端區域可將RNA聚合酶吸引至啟動子；第三、在建立起起始前複合體後，藉由TFB之核心區域(core domain)與zinc ribbon之間保守性的linker motif來幫助於RNAP離開啟動子(即啟動子清除(promoter clearance)功能)[27]。

於*Halobacterium* sp. NRC-1基因體內[5]，找出共可能存在7個TFB，包括TfbA、TfbB、TfbC、TfbD、TfbE、TfbF和TfbG。其核酸長度，蛋白質大小和座落位置經整理成表(表三)。將7個TFB胺基酸序列排列對齊起來(附圖二)[25]，其N端皆具有鋅手指區域(zinc-finger domain)，C端具有HTH motif，其中除了TfbE外，其餘六個TFB含有不完美的cyclin repeat，並夾帶glycine(G)和lysine(K)/arginine(R)在其中，這些帶正電的殘基(residues)可能為與TBP-DNA交互作用所必需的[28]。

1.5 TBP-TFB-DNA之間的交互作用(interaction)

古生菌轉錄起始前複合體(PIC)和真核生物typeII RNA polymerase之轉錄有相當程度的相似，從極端嗜熱(hyperthermophilic)古生菌中的*Pyrococcus woesei* (Pw)可見一斑。藉由Pw之TBP-TFBc (carboxy-terminal domain of TFB)-DNA結晶構造(crystal structure)[29]，來研究古生菌TBP、TFB及啟動子之間的關係，多數參與*Pyrococcus* TFB-TBP交互作用的胺基酸在古生菌裡都有相當的保守性，顯示TFB與C端區域的TBP結合是高度保守的現象。值得注意的是*Pyrococcus* TFBc-TBP-DNA的交互作用與真核生物TFIIBc-TBP-DNA的構造相當類似，若缺乏TFB/BRE交互作用，TBP結合TATA box就會產生兩種方向，故BRE的存在對於決定整個轉錄起始前複合體的方向上扮演重要的角色[30]。細胞外，古生菌TFB與BRE的結合可幫助穩定TBP與TATA

box區域，且是在RNA聚合酶不存在的情況下。TFB的C端結合BRE，N端可結合TATA box下游區域[31]，有研究指出*S. solfataricus* 之TFB N端可在DNA不存在的情況下可專一性的和RNA聚合酶的單元RpoK (RNA polymerase subunit K)結合，與RpoE (RNA polymerase subunit E)也有較微弱的結合[32]。

鹽濃度對TBP-DNA交互作用的影響

不同的生物適應不同的鹽濃度會明顯地影響其分子作用過程之親和性與選擇性，這種特性對於DNA-protein交互作用的影響特別明顯。因為DNA本身為帶有多電荷的核乾酸，周圍總是圍繞著帶正電的陽離子，而與DNA結合的蛋白質在其DNA結合位置反而呈現較多正電，平時則環繞著陰離子，當形成protein-DNA複合體時，陰陽離子和水分子都將被取代出來，使得蛋白質殘基和DNA可以有直接的交互作用[33]。一般mesophilie在DNA-protein交互作用形成時，如前所述，陰陽離子和水分子都將被釋放出來，當環境的鹽濃度高時，自然這種釋放能力就會變小，所以DNA-protein之間的交互作用便會因周圍的高鹽濃度而減弱。嗜鹽古生菌(haloarchaea)在細胞內累積了相等鹽濃度來適應外界的高鹽環境[34]，研究指出*Pyrococcus woesei* (Pw)在鹽濃度較高的環境下，其TBP對DNA的結合能力也會提昇，這樣的現象與一般mesophilic DNA-protein交互作用因鹽濃度的提高而降低剛好相反，進一步研究發現可能是因為處在高鹽環境下的嗜鹽生物在DNA-protein複合物形成時，會傾向將陽離子加入protein-DNA複合物之間，經由突變分析實驗，發現參與在陽離子取得的胺基酸----帶負電的glutamic acid (E12)扮演重要的角色[35]，若突變為lysine (K12)，則使加入的陽離子減少了結合的位置，降低其DNA-protein之交互作用，而變得偏向類似mesophilie的特性。當然TBP還有其他位置的glutamic acid (E)有類似的影響，例如(E41/E42/E128)[36]，但其中以E12在古生菌中保守性最高。本實驗使用的物種*Halobacterium* sp. NRC-1其TBP蛋白，也有E12和E41的存在，顯示其TBP-DNA交互作用的產生或許也需要高鹽環境的幫助。

1.6 質譜(mass spectrometry)技術

質譜儀目前主要用於蛋白質身份鑑定(protein identification)與後轉譯修飾基(post-translational modification)等。此外，也被應用於探討蛋白質結構，如複合體形成、蛋白質折疊(protein folding)等。質譜儀由幾部分構成，包括離子源(ion source)、質量分析器(mass analyser)及離子偵測器(detector)，ESI (electrospray ionization)和 MALDI (matrix-assisted laser desorption/ ionization)為最常見的兩種離子化方式，MALDI-MS 通常用來分析單純的胜肽混合物(peptide mixture)，ESI-MS (LC-MS)則分析較為複雜的物質。而常見分析器的有四種，包括 ion trap、time-of-flight (TOF)、quadrupole 和 fourier transform (FT)。傳統辨識蛋白質身份的作法，乃由胺基酸定序的方式，但定序一個殘基需要花上一小時的時間。現在有人利用二維電泳先分離純化蛋白，配合質譜的技術鑑定蛋白身分，但是表現量過低的蛋白便無法呈現在膠片上，且不適用於全蛋白(whole cell lysate)的全面分析。利用串聯質譜(MS/MS)可找出胜肽之一個個胺基酸序列，相較於傳統 Edman 降解反應(Edman degradation)之定序法，MS/MS 定序一段胜肽僅需較少的時間，且可偵測到約等於 femtomole 的程度。蛋白質被胰蛋白脢(trypsin)水解成胜肽後，每個胜肽依據不同的質荷比(mass-to-charge ratio 或 m/z)都可以被分離出來，經過碰撞所誘發之斷裂步驟(collision induced fragmentation)含 N-端之 b-ions 及 C-端之 y-ions，便可得知片段圖譜，再配合搜尋引擎比對資料庫(database)找出該胜肽片段可能源自於某個蛋白。常使用的液相層析儀質譜儀 LC-MS/MS (liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry)乃先利用 reversed phase C18 來濃縮及分離胜肽(較偏疏水的胜肽先流出)，再配合 ESI 將胜肽離子化後進入質譜儀中，特定的胜肽將可以透過 data dependent acquisition 之方式被選擇出來進行下一步的斷裂(產生 collision-induced (CID) spectra)及偵測。

第二章 研究架構

2.1 研究動機與目的

相較於細菌乃利用不同σ因子選擇要表達的基因以及真核生物利用3種RNA聚合酶和更多的轉錄因子調控基因表現，有些古生菌擁有多個轉錄因子(附表一)，NRC-1基因體定序找到13個基礎轉錄因子，包括6個*tbp*基因和7個*tfb*基因，且之前的蛋白體研究也顯示在正常培養的條件下，用質譜的方式已找到位於染色體上的TbpE、TfbF和TfbG，和位於微染色體上的TbpB[37, 38]，因此推論NRC-1很可能是利用不同TBP和TFB的配對組合，辨認多種類型的啟動子，如果調控某一種類型的啟動子需要一個TBP和一個TFB的參與，那麼在NRC-1體內最多可達42種不同的TBP-TFB對。不過，是否一個啟動子可被一對或是多對TBP-TFB的組合辨認，也是本實驗感興趣的地方。另外，基因體定序也預測NRC-1具有27個轉錄調節子(transcription regulators)。為了找出*Halobacterium* sp. NRC-1 TBP-TFB之間的關係與研究起始轉錄(transcription initiation)的調控機轉，本實驗分為兩大方向進行:

(I) 利用蛋白質pull down assay和串聯質譜(tandem mass spectrometry)分析方式找出TBP-TFB之交互關係(partnerships)------

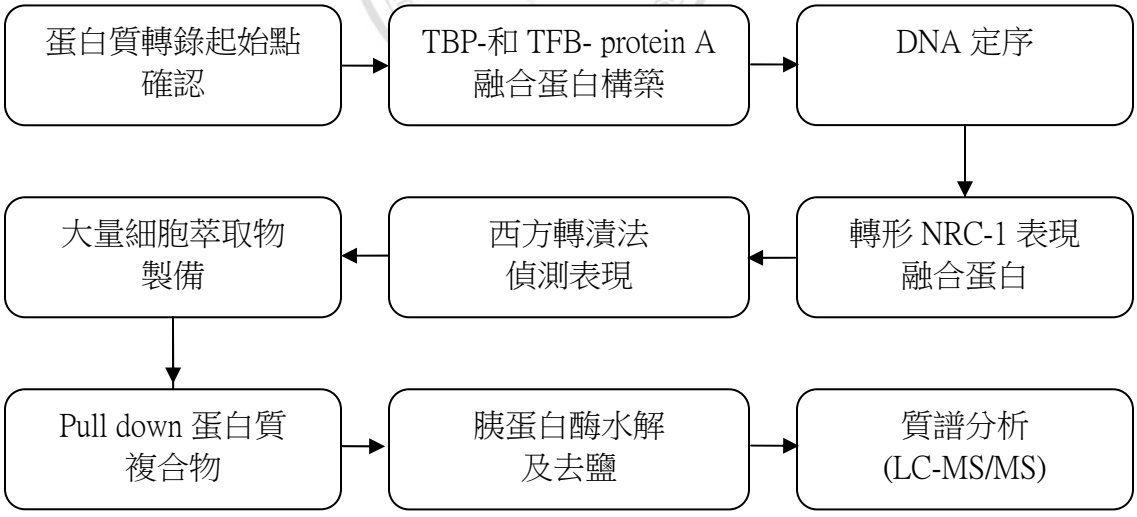
本實驗將產生TBP和TFB與protein A的融合蛋白(fusion proteins)，利用固定相(immobilized) IgG之Fc區域和protein A的親和性(affinity)，以蛋白質pull down的實驗方式，將轉形的細胞萃取物中所有與TBP或TFB作用(interaction)的轉錄相關複合物一起抓下來，並以wild-type和表現protein A的細胞萃取物作為負控制組(negative controls)。再配合串聯質譜(tandem mass spectrometry)的高靈敏度，分析在*Halobacterium* sp. NRC-1可能存在的轉錄因子對。

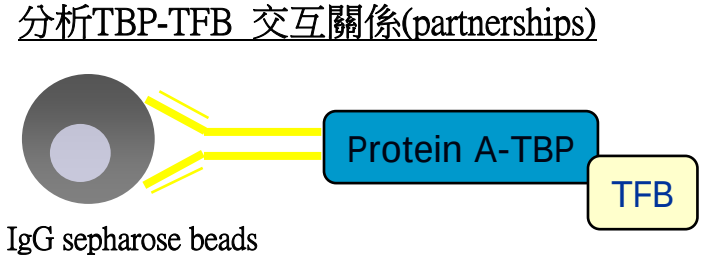
(II) 以特異性啟動子DNA親和純化實驗(promoter DNA affinity purification)和串聯質譜(tandem mass spectrometry)分析方式找出調控某一啟動子的TBP-TFB組合或其它調控因子------

本實驗先構築特定基因的啟動子至pSK和pUC19兩種載體上，再以針對載體的專一性引子(primers)以PCR方式在該啟動子片段5’端標上生物素(biotin)，另一5’端則標上Cy5螢光以便追蹤DNA的存在，利用含卵白素(avidin)的磁珠將biotin-DNA固定後，加入wild-type NRC-1細胞萃取物與DNA混合反應，形成轉錄起始前複合體(PIC)，洗去非專一結合之蛋白後，再以破壞avidin-biotin鍵结來釋出DNA-protein複合物，配合串聯質譜找出專一調控某個啟動子的可能蛋白，並以不含有DNA的磁珠和只對載體PCR產生的DNA片段與細胞萃取物混合反應，當作負控制組(negative controls)。

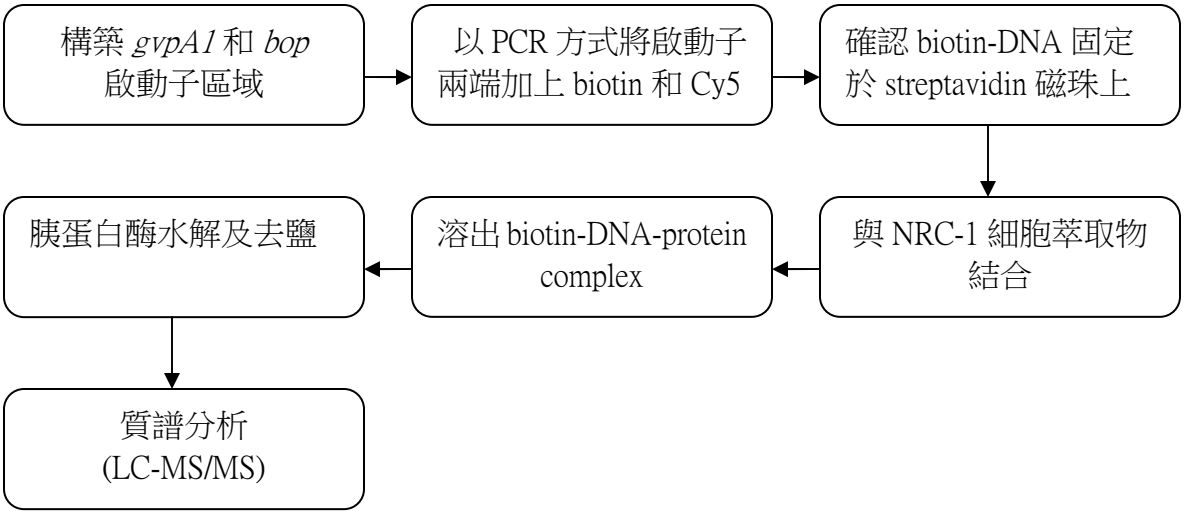
2.2 實驗流程設計

2.2.1 Protein pull down assay

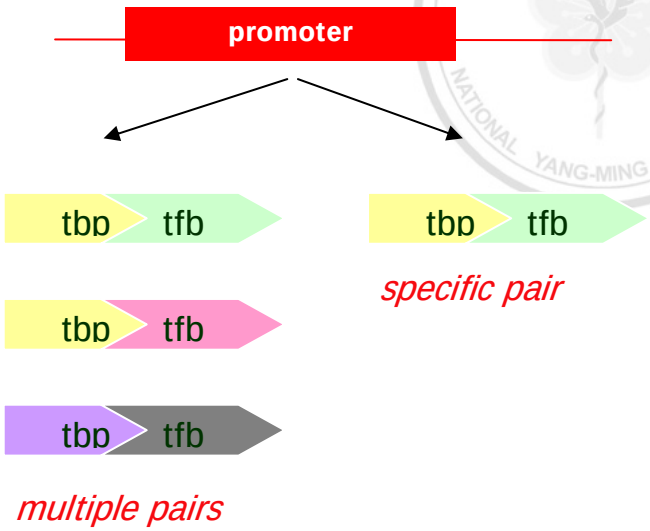




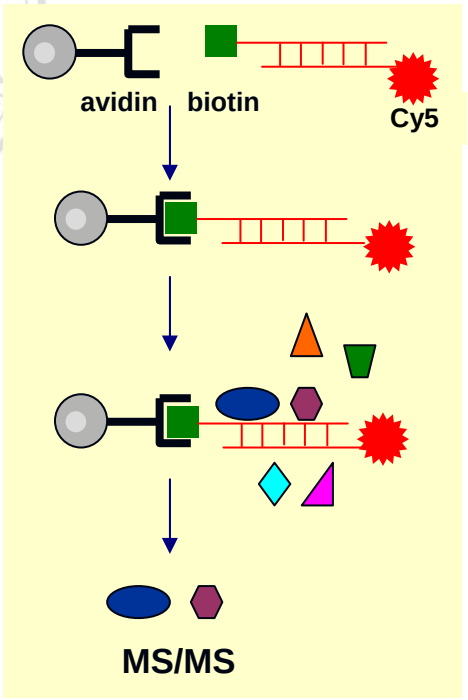
2.2.2 特異性啟動子DNA親和純化實驗(Promoter DNA affinity purification)



實驗目標示意圖:



實驗原理示意圖:



第三章、研究材料與實驗方法

3.1 NRC-1 TBP和TFB轉譯起始點(translation start site)確認

至 *Halobacterium* Genome 網站(http://halo2.umbi.umd.edu/cgi-bin/haloweb/nrc1.pl)找尋所有 TBP 及 TFB 蛋白的胺基酸序列(包括 6 個 TBP 及 7 個 TFB)，並儲存下來。利用 NCBI 網站(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)之 blastP，比對各個蛋白與 archaea、eukarya 和 bacteria 的同源性蛋白，這三種分類裡，每種各挑出幾個來自不同物種且同源性高的蛋白，整理成 FASTA 檔後，利用 EBI 網站(http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html)的 ClustalW 程式執行多重序列比對(multiple sequence alignment)，步驟為:開啟 FASTA 檔，選擇匯出形式(output format)為 gcg-MSF 後，點選 RUN，將結果的 alignment file 儲存起來，再匯入 GENEDOC 程式來呈現。檢查 NRC-1 TBP 及 TFB 蛋白之轉譯起始點位置是否相近於其他物種的蛋白質，若不同於其他蛋白質之轉譯起始點，則往上游或下游找尋其他可能的轉譯起始點，若另外一個起始點存在，則再進行一次多重序列比對。

3.2 *Halobacterium* sp. NRC-1的培養

<實驗材料>

1. *Halobacterium* 液體培養基(broth): 250 g NaCl、20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、3 g trisodium citrate・$2H_2O$、2 g KCl和10 g Oxoid peptone補去離子水至總體積為1公升，高溫滅菌再加入0.1 ml trace metal solution
2. *Halobacterium* trace metal solution: 1.32 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、0.34 g $MnSO_4 \cdot H_2O$、0.78 g，$Fe(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$和0.14 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$於0.1 N HCl 200 ml中完全溶解後，以0.2 μm filter過濾
3. *Halobacterium* 洋菜凝膠平面培養基(agar plate): 250 g NaCl、20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、3 g

trisodium citrate・$2H_2O$、2 g KCl、10 g Oxoid peptone和15 g agarose加入去離子水至總體積為1公升，高溫滅菌後再加0.1 ml trace metal solution，倒入9 cm培養皿，於室溫下冷卻後存放於4℃冰箱

<實驗方法>

培養*Halobacterium* sp. NRC-1於洋菜凝膠平面培養基:

將菌分區塗於洋菜凝膠平面培養基上，培養於37℃，待一星期粉紅色圓形菌落出現。

Halobacterium sp. NRC-1之小量液體培養:

取洋菜凝膠平面培養基上之*Halobacterium* sp. NRC-1粉紅色單一菌落，種至4 ml *Halobacterium* 液體培養基培養37℃，震盪200 rpm，約一星期後存放於4℃。

3.3 大量製備*Halobacterium* sp. NRC-1 genomic DNA

<實驗材料>

1. *Halobacterium* sp. NRC-1液體培養基(見3.2實驗材料)
2. Basal salt solution (BSS): 250 g NaCl、20 g $MgSO_4$・$7H_2O$、3 g trisodium citrate・$2H_2O$和2 g KCl補去離子水至總體積為1公升，完全溶解後用0.2 μm filter過濾
3. 其它試劑: RNaseA (100 μg/μl)、1 M Tris (pH8.0)、0.5 M EDTA、10% SDS、proteinase K、phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)、ethanol (EtOH)、TE buffer (10 mM Tris-HCl和1 mM EDTA)、isopropanol

<實驗方法>

從*Halobacterium* sp. NRC-1之小量培養中，以1000:1之稀釋比例種於100 ml之液體

培養基，以37℃，200 rpm培養約一星期至late log phase (OD_{600}>2.0)，接著以7000 rpm，4℃ 15分鐘離心收集細胞，去除上清液，以2 ml basal salt solution懸浮(resuspend)細胞，再快速加入8 ml滅菌水裂解(lyse)細胞，並將之轉移到50 ml管中，加入2 μl RNaseA後於室溫反應10分鐘，接著加入1 M Tris (pH8.0) 100 μl、0.5M EDTA 20 μl、10% SDS 1 ml和1 mg proteinase K於50℃反應overnight，加入TE buffer至總體積為20 ml，輕輕混合均勻，再加入isopropanol到最大體積(不去搖晃它)，靜置冰上，使DNA被帶到上層，將上層DNA轉移到含有40 ml 70%EtOH的管中清洗掉殘留色素，其餘的再翻轉混合一次，靜置於4℃(重覆此步驟至DNA不再被拉出為止)，最後以70% EtOH 洗DNA，於室溫風乾以真空乾燥濃縮機(Speedvac)去除殘留酒精後，溶於TE buffer置-20℃存放。

3.4 *Halobacterium* sp. NRC-1 *tbp*與*tfb*基因的構築

3.4.1 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction)與產物之磷酸化反應

<實驗材料>

1.設計各個 *tbp* 及 *tfb* 基因引子對(表二)

2. *Halobacterium sp.* NRC-1 genomic DNA

3.其它試劑: TOYOBO KOD-Plus-DNA polymerase (1U/ μl)與其 10 倍緩衝液、dNTP、$MgSO_4$、99.9% DMSO、10 倍 DNA loading dye、Invitrogen T4 Polynucleotide Kinase (10U/ μl)與其 5 倍緩衝液、ATP、phenol、chloroform、sodium acetate、ethanol (EtOH)

4. 50 倍 TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA 緩衝液): Tris-base 242 g、glacial acetic acid 57.1 ml 和 0.5 M EDTA (pH8.0) 100 ml 加去離子水至 1 公升

5. 1%洋菜膠(agarose gel): 取 1 g agarose 粉末溶於 100 ml 1 倍 TAE 緩衝液，微波加熱充份溶解後，加入 4 μl 之 10 mg/ml EtBr (ethidium bromide)混合均勻倒入模具內，趕走氣泡待其凝固後，置入 1 倍 TAE 緩衝液中保存

6. Amersham Biosciences Sephaglas™ BandPrep Kit (Cat. NO. 27-9285-01)

7. Phase-lock gel (Eppendorf)

<實驗方法>

取 2 mM dNTP 5 μl、2.5 mM $MgSO_4$ 2 μl、KOD polymerase 1 μl 與其 10 倍 buffer 5 μl、10 μM forward 引子 1 μl、10 μM reverse 引子 1 μl、99.9% DMSO 2.5 μl 和 *Halobacterium* sp. NRC-1 genomic DNA 1 ng，補滅菌水至總體積 50 μl，混合均勻，反應條件為 94℃，2 分鐘；再以 94℃，30 秒；60℃，30 秒；68℃，2 分鐘(重複反應 30 個循環)；最後以 68℃，7 分鐘及 4℃結束反應。反應結束後將 PCR 產物與 DNA loading dye 混合，以 160V 進行電泳 30 分鐘，在 UV 燈下觀察結果。將全部 PCR 產物進行跑膠後，進行 PCR 產物純化(gel purification):從洋菜膠上切下正確位置的 band，切碎裝入 1.5 ml 微離心管中，依 Sephaglas BandPrep Kit 標準步驟，加入建議量之 gel solublizer，震盪後置於 60℃，5~10 分鐘(每 2 分鐘混勻一次)使膠完全溶解，加入建議量之 Sephaglas BP suspension，室溫反應 5 分鐘(每分鐘輕微混勻)，離心 30 秒並去除上清液，再加入適量之 wash buffer 徹底將團塊懸浮，離心 30 秒後去除上清液，此清洗步驟重複二次後，倒放至少 10 分鐘以風乾 DNA，加入建議量的滅菌水重新懸浮之，置室溫 5 分鐘後離心最高速 1 分鐘，取上清液至新的 1.5 ml 微離心管中。取 3 μl DNA 跑洋菜膠電泳檢查基因大小是否正確。

取上述反應剩餘之DNA(約37 μl)，加入10 mM ATP 5 μl、5倍 forward reaction buffer 12 μl和T4 polynucleotide kinase 1 μl，補滅菌水至總體積為60 μl，於37℃反應20至30分鐘，65℃ 10分鐘停止反應。挖取適量phase-lock gel至以上之微離心管，加入1倍體積之phenol混合均勻，最高速離心5分鐘，再加入1倍體積之chloroform混合均勻，最高速離心5分鐘(再加入chloroform並離心，此步驟重複三次)，最後取上清液至新的一管，加入1/10倍體積之3 M sodium acetate 與3倍體積之100% EtOH混勻後，置-80℃一小時，再以最高速離心10分鐘，去除上清液，以70% EtOH清洗DNA，接著用最高速離心去除殘餘酒精，並風乾後以20 μl滅菌水回溶。

3.4.2 表現融合蛋白載體pNBPA的製備

<實驗材料>

1.載體 pNBPA(圖一 A)

2.其它試劑: NEB restriction enzyme *Nde*I (20U/μl)與其 10 倍緩衝液、Invitrogen calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) (1U/μl)、Invitogen T4 DNA polymerase (5U/μl)與其 5 倍緩衝液、phenol、chloroform

3. Phase-lock gel

4. Amersham Biosciences Sephaglas ™ BandPrep Kit

5. 1%洋菜膠(見 3.4 實驗材料)

<實驗方法>

取5μg pNBPA加入1.25μl *Nde*I限制酶與其10倍buffer 10μl補滅菌水至總體積為100μl，於37℃反應1小時將載體線性化(linearlized)，加入1U之CIAP，37℃反應 5分鐘將DNA 5’ 端進行去磷酸化後，以phase-lock gel純化載體(見3.4.1實驗方法)，得到的pellet加入176μl滅菌水，5倍T4 DNA polymerase buffer 40μl，2 mM dNTP 5μl，1μl之T4 DNA polymerase混勻後，於11℃水浴反應30分鐘，此乃為將載體DNA之黏端(sticky end)經由DNA polymerase反應成平端(blunt end)。再進行切膠純化(見3.4.1實驗方法)，取 3μl DNA 跑洋菜膠檢查線性化後之載體是否被成功純化出來。

3.4.3 將tbp和tfb基因接合(ligation)載體pNBPA並轉形(transform)E. coli

<實驗材料>

1. Reagents: Invitrogen T4 DNA ligase (1U/μl)與其 5 倍 ligase buffer、0.1 M $CaCl_2$

2. LB (Luria-Bertani)-ampicillin 瓊脂平面培養基(argar plate): 5 g yeast extract、10 g tryptone、10 g NaCl 和 15 g Bacto agar，溶於 1 公升去離子中，滅菌後加入 ampicillin 至最終濃度為 100μg/ml，倒入 9 cm 培養皿於室溫下冷卻，置 4℃保存

3. LB (Luria-Bertani)瓊脂平面培養基(argar plate): 作法同 LB-ampicillin 瓊脂平面培養基，但滅菌後不需加入 ampicillin
4. LB (Luria-Bertani)- ampicillin 液體培養基(broth): 作法同 LB-ampicillin 瓊脂平面培養基，惟不需加入 Bacto agar
5. LB (Luria-Bertani)液體培養基(broth): 作法同 LB-ampicillin 瓊脂平面培養基，成分不需外加 Bacto agar 與 ampicillin
6. SOB 培養液: Bacto tryptone 20 g、Bacto yeast extract 5 g 和 NaCl 0.5 g 補去離子水至總體積為 1 公升，滅菌後，儲存於 4℃(使用前加 $MgCl_2$ 和 $MgSO_4$ 至最終濃度 10 mM)
7. SOC 培養液: Bacto tryptone 20 g、Bacto yeast extract 5 g 和 NaCl 0.5 g 補去離子水至總體積為 1 公升，滅菌後，儲存於 4℃(使用前加 $MgCl_2$ 和 $MgSO_4$ 至最終濃度 10 mM，另加 glucose 至最終濃度 20 mM)

<實驗方法>

把以上處理好的 *tbp* 及 *tfb* 基因與線性(linearlized)的載體 pNBPA DNA 以 1:1(v:v)的比例進行接合反應(ligation)，即在總反應體積 20 μl 中，加入 1 μl insert、1 μl vector、4 μl 5 倍 ligase buffer、1 μl T4 DNA ligase 和 13 μl 滅菌水，均勻混合後 14℃反應 overnight。之前先將 DH5α 分區劃開於 LB 瓊脂平面培養基，隔天取單一菌落至 3 ml 之 LB 液體培養基培養 overnight。轉形進行當天，以 1:100 稀釋比例種入含 50 ml SOB 之三角瓶，37℃震盪培養 2.5 至 3 小時，測 OD_{600} 約介於 0.2~0.5 之間，將其離心 4000 rpm，10 分鐘後去除上清液(倒放以流出多餘上清)，並以冰涼之 10 ml 0.1M $CaCl_2$ 小心懸浮細胞後，離心 4000 rpm，10 分鐘後去除上清液，以冰涼之 2 ml 0.1M $CaCl_2$ 小心懸浮細胞，置冰上備用，此乃完成勝任細胞(competent cells)的製備。針對每一接合反應分裝 200 μl 勝任細胞於微離心管，並加入 5 μl ligation mixture，均勻混合放冰上 30 分鐘後移至 42℃水浴 90 秒，再立刻插入冰塊中 1~2 分鐘，隨後加入 800 μl SOC，於 37℃振盪 45 分鐘，再快速離心約 20 秒，去除大部份的上清液，留下約 100 μl 的上清液以重新懸浮細胞，將其塗在 LB-ampicillin 瓊脂平面培養基上進行篩選，倒放於 37℃培養 overnight。

3.4.4 質體小量萃取(mini-prep.)及 DNA 定序

<實驗材料>

1. Reagents: ProTaq Plus DNA polymerase (5U/μl)與其 10 倍緩衝液、dNTP、forward 和 reverse primer、phenol、chloroform、ethanol、big dye terminator、5 倍 sequencing buffer、99.9% DMSO
2. 位於 pNBPA 上之引子: 102F、103F、101R 和 103R(表三)
3. LB- ampicillin 液體培養基:(見 3.4.3 實驗材料)
4. Alkaline lyse solution I: 50 mM glucose、25 mM Tris-HCl (pH 8.0)和 10 mM EDTA (pH 8.0)，滅菌後存於 4℃
5. Alkaline lyse solution II: 0.2 M NaOH 和 1% SDS
6. Alkaline lyse solution III: 60 ml 5 M potassium acetate 和 11.5 ml glacial acetic acid 補滅菌水至總體積 100 ml
7. DT wash buffer : 3 μl 3M NaOAc和60 μl 100% EtOH加滅菌水混合均勻補至總體積 95 μl
8. 1%洋菜膠(見3.4實驗材料)

<實驗方法>

挑選生長於LB-ampicillin瓊脂平面培養基上的菌落進行PCR檢查，取103F和101R引子各0.5 μl、2.5 mM dNTP 1 μl、ProTaq酵素0.5 μl及其10倍 buffer 2.5 μl，補滅菌水至總體積25 μl，以牙籤挑單一菌落至反應管，充分混勻後上機，另取載體pNBPA當模板作為正控制組(positicve control)，不加入任何模板DNA(template)當作負控制組(negative control)。進行94℃，10分鐘；再以94℃，30秒；60℃，30秒；72℃，2分鐘(25次循環反應)；最後為72℃，10分鐘及4℃，∞結束反應，跑1%洋菜膠電泳觀察結果。將可能有選殖成功的菌落種於3 ml之LB- ampicillin液體培養基，37℃震盪培養overnight，離心去除上清液後加入Alkaline lyse solution I 100 μl 徹底懸浮細胞，再加

Alkaline lyse solution II 200 μl 後，立刻翻轉搖晃數次，細胞呈現粘稠透明狀後加入Alkaline lyse solution III 150 μl，立刻翻轉搖晃數次，此時可見白色大塊沉積物，置冰上5分鐘，14000 rpm離心5分鐘，加入等體積1:1混合均勻之phenol:chloroform mixture，劇烈震盪後，14000 rpm離心2分鐘，取上清液至新的微離心管，再加入上清液兩倍體積之100% EtOH，混合均勻以14000 rpm離心5分鐘，去除上清液，再以70% EtOH 清洗DNA pellet，14000 rpm離心2分鐘，去除上清液後風乾，以50 μl滅菌水回溶pellet，跑1%洋菜膠電泳檢查是否成功抽出質體。利用big dye terminator DNA定序試劑反應，forward和reverse反應分別進行，加入質體DNA 1.5 μl、big dye terminator 2 μl、3.2 μM 102F (forward primer) 1 μl或3.2 μM 103R (reverse primer) 1 μl、5倍sequencing buffer 2 μl、DMSO 0.5 μl及滅菌水3 μl，反應96℃ ，1分鐘；再進行96℃ ，10秒；52℃ ，10秒；60℃，4分鐘(35次循環反應)；60℃，7分鐘；4℃，∞，之後加入DT wash buffer 95 μl，避光靜置20分鐘之後，以14000 rpm離心30分鐘，吸去上清液，加入100 μl 70% EtOH清洗pellet，以14000 rpm離心10分鐘，吸去上清液，再以14000 rpm離心1分鐘，將上清液去除乾淨後，避光倒放風乾至少20分鐘，置入-20℃保存。以Applied Biosystems 3700或3730自動定序儀作DNA定序。

3.5 *Halobacterium* sp. NRC-1轉形(transform)實驗

<實驗材料>

1. *Halobacterium* 洋菜凝膠平面培養基(含 mevinolin):(見 3.2 實驗材料之 *Halobacterium* 洋菜凝膠平面培養基)，另在滅菌後加 trace metal solution 及 4 μg/ml mevinolin
2.其它試劑: 0.5M EDTA (pH8.0)、polyethylene glycol (PEG)
3. Spheroplasting solution (Sph): 11.7 g NaCl、0.2 g KCl、60% sucrose 25 ml、1 M Tris-HCl (pH8.75) 5 ml 及 glycerol 15 ml，補去離子水至總體積 100ml
4. Regeneration salts solution: 250 g NaCl、20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、2 g KCl、3 g trisodium citrate・$2H_2O$、1 M Tris-HCl (pH7.4) 50 ml、10% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2 ml 和 60% sucrose 250 ml 補去離子水至總体積 1 公升

<實驗方法>

取*Halobacterium* sp. NRC-1 OD_{600} 0.8~1.0的菌液1 ml至微離心管，14000 rpm離心30秒，去除上清液，加入100 μl Spheroplasting solution懸浮細胞後加入10 μl 0.5 M EDTA(目的在螯合(chelate)二價鎂離子(Mg^{2+})，使S-layer脆弱而造成spheroplasts)，輕輕混合置室溫下10分鐘，再加入10 μl質體DNA(即Tbp、Tfb和pNBPA質體)靜置室溫下5分鐘，加入115 μl之PEG:Sph(6:4)混合液，目的在誘導其成為勝任細胞(competent cells)，立即來回翻轉10次混合均勻，靜置室溫20分鐘，再加入Regernation salts solution 1 ml，6000 xg離心4分鐘，去上清液後再加1 ml Regernation salts solution，搖晃200 rpm 37℃培養overnight，隔天離心後去除上清取適量塗於含4 μg/ml mevinolin 之 *Halobacterium* 洋菜凝膠平面培養基，37℃培養約一星期。粉紅色菌落出現後，以PCR方式檢查細胞是否含有目標質體(方法同上)。

3.6 以西方轉漬(Western blot)偵測融合蛋白(fusion protein)表現

3.6.1 小量製備 Halobacterium sp. NRC-1 細胞萃取物(cell lysates)與萃取全蛋白(total protein)

<實驗材料>

1. *Halobacterium* sp. NRC-1 液體培養基(見 3.2 實驗材料)
2. Basal salt solution(見 3.3 實驗材料)
3.其它試劑: 0.1 M PMSF、DNaseI、acetone、50 mM ammonium bicarbonate
4. BIO-RAD Protein Assay Kit (Cat. No. 500-006)

<實驗方法>

培養 *Halobacterium* sp. NRC-1 於 50 ml 液體培養基，達 OD_{600} 為 0.8~1.0 離心去上清液並收取細胞後，以 1ml basal salt solution 將細胞充分懸浮，來回-80℃與 37℃(各 30 分鐘)進行重複冷凍解凍 5 次，使細胞破裂死亡，加入 PMSF 達最終濃度為 1 mM 以抑制蛋白酶作用，再加入適量 DNaseI 分解 DNA 直到不黏稠為止，之後於室溫充分搖晃反應 30 分鐘，取 450 μl 細胞萃取物與 450 μl 滅菌水等體積混合後，再加入等體積 aectone:H_2O (600 μl:300 μl) mixture，充分混合以 14000 rpm 離心 5 分鐘(可見紅色 pellet)，去除上清液後加入 300 μl 滅菌水重新懸浮 pellet，再加入 1200 μl 冰的 acetone，劇烈震盪可見白色沉澱，再以 14000 rpm 離心 10 分鐘，去上清液後將 pellet 以 Speedvac 抽乾 5 分鐘(周圍透明狀即可)，再以 50 mM ammonium bicarbonate 回溶(置 4℃有助於回溶)，利用 BIO-RAD Protein Assay Kit 用波長 595nm 定量蛋白質濃度。

3.6.2 西方轉漬法(Western Blotting) ----SDS 膠體電泳(sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)部分

<實驗材料>

1. Reagents: BIO-RAD 30% acrylamide/bis-acrylamide (Cat. No. 161-0146)、TEMED =N, N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine、10% APS (ammonium persulfate)、1.5 M Tris-HCl (pH8.8)、1.0 M Tris-HCl (pH6.8)、10% SDS、isopropanol
2. 5 倍 Tris-glycine eletrophoresis buffer: 15.1 g Tris-base 與 44 g glycine 先溶於 900 ml 去離子水中，再加入 10%SDS 溶液 50 ml，補去離子水至總體積為 1 公升
3. 1 倍 SDS-gel loading buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、100 mM DTT、2% (w/v) SDS、0.1% bromophenol blue 和 10% (v/v) glycerol 充分混勻後分裝至-20℃保存

<實驗方法>

組裝好 BIO-RAD 蛋白質電泳裝置裝置，並先加入去離子水測試以確保不會外漏。製作一片 10%之聚丙烯醯胺凝膠(polyacrylamide gel)下層(separating gel):取去離子

水 4.0 ml、30% acrylamide/bis-acrylamide 3.3 ml、1.5 M Tris-HCl (pH8.8) 2.5 ml、10% SDS 0.1 ml、10% APS (ammonium persulfate) 0.1 ml 和 TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine) 0.4 ml，混合均勻後，快速倒入兩片擦乾淨的玻璃片之間，再以滴管吸取 isopropanol 蓋在膠上壓平，靜置約 1 小時後，倒去 isopropanol，待揮發完全再製備上層膠(stacking gel):取去離子水 2.1 ml、30% acrylamide/bis-acrylamide 0.5 ml、1.0 M Tris-HCl (pH6.8) 0.38 ml、10% SDS 0.03 ml、10% APS 0.03 ml 和 TEMED 0.003 ml，混合均勻後，快速倒在下層膠上，插入孔梳，靜置 30 分鐘即可。取適量蛋白質樣品與 loading dye 混合之後，裝上防爆夾於 100℃煮 5 分鐘使蛋白質變性(denature)，再置冰上數分鐘。將電泳槽內倒入約 1 公升之 1 倍 Tris-glycine eletrophoresis buffer 後，架上膠片，開始注入樣品，插上正負極後，設定 70 伏特跑 30 分鐘進行 stacking，再調到 120 伏特跑約 2 到 3 小時不等，觀察 protein markers 分離的情況以決定跑膠的時間長短。

3.6.3 西方轉漬法(Western Blotting) ----蛋白質轉漬(transfer)部分

<實驗材料>

1. Transfer buffer: Tris-base 3.0 g 和 glycine 14.4 g 兩者先溶解於水，再加入 200 ml methanol 並調 pH 至 8.3，再補去離子水至總體積 1 公升，置於 4℃儲存
2. 5 倍 TBS: Tris-base 121.1 g 和 glycine 146.3 g 兩者先溶解於水並以 HCl 調至 pH7.5，補去離子水至總体積 1 公升，於室溫下儲存
3. 1 倍 TBST: 取 100 ml 的 5 倍 TBS 加 900 ml 的去離子水，再加入 0.05% Tween20，混合均勻
4. 5% blocking reagent: 1 g 脫脂奶粉溶於 20 ml 的 1 倍 TBST 中
5. Fermentas PageRuler ™ Prestained protein Ladder (Cat. No. 00015561)
6. Invitrogen SimplyBlue™ SafeStain (Cat. No. LC6060)
7. Millipore Immobilon PVDF (polyvinylidene difluoride)轉漬膜(Cat. No. IPVH00010)
8. Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Luminol reagent 和

Peroxide Solution) (Cat. No. WBKLS0500)

9. human IgG-鍵結 HRP(horseradish peroxidase)抗體

10.底片: Kodak Biomax XAR Film 或 Fuji Medical X-ray Film

11.卡匣: Kodak Biomax Cassette

<實驗方法>

使用 BIO-RAD 蛋白質轉漬裝置，將兩片海綿及裁剪兩片大小合適(8x10 cm)的 3 mm 濾紙，置於 transfer buffer 中平衡，再剪取類似大小的 PVDF 轉漬膜，置入 methanol 中活化(膜將呈現透明狀)。將卡匣攤開，黑色(陰極)部份朝下，依序放上海棉、3 mm 濾紙、蛋白質膠片 、PVDF 轉漬膜、3 mm 濾紙以及海綿(過程中避免氣泡存在)，卡緊後放入轉漬槽(注意正負極)，槽內加滿 transfer buffer，槽外則盡量用冰塊降低過程中產生的熱量，電流固定 400 毫安培，進行轉漬 1 小時。一小時後，檢查 protein marker 是否成功轉漬於 PVDF 膜上，並將 PVDF 膜浸泡於 5% blocking reagent 4℃ overnight，以避免後續加入的抗體與膜上的蛋白質之非專一性結合。(可進一步將轉漬完成的膠片 ，以 SimplyBlue SafeStain 染色，觀察蛋白質轉漬效率)。隔天，先將 PVDF 膜以適量 1 倍 TBST 搖晃清洗 5 分鐘，再加入約 15~20 ml 之 1:30000 human IgG-HRP (以 5% blocking reagent 配製)，於室溫下輕微搖晃 1 小時進行反應，再以 1 倍 TBST 搖晃清洗 10 分鐘 4 次以上，洗去非專一性鍵結。將基質(substrate) luminol reagent 和 peroxide solution 以體積比 1:1 的比例混合，加到 PVDF 膜上與抗體上 HRP 反應發出冷光，於暗房中進行壓片，感光時間約為 10 秒至 2 分鐘不等。之後需標明 protein marker 的位置以利比對。

3.7 Pull down NRC-1 TBP-pA 與 TFB-pA 之蛋白質複合物(protein complexes)

3.7.1 利用電動式高壓破碎裝置(French press)大量製備 Halobacterium sp. NRC-1 細胞萃取物(cell lysates)

<實驗材料>

1. 電動式高壓破碎裝置(French press)
2. 超音波細胞粉碎機(Sonicator)
3. *Halobacterium* sp. NRC-1 液體培養基(見 3.2 實驗材料)
4.其他試劑: basal salt solution(見 3.3 實驗材料)和 0.1 M PMSF
5. 1%洋菜膠(見 3.4 實驗材料)

<實驗方法>

培養 *Halobacterium* sp. NRC-1 於 500 ml 液體培養基，達 OD_{600} 為 0.8~1.0 時，離心去上清液收取細胞後，以 15 ml basal salt solution 將細胞充分懸浮，加入 160 μl 0.1 M PMSF(蛋白酶抑制劑)劇烈震盪均勻後，放置-80℃儲存。為使樣品不黏稠，本實驗採用到兩種打斷 DNA 的方法，如下:

1) 電動式高壓破碎裝置:

欲破細胞當天，自-80℃取出細胞解凍，以電動式高壓破碎裝置 16000 psi 的壓力重複進行三次以徹底打破細胞(盡量於冰上進行)，最後再以 2 ml basal salt solution 以相等壓力進行一次，洗出殘餘細胞，將這些細胞萃取物以 14000 rpm 離心 15 分鐘去除細胞碎片，取上清液分裝儲存於-80℃備用。在替換不同的樣品時，為避免污染，所有零件皆會拆下來清洗，並先加滿去離子水，以 16000 psi 的壓力重複進行二次以徹底清洗儀器內通道

2) 超音波細胞粉碎機:

自-80℃取出細胞解凍之後，或利用超音波細胞粉碎機來震斷 DNA，探針(probe)伸入樣品中離管底約 1~2 公分，調整強度為”2”，將欲處理之樣品置冰上後啟動機器進行震碎，每次持續 20 秒後再劇烈震盪(votex)以避免團塊不均勻分布，振碎又劇烈震盪重複五，七或十五次之後，將這些細胞萃取物以 14000 rpm 離心 15 分鐘去除細胞碎片，取上清液分裝儲存於-80℃備用。替換不同樣品時，必需以去離子水沖洗

探針，並伸入去離子水中直接啟動超音波細胞粉碎機，以洗出殘留物，最後探針用 Kimwipes 擦拭乾淨。

取細胞萃取物離心過後之上清液 1 μl 加入去離子水 9 μl(稀釋鹽分)，混合 DNA loading dye 之後，進行 1% 洋菜膠電泳，檢查在不同條件處理下的 DNA 斷裂的情形及斷裂 DNA 片段分布的大小範圍。

3.7.2 Protein A 融合蛋白 pull down assay

<實驗材料>

1. Amersham Biosciences IgG Sepharose™ 6 Fast Flow (Cat. No. 17-0969-01)
2. BIO-RAD Poly-prep chromatography columns (Cat. No. 731-7550)
3.低鹽 TS (Tris-saline) buffer: 50 mM Tris-HCl (pH7.6)和 150 mM NaCl
4.高鹽 TS (Tris-saline) buffer: 50 mM Tris buffer (pH7.6)和 4 M NaCl
5. 0.5 M CH_3COOH (HAc): 使用 NH_4CH_3COOH (NH_4AC)調整為 pH3.4
6.其他試劑: 25 mM NH_4HCO_3、5 mM NH_4Ac (pH5.0)、0.5 M HAc (pH 3.4)、basal salt solution (見 3.3 實驗材料)
7. pH paper

<實驗方法>

比較電動式高壓破碎或超音波細胞粉碎方式製成的細胞萃取液所採用的 pull down 條件------此實驗只選取 NRC-1 *tbpC* 轉形株(transformant)作測試

管柱的填充與洗滌:

每 ml IgG sepharose beads 於 pH7.5 之下，最少可抓 2 mg 之 protein A。先均勻搖晃以懸浮 IgG Sepharose™ 6 Fast Flow 接著取適量體積(約 120 μl)加入管柱，以 600 μl (至少 5 倍 beads 體積)低鹽 TS 洗去 beads 上殘餘的酒精，重複沖洗 4 次。

管柱平衡與樣品添加:

加入 360 μl (2-3 倍 beads 體積)之 0.5 M HAc，再加入 306 μl (2-3 倍 beads 體積)之 TS 以平衡管柱，此步驟再重複一次，以酸鹼試紙檢查 pH 是否為中性，若仍偏酸，再以 360 μl TS 沖洗一次。確定偏中性後，將管柱尖端以 parafilm 緊密封住，即可加入細胞萃取物上清液 2 ml，再封住管柱之另一端，與 beads 混合在一起置入含冰塊之保鮮盒輕微搖晃(25 rpm)作用 2 小時。

樣品的清洗與溶出(elution):

用 1 ml TST 沖洗 6 次，以洗去非專一性結合，加入 2 ml 25 mM NH_4HCO_3 以洗去 Tris-HCl，再加入 240 μl (2 倍 beads 體積)之 5 mM NH_4AC (pH 5.0)，重複加入一次 240 μl NH_4AC 後，再加入 500 μl 0.5 M HAc (pH 3.4)靜置約 1 分鐘，此步驟再重複一次，以將蛋白質複合體由 sepharose beads 溶出，最後總共可得到 1ml 的醋酸溶出液，以 Speedvac 抽氣伴隨離心的方式抽乾醋酸，將 pellet 以 150-200 μl 50 mM NH_4HCO_3 回溶，測蛋白質濃度後，保存於-20℃。視情況取適量進行蛋白電泳利用銀染檢查 pull down 結果，剩下樣品則以質譜進一步分析成分。

之後其他基因皆以低鹽TS溶液pull down方式大致如上(詳細實驗細節見表四)，但細胞萃取物皆使用電動式高壓破碎裝置來製備。

高鹽實驗 pull down 條件調整

1) 高鹽TS溶液:將以上每個步驟的低鹽TS溶液(150 mM NaCl和 50 mM Tris-HCl)以高鹽TS溶液(4M NaCl和 50 mM Tris-HCl)替代，並省略之後加入NH_4HCO_3和NH_4AC的步驟，即以TS沖洗後，直接以HAc溶出。

2) Basal salt solution(BSS):將以上每個步驟的低鹽TS溶液(150 mM NaCl和 50 mM Tris-HCl)以高鹽basal salt solution替代，並省略之後加入NH_4HCO_3和NH_4AC的步驟，即以TS沖洗後，直接以HAc溶出。

將以低鹽TS溶液、高鹽TS溶液或basal salt solution(BSS)之詳細pull down使用的條件整理於下表(表四)。

3.7.3 Protein A 融合蛋白 pull down 蛋白質複合物之去鹽(desalting)

此步驟僅需用於 protein A pull down 實驗若採用高鹽溶液 4M TS 和 BSS 沖洗，則在進行其他後續實驗前(e.g. 胰蛋白酶作用)，為避免干擾必須先行去鹽。Millipore Microcon YM3 此 column 的去鹽方式乃利用濃縮的原理，其膜可留住分子量 3kDa 以上的蛋白質，其他的鹽類或分子量過小的蛋白質都將被濾除，也可進一步替換成後續實驗所需的溶液。

<實驗材料>

1. Millipore Microcon Ultracel YM-3 (molecular cut-off, 3kDa) (Cat. No. 42403)
2. Reagent: 50 mM NH_4HCO_3

<實驗方法>

將 Millipore Microcon YM-3 column (黃色)裝在其附贈的 microtube 上，加入 200 μl 滅菌水離心 14000 xg 30 分鐘，去除覆在膜上的甘油(glycerin)，將 pull down elution (含 HAc)或是已經抽乾醋酸又回溶在 50 mM NH_4HCO_3 的蛋白質樣品加到 column 中(最多承載 500 μl)，離心 14000 xg 50 分鐘，去下液，若有需要再加另一半的蛋白質樣品，同樣離心 14000 xg 50 分鐘，去下液，加入 200 μl 50 mM NH_4HCO_3 再離心 14000 xg 30 分鐘(目的為替換溶液)，去下液，換到另一新 microtube，將黃色 column 倒放，離心

1000 xg 3 分鐘，可離下約 20-30 μl 的液體，以 50 mM NH_4HCO_3 補至適量體積，進行後續實驗。

3.7.4 利用銀染(Silver Staining)檢查經 pull down 之蛋白質複合物

<實驗材料>

1. SDS 膠體電泳(見 3.6.2 實驗材料)
2. BIO-RAD 銀染套組(Silver stain kit):(厚度為 1.5 mm 的膠每次需 50 ml 溶液)

   固定液(Fixative)----以三次水配製 40% methanol + 10% acetic acid 和 10% ethanol + 5% acetic acid

   氧化液(Oxidizer)---原 10 倍濃縮溶液 5 ml 加 45 ml 三次水，儲存於 4℃

   銀試劑(Silver reagent)---原 10 倍濃縮溶液 5 ml 加 45 ml 三次水，儲存於 4℃

   顯影劑(Developer)---16 g developer 粉末加入三次水補體積至 500 ml，用力搖晃以溶解粉末

   終止液---以三次水配製 5% acetic acid

<實驗方法>

進行 SDS-PAGE(見 3.6.2 實驗方法)。將膠片以固定液 40% methanol + 10% acetic acid 浸泡整晚或 1 小時，輕微搖晃使反應均勻，倒掉後再以 10% ethanol + 5% acetic acid 反應 30 分鐘兩次。倒掉後以現配(fresh prepared)之氧化液反應 10 分鐘，再用三次水浸泡 10 分鐘且至少重複三次，直到黃色褪去為止。加入銀試劑反應 30 分鐘，再以三次水浸泡 2 分鐘後，分段加入顯影劑反應即開使始呈色，第一次加入顯影劑時只反應約 30 秒(溶液有些變黃變濁)，隨即倒去，第二次反應 5 分鐘後再倒掉換新的，第三次再反應 5 分鐘，以此類推，必須在旁隨時觀察，直到已達想看的效果為止。最後，加入終止液終止呈色。

3.8 質譜(mass spectrometry)樣品前處理與結果分析

3.8.1 以胰蛋白酵素(trypsin)水解蛋白並以 C18 管柱以去鹽(desalting)

<實驗材料>

1. Promega Sequencing Grade Modified Trypsin
2. PIERCE PepClean™ C18 spin columns (Cat. No. 89870)

   配製 C18 spin columns 相關溶液------

   a) 平衡溶液(equilibration solution)/沖洗溶液(wash solution): 5% ACN (acetonitrile)中含 0.5%TFA (trifluoroacetic acid)
   b) 活化溶液(activation solution): 50% methanol
   c) 溶出溶液(elution buffer): 70% ACN
   d) 潤絲溶液(rinse buffer): 70%中含有 0.1% TFA
3. 其他試劑: 50 mM NH_4HCO_3、0.1% formic acid

<實驗方法>

將回溶於 50 mM NH_4HCO_3 之蛋白質樣品，將胰蛋白酵素以 1:20~1:50(胰蛋白酵素質量:蛋白質量)的比例(甚至過量)加入，混合均勻，以封口膜(parafilm)封緊 microtube 後，置於 37℃水浴槽作用 overnight。再經由 Speedvac 將 NH_4HCO_3 抽乾後，以平衡溶液 50~150 μl 回溶 pellet(劇烈震盪 10 分鐘)，準備 C18 spin columns，先在桌上敲幾下，使粉末得以聚集，取走其紅色上下蓋，置入微離心管內，加入 200 μl 活化溶液離心 1500 xg 1 分鐘，倒去微離心管內的液體，再重覆一次此步驟。加入 200 μl 平衡溶液後離心 1500 xg 1 分鐘，倒去下液，重覆一次此步驟。換一個新的微離心管，將蛋白質樣品加入 column 內，離心 1500 xg 1 分鐘，把微離心管內的液體留起來，再加入 column 中(為確保蛋白質樣品與 column 的徹底結合)，離心 1500 xg 1 分鐘，去掉下液。

加入 200 μl 沖洗溶液離心 1500 xg 1 分鐘，倒去微離心管內的液體後，再重覆一至二次此步驟。最後，再換一個新的微離心管，此新的微離心管先以潤絲溶液沖過以去除雜質，再加入 20 μl 溶出溶液離心 1500 xg 1 分鐘，再重覆一次此步驟，收集兩次溶出的液體共約 40 μl，再經由 Speedvac 抽乾。Pellet 以 0.1% formic acid 徹底回溶，14000 rpm 離心後取上清液分析，可將樣品分一次或多次上機。

3.8.2 質譜(mass spectrometry)結果分析

本實驗使用LC-ESI-MS/MS (Liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry)串聯質譜來進行所有的樣品分析，接著以*SEQUEST*搜尋引擎來比對 *Halobacterium* 的資料庫TPP (Trans-Proteomic Pipeline)分析找到的胜肽可能為何種蛋白所有。*SEQUEST*是一個tandem MS peptide search program，使用已知蛋白質身份的資料庫比對tandem MS所找到的peptide mixture。而TPP為分析LC-MS/MS proteomics data的一種工具，乃一套多功能的module，包含可以確認資料庫搜尋的統計結果，確認蛋白身分，也可作為檢視原始LC/MS資料，胜肽搜尋結果與蛋白質搜尋結果的工具。

3.9 特異性啟動子 DNA 親和純化實驗(Promoter DNA affinity purification)

3.9.1 Halobacterium sp. NRC-1 bop 和 gvpA1 啟動子(promoter)區域構築(cloning)

<實驗材料>(見3.4實驗材料)

1. 設計 *gvpA1* 及 *bop* 啟動子區域引子對(primers)(表三)
2. 引子對 oligo_VNG_28/oligo_VNG_29 (表三)
3. 限制酶 NEB *Bam*HI (20U/ μl)和 fermentas *Pst*I (10U/ μl)及其 10 倍緩衝液
4. 載體 pUC19 與 pSK⁻(圖一 B,C)

<實驗方法>

以TOYOBO KOD-Plus-DNA polymerase和專一引子對進行PCR夾出NRC-1之*gvpA1*及*bop*引子區域(見3.4.1實驗方法)，反應條件為94℃，2分鐘；再以94℃，30 sec；60℃，30秒；68℃，2分鐘(重複30個循環)；最後以68℃，7分鐘及4℃結束反應。將全部PCR產物以Sephaglas BP純化後，進行雙重切割(double digestion)，加入0.5 μl *Bam*HI和*Pst*I限制酶、10倍buffer 10 μl，再補滅菌水至100 μl，反應37℃ 2小時，利用Sephaglas BP純化，以20 μl滅菌水回溶。另取小量製備的載體2~5 μl，加入0.5 μl *Bam*HI和*Pst*I限制酶及10倍buffer 4 μl，補滅菌水至總體積為40 μl進行37℃雙重切割2小時後，加入1 unit之CIAP作用37℃ 5分鐘，再作用50℃ 5分鐘，利用Sephaglas BP純化，以20 μl滅菌水回溶，分別與純化的啟動子DNA區域進行接合(ligation)反應(見3.4.3)，作用於室溫下(約23℃)1個半小時即可，然後轉形至*E. coli* (見3.4.3)。過夜培養後，挑選單一菌落利用位於載體上的VNG28/VNG29引子對，進行PCR篩選，PCR產物跑洋菜膠電泳後將含正確大小DNA的菌落，抽其小量質體，送定序確認(見3.4.4)。

3.9.2 NRC-1 細胞萃取液結合固定相的 DNA 形成 protein-DNA 複合物並進行質譜分析

<實驗材料>

1. Qiagen Hotstar Taq™ DNA polymerase (5U/ μl)與其 10 倍緩衝液、dNTP 和質體 DNA 模板 (pUC19-*gvpA1*，pUC19-*bop*，pSK-*gvpA1* 和 pSK-*bop*)
2. 引子對 oligo_VNG_26 (biotin)和 oligo_VNG_27 (Cy5)(表三)
3. DYNAL beads M-280 Streptavidin (Cat. No. 112.05D)(1 μl 磁珠可結合 1 pmole dsDNA)
4. B&W buffer: 10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA 和 2.0 M NaCl
5. 其他試劑: basal salt solution (見 3.3 實驗材料)、0.1%SDS、50 mM NH_4HCO_3、Promaga Sequencing Grade Modified Trypsin
6. 磁座

<實驗方法>

確認 Streptavidin 磁珠能結合 biotin-DNA:

以 10 倍稀釋過的質體 0.2 μl 為模板進行 PCR，加入 37.8 μl 滅菌水和 Qiagen Hotstar Taq™ DNA polymerase 0.5~ 1 μl，及其 10 倍 buffer 5 μl，10 μM 引子對 oligo-_VNG_26 和 oligo_VNG_27 各 1 μl，2.5 mM dNTP 4 μl，混合均勻後，反應條件為: 95℃；15 分鐘；再以 95℃，30 秒；60℃，30 秒；72℃，30 秒(重複 35 個循環)；最後以 72℃，10 分鐘和 4℃結束反應，反應完畢即可得到兩個 5’端分別標上 biotin 和 Cy5 螢光的啟動子片段了，跑洋菜膠電泳確認大小，並測 $OD_{260/280}$ 推算 DNA 濃度。將 Streptavidin 磁珠搖晃均勻懸浮，取適量磁珠置於磁座 1~2 分鐘，去除上清液，加入等體積之 B&W buffer，輕輕拍彈管壁以懸浮之，置於磁座 1~2 分鐘，去除上清液，加入 2 倍體積之 B&W buffer 懸浮磁珠後，再加入等體積的 biotin-DNA(使最終濃度為 1 倍 B&W buffer)，避光置室溫 30 分鐘，偶爾拍彈管壁混合，置於磁座 1~2 分鐘，取上清液(先留起來)，加入 1 倍 B&W buffer 500 μl 清洗磁珠，置於磁座 1~2 分鐘，去除上清，此步驟再重複一次以徹底洗去未結合的 DNA，以適量 0.1%SDS 懸浮磁珠後，套上防爆夾，置入沸水中煮 5~10 分鐘，再置於磁座 1~2 分鐘，取上清液即含有 biotin 的 DNA，並將磁珠保留起來以便之後追蹤。將原始 PCR 產物，未與磁珠結合的上清液和 elute 過後剩下的磁珠，三者進行洋菜膠電泳，以確認 Streptavidin 磁珠確實能與 biotin-DNA 結合，將膠片以雷射波長 635 nm 激發 Cy5 螢光來偵測。

將 biotin-DNA 與 NRC-1 細胞萃取液反應:

取 30 μl 的 Streptavidin 磁珠，置於磁座 1~2 分鐘去上清後，加入等量體積(30 μl)之 B&W buffer 混合均勻，再置於磁座 1~2 分鐘去上清後，加入原先磁珠的兩倍體積量(60 μl)的 B&W buffer，與同樣體積(60 μl)的 DNA 溶液(約為 30 pmle)，混合均勻，使反應最終濃度為 1 倍 B&W buffer，置室溫下反應 30 分鐘 (過程中為避免磁珠沉澱造成反應不均，應時常敲打管壁混合)，置於磁座 1~2 分鐘去上清，加入 500 μl 1 倍 B&W buffer 均勻懸浮洗去未與磁珠結合之 biotin-DNA 溶液，再加入一次 500 μl 1 倍 B&W buffer，重複清洗，接著將磁珠加入經 french press 處理過的 500 μl wild type

NRC-1 細胞萃取液(如前述)並混合 500 μl 的 basal salt solution 和適量的 PMSF，於室溫下搖晃(25 rpm)作用 2 小時，置於磁座 1~2 分鐘去上清，再以 1 ml basal salt solution 重複徹底清洗 5 次，最後加入 30 μl 0.1%SDS 於 100℃沸水煮 10 分鐘(破壞 biotin-avidin 鍵結)，再置於磁座上，取其上清液。將此上清液加入 500 μl 50 mM NH_4HCO_3 與 0.5 μl trypsin 混勻，於 37℃水浴槽作用 overnight，再經由 Speedvac 抽乾，利用 C18 spin column desalt (見 3.8.1)，40 μl 之 elution 再以 Speedvac 抽乾一次，最後將產物充份回溶在 11 μl 0.1% formic acid 中，14000 rpm 離心取上清液以 LC-MS/MS 分析。

第四章 實驗結果

4.1 NRC-1 Tbp和Tfb轉譯起始點(Translation start site)確認

將從*Halobacterium* Genome網站(http://halo2.umbi.umd.edu/cgi-bin/haloweb/nrc1.pl)找出NRC-1的6個TBP及7個TFB蛋白胺基酸序列，於NCBI blastP分別對於eukarya、bacteria及archaea進行胺基酸序列比對，挑選數個相似性較高的蛋白質，以ClustalW進行多重序列比對(multiple alignment)後，存檔匯入Gene Doc程式呈現，顏色越深者，表示該處保守性越高。為了更清楚辨別，在各物種名稱前標示代號A_代表archaea，B_代表bacteria，E_則代表eukarya。在TBP蛋白質的部分:與NRC-1 TbpA比對的物種，蛋白質名稱及其gi number皆列於附表二A中，圖二A顯示其結果，TbpA比對bacteria因為相似度太低，故不考慮列入比較，觀察各物種的轉譯起始點發現其與archaea的位置較eukarya類似，但是較其他archaea之轉譯起始點M要來得下游約27~29個胺基酸，故往此*tbpA*上游找尋其他起始密碼，發現約87 bp處發現另一個起始密碼的存在，圖二B乃以此新的轉錄起始點重新進行multiple alignment，發現此轉譯起始點更能吻合其他archaea轉譯起始的位置，故由此判斷，往原始*tbpA*上游推算87 bp的地方為真正的轉譯起始點，後續實驗也以此真正的轉譯起始點來構築*tbpA*基因。與NRC-1 TbpB、TbpC、TbpD、TbpE和TbpF比對的物種，蛋白質名稱及其gi number依序分別列於附表二B,C,D,E,F中，分別於圖二C,D,E,F,G顯示各結果，比對bacteria皆因為相似度太低，故不考慮列入多重序列比對，觀察各物種的轉譯起始點發現其與archaea的位置較eukarya類似，且都座落在附近的位置，與其他archaea的轉譯起始點相差不遠甚至幾近相同，其中TbpC之轉譯起始點與其他archaea略有一點差距，但是其附近上下游區域已無其他轉譯起始點的存在，故認為此TbpB、TbpC、TbpD、TbpE和TbpF轉譯起始點為真的起始點，不作修改。在TFB蛋白質的部份，與NRC-1 TfbA、TfbB、TbpC、TfbD、TfbE、TfbF和TfbG比對的物種，蛋白質名稱及其gi number依序分別列於附表二G,H,I,J,K,L,M中，分別於圖二H,I,J,K,L,M,N顯示各結果，比對bacteria皆因為相似度太低，故不考慮列入多重序列比對。相較於TBP的結果，TFB比對各蛋白質轉譯起始

點的位置似乎不像TBP那麼相近，即使在archaea之間都還保有一些差異，但是找尋它們附近上下游區域並沒有其他可能的轉譯起始點存在，故認為此TfbA、TfbB、TfbC、TfbD、TfbE、TfbF和TfbG轉譯起始點為真的起始點，不作修改。

4.2 構築13個*tbp*和*tfb*基因及表現protein A融合蛋白

以 NRC-1 genomic DNA 為模板，KOD 為酵素，配合專一性引子對進行 PCR 反應，將各個 *tbp* 及 *tfb* 基因從轉錄起始點一直到終止密碼前的 ORF 區域放大出來，PCR 產物進行 1%洋菜膠電泳後照射 UV 光，觀察 DNA 片段大小，*tbp* 基因如圖三 A: *tbpA* (新的轉錄起始點)為 300 bp，*tbpB* 561 bp，*tbpC* 546 bp，*tbpD* 561 bp，*tbpE* 561 bp 和 *tbpF* 561 bp；*tfb* 基因如圖三 B: *tfbA* 864 bp，*tfbB* 978 bp，*tfbC* 954 bp，*tfbD* 987 bp，*tfbE* 924 bp，*tfbF* 960 bp 和 *tfbG* 972 bp。

在此用的載體 pNBPA(圖一 A)，大小為 6621 bp，此穿梭載體(shuttle vector)具有 ferredoxin 啟動子序列，*E. coli* 和 NRC-1 的複製原點，幫助在 *E. coli* 中篩選的 ampicillin 抗藥性之 β-lactamase (*bla*)基因，和用來篩選轉形 NRC-1 的 mevinolin (一種 HMG-CoA reductase inhibitors)抗藥性基因，以及包含了部分 protein A 的序列(長度為 273 個胺基酸)，可表現具 protein A Tag 的融合蛋白，便於日後利用 IgG 和 protein A 的親和力來純化。純化前述的 PCR 產物與線性 pNBPA 進行接合後，以 $CaCl_2$ 轉形方式送入 DH5α，牙籤挑選單一菌落為模板，利用載體上專一引子對 103F/102F 和 101R 進行 PCR 確認是否成功轉入，將產物進行 1%洋菜膠電泳後照射 UV 光，圖四顯示結果，正控制組(positive control)以 103F/101R 引子對產生片段 1047 bp (圖四之+)，*tbpA* 以 103F/101R 引子對產生片段 1347 bp，*tbpB* 以 102F/101R 引子對產生片段 1450 bp，*tbpC* 以 102F/101R 引子對產生片段 1435 bp，以 103F/101R 引子對產生片段 1593 bp，*tbpD* 以 102F/101R 引子對產生片段 1450 bp，*tbpE* 以 103F/101R 引子對產生片段 1608 bp，*tbpF* 以 102F/101R 引子對產生片段 1450 bp，*tfbA* 以 103F/101R 引子對產生片段 1911 bp，*tfbB* 以 103F/101R 引子對產生片段 2025 bp，*tfbC* 以 102F/101R 引子對產生片段 1843 bp，*tfbD* 以 102F/101R 引子對產生片段 1876 bp，*tfbE* 以 102F/101R 引子對產生

片段 1813 bp，*tfbF* 以 102F/101R 引子對產生片段 1849 bp，*tfbG* 以 102F/101R 引子對產生片段 1861 bp。將質體送定序確認無誤者，乃於圖四中以編號標示，代號分別如下:*tbpA#1，tbpB#7，tbpC#5，tbpD#6，tbpE#2,4,11,17,19，tbpF#7,8，tfbA#10，tfbB#8,2,9，tfbC#5，tfbD#1,2,3,9,10,12,15，tfbE#5，tfbF#12,13,17 以及 tfbG#8,9*。

將序列無誤之質體轉形至 NRC-1，牙籤挑選單一菌落為模板，利用載體上專一引子對 103F/102F 和 101R 進行 PCR 確認是否成功轉入 NRC-1，如圖五，為 PCR 產物進行 1%洋菜膠電泳的結果，*tbpA#1* 以 103F/101R 引子對產生片段 1347 bp，*tbpB#7* 以 103F/101R 引子對產生片段 1608 bp，*tbpC#5* 以 103F/101R 引子對產生片段 1593 bp，*tbpD#6* 以 102F/101R 引子對產生片段 1450 bp，*tbpE#2* 和#4 以 103F/101R 引子對產生片段 1608 bp，*tbpF#8* 以 103F/101R 引子對產生片段 1608 bp，*tfbA#10* 以 103F/101R 引子對產生片段 1911 bp，*tfbB#2,#9,#8* 以 103F/101R 引子對產生片段 2025 bp，*tfbC#5* 以 103F/101R 引子對產生片段 2001 bp，*tfbD#1* 以 103F/101R 引子對產生片段 2034 bp，*tfbE#5* 以 103F/101R 引子對產生片段 1971 bp，*tfbF#12,#13,#17* 以 103F/101R 引子對產生片段 2007 bp，*tfbG#8* 以 103F/101R 引子對產生片段 2019 bp。載體 pNBPA 也轉形 NRC-1 作為日後的負控制組(negative control)，pNBPA 以 103F/101R 引子對產生片段 1047 bp。圖五中，以編號標示者為 PCR 結果產生預期大小片段的菌落編號，分別如下:*tbpA#1* 之 1,3,4,5,6,7,8,10,11，*tbpB#7* 之 4，*tbpC#5* 之 14，*tbpD#6* 之 3，*tbpE#2* 之 2,3,4,5 和*#4* 之 9，*tbpF#8* 之 5,10，*tfbA#10* 之 1,3，*tfbB#2* 之 2,3,4,7,9，*#8* 之 1,2,3,4,5,6,19 和*#9* 之 1,2,3,4，*tfbC#5* 之 1,2,3，*tfbD#1* 之 15，*tfbE#5* 之 1，*tfbF#12* 之 1,2,3,5,7,8,9,10，*#13* 之 1,2，*#17* 之 2,3,14,16，*tfbG*#8 之 6 及 pNBPA#1,2,3,4,5。

隨機挑數個轉形 NRC-1 成功的菌落，進行西方轉漬法偵測 TBP-/TFB-protein A 融合蛋白表現。圖六，乃取 40~60 μg 之 total protein 進行轉漬後，以 1:30000 之 IgG-HRP 與之反應，壓片的結果。只轉入載體 pNBPA 的控制組表現分子量約為 26 kDa 的 protein A (圖六 A 右二)，修改轉譯起始點之 TbpA-protein A (#1 之 1,5)表現分子量約為 37 kDa 的融合蛋白(圖六 A)，TbpB-protein A (#8 之 10)表現分子量約為 46 kDa 的融合蛋白(圖六 B)，TbpC-protein A (#5 之 14)表現分子量約為 46 kDa 的融合蛋白(圖六 B)，TbpD-protein A (#6 之 3)表現分子量約為 46 kDa 的融合蛋白(圖六 B)，TbpE-protein A (#4 之 9)表現分子量約為 46 kDa 的融合蛋白(圖六 B)，TfbA-protein A (#10 之 1)表現分子

量約為 57 kDa 的融合蛋白(圖六 C)，TfbB-protein A (#8 之 1,19)表現分子量約為 62.5 kDa 的融合蛋白(圖六 D)，TfbC-protein A (#5 之 3)表現分子量約為 62.25 kDa 的融合蛋白(圖六 C)，TfbD-protein A (#1 之 15)表現分子量約為 62.2kDa 的融合蛋白(圖六 C)，TfbE-protein A (#5 之 1)表現分子量約為 59.6 kDa 的融合蛋白(圖六 C)，TfbF-protein A (#12 之 2,7,10，#13 之 1,2，#17 之 2)表現分子量約為 61.6 kDa 的融合蛋白(圖六 E)，TfbG-protein A (#8 之 6)表現分子量約為 62.9 kDa 的融合蛋白(圖六 C)。以上融合蛋白的大小比對右邊的 protein marker，即可得知這些蛋白皆位於預期的大小上，作為控制組的 WT (wild type) NRC-1 和只送入載體表現 protein A 的 NRC-1，雖然在 55-72 kDa 位置上有產生微弱的 background，但此 background 依據經驗是可以經過多次 wash 而洗掉的非專一性結合。整體看來，Tbp 較 Tfb 融合蛋白的表現要強，表現弱的 TfbB 及 TfbF 則多挑選不同的 NRC-1 轉形株(transformants)作確認，發現與 Tbp 融合蛋白相比的確表現都弱了些，但是壓片還是看得出來有專一的訊號。另外，Tfb 也比較容易產生非專一性的訊號，例如 TfbC 及 TfbD。

4.3 Pull down TBP/TFB-protein A 蛋白質複合體

4.3.1 比較以電動式高壓破碎裝置(French press)和超音波細胞粉碎機(Sonicator)製備細胞萃取液的差異

因為轉錄因子必須先結合在特定的 DNA 序列上，再吸引其他因子前來結合，故要找出 NRC-1 TBP-TFB 的結合關係，DNA 的存在是必要的，在製備細胞萃取液時，不適合加入 DNase 來水解 DNA，但又需克服細胞破裂後染色體聚集導致的黏稠現象，故採用其他斷裂 DNA 的方式。在這裡選取 TbpC 做試驗，將 500 ml 的 TbpC (#5 之 14) NRC-1 轉形株菌液經電動式高壓破碎裝置 16000 psi 壓力破碎細胞三次，或超音波粉碎 20 秒 5 次，或 20 秒 7 次，或 20 秒 15 次，各取其上清液之後，進行 1%洋菜膠電泳結果如圖七。產生的 DNA/RNA 片段大小由大到小為超音波粉碎 20 秒 5 次 > 超音波粉碎 20 秒 7 次 > 超音波粉碎 20 秒 15 次 > 電動式高壓破碎裝置，電動式

高壓破碎裝置能使細胞破碎的最完全產生最均勻的 DNA 片段，片段大小範圍在 1kb 以下，大部分都分布在 500 bp 以下的範圍，而隨著超音波粉碎的次數增加，大分子量的片段(>3kb)也隨之減少，但是即使達到了 20 秒 15 次的頻率(菌液外觀已經起泡且不黏稠了)，仍然無法產生像電動式高壓破碎方式般均勻大小的片段，在 1-2 kb 的位置上仍存在可能為完整的 16S 及 23S rRNA，由此可見，在此情形下電動式高壓破碎裝置對於破碎 NRC-1 細胞有較佳的效果。

取這四種不同處理 NRC-1 TbpC 轉形株的細胞萃取液進行 pull down 實驗，各進行二重複，經 LC-MS/MS 分析，利用 *SEQUEST* 比對 *Halobacterium* 的資料庫得到的結果，其中只採納符合 protein probability(P)≧0.9 和 peptide probability(p)≧0.9 的蛋白來進一步分析(表五)。表格中的 T 代表 total peptides，為該蛋白被找到 p≧0.9 以上 peptides 的個數，U 代表 unique peptides，表示在這些所找到的胜肽中的 unique peptides 個數。在此僅列出幾個與轉錄作用可能相關的蛋白，另外也列出幾次 MS/MS 下來常見的蛋白，表示它們在細胞內屬於含量較高的蛋白質，可以讓我們做為一個參考，包括 ThsA、ThsB 和 Csg 等(見附表三)。由表格看出這四種不同處理產生的結果並沒有很大的差異，都有找到應該有的 TbpC 和 protein A，且不論是在電動式高壓破碎及超音波粉碎方式有被找到幾個與轉錄相關的蛋白，例如 RpoA、Trh4 和 NusG 等。由於分析結果顯示並沒有明顯差異，加上以電動式高壓破碎方式製備細胞萃取物能得到最均勻的 DNA/RNA 片段，故之後製備的細胞萃取液都將採用電動式高壓破碎方式來進行。

以下用來進行 pull down 實驗的 NRC-1 轉形株編號分別為: *tbpA#1* 之 5，*tbpB#7* 之 4，*tbpC#5* 之 14，*tbpD#6* 之 3，*tbpE#4* 之 9，*tbpF#8* 之 10，*tfbA#10* 之 1，*tfbB#8* 之 2，*tfbC#5* 之 3，*tfbD#1* 之 15，*tfbE#5* 之 1，*tfbF#13* 之 2 及 *tfbG#8* 之 6。

4.3.2 以銀染偵測 pull down 得到的蛋白複合物

以低鹽 TS 溶液 pull down wild type 及含 pNBPA 的 NRC-1，和具有 TBP 或 TFB-protein A 融合蛋白的 NRC-1 轉形株之細胞萃取液後，取 pull down 產物的 1/8 至 1/10 體積的量之蛋白進行 SDS-PAGE，再將蛋白質複合物進行銀染。結果如圖八，

圖八 A 顯示 TBP-protein A 抓到的蛋白質複合物，TbpB、C、E 和 F 明顯有表現預計約 46 kDa 之融合蛋白(但 TbpF 表現較微弱)，TbpA 應該表現 37 kDa 的融合蛋白，由結果看來，並沒有被染出來，但在之後 MS/MS 的結果中的確有找到 TbpA-protein A 的存在。另外，TbpD 雖然有出現明顯的蛋白訊號，但是相較於其他同樣為 46 kDa 的 TBP 融合蛋白，位置似乎偏大了一些，但在之後 MS/MS 的結果中也的確有找到 TbpD-protein A 的存在。而 pNBPA 推測是因為訊號過低，不足以在銀染中看見，這符合在西方轉漬實驗中，protein A 訊號微弱的現象。除了融合蛋白本身的表現外，有些樣品也能看到些許不同大小的蛋白質。在 TFB-protein A 方面(圖八 B)，則看到可能是 TfbF 和 TfbD 的蛋白出現在預期位置 61-62 kDa 處，但是相當微弱，另外，TfbF 和 TfbC 皆看到其他分子量較大的蛋白質，有可能是其它組成此蛋白複合物的成員之一。TfbA、TfbE、TfbG 和 TfbB 融合蛋白則是幾乎看不到或訊號非常微弱。而 TfbE 在預計的大小 59 kDa 也看不到訊號，但卻也能看見其他分子量較小的蛋白。以上這些目前用銀染方式看不出來表現的蛋白，取另一部分 pull down 樣品以質譜分析的結果中，確認它們的確是有表現的(TfbA 除外)。

4.3.3 質譜分析中樣品交叉汙染問題及質譜結果分析原則

此計劃乃為探討高鹽古生菌NRC-1轉錄因子TBP及TFB的關係，採用的是Amersham Biosciences IgG Sepharose™ 6 Fast Flow商品，預測可抓住TBP-或TFB-protein A融合蛋白，再伴隨著其他因子與這些轉錄因子的結合，將整個轉錄相關之蛋白複合物抓下來，進而以質譜分析其中組成。但是商品有其最適作用條件(適用之緩衝液，這些條件須調整才能符合本實驗所用之物種*Halobacterium* sp. NRC-1的細胞內狀況，故本實驗採用數種不同的條件進行pull down實驗，為的是找出模擬最相近於其生理狀態下的情況，pull down總共分三種條件處理(如表四): Condition I----同原廠建議的低鹽TS (150 mM NaCl和50 mM Tris-HCl) 緩衝液，Condition II----將原廠建議的緩衝液濃度作修改，為高鹽TS (4 M NaCl和50 mM Tris-HCl)，其中4 M NaCl組成與NRC-1培養液中的鹽度相同，Condition III----直接以近似於NRC-1培養液的basal salt solution (BSS)進行實驗。

另一個仍需待解決的問題為樣品交叉污染問題，即在質譜分析上，因為前一個樣品的殘留而導致干擾下一個樣品的分析，在此舉例說明。目前準備上機的樣品有(回溶於 0.1% formic acid) TfbB、TfbC、TfbD、TfbE、TfbF 和 TfbG 五個，為證明樣品污染問題的確存在，於 TfbB、TfbD 和 TfbF 中各加入經 trypsin 處理過的 BSA 0.2 μg，如果有樣品汙染問題，就可以分別在 TfbC,TfbE 和 TfbG 中發現 BSA 的存在，MS/MS 分析擷取部份結果如表六，可以得知樣品的確彼此交叉污染，以 total peptides 個數來說，在 TfbC 中找到的 BSA 胜肽個數約為 TfbB 找到個數的 11%，在 TfbE 中找到的約為 TfbD 的 9%，在 TfbG 中找到的約為 TfbF 的 22%，故此資料顯示，最多可能達 1/5 以上的樣品殘留至下一輪，所以本實驗之相關分析，若產生樣品污染的疑慮，將以 22%做為一篩選標準，即若找到的某胜肽個數超過上一個樣品找到個數的 22%，將被我們認為是較可信的，而不是污染得來的，如此便可以分析究竟在表六中 TfbD 中找到的 TfbC 或在 TfbG 中找到的 TfbF 是真是假，以此前提判別，相信可得到較為客觀的結果。

另外，pull down WT NRC-1 與含 pNBPA 質體的 NRC-1 轉形株之目的，乃為了將兩者找到的蛋白當作背景值參考，若 TBP 或 TFB-protein pull down 也找到相同的蛋白，那麼這些蛋白將會被排除掉，或是將其 normalize 看有無較背景更為突出的表現。而 normalize 的方式如下:

$$\frac{\text{“X peptide” no.}}{\Sigma \text{P/p} \geq 0.9 \text{ peptide no.}} \text{ X 100\%}$$

在 P≧0.9，p≧0.9 條件下，將某 X protein 找到的 peptide 個數除以當次質譜實驗找到的所有 peptide 個數，乘上百分比，將實驗組數值與控制組作比較，以辨別某蛋白是否只是一個背景(background)，而非真正參與的蛋白。以下針對各個不同的細胞萃取液(WT、P、TBP 及 TFB)的 pull down 結果分析: 表格中 T 和 U 乃該 protein 找到的 total peptide number 及 unique peptide number，而總和的”total peptides (-pA)”代表的是該次質譜結果扣除 BSA 及 protein A 找到的所有 peptide 個數，”total proteins”指的是該次質譜找到的所有蛋白質個數(種)，表中標示的百分比，為 normalize 後的結果。若有上一個樣品汙染的疑慮在表中則用分數表現，分母代表上一個樣品打到該蛋白的

peptide 個數，故分子數值必須超過分母的 22%，才會被認為有意義，而扣除這 22%後的所剩的胜肽個數，才會拿來進行下一步的 normalization。

4.3.4 NRC-1 TBP/TFB-protein A pull down，以質譜分析各蛋白複合物組成

以 wild type NRC-1 及轉形株 pNBPA 進行 pull down 之結果作為背景參考蛋白

表七 A 為 NRC-1 wild type (WT)細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。低鹽 TS (Condition I)與高鹽 TS (Condition II 和 III)結果有相當的差異，高鹽環境下找到較多的 RNA 聚合酶單元(RNA polymerase subunits (Rpo))，也看到 TbpB 和 TbpE 這兩種轉錄因子存在於背景中，為了後續實驗比對，將 Condition II 之 TbpB 和 TbpE normalize 後結果分別為 0.8%及 1.4%，而 Condition III 之 TbpB 和 TbpE normalize 後結果分別為 1.2%及 5.4%。表上又列出幾個表現量較高的蛋白質(如 ThsA、ThsB 和 Csg 等)，以利對照。比較兩種條件，可以發現 Condition I 打到的 peptide 個數太少，可能是上機的樣品量不夠的緣故。表七 B 為 NRC-1 pNBPA 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。在 Condition II 及 III 條件下同樣找到 TbpB 和 TbpE，將 Condition II 之 TbpB 和 TbpE 經 normalize 後分別為 0.2%與 0.8%，而 Condition III 之 TbpB 和 TbpE normalize 後結果分別為 1.6%和 3%。如同 wild type 一樣，高鹽環境下找到很多 RPO 蛋白。

TbpA pull down 的蛋白複合物中，含有 TbpE 存在 (Condition I 和 II)

表七 C 為 NRC-1 *tbpA* 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。Condition I,II,III 下皆找到了 TbpE，特別是 Condition II 在經 normalize 後 TbpE 佔 2.6%，較相同 condition 下之 WT (1.4%)和 P (0.8%)來的高。另外，Condition II 和 III 找到的 TbpB 以及 Condition III 找到的 TbpE，其 normalize 後皆較背景 WT 或 pNBPA 要來得低，故可能只算是 background 蛋白。高鹽條件的 Condition II 可找到 8 種 RNA 聚合酶單元，Condition III 也發現 6 種 RNA 聚合酶單元，相對於低鹽的 Condition I 來說明顯不同。

TbpB pull down 的蛋白複合物中，含有 TbpF 存在 (Condition I 和 II)

表七 D 為 NRC-1 *tbpB* 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。Condition I,II 之下皆找到 TbpF，都是背景(background)未發現的蛋白，且低鹽狀態下找到的 TbpF 相當多，顯示 TbpB 和 TbpF 的交互作用在高鹽環境可能會發生，但在低鹽環境下更為明顯。在低鹽 Condition I 找到的 TbpE，因 peptide 數量超過前次樣品的 22%，故應非前一個樣品交叉汙染造成的。Condition III 則沒有較明顯的結果。

TbpC pull down 的蛋白複合物中，含有 TbpB 存在 (Condition III)

表七 E 為 NRC-1 *tbpC* 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。Condition III 下找到 TbpE 及 TbpB，兩次質譜分析的 TbpE 經 normalize 後，皆較背景值低，而其中一次找到的 TbpB normalize 後為 2.5%比背景值 1.6%高。同樣的，找到 5 種 RNA 聚合酶單元。

TbpD pull down 的蛋白複合物中，含有 TbpB 存在 (Condition I 和 III)

表七 F 為 NRC-1 *tbpD* 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。在低鹽 Condition I 下排除樣品汙染的因素後，找到 TbpE 和 TbpB 兩個在背景中未發現的蛋白。而 Condition II 也找到同樣的兩個轉錄因子，其中 TbpE 經 normalize 後已被排除，而 TbpB 則可能是受前一樣品汙染才會被偵測到。Condition III 下找到 tbpB 及 tbpE，其中 TbpB 經 normalize 後數值比背景值高，被認為是有意義的結果。另外，高鹽環境(II，III)找到至少三種與轉錄有關的 RNA 聚合酶單元。

TbpE

表七 G 為 NRC-1 *tbpE* 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。在低鹽 Condition I 找到的 TbpB、TbpD 和 TbpF 因為樣品汙染的疑慮而被排除，Condition II 和 III 找的 TbpB normalize 後分別為 0.3%和 1%，皆較背景值低，也被排除了。

TbpF pull down 的蛋白複合物中，含有 TbpB 和 TbpD 存在 (Condition II)

表七 H 為 NRC-1 *tbpF* 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。Condition I 和 III 找到有意義的 TbpE，而在 Condition II 發現的 TbpE 則經 normalize 後被排除。

在 Condition II 和 III 下找到了有意義的 TbpB，其中 Condition II 找到的 TbpB normalize 後為 2.4%，明顯高出背景的 0.8%，而 Condition III 的 TbpB normalize 後為 6.8%也較背景的 1.6%高出許多，此結果與在 TbpB pull down 實驗中同樣找到 TbpF 相互對應。值得注意的是，發現一個與轉錄調節有關的蛋白 Trh2 (Q9HQ80)，和 4 種 RNA 聚合酶單元，或許也參與在 TbpF 調控基因表現的機制中。

TfbA pull down 蛋白中，沒有找到 TfbA 本身

表七 I 為 NRC-1 *tfbA* 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。不論是在哪一種條件下，三次 pull down 實驗皆找不到 TfbA 本身，但卻能打到與 TfbA 融合的 protein A，究竟是沒有表現，表現量太低或實驗技術上的問題，仍尚待解決。發現的其它 Tfb 蛋白，如 TfbB、TfbC、TfbD 和 TfbF 也都被歸於前面樣品汙染的原因。在 Condition I 找到的 TbpE，也因為 TfbA 本身沒有被找到使兩者間的關係也無法確定。

TfbB pull down 的蛋白複合物中，含有 TbpE 和 TfbC 存在 (Condition I)

表七 J 為 NRC-1 *tfbB* 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。Condition I 中找到了 TbpE 及 TfbC，但 TfbD 和 TfbF 被認為是汙染的結果，另外，在 Condition II 中找到的 TfbC 及 TfbD 也都可能為樣品汙染的結果，TbpE 則經過 normalize 後被排除。也有 5 種 RNA 聚合酶單元在此被找到。

TfbC pull down 的蛋白複合物中，含有 TbpE、TfbD 和 TfbF 存在 (Condition I)

表七 K 為 NRC-1 *tfbC* 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。其中一個 Condition I 中找到 TfbD 及 TfbF 與 TfbC 有結合的可能，因找到 peptide 的個數皆為前一次樣品找到的 22%以上，另外也有可能包含 TbpE 參與其中。Condition II 找到的 TfbD 則被歸為汙染所得來。

TfbD pull down 的蛋白複合物中，含有 TbpE 和 TfbC 存在 (Condition I)

表七 L 為 NRC-1 *tfbD* 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。在

Condition I 裡找出可能與 TfbD 結合的蛋白 TbpE 和 TfbC(和前述之 Condition I 裡，TfbC 也找到 TfbD 呼應)雖然有可能有汙染問題，但是找到的 peptide 個數都在前一個樣品的 22%以上，所以被認為有其意義。相反的，Condition III 找到的 TfbC 和 Condition I 找到的 TfbE 和 TfbF 是被忽略不取的。

TfbE pull down 的蛋白複合物中，含有 TbpE 存在 (Condition II)

表七 M 為 NRC-1 *tfbE* 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。在 Condition II 找到的 TbpE 經 normalize 後得到 1.6%，較 WT 1.4%要高，顯示 TfbE 和 TbpE 可能有一個 partnership 的關係，另外，在 Condition III 同樣也發現 TbpE，經 normalize 認為其應為背景蛋白。而 Condition I 找到的 TfbC、TfbD 和 TfbF 則有汙染的問題而不列入考量。

TfbF pull down 的蛋白複合物中，含有 TbpE 存在 (Condition I)

表七 N 為 NRC-1 *tfbF* 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。除了用 Condition I 找到的 TbpE 之外，其他找到的 Tfb 蛋白皆被歸類為樣品汙染，如 TfbE 和 TfbG。Condition III 也找到 tbpE，但 normalize 後的數值較背景低。

TfbG pull down 的蛋白複合物中，含有 TfbD、TfbF 和 TbpE 存在 (Condition I)

表七 O 為 NRC-1 *tfbG* 轉形株細胞萃取液經 pull down 後，質譜分析的結果。在 Condition I 實驗的條件下，發現了 TbpE，TfbD 及 TfbF 可能包含在此蛋白複合物中，尤其是 TfbF，扣除掉可能從前一個樣品帶下來的 22% 的 peptide 後，還有約 14 個胜肽參與其中，顯示 TfbG 和 TfbF 結合的可能性是相當大的。Condition II 和 III 下也發現 TbpE，在 normalize 後分別為 0.6%和 1%皆較 background 來得低，也忽略不計。

以上的 pull down 實驗找出 NRC-1 轉錄因子間的可能關係整合如圖十二。

4.4 增加樣品間的清洗時間可避免質譜樣品交叉污染問題

為了解決樣品間的交叉汙染問題，此實驗增加兩樣品間清洗的時間，並同樣的以 BSA 檢測是否殘留在下一個樣品中。準備上機的樣品(回溶於 0.1% formic acid)依上機順序排列為 TbpA、TbpB、TbpC 和 TbpD 四個，於 TbpA 和 TbpC 中各加入經 trypsin 處理過的 BSA 0.2 μg。不同的是，在進行下一個樣品之前，將原本洗 10 分鐘的 wash program，改成安插與本實驗無關的三個樣品，然後才跑我們的下一個樣品。結果如表八，TbpA 找到 101 個 BSA 胜肽，TbpB 經過中間安插三個樣品後才排進來跑，結果並沒有發現 BSA 的殘留，同樣的，TbpC 找到 131 個 BSA 的胜肽，也沒有留在 TbpD 中。這樣可以幫助我們清楚的判別結果，例如表中 TbpC 找到的 TbpB 並非來自前一個 pull down 樣品，TbpD 找到的 TbpE 也不是來自於 TbpC。故之後質譜的進行，將會以此洗滌模式，去除掉不必要的干擾。

4.5 特異性啟動子 DNA 親和純化實驗結果

4.5.1 Streptavidin 磁珠可有效結合 biotin-DNA

Halobacterium 在細胞膜上會產生 purple membrane，由 bacteriorhodopsin (BR)所構成，BR 是 bacterio-opsin 和 chromophore retinal 由 1:1 組成的蛋白複合體，其角色為細胞膜上的質子幫浦(proton pumping)。在有氧的情況下，*Halobactrium* sp. 藉由 trichloroacetic (TCA) cycle 合成 ATP [5]，在無氧的情況下，ATP 的合成可藉由發酵 arginine 合成[39]和光合成[40]兩種途徑達到。*Halobactreium* sp. NRC-1 可藉由光誘導 BR 產生 proton pumping 間接促使 ATP 製造，且處於強光下及低氧分壓下，使得 BR 在指數期晚期(late exponential)到靜止期(stationary phase)會被高度誘導表現[41]。在 NRC-1 bacteriorhodopsin 蛋白由 *bop* 基因所編碼(encoded)，位於 *bop* 附近的 *brp*、*bat*、*blp* 和 *crtB1* 等也被認為是與 chromophore、基因調控和 purple membrane 的合成有關[42]，其中 *brp* 和 *bat* 以操作組(operon)的形式來調控 *bop* 基因表現。*bop* 基因的啟動子區域包括 TATA box 和 UAS (upstream activator sequence)，而 UAS 目前已知為 Bat 結合的位置[43, 44]。

Gas vesicles 是一種中空可漂浮的蛋白質，由一群 *gvp* 基因編碼(encoded)，功用在於幫助 NRC-1 菌體在鹽水中漂浮起來，以增加陽光和氧的接觸面。在位於 pNRC100 的 gas vesicles 的基因群(gene cluster)中，GvpA (GvpA1)和 GvpC (GvpC1)為構造蛋白(structure proteins)，GvpD (GvpD1)和 GvpE (GvpE1)為轉錄調節蛋白(transcription regulators)[45-47]。而 GvpA 和 GvpC 為表現量最多的 gas vesicle 蛋白，於早期的指數期即被誘導表現出來[46]。故藉由 purple membrane 和 gas vesicles 的生成，可使菌體浮在水面上並接受光照經由 BR 間接產生 ATP 幫助生長。然而後續實驗希望能針對 *bop* 及 *gvpA1* 啟動子區域找出調控的基礎轉錄因子。

將 *gvpA1* 及 *bop* 基因之啟動子區域分別為 102 bp 和 166 bp 以 PCR 放大出來，其中 *gvpA1* 啟動子區域包括 TATA-box 及 BRE，*bop* 啟動子區域包括 TATA-box 及 UAS 區域(圖九)，PCR 產物進行 1%洋菜膠電泳後照射 UV 光，觀察 DNA 片段大小(圖十 A)。將此 DNA 片段以載體 pUC19 或 pSK$^-$接合後送入 *E. coli*，以 oligo_VNG_28/29 引子對挑取單一菌落為模板進行 PCR，跑 1%洋菜膠電泳結果如圖(圖十 B)，以載體 pUC19 或 pSK$^-$單獨 PCR 作為正控制組(positive controls)，分別產生 185 bp 和 311 bp 的片段大小，以不加入任何模板 DNA 作為負控制組(negative control)。以 pUC19-*gvpA1* 的菌落做為模板產生 287 bp，以 pUC19-*bop* 的菌落做為模板產生 351 bp，以 pSK$^-$-*gvpA1* 的菌落做為模板產生 413 bp，以 pSK$^-$-*bop* 的菌落做為模板產生 477 bp。三角形標示者為 PCR 結果產生預期大小片段的菌落，各挑選數個送定序，定序無誤者菌落標示為: pUC19-*gvpA1*#6,7，pUC19-*bop*#1,2,3，pSK$^-$-*gvpA1*#8,9，pSK$^-$- *bop*#5,6,7。

選取 pUC19-*gvpA1*#6，pUC19-*bop*#1，pSK$^-$-*gvpA1*#8，pSK$^-$- *bop*#5，載體 pUC19 和 pSK$^-$以 biotin-oligo_VNG_26/Cy5-oligo_VNG_27 引子對進行 PCR 後，產生 DNA 長度分別為 244 bp、308 bp、370 bp、434 bp、142 bp 和 268 bp，測試這些 biotin-DNA 是否能成功固定在 Streptavidin 磁珠上。如圖十一，以雷射 635nm 激發 Cy5 螢光的結果，包含原始 PCR 產物，與磁珠鍵結的溶出液(elutent)或未能與磁珠鍵結的 DNA 上清液(supernatant)及溶出過後的磁珠。由此得知大部分加入的 biotin-DNA 都可以與 Streptavidin 磁珠結合，並由加熱釋放出來，少部分的 biotin-DNA 尚存留在上清液中，未能與 Streptavidin 有效鍵結，且雖然之後煮沸的步驟使得大部分的 biotin-DNA 能釋放出來，但是仍有一小部份仍然不免殘留在磁珠上。

4.5.2 以質譜找尋結合於 gvpA1 和 bop 啟動子上的可能調控蛋白

為了分析結合在啟動子上的蛋白，我們將實驗分為四組，包括 pUC19、beads、pUC19-*gvpA1* 和 pUC19-*bop*，前兩組為控制組，pUC19 組代表僅以 pUC19 為模板產生的 PCR 產物進行實驗，而 beads 組代表其不含有 DNA 固定其上，僅和細胞萃取液反應的磁珠作為控制組，其他兩組則是將固定於磁珠上的 biotin-DNA 和 wild type NRC-1 細胞萃取液混合反應後，經過一連串沖洗純化步驟，將溶出之蛋白複合物以串聯式質譜 LC-MS/MS 分析其組成。結果如表九，控制組 beads 和 pUC19 找不到任何與轉錄相關的調控因子，而在 pUC19-*gvpA1* 和 pUC19-*bop* 組則發現了轉錄調控子 Trh5 (Q9HNV9)和 SirR (Q9HRU8)(Transcription regulator)的存在。顯示此兩種轉錄調控子，對於 *gvpA1* 和 *bop* 啟動子區域可能有調控功能。但是在這一次的結果中，*gvpA1* 並沒有發現 Tbp 或 Tfb 蛋白的存在，*bop* 也沒看到可能與其啟動子序列結合的 Tbp 和 Bat 蛋白，故尚須進一步實驗探討。

國立陽明大學 NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY

第五章 討論

5.1 融合蛋白表現量差異

由西方轉漬法偵測 protein A 融合蛋白表現量的實驗中，發現 TBP 皆較 TFB 有較強的訊號，原因可能是因為雖然 TFB 為基礎轉錄因子，但是當過量表現的時候，如果非必要並不是細胞樂見的事，所以表現量有可能被細胞本身所抑制，因此我們也推測，在 NRC-1 中 TBP 可能較 TFB 來的普遍，從表一中也可窺出 NRC-1 基因體擁有多個相同的 *tbp*，有的甚至高達 4 個，而每個 *tfb* 基因卻都只擁有一個。

將 pull down 產物進行銀染偵測表現時，不論是融合蛋白本身或它們所交互作用的蛋白質，TBP 融合蛋白 pull down 皆較 TFB 融合蛋白 pull down 要多，這也可能是因為 TFB 長度較 TBP 長而在構造上影響了 protein A 和 IgG 的結合。銀染 TFB 部份只能看到 TfbC 及 TfbF 的訊號(比對它們在質譜分析中被找到的胜肽個數是相吻合的，TfbC 和 TfbF 的確是在 TFB 中找到本身胜肽個數最多的兩個蛋白)。銀染實驗中，修改轉譯起始點後的 TbpA 融合蛋白預期大小為 37 kDa，但卻染出約介於 45-60kDa 的蛋白，由之後 MS/MS 結果推斷，其最有可能是分子量為 49.9 kDa 的 G9abT，除了大小符合之外，G9abT 在 MS/MS 的結果中也共找到 9 個胜肽，甚至比在細胞內屬於高含量的蛋白 Csg 和 ThsA 要來的多。有很多蛋白雖然銀染看不出其訊號，但是卻能從更敏感的質譜或西方轉漬的方法找到。

5.2 不同實驗條件對 pull down 實驗之影響探討

雖然在本實驗中採用三種不同鹽濃度之 TS 緩衝溶液進行 pull down，但對於 IgG sepharose beads 之最適條件於嗜鹽菌之生理情況有相當的衝突，建議使用的低鹽 TS buffer，與後來嘗試的高鹽 TS buffer，其 pull down 效果有很明顯的不同，暫且不討論哪一種方式找到較多轉錄相關蛋白，從必須要抓下的 protein A 融合蛋白來說，用高

鹽 TS (Condition II，III)抓下來的 TBP/TFB-protein A 比例明顯少了很多，顯示雖然高鹽較能符合我們的實驗需求，但是卻可能阻礙 IgG 和 protein A 的結合，使得後續找到可能與轉錄因子結合的蛋白也會減少。雖然在本實驗使用高濃度的 NaCl 4M 想要模擬嗜鹽菌的生長環境，但是其實在細胞內存在的是 4 M 濃度的鉀離子，且 Tfb 蛋白具有鋅手指區域(Zn-finger domain)，或許在其蛋白與蛋白之間的交互作用(protein-protein interaction)上，需要 Zn^{2+}或其他離子的輔助。

另一個實驗上的問題是，製作細胞萃取液採用電動式高壓破碎法取代超音波細胞粉碎法，算是能夠打破細胞又可以使 DNA 斷裂的劇烈方式，或許可能破壞原本為數不多的 protein-protein interaction 卻也無從得知，可以參考在打破細胞前利用 cross-linking 的方式將細胞內多數蛋白質與 DNA 固定，增加找到另一群轉錄因子的機率。

5.3 質譜結果討論

5.3.1 找出每一組 TBP-TFB 對有其困難性

Pull down 下來的 protein A 融合蛋白如果不考慮以上所討論的鹽度問題，和劇烈的打破細胞的問題，那麼假設 IgG 與 protein A 結合的效率相當高，如果要能找到與 TBP 或 TFB 配合的轉錄因子，必須盡量克服以下問題: 1) pull down 下來的融合蛋白 TBP 必須結合在 DNA (TATA box)上，就機制上來說，TBP 先結合 DNA 後才能吸引 TFB 結合 BRE，且 TFB 與 DNA 的結合也可以幫助穩固 TBP-TATA box 構造，故如果抓下來的融合蛋白是自由狀態的，可能就找不到另一個轉錄因子。2) 轉錄因子結合 DNA 的情況是動態的，並不是隨時隨地都在發生，所以除非利用非常大量的細胞萃取液進行實驗，否則將細胞 cross-linking 可能還是有其必要性。3) 雖然實驗在 NRC-1 內過量表現 TBP 或 TFB 融合蛋白，但菌體本身當然也有內生性的 TBP 或 TFB 存在，這些內生性蛋白可能和外送表現的融合蛋白競爭 partner，於是要找到與融合蛋白作用的其他轉錄因子的機會就更小了些。4) pull down 下來的融合蛋白並不多，在經過

一連串的實驗過程，包括沖洗、去鹽、酵素水解和回溶等等繁瑣的過程中，可能就損失了一部分，對於本來就含量很少的蛋白質，便很難被找到。5) 理論上，6 種 TBP 和 7 種 TFB 最多可以找到 42 種 TBP-TFB 的配對組合，不同的配對組合在不同的需求下調控不同類型的啟動子序列，實驗中都採用培養於 37℃且生長處在指數期的菌液，那麼某些在特殊環境下才會啟動的基因，其調控蛋白就比較難被找到了，所以除了鹽濃度的調整之外，或許利用不同的培養條件，有助於找出其他 TBP-TFB 組合。6) 在此構築的 protein A 部份序列，表現約 26 kDa 蛋白，而實驗中最小的 TbpA 也只有 7 kDa，最大的 TfbG 為 36 kDa，故 protein A 對 TBP 和 TFB 蛋白來說並不算小，然而這樣的融合蛋白是否仍能保有原本的構形，不影響與其他蛋白之交互作用，仍有些疑慮，或許可以利用分子量較小的 His tag 取代 protein A 的功能，把影響降到最低。

5.3.2 pull down 結果分析討論

在 TfbA 進行多次的質譜分析卻連一個胜肽都找不到，但是可以找到不少 protein A 的胜肽顯示至少它是有表現的，問題可能是 TfbA 的部份造成 trypsin 不好切的關係，但觀察 TfbA 的胺基酸序列，能被 trypsin 辨認的位置並不會少，利用 protein hydrophobicity plot 分析其整條胜肽鏈的親疏水性，也沒有發現高度疏水的地方。觀察質譜結果，雖然多數 TFB 蛋白都比 protein A 來得長，但是找到 TFB 本身的 peptide 個數幾乎都會比 protein A 來得少很多。預計以更大量的細胞萃取液及更多的 IgG sepharose beads 進行 pull down 實驗，或許能增加原本少量 TfbA 被找到的機會。

TbpE 在幾乎每個質譜的結果都存在，顯示在 NRC-1 中此轉錄因子扮演重要的角色。比較特別的是在 Condition II 和 III 的 wild type 與 pNBPA pull down 結果找到的 TbpE，在 Condition I 中都沒發現，比較 wild type 在三種狀況下找到的胜肽總數及蛋白種類，Condition I 明顯找到的胜肽很少，Condition I 中的 pNBPA 其找到機率 p 大於 0.9 以上的個數幾乎是零，所以這部份結果在此沒有呈現出來，故 TbpE 在 Condition I 的背景中有可能存在，或許是操作技術上的問題才會造成質譜結果不佳，這一部份實驗還需要重複進行再確認結果。

觀察在低鹽(Condition I)及高鹽(Condition II,III)條件下pull down的結果，大部分的交互作用都是由Condition I的條件被找到，原因可能是，低鹽濃度是最適於IgG與protein A結合的環境，比例上常常都可以找到較多的融合蛋白的胜肽，故能發現其他蛋白的機率當然也就比較高。雖然生長在高鹽度的環境下，或許某些在NRC-1中protein-DNA結合的關係並非如前所述都需要高鹽，NRC-1 TBP與DNA的結合如前所述，因為含有帶正電的glutamic acid的關係，在高鹽環境下有助於此結合，對於TBP pull dwon實驗來說，除去和TbpE可能為background的部分不計，找到可能有交互作用的蛋白在Condition I和II有些許一致的結果，例如pull down TbpB找到TbpF，TbpA找到多量的TbpE，值得注意的是TbpA只具有單一個C端區域，大小只有其他Tbp的一半而已，故TbpA或許需藉由與TbpE dimerization來執行其功能。但是目前則沒有文獻針對嗜鹽菌認為其TFB與DNA結合需要高鹽環境，可能這也是在本實驗找到與TFB結合的蛋白都是在Condition I下找到為主的原因之一。另外，用高鹽pull down實驗有個非常有趣的現象，就是可以找到相當多的RNA聚合酶單元(Rpo)，這些Rpo蛋白在Condition I下卻都沒有出現，顯示鹽度會影響RNA聚合酶與其他蛋白質的交互作用，在Condition II的條件裡，只要找到Rpo蛋白，也可以找到其他的轉錄因子(最多為TbpE)，顯示RNA聚合酶和轉錄因子結合需要高鹽度的可能性，至於為什麼找不到另一半轉錄因子卻找到一群RNA聚合酶單元的原因，可能是NRC-1 RNA聚合酶由11個單元所構成，單元大至67 kDa(RpoB’)，加總起來是一個相當大的蛋白複合物，使得被質譜找到到機率較高。目前的文獻關於高鹽度下protein-DNA關係的研究仍屬少數，但已有證據顯示鹽濃度的不同確實會影響不同的基因表現[48]。

在本實驗 pull down 的結果中，不論是在 TFB 或在 TBP 蛋白都可以找到其與 TbpE 結合的蹤跡，包括 TbpA、TbpB、TbpD、TbpF、TfbB、TfbC、TfbD、TfbE、TfbF 和 TfbG，比對之前的文獻顯示在正常培養的條件下，用質譜的方式已找到位於染色體上的 TbpE [37]，顯示 TbpE 或許有較多量的表現，也暗示了 NRC-1 基因調控中很可能存在的是以 TbpE 為主搭配 TFB 轉錄因子的組合對，這樣的推論與其他已解碼的古生菌轉錄因子分配情形相似(附表一)，為單一的 TBP 配合多個 TFB 的情況。實驗結果得知，在 NRC-1 中，除了預期的 TBP-TFB 配對外，另有可能存在 TBP-TBP 及 TFB-TFB 配對。過去研究顯示，在一般的培養條件下，將 NRC-1 *tfbF*、*tfbG*、*tbpB*、

tbpE 和 *tbpF* 剔除(knockout)後，會使得菌體無法生長[24]，顯示這幾個基礎轉錄因子在此生長狀況下為不可或缺的。故推論於本實驗固定的條件培養下，並非每一基礎轉錄因子都能有表現，亦或是表現量太低而難以找到，所以無法看見每一種轉錄因子配對，而變化不同的培養環境，或許有助於找到其他的配對組合。

另外必須特別提到的是，由於樣品間污染的關係，使得在此實驗有汙染疑慮的樣品，如前所述，以胜肽個數超過背景的 22%才被認為是有意義的結果，此一高標準門檻，是否會遮蔽掉很多原本就少量存在的蛋白，又每次產生交叉汙染的程度也都不一，故徹底避免並想辦法解決質譜樣品污染的問題才是最根本的方法。

5.3.3 特異性啟動子 DNA 親和純化實驗結果討論

gvpA1 和 *bop* 基因啟動子序列預期可以找到調控的轉錄因子對。對於 *bop* 來說，其啟動子序列只有 TATA-box 和 UAS 而缺乏 BRE，顯示需要 TBP 和 Bat 蛋白調控其表現，而可能 TFB 在此不被需要。實驗結果顯示 *gvpA1* 和 *bop* 皆可能與 Trh5 (轉錄調節子)和 SirR (轉錄抑制子)結合，顯示除了基礎的轉錄因子不同的配對組合外，要達到調控多個啟動子類型的生理需求上，還需要其他蛋白幫助。找不到調控 *gvpA1* 和 *bop* 啟動子序列的調控因子可能在於，BR 的表現其實是在處於強光下及低氧分壓下，會被高度誘導[41]，而 gas vesicles 蛋白也在晚期表現量較高。而本實驗所使用的細胞萃取液都是採用 37℃下在培養箱內為有氧狀況的培養，所以 Bop 的表現並非最大，便可能不易找到其他調控蛋白。從另一個角度來探討，這兩組啟動子序列都找到了 SirR 此轉錄抑制子，在古生菌中，轉錄抑制的機制其中一項就是轉錄抑制子會佔據在 TATA-box 和 BRE 等啟動子序列上，使得原本應該結合上來的 TBP 和 TFB 蛋白無法與 DNA 交互作用，導致轉錄無法進行，另一種抑制方式則是轉錄抑制子結合在轉錄起始點上，不阻礙轉錄因子的結合但卻干擾 RNA 聚合酶的前來[30]。所以這裡找到的 SirR 蛋白很有可能是透過第一種方式來抑制還沒有必要大量表現的 GvpA 和 Bop，可能就是為什麼在此實驗中沒發現 TBP 或 TFB 蛋白的原因之一。

參考文獻

1. Purschwitz, J., et al. *Seeing the rainbow: light sensing in fungi.* Curr Opin Microbiol, 2006. **9**: 566-71.
2. Hanna, B.C., et al. *Blood splash from different diathermy instruments during tonsillectomy.* J Laryngol Otol, 2006. **120**: 927-31.
3. Cline, S.W., et al. *Transformation methods for halophilic archaebacteria.* Can J Microbiol, 1989. **35**: 148-52.
4. Hillebrecht, J.R., et al. *Structure, function, and wavelength selection in blue-absorbing proteorhodopsin.* Biochemistry, 2006. **45**: 1579-90.
5. Ng, W.V., et al. *Genome sequence of Halobacterium species NRC-1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**: 12176-81.
6. Ng, W.V., et al. *Snapshot of a large dynamic replicon in a halophilic archaeon: megaplasmid or minichromosome?* Genome Res, 1998. **8**: 1131-41.
7. Ng, W.L., S. Kothakota, and S. DasSarma. *Structure of the gas vesicle plasmid in Halobacterium halobium inversion isomers, inverted repeats, and insertion sequences.* J Bacteriol, 1991. **173**: 3933.
8. Kennedy, S.P., et al. *Understanding the adaptation of Halobacterium species NRC-1 to its extreme environment through computational analyse of its genome sequence.* Genome Res, 2001. **11**: 1641-50.
9. Hampsey, M. *Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery.* Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**: 465-503.
10. Lee, T.I. and R.A. Young. *Transcription of eukaryotic protein-coding genes.* Annu Rev Genet, 2000. **34**: 77-137.
11. Hickey, A.J., E. Conway de Macario, and A.J. Macario. *Transcription in the archaea: basal factors, regulation, and stress-gene expression.* Crit Rev Biochem Mol Biol, 2002. **37**: 537-99.

12. Browning, D.F. and S.J. Busby. *The regulation of bacterial transcription initiation.* Nat Rev Microbiol, 2004. **2**: 57-65.
13. Ishihama, A. *Functional modulation of Escherichia coli RNA polymerase.* Annu Rev Microbiol, 2000. **54**: 499-518.
14. Lagrange, T., et al. *New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB.* Genes Dev, 1998. **12**: 34-44.
15. Smale, S.T. and J.T. Kadonaga. *The RNA polymerase II core promoter.* Annu Rev Biochem, 2003. **72**: 449-79.
16. Buratowski, S., et al. *Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II.* Cell, 1989. **56**: 549-61.
17. Conaway, R.C. and J.W. Conaway. *General initiation factors for RNA polymerase II.* Annu Rev Biochem, 1993. **62**: 161-90.
18. Langer, D., et al. *Transcription in archaea: similarity to that in eucarya.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**: 5768-72.
19. Hausner, W., et al. *Two transcription factors related with the eucaryal transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB direct promoter recognition by an archaeal RNA polymerase.* J Biol Chem, 1996. **271**: 30144-8.
20. Hethke, C., et al. *A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus.* Nucleic Acids Res, 1996. **24**: 2369-76.
21. Albright, S.R. and R. Tjian. *TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas.* Gene, 2000. **242**: 1-13.
22. Soppa, J. *Transcription initiation in Archaea: facts, factors and future aspects.* Mol Microbiol, 1999. **31**: 1295-305.
23. Soppa, J. *Normalized nucleotide frequencies allow the definition of archaeal promoter elements for different archaeal groups and reveal base-specific TFB contacts upstream of the TATA box.* Mol Microbiol, 1999. **31**: 1589-92.

24. Facciotti, M.T., et al. *General transcription factor specified global gene regulation in archaea.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**: 4630-5.

25. Baliga, N.S., et al. *Is gene expression in Halobacterium NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors?* Mol Microbiol, 2000. **36**: 1184-5.

26. Zhu, W., et al. *The N-terminal domain of TFIIB from Pyrococcus furiosus forms a zinc ribbon.* Nat Struct Biol, 1996. **3**: 122-4.

27. Bell, S.D. and S.P. Jackson. *The role of transcription factor B in transcription initiation and promoter clearance in the archaeon Sulfolobus acidocaldarius.* J Biol Chem, 2000. **275**: 12934-40.

28. Buratowski, S. and H. Zhou. *Functional domains of transcription factor TFIIB.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**: 5633-7.

29. Kosa, P.F., et al. *The 2.1-A crystal structure of an archaeal preinitiation complex: TATA-box-binding protein/transcription factor (II)B core/TATA-box.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**: 6042-7.

30. Bell, S.D., et al. *Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**: 13662-7.

31. Bell, S.D. and S.P. Jackson. *Mechanism and regulation of transcription in archaea.* Curr Opin Microbiol, 2001. **4**: 208-13.

32. Magill, C.P., S.P. Jackson, and S.D. Bell. *Identification of a conserved archaeal RNA polymerase subunit contacted by the basal transcription factor TFB.* J Biol Chem, 2001. **276**: 46693-6.

33. Bergqvist, S., et al. *Halophilic adaptation of protein-DNA interactions.* Biochem Soc Trans, 2003. **31**: 677-80.

34. Soppa, J. *From genomes to function: haloarchaea as model organisms.* Microbiology, 2006. **152**: 585-90.

35. Bergqvist, S., R. O'Brien, and J.E. Ladbury. *Site-specific cation binding mediates TATA binding protein-DNA interaction from a hyperthermophilic archaeon.* Biochemistry, 2001. **40**: 2419-25.

36. Bergqvist, S., et al. *Reversal of halophilicity in a protein-DNA interaction by limited mutation strategy.* Structure, 2002. **10**: 629-37.

37. Gan, R.R., et al. *Proteome analyse of Halobacterium sp. NRC-1 facilitated by the biomodule analyse tool BMSorter.* Mol Cell Proteomics, 2006. **5**: 987-97.

38. Goo, Y.A., et al. *Proteomic analyse of an extreme halophilic archaeon, Halobacterium sp. NRC-1.* Mol Cell Proteomics, 2003. **2**: 506-24.

39. Ruepp, A. and J. Soppa. *Fermentative arginine degradation in Halobacterium salinarium (formerly Halobacterium halobium): genes, gene products, and transcripts of the arcRACB gene cluster.* J Bacteriol, 1996. **178**: 4942-7.

40. Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius. *Functions of a new photoreceptor membrane.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**: 2853-7.

41. Yang, C.F. and S. DasSarma. *Transcriptional induction of purple membrane and gas vesicle synthesis in the archaebacterium Halobacterium halobium is blocked by a DNA gyrase inhibitor.* J Bacteriol, 1990. **172**: 4118-21.

42. Leong, D., et al. *Characterization of a second gene involved in bacterio-opsin gene expression in a halophilic archaebacterium.* J Bacteriol, 1988. **170**: 4903-9.

43. Baliga, N.S. and S. DasSarma. *Saturation mutagenesis of the TATA box and upstream activator sequence in the haloarchaeal bop gene promoter.* J Bacteriol, 1999. **181**: 2513-8.

44. Baliga, N.S. and S. Dassarma. *Saturation mutagenesis of the haloarchaeal bop gene promoter: identification of DNA supercoiling sensitivity sites and absence of TFB recognition element and UAS enhancer activity.* Mol Microbiol, 2000. **36**: 1175-83.

45. Hofacker, A., et al. *GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the p-gvp genes encoding gas vesicles in Halobacterium salinarum.* Microbiology, 2004. **150**: 1829-38.

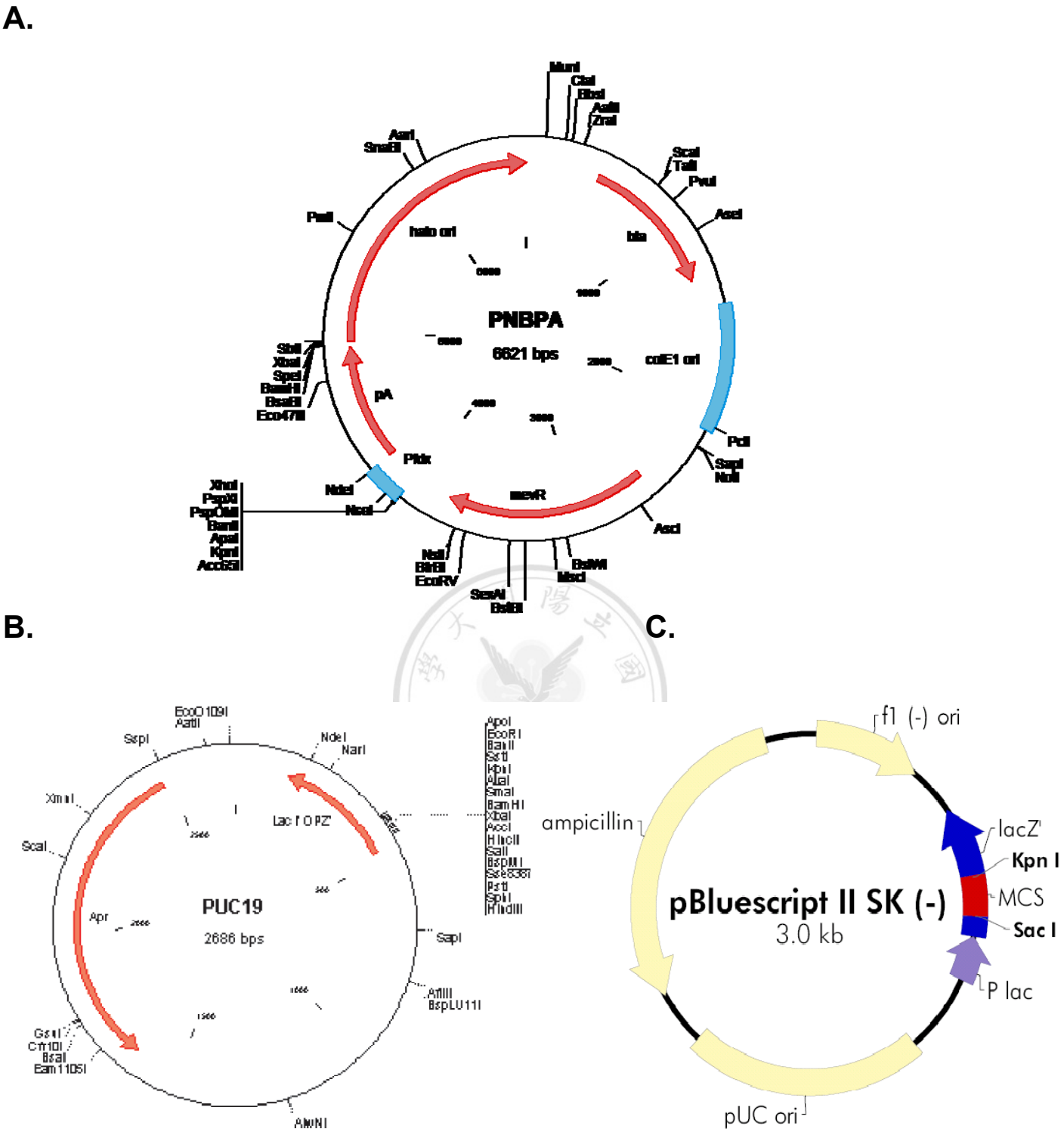
46. Halladay, J.T., et al. *The rightward gas vesicle operon in Halobacterium plasmid pNRC100: identification of the gvpA and gvpC gene products by use of antibody*

probes and genetic analyse of the region downstream of gvpC. J Bacteriol, 1993. **175**: 684-92.

47. DasSarma, S., et al. *Wild-type gas vesicle formation requires at least ten genes in the gvp gene cluster of Halobacterium halobium plasmid pNRC100*, in *J Bacteriol*. 1994.**176**: 7646-52.

48. Ferrer, C., et al. *Differentially transcribed regions of Haloferax volcanii genome depending on the medium salinity.* J Bacteriol, 1996. **178**: 309-13.

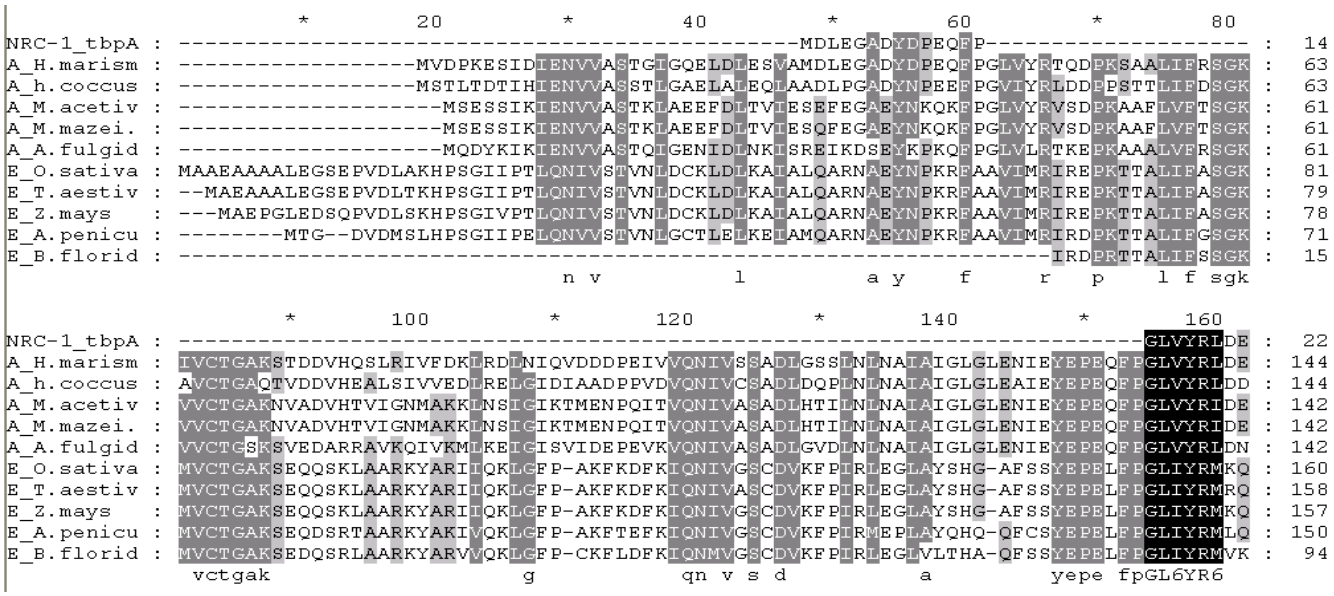
國立陽明大學 NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY



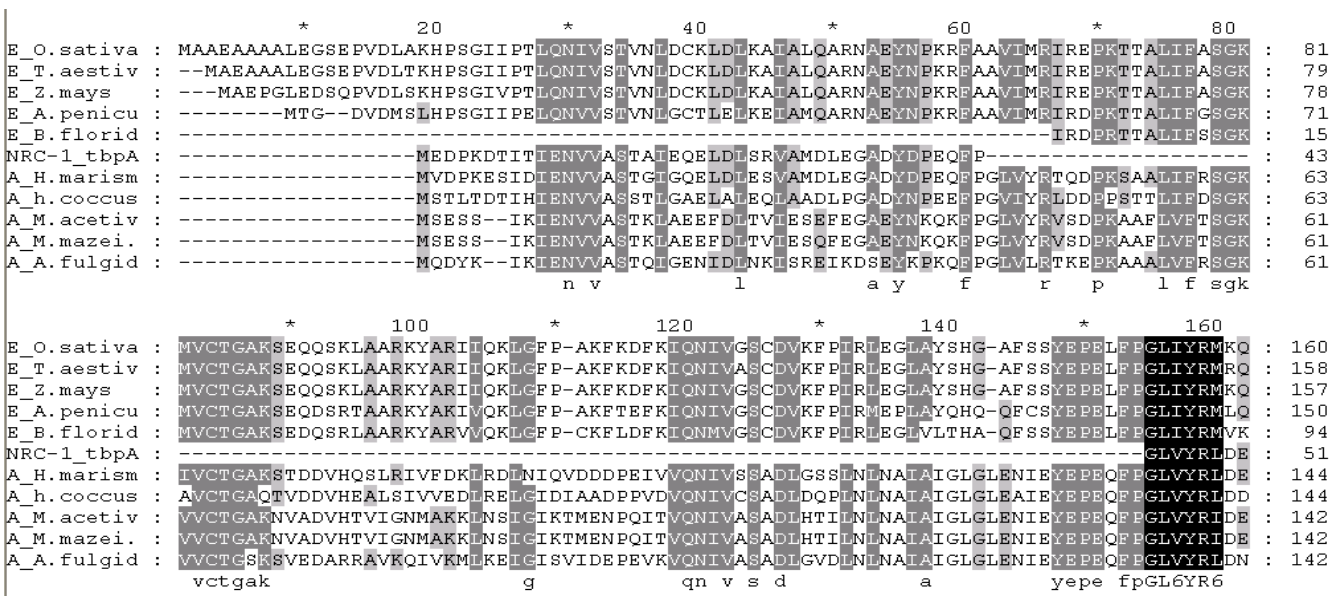
圖一、實驗中所用到的載體基因圖

(A) pNBPA，(B) pUC19，(C) pSK-

A.

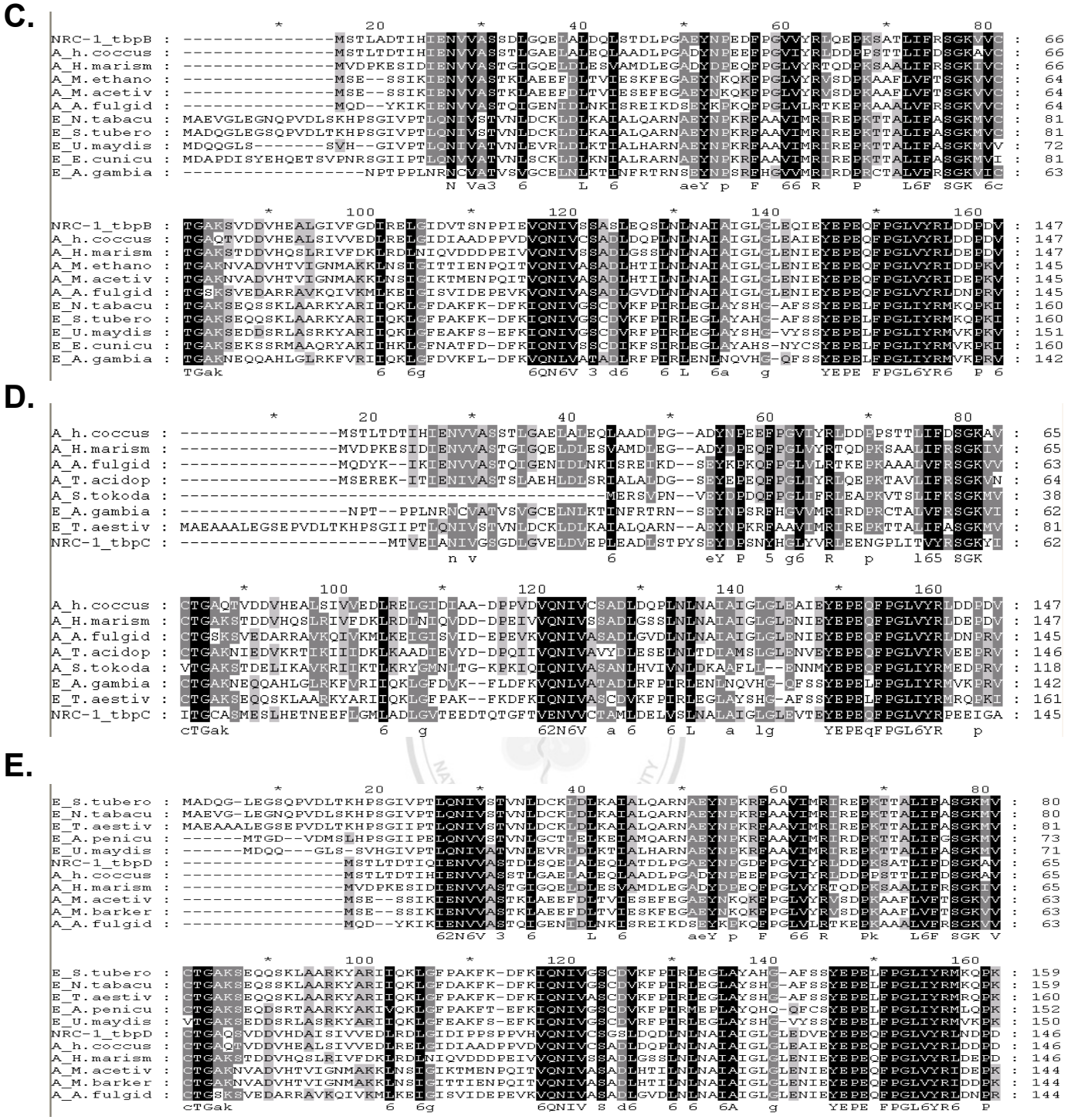


B.



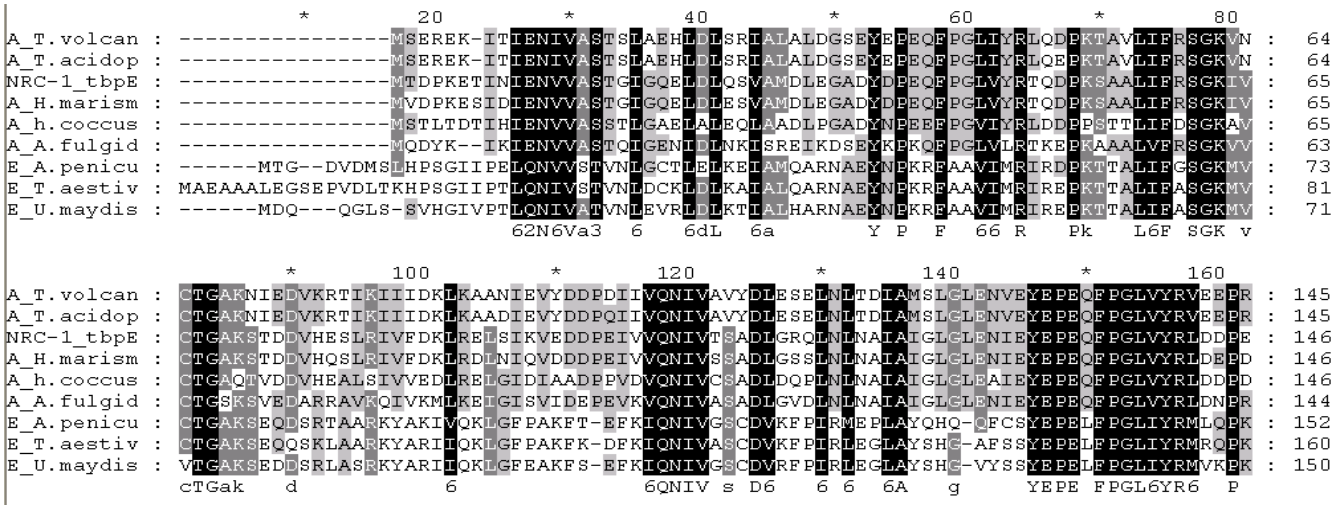
圖二、NRC-1 TBP和TFB與其他物種相同蛋白之轉譯起始位置比對

此結果是經blastP比對再利用ClustalW 程式執行多重序列比對後，由Gene Doc程式顯示。其中的胺基酸序列來源列於附表二(A_: archaea，E_: eularyote) (A) 比對NRC-1原始TbpA的結果 (B) 比對NRC-1修改後(往上游87bp)TbpA的結果

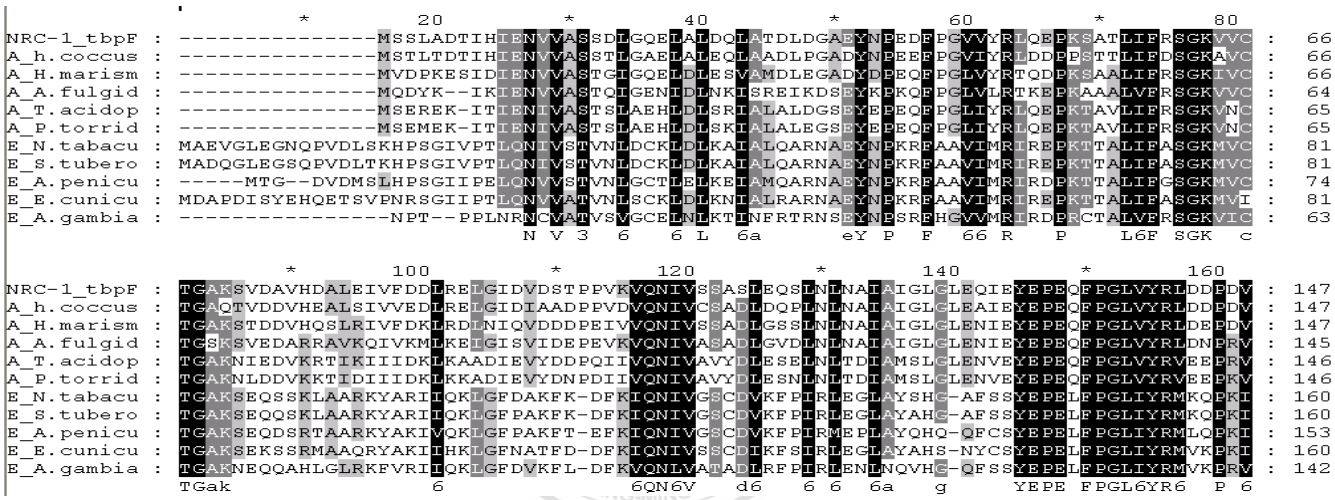


(C) 比對NRC-1 TbpB的結果 (D) 比對NRC-1 TbpC的結果 (E) 比對NRC-1 TbpD的結果

F.

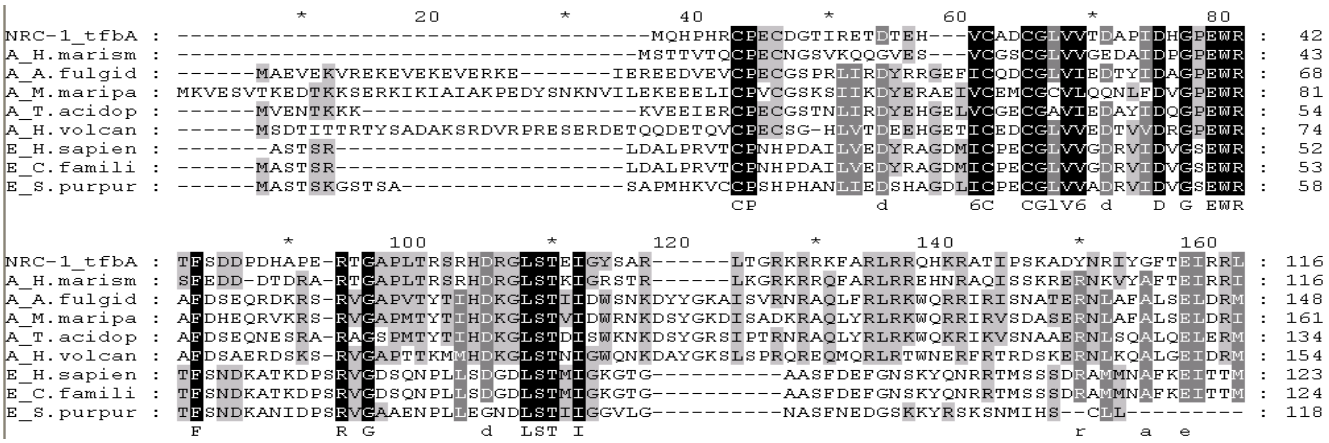


G.

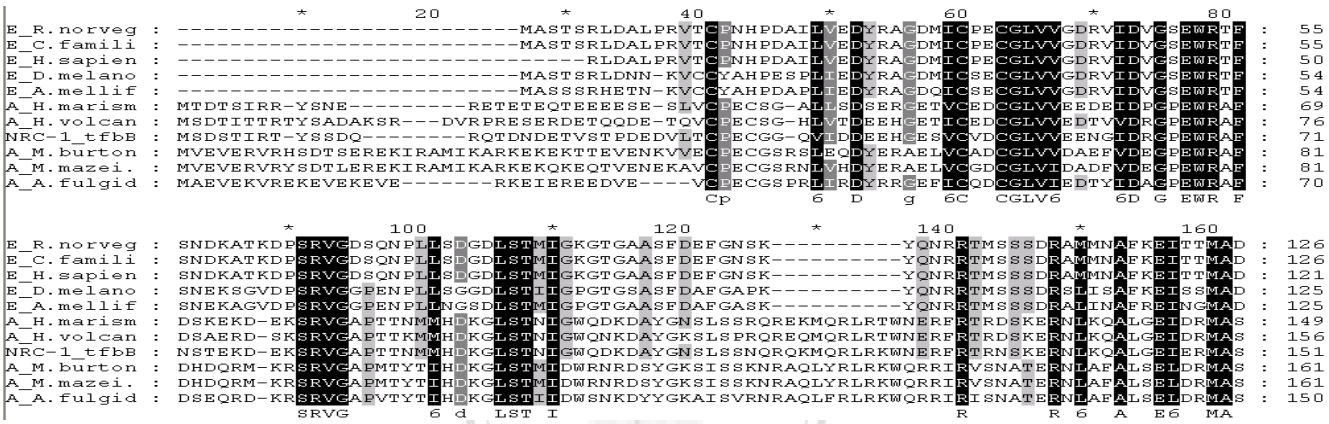


(F) 比對NRC-1 TbpE的結果 (G) 比對NRC-1 TbpF的結果

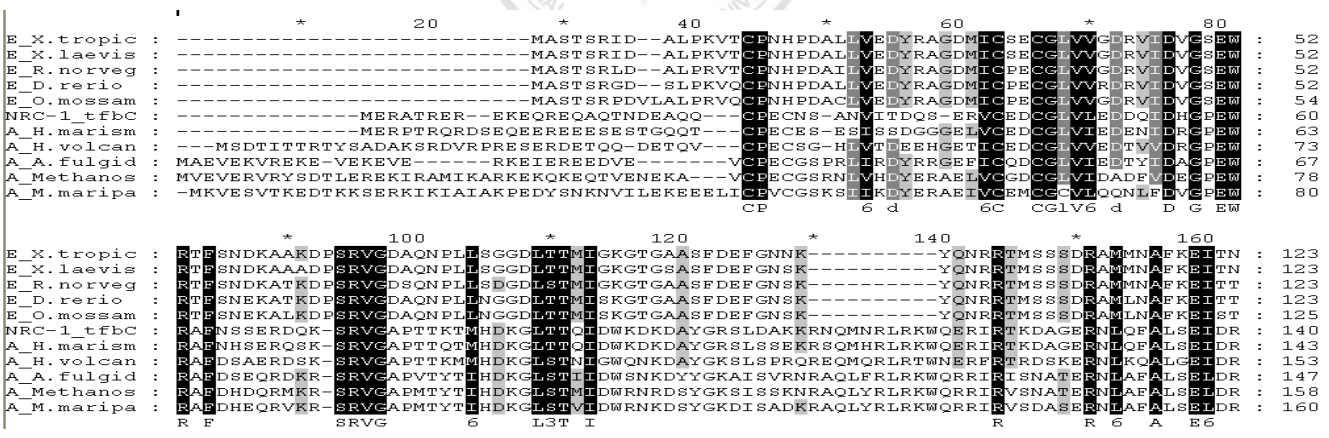
H.



I.

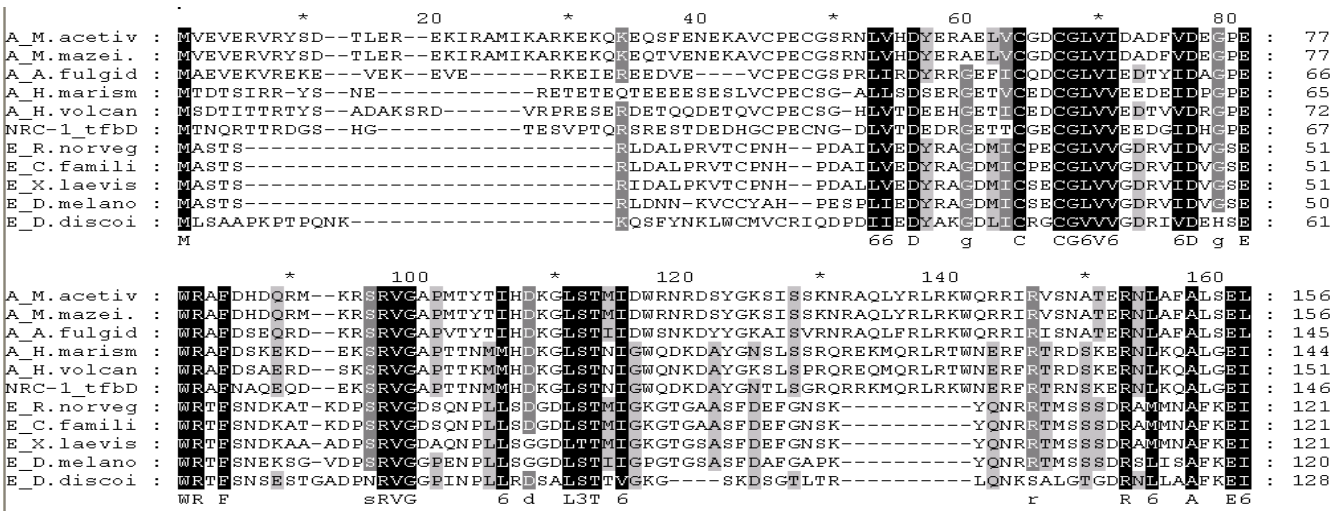


J.

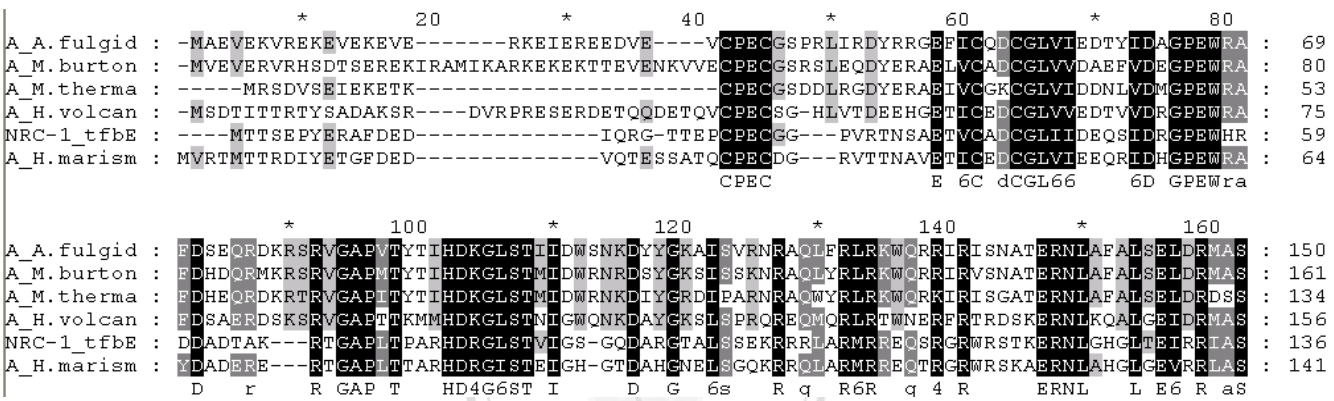


(H) 比對NRC-1 TfbA的結果 (I) 比對NRC-1 TfbB的結果 (J) 比對NRC-1 TfbC的結果

K.

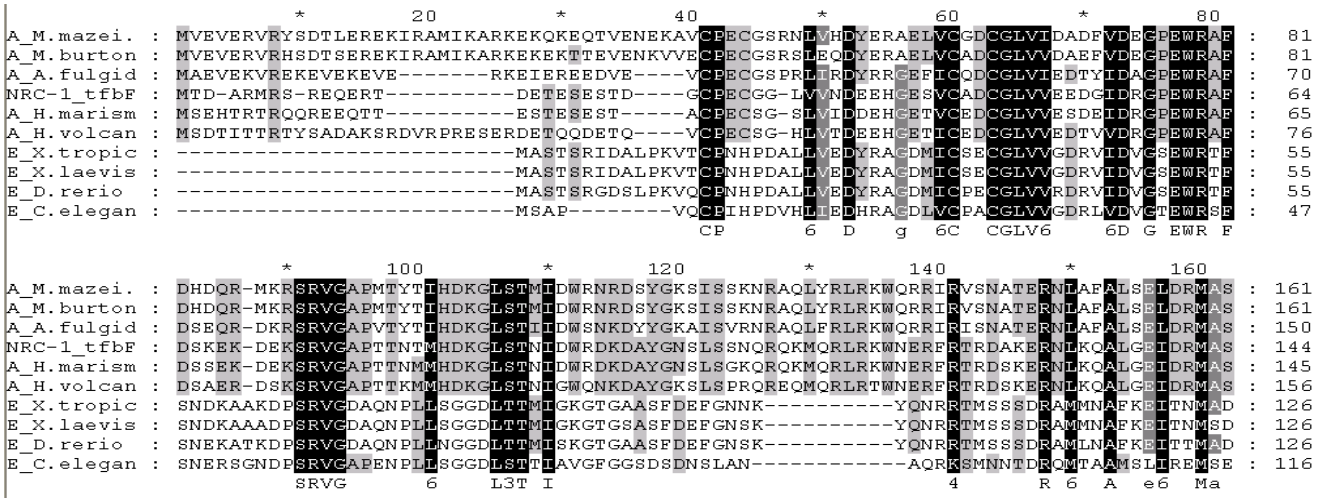


L.

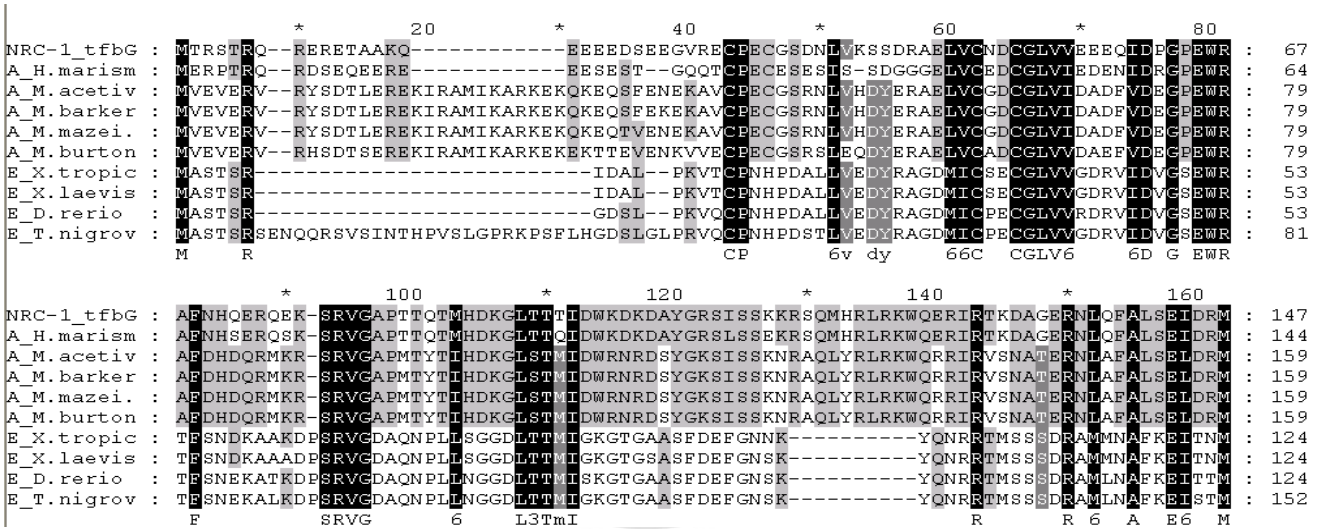


(K) 比對NRC-1 TfbD的結果 (L) 比對NRC-1 TfbE的結果

M.

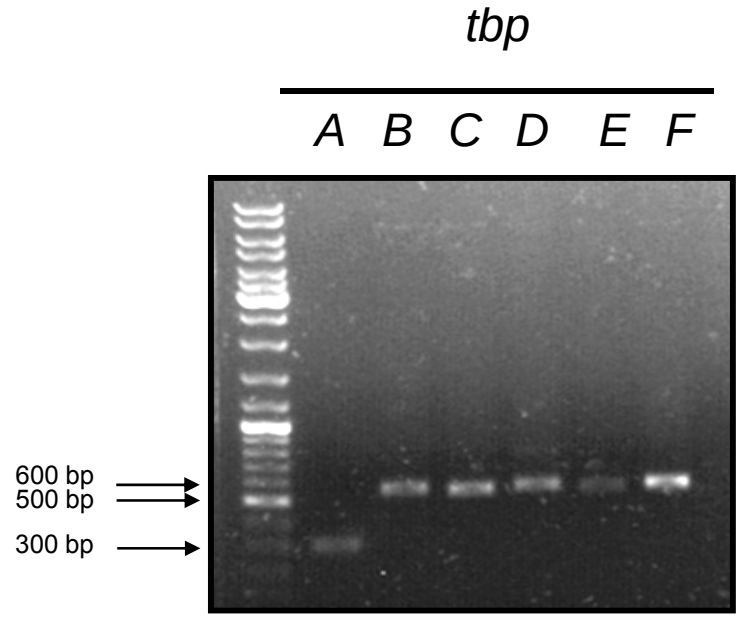


N.

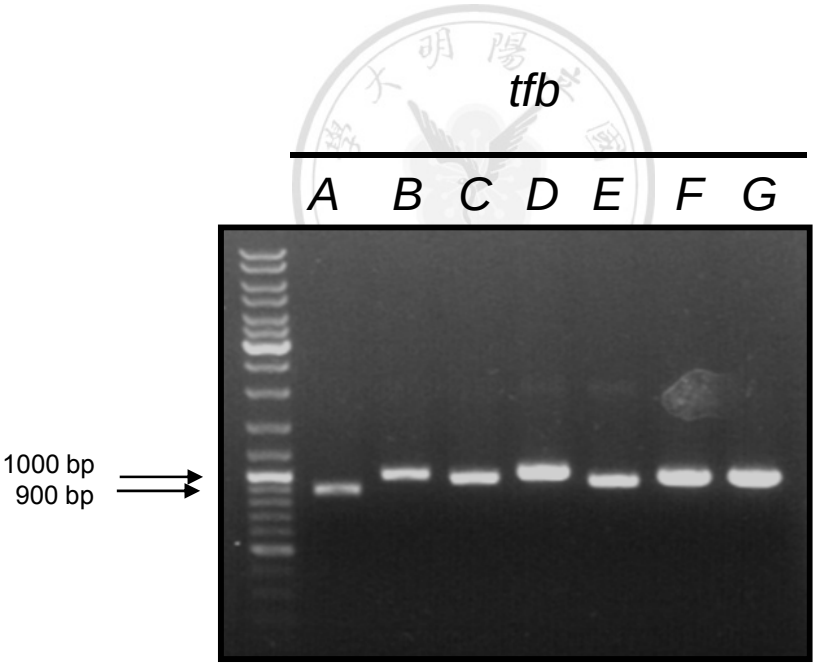


(M) 比對NRC-1 TfbF的結果 (N) 比對NRC-1 TfbG的結果

A.



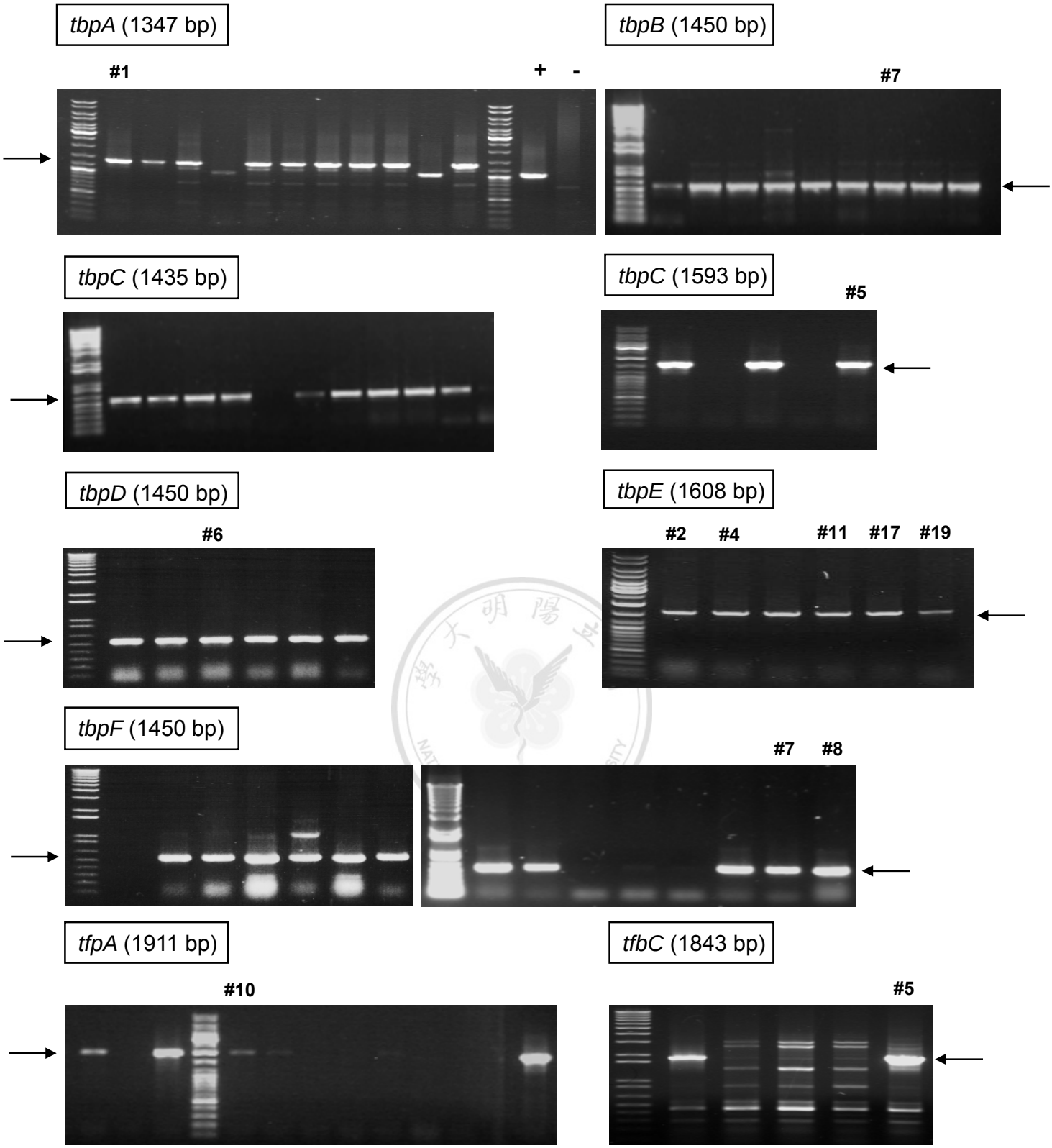
B.



圖三、PCR反應放大13個*tbp*和*tfb*基因

NRC-1 genomic DNA 經使用*tbp*和*tfb*專一性引子進行PCR後，其產物進行1%洋菜膠電泳結果，最左邊標示DNA ladder部份片段大小

(A) *tbpA, B, C, D, E, F*和 (B) *tfbA, B, C, D, E, F*

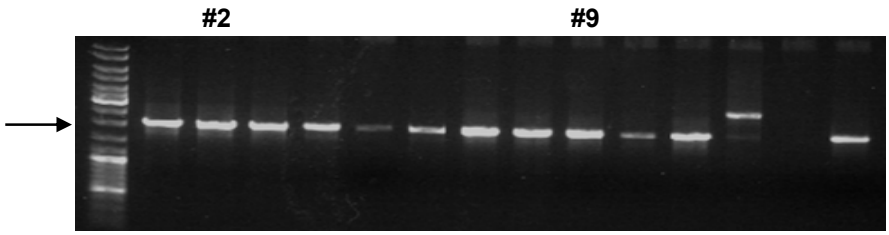


圖四、以PCR確認質體成功轉形*E. coli* DH5α，將PCR產物進行1%洋菜膠電泳

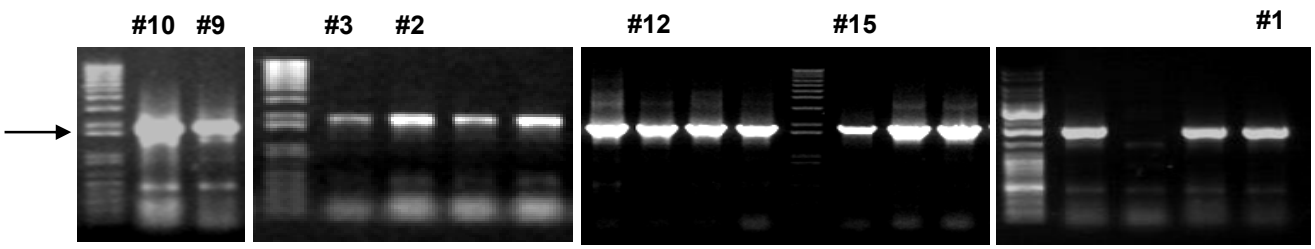
編號標示者乃其質體DNA經定序後為正接且序列無誤者編號，箭頭所指代表預期DNA片段大小，每一組*E. coli* 轉形株所使用之*tbp*或*tfb*重組DNA及PCR產物大小均列於圖上

+: positive control，-: negative control

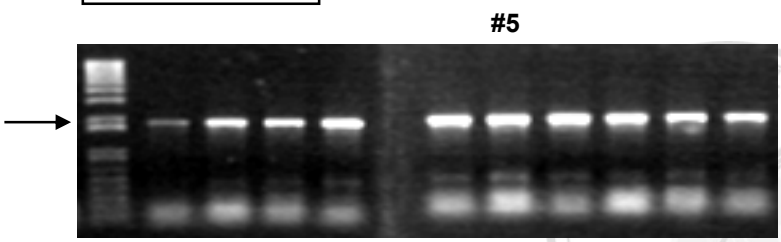
tfbB (2025 bp)



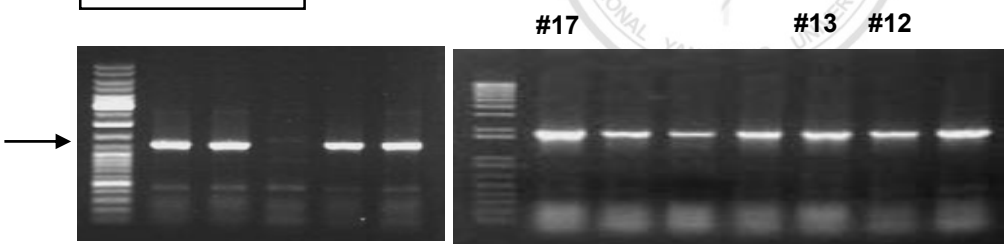
tfbD (1876 bp)



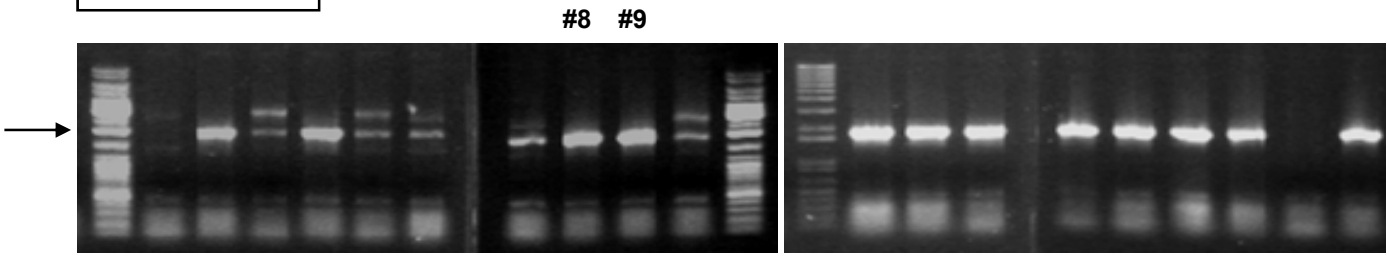
tfbE (1813 bp)

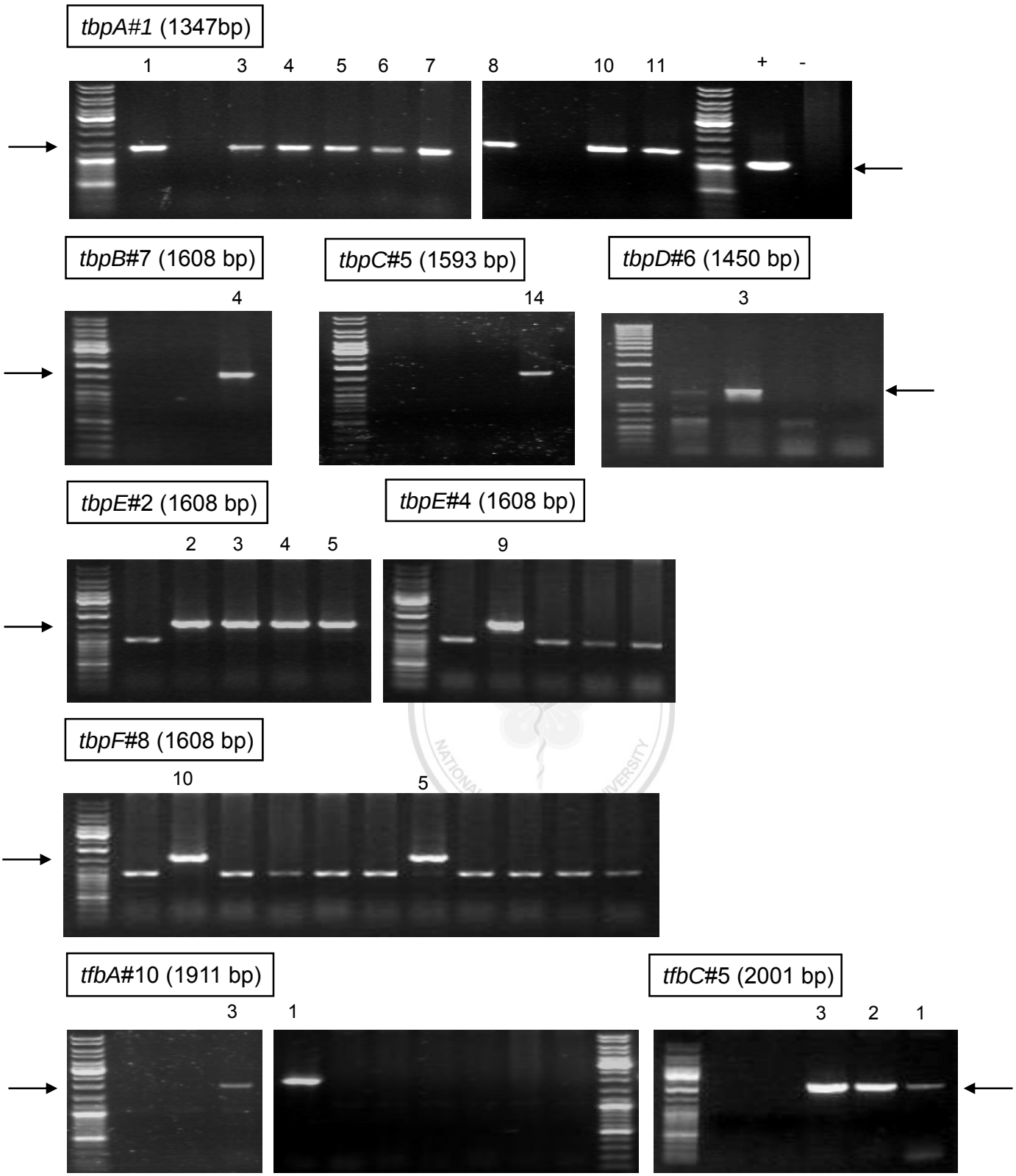


tfbF (1849 bp)



tfbG (1861 bp)



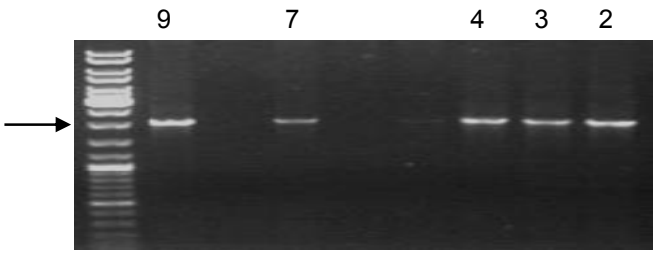


圖五、以PCR方式確認各質體成功轉形NRC-1，將PCR產物進行1%洋菜膠電泳

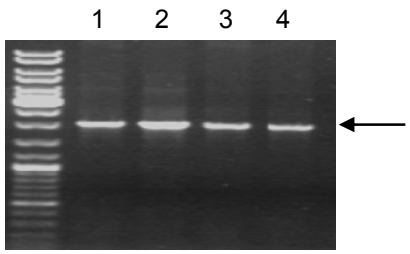
編號標示者乃質體DNA成功轉入的NRC-1菌落編號，箭頭所指代表預期DNA片段大小，每一組NRC-1轉形株所使用之*tbp*或*tfb*重組DNA及其代號和PCR產物大小均列於圖上

+: positive control，-: negative control

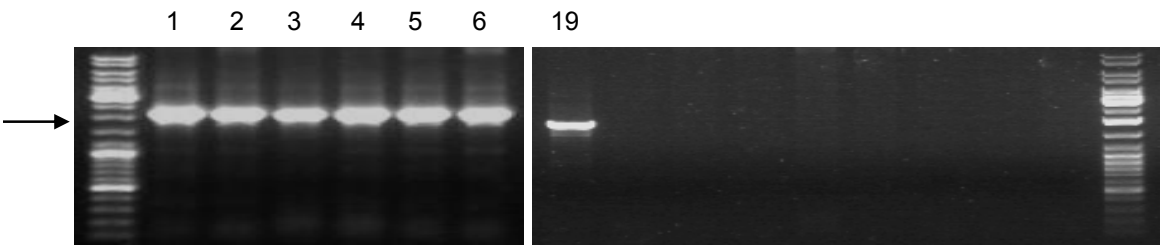
tfbB#2 (2025 bp)



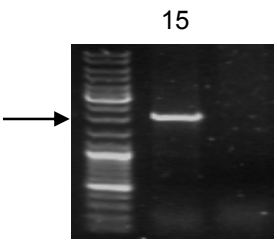
tfbB#9 (2025 bp)



tfbB#8 (2025 bp)

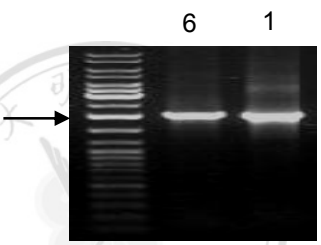


tfbD#1 (2034 bp)



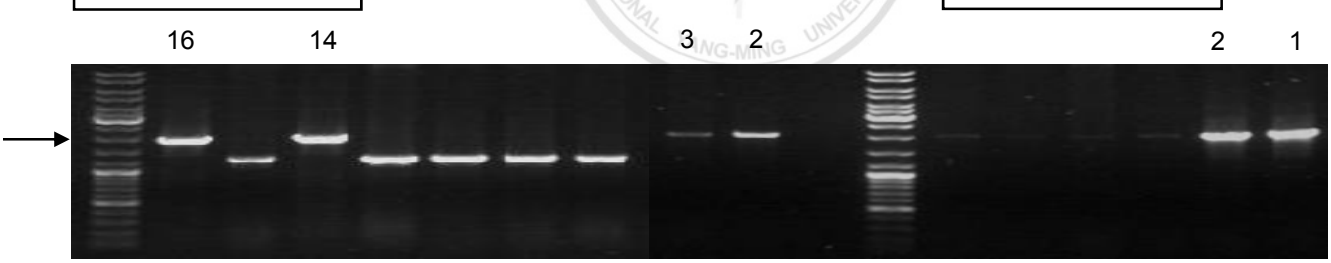
tfbG#8 (2019 bp)

tfbE#5 (1971 bp)

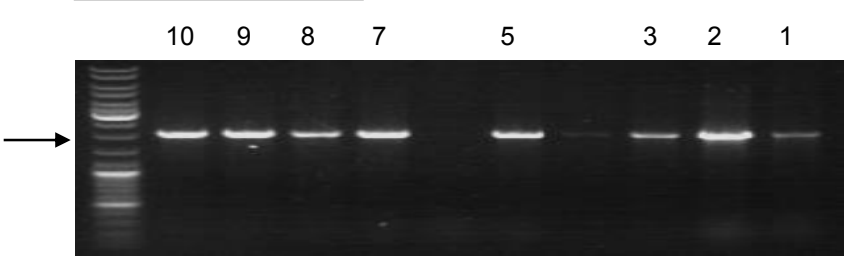


tfbF#17 (2007 bp)

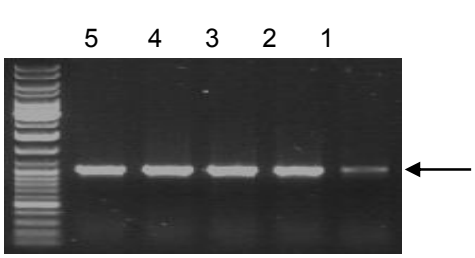
tfbF#13 (2007 bp)



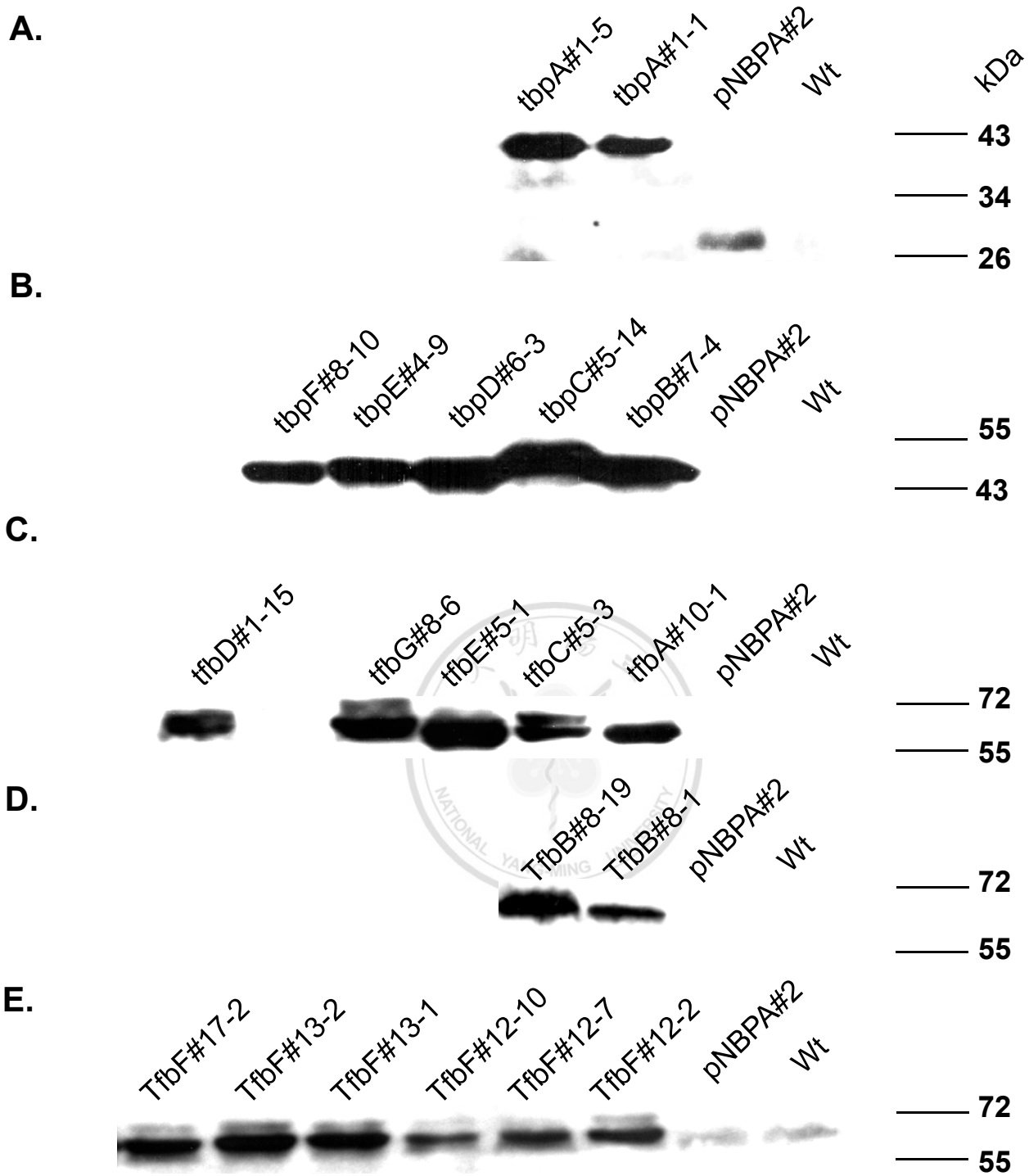
tfbF#12 (2007 bp)



pNBPA (1047 bp)

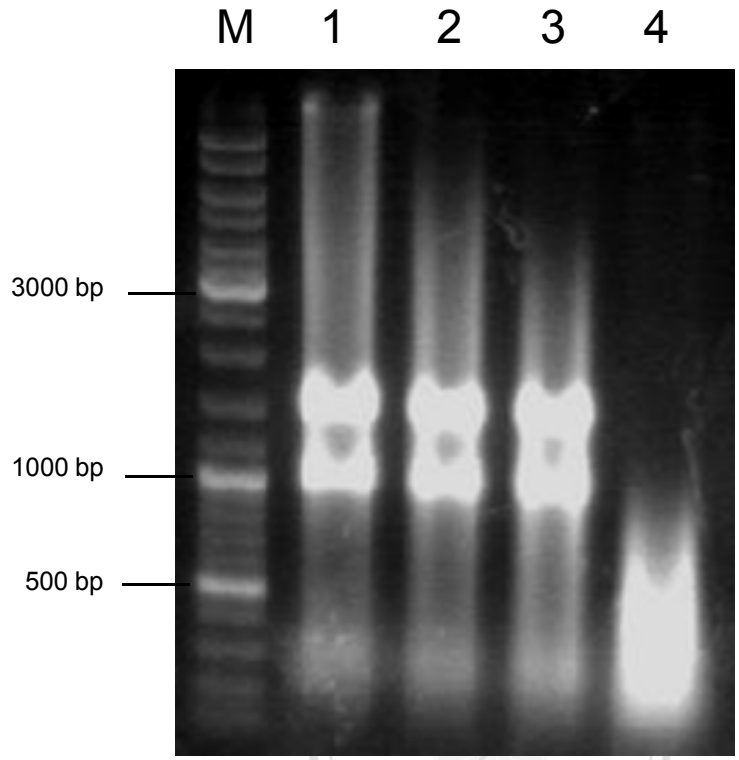


NATIONAL CHUNG-MING UNIVERSITY



圖六、以西方轉漬法偵測NRC-1 TBP/TFB-protein A的表現

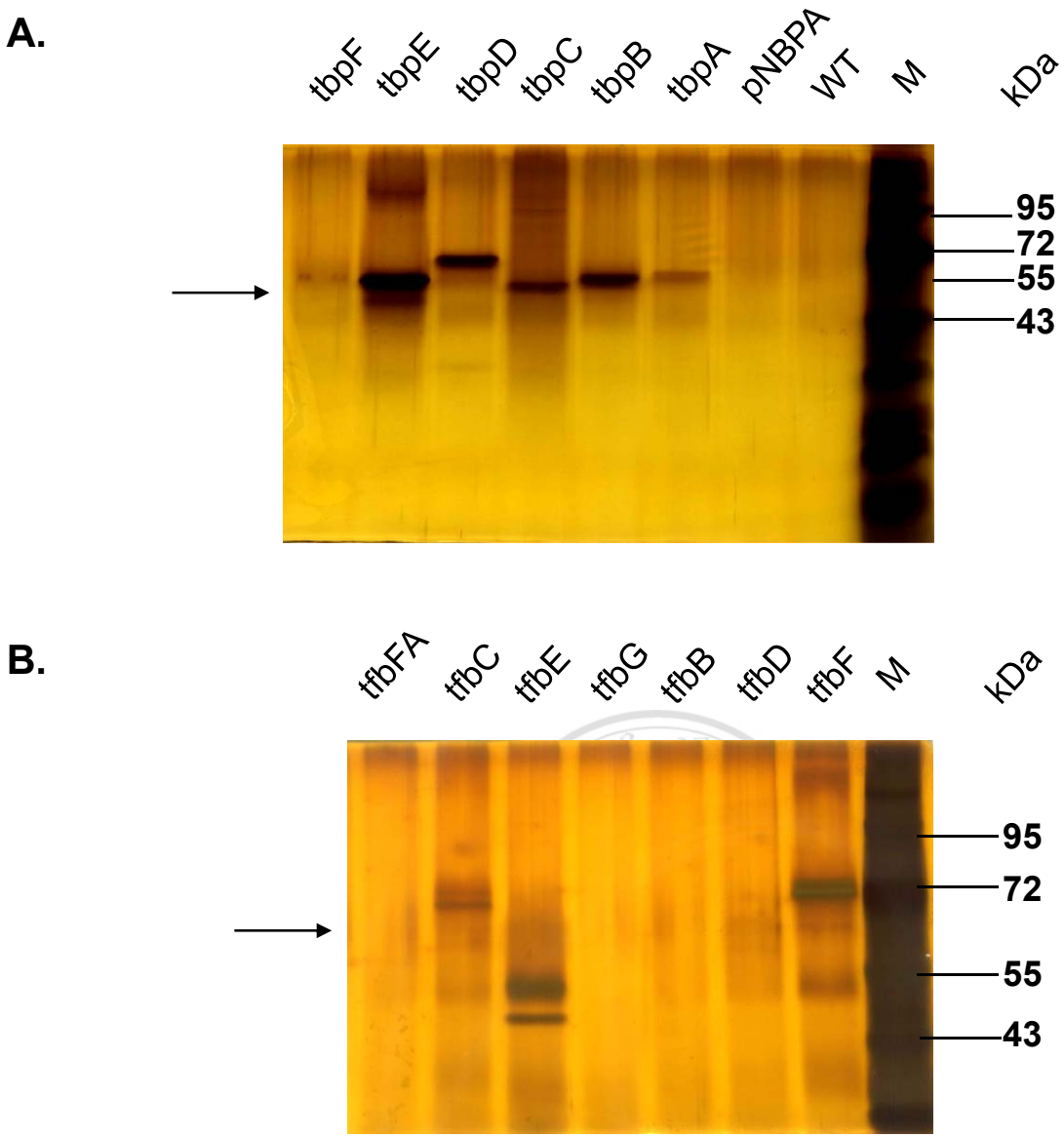
其中pNBPA以及WT (wild type)為控制組，基因後面代號為菌落編號，protein marker 分子量標示於右 (A) TbpA-protein A (B) TbpB, C, D, E, F-protein A (C) TfbA, C, D, E, G-protein A (D) TfbB-protein A (E) TfbF-proteinA



圖七、比較電動式高壓破碎或超音波粉碎方式置備細胞萃取液

此為將不同處理方式的細胞萃取液進行1%洋菜膠電泳

1) 超音波粉碎20秒5次，2) 超音波粉碎20秒7次，3) 超音波粉碎20秒15次，4) 電動式高壓破碎16000 psi重複三次，M) DNA ladder及其部份相對長度

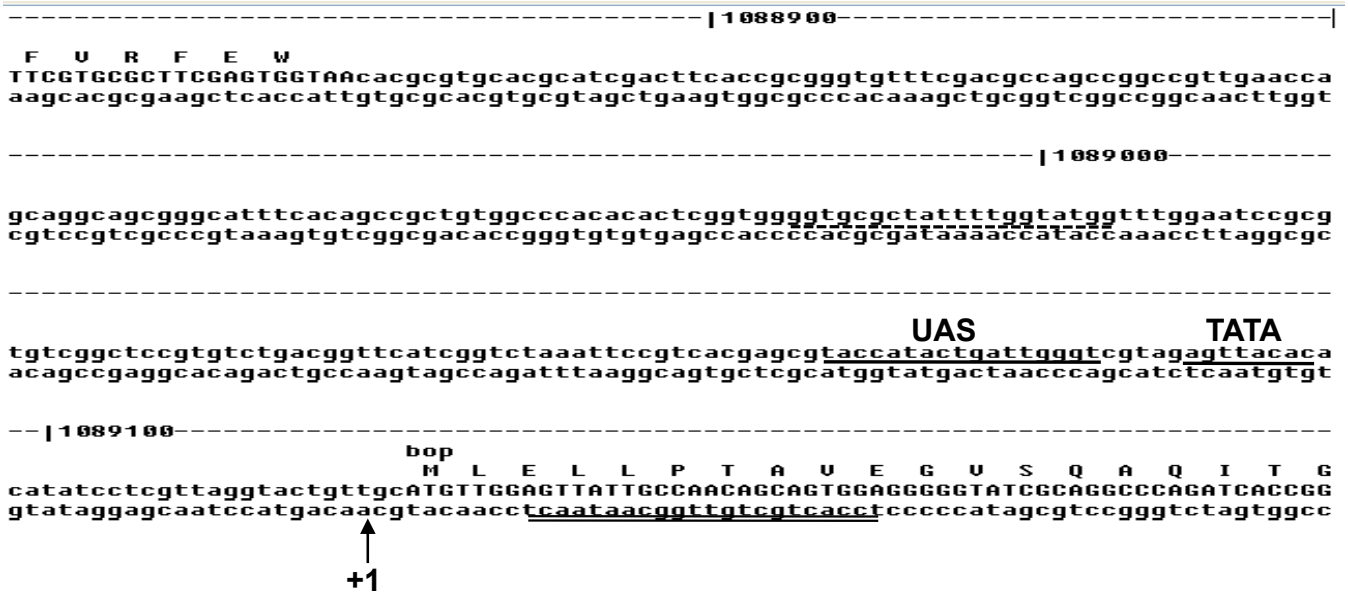


圖八、銀染偵測pull down的蛋白質複合物

箭頭所指的代表預期出現的TBP或TFB-protein A融合蛋白的位置

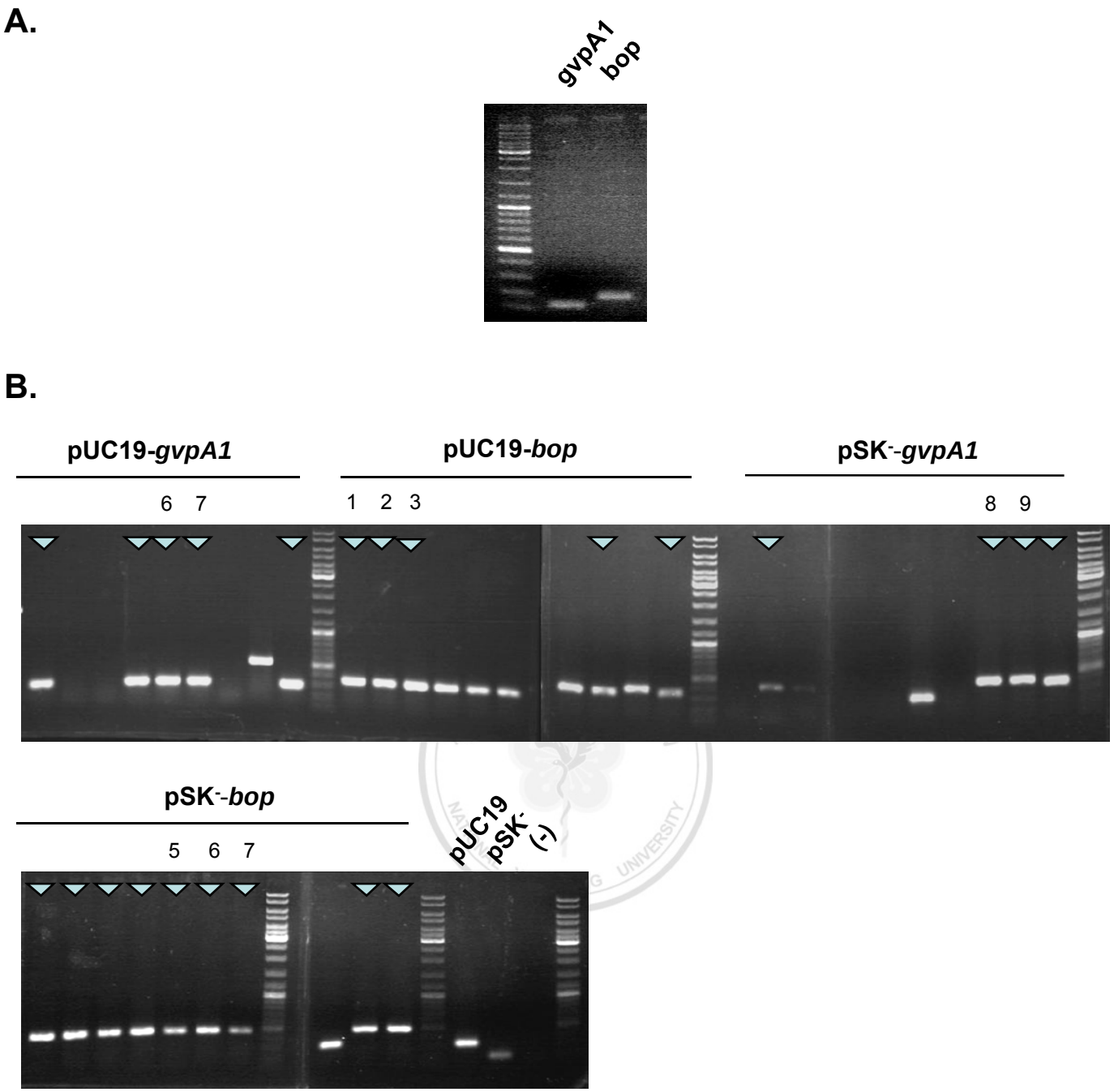
(A)由右至左分別為 M: protein marker，WT: wild type NRC-1，pNBPA:只含表現protein A的載體，其他依序為pull down TbpA, TbpB, TbpC, TbpD, TbpE和TbpF-protein A的結果 (B)最右邊為M: protein marker，其他依序為pull down TfbA, TfbB, TfbC, TfbD, TfbE, TfbF和TfbG-protein A的結果

A.



圖九、NRC-1 *bop*及*gvpA1*基因之啟動子區域構築資訊

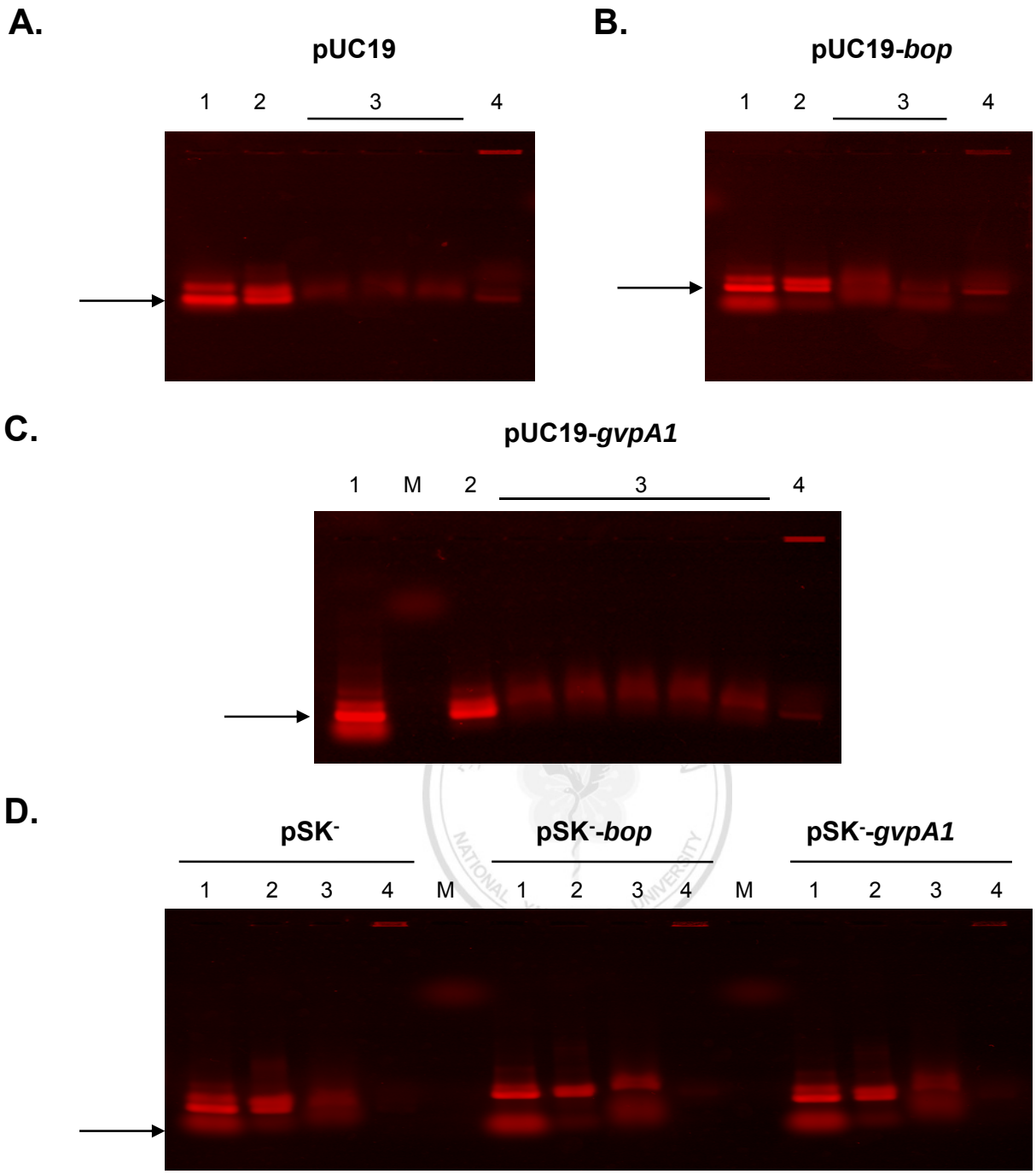
(A) *bop*基因啟動子序列包含UAS及TATA-box 和 (B) *gvpA1*基因啟動子序列包含BRE及TATA-box，虛線對應 forward primer， 雙實線對應reverse primer，箭頭所指處為轉錄起始點+1，小寫字母為核苷酸序列，大寫字母為胺基酸序列



圖十、*gvpA1*及*bop*啟動子區域構築

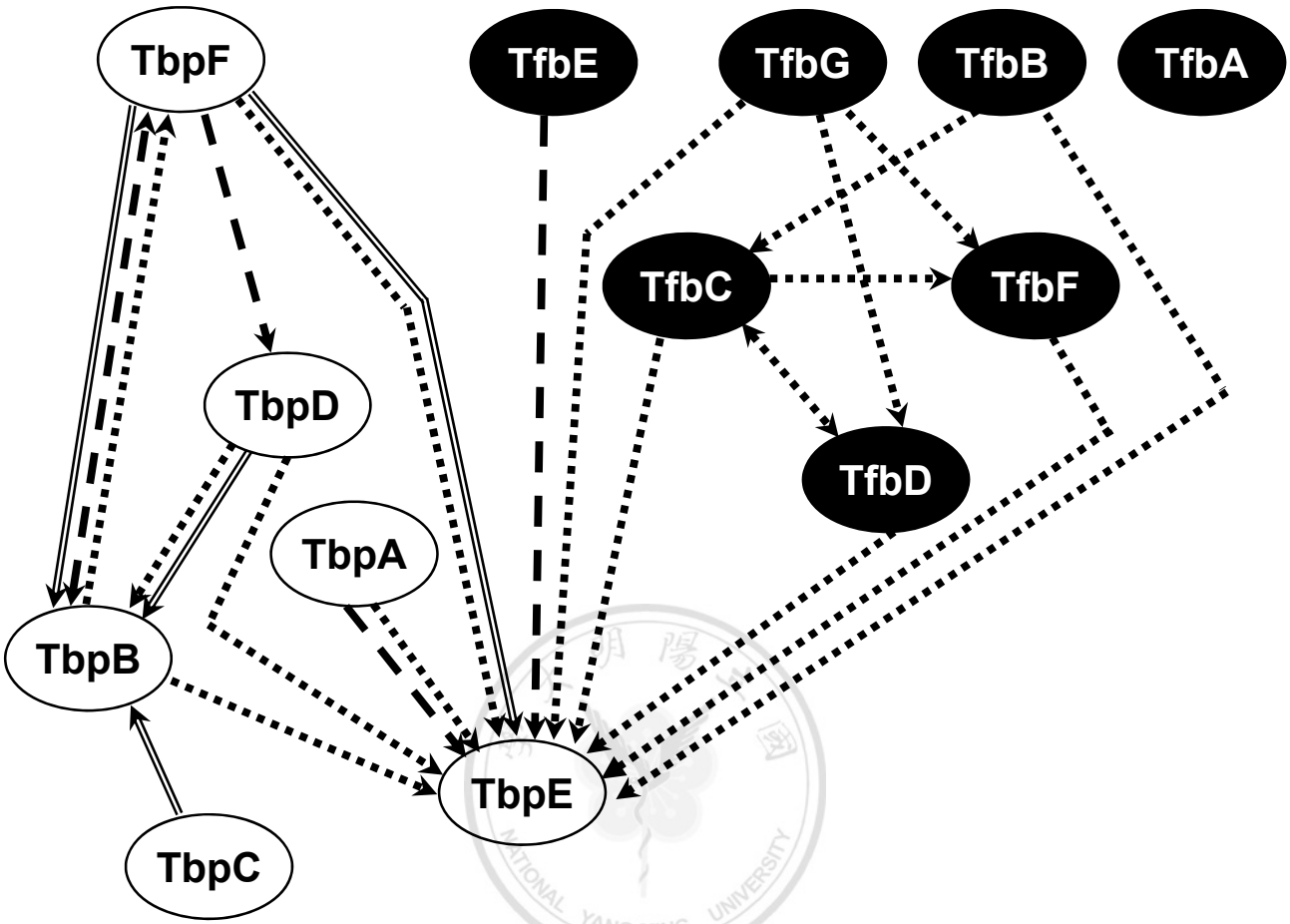
三角形標示者乃PCR產物符合預期大小，標有編號者代表該質體經定序無誤

(A) PCR放大NRC-1 *bop*及*gvpA1*基因啟動子區域，進行1%洋菜膠電泳確認 (B) PCR確認各質體成功轉形*E. coli*，此為將PCR產物進行1%洋菜膠電泳。右下之pUC19及pSK-為positive controls，(-)為negative control



圖十一、Streptavidin 磁珠能與biotin-DNA有效的結合

*bop*和*gvpA1*之啟動子區域經PCR放大後，以磁珠固定biotin-DNA，進行1%洋菜膠電泳後掃描Cy5影像，1:以biotin-VNG26及Cy5-VNG27引子對進行PCR之產物，2:能與磁珠結合之biotin-DNA (elutents)，3:未能與磁珠結合之biotin-DNA (supernatant)，4:溶出(elute)後的磁珠，M:DNA marker，箭頭所指為預期*bop*或*gvpA1*片段 (A) PCR以載體pUC19為模板 (B) PCR以質體pUC19-*bop*為模板 (C) PCR以質體pUC19-*gvpA1*為模板 (D) PCR分別以質體pSK- ，pSK-- *bop* 或pSK--*gvpA1*為模板



圖十二、NRC-1基礎轉錄因子TBP/TFB可能的作用關係

白色圓代表TBP蛋白，黑色圓代表TFB蛋白，箭頭指向代表經pull down實驗找到的蛋白，不同類型的箭頭代表不同條件下找到的蛋白。例如: TbpF ▪▪▪▪▪▪▪▪➤TbpE即代表TbpF-protein A 融合蛋白可pull down TbpE

Condition I ▪▪▪▪▪▪▪▪➤

Condition II ▬ ▬ ➔

Condition III ⟹

Gene Name/ Aliases (NCBI)	Gene Name/ ID(Halo_Web)	Replicon	Start	Stop	Gene length (bp)	M.W. (kDa)
X	tbpA / 5039	pNRC100	30131	30343	213	7.65
tbpA / VNG6037G	tbpA / 6037	pNRC200	30131	30343	213	
tbp / VNG7038	tbpB / 5052	pNRC100	40439	39879	561	19.93
VNG7171 / VNG7171	tbpB / 5245	pNRC100	182950	183510	561	
tbp 1 / VNG6050G	tbpB / 6050	pNRC200	40439	39879	561	
tbp 2 / VNG6476G	tbpB / 6476	pNRC200	357029	357589	561	
tbpC / VNG7100	tbpC / 5142	pNRC100	111987	112532	546	19.76
tbpC / VNG6140G	tbpC / 6140	pNRC200	111987	112532	546	
tbpD / VNG7114	tbpD / 5163	pNRC100	128906	128346	561	19.88
tbpE / VNG2243G	tbpE / 2243	chromosome	1670410	1670970	561	20.30
tbpF / VNG6438G	tbpF / 6438	pNRC200	329788	330348	561	19.89
tfbA / VNG2184G	tfbA / 2184	chromosome	1618510	1617647	864	31.11
tfbB / VNG0734G	tfbB / 734	chromosome	554386	553409	978	36.15
tfbC / VNG6351G	tfbC / 6351	pNRC200	283079	282126	954	35.90
tfbD / VNG0869G	tfbD / 869	chromosome	657525	656539	987	35.93
tfbE / VNG6389G	tfbE / 6389	pNRC200	308322	307399	924	33.26
tfbF / VNG0315G	tfbF / 315	chromosome	247967	247008	960	35.32
tfbG / VNG0254G	tfbG / 254	chromosome	209257	208286	972	36.62

表一、NRC-1各*tbp*及*tfb*基因相關資訊及其蛋白質分子量

此列出的*tbpA*尚未修改轉錄起始位置

引子名稱	5’端至3’端序列
***tfbA*_forward**	ATGCAGCATCCACACCGCTGC
***tfbA*_reverse**	GGCGTCAGTGAGGTTCTGGTA
***tfbB*_forward**	ATGAGTGACAGTACAATCAGA
***tfbB*_reverse**	GGCGGCTGCTTCGGTGGCTTC
***tfbC*_forward**	ATGGAACGGGCGACTCGGGAA
***tfbC*_reverse**	TACTCCGAAGCCCATCGCTTC
***tfbD*_forward**	ATGACAAACCAGCGCACAACA
***tfbD*_reverse**	CGCTTCCACGCCGGGTTCACC
***tfbE*_forward**	ATGACGACGAGTGAACCCTACGA
***tfbE*_reverse**	TTCTACGATGGAGAGCAGCCGAT
***tfbF*_forward**	ATGACAGACGCACGAATGCGT
***tfbF*_reverse**	CACCGGAATAGTGTCTTCGGC
***tfbG*_forward**	ATGACACGGTCCACCCGCCAG
***tfbG*_reverse**	GCCGTGAATACCCATCGCTTC
***tbpA*_forward**	ATGGAAGATCCGAAGGACACCAT
***tbpA*_reverse**	TTTCGCCCGATCGCCGTACCC
***tbpB*_forward**	ATGAGCACGCTGGCGGACACG
***tbpB*_reverse**	GTCAAGCAGGCCGAGTTCGGT
***tbpC*_forward**	ATGACGGTCGAGATTGCGAAC
***tbpC*_reverse**	AACTAATTCTTGGACTTTCGA
***tbpD*_foreard**	ATGAGTACACTCACCGACACC
***tbpD*_reverse**	CTCGAGGAGGCCGAGGTCGGT
***tbpE*_forward**	ATGACCGACCCCAAGGAAACCAT
***tbpE*_reverse**	GTCGAGGAGCCCCAGCTCCTC
***tbpF*_forward**	ATGAGCAGTCTGGCGGACACG
***tbpF*_reverse**	CTCAAGCAGGCCGAGTTCCGT

表二、用於此研究之NRC-1 *tbp*及*tfb*之基因引子序列

引子名稱	5’端至3’端序列	備註
102F	CGTGGCAGTACGCTGGCCCGA	位於pNBPA 4164-4184
103F	TGCCACTCTTCACACGCGGTAC	位於pNBPA 4006-4027
101R	GCGGCGTGGAGCCAGTATTGG	位於pNBPA 5032-5052
103R	GCGCTTTGTTGATCTTTGTTGAAGTT	位於pNBPA 4285-4310

gvpA1-forward	CGCGGATCCAACGACTGGTGAAACCATACAC	位於pNC100和pNC200 22409-22430 紅色表示*Bam*HI 切位
gvpA1-reverse	AACTGCAGCAAGCCTGAAGAATCTGGTTG	位於pNC100和pNC200 22510-22490 紅色表示*Pst*I切位
bop-forward	CGCGGATCCGGTGCGCTATTTTGGTATGG	位於chromosome 108985-1089004 紅色表示*Bam*HI 切位
bop-reverse	AACTGCAGTCCACTGCTGTTGGCAATAAC	位於chromosome 1089151-1089004 紅色表示*Pst*I切位

Oligo_VNG_26	biotin-TTTCCCAGTCACGACGTTGT	位於 pUC19 361-380 位於 pSK- 582-261
Oligo_VNG_27	Cy5-GTGAGCGGATAACAATTTCAC	位於pUC19 483-503 位於 pSK- 830-850

Oligo_VNG_28	GGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC GTTGTA	位於 pUC19 346-381 位於 pSK- 567-602
Oligo_VNG_29	GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGT GAGCGG	位於pUC19 496-531 位於 pSK- 843-878

表三、本研究中，除*tbp*和*tfb*引子對之外所用到的其他引子資訊

列出各引子序列及其於載體上或於NRC-1基因體上之位置。包含位於pNBPA上之引子、NRC-1 *gvpA1*和*bop*之啟動子序列專一性引子和位於pUC19和pSK- 上之引子(Oligo_VNG_26 和 Oligo_VNG_27之5’ 端分別具有biotin和Cy5標示)

Pull down流程 / 各步驟所加的量		Condition I	Condition II	Condition III
		低鹽TS溶液 (150 mM NaCl+ 50 mM Tris-HCl)	**高鹽TS溶液** (4 M NaCl+ 50 mM Tris-HCl)	**Basal salt solution** (BSS)
管柱的填充與洗滌	IgG Sepharose beads	200 µl	150 µl	150 µl
	TS or BSS洗去beads殘餘酒精	1000 µl x3	600 µl x4	600 µl x4
管柱平衡與樣品添加	(HAc←→TS or BSS) x2 +TS或BSS x1	600 µl	360 µl	360 µl
	NRC-1細胞萃取物上清液	4 ml	4 ml	4 ml
樣品的清洗與溶出	TS或BSS	8 ml	6 ml	8 ml
	25 mM NH_4HCO_3	1 ml x3		
	5 mM NH_4AC	400 µl x2		
	0.5 M HAc	500 µl x2	500 µl x2	1000 µl x2

表四、pull down實驗所用的不同條件之詳細步驟

(BSS: basal salt solution)

Condition	1-1		1-2		2-1		2-2		3-1		3-2		4-1		4-2	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U	T	U	T	U	T	U	T	U
TBPC_HALSA	19	2	11	2	17	5	16	2	12	2	13	2	16	2	5	2
THSA_HALSA	9	6	5	3	32	14	23	12	34	16	11	8	20	11	7	5
THSB_HALSA	9	6	6	4	23	14	15	9	17	12	8	6	12	8	7	5
CSG_HALSA	5	3	4	3	20	11	4	3	17	8	8	5	12	6	2	2
TBPE_HALSA	0	0	2	1	3	2	1	1	3	2	1	1	3	2	0	0
Protein_A	78	15	65	13	88	19	80	16	73	14	63	17	84	16	45	16
Q9HNI1_HALSA	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Q9HS73_HALSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
RPOA1_HALSA	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
RPOA2_HALSA	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RPON_HALSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0
total peptides(-pA)	153		133		558		214		431		155		188		72	
total proteins	44		38		161		65		138		50		58		25	

國立陽明大學 NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY

表五、比較電動式高壓破碎或超音波粉碎方式置備細胞萃取液之pull down結果

各作二重複，利用*SEQUEST*比對*Halobacterium* 的資料庫產生的部分結果(P≧0.9，p≧0.9)

T: total peptide number U: unique peptide number

1-1/1-2:超音波粉碎20秒5次，2-1/2-2:超音波粉碎20秒7次，3-1/3-2:超音波粉碎20秒15次，4-1/4-2:電動式高壓破碎方式

Condition	TfbB+BSA		TfbC		TfbD+BSA		TfbE		TfbF+BSA		TfbG	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U	T	U	T	U
BSA	106	31	12	5	116	27	11	4	128	30	29	10
TFBC_HALSA	0	0	52	15	2	2	0	0	0	0	1	1
TFBD_HALSA	0	0	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0
TFBE_HALSA	0	0	0	0	0	0	6	5	0	0	0	0
TFBF_HALSA	0	0	0	0	0	0	0	0	17	9	2	2
TFBG_HALSA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	4

國立陽明大學 NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY

表六、質譜樣品之交叉污染情形呈現

由LC-MS/MS偵測，利用*SEQUEST*比對*Halobacterium*的資料庫所產生的部分結果(P≧0.9，p≧0.9)

T: total peptide number U: unique peptide number

取Tfb pull down實驗的六組樣品中交錯加入BSA，接連以質譜分析，觀察BSA殘留情形

A. wild type NRC-1

Condition	I		II		III	
Protein ID	T	U	T	U	T	U
THSA_HALSA	3	2	27	14	31	15
THSB_HALSA	4	4	17	11	17	10
CSG_HALSA	3	2	19	10	22	8
TBPE_HALSA	0	0	8 (1.4%)	4	17 (5.4%)	5
RPOA1_HALSA	0	0	10	8	0	0
RPOA2_HALSA	0	0	3	3	0	0
RPOB1_HALSA	0	0	5	4	0	0
RPOB2_HALSA	0	0	6	5	2	2
RPOD_HALSA	0	0	3	2	0	0
RPOH_HALSA	0	0	3	2	6	1
RPOL_HALSA	0	0	1	1	0	0
RPON_HALSA	0	0	6	4	4	2
RPOP_HALSA	0	0	3	1	2	1
TBPB_HALSA	0	0	5 (0.8%)	3	4 (1.2%)	3
total peptides	41		564		311	
total proteins	17		127		71	

B. pNBPA

Condition	II		III	
Protein ID	T	U	T	U
THSA_HALSA	28	11	92	22
THSB_HALSA	21	13	59	20
CSG_HALSA	17	8	33	12
TBPE_HALSA	3 (0.8%)	2	15 (3%)	5
Protein_A	24	13	25	12
RPOA1_HALSA	1	1	0	0
RPOA2_HALSA	2	2	2	2
RPOB1_HALSA	2	2	0	0
RPOH_HALSA	1	1	4	2
RPOK_HALSA	2	2	0	0
RPOL_HALSA	0	0	2	1
RPON_HALSA	2	2	6	4
RPOP_HALSA	2	1	2	1
TBPB_HALSA	1 (0.2%)	1	8 (1.6%)	4
total peptides (-pA)	349		497	
total proteins	99		82	

表七、各個 NRC-1轉形株 pull down 實驗找到的相關蛋白

此pull down 實驗由LC-MS/MS偵測，利用*SEQUEST*比對*Halobacterium* 的資料庫所產生的部分結果(P≧0.9，p≧0.9) T: total peptide number U: unique peptide number，括號內為normalize結果以百分比呈現 (A) wild type NRC-1，作為背景 (B) pNBPA，作為背景

C. TbpA-protein A

Condition	I		II		III		III'	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U
O51971_HALSA	52	12	9	4	23	7	27	8
THSA_HALSA	6	5	32	14	58	18	65	17
THSB_HALSA	11	7	18	10	37	15	37	14
CSG_HALSA	9	5	26	12	14	10	22	10
TBPE_HALSA	21	4	15/3 (2.6%)	8	15 (3.7%)	5	19 (5.2%)	5
Protein_A	127	28	48	17	57	17	57	18
RPOA1_HALSA	0	0	10	9	0	0	0	0
RPOA2_HALSA	0	0	2	2	1	1	0	0
RPOB1_HALSA	0	0	2	2	1	1	0	0
RPOB2_HALSA	0	0	3	2	0	0	0	0
RPOD_HALSA	0	0	2	1	0	0	0	0
RPOH_HALSA	0	0	4	2	6	3	5	1
RPOL_HALSA	0	0	0	0	1	1	2	1
RPON_HALSA	0	0	1	1	1	1	6	2
RPOP_HALSA	0	0	1	1	1	1	1	1
TBPB_HALSA	0	0	4 (0.7%)	2	6 (1.4%)	3	4 (1.1%)	2
total peptides (-pA)	155		558		401		359	
total proteins	23		133		80		52	

D. TbpB-protein A

Condition	I		I'		II		III		III'	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U	T	U
TBPB_HALSA	53	20	58	20	41	15	35	15	47	17
THSA_HALSA	4	3	3	3	15	11	5	4	4	4
THSB_HALSA	5	4	7	6	7	5	3	3	2	2
CSG_HALSA	6	5	7	4	6	5	3	2	5	3
TBPE_HALSA	0	0	11/29	2	2/15	2	3 (3.2%)	2	2 (1.9%)	1
Protein_A	160	31	247	57	173	43	152	40	180	36
RPOA1_HALSA	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
RPOH_HALSA	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
RPOL_HALSA	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
RPON_HALSA	0	0	0	0	5	2	0	0	0	0
RPOP_HALSA	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
TBPD_HALSA	0	0	4/55	2	0	0	0	0	0	0
TBPF_HALSA	20	7	11	6	2	2	0	0	0	0
total peptides (-pA)	186		139		364		91		102	
total proteins	14		21		65		19		15	

E. TbpC-protein A

Condition	III		III'	
Protein ID	T	U	T	U
TBPC_HALSA	13	2	17	3
THSA_HALSA	36	15	43	19
THSB_HALSA	21	13	20	10
CSG_HALSA	19	10	19	10
TBPE_HALSA	3 (1.0%)	2	9 (3.0%)	5
Protein_A	89	16	70	18
RPOB2_HALSA	1	1	0	0
RPOH_HALSA	1	1	4	2
RPOL_HALSA	3	2	2	2
RPON_HALSA	8	3	9	3
RPOP_HALSA	1	1	5	2
TBPB_HALSA	7 (2.5%)	4	4 (1.3%)	3
total peptides (-pA)	278		296	
total proteins	69		57	

(C) TbpA (D) TbpB (E) tbpC

F. TbpD-protein A

Condition	I		I'		II		III		III'	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U	T	U
TBPD_HALSA	66	30	55	17	24	13	69	29	47	14
THSA_HALSA	6	5	7	4	29	16	22	12	8	7
THSB_HALSA	6	5	13	7	20	11	11	8	5	3
CSG_HALSA	5	4	8	5	14	10	16	10	8	4
TBPE_HALSA	2	1	29/80	3	5/2 (1.4%)	3	5 (1.7%)	3	0	0
Protein_A	206	49	230	50	197	45	260	55	196	38
RPOB1_HALSA	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
RPOH_HALSA	0	0	0	0	1	1	4	2	1	1
RPOL_HALSA	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
RPON_HALSA	0	0	0	0	3	3	3	2	1	1
RPOP_HALSA	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
TBPB_HALSA	11/53	3	3	1	8/41	4	7 (2.4%)	4	11 (7.6%)	2
total peptides (-pA)	123		155		334		281		144	
total proteins	14		22		80		56		26	

G. TbpE-protein A

Condition	I		I'		II		III	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U
TBPE_HALSA	110	25	80	26	38	13	48	12
THSA_HALSA	0	0	0	0	14	9	12	9
THSB_HALSA	0	0	3	2	4	3	6	6
CSG_HALSA	1	1	0	0	7	6	11	9
Protein_A	350	63	326	84	197	45	229	41
RPOB2_HALSA	0	0	0	0	0	0	1	1
RPOH_HALSA	0	0	0	0	1	1	1	1
RPOL_HALSA	0	0	0	0	0	0	1	1
RPON_HALSA	0	0	0	0	2	1	0	0
TBPB_HALSA	2/11	2	0	0	2/8 (0.3%)	2	2 (1%)	2
TBPD_HALSA	5/66	1	0	0	1/24	1	0	0
TBPF_HALSA	0	0	4/45	3	0	0	0	0
total peptides (-pA)	149		115		279		187	
total proteins	13		11		67		51	

H. TbpF-protein A

Condition	I		I'		II		III	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U
TBPF_HALSA	22	10	45	11	9	5	36	10
THSA_HALSA	2	2	6	5	38	17	12	8
THSB_HALSA	3	2	2	2	19	14	6	4
CSG_HALSA	5	3	6	4	10	8	15	8
TBPE_HALSA	44/110	4	2	1	10/38 (0.6%)	6	9 (5.5%)	5
Protein_A	92	17	100	23	52	17	91	22
Q9HQ80_HALSA	0	0	0	0	1	1	0	0
RPOB1_HALSA	0	0	0	0	4	2	0	0
RPOB2_HALSA	0	0	0	0	1	1	0	0
RPOH_HALSA	0	0	0	0	2	1	3	1
RPON_HALSA	0	0	0	0	4	3	3	2
TBPB_HALSA	0	0	0	0	8/2 (2.4%)	4	11 (6.8%)	4
TBPD_HALSA	0	0	0	0	4/1	3	0	0
total peptides (-pA)	94		112		321		161	
total proteins	11		25		84		32	

(F) tbpD (G) TbpE (H) TbpF

I. TfbA-protein A

Condition	I		I'		II		III	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U
THSA_HALSA	0	0	5	4	23	13	4	2
THSB_HALSA	2	2	8	6	20	12	6	5
CSG_HALSA	1	1	8	5	17	8	3	3
TBPE_HALSA	0	0	3/4	2	0	0	0	0
Protein_A	61	16	147	30	35	14	10	8
RPOA1_HALSA	0	0	0	0	3	3	0	0
RPOB1_HALSA	0	0	0	0	7	4	0	0
RPOB2_HALSA	0	0	0	0	7	5	0	0
RPOH_HALSA	0	0	0	0	1	1	0	0
TF2B2_HALSA	0	0	7/46	2	0	0	0	0
TF2B3_HALSA	0	0	17/118	4	1	1/113	0	0
TF2B4_HALSA	0	0	3/44	1	0	0	0	0
TF2B6_HALSA	0	0	2/144	1	0	0	0	0
total peptides (-pA)	16		141		312		38	
total proteins	9		37		93		19	

J. TfbB-protein A

Condition	I		I'		II	
Protein ID	T	U	T	U	T	U
TF2B2_HALSA	13	7	46	16	13	7
THSA_HALSA	1	1	6	4	15	11
THSB_HALSA	1	1	14	9	15	11
CSG_HALSA	1	1	10	6	14	8
TBPE_HALSA	1	1	4	2	3 (1%)	2
Protein_A	58	16	118	24	15	9
RPOA1_HALSA	0	0	0	0	4	3
RPOA2_HALSA	0	0	0	0	1	1
RPOB1_HALSA	0	0	0	0	7	3
RPOB2_HALSA	0	0	0	0	8	6
RPOP_HALSA	0	0	0	0	1	1
TF2B3_HALSA	0	0	47/118	6	6/113	4
TF2B4_HALSA	0	0	7/44	4	1/38	1
TF2B6_HALSA	0	0	3/144	3	0	0
total peptides (-pA)	42		270		293	
total proteins	15		43		80	

K. TfbC-protein A

Condition	I		I'		II		III	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U
TF2B3_HALSA	78	15	118	23	113	17	52	15
THSA_HALSA	2	1	0	0	15	9	2	2
THSB_HALSA	7	5	3	3	15	9	10	8
CSG_HALSA	6	3	6	5	10	6	4	4
TBPE_HALSA	1/1	1	0	0	0	0	2 (1.4%)	1
Protein_A	169	40	262	54	115	34	143	40
RPOB1_HALSA	0	0	0	0	1	1	0	0
RPON_HALSA	0	0	0	0	0	0	6	4
RPOP_HALSA	0	0	0	0	1	1	1	1
TF2B2_HALSA	2/13	1	0	0	0	0	0	0
TF2B4_HALSA	0	0	11/44	3	3/38	2	0	0
TF2B6_HALSA	0	0	2/3	2	0	0	0	0
total peptides(-pA)	136		186		240		136	
total proteins	15		15		45		23	

(I) TfbA (J) TfbB (K) TfbC

L. TfbD-protein A

Condition	I		I'		II		III	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U
TF2B4_HALSA	40	6	44	7	38	13	4	3
THSA_HALSA	20	12	21	15	17	11	2	1
THSB_HALSA	4	4	6	6	12	8	0	0
CSG_HALSA	14	7	15	10	16	9	0	0
TBPE_HALSA	2/1	1	3	2	0	0	0	0
Protein_A	193	32	243	37	91	28	63	19
RPOA1_HALSA	0	0	0	0	4	3	0	0
RPOB1_HALSA	0	0	0	0	6	4	0	0
RPOH_HALSA	0	0	0	0	2	2	0	0
RPOP_HALSA	0	0	0	0	1	1	0	0
TF2B3_HALSA	18/78	5	0	0	0	0	2/52	2
TF2B5_HALSA	0	0	7/45	2	0	0	0	0
TF2B6_HALSA	0	0	3/14	2	0	0	0	0
total peptides (-pA)	173		293		355		71	
total proteins	36		71		76		12	

M. TfbE-protein A

Condition	I		I'		II		III	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U
TF2B5_HALSA	29	13	45	22	11	8	6	5
THSA_HALSA	1	1	3	2	20	13	3	2
THSB_HALSA	8	6	9	6	8	6	4	4
CSG_HALSA	7	3	18	11	12	6	5	3
TBPE_HALSA	0	0	0	0	3(1.6%)	2	3 (2.9%)	2
Protein_A	385	78	332	65	410	73	282	65
RPOA1_HALSA	0	0	0	0	3	3	0	0
RPOB1_HALSA	0	0	0	0	2	1	0	0
RPOH_HALSA	0	0	0	0	5	2	0	0
RPON_HALSA	0	0	0	0	2	1	1	1
RPOP_HALSA	0	0	0	0	0	0	2	2
TF2B3_HALSA	1/18	1	0	0	0	0	0	0
TF2B4_HALSA	5/40	3	3	2	0	0	0	0
TF2B6_HALSA	0	0	14/144	5	0	0	0	0
total peptides (-pA)	90		161		180		101	
total proteins	11		23		46		30	

N. TfbF-protein A

Condition	I		I'		II		III	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U
TF2B6_HALSA	154	24	144	24	40	11	17	9
THSA_HALSA	0	0	0	0	16	11	7	5
THSB_HALSA	4	3	2	2	15	11	4	3
CSG_HALSA	3	2	2	1	11	8	1	1
TBPE_HALSA	2	1	1/2	1	0	0	2/3 (2.4%)	2
Protein_A	295	40	273	42	47	18	68	18
RPOA1_HALSA	0	0	0	0	1	1	0	0
RPOB1_HALSA	0	0	0	0	4	2	0	0
RPOB2_HALSA	0	0	0	0	2	2	0	0
RPON_HALSA	0	0	0	0	1	1	2	1
RPOP_HALSA	0	0	0	0	2	2	0	0
TF2B4_HALSA	1/5	1	0	0	0	0	0	0
TF2B5_HALSA	3/29	2	0	0	0	0	0	0
TF2B7_HALSA	0	0	0	0	2/35	2	0	0
total peptides (-pA)	197		185		183		81	
total proteins	19		16		48		21	

(L) TfbD (M) TfbE (N) TfbF

O. TfbG-protein A

Condition	I		I'		II		III	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U
TF2B7_HALSA	6	4	6	5	35	11	12	4
THSA_HALSA	2	2	10	8	14	9	10	7
THSB_HALSA	5	4	9	7	15	11	7	5
CSG_HALSA	9	6	32	12	15	8	12	6
TBPE_HALSA	0	0	2	1	2 (0.6%)	1	2/2 (1%)	2
Protein_A	162	32	172	30	71	23	84	25
RPOA1_HALSA	0	0	0	0	4	3	0	0
RPOA2_HALSA	0	0	0	0	1	1	0	0
RPOB1_HALSA	0	0	0	0	7	3	0	0
RPOB2_HALSA	0	0	0	0	2	2	1	1
RPOH_HALSA	0	0	0	0	4	2	1	1
RPON_HALSA	0	0	0	0	1	1	3	3
RPOP_HALSA	0	0	0	0	3	2	0	0
TF2B3_HALSA	0	0	0	0	0	0	1	1
TF2B4_HALSA	2/1	2	0	0	0	0	0	0
TF2B6_HALSA	47/154	9	0	0	0	0	2/17	2
total peptides (-pA)	95		254		289		191	
total proteins	17		73		77		69	

國立陽明大學 NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY

(O) TfbG

Condition	TbpA+BSA		TbpB		TbpC+BSA		TbpD	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U
BSA	101	24	0	0	131	30	0	0
O51971_HALSA	23	7	0	0	0	0	0	0
TBPB_HALSA	6	3	35	15	7	4	7	4
TBPC_HALSA	0	0	0	0	13	2	0	0
TBPD_HALSA	0	0	0	0	0	0	67	29
TBPE_HALSA	15	5	3	2	3	2	5	3

國立陽明大學 NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY

表八、質譜樣品之污染情形改善

由LC-MS/MS偵測，利用*SEQUEST*比對*Halobacterium*的資料庫所產生的部分結果(P≧0.9，p≧0.9)

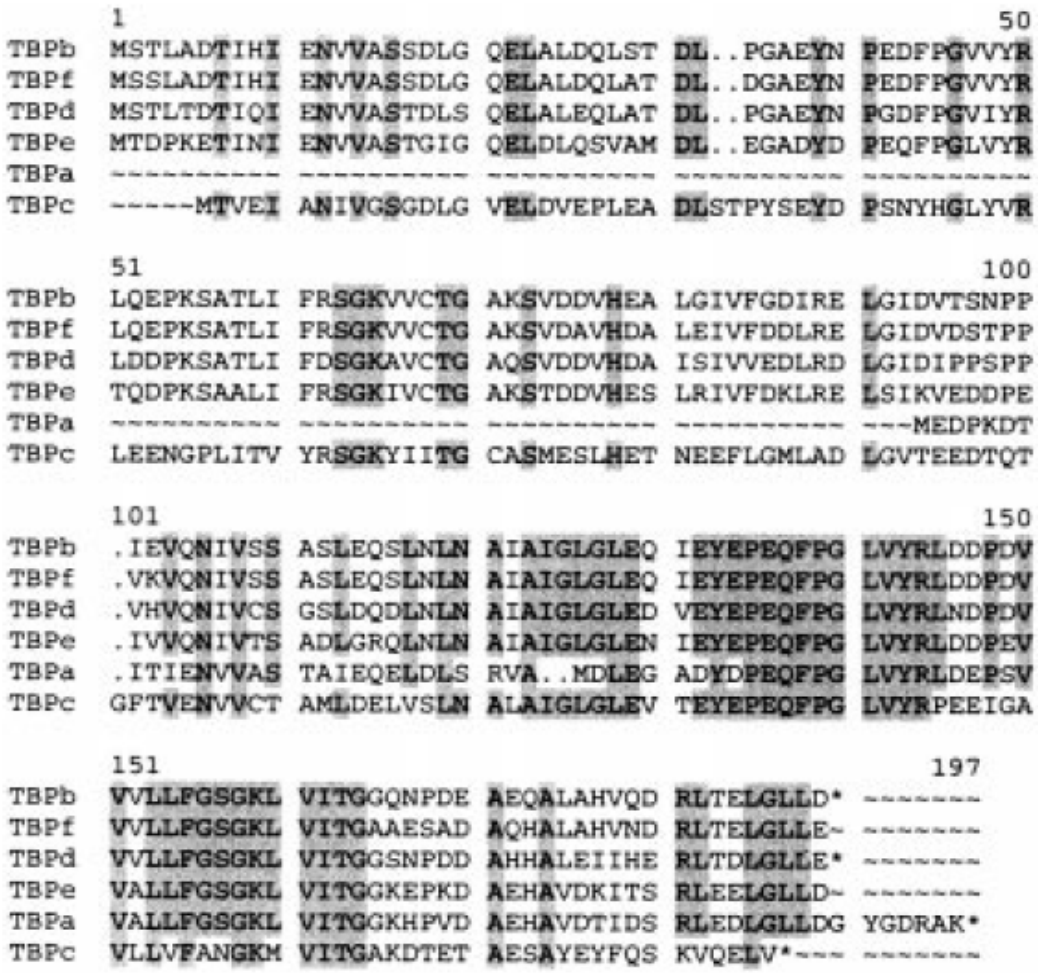
T: total peptide number U: unique peptide number 取Tbp pull down實驗的四組樣品中交叉加入BSA，以質譜分析，期間增加沖洗時間，觀察BSA殘留情形

Condition	beads		pUC19		pUC19-*gvpA1*		pUC19-*bop*	
Protein ID	T	U	T	U	T	U	T	U
THSA_HALSA	15	7	30	14	13	3	32	11
THSB_HALSA	16	5	19	10	20	5	34	11
CSG_HALSA	39	7	39	10	30	8	43	12
Q9HNV9_HALSA	0	0	0	0	1	1	2	1
Q9HRU8_HALSA	0	0	0	0	1	1	1	1
RPOA1_HALSA	3	3	3	3	0	0	9	6
RPOA2A_HALSA	2	2	2	2	1	1	1	1
RPOB1 _HALSA	4	2	2	2	2	1	5	3
RPOB2_HALSA	0	0	0	0	0	0	1	1
RPOD_HALSA	1	1	2	1	0	0	1	1
total peptides	409		398		344		614	
total proteins	99		104		106		147	

國立陽明大學 NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY

表九、特異性啟動子DNA親和純化實驗經質譜分析之部分結果

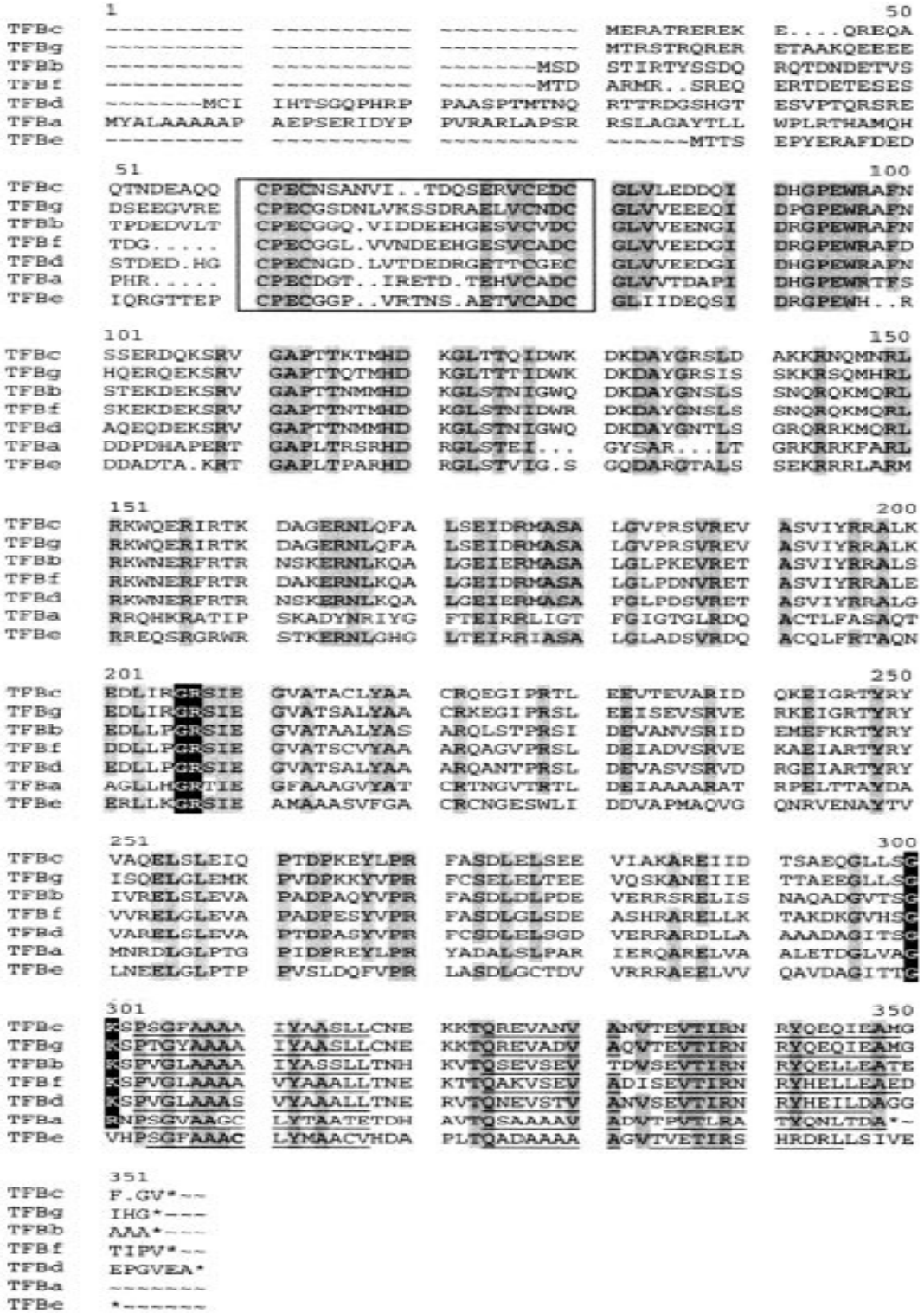
實驗由LC-MS/MS偵測，利用*SEQUEST*比對*Halobacterium* 的資料庫所產生的部分結果 (P≧0.9，p≧0.9) T: total peptide number U: unique peptide number ，蛋白質全名見附表



(Baliga et al., 2000)

附圖一、六個*Halobacterium* TBPs蛋白序列之多重比對

保守度在五個胺基酸以上的以灰色標示



(Baliga et al., 2000)

附圖二、七個*Halobacterium* TFBs蛋白序列之多重比對

疑似為Zn-finger domains 的部份被框起來，保守度在五個胺基酸以上的為灰色，和TBP作用的區域為黑色，HTH motif下標有黑線

Table 2. Number of GTFs in fully sequenced archaeal genomes

Organism name	Genome size, Mb	No. of TBPs	No. of TFBs
Aeropyrum pernix K1	1.66	1	3
Archaeoglobus fulgidus DSM4304	2.17	1	1
Haloarcula marismortui ATCC 43049	4.27	1	8
Halobacterium sp. NRC-1	2.57	6	7
Methanobacterium thermoautotrophicum delta H	1.75	1	1
Methanococcus jannaschii DSM2661	1.73	1	1
Methanococcus maripaludis S2	1.66	1	1
Methanopyrus kandleri AV19	1.69	1	2
Methanosarcina acetivorans C2A	5.75	3	1
Methanosarcina barkeri fusaro	4.87	2	1
Methanosarcina mazei Goe1	4.09	1	1
Methanosphaera stadtmanae DSM 3091	1.76	1	1
Methanospirillum hungatei JF-1	3.54	2	1
Nanoarchaeum equitans Kin4-M	0.49	1	1
Natronomonas pharaonis sp	2.74	1	7
Picrophilus torridus DSM 9790	1.54	1	2
Pyrobaculum aerophilum IM2	2.22	1	1
Pyrococcus abyssi GE5	1.76	1	1
Pyrococcus furiosus DSM 3638	1.90	1	2
Pyrococcus horikoshii shinkaj OT3	1.73	1	2
Sulfolobus acidocaldarius DSM 639	2.22	1	3
Sulfolobus solfataricus P2	2.99	1	1
Sulfolobus tokodaii strain 7	2.69	1	3
Thermococcus kodakarensis KOD1	2.08	1	2
Thermoplasma acidophilum DSM 1728	1.56	1	3
Thermoplasma volcanium GSS1	1.58	1	3

Data were gathered from GenBank http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi.

(Facciotti et al., 2007)

附表一、已定序之archaeal基因體中，其基礎轉錄因子的個數

A.

ID	Organism	Putative function	gi number
A_H.marism	H.marismortui.ATCC.43049	TATA-box binding protein E	gi55230263
A_h.coccus	haloarchaeal coccus LOC-1	TATA binding protein D	gi19073311
A_M.acetiv	Methanosarcina acetivorans str. C2A	TATA-binding protein	gi19918456
A_M.mazei.	Methanosarcina mazei Go1	Transcription initiation factor TFIIB	gi21227130
A_A.fulgid	Archaeoglobus fulgidus DSM 4304	transcription initiation factor IID	gi11497985
E_B.florid	Branchiostoma floridae	TATA-binding protein isoform 4	gi37727185
E_O.sativa	Oryza sativa	TATA-binding protein TBP2	gi31415973
E_Z.mays	Zea mays	TATA-binding protein	gi293904
E_T.aestiv	Triticum aestivum	DNA binding protein	gi21877
E_A.penicu	Acetabularia peniculus	TATA box binding protein	gi2654376

B.

ID	Organism	Putative function	gi number
A_h.coccus	haloarchaeal coccus LOC-1	TATA binding protein D	gi19073311
A_H.marism	Haloarcula marismortui ATCC 43049	TATA-box binding protein E	gi55230263
A_M.ethano	Methanosarcina barkeri str. fusaro	Transcription factor TFIID	gi68132603
A_M.acetiv	Methanosarcina acetivorans str. C2A	TATA-binding protein	gi19918456
A_A.fulgid	Archaeoglobus fulgidus DSM 4304	transcription initiation factor IID	gi11497985
E_N.tabacu	Nicotiana tabacum	TATA binding protein	gi1498162
E_S.tubero	Solanum tuberosum	TATA-binding protein	gi21581
E_E.cunicu	Encephalitozoon cuniculi GB-M1	TRANSCRIPTION INITIATION FACTOR TFIID	gi19068865
E_A.gambia	Anopheles gambiae str. PEST	ENSANGP00000006936	gi58389935
E_U.maydis	Ustilago maydis 521	transcription initiation factor TFIID-1	gi71012922

C.

ID	Organism	Putative function	gi number
A_h.coccus	haloarchaeal coccus LOC-1	TATA binding protein D	gi19073311
A_H.marism	Haloarcula marismortui ATCC 43049	TATA-box binding protein E	gi55230263
A_A.fulgid	Archaeoglobus fulgidus DSM 4304	transcription initiation factor IID	gi11497985
A_T.acidop	Thermoplasma acidophilum	probable TATA-box binding protein	gi10639343
A_S.tokoda	Sulfolobus tokodaii str. 7	hypothetical TATA-box binding protein	gi15622325
E_A.gambia	Anopheles gambiae str. PEST	ENSANGP00000006936	gi58389935
E_T.aestiv	Triticum aestivum	DNA binding protein	gi21877

附表二、NRC-1 TBP和TFB與其他物種轉譯起始位置比對之相關資訊

ID為呈現在GeneDoc上的名稱。A_: archaea，E_: eukaryote

(A) 比對TbpA之相關資訊 (B) 比對TbpB之相關資訊 (C) 比對TbpC之相關資訊

D.

ID	Organism	Putative function	gi number
E_S.tubero	Solanum tuberosum	TATA-binding protein	gi21581
E_T.aestiv	Triticum aestivum	DNA binding protein	gi21877
E_N.tabacu	Nicotiana tabacum]	TATA binding protein	gi1498162
E_U.maydis	Ustilago maydis 521	transcription initiation factor TFIID-1	gi71012922
A_h.coccus	haloarchaeal coccus LOC-1	TATA binding protein D	gi19073311
A_H.marism	Haloarcula marismortui ATCC 43049	TATA-box binding protein E	gi55230263
A_M.acetiv	Methanosarcina acetivorans str. C2A	TATA-binding protein	gi19918456
A_M.barker	Methanosarcina barkeri str. fusaro	Transcription factor TFIID	gi68132603
A_A.fulgid	Archaeoglobus fulgidus DSM 4304	transcription initiation factor IID	gi11497985

E.

ID	Organism	Putative function	gi number
E_A.penicu	Acetabularia peniculus	TATA box binding protein	gi2654376
E_T.aestiv	Triticum aestivum	DNA binding protein	gi21877
E_U.maydis	Ustilago maydis 521	transcription initiation factor TFIID-1	gi71012922
A_H.marism	Haloarcula marismortui ATCC 43049	TATA-box binding protein E	gi55230263
A_h.coccus	haloarchaeal coccus LOC-1	TATA binding protein D	gi19073311
A_A.fulgid	Archaeoglobus fulgidus DSM 4304	transcription initiation factor IID	gi11497985
A_T.volcan	Thermoplasma volcanium GSS1	Transcription initiation factor TFIID	gi13542225
A_T.acidop	Thermoplasma acidophilum	probable TATA-box binding protein (TFIID homolog)	gi10639343

F.

ID	Organism	Putative function	gi number
E_N.tabacu	Nicotiana tabacum	TATA binding protein	gi1498162
E_S.tubero	Solanum tuberosum	TATA-binding protein	gi21581
E_A.penicu	Acetabularia peniculus	TATA box binding protein	gi2654376
E_E.cunicu	Encephalitozoon cuniculi GB-M1	TRANSCRIPTION INITIATION FACTOR TFIID	gi19068865
E_A.gambia	Anopheles gambiae str. PEST	ENSANGP00000006936	gi58389935
A_h.coccus	haloarchaeal coccus LOC-1	TATA binding protein D	gi19073311
A_H.marism	Haloarcula marismortui ATCC 43049	TATA-box binding protein E	gi55230263
A_A.fulgid	Archaeoglobus fulgidus DSM 4304	transcription initiation factor IID	gi11497985
A_T.acidop	Thermoplasma acidophilum	probable TATA-box binding protein (TFIID homolog)	gi10639343
A_P.torrid	Picrophilus torridus DSM 9790	TATA-box binding protein	gi48477578

(D) 比對TbpD之相關資訊 (E) 比對TbpE之相關資訊 (F) 比對TbpF之相關資訊

G.

ID	Organism	Putative function	gi number
A_H.marism	Haloarcula marismortui ATCC 43049	transcription initiation factor IIB	gi55232111
A_A.fulgid	Archaeoglobus fulgidus DSM 4304	transcription initiation factor IIB	gi11498897
A_M.maripa	Methanococcus maripaludis S2	transcription initiation factor B	gi45357604
A_T.acidop	Thermoplasma acidophilum	transcription initiation factor IIB related protein	gi10640255
A_H.volcan	Haloferax volcanii	transcription factor B	gi5410473
E_H.sapien	Homo sapiens	general transcription factor IIB	gi57209367
E_C.famili	Canis familiaris	similar to general transcription factor IIB isoform 2	gi73959628
E_S.purpur	Strongylocentrotus purpuratus	similar to general transcription factor IIB	gi72141649

H.

ID	Organism	Putative function	gi number
A_H.marism	Haloarcula marismortui ATCC 43049	transcription initiation factor IIB	gi55230869
A_H.volcan	Haloferax volcanii	Transcription initiation factor IIB 2	gi14195256
A_M.burton	Methanococcoides burtonii DSM 6242	Transcription factor TFIIB	gi68212245
A_M.mazei.	Methanosarcina mazei Go1	Transcription initiation factor IIB	gi21227874
A_A.fulgid	Archaeoglobus fulgidus DSM 4304	transcription initiation factor IIB	gi11498897
E_R.norveg	Rattus norvegicus	general transcription factor IIB	gi13591965
E_C.famili	Canis familiaris	similar to Transcription initiation factor IIB (S300-II) isoform 1	gi57088257
E_H.sapien	Homo sapiens	TFIIB	gi254934
E_D.melano	Drosophila melanogaster	CG5193-PA	gi7297699
E_A.mellif	Apis mellifera	similar to Transcription initiation factor IIB isoform 1	gi48102797

I.

ID	Organism	Putative function	gi number
A_H.marism	Haloarcula marismortui ATCC 43049	transcription initiation factor IIB	gi55229682
A_H.volcan	Haloferax volcanii	transcription factor B	gi5410473
A_A.fulgid	Archaeoglobus fulgidus DSM 4304	transcription initiation factor IIB	gi11498897
A_Methanos	Methanosarcina.mazei.Go1	Transcription initiation factor IIB	gi21227874
A_M.maripa	Methanococcus maripaludis S2	transcription initiation factor B	gi45357604
E_X.tropic	Xenopus tropicalis	hypothetical protein LOC549031	gi62858845
E_X.laevis	Xenopus laevis	TFIIB	gi65129
E_R.norveg	Rattus norvegicus	general transcription factor IIB	gi13591965
E_D.rerio	Danio rerio	General transcription factor IIB	gi33585882
E_O.mossam	Oreochromis mossambicus	general transcription factor II B	gi50844459

(G) 比對TfbA之相關資訊 (H) 比對TfbB之相關資訊 (I) 比對TfbC之相關資訊

J.

ID	Organism	Putative function	gi number
A_M.acetiv	Methanosarcina acetivorans str. C2A	archaeal transcription factor B	gi19914407
A_M.mazei.	Methanosarcina mazei Go1	Transcription initiation factor IIB	gi21227874
A_A.fulgid	Archaeoglobus fulgidus DSM 4304	transcription initiation factor IIB	gi11498897
A_H.volcan	Haloferax volcanii	transcription factor B	gi5410473
A_H.marism	Haloarcula marismortui ATCC 43049	transcription initiation factor IIB	gi55230869
E_R.norveg	Rattus norvegicus	general transcription factor IIB	gi13591965
E_C.famili	Canis familiaris	similar to Transcription initiation factor IIB (S300-II) isoform 1	gi57088257
E_X.laevis	Xenopus laevis	TFIIB	gi65129
E_D.melano	Drosophila melanogaster	CG5193-PA	gi7297699
E_D.discoi	Dictyostelium discoideum AX4	transcription initiation factor IIB	gi66803286

K.

ID	Organism	Putative function	gi number
A_H.marism	Haloarcula marismortui ATCC 43049	transcription initiation factor IIB 5	gi55376520
A_A.fulgid	Archaeoglobus fulgidus DSM 4304	transcription initiation factor IIB	gi11498897
A_M.burton	Methanococcoides burtonii DSM 6242	Transcription factor TFIIB	gi68212245
A_M.therma	Methanothermobacter thermautotrophicus str. Delta H	transcription initiation factor TFIIB	gi2621979
A_H.volcan	Haloferax volcanii	Transcription initiation factor IIB 2	gi14195256

L.

ID	Organism	Putative function	gi number
E_X.tropic	Xenopus tropicalis	hypothetical protein LOC549031	gi62858845
E_X.laevis	Xenopus laevis	TFIIB	gi65129
E_D.rerio	Danio rerio	General transcription factor IIB	gi33585882
E_C.elegan	Caenorhabditis elegans	TFIIB (general transcription factor) family member (ttb-1)	gi17564892
A_H.marism	Haloarcula marismortui ATCC 43049	transcription initiation factor IIB	gi55231337
A_H.volcan	Haloferax volcanii	transcription factor B	gi5410473
A_M.mazei	Methanosarcina mazei Go1	Transcription initiation factor IIB	gi21227874
A_M.burton	Methanococcoides burtonii DSM 6242	Transcription factor TFIIB	gi68212245
A_A.fulgid	Archaeoglobus fulgidus DSM 4304	transcription initiation factor IIB	gi11498897

(J) 比對TfbD之相關資訊 (K) 比對TfbE之相關資訊 (L) 比對TfbF之相關資訊

M.

ID	Organism	Putative function	gi number
A_H.marism	Haloarcula marismortui ATCC 43049	transcription initiation factor IIB	gi55229682
A_M.acetiv	Methanosarcina acetivorans str. C2A	archaeal transcription factor B	gi19914407
A_M.barker	Methanosarcina barkeri str. fusaro	Transcription factor TFIIB	gi68134926
A_M.mazei.	Methanosarcina mazei Go1	Transcription initiation factor IIB	gi21227874
A_M.burton	Methanococcoides burtonii DSM 6242	Transcription factor TFIIB	gi68212245
E_X.tropic	Xenopus tropicalis	hypothetical protein LOC549031	gi62858845
E_X.laevis	Xenopus laevis	TFIIB	gi65129
E_D.rerio	Danio rerio	General transcription factor IIB	gi33585882
E_T.nigrov	Tetraodon nigroviridis	unnamed protein product	gi47215967

國立陽明大學 NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY

(M) 比對TfbG之相關資訊

蛋白質ID	全名/預期功能
O51971	TATA box binding protein A (TbpA)
TBPB	TATA box binding protein B
TBPC	TATA box binding protein C
TBPD	TATA box binding protein D
TBPE	TATA box binding protein E
TBPF	TATA box binding protein F
TF2B2	Transcription initiation factor IIB 2 (TfbB)
TF2B3	Transcription initiation factor IIB 3 (TfbC)
TF2B4	Transcription initiation factor II B 4 (TfbD)
TF2B5	Transcription initiation factor II B 5 (TfbE)
TF2B6	Transcription initiation factor II B 6 (TfbF)
TF2B7	Transcription initiation factor II B 7 (TfbG)
CSG	Cell surface glycoprotein precursor (S-layer protein)
Q9HNI1	Transcription regulator (Trh4)
Q9HNV9	Transcription regulator (Trh5)
Q9HQ80	Transcription regulator (Trh2)
Q9HRU8	Transcription repressor (SirR)
Q9HS73	Transcription termination-antitermination factor (NusG)
RPOA1	DNA-directed RNA polymerase subunit A'
RPOA2	DNA-directed RNA polymerase subunit A'' (Subunit C)
RPOB1	DNA-directed RNA polymerase subunit B'
RPOB2	DNA-directed RNA polymerase subunit B''
RPOD	DNA-directed RNA polymerase subunit D
RPOH	DNA-directed RNA polymerase subunit H
RPOK	DNA-directed RNA polymerase subunit K
RPOL	DNA-directed RNA polymerase subunit L
RPON	DNA-directed RNA polymerase subunit N
RPOP	DNA-directed RNA polymerase subunit P
THSA	Thermosome subunit alpha (Thermosome subunit 1)
THSB	Thermosome subunit beta (Thermosome subunit 2)

附表三、部分質譜結果，經*SEQUEST*搜尋匯出後呈現蛋白質代號註解(全名/功能)