106 年度生醫系專題研究競賽報名表

年級:三　學號:0417030　姓名:陳冠霖　指導教授:黃晟洋

題目(中文)：引子合成體蛋白質 DnaT 與單股 DNA、PriB 的複合結晶結構的解析並闡明 DNA 複製重啟中引子合成體組裝方式與載入解旋酶的換手機制

（英文）：Crystal structures of the primosomal protein DnaT in complex with ssDNA and PriB reveal a hand-off mechanism for primosome assembly and the helicase loading in DNA replication restart

摘要：

研究背景及動機：

細菌的 DNA 複製常會意外中斷，因而發展出與人類不同的 DNA 複製重啟(replication restart)系統，稱之為複製重啟的引子合成體(primosome)；因此，若能詳細研究出此細菌特有的 DNA 複製機制，可能有助於新型抗生素研發。此研究使用的克雷伯氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)是目前已知具有多重抗藥性的超級細菌(superbugs)之一，尤其對於免疫力下降的病人會有嚴重的感染，死亡率極高。引子合成體組裝包含 PriA、PriB、DnaT、DnaB、DnaC、DnaG、PriC 與 SSB 等八個相關蛋白質有順序的辨識並結合上停止的複製叉，然而在此換手機制中(hand-off mechanism)中，DnaT 是如何結合 DNA 並促使解旋酶的載入目前尚未清楚。我們透過結晶結構的解析來提供其分子結合機制，同時並找尋抑制劑來阻斷 DnaT 的功能，並希望最後能優化成為藥物作為醫療上實質運用，提供解決超級細菌的方案之一。

實驗方法：

首先利用大腸桿菌與其相關質體來大量表達這些重組蛋白質，再經由放大、離心、破菌、管柱層析、透析以及濃縮，純化出這些目標蛋白質，並經由 SDS-PAGE 來確認蛋白質純度。透過篩選數千種蛋白質結晶條件嘗試產生蛋白質晶體、利用 X 光繞射收集其繞射數據、經過電腦軟體 HKL2000 以及 ccp4i 分析，最後經傅立葉轉換(Fourier transform)來得到空間中的電子密度資訊，也就是得到蛋白質結構。在此研究，我們將嘗試使用多波長異常色散法(MAD)來得到 DnaT 結構的相位角(phase)。

實驗結果：

經過篩選、不斷修飾多種蛋白質結晶條件與透過光學顯微鏡在不同時間來觀察晶體的生長情形後，目前發現 DnaT 與單股 DNA dT25 在主沉澱劑為 PEG 4000 的條件下，出現柱狀且立體度明顯的晶體；而另外在 PEG 20000 為主的條件下也長出了方形片狀的晶體。我們亦在其他條件下發現了 DnaT 與 PriB 的複合結晶。目前已多次利用同步輻射光得到這些不同晶體的 X 光繞射數據並嘗試解出其結構。

研究結論及未來展望：

目前已得到 DnaT 各種複合晶體與其繞射數據，我們接下來將嘗試 MAD 等方式，來解出新蛋白質結構上會面臨到的相位問題。除了結構之外，我們亦已從一些天然物中篩選出可抑制 DnaT 活性的化合物，並利用結構模擬一步步優化，希能成為醫療上實際能運用的藥物。