

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系暨研究所



碩士論文

Department of Biochemical Science & Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

感覺型視紫質 SRM 和其傳導元 HtrM 對

嗜鹽古生菌光趨性之影響

The Functional Impact Of Photosensory Rhodopsin

SRM-HtrM In The Phototaxis Response Of Haloarchaea

陳政良

Jheng-Liang Chen

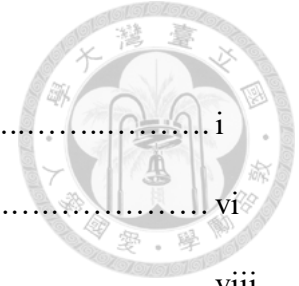
指導教授：楊啓伸 博士

Advisor : Chii-Shen Yang, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July 2017

# 目錄

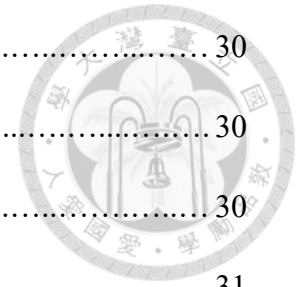


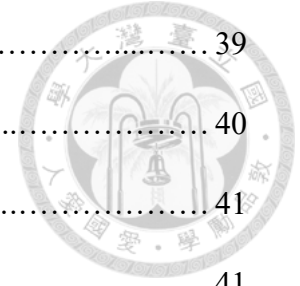
目錄.....	i
圖目錄.....	vi
表目錄.....	viii
摘要.....	ix
Abstract.....	x
<b>第一章 緒論.....</b>	<b>1</b>
第一節 嗜鹽古生菌之介紹.....	1
第二節 微生物視紫質.....	2
第三節 古生菌感覺型視紫質.....	7
I-3.1 紫外光/可見光譜.....	7
I-3.2 光週期.....	8
I-3.3 質子傳輸.....	9
I-3.4 重要胺基酸.....	11
I-3.5 演化探討.....	13
第四節 傳導元 (Transducer) 的結構與特性.....	14
第五節 嗜鹽古生菌的光趨性.....	16
I-5.1 SRs 於嗜鹽古生菌中的光趨性.....	16
I-5.2 嗜鹽古生菌的光趨性.....	16
I-5.3 SRs 調控光趨性之機制.....	18
第六節 研究動機及策略.....	20

<b>第二章 材料與方法</b> .....	22
<b>第一節 生物試劑</b> .....	22
II-1.1 菌種.....	22
II-1.2 質體.....	23
II-1.3 蛋白質藥品.....	23
<b>第二節 化學藥品</b> .....	23
<b>第三節 儀器設備</b> .....	25
II-3.1 核酸電泳.....	25
II-3.2 蛋白質電泳及轉印.....	25
II-3.3 離心機.....	25
II-3.4 光學設備.....	26
II-3.5 恆溫培養箱.....	27
II-3.6 酸鹼度計.....	27
II-3.7 其他.....	27
<b>第四節 實驗方法</b> .....	28
II-4.1 生物資訊學分析.....	28
II-4.1.1 基因資料庫.....	28
II-4.1.2 序列親緣比對.....	28
II-4.1.3 蛋白質結構分析.....	28
II-4.2 DNA 建構及轉形.....	29
II-4.2.1 小量核酸萃取.....	29
II-4.2.2 聚合酶鏈鎖反應 (PCR).....	29
II-4.2.3 DNA 膠體純化.....	30



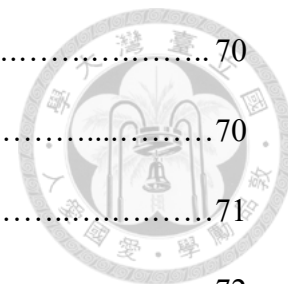
II-4.2.4 限制酶截切.....	30
II-4.2.5 DNA 黏合.....	30
II-4.2.6 大腸桿菌轉形.....	30
II-4.2.7 嗜鹽古生菌 <i>H. salinarum</i> 轉形.....	31
II-4.2.8 轉形株鑑定.....	32
II-4.3 重組蛋白質之表現及純化.....	32
II-4.3.1 重組視紫質表現.....	32
II-4.3.2 重組可溶蛋白質表現.....	33
II-4.3.3 重組視紫質純化.....	33
II-4.3.4 重組可溶蛋白質純化 (Hexa-His-tagged) .....	34
II-4.3.5 重組可溶蛋白質純化 (GST-tagged).....	34
II-4.3.6 <i>H. salinarum</i> 細胞膜之純化.....	35
II-4.4 蛋白質定量及定性.....	35
II-4.4.1 蛋白質定量.....	35
II-4.4.2 蛋白質變性電泳.....	36
II-4.4.3 蛋白質原態電泳.....	37
II-4.4.4 蛋白質轉印.....	38
II-4.4.5 免疫呈色.....	38
II-4.5 感光蛋白質光學分析.....	38
II-4.5.1 吸收光譜測定.....	38
II-4.5.2 視紫質光週期量測.....	39
II-4.5.3 光驅動離子幫浦活性測定.....	39
II-4.6 嗜鹽古生菌生理分析.....	39





II-4.6.1 泳動菌株挑選.....	39
II-4.6.2 顯微鏡觀察.....	40
II-4.6.3 光趨性分析.....	41
II-4.6.4 光照生長曲線.....	41
<b>第三章 實驗結果.....</b>	<b>43</b>
<b>第一節 蛋白質性質.....</b>	<b>43</b>
III-1.1 序列比對.....	43
III-1.2 結構模擬.....	44
III-1.3 pI 及 pKa.....	46
III-1.4 光誘發質子傳輸.....	49
III-1.5 光週期.....	50
<b>第二節 微生物光趨性研究方法.....</b>	<b>51</b>
III-2.1 顯微鏡觀察.....	51
III-2.2 ELISA Reader 測定.....	56
<b>第三節 SRM 及 SRM-HtrM 之移植.....</b>	<b>60</b>
III-3.1 DNA 確認.....	60
III-3.2 蛋白質表現確認.....	60
III-3.3 SRM 功能性測試.....	62
<b>第四節 嗜鹽古生菌之生理探討.....</b>	<b>64</b>
III-4.1 細胞型態.....	64
III-4.2 生長曲線.....	65
III-4.3 光趨性研究.....	67

第四章 結論與探討.....	70
第一節 微生物之光趨性研究.....	70
第二節 光趨性在生理上之意義.....	71
第三節 <i>H. salinarum</i> 的 SRM-HtrM 功能獲得型轉殖株.....	72
第四節 嗜鹽古生菌的光趨性機制.....	73
第五章 未來展望.....	74
第一節 感覺型視紫質的轉介.....	74
第二節 光趨性機制之研究方向.....	74
第六章 參考文獻.....	76
附圖.....	83

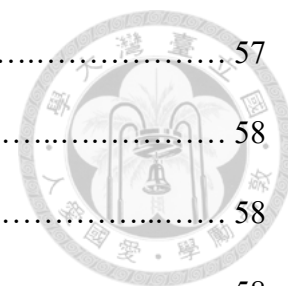


## 圖目錄



圖 1： 微生物視紫質之共通特性.....	2
圖 2： 嗜鹽古生菌中視紫質的分佈.....	4
圖 3： 嗜鹽古生菌中感覺型視紫質與其傳導元.....	6
圖 4： <i>H. salinarum</i> 感覺型視紫質的質子傳輸現象.....	10
圖 5： 感覺型視紫質重要胺基酸比對.....	12
圖 6： 傳導元之結構及比較.....	14
圖 7： 菌體泳動分析.....	17
圖 8： <i>NpSRII</i> 傳遞避光反應的訊息路徑.....	19
圖 9： 實驗流程表.....	21
圖 10： 感覺型視紫質之間的蛋白質多序列比對.....	45
圖 11： <i>HmCheR</i> 及 <i>HmHtrM</i> 之模擬結構 .....	46
圖 12： SRM 及其複合蛋白質之 pKa 測定.....	47
圖 13： 原態等電聚焦電泳.....	48
圖 14： SRM 及 SRM-HtrM 的氫離子傳輸能力 .....	49
圖 15： 顯微鏡之架設.....	52
圖 16： LED 燈源之波譜.....	53
圖 17： 樣品薄片.....	53
圖 18： 顯微鏡刺激光源的照射範圍.....	54
圖 19： 光源刺激時間.....	55
圖 20： 光趨性影像分析.....	55
圖 21： 光趨性分析裝置架設.....	56

圖 22： 照射光源的波譜.....	57
圖 23： 偵測光源範圍.....	58
圖 24： 光源限制片.....	58
圖 25： <i>C. reinhardtii</i> 於光趨性分析裝置之分析.....	58
圖 26： <i>C. reinhardtii</i> 在白光下的巨觀避光現象.....	59
圖 27： <i>H. salinarum</i> 轉形株的菌落 PCR.....	61
圖 28： <i>H. salinarum</i> 轉形株之 Western Blot.....	61
圖 29： <i>H. salinarum</i> 野生株及轉形株細胞膜的可見光吸收波譜.....	62
圖 30： SRM 及 SRM-HtrM 於不同條件之光週期分析.....	63
圖 31： <i>H. salinarum</i> 野生株及轉形株型態.....	64
圖 32： 嗜鹽古生菌於不同光照下之生長曲線.....	66
圖 33： 嗜鹽古生菌在顯微鏡之光趨性分析.....	68
圖 34： 嗜鹽古生菌在 ELISA Reader 之光趨性測定.....	69
圖 35： <i>E. coli</i> BL21 表現 <i>HmCheR</i> .....	75
圖 36： <i>E. coli</i> BL21 少量表現 GST 嵌合蛋白質.....	75





## 附圖目錄

附圖 1： 光照培養箱之設計.....	83
附圖 2： <i>H. salinarum</i> 的趨氧現象.....	83
附圖 3： 嗜鹽古生菌於不同光照下之菌體狀況.....	84

## 表目錄

表 1： 各類視紫質在四種嗜鹽古生菌中的分佈及吸收峰.....	8
表 2： 各蛋白質長度及帶電胺基酸的占比.....	44
表 3： <i>HmSRs</i> 在不同 pH 值下的光週期速率.....	50
表 4： 嗜鹽古生菌於不同光照環境下之世代時間.....	65
表 5： 單隻嗜鹽古生菌對 RGB 光源刺激之反應.....	67

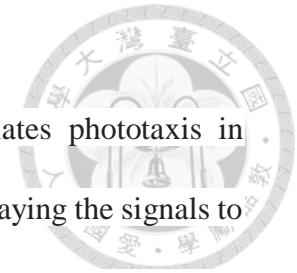
## 摘要



古生菌的感覺型視紫質 (Sensory Rhodopsin, SR) 可藉由感受不同可見光波長之光源，並藉由其對應之傳導元 (Transducer, Htr) 傳遞訊息，以調控嗜鹽古生菌之趨、避光反應。目前發現之 SRs 共有三種型態：SRI, SRII 及 SRM；其感受之可見光波長分別分佈於紅藍綠光波段。基因體的序列中，嗜鹽古生菌 *Natronomonas pharaonis* 僅具有調控吸收 ~498 nm 而驅動避光的 NpSRII、*Halobacterium salinarum* 擁有 SRII 及吸收~590 nm 來調控趨光的 SRI。本實驗室先前發表基因體的 *Haloarcula marismortui*，為一三色感光系統之嗜鹽古生菌，除了 SRI, SRII 以外，尚有一個功能未定的 SRM。SRI 及 SRII 之傳導元藉由類同細菌中化學趨性的 two-component system，將光訊號轉化為化學訊息傳遞至鞭毛，進而調控菌體之泳動；然而，SRM 的傳導元 HtrM 結構上缺乏了許多構件，因此我們推測 SRM-HtrM 應由其他機制調控嗜鹽古生菌之光趨性。本篇研究，先建立 SRM 及 SRM-HtrM 在二色感光系統 *H. salinarum* 菌株中的表現及確立其功能，再以兩種本篇研究發展之光趨性研究方法 (ELISA Reader 之量測及顯微鏡之觀察)，量化 *H. salinarum* 及其轉形株的光趨反應。初步結果顯示，SRM-HtrM 減少了 *H. salinarum* 在綠光及藍光下的避光反應；並且，在 HtrM 缺乏的轉形株中，該現象並沒有被觀察到。因此，我們認為 HtrM 的存在，對於 SRM-HtrM 複合蛋白質在 *H. salinarum* 中調控的趨光反應是重要的。未來，可以嘗試將 SRM-HtrM 複合蛋白質嵌入磷脂中，分析其與化學趨性相關蛋白質之間的交互作用，以解出其分子機制。

**關鍵字：**光趨性、感覺型視紫質、*Halobacterium salinarum*、SRM、HtrM

## Abstract



A group of photoreceptors, sensory rhodopsin (SR), regulates phototaxis in haloarchaea through absorbing diverse range of visible light and relaying the signals to the cell by their cognate transducer (Htr). To date, there are three types of SRs identified: SRI, SRII and SRM, and they response to red, blue and green light, respectively. Among the annotated archaeal genomes, *Natromonas pharaonis* solely own the NpSRII, which response blue light and mediates photorepellent; *Halobacterium salinarum* holds *HsSRII* and *HsSRI*, and *HsSRI* is known to absorb ~590 nm of light to mediate photoattractant. However, in *Haloarcula marismortui*, there exists three SRs, namely SRI, SRII and functionally unknown SRM. Previous studies showed that SRI and SRII transduce photo signal to flagellum through transducer and chemotaxis proteins, similar to two-component system of chemotaxis in bacteria. However, it is speculated that the SRM-HtrM complex regulates the phototaxis responses through new pathway as SRM-HtrM lacks many structural components seen in other transducers. In this study, we transplanted SRM and SRM-HtrM into *H. salinarum* cells and compare the phototaxis responses of *H. salinarum* and its transformants under different wavelengths of light through two new measurements developed in this study. It is found that SRM-HtrM decreased the photorepellent response of *H. salinarum* in green and blue light; but not in SRM transformant. The importance of HtrM in SRM-HtrM signaling was concluded. In future, the molecular mechanism of SRM-HtrM can be examined through measurements of the interaction between lipid-reconstituted SRM-HtrM with related chemotaxis proteins.

**Keywords:** Phototaxis, Sensory Rhodopsin, *Halobacterium salinarum*, SRM, HtrM

# 第一章 緒論



## 第一節 嗜鹽古生菌之介紹

自然界的生命系統，藉由 16S rRNA 的演化分析，被分為細菌、古生菌及真核生物；甚至可以藉此，區分出他們的種或屬<sup>[1,2]</sup>。其中，古生菌被相信是一群生活在地球早期環境的微生物，能夠適應早期的嚴苛環境，如高溫、高壓、高鹽、酸性及缺氧等等<sup>[3]</sup>。其中，嗜鹽古生菌能夠忍受高光照、高鹽 (1.5~2.5 M NaCl 以上) 且乾旱的環境<sup>[4,5]</sup>，包括在 1919 年最早被發現並且被研究較多的 *Halobacterium salinarum*<sup>[6]</sup>、於死海發現的 *Haloarcula marismortui*<sup>[7,8]</sup>、於埃及鹽湖分離出的 *Natronomonas pharaonis*<sup>[9]</sup> 及具有特殊扁方形狀且能忍受高濃度鎂離子的 *Haloquadratum walsbyi*<sup>[10,11]</sup>。嗜鹽古生菌廣泛分佈在世界各地<sup>[4]</sup>，並且隨著分子生物學的進步，嗜鹽古生菌中的模式生物 *Halobacterium salinarum* (*Halobacterium* sp. NRC-1) 及 *Haloarcula marismortui* 的全基因體已分別於西元 2000 及 2004 年被發表<sup>[3,12]</sup>，目前已經有 20 餘種嗜鹽古生菌的全基因體序列被記錄於資料庫中。

## 第二節 微生物視紫質 (Microbial Rhodopsins)

微生物視紫質 (Microbial Rhodopsin, MRho)，是普遍存在於微生物中，能夠感受可見光，並對微生物產生生理作用的一群穿膜蛋白質 [13,14]。這群感光蛋白質 (圖 1) 具有以下共同特性：(1) 由七個 alpha 螺旋穿膜區域構成的筒狀蛋白質，由 N 端至 C 端分別被標示為 A-G helix；(2) 由視黃醛 (retinal) 與 G-helix 上的離胺酸 (Lysine) 形成共價鍵結的 Schiff base 構成一個感光基團；(3) 蛋白質在基態時，發光基團為全反式視黃醛 (all-trans retinal)，並且發光基團受光子激發後，會變為 13-順視黃醛 (13-cis retinal)，進而改變蛋白質結構，使其變為數個不同中間激發態 (intermediates)；(4) 視紫質能夠依其 retinal binding pocket (RBP) 朝向細胞外或胞內，而分別定義為 E 及 C conformer [15]。

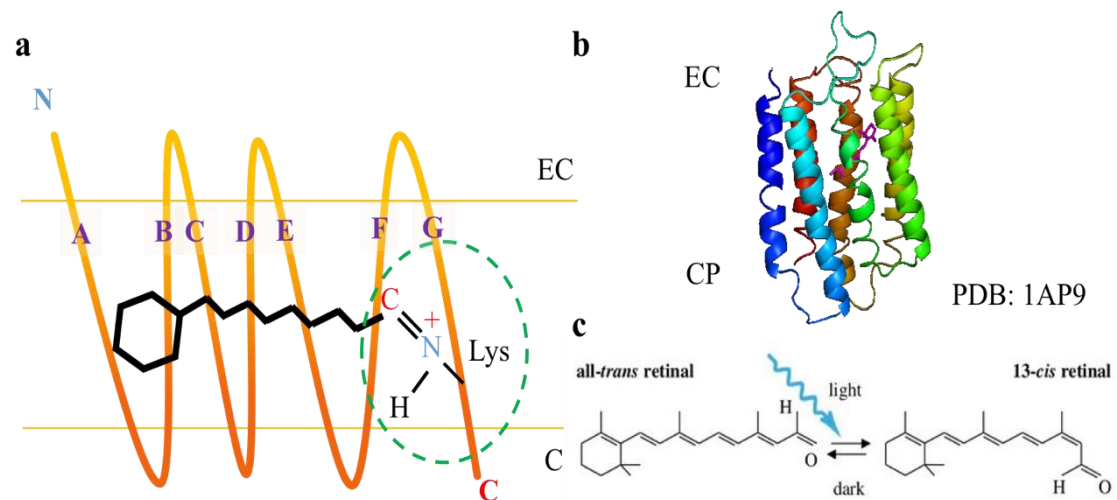



圖 1、微生物視紫質之共通特性。 a. 由 A 至 G 共七個 alpha 螺旋構成的穿膜區域，虛線圈出感光基團 all-trans-retinal 與蛋白質 G 螺旋上的離胺酸形成 Schiff base 鍵結。 b. 以菌式視紫質 *HsBR* 為模板，展示視紫質的蛋白質結構，藍色為 N 端，紅色為 C 端。 c. 發光基團 retinal 在光照前後，於 all-trans 及 13-cis 型態間之轉換。



統整目前在所有微生物中 MRho 的功能研究結果，MRho 主要可區分出光驅動離子幫浦 (light-driven ion transporters) 及光趨性受體 (phototaxis receptors) 兩大類 [14, 16, 17]。第一類中，包含了在嗜鹽古生菌中的菌式視紫質 (Bacteriorhodopsin, BR)、氣視紫質 (Halorhodopsin, HR) [18]，以及在海洋細菌中的鈉視紫質 (Sodium-pumping rhodopsin) [19]。而在第二類光趨性受體中，則包含了在嗜鹽古生菌的感覺型視紫質 (Sensory Rhodopsin, SR)、藍綠菌中的感覺型視紫質 (Anabaena Sensory Rhodopsin) [20, 21]、藻類中的陽/陰離子通道 (Cation / Anion Channel Rhodopsin, ChR) [22, 23] 調控微細綠藻的鞭毛等等。

在真菌，除了原先被發現的 Nop-1 的真菌視紫質 [24] 外，近年藉由生物資訊學的方式，也的確在許多真菌中發現視紫質的存在，並有其豐富的多樣性，如光週期快的、慢的以及離子傳輸與否的都有被報導過 [25, 26]，有些研究指出真菌視紫質能夠調控真菌的光趨性 [27]。

若只針對嗜鹽古生菌來看，截至目前的研究，這類 MRho 主要功能有三種 (圖 2)：菌式視紫質、氣視紫質、以及感覺型視紫質 [28]。值得一提的是，在目前發現的微生物視紫質中，有兩個功能尚未確定的蛋白質，分別為：*HwMR* [29] 及 *HmSRM* [30, 31]。

其中，*HwMR* 存在於缺乏感覺型視紫質的 *H. walsbyi* 中，該菌株藉由未知機制調控液胞 (gas vesicles)，而能在水域中改變可見光的獲取量 [11]。*HwMR* 在序列比對上被歸屬於 BR，但其同時具有光週期慢的特性，這又比較類似感覺型視紫質。*HmSRM* 則是存在於目前已知同時具有最多視紫質的嗜鹽古生菌 *H.*

*marismortui* 中 [31, 32]，由序列分析及基因體比對發現和它配對的傳導元 (transducer) HtrM [31]，推測其為感覺型視紫質，為本篇研究的重點。

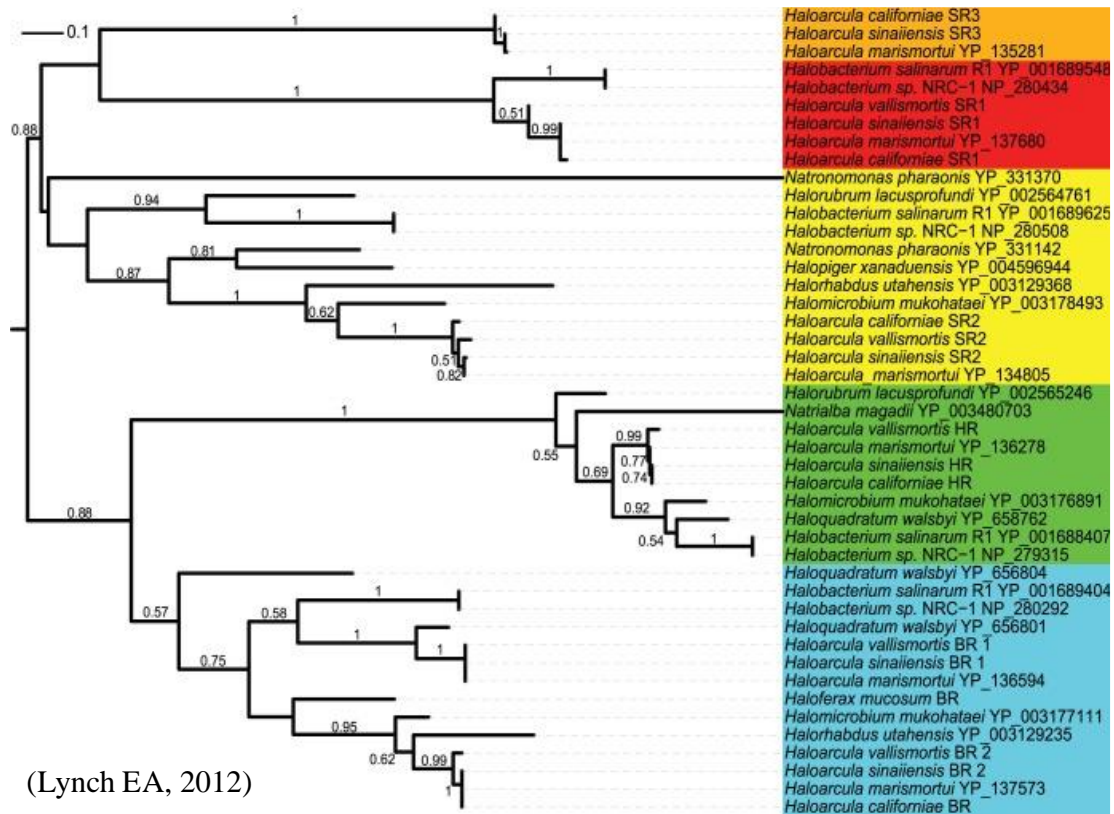


圖 2、嗜鹽古生菌中視紫質的分佈。將七株嗜鹽古生菌基因體中發現的微生物視紫質，按照蛋白質序列比對親緣關係，並以不同色塊標出五大類的微生物視紫質：BR (青色), HR (綠色), SRI (紅色), SRII (黃色), SRM (橘色)。標記方式為學名加上蛋白質名稱。圖中數字標出 Bootstrap value (>0.5)，數值越大表示統計資料的確定性越高。BR: bacteriorhodopsin; HR: halorhodopsin; SR: sensory rhodopsin。

菌式視紫質 (Bacteriorhodopsin; BR) 以三聯體為單位，聚集在古生菌細胞膜上，形成一塊連續性的特定區位，稱之為紫膜 (purple membrane) [35]。BR 是一個光驅動質子幫浦，能夠吸收 550 nm 波長附近的綠光波長，將質子從細胞內傳輸至細胞外 [33, 34]。藉由此質子傳輸形成胞內外間的質子濃度梯度，使質子由胞

外通過 ATPase 進入胞內時，以 10 : 3 的質子/ATP 分子比例，產生生物之能量分子 ATP [35]。*HsBR* 是最早從 *H. salinarum* 被選殖出來表現並定性的 BR，Pebay-Peyroula 更在 1997 年提出了解析度達 2.35 Å 的 X-ray 結構 [36]。其質子傳遞路徑及過程，也已經藉由點突變、X-ray 結晶繞射及 NMR 等技術，完整的呈現 [37]。

氯視紫質 (Halorhodopsin; HR) 為一光驅動氯離子幫浦，普遍最高吸收峰在於 570 nm 前後，能夠將氯離子從細胞外傳輸至胞內 [38]。於本實驗室 2016 年出版的研究中，發現其具有質子依賴 (*NpHR*, *HwHR*) 及非依賴 (*HsHR*, *HmHR*) 兩種氯離子運送型態 [39]。生理上，因為他廣泛存在於目前發現的嗜鹽古生菌中，並且和其他存活於高鹽環境的生物，以利用消耗 ATP 驅動 Na/Cl transporter 維持滲透壓 [40] 不同，是利用光能運送氯離子，被認為與維持細胞內滲透壓有關。

嗜鹽古生菌的感覺型視紫質，在視紫質本身外，還有一個具兩個穿膜區域 (alpha helix) 的傳導元 (transducer) 以氫鍵及電荷配對的方式依附在其 F & G 螺旋旁邊 (圖 3a) [41]。依其功能及吸收波段分為二類：吸收紅光波段並且調節趨光反應的 Sensory Rhodopsin I (SRI) [42]；及吸收藍光波段並調節避光反應的 Sensory Rhodopsin II (SRII) [43]。本實驗室發表的 Sensory Rhodopsin M (SRM) 則會吸收綠光波段，推測能夠增加趨光反應。感覺型視紫質 (*NpSRII*) 訊息傳遞機制，是由 F, G alpha 螺旋上兩個胺基酸：tyrosine, threonine，往外推送，將此感受訊號藉由氫鍵，物理性地傳導至旁邊的傳導元 (transducer) [44]。生理上，SRs 會以三聯雙聯體 (trimer of dimer) 的形式存在於細胞膜上，而此形式能夠增加其酵素活性達百倍 (圖 3b) [45, 46]。

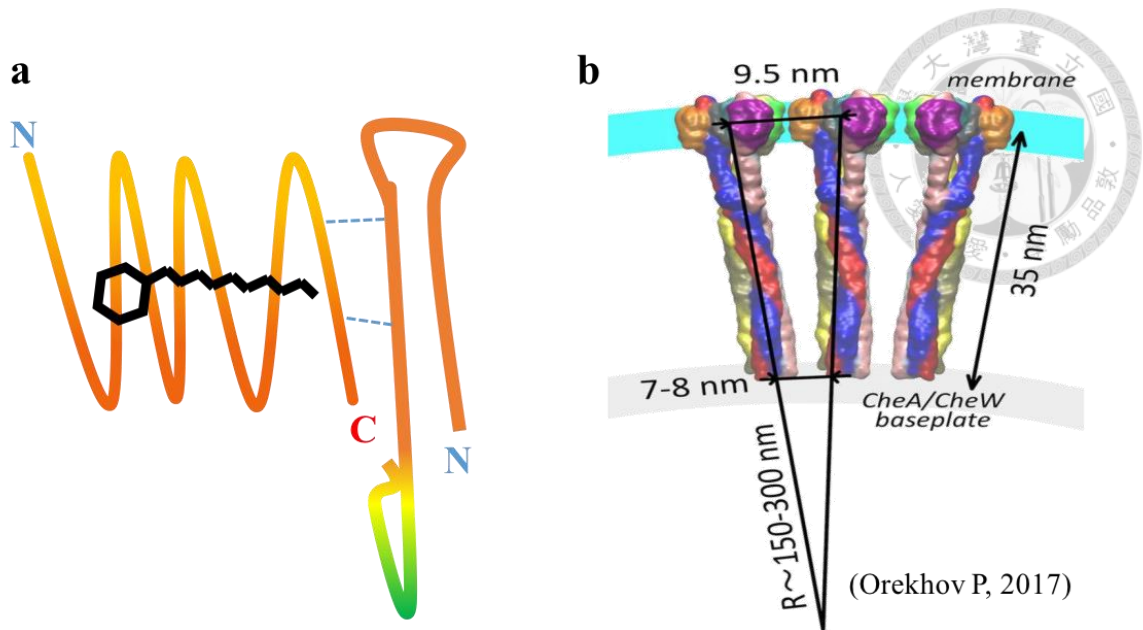


圖 3、嗜鹽古生菌中感覺型視紫質與其傳導元。 **a** 以 SRM 及 HtrM 的簡圖示意，感覺型視紫質與其傳導元之位置關係。 **b** 以 *NpSRII* 的 X-ray 結構表示，生理上感覺型視紫質以三聯雙聯體存在。SR 單元體之間距離約 9 nm、傳導元之長度約為 35 nm、傳導元之間的距離則為 7-8 nm。不同之單元體以不同的顏色標示。複合體胞內端以六個傳導元尖端，共同構成與 CheA/CheW 複合體結合之區域。

### 第三節 古生菌感覺型視紫質



MRho 彼此之間具有相似的主要結構，然其間亦有許多的異同之處，以下分成物理特性及演化觀點兩部分介紹古生菌的感覺型視紫質：第一部分 (3.1–3.3) 包含了，它們的吸收光譜、光週期及離子傳輸之現象；第二部分 (3.4, 3.5) 則以序列及蛋白質功能來探討它們在演化上的關係。

#### I-3.1 紫外光/可見光譜

如前節所提，所有的微生物視紫質，MRho，都是七穿膜的蛋白質，也皆使用視黃醛作為它們的感光基團，但相同的視黃醛分子被包在不同七穿膜蛋白質時，其分子環境是由不同的胺基酸支鏈所組成，因此，視黃醛被激發的波長，也就是其感受最敏銳的可見光波長（最高吸收峰）都不一樣。不同的最高吸收峰，可能意味著不同的生理功能、不同光週期快慢、和相同蛋白質，但在不同的構形狀態。因此，光譜分析可以幫助我們掌握蛋白質之特性及狀態。以感覺型視紫質為例，依其感受的可見光波段以及其調控的生理功能，可分為 SRI (趨光 / S<sub>373</sub> 參與避光反應)、SRM (推測為協助趨光反應) 及 SRII (避光) 三類，其於不同嗜鹽古生菌中的特徵吸收峰整理於 (表 1)。此外，研究也發現在不同 pH 值、氯化鈉濃度等條件下，也會造成特徵吸收波長的改變 [43, 47, 48]；甚或透過胺基酸點突變也可能造成吸收峰的藍移或紅移，可以進而推測出某些胺基酸對於 Retinal Binding Pocket 微環境的影響 [49-51]。



### I-3.2 光週期

光週期的定義為，當視紫質的發光基團 (retinal) 受到一個光子激發後，會從原本的 *all-trans* retinal 異構化為 *13-cis* retinal。這個異構化 (isomerization) 的過程，會帶動視紫質整體結構的改變，如前所述，發光團也隨著一系列蛋白質構形變化，改變其最高吸收波長。於是從基態引發一連串型態的變化，最後再回到基態，可以藉由測量特定狀態，最高吸收波長隨時間的變化而知，稱之為光週期 [52]。菌式視紫質的光週期通常都在數十毫秒 (millisecond) 內完成，其光週期因為最早被量測，因此由其定義出 K, L, M, N, O state，後續在視紫質光週期的研究中，也都沿用這些名詞表述 retinal 在光週期中的狀態改變 [52]。氣視紫質的光週期則稍微快一點，通常在數毫秒內完成，過程中 Schiff base 維持在質子化的狀態，缺乏 M, N state [53]。感覺型視紫質的光週期相對長很多，通常在一秒至數秒，甚或更久 [54, 55]，且具有以下特性：當 SRIs 與可以專一性作用的傳導元結合後，光週期會變得對於 pH 質較不敏感 (pH 4-8)；當 SRIIs 與專一性作用的傳導元結合後，光週期則會變得較快 [56]，這個特性也成為研究 SRs 是否與 transducers 作用的依據之一 [57, 58]。

表 1、各類視紫質在四種嗜鹽古生菌中的分佈及吸收峰。

Haloarchaea	$\lambda_{max}$				
	BR	HR	SRI	SRM	SRII
<i>H. marismortui</i>	552	576	578	503	483
<i>H. salinarum</i>	550	578	590	X	490
<i>N. pharaonis</i>	X	589	X	X	500
<i>Haloferax sp.</i>	X	X	X	X	X

表中的數字代表各個 MRho，在 micelle (DDM) 環境下的最高吸收峰 (nm)。

### I-3.3 質子傳輸

雖然感覺型視紫質主要功能為調控古生菌光趨性，但先前的研究也發現，感覺型視紫質在沒有傳導元的依附下，同樣會有類似 BRs 質子傳輸的現象。*HsSRI* 及 *HsSRII* 已於前人的努力下，對於其質子傳輸現象有較完整的陳述<sup>[59, 60]</sup>；*HmSRM* 則於近期研究中指出，未與傳導元結合的情況下，*HmSRM* 具有微弱質子幫浦能力<sup>[30]</sup>；但其與傳導元 *HtrM* 作用後的質子傳輸及光週期並未被研究。

目前的研究顯示，*HsSRI* 的質子傳輸機制較為複雜，但研究也認為質子傳輸或循環對於 SRs 的 M state (實際將光趨性訊號傳遞至傳導元的 state) 之形成都是重要的<sup>[59]</sup>。在沒有傳導元的作用且環境 pH 值高於中性的條件下，因為胞外側的 Asp76 會被去質子化而帶負電 (對應至 BR 的 Asp85)，成為 Schiffbase 的拮抗離子 (counterion)<sup>[61]</sup>，因此導致 *HsSRI* 的吸收峰藍移至 552 nm。此時 *HsSRI* 能夠像質子幫浦般，將質子幫浦至細胞外，且不會伴隨調節避光反應的 M' state 形成 (圖 4a)；反之，若 pH 值處於酸性，則 *HtrI*-free *HsSRI* 的吸收峰會紅移至 587 nm，若只有 587 nm 的光子激發，並不會有從胞外拿取質子的 M' state 形成，所以並無淨質子傳輸；但若同時給予 373 nm 波段的光子，則 *HsSRI* 能藉由 two-photon pathway 進入 M's state 而調控避光反應，質子向胞內淨傳輸<sup>[62]</sup>。然而當 *HsSRI* 與 *HsHtrI* 作用後，因為 Asp76 的 pKa 增加至 ~8.5<sup>[62]</sup>，質子僅能藉由胞內側的 His166 循環，並不會改變淨質子傳輸量 (圖 4b)<sup>[63]</sup>。利用這個質子傳輸抑制的現象，我們也可以判斷 SRIs 是否與傳導元作用。

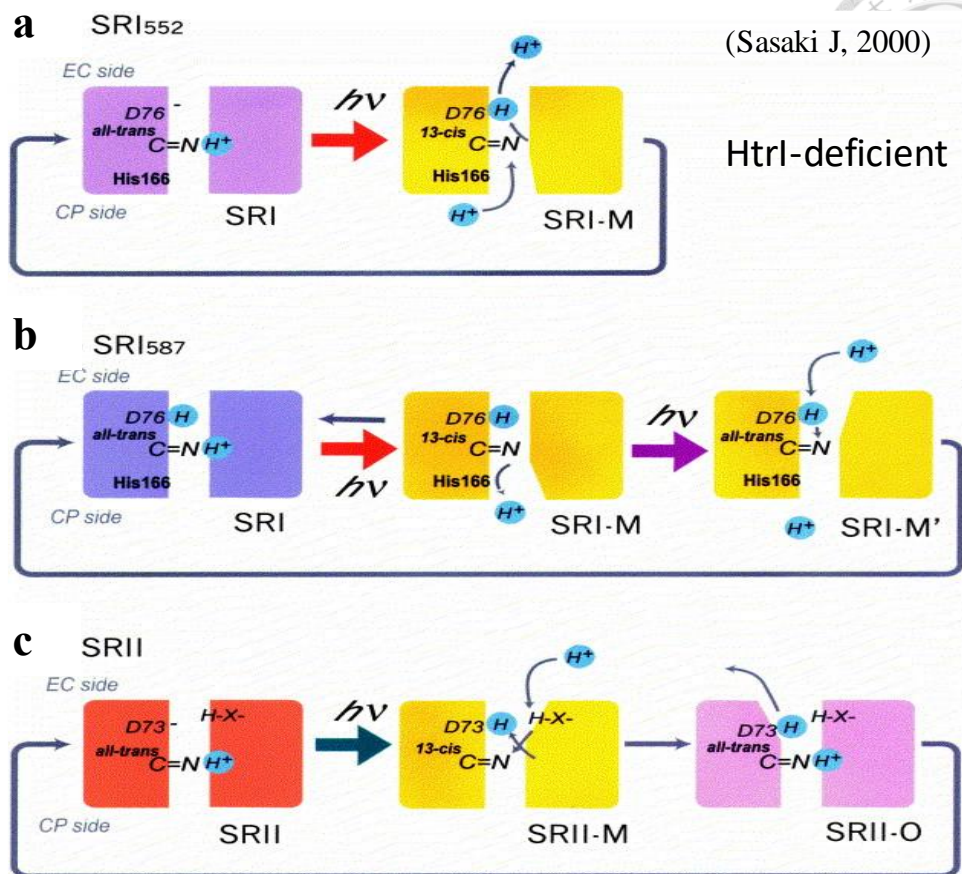


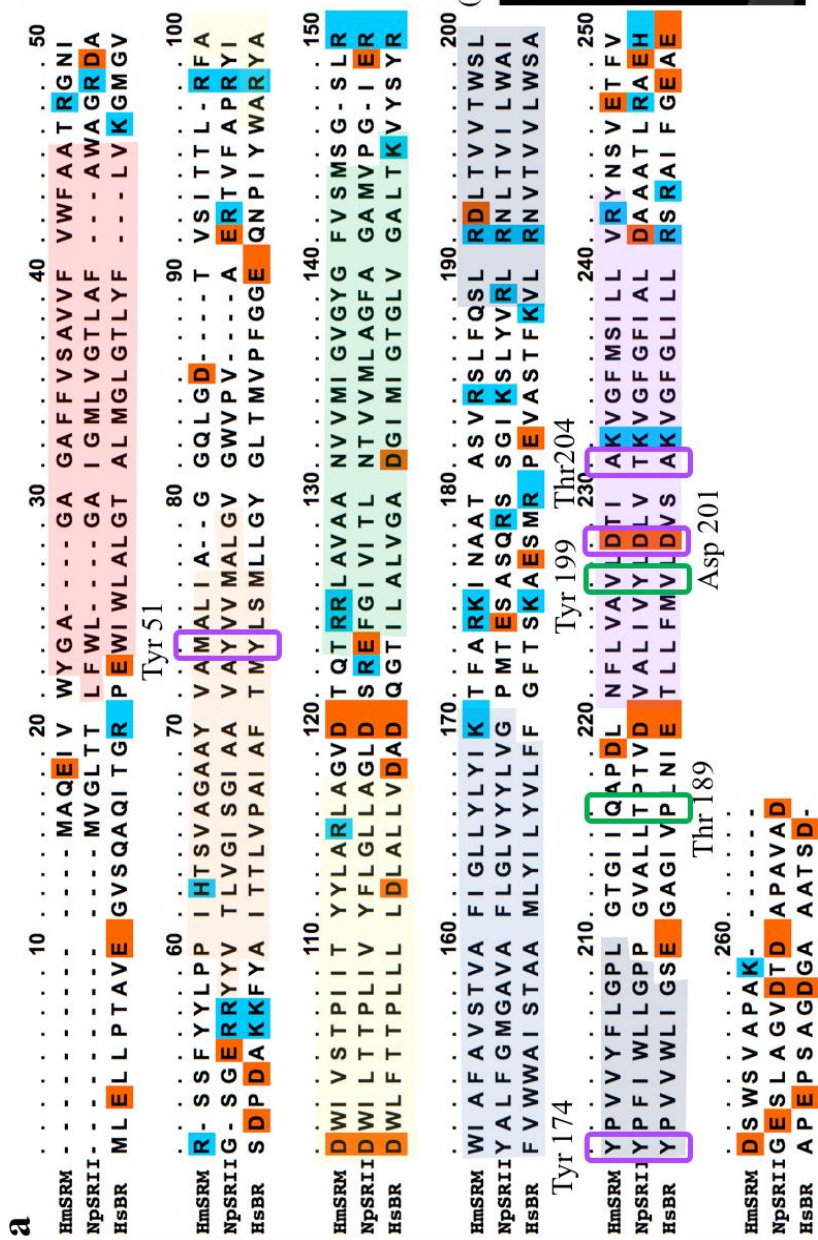
圖 4、*H. salinarum* 感覺型視紫質的質子傳輸現象。a SRI 在沒有傳導元作用下，吸收峰會藍移 35 nm，並藉由 His166 > Schiff base > D76 之路徑，將質子幫浦至胞外 b 當 SRI 與傳導元作用後，能夠進行 two photon pathway，進入可調控避光反應的 M' state。若僅有紅光刺激，則質子只會在胞內循環；若進入 M' state 則，整體質子往胞內淨傳輸 c SRII 與傳導元作用後，質子僅藉由 Asp73 在胞外循環。方框斜線開口標示了該狀態下，Schiff base 朝向的方向：胞外端 (E conformer) 或胞內端 (C conformer)。

*HsSRII* 於光週期的特徵跟 BRs 很像，並且也具有 Asp73 做為 Schiff base 的拮抗離子，承接了 M state 形成時丟出的質子 [64]。然而，在實驗結果中並未顯示出 (或說微弱至可忽略) 其具有質子幫浦的能力；在更進一步的研究指出，

Asp73 負責了在不同的 state 下，質子在胞外側的循環 (圖 4c)<sup>[60]</sup>。因為無實際資料指出 SRIIs 具有質子傳輸功能，所以也無法以此為依據，判斷 HtrII 是否與其作用。另外，HtrII 的結合，也不會提高 Asp73 及 Schiffbase 的 pKa; 在吸收峰的改變上，更沒有像 SRIs 與傳導元作用後，紅移達 35 nm<sup>[56]</sup>。值得一提的是，傳導元的作用會影響 SRs 進入 M state 時，F (G)-helix 向外的推出 (C conformer)。並且，HsHtrII 會加快 HsSRII – M, O state 的進行 (加速 Asp73 去質子化)<sup>[60]</sup>。F, G 螺旋的向外推出，導致 E, C conformer 轉換的動作，也被視為 SRs 感受光子並傳遞訊號的重要指標之一。在一些研究中發現，只要能觸發 SRs 處於 C conformer (對應至 SR 的 M state)，就能將光趨性訊息傳遞下去<sup>[65]</sup>。


### I-3.4 重要胺基酸

於 NpSRII 的研究中，藉由 X-ray 晶體繞射，可以得知 SRII 藉由哪些胺基酸與傳導元作用<sup>[66, 67]</sup>。在 SRII 的 Tyr51 (B-helix), Tyr174 (F-helix), Asp201 & Thr204 (G-helix) 構成了感光基團的結合區域(RBP)<sup>[66, 68]</sup>，利用氫鍵的網絡，將視黃醛產生形變的物理作用力傳導至 F 及 G-helix (圖 5c)<sup>[69]</sup>。Tyr51 對應至 SRM 為 Met54，但在 BRs 中同樣是 Tyrosine; Thr204 對應至 HsBR 及 NpSRII 都為 Alanine，並且 HsBR\_A215T 具有與 HtrII 作用的能力 (圖 5a)<sup>[66]</sup>。傳導元藉由兩個位置與 SRII 結合：Thr189 (F-G loop) / Glu43 (loop), Ser62 (TM2) 及 Tyr199 (G-helix) / Asn74 (TM2) [NpSRII / HtrII] (圖 5b)<sup>[15, 67]</sup>。Thr189 對應至 SRM 為 Glu189，在 HsBR 中則是 Proline; Tyr199 對應至 HsBR 及 NpSRII (199) 都為 Valine (圖 5a)。



**圖 5、感覺型視紫質重要胺基酸比對。** **a** *HmSRM*, *NpSRII* & *HsBR* 蛋白質序列的比對。紫色方框標示出 retinal binding pocket 的重要胺基酸；綠色方框標示出，*NpSRII* 朝外與傳導元作用的胺基酸；旁邊標示的胺基酸編碼，為對應至 *NpSRII* 上的胺基酸位置。**b** 結構上，*NpSRII* 與傳導元胺基酸之間的氫鍵作用（黃色虛線）。橘色箭頭表示，蛋白質變後，Y199 的移動方向。**c** *HsBR*（紅），*HsBR\_A215T*（黃）& *NpSRII*（藍）的 RBP 在結構上的比較。

### I-3.5 演化探討



嗜鹽古生菌的視紫質目前並沒有一個完整的演化理論，但從蛋白質序列比對、點突變及功能特性上，可以找出在演化上可能的相關性 [70]。 *HsBR\_D85T* (D85 為 BR Schiff base 的拮抗離子，對應至 HR 的位置)，具有與 HR 相似的氯離子幫浦功能 [71, 72]; 然目前仍無法以類似方法，將 HR 轉變為質子幫浦 [73, 74]。SRI 具有與 BR 類似的質子幫浦功能，但 SRII 因為缺乏了胞內端的質子受體，質子僅能在胞外端循環。在 *NpSRII* 的研究中，有個爭議的問題，在一些研究中顯示，氯離子會跟 *NpSRII* 結合，並且會有吸收峰及光週期上的差異 [75]。BR 也可以利用點突變的方式，將對應至 *NpSRII* 的 Thr189, Tyr199, Thr204 的胺基酸突變，成功地利用 BR 變異株傳導光趨性的訊號 [66, 76]。本篇研究的 *HmSRM* 在蛋白質序列的比對上 (圖 5a)，相較於 SRI，其相似度與 SRII 較近; SRII 在序列比對上又與 BR 相似度較高，因此目前認為 SRII 可能是由 BR 演化而來。

#### 第四節 傳導元的結構與特性

傳導元 (Transducer) 是 SRs 將光訊號轉換成生理化學訊號的一個重要輔助蛋白質，它專一性地依附在 SRs 旁邊 [58]，並以 2:2 的分子比例形成雙聯複合體 [51]。依其野生型態結合的 SRs 命名，如 *HsSRI* 的傳導元即為 *HsHtrI*，*HmSRM* 的傳導元即為 *HmHtrM*。傳導元的結構上 (圖 6a) 具有兩個穿膜 (transmembrane; TM) 的 alpha 螺旋: TM1, TM2、在胞內的 HAMP (Histidine kinases, Adenylyl cyclases, Methyl binding proteins, Phosphatases) domain 及 MCP (Methyl-accepting chemotaxis protein) domain。HtrI 的胞外環 (loop between TM1, 2) 普遍都很短，HtrII 的胞外環通常都長很多; 然而，*NpHtrII* 及 *HmHtrM* 的胞外環卻跟 HtrI 比較類似，並沒有很長。本篇研究的動機之一為，缺乏 MCP domain 及與 Che proteins 作用之尖端的 *HmHtrM* 如何調控光趨性(圖 6b)。

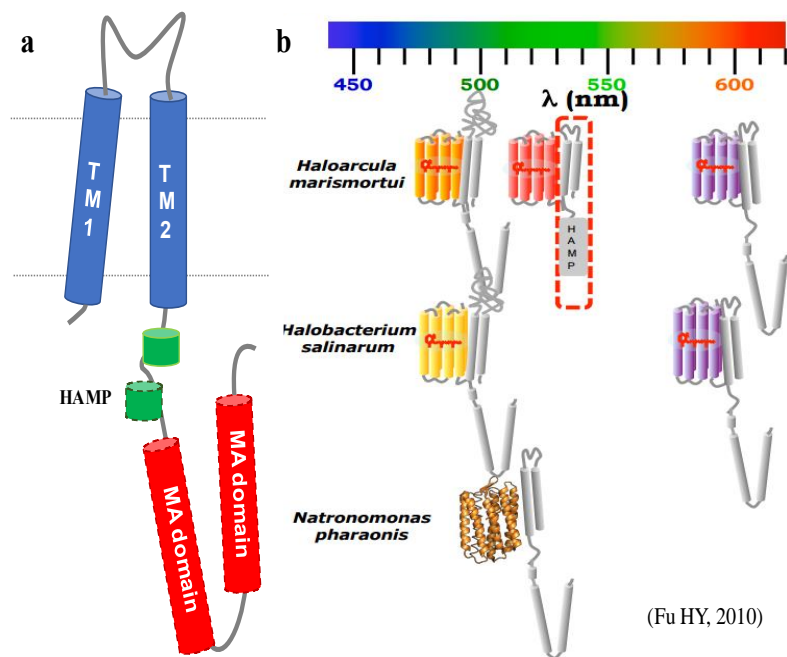



圖 6、傳導元之結構及比較。a 傳導元的基本結構。包含兩個穿膜螺旋 (藍)、胞外環 (上方灰)、HAMP domain (綠) 及 MA domain (紅)，下方的尖端則與 CheA/CheW 作用。然而，SRM 的傳導元 HtrM 缺乏了虛線的幾個區域。b 不同種的 SRs 在吸收波譜上的分佈。

左邊橘黃色的為 SRIIs，中間紅色的為 SRM，右邊紫色的則為 SRI。可看出傳導元的胞外環有長短之分，並且 HtrM 沒有很長且向下延長的尖端 (紅色虛線)。



在先前的研究中，傳導元與 SRs 的專一性由兩個穿膜區域及部分的胞內端即可決定 [77]。在 *HsSRI* 的研究上，只需要 *HsHtrI* 由 N 端算起的 147 個胺基酸，即可專一性地結合並穩定 *HsSRI* [58]。有趣的是，當把 *NpSRII* 接上一個複合傳導元 (*NpHtrII* + *E. coli* Tsr)，藉由 *NpHtrII* 的兩個穿膜區域及一個 HAMP domain，該傳導元可以傳遞 *NpSRII* 感受的藍光訊號，並且藉由大腸桿菌的化學趨性受體 Tsr 的胞內端，改變化學趨性系統 (chemotaxis signaling pathway) 的活性 [78]。在 *NpSRII* 與 *HsBR* 的結構比較上，SR 胞內端的表面電荷相較於 BR，帶有許多正電荷，推測與傳導元胞內端負電荷胺基酸的電荷作用有關，因此 BR 無法與傳導元結合 [79]。

光子趨動 SRs 的 F-helix 推出後，造成了傳導元的 TM2 旋轉了 12-30 度 [80]，這個旋轉的動作導致了下游各個元件，包含 TM2、HAMP1、HAMP2、甲基化區域及尖端，能動性 (dynamic) 的交替轉換。於 *NpSRII* / *HtrII* trimer of dimer 的研究中，發現在活化訊息的傳遞狀態下，TM2、HAMP2 及尖端的活動性較高 [81]。因此，以雙聯體形式結合在尖端的 CheA/CheW 能夠被活化，而進行生化訊息的傳遞。另外，甲基化區域可逆的甲基化 (methylation) 反應也影響了該區域的能動性，在 CheR 的幫助下，該區域會被甲基化，並且因為電荷減少的緣故，彼此靠近造成該區域的能動性下降 [81]。此舉會增加尖端的能動性 (因為能動性的高低，是各元件間交替起伏的)，而活化與尖端結合的 CheA kinase，將訊息以生化路徑傳遞至鞭毛 (圖 8) [81]。

## 第五節 嗜鹽古生菌的光趨性



### I-5.1 SRs 於嗜鹽古生菌中的分佈

感覺型視紫質顯然並非嗜鹽古生菌必要的蛋白質，並且在不同的嗜鹽古生菌中，分布的數量也不同 (表 1, 圖 6b); 然而，它可以將菌體帶至適合 BRs 作用並且輻射傷害較少的光照環境。藉由這些具有不同數量 SRs 的嗜鹽古生菌 (包含了在基因體鑑定上沒有發現視紫質的菌株 *Hfx*)，我們可以更廣泛地去探討，*HmSRM-HtrM* 在調控光趨性的機制中，扮演的角色。

### I-5.2 嗜鹽古生菌的光趨性

微生物感光的目的，通常為避開有害藍光或找到利用光源的最佳生態地理位置。對於嗜鹽古生菌來說，生理上，他們必須在面對有害的藍光及利於 BRs 作用，進而產生 ATPs 的黃綠光，之間取得一個平衡。如前所述，目前主要以蛋白質序列、感受的光源波段及其調控的生理功能，將感覺型視紫質分為三類：SRI 可以感受橘至紅光波段光源，其 M state 傳遞了趨光反應的訊息 [42]。然而，如果在 SRI 進入 M state (S<sub>373</sub>) 時，再給予另一個藍光光子，可以使其進入 M' state 則會傳遞避光反應的訊號 [82]。SRMs 可以感受綠光 ( $\lambda_{max} = 503 \text{ nm}$ )，在生理上的泳動分析，推測它的作用是增加趨光反應的效應 (圖 7; unpublished data from Lin Y.C.)。SRIIs 感受藍光光源，並且傳遞避光的訊號 [43]，目前主要的研究都在於，僅具有 SRII 的嗜鹽古生菌 *Natromonas pharaonis* 的 *NpSRII* 上。目前僅有 *Haloarcula* 屬被發現，同時擁有這三種 SRs; 而 SRs 在嗜鹽古生菌中也不是並非每個都是必要的 (表 1)。



先前於感覺型視紫質如何調控光趨性的機制，主要在於 *NpSR*II 的機制研究。目前認為 SRI 及 SR<sub>II</sub> 共用了 Che (chemotaxis) proteins，(細菌調控化學趨性的 two-component system) 調控了嗜鹽古生菌的光趨性。SRs 受光激發後，藉由推出的 F helix，使傳導元的 TM2 位移。傳導元的整體結構有如蹺蹺板，有許多元件間的節點，在活化及非活化的狀態下，各區域會在動態及靜態之間轉換 [81]。以此機制去調節 CheA(藉由 CheW 的輔助而結合在傳導元尾端) 的活性，進而磷酸化 CheB 及 CheY 而使其活化，CheB-P 能將傳導元的 MCPs 去甲基化，CheZ 則負責將 CheY-P 去磷酸化。CheY-P 能夠調控菌體的鞭毛，使其產生 tumble 的反應而轉向，在整個系統重置後，菌體改為前進模式，最後產生避光的折返現象 [81]。

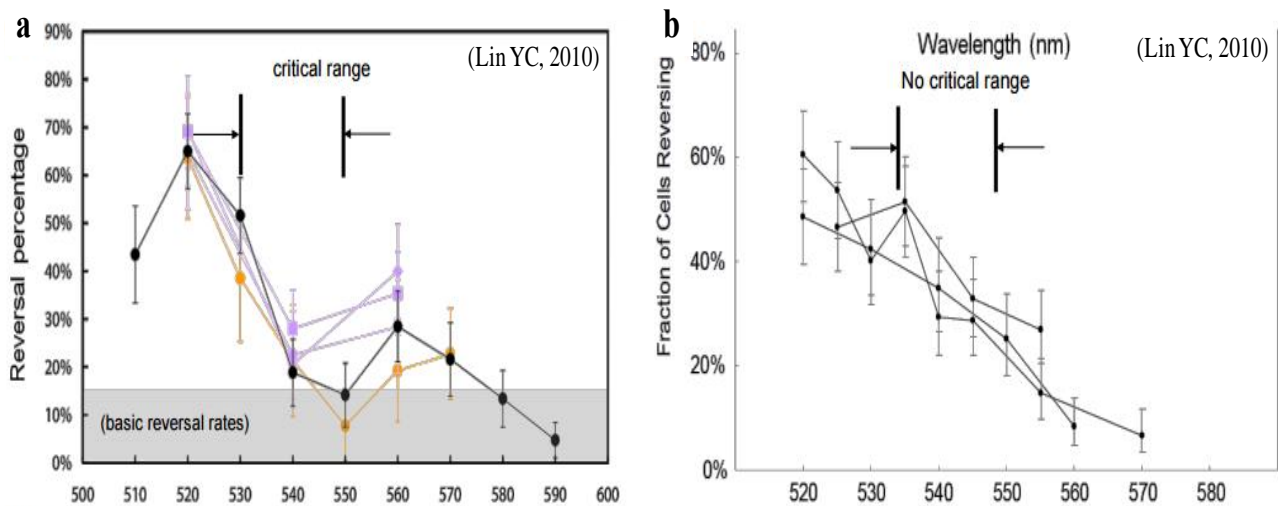


圖 7、菌體泳動分析。a *Haloarcula marismortui* b *Halobacterium salinarum*，在不同波長的光源脈衝(0.5 sec) 刺激後，菌體折返的機率 (偏移原路徑 >90°)。折返率越高，代表越高的避光反應。X 軸為使用光源之波長，單位：nm。

### I-5.3 SRs 調控光趨性之機制



避光反應（菌體折返）的過程牽涉了許多的蛋白質，按順序為：Sensory rhodopsin (SR)、Transducer (Htr)、CheA/CheW、CheR、CheB、CheY、CheZ 及鞭毛。*NpSRII/HtrII* complex 本身就是一個感受光刺激的 two component system。CheR 是一個持續活化的酵素，持續地將傳導元甲基化，維持 *NpSRII/HtrII* complex 在高光敏度，也是在一個週期的光刺激後，將感光系統重置 (reset) 的酵素 [45]。訊息傳導的完整流程如下：(1) *NpSRII* 受藍光激發，retinal 構型由 *all-trans* 變為 *13-cis*，帶動 F(G)-helix 向外推出。(2) 推出的 F-helix，造成傳導元 TM2 旋轉，改變該區域的能動性。(3) 藉由交替的能動性改變，傳導元尖端活化與其結合的 CheA/CheW 雙聯複合體。(CheA 為 kinase; CheW 為幫助 CheA 結合在傳導元尖端的蛋白質) (4) 被活化的 CheA，會將 CheB 及 CheY 磷酸化而使其活化。(5) CheB-P 會將傳導元的甲基化區域去甲基化，傳導元失去活性（負回饋抑制）(6) Che-Y 則跑去活化鞭毛，使其產生 "tumble"（順時針轉動）的生理反應，藉此將菌體轉向。(7) CheZ 會將 CheY-P 去磷酸化，將其重置。(8) 當整個訊息傳遞完 "tumble" 的訊息並且重置後，細胞轉為 "Run"（逆時針轉動）的模式，產生了一個折返的生理反應 (圖 8) [81]。

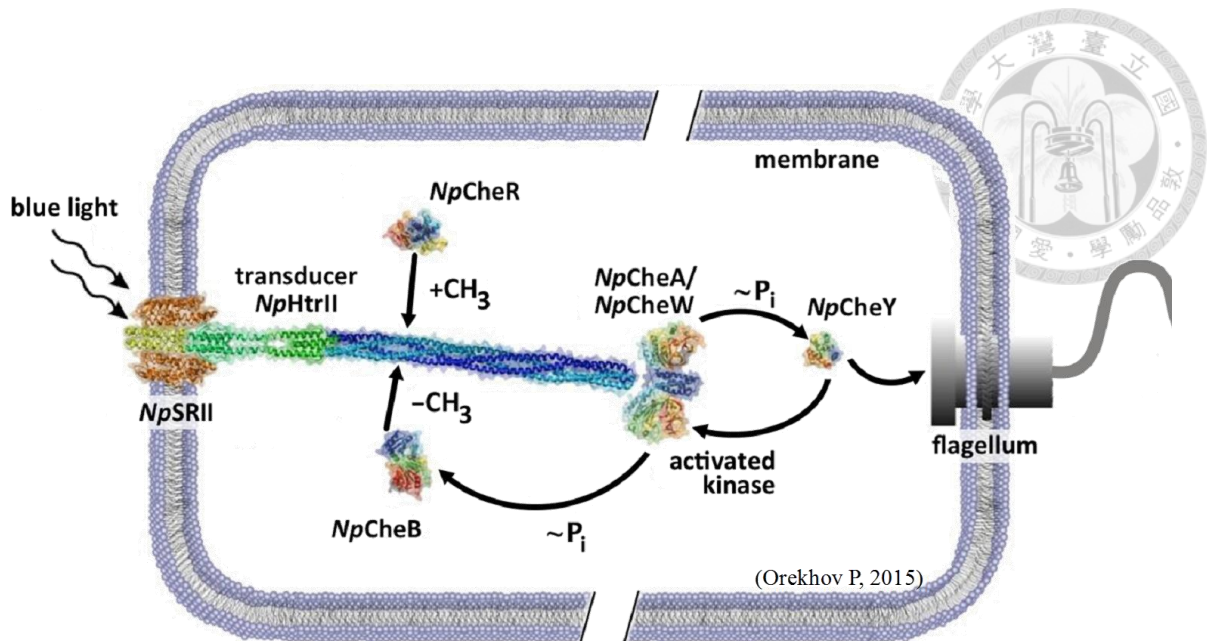


圖 8、*NpSRII* 傳遞避光反應的訊息路徑。*NpSRII* 及 *CheA/CheW* 都是以雙聯複合體的形式存在，*CheR* 是一直具有活性的甲基化酵素，*CheR* 及 *CheY* 則是被 *CheA* kinase 磷酸化後，才活化的去甲基化酵素及鞭毛調控因子。另外，有個未標示出的 *CheZ* 酵素，會將磷酸化的 *CheY* 去磷酸化，以重置訊息的傳遞。

## 第六節 研究動機及策略



本實驗室的傅煦媛博士於2010年，發表了一篇關於在 *Haloarcula marismortui* 這株於死海發現的嗜鹽古生菌中，定義出截至目前為止，具有最多視紫質的古生菌<sup>[31]</sup>。其中，有個視紫質因為藉由胺基酸序列比對，發現既沒有類似光驅動離子傳輸受體的序列，也沒有能夠與傳導元交互作用的保守胺基酸，因此命名為未知功能的 opsin: *xop2* (*HmSRM*)。於光週期的研究中，發現 SRM 的光週期很慢，與 SRs 的特性類似。並且在後續的基因體研究中，發現該基因下游有一個 184 個胺基酸的 HAMP domain 蛋白質，是可以與 *HmSRM* 作用的傳導元 *HmHtrM*。因此，目前認為 *HmSRM* 是一個感覺型視紫質，並且與僅具有兩個穿膜區域及一個 HAMP domain 的傳導元 *HmHtrM* 作用。由於這個蛋白質在生物資訊學上的分析，不同於以往定義出的視紫質 (BR, HR, SRI, SRII)，因此我們對於這個蛋白質在生理上，是否與先前研究的看法相同，有極大的興趣。

本篇研究著重於 *HmSRM* 的兩個層面：(1) 生理上，它在趨光反應中產生的效應 (2) 機制上，*HtrM* 是否為光趨性調控的重要元件。

本實驗室在先前於 SRM 的研究中，發現 *H. marismortui* 相較於只有 SRI 及 SRII 的 *H. salinarum*，在面對接近綠光波段的光源時，會有一個明顯快速上升的趨光反應 (圖 7)。並且由於 *HtrM* 的胞內端缺少許多結構，因此推測 SRM-*HtrM* 複合體，可能會與 CheR 或 CheB 結合，“間接”地調控光趨性系統的活性。本研究藉由轉基因菌株 (*Hs<sup>SRM</sup>*, *Hs<sup>SRM-HtrM</sup>*) 及重新設計之光趨性分析系統，分析具有不同數量 SRs 的菌株，觀察 SRM 對於嗜鹽古生菌光趨性的影響。

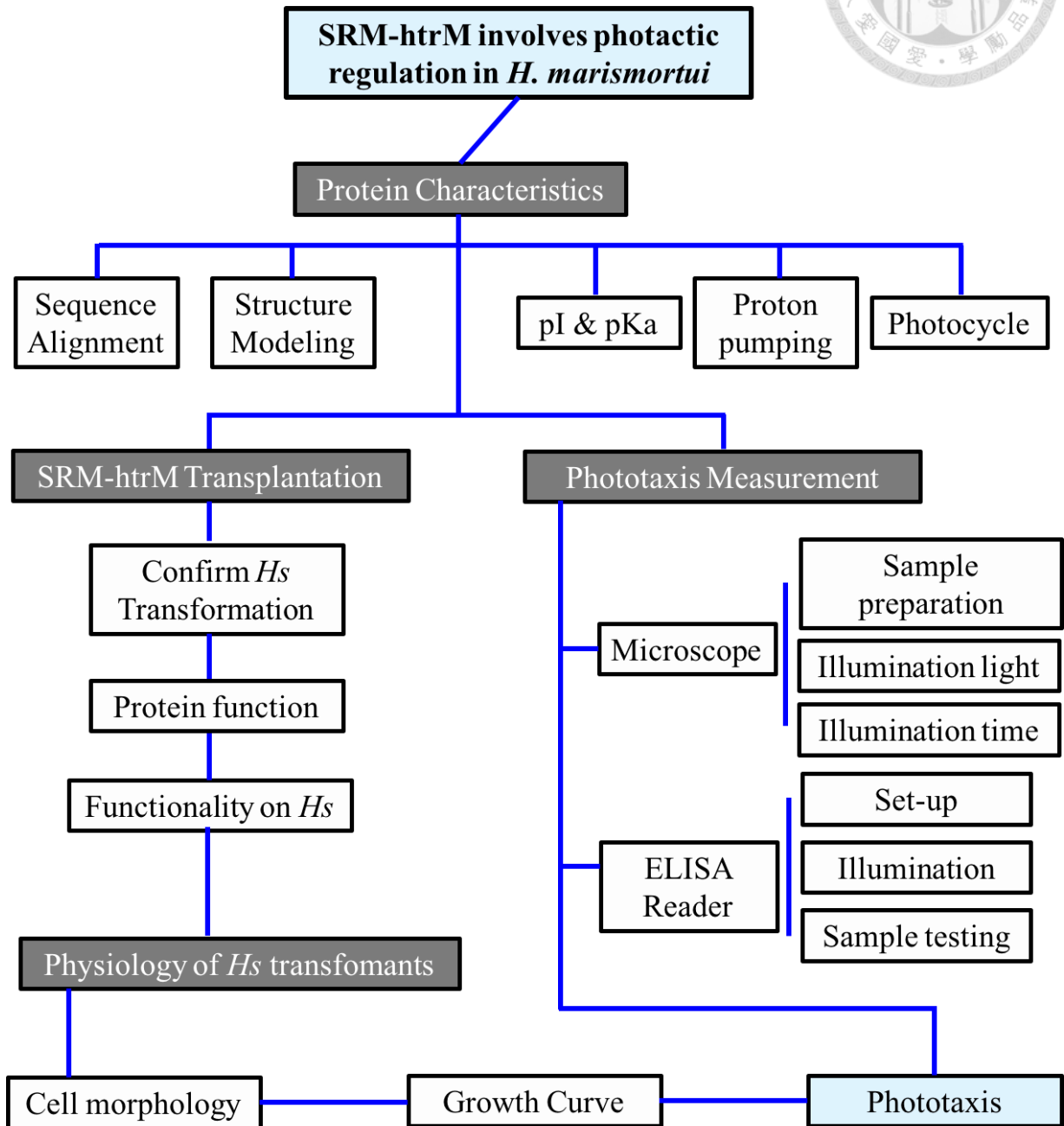


圖 9、實驗流程表。本研究分為四大部分：*HmSRM* 蛋白質的性質、*HmSRM* 在 *H. salinarum* 轉形株的建立、光趨性研究方法的建立及 *H. salinarum* 轉形株之生理分析。

## 第二章 材料與方法



### 第一節 生物試劑

#### II-1.1 菌種

*E. coli* strain DH5 $\alpha$ ，用以放大複製及保存質體。

*E. coli* strain BL21 (DE3)，用以表現重組可溶蛋白質。

*E. coli* strain C43 (DE3)，基因突變所致細胞膜增生之細胞株。用以表現重組視紫質(穿膜蛋白質)。由中央研究院 王惠鈞博士實驗室提供。

*Haloarcula marismortui* ATCC 43049，於 2010 年由本實驗室 傅煦媛博士發表具有六種視紫質之嗜鹽古生菌。本研究中之感覺型視紫質 *HmSRM* 及 *HmSRM-HtrM* 即為其視紫質之一。由國立陽明大學 生物技術研究所 吳韋訥博士實驗室提供。

*Halobacterium salinarum*，具有 SRI 及 SRII 兩種感覺型視紫質的嗜鹽古生菌。

*Chlamydomonas reinhardtii* (137C)，野生株的單細胞綠藻，具有兩根鞭毛及眼點，調控光趨性反應。由國立臺灣大學 生物科技研究所 陳仁治博士提供。

#### II-1.2 質體

pET-21b: 用於表達重組蛋白質 (包含 *xop2*, CheB, CheR)

pET-Duet: 用於建構及表現兩目標重組蛋白質之結合蛋白質。(包含 *xop2-xHtrII*); 本研究中使用之基因為將 6His-tag 放在傳導元 *xHtrII* 兩個穿膜螺旋之間的胞外環。

pGEX 4T-1: 用於表現 GST 蛋白質，並且建構 GST-CheR 及 GST-CheB 嵌合蛋白

質的載體。

以上載體皆由 T7 promoter 所調控，藉由 IPTG 誘導，於 *Escherichia coli* 異源表現系統中表現重組蛋白質。




pJS005: 使用菌式視紫質的啟動子 *bop* promoter 作為大量表現目標基因之啟動子，於低氧高光照的條件下被誘導。此研究中使用，分別將 *xop2* 及 *xop2-xHtrII* 放在 pJS005 載體的兩個建構質體。

### II-1.3 蛋白質藥品

酵素名稱	生產廠商
DNA T4 ligase	Yeastern Biotech
Restriction enzyme	Fermentas fast digest
2x PCR Dye Master Mix II (Taq; red)	GeneMark
GoTaq® Green Master Mix (2x)	Promega
2x Pfu PCR MasterMix (blue)	Genomics
Penta His HRP Conjugate kit	QIAGEN

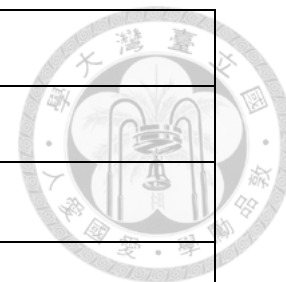
### 第二節 化學藥品

藥品名稱	生產廠商
Acrylamide/Bis-acrylamide, v/v = 37.5:1, 40% solution	J. T. Baker
Agar	Bioshop
Agarose (Halo-plate)	Bioman
Agarose (DNA gel)	MDBio



all- <i>trans</i> retinal	SIGMA
Ampicillin	Bioman
Beta-mercaptoethanol	Bioman
Commassie Blue R-250	Biobasic
Diaminobenzidine (DAB-HCl)	SIGMA
DNA ladder 100 bp marker	Bioman
Gel extraction kit	Geneaid
HealthView Nucleic Acid Stain	Genomics
High-speed plasmid mini kit	Geneaid
Hydrochloric Acid 36.5-38.0 %	J. T. Baker
30% Hydrogen peroxide	SIGMA
Imidazole	Fluka Analytical
Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	Bioman
Luria-Bertani Broth	Neogen
Magnesium chloride hexahydrate	SIGMA
MES hydrate	SIGMA
Methanol	GENEStar
N-dodecyl-beta-D-maltoside (DDM)	Anatrace
Ni-NTA resin	GE Healthcare
Oxido LP0034 peptone	Oxoid
Potassium chloride	J. T. Baker
Prestain protein marker	Geneaid
Sodium chloride	SIGMA

Sodium citrate	Fluka Analytical
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	SIGMA
Tris-HCl	AMRESCO
Trisodium chloride	J. T. Baker



### 第三節 儀器設備

#### II-3.1 核酸電泳

迷你水平電泳槽及鑄膠器：需璟實業 MJ-105

電源供應器：Bio-Rad PowerPac Basic Power Supply

#### II-3.2 蛋白質電泳及轉印

蛋白質垂直電泳鑄膠器：Bio-Rad

蛋白質垂直電泳槽：Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis cell

蛋白質轉印槽：Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell

電源供應器：Major Science (MP-250V power supply)

#### II-3.3 離心機

桌上型低速離心機：CUBEE Mini Centrifuge

桌上型離心機：KUBOTA KM-15200

低溫桌上型離心機(置冰箱內)：GyroSpin Mini (10-001-04-0007)

落地式懸籃中低速離心機：KUBOTA 5910

落地式高速離心機：HITACHI CR 21 GII

落地式超高速度離心機：HITACHI Ultracentrifuge CP80WX



### II-3.4 光學設備

分光光度計	HITACHI U-1900
ELISA Reader	Molecular Device Spectramax
96 孔黑盤	Greiner Bio-one
顯微鏡架設	
光學顯微鏡	OLYMPUS BH-2
RGB LED 燈泡	DL 夢想地; DSL5W-16
恆溫熱盤	KITAZATO MR-10DMF
CCD camera	MINTRON MTV-62V6HN
樣品薄片	載玻片 (KIMBLE)、蓋玻片、透明膠帶 (北極熊)、凡士林 (Vaseline)
光週期測量架設	
可調式超短脈衝雷射	LOTIS TII LS 2137/3
光電倍增管	Photomultiplier; Hamamatsu R928
PMT Socket	Hamamatsu E717
高壓電源供應器	Stanford research system PS325
訊號放大器	Stanford research system SR570
示波器	Tektronix DPO4032
單光儀	Optometrics DMC1-02
監測白光光源	StellarNet SL1-Cuvette
其餘光學元件	Mirror and holder from OptoSigma

### II-3.5 恆溫培養箱

Tks orbital shaking incubator OSI500R

Biometra OV3 (37°C for swam plate)



### II-3.6 酸鹼度計

SUNTEX SP-701; EUTECH CyberScan pH 2100(連接至電腦即時偵測，菌體胞外 pH 值變化量測用); HORIBA (電極: 9669-10D)

### II-3.7 其他

超音波清洗器：Branson 2510

超音波破菌機：Misonix Sonicator 3000

聚合酶鏈鎖反應器：Labneet MultiGene; Thermo PCR Sprint

試管振盪器：Spire mixer 5100

乾浴槽：PANTECH firefox dry bath 6120; Major Science (MD-mini)

恆溫水浴槽：Firstek Scientific

## 第四節 實驗方法



### II-4.1 生物資訊學分析

#### II-4.1.1 基因資料庫

基因序列之比對藉由 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站上之 Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTx) 分析比對。

#### II-4.1.2 序列親緣比對

蛋白質之間之親緣與序列相似比對，為將蛋白質序列上傳至 Center for Integrative Bioinformatics VU 網站，以 PRALINE - Multiple sequence alignment 之公開資源分析。

#### II-4.1.3 蛋白質結構分析

蛋白質結構主要以分析軟體 PyMol (maintained and distributed by Schrödinger) 分析，包含結構胺基酸位置，表面電荷分佈及胺基酸變異策略分析。若已解出結構之蛋白質，則以其公開之 protein data bank (pdb) 檔案呈現；若無結構之發表，則以相似之結構分析 (視紫質以 bacteriorhodopsin 為模板)。對於未知結構的蛋白質，以 ExPASy Swiss Model 找尋最佳模板，及結構模型的模擬。



## II-4.2 DNA 建構及轉形

### II-4.2.1 小量核酸萃取

藉由實驗方法 4.2.6 將目標質體遞送至大腸桿菌株 DH5 $\alpha$  中，並將菌液塗布至具 50  $\mu\text{g/ml}$  ampicillin 之 LB 培養基，隔夜培養於 37°C。將單一菌落接種至約 6 ml 添加 ampicillin 的 LB 培養液中，37°C 培養 12-16 小時，使其生長至生長穩定期。其後，使用 High-speed plasmid mini kit 將質體從菌液中抽出：(1) 以 12,000 rpm、30 秒將菌液收集至菌塊；(2) 依序加入 PDI, II, III 試劑 200, 200, 300  $\mu\text{l}$ ，使其溶菌，破菌及沈澱蛋白質；(3) 以 15,000 rpm、5 分鐘，將蛋白質沈澱離心成塊狀；(4) 將上清液（含質體 DNA）吸取至核酸親和濾管，並以 12,000 rpm、30 秒將其流過濾膜；(5) 以 Wash buffer 清洗濾膜兩次，方法同(4)；(6) 最後，以 50  $\mu\text{l}$  之 Elution buffer 及 12,000 rpm、2 分鐘將質體析出。

### II-4.2.2 聚合酶鏈鎖反應 (PCR)

分成一般 PCR 及菌落 PCR。一般 PCR，將目標基因片段放大，並賦予其限制酶切位於兩端，通常會接續方法 4.2.3 將其純化出來：分別加入 DNA 模板，順向引子，反向引子，2x Mastermix (<1 kbp, 用 Omega® Master Mix taq;  $\geq$  1 kbp, 用 2x Pfu PCR Master Mix)，無核酸切酶之水 1, 3, 3, 15, 8  $\mu\text{l}$ ，於 PCR 反應管。菌落 PCR，目的為初步檢測大腸桿菌轉形株之質體內含之目標基因大小：先於 PCR 反應管中加入順向引子，反向引子，2x PCR Dye Master Mix II，無核酸切酶之水 1, 1, 7, 5  $\mu\text{l}$ ，並以牙籤將單一菌落先接種至新鮮 LB 培養皿後，再於反應管中攪拌，使其懸浮。



### II-4.2.3 DNA 膠體純化

使用 Gel Extraction kit 將 DNA 片段從瓊脂膠體內純化，流程如下：(1) 將具有核酸片段之膠體切下，並放入微量離心管中；(2) 加入 500  $\mu\text{l}$  Gel/PCR solution，並置 60°C 至膠體溶解；(3) 將混合液吸取至核酸親和濾管，並以 12,000 rpm, 30 秒離下；(4) 以 600  $\mu\text{l}$  Wash Buffer 清洗兩次，方法同(3)；(5) 以 20  $\mu\text{l}$  Elution buffer 靜置 2 分鐘，離心 2 分鐘析出。

### II-4.2.4 限制酶截切

(1) 將以下試劑依序加入 PCR 反應管中：DNA 載體，目標基因片段，10x buffer, 限制酶 I, 限制酶 II 2.5, 10, 1.5, 0.5, 0.5  $\mu\text{l}$ 。(2) 靜置於 37°C 中 2.5 小時。(3) 85°C、10 分鐘，使酵素失去活性。

### II-4.2.5 DNA 黏合

(1) 將以下試劑依序加入 PCR 反應管中：截切過之 DNA 載體及目標基因片段混合液，10x buffer A, 10x buffer B, T4 ligase 7.5, 1, 1, 0.5  $\mu\text{l}$ 。(2) 靜置於 4°C 中 12 小時或 16°C 中 4 小時。

### II-4.2.6 大腸桿菌轉形

勝任細胞 (competent cell) 製作。(1) 從凍菌，於 LB 培養皿中取出單一菌落，接種至 3 ml LB broth, 37°C 隔夜培養。(2) 次日，接種 500  $\mu\text{l}$  至 500 ml LB，於 37°C 培養至 OD600 = 0.3-0.5。(3) 以離心管收取，並置冰上 10 分鐘。(4) 以 3,500

rpm 離心後去除上清，再以 10 ml TB buffer 回溶後靜置冰上 10 分鐘。(5) 在離心去除上清液後，以 2 ml TB buffer 回溶。(6) 每 100  $\mu$ l 分裝至微量離心管中，並置 -80°C 存放備用。\*TB (Transformation buffer): 15% glycerol, 2 mM NaOH, 10 mM MOPS, 85 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5% D-glucose

大腸桿菌轉形。(1) 將勝任細胞至於冰上 10 分鐘，待其退冰。(2) 將 1  $\mu$ l 質體加入 100  $\mu$ l 勝任細胞中，置冰上 15 分鐘。(3) 於 42°C，90 秒 (Heat shock)。(4) 靜置冰上 1 分鐘。(5) 加入 500  $\mu$ l LB，並於 37°C 振盪培養 30 分鐘。(6) 取 100-150  $\mu$ l 菌液塗布至具篩選標記之培養基。(7) 於 37°C 隔夜培養，接續方法 4.2.8。

#### II-4.2.7 嗜鹽古生菌 *H. salinarum* 轉形

(1) 將嗜鹽古生菌 *H. salinarum* 畫線於 Halomedium plate 上；(2) 挑取單一菌落，並接種至 2 ml CM<sup>+</sup> medium，於 42°C，200 rpm，培養至 O.D.600 = 0.4 – 0.6；(3) 放大培養 150  $\mu$ l 菌液至 15 ml CM<sup>+</sup> medium，於 42°C，200 rpm，培養大約 18 - 24 小時至 O.D.600 = 0.4 – 0.5；(4) 以 15 ml falcon tube，750 xg, 15 min，收 2 ml 菌液；(5) 去除上清液後，以 200  $\mu$ l Spheroplast solution (SPS) 溫和地搖盪懸浮菌體，並於 2 小時內使用完畢；(6) 準備下列材料： a. 加 10  $\mu$ l 0.5 M EDTA 到 falcon tube 中 b. 10  $\mu$ l DNA + 20  $\mu$ l SPS  $\rightarrow$  30  $\mu$ l c. 120  $\mu$ l PEG600 + 120  $\mu$ l SPS  $\rightarrow$  50% PEG600 SPS；(7) 將 200  $\mu$ l 懸浮菌液 直接加於 10  $\mu$ l 0.5 M EDTA 上；(8) 馬上接著加入 30  $\mu$ l DNA，等待 5-10 分鐘；(9) 將 240  $\mu$ l 50% PEG SPS 從管壁緩慢流下，溫和振盪 20-30 週期，等待 30 分鐘，溶液應該要沒有絲狀雜質；(10) 準備 CM<sup>+</sup> sucrose medium (CM<sup>+</sup> medium:75% sucrose = 4:1)；(11) 加入 5 ml CM<sup>+</sup>

sucrose medium 至管中，以去除 PEG；(12) 2,000 rpm (750 xg), 15 min；(13) 去除上清，再以 5 ml CM<sup>+</sup> sucrose medium 懸浮；(14) 37°C, 130 rpm, 24 h，recover 菌體；(15) 將 50 µl 菌液塗布於 SRMEV plate (10 µg/ml MEV) 上，42°C 培養；(16) 24 小時後，再重複步驟 15 (10 天可以知道有或無，15 天可以收穫菌體)。

#### II-4.2.8 轉形株鑑定

初步挑選 3 個單一菌落做菌落 PCR。並挑選出可能含有成功建構之質體的菌體，做 DNA 定序服務 (由基龍米克斯生物科技股份有限公司提供)。最後以西方墨點法，確認目標蛋白質在轉形株中的表現。

#### II-4.3 重組蛋白質之表現及純化

##### II-4.3.1 重組視紫質表現

按方法 4.2.6 將建構好之目標載體送入大腸桿菌株 C43 中。取單一菌落接種至 3 ml LB broth (50 µg/ml ampicillin) 中，37°C 培養 12 小時。再將 2 ml 菌液放大培養至 100 ml (50 倍稀釋)，37°C 隔夜培養至穩定生長期。於每一大瓶 LB 培養液 (800 ml) 中加入 16 ml 菌液，37°C 培養約 1.5-2.0 小時至 OD<sub>600</sub> = 0.4-0.6。加入 250 µM IPTG 及 5-10 nM all-*trans* retinal。37°C 避光培養誘導 4 小時，進行純化。



### II-4.3.2 重組可溶蛋白質表現

按方法 2-6 將建構好之目標載體送入大腸桿菌株 BL21 中。取單一菌落接種至 3 ml LB broth (50  $\mu$ g/ml ampicillin) 中，於 37°C 培養 12 小時。再將 2 ml 菌液放大培養至 100 ml (50 倍稀釋)，37°C 隔夜培養至穩定生長期。於每一大瓶 LB 培養液 (800 ml) 中加入 16 ml 菌液，於 37°C 培養約 1.5-2.0 小時至 OD600=0.4-0.6，靜置於 25°C 半小時。加入 50  $\mu$ M IPTG 誘導 1 小時。(GST 蛋白質於 37°C 誘導 2 小時)

### II-4.3.3 重組視紫質純化

將菌液以 6,000 rpm, 4°C 離心 10 min，並用 30 ml 預冷過的 Lysis buffer (4 M NaCl, 50 mM Tris, pH 7.8) 回溶菌塊。以 lysis buffer 將體積補至 40 ml 後，加入 1.43 mM 2-ME 及 100  $\mu$ M PMSF。設定超音波破菌機 (5 sec pulse, 5 sec rest, 共 5 min; 能量：69 W)，將回溶後的菌液置入燒杯，放於冰上，啟動超音波破菌機。將破菌後的均質液以 12,000 rpm, 4°C 離心 10 min; 上清液進行超高速離心 (48,000 rpm, 70 min, 4°C) 將細胞膜離下。以 2% DDM, lysis buffer 旋轉回溶(4°C, 20 rpm, 16 h) 超高速離心後的膜塊。再以 18,000 rpm、離心 45 min, 於 4°C 將未回溶完全的殘骸去除，將上清液與預先以 20 mM imidazole, lysis buffer 洗過的 Ni-NTA 膠體混合，進行 Resin binding (4°C, 20 rpm, 6 h)。在重力膠體管柱中，將混合液中的液體流去 (flow through)。再分別以 20 mM, 50 mM, 250 mM imidazole, lysis buffer 流洗膠體。收集各個流洗液，並將 I250 的流洗液以 30 kD Amicon 濃縮後，透析至下一步試驗所需的溶液環境中。



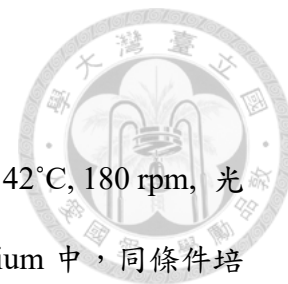
#### II-4.3.4 重組可溶蛋白質純化 (Hexa-His-tagged)

將菌液以 6,000 rpm, 10 min, 4°C 離心下來，並用 30 ml 預冷過的 Lysis buffer (50 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.8) 回溶菌塊。以 lysis buffer 將體積補至 40 ml 後，加入 1.43 mM 2-ME 及 100  $\mu$ M PMSF。設定超音波破菌機 (5 sec pulse, 5 sec rest, 共 5 min; 能量：69 W)，將回溶後的菌液置入燒杯，必放於冰上，啟動超音波破菌機。將破菌後的均質液以 15,000 rpm, 20 min, 4°C 離心；上清液與預先以 20 mM imidazole, lysis buffer 洗過的 Ni-NTA 膠體混合，進行 Resin binding (4°C, 20 rpm, 1.5 h)。在重力膠體管柱中，將混合液中的液體流去 (flow through)。再分別以 20 mM, 50 mM, 250 mM imidazole, lysis buffer 流洗膠體。收集各個流洗液，並將 I250 的流洗液以 10 kD Amicon 濃縮後，透析至下一步試驗所需的溶液環境中。

#### II-4.3.5 重組可溶蛋白質純化 (GST-tagged)

將菌液以 6,000 rpm, 10 min, 4°C 離心下來，並用 20 ml 預冷過的 Lysis buffer (50 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.8) 回溶菌塊，加入 1.43 mM 2-ME 及 100  $\mu$ M PMSF。設定超音波破菌機 (5 sec pulse, 5 sec rest, 共 4 min; 能量：69 W)，將回溶後的菌液置入燒杯，放於冰上，啟動超音波破菌機。將破菌後的均質液以 48,000 rpm, 1 h 10 min, 4°C 離心；上清液與預先以 lysis buffer 洗過的 GST-beads 膠體混合，進行 Resin binding (4°C, 20 rpm, 2 h)。在重力膠體管柱中，將混合液中的液體流去 (flow through)。以 6.8 mg/ml glutathione, elution buffer (50 mM Tris, pH 8.0) 回沖膠體後，進行蛋白質的溶出 (4°C, 20 rpm, 12 h)。收集流洗液，並以 10 kD Amicon 濃縮後，加入 20 mM DTT 貯存。\* GST-CheR 蛋白質必須在 4°C 下進行純化，避免大量沈澱生成。

### II-4.3.6 *H. salinarum* 細胞膜之純化



挑出 *H. salinarum* 及轉形株的單一菌落至 20 ml Halomedium, 42°C, 180 rpm, 光照培養至 stationary phase。再次培養 16 ml 至 800 ml halomedium 中, 同條件培養約 4 天, 至 OD600 值為 1.0 - 1.4。將菌體以 6,000 rpm, 4°C, 10 min 收下, 並用 20 ml cold MES buffer (4 M NaCl, 50 mM MES, pH 5.8) 回溶。超音波振盪 (“ON”: 5 sec; “OFF”: 5 sec; total 4 min; energy: 69 W) 將菌體破碎後, 以超高速離心機將細胞膜離下(48,000 rpm, 4°C, 1 h 10 m)。之後以 2 ml cold MES buffer 再次將細胞膜回溶 (嗜鹽古生菌細胞膜不需要界面活性劑即可回溶), 4°C, 12,000 rpm; 多餘殘骸去除。可見光譜的分析, 以 MES buffer 稀釋 10 倍測量, 光週期的分析則以 4 M NaCl, 50 mM (Tris/MES), pH (8.5/6.2) 稀釋五倍, 最後以 pH meter 量測 pH 值。

## II-4.4 蛋白質定量及定性

### II-4.4.1 蛋白質定量

將蛋白質以 12,000 rpm, 4°C 將將沈澱及雜質離下。再將蛋白質存在的溶液 (Blank) 加 150 µl 在 cuvette 中, 以拭鏡紙擦拭其觀測窗。在 Spectrometer U-1900 進行 “Baseline” (測量範圍: 250 – 750 nm) 校正。將溶液倒出後, 以去離子水洗淨, 再將蛋白質溶液 150 µl 加入 cuvette 中, 進行 “Measure”。將目標蛋白質序列, 在 ExPASy tool: ProtParam 中計算蛋白質的 Extinction coefficient。在按所測得的 280 nm 吸收值, 以下列方程式計算蛋白質濃度:

$$\text{Concentration} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{OD \text{ (measured)} * MW}{\varepsilon \text{ (extinction coefficient)}}$$



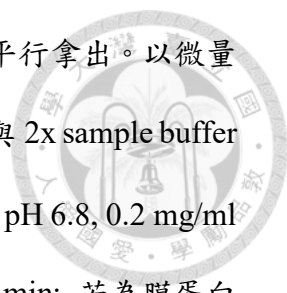
#### II-4.4.2 蛋白質變性電泳

按下列表格配製聚丙烯醯胺膠體。

膠體百分比	分離膠體		焦集膠體
	10%	12.5%	4%
A sol.(40%)	2.5	3.125	0.5
B solution	2.5	2.5	-
C solution	-	-	1.24
ddH <sub>2</sub> O	4.85	4.225	3.11
10% SDS	0.1	0.1	0.05
10% APS	0.05	0.05	0.1
總體積 (ml)	10	10	5

\* Solution A : commercial acrylamide and bis-acrylamide mixture 。 Solution B : 1.5 M Tris, TEMED, pH 8.8 。 Solution C : 0.5 M Tris, TEMED, pH 6.8 。

將 Bio Rad 垂直電泳鑄膠器架好，玻璃板以 95% 酒精擦拭。將溶液分別配好後，最後加入 APS 後，馬上將 4.5 ml 的分離膠體混合液注入玻璃板之間，再以 100  $\mu$ l isopropanol 將膠體壓平。待約 30 min 分離膠體凝結後，以濾紙將 isopropanol 吸出。加入 APS 後，將焦集膠體注滿玻璃板間，並放入尺梳。待其凝結後使用，若不馬上使用，則保存於 4°C, TBE buffer (90 mM Tris, 80 mM Boric acid, 2.5 mM EDTA) 中。



將電泳槽架好，注入足夠的 TBE buffer 於陰陽極槽，並將尺梳平行拿出。以微量吸管 P200 清洗樣品槽，並預跑 20-30 min。將蛋白質樣品 1:1 與 2x sample buffer (8% SDS, 15% glycerol, 100 mM Tris, 2 mM EDTA, 160 mM DTT, pH 6.8, 0.2 mg/ml bromophenol blue) 混合。若為可溶蛋白質，則以 95°C 加熱 10 min; 若為膜蛋白質，則以 55°C 加熱 30 min (或 42°C, 1 h)。若為全細胞裂解分析，*E. coli* 以 95°C 加熱菌液與 sample buffer 之混合液 10 分鐘; 嗜鹽古生菌則以 120  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 回溶從 3-5 ml 菌液收集之菌體 (回溶即破菌)，以超音波 microtip 破碎基因體 (“ON”: 1 sec; “OFF”: 1 sec; total 10 sec; energy: 6 W)，再與 2x sample buffer 混合後，置於 55°C, 30 分鐘。將 15  $\mu$ l 的樣品及 2.5  $\mu$ l protein marker 依序注入樣品槽。以 4°C, 60 V 執行電泳至追蹤染劑通過聚焦膠體後，以 4°C, 150 V (若含有膜蛋白質樣品，則以 100 V 執行) 繼續跑電泳至追蹤染劑跑至膠體底端。完成電泳後，以 CBR 染劑 (1 g Coomassie brilliant blue R-250 in 250 ml ddH<sub>2</sub>O, 250 ml methanol, 50 ml acetic acid) 染色膠體 30 min，並以脫色液 (20% Methanol, 10% Acetic acid) 脫色至蛋白質條帶出現。以玻璃紙將完成染色的膠體封起，並護貝保存。

#### II-4.4.3 蛋白質原態電泳

同上表格配製膠體。 Solution B & C without TEMED (配製膠體時再加入 1% TEMED)。\* Running Buffer: 25 mM Tris, 192 mM glycine，2x sample buffer: 62.5 mM Tris, pH 6.8, 25% glycerol, 1% bromophenol blue。電泳及染色步驟同上，惟以 4°C, 60 V 跑完電泳全程。



#### II-4.4.4 蛋白質轉印

將轉印 cassette 依序如下組裝：黑夾 → 海綿 → 濾紙 → 膠體 → 以 methanol 預先活化的 PVDF 膜 → 濾紙 → 海綿 → 白夾(y94transfer buffer 中進行，並避免氣泡產生)。將 cassette 置入電泳槽，並放入降溫冰塊。以 Transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3, 10% methanol) 填滿，並以 400 mA, 1 h 執行轉印。完成後，將 PVDF 膜取出，進行免疫呈色。

#### II-4.4.5 免疫呈色

將轉印後的 PVDF 膜取出，浸泡於 Urea-PBST, 1 h 至隔夜。以 TBS buffer 清洗三次 (清洗步驟皆為 10 分鐘)。以 BSA 及 TBS 配製 Blocking buffer，並進行 blocking 至少至少 1 h。再以 TBS-Tween/Triton 清洗兩次，以 TBS 清洗一次。接著浸泡於含 1/3000 Penta-His HRP 抗體的 Blocking buffer 搖晃 1 h。再來用 TBS-Tween/Triton 清洗兩次。於避光環境下加入 HRP staining solution 呈色 5 – 10 min，風乾後護貝。

### II-4.5 感光蛋白質光學分析

#### II-4.5.1 吸收光譜測定

同方法 4-1. 中的 "Baseline" 及 "Measure"。



## II-4.5.2 視紫質光週期量測

將蛋白質樣品定量至特徵吸收峰  $\approx 0.3 - 0.6$ ，取 150  $\mu\text{l}$  置入三面透光的石英比色管中。比色管單一光徑上只有一個開口的那端接受 20 U 焦耳強度的 6 ns 雷射脈衝 (可調整波長，若未特別說明則為 532 nm)。相對的兩個開口分別連接至：白光監測光源；單光儀 (選擇偵測波長)  $\rightarrow$  光電倍增管 (放大訊號)  $\rightarrow$  示波器 (擷取訊號)。如此重複數個週期，並以平均模式計算。

## II-4.5.3 光驅動離子幫浦活性測定

將誘導表現視紫質的大腸桿菌 200 ml，以 3,500 rpm, 15 min, 25°C 收集。再用 50 ml unbuffered solution (10 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 100  $\mu\text{M}$  CaCl<sub>2</sub>) 清洗兩次。再以 25 ml unbuffered solution 懸浮後，保存於黑暗中。使用時，以 unbuffered solution 調整 OD<sub>600</sub> 至大約 2.0，並置於裝有攪拌磁石的玻璃瓶中，置於磁攪拌台上。攪拌的同時，以 pH meter 測量 pH 值，紀錄有照射光源及黑暗的條件下，細胞外環境的 pH 值變化。

## II-4.6 嗜鹽古生菌生理分析

### II-4.6.1 泳動菌株挑選

將 *H. marismortui*, *H. salinarum* 及轉形株 *Hs<sup>SRM</sup>*, *Hs<sup>SRM-HtrM</sup>* 於高鹽培養基劃四區，並挑取單一菌落接種至 1 ml 液態培養基中。待生長至 stationary phase 後，取 10  $\mu\text{l}$  菌液，接種至 20 ml 泳動培養基 (swam plate; halo-medium w. 0.3% agar)；重複接種外環菌液至新泳動培養基兩次以上，如此繼代培養。欲做分析時，取 10

µl 外環菌液，接種至 10 ml 高鹽培養基。泳動培養基培養於 37°C、持續白光照  
射；液態培養條件為 42°C, 180 rpm, 持續光照。*H. salinarum* 之轉形株培養過程  
皆含有 4 µg/ml mevinolin。因為生長速率之不同，接種之起始比例會不同，各嗜  
鹽古生菌之接種量比如下， $H. marismotui : H. salinarum : H_s^{SRM} : H_s^{SRM-HtrM} = 4 :$   
1 : 1.3 : 2。

#### II-4.6.2 顯微鏡觀察

將篩選過後的嗜鹽古生菌從泳動培養基 1:1000 接種至 10 ml hlaomedium 中  
(20 ml 小玻璃培養管)，並封上石蠟膜。42°C, 180 rpm 培養約三天後，菌體達到  
log phase，將培養液靜置於 37°C，光照隔夜。將透明膠帶貼於載玻片的兩側，使  
蓋玻片能夠橋架於其間。取 1 µl 上層菌液滴於蓋玻片中央，並於周圍塗上少量  
的凡士林。將整個蓋玻片樣品，正面壓上載玻片，並確認兩端平貼膠帶且周圍凡  
士林為密合狀態。將製備好的樣品置於 (圖 15) 的顯微鏡架設下觀察。在長期照  
光並觀察菌體湧動的實驗中，以 10 倍目鏡拍攝視野；照射光源時將 LED 燈接  
入目鏡，並從物鏡照射至樣品上，照射時間為 5 分鐘。將收集到的影像檔案，  
匯入 Image J 影像分析軟體，並按照以下步驟量化嗜鹽古生菌的光趨性：(1)  
將影像轉換成 8-bit 灰階影像；(2) Process > Find Edges；(3) Image > Adjust  
Threshold；(4) Image > Binary > Fill Holes；(5) Image > Binary > Watershed；(6) 選  
取整張影像，以及由藍光結果所定義出的光源照射區域；(7) Analyze > Analyze  
Particles, 10-Infinity；(8) 計算照光區域內外菌數比的變化百分比。



### II-4.6.3 光趨性分析 (ELISA Reader)

菌液生長至 log phase (OD = 0.6 - 0.8) 後，靜置於 37 °C 隔夜，取所需體積上層菌液至微量離心管中混勻。吸取 100  $\mu$ l 菌液至 96 孔盤中 (黑盤透明底)，三重複，初始 OD<sub>600</sub> 值約為 0.10 - 0.14 (光徑為 0.2 cm)。測量以不同光源 (孔洞直徑為 2 mm) 照射下: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120 分鐘的 OD<sub>600</sub> 值。藉由不同濾光片及衰光片將不同波段之光源，由螢光燈管所提供之白光中分離出來。藉由 Black-Comet (CSR-SR-25) 測量及校正光源之波段及強度。

測得之 OD<sub>600</sub> 值按下列公式，計算各光照條件下，相對於初始 OD 質的變化量，扣除黑暗條件下的自然擴散因素，所佔總體菌量的百分比。

$$\frac{(OD_{tx} - OD_{t0}) - \text{avg}(OD_{tx\_dark} - OD_{t0\_dark})}{\text{avg}(OD_{t0\_light}, OD_{t0\_dark})} * 100 (\%)$$

### II-4.6.4 光照生長曲線

將各菌株 (*H. marismotui*, *H. salinarum*, *H<sub>s</sub><sup>SRM</sup>*, *H<sub>s</sub><sup>SRM-HtrM</sup>*) 從凍菌挑出單一菌落後，接種至 300  $\mu$ l halomedium 回復生長力。待其生長至穩定期，再 1:10 次培養到 3 ml 的 halomedium (轉形株加入 4  $\mu$ g/ml mevinolin)，約莫培養 (42 °C, 180 rpm) 三天到穩定期。將各菌株培養液 OD<sub>600</sub> 值調整至 1.5。取 400  $\mu$ l 菌液接種到 40 ml fresh halomedium，混勻後分裝 3 ml 至各個玻璃培養管中。每個菌株共 12 管，四個光照條件 (黑暗、橘光、綠光及藍光)，每個條件進行三重複。將分裝好的培

養液，放置在特製培養箱中 (附圖 1)，開啟各個條件之光源 (5 W LED 燈)，於 42°C, 200 rpm 條件下進行培養。每隔約 12 小時，測量一次 OD<sub>600</sub> 值，並進行生長曲線之繪製。生長曲線以 Weibull Groeth Curve 為模型，套入所測得之數據繪製。世代時間 (Generation time; Doubling time) 之計算，取線性範圍較佳的兩個範圍點 (OD = 0.4, 0.8) 對應之生長時間，將數值套入下列公式 (或直接相減) 即可得世代時間 [83]。

Generation time

$$= \frac{\text{duration} * \log 2}{\log (\text{final } OD = 0.8) - \log(\text{initial } OD = 0.4)}$$



## 第三章 實驗結果

### 第一節 蛋白質性質

科學界在 SRs 的研究，主要聚焦於 *Natromonas pharaonis* 的 SRII 上，而目前為止的結構解析，僅揭示了 *Np*SRII 與 *Np*HtrII 穿膜區域作用的位置，HAMP domain 以下的結構，只能以模擬方式討論結構。因此，此節希望藉由資訊庫的比對，了解 *Hm*SRM 的演化特性以及實驗策略。隨後，對於從 *Haloarcula marismortui* 中選殖出來的 SRM 及 SRM-HtrM 嵌合蛋白質，進行蛋白質特性上的測定，並與先前在 SRs 研究中觀察到的現象做比對。

#### III-1.1 序列比對

結構上，SRs 的胞內端表面電位傾向帶正電荷，方便與表面負電荷主導的傳導元 (尤其在 HAMP domain 1)，因為電性而產生專一性結合。從胺基酸序列計算蛋白質帶負電 (Asp + Glu) 及正電 (Arg + Lys) 的胺基酸比例來看 (表 2)，SRM 及 HtrM 與其他類別的 SRs 和傳導元相比，都有較高比例的帶正電胺基酸。因此，HtrM 可能可以藉由較高的正電荷比例與高負電的 CheR 結合，進而用傳導元本身的負電調控 (排斥) CheR 的結合。另外，由蛋白質多序列的比對，*Hm*SRM 在演化上，與 SRII (*Hs*SRII 除外) 是相對接近的 (圖 10)。因此，若要進行氨基酸的點突變，以探討演化上的關係，SRII 可以作為一個比對的對象。



表 2、各蛋白質長度及帶電胺基酸的佔比。

Protein	Length	Negative	Positive	Protein	Length	Negative	Positive
<i>HmSRM</i>	232	3.9	6.4	<i>HmHtrM</i>	184	15.2	8.7
<i>HmSRI</i>	236	5.9	5.5	<i>HmHtrI</i>	431	23.0	6.5
<i>HmSRII</i>	236	7.2	4.7	<i>HmHtrII</i>	773	20.2	6.1
<i>NpSRII</i>	239	6.7	5.4	<i>NpHtrII</i>	534	23.0	6.8
<i>HmCheR</i>	269	21.6	14.1	<i>BsCheR</i>	256	13.3	15.6
	(a.a.)	(%)	(%)		(a.a.)	(%)	(%)

\* *BsCheR* 為 *Bacillus subtilis* CheR 蛋白質，其在已知結構的蛋白質中，序列相似度與 *HmCheR* 最高，因此以其 X-ray 結構模擬 *HmCheR* 的結構並分析。

### III-1.2 結構模擬

為了進一步推斷傳導元 HtrM 與 CheR 以電性結合的可能性，我們分析結構上，它們的表面電性分布以及可能作用的區域。同時，尋找能夠以內生性或點突變置入 cysteine 的方式，標定螢光物質的潛在位置。由於缺乏結構解析的資訊，我們藉由蛋白質序列，在 SWISS-MODEL 資料庫尋找合適的結構模板，並預測其結構進行分析。在 *HmHtrM* 的結構模擬中，以 *Pseudomonas aeruginosa* 的 aerotaxis transducer 結構為模板 (pdb: 4i44)；*HmCheR* 的結構模擬則以 *Bacillus subtilis* 的 CheR 為模板 (pdb: 5ftw)。



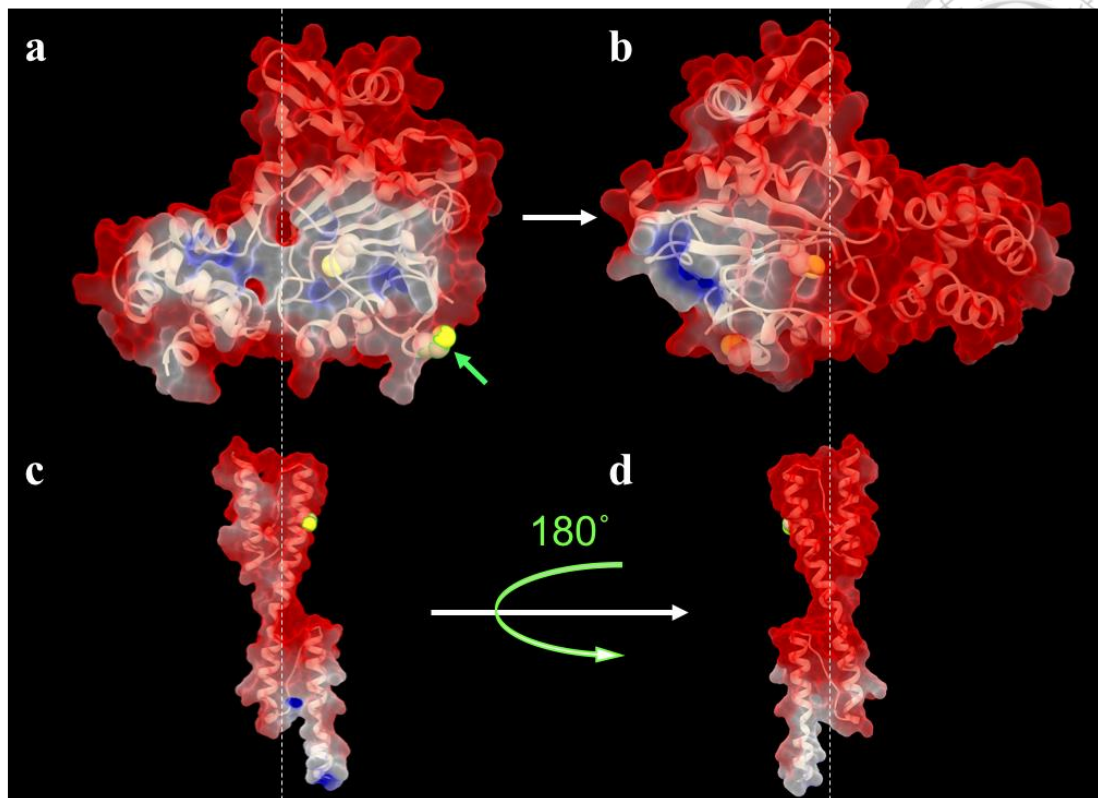


圖 11、*HmCheR* 及 *HmHtrM* 之模擬結構。此圖顯示以分析軟體 Chimera, APBS tool 預測蛋白質表面電荷。藍色代表正電荷；紅色代表負電荷；白色則代表中性，其顏色深淺表示了電荷的強度。其中，蛋白質的 Cysteine 胺基酸以黃色 sphere 表示，黃色為硫原子。綠色箭頭所示，為具有螢光標記潛力之 Cys 殘基。白色虛線代表結構展示的旋轉軸。**a** *HmCheR* **b** *HmCheR*, 向右旋轉 180 度 **c** *HmHtrM* **d** *HmHtrM*, 向右旋轉 180 度。

### III-1.3 pI 及 pKa

為了瞭解 SRM 及其複合蛋白質中，影響發光基團微環境的 Asp 胺基酸之 pKa 值，以及蛋白質原態下的表面電荷，藉由測量 SRM 及其複合蛋白質在不同 pH 值下的可見光譜吸收峰，可測定得知其 pKa 結果為 SRM = 4.0, SRM-HtrM

= 4.2 (圖 12a); 並以原態等電聚焦電泳 (Isoelectric Focusing; IEF) 來訂定其 pI 值 (圖 13), SRM 及 SRM-HtrM 的 pI 值分別為 4.7 及 5.2。



pKa 及 pI 值是初步了解蛋白質特性時，重要的基礎資訊。這裡利用最大吸收峰的改變，測量 pKa，顯示在不同 pH 值下，視紫質發光基團微環境的改變。SRs 實際的 pI 值通常會比以序列預測的 pI 值還要偏酸性，因此蛋白質表面電荷，實際受 pH 值的影響 (pI 值)，為純化蛋白質與養晶條件上的考量點之一。與其他視紫質 pKa 值比較，HmSRM 的 pKa 值明顯偏酸，且更趨近於 BRs，並且，在具有傳導元 (HtrM) 的結合後，pKa 並無明顯改變 (圖 12b)。

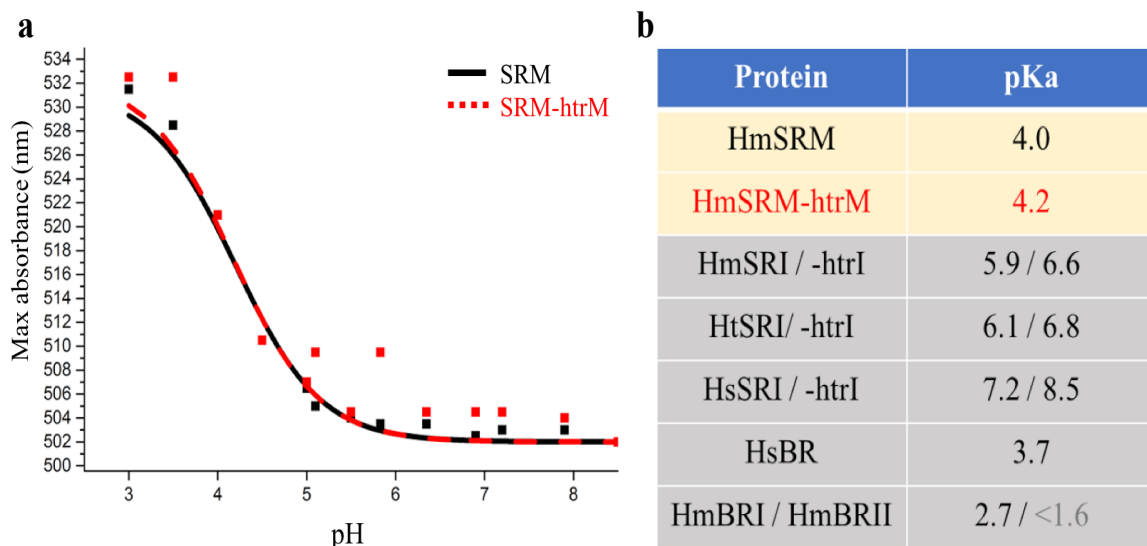


圖 12、SRM 及其複合蛋白質之 pKa 測定。 a SRM 及 SRM-HtrM 在不同 pH 值下 (4 M NaCl, 0.02% DDM, 50 mM MOPS, MES or Tris-HCl), 最高吸收峰之測定。

b 不同種類的 SRs 及 BRs, 以相同方式所測得的 pKa 值對照。SRI 的結果中, ” / ” 左邊為單獨只有 SR 的情況下之 pKa 值 ; 右邊為以 flexible-linker [-ASASNGASAH-] 連結其 C 端與同源傳導元之 N 端後的 pKa 值。

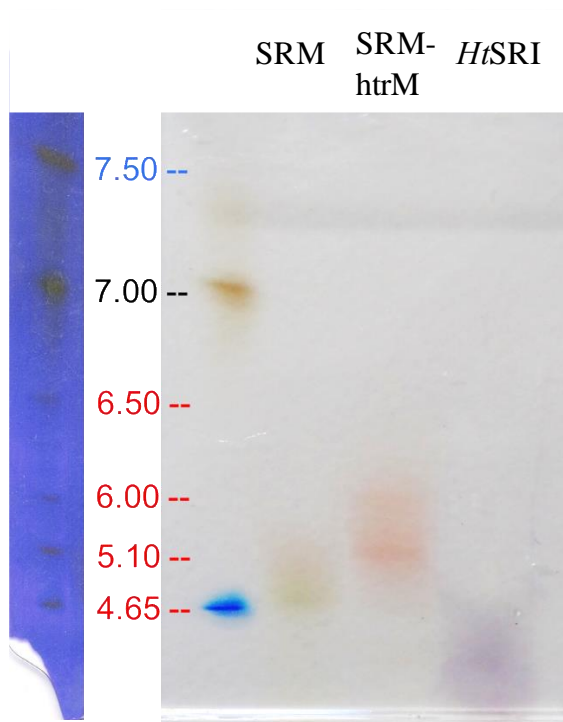


圖 13、原態等電聚焦電泳。由左至右分別為 Marker, *HmSRM*, *HmSRM-HtrM* 及 *HtSRI* (*H. taiwanesis* 為另一株本實驗室從台南井仔腳分離培養的嗜鹽古生菌)。對照 marker 可以得知各蛋白質於原態時表面的 pI 值: *HmSRM* = 4.7, *HmSRM-HtrM* = 5.2, *HtSRI* ≈ 3.5。膠體上, 可以直接觀察到蛋白質元原態的顏色。

### III-1.4 光誘發質子傳輸



在 SRs 的研究中，SRI 雖然有幫浦氫離子的功能，但其與傳導元 (HtrI) 結合後，此功能即會被抑制；然而，SRII 本身雖有氫離子的單側循環，卻沒有幫浦氫離子的能力。我們好奇，結構獨特的 SRM 及其複合蛋白質 (SRM-HtrM)，是否具有氫離子的傳輸功能。結果顯示，不論有無傳導元 (HtrM) 的結合，SRM 都具有能夠將質子往外傳輸的能力 (圖 14)。

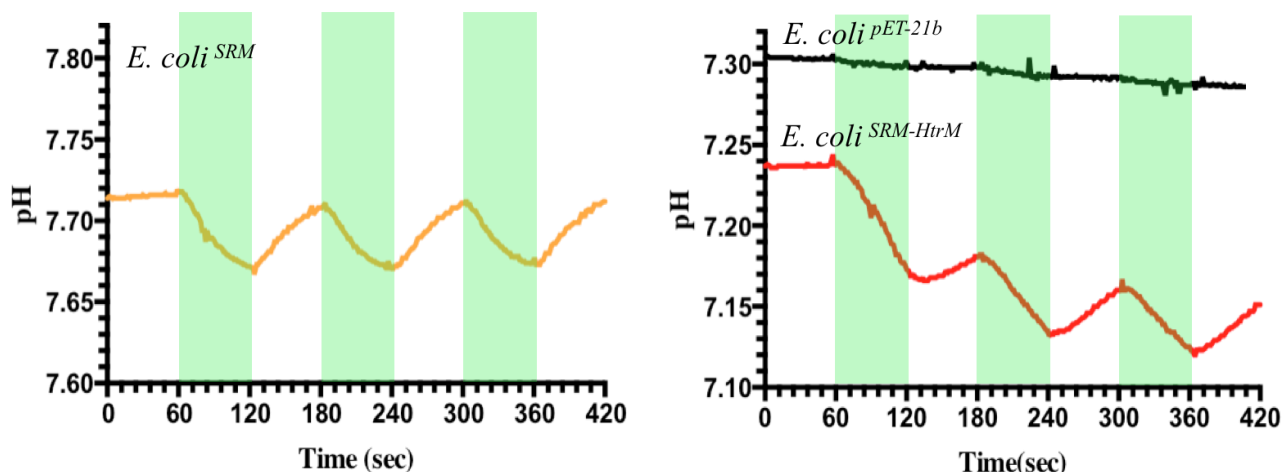


圖 14、SRM 及 SRM-HtrM 的氫離子傳輸能力。在 *E. coli* 表現系統上，給予綠光雷射刺激，同時測量胞外溶液的 pH 值，並進行三組 60 秒黑暗/ 60 秒照光的週期。結果顯示，光照後兩個蛋白質形式皆會造成細胞外 pH 值下降 (氫離子變多)。



### III-1.5 光週期

在 *HsSRI* 及 *HsSRII* 的研究中，發現傳導元 I (*HsHtrI*) 的結合能夠減少，*HsSRI* 在不同 pH 值下，大幅變化的光週期單相衰變 (one phase decay) 反應常數 (k value); 若傳導元 II (*HsHtrII*) 與 *HsSRII* 結合，則會大幅提高其反應速率 (減少光週期時間)。我們好奇，在 *Haloarcula marismortui* 這株尚未有太多研究的嗜鹽古生菌中，其感覺型視紫質 (尤其是 SRM) 與傳導元 (*HmHtrM*) 結合後，光週期特性是否符合先前在 SRs 上的研究。從結果發現，*HmSRs* 同樣具有先前在 *HsSRs* 上觀察到的現象，並且 SRM-*HtrM* 相較於 SRM，在不同 pH 值下的光週期動力學，變化幅度相對於 SRM 較小 (表 3)。光週期對於 pH 變化敏感度的特性，是我們在後續實驗中，能夠判定感覺型視紫質 (SRs) 是否與傳導元 (transducer) 作用的重要指標之一。

表 3、*HmSRs* 在不同 pH 值下的光週期速率。

pH		<i>HmSRI</i>	<i>HmSRI-htrI</i>	<i>HmSRM</i>	<i>HmSRM-htrM</i>	<i>HmSRII</i>
7.9 (7.6)	k value	ND	0.22	(0.06)	0.12	0.77
	Tau (t)	ND	4.495	(16.11)	5.62	1.298
6.5 (6.1)	k value	(0.20)	0.42	(0.37)	0.17	2.235
	Tau (t)	(4.99)	2.38	(2.70)	4.05	0.45

\* 藍色及紅色分別代表弱鹼及弱酸的條件，括弧則表示了稍微不同的 pH 值及其對應的反應速率常數 (k value)。Tau 值為時間常數，定義為速率常數之倒數 (1/k)。

## 第二節 微生物光趨性研究方法



鑒於過去於光趨性的研究方法，主要集中在顯微鏡觀察及數學模型的運算，我們想觀察微生物整體的光趨性行為。為了快速定性篩選及量化不同菌株，對於不同波長光源的光趨性反應，以前人的研究為發想<sup>[84]</sup>，觀察菌體在顯微觀察下的族群行為。此外，根據此現象，我們嘗試以 96 孔盤，在 ELISA Reader 進行類似的操作，期望能夠以此作為快速定量微生物光趨性的研究方法。

### III-2.1 顯微鏡觀察

此部分實驗，以顯微鏡觀察嗜鹽古生菌在長期光照下的族群反應，也記錄單一菌體在 RGB 光源刺激後的生理反應 (圖 15、16)。初步實驗條件測試，以 *H. salinarum* 野生株為樣本，並以藍光 LED 為光源，使其產生避光反應。為了減低我們在觀察菌體泳動時，其垂直方向的運動，以及能夠更完整地呈現族群泳動行為，我們將菌液樣品壓製成厚度約為一層膠帶的薄片 (圖 17)。接著以不同倍率的目鏡，調整刺激光徑的大小；以 LED 藍光照射 10 分鐘前後的影像分析，可以得知光源照射的範圍越小越好，並且光幅太大 (10X 及 20X 目鏡) 將使視野下的光趨性反應即不明顯 (圖 18)，因此後續實驗皆以 100X 目鏡為刺激光源的光徑。隨後，在藍光照射下，不同時間後所截取的影像分析中，可以得知菌體在光源刺激後 5 分鐘，即有明顯的避光反應 (圖 19)。擷取光源刺激前後的影像，藉由軟體分析，定義及計算出照射區域內外的菌數比，並量化嗜鹽古生菌的光趨性 (圖 20)。此外，菌體的趨氧現象也可以在此設置下，於黑暗中靜置約 12 小時後觀察到 (附圖 2)。

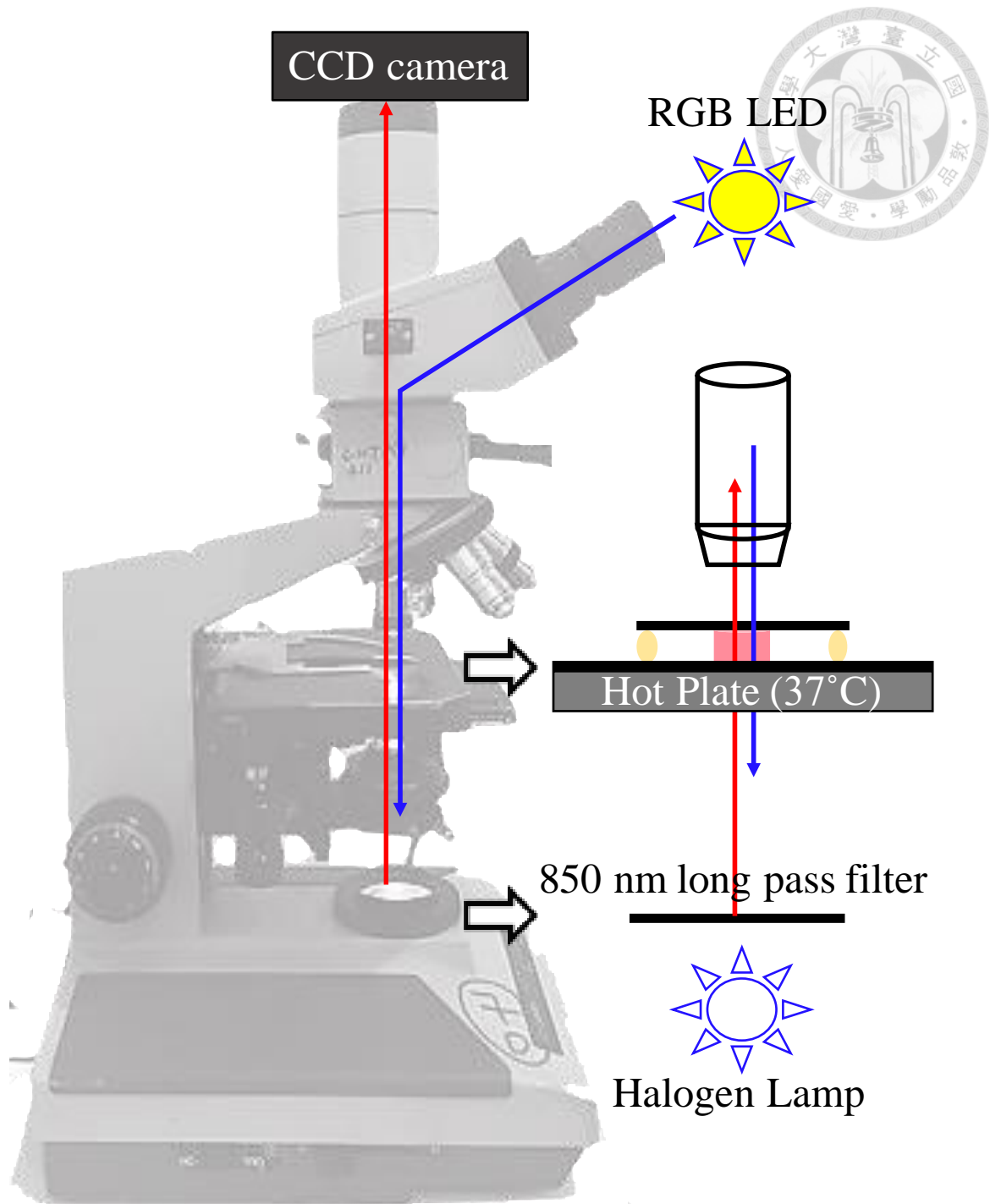


圖 15、顯微鏡之架設。顯微鏡觀察的架設由下而上分別為：以紅光濾片過濾出紅光（不影響菌體上感光物質的波段），偵測菌體的泳動。將菌液樣品壓製成薄片後，周圍以凡士林塗抹防止水氣蒸發，並置於 37°C 之熱盤上恆溫。刺激光源則從目鏡打入，經過 100X 物鏡照射至菌體樣品上。

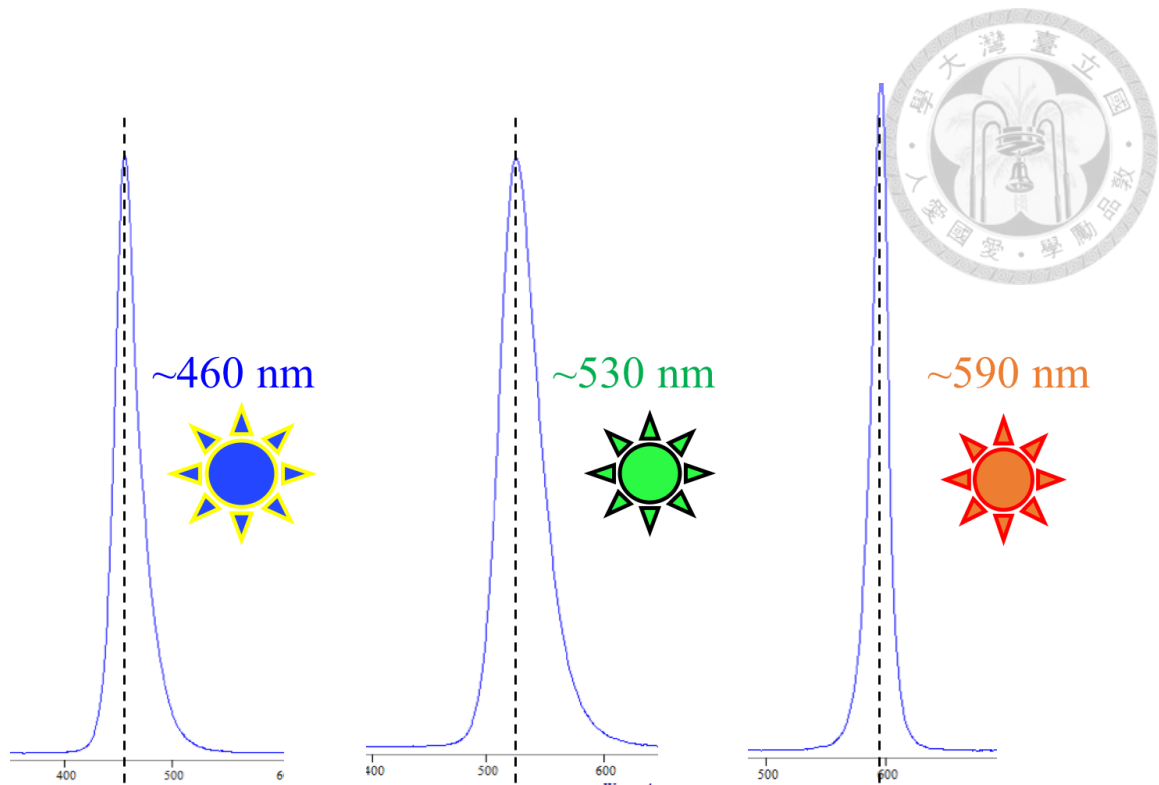


圖 16、LED 燈源之波譜。顯微鏡研究中，所使用的 LED RGB 燈泡之出光波段。

(燈泡之功率為 5 W)

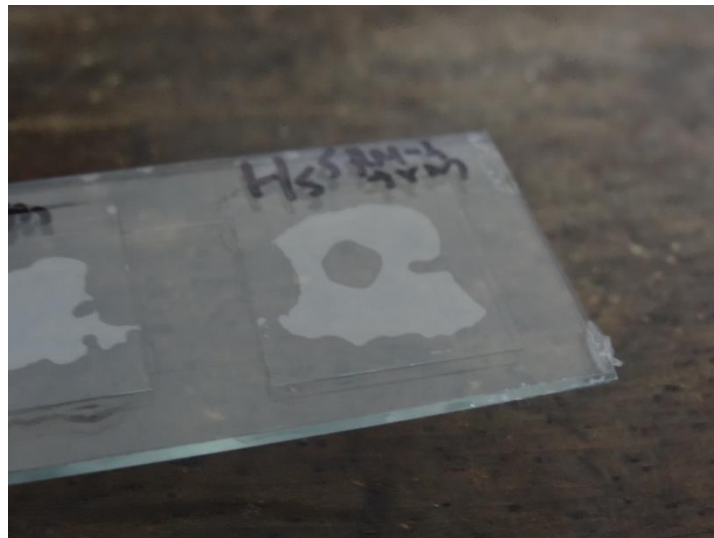


圖 17、樣品薄片。載玻片上下兩端有一層透明膠帶，蓋玻片橋架於兩個透明膠帶之間，中央菌液與周圍的凡士林之間有一個空氣介面。

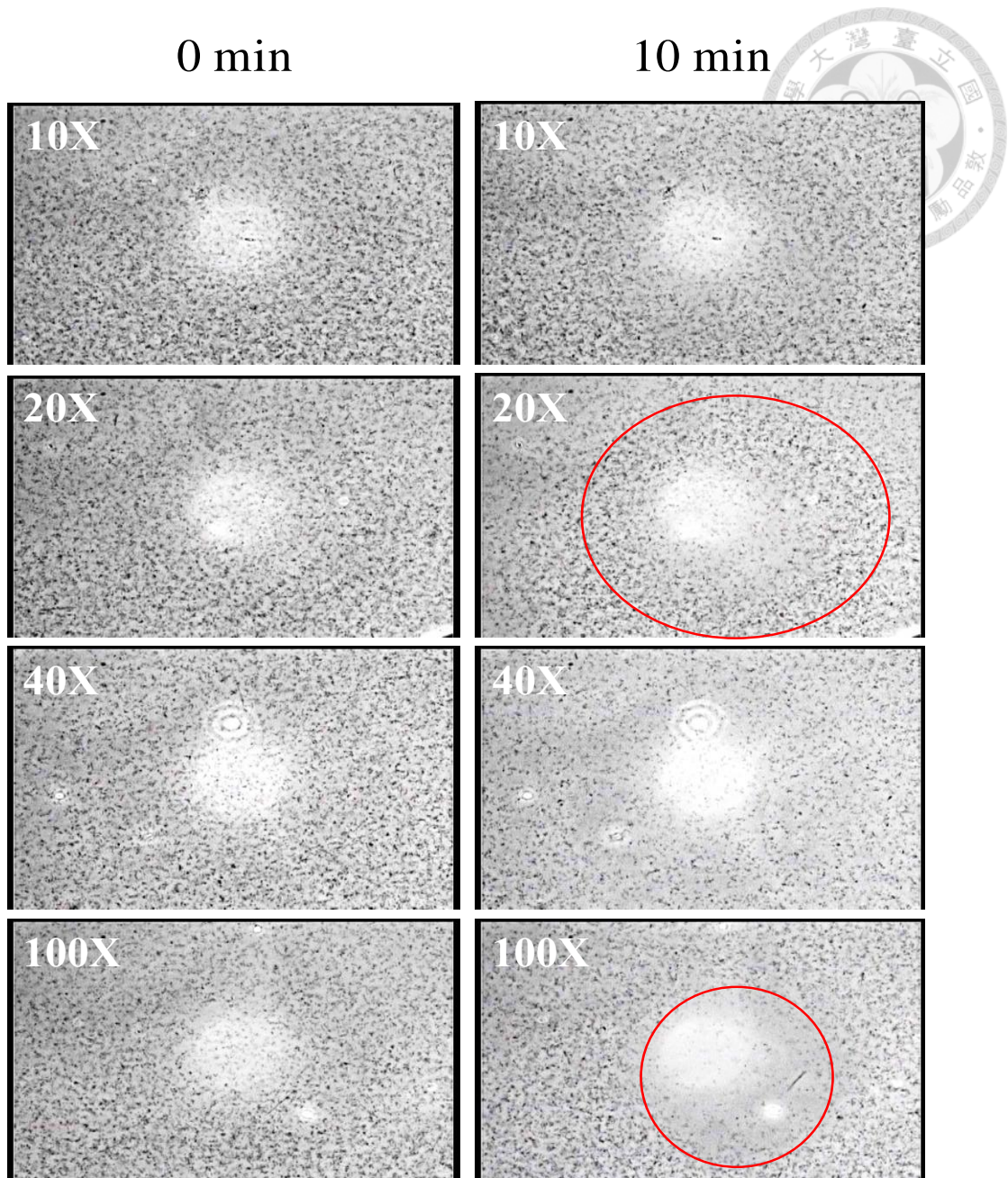


圖 18、顯微鏡刺激光源的照射範圍。由上而下為以不同倍率的目鏡，利用不同目鏡調整刺激光源大小的結果圖。圖中黑點即為 *H. salinarum* 菌體，右欄為以藍光 LED 照射 10 分鐘後，同個地點以 10X 目鏡所拍攝之影像，左上方數字為照射刺激光源時所使用的物鏡。20X 目鏡結果圖中的圓圈，顯示該照射範圍下，內部的菌體並沒有明顯的避光現象。40X 目鏡結果圖中的圓圈，則為根據菌液被分開後的區域，定義出的光源照射範圍。100X 目鏡結果圖中的圓圈，則為根據菌液被分開後的區域，定義出的光源照射範圍。

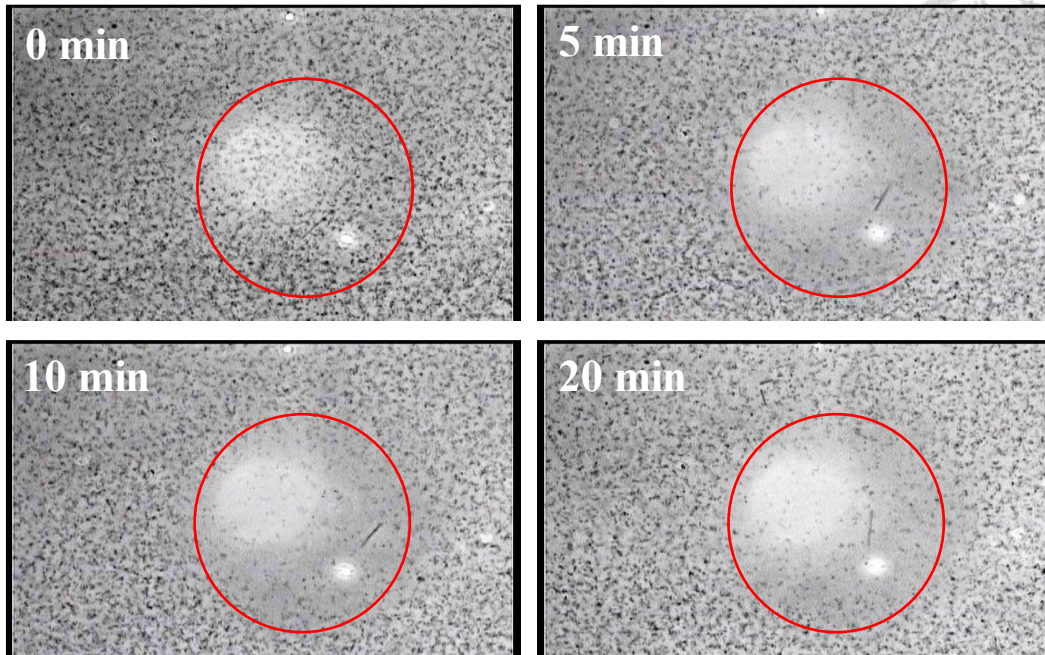


圖 19、光源刺激時間。*H. salinarum* 在藍光 LED 經過 100X 目鏡的照射後，於不同照射時間後，在 10X 目鏡下所擷取之影像。圖中圓圈為定義出的光源照射範圍。

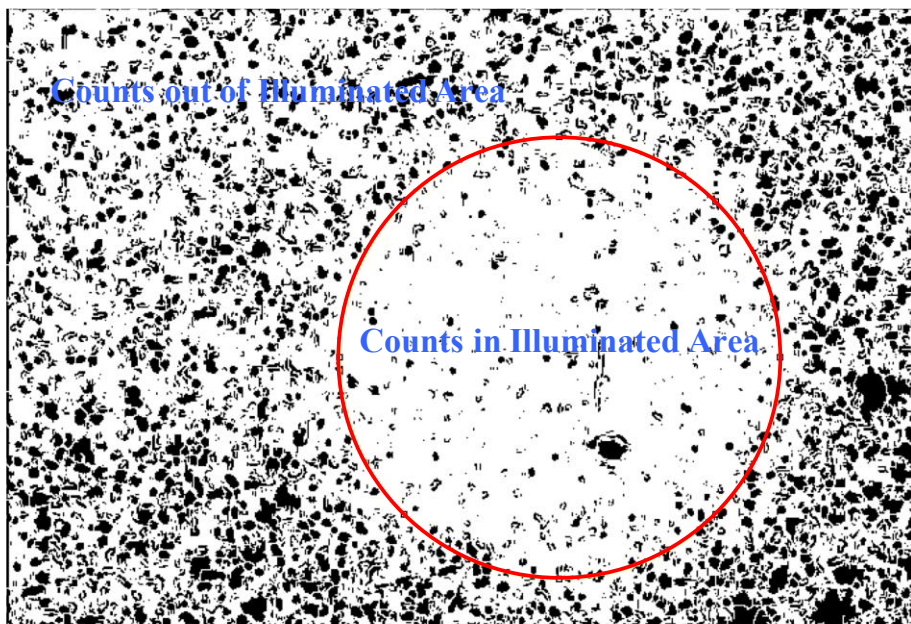


圖 20、光趨性影像分析。在分析過後的影像中定義出照光區域，分別計算照光區域內外的菌體數量。隨後，以區域內數量除以區域外數量，可計算出其比值。最後，計算照光前後，該比值的變化百分比作為光趨性分析指標。

### III-2.2 ELISA Reader 測定



ELISA Reader 測量吸收值時，偵測光源只會通過樣品槽中央的小部分區域。利用此特性，我們將照射範圍大約等同偵測光源的照射光源通過樣品槽中央，藉以模擬顯微鏡架設下光源的通過 (圖 21a)。光源的部分，以白色螢光燈管為共同光源，通過不同濾鏡，分離出不同之可見光波段 (圖 22)，整體的架設如 (圖 21b)。最後，於不同的照射時間下，以 ELISA Reader 讀取中央區域的細胞密度 ( $OD_{600}$ )。

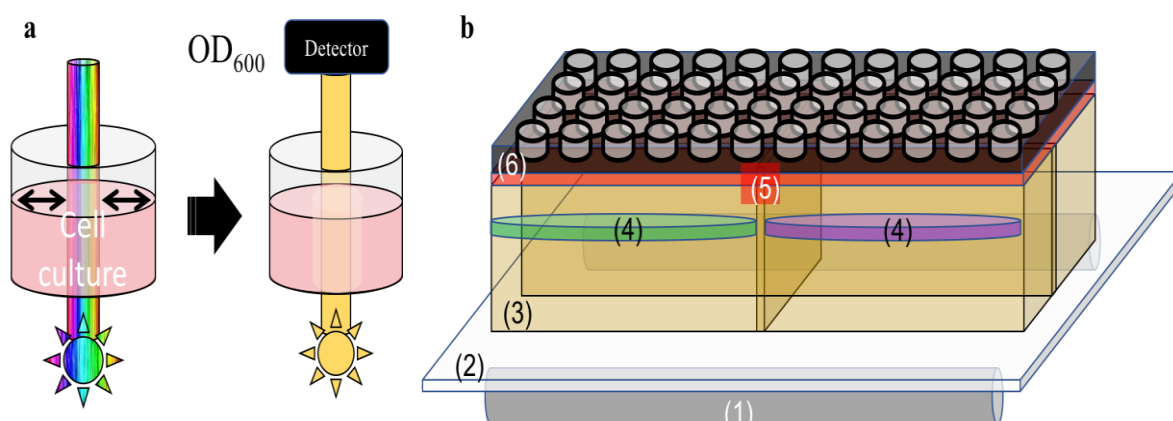


圖 21、光趨性分析裝置架設。a 分析概念圖，照射光源及偵測光源通過樣品槽中央。避光反應使照射光源通過之範圍，菌體濃度 ( $OD_{600}$ ) 下降 b 照射光源之架設，由下至上分別為：螢光燈管 (1)、白色壓克力板 (2)、紙板支架 (3)、濾光鏡及衰光片 (4)、光源限制片 (5)及透明底 96 孔黑盤 (6)。

由不同孔徑的光源限制片，測試不同孔徑下，偵測光源的通過率 (Transmission; %)，得知 ELISA Reader 之偵測光源寬度約為 1.5 mm (圖 23)。接著，搭配不同的可見光濾鏡可以將白光中的 RGB 波段分離出來，並做能量強度上的定量 (圖 22)。起初，我們選用光照孔徑為 2.0 mm 之光源，作為刺激的範圍

(圖 24)，而在光源刺激時間上，發現嗜鹽古生菌大致在光源照射 100 分鐘後，OD<sub>600</sub> 之讀值即趨於穩定 (圖 33)；同時，藉由相同方式以綠藻細胞 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 作為跨物種的測試，發現其在 1 分鐘左右即達平衡 (圖 25)，可以對照至巨觀上的觀察 (圖 26)。另外，此系統在樣品體積 (影響光源通過的厚度)、菌體密度以及是否添加 agarose 作為減少振盪誤差的添加物的結果上，尚未有一個完整的定論，因此本研究方法仍然包含了一些誤差，推測為菌體沉降、菌體受刺激後於垂直方向之泳動以及菌體是否受趨氧反應所造成之誤差結果。

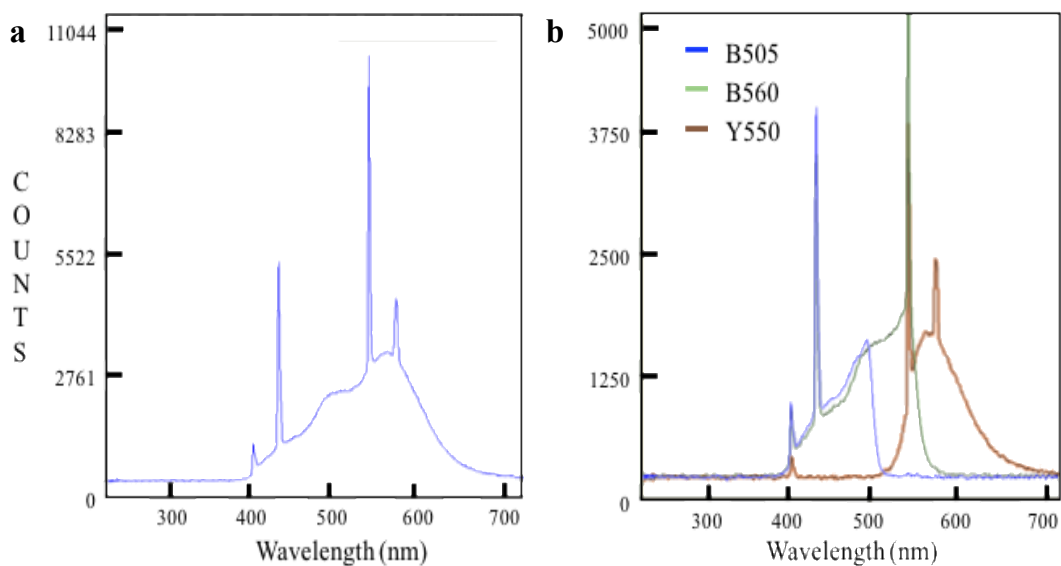


圖 22、照射光源的波譜。a 為白光光源的波段及強度，b 則是以圖中所標示的濾鏡，篩選出的 RGB 光源。

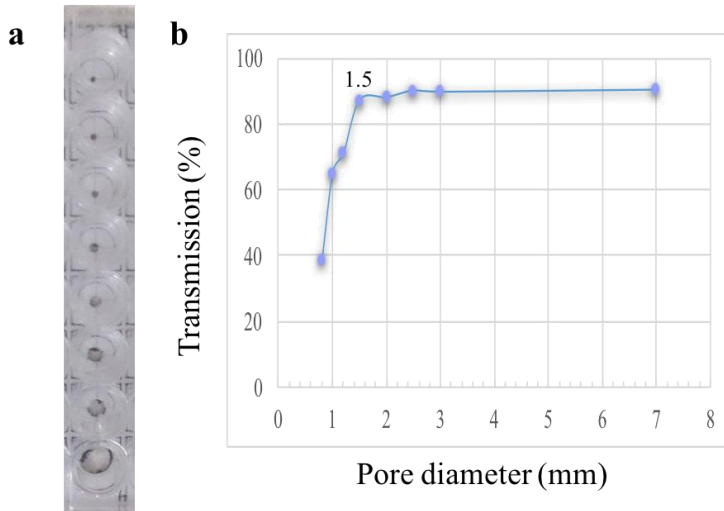


圖 23、偵測光源範圍。a 利用不同孔徑大小的光源限制片，限制偵測光源的通過，b 並偵測 ELISA Reader 偵測光源之穿透率。

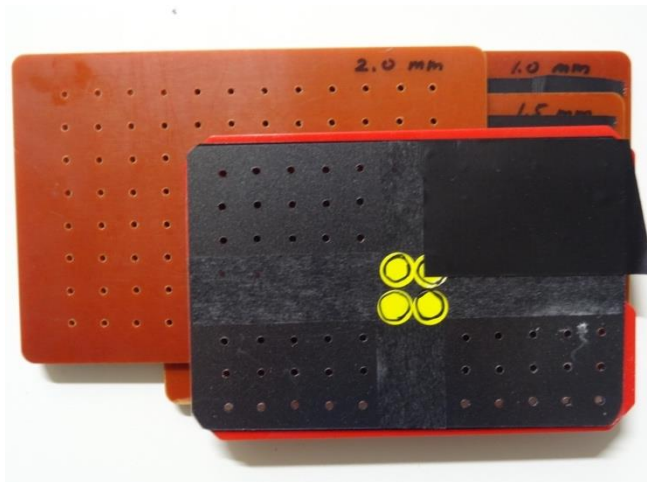
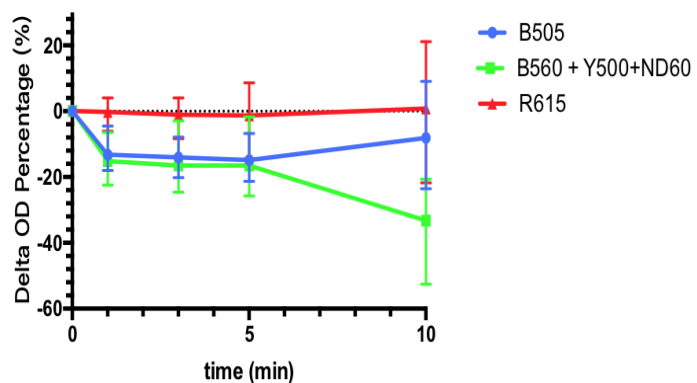


圖 24、光源限制片。將 96 孔盤分為四個區域，分別給予四種不同的光照條件。具有不同的孔徑大小（圖中標示為孔徑直徑）。

圖 25、*C. reinhardtii* 於光趨

性分析裝置之分析。以藍綠紅等不同的色光照射 *C. reinhardtii* 培養液，並測量照射區域細胞密度的變化。扣除黑暗組的 OD 值變化，可

*C. reinhardtii* strain 137C (wt)



算出 OD 值相對於初始狀態的變化比率。結果顯示，在 1 分鐘內，*C. reinhardtii* 在藍光及綠光下的避光反應即達到飽和。

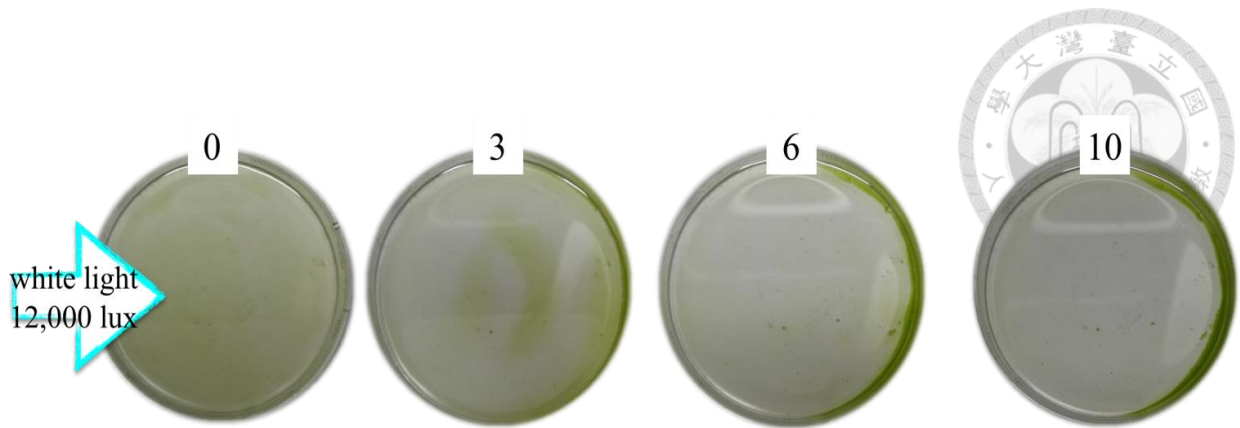


圖 26、*C. reinhardtii* 在白光下的巨觀避光現象。將 log phase 之 *C. reinhardtii* strain 137C (wt) 培養液，注入培養皿中，並以白光光源（螢光燈管）由左方照射。各培養皿上的數字代表光源照射時間（分鐘）。由結果可知，*C. reinhardtii* 可在 10 鐘內游培養皿一端游至另一端，泳動距離約 10 公分。

### 第三節 SRM 及 SRM-HtrM 之移植



嗜鹽古生菌 (*H. salinarum*) 僅具有 SRI 及 SRII 兩種 SR，因此我們將可感受綠光波段的 SRM 及 SRM-HtrM 移植入其中，使其成為功能獲得型菌株。由於 *H. salinarum* 的質體基因轉殖方法相對較成熟，加上目前對於嗜鹽古生菌的基因體編輯的研究較少，並且較難執行，我們以 Polyethylene glycol 添加的方式，將 *HmSRM* 及 *HmSRM-HtrM* 複合體之基因放於 *bop* promoter 後 (vector: pJS005)，並接上六個 His 的標記，轉入嗜鹽古生菌 (*H. salinarum*) 中。再以嗜鹽古生菌的生長抑制劑 4  $\mu\text{g/ml}$  mevinolin，篩選出候選轉形株。此篇章確認 SRM 及 SRM-HtrM 在 *H. salinarum* 轉形株細胞上的表現及功能。

#### III-2.1 DNA 之確認

為了確認篩選出來的 *Hs* 轉形株是否帶有送入的 SRM 及 SRM-HtrM 基因，首先以兩段基因頭尾之引子 (forward and reverse primer) 進行菌落 PCR。結果顯示，我們所篩選並保存之轉形菌株帶有送入的質體基因 (圖 27)。

#### III-2.2 蛋白質表現確認

由 Anti-His 抗體所做的西方墨點法，確認轉形株表現了 SRM 及 SRM-HtrM 蛋白質(圖 28)。然而，SRM 在 *Hs* 上的表現量相較於 SRM-HtrM 少很多，猜測為缺乏 HtrM 的伴護下，SRM 在細胞膜上的穩定性會下降。

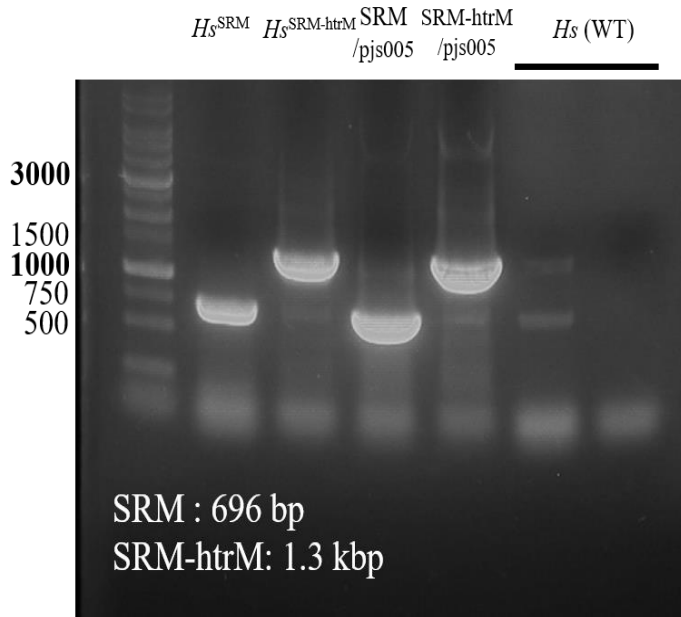


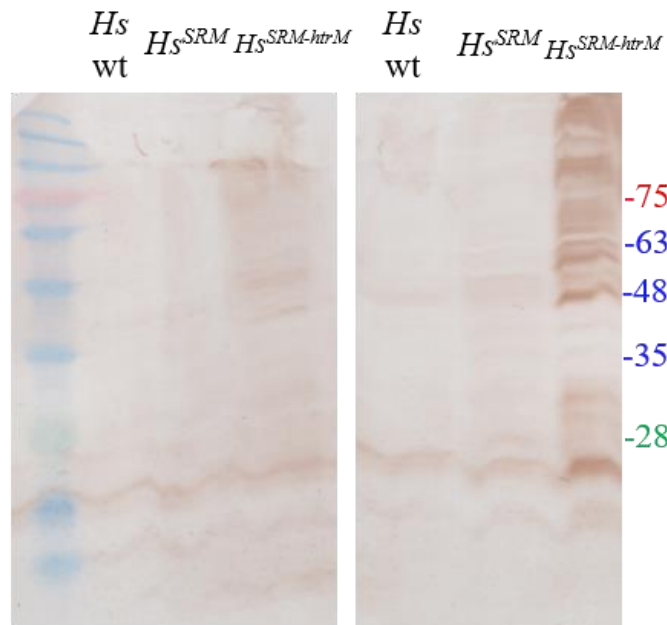
圖 27、*Hs* 轉形株的菌落

PCR。Lane 1, 3, 5 為使用 SRM (*xop2*) 基因序列之前段及後段引子；Lane 2, 4, 6 為使用 SRM (*xop2*) 的前端引子及 HtrM (*xHtr2*) 的末端引子，夾取目標基因片段。Lane 1, 2 分別為以 *Hs*<sup>SRM</sup>

及 *Hs*<sup>SRM-HtrM</sup> 轉形株的菌落作為模板；Lane 3, 4 則以轉入的質體當作 DNA 模板；Lane 5, 6 為以 *H. salinarum* 野生株的菌落作為模板。

圖 28、*H. salinarum* 轉形株之 Western Blot。

由於我們表現的 SRM 及 SRM-HtrM 蛋白質具有 6xHis-tag，因此我們以 Anti-Penta His-HRP 的抗體與其作用。左邊組別為，光趨性分析用的 log phase



菌液，全細胞裂解液 (whole cell lysate) 的呈色結果。右邊組別為，將菌體大量培養至 stationary phase 後，細胞膜 fraction 的染色結果。由於，訊號的片段過於雜亂，並無法指出目標蛋白質的確切位置。

### III-2.3 SRM 功能性測試



膜蛋白質在界面活性劑 (detergent, e.g. DDM) 及磷脂 (phospholipid) 等不同環境下，其物理及生物化學特性往往會有一些差異。因此，我們將表現 SRM 及 SRM-HtrM 的 *H. salinarum* 之細胞膜純化出來，並做紫外光/可見光波譜的分析 (圖 29)。相較於 *H. salinarum* 的細胞膜溶液， $H_s^{SRM}$  及  $H_s^{SRM-HtrM}$  的細胞膜於大約 480 及 500 nm 部分的吸收有相對明顯的上升 (視該吸收峰與~550 nm 的吸收峰之比值)。並且，在 300-400 nm 的波段，兩者的吸收峰，相較於 *H. salinarum\_wt*，都有顯著的上升，可能跟 SRs 在光照環境下培養，導致的 M-state 累積有關。

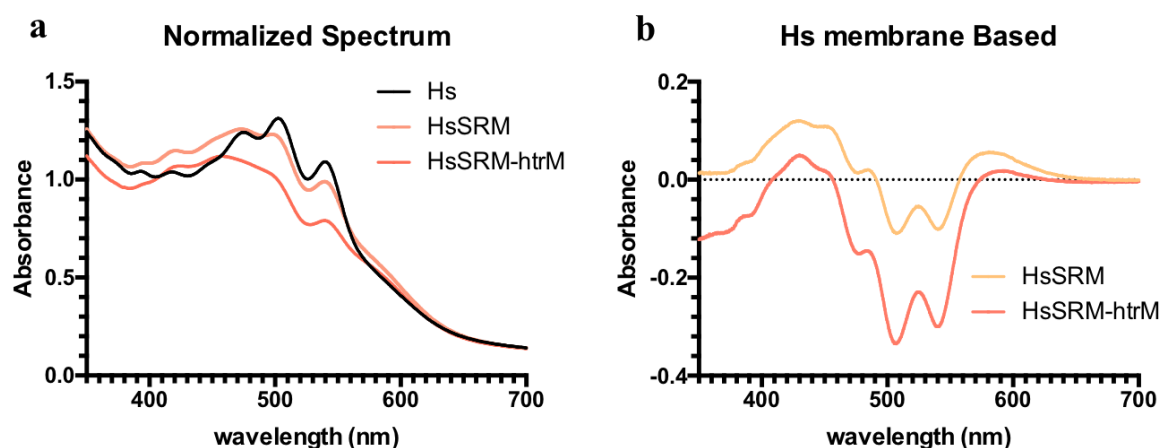


圖 29、*H. salinarum* 野生株及轉形株細胞膜的可見光吸收波譜。a 每個樣品的吸收波譜藉由 *H. salinarum\_wt* 750 nm 的吸收值 (視為細胞膜的定量) normalized，位於 550 nm 的波峰，推測為 *HsBR* 的吸收峰。b 將標準化後的可見光波譜扣除 *H. salinarum\_wt*，可以得到各波段吸收值之消長。

另外，SRM 在有無傳導元結合的條件下，光週期動力學對 pH 值敏感度差異之現象，同樣可以在 *Hs* 轉形株的細胞膜上觀測到 (圖 30)。不論在界面活性劑形成的 bicelle，或者 *Hs* 的細胞膜上，都可以觀測到 SRM-HtrM 在弱酸及弱鹼性下，光週期動力學的高穩定度。同時，再次確認 SRM 在 *Hs* 轉形株中的表現，並且傳導元 HtrM 與其有作用。

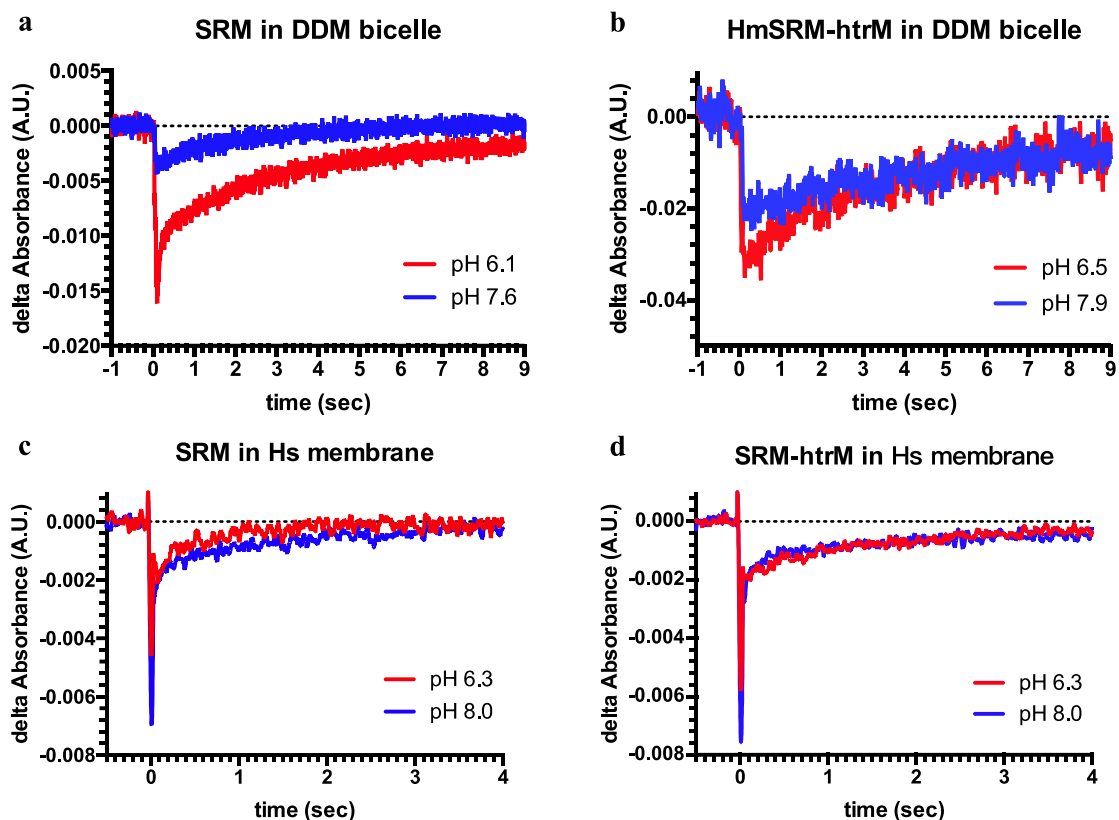


圖 30、SRM 及 SRM-HtrM 於不同條件之光週期分析。測量 503 nm 的吸收值在飛秒雷射 (532 nm; 2 ns pulse) 刺激後的變化，分析 SRM 及 SRM-HtrM 在 Bicelle 環境及 *H. salinarum* 細胞膜上的光週期。a, b SRM 及 SRM-HtrM 在由界面活性劑 DDM 所形成的 bicelle 環境中，其光週期動力學在不同 pH 值下之差異。c, d SRM 及 SRM-HtrM 在 *Hs* 細胞膜上，其光週期動力學在不同 pH 值下之差異。

#### 第四節 嗜鹽古生菌之生理探討



在分析完蛋白質基本的特性，及建立 SRM 及 SRM-HtrM 在 *H. salinarum* 的轉形株後，進一步地探討，兩者在生理的生長上是否有所改變，分別從細胞型態觀察、生長曲線上的量測，確認轉形株的生理狀況良好。最後，以本篇研究第三章第二節所述的研究方法，分析嗜鹽古生菌光趨性行為上之差異。

##### III-4.1 細胞型態

首先，我們需確認外源蛋白質表達，並不會對於 *H. salinarum* 菌體本身造成細胞型態及泳動能力上之影響。我們將培養至 stationary phase 的 *H. salinarum*,  $H_s^{SRM}$  及  $H_s^{SRM-HtrM}$  以高鹽培養基稀釋 1000 倍，並於 10 x 40 (物鏡 x 目鏡) 及連接 CCD camera 的顯微鏡下觀察單一細胞型態。(圖 31) 藉由顯微觀察，*H. salinarum* 之野生株及轉形株並沒有太多形態上之差異，並且皆具有泳動能力。

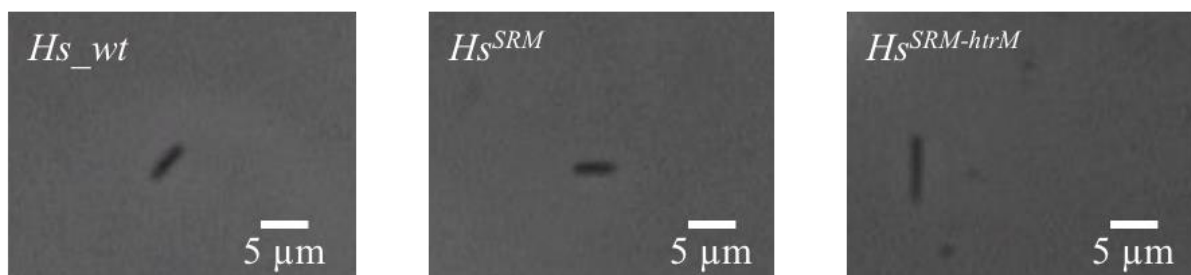


圖 31、*H. salinarum* 野生株及轉形株型態。於 400x 視野下觀察之細胞型態。

### III-2.3 生長曲線



初步，我們想得知不同光照環境下，對於嗜鹽古生菌的生長是否有影響。在不同菌株的生長比較上 (表 4; 圖 32)，因為轉形株的培養基中，具有生長抑制劑 mevinolin，*H. salinarum* 轉形株普遍的生長速率都較野生株來得慢，其中  $H_S^{SRM-HtrM}$  轉形株中，猜測因為表現大量 SRM-HtrM 蛋白質複合體的緣故，生長速率又比  $H_S^{SRM}$  還慢 (SRM-HtrM 在 *H. salinarum* 上的表現量比 SRM 高出很多)。在 *H. salinarum* 的結果中，其於橘光的生長速率有明顯提升，並且隨著光源往短波長移動，其生長速率也隨之減少。然而，當 *H. salinarum* 表現微量的 SRM 或大量的 SRM-HtrM 後，其在不同光源照射下的生長速率，與波長呈現負相關，並且相較於黑暗條件，在橘光下的生長速率都略為緩慢。

表 4、嗜鹽古生菌於不同光照環境下之世代時間。

Haloarchaea	Illumination Condition			
	Dark	Orange	Green	Blue
<i>H. marismortui</i>	15.66	15.98	15.44	13.82
<i>H. salinarum</i>	12.76	10.76	11.69	13.42
$H_S^{SRM}$	13.76	13.81	12.71	12.36
$H_S^{SRM-htrM}$	13.30	14.78	13.28	13.31

\*單位：小時 (hour)

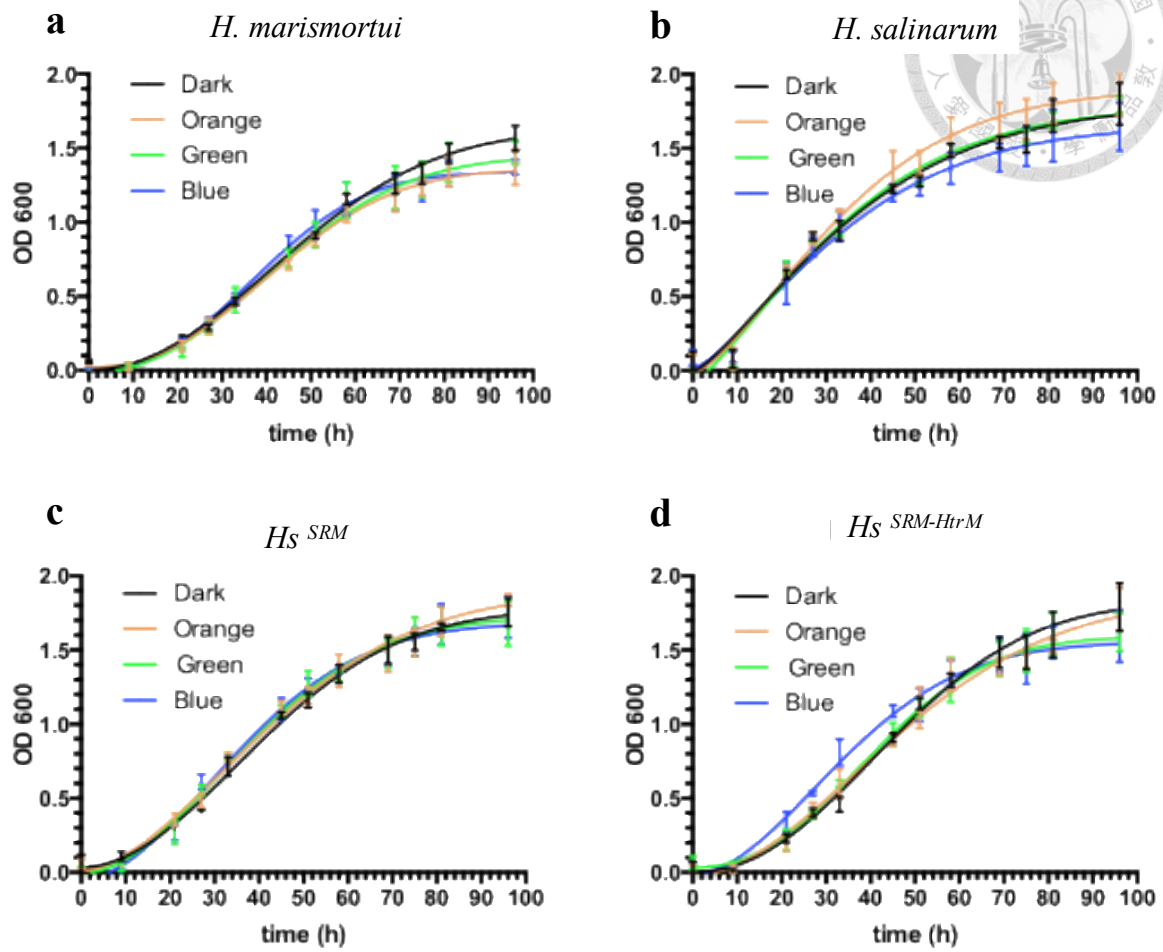


圖 32、嗜鹽古生菌於不同光照下之生長曲線。不同嗜鹽古生菌及轉形株在以橘、綠及藍光 LED 燈的照射下，所測定之生長曲線。

### III-2.3 光趨性研究



在此小節中，我們想回答以下兩個問題：(1) SRM-HtrM 複合蛋白質所調控的光趨反應為趨光或避光 (2) 因為其傳導元結構上的構件缺失，HtrM 是否為其調控光趨性時必要的元件？

首先，在單一菌體的行為分析上，以 3.2.1 小節所述的顯微鏡架設，在高倍率稀釋的菌液中，觀察單一隻菌體泳動行為差異 (表 5)。單一菌體的行為記錄中，少數的菌體對光刺激的反應很低，因此主要以會對藍光產生反應的菌體，作為可信的研究對象。嗜鹽古生菌 (*H. salinarum*) 在橘光脈衝的照射下，大部分菌體泳動路徑不受影影響，有些則產生 tumble，有些則會與原路徑偏離小於 90° 的角度；在綠光脈衝的刺激下，唯有  $H_s^{SRM-HtrM}$  轉形株會產生 tumble 的反應，此行為與其野生株 *H. salinarum* 及  $H_s^{SRM}$  不同；而在藍光脈衝的照射下，三種菌體皆一致性地產生避光的折返現象 (惟如上所述，很小一部的菌體對其沒有反應)。

表 5、單隻嗜鹽古生菌對 RGB 光源刺激之反應。

	橘光 (590 nm)	綠光 (530 nm)	藍光 (460 nm)
<i>H. salinarum</i>	Run	Reverse	Reverse
$H_s^{SRM}$	Run	Reverse	Reverse
$H_s^{SRM-HtrM}$	Run	Tumble	Reverse



其次，我們欲觀測嗜鹽古生菌面對長期的光源刺激，所產生的群體泳動現象。第一部分，在顯微鏡的設置下，可以觀測並分析長期照光區域內菌量變化 (圖 33)。黑暗組的結果，揭示此分析系統可能存在最大到 10% 的計算誤差。接著，在橘光照射組的結果中，發現野生株及轉形株都具有趨光的效應；在綠光的刺激下， $H_s^{SRM-HtrM}$  相對於其野生株 *H. salinarum* 及  $H_s^{SRM}$  轉形株，初步地發現避光反應有明顯地減少；在藍光的刺激下，三種菌株一致地產生顯著的避光反應，但  $H_s^{SRM-HtrM}$  轉形株的避光反應，仍然有顯著地被抑制。

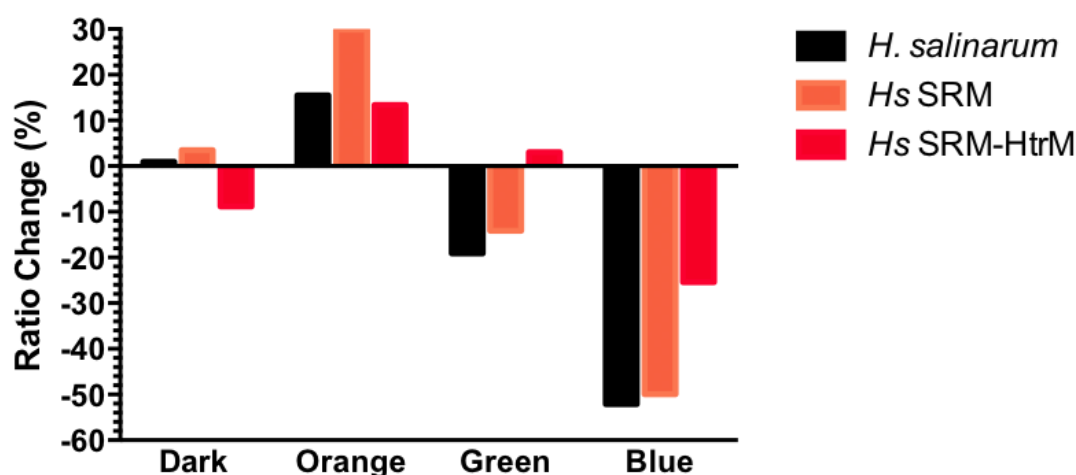


圖 33、嗜鹽古生菌在顯微鏡之光趨性分析。在黑暗、橘光、綠光及藍光四組照光條件下，*H. salinarum* 之野生株及兩個轉形株的光區趨性。Y 軸為計算照光區域內外的菌數比值後，再計算照光五分鐘前後，該比值的變化百分比。比值變化相對黑暗組為正值，視為趨光反應；反之則是為避光反應。數值絕對值越大，則表示該光趨性反應的程度越高。

以相同的概念移植到 96 孔盤進行類似的分析 (圖 34)。橘光結果中，顯示三種菌株在此條件下，OD 值變化與黑暗組皆無太大差別。然而， $H_s^{SRM-HtrM}$  轉形株在綠光與藍光的結果中，都一致地相較於  $H. salinarum$  野生株及  $H_s^{SRM}$  轉形株，OD 值下降的比率有明顯回升。此分析在綠光與藍光的結果與顯微鏡所觀測的結果相吻合，惟在此並無明顯的趨光反應被觀測到。

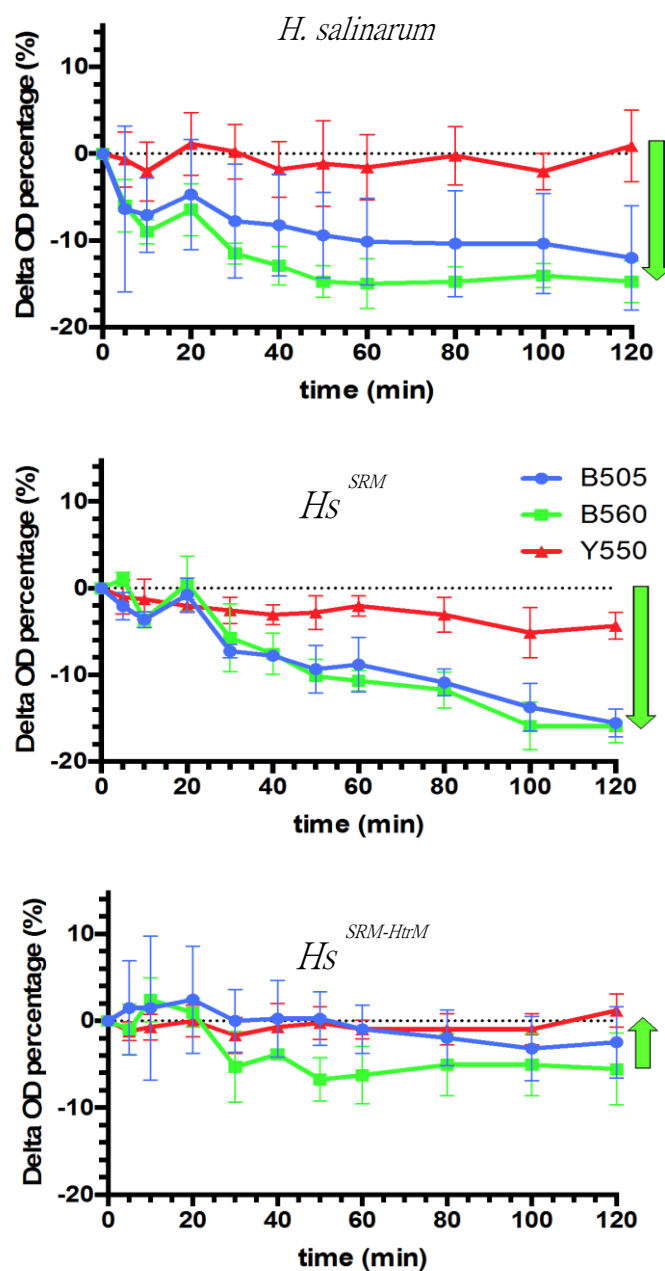


圖 34、嗜鹽古生菌在 ELISA Reader 之光趨性測定。

X 軸為刺激光源的照射時間，

Y 軸為各個光照條件所造成的 OD<sub>600</sub> 之改變，相對於黑暗條件之 OD<sub>600</sub> 變化的百分比。

*H. salinarum* 野生及轉形株對於橘光皆與黑暗條件沒有

太大差別，惟在藍光及綠光

的組別中可以觀察到 OD 值

的下降。並且 OD 值在藍光

及綠光中下降的現象，在

$H_s^{SRM-HtrM}$  中有明顯的減緩

(從 16% 下降至 6%)。

## 第四章 結論與探討



### 第一節 微生物之光趨性研究

動物與植物的光趨性研究往往能夠藉由肉眼的觀察與計數而統計，但微生物的光趨性研究卻與顯微鏡技術的發展有密不可分的關聯。隨著顯微鏡解析度及軟硬體的發展，我們從觀察微生物巨觀的行為至觀察 2D 平面上菌體的泳動，再到能夠追蹤菌體在三維空間中的運動；配合了電腦的運算，可以統計出單一菌體或是多隻菌體受光源刺激後的行為改變<sup>[85]</sup>。在族群整體的行為上，亦有相關研究指出本研究中使用的嗜鹽古生菌菌株 *H. salinarum*，在不同光照下的集體趨光性（菌體聚集）及避光反應（菌體驅散）<sup>[84]</sup>。

在本篇研究中，我們嘗試從單一菌體及微生物族群兩個面向來解釋光趨性的行為。單一菌體的觀察上，可藉由不同波段的 LED 光源脈衝刺激，以顯微鏡觀察到嗜鹽古生菌的泳動行為、趨光 (tumble) 及避光反應 (reverse; tumble and run)。在族群整體的光趨行為上，單細胞綠藻的泳動行為，可以在培養皿上被巨觀地觀察到 (圖 26)。接著，根據前人研究的例子<sup>[84]</sup>，我們將此概念延伸到顯微鏡及 ELISA Reader 上進行光趨性的定量分析。在分析結果中，初步的確可以觀察到嗜鹽古生菌的趨光及避光反應，並且量化比較出他們在不同光照條件下，族群的光趨性行為。若要分析不同的菌體樣品，可以再進行條件上的優化，使光趨性分析更為精確。

## 第二節 光趨性在生理上之意義



從部分嗜鹽古生菌中 MRho 的分佈來看 (表 1)，SRI 的存在 (調控趨光反應)，皆與 BR 伴生，在 *N. pharaonis* 的例子中，*Np* 同時缺乏了 BR 及 SRI；而在 *H. salinarum* 及 *H. marismortui* 的 SRI 及 SRII 吸收峰中，*HsSRI* 及 *HsSRII* 同時相較於 *HmSRI* 及 *HmSRII* 紅移了 10 nm 以上 (表 1)。因此，SRI 所調控的趨光反應，可能是為了使菌體能夠停留在適合 BR 運作的光源環境下。嗜鹽古生菌是個能夠同時代謝有機碳源，及利用 BR 產生的質子梯度製造 ATP 的物種。通常在比較嚴苛的環境下 (低氧、高光照)，會活化古生菌調控 BR 表現的啟動子 *bop promoter*；促使嗜鹽古生菌去尋求適合 BR 作用的環境，也因此增加了光趨性活性。

*H. marismortui* 在不同波長下的泳動分析結果中 (圖 7)，相較於 *H. salinarum*，其在大約 540 nm 的光源刺激時，就會產生明顯的趨光現象 (折返率減少至 20%)，而 *H. salinarum* 則是在約 555 nm 時，折返率才以線性的方式達到 20%；有趣的是，這兩株菌在同樣達到 20% 折返率所對應的光源波長，相差了約 15 nm，這個差值剛好也與 *HsSRI*, *HsSRII* 及 *HmSRI*, *HmSRII* 特徵吸收峰的差值差不多。另外，在菌體胡蘿蔔系列色素 (carotenoids) 的研究中，尤其是 bacterioruberin 的合成，這些色素能減少嗜鹽古生菌在高光照環境下，菌體 DNA 之損害 [86]。在菌體顏色的觀察中，我們發現在藍光的照射下，*H. salinarum* 會產生粉紅色的色素 (附圖 3)；然而，*H. marismortui* 的顏色不管在什麼光照條件下，都是呈現橘色。這個顏色的差異，也顯示出 *H. marismortui* 所產生的色素，相較於 *H. salinarum*，會吸收波長比較短的光源 (藉由互補色，推測其色素吸收

之光源波段) ，也對應了 *H. marismortui* 會停留在比較短波長光源下的現象。

從 MRho 的分佈來看，SRII 所調控的避光反應似乎是普遍存在於嗜鹽古生菌中 (表 1)，如在 *Natromonas pharaonis* 中，僅具有 SRII 一個 SR；並且，從序列比對的演化觀點來看，MRho 的演化路徑，有可能是從 BR → SRII → SRM → SRI。因此，對於微生物來說，避免有害的光源，應該是生存上的首要策略。另外，在本篇研究中，趨光反應的現象往往是在族群密度較高的條件下，最容易被觀察到。因而能夠推斷，趨光反應是幫助嗜鹽古生菌在營養缺乏的條件下，尋求能夠利用光能的環境。

### 第三節 *H. salinarum* 的 SRM-HtrM 功能獲得型轉殖株

為了解在 *H. marismortui* 中所發現的新型感覺型視紫質：SRM-HtrM 複合蛋白質，在嗜鹽古生菌光趨性調控中的角色；我們首先將此蛋白質轉殖到，缺乏此蛋白質的嗜鹽古生菌 (*H. salinarum*) 系統中。在轉形株確認的結果中，我們利用菌落 PCR (圖 27) 及西方墨點法 (圖 28) 確認 SRM & SRM-HtrM DNA 的存在及蛋白質表現。在西方墨點法的結果中，顯示出了傳導元 HtrM 可以幫助穩定 SRM，因此 SRM-HtrM 相較於 SRM，在 *H. salinarum* 上的表現量明顯高很多，此結果與先前在 SRs 的研究相符。另外，藉由 SRs 在與傳導元 (transducer) 作用的條件下，於不同 pH 值環境中，會有較穩定的光週期動力學 (photocycle kinetic) 的特性，確認 SRM 及 SRM-HtrM 在轉形株中具有光週期活性，同時也顯示 SRM 與 HtrM 的正確交互作用 (圖 30)。同時，由細胞型態及生長曲線的結果，可以確認 *Hs* 野生株及轉形株的生長及泳動能力。

#### 第四節 嗜鹽古生菌的光趨性機制



在先前嗜鹽古生菌的光趨性研究中 (圖 8)，可以得知這個感光的 two-component 系統利用 SR 當作光源的感受器，並利用傳導元將 SR 產生結構改變帶動的訊號，轉化為化學訊號，藉由化學趨性調控蛋白質組 (chemotaxis proteins) 傳遞訊號至鞭毛。然而，傳導元 HtrM 的結構中，相較於 HtrI 及 HtrII，缺乏了與 CheB, CheR 作用的 methyl accepting domain、與 CheA/CheW dimer 結合的尖端，以及少了一個 HAMP domain，使我們對於 SRM-HtrM 所調控的趨光反應之機制很有興趣。因此假設，SRM-HtrM 的活化態會與 CheR 結合，導致細胞中 CheR 的量變得很少，間接地減少細胞對於藍光的避光反應 (CheR 能夠維持 SRII-HtrII 對於藍光的敏感度<sup>[81]</sup>)。此外，不同於以往在 SR-Htr 複合體上的觀察，SRM-HtrM 仍舊維持了將質子幫浦至細胞外的能力，此現象在生理上是否具有意義，目前也不清楚。

本篇研究，將 SRM 及 SRM-HtrM 轉殖到 *H. salinarum* 中，並利用顯微鏡及 ELISA Reader 的測定，分析野生株及轉形株之間，光趨性行為的差異。實驗結果初步地指向，SRM-HtrM 在異源表達系統 *H. salinarum* 中，可以表現並執行功能，能夠改變菌體對於綠光及藍光的光趨性行為。更深入地分析，*Hs*<sup>SRM</sup> 轉形株的光趨性行為，可以在缺乏傳導元 HtrM 的情況下，光趨性行為改變並無法被完整地執行 (與 *H. salinarum* 野生株差異不大)。因此，得出以下結論：HtrM 對於 SRM-HtrM 在 *H. salinarum* 中，抑制避光反應的行為，是重要的。

## 第五章 未來展望



### 第一節 感覺型視紫質的轉介

由於在嗜鹽古生菌上進行基因編輯的不方便性，我們將 SRM-HtrM 以載體 (pJS005) 的形式放入 *H. salinarum* 中，並研究其功能。然而，若能將 SRM-HtrM 在 *H. marismortui* 上 knock-out 或 knock-down 將可以更完整地陳述 SRM-HtrM 在光趨性調控機制上的角色。其次，本實驗室目前也利用類似的方式，將目標基因放入 *Natromonas pharaonis* 之中，如此能夠更深入地探討 SRM-HtrM 的生理功能。有趣的是，*NpSRII* (498 nm) 的吸收峰與 *HmSRM* (503 nm) 相近，因此所用的激發光源能夠同時活化這兩個蛋白質，並探討其功能。最後，利用量化的光趨性研究方法，可以進一步地探討不同的蛋白質構件、突變等等，對於光趨性行為直接或間接造成的影響。

### 第二節 光趨性機制之研究方向

SRM-HtrM 是一個與先前認知的 SR-HtrS 有很多共通性及差異性的蛋白質。若能了解其調控光趨性的機制，對於嗜鹽古生菌所調控的光趨性也能夠有新的想法。而 Nanodisc 是一個很好的方法，能夠在 *in vitro* 的實驗中，模擬膜蛋白質在細胞膜上的特性及活性。

為了證實我們的假說，首先嘗試純化出 SRM-HtrM 及 CheR 蛋白質，並做 *in vitro* 的交互作用。然而，CheR 蛋白質非常的不穩定，很容易形成內涵體 (圖

34); 因此，我們將該蛋白質與 GST 蛋白質嵌合，增加其溶解度，並且以 GST 當作純化及免疫標定的標籤 (圖 35)。於初步的成果中，我們可以純化出原態的 GST-CheR 蛋白質。接下來，為了提高 SRM-HtrM 的活性，我們嘗試將其放到能夠模擬細胞膜條件下的 nanodisc 上，期望其能形成雙聯體 (dimer) 或三聯雙聯體 (trimer of dimer)<sup>[46]</sup>。爾後，藉由此方式去研究 SRM-HtrM complex 與其他蛋白質交互作用的可能性。

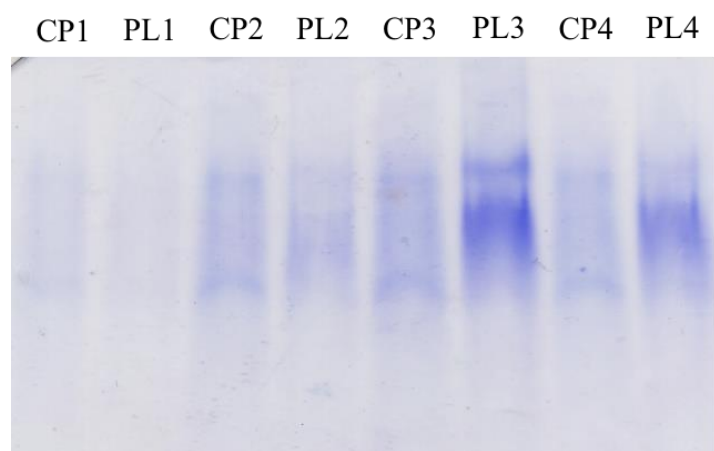


圖 35、*E. coli* BL21 表現 *HmCheR*。在 50  $\mu$ M IPTG, 20°C 條件下誘導 CheR 的合成。CP (cytoplasmic) 為破菌及 15,000 rpm 離心後的上清液; PL (pellet) 為前述步驟的菌塊。數字代表誘導的時間 (小時)。

導的時間 (小時)，可以得知內涵體大約在誘導後兩個小時開始生成 (PL2)。

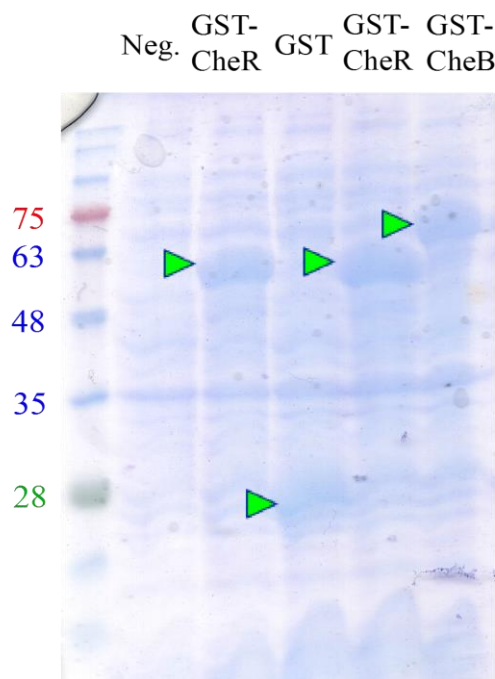
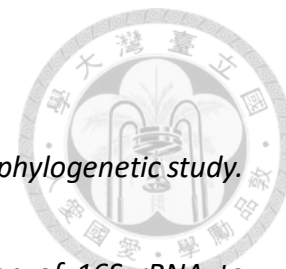



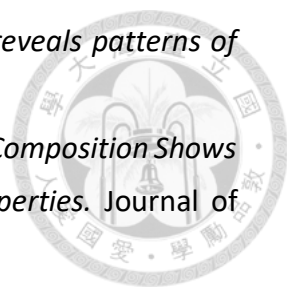
圖 36、*E. coli* BL21 小量表現 GST 嵌合蛋白質。*E. coli* BL21 在 100  $\mu$ M IPTG, 37°C, 2 h, 誘導表現 GST-*HmCheR*, GST, GST-*HmCheR*, GST-*HmCheB* 的全細胞裂解蛋白質電泳。綠色箭頭標出了目標蛋白質所在的位置。此實驗以未誘導的 *E. coli* BL21 菌體作為負控制組。


## 第六章 參考文獻



1. Weisburg, W.G., et al., *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. J Bacteriol, 1991. **173**(2): p. 697-703.
2. Lu, T., P.G. Stroot, and D.B. Oerther, *Reverse transcription of 16S rRNA to monitor ribosome-synthesizing bacterial populations in the environment*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(13): p. 4589-98.
3. Robertson, C.E., Harris, J. K., Spear, J. R. & Pace, N. R., *Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea*. . Current opinion in microbiology, 2005. **8**.
4. Capes, M.D., DasSarma, P. & DasSarma, S., *The core and unique proteins of haloarchaea*. BMC Genomics, 2012. **13**.
5. Lanyi, J.K., *Salt-dependent Properties of Proteins from Extremely Halophilic Bacteria*. Bacteriological Review, 1974. **38**: p. 272-290.
6. Larsen, H., S. Omang, and H. Steensland, *On the gas vacuoles of the halobacteria*. Arch Mikrobiol, 1967. **59**(1): p. 197-203.
7. Ginzburg, M., L. Sachs, and B.Z. Ginzburg, *Ion metabolism in a Halobacterium. I. Influence of age of culture on intracellular concentrations*. J Gen Physiol, 1970. **55**(2): p. 187-207.
8. Oren, A., et al., *Haloarcula marismortui (Volcani) sp. nov., nom. rev., an extremely halophilic bacterium from the Dead Sea*. Int J Syst Bacteriol, 1990. **40**(2): p. 209-10.
9. Soliman G.S.H, T.H.G., *Halobacterium pharaonis sp. nov., a new, extremely haloalkaliphilic archaeobacterium with low magnesium requirement*. 1982. **I. Abt. Orig.** : p. 318-329.
10. Burns, D.G., et al., *Haloquadratum walsbyi gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain*. Int J Syst Evol Microbiol, 2007. **57**(Pt 2): p. 387-92.
11. Stoechenius, W., *Walsby's square bacterium: fine structure of an orthogonal prokaryote*. journal of bacteriology, 1981. **148**: p. 352-360.
12. Ng, W.V.e.a., *Genome sequence of Halobacterium species NRC-1*. Acad Sci USA, 2000. **97**: p. 12176-81.
13. Lefkowitz, R.J., *Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(8): p. 413-22.

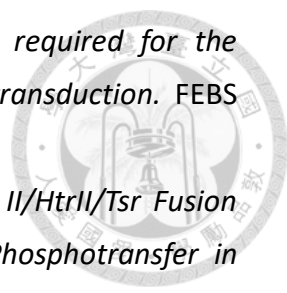
- 
14. Grote, M. and M.A. O'Malley, *Enlightening the life sciences: the history of halobacterial and microbial rhodopsin research*. FEMS Microbiol Rev, 2011. **35**(6): p. 1082-99.
  15. Spudich J.L., S.O.A., Govorunova E.G., *Mechanism divergence in microbial rhodopsins*. Biochim Biophys Acta, 2014: p. 1837(5):546-52.
  16. Spudich, J.L.a.J., K.-H., *Microbial Rhodopsins: Phylogenetic and Functional Diversity*, in *Handbook of Photosensory Receptors*. 2005: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
  17. G Kuan, M.H.S.J., *Phylogenetic relationships among bacteriorhodopsins*. Res. Microbiol., 1994: p. 273–285.
  18. Matsuno-Yagi, A. and Y. Mukohata, *Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of Halobacterium halobium differing in pigmentation*. Biochem Biophys Res Commun, 1977. **78**(1): p. 237-43.
  19. Inoue, K., et al., *A light-driven sodium ion pump in marine bacteria*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1678.
  20. Kim, S.Y., et al., *A role of Anabaena sensory rhodopsin transducer (ASRT) in photosensory transduction*. Mol Microbiol, 2014. **93**(3): p. 403-14.
  21. Vogeley, L., et al., *Anabaena sensory rhodopsin: a photochromic color sensor at 2.0 Å*. Science, 2004. **306**(5700): p. 1390-3.
  22. Lorenz-Fonfria, V.A., et al., *Transient protonation changes in channelrhodopsin-2 and their relevance to channel gating*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(14): p. E1273-81.
  23. Nagel, G., et al., *Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae*. Science, 2002. **296**(5577): p. 2395-8.
  24. Bieszke, J.A., et al., *The nop-1 gene of Neurospora crassa encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 8034-9.
  25. Fan, Y., L. Shi, and L.S. Brown, *Structural basis of diversification of fungal retinal proteins probed by site-directed mutagenesis of Leptosphaeria rhodopsin*. FEBS Lett, 2007. **581**(13): p. 2557-61.
  26. Zhai, Y., et al., *Homologues of archaeal rhodopsins in plants, animals and fungi: structural and functional predications for a putative fungal chaperone protein*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1511**(2): p. 206-23.
  27. Saranak, J. and K.W. Foster, *Rhodopsin guides fungal phototaxis*. Nature, 1997. **387**(6632): p. 465-6.

- 
28. Lynch, E.e.a., *Sequencing of seven haloarchaeal genomes reveals patterns of genomic flux*. PLoS One, 2012. **7**.
29. Sudo, Y., et al., *A Microbial Rhodopsin with a Unique Retinal Composition Shows Both Sensory Rhodopsin II and Bacteriorhodopsin-like Properties*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(8): p. 5967-5976.
30. Nakao, Y., et al., *Photochemistry of a putative new class of sensory rhodopsin (SRIII) coded by xop2 of Haloarcula marismortui*. J Photochem Photobiol B, 2011. **102**(1): p. 45-54.
31. Hsu-Yuan Fu, Y.-C.L., Yung-Ning Chang, Hsiao-chu Tseng, Ching-Che Huang, Kang-Cheng Liu, Ching-Shin Huang, Che-Wei Su, Rueyhung Roc Weng, Yin-Yu Lee, Wailap Victor Ng, and Chii-Shen Yang., *A Novel Six-Rhodopsin System in a Single Archaeon*. journal of bacteriology, 2010. **192**: p. 5866-5873.
32. Baliga, N.S.e.a., *Genome sequence of Haloarcula marismortui: a halophilic archaeon from the Dead Sea*. Genome Res, 2004. **14**: p. 2221-34.
33. Oesterhelt, D., *Bacteriorhodopsin as an Example of a Light-Driven Proton Pump*. Angewandte Chemie-International Edition in English, 1976. **15**(1): p. 17-24.
34. Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius, *Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium*. Nat New Biol, 1971. **233**(39): p. 149-52.
35. Hartmann, R., H.D. Sickinger, and D. Oesterhelt, *Quantitative aspects of energy conversion in halobacteria*. FEBS Lett, 1977. **82**(1): p. 1-6.
36. Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J.P. & Landau, E.M., *X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipid cubic phases*. Science, 1997. **277**: p. 1676-81.
37. Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailler, J.P. & Lanyi, J.K., *Strucutre of bacteriorhodopsin at 1.55 A resolution*. journal of molecular biology, 1999. **291**: p. 899-911.
38. Sharma, A.K., J.L. Spudich, and W.F. Doolittle, *Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility*. Trends Microbiol, 2006. **14**(11): p. 463-9.
39. Xiao-Ru Chen, Y.-C.H., Hsiu-Ping Yi, Chii-Shen Yang, Chii-Shen Yang, *A Unique Light-Driven Proton Transportation Signal in Halorhodopsin from Natronomonas pharaonis* Biophysical journal, 2016. **111**: p. 2600-2607.
40. Pfisterer, C., Gruia, A. & Fishcer, S. , *The mechanism of photo-energy storage in the halorhodopsin chloride pump*. journal of Biological Chemistry, 2009. **284**: p. 13562-13569.

- 
41. Ishchenko, A., et al., *New Insights on Signal Propagation by Sensory Rhodopsin II/Transducer Complex*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 41811.
  42. McCain, D.A., et al., *Phototactic Responses Mediated by Sr-I in H-Halobium Reconstituted with All-Trans Retinal and a Series of Ring Desmethyl and Acyclic Analogs*. Biophysical Journal, 1987. **51**(2): p. A138-A138.
  43. Chizhov, I., et al., *The photophobic receptor from Natronobacterium pharaonis: Temperature and pH dependencies of the photocycle of sensory rhodopsin II*. Biophysical Journal, 1998. **75**(2): p. 999-1009.
  44. Radu, I., et al., *Signal relay from sensory rhodopsin I to the cognate transducer HtrI: Assessing the critical change in hydrogen-bonding between Tyr-210 and Asn-53*. Biophysical Chemistry, 2010. **150**(1-3): p. 23-28.
  45. Gordeliy, V., Labahn J, Moukhametzianov R, Efremov R, Granzin J, Schlesinger R, Büldt G, Savopol T, Scheidig AJ, Klare JP, Engelhard M., *Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II–transducer complex*. Nature, 2002. **3**: p. 484-7.
  46. Orekhov, P., et al., *Sensory Rhodopsin I and Sensory Rhodopsin II Form Trimers of Dimers in Complex with their Cognate Transducers*. Photochem Photobiol, 2017. **93**(3): p. 796-804.
  47. Stenrup, M., et al., *pH-Dependent absorption spectrum of a protein: a minimal electrostatic model of Anabaena sensory rhodopsin*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2017. **21**: p. 14073-14084.
  48. Jun Tamogami, K.I., Atsushi Matsuyamaa, Takashi Kikukawab, Makoto Demurab, Toshifumi Naraa, Naoki Kamaoa, *The effects of chloride ion binding on the photochemical properties of sensory rhodopsin II from Natronomonas pharaonis*. Journal of Photochemistry and Photobiology, 2014. **141**(192-201).
  49. Hoffmann, M., et al., *Color tuning in rhodopsins: the mechanism for the spectral shift between bacteriorhodopsin and sensory rhodopsin II*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(33): p. 10808-18.
  50. Hayashi, S., E. Tajkhorshid, and K. Schulten, *Structural determinants of spectral tuning in the rhodopsin family of proteins*. Biophysical Journal, 2002. **82**(1): p. 226a-226a.
  51. Luecke, H., et al., *Crystal structure of sensory rhodopsin II at 2.4 angstroms: Insights into color tuning and transducer interaction*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1499-1503.
  52. Kuschmitz, D. and B. Hess, *Coupling of Proton and Cycle and Photocycle in*

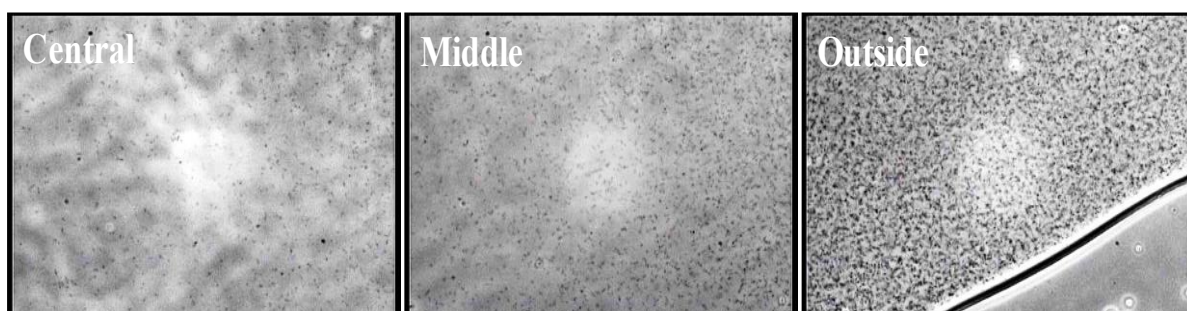
- Bacterio-Rhodopsin*. Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie, 1977. **358**(11): p. 1383-1384.
53. Essen, L.-O., *Halorhodopsin: light-driven ion pumping made simple?* Current opinion in structural biology, 2002. **12**: p. 516-522.
54. Szundi, I., T.E. Swartz, and R.A. Bogomolni, *Multicolored protein conformation states in the photocycle of transducer-free sensory rhodopsin-I*. Biophysical Journal, 2001. **80**(1): p. 469-479.
55. Ohtani, H., T. Kobayashi, and M. Tsuda, *Branching Photocycle of Sensory Rhodopsin in Halobacterium-Halobium*. Biophysical Journal, 1988. **53**(4): p. 493-496.
56. Sasaki, J. and J.L. Spudich, *The transducer protein HtrII modulates the lifetimes of sensory rhodopsin II photointermediates*. Biophysical Journal, 1998. **75**(5): p. 2435-2440.
57. Sasaki, J.e.a., *Different dark conformations function in color-sensitive photosignaling by the sensory rhodopsin I-HtrI complex*. Biophysical journal, 2007. **92**: p. 4045-53.
58. Zhang XN, Z.J., Spudich J.L., *The specificity of interaction of archaeal transducers with their cognate sensory rhodopsins is determined by their transmembrane helices*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**: p. 857-62.
59. Sasaki, J. and J.L. Spudich, *Proton transport by sensory rhodopsins and its modulation by transducer-binding*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, 2000. **1460**(1): p. 230-239.
60. Sasaki, J. and J.L. Spudich, *Proton circulation during the photocycle of sensory rhodopsin II*. Biophysical Journal, 1999. **77**(4): p. 2145-2152.
61. Rath, P., et al., *Asp76 is the Schiff base counterion and proton acceptor in the proton-translocating form of sensory rhodopsin I*. Biochemistry, 1996. **35**(21): p. 6690-6696.
62. Bogomolni, R.A., et al., *Removal of Transducer HtrI Allows Electrogenic Proton Translocation by Sensory Rhodopsin-I*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(21): p. 10188-10192.
63. Zhang, X.N. and J.L. Spudich, *HtrI is a dimer whose interface is sensitive to receptor photoactivation and His-166 replacements in sensory rhodopsin I*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(31): p. 19722-19728.
64. Engelhard, M., B. Scharf, and F. Siebert, *Protonation changes during the photocycle of sensory rhodopsin II from Natronobacterium pharaonis*. Febs

- Letters, 1996. **395**(2-3): p. 195-198.
65. Spudich, J.L., *Variations on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins*. Molecular Microbiology, 1998. **28**(6): p. 1051-1058.
66. Elena N. Spudich, G.O., Eric V. Schow, , Douglas J. Tobias, , John L. Spudich, Hartmut Luecke, *A transporter converted into a sensor, a phototaxis signaling mutant of bacteriorhodopsin at 3.0 Å*. journal of molecular biology, 2012. **415**: p. 455-463.
67. Johann P Klarea, V.I.G., Jörg Labahn, Georg Büldt, Heinz-Jürgen Steinhoff, Martin Engelhard, *The archaeal sensory rhodopsin II/transducer complex: a model for transmembrane signal transfer*. FEBS Letters, 2004. **564**: p. 219-224.
68. Mizuno M, S.Y., Homma M, Mizutani Y, *Direct Observation of the Structural Change of Tyr174 in the Primary Reaction of Sensory Rhodopsin*. Biochemistry, 2011. **50**: p. 3170-80.
69. Johann P Klarea, V.I.G., Jörg Labahn, Georg Büldt, Heinz-Jürgen Steinhoff, Martin Engelhard, *The archaeal sensory rhodopsin II/transducer complex: a model for transmembrane signal transfer*. FEBS Letters, 2004. **564**: p. 219-224.
70. Inoue, K., T. Tsukamoto, and Y. Sudo, *Molecular and evolutionary aspects of microbial sensory rhodopsins*. Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics, 2014. **1837**(5): p. 562-577.
71. Ernst, O.e.a., *Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms*. Chemical reviews, 2014. **114**: p. 126-163.
72. Sasaki, J.e.a., *Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride pump* Science, 1995. **269**: p. 73-75.
73. Havelka, W., Henderson, R. & Oesterhelt, D., *Three-dimensional structure of halorhodopsin at 7 Å resolution*. journal of molecular biology, 1995. **247**: p. 726-738.
74. Váró G, B.L., Needleman R, Lanyi JK., *Proton transport by halorhodopsin*. Biochemistry., 1996. **35**: p. 6604-11.
75. Jun Tamogami, K.I., Atsushi Matsuyama, Takashi Kikukawa, Makoto Demura, Toshifumi Nara, Naoki Kamo, *The effects of chloride ion binding on the photochemical properties of sensory rhodopsin II from Natronomonas pharaonis*. Journal of Photochemistry and Photobiology 2014. **141**(192-201).
76. Spudich, Y.S.a.J.L., *Three strategically placed hydrogen-bonding residues convert a proton pump into a sensory receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**: p. 16129–16134.

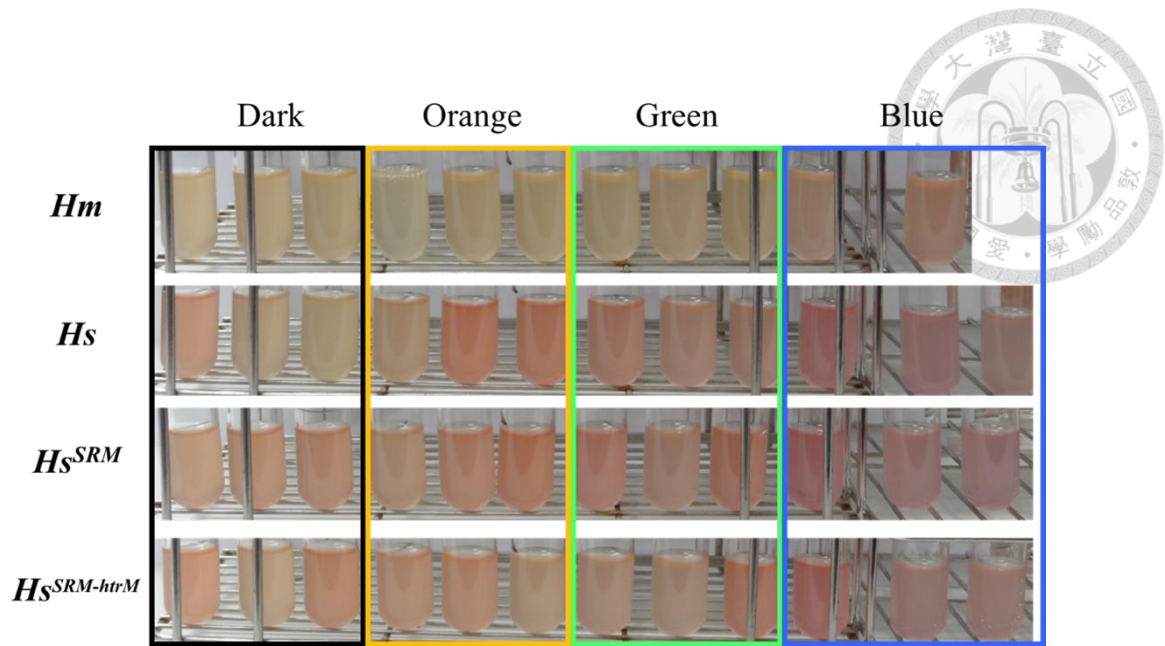
- 
77. Krah M, M.W., Oesterhelt D., *A cytoplasmic domain is required for the functional interaction of SRI and HtrI in archaeal signal transduction.* FEBS Letters, 1994. **353**: p. 301-4.
78. Trivedi VD, S.J., *Photostimulation of a Sensory Rhodopsin II/HtrII/Tsr Fusion Chimera Activates CheA-Autophosphorylation and CheY-Phosphotransfer in Vitro.* Biochemistry, 2003. **42**: p. 13887-92.
79. Royant A, N.P., Edman K, Neutze R, Landau EM, Pebay-Peyroula E, Navarro J., *X-ray structure of sensory rhodopsin II at 2.1-Å resolution.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**: p. 10131-6.
80. Klare JP, B.E., Engelhard M, Steinhoff HJ., *Sensory rhodopsin II and bacteriorhodopsin: Light activated helix F movement.* Photochem Photobiol Sci, 2004. **3**: p. 543-7.
81. Orekhov PS, K.D., Mulkidjanian AY, Shaitan KV, Engelhard M, Klare JP, Steinhoff HJ., *Signaling and Adaptation Modulate the Dynamics of the Photosensory Complex of Natronomonas pharaonis.* PLoS Comput Biol, 2015. **11**.
82. Spudich, J.L. and R.A. Bogomolni, *Mechanism of Color Discrimination by a Bacterial Sensory Rhodopsin.* Nature, 1984. **312**(5994): p. 509-513.
83. Cappuccino JG, S.N., *Microbiolog A Laboratory Manual; Experiment 20 : The Bacterial Growth Curve.* 9th ed. p.139-142. 2011, San Francisco, USA: PEARSON.
84. Stoeckenius, W., E.K. Wolff, and B. Hess, *A rapid population method for action spectra applied to Halobacterium halobium.* J Bacteriol, 1988. **170**(6): p. 2790-2795.
85. Lin, Y.C., H.Y. Fu, and C.S. Yang, *Phototaxis of Haloarcula marismortui revealed through a novel microbial motion analysis algorithm.* Photochem Photobiol, 2010. **86**(5): p. 1084-1090.
86. Shahmohammadi, H.R., et al., *Protective roles of bacterioruberin and intracellular KCl in the resistance of Halobacterium salinarium against DNA-damaging agents.* J Radiat Res, 1998. **39**(4): p. 251-262.



附圖 1、光照培養箱之設計。(左) 可供四種光照條件的 chamber; (右) 每個 chamber 可以放置 12 管樣品，光源從圓心正上方照射。整個裝置以棉線固定於培養箱中。



附圖 2、*H. salinarum* 的趨氧現象。將圖 17 之樣品薄片靜置隔夜後，菌液液滴由內而外的影像擷取。越靠近空氣的介面，菌體聚集的越多。



附圖 3、嗜鹽古生菌於不同光照下之菌體狀況。各嗜鹽古生菌株生長至穩定期後，其菌體之顏色。