

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 030032

參展科別 化學

作品名稱 即時觀測核苷酸調控單一 DNA 分子上重組酵
素的結合反應

得獎獎項 四等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 李弘文、許名智

作者姓名 羅哲琦、劉庭妤

關鍵詞 單分子拴球實驗、環狀核苷酸、重組酵素

作者簡介



我們是來自北一女中的羅哲琦和劉庭妤，很幸運能有機會獨立進行一項完整的專題研究，研究過程中有辛苦的瓶頸期，卻也有意想不到的驚喜。感謝李弘文教授和許名智老師，總是給予我們建議和鼓勵。感謝實驗室的學長姊，除了教導我們實驗技術和知識外，也展示了科學精神。感謝一路上陪伴並支持我們的親友，在我們實驗中遭遇困難時，始終支持著我們。

摘要

在 DNA 重組反應中，核苷酸擔任輔助重組酵素 *E. coli* RecA 蛋白和 DNA 結合的重要角色，近期研究發現環狀核苷酸 Cyclic di-AMP 和 Cyclic di-GMP 是細菌內普遍控制複雜細胞活動的二級訊號，因此本研究運用單分子拴球實驗直接觀察單一 DNA 分子，以布朗運動值反映 DNA 長度的特性，分析環狀核苷酸參與調控後，重組酵素結合上 DNA 的反應速率與機制，進而了解環狀核苷酸在調節基因組穩定性的角色。

藉由分析單一種類核苷酸與混合核苷酸的實驗結果，得到兩種環狀核苷酸在重組酵素的結合反應中皆屬抑制劑，大幅降低蛋白結合上 DNA 的反應速率，且就結構來看，相較一般參與反應的三磷酸腺苷會增加 DNA 長度，新發現 Cyclic di-AMP 有縮短部分 DNA 長度的特質。

由於 DNA 修復主要倚賴 DNA 重組反應進行，因此若細菌 DNA 出現損壞時，加入環狀核苷酸抑制重組酵素結合上破損的 DNA 分子，使細菌 DNA 無法成功複製，達到預防細菌擴散的效果。

Abstract

Nucleotides have been shown to play an important role in modulating DNA metabolism. We plan to study how commonly known secondary metabolites, cyclic di-AMP and cyclic di-GMP, affect DNA recombination. Both cyclic di-nucleotides are second messengers, functioning as signaling nucleotides that can regulate many complex cell activities in a wide variety of bacteria. We use single-molecule Tethered Particle Motion (TPM) experiments to directly monitor the conformations of individual DNA molecules. Specifically, it measures the Brownian Motion of a bead tethered to a microscope slide by a single DNA molecule, reflecting the conformation and tether length of DNA.

Different nucleotides regulate the recombination progression of *E. coli* RecA recombinases during DNA recombination. We showed that the assembly kinetics of recombinases onto DNA can be monitored in real-time, including nucleation time, extension rate, and the overall complex length. By studying how these cyclic di-nucleotides modulate the kinetics of DNA recombination, we hope to understand the role of nucleotides in regulating genome stability.

In our results, *E. coli* RecA recombinases with pure cyclic di-nucleotides cannot effectively bind onto single-strand DNA forming longer filament, while cyclic di-AMP specifically decreases overall DNA length. Adding ATP and cyclic di-nucleotides mixture in DNA recombination, the percentage of nucleoprotein filament decreases when the concentration of cyclic di-nucleotides increases caused by the decrease of reaction rate. In conclusion, cyclic di-AMP and cyclic di-GMP work as inhibitors during DNA recombination of *E. coli* RecA recombinases.

壹、前言

一、研究動機

在一般生化實驗中，常利用三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)或是不會水解的 ATP γ S 作為核苷酸，輔助重組酵素 RecA 蛋白進行 DNA 重組反應。然而在近期研究中發現環狀核苷酸 Cyclic di-AMP 與 Cyclic di-GMP 作為細菌訊息傳遞分子，可以調控細胞訊息傳遞等重要生理活動。因此研究計畫以環狀核苷酸為主角，從反應動力學觀察其與重組酵素 RecA 蛋白結合方式、結合效率等不同方面影響，進而探討在不同核苷酸如何調控 DNA 重組反應。

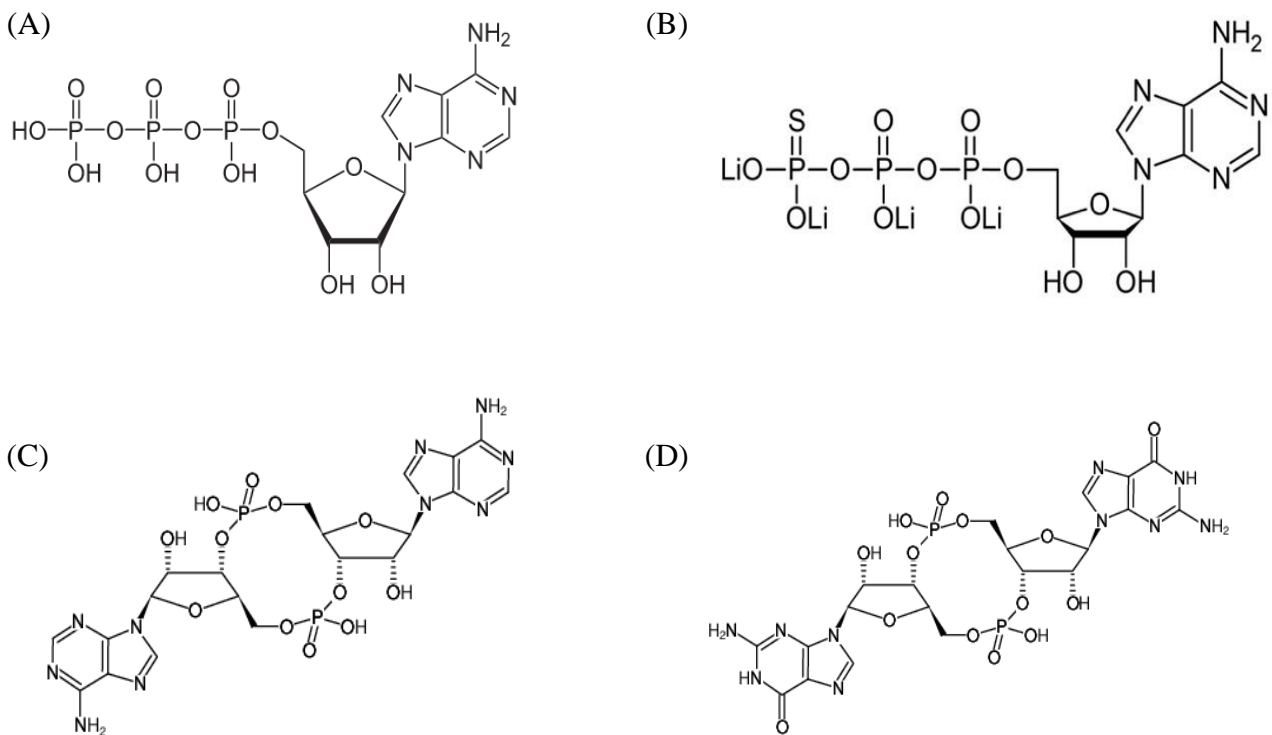


圖-1、(A) 三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP), (B) Adenosine 5'-O-(3-thio) triphosphate (ATP γ S), ATP γ -磷酸基上鍵結的氧替換為硫，不易水解, (C) 環狀核苷酸 Cyclic di-AMP, $2\text{ATP} \rightarrow \text{Cyclic di-AMP} + 2\text{pyrophosphate}$ [6], (D) 環狀核苷酸 Cyclic di-GMP, $2\text{GTP} \rightarrow \text{Cyclic di-GMP} + 2\text{pyrophosphate}$ [7]。

二、研究目的

- (一) 利用單分子拴球實驗觀察使用 ATP γ S, ATP, Cyclic di-AMP, Cyclic di-GMP 4 種不同的核苷酸，分析在特定時段的多個拴球分子(Snapshots 實驗) RecA 蛋白結合上 351/dT90 單股 DNA 的比例。
- (二) 利用單分子拴球實驗觀察將環狀核苷酸 Cyclic di-AMP 及 Cyclic di-GMP 與 ATP 以不同比例混合，分析在特定時段的多個拴球分子(Snapshots 實驗) RecA 蛋白結合上 351/dT90 單股 DNA 的比例。

三、文獻回顧

- (一) RecA 蛋白與 DNA 相互作用以及核苷酸所扮演之角色

1. DNA 同源重組反應 (DNA homologous recombination)

當 DNA 出現雙股斷裂時，細胞會先產出一種保護單股 DNA 的單鏈結合蛋白 (SSB, single-stranded DNA-binding protein) 來維持其穩定性，直到細胞內產出重組酶，如 *E. coli* RecA 蛋白，去協助破損的 DNA 尋找相對應的同源 DNA，進行同源重組以修復 DNA，如圖-2。

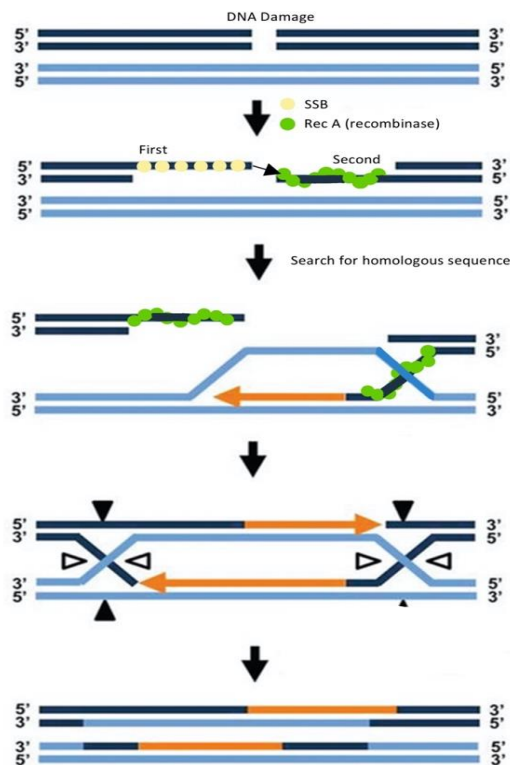


圖-2、DNA 同源重組反應。

2. *E. coli* RecA 蛋白與核苷酸結構[4][5]

RecA 蛋白是細菌中普遍存在的重組酵素，而實驗中使用的 *E. coli* RecA 蛋白則是大腸桿菌內的重組酶，為眾多 RecA 蛋白中研究最為深入透徹者。RecA 蛋白 (A) 不需選擇特定序列與單股 DNA 或雙股 DNA 結合，且無論是否有 DNA 存在皆可形成一段規則的絲狀螺旋結構，一圈螺旋由六個 RecA 蛋白及核苷酸 (如圖-3 紅色區塊) 構成 (B)，連接對應到一迴圈有 18 個鹼基對的 DNA，當核苷酸水解時，RecA 蛋白就會失去與 DNA 結合的活性。

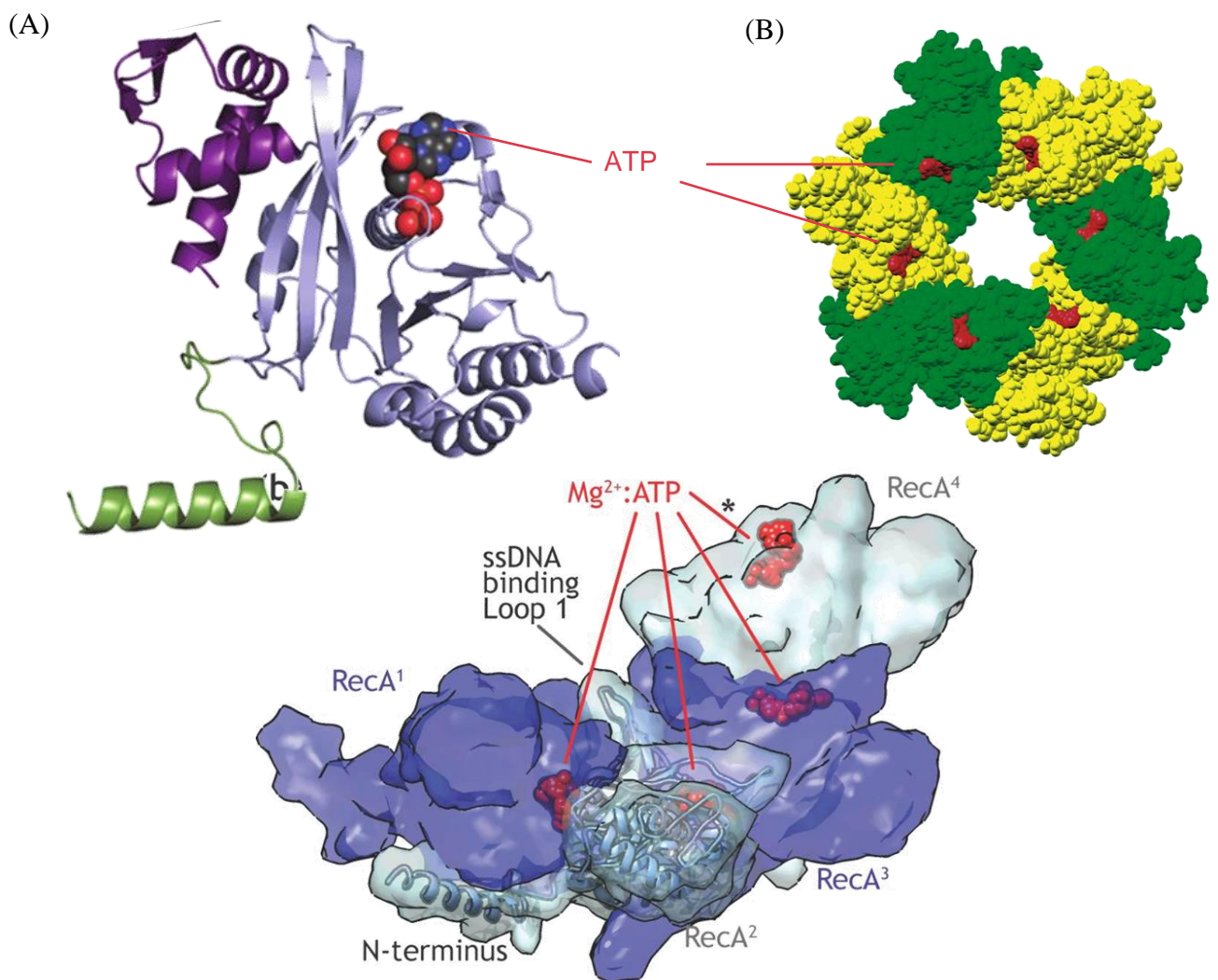


圖-3、(A) RecA 蛋白與核苷酸結構, (B) 6 個一環的 RecA 蛋白與核苷酸結構。

3. RecA 蛋白與 DNA 的結合反應

參考已知的實驗結果，此為 RecA 蛋白與 DNA 的結合反應式，由於實驗中 DNA 濃度固定不變，且研究中核苷酸濃度極度過量，因此重組酶成核至 DNA 上可視為偽一級反應，成核反應速率式為 $\text{Rate} = k[\text{重組酵素}]^n$ 。

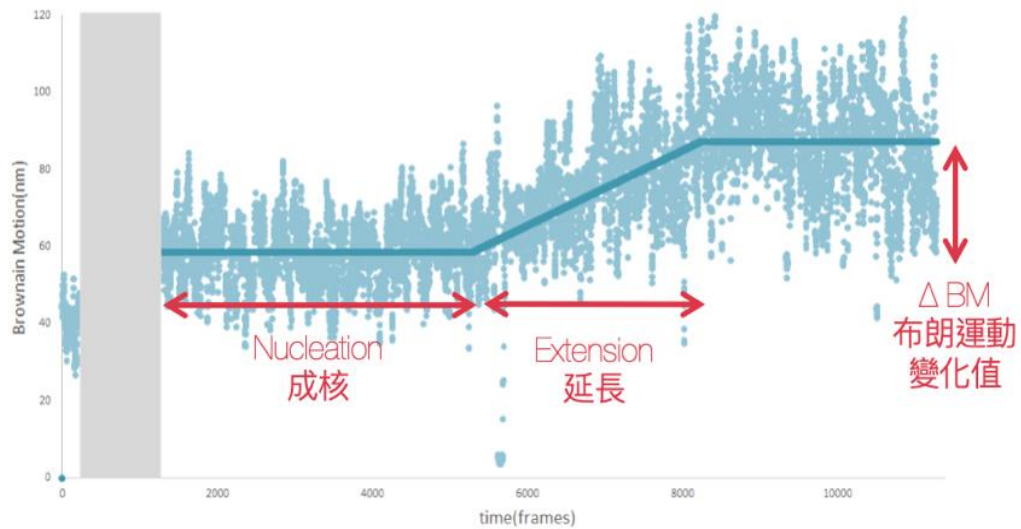


圖-4、DNA 重組反應動力學進程。

上述為單分子實驗即時觀測 DNA 與重組酵素結合反應的的動力學進程，分析反應圖形的兩個階段與 DNA 長度變化值：

(1) 成核 (Nucleation)

將重組酶通入反應槽後，到布朗運動值產生變化的期間，稱之為成核時間，為結合反應的速率決定步驟。

(2) 延長 (Extension)

當布朗運動值開始出現變化，直到 DNA 延伸出核蛋白絲的過程，即達到結合的正逆反應平衡穩定的第二布朗運動值，此過程稱之為延長。

(3) 布朗運動變化值

達正逆反應速率相等的平衡狀態時，反應末穩定的布朗運動平均值減掉初始布朗運動值，即是布朗運動變化值，可以分析 DNA 伸長量。

(二) 單分子拴球實驗 (Tethered Particle Motion, TPM)[1][2]

單分子拴球實驗是一種常用以探討蛋白質和 DNA 交互作用與機制的生物物理技術。首先利用抗體抗原間 (anti-digoxigenin 與 5' digoxigenin) 作用力將 DNA 一端固定在玻片表面，另一端連接到修飾有鏈霉親和素(Streptavidin)的聚苯乙烯小球 (A)，由於反應在水溶液中進行，分子受碰撞會進行布朗運動，使用倒立式顯微鏡觀測與錄攝反應槽內拴球運動影像 (B)，由 Python 程式運算出各分子的布朗運動值，而根據過往實驗數據顯示：布朗運動值即能反應 DNA 長度 (C)。因此，對於和 DNA 有作用、並造成 DNA 長度變化的蛋白質 (例如 *E coli. RecA*)，單分子拴球實驗是非常有效的分析方法。

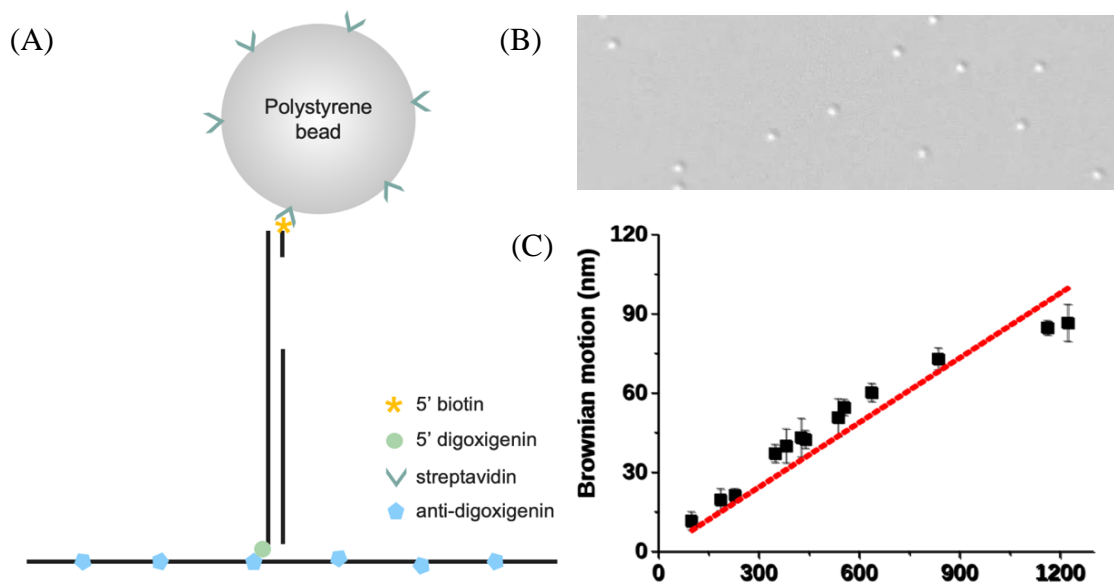


圖-5、(A)玻片-351/dT90 DNA-拴球分子架構的橫向側視圖, (B)單分子拴球實驗在光學顯微鏡下觀察到的影像, (C)布朗運動值反映 DNA 長度的關係圖。

貳、 研究設備及器材

一、 351/dT90 DNA 的製備：

(一) 設備

1. 聚合酶連鎖反應儀
2. 超微量分光光度計
3. 微量離心機
4. 恆溫乾浴器
5. 水平電泳槽及電源供應系統
6. 電泳照膠系統

(二) 器材

1. 微量離心管
2. 500 μ L 離心管
3. 移液器及微量吸管尖

(三) 藥品

1. 超純水
2. dT90 核苷酸 (polynucleotide (dT) DNA oligonucleotide)
3. 蛋白酶 (Taq DNA polymerase, T4 PNK, T4 DNA ligase)
4. 緩衝溶液 (Thermopol buffer, T4 PNK buffer, TBE buffer)
5. 質體 (pBR322)
6. 引子 (p129-dig, p411-idsp)
7. 三磷酸腺苷 (ATP, adenosine triphosphate)
8. 洋菜粉 (Agarose)
9. 膠體純化套件 (Gel Extraction Kit)

二、單分子拴球實驗 (TPM experiment) :

(一) 設備

1. 超音波洗淨器
2. 氮氣鋼瓶與噴槍
3. 恆溫乾浴器
4. 倒立式顯微鏡 (Olympus ix71)

(二) 器材

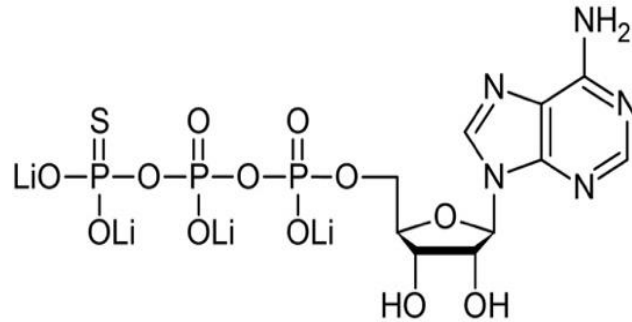
1. 24 mm x 60 mm 載玻片及 22 mm × 22 mm 蓋玻片
2. 郵寄玻片盒
3. 3M 雙面膠
4. 0.5, 1.5, 2 ml 離心管
5. 移液器及微量吸管尖

(三) 藥品

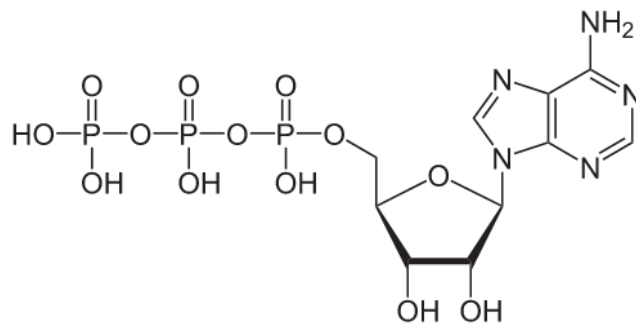
1. 超純水
2. 抗體 (α -dig, Anti Digoxigenin)
3. BSA 蛋白
4. pH7.5 RecA 緩衝液 (10X RecA buffer)
[250 mM Tris-HCl, 30 mM potassium glutamate, 100 mM MgOAc]
5. 351/dT90 DNA
6. 二硫蘇糖醇 (DTT, Dithiothreitol)
7. 聚苯乙烯小球 (SA beads, Streptavidin coated polystyrene beads)
8. *E. coli* RecA 重組酵素 (*E. coli* RecA Recombinase)

9. 核苷酸

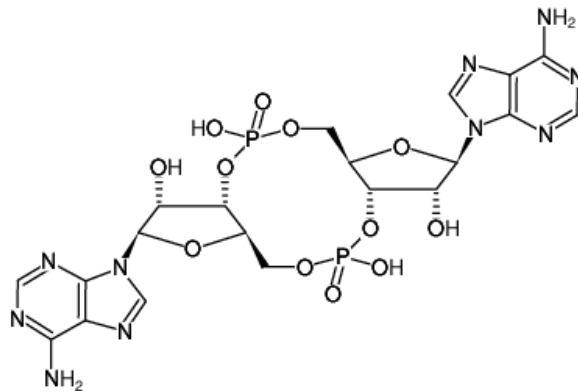
(4) Adenosine 5'-O-(3-thio) triphosphate (ATP γ S)



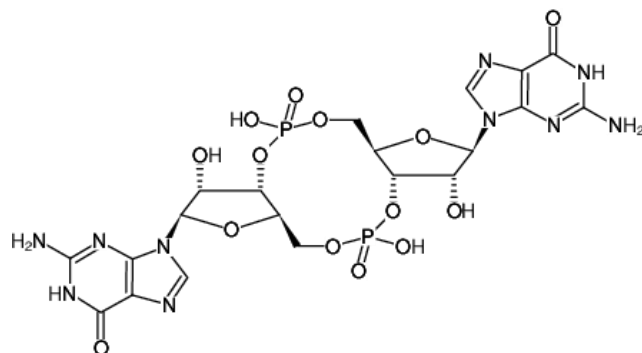
(5) 三磷酸腺苷 (ATP, adenosine triphosphate)



(6) 環腺苷酸 (Cyclic di-AMP, Cyclic di-adenosine monophosphate)

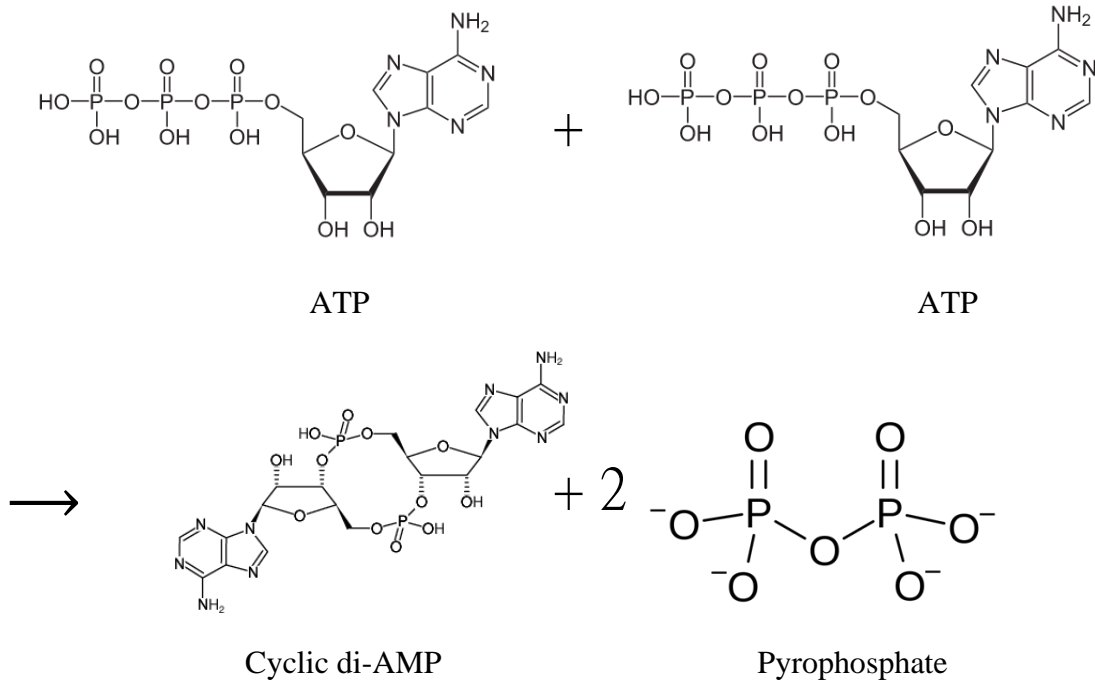


(7) 環磷酸鳥苷 (Cyclic di-GMP, Cyclic diguanylate)

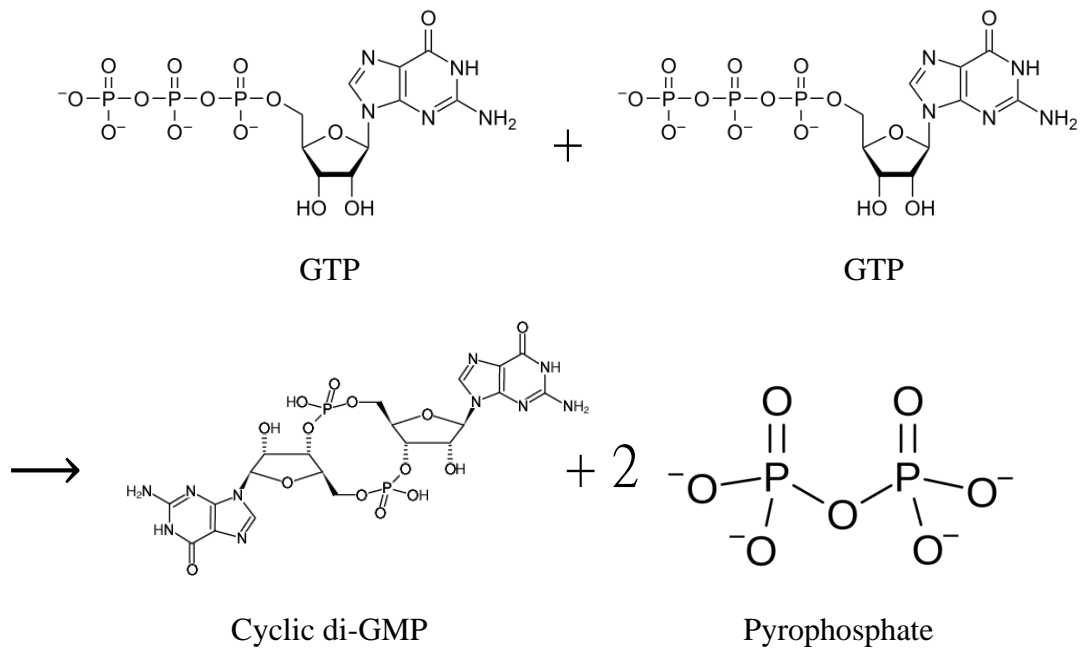


環狀核苷酸的合成

一、環腺苷酸(Cyclic di-AMP, Cyclic di-adenosine monophosphate)



二、環磷酸鳥苷 (Cyclic di-GMP, Cyclic diguanylate)



中英文重要名詞縮寫對照表

英文縮寫	英文名	中文名
TPM	Tethered Particle Motion	單分子拴球實驗
<i>E. coli. RecA</i>	<i>Escherichia coli</i> RecA recombinase	大腸桿菌重組酵素/酶
Cyclic di-AMP	Cyclic di-adenosine monophosphate	環腺苷酸
Cyclic di-GMP	Cyclic diguanylate	環磷酸鳥苷
ATP	Adenosine triphosphate	三磷酸腺苷
ATP γ S	Adenosine 5'-O-(3-thio)triphosphate	-
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶式連鎖反應

參、研究過程或方法

一、351/dT90 DNA 的製備

(一) 351/dT90 DNA 結構

本研究使用單股 DNA 的片段觀察 RecA 蛋白和不同核苷酸在重組反應中的機制，為防止單股 DNA 的序列隨機排列產生二級結構，導致單分子拴球實驗所得之布朗運動值無法反映真正的 DNA 長度，因此實驗使用 90 nt (鹼基, nucleotide) 的胸腺嘧啶 (Thymine)。此外，實驗設計以 351 bp (鹼基對, base pair) 的雙股 DNA 作為支撐避免單股 DNA 因溶液沖洗而黏在表面，如圖-6 所示。

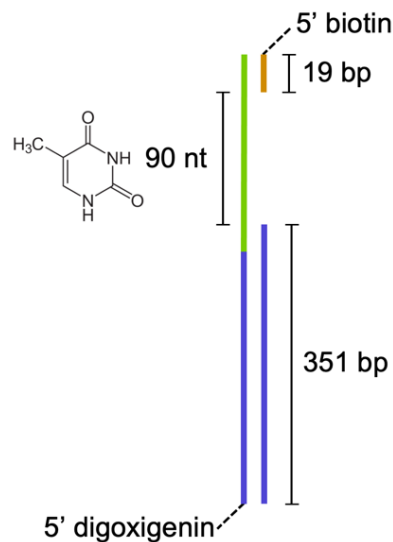


圖-6、351/dT90 DNA。

(二) 351/dT90 DNA 製作步驟

1. 以聚合酶式連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 合成出 5'端分別修飾有 digoxigenin、OH，且一股 351 nt、另一股 331 nt 的雙股 DNA 並純化。
2. 於攝氏 37 度下，利用 T4 Polynucleotide kinase (PNK) 將單股 dT90 DNA 磷酸化，DNA 5'端帶有磷酸根修飾可使抗體和抗原的連接更緊密。
3. 利用 DNA 連接酶 (Ligase) 將第一步驟合成的 331/351 雙股 DNA 與第二步驟的單股 DNA 以序列互補之氫鍵相互連接，再以膠體 DNA 萃取篩選出適當長度的 DNA 並純化，製備出 351/dT90 DNA。

二、重組反應環境製備

(一) 玻片製備

1. 將載玻片與蓋玻片浸泡在 2 M 的氫氧化鉀 (KOH, Potassium hydroxide) 水溶液中，於室溫下超音波震盪 15 分鐘。
2. 依序以超純水、酒精 (EtOH, Ethanol) 水溶液沖洗玻片表面，並浸泡在 EtOH 水溶液中，於室溫下超音波震盪 15 分鐘。
3. 依序以 EtOH 水溶液、超純水沖洗玻片表面，並浸泡於超純水中，於室溫下超音波震盪 20 分鐘。
4. 以超純水沖洗玻片表面後，用氮氣將玻片表面吹乾。
5. 利用清洗過的載玻片和蓋玻片，和切割好的雙面膠，製成實驗所需的反應槽；一片有 4 個反應槽，一個反應槽約有 10 μ L 的體積。

(二) 反應槽製備與修飾

1. 於每個反應槽通入濃度 18 μ g/ml 的抗體 anti-digoxigenin 後，等待 20 分鐘。
2. 將反應緩衝溶液一通入每個反應槽各三次，反應緩衝溶液一含有 1 mg/ml 的牛血清蛋白，可將玻片表面上未被抗體 anti-digoxigenin 覆蓋作用的空隙填滿，防止其他物質黏在表面，沖洗後等待 20 分鐘。
3. 將濃度 5 nM 的 351/dT90 DNA 通入反應槽，並等待 20 分鐘。
4. 將反應緩衝溶液一通入反應槽三次，將未鍵結的 DNA 沖去，隨即通入修飾有特殊蛋白(鏈霉親和素, streptavidin)的聚苯乙烯小球，利用抗原抗體間的親和力，可使之與 DNA 基質上之 biotin 連結。
5. 以反應緩衝溶液二將未連接 DNA 的聚苯乙烯小球沖去。

反應條件:

(1) 反應緩衝溶液一

BSA [0.2 mg/ml]、pH7.5 RecA buffer [1X]、超純水

(2) 反應緩衝溶液二

BSA [0.2 mg/ml]、pH7.5 RecA buffer [1X]、二硫蘇糖醇[1mM]、超純水

三、單分子拴球實驗

因為反應中 RecA 蛋白的濃度較不易觀察，本研究利用單分子拴球實驗即時觀測各個單一 DNA 分子與 RecA 蛋白之間的結合反應，採用在特定反應時間點下觀測畫面多個 DNA 分子的 Snapshots 實驗，藉由將各拴球布朗運動值繪製成直方圖去分析加入各種核苷酸後 DNA 長度增長的變化，探討環狀核苷酸對 RecA 蛋白結合反應速率與機制的影響。

(一) Snapshots 原理

將玻片置於倒立式顯微鏡下，通入含有 RecA 蛋白與核苷酸的反應溶液，並於通入後的 1, 3, 5, 10, 15 分鐘 5 個時間點下，每分鐘分別挑錄製 3 個相異的畫面以頻率 33 Hz 拍攝的 100 張影像，分析各時間點下多個拴球分子的布朗運動值。

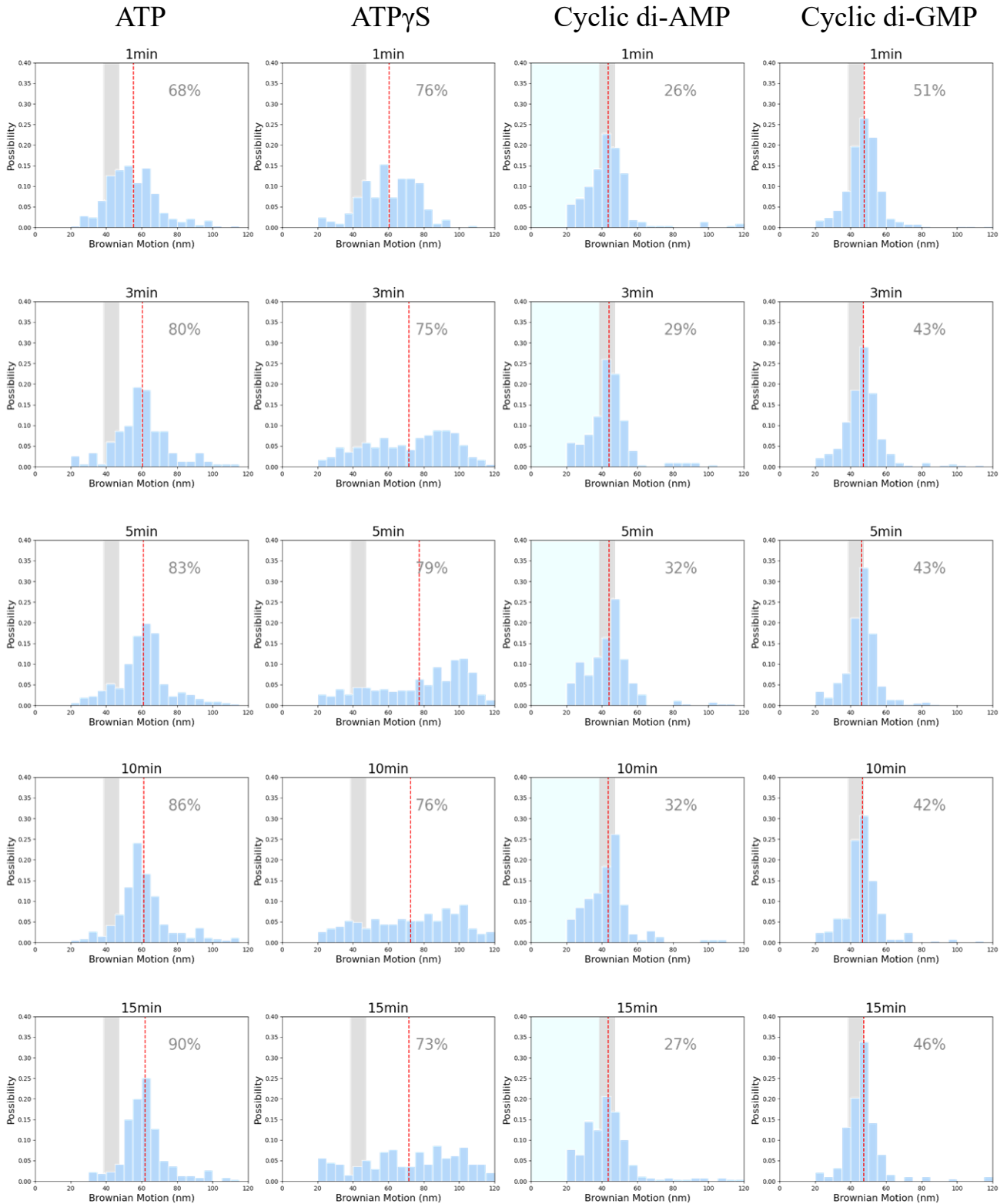
(二) Snapshots 數據分析

1. 將 Snapshot 實驗中倒立式顯微鏡錄製一次的 100 張影像以 20 張影像為單位取平均數，每次往下挪移一個單位格，可以獲得拴球 xy 方向位移、xy 方向位移標準差、xy 方向位移比值等統計數據。
2. 為避免 DNA 和乳膠小球並不是一對一的連接，我們利用拴球在 x,y 方向的位移比值應接近 1 的特性，篩選掉比值小於 0.8 和大於 1.2 的拴球。
3. 將 1, 3, 5, 10 15 分鐘下，x 座標為拴球布朗運動值 (nm)，y 座標為各 DNA 分子在各布朗運動值範圍下的分佈機率，繪成直方圖。
4. 分析各個時間點下直方圖的平均數、大於與小於未反應 351/dT90 DNA 平均值一個標準差的拴球比例，比較加入不同核苷酸後的反應成效。

肆、研究結果與討論

一、單分子拴球 Snapshots 實驗結果

(一) 2 mM 單一核苷酸布朗運動值直方圖



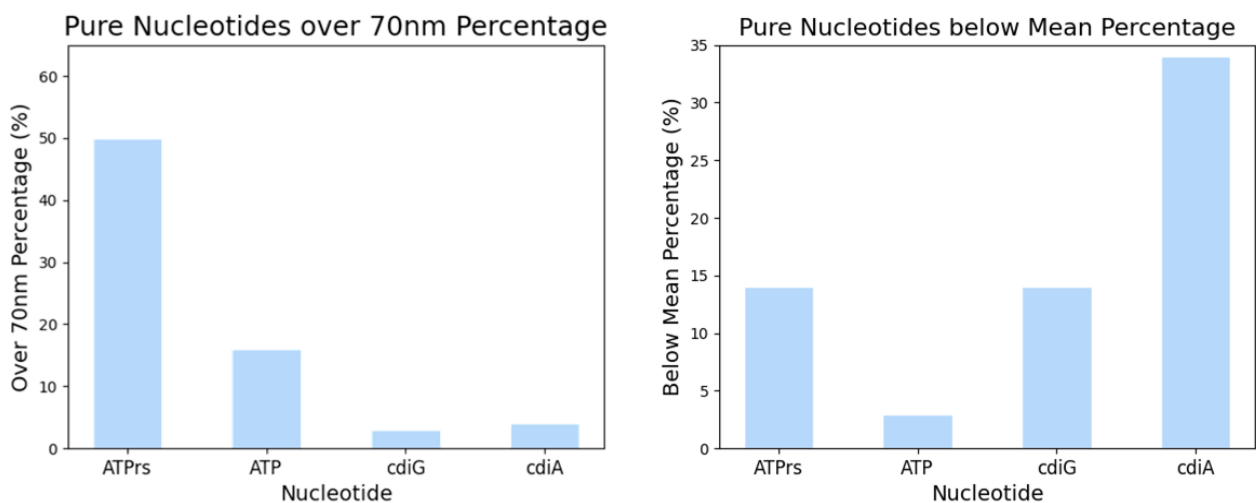
圖表-1。

以上圖表-1 為 4 種 2 mM 單一核苷酸在 1, 3, 5, 10, 15 分鐘 5 個時段下的 DNA 布朗運動值直方圖，x 座標為布朗運動值 (nm)，y 座標為 DNA 分子分佈機率。灰色區域代表著純 351/dT90 DNA 的布朗運動平均值上下一個標準差的範圍，藍色區域表示低於平均值一個標準差的範圍，紅色虛線為該核苷酸、該時間點布朗運動的平均值，灰色百分比則是超過平均值一個標準差所佔的比率，研究中定義為 RecA 蛋白有成功鍵結上 DNA 形成核蛋白絲的比例。

由圖表-1 可得 ATP 與 ATP γ S 皆有超過半數有形成核蛋白絲，且兩者的平均值皆有升高的趨勢，其中 ATP γ S 分佈較為分散，ATP 則是平均性升高，分佈集中。環狀核苷酸無明顯反應，其中 Cyclic di-GMP 有小幅度使布朗運動值上升。

(二) 加入 2 mM 純核苷酸的 RecA 結合上 DNA 的比例

由上方 DNA 布朗運動值分佈圖 (圖表-1) 統整各核苷酸第 15 分鐘數據，分析超過 70 nm 定義為長核蛋白絲及長度縮減的藍色區域的比例，可得圖表-2。



圖表-2。

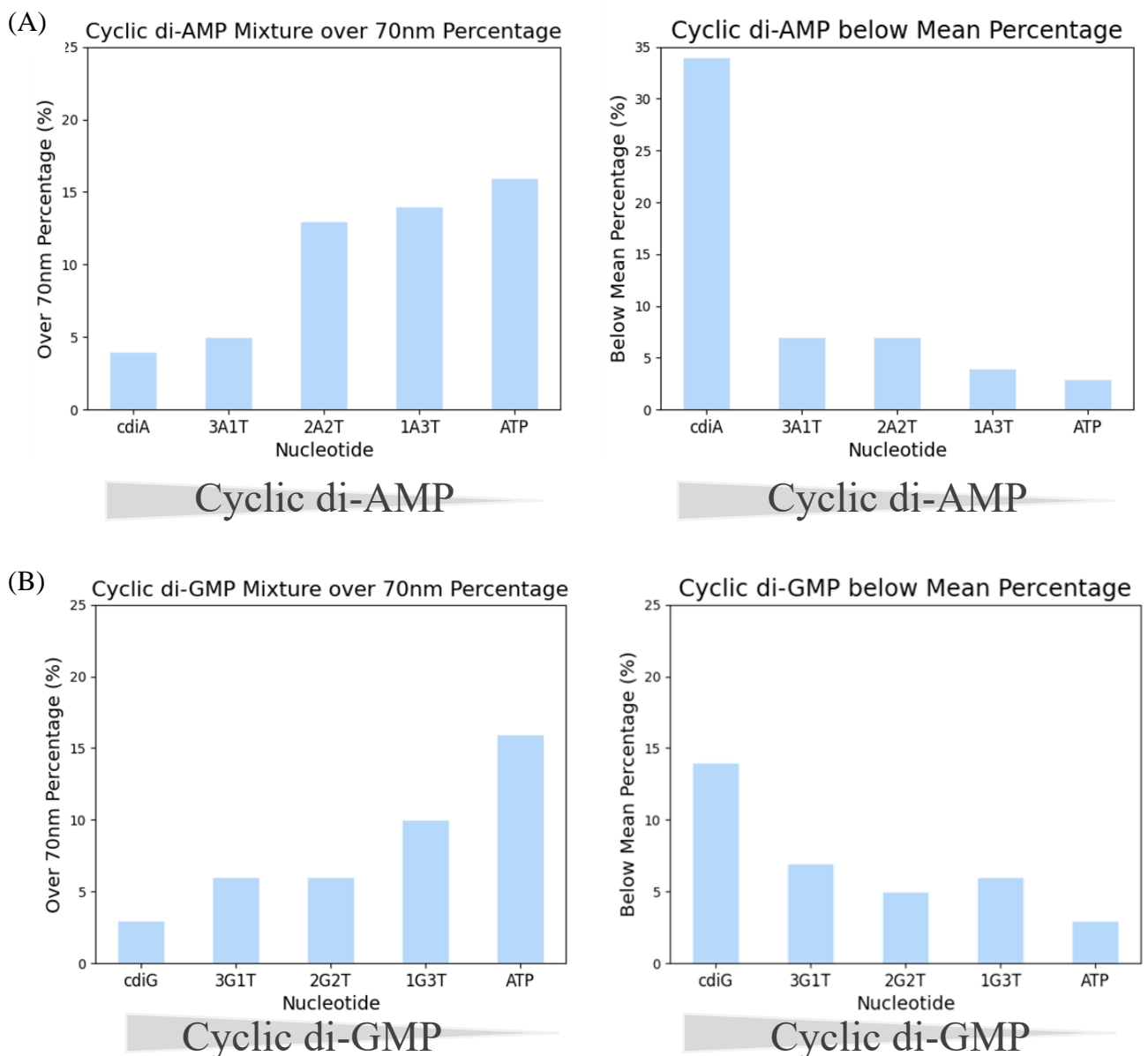
由圖表-2 的右圖可知 ATP γ S 及 ATP 皆可反應且 ATP γ S 相較 ATP 有更高機率形成長的核蛋白絲，環狀核苷酸則近乎沒有形成長的核蛋白絲。

分析圖表-2 的左圖可得 Cyclic di-AMP 在低於平均值一個標準差的範圍相較其他核苷酸有明顯的高機率分布，推測可縮短 DNA 長度。

(三) 加入 2 mM 環狀核苷酸不同比例混 ATP 的 RecA 鍵結 DNA 的比例

從加入純核苷酸的實驗成果可以大致推得環狀核苷酸對於 RecA 蛋白結合上 DNA 分子有負向的效果，因此研究討論將總濃度 2 mM 的環狀核苷酸與 ATP 以 1:3, 1:1, 3:1 的比例混合，觀察環狀核苷酸濃度與反應成效的關係。

同(二)取第 15 分鐘的數據分析超過 70 nm 定義為長核蛋白絲及長度縮減的藍色區域的比例，可得以下圖表-3。A 表示 Cyclic di-AMP，G 表示 Cyclic di-GMP，T 表示 ATP，數字表示混合比例 (例：3A1T 為濃度 3:1，1.5 mM Cyclic di-AMP 與 0.5 mM ATP)，由左至右，環狀核苷酸濃度由高到低。



圖表-3、(A)不同濃度 Cyclic di-AMP 混 ATP, (B)不同濃度 Cyclic di-GMP 混 ATP。

統整圖表-3 (A)、(B)左圖可知，隨著環狀核苷酸 Cyclic di-AMP 及 Cyclic di-GMP 濃度的升高，DNA 分子因結合上 RecA 蛋白而形成長核蛋白絲的比例下降，可推得兩種環狀核苷酸皆為 RecA 蛋白結合反應的抑制劑。對比圖表-3 A)、(B)右圖可得出 Cyclic di-AMP 混合 ATP 後，與 Cyclic di-GMP 混合 ATP 前後相同，皆無明顯影響 DNA 長度下降。

伍、結論與應用

一、結論

- (一) 本研究首創以核苷酸為操縱變因研究 *E. coli* RecA 蛋白與 DNA 的結合反應，運用單分子即時觀測法，創新發現核苷酸的種類會決定性地影響結合反應的速率與延伸的核蛋白絲長度。
- (二) 若加入 ATP、ATP γ S，結合的正反應速率較快，反應達平衡後 DNA 形成的核蛋白絲較長；若加入環狀核苷酸 Cyclic di-AMP、Cyclic di-GMP，會使結合的逆反應(debind)速率上升，反應達平衡後的核蛋白絲長度較短。
- (三) 將環狀核苷酸(Cyclic di-AMP 或 Cyclic di-GMP)和 ATP 以不同的比例混合後，發現隨著環狀核苷酸濃度上升，結合的逆反應(debind)速率隨之上升，其淨反應速率因此下降，形成長核蛋白絲(長度超過 70 nm)的比例也降低。
- (四) 歸納上述可以推論出環狀核苷酸 Cyclic di-AMP 和 Cyclic di-GMP 在 *E. coli* RecA 蛋白與 DNA 的結合反應中，能夠使成核(速率決定步驟)時間增加，反應速率下降，因此環狀核苷酸在反應中擔任抑制劑的角色。
- (五) 本研究意外發現，環狀核苷酸 Cyclic di-AMP 與 *E. coli* RecA 蛋白在結合反應中不但不會延長 DNA 長度，反而會使 DNA 長度縮短，其原因有待進一步探究。

二、應用

目前本研究專注於探討調控大腸桿菌的重組酵素 *E. coli* RecA 蛋白的結合反應，若將我們的研究方法應用於調控其他有害細菌的重組酵素活性，找出抑制其重組酵素結合反應的抑制劑，就能進一步阻礙 DNA 的修復。又由於本研究有能使基因組穩定下降的特性，相對於傳統利用抗生素的抑菌方法，可以避免細菌產生抗藥性的缺點。

三、創新與展望

本研究不同於原本以電泳跑膠實驗大數據分析 DNA 重組反應的實驗方法，特別選擇利用創新的單分子物理化學方法，偵測單個或數個分子的行為與性質，利用機率與統計法不僅能得到傳統平均實驗的結果，同時能大幅提升實驗的靈敏度，並獲得更細微的生化分子性質分布及運動機制，而運用拴球布朗運動值可反映 DNA 長度的特性，即時觀測所有單一分子的數據，可直接分析出 DNA 分子上重組酵素 RecA 蛋白結合反應的速率 k 值的大小。

研究結果最新發現環狀核苷酸 Cyclic di-AMP 及 Cyclic di-GMP 對於結合反應的抑制性，且進一步觀測到加入 Cyclic di-AMP 核苷酸的 RecA 蛋白反應溶液會縮短部分 DNA 分子的特性，值得延伸利用單分子光鉗技術，研究環狀核苷酸參與反應後 DNA 與蛋白質之交互作用的模型，獲得更準確、精密的反應機制量測。

陸、參考文獻資料

1. 陳晏誠、范秀芳、李弘文 (2009)。單分子拴球實驗在生醫研究的應用。 *科儀新知*, 171, 38-43。
2. Nelson, P. C., Zurla, C., Brogioli, D., Beausang, J. F., Finzi, L., & Dunlap, D. (2006). Tethered Particle Motion as a Diagnostic of DNA Tether Length. *The Journal of Physical Chemistry Part B*, 110 (24), 17260-17267。
3. Jason C Bell, Stephen C Kowalczykowski (2016, June). RecA: Regulation and Mechanism of a Molecular Search Engine. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(6), 491–507.
4. Randall M. Story, Thomas A. Steitz (1992). Structure of the recA protein–ADP complex. *Nature*, 355, 374-376.
5. Margaret S. Vanloock, Xiong Yu, Shixin Yang, Alex L. Lai, Claudia Low, Michael J. Campbell, Edward H. Egelman (2003, February). ATP-Mediated Conformational Changes in the RecA Filament. *Structure*, 11(2), 187-196.
6. Sudhanshu Mudgal, Kasi Manikandan, Ahana Mukherjee, Anuja Krishnan, Krishna Murari Sinha (2021, December). Cyclic di-AMP: Small molecule with big roles in bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 161(A), 105264.
7. Urs Jenal, Alberto Reinders, Christian Lori (2017, February 6). Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 271–284.
8. Chung, C., Li, H.-W. (2013). Direct Observation of RecBCD Helicase as Single-Stranded DNA Translocases. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 8920-8925.
9. Wu, H.-Y., Li, H.-W. (2014). Crowding Alters Dynamics and Length of RecA Nucleoprotein Filaments in RecA-Mediated Strand Exchange. *ChemPhysChem*, 15, 80-84.
10. Kim, SH, Ragunathan, K., Park, J., Joo, C., Kim, D., Ha, T.J. (2014). Cooperative Conformational Transitions Keep RecA Filament Active During ATPase Cycle. *J. Am. Chem. Soc.*, 136, 14796-14800.
11. Lan WH, Lin SY, Kao CY, Chang WH, Yeh HY, Chang HY, Chi P, Li HW. (2020, May 13) Rad51 facilitates filament assembly of meiosis-specific Dmc1 recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 May 26, 117(21), 11257-11264.

【評語】 030032

整體實驗設計有趣，研究完整。但必須需要注意如此研究目的為開發新型態的微生物抑制方法，需要比較微生物及宿主的差異。再者破壞微生物的 DNA 修復與直接抑制微生物是否直接相關需要被驗證。該方法是否可以穿過微生物細胞膜亦需要被驗證。