

國立交通大學生物科技學系

碩士論文

克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中 RstA/RstB 雙分子訊息傳

遞系統的特性分析

**Characterization of the two-component system**

**RstA/RstB in *Klebsiella pneumoniae* CG43**



研究生：蔡雅雯

Student : Ya-Wun Cai

指導教授：彭慧玲 博士

Advisor : Hwei-Ling Peng, Ph.D

中華民國九十八年六月

June, 2009

## 中文摘要

因為克雷白氏肺炎桿菌( *Klebsiella pneumoniae* )的 RstA/RstB 之基因組成和大腸桿菌、沙門氏菌不盡相同，為了了解克雷白氏肺炎桿菌中 RstA/RstB 的功能：首先，我們利用同源互換的方式取得 *rstA* 及 *rstB* 缺損株，其外型 and 生長曲線和野生株並沒有差異；另外，分析 RstA/RstB 對細菌抗藥性的影響時發現，大量表現 RstA 會增加細菌對 cefotaxime 的感受性；進一步，我們發現克雷白氏肺炎桿菌 *asr* (acid shock RNA) 的啟動子活性在 *rstA* 或 *rstB* 缺損株中皆明顯下降，因此，我們推測 RstA/RstB 可能和抗酸作用有關。然而，*rstA* 或 *rstB* 缺損株在酸性環境的生長曲線或酸逆境下的存活率和野生株差異不大。更意外的，*asr* 的基因缺損對細菌在酸性環境的生長或酸逆境下存活的影響也不明顯。不過，藉由西方墨點法分析，我們發現克雷白氏肺炎桿菌的 Asr 在生成過程中也會有被切割的情形；另外，藉由啟動子活性分析，我們也發現 *rstA* 的基因缺損不會影響其它和酸有關的 *hdeD*、*yfdX*、*yfiD* 的啟動子活性表現。分析 *rstA* 啟動子序列，可以找到 PhoP 及 RstA 可能的鍵結序列，而以啟動子活性測試，輔以實驗室 EMSA 分析的結果，證實 PhoP/PhoQ 會調控 RstA/RstB 的表現。而為了解 RstA/RstB 所感應的訊息，我們以添加不同金屬離子來分析啟動子活性表現，結果發現銅、鋅

離子可以使 *rstA*、*rstB*、*asr* 啟動子活性明顯減少。另外，分析 *rstB* 啟動子序列，發現類似 Fur 的鍵結序列，而由啟動子活性測試顯示 *fur* 的基因缺損，除了影響 *rstB* 啟動子活性外，*asr* 啟動子的活性也會明顯減少。



## Abstract

Gene organization of the two-component signal transduction system RstA/RstB in *Klebsiella pneumoniae* is different from that of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. In order to investigate if different functional role exerted by the RstA/RstB, deletion mutants of *rstA* or *rstB* were firstly generated by allelic exchange via homologous recombination. Neither deletion has apparent effect on the phenotype or growth. The drug susceptibility analysis revealed that the overexpression of RstA rendered the *E. coli* an increase of susceptibility to cefotaxime. Deletion of *rstA* or *rstB* was found to decrease dramatically the promoter activity of the acid response regulator Asr. Hence, we presumed RstA/RstB may involve in the acid resistance. However, deletion of *rstA* or *rstB* did not change the acid survival rate or affect the growth in acidic condition. Intriguingly, neither the *asr* deletion had apparent effect on the acid survival rate or the growth in acidic condition. Nevertheless, we found that the *K. pneumoniae* Asr was also susceptible to the protease digestion and hence two fragments were found in the cytosol after the overexpression of the Asr in the recombinant *E. coli*. Moreover, the deletion of *rstA* did not influence the promoter activity of the acid resistance-related genes *hdeD*, *yfdX* and *yfiD*. Analyses of the putative promoter of *rstA* revealed a conserved PhoP and RstA binding box, suggesting a PhoP/PhoQ-

dependent expression of the RstA/RstB. In order to determine the signal sensory molecules for the expression of RstA/RstB, different metal ions were added into the medium for the effect on the promoter activity. The results showed that copper or zinc ion could reduce the promoter activity of *rstA*, *rstB* and *asr*. A putative Fur binding box was found in the *rstB* promoter, and therefore *fur* deletion effect was studied. Interestingly, deletion of *fur* not only reduced the promoter activity of *rstB* but also the *asr* promoter activity.



## 致謝

記得當初爸媽把我載到新竹放下後，對自己有一種期許，希望自己在這裡有更多的成長。而在這兩年的時間也真的是一晃眼就過去，時間快的就像我昨日才初到新竹的感覺。在這裡，兩年的生活，除了邏輯思考的進步，實驗技巧，表達能力外，感覺也磨練自己做事情的態度與方法，同時也學習人與人之間的溝通與相處。

這兩年的生活，我最感謝的人是我的指導教授彭慧玲老師，當初可以進這個實驗室其實心情是充滿感激，感謝老師的識人。在這裡，每一週跟老師面對面討論實驗也獲益良多，因為老師總是會帶領我思考找出盲點，或者在討論的過程中，讓我突然想通一些卡在腦袋裡的疑問，也因為老師的用心與關心，讓我覺得自己其實是一個很幸運的人，能遇到這樣一位好老師。

還有感謝清大張晃猷老師以及張老師實驗室的夥伴給予實驗上的建議以及協助，以及中興大學鄧文玲老師，給予我諸多建議，讓我對實驗有多一點的想法而加以探討，也感謝交通大學楊昀良老師，給予不同的觀點以及教導論文中的修正。

而這兩年的生活，最重要的是有實驗室大夥的歡樂與扶持。親愛的小丸子總是在我實驗卡關會陪著我一步步討論，在我實驗低潮時也不忘給我鼓勵而讓我繼續努力，更是吃飯邀約的好咖；秉熹則是在實驗上傳授我諸多功

力；靜柔姐姐，則是會在我不順遂時，陪著我聊天，當我有開心的事情時也能一同分享；而我的好同學顛峰，也感謝你兩年來給予我的幫助以及支持；還有實驗室可愛又體貼的學妹家華和佩君，你們真是實驗室的開心果，總是讓我感動在心裡；也感謝小新學長及建誠學長實驗上的指導，讓我可以實驗卡關時找出問題點；也感謝志桓、小珊、承哲、哲充、信文、朝彥、豪君、歲云，實驗室有你們真好。

最後要感謝我最強的後盾，親愛的老爸老媽，總是在我週末回家陪我聊天，給我打氣，讓我充滿能量的回來繼續努力。也感謝我的好麻吉玉秀和松志，陪我談心陪我逛街；以及景程，給予我研究所生活諸多的協助。

最後，我要開始邁入人生的另一個啟程，我會繼續努力，也希望大家一同努力，往自己的目標邁進。

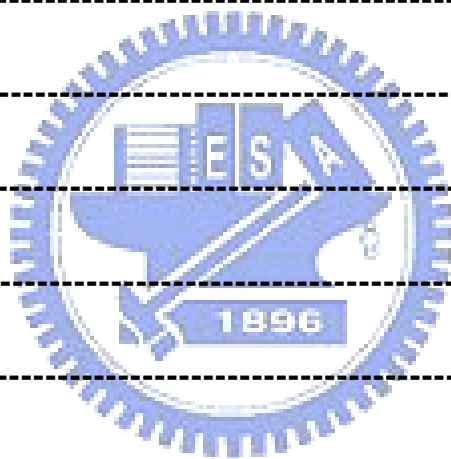


雅雯

民國 98 年 7 月 19 日筆於新竹交通大學竹銘館分子調控實驗室

# 目錄

中文摘要	i
英文摘要	iii
致謝	v
目錄	vii
圖表目錄	viii
縮寫表	1
前言	2
實驗材料及方法	8
結果	18
討論	24
參考文獻	32





## 圖表目錄

表一、本實驗所使用之菌株-----	39
表二、本實驗所使用之質體-----	40
表三、本實驗所使用之引子-----	42
圖一、不同菌種中 <i>rstA/rstB</i> 及其上下游基因分析-----	43
圖二、確認 <i>rstA</i> 及 <i>rstB</i> 基因缺損株-----	44
圖三、分析 <i>rstA</i> 或 <i>rstB</i> 基因缺損株在LB及M9培養液的生長情形-----	45
圖四、分析克雷白氏肺炎桿菌中 <i>RstA</i> 或 <i>RstB</i> 對於不同藥物濾紙錠的影響-46	
圖五、大腸桿菌中大量表現 <i>RstA</i> 對於不同藥物濾紙錠的影響-----	48
圖六、分析不同菌種中 <i>asr</i> 上下游基因以及其可能的啟動子序列-----	49
圖七、 <i>rstA</i> 或 <i>rstB</i> 基因缺損對 <i>asr</i> 啟動子活性的影響-----	51
圖八、分析 <i>rstA</i> 基因缺損對 <i>hdeD</i> 、 <i>yfdX</i> 、 <i>yfiD</i> 啟動子活性表現的影響-----	52
圖九、野生株及 <i>rstA</i> 缺損株於LPM pH 4.8、pH 4.4、pH 4.0環境下生長曲線 -----	53
圖十、 <i>rstA</i> 及 <i>rstB</i> 的基因缺損於酸逆境下的存活率分析-----	54
圖十一、 <i>asr</i> 缺損株的建構示意圖以及確認-----	55
圖十二、 <i>asr</i> 的基因缺損在酸環境下的生長曲線及酸逆境下的存活率-----	56
圖十三、重組蛋白 <i>Asr</i> 的表現純化及西方墨點法分析-----	58
圖十四、分析 <i>rstA</i> 的基因缺損對於 <i>feo</i> 啟動子活性的影響-----	60
圖十五、 <i>rstA</i> 啟動子區域序列分析-----	61
圖十六、PhoP對於 <i>rstA</i> 啟動子活性的分析-----	62
圖十七、PhoP對於 <i>rstB</i> 啟動子活性的分析-----	63

圖十八、RstA對於 <i>rstA</i> 啟動子活性的分析-----	64
圖十九、不同金屬離子對於 <i>rstA</i> 、 <i>rstB</i> 、 <i>asr</i> 啟動子活性的影響-----	65
圖二十、分析 <i>fur</i> 的基因缺損對 <i>rstB</i> 、 <i>rstA</i> 、 <i>asr</i> 啟動子活性表現的影響-----	66
附錄一、克雷白氏肺炎桿菌RstA/RstB調控示意圖-----	67
附錄二、藉由EMSA分析PhoP對於P <sub><i>rstA</i></sub> 的鍵結能力-----	68
附錄三、藉由EMSA分析RstA對於P <sub><i>rstA</i></sub> 的鍵結能力-----	69
附錄四、 <i>rscB</i> 的基因缺損在酸逆境下的存活率分析-----	70



## 縮寫表

Ap	Ampicilin
APS	Ammonium persulfate
<i>asr</i>	acid shock RNA
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	N'N'N'N'-ethylenediamineteraacetate
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactopyranoside
Km	Kanamycin
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB	Luria-Bertani broth
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride
ONPG	<i>o</i> -nitrophenyl- $\beta$ -galactopyranoside
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PVDF	Polyvinylidene fluoride
rpm	Revolution per minute
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Str	Streptomycin
Tc	Tetracycline
TEMED	N,N,N,'N'-Tetramethylethylenediamine

## 前言

克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 是一株伺機性的革蘭氏陰性病原菌，與大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 同屬腸內菌科，在臨床上容易造成院內感染，常在老人、小孩、以及免疫力較差的宿主造成嚴重的病徵，例如敗血症 (septicemia)，肺炎 (pneumonia)，尿道感染 (urinary tract infection)，和腦膜炎 (meningitis) (32)。在台灣，許多研究顯示克雷白氏肺炎桿菌造成的肝膿瘍與糖尿病人有高度的相關性 (7, 31, 47)。克雷白氏肺炎桿菌的毒力因子 (virulence factor) 包含：可以使細菌躲過吞噬細胞 (phagocytes) 攻擊而有致病能力的莢膜多醣體 (capsular polysaccharide)、會保護細菌使不被補體 (complements) 攻擊的脂多醣體 (lipopolysaccharide) (45)、能幫助細菌黏附於宿主細胞而順利入侵的黏附蛋白 (adhesin)、會螯合外界環境中的鐵來促進細菌生長及致病力、對抗生素具有抗性的螯鐵系統 (siderophores) (27, 40)；近幾年來的研究證實雙分子調控系統 (Two-component system, TCS) 也和細菌的致病有關，例如 *E. coli* 的 EvgA/EvgS (23) 及 *Salmonella* 的 PhoP/PhoQ (28)。

TCS 包含感應蛋白 (sensor) 和反應調節蛋白 (response regulator) , 其訊號傳遞主要靠組胺酸到天門冬胺酸的磷酸根傳遞 (His-to-Asp phosphorelay) 使細菌可以因應外在環境, 例如溫度、滲透壓、營養物、酸逆境等的改變, 而活化或抑制下游基因的表現。這樣的調控方式並非僅出現於細菌, 在真核生物及植物中也都有相同的系統存在。目前已知 TCS 的訊號傳遞有三種模式: 第一種稱為典型的 TCS, 主要由位於膜上的感應蛋白接受到外界訊號後, 其組胺酸激酶 (histidine kinase) 會自行磷酸化 (autophosphorylation) , 而由於此蛋白同時具有轉移磷酸酶 (phosphotransferase) 的功能, 所以感應蛋白磷酸化後會繼續將磷酸根 (phosphate group) 傳給位在細胞質的反應調節蛋白, 此蛋白分子的反應調節區域 (response regulator domain, receiver domain) 的天門冬胺酸 (aspartic acid) 在接收到磷酸根後, 改變蛋白的結構, 進而調控下游基因的表現; 第二種為多步驟的磷酸根傳遞, 主要在接受到外界訊號後, 磷酸根經由磷酸根傳遞分子 (His-containing phosphotransfer) 上的組胺酸傳到下游的反應調節蛋白上的天門冬胺酸; 第三種的 TCS 和第二種類似, 皆為多步驟的傳遞, 差別在於含組胺酸的磷酸根傳遞分子和感應蛋白是分開的, 分別位於兩個蛋白質上 (14, 26)。

本論文所研究的主角為 RstAB，其中 RstB 為感應蛋白而 RstA 則是反應調節蛋白，這套系統在分類上屬於典型的 TCS (6)。有研究顯示 PhoP/PhoQ TCS 會影響 RstA/RstB 的表現，大腸桿菌的 PhoP/PhoQ 能感應鎂離子 ( $Mg^{2+}$ ) 濃度的改變，被微量 ( $\mu M$ ) 的鎂離子活化後的 PhoP/PhoQ，會辨認帶有串聯正向重複序列 (T/G)GTTTA-nnnnn-(T/G)GTTTA 的啟動子，與此啟動子結合後調節下游基因的表現 (25)。

Minagawa 等人利用 DNA 微陣列分析，再以膠體移位實驗 (gel shift assay) 證明了 PhoP/PhoQ 會調控數個下游基因的表現，其中包含了 RstA/RstB 雙分子調控系統 (25)。而在 2003 年，利用顯型微陣列 (Phenotype Macroarray) 分析大腸桿菌的 TCS，結果顯示 RstAB 突變後的菌株對於 ketoprofen, pridinol 和 troleandomycin 等抗生素比較敏感 (51)；另一研究發現大量表現 RstA 後會使細菌對於 cefmetazole、crystal violet、fosfomycin 較有抗性 (12, 13)。

除了影響細菌對抗生素的敏感性外，Hiroshi Ogasawara 等人利用 genomic SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 分析發現：*E. coli* 的 RstA/RstB 會負向調控與 curli 生合成有關的 *csgD* 表現，卻正向調控和酸逆境有關的 *asr* 基因的表現。而在 *asr* 啟動子可以找到 RstA 辨認的序列 (TACA-nnnnnn-TACA)，經由

活性實驗推測 RstA/RstB 負責感應弱酸的環境 (29)。分析已發表的克雷白氏肺炎桿菌基因體 (MGH78578 : <http://genome.wustl.edu/> ; 342 : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) , 可以找到 *asr* 但未發現 *csgD* 相似序列。

Asr (acid shock RNA) 可轉譯一百個胺基酸, 在腸內菌科細菌中普遍存在, 可在 pH < 5.0 之下被誘導表現, 並且被發現在 M9 培養液中的表現量比在 LB 培養液中高 (39)。*E. coli* Asr 在送到膜間隙 (periplasmic space) 過程中, 會先行去掉訊號序列 (signal peptide), 到了膜間隙時, N 端部分被切割, 剩下的 C 端才真正具有抗酸的能力 (38)。一旦 *asr* 突變, 除了使細菌對酸的敏感性增加外, 也會影響 *E. coli* 在老鼠腸道的群聚 (3)。過去研究指出, 微量的鋅是生物生長所必需的, 鋅的濃度改變會影響生物生理的正常運作 (11)。而在 2005 年的一篇論文指出給予大腸桿菌 0.2 mM ZnSO<sub>4</sub>, 再利用微陣列分析去分析訊息核糖核酸 (mRNA) 的表現量, 結果顯示 *asr*, *rstA*, *rstB* 表現量皆會變高 (20)。除了 RstA/RstB 外, *E. coli asr* 的表現也受感應磷離子變化的 PhoB/PhoR 所調控 (43)。另有研究指出在生長靜止期 (stationary phase), *asr* 的轉錄與 RpoS 有關 (39)。沙門氏桿菌的 RstA/RstB 除了可調控受 RpoS 影響的三個基因表現 (*narZ*, *spvA*, and *bapA*) 外, 也影響



RpoS的降解，還可抑制生物膜的生合成 (6, 52)。

鐵是細菌生長與繁殖所必須，細菌具有螯鐵分子 (siderophore) 和運鐵系統由環境中取得微量的鐵。在克雷白氏肺炎桿菌CG43中，有三個螯合氧化態三價鐵 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) 的螯鐵分子：aerobactin，enterobactin，以及yersinabactin，生成aerobactin及enterobactin的基因組 *iucABCD* 和 *iroBCDN*位於CG43的大質體上，而生成yersinabactin的*ybt*基因組和負責二價鐵 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 運輸的基因組*feoABC*和*sitABCD*則在染色體上 (8, 9)。2008年，有報導指出沙門氏菌的RstA/RstB會活化*feoA/feoB*的表現使其產生FeoB，FeoB會將外界的二價鐵 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 運輸到細胞內與Fur結合形成Fur-Fe複合體，Fur-Fe複合體會轉而負向調控*feoA/feoB*的表現，並抑制其他運鐵系統及受Fur調控的基因表現 (17)。

分析比較大腸桿菌、沙門氏菌，以及克雷白氏肺炎桿菌RstA/RstB相鄰的基因組成 (如圖一所示)，大腸桿菌的*rstA*與*rstB*為相鄰，而沙門氏菌的*rstA*與*rstB*中間則有三個開讀框架 (Open reading frame)：*stm1474*、*ompN*、*stm1472*；而克雷白氏肺炎桿菌則在*rstA*與*rstB*中間有一可被轉譯的假設性蛋白 (hypothetical protein)。比較不同來源之大腸桿菌、沙門氏菌，以及克雷白氏肺炎桿菌胺基酸序列得知RstA有91.0%相似度，RstB則有96.5%相似度。但不同的基因構造暗示著克雷白氏



肺炎桿菌 RstA/RstB 可能有不一樣的調控。因此本實驗目的即在探討 RstA/RstB 在克雷白氏肺炎桿菌中所扮演的角色：（一）RstA/RstB 的功能性分析，在建構突變株後，觀察 RstA/RstB 是否會影響細菌對酸的耐受性，是否影響 *asr*、*feoAB* 和其他相關基因的表現；（二）將以啟動子活性報告系統分析 RstA/RstB 的表現，是否受 PhoP/PhoQ 所調控，並探討是否會受鎂離子或其他離子及抗生素所影響，以及是否受 Fur 所影響。



## 實驗材料及方法

### 菌種與質體

本實驗所使用的菌種及質體列於表一及表二。克雷白氏肺炎桿菌 CG43 為 K2 血清型的伺機性病源菌，LD<sub>50</sub> 為 10 c.f.u. (22)。製備質體的過程，包括限制酶作用、連接作用 (ligation)、轉形作用 (transformation)，按照 Molecular cloning 實驗手冊描述的方法操作 (35)。抽取大腸桿菌質體依據 Protech miniprep kit (波士特，台北，台灣) 說明書操作。

### 實驗試劑藥品和材料來源

LB (Luria-Bertani) 培養基及培養液中的 tryptone 及 yeast extract 購自生工，而限制酶購自 Promega、Biolab 或 MBI，Tag 聚合酶購自生工，其他藥品則購自 Sigma 或 Merck。

### 培養基及培養液的配法

LB 培養液：取 25 克 LB 粉末 (內含 Bacto-tryptone 10 克，Bacto-yeast extract 5 克，NaCl 10 克) 先加水 800 毫升，調 pH 值至 7.0，最後加水至 1 升，滅菌後使用。LB 培養基：每 500 毫升加入 7.5 克的洋菜粉及 12.5 克 LB 粉末，滅菌後，待溫度降至 60°C 時，依所需加入抗生素，混合後，倒入培養皿中，凝固後使用。M9 培養基：15 克的洋菜粉加入二次水使成 800 毫升和 200 毫升的 5X M9，經滅菌，待溫度降至 60°C 時，將其混合 2 毫升的 1 M MgSO<sub>4</sub>、20 毫升的

20%葡萄糖和100微毫升的1 M  $\text{CaCl}_2$ ，再加入所需的抗生素，倒入培養皿中凝固後使用。LPM培養液：一升的水中含50 mM Tris base，20 mM KCl，7.5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，6.5  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ ，0.6% Bacto peptone待滅菌後，再分別加入9.6微毫升的1 M  $\text{MgCl}_2$ ，12.8微毫升的1 M  $\text{CaCl}_2$ ，及0.4毫升的20% glucose後使用。

### 勝任細胞（competent cell）的製作

將菌畫於LB培養基上，隔夜培養於37°C培養箱，挑單一菌落接種於50毫升的LB培養液震動培養隔夜後，將此菌液加入500毫升的LB中於37°C培養至 $\text{OD}_{600} = 0.4$ ，將500毫升的菌液分裝於三個250毫升滅過菌的離心瓶中冰浴20分鐘，在4°C以13,000  $\times g$ 離心20分鐘，倒掉上清液，各以150毫升滅過菌冰的二次水將菌塊重新懸浮，並將三瓶合於兩瓶，於4°C再以13,000  $\times g$ 離心20分鐘後倒掉上清液，用100毫升滅過菌冰的10%甘油將菌塊重新懸浮，再一次離心倒掉上清液，用10%無菌冰甘油（glycerol）洗沉澱物後將兩瓶合成一瓶再離心，倒乾水分，最後以1毫升的GYT培養液（10%甘油，0.125% yeast extract，0.25% tryptone）將沉澱物懸浮以每40微毫升分裝於1.5毫升離心管中。這些勝任細胞可以直接使用或者保存於攝氏零下80°C。

### 染色體DNA製備

取1毫升隔夜培養的菌液，離心之後用0.8毫升的lysis溶液（200 mM

NaCl, 20 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl, 0.2% Triton X-100, 5 mM DTT, 80  $\mu$ g lysozyme) 溶解於37°C放置30分鐘後加入4微毫升蛋白酶K (20 毫克/毫升), 在50°C水浴作用2小時, 接著置於冰上10分鐘, 再加入250微毫升的飽和食鹽水, 搖晃之後, 以16,000  $\times$ g離心10分鐘, 分別取500微毫升的上清液到兩個1.5毫升的離心管中, 並各加入1,000微毫升絕對的冰酒精, 搖晃之後以16,000  $\times$ g離心10分鐘, 最後倒掉上清液, 用冰的75%酒精清洗兩次, 烘乾並以50微毫升二次水溶解之後保存於-20°C。

### 轉型作用 (電穿孔法)

將勝任細胞從-80°C冰箱中拿出來退冰, 取要轉殖的質體1微毫升到勝任細胞中, 混合並移至電菌管中, 以2.5 V電極 (BIO-RAD#165-2098) 5秒鐘後用1毫升的LB清洗電極管, 將此細胞與質體混合液在37°C培養60分鐘, 塗盤於含抗生素的篩選性培養基上, 於37°C培養箱中培養。隔天挑選平板上之單一菌落接種於篩選性培養液, 經培養後抽取質體DNA, 以瓊脂膠電泳 (agrose gel electrophoresis) 來確定轉型成功與否。

### 建構突變株與互補株

#### 建構含*asr*或*rstB*基因缺損的質體

DNA引子的設計見於表三, 由生工公司代為合成。先以 (*asr*: YWp09、YWp10) (*rstB*: YWp18、YWp19) PCR分別將基因及其前後2 kb

的序列接入pyT&A，再以（*asr*：YWp11、YWp12）（*rstB*：YWp20、YWp21）PCR分別增幅去掉*asr*（約300 bp）和*rstB*（約1300 bp），留下前後兩段各約1 kb的核酸片段，再將此兩片段結合，接入質體pKAS46，送入大腸桿菌S17-1 $\lambda$ *pir*中。

### 接合作用與挑選突變株

將帶有建構好質體的大腸桿菌S17-1 $\lambda$ *pir*做隔夜培養，同時亦將克雷白氏肺炎桿菌CG43S3隔夜培養，分別取1毫升的隔夜培養液於1毫升的新鮮LB中於37°C培養30分鐘，再分別取1毫升於無菌的1.5毫升離心管中，以適當的轉速將菌體離心下來，使用無菌0.85% NaCl重新懸浮細胞，重複至少兩次，將500微毫升已洗淨的克雷白氏肺炎桿菌混合於1毫升的S17-1 $\lambda$ *pir*中，再離心去除上清液，用100微毫升0.85% NaCl重新懸浮，再把這100微毫升懸浮小心滴在滅菌過的纖維膜上（事先先將滅過菌的消化纖維膜置於培養基中），培養基正放於37°C培養箱中12~16小時，用滅過菌的夾子輕輕將纖維膜捏起放入新鮮LB中，震盪讓菌體離下來，吸取100微毫升，系列稀釋後（1x，1/10x），塗於M9培養基中（Km25微毫克/毫升、Ap100微毫克/毫升、0.2% glucose）。隨機選取5顆單一菌落，分別培養於4毫升的LB中後（37°C，12~16小時），吸取1毫升的菌液抽取菌體染色體DNA，另外的3毫升菌液暫時存放於4°C中。設計一組引子，用PCR檢查，任選一株質體有成功進入菌體

DNA的克雷白氏菌，吸取100微毫升隔夜的菌液種於於4毫升LB（含有Str 500微毫克/毫升）中置於37°C培養8小時，吸取100微毫升的菌液，系列稀釋後（1x，1/100x，1/10,000x），塗在LB培養基（含Str500），用牙籤隨機挑選至少50菌落，分別種在含Str500微毫克/毫升的LB培養基與含Ap100微毫克/毫升Km25微毫克/毫升培養基上，挑選對streptomycin有抗性但對kanamycin沒有抗性的菌落，抽取染色體DNA後，進行PCR檢查，找尋只含有突變片段的菌落即為突變株。

### 建構互補株

以YWp09、YWp10 PCR增幅出包含*asr*及其啟動子區域的片段接入pRK415質體中，再轉型至大腸桿菌S17-1 $\lambda$ pir，利用接合作用送入突變株中。



### **生長曲線測試**

取隔夜培養的菌液 200 微毫升加至新鮮的 4 毫升 M9、LB 或 LPM 中，每隔一段時間測 OD<sub>600</sub> 的吸光值直到生長趨於靜止生長期。

### **IPTG誘導RstA或Asr蛋白質的表現**

取200微毫升隔夜培養的菌液，加入4毫升新鮮LB或LPM培養液，在37°C培養2小時後，將IPTG 加入培養液中至濃度為0.5 mM，經37°C培養6小時後，以2,800 xg離心10分鐘取得菌體，進一步以SDS-PAGE分析並作為蛋白質

純化的來源。

### 抗生素抗性試驗

隔夜培養的菌液取200微毫升至新鮮4毫升LB中，於37°C培養箱中培養2~3小時後，加入IPTG至0.5 mM作用3小時後，同時進行SDS-PAGE分析蛋白質的表現，並且將菌液三重複用棉花棒塗抹於LB盤，待10~20分，將含抗生素的濾紙錠放於盤中央，放入37°C培養箱中培養12~16小時後觀察抑菌圈大小。

### 啟動子活性試驗

抽取pLacZ15的質體並將目標基因（*asr*：YWp01、YWp02；*rstB*：YWp27、YWp28）啟動子區域用PCR增幅出來之後切酵素，再與pLacZ15接合在一起，接著利用轉型作用送入大腸桿菌S17-1 $\lambda$ pir。取隔夜培養的菌液200微毫升至新鮮的4毫升M9、LB或LPM中，置於37°C培養箱至OD<sub>600</sub> = 0.7，取1毫升菌液於1.5毫升的離心管中，用Z buffer（取16.1克 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、4.78克NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.75克KCl、0.246克MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O配製成一升且pH為7.0，滅菌完後使用前加入2.7毫升2-mercaptoentanol）洗兩次菌塊並將細菌刮破後，加入1毫升的Z buffer使之懸浮，取100微毫升至試管中（已加入35微毫升chloroform，17微毫升0.1% SDS，900微毫升Z buffer）使混合均勻，將試管放入37°C，10分鐘後，加入4毫克/毫升ONPG溶液（加入102.5毫升0.2 M



$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、22.5 毫升 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、一克 ONPG，補水至 250 毫升) 200 微毫升使之反應開始，待達作用完成之時間點加入 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  500 微毫升使之停止反應。測量  $\text{OD}_{420}$  之吸光值並記錄之 (24)。

### 酸逆境下菌存活試驗

將隔夜培養的菌液取 200 微毫升至新鮮 pH 7.0 LPM 培養液中，至  $\text{OD}_{600}=0.6$  塗盤，並分兩部分；第一部分，直接給予酸逆境，pH 3.0 作用兩小時後塗盤，隔夜計數菌落數除以初始反應菌數為存活率；第二部分，先在弱酸 pH 4.6 適應 2 小時後，再給予酸逆境 pH 3.0 作用兩小時，再塗盤，隔夜培養將酸逆境後塗盤菌數除以初始反應菌數為存活率 (38)。

### 十二酯硫酸鈉- 聚丙烯醯氨膠體電泳 (SDS-PAGE)

首先先將玻璃擦拭乾淨架好之後，迅速倒入 Running gel (12.5%) : deionized water 3.7 毫升；Running buffer 1 毫升 (3 M Tris-HCl, pH 8.0) ; 10% SDS 80 微毫升；40% (w/v) acrylamide solution (acrylamide : bis-acrylamide = 37.5 : 1) 3 毫升；TEMED 9 微毫升，10% APS 100 微毫升) 至適當高度，以酒精輕輕加至電泳膠上方，等待電泳膠凝固後，倒掉上層水並以紙吸乾，再加入 stacking gel (Deionized Water 1.9 毫升；Stacking buffer (1.0 M Tris-HCl pH 6.8) ，83 毫升；10% SDS 33 微毫升；40% (w/v) acrylamide solution (acrylamide : bis-acrylamide = 37.5 : 1) 0.4 毫升；TEMED，5 微毫升；10%



APS，60微毫升) 至溢出，隨即插入樣品梳，凝固之後移去樣品梳，並置於電泳槽內，倒入 running buffer (35 mM Tris-base，250 mM glycine，0.1% SDS) 待用，將欲分析的蛋白質加入2X loading dye [ 2X SDS gel-loading buffer：100 mM Tris-HCl pH 6.8；4% SDS；20% glycerol；0.2% bromophenol blue (3',3'',5',5''-tetrabromophenol Sulfonphthalein)；200 mM dithio-threitol ]，並於100°C 加熱十分鐘後加至電泳膠well中，以100伏特數電泳分析15分鐘後，再以90伏特電泳2小時，最後由玻璃夾層中取出電泳膠。將經電泳後的SDS-PAGE切掉stacking-gel後，浸於staining buffer (0.25克Coomassie Brilliant Blue R250；45毫升deionized water；45毫升methanol；10毫升glacial acetic acid) 室溫搖晃30分鐘，再浸於Destain buffer (30% methanol；10% acetic acid) 中退染至可清楚的看見蛋白質為止。

### **Gst • tag 親和性管柱純化Asr蛋白質**

以GST • tag親和性管柱純化蛋白質，將200毫升菌液離心後的菌體加入10毫升 1X loading buffer 混勻 (10X Extraction/Loading Buffer：1.4 mM NaCl；100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>；18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，pH 7.5)，使用超音波震碎菌體後離心4°C 13,000 xg (微量離心機) 20分鐘，上清液內即含有所要的蛋白質。先將4毫升離子水通入GST • tag管柱 (重複三次)，再加入4毫升loading buffer至管柱使之平衡 (重複三次)，再將菌體離心後的上清液通入

GST·tag管柱，蓋住上下蓋直立插於冰上20分鐘。接著拿掉上下蓋，通入4毫升1X extraction buffer至管柱5次（前4次使用extraction buffer，第5次使用4毫升的10毫克reduced glutathione/10毫升elution buffer），再通入6毫升的elution buffer（elution buffer：50 mM Tris-Base，pH 8.0，要使用前取出10毫升外加100毫克reduced glutathione）至管柱，以微量離心管收集溶離液。最後再以Regeneration buffers清洗GST·tag管柱；40毫升Buffer 1（0.1 M Tris-HCl，0.5 M NaCl，pH 8.5），接著以40毫升Buffer 2（0.1 M Sodium acetate，0.5 M NaCl，pH 4.5），再以20毫升Buffer 3（140 mM NaCl，10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，pH 7.5），最後將管柱內溶液置換成20%乙醇，上下蓋外包覆paraffin，保存於4°C冰箱。接著以SDS-PAGE分析收集到的蛋白質的純度(1, 36, 44)。

### 西方轉印免疫法

將蛋白質經由SDS-PAGE分離，以轉印緩衝液（39 mM glycine，48 mM Tris base，0.037%SDS）轉印到纖維膜上，然後將纖維膜（PVDF）浸泡於含有5% skim milk的PBS中，置於4°C搖晃兩小時，用PBST沖洗二次、PBS沖洗一次，再加入稀釋1000倍的anti-GST，用PBST沖洗二次、PBS沖洗一次，加入稀釋5000倍的anti-mouse AP，在室溫搖晃30分鐘，以PBST沖洗二次、PBS沖洗一次後，纖維膜浸入加有NBT和BCIP的冰鹼性磷酸緩衝液（100 mM

NaCl , 5 mM MgCl<sub>2</sub> , 100 mM Tris-HCl pH 9.5) 中進行呈色。



## 結果

### *rstA* 或 *rstB* 的基因缺損不影響細菌的生長

如圖一所示，克雷白氏肺炎桿菌 *rstA/rstB* 上下游基因組成的不同，可能暗示著其有不同的功能，所以在這裡我們分別建構 *rstA* 或 *rstB* 缺損株。建構的方法為將基因缺損的片段建構於質體後，利用同源互換的方式與野生株做交換，再以電泳分別確認 *rstA* (圖二 A) 及 *rstB* 缺損株 (圖二 B)。在此挑選出的 *rstA* 及 *rstB* 缺損株於外觀上和野生株無區別，為了解基因缺損是否對菌株的生長有所影響，我們分別測試菌株於營養充分的 LB 培養液以及僅供應最低營養生長需求的 M9 培養液中，觀察缺損株在生長上是否會受影響，由實驗的結果顯示 *rstA* 或 *rstB* 缺損株在此兩種培養液中生長情形和野生株相比無差異 (圖三)。

### 大量表現 RstA 使大腸桿菌對 cefotaxime 抗性稍為變大

我們以實驗室現有不同藥物濾紙錠，分析 RstA 是否與抗藥性有關，圖四 A 顯示不論野生株、*rstA* 缺損株、*rstA* 互補株，都對這些抗生素的感受性無明顯差異。另一方面，*rstB* 基因缺損也不影響其對抗生素的感受性 (圖四 B)。而 cefotaxime 在大量表現 RstA 於大腸桿菌，相較於僅含 N 端 RstA 片段的菌株感受性較大 (45.2 mm vs. 36.6 mm)，其他藥物則沒有明顯的差異 (圖五)。

## **RstA 和 RstB 會參予 *asr* 啟動子的活性表現**

Ogasawara 等人發現：在大腸桿菌裡，RstA 能調控和抗酸有關 *asr* 基因的表現。如圖六 A 所示，克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中也含有 *asr* 基因，並於其啟動子區域有比對到 RstA 鍵結辨認序列（圖六 B）。因此我們將 *asr* 可能的啟動子區域建構於 pLacZ15（圖七 A），藉由偵測 LacZ 活性的表現來看 *asr* 啟動子是否會受到 RstA 所調控。由圖七 B 顯示，在 pH 7.0 LPM 中，不論是野生株或 *rstA* 缺損株，*asr* 啟動子活性表現量都很低。然而相對的，在 pH 4.6 LPM 中，野生株裡 *asr* 啟動子活性表現量高達 5000 miller units，而在 *rstA* 缺損株裡，*asr* 啟動子活性表現量僅 250 miller units。由於 *rstA* 基因缺損後，*asr* 啟動子活性明顯減少，我們進一步想了解 *rstB* 基因的缺損是否也會影響 *asr* 啟動子的活性表現。因此偵測 *rstB* 基因缺損下，*asr* 啟動子的活性表現，由圖七 C 結果顯示，不論 *rstA* 或 *rstB* 基因的缺損，都會明顯降低 *asr* 啟動子的活性表現。

## ***rstA* 的基因缺損不影響 *hdeD*、*yfdX*、*yfiD* 啟動子的活性表現**

由於 RstA 表現與否顯著影響 *asr* 啟動子活性，因此我們想了解是否還有其他和抗酸相關的基因也會受到 RstA 所調控。在此選擇實驗室研究和抗酸相關的三個基因：*hdeD*、*yfdX*、*yfiD*，分別測試其啟動子的活性表現。結果

顯示，這三個基因之啟動子活性在野生株及 *rstA* 缺損株中無明顯差異（圖八）。

### *rstA* 的基因缺損不影響細菌在酸環境下指數生長期的生長曲線以及酸逆境下的存活率

為了更進一步確認 RstA/RstB 在克雷白氏肺炎桿菌裡是否扮演抗酸作用的角色，在此藉由測試在酸環境下的生長曲線以及酸逆境下的存活率分析。在分析酸環境下的生長曲線，如圖九所示，*rstA* 缺損株於指數生長期在不同酸 pH 值環境下的生長趨勢和野生株相比無明顯的差異，然而於靜止生長期，*rstA* 缺損株的生長情形相較於野生株則較緩慢。在酸逆境比較方面，*rstA* 缺損株、*rstB* 缺損株或野生株的菌存活比例，也無明顯差異（圖十 A、B）。

### *asr* 的基因缺損對於細菌在酸環境下的生長曲線及酸逆境下的存活率影響不大

在酸環境下，*rstA/rstB* 存在與否會顯著影響 *asr* 啟動子的活性表現，然而並不影響細菌在酸性環境下指數生長期的生長曲線及酸逆境下的存活率。因此，推測真正參予抗酸作用機制得藉由 *asr* 的表現。在此，我們利用同源互換的方式建構 *asr* 缺損株（圖十一 A），並且以 DNA 電泳確認 *asr* 缺損株（圖十一 B）。接著分析 *asr* 缺損株在酸環境下的生長情形，如圖十二 A 所

示，*asr* 基因缺損會使其生長略慢於野生株。在酸逆境菌的存活率分析，如圖十二 B 所示，其存活率與野生株的存活率相比僅相差百分之十（67.3% → 57.4%）。另一方面，野生株、*asr* 缺損株、*asr* 互補株在酸逆境的存活率分析也無明顯差異（圖十二 C）。

### 克雷白氏肺炎桿菌 Asr 蛋白於細胞質內會被切割

為了解 Asr 參予抗酸的機制，我們利用大腸桿菌表現系統大量表現 Asr 重組蛋白（圖十三 A），接著以 GST 管柱純化，並以 SDS-PAGE（圖十三 B）及利用西方墨點法分析（圖十三 C）。結果顯示，純化後的重組 Asr 蛋白呈現兩種片段的大小，大片段為完整的 Asr 重組蛋白，而小片段為 GST 接上 Asr 之 N 端部分的重組蛋白，由此，克雷白氏肺炎桿菌 Asr 的作用方式和大腸桿菌 Asr 的作用方式可能相同，即 Asr 須經切割後才具有功能性。

### *rstA* 的基因缺損不會影響 *feo* 啟動子的活性表現

在沙門氏菌，RstA/RstB 會活化 *feoAB* 的表現，為了解克雷白氏肺炎桿菌 RstA/RstB 是否也會調控 *feoAB* 的表現，我們對 *feo* 啟動子進行活性分析，如圖十四 A 所示，野生株與 *rstA* 缺損株在無含鐵離子、含 40  $\mu$ M 鐵離子，或加入 0.2 mM 螯鐵劑於 M9 培養液中，對於 *feo* 啟動子活性表現並沒有明顯的差異（圖十四 A）。在此，為了在 *rstA* 缺損株中大量表現 RstA 並偵測 *feo* 啟動子的活性表現，因而需要於培養液中同時加入 chloramphenicol（35



µg/ml) 及 tetracycline (10 µg/ml) 兩種抗生素以維持兩種質體的存在，因此造成細菌生長明顯變慢，活性分析也下降，無法觀測 *feo* 啟動子的活性表現是否有差異 (圖十四 B)。

### PhoP 於低鎂離子濃度會影響 *rstA*、*rstB* 啟動子的活性表現

如圖十五所示，在克雷白氏肺炎桿菌 *rstA* 的啟動子區域有 PhoP 及 RstA 的鍵結辨認序列。為了解在克雷白氏肺炎桿菌中，能感應鎂離子的 PhoP/PhoQ 調控系統是否會活化 *rstA/rstB*，在此我們比較在野生株與 *phoP* 缺損株中 *rstA* 及 *rstB* 啟動子的活性表現。由啟動子活性分析結果：*rstA* 啟動子於低鎂離子濃度活性表現量較高，其表現量在 *phoP* 基因缺損或高鎂離子濃度下則相對較低 (圖十六)。另外，由實驗室 EMSA 分析結果，也顯示 PhoP 會專一性的鍵結於 *rstA* 啟動子區域 (附錄二)。由於 *phoP* 的基因缺損會降低 *rstA* 啟動子活性，是否 *phoP* 的基因缺損對 *rstB* 啟動子活性也有影響，在此，我們測試 *rstB* 啟動子活性表現，*rstB* 啟動子活性在高或低鎂離子濃度表現差異不大 (圖十七)；同於 *rstA* 啟動子活性測試結果，*phoP* 的基因缺損會降低 *rstB* 啟動子的活性表現，在此證明 PhoP 會影響 *rstB* 啟動子的活性表現。除了 PhoP 鍵結辨認序列，*rstA* 啟動子區域也有比對到 RstA 鍵結辨認序列 (圖十五)，是否 *rstA* 的表現除了受到 PhoP 影響外，也會受到 RstA 自我調控，在此經由啟動子活性分析結果：*rstA* 啟動子活性於野生株中



表現量高，而於 *rstA* 缺損株中則活性下降，由此，RstA 也會去影響 *rstA* 啟動子的活性表現（圖十八）。另外，實驗室 EMSA 結果也顯示，RstA 會鍵結於 *rstA* 啟動子區域（附錄三）。

### 銅離子會影響 *rstA*、*rstB*、*asr* 啟動子的活性表現

克雷白氏肺炎桿菌中 RstA/RstB 調控系統所感應的訊息還未被報導，由前面實驗結果也顯示：RstA/RstB 會受到感應鎂離子濃度的 PhoP/PhoQ 所調控，而 *asr* 啟動子活性表現會顯著受到 RstA/RstB 所影響。在此，我們分析不同金屬離子對 *rstA*、*rstB*、*asr* 啟動子活性表現的影響。實驗結果顯示外加銅離子對 *rstA* 啟動子活性表現影響不大（圖十九 A），然而會明顯降低 *rstB* 及 *asr* 啟動子的活性表現（圖十九 B、C）。

### *fur* 的基因缺損會影響 *rstA*、*rstB*、*asr* 啟動子的活性表現

Fur 是細菌體內重要的調控因子（global regulator），可調控多種基因表現，其鍵結辨認序列已被確認 (2)。我們以此特定鍵結序列分析克雷白氏肺炎桿菌基因體序列時，在 *rstB* 啟動子區域找到一處可能為 Fur 鍵結辨認的序列（圖二十 A）；在進一步的實驗顯示：*fur* 的基因缺損對 *rstA* 及 *rstB* 啟動子的活性表現影響不大，然而卻會明顯降低 *asr* 啟動子的活性表現（圖二十 B）。

## 討論

雙分子調控系統是細菌體內傳遞訊號很重要的工具，已知有許多和細菌的致病性有關，單一菌體內往往擁有多套系統，使細菌因應不同環境以利存活 (34)。目前，許多套雙分子系統的功能已被鑑定，然而 RstA/RstB 的研究直到近兩年才有報告。大腸桿菌的 RstA/RstB 會受感應鎂離子濃度的 PhoP/PhoQ 所調控，並可活化和抗酸有關的 *asr* 表現 (29)；而沙門氏菌的 RstA/RstB 可活化和螯鐵有關之 *feoA/feoB* 的表現，使生成的 FeoB 可將體外傳輸進細菌體內的二價鐵和 Fur 形成 Fur-Fe 複合體，此複合體進而去抑制 *feoA/feoB*、運鐵系統以及其他受 Fur 調控的基因表現 (17)。

由於克雷白氏肺炎桿菌中 *rstA/rstB* 及其前後基因組成和大腸桿菌及沙門氏菌不同，因而推測其在功能表現上會有所不同，因此，本論文想探討 RstA/RstB 在克雷白氏肺炎桿菌裡所扮演的功能及角色。首先，在此建構的 *rstA* 及 *rstB* 缺損株於外觀上和野生株無明顯差異，而培養於富含養分的 LB 培養液或僅提供最低營養生長需求的 M9 培養液中，其生長情形和野生株相比也無明顯的差異，因此 *rstA* 或 *rstB* 的基因缺損並不影響細菌的生長。

另外，為了解 RstA/RstB 是否會影響其對抗生素的感受性，我們分別於克雷白氏肺炎桿菌中轉殖帶有表現 RstA 的質體、在大腸桿菌中大量表現

RstA，以及在 *rstB* 缺損株比較不同抗生素的影響，實驗結果顯示於大腸桿菌中大量表現 RstA 會對抑制細胞壁合成的 cefotaxime 較敏感，其抑菌圈接近顯著差異值，因此要探討是否 RstA 會影響細菌對於 cefotaxime 的感受性，還需要進一步的驗證 (37, 42, 49)。

大腸桿菌的 RstA/RstB 已被證實會調控和酸逆境有關的 *asr* 基因表現，然而在基因結構的比對上，大腸桿菌及克雷白氏肺炎桿菌 *asr* 前後的基因組成不太一樣，在此我們推測不同菌種中 *asr* 在調控反應上可能有所不同。在克雷白氏肺炎桿菌 *asr* 啟動子區域有 RstA 鍵結保留序列很相近的片段，推測克雷白氏肺炎桿菌的 RstA 可能會影響 *asr* 啟動子的活性表現。在此，分析 *asr* 啟動子的活性表現結果顯示，在 pH 4.6 LPM 培養液中，*rstA* 的基因缺損會顯著的影響 *asr* 啟動子的活性表現，而這樣的影響在 *rstB* 缺損時也觀測得到。由以上的結果推測其調控路徑為磷酸化後的 RstB 將磷酸根傳遞給 RstA，接受到磷酸根的 RstA 會進一步調控 *asr* 的表現 (RstB-RstA-Asr)。

在分析比對其他套雙分子調控系統的反應調節蛋白胺基酸序列，可以發現雖然反應調節區域有多個相同的天門冬胺酸，然而，經由比對多數磷酸化位置為於 D52，由此，我們推測 RstB 在接受到訊號刺激而磷酸化時，會將磷酸根傳遞給 RstA<sub>D52</sub>，接著再影響 *asr* 的表現 (46, 48)。

RstA/RstB 對於 *asr* 啟動子活性影響很大，因此推測 RstA/RstB 可能和抗酸的調控作用有關，然而 *rstA* 或 *rstB* 的基因缺損並不影響細菌在酸逆境中的存活率分析，對酸環境下的生長曲線也無顯著差異，因此 RstA/RstB 於克雷白氏肺炎桿菌裡並非直接和抗酸的作用有關，推測其真正行使抗酸功能還是得經由 Asr。此外，在大腸桿菌的研究中，他們發現 *asr* 缺損株在 pH 4.5 LPM 中的生長情況和野生株相比有明顯的差異，而在酸逆境中，*asr* 缺損株的存活率和野生株相比有高達二十倍的差異（40% → 2%）(38)。然而克雷白氏肺炎桿菌，*asr* 缺損株和野生株在酸環境下的生長曲線以及酸逆境下的存活率並沒有像大腸桿菌差異很明顯，在此推測可能是實驗所使用的條件下，Asr 並不是主要參予抗酸作用的蛋白。另外，由於細菌在接觸到酸時，會有多種和酸相關的基因被同時誘導表現，所以儘管 *asr* 基因缺損，其他受酸誘導的基因仍會被誘發表現而協助細菌在酸環境下可以存活下來 (39)。在此，由 Asr 表現純化及西方墨點法分析，我們發現重組蛋白 Asr 也會有被切割的情形，因此會純化出兩個大小的片段，這樣的情形如同大腸桿菌裡的 Asr，由此，我們推測 Asr 於大腸桿菌及克雷白氏肺炎桿菌的作用機制相似。由於 Asr 在大腸桿菌中被指出其於膜間隙會行使抗酸的作用，有推測指出其具有類似 HdeA 保護蛋白（chaperone）的功能，可以保護細菌在酸性環境下得以存活，也有推測指出 Asr 因為含有較多鹼性胺基酸，而使細菌在酸性環

境下可以減低傷害 (38)。在過去的研究中指出，酸性環境下，外界的氫離子會進入細胞內，當細胞內的 pH 值下降，細菌為了維持胞內離子的恆定，會將過多的氫離子中和或送出菌體外，其中，胞內鹼性胺基酸 (Arg, His, Lys) 的羧基於環境中 pH 值小於其 pKa 值時，羧基會與一個氫離子鍵結再輸送到胞外以維持胞內 pH 值的恆定 (33)。分析克雷白氏肺炎桿菌 Asr，推測可行使抗酸功能的 C 端部分經由序列比對，含有鹼性胺基酸的比例為 16/43。

由於我們分析酸逆境存活率以及酸環境下的生長曲線差異性都不明顯，在此，藉由分析比較大腸桿菌及克雷白氏肺炎桿菌，我們發現其最大不同之處在於克雷白氏肺炎桿菌擁有較多的莢膜多醣體，或許包覆較多的莢膜多醣體可以使細菌在酸環境下擁有較多的保護而得以存活，因此，要觀察酸性環境下對克雷白氏肺炎桿菌特定基因是否有影響，或許可以於莢膜多醣體生成量低的情況下進行分析。克雷白氏肺炎桿菌 *rcsB* 在實驗室的研究中發現其基因缺損後，莢膜多醣體會明顯減少，並且在 M9 培養液中其酸逆境存活率和野生株相比有顯著差異，在此，分析我們所使用的條件之下，*rcsB* 缺損株對於酸逆境的存活率，實驗結果顯示沒有明顯差異，推測或許是 *rcsB* 缺損株仍擁有少許的莢膜多醣體得以保護細菌，也或許是在本實驗所使用的條件無法觀測到差異值 (附錄四)。

由於 RstA 會明顯影響 *asr* 啟動子的活性表現，因此我們推測 RstA/RstB 可能也會調控其他和抗酸作用有關的基因表現，在此分析實驗室研究和抗酸作用相關的基因：*hdeD*、*yfdX*、*yfiD*。HdeD 是一個和抗酸有關的膜間隙蛋白，且經由微陣列分析，在 *gadX* 大量表現於 pH 5.5 M9 培養液中，*hdeD* 可以被誘發表現 (15, 30)；而 *yfdX* 在大腸桿菌中座落於 *evgA/evgS* 附近，因而被推測與酸有關 (16, 21)；有關於 YfiD 則是在大腸桿菌被報導與抗酸的作用有關，其啟動子活性在有氧及菌生長靜止期時有較高的表現，而在克雷白氏肺炎桿菌，*yfiD* 被實驗室證明在微氧弱酸環境下表現量較高 (46, 50)。然而由實驗結果顯示，克雷白氏肺炎桿菌的 RstA 並不會影響 *hdeD*、*yfdX*、*yfiD* 啟動子的活性表現。

在沙門氏菌有報導指出 RstA/RstB 會調控和螯鐵有關的 *feoA/feoB* 表現，然而在我們以啟動子活性分析的結果上並沒有得到相同結果；而在沙門氏菌的研究是在大量表現 RstA 的情況下才看的出差異，因此，我們也在克雷白氏肺炎桿菌中大量表現 RstA，並偵測 *feo* 啟動子的活性表現，然而在此同時加入兩種抗生素以維持兩種質體存在於細菌體內的情況下，即使我們將抗生素濃度各減半，甚至嘗試將 Tetracycline 的濃度降為 5 微毫克/毫升，細菌的生長狀況仍舊較慢，並且偵測到的活性表現量也相對較低，因此要探討在克



雷白氏肺炎桿菌裡，RstA/RstB 是否會調控 *feoA/feoB*，可能需要藉由其他實驗，例如 real-time PCR 來驗證。

在大腸桿菌中已知會感受低鎂離子濃度的 PhoP/PhoQ 會影響 *rstA/rstB* 的表現，因此我們想了解克雷白氏肺炎桿菌中的 PhoP/PhoQ 是否也會調控 RstA/RstB 的表現。首先在序列的分析上，*rstA* 啟動子區域有 PhoP 及 RstA 鍵結辨認序列，並且經由實驗室 EMSA 結果可進一步確定 PhoP 的確會鍵結於 *rstA* 啟動子區域。在啟動子活性分析方面，*rstA* 啟動子活性於低鎂離子濃度下表現量較高，而在高鎂離子濃度以及 *phoP* 基因缺損下則活性相對較低。由於 PhoP/PhoQ 會去調控 *rstA* 啟動子的活性表現，在此我們也想了解 PhoP/PhoQ 是否也會去調控 *rstB* 的表現，由實驗結果顯示 *rstB* 啟動子活性在高或低鎂離子環境下，啟動子活性表現結果差異不大，然而 *phoP* 基因的缺損，則會降低 *rstB* 啟動子的活性表現，因此我們推測 *rstB* 也會受 PhoP/PhoQ 所調控。經序列分析，*rstA* 啟動子區域也有 RstA 鍵結保留序列，因此我們推測 RstA 會有自我調控的機制，在此，實驗室 EMSA 的結果顯示 RstA 會鍵結於其啟動子區域，並且在啟動子活性分析結果也顯示 *rstA* 啟動子活性於低鎂離子濃度下表現量較高，而將 *rstA* 基因缺損則會使活性下降，由此可以證實 RstA 會自我調控表現。此外，儘管 *rstA* 缺損，*rstA* 啟動子的活性表現仍有 59 miller units，推測為受上游 PhoP/PhoQ 所影響。

另外，已知 RstA/RstB 會受到感應鎂離子變化的 PhoP/PhoQ 所調控，然而對於 RstA/RstB 這套系統是否會感應特定金屬離子仍未知，也因為 *asr* 目前僅了解其和抗酸有關以及知道它可以受到感應磷離子濃度的 PhoB/PhoR 所影響，所以在此想進一步了解不同離子對於 *rstA*、*rstB*、*asr* 啟動子活性表現的影響。在此結果顯示銅離子的作用會降低 *asr*、*rstB*、*rstA* 啟動子的活性表現，因此推測 *rstB* 在感應到銅離子後可能會經由 RstA 影響 *asr* 的表現。而由於銅離子會參予細胞內酵素的反應，因此推測銅離子也會直接影響 Asr 的酵素活性表現 (52)。有報導指出經由微陣列實驗分析，0.2 mM 的鋅可以誘導 *rstA*、*rstB* 及 *asr* 的表現，而本實驗使用的鋅離子濃度為 1 mM，*rstA*、*rstB* 及 *asr* 的啟動子活性表現就明顯降低，我們推測這樣的環境下，可能鋅離子濃度過高，所以活性下降，因此對於 RstB-RstA-Asr 的訊號傳遞，我們推測其也會受到鋅離子所影響。

Fur 被報導可以調控多種基因表現，為了解 Fur 是否會調控 *rstA/rstB* 以及影響 *asr* 的啟動子活性表現。首先，經由序列分析，*rstB* 的啟動子區域有一處 Fur 鍵結保留序列，然而在啟動子活性分析測試結果，*fur* 的基因缺損並沒有明顯降低 *rstA*、*rstB* 啟動子的活性表現，因此推測或許是 *rstA/rstB* 本身表現量不大，而看不出明顯的影響。而在觀測 *asr* 啟動子活性方面，*fur* 的基因缺損會明顯降低 *asr* 啟動子的活性表現（從 5900 減少到 3600 miller



units) ，由此推測 Fur 可能藉由 RstB/RstA 或藉由自己影響 *asr* 啟動子的活性表現。

綜合以上對於克雷白氏肺炎桿菌 RstA/RstB 的研究，我們推測 RstA/RstB 調控路徑，如附錄一所示 RstA/RstB 非專一的接受 PhoP/PhoQ 的調控，也非單一的調控和酸有關的 *asr*，在此暗示著 RstA/RstB 調控系統可能參予更複雜的調控路徑，進而協調克雷白氏肺炎桿菌裡多項刺激訊號傳遞。



## 參考文獻

1. **GST Gene Fusion System Handbook. Amersham Biosciences.**
2. **Achenbach, L. A., and W. Yang.** 1997. The fur gene from *Klebsiella pneumoniae*: Characterization, genomic organization and phylogenetic analysis. *Gene* **185**:201-207.
3. **Armalyte, J., V. Seputiene, O. Melefors, and E. Suziedeliene.** 2008. An *Escherichia coli* asr mutant has decreased fitness during colonization in a mouse model. *Research in Microbiology* **159**:486-493.
4. **Baichoo, N., and J. D. Helmann.** 2002. Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**:5826-32.
5. **Bisen, P. S., S. K. Garg, R. P. Tiwari, P. R. Tagore, R. Chandra, R. Karnik, N. Thaker, N. Desai, P. K. Ghosh, M. Fraziano, and V. Colizzi.** 2003. Analysis of the shotgun expression library of the *Mycobacterium tuberculosis* genome for immunodominant polypeptides: potential use in serodiagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**:1051-8.
6. **Cabeza, M. L., A. Aguirre, F. C. Soncini, and E. G. Vescovi.** 2007. Induction of RpoS degradation by the two-component system regulator RstA in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology* **189**:7335-7342.
7. **Chang, F. Y., and M. Y. Chou.** 1995. Comparison of pyogenic liver abscesses caused by *Klebsiella pneumoniae* and non-*K. pneumoniae* pathogens. *J Formos Med Assoc* **94**:232-7.
8. **Chen, Y. T., H. Y. Chang, Y. C. Lai, C. C. Pan, S. F. Tsai, and H. L. Peng.** 2004. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene* **337**:189-198.

9. **Crosa, J. H., and C. T. Walsh.** 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**:223-+.
10. **De Lorenzo, V., and K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**:386-405.
11. **Hantke, K.** 2001. Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals* **14**:239-49.
12. **Hirakawa, H., K. Nishino, T. Hirata, and A. Yamaguchi.** 2003. Comprehensive studies of drug resistance mediated by overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:1851-6.
13. **Hirakawa, H., K. Nishino, J. Yamada, T. Hirata, and A. Yamaguchi.** 2003. Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **52**:576-82.
14. **Hoch, J. A.** 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion in Microbiology* **3**:165-170.
15. **Hommais, F., E. Krin, J. Y. Coppee, C. Lacroix, E. Yeramian, A. Danchin, and P. Bertin.** 2004. GadE (YhiE): a novel activator involved in the response to acid environment in *Escherichia coli*. *Microbiology-SGM* **150**:61-72.
16. **Itou, J., Y. Eguchi, and R. Utsumi.** 2009. Molecular Mechanism of Transcriptional Cascade Initiated by the EvgS/EvgA System in *Escherichia coli* K-12. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **73**:870-878.

17. **Jeon, J., H. Kim, J. Yun, S. Ryu, E. A. Groisman, and D. Shin.** 2008. RstA-promoted expression of the ferrous iron transporter FeoB under iron-replete conditions enhances Fur activity in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **190**:7326-34.
18. **Keen, N.T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger.** 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* **70**:191-7.
19. **Lai, Y. C., H. L. Peng, and H. Y. Chang.** 2001. Identification of genes induced in vivo during *Klebsiella pneumoniae* CG43 infection. *Infect Immun* **69**:7140-5.
20. **Lee, L. J., J. A. Barrett, and R. K. Poole.** 2005. Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. *Journal of Bacteriology* **187**:1124-1134.
21. **Lin, C. T., T. Y. Huang, W. C. Liang, and H. L. Peng.** 2006. Homologous response regulators KvgA, KvhA and KvhR regulate the synthesis of capsular polysaccharide in *Klebsiella pneumoniae* CG43 in a coordinated manner. *J Biochem* **140**:429-38.
22. **Lin, C. T., and H. L. Peng.** 2006. Regulation of the homologous two-component systems KvgAS and KvhAS in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Biochem* **140**:639-48.
23. **Masuda, N., and G. M. Church.** 2002. *Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA. *J Bacteriol* **184**:6225-34.
24. **Miller, J. H.** 1972. *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
25. **Minagawa, S., H. Ogasawara, A. Kato, K. Yamamoto, Y. Eguchi, T. Oshima, H. Mori, A. Ishihama, and R. Utsumi.** 2003. Identification and molecular characterization of the Mg<sup>2+</sup> stimulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:3696-702.
26. **Mizuno, T.** 2005. Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: from hormone responses to circadian rhythms. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**:2263-76.

27. **Nassif, X., and P. J. Sansonetti.** 1986. Correlation of the Virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the Presence of a Plasmid Encoding Aerobactin. *Infection and Immunity* **54**:603-608.
28. **Navarre, W. W., T. A. Halsey, D. Walthers, J. Frye, M. McClelland, J. L. Potter, L. J. Kenney, J. S. Gunn, F. C. Fang, and S. J. Libby.** 2005. Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Mol Microbiol* **56**:492-508.
29. **Ogasawara, H., A. Hasegawa, E. Kanda, T. Miki, K. Yamamoto, and A. Ishihama.** 2007. Genomic SELEX search for target promoters under the control of the PhoQP-RstBA signal relay cascade. *Journal of Bacteriology* **189**:4791-4799.
30. **Peng, C. A., M. J. Oliver, and A. J. Wood.** 2005. Is the rehydrin TrDr3 from *Tortula ruralis* associated with tolerance to cold, salinity, and reduced pH? Physiological evaluation of the TrDr3-orthologue, HdeD from *Escherichia coli* in response to abiotic stress. *Plant Biology* **7**:315-320.
31. **Peng, H. L., P. Y. Wang, J. L. Wu, C. T. Chiu, and H. Y. Chang.** 1991. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae*. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* **24**:264-71.
32. **Podschun, R., and U. Ullmann.** 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews* **11**:589-+.
33. **Richard, H., and J. W. Foster.** 2004. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *J Bacteriol* **186**:6032-41.

34. **Rodrigue, A., Y. Quentin, A. Lazdunski, V. Mejean, and M. Foglino.** 2000. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends in Microbiology* **8**:498-504.
35. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
36. **Scheich, C., V. Sievert, and K. Bussow.** 2003. An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography. *Bmc Biotechnology* **3**:-.
37. **Schrinner, E., M. Limbert, L. Penasse, and A. Lutz.** 1980. Antibacterial activity of cefotaxime and other newer cephalosporins (in vitro and in vivo). *J Antimicrob Chemother* **6 Suppl A**:25-30.
38. **Seputiene, V., D. Motiejunas, K. Suziedelis, H. Tomenius, S. Normark, O. Melefors, and E. Suziedeliene.** 2003. Molecular characterization of the acid-inducible *asr* gene of *Escherichia coli* and its role in acid stress response. *Journal of Bacteriology* **185**:2475-2484.
39. **Seputiene, V., K. Suziedelis, S. Normark, O. Melefors, and E. Suziedeliene.** 2004. Transcriptional analysis of the acid-inducible *asr* gene in enterobacteria. *Research in Microbiology* **155**:535-542.
40. **Sirot, D.** 1995. Extended-Spectrum Plasmid-Mediated Beta-Lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **36**:19-34.
41. **Skorupski, K., and R. K. Taylor.** 1996. Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene* **169**:47-52.

42. **Smith, A. M., and K. P. Klugman.** 2001. Alterations in MurM, a cell wall muropeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2393-6.
43. **Suziedeliene, E., K. Suziedelis, V. Garbenciute, and S. Normark.** 1999. The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: Transcriptional control by the *phoBR* operon. *Journal of Bacteriology* **181**:2084-2093.
44. **Terpe, K.** 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**:523-533.
45. **Tomas, J. M., V. J. Benedi, B. Ciurana, and J. Jofre.** 1986. Role of Capsule and O-Antigen in Resistance of *Klebsiella-Pneumoniae* to Serum Bactericidal Activity. *Infection and Immunity* **54**:85-89.
46. **Tsai, B.-S.** August, 2008. Regulation of *yfiD* gene expression in *Klebsiella pneumoniae* CG43, Department of Biological Science and Technology National Chiao Tung University.
47. **Wang, J. H., Y. C. Liu, S. S. J. Lee, M. Y. Yen, Y. S. Chen, J. H. Wang, S. R. Wann, and H. H. Lin.** 1998. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clinical Infectious Diseases* **26**:1434-1438.
48. **Wang, W. B., I. C. Chen, S. S. Jiang, H. R. Chen, C. Y. Hsu, P. R. Hsueh, W. B. Hsu, and S. J. Liaw.** 2008. Role of RppA in the regulation of polymyxin b susceptibility, swarming, and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. *Infect Immun* **76**:2051-62.
49. **Willey, J. M., L. M. Sherwood, and C. J. Woolverton.** 2008. Prescott, Harley, and Klein's Microbiology, 7 ed.

50. **Wyborn, N. R., S. L. Messenger, R. A. Henderson, G. Sawers, R. E. Roberts, M. M. Attwood, and J. Green.** 2002. Expression of the Escherichia coli yfiD gene responds to intracellular pH and reduces the accumulation of acidic metabolic end products. Microbiology-Sgm **148**:1015-1026.
51. **Zhou, L., X. H. Lei, B. R. Bochner, and B. L. Wanner.** 2003. Phenotype microarray analysis of Escherichia coli K-12 mutants with deletions of all two-component systems. J Bacteriol **185**:4956-72.
52. **Zhou, Y., S. Gottesman, J. R. Hoskins, M. R. Maurizi, and S. Wickner.** 2001. The RssB response regulator directly targets sigma(S) for degradation by ClpXP. Genes Dev **15**:627-37.





表一：Bacterial strains used in this study

Strains	Descriptions	Reference or source
<i>E. coli</i> :		
JM109	<i>RecA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 rolA1thi</i> $\Delta(lac-proAB)$	Laboratory stock
S17-1 $\lambda$ <i>pir</i>	$Tp^f Sm^f recA, thi, pro, hsdR^- M^+$ [RP4-2-Tc::Mu:Km <sup>r</sup> Tn7] ( <i>pir</i> )	(10)
BL21 (DE3)	$F^- ompT hsdS_B(rB^- mB^-) gal dcm met$	Laboratory stock
<i>K. pneumoniae</i> :		
CG43	K2 serotype	Laboratory stock
CG43S3	$\Delta rspL, St^f$	Laboratory stock
CG43-101	Curing the large plasmid pLVPK from CG43	Laboratory stock
CG43S3-Z01	CG43-S3 $\Delta lacZ Sm^f$	Laboratory stock
CG43S3 $\Delta rstA$	CG43-S3 $\Delta rstA Sm^f$	This study
CG43S3 $\Delta rstB$	CG43-S3 $\Delta rstB Sm^f$	This study
CG43S3 $\Delta asr$	CG43-S3 $\Delta asr Sm^f$	This study
CG43S3-Z01 $\Delta rstA$	Z01 $\Delta rstA Sm^f$	This study
CG43S3-Z01 $\Delta rstB$	Z01 $\Delta rstB Sm^f$	This study

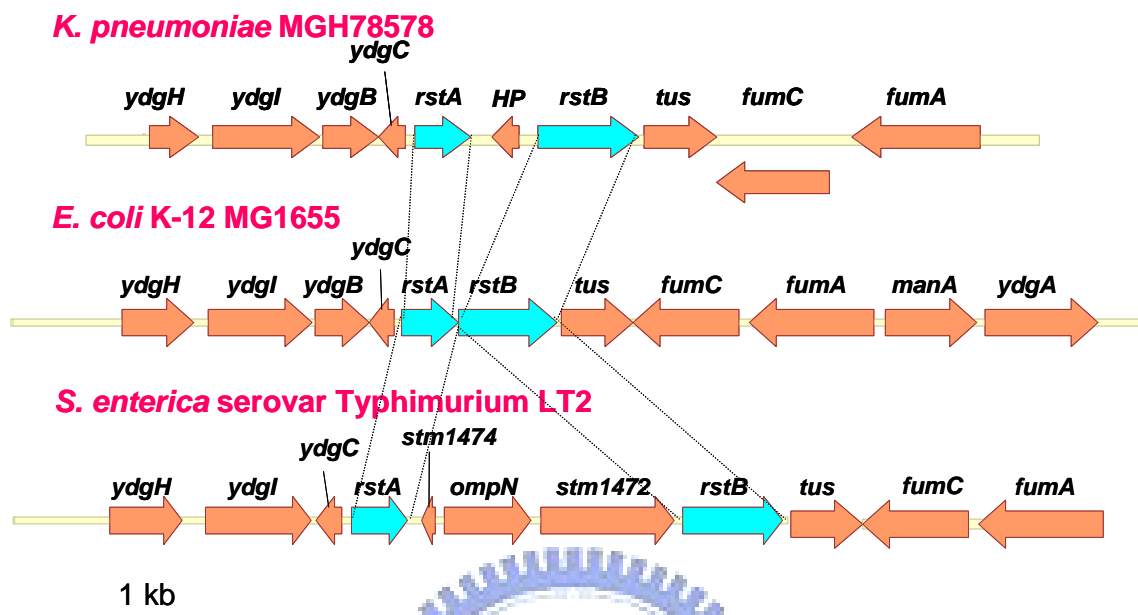
表二：Plasmids used in this study

Plasmid	Relevant characteristic	Source or reference
yT&A	PCR cloning vector, Ap <sup>r</sup>	Yeastern Biotech Co.
pKAS46	Suicide vector ; Km <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup> , Str <sup>s</sup>	(41)
pRK415	Broad-host-range IncP cloning vector, Tc <sup>r</sup>	(18)
pLacZ15	A derivative of pYC016 (19), containing a promoterless <i>lacZ</i> from <i>K. pneumoniae</i> CG43S3 as the reporter, Cm <sup>r</sup>	(21)
pGEX-5X-1	GST-tagging protein expression vector, Ap <sup>r</sup>	(5)
pHY015	<i>SacI/XbaI</i> digested fragment of pHY014 cloned into pKAS46	Laboratory stock
pHY048	450 bp <i>BamHI/BglIII</i> digested fragment of the putative <i>rstA</i> promoter region was cloned into pLacZ15	Laboratory stock
pHY089	700 bp <i>EcoRV/SacI</i> digested fragment of expressing RstA cloned into pET30b	Laboratory stock
pHY091	<i>rstA</i> gene with no C-terminal domain was digested by <i>SalI</i> and cloned into pET30b	Laboratory stock
pHY110	1.1 kb <i>EcoRI/PstI</i> fragment containing the putative <i>rstA</i> promoter and <i>rstA</i> was cloned into pRK415	Laboratory stock
pHY112	3 kb <i>HindIII</i> digested fragment containing putative <i>rstA</i> promoter, <i>rstA</i> , <i>rstB</i> promoter region, and <i>rstB</i> was cloned into pRK415	Laboratory stock
pHY070	400 bp <i>BamHI/BglIII</i> digested fragment containing the putative <i>mgtA</i> promoter was cloned into pLacZ15	Laboratory stock
pfeoZ15	564 bp <i>BamHI/BglIII</i> digested fragment containing the putative <i>feo</i> promoter was cloned into pLacZ15	Laboratory stock
pirocyZ15	455 bp <i>BamHI/BglIII</i> digested fragment containing the putative <i>iro</i> promoter was cloned into pLacZ15	Laboratory stock
pYjcC525	525 bp <i>BamHI/BglIII</i> digested fragment containing the putative <i>yjcC</i> promoter was cloned into pLacZ15	Laboratory stock
pYfdX	417 bp <i>BamHI/BglIII</i> digested fragment containing the putative <i>yfdX</i> promoter was cloned into pLacZ15	Laboratory stock
pYfiD02	302 bp <i>BamHI/BglIII</i> digested fragment of pYfiD01 cloned into the <i>BamHI</i> site of pLacZ15	Laboratory stock

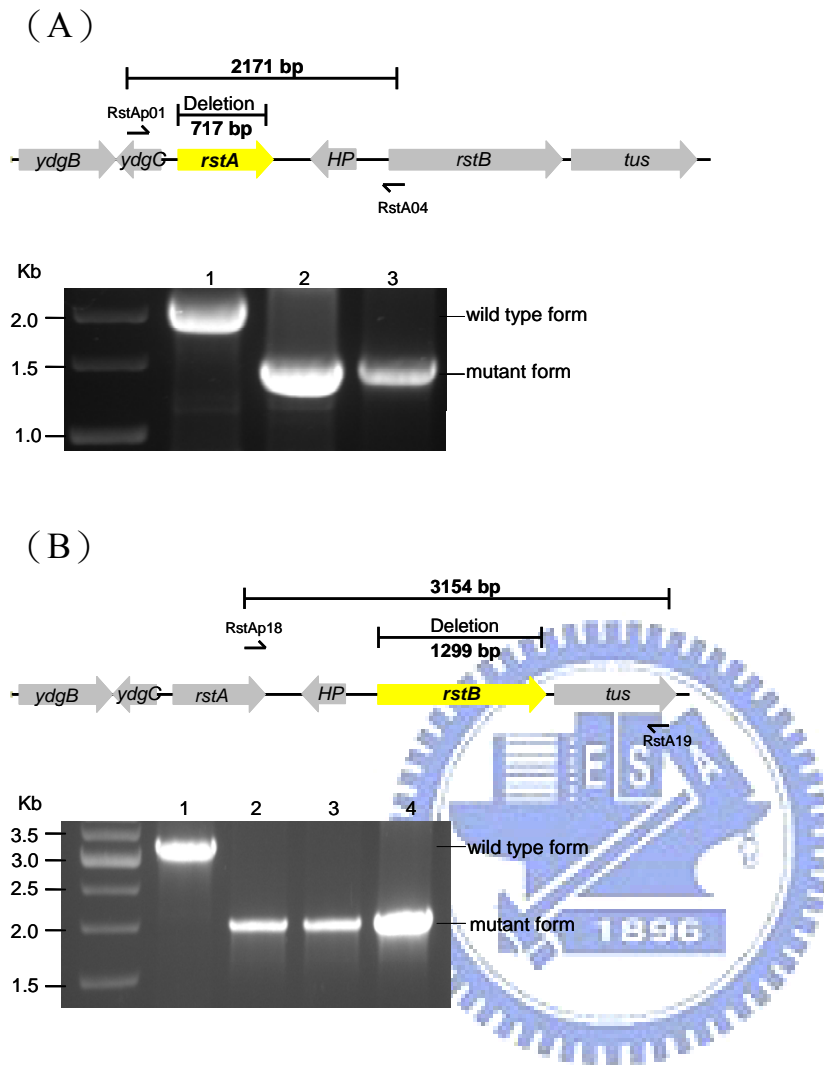
pHdeD	417 bp <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II digested fragment containing the putative <i>HdeD</i> promoter was cloned into pLacZ15	Laboratory stock
pAsr2-2	270 bp <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II digested fragment containing the putative <i>asr</i> promoter was cloned into pLacZ15	This study
pAsr-2-yT	2.3 kb PCR product containing the <i>asr</i> , the upstream of <i>asr</i> , and the downstream of <i>asr</i> was cloned into pyT&A	This study
pAsr-m-yT	The 4.7 kb fragment containing no <i>asr</i> gene amplified from pAsr-2-yT by using PCR, and then was religated	This study
pAsr-m-46	The fragment which was digested from pAsr-m-yT by using <i>Sac</i> I/ <i>Xba</i> I was cloned into pKAS46	This study
pGEX-5X-1-Asr	200 bp PCR product of <i>asr</i> with no signal peptide was cloned into pGEX-5x-1	This study
pRstB-2-yT	3.3 kb PCR product containing the <i>rstB</i> , the upstream of <i>rstB</i> , and the downstream of <i>rstB</i> was cloned into pyT&A	This study
pRstB-m-yT	The 4.7 kb fragment containing no <i>rstB</i> gene amplified from pRstB-2-yT by using PCR, and then was religated	This study
pRstB-m-46	The fragment which was digested from pRstB-m-yT by using <i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I was cloned into pKAS46	This study
pRstB	300 bp PCR product carrying P <sub><i>rstB</i></sub> cloned into the <i>Bam</i> HI site of pLacZ15	This study
pAsr-c-yT	550 bp PCR product carrying <i>asr</i> and P <sub><i>asr</i></sub> cloned into yT&A	This study
pAsr-c-415	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III digested fragment of pAsr-c-yT cloned into pRK415	This study

表三：Primers used in this study

Primer	Sequence
RstA04	5'-CAGGTCGAGCTCTTTAAGGG-3'
RstAp01	5'-GCAGGATCCCGGTGAAATAC-3'
YWp01	5'-ATGCTGCGGATCCGTTTT-3'
YWp02	5'-CGGCAACGACCAGATCTAATAC-3'
YWp07	5'-GCAGAATGTTCGGATCCGCCTATG-3'
YWp08	5'-GCTACCACCACCAAGATCTCGTCGTTA-3'
YWp09	5'-GGTCATGGGCTTTATTGGATTACTGGT-3'
YWp10	5'-CATTATGGTGCGTTCGATTGGACTC-3'
YWp11	5'-CGGCAACGACCATGGCTAATACTT-3'
YWp12	5'-GCACCATGGTCAGGGCGTTAAG-3'
YWp14	5'-CCAGAATTCGCCGATGCGGCAAGCACCACCCC-3'
YWp15	5'-CTTCTCGAGCCATTATGCCGCCGGTTA-3'
YWp16	5'-GCTGACCGATATGATTGTGCC-3'
YWp17	5'-TATTTAAACATCAAGCGCAGGGTA-3'
YWp18	5'-GAGCCCTATCGTATTAAGACCGTTCGCA-3'
YWp19	5'-TCGGCATCATAGTTCAGCAGCTCGC-3'
YWp20	5'-ATAGGATCCCAGAAAGCAGACGAAGAGCAGAAGAT-3'
YWp21	5'-ATTGGATCCTAGCTGCCTGATTTACCTCTGCC-3'
YWp27	5'-CACGGATCCGGTAGACATTCCTTATTAT-3'
YWp28	5'-GAAGATAGATCTGCACGAACAGCT-3'
YWp31	5'-CCACGGATCCGGTAGACATTCCTTA-3'
YWp32	5'-GAATTCAGATTTTTGCAGCATACCCAGCCC-3'
YWp33	5'-GCAGCGCCAGCCTTCCAGCATCATC-3'
YWp34	5'-GGCGCTGTTCAGCGCCGGTTTATCA-3'



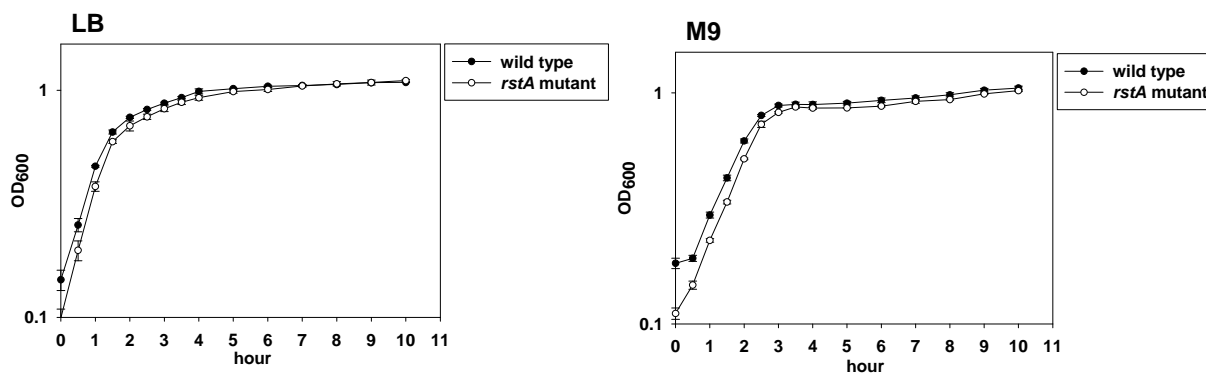
圖一. 不同菌種中 *rstA/rstB* 及其上下游基因分析。比較克雷白氏肺炎桿菌、大腸桿菌、沙門氏菌中 *RstA/RstB* 基因及其前後基因的組成。圖中基因分別可編譯出，*ydgH*：假設性蛋白，*ydgl*：預測為精胺酸/鳥胺酸反向轉運運輸體，*ydgB*：短鏈脫氫酶，*ydgC*：假設性蛋白，*hp*：假設性蛋白，*tus*：DNA 複製終止位鍵結蛋白，*fumC*：延胡索酸水合酶，*fumA*：延胡索酸水合酶，*manA*：磷酸甘露糖異構酶，*ydgA*：假設性蛋白，*stm1474*：偽基因，*ompN*：外膜孔蛋白 N，*stm1472*：假設性外膜蛋白。



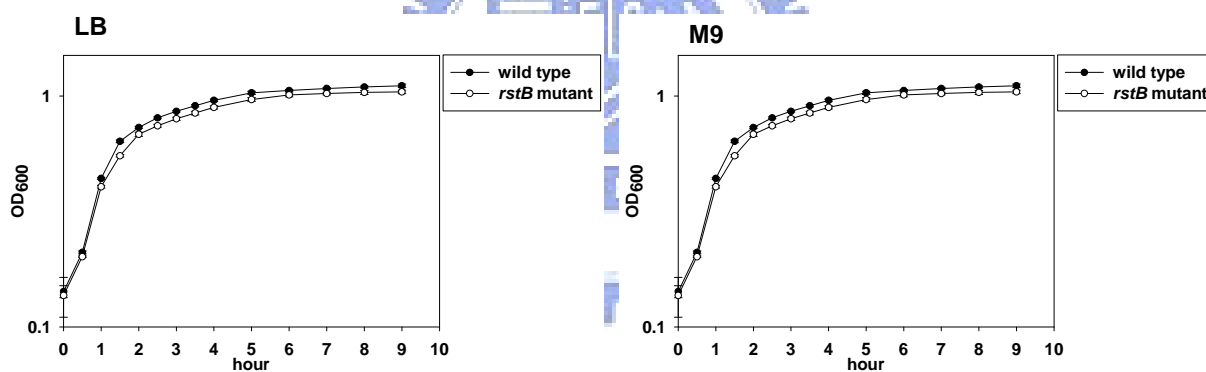
圖二. 確認 $rstA$ 及 $rstB$ 基因缺損株。(A) 利用引子RstA04、RstAp01經PCR增幅後，以DNA電泳確認。野生株可增幅2171 bp，而 $rstA$ 缺損株則可增幅1454 bp。Lane 1：野生株，Lanes 2： $rstA$ 缺損株，Lanes 3：帶有 $rstA$ 缺損的質體。

(B) 利用引子YWp18，YWp19經PCR後，再以DNA電泳確認。野生株增幅3154 bp，而 $rstB$ 缺損株則可增幅1855 bp， Lane 1：野生株，Lanes 2~3： $rstB$ 缺損株，Lanes 4：帶有 $rstB$ 缺損的質體。

(A)



(B)



圖三. 分析 *rstA* 或 *rstB* 基因缺損株在 LB 及 M9 培養液的生長情形。取二十分之一隔夜培養的菌液加入 4 毫升的 LB 培養液或 M9 培養液中，觀測不同時間點 600 nm 的吸光值 (A) 野生株與 *rstA* 缺損株。(B) 野生株與 *rstB* 缺損株。

(A)

Drug		<i>Klebsiella pneumoniae</i> CG43S3				
		Wild type	<i>rstA</i> <sup>-</sup>	pRK415 in <i>rstA</i> <sup>-</sup>	pHY110 in <i>rstA</i> <sup>-</sup>	pHY112 in <i>rstA</i> <sup>-</sup>
<b>Cell Wall Synthesis Inhibition</b>						
Penicillins	Ampicillin (10 µg)	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0
	Carbenicillin(100 µg)	9.6 ± 0.7	11.2 ± 0.5	20.0 ± 0	20.0 ± 0	20.6 ± 0.5
	Methicillin (5 mcg)	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0
Cephalosporins	Cefotaxime (30 µg)	22.0 ± 0	23.2 ± 1.1	34.0 ± 0	32.0 ± 0	33.2 ± 0.5
	Ceftazidime(30 mcg)	22.0 ± 0	22.2 ± 0.2	30.6 ± 0.5	30.0 ± 0	32.0 ± 0
<b>Protein Synthesis inhibition</b>						
Aminoglycosides	Kanamycin (30 µg)	15.2 ± 0.5	16.0 ± 0	18.0 ± 0	18.0 ± 0	18.0 ± 0
Tetracyclines	Tetracyclin (30 µg)	23.0 ± 0.7	22.6 ± 0.5	8.6 ± 0.5	8.6 ± 0.5	8.0 ± 0
<b>Nucleic Acid Synthesis inhibition</b>						
Quinolones and Fluoroquinolones	Ciprofloxacin(5 µg)	30.6 ± 0.5	32.0 ± 1.0	36.0 ± 0.1	37.4 ± 0.1	34.6 ± 0.1
	Nalidixic acid (30 µg)	17.2 ± 0.5	16.0 ± 0	19.6 ± 0.2	20.0 ± 0	20.0 ± 0
<b>Cell Membrane Disruption</b>						
Polymyxin B	Polymyxin B (300 units)	14.0 ± 0	14.0 ± 0	16.6 ± 0.5	14.6 ± 0.5	14.6 ± 0.5
<b>Antimetabolites</b>						
Sulfonamides	Sulfamethoxazole (25 µg)	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0

(B)

Drug		<i>Klebsiella pneumoniae</i> CG43S3	
		Wild type	<i>rstB</i> <sup>-</sup>
<b>Cell Wall Synthesis Inhibition</b>			
Penicillins	Ampicillin (10 µg)	6.0 ± 0	6.0 ± 0
	Penicillin G (10 units)	6.0 ± 0	6.0 ± 0
	Methicillin (5 mcg)	6.0 ± 0	6.0 ± 0
	Carbenicillin (100 µg)	17.0 ± 0.1	18.0 ± 0.2
Cephalosporins	Cefotaxime (30 µg)	23.0 ± 0.9	23.0 ± 0.5
	Ceftazidime (30 mcg)	18.0 ± 1.0	20.0 ± 1.0
	Cefmetazole (30 µg)	22.8 ± 0.2	23.2 ± 0.3
Fosfomycin	Fosfomycin (200 µg)	12.6 ± 0.2	13.4 ± 0.3
<b>Protein Synthesis inhibition</b>			
Aminoglycosides	Kanamycin (30 µg)	9.8 ± 0.1	10.8 ± 0.4
	Novobiocin (5 µg)	6.0 ± 0	6.0 ± 0
Tetracyclines	Tetracyclin (30 µg)	22.0 ± 0.1	24.0 ± 0
Macrolides	Erythromycin (15 µg)	11.0 ± 0.4	9.8 ± 0.1
Chloramphenicol	Chloramphenicol (30 µg)	22.0 ± 0.7	21.8 ± 0.2
<b>Nucleic Acid Synthesis inhibition</b>			
Quinolones and Fluoroquinolones	Ciprofloxacin(5 µg)	20.4 ± 0.3	21.6 ± 0.3
	Nalidixic acid (30 µg)	17.8 ± 0.4	17.6 ± 0.3
<b>Cell Membrane Disruption</b>			
Polymyxin B	Polymyxin B (300 units)	13.6 ± 0.3	13.8 ± 0.4
<b>Antimetabolites</b>			
Sulfonamides	Sulfamethoxazole (25 µg)	6.0 ± 0	6.0 ± 0



圖四. 分析克雷白氏肺炎桿菌中 **RstA (A)** 或 **RstB (B)** 對於不同藥物濾紙錠的影響。將野生株、缺損株或帶有表現蛋白質質體的菌隔夜培養後，以 1:1 的比例和 LB 混合，於 37°C 培養三十分鐘後，以棉花棒沾取菌液塗盤，再放入不同藥物的濾紙錠，經隔夜培養後觀察抑菌圈直徑的大小。單位：mm。pRK415 (vector only) ; pHY110 (containing putative *rstA* promoter region and *rstA*) ; pHY112 (containing putative *rstA* promoter region, *rstA*, putative *rstB* promoter region, and *rstB*) 。

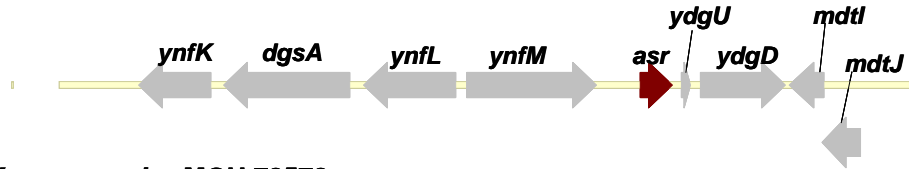


Drug	<i>E. coli</i> BL21				
	pHY089		pHY091		
	IPTG induction		IPTG induction		
	0 mM	0.5 mM, 4h	0 mM	0.5 mM, 4h	
<b>Cell Wall Synthesis Inhibition</b>					
Penicillins	Ampicillin (10 µg)	19.0 ± 0.5	27.2 ± 0.5	18.0 ± 1.0	23.6 ± 0.2
	Penicillin G (10 units)	16.0 ± 0	11.0 ± 0.5	9.4 ± 0.2	10.0 ± 0
Cephalosporins	Cefotaxime (30 µg)	30.0 ± 1.0	45.2 ± 1.5	26.6 ± 0.5	36.6 ± 0.5
	Ceftazidime (30 mcg)	26.0 ± 1.0	38.0 ± 0	27.2 ± 0.5	33.2 ± 0.5
Fosfomicin	Fosfomicin (200 µg)	52.4 ± 0.5	51.2 ± 1.1	50.2 ± 0.1	57.2 ± 0.5
<b>Protein Synthesis inhibition</b>					
Aminoglycosides	Kanamycin (30µg)	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0
	Novobiocin (5 µg)	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0
Tetracyclines	Tetracyclin (30 µg)	20.5 ± 0.5	28.6 ± 0.5	19.2 ± 0.5	26.6 ± 0.5
Macrolides	Erythromycin (15 µg)	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0
Chloramphenicol	Chloramphenicol (30 µg)	16.6 ± 0.5	24.0 ± 1.0	18.2 ± 0.2	19.6 ± 0.2
<b>Nucleic Acid Synthesis inhibition</b>					
Quinolones and Fluoroquinolones	Ciprofloxacin (5 µg)	22.0 ± 0	32.0 ± 1.7	18.6 ± 0.5	30.6 ± 0.5
	Nalidixic acid (30 µg)	6.0 ± 0	12.0 ± 1.0	6.0 ± 0	8.0 ± 0
<b>Cell Membrane Disruption</b>					
Polymyxin B	Polymyxin B (300 units)	16.0 ± 0	24.0 ± 1.0	15.0 ± 0.5	20.6 ± 0.5
<b>Antimetabolites</b>					
Sulfonamides	Sulfamethoxazole (25 µg)	6.0 ± 0	18.0 ± 1.0	6.0 ± 0	19.0 ± 1.5
	Sulfamethoxazde (25 µg)	8.0 ± 0	8.8 ± 0	7.8 ± 0	8.6 ± 0

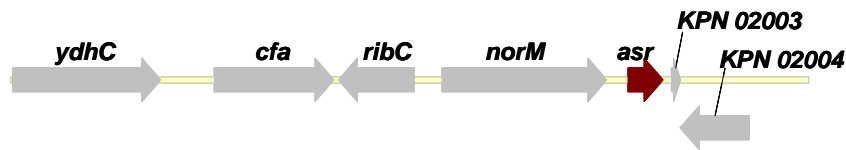
圖五. 大腸桿菌中大量表現 RstA 對於不同藥物濾紙錠的影響。將帶有完整表現 RstA (pHY089) 或僅含 RstA N 端部分 (pHY091) 的大腸桿菌 BL21 (DE3) 經隔夜培養後，取二十分之一加至 4 毫升的 LB 中，於 37°C 培養至 OD<sub>600</sub> 為 0.4~0.5，加入 0.5 mM IPTG 誘導三小時後，以棉花棒沾取菌液塗抹於 LB 培養皿，再放入不同藥物的濾紙錠，經隔夜培養後，觀察抑菌圈直徑的大小。單位：mm。

(A)

*E. coli* K-12 MG1655



*K. pneumoniae* MGH 78578



*S. enterica* serovar Typhimurium CT18



1 kb

(B)

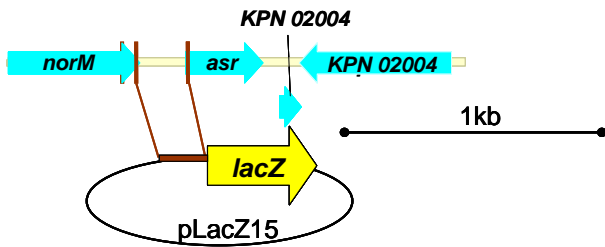
cttgctaacgcccggcctccggcgggcttttcggtctctcgctataacggcgcgtgTACAttccgTACTc  
cctgacaccaaagactcactgatagcctcccggcaggccttatagttgccaacagccccgcagtggg  
gttactcaagaaaccaagtcgaggatttcagaatg <sup>+1</sup> **asr**

-35 box                      -10 box                      putative RstA binding box

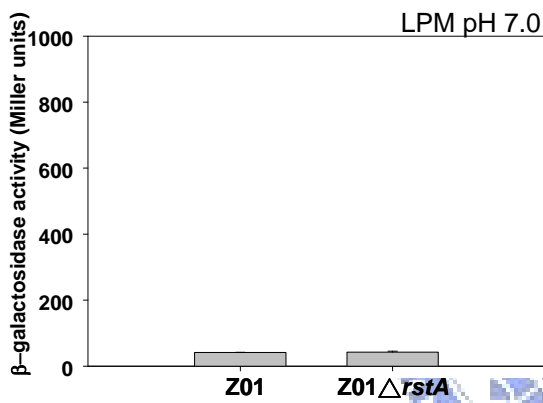
圖六. 分析不同菌種中 *asr* 上下游基因以及其可能的啟動子序列：(A) 分析大腸桿菌、克雷白氏肺炎桿菌、沙門氏菌的 *asr* 基因構造。基因說明如下：

*ynfK* : putative dethiobiotin synthetase, *dgsA* : DNA-binding transcriptional repressor, *ynfL* : transcriptional regulator, *ynfM* : Inner membrane transport protein YnfM, *ydgU* : hypothetical protein, *ydgD* : predicted peptidase, *mdtI* : Multidrug resistance protein, *mdt* : multidrug efflux system protein MdtJ, *ydhC* : inner membrane transport protein YdhC, *cfa* : cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase family protein, *ribC* : riboflavin synthase alpha subunit, *norM* : multidrug efflux protein, *KPN 02003* & *KPN 02004* : hypothetical protein, *bioD* : putative dithiobiotin synthetase, *STY 1576* & *STY 1578* : putative regulatory protein, *STY 1579* : putative membrane transport protein, *tnpA* : transposase for insertion sequence element IS200, *STY 1583* : putative secreted protein, *STY 1584* : multidrug efflux system protein MdtI. (B) 克雷白氏肺炎桿菌中，*asr* 可能的啟動子區域（約 175 bp）之序列分析，灰底標示為可能的 RstA 鍵結辨認區域 (29)。

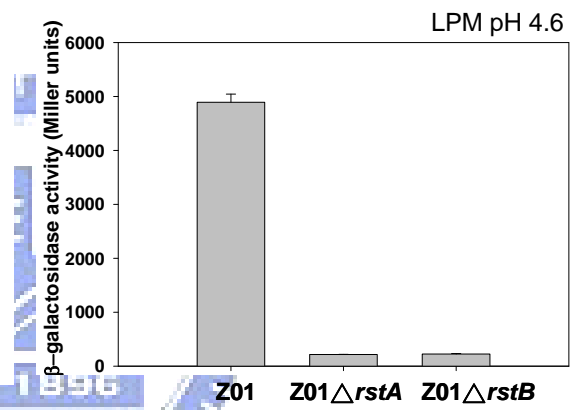
(A)



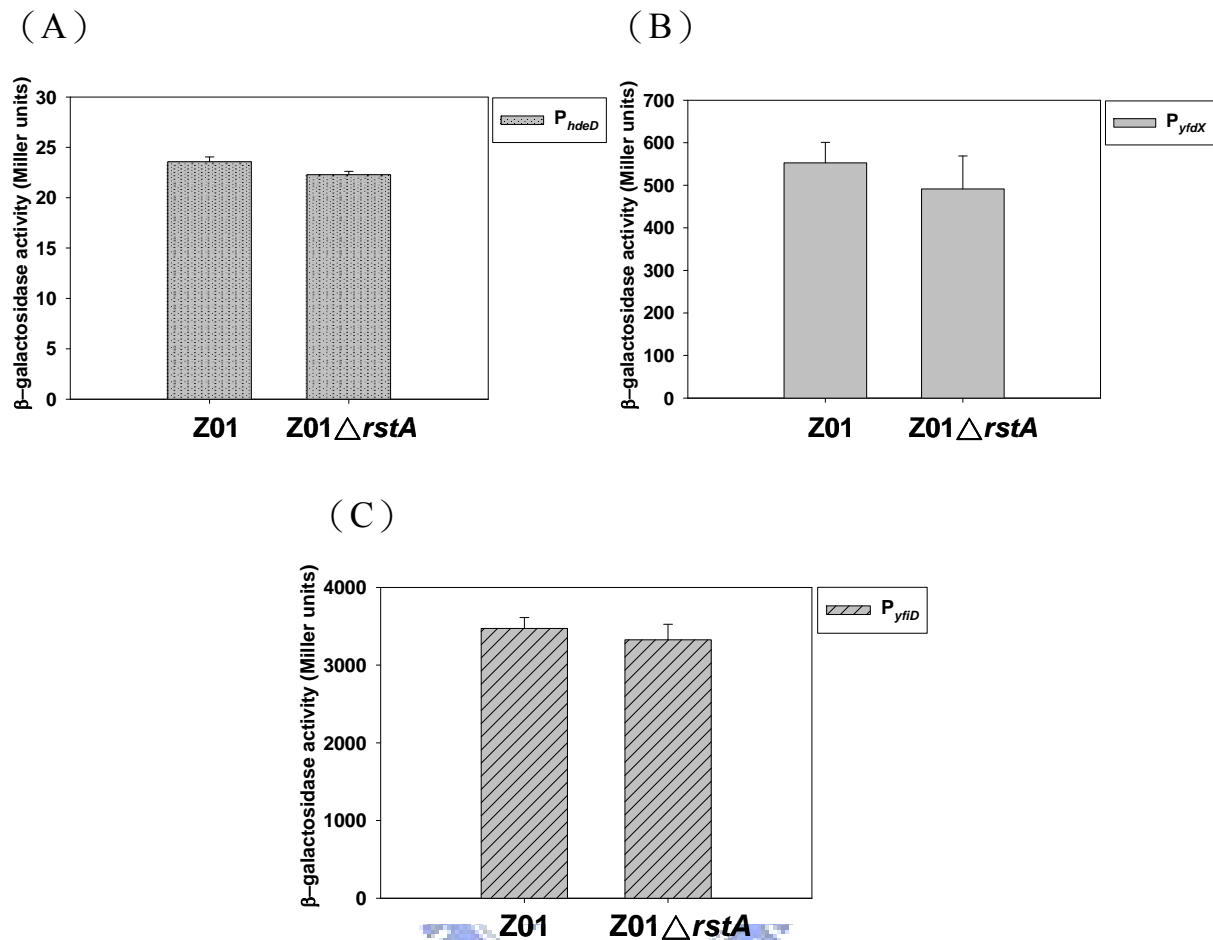
(B)



(C)

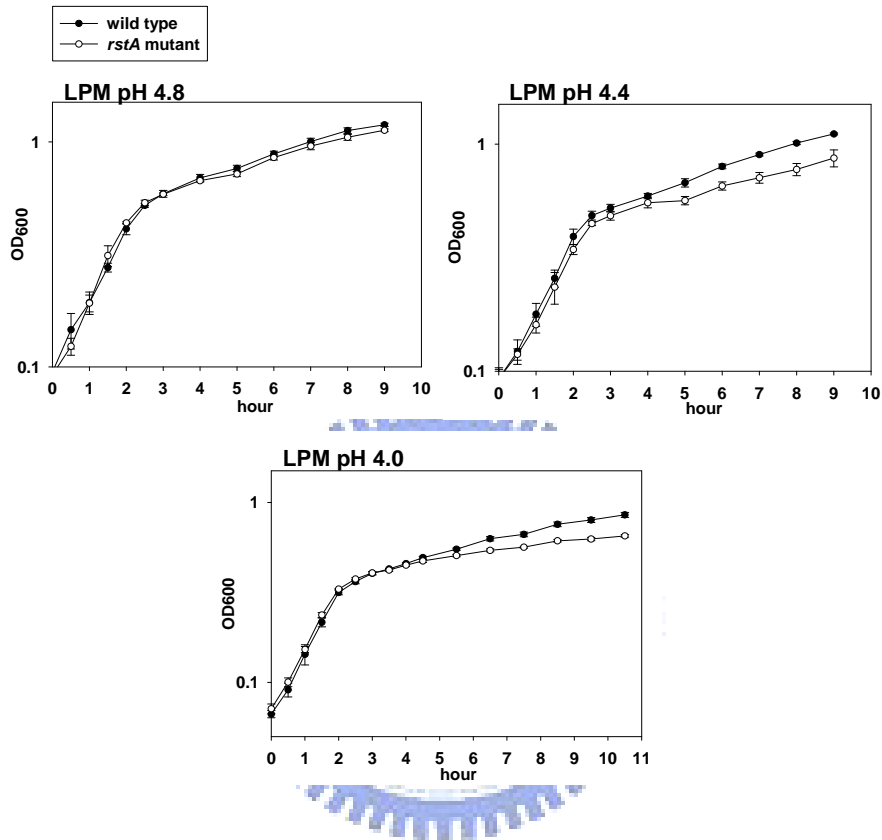


圖七. *rstA* 或 *rstB* 基因缺損對 *asr* 啟動子活性的影響。(A) *asr* 啟動子建構之示意圖，以 YWp01、YWp02 為引子，經 PCR 增幅，增幅後的片段接至 pLacZ15，以 *lacZ* 為報導基因。取二十分之一隔夜培養的菌液加至新鮮 pH 7.0 LPM 培養液 (B) 或 pH 4.6 LPM 培養液 (C)，於 37°C 培養至 OD<sub>600</sub> 約 0.6 後，依據 Miller 的方法操作，測試觀察 *asr* 啟動子的活性表現。



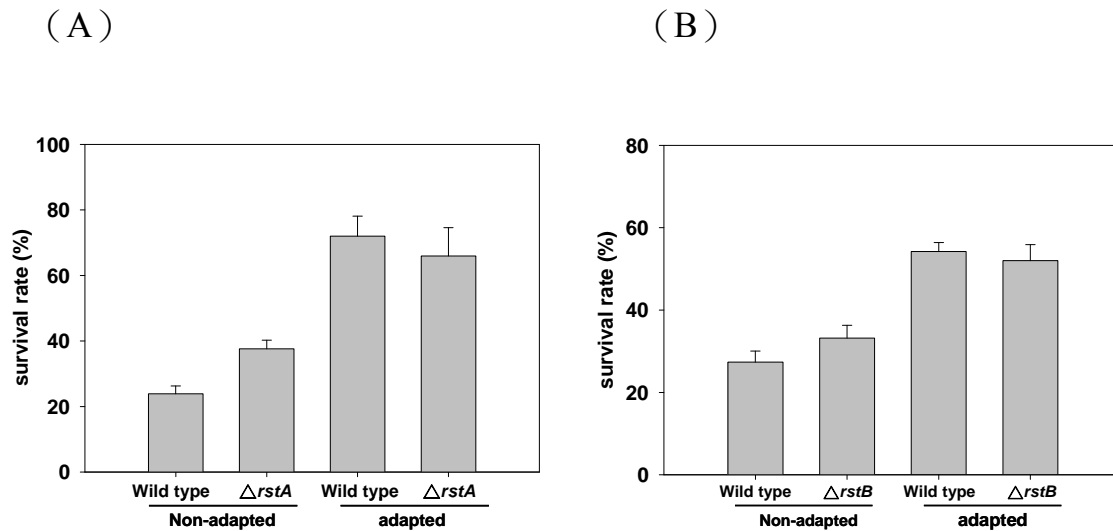
圖八. 分析 *rstA* 基因缺損對 *hdeD*、*yfdX*、*yfiD* 啟動子活性表現的影響。

(A) 將細菌培養於 pH 5.5 LBMEs 培養液至  $OD_{600}$  約 0.7，依據 Miller 的方法操作，觀測 *hdeD* 啟動子的活性表現。(B) 菌液隔夜靜置培養於 LB，至  $OD_{600}$  約 0.5，依據 Miller 的方法操作，觀測 *yfdX* 啟動子的活性表現。(C) 取二十分之一隔夜培養的菌液加至新鮮 LB 培養液中，並加入 1 毫升礦油，於 37°C 培養五小時後 ( $OD_{600}$  約 0.4)，依據 Miller 的方法操作，觀測 *yfiD* 啟動子的活性表現。

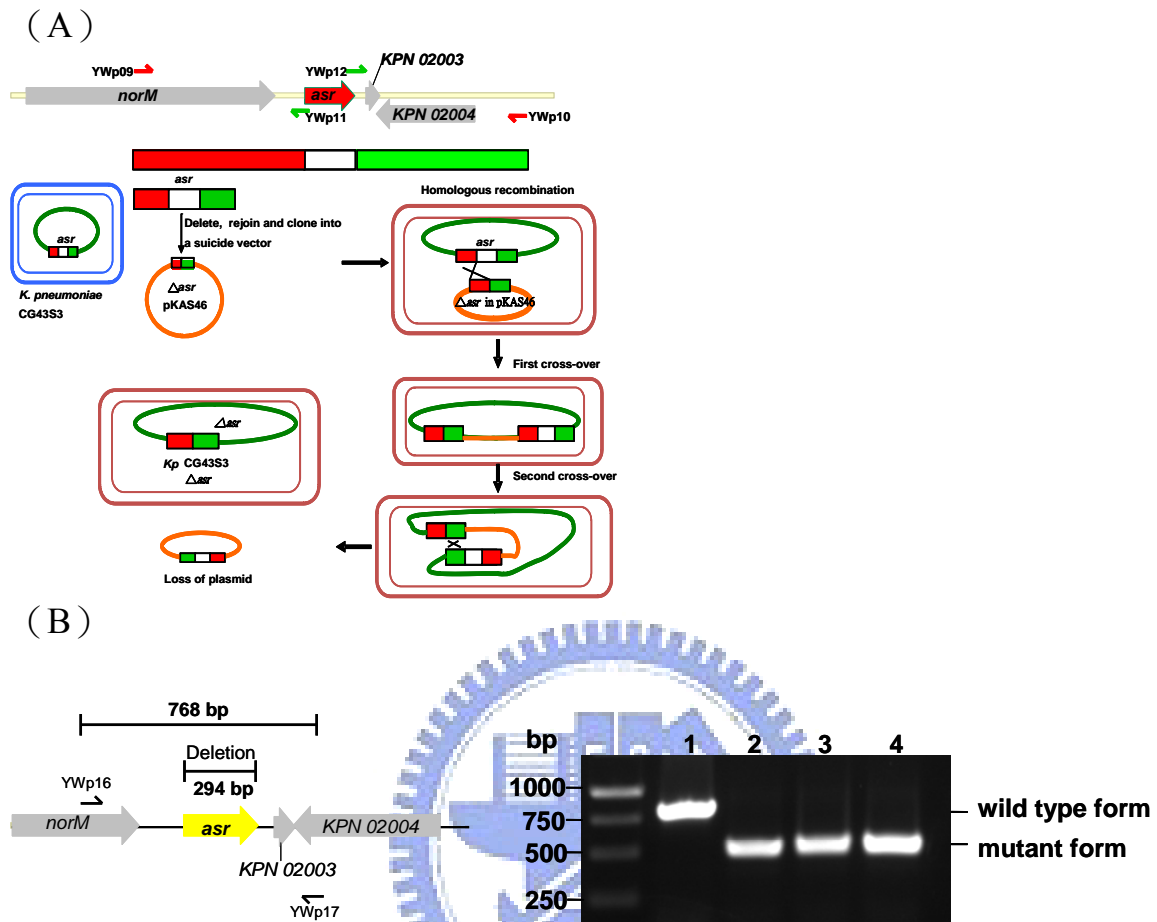


圖九. 野生株及 *rstA* 缺損株於 LPM pH 4.8、pH 4.4、pH 4.0 環境下生長曲線。取二十分之一隔夜培養的菌液加入新鮮 pH 4.8、pH 4.4、pH 4.0 LPM 培養液中，於不同時間點偵測 600 nm 的吸光值。



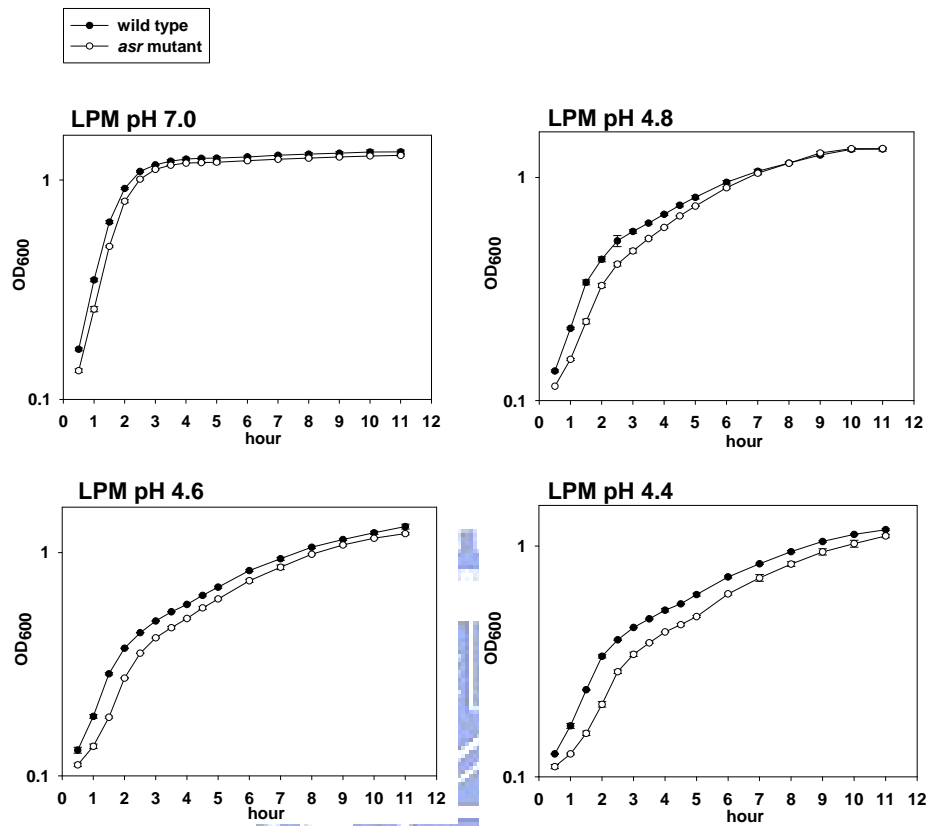


圖十. *rstA* 及 *rstB* 的基因缺損於酸逆境下的存活率分析。(A) 取二十分之一隔夜培養的菌液加入 pH 7.0 LPM 培養液中，待菌長至  $OD_{600}=0.6$  時，進行第一次塗盤數菌，並且將菌液分兩組進行酸逆境下的存活率分析，第一組無弱酸適應：將菌培養於 pH 3.0 LPM 培養液兩小時，以塗盤方式數菌，存活率計算方式為隔夜培養後，酸逆境後塗盤的菌落數除以初始塗盤菌數為存活率；第二組為有先弱酸適應：將細菌放入 pH 4.6 LPM 培養液兩小時後再將細菌於 pH 3.0 LPM 培養液培養兩小時，以塗盤計數，存活率計算方式為隔夜培養後，將酸逆境後塗盤的菌落數除以初始塗盤的菌落數為存活率 (B) 野生株及 *rstB* 缺損株於酸逆境下的存活率，測試與計數方式同 (A)。

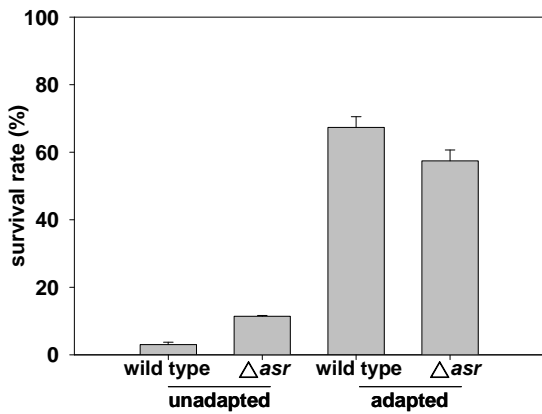


圖十一. *asr* 缺損株的建構示意圖以及確認。(A) 先以引子 YWp09、YWp10 經 PCR 增幅 *asr* 及其前後 2 kb 的序列，並且將增殖片段接至 pyT&A，再以 YWp11、YWp12 為引子利用 PCR 取得包含 *asr* 缺損片段的區域，此區域再以 *SacI/XbaI* 裁切獲得 *asr* 缺損片段，並接至 pKAS46，建構好的質體以接合作用送入野生株，進行兩次同源互換以獲得 *asr* 缺損株。(B) 利用 YWp16、YWp17 經 PCR 增幅後，以 DNA 電泳確認 *asr* 缺損株。野生株可增幅出 770 bp 的片段，而 *asr* 缺損株則可增幅 498 bp。Lane 1：野生株，Lanes 2：帶有 *asr* 缺損的質體，Lanes 3~4：*asr* 缺損株。

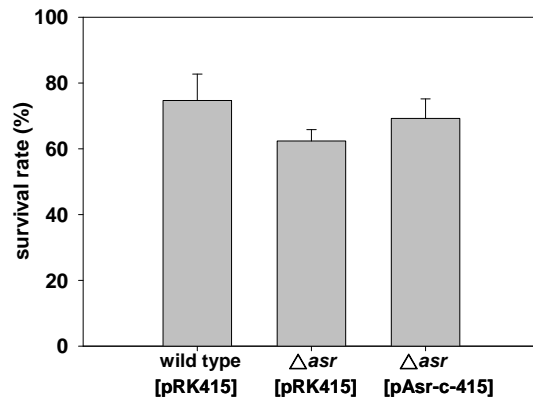
(A)



(B)



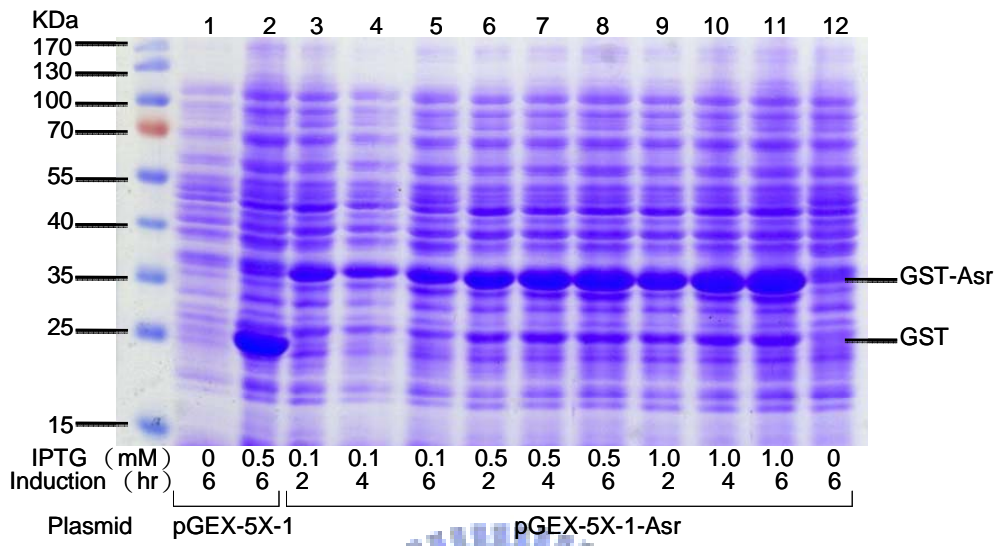
(C)



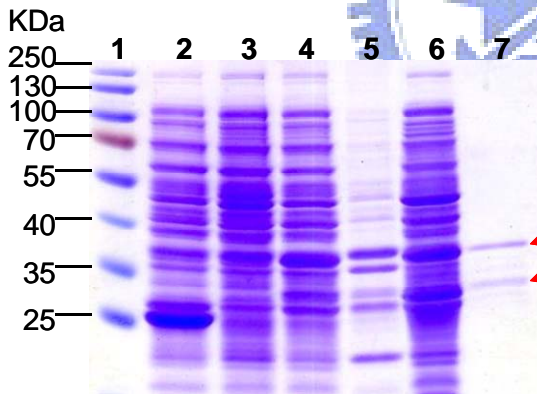
圖十二. *asr* 的基因缺損在酸環境下的生長曲線及酸逆境下的存活率。(A) 取二十分之一隔夜培養的菌液加入 pH 7.0、pH 4.8、pH 4.6、pH 4.4 LPM 培養液中，於不同時間點偵測 600 nm 的吸光值。(B) 野生株及 *asr* 缺損株於酸逆境下的存活率，測試與計數方式同圖十 A。(C) *asr* 互補株在酸逆境下的存活：將轉殖帶有質體的細菌株培養至  $OD_{600}=0.6$  後，塗盤數菌，接著弱酸 pH 4.6 LPM 培養液適應兩小時後再給予 pH 3.0 LPM 培養液酸逆境兩小時，再塗盤，隔夜計數酸逆境後塗盤的菌數除以初始塗盤菌數為存活率。



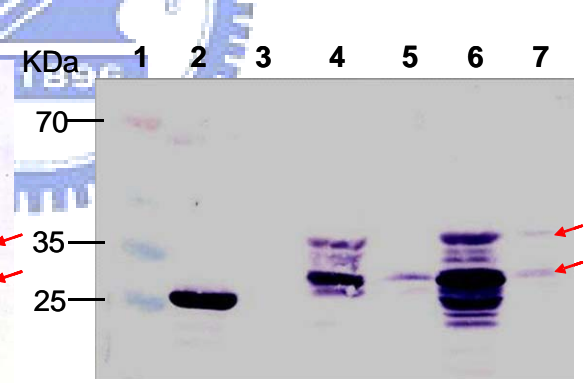
(A)



(B)

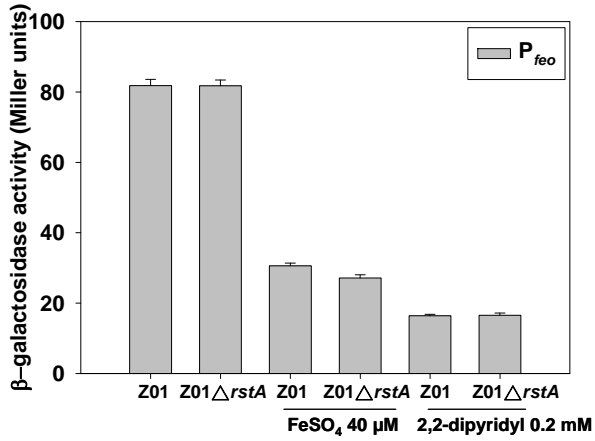


(C)

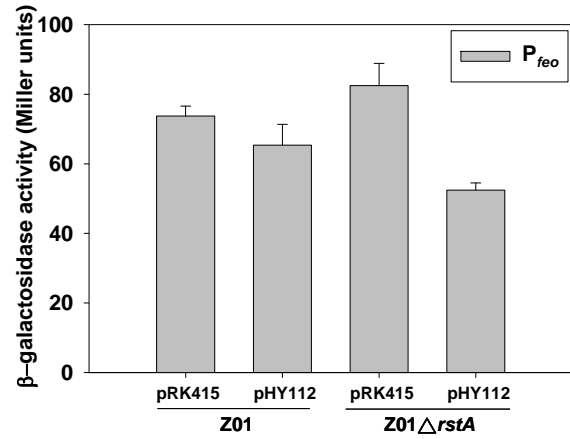


圖十三. 重組蛋白 Asr 的表現純化及西方墨點法分析。(A) 大腸桿菌 BL21 (DE3) [ pGEX-5X-1-Asr ] 以不同濃度 IPTG 誘導：lanes 1 和 12 未添加 IPTG；lanes 3、4、5，添加 0.1 mM IPTG；lanes 2、6、7、8，添加 0.5 mM IPTG；lanes 9、10、11，添加 IPTG 1 mM。IPTG 誘導表現時間分別為兩小時 (lanes 3、6、9)、四小時 (lanes 4、7、10)、六小時 (lanes 1、2、5、8、11、12) 後以 SDS-PAGE 分析。(B) 膠片以 Coomassie Blue 染色或 (C) GST 抗體做免疫呈色。Lane 1：分子量標記；2：BL21 (DE3) [pGEX-5X-1] 以 0.5 mM IPTG 誘導六小時；3：BL21 (DE3) [pGEX-5X-1-Asr] 未加 IPTG 培養六小時；4：BL21 (DE3) [pGEX-5X-1-Asr] 以 0.5 mM IPTG 誘導六小時；5：BL21 (DE3) [pGEX-5X-1-Asr] 以 0.5 mM IPTG 誘導六小時後，經超音波震盪所離心的沉澱物；6：BL21 (DE3) [pGEX-5X-1-Asr] 以 0.5 mM IPTG 誘導六小時，經超音波震盪並離心後的上清液；7：經 GST 管柱純化後的重組蛋白 Asr。

(A)



(B)



圖十四.分析 *rstA* 的基因缺損對於 *feo* 啟動子活性的影響。(A) 取二十分之一隔夜培養的菌液加至 4 毫升的 M9 培養液中，再分別未添加、加入 40  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> 或 0.2 mM 2,2-dipyridyl 後，於 37°C 培養至 OD<sub>600</sub>=0.6，以 Miller 方式偵測 *feo* 啟動子的活性表現。(B) 在野生株及 *rstA* 缺損株中，轉殖 pRK415 或 pHY112，於 37°C 培養至 OD<sub>600</sub>=0.6，依據 Miller 的方法操作，偵測 *feo* 啟動子的活性表現。pHY112 (containing putative *rstA* promoter region, *rstA*, putative *rstB* promoter region, and *rstB*)



***K. pneumoniae* CG43S3**


GTTAGGGCAGCATAGCGGATTTAACGCTGTTTAA<sup>-35</sup>AAAGAGTAA<sup>-10</sup>TGGCGGGT  
AAAATAAGTGCGGTGTATGTTACTTCTTTACTGATGTGCAATAGAC-ATG

***E. coli* K-12 MG1655**

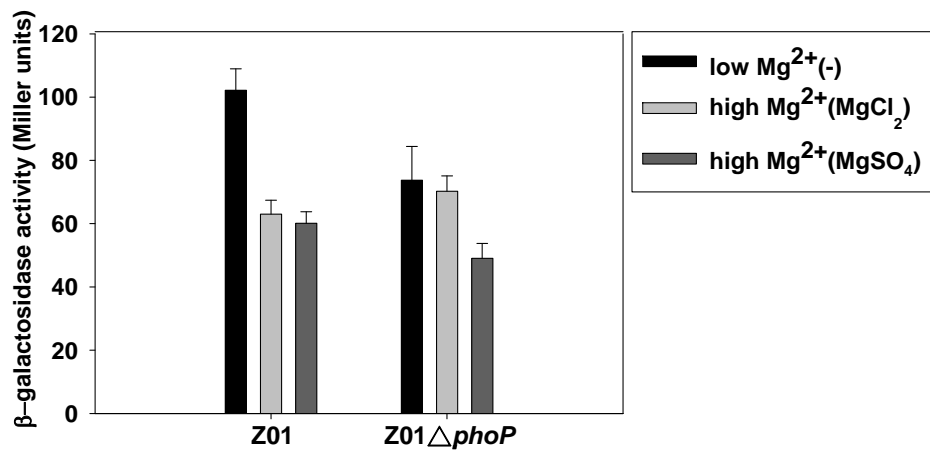
GTCGGGAAAAGTGAATCAGCCCGGCGATATAATAATTTTTCGTTTTGCTAAA<sup>-35</sup>  
ACACCAATCAACAGCACTACCAGCGCACCGAGCGCGGCTTTGATTACCAGCC<sup>-10</sup>  
CCATCTTTTACCTTAACACTTCCATAACAAGTCATCAGTAGAATACCTGATGAA  
AACTTGTTTAA<sup>-35</sup>GAAACGATTGATAGTAAGTAAAAACAGCGCG-ATG

***S. Typhimurium* LT2**

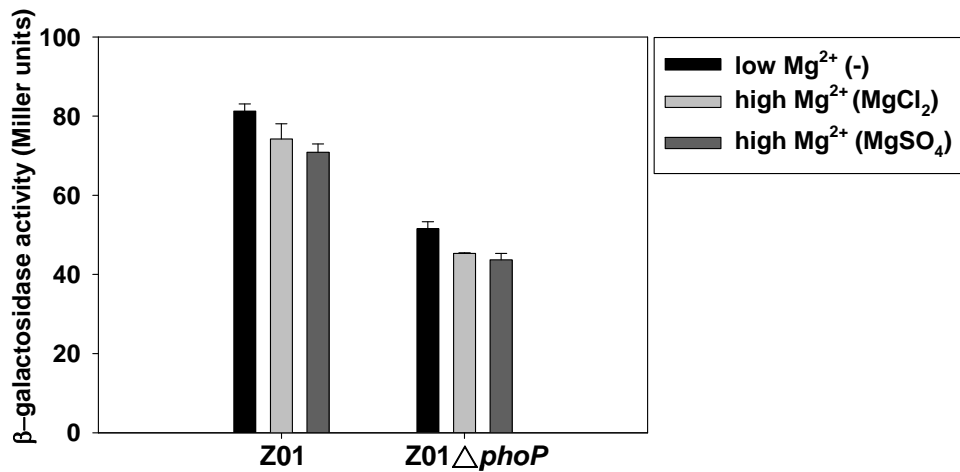
ACGTTGGAAACAGAGGAATTAATCCGGCGATATAATAATTTTTGTTTTGACAG<sup>-35</sup>  
CAGACCAATCAATACGACGACCAGCGCCCCCAGGGCAGCTTTAATCACGAGTC<sup>-10</sup>  
CCATACCTTGCCTTAACAATGCTAATAACAACAGCATGTAGCATAACGGAACCG  
CTCTCGTTTAA<sup>-35</sup>GAAAA<sup>-10</sup>GATTTATG-53bp-ATG

 **PhoP consensus sequence (T/G)GTTA-nnnnn-(T/G)GTTA**  
..... **RstA consensus sequence TACA-nnnnn-TACA**

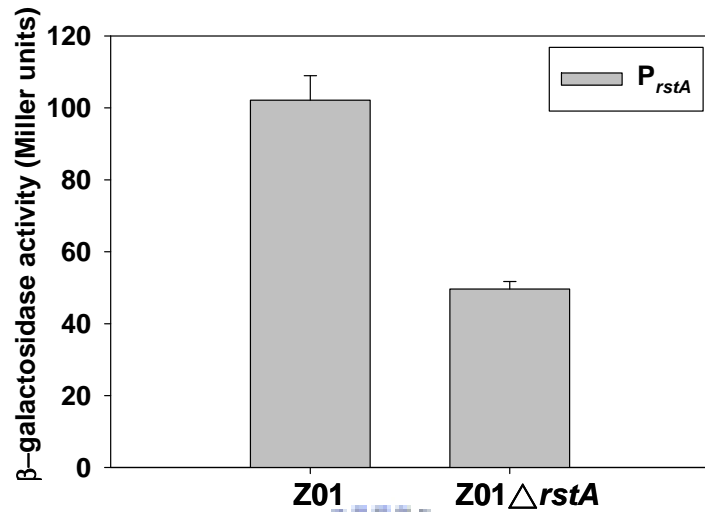
圖十五. *rstA* 啟動子區域序列分析。克雷白氏肺炎桿菌、大腸桿菌、以及沙門氏菌的 *rstA* 啟動子區域，以方框標示 PhoP 辨認位置 (25)，以虛線標示 RstA 辨認序列 (29)。



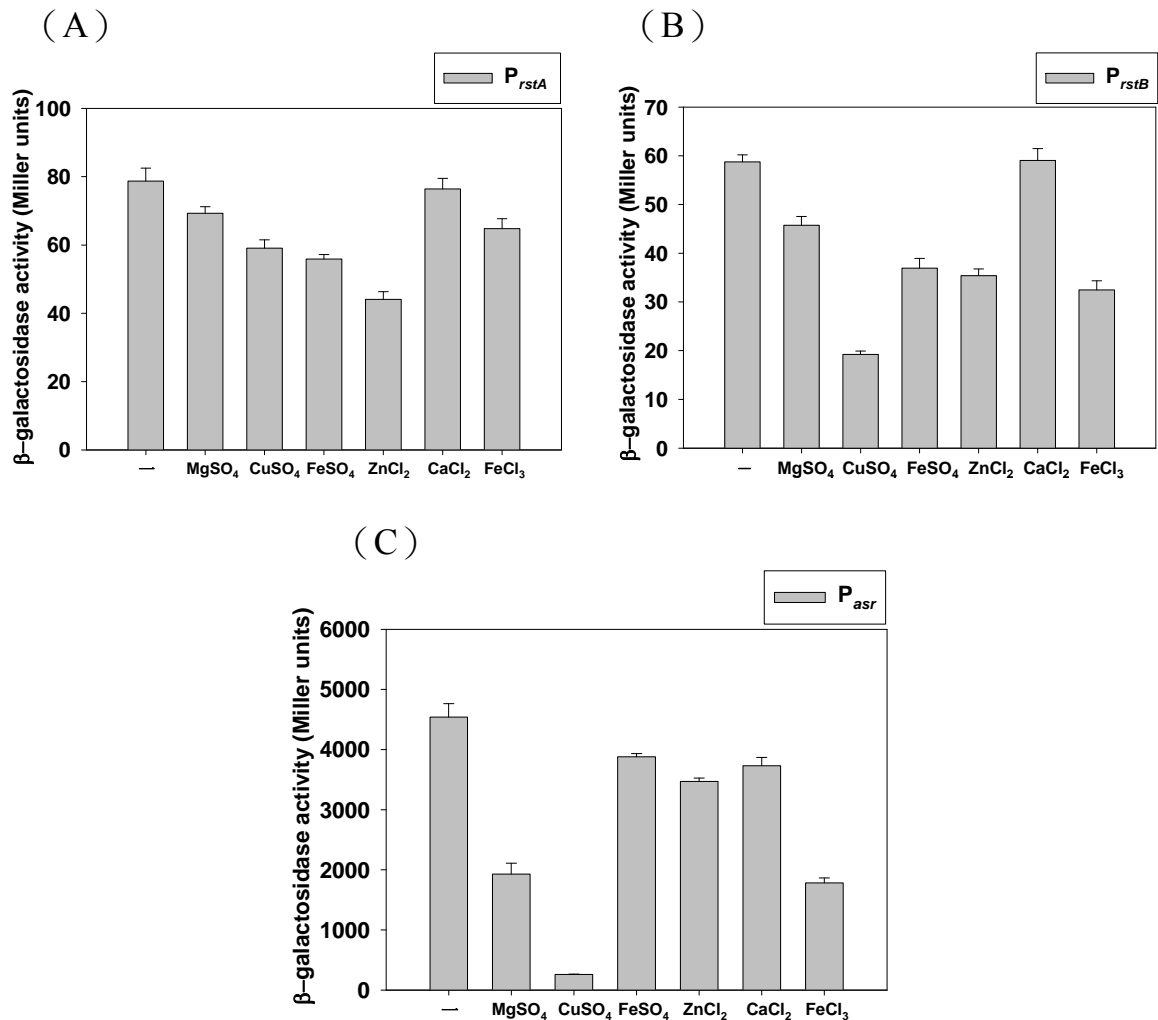
圖十六. **PhoP** 對於 *rstA* 啟動子活性的分析。取二十分之一隔夜培養的菌液加至 4 毫升新鮮的 LB 培養液中，分別未添加或加入 30 mM 氯化鎂或硫酸鎂，37°C 培養至 OD<sub>600</sub>=0.6，依據 Miller 的方法操作，偵測 *rstA* 啟動子的活性表現。



圖十七. **PhoP** 對於 *rstB* 啟動子活性的分析。取二十分之一隔夜培養的菌液加至 4 毫升的 LPM 培養液中，分別未添加或加入 30 mM 氯化鎂或硫酸鎂，37 °C 培養至 OD<sub>600</sub>=0.6，依據 Miller 的方法操作，偵測 *rstB* 啟動子的活性表現。



圖十八. RstA 對於 *rstA* 啟動子活性的分析。取三十分之一隔夜培養的菌液加至 4 毫升的 LB 培養液中，37°C 培養至  $OD_{600}=0.6$ ，依據 Miller 的方法操作，偵測 *rstA* 啟動子的活性表現。

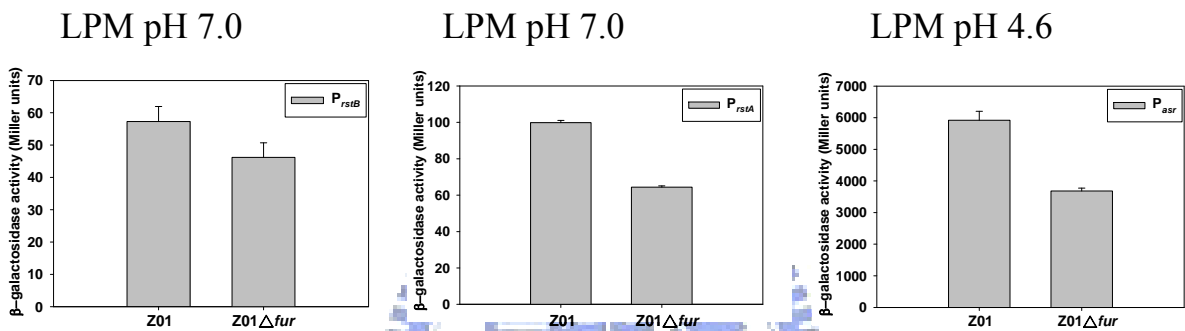


圖十九.不同金屬離子對於 *rstA* (A)、*rstB* (B)、*asr* (C) 啟動子活性的影響。(A) (B) 取二十分之一隔夜培養的菌液加至 4 毫升 pH 7.0 LPM 中；(C) 取二十分之一隔夜培養的菌液加至 4 毫升的 LPM pH 4.6 中，再加入不同離子，37°C 培養，待 (A) (B) 長至  $OD_{600}=0.6$ ，待 (C) 長至  $OD_{600}=0.5$ ，分別測 *rstA*、*rstB*、*asr* 啟動子的活性表現。加入的金屬離子分別為 1 mM  $CaCl_2$ 、1 mM  $CuSO_4$ 、30 mM  $MgCl_2$ 、1 mM  $ZnCl_2$ 、1 mM  $FeCl_3$ 、30 mM  $MgSO_4$ 、1 mM  $FeSO_4$ 。

(A)

-87	cggg	<u>gatatc</u>	:	<u>gataac</u>	:	<u>attgact</u>	cccc	-60	<i>rstB</i>
-8	tgtt	<u>gataat</u>	:	<u>gggaat</u>	:	<u>ctttatc</u>	gaca	+19	<i>iucA</i>
-82	aaac	<u>acaaat</u>	:	<u>gataat</u>	:	<u>cattatc</u>	atct	-55	<i>iroB</i>
-138	tatt	<u>gatgat</u>	:	<u>aaaaac</u>	:	<u>cattctc</u>	atta	-111	<i>feoA</i>
-89	gttc	<u>tataat</u>	:	<u>gagacg</u>	:	<u>cattacg</u>	tcgg	-62	<i>fur</i>
	.atc	GATAAT	:	GATAAT	:	CATTATC	tac.		Fur Box

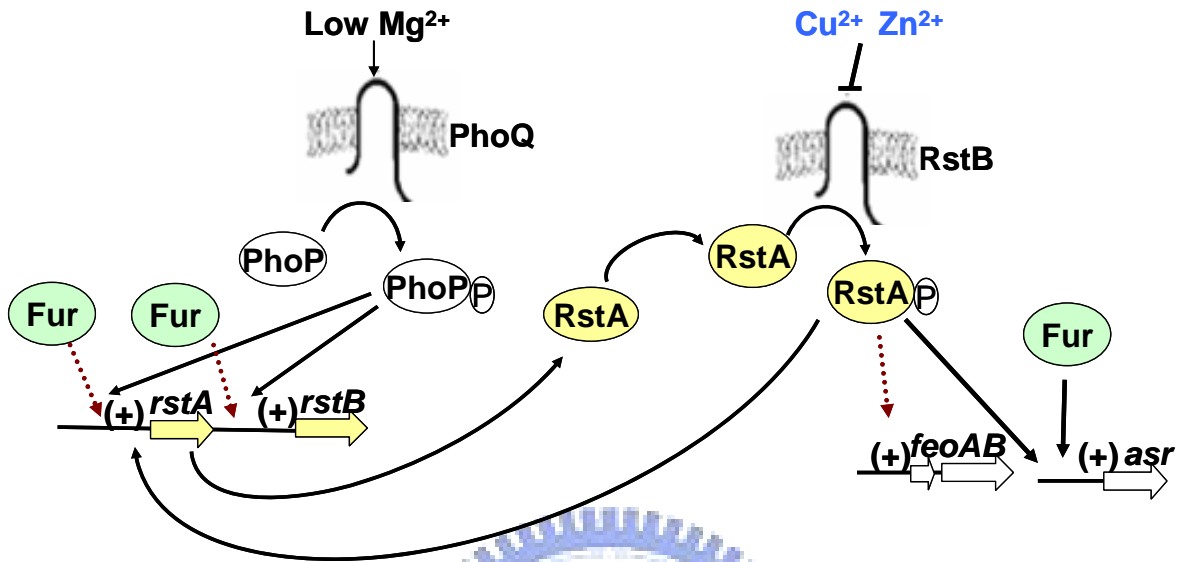
(B)



圖二十. 分析 *fur* 的基因缺損對 *rstB*、*rstA*、*asr* 啟動子活性表現的影響。

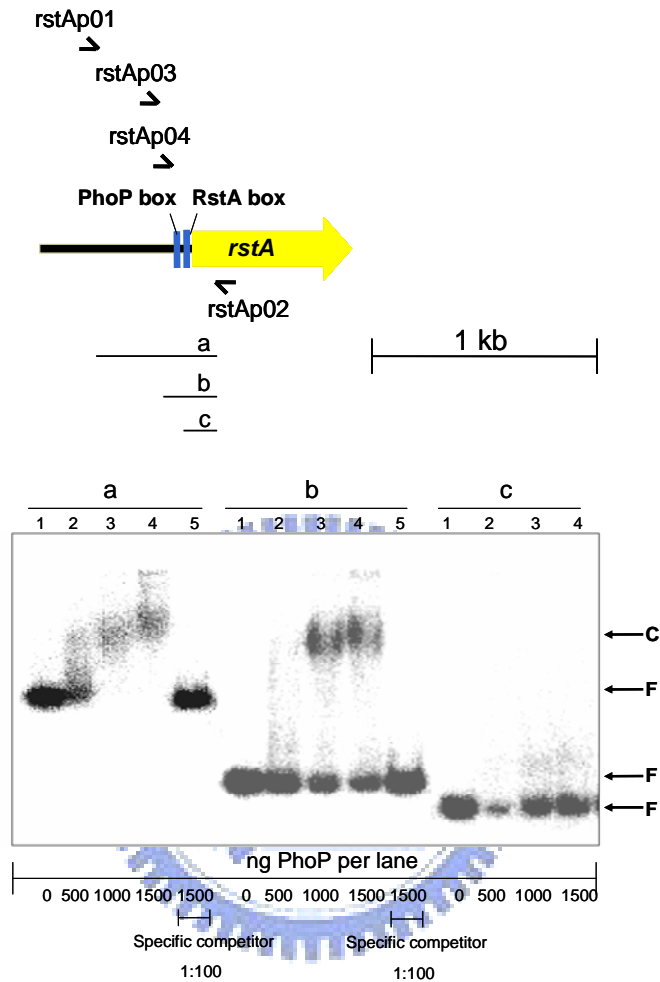
(A) 比對 *rstB*、*iucA*、*iroB*、*feoA*、*fur* 的 Fur 鍵結辨認序列。以劃底線方式標示和報導 Fur 鍵結辨認序列相同之處 (4)。(B) 取二十分之一隔夜培養的菌液加至 4 毫升 LPM 培養液中，待菌長至  $OD_{600}=0.6$ ，依據 Miller 的方法操作，分別測 *rstB*、*rstA*、*asr* 啟動子的活性表現。

附錄一



克雷白氏肺炎桿菌 RstA/RstB 調控示意圖。實線部分為實驗結果差異性較顯著，而虛線的部份則需要進一步實驗證明的可能調控關係。

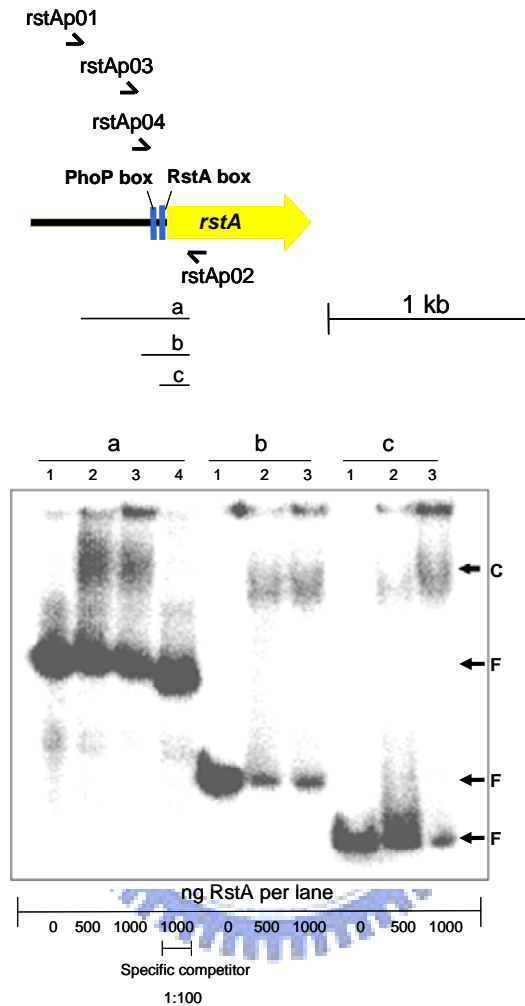
## 附錄二



藉由 EMSA 分析 PhoP 對於  $P_{rstA}$  的鍵結能力。Lane 1, 2, 3, 4, 5 分別代表加入 0, 500, 1000, 1500, 1500 ng 純化之 His-PhoP 蛋白質，所用之 *rstA* 啟動子區域如上圖所標示，並在 lane 5 中加入過量之未以放射線標定之核酸序列。DNA 與蛋白質形成複合體標示為 C，未標定探針為 F。

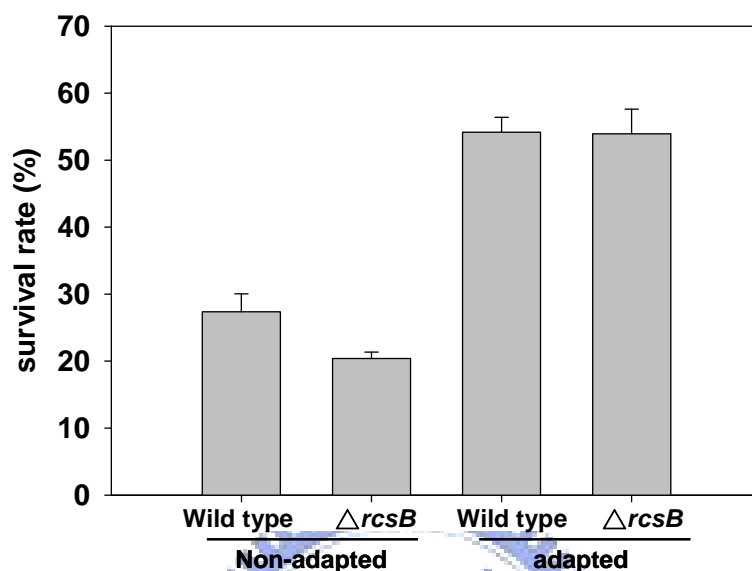


### 附錄三



藉由 EMSA 分析 RstA 對於  $P_{rstA}$  的鍵結能力。Lane 1, 2, 3, 4 分別代表加入 0, 500, 1000, 1000 ng 純化之 His-RstA 蛋白質，所用之 *rstA* 啟動子區域如上圖所標示，並在 lane 4 中加入過量之未以放射線標定之核酸序列。DNA 與蛋白質形成複合體標示為 C，未標定探針為 F。

#### 附錄四



*rcsB* 的基因缺損在酸逆境下的存活率分析。取二十分之一隔夜培養的菌液加入 pH 7.0 LPM 培養液中，待菌長至  $OD_{600}=0.6$  時，進行第一次塗盤數菌，並且將菌液分兩組進行酸逆境存活率分析，第一組無弱酸適應：將菌培養於 pH 3.0 LPM 培養液兩小時後，以塗盤方式數菌，存活率計算方式為隔夜培養後，經酸逆境生成的落菌數除以初始塗盤菌數為存活率；第二組為有先弱酸適應：將細菌放入 pH 4.6 LPM 培養液兩小時，再將細菌於 pH 3.0 LPM 培養液培養兩小時後，塗盤計數，存活率計算方式為酸逆境後的菌落數除以初始塗盤菌數為存活率。