

國立交通大學生化工程研究所

碩士論文

克雷白氏肺炎桿菌 CG43 對多黏菌素的抗性調控

分析

Regulation of polymyxin resistance in

***Klebsiella pneumoniae* CG43**



Student : Yi-Fong Chen

指導教授：彭慧玲 博士

Advisor : Hwei-Ling Peng, Ph.D

中華民國九十八年七月

July, 2009

中文摘要

已知，由七個基因所組成的 *pmr* 操縱子和 *ugd* 所轉譯的蛋白共同參與 4-aminoarabinose 的合成，進而修飾脂多醣體的磷酸根以降低其陰電性，此修飾行為能保護細菌免受於陽離子性抗生素多黏菌素的攻擊。比較克雷白氏肺炎桿菌、沙門氏菌、大腸桿菌以及鼠疫桿菌的 *pmr* 操縱子的上游序列，只在克雷白氏菌及鼠疫桿菌的相對位置發現 PhoP 和 PmrA 的結合位；不同於鼠疫桿菌，克雷白氏菌還擁有 *pmrD* 同源基因。首先，我們證實在添加 2 units/ml 多黏菌素的培養環境下，*pmrH*、*pmrF*、或 *ugd* 基因的缺損，會使克雷白氏菌存活率下降；而 PhoP、PmrA 或 PmrD 的基因缺損時，菌株對多黏菌素的抗性也會降低。進一步以 LacZ 為報導子分析 P_{pmrH} 的活性，結果顯示在 *phoP* 或 *pmrA* 突變株中其活性均會降低。然而，PhoP、PmrA 或 RcsB 的基因缺損，並不影響 *ugd* 的啟動子 P_{ugd-1} 的活性。同時，我們利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應證實 *ugd* 和上游相鄰的 *manC*、*manB* 基因屬同一操縱子，暗示另一 *ugd* 啟動子的存在，我們命名為 P_{ugd-2} 。雖然 P_{ugd-2} 的活性在 *rscB* 突變株中有明顯下降，但是 *rscB* 基因的缺損並不影響菌株對多黏菌素的抗性。最後，細胞內存活率測試顯示 *pmrF*、*phoP* 或 *pmrA* 的基因缺損不利克雷白氏菌在已分化的 THP-1 或 RAW264.7 細胞內的存活。

Abstract

It has been demonstrated that the seven-gene *pmr* operon and *ugd* respectively encode the proteins for the synthesis of 4-aminoarabinose to modify the phosphate residues of lipopolysaccharide (LPS). The decrease of the net negative charge by the LPS modification allows protection of the bacteria from the attack of the cationic antimicrobial peptide polymyxin B. In comparison of the *pmr* upstream sequences of *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Yersinia pestis*, the putative PhoP and PmrA binding boxes were identified in the counterpart of *K. pneumoniae* and *Y. pestis*. Different from *Y. pestis*, the *pmrD* homologue was only present in the genome of *K. pneumoniae*. Deletion of either *pmrH*, *pmrF* or *ugd* reduced the resistance to 2 units/ml polymyxin B. The deletion mutants of *phoP*, *pmrA*, or *pmrD* also appeared to decrease their resistance to polymyxin B. Promoter activity measurement using LacZ as reporter revealed a reduction of P_{pmrH} activity in *phoP* or *pmrA* mutant. However, deletion of *phoP*, *pmrA* or *rcsB* had no apparent effect on the expression of P_{ugd-1} indicating a different regulation of polymyxin B resistance in *K. pneumoniae* from that in *S. enteric*. RT-PCR analysis demonstrated that the *ugd* with the upstream *manC* and *manB* are organized as an operon indicating the presence of another promoter of *ugd*, namely P_{ugd-2} . The activity of P_{ugd-2} reduced in the *rcsB* mutant. However, the deletion of *rcsB* had no apparent effect on the polymyxin B resistance. Finally,

deletion of *pmrF*, *phoP* or *pmrA* was found to reduce the bacterial survival in the cells of either THP-1 or RAW264.7.



致謝

2007年夏天的8月27日我踏進了這裡，2009年同樣是夏天的7月24日我要從這裡離開。兩年的碩士生涯將告一段落，有著不捨和一份難以割捨的情懷，感謝一直陪伴和扶持的朋友，因為你們我的生活才如此精彩。

這一路上總會遇到很多的挫折和困難，但也總會遇到很多很多的貴人，很感謝在我很無助的時候引領我進門的指導教授，彭慧玲老師。她用心和認真的教導，讓我從一個甚麼都不懂得門外漢漸漸地可以對自己的研究侃侃而談，從一個沒甚麼信心的人漸漸變得有自信，從一個只會接受的人漸漸變成也有給的能力；思考和解決問題是我從老師身上獲得的最大收穫，她總說碩士班學生最重要的不是實驗技巧，而是邏輯思維，這點，我想我在口試的那天領會了，很感謝彭老師一切的付出。

感謝新耀學長，對一個當初完全對分生技術沒甚麼概念的我耐心指導，讓我的實驗可以進行的這麼順利；平易近人的盈蓉學姐給予我實驗和觀念上許多建議和幫助；風趣的健誠學長總是帶來許多歡樂；美麗氣質的靜柔和雅淑學姐讓我覺得實驗室有溫暖；執著的秉熹學長是我討論的好對象；熱心的志桓幫我解決不少電腦上的問題；溫柔的純珊是我的好鄰居；一路相伴的雅雯總是情義相挺；可愛的佩君和家華學妹為實驗室增添許多活力；沉默是金的承哲和陽光的哲充總是替實驗室默默的付出；開朗的朝彥和信文讓我的實

驗生活不乏味；豪君、歲云和品瑄為實驗室注入新血。感謝這些和我一起打拚、一起努力、一起歡笑、一起瘋狂、一起發牢騷、一起體驗生活之美的你們，為我人生中寫下美好的一頁，我會珍藏在心，因為這些都是一次次美麗的感動。

另外，也感謝清華大學的張晃猶老師及張老師實驗室的夥伴，在口試前百忙抽空聽我預報，給予我許多指點和建議，讓我在口試中遊刃有餘。

感謝中興大學鄧文玲老師，在口試中點出我研究的盲點和不曾思考過的問題，以及非常用心的修改指正我的碩士論文。

感謝交通大學楊昀良老師，給予我研究上新穎的討論觀點以及導正論文中的錯誤。

非常感謝我的家人，我的父母、哥哥、和姐姐，一路上默默的付出和相挺，我想這是我得以完成學業的最大動力，有你們一起見證我的光榮時刻真的很感動，感恩！

要感謝的人實在太多，族繁不及備載，但最後，我要感謝我的大學同學碧瑩，在我最低潮的時候一直鼓勵我，因為有你，我的碩士生涯才得以這麼順遂，感謝！

結束，不是一個解脫，而是另一個責任的開始，我想我將要接下另一個新的責任；有人問我，兩年來你獲得什麼，一時間不知如何回答，但在即將

離開的這刻我明白了，以前，總是老師、學長給我什麼就接受什麼，一直以來就只是扮演著被給予的角色，但是，現在我發現我也有給的能力了，就在離開的這刻，我想這就是彭老師所謂的帶著自信離開吧！最後，由衷的祝福大家在未來的日子裡都能順心，百尺竿頭、更進一步！

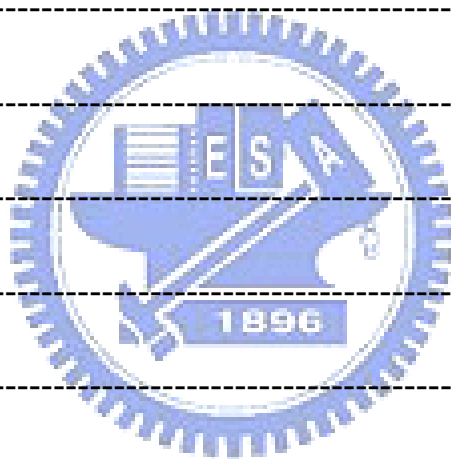
顛峰

民國九十八年七月十八號筆於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	ii
致謝	iv
目錄	vii
圖表目錄	viii
縮寫表	1
前言	2
實驗材料與方法	10
結果	18
討論	26
參考文獻	32
圖表	42
附錄	64



圖表目錄

表一、本實驗所使用的菌株基因型-----	42
表二、本實驗所使用的質體構築表-----	44
表三、本實驗所使用的引子序列-----	46
圖一、不同菌種間 <i>pmr</i> 操縱子上游序列比較分析-----	47
圖二、PCR 分析確認 <i>pmrH</i> 突變株-----	48
圖三、PCR 分析確認 <i>pmrF</i> 突變株-----	49
圖四、 <i>K. pneumoniae</i> CG43S3、 <i>pmrH</i> 和 <i>pmrF</i> 突變株生長曲線-----	50
圖五、 <i>pmrH</i> 、 <i>pmrF</i> 和 <i>ugd</i> 突變株及互補株對多黏菌素的抗性分析-----	51
圖六、 <i>pmrA</i> 、 <i>phoP</i> 和 <i>pmrD</i> 突變株及互補株對多黏菌素的抗性分析-----	53
圖七、 <i>pmrA/phoP</i> 基因缺損的 <i>pmrA</i> 或 <i>phoP</i> 互補株對多黏菌素的抗性分析-----	55
圖八、 <i>pmr</i> 操縱子的基因組成示意圖和 $P_{pmrH}::lacZ$ 的活性測試-----	56
圖九、 <i>pmrF</i> 、 <i>pmrA</i> 和 <i>phoP</i> 突變株及互補株在 THP-1 的存活率測試-----	57
圖十、 <i>pmrF</i> 、 <i>pmrA</i> 和 <i>phoP</i> 突變株在 RAW264.7 的存活率測試-----	59
圖十一、 P_{ugd-1} 的活性測試-----	60
圖十二、RT-PCR 分析確認 <i>manC-manB-ugd</i> 操縱子和 P_{ugd-2} 的活性測試-----	61
圖十三、 <i>rscB</i> 突變株對多黏菌素的抗性分析-----	63

縮寫表

CFU	colony forming unit
LB	Luria-Bertani medium
PCR	polymerase chain reaction
bp	base pair
Pmr	polymyxin resistance
LPS	lipopolysaccharide
CPS	capsular polysaccharide
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
L-Ara4N	4-amino-4-deoxy-L-arabinose
pEtN	phosphoethanolamine
ESBL	extended spectrum β -lactamase
ONPG	<i>o</i> -nitrophenyl- β -galactopyranoside
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
Sm	streptomycin
Ap	ampicillin
Km	kanamycin
Tc	tetracycline
MOI	multiplicity of infection
FCL	feedforward connector loop

前言

克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 是一屬腸內菌科 (*Enterobacteriaceae*) 的革蘭氏陰性菌，也是一伺機性病原菌，它造成的院內感染僅次於大腸桿菌。在免疫力缺失的宿主經常造成嚴重的病灶，例如肺炎 (pneumonia)、敗血症 (septicemia)、菌血症 (bacteremia)、腦膜炎 (meningitis)、尿道和呼吸道感染(43, 47)。近來發現，在台灣的克雷白氏肺炎桿菌和糖尿病病人體內好發的肝膿瘍 (liver abscess) 有著高度相關性(11)。

目前，有五種克雷白氏肺炎桿菌的毒性因子已經被確定，包括莢膜多醣體 (capsule polysaccharide)、脂多醣體 (lipopolysaccharide)、黏附蛋白 (adhesin)、螯鐵因子 (siderophore) 和血清抵抗因子 (serum resistance factor)。另外，常見於大腸桿菌和克雷白氏肺炎桿菌中的廣泛抗藥性乙內醯氨酶 (extended spectrum β -lactamase; ESBL) 也可能和克雷白氏肺炎桿菌的致病性相關(32)；可產生廣泛抗藥性的乙內醯氨酶的克雷白氏肺炎桿菌 (ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*) 的發現率有越來越高的趨勢，因而增加了臨床上治療的困難度(27)。

脂多醣體是革蘭氏陰性菌外膜的主要結構之一，覆蓋細菌表面超過百分之九十的面積，為細菌的主要屏障(1)。此高分子量的脂多醣體，主要由三個

部分所組成、包括最外層的 O 抗原 (O-antigen 或稱 O-polysaccharide)、連接 O 抗原的核心部分 (core region) , 和最內層具有高親脂性和內毒素毒性的脂質 A (lipid A) (13, 53)。脂多醣體通常藉由脂質 A 鍵結在菌體的外膜上 (3), 脂質 A 是由帶有兩個磷酸根的雙糖 β -D-GlcN-(1-6)- α -D-GlcN 所組成 (13), 為脂多醣體主要帶負電荷的部位, 也是陽離子性抗生素 (cationic antibiotic) 作用的主要部位。

多黏菌素 (Polymyxin) 類的抗生素, 在臨床上被報導能有效治療克雷白氏肺炎桿菌的感染(61)。多黏菌素是由多黏芽孢桿菌 (*Bacillus polymyxa*) 所分離出來的一種脂縮氨酸 (lipopeptide) 類抗生素, 由一聚陽離子縮氨酸環 (polycationic peptide ring) 和尾端帶有脂肪酸的三縮氨酸支鏈 (tripeptide side chain) 所組成(24)。臨床上使用的多黏菌素主要有兩種: Polymyxin B 和 Polymyxin E (或稱 colistin), 兩者差別在於聚陽離子縮氨酸環上的一個胺基酸不同(33); 前者主要是以硫酸鹽類 (sulphate salt) 劑型方式給藥, 而後者則為多黏菌素甲磺酸鹽的鈉鹽 (sodium salt of colistin methanesulphonate) 型式(6)。

Polymyxin B 由至少四種成分相近的物質組成的混合物, 這四種組成分別為多黏菌素 B1 到 B4, 而以 B1 和 B2 為主要成分, 其間的差異在於脂肪酸的構造不同(29, 42)。Polymyxin B 被報導對於具有多重抗藥性的腸道和非發

酵性 (non-fermentative) 的革蘭氏陰性菌特別有效(14, 25)。但由於 Polymyxin B 會對人體造成毒性副作用，例如：腎毒性 (nephrotoxicity) 和神經毒性 (neurotoxicity) (16)，因此在臨床上已經停用五十幾年。目前對於它的藥物動力學 (pharmacokinetics) 和藥物效力學 (pharmacodynamics) 的知識很有限，由於近年來多重抗藥性 (multidrug-resistance) 的革蘭氏陰性菌所引起的院內感染有增加的趨勢，因此 Polymyxin B 又被重新評估使用(33)。

Polymyxin B 是一典型的 antimicrobial peptides (AMPs)，具有兩性離子和帶正電的特性。Polymyxin B 能利用帶正電荷的特性和革蘭氏陰性菌體表面帶負電荷的脂多醣體結合，藉由 self-promoted uptake 穿過細菌外膜進到 periplasmic space，並和 cytoplasmic membrane 作用。有關於 Polymyxin B 實際對於細菌毒殺作用的機轉目前並不清楚，有兩種推測，一為 Polymyxin B 進到內膜後能在其上造成孔洞，使胞內物質流失而達到殺菌的效果；另一為 Polymyxin B 能造成細菌的內膜和外膜產生分子接觸作用 (molecular contact) 使得膜的脂質構造改變，最終導致物質流失和滲透壓不穩而死亡(2, 61)。

目前已知，細菌會透過對脂質 A 的修飾來降低脂多醣體的陰電性，減少與 Polymyxin B 類的陽離子性抗生素的結合而產生抗藥性。例如，沙門氏傷寒桿菌 (*Salmonella typhimurium*)，會在脂質 A 的磷酸根加上 4-amino-4-

deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) 和 phosphoethanolamine (pEtN) 來降低脂多醣體的陰電性(40, 63)。而此修飾過程是由 PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 兩套雙分子系統 (two-component system) 所調控(19, 41)。

雙分子系統為細菌感應外界環境變化的調控系統，能幫助細菌抵抗外界環境的壓力、調節毒性、代謝能量和取得養分(10, 15, 46, 48, 52)。雙分子系統由組胺酸激酶 (sensor histidine kinase) 負責訊息的感應和反應調控子 (response regulator) 負責調控基因的表現。感應組胺酸激酶位於細胞膜上，具有組胺酸磷酸轉移酶 (histidine phosphotransferase) 區域(26)，在感應到環境刺激時，此區域的組胺酸殘基會經由自體磷酸化作用 (autophosphorylation) 加上一磷酸根，此磷酸根接著會被傳遞給位於細胞質上的反應調控子上的天門冬胺酸 (aspartic acid) 殘基而活化反應調控子。經活化的反應調控子會因為蛋白質結構的改變，再去活化或抑制下游基因的表現(7)。目前已經有超過 180 種的雙分子系統被確定(57)，這些不同的雙分子系統間也會有交互作用，例如沙門氏菌中的雙分子系統 PhoP/PhoQ 會影響 PmrA/PmrB 的表現。

PhoP/PhoQ 為一套和毒性相關的雙分子系統 (PhoQ 為感應子而 PhoP 為反應調控子)，最早在沙門氏菌被確認和調控非專一性酸性磷酸酶 (nonspecific acid phosphatase) 的表現有關，因此被命名為 *pho*。PhoP/PhoQ

是第一個在細菌中被發現負責感應環境中鎂離子濃度的調控系統：微莫耳濃度的鎂離子可以活化這套系統及下游基因的表現，然而毫莫耳濃度的鎂離子則會抑制它的表現；錳和鈣離子也有類似的效果。PhoP/PhoQ 能感應二價陽離子是由於 PhoQ 的 periplasmic domain 擁有許多酸性胺基酸，被認為可能和感應二價陽離子有關(17, 19, 30, 50)。弱酸環境亦可活化受到 PhoP/PhoQ 系統調控的下游基因表現，但此活化過程不經由 PhoQ 感應調控(5, 17)。PhoP/PhoQ 是一套可自我調控的雙分子系統，所活化的下游基因包括 *pmrD*、*mgtA* 以及 *pagP*。最近的報導顯示沙門氏菌的 PhoP/PhoQ 能藉由調控 PmrD 的表現來影響 PmrA/PmrB 的活性表現(19, 21, 51)。

PmrA/PmrB 可使細菌躲避巨噬細胞的毒殺、抵抗高濃度的鐵離子及抗生素 Polymyxin B，因此被命名為 *pmr* (polymyxin resistance)；PmrA 是這套系統中的反應調控子而 PmrB 是感應子(9, 22, 62)。已知沙門氏桿菌的 PmrA/PmrB 可受兩個訊號刺激而活化：(i) 低濃度的鎂離子活化 PhoP/PhoQ，而被 PhoP 活化而表現的 PmrD 可和磷酸化的 PmrA 結合，使 PmrA 不被 PmrB 去磷酸化而使受到 PmrA 調控的基因得以持續活化表現（附錄四，Luo and Cheng, unpublished results）。(ii) PmrB 感應高濃度的鐵離子和弱酸性 (pH 5) 訊號的變化後，能將磷酸根傳給 PmrA，再由磷酸化的 PmrA 活化下游基因的表現(45, 59)。PmrA/PmrB 也是一套自我調控的雙分子

系統，所調控的下游基因包括 *pmr*（也稱 *arn* 或 *pbg*）操縱子（operon）、*ugd* 以及 *pmrCAB*，其中 *pmr* 操縱子和 *ugd* 的表現已經被報導和 Polymyxin B 的抗性有關(54, 62)。*pmr* 操縱子是由七個基因所組成並且一起轉錄，命名為 *pmrHFIJKLM*。*pmrHFIJKLM* 主要產物為 L-Ara4N，其合成途徑是由一開始的 PmrI 將 UDP-glucuronic acid 進行氧化脫羧反應而（oxidative decarboxylation）產生 UDP-4-ketopentose，此物質接著會被 PmrH 進行轉胺作用（transamination）加上一麩胺酸（glutamic acid）而形成 UDP-β-L-Ara4N；PmrF 接著會將此物質運送到內膜和十一異戊二烯磷酸根（undecaprenyl phosphate）結合，此產物很快就會被 PmrJ 去甲基化（deformylation），再藉由一未知機轉送到內膜的外表面（outer surface of the plasma membrane），最後由 PmrK 將最終產物送到脂質 A 進行修飾。PmrL 和 PmrM 的功能目前並不清楚，但是報導指出缺少這兩個酵素會使得細菌對 Polymyxin B 的抗性下降許多(8, 60)。

不同細菌的 PmrA/PmrB 雙分子系統對於下游基因 *pmrHFIJKLM* 的調控方式也不一樣，已知有三個類型：（i）在沙門氏菌中，*pmrHFIJKLM* 除了可受 PmrA/PmrB 的直接調控外，也可經由 PmrD 間接受到 PhoP/PhoQ 調控，因此低濃度鎂離子和高濃度鐵離子的環境均可活化 *pmrHFIJKLM*。（ii）大腸桿菌的 PmrD 並不會跟 PmrA/PmrB 共同作用，因此其 *pmrHFIJKLM* 僅可受到

PmrA/PmrB 的直接調控，而不受 PhoP/PhoQ 所調控(56)。(iii) 在葉赫氏鼠疫桿菌 (*Yersinia pestis*) 中，雖然缺少 PmrD，但 PhoP/PhoQ 和 PmrA/PmrB 均可直接調控 *pmrHFIJKLM* (57)。

Ugd (UDP-glucose dehydrogenase) 為尿嘧啶雙磷酸葡萄糖去氫酵素，其主要功能可催化合成 colanic acid 和 L-Ara4N 的前驅物 UDP-glucuronic acid (UDP-GlcA)，colanic acid 是組成莢膜多醣體的重要成分，莢膜多醣體在克雷白氏菌中已被報導和多黏菌素的抗性有關，主要是干擾抗生素和外膜上的目標位置作用而達到提高耐受性的目的(47)。在大腸桿菌中，*ugd* 是位於 *cps* 基因組上，這個基因組是由超過 20 個基因所組成，主要功能也是合成莢膜多醣體所需的 colanic acid，研究中指出，*ugd* 會受這基因組上的 *wzc* 基因產物磷酸化，當 *wzc* 不活化時會使得 colanic acid 的產量減少(18, 23, 38, 39)。在沙門氏菌中，*ugd* 被發現和多黏菌素的抗性相關，分別受到 PhoP/PhoQ、PmrA/PmrB 和 RcsC/YojN/RcsB 這三套雙分子系統的調控；在低鎂離子環境下，能藉由 PhoP 活化其下游基因 PmrD 和 PmrA 作用後進而去調控 *ugd*，也能在高濃度鐵離子的環境下活化 PmrA 去調控 *ugd*；RcsC/YojN/RcsB 則不和 PhoP/PhoQ 或 PmrA/PmrB 作用而直接調控 *ugd* 的表現(38, 39)。

分析克雷白氏肺炎桿菌 CG43、大腸桿菌、沙門氏傷寒桿菌以及葉赫氏鼠疫桿菌的 *pmrHFIJKLM* 啟動子序列，如圖一所示只有克雷白氏肺炎桿菌

CG43 的 *pmrHFIJKLM* 啟動子同時擁有 PhoP 和 PmrA 兩個調控子的結合位 (binding box)，由於克雷白氏肺炎桿菌中還擁有 PmrD 同源蛋白，因此推測 *pmrHFIJKLM* 的調控方式極有可能為第四種類型，也就是除了 PmrA/PmrB 直接調控和 PhoP/PhoQ 間接調控外，PhoP/PhoQ 亦可以直接調控 *pmrHFIJKLM* 表現。本論文首先欲證明克雷白氏肺炎桿菌中 PmrHFIJKLM 是否和 Polymyxin B 的抗性有關，進一步探討 *pmrHFIJKLM* 和 PmrA/PmrB、PhoP/PhoQ 這兩套雙分子系統的調控關係。另外，由於實驗室先前研究發現在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中 *ugd* 並非像在沙門氏菌一樣受 PmrA/PmrB、PhoP/PhoQ 和 RcsC/YojN/RcsB 這三套雙分子系統的調控；分析 *ugd* 及其上下游的基因組成，如圖十二所示，發現有兩個可能的假定啟動子分別為 P_{ugd-1} 和 P_{ugd-2} ，分析其序列發現 P_{ugd-1} 並未擁有任一 PhoP、PmrA 或 RcsB 結合位， P_{ugd-2} 則擁有一個假設的 RcsB 結合位 (putative RcsB binding box)，因此，為了尋找克雷白氏肺炎桿菌 CG43 *ugd* 的調控子，我們計畫用跳躍子突變 (transposon mutagenesis) 方式篩選調控 *ugd* 的調控子。

實驗材料與方法

質體、菌株和生長條件

本實驗所使用之菌株和質體列於表一和表二。本實驗室所配置的 Luria-Bertani (LB) 培養基及培養液中的 trypton、yeast extract 及 agar 購自 Difco。除了特別指出，菌株都是在 37°C 的環境下於加入適當抗生素的 LB 培養液振盪培養。

重組質體 DNA 的製備

重組質體 DNA 是參考 Molecular cloning 實驗手冊標準步驟製備(28)。聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction ; PCR) 所使用到的引子列於表三。質體 DNA 是用 High-speed plasmid mini kit (Geneaid, Taiwan) 按照說明書使用製備。限制內切酶 (restriction endonucleases) 是購自 New England Biolab (Beverly, MA, USA) 或 MBI (Fermentas, Hanover, MD)，並且根據使用說明書操作使用。

染色體 DNA 的製備

將 *K. pneumoniae* CG43S3 以 LB 培養液培養 16 小時，離心去除上清液，加入 800 μ l lysis solution (200 mM NaCl, 20 mM EDTA, 40 mM Tris-

HCl, 0.2% Triton X-100, 5 mM DTT, 80 μ g lysosome) 後劇烈振盪，並在 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 分鐘以打破菌體，之後在 Proteinase K 濃度為 0.1 mg/ml，溫度 50 $^{\circ}$ C 的水浴槽作用隔夜，此時需密封防止溶液蒸發。之後放置冰上 10 分鐘，加入 250 μ l 飽和食鹽水，輕微搖晃，繼續放置冰上 10 分鐘後，以 16000 \times g 離心 10 分鐘，取 400 μ l 上清液分別加入兩個 1.5 毫升離心管中，每管各加入 1000 μ l 絕對酒精輕輕翻轉 3 次，放置冰上 20 分鐘後，以 16000 \times g 離心 15 分鐘，倒掉上清液，加入 75%酒精，16000 \times g 離心 10 分鐘，在 37 $^{\circ}$ C 烘乾去除多餘水分，在尚未完全乾燥前加入 50 μ l 二次水，放置隔夜後即可使用或繼續放置-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。



建構 *pmrH* 及 *pmrF* 突變株

利用 *pmrH01/pmrH03* 和 *pmrH02/pmrH04* 以及 *pmrF01/pmrF03* 和 *pmrF02/pmrF04* 四對引子從 *K. pneumoniae* CG43S3 以 PCR 的方式分別增殖 *pmrH* 及 *pmrF* 區域上下游兩段大約 1 kb 的片段，接著再分別將兩兩片段結合，接入質體 pKAS46 (suicide vector) (49)，送入大腸桿菌 S17-1 λ *pir* (12) 中。將帶有建構好質體的大腸桿菌作隔夜培養，同時亦將 *K. pneumoniae* CG43S3 隔夜培養，分別取 1 ml 的隔夜培養液於 1 ml 新鮮的 LB 中，在 37 $^{\circ}$ C 培養 1 小時，再分別取 1 ml 的培養液於無菌的 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，將洗淨的克雷白氏肺炎桿菌和帶有質體的大腸桿菌 S17-1λ *pir* 以 1:2 的比例混合，再離心去除上清液，用 80 μl 0.85% NaCl 重新懸浮，再把這 80 μl 的懸浮液小心滴在 LB 培養基上無菌的硝化纖維膜上，將培養基放於 37 °C 培養箱中培養 12-16 小時，之後用滅過菌的夾子將纖維膜夾起放入 LB 培養液中，將菌體振盪下來，吸取 1 ml 離心去除上清液後再用 0.85% NaCl 重新懸浮，吸取 100 μl，經系列稀釋後（1X，1/100X）塗於 M9 培養基中（含 Ap100、Km25、0.2% glucose）。隨機挑選五顆單一菌落，分別培養於 4 ml 的 LB 中 12-16 小時後，吸取 1 ml 的菌液抽取菌體染色體 DNA，其餘的菌液則暫時保存於 4 °C 中。用引子 pmrH01/pmrH02 及 pmrF01/pmrF02 進行 PCR 確認，任選一株質體有成功進入菌體 DNA 的克雷白氏菌，吸取 100 μl 隔夜的菌液接種於 4 ml LB（含有 Sm500）中置於 37°C 振盪培養 8 小時，吸取 100 μl 的菌液，系列稀釋後（1X，1/100X，1/10000X）塗於 LB 培養基（含 Sm500），用牙籤隨機挑選至少 50 個菌落，分別劃於含 Sm500 與 Ap100/Km25 的 LB 培養基上，挑選對 streptomycin 有抗性但對 ampicillin/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

利用引子 pmrAp03/pmrA06、phoP01/phoP02 和 ppmrF01/ppmrF02 從 *K. pneumoniae* CG43S3 以 PCR 的方式分別增殖出包含核糖體結合位 (ribosomal binding site) 的完整 *pmrA*、*phoP* 以及 *pmrF* 基因片段，分別接至 pRK415 質體中，轉型 (transform) 至大腸桿菌 S17-1λ *pir* 菌株，利用接合作用送入突變株。

生長曲線測試

將隔夜培養的菌液加至新鮮含抗生素的 LB 培養液，調整濃度在 OD₆₀₀ 的吸光值約 0.1，並在 37°C 培養箱振盪培養，每隔一小時測量 OD₆₀₀ 的吸光值。



啟動子活性測試

引子 pmrHp01/pmrHp02 從 *K. pneumoniae* 以 PCR 的方式增幅出 *pmr* 操縱子假定啟動子片段，接至帶有 *lacZ* 報導基因的 pLacZ15 (34) 質體上，轉型至大腸桿菌 S17-1λ *pir* 菌株，利用接合作用送入 *K. pneumoniae* CG43S3Z01、Z01Δ*pmrA* 和 Z01Δ*phoP* 菌株中。啟動子活性測試是根據 Miller 的方法(36)。將隔夜培養的菌液加至新鮮含氯黴素 (chloramphenicol) 的 LB 培養液，直至

OD₆₀₀ 的吸光值約 0.4-0.6，取 100 μ l 菌液和 900 μ l 的 Z buffer、17 μ l 0.1% 的 SDS 以及 35 μ l 的氯仿 (chloroform) 混合並且在 30°C 培養 20 分鐘。加入 200 μ l 4 mg/ml 的 *o*-nitrophenyl- β -galactopyranoside (ONPG) 混合均勻，培養在 30°C 直到出現黃色，最後加入 500 μ l 1 M 的 Na₂CO₃ 終止反應，並測量 OD₄₂₀ 的吸光值。

多黏菌素抗性測試

將隔夜培養的菌液取 1 ml 至無菌的 1.5 毫升離心管，以 21130 \times g 轉速離心 5 分鐘，去除上清液，用 0.85% NaCl 重新懸浮細胞兩次，以 1:100 的比例加到新鮮不含離子或含 1 mM Fe³⁺ 的 LB 培養液，在 37°C 培養 3-4 小時，OD₆₀₀ 的吸光值約 0.6，用 0.85% NaCl 重新懸浮細胞兩次，再以新鮮的 LB 培養液系列稀釋至 2 \times 10⁴ CFU/ml，取 100 μ l 加到 96 孔微滴定盤。加入等體積配製好不同濃度的多黏菌素，使最後濃度為 2、4 units/ml (1 unit 為 0.1218 g)，在 37°C 振盪培養 1 小時。取 100 μ l 的菌液直接塗於 LB 培養基培養 16 小時，隔天計算菌數。

細胞培養

測試細胞株包含人類單核白血球細胞株 THP-1 和鼠類巨噬細胞 RAW264.7 (交大生科所袁俊傑老師實驗室)。THP-1 培養於 RPMI 1604 含 10% 胎牛血清、2 g/l 碳酸氫鈉 (sodium bicarbonate)、4.5 g/l 葡萄糖、1 mM 丙酮酸鈉 (sodium pyruvate) 以及 1% 盤尼西林/鏈黴素 (penicillin/streptomycin)，而 RAW264.7 則以 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 含 10% 胎牛血清、3.2 g/l 碳酸氫鈉以及 1% 盤尼西林/鏈黴素培養液培養，這兩株細胞株培養於 37°C 含有 5% CO₂ 的培養箱中。為了活化 THP-1 細胞吞噬活性，將 THP-1 細胞株培養於含 3 μM/ml PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) 的 RPMI 1640 培養液中，在 37°C 含有 5% CO₂ 的培養箱中培養 48 小時。



巨噬細胞存活率測試

將已活化的 THP-1 或 RAW264.7 細胞株分別種於 24 孔的培養盤中，培養至約 80% 滿 (2×10^5 的細胞)，用 PBS 洗二次，加入 1 ml 不含血清的培養液，再加入約細胞數 30-40 倍的細菌，在 37°C 含有 5% CO₂ 的培養箱中培養 2 小時，然後以 PBS 洗三次，加入 1 ml 的培養液 (含 100 μg/ml 的

gentamicin) 分別培養 4 和 8 小時，最後加入 0.1% 的 Triton X-100 混合 10 分鐘後，取作用後的混和液作系列稀釋並塗盤以計算菌數。

反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (Reverse-transcription PCR)

將隔夜培養的 *K. pneumoniae* CG43S3 重新培養於含抗生素的新鮮 LB 培養液中，到達 OD₆₀₀ 吸光值約 0.6-0.7，離心去除上清液，用 200 μ l 10 mM 的 Tris 重新懸浮細胞，加入 20 μ l 10 mg/ml 的 lysozyme，在 37°C 下培養半小時。RNA 的抽取是用 High pure RNA isolation kit (Roche) 按照說明書使用製備。測量 RNA 的 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀ 的吸光值並計算濃度，OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀ 的比值要介於 1.6-2.1 之間。取 1 μ g 的 RNA 加入 DNase (Promega) 在 37°C 作用 1 小時，之後再加入 DNase 終止反應溶液在 65°C 作用 15 分鐘。用 23S RNA 引子 PCR 確認 RNA 已經沒有 DNA 的殘留，再將剩餘的 RNA 利用反轉錄酶翻轉成 cDNA，反轉錄聚合酶鏈鎖反應是用 RevertAidTM First Stand cDNA Synthesis kit (Fermentas) 按照說明書操作使用。

轉位子誘導突變篩選測試

將隔夜培養的大腸桿菌 S17-1 λ *pir* [pUT mini-Tn5 *luxCDABE* Km2](58) 及 *K. pneumoniae* CG43S3 [*P_{ugd-2}*]，分別與新鮮 LB 培養液以 1:1 混合，振盪培

養 30 分鐘後，離心去除上清液，以等體積之 0.85% NaCl 洗去 LB 培養液，將質體提供者與接受者以 1 ml : 0.5 ml 的比例混合後，濃縮成 0.1 ml 後，將菌液平鋪在 LB 培養皿上的硝化纖維膜上，靜置 10 小時，取出硝化纖維膜，將膜上細菌懸浮至新鮮 LB 培養液中，以表面塗有 X-gal 並添加抗生素的 LB 培養基篩選出抗 chloramphenicol 與 kanamycin 的 *K. pneumoniae*，挑選 X-gal 呈色反應不同的菌株。

轉位子插入位置分析

為了分析 pUT mini-Tn5 *luxCDABE* Km2 在染色體的插入位置，將製備完成的染色體 DNA 以限制內切酶 *Pst*I 作用隔夜。切碎的染色體基因片段藉連結酶 (ligase) 轉殖到 pUC19，轉殖後的產物藉由電穿孔的方式轉型 (transform) 到大腸桿菌 JM109 菌株，並以 kanamycin 抗生素篩選出含有抗 kanamycin 基因片段的質體。最後，以轉位子序列為引子確認轉位子插入位置附近的序列。

結果

不同菌種間 *pmr* 操縱子的上游序列比較分析

利用 BPROM of Softberry (<http://www.softberry.com/>) 分析克雷白氏肺炎桿菌、大腸桿菌、沙門氏菌以及鼠疫桿菌這四株菌種間的 *pmr* 操縱子上游序列並確認-10 及-35 boxes。如圖一，在克雷白氏肺炎桿菌及鼠疫桿菌中都同時擁有 PhoP 和 PmrA 兩個結合位，大腸桿菌及沙門氏菌只發現 PmrA 結合位。

pmrH 和 *pmrF* 基因缺損株的建構

pmrH 為 *pmr* 操縱子的第一個基因，其轉譯蛋白在合成 L-Ara4N 的過程主要負責轉胺作用；*pmrF* 為 *pmr* 操縱子的第二個基因，其轉譯蛋白在合成 L-Ara4N 的過程主要負責運送作用。為了建構 *pmrH* 和 *pmrF* 突變株，利用 PCR 的方式將目標基因上下游各 1 kb 的片段增殖並接到質體 pKAS46 (49)，命名為 pKAHm034 及 pKAFm034。接著，利用接合作用將質體送入克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3，經過同源互換後，在選擇性培養基上篩選突變菌株，挑選可以在 Sm500 培養基生長而不在 Ap100/Km25 培養基生長的菌株，分別利用引子 *pmrH01/pmrH02* 和 *pmrF01/pmrF02*，以 PCR 分析去確認所得到的突變株。引子 *pmrH01/pmrH02* 在野生株 PCR 增殖的片段約為 3,183 bp，若

pmrH 基因缺損，增殖片段約為 1,936 bp（圖二）；引子 *pmrF01/pmrF02* 在野生株 PCR 增殖的片段約為 2,977 bp，若 *pmrF* 基因缺損，增殖片段約為 2,071 bp（圖三）

***pmrF* 或 *pmrH* 基因缺損不會影響菌株生長**

將隔夜培養的 *K. pneumoniae* CG43S3、*pmrH* 和 *pmrF* 突變株重新培養於新鮮的 LB 培養液或外加高濃度鐵離子（1 mM Fe³⁺）、高濃度鎂離子（10 mM Mg²⁺）的 LB 培養液，並且每隔一小時測量 OD₆₀₀ 的吸光值。在任一生長條件下，*pmrH* 或 *pmrF* 突變株和野生株的生長情形並無明顯差異（圖四）。

***pmrH*、*pmrF* 或 *ugd* 基因缺損會降低菌株對多黏菌素的抗性**

PmrH 和 *PmrF* 主要功能分別為在合成 L-Ara4N 時進行轉胺及運送作用；*Ugd* 則是能合成 L-Ara4N 的前驅物 UDP-glucuronic acid。為了確認 *PmrHFIJKLM* 及 *Ugd* 和多黏菌素抗性的關係，以多黏菌素抗性測試分析 *pmrH*、*pmrF* 以及 *ugd* 突變株。結果如圖五 A，*pmrH*、*pmrF* 或 *ugd* 突變株，在濃度 2 units/ml 的多黏菌素環境下，存活率均有明顯下降，*pmrF* 突變株下降的情形較 *pmrH* 為明顯，約只剩 20% 的存活率；*ugd* 突變株的存活率幾乎

為零。*pmrF* 互補株可以回復菌株對多黏菌素的抗性，存活率可提高至約 80 % (圖五 B)。

***phoP*、*pmrA* 和 *pmrD* 基因缺損會降低菌株對多黏菌素的抗性**

PhoP 和 PmrA 已被報導能調控和多黏菌素抗性相關的下游基因 *pmrHFIJKLM* 的表現，而 PmrD 是一個能被 PhoP 活化進而促進 PmrA 表現的連接蛋白(56)，為了瞭解 PmrA、PhoP 以及 PmrD 和多黏菌素的抗性關係，分別構築了 *pmrA*、*phoP* 和 *pmrD* 突變株。結果如圖六，在濃度 4 units/ml 的多黏菌素環境下，*pmrA*、*phoP* 和 *pmrD* 三株突變株的抗性均有顯著下降，其中 *phoP* 突變株的抗性下降最為明顯，存活率和野生株相差約 30 倍。*phoP*、*pmrA* 或 *pmrD* 互補株均能回復菌株對多黏菌素的抗性，其中 *phoP* 互補株回復抗性的能力最顯著，抗性可比野生株高約 4 倍。

***phoP/pmrA* 雙基因缺損的 *phoP* 互補株能較 *pmrA* 互補株有較高的多黏菌素抗性**

由於 PhoP 和 PmrA 對於 *pmr* 操縱子的調控上有不同程度的差別，為了探討 PhoP 和 PmrA 在克雷白氏肺炎桿菌中對多黏菌素抗性上所扮演角色的重要程度，進一步比較 *phoP/pmrA* 雙基因缺損株以 *phoP* 或 *pmrA* 互補株回補

時，分別對多黏菌素的抗性回復能力的影響。結果如圖七，在濃度 4 units/ml 的多黏菌素環境下，*pmrA* 互補株的抗性並無顯著提升，而 *phoP* 互補株則有明顯提高，其回復抗性的能力比 *pmrA* 互補株高出約 4 倍。

***pmrA* 或 *phoP* 基因缺損會降低 P_{pmrH} 的活性**

在多黏菌素抗性測試中，*pmrA* 或 *phoP* 基因缺損時，都會降低克雷白氏肺炎桿菌對多黏菌素的抗性，因此進一步探討 PmrA 或 PhoP 是否藉由調控 *pmr* 操縱子的表現而影響對多黏菌素的抗性。首先，利用引子 *pmrHp01/pm rHp02* 將 *pmr* 操縱子的假定啟動子 P_{pmrH} 以 PCR 的方式增殖，再將此片段接到帶有 *lacZ* 報導基因的質體 pLacZ15 (34) 上，此質體被命名為 pHY072，接著，將此質體送入到 *K. pneumoniae* CG43S3Z01 菌株後，在不同生長條件下測量其啟動子活性。結果如圖八，當 P_{pmrH} 在高濃度鐵離子或低濃度鎂離子的活化條件下，活性均能比在高濃度鎂離子的抑制條件下高，代表 P_{pmrH} 的表現可能受這兩個調控子的調控。進一步在 $Z01\Delta pmrA$ 和 $Z01\Delta phoP$ 菌株中測試 P_{pmrH} 的活性，結果顯示在兩株突變株中 P_{pmrH} 的活性表現均比野生株低，而在 *phoP* 突變株中， P_{pmrH} 活性下降更為明顯，和野生株相差約 4 倍，此結果代表 PhoP 可能在此調控模式中扮演著一個比較主要的角色。

***pmrF*、*pmrA* 和 *phoP* 基因缺損會降低菌株在 THP-1 細胞株內的存活率**

在細胞內含有許多陽離子性縮氨酸，能抵抗細菌的入侵，而陽離子性縮氨酸的抑菌機制和多黏菌素類似(35)。因此，為了探討 *pmrF*、*pmrA* 及 *phoP* 這些和多黏菌素類陽離子性抗生素相關的基因，在細菌感染寄主時扮演的角色，我們利用 THP-1 細胞株進行吞噬試驗，觀察這些菌株在被吞噬後的存活率是否有差別。*wza* 是和莢膜多醣體生合成相關的基因，此基因缺損會使莢膜多醣體的產量降低而利於吞噬(18)，在此以 *wza* 基因缺損的突變株當作野生株。結果如圖九，在吞噬後 0 小時，各菌株間的回收率均在 0.8% 上下，代表野生株和突變株被吞噬的量差不多。在吞噬後 4 小時，*pmrF*、*phoP* 及 *pmrA* 突變株的回收率均較野生株低，其中 *pmrF* 突變株的回收率最低。在吞噬後 8 小時，野生株和突變株的回收率均下降至一開始吞噬的量，之間並無顯著差異。進一步測試 *pmrF*、*phoP* 及 *pmrA* 互補株在細胞內的存活率，在吞噬後 8 小時，三株互補株均能將存活率提高 1 倍以上。

***pmrF*、*pmrA* 和 *phoP* 基因缺損會降低菌株在 RAW264.7 細胞株內的存活率**

為了確認 *pmrF*、*pmrA* 和 *phoP* 基因確實會影響克雷白氏菌在細胞內的存活率，我們再利用另一株巨噬細胞株 RAW264.7 進行細菌存活率測試。結果如圖十，在吞噬後的 4 小時，*pmrF*、*pmrA* 和 *phoP* 突變株和 THP-1 結果一

樣均較野生株有較低的回收率，其中 *pmrF* 突變株的回收率也最低。另外由結果也發現 RAW264.7 有較高的吞噬效果，可能是由於 THP-1 無法百分百的分化成巨噬細胞所造成的差異。

***pmrA*、*phoP* 或 *rscB* 基因缺損不會影響 P_{ugd-1} 的活性**

在先前沙門氏菌的研究中，*ugd* 會同時受到 PmrA/PmrB、PhoP/PhoQ 及 RcsC/YojN/RcsB 三套雙分子系統的調控，為了瞭解 *ugd* 在克雷白氏肺炎桿菌中是否也會受到 PmrA、PhoP 及 RcsB 的調控，首先利用 BPROM of Softberry 分析 P_{ugd-1} 序列並確認 -10 和 -35 boxes，結果只找到和抑制 *N*-acetylglucosamine 合成相關的 NagC 結合位(44)，並未發現 PhoP、PmrA 或 RcsB 結合位（附錄一）。同時，我們也利用引子 *ugd03/ugd04* 將 *ugd* 的假定啟動子 P_{ugd-1} 以 PCR 的方式增殖，再將增殖片段接到帶有 *lacZ* 報導基因的質體 pLacZ15 上，並命名為 pHY069。接著，將此質體分別送入到 Z01、Z01 $\Delta pmrA$ 、Z01 $\Delta phoP$ 及 Z01 $\Delta rcsB$ 菌株中。活性測試結果發現不論在 Z01、Z01 $\Delta pmrA$ 、Z01 $\Delta phoP$ 或 Z01 $\Delta rcsB$ 菌株中， P_{ugd-1} 的活性都沒有明顯差異（圖十一）。

mamC-manB-ugd 為一操縱子

在 P_{ugd-1} 啟動子的測試中，並沒有找到確切的調控子，進一步分析已公佈資料庫的克雷白氏肺炎桿菌的基因組 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，發現 *manC*、*manB* 及 *ugd* 基因間的距離非常相近，並且轉錄的方向均相同 (圖十二 A)。因此，推測 *manC-manB-ugd* 可能為一操縱子，進一步利用 RT-PCR 的方法來證明。如圖十二 A 所示，431、443 和 510 bp 的 PCR 產物分別為 *gnd-manC*、*manC-manB* 和 *manB-ugd* 基因間的距離，以 RNA 為模板並未得到任何 PCR 產物，而以 genomic DNA 及 cDNA 為模板均可得到此片段大小的 PCR 產物 (圖十二 B)，此結果證明 *manC-manB-ugd* 為一操縱子。

rcsB 基因缺損會降低 P_{ugd-2} 的活性

知道 *manC-manB-ugd* 為一操縱子後，我們推測 *ugd* 可能擁有第二個啟動子 P_{ugd-2} 位於 *manC* 的上游非轉譯區 (圖十二 A)。分析 P_{ugd-2} 序列，發現一個假定 RcsB 結合位 (14 個核苷酸序列 4 個配對錯誤) (附錄二)。因此，進一步測試 P_{ugd-2} 的活性是否會受 PhoP、PmrA 或 RcsB 的影響。活性測試的結果顯示 P_{ugd-2} 的活性只在 *rcsB* 突變株中才有明顯下降，約和野生株相差 3 倍，在 *phoP* 或 *pmrA* 突變株中則沒有顯著的差異 (圖十二 C)。

***rcsB* 基因缺損會輕微降低菌株對多黏菌素的抗性**

在 P_{ugd-2} 的活性測試中，發現 *RcsB* 缺損會降低其活性表現，因此進一步測試 *rcsB* 基因缺損對多黏菌素抗性的影響。結果如圖十三，在多黏菌素濃度 2、4 units/ml 的條件下，*rcsB* 突變株的存活率和野生株並無明顯差異，而 *rcsB* 互補株則能將抗性提高。



討論

雙分子訊息傳遞系統廣泛地存在於革蘭氏陽性和陰性菌中，能感應外界訊息的變化使細菌做出適當反應以存活在不同的環境或寄主中。PmrA/PmrB 是一套已經被確定和多黏菌素抗性相關的雙分子系統(20)，能調控下游 *ugd* 基因和 *pmrHFIJKLM* 基因組的表現，以合成 L-Ara4N 對 LPS 進行修飾(54, 62) 進而增加對多黏菌素的抗性。這樣的抗性機制在不同菌種有著不同的調控模式。在沙門氏菌中，能藉由 PmrA/PmrB 直接調控 *pmrHFIJKLM* 基因組的表現，或 PhoP/PhoQ 活化 PmrD 和 PmrA 作用後，間接去調控 *pmrHFIJKLM*；在大腸桿菌中，主要只有 PmrA/PmrB 的直接調控(56)；在鼠疫桿菌中，PmrA/PmrB 和 PhoP/PhoQ 均能直接調控 *pmrHFIJKLM* (57)。

在克雷白氏肺炎桿菌中，根據 *pmr* 操縱子的上游序列分析結果，發現了兩個 PhoP 以及一個 PmrA 結合位（圖一），同時，克雷白氏菌還擁有 PmrD 同源蛋白。因此，我們推測不同於上述三種類型，在克雷白氏肺炎桿菌中對於 *pmr* 操縱子的調控方式，可能為第四種類型，除了 PmrA/PmrB 直接及 PhoP/PhoQ 間接的調控外，PhoP/PhoQ 亦可以直接調控 *pmr* 操縱子。

我們首先在抗性分析上證實了 PmrHFIJKLM 確實負責多黏菌素的抗性，所建構的 *pmrH* 和 *pmrF* 兩株突變株對多黏菌素的抗性均較野生株低，其中 *pmrF* 突變株的抗性又較 *pmrH* 突變株低（圖五 A），這可能是因為在合成

L-Ara4N 的機轉上，PmrH 主要功能為轉胺作用，而 PmrF 則負責將中間產物運送到內膜上進一步作修飾(8)，PmrF 在整個合成機轉上可能扮演著一個比較關鍵的角色。

進一步測試 *pmrHFIJKLM* 的上游調控子 PhoP、PmrA 及之間的連接蛋白 PmrD 對多黏菌素的抗性，結果顯示不論 *phoP*、*pmrA* 或 *pmrD* 基因缺損均會造成抗性降低，而 *phoP* 突變株抗性降低的情形最為明顯（圖六 A）；在互補株試驗中，*phoP*、*pmrA* 及 *pmrD* 互補株均能回復對多黏菌素的抗性，其中 *phoP* 互補株回復抗性的能力為最高（圖六 B），此也凸顯了 PhoP 在多黏菌素抗性上的重要性。進一步在 *phoP/pmrA* 基因缺損株下分別回補 *phoP* 或 *pmrA* 互補株，比較抗性回復的能力，發現只有 *phoP* 互補株能將抗性有效回復，而 *pmrA* 效果則較不明顯（圖七）。綜合以上以及根據 *pmr* 操縱子上游序列分析所發現的兩個 PhoP 和一個 PmrA 結合位的結果，顯示 PhoP 在克雷白氏肺炎桿菌中對多黏菌素的抗性上可能扮演著一個比較主要的角色，一旦 *phoP* 基因缺損就會使得整個抗性陡降，即使在菌內過度表現 PmrA，能回復的抗性也很有限，因此在克雷白氏肺炎桿菌中 PhoP 在 *pmr* 操縱子調控上的重要性較 PmrA 高。

在啟動子活性測試中，我們證實了 PhoP 和 PmrA 對於 *pmr* 操縱子的調控關係。 P_{pmrH} 在低濃度鎂離子及高濃度鐵離子的條件下均有較高的活性（圖

八 B) ，進一步在 *phoP* 及 *pmrA* 突變株下測試， P_{pmrH} 的活性均有明顯降低 (圖八 C) ，而在 PhoP 缺損下降低的情形更為明顯，證實 P_{pmrH} 確實會受到 PhoP 及 PmrA 的調控，此也符合多黏菌素抗性測試的結果。在最近的研究中，利用 DNase footprinting 實驗證實在克雷白氏肺炎桿菌中 PhoP 能直接調控 *pmr* 操縱子，因此除了先前已知 PhoP 間接及 PmrA 直接的調控外，克雷白氏肺炎桿菌還擁有 PhoP 的直接調控，此調控模式被命名為 FCL (feedforward connector loop) (37) ，證實在克雷白氏肺炎桿菌中對於 *pmr* 操縱子的調控方式不同於前述的三種類型，而是第四種類型—FCL。

ugd 為另一個影響多黏菌素抗性的重要基因，它的產物 UDP-glucuronic acid 是合成 L-Ara4N 的前驅物(18, 38) ，因此在對多黏菌素的抗性上也扮演著一個重要的角色。當 *ugd* 基因缺損時，克雷白氏菌對濃度 2 units/ml 的多黏菌素幾乎沒有抗性 (圖五 A) ，濃度要低於 1 units/ml 以下才可觀察到存活率 (附錄三) ，報導指出 *ugd* 在克雷白氏菌中影響的層面除了 LPS 外，還包括也和多黏菌素的抗性相關的 CPS (31) ，因此 *ugd* 一旦不活化就會使得克雷白氏菌對多黏菌素的抗性幾乎降至為零。

在先前沙門氏菌報導中指出 *ugd* 基因的上游序列含有 PhoP、PmrA 及 RcsB 的結合位並且會受到 PhoP/PhoQ、PmrA/PmrB 和 RcsC/YojN/RcsB 這三套雙分子系統調控(38) ，但在克雷白氏肺炎桿菌 *ugd* 的啟動子 P_{ugd-1} 序列分析

中並沒有發現到 PhoP、PmrA 或 RcsB 結合位（附錄一），進一步在三株突變株下測試 P_{ugd-1} 的活性也沒有明顯差異（圖十一），此結果和在沙門氏菌中的發現並不相同；利用生物資訊的方法分析克雷白氏肺炎桿菌中 *ugd* 及上下游基因的組成，發現 *ugd* 和上游的 *manC* 以及 *manB* 彼此基因間的距離很相近，並且有相同的轉錄方向（圖十二 A），推測有可能為一操縱子，我們利用 RT-PCR 的方法證明了 *manC-manB-ugd* 確實為一操縱子（圖十二 B），暗示 *ugd* 可能還擁有另一個啟動子 P_{ugd-2} 位於 *manC* 的上游非轉譯區。分析 P_{ugd-2} 序列，發現一個 RcsB 結合位（附錄二），推測此結合位可能會受到 RcsB 的調控而影響到 P_{ugd-2} 的活性表現。測試 P_{ugd-2} 的活性表現，發現只在 *rscB* 基因缺損的情形下活性才有明顯下降（圖十二 C），但 RcsB 是否會直接調控 P_{ugd-2} 的活性表現則需再進一步的實驗證明。進一步測試 RcsB 和多黏菌素的抗性關係，發現 *rscB* 基因缺損相對於野生株只會稍微降低菌株對多黏菌素的抗性（圖十三）。RcsB（regulation of capsule synthesis）被報導主要和莢膜多醣體的合成有關(55)，當其缺損時雖然會降低莢膜多醣體的產量，但此降低的情形可能不足以對克雷白氏菌在多黏菌素的抗性上造成很大的影響。另一方面，雖然在 *rscB* 基因缺損會降低 P_{ugd-2} 的活性，但 RcsB 實際對 P_{ugd-2} 表現的影響為何可能須藉由 real-time PCR 加以證明。

最後，我們利用細胞吞噬試驗來探討這些基因是否能幫助細菌增加在感染寄主時的存活率；由於在細胞內含有一些陽離子性縮氨酸能幫助增加免疫反應，這些陽離子性縮氨酸的抑菌機制大致和多黏菌素相似(35)，我們使用的巨噬細胞株為免疫反應上的第一道防線，主要負責將侵入物吞噬後進行溶解並呈現抗原及分泌一些刺激因子促進後續的免疫反應，因此細菌在受到巨噬細胞吞噬後，可能主要還是受到陽離子性縮氨酸的毒殺。在我們的結果中顯示，*pmrF*、*phoP* 及 *pmrA* 突變株在 THP-1 和 RAW264.7 吞噬後均比野生株有較低的存活率（圖九、圖十），但此降低的情形不是很明顯，這可能是由於我們拿來當作野生株的 *wza* 基因缺損株本身就會影響細菌對陽離子性抗生素的抗性，使得我們是在抗性已經降低的情形下去比較 *pmrF*、*phoP* 及 *pmrA* 基因缺損所造成的影響，導致差異效果不明顯，但是，這些和陽離子性抗生素抗性相關的基因 *pmrHFIJLM*、*pmrA* 及 *phoP* 缺損時確實較不利於細菌在細胞內存活。目前雖然沒有證據可以證明此存活率降低的情形主要是由細胞內的陽離子縮氨酸所造成的，但可以證明 *pmrHFIJLM*、*pmrA* 及 *phoP* 基因缺損的突變株是比較無法抵抗細胞的毒殺作用。

另外，之前實驗室的研究發現嗜中性白血球對於細菌的吞噬並不會受到莢膜多醣體的干擾，因此就可去除 *wza* 基因缺損的影響，但取得嗜中性白血

球的方法須藉由抽取人體血液再進行分離或是誘導 HL-60 細胞株分化，但此兩種方法所得到的嗜中性白血球數量均有限，不符我們試驗需求。

在克雷白氏肺炎桿菌對多黏菌素的抗性調控中，我們證實了 PmrHFIJKLM 及 Ugd 確實和多黏菌素的抗性相關，而 PhoP 和 PmA 則主要調控整個抗性機制。克雷白氏菌對於 *pmr* 操縱子的調控不同於沙門氏菌、大腸桿菌以及鼠疫桿菌而擁有三條調控路徑，包括 (i) 低濃度鎂離子下，PhoP-PmrD-PmrA 的間接調控以及 (ii) 高濃度鐵離子下，PmrA 的直接調控，近來的研究也證明 (iii) PhoP 能直接調控 *pmr* 操縱子。這三條不同的調控路徑也凸顯了 PhoP 對於克雷白氏菌在多黏菌素抗性上的重要性；另一部分，克雷白氏菌對於 *ugd* 的調控也不同於沙門氏菌受到 PhoP、PmA 或 RcsB 的調控，雖然我們所建構的啟動子 P_{ugd-2} 會受到 *rcsB* 缺損的影響，但其調控的方式為何則還需進一步的證明。最後，我們以細胞內存活率的方法，證實這些和陽離子抗生素抗性相關的 PmrHFIJKLM、PhoP 及 PmA 確實能幫助細菌提高在感染細胞時的存活率。

參考文獻

1. **Alexander, C., and E. T. Rietschel.** 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* **7**:167-202.
2. **Bader, M. W., W. W. Navarre, W. Shiau, H. Nikaido, J. G. Frye, M. McClelland, F. C. Fang, and S. I. Miller.** 2003. Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Mol Microbiol* **50**:219-30.
3. **Bader, M. W., S. Sanowar, M. E. Daley, A. R. Schneider, U. Cho, W. Xu, R. E. Klevit, H. Le Moual, and S. I. Miller.** 2005. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* **122**:461-72.
4. **Barry, G. F.** 1988. A broad-host-range shuttle system for gene insertion into the chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene* **71**:75-84.
5. **Bearson, B. L., L. Wilson, and J. W. Foster.** 1998. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *J Bacteriol* **180**:2409-17.
6. **Bergen, P. J., J. Li, C. R. Rayner, and R. L. Nation.** 2006. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1953-8.

7. **Bijlsma, J. J., and E. A. Groisman.** 2003. Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol* **11**:359-66.
8. **Breazeale, S. D., A. A. Ribeiro, and C. R. Raetz.** 2003. Origin of lipid A species modified with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose in polymyxin-resistant mutants of *Escherichia coli*. An aminotransferase (ArnB) that generates UDP-4-deoxyl-L-arabinose. *J Biol Chem* **278**:24731-9.
9. **Chamnongpol, S., W. Dodson, M. J. Cromie, Z. L. Harris, and E. A. Groisman.** 2002. Fe(III)-mediated cellular toxicity. *Mol Microbiol* **45**:711-9.
10. **Chang, C., S. F. Kwok, A. B. Bleecker, and E. M. Meyerowitz.** 1993. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**:539-44.
11. **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.
12. **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.
13. **Erridge, C., E. Bennett-Guerrero, and I. R. Poxton.** 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* **4**:837-51.

14. **Evans, M. E., D. J. Feola, and R. P. Rapp.** 1999. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother* **33**:960-7.
15. **Fabret, C., V. A. Feher, and J. A. Hoch.** 1999. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol* **181**:1975-83.
16. **Falagas, M. E., and S. K. Kasiakou.** 2006. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care* **10**:R27.
17. **Garcia Vescovi, E., F. C. Soncini, and E. A. Groisman.** 1996. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* **84**:165-74.
18. **Grangeasse, C., B. Obadia, I. Mijakovic, J. Deutscher, A. J. Cozzone, and P. Doublet.** 2003. Autophosphorylation of the *Escherichia coli* protein kinase Wzc regulates tyrosine phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase. *J Biol Chem* **278**:39323-9.
19. **Groisman, E. A.** 2001. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* **183**:1835-42.

20. **Gunn, J. S.** 2008. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol* **16**:284-90.
21. **Gunn, J. S., and S. I. Miller.** 1996. PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol* **178**:6857-64.
22. **Gunn, J. S., S. S. Ryan, J. C. Van Velkinburgh, R. K. Ernst, and S. I. Miller.** 2000. Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **68**:6139-46.
23. **Hagiwara, D., M. Sugiura, T. Oshima, H. Mori, H. Aiba, T. Yamashino, and T. Mizuno.** 2003. Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:5735-46.
24. **Hancock, R. E.** 1997. Peptide antibiotics. *Lancet* **349**:418-22.
25. **Hermsen, E. D., C. J. Sullivan, and J. C. Rotschafer.** 2003. Polymyxins: pharmacology, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical applications. *Infect Dis Clin North Am* **17**:545-62.

26. **Hsing, W., and T. J. Silhavy.** 1997. Function of conserved histidine-243 in phosphatase activity of EnvZ, the sensor for porin osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**:3729-35.
27. **Hsueh, P. R., C. Y. Liu, and K. T. Luh.** 2002. Current status of antimicrobial resistance in Taiwan. *Emerg Infect Dis* **8**:132-7.
28. **Joseph, S., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual—3rd edition.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
29. **Kang, J. W., A. Van Schepdael, J. A. Orwa, E. Roets, and J. Hoogmartens.** 2000. Analysis of polymyxin B sulfate by capillary zone electrophoresis with cyclodextrin as additive. Method development and validation. *J Chromatogr A* **879**:211-8.
30. **Kier, L. D., R. M. Weppelman, and B. N. Ames.** 1979. Regulation of nonspecific acid phosphatase in *Salmonella*: *phoN* and *phoP* genes. *J Bacteriol* **138**:155-61.
31. **Lacour, S., E. Bechet, A. J. Cozzone, I. Mijakovic, and C. Grangeasse.** 2008. Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PLoS ONE* **3**:e3053.
32. **Lan, C. K., P. R. Hsueh, W. W. Wong, C. P. Fung, Y. T. Lau, J. Y. Yeung, G. T. Young, and C. C. Su.** 2003. Association of antibiotic

- utilization measures and reduced incidence of infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Microbiol Immunol Infect* **36**:182-6.
33. **Li, J., R. L. Nation, J. D. Turnidge, R. W. Milne, K. Coulthard, C. R. Rayner, and D. L. Paterson.** 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis* **6**:589-601.
34. **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.
35. **Mendez-Samperio, P.** 2008. Role of antimicrobial peptides in host defense against mycobacterial infections. *Peptides* **29**:1836-41.
36. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
37. **Mitrophanov, A. Y., M. W. Jewett, T. J. Hadley, and E. A. Groisman.** 2008. Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. *PLoS Genet* **4**:e1000233.
38. **Moulim, C., and E. A. Groisman.** 2003. Control of the *Salmonella ugd* gene by three two-component regulatory systems. *Mol Microbiol* **47**:335-44.

39. **Mousslim, C., T. Latifi, and E. A. Groisman.** 2003. Signal-dependent requirement for the co-activator protein RcsA in transcription of the RcsB-regulated *ugd* gene. *J Biol Chem* **278**:50588-95.
40. **Nishino, K., F. F. Hsu, J. Turk, M. J. Cromie, M. M. Wosten, and E. A. Groisman.** 2006. Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the *Salmonella* PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe(III) and Al(III). *Mol Microbiol* **61**:645-54.
41. **Ohl, M. E., and S. I. Miller.** 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* **52**:259-74.
42. **Orwa, J. A., C. Govaerts, R. Busson, E. Roets, A. Van Schepdael, and J. Hoogmartens.** 2001. Isolation and structural characterization of polymyxin B components. *J Chromatogr A* **912**:369-73.
43. **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.
44. **Pennetier, C., L. Dominguez-Ramirez, and J. Plumbridge.** 2008. Different regions of Mlc and NagC, homologous transcriptional repressors controlling expression of the glucose and N-acetylglucosamine phosphotransferase systems in *Escherichia coli*, are required for inducer signal recognition. *Mol Microbiol* **67**:364-77.

45. **Perez, J. C., and E. A. Groisman.** 2007. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **63**:283-93.
46. **Perraud, A. L., V. Weiss, and R. Gross.** 1999. Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* **7**:115-20.
47. **Podschun, R., and U. Ullmann.** 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* **11**:589-603.
48. **Scarlato, V., B. Arico, M. Domenighini, and R. Rappuoli.** 1993. Environmental regulation of virulence factors in *Bordetella* species. *Bioessays* **15**:99-104.
49. **Skorupski, K., and R. K. Taylor.** 1996. Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene* **169**:47-52.
50. **Soncini, F. C., E. Garcia Vescovi, F. Solomon, and E. A. Groisman.** 1996. Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J Bacteriol* **178**:5092-9.
51. **Soncini, F. C., E. G. Vescovi, and E. A. Groisman.** 1995. Transcriptional autoregulation of the *Salmonella typhimurium* *phoPQ* operon. *J Bacteriol* **177**:4364-71.

52. **Stock, J. B., A. M. Stock, and J. M. Mottonen.** 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature* **344**:395-400.
53. **Swain, P., S. K. Nayak, P. K. Nanda, and S. Dash.** 2008. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review. *Fish Shellfish Immunol* **25**:191-201.
54. **Tamayo, R., S. S. Ryan, A. J. McCoy, and J. S. Gunn.** 2002. Identification and genetic characterization of PmrA-regulated genes and genes involved in polymyxin B resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **70**:6770-8.
55. **Wehland, M., and F. Bernhard.** 2000. The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *J Biol Chem* **275**:7013-20.
56. **Winfield, M. D., and E. A. Groisman.** 2004. Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:17162-7.
57. **Winfield, M. D., T. Latifi, and E. A. Groisman.** 2005. Transcriptional regulation of the 4-amino-4-deoxy-L-arabinose biosynthetic genes in *Yersinia pestis*. *J Biol Chem* **280**:14765-72.
58. **Winson, M. K., S. Swift, P. J. Hill, C. M. Sims, G. Griesmayr, B. W. Bycroft, P. Williams, and G. S. Stewart.** 1998. Engineering the *luxCDABE*

- genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs. *FEMS Microbiol Lett* **163**:193-202.
59. **Wosten, M. M., L. F. Kox, S. Chamnongpol, F. C. Soncini, and E. A. Groisman.** 2000. A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell* **103**:113-25.
60. **Yan, A., Z. Guan, and C. R. Raetz.** 2007. An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **282**:36077-89.
61. **Zavascki, A. P., L. Z. Goldani, J. Li, and R. L. Nation.** 2007. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother* **60**:1206-15.
62. **Zhao, Y., R. Jansen, W. Gaastra, G. Arkesteijn, B. A. van der Zeijst, and J. P. van Putten.** 2002. Identification of genes affecting *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection of chicken macrophages. *Infect Immun* **70**:5319-21.
63. **Zhou, Z., A. A. Ribeiro, S. Lin, R. J. Cotter, S. I. Miller, and C. R. Raetz.** 2001. Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J Biol Chem* **276**:43111-21.

表一、本實驗所使用的菌株基因型

Strain	Genotype or relevant property	Reference or source
<i>E.coli</i> :		
JM109	<i>RecA1 supE44 endA1 hsdR17</i> <i>gyrA96 rolA1 thiΔ(lac-proAB)</i>	Laboratory stock
S17-1λ <i>pir</i>	Tp ^r Sm ^r <i>recA, thi, pro, hsdR</i> ⁻ M ⁺ [RP4-2-Tc::Mu:Km ^r Tn7](<i>pir</i>)	(12)
<i>K.pneumoniae</i> :		
CG43	K2 serotype	(43)
CG43S3	<i>rspL</i> mutant, Sm ^r	(43)
CG43S3-Z01	<i>lacZ</i> mutant in CG43S3	(34)
CG43S3-Z01Δ <i>pmrA</i>	<i>pmrA</i> mutant in CG43S3-Z01	This study
CG43S3-Z01Δ <i>phoP</i>	<i>phoP</i> mutant in CG43S3-Z01	This study
CG43S3-Z01Δ <i>rcsB</i>	<i>rcsB</i> mutant in CG43S3-Z01	Laboratory stock
CG43S3Δ <i>ugd</i>	<i>ugd</i> mutant in CG43S3	Laboratory stock
CG43S3Δ <i>pmrH</i>	<i>pmrH</i> mutant in CG43S3	This study
CG43S3Δ <i>pmrF</i>	<i>pmrF</i> mutant in CG43S3	This study
CG43S3Δ <i>pmrA</i>	<i>pmrA</i> mutant in CG43S3	This study
CG43S3Δ <i>phoP</i>	<i>phoP</i> mutant in CG43S3	Laboratory stock
CG43S3Δ <i>pmrD</i>	<i>pmrD</i> mutant in CG43S3	Laboratory stock
CG43S3Δ <i>pmrA/phoP</i>	<i>pmrA/phoP</i> mutant in CG43S3	This study

CG43S3 Δ <i>wza/pmrF</i>	<i>wza</i> and <i>pmrF</i> mutant in CG43S3	This study
CG43S3 Δ <i>wza/pmrA</i>	<i>wza</i> and <i>pmrA</i> mutant in CG43S3	This study
CG43S3 Δ <i>wza/phoP</i>	<i>wza</i> and <i>phoP</i> mutant in CG43S3	This study



表二、本實驗所使用的質體構築表

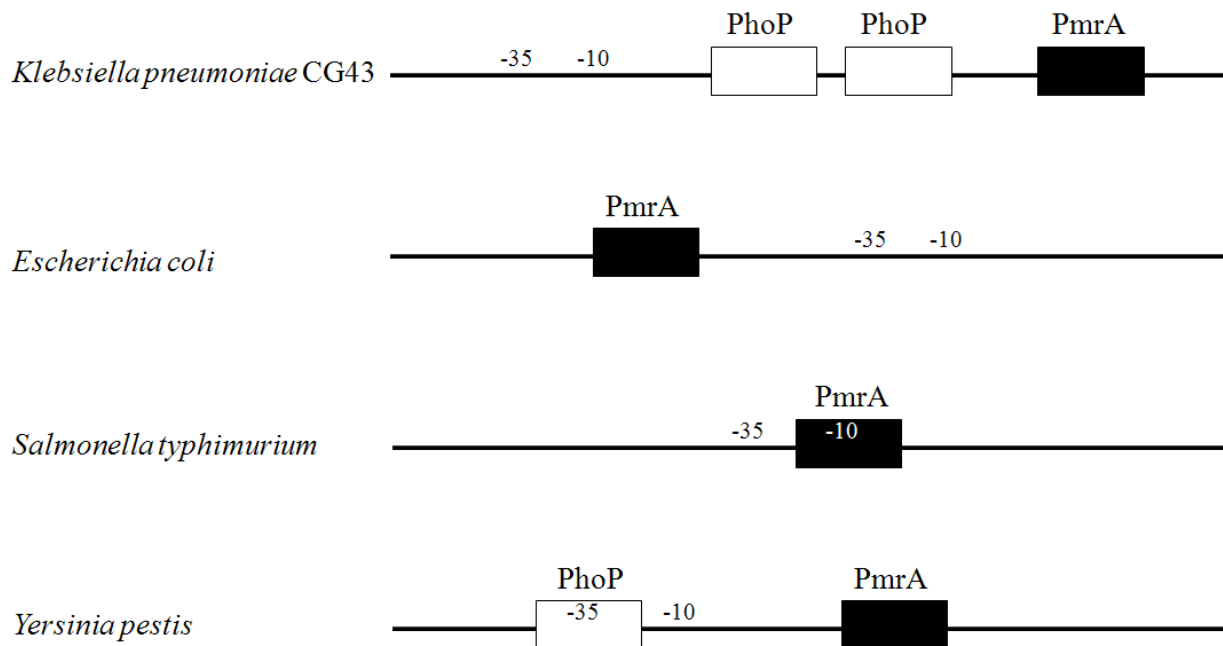
Plasmid	Relevant characteristic	Reference or source
yT&A	PCR cloning vector, Ap ^r	Yeastern Biotech Co.
pLacZ15	A derivative of pYC016, containing a promoterless <i>lacZ</i> from <i>K.pneumoniae</i> CG43S3 as the reporter, Cm ^r	(34)
pKAS46	Suicide vector, <i>rspL</i> , Ap ^r , Km ^r	(49)
pRK415	Broad-host-range IncP cloning vector, Tc ^r	(4)
pYTHm034	946-bp and 984-bp PCR product of the region upstream and downstream of <i>pmrH</i> cloned into yT&A	This study
pKAHm034	<i>XbaI/SacI</i> digested fragment of pYTHm034 cloned into pKAS46	This study
pYTFm034	1034-bp and 1037-bp PCR product of the region upstream and downstream of <i>pmrF</i> cloned into yT&A	This study
pKAFm034	<i>EcoRI/XbaI</i> digested fragment of pYTFm034 cloned into pKAS46	This study
pKAS46-wza ⁻	A 2.0-kb fragment containing a 500-bp deletion in <i>wza</i> locus cloned into pKAS46,	Laboratory stock
pHY006	A 2.0-kb fragment containing a 700-bp deletion in <i>phoP</i> locus cloned into pKAS46	Laboratory stock

pHY025	A 2.0-kb fragment containing a 660-bp deletion in <i>pmrA</i> locus cloned into pKAS46	Laboratory stock
pHY029	A 2.0-kb fragment containing a 500-bp deletion in <i>pmrD</i> locus cloned into pKAS46	Laboratory stock
pHY034	A 2.0-kb fragment containing a 1100-bp deletion in <i>ugd</i> locus cloned into pKAS46	Laboratory stock
pFcYT	1277-bp PCR product carrying <i>pmrF</i> cloned into yT&A	This study
pFcRK	<i>HindIII/BamHI</i> digested fragment of pFcYT cloned into pRK415	This study
pAcYT	1105-bp PCR product carrying <i>pmrA</i> cloned into yT&A	This study
pAcRK	<i>HindIII/XbaI</i> digested fragment of pAcYT cloned into pRK415	This study
pPcYT	900-bp PCR product carrying <i>phoP</i> cloned into yT&A	This study
pPcRK	<i>BamHI/EcoRI</i> digested fragment of pPcYT cloned into pRK415	This study
pHY069	<i>BamHI/BglIII</i> digested fragment of 253-bp PCR product amplified by primer sets <i>ugd03/ugd04</i> cloned into the <i>BamHI</i> site of pLacZ15	Laboratory stock
pHY072	<i>BamHI/BglIII</i> digested fragment of 477-bp PCR product amplified by primer sets <i>pmrHp01/pmrHp02</i> cloned into the <i>BamHI</i> site of pLacZ15	Laboratory stock
pHY123	1181-bp PCR product carrying <i>rcsB</i> cloned into pRK415	Laboratory stock
porf162Y	A 400-bp PCR product of <i>cps</i> <i>porf16-17</i> promoter region cloned into yT&A	Laboratory stock
porf162Z15	A <i>BglIII</i> fragment of <i>porf162Y</i> cloned into the <i>BamHI</i> site of pLacZ15	Laboratory stock

表三、本實驗所使用的引子序列

Primer	Sequence
pmrAp03	5'-CAA,TTG,GAT,C ^a CA,GGG,CTG,TAC-3'
pmrA06	5'-GAG,CCA,TGG ^a ,TCT,ATT,CCG,TG-3'
pmrH01	5'-TGA,TTC,AGC,AGT,AGT,TCG,CCA,GCC-3'
pmrH02	5'-AAC,AGC,ACG,GCG,AAG,AGC,ATA,AAC,A-3'
pmrH03	5'-GTC,ACG,AAA,AAG,AGA,ACA,GGA,ACG,C-3'
pmrH04	5'-AAA,TAT,TAC,CGC,GAG,CGC,TTC,CCT-3'
pmrF01	5'-ATG,CGA,TTG,CCG,TCA,GTT,CAG,C-3'
pmrF02	5'-AGG,CGC,TCG,GTC,AGG,TGG,TTA,C-3'
pmrF03	5'-GGG,ATA,ACC,ACC,GAG,ACC,TTC-3'
pmrF04	5'-GGA,AAC,GGC,ATC,TAA,AGA,GGA,A-3'
phoP01	5'-CGC,TCG,CCG,TTC,GGA,TCC ^a ,TG-3'
phoP02	5'-GCA,ACG,GTA,CC ^a T,TCA,TCA,GCG,C-3'
ppmrF01	5'-GAT,GGA,AAA,GCT,GAA,GGC,GAT,GG-3'
ppmrF02	5'-CAG,CGA,TAT ^a ,CAT,ACC,CGG,CGT,C-3'
ugd03	5'-GCA,GGA,TCC ^a ,ATA,ATG,GAA,GC-3'
ugd04	5'-CGA,GAT,CT ^a A,GGG,CCA,CCA,C-3'
pmrHp01	5'-TCT,GGA,TCC ^a ,TGG,TCA,TTA,ATT,GCC,CGG,C-3'
pmrHp02	5'-CTT,AGA,TCT ^a ,CGC,TCA,TCA,TCA,TCC,TGT,TC-3'
WzaD1	5'-TTT,CTA,TGG,GCA,GAT,GGT,TG-3'
WzaD4	5'-GCT,GAC,TAT,CGG,GAA,GCA,TC-3'

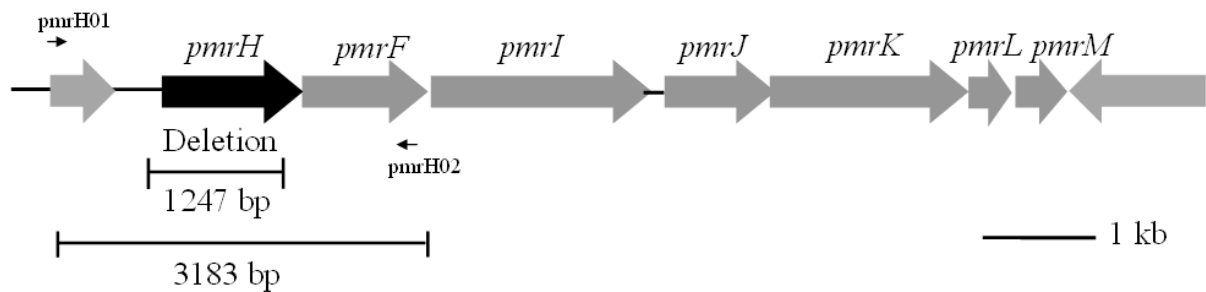
^a , restriction enzyme site



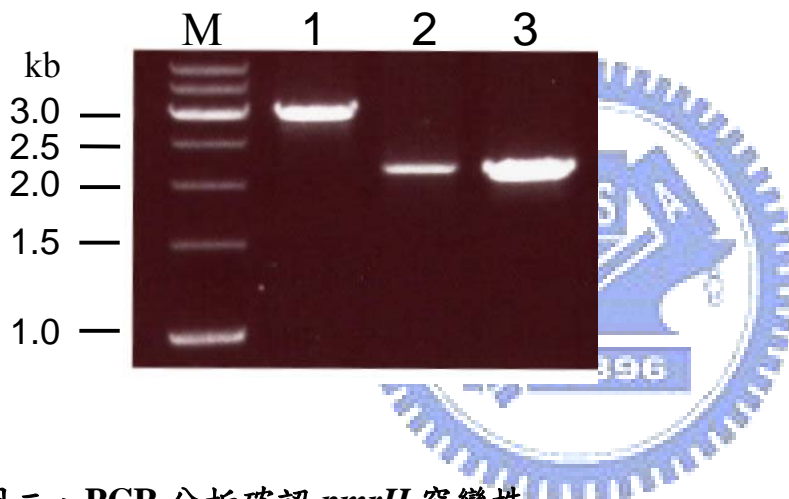
圖一、不同菌種間 *pmr* 操縱子上游序列比較分析

比較克雷白氏菌、大腸桿菌、沙門氏菌及鼠疫桿菌間的 *pmr* 操縱子上游序列，並標示-10 box 和-35 box，PhoP 結合位以空心方塊表示，PmrA 結合位以實心方塊表示。

(A)



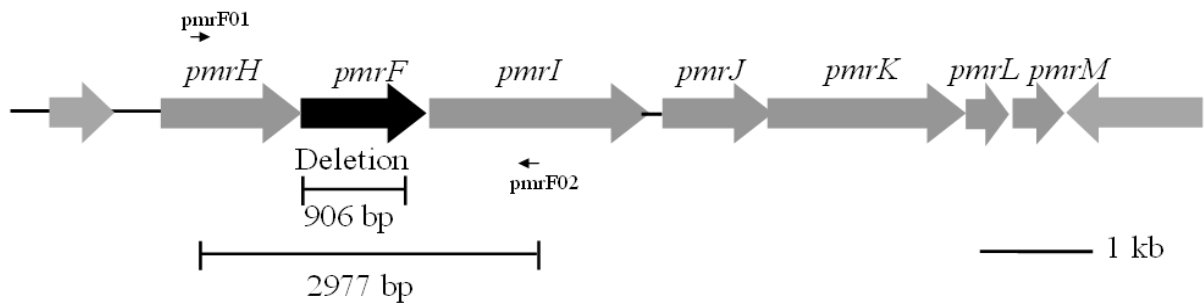
(B)



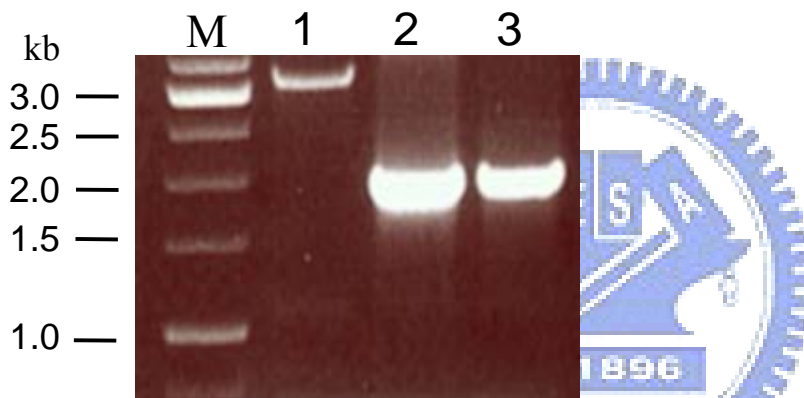
圖二、PCR 分析確認 *pmrH* 突變株

(A) *pmrH* 及上下游基因組成示意圖。引子 *pmrH01*/*pmrH02* 是用來確 *pmrH* 基因缺損。(B) 利用引子 *pmrH01*/*pmrH02* 進行 PCR 分析確認 *pmrH* 基因缺損。質體 pKAHm034 包含 *pmrH* 基因上下游序列以進行同源互換產生 *pmrH* 突變株。M：DNA 大小標準溶液，lane 1：*K. pneumoniae* CG43S3，lane 2：pKAHm034，lane 3：*K. pneumoniae* CG43S3 Δ *pmrH*。

(A)

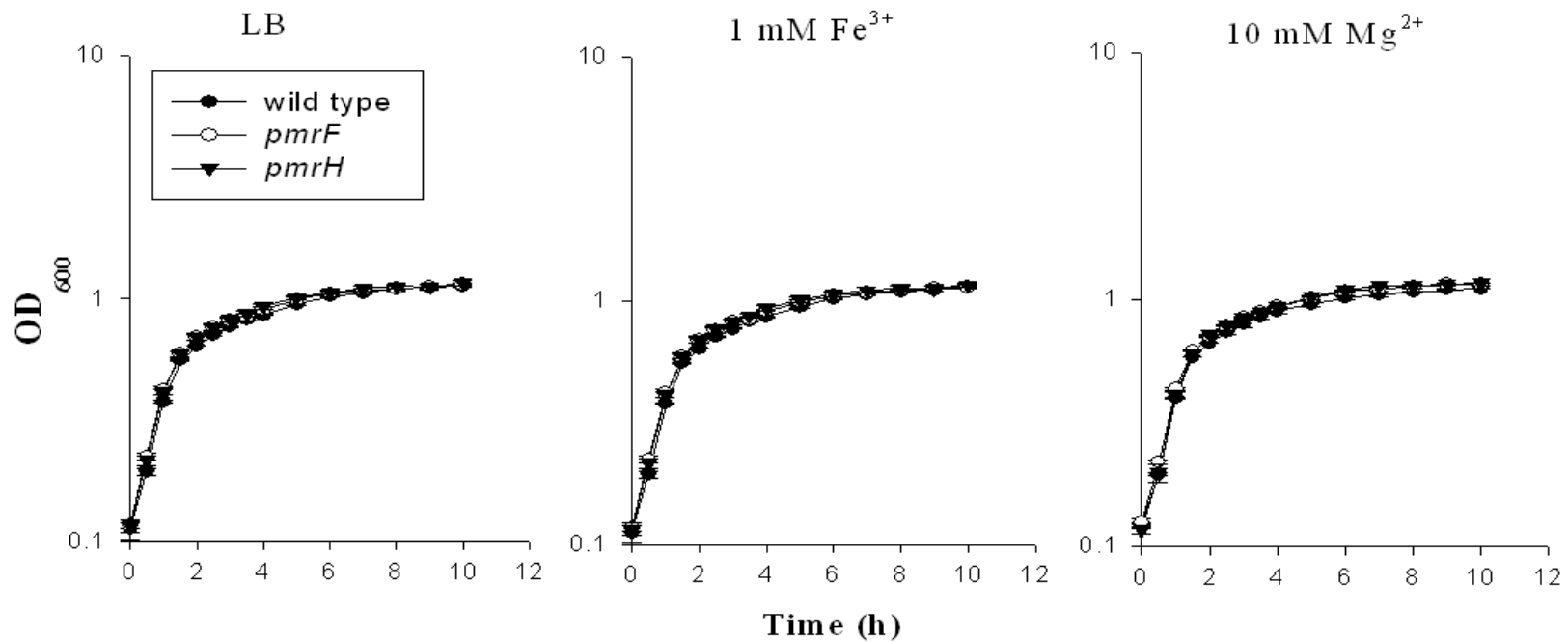


(B)



圖三、PCR 分析確認 *pmrF* 突變株

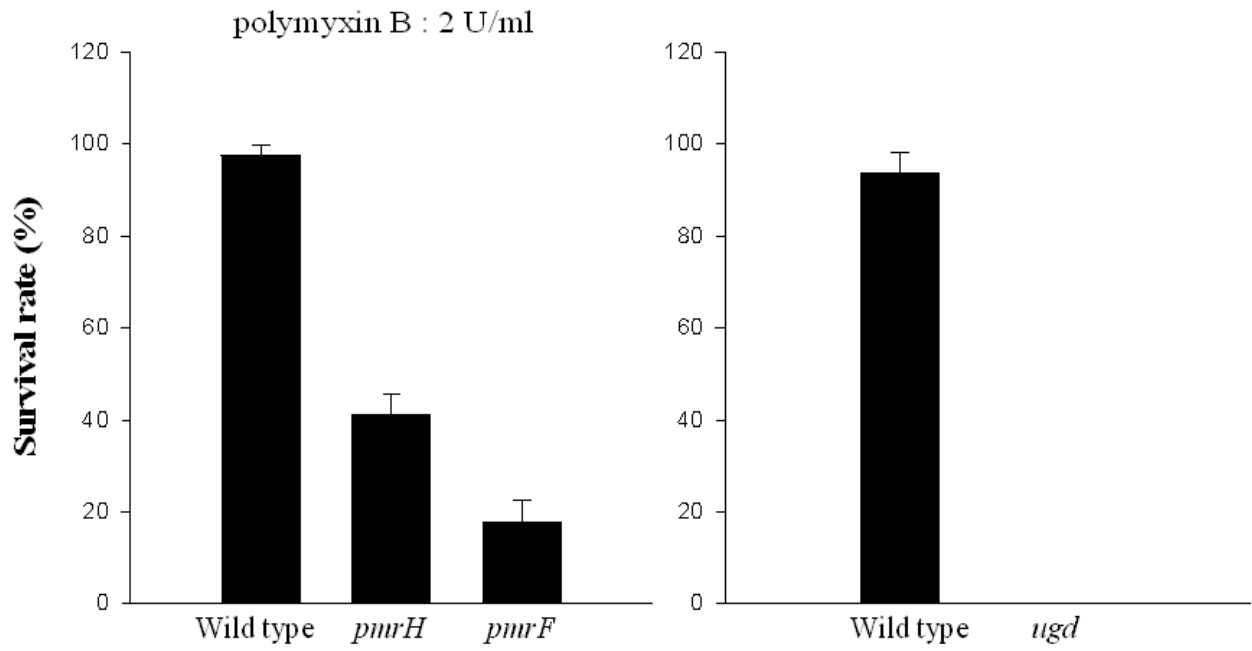
(A) *pmrF* 及上下游基因組成示意圖。引子 pmrF01/pmrf02 是用來確認 *pmrF* 基因缺損。(B) 利用引子 pmrF01/pmrf02 進行 PCR 分析確認 *pmrF* 基因缺損。質體 pKAFm034 包含 *pmrF* 基因上下游序列以進行同源互換產生 *pmrF* 突變株。M：DNA 大小標準溶液，lane 1：*K. pneumoniae* CG43S3，lane 2：pKAFm034，lane 3：*K. pneumoniae* CG43S3 Δ *pmrF*。



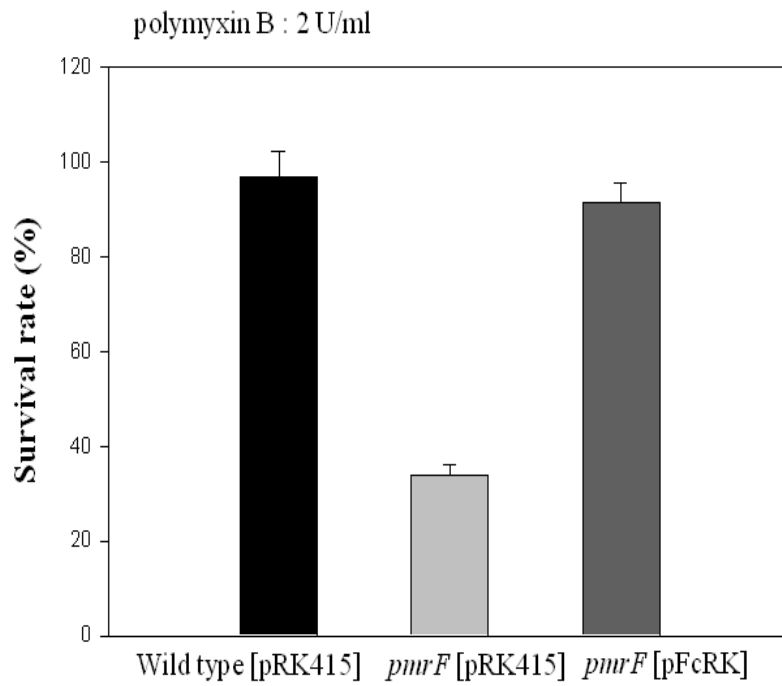
圖四、*K. pneumoniae* CG43S3、CG43S3Δ*pmrH*和CG43S3Δ*pmrF* 生長曲線圖

將隔夜培養的菌液以 1 : 100 比例更新培養於 LB、LB + 1 mM Fe³⁺ 及 LB + 10 mM Mg²⁺ 離子，在 37°C 下振盪培養，每隔 1 小時量測 OD₆₀₀ 的吸光值。

(A)



(B)

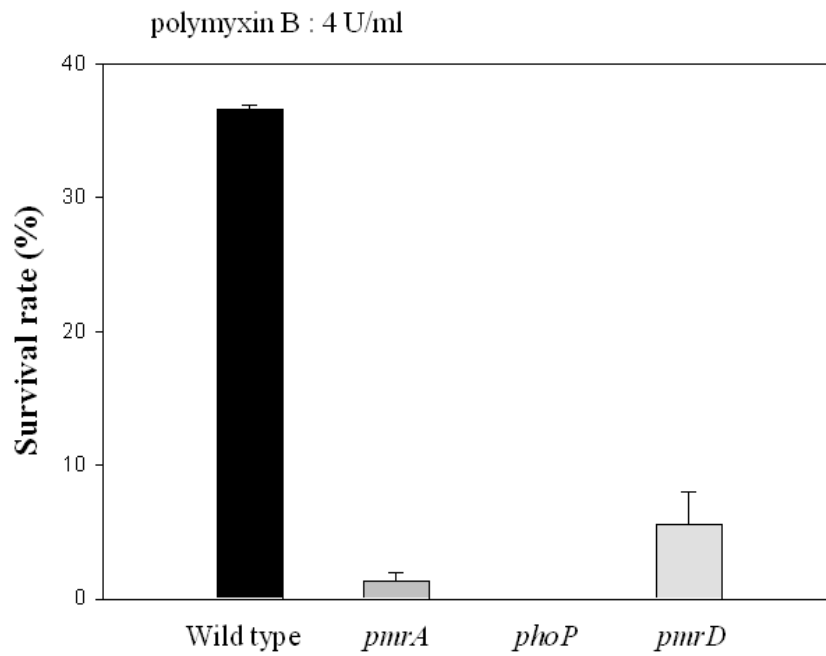


圖五、*pmrH*、*pmrF* 和 *ugd* 基因缺損株 (A) 以及 *pmrF* 互補株 (B) 對多黏菌素的抗性分析

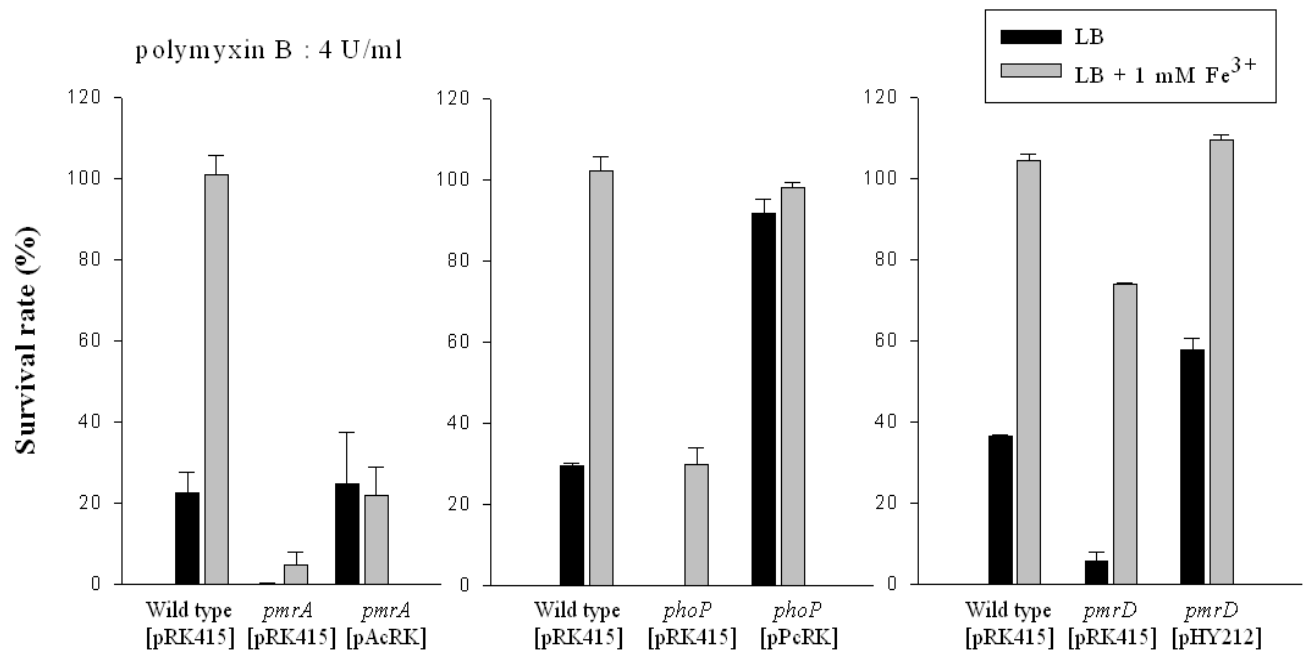
隔夜培養的菌液以 1 : 200 的比例重新培養於含 1 mM Fe³⁺ 的 LB 培養液，在 37°C 下振盪培養 3-4 小時。將菌液稀釋成 1-3 × 10³ CFU/ml，加入多黏菌素使最後濃度為 2 units/ml，在 37°C 下振盪培養 1 小時後直接塗盤於 LB 培養基使其長出單一菌落。存活率的計算是以多黏菌素作用後長出來的總菌數除以原始下反應未和多黏菌素作用的總菌數的百分比。質體 pFcRK 為 pRK415 包含 *pmrF* 完整基因及其核糖體結合位序列。



(A)

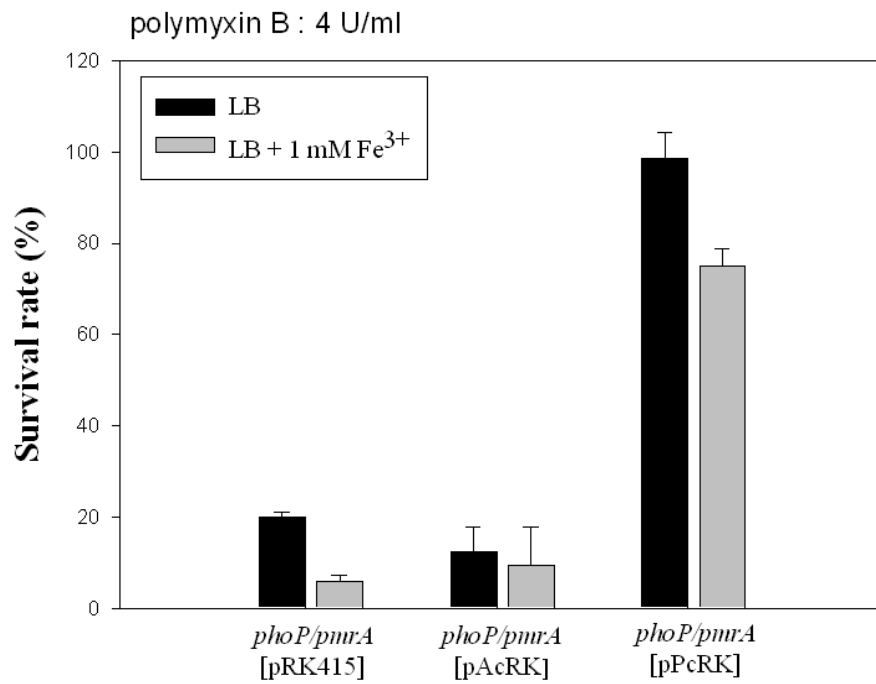


(B)

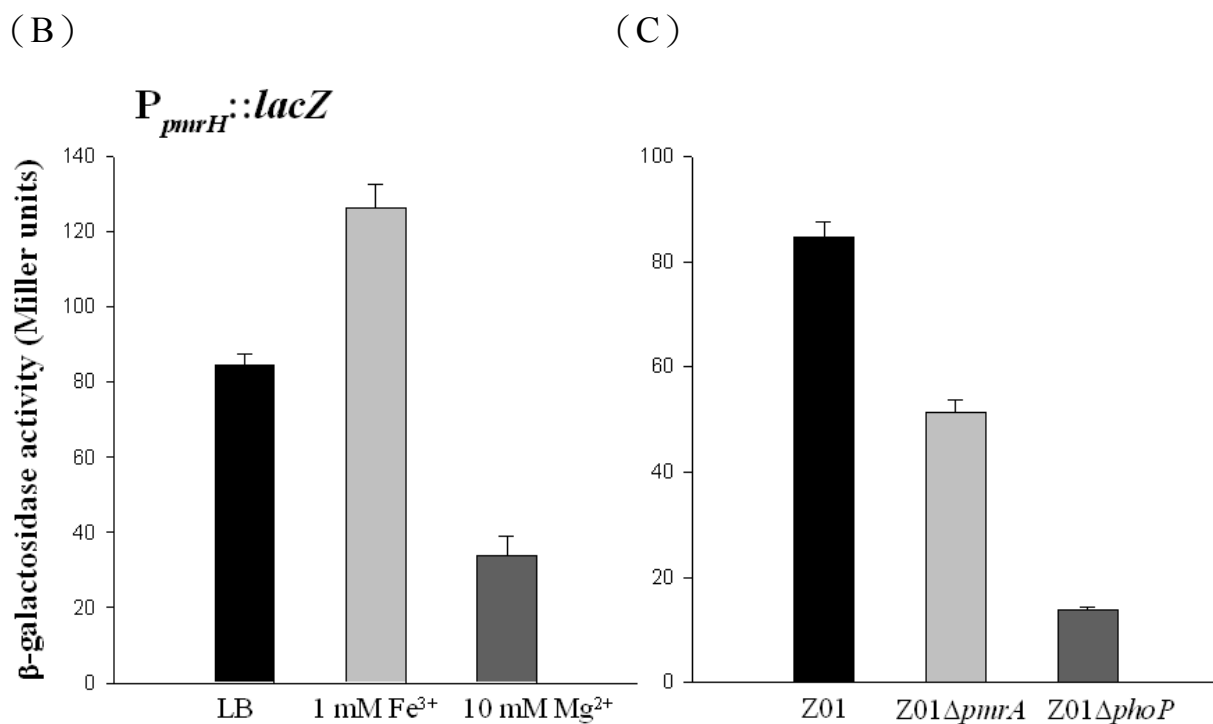
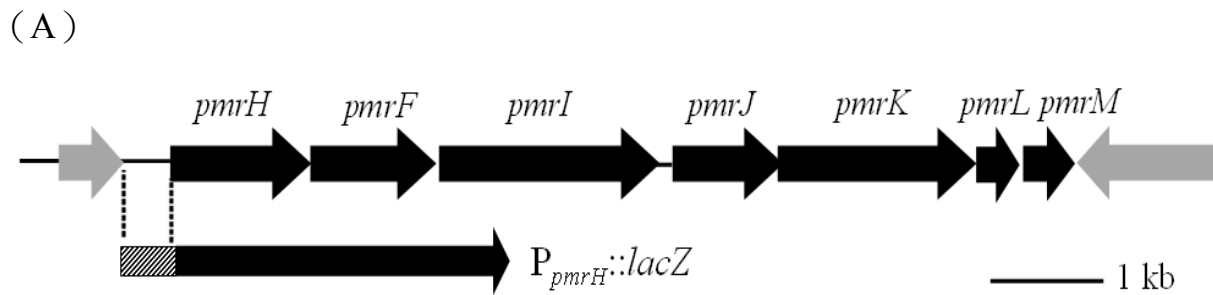


圖六、*pmrA*、*phoP* 和 *pmrD* 基因缺損株以及互補株對多黏菌素的抗性分析
野生株和 *pmrA*、*phoP* 及 *pmrD* 基因缺損株 (A) 以及 *pmrA*、*phoP* 和 *pmrD*
互補株 (B) 在濃度 4 units/ml 的多黏菌素環境下的存活率。質體 pAcRK、
pPcRK 及 pHY212 分別為 pRK415 包含 *pmrA*、*phoP* 或 *pmrD* 完整基因及其核
糖體結合位序列。





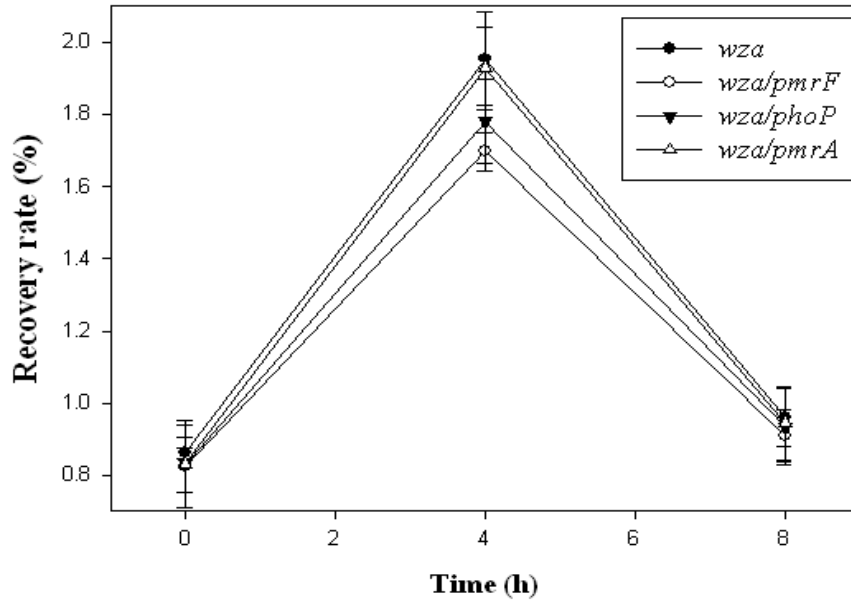
圖七、*pmrA/phoP*基因缺損的*pmrA*或*phoP*互補株對多黏菌素的抗性分析
*pmrA/phoP*突變株、*pmrA/phoP*基因缺損的*pmrA*或*phoP*互補株在濃度
 4 units/ml的多黏菌素環境下的存活率。



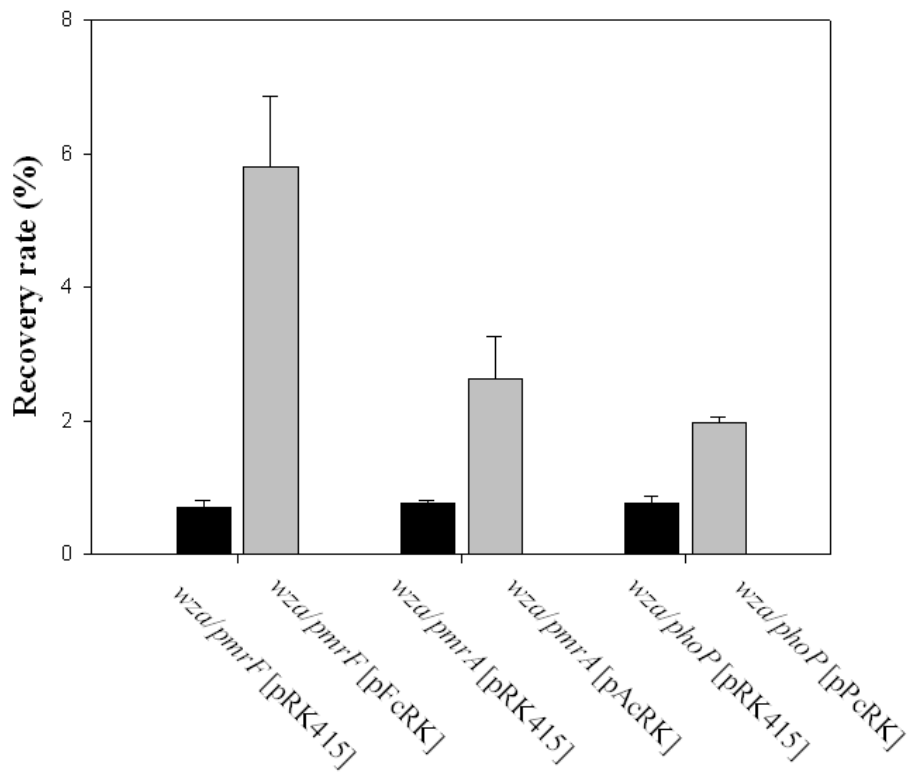
圖八、*pmr* 操縱子的基因組成示意圖和 $P_{pmrH}::lacZ$ 的活性測試

(A) 利用 VectorNTI 軟體 ([Invitrogen](#) Vector NTI™ Advance) 分析 *pmr* 操縱子的基因組成，並標示 $P_{pmrH}::lacZ$ (pHY072) 的建構方式。(B) 隔夜培養的菌液重新培養於 LB、LB+1 mM Fe^{3+} 及 LB+10 mM Mg^{2+} 中 3-4 小時，並測試 $P_{pmrH}::lacZ$ 的活性。(C) 隔夜培養的菌液重新培養於 LB 培養液 3-4 小時，並測量在野生株、*pmrA* 或 *phoP* 突變株中的 P_{pmrH} 活性。

(A)



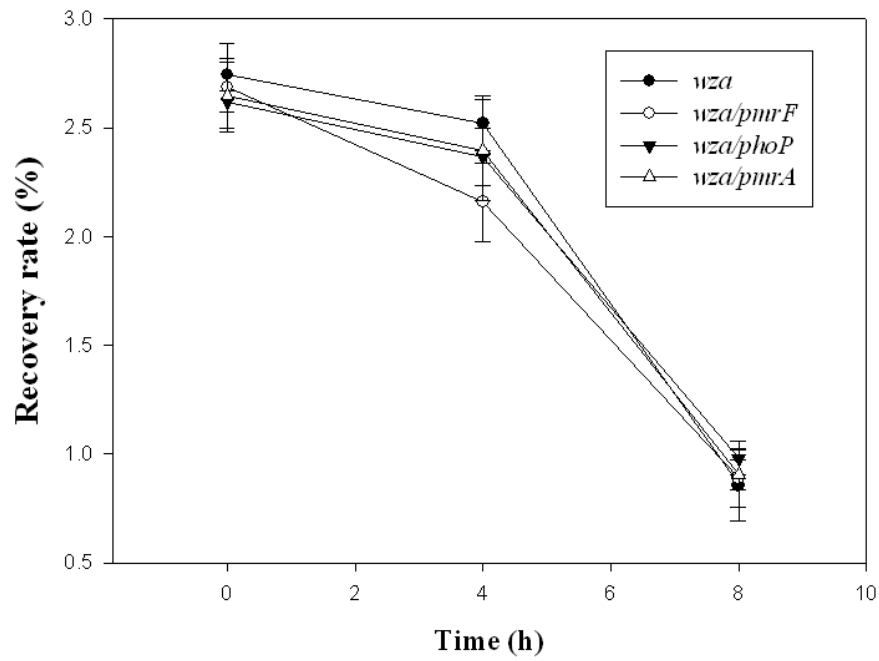
(B)



圖九、*pmrF*、*pmrA* 和 *phoP* 基因缺損株 (A) 及互補株 (B) 在 THP-1 細胞株內的存活率測試

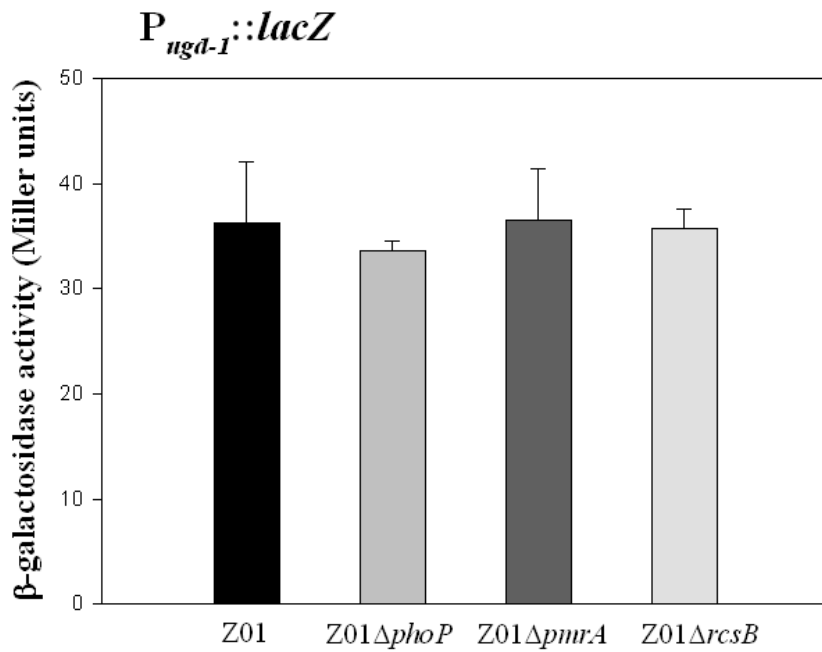
將 $m.o.i=30$ 的細菌加到已接種在 24 孔培養盤的細胞中，並培養在不含胎牛血清及抗生素的 RPMI 1640 液培養 2 小時，加入 gentamicin 抗生素作用 1 小時，之後分別在 0、4、8 小時加入 0.1% 的 Triton X-100 作用 10 分鐘，將菌液系列稀釋 (1/100X) 後直接塗盤於 LB 培養基使其長出單一菌落。回收率的計算是以經細胞吞噬後回收的總菌數除以下反應的總菌數的百分比。





圖十、*pmrF*、*pmrA* 和 *phoP* 基因缺損株在 RAW264.7 細胞株內的存活率測試

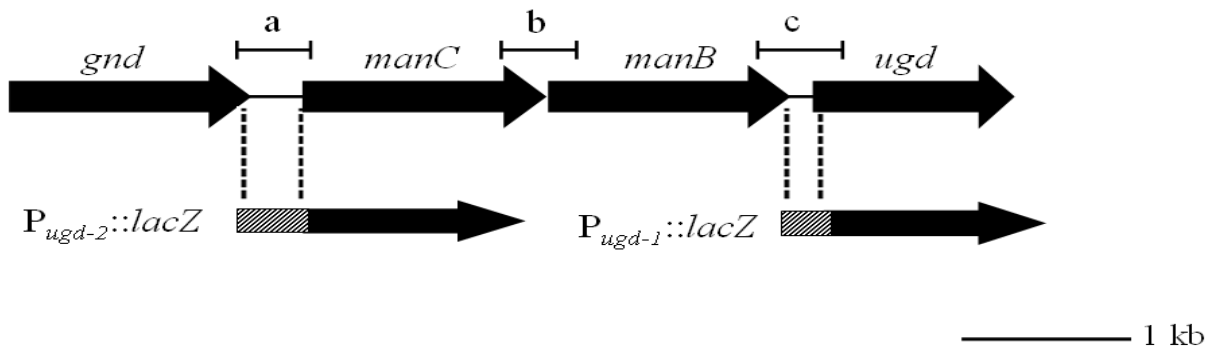
wza 野生株、*pmrF*、*phoP* 及 *pmrA* 突變株在受 RAW264.7 細胞株吞噬後 0、4、8 小時的回收率。



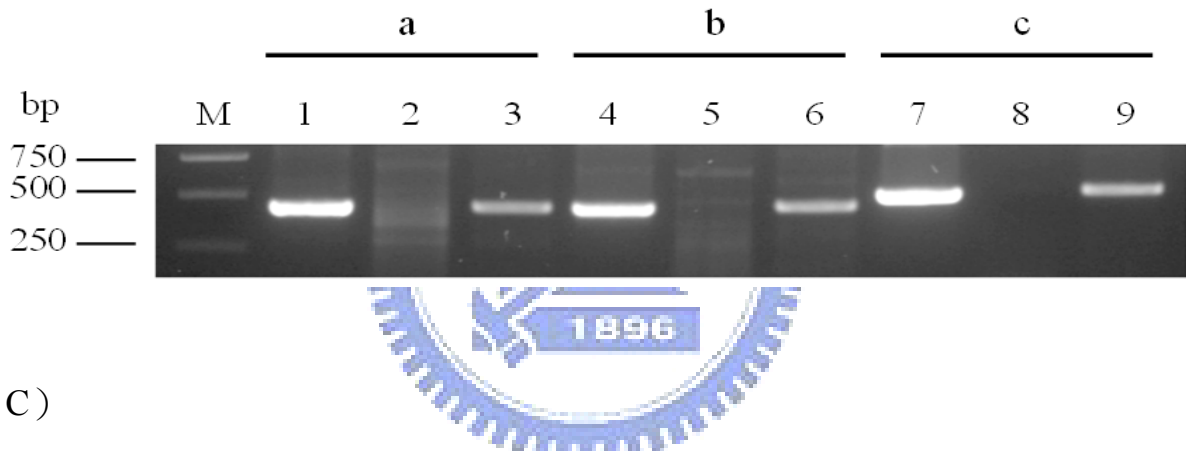
圖十一、 $P_{ugd-1}::lacZ$ 的活性測試

隔夜培養的菌液重新培養於 LB 培養液 3-4 小時，並測量在野生株、*phoP*、*pmrA* 或 *rcsB* 突變株中的 P_{ugd-1} 活性。

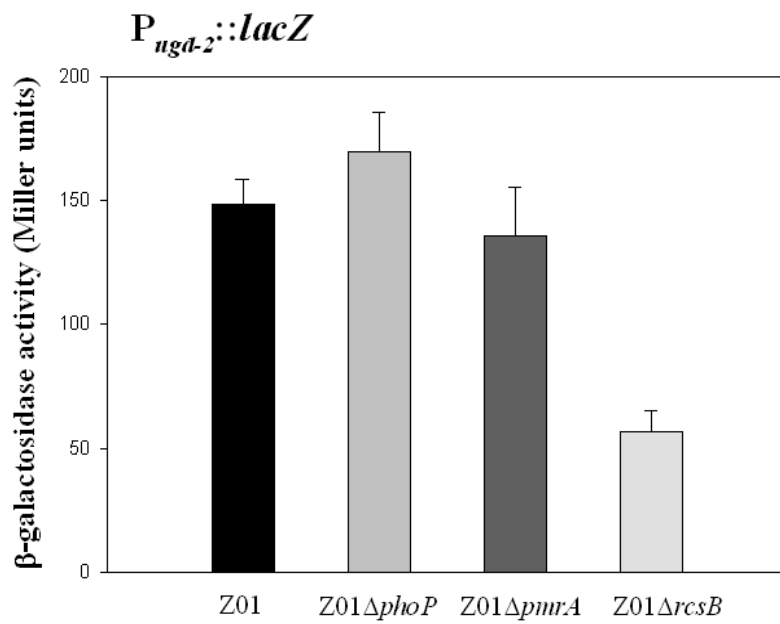
(A)



(B)



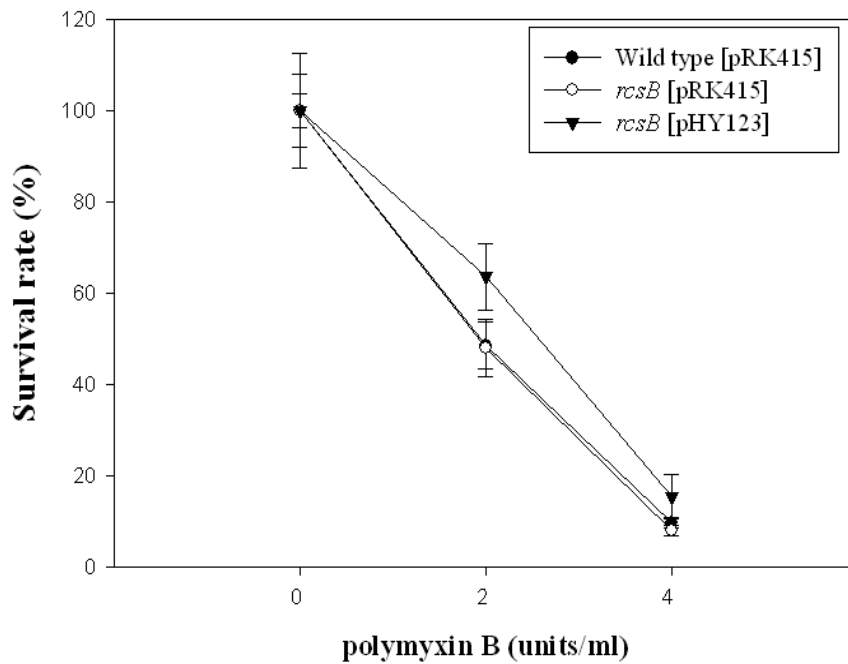
(C)



圖十二、RT-PCR 分析確認 *manC-manB-ugd* 操縱子和 $P_{ugd-2}::lacZ$ 的活性測試

(A) *ugd* 及上下游基因組成示意圖。a、b 和 c 分別為利用引子 Rorf1601/Rorf1602、Rorf1701/Rorf1702 和 Rugd01/Rugd02 進行 PCR 所增殖出 *gnd-manC*、*manC-manB* 和 *manB-ugd* 基因間的片段大小。 $P_{ugd-1}::lacZ$ 和 $P_{ugd-2}::lacZ$ 分別表示兩個所建構的 *ugd* 啟動子部位。(B) RT-PCR 分析 *manC*、*manB* 和 *ugd* 基因間的區域，PCR 增殖的片段 a、b 和 c 分別為 1-3 行 (431 bp)、4-6 行 (443 bp) 和 7-9 行 (510 bp)。第 1、4 和 7 行為 genomic DNA 的 PCR 產物，當做正對照組。第 2、5 和 8 行為 RNA 的 PCR 產物，當作負對照組。第 3、6 和 9 行為 cDNA 的 PCR 產物。(C) 隔夜培養的菌液重新培養於 LB 培養液 3-4 小時，並測量在野生株、*phoP*、*pmrA* 或 *rscB* 突變株中的 P_{ugd-2} 活性。





圖十三、*rcsB* 基因缺損株對多黏菌素的抗性分析

野生株、*rcsB* 突變株及 *rcsB* 互補株在濃度 2、4 units/ml 的多黏菌素環境下的存活率。質體 pHY123 為 pRK415 包含 *rcsB* 完整基因及其核糖體結合位序列。

附錄

GATGATCCCGTGGCTGCTGGTGGCGGAGCTTCTGTGCCTGAAGAACAGTTCCG
CTGAAATCGCTGGTGGCGGACCGCCAGGCGGC GTTCCCGGCGTCCGGGGGAG
ATCAACCGCAAGCTGGGAAATGCGGCGGAGGCGATAGCGCGCATCCGGGGCG
CAGTATGAGCCGGCGGCCGCACACATCGACACAACGGACGGTATCAGTATTGA
ATACCCTGAGTGGCGCTTTAACCTGCGCACGTCCAACACGGAGCCGGTGGTG
CGTCTGAACGTTGAGTCCAGAGCGGATACTGCGTTAATGAACGCCAAA ACTGA
AGAGATTTTAGCTCTTCTCAAGTAATGCATTACCCATAATGGGAGCCATAGGGTC
AGATTTTAATCGTATTATTGACCTTATGGCTTATTCCTTGACTTCCCACTGGTCAA
-10box NagC element -35box
GCGTAAAACCGCCACAGCATTATTTAATTCGTGGCTATCCGCCATTATCCAGT
TAACTGATTAAAGTGTAATCTCATG *ugd*

附錄一、*P_{ugd-1}* 的序列分析

標示 -10 box 和 -35 box 以及一 NagC 結合位。



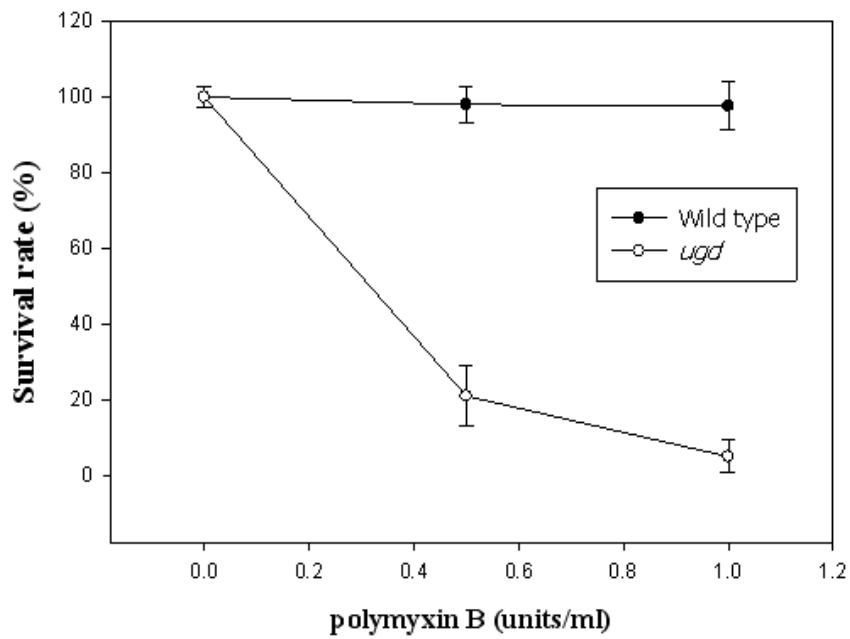
GAGAGGGGACGGCTAACTGCCAGGATTCCCGGGGATCTATAAGCGTACTGATAA
 AGAAGGTGTATTCCATACCGAGTGGTTGGAATAATCTTTATATGCCGCCCCAGTCAG
 GCCATTTGGCCTGACTGTAATCTATTGTTAGTTATTCTACAATAAACTGACCAAGTCAT
 CTTGTTTCCTCTCCTTCGTTGTTTTCCAGCTCTAATAAACCAAATGCTTATCTTT
 TAAGAATTTGCCATATTATACTTTTGTATACCTATAATAAGCTACTTCTGGCCTCAGAATATA
 TCTGGGTGTTTAAATAACAGGGTTTAAATTAAGGATATTAATATG *orf16*

-10 box Ihf element -35 box GcvA element
 putative RcsB binding box

附錄二、*P_{ugd-2}* 的序列分析

標示-10 box 和-35 box 以及 Ihf、GcV 結合位和一假定 RcsB 結合位。

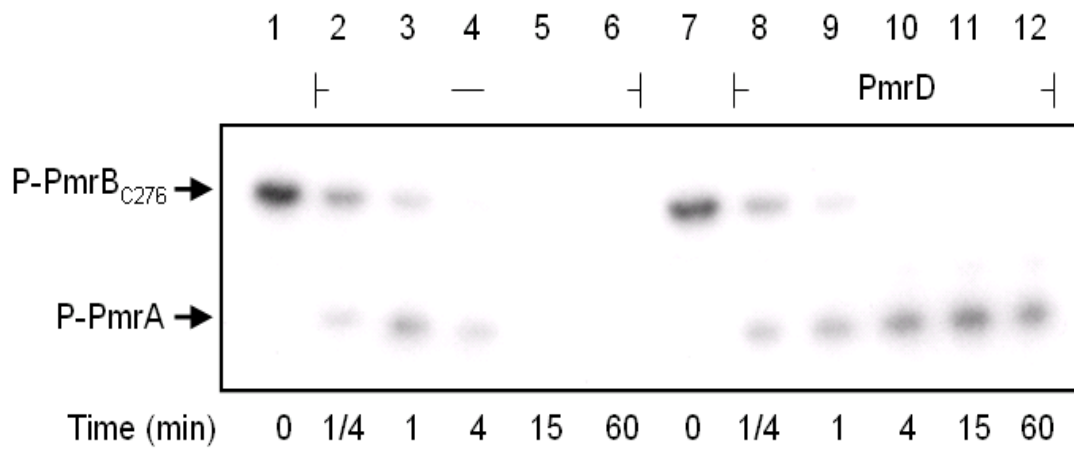




附錄三、*ugd* 基因缺損株對多黏菌素的抗性分析

野生株、*ugd* 基因缺損株在濃度 0.5、1 units/ml 的多黏菌素環境下的存活率。





附錄四、PmrA 重組蛋白的磷酸化試驗

PmrA 重組蛋白在含有 PmrD 或不含 PmrD 蛋白的條件下，在特定的不同時間點受其感應子蛋白 PmrB_{c276} 磷酸化的情形。箭頭分別代表磷酸化的 PmrB_{c276} 及 PmrA 蛋白。

