

國立交通大學

生物醫學研究所

碩士論文

RcsB 蛋白質在克雷白氏肺炎桿菌 CG43

中抗酸能力所扮演的角色

Role of RcsB in acid-resistance in

***Klebsiella pneumoniae* CG43**



研究生：林志桓

Student: Chih-Huan Lin

指導教授：彭慧玲 博士

Advisor: Hwei-Ling Peng, Ph.D

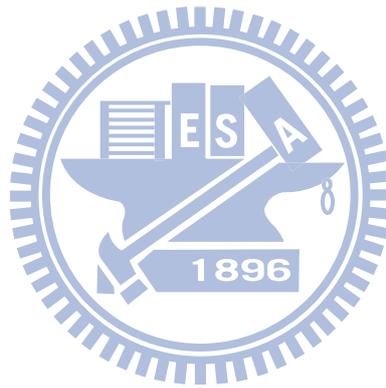
中華民國九十八年八月

August, 2009

中文摘要

已知 Rcs 雙分子訊息傳導系統參與調控細菌體中許多的生理反應；如同許多腸內菌，此雙分子系統的反應調控蛋白 *rcsB* 的基因缺損，會明顯的降低克雷白氏肺炎桿菌 CG43 莢膜多醣體的生合成。我們在此研究中探討：是否如同近期報導的大腸桿菌 RcsB 蛋白，克雷白氏肺炎桿菌 CG43 的 RcsB 也具有抗酸調控的功能，並進一步研究其調控機制。我們發現：克雷白氏肺炎桿菌 CG43 在弱酸 (pH 4.4) 適應一小時後，其抗酸逆境 (pH 3) 能力大幅提高，而 *rcsB* 基因的缺損會降低其抗酸能力，但 *rcsB* 的啟動子活性並不受弱酸的誘導。同時，我們利用生物資訊工具在 CG43 基因體序列 (<http://genome.nhri.org.tw/KP/index.php>) 中，找出六個可能由 RcsB 所調控的抗酸基因，其中 *yfdX*, *hdeD-hdeB1* 及 *hdeB2* 聚集座落於相對大腸桿菌的酸適應島嶼 (acid fitness island)；再經 PCR 選殖以 LacZ 來報告這六個啟動子的活性，結果發現 *cfa* 及 *yfdX* 在 *rcsB* 缺損株的表現明顯下降；然而，*cfa* 或 *yfdX* 基因缺損突變株的抗酸能力，與野生株差異不大；我們發現只有在靜置培養下，*yfdX* 的基因缺損才會降低克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力。而在靜置培養下分析 *hdeD-hdeB1*, *yfdX* 及 *hdeB2* 的啟動子活性，我們發現 *rcsB* 或 *kvhA* 的基因缺損都會降低上列啟動子的活性。最後，我們利用二維電泳比較分析 CG43 和 *rcsB* 基因缺損株的蛋白質體，結果發現在中性環境下 (pH 7.5)，沒有看到表現量差異很大的蛋白質點；而在酸適應條件下 (pH 4.4)，

發現有 2 個蛋白質點在 CG43S3 Δ *rscB* 的二維電泳膠上消失，另有 3 個蛋白質點的表現量，則在 CG43S3 Δ *rscB* 分別下降了 2.18, 1.90 及 1.52 倍。我們將進一步鑑定其蛋白質 ID，以了解是哪些蛋白質提高了抗酸能力。綜合以上結果，RcsB 在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 於震盪培養條件下，會調控未知的蛋白質來提高抗酸能力；而在靜置培養下，則可能藉由調控基因 *hdeD-hdeB1*, *yfdX* 及 *hdeB2* 的表現來提高其抗酸能力，同時，位於此可能的酸適應島嶼中的雙分子訊息傳導系統 KvhAS 也參與調控 HdeD, HdeB1, YfdX 及 HdeB2 的抗酸能力。



Abstract

The Rcs two component signal transduction system controls a variety of physiological functions in bacteria. Deletion of the response regulator gene *rcsB* in *Klebsiella pneumoniae* CG43, a highly encapsulated clinical isolate, resulted in reduction of the CPS production as reported for many enterobacteria. Recently, an involvement of RcsB in the acid resistance regulation has been reported in *Escherichia coli*. If *K. pneumoniae* RcsB plays a similar role is investigated and the regulatory mechanism also analyzed in this study. The resistance to acidic stress (pH 3.0) apparently increased for *K. pneumoniae* CG43 after an adaption under the weak acidic environment (pH 4.4). Deletion of *rcsB* reduced the bacterial survival under the acid stress treatment. However, the acid adaptation had no inducing effect for the expression of *rcsB*. Homologous gene search in CG43 genome (<http://genome.nhri.org.tw/KP/index.php>) using bioinformatic tools revealed six putative RcsB-dependent acid resistance genes. Among them, *yfdX*, *hdeD-hdeB1* and *hdeB2* genes were found to be clustered within the putative AFI (acid fitness island). The putative promoters were PCR amplified and cloned into the LacZ reporter plasmid pLacZ15. The activity measurement showed that the expression of *cfa* or *yfdX* was reduced in the *rcsB* deletion mutant. Deletion of *cfa* or *yfdX* had no effect on acid resistance ability of *K. pneumoniae*. Only under a statically culture condition, deficiency in the acid resistance

ability could be observed for the *yfdX* deletion mutant. Thus, the promoter activity of *yfdX*, *hdeD-hdeB1*, or *hdeB2* was analyzed under static culture. The result showed that deletion of *rcsB* or *kvhA* reduced the promoter activity of these genes. Finally, comparative proteome analysis of CG43S3 and CG43S3 Δ *rcsB* using two-dimensional electrophoresis was also employed. No significant change of expression fold was found under the growth at pH 7.5. While under the acidic condition (pH 4.4), 2 protein spots only present on the 2D gel of CG43S3 and 3 proteins with decreased expression level (-2.18, -1.90 and -1.52 fold, respectively) in CG43S3 Δ *rcsB* were observed. The proteins ID will be resolved in the near future. To sum up, RcsB appears to regulate some unknown proteins for acid resistance response under shaking culture. Under static culture with micro-aeration, expression of *yfdX*, *hdeD-hdeB1* and *hdeB2* was positively regulated by RcsB to increase the acid resistance activity. Moreover, the 2CS KvhAS located on the putative AFI is probably also involved in regulation of the acid resistance ability conferred by YfdX, HdeD, HdeB1 or HdeB2 in *K. pneumoniae* CG43.

致謝

2006年11月29日，我在交通大學生物科技研究所甄試入學口試時，碰到了彭慧玲老師，當時老師為其中一位口試老師，不過我落榜了；之後我再度報考交通大學生物醫學研究所，於2007年4月17日口試時，我再度碰到了彭老師。也許這就是所謂的緣分吧，我兩次口試都碰到了彭老師，放榜後，我順利考上了生物醫學研究所，因為老師的識人，讓我得以進入彭家這個大家庭，接受老師的指導。

兩年的時間真的過的很快，轉眼間，我即將帶著滿滿的收穫，踏出校園，步入社會，往自己人生的下一個目標邁進。這兩年的生活，最感謝的人是我的指導教授彭老師，每週跟老師討論讓我收穫許多，除了可以練習講出自己對實驗的看法之外，在跟老師討論的過程中，也對自己的實驗有了新的想法，或是解決一些實驗上的困惑，能夠遇到這樣一位不可多得的好老師，心中充滿了無限感激。

感謝清華大學張晃猷老師以及張老師實驗室的夥伴，在實驗上給予諸多的建議及幫助。

感謝長庚大學鄧致剛老師以及交通大學楊昀良老師，在百忙之中撥冗擔任我的口試委員，用心的修正我論文中的錯誤及指點我實驗中未曾想過的盲點。

感謝實驗室的大夥，因為有你們，這本論完才可以順利完成，也因為你們，這兩年的生活才會如此多采多姿。思緒縝密的新耀學長，在我剛進實驗室時，耐心的指導我，讓我可以順利進行我的研究；永

遠年輕的丸子學姊，總是在我失意時給我力量，也給我實驗上許多建議及幫助；擁有好歌喉的健誠學長，在我實驗遇到瓶頸時，細心的與我討論，幫我解決問題；溫柔美麗的靜柔及亮亮學姊，時常關心著我的生活；好同學小珊，總是聽我抱怨東抱怨西，一同分享喜怒哀樂；積極負責的顛峰及雅雯，不吝嗇的跟我分享一些實驗上的技巧；陽光運動男孩哲充，耐心的與我討論實驗，義氣的載我去坐客運，還有，你跳的 SORRY SORRY，實在是堪稱經典中的經典；不愛說話的承哲，慷慨的分享好吃的五穀雜糧麵包；開朗的佩君及家華，實驗室有妳們，總是可以聽到豪邁的笑聲；骨子裡帶著諧星特質的朝彥，總是帶來歡樂；熱心的洗髮精，幫我張羅回家的車票；崑云、品瑄以及豪君，為實驗室注入新的生命力。因為你們，我的碩班生涯才充滿精彩，謝謝你們，伴我一同寫下人生美好的一頁。

還有感謝吳東昆老師以及廖光文老師實驗室的成員，無私的提供我支援，給予我實驗上的幫助。

最後要感謝我親愛的家人，因為你們默默的付出及全力相挺，我的碩班生涯才會如此順遂。也感謝小欣，妳跟我說的話，我都有聽進去，都有記在心裡，也因為妳，我才可以順利完成我的論文。

最後，我即將邁向人生的另一段旅程，我會繼續努力，因為機會是留給準備好的人，與大家共勉！

志桓

民國九十八年八月一日筆於交通大學竹銘館分子調控實驗室

目錄

中文摘要.....	i
Abstract.....	iii
致謝.....	v
目錄.....	vii
表目錄.....	viii
圖目錄.....	ix
縮寫表.....	xi
前言.....	1
材料與方法.....	6
結果.....	13
討論.....	21
參考文獻.....	27



表目錄

表一：本研究所使用的菌株	33
表二：本研究所使用的質體	34
表三：本研究所使用的引子	36
表四：可能由 RcsB 所調控的抗酸基因	37
表五：CG43S3 與 CG43S3 Δ <i>rscB</i> 在中性環境下表現量有差異的蛋白質	38
表六：CG43S3 與 CG43S3 Δ <i>rscB</i> 在酸性環境下表現量有差異的蛋白質	39



圖目錄

圖一： <i>rcsB</i> 基因缺損降低克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力	40
圖二： <i>rcaA</i> 基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力沒有影響	41
圖三： <i>rcaB</i> 啟動子的活性不受 pH 值的影響	42
圖四：可能由 RcsB 所調控的抗酸基因啟動子區示意圖	43
圖五： <i>rcaB</i> 基因缺損降低 <i>cfa</i> 及 <i>yfdX</i> 啟動子的活性	44
圖六：建構 <i>cfa</i> 基因缺損突變株	45
圖七：建構 <i>yfdX</i> 基因缺損突變株	46
圖八： <i>cfa</i> 或 <i>yfdX</i> 基因缺損對細菌的生長沒有影響	47
圖九： <i>cfa</i> 或 <i>yfdX</i> 基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力沒有明顯影響	48
圖十：酸適應島嶼	49
圖十一： <i>rcaB</i> 或 <i>kvhA</i> 基因缺損降低 <i>hdeB2</i> , <i>hdeD-hdeB1</i> 及 <i>yfdX</i> 在靜置培養下啟動子的活性	50
圖十二： <i>rcaB</i> , <i>kvhA</i> 或 <i>yfdX</i> 基因缺損降低克雷白氏肺炎桿菌在靜置培養下的抗酸能力	51
圖十三：不同長度的 <i>yfdX</i> 啟動子在 <i>rcaB</i> 或 <i>kvhA</i> 基因缺損株下的活性	52
圖十四：不同長度的 <i>kvhA</i> 啟動子在 <i>rcaB</i> 基因缺損株下的活性	53
圖十五：克雷白氏肺炎桿菌在中性環境下的蛋白質表現圖譜	54
圖十六：克雷白氏肺炎桿菌在酸性環境下的蛋白質表現圖譜	55
圖十七：克雷白氏肺炎桿菌在酸性環境下表現量差異很大的蛋白質	56
圖十八：RcsB 在抗酸調控的可能相關機制	57
附錄一：Rcs 系統的訊息傳遞路徑	58
附錄二：Rcs 系統的基因組成及 <i>rcaB</i> 啟動子序列預測的轉錄因子	59

附錄三：草酸鹽分解代謝的成對反應及其所需的酵素.....60

附錄四：*rcaB* 基因缺損降低克雷白氏肺炎桿菌對氧化壓力的抗性61



縮寫表

ACN	<u>a</u> ce <u>t</u> ro <u>n</u> itri <u>l</u> e
AFI	<u>a</u> ci <u>d</u> <u>f</u> it <u>n</u> e <u>s</u> s <u>i</u> sl <u>a</u> nd
AR	<u>a</u> ci <u>d</u> <u>r</u> esi <u>s</u> tance
ArcA	<u>a</u> er <u>o</u> bi <u>c</u> <u>r</u> es <u>p</u> ir <u>a</u> ti <u>o</u> n <u>c</u> o <u>n</u> tr <u>o</u> l r <u>e</u> g <u>u</u> l <u>a</u> tor
ATP	<u>a</u> de <u>n</u> osi <u>n</u> e <u>t</u> ri <u>p</u> h <u>o</u> s <u>p</u> h <u>a</u> te
bp	<u>b</u> a <u>s</u> e <u>p</u> ai <u>r</u>
CFU	<u>c</u> o <u>l</u> o <u>n</u> y <u>f</u> o <u>r</u> mi <u>n</u> g <u>u</u> ni <u>t</u>
CPS	<u>c</u> ap <u>s</u> u <u>l</u> ar <u>p</u> o <u>l</u> y <u>s</u> ac <u>c</u> h <u>a</u> ri <u>d</u> e
CRP	<u>c</u> yc <u>l</u> ic AMP <u>r</u> ec <u>e</u> pt <u>o</u> r <u>p</u> ro <u>t</u> e <u>i</u> n
DNA	<u>d</u> e <u>o</u> xyribo <u>n</u> ucl <u>e</u> ic <u>a</u> ci <u>d</u>
DTT	<u>d</u> i <u>t</u> hi <u>o</u> thre <u>i</u> tol
Evg	<i><u>E</u>s<u>c</u>h<u>e</u>ri<u>c</u>h<u>i</u>a <u>v</u>ir<u>u</u>l<u>e</u>n<u>c</u>e g<u>e</u>n<u>e</u></i>
GABA	γ - <u>a</u> mi <u>n</u> o <u>b</u> u <u>t</u> yric <u>a</u> ci <u>d</u>
IAA	<u>i</u> do <u>a</u> ce <u>t</u> ami <u>d</u> e
Kvh	<i><u>K</u>l<u>e</u>bs<u>i</u>e<u>l</u>l<u>a</u> <u>v</u>ir<u>u</u>l<u>e</u>n<u>c</u>e g<u>e</u>n<u>e</u> <u>h</u>o<u>m</u>o<u>l</u>o<u>g</u>u<u>e</u></i>
LB	<u>L</u> ur <u>i</u> a- <u>B</u> er <u>t</u> ani
LPS	<u>l</u> ip <u>o</u> l <u>y</u> sac <u>c</u> h <u>a</u> ri <u>d</u> e
MALDI-TOF	<u>m</u> at <u>r</u> ix <u>a</u> ssi <u>s</u> t <u>e</u> d <u>l</u> as <u>e</u> r <u>d</u> es <u>o</u> r <u>p</u> ti <u>o</u> n/ <u>i</u> o <u>n</u> iz <u>a</u> ti <u>o</u> n- <u>t</u> i <u>m</u> e <u>o</u> f <u>f</u> li <u>g</u> h <u>t</u>
ONPG	<u>o</u> - <u>n</u> itro <u>p</u> h <u>e</u> n <u>y</u> l- β -D-galactopyranoside
PCR	<u>p</u> o <u>l</u> ym <u>e</u> r <u>a</u> s <u>e</u> <u>c</u> h <u>a</u> i <u>n</u> <u>r</u> e <u>a</u> ct <u>i</u> o <u>n</u>
Res	<u>r</u> eg <u>u</u> l <u>a</u> tor of <u>c</u> ap <u>s</u> u <u>l</u> ar <u>s</u> yn <u>t</u> h <u>e</u> s <u>i</u> s
SDS	<u>s</u> o <u>d</u> ium <u>d</u> o <u>d</u> ec <u>y</u> l <u>s</u> ulf <u>a</u> te
SPI	<i><u>S</u>al<u>m</u>o<u>n</u>e<u>l</u>l<u>a</u> <u>p</u>at<u>h</u>o<u>g</u>e<u>n</u>i<u>c</u>it<u>y</u> <u>i</u>sl<u>a</u>nd</i>
TCS	<u>t</u> wo <u>c</u> o <u>m</u> po <u>n</u> ent <u>s</u> ys <u>t</u> e <u>m</u>
TFA	<u>t</u> ri <u>f</u> lu <u>o</u> roacetic <u>a</u> ci <u>d</u>

前言

克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 為常見的伺機性病原菌，常造成社區感染及院內感染 (56)。臨床上，克雷白氏肺炎桿菌常在免疫不全的病人身上造成敗血症、肺炎、尿道感染、腦膜炎，及特定部位的化膿性感染 (73)。而在台灣的糖尿病病人身上，由肝膿瘍導致的嚴重併發症則與克雷白氏肺炎桿菌有高度的相關性 (67)。

克雷白氏肺炎桿菌屬革蘭氏陰性菌，外被大量的莢膜多醣體包覆，使其菌落具有高度的黏性 (1)。這層密集絲狀的莢膜構造包覆在菌體表面，可保護菌體免受多型態有核顆粒細胞 (polymorphonuclear granulocytes) 的吞噬，及血清因子的毒殺作用 (54, 55, 69)。據此多醣體的多樣構造，可將克雷白氏肺炎桿菌分成 77 種莢膜血清型 (51)，以小鼠腹腔注射模式分析顯示：K1 及 K2 血清型具有最高的毒性 (48)；最近的文獻指出：K1 及 K2 血清型的克雷白氏肺炎桿菌與肝膿瘍的發生有高度的相關性 (72)。除了莢膜多醣體，克雷白氏肺炎桿菌還具有黏附蛋白、螯鐵系統、脂多醣體 (LPS) 及抗血清因子等致病因子 (56)。

細菌感染成功的關鍵在於其是否有能力可以在不利的環境中生存及複製，而這些不利的環境存在著時常變動的挑戰，例如：氧氣的濃度、pH 值的變化，及滲透壓的改變等，而細菌藉由改變基因的表現來對抗這些挑戰。雙分子系統 (two component system, TCS) 廣泛分佈於所有細菌中，在細菌生理中扮演多樣性的調控角色，例如：壓力

抵抗、毒性調控、能量代謝、養分取得，及群體感應 (quorum sensing) 等 (11, 20, 41, 53, 59, 63)。TCS 包含感受蛋白及反應調控子，當感受蛋白感受到外界特定訊號時，會利用高能的三磷酸腺苷 (ATP) 將本身保留的組氨酸殘基自我磷酸化，之後，此磷酸根會傳給反應調控子上特定的天門冬氨酸殘基，而被磷酸化的反應調控子，則因結構變化會提高對特定目標 DNA 序列黏合的能力，而調控此基因的表現 (3, 41)。

Rcs (Regulator of Capsular Synthesis) 系統亦屬於 TCS 的一種，最早被發現參與大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 莢膜多醣體生合成的調控 (25)。相較於一般典型的 TCS，Rcs 系統除了具有感受蛋白 RcsC、反應調控子 RcsB，還具有包含組氨酸的磷酸根傳遞蛋白 RcsD、附屬調控子 RcsA，及鑲嵌在外膜上的脂蛋白 RcsF。而活化 Rcs 系統的方式除了可藉由環境中的訊號直接刺激 RcsC 之外，亦可藉由刺激 RcsF，而將訊號傳遞給 RcsC 後，再活化 Rcs 系統。而當 RcsC 接受到外來的訊號後，會自我磷酸化組氨酸殘基，再將此磷酸根傳遞給本身的天門冬氨酸殘基，此磷酸根會再傳遞給 RcsD 上的組氨酸殘基，最後磷酸化 RcsB 上特定的天門冬氨酸殘基。而被磷酸化後的 RcsB，則會形成同型二聚體 (homodimer)，或與 RcsA 形成異型二聚體 (heterodimer)，而分別調控下游目標基因的表現 (附錄一) (8, 41, 42)。

關於 Rcs 系統的分子活化訊號，目前仍不清楚；有文獻指出，大腸桿菌在低溫 (20°C)，且存在葡萄糖或高濃度鋅 (1 mM ZnCl₂) 的環境下，會活化此套系統的表現 (26)；而多種與包膜壓力 (envelope stress) 有關的因子，及 *djlA*、*lolA*、*ompG* 此三個基因的過量表現，也會活化此套系統 (10, 12, 14, 15, 34, 37)。在大腸桿菌中，Rcs 系統能

調控至少 5% 的基因體 (genome) (42, 57)，這些基因包括莢膜多醣體及鞭毛的生合成 (21, 25)，及一些位於細胞質週緣區 (periplasm) 與壓力反應有關的基因 (16)。另外，RcsB 會藉由調控兩個重組酶 FimB、FimE 的轉錄來控制第一型線毛的表現 (60)；及藉由調控兩個與細胞分裂有關的基因 *ftsA*、*ftsZ* 來控制細胞分裂 (7)。在沙門氏菌 (*Salmonella*) 中，IgaA 則會負向調控 Rcs 系統，避免此系統過度活化 (22, 23, 44, 68)。RcsB 會在 *S. typhi* 不同的致病階段，分別調控侵入蛋白、鞭毛及莢膜多醣體 (Vi 抗原) 的表現，進而改變 *S. typhi* 的侵入能力，以適應各階段的不同環境 (2, 66)；在 *S. enterica* serovar Typhimurium 中，Rcs 系統會誘導莢膜的生合成，持續活化 Rcs 系統，會增加莢膜的生合成，並減弱 *S. enterica* 對 BALB/C 老鼠的毒性 (24)；而 RcsB 也會藉由調控鞭毛操作子 (*flhDC*) 來抑制鞭毛的表現 (6, 68)；另外 Rcs 系統也會調控下列基因的表現：對老鼠造成持續感染相關的 *ydeI* 基因、修飾脂多醣體 lipid A 部分有關的 *ugd* 基因 (19, 29)、與毒性相關的操作子 *srfABC* 及毒性基因 SPI-2 (22, 68)；而近期有文獻指出，在 *S. enterica* 中，未被磷酸化的 RcsB，亦可正向調控毒性基因 *spvA* 的表現 (44)。而在克雷白氏肺炎桿菌的研究中，只知 Rcs 系統參與調控莢膜多醣體的生合成，我們發現克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3 Δ *rscB* 的莢膜多醣體生成量減少，且其菌落失去黏性 (36)。

腸內菌經過胃部的酸性環境，其抗酸 (acid resistance) 能力是造成後續感染的一個重要因子，因此，腸胃道的致病菌均具備特定的抗酸機制，使得少量的菌體得以在胃酸環境中生存，進而進入較鹼性的腸內環境，大量複製而造成感染。目前已知大腸桿菌有四套 AR 系統：

第 1 套 AR 系統在其穩定生長期 (stationary phase) 時表現且會受到葡萄糖的抑制，已知 RpoS 及 CRP 會參與調控這套系統 (9, 58)；其他三套 AR 系統則不受到葡萄糖的抑制，但需要特定的氨基酸 (amino acid) 來執行其抗酸的功能：第 2 套 AR 系統需要谷氨酸 (glutamate)，第 3 套 AR 系統需要精氨酸 (arginine)，而第 4 套 AR 系統則需要離氨酸 (lysine)。這些氨基酸依賴型抗酸系統是利用成對的脫羧酶 (decarboxylase) 及轉運蛋白 (antiporter) 來達到保護菌體的目的，藉脫羧酶將氨基酸脫去一個羧基，並消耗菌體內的氫離子 (proton)，提高菌體內的 pH 值，而達到抗酸的目的，而脫羧後的產物再藉由轉運蛋白運至菌體外。第 2 套 AR 系統的谷氨酸脫羧酶為 GadA 及 GadB，其轉運蛋白為 GadC；第 3 套 AR 系統中的精氨酸脫羧酶為 AdiA，其轉運蛋白為 AdiC；第 4 套 AR 系統中的離氨酸脫羧酶為 CadA，而其轉運蛋白為 CadB (9, 17, 28, 30, 49, 58)。在 2007 年有文獻指出，大腸桿菌的 RcsB 可以調控第 2 套谷氨酸依賴型抗酸系統，*rcsB* 基因缺損會大幅降低其谷氨酸依賴型的抗酸能力，同時也降低 *gada* 及 *gadBC* 的表現；然而，經活化 RcsCD 傳導路徑或表現過量的 RcsA 來增加 RcsB 的活性，卻降低該抗酸能力。因此，RcsB 在該抗酸系統扮演雙向調控的角色 (10)。

除了上述四套 AR 系統外，在大腸桿菌的基因體中，尚有一組由 12 個基因組成的酸適應島嶼 (acid fitness island, AFI)，座落於染色體 78.8 min，這 12 個基因分別為 *slp*, *dctR*, *yhiD*, *hdeB*, *hdeA*, *hdeD*, *gadE*, *mdtE*, *mdtF*, *gadW*, *gadX* 及 *gada*。在酸性環境下生長時，大部分的 AFI 基因表現量會提高；若將某些 AFI 基因突變，則會造成大腸桿菌

失去在 pH 2 的環境下存活的能力 (46)。

克雷白氏肺炎桿菌亦屬於腸內菌，有關其抗酸能力的研究極少；本實驗室先前研究發現，*fur* 或 *yfiD* 基因缺損，會降低克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力 (65, 70)。但其他關於克雷白氏肺炎桿菌的抗酸機制，目前則不是非常清楚，相關的抗酸系統是否存在於克雷白氏肺炎桿菌中，仍需進一步研究。

本研究中，我們希望探討在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中，RcsB 對其抗酸能力是否扮演重要的角色及其調控機制。首先，我們先確定在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中，*rscB* 基因缺損是否影響其抗酸能力；接著利用生物資訊 (bioinformatics) 工具，預測可能由 RcsB 所調控的抗酸基因，其作法為：首先參考大腸桿菌的相關文獻，找出跟抗酸相關的基因；接著，在已知的克雷白氏肺炎桿菌 CG43 基因體序列 (<http://genome.nhri.org.tw/KP/index.php>) 比對 (blastp)，搜尋上述基因的同源基因；並進一步利用網頁 SoftBerry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)，及已知的 RcsB 結合序列 (GANnnnnC) (4)，找出可能由 RcsB 所調控的抗酸基因，並建構其啟動子報告質體，分別在 CG43 及 *rscB* 基因缺損突變株中，測定這些啟動子的活性，確定這些基因是否受到 RcsB 的調控；同時，也將藉二維電泳分析比較 CG43 及 *rscB* 基因缺損突變株的蛋白質體，進一步分離鑑定受 *rscB* 基因缺損影響表現的蛋白質。最後，將建構相關的基因缺損突變株，進而說明這些基因與抗酸的關係及 RcsB 在抗酸調控的機制。

材料與方法

菌株、質體及生長環境

本研究所使用的菌株及質體分別列於表一及表二。克雷白氏肺炎桿菌 CG43 是由長庚紀念醫院林口分院分離的臨床分離株。菌株震盪或靜置培養於 37°C，已加入適當抗生素的 Luria-Bertani [LB：10 g/L 胰蛋白胍 (tryptone)、5 g/L 酵母萃取物 (yeast extract) 及 10 g/L 氯化鈉 (sodium chloride)] 培養液或培養基。而使用的抗生素及濃度分別為：鏈黴素 (streptomycin) 500 $\mu\text{g/ml}$ 、氨比西林 (ampicillin) 100 $\mu\text{g/ml}$ 、氯黴素 (chloramphenicol) 35 $\mu\text{g/ml}$ 、卡那毒素 (kanamycin) 25 $\mu\text{g/ml}$ 及四環黴素 (tetracycline) 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 。

基因重組技術

基因重組實驗參考標準流程 (31)。質體 DNA 使用 High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) 抽取；限制酶及 DNA 修飾酵素分別購置 New England Biolab (Beverly, MA) 或 MBI Fermentas (Hanover, MD)，並且依照供應商建議的方式使用。而 PCR 使用的酵素為 Blend Taq-PLUS- (COSMO)；PCR 產物及 DNA 片段則使用 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) 抽取。而 PCR 所使用的引子 (primer) 由生工公司 (MDBio) 合成並詳列於表三。

谷氨酸依賴型抗酸能力評估

本分析方法根據以下文獻並修飾部分步驟 (9); 細菌在含有 0.4% 葡萄糖的 LB (LBG) 培養液隔夜培養後，1000 倍稀釋至預熱，且含有 0.4% 葡萄糖的 M9 (pH 2.5, adjusted with HCl) 培養液中，培養液中不加或加入 1.5 mM 谷氨酸，培養 0、0.5、1、2、4 小時後，分別將測試菌液稀釋至適當濃度並均勻塗布於 LB 固態培養基上；存活率是根據在 0.5、1、2、4 小時後，每毫升存活的菌數 (CFU) 比上 0 小時每毫升的菌數的比值。

其他型抗酸能力評估

待測菌株分別採取震盪或靜置培養方式測試抗酸能力；震盪培養方式根據以下文獻 (27) 並修飾部分步驟；細菌在 LB 培養液隔夜培養後，20 倍稀釋加入新鮮的 LB 培養液中，並再培養 3 個小時，之後將菌體移至 pH 4.4 的 LB 培養液中，適應 1 小時，最後移至 pH 3.0 的 M9 培養液中，培養 45 分鐘或 1 小時；而靜置培養方式為，細菌在 LB 培養液靜置培養 20 小時後，移至 pH 3.0 的 M9 培養液中靜置培養 45 分鐘或 1 小時；之後分別將以上兩種測試菌液稀釋至適當濃度並均勻塗布於 LB 固態培養基上；存活率是根據在 45 分鐘或 1 小時後，每毫升存活的菌數和 0 小時每毫升菌數的比值；每次獨立實驗以三重覆數據求得平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中具代表性的一次。

啟動子報告質體建構

將各基因預測的啟動子片段或截短片段，利用 PCR 增幅後，接入 yT&A 選殖載體中，再次轉殖至 pLacZ15 (39)報告質體中，使這些啟動子片段與缺乏啟動子的 *lacZ* 報告基因黏合，再藉由 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase)活性評估，以測定這些啟動子的活性。

β -半乳糖苷酶活性評估

本分析方法根據 Miller (47)的方法修訂：待測菌株以適當方式培養後，取 100 μ l 的待測菌液，加入含有 900 μ l 的 Z buffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 50 mM β -mercaptoethanol), 17 μ l 的 0.1% SDS 及 35 μ l 的三氯甲烷 (chloroform)的混合液中，並於 30°C 水浴槽靜置 10 分鐘，再加入 200 μ l 的 4 mg/ml 的 ONPG，混合均勻後，靜置於 30°C 水浴槽直到黃色清晰可見，最後，再加入 500 μ l 1 M Na_2CO_3 以終止反應，最後，使用分光光度計 (Spectronic 20 Genesys)讀取在波長 420 nm 下的吸光值 (OD_{420})；每次獨立實驗以三重覆數據求得平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中具代表性的一次。

基因缺損突變株建構

基因缺損突變株建構方法採取同源基因互換方式；利用 PCR 增幅要缺損的目標基因前後約 1000 bp 的 DNA 片段，再將此兩片段結合，並接入自殺性質體 pKAS46 (62)中，再將此質體利用電穿孔方式

(electroporation) 送入 *E. coli* S17-1 λ pir；之後，利用接合作用 (conjugation) 將此質體送入克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3 中，再利用含有 ampicillin 及 kanamycin 的 M9 固態培養基選出該質體經由同源互換作用，而成功插入染色體中的接合體 (transconjugant)；隨機選取該接合體的 5 顆單一菌落，於 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，利用 PCR 檢查該質體確實成功插入染色體中；任選一株質體成功插入染色體中的接合體，於含有 streptomycin 的 LB 培養液 37°C 培養 8 小時後，稀釋至適當濃度，並均勻塗布於含有 streptomycin 的 LB 固態培養基上，隔夜培養後，用牙籤隨機挑選至少 50 顆單一菌落，同時劃於含有 streptomycin 或 kanamycin 及 ampicillin 的 LB 固態培養基上，挑選對 streptomycin 具有抗性，且對 kanamycin 及 ampicillin 沒有抗性的菌落，最後 PCR 檢查，帶有預期突變片段大小的菌株即為突變株。

生長曲線量測

細菌在 LB 培養液隔夜培養後，將其稀釋至新鮮的 LB 培養液 (OD_{600} 約為 0.15)，再置於 37°C 培養，並在不同的時間點測量其在波長 600 nm 下的吸光值。

抗氧化壓力能力評估

待測菌株分別採取震盪或靜置兩種培養方式測試抗氧化壓力能力；細菌在 LB 培養液隔夜培養後，20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液中，並再培養至 OD_{600} 為 0.6~0.7，之後吸取 1 毫升菌液至乾淨且滅過菌的

空試管中，再加入適量的雙氧水 (H_2O_2)，使其最終濃度為 30 mM，並培養 35 分鐘；或將細菌在 LB 培養液靜置培養 20 小時後，吸取 1 毫升菌液至乾淨且滅過菌的空試管中，再加入適量的雙氧水，使其最終濃度為 40 mM，並靜置培養 35 分鐘；之後分別將以上兩種測試菌液稀釋至適當濃度並均勻塗布於 LB 固態培養基上；而控制組則為相同的培養方式但未加入雙氧水；存活率是根據實驗組每毫升所存活的菌數比上控制組每毫升的菌數的比值；每次獨立實驗以三重覆數據求得平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中具代表性的一次。

二維電泳實驗

我們分別採取以下兩種方法培養細菌並收取可溶性蛋白質進行二維電泳實驗；細菌隔夜培養後，20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液 (pH 7.5) 中，並再培養至對數中期 (mid-log phase, $\text{OD}_{600}=0.6\sim 0.7$)；或將隔夜培養後的細菌 20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液 (pH 7.5) 中，再培養 3 個小時，再將菌體移至 pH 4.4 的 LB 培養液適應 1 小時；細菌培養好後，隨即移至超高速離心瓶，並以超高速 (30000 rpm) 離心 30 分鐘，將菌體離心下來，接下來以 wash buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM sucrose,) 清洗三次，再以 lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5) 清洗一次；將菌體清洗好後，以 3 ml 的 lysis buffer 懸浮菌體，隨即以反覆冷凍解凍並輔以超音波震碎儀 (sonication) 打破菌體，之後再以超高速 (30000 rpm) 離心 40 分鐘，去除不可溶的部分；離心後的上清液以核酸酶 (DNase, RNase), 37°C 作用 45 分鐘，作用完後以 15000 rpm 離心 30 分鐘去除不可溶的物質；離心後的上清液再通過 10 kDa

的 microcon (Millipore) 以去除雜質；處理好的樣本以 Bradford 方式 (5) 測定蛋白質濃度，並將 250 μg 的蛋白質定量分裝，分裝好的樣本以冷凍乾燥法乾燥並冰於 -80°C 冰箱保存備用。

待要進行二維電泳時，將樣本自 -80°C 冰箱取出，並以 250 μl rehydration buffer (2 M thiourea, 7 M urea, 2% CHAPS, 1% IPG buffer, 0.002% bromophenol blue, 0.28% DTT) 溶解樣本，並以 15000 rpm 離心 20 分鐘以去除不可溶的物質，之後將樣本加入 holder 中，再將 strip (pH 4-7, 13cm) 輕輕放入，加入適量的專用礦物油，並蓋上蓋子；再將 holder 放置於 IPGphor (GE Healthcare) 進行等電點聚焦 (isoelectric focusing)；待聚焦完畢後，將 strip 小心取出並浸泡於含有 1% DTT 的 equilibration buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue) 15 分鐘，再將 strip 移至含有 2.5% IAA 的 equilibration buffer 浸泡 15 分鐘；將 strip 處理完畢後，直接以 12.5% 的聚丙烯酰胺膠體 (polyacrylamide gel) 進行二維電泳。電泳完畢後，以 Sypro Ruby (Invitrogen) 染色，再以 Typhoon 9200 (GE Healthcare) 進行掃描。

二維電泳膠片分析比對

電泳膠片利用 ImageMaster 2D platinum 6.0 (GE Healthcare) 軟體進行蛋白質點的偵測、膠片配對及蛋白質點的定量，並使用 student *t*-test 來比較 CG43S3 及 CG43S3 Δ *rcsB* 膠片上蛋白質點的相對體積 (% vol)。具有顯著差異且表現量 (% vol) 差異在 1.5 倍以上的蛋白質點將被挑出並鑑定其蛋白質 ID。

膠內酵素分解 (in-gel digestion)

本實驗方法參考以下文獻 (61)，並作部分修飾；將有差異的蛋白質點從電泳膠片挖下，加入 100 μl wash buffer (50% ACN, 25 mM NH_4HCO_3) 清洗 15 分鐘，移除液體後加入 100 μl 100% ACN，使膠體脫水至皺縮狀，移除 ACN 後加入 50 μl 50 mM NH_4HCO_3 浸泡 5 分鐘，使膠體再水化 (rehydration)，之後再加入 50 μl 100% ACN 混合均勻並浸泡 15 分鐘，移除液體後再加入 100 μl 100% ACN，使膠體脫水至皺縮狀，移除溶液並風乾；最後，加入 3 μl 含有 20 ng/ μl trypsin (promega) 的 25 mM NH_4HCO_3 溶液，並在 4°C 靜置 1 小時，使 trypsin 完全進入膠體內，並加入適當體積的溶液 (25 mM NH_4HCO_3) 以避免膠體乾掉，再將膠體置於 37°C 隔夜作用後，加入 2 μl 含有 100% ACN 及 1% TFA 的溶液，超音波震盪 10 分鐘，以將胜肽 (peptide) 自膠體中萃取出來，重複以上步驟三次，再將三次所得到的產物混合在一起，得到的萃取物送至清大生命科學系進行 MALDI-TOF 質譜分析以鑑定蛋白質。

結果

谷氨酸依賴型抗酸能力測試

在 2007 年有文獻指出，在大腸桿菌中，*rcsB* 基因缺損突變株，會大幅降低其谷氨酸依賴型抗酸能力 (10)；因此，我們首先確定在克雷白氏肺炎桿菌中，*rcsB* 是否也扮演相關的調控角色。結果發現：不論是否加入谷氨酸，在 pH 2.5 的 M9 培養液培養 0.5 小時後，CG43S3 或 CG43S3 Δ *rcsB* 的存活率都相當低，幾乎無法存活。

rcsB 基因缺損降低克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力

當測試克雷白氏肺炎桿菌的谷氨酸依賴型抗酸能力時，細菌在 pH 2.5 的 M9 培養液中幾乎無法存活，無法看出差異。因此我們參考文獻 (27) 的方法；在細菌培養好後，先在 pH 4.4 的 LB 培養液適應 1 小時後，再移至 pH 3.0 的 M9 培養液中，測試其抗酸能力。結果如圖一，當細菌經過弱酸的 LB 培養液適應後，其抗酸能力大幅提高，而 CG43S3 Δ *rcsB* 其抗酸能力則較 CG43S3 下降許多；而當我們在 CG43S3 Δ *rcsB* 送入會表現 *rcsB* 的質體 pHY123 後，其抗酸能力則回復至與 CG43S3 相當。

rcsA 基因缺損不會影響克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力

因為 RcsB 會與 RcsA 形成異型二聚體，進而調控目標基因的表現，因此，我們想要確認 RcsA 是否也參與調控抗酸能力。結果如圖

二，CG43S3 Δ *rcaA* 其抗酸能力並沒有明顯下降，而與 CG43S3 相當。

***rcaB* 的表現不受 pH 值的影響**

因為 CG43S3 在酸適應後，其抗酸能力明顯提高許多，且 *rcaB* 與抗酸能力有明顯的相關性，因此，我們懷疑 *rcaB* 的表現，在酸性環境下會提高，進而提高 CG43S3 的抗酸能力，所以我們利用帶有 *rcaB* 預測啟動子片段的報告質體 pHY064，並在不同 pH 值下測定其活性。結果如圖三，不論在 pH 7.0, pH 5.5 或 pH 4.4 的條件下，*rcaB* 的表現量都非常低，並沒有顯著差異。

利用生物資訊工具預測可能由 RcsB 調控的抗酸基因

因為 *rcaB* 的表現並不會受到 pH 值的影響，所以我們懷疑 *rcaB* 跟抗酸能力有關，可能是藉由調控下游基因的表現，進而調控克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力。所以我們利用生物資訊工具預測可能由 RcsB 調控的抗酸基因；首先，我們參考相關文獻 (45, 58)，找出大腸桿菌中跟抗酸相關的基因，總共挑選出 14 個基因 (表四)；該文獻作者是利用微晶片 (microarray) 或基因缺損方式來推測該基因可能與抗酸有關；接著，利用 protein blast 比對已知的克雷白氏肺炎桿菌 CG43 基因體序列 (<http://genome.nhri.org.tw/KP/index.php>)，共找出 10 個同源基因；進一步利用網頁 SoftBerry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 分析上述 10 個基因 5 端未轉錄的序列，確定該序列可能為一啟動子，並在該序列搜尋是否含有 RcsB

結合序列 (GAnnnnnC) (4)，其中有 8 個基因的啟動子序列包含 RcsB 結合序列，而其中 *adiA* 及 *adiC* 可能為氨基酸依賴型抗酸系統，因為先前實驗發現克雷白氏肺炎桿菌可能沒有類似的抗酸系統，所以我們先挑選其他 6 個基因出來研究，分別為 *cfa*, *hdeB2*, *hdeD*, *ydeP* (KPN_01825), *yfdX* 及 *yhiO*，其相關敘述列於表四，而基因大小及預測到的 RcsB 結合序列，則如圖四所示。

***rscB* 基因缺損降低 *cfa* 及 *yfdX* 啟動子的活性**

為了確認上述 6 個基因是否會受到 RcsB 的調控，我們利用引子放大其預測的啟動子片段，並接入 pLacZ15 (39) 中，進而得到帶有該基因啟動子片段的質體 P_{cfa} , P_{hdeB2} , $P_{hdeD-hdeB1}$, P_{ydeP} , P_{yfdX} 及 P_{yhiO} ，再將上述質體利用接合作用送入 Z01 及 Z01 $\Delta rcsB$ 中；將以上待測菌株培養好後，先在 pH 4.4 的 LB 培養液適應 1 小時後，再進行啟動子活性測試。結果如圖五，*cfa* 及 *yfdX* 啟動子在 *rscB* 基因缺損的條件下，其活性會較野生菌株低，而其他 4 個基因的啟動子活性，則沒有看到明顯差別。

建構 *cfa* 及 *yfdX* 基因缺損突變株

因為 *cfa* 及 *yfdX* 啟動子活性會受到 RcsB 的調控，且其在大腸桿菌中與抗酸相關，所以我們想確認，在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中，*cfa* 及 *yfdX* 是否也與抗酸相關，所以建構其基因缺損突變株。利用 PCR 增幅 *cfa* 或 *yfdX* 前後約 1000 bp 的 DNA 片段，再將此兩片段結合，

並接入自殺性質體 pKAS46 (62) 中，分別得到質體 pCH014 及 pCH015，再利用接合作用分別將質體送入克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3 中，利用同源互換作用而得到基因缺損突變株。引子 CH028/CH031 用來確認 *cfa* 基因缺損突變株，而引子 CH024/CH027 則用來確認 *yfdX* 基因缺損突變株 (圖六，圖七)。

***cfa* 或 *yfdX* 基因缺損不會影響細菌的生長**

在獲取 CG43S3 Δ *cfa* 及 CG43S3 Δ *yfdX* 突變株後，我們首先確認 *cfa* 或 *yfdX* 基因缺損是否會影響細菌的生長。結果如圖八，*cfa* 或 *yfdX* 基因缺損均不會影響細菌的生長。

***cfa* 或 *yfdX* 基因缺損不會影響克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力**

在確認 *cfa* 或 *yfdX* 基因缺損不會影響細菌的生長後，我們測試 *cfa* 或 *yfdX* 基因缺損是否會影響細菌的抗酸能力。結果如圖九，不論是 CG43S3 Δ *cfa* 或 CG43S3 Δ *yfdX*，其抗酸能力均沒有明顯下降，而與 CG43S3 相當。

在克雷白氏肺炎桿菌中預測相對酸適應島嶼的基因組

利用生物資訊工具預測到的抗酸基因中，*hdeB1*、*hdeB2* 及 *hdeD* 均屬於大腸桿菌中酸適應島嶼的基因，且其均位於 *kvhAS* 的兩側；根據序列比對分析結果，*kvhAS* 與 *evgAS* 具有高度的同源性 (39)，而 *EvgAS* 在大腸桿菌中，已知與多重抗藥性、抗酸及抗熱相關 (13, 40,

50)；所以我們預測 *kvhAS* 此套 TCS，亦與抗酸有關，且與鄰近的抗酸基因，形成克雷白氏肺炎桿菌的酸適應島嶼 (圖十)。

***rcsB* 或 *kvhA* 基因缺損降低 *hdeB2*, *hdeD-hdeB1* 及 *yfdX* 啟動子的活性**

因為酸適應島嶼的基因 *hdeB2* 及 *hdeD-hdeB1*，其啟動子在有氧且經過酸適應的情況下，均沒有明顯的活性 (圖五)，因此我們在靜置培養下，測定這些基因啟動子的活性；同時，並確認這些啟動子的表現是否會受到 *kvhA* 的調控。結果如圖十一，*hdeB2*, *hdeD-hdeB1* 及 *yfdX* 啟動子的活性，在靜置培養下，均有明顯的增加，且同時受 *rcsB* 及 *kvhA* 基因缺損的影響。

***rcsB*, *kvhA* 或 *yfdX* 基因缺損降低克雷白氏肺炎桿菌在靜置培養下的抗酸能力**

因為 *rcsB* 或 *kvhA* 基因缺損，均會降低 *hdeB2*, *hdeD-hdeB1* 及 *yfdX* 在靜置培養下啟動子的活性，所以我們測定 *rcsB* 或 *kvhA* 基因缺損，是否會影響克雷白氏肺炎桿菌在靜置培養下的抗酸能力；同時，因為 *yfdX* 在靜置培養下，其啟動子活性有明顯的增加，所以我們也測定 *yfdX* 基因缺損，是否也會影響其抗酸能力。結果如圖十二，CG43S3 Δ *rcsB*, CG43S3 Δ *kvhA* 及 CG43S3 Δ *yfdX*，其在靜置培養下的抗酸能力，均較 CG43S3 低；而當我們在 CG43S3 Δ *rcsB* 送入會表現 *rcsB* 的質體 pHY123 後；或是在 CG43S3 Δ *kvhA* 送入會表現 *kvhA* 的質體

pKvhAcPP 後，其抗酸能力均有回復的現象。

截短的 *yfdX* 啟動子依然受到 RcsB 及 KvhA 的調控

因為 *yfdX* 啟動子的活性同時受到 RcsB 及 KvhA 的調控，而參考圖四的結果及相關文獻 (32)，可知其啟動子序列有 4 個可能的 RcsB 結合位置及 1 個可能的 EvgA 結合位置；為了確定這些可能的結合位置是否有其功能存在，我們建構不同長度的啟動子序列，並在 Z01, Z01Δ*kvhA* 及 Z01Δ*rscB* 中，測定這些啟動子的活性。結果如圖十三，當我們將第一個可能的 RcsB 結合位置去除，或是截短部分的 EvgA 結合位置，其活性依然都受到 RcsB 及 KvhA 的調控。

kvhA 啟動子的活性不受 RcsB 的調控

因為 *hdeB2*, *hdeD-hdeB1* 及 *yfdX* 其啟動子的活性，同時受到 RcsB 及 KvhA 的調控，所以我們懷疑 RcsB 可能經由調控 KvhA 的表現，進而調控 *hdeB2*, *hdeD-hdeB1* 及 *yfdX* 的表現；所以我們在 Z01 及 Z01Δ*rscB* 中，測定不同長度的 *kvhA* 啟動子活性。結果如圖十四，P_{*kvhA-1*} 及 P_{*kvhA-2*} 其啟動子活性，在 CG43 及 *rscB* 基因缺損突變株中沒有明顯差別，而包含部分 KvhA 編碼區 (coding region) 的啟動子 pA15, pF15, pE15，則沒有明顯活性。

克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3 與 CG43S3 Δ *rscB* 在中性環境下 沒有表現量差異很大的蛋白質

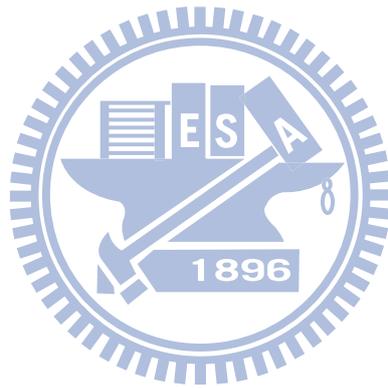
另外，我們同時利用二維電泳，分析比較 CG43S3 及 CG43S3 Δ *rscB* 的蛋白質體，以找出由 RcsB 調控的蛋白質。細菌隔夜培養後，20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液 (pH 7.5) 中，並再培養至對數中期 (mid-log phase, OD₆₀₀=0.6~0.7)，再收其可溶性蛋白質進行二維電泳，我們首先使用 pH 3-10 的 strip 進行二維電泳，結果發現，大部分的蛋白質都位於 pH 4-7 的位置，因此為了增加解析度，我們改用 pH 4-7 的 strip 進行實驗。結果發現，雖然 CG43S3 與 CG43S3 Δ *rscB* 的蛋白質表現圖譜有些差異，但大部份差異量都小於 1.5 倍 (圖十五，表五)。



克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3 與 CG43S3 Δ *rscB* 在酸性環境下 有表現量差異很大的蛋白質

因為在中性環境下，我們沒有看到 CG43S3 與 CG43S3 Δ *rscB* 有表現量差異很大的蛋白質，所以我們改在酸性環境下進行二維電泳實驗。細菌隔夜培養後，20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液 (pH 7.5) 中，培養 3 個小時後，再將菌體移至 pH 4.4 的 LB 培養液適應 1 小時，再收其可溶性蛋白質進行二維電泳。結果發現，在酸性環境下，CG43S3 與 CG43S3 Δ *rscB* 有表現量差異很大的蛋白質 (圖十六，圖十七，表六)。如表六所示，點 772, 972 及 973 在 CG43S3 Δ *rscB* 的表現量分別下降 2.18, 1.90 及 1.52 倍；而點 817 及 832 則在 CG43S3 Δ *rscB* 中完全

消失。



討論

腸內菌為了順利通過胃部的酸性環境，通常會具備多套的抗酸機制。在大腸桿菌中，已知最少具有四套 AR 系統：其中第 1 套 AR 系統在其穩定生長期時表現且受到葡萄糖的抑制，而 RpoS 及 CRP 會參與調控這套系統；而第 2 至第 4 套 AR 系統則需要特定的氨基酸來執行功能 (9, 58)；另外，大腸桿菌還具有一組由 12 個基因組成的酸適應島嶼，大部分的酸適應島嶼基因的表現量會在酸性環境下提高，而突變掉某些酸適應島嶼基因，則會造成大腸桿菌失去在 pH 2 的環境下存活的能力 (46)。而關於克雷白氏肺炎桿菌抗酸機制的研究，目前只知道 *fur* 及 *yfiD* 基因缺損會降低克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力 (65, 70)，其餘相關機制目前仍不清楚。

Rcs 系統自 1985 年，在大腸桿菌被發現後，目前在大腸桿菌及沙門氏菌已有相當多的研究；而在克雷白氏肺炎桿菌中，亦有同源基因存在，但目前 Rcs 系統在克雷白氏肺炎桿菌的研究，只知道其參與莢膜多醣體的生合成，在 *rscB* 基因缺損突變株中，其莢膜多醣體的生成量會減少 (36)。關於 Rcs 系統的分子活化訊號，目前仍不清楚；有文獻指出，大腸桿菌在低溫 (20°C)，且存在葡萄糖或高濃度鋅 (1 mM ZnCl₂) 的環境下，會活化此套系統的表現 (26)；而多種與包膜壓力有關的因子，及 *djlA*、*lolA*、*ompG* 此三個基因的過量表現，也會活化此套系統 (10, 12, 14, 15, 34, 37)。我們分析比較克雷白氏肺炎桿菌、大腸桿菌及沙門氏菌 Rcs 系統的基因組成 (gene organization)，發現其基因組成相當類似；但我們進一步利用網頁 SoftBerry 去比對

三種細菌 RcsB 預測的啟動子序列，卻發現可能參與調控的轉錄因子 (transcription factor) 不盡相同 (附錄二)，暗示 Rcs 系統在三種細菌中參與的生理調控可能不完全相同。在克雷白氏肺炎桿菌中，RcsB 的表現可能會受到 RpoH2, LexA, NagC 及 Ihf 的調控；而在大腸桿菌中，RcsB 的表現可能會受到 ArgR 的調控；而在沙門氏菌中，RcsB 的表現可能會受到 ArgR2, SoxS 及 GcvA 的調控。

近期有文獻指出，在大腸桿菌中，*rscB* 基因缺損，會降低其谷氨酸依賴型抗酸能力 (10)；而克雷白氏肺炎桿菌亦屬於腸內菌，且有 *rscB* 的同源基因存在，因此我們懷疑，RcsB 在克雷白氏肺炎桿菌中，亦與抗酸能力有關；所以我們首先測試，在克雷白氏肺炎桿菌中，RcsB 是否也與谷氨酸依賴型抗酸能力有關；結果不管是在 CG43S3 或 CG43S3 Δ *rscB* 中，不論是否加入谷氨酸，細菌都無法存活於 pH 2.5 的 M9 培養液中；造成這結果的原因可能為，在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中，沒有類似的抗酸系統存在，所以無法利用谷氨酸來達到抗酸的能力；同時我們也利用大腸桿菌的 *gadABC* 基因序列，在已知的克雷白氏肺炎桿菌 CG43 基因體序列搜尋，並未發現同源基因存在，此結果也支持上述的推論。

如圖一所示，CG43S3 Δ *rscB* 其抗酸能力較 CG43S3 下降許多，所以我們推測，弱酸誘導克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力，而 RcsB 扮演必要的角色。如圖二所示，CG43S3 Δ *rscA* 的抗酸能力並沒有明顯的下降，所以我們推測，在克雷白氏肺炎桿菌中，RcsB 是形成同型二聚體，而調控抗酸基因的表現。而酸適應後抗酸能力的提高，有可能是因為弱酸刺激了 RcsB 的表現量，而增加下游抗酸基因的表現；但在

弱酸環境下 *rscB* 啟動子的活性，並沒有明顯的增加 (圖三)，所以弱酸可能活化了 Rcs 系統，因而增加磷酸化的 RcsB，而提高抗酸基因的表現量。

在弱酸環境下，*cfa* 及 *yfdX* 啟動子活性，在 *Z01ΔrscB* 中明顯的降低 (圖五)，可以確認 *cfa* 及 *yfdX* 的表現受到 RcsB 的調控。但是，*CG43S3Δcfa* 及 *CG43S3ΔyfdX* 酸適應後的抗酸能力，並沒有明顯下降 (圖九)。我們推測造成 *CG43S3Δcfa* 抗酸能力未下降的可能原因為：*Cfa* 的功能為環丙烷脂肪酸 (cyclopropane fatty acid) 合成酶，可以將細胞膜上非飽和脂肪酸轉換成飽和脂肪酸，而降低氫離子通透性，因而提高抗酸的能力 (58)；而在克雷白氏肺炎桿菌中，可能還有類似 *Cfa* 功能的因子存在，或是有其他存在於細胞質的抗酸基因，可以將外界進入菌體內的氫離子排出菌體外，而達到抗酸的目的。而造成 *CG43S3ΔyfdX* 抗酸能力未下降的可能原因為：在此培養條件下，*yfdX* 的表現量並不高，所以其缺損突變株並不會看到影響。在靜置培養條件下，*yfdX* 的表現量明顯高出許多，而此時 *CG43S3ΔyfdX* 抗酸能力則有明顯的下降 (圖十二)。

我們利用生物資訊工具找到的 6 個基因當中，有兩個基因 *hdeB2* 及 *hdeD* 是屬於大腸桿菌 AFI 中的基因，而這些基因都位於 *kvhAS* 基因的兩側；*kvhAS* 與 *evgAS* 具有高度的同源性 (39)，且 *EvgAS* 在大腸桿菌中，已知與抗酸相關 (40)，而其鄰近尚有 *yfdX* 基因存在，而 *yfdX* 亦被報導會受到 *EvgA* 的正向調控 (45)，因此，我們預測，這一系列的基因，可能形成克雷白氏肺炎桿菌的酸適應島嶼 (圖十)。但 *hdeB2* 及 *hdeD-hdeB1*，其啟動子在酸適應的情況下，並沒有明顯

的活性 (圖五)，因此我們在靜置培養下，測定這些啟動子的活性，結果這些啟動子的活性，均有明顯的增加，且同時受到 RcsB 及 KvhA 的調控 (圖十一)。為了確定這些基因的確與抗酸相關，我們建構其基因缺損突變株，並在上述條件測試其抗酸能力；*hdeB1*, *hdeD* 及 *hdeB2* 基因缺損突變株仍在建構中，*yfdX* 基因缺損突變株在前述實驗已經獲得，且其抗酸能力較 CG43S3 下降許多，因此可以確認 *yfdX* 的確與抗酸相關；我們預測 *hdeB1*, *hdeD* 及 *hdeB2* 基因缺損突變株，也會影響其抗酸能力；因為 HdeB 為伴隨蛋白 (chaperone)，可以在酸性環境下保護蛋白質不被破壞，並可以在環境回復為中性時，幫助蛋白質回復為可溶狀態 (43)；而 HdeD 目前雖然不知其確切功能為何，如何影響抗酸能力，但有文獻指出，*hdeD* 基因缺損會降低大腸桿菌在高菌體密度 ($2 \times 10^8 \sim 4 \times 10^8$ CFU/ml) 的抗酸能力 (46)。而 YfdX 目前也不知其確切功能為何，但在大腸桿菌中，*yfdWXUVE* 為一操作子，而目前已知 YfdW (現更名為 Frc) 為 formyl-CoA:oxalate CoA transferase，而 YfdU (現更名為 Oxc) 為 thiamine-dependent oxalyl-CoA decarboxylase，這兩個酵素為草酸鹽分解代謝的成對 (coupled) 酵素，且反應中會消耗氫離子 (附錄三)；此機制類似大腸桿菌中 AR2 至 AR4 的抗酸機制，利用特定的氨基酸來消耗菌體內的氫離子，而達到抗酸的目的；而 *yfdWXUVE* 是否會在酸性環境下提高草酸鹽的分解代謝，則需作進一步的研究 (64)。而在克雷白氏肺炎桿菌中，YfdX 目前也不知其功能為何，我們利用網頁 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)，也無法比對到任何的保留區域 (conserved domain)；而在克雷白氏肺炎桿菌基因體中，我們也找到 YfdV 的同源基因，目前 YfdV 預測的

功能為一輸送蛋白 (transporter)，至於在克雷白氏肺炎桿菌中，YfdXV 如何去調控抗酸能力，則需作進一步研究。

YfdX 啟動子的活性，在靜置培養下會大幅升高，我們進一步分析其啟動子序列，可以發現有一個可能的 ArcA 結合位置存在，而在大腸桿菌中，已知 ArcA 會調控 *yfiD* 的表現，而 YfiD 會減低酸性代謝物的累積 (71)，因此，ArcA 也參與抗酸的調控。而在克雷白氏肺炎桿菌中，ArcA 是否會參與 *yfdX* 的表現，則需作進一步研究。但由本研究結果可知，在靜置培養下，*hdeB1*, *hdeD*, *yfdX* 及 *hdeB2* 這些抗酸基因會受到 RcsB 及 KvhA 的調控，且 *yfdX* 亦有可能受到 ArcA 的調控，這也許與在人體內，大多數環境為氧氣濃度較低的狀態有關，因此需要較複雜的調控來調控這些抗酸基因的表現。

在二維電泳實驗中，首先在中性環境下，比較分析 CG43S3 及 CG43S3 Δ *rscB* 的蛋白質電泳圖譜，雖然有找到差異的點，但其差異量都小於 1.5 倍；CG43S3 及 CG43S3 Δ *rscB* 在中性環境時，莢膜多醣體的表現，有明顯的差異 (36)，但我們在蛋白質表現電泳圖譜卻沒有看到差異量很大的蛋白質；這也許是因為，蛋白質表現量有些許差異即可造成莢膜多醣體表現量的改變，或是蛋白質表現量的差異雖然不大，但其活性有顯著差異，因此造成莢膜多醣體表現量的改變；也有可能是因為，我們收取可溶性的蛋白質進行二維電泳，而表現量差異很大的蛋白質為不可溶的，因此就無法在二維電泳中看到這些蛋白質。接下來，我們在酸性環境下，比較分析 CG43S3 及 CG43S3 Δ *rscB* 的蛋白質電泳圖譜，分析比較後，可以找到兩個蛋白質 (Match ID: 832, 817) 在 CG43S3 Δ *rscB* 完全消失及三個蛋白質 (Match ID: 772, 972,

973)在 CG43S3 Δ *rscB* 表現量下降超過 1.5 倍，進一步分析比對，我們也發現消失的兩個蛋白質，在中性環境下 CG43S3 的電泳膠片中也沒有出現 (圖十七)，所以我們推論這兩個蛋白質必須在弱酸環境且 RcsB 存在的情況下才會表現；而這些蛋白質可能就是造成 CG43S3 及 CG43S3 Δ *rscB* 在酸適應後，抗酸能力有差異的蛋白質；我們將進一步鑑定這些蛋白質的 ID，以了解在弱酸適應後，是哪些蛋白質受到 RcsB 的調控，而提高了抗酸能力。

根據本研究得到的結果，我們推論出 RcsB 在調控的可能相關機制 (圖十八):弱酸會誘導 RcsB 調控未知的蛋白質，而提高抗酸能力。而靜置培養下會誘導 RcsB 調控酸適應島嶼中的基因 HdeB1, HdeD, YfdX 及 HdeB2 的表現，而提高抗酸能力，同時 KvhA 亦扮演必須的角色。

Rcs 系統在大腸桿菌及沙門氏菌，目前已有相當多的研究，參與相當多的生理調控；而在克雷白氏肺炎桿菌中，目前只知其參與調控莢膜多醣體的生合成。本研究證實，在克雷白氏肺炎桿菌中，RcsB 參與抗酸的調控，而其調控的可能相關機制如圖十八所示。另外，本研究也證明 Rcs 系統與氧化壓力抗性的調控有關，實驗發現 *rscB* 基因缺損突變株，會降低對氧化壓力的抗性 (附錄四)，而其調控的詳細機制，則須作進一步的研究。至於 Rcs 系統在克雷白氏肺炎桿菌中，是否還參與其他生理的調控，則需作進一步的研究。

參考文獻

1. **Amako, K., Y. Meno, and A. Takade.** 1988. Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol* **170**:4960-2.
2. **Arricau, N., D. Hermant, H. Waxin, C. Ecobichon, P. S. Duffey, and M. Y. Popoff.** 1998. The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Mol Microbiol* **29**:835-50.
3. **Bijlsma, J. J., and E. A. Groisman.** 2003. Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol* **11**:359-66.
4. **Boulanger, A., A. Francez-Charlot, A. Conter, M. P. Castanie-Cornet, K. Cam, and C. Gutierrez.** 2005. Multistress regulation in *Escherichia coli*: expression of *osmB* involves two independent promoters responding either to sigmaS or to the RcsCDB His-Asp phosphorelay. *J Bacteriol* **187**:3282-6.
5. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
6. **Cano, D. A., G. Dominguez-Bernal, A. Tierrez, F. Garcia-Del Portillo, and J. Casadesus.** 2002. Regulation of capsule synthesis and cell motility in *Salmonella enterica* by the essential gene *igaA*. *Genetics* **162**:1513-23.
7. **Carballes, F., C. Bertrand, J. P. Bouche, and K. Cam.** 1999. Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system *rscC-rscB*. *Mol Microbiol* **34**:442-50.
8. **Castanie-Cornet, M. P., K. Cam, and A. Jacq.** 2006. RcsF is an outer membrane lipoprotein involved in the RcsCDB phosphorelay signaling pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:4264-70.
9. **Castanie-Cornet, M. P., T. A. Penfound, D. Smith, J. F. Elliott, and J. W. Foster.** 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**:3525-35.
10. **Castanie-Cornet, M. P., H. Treffandier, A. Francez-Charlot, C. Gutierrez, and K. Cam.** 2007. The glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*: essential and dual role of the His-Asp phosphorelay RcsCDB/AF. *Microbiology* **153**:238-46.
11. **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.

12. **Chen, M. H., S. Takeda, H. Yamada, Y. Ishii, T. Yamashino, and T. Mizuno.** 2001. Characterization of the RcsC-->YojN-->RcsB phosphorelay signaling pathway involved in capsular synthesis in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**:2364-7.
13. **Christ, D., and J. W. Chin.** 2008. Engineering *Escherichia coli* heat-resistance by synthetic gene amplification. *Protein Eng Des Sel* **21**:121-5.
14. **Clavel, T., J. C. Lazzaroni, A. Vianney, and R. Portalier.** 1996. Expression of the *tolQRA* genes of *Escherichia coli* K-12 is controlled by the RcsC sensor protein involved in capsule synthesis. *Mol Microbiol* **19**:19-25.
15. **Conter, A., R. Sturny, C. Gutierrez, and K. Cam.** 2002. The RcsCB His-Asp phosphorelay system is essential to overcome chlorpromazine-induced stress in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**:2850-3.
16. **Davalos-Garcia, M., A. Conter, I. Toesca, C. Gutierrez, and K. Cam.** 2001. Regulation of *osmC* gene expression by the two-component system *rscB-rscC* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**:5870-6.
17. **De Biase, D., A. Tramonti, F. Bossa, and P. Visca.** 1999. The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Mol Microbiol* **32**:1198-211.
18. **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.
19. **Erickson, K. D., and C. S. Detweiler.** 2006. The Rcs phosphorelay system is specific to enteric pathogens/commensals and activates *ydeI*, a gene important for persistent *Salmonella* infection of mice. *Mol Microbiol* **62**:883-94.
20. **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.
21. **Francez-Charlot, A., B. Laugel, A. Van Gemert, N. Dubarry, F. Wiorowski, M. P. Castanie-Cornet, C. Gutierrez, and K. Cam.** 2003. RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**:823-32.
22. **Garcia-Calderon, C. B., J. Casadesus, and F. Ramos-Morales.** 2007. Rcs and PhoPQ regulatory overlap in the control of *Salmonella enterica* virulence. *J Bacteriol* **189**:6635-44.
23. **Garcia-Calderon, C. B., J. Casadesus, and F. Ramos-Morales.** 2009. Regulation of *igaA* and the Rcs system by the MviA response regulator in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*.
24. **Garcia-Calderon, C. B., M. Garcia-Quintanilla, J. Casadesus, and F.**

- Ramos-Morales.** 2005. Virulence attenuation in *Salmonella enterica rcsC* mutants with constitutive activation of the Rcs system. *Microbiology* **151**:579-88.
25. **Gottesman, S., P. Trisler, and A. Torres-Cabassa.** 1985. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J Bacteriol* **162**:1111-9.
26. **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.
27. **Hall, H. K., and J. W. Foster.** 1996. The role of *fur* in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J Bacteriol* **178**:5683-91.
28. **Hersh, B. M., F. T. Farooq, D. N. Barstad, D. L. Blankenhorn, and J. L. Slonczewski.** 1996. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**:3978-81.
29. **Huang, Y. H., L. Ferrieres, and D. J. Clarke.** 2006. The role of the Rcs phosphorelay in Enterobacteriaceae. *Res Microbiol* **157**:206-12.
30. **Iyer, R., C. Williams, and C. Miller.** 2003. Arginine-aggmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:6556-61.
31. **Joseph, S., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual* – 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
32. **Kato, A., H. Ohnishi, K. Yamamoto, E. Furuta, H. Tanabe, and R. Utsumi.** 2000. Transcription of *emrKY* is regulated by the EvgA-EvgS two-component system in *Escherichia coli* K-12. *Biosci Biotechnol Biochem* **64**:1203-9.
33. **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.
34. **Kelley, W. L., and C. Georgopoulos.** 1997. Positive control of the two-component RcsC/B signal transduction network by Dj1A: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **25**:913-31.
35. **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.
36. **Lai, Y. C., H. L. Peng, and H. Y. Chang.** 2003. RmpA2, an activator of capsule biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, regulates K2 cps gene expression at the transcriptional level. *J Bacteriol* **185**:788-800.

37. **Laubacher, M. E., and S. E. Ades.** 2008. The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J Bacteriol* **190**:2065-74.
38. **Liang, W. C.** 2002. Functional analysis of the Two-component System KvhAS in *Klebsiella pneumoniae* CG43 Master Thesis, Graduate Institute of Biological Science and Technology, National Chiao Tung University.
39. **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.
40. **Ma, Z., N. Masuda, and J. W. Foster.** 2004. Characterization of EvgAS-YdeO-GadE branched regulatory circuit governing glutamate-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:7378-89.
41. **Majdalani, N., and S. Gottesman.** 2005. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol* **59**:379-405.
42. **Majdalani, N., M. Heck, V. Stout, and S. Gottesman.** 2005. Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:6770-8.
43. **Malki, A., H. T. Le, S. Milles, R. Kern, T. Caldas, J. Abdallah, and G. Richarme.** 2008. Solubilization of protein aggregates by the acid stress chaperones HdeA and HdeB. *J Biol Chem* **283**:13679-87.
44. **Mariscotti, J. F., and F. Garcia-del Portillo.** 2009. Genome expression analyses revealing the modulation of the *Salmonella* Rcs regulon by the attenuator IgaA. *J Bacteriol* **191**:1855-67.
45. **Masuda, N., and G. M. Church.** 2003. Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**:699-712.
46. **Mates, A. K., A. K. Sayed, and J. W. Foster.** 2007. Products of the *Escherichia coli* acid fitness island attenuate metabolite stress at extremely low pH and mediate a cell density-dependent acid resistance. *J Bacteriol* **189**:2759-68.
47. **Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
48. **Mizuta, K., M. Ohta, M. Mori, T. Hasegawa, I. Nakashima, and N. Kato.** 1983. Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infect Immun* **40**:56-61.
49. **Moreau, P. L.** 2007. The lysine decarboxylase CadA protects *Escherichia coli* starved of phosphate against fermentation acids. *J Bacteriol* **189**:2249-61.

50. **Nishino, K., and A. Yamaguchi.** 2001. Overexpression of the response regulator *evgA* of the two-component signal transduction system modulates multidrug resistance conferred by multidrug resistance transporters. *J Bacteriol* **183**:1455-8.
51. **Ørskov, I., and F. Ørskov.** 1984. Serotyping of *Klebsiella*. *Methods Microbiol* **14**.
52. **Peng, H. L., P. Y. Wang, J. L. Wu, C. T. Chiu, and H. Y. Chang.** 1991. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae*. *Chinese journal of microbiology and immunology* **24**:264-71.
53. **Perraud, A. L., V. Weiss, and R. Gross.** 1999. Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* **7**:115-20.
54. **Podschun, R., I. Penner, and U. Ullmann.** 1992. Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. *Microb Pathog* **13**:371-9.
55. **Podschun, R., and U. Ullmann.** 1992. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J Med Microbiol* **36**:250-4.
56. **Podschun, R., and U. Ullmann.** 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* **11**:589-603.
57. **Pruss, B. M., C. Besemann, A. Denton, and A. J. Wolfe.** 2006. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:3731-9.
58. **Richard, H. T., and J. W. Foster.** 2003. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol* **52**:167-86.
59. **Scarlato, V., B. Arico, M. Domenighini, and R. Rappuoli.** 1993. Environmental regulation of virulence factors in *Bordetella* species. *Bioessays* **15**:99-104.
60. **Schwan, W. R., S. Shibata, S. Aizawa, and A. J. Wolfe.** 2007. The two-component response regulator RcsB regulates type 1 piliation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**:7159-63.
61. **Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann.** 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**:850-8.
62. **Skorupski, K., and R. K. Taylor.** 1996. Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene* **169**:47-52.
63. **Stock, J. B., A. M. Stock, and J. M. Mottonen.** 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature* **344**:395-400.

64. **Toyota, C. G., C. L. Berthold, A. Gruez, S. Jonsson, Y. Lindqvist, C. Cambillau, and N. G. Richards.** 2008. Differential substrate specificity and kinetic behavior of *Escherichia coli* YfdW and *Oxalobacter formigenes* formyl coenzyme A transferase. *J Bacteriol* **190**:2556-64.
65. **Tsai, B. S.** 2008. Regulation of *yfiD* gene expression in *Klebsiella pneumoniae* CG43. Master Thesis, Graduate Institute of Biological Science and Technology, National Chiao Tung University.
66. **Virlogeux, I., H. Waxin, C. Ecobichon, J. O. Lee, and M. Y. Popoff.** 1996. Characterization of the *rcaA* and *rcaB* genes from *Salmonella typhi*: *rcaB* through *tviA* is involved in regulation of Vi antigen synthesis. *J Bacteriol* **178**:1691-8.
67. **Wang, J. H., Y. C. Liu, S. S. 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. *Clin Infect Dis* **26**:1434-8.
68. **Wang, Q., Y. Zhao, M. McClelland, and R. M. Harshey.** 2007. The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes. *J Bacteriol* **189**:8447-57.
69. **Williams, P., P. A. Lambert, M. R. Brown, and R. J. Jones.** 1983. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J Gen Microbiol* **129**:2181-91.
70. **Wu, C. Y.** 2008. Functional characterization of Fur in *Klebsiella pneumoniae* CG43. Master Thesis, Graduate Institute of Biological Science and Technology, National Chiao Tung University.
71. **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* **148**:1015-26.
72. **Yeh, K. M., A. Kurup, L. K. Siu, Y. L. Koh, C. P. Fung, J. C. Lin, T. L. Chen, F. Y. Chang, and T. H. Koh.** 2007. Capsular serotype K1 or K2, rather than *magA* and *rmpA*, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J Clin Microbiol* **45**:466-71.
73. **Yu, W. L., W. C. Ko, K. C. Cheng, H. C. Lee, D. S. Ke, C. C. Lee, C. P. Fung, and Y. C. Chuang.** 2006. Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis* **42**:1351-8.

表一：本研究所使用的菌株

細菌菌株	基因型或相關特性	來源或 參考文獻
<i>E. coli</i>:		
JM-109	<i>RecA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 rolA1 thi Δ(lac-proAB)</i>	Laboratory stock
S17-1 λ <i>pir</i>	Tp ^r Sm ^r <i>recA, thi, pro, hsdR⁻M⁺</i> [PR4-2-Tc::Mu:Km ^r Tn7](<i>pir</i>)	(18)
<i>K. pneumoniae</i>:		
CG43	K2 serotype	(52)
CG43S3	<i>rspl</i> mutant, Sm ^r	(52)
CG43S3 Δ <i>rcsB</i>	<i>rcsB</i> mutant in CG43S3, Sm ^r	(36)
CG43S3 Δ <i>rcsA</i>	<i>rcsA</i> mutant in CG43S3, Sm ^r	Laboratory stock
Z01	<i>lacZ</i> mutant in CG43S3, Sm ^r	(39)
Z01 Δ <i>rcsB</i>	<i>rcsB</i> mutant in Z01, Sm ^r	Laboratory stock
Z01 Δ <i>kvhA</i>	<i>kvhA</i> mutant in Z01, Sm ^r	Laboratory stock
CG43S3 Δ <i>cfa</i>	<i>cfa</i> mutant in CG43S3, Sm ^r	This study
CG43S3 Δ <i>yfdX</i>	<i>yfdX</i> mutant in CG43S3, Sm ^r	This study

表二：本研究所使用的質體

質體	相關特性	來源或 參考文獻
yT&A	PCR cloning vector, Ap ^r	Yeastern Biotech Co.
pKAS46	Suicide vector, <i>rpsL</i> , Km ^r Ap ^r	(62)
pLacZ15	A derivative of pYC016 (35), containing a promoterless <i>lacZ</i> from <i>K. pneumoniae</i> CG43S3, Cm ^r	(39)
pRK415	broad-host-range IncP cloning vector, <i>mob</i> ⁺ , Tc ^r	(33)
pKvhAcTA	698 bp PCR product carrying <i>kvhA</i> cloned into yT&A, Ap ^r	(65)
pKvhAcPP	BamHI/EcoRI digested fragment of pKvhAcTA cloned into pCPP45, Tc ^r	(65)
pA15	467 bp PCR product carrying putative <i>kvhA</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	(38)
pF15	379 bp PCR product carrying putative <i>kvhA</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	(38)
pE15	180 bp PCR product carrying putative <i>kvhA</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	(38)
pCPP45	broad-host-range cloning vector with the partition region from RK2 plasmid, Tc ^r	Dr. David Bauer at Cornell University
pHY123	<i>rcsB</i> complement plasmid, Tc ^r	Laboratory stock

質體	相關特性	來源或 參考文獻
pHY064	424 bp PCR product carrying putative <i>rcaB</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	Laboratory stock
P _{<i>hdeD-hdeB1</i>}	417 bp PCR product carrying putative <i>hdeD-hdeB1</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	Laboratory stock
P _{<i>yfdX</i>}	417 bp PCR product carrying putative <i>yfdX</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	Laboratory stock
P _{<i>cfa</i>}	322 bp PCR product carrying putative <i>cfa</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	This Study
P _{<i>hdeB2</i>}	409 bp PCR product carrying putative <i>hdeB2</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	This Study
P _{<i>ydeP</i>}	330 bp PCR product carrying putative <i>ydeP</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	This Study
P _{<i>yhiO</i>}	396 bp PCR product carrying putative <i>yhiO</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	This Study
pCH012	two about 1kb DNA fragments flanking the <i>yfdX</i> cloned into yT & A, Ap ^r	This Study
pCH015	EcoRI/XbaI digested fragment of pCH012 cloned into pKAS46, Km ^r Ap ^r	This Study
pCH013	two about 1kb DNA fragments flanking the <i>cfa</i> cloned into yT & A, Ap ^r	This Study
pCH014	EcoRI/XbaI digested fragment of pCH013 cloned into pKAS46, Km ^r Ap ^r	This Study
pCH017	283 bp PCR product carrying putative <i>yfdX</i> promoter cloned into yT&A, Ap ^r	This Study
P _{<i>yfdX-2</i>}	BamHI/BglII digested fragment of pCH017 cloned into pLacZ15, Cm ^r	This Study
pCH018	216 bp PCR product carrying putative <i>yfdX</i> promoter cloned into yT&A, Ap ^r	This Study
P _{<i>yfdX-3</i>}	BamHI/BglII digested fragment of pCH018 cloned into pLacZ15, Cm ^r	This Study
P _{<i>kvhA-1</i>}	409 bp PCR product carrying putative <i>kvhA</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	This Study
P _{<i>kvhA-2</i>}	276 bp PCR product carrying putative <i>kvhA</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	This Study

表三：本研究所使用的引子

引子	序列
CH001	5'-CCCAGATCTCACCCCACTCTTCCCACGCG-3'
CH002	5'-CCCAGATCTCTCATAGCTTCTCCATCACGCCC-3'
CH003	5'-GACGGATCCGATTATCGCATTTCATGGGGGC-3'
CH005	5'-CCCGGATCCCTGACCTGAGCCTGGCCC-3'
CH006	5'-CCTAGATCTGGTCATCTCTTTACTCCTGCTGC-3'
CH007	5'-CCCGGATCCAGCCATAGTGTTACTCCTTCCA-3'
CH008	5'-CCTAGATCTCTGATCATACTCCTCCCCG-3'
CH015	5'-CCACCGCGGCGCTACTCATT-3'
CH024	5'-AGAAGGCCACCGGGGTCATG-3'
CH027	5'-AGCAGACCGGCTCCGGACT-3'
CH028	5'-AACGTCCTGATCTACGCCGC-3'
CH031	5'-GTATCGACAAAACCCATCGCC-3'
CH033	5'-GACGGATCCGGGCTAAACGCATTTAAGGTG-3'
CH034	5'-GACGGATCCGCCTGACGCTGAATAAAAAGC-3'
CH035	5'-CCTAGATCTATCACCAAACGCAGCCAGC-3'

表四：可能由RcsB所調控的抗酸基因

灰色部分表示選出的 6 個基因

基因	功能描述	AR 系統	在克雷白氏肺炎桿菌中 是否有同源基因	RcsB 結合序列數目
<i>adiA</i>	arginine decarboxylase	III	是	1
<i>appB</i>	cytochrome oxidase bd-II, subunit II	— ^a	是	0
<i>cfa</i>	cyclopropane fatty acid synthetase	I	是	5
<i>gadA</i>	glutamate decarboxylase	II	否	X ^b
<i>gadB</i>	glutamate decarboxylase	II	否	X ^b
<i>gadC</i>	putative glutamate:GABA antiporter	II	否	X ^b
<i>hdeA</i>	acid-resistance protein	I	否	X ^b
<i>hdeB2</i>	acid-resistance protein	I	是	4
<i>hdeD</i>	acid-resistance membrane protein	— ^a	是	4
<i>ydeP</i>	putative anaerobic dehydrogenases	— ^a	是	1
<i>ydgK</i>	putative oxidoreductase	— ^a	是	0
<i>yfdX</i>	hypothetical protein	— ^a	是	4
<i>yhiO</i>	universal stress protein UspB	— ^a	是	3
<i>yjdE (adiC)</i>	putative arginine:agmatine antiporter	III	是	1

a：不屬於任何一套 AR 系統

b：未搜尋是否含有 RcsB 結合序列

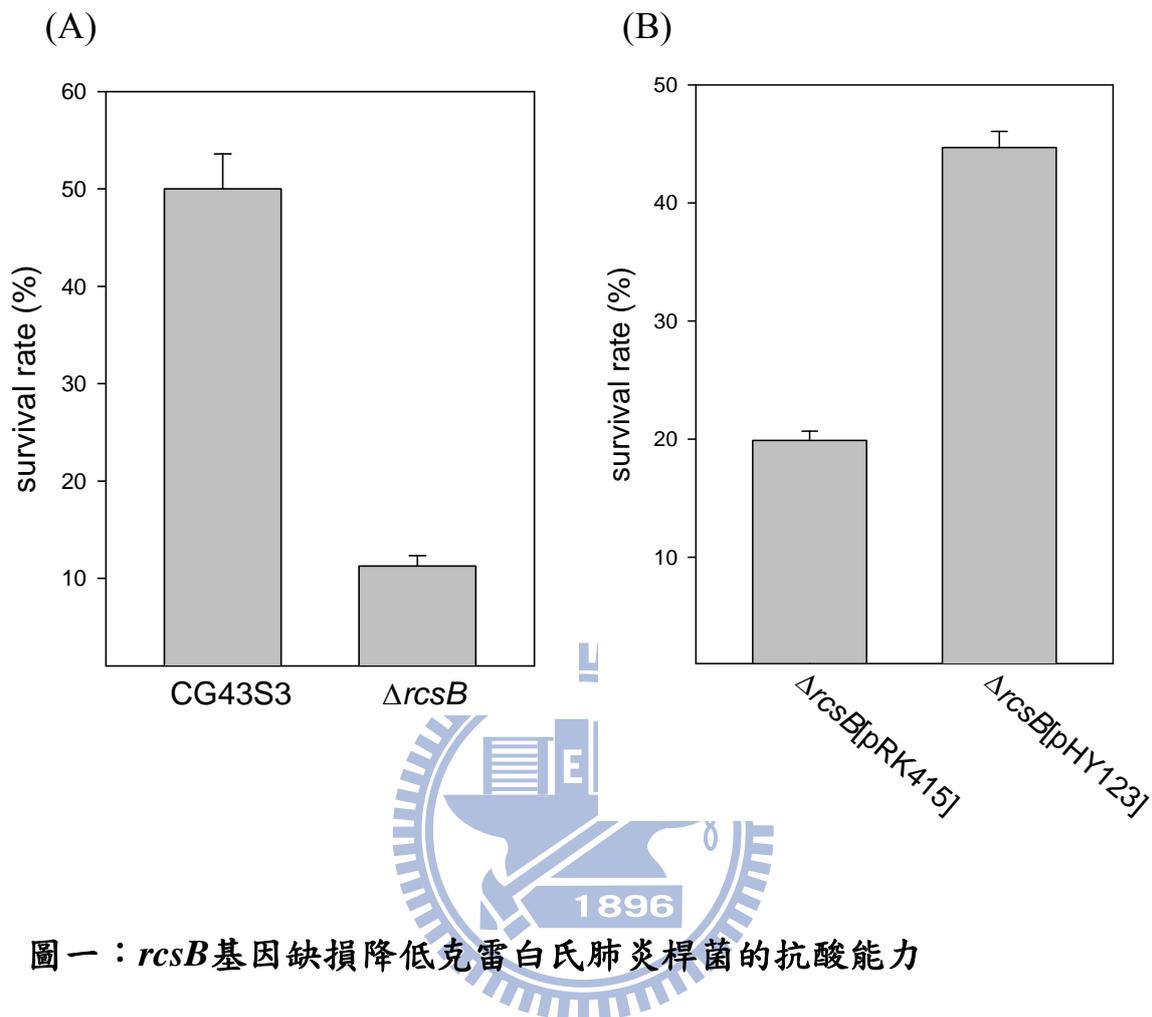
表五：CG43S3 與CG43S3 Δ *rcsB*在中性環境下表現量有差異的蛋白質

Match ID	pI	Mr (kDa)	Expressional fold change
167	5.60	107	↓ 1.50
215	5.56	92	↓ 1.24
332	5.20	72	↓ 1.28
412	6.26	65	↑ 1.10
491	6.36	57	↑ 1.30
553	6.29	51	↑ 1.10
821	6.04	34	↑ 1.21

表六：CG43S3 與CG43S3 Δ *rcsB*在酸性環境下表現量有差異的蛋白質

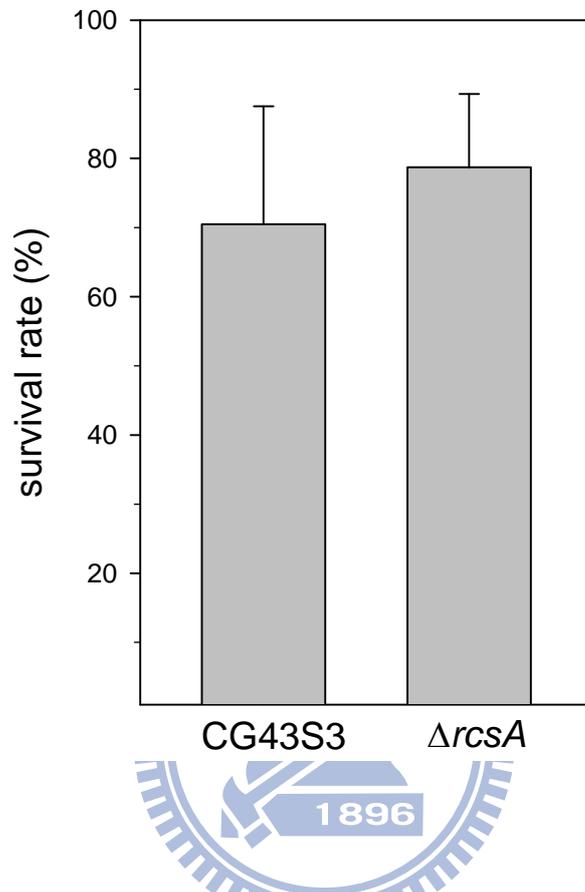
Match ID	pI	Mr (kDa)	Expressional fold change
772	5.98	25	↓ 2.18
817	5.23	21	— ^a
832	5.05	19	— ^a
879	5.92	14	↓ 1.13
946	5.98	10	↓ 1.22
972	4.70	9	↓ 1.90
973	4.59	9	↓ 1.52
1064	5.08	18	↑ 1.14

a：只在 CG43S3 中出現的蛋白質



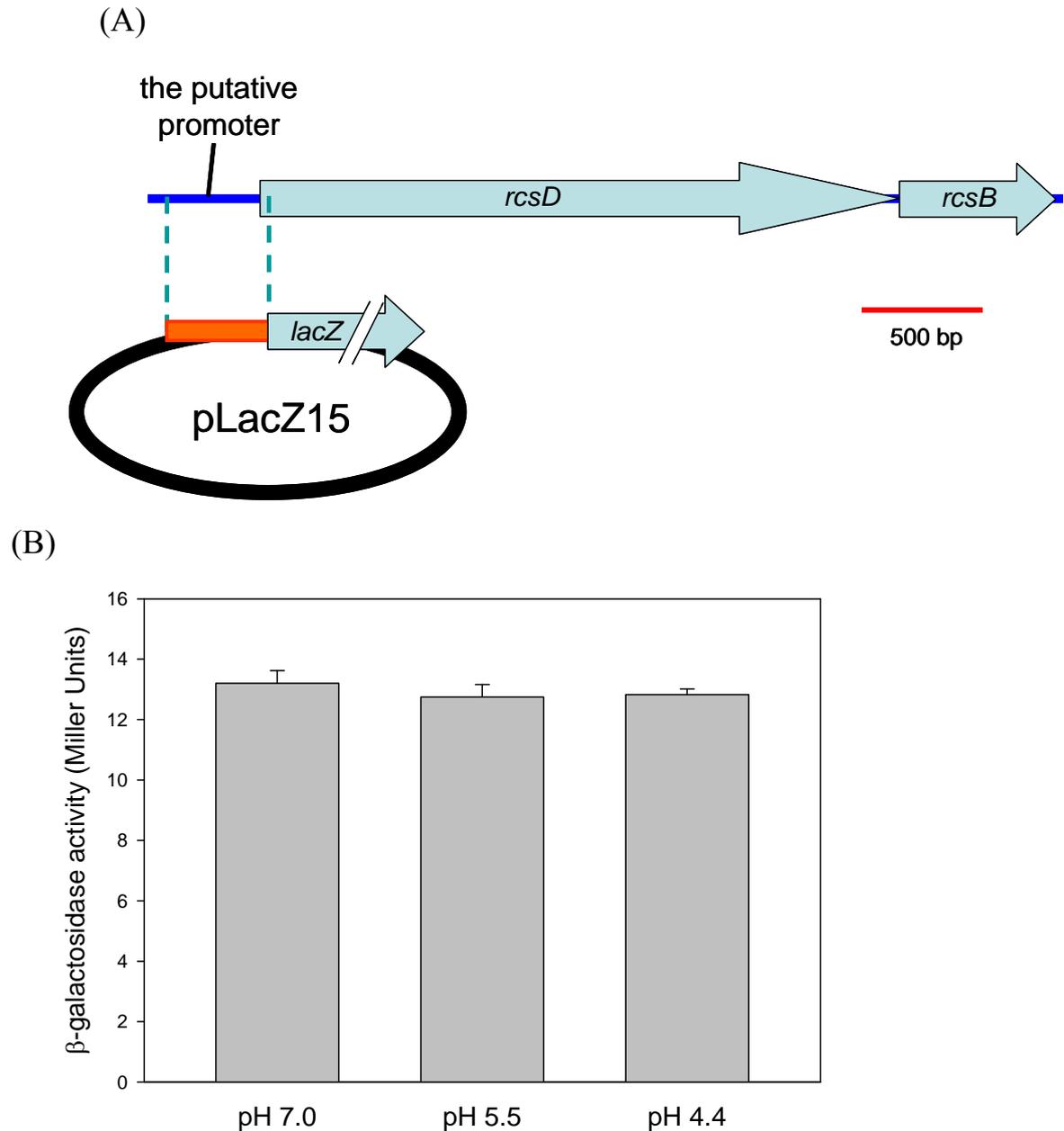
圖一：*rcsB*基因缺損降低克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力

細菌在 LB 培養液隔夜培養後，20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液中，再培養 3 個小時至 OD_{600} 約為 0.6~0.8，之後將菌體移至 pH 4.4 的 LB 培養液中，適應 1 小時後，再移至 pH 3.0 的 M9 培養液中，培養 1 小時 (A) 或 45 分鐘 (B) 後，取適當菌液稀釋塗盤後，計算菌數；存活率是根據在 45 分鐘或 1 小時後，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。pHY123 為 *rcsB* 互補質體。



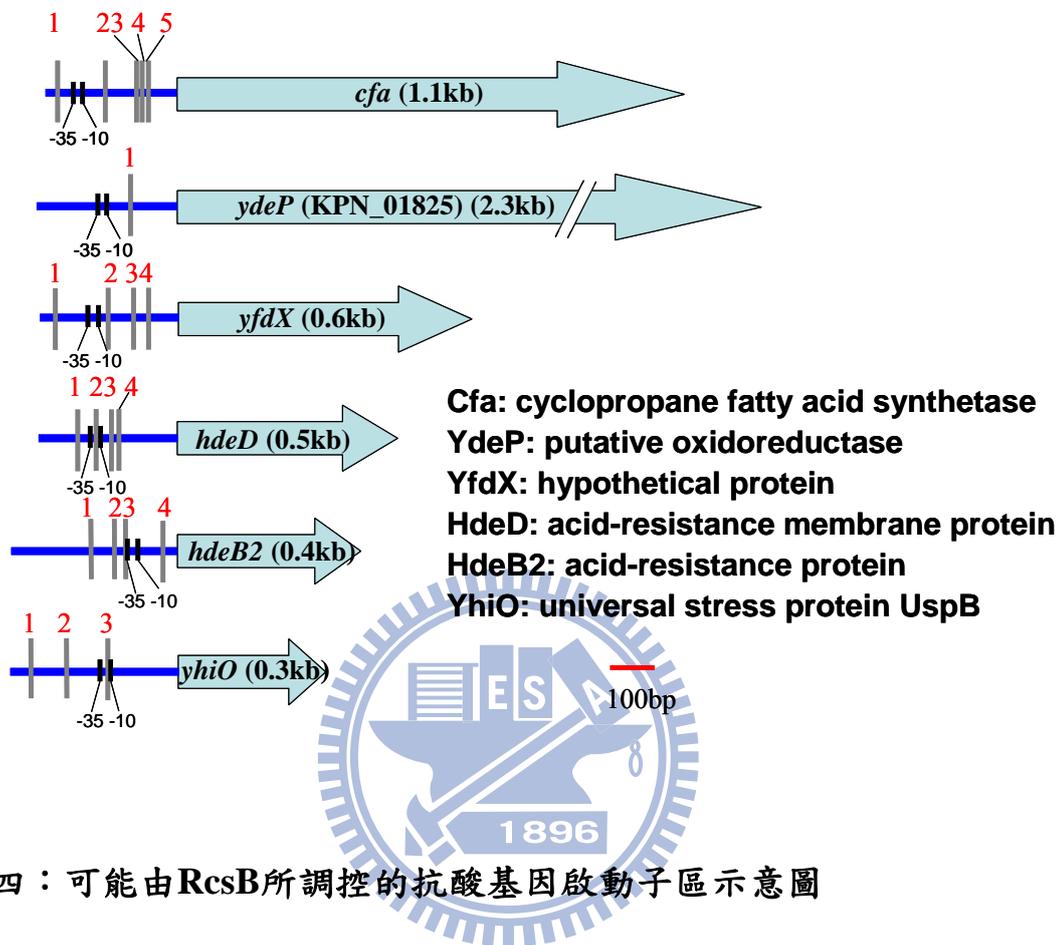
圖二：*rcsA*基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力沒有影響

細菌在 LB 培養液隔夜培養後，20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液中，再培養 3 個小時至 OD_{600} 約為 0.6~0.8，之後將菌體移至 pH 4.4 的 LB 培養液中，適應 1 小時後，再移至 pH 3.0 的 M9 培養液中，培養 1 小時後，取適當菌液稀釋塗盤後，計算菌數；存活率是根據在 1 小時後，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。



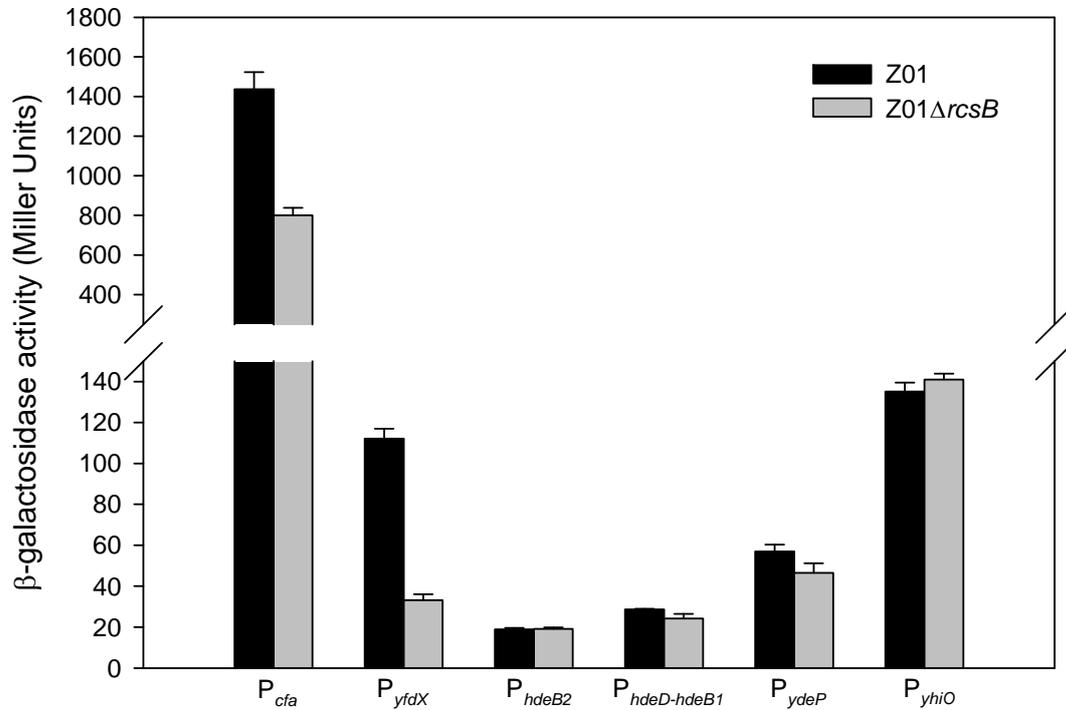
圖三：*rcsB*啟動子的活性不受pH值的影響

(A) *rcsB* 啟動子報告質體建構示意圖。(B) *rcsB* 啟動子活性測試。細菌在 LB 培養液隔夜培養後，20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液中，再培養 3 個小時至 OD_{600} 約為 0.6~0.8，之後將菌體分別移至不同 pH 值的 LB 培養液中，適應 1 小時後，測定其啟動子活性。



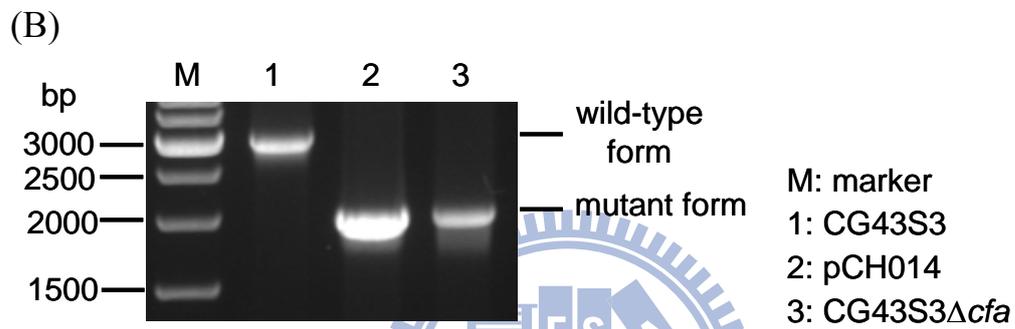
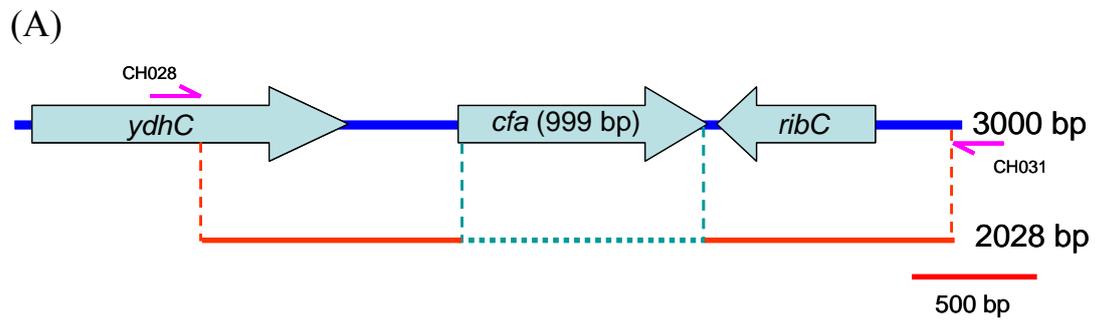
圖四：可能由RcsB所調控的抗酸基因啟動子區示意圖

灰色的長條代表預測的 RcsB 結合位置，其上方數字代表預測到的數目。而-10 及-35 box 使用網頁 SoftBerry 預測並以黑色長條表示。



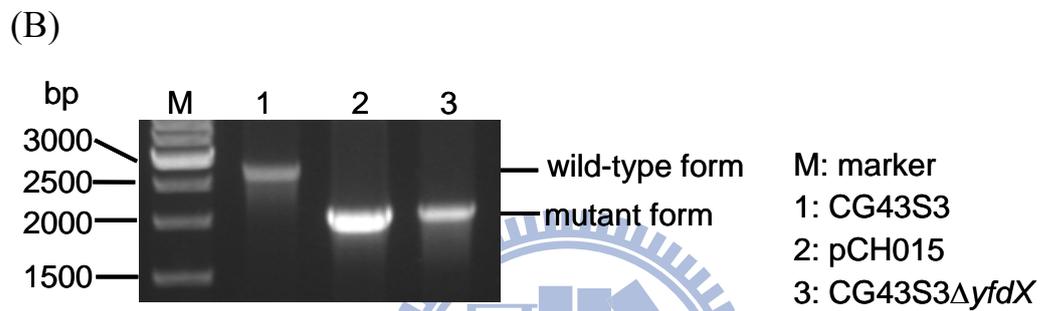
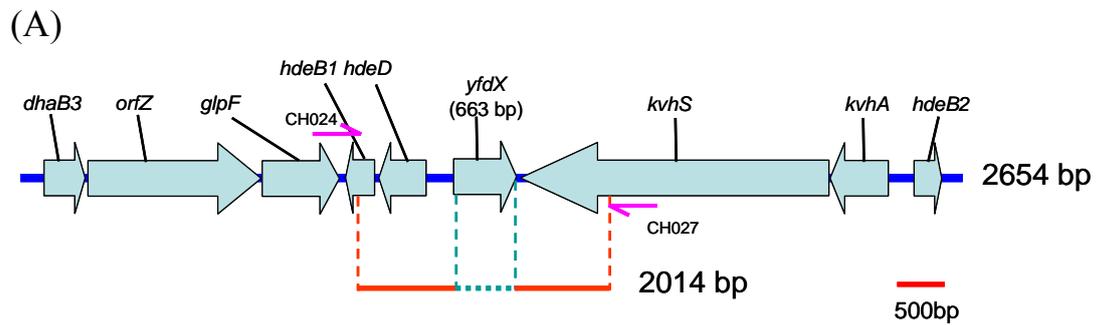
圖五：*rscB*基因缺損降低*cfa*及*yfdX*啟動子的活性

細菌在 LB 培養液隔夜培養後，20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液中，再培養 3 個小時至 OD_{600} 約為 0.6~0.8，之後將菌體移至 pH 4.4 的 LB 培養液中，適應 1 小時後，再測定其啟動子活性。



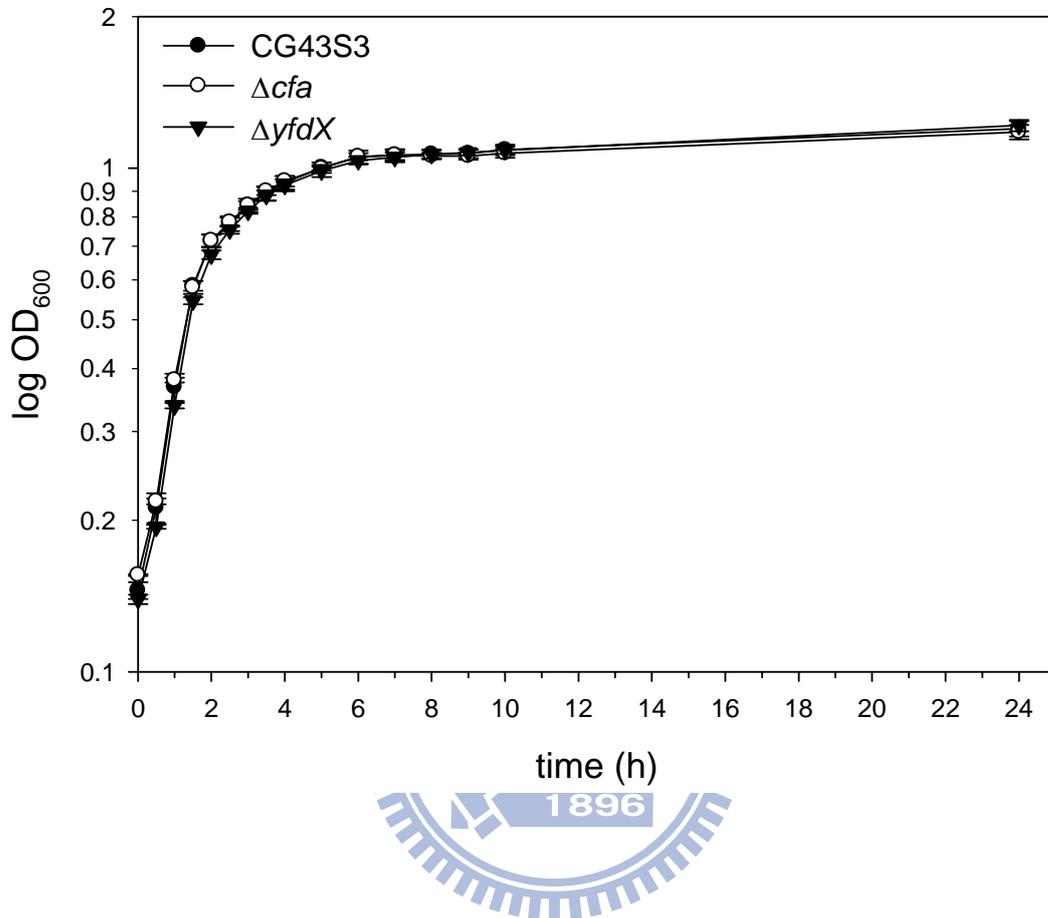
圖六：建構*cfa*基因缺損突變株

(A) *cfa* 及兩側基因的示意圖。引子 CH028/CH031 設計來確認 Δ *cfa* 突變株；虛線部分表示基因缺損的位置。(B)利用 PCR 來確認 Δ *cfa* 突變株。質體 pCH014 包含 *cfa* 兩側各約 1kb 的基因片段。



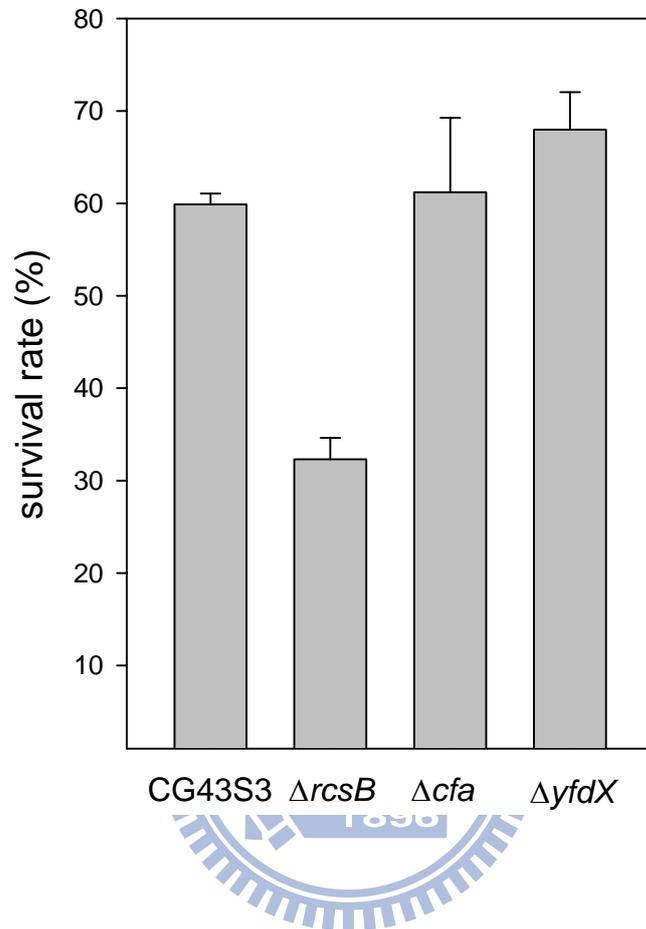
圖七：建構*yfdX*基因缺損突變株

(A) *yfdX* 及兩側基因的示意圖。引子 CH024/CH027 設計來確認 Δ *yfdX* 突變株；虛線部分表示基因缺損的位置。(B) 利用 PCR 來確認 Δ *yfdX* 突變株。質體 pCH015 包含 *yfdX* 兩側各 1kb 的基因片段。



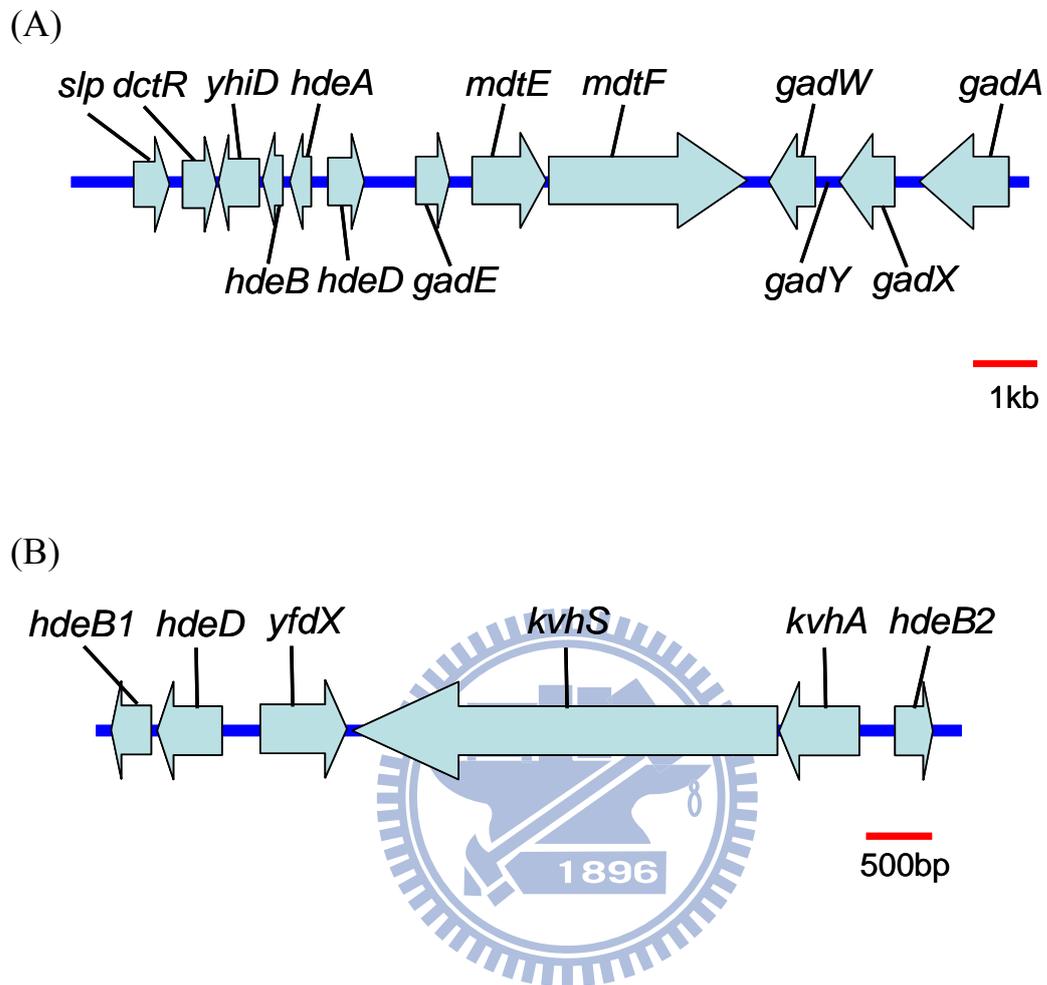
圖八：*cfa*或*yfdX*基因缺損對細菌的生長沒有影響

細菌在 LB 培養液隔夜培養後，稀釋至新鮮的 LB 培養液中，使其 OD₆₀₀ 約為 0.15，置於 37°C 培養，並在不同的時間點測量其吸光值 (OD₆₀₀)。



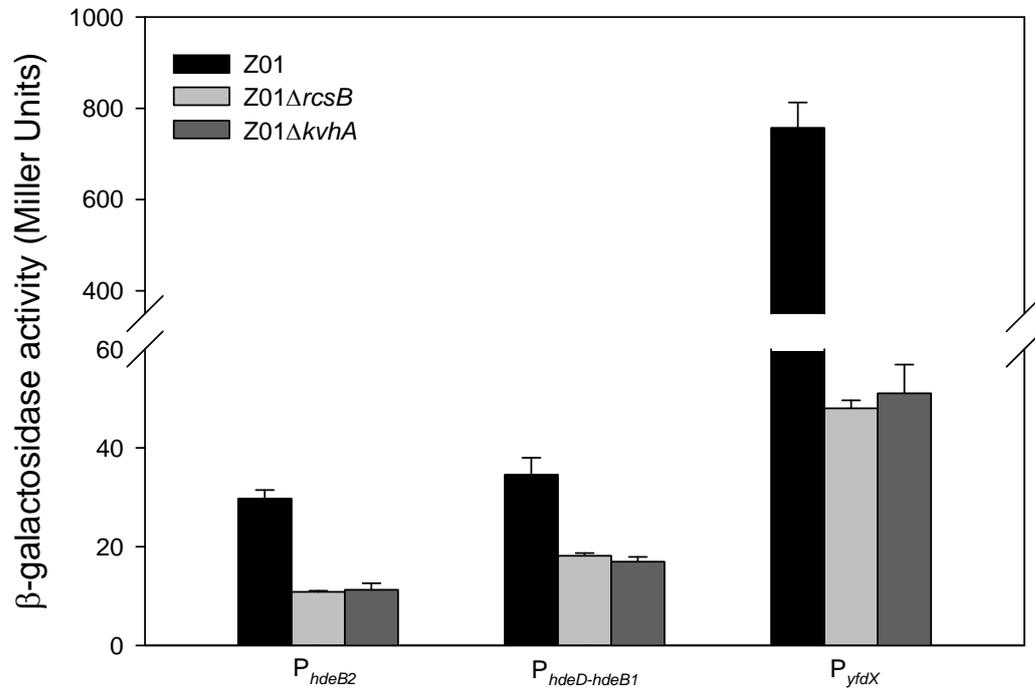
圖九：*cfa*或*yfdX*基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力沒有明顯影響

細菌在 LB 培養液隔夜培養後，20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液中，再培養 3 個小時至 OD_{600} 約為 0.6~0.8，之後將菌體移至 pH 4.4 的 LB 培養液中，適應 1 小時後，再移至 pH 3.0 的 M9 培養液中，培養 1 小時後，取適當菌液稀釋塗盤後，計算菌數；存活率是根據在 1 小時後，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。



圖十：酸適應島嶼

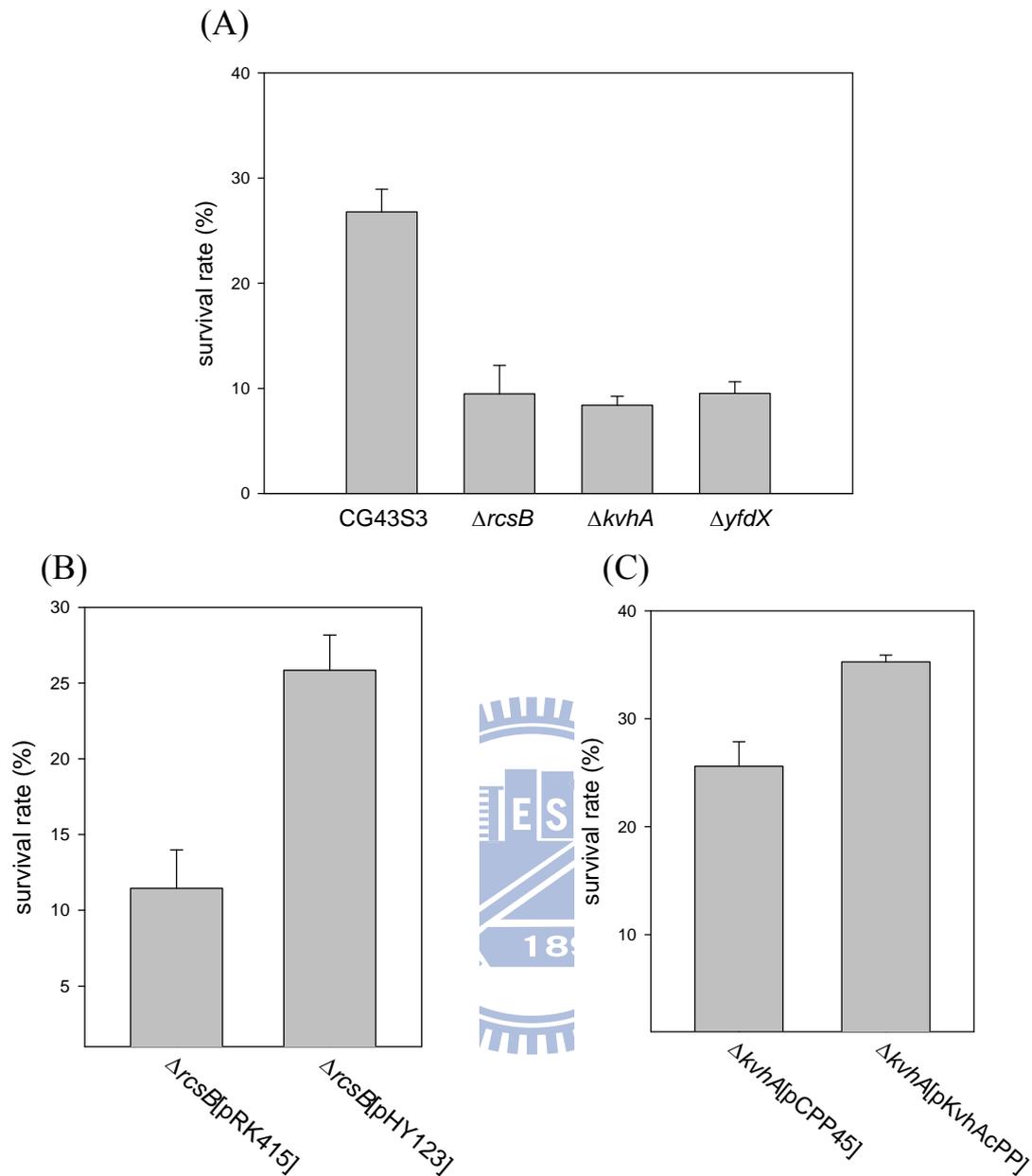
(A) 大腸桿菌中的酸適應島嶼 (46)。(B) 本研究預測在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中相對酸適應島嶼的基因組。



圖十一：*rcsB*或*kvhA*基因缺損降低*hdeB2*, *hdeD-hdeB1* 及*yfdX*在靜置

培養下啟動子的活性

細菌在 LB 靜置培養 20 小時後，再分別測定其啟動子活性。

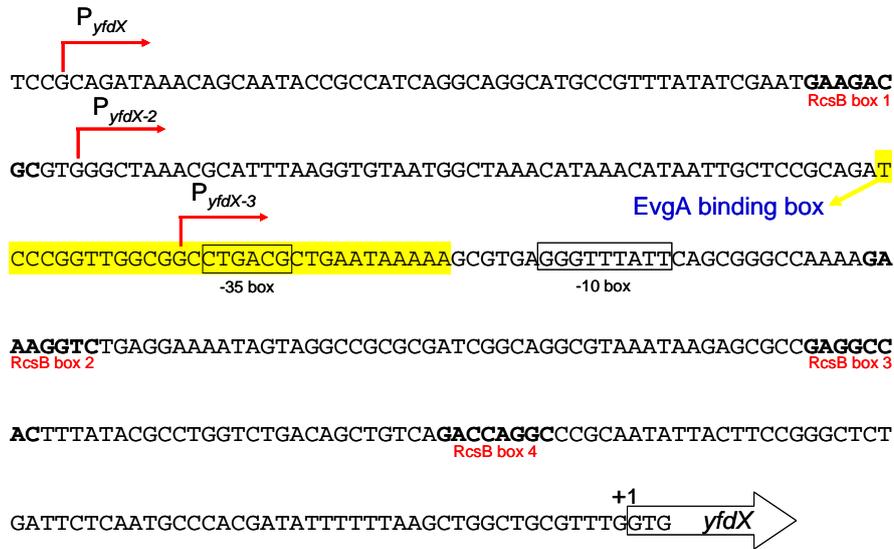


圖十二：*rcsB*, *kvhA* 或 *yfdX* 基因缺損降低克雷白氏肺炎桿菌在靜置培

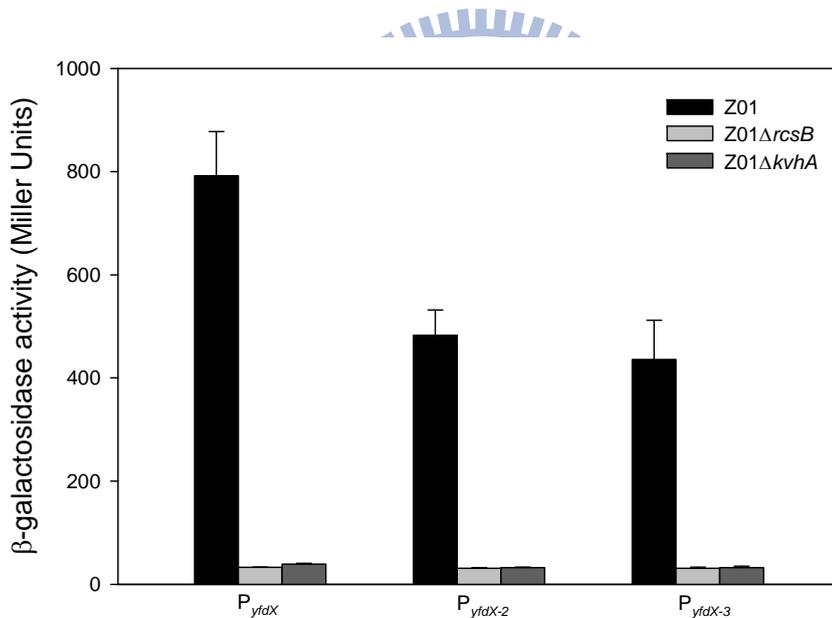
養下的抗酸能力

細菌在 LB 靜置培養 20 小時後，移至 pH 3.0 的 M9 培養液中，培養 1 小時 (A) 或 45 分鐘 (B)，(C) 後，取適當菌液稀釋塗盤後，計算菌數；存活率是根據在 45 分鐘或 1 小時後，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。pHY123 為 *rcsB* 互補質體；pKvhAcPP 為 *kvhA* 互補質體。

(A)



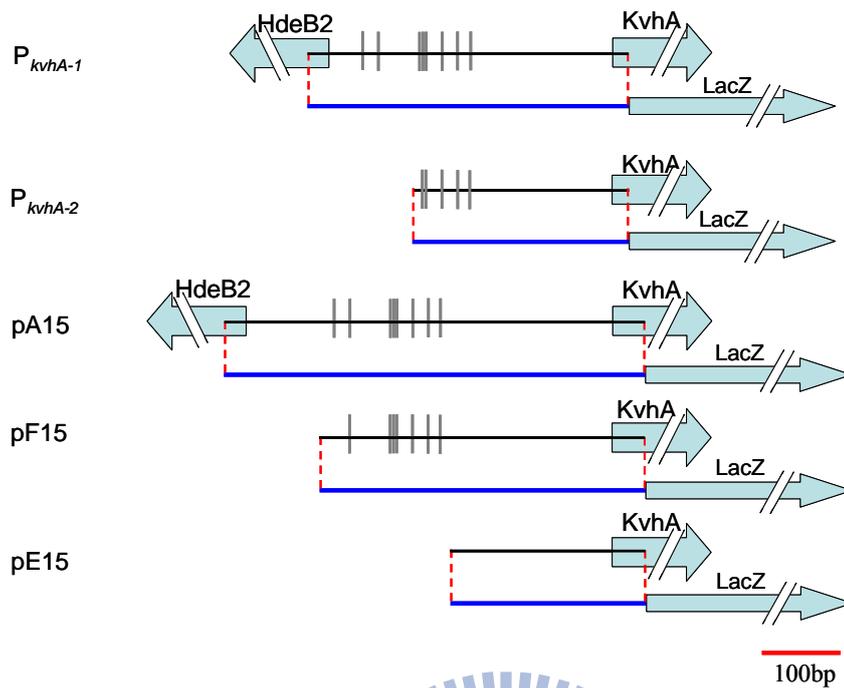
(B)



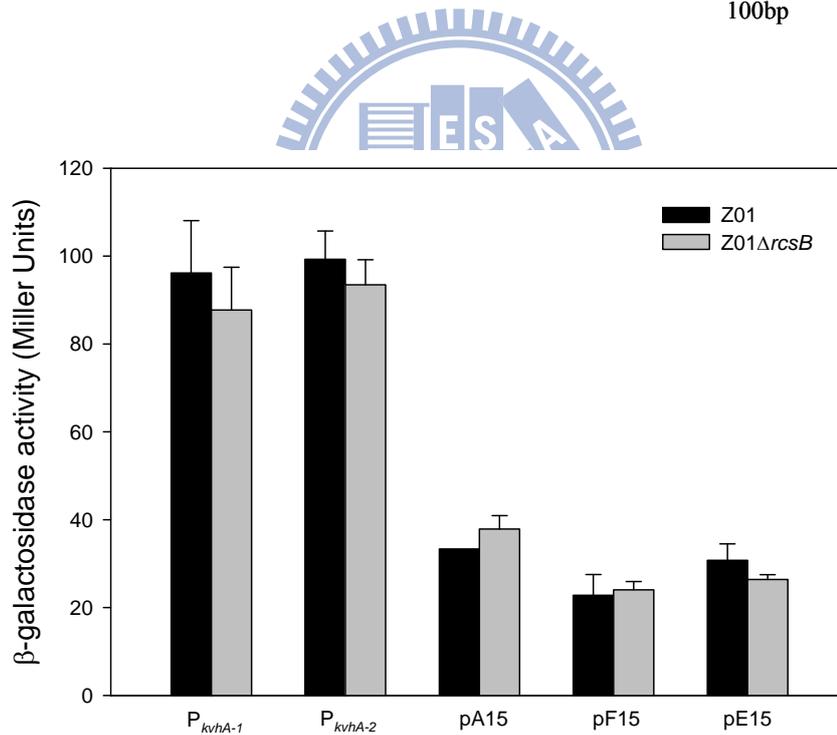
圖十三：不同長度的yfdX啟動子在rcsB或kvhA基因缺損株下的活性

(A) 不同長度的 yfdX 啟動子建構示意圖。預測的-10 box 及 -35 box 被框出；而預測的 EvgA 及 RcsB 結合位置亦被指出。(B) 啟動子活性。細菌在 LB 靜置培養 20 小時後，再分別測定其啟動子活性。

(A)

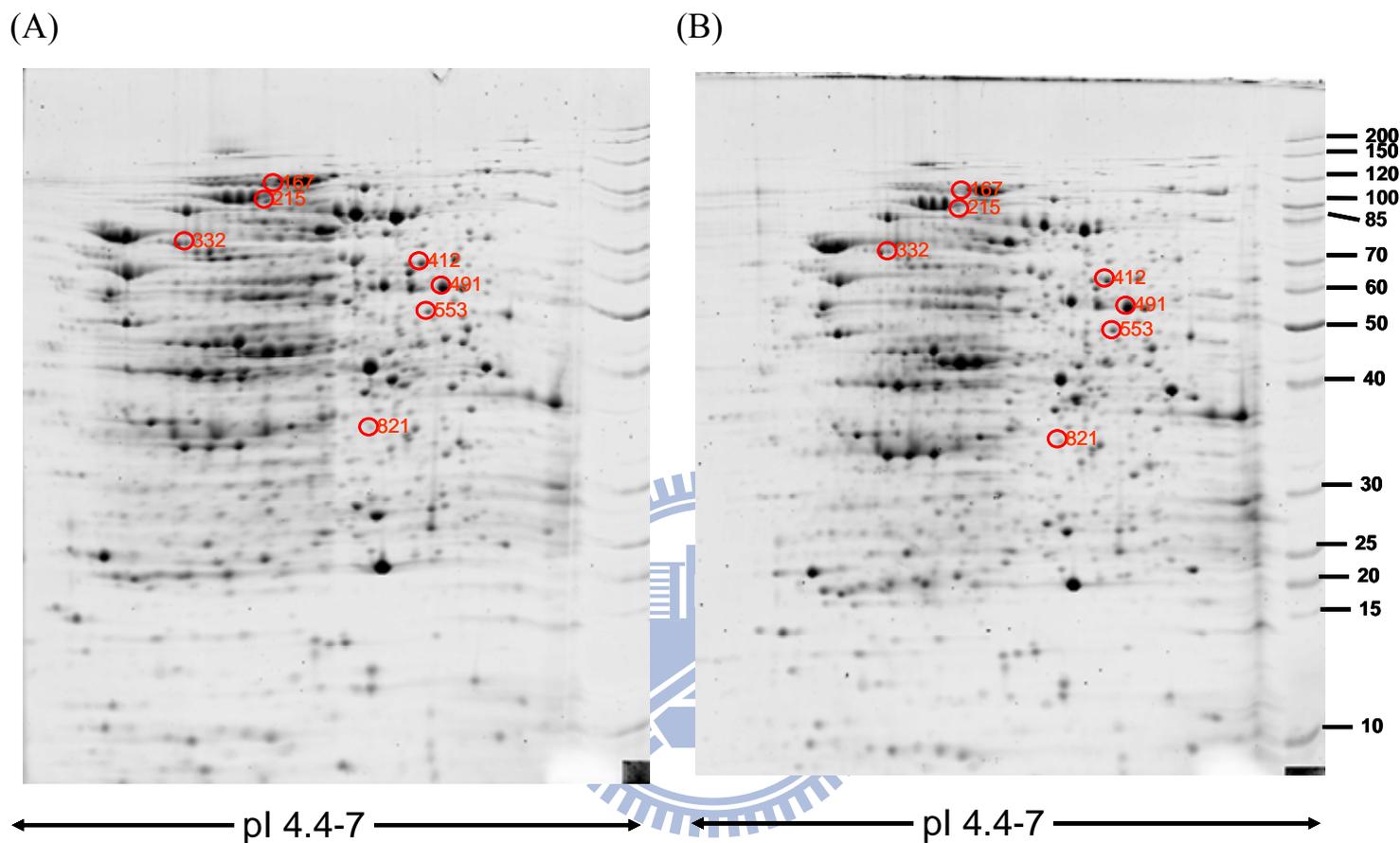


(B)



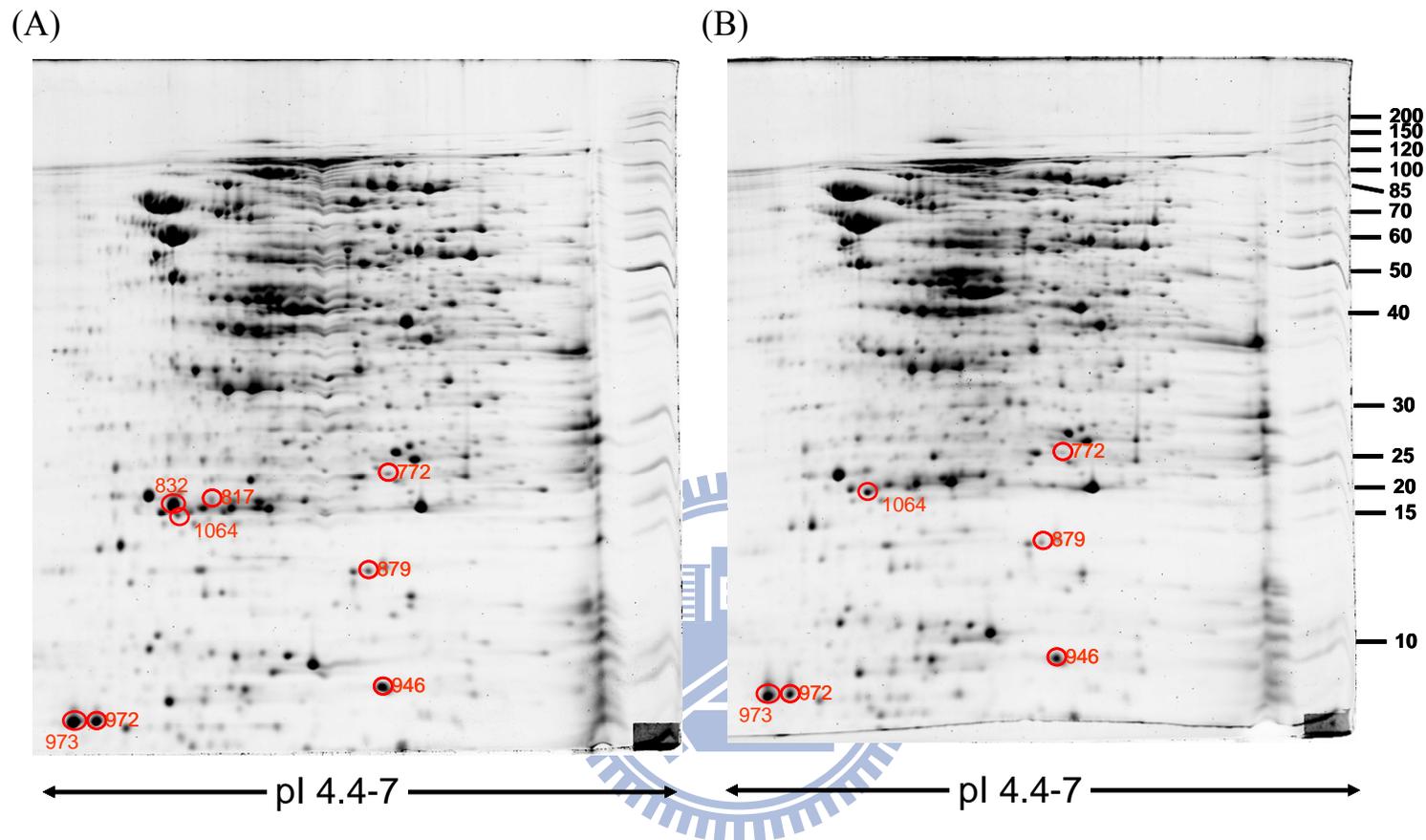
圖十四：不同長度的*kvhA*啟動子在*rscB*基因缺損株下的活性

(A) 不同長度的 *kvhA* 啟動子建構示意圖。灰色的長條代表預測的 RcsB 結合位置。(B) 啟動子活性。細菌在 LB 靜置培養 20 小時後，再分別測定其啟動子活性。



圖十五：克雷白氏肺炎桿菌在中性環境下的蛋白質表現圖譜

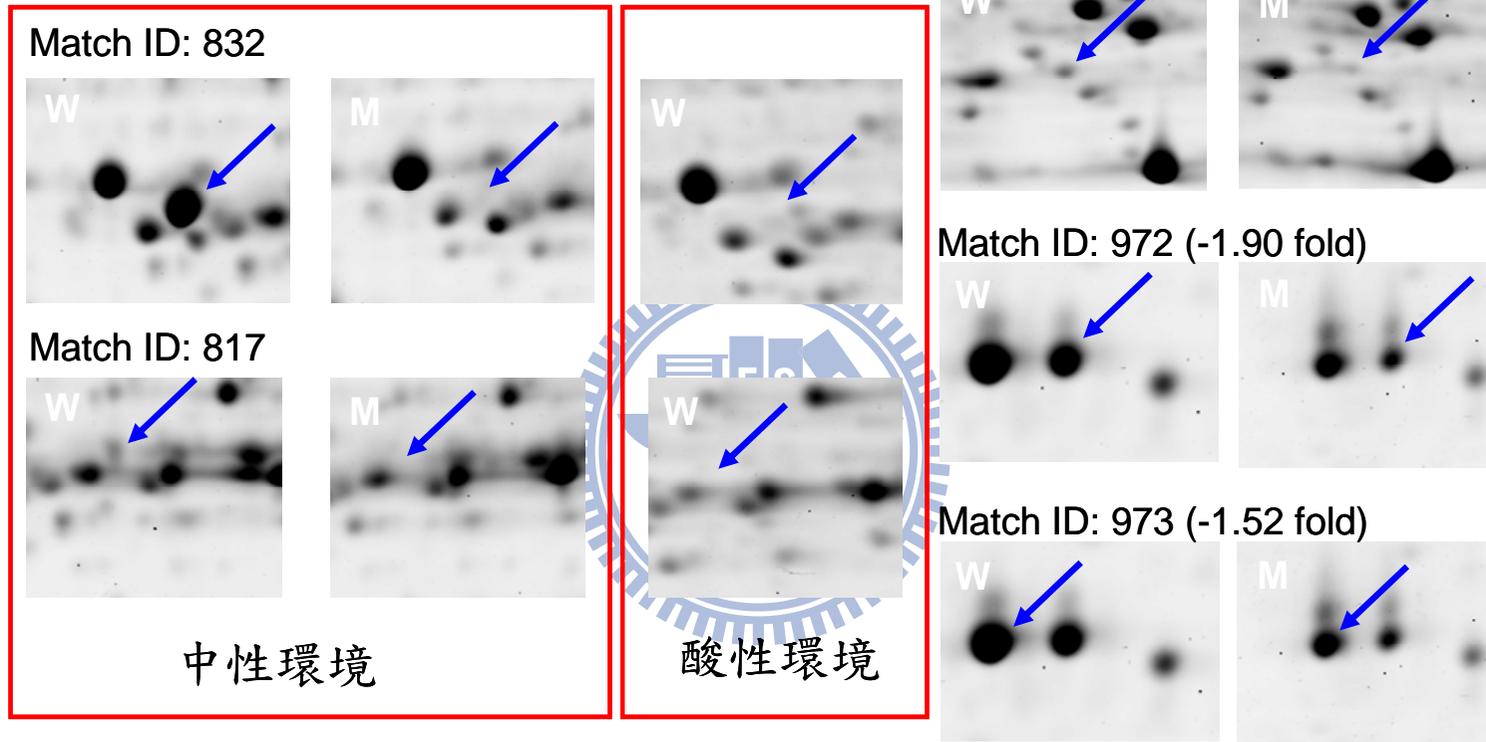
細菌隔夜培養後，20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液 (pH 7.5) 中，再培養至對數中期 (mid-log phase, $OD_{600} = 0.6 \sim 0.7$)，再收其可溶性蛋白質進行二維電泳實驗。(A)CG43S3 (B)CG43S3 Δ *rcsB*。紅圈框出的點為表現量有差異的點，其數字為其 Match ID；圖為三次實驗具代表性的一次結果。



圖十六：克雷白氏肺炎桿菌在酸性環境下的蛋白質表現圖譜

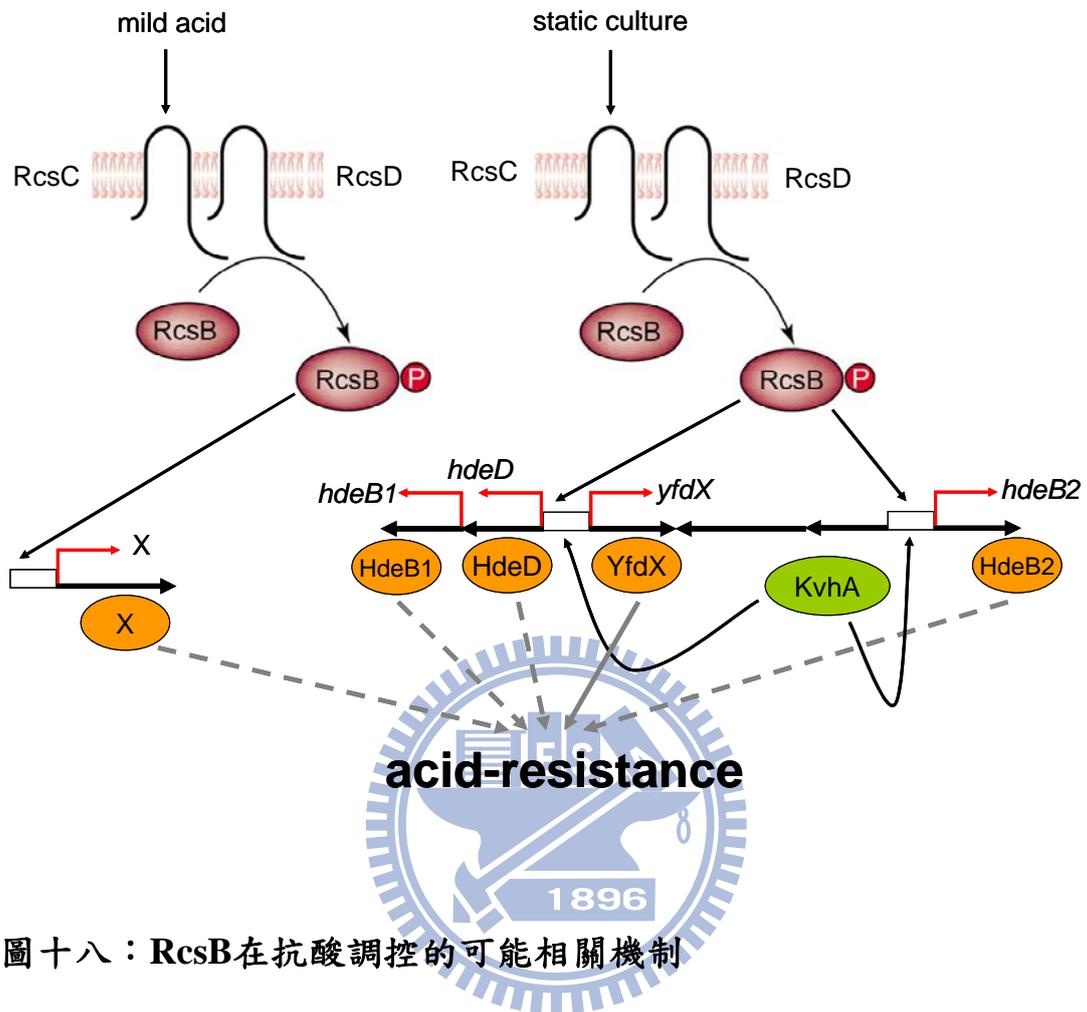
細菌隔夜培養後，20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液 (pH 7.5) 中，培養 3 個小時後，再將菌體移至 pH 4.4 的 LB 培養液適應 1 小時，再收其可溶性蛋白質進行二維電泳實驗。(A)CG43S3 (B)CG43S3 Δ *rcsB*。紅圈框出的點為表現量有差異的點，其數字為其 Match ID；圖為三次實驗具代表性的一次結果。

W: CG43S3 M: CG43S3 Δ *rscB*



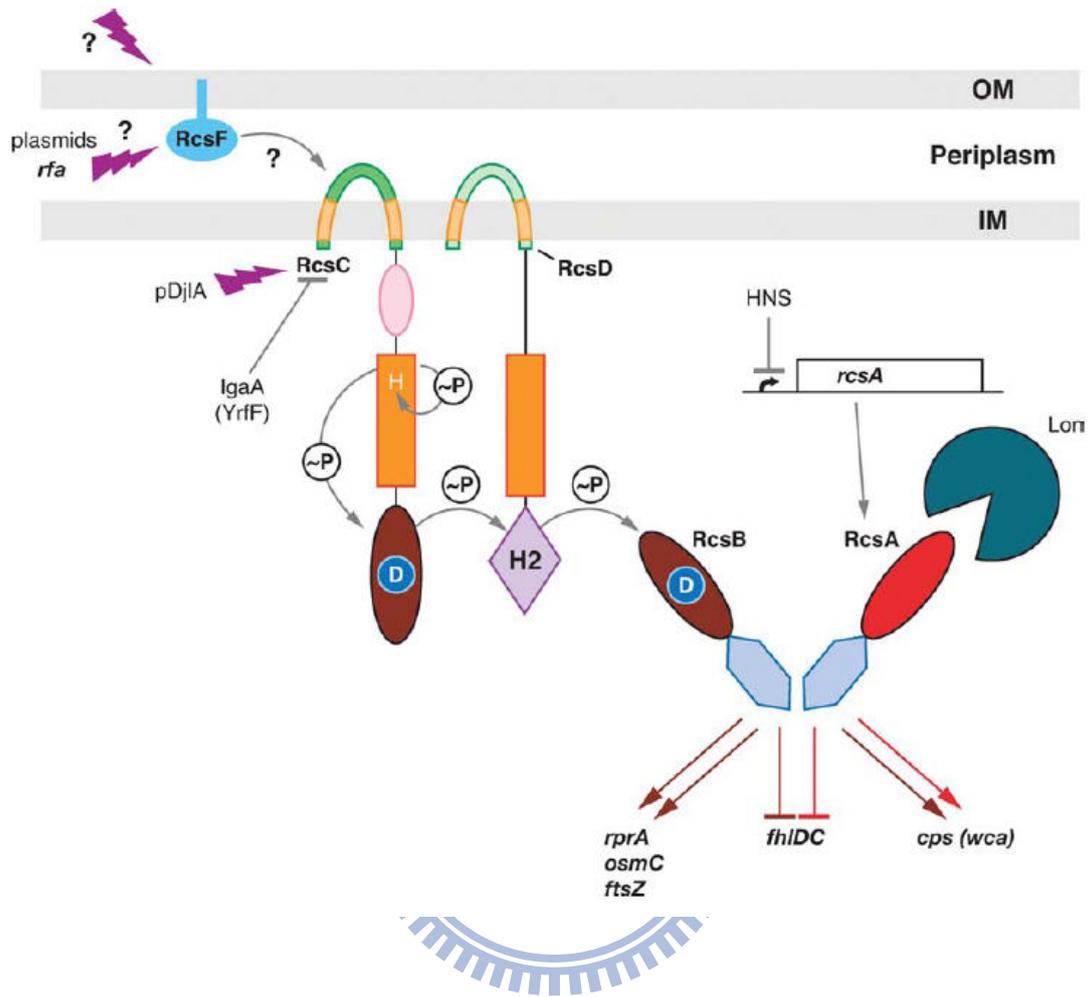
圖十七：克雷白氏肺炎桿菌在酸性環境下表現量差異很大的蛋白質

Match ID 旁的數字代表其表現量在 CG43S3 Δ *rscB* 中下降的倍率。

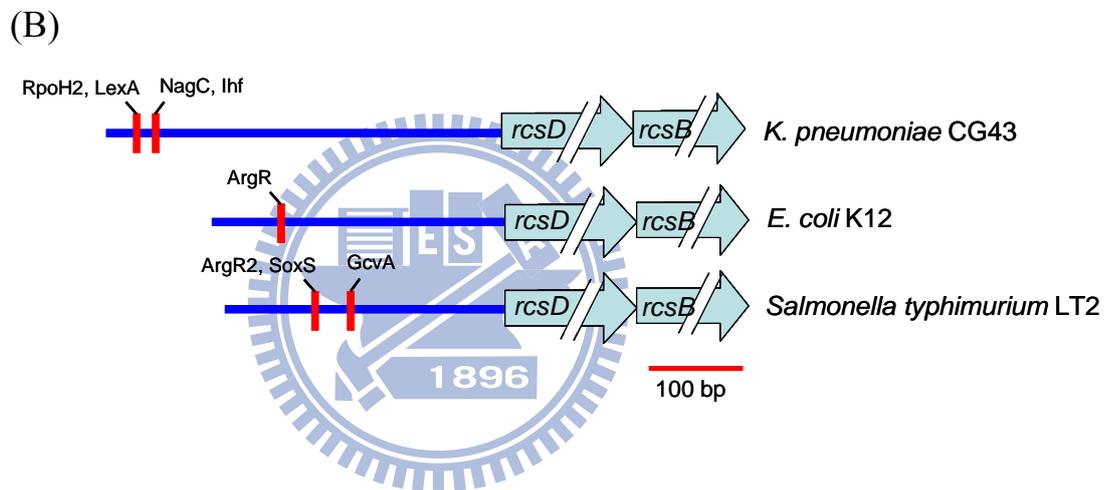
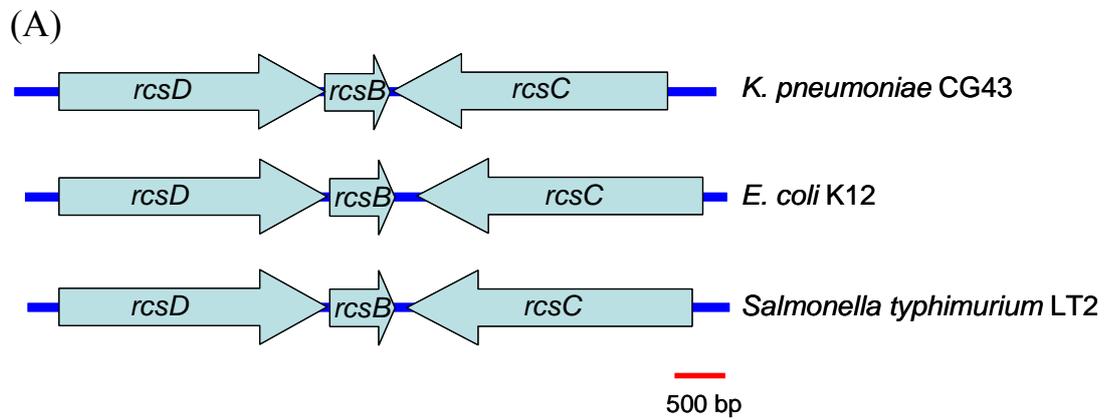


圖十八：RcsB在抗酸調控的可能相關機制

弱酸會誘導 RcsB 調控某個未知的蛋白質，而提高抗酸能力。而靜置培養下會誘導 RcsB 調控酸適應島嶼中的基因 HdeB1, HdeD, YfdX 及 HdeB2 的表現，而提高抗酸能力，同時 KvhA 亦扮演必須的角色。虛線部分僅代表推論，但尚未有實驗數據證明。

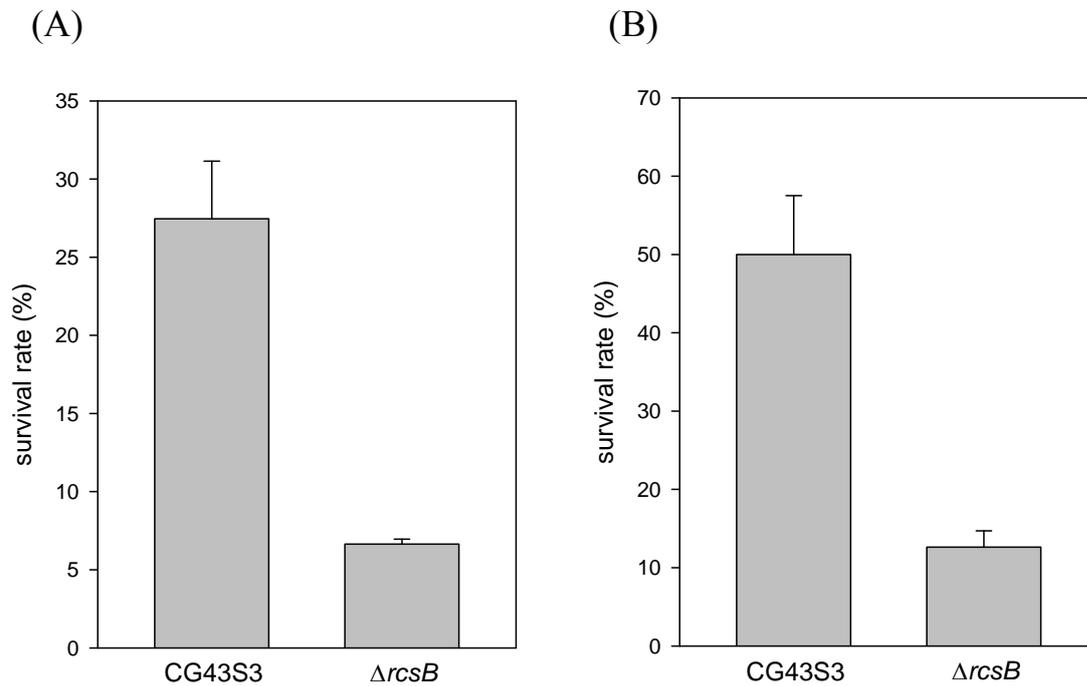


附錄一：Rcs系統的訊息傳遞路徑 (41)



附錄二：Rcs系統的基因組成及 $rscB$ 啟動子序列預測的轉錄因子

(A) Rcs 系統的基因組成示意圖。(B) 在 RcsB 啟動子序列預測到的轉錄因子。



附錄四：*rcsB*基因缺損降低克雷白氏肺炎桿菌對氧化壓力的抗性

(A) 細菌在 LB 培養液隔夜培養後，20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液中，再培養至 OD_{600} 約為 0.6~0.7，之後在含有 30 mM 雙氧水的 LB 培養液，培養 35 分鐘。(B) 細菌在 LB 靜置培養 20 小時，之後在含有 40 mM 雙氧水的 LB 培養液，培養 35 分鐘；分別取上述菌液稀釋塗盤後，計算菌數，決定存活率。