

國立交通大學

生物科技學系

碩士論文

**YfdX 在克雷白氏肺炎桿菌 CG43**

**抗酸反應中所扮演的角色**

**YfdX role in acid-resistance response of**

***Klebsiella pneumoniae* CG43**



**研究生：樊力成**

**Student: Li-Cheng Fan**

**指導教授：彭慧玲 博士**

**Advisor: Hwei-Ling Peng, Ph.D**

**中華民國一百零一年七月**

**July, 2012**

## 中文摘要

已知雙分子調控系統 RcsB 正向調控克雷白氏肺炎桿菌的抗酸反應。*rscB* 基因的剔除使細菌於低酸鹼值(pH3)之生存率顯著的降低。蛋白質體的研究發現，經過弱酸的適應後 *rscB* 基因剔除使特定蛋白質表現量顯著降低，而後此蛋白質被鑑定為 YfdX。位於克雷白氏肺炎桿菌酸適應島嶼的 *yfdX* 基因經剔除後，細菌於低酸鹼值的生存率顯著降低。在靜態培養以及弱酸的條件下，剔除 *rscB* 基因或 *kvhA* 基因的菌株觀察到  $P_{yfdX}$  表現量的降低。本研究中，我們製作  $\Delta rcsB\Delta yfdX$  以及  $\Delta kvhA\Delta yfdX$  之雙突變菌株。抗酸存活率試驗指出  $\Delta kvhA\Delta yfdX$  以及  $\Delta yfdX$  反應相似，然而  $\Delta rcsB\Delta yfdX$  的存活率則相似於  $\Delta rcsB$  突變株。顯示酸適應島嶼之雙分子調控系統 KvhA 在靜態培養條件下的抗酸反應主要透過 YfdX 表現。目前尚未有研究指出 *yfdX* 基因的功能，而使用生物資訊的工具(BLAST, pfam)搜尋指出 YfdX 具有訊息胜肽但並無其他保守性的序列。酸適應島嶼的伴隨蛋白基因 *hdeB* 亦具有訊號序列，且 *hdeB-hdeD* 相鄰於 *yfdX* 而同樣受到 KvhA 以及 RcsB 的調控，於是假設 *yfdX* 與 *hdeB-hdeD* 在抗酸功能上具有關聯性。我們再進一步製作  $\Delta hdeB\Delta hdeD\Delta yfdX$  以及  $\Delta yfdX\Delta hdeB$  突變菌株，結果顯示  $\Delta hdeB\Delta hdeD$  與  $\Delta hdeB\Delta hdeD\Delta yfdX$  有近似的酸存活率； $\Delta hdeB$  基因不具備訊息胜肽  $\Delta yfdX$  而在抗酸功能未具相關性。接下來，我們建構 YfdX 表現載體 pET30a-yfdX，測試 YfdX 蛋白質之功能或用於 YfdX 抗體之製作。體外的伴隨蛋白活性試驗指出 His<sub>6</sub>-YfdX 降低 ADH 的沉澱，His<sub>6</sub>-YfdX 相較於 His<sub>6</sub>-HdeB 具有較高的體外伴隨蛋白質活性，但 YfdX 與 HdeB 體外的伴隨蛋白活性並沒有明顯的加乘效果。抗體製作完成後，西方點墨法的測試顯示 YfdX 表現於膜間質，並受靜置培養及弱酸的影響增加表現量。最後，免疫共沉澱的實驗指出在弱酸環境下 YfdX 能與多數膜間質蛋白質作用，而在中性時與膜間質蛋白質的結合能力較低。以上體外的試驗指出，YfdX 在酸性環境下具備伴隨蛋白的活性，保護蛋白質發生沉澱。

## Abstract

The two component system (2CS) response regulator (RR) RscB has been previously shown to play a positive role in the acid-resistance response in *Klebsiella pneumoniae* CG43. Deletion of *rcsB* apparently reduced the bacterial survival under pH 3 culture condition. After mild acid adaptation, the proteome study revealed a missing protein spot in the *rcsB* deletion mutant which later identified as YfdX. Deletion of the *yfdX*, located on a putative acid fitness island (AFI), appeared to reduce the bacterial survival at pH 3. In statically or mild acidic cultured condition, a reduced level of P<sub>*yfdX*</sub> promoter activity in the *rcsB* deletion and *kvhA* deletion mutant was also observed. Here,  $\Delta rcsB\Delta yfdX$  and  $\Delta kvhA\Delta yfdX$  mutants were generated. Acid survival analysis revealed that  $\Delta kvhA\Delta yfdX$  and  $\Delta yfdX$  had similar response to pH 3 treatment, while  $\Delta rcsB\Delta yfdX$  revealed same survival level as  $\Delta rcsB$  mutant. These suggested that KvhA, a 2CS RR encoding gene on the AFI, also plays a regulatory role of acid stress primarily on YfdX expression under statically cultured condition. Furthermore, A signal peptide has been found on YfdX by BLAST but no conserved domain on YfdX protein. We proposed that there are some functional relationships between *yfdX* and the nearby gene *hdeB-hdeD* of acid resistance. Therefore,  $\Delta hdeB\Delta hdeD\Delta yfdX$  and  $\Delta yfdX\Delta hdeB1$  mutants were generated and confirmed the correlation between *yfdX* and *hdeB-hdeD* under acid stress. Thus, Recombinant YfdX protein has been generated for testing chaperone activity and raising antibodies for YfdX localization detection. Western blotting analysis further confirmed *rcsB* and *kvhA* controlling the periplasmic expression of YfdX under acidic and static culture condition. *in vitro* acid chaperone activity assay revealed the potent protective effects on ADH of YfdX then HdeB. Finally, co-immunoprecipitation test indicated that YfdX can interact with periplasmic proteins under acidic condition.

## 致謝

碩士的兩年研究所生活，如今在此告一段落。考上研究所的興奮，以及到校園時的期待，最後是現在收成的喜悅，這一切都要感謝許多人對我的指導與幫助。這一篇論文能夠順利完成，首先要感謝我的指導老師—彭慧玲教授。在老師辛勞叮嚀論文的進度之下，論文才能夠如期的完成，除了本篇論文外，張老師也指導我們口試方面的問題，讓學生的口試能夠更加順利，這都需感謝老師對於我的指導跟協助。

再來要感謝我的口試委員黃兆祺教授與林靖婷教授，在黃老師的課堂上，學習了很多實務上的觀念，增加我對實驗上的理解。而林老師在口試時對於我的指導，更讓我發現本論文主題可以更深入探討的地方，能夠真正到學以致用的目標。

在實驗的大家在這段時間給予了無與倫比的協助，尤其在實驗遇到困難的時候，給予了我許多寶貴的建議。我要特別感謝靜柔學姊、哲充學長、舉豪、大熊跟小波，以及實驗室的所有人，由於大家的協助才得以順利完成兩年的學業。兩年的相處下來，總有許多難以忘懷的回憶，但我是個不善言詞的人，只能將感謝寄託在短短的幾行字裡。另外，還有很多曾經幫助過我的朋友，因為有大家的幫助，我才能有今天的成果。

最後要感謝我的爸媽，這段時間一直在忙工作與學業的問題，與家人相處的時間很少，因為爸媽的體諒，才能專心完成學業。

## 目錄

|   | 頁數   |
|---|------|
| 中文摘要.....   | I    |
| Abstract.....                                     | II   |
| 致謝.....   | III  |
| 目錄.....   | IV   |
| 表目錄.....  | V    |
| 圖目錄.....  | VI   |
| 縮寫表.....  | VIII |
| 一、 前言.....  | 1    |
| 1.1 克雷白氏肺炎桿菌.....                                 | 1    |
| 1.2 腸胃道病原細菌的抗酸機制.....                             | 2    |
| 1.3 分子伴隨蛋白在周邊胞質(Periplasm)的抗酸作用.....              | 3    |
| 1.4 克雷白氏肺炎桿菌的調控基因與抗酸作用.....                       | 4    |
| 二、 材料與方法.....                                     | 6    |
| 三、 結果.....  | 11   |
| 3.1 <i>yfdX</i> 與其鄰近基因對細菌抗酸能力的影響.....             | 11   |
| 3.2 <i>YfdX</i> 以及 <i>HdeB</i> 抗酸能力與伴隨蛋白活性分析..... | 13   |
| 四、 討論.....  | 16   |
| 相關文獻.....   | 20   |
| 表.....  | 25   |
| 圖.....  | 29   |
| 附錄.....   | 51   |

## 表目錄

|                        | 頁數 |
|------------------------|----|
| 表一：本次實驗使用與建構之細菌菌株..... | 24 |
| 表二：本次實驗使用與建構之質體.....   | 26 |
| 表三：本次實驗使用之核苷酸引子.....   | 27 |



## 圖目錄

|   | 頁數 |
|---|----|
| 圖一：酸適應島嶼(acid fitness island) .....                                       | 28 |
| 圖二：建構 $\Delta rcsB \Delta yfdX$ 及 $\Delta rcsB \Delta yfdX$ 雙基因缺損突變株..... | 29 |
| 圖三：建構 $\Delta hdeB \Delta hdeD \Delta yfdX$ 基因缺損突變株.....                  | 30 |
| 圖四：建構 $\Delta hdeB1 \Delta yfdX$ 雙基因缺損突變株.....                            | 31 |
| 圖五：突變菌株 $yfdX$ 基因缺損對細菌的生長沒有影響.....  | 32 |
| 圖六：在震盪培養的條件下 $kvhA$ 與 $yfdX$ 基因缺損不影響克雷白氏肺炎桿菌<br>抗酸能力.....                 | 33 |
| 圖七： $kvhA$ 主要透過 $yfdX$ 基因影響靜置培養下的抗酸能力.....                                | 34 |
| 圖八： $hdeB$ , $hdeD$ 及 $yfdX$ 基因共同影響靜置培養下的抗酸能力.....                        | 35 |
| 圖九：震盪培養下 $yfdX$ 啟動子的活性較低.....   | 36 |
| 圖十：靜置培養下 $yfdX$ 啟動子的活性受到弱酸的誘導.....  | 37 |
| 圖十一： $rscB$ 及 $kvhA$ 基因缺損降低靜置培養下 $yfdX$ 啟動子的活性.....                       | 38 |
| 圖十二：YfdX 表現載體製作、誘導與純化.....  | 39 |
| 圖十三：ADH、HdeB 以及 YfdX 體外酸沉澱的模式.....  | 40 |
| 圖十四：His6-HdeB 在活體外擁有伴隨蛋白的活性.....  | 41 |
| 圖十五：His6-YfdX 在活體外擁有伴隨蛋白的活性.....  | 42 |
| 圖十六：His6-YfdX 以及 His6-HdeB 活體活性沒有加乘效果.....                                | 43 |
| 圖十七：西方點墨法偵測 YfdX 表現於膜間質.....  | 44 |
| 圖十八：靜態培養增加 YfdX 蛋白質的表現量.....  | 45 |
| 圖十九：YfdX 表現量受到 $rscB$ 以及 $kvhA$ 影響.....                                   | 46 |
| 圖二十：YfdX 體內伴隨蛋白活性試驗顯示出微弱伴隨蛋白活性.....                                       | 47 |
| 圖二十一：免疫共沉澱實驗顯示 YfdX 酸性環境下作用於膜間質蛋白.....                                    | 48 |
| 圖二十二：酸適應島嶼基因的可能相關調控機制與功能.....   | 49 |

## 附錄

|  | 頁數 |
|--|----|
| 附錄一：預測 YfdX 具有訊息胜肽.....                          | 50 |
| 附錄二： <i>yfdX</i> 基因缺損不影響鐵載體(siderophore)的分泌..... | 51 |
| 附錄三： <i>yfdX</i> 基因缺損對細菌在 5%膽鹽下的生長沒有影響.....      | 52 |
| 附錄四： <i>yfdX</i> 基因缺損不影響離胺酸脫梭酶的功能.....           | 53 |



## 縮寫表

|            |  |
|------------|--|
| ADH        | alcohol dehydrogenase                                |
| AFI        | acid fitness island                                  |
| AR         | acid resistance                                      |
| ArcA       | aerobic respiration control regulator                |
| ATP        | adenosine triphosphate                               |
| bp         | Base pair  |
| CFU        | colony forming unit(s)                               |
| CPS        | capsular polysaccharide                              |
| DNA        | deoxyribonucleic acid                                |
| Evg        | Escherichia virulence gene                           |
| EDTA       | ethylenediamine-tetraacetic acid                     |
| GABA       | $\gamma$ -aminobutyric acid                          |
| IPTG       | isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside       |
| kb         | kilobase(s)  |
| kDa        | kiloDalton(s)  |
| Kvh        | Klebsiella virulence gene homologue                  |
| LB         | Luria-Bertani  |
| $\mu$ M    | micromolar   |
| mM         | millimolar   |
| ONPG       | phosphateo-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside |
| NBT        | nitro blue tetrazolium chloride                      |
| PAGE       | polyacrylamide gel electrophoresis                   |
| PCR        | polymerase chain reaction                            |
| PVDF       | polyvinylidene difluoride                            |
| $P_{yfdX}$ | promoter of <i>yfdX</i>                              |
| Rcs        | regulator of capsular synthesis                      |
| SDS        | sodium dodecyl sulfate                               |
| TCS        | two component system                                 |
| X-gal      | 5-bromo-4-chloro-3-indoly-B-D-galactopyranoside      |

## 一、前言

### 1.1 克雷白氏肺炎桿菌

克雷白氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*) 屬於腸內菌科，為格蘭氏陰性兼性厭氧菌，其菌體尺寸約為 2 微米、0.5 微米長寬之桿狀，且外層包覆厚實莢膜。克雷白氏菌最早於西元 1882 年由 Friedlander C. Uber 發現為肺炎之病原體。除了棲息人體外，克雷白氏肺炎桿菌存在環境中，包含於污水、土壤或是水域表面。在醫院內，克雷白氏肺炎桿菌常存在病患腸胃道或醫護人員手上、鼻咽內，受到糞便污染的器材及用具，為其疾病重要的傳播方式，被認為是全球性院內感染的主要細菌之一 [33]。

克雷白氏肺炎桿菌是伺機性的病原菌，其感染好發於免疫力低下的中、高年齡層病患、慢性病患、酗酒者、或於治療過程中，病患因免疫功能缺損且與此菌接觸而造成特定部位的感染；其感染症狀包括上呼吸道感染、肺炎、肝膿瘍、腹瀉、傷口感染、尿道感染、敗血病等，而出現菌血或敗血病患，即使給予抗生素治療，依然有高致死率 [41]。近年來，新種的抗藥性菌株在院內感染的病例中逐漸被發現 [48]，抗藥菌株的出現，使得抗生素的使用受到限制。干擾細菌面臨宿主壓力的存活機制與調控，有潛力可成為控制細菌感染的重要策略。

流行病學的研究顯示，無論最終感染的部位為何，造成最初階段感染的克雷白氏肺炎桿菌經常源自病患腸胃道的常駐細菌 (endogenous colonization)[10,26]。而當感染原進入消化道時，人體的第一道天然屏障是 pH 酸鹼度 1-3 間之胃酸，在面對極酸的環境，大腸桿菌、沙門氏菌或胃幽門桿菌，能以特定的抗酸機制來規避胃酸所造成的傷害 [40]；而從胃進入小腸後，除了酸鹼度變化外，感染原將面臨滲透壓與氧氣濃度的改變，腸內菌發酵產生的有機酸，也是病原菌需要抵抗的酸壓力 [35]。因此，如何感應環境中可能的致命威脅，並進行精細的調控來規避傷害的能力，為腸內病原細菌存續於宿主腸胃道的關鍵。

### 1.2 腸胃道病原細菌的抗酸機制

細胞膜對於離子的通透性低，可以防止細胞外物質自由進入細胞，然而，高濃度的氫離子，可以滲透細胞膜使得細胞內的酸鹼值降低 [36]；而未解離的弱酸，如有機酸或短鏈脂肪酸(Volatile fatty acids)，則能透過擴散作用進入細胞內，造成酸鹼值降低。在酸性之下，生物分子原有的結構發生改變，造成蛋白質的去摺疊(unfolding)與聚集(aggregation)而變性，阻礙細胞正常生理功能、破壞細胞結構，最終導致細胞死亡。是故，腸內細菌的主要的抗酸反應是去避免細胞酸鹼度的遽變、紓緩酸造成的傷害、及保護生物分子結構免受破壞。

在低酸鹼值下只能存活數分鐘的胃幽門桿菌，除了產生大量的尿素分解酵素(urease)消耗氫離子，將氨(ammonia)轉換成銨根(amine)，來中和細胞質與膜間質(periplasm)的酸鹼度。此外，胃幽門桿菌得以在人類胃粘膜表面形成菌落，在感受胃酸刺激即泳動至胃粘膜上皮細胞接近中性區 [6]。相對的，大腸桿菌則使用不同的抗酸機制通過胃酸，另外，痢疾桿菌(*Shigella flexneri*)和大腸桿菌一樣擁有較強的抗酸能力，而霍亂桿菌(*Vibrio cholerae*)的抗酸能力較低 [29]。

在大腸桿菌中，已知有五種抗酸途徑為 AR (acid resistance) 1~AR5 [13, 50]。大腸桿菌於 pH 5.5 LB 培養至穩定生長期(stationary phase)後換置於 pH 2.5 的限制培養基(minimal media)，且不外加任何胺基酸時即啟動 AR1 抗酸系統，AR1 的活性受  $\sigma^S$  與 CRP(cAMP receptor protein)調控，並受葡萄糖抑制 [17]。AR2~AR5，都是以胺基酸去梭酸基酵素(amino acid decarboxylase)消耗特定胺基酸與氫離子，產生終產物胺類 (amines) 與二氧化碳而提高 pH 值；一般而言，厭氧的酸性環境能夠誘導胺基酸去梭酸基酵素的作用，AR2 及 AR3 作用於 pH 2.5 的強酸環境；AR4 及 AR5 的抗酸系統，則與細菌在 pH 4.5 環境下的生存相關。AR2 為麩胺酸(glutamate)去梭酸基酵素系統；大腸桿菌對抗極酸環境(pH 2.5)的主要系統，pH 4 為其酵素作用值；AR2 包含 GadA、GadB 去梭酸基酵素，與位於內膜的反向轉運蛋白(antiporter) GadC，另外，GadE 為 AR2 主要的轉錄啟動因子。GadA 及 GadB 藉消耗細胞內的氫離子提升細胞質之酸鹼值，同時把麩胺酸轉換成胺基丁酸( $\gamma$ -amino butyric acid, GABA)與二氧化碳(carbon

dioxide)，胺基丁酸再透過 GadC 送至細胞外與麩胺酸交換而使反應持續 [5]。AR3 為精胺酸(arginine)去梭酸基酵素系統，AR3 使大腸桿菌在極酸環境下存活，pH 5 為其酵素作用最佳[14]，AR3 由精胺酸去梭酸基酵素 AdiA 與反向運輸蛋白 AdiC 組成，藉由類似 AR2 的機制，AR3 消耗精胺酸與氫離子以增加細胞內的 pH；AdiA 轉換精胺酸為胍丁胺(agmatine)與二氧化碳，AdiC 則將胍丁胺運送至細胞外，並交換精胺酸進入細胞內。在 pH 2.5 極酸的環境時，AR2 與 AR3 能夠提升細胞至約 pH 4.5，而失去 AR2 與 AR3 的菌株細胞降為 pH 3.5 [50]。AR4 為離氨酸(lysine)去梭酸基酵素系統，相較於 AR2 與 AR3，AR4 作用於較微酸環境(pH 5)，其酵素作用之最佳值為 pH 5.5-5.7 [13]，AR4 抗酸系統包含離氨酸去梭酸基酵素 LdcI (CadA)與反向轉運蛋白 CadB，LdcI 轉換離氨酸為屍胺(cadaverine)與二氧化碳，以降低細胞內氫離子濃度，CadB 將屍胺運送至細胞外，並交換離氨酸進入細胞內 [31]。目前對於 AR5 系統的研究較少，AR5 包含鳥氨酸去梭酸基酵素 SpeF 與鳥氨酸-腐胺反向轉運蛋白 PotE，SpeF 酵素作用的最佳值約 pH 6.9 [18]。

### 1.3 分子伴隨蛋白在周邊胞質(Periplasm)的抗酸作用

格蘭氏陰性菌具有雙層膜結構，位於外層膜上的非專一性通道蛋白(porins)，允許分子量小於 600 Da 之分子自由擴散，包含氫離子，使得膜間質承受較大的環境壓力 [47]，膜間質與細胞質一樣包含參與養分代謝的重要酵素與轉運蛋白，但缺乏三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)。分子伴隨蛋白(molecular chaperone)參與新生成蛋白質的摺疊、多元體的聚合、或幫助壓力下失活的蛋白質重新摺疊，使其具有活性構型 [28]。大部分膜間質的伴隨蛋白被分為為三類 [38]；第一類催化雙硫鍵合成與異構化；第二類為肽基脯胺酸順反異構酶(Peptidyl-prolyl cis / trans isomerases, PPIase)；第三類為一般性伴隨蛋白(general chaperone)，如 Skp、DegP 與 SurA，催化廣泛的受質重新摺疊(refold) [22]。Skp、DegP 與 SurA 的表現受到 RpoE 調控，並影響外膜蛋白質(Outer

membrane protein, OMP) 的合成 [28]。合成性致死的現象 (synthetic lethal phenotypes) 發生於 *skp* 與 *surA* 或是 *degP* 與 *surA* 的雙失能突變菌株 (null mutation)，但非 *skp* 及 *degP* 雙突變菌株，顯示膜間質伴隨蛋白質 *skp* 及 *degP* 的作用路徑相同，SurA 則進行相異的作用路徑。

而在格蘭氏陰性菌的抗酸系統中，除了細胞質的去梭酸基酵素外，特殊的伴隨蛋白能夠辨認並保護蛋白質，使其維持活性狀態而避免沉澱發生。大腸桿菌中，已知參與膜間質抗酸反應的伴隨蛋白為 HdeA 及 HdeB，此二基因位於同一操縱組 (operon)，受酸誘導表現。而阻斷 *hdeAB* 表現可明顯降低大腸桿菌、痢疾桿菌或布氏桿菌 (*Brucella abortus*) 在酸壓力下的存活 [20,24,44]，恢復 *hdeA* 或 *hdeB* 任一基因功能，則可增進大腸桿菌的存活率。已知，HdeA 能結合膜間質的蛋白質包含轉運蛋白、代謝酵素、伴隨蛋白、脂蛋白及蛋白質分解酵素等參與細菌生理活性的重要蛋白 [49]。

HdeA 與 HdeB 主要透過疏水性作用力 (hydrophobic forces) 來結合標的蛋白質 [28]：在中性環境下，HdeA 與 HdeB 以二元體 (Dimer) 不具有伴隨蛋白活性的構型存在，當 pH 值低於 3 時，HdeA 與 HdeB 解離為單元體 (monomer)，並透過疏水性作用力與受質結合，增加受質之溶解度並使回復活性 [24]。HdeA 與 HdeB 皆為小分子量的伴隨蛋白 (9.7 kDa 及 9 kDa)，其氨基酸序列僅有 17% 相似度，但由於二、三級結構上的相似性被認為是結構同源的蛋白質，至今，菌體內仍無法偵測到異雙聚體 HdeA-HdeB 的存在 [20]。

#### 1.4 克雷白氏肺炎桿菌的調控基因與抗酸作用

克雷白氏肺炎桿菌與大腸桿菌同屬於腸內菌科，但相關抗酸研究較少，已知，剔除克雷白氏肺炎桿菌的尿素酵素基因並不影響其於酸性環境下的存活率，但可降低在腸胃道中與野生菌株的競爭能力 [26]。沙門氏菌及霍亂弧菌缺少 AR2，無法在小於 pH 2.5 之極酸環境存活；痢疾桿菌則不具備 AR3 及 AR4，於 pH 3~4.5 之酸性環境只有極低的存活率 [15]。相對的，克雷白氏肺炎桿菌缺乏

AR2 及 AR3，在 pH 3 的存活率極低 [1]。

實驗室先前的研究指出，克雷白氏肺炎桿菌除了缺乏 AR2 及 AR3 抗酸系統外，也沒有 HdeA 伴隨蛋白 [2]；雙分子訊息調控系統的調控基因 *rcsB* 的缺損，導致克雷白氏肺炎桿菌 CG43 在 pH 3 下的存活率降低百分之三十；而伴隨蛋白 *hdeB* 基因的缺損，只降低菌株百分之六存活率，此結果顯示除了伴隨蛋白基因 *hdeB* 以外，尚有未知的抗酸機制；另外，以二維電泳實驗分析克雷白氏肺炎桿菌 *RcsB* 基因缺損株於酸性環境下蛋白質體的實驗中，發現其中表現量改變幅度最高的蛋白質定為 YfdX。有趣的是，*yfdX* 基因與伴隨蛋白 *hdeB* 及雙分子調控基因 *kvhS* 共同座落類似大腸桿菌的抗酸島嶼 (acid fitness island, AFI)，而進一步經剔除 *yfdX* 基因使克雷白氏肺炎桿菌在極酸環境的存活率大為降低 [1]，顯示 YfdX 扮演抗酸角色。

接下來，我們搜尋 *yfdX* 基因之相關研究，得知在大腸桿菌中 YfdX 受到 EvgSA 之正向調控 [8]，但至今尚無研究指出 YfdX 之功能。在本研究中，我們希望確認克雷白氏肺炎桿菌 YfdX 的抗酸角色及其抗酸機制。首先，我們先建構 *rcsByfdX* 以及 *kvhA yfdX* 雙基因缺損突變株，藉由比較  $\Delta rcsB$ 、 $\Delta kvhA$  以及  $\Delta yfdX$  與雙基因缺損突變菌株的抗酸能力，進而說明 *rcsB* 以及 *kvhA* 參與調控 *yfdX* 的機制；並藉由測定 *yfdX* 啟動子活性，來確定相關基因與 *yfdX* 的調控關係；接下來，我們觀察到克雷白氏肺炎桿菌的抗酸島嶼的 *yfdX* 與其相鄰基因 *hdeDB* 皆受到 *RcsB* 以及 *KvhA* 調控 [2]，且生物資訊工具之搜尋尚無法找出 YfdX 蛋白質之保守之功能區塊，於是我們假設 YfdX 的功能與 HdeB 以及 HdeD 相關，而已知大腸桿菌 HdeB 具有酸伴隨蛋白的功能；於是，我們再建構 *hdeD hdeB yfdX* 之三突變菌株與 *yfdX hdeB* 之雙突變菌株；同時，我們建構 YfdX 蛋白質表現菌株後，大量表現並純化蛋白質，且用於製備 YfdX 之多株抗體，並進一步探討 YfdX 在抗酸可能扮演如伴隨蛋白的功能，以及利用抗體來測定不同調控基因與表現條件，對 YfdX 之相對表現量的影響。

## 二、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 µg/ml、氨比西林 (ampicillin) 100 µg/ml、氯黴素 (chloramphenicol) 35 µg/ml、卡那毒素 (kanamycin) 25 µg/ml 及四環黴素 (tetracycline) 12.5 µg/ml。

### 重組 DNA 之製作

使用於質體建構與核酸切割、修飾之酵素與聚合目標基因之核酸聚合酵素購自於 MBI Fermentas (Hanover, MD) 與 New England Biolab (Beverly, MA, USA)，其反應條件及使用量皆遵循廠商提供之標準作法。鏈聚合酶連鎖反應之核酸片段以 Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (Geneaid, Taiwan) 所純化，而欲篩選及重建之質體以 High-Speed Plasmid Mini kit (Geneaid, Taiwan) 純化。建構質體與基因所需之引子則由 MDBio, Inc, Taiwan 合成。

### 細菌抗酸能力評估

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 [7] 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 2 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。

### **β-半乳糖苷酶活性評估**

本分析方法根據 Miller [9]的方法修訂：待測菌株以適當方式培養後，取 100 μl 的待測菌液，加入含有 900 μl 的 Z buffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM β-mercaptoethanol), 17 μl 的 0.1% SDS 及 35 μl 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 μl 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 μl 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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。

### **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。

### **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 [41]中，再將此質體利用電穿孔方式 9 (electroporation)送入 E. coli S17-1λpir；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。

### 大量表現與純化 His<sub>6</sub>-YfdX

將表現質體 pET30a-yfdX 與 pET30b-hdeB 的 *E. coli* BL21 在含有 kanamycin 之 200 ml LB 培養液中培養，待其生長至 OD<sub>600</sub> 值 0.5~0.6 時，加入 1 mM IPTG 誘導目標基因表現 8 小時，誘導後之細菌以 6000 rpm、離心 5 分鐘去除培養液後回溶於 binding buffer (20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、5 mM imidazole、pH7.9) 中，接著以超音波震盪破菌後以 13000 rpm 離心 10 分鐘去除細胞碎片後將破菌之上清液通過管柱層析，被 His<sub>6</sub> 標定之蛋白質會附著於 His-Bind resin (Novagen) 上，隨後被 elute buffer (20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、1 M imidazole、pH7.9) 將 His<sub>6</sub> 標定之蛋白質從 resin 上置換出來，並以 dialysis buffer (50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、1 mM EDTA 與 10% glycerol、pH7.5) 除去純化過程中接觸之多餘的離子，收集之蛋白質再以 SDS-PAGE 確認蛋白質之純度。

### SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳

SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳之蛋白質先以等比例混和蛋白質染劑 [0.0626 M Tris-HCl pH 6.8、2% (v/v) SDS、10% (v/v) glycerol、0.01% (v/v) bromophenol blue、與 100 mM dithiothreitol]，並置於 95°C 乾浴槽上加熱 10 分鐘後，再注入 12.5% (v/v) 之 SDS-聚丙烯醯胺膠中，以 100 V、200 mA 電泳 140 分鐘。電泳完之 SDS-聚丙烯醯胺膠可做西方免疫墨點分析與 Coomassie Blue 染色分析。Coomassie Blue 染色分析先以 Coomassie Blue 染劑 1.2 mM Brilliant blue、45% (v/v) methanol 與 10%

(v/v) acetic acid 染色 20 分鐘，再以退染劑 5% (v/v) methanol 與 7% (v/v) acetic acid 退染 16 小時，隨後觀察色帶大小或色帶與 marker 之相對位置便可得知蛋白質之分子量以及濃度。

### 西方點墨法

利用轉漬系統將分離後的蛋白質轉移於硝化纖維膜 (nitrocellulose membrane)，完成後，將的硝化纖維膜放入有 blocking buffer (5% milk PBS) 的容器中，在室溫下作用 30 分鐘(或隔夜於 4 °C)，以 TBST 以及 TBS 緩衝液清洗 3 次，加入一級抗體 (primary antibody) 在室溫下作用 2 小時，以 TBST 以及 TBS 緩衝液清洗 2 次，加入二級抗體 (secondary antibody) 在室溫下作用 30 分鐘，以 TBST 以及 TBS 緩衝液清洗 2 次，去除二級抗體。最後加入 BCIP/NBT 呈色。

### 蛋白質定量

取適量待測樣品加去離子水至 800  $\mu$ l，再加入 200  $\mu$ l 蛋白質染劑 (Bio-Rad protein assay dye reagent)，以分光光度計 (spectrophotometer) 測量在波長 595 nm 之吸光值，再根據已知濃度的胎牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 所訂之標準曲線，換算出蛋白質濃度。

### 體外伴隨蛋白活性測試

根據 HdeB 體的體外活性測試 [20, 24]，本試驗以醇脫氫酶 (ADH) 作為伴隨蛋白質受質。測定待測蛋白質濃度後，將醇脫氫酶稀釋於 pH 7.0 去離子水，使濃度為 10  $\mu$ M。加入固定濃度之待測蛋白質後，以鹽酸調整溶液酸鹼值至 pH 1.0 反應 15 分鐘，在以 15000 rpm 離心 10 分鐘，分離沉澱與溶解之蛋白質，最後以膠體電泳呈現。

### 分離膜間質之蛋白質

分離膜間質蛋白質使用滲透休克法(lysozyme-EDTA method) [11]，將菌液離心後，以 Osmotic shock buffer 重新懸浮菌液，並於室溫反應一分鐘後，加入 lysozyme(20  $\mu\text{g/ml}$ )於室溫反應 5 分鐘。反應後，以 15000 rpm 離心 5 分鐘將菌液沉澱，並吸取上清液。加入一定量之去離子水重新懸浮菌液，並置於冰上反應 5 分鐘後以 15000 rpm 離心 5 分鐘，上清液即為膜間質蛋白質之分離液。

### 體外伴隨蛋白活性試驗

本方法參考並修改於 [24]。菌液隔夜培養後，以滲透休克法分離膜間質之蛋白質，加入鹽酸調整溶液酸鹼值至 pH 7.0、pH 5.0 以及 pH 3.0，反應 5 分鐘後以 15000 rpm 離心 10 分鐘，分離蛋白質沉澱與上清液，呈現於膠體電泳。

### 免疫共沉澱試驗

菌液隔夜培養後，以滲透休克法分離膜間質之蛋白質。測定待測蛋白質濃度 (loading fraction)後，取 200  $\mu\text{l}$  膜間質之蛋白質溶液加入 5  $\mu\text{l}$  YfdX 抗體，輕微的搖動於 4  $^{\circ}\text{C}$  並隔夜反應。此後，加入 50  $\mu\text{l}$  protein A-Sepharose beads (Amersham) 於 4  $^{\circ}\text{C}$  作用 3 小時，並輕微的搖動樣品。以 6000 rpm 離心 3 分鐘，並以 1 ml 0.1% DOC 清洗三次(wash fraction)，最後加入等體積之蛋白質染劑加熱 95  $^{\circ}\text{C}$  10 分鐘，加入蛋白質電泳分離(elution fraction)。

### 三、結果

#### 3.1 *yfdX*與其鄰近基因對細菌抗酸能力的影響

##### *yfdX*位於克雷白氏肺炎桿菌的相對酸適應島嶼基因組

目前尚未有文獻指出 *yfdX* 對於細菌抗酸能力的影響，我們利用生物資訊工具預測到的抗酸基因中，*hdeB*, *hdeB1* 及 *hdeD* 均屬於大腸桿菌的酸適應島嶼基因，且其均位於 *yfdX* 以及 *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 [32]，而 *EvgAS* 在大腸桿菌中，已知與抗酸、抗熱及多重抗藥性相關 [19,22,32]；實驗室先前的研究顯示 *yfdX* 及 *kvhAS* 基因的剔除，亦造成細菌的抗酸能力下降。因此我們將 *yfdX* 與鄰近的抗酸基因，定義為克雷白氏肺炎桿菌的酸適應島嶼（圖一）。

##### 建構基因缺損突變菌株

之前實驗室的研究指出， $\Delta rcsB$  降低弱酸環境下 *YfdX* 的表現量； $\Delta kvhA$  則降低靜置培養條件下 *yfdX* 啟動子的活性[1]。為了得知調控基因 *rscB* 以及 *kvhA* 在調控 *yfdX* 角色上的差異以及上下游的關連性，於是我們進一步建構  $\Delta rcsB \Delta yfdX$  以及  $\Delta kvhA \Delta yfdX$  雙突變菌株(圖二)；為了確認酸適應島嶼基因 *hdeB*、*hdeD* 以及 *hdeB1* 在功能上是否跟 *yfdX* 存在相關性，我們再建構  $\Delta hdeB \Delta hdeD \Delta yfdX$  以及  $\Delta yfdX \Delta hdeB1$  多基因缺損菌株(圖三、圖四)，以測試突變菌株在酸環境下的生存能力。

##### 抗酸島嶼基因缺損不影響克雷白氏肺炎桿菌 CG43 正常生長

藉由生長曲線的量測，顯示無論在 LB 培養液或是 M9 培養液中， $\Delta kvhA \Delta yfdX$ 、 $\Delta hdeB \Delta hdeD \Delta yfdX$ 、 $\Delta yfdX \Delta hdeB1$  菌株之生長曲線皆與野生菌株相似。由於 *rscB* 影響莢膜合成，因此  $\Delta rcsB \Delta yfdX$  雙基因剔除菌株，生長曲線略高於野生菌株(圖五)。

### ***kvhA* 與 *yfdX* 基因缺損影響細菌在靜置培養下的抗酸能力**

震盪培養的條件下， $\Delta kvhA$ 、 $\Delta yfdX$  以及  $\Delta kvhA \Delta yfdX$  基因缺損菌株的存活率與野生菌株相同，但  $\Delta rcsB$  以及  $\Delta rcsB \Delta yfdX$  基因缺損造成細菌存活率低於野生菌株百分之二十（圖六）；而在靜置培養的條件下， $\Delta kvhA$ 、 $\Delta yfdX$  以及  $\Delta kvhA \Delta yfdX$  菌株的存活率相似且低於野生菌株（圖七），暗示抗酸調控基因 *kvhA* 的抗酸功能，主要在於靜置培養下透過影響而改變抗酸表現。

### ***hdeB*、*hdeD* 及 *yfdX* 基因共同影響細菌靜置培養下的抗酸能力**

在靜置培養的條件下， $\Delta hdeB$ 、 $\Delta hdeD$  及  $\Delta yfdX$  菌株皆造成細菌存活率的降低（圖八 A）。此外，我們比較  $\Delta hdeB \Delta hdeD$  以及  $\Delta hdeB \Delta hdeD \Delta yfdX$  兩菌株間的存活率，發現剔除 *yfdX* 基因不會改變兩菌株的存活率，於是我們猜測位於酸適應島嶼的相鄰基因 *hdeB*、*hdeD* 以及 *yfdX* 的抗酸途徑或是功能上擁有相關性。另一方面， $\Delta hdeB \Delta yfdX$  細菌抗酸存活率則顯示生存率低於單基因突變菌株  $\Delta hdeB$  以及  $\Delta yfdX$ （圖八 B），暗示著兩基因產物可能在抗酸途徑扮演不同角色。

### **靜置培養條件下 *yfdX* 啟動子的活性才會受到酸性環境的誘導**

由於酸適應島嶼的基因 *hdeB* 及 *hdeB-hdeD*，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 [2]。因此，我們在震盪培養下，再測定酸鹼值降低對 *yfdX* 啟動子的活性的影響，結果顯示無論在 pH7、pH6 以及 pH5 LB 培養液，*yfdX* 啟動子活性均沒有明顯的增加（圖九），與抗酸測試相符合；同時，我們將細菌培養條件改變為靜置培養，並確認 *yfdX* 啟動子的活性是否會改變，結果顯示靜置培養 4 小時及 6 小時後，酸鹼值較低的 LB 培養液，*yfdX* 啟動子的活性明顯增加（圖十）。此結果顯示在靜置培養的條件下，*yfdX* 啟動子的活性才會受到酸性環境的誘導。

### ***rcsB* 及 *kvhA* 基因缺損降低靜置培養下 *yfdX* 啟動子的活性**

如圖十一，我們同時使用  $\Delta lacZ$ 、 $\Delta lacZ\Delta rcsB$ 、 $\Delta lacZ\Delta kvhA$  以及  $\Delta lacZ\Delta rpoS$  四株菌株在靜置培養的條件下，測試 *yfdX* 啟動子的活性。*RpoS* 為細菌生長平穩期之主要調控因子[37]，包含一般性的壓力反應基因的調控，我們懷疑在靜置培養的情況下，*RpoS* 亦參與抗酸基因的調控。結果顯示，菌株靜置於 LB 培養液時， $\Delta lacZ\Delta rpoS$ 、 $\Delta lacZ\Delta rcsB$  以及  $\Delta lacZ\Delta kvhA$  菌株啟動子活性皆低於  $\Delta lacZ$  菌株；當培養於 pH 5.0 LB 培養液時， $\Delta lacZ$  以及  $\Delta lacZ\Delta rpoS$  菌株的活性皆顯著提高， $\Delta lacZ\Delta rcsB$  以及  $\Delta lacZ\Delta kvhA$  之啟動子活性則顯著降低。顯示 *rcsB* 亦或是 *kvhA* 基因的缺損，在靜置培養的條件下，皆會造成 *yfdX* 啟動子活性的下降，並且不受到酸性環境的誘導。

### **3.2 *YfdX* 以及 *HdeB* 抗酸能力與伴隨蛋白活性分析**

#### ***YfdX* 以及 *HdeB* 重組蛋白在酸環境下維持可溶性**

我們使用序列分析比對工具 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 以及 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 搜尋 *YfdX* 相關的保守序列以及功能區域，未有結果暗示 *YfdX* 可能的功能。為了更進一步測試 *YfdX* 與 *HdeB* 在抗酸功能上的關聯性，我們進一步建構 *YfdX* 表現載體 pET30a-*yfdX* (圖十二)，以表現及純化克雷白氏肺炎桿菌 CG43 的 *HdeB* 以及 *YfdX* 重組蛋白質。觀察蛋白質體外酸沉澱的模式，我們發現 *HdeB* 在體外環境 pH 7.0 時可溶性蛋白質(S)的部份較多，pH 1.0 時部份蛋白質維持亦維持可溶性；*YfdX* 在體外環境中性環境時可溶性蛋白質比例較高，且 pH 1.0 時大部份蛋白質維持可溶性。顯示 *YfdX* 以及 *HdeB* 重組蛋白質在強酸環境下，大部分蛋白質可維持水溶性而不發生沉澱(圖十三)。最後，為了更進一步偵測 *YfdX* 的表現量，我們委託濁水溪生物科技公司代為製備 *YfdX* 之多株抗體。

## YfdX 以及 HdeB 重組蛋白在活體外具有伴隨蛋白的活性

在 2007 年有文獻指出，大腸桿菌 HdeB 在酸性環境下，能夠降低酒精脫氫酶(ADH)的不可逆聚集沉澱，而展示出體外的伴隨蛋白質活性 [24]。首先，我們測試 ADH 於中性環境下大部分的蛋白質維持可溶；在酸性環境下，則發生嚴重的聚集沉澱(圖十三)。接著，我們進行體外伴隨蛋白質活性的測試，結果顯示如圖十四，當 ADH 逐漸聚集沉澱時，溶液在 OD400 的吸光值漸增，同時加入 HdeB 濃度越高，則抑制吸光值的上升(圖十四 A)。此外，ADH 在 pH 1.0 的酸性環境下同時加入 HdeB 的濃度越高，膠體電泳的結果顯示 ADH 可溶性蛋白質的比例越高(圖十四 B)。同時，我們也測試 YfdX 蛋白質抑制 ADH 沉澱的能力，結果顯示相同濃度下 YfdX 相較於 HdeB 具有更佳的抑制效果(圖十五 A, B)。最後，由於剔除突變菌株的存活率相近(圖八 A)，我們測試 YfdX 以及 HdeB 在體外伴隨蛋白活性是否具有加乘效果，但無法觀察到顯著活性的增加(圖十六)。

## 西方點墨法偵測 YfdX 表現於膜間質

文獻指出，大腸桿菌的酸伴隨蛋白 HdeA 以及 HdeB 皆存在於細菌的膜間質 [44]。因此，我們首先使用生物資訊工具 SignalP 4.0 預測 YfdX 蛋白質是否亦具備訊息胜肽(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)，結果顯示 YfdX 序列 1-22 之胺基酸極可能為訊息胜肽(附錄一)。因此，我們透過滲透休克法(osmotic shock) [11]，分離出克雷白氏肺炎桿菌的膜間質蛋白質，並以西方點墨法偵測 YfdX 的表現(圖十七)。首先，我們證明 YfdX 抗體，在  $\Delta yfdX$  菌株皆無法偵測到蛋白質表現，顯示抗體具備抗原專一性。我們並使用乙內醯胺分解酵素抗體(beta-lactamase antibodies)，作為膜間質的標誌抗體。結果顯示，野生菌株在相同的蛋白質濃度下，膜間質 YfdX 蛋白質偵測量較高，顯示 YfdX 表現於膜間質。最後，我們使用西方點墨法，偵測 YfdX 於靜置培養的酸性環境，有較高的表現量(圖十八)，額外加入二價鐵離子亦增加 YfdX 於靜置培養下的表現量；基因的剔除如 *rscB* 或是 *kvhA*，皆造成 YfdX 在靜置的酸性環境表現量大幅降低，而剃

除 *fur* 基因，則些微降低 YfdX 在靜置培養下的表現量(圖十九)。

### **YfdX 體內伴隨蛋白活性試驗顯示出微弱的伴隨蛋白活性**

為了證明 YfdX 在酸性環境下，能夠保護膜間質蛋白質免於聚集沉澱，我們首先將表現質體 pRK415 以及 pRK415-yfdX，以接合作用將質體送入  $\Delta yfdX$  菌株，再透過滲透休克法取得兩菌株膜間質的蛋白質溶液。接下來，我們以鹽酸分別調整溶液酸鹼值至 pH 7、pH 5 或 pH 3，以觀察蛋白質的聚集沉澱 (圖二十)。結果顯示，在 pH 7、pH 5 的環境中，膜間質蛋白質的聚集沉澱程度較低；酸鹼值降低為 pH 3 時，顯示具有 YfdX 表現之蛋白質溶液，在分子量介於 55KDa 與 45KDa，具備較多可溶的蛋白質(圖二十 箭頭處)。顯示 YfdX 對於膜間質蛋白質有微弱的伴隨蛋白活性。

### **免疫共沉澱實驗顯示 YfdX 在酸性環境下作用於廣泛的膜間質蛋白質**

免疫共沉澱實驗結果顯示，膜間質蛋白質在於 pH 7 的沉澱環境時，最後洗提出(elution)的蛋白質沒有差異，顯示中性環境下，YfdX 對於膜間質的蛋白質沒有明顯的作用力 (圖二十一 A)；膜間質蛋白質在 pH 5 的沉澱環境下，最後洗提出的蛋白質則有差異，顯示弱酸環境下 YfdX 對於膜間質的蛋白質具有活性(圖二十一 B)，並非作用於單一受質。

#### 四、討論

胃酸是人體對抗細菌感染的第一道天然屏障，而從胃到達小腸之後，養份經過腸內細菌發酵，產生的有機酸以及短鏈脂肪酸，使得細菌在腸道也承受到酸的壓力。除了酸鹼度改變外，細菌在腸道內還會遭遇膽鹽、微氧等環境壓力 [12,46]。病原細菌成功的定殖於腸胃道、宿主免疫能力下降以及腸黏膜細胞受損，則是促進細菌位移感染的三個主要機制 [4]。因此，抗酸的能力與腸內細菌的感染能力，有很大的相關性。

在大腸桿菌，具有一組由 12 個基因組成的酸適應島嶼，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 [27]；實驗室的研究指出，克雷白氏肺炎桿菌亦有類似的抗酸島嶼存在(圖一)，其中 *yfdX* 基因剔除後，使細菌在靜置培養條件下的抗酸能力下降，而目前尚未有研究指出 *yfdX* 的功能。

靜置培養時，培養液的氧氣濃度逐漸降低至微氧(microaero)，較接近於微氧的腸道環境。於是，除了 *yfdX* 的抗酸活性外，我們也測試了 *yfdX* 基因缺失是否會影響細菌對於其他腸道壓力的反應；首先，膽鹽作為乳化脂肪酸之兩性分子，在高濃度下，具有表面活性劑的作用，破壞細菌的細胞膜而抑制細菌的生長。於是我們測試  $\Delta yfdX$  在 5% 膽鹽下的存活率，如附錄二，透過量測吸光值的結果顯示， $\Delta yfdX$  菌株與野生菌株的生長並無差異；此外，螯鐵分子(siderophore)亦影響腸內菌的致病能力 [30]，我們透過 CAS 培養基 [23]，測試菌株的螯鐵能力，而結果顯示  $\Delta yfdX$  菌株的螯鐵能力並沒有改變(附錄三)。

除了抗酸島嶼的基因外，腸內細菌能使用氨基酸酵素系統，抵抗酸性環境造成的壓力，藉由消耗特定的氨基酸，而提高細胞與環境的酸鹼值；在 2010 年有文獻指出，克雷白氏肺炎桿菌 *cadC* 調控基因缺損會大幅降低離氨酸依賴型抗酸能力 [16]；因此，我們先確定在克雷白氏肺炎桿菌中，*yfdX* 是否作用於離氨酸依賴型抗酸系統，或是基因是否會參與調控。我們將菌液置於離胺酸脫梭酶培養

液靜置培養 12 或 24 個小時，細菌的生理代謝使溶液酸鹼值降低，則培養液顏色變黃；此時酸性環境亦誘導離氨酸脫梭酶的表現，溶液顏色則回復至中性酸鹼值的藍色；如剔除基因影響離氨酸依賴型抗酸系統，則溶液顏色不回復至藍色，而保持黃色。結果發現：培養 12 時時溶液顏色變黃，表現此時酸鹼值降低；24 小時後，所有菌株的培養液變藍，結果顯示 *yfdX* 不影響離氨酸脫梭酶之正常作用，而溶液酸鹼值回復(附錄四)。 $\Delta rcsB$  則於 12 時培養液顏色較黃，而 24 小時後依然成功回覆為代表中性之藍色，表示抗酸系統依然正常作用。因此，我們猜測 *rcsB* 調控某些抗酸基因的作用，亦可能影響細菌的生長速率，造成  $\Delta rcsB$  對氨酸依賴型抗酸系統的反應較為遲緩。

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，近期有文獻指出，在大腸桿菌中，*rcsB* 基因影響酸適應島嶼之基因 *gadA* 以及 *gadX* 的調控 [43]；而在克雷白氏肺炎桿菌中，缺乏 *gadA* 以及 *gadX* 基因，而目前 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成，在 *rcsB* 基因缺損突變株中，其莢膜多醣體的生成量會減少。我們透過抗酸能力的試驗，顯示在震盪培養以及靜置培養的條件下  $\Delta rcsB$  對於存活率皆有顯著的影響(圖六、圖七)，而 *yfdX* 的抗酸能力則受限於靜置培養的條件(圖十八)。接著，西方點墨法(圖十八)以及測量 *yfdX* 啟動子的表現量(圖十一)，皆顯示 *rcsB* 在靜置培養的酸性環境下正向調控 *yfdX*，而 *rcsB* 在抗酸的功能上，並不只侷限於調控 *YfdX* 來影響抗酸功能。

大腸桿菌的 EvgS/EvgA 雙分子訊息傳遞系統(two-component signal transduction system)為致病相關之調控基因，並參與抗生素抗性基因與抗酸基因之調控[51]。EvgS/EvgA 高度同源於百日咳博得式菌(*Bordetella pertussis*)之調控基因 BvgS/BvgA [3]，以及克雷白氏肺炎桿菌之 KvgS/KvgA 系統，此外，克雷白氏肺炎桿菌 CG43 尚具有另一套高度同源基因 KvhS/KvhA。而本次實驗的結果顯示  $\Delta kvhA$  以及  $\Delta yfdX$  在抗酸存活率上相近(圖七)，而  $\Delta kvhA$  亦降低 *yfdX* 啟動子以及蛋白質之表現量(圖十八)，顯示 *kvhA* 在抗酸的功能，主要在於調控 *yfdX*，而 KvhS/KvhA 的高度同源基因 KvgS/KvgA 的抗酸功能上是否類似，則待更近一

步的研究。

此外，在痢疾桿菌中 Fur 間接調控 EvgA，而影響下游抗酸基因的作用[51]。我們觀察到靜置培養下，加入鐵離子大量增加 YfdX 的表現量(圖十八)，而剔除 fur 基因則些微降低 YfdX 之表現量，暗示克雷白氏肺炎桿菌亦可能有類似於痢疾桿菌的調控機制。

HdeA 與 HdeB 為伴隨蛋白，可以在酸性環境下維持蛋白質的溶解度，抑制沉澱的發生。在中性環境下，HdeA 與 HdeB 則不具備伴隨蛋白質活性。在體外試驗中，溶液酸鹼值降低至 pH 2 或 pH 3，能分別促進 HdeA 或是 HdeB 的最佳保護活性[21]。此外，亦有文獻指出，在體內試驗 HdeA 作用於許多膜間質蛋白質，而並非侷限於專一性的受質 [49]。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的抗酸能力 [27]。而實驗室先前的研究發現 HdeD 有穿膜結構；而序列上相近於 HdeB 的 HdeB1，則未預測到訊號序列，顯示 HdeB1 在克雷白氏肺炎桿菌的功能，可能並非作用於膜間質，而扮演未知的抗酸角色。

在克雷白氏肺炎桿菌當中，*hdeB*、*hdeD* 以及 *yfdX* 皆受到 RcsB 以及 KvhA 的調控 [1,2]。而後抗酸能力的測定，亦顯示 *hdeB*、*hdeD* 以及 *yfdX* 在抗酸功能上可能具有相關性(圖八)。西方點墨法的結果亦證實 *yfdX* 分泌於膜間質。

一般認為，膜間質的伴隨蛋白質活性，主要是透過疏水性作用力與其他蛋白質作用 [21]。環境酸鹼值的改變，使伴隨蛋白質顯露活性區域，而保護特定的受質。藉由體外與體內伴隨蛋白質的活性的試驗，顯示在酸性環境下，YfdX 蛋白質以及 HdeB 皆具有維持酒精分解酵素溶解度的活性。此外，回補 YfdX 在 pH 3.0 的酸性環境下，也顯示了些微增加溶解度的效果。暗示 YfdX 亦可能是酸的伴隨蛋白質。此外，免疫共沉澱的實驗發現，當酸鹼值降低時，YfdX 在體外具有與膜間質蛋白質作用的活性，而顯示 YfdX 並非只作用於單獨特定的蛋白質(圖二十一)。

綜合實驗室先前與本實驗所得到的結果，我們推論出 YfdX 在抗酸可能扮演的相關角色(圖二十二)：弱酸與靜置培養下誘導 RcsB 調控酸適應島嶼基因，促進 YfdX 的表現，同時 KvhA 亦扮演重要的調控角色。酸適應島嶼中的基因 HdeB 及 YfdX 的表現的提高，則在酸性環境下抑制膜間質蛋白在酸環境的聚集與沉澱。



## 相關文獻

1. 林志桓. (2009). 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. 碩士論文, 生物醫學研究所, 國立交通大學.
2. 曾品瑄. (2011). HdeB、HdeB1、HdeD 蛋白質參與克雷白氏肺炎桿菌 CG43 抗酸反應的探討. 碩士論文, 生物醫學研究所, 國立交通大學.
3. **Beier, D., and R. Gross.** 2008. The BvgS/BvgA phosphorelay system of pathogenic *Bordetellae*: structure, function and evolution. *Adv Exp Med Biol* **631**:149-60.
4. **Berg, R. D.** 1995. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol* **3**:149-54.
5. **Bergholz, T. M., C. L. Tarr, L. M. Christensen, D. J. Betting, and T. S. Whittam.** 2007. Recent gene conversions between duplicated glutamate decarboxylase genes (*gadA* and *gadB*) in pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **24**:2323-33.
6. **Boot, I. R., P. Cash, and C. O'Byrne.** 2002. Sensing and adapting to acid stress. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**:33-42.
7. **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.
8. **Christ, D., and J. W. Chin.** 2008. Engineering *Escherichia coli* heat-resistance by synthetic gene amplification. *Protein Eng Des Sel* **21**:121-5.
9. **Cupples, C. G., and J. H. Miller.** 1988. Effects of amino acid substitutions at the active site in *Escherichia coli* beta-galactosidase. *Genetics* **120**:637-44.
10. **De Champs, C., M. P. Sauvart, C. Chanal, D. Sirot, N. Gazuy, R. Malhuret, J. C. Baguet, and J. Sirot.** 1989. Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit. *J Clin Microbiol* **27**:2887-90.
11. **de Maagd, R. A., and B. Lugtenberg.** 1986. Fractionation of *Rhizobium leguminosarum* cells into outer membrane, cytoplasmic membrane, periplasmic, and cytoplasmic components. *J Bacteriol* **167**:1083-5.
12. **Edelstone, D. I., and I. R. Holzman.** 1981. Oxygen consumption by the

- gastrointestinal tract and liver in conscious newborn lambs. *Am J Physiol* **240**:G297-304.
13. **Foster, J. W.** 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol* **2**:898-907.
  14. **Gong, S., H. Richard, and J. W. Foster.** 2003. YjdE (AdiC) is the arginine:agmatine antiporter essential for arginine-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:4402-9.
  15. **Hong, W., Y. E. Wu, X. Fu, and Z. Chang.** Chaperone-dependent mechanisms for acid resistance in enteric bacteria. *Trends Microbiol.*
  16. **Hsieh, P. F., H. H. Lin, T. L. Lin, and J. T. Wang.** CadC regulates cad and tdc operons in response to gastrointestinal stresses and enhances intestinal colonization of *Klebsiella pneumoniae*. *J Infect Dis* **202**:52-64.
  17. **Kashiwagi, K., S. Miyamoto, F. Suzuki, H. Kobayashi, and K. Igarashi.** 1992. Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the potE gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:4529-33.
  18. **Kashiwagi, K., R. Watanabe, and K. Igarashi.** 1994. Involvement of ribonuclease III in the enhancement of expression of the speF-potE operon encoding inducible ornithine decarboxylase and polyamine transport protein. *Biochem Biophys Res Commun* **200**:591-7.
  19. **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.
  20. **Kern, R., A. Malki, J. Abdallah, J. Tagourt, and G. Richarme.** 2007. *Escherichia coli* HdeB is an acid stress chaperone. *J Bacteriol* **189**:603-10.
  21. **Lin, C. T., T. Y. Huang, W. C. Liang, and H. L. Peng.** 2006. Homologous response regulators KvgA, KvhA and KvhR regulate the synthesis of capsular polysaccharide in *Klebsiella pneumoniae* CG43 in a coordinated manner. *J Biochem* **140**:429-38.
  22. **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.
  23. **Machuca, A., and A. M. Milagres.** 2003. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Lett Appl Microbiol* **36**:177-81.

24. **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.
25. **Markowitz, S. M., J. M. Veazey, Jr., F. L. Macrina, C. G. Mayhall, and V. A. Lamb.** 1980. Sequential outbreaks of infection due to *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: implication of a conjugative R plasmid. *J Infect Dis* **142**:106-12.
26. **Maroncle, N., C. Rich, and C. Forestier.** 2006. The role of *Klebsiella pneumoniae* urease in intestinal colonization and resistance to gastrointestinal stress. *Res Microbiol* **157**:184-93.
27. **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.
28. **Merdanovic, M., T. Clausen, M. Kaiser, R. Huber, and M. Ehrmann.** Protein quality control in the bacterial periplasm. *Annu Rev Microbiol* **65**:149-68.
29. **Merrell, D. S., C. Bailey, J. B. Kaper, and A. Camilli.** 2001. The ToxR-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires OmpU. *J Bacteriol* **183**:2746-54.
30. **Miethke, M., and M. A. Marahiel.** 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:413-51.
31. **Moreau, P. L.** 2007. The lysine decarboxylase CadA protects *Escherichia coli* starved of phosphate against fermentation acids. *J Bacteriol* **189**:2249-61.
32. **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.
33. **Podschun, R., and U. Ullmann.** 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* **11**:589-603.
34. **Rhodijs, V. A., W. C. Suh, G. Nonaka, J. West, and C. A. Gross.** 2006. Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol* **4**:e2.
35. **Rode, T. M., T. Moretro, S. Langsrud, O. Langsrud, G. Vogt, and A. Holck.** Responses of *Staphylococcus aureus* exposed to HCl and organic acid stress. *Can J Microbiol* **56**:777-92.

36. **Ron, E. Z.** 2009. Editorial: an update on the bacterial stress response. *Res Microbiol* **160**:243-4.
37. **Schellhorn, H. E., J. P. Audia, L. I. Wei, and L. Chang.** 1998. Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**:6283-91.
38. **Sklar, J. G., T. Wu, D. Kahne, and T. J. Silhavy.** 2007. Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **21**:2473-84.
39. **Skorupski, K., and R. K. Taylor.** 1996. Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene* **169**:47-52.
40. **Smith, J. L.** 2003. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. *J Food Prot* **66**:1292-303.
41. **Su, L. H., T. L. Wu, Y. P. Chiu, J. H. Chia, A. J. Kuo, C. F. Sun, T. Y. Lin, and H. S. Leu.** 2001. Outbreaks of nosocomial bloodstream infections associated with multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unit. *Chang Gung Med J* **24**:103-13.
42. **Tapley, T. L., T. M. Franzmann, S. Chakraborty, U. Jakob, and J. C. Bardwell.** Protein refolding by pH-triggered chaperone binding and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:1071-6.
43. **Tramonti, A., M. De Canio, and D. De Biase.** 2008. GadX/GadW-dependent regulation of the *Escherichia coli* acid fitness island: transcriptional control at the *gadY-gadW* divergent promoters and identification of four novel 42 bp GadX/GadW-specific binding sites. *Mol Microbiol* **70**:965-82.
44. **Valderas, M. W., R. B. Alcantara, J. E. Baumgartner, B. H. Bellaire, G. T. Robertson, W. L. Ng, J. M. Richardson, M. E. Winkler, and R. M. Roop, 2nd.** 2005. Role of HdeA in acid resistance and virulence in *Brucella abortus* 2308. *Vet Microbiol* **107**:307-12.
45. **Wang, W., T. Rasmussen, A. J. Harding, N. A. Booth, I. R. Booth, and J. H. Naismith.** Salt bridges regulate both dimer formation and monomeric flexibility in HdeB and may have a role in periplasmic chaperone function. *J Mol Biol* **415**:538-46.
46. **Watson, D., R. D. Sleator, C. Hill, and C. G. Gahan.** 2008. Enhancing bile tolerance improves survival and persistence of *Bifidobacterium* and *Lactococcus* in the murine gastrointestinal tract. *BMC Microbiol* **8**:176.
47. **Wollmann, P., and K. Zeth.** 2007. The structure of RseB: a sensor in periplasmic stress response of *E. coli*. *J Mol Biol* **372**:927-41.

48. **Yong, D., M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee, and T. R. Walsh.** 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:5046-54.
49. **Zhang, M., S. Lin, X. Song, J. Liu, Y. Fu, X. Ge, X. Fu, Z. Chang, and P. R. Chen.** A genetically incorporated crosslinker reveals chaperone cooperation in acid resistance. *Nat Chem Biol* **7**:671-7.
50. **Zhao, B., and W. A. Houry.** Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria: an aptitude for survival. *Biochem Cell Biol* **88**:301-14.



表一：本次實驗使用與建構之細菌菌株

| 菌株                               | 基因型及相關資訊  | 來源與參考資料          |
|----------------------------------|---|------------------|
| <b><i>E.coli</i>:</b>            |   |                  |
| JM109                            | <i>RecA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 rolA1 thi</i> $\Delta(lac-proAB)$                               | Laboratory stock |
| BL21-RIL                         | <i>F ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)gal dcm(DE3)</i>      | Laboratory stock |
| S17-1 $\lambda$ pir              | <i>RecA thi pro hsdR<sup>+</sup>M<sup>+</sup></i> [RP4-2-Tc::Mu:Km <sup>R</sup> Tn7] ( <i>pir</i> ) | Laboratory stock |
| <b><i>K.pneumoniae</i>:</b>      |   |                  |
| CG43                             | Clinical isolate of K2 serotype   | Laboratory stock |
| CG43-S3                          | <i>rspL</i> mutant, Sm <sup>R</sup>   | Laboratory stock |
| CG43-S3 $\Delta rcsB$            | <i>rscB</i> deletion mutant in CG43-S3  | Laboratory stock |
| CG43-S3 $\Delta kvhA$            | <i>kvhA</i> deletion mutant in CG43-S3  | Laboratory stock |
| CG43-S3 $\Delta yfdX$            | <i>yfdX</i> deletion mutant in CG43-S3  | (1)              |
| CG43-S3 $\Delta rcsB\Delta yfdX$ | <i>rscB</i> and <i>yfdX</i> deletion mutant in CG43-S3  | This study       |
| CG43-S3 $\Delta kvhA\Delta yfdX$ | <i>kvhA</i> and <i>yfdX</i> deletion mutant in CG43-S3  | This study       |
| CG43-S3 $\Delta hdeB$            | <i>hdeB</i> deletion mutant in CG43-S3  | (2)              |

---

|  |  |                  |
|--|--|------------------|
| CG43-S3 $\Delta$ <i>hdeB1</i>  | <i>hdeB1</i> deletion mutant in CG43-S3                              | (2)              |
| CG43-S3 $\Delta$ <i>hdeD</i>   | <i>hdeD</i> deletion mutant in CG43-S3                               | (2)              |
| CG43-S3 $\Delta$ <i>hdeB</i> $\Delta$ <i>hdeD</i>                      | <i>hdeB</i> and <i>hdeD</i> deletion mutant in CG43-S3               | (2)              |
| CG43-S3 $\Delta$ <i>hdeB</i> $\Delta$ <i>hdeD</i> $\Delta$ <i>yfdX</i> | <i>hdeB</i> , <i>hdeD</i> and <i>yfdX</i> deletion mutant in CG43-S3 | This study       |
| CG43-S3 $\Delta$ <i>hdeB1</i> $\Delta$ <i>yfdX</i>                     | <i>hdeB1</i> and <i>yfdX</i> deletion mutant in CG43-S3              | This study       |
| CG43-S3 $\Delta$ <i>fur</i>  | <i>fur</i> deletion mutant in CG43-S3                                | Laboratory stock |
| CG43-S3 $\Delta$ <i>soxRS</i>  | <i>soxRS</i> deletion mutant in CG43-S3                              | Laboratory stock |
| CG43-S3 $\Delta$ <i>pecS</i>   | <i>pecS</i> deletion mutant in CG43-S3                               | Laboratory stock |
| CG43-S3 $\Delta$ <i>pecM</i>   | <i>pecM</i> deletion mutant in CG43-S3                               | Laboratory stock |
| CG43-S3 $\Delta$ <i>mrkI</i>   | <i>mrkI</i> deletion mutant in CG43-S3                               | Laboratory stock |
| CG43-S3 $\Delta$ <i>rpoS</i>   | <i>rpoS</i> deletion mutant in CG43-S3                               | Laboratory stock |
| Z01  | <i>lacZ</i> deletion mutant in CG43-S3                               | Laboratory stock |
| Z01 $\Delta$ <i>kvhA</i>   | <i>kvhA</i> deletion mutant in Z01                                   | Laboratory stock |
| Z01 $\Delta$ <i>rcsB</i>   | <i>rcsB</i> deletion mutant in Z01                                   | Laboratory stock |
| Z01 $\Delta$ <i>rpoS</i>   | <i>rpoS::tet</i> in Z01  | Laboratory stock |

---

表二：本次實驗使用與建構之質體

| 質體                       | 基因型及相關資訊   | 來源與參考資料              |
|--------------------------|--|----------------------|
| yT&A                     | PCR cloning vector, Ap <sup>R</sup>  | Yeastern Biotech Co. |
| pKAS46                   | Suicide vector, <i>rspL</i> , Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>  | Laboratory stock     |
| pRK415                   | Broad-host-range IncP plasmid, Tc <sup>R</sup>   | Laboratory stock     |
| pLacZ15                  | A derivative of pYC016 (61), containing a promoterless <i>lacZ</i> from <i>K. pneumoniae</i> CG43S3, Cm <sup>R</sup> | Laboratory stock     |
| pET30a                   | Overexpression of His6 fusion proteins, Km <sup>R</sup>  | Novagen              |
| pCH015                   | About 2kb fragment containing the flanking sequence of <i>yfdX</i> cloned into pKAS46                                | (1)                  |
| pLC01                    | About 2kb fragment containing the flanking sequence of <i>hdeB</i> , <i>hdeD</i> and <i>yfdX</i> cloned into pKAS46  | This study           |
| pRK415- <i>yfdX</i>      | <i>yfdX</i> complement plasmid, Tc <sup>R</sup>  | (1)                  |
| P <sub><i>yfdX</i></sub> | 417 bp PCR product carrying putative <i>yfdX</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm <sup>R</sup>                       | (1)                  |
| pET30a- <i>hdeB</i>      | His <sub>6</sub> - <i>hdeB</i> expression plasmid, Km <sup>R</sup>   | (2)                  |
| pET30a- <i>yfdX</i>      | His <sub>6</sub> - <i>yfdX</i> expression plasmid, Km <sup>R</sup>   | This study           |

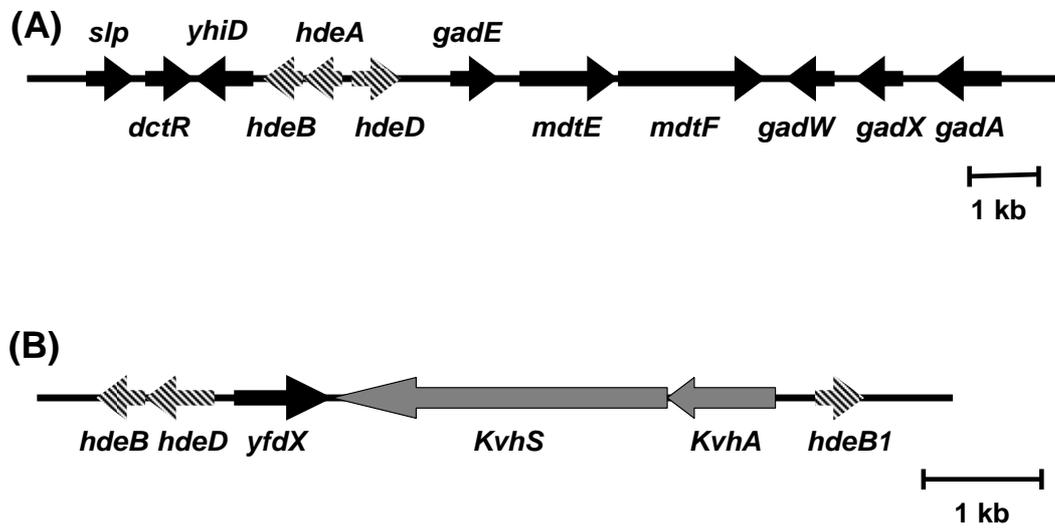
表三：本次實驗使用之核苷酸引子

---

| 引子    | 序列(5' 到 3')                           |
|-------|---------------------------------------|
| CH026 | 5'-CTCGAGTGGTGGCAGGCAACTGATACTT-3'    |
| CH027 | 5'-AGCAGACCGGCTCCGGACT-3'             |
| CH034 | 5'-GACGGATCCGCCTGACGCTGAATAAAAAGC-3'  |
| CH036 | 5'-CCAGATATCCACGGAAGCCTTGTCGCACT-3'   |
| CH037 | 5'-CCACTCGAGAATAACCCCCCGGCATCAG-3'    |
| CH043 | 5'-TGCGCTCTCTCAGGGTGGAA-3'            |
| LC02  | 5'-GTCGACTGCGCTCTCTCAGGGTGGAAC-3'     |
| LC10  | 5'-GAATTCACAGATAGCGCGACGGCAGCGCCAG-3' |
| LC17  | 5'-AAAAGTGTTCACAGTCTGGCCGG-3'         |
| LC18  | 5'-TCTGCACGGTTCAGCACAAATTCT-3'        |

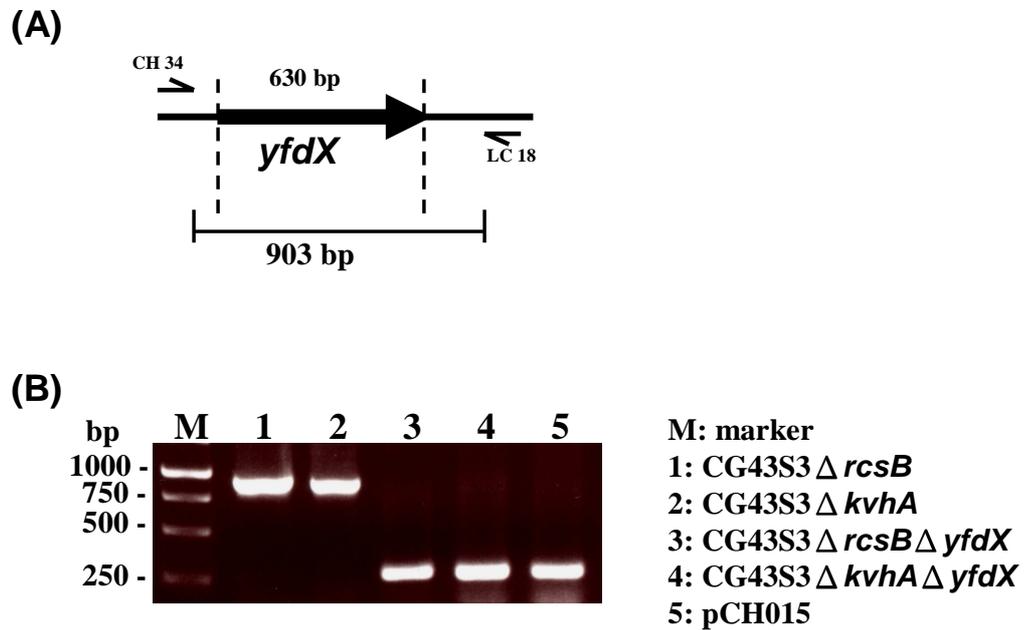
---





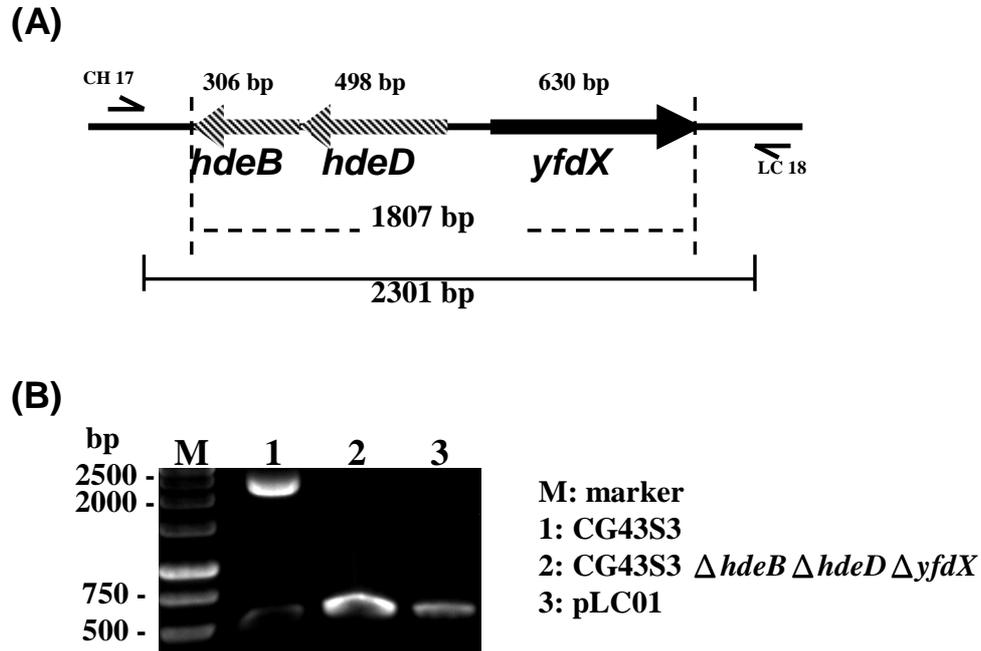
圖一：酸適應島嶼(acid fitness island)

(A) 大腸桿菌中的酸適應島嶼。(B) 在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中預測的相對酸適應島嶼的基因組。



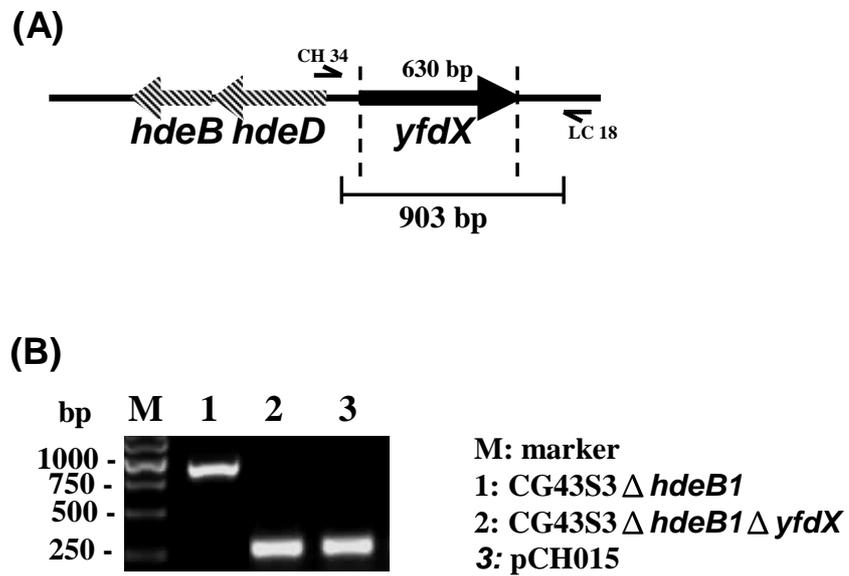
圖二：建構  $\Delta rcsB \Delta yfdX$  及  $\Delta kvhA \Delta yfdX$  雙基因缺損突變株

(A) *yfdX* 基因的示意圖。引子 CH034/LC18 設計來確認  $\Delta rcsB \Delta yfdX$  及  $\Delta rcsB \Delta yfdX$  突變株；虛線部分表示基因缺損的位置。(B) 利用 PCR 來確認  $\Delta rcsB \Delta yfdX$  及  $\Delta rcsB \Delta yfdX$  突變株。質體 pCH015 包含 *yfdX* 兩側各 1kb 的基因片段。



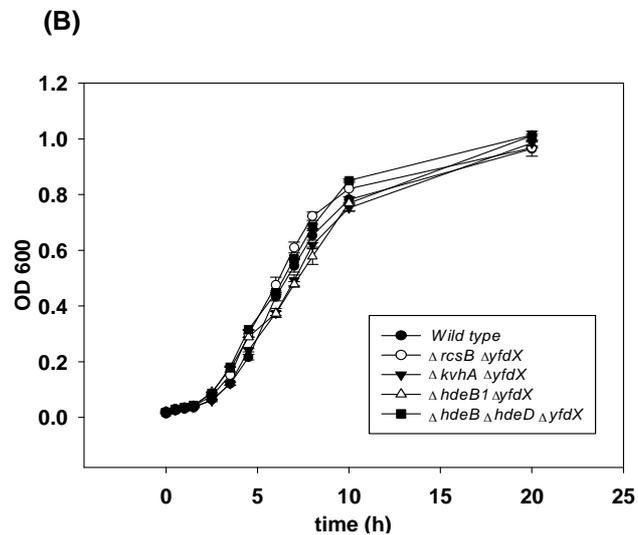
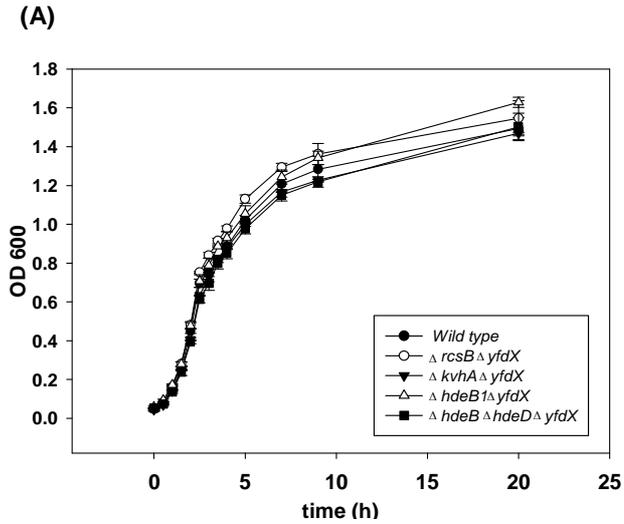
圖三：建構  $\Delta hdeB \Delta hdeD \Delta yfdX$  基因缺損突變株

(A) *HdeB*, *HdeD* 及 *yfdX* 基因的示意圖。引子 LC17/LC18 設計來確認  $\Delta hdeB \Delta hdeD \Delta yfdX$  突變株；虛線部分表示基因缺損的位置。(B) 利用 PCR 來確認  $\Delta hdeB \Delta hdeD \Delta yfdX$  突變株。質體 pLC01 包含圖(A) *hdeB* 左側及 *yfdX* 右側各 1kb 的基因片段。



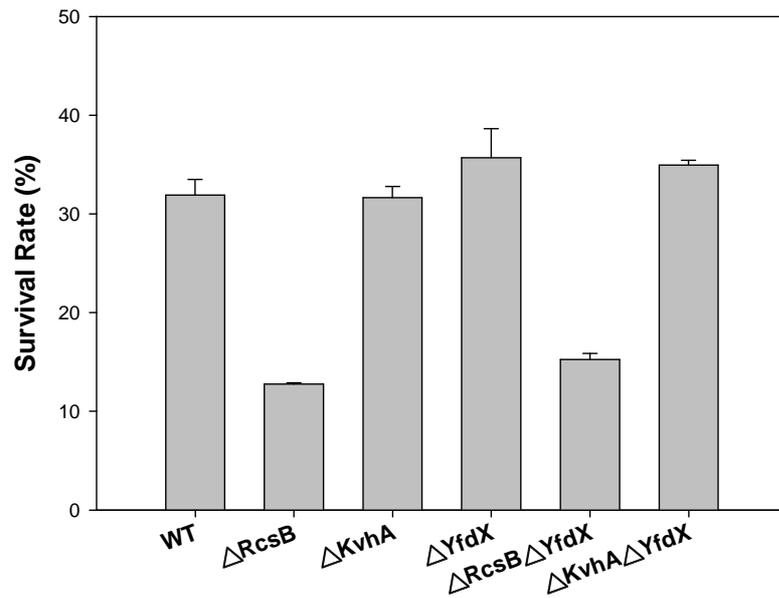
圖四：建構  $\Delta$  *hdeB*  $\Delta$  *yfdX* 雙基因缺損突變株

(A) *yfdX* 基因的示意圖。引子 CH034/LC18 設計來確認  $\Delta$  *hdeB*  $\Delta$  *yfdX*；虛線部分表示基因缺損的位置。(B) 利用 PCR 來確認  $\Delta$  *hdeB*  $\Delta$  *yfdX* 突變株。質體 pCH015 包含 *yfdX* 兩側各 1kb 的基因片段。



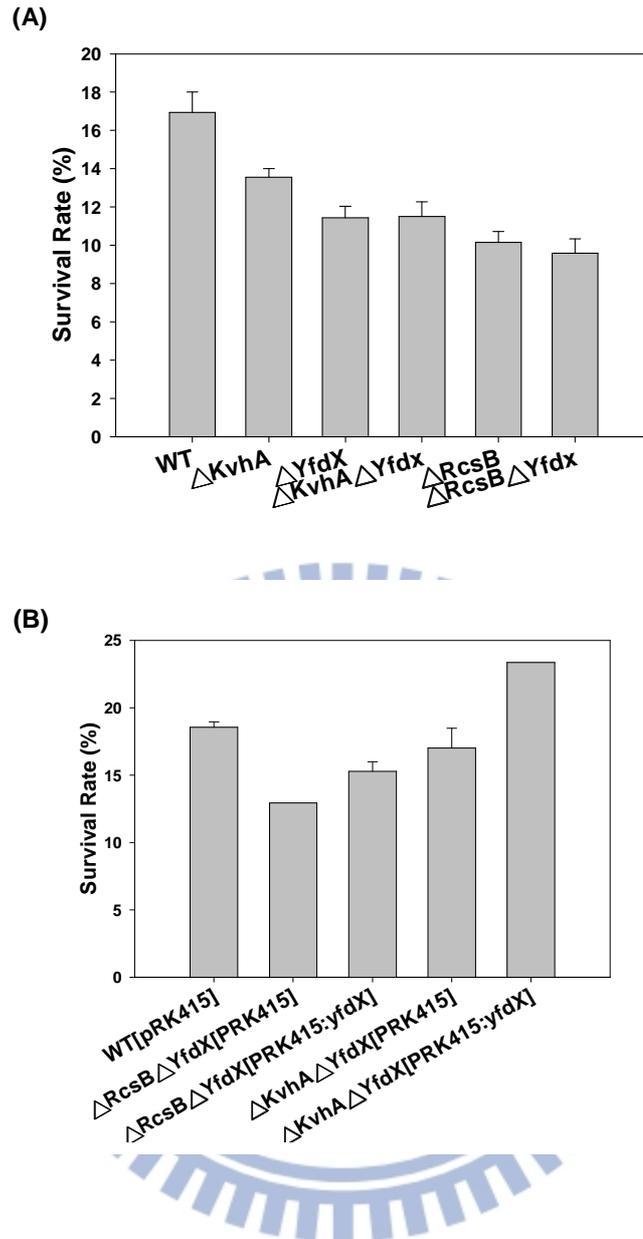
圖五：突變菌株 *yfdX* 基因缺損對細菌的生長沒有影響

細菌在 (A) LB 培養液或 (B) M9 培養液隔夜培養後，稀釋至新鮮的(A) LB 培養液或 (B) M9 培養液，使其 OD 600 約為 0.15，置於 37°C 培養，並在不同的時間點測量其吸光值(OD 600)。



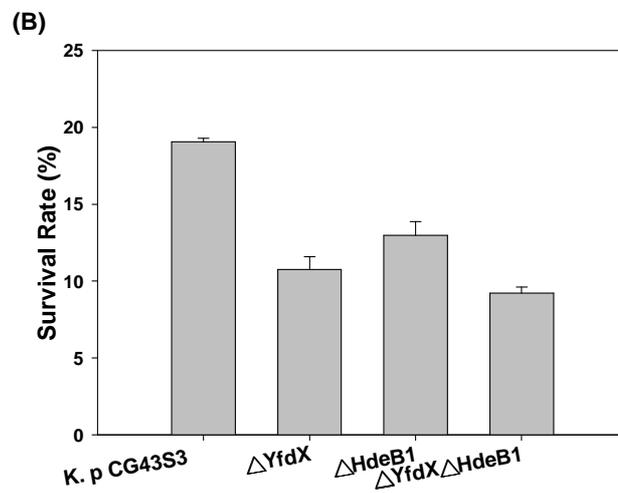
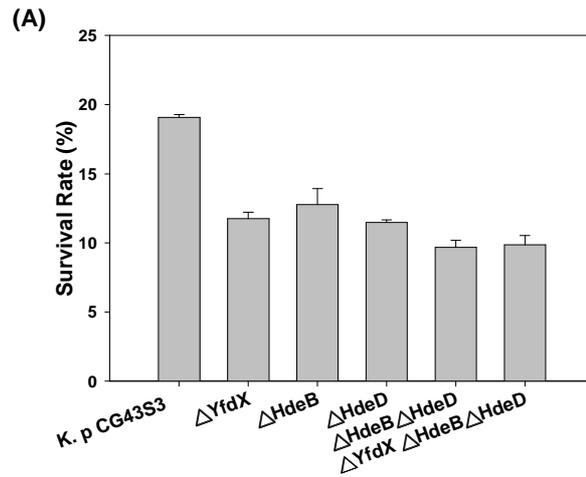
圖六：在震盪培養的條件下 *kvhA* 與 *yfdX* 基因缺損不影響克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力

細菌在 pH 4.5 LB 酸適應培養 2 小時後，移至 pH 3.0 的 M9 培養液中，培養 45 分鐘後，取適當菌液稀釋塗盤後，計算菌數；存活率是根據在 45 分鐘，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。



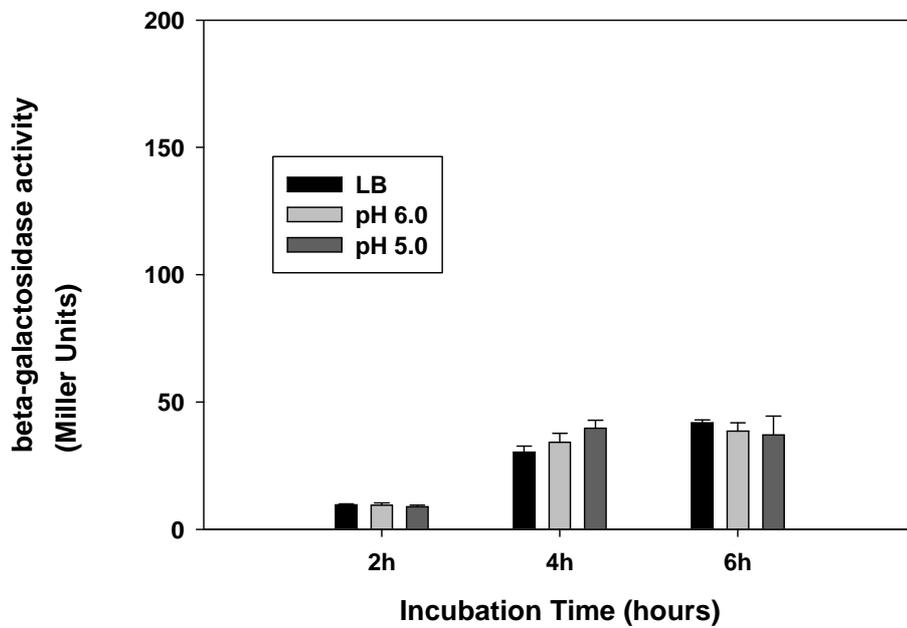
圖七：*kvhA* 主要透過 *yfdX* 基因影響靜置培養下的抗酸能力

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 45 分鐘後，取適當菌液稀釋塗盤後，計算菌數。(A)  $\Delta kvhA \Delta yfdX$  與  $\Delta rcsB \Delta yfdX$  雙突變菌株在靜置培養下的抗酸能力；(B) pRK415:*yfdX* 為 *yfdX* 互補質體。



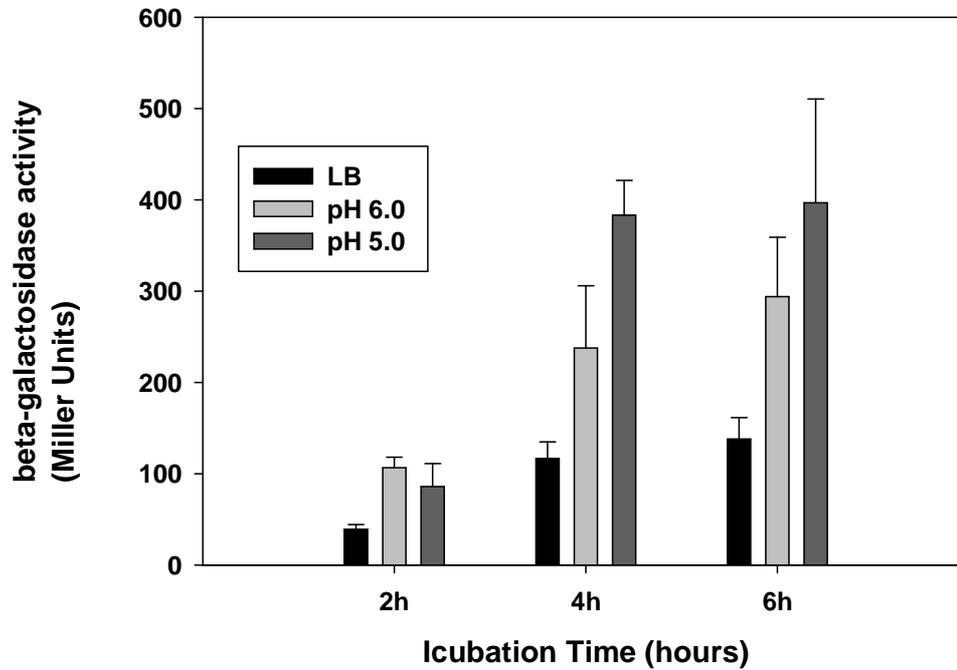
圖八：*hdeB*、*hdeD* 及 *yfdX* 基因共同影響靜置培養下的抗酸能力

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 45 分鐘後，取適當菌液稀釋塗盤後，計算菌數；存活率是根據在 45 分鐘，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。(A)  $\Delta yfdX \Delta hdeB \Delta hdeD$  三突變菌株在靜置培養下的抗酸能力；(B)  $\Delta yfdX \Delta hdeB1$  雙突變菌株在靜置培養下的抗酸能力



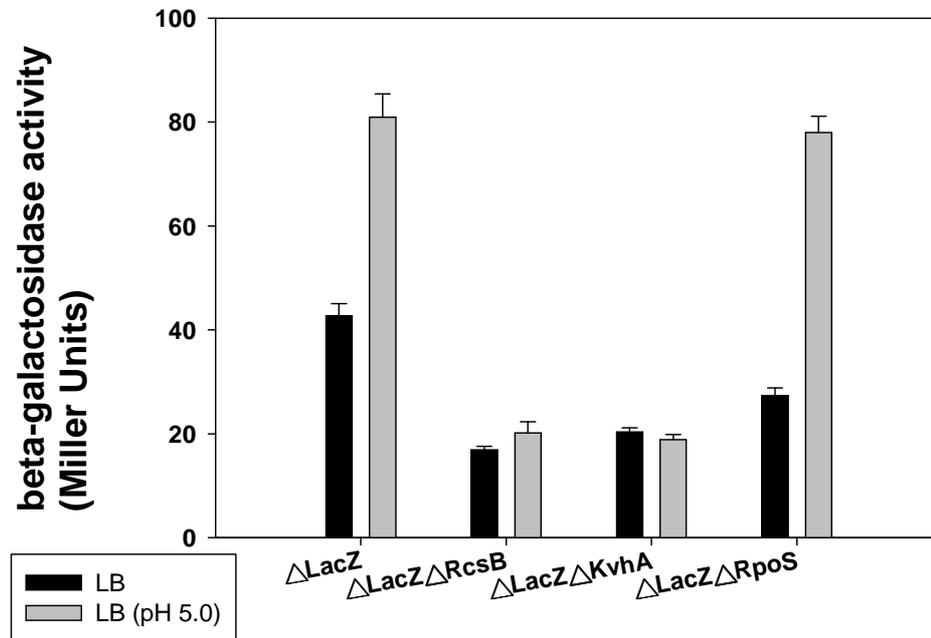
圖九：震盪培養下 *yfdX* 啟動子的活性較低

細菌在 LB、pH 6.0 LB 或 pH 5.0 LB 震盪培養 2, 4 及 6 小時後，再分別測定其啟動子活性，並在不同的時間點測量其吸光值(OD 600)。



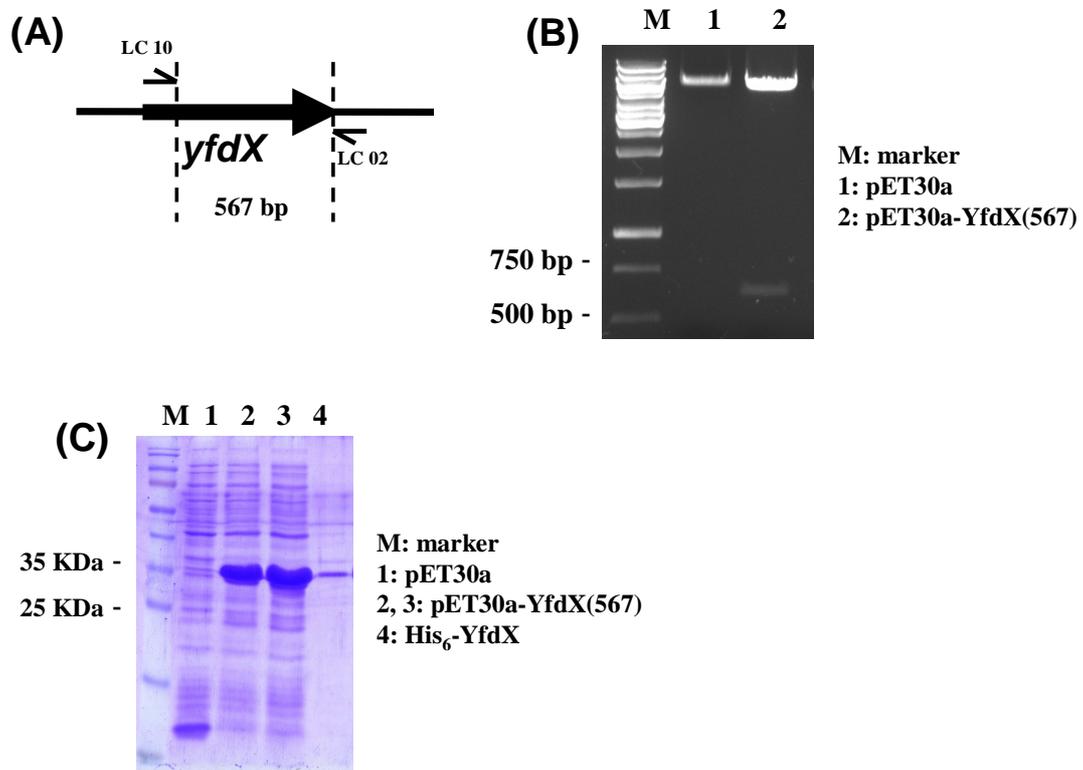
圖十：靜置培養下 *yfdX* 啟動子的活性受到弱酸的誘導

細菌在 LB、pH 6.0 LB 或 pH 5.0 LB 靜置培養 2, 4 及 6 小時後，再分別測定其啟動子活性，並在不同的時間點測量其吸光值(OD 600)。



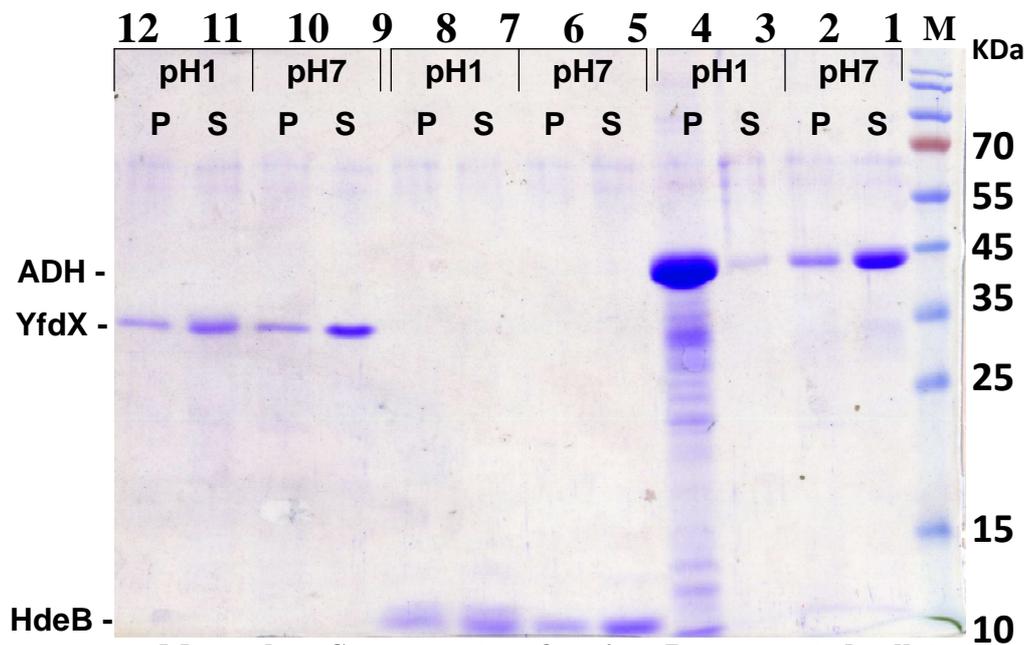
圖十一：*rscB* 及 *kvhA* 基因缺損降低靜置培養下 *yfdX* 啟動子的活性

細菌在 LB 或 pH 5.0 LB 靜置培養 24 小時後，再分別測定其啟動子活性。



圖十二：YfdX 表現載體製作、誘導與純化

(A) YfdX 表現區域示意圖，設計引子 LC10/LC02 確認表現載體 (B)利用 PCR 來確認 YfdX 之表現載體 (C)誘導 YfdX 並純化，最後呈現於膠體電泳。



M: marker; S: supernatant fraction; P: aggregated pellet

1, 2: ADH(10  $\mu$ M), pH 7.0

3, 4: ADH(10  $\mu$ M), pH 1.0

5, 6: His6-HdeB(20  $\mu$ M) pH 7.0

7, 8: His6-HdeB(20  $\mu$ M), pH 1.0

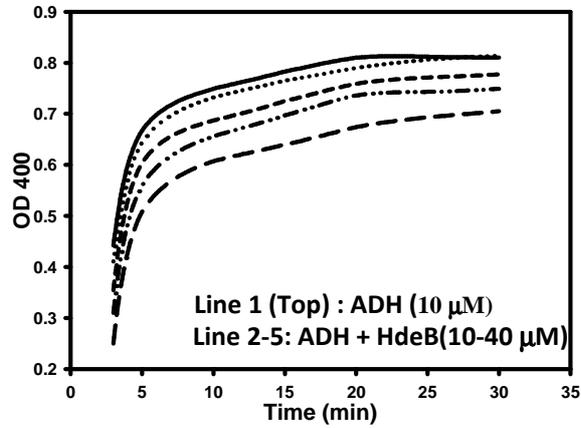
9, 10: His6-YfdX(10  $\mu$ M), pH 7.0

11, 12: His6-YfdX(10  $\mu$ M), pH 1.0

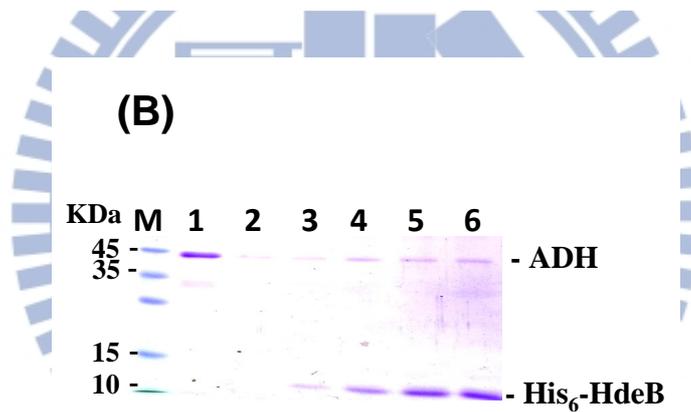
圖十三：ADH、HdeB 以及 YfdX 體外酸沉澱的模式

酒精脫氫酵素 ADH (10  $\mu$ m)在體外環境 pH 7.0 時可溶性蛋白質(S)的部份較多，pH 1.0 時產生大量沉澱(P)；HdeB (20  $\mu$ m)在體外環境 pH 7.0 時可溶性蛋白質(S)的部份較多，pH 1.0 時大部份蛋白質維持可溶性(S)； YfdX (10  $\mu$ m)在體外環境 pH 7.0 時可溶性蛋白質(S) 比例較高，pH 1.0 時大部份蛋白質維持可溶性(S)。

(A)



(B)



M: marker

1: ADH(10  $\mu$ M), pH 7.0

2: ADH(10  $\mu$ M), pH 1.0

3: ADH(10  $\mu$ M) + His<sub>6</sub>-HdeB(10  $\mu$ M), pH 1.0

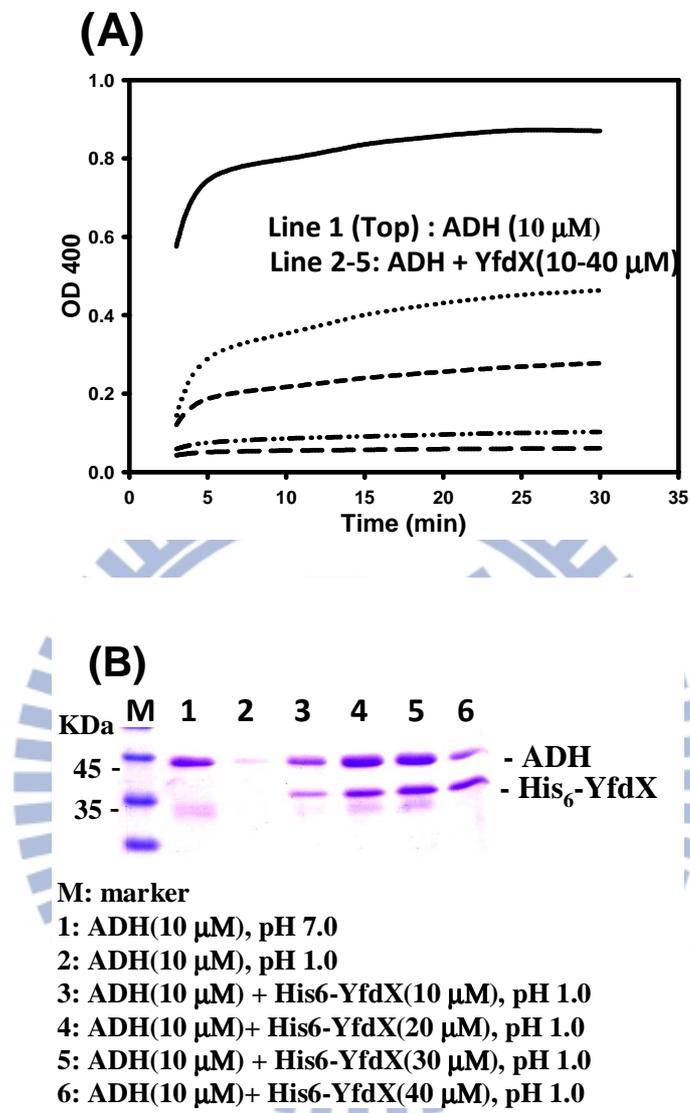
4: ADH(10  $\mu$ M)+ His<sub>6</sub>-HdeB(20  $\mu$ M), pH 1.0

5: ADH(10  $\mu$ M) + His<sub>6</sub>-HdeB(30  $\mu$ M), pH 1.0

6: ADH(10  $\mu$ M)+ His<sub>6</sub>-HdeB(40  $\mu$ M), pH 1.0

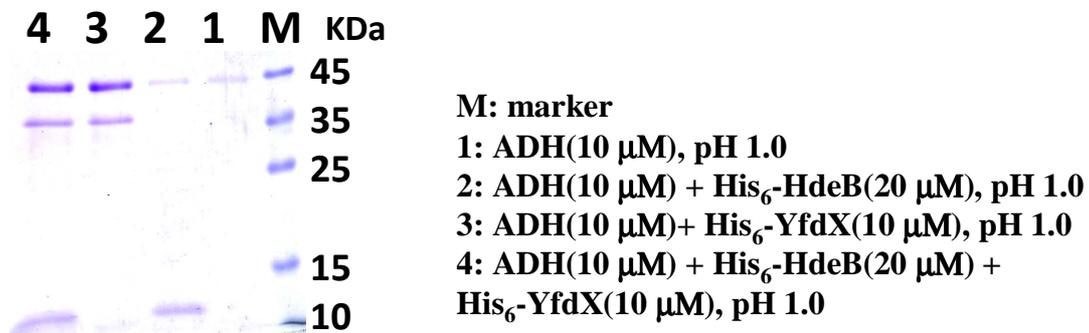
圖十四：His<sub>6</sub>-HdeB 在活體外擁有伴隨蛋白的活性

(A) ADH (10  $\mu$ M)於 pH 1.0 下，加入 His<sub>6</sub>-HdeB (10-40  $\mu$ M)，並在不同的時間點測量其吸光值(OD 400)。吸光值越高，則溶液中沉澱越多。(B) ADH (10  $\mu$ M)加入不同濃度的 His<sub>6</sub>-HdeB (10-40  $\mu$ M)，離心並取得其可溶上清液，最後呈現於膠體電泳。



圖十五：His<sub>6</sub>-YfdX 在活體外擁有伴隨蛋白的活性

(A) ADH(10  $\mu$ M)於 pH 1.0 下，加入 His<sub>6</sub>-YfdX( 10-40  $\mu$ M)，並在不同的時間點測量其吸光值(OD 400)。吸光值越高，則溶液中沉澱越多。(B) ADH(10  $\mu$ M)加入不同濃度的 His<sub>6</sub>-YfdX(10-40  $\mu$ M)，離心並取得其可溶上清液，最後呈現於膠體電泳。



圖十六：His<sub>6</sub>-YfdX 以及 His<sub>6</sub>-HdeB 活體活性沒有加乘效果

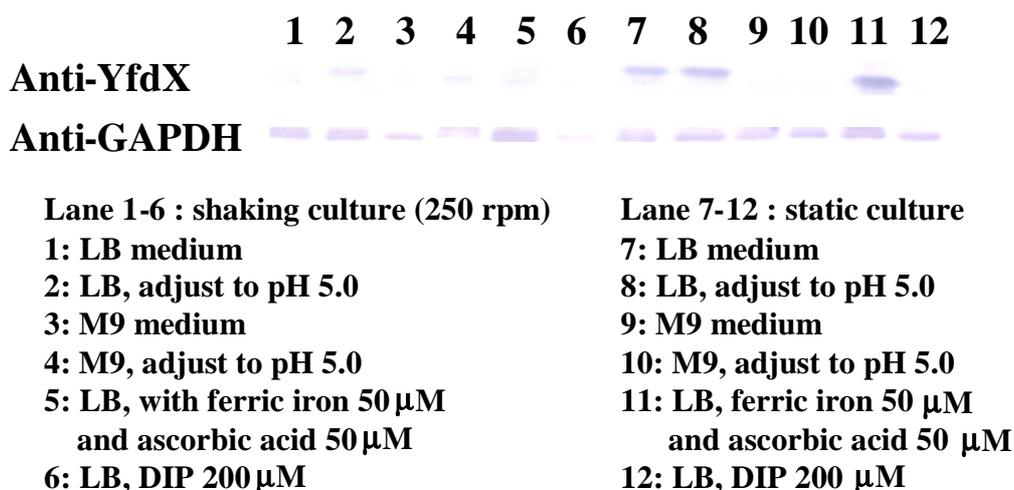
10  $\mu$ M 的 ADH 以鹽酸調整溶液酸鹼值 1.0 後，分別加入 20  $\mu$ M His<sub>6</sub>-HdeB (lane 2)、10  $\mu$ M 的 His<sub>6</sub>-YfdX (lane 3)或是 20  $\mu$ M 的 His<sub>6</sub>-HdeB, 10  $\mu$ M His<sub>6</sub>-YfdX (lane 4)。離心並取得其可溶上清液，最後呈現於膠體電泳。



- 1: WT, total cell lysate**
- 2:  $\Delta yfdX$ , total cell lysate**
- 3: WT, periplasmic fraction**
- 4:  $\Delta yfdX$ , periplasmic fraction**

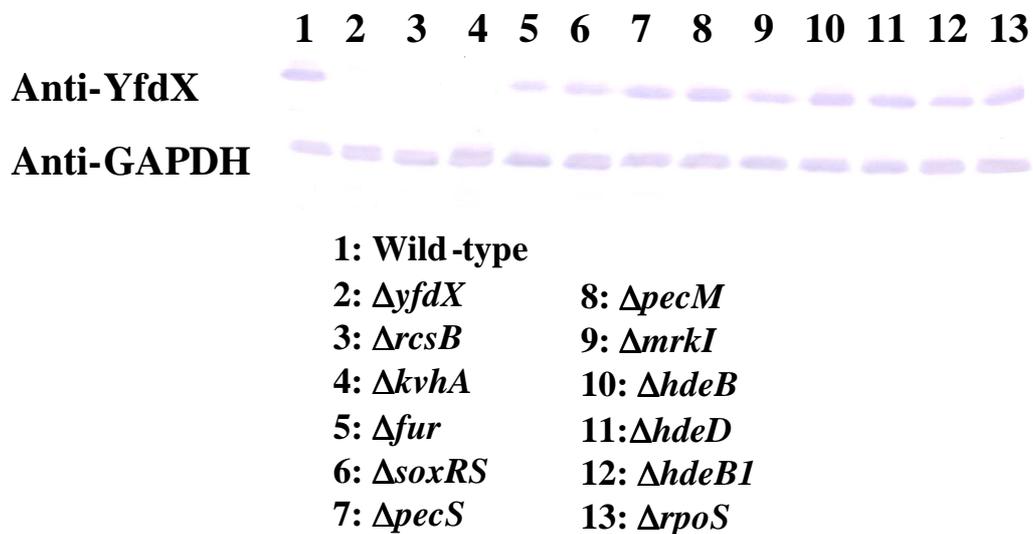
**圖十七：西方點墨法偵測 YfdX 表現於膜間質**

細菌隔夜培養後，使用超音波破碎法(lane 1, 2)或滲透休克法(lane 3,4)取得全細胞溶液或膜間質溶液，再以膠體電泳分離蛋白質，並透過西方點墨法偵測。上圖為 YfdX 抗體，下圖為膜間質之標誌抗體(乙內醯胺分解酵素抗體)。



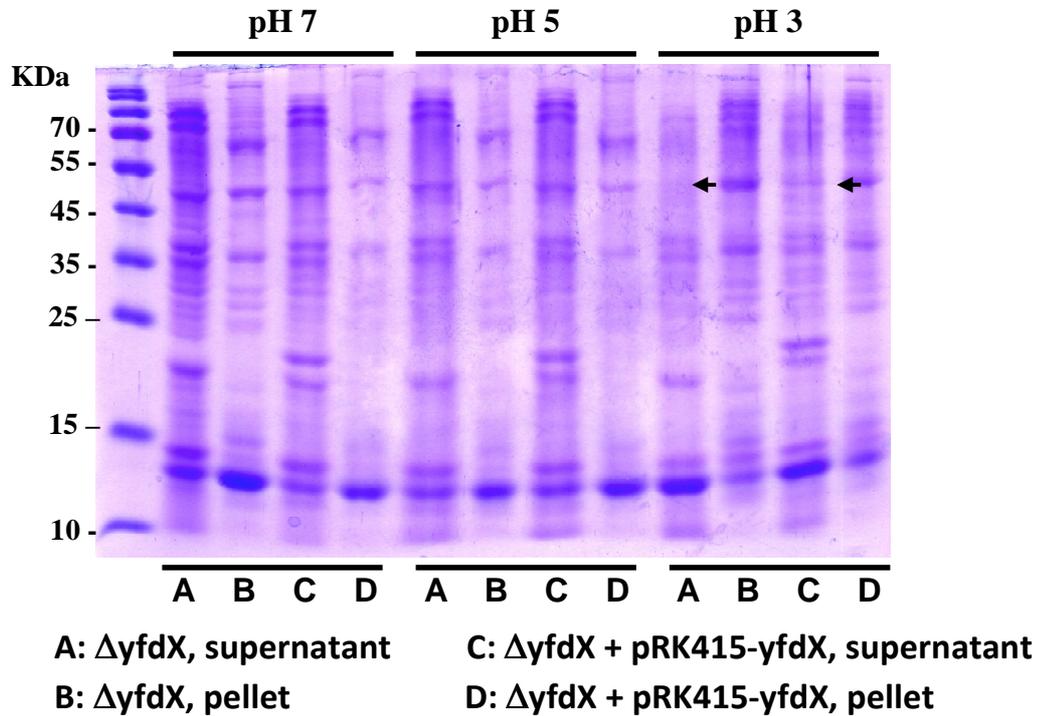
**圖十八：靜態培養增加 YfdX 蛋白質的表現量**

細菌在不同培養液以震盪(lane 1 - 6)或靜置(lane 7 - 12)的條件隔夜培養後，使用超音波破碎法取得全細胞溶液，以膠體電泳分離蛋白質後，透過西方點墨法偵測。上圖為 YfdX 抗體，下圖為標誌抗體(甘油醛 3-磷酸脫氫酶抗體)。細菌培養液含有 LB 培養液(lane 1, 7)、pH 5.0 LB 培養液(lane 2, 8)、M9 培養液(lane 3, 9)、pH 5.0 M9 培養液(lane 4, 10)、LB 培養液添加 50  $\mu$ m 鐵離子與 50  $\mu$ m 抗壞血酸(lane 5, 11)以及 LB 培養液添加鐵離子螯合劑 200  $\mu$ m (lane 6,12)



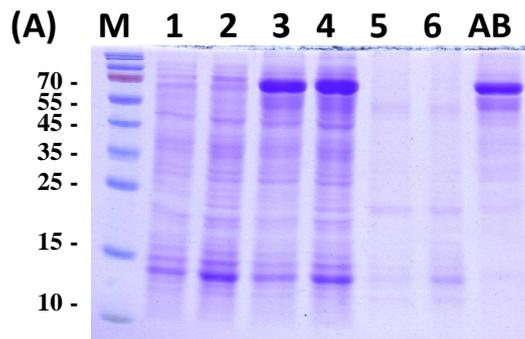
圖十九：YfdX 表現量受到 *rcsB* 以及 *kvhA* 影響

不同基因剔除菌株在 pH 5.0 LB 培養液靜置培養 24 小時後，使用超音波破碎法取得全細胞溶液，以膠體電泳分離蛋白質後，透過西方點墨法偵測。上圖為 YfdX 抗體，下圖為標誌抗體(甘油醛 3-磷酸脫氫酶抗體)。

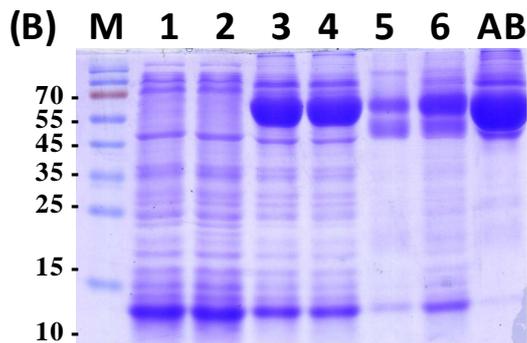


圖二十：YfdX 體內伴隨蛋白活性試驗顯示出微弱伴隨蛋白活性

酸鹼值 3 時，含有 YfdX 之膜間質蛋白存在較多可溶蛋白質，位於 45 KDa 之未知蛋白質保護效果最為顯著。細胞隔夜培養後，抽取膜間質蛋白質，以鹽酸調整溶液酸鹼值至 pH 7、pH 5 或 pH 3 反應 15 分鐘後，以高速離心分離蛋白質沉澱與上清液，呈現於膠體電泳。



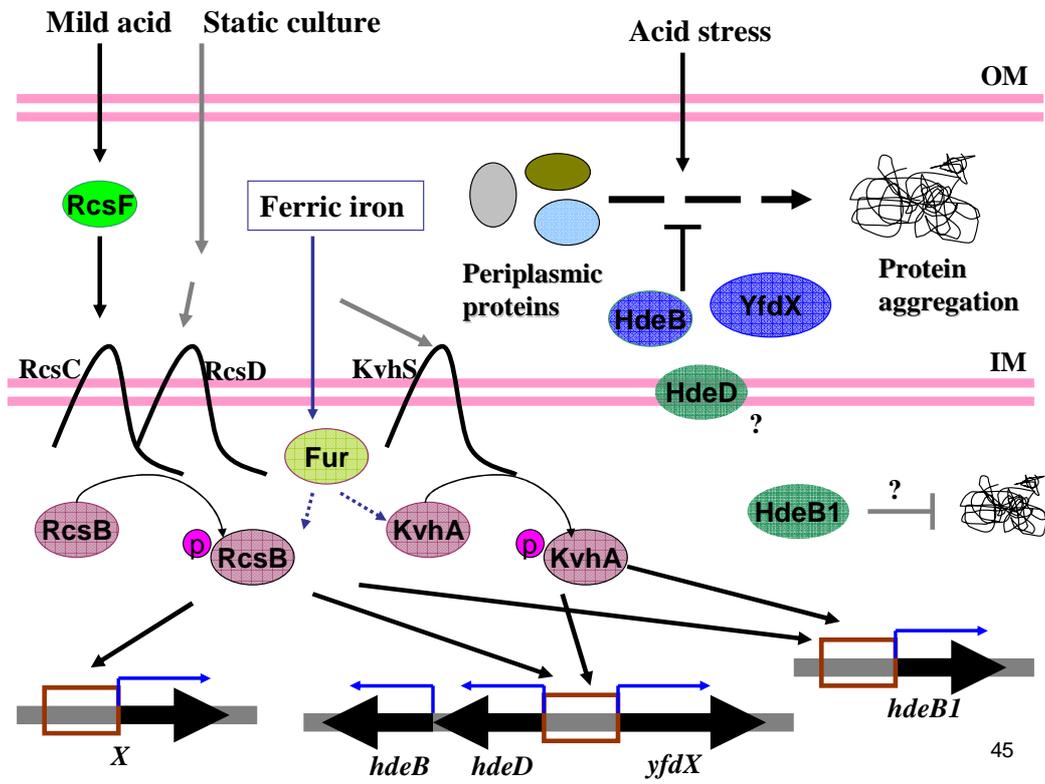
M: marker  
 AB: Anti-YfdX antibodies  
 1:  $\Delta yfdX$ , loading  
 2:  $\Delta yfdX$  + pRK415-yfdX, loading  
 3:  $\Delta yfdX$ , wash  
 4:  $\Delta yfdX$  + pRK415-yfdX, wash  
 5:  $\Delta yfdX$ , elution  
 6:  $\Delta yfdX$ + pRK415-yfdX, elution



M: marker  
 AB: Anti-YfdX antibodies  
 1:  $\Delta yfdX$ , loading  
 2:  $\Delta yfdX$  + pRK415-yfdX, loading  
 3:  $\Delta yfdX$ , wash  
 4:  $\Delta yfdX$  + pRK415-yfdX, wash  
 5:  $\Delta yfdX$ , elution  
 6:  $\Delta yfdX$ + pRK415-yfdX, elution

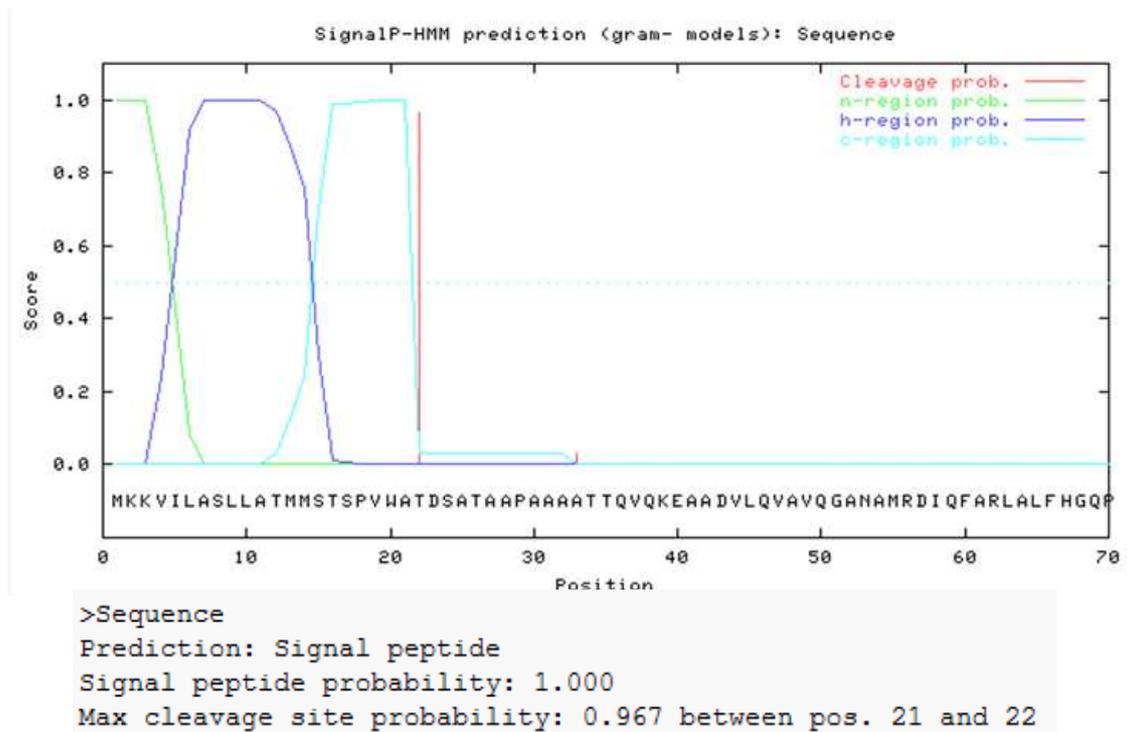
圖二十一：免疫共沉澱實驗顯示 YfdX 酸性環境下作用於膜間質蛋白

抽取 yfdX 剔除菌株與 yfdX 補償菌株的膜間質蛋白質，以鹽酸調整溶液酸鹼值至 pH 7, pH 5 或 pH 4 後，分別進行免疫共沉澱實驗。電泳泳道 1 與 2 為 yfdX 剔除菌株與 yfdX 補償菌株的膜間質蛋白質；電泳泳道 3 與 4 為清洗出的未作用蛋白質；電泳泳道 5 與 6 為共沉澱之蛋白質；電泳泳道 7 為 YfdX 的抗體。圖(A)，pH 7 之膜間質溶液；圖(B)，以鹽酸調整溶液至 pH 5



圖二十二：酸適應島嶼基因的可能相關調控機制與功能

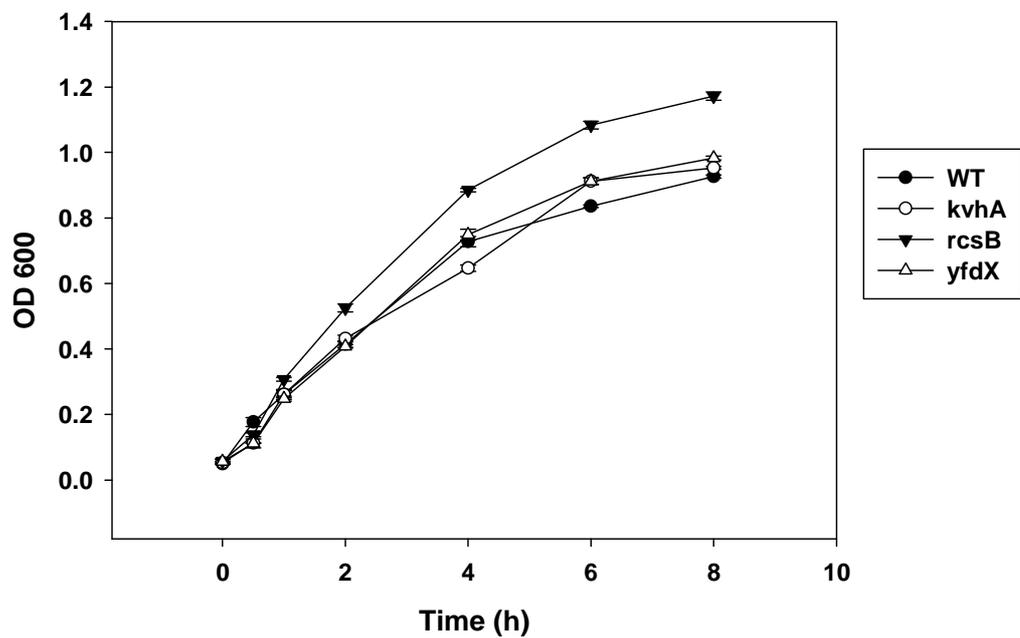
弱酸與靜置培養下誘導 RcsB 調控酸適應島嶼基因，而提高抗酸能力，同時 KvhA 亦扮演重要的調控角色。酸適應島嶼中的基因 HdeB 及 YfdX 的表現提高，抑制膜間質蛋白在酸環境下的聚集與沉澱。預測有穿膜結構的 HdeD 以及未具有訊號序列的 HdeB1，則扮演未知的抗酸角色。



### 附錄一：預測 YfdX 具有訊息胜肽

使用生物資訊工具 SignalP 4.0 預測 YfdX 蛋白質具備訊息胜肽

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。顯示 YfdX 序列 1-22 胺基酸極可能為訊息胜肽。



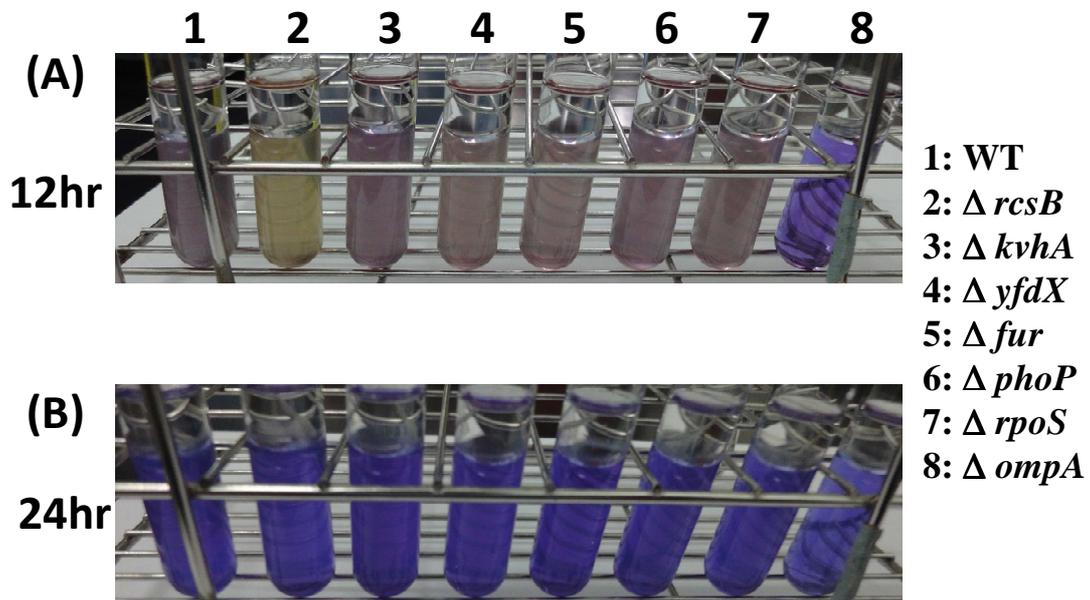
附錄二：*yfdX* 基因缺損對細菌在 5%膽鹽下的生長沒有影響

細菌在隔夜培養後，加入稀釋至含有 5%膽鹽之 LB 培養液後，使其 OD 600 約為 0.15，置於 37°C 培養，並在不同的時間點測量其吸光值(OD 600)。



**附錄三：yfdX 基因缺損不影響鐵載體(siderophore)的分泌**

細菌在 LB 培養液隔夜培養後，取 10 ul 滴至 CAS 培養基，並置於 37°C 培養 12 小時。



#### 附錄四： *yfdX* 基因缺損不影響離胺酸脫梭酶的功能

細菌隔夜培養後，取 20  $\mu$ l 菌液至離胺酸脫梭酶培養液培養 12 或 24 個小時，觀察顏色變化。培養 12 時時溶液顏色變黃，顯示酸鹼值降低；24 小時時溶液變藍，顯示離胺酸脫梭酶正常作用使溶液酸鹼值回復。