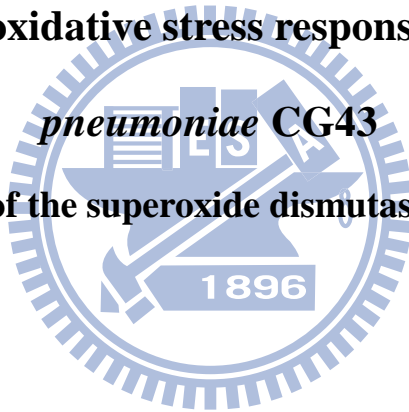


國立交通大學
生物科技研究所
碩士論文

克雷白氏肺炎桿菌 CG43 抗氧化逆境反應的研究
-超氧化歧化酶 SodA 的表現調控

**Study of the oxidative stress response in *Klebsiella*
pneumoniae CG43**
- Regulation of the superoxide dismutase A expression



研究生：吳宛怡 (Wan-Yi Wu)

學號：9928531

指導教授：彭慧玲博士 (Hwei-Ling Peng)

中華民國一零一年六月

Abstract

During infection, defenses against oxidative stress play an important role in determining the bacterial virulence. Here, the antioxidative response in *Klebsiella pneumoniae* CG43 was investigated. Specific gene-deletion mutants including $\Delta sodA$, $\Delta sodB$, $\Delta sodC$, $\Delta katE$, $\Delta katG$ and $\Delta rpoS$ were generated and the deletion effects were analyzed. Each of the deletion had no apparent effect on the cell growth and phenotypic presentation except that $\Delta katG$ showed faster growth and $\Delta sodA$ exerted varied colony forms. Compared to the parental strain *K. pneumoniae* CG43S3 or the deletion mutant $\Delta sodB$, $\Delta sodC$, $\Delta katE$ and $\Delta rpoS$, the survival analysis or the disc diffusion assay revealed that $\Delta sodA$ mutant was most sensitive to the treatment of paraquat (PQ) and $\Delta katG$ was most sensitive to H_2O_2 treatment. These results indicated that SodA and KatG likely play a major role in the oxidative stress response. Using LacZ reporter analysis and qRT-PCR measurement, the *sodA* promoter activity and mRNA level were found to be increased in the *fur* deletion strain but the deleting effect was suppressed by further deleting the *ryhB* gene. This suggests a negative role of Fur but a positive role of RyhB on the expression of *sodA*. Finally, the periplasmic fractionation analysis indicated that although SodA and SodB carrying no N-terminal signal peptide, they as well as SodC were found in the periplasmic fraction after PQ treatment.

中文摘要

在感染的過程中，細菌的抗氧化防禦機制對於其毒性扮演著重要的角色。本研究中，我們探討克雷白氏肺炎桿菌 CG43 的氧化逆境反應。首先，我們建構 $\Delta sodA$ 、 $\Delta sodB$ 、 $\Delta sodC$ 、 $\Delta katE$ 、 $\Delta katG$ 和 $\Delta rpoS$ 等突變株，並分析這些基因缺損後對克雷白氏肺炎桿菌抗氧化逆境反應造成的影響，結果發現 $\Delta katG$ 的生長速度變快，而 $\Delta sodA$ 菌落大小不一。利用生存率測試與紙錠分析的結果發現，相較於 CG43S3 野生株以及 $\Delta sodB$ 、 $\Delta sodC$ 、 $\Delta katE$ 和 $\Delta rpoS$ 突變株， $\Delta sodA$ 突變株對 paraquat 的處理最為敏感，而 $\Delta katG$ 則對 H_2O_2 處理最為敏感，這些結果暗示 SodA 或 KatG 可能是克雷白氏肺炎桿菌在抗氧化壓力主要的反應因子。接著，我們利用 LacZ 報導系統和即時聚合酶連鎖反應來分析，發現在 *fur* 基因缺損的情況下，*sodA* 基因啟動子的活性及 mRNA 的表現量增加，而在 *fur* 和 *ryhB* 雙基因缺損菌株，Fur 的抑制作用消失，這些結果暗示著 Fur 是 *sodA* 基因表現的抑制蛋白，而 RyhB 則會促進 *sodA* 基因表現。最後，藉由細胞膜間隙蛋白質的分析，我們發現 SodA 或 SodB 雖然缺乏 N 端訊號勝肽，卻和膜間隙蛋白 SodC 一樣在經過 paraquat 處理後會出現在細胞膜間隙。

致謝

兩年的研究生生活將告一段落了，即將開啟我人生中的另一個階段，在實驗室中有許多以前沒經歷過的人、事、物，有許多感謝的人及感恩的事，我由衷的感到依依不捨，但也對未來充滿展望。

首先我要感謝的是我心目中最美麗最可愛最尊敬的指導老師彭慧玲老師，在我們的實驗或是論文上遇到問題時，她總是很細心的指導，給我們很多寶貴的意見，而在待人處事上也給我們相當多的啟發，很喜歡老師令人感到溫暖的笑容，希望在將來老師還是會很快樂很健康喔～接著我要感謝的是林志生老師以及林靖婷老師，百忙之中來擔任我的口試委員，謝謝你們給予我諸多寶貴的意見，另外我還要感謝師丈張晃猷老師以及張老師實驗室的學生，謝謝你們在論文及實驗上給我的許多建議，讓我的碩士論文可以更加的完整。

在大學沒有當過專題生的我，對於許多實驗的操作技巧及流程都是相當的不清楚，非常謝謝對我而言就像姊姊一樣的靜柔學姊教導我許多關於實驗上的事物，並且在我灰心、難過時給予我相當的安慰與鼓勵；也謝謝哲充學長的廣播，讓我們在做實驗時有更多的樂趣；還有謝謝有義氣的舉豪、大熊、力成，我們度過許多一起歡笑一起憤慨的日子，以及感謝你們在臉書上面給我的支持與鼓勵；另外還有感謝已經畢業的歲云及品瑄，謝謝你們在我碩一的時候，給我的幫助以及帶給我充實的生活，並且在畢業後還會時時的關心我。

另外我要謝謝實驗室外的好朋友莊鈞凱、旻容、妮妮、阿爆、美惠、勁八舞九們，因為有你們讓我的生活更加的光彩美滿；最感謝的是我的爸爸、媽媽、妹妹、弟弟從小到大給予我的支持與鼓勵，你們是我精神上永遠的支柱，我永遠愛你們。我將我這兩年來努力得到的碩士學位獻給我的家人及我愛的人，謝謝你們讓我可以一路上堅持的走過來，我相信將來一定會更加美好！

宛怡 謹致於

交通大學生物科技研究所中華民國 101 年 6 月

目錄

	頁數
英文摘要.....	i
中文摘要.....	ii
致謝.....	iii
目錄.....	iv
表目錄.....	vi
圖目錄.....	vii
縮寫.....	ix

一、前言

1. 克雷白氏肺炎桿菌.....	1
2. 氧化壓力.....	2
3. 氧化壓力下的調控.....	2
4. 氧化壓力下的反應及抗氧化酵素.....	4
5. 二級信使 Cyclic-di-GMP.....	5
6. 具體目標.....	5

二、材料與方法

1. 菌株.....	7
2. 基因重組技術.....	7
3. 生物資訊的分析.....	7
4. 基因缺損突變株的建構.....	8
5. 生長曲線量測.....	8
6. 生物膜染色.....	8
7. 抗氧化酵素活性染色.....	9
8. 抗氧化壓力的能力評估.....	10

9. 基因回補質體建構.....	11
10. 啟動子報告質體建構.....	11
11. β -半乳糖苷酶活性評估.....	11
12. 即時聚合酶連鎖反應測試.....	12
13. 抗酸能力評估.....	12
14. 細胞膜間隙蛋白質的抽取.....	12
15. 西方免疫墨點法分析膜間隙蛋白質.....	13
三、結果	
建構 <i>sodA</i> 、 <i>sodB</i> 、 <i>sodC</i> 、 <i>katE</i> 、 <i>katG</i> 及 <i>rpoS</i> 基因缺損突變株.....	14
<i>sodA</i> 、 <i>sodB</i> 、 <i>sodC</i> 、 <i>katE</i> 、 <i>katG</i> 及 <i>rpoS</i> 基因缺損的影響.....	14
膠染色確認基因缺損影響抗氧化酵素的活性.....	14
<i>sodA</i> 或 <i>katG</i> 基因缺損對抗氧化能力的影響.....	15
<i>sodA</i> 及 <i>katG</i> 基因回補實驗.....	15
<i>sodA</i> 啟動子活性分析.....	16
Fur 或 RyhB 對 <i>sodA</i> 基因表現的影響.....	16
RpoS、SoxRS、YjcC、MrkH 或 RcsB 在調控 <i>sodA</i> 的路徑上扮演角色.....	17
<i>rpoS</i> 、 <i>sodA</i> 、 <i>katG</i> 、 <i>yjcC</i> 或 <i>rpsB</i> 基因缺損對抗酸能力的影響.....	17
SodA 的 N 端氨基酸序列比對.....	17
SodA、SodB 和 SodC 皆會出現在細胞膜間隙.....	18
四、討論	19
五、參考文獻	24

表目錄

表一：本研究所使用的菌株.....	36
表二：本研究所使用和建構的質體.....	38
表三：本研究所使用的引子.....	40



圖目錄

圖一：建構 <i>sodA</i> 基因缺損突變株.....	42
圖二：建構 <i>sodB</i> 基因缺損突變株.....	43
圖三：建構 <i>sodC</i> 基因缺損突變株.....	44
圖四：建構 <i>katE</i> 基因缺損突變株.....	45
圖五：建構 <i>katG</i> 基因缺損突變株.....	46
圖六：建構 <i>katG</i> 基因缺損突變株.....	47
圖七： <i>sodA</i> 、 <i>sodB</i> 、 <i>sodC</i> 、 <i>katE</i> 、 <i>katG</i> 及 <i>rpoS</i> 基因缺損株的生長曲線.....	48
圖八： <i>sodA</i> 、 <i>sodB</i> 、 <i>sodC</i> 、 <i>katE</i> 、 <i>katG</i> 及 <i>rpoS</i> 基因缺損株的外表型.....	49
圖九：膠染色分析抗氧化酵素的活性.....	50
圖十： <i>sodA</i> 、 <i>sodB</i> 、 <i>sodC</i> 、 <i>katE</i> 、 <i>katG</i> 或 <i>rpoS</i> 基因缺損對抗 paraquat 能力的影響.....	51
圖十一： <i>sodA</i> 、 <i>sodB</i> 、 <i>sodC</i> 、 <i>katE</i> 、 <i>katG</i> 或 <i>rpoS</i> 基因缺損對抗 H ₂ O ₂ 能力的影響.....	52
圖十二： $\Delta katG$ 突變的回補實驗分析.....	53
圖十三： $\Delta sodA$ 突變的的回補實驗分析.....	54
圖十四： <i>sodA</i> 啟動子序列分析.....	55
圖十五：LacZ 報導系統分析 <i>sodA</i> 的啟動子活性.....	56
圖十六：Fur、RyhB 對 <i>sodA</i> 基因表現的影響.....	57

圖十七： <i>sodA</i> 、 <i>soxRS</i> 、 <i>yjcC</i> 或 <i>mrkH</i> 基因缺損對抗氧化能力的影響.....	58
圖十八：LacZ 報導系統分析調控蛋白分子對 <i>sodA</i> 的影響.....	59
圖十九： <i>rpoS</i> 、 <i>sodA</i> 、 <i>katG</i> 、 <i>yjcC</i> 、 <i>fur</i> 或 <i>rscB</i> 基因缺損對抗酸能力的影響.....	60
圖二十：SodA 和 SodB 的 N 端 10 個氨基酸序列.....	61
圖二十一：SodA、SodB 和 SodC 在細胞膜間隙的活性分析.....	62
圖二十二：Fur 及 RyhB 對 <i>sodA</i> 表現的可能調控路徑.....	63



縮寫表

bp	<u>b</u> ase <u>p</u> air
c-di-GMP	Bis-(3'-5')- <u>c</u> yclic <u>d</u> imeric <u>g</u> uanosine <u>m</u> onophosphate
CFU	<u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nits
CPS	<u>c</u> apsular <u>p</u> olysaccharide
DGC	<u>d</u> i-guanylate <u>c</u> yclase
DNA	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
EDTA	<i>N</i> ' <i>N</i> ' <i>N</i> ' <i>N</i> '-ethylenediaminetetraacetate
ESBL	<u>e</u> xtended- <u>s</u> pectrum <u>β</u> - <u>l</u> actamase
Fur	<u>f</u> erric <u>u</u> ptake <u>r</u> egulator
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
LPS	<u>l</u> ipolysaccharide
μg	<u>m</u> icrogram
μl	<u>m</u> icroliter
μM	<u>m</u> icromolar
mM	<u>m</u> illimolar
NBT	<u>n</u> itroblue tetrazolium chloride
ONPG	<u>o</u> - <u>n</u> itrophenyl, β-D-galactopyranoside
OD	<u>o</u> ptical <u>d</u> ensity
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PDE	<u>p</u> hosphodiesterase
PQ	<u>p</u> araquat
PVDF	<u>p</u> olyvinylidene <u>d</u> ifluoride
qRT-PCR	<u>q</u> uantitative <u>r</u> eal <u>t</u> ime <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
Rcs	<u>r</u> egulator of <u>c</u> apsular <u>s</u> ynthesis
RNA	<u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
RNS	<u>r</u> eactive <u>n</u> itrogen <u>s</u> pecies
ROS	<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies
rpm	<u>r</u> evolution <u>p</u> er <u>m</u> inute
Sod	<u>s</u> uperoxide <u>d</u> ismutase
SDS-PAGE	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate-polyacrylamidegel <u>e</u> lectrophoresis
TEMED	<i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> '', <i>N</i> '-tetramethylthyl-enediamine

一、前言

1. 克雷白氏肺炎桿菌

克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 為一革蘭氏陰性菌，歸屬腸內菌科 (*Enterobacteraceae*)，是常見的伺機性病原，對於免疫性不良或缺乏的病人會造成嚴重的感染。臨床上常見的病徵有：敗血症、肺炎、腦膜炎、尿道感染及特定部位的化膿性感染，如不加以治療，會有高達 90% 的致死率 (14、16、42、85、96)。在台灣，糖尿病病人肝膿瘍導致的嚴重併發症與克雷白氏肺炎桿菌有高度的相關性 (12、90)。另外，因為濫用抗生素造成抗藥性菌株的產生，包括會製造廣效性乙內醯胺酶 (Extended-spectrum β -lactamase, ESBLs) 類的克雷白氏肺炎桿菌 (18)，和後來對 carbapenems 類的抗生素產生抗性的菌株，簡稱為 KPC (27、36、60)，以及近來報導由新德里 (New Delhi) 醫院分離出的 NDM-1 菌株，除了抗 carbapenems 外，還會製造新的金屬 β -內醯胺酶 (metallo- β -lactamase)，使大多內醯胺類抗生素失效，造成新的危機 (46、93)。

克雷白氏肺炎桿菌的致病因子包括：一、細菌表面抗原：如莢膜多醣體 (capsular polysaccharide, CPS)，可保護細菌免受多型態有核顆粒細胞 (polymorphonuclear granulocyte) 的吞噬及抗血清殺菌的能力，藉 CPS 多樣的構造，將克雷白氏肺炎桿菌分成 77 種血清型，並以 K1 及 K2 血清型具有最高的毒性 (4、57、62、67、91)；脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS) 除具有類似 CPS 的作用外，亦會引發宿主產生敗血性休克的免疫反應 (66、84)。二、黏附因子：細菌常藉由表面黏附蛋白與宿主細胞受器結合來達到附著的目的，如第一型與第三型的線毛 (type 1 and 3 fimbriae) 以及非線毛型的黏附蛋白 CF29K 與 KPF28 (28、82)。三、細菌競爭宿主內鐵質來源的能力：即奪取鐵的系統 (iron acquisition system)，主要為 siderophores，此類物質對於鐵具有極高親和力，在克雷白氏肺炎桿菌中可分為 enterochelin 以及 aerobactin 兩種 (67)。此外，克雷白氏肺炎桿菌如何抵抗酸性逆境或過氧化逆境的分子機制，相對的較少研究報導。

2. 氧化壓力

細菌感染成功的關鍵，在於是否有能力可以戰勝外在環境所給予的壓力，例如：氧化壓力 (oxidative stress)。氧化壓力主要是由 reactive oxygen species (ROS) 和 reactive nitrogen species (RNS) 所造成，ROS 包含超氧自由基 (superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$)、過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 以及氫氧自由基 (hydroxyl radical, OH^{\cdot})，而 RNS 則包含了帶電的一氧化氮 (nitric oxide radical, NO) 及過氧化氮 (peroxynitrite, $ONOO^{\cdot}$)。這些 ROS 和 RNS 會對 DNA、蛋白質、脂質以及細胞膜造成傷害，而影響細菌的生長及繁殖 (37、94)。

在感染過程中，細菌處在一個充滿氧化壓力的環境，這時氧化壓力的來源主要來自 (一) 細菌本身體內的氧化壓力：例如電子傳遞鏈 (electron transport chain, ETC)，在傳遞電子時，因電子跳脫傳遞鏈而與體內氧氣作用形成；(二) 外在環境：除了環境中原本就存在的氧化還原反應所造成的氧化壓力外，在感染宿主的過程中也會出現競爭的細菌，這時競爭者也會產生 ROS 來與之競爭；(三) 宿主体內的吞噬細胞 (phagocytic cells)：細菌進到宿主体內之後，受到吞噬細胞的辨識，而將細菌吞進細胞裡，吞噬細胞裡的 NADPH oxidase 會與氧氣作用而形成大量的超氧自由基及過氧化氫，來攻擊入侵的細菌 (26、38)。

3. 氧化壓力下的調控

受到氧化壓力的攻擊時，細菌會有一連串的反应，這些反应被調控分子 (regulators) 所控制。不同的調控分子藉由感應到不同的訊號，會有不一樣的調控路徑，文獻報導上較為著名的像是：在大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 中， $O_2^{\cdot-}$ 存在時，SoxR 會與之反應後改變含有鐵硫中心 SoxR 的構型，構型改變的 SoxR 會去結合在 *soxS* 這段基因的啟動子 (promoter) 上，促使 *soxS* 基因表現，而 SoxS 則進一步促使 *sodA* (superoxide dismutase A)、*sodB* (superoxide dismutase B)、*fur* (ferric uptake regulator) 和其他目標基因的表現 (19、32、61)；而當 H_2O_2 存在時，OxyR 會與之反應，而由原本的還原態變成氧化態，氧化態的 OxyR 可

以去結合在 *katG* (hydroperoxidase I)、*fur*、*ahpC* (alkylhydroperoxide reductase)、*gorA* (glutathione reductase) 和其他目標基因的 promoter 上，促使這些基因表現(3、6、7、35)。

另一方面，在無氧的環境下，則會有其他的調控分子來參與調控。Fnr (fumarate nitrate reductase) 是一 global regulator，主要藉由感應氧氣與一氧化氮 (NO) 的有無來決定其活性，缺乏氧氣與一氧化氮時，會呈現有活性的狀態，去結合在下游 *sodA* 及 *sodC* 的 promoter 上，調控基因表現 (20、88)；而 ArcAB 雙分子系統 (two component system, TCS) 的調控方式以帶有激酶 (kinase) 活性的 ArcB，感受到氧化壓力時，會自體磷酸化 (autophosphorylation)，再將磷酸根 (phosphate) 傳給 ArcA，活化的 ArcA 會促進下游基因表現，文獻報導顯示：在 *E. coli* 中，ArcAB 的基因缺損，會對 H₂O₂ 的抗性下降 (52)。

在細菌中，除了上述的 global regulators 會去感應到壓力而促使基因表現外，基因的表現也與 sigma (σ) factors 的調控有很大的相關性。在 *E. coli* 和沙門氏菌 (*Salmonella* spp.) 中，RpoS 是一個在 stationary phase 的 sigma factor (σ^s , σ^{38})，負責調控許多基因的表現，幫助細菌適應不良的環境。*E. coli* 四千六百多個基因中，RpoS 調控組 (regulon) 的基因占了 10% (2、23)。抗氧化基因 *katE* (hydroperoxidase II)、*katG* 和 *sodC* (superoxide dismutase C) 皆包含在 RpoS 調控組裡 (24)。

剔除創傷弧菌 (*Vibrio vulnificus*) *rpoS* 基因，會造成 *fur* 的表現下降 (49、63)，Fur 也是一個 global regulator，它的調控作用與亞鐵離子 (Fe²⁺) 濃度有關，Fur 與亞鐵離子結合變成有活性的狀態，有活性的 Fur 會去結合 Fur box (含 19-base pair) 序列，進而抑制下游基因的表現。Fur 的調控與鐵離子的含量有關係，而鐵離子的多寡與外在環境及氧化壓力也息息相關。文獻報導顯示：Fur 會抑制一個反義 RNA (anti-sense RNA) *ryhB* 表現，進而影響基因表現或造成標的基因的 mRNA 降解，抗氧化基因 *sodB* 即為受調控的基因之一 (53、89、92)。

4. 氧化壓力下的反應及抗氧化酵素

細菌受到大量氧化壓力攻擊後，可能會造成 DNA、蛋白質、脂質以及細胞膜的傷害，被傷害的 DNA 會由 DNA 的直接修復 (direct repair) 作用，來將之恢復成正常；而間接修復 (indirect repair) 作用，也可藉由蛋白酶 (proteases)、脂質酶 (lipases) 和核酸水解酶 (nucleases)，來將錯誤的物質直接水解掉，避免更進一步的傷害 (26、38)。但是大量的氧化壓力所造成的傷害，使直接或間接修復作用措手不及，所以細菌本身除了上述的修復作用外，也藉由體內眾多的調控路徑，產生出抗氧化酵素 (antioxidant enzyme)，來清除掉過多的 ROS。

超氧化歧化酶 (superoxide dismutase) 可以將超氧自由基和氫氣轉變成過氧化氫及氧氣 ($\text{H}_2 + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$)，在 *E. coli* 中，含有 SodA、SodB 及 SodC 三種超氧化歧化酶。SodA 是以錳離子 (Mn^{2+}) 為輔因子 (cofactor) 的酵素，在原核生物，通常存在於細胞質 (cytosol) 中 (40)，但有研究報導指出：SodA 雖然缺乏訊號勝肽 (signal peptide)，卻也會出現在細菌的細胞膜間隙 (periplasm) (44)。SodB 以亞鐵離子 (Fe^{2+}) 為輔因子的酵素，在原核生物中，通常存在於細胞質，文獻也指出：sodB 會受到 Fur 及 RyhB 的相互調控進而表現或是降解 (53、95)。SodC 是以銅鋅離子 ($\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$) 為輔因子的酵素，通常存在於原核生物的細胞膜間隙，為 RpoS 所調控 (9、25、58)。

過氧化氫酶 (catalase) 可以將過氧化氫轉變成氧氣及水 ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$)，在 *E. coli* 中，含有 KatE 及 KatG。KatE 又稱為 Hydroperoxidase II (HPII)，為 RpoS-dependent 的酵素，通常存在於原核生物的細胞質中 (51、75)。KatG 為 Hydroperoxidase I (HPI)，也是存在於原核生物的細胞質中，由 OxyR 所調控，文獻報導指出：KatG 有 catalase-peroxidase 雙活性，過氧化氫酶 (peroxidase) 可以將 R 氫基團及過氧化氫轉變成兩分子的水 ($\text{RH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{R} + 2\text{H}_2\text{O}$) (3、39、81)。上述的酵素皆可以清除掉極具破壞性的 ROS，保護細菌免受於 ROS 的攻擊。

5. 二級信使 Cyclic-di-GMP

Bis- (3'-5') -cyclic dimeric GMP (c-di-GMP) 為細菌體內的二級信使 (second messenger)，控制細菌的各種表現，包含細菌的能動性 (motility)、線毛的表現 (fimbriae expression)、生物膜的形成 (biofilm formation) 以及細胞週期的程序 (cell cycle processes)，對於細菌的毒性扮演著重要的角色 (34)。文獻報導說明：在 *E. coli* 中，c-di-GMP 含量的多寡，會去改變某些基因的轉錄活性 (transcription activity)，進而造成轉錄調控者 (transcription regulators) 的基因表現，而這些調控者與 CPS 的合成、抗氧化反應的表現及攝取鐵的系統 (iron uptake system) 息息相關 (54)。

C-di-GMP 含量的多寡，由 GGDEF、EAL 及 HD-GYP domain 來決定，GGDEF domain 有雙鳥苷酸環化酶 (diguanylate cyclase, DGC) 的活性，可以將兩個 GTP 環化形成 c-di-GMP，而 EAL 及 HD-GYP domain 則含有磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 的活性，會將 c-di-GMP 分解 (77、78)。近來有研究報導顯示：c-di-GMP 與 PilZ-domain 的相互作用會影響到下游基因的表現 (5、15、55、71)。屬於第三型線毛基因組的 MrkH，即是一個含有 PilZ domain 的蛋白質，會和 c-di-GMP 相互作用，進而影響許多基因表現。

6. 具體目標

本論文將探討克雷白氏肺炎桿菌 CG43 在氧化壓力下的反應。首先，我們將分別建構 *sodA*、*sodB*、*sodC*、*katE*、*katG* 和 *rpoS* 基因缺損突變株，再將這些基因缺損突變株經過 paraquat (PQ) 或 H_2O_2 處理，分析在不同類型的氧化壓力攻擊下，*sodA*、*sodB*、*sodC*、*katE*、*katG* 或 *rpoS* 的基因缺損是否影響其抗氧化的能力。接著，我們將針對基因缺損影響最大的基因做更深入的研究，包括：建構 LacZ-報導系統 (reporter system)、利用即時聚合酶連鎖反應 (quantitative Real time PCR, qRT-PCR) 探討是否受到過氧化逆境相關的調控分子所調控；同時，針對特定目標基因產物分析其生物活性，如在細胞的位置與其生化活性的相關性。

另外探討一些與過氧化逆境相關的調控分子在抗氧化或抗酸作用的調控角色：包括(1) SoxRS；(2) YjcC 蛋白，其 N 端帶有 CSS motif，歸屬 EAL domain 蛋白家族，其 C 端含有功能性的 EAL domain，可以分解 c-di-GMP，造成 c-di-GMP 量的下降；(3) Rcs (regulator of capsular synthesis) 系統屬於雙分子系統，最早被發現參與大腸桿菌莢膜多醣體生合成的調控 (31)。我們實驗室研究發現 RcsB 調控蛋白與克雷白氏肺炎桿菌抗酸的能力相關 (1)，細菌的抗氧化及抗酸作用息息相關，當 *E. coli* 處在酸環境時，會促使過氧化氫酶 (catalase) 大量產生 (76)；而乳酸球菌 (*Lactococcus lactis*) 和金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 在酸的環境中，則會促使 *sodA* 基因表現，將 *sodA* 基因移除會使二者在酸環境下的存活率大大下降 (74)；(4) 含有 PilZ domain 的 MrkH 蛋白質，可結合 c-di-GMP 進而調控下游基因表現；(5) PecSM 系統，屬於 MarR family，PecS 會與具有迴文序列之 *pecO* 結合進而抑制下游基因表現，有研究顯示 MarR family 裡的成員與抗氧化作用有關，膿桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) PecS 會與尿酸鹽 (Uric acid) 結合，產生構型改變而無法與 *pecO* 結合，使原本被抑制的基因可以表現 (69、70)；而在伊文氏桿菌 (*Erwinia*) 中，PecM 可以將 PecS 所調控的抗氧化物 (indigoidine) 帶至細胞外 (64)。

二、材料與方法

1. 菌株

本研究的克雷白氏肺炎桿菌 CG43 為長庚紀念醫院林口分院的臨床分離株，而 CG43S3 是由實驗室學姐篩選獲得具有鏈黴素 (streptomycin) 抗性的突變株 (13、47)；另外，CG43S3 Δ *ryhB*、CG43S3 Δ *fur* Δ *ryhB* 由中國醫藥大學林靖婷教授實驗室提供。本實驗上所使用的菌株及質體詳列於表一及表二。所有菌株於已加入適量抗生素的 Luria-Bertani (LB) 培養液或培養基，經震盪培養於 37°C；使用的抗生素及濃度分別為：鏈黴素 500 μ g/ml、氨比西林 (ampicillin) 100 μ g/ml、卡那黴素 (kanamycin) 25 μ g/ml、四環黴素 (tetracycline) 12.5 μ g/ml 及氯黴素 (chloramphenicol) 35 μ g/ml。

2. 基因重組技術

基因重組實驗參考標準流程 (73)。PCR 所使用的引子 (primer) 由生工公司 (MDBio, Inc, Taiwan) 合成並詳列於表三；而 PCR 使用的酵素為 Blend Taq DNA polymerase (TOYOBO, Japan) 及 Taq DNA polymerase (MDBio)；PCR 產物及 DNA 片段則使用 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan) 抽取。質體 DNA 使用 High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) 抽取；RNA 使用 RNeasy Mini Kit (QIAGEN) 抽取；限制酵素及 DNA 修飾酵素分別由 New England Biolab (Beverly, MA) 或 MBI Fermentas (Hanover, MD) 購置，且依照供應商建議的方式使用。

3. 生物資訊的分析

相關基因的比較分析是利用 NCBI 網站或 Vector NTI 軟體；啟動子的預測以 Softberry (<http://linux1.softberry.com/all.htm>) 或 Bioinformatics @ MolGen ppp (<http://bioinformatics.biol.rug.nl>) 分析；預測 RNA 雜交區域構型序列經由

RNAhybrid (<http://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de>) 軟體分析。

4. 基因缺損突變株的建構

首先利用 PCR 增幅目標基因的上下約 1000 bp 的 DNA，將前後兩片段結合後接入自殺性載體 pKAS46 (80)，再將此重組質體以電穿孔 (electroporation) 送入 *E. coli* S17-1 λ pir，以接合作用 (conjugation) 將此質體送入 CG43S3 中，並以含有 kanamycin 及 ampicillin 的 M9 固態培養基篩選經由同源互換作用而插入染色體的 transconjugants。接著，隨機挑選幾顆單一 transconjugant 菌落於 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，先以 PCR 確認該質體插入染色體中，再取 75 μ l 菌液於含有 streptomycin 的 LB 培養液 37°C 培養 8 小時後，系列稀釋至 10^{-6} 倍，取 100 μ l 的菌液均勻的塗抹在含有 streptomycin 的 LB 固態培養基上培養隔夜，最後以滅菌牙籤隨機挑選至少 50 顆單一菌落，分別劃開於含 streptomycin、含 kanamycin 和 ampicillin 的 LB 固態培養基上，挑選出具 streptomycin 抗性但對 kanamycin 及 ampicillin 敏感的菌落，最後再利用 PCR 檢查，並以挑選出的總菌落數及成功剔除基因的菌落數算出重組互換成功的機率。

5. 生長曲線量測

細菌在 LB 培養液中培養隔夜後，以 200 倍稀釋至 LB 培養液中，再置於 37°C 培養，每隔 2 小時即測量其在波長 600 nm 下的吸光值；或以菌落形成單位 (colony forming units, CFU) 標示：即每隔 2 小時取 100 μ l 菌液經適當系列稀釋後，均勻塗抹在 LB 固態培養基上，37°C 隔夜培養後數菌落數；每次獨立實驗以三重覆數據換算出平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中較具代表性的一次。

6. 生物膜染色

細菌在 LB 培養液中培養隔夜後，以 200 倍稀釋至 4 ml LB 培養液中，再於 37°C 靜置培養 24 小時，小心去除菌液後以一次水清洗兩次，再加入 4 ml 1% 結

晶紫，以每分鐘 60 轉 (revolution per minute, rpm) 震盪處理五十分鐘後，再以一次水清洗 3 次。

7. 抗氧化酵素活性染色

超氧化歧化酶活性

根據 Beauchamp 和 Fridovich 的方法 (8)，取 200 μ l 隔夜培養菌液加入 LB 培養液於 37°C 培養至 OD₆₀₀ 約 0.6~0.8 左右，將菌液以 15000 rpm 離心 5 分鐘後去掉上清液，再以 1 ml 0.85% saline 清洗細菌並離心去上清液，再加入 300 μ l pH7.0 10 mM potassium phosphate，在冰上以超音波震盪 (sonication) 打破菌體至菌液澄清，最後以 Bradford 法 (10) 定量蛋白質後，取適量萃液 (約 30 μ g 的蛋白質) 加入 13.5% native polyacrylamide gel 以電泳分離蛋白 (先以 80 V、200 mA 分離 40 分鐘，再以 150 V、200 mA 分離 160 分鐘)。經膠電泳分離後以一次水清洗膠片，再加入 40 ml pH7.0 10 mM potassium phosphate 含 0.08 g nitroblue tetrazolium chloride (NBT)，在室溫下震盪避光清洗 20 分鐘，接著換成 40 ml pH7.0 10 mM potassium phosphate 含 0.4 g riboflavin 及 336 μ l TEMED 混合以日光燈 (110 V, 60 Hz, 0.3 A) 照光呈色 20 分鐘，最後用一次水震盪清洗數次。

過氧化氫酶活性

本測試根據 Clare 的方法修訂 (17)，首先，取 200 μ l 隔夜培養之菌液於 LB 培養液中，37°C 培養至 OD₆₀₀ 約 0.6~0.8 左右，將菌液以 15000 rpm 離心 5 分鐘後去掉上清液，再以 1 ml 0.85% saline 清洗細菌，經離心去上清液後加入 300 μ l pH7.0 10 mM potassium phosphate，在冰上以超音波震盪打破菌體至菌液澄清，最後以 Bradford 法定量後，取適量萃液 (約 30 μ g 蛋白質) 加入 10.8% native polyacrylamide gel 以電泳分離蛋白 (先以 80 V、200 mA 分離 40 分鐘，再以 150 V、200 mA 分離 160 分鐘)。經膠電泳分離後，先以一次水清洗膠片，接著用含

有 10 μ l 1M H₂O₂ 之 100 ml 二次水在室溫下震盪避光清洗 10 分鐘，再換成 50 ml 含有 2% ferric chloride 及 1 g potassium ferricyanide 二次水混合並以日光燈(110 V, 60 Hz, 0.3 A) 照光呈色 20 分鐘，最後以一次水震盪清洗數次。

8. 抗氧化壓力的能力評估

生存率測試

細菌在 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，以 20 倍稀釋至 LB 液培養至 OD₆₀₀ 約 0.6~0.8 左右，取 1 ml 菌液至微量離心管以 15000 rpm 離心 5 分鐘後去掉上清液，再加入 1 ml 濃度為 10 mM 的 H₂O₂ 或 3 mM 的 PQ，培養 40 分鐘後，取出 100 μ l 菌液系列稀釋至 10⁻⁶ 倍後均勻塗抹在 LB 固態培養基上於 37°C 隔夜培養後數菌落數。存活率是根據實驗組每 1 ml 所存活的菌數與未加入 10 mM 的 H₂O₂ 或 3 mM 的 PQ 的控制組每 1 ml 的菌數比值；每次獨立實驗以三重覆數據換算出平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中較具代表性的一次。

紙錠分析 (Disc diffusion assay)

細菌在 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，稀釋 20 倍至 LB 液中培養至 OD₆₀₀ 約 0.3~0.4 左右，接著用無菌棉花棒沾取菌液均勻塗抹在 M9 培養基上，接著以無菌鑷子將紙錠置入培養基中央，再吸取 5 μ l 10 mM PQ 或 50 mM H₂O₂ 至紙錠上於 37°C 正置培養隔夜。

氧化壓力下的生長測試

培養隔夜後的細菌以 200 倍稀釋至 LB 培養液中，加入不同濃度的 PQ(100、300 或 600 μ M) 或 H₂O₂ (1、2 或 4 mM) 後再置於 37°C 培養，每隔 2 小時測量在波長 600 nm 的吸光值，所呈現的實驗數據為實驗組的 OD₆₀₀ 與未加入 H₂O₂ 或 PQ 的控制組 OD₆₀₀ 比值；每次獨立實驗以三重覆數據換算出平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中較具代表性的一次。

9. 基因回補質體建構

利用 PCR 增幅目標基因殖入 yT&A 載體中，經由次選殖至 pRK415 (41) 廣寄主載體後以電穿孔送入 *E. coli* S17-1 λ pir，再以接合作用轉入 CG43S3 中，將菌液均勻塗抹在含 tetracycline 的 M9 固態培養基，37°C 培養隔夜後以滅菌牙籤隨機挑選至少 25 顆單一菌落，分別劃於含 streptomycin、tetracycline 的 LB 固態培養基上，最後，挑選同時具 streptomycin 及 tetracycline 抗性的菌落，以 PCR 驗證預期基因片段大小。

10. 啟動子報告質體建構

將預測的啟動子片段或截短片段以 PCR 增幅後，接入 yT&A 選殖載體中，再轉殖至啟動子報導質體 pLacZ15 (50) 中，使啟動子片段與 lacZ 報導基因黏合，再藉由 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 活性評估報告啟動子的活性。

11. β -半乳糖苷酶活性評估

大致根據 Miller 方法 (56)，將隔夜培養之菌液以 100 倍稀釋於 LB 培養液中，待菌液 OD₆₀₀ 約 0.6~0.8 左右，未加或加入稀釋後濃度為 30 μ M 的 PQ 培養 40 分鐘，取 100 μ l 的待測菌液加入含有 900 μ l Z buffer (60 mM Na₂HPO₄、40 mM NaH₂PO₄、10 mM KCl、1 mM MgSO₄ 及 50 mM β -mercaptoethanol)、17 μ l 0.1% SDS 及 35 μ l 三氯甲烷 (chloroform) 混合液中，並於 30°C 水浴槽靜置 10 分鐘，隨即加入 200 μ l 的 4 mg/ml o-nitrophenyl, β -D-galactopyranoside (ONPG) 混合均勻靜置於 30°C 水浴槽，並開始計時至混合液變成黃色，再加入 500 μ l 1 M Na₂CO₃ 終止反應後測量波長 420 nm 下的吸光值；每次獨立實驗以三重覆數據換算出平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中較具代表性的一次。

12. 即時聚合酶連鎖反應測試

將培養隔夜之菌液以 100 倍稀釋分別培養於 LB 培養液、含 50 μM ferric ion 和 50 μM ascorbic acid 的 LB 培養液、含 200 μM dipyridyl 之 LB 培養液中，待菌液 OD_{600} 約 0.6~0.8 左右，將菌液以 13200 rpm 離心 5 分鐘後去掉上清液，再以 RNeasy Mini Kit 抽取全菌 RNA。接著將所抽出之 RNA 利用 AMV Reverse Transcriptase 及 random primer pDN 反轉錄成 cDNA 後，加入 SYBR Green PCR Master Mix 及待測基因之引子，隨即利用 PRISM 7000 HT platform (Applied Biosystems, USA) 的 SDS 2.1 software 執行即時聚合酶連鎖反應。

13. 抗酸能力評估

細菌在 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，以 20 倍稀釋至 LB 培養液中，培養至 OD_{600} 約 0.6~0.8 左右，取 1 ml 菌液，以每分鐘 15000 rpm 離心 5 分鐘後去掉上清液，加入 1 ml pH 4.4 的 LB 培養液適應 1 小時，最後移至 pH 3.0 的 M9 培養液中，培養 45 分鐘後，即取出 100 μl 的菌液系列稀釋至 10^{-6} 倍，並均勻的塗抹在 LB 固態培養基上，37°C 隔夜培養後數菌落數；存活率是以在 M9 培養液中培養 45 分鐘後，每 1 ml 存活的菌數和培養 0 小時每 1 ml 菌數的比值；每次獨立實驗以三重覆數據換算出平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中較具代表性的一次。

14. 細胞膜間隙蛋白質的抽取

大致根據 Neu 和 Heppel 的方法 (59)，依滲透壓差 (Osmotic Shock) 抽取膜間隙蛋白。首先將培養隔夜之菌液，以有無 30 μM PQ 處理約 40 分鐘後以 15000 rpm 離心 10 分鐘後去掉上清液，加入 1 ml osmotic shock buffer (30 mM Tris pH7.5、20% sucrose 及 10 mM EDTA) 室溫處理 1 分鐘後，隨即加入 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ lysozyme 20 μl 室溫下處理 10 分鐘，以 15000 rpm 離心 10 分鐘後去掉上清液，

再加入 100 μ l 冰的二次水或 5 mM Tris-HCl pH7.5 於冰上靜置 10 分鐘，最後以 15000 rpm 離心 10 分鐘，上清液即為細胞膜間隙的蛋白質。取適量膜間隙蛋白萃液（約 15 μ g）行超氧化歧化酶活性染色。

15. 西方免疫墨點法（Western blot）分析膜間隙蛋白質

將膜間隙蛋白質等比例混合蛋白質染劑（0.0626 M Tris-HCl pH 6.8、2% SDS、10% glycerol、0.01% bromophenol blue、及 100 mM dithiothreitol），並以 95°C 加熱 10 分鐘，取適量蛋白質（約 15 μ g）加入 13.5% SDS-PAGE 電泳分離蛋白（100 V、200 mA、140 分鐘）。蛋白質經膠電泳分離後，將膠上之蛋白質電泳 100 分鐘（140 V、400 mA）轉漬到聚偏二氟乙烯膜（polyvinylidene difluoride, PVDF; Millipore, Billerica, MA, USA）上，再以 5% 的脫脂牛奶 4°C 處理隔夜，接著加入一級抗體 anti- β lactamase 在室溫下 2 小時，再以經 5000 倍稀釋之二級抗體 alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G（Sigma）室溫下處理 1 小時，隨後加入呈色劑 BCIP（5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate）、NBT 及 alkaline phosphatase buffer（5 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 和 150 mM Tris-HCl pH9.5）避光呈色。

三、結果

建構 *sodA*、*sodB*、*sodC*、*katE*、*katG* 及 *rpoS* 基因缺損突變株

為了解在克雷白氏肺炎桿菌抗氧化系統的防禦機制，我分別建構 *sodA*、*sodB*、*sodC*、*katE*、*katG* 和 *rpoS* 基因缺損突變株。首先利用 PCR 增幅各個基因前後約 1000 bp 的 DNA 片段，將其結合成一段後接入自殺性載體 pKAS46，分別得到質體 pPO04、pPO08、pPO12、pPO16、pPO20 及 pPO24 (表二)，再以接合作用分別將各個質體送入克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3 中，藉同源序列重組互換及抗生素的篩選而得到基因缺損的突變株，最後利用引子確認各個基因的缺損。如圖一至圖六， $\Delta sodA$ 、 $\Delta sodB$ 、 $\Delta sodC$ 、 $\Delta katE$ 、 $\Delta katG$ 、 $\Delta rpoS$ 均可以 PCR 確認各個缺損的片段，分別獲得同源序列重組互換機率为 $\Delta sodA$ ：6.6%、 $\Delta sodB$ ：16.6%、 $\Delta sodC$ ：1.3%、 $\Delta katE$ ：6.6%、 $\Delta katG$ ：1% 及 $\Delta rpoS$ ：33%。

sodA、*sodB*、*sodC*、*katE*、*katG* 及 *rpoS* 基因缺損的影響

如圖七 A，*sodA*、*sodB*、*sodC*、*katE* 或 *rpoS* 基因缺損後，OD₆₀₀ 吸光值與 WT 無明顯差異，但是 $\Delta katG$ OD₆₀₀ 吸光值明顯比 WT 高，進一步利用塗盤數菌落的方式確認 *katG* 基因缺損後，隨著生長的時間拉長，單位菌數明顯比 WT 多許多 (圖七 B)，顯示 *katG* 基因缺損後生長速度變快；進一步分析各個基因缺損株外觀，如圖八 A，*sodA* 基因缺損後菌落變成大小不均一；*katG* 基因缺損後，菌液經離心後明顯形成沉澱 (圖八 B)，而 *sodB*、*sodC*、*katE* 或 *rpoS* 的基因缺損不造成細菌外觀上明顯的差異；測試各個基因缺損株的生物膜形成，發現各個基因缺損也不影響其生物膜的 formed 能力 (圖八 C)。

膠染色確認基因缺損影響抗氧化酵素的活性

為了量測個別抗氧化酵素基因的剔除後，克雷白氏肺炎桿菌中抗氧化酵素活性的變化，利用超音波震盪打破菌體後，以電泳方式將總蛋白於 polyacryamide

膠上展開後分析膠上超氧化歧化酶及過氧化氫酶活性。如圖九 A，*sodA* 及 *sodB* 基因缺損其相對轉譯的酵素活性消失；而 *sodC* 基因缺損其膠染色結果與 WT、*katE* 及 *katG* 基因缺損突變株沒有明顯差異；如圖九 B，*katE* 或 *katG* 的基因缺損，其相對轉譯的酵素活性消失。

***sodA* 或 *katG* 基因缺損對抗氧化能力的影響**

確認各個基因缺損影響抗氧化酵素的活性後，以 3 mM PQ 來測試各個基因缺損突變株的抗氧化能力的變化，如圖十 A，*rpoS* 或 *sodA* 基因缺損株存活率明顯比其他突變菌株的存活率較低；而以 10 mM PQ 紙錠測試，*sodA* 基因缺損株的生長抑制圈也明顯比其它菌株的大出許多（圖十 B）；最後，再將各個菌株培養於含不同濃度 PQ 的 LB 培養液中，如圖十 C，*sodA* 基因缺損株，無論是在含 100、300 或 600 μM PQ 的 LB 培養，其生長狀況都比其他菌株差許多，而 *rpoS* 或 *sodC* 基因缺損株在 600 μM PQ 培養液培養下也有明顯影響。

如圖十一 A，以 10 mM H_2O_2 添加於 LB 培養液中，*katG* 基因缺損株的存活率明顯的比其他菌株較低，而 *rpoS*、*sodA* 或 *katE* 基因缺損株的生存率也稍低；以含有 50 mM H_2O_2 紙錠處理，*katG* 基因缺損株的抑制圈比其它菌株明顯大許多（圖十一 B），而 *sodA* 基因缺損株的抑菌圈，比 WT 稍微大些；如圖十一 C，將各菌株培養在含有不同濃度的 H_2O_2 LB 中，*katG* 基因缺損株，在 1、2 或 4 mM H_2O_2 培養液的生長狀況都比其他菌株差許多，*rpoS* 基因缺損株則是在 2 或 4 mM H_2O_2 培養液培養下有明顯差異，而 ΔsodA 、 ΔsodB 、 ΔsodC 或 ΔkatE 在 4 mM H_2O_2 培養液培養下也有明顯差異。

***sodA* 及 *katG* 基因回補實驗**

如圖十二 A，disc diffusion assay 顯示利用 pRK415 載體回補 *katG* 基因至 *katG* 基因缺損株後使抑菌圈縮小許多；而膠電泳染色結果也發現回補 *katE* 或 *katG* 基因後在膠上可染色定位 KatE 或 KatG 的活性（圖十二 B）。如圖十三 A，利用

pRK415 載體回補 *sodA* 基因至 *sodA* 基因缺損株後，發現菌落的大小不一會回復到與 WT 相同的大小均一，確認了 *sodA* 基因缺損株菌落大小不一是因 *sodA* 基因剔除造成；而 disc diffusion assay 也顯示回補 *sodA* 基因使抑菌圈小許多（圖十三 B）；最後，膠電泳染色結果也發現回補 *sodA* 或 *sodB* 基因後在膠上可染色定位 SodA 或 SodB 的活性（圖十三 C）。

sodA 啟動子活性分析

接著以 Softberry 分析 *sodA* 基因上游非轉譯區的序列(圖十四 A)，發現 ArcA binding box，而以目測分析發現 *pecO*-like sequence 及 Fur binding box，再進一步以 RNAhybrid 分析找到 small RNA RyhB 與 *sodA* 啟動子的 binding sequence（圖十四 B），並可預測其結合的構型（圖十四 C）。

進一步以此分析結果為依據建構了含三種不同長度 *sodA* putative promoter P_{sodA1} 、 P_{sodA2} 、 P_{sodA3} 分別與 LacZ 報導系統結合的質體，如圖十五 A， P_{sodA2} 少了 RNAhybrid 軟體預測的 RyhB 結合序列，而 P_{sodA3} 只包含 Fur binding box。Fur 曾被證明會調控 *sodA* 的表現（33、83）；而在膿桿菌中證實 PecS 會與具有迴文序列之 *pecO* 結合進而抑制下游基因表現（69、70）。進一步測試 *sodA* 啟動子活性，結果如圖十五 B，無論在有無 PQ 的處理下，相較於 P_{sodA1} ， P_{sodA2} 活性增加了十至二十倍；*sodA* 啟動子活性在 Δfur 或 $\Delta fur\Delta rylhB$ 中明顯大於其他菌株，但 $\Delta fur\Delta rylhB$ 在 P_{sodA1} 下的活性明顯比 Δfur 還低，且在 $\Delta rylhB$ 中活性也是較低，而在 P_{sodA2} 或 P_{sodA3} 則無此現象；另外在 *pecS* 基因缺損情況下無經過 PQ 的處理， P_{sodA1} 或 P_{sodA2} 活性有稍低的現象。

Fur 或 RyhB 對 *sodA* 基因表現的影響

接著利用即時聚合酶連鎖反應來測試 Fur 或 RyhB 對於 *sodA* 的基因表現是否有影響，結果如圖十六，當 *fur* 基因剔除後，*sodA* 表現量明顯增加，將 WT 培養於富含亞鐵離子的 LB 培養液後，*sodA* 表現量明顯下降，而將 WT 培養於含亞

鐵離子螯合劑 dipyrityl 的缺鐵 LB 培養液後，*sodA* 表現量明顯上升；另外，將 *fur* 及 *ryhB* 雙基因剔除後，*sodA* 表現量比 *fur* 單一基因剔除後明顯降低許多，而利用載體攜帶 *ryhB* 基因至各菌株後，*sodA* 表現量有明顯的上升。

RpoS、SoxRS、YjcC、MrkH 或 RcsB 在調控 *sodA* 的路徑上扮演角色

為了解過氧化逆境相關的調控分子 *soxRS*、*yjcC*、*mrkH* 或 *fur* 在氧化壓力下的重要性，測試各個基因缺損株的抗氧化能力的結果如圖十七 A，在 3 mM PQ 處理下， $\Delta soxRS$ 、 $\Delta yjcC$ 或 $\Delta mrkH$ 存活率都比野生株低，而 Δfur 卻無明顯影響；由 (B)、(C) 圖可知將 *soxRS*、*yjcC* 或 *mrkH* 基因剔除後，在含 10 mM PQ 紙錠 LB 培養基上， $\Delta soxRS$ 、 $\Delta yjcC$ 或 $\Delta mrkH$ 的抑菌圈比野生株的抑菌圈要大。另外為了探究與過氧化逆境相關的調控分子 *rpoS*、*soxRS*、*yjcC*、*mrkH*、*rscB* 基因缺損突變株是否會參與 *sodA* 的表現調控，將利用 LacZ 報導系統來做測試，結果如圖十八：在 *rpoS*、*soxRS*、*yjcC*、*mrkH* 或 *rscB* 基因缺損情況下， P_{sodA1} 的活性有降低的現象。

***rpoS*、*sodA*、*katG*、*yjcC* 或 *rscB* 基因缺損對抗酸能力的影響**

許多文獻報導顯示，細菌體內的抗氧化與抗酸機制息息相關 (11、74、76)，所以，我們也將測試與過氧化逆境相關的調控分子及抗氧化酵素基因缺損突變株的抗酸能力，結果如圖十九：當各個基因缺損突變株在 pH 3.0 的 M9 培養液培養後，*rpoS*、*sodA*、*katG*、*yjcC* 或 *rscB* 基因缺損後的存活率明顯下降，而 *fur* 基因缺損後則相反。

SodA 的 N 端氨基酸序列比對

最近報導，根瘤菌及大腸桿菌 SodA 缺乏訊號胜肽，仍可靠 N 端 10 個氨基酸以 SecA-dependent 方式，將 SodA 由細胞質送到細胞膜間隙 (44)。我們利用 VectorNTI 軟體比較發現克雷白氏肺炎桿菌 SodA、SodB 與大腸桿菌及根瘤菌

SodAN 端 10 個氨基酸相似度很高 (圖二十 A)，暗示著克雷白氏肺炎桿菌 SodA 或 SodB 可藉 SecA-dependent 方式分泌至細胞膜間隙；同時比較 SodC 發現 SodA、SodB 與含有訊號胜肽的 SodC N 端氨基酸差異度極大 (圖二十 B)。

SodA、SodB 和 SodC 皆會出現在細胞膜間隙

將不同的菌株分別有無經過 30 μ M PQ 處理後，再利用滲透壓差 (59) 抽取細胞膜間隙蛋白，接著以 13.5% native polyacrylamide gel 以電泳分離蛋白，並行膠染色分析超氧化歧化酶活性。結果如圖二十一，在 LB 液培養下，WT 的 SodA 及 SodB 的酵素活性皆有出現在膜間隙，*sodA* 及 *sodB* 基因缺損株在膜間隙的相對酵素活性消失，而 SodA 及 SodB 的酵素活性可在 *sodC* 基因缺損株中發現；經過 30 μ M PQ 處理後，膜間隙的 SodC 酵素活性在 *sodA* 基因缺損的情況下明顯表現，在膠上的位置與 SodA 相近。此實驗在菌株培養至 stationary phase 或 log phase (OD_{600} 約 0.6~0.8) 時結果相同。我們同時利用西方免疫墨點法來針對細胞膜間隙的標記 β lactamase 進行呈色分析，結果可以看到膜間隙蛋白的 anti- β lactamase 呈色比全蛋白明顯許多，證明所萃取出之蛋白為細胞膜間隙蛋白質。

四、討論

地球上由氧、氮所造成的氧化壓力環境處處可見，細菌除了環境的氧化壓力外，還有體內形成的氧化壓力，感染宿主時也會面臨相當大的超氧自由基的攻擊 (26、38)，為了適應環境而生存，細菌對抗氧化壓力的防禦機制因而相當重要。

在有氧環境中，研究較透徹的是 SoxRS 及 OxyR 抗氧化機制的調控系統 (7、61)，而在無氧情況下，以 Fnr 及 ArcAB 為主要調控系統 (20、52)，當這些調控分子在感受到氧化壓力的威脅時，即促使抗氧化酵素的產生。克雷白氏肺炎桿菌中，主要的抗氧化酵素為超氧化歧化酶 SodA、SodB 及 SodC、過氧化氫酶 KatE 及 KatG，這些抗氧化酵素在大腸桿菌裡已有許多相關研究，而在克雷白氏肺炎桿菌則相對較少。本研究發現 *katG* 基因剔除後，生長速度明顯變快且菌體較容易被離心沉澱、菌落黏性明顯的降低，由此推測 *katG* 基因缺損可能降低其莢膜生成量，細菌因不用耗費能量去生合成莢膜而使生長速度變快；而 *sodA* 基因剔除後，菌落型態變成大小不一，這些改變可能為一相位變化 (phase variation)。已知，細菌在惡劣環境或處於較不好的狀況時，可藉由相位變化改變本身的型態而存活 (87)。因此，我們推測 *sodA* 或 *katG* 基因剔除使菌株對抗氧化壓力的能力降低而累積 ROS， $\Delta sodA$ 或 $\Delta katG$ 突變株為了生存而改變其外膜或莢膜組成以避免 ROS 攻擊。

RpoS 是一 stationary phase 的 sigma factor，負責調控許多基因的表現，其中也包含了抗氧化酵素的調控 (2、23、24)。克雷白氏肺炎桿菌 CG43 的 *rpoS* 基因被剔除後，在 PQ 或 H_2O_2 處理下的生存率明顯降低；除 $\Delta rpoS$ 外，*sodA* 和 *katG* 基因的缺損對於克雷白氏肺炎桿菌的抗氧化能力有較大的影響，另外我們利用不同濃度的 PQ 或 H_2O_2 來測試各個基因缺損後的生長情形，結果可以看到 $\Delta sodA$ 在 100 μM PQ 或 $\Delta katG$ 在 1 mM H_2O_2 處理下，生長明顯受到影響，而當 PQ 濃度提升至 300 μM 或 600 μM 後， $\Delta rpoS$ 和 $\Delta sodC$ 生長情形也明顯較差；當 H_2O_2 濃度提升至 2 mM 後， $\Delta rpoS$ 生長受到抑制，而以 4 mM H_2O_2 處理時， $\Delta sodA$ 、

$\Delta sodB$ 和 $\Delta katE$ 生長也受到明顯影響，以上實驗結果暗示著：雖然我們利用不同的抗氧化能力測試方法及回補實驗均確認克雷白氏肺炎桿菌主要以超氧化歧化酶 SodA 來對抗 $O_2^{\cdot-}$ 、過氧化氫酶 KatG 對抗 H_2O_2 ，但 RpoS、SodB、SodC 或 KatE 可能在不同環境或不同濃度的氧化攻擊下扮演著重要角色，藉由不同的抗氧化酵素間的相互合作，消滅各種氧化威脅才可存活下來。

大腸桿菌 *sodA* 基因為 SoxRS 及 Fur 所調控 (19、33、83)，而我們分析 *sodA* 基因啟動子序列，發現 ArcA binding box、*pecO*-like sequence、Fur binding box 及 small RNA RyhB 的 binding sequence。我們依啟動子分析的結果建構了三種含不同長度的 *sodA* putative promoter P_{sodA1} 、 P_{sodA2} 、 P_{sodA3} 的 LacZ 報導質體，活性分析結果顯示無論在有無 PQ 的處理下，Fur 會抑制 *sodA* 基因表現、RyhB 則促進 *sodA* 表現，另外當 $\Delta pecS$ 未以 PQ 處理的情況下， P_{sodA1} 和 P_{sodA2} 活性比起 WT 有稍低的情形，顯示 PecS 在一般正常情況下可能會影響 *sodA* 的表現，但並不是很主要的調控者。

進一步以 qRT-PCR 確認 Fur 與 RyhB 對 *sodA* 基因的調控關係。在鐵離子濃度充足情況下，*ryhB* 會被 *fur* 抑制 (89)，只有在 *fur* 基因缺損時 *ryhB* 基因始有表現；比較 Δfur 及 $\Delta fur\Delta ryhB$ 突變株，可發現在 *fur* 基因缺損下，*sodA* 基因的表現量明顯上升，而在 $\Delta fur\Delta ryhB$ 突變株中，*sodA* 的表現比起 Δfur 則明顯下降；大量表現 *ryhB* 基因後也可以觀察到 *sodA* 基因的表現明顯上升。Fur 的調控作用與亞鐵離子 (Fe^{2+}) 濃度有關，Fur 與亞鐵離子結合後的活性複合體才會結合 Fur box 序列，進而抑制下游基因的表現 (89)。所以，將 CG43S3 培養在富含亞鐵離子的環境下，Fur 活性上升而 *sodA* 基因表現量下降；當環境缺乏亞鐵離子時，*sodA* 基因表現量則上升。綜合 LacZ 報導系統及 qRT-PCR 的結果顯示：Fur 經由 *sodA* 啟動子上 Fur box 扮演 repressor 角色 (圖二十二黑色路徑)；*sodA* 啟動子上的 RyhB binding sequence 的二級結構會抑制 *sodA* 基因表現，而 RyhB 結合這段序列打開二級結構後間接促使 *sodA* 基因表現 (圖二十二藍色路徑)。此外，文獻報導 RyhB 會在 post-transcription level 以帶有三個 loop 的二級結構結合在 *sodB*

mRNA 上，促使 *sodB* mRNA 降解，抑制 *sodB* 的表現 (53、95) (圖二十二紅色路徑)。

大腸桿菌 *sodA* 由 SoxRS 所調控 (19)，而在 PQ 的處理下， Δ *soxRS*、 Δ *yjcC*、 Δ *mrkH* 的生存率測試或紙錠分析均顯示抗氧化能力降低，而 Δ *fur* 則無明顯改變，由 LacZ 報導系統的結果可以看到，在 Δ *rpoS*、 Δ *soxRS*、 Δ *yjcC*、 Δ *mrkH* 或 Δ *rscB* 下的 *sodA* 啟動子活性，與 WT 比較起來有降低的情形，此暗示著 RpoS、SoxRS、YjcC、MrkH 或 RcsB 可能在調控 *sodA* 的路徑上扮演角色。

許多文獻報導說明細菌的抗氧化與抗酸機制息息相關，在乳酸球菌和金黃色葡萄球菌中，SodA 已被證明與抗酸能力有關 (74)，而在大腸桿菌裡的過氧化氫酶，也被證實與抗酸能力相關 (76)；CG43S3 抗酸能力測試發現 *rscB* 基因剔除後，其抗酸的能力明顯下降，*rscB* 參與莢膜多醣體生合成的調控，與克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力相關 (1、31)，我們利用 LacZ 報導系統的結果可以看到 *rscB* 基因缺損後，*sodA* 啟動子活性降低，顯示 RcsB 可能會調控 *sodA* 的表現，除了 Δ *rscB* 外，與抗氧化逆境相關的 *rpoS*、*sodA*、*katG* 或 *yjcC* 基因剔除後，其抗酸的能力也明顯下降，這些結果暗示著：克雷白氏肺炎桿菌裡的抗氧化及抗酸機制也有相當的關聯性。另一方面，將 *rscB* 基因剔除後，其莢膜生成量降低，且抗酸的能力明顯下降，*katG* 基因剔除後，與此結果相似，而將 *fur* 基因剔除後，莢膜的生成量大增，且其抗酸的能力變強；克雷白氏肺炎桿菌的莢膜為重要的致病因子 (4、57、62、67、91)，實驗結果暗示著克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力與其莢膜的生合成量有關聯，但其作用機制還不清楚。

在大腸桿菌及根瘤菌中，不含訊號勝肽的 SodA 可靠 N 端 10 個氨基酸以 SecA-dependent 方式，將 SodA 由細胞質送到細胞膜間隙 (44)。而一樣缺乏訊號勝肽的 SodB，也被認為會出現在大腸桿菌的膜間隙 (79)。我們發現克雷白氏肺炎桿菌的 SodA 及 SodB 與大腸桿菌及根瘤菌的 SodA 有相似的 N 端序列，也發現 SodA、SodB 和 SodC 皆會出現在細胞膜間隙，此結果暗示著克雷白氏肺炎桿菌 SodA 或 SodB 也藉 N 端 10 個氨基酸以 SecA-dependent 方式送至膜間隙；

另外，我們也發現 SodC 須先經 30 μM PQ 處理後，才能明顯觀察到其酵素活性，此結果暗示著在一般生長情況下 SodA 及 SodB 會出現在細胞質及膜間隙中，而當環境中 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 增加時，*sodC* 才表現而被送至細胞膜間隙中。

SodC 為在 stationary phase 才會有表現的蛋白，且在無氧的狀況下被 Fnr 所抑制 (29、30、43)。但是，我們將菌株培養在有氧的情況至 stationary phase 時，未以 PQ 處理看不到 SodC 表現 (圖二十一)，而當菌株培養至 log phase (OD_{600} 約 0.6~0.8) 再經 PQ 處理後，即可以膠染色方式在 ΔsodA 下看到 SodC 表現，這些結果暗示著在克雷白氏肺炎桿菌超氧化歧化酶 SodC 的表現是必須有氧化壓力 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 才會被誘導表現。沙門氏菌有 SodCI 及 SodCII，其 *sodC* 基因的表現也由 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 誘導，但 SodCI 扮演較重要的角色，並會促使過氧化氫酶表現 (45、86)。

克雷白氏肺炎桿菌 *sodC* 基因缺損後，利用酵素活性染色分析可以看到，在巴拉刈的攻擊下膜間隙 SodA 的表現明顯比 SodB 增加，且實驗室利用轉錄體 (transcriptome) 分析結果也顯示當 CG43S3 經過 PQ 處理後，*sodA* 基因的表現約為原本的 4.3 倍，代表大量外來的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 也會促使 *sodA* 基因表現上升。相對於大腸桿菌 *sodA* 只在有氧的環境且受到體內的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 誘導而表現 (19、22)，我們的結果顯示克雷白氏肺炎桿菌 SodA 不僅僅負責消滅細菌體內的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ，也參與了對抗外來的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ，而 SodC 只負責細胞膜間隙的部分。

有文獻報導 *sodB* 是有氧及無氧環境下的 housekeeping 基因 (48)，會受 Fur 促進及 RyhB 的抑制 (53、95)，由 PQ 測試結果發現將 *sodB* 基因剔除後，對細菌抗氧化壓力的存活率影響不大，且對抗酸能力也無明顯影響，這結果與大腸桿菌 SodB 相同 (11)，但這些實驗均在有氧環境下測試，因在無氧環境下 SodA 及 SodC 皆不表現 (20、22、30)，所以，我們相信 SodB 在無氧環境下扮演重要的抗氧化壓力角色。

細菌體內的調控路徑複雜，在不同的環境、不同的生長階段或面臨不同的刺激，其所負責的調控分子或是感應的路徑可能不一樣，經由不同分子之間的交互作用而促使產生特定的蛋白質來對抗氧化壓力。而從我們的實驗結果知道：克雷

白氏肺炎桿菌超氧化歧化酶 SodA 在對抗 $O_2^{\cdot-}$ 中扮演重要的角色，*sodA* 基因的表現可被 Fur 抑制或被 small RNA RyhB 促進，且與環境中鐵離子濃度息息相關，small RNA 通常扮演負向調控角色，但近來也有文獻報導其正向調控的機制（68、72），本研究的結果就是個例子，但其調控方式必須再更深入研究。



五、參考文獻

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. 國立交通大學碩士學位論文.
2. **Alberto S. Z., Socorro G. C., and Ernesto P. R.** 2011. A comparative genome analysis of the RpoS-sigmulon shows a high diversity of responses and origins. *Microbiology*. **157**:1393-401.
3. **Altuvia S., Almirón M., Huisman G., Kolter R., and Storz G.** 1994. The dps promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Mol Microbiol*. **13**:265–272.
4. **Amako K., Meno Y., and Takade. A.** 1988. Fine structure of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol*. **170**:4960–4962.
5. **Amikam D. and Galperin M. Y.** 2006. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics*. **22**:3–6.
6. **Anand A., Duk B. T., Singh S., Akbas M. Y., Webster D. A., Stark B. C., and Dikshit K. L.** 2010. Redox-mediated interactions of VHb (*Vitreoscilla* haemoglobin) with OxyR: novel regulation of VHb biosynthesis under oxidative stress. *Biochem J*. **426**:271–280.
7. **Anjem A., Varghese S., and Imlay J. A.** 2009. Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **72**:844–858.
8. **Beauchamp C. and Fridovich I.** 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*. **44**:276–287.
9. **Benov L. T. and Fridovich I.** 1994. *Escherichia coli* express a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem*. **269**:25310–25314.
10. **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**:248-254.

11. **Bruno-Bárcena J. M., Azcárate-Peril M. A., and Hassan H. M.** 2010. Role of Antioxidant enzymes in bacterial resistance to organic acids. *Applied and Environmental Microbiology.* **76**:2747–2753.
12. **Chang F. Y. and Chou M. Y.** 1995. Comparison of pyogenic liver abscesses caused by *Klebsiella pneumoniae* and non-*K. pneumoniae* pathogens. *J Formos Med Assoc.* **94**:232–237.
13. **Chang H. Y., Lee J. H., Deng W. L., Fu T. F., and Peng H. L.** 1996. Virulence and outer membrane properties of a *galU* mutant of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microb Pathog.* **20**:255–261.
14. **Chen K. Y., Hsueh P. R., Liaw Y. S., Yang P. C., and Luh K. T.** 2000. A 10-year experience with bacteriology of acute thoracic empyema: emphasis on *Klebsiella pneumoniae* in patients with diabetes mellitus. *Chest.* **117**:1685–1689.
15. **Christen M., Christen B., Allan M. G., Folcher M., Jenö P., Grzesiek S., and Jenal U.** 2007. DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104**:4112–4117.
16. **Chuang Y. P., Fang C. T., Lai S. Y., Chang S. C., and Wang J. T.** 2006. Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary liver abscess. *J Infect Dis.* **193**:645–654.
17. **Clare D. A., Duong M. N., Darr D., Archibald F., and Fridovich I.** 1984. Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Anal Biochem.* **140**:532–537.
18. **Colodner R., Raz R., Chazan B., and Shkran W.** 2004. Susceptibility pattern of extended-spectrum beta-lactamase producing bacteria isolated from inpatients

to five antimicrobial drugs in a community hospital in Northern Israel. *Int J Antimicrob Agents*. **24**:409–410.

- 19. Compan I. and Touati D.** 1993. Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*. **175**:1687–1696.
- 20. Cruz-Ramos H., Crack J., Wu G., Hughes M. N., Scott C., Thomson A. J., Green J., and Poole R. K.** 2002. NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *The EMBO Journal*. **21**:3235–3244.
- 21. de Lorenzo V. and Timmis K. N.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol*. **235**:386–405.
- 22. Dimple B.** 1991. Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu Rev Genet*. **25**:315–337.
- 23. Dong T. and Schellhorn H. E.** 2009. Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *BMC Genomics*. **10**:349.
- 24. Dong T. and Schellhorn H. E.** 2010. Role of RpoS in Virulence of Pathogens. *Infection And Immunity*. **78**:887–897.
- 25. D'Orazio M., Scotti R., Nicolini L., Cervoni L., Rotilio G., Battistoni A., and Gabbianelli R.** 2008. Regulatory and structural properties differentiating the chromosomal and the bacteriophage-associated *Escherichia coli* O157:H7 Cu, Zn Superoxide Dismutases. *BMC Microbiology*. **8**:166.
- 26. Ehrt S. and Schnappinger D.** 2009. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cellular Microbiology*. **11**:1170–1178.
- 27. French G. L., Shannon K. P., and Simmons N.** 1996. Hospital outbreak of

- Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. *J Clin Microbiol.* **34**:358–363.
- 28. Gerlach G. F., Clegg S., and Allen B. L.** 1989. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol.* **171**:1262–1270.
- 29. Gort A. S., Ferber D. M., and Imlay J. A.** 1999. The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **32**:179–191.
- 30. Gort A. S., Ferber D. M., and Imlay J. A.** 2002. The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology.* **32**:179–191.
- 31. Gottesman S., Trisler P., and Torres-Cabassa A.** 1985. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J Bacteriol.* **162**:1111–1119.
- 32. Gu M. and Imlay J. A.** 2011. The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. *Molecular Microbiology.* **79**:1136–1150.
- 33. Hassan H. M. and Sun H. C.** 1992. Regulatory roles of Fnr, Fur, and Arc in expression of manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**:3217–3221.
- 34. Hengge R.** 2009. Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Net Rev Microbiol.* **7**:263–273.
- 35. Hennequin C. and Forestier C.** 2009. *oxyR*, a LysR-Type regulator involved in *Klebsiella pneumoniae* mucosal and abiotic colonization. *Infection And Immunity.* **77**:5449–5457.

36. **Hirsch E. B. and Tam V. H.** 2010. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother.* **65**:1119–1125.
37. **Imlay J. A.** 2003. Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* **57**:395–418.
38. **Imlay J. A.** 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* **77**:755–776.
39. **Jangiam W., Loprasert S., Smith D. R., and Tungpradabkul S.** 2010. *Burkholderia pseudomallei* RpoS regulates OxyR and the KatG-dpsA operon under conditions of oxidative stress. *Microbiol Immunol.* **54**:389-397.
40. **Keele B. B., Jr., McCord J. M., and Fridovich I.** 1970. Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme. *J Biol Chem.* **245**:6176–6181.
41. **Keen N. T., Tamaki S., Kobayashi D., and Trollinger D.** 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene.* **70**:191–197.
42. **Keynan Y., and Rubinstein E.** 2007. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. *Int J Antimicrob Agents.* **30**:385–389.
43. **Korshunov S. and Imlay J. A.** 2006. Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **188**:6326–6334.
44. **Krehenbrink M., Edwards A., and Downie J. A.** 2011. The superoxide dismutase SodA is targeted to the periplasm in a SecA-dependent manner by a novel mechanism. *Molecular Microbiology.* **82**:164–179.
45. **Krishnakumar R., Craig M., Imlay J. A., and Slauch J. M.** 2004. Differences in enzymatic properties allow SodCI but not SodCII to contribute to virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain 14028. *J Bacteriol.*

186:5230–5238.

46. **Kumarasamy K. K., Toleman M. A., Walsh T. R., Bagaria J., Butt F., Balakrishnan R., Chaudhary U., Doumith M., Giske C. G., Irfan S., Krishnan P., Kumar A. V., Maharjan S., Mushtaq S., Noorie T., Paterson D. L., Pearson A., Perry C., Pike R., Rao B., Ray U., Sarma J. B., Sharma M., Sheridan E., Thirunarayan M. A., Turton J., Upadhyay S., Warner M., Welfare W., Livermore D. M., and Woodford N.** 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* **10**:597–602.
47. **Lai Y. C., Peng H. L., and Chang H. Y.** 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.
48. **Leclère V., Chotteau-Lelièvre A., Gancel F., Imbert M., and Blondeau R.** 2001. Occurrence of two superoxide dismutases in *Aeromonas hydrophila*: molecular cloning and differential expression of the *sodA* and *sodB* genes. *Microbiology.* **147**:3105–3111.
49. **Lee H. J., Park K. J., Lee A. Y., Park S. G., Park B. C., Lee K. H., and Park S. J.** 2003. Regulation of *fur* expression by RpoS and Fur in *Vibrio vulnificus*. *J Bacteriol.* **185**:5891–5896.
50. **Lin C. T., Huang T. Y., Liang W. C., and Peng H. L.** 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**:429–438.
51. **Loewen P. C., Switala J., and Triggs-Raine B. L.** 1985. Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* induced independently. *Arch Biochem Biophys.* **243**:144–149.

52. **Loui C., Chang A. C., and Lu S.** 2009. Role of the ArcAB two-component system in the resistance of *Escherichia coli* to reactive oxygen stress. *BMC Microbiology*. **9**:183.
53. **Masse E., Salvail H., Desnoyers G., and Arguin M.** 2007. Small RNAs controlling iron metabolism. *Current Opinion in Microbiology*. **10**:140–145.
54. **Méndez-Ortiz M. M., Hyodo M., Hayakawa Y., and Membrillo-Hernández J.** 2006. Genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger 3', 5'-cyclic diguanylic acid. *J Bio Chem*. **281**:8090–8099.
55. **Merighi M., Lee V. T., Hyodo M., Hayakawa Y., and Lory S.** 2007. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. **65**:876–895.
56. **Miller J. H.** 1972. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY M7
57. **Mizuta K., Ohta M., Mori M., Hasegawa T., Nakashima I., and Kato N.** 1983. Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infect Immun*. **40**:56–61.
58. **Mmendola S., Pasquali P., Pacello F., Rotilio G., Castor M., Libby S. J., Figueroa-Bossi N., Bossi L., Fang F. C., and Battistoni A.** 2008. Regulatory and structural differences in the Cu, Zn-superoxide dismutases of *Salmonella enterica* and their significance for virulence. *J Biol Chem*. **283**:13688–13699.
59. **Neu H. C. and Heppel L. A.** 1965. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J Biol Chem*. **240**:3685–3692.
60. **Nordmann P., Cuzon G., and Naas T.** 2009. The real threat of *Klebsiella*

pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis. **9**:449–461.

- 61. Nunoshiba T., Hidalgo E., Amábile Cuevas C. F., and Demple B.** 1992. Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox inducible expression of the *soxS* regulatory gene. J Bacteriol. **174**:6054–6060.
- 62. Pan Y. J., Fang H. C., Yang H. C., Lin T. L., and Hsieh P. F.** 2008. Capsular Polysaccharide Synthesis Regions in *Klebsiella pneumoniae* Serotype K57 and a New Capsular Serotype. J Clin Microbiol. **46**:2231–2237.
- 63. Park K. J., Kang M. J., Kim S. H., Lee H. J., Lim J. K., Choi S. H., Park S. J., and Lee K. H.** 2004. Isolation and characterization of *rpoS* form a pathogenic bacterium, *Vibrio vulnificus*: role of σ^s in survival of exponential-phase cells under oxidative stress. J Bacteriol. **186**:3304–3312.118
- 64. Perera I. C. and Grove A.** 2010. Urate is a ligand for the transcriptional regulator PecS. J Mol Biol. **402**:539-51
- 65. Podschun R. and Ullmann U.** 1992. *Klebsiella* capsule type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. J Med Microbiol. **36**:250–254.
- 66. Podschun R. and Ullmann U.**1998. *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. **11**:589–603.
- 67. Podschun R., Fischer A., and Ullmann U.**1992. Siderophore production of *Klebsiella* species isolated from different sources. Zentralbl Bakteriol. **276**:481–486.
- 68. Prévost K., Salvail H., Desnoyers G., Jacques J-F, Phaneuf É., and MasséE.** 2007. The small RNA RyhB activates the translation of *shiA*mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis.

Molecular Microbiology. **64**:1260–1273.

- 69. Reverchon S., Rouanet C., Expert D., and Nasser W.** 2002. Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. *J Bacteriol.* **184**:654–665.
- 70. Rouanet C. and Nasser W.** 2001. The PecM protein of the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*, membrane topology and possible involvement in the efflux of the blue pigment indigoidine. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **3**:309–318.
- 71. Ryjenkov D. A., Simm R., Römling U., and Gomelsky M.** 2006. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem.* **281**:30310–30314.
- 72. Salvaila H., Lanthier-Bourbonnaise P., Sobotab J. M., Cazac M., Benjamina J-A M., Sequeira Mendietaa M. E., Lépinec F., Dozoisc C. M., Imlay J., and Masséa E.** 2010. A small RNA promotes siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling. *PNAS.* **107**:15223–15228.
- 73. Sambrook J. and Russell D. W.** 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*—3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 74. Sanders J. W., Leenhouts K. J., Haandrikman A. J., Venema G., and Kok J.** 1995. Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J Bacteriol.* **177**:5254–5260.
- 75. Schellhorn H. E. and Hassan H. M.** 1988. Transcriptional regulation of *katE* in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **170**:4286–4292.
- 76. Schellhorn H. E. and Stones V. L.** 1992. Regulation of *katF* and *katE* in *Escherichia coli* K-12 by weak acids. *J Bacteriol.* **174**:4769–4776.

77. **Schirmer T. and Jenal U.** 2009. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signaling. *Nat Rev Microbiol.* **7**:724–735.
78. **Schmidt A. J., Ryjenkov D. A., and Gomelsky M.** 2005. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domain. *J Bacteriol.* **187**:4774–4781.
79. **Serres M. H., Goswami S., and Riley M.** 2004. GenProtEC: an updated and improved analysis of functions of *Escherichia coli* K-12 proteins. *Nucleic Acids Res.* **32**:300–302.
80. **Skorupski K. and Taylor R. K.** 1996. Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene.* **169**:47–52.
81. **Storz G., Tartaglia L. A., and Ames B. N.** 1990. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science.* **248**:189–194.
82. **Svanborg E. C. and de Man P.** 1987. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am.* **1**:731–750.
83. **Tardat B. and Touati D.** 1991. Two global regulators repress the anaerobic expression of MnSOD in *Escherichia coli*: *fur* (ferric uptake regulation) and *Arc* (aerobic respiration control). *Mol Microbiol.* **5**:455–465.
84. **Tomas J. M., Camprubi S., Merino S., Davey M. R., and Williams P.** 1991. Surface exposure of O1 serotype lipopolysaccharide in *Klebsiella pneumoniae* strains expressing different K antigens. *Infect Immun.* **59**:2006–2011.
85. **Tsay R. W., Siu L. K., Fung C. P., and Chang F. Y.** 2002. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arch Intern Med.* **162**:1021–1027.
86. **Uzzau S., Bossi L., and Figueroa-Bossi N.** 2002. Differential accumulation of

Salmonella [Cu, Zn] superoxide dismutases SodCI and SodCII in intracellular bacteria: correlation with their relative contribution to pathogenicity. *Mol Microbiol.* **46**:147–156.

87. **van der Woude, M. W., and Bäuml A. J.** 2004. Phase and Antigenic Variation in Bacteria. *Microbiol Rev.* **17**:581-611.
88. **Vasilievaa S. V., Streltsovaa D. A., Moshkovskayaa E. Yu., Saninab N. A., and Aldoshinb S. M.** 2010. Fnr[4Fe-4S]²⁺ protein regulates the *aidB* gene expression in *Escherichia coli* cultured under anaerobic conditions. *Doklady Biochemistry And Biophysics.* **433**:179–182.
89. **Veerek B., Moll I., and Bläsi U.** 2007. Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *The EMBO Journal.* **26**:965–975.
90. **Wang J. H., Liu Y. C., Lee S. S., Yen M. Y., Chen Y. S., Wann S. R., and Lin H. H.** 1998. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis.* **26**:1434–1438.
91. **Williams P., Lambert P. A., Brown M. R., and Jones R. J.** 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**:2181–2191.
92. **Yang Y., McCue L. A., Parsons A. B., Feng S., and Zhou J.** 2010. The tricarboxylic acid cycle in *Shewanella oneidensis* is independent of Fur and RyhB control. *BMC Microbiology.* **10**:264.
93. **Yong D., Toleman M. A., Giske C. G., Che H. S., Sundman K., Lee K., and Walsh T. R.** 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**:5046–5054.

94. **Yoshikawa T. and Naito Y.** 2002. What Is Oxidative Stress? *JMAJ*. **45**:271–276.
95. **Yost F. J., Jr., and Fridovich I.** 1973. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. **248**:4905–4908.
96. **Yu W. L., Ko W. C., Cheng K. C., Lee H. C., Ke D. S., Lee C. C., Fung C. P., and Chuang Y. C.** 2006. Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis*. **42**:1351–1358.



表一、本研究所使用和建構的菌株

細菌菌株	基因型或相關特性	來源或參考文獻
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1 glnV44 endA1 thi-1 relA1 gyrA96 mcrB⁺</i> <i>Δ(lac-proAB) e14-[F' traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ</i> <i>ΔM15]hsdR17(r_Km_K⁺)</i>	Laboratory stock
S17-1 λpir	<i>hsdR⁻M⁺ recA pro thi</i> Tp ^f Sm ^r (RP4-2-Tc::Mu; Km::Tn7)(λpir)	(21)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
CG43S3	Clinical isolate of K2 serotype, Sm ^r	(47)
Δ <i>sodA</i>	CG43S3 Δ <i>sodA</i> , Sm ^r	This study
Δ <i>sodB</i>	CG43S3 Δ <i>sodB</i> , Sm ^r	This study
Δ <i>sodC</i>	CG43S3 Δ <i>sodC</i> , Sm ^r	This study
Δ <i>katE</i>	CG43S3 Δ <i>katE</i> , Sm ^r	This study
Δ <i>katG</i>	CG43S3 Δ <i>katG</i> , Sm ^r	This study
Δ <i>rpoS</i>	CG43S3 Δ <i>rpoS</i> , Sm ^r	This study
Δ <i>soxRS</i>	CG43S3 Δ <i>soxRS</i> , Sm ^r	Laboratory stock
Δ <i>yjcC</i>	CG43S3 Δ <i>yjcC</i> , Sm ^r	Laboratory stock
Δ <i>mrkH</i>	CG43S3 Δ <i>mrkH</i> , Sm ^r	Laboratory stock
Δ <i>pecS</i>	CG43S3 Δ <i>pecS</i> , Sm ^r	Laboratory stock
Δ <i>rcsB</i>	CG43S3 Δ <i>rcsB</i> , Sm ^r	Laboratory stock
Δ <i>fur</i>	CG43S3 Δ <i>fur</i> , Sm ^r	Laboratory stock
Δ <i>ryhB</i>	CG43S3 Δ <i>ryhB</i> , Sm ^r	Dr. Ching-Ting Lin
Δ <i>fur</i> Δ <i>ryhB</i>	CG43S3 Δ <i>fur</i> Δ <i>ryhB</i> , Sm ^r	Dr. Ching-Ting Lin
Δ <i>sodA</i> [pRK415- <i>sodA</i>]	CG43S3 Δ <i>sodA</i> [pRK415- <i>sodA</i>], Tc ^r Sm ^r	This study
Δ <i>katG</i> [pRK415- <i>katG</i>]	CG43S3 Δ <i>katG</i> [pRK415- <i>katG</i>], Tc ^r Sm ^r	This study
Δ <i>lacZ</i>	CG43S3 Δ <i>lacZ</i> , Sm ^r	Laboratory stock
Δ <i>lacZ</i> Δ <i>pecS</i>	CG43S3 Δ <i>lacZ</i> Δ <i>pecS</i> , Sm ^r	Laboratory stock
Δ <i>lacZ</i> Δ <i>fur</i>	CG43S3 Δ <i>lacZ</i> Δ <i>fur</i> , Sm ^r	Laboratory stock
Δ <i>lacZ</i> Δ <i>ryhB</i>	CG43S3 Δ <i>lacZ</i> Δ <i>ryhB</i> , Sm ^r	Dr. Ching-Ting Lin

細菌菌株	基因型或相關特性	來源或參考文獻
<i>ΔlacZΔfurΔryhB</i>	CG43S3 <i>ΔlacZΔfurΔryhB</i> , Sm ^r	Dr. Ching-Ting Lin
<i>ΔlacZΔsoxRS</i>	CG43S3 <i>ΔlacZΔsoxRS</i> , Sm ^r	This study
<i>ΔlacZΔrpoS</i>	CG43S3 <i>ΔlacZΔrpoS</i> , Sm ^r	This study
<i>ΔlacZΔyjeC</i>	CG43S3 <i>ΔlacZΔyjeC</i> , Sm ^r	This study
<i>ΔlacZΔmrkH</i>	CG43S3 <i>ΔlacZΔmrkH</i> , Sm ^r	Laboratory stock
<i>ΔlacZΔrcsB</i>	CG43S3 <i>ΔlacZΔrcsB</i> , Sm ^r	Laboratory stock
CG43S3 [pETQ33- <i>ryhB</i>]	CG43S3 [pETQ33- <i>ryhB</i>], Km ^r Sm ^r	This study
<i>Δfur</i> [pETQ33- <i>ryhB</i>]	CG43S3 <i>Δfur</i> [pETQ33- <i>ryhB</i>], Km ^r Sm ^r	This study
<i>ΔryhB</i> [pETQ33- <i>ryhB</i>]	CG43S3 <i>ΔryhB</i> [pETQ33- <i>ryhB</i>], Km ^r Sm ^r	This study
<i>ΔfurΔryhB</i> [pETQ33- <i>ryhB</i>]	CG43S3 <i>ΔfurΔryhB</i> [pETQ33- <i>ryhB</i>], Km ^r Sm ^r	This study



表二、本研究所使用和建構的質體

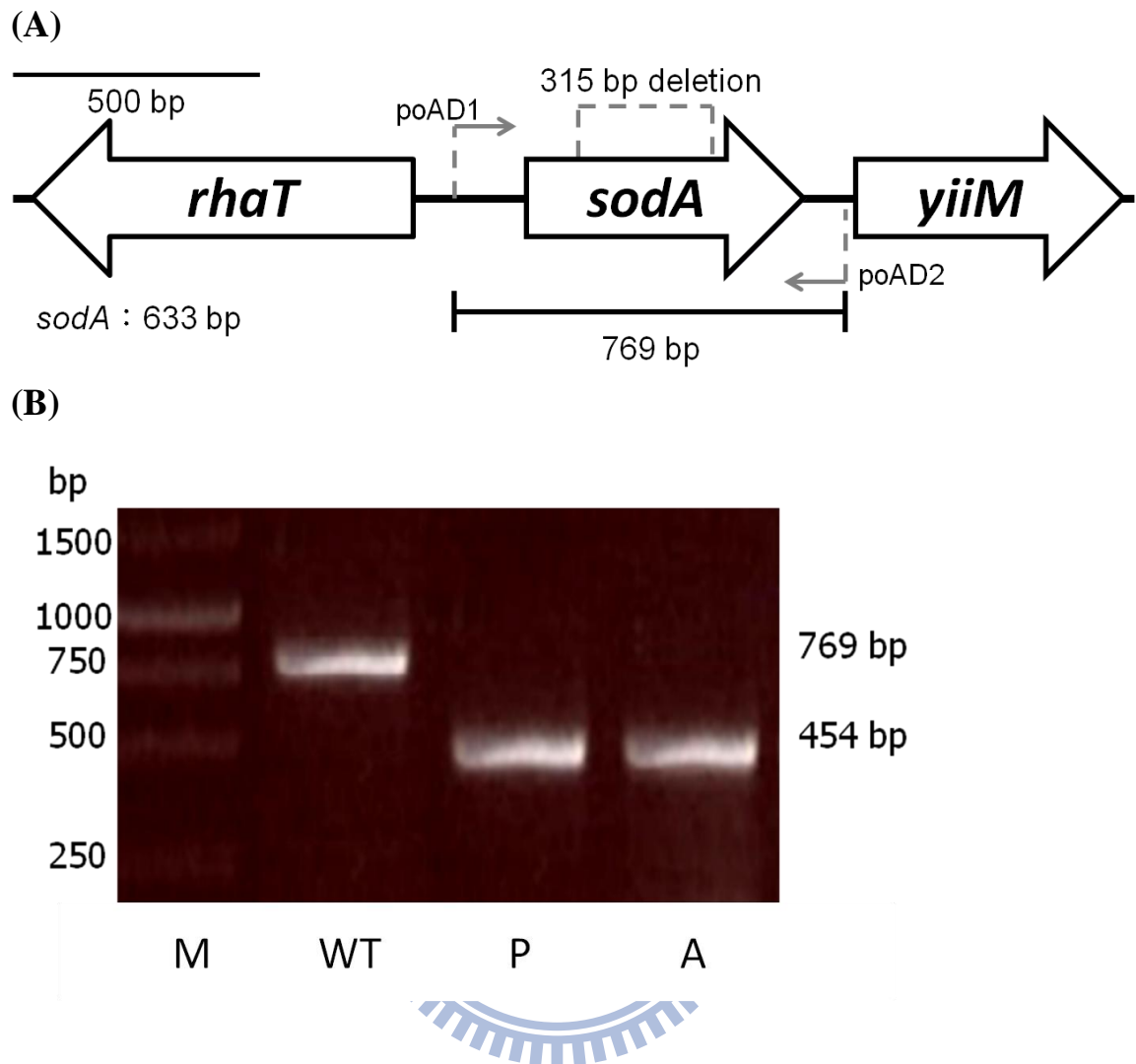
質體	相關特性	來源或參考文獻
yT&A	T/A-type PCR cloning vector, Ap ^r	Yeastern biotech
pJET	Blunt cloning vector, Ap ^r	Fermentas
pKAS46	Suicide vector, <i>rpsL</i> , Km ^r Ap ^r	(80)
pRK415	broad-host-range IncP cloning vector, <i>mob</i> ⁺ , Tc ^r	(41)
pLacZ15	promoter selection vector, <i>lacZ</i> ⁺ , Cm ^r	(50)
pETQ33	Protein overexpression vector, IPTG inducible, Km ^r	Laboratory stock
pPO01	930 bp fragment of upstream region of <i>sodA</i> cloned into pJET, Ap ^r	This study
pPO02	928 bp fragment of downstream region of <i>sodA</i> cloned into yT&A, Ap ^r	This study
pPO04	930 bp fragment of upstream and 928 bp fragment of downstream region of <i>sodA</i> cloned into pKAS46, Km ^r Ap ^r	This study
pPO05	1008 bp fragment of upstream region of <i>sodB</i> cloned into pJET, Ap ^r	This study
pPO06	928 bp fragment of downstream region of <i>sodB</i> cloned into yT&A, Ap ^r	This study
pPO08	1008 bp fragment of upstream and 928 bp fragment of downstream region of <i>sodB</i> cloned into pKAS46, Km ^r Ap ^r	This study
pPO09	858 bp fragment of upstream region of <i>sodC</i> cloned into yT&A, Ap ^r	This study
pPO10	904 bp fragment of downstream region of <i>sodC</i> cloned into yT&A, Ap ^r	This study
pPO12	858 bp fragment of upstream and 904 bp fragment of downstream region of <i>sodC</i> cloned into pKAS46, Km ^r Ap ^r	This study
pPO13	1016 bp fragment of upstream region of <i>katE</i> cloned into yT&A, Ap ^r	This study
pPO14	1072 bp fragment of downstream region of <i>katE</i> cloned into yT&A, Ap ^r	This study

質體	相關特性	來源或參考文獻
pPO16	1016 bp fragment of upstream and 1072 bp fragment of downstream region of <i>katE</i> cloned into pKAS46, Km ^r Ap ^r	This study
pPO17	998 bp fragment of upstream region of <i>katG</i> cloned into yT&A, Ap ^r	This study
pPO18	883 bp fragment of downstream region of <i>katG</i> cloned into yT&A, Ap ^r	This study
pPO20	998 bp fragment of upstream and 883 bp fragment of downstream region of <i>katG</i> cloned into pKAS46, Km ^r Ap ^r	This study
pPO21	932 bp fragment of upstream region of <i>rpoS</i> cloned into yT&A, Ap ^r	This study
pPO22	977 bp fragment of downstream region of <i>rpoS</i> cloned into yT&A, Ap ^r	This study
pPO24	932 bp fragment of upstream and 977 bp fragment of downstream region of <i>rpoS</i> cloned into pKAS46, Km ^r Ap ^r	This study
pRK415- <i>sodA</i>	<i>sodA</i> complement plasmid, Tc ^r	This study
pRK415- <i>katG</i>	<i>katG</i> complement plasmid, Tc ^r	This study
P _{<i>sodA1</i>}	416 bp PCR product carrying putative <i>sodA</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	This study
P _{<i>sodA2</i>}	336 bp PCR product carrying putative <i>sodA</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	This study
P _{<i>sodA3</i>}	248 bp PCR product carrying putative <i>sodA</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^r	This study
pETQ33- <i>ryhB</i>	carring <i>ryhB</i> gene cloned into pETQ33, Km ^r	Dr. Ching-Ting Lin

表三、本研究所使用的引子

引子	序列(5'→3')
poA1	TAGAATTCTTTGATGCCCATTTTGCGC
poA2	AGGTACCAACTCCGGCAGGCTTTCC
poA3	TACGTACCAAGCCATTTCCGGCG
poA4	TATCTAGAAACCTGACGCCGACCC
poAD1	ATGGACAAACTGCTTACGCG
poAD2	TTCACCGGATAATGCATGG
poAC1	AAAGCTTTCGACAATAATGGAGATG
poAC2	ATCTAGATGCTCTCCTTGCTACAG
poAL1	GGATCCTTTTATCGGAGACGGCGGC
poAL2	GGATCCACGGCATTGATAAGCATTTC
poAL3	GGATCCTGGCGAACCTGGCAACC
poAL4	AGATCTAACTCCGGCAGGCTTTCC
poAQ1	AAAGCCTGCCGGAGTTCGCT
poAQ2	TCAGGTCCCTGCAGGGT
poB1	TAGAATCAAGCGGCTTGTCCTCG
poB2	AGGTACCTAGGCGCCAGGCAGTTCC
poB3	TACGTACCATCGTCTCCACCAGCAACG
poB4	TATCTAGAATGTCCTTCCTTGCTACTGC
poBD1	TACAATAACACGCCCCGGGACG
poBD2	ATCATCGGCTGGGCAAGG
poC1	ATCTAGAATCTGCTGCGTGCTCTACTC
poC2	ACTCGAGAACATGGCCGACAGTCCG
poC3	ACTCGAGTTTTGACGCTGCCGATGG
poC4	AGGTACCAAATCGTCAGCAAATGCGG
poCD1	AACCACCATCATCAGCCGG
poCD2	TTCCGCATCCGTAAAGCC
poE1	ATCTAGAATTCGATCGTGACGCCG
poE2	ACTCGAGTCTGCATGTTCCGACCC
poE3	ACTCGAGAACTTCATCGCGTCCTGG

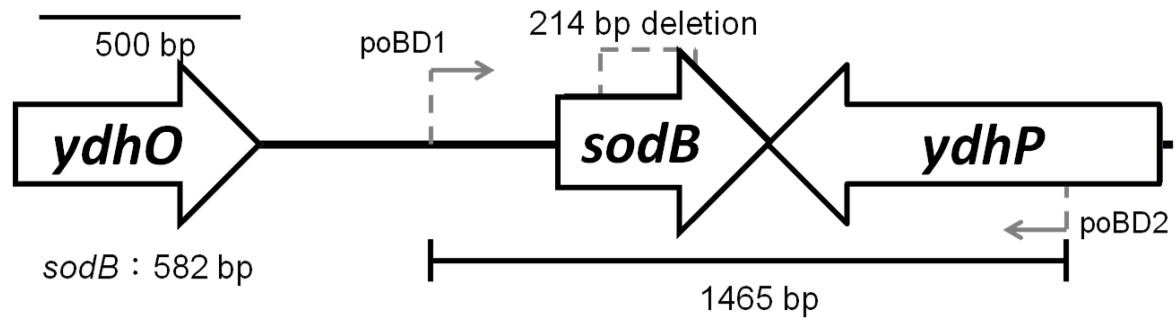
引子	序列(5'→3')
poE4	AGGTACCAATGCCGGTGAGCGACG
poED1	ATCGGATCATTATGGGCAGCG
poED2	TTTGACCACGAGCGTATTCCG
poG1	ATCTAGATTACCTGACCGCCTCCC
poG2	ACTCGAGAAACAAGCCAATATAGC
poG3	ACTCGAGATTTGGCAGGATCCGC
poG4	AGGTACCATTACAGATCGAAGCGG
poGD1	TTAAACCAGCACTCCAATCGC
poGD2	AACGGCACATTGACGCTGACG
poGC1	ATCTAGATTCACAAAAGCAAACGGAG
poGC2	AGGTACCAGGGGATTACAGATCGAAG
poR1	ATCTAGAATGGTGCCCTGGTCGCTG
poR2	ACTCGAGAGGTGGAAGGTCTGCGTCG
poR3	ACTCGAGTCATCAAATTCCGCGTCTTC
poR4	AGGTACCAACGCAACAACATCCCGGC
poRD1	AAATCATCAGCGAGTGGCAC
poRD2	ATCAGCTAACAGGCGCCAGG



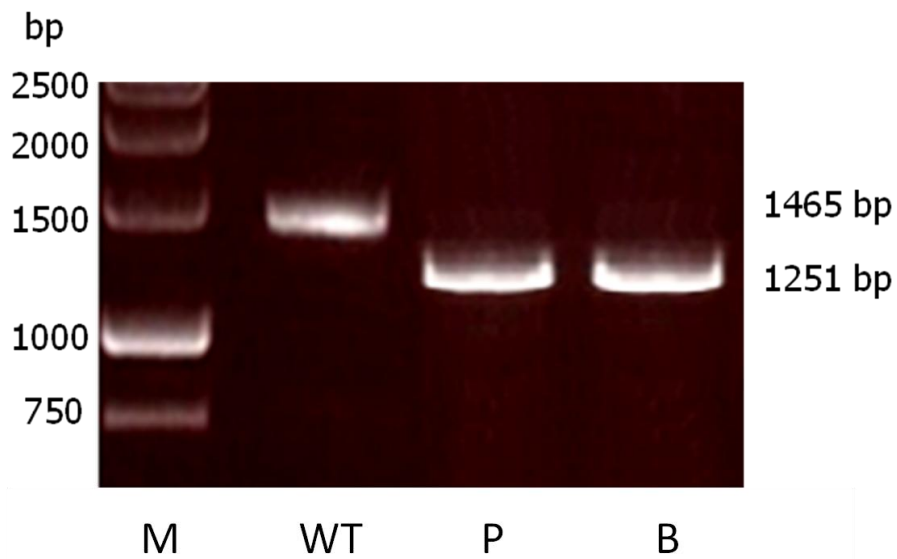
圖一：建構 *sodA* 基因缺損突變株

(A) *sodA* 及兩側基因示意圖。poAD1/poAD2 為設計來確認 $\Delta sodA$ 突變株的引子；虛線部分表示基因缺損的位子。(B)利用 PCR 來確認 $\Delta sodA$ 突變株。M：DNA molecular size marker，WT：wild-type，P：plasmid(pPO04)，A： $\Delta sodA$ 突變株。

(A)

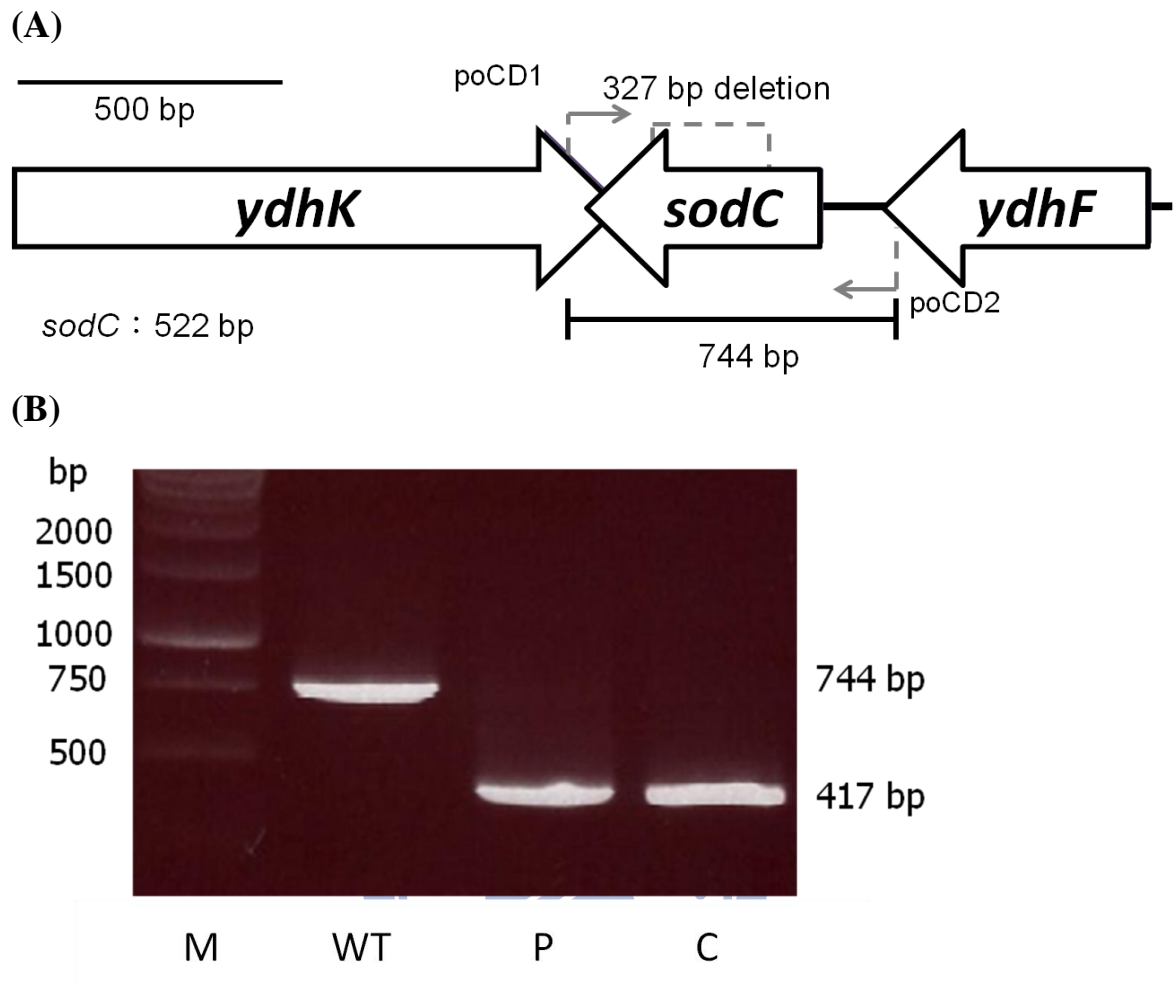


(B)



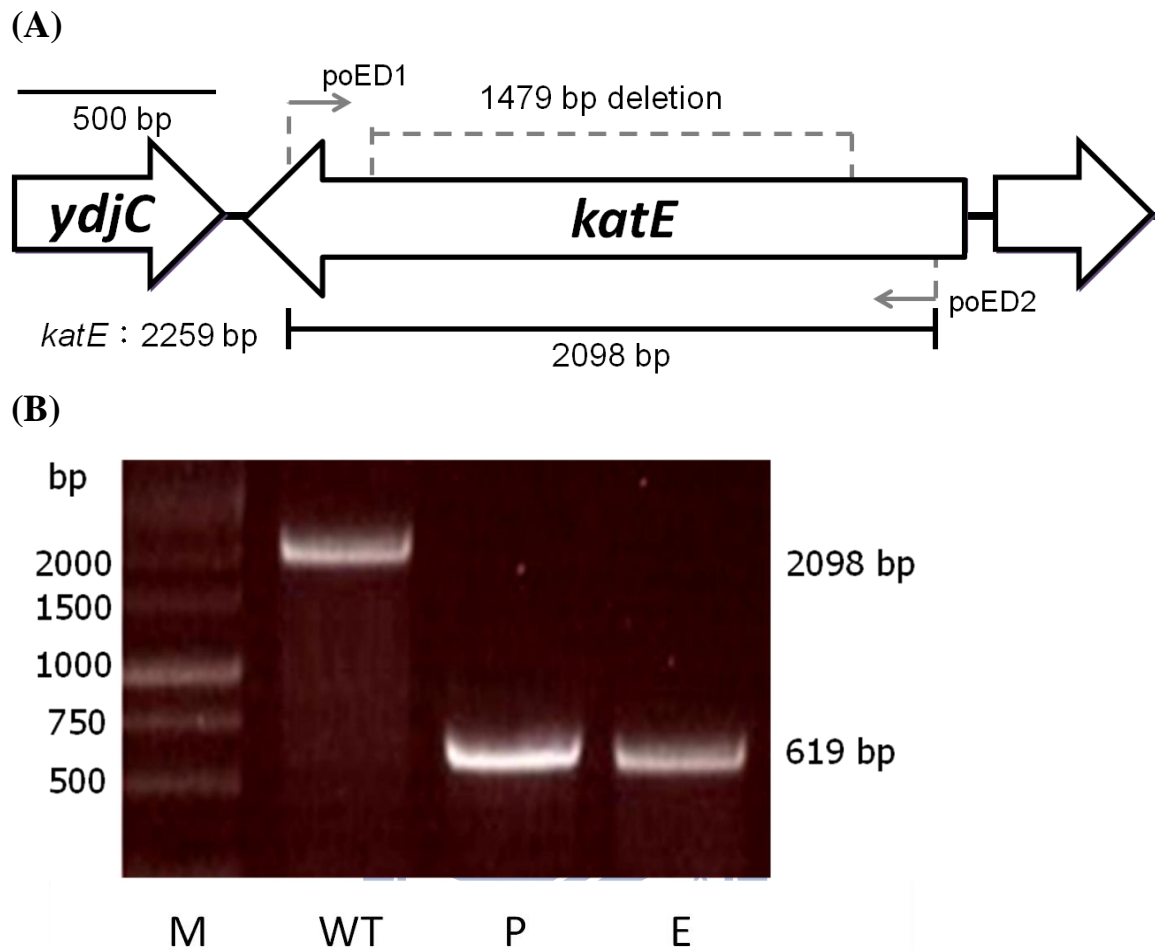
圖二：建構 *sodB* 基因缺損突變株

(A) *sodB* 及兩側基因示意圖。poBD1/poBD2 為設計來確認 $\Delta sodB$ 突變株的引子；虛線部分表示基因缺損的位子。(B)利用 PCR 來確認 $\Delta sodB$ 突變株。M：DNA molecular size marker，WT：wild-type，P：plasmid(pPO08)，B： $\Delta sodB$ 突變株。



圖三：建構 *sodC* 基因缺損突變株

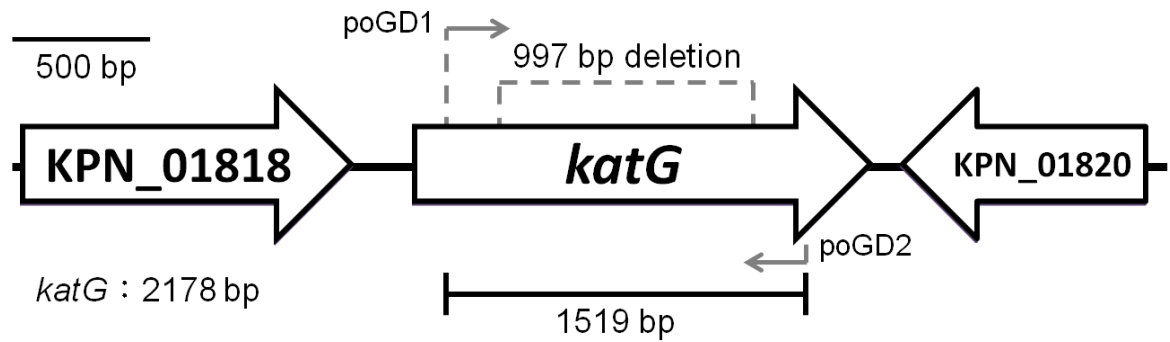
(A) *sodC* 及兩側基因示意圖。poCD1/poCD2 為設計來確認 $\Delta sodC$ 突變株的引子；虛線部分表示基因缺損的位子。(B)利用 PCR 來確認 $\Delta sodC$ 突變株。M：DNA molecular size marker，WT：wild-type，P：plasmid(pPO12)，C： $\Delta sodC$ 突變株。



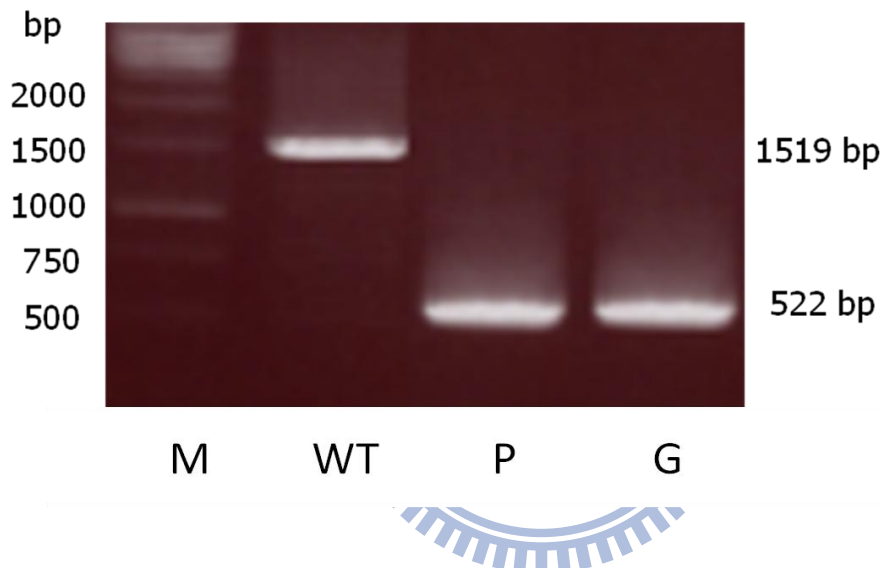
圖四：建構 *katE* 基因缺損突變株

(A) *katE* 及兩側基因示意圖。poED1/poED2 為設計來確認 $\Delta katE$ 突變株的引子；虛線部分表示基因缺損的位子。(B)利用 PCR 來確認 $\Delta katE$ 突變株。M：DNA molecular size marker，WT：wild-type，P：plasmid(pPO16)，E： $\Delta katE$ 突變株。

(A)

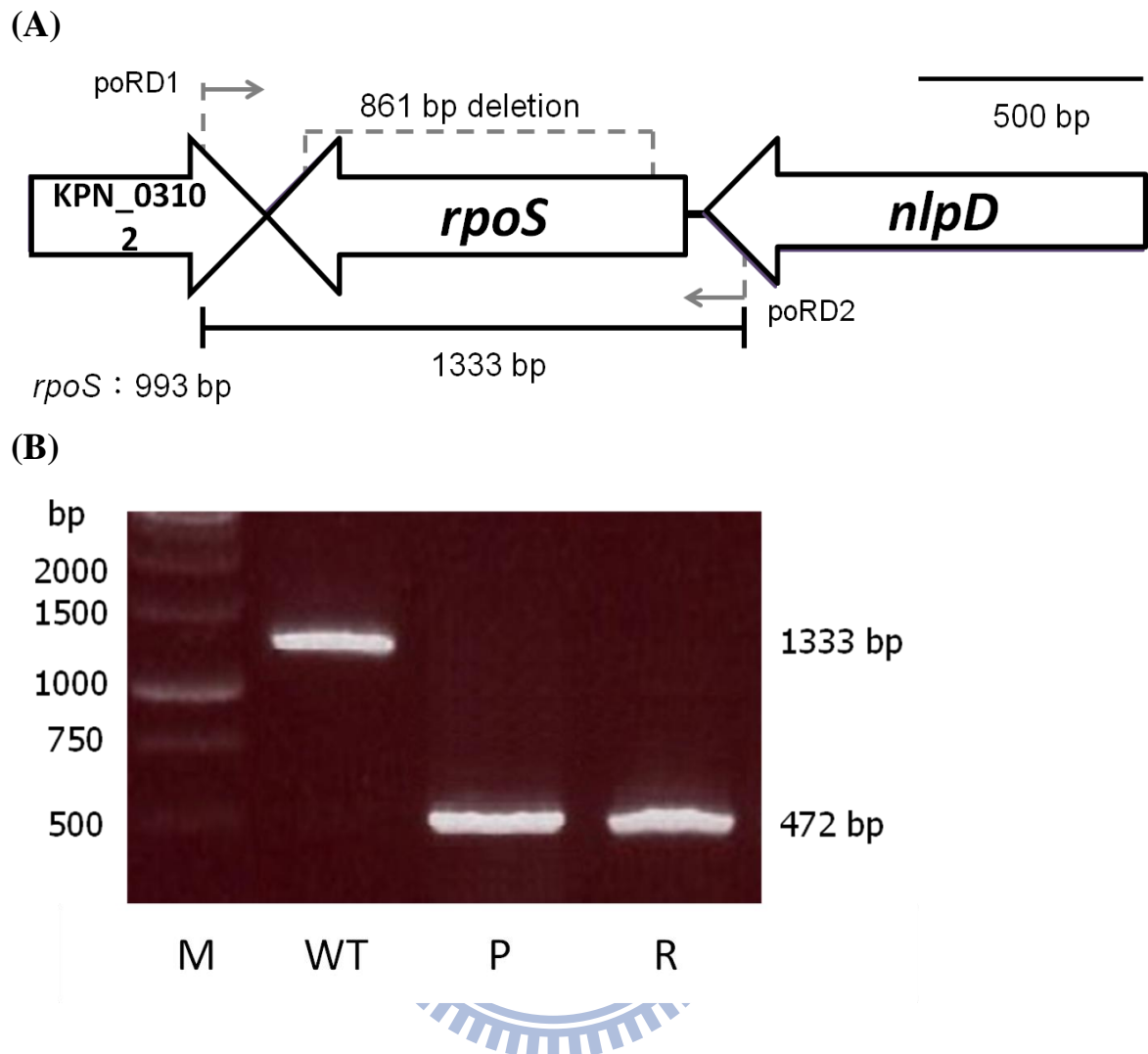


(B)



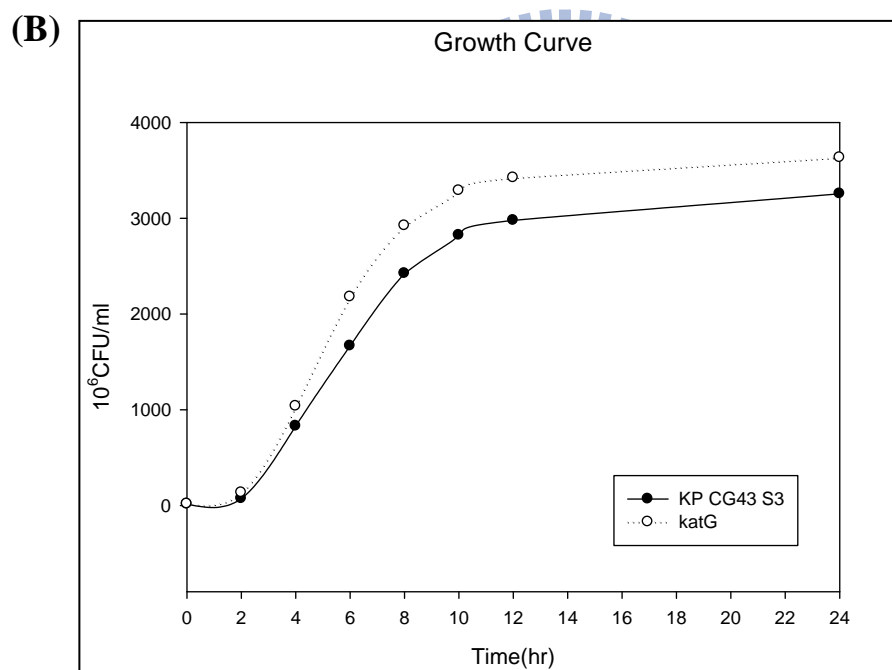
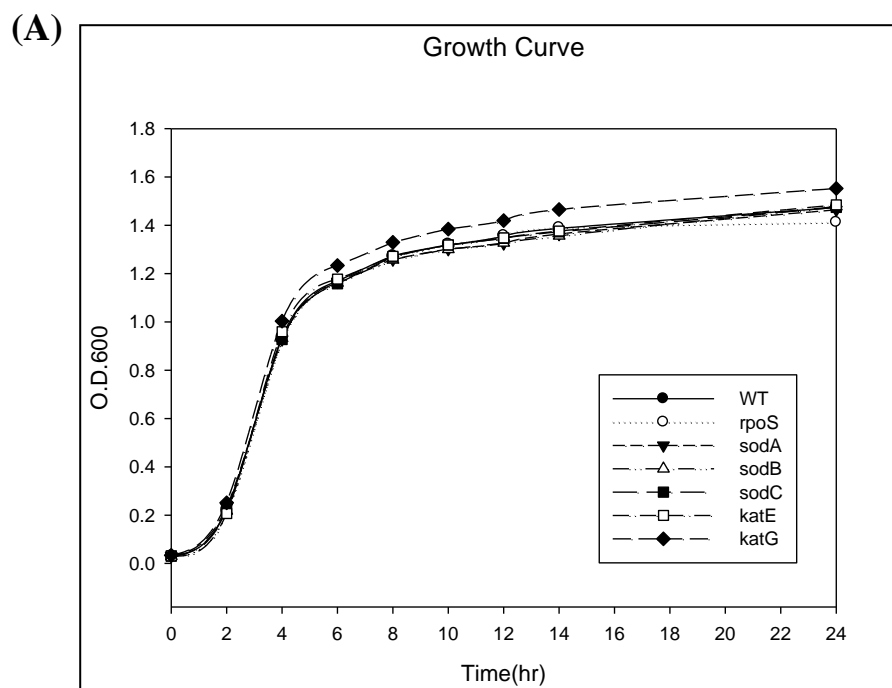
圖五：建構 *katG* 基因缺損突變株

(A) *katG* 及兩側基因示意圖。poGD1/poGD2 為設計來確認 $\Delta katG$ 突變株的引子；虛線部分表示基因缺損的位子。(B)利用 PCR 來確認 $\Delta katG$ 突變株。M：DNA molecular size marker，WT：wild-type，P：plasmid(pPO20)，G： $\Delta katG$ 突變株。



圖六：建構 *rpoS* 基因缺損突變株

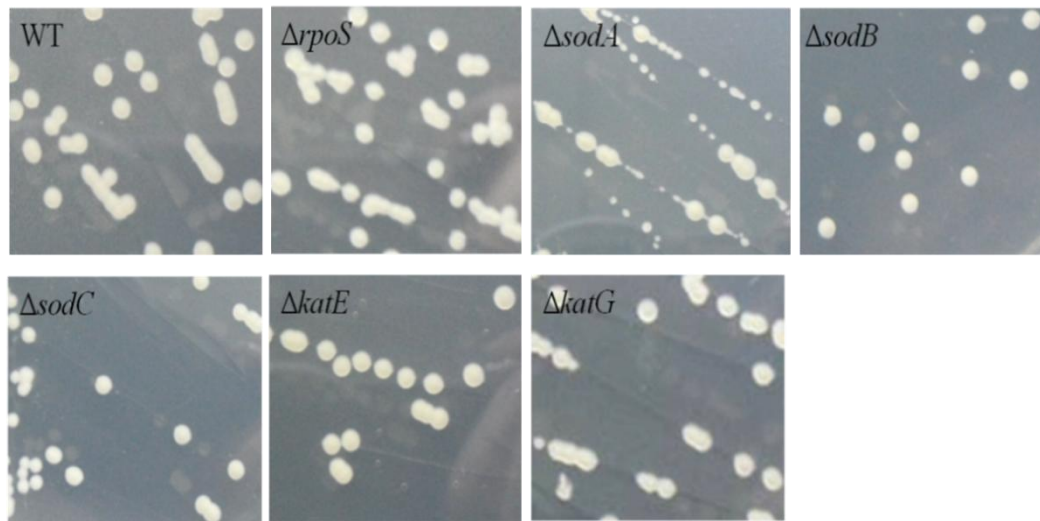
(A) *rpoS* 及兩側基因示意圖。poRD1/poRD2 為設計來確認 $\Delta rpoS$ 突變株的引子；虛線部分表示基因缺損的位子。(B)利用 PCR 來確認 $\Delta rpoS$ 突變株。M：DNA molecular size marker，WT：wild-type，P：plasmid(pPO24)，R： $\Delta rpoS$ 突變株。



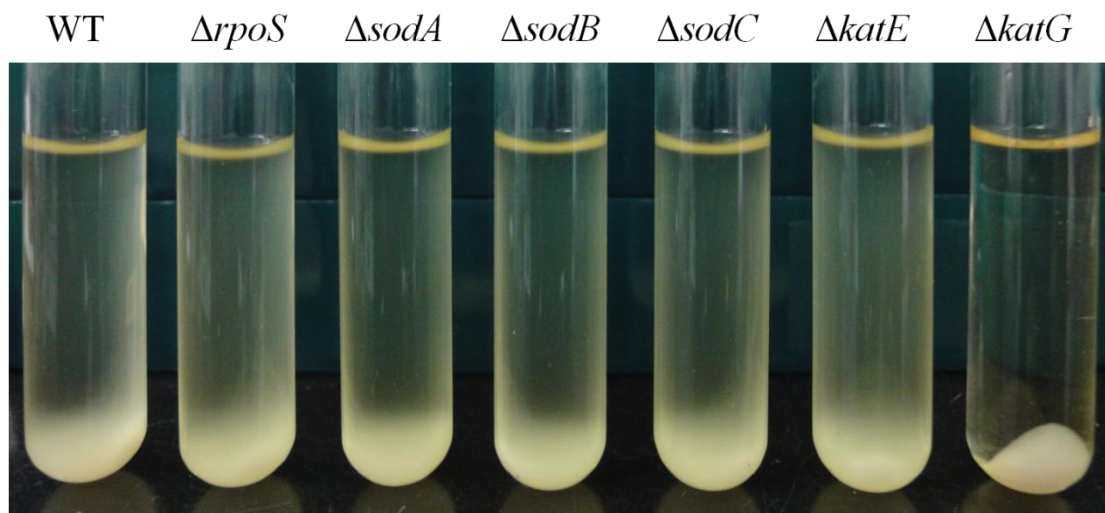
圖七：*sodA*、*sodB*、*sodC*、*katE*、*katG* 及 *rpoS* 基因缺損株的生長曲線

(A)細菌在 LB 培養液中培養隔夜後，取 20 μ l 菌液至 4 ml LB 培養液中，再置於 37°C 培養，每隔 2 小時即測量其在波長 600 nm 下的吸光值。(B)細菌在 LB 培養液中培養隔夜後，取 20 μ l 菌液至 4 ml LB 培養液中，再置於 37°C 培養，每隔 2 小時即取出 100 μ l 的菌液，並做適當的序列稀釋後，均勻的塗抹在 LB 固態培養基上，37°C 隔夜培養後數菌落數，再回推每 1 ml 所包含的菌數。

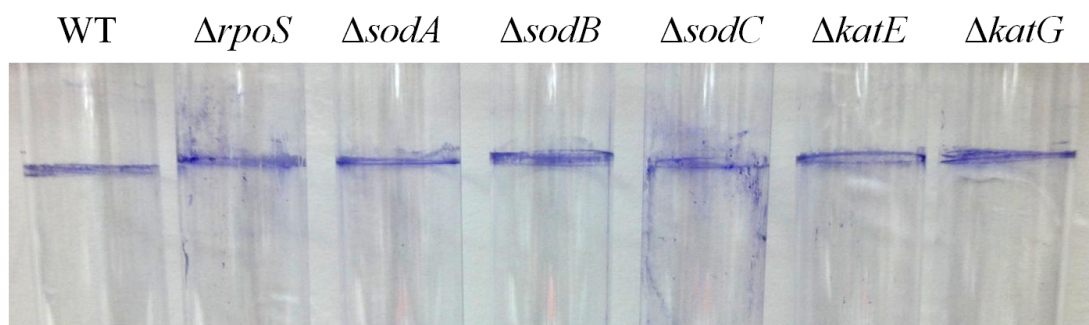
(A)



(B)



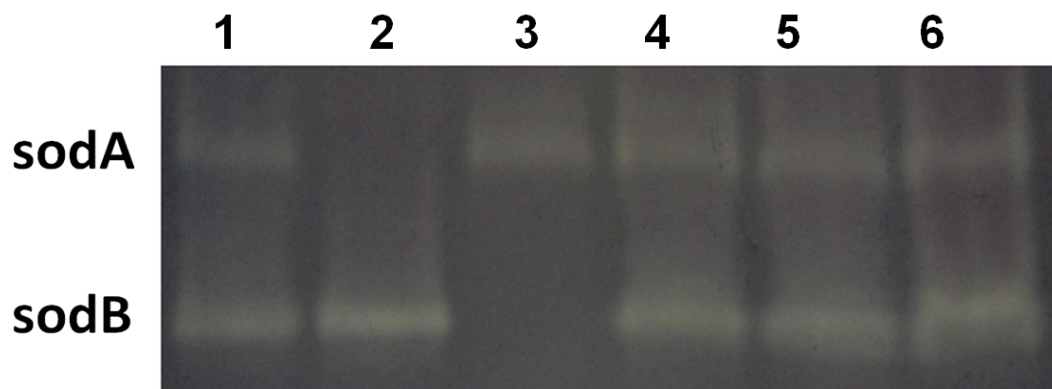
(C)



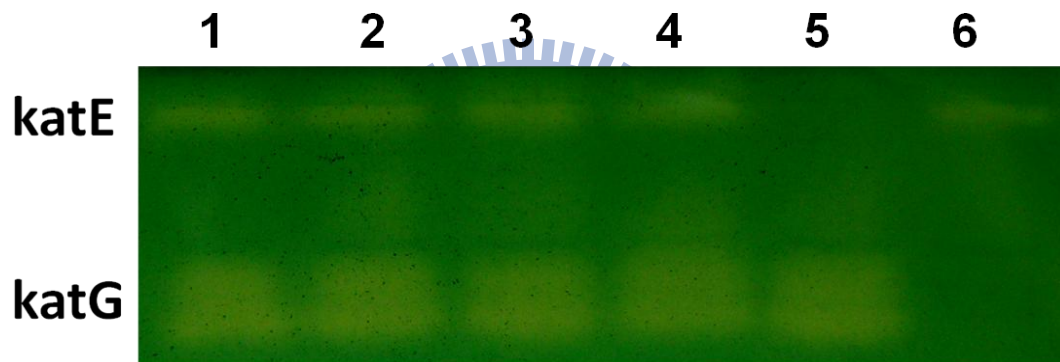
圖八：*sodA*、*sodB*、*sodC*、*katE*、*katG* 及 *rpoS* 基因缺損株的外表型

(A) WT 及各個基因缺損後的菌落型態。(B) WT 及各個基因缺損突變株菌液以 4000 rpm 離心 5 分鐘。(C) WT 及各個基因缺損突變株在靜態培養下，生物膜形成的變化。

(A)

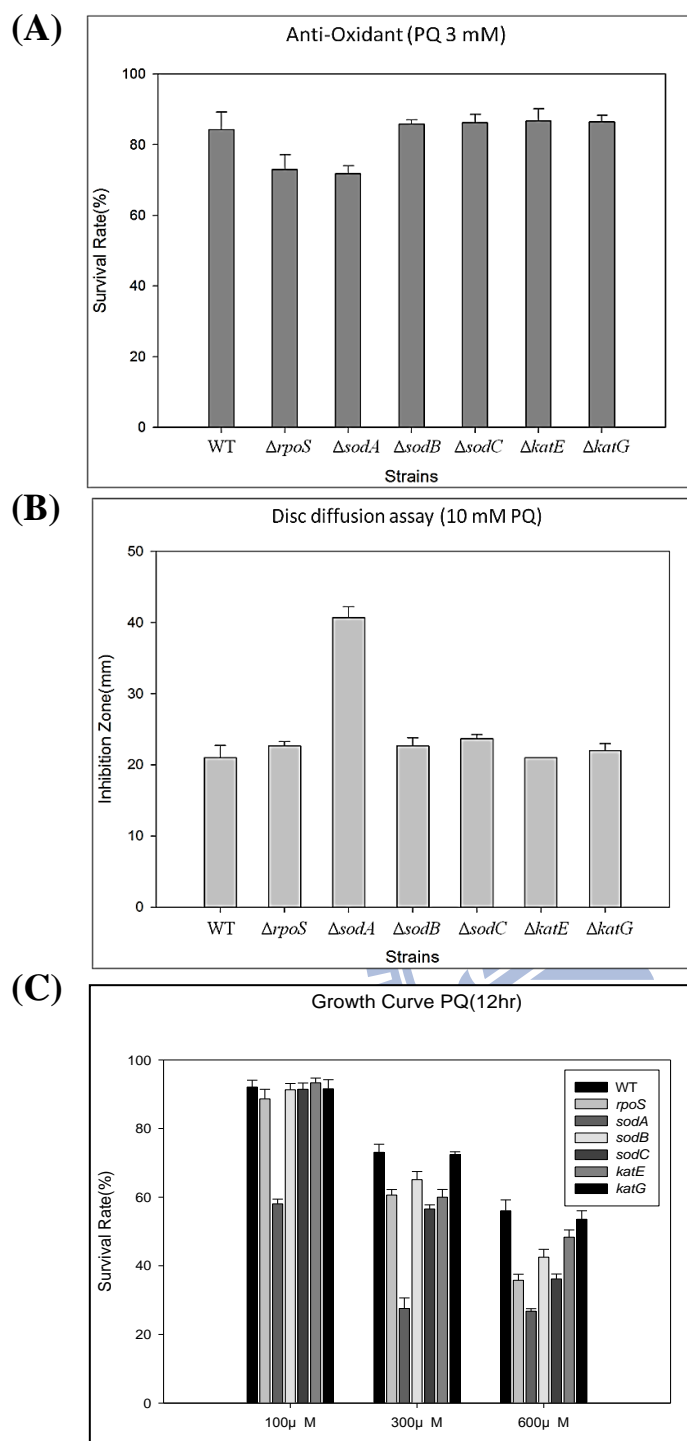


(B)



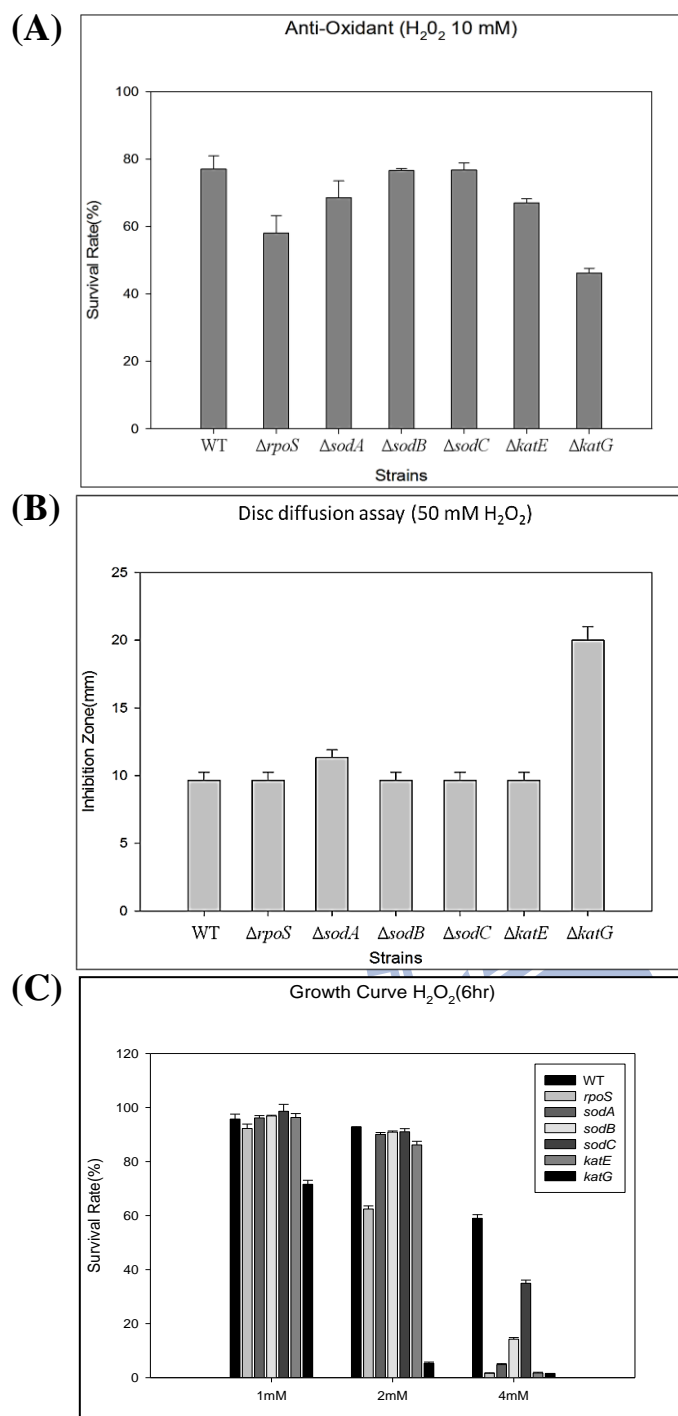
圖九：膠染色分析抗氧化酵素的活性

(A)超氧化歧化酶活性。(B) 過氧化氫酶活性。Lanes 1: WT, 2: $\Delta sodA$, 3: $\Delta sodB$, 4: $\Delta sodC$, 5: $\Delta katE$, 6: $\Delta katG$ 。



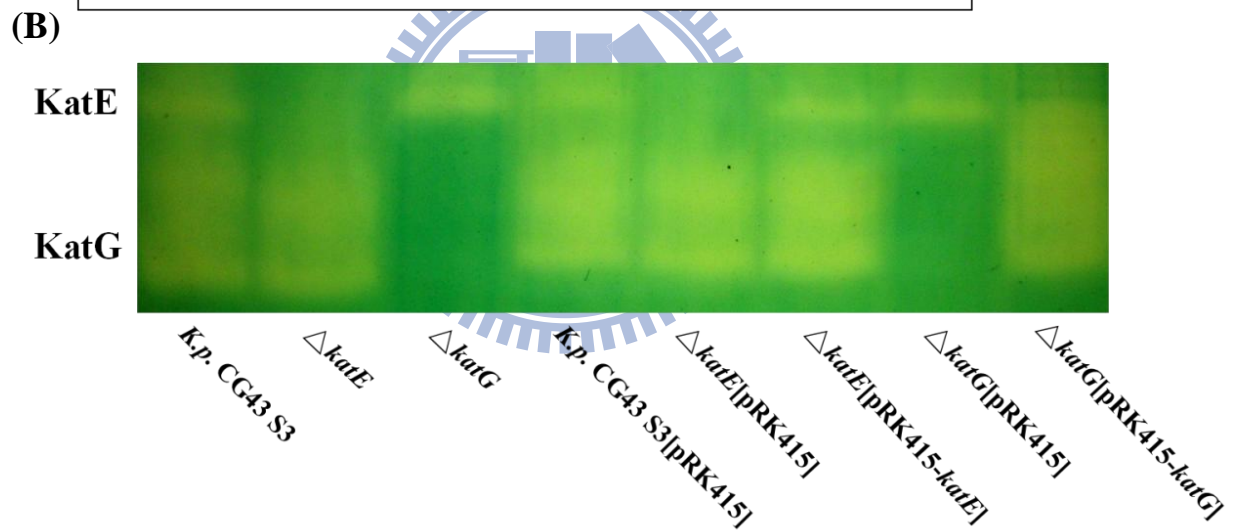
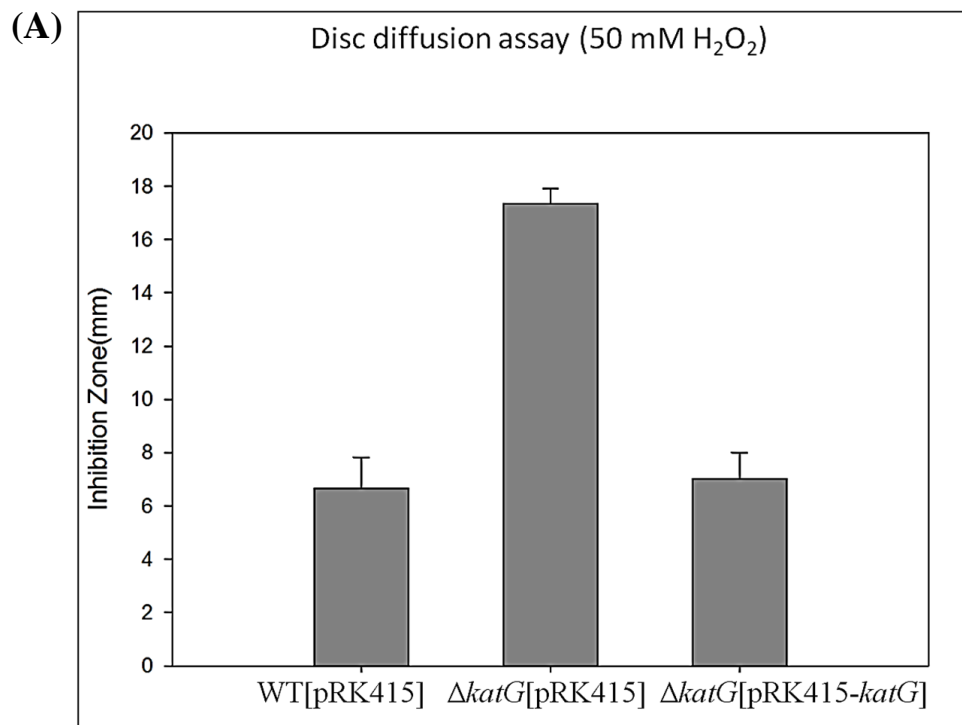
圖十：*sodA*、*sodB*、*sodC*、*katE*、*katG* 或 *rpoS* 基因缺損對抗 paraquat 能力的影響

(A)細菌在 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，以 20 倍稀釋至 LB 培養液中，培養至 OD₆₀₀ 約 0.6~0.8 左右，加入 3 mM PQ 37°C 培養細菌 40 分鐘。(B)在 10 mM PQ 處理下的 disc diffusion assay。(C)細菌分別在 100/300/600 μ M PQ 下培養 12 小時的生長情形。



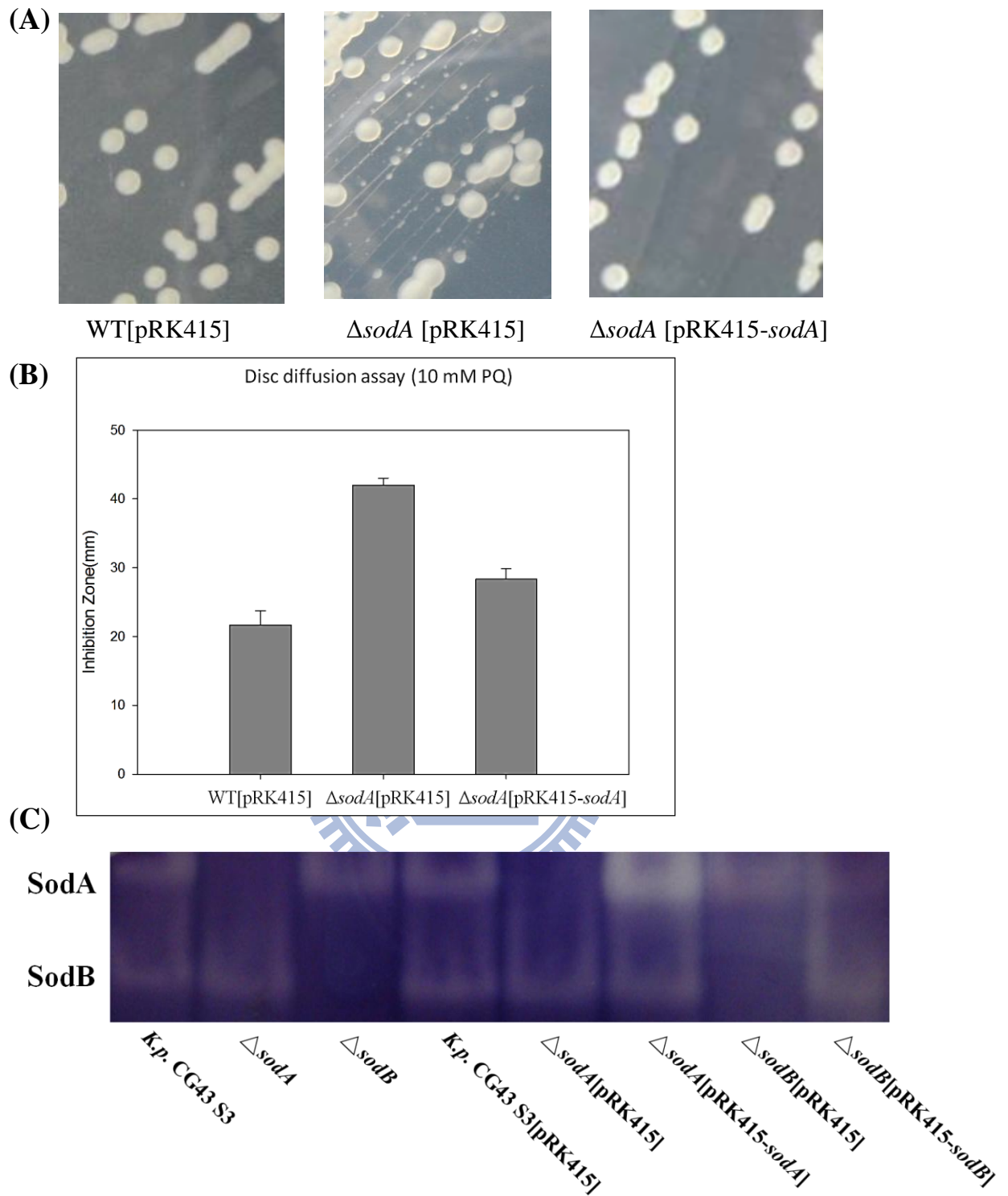
圖十一：*sodA*、*sodB*、*sodC*、*katE*、*katG* 或 *rpoS* 基因缺損對抗 H₂O₂ 能力的影響

(A)細菌在 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，以 20 倍稀釋至 LB 培養液中，培養至 OD₆₀₀ 約 0.6~0.8 左右，加入 10 mM H₂O₂ 37°C 培養細菌 40 分鐘。(B)在 50 mM 雙氧水處理下的 disc diffusion assay。(C)細菌分別在 1/2/4 mM H₂O₂ 下培養 6 小時的生長情形。



圖十二： $\Delta katG$ 突變的回補實驗分析

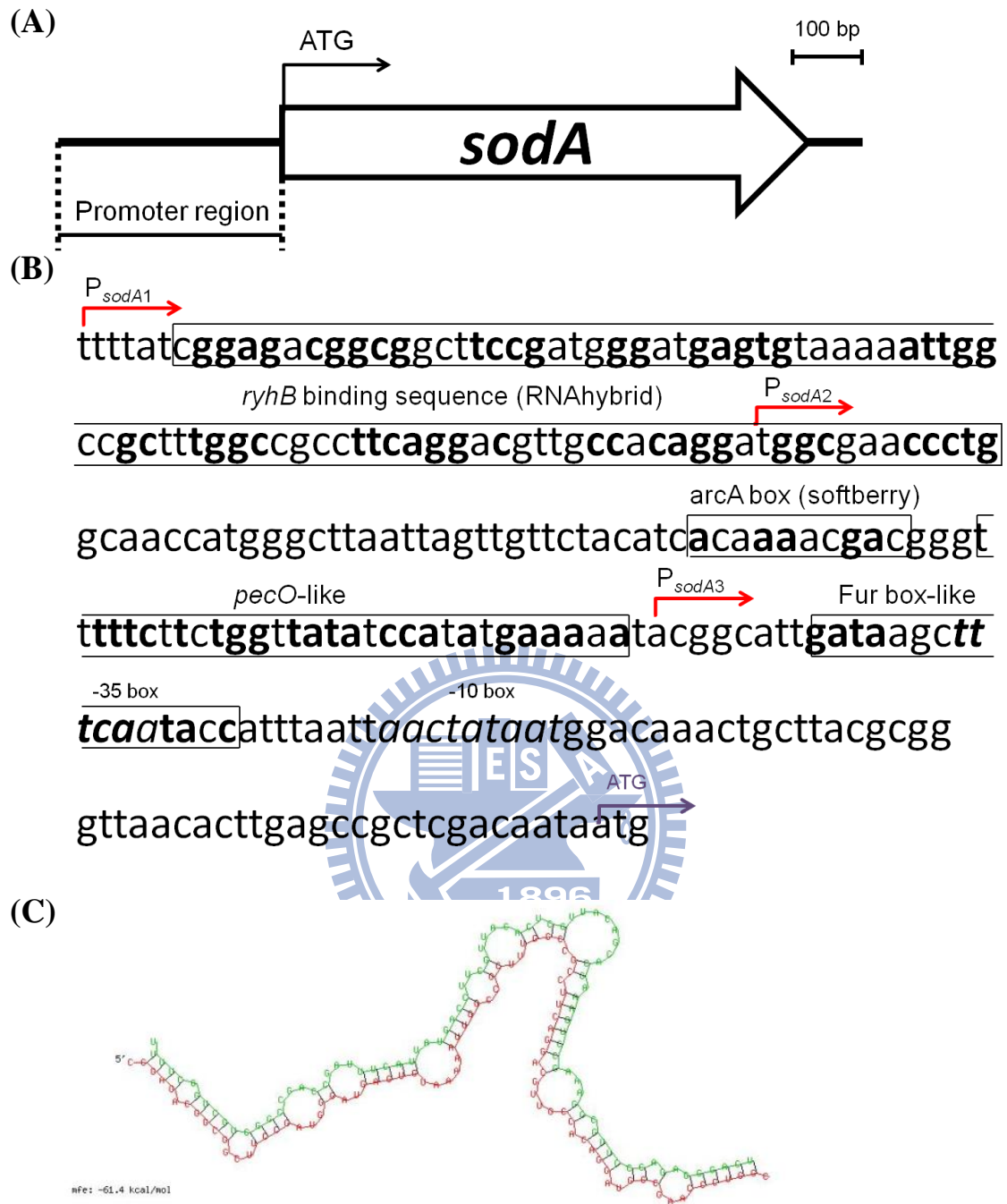
(A)回補 *katG* 基因後的 disc diffusion assay。(B)回補 *katG* 基因後，利用膠染色觀察酵素活性。



圖十三： Δ sodA 突變的的回補實驗分析

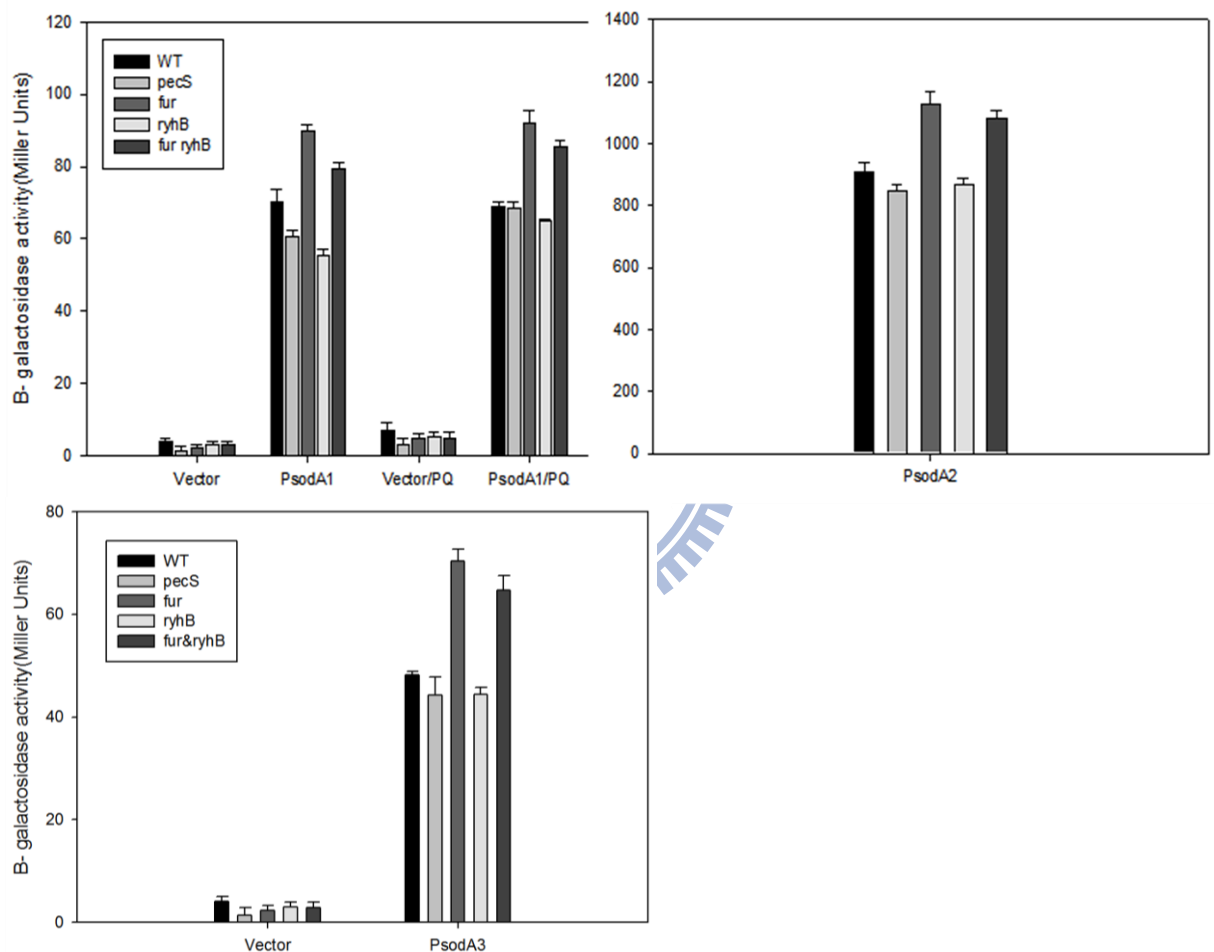
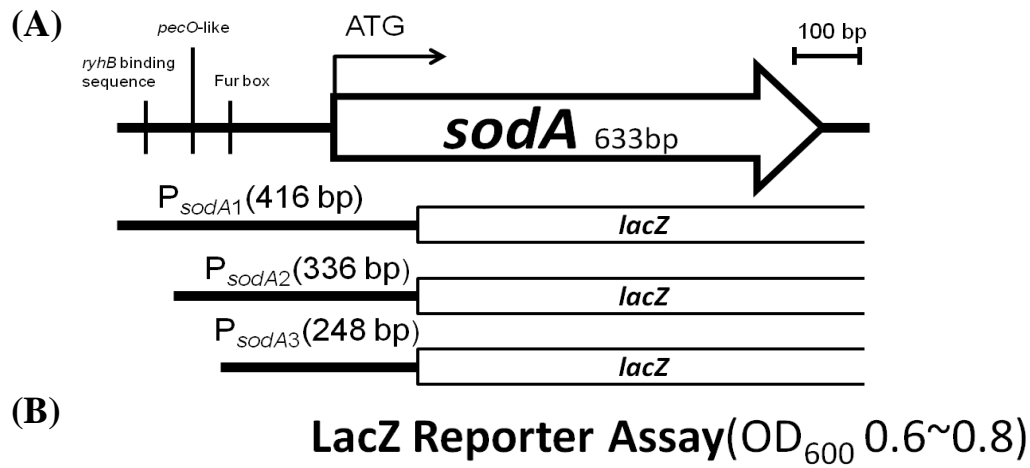
(A)回補 *sodA* 基因後的菌株型態。(B)回補 *sodA* 基因後的 disc diffusion assay。

(C)回補 *sodA* 基因後，利用膠染色觀察酵素活性。



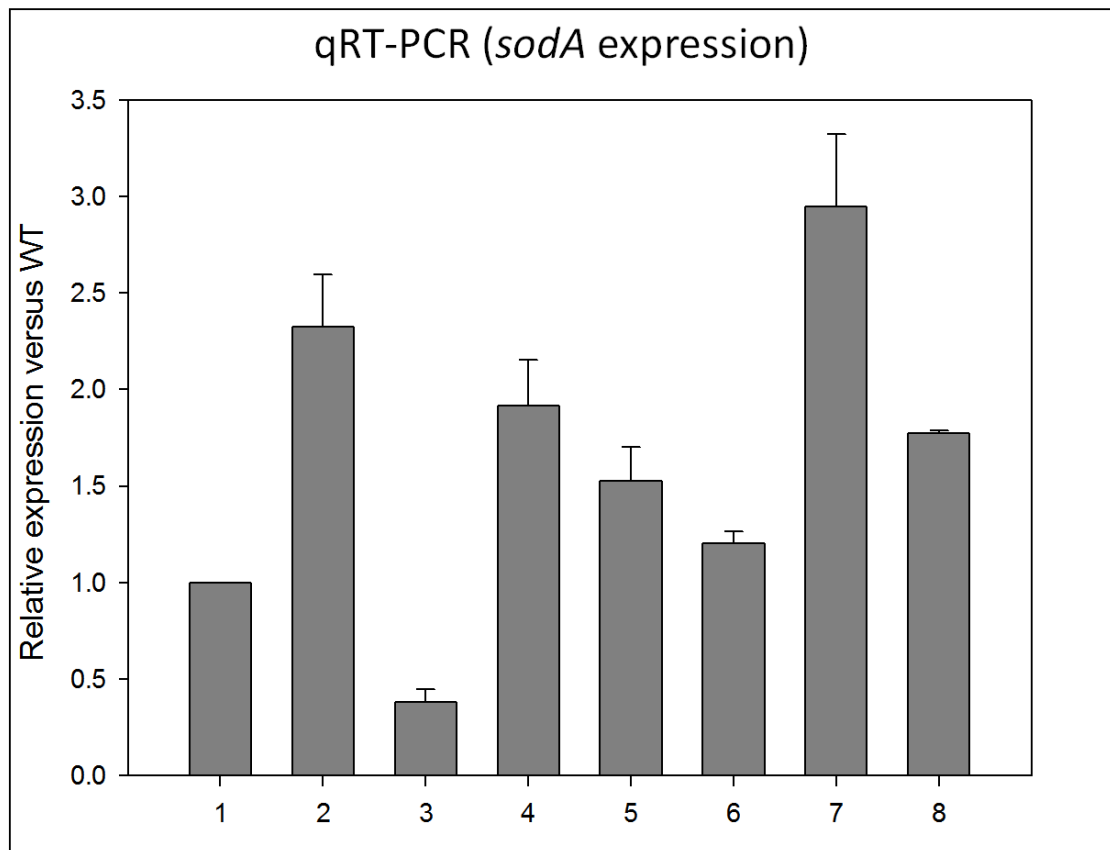
圖十四：sodA 啟動子序列分析

(A)sodA 啟動子區域示意圖。(B)分析 sodA 啟動子序列，框起來的為可能與調控分子有作用的區域，粗寫的字體為調控分子結合的保留基因序列，斜體則為-35 或-10 box。箭頭方向為建構 LacZ 報導系統裡，不同長度的 sodA 啟動子起始的位置。(C)利用 RNA hybrid 軟體所預測出 RyhB 與 sodA 啟動子區域的結合構型。



圖十五：LacZ 報導系統分析 *sodA* 的啟動子活性

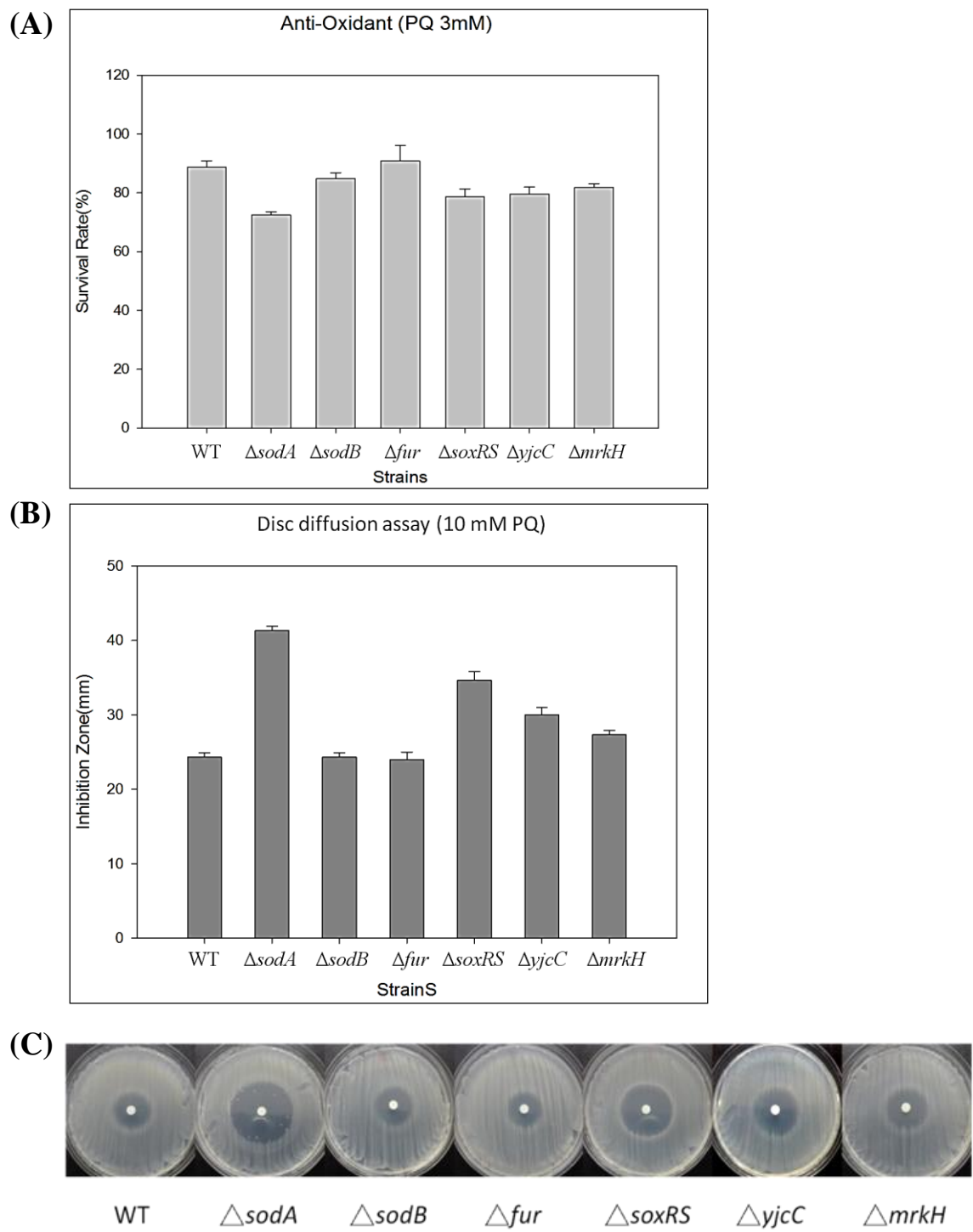
(A) 建構出三種不同長度的 *sodA* 啟動子, P_{sodA1} 為完整長度的 *sodA* 啟動子, P_{sodA2} 少了 *RyhB* 結合的序列, 而 P_{sodA3} 包含 *Fur* binding box。(B) 不同長度的 *sodA* 啟動子, 分別在有無 30 μ M PQ 的處理下及在各種不同基因缺損下, $P_{sodA1-3}$ 的 β -galactosidase 活性。



圖十六：Fur、RyhB 對 *sodA* 基因表現的影響

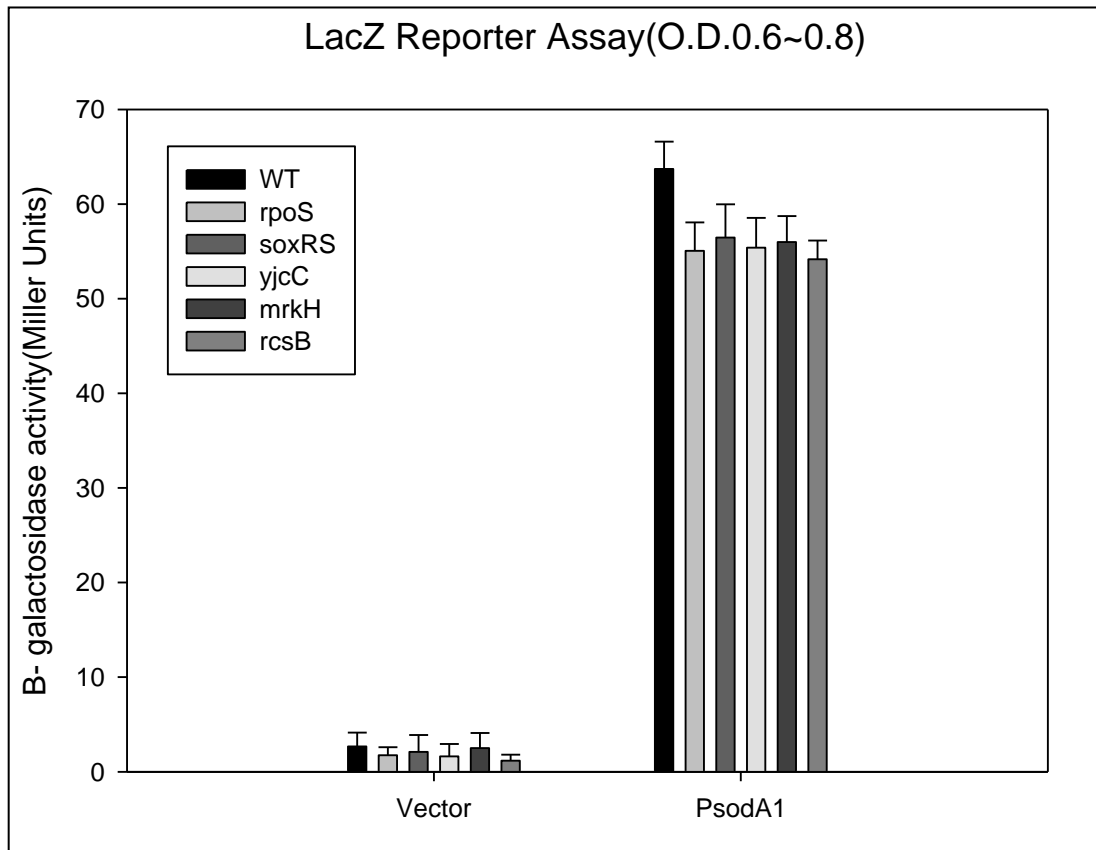
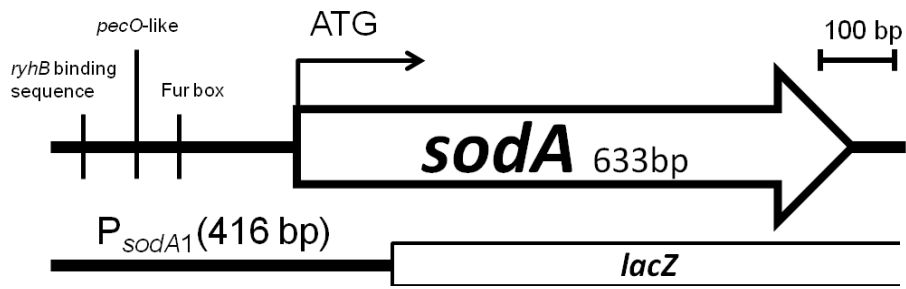
將培養隔夜之菌液以 100 倍稀釋分別培養於 LB 培養液，待菌液 OD₆₀₀ 約 0.6~0.8 左右，抽取全菌 RNA，接著執行即時聚合酶連鎖反應，分析 *sodA* 基因表現量。

Lanes 1: WT, 2: Δfur [pETQ33], 3: WT 培養於 50 μ M ferric ion 及 50 μ M ascorbic acid 的 LB 培養液，4: WT 培養於 200 μ M dipyrldyl 之 LB 培養液，5: WT[pETQ33-*ryhB*]，6: $\Delta fur\Delta ryhB$ [pETQ33]，7: Δfur [pETQ33-*ryhB*]，8: $\Delta fur\Delta ryhB$ [pETQ33-*ryhB*]。



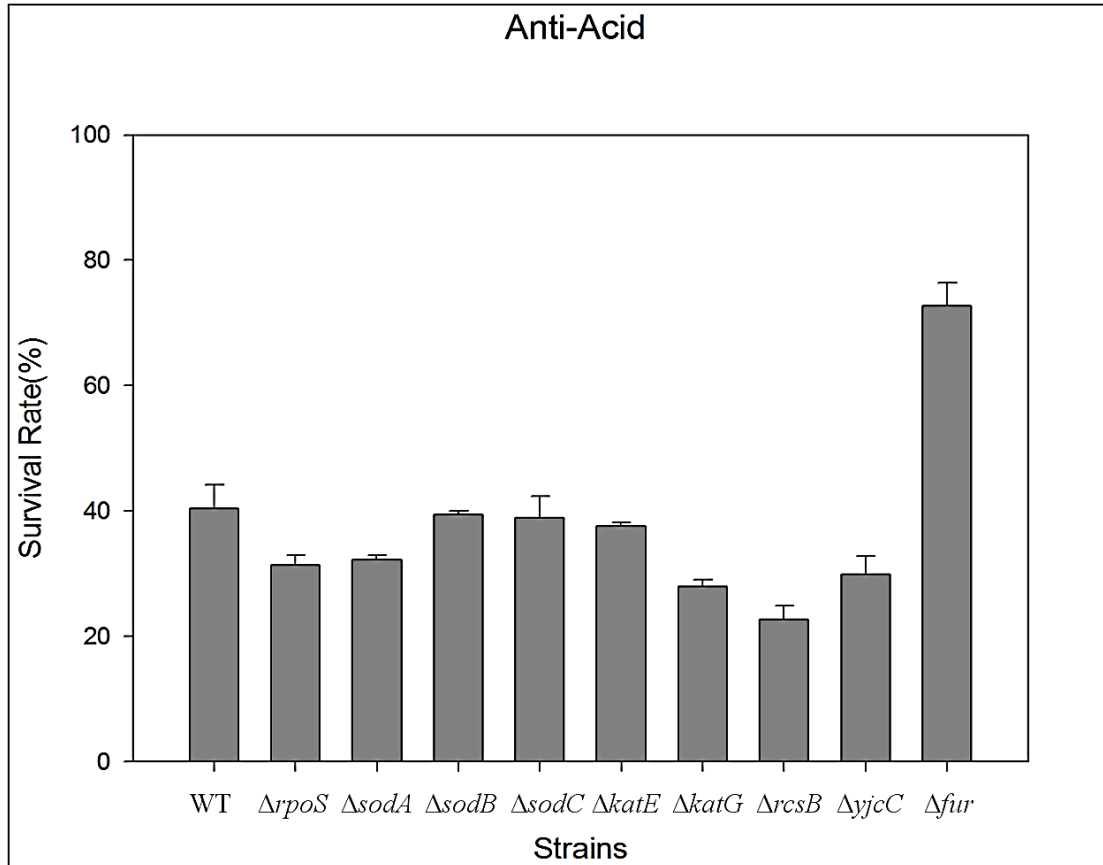
圖十七：*sodA*、*soxRS*、*yjcC* 或 *mrkH* 基因缺損對抗氧化能力的影響

(A)細菌在 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，以 20 倍稀釋至 LB 培養液中，培養至 OD₆₀₀ 約 0.6~0.8 左右，加入 3 mM PQ 37°C 培養細菌 40 分鐘。(B)在 10 mM PQ 處理下的 disc diffusion assay。(C)disc diffusion assay 的抑菌情形。



圖十八：LacZ 報導系統分析調控蛋白分子對 *sodA* 的影響

利用 LacZ 報導系統來看分別在調控分子 *rpoS*、*soxRS*、*yjcC*、*mrkH* 或 *rcsB* 基因缺損的情況下，*P_{sodA1}* 的 β -galactosidase 活性。



圖十九：*rpoS*、*sodA*、*katG*、*yjeC* 或 *rcsB* 基因缺損對抗酸能力的影響
 細菌在 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，以 20 倍稀釋至 LB 培養液中，培養至 OD₆₀₀ 約 0.6~0.8 左右，加入 pH 4.4 的 LB 培養液適應 1 小時，最後移至 pH 3.0 的 M9 培養液中，培養 45 分鐘。

(A)

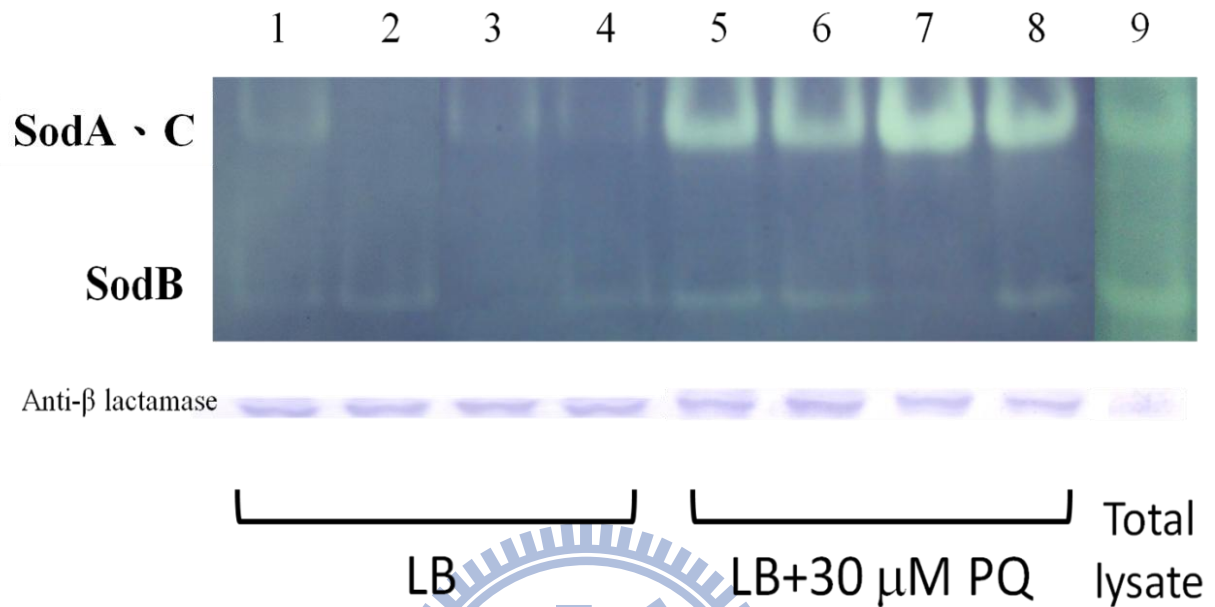
	(1)	1							10	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SodA	(1)	MEMI	MSY	TLPS	SLPY					
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SodB	(1)	----	MSFELPALPY							
<i>Escherichia coli</i> K-12 SodA	(1)	----	MSYTLPSLPY							
<i>Rhizobium leguminosarum</i> SodA	(1)	----	MAFELPELPY							
Consensus	(1)		MSFTLPSLPY							

(B)

	(1)	1							10	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SodA	(1)	MEMI	MSY	TLPS	SLPY					
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SodB	(1)	----	MSFELPALPY							
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SodC	(1)	----	--MQRCILAI							
<i>Escherichia coli</i> K-12 SodA	(1)	----	MSYTLPSLPY							
<i>Rhizobium leguminosarum</i> SodA	(1)	----	MAFELPELPY							
Consensus	(1)		MSF LPSLPY							

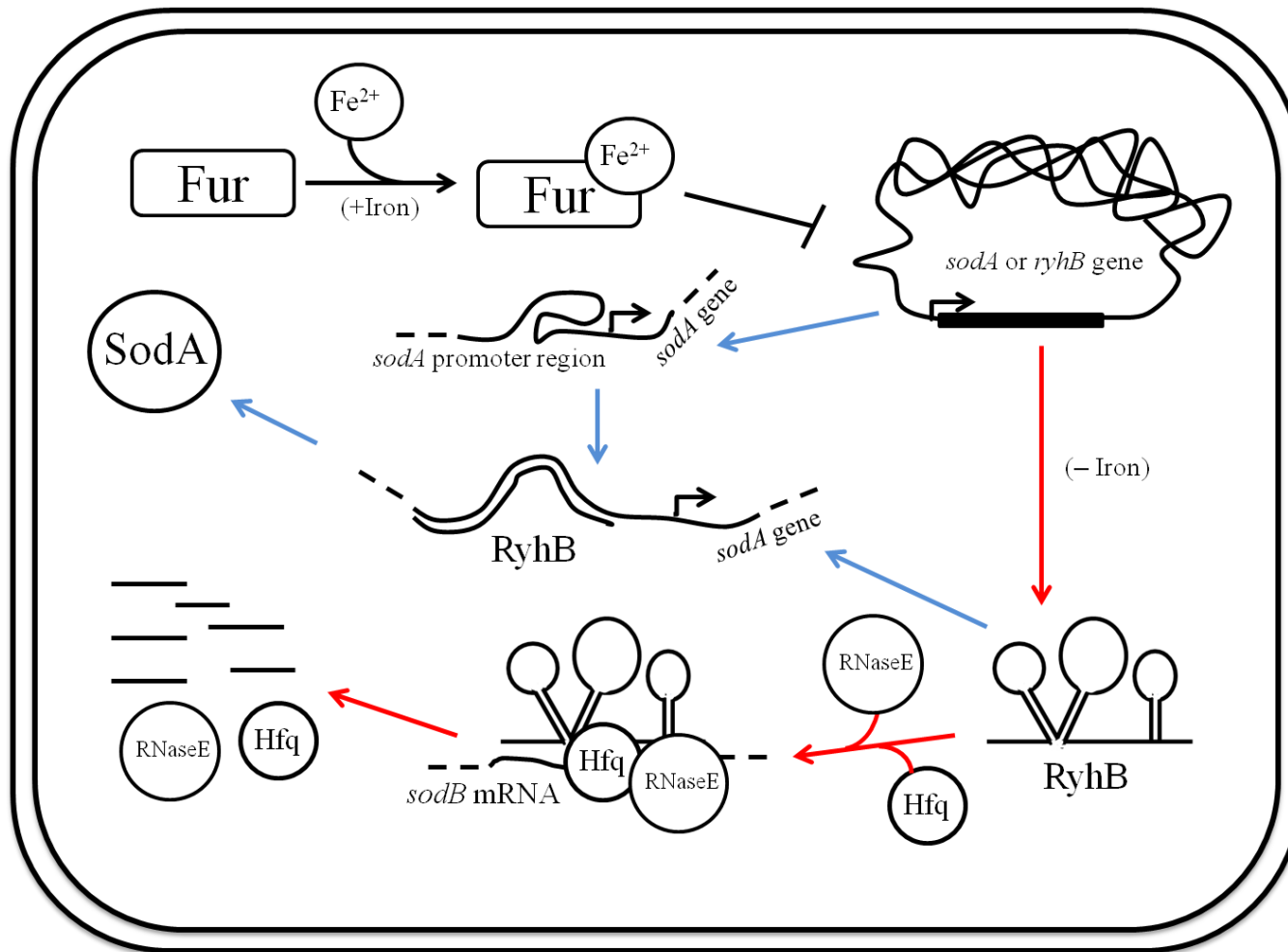
圖二十：SodA 和 SodB 的 N 端 10 個氨基酸序列

(A) 克雷白氏肺炎桿菌的 SodA 與 SodB 和大腸桿菌的 SodA 及根瘤菌 SodA 的 N 端 10 個氨基酸序列比較。(B) 以上與克雷白氏肺炎桿菌的 SodC 一同比較。



圖二十一：SodA、SodB 和 SodC 在細胞膜間隙的活性分析

分別萃取有無經 30 μM PQ 處理過的各菌株細胞膜間隙蛋白質，取適量之蛋白以電泳方式將蛋白質分離，再利用膠染色來分析超氧化歧化酶活性，並且以西方免疫墨點法來對細胞膜間隙的標記 β lactamase 進行呈色分析。Lanes 1 and 5 : WT, 2 and 6 : ΔsodA , 3 and 7 : ΔsodB , 4 and 8 : ΔsodC , 9 : WT 生長在 LB 培養液下萃取出全蛋白。



圖二十二：Fur 及 RyhB 對 *sodA* 表現的可能調控路徑