

國立交通大學

分子醫學與生物工程研究所

碩士論文

克雷白氏肺炎桿菌 CG43 之 PecS 與 PecM

在調控第三型纖毛表現所扮演之角色

**Roles of PecS and PecM on the expression of type 3
fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43**

研究生：王郁勝 (Yu-Seng Wang)

指導教授：彭慧玲 博士 (Hwei-Ling Peng)

中華民國一零一年七月

致謝

感謝彭老師肯收完全沒有生科背景的我做學生，更在這兩年當中對我的耐心教導。不論是實驗上的問題，抑或是寫論文做簡報，老師也都給了我許多的建議。這些幫助無論是在研究上或是人生態度上都對我有很大的助益。

也很感謝已經畢業的博班學長姊盈蓉、新耀及健誠，雖然與你們相處的時間並不長，但你們總是細心教導我有關實驗上的問題，也教我在做實驗上應有的態度及習慣，這些態度及習慣對我研究所生涯有很大的影響。

感謝靜柔學姊在實驗上的細心教導或是生活上對我的關懷及鼓勵，感謝哲充學長在我實驗有問題時總是可以與我深入討論並且給我一些很棒的建議。

感謝實驗室的同學舉豪、力成跟婉怡，在這兩年我們一起互相扶持、鼓勵，也在實驗室帶來了歡樂。也很感謝這屆升碩二的學弟妹教了我很多我之前從沒想過的人生態度及處理事情的方法，真的使我受益良多也讓我開了眼界。

在此我更感謝我的家人，雖然我走的路與大學所學的完全不同，但他們還是全力支持我所做的決定。尤其要感謝我的姊姊，是她帶我進入這個未知且有趣的領域，並且在我實驗或是報告上都給我莫大的幫助，也常常在我陷入低潮時開導我、鼓勵我，讓我可以很快的恢復。

最後要感謝在大學 4 年與我同甘共苦的中山醫學大學物理治療系 94 級與語言治療及聽力 94 級同學們，在我情緒低落時陪我聊天也常抽空與我一起出遊散心。

中文摘要

在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 菌株，若移除座落於第一型纖毛及第三型纖毛基因組間之 *pecS* 或 *pecM* 基因，可增加第三型纖毛主結構蛋白 MrkA 之表現，因此本研究進一步探討 *pecS* 與 *pecM* 在克雷白氏肺炎桿菌之纖毛調控上所扮演之角色。藉由西方墨點法、甘露糖敏感之酵母菌凝集測試及生物膜生成活性測試，顯示 *pecS* 或 *pecM* 之基因缺損會導致第三型纖毛之表現量上升，但不影響第一型纖毛之表現，且移除 *pecM* 對第三型纖毛表現量之影響似乎比移除 *pecS* 更顯著。此外，添加尿酸會使 MrkA 表現量及生物膜生成活性皆明顯上升，但將 *pecM* 基因移除後，其生物膜之生成活性卻無顯著上升，暗示具穿膜結構之 PecM 可能參與尿酸之運送，而尿酸可誘導生物膜之生成。續以凝膠電泳位移分析，證實重組蛋白 PecS 可結合含有類 *pecO* 序列之 *mrkA*、*pecS* 和 *pecM* 之啟動子，且在凝膠電泳位移競爭實驗，證實尿酸可作為配體角色，防止 PecS 與含有 *pecO* 序列之 DNA 結合。在啟動子活性之量測試驗，發現一旦 *pecS* 缺失，*pecS* 與 *pecM* 啟動子之活性顯著上升，此結果證實 PecM 和 PecS 除了會抑制第三型纖毛之表現，PecS 亦可在轉錄層面抑制 *pecS* 及 *pecM* 基因之表現。另亦證實 PecM 或 PecS 之基因缺損似乎並不影響細菌抵抗 paraquat 所造成之氧化壓力，且利用 Two hybrid 分析，顯示 PecS 與 PecM 之間似乎無交互作用。

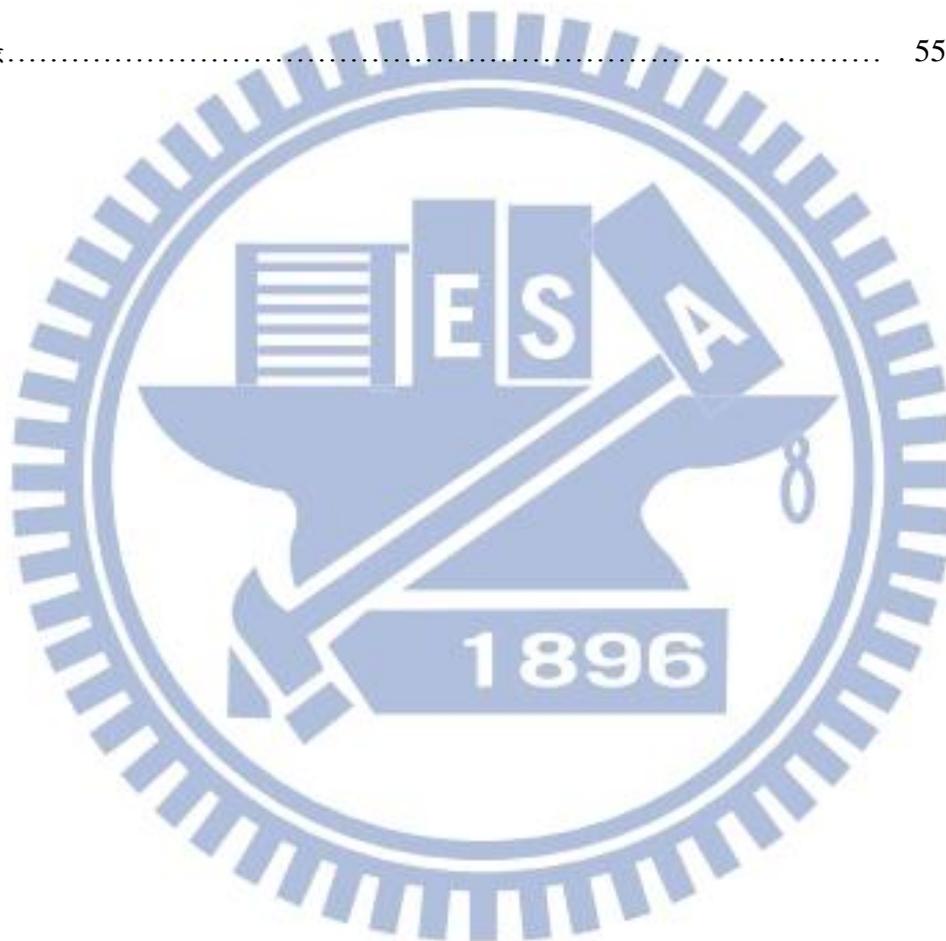
Abstract

In *Klebsiella pneumoniae* CG43, deletion of *pecS* or *pecM*, which located in-between the type 1 and type 3 fimbriae gene clusters, had previously been shown to increase the expression of type 3 fimbriae major pilin MrkA. Here the deleting effect of *pecS* and *pecM* is further analyzed. The analysis of western blotting hybridization, mannose sensitive yeast agglutination, and biofilm formation activity revealed that either gene deletion increased the expression of type 3 fimbriae but had no apparent influence on type 1 fimbriae expression. Notably, the deleting effect of *pecM* on type 3 fimbriae was more apparent than that of *pecS*. Addition of urate was able to increase the MrkA expression and biofilm forming activity, however, deletion of the *pecM* had lost of the urate induced activity. This implied that the transmembrane domain of PecM may be involved in the transport or sensing uric acid for biofilm formation. Moreover, EMSA analysis indicated that the recombinant PecS was able to bind to the the putative *pecO*-containing promoters P_{mrkA} , P_{pecS} or P_{pecM} . The following competitive assay suggests that uric acid is a ligand of the recombinant PecS to prevent from the binding to the *pecO*-containing DNA. Moreover, the promoter activity measurement revealed that the level of P_{pecS} , P_{pecM} , or P_{mrkA} increased by the deletion of *pecS*. Taken together, these results suggest that PecM and PecS are able to negatively regulate the expression of type 3 fimbriae and PecS could also repress *pecS* and *pecM* expression at the transcriptional level. Finally, disc inhibition assay failed to detect either gene deleting effect on the bacterial response to paraquat treatment. The 2-hybrid analysis was also unable to demonstrate the interaction between PecS and PecM.

目錄

	頁數
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
表目錄.....	5
圖目錄.....	6
縮寫表.....	7
一、前言.....	8
二、實驗材料與方法.....	13
三、實驗結果.....	18
3.1 PecS 及 PecM 序列分析.....	
3.1.1 PecS 與尿酸結合之高度保留性胺基酸序列.....	18
3.1.2 分析確認 <i>pecO</i> 序列.....	18
3.1.3 分析 <i>mrkA</i> 啟動子序列.....	18
3.1.4 PecM 之序列分析.....	19
3.2 以突變株進行纖毛之功能性測試.....	
3.2.1 西方墨點法分析 PecS、PecM 及 PecS/PecM 突變株.....	19
3.2.2 酵母菌凝集測試第一型纖毛的表現.....	20
3.2.3 生物膜生成分析.....	20
3.2.4 尿酸環境對第三型纖毛表現之影響.....	20
3.3 PecS 與 DNA、PecM 之交互作用.....	
3.3.1 凝膠電泳位移測定重組 PecS 蛋白與 <i>pecO</i> 序列的結合.....	21
3.3.2 啟動子活性分析測試.....	22
3.3.3 Bacterial Two hybrid system 分析.....	22
3.4 紙錠測試 (Disc inhibition assay).....	23

四、討論.....	24
4.1 PecS 與 PecM.....	24
4.2 PecS 與 PecM 調控第三型纖毛可能的機制.....	24
4.3 PecS 在 <i>K. pneumoniae</i> CG43S3 中對抗氧化壓力的影響.....	25
相關文獻.....	27
表.....	34
圖.....	39
附錄.....	55



表目錄

	頁數
表一、本次實驗使用與建構之細菌菌株.....	34
表二、本次實驗使用與建構之質體.....	36
表三、本次實驗使用之核苷酸引子.....	38



圖目錄

	頁數
圖一、基因 <i>pecS</i> 、 <i>pecM</i> 與第一型纖毛、第三型纖毛基因組之位置	39
圖二、PecS 胺基酸序列比對及膿桿菌後 PecS 可能的作用機制.....	40
圖三、分析確認 <i>pecO</i> 序列	41
圖四、分析第三型纖毛主結構蛋白基因 <i>mrkA</i> promoter 序列	41
圖五、分析 PecM 之構型及預測其功能	42
圖六、西方墨點法分析.....	43
圖七、酵母菌凝集測試.....	44
圖八、移除 <i>pecS</i> 或 <i>pecM</i> 後對 biofilm 生成的影響	45
圖九、西方墨點法分析尿酸對 MrkA 表現的影響.....	46
圖十、分析尿酸對生物膜生成能力的影響.....	47
圖十一、純化重組 PecS 蛋白	48
圖十二、分析重組 PecS 蛋白與 <i>pecO</i> 結合	49
圖十三、競爭型凝膠電泳位移測定.....	50
圖十四、凝膠電泳位移測定.....	50
圖十五、啟動子活性分析測試	51
圖十六、Bacterial two hybrid system 分析.....	52
圖十七、紙錠測試(Disc inhibition assay)分析	53
圖十八、PecS 與 PecM 調控第三型纖毛的可能路徑.....	54
附錄一、PecS 與 PecM 對第三型纖毛的影響.....	55
附錄二、Bacterial two hybrid system 之原理.....	56

縮寫表

APS	ammonium persulfate
BCIP	5-bromo-4 chloro-3-indoll phosphate
bp	base pair(s)
CPS	capsular polysaccharide
CFU	colony forming unit
c-di-GMP	Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate
ESBL	extended-spectrum β -lactamase
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
h	hour(s)
IPTG	isopropyl 1-thio- β - D -galactopyranoside
kDa	kilodalton(s)
LB	Luria-Bertani
LPS	lipopolysaccharide
μ g	microgram
ml	mililiter
μ l	microliter
mM	milimolar
mm	millimeter
NBT	nitro blue tetrazolium
OD	optical density
ONPG	o-nitrophenyl- β - D -galactopyranoside
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PVDF	polyvinylidene fluoride
rpm	revolutions per minutes
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfat
TBS	tris-buffer saline
TBST	tris-buffer saline Tween-20
TEMED	N-tetramethylethyl-endiamide

一、前言

克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)

克雷白氏肺炎桿菌為革蘭氏陰性菌，屬腸內菌科之伺機性病原菌，常在免疫功能不全病患造成院內感染，引發尿道感染、呼吸道感染、敗血症以及腦膜炎等症狀 (Podschun et al. 1998)，在台灣臨床上，亦發現遭受克雷白氏肺炎桿菌感染之糖尿病患者容易出現肝膿瘍症狀 (Chen et al. 2000)。近年來濫用抗生素，衍生許多具抗藥性之克雷白氏肺炎桿菌株，造成治療上極大的困難，如 1980 年代之 extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-*K. pneumoniae* (Hibbertrogers et al. 1995)，1990 年代之 Carbapenemase-*K. pneumoniae* (KPC)，對於 carbapenem 這類用來治療多重抗藥性之藥物亦產生抗性 (Patel, 2008)，以及 2010 年在印度首次發現之 New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1)-*K. pneumoniae*，在醫療界造成極大之恐慌 (Herte et al. 2012)。

克雷白氏肺炎桿菌之致病因子主要為多醣莢膜 (CPS)、脂多醣 (LPS)、螯鐵系統 (Siderophores) 及黏附因子 (Adhesins)；多醣莢膜與脂多醣可保護 *K. pneumoniae* 躲避宿主免疫系統攻擊，螯鐵系統可讓 *K. pneumoniae* 在宿主內取得生存所必需之鐵離子，黏附因子可使菌體附著於宿主組織上皮細胞或內皮細胞以利感染宿主。纖毛為突出細菌表面之髮狀結構，屬一黏附因子，常與細菌黏附至宿主組織以及與生物膜之形成有關，而近年來克雷白氏肺炎桿菌之第一型及第三型纖毛之作用機轉受到廣泛地討論 (Gerald et al. 1989)。

第一型纖毛 (type 1 pili 或 fimbriae)

第一型纖毛長約 1-2 微米、寬約 7 奈米，在腸內菌科菌株普遍存在且被廣泛地研究 (Hanson et al. 1988)。第一型纖毛具對甘露糖敏感 (mannose sensitive) 之特性，細菌表現第一型纖毛可與紅血球或酵母菌結合導致紅血球凝集

(hemagglutination) 或酵母菌凝集 (yeast agglutination)，而此凝集作用在添加甘露糖後被抑制 (Rosen et al. 2008)，許多研究亦指出第一型纖毛為尿道感染之重要致病因子，可藉結合尿道上皮細胞上含有甘露糖的受體而增加感染尿道的機會 (Buchanan et al. 1985)。第一型纖毛由 *fim* 基因組所組成，其中 FimA 為第一型纖毛之主要結構蛋白，FimI、FimF 與 FimG 為次要結構蛋白，FimH 位於纖毛頂端負責專一性的黏附子；第一型纖毛經由 chaperone—usher 路徑所合成，FimC 及 FimD 分別為 chaperone 與 usher 與纖毛之合成息息相關；*fimK* 位於 *fimH* 之下游，可轉譯具有 EAL 功能區域之蛋白 (Rosen et al. 2008)。第一型纖毛受相位變化 (phase variation) 調控，*fimA* 前有一段可藉由重組酵素 (recombinase) FimB 及 FimE 翻轉之序列 *fimS*，當 *fimS* 序列為可被轉錄方向時稱為 on-phased，第一型纖毛可被表現，但當 *fimS* 序列為相反方向時為 off-phased，第一型纖毛則不表現 (Klemm et al. 1986)。

第三型纖毛 (type 3 pili 或 fimbriae)

第三型纖毛長約 0.5-2 微米、寬約 2-4 奈米，主要存在於 *K. pneumoniae* 菌株，雖可凝集紅血球，但不因添加甘露糖而抑制其凝集活性 (Gerald et al. 1989)，其結合受體還未被發現。已知第三型纖毛為克雷白氏肺炎桿菌在生物性或非生物性之表面形成生物膜之主要因子，在維生器材 (譬如：導尿管、胸管、氣管內管等) 形成生物膜時，除了使患者更容易受到感染外，也提高細菌對宿主防禦系統以及抗生素之抗性 (Struve et al. 2009)，另有研究指出克雷白氏肺炎桿菌可藉由第三型纖毛黏附於人類腎臟、肺部組織、人類尿道及膀胱上皮細胞 (Hornick et al. 1992)。第三型纖毛由 *mrk* 基因組所組成，MrkA、MrkF 分別為第三型纖毛之主要結構蛋白與次要結構蛋白 (Huang et al. 2009)，位於第三型纖毛頂端之 MrkD 為黏附子，與生物膜的形成及特定細胞的結合有關 (Jagnow et al. 2003)；第三型纖毛之形成亦經由 chaperone-usher 路徑，MrkB 與 MrkC 分別為 chaperone 及 usher

(Allen et al. 1991)；在第三型纖毛基因組後半段有三個分別轉譯出可調控第三型纖毛表現之基因：MrkH、MrkI 以及 MrkJ(Jeremiah et al. 2010)，其中 MrkI 含有著 LuxR-type 之轉錄因子，可直接與受其調控之基因結合，進而影響基因表現；MrkI 對第三型纖毛之調控為正調控(Jeremiah et al. 2010)；MrkH 具有 PilZ 功能區域，可與二級信使 (second messenger) bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP 結合，進而活化 MrkH 調控基因之能力，MrkH 對第三型纖毛的調控亦屬於正調控 (Jeremiah et al. 2011)。MrkH、MrkI 皆會受到 ferric uptake regulator (Fur)之調控，當 *fur* 基因被移除後，MrkH 與 MrkI 之表現量因受其影響而下降，進而造成第三型纖毛之表現量下降(Wu et al. 2012)；MrkJ 為一種磷酸雙酯酶，可調節細菌中 bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP 之濃度，並對第三型纖毛進行負調控(Jeremiah et al. 2010)。

PecS

在 *Erwinia chrysanthemi*，PecS 被證實為一負責調控許多致病因子之轉錄蛋白 (Hommais et al. 2008)，屬於 MarR (multiple antibiotic resistance regulator) 家族，另在大腸桿菌，MarR 蛋白為調控抗藥性基因之轉錄抑制子 (repressor) (Alekhun et al. 1999)。MarR 家族中，有一群蛋白可與尿酸結合稱為 UrtR (urate responsive transcriptional regulator)，這些蛋白具有四個高度保留之胺基酸序列與尿酸結合有關，當 UrtR 蛋白之特定保留胺基酸與尿酸結合後，會使 UrtR 蛋白產生構型上之改變 (conformational change)，並會失去與特定 DNA 結合之能力，使得受調控之基因得以順利轉錄 (Perera et al. 2011)。尿酸為一種代謝副產物，細菌入侵宿主細胞時，宿主細胞常利用氧化壓力對抗細菌感染，宿主可利用 xanthine oxidase 將 xanthine 分解為尿酸以產生氧化壓力，尿酸則以副產物形式產生 (Segal et al. 2000)。由於尿酸為細胞產生氧化壓力時所產生之副產物，所以許多由 UrtR 蛋白所調控之基因都與細菌之抗氧化能力有關 (Perera et al. 2011)。在 *Agrobacterium*

tumefaciens 實驗模式，已證實 PecS 以雙倍體形式與 DNA 結合，此具有迴文序列之 DNA 稱為 *pecO*，PecS-*pecO* 結合佔據了 RNA 聚合酶位置而抑制該基因之轉錄，而當尿酸進入細菌內與 PecS 結合，使 PecS 失去了與 *pecO* 結合之能力，下游基因之轉錄即可進行 (Perera et al. 2010)；另以 *Burkholderia thailandensis* 為例 (Grove 2010)，UrtR 之同源性蛋白質 MftR 會抑制著屬為 Drug/metabolism transporter superfamily 之 MFTP 蛋白，一旦尿酸進入細菌內，MftR 就失去結合 DNA 之能力，使 MFTP 蛋白順利轉錄。此外，目前已證實某些細菌在缺乏氮源之環境之下可利用環境中的尿酸作為氮來源，例如 *Bacillus subtilis*、*Mycobacterium phlei*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Serratia marcescens*。

PecM

PecM 為一膜蛋白，最早發現與 PecS 皆會調控 *E. chrysanthemi* 所產生之果膠酵素 (pectinase)，以增加將 *E. chrysanthemi* 感染宿主之能力 (Reverchon et al. 1994)。將 *pecS* 或 *pecM* 基因後移除後，皆產生相似之顯型 (phenotype)，因此認為 PecS 與 PecM 屬於相同的調控網絡系統 (Reverchon et al. 1994)。其後研究發現 PecM 亦擔任 efflux pump 角色，與 indigoidine 藍色色素之生合成與分泌有關 (Rouanet et al. 2001)。indigoidine 為 *E. chrysanthemi* 對抗宿主之防禦機制，宿主細胞會藉由產生氧化壓力作為防禦手段，而 indigoidine 可對抗宿主所產生之氧化壓力，以增加細菌在宿主內隻存活 (Reverchon et al 2002)。根據早期研究結果，若將 *pecS* 與 *pecM* 同時送入大腸桿菌，發現 PecS 需要 PecM 之幫助才能與 DNA 結合，暗示 PecS 與 PecM 之交互作用，但目前仍未知此為直接或間接之交互作用 (Praillet et al. 1997)。

研究目標

在 *K. pneumoniae* CG43 中，*pecS* 及 *pecM* 座落於相鄰之 *fim* 與 *mrk* 基因組中

(圖一)，*pecS* 與 *pecM* 轉錄方向相反，但共用同一個啟動子。根據本實驗室之早期研究結果，顯示 *pecS* 基因轉錄可被 PecS 自我調控，而 *pecM* 的轉錄亦受到 PecS 影響 (黃盈蓉，民國九十六年)，如附錄一；分別將 *pecS* 與 *pecM* 這兩個基因移除，以西方免疫墨點分析偵測第三型纖毛之主要結構蛋白 MrkA 之表現量，發現 *pecS* 或 *pecM* 基因缺失會使 MrkA 表現量明顯增加；利用 limiting dilution RT-PCR 分析，發現在 *pecS* 突變株或 *pecM* 突變株中 *mrkA* RNA 表現量亦明顯增多，暗示 PecS 與 PecM 會負向調控第三型纖毛之表現；進一步大量表現並純化 His₆-PecS 後，以凝膠電泳位移(EMSA)分析，發現 His₆-PecS 會與 *mrkA* 之啟動子結合，顯示 PecS 以轉錄調控第三型纖毛之表現。延續先前針對 PecS 之探討，本研究擬再次深入探討 PecS 與 PecM 調控第三型纖毛表現之機制，並分析其對第一型纖毛表現之影響，以及尿酸處理後對第三型纖毛表現及生物膜生成能力之影響，並以 two-hybrid analysis 測試 PecS 與 PecM 是否進行交互作用。

二、實驗材料與方法

酵母菌凝集試驗 (Yeast agglutination)

以 Blumer 於 2005 年發表之方法(Blumer et. al., 2005)，利用酵母菌 *Saccharomyce cerevisiae* AH109 菌株(Sigma, YSC2) 進行酵母菌凝集試驗。將 *K. pneumoniae* CG43S3 Δ *mrkA*、CG43S3 Δ *mrkA* Δ *pecS*、CG43S3 Δ *mrkA* Δ *pecM*、CG43S3 Δ *mrkA* Δ *pecS* Δ *pecM* ($\sim 10^8$ c.f.u./ml) 回溶於含有(無)2%甘露糖之 PBS，再將細菌與 10 mg/ml 酵母菌於玻片上混和均勻，並於室溫下以 80 rpm 轉速震盪 10 分鐘。

生物膜形成測定

將隔夜培養之 *K. pneumoniae* CG43S3、CG43S3 Δ *pecS*、CG43S3 Δ *pecM* 與 CG43S3 Δ *pecS* Δ *pecM* 菌液以含有或不含尿酸之 LB 以 1:100 比例稀釋後，加入 96 孔盤於 37°C 培養 24 小時或 48 小時。續以去離子水清洗孔洞，再以 1% (w/v) 結晶紫溶液於室溫下染色 1 小時，再利用去離子水清洗孔洞，接著加入 1% (w/v) SDS 溶液震盪 60 分鐘，洗去殘留於孔洞中之結晶紫，最後以波長 595nm 測定孔洞中溶液之吸光值以換算生物膜之形成量。

西方免疫墨點分析

將隔夜培養之 *K. pneumoniae* CG43S3、CG43S3 Δ *pecS*、CG43S3 Δ *pecM* 與 CG43S3 Δ *pecS* Δ *pecM* 菌液以 LB 經 1:20 比例稀釋後以 37°C 培養至 OD₆₀₀=0.5，以含不同濃度尿酸之 LB 經 1:4 比例稀釋菌液，續以 37°C 培養 4 小時，之後破菌取全細胞蛋白。若無需尿酸處理，直接以隔夜培養之 *K. pneumoniae* CG43S3、CG43S3 Δ *pecS*、CG43S3 Δ *pecM*、CG43S3 Δ *pecS* Δ *pecM*、CG43S3 Δ *mrkA*、CG43S3 Δ *mrkA* Δ *pecS*、CG43S3 Δ *mrkA* Δ *pecM*、CG43S3 Δ *mrkA* Δ *pecS* Δ *pecM* 菌液破菌取全細胞蛋白。將欲分析之全細胞蛋白質樣本與蛋白質染劑【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】以等比例混和均勻，置於 95°C 乾浴槽上加熱 10 分鐘，再加入 13.5% (v/v) 之 SDS-聚丙烯醯胺膠之孔洞中，以 100 V、200 mA 電泳 140 分鐘。電泳後的 SDS-聚丙烯醯胺膠以 140 V、400 mA、電泳 140 分鐘之條件將膠上之蛋白質轉漬到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene difluoride, PVDF) 上，續利用 5% 脫脂奶粉進行蛋白質阻擋 (Protein Blocking)。經蛋白質阻擋後之 PVDF 進行清洗步驟：TBST 清洗兩次、TBS 清洗一次後，以第一抗體(帶有 rabbit 抗原的 MrkA、FimA 抗體) 震盪兩小時以結合 PVDF 上之目標蛋白，經過清洗步驟後再利用第二抗體 anti-rabbit IgG conjugate alkaline phosphatase antibody (Sigma) 震盪一小時偵測第一抗體。再經過清洗，最後加入鹼性磷酸酶之受質 (nitro blue tetrazolium chloride (NBT)/5-bromo-4-chloro -3-indolyl phosphate (BCIP) 便可催化產生有色產物沉澱於第一型、第三型纖毛主要結構蛋白 MrkA 與 FimA 之位置。

重組 PecS 蛋白的大量表現以及純化

首先，將含有已接入蛋白質基因 *pecS* 的表現質體 pET30 之 *E. coli* NovaBlue(DE3) 隔夜培養，將隔夜培養之菌液以 LB 經 1:20 比例稀釋，於 37°C 下搖盪培養菌液濃度至 $OD_{600}=0.4\sim0.6$ ，加入 1 mM IPTG 誘導目標蛋白基因 6 小時。之後將經破菌處理以取得全細胞蛋白，取得得之細胞蛋白以轉速 8000 rpm 離心，取上清液藉通過鎳樹脂(nickel resin)親和性管柱以純化重組 PecS 蛋白。重組 PecS 蛋白之 N 端皆帶有 His-tag，所以 PecS 蛋白會附著於鎳樹脂親和性管柱(Novagen)上，再利用 elute buffer (20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、1 M imidazole、PH7.9)將 PecS 蛋白質從管柱上置換出來，並利用 dialysis buffer (phosphate buffer pH=6.8)交換出在純化過程之殘留離子，並利用 PEG 20000 進行蛋白質濃縮以達到所需之目標濃度。

凝膠電泳位移測定(EMSA)分析

此分析係以 Lightshift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo) 試劑套組進行測定：將不同濃度之 PecS 蛋白與所要測定之 DNA 片段相混並加入 EMSA buffer (20 mM Tris-HCl、50 mM NaCl、0.5% Triton-X100、20 mg/ml BSA、1.5% glycerol)、鮭魚精子 DNA 片段、去離子水，混和均勻後靜置於室溫 30 分鐘，再將樣本注入於預先在 0.5 倍 TBE buffer 中以 100 V、20 mA 條件電泳 50 分鐘後之 5% 聚丙烯醯胺凝膠(聚丙烯醯胺為 29:1)，續以 100 V、20 mA 條件於 0.5 倍 TBE buffer 中電泳 65 分鐘，上述之預先電泳以及正式電泳皆須在低溫進行。電泳後的聚丙烯醯胺凝膠可使用 cyber green 染色並以紫外光進行顯影。若為競爭型凝膠電泳位移測定，須將電泳過後的聚丙烯醯胺凝膠以 100 V、300 mA、電泳 30 分鐘之條件將凝膠上之 DNA 轉漬到 Biodyne Nylon Transfer Membrane (Pall corporation)，將完成轉漬之 Biodyne Nylon Transfer Membrane 置於紫外燈管下 15 分鐘進行交互連結。交互連結完成後，加入 blocking buffer 並以轉速 20 rpm 震盪 15 分鐘，之後將 membrane 放置於含 Stabilized Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate 之 blocking buffer 並以轉速 20 rpm 震盪 20 分鐘。以 wash buffer 清洗 5 分鐘共 4 次(以轉速 20 rpm 震盪)，再將 membrane 放置於 Substrate Equilibration buffer 中 5 分鐘，最後在 membrane 上滴入 Substrate working buffer 靜置 5 分鐘後，以顯影劑與定影劑進行顯影。

紙錠測試(Disc inhibition assay)分析

將隔夜培養之 *K. pneumoniae* CG43S3、CG43S3 Δ pecS、CG43S3 Δ pecM 與 CG43S3 Δ pecS Δ pecM 菌液以 LB 經 1:20 比例稀釋後在 37°C 培養菌液濃度至 OD₆₀₀=0.2~0.3，而後將菌液已無菌棉花棒均於塗於 M9 培養基上，在 M9 培養基中間放入一圓形小紙錠並於其上滴入 10 mM 之 Paraquat 作為氧化壓力之來源，再置於 37°C 靜置培養 16 小時。之後測量各培養基中所產生的抑菌環大小。

啟動子活性分析(promoter activity assay)

根據 Miller, J. H. 於 1972 發表之方法，先利用 2 對引子(BR19/ BR20 與 BR21/ BR22)，經聚合酵素鏈鎖反應(PCR)分別將 *pecS*、*pecM* 基因可能之啟動子片段放大，再將啟動子片段次選殖(subclone)至 *placZ15* 質體。以電穿孔法將選殖好含有 *pecS*、*pecM* 啟動子片段之 *placZ15* 轉殖至 *E. coli* S-17 λ *pir*。再將含有質體 *lacZ::PmrkA₅₀₀*、*lacZ::PmrkA₂₃₂*、*lacZ::PpecS*、*lacZ::PpecM* 之 *E. coli* S-17 λ *pir* 菌液與隔夜培養之 *K. pneumoniae* CG43S3、CG43S3 Δ *pecS* 與 CG43S3 Δ *pecM* 菌液相混，利用 *E. coli* S-17 λ *pir* 之性線毛將 *lacZ15* 質體轉殖到已預先移除 *lacZ* 基因之 *K. pneumoniae* CG43S3、CG43S3 Δ *pecS* 與 CG43S3 Δ *pecM* 中。

根據 Kader 於 2006 發表之方法，藉由測定 *lacZ* 基因所轉譯 β -galactosidase 之活性來推算啟動子之活性。將欲測定之菌株隔夜培養液以 LB 經 1:80 比例稀釋，於 37°C 下震盪培養菌液濃度至 OD₆₀₀=0.6~0.8，續以 100 ml 菌液與 900 ml 之 Z buffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β -mercaptoethanol)、17 ml 1% (w/v) SDS 以及 35 ml chloroform 於試管內混和均勻，將混和溶放至 30°C 水浴槽 10 分鐘後，續加入 200 ml ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside，濃度 4 mg/ml) (Sigma-Aldrich) 進行反應並觀察混和溶液之顏色變化，當顏色達到黃色時，加入 500 ml，濃度 1 M 之 Na₂CO₃ 以停止反應。以波長 420nm 測定溶液吸光值，再利用公式換算為 Miller units (Miller, 1972)。

Bacterial two hybrid system

以 BacterioMatch II Two-Hybrid System Vector Kit (Agilent Technologies) 試劑套組進行分析，原理如附錄二，若要執行 Bacterial two hybrid system 則需先建構含有目標基因 *pecS*、*pecM* 之表現載體 pBT 及 pTRG。先利用引子 BR11/ BR12

及 BR09/ BR16，以聚合酵素鏈鎖反應(PCR)將 *pecS*、*pecM* 基因放大，再將目標基因次選殖(subclone) 至 pBT 及 pTRG 表現載體，續以電穿孔之方式，將帶有不帶或不帶有目標基因之兩種表現載體同時轉殖至 *E. coli* XL1-Blue MRF^rKan，續於 30°C 下以轉速 200 rpm 震盪 20 小時，最後利用質體所帶之抗藥性基因來確認是否兩種質體皆轉殖進入 *E. coli* XL1-Blue MRF^rKan，藉此系統可利用 *E. coli* XL1-Blue MRF^rKan 所轉譯之 β -galactosidase 之活性來做為有無蛋白質之間直接交互作用之定量指標，將欲測定之菌株隔夜培養，增殖後之菌液以 LB 經 1:100 比例稀釋，並於 30°C 下震盪培養菌液濃度至 OD₆₀₀=0.6~0.8，續將 100 ml 菌液與 900 ml 之 Z buffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β -mercaptoethanol)、17 ml 之 1% (w/v) SDS 以及 35 ml 之 chloroform 於試管內混和均勻，混和溶放於 30°C 水浴槽 10 分鐘，續加入 200 ml 之 ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside, 濃度為 4 mg/ml) (Sigma-Aldrich) 開始進行反應並觀察混和液之顏色，當顏色達到黃色時，加入 500 ml 之 1 M Na₂CO₃ 停止反應。而後以波長 420nm 測量試管內溶液之吸光值，再以公式換算為 Miller units (Miller, 1972)。

三、實驗結果

3.1 PecS 及 PecM 序列分析

3.1.1 PecS 與尿酸結合之高度保留性胺基酸序列

分析不同菌株之 PecS 胺基酸序列，如圖二 A，*K. pneumoniae* CG43S3 之 PecS、*A. tumefaciens* 及 *E. chrysanthemi* 之 PecS 胺基酸序列上皆含有如 UrtR 具高度保留性之四個胺基酸 W₁₇、D₆₂、R₆₉、R₉₅，而這四個高度保留性之胺基酸序列可能決定 PecS 蛋白與尿酸之結合(Perera et al. 2010)，因此推測 *K. pneumoniae* 之 PecS 功能上可能相似於 *A. tumefaciens* 之 PecS，藉與尿酸結合而調控 PecS 之功能(圖二 B)。

3.1.2 分析確認 *pecO* 序列

在 *A. tumefaciens*，位於 *pecS* 與 *pecM* 間之非轉譯序列 *pecO* 包含兩個迴文序列：5'-TCTTGATATCAAGA-3'和 5'-TTACCTTGAAGTGAAGATAAA-3'，PecS 藉由結合此兩個迴文序列以抑制下游基因之轉錄。如圖三，*K. pneumoniae* CG43S3 *pecS* 與 *pecM* 間亦含有兩個與 *A. tumefaciens* 相似之 *pecO* 序列，命名為 P1，另一命名為 P2。

3.1.3 分析 *mrkA* 啟動子序列

本實驗室先前已發現 PecS 可與 *mrkA* 之啟動子結合，且 2010 年 Perera 等人證實 PecS 可與 *pecO* 序列結合並調控下游基因之表現，因此本研究欲分析 *mrkA* 啟動子是否含有類似 *pecO* 之迴文序列，結果如圖四，*mrkA* 啟動子含類似 *pecO* 之不完整迴文序列 5'-AGTGGCAGCCCTGCCAGT-3'和 5'-ACGCAGGGTTAATAATCATGAAT-3'，分別命名為 *pecO*-like 1 (*pecO*-L1)及 *pecO*-like 2 (*pecO*-L2)，暗示第三型纖毛的表現可能受到 PecS-*pecO*-L 之調控。

3.1.4 PecM 之序列分析

目前針對 PecM 蛋白之相關研究並不多，只確定 PecM 在 *E. chrysanthemi* 中與 pectinase 的調控 (Reverchon et al.1994) 以及 indigoidine 之生合成與分泌有關 (Rouanet et al. 2001)。藉由網站軟體 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析其胺基酸序列，結果顯示 PecM 之二級結構為含有 10 個穿膜結構的膜蛋白 (圖五)；另以 Pfam 網站分析，顯示 PecM 屬於未確定功能的 EamA 蛋白家族，由兩個相同的 domain 構成，可能作為輸送蛋白。綜合以上分析，我們推測 PecM 為一膜蛋白，可作為傳遞訊息的輸送者。

3.2 以突變株進行纖毛之功能性測試

3.2.1 西方墨點法分析 PecS、PecM 及 PecS/PecM 突變株

在 LB 培養下，*K. pneumoniae* CG43S3 主要表現第三型纖毛，惟在 *K. pneumoniae* CG43S3 Δ mrkA 突變株才能測得第一型纖毛之表現 (實驗室尚未發表的報告)。為了探討 PecS 與 PecM 基因缺失是否影響第一型纖毛表現，本研究以本實驗室原有之 *K. pneumoniae* CG43S3 Δ pecS、CG43S3 Δ pecM 及 CG43S3 Δ pecS Δ pecM (黃盈蓉 民國九十六年) 為親本，以同源互換方式建構了 CG43S3 Δ mrkA Δ pecS、CG43S3 Δ mrkA Δ pecM 及 CG43S3 Δ mrkA Δ pecS Δ pecM。

進一步以西方墨點法偵測第一型、第三型纖毛主結構蛋白 FimA、MrkA 的生成，如圖六 A，在 *K. pneumoniae* CG43S3 Δ pecM、 Δ pecS Δ pecM 突變株中，MrkA 之表現量明顯高於 *K. pneumoniae* CG43S3，但在 CG43S3 Δ pecS 之 MrkA 表現量卻些微下降；而不論 *K. pneumoniae* CG43S3 Δ mrkA Δ pecS、 Δ mrkA Δ pecM 或 Δ mrkA Δ pecS Δ pecM，其 FimA 表現量與 *K. pneumoniae* CG43S3 Δ mrkA 相當，顯示 PecS 與 PecM 可能不影響第一型纖毛的表現。

3.2.2 酵母菌凝集測試第一型纖毛的表現

為了確認 *pecS* 或 *pecM* 基因缺損不影響第一型纖毛之表現，進一步以第一型纖毛能凝聚酵母菌之特性來分析 *K. pneumoniae* CG43S3 Δ *mrkA*、CG43S3 Δ *mrkA* Δ *pecS*、CG43S3 Δ *mrkA* Δ *pecM* 或 CG43S3 Δ *mrkA* Δ *pecS* Δ *pecM*，如圖七 A，這些菌株都能凝集酵母菌而形成顆粒沉澱，且此凝集現象會因加入甘露糖後消失（圖七 B），顯示 *PecS* 或 *PecM* 之基因缺失不影響第一型纖毛的表現。

3.2.3 生物膜生成分析

過去研究證實第三型纖毛為決定 *K. pneumoniae* 生成生物膜之重要因子 (Struve et al. 2009)，故本研究藉由偵測生物膜之生成分析以確認 *PecS* 與 *PecM* 對第三型纖毛表現之影響。如圖八，*K. pneumoniae* CG43S3、CG43S3 Δ *pecS* 與 CG43S3 Δ *pecM* 在 24 小時的生物膜生成量類似，CG43S3 Δ *pecM* 在 48 小時的生物膜生成量高於 *K. pneumoniae* CG43S3，只有 CG43S3 Δ *pecS* Δ *pecM* 在 24 小時或 48 小時的生物膜生成量都明顯高於 *K. pneumoniae* CG43S3，暗示 *PecS* 與 *PecM* 經交互作用負向調控第三型纖毛之表現，且 *PecM* 扮演決定性的角色。

3.2.4 尿酸環境對第三型纖毛表現之影響

在含有尿酸之環境下，*A. tumefaciens* *PecS* 會失去與 DNA 結合之能力，進而促進下游基因的轉錄 (Perera et al 2010)。為了分析尿酸對 *PecS*、*PecM* 之影響，如圖九，隔夜培養後的 *K. pneumoniae* 菌株在添加尿酸誘導四小時後以西方免疫墨點分析 *MrkA* 之表現量，結果顯示隨著尿酸濃度的增加，*MrkA* 之表現量也隨之增加，此暗示尿酸會誘導第三型纖毛的表現。進一步分析尿酸處理過之 *K. pneumoniae* 菌株的生物膜形成能力，如圖十，經尿酸處理後的 *K. pneumoniae* CG43S3、CG43S3 Δ *pecS*、CG43S3 Δ *pecM* 與 CG43S3 Δ *pecS* Δ *pecM* 之生物膜生成能力皆明顯上升，然而 CG43S3 Δ *pecM* 在有尿酸的情況下，於 24 小時生物膜生成能力明顯下降，暗示 *PecM* 蛋白與尿酸的運送有關。然而 *pecM* 基因缺損似乎

對 48 小時之生物膜生成量沒有顯著影響，顯示 PecM 在含有尿酸環境下對第三型纖毛的確會產生影響，但仍需更多分析以闡明 PecM 對於第三型纖毛之調控機轉。

3.3 PecS 與 DNA、PecM 之交互作用

3.3.1 凝膠電泳位移測定重組 PecS 蛋白與 *pecO* 序列的結合

為了證實 PecS 是否會與 *pecO*、*pecO*-L 序列結合，藉由純化之重組 PecS 蛋白(圖十一)與合成的 *pecO* 序列 P1、P2 及含 *pecO*-like 1 片段的 A2 進行凝膠電泳位移測定。隨著重組 PecS 蛋白之濃度增加，重組 PecS 蛋白分別與 *pecO* 序列結合，如圖十二 A，100 nM 重組 PecS 蛋白即可與 P1 形成複合體，而需 200 nM 或 400 nM 才能分別看到 PecS-P2 (圖十二 B) 及 PecS-A2 (圖十二 C)。

為了進一步分析 PecS 與 *pecO* 序列是否為特異性結合，本研究利用生物素 (biotin) 標定及無標定之 *pecO* 序列進行競爭型凝膠電泳位移測定。圖十三顯示，重組 PecS 蛋白濃度達到 75 nM 時與 biotin 標定之 *pecO* 結合位移達到最大，而加入 50 倍及 100 倍無標定之 *pecO* 序列時，PecS 與 biotin-*pecO* 之混和體逐漸消失，當 non label-*pecO* 濃度達到 200 倍時，biotin-*pecO* 與 PecS 的結合完全被 non label-*pecO* 競爭而混和體完全消失，由此證明 PecS 與 *pecO* 序列的結合確實為特異性結合。

其他研究發現 *A. tumefaciens* 中添加尿酸後會破壞 PecS 結合 DNA 能力 (Perera et al 2010)，因此本研究亦測試在 *K. pneumoniae* CG43S3 是否也會出現此特性。藉由重組 PecS 蛋白與 *pecO* 序列進行之凝膠電泳位移測定，發現在重組 PecS 蛋白濃度達到 400 nM 時 *pecO* 與 PecS 因結合而產生之位移情況達到最大；並在此時加入不同濃度之尿酸，發現重組 PecS 蛋白與 *pecO* 結合之混和體隨著尿酸的濃度增加而逐漸減少，當尿酸濃度達到 10 mM 時重組 PecS 蛋白與 *pecO*

之混和體即完全消失（圖十四）。證明如同 *A. tumefaciens* 之研究結果，於 *K. pneumoniae* 實驗模式中，尿酸的確能破壞 PecS 結合 DNA 之能力。

在競爭型凝膠電泳位移測定以及添加尿酸之凝膠電泳位移測定的實驗中發現 PecS 與 *pecO* 混和體出現在兩種不同的位置，出現此現象是因為在 *pecO* 中同時含有兩個迴文序列，若 *pecO* 中只有其中一個迴文序列與 PecS 結合，則其混和體之所在位置則較低，若兩個迴文序列同時皆與 PecS 結合，則其混和體所在的位置則較高。

3.3.2 啟動子活性分析測試

由先前實驗得知 PecS 與 PecM 會對第三型纖毛進行負向調控，本研究欲進一步了解其影響是否發生於轉錄層面，因此在 *K. pneumoniae* CG43S3 Δ *pecS* 與 CG43S3 Δ *pecM* 中，分析 *mrkA*、*pecS*、*pecM* 之啟動子之活性是否受到影響。以 *mrkA*、*pecS*、*pecM* 之啟動子進行啟動子活性測試，如圖十五 A，*mrkA* 啟動子分為兩種長度：含有兩個 *pecO*-like 序列的長度 500 bp 以及只包含一個 *pecO*-like 序列的長度 232 bp，圖十五 B 顯示相較於 232 bp，500 bp 之 *mrkA* 啟動子在各突變株中之活性皆明顯高很多，顯示 *mrkA* 啟動子活性主要是在 500 bp 之片段。另外，*pecS* 與 *pecM* 之啟動子於 *K. pneumoniae* CG43S3 Δ *pecS* 中活性皆明顯較高，顯示 PecS 亦具有自我調控之特性，而膜蛋白 PecM 之表現亦受其調控。

3.3.3 Bacterial Two hybrid system 分析

1997 年 Praillet 等人在大腸桿菌的模式提出的 PecS 需要與 PecM 交互作用才能與 DNA 結合的理論，為證實在 *K. pneumoniae* CG43S3 中是否也存在此特性，我們利用細菌雙雜交系統（附錄二）進行分析，並測量其 β -galactosidase 活性作為定量依據。圖十六顯示同時帶有 *pecS*、*pecM* 質體之菌株在 β -galactosidase 的活性上與 negative control 並無差異，說明 PecS 與 PecM 似乎並無直接蛋白質的直

接交互作用，然而是否存在交互作用仍需多次實驗證明。

3.4 紙錠測試 (Disc inhibition assay)

據研究指出，UrtR(urate responsive transcriptional regulator) 蛋白家族多與細菌之抗氧化壓力能力有關，因此藉由觀察滴於紙錠上之氧化劑(paraquat) 造抑菌環的大小來檢測在移除 *pecS* 與 *pecM* 之影響，結果顯示不論在剔除 *pecS*、*pecM* 或兩者皆剔除之突變株，其抑菌環大小與野生株並無明顯差異(圖十七)，此結果顯示 PecS 與 PecM 在 *K. pneumoniae* CG43S3 中與抗 paraquat 之氧化壓力能力可能無直接關係。



四、討論

4.1 PecS 與 PecM

先前研究顯示 PecS 會參與許多致病因子之調控(Hommais et.al 2008)，且藉由直接與受調控基因之啟動子結合以達到調控目的。本研究證實 PecS 的確會與 *pecO* 序列結合且為特異性結合(specific binding)，亦證實 PecS 可與 *mrkA* 啟動子中 *pecO*-like 序列結合，因此推測第三型纖毛可能直接受到 PecS 之負向調控。但本次研究結果發現若將 *pecS* 剔除後，無論是在第三型纖毛之蛋白質表現層次或其啟動子之活性皆無明顯上升，甚至可能有些微下降，推測可能 PecM 抑制第三型纖毛之表現，且相較於 PecS，PecM 對第三型纖毛的負向調控更為顯著，而啟動子活性測試發現 *pecM* 啟動子之活性受到 PecS 之負向調控。由上述實驗數據推測若將 *pecS* 剔除，PecM 可大量表現，進而展現對第三型纖毛表現之抑制，然而剔除 PecS 雖可以增加第三型纖毛表現，但因 PecM 大量增加抑制了 MrkA 的表現，反而在將 *pecS* 剔除後第三型纖毛之表現並無增加。

4.2 PecS 與 PecM 調控第三型纖毛可能的機制

由本次研究數據顯示，若個別將 *pecS* 或 *pecM* 剔除，對第三型纖毛表現之影響有限，但若同時剔除 *pecS* 及 *pecM*，就會明顯提升第三型纖毛之表現量。在添加尿酸後，無論在野生株、*pecS* 剔除株及 *pecSpecM* 剔除株，其生物膜之生成比起未添加尿酸時皆明顯上升，但在 *pecM* 剔除株之生物膜生成卻明顯下降，因此由以上結果，推測出 PecS、PecM 對第三型纖毛表現之調控路徑(如圖十八)：

(一) 環境中無尿酸：PecM 會對第三型纖毛行進行負向調控，而 PecS 除了直接抑制 PecM 之表現外，亦抑制第三型纖毛之表現，但 PecM 抑制第三型纖毛之表現佔大部分之影響。當 *pecS* 剔除後，PecM 的表現量增加，雖然受 PecS 直接抑制之 MrkA 表現量應要增加，但卻會被 PecM 所抑制，導致 MrkA 表現量並無增加；當 *pecM* 被剔除後，PecM 抑制 MrkA 表現之抑制效果不復存在，則 MrkA

表現量隨及上升；若將 *pecS*、*pecM* 同時剔除，PecS 與 PecM 所參與負向調控皆消失，第三型纖毛表現量則明顯增加(圖十八 A)。

(二) 環境中有尿酸：先前已由實驗證明尿酸可誘導第三型纖毛之表現。PecM 經由軟體預測顯示 PecM 屬於 EamA 家族，但功能為何目前尚不得知，然而在 *E. chrysanthemi* 中 PecM 任 efflux pump 角色，推測 PecM 可能與尿酸的傳遞有關，並推測當 PecM 與尿酸接觸後會改變其構型，因而 PecM 抑制 MrkA 表現之效果受到影響。另外，藉由 National Center for Biotichnology Information (NCBI) 網站分析，發現在 *K. pneumonia* NTUH-K2044 中發現有一蛋白質(NC_012731) 其預測之功能可能為滲透酶，而此蛋白屬於 MFS 家族並可能會受到 UrtR 蛋白的調控，推測在 *K. pneumoniae* CG43S3 中可能也存在此種蛋白，而此蛋白與尿酸之運輸有關並且會受 PecS 的調控。當環境中有尿酸時，尿酸經由 PecM 與另一個運輸蛋白運送至細菌內，使 PecS 失去抑制 PecM 及滲透酶之表現，使得尿酸大量運送至細菌體內而誘導第三型纖毛之表現；將 *pecS* 剔除後，兩種與尿酸之運輸有關的蛋白皆大量表現，讓更多尿酸進入細菌使得第三型纖毛表現量上升，其結果應與野生株類似；若將 *pecM* 剔除後，因與運送尿酸有關之蛋白減少，因此運送入細菌體內之尿酸量隨之減少，尿酸所誘導之效果也跟著下降，導致第三型纖毛之誘導表現量並不如野生株；若將 *pecS*、*pecM* 同時剔除，雖然與運輸尿酸有關之 PecM 消失，但還有其他可運送尿酸的蛋白，而且抑制此蛋白之 PecS 也被剔除，使得其他尿酸運輸蛋白表現量上升並可彌補 PecM 被剔除的不足(圖十八 B)。

4.3 PecS 在 *K. pneumoniae* CG43S3 中對抗氧化壓力的影響

先前研究指出 UrtR 蛋白會與 *pecO* 序列中之迴文序列結合並調控其下游基因，且受調控之基因多與細菌之抗氧化能力有關，且在 *K. pneumoniae* CG43S3 之抗氧化基因 *sodA* 啟動子中亦找到不完整迴文序列。針對這點本次研究利用

paraquat 對 *pecS*、*pecM* 剔除株進行紙錠測試(disc inhibition assay)，但卻發現剔除株對 paraquat 所造成之氧化壓力之抗性與 *K. pneumoniae* CG43S3 型野生株並無明顯差異，其原因可能為以下幾點：

(一) 使用錯誤之氧化壓力來源：先前研究指出 UrtR 蛋白可調控與抗氧化壓力有關之基因，但氧化壓力之來源有很多，例如 H₂O₂、NO、paraquat...等，本次實驗所採用 paraquat 作為氧化壓力來源，其結果並不明顯，但本實驗未用其他氧化壓力來源，因此對於 PecS 在抗氧化壓力能力中所扮演之角色尚無法定論；(二) 模擬氧化壓力所使用之氧化劑劑量：若氧化壓力源之劑量不足，過低的氧化壓力或許不足以啟動 PecS 的調控機制。

(三) 不完整迴文序列：因 *sodA* 啟動子中不完整迴文序列使 PecS 無法與之結合。2004 年 Rouanet 等人於 *E. chrysanthemi* 中分析與 PecS 結合之迴文序列，發現其序列可能為 C₁₁G₁₀A₉N₈W₇T₆C₅G₄T₃A₂T₁A₀T₁T₂A₃C₄G₅A₆N₇N₈N₉C₁₀G₁₁，而 Perera 等人於 2011 年提出與 UrtR 蛋白結合的迴文序列中包含 C₄T₅T₆-A₁₃A₁₄G₁₅ 等關鍵鹼基對。然而，無論 *pecS*、*pecM* 間的 *pecO* 序列，或是 *mrkA* 啟動子中 *pecO*-like 序列，皆不符合上述兩種序列模式，由此可知 PecS 可能與迴文序列結合，但其二者結合之確切模式目前尚待釐清。

相關文獻

1. 黃盈蓉。2006。克雷白氏菌之第三型纖毛特性之研究。國立交通大學博士學位論文。
2. Alekshun, M. N. and Levy, S. B. 1999. Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli* marRAB locus, by multiple chemicals in vitro. *J. Bacteriol.* 181:4669–4672.
3. Allen, B.L., Gerald, F.G. and Clegg, S. 1991. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 173:916-920.
4. Bagnasco.S.M.(2005). Role and regulation of urea transporters. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* (2005) 450: 217–226
5. Benoit S.L., McMurry J. L., Hill S. A. b, Maier R. J.(2012) Helicobacter pylori hydrogenase accessory protein HypA and urease accessory protein UreG compete with each other for UreE recognition. *Biochimica et Biophysica Acta*(2012)
6. Boddicker, J. D., Rebecca. A.A., Jagnow, J. and Clegg, S. 2006. Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. *Infect. Immun.* 74:4590–4597.
7. Buchanan, K., Falkow, S., Hull, R.A, and Hull, S.I. 1985. Frequency among *Enterobacteriaceae* of the DNA sequences encoding type 1 pili. *J. Bacteriol.* 162(2):799–803.
8. Chang, S.C., Fang, C.T., Hsueh, P.R, Chen, Y.C. and Luh, K.T. 2000. *Klebsiella pneumoniae* isolates causing liver abscess in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect Dis.* 37:279 –284.
9. Collmer, A. and Keen, N. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis.

- Annu. Rev. Phyto-pathol. 24:383–409.
10. Chou H.C, Lee C.Z, Ma L.C, Fang C.T. Chang S.C, Wang J.T (2004). Isolation of a Chromosomal Region of *Klebsiella pneumoniae* Associated with Allantoin Metabolism and Liver Infection. *Infection and Immunity*, July 2004, p. 3783–3792
 11. Donald, L.J., Yang, N.M., Saier, M.H.Jr. 2001. The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* 268:3620–3639.
 12. El-Herte, R.I., Araj, G.F., Matar, G.M., Baroud, M., Kanafani, Z.A. and Kanj, S.S. 2012. Detection of carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 in Lebanon. *J Infect Dev Ctries.* 6(5):457-461.
 13. Gerald, F.G., Clegg, S. and Allen, B. L. 1989. Identification and characterization of the gene encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 171:1262-1270.
 14. Gerald F.G., Allen, B. L. and Clegg, S. 1989. Type 3 fimbriae among enterobacteria and the ability of spermidine to inhibit MR/K hemagglutination. *Infect Immun.* 57:219-224.
 15. Grove. A (2010). Urate-responsive MarR homologs from *Burkholderia*. *Mol. BioSyst.*, 2010, 6, 2133–2142 2133
 16. Guzmán, K., Badia, J., Giménez, R., Aguilar, J. and Baldoma, L. 2011. Transcriptional regulation of the gene cluster encoding allantoinase and guanine deaminase in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 193(9):2197–2207.
 17. Hanson, M. S., Hempel, J. and Brinton, C. C. Jr. 1988. Purification of the *Escherichia coli* type 1 pilin and minor pilus proteins and partial characterization of the adhesin protein. *J. Bacteriol.* 170:3350-3358.
 18. Hibbertrogers, L. C. F., Heritage, J., Gascoynebinzi, D. M., Hawkey, P. M., Todd, N., Lewis, I. J. and Bailey, C. 1995. Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology

- ward. J. Antimicrob. Chemother. 36:65–82.
19. Hommais, F., Oger-Desfeux, C., Van Gijsegem, F., Castang, S., Liori, S., Expert, D. 2008. PecS is a global regulator of the symptomatic phase in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. J. Bacteriol. 190: 7508–7522.
20. Hornick, D.B., Allen, B.L., Horn, M.A. and Clegg, S. 1992. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. Infect Immun. 60:1577–1588.
21. Huang, Y. J., Liao, H. W., Wu, C. C. and Peng, H. L. 2009. MrkF is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. Res. Microbiol. 160:71-79.
22. Jagnow, J. and Clegg, S. 2003. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. Microbiology 149:2397-2405.
23. Jeremiah, G.J. and Clegg, S. 2010. Role of MrkJ, a phosphodiesterase, in type 3 fimbrial expression and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol. 192:3944–3950.
24. Jeremiah, G. J., Murphy, C. N., Sippy, J., Johnson, T. J. and Clegg, S. 2011. Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol. 193:3453–3460.
25. Kader, A.A., Kamath, K.A. and Dass, .SM. 2006. Accelerated detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. Br. J. Biomed. Sci. 63(4):151-154.
26. Klemm, P. 1986 Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. EMBO J. 5:1389–1393.

27. Kumarevel, T., Tanaka, T., Umehara, T., Yokoyama, S. 2009. ST1710-DNA complex crystal structure reveals the DNA binding mechanism of the MarR family of regulators. *Nucl. Acids Res.* 37:4723–4735.
28. Langstraat, J., Bohse, M. and Clegg, S. 2001. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infect Immun.* 69:5805-12.
29. Chen M., Cai L, Fang Z, Tian H, Gao X, and Yao W.(2008). Site-specific incorporation of unnatural amino acids into urate oxidase in *Escherichia coli*. *Protein Science* (2008), 17:1827–1833
30. Lin W, Mathys V, Ang E.L.Y, Koh V. H.Q, Martinez Gomez J. M.(2012). Urease activity represents an alternative pathway for *Mycobacterium tuberculosis* nitrogen metabolism. *Infect. Immun.* doi:10.1128/IAI.06195-11
31. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
32. Ong, C. L., Ulett, G. C., Mabbett, A. N., Beatson, S. A., Webb, R. I., Monaghan, W., Nimmo, G. R., Looke, D. F., McEwan, A. G. and Schembri, M. A. 2008. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 190:1054-1063.
33. Ong, C. L., Beatson, S. A., Totsika, M., Forestier, C., McEwan, A. G. and Schembri, M. A.. 2010. Molecular analysis of type 3 fimbrial genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Citrobacter* species. *BMC Microbiol.* 10:183.
34. Patel, G., Huprikar, S., Factor, H. S., Jenkins, G.S. and Calfee, P.D. 2008. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infection Control and Hospital.*
35. Perera, I. C. and Grove, A. 2011. MarR homologs with urate-binding signature. *Protein Science* 20:621—629.

36. Perera, I. C. and Grove, A. 2010. Urate is a ligand for the transcriptional regulator PecS. *J. Mol. Biol.* 402:539–551.
37. Perera, I.C., Lee, Y.H., Wilkinson, S.P. and Grove, A. 2009. Mechanism for attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators by small molecule ligands. *J. Mol. Biol.* 390:1019–1029.
38. Perera, I. C. And Grove, A. 2010. Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators. *J. Mol. Cell Biol.* in press.
39. Piatek, R., Zalewska, B., Bury, K. and Kur, J. 2005. The chaperone-usher pathway of bacterial adhesin biogenesis -- from molecular mechanism to strategies of anti-bacterial prevention and modern vaccine design. *Acta. Biochim. Pol.* 52:639-646.
40. Pinto E. L, Tao W., Rappaport J., Richardson M, Knorr B. A., and Abramson R. G. (1997). Molecular Cloning and Functional Reconstitution of a Urate Transporter/Channel. *The journal of biological chemistry* 617–625, 1997
41. Praillet, T., Reverchon, S. and Nasser, W. 1997a. Mutual control of the PecS/PecM couple, two proteins regulating virulence-factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* 24:803-814.
42. Podschun, R. and Ullmann, U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:589-603.
43. Praillet, T., Reverchon, S., Robert-Baudouy J. and Nasser, W. 1997. The PecM protein is necessary for the DNA-binding capacity of the PecS repressor, one of the regulators of virulence-factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 154(2):265-270.

44. Reverchon, S., Nasser, W. and Robert-Baudouy, J. 1994. PecS: a locus controlling pectinase, cellulase and blue pigment production in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* 11:1127-1139.
45. 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(3):654–665.
46. Rosen, D. A., Pinkner, J. S., Jones, J. M., Walker, J. N., Clegg, S. and Hultgren, S. J. 2008. Utilization of an intracellular bacterial community pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the effects of FimK on type 1 pilus expression. *Infect Immun.* 76:3337-3345.
47. Rosen, D. A., Pinkner, J. S., Jones, J. M., Walker, J. N., Clegg, S. and Hultgren, S. J. 2008. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. *Infect Immun.* 76(7):3346-3356.
48. 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.
49. Rouanet, C., Reverchon, S., Rodionov, D. A. and Nasser, W. 2004. Definition of a consensus DNA-binding site for PecS, a global regulator of virulence gene expression in *Erwinia chrysanthemi* and identification of new members of the PecS regulon. *J. Biol. Chem.* 279:30158–30167.
50. Rouf .M. A., Lomprey R. F.(1968). Degradation of Uric Acid by Certain Aerobic Bacteria . *Journal of bacteriology*, Sept. 1968, p. 617-622
51. Segal, B.H., Sakamoto, N., Patel, M., Maemura, K., Klein, A.S., Holland, S.M. and Bulkley, G.B. 2000. Xanthine oxidase contributes to host defense against

- Burkholderia cepacia* in the p47(phox^{-/-}) mouse model of chronic granulomatous disease. *Infect Immun.* 68:2374–2378.
52. Struve, C. and Bojer, M. 2009. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect Immun.* 77(11):5016-5024.
53. Tang, Y., Quail, M.A., Artymiuk, P.J., Guest, J.R. and Green, J. 2002. *Escherichia coli* aconitases and oxidative stress: post-transcriptional regulation of *sodA* expression. *Microbiology* 148:1027–1037.
54. Warren, J. W. 2001. Catheter-associated urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17:299-303.
55. Wu, C.C., Lin, C.T., Cheng, W.Y., Huang, C.J., Wang, Z.C. and Peng, H.L. 2012. Fur-dependent MrkHI regulation of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microbiology* 158:1045–1056.
56. Yeh, K. M., Kurup, A. 2007. Capsular serotype K1 or K2, rather than *magA* and *rmpA*, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 45(2):466-471.

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
<i>E.coli</i>:		
JM109	<i>RecA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 rolA1 thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)	Laboratory stock
Novablue (DE3)	<i>F ompT hsdS B(rB mB⁻) gal dcm (DE3), Tc^r</i>	Novagen
S17-1 λ pir	<i>RecA thi pro hsdR⁺ M⁺ [RP4-2-Tc::Mu:Km^RTn7] (pir)</i>	De Lorenzo <i>et al.</i> ,1994
XL-1 Blue MRF ⁺ Kan	Δ <i>mcrA 183Δ[(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> (F⁺ <i>proAB lacI^f Z</i>ΔM15 Tn5(Km^r)))]</i>	Novagen
<i>K.pneumoniae</i>:		
CG43	Clinical isolate of K2 serotype	Laboratory stock
CG43-S3	<i>rspL</i> mutant, Sm ^R	Ping-Hui Bai, 2004
CG43S3 <i>pecS</i> ⁻	CG43S3 with deletion in <i>pecS</i> gene	(黃盈蓉, 民國 96 年)
CG43S3 <i>pecM</i> ⁻	CG43S3 with deletion in <i>pecM</i> gene	(黃盈蓉, 民國 96 年)
CG43S3 <i>pecS</i> ⁻ <i>pecM</i> ⁻	CG43S3 with deletion both <i>pecS</i> and <i>pecM</i> gene	(黃盈蓉, 民國 96 年)

CG43S3 <i>mrkA</i> ⁻	CG43S3 with deletion in <i>mrkA</i> gene	(呂文鈴，民國 90 年)
CG43S3 <i>mrkA</i> ⁻ <i>pecS</i> ⁻	CG43S3 with deletion both <i>mrkA</i> and <i>pecS</i> gene	This study
CG43S3 <i>mrkA</i> ⁻ <i>pecM</i> ⁻	CG43S3 with deletion both <i>mrkA</i> and <i>pecM</i> gene	This study
CG43S3 <i>mrkA</i> ⁻ <i>pecM</i> ⁻ <i>pecS</i> ⁻	CG43S3 with deletion in <i>mrkA</i> , <i>pecM</i> and <i>pecS</i> gene	This study
CG43S3 <i>fimA</i> ⁻	CG43S3 with deletion in <i>fimA</i> gene	Laboratory stock
CG43S3 <i>lacZ</i>	CG43S3 with deletion in <i>lacZ</i> gene	(Lin et al., 2006)
CG43S3 <i>lacZ</i> <i>pecS</i> ⁻	CG43S3 <i>lacZ</i> with deletion in <i>pecS</i> gene	(黃盈蓉，民國 96 年)
CG43S3 <i>lacZ</i> <i>pecM</i> ⁻	CG43S3 <i>lacZ</i> with deletion in <i>pecM</i> gene	(黃盈蓉，民國 96 年)
CG43S3 <i>sodA</i> ⁻	CG43S3 with deletion in <i>sodA</i> gene	(吳宛怡，民國 101 年)
CG43S3 <i>katG</i> ⁻	CG43S3 with deletion in <i>katG</i> gene	(吳宛怡，民國 101 年)

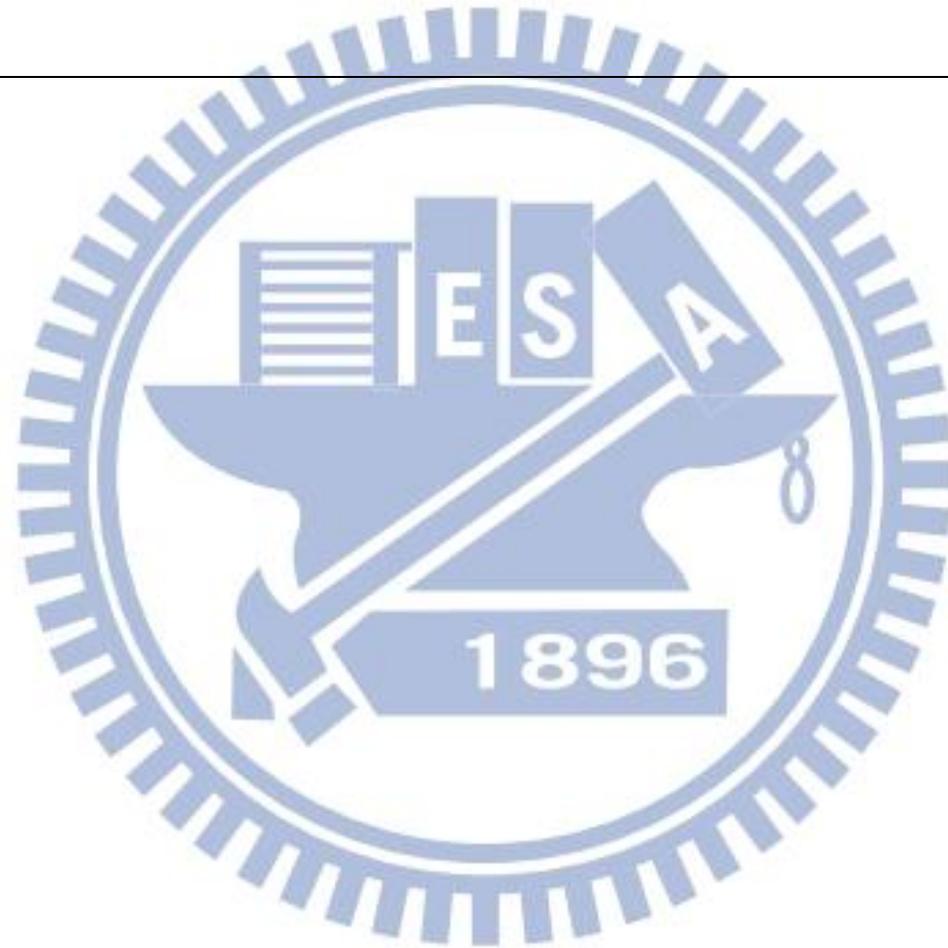
表二、 本次實驗使用與建構之質體

質體	基因型及相關資訊	來源與參考資料
yT&A	PCR cloning vector, Ap ^R	Yeastern Biotech Co.
pET30a	Overexpression of His6 fusion proteins, Km ^R	Novagen
pET30a- <i>pecS</i>	DNA fragment containing <i>pecS</i> cloned into pET30a	黃盈蓉，民國 96 年
pBT	Cm ^r ; bait plasmid, <i>p15A</i> origin of replication, <i>lac-UV5</i> promoter, λ -cI open reading frame	Stratagene
pTRG	Tc ^r ; target plasmid, ColE1 origin of replication, <i>lac-UV5</i> promoter, <i>RNAPα</i> open reading frame	Stratagene
pBT-LGF2	Cm ^r ; control plasmid containing a fragment encoding the yeast transcriptional activator Gal4 fused with λ -cI	Stratagene
pTRG-GAL11 ^P	Tc ^r ; control plasmid containing a fragment encoding a mutant form of Gal11 protein, called Gal11P, fused with <i>RNAPα</i>	Stratagene
pLacZ15	Containing <i>K. pneumoniae</i> CG43S3 <i>lacZ</i> as a reporter, Cm ^r	(Lin et al., 2006)
pLacZ15- <i>PmrkA</i> (500bp)	DNA fragment containing 500-bp <i>mrkA</i> promoter cloned into pLacZ15	(黃盈蓉，民國 96 年)
pLacZ15- <i>PmrkA</i> (232bp)	DNA fragment containing 232-bp <i>mrkA</i> promoter cloned into pLacZ15	(黃盈蓉，民國 96 年)
pLacZ15- <i>PpecS</i>	DNA fragment containing 244-bp <i>pecS</i> promoter cloned into pLacZ15	This study

pLacZ15-P*pecM*

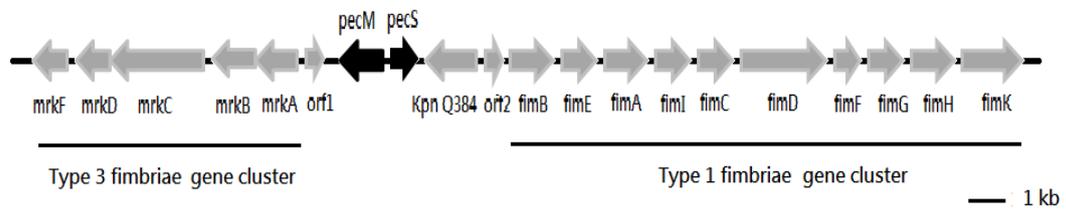
DNA fragment containing 255-bp *pecM* promoter cloned into pLacZ15

This study



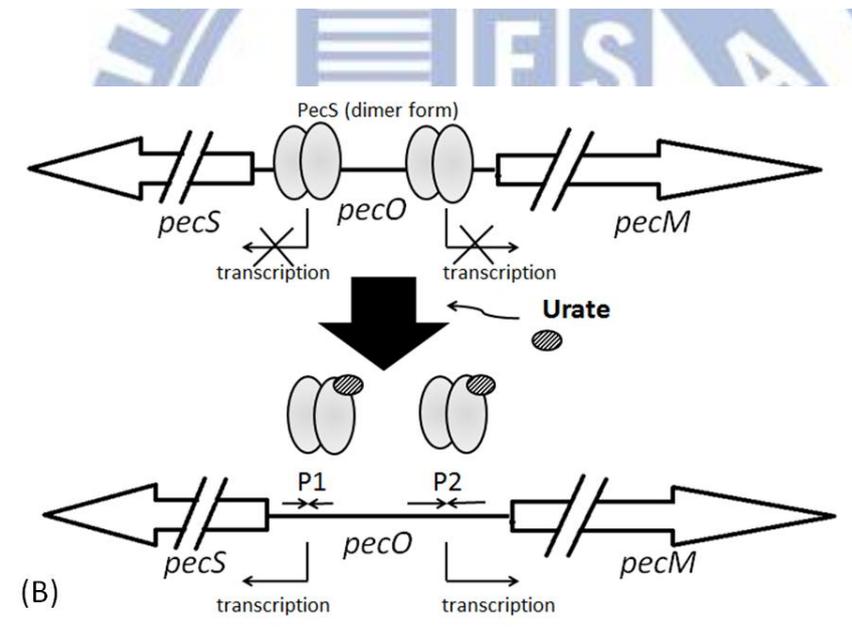
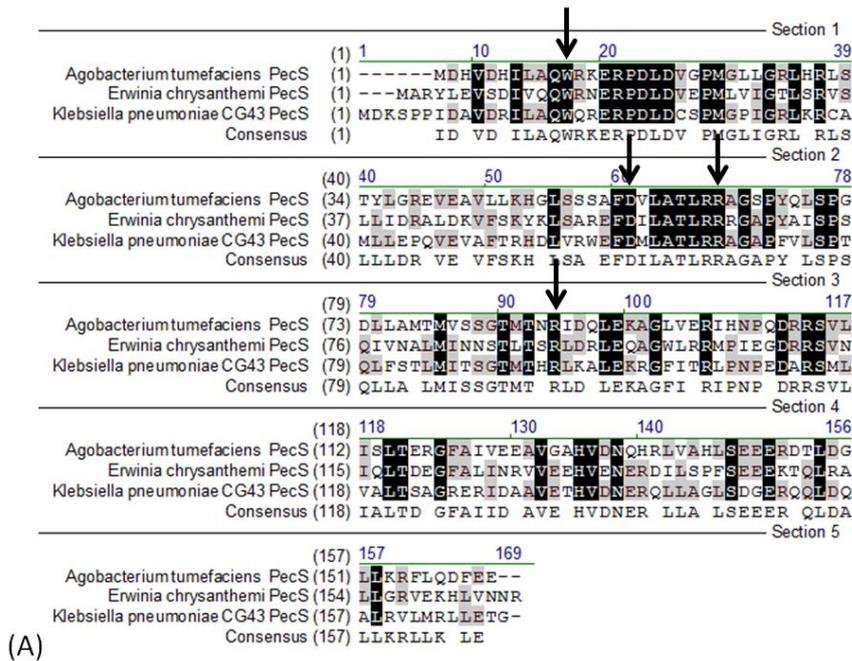
表三、 本次實驗使用之核苷酸引子

引子	序列(5' 到 3')
BR07	GCGGTGATTTGTCCATTAGTGC
BR08	AGATTACGTGAGAGAAAAGCCATGAT
BR09	GCGGCCGCCATGGCTTTTCTCTCACGTAATCTG
BR11	GCGGCCGCAATGGACAAATCACCGCCGATC
BR12	CTCGAGGCCCGTTTCCAGCAGTCGC
BR16	CTCGAGCTCGCCGCTGCCGGTATGC
BR19	GGATCC-GCCATGATTTTATCTTCACTTCAAGG
BR20	AGATCT-GCGCGTAAAGGCCACTTCCA
BR21	GGATCC-GTCCATTAGTGCTCACTTGTCTTGATA
BR22	AGATCT-CCAGATCAGCAGGGCGATACCT

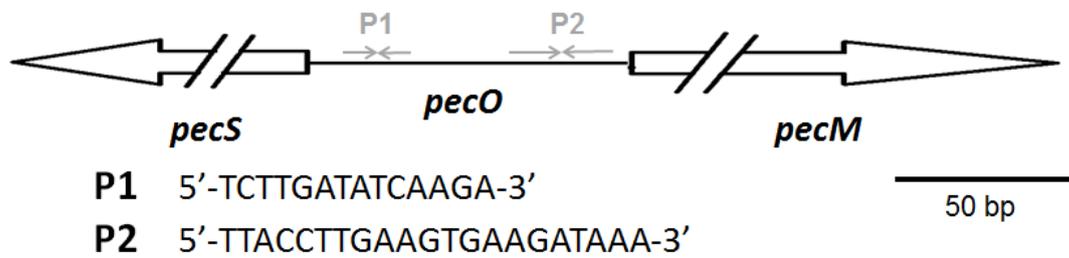


圖一. *Klebsiella pneumoniae* CG43S3 *pecS* 與 *pecM* 位於第一型纖毛與第三型纖毛基因組之間。



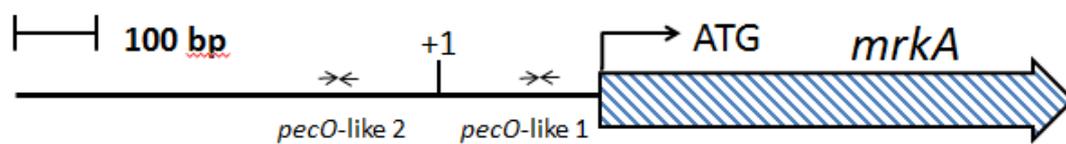


圖二. PecS 在不同菌株序列比對及膿桿菌實驗模式 PecS 可能的作用機制。(A) 將 *E. chrysanthemi*、*A. tumefaciens* 及 *K. pneumoniae* CG43S3 的 PecS 胺基酸序列進行比對，箭頭標示與尿酸結合之四個高度保留性殘基；(B) PecS 以雙聚合體結合 *pecO* 迴紋，使 RNA 聚合酶無法進行轉錄因而抑制下游基因表現；而在尿酸濃度增加的環境，urate 與 PecS 結合，使 PecS 失去與 *pecO* 之 DNA 結合的能力而離開，RNA 聚合酶即可進行轉錄。



圖三. *pecS* 與 *pecM* 間的 *pecO* 序列。

pecO 序列包含迴紋序列 P1 和迴紋序列 P2。

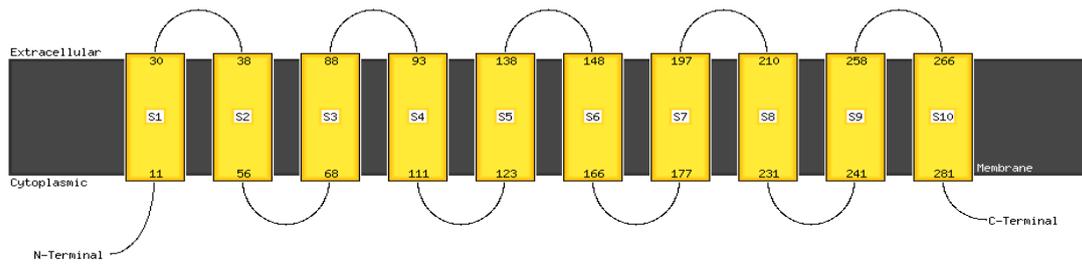


圖四. 第三型纖毛的主要結構蛋白基因 *mrkA* promoter 含有類 *pecO* 序列。此序列

與 *pecO* 相似的迴紋序列，因而命名為 *pecO*-like 1

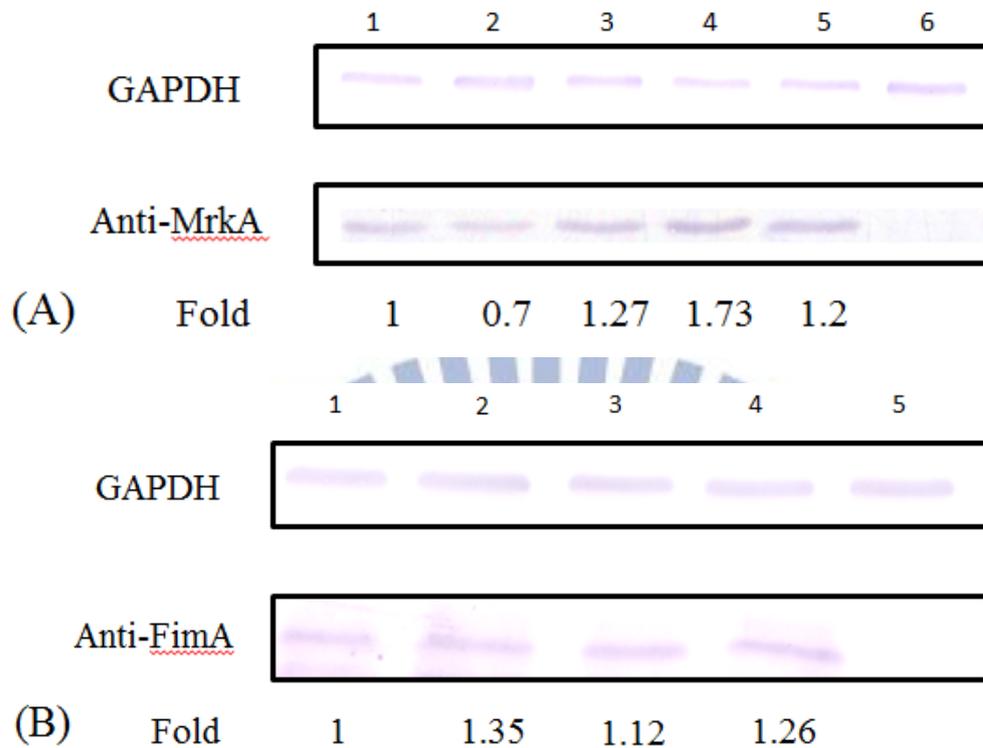
(5'-AGTGGCAGCCCTGCCAGT-3') 及 *pecO*-like 2

(5'-ACGCAGGGTTAATAATCATGAAT-3')。

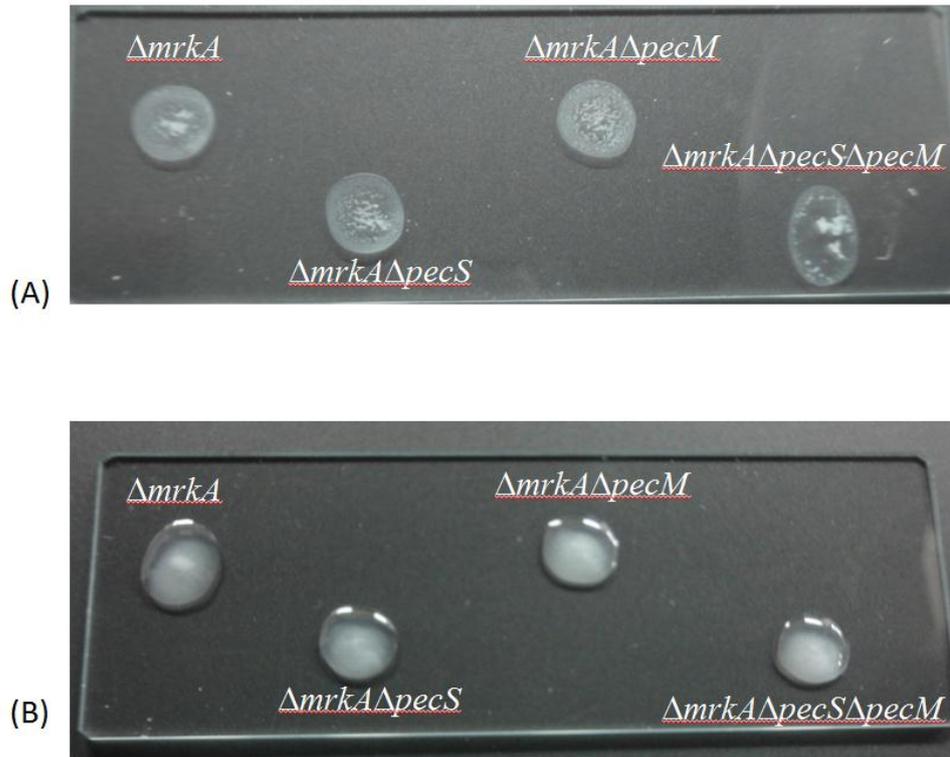


圖五. 利用軟體 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 預測 PecM 構型。結果顯示 PecM 為含有 10 個穿膜結構之膜蛋白。



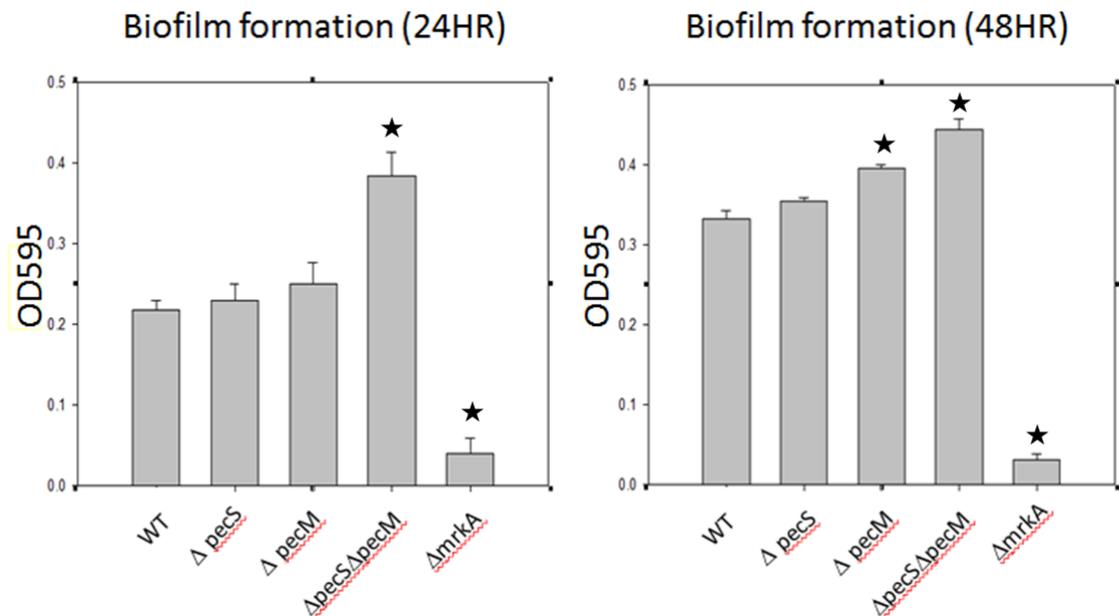


圖六. 西方墨點法分析。將隔夜培養菌液破菌取全細胞蛋白質做膠電泳展開後，進行 western blot 分析。(A) 利用 anti-MrkA 抗體偵測 MrkA 的表現量，Lanes 1： *K. pneumoniae* CG43S3；2： $\Delta pecS$ 突變株；3： $\Delta pecM$ 突變株；4： $\Delta pecS\Delta pecM$ 突變株；5： $\Delta fimA$ 突變株，作為 positive control；6： $\Delta mrkA$ 突變株，作為 negative control。(B) 利用 anti-FimA 抗體偵測 FimA 的表現量，Lanes 1： *K. pneumoniae* CG43S3 $\Delta mrkA$ 突變株；2： $\Delta mrkA\Delta pecS$ 突變株；3： $\Delta mrkA\Delta pecM$ 突變株；4： $\Delta mrkA\Delta pecS\Delta pecM$ 突變株；5： $\Delta fimA$ 突變株，作為 negative control。

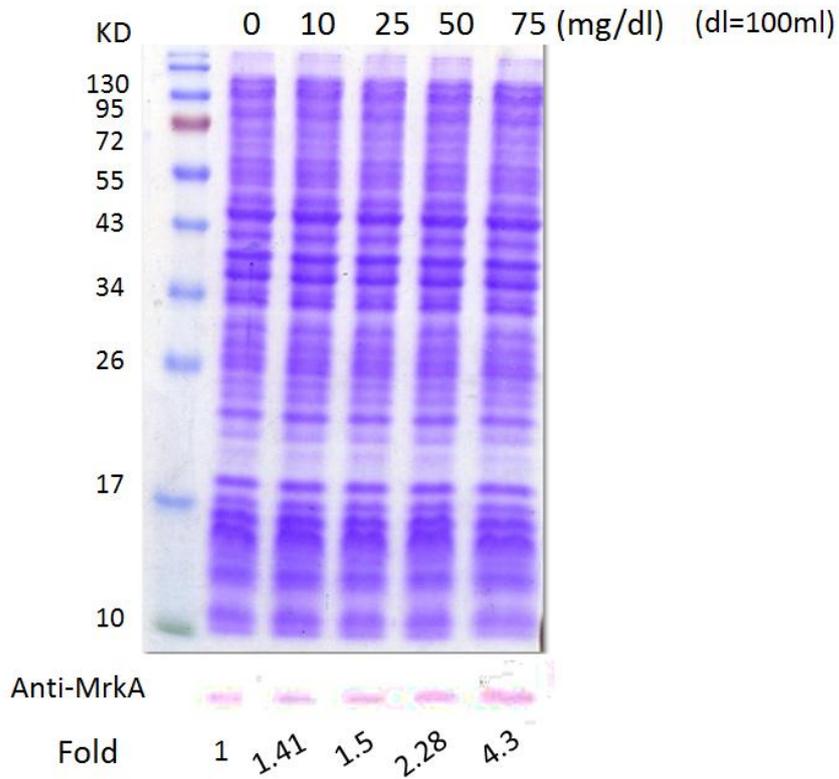


圖七. 酵母菌凝集測試。

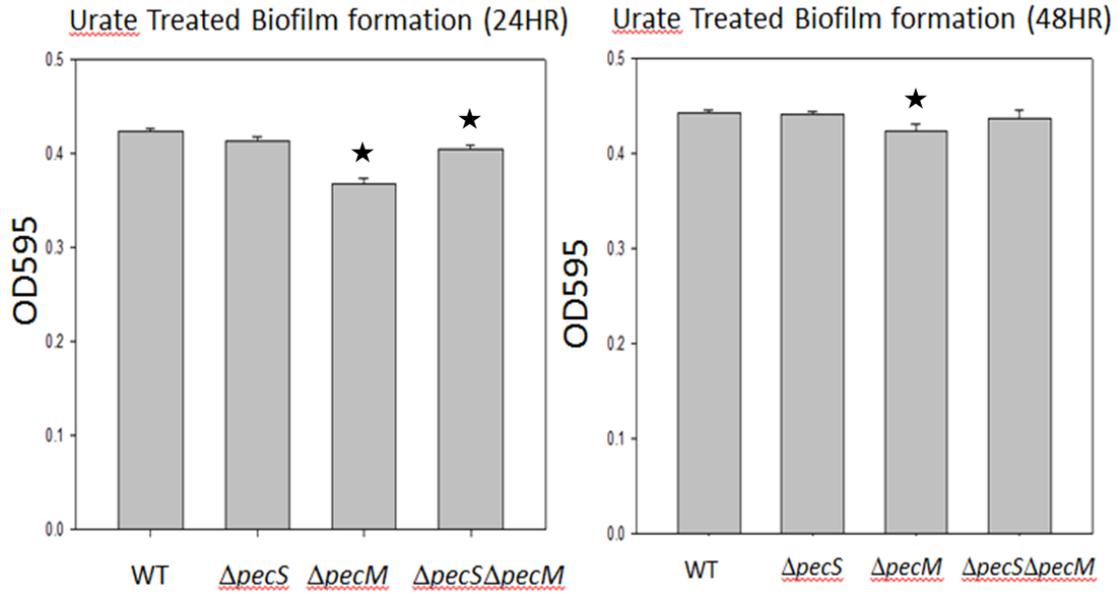
(A) 隔夜培養的 *K. pneumoniae* CG43S3 $\Delta mrkA$ 、CG43S3 $\Delta mrkA\Delta pecS$ 、CG43S3 $\Delta mrkA\Delta pecM$ 與 CG43S3 $\Delta mrkA\Delta pecS\Delta pecM$ 菌液離心後利用 PBS 復溶，與酵母菌溶液混合均勻後再以轉速 80 rpm 搖晃 10 分鐘。(B) 隔夜培養的 *K. pneumoniae* CG43S $\Delta mrkA$ 、CG43S3 $\Delta mrkA\Delta pecS$ 、CG43S3 $\Delta mrkA\Delta pecM$ 與 CG43S3 $\Delta mrkA\Delta pecS\Delta pecM$ 菌液離心後利用含有 2% 甘露糖之 PBS 復溶，與酵母菌溶液混合均勻後再以轉速 80 rpm 震盪 10 分鐘。



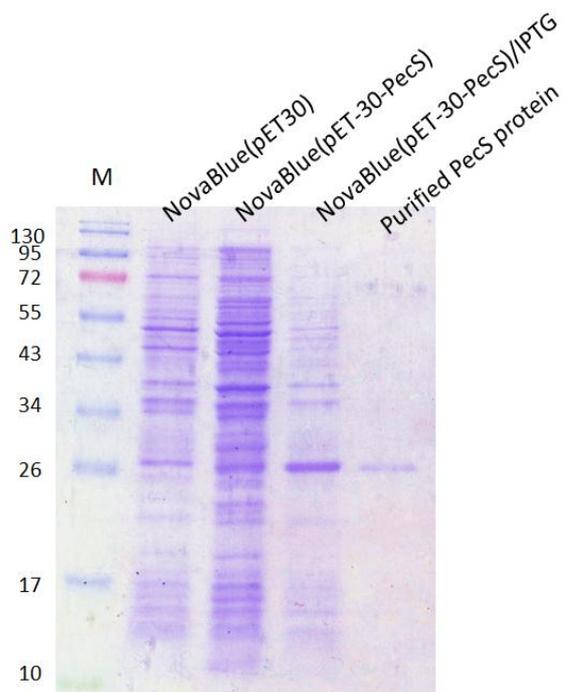
圖八. 移除 *pecS* 或 *pecM* 後對 biofilm 生成的影響。隔夜培養的 *K. pneumoniae* CG43S3、CG43S3 $\Delta pecS$ 、CG43S3 $\Delta pecM$ 與 CG43S3 $\Delta pecS\Delta pecM$ 菌液用 LB 以 1:100 的比例稀釋後加入 96 孔盤在 37°C 培養 24 小時或 48 小時，之後用結晶紫染色並用 1% 的 SDS 退染後，再測量各孔在波長 595 nm 之吸光值。



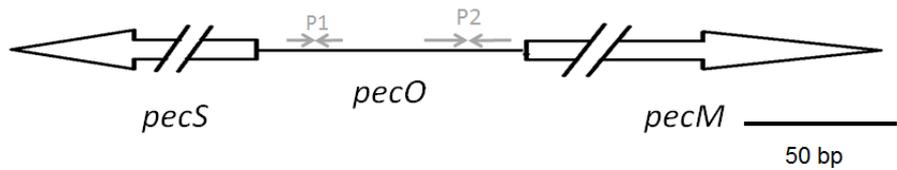
圖九. 西方墨點法分析添加尿酸後對 MrkA 表現的影響。將隔夜培養的 *K. pneumoniae* CG43S3 菌液以含有不同濃度尿酸的 LB 以 1:100 的比例稀釋，在 37°C 並搖動的條件下培養 4 小時，而後破菌取全細胞蛋白質進行膠電泳展開後，再利用 anti-MrkA 抗體進行 western blot 分析。



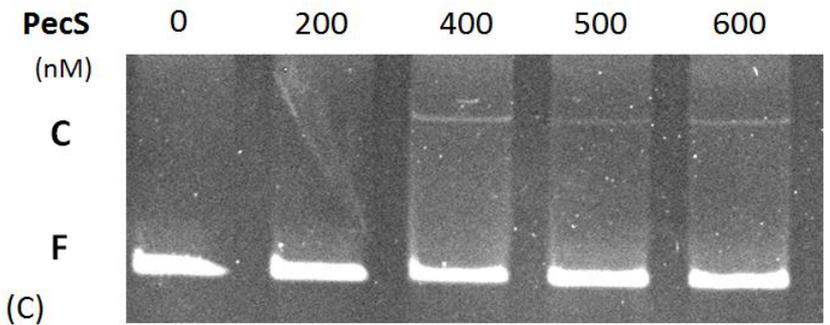
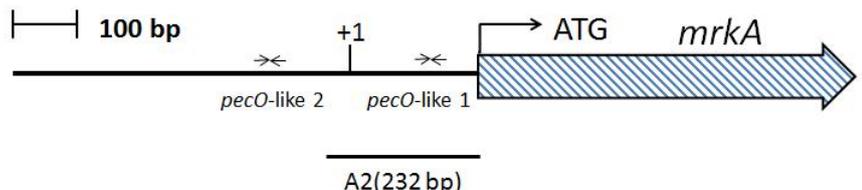
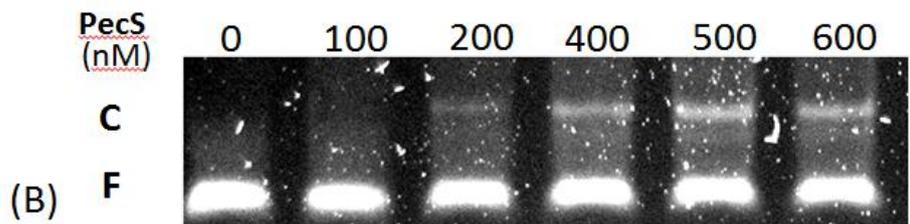
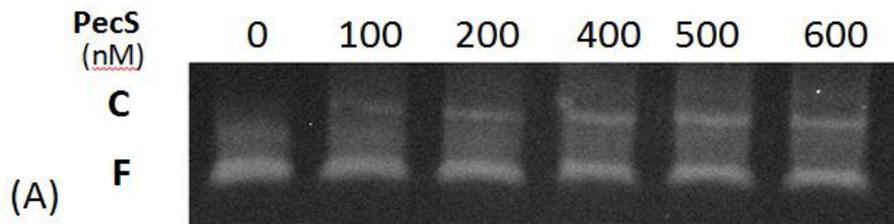
圖十. 分析尿酸對生物膜生成能力的影響。將隔夜培養的 *K. pneumoniae* CG43S3、CG43S3 $\Delta pecS$ 、CG43S3 $\Delta pecM$ 與 CG43S3 $\Delta pecS\Delta pecM$ 菌液用含有濃度為 75 mg/dl 尿酸之 LB 以 1:100 的比例稀釋後加入 96 孔盤在 37°C 培養 24 小時或 48 小時，之後用結晶紫染色並用 1% 的 SDS 退染後，再測量各孔在波長 595 nm 之吸光值。



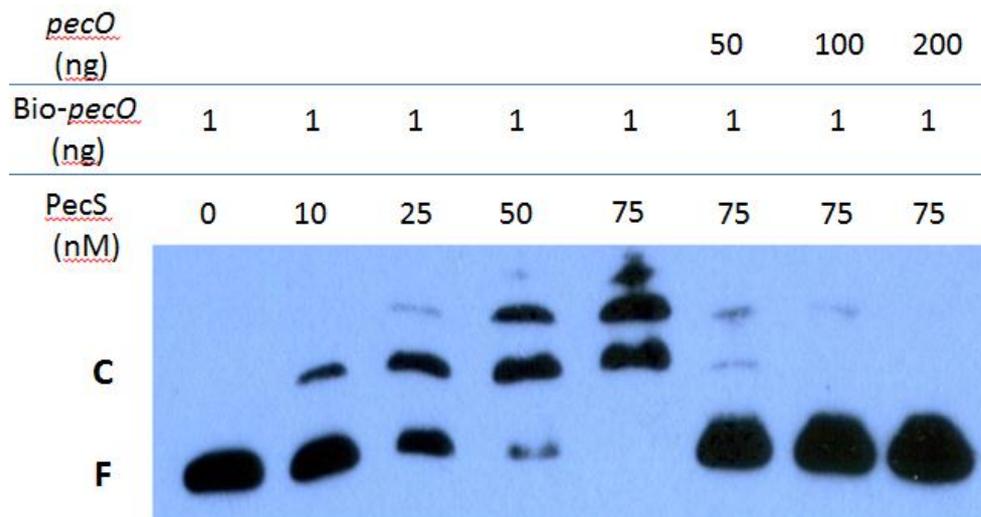
圖十一. 表純化重組 PecS 蛋白。將過夜培養的菌液用 LB 以 1:100 的比例稀釋後在 37°C 培養至 OD600=0.4~0.6，再加入 0.5 mM 的 IPTG 並繼續培養 6 小時。再經由 resin 純化帶有 His₆-tag 之 PecS 重組蛋白質，將所得之蛋白質以 SDS-PAGE 電泳分離後再以 Comassie blue 染色並分析蛋白質之表現狀況以及純化蛋白質之分子量大小。



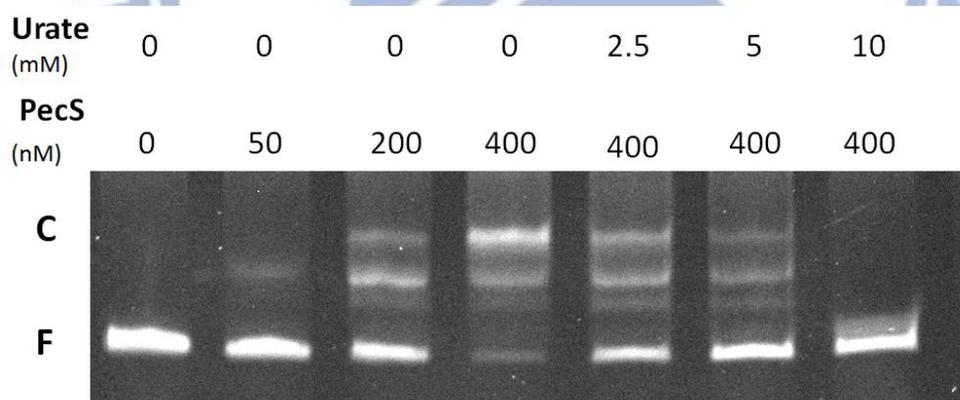
P1 *pecO* sequence 5'-TCTTGATATCAAGA-3' P2 *pecO* sequence 5'-TTACCTTGAAGTGAAGATAAA-3'



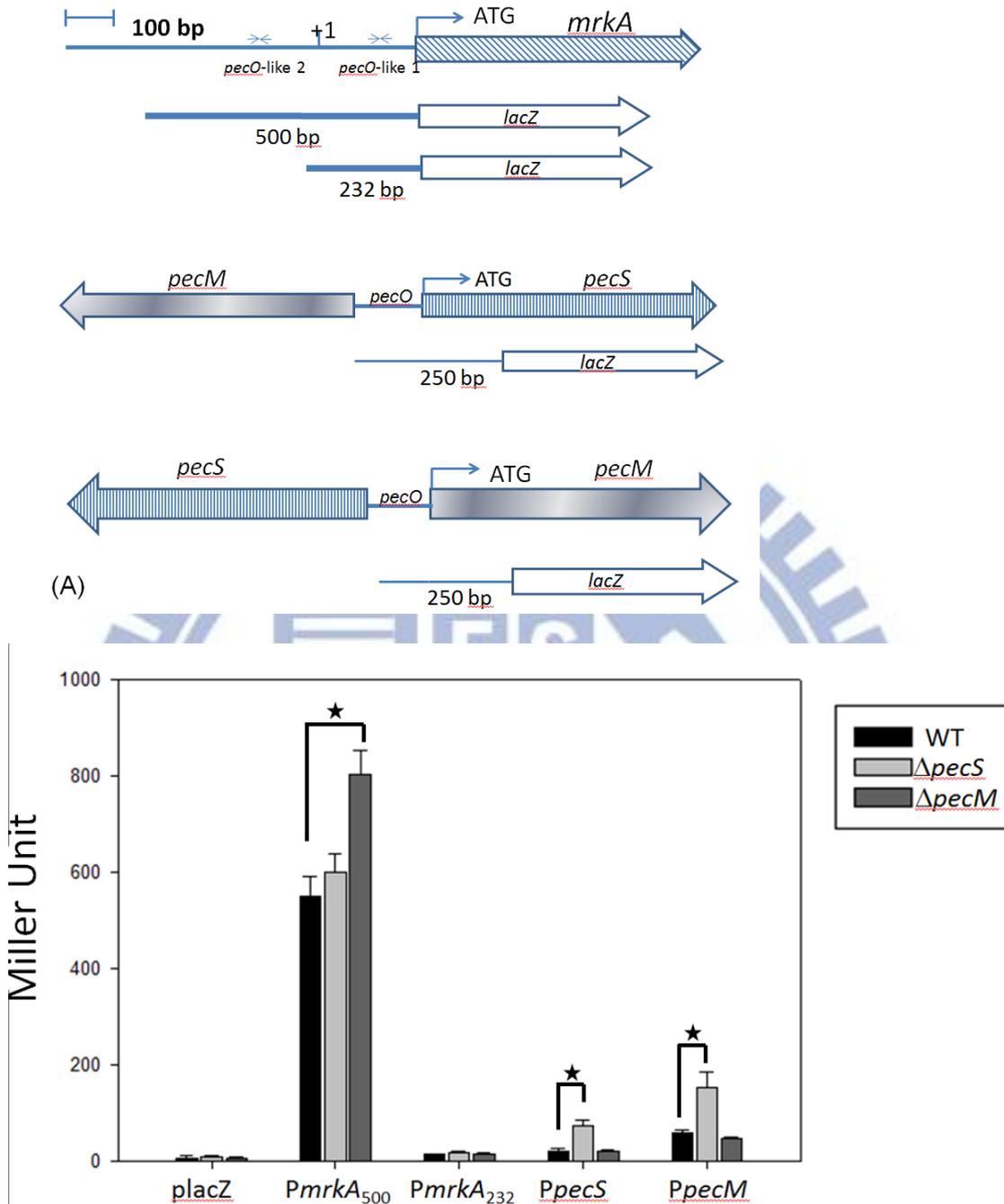
圖十二. 分析重組 PecS 蛋白與 *pecO* 結合情形。20 ng 的 P1(A)、P2(B)及 *mrkA* promoter 中含有 *pecO*-like1 序列的 DNA-A2(C)與不同濃度的 PecS 混合並靜置於室溫 30 分鐘，而後使用 5 % polyacrylamide gel 電泳分離後，再使用 cyber green 將 DNA 染色。C：PecS-DNA complex，F：free-form DNA。



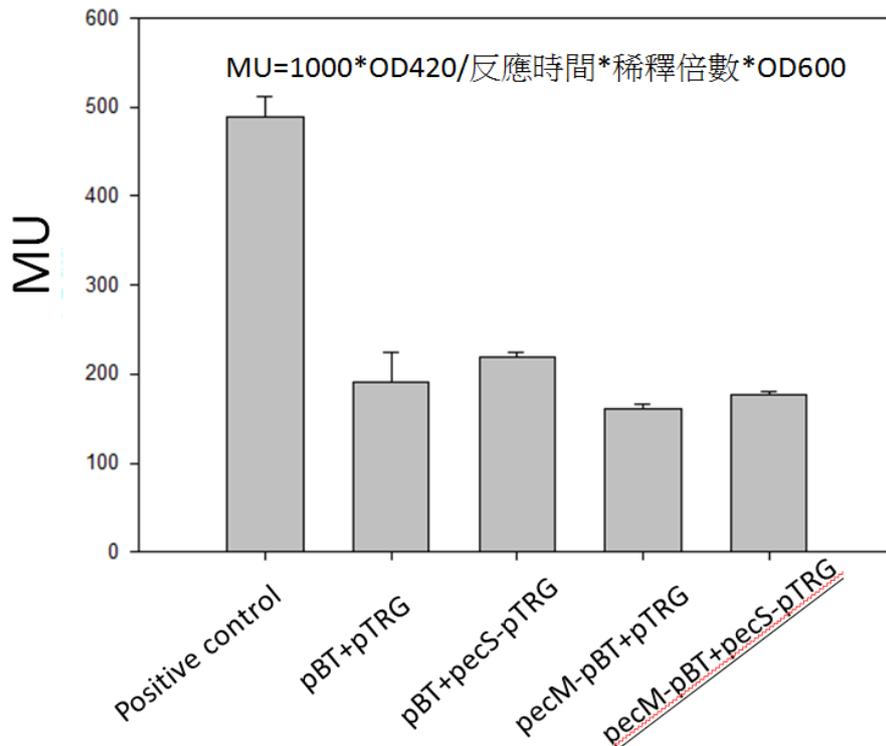
圖十三. 競爭型凝膠電泳位移測定。1 ng 的 bio-*pecO* 與不同濃度之 PecS 混合並置於室溫 30 分鐘，針對 PecS 濃度已達 75 nM 的樣本加入 50 ng (50 倍)、100 ng (100 倍) 與 200 ng (200 倍) 的 non label-*pecO* 混何均勻並置於室溫 30 分鐘，而後使用 5 % 的 polyacrylamide gel 電泳分離後，並利用帶有 HRP 酵素的抗體進行螢光免疫呈色分析。



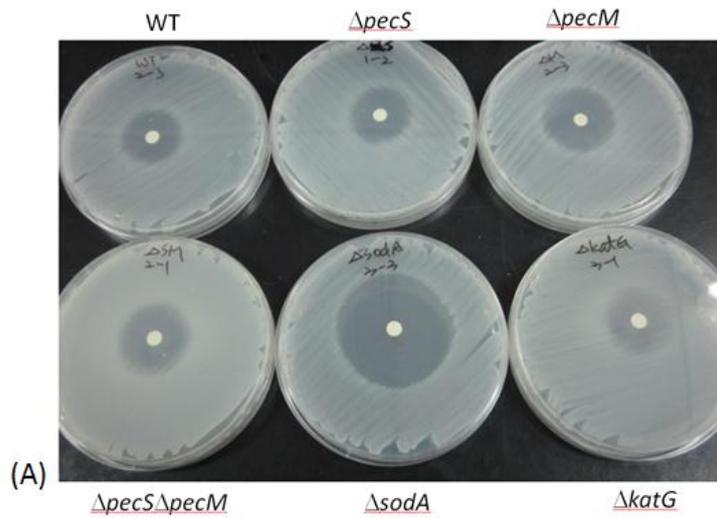
圖十四. 凝膠電泳位移測定。20 ng 的 *pecO* 與不同濃度之 PecS、尿酸混合均勻並置於室溫 30 分鐘，而後使用 5 % 的 polyacrylamide gel 電泳分離後，並使用 cyber green 將 DNA 染色，最後再置於紫外光下觀察。C：PecS-DNA complex，F：free-form DNA。



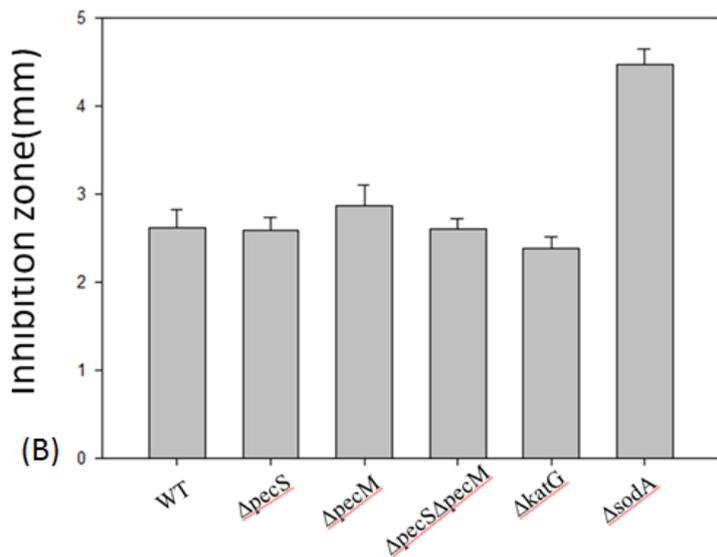
圖十五. 啟動子活性分析。(A) 所會用到之 *mrkA* 啟動子 500 bp 及 232 bp、*pecS* 啟動子與 *pecM* 啟動子片段示意圖。(B) 將各帶有啟動子質體：*placZ*、*lacZ*::*PmrkA*₅₀₀、*lacZ*::*PmrkA*₂₃₂、*lacZ*::*PpecS*、*lacZ*::*PpecM* 之隔夜培養的 *K. pneumoniae* CG43S3、CG43S3 $\Delta pecS$ 、CG43S3 $\Delta pecM$ 與 CG43S3 $\Delta pecS\Delta pecM$ 菌液用 LB 以 1:80 的比例稀釋後在 37°C 培養至 OD600=0.6~0.8，再利用水浴槽在 30°C 的溫度下測得 β -galactosidase 的活性，而後利用公式推算各啟動子的活性。



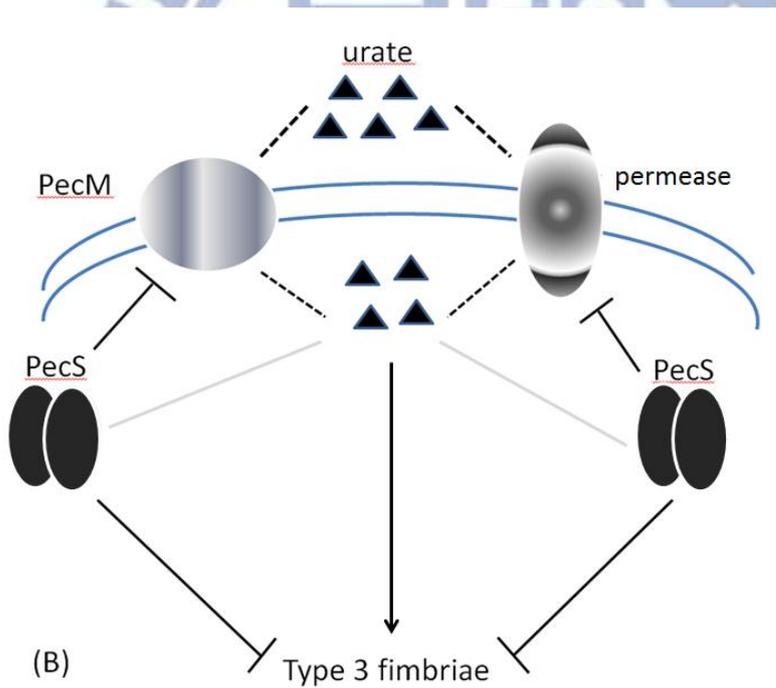
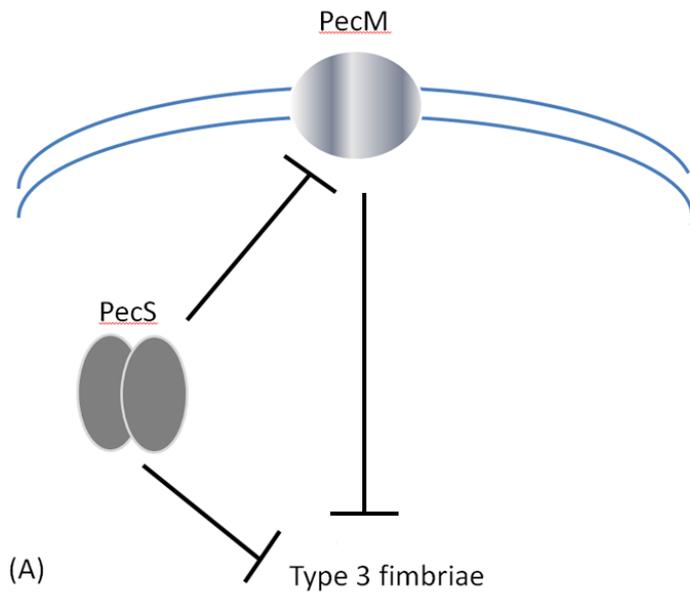
圖十六. Bacterial Two hybrid system 分析。將含有各待測質體的隔夜培養之 *E.coli* XLI-Blue MRF' Kan 菌液用 LB 以 1:100 的比例稀釋並於 30°C 下搖晃培養至 OD₆₀₀=0.6~0.8，再利用水浴槽在 30°C 的溫度下測得 β -galactosidase 的活性。



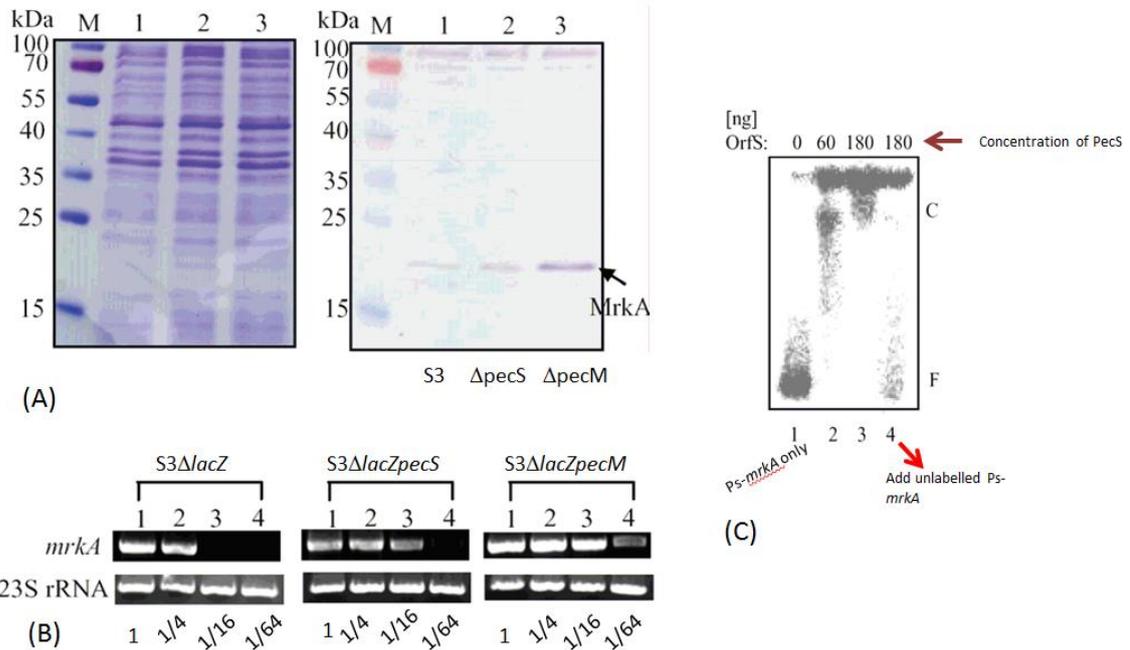
(A)



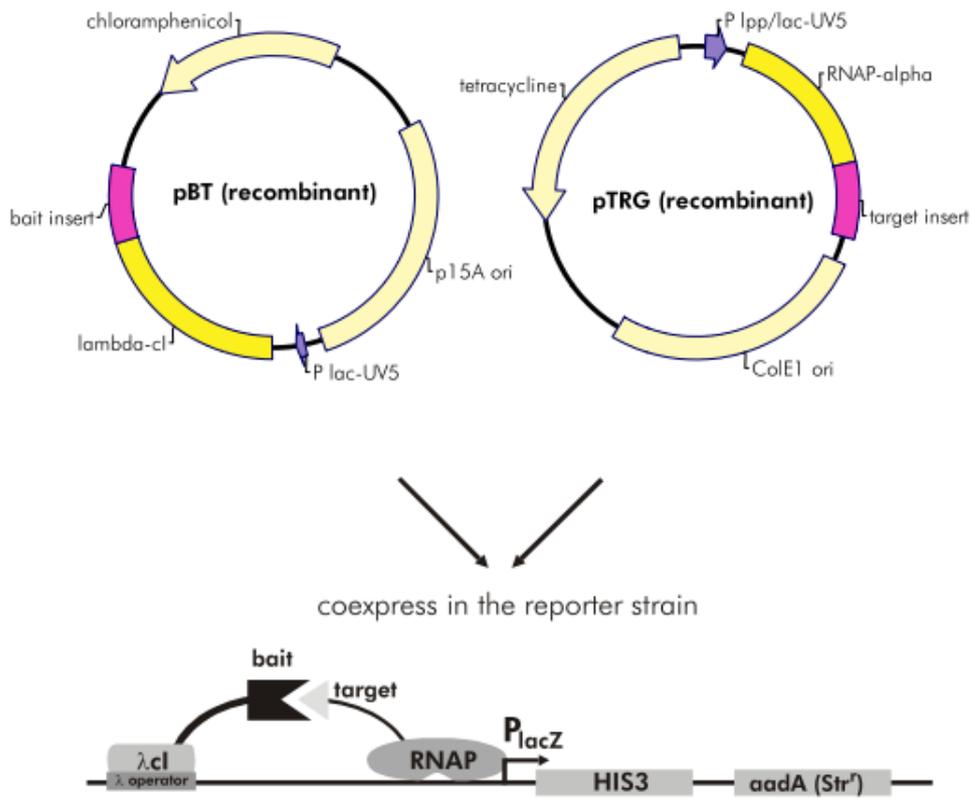
圖十七. 紙錠測試 (Disc inhibition assay) 分析。隔夜培養的 *K. pneumoniae* CG43S3、CG43S3 $\Delta pecS$ 、CG43S3 $\Delta pecM$ 、CG43S3 $\Delta pecS\Delta pecM$ 、CG43S3 $\Delta katG$ 、CG43S3 $\Delta sodA$ 菌液用 LB 以 1:20 的比例稀釋後在 37°C 培養至 OD600=0.2~0.3，將菌液均於塗於 M9 培養基上，於中間放入一紙錠並於其上滴入 10 mM 之 paraquat 作為氧化壓力之來源，再置於 37°C 培養 16 小時。(A) 實際照片情形。(B) 量化後之長條圖。



圖十八. PecS 與 PecM 調控第三型纖毛的可能路徑。(A) 在環境中沒尿酸的情況下 PecS 與 PecM 對第三型纖毛的可能調控路徑。(B) 環境中有尿酸的情形下 PecS 與 PecM 調控第三型纖毛的可能路徑。



附錄一. 黃盈蓉博士於民國 96 年博士論文發表之 PecS 與 PecM 對第三型纖毛的影響。首先利用西方墨點法分析 *K. pneumoniae* CG43S3 $\Delta pecS$ 、CG43S3 $\Delta pecM$ 突變株對第三型纖毛主結構蛋白 MrkA 在表現上之影響，結果發現將 *pecS* 或 *pecM* 剔除後，MrkA 蛋白的表現量有明顯增加(A)。接著利用 limiting dilution RT-PCR 看看在各突變株中 *mrkA* 所轉錄的 RNA 表現量是否也會增加，其結果為將無論是將 *pecS* 或是 *pecM* 剔除後，*mrkA* 所轉錄出的 RNA 量皆較 *K. pneumoniae* CG43S3 還要高(B)。之後將 PecS 蛋白大量表現及純化後與利用 ^{32}P 所標定之 *mrkA* 啟動子進行競爭型凝膠電泳位移測定，其結果發現隨著 PecS 蛋白濃度的上升，PecS 與 *mrkA* 啟動子之混和體的量也隨之上升(C)，其證明 PecS 可能是透過直接與 *mrkA* 啟動子的結合來調控第三型纖毛的表現。



附錄二. Bacterial Two hybrid system 之原理。將待測的蛋白質基因分別選殖到會轉譯出 λ cl 蛋白的表現質體 pBT 以及會轉譯出 RNA 聚合酶的表現質體 pTRG 中，再將這兩種帶有不同蛋白質基因的質體同時轉殖至表現菌株。如果待測的蛋白質產生直接交互作用，則可使後面的報導基因轉錄，藉由報導基因是否表現觀察待測蛋白質是否會產生直接交互作用。