

國立交通大學

生物科技研究所

碩士論文

碳源與生長速率對大腸桿菌 DNA 超螺旋結構、ATP  
生合成基因與細胞分裂基因調控之研究



DNA supercoiling, ATP generation and cell division  
gene expression are regulated by carbon source  
and growth rate in *Escherichia coli*

研究生：鄭惠文

指導教授：曾慶平 博士

# 碳源與生長速率對大腸桿菌 DNA 超螺旋結構、ATP 生合成基因與細胞分裂基因調控之研究

學生：鄭惠文

指導教授：曾慶平 博士

國立交通大學 生物科技研究所 碩士班

## 摘 要

微生物可利用不同受質獲取能量，大腸桿菌代謝碳源產生能量的途徑與生長速率亦隨受質不同而改變。本論文以醋酸、葡萄糖、甘油與琥珀酸四種不同碳源作為大腸桿菌之生長基質，結果發現不同碳源會造成細胞生長速率改變，相對地代謝途徑上與 ATP 生合成相關基因的表現量也發生變化 (*pgk*、*pyk*、*ackA*、*sucCD*、*atpI*)。由於 DNA 超螺旋結構受 ATP/ADP 比例所調控，研究發現細胞內 ATP 與 ADP 含量以及 ATP/ADP 比例會隨碳源不同而上升或下降，當生長速率加快時，因 ATP/ADP 比例與 *gyrase* 表現量受到調控而上升，因此促使 DNA 超螺旋結構較生長速率緩慢時來得緊密。

此外 ppGpp 為大腸桿菌在貧瘠環境下的重要調控因子，實驗結果顯示 ppGpp 並不影響大腸桿菌體內 ATP/ADP 比例與 DNA 超螺旋結構的改變，但卻觀察到 ppGpp 會使細胞分裂基因 *ftsZ* 表現上升，且對 *minC* 與 *minD* 基因進行負向調控。本研究也發現細胞大小會隨生長速率加快而變大，以不同碳源為生長基質時，造成細胞分裂基因 (*ftsZ*, *minC*, *minD*) 的表現有明顯差異。當大腸桿菌生長在碳源貧乏的環境時，菌體型態會趨向長絲狀並呈現鍊狀結構，因此推測 ppGpp 有可能透過影響細胞分裂基因的表現而改變細胞大小以及菌體型態。本實驗藉由研究碳源如何改變大腸桿菌生長速率，ATP 與 ADP 含量及細胞內 ATP/ADP 比例、DNA 超螺旋結構、細胞分裂等結果，可作為基礎分子生物學研究提供一個重要的模式發現。

## ABSTRACT

To understand the expression of ATP generation and cell division genes in different carbon sources, we individually used acetate, glucose, glycerol or succinate as a sole carbon for energy source. The results of this study showed that the expression of ATP generating genes in metabolic pathway varied with carbon sources and ATP concentration increased with cell growth rate. Comparison with the wild-type strain and *relA spoT* double mutant, the growth rate and ATP yields were changed, but ATP/ADP ratio remained at the same level. DNA supercoiling was dependent on ATP/ADP ratio. Whereas ppGpp did not change DNA supercoiling.

Under various growth conditions, fast-growing *E. coli* cells were larger than slowly growing ones. Starvation of the cells resulted in filamentous morphology. In addition, the results clearly showed that *relA spoT* double mutant had more filamentous than wild-type cells regardless acetate or glucose as carbon substrates. It was also notable that the filamentous features provided the phenotypic clues for ppGpp function. However, the morphology raised the possibility of indirect, rather than direct, effects of ppGpp. It indicated that a link between the levels of ppGpp and cell division, which ppGpp could act as a positive regulator of the expression of *ftsZ* gene. Deficiency of ppGpp (*relA spoT* double mutant) drastically reduced the expression of *minC* and *minD*. These results also suggested that ppGpp was important factor involved in the regulation of cell cycle of *E. coli* under starvation condition.

## 誌謝

在此衷心感謝指導教授曾慶平老師在實驗與生活上悉心指導與啟發導，讓我受益良多，並感謝彭慧玲老師與楊昀良老師的細心指導與寶貴意見，使我得到更多科學上的觀點與想法，本論獻上最誠摯的謝意。

實驗室裡每一位深具個人特色的伙伴，感謝你們陪我走過漫漫的研究歲月，使我感受到研究生活中動人又有趣的另一面，不管實驗或生活上的點點滴滴都深深烙印在心裡，還記得說話與實驗都超快的鐘達、深具智慧的育甄，慈祥又美麗的傅老師、認真又滿懷搞笑細胞的校賢、寬容又博學多聞的煜沛、堆肥王國裡的羽球王子--國領、熱心負責的宗益、聰明又具耐心的慧貞、鬼靈精怪的鈞毅、能言善道的承宏、活潑善良的慧珊、高人一等的上進青年--岳賢，以及可愛又美麗的同學們--靜雪、慧君、郁婷、巧璇，還有一群嗷嗷待哺又充滿活力的學弟妹們--繼元、愛雁、翊維、冀冬和智彬，另外，要感謝大學的學長姐及同窗好友們，因為你們的存在，我才能順利完成論文，你們的幫助與鼓勵真是令我感動不已。

最後要感謝父母與家人精神上的支持，默默陪我走過最低潮的時候，過去的衝突與挫折，因為你們的包容，讓我得以在人生的路途上不斷前進，以本論獻上最深的愛意與敬意，滿心感激每一位伴我成長的伙伴們！

# 目錄

	頁次
中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
致謝.....	iii
目錄.....	iv
圖表目錄.....	vii
<b>壹 序言</b> .....	<b>1</b>
1.1 研究緣起.....	1
1.2 研究目的.....	2
<b>貳、文獻回顧</b> .....	<b>4</b>
2.1 碳源與生長速率對大腸桿菌能量狀態與 DNA 超螺旋結構之影響.....	4
2.1.1 碳源對大腸桿菌細胞生長速率之影響.....	4
2.1.2 生長速率對大腸桿菌細胞組成及其生理狀況的影響.....	4
2.1.3 細胞生長速率對基因表現的影響.....	5
2.1.4 生長速率調控機制的探討.....	6
2.1.5 細胞內主要來源 ATP.....	7
2.1.6 碳源對代謝產生能量途徑之影響.....	8
2.1.7 ATP/ADP 比例.....	9
2.1.8 DNA 超螺旋結構(DNA supercoiling)與 topoisomerase .....	10
2.1.9 細胞內能量因子調控 DNA 超螺旋結構.....	12
2.2 貧乏培養 (starvation) 與 ppGpp 對大腸桿菌生理之影響.....	13
2.2.1 迫切反應(stringent response)與 ppGpp 對大腸桿菌之生理調控.....	13
2.2.2 ppGpp 作用機制與對細菌生理影響.....	14

2.3 大腸桿菌之細胞分裂基因.....	15
2.3.1 細胞分裂 ( cell division ).....	15
2.3.2 細胞隔板的形成 ( septum formation ) .....	16
2.3.3 細胞隔板形成之抑制者.....	17
<b>參 基本理論</b> .....	18
3.1 批次培養 ( batch culture ) 之細胞生長模式. ....	18
3.1.1 批次培養下細胞之生長曲線.....	18
3.1.2 菌體倍增時間.....	18
3.2 連續式培養之動力學模式.....	20
3.3 聚合酶連鎖反應 ( Polymerase chain reaction , PCR ) 之原理.....	22
<b>肆 材料、設備與方法</b> .....	24
4.1 實驗材料.....	24
4.1.1 菌株質體與噬菌體.....	24
4.1.2 藥品與試劑.....	24
4.1.3 緩衝液.....	26
4.1.4 培養基與培養液.....	27
4.1.5 電泳膠體.....	28
4.2 實驗方法.....	28
4.2.1 大腸桿菌生長條件與培養方法.....	28
4.2.2 細胞倍增時間的測定.....	31
4.2.3 細胞轉型 ( transformation ).....	32
4.2.4 大量抽取細菌質體.....	33
4.2.5 DNA 超螺旋結構電泳分析.....	34
4.3.6 細胞內能量狀態測定.....	35
4.3.7 突變株的構築與篩選.....	36



4.3.8 大腸桿菌總 RNA 製備方法.....	38
4.3.9 北方墨點轉漬分析法( Northern blotting analysis ).....	39
4.3.10 革蘭氏染色法.....	44
<b>伍 結果</b> .....	<b>45</b>
5.1 大腸桿菌生長速率與能量變化之關係.....	45
5.2 貧乏培養 (starvation) 與 ppGpp 對大腸桿菌能量變化之影響.....	45
5.3 DNA 超螺旋結構之電泳分析.....	46
5.3.1 不同碳源對大腸桿菌 DNA 超螺旋結構之影響.....	47
5.3.2 貧乏培養(starvation)與 ppGpp 對大腸桿菌 DNA 超螺旋結構之影響...	48
5.4 生長速率與碳源對不同 topoisomerase 基因表現之影響.....	49
5.5 不同碳源對 ATP 合成酵素基因表現之影響.....	49
5.6 碳源與 ppGpp 對細胞分裂基因之影響.....	50
5.7 碳源與 ppGpp 對大腸桿菌菌體型態之影響.....	51
<b>陸 討論</b> .....	<b>53</b>
6.1 碳源與生長速率對大腸桿菌細胞內能量之關係.....	53
6.1.2 不同碳源與生長速率對大腸桿菌細胞內能量狀態的影響.....	53
6.1.3 貧乏培養(starvation)與 ppGpp 對大腸桿菌細胞內能量狀態之影響.....	55
6.1.4 碳源對大腸桿菌 ATP 產生相關酵素基因之影響.....	56
6.2 碳源與生長速率對大腸桿菌 DNA 超螺旋結構之關係.....	59
6.2.1 碳源、生長速率與 ATP/ADP 比例對 DNA 超螺旋結構之影響.....	59
6.2.2 碳源與生長速率對於 topoisomerases 基因表現之影響.....	60
6.3 生長速率與大腸桿菌細胞分裂之關係.....	61
6.3.1 碳源對大腸桿菌細胞分裂基因 ( <i>ftsZ</i> , <i>minC</i> , <i>minD</i> ) 的影響.....	61
6.3.2 ppGpp 對大腸桿菌細胞分裂基因 ( <i>ftsZ</i> , <i>minC</i> , <i>minD</i> ) 與菌體型態之影響	62
<b>柒 參考文獻</b> .....	<b>79</b>

## 圖表目錄

Table 1. Effect of carbon source on energy state of <i>E. coli</i> in batch culture.	65
Table 2. Effect of starvation and ppGpp on energy state of <i>E. coli</i> in batch culture.	66
Table 3. The changes of ATP generating gene expression in various carbon medium.	67
Fig 1. Effect of carbon source on intracellular ATP of <i>E. coli</i> in batch culture.	68
Fig 2. Effect of carbon source on DNA supercoiling of <i>E. coli</i> in batch culture.	69
Fig 3. Effect of starvation and ppGpp on DNA supercoiling at different carbon sources in <i>E. coli</i> in batch culture.	70
Fig 4. Effect of carbon source and growth rate on the expressions of topoisomerase genes ( <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>topA</i> ) in <i>E. coli</i> .	71
Fig 5. Effect of carbon source on the expressions of ATP generating genes ( <i>pgk</i> , <i>pyk</i> , <i>ackA</i> , <i>sucCD</i> , <i>atpI</i> ) in <i>E. coli</i> .	72
Fig 6. The quantitative northern blot analysis of <i>pgk</i> , <i>pyk</i> , <i>ackA</i> , <i>sucCD</i> and <i>atpI</i> .	73
Fig 7. The metabolic pathways of glycolysis, tricarboxylic acid cycle and electron transfer chain.	74
Fig 8. Effect of carbon source on the expressions of cell division genes ( <i>ftsZ</i> , <i>minC</i> , <i>minD</i> ) of <i>E. coli</i> .	75
Fig 9. Effect of starvation and ppGpp on the expressions of cell division genes ( <i>ftsZ</i> , <i>minC</i> , <i>minD</i> ) at different carbon sources in <i>E. coli</i> .	76
Fig 10. Morphology of wild-type K12 and ppGpp mutant under different carbon sources in minimal medium.	77
Fig 11. Morphology of wild-type K12 and <i>relA spoT</i> mutant in carbon-starved minimal medium.	78

# 壹、序言

## 1.1 研究緣起

細菌生長過程從生長、分裂以至死亡各階段中，每個細胞明顯地受到環境中物理以及化學因子所影響 (Rothfield, 1996)，我們可清楚地觀察到當細胞生長在養分充足或適宜的環境時，細胞生長與分裂較為快速，反之則變得較緩慢，而在生長快速與緩慢細胞之間有明顯不同的生理變化。已知環境中的養分、溫度、含氧量、酸鹼度、滲透壓等因子改變均會造成細胞生長及生理變化 (Bloch *et al.*, 1980; Epstein and Schultz, 1965; Herendeen *et al.*; 1979, Felle *et al.*, 1980)，而且細胞生長速率改變時會影響細胞內巨分子(如 DNA、RNA)的組成 (Rothfield, 1996)。目前已證實許多基因會受生長速率影響 (growth rate-dependent regulation)，如生長速率加快時，glucose-6-phosphate dehydrogenase、enolase、DNA methyltransferase 等基因的表現量會隨之上升 (Rasmussen *et al.*, 1995; Rowley *et al.*, 1991)，而 fumarase reductase 與 TCA cycle 中 succinate dehydrogenase、malate dehydrogenase 及 fumarate dehydrogenase 等基因的表現卻隨著生長速率加快而下降。

此外細胞生長與分裂需要能量供應，而在不同環境下細胞內的能量狀態亦有所不同。目前多數研究以 ATP/ADP 比例作為能量對細胞生理狀況影響的指標 (Neidhardt *et al.*, 1990)，細胞體外實驗顯示經純化後的 DNA gyrase 活性受到 ATP/ADP 比例影響，細胞內 ATP/ADP 比例增加時，質體 DNA 超螺旋結構亦隨之旋緊 (Workum *et al.*, 1996)。細胞內 ATP 和 ADP 含量會有一定比例關係，細胞接受外界環境的刺激，例如改變溫度，滲透壓及含氧量等因子均會使得 ATP/ADP 比例發生變化，並且同時觀察到 DNA 超螺旋結構相對應改變 (Hsieh *et al.*, 1991; Camacho-Carranza *et al.*, 1995)，此訊息透露 ATP/ADP 比例對

DNA 超螺旋結構的調控扮演重要角色。由於 DNA 超螺旋結構與 ppGpp 均為細菌體內重要的調控因子，目前已知在大腸桿菌細胞內至少有 88 種以上蛋白質的表現受 DNA 超螺旋結構影響 (Notley-McRobb *et al.*, 1997)，且細胞內 DNA 超螺旋結構也影響了 DNA 複製、轉錄等機制，此外大腸桿菌體內 ppGpp 在營養素缺乏 (starvation) 時對菌體生理之調控已被廣為研究 (Gallant, 1979; Hernandez and Bremer, 1990)。因此本論文經由探討不同碳源對細菌生理所造成之變化，藉此了解是否不同碳源可經由改變細胞內能量狀態、代謝途徑與生合成反應，以及 DNA 超螺旋結構或是 ppGpp 層次變化，造成細胞分裂基因表現與菌體型態改變，進而影響了細胞生長速率。

## 1.2 研究目的



已知生長速率可調控細菌某些基因的表現，但是基因表現受細胞生長速率影響的機制尚未明確，由於 DNA 超螺旋結構改變與 ppGpp 濃度改變等已證實會影響許多基因表現，因此藉由連續式培養操作技術與分子生物學結合，來研究大腸桿菌不同碳源及生長速率對能量狀態、DNA 超螺旋結構、細胞分裂與 ppGpp 的影響。大腸桿菌目前為研究基因調控最有效的系統之一，由其所建立的模式可作為研究其它生物細胞相關機制之參考。藉由探討不同碳源對大腸桿菌生長速率與基因調控之間的關係，可為基礎分子生物學發現整體相互調控作用，並對微生物遺傳與生理之間的關係有更深一層的瞭解。

綜合上述，我們以下列關係圖顯示此論文目的與研究方向之關聯。

**研究目的：**不同碳源與生長速率對細胞內 ATP/ADP 比例及 DNA 超螺旋結構的影響，並偵測代謝途徑上 ATP 生合成基因之表現，以及對細胞分裂基因與菌體型態調控之關係。

**研究方向**

1. 不同碳源與starvation時 ppGpp 對菌體 ATP/ADP 比例與 DNA 超螺旋結構改變。

2. 不同碳源與生長速率下偵測 topoisomerase ( *gyrA*、*gyrB*、*topA* ) 基因表現。

不同碳源下偵測代謝途徑ATP生合成基因 ( *pgk*、*pyk*、*ackA*、*sucCD*、*atp* ) 表現變化。

不同碳源與starvation時 ppGpp 對細胞分裂基因 ( *ftsZ*、*minC*、*minD* ) 表現與菌體型態變化。

## 貳、文獻回顧

### 2.1 碳源與生長速率對大腸桿菌能量狀態與 DNA 超螺旋結構之影響

#### 2.1.1 碳源對大腸桿菌細胞生長速率之影響

大腸桿菌可利用不同基質 (substrate) 來生長，不同的營養成份如碳源及氮源經微生物攝取後可經由細胞內不同的代謝途徑加以利用，進而產生不同細胞生長速率。例如大腸桿菌 K12 菌株培養在以葡萄糖 (glucose) 為碳源的培養基時，其細胞倍增所需的時間 (doubling time) 約為 0.5 小時。若培養在僅以醋酸 (acetate) 為碳源之培養基時，其細胞倍增時間則增長為 2 小時。Wolf 等人曾利用不同養分培養液證明大腸桿菌體內 6-磷酸葡萄糖酸鹽去氫酶 (6-phosphogluconate dehydrogenase) 及葡萄糖-6-磷酸去氫酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 等酵素活性均受到細胞生長速率所調控，並證實此二酵素活性的改變是直接由生長速率改變所造成，而不是由於碳源的專一性所影響造成 (Rowley *et al.*, 1991)。同樣利用不同養分培養基組成也證明了 *ompA* 基因、elongation factor Tu 及 *gua* 操縱子的表現會受到生長速率的調控 (Furano, 1975; Cozzarelli *et al.*, 1990; Georgellise *et al.*, 1992)，本實驗即利用不同碳源進行批次培養以研究生長速率的變化。

#### 2.1.2 生長速率對大腸桿菌細胞組成及其生理狀況的影響

細胞生長速率會影響細胞內的生理狀況，特別是細胞內巨分子組成，包括 DNA、RNA 及蛋白質等均會隨著細胞生長速率不同而改變。Dorman 等人在研

究傷寒沙門氏桿菌 (*Salmonella typhimurium*) 中首先證明細胞內巨分子組成隨生長速率上升而增加 (Dorman *et al.*, 1988)。陸續研究亦發現在大腸桿菌 B/r 菌株中，當生長速率由 0.6 doubling/hr 增快至 2.5 doubling/hr 時，RNA 含量及核糖體 (ribosome) 增加近 10 倍，而 DNA 含量增加近 2 倍 (Ingraham, 1987)。由於生長速率改變對於細胞的巨分子組成造成了重大改變，意謂著生長速率對於細胞生理而言是複雜且重要的調控因子。

除了巨分子外，許多細胞內生理因子亦被生長速率所調控。如 RNA 聚合酶活性也隨著生長速率增快而增加。生長速率加快同時也造成了細胞轉譯頻率 (translational frequency) 增加，複製時間與複製起始重量下降等的情形 (Ingraham, 1987; Wold *et al.*, 1994)，由於上述各種因子均受生長速率所調控，因此細胞生長速率與基因表現之關係一直受到重視。



### 2.1.3 細胞生長速率對基因表現的影響

在菌體中有許多基因會受生長速率所影響，這些基因的表現量與酵素活性高低一般可分為兩種情形：

1. 隨著生長速率加快而上升。
2. 隨著生長速率下降而增加。

例如 *zwf* (glucose-6-phosphate dehydrogenase)、*ompA* (out membrane protein II) 等基因屬於前者 (Rowley *et al.*, 1991; Georgellis *et al.*, 1992)，而 *rmf* (ribosome modulation factor)、*frdABCD* (fumarate reductase) 以及 *lacZ* 基因則屬於後者 (Yamagish *et al.*, 1993; Tseng *et al.*, 1994a; 2001b)。除此之外，以下再舉出幾個受生長速率調控的基因為範例加以介紹：

在 TCA cycle 中，將琥珀酸轉換成延胡索酸 (fumarate) 的琥珀酸去氫酶

(succinate dehydrogenase, *sdhCDAB*) 與催化蘋果酸 (malate) 和草醋酸 (oxaloacetate) 之間轉換的蘋果酸去氫酶 (malate dehydrogenase, *mdh*) 此二酵素，無論在有氧或無氧環境下基因表現量均受生長速率調控 (Park *et al.*, 1995a; 1995b)。本研究室亦發現於有氧環境下催化延胡索酸與蘋果酸轉換的延胡索酸酶 A (*fumA*) 及延胡索酸酶 C (*fumC*) 之表現量也均會隨著生長速率加快而降低。

DNA methyl-transferase (*dam*) 是基因複製時負責甲基化 GATC 序列且為錯誤配對 (mismatch) 修復時的必需酵素。目前已證實 *dam* 基因中的主要啟動子 P2 在高生長速率下有較高的轉錄頻率 (transcriptional frequency) (Rasmussen *et al.*, 1995)。而在磷酸五碳糖反應途徑 (pentose phosphate pathway) 中，將乳糖 (lactose) 轉換為核酮酸-5-磷酸 (ribulose-5-phosphate) 之 6-phosphogluconate dehydrogenase (*gnd*)，在大腸桿菌 K12 菌株中發現以葡萄糖為碳源時，*gnd* 基因表現量是以醋酸為碳源時的 3 倍，因此生長速率增加時，*gnd* 基因的表現量亦增加 (Wolf *et al.*, 1979)。



#### 2.1.4 生長速率調控機制的探討

細胞生長速率對細胞生理功能的影響深遠複雜，因此生長速率對基因的調控一直是許多研究的著眼點，目前對於生長速率改變時對基因調控的機制仍不是十分清楚，相關的研究亦未臻成熟。我們已了解在不同的生長速率下，影響酵素活性及其產量高低的機制可能是在轉錄或轉錄後過程受到調控 (transcription level 或 post-transcription level)。例如：產生 pentose phosphate pathway 中催化第一個步驟酵素的 *zwf* 基因，在生長速率改變時，可藉由轉錄的步驟來調控 (Rowley *et al.*, 1991)；而產生大腸桿菌外膜蛋白質的 *ompA* 基因隨著生長速率提高而增加表現量，則是因為生長速率的不同影響了 *ompA* 基因 mRNA 的穩定性 (Nilsson

*et al.*, 1984; Georgellis *et al.*, 1992)。

由於生長速率調控基因的方式不一，亦沒有特定的啟動子需求，目前仍有不明確的調控機制存在，因此本論文由探討不同碳源對細菌生理所造成之變化，藉此了解是否不同碳源可經由改變細胞內能量狀態、代謝途徑與生合成反應，以及 DNA 超螺旋結構改變影響細胞生長速率，或是鳥苷四磷酸 (guanosine tetraphosphate, ppGpp) 造成細胞分裂基因表現改變與菌體型態變化，進而影響了細胞生長速率。

### 2.1.5 細胞內主要來源 ATP

細菌吸收並分解環境或培養基中的養分後，以 ATP 形式存在於細胞內，這些 ATP 隨即被消耗運用於溶質運送、單體（單醣、核苷酸、脂肪酸）與大分子（核酸、脂質、蛋白質、多醣類）合成等各種需能反應上。這些反應所製造出的物質不但造成細胞重量增加，也使得細菌能持續分裂與生長，因此微生物的生長與 ATP 有直接關係。

細菌體內合成 ATP 的機制有二 (Gottschalk, 1988)：

1. 氧化磷酸化反應 (oxidative phosphorylation)：利用電子從氧化還原電位較低的供給者轉移到電位較高的接受者時，伴隨 ADP 與無機磷酸根 (Pi) 結合產生 ATP。這一部份的反應多發生於呼吸鏈或光合成反應中。
2. 受質水平磷酸化反應 (substrate level phosphorylation)：在有機受質被分解成小分子中間物時，放出的高能磷酸鍵與 ADP 結合而生成 ATP。

## 2.1.6 碳源對代謝產生能量途徑之影響

不同環境下微生物的代謝產能途徑會隨之改變，大腸桿菌利用不同受質經呼吸酵素產生 NADH，再經由細胞內 quinone pool 傳給電子接受者，以進行氧化磷酸化反應來產生 ATP 供給生長所需。在有氧環境下，若以一分子葡萄糖為例，由 Fig 7 代謝途徑可知葡萄糖經由糖解作用 (glycolysis) 生成兩分子丙酮酸 (pyruvate) 的過程中，先後分別由磷酸甘油激酶 (phosphoglycerate kinase, *pgk*) 與丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, *pyk*) 催化，可經由受質水平磷酸化反應產生 2 個 ATP。接著 pyruvate 以乙醯輔酶 A (acetyl-CoA) 為主要的分解代謝產物，進行完整的 TCA cycle 後氧化成二氧化碳，在此過程中，由琥珀醯硫激酶 (succinyl thiokinase, *sucCD*) 將琥珀醯硫 A (succinyl-CoA) 催化成琥珀酸 (succinate) 步驟中，可生成一個高能 ATP 分子，同時經由電子傳遞鏈 (electron transfer chain) 伴隨進行氧化磷酸化作用，由 ATP 合成酶 (ATP synthase, *atp*) 產生 38 個 ATP 分子。若是處於無氧的環境下，同樣是一分子的葡萄糖僅可藉由發酵作用 (fermentation) 或厭氧呼吸產生 ATP，在此過程中大腸桿菌是以醋酸激酶 (acetate kinase, *ackA*) 將帶有高能磷酸根的乙醯磷酸 (acetyl-phosphate) 轉變為醋酸，並伴隨一個 ATP 分子產生。

綜合以上所述，在代謝途徑上與 ATP 直接合成的相關酵素共有五種，分別是磷酸甘油激酶 (phosphoglycerate kinase, *pgk*)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, *pyk*)、琥珀醯硫激酶 (succinyl thiokinase, *sucCD*)、ATP 合成酶 (ATP synthase, *atp*) 與醋酸激酶 (acetate kinase, *ackA*)。本實驗將探討不同碳源為生長基質時，對於 *pgk*、*pyk*、*ackA*、*sucCD* 與 *atp* 等基因的影響與表現量改變情形。

### 2.1.7 ATP/ADP 比例

ATP 是生物系統能量可供利用的形式，作為自由能的直接供應者而非用來長期儲存自由能。ATP 轉換速率 (turn over rate) 在細胞中極為快速，一分子 ATP 在形成後一分鐘內即被消耗，唯有持續將 ADP 與 Pi 結合再生 ATP 才能提供細胞所需的能量 (Stryer, 1995)。因此產能與耗能的反應不斷交替進行著，使得細胞內 ATP 與 ADP 二者間的濃度比例與細胞內生理狀態有關。例如：在肌細胞中 ATP/ADP 比例可調控肌動蛋白 (actin) 的作用 (Carlier *et al.*, 1993)；反之，肌細胞內的肌酸激酶 (MM creatine kinase) 可調控 ATP/ADP 比例 (Korge *et al.*, 1993)。目前已知在有氧環境下，大腸桿菌細胞內 ATP/ADP 比例較生長於無氧下為低 (Hsieh *et al.*, 1991)。許多活體外試驗均證實 ATP/ADP 比例影響 DNA 超螺旋結構。當培養環境之含氧量降低時 ATP/ADP 比例提高，DNA 超螺旋隨之旋緊；或將菌體由一般培養基中轉移至高鹽 (NaCl) 環境下，ATP/ADP 比例會立刻增加且 DNA 超螺旋結構也變得較為緊密 (Hsieh *et al.*, 1991)。推論其作用為 ATP/ADP 比例影響了 gyrase B 的活性，進而影響細胞 DNA 超螺旋結構。再者，也發現 ATP/ADP 比例會影響 RNA 的穩定性，磷酸酶 (phosphorylate kinase, PPK) 可藉由磷酸根的轉移來調控 mRNA 穩定性，當 RNA 處在分解狀態下，PPK 會將 ATP 水解且於 RNA 的 5' 或 3' 端形成多磷酸鏈 (polyphosphorylate chain)，此作用可增加 RNA 的穩定性；但加入 ADP 時，PPK 則會催化 ATP 合成而不進行加磷酸鏈反應。由此可知 ATP/ADP 比例高時 RNA 較穩定，反之則較不穩定 (Blum *et al.*, 1997)。Rohwer 等學者亦發現藉由誘導 *atp* 操縱子 (H<sup>+</sup>-ATPase) 表現量的不同而改變 ATP/ADP 比例時，會影響大腸桿菌攝取葡萄糖的 PTS (phosphoenolpyruvate phosphotransferase system) 活性，當 ATP/ADP 比例低時會降低 PTS 活性，反之則使 PTS 的活性升高 (Rohwe *et al.*, 1996)。由這些例證均可肯定 ATP/ADP 比例的確可反應細胞內的生理狀況，因此

ATP/ADP 比例已成為相關研究中的反應參考指標。

### 2.1.8 DNA 超螺旋結構 (DNA supercoiling) 與 topoisomerase

由電子顯微鏡觀察到 DNA 分子具有雙股雙股之間緊密纏繞的現象，此種 DNA 形式稱為超螺旋結構 (supercoiling)。實驗證實菌體 DNA 以自由能最小的 negatively supercoiling 狀態存在 (Worcel and Burgi, 1972; Sinden and Pettijohn, 1981)，且在 negative 狀態下，有利於雙股 DNA 在複製、重組及轉錄時的分離。

為了解決 DNA 半保留複製造成的雙股解旋 (untwining) 與鏈結 (catention) 現象，不論在原核或真核細胞中皆有某些酵素可以藉由改變 DNA linking number 來解決這些問題。而這些酵素亦可使 DNA 形成各種拓樸異構物，因此就統稱它們為拓樸異構酶 (topoisomerases)。

目前所發現的 topoisomerases 以它們的作用形式大致上可分為兩類：type I topoisomerase 利用切斷雙股 DNA 的一股使其穿過另一股，再以 ligase 將其連接；而藉由將兩股 DNA 完全切斷，讓兩股相互繞過再結合的則屬於 type II topoisomerase (Wang, 1985)。目前在大腸桿菌中已發現 topoisomerase I、II、III、IV 四種形式；其中 topoisomerase I、III 屬於 type I，而 topoisomerase II、IV 則屬於 type II。已知 DNA topoisomerase III (*topB*) 在細胞中含量非常低，且 DNA topoisomerase III 突變株對 DNA 超螺旋結構並沒有顯著的影響。至於 DNA topoisomerase IV 目前尚無豐富的相關研究，僅知此酵素只在 *topA* 突變株中才會經由 *parC* 及 *parE* 基因轉錄 (Drlica, 1992)。因此生物體內 DNA 超螺旋結構最主要是由 DNA topoisomerase I 與 II 來調控，所以多由此二酵素進行相關研究。以下簡要地介紹這兩個重要的酵素。

## 1. DNA topoisomerase I

在 1971 年所發現的 DNA topoisomerase I 是由 *topA* 基因所轉譯，早期一直被稱為  $\omega$  蛋白質，為 110 kDa 大小的單一多肽鏈 (Gellert, 1981)。DNA topoisomerase I 可將雙股 DNA 切斷其中一股，此酵素會與斷裂的 DNA 形成共價中間物，繞著另一股鬆開後再以 ligase 連接。DNA topoisomerase I 僅作用於 negatively supercoiling DNA，對 positively supercoiling DNA 並無作用，且 DNA topoisomerase I 並不能將 DNA 超螺旋結構完全鬆開，研究顯示當 DNA topoisomerase I 存在時，若加入 DNA gyrase 的抑制劑，DNA 超螺旋結構鬆開的速率並不受影響。因此推論 DNA topoisomerase I 的功能主要是為了協調 DNA gyrase 作用，避免 DNA 超螺旋過度纏繞 (Wang, 1985)。

## 2. DNA topoisomerase II (DNA gyrase)

1976 年在大腸桿菌中分離出可將鬆散結構 DNA 纏繞成超螺旋形式的 DNA gyrase，因為緊繞的 DNA 具有較高自由能，所以在 DNA gyrase 作用時需要水解 ATP 來提供反應所需要的能量。DNA gyrase 含兩個次單元 (subunit)：gyrase A (*gyrA*) 與 gyrase B (*gyrB*)，每一分子 DNA gyrase 由二個 gyrase A 與二個 gyrase B 次單元所組成，在細胞內二者皆以雙聚合體 (dimer) 的形式存在，且只有當這兩個次單元結合形成四聚體 (tetramer) 一起作用時，DNA gyrase 才有完整的活性。具有旋緊 DNA 功能的是 gyrase B，而 gyrase A 則有放鬆 DNA 之活性 (Cozzarelli, 1980)。DNA gyrase 可水解 ATP 以誘發 DNA 雙股的斷裂，切開後的 DNA 其 5' 末端會固定在 gyrase A 上，避免其自由旋轉，待斷裂缺口繞過另一段 DNA 後，再加以接合 (Wold *et al.*, 1994)。

在細胞內 gyrase A 及 gyrase B 兩個次單元可相互協調，來保持細胞內 DNA 超螺旋結構的恆定狀態，若太緊時才由 DNA topoisomerase I 進行鬆散的工作。由於 gyrase B 是細胞內唯一具有將 DNA 超螺旋結構纏繞的酵素活性，因

此細胞內不能完全沒有 gyrase B 的活性 (Gellert, 1981)。

### 2.1.9 細胞內能量因子調控 DNA 超螺旋結構

目前發現 DNA gyrase 是菌體中唯一具有纏緊 DNA 超螺旋結構功能之酵素，這個反應必須伴隨著 ATP 水解以獲得能量，目前有愈來愈多的研究證實細胞內 ATP/ADP 比例是影響 DNA 超螺旋結構的重要因子。當細胞內 ATP 缺乏時，DNA 超螺旋結構會變得鬆散，若 ATP/ADP 比例增加，質體 DNA 超螺旋結構亦隨之旋緊 (Workum *et al.*, 1996)。此外體外實驗中也已證實純化後的 DNA gyrase 活性受 ATP/ADP 比例影響，所以目前推論 ATP/ADP 比例是藉由改變 DNA gyrase 活性而控制 DNA 超螺旋結構。從此觀點可了解在不同生長環境下改變 DNA 超螺旋結構的機制：

1. 含氧量：將大腸桿菌培養環境從有氧迅速變成無氧後，ATP/ADP 比例逐漸上升，且在不同的時間點抽取質體觀察也發現，其 DNA 超螺旋結構呈現愈來愈緊的現象 (Hsieh *et al.*, 1991)。
2. 溫度：在 37°C 培養時，大腸桿菌質體 DNA 扭轉程度較 17°C 時緊，而當溫度從 30°C 增加至 42、45、47 或 50°C，觀察質體 DNA 超螺旋程度也是漸增的，這之間的變化亦伴隨著 ATP/ADP 比例而上升 (Goldstein and Drlica, 1984; Camacho *et al.*, 1995)。
3. 滲透壓：在 0.5 M NaCl 影響下，大腸桿菌之 ATP/ADP 比例較高，且質體 DNA 超螺旋結構為較緊密的狀態 (Hsieh, *et al.*, 1991)。

## 2.2 貧乏培養 (starvation) 與 ppGpp 對大腸桿菌生理之影響

### 2.2.1 迫切反應 (stringent response) 與 ppGpp 對大腸桿菌之生理調控

細菌生活在自然界中，常會因為環境因素的不穩定而遭受到相當的壓力 (stress)，因此細菌會因應環境而產生不同的 global regulator 來調節基因表現。細胞內常見的 global regulator 為 ppGpp 與 cAMP 等物質，統稱為警報素 (alarmone)，可透過此類調控子來改變生理狀況來適應不同環境。當大腸桿菌處於胺基酸貧乏的環境時，體內會產生一系列迫切反應 (stringent responses) 以應付不利環境。迫切反應的調控是由 ppGpp 所影響，透過 ppGpp 抑制核糖體和其他大分子合成等應急反應，活化某些胺基酸操縱子的轉錄表達，抑制與胺基酸運轉無關的系統，活化蛋白水解酶等，以節省或開發能源度過難關。

當培養基缺乏必需胺基酸時，大腸桿菌能合成鳥苷五磷酸 (guanosine pentaphosphate, pppGpp) 或鳥苷四磷酸 (guanosine tetraphosphate, ppGpp)。這是由於菌體在缺乏營養的環境下，會啟動 *relA* 基因促使 ppGpp 合成。ppGpp 的合成在菌體的生理與生化代謝上扮演重要功能，包括抗藥性 (antibiotic resistance) 與抗殺蟲劑 (biocide resistance) 的功能也與 ppGpp 有關 (Greenway and England, 1999; Xu *et al.*, 2002)。

與 ppGpp 合成的相關基因除了 *relA* 基因外，另有 *spoT* 基因。SpoT 具有 synthase 與 hydrolase 兩種區域 (domain)，可負責 ppGpp 的合成與分解。通常於缺乏碳源與磷酸時會活化 *spoT* 基因，進行 *relA*-independent 方式來合成 ppGpp，同時 SpoT 也具有將 ppGpp 分解的功能 (Murray and Bremer, 1996)。

## 2.2.2 ppGpp 作用機制與對細菌生理影響

在旺盛生長的細胞中約有 65~90% tRNA 是載有胺基酸的。當胺基酸缺乏時，亦即不負載胺基酸的 tRNA 增多，這種不負載胺基酸的 tRNA 是細胞產生迫切反應之重要信號，仍能與核糖體 A 位結合。在正常的蛋白質合成過程中，將負載有胺基酸之 tRNA 運轉到正在延伸的多肽鏈上需要 GTP，由於多肽鏈的停止使得大量 GTP 便被用作合成 ppGpp 的前趨物。

自 1979 年 Gallant 學者探討細菌迫切反應之機制，已知當胺基酸貧乏時，未負載胺基酸的 tRNA 進入核糖體 A 位會導致兩種效應：一是空載的 tRNA 與 mRNA 密碼子結合而中止蛋白質生成，二為刺激 *relA* 基因的啟動而產生迫切控制因子 (stringent factor, 簡寫為 SF)，SF 為核糖體相關蛋白質，會促使 GTP 或 GDP 與 ATP 反應，進而合成 pppGpp 或 ppGpp (Gallant, 1979)。而 ppGpp 累積會抑制 rRNA 基因 (*rrn*) P1 啟動子的轉錄，透過 ppGpp 與  $\sigma^S$  因子結合以降低 RNA 聚合酶與 P1 啟動子的親合力，藉以降低 rRNA 的轉錄。由此可知，ppGpp 會與 RNA 聚合酶結合以抑制其活性，使基因的轉錄下降，或是可能影響 RNA 聚合酶與啟動子結合的專一性，從而改變了基因轉錄的效率，進而調控蛋白質的合成能力 (Gallant, 1979; Hernandez and Bremer, 1990)。

在細菌正常生長期間 ppGpp 含量極低，當進入對數生長期時，ppGpp 含量會隨生長速率下降而上升；而生長速率對於具有高穩定性的 RNA (tRNA 及 rRNA) 基因所存在的正比表現關係是藉由 ppGpp 所調控 (Neidhardt *et al.*, 1990)。

除了胺基酸貧乏時會引發 ppGpp 合成，碳源與磷酸的缺乏以及生長速率下降時都會促使 ppGpp 產生，以降低新的蛋白質合成進而回饋抑制穩定性 RNA 的轉錄，因此使各種酵素表現量也跟著下降 (Joseleau-Petit *et al.*, 1999)。受 ppGpp 所調控的基因不只是一個或幾個操縱子，而是影響一連串迫切反應，主要包括：(1) 節流：如抑制大部分蛋白質、rRNA、tRNA、脂肪、磷酸與核苷酸等合成；(2)

開源：如促進 *lac*、*ara*、*his*、*trp* 及 *arg* 等操縱子開放，活化蛋白質水解系統以提供胺基酸

## 2.3 大腸桿菌之細胞分裂基因

### 2.3.1 細胞分裂 ( cell division )

大腸桿菌以二分裂的方式進行繁殖，其分裂是從染色體複製開始。為了使遺傳物質能均等地傳給兩個子細胞 ( daughter cell )，染色體複製與細胞分裂必須有嚴謹的調控。正常生長狀態下，若染色體複製未完成則細胞就不能分裂，複製一旦完成細胞隨即開始分裂。在生長緩慢時，大腸桿菌待染色體複製完成且分離後才進行細胞分裂，分裂完成之菌體才開始下一次染色體複製。在快速生長時，染色體複製一次尚未結束時，在尚未分開的染色體上又開始了新的複製，導致染色體複製的時間大為縮短，也因此細胞分裂的倍增時間大為減少 ( Donachie, 1993 )。

接種到新鮮培養基中的大腸桿菌細胞，從周圍環境中選擇地吸收營養物質。在細胞內合成所需的 RNA、DNA、蛋白質及酵素等大分子物質，細胞體積不斷增大，待染色體複製完成後即進行分裂過程。首先是以複製完成之染色體開始分離，同時細胞中央的隔板 ( septum ) 也開始對稱地向中心凹陷生長，使染色體均等地分配到凹陷兩側。隨著細胞膜的向內凹陷，母細胞的肽聚糖層也跟著由四周向中心生長，把細胞膜分為兩層，每層分別成為子細胞的細胞膜。肽聚糖層也分為兩層，直至中央會合，形成由細胞質膜和肽聚糖組成之隔膜。隔膜完全形成後，兩個子細胞分開，完成了一次細胞分裂 ( Romberg and Levin, 2003 )。

### 2.3.2 細胞隔板的形成 (septum formation)

在大腸桿菌中，當染色體複製與分離完成後會在細胞中間形成隔板 (septum)，並分裂成兩個子細胞 (Donachie, 1993a; 2001b)。隔板是由 FtsZ 蛋白質所構成的環狀多聚體環 (Z ring)，Z ring 的形成至少有九種蛋白質參與，分別為 FtsZ、FtsA、FtsQ、FtsL、FtsI、FtsW、FtsK、FtsN 與 ZipA 等蛋白質，其中 FtsZ 為周邊膜蛋白，屬於 actin/hsp70/sugar kinase family，可水解 ATP 以促使隔板形成，而 ZipA 是一種與 FtsZ 交互作用的膜蛋白，也會促進 Z ring 的聚合，其餘與細胞分裂有關之蛋白質皆具有至少一個 membrane domain，可與細胞膜進行交互作用以幫助細胞隔板的形成。

FtsZ (filamenting temperature sensitive) 是從大腸桿菌溫度敏感型突變體中分離到的基因，該基因與大腸桿菌細胞分裂密切相關。自 1980 年首次從大腸桿菌中選殖 (clone) 到該基因後 (Lutkenhaus *et al.*, 1980)，又陸續在多種生物中發現了 *ftsZ* 基因的存在。隨後研究發現 FtsZ 蛋白為原核細胞的骨架蛋白，通常在細胞的分裂位點聚集形成一個 Z ring，從而引發並控制原核細胞分裂過程。FtsZ 為細胞隔板形成最重要的蛋白質，其蛋白質結構與真核生物的微管蛋白 (tubulin) 同源，同樣具有 GTPase 活性，可水解 GTP 以進行 Z ring 的聚合作用。在正常的細胞分裂周期中，*ftsZ* 基因發揮著不可替代的作用，如果胞內 *ftsZ* 基因的表現異常，則會導致細胞分裂受阻並形成不分裂的長絲狀 (filamentous) 細胞 (Bi and Lutkenhaus, 1991; Addinall *et al.*, 1996)。

當 FtsZ 過量時會聚合過多的 Z ring，而在細胞兩端也形成隔板導致 minicell 產生，若 FtsZ 含量再更多時則會完全抑制細胞分裂，這是因為 FtsZ 與 FtsA 之間的比例在正常分裂時是固定的，若之間比例變動過大時則導致細胞隔板無法形成以致不能進行細胞分裂 (Dewar *et al.*, 1992)。

### 2.3.3 細胞隔板形成之抑制者

隔板是由 FtsZ 蛋白質所構成的 Z ring，形成的位置目前推論至少有兩種機制，一為核酸聚集 (nucleoid occlusion)，當染色體複製完成後，將兩個子染色體由細胞中央分別移動至兩極，核酸會佔據 Z ring 形成的位置，因此限制了 Z ring 形成的位置；另一為 MinCD 複合物，MinCD 複合物是 Z ring 抑制者，由 MinC 與 MinD 兩種蛋白質所組成，分布於細胞的兩端，會抑制 FtsZ 在此處聚合，使得 Z ring 只在細胞中央形成隔板。MinC 的 C 端會與 MinD 結合，N 端則與 FtsZ 結合以抑制 Z ring 合成；MinD 具有 ATPase 活性，可分解 ATP 在細胞膜內側形成雙聚體分子，並與 MinC 結合以抑制 FtsZ 在膜上聚合 (Rothfield and Garcia-Lara, 1996; Pichoff and Lutkenhaus, 2001; Hu *et al.*, 2003; Lackner *et al.*, 2003)。



在本論文中，除探討 ATP/ADP 比例對大腸桿菌生長速率與 DNA 超螺旋結構之間的關係，以及偵測代謝途徑上與 ATP 產生相關酵素之基因的研究，也將一併探討碳源與其他調控因子對細胞分裂基因 (*ftsZ*, *minC*, *minD*) 的影響。

## 參、基本理論

### 3.1 批次培養 (batch culture) 之細胞生長模式

批次培養法是指在細胞的培養過程中不再添加任何新鮮培養液，僅提供一定量培養液供細胞生長所需。由於細胞生理狀況、培養液組成養分及細胞代謝產物等因素，在批次培養過程中均會影響細胞的生長。因此當進行批次培養時，細胞的生長具有一定模式。

#### 3.1.1 批次培養下細胞之生長曲線

在批次培養系統下細菌的生長過程可分為六個時期 (Lee, 1992)：



1. 遲滯期 (lag phase)：

微生物開始適應新的環境，菌體的重量會增加，但細胞不會分裂繁殖。

2. 加速生長期 (accelerated growth phase)；

菌體開始分裂，細胞數目開始增加，且細菌生長速率逐漸增加，而達到最大生長速率。

3. 對數生長期 (exponential growth phase)；

細胞以最大速率進行分裂，且在一定時間間隔內分裂一次，此時期菌體的數目會隨時間呈對數增加。

4. 減速生長期 (decelerated growth phase)；

菌體生長及分裂速率均開始降低。

5. 靜止期 (stationary phase)

細胞的增殖速率與死亡速率相等，細胞數目維持一定。

## 6. 死亡期 (death phase)

因環境中的養分已被耗盡，而代謝產物累積對菌體產生毒害。細胞死亡速率較增殖速率快，細胞數目開始降低。

上面所述細胞生長曲線的六個時期中，一般研究細菌生理及生長速率時，均取對數生長時期的菌體加以測定。

### 3.1.2 菌體倍增時間

菌體自開始培養，到最後總菌群為  $N$  時，可依下列公式表示：

$$N = N_0 \times 2^n \quad (3-1)$$

其中  $N$ ：最後菌數

$N_0$ ：起始時間菌數

$n$ ：菌體培養時的世代數

對 3-1 式兩邊取對數

$$\log_{10}N = \log_{10}N_0 + n \log_{10}2$$

↓

$$n = (\log_{10}N - \log_{10}N_0) / \log_{10}2 \quad (3-2)$$

$\log_{10}2 = 0.301$  代入 3-2 式

$$n = (\log_{10}N - \log_{10}N_0) / 0.301$$

↓

$$n = 3.3 (\log_{10}N - \log_{10}N_0) \text{----- (3-3)}$$

菌群加倍所需時間為倍增時間，以下列公式表示：

$$g = t/n \text{----- (3-4)}$$

其中  $g$ ：菌體倍增時間

$t$ ：發生  $n$  次世代所需時間

$N_0$  和  $N$  為已知，則可由 3-3 式得到  $n$  值，將其代入 3-4 得到  $g$  值即菌體的倍增時間。



### 3.2 連續式培養之動力學模式

基於研究或工業上生產之需要，必須使菌體維持在對數生長期(log phase)，利用連續式培養則可達到此目的。連續式培養法是控制新鮮且無菌之培養液流入槽體內的速率，並且以相同速率將槽體內多餘的培養液排出，以維持反應槽內培養液體積。連續式培養可以依對流量控制方式不同而分成兩種形式。一種是利用可調式幫浦(pump)直接控制流進基質的量，同時從反應槽中移除相同體積的菌液，以維持反應槽之培養體積。流入基質成份中，除了最基本的營養成份以供細胞生長外，還含有特定的限量基質(limited nutrient)，而此限制生長的營養因子控制了穩定狀態(steady state)下細胞族群大小，此種方式之培養稱為化學

恆定 (chemostat) 的連續式培養 (chemostat 是指在穩定狀態時培養基內的化學組成維持一定)。另一種方式稱為濁度恆定 (turbidostat) 連續式培養，其培養液之流量是以光電管來控制，這種光電管可以很敏銳的察覺反應槽中細胞濃度的變化，當培養液中菌體的吸光度超過設定值時，可依據光電管發出的訊號來添加基質以維持一定的細胞濃度 (Wang *et al.*, 1981)。本論文中採用化學恆定的連續式培養法來控制細胞生長速率。

連續式培養之動力學模式如下 (Wang *et al.*, 1981)：

當連續式培養達穩態時，對反應槽中細胞質量作質量平衡：

cell in - cell out + cell growth - cell death = cell accumulation

$$FX_0/V - FX/V + \mu X - \alpha X = dX/dt \quad (3-5)$$

其中  $X_0$ : 進料時的細胞質量

$X$ : 細胞質量

$\mu$ : 比生長速率 ( $\text{hr}^{-1}$ )

$\alpha$ : 比死亡速率 ( $\text{hr}^{-1}$ )

$F$ : 培養液流量 ( $\text{hr}^{-1}$ )

$V$ : 培養液體積 (L)

$t$ : 時間 (hr)

由於進料培養液已滅菌，所以為無菌狀態 (即  $X_0=0$ )，而且在連續式培養中，比生長速率遠大於死亡速率 ( $\mu \gg \alpha$ )，所以 3-5 式可以簡化如下：

$$(\mu - F/V) X = dX/dt \text{----- (3-6)}$$

當反應槽達穩定狀態時，單位時間內菌體質量變化為零，即

$$dX/dt = 0$$

所以由 (3-6) 式可得  $\mu = F/V$ ----- (3-7)

又 (3-7) 式中  $F/V$  可定義為  $F/V = D$  ----- (3-8) 且  $D = 1/T$

其中  $D$ ：稀釋速率

$T$ ：培養液流經槽體的平均滯留時間



也就是在 chemostat 的連續式培養中，操作者只需決定培養液進料時的流量 ( $F$ ) 或稀釋率 ( $D$ ) 便可以控制細胞的比生長速率。所以在低稀釋速率時，相對槽體內所含的限制營養成分濃度降低，細胞生長速率減慢；在稀釋速率高時，相對槽體內所含的限制營養成分濃度提高，細胞生長速率加快。

### 3.3 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 之原理

聚合酶連鎖反應是在活體外，以基因組 DNA 當模板 (template)，將某段特定序列之套數擴增至數百萬倍，利於實驗進行分析。PCR 原理係利用高溫將雙股基因組 DNA 分成單股 (denature)，並以兩段單股的引子 (primer) 與單股基因組 DNA 互補接合 (primer annealing)，經由耐熱性高的 *Taq* DNA polymerase

產生聚合反應，進行引子下游的序列合成（**extention**），至此稱為一個週期。之後重新進行 DNA 分股步驟，依序進行多個週期。當進行  $n$  個週期時，便產生  $2^n$  條特定序列雙股 DNA，藉此達到擴增大量特定序列之目的。



## 肆、材料、設備與方法

### 4.1 實驗材料

#### 4.1.1 菌株質體與噬菌體

##### 1. 菌株

*Escherichia coli* K12 (W3110)：大腸桿菌野生菌株。

*Escherichia coli* K12 (W3110)  $\Delta relA \Delta spoT$ ：大腸桿菌 ppGpp 突變株。

##### 2. 質體

pBR322 (Amp<sup>r</sup> Tet<sup>r</sup>) 4.3 kb

##### 3. 噬菌體

P1 *vis* lysate



#### 4.1.2 藥品與試劑

##### 1. Sigma Chemical Co.

ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), rifampin, deoxyribonucleic acid, pyruvate kinase, adenylate kinase, sodium dodecyl sulfate (SDS), chloroquine, ampicillin, tetracyclin, ethidium bromide (EtBr), diethyl pyrocarbonate (DEPC), dextran sulfate

##### 2. E. Merck.

N,N-methylformamide, ethanol, phenol, isoamyl alcohol, chloroform, phosphoenopyruvate, glacial acid, formamide, formaldehyde, ammonium

acetate, 3-N-Morpholino propanesulfonic acid (MOPS) , sodium acetate, potassium citrate, Denhardt's solution

3. Promega Biotec.

*EcoR* I

4. Difco Laboratories

yeast extract, tryptone, agar, casamino acid

5. J. T. Baker

HCl, NaOH, glacial acid,  $MgCl_2 \cdot H_2O$ , NaCl,  $H_2SO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ,  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ , dextrose (glucose) , 2-propanol, Tris (Base) , glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO) , potassium acetate, sodium acetate, citric acid  $\cdot H_2O$ ,  $NaNH_4HPO_4 \cdot H_2O$ , boric acid

6. Riedel-de Haen

$C_4H_4Na_2O_4 \cdot 7H_2O$



7. Roche

anti-DIG-AP, positively charged nylon membrane, CSPD, PCR DIG Probe Synthesis Kit, DIG Wash and Block Buffer set, ATP Bioluminescence Assay Kit HSII

8. MRC

TRI reagent

9. Amresco

agarose, ammonia persulfate

10. Becton Drive

BBL™ gram stain kit ( crystal violet solution , iodine solution gram decolorizer solution and safranin solution )

### 4.1.3 緩衝液

1. TAE buffer  
40 mM Tris acetate, 1 mM EDTA
2. TBE buffer  
45 mM Tris borate, 1 mM EDTA
3. 10X formaldehyde gel running buffer : 0.2 M MOPS, 80 mM sodium acetate, 10 mM EDTA (pH 7.0)
4. RNA gel loading dye (Ambion cat#8552)
5. 20X SSC, pH 7.0 : 3 M NaCl, 300 mM sodium citrate
6. 20X SSPE, pH 7.0 : 3 M NaCl, 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.02 mM EDTA (pH 7.4)
7. Hybridization buffer : 5X Denhardt's solution, 33% formamide, 6.6X SSPE, 1% SDS, 50% dextran sulfate, sterilized by filter
8. Tris-glycine electrophoresis buffer : 25 mM Tris-base, 250 mM glycine (pH 8.3) , 0.1% SDS
9. Rifampicin solution : 1 g rifampicin in 10 ml DMSO, sterilized by filter
10. DEPC treated water : 1 ml DEPC in 1 L ddH<sub>2</sub>O, reacted 10 hrs, sterilized by autoclave
11. ATP assay reagent : 75 mM potassium phosphate buffer, 15 mM  $\text{MgCl}_2$
12. ATP+ADP assay reagent : 75 mM potassium phosphate buffer, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM phosphoenopyruvate (PEP) , 4U pyruvate kinase

#### 4.1.4 培養基與培養液

1. 基礎培養液 (minimal medium) ( /L ) : 每公升 solution I 加入 1 ml solution II  
Solution I :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.44g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10.49 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g, casamino acid 0.5 g  
Solution II :  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  50 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.125 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.735 g (以 0.2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  為溶劑)
2. LB (Luria-Bertani) 培養液  
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl pH 7.0
3. LB – ampicillin 培養液  
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl pH 7.0, 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ampicillin
4. LB 培養基  
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl pH 7.0, 1.5% agar
5. LB – ampicillin 培養基  
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl pH 7.0, 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ampicillin, 1.5% agar
6. LB – ampicillin – tetracyclin 培養液  
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl pH 7.0, 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ampicillin, tetracyclin 20 mg/ml
7. LB ( ampicillin ( tetracyclin 培養基  
1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl pH 7.0, 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ampicillin, tetracyclin 20 mg/ml, 1.5% agar

以上培養基 (液) 若須添加碳源、抗生素或指示劑時皆待 121°C 高溫高壓滅菌後冷卻至 55°C 後再加入。

#### 4.1.5 電泳膠體

##### 1. DNA gel

1.0 % agarose 溶於 1 X TAE buffer 中

##### 2. RNA gel

1.2 % agarose, 1 X formaldehyde gel running buffer, 2.2 M formaldehyde

#### 4.2 實驗方法

##### 4.2.1 大腸桿菌生長條件與培養方法

###### 1. 繼代培養



第一代菌株皆以 LB 為培養液，挑單一菌落培養於培養液，在 37°C 恆溫震盪箱以轉速 200 rpm 培養。菌株之繼代保存則以 LB 作為繼代保存培養基，利用劃線法將菌株接種於平板培養基，在 37°C 恆溫箱培養到適當大小的菌落，置於 4°C 保存。

###### 2. 批次培養

為了使菌體適應生長環境，所以需先作二次繼代培養，然後再於第三代時培養在所需條件。

第一代培養：挑取單一菌落接種至 5 ml LB 培養液，培養 6 ~ 8 小時使菌體活化。

第二代培養：取 50 $\mu$ l 菌液接種到 5 ml 基礎培養基 (minimal medium)，並以最終濃度 2.25 mM 或 40 mM 葡萄糖作為碳源，然後於 37 $^{\circ}$ C 隔夜培養，此培養目的在使細菌適應新的生長環境。

第三代培養：取適量菌液至含不同碳源的基礎培養基中進行培養，培養時所加的菌量在 OD<sub>600</sub> 上升範圍控制於 0.02~0.025 之間。本實驗所使用的碳源為醋酸 (acetate)、葡萄糖 (glucose)、甘油 (glycerol) 與琥珀酸 (succinate)。之後於 37 $^{\circ}$ C 200 rpm 培養至 OD<sub>600</sub> 吸光值為 0.4~0.45 時，置於冰上 10 分鐘後，以 5,000 rpm 離心 10 分鐘收取菌體，目的為取得處於對數生長期的菌體進行 RNA 萃取與 ATP 與 ADP 含量分析。

### 3. 連續式培養

本實驗連續式培養是採用化學恆定的連續式培養 (chemostat continuous culture)，其最大的優點在於只需決定稀釋速率 (D) 便可以得到比生長速率 ( $\mu$ ) (詳見 3.2)，而稀釋率由可調式幫浦便可決定，因此可控制細菌的比生長速率。

#### (1) 培養基的製備

化學恆定連續式培養使用之培養基與批次培養之基本培養基成分相同，唯碳源的添加為每公升 2.25 mM，在此以 carbon limitation 來限制菌體生長。由於連續式培養須消耗大量培養液，所以我們以 20 公升的儲水桶 (Nalgene Cat. No. 2250-0050) 為單位，每桶裝 17 公升基礎培養基，配製數桶後於高溫高壓下滅菌 90 分鐘，於滅菌後待培養液溫度下降至室溫時再添加碳源

#### (2) 連續式培養系統之裝置

連續式培養系統主要可分為四個部份：槽體、流速測定管、培養液供應桶、廢液收集桶。

a. 槽體之組裝：

槽體為連續式發酵之主體，加入 1 公升去離子水，將上蓋裝配鎖緊後，於冷凝管出口及進氣口接上 0.22  $\mu\text{m}$  濾菌膜，各出口及接頭均用鐵夾封閉並在管口處包上鋁箔紙。以打氣幫浦測試槽體是否有漏氣情況，直到調整至完全封閉後才可加以滅菌。滅菌時須打開冷凝管出口以防止滅菌時壓力的變化。

b. 流速測定管：

將滴定管頂部以棉花塞住並包上鋁箔紙。滴定管之下方接上三插管，再接上矽膠管而分成兩個接頭，其中一個與槽體相接，另一個則與進料管相接。並在管口處包上鋁箔紙，二接頭均用鐵夾封閉。

c. 培養液供應桶：

內裝有 17 公升培養液，桶上的蓋子有兩個接頭，一為負責進料之接頭，另一則與過濾器相接，目的在平衡桶子內外的壓力並過濾空氣，所有出口及接頭均用鐵夾封閉並在管口處包上鋁箔紙，以防止滅菌後污染。

d. 廢液收集桶：

以 20 公升空桶作為收集廢液用。桶上蓋子也有兩個接頭，一個與發酵槽出料管相接以收集廢液，另一個接頭與裝有棉花之注射筒的筒身相接，以平衡桶子內外的壓力並過濾空氣，出口及接頭均用鐵夾封閉並在管口處包上鋁箔紙，以防止滅菌後污染。

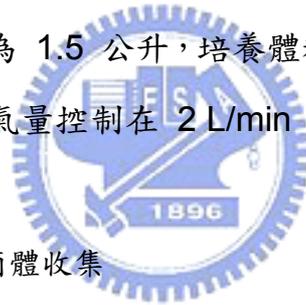
槽體、流速測定管、廢液收集桶三者可同時置於 121°C，1 大氣壓下滅菌 60 分鐘或個別滅菌，而培養液供應桶則需 121°C，1 大氣壓下滅菌 90 分鐘。滅菌後便可以將此四部份所有接頭相連接，所有操作過程皆需快速完成並過火滅菌以避免污染。

### (3) 接菌前的準備及接菌

連續式培養系統於每次裝置完成後，由於安裝於蠕動幫浦之矽膠管長度可能會有些許的不同，所以每次接菌前須先利用流速測定管測定本次蠕動幫浦的流速，以作為往後調控培養液之流動速率的依據。並且在接菌之前需先啟動連續式培養系統，將槽體內的去離子水置換成培養液，本實驗的通氣量是利用氣體流量計來控制，而氣體流量計在使用之前需用排水集氣法校正。另外欲進行連續式培養的菌株需先培養在 5 ml LB 培養液，於 37°C 恆溫振盪培養至對數期後注入發酵槽內，再調整蠕動幫浦的流速以控制生長速率進行連續式培養。

### (4) 連續式培養的生長條件

本實驗是利用 BIOFLO 發酵槽及控制器來控制生長條件 (New Brunswick Scientific Co.)。槽體體積為 1.5 公升，培養體積為 1 公升，培養溫度為 37°C，攪拌速率為 500 rpm，通氣量控制在 2 L/min，pH 值則維持在 6.9 (0.1)。



### (5) 細胞生長速率之控制與菌體收集

利用調節培養液流動的快慢以控制細胞生長速率，在每次變換培養液流動速率時，至少須相隔 6 個反應槽的滯留時間 (reactor residence time,  $\tau$ )，以確定菌體的生長到達新的穩定期 (steady state)。當菌體生長達穩定狀態後才可以收集樣本。

## 4.2.2 細胞倍增時間的測定

本實驗之生長條件及培養方法均與批次培養相同，但需每隔 0.5~1 小時用分光光度計在波長 600 nm 下測定菌體之光學密度。由於光學密度主要是用來測定細胞濃度，所以需先用分光光度計作細胞濃度和吸光度相互關係的校正曲線，再由吸光值轉換

成細胞濃度，則可求得細菌之生長曲線。由菌體的生長曲線可知當對數生長期中細胞數目在  $t_1$  與  $t_2$ ，時間分別為  $N_1$  與  $N_2$  時，由 3-3 式得  $n = 3.3 (\log N_2 - N_1)$ ，而細胞倍增時間則由 3-4 式得  $g = t/n$  求得，其中  $g$  為菌體倍增時間， $t$  為發生  $n$  次世代所需時間。

### 4.2.3 細胞轉型 (transformation)

#### (1) 原理

將質體導入細胞的過程稱為轉型。目前我們使用  $\text{CaCl}_2$  將細胞穿孔，再以 heat-shock 的方式將質體送入。

#### (2) 實驗流程如下

##### a. 製備勝任細胞 (competent cell)

活化欲轉型之細胞挑取單一菌落培養於  $37^\circ\text{C}$  14~18 小時後，將菌液稀釋 1/20 至新 LB 培養液中培養，至  $\text{OD}_{600}$  吸光值約 0.4~0.6 時以 6,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後，以 5 ml  $4^\circ\text{C}$  0.1 M  $\text{CaCl}_2$  懸浮菌體，置於冰上 1 小時後同以上條件離心並去除上清液，加入 0.5 ml  $4^\circ\text{C}$  0.1 M  $\text{CaCl}_2$  懸浮菌體，仍置於冰上 1 小時後，加入甘油 (終濃度 30%) 分裝，迅速以  $-80^\circ\text{C}$  儲存。

##### b. 勝任細胞的轉型

取出勝任細胞置於冰上，待其溶解後加入 0.1 ~ 1.0  $\mu\text{g}$  質體 pBR322 DNA (質體體積不得超過 10 $\mu\text{l}$ )，過程中需有對照組，除不加質體外其餘操做均相同。置於冰上 40 ~ 60 分鐘後利用  $42^\circ\text{C}$  水浴槽加熱處理 2 分鐘，再置於冰上 5 分鐘後加入 0.2 ml LB 培養液，以  $37^\circ\text{C}$  恆溫培養。

### c. 篩選轉型細胞

由於大腸桿菌 K12 野生株並不能生長於含有抗生素的培養基，又質體 pBR322 DNA 含有抗 ampicillin 及 tetracyclin 之基因，因此以 LB-ampicillin-tetracyclin 培養基篩選 pBR322 轉型細胞，只有轉型成功的細胞才能生長，對照組的細胞在培養基上則不會生長。

## 4.2.4 大量抽取細菌質體 (Sambrook *et al.*, 2001)

### (1) 原理

利用 alkaline lysis 的方式將細胞打破，以 phenol-chloroform 將多餘的蛋白萃取出，再以酒精將 DNA 沈澱並以水將其溶出。



### (2) 溶液的製備

#### a. Solution I :

含 50 mM 葡萄糖、25 mM TrisCl (pH 8.0) 及 10 mM EDTA (pH 8.0)，高溫高壓滅菌後儲存於 4°C。

#### b. Solution II :

含 0.2 N NaOH (由 10 N 溶液稀釋) 及 1% SDS，使用前配置此溶液。

#### c. Solution III :

含 5 M potassium acetate 60 ml、glacial acid 11.5 ml 及 dH<sub>2</sub>O 28.5 ml，高溫高壓滅菌後儲放於 4°C。

#### d. phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 混合液

將中和後的酚與 chloroform、isoamyl alcohol 以 25 : 24 : 1 比例混合，避光以 4°C 儲放一個月。

### (3) 抽取步驟

收取生長穩定期之菌體，立即加入 rifampin (終濃度 50 µg/ml) 後冰浴 10 分鐘，以 6,000 rpm 離心 15 分鐘收集菌體，接著加入適量的 solution I 將菌塊均勻打散後移至 50 ml 離心管中。加入 2 倍體積之 solution II 翻轉離心管使液體充分混合，並置於室溫下 5 分鐘，待菌體溶解澄清後加入 1.5 倍體積之 solution III，翻轉離心管後置於冰上 10 分鐘後以 12,000 rpm 離心 20 分鐘，留取上清液，加入等倍體積之 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 溶液，輕搖使兩相液體充分混合，以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，助兩相完全分離後留取上層 (水相)，此步驟重複兩次以去除多餘蛋白質。最後，吸取上清液加入 2 倍體積之 95% 乙醇並置於冰上 1 小時幫助質體沈澱，以 12,000 rpm 離心 20 分鐘後棄置上清液，加入 5 ml 70% 乙醇潤洗 pellet 後以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，所得 pellet 以適量含 RNase A 的無菌水溶解沈澱質體，於 37°C 反應 30 分鐘後置於 -20°C 備用。



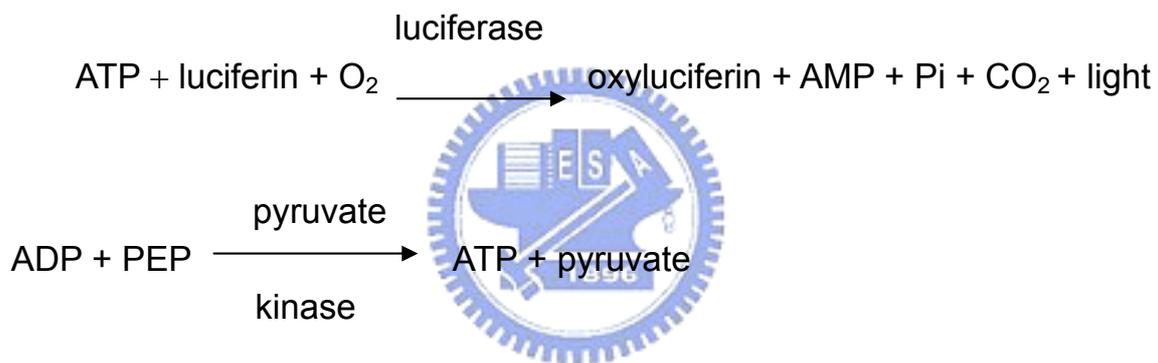
#### 4.2.5 DNA 超螺旋結構電泳分析

質體 DNA 的超螺旋結構可利用含 chloroquine agarose gel 電泳加以分析。製備 20 × 20 cm<sup>2</sup> 1% agarose gel (含有 25 µg/ml chloroquine)，使用同樣含有 25 µg/ml chloroquine 之 TBE 緩衝液作為導電液以進行電泳分析。將質體 DNA 混合 0.2 倍體積之 loading buffer 後注入瓊脂糖凝膠 well 內，通電 50 V 使 DNA 泳動 45 小時。完成後將瓊脂糖凝膠取出置於去離子水內 1 小時以除去 chloroquine，再以 0.5 µg/ml ethidium bromide 染色 30 分鐘。於紫外光下觀察並照相記錄。

### 4.3.6 細胞內能量狀態測定 (Chapman *et al.*, 1971)

#### (1) 原理

本實驗中以 ATP/ADP 比例作為細胞內能量的指標，可藉由偵測細胞內 ATP 與 ADP 的含量求得。luciferase 會利用 ATP 將 luciferin 氧化產生激光反應，當受激發的分子回復到基態時，部分能量將以光 (photon) 的方式釋出。因過程中以化學反應方式激發分子而不以熱激發，最後釋放出冷光。由於 ADP 無法直接測得，因此以 pyruvate kinase 將 ADP 轉換成 ATP 後，再扣除 ATP 含量求出。反應式如下：



#### (3) 實驗步驟

此實驗採用 Roche 公司所生產 ATP Bioluminescence Assay Kit HSII。首先收取 0.5 ml 到達穩定期之菌液，立即加入等量的溶菌劑，均勻混合置於冰上。分別取 200  $\mu$ l 溶菌液加入 ATP assay reagent 及 ATP+ADP assay reagent 中 (以 200  $\mu$ l 溶菌劑作為空白對照組)，利用 37°C 水浴 15 分鐘，使酵素充分反應，置於冰上等待測試。以冷光儀混合 luciferin、luciferase mix reagent 與待測樣本，反應 10 秒，積分讀值 10 秒，以標準曲線判斷偵測結果。

### 4.3.7 突變株的構築與篩選

#### 1. P1 lysate

挑選單一菌落 (single colony) 宿主細胞至 5ml LB 培養液中。宿主細胞為含有突變基因的菌株當作 donor cell，即利用 P1 phage 將它所帶有的特定基因片段攜出，再轉給另一隻 recipient cell。將宿主細胞培養於 37°C 恆溫震盪培養箱 14~18 小時後，取出 50  $\mu$ l 菌液至含 0.2 % 葡萄糖及 5 mM  $\text{CaCl}_2$  之 LB 培養液中 (此時提供含  $\text{CaCl}_2$  的新鮮培養液除了可使宿主細胞快速分裂生長外，還可增加細胞膜的通透性，且鈣離子是 P1 phage 在吸附宿主細胞時所必需的離子)。置於 37°C 恆溫震盪培養箱培養 30 分鐘後，以下列比例加入 P1 vir lysate。



試管編號	噬菌體體積 ( $\mu$ l)
1	0 (對照組)
2	5
3	10
4	30
5	50

加入 P1 vir lysate 後以 40 rpm 旋轉培養 2~3 小時，此時噬菌體吸附宿主細胞之後將本身 DNA 送入宿主細胞內。P1 phage 在宿主細胞內若處於 lysogenic state 時會以環狀質體獨立存在於宿主細胞內；而當宿主細胞 DNA 複製完畢進行細胞分裂時，噬菌體的質體可平均分佈到各個子細胞內，而不如一般噬菌體是將本身的 DNA 嵌入宿主細胞染色體中。P1 phage 在宿主細胞內進行 lytic cycle 時會將宿主細胞的染色體 DNA 分成小片段，並將之裝配至蛋白質外鞘中，此時被包入外鞘中的 DNA 可能包括噬菌體原有 DNA，亦可能包括宿主

細胞內的 DNA。以 P1 phage 而言，其蛋白質外鞘可包裹 91.5 Kb 大小的 DNA，一隻 P1 phage 可容納 2.4 % 大腸桿菌之染色體 DNA。因此於本實驗中使用 P1 phage 將 *relA* 及 *spoT* 突變 DNA 片段送至大腸桿菌 K12 菌體內。

當 P1 phage 進行 lytic cycle 路徑時，比較加入 P1 phage 與對照組之宿主細胞，培養 3~4 小時後即可明顯看出宿主細胞被水解 (lysis) 而呈較透明狀。於已呈透明狀的試管每管加入 0.1 ml chloroform 震盪混合均勻後，以 5,000 離心 10 分鐘，此時被水解及未被水解的細胞因而沉澱下來。離心後小心地取含 P1 phage lysate 的上清液，將每 1 ml 上清液置於 2 ml 冷凍保存瓶中，再加入 0.1 ml chloroform 混合均勻後即可放入 4°C 冰箱保存。

## 2. P1 transduction

將宿主細胞作為 recipient cell (K12 菌株) 以接受 P1 phage 所攜帶之外來 DNA。recipient cell 於 37°C 恆溫震盪培養 14~18 小時，將菌體離心 10 分鐘後以 2.5 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> (含 5 mM CaCl<sub>2</sub>) 懸浮菌體。並以下列比例之 P1 phage (可能帶有  $\Delta relA$  及  $\Delta spoT$ ) 加入微量離心管中：

試管編號	細胞體積 (μl)	噬菌體體積 (μl)
1	100	0 (對照組)
2	100	10
3	100	30
4	100	50
5	100	100
6	0	10 (對照組)

混合均勻置於 37°C 培養 30 分鐘後，加入 0.1 ml 1 M sodium citrate，由於鈣離子是 phage 吸附宿主細胞所必需，而 citrate 又可與鈣離子緊密結合，

故 sodium citrate 的加入可使 P1 phage 不再吸附宿主細胞。接著於 37°C 以 100 rpm 懸轉培養 1 小時，使 P1 phage 之 DNA 與宿主細胞染色體進行重組，則 phage 就可將所帶有特定基因片段送到宿主細胞染色體 DNA 上。因  $\Delta relA$  及  $\Delta spoT$  基因分別含有抗 kanamycin 與 chloramphenicol 的片段，故 1 小時後即可將其塗抹在含 kanamycin 與 chloramphenicol 的培養基中以篩選  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株。

#### 4.3.8 大腸桿菌總 RNA 製備方法

收集 5 ml 菌液 ( $OD_{600} = 0.4 \sim 0.45$ ) 置於離心管內，迅速插於 -80°C 酒精桶內冰浴 10 秒鐘後迅速插於冰上，並立刻以 4°C 6,000 rpm 離心 10 分鐘後去除上清液，加入 0.75 ml TRI reagent 將菌塊震盪溶解，隨即將溶解之菌液置於微量離心管內，於 65°C 水浴槽內水浴 10 分鐘（每隔 2.5 分鐘以手搖方式溫和混勻），接著於室溫下加入 200  $\mu$ l chloroform，以溫和手搖方式充份混勻後靜置於室溫下 15 分鐘，再以 4°C 12,000 rpm 離心 15 分鐘，棄置下層液，將上清液吸取至另一乾淨微量離心管內，加入 600  $\mu$ l 2-propanol 及 40  $\mu$ l 3 M sodium acetate (pH 5.2)，置於 -20°C 冰箱內 30 分鐘以幫助 RNA 析出。然後於 4°C 12,000 rpm 離心 10 分鐘，棄置上清液後留下 RNA 沉澱物，加入 75% 乙醇 1 ml 清洗一次，再於 4°C 12,000 rpm 離心 10 分鐘，完全吸乾上清液後將沉澱之 RNA 進行真空乾燥 10 分鐘，待沉澱物成半溶解狀時加入適量 DEPC  $\cdot$  ddH<sub>2</sub>O，測定 D<sub>260</sub> 及 OD<sub>280</sub> 吸光比值以確定 RNA 濃度及純度。剩餘之 RNA 樣本則須立刻置於 -80°C 冰箱內保存。

### 4.3.9 北方墨點轉漬分析法 (Northern blotting analysis)

#### 1. RNA 電泳分析

##### (1) 1.2 % 洋菜膠 (agarose gel) 配製

取洋菜膠 0.55 g 加入 29.4 ml DEPC · ddH<sub>2</sub>O，加熱溶解並混合均勻，待稍冷卻後即加入 5 倍濃度之 formaldehyde gel running buffer 9 ml 及甲醛 (formaldehyde) 7.4 ml，再次混和均勻並倒入膠體模版中製成膠體。

##### (2) 樣品製備

取出下列試劑分別加入微量離心管內並充份混合均勻：8 µg RNA，2 µl 之 5 倍濃度 formaldehyde gel running buffer，3.5 µl formadehyde (37%)，10 µl formamid。

##### (3) 樣品變性 (denature) 及電泳處理

將樣本置於 65 °C 水浴 10 分鐘後置於冰上，加入 5 µl 6X RNA dye，充份混勻後於室溫下，以 60 伏特電壓進行 RNA 電泳 2.5 小時。

##### (4) 膠體染色

電泳完成後，將膠體浸泡於 150 ml ethidium bromide 染液 (0.5 µg/ml ethidium bromide 溶於 0.1 M ammonium acetate) 染色 8 分鐘，接著以 DEPC · ddH<sub>2</sub>O 進行退染 (destain) 3 小時後，利用 UV 燈箱即可觀察到 rRNA，之後進行照相。

#### 2. RNA 轉漬

此轉漬原理係利用厚濾紙產生的毛細現象，引導 20 X SSC 溶液向上流動，

進而帶動膠體中的 RNA 脫離膠體，吸附於 nylon membrane。

退染後進行 RNA 轉漬。剪裁與膠體面積相同之  $8 \times 7 \text{ cm}^2$  nylon membrane，轉漬前先將 membrane 以 20 X SSC 溶液浸溼。取一方形容器，其內放置一表面平整 2~4 cm 高的方形塑膠盒，於容器內倒入適量 20 X SSC，並在塑膠盒表面鋪上一張  $8 \times 22 \text{ cm}^2$  長方形 Whatman 3MM 濾紙，濾紙二端需浸於 20 X SSC 溶液中。然後濾紙上層再鋪一張與膠體相同大小之 Whatman 3MM 濾紙，並用 20 X SSC 溶液使其潤濕。將膠體反轉（原來電泳時朝下的一面朝上）置於已溼潤的濾紙上，接著把濕潤的 nylon membrane 置於膠體上，再放一張  $8 \times 7 \text{ cm}^2$  Whatman 3MM 濾紙於 nylon membrane 上方，在濾紙、膠體、nylon membrane 與濾紙相互之間必須把氣泡完全趕出，避免 RNA 轉漬不完全。最後放一疊厚達 6~7 cm 厚濾紙（長寬為  $8 \times 7 \text{ cm}^2$ ）置於上端，厚濾紙最上層置一塑膠板並用 500 公克重的血清瓶壓住。

轉漬過程進行 12~16 小時後，取出 nylon membrane 置於核酸快速固定儀中，利用 UV 光 (254 nm) 照射 2 分鐘使 RNA 固定於 nylon membrane 上以進行雜交反應。

### 3. 核酸探針製備

本實驗使用聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 擴增特定序列上含有 DIG-11-dUTP (Roche PCR DIG Probe Synthesis Kit Cat. No. 1 636 090) 之 DNA，以此段 DNA 做為核酸探針。其做法敘述如下：將 63  $\mu\text{l}$  滅菌二次逆滲透水，10  $\mu\text{l}$  10X PCR reaction buffer，10  $\mu\text{l}$  DIG-labeling mixture，8  $\mu\text{l}$  (25 ng/ $\mu\text{l}$ ) DNA template，4  $\mu\text{l}$  (20  $\mu\text{M}$ ) primer 1 與 primer 2，5 units Taq DNA polymerase，依序放入 0.5 ml 的微量離心管內，最終體積為 100  $\mu\text{l}$ 。混合均勻後放入聚合酶溫度循環機進行反應。

PCR 設定溫度如下

將上述微量離心管內混合液先於 95°C 反應 5 分鐘，分開所有 DNA 模板，再進行以下之溫度循環步驟：

1. 95°C，1 分鐘：使兩股 DNA 模板分開。
2. 58°C，1 分鐘：引子對與 DNA 模板結合。
3. 72°C，1 分鐘：DNA polymerase 合成新股 DNA。

重覆上列溫度循環 30 次，之後進行 72°C 反應 10 分鐘，使最後一次合成未完全的 PCR 產物合成完全，最終保存溫度設定為 4°C。



本實驗所採用核酸探針之引子對序列如下表所示：

基因	引子名稱	引子對之序列	探針 長度
<i>ftsZ</i>	ftsZ411	5'-TGAAGGCAAGAAGCGTATGGCA- 3'	282 bp
	ftsZ691	5'-TCGCCACGCCAGAACCCA- 3'	
<i>minC</i>	minC279	5'-GGGGCTGCCTATCCTGACGG- 3'	318 bp
	minC596	5'-CCTGCGATGGACACCAGTTCC- 3'	
<i>minD</i>	minD553	5'-CCAGGCCGCGYAAGCAGA- 3'	253 bp
	minD805	5'-CGAACAAGCGTTTGAGGAAGC- 3'	
<i>pgk</i>	pgk1	5'-TTACTTCTTAGCGCGCTCTTCGAG- 3'	401 bp
	pgk2	5'-CTGATGTTTCGCGTAGCAACCGAGT- 3'	
<i>pyk</i>	pyk1	5'-ATGTCCAGAAGGCTTCGCAGAACA- 3'	401 bp
	pyk2	5'-ACGCGACCATCGTCCAGCAGCA- 3'	
<i>ackA</i>	ackA1	5'-ATGTCGAGTAAGTTAGTACTGGTTC- 3'	401 bp
	ackA2	5'-GCTTCTTCGATACCGATCAGGTG- 3'	
<i>sucCD</i>	sucCD1	5'-CGCAGGTCTGGCGATGGG- 3'	365 bp
	sucCD2	5'-CCTCCACTGCGGCAACAACCT- 3'	
<i>atpI</i>	atpI1	5'-TTACCCTTTGTTGTTAATTACAGCCG-3'	401 bp
	atpI2	5'-GTGAAAACGTGATGTCTGTGTCG-3'	
<i>gyrA</i>	gyrA1	5'-TTATTCTTCTTCTGGCTCGTCGTC- 3'	401 bp
	gyrA2	5'-CAATCCTCACCGCAACGCAAAC- 3'	
<i>gyrB</i>	gyrB1	5'-TTAAATATGGATATTCGCCGCTTTCA- 3'	401 bp
	gyrB2	5'-ATACTGACTATCCGCTGGATCACG- 3'	
<i>topA</i>	topA1	5'-ATGGGTAAAGCTCTTGTCATCGTT- 3'	401 bp
	topA2	5'-TAGCGCGCATCATCACCCCAAT- 3'	

#### 4. 雜交反應 (hybridization)

將已固定 RNA 之 nylon membrane 置入玻璃雜交管內，加入 15 ml hybridization buffer，於 48°C 核酸雜交烘箱旋轉反應 30 分鐘，轉速設定為 30 rpm，此過程稱為 pre-hybridization。之後加入 150 ng 核酸探針（核酸探針需先以 100°C 煮沸 10 分鐘後，置於冰上 10 分鐘），繼續進行 48 °C 核酸雜交烘箱旋轉反應，反應時間為 14 ~ 18 小時。反應結束後將 nylon membrane 自玻璃雜交管取出，平放於微免疫偵測反應盒內，加入含 2 X SSC，0.1 % SDS 洗滌液 50 ml，在室溫下以平面震盪的方式清洗 5 分鐘，震盪速度為 25 rpm，此步驟重複二次；再使用 50 ml 含 0.1 X SSC 與 0.1 % SDS 洗滌液清洗 15 分鐘，此步驟重複三次。

#### 5. 免疫偵測 (immunological detection)

本實驗採用 Roche 公司所生產的 DIG Wash and Block Buffer Set，內含有 10 X buffer 1、2、3 和 4。將 nylon membrane 用洗滌液清洗完畢後，加入 30 ml 1X buffer 1 清洗 5 分鐘，倒掉 1X buffer 1 後，加入 30 ml 1X buffer 2 與 1X buffer 3 混和液，於室溫下，以平面震盪的方式搖動 40 分鐘，震盪速率為 25 rpm。目的在於使 buffer 3 中的 Bovine Serum Albumin (BSA) 均勻佈滿整張 nylon membrane 表面，避免 anti-DIG-AP 直接與 nylon membrane 結合，此舉可以減少大量非專一性之鍵結 (non-specific binding)，這個步驟稱為 blocking。反應結束後將 3  $\mu$ l anti-DIG-AP 加入 30 ml 1X buffer 2 與 1X buffer 3 混和液，於室溫下搖動 40 分鐘，使 anti-DIG-AP 與核酸探針上的 DIG 形成專一性之鍵結。之後於室溫下，用 30 ml 1X buffer 1 清洗兩次，每次 15 分鐘。倒掉 1X buffer 1 後，加入 15 ml 1X buffer 4 清洗 5 分鐘，接著將 nylon membrane 平放於投影片夾層內，將 10  $\mu$ l CSPD 溶於 1 ml 1X buffer 4 內，均勻灑佈於 membrane 上，蓋上投影片，立刻置於底片夾內，於室溫下進行避

光反應 10 分鐘。反應後於暗房內以 Kodak XAR-5 X 光底片進行壓片，感光適當時間後沖洗底片。

## 6. 訊號分析

利用雷射掃描密度測定儀可以偵測每一個雜交訊號 (hybridization signal) 的強度，以偵測 mRNA 的表現量。

### 4.3.10 革蘭氏染色法

#### (1) 原理

在細菌鑑定過程中可依照染色結果分為兩族群：革蘭氏陽性 (gram-positive) 和革蘭氏陰性菌 (gram-negative)。各種細菌依據其不同的細胞壁組成及結構而有不同的反應，其中革蘭氏陽性菌由於不會被酒精脫色，所以呈現最初染料顏色 (藍紫色)，而革蘭氏陰性菌由於會被酒精脫色，所以呈現最後染料顏色 (紅色)。

#### (2) 染色步驟

將固定好的玻片覆蓋結晶紫 (crystal violet) 溶液，放置 60 秒後以一次水沖洗。接著以碘液 (iodine) 沖掉多餘的水分，以碘液覆蓋玻片放置 60 秒後，輕輕地以一次水沖洗。以酒精進行脫色直至脫色液呈無色為止。脫色的時間依據抹片的厚度而定，並以一次水沖洗掉多餘的酒精。最後以番紅 (safranin) 覆蓋玻片，放置 30 秒後，以一次水沖洗掉多餘的番紅，將抹片烘乾置於顯微鏡下觀察染色完成的抹片。

## 伍、結果

### 5.1 大腸桿菌生長速率與能量變化之關係

為了解在不同碳源下大腸桿菌能量狀態的變化，我們使用基礎培養基分別添加 2.25 mM 醋酸、葡萄糖、甘油及琥珀酸為碳源進行批次培養。當 OD<sub>600</sub> 到達 0.4~0.45 時收集細胞，以 luciferase 反應法分別測得細胞內 ATP 含量。並利用 pyruvate kinase 將 ADP 轉換成 ATP 後，測量所得結果扣除同一樣本之 ATP 含量以得到 ADP 含量 (Table 1)。

比較醋酸、葡萄糖、甘油與琥珀酸四種不同碳源下大腸桿菌細胞內能量狀態，結果顯示在不同碳源下大腸桿菌體內 ATP、ADP 含量及 ATP/ADP 比例皆為不同 (Table 1)，其中以葡萄糖為碳源時菌體中 ATP 含量為最高 (65 pmol/10<sup>7</sup> cell)，而以醋酸為碳源時 ATP 含量為最低 (7.4 pmol/10<sup>7</sup> cell)。若將菌體的倍增時間與細胞內 ATP 含量合併作圖得 Fig 1，可觀察到生長速率與細胞內 ATP 含量具有線性關係，得知大腸桿菌體內 ATP 的含量隨生長速率上升而增加。此外，由 Table 1 可知以葡萄糖為碳源時菌體中 ADP 含量最高 (17 pmol/10<sup>7</sup> cell)，而以醋酸與琥珀酸為碳源時 ADP 含量最低 (均為 3.1 pmol/10<sup>7</sup> cell)。由於 ATP 與 ADP 含量不同，使得以此四種不同碳源生長之菌體有不同 ATP/ADP 比例，其中以琥珀酸為碳源時 ATP/ADP 比例最高，以醋酸為碳源時最低，所得結果分別為 7.3 與 2.4，此結果顯示不同碳源會對菌體內能量狀態產生明顯影響。

### 5.2 貧乏培養 (starvation) 與 ppGpp 對大腸桿菌能量變化之影響

ppGpp 為細菌體內重要調控因子 (global regulator)，在營養貧乏時會引發

細胞一連串迫切反應，包括抑制 DNA、tRNA 與 rRNA 的合成，並減少蛋白質生成與多肽鏈延長。ppGpp 含量在大腸桿菌體內隨生長速率下降而上升 (Cashel *et al.*, 1996)，為了研究 ppGpp 是否會影響細胞體內的能量狀態，首先構築  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株，並與野生株分別同時培養於 2.25 mM 醋酸與葡萄糖為碳源之基礎培養基中，當 OD<sub>600</sub> 到達 0.4 ~ 0.45 時，以 5,000 rpm 轉速離心 10 分鐘收集細胞，去除上清液後立即進行碳源貧乏 (starvation) 培養，只添加 5 ml 不含任何碳源之基礎培養基，於 37°C 培養 30 分鐘後，再以 luciferase 反應法測得細胞內 ATP 與 ADP 含量 (Ohlsen and Gralla, 1992)。

由 Table 2 中以醋酸與葡萄糖分別為碳源時，比較大腸桿菌野生株與  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株細胞內能量狀態之變化，結果顯示兩者細胞內 ATP/ADP 比例並無明顯差異，在以葡萄糖為碳源時 ATP/ADP 比例分別為 5.4 與 5.3，而以醋酸為碳源時 ATP/ADP 比例分別為 3.5 與 3.8，結果可推測 ppGpp 對大腸桿菌 ATP/ADP 比例並無顯著影響。此外野生株菌體中 ATP 含量在進行碳源貧乏培養時，以醋酸與葡萄糖為碳源時的 ATP 含量分別為 7.1 與 68.3 pmol/10<sup>7</sup> cell，相差約 10 倍，此結果與 Table 1 中野生株以醋酸與葡萄糖為生長基質未進行碳源貧乏培養時的數值相似。值得注意的是  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株在醋酸與葡萄糖為碳源時，ATP 含量分別為 47.3 與 49.3 pmol/10<sup>7</sup> cell，此結果顯示當缺乏 ppGpp 時 ATP/ADP 比例雖無明顯變化，但會使得 ATP 與 ADP 含量改變，表示同時缺乏碳源與 ppGpp 對菌體生合成反應之間有關。

### 5.3 DNA 超螺旋結構之電泳分析

研究報告指出大腸桿菌體內染色體 DNA 與質體 DNA 的超螺旋結構具有一致性，當大腸桿菌體內染色體 DNA 超螺旋結構纏繞緊密時可觀察到質體 DNA

超螺旋結構亦纏繞緊密，反之若大腸桿菌體內染色體 DNA 超螺旋結構鬆散則觀察到質體 DNA 超螺旋結構鬆散 (Miller *et al.*, 1993)。質體 pBR322 經常被應用於 DNA 超螺旋結構改變的研究 (Goldstein *et al.*, 1984 ; Hsieh *et al.*, 1991)，因此本實驗亦採用質體 pBR322 來探討碳源對 DNA 超螺旋結構的影響。批次培養條件及培養基使用均相同，但在培養基中需另外加入 ampicillin (40 µg/ml) 以保持質體 pBR322 在細胞中的穩定性，在收取菌體的同時也立即加入 rafampicin 以降低轉錄對 DNA 超螺旋結構的影響。

在 DNA 超螺旋結構的分析方面，由於 chloroquine 為平面環狀化合物可嵌入 DNA 結構中鹼基之間，然而在嵌入的同時會連帶地將環狀 DNA 往正的 (positive) 方向旋扭，但此過程並不影響 DNA 超螺旋結構之 LK (linking number) 數。因此在低濃度 chloroquine 電泳膠上，DNA 的拓撲異構物為 negative form，而在高濃度 chloroquine 電泳膠上，DNA 的拓撲異構物則皆為 positive form (Mizushima *et al.*, 1997)。在本論文中有關 DNA 超螺旋結構的電泳分析圖其所使用的 chloroquine 含量 25 µg/ml 已超過質體 pBR322 negative form 的臨界濃度，因此使得在電泳圖上所分布的結構皆為 positive supercoiling form (Ogata *et al.*, 1994)。在電泳圖中可觀察到鬆散 (relax) 結構之 DNA 移動速率較緊密 (negative) 結構為快 (Mizushima *et al.*, 1997)，經由這些結構改變可分析在不同條件下菌體中 DNA 超螺旋結構的分布情形。

### 5.3.1 不同碳源對大腸桿菌 DNA 超螺旋結構之影響

以醋酸、葡萄糖、甘油及琥珀酸分別為碳源時，當 OD<sub>600</sub> 到達 0.4~0.45 時收取菌體內的質體 pBR322，其超螺旋結構的分布狀態可由電泳圖中得知 (Fig 2)。結果發現在批次培養下，以琥珀酸為碳源時質體 DNA 的拓撲異構物較少，

甘油次之、葡萄糖再次之，而以醋酸為碳源時質體 DNA 的拓樸異構物相對地較多，證明 DNA 超螺旋結構會受碳源改變。對照細胞內 ATP/ADP 比例變化 (Table 1)，可看出 ATP/ADP 比例上升時 DNA 超螺旋結構旋緊的程度也愈大，以琥珀酸為碳源時 ATP/ADP 比例較高，其 DNA 超螺旋結構也較為緊密；而以醋酸為碳源時 ATP/ADP 比例最低，DNA 超螺旋結構也較為鬆散，此結果進一步證實當碳源改變細胞內能量狀態時，細胞內會改變 DNA 超螺旋結構。

### 5.3.2 貧乏培養 (starvation) 與 ppGpp 對大腸桿菌 DNA 超螺旋結構之影響

本實驗將大腸桿菌野生株與  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株在醋酸與葡萄糖的供應下培養至對數生長期時，以不含任何碳源的基礎培養基置換含有碳源之培養基，分別進行碳源貧乏培養 30 分鐘後，萃取其質體 DNA 進一步探討碳源貧乏與 ppGpp 對 DNA 超螺旋結構的影響。

由 Fig 3 可知  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株與大腸桿菌野生株在碳源貧乏時，兩者之 DNA 超螺旋結構依然隨碳源不同而改變，以葡萄糖為碳源時 DNA 超螺旋結構較為緊密，以醋酸為碳源時則較為鬆散，顯示 ppGpp 並不影響細胞內 DNA 超螺旋結構。對照 Table 2 中  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株在碳源貧乏時 ATP/ADP 比例關係，也以葡萄糖為碳源時較高，由這些結果得知突變株與野生株之 DNA 超螺旋結構皆隨碳源不同而改變，且受能量狀態所影響，再次證實細胞內 ATP/ADP 比例是影響 DNA 超螺旋結構的重要因子，當 ATP/ADP 比例增加，質體 DNA 的超螺旋結構亦隨之旋緊，此現象不受碳源貧乏與 ppGpp 影響。

#### 5.4 生長速率與碳源對不同 topoisomerase 基因表現之影響

由於 topoisomerase (*gyrA*、*gyrB*、*topA*) 會改變 DNA 超螺旋結構，本論文進一步探討在連續式培養下，不同生長速率與碳源對大腸桿菌 topoisomerase 基因的影響，由 Fig 4A 北方墨漬結果經定量軟體分析數值化得 Fig 4B。由 Fig 4 可知在生長速率較快時，以醋酸與葡萄糖為碳源時 *gyrA*、*gyrB* 與 *topA* 基因的表現都較高，證明生長速率較快會使 topoisomerase 基因表現上升，此結果也符合在連續式培養下生長速率較快時，有較高的 ATP/ADP 比例與較緊密的 DNA 超螺旋結構 (張育甄, 1998)。由這些結果可推論碳源與生長速率會影響 topoisomerase 基因的表現，因 topoisomerase 為調控 DNA 超螺旋結構所需，使得 DNA 超螺旋結構在不同的碳源與生長速率下也有所差異。



#### 5.5 不同碳源對 ATP 生合成基因表現之影響

微生物可利用不同的受質來獲取能量，在不同的環境下大腸桿菌利用碳源的代謝產能途徑也會改變。本實驗以四種不同碳源 (醋酸、葡萄糖、甘油與琥珀酸) 為培養基，探討大腸桿菌分別在 2.25 mM 與 40 mM 不同碳源濃度下代謝途徑上與 ATP 生合成相關酵素之基因表現，由 Fig 5 北方墨漬結果經定量軟體分析數值化得 Fig 6，並將基因相對表現量歸納成 Table 3，其中以粗黑體字表示者為特定基因相對表現量較其他碳源為高或低。

比較高低不同濃度為碳源時，在高濃度葡萄糖 (40 mM) 為碳源下，觀察到 Fig 5 中 *pgk*、*pyk* 與 *ackA* 等基因具有降解物阻遏 (catabolic repression) 現象。同時也觀察到糖解作用中 *pgk* 與 *pyk* 基因以及發酵作用中 *ackA* 基因，其表現量皆以甘油為碳源時最高。以醋酸為生長基質時 *sucCD* 基因大量表現，推

測以醋酸為碳源時是經由 TCA cycle 與電子傳遞鏈代謝途徑而獲得 ATP；以琥珀酸為碳源時，低濃度培養下的 *sucCD* 基因表現則遠高於高濃度培養，推測高濃度琥珀酸會抑制 TCA cycle 內相關代謝基因，使得在高濃度琥珀酸的供應下菌體 ATP 來源以糖解作用為主，可由 Fig 5 中 *pgk* 與 *pyk* 基因表現大於低濃度琥珀酸得知，而低濃度琥珀酸的培養環境下 *sucCD* 表現則不受抑制，推測此時 ATP 的主要來源也是經由 TCA cycle 與電子傳遞鏈獲得。

## 5.6 碳源與 ppGpp 對細胞分裂基因之影響

以批次培養法使用不同碳源培養大腸桿菌，使得菌體生長速率有所變化，因生長速率即為細胞分裂之快慢，快速生長的細胞會比慢速生長的細胞較早開始聚合 Z ring，並在細胞中央處形成隔板，使得細胞週期與細胞分裂較快。慢速生長的細胞有較長的細胞生長與染色體複製時間，之後再開始下一個細胞分裂。本實驗以醋酸與葡萄糖為碳源，探討在此培養條件下細胞分裂基因( *ftsZ*、*minC*、*minD*) 的表現如何受碳源調控，Fig 8A 為其北方墨漬之結果，而 Fig 8B 為其數值定量之結果。由此結果可知以不同碳源為生長基質時，會造成細胞分裂基因的表現有明顯差異，其中以葡萄糖為碳源時，*ftsZ* 基因表現量比醋酸為碳源時來得高，*minD* 基因也以葡萄糖為碳源時略高，而 *minC* 基因則是以醋酸為碳源時較高，得知以不同碳源作為生長基質時影響細胞分裂基因的表現，也造成生長速率產生變化。

將野生株與  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株分別培養於 40 mM 醋酸與葡萄糖為碳源之基礎培養基，在菌體生長至對數生長期時 ( $OD_{600}$  0.4~0.45)，以 5 ml 不含任何碳源之基礎培養液置換原先添加碳源之培養液，於 37°C 下進行 30 分鐘碳源貧乏培養，並以北方墨漬法分析細胞分裂基因 (*ftsZ*、*minC*、*minD*) 之表現，

Fig 9A 與 Fig 9B 分別為其北方墨漬與數值分析化之結果。由 Fig 9 可知 ppGpp 會影響大腸桿菌細胞分裂基因的表現，在野生株中由於碳源貧乏而引起 ppGpp 產生，使得 *ftsZ* 基因表現量上升，其中以葡萄糖為碳源時較明顯，表現量約為  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株之 2 倍；而 *minC* 與 *minD* 等基因表現量在野生株中則較低，其中 *minC* 基因在以醋酸與葡萄糖為碳源時皆明顯受 ppGpp 抑制（以醋酸為碳源時 *minC* 基因表現量約下降 13 倍，以葡萄糖為碳源時約下降 7 倍），*minD* 基因則是以醋酸為碳源時表現量下降約 2 倍（Fig 9B）。由於缺乏 *relA* 與 *spoT* 之雙突變株不能合成 ppGpp，可證明在野生株中誘發 ppGpp 合成的確會影響細胞分裂基因之表現。

## 5.7 碳源與 ppGpp 對大腸桿菌菌體型態之影響



將大腸桿菌野生株與  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株分別培養於基礎培養基，外加醋酸與葡萄糖作為碳源（最終濃度為 40 mM），當細菌生長至快速生長期時，以革蘭氏染色法（gram stain）來觀察菌體型態。在 Fig 10 觀察到野生株與  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株在葡萄糖培養環境下的細胞皆比醋酸培養來得大，若在同一種碳源供應下，也發現  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株細胞較大，從 Table 2 得知若在正常培養條件下時， $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株的細胞倍增時間較野生株來得快些（以醋酸與葡萄糖為碳源時倍增時間分別為 57 與 46 分鐘），此結果與先前研究結果相似，證實生長快速的菌體其細胞體積較大，反之則較小。

此外，我們也著手進行碳源貧乏培養，探討 ppGpp 對菌體型態的影響。當細菌生長至快速生長期時，以不加任何碳源的基礎培養基置換原本已加碳源之培養基，接著進行 30 分鐘碳源貧乏培養後，以革蘭氏染色法觀察菌體外型。由 Fig 11 中發現野生株與  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株的菌體型態皆趨於長絲狀

(filamentous)，尤其以  $\Delta reIA \Delta spoT$  雙突變株於葡萄糖為生長基質時最為明顯 (Fig 11D)。



## 陸、討論

### 6.1 碳源與生長速率對大腸桿菌細胞內能量之關係

#### 6.1.1 不同碳源與生長速率對大腸桿菌細胞內能量狀態的影響

微生物吸收並分解環境或培養基中的養分，產生能量後以 ATP 的形式存在於細胞內。我們發現不同碳源培養造成不同的細胞生長速率，並發現細胞內的 ATP 含量會隨生長速率加快而上升 (Fig 1 與 Table 1)。ATP 含量增加顯示生長速率快的細胞較生長速率慢的細胞有較高的能量，處於高生長速率下的細胞其分裂速率較快，因此消耗在細胞內溶質運送、單體與大分子合成等各種生化需能反應較多 (Gottschalk, 1988)。由於高生長速率的細胞與低生長速率細胞內 ATP 的含量有明顯差異，而生長可說是生化反應的總體結果，這些生化反應所得到最終現象可以細胞質量 (biomass) 改變為代表，因此在加快生化反應的同時亦造成了細胞重量增加。

微生物可利用不同受質來獲取能量，在不同環境下大腸桿菌利用碳源代謝產能途徑也改變。分析實驗中使用四種不同碳源其所依循的代謝途徑，當以葡萄糖為碳源時，大腸桿菌會利用 phosphoenopyruvate phosphotransferase system (PTS) 將細胞外葡萄糖磷酸化後帶入細胞中，經由糖解作用以 acetyl-CoA 為主要分解代謝產物，進行 TCA cycle 後氧化成二氧化碳並獲得能量 (Furano, 1975)。當以甘油為碳源時，大腸桿菌可利用被動運輸系統 (passive diffusion) 進入細胞中，在傳遞過程中藉由 glycerol facilitator 作為運送通道以通過細胞膜，再經由甘油激酶 (glycerol kinase) 將甘油磷酸化轉換為甘油-3-磷酸 (glycerol-3-phosphate) 進入細胞內代謝，因此細胞中並不存在自由態的甘油分子 (Voegelé *et al.*, 1993)。雖然甘油激酶已證明可被 PTS 與果糖-1,6-二磷酸

(fructose 1,6-bisphosphate) 所調控 (De Boer *et al.*, 1986), 但僅以甘油為碳源時, 細胞對甘油攝入與代謝所受到的影響因子便可減少。以琥珀酸為碳源時大腸桿菌則是利用 C4-dicarboxylate transporter 將琥珀酸運送進入細胞內, 可直接進入 TCA cycle 與電子傳遞鏈進行代謝利用, 此時能量的產生是取決於氧化磷酸化反應 (Boogerd *et al.*, 1998)。若以醋酸為碳源供應時, 醋酸可經由主動運輸傳送至細胞中, 隨即藉由乙醯輔酶 A 合成酶 (acetyl-CoA synthetase) 將醋酸轉換成 acetyl-CoA, acetyl-CoA 便可進入 TCA cycle 代謝產能。然而為了生化合成的需要, 在以醋酸為碳源的同時, 大腸桿菌亦可進行 glyoxylate cycle 來代謝 acetyl-CoA (Furano, 1975)。由於這些複雜的生理機制使得利用不同碳源生長時菌體內的能量狀態也有所差異。

由 Fig 1 與 Table 1 結果可了解菌體在對數生長期時, 細胞內 ATP 與 ADP 含量有明顯差異, 這是由於不同碳源導致含有高能磷酸鍵的 adenylate 化合物 (ATP 與 ADP) 以及 ATP/ADP 比例隨之改變, 因此 ATP 與 ADP 之間的轉換成為生物能量重要指標。同時細胞所得能量狀態也對碳源的傳輸造成不同影響, 由於葡萄糖的傳送系統為 ATP-dependent, 且 PTS 系統也需要高能 PEP 作用, 因此處於高能量狀態下有助於細胞對葡萄糖的攝取。最近研究也發現大腸桿菌對於甘油正向趨化性 (chemotaxis) 為 energy-dependent (Zhulin *et al.*, 1997); 而在大腸桿菌 *atp* ( $H^+$ -ATPase) 突變株中因缺乏 C4-dicarboxylate transporter, 無法在以琥珀酸為碳源的環境下生長 (Boogerd *et al.*, 1998), 因此依據所得結果可推論在批次培養下, 當 ATP/ADP 比例較高時, 也可能增加了菌體對葡萄糖及琥珀酸的攝取以及對甘油的趨化性反應。

在批次培養下以醋酸、葡萄糖、甘油與琥珀酸四種不同碳源作為大腸桿菌生長基質時, 細胞生長速率以葡萄糖為碳源時最快, 其次是甘油與琥珀酸, 以醋酸為碳源時則最慢, 碳源不同可造成細胞生長速率的變化, 除了影響細胞內 ATP 與 ADP 含量外, 也調控了 ATP/ADP 的比例。由 Fig 1 可看出生長速率愈快時細

胞內 ATP 含量愈高，此現象為 growth rate-dependent，因此推論在生長速率上升時，細胞內將 ADP 轉換成 ATP 的速率加快許多。

由最近研究也發現糖解作用的效率並非由 ATP/ADP 比例所調控，而是直接受 ATP 含量所影響，當 H<sup>+</sup>-ATP 合成酶活性上升時，發現 ATP 含量增加且糖解作用效率提高 70% (Kobmann *et al.*, 2002)，我們也觀察到以葡萄糖為碳源時，ATP 含量最高且生長速率較其他碳源來得快，可知 ATP 含量較高使得生化代謝途徑加速進行，有利於細胞生長所需之巨分子合成，也證實能量的確會調控生化合成途徑並影響基質的吸收，與生長速率也有密切關係。

### 6.1.2 貧乏培養 (starvation) 與 ppGpp 對大腸桿菌細胞內能量狀態之影響

在批次培養下以基礎培養基外加碳源為生長培養條件，探討  $\Delta reIA \Delta spoT$  雙突變株利用不同碳源時之能量狀態與 DNA 超螺旋結構的改變，同時比較大腸桿菌野生株在碳源貧乏環境下誘發 ppGpp 合成時，探討 ppGpp 對大腸桿菌野生株能量狀態之影響。

由 Table 1 與 Table 2 結果指出大腸桿菌野生株在碳源貧乏時，ATP/ADP 比例與正常碳源供應時比較並無明顯變化，顯示野生株體內 ppGpp 對其能量狀態的改變並無明顯變化，但  $\Delta reIA \Delta spoT$  雙突變株無法合成 ppGpp，發現以醋酸及葡萄糖為碳源時突變株細胞內 ATP 含量皆明顯變動，由於 ppGpp 合成需要 ATP 參與 (Cashel *et al.*, 1996)，推測  $\Delta reIA \Delta spoT$  雙突變株由於缺乏 RelA 與 SpoT 等蛋白質，因此無法利用 ATP 與 GDP 來合成 ppGpp 而造成細胞內 ATP 與 ADP 含量差異。此外碳源貧乏對細菌而言是極大的逆境， $\Delta reIA \Delta spoT$  雙突變株中無法合成 ppGpp，導致菌體無法誘發  $\sigma^S$  合成，使得細胞內生合成路徑上之蛋白質及酵素等無法因應迫切反應 (Cashel *et al.*, 1996)，同時

ATP 與 ADP 含量也因細胞內這些生合成反應無法進行而有所改變，但 ATP 與 ADP 含量之比例關係卻不受影響。

### 6.1.3 碳源對大腸桿菌 ATP 生合成基因之影響

在細菌生長中能量在其生理上扮演重要角色，細胞結構的維持、細胞基本功能的進行以及細胞內新物質的合成等等都是需能反應，這些能量皆由一連串生化代謝反應所生成的 ATP 來供應。另一方面，各種基質在氧化分解中所形成的各種中間產物 (intermediates) 多為合成其他重要生化分子的原料，包括合成醣類、蛋白質、脂肪、核酸及酚類等。因此微生物的成長與增殖都必須依賴營養供給，當提供不同碳源作為生長基質時，碳源種類對於細胞中生化代謝反應以及生長速率之間都有著密切的關係。

以醋酸為生長基質時，醋酸進入細胞後轉變成 acetyl-Co A，接著進入 glyoxylate shunt 與 TCA cycle 等代謝途徑 (Cozzone, 1998)，本實驗觀察到 *sucCD* 表現量在以醋酸為碳源時最高 (Fig 5 與 Table 3)，可知以醋酸為碳源時是以 TCA cycle 為主要產能之代謝途徑。與醋酸代謝有關的基因通常會受葡萄糖抑制，這是因為醋酸與葡萄糖兩種碳源會進行不同的代謝路徑，使得不同代謝路徑的基因被活化，特別是與脂肪酸代謝相關的基因，這些基因大部分會被醋酸活化而受葡萄糖抑制 (Cozzone, 1998; Holms, 1996)。反之與生化合成有關之基因，例如胺基酸與核酸合成相關基因表現則在醋酸培養時降低，此外與細胞結構、DNA 複製、轉錄及轉譯之基因也以醋酸為碳源時表現量較低 (Oh *et al.*, 2002)，因此醋酸培養時菌體之生長速率降低。本實驗也指出以醋酸為碳源時，在代謝途徑上與 ATP 合成有關酵素之基因以 *pgk*、*pyk*、*sucCD* 及 *atpI* 等基因表現量都比以葡萄糖為碳源時高 (Fig 5 與 Table 3)。以葡萄糖作為生長基質

時，觀察到 *pgk*、*pyk* 與 *ackA* 等基因皆有降解物阻遏的現象，尤其在高濃度的葡萄糖供應培養下，*pyk* 與 *ackA* 等基因受葡萄糖抑制的程度最大。葡萄糖所引起的降解物阻遏現象是指該代謝物降低了細胞中 cAMP 含量，cAMP 透過與 CRP (cAMP receptor protein) 結合形成 cAMP-CRP 複合物，進而影響 RNA 聚合酶的活性以阻止基因的轉錄 (Ishizuka *et al.*, 1994)。

甘油除了被利用為合成細胞的基本成分外，有氧環境下可進行氧化作用生成能量。當以甘油為碳源時，利用 glycerol facilitator 經由 glycerol kinase 將甘油磷酸化轉換為 glycerol-3-phosphate 進入細胞內代謝循環 (Voegelé *et al.*, 1993)，當甘油濃度較低時，細胞會限制甘油的被動運輸而較不利細胞生長 (Richey and Lin, 1972)，若生長基質含有葡萄糖時會抑制 glycerol facilitator (Sanno *et al.*, 1968)。glycerol-3-phosphate 進入細胞後，可作為磷脂類合成之前驅物，或是形成 glyceraldehyde-3-phosphate 進入糖解作用。由 Fig 6 可知 *pgk* 與 *pyk* 基因的表現在以甘油為生長基質時表現量最高，尤其當甘油濃度較高時表現更為上升，表示以甘油為碳源進入細胞後會進行糖解作用，接著進入 TCA cycle 與電子傳遞鏈，因此觀察到在這些代謝途徑上產生 ATP 基因都明顯上升，此外也發現發酵作用中 *ackA* 基因表現也以甘油為碳源時表現量較高，推測是因甘油為碳源時進入糖解作用後大量生成 pyruvate，造成 pyruvate 累積，使得 pyruvate 除了轉變成 acetyl-CoA 進入 TCA cycle 代謝外，另外會進行混合酸發酵 (mixed acid fermentation)，將 acetyl-CoA 轉變成 acetyl-phosphate，接著由 acetate kinase (*ackA*) 生成醋酸，所合成的醋酸在有氧狀況下又再次轉變為 acetyl-CoA 進入 TCA cycle 中繼續代謝，因此 *ackA* 基因在甘油為碳源時表現量上升 (Cashel *et al.*, 1996)。

以琥珀酸為碳源時，大腸桿菌利用 C4-dicarboxylate transporter 將琥珀酸運送進入細胞內，可直接進入 TCA cycle 進行代謝利用，而 TCA cycle 進行速率會受 acetyl-CoA 與 oxaloacetate 結合產生 citrate 此步驟所調控，意指

acetyl-CoA 與 oxaloacetate 濃度會影響 TCA cycle 的速率 (Cozzone, 1998)。當高濃度琥珀酸為碳源時，*sucCD* 基因並沒有預期中表現量上升，反而受到抑制而表現下降，推測琥珀酸進入在 TCA cycle 後，造成 oxaloacetate 累積，使得 TCA cycle 進行速率下降，而過多的 oxaloacetate 會由 PEP carboxylase 轉換成 PEP，接著由 pyruvate kinase (*pyk*) 轉變為 pyruvate，因此在此培養條件下 *pyk* 基因表現上升，使得在高濃度琥珀酸的供應下菌體 ATP 也以糖解作用為來源；而低濃度琥珀酸培養環境下 *sucCD* 表現則不受抑制，也不會造成過多 oxaloacetate 累積轉變而成 PEP，因此並沒有觀察到 *pyk* 基因表現上升，推測此時 ATP 的主要來源是經由 TCA cycle 與電子傳遞鏈而獲得。

由實驗結果可知以不同碳源作為生長基質時，會明顯改變代謝途徑與中間代謝產物，這些產生 ATP 分子之途徑會隨著環境中不同碳源而改變，因此碳源是產能機制十分重要的影響因子。

在本實驗中以葡萄糖為碳源時的 ATP 含量最高，由前人研究推論此時的糖解作用進行最快速，而以醋酸為碳源時進行最慢 (Oh *et al.*, 2002)，但是我們觀察到在糖解作用上與 ATP 合成酵素之相關基因 *pgk* 與 *pyk* 表現量卻是以葡萄糖為碳源時較低，由這些 ATP 合成基因轉錄層次的表現量來看細胞內 ATP 濃度差異並無直接相關的影響，但 ATP 與 ADP 含量卻會受碳源與生長速率影響 (Table 1)。推測 ATP 與 ADP 濃度的影響因子極為廣泛，不單只是代謝途徑上的改變，還包括其他巨分子與蛋白質等生合成反應的參與，此外訊息傳遞途徑上有許多激酶 (kinase) 以及去磷酸酶 (phosphatase) 的作用都需要 ATP，甚至磷酸根的濃度也會影響 ATP 合成與分解的反應，另外 NADH 與 NAD<sup>+</sup> 等分子也會影響 ATP 的含量 (Koeblmann *et al.*, 2002)。本實驗雖未證明代謝途徑上與 ATP 合成相關酵素基因的表現與細胞中 ATP 含量有直接調控之關係，但碳源改變大腸桿菌之生長速率是透過細胞內能量狀態所影響。

## 6.2 碳源與生長速率對大腸桿菌 DNA 超螺旋結構之關係

### 6.2.1 碳源、生長速率與 ATP/ADP 比例對 DNA 超螺旋結構之影響

先前研究報告已指出質體 DNA 可充分反應出染色體 DNA 的變化，大腸桿菌體內染色體 DNA 與質體 DNA 的超螺旋結構具有一致性，由於 pBR322 質體上並不具任何會被碳源誘發的起動子，因此本論文中利用質體 pBR322 分析生長速率對 DNA 超螺旋結構的影響 (Sinden *et al.*, 1981)。

許多研究已證明外界環境的刺激如：溫度、滲透壓、含氧量等所造成的 ATP/ADP 比例改變與 DNA 超螺旋結構的變化皆相互伴隨而生。除此之外，當 uncoupler 化合物加入後細胞內 ATP/ADP 比例迅速下降，同時 DNA 超螺旋結構 LK 值變化亦變得不明顯 (Workum *et al.*, 1996)。在先前實驗結果中得到相似的結論，當以不同的碳源進行大腸桿菌連續式培養，在生長速率愈高時 ATP/ADP 比例隨之上升，此時 DNA 超螺旋結構呈現較為緊密的狀態，在生長速率愈低時 ATP/ADP 比例降低，此時 DNA 超螺旋結構呈現較為鬆散的狀態。而在高生長速率時( $\mu = 1.20/h$ )，以不同的碳源供應下可明顯地發現 ATP/ADP 比例最高為醋酸、琥珀酸次之、葡萄糖再次之、甘油最低，在 DNA 超螺旋結構也發現以醋酸為碳源時最緊密、琥珀酸次之、葡萄糖再次之，而以甘油最為鬆散(張育甄, 1998)。本論文進一步探討批次培養下，就不同碳源下觀察大腸桿菌超螺旋結構分布狀態亦可看出在 ATP/ADP 比例高時，pBR322 質體的拓撲異構物較少，當 ATP/ADP 比例低時則 pBR322 質體的拓撲異構物則較多 (Fig 1)，由這些結果分析，可知細胞內能量狀態變動時細胞會改變其 DNA 超螺旋結構。

由實驗結果得知經 starvation 培養後，不論以醋酸或葡萄糖為生長受質時， $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株之 ATP/ADP 比例與野生株相差不大，而 DNA 超螺旋分布也無明顯差異，仍隨能量狀態的高低而有不同分布，當 ATP/ADP 比例高時

DNA 超螺旋結構較為緊密，若比例下降時則使 DNA 超螺旋結構較為鬆散 (Table 2 與 Fig 3)。過去有關 rRNA 基因 (*rrnB*) P1 啟動子的研究指出，當菌體失去超螺旋結構或在低鹽環境下會促進 P1 啟動子的轉錄，而 ppGpp 則會抑制 P1 的活性，探討 DNA 超螺旋結構與 ppGpp 之間的關係，推測 ppGpp 並非為影響 DNA 超螺旋結構之因子 (Ohlsen and Gralla, 1992)，在本實驗中也證實 ppGpp 並不會調控 DNA 超螺旋結構。

### 6.2.2 碳源與生長速率對於 topoisomerases 基因表現之影響

在不同的 topoisomerases 中，gyrase B 需要水解 ATP 來獲得能量以旋緊 DNA，若 ATP 缺乏時會使 DNA 超螺旋結構變得較為鬆散 (Cozzarelli, 1980)。體外實驗也證實純化的 gyrase B 活性會受 ATP/ADP 比例影響 (Drlaca, 1992)。先前本實驗室也接合了 gyrase 啟動子與 *lacZ* 結構基因 (*pgyr-lacZ*)，同樣利用連續式培養證明了生長速率愈快時 gyrase 啟動子的活性愈高 (林楨桓, 1997)，而由 Fig 4 可知生長速率加快時 topoisomerase 等基因表現量上升，因此推測在生長速率增加時 ATP/ADP 比例與 gyrase 表現量受到調控而上升，促使 DNA 超螺旋結構較生長速率緩慢時來得緊密。

由於 topoisomerases 會改變 DNA 超螺旋結構，本論文中探討在連續式培養下，生長速率與碳源對大腸桿菌 topoisomerases 基因的影響。由 Fig 4 可知在生長速率較快時，*gyrA*、*gyrB* 與 *topA* 基因的表現都較生長速率低時來得高，此結果與先前在連續式培養下之 DNA 超螺旋結構相一致，觀察到生長速率較快時 DNA 超螺旋結構較為緊密，因此各 topoisomerases 基因表現量上升。而先前研究也發現 *pgyr-lacZ* 基因在低生長速率變動時表現變化量明顯地較高生長速率變動時多，分析這些結果可推論在高生長速率變化時各

topoisomerases 基因之啟動子產生了 autoregulation 的現象。因此對於 DNA 超螺旋結構而言，我們認為在低生長速率時細胞內有較強的 thermodynamic control，而在高 ATP/ADP 比例時，homeostatic control 上升會減弱了 thermodynamic control 的效應，造成生長速率快時 *gyrA*、*gyrB* 與 *topA* 基因的表現量較高，證明 topoisomerase 基因受 growth rate-dependent 調控，使得 DNA 超螺旋結構隨碳源與生長速率不同而改變。

綜而言之，不同的生長速率可經由改變細胞內 DNA 超螺旋結構來調控許多基因的表現，而細胞內 ATP/ADP 比例則是調控 DNA 超螺旋結構的重要因子。細胞內 ATP 缺乏時 DNA 超螺旋結構會變得較為鬆散，若 ATP/ADP 比例增加時 DNA 超螺旋結構也隨之旋緊 (Workum *et al.*, 1996)。批次培養下不同碳源使得菌體進行不同的代謝路徑與生理反應而造成 ATP/ADP 比例改變，藉由 ATP/ADP 比例調控 DNA gyrase 活性，進而控制 DNA 的超螺旋結構，而 DNA 超螺旋結構可調控其他基因的表現 (Monzel and Gellert, 1987; Dorman *et al.*, 1988)，造成細胞內生理反應產生變化並影響生長速率。



## 6.3 生長速率與大腸桿菌細胞分裂之關係

### 6.3.1 碳源對大腸桿菌細胞分裂基因 (*ftsZ*, *minC*, *minD*) 的影響

由 Fig 8 可發現在批次培養下 *ftsZ* 基因表現是以葡萄糖為碳源時較高，由於 FtsZ 具有 GTPase 活性，會水解 GTP 產生 GDP 與 Pi 將 FtsZ 單體聚合成 Z ring，先前文獻也提出 FtsZ 會受能量狀態調控 (Rueda *et al.*, 2003)，由 Table1 可知以葡萄糖為碳源時細胞內 ATP 含量與 ATP/ADP 比例都較醋酸來得高，顯示 *ftsZ* 基因表現是受 ATP-dependent 調控，因此以葡萄糖為碳源時

*ftsZ* 表現量較高，此外菌體分裂速度也在葡萄糖為碳源時分裂較快，此現象與 *ftsZ* 基因表現較高相一致。*minD* 基因的表現也是以葡萄糖為碳源時較高，由於 MinD 具有 ATPase 活性，會水解 ATP 形成雙聚體分子後與細胞膜內側結合以抑制 Z ring 形成，因此 MinD 也受能量影響 (Lackner *et al.*, 2003)；由上述結果可知在葡萄糖為碳源時，大腸桿菌體內 *ftsZ* 與 *minD* 等細胞分裂基因表現量都較高，而 ATP 含量與 ATP/ADP 比例也比以醋酸為碳源時來得高，顯示 *ftsZ* 與 *minD* 等基因的表現受能量所調控，也證實細胞分裂會受能量狀態影響。因 *minC* 基因是以醋酸為碳源時表現量較高，已知生長速率上升時，菌體的直徑大小會呈正比增加 (Frederick *et al.*, 1996)，此外 Lackner 等學者說明 *minC* 基因的表現會受細胞大小影響 (Lackner *et al.*, 2003)，在本實驗中觀察到以醋酸為碳源的菌體大小比葡萄糖為碳源時來得小 (Fig 10)，我們推測若細胞兩端的間隔愈大，相對地 *minC* 基因表現量隨之減少，因此以葡萄糖為碳源時 *minC* 基因表現量較低。



### 6.3.2 ppGpp 對大腸桿菌細胞分裂基因 (*ftsZ*, *minC*, *minD*) 與菌體型態之影響

當大腸桿菌處於營養素貧乏時，例如胺基酸、碳源或磷酸缺乏，菌體內會立刻停止許多 RNA 的轉錄，先前文獻提出 ppGpp 會影響細胞分裂，推測菌體處於靜止生長期 (stationary growth phase) 時，ppGpp 會刺激 *rpoS* 基因轉錄以增加  $\sigma^S$  (sigma factor) 合成， $\sigma^S$  進而活化 *ftsQAZ* 操縱子的 *ftsQ1p* 啟動子以促進其轉錄，因此在菌體靜止生長期時，ppGpp 會正向調控細胞分裂 (Joseleau-Petit *et al.*, 1999)。

在本論文批次培養中，探討 ppGpp 對細胞分裂基因之研究皆是收取對數生長期的菌體，立即進行碳源貧乏培養後加以分析。我們也觀察到先前文獻所提出

之結果，發現 ppGpp 會促進 *ftsZ* 基因表現 (Fig 9) (Joseleau-Petit *et al.*, 1999)，這是由於 *ftsQAZ* 操縱子的上游有六個啟動子，分別為 *ftsQ1p*、*ftsQ2p*、*ftsAp*、*ftsZ2p*、*ftsZ3p* 與 *ftsZ4p*，這些啟動子個別受到不同因子調控，其中 *ftsQ2p* 啟動子在對數生長期時大量表現，而 *ftsQ1p* 啟動子則在靜止生長期大量表現，可知不同生長時期會活化不同的啟動子表現，而使得 *ftsZ* 基因有不同的表現量 (Navarro *et al.*, 1998)。在菌體進行碳源貧乏培養時菌體隨即誘發 ppGpp 合成，ppGpp 會活化 *ftsQ1p* 啟動子以增加 *ftsZ* 基因表現，並且使得 Z ring 形成的數量增加，而長絲狀的菌體型態也擁有較多的 Z ring，因此我們由 Fig 11 的菌體型態也得知碳源貧乏時會使菌體呈現長絲狀，此一推論與 Khattar 學者所提出長絲狀細胞 Z ring 形成較多的觀點一致 (Khattar *et al.*, 1997)，也得知 ppGpp 不會抑制細胞隔板的形成，相反地會增加細胞隔板的形成 (Schreiber *et al.*, 1995)。

此外也發現當菌體完全缺乏 ppGpp 時會使 *minC* 與 *minD* 等基因表現量上升 (Fig 9)，表示 ppGpp 對 *minC* 與 *minD* 基因進行負向調控，已知 ppGpp 含量隨生長速率上升而下降，由此推測菌體在生長緩慢狀態下，ppGpp 含量較高而降低 *minC* 與 *minD* 基因的表現，也表示 Z ring 的抑制者濃度下降，而使得 Z ring 可在細胞內形成的機率提高，因此也證實上述論點 ppGpp 會使得 Z ring 的產生增加，並且由 Fig 11 觀察到 ppGpp 會使菌體型態呈現長絲狀。

由細菌型態來觀察，不論是大腸桿菌野生株或  $\Delta reIA \Delta spoT$  雙突變株中，菌體的型態都是短桿狀，但菌體大小會隨碳源不同而改變，這是由於菌體大小會隨生長速率加快而增加，生長速率愈快時生物質量 (biomass) 愈多，因此造成菌體大小產生差異，可知生長速率與細胞質量兩者間呈現正比的關係 (Frederick *et al.*, 1996)。我們發現在批次培養條件下，大腸桿菌野生株與  $\Delta reIA \Delta spoT$  雙突變株的菌體大小皆是以葡萄糖為碳源時較大 (Fig 10)，由 Table 1 可知以葡萄糖為碳源時細胞倍增的速率都較快，因此菌體大小依賴生長速率的快慢；而

$\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株的菌體大小又比野生株來得大些，由 Table 2 可知  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株中由於缺乏 ppGpp 合成，使得細胞生長速率變得略快，且細胞大小會隨生長速率加快而增加，因此觀察到  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株的細胞大小較野生株大。

另外也觀察到碳源貧乏的環境會使大腸桿菌菌體型態趨向長絲狀，並呈現鍊狀結構 (chain-formation) (Fig 11)，推測原因可能是由於細胞停止生長時 (growth arrest)，也同時停止巨分子之合成，使得細胞分裂趨於緩慢而呈現長絲狀的型態 (Chang *et al.*, 2002)。同時菌體型態也可能與細胞分裂基因的表現有關，由 Fig 11 觀察到  $\Delta relA \Delta spoT$  雙突變株經碳源貧乏培養後，*ftsZ* 基因表現降低，而 *minC* 與 *minD* 基因則上升，細胞隔板無法形成使得細胞呈現長絲狀，也因此在此 Fig 11 觀察到當菌體完全缺乏 ppGpp 時，其型態呈現長絲狀的情形更為明顯。

在 Fig 10A 與 10C 中，我們發現 starvation 時菌體誘發 ppGpp 產生會影響菌體型態，推測 ppGpp 透過  $\sigma^S$  或 RpoS regulon 直接或間接地影響了特定蛋白質表現使細菌型態改變 (Xiao *et al.*, 1991)。Khattar 等學者發現與細胞分裂有關基因之一 *ftsW* 的調控是 *relA*-dependent，且 FtsW 與細胞延長 (elongation) 以及維持桿狀型態有密切關係，並會幫助 Z ring 形成 (Khattar *et al.*, 1997)，由此可知 ppGpp 有可能透過影響細胞分裂基因的表現而改變細胞大小以及菌體型態，推測 ppGpp 雖會抑制蛋白質的合成卻不會抑制阻止隔板形成，推測長絲狀細胞中可能存在不只一個以上的 Z ring，但缺乏分裂的能力，另外也觀察到 ppGpp 突變株細胞有形成鍊狀的型態，這種改變可能與 Z ring 形成有多寡有關。

**Table 1. Effect of carbon source on energy state of *E. coli* in batch culture.**

carbon source (2.25 mM)	generation time (min)	ATP (pmol/ 10 <sup>7</sup> cell)	ADP (pmol/ 10 <sup>7</sup> cell)	ATP/ADP ratio
acetate	72 ± 3	7.4 ± 1.1	3.1 ± 1.1	2.4 ± 0.3
glucose	50 ± 2	64.8 ± 1.7	17.1 ± 1.7	3.8 ± 0.6
glycerol	60 ± 4	31.7 ± 1.4	5.1 ± 1.4	6.2 ± 0.4
succinate	65 ± 3	22.5 ± 0.9	3.1 ± 0.9	7.3 ± 0.7



**Table 2. Effect of starvation and ppGpp on energy state of *E. coli* in batch culture.**

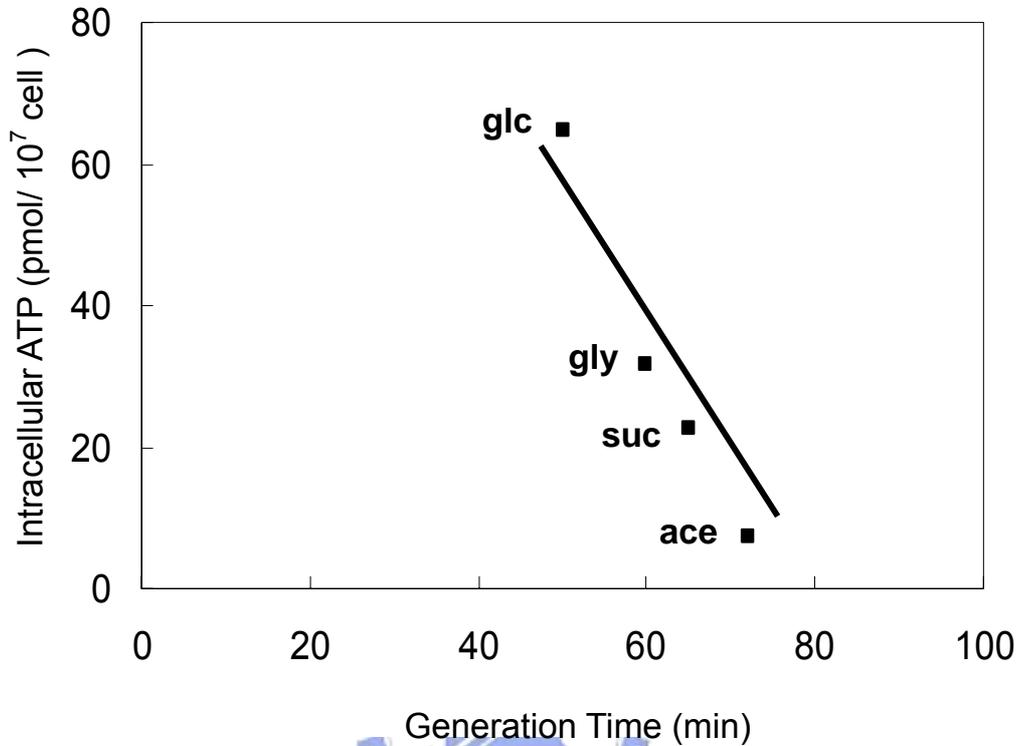
strains	carbon source (2.25 mM)	generation time (min)	ATP <sup>a</sup> (pmol/ 10 <sup>7</sup> cell)	ADP <sup>a</sup> (pmol/ 10 <sup>7</sup> cell)	ATP/ADP ratio <sup>a</sup>
K12	acetate	72 ± 3	7.1 ± 0.5	2.0 ± 0.5	3.5 ± 0.4
	glucose	50 ± 2	68.3 ± 0.8	12.6 ± 0.8	5.4 ± 0.6
K12 $\Delta relA$ $\Delta spoT$	acetate	57 ± 5	47.3 ± 1.1	12.4 ± 1.1	3.8 ± 0.7
	glucose	46 ± 3	49.3 ± 0.9	9.3 ± 0.9	5.3 ± 0.6

a. Wild-type K12 and *relA spoT* double mutant separately incubated in acetate or glucose minimal medium at 37°C to OD600 0.4~0.45, then starvation for 30 mins to collect cell pellets for detection of ATP and ADP concentrations.

**Table 3. The changes of ATP generating gene expression in various carbon medium.**

carbon source concentration (mM)	Acetate		Glucose		Glycerol		Succinate	
	2.25	40	2.25	40	2.25	40	2.25	40
<i>pgk</i>	3	25	1	3	<b>20</b>	<b>50</b>	6	15
<i>pyk</i>	15	6	9	<b>1</b>	<b>37</b>	<b>94</b>	11	<b>65</b>
<i>ackA</i>	21	3	31	<b>1</b>	<b>78</b>	<b>92</b>	22	48
<i>sucCD</i>	<b>122</b>	<b>140</b>	23	92	33	63	<b>114</b>	<b>22</b>
<i>atpl</i>	43	69	55	45	60	77	40	48

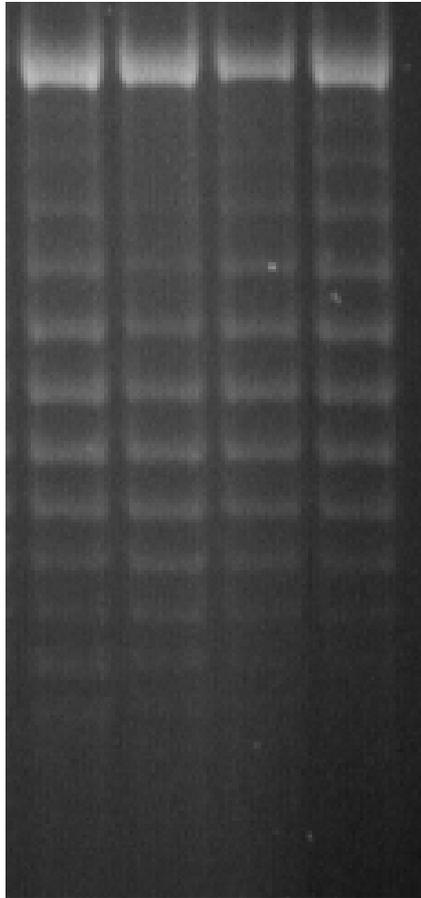
The boldface indicated the lower or higher expression of ATP generating genes. *pgk*: phosphoglycerate kinase, *pyk*: pyruvate kinase, *ackA*: acetate kinase, *sucCD*: succinate thiokinase, *atpl*: ATPase



**Fig 1. Effect of carbon source on intracellular ATP of *E. coli* in batch culture.** The *E. coli* cells were cultured in 2.25 mM minimal medium with different carbon sources at 37°C. ace: acetate. glc: glucose. gly: glycerol. suc: succinate.

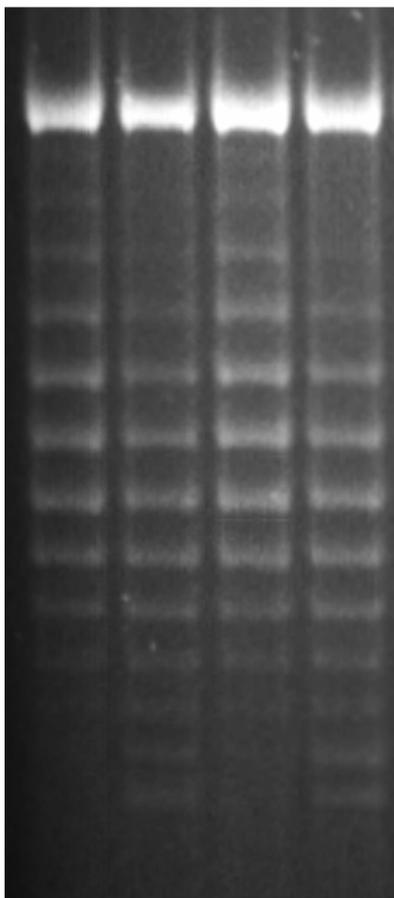
carbon : Ace Glc Gly Suc  
sources

ATP/ADP : 2.4 3.8 6.2 7.3



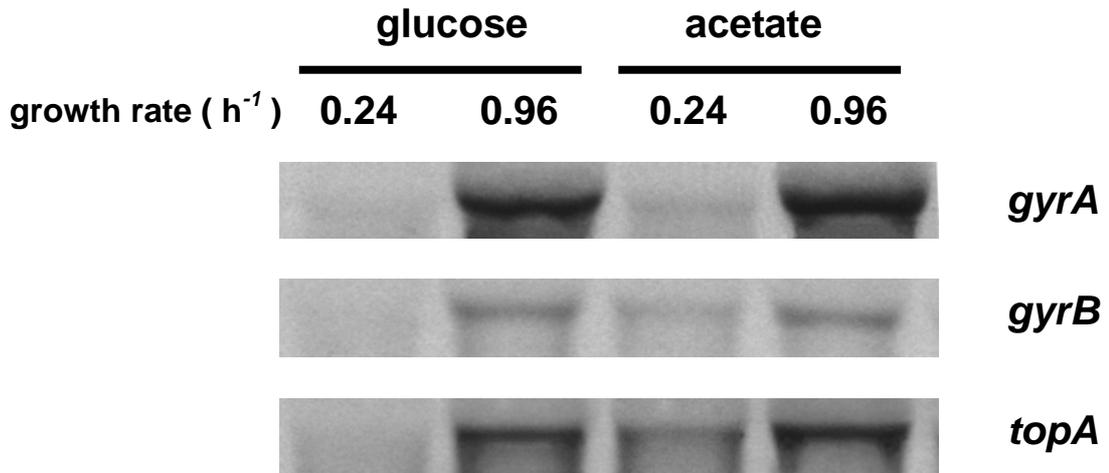
**Fig 2. Effect of carbon source on DNA supercoiling of *E. coli* in batch culture.** Chloroquin-agarose gel electrophoresis showing differences in DNA supercoiling of pBR322 from strains grown in different carbon sources. The wild-type K12 strain were cultured in 2.25mM acetate ( lane 1 ), glucose ( lane 2 ) , glycerol ( lane 3 ) and succinate ( lane 4 ) minimal medium.

Strain :	K12 $\Delta relA$ $\Delta spoT$		K12	
carbon :	Glc	Ace	Glc	Ace
ATP/ADP :	5.3	3.8	5.4	3.5

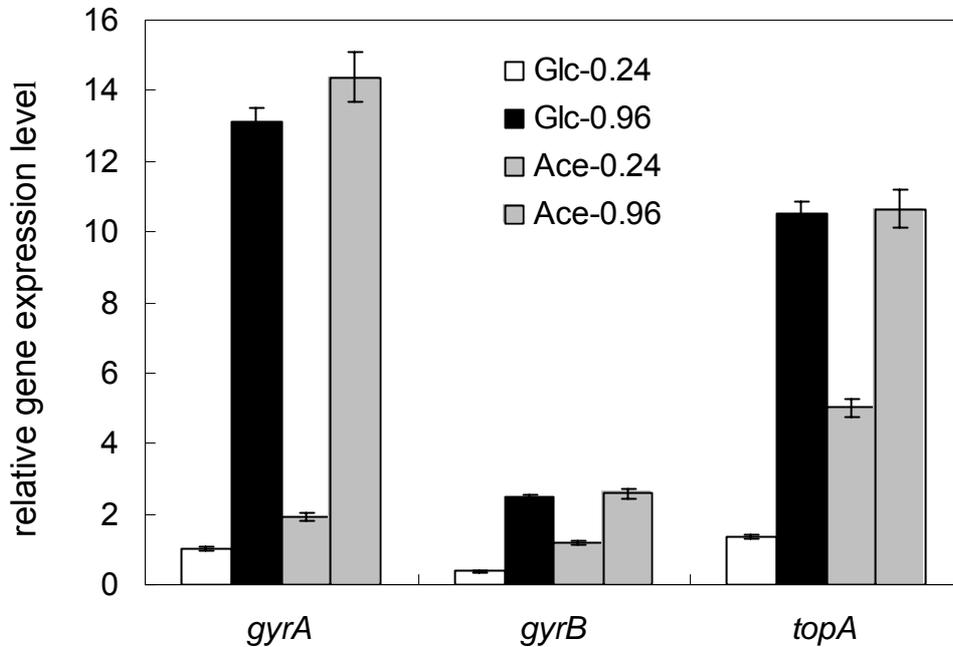


**Fig 3. Effect of starvation and ppGpp on DNA supercoiling at different carbon sources in *E. coli* in batch culture.** The *relA spoT* double deletion mutant ( lane1 and 2 ) and wild-type K12 strain ( lane 3 and 4 ) were cultured in 2.25mM glucose or acetate minimal medium, then starvation for 30 mins.

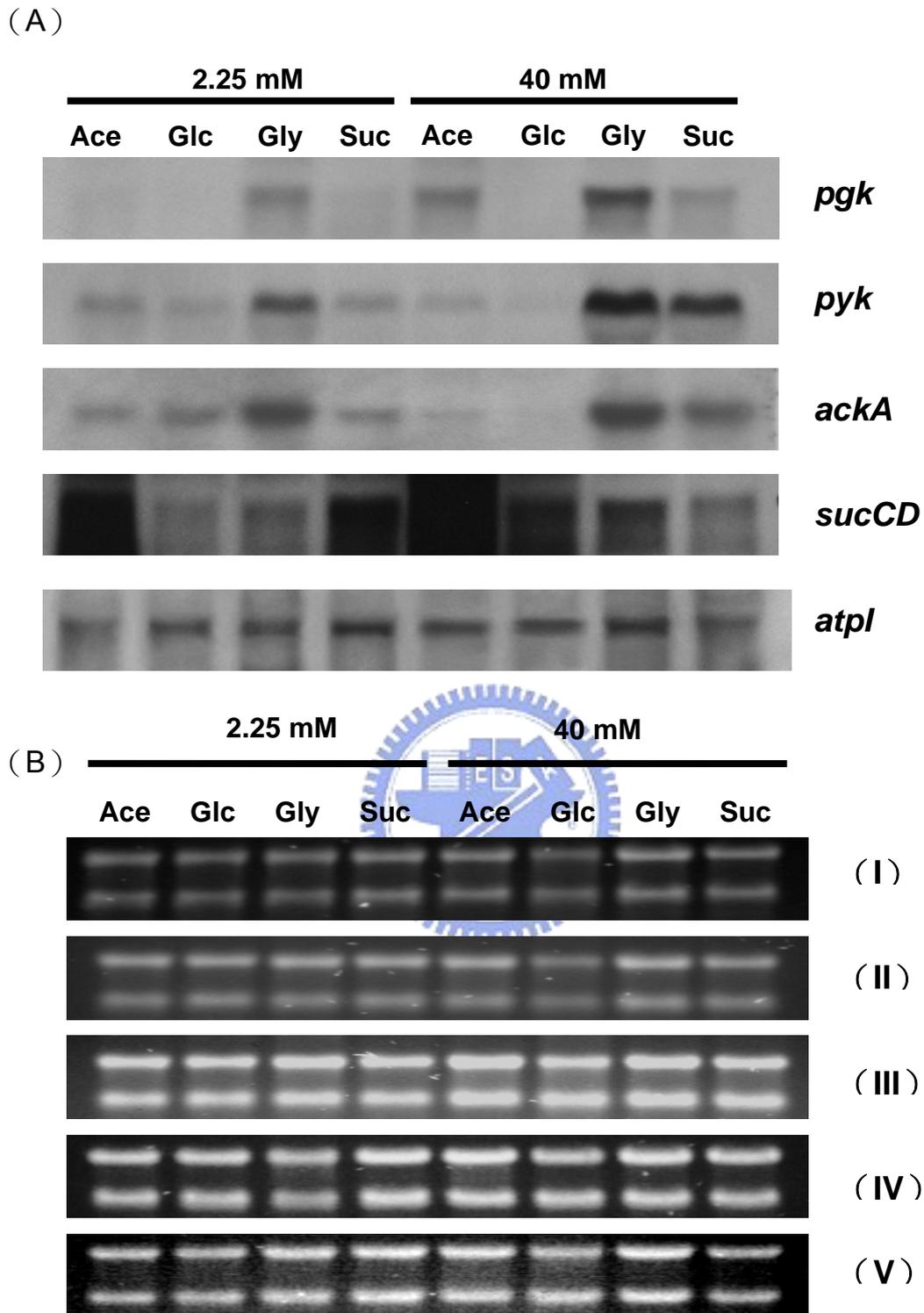
(A)



(B)

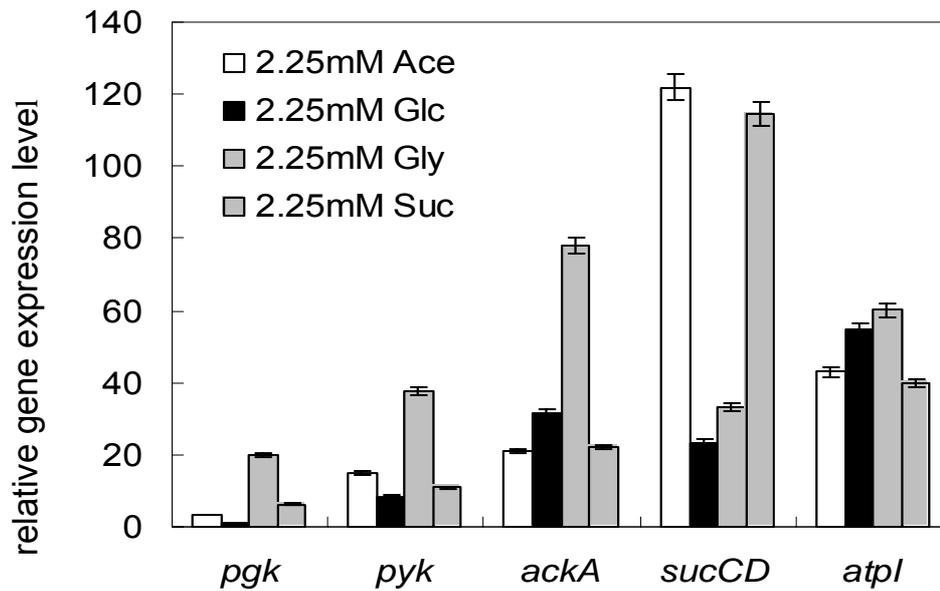


**Fig 4. Effect of carbon source and growth rate on the expressions of topoisomerase genes ( *gyrA*, *gyrB*, *topA* ) in *E. coli*.** The wild-type K12 strain was cultured in carbon-limited chemostates at 37°C and specific growth rates were 0.24/h or 0.96/h. (A) Northern blot analysis of *gyrA*, *gyrB* and *topA*. (B) The quantitative northern blot analysis of *gyrA*, *gyrB* and *topA*. Indicated are calculated mRNA profiles as determined by three independent experiments with different preparation of total RNA.

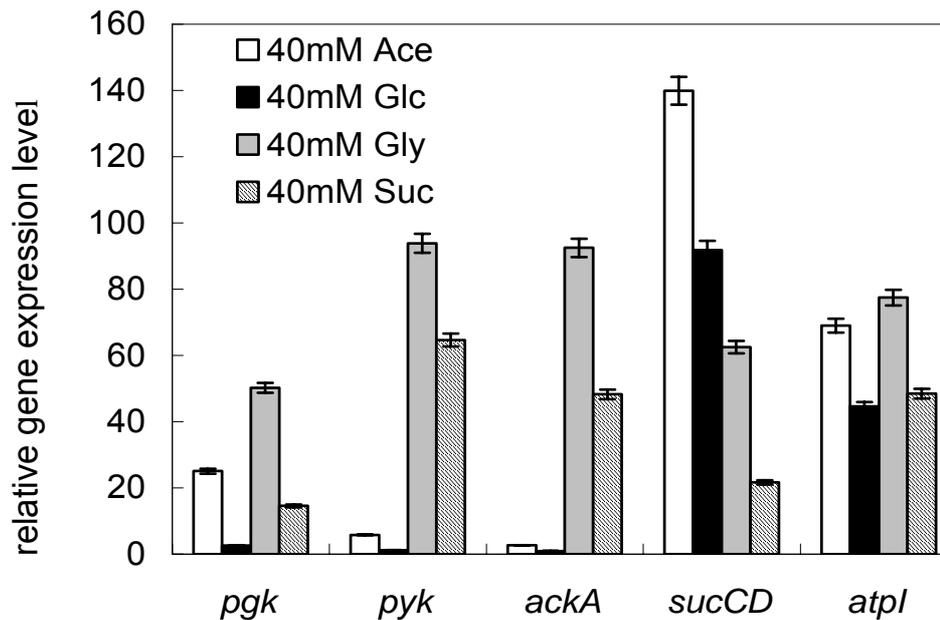


**Fig 5. Effect of carbon source on the expressions of ATP generating genes (*pgk*, *pyk*, *ackA*, *sucCD*, *atpI*) in *E. coli*.** (A) Northern blot analysis of *pgk*, *pyk*, *ackA*, *sucCD* and *atpI*. (B) The internal controls of total RNA. The upper bands were 23S rRNA, and the under bands were 16S rRNA. (I) *pgk*, (II) *pyk*, (III) *ackA*, (IV) *sucCD*, (V) *atpI*.

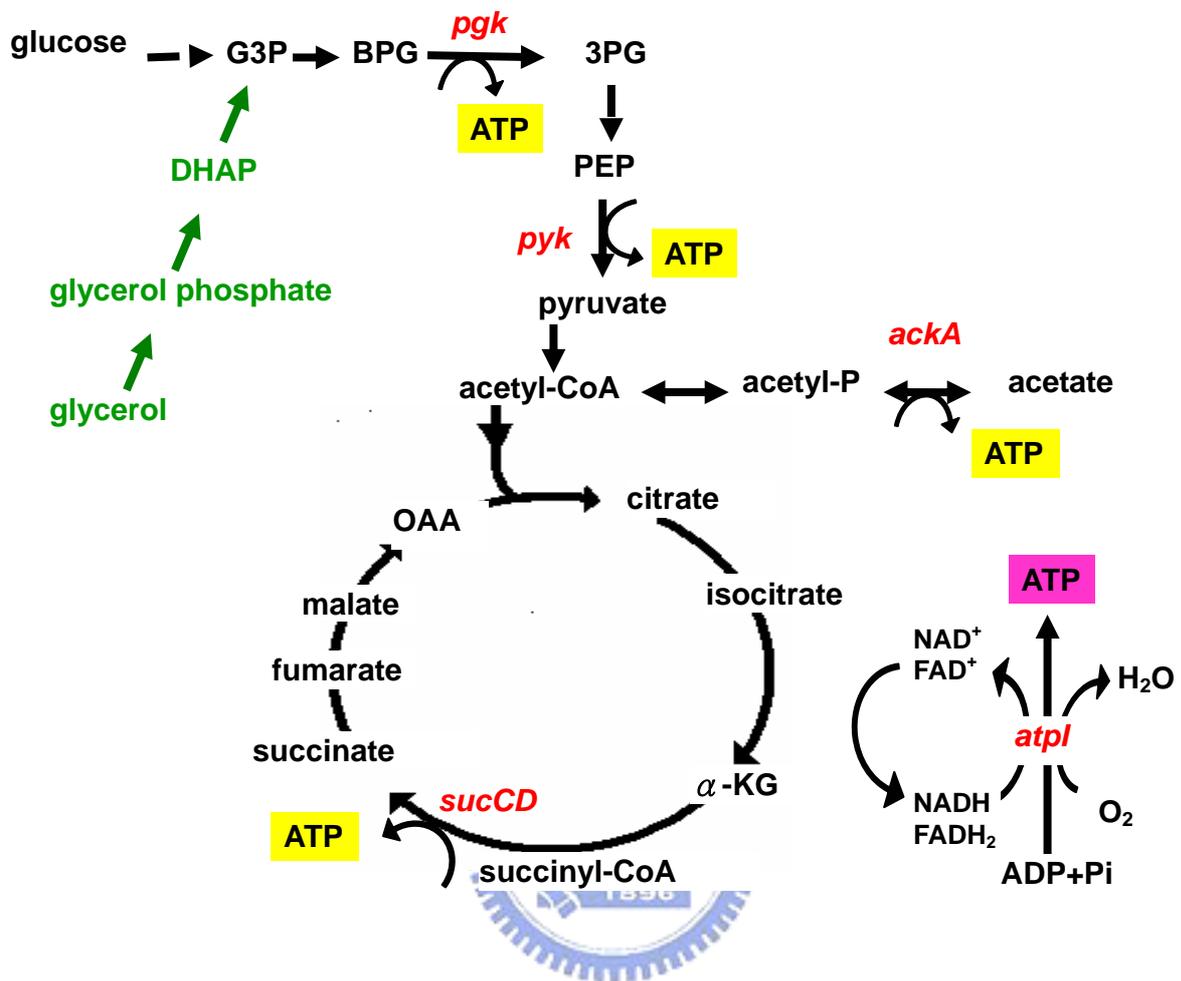
(A)



(D)

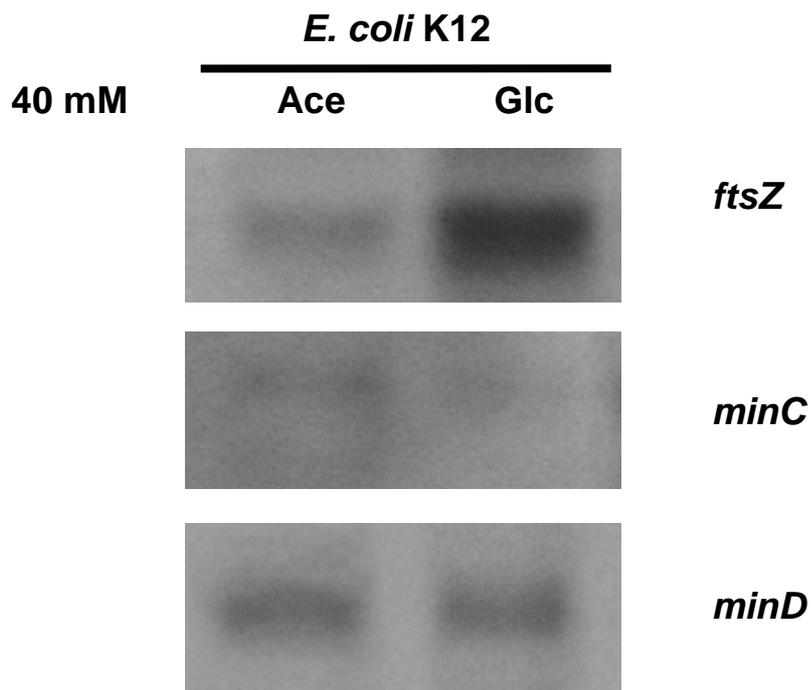


**Fig 6. The quantitative northern blot analysis of *pgk*, *pyk*, *ackA*, *sucCD* and *atpI*.** The carbon sources were used in acetate, glucose, glycerol and succinate minimal medium at 37°C. The different carbon concentrations were used in 2.25 mM (A) or 40 mM (B). Indicated were calculated mRNA profiles as determined by three independent experiments with different preparation of total RNA.

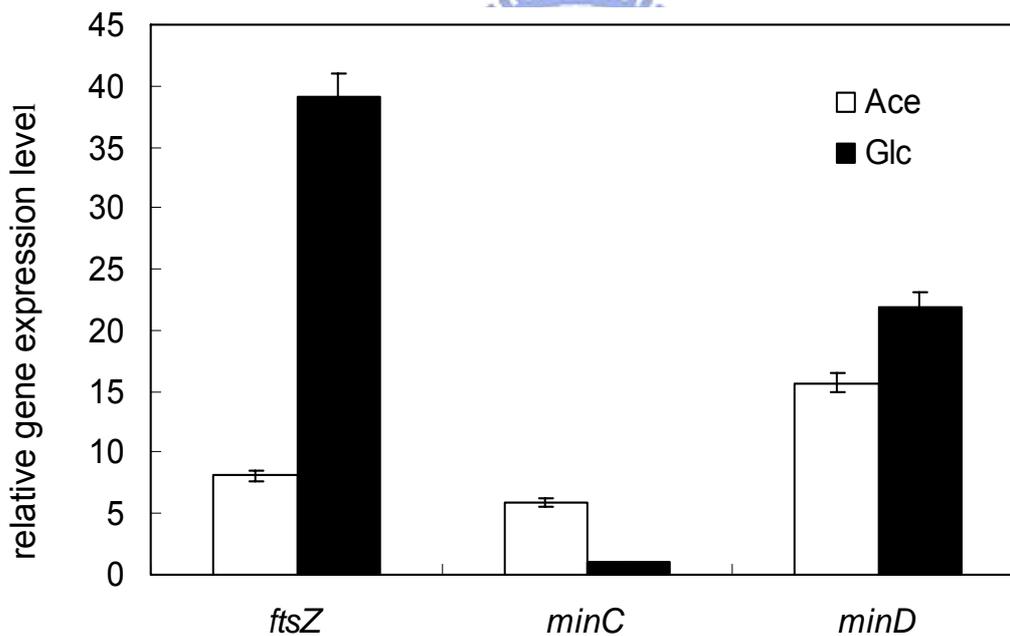


**Fig 7. The metabolic pathways of glycolysis, tricarboxylic acid cycle and electron transfer chain.** The green arrows and letters represented glycerol as carbon source entry into glycolysis. The abbreviations were shown. acetyl-P: acetyl-phosphate, BPG: bisphosphoglycerate, DHAP: dihydroxyacetone phosphate, G3P: glycerate-3-phosphate, OAA: oxaloacetate. 3PG: 3-phosphoglycerate, PEP: phosphoenolpyruvate,  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -ketoglutarate, *pgk*: phosphoglycerate kinase. The ATP generating genes were shown *pyk*: pyruvate kinase, *ackA*: acetate kinase, *sucCD*: succinate thiokinase, *atpI*: ATPase

(A)

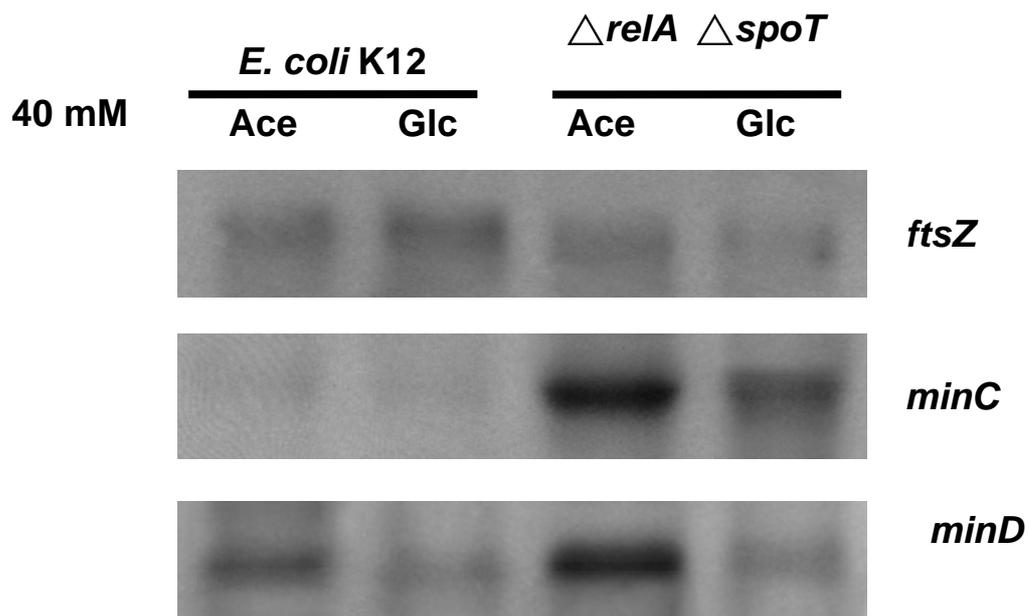


(B)

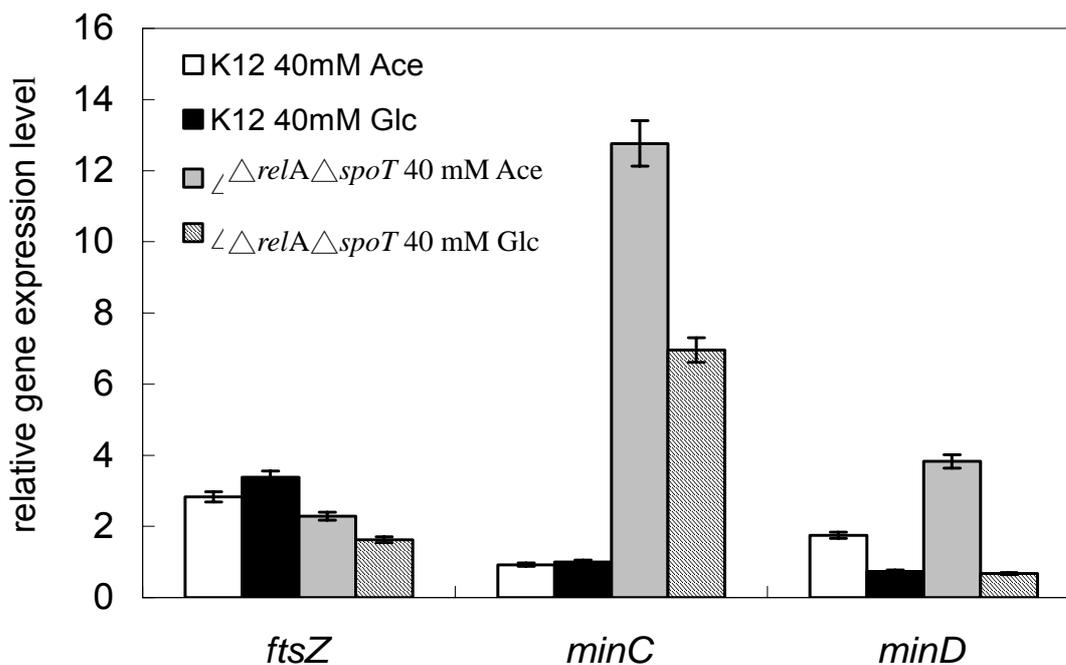


**Fig 8. Effect of carbon source on the expressions of cell division genes (*ftsZ*, *minC*, *minD*) of *E. coli*.** The wild-type K12 strain were cultured in 40 mM glucose or acetate minimal medium. (A) Northern blot analysis of *ftsZ*, *minC* and *minD*. (B) The quantitative northern blot analysis of *ftsZ*, *minC* and *minD*.

(A)

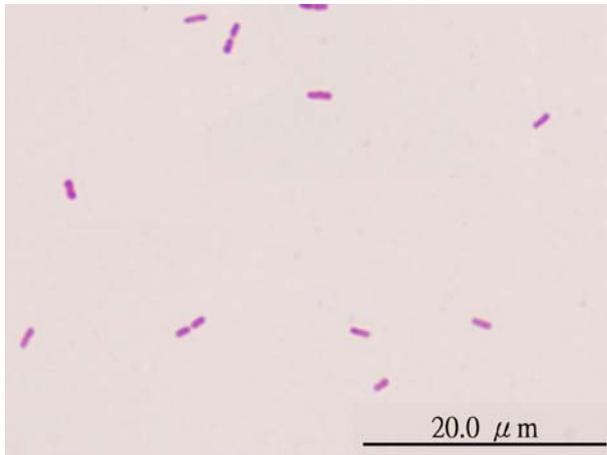


(B)

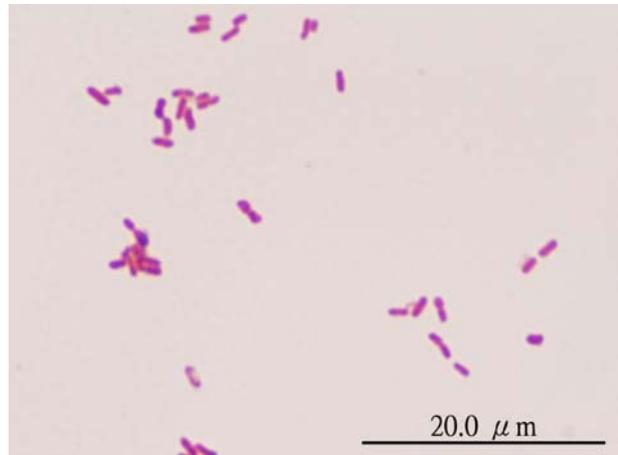


**Fig 9. Effect of starvation and ppGpp on the expressions of cell division genes (*ftsZ*, *minC*, *minD*) at different carbon sources in *E. coli*.** The *relA spoT* double deletion mutant ( lane1 and 2 ) and wild-type K12 strain ( lane 3 and 4 ) were cultured in 40 mM glucose or acetate minimal medium, then starvation for 30 mins. (A) Northern blot analysis of *ftsZ*, *minC* and *minD*. (B) The quantitative northern blot analysis of *ftsZ*, *minC* and *minD*.

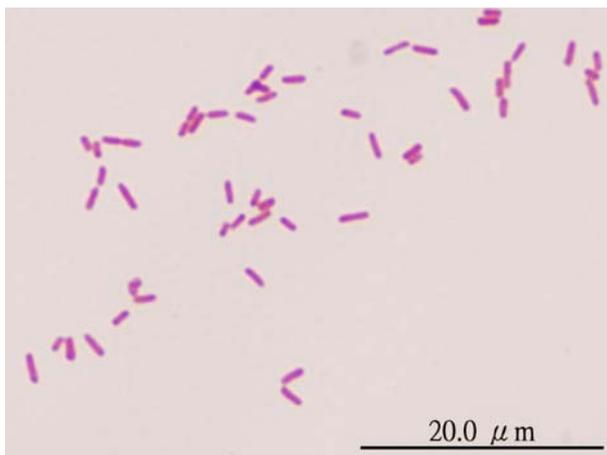
(A) K12 in acetate minimal medium



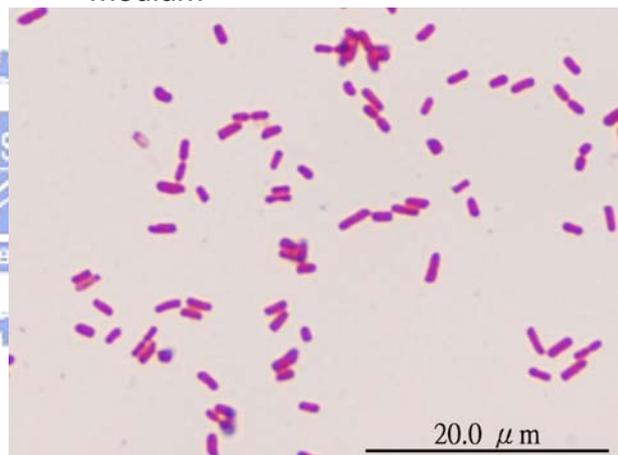
(B)  $\Delta relA \Delta spoT$  mutant in minimal medium



(C) K12 in glucose minimal medium

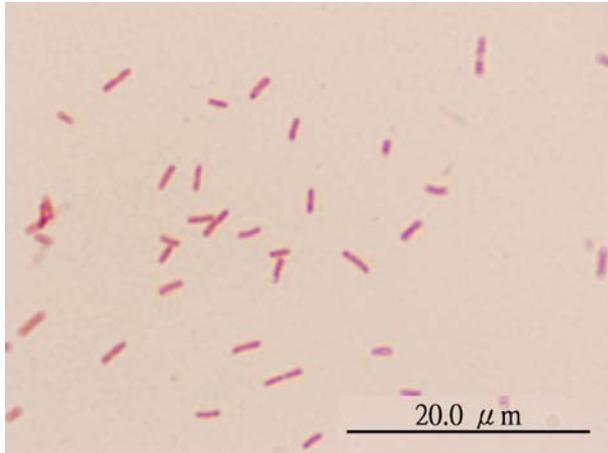


(D)  $\Delta relA \Delta spoT$  mutant in minimal medium



**Fig 10. Morphology of wild-type K12 and ppGpp mutant under different carbon sources in minimal medium.** Cells were stained with gram's stain and observed by light microscopy using an oil immersion objective. Wild-type K12 and *relA spoT* mutant were grown in acetate minimal medium (A) (B), and grown in glucose minimal medium (C) (D). The bar represented 20  $\mu\text{m}$ .

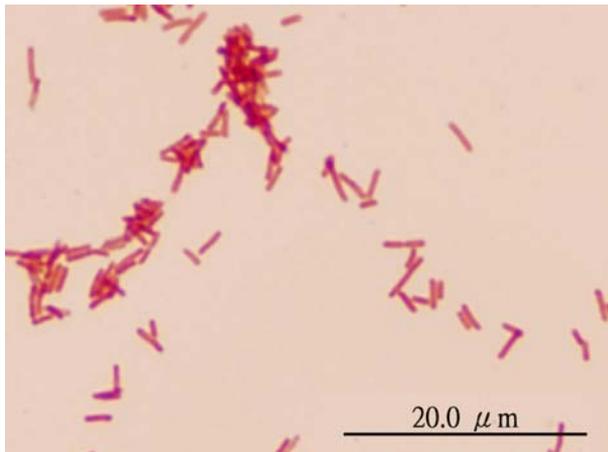
( A ) K12 starved in acetate minimal medium



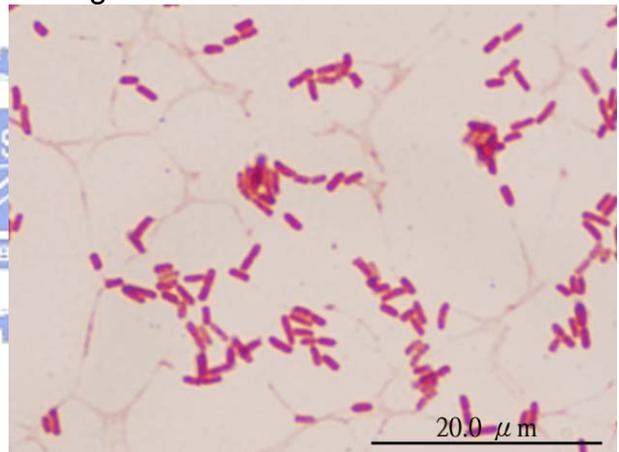
( B )  $\Delta relA \Delta spoT$  mutant starved in acetate minimal medium



( C ) K12 starved in glucose minimal medium



( D )  $\Delta relA \Delta spoT$  mutant starved in glucose minimal medium



**Fig 11. Morphology of wild-type K12 and *relA spoT* mutant in carbon-starved minimal medium.** Cells were stained with gram's stain and observed by light microscopy using an oil immersion objective. Wild-type K12 and *relA spoT* mutant were starved in acetate minimal medium (A) (B), and starved in glucose minimal medium (C) (D). The bar represented 20 μm.

## 柒、參考文獻

- Addinall SG, Bi E, Lutkenhaus J. (1996) FtsZ ring formation in *fts* mutants. *J Bacteriol* **178**: 3877-3884.
- Bi EF, Lutkenhaus J. (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**: 161-164.
- Bloch, P. L., T. A. Phillips and F. C. Neidhardt. (1980) Protein identification *Escherichia coli* on o\*farrell two-dimensiopnal gels: location of 81 *Escherichia coli* proteins. *J Bacteriol* **141**: 1409-1420.
- Bloch, P. L., T. A. Phillips and F. C. Neidhardt. (1980) Protein identification *Escherichia coli* on o\*farrell two-dimensiopnal gels: location of 81 *Escherichia coli* proteins. *J Bacteriol* **141**: 1409-1420.
- Blum E, Py B, Carpousis AJ, Higgins CF. (1997) Polyphosphate Kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome *Mol Microbiol* **26**: 387-398
- Boogerd, F. C., L. Boe, O. Michelsen and P. R. Jensen. (1998) *atp* mutants of *Escherichia coli* fail to grow on succinate due to a transport deficiency. *J Bacteriol* **180**: 5855-5859.
- Camacho-Carranza, R., J. Membrillo-Hernandez, J. Ramirez-Santos, J. Castro-Dorates, V. Chagoya DE Sanchez, and M. Carmen Gomerz-Eichelmann. (1995) Topoisomerase activity during the heat shock response in *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol* **177**: 3619-3622.
- Carlier, M. F., C. Jean, K J. Rieger, M. Lenfant and D. Pantaloni. (1993) Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 5034-5038.
- Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J., Vinella, D. (1996) The stringent response. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C., Curtiss R., III, Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., *et al.* (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 1458-1496.

- Chang DE, Smalley DJ, Conway (2002) Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Mol Microbiol* **45**:289-306.
- Chapman, A. G., L. Fall and D. E. Atkinson. (1971) Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J Bacteriol* **108**: 1072-1086.
- Chiaramello AE, Zyskind JW. (1990) Coupling of DNA replication to growth rate in *Escherichia coli*: a possible role for guanosine tetraphosphate. *J Bacteriol* **172**: 2013-2019.
- Cozzarelli, N. R. (1980) DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science* **207**:953-960.
- Cozzarelli., N. R. and J. C. Wang. (1990) DNA topology and its biological effects. New York. Cold spring harbor laboratory press.
- Cozzone AJ. (1998) Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria. *Annu Rev Microbiol* **52**:127-164.
- David White. (1999) The Physiology & Biochemistry of Prokaryotes. Oxford University Press, 2nd ed.
- Davies, I. J. and W. T. Drabble. (1996) Stringent and growth-rate-dependent control of the *gua* operon of *Escherichia coli* K12. *Microbiology* **142**: 2429-2437.
- De Boer, M., C. P. Brodkhuizen and P. W. Postma. (1986) Regulation of glycerol kinase by enzyme III<sub>Glc</sub> of the phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase system. *J Bacteriol* **167**: 393-395.
- Dewar SJ, Begg KJ, Donachie WD. (1992) Inhibition of cell division initiation by an imbalance in the ratio of FtsA to FtsZ. *J Bacteriol* **174**: 6314-6316.
- DiNardo, S., K. A. Voelkel and R. Sternglanz. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase gene. *Cell* **31**: 43-51.
- Donachie WD. (1993) The cell cycle of *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **47**:199-230.
- Donachie WD. (2001) Co-ordinate regulation of the *Escherichia coli* cell cycle or the cloud of unknowing. *Mol Microbiol* **40**: 779-785.
- Dorman, C. J., G. C. Barr, N. N. Bhriain, and C. F. Higgins. (1988) DNA supercoiling

- and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. *J Bacteriol* **170**: 2816-2826.
- Drlica, K. (1992) Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol* **6**: 425-433
- Epstein, W., and S. G. Schultz. (1965) Cation transport in *Escherichia coli*.V. Regulation of cation content. *J Gen physiol* **49**: 221-234.
- Felle, H., J. S. Porter, C. L. Slayman, and H. R. Kaback. (1980) Quantitative measurements of membrane potential in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **19**: 3585-3590.
- Frederick C. N. *et al.* (1996) Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Washington: American Society for Microbiology, pp.1553-1569
- Furano, A. V. (1975) Content of elongation factor Tu in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **72**: 4780-4784.
- Gallant JA. (1979) Stringent control in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* **13**: 393-415.
- Gellert, M. (1981) DNA topoisomerases. *Ann Rev Biochem* **50**: 879-910
- Georgellis, D., S. Arvidson, and A. von Gabain. (1992) Decay of *ompA* mRNA and processing of 9S RNA are immediately affected by shifts in growth rate, but in opposite manners. *J Bacteriol* **174**: 5382-5390.
- Goldstein, E. and K. Drlica. (1984) Regulation of bacterial DNA supercoiling: plasmid linking numbers vary with growth temperature. *Proc Natl Acad Sci* **81**: 4046-4050.
- Gottschalk, G. (1988) Bacterial metabolism. New York. 2nd. *Springer-Verlag*.
- Greenway DL, England RR. (1999) ppGpp accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* subjected to nutrient limitation and biocide exposure. *Lett Appl Microbiol* **29**:298-302.
- Gunsalus, R. P. (1992) Control of electron flow in *Escherichia coli*: Coordinated transcription of respiratory pathway genes. *J Bacteriol* **174**: 7069-7074.
- Herendeen, S. L., R. A. Van Bogelen, and F. C. Neidhardt. (1979) Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J Bacteriol* **139**: 185-194.

- Hernandez VJ, Bremer H. (1990) Guanosine tetraphosphate (ppGpp) dependence of the growth rate control of *rrnB* P1 promoter activity in *Escherichia coli*. *Biol Chem* **265**:11605-14.
- Holms H. (1996) Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **19**:85-116
- Hsieh, L. S., J. Rouviere-Yaniv, and K. Drlica. (1991) Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP] ratio: changes associated with salt shock. *J Bacteriol* **173**: 3914-3917.
- Hsieh, L. S., R. M. Burger, and K. Drlica. (1991) Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP] changes associated with a transition to anaerobic growth. *J Mol Biol* **219**: 443-450.
- Hu Z, Saez C, Lutkenhaus J. (2003) Recruitment of MinC, an inhibitor of Z-ring formation, to the membrane in *Escherichia coli*: role of MinD and MinE. *J Bacteriol* **185**: 196-203.
- Ingraham, J. (1987) Effect of temperature, pH, water activity, and pressure on growth. p. 1543-1554. In F. C.
- Ishizuka, H., A. Hanamura, T. Inada and H. Aiba. (1994) Mechanism of the down-regulation of cAMP receptor protein by glucose in *Escherichia coli*: role of autoregulation of *crp* gene. *EMBO J* **13**: 3077-3082.
- Jesen, P. R., L. Loman, B. Petra, C. Weijden and H. V. Westerhoff. (1995) Energy buffering of DNA structure fails when *Escherichia coli* runs out of substrate. *J Bacteriol* **177**: 3420-3426.
- Joseleau-Petit D, Vinella D, D'Ari R. (1999) Metabolic alarms and cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 9-14.
- Khattar MM, Addinall SG, Stedul KH, Boyle DS, Lutkenhaus J, Donachie WD. (1997) Two polypeptide products of the *Escherichia coli* cell division gene *ftsW* and a possible role for FtsW in FtsZ function. *J Bacteriol* **179**: 784-793.
- Koebmann BJ, Westerhoff HV, Snoep JL, Nilsson D, Jensen PR. (2002) The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J Bacteriol* **184**: 3909-3916.
- Korge, P., S. K. Byrd and K. B. Campbell. (1993) Functional coupling between

- sarcoplasmic-reticulum-bound creatine kinase and Ca(2+)-ATPase. *Eur J Biochem* **213**: 973-980.
- Lackner LL, Raskin DM, de Boer PA. (2003) ATP-dependent interactions between *Escherichia coli* Min proteins and the phospholipid membrane in vitro. *J Bacteriol* **185**: 735-749.
- Lee, J. M. (1992) *Biochemical Engineering* Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. Y.
- Liu, L. F. and J. C. Wang. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci* **84**: 7024-7027.
- Lutkenhaus JF, Wolf-Watz H, Donachie WD. (1980) Organization of genes in the *ftsA-envA* region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new *fts* locus. *J Bacteriol* **142**: 615-620.
- Menzel, R., and M. Gellert. (1983) Regulation of genes for *Escherichia coli* DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling. *Cell* **34**: 105-113.
- Miller, W. G., and R. W. Simons. (1993) Chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **10**: 675-684.
- Mizushima, T., K. Kataoka, Y. Ogata, R. Inoue and K. Sekimizu. (1997) Increase in negative supercoiling of plasmid DNA in *Escherichia coli* exposed to cold shock. *Mol Microbiol* **23**: 381-386.
- Mojica, F. J. M. and C. F. Higgins. (1996) Localized domains of DNA supercoiling topological coupling between promoters. *Mol Microbiol* **22**: 919-928.
- Monzel, R. and M. Gellert. (1987) Fusions of the *Escherichia coli* *gyrA* and *gyrB* control regions and galactokinase gene are inducible by coumermycin treatment. *J Bacteriol* **169**: 1272-1278.
- Murray KD, Bremer H. (1996) Control of *spoT*-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **259**: 41-57.
- Navarro F, Robin A, D'Ari R, Joseleau-Petit D. (1998) Analysis of the effect of ppGpp on the *ftsQAZ* operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **29**: 815-823.
- Neidhardt F. C., *et al.*, (1990) Physiology of the bacterial cell: a molecular approach. U.S.A. *Sinauer Associates*.
- Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H.E. Umbarger(ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and

- molecular biology. Vol. 2. American Society for Microbiology, Washington D. C.
- Ng, H., J. L. Ingraham and A. G. Marr. (1962) Damage and depression in *Escherichia coli* resulting from growth at low temperatures. *J. Bacteriol* **84**: 331-339.
- Nilsson, G., J. G. Belasco, S. N. Cohen, and A. von Gabain. (1984) Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*. *Nature* **312**: 75-77
- Notley-McRobb, L., A. Death and T. Ferenci. (1997) The relationship between external glucose concentration and cAMP level inside *Escherichia coli*: implications for models of phosphotransferase-mediated regulation of adenylate cyclase. *Microbiology* **143**:1909-1918.
- Ogata, Y., Y. Mizushima, K. Kataoka, T. Miki and K. Sekimizu. (1994) Identification of DNA topoisomerase involved in immediate and transient DNA relaxation induced by heat shock in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **244**: 451-455.
- Oh MK, Rohlin L, Kao KC, Liao JC. (2002) Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**:13175-13183.
- Ohlsen KL, Gralla JD. (1992) Interrelated effects of DNA supercoiling, ppGpp, and low salt on melting within the *Escherichia coli* ribosomal RNA *rrnB* P1 promoter. *Mol Microbiol* **6**: 2243-2251.
- Park, S. J., C. P. Tseng, and R. P. Gunsalus. (1995) Regulation of succinate dehydrogenase (*sdh CDAB*) operon expression in *Escherichia coli* in response to carbon supply and anaerobiosis: role of *arcA* and Fnr. *Mol Microbiol* **15**: 473-482.
- Park, S. J., P. A. Cotter, and R. P. Gunsalus. (1995) Regulation of malate dehydrogenase (*mdh*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon, and heme availability. *J Bacteriol* **177**: 6652-6656.
- Pichoff S, Lutkenhaus J. (2001) *Escherichia coli* division inhibitor MinCD blocks septation by preventing Z-ring formation. *J Bacteriol* **183**: 6630-6635.
- Powell BS, Court DL. (1998) Control of *ftsZ* expression, cell division, and glutamine metabolism in Luria-Bertani medium by the alarmone ppGpp in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 1053-1062.
- Pruss, G. J. and K. Drlica. (1989) DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* **56**: 521-523.

- Rasmussen, L. J., A. Lobner-Olesen and M. G. Marinus. (1995) Growth-rate-dependent transcription initiation from the *damP2* promoter. *Gene* **157**: 213-215.
- Richey DP and Lin EC. (1972) Importance of facilitated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **112**: 784-790.
- Rohwer, J. M., P. R. Jense, Y. Shinohara, P. W. Postma and H. V. Westerhoff. (1996) Changes in the cellular energy state affect the activity of the bacterial phosphotransferase system. *Eur J Biochem* **235**: 225-230.
- Romberg L, Levin PA. (2003) Assembly dynamics of the bacterial cell division protein FtsZ: poised at the edge of stability. *Annu Rev Microbiol* **57**:125-154.
- Rothfield, L.I. and Garcia-Lara, J. (1996) Cell division. In regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Lin, E.C.C., and Lynch, A.S. (eds). New York: Chapman & Hall, pp. 547-569.
- Rowley, D. L., A. J. Pease. and R. E. Wolf. JR. (1991) Genetic and physical analyses of growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli zwf* expression. *J Bacteriol* **173**: 4660-4667.
- Rueda S, Vicente M, Mingorance J. (2003) Concentration and assembly of the division ring proteins FtsZ, FtsA, and ZipA during the *Escherichia coli* cell cycle. *J Bacteriol* **185**: 3344-3351.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- de Boer M, Broekhuizen CP, Postma PW. (1986) Regulation of glycerol kinase by enzyme III<sub>Glc</sub> of the phosphoenopyruvate carbohydrate phosphotransferase system. *J Bacteriol* **167**: 393-395.
- Sanno Y, Wilson TH, Lin EC. (1968) Control of permeation to glycerol in cells of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **32**: 344-349.
- Schreiber G, Ron EZ, Glaser G. (1995) ppGpp-mediated regulation of DNA replication and cell division in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 1995 **30**: 27-32.
- Sinden, P. P., and D. E. Pettijohn. (1981) Chromosomes in living *Escherichia coli* cell are segregated into domains of supercoiling. *Proc Natl Acad Sci* **78**: 224-228.
- Stryer, L. (1995) *Biochemistry*. 4th. New York.. W. H. Freeman and Company.

- Tse-Dinh, Y. (1985) Regulation of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene by DNA supercoiling. *Nucleic Acid Res* **13**: 4751-4763.
- Tse-Dinh, Y., and R. Beran. (1988) Multiple proteins for transcription of the *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene and their regulation by DNA supercoiling. *J Mol Biol* **202**: 735-742.
- Tseng, C. P., A. K. Hansen, P. Cotter and R. P. Gunsalus. (1994) Effect of cell growth rate on expression of the anaerobic respiratory pathway operons *frdABCD*, *dmsABC*, and *narGHI* of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 6599-6605.
- Tseng CP, Yu CC, Lin HH, Chang CY, Kuo JT. (2001) Oxygen- and growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (FumA, FumB, and FumC) activity. *J Bacteriol* **183**: 461-467.
- Voegelé, R. T., G. D. Sweet and W. Boos. (1993) Glycerol kinase of *Escherichia coli* is activated by interaction with the glycerol facilitator. *J Bacteriol* **175**: 1087-1094.
- Vogel, U., and F. Jensen. (1994) The RNA chain elongation rate in *Escherichia coli* depends on the growth rate. *J Bacteriol* **176**: 2807-2813
- Wang, D. I. C., C. L. Cooney, A. L. Demain, P. Dunnill, A. E. Humphrey, and M. D. Lilly. (1981) *Fermentation and enzyme technology*. John Wiley & Sons. Inc. Canada.
- Wang, J. C. (1985) DNA topoisomerases. *Ann Rev Biochem* **54**: 665-697
- Wold, S., K. Skarstad, H. B. Steen, T. Stokke, and E. Boye. (1994) The initiation mass for DNA replication in *Escherichia coli* K12 is dependent on growth rate. *EMBO J* **13**: 2097-2102.
- Wolf, R. E., Jr., D. M. Prather, and F. M. Shea. (1979) Growth- rate-dependent alteration of 6-phosphogluconate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase levels in *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol* **139**: 1093-1096
- Worcel, A., and E. Burgi. (1972) On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **71**: 127-147.
- Workum, M., S. J. M. Dooren, N. Oldenburg, D. Molenaar, P. R. Jesen, J. L. Snoep and H. V. Westerhoff. (1996) DNA supercoiling depends on the phosphorylation potential in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**: 351-360.
- Workum, M., S. J. M. Dooren, N. Oldenburg, D. Molenaar, P. R. Jesen, J. L. Snoep

- and H. V. Westerhoff. (1996) DNA supercoiling depends on the phosphorylation potential in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**: 351-360.
- Wu, H. Y., S. Shyy, J. C. Wang and L. F. Liu. (1988) Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell* **53**: 433-440.
- Xiao H, Kalman M, Ikehara K, Zemel S, Glaser G, Cashel M. (1991) Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J Biol Chem* **266**: 5980-5990.
- Xu J, Tozawa Y, Lai C, Hayashi H, Ochi K. (2002) A rifampicin resistance mutation in the *rpoB* gene confers ppGpp-independent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Genet Genomics* **268**: 179-189.
- Yamagish, M., H. Marsushima, A. Wada, W. Sakagami, N. Fujita and A. Ishihama. (1993) Regulation of the *Escherichia coli* *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor: growth- and growth rate-dependent control. *EMBO J* **12**: 625-630.
- Young KD. (2003) Bacterial shape. *Mol Microbiol* **49**: 571-580.
- Zhulin, I. B., E. H. Rowell, M. S. Johnson and B. L. Taylor. (1997) Glyceol elicits energy taxis of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **179**: 3196-3201.
- 張育甄，(1998) 生長速率對大腸桿菌能量狀態、DNA 超螺旋結構與 cAMP 濃度調控之研究，國立交通大學生物科技研究所，碩士論文。
- 林楨桓，(1997) 細胞生長速率對大腸桿菌 DNA 超螺旋結構、ATP/ADP 比例、*lacZ* 基因表現影響之研究，國立交通大學，碩士論文。