

國立交通大學

生物科技學系

碩士論文

克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中  
RcsFCDB 訊息傳遞所扮演的角色  
**Roles of RcsFCDB signaling relay  
in *Klebsiella pneumoniae* CG43**

研究生：彭冠男

**Student: Kuan-Nan Peng**

指導教授：彭慧玲 博士

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

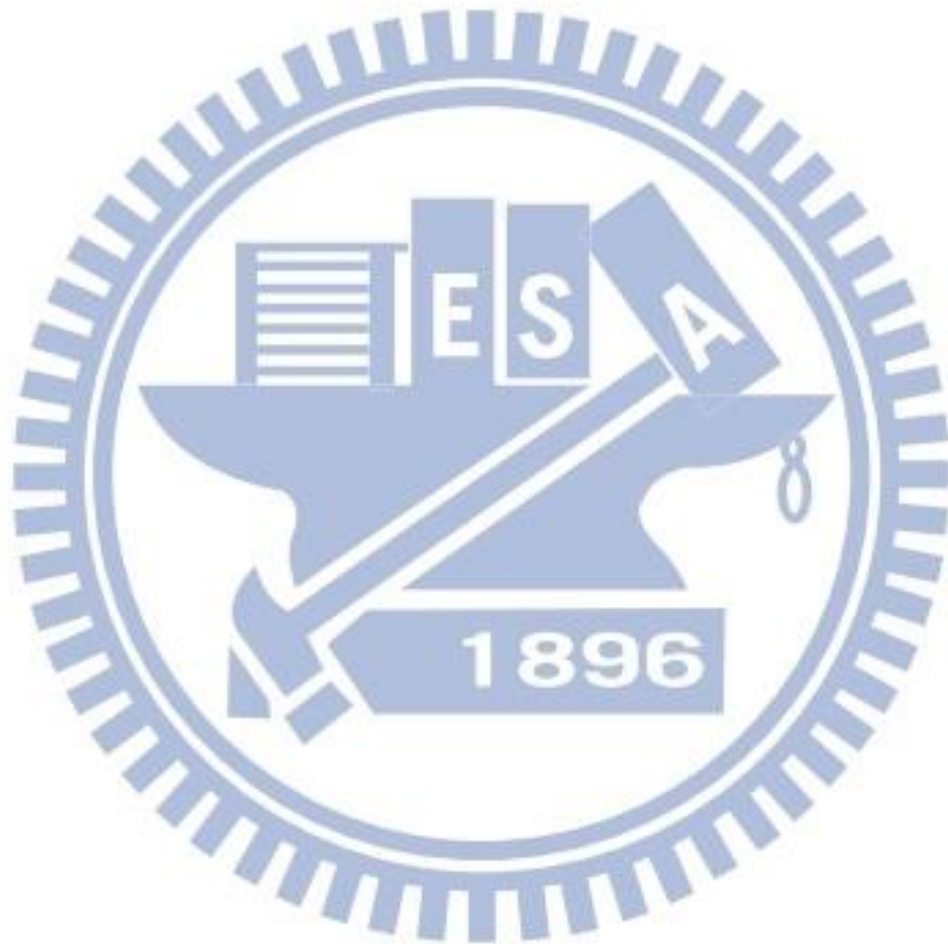
中華民國一百零二年六月

**June, 2013**

## 中文摘要

RcsFCDB 磷酸根傳遞系統最早被發現可調控細菌莢膜的生合成，近年來陸續有研究報導此訊息傳遞系統也參與了鞭毛的形成、泳動力及 O 抗原鏈的生成等與細菌毒性相關的調控。RcsF 脂質蛋白位於外膜；RcsC 及 RcsD 位於內膜，分別具有組氨酸激酶和組氨酸轉移酶活性；RcsB 是細胞質中的反應調節蛋白。前期實驗室成員的研究發現克雷白氏肺炎桿菌 CG43 其 *rscB* 基因缺損會降低莢膜多醣體含量、酸性逆境存活率、膜間質扮隨蛋白 YfdX 及第三型線毛單位蛋白 MrkA 的生成量，本論文探討 RcsF、RcsC 及 RcsD 蛋白對此磷酸根傳遞途徑下游的 RcsB 調控功能的影響。首先，我以同源互換原理建構了克雷白氏肺炎桿菌 CG43 $\Delta$ *rscC*、CG43 $\Delta$ *rscD*、CG43 $\Delta$ *rscD-hk*、CG43 $\Delta$ *rscD-hpt*、CG43 $\Delta$ *rscF*、CG43 $\Delta$  $\Delta$ *rscCrcsF* 突變株，並進一步分析比較這些突變菌株與 CG43 $\Delta$ *rscB* 表現型的差異後發現：CG43 $\Delta$ *rscD* 與 CG43 $\Delta$ *rscB* 有相同的表現型，而 CG43 $\Delta$ *rscC* 與 CG43 $\Delta$ *rscF* 的莢膜多醣與 MrkA 的生成量沒有明顯變化；過度表達 RcsC 會增加莢膜多醣生成量；*rscF* 基因缺失會使細菌失去偵測多黏菌素壓力的能力，CG43 $\Delta$ *rscD* 與 CG43 $\Delta$ *rscB* 酸壓力下存活率下降。接著，我以 LacZ 報導系統及定量 PCR 分析啟動子活性，結果顯示啟動子  $P_{rscB}$  活性遠高於  $P_{rscC}$ 、 $P_{rscDB}$  及  $P_{rscF}$  三個啟動子，而  $P_{rscB}$ 、 $P_{rscDB}$ 、 $P_{rscF}$  會被弱酸誘

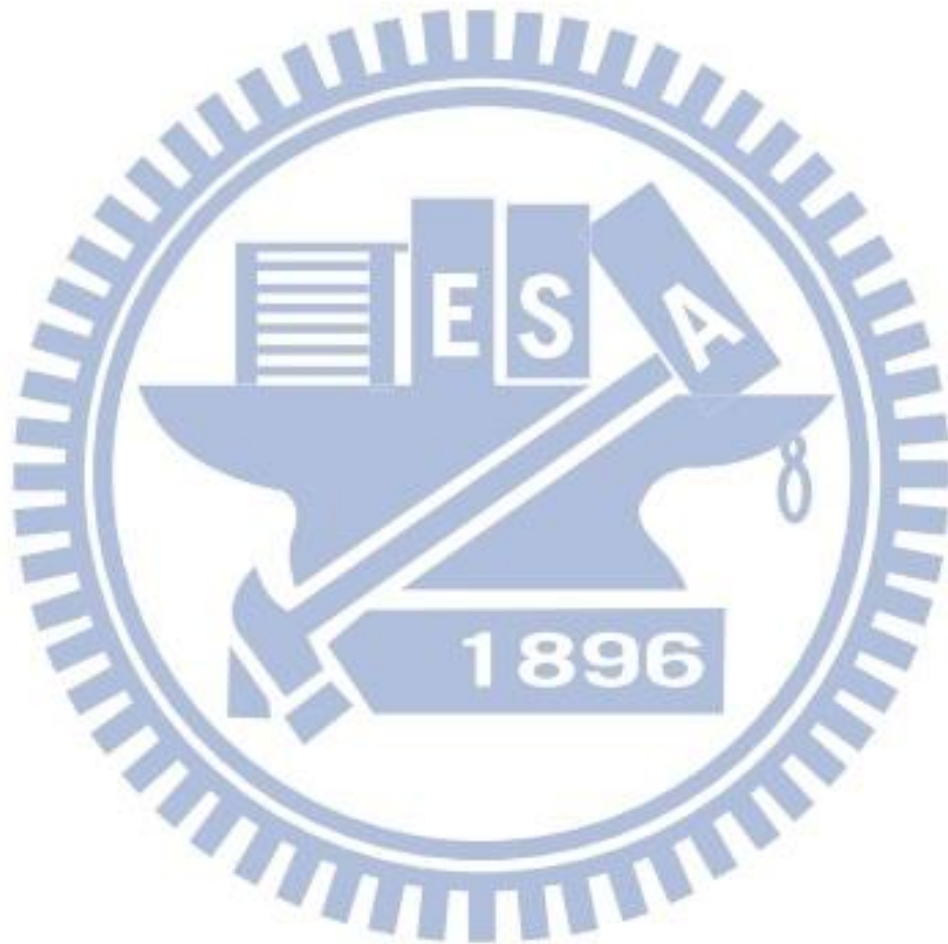
導； $P_{rcsB}$ 、 $P_{rcsC}$ 、 $P_{rcsF}$  會被多黏菌素所誘導。最後，體外磷酸轉移系統建立的結果顯示：磷酸根染劑 ProQ 將來可以做為探討磷酸根自 RcsC 經由 RcsD 至 RcsB 傳遞路徑的標記。



## Abstract

The RcsFCDB phosphorelaying system originally identified as a regulator of capsule synthesis (Rcs) is also involved in regulation of the expression of other virulence properties including flagella production, swimming motility, and O-antigen chain length control. RcsF is a periplasmic lipoprotein; RcsC and RcsD are two inner membrane proteins respectively exerting histidine kinase (Hk) and histidine phosphotransfer (Hpt) activity; RcsB is a cytoplasmic response regulator. We have previously shown that the deletion of *rcsB* from *Klebsiella pneumoniae* CG43S3 reduced the levels of not only the capsular polysaccharide (CPS) biosynthesis but also the type 3 fimbriae major pilin MrkA production and the acid stress response. Here we investigate if the regulatory activity of RcsB could be correlated to the RcsFCD phosphorelay. Firstly, we generate *K. pneumoniae* CG43S3 $\Delta$ *rcsF*, CG43S3 $\Delta$ *rcsC*, CG43S3 $\Delta$ *rcsD*, CG43 $\Delta$ *rcsD-hk*, and CG43 $\Delta$ *rcsD-hpt*, and compare their deletion effects with those of CG43S3 $\Delta$ *rcsB*. The results showed that CG43S3 $\Delta$ *rcsD* exerted a similar phenotype as that of CG43S3 $\Delta$ *rcsB*. However, the deletion of *rcsF* or *rcsC* had no apparent effect on the production of CPS or MrkA; overexpression of RcsC increased the CPS production; deletion of *rcsF* rendered the bacteria insensitive to polymyxin B stimulation. We have also measured the gene expression using promoter reporter assay and qRT-PCR analysis. The results revealed that  $P_{rcsB}$  had much higher activity than the activity of  $P_{rcsB}$ ,  $P_{rcsDB}$ , and  $P_{rcsF}$  could be induced by

weak acid while  $P_{rcsC}$ ,  $P_{rcsB}$ , and  $P_{rcsF}$  were polymyxin B inducible. Finally, the set up *in vitro* phosphorelay system revealed that the non-specific dye ProQ could be used to determine the phosphorelaying activity between the signal transferred from RcsC, RcsD to RcsB.



## 致謝

時間飛快，兩年的時間一下就過去了。現在，我也即將帶著滿滿的收穫離開校園，步入社會。

很開心可以加入彭家這一個大家庭。在這兩年中我最感謝的人是我的指導教授彭慧玲老師，每周彭老師總會撥出時間與我討論、整理結果，並在實驗給予意見；在我實驗困惑時，也總會像一盞明燈般的給予新的方向、新的想法。老師不厭其煩的教導以及每次實驗室的新聞翻譯、論文討論給予我扎實的訓練，使我受益良多。除此之外，老師也教導了許多處事該有的態度及道理，可以遇到如此認真的老師，我心中滿滿的感激。

感謝清華大學張晃猷老師以及交通大學梁美智老師，在百忙之中撥冗擔任我的口試委員，用心的修正我論文中的錯誤及指點我實驗中未曾想過的盲點。以及感謝清華大學張晃猷老師實驗室的夥伴，在實驗上給予諸多的建議及幫助。

感謝實驗室的大夥，因為有你們，這本論完才可以順利完成，也因為你們，這兩年的生活才會如此多采多姿。帥氣的健誠學長，在我剛進入實驗室時，耐心仔細的指導，讓我可以順利的進行研究；美麗的靜柔學姐，在實驗中我有任何的問題，你總不厭其煩的幫忙解決，一定先處理完學弟妹的問題才會繼續忙自己的事；哲充學長、舉豪學長、大熊學長、力成學長、小波學姐在實驗中給予了很多幫助；老朋友一般的偉豐，總是削出一盤盤完美的水果，並和我一起運動，雖然沒瘦下來；神經跟烏賊一樣粗的惠瑜，總為實驗室帶來歡笑；傻大姐珍儀，因為你我愛上吃素；認真的俐君，總是最捧場我的笑話；還有

碩班中最重要的兩個同學燕曦以及子祥，你們兩個總是和我一起討論實驗，無私的與我分享實驗經驗，一起面對生活上大大小小的事情，並一起在大考前一起 Overnight，考完試後一起唱 K、一起吃猛的、一起嗨，如今，這一些將成為我們美麗的回憶。也因為有你們，我的碩班生涯充滿精彩，謝謝你們，伴我一同寫下人生美好的一頁。

感謝慈濟大學的劉怡均老師啟蒙我對生科的熱愛，不只溫柔的指導，還時常教導氣質的品德。感謝劉老師實驗室的纖婷、妮均學姐、睿哲學姐、小花學姐、耀華學長、若羽學姐、盈瑜同學在我最辛苦時給予最有力的幫助；在學習之路中，也給予大量的建議與指導。

感謝我的好朋友世穎，不只常給我借宿，你那異於常人的 GPS 導航功能，讓我遠離迷路；還有感謝你幫忙了生活中大大小小的事情。

最後我要感謝我的家人，爸鼻榮本、媽迷美玉以及小妹乃欣，每周總是準備大袋小袋的水果；總是整理好我的盥洗衣物，因為你們默默的付出及全力相挺，讓我衣食無缺，我的碩班生涯才會如此順遂。

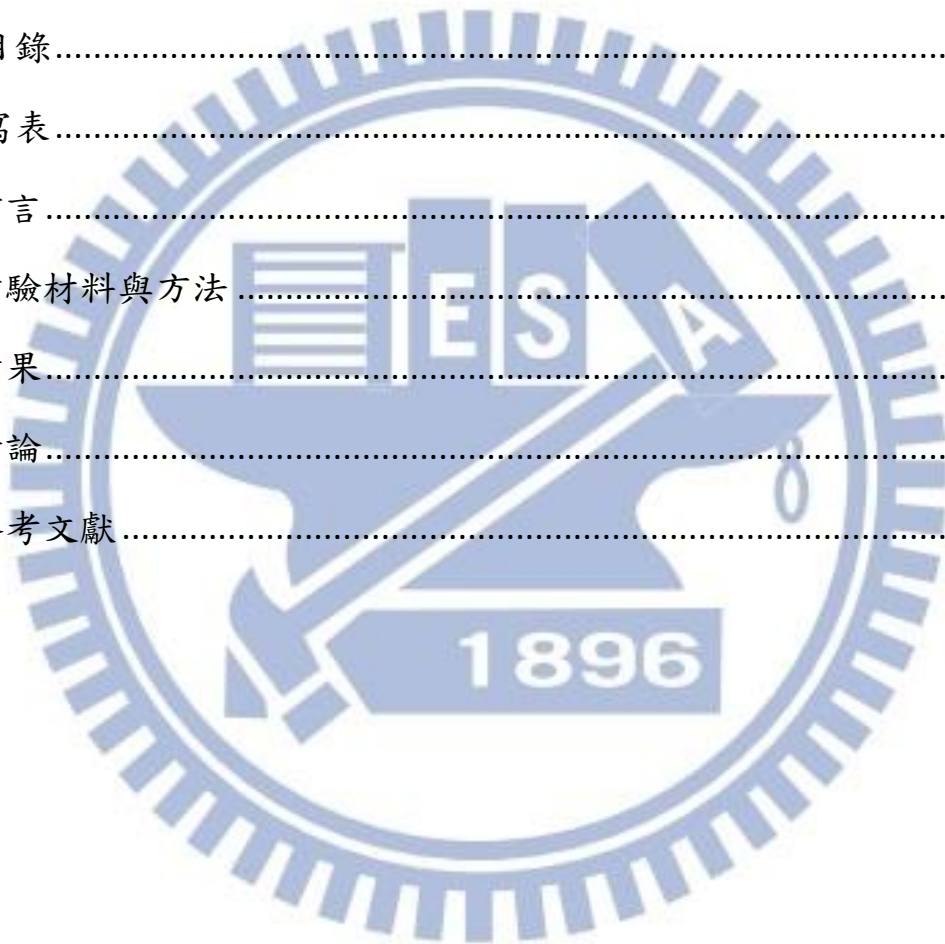
最後，我即將邁向人生的另一段旅程，我會繼續努力，因為機會是留給準備好的人，與大家共勉！

冠男

民國一百零二年八月一日筆於交通大學竹銘館分子調控實驗室

# 目錄

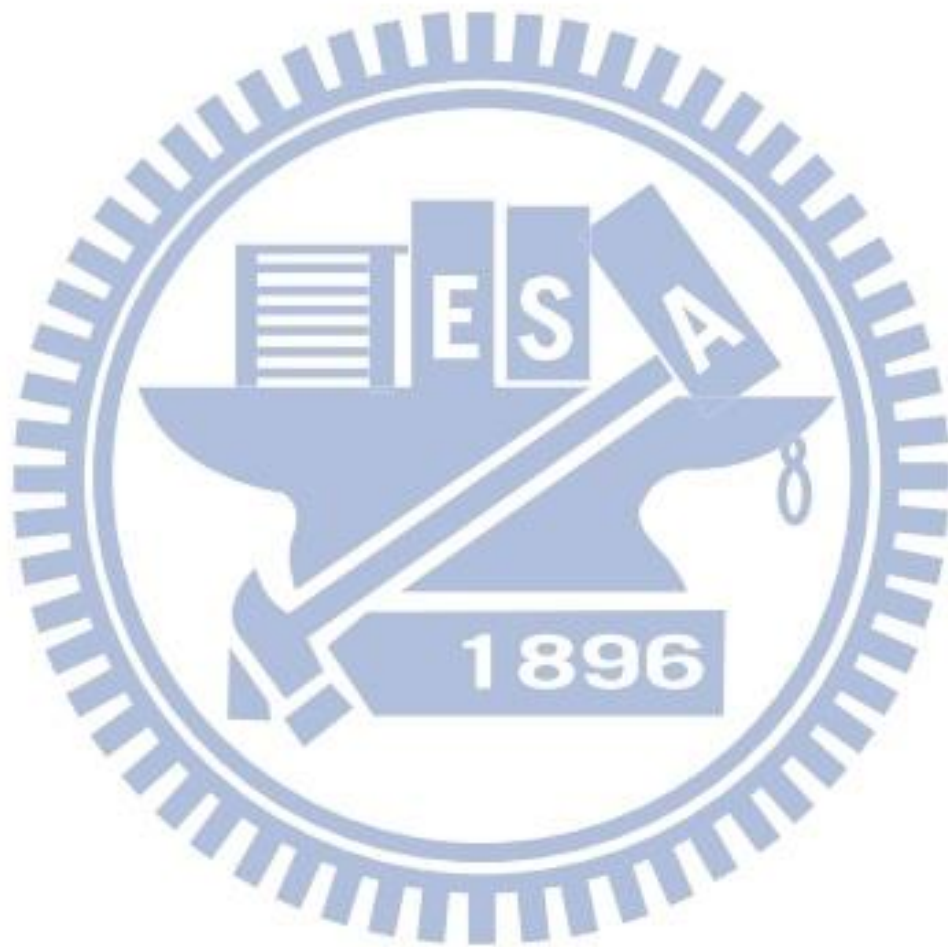
中文摘要 .....	ii
Abstract .....	iv
致謝 .....	ivi
目錄 .....	viii
表目錄 .....	ixx
圖目錄 .....	x
縮寫表 .....	xii
1.前言 .....	1
2.實驗材料與方法 .....	9
3.結果 .....	16
4.討論 .....	24
5.參考文獻 .....	28





## 表目錄

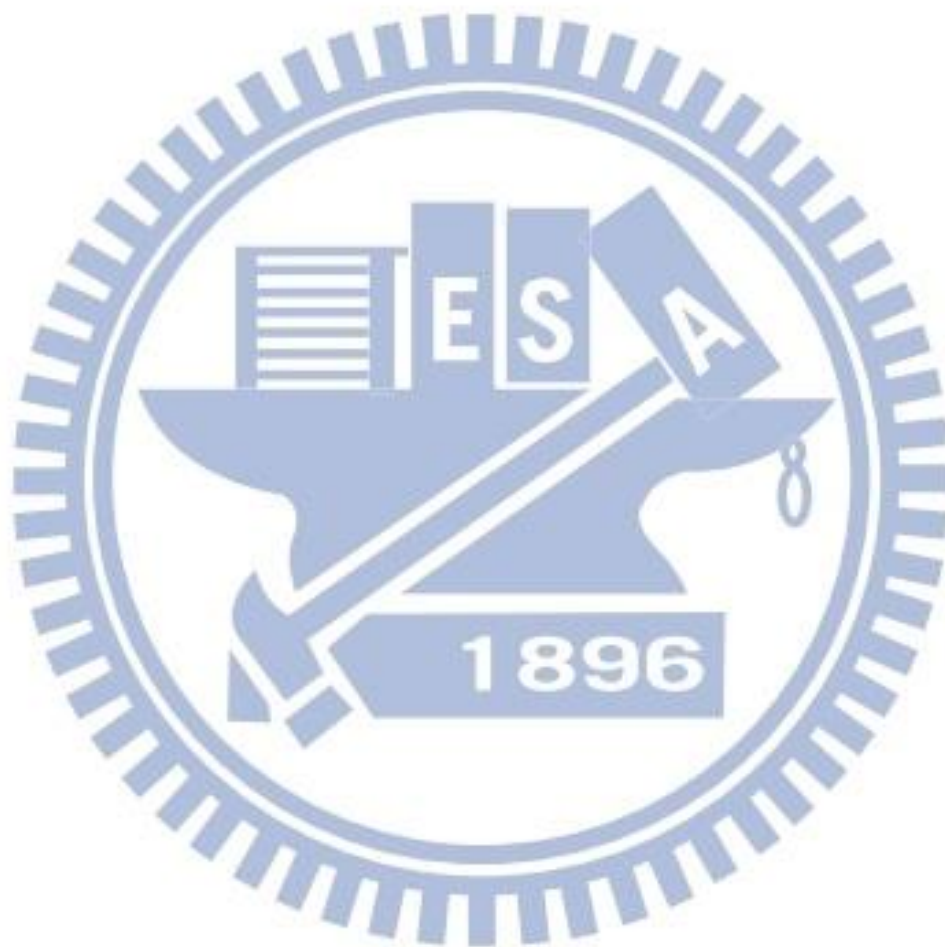
表一、本研究所使用的菌株 .....	36
表二、本研究所使用的質體 .....	37
表三、本研究所使用的引子 .....	39



## 圖目錄

圖一、Rcs C 及 RcsD 蛋白質功能區域預測 .....	41
圖二、建構 <i>rscC</i> 基因缺損突變株 .....	42
圖三、建構 <i>rscD</i> 、 <i>rscD-hk</i> 及 <i>rscD-hpt</i> 基因缺損突變株 .....	45
圖四、建構 <i>rscF</i> 、 <i>rscCrcsF</i> 基因缺損突變株 .....	47
圖五、 <i>rscB</i> 、 <i>rscC</i> 、 <i>rscD</i> 及 <i>rscF</i> 基因缺損株的生長曲線和菌落型態 .....	49
圖六、 <i>rscB</i> 、 <i>rscC</i> 、 <i>rscD</i> 及 <i>rscF</i> 基因缺損株對莢膜表現的影響 .....	50
圖七、 <i>rscD</i> 及 <i>rscD Hpt</i> 基因缺損株莢膜表現量下降 .....	51
圖八、 <i>rscCrcsF</i> 雙基因缺損突變株對莢膜生合成沒有影響 .....	52
圖九、 <i>rscB</i> 、 <i>rscC</i> 、 <i>rscD</i> 及 <i>rscF</i> 基因缺損株對多粘菌素 B 的敏感度 .....	53
圖十、 <i>rscB</i> 及 <i>rscD</i> 基因缺損株後第三型線毛 MrkA 單位蛋白生成量下降 .....	54
圖十一、 <i>rscB</i> 、 <i>rscC</i> 、 <i>rscD</i> 及 <i>rscF</i> 基因缺損株對生物膜型成的影響 .....	56
圖十二、RcsC 大量表達使對莢膜表現增加以及 MrkA 表達量上升 .....	57
圖十三、回補 RcsD 以及 RcsD Hk 區域莢膜表現量 .....	58
圖十四 A、 <i>rscB</i> 、 <i>rscC</i> 、 <i>rscD</i> 及 <i>rscF</i> 基因缺損株後酸性環境下的存活率 ...	59
圖十四 B 以及 C、 <i>rscB</i> 、 <i>rscC</i> 、 <i>rscD</i> 及 <i>rscF</i> 基因缺損株對膜間質伴隨蛋白 YfdX 蛋白表達量 .....	61
圖十五、 <i>rscB</i> 、 <i>rscC</i> 、 <i>rscD</i> 及 <i>rscF</i> 啟動子分析及建構 .....	62
圖十六、微酸或多黏素處理下 <i>rscB</i> 、 <i>rscC</i> 、 <i>rscD</i> 及 <i>rscF</i> 啟動子活性變化 .....	65
圖十七 A 及 B、RcsC Hpt 區域蛋白於 Pro-Q 呈色劑染色結果 .....	66
圖十七 C 及 D、RcsC Hk 區域蛋白於 ATP 處理後 Pro-Q 呈色劑染色結果 .....	68
圖十八、RcsC Hk 與 RcsC Hpt 區域蛋白混和後於 ATP 處理後 Pro-Q 呈色劑染色結 果 .....	70

附圖一、MrkA 基因的缺損降低 YfdX 的表現量.....	73
附圖二、 <i>rscB</i> 或 <i>yfdX</i> 基因的缺損降低 CG43S3 的抗酸能力 .....	74
附圖三、 <i>rscB</i> 基因的缺損降低 YfdX 的表現量 .....	75
附圖四、沙門氏菌 RcsFCDB 系統的調控方式 .....	76



## 縮寫表

AFI	<u>a</u> cid <u>f</u> itness <u>i</u> sland
BCIP	5- <u>b</u> romo-4- <u>c</u> hloro-3- <u>i</u> ndolyl phosphate
bp	<u>b</u> ase <u>p</u> airs
cDNA	<u>c</u> omplementary <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
CFU	<u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nit
CPS	<u>c</u> apsular <u>p</u> olysaccharide
DTT	<u>d</u> ithio <u>t</u> hreit <u>o</u> l
Hk	<u>H</u> istidine <u>k</u> inase
Hpt	<u>H</u> istidine <u>p</u> hospho <u>t</u> ransferase
IPTG	<u>I</u> sopropyl $\beta$ -D- <u>T</u> hiogalactopyranoside
LB	<u>l</u> ipopolysaccharide
LPS	<u>l</u> ipopolysaccharide
ONPG	<u>o</u> - <u>n</u> itrophenyl- $\beta$ -D- <u>g</u> alactopyranoside
PCR	polymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
Rcs	<u>r</u> egulator of <u>c</u> apsular <u>s</u> ynthesis
RR	Response regulator
rpm	<u>r</u> evolution per <u>m</u> inute
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
SPI	<u>S</u> almonella pathogenicity <u>i</u> sland
TCS	<u>t</u> wo <u>c</u> omponent <u>s</u> ystem

# 1.前言

## 1.1 克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)

克雷白氏肺炎桿菌為一株革蘭氏陰性菌，屬於腸內菌科 (*Enterobacteraceae*)，是常見的伺機性感染病原，常在人體的皮膚、口腔、腸道當中被發現，對於免疫缺失之病人常有嚴重的感染。在臨床上克雷白氏肺炎桿菌會引起肺炎、腦膜炎、尿道感染、特定部位的化膿性感染以及菌血症，如不加以治療，會有相當高的致死率，而它也是造成群聚感染及院內感染常見的病原菌之一[5-7]。在台灣，糖尿病患者，合併肝膿瘍 (Liver Abscess) 的致病菌株分析中發現，克雷白氏肺炎桿菌佔所有分離菌株的 97%，而大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 與其他的腸內菌分別只佔 1 至 2 個百分比，這個現象與西方國家的肝膿瘍現象不大相同，在西方國家導致肝膿瘍的致病菌株通常以大腸桿菌、鏈球菌 (*Streptococcus spp.*) 和厭氧菌為主。因此，克雷白氏肺炎桿菌在台灣地區，獨特感染的行為逐漸引起廣泛注意[5-7]。

克雷白氏肺炎桿菌常見的毒性因子有：多醣莢膜 (Capsular polysaccharides, CPS)、脂多醣 (Lipopolysaccharide, LPS)、黏附因子 (Adhesins) 與鰲鐵蛋白，把這些毒性因子分為三大類：一、細菌表面抗原：莢膜多醣體，厚重的莢膜可使細菌具有躲避補體系統 (Complement system) 與抗吞噬 (Anti-phagocytosis) 的能力；此外，脂多醣體 (Lipopolysaccharides) 除了具有類似莢膜的作用以外，亦會引發宿主產生敗血性休克的強烈免疫反應[5,8]。二、黏附因子：可以有辨識宿主表面上的特殊受器，並且專一性的黏附於宿主或是環境中，例如第一型線毛 (Type 1 fimbriae) 和第三型線毛 (Type 3 fimbriae)

以及非線毛型的黏附蛋白 CF29K 與 KPF28[9-11]。三、細菌競爭宿主体內鐵質的能力：又稱為獲取鐵的系統 (Iron acquisition system)，主要為鐵載體 (Siderophores)，此類小分子對鐵離子具有非常高的親和力，有能力競爭結合在宿主蛋白質上的鐵離子，目前在克雷白氏肺炎桿菌中被報導的有 enterochelin 及 aerobactin[12,13]。大多數克雷白氏肺炎桿菌的表層都具有很厚的莢膜，而使菌落型態呈現圓潤、光滑並且具有高度的黏性，目前被分離出的莢膜血清型約 77 種[14]，其中以 K1 (capsular type 1) 及 K2 (capsular type 2) 毒性最高，也是造成肝膿瘍主要的血清型。

肝膿瘍是病原菌在肝臟內增殖造成結構破壞形成空腔，而在空腔中有濃汁形成的一種疾病。形成肝膿瘍有兩個先決條件，一是病人本身的免疫系統功能低下，致使肝臟易受病原菌的攻擊；二是病人體內某處有感染，且不斷將細菌送出，再透過各種管道到達肝臟實質內增殖。免疫系統健全的肝臟內部是呈現無菌狀態，因為它具有防禦細胞，可將進入的病原菌過濾並消滅之。但是，病人如果因為年紀大，或是患有會使免疫功能低下的疾病，如：糖尿病、愛滋病時，會使肝臟的防禦功能降低而曝露於易受攻擊的狀態[15]。研究指出克雷白氏肺炎桿菌 K1 血清型主要造成原發性肝膿瘍 (Primary liver abscess)，而 K2 血清型則是導致次發性肝膿瘍 (Secondary liver abscess) 的主因[16]。在本實驗中，所使用的克雷白氏肺炎桿菌 CG43 是長庚大學由肝膿瘍病患中分離出的 K2 血清型菌株，對於 BALB/c 小鼠有很高的毒性，LD<sub>50</sub> 只有 10 菌落形成單位 (Colony forming units, CFU) [17]。

## 1.2 莢膜功能與合成

許多細菌的表面具有大量的多醣體 (Polysaccharides)，這些被稱為糖被 (Glycocalyx) 的多醣體可以幫助細菌在惡劣的環境下生存及抵抗宿主免疫細胞的攻擊。而糖被的結實或鬆散可構成莢膜或黏膜 (Slime layer) 兩種結構。克雷白氏肺炎桿菌的莢膜多糖體為重複單元 (Repeat units) 所聚合而成，K1 莢膜多糖體構成單元為  $[\rightarrow 4)\text{-}[2,3\text{-}(\text{S})\text{-pyruvate}]\text{-}\beta\text{-GlcA}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Fuc}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Glc}\text{-}(1)]_n$  [18]，而本實驗所使用菌株 K2 莢膜多糖體構成單元為  $[\rightarrow 4)\text{-Glu}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-Glc}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-Man}\text{-}(3\rightarrow 1)\text{-}\alpha\text{-GlcA}\text{-}(1\rightarrow)]_n$  [19]，K2 多醣莢膜類似大腸桿菌的第一型多醣莢膜 [20]。

莢膜生合成的調控在大腸桿菌中首次被報導，此系統因而得名 Rcs (Regulation of capsule synthesis system)，Rcs 為一雙分子調控系統，藉激酶傳遞磷酸根予反應蛋白 [21]。

## 1.3 雙分子調控系統 (Two-component regulatory system, TCS)

細菌、酵母菌可以藉細胞表面的激酶接收環境壓力，將訊號傳至下游的感應蛋白，而做出有效或快速的反應來因應其變化 [22]。此雙分子調控系統是一個刺激-反應的偶合機構，這一機構使生物體偵測訊息並且反應藉以對抗來自外界的環境的壓力 [23]。鑲嵌於細胞膜上的組胺酸激酶 (Histidine kinase, HK)，它可以偵測來自於環境中或細胞內的壓力，並且將訊號傳遞於相對應的反應調控因子 (Response regulator, RR) [24,25]；反應調控因子存在於細胞質當中，可以接受來自於組胺酸激酶的訊號，接收到訊號的反應調控因子會去與下游基因

結合，調控下游基因反應[24]。在大腸桿菌當中現有 29 個組胺酸激酶，以及 32 個反應調控因子以被發[26]。目前，像這樣的雙分子調控系統已廣泛的被發現在原核生物，也有少部分的雙分子調控系統在真核細胞中被確立[23,27]。

在雙分子調控系統中，訊息的傳遞通常是透過磷酸根的轉移。鑲嵌於細胞膜上的組胺酸激酶會水解三磷酸腺苷 (ATP) 使其組胺酸部位帶有磷酸根，並將磷酸根傳遞給下游，以上為一個自我磷酸化 (Phosphorylation) 的反應[28,29]。隨後，組胺酸激酶會利用磷酸的的傳遞活化下游反應調控因子的天冬氨酸殘基 (Aspartic acid residue)。被磷酸化後的應調控因子會產生構型的改變，通常被激活的反應調節子會產生一個與 DNA 結合的區域，接著利用與 DNA 的結合去活化或抑制目標基因[23,25]。有一些組胺酸激酶除了具有磷酸化外，還具有去磷酸化 (Dephosphorylation) 的雙重功能，而組胺酸激酶扮演的角色常常由環境的刺激來做決定[23]。

雙分子訊號傳導系統使細菌可以感覺、反應，適應各種來自於環境的壓力，並且成長[30]。有些細菌最多可以包含 200 套以上的雙分子系統，所以這一些系統需要嚴格監管，以避免系統間的相互干擾[31]。雙分子系統的調控途徑受到各式各樣的刺激，其中包括：營養物質的多寡、細胞的氧化還原狀態、滲透壓變化、抗生素、溫度高低、趨化因子、pH 值等[32,33]。

在雙分子訊號傳遞當中，常常會見到磷酸化中繼系統 (Phospho-relay system) 的存在，這套系統不僅混合了組胺酸激酶自我磷酸化的功能，還可以將磷酸根基團傳遞於下游接收的區域，而不單



單只將磷酸根基團傳遞於反應調節子。這一套系統稱之為組氨酸磷酸轉移酶 (Histidine phosphotransferase, Hpt)，可使其磷酸根在反應調控因子之中傳遞，扮演者激發下游的重要角色[34,35]。

#### 1.4 調控莢膜生合成的 RcsFCDB 系統

在大腸桿菌中，莢膜又稱為莢膜異多醣酸 (Colanic acid)，主要是由葡萄糖 (Glucose)、半乳糖 (Galactose) 和葡萄糖醛酸 (Glucuronic acid) 組合而成。野生型 (Wild-type) 的細胞當中，在正常的生活環境下，莢膜的合成並不豐富，但是在 *lon* (ATP-dependent cytoplasmic protease) 基因突變的菌株中發現莢膜的生成量有明顯的上升，研究結果也證明，*lon* 基因的突變會使參與莢膜形成的蛋白質表現量上升[36]。為了確認 *lon* 基因的表現途徑，使用了融合基因來篩選和選擇突變株，發現將其 *lon* 基因突變後會使其莢膜大量增加，代表者 *lon* 有直接或間接的調控莢膜生成[37]。利用乳糖操縱子 (Lac operon) 的融合發現了被 Lon 所抑制的基因，命名為 *cps*，將 *lon* 基因突變後發現 *cps* 表現量提升，再將 *lon* 基因突變的細胞做點突變，發現有兩個位置的基因突變後 *cps* 表現量反而下降，並將這兩個位置分別命名為 *rscA* (Regulator of capsule synthesis A) 與 *rscB* (Regulator of capsule synthesis B)；又在 *lon* 基因正常的細胞中進行點突變，發現一個位置突變後 *cps* 表現量大量提升，並且將此位置命名為 *rscC* (Regulator of capsule synthesis C) [38]。*rscA* 被發現會編碼出一個較不穩定的反應調控因子，他非常容易被 Lon 蛋白酶 (Protease) 給分解掉[39]。再進一步的基因分析和定序之後，也證明了 *rscC* 會轉錄出傳感蛋白激酶 (Sensor kinase)，*rscB* 會轉錄出反

應調控因子[21,40]。RcsA 會與 RcsB 形成同型二聚體 (Homodimer)，刺激 *cps* 基因轉譯，但 RcsA 較不穩定，容易被分解，所以他的表現水平偏低，而當 *lon* 被突變之後，RcsA 上升，莢膜表現就明顯上升[35]。

Rcs 系統是雙分子調控系統之一，它具有組胺酸激酶與反應調控因子，但它並不是一個簡單的雙分子傳遞系統。目前，此系統已被證明是一種多分子磷酸根傳遞 (multicomponent phosphorelay)，由細菌細胞外膜上的偵測子 (sensor) RcsF (Regulator of capsule synthesis F) 與細菌細胞內膜上的偵測子 RcsC (Regulator of capsule synthesis C) 接受來自於細胞外、細胞內的訊號，接著使 RcsC 自我磷酸化，並將磷酸根傳遞於下游的 RcsD (Regulator of capsule synthesis D)，RcsD 會將訊號傳遞於在最下游的反應調控因子 RcsB (Regulator of capsule synthesis B)，RcsB 可以單獨形成複合體影響下游；或與其他蛋白質結合，共同調控下游，使其反應。而這一套調控因子已被發現在致病的大腸桿菌、沙門氏菌 (*Salmonella*)、克雷白氏菌、志賀氏菌 (*Shigella*) 當中被發現。在目前的研究也發現，調控莢膜生合成系統不僅僅與莢膜生合成相關，還與鞭毛生合成 (Flagellum synthesis)、細菌細胞分裂 (Cell division)、細菌移動 (Motility) 有者密不可分的關係。

關於 Rcs 系統的分子活化訊號，目前仍不清楚；有文獻指出，大腸桿菌在低溫 (20°C)，且存在葡萄糖或高濃度鋅 (1 mM ZnCl<sub>2</sub>) 的環境下，會活化此套系統的表現 [41]；而多種與包膜壓力 (envelope stress) 有關的因子，及 *djlA*、*lola*、*ompG* 此三個基因的過量表現，也會活化此套系統 [42-47]。在大腸桿菌中，Rcs 系統能調控至少 5% 的基因體 [48,49]，這些基因包括莢膜多醣體及鞭毛的生合成 [38,50]，及一

些位於細胞質週緣區 (periplasm) 與壓力反應有關的基因 [51]。另外，RcsB 會藉由調控兩個重組酶 FimB、FimE 的轉錄來控制第一型線毛的表現 [52]；及藉由調控兩個與細胞分裂有關的基因 *ftsA*、*ftsZ* 來控制細胞分裂 [53]。在沙門氏菌 (*Salmonella*) 中，IgaA 則會負向調控 Rcs 系統，避免此系統過度活化 [54-57]。RcsB 會在沙門氏菌不同的致病階段，分別調控侵入蛋白、鞭毛及莢膜多醣體的表現，進而改變沙門氏菌的侵入能力，以適應各階段的不同環境 [58,59]；在沙門氏鼠傷寒桿菌 (*Salmonella enterica* Typhimurium) 中，Rcs 系統會誘導莢膜的生合成，持續活化 Rcs 系統，會增加莢膜的生合成，並減弱沙門氏菌對 BALB/c 老鼠的毒性 [60]；而 RcsB 也會藉由調控鞭毛操作子 (*flhDC*) 來抑制鞭毛的表現 [55,61]；另外 Rcs 系統也會調控下列基因的表現：對老鼠造成持續感染相關的 *ydeI* 基因、修飾脂多醣體 lipid A 部分有關的 *ugd* 基因 [62,63]、與毒性相關的操作子 *srfABC* 及毒性基因 SPI-2 [54,55]；而近期有文獻指出，在沙門氏菌中，未被磷酸化的 RcsB，亦可正向調控毒性基因 *spvA* 的表現 [57]。

目前已發現克雷白氏肺炎桿菌 K2 血清型 *cps* 基因群組 (*cps* gene cluster) 包含了 19 個開放讀框 (Open reading frames, ORF)，分為三個轉錄單位，其中四個基因 *wzi*-*wza*-*wzb*-*wzc*，與大腸桿菌具有很高的相似性。而在克雷白氏肺炎桿菌的研究中，只知 Rcs 系統參與調控莢膜多醣體的生合成，我們發現克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3 *rscB* 基因缺損後的莢膜多醣體生成量減少，且其菌落失去黏性 [64]。

## 1.5 先前的研究- 依賴 RcsB 的調控路徑

本實驗室前期研究發現：RcsB 基因缺損時莢膜生合成下降 [19]；第三型線毛的組成蛋白 MrkA 表達量下降（附圖一），生物膜的生成也顯著下降；本實驗室畢業的林志桓曾以二維電泳分析 CG43*rscB* 基因缺損株於酸性環境下的蛋白體，結果發現蛋白質 YfdX 表達量顯著下降，*yfdX* 座落於抗酸島嶼（acid fitness island, AFI），很可能是一膜間質抗酸壓力的伴隨蛋白（chaperone），*yfdX* 基因剔除降低細菌在酸性環境下的存活率，而 *rscB* 基因缺損也降低細菌的抗酸能力（附圖二），且 YfdX 的表達量下降（附圖三） [4]。

## 1.6 研究目標

本論文探討克雷白氏肺炎桿菌 CG43 菌株 Rcs 磷酸根傳遞途徑中的 RcsF、RcsC 及 RcsD 蛋白與 RcsB 調控功能是否絕對相關。首先，我們建構 *rscC*、*rscD*、*rscF*、*rscD* Hpt 和 *rscD* Hk 基因缺損突變株，並分析這些基因缺損對 CG43 細菌莢膜多醣的生成量、第三型線毛單位蛋白 MrkA 的表現量、生物膜的形成能力、抗酸逆境反應的影響是否與此磷酸根傳遞途徑的下游反應蛋白 RcsB 的調控功能絕對相關；另外，我們建構 LacZ-報導系統（LacZ reporter system）分析 RcsF、RcsC、RcsD 與 RcsB 的表現活性；最後，此論文將建立活體外 RcsFCD 磷酸傳遞的分析平台的表現，最終希望能作為活體外篩選抑制此磷酸根傳遞的藥物。

## 2. 實驗材料與方法

### 2.1 菌株

此研究的克雷白氏肺炎桿菌 CG43 為長庚大學紀念醫院林口分院的臨床分離菌株，其中 CG43S3 是由實驗室篩選具有抵抗鏈黴素 (Streptomycin) 的突變菌株[17]。本實驗所使用的菌株以及質體詳列於表一及表二。所有菌株均已加入適量的抗生素的 Luria-Bertani (LB) 培養液或培養基，經震盪培養於 37°C；使用抗生素及濃度分別為：鏈黴素 500 mg/ml、氨比西林(ampicillin)100 mg/ml、卡那黴素(kanamycin) 25 mg/ml、四環黴素(tetracycline)12.5 mg/ml 及氯黴素(chloramphenicol) 35 g/ml。

### 2.2 基因重組技術

基因重組實驗參考標準流程[65]。聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 所使用的引子 (primer) 由生工公司 (MDBio, Inc, Taiwan) 合成並詳列於表三；而 PCR 使用的酵素為 Blend Taq DNA polymerase (TOYOBO, Japan) 及 Taq DNA polymerase (MDBio)；PCR 產物及 DNA 片段則使用 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) 抽取；RNA 使用 RNeasy Mini Kit (QIAGEN) 抽取；限制酵素及 DNA 修飾酵素分別由 New England Biolab (Beverly, MA) 或 MBI Fermentas (Hanover, MD) 購置，且依照供應商建議的方式使用。

### 2.3 生物資訊分析

相關基因的比較是利用 NCBI 網站或 Vector NTI 軟體；啟動子的預

測以 Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 或 Bioinformatics @ MolGen ppp (<http://bioinformatics.biol.rug.nl>) 分析；預測 RNA 雜交區域構型序列經由 RNAhybrid (<http://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de>) 軟體進行分析。

## 2.4 基因缺損突變株的建構

首先利用 PCR 增幅目標基因的上下游片段約 1000 鹼基對 (base pair, bp) 的 DNA，將前後兩片段結合後接入自殺性載體 pKAS46[66]，再將此重組質體以電穿孔 (electroporation) 送入 *E. coli* *λpir*，以接合作用 (conjugation) 將此質體送入克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3 中，並以含有卡那黴素 (kanamycin) 及氨苄青黴素 (ampicillin) 的 M9 固態培養基篩選經由同源互換作用而插入染色體的接合子 (transconjugants)。接著，隨機挑選幾顆單一接合子菌落於 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，先以 PCR 確認該質體插入染色體中，在取 75 μl 菌液於含有鏈黴素 (streptomycin) 的 LB 培養液 37°C 培養 8 小時後，序列稀釋至 10<sup>-6</sup> 倍，取 100μl 的菌液均勻的塗抹在含有鏈黴素的 LB 固態培養基上培養基上培養隔夜，最後以滅菌牙籤隨機挑選約 50 顆單一菌落，分別畫在含有鏈黴素、含卡那黴素與氨苄青黴素的 LB 固態培養基上，並挑選出具鏈黴素抗性但對含卡那黴素與氨苄青黴素沒有抗性的菌落，最後再利用 PCR 檢查。

## 2.5 基因回補質體建構

利用 PCR 增幅目標基因殖入 yT&A 載體中，經由次選殖 (subclone)

至 pRK415[67]廣寄主載體後以電穿孔送入 *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir，再以接合作用轉入 CG43 中，將菌液塗抹在含四環素（tetracycline）的 M9 固態培養基，37°C 培養隔夜以後以滅菌牙籤隨機挑選至少 25 顆單一菌落，分別畫於含鏈黴素、四環素的 LB 固態培養基上，最後，挑選同時具鏈黴素、四環素抗性的菌落，以 PCR 驗證預期基因片段大小

## 2.6 生長曲線量測

細菌在 LB 培養液中培養隔夜後，以 200 倍稀釋至 LB 培養液中，在置於 37°C 培養，每隔 1 小時即測量其在 600 nm 下的吸光值；每次獨立實驗以三重複數據換算出平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中較具代表性的一次。

## 2.7 莢膜多醣定性與定量

莢膜多醣定性方式為將細菌在 LB 培養液中培養隔夜後，以 200 倍稀釋至 LB 培養液中，在置於 37°C 培養 16 小時，以 4000 轉離心 5 分鐘後觀測其結果。莢膜多醣定量方式為將細菌在 LB 培養液中培養隔夜後，再取 500  $\mu$ l 菌液和 100  $\mu$ l 含有 1% 兩性洗滌劑（Zwittergent 3-14 detergent）之 100 mM 檸檬酸（citric acid）溶液於 1.5ml 離心管中，以 50°C 加熱 20 分鐘後離心 14000 轉、2 分鐘，取 250  $\mu$ l 上清液加入 1ml 絕對酒精並置於 4°C，30 分鐘再以 140000 轉離心 5 分鐘，除去上清液後以 200 $\mu$ l 二次水回溶沉澱物，加入 1200  $\mu$ l 含有 12.5 mM 硼（borax）的硫酸（Sulfuric acid）溶液中，混合後以 100°C 加熱 5 分鐘，待冷卻後即加入 20  $\mu$ l 0.15% 3-羥基二酚（3-hydroxy diphenol）呈色劑，即測

量其在波長 520 nm 下的吸光值。將所測值對照莢膜多醣體含量與吸光值之標準曲線，即可取得莢膜多醣體的含量。最終實驗數值以  $1 \times 10^9$  CFU 含有多少莢膜多醣體表示之。

## 2.8 西方免疫墨點法 (Western blot)

將蛋白質以等比例混合蛋白質染劑 (0.0626 M Tris-HCl pH 6.8、2% SDS、10% glycerol、0.01% bromophenol blue 以及 100 mM dithiothreitol)，並以 95°C 加熱 10 分鐘，取適量蛋白質 (約 15  $\mu$ g) 加入 13.5% SDS-PAGE 電泳分離蛋白 (100V、200 mA、140 分鐘)。蛋白質經過膠電泳分離後，將膠上之蛋白質電泳 100 分鐘 (140V、400 mA、100 分鐘) 轉漬於聚篇二氟乙烯模 (polyvinylidene difluoride, PVDF; Millipore, Billerica, MA, USA) 上，再以 5% 的脫脂奶粉 4°C 處理隔夜，接著加一級抗體 anti- $\beta$  lactamase 在室溫下 2 小時，再以 5000 被稀釋之二級抗體：鹼性磷酸酶偶聯的抗兔免疫球蛋白 G (alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G) 在室溫下處理 1 小時，隨後加入呈色劑 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)、NBT 及鹼性磷酸酶緩衝液 (alkaline phosphatase buffer) 避光呈色。

## 2.9 生物膜染色

細菌在 LB 培養液中培養隔夜後，以 200 倍稀釋至 4 ml LB 培養液中，再於 37°C 靜置培養 24 小時，小心除去菌液後以一次水清洗兩次，再加入 4 ml 1% 結晶紫，以每分鐘 60 轉 (revolution per minute, rpm) 震盪處理五十分鐘後，再以一次水清洗三次。



## 2.10 抗酸能力評估

震盪培養方式根據以下文獻 [68]並修飾部分步驟；細菌在 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，以 20 倍稀釋至 LB 培養液中，培養至 OD<sub>600</sub> 約 0.6~0.8 左右，取 1 ml 菌液以 15000 轉離心 5 分鐘後去除上清液，加入 1 ml pH4.4 的 LB 培養液適應 1 小時，最後移至 pH3 的 M9 培養液中培養 45 分鐘，即取出 100 µl 的菌液序列稀釋至 10<sup>-6</sup> 倍，並均勻的塗抹於 LB 固態培養基上，37°C 隔夜培養後數菌落數；存活率是以在 M9 培養液中培養 45 分鐘後，每 1 ml 存活的菌數和培養 0 小時 1 ml 菌數的比值；每次獨立實驗以三重複數據計算平均值及標準差。

## 2.11 啟動子報告質體建構

將預測的啟動子片段或截短片段以 PCR 增幅後，接入 yT&A 選殖載體中，再轉殖制啟動子報導質體 pLacZ15[69]中，使啟動子片段與 lacZ 報導基因黏合，再藉由β-半乳糖苷酶 (β-galactosidase) 活性評估報告啟動子的活性。

## 2.12 β-半乳糖苷酶活性評估

根據 Miller 方法[70]，將隔夜培養之菌液以 100 倍稀釋於 LB 培養液中，待菌液 OD<sub>600</sub> 約 0.6~0.8 左右，加入於 pH5.5 LB 或含有濃度為 4 單位濃度多粘菌素 B (polymyxin B) LB 當中培養 40 分鐘，取 100 µl 的待測菌液加入 900 µl Z buffer (60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM KCl、1 mM MgSO<sub>4</sub> 及 50 mM β-mercaptoethanol)、0.1% SDS 及

三氯甲烷 (chloroform) 混合液中，並於 30°C 水浴槽靜置 10 分鐘，隨即加入 200  $\mu$ l 4 mg/ml 的邻硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷 (o-nitrophenyl,  $\beta$ -D-galactopyranoside, ONPG) 混合均勻靜置於 30°C 水浴槽，並開始計時至混合液變成黃色，再加入 500  $\mu$ l 1M 碳酸鈉終止反應，測量波長 420 nm 下的吸光值；每次獨立實驗以三重複數據計算平均值及標準差。

### 2.13 蛋白質大量表達質體之建構

將預大量表的的蛋白質片段 DNA 以 PCR 增幅後，接入 yT&A 選殖載體中，再轉殖制蛋白質表現質體 pET30 中，使欲表達代白質 DNA 片段與 pET30 黏合，將質體放入大腸桿菌 BL21 (*E. coli* BL21) 中，再藉由異丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside, IPTG) 誘導，大量表達欲取得之蛋白質。

### 2.14 蛋白質純化

將帶有欲表達片段的大腸桿菌 BL21 細菌在 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，以 20 倍稀釋至含有卡那黴素的 LB 培養液中，培養至 OD<sub>600</sub> 約 0.6~0.8 左右，加入異丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷誘導 6 小時，14000 轉離心 5 分鐘後去上清液，回溶於緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、5 mM imidazole、pH7.9) 中，以超音波震盪破菌後，離心 13000 轉 10 分鐘，去除沉澱於下的細胞碎片後，將上清液通入管柱層析，大量表達之蛋白會留於管中，利用緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、1 M imidazole、pH7.0) 回溶，收集之蛋白質以 13.5% SDS-PAGE 電泳分離蛋白並確認。

## 2.15 生物體外磷酸化實驗 (In vitro phosphorylation test)

生物體外磷酸化實驗操作及條件參照下列文獻。將組氨酸激酶 (histidine kinase) 與欲磷酸化之目標蛋白混合，並加入緩衝溶液 (10 mM ATP、25 mM Tris-HCl、1 mM DTT、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA、pH7.0) 中，於 37°C 水浴槽中反應 30 分鐘，隨後以 95°C 加熱 10 分鐘終止反應，以 13.5% SDS-PAGE 電泳將蛋白分離。將電泳後的膠以 Pro-Q Diamond 磷酸蛋白質螢光染劑染色，進而分析蛋白質之磷酸化狀況。

## 2.16 即時聚合酶連鎖反應測試 (Real-time Quantitative PCR Detecting System)

細菌在 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，以 20 倍稀釋至 LB 培養液中，培養至 OD<sub>600</sub> 約 0.6~0.8 左右，將菌液以 13200 轉離心 5 分鐘後去上清液，再以 RNeasy Mini Kit 抽取全菌核糖核酸 (Ribonucleic acid, RNA)，利用 AMV 反轉錄酶 (AMV Reverse Transcriptase) 及隨機引子 (random primer) 反轉錄成互補去氧核糖核酸 (Complementary DNA, cDNA) 後，加入 SYBR Green PCR Master Mix 以及待測引子，隨即利用 7000 HT platform (Applied Biosystems, USA) 的 SDS 2.1 software 執行即時聚合酶連鎖反應。

## 3.結果

### 3.1 克雷白氏肺炎桿菌中 RcsFCDB 的訊息傳遞路徑

#### 3.1.1 RcsC 以及 RcsD 蛋白質區域預測

探討克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中 RcsC、RcsD 所扮演的角色，因此將克雷白氏肺炎桿菌的 RcsC 以及 RcsD 蛋白質放入線上軟體 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 中進行預測，預測其蛋白質的功能以及具有功能的區域。在 RcsC 上 (圖一 A)，除了預測出含組氨酸磷酸基以及組氨酸激酶的區域外，還有預測出反應調節子接受區域 (response regulator receiver domain)，猜測雷白氏肺炎桿菌的 RcsC 具有磷酸酶 (phosphatase) 的活性存在，利用質體的方式大量表達 RcsC 觀測其結果。在 RcsD 上 (圖一 B)，除了預測出含組氨酸磷酸基 (histidine-containing phosphotransfer, Hpt) 的區域外，也有組氨酸激酶 (histidine kinase) 的區域，猜測雷白氏肺炎桿菌的 RcsD 蛋白會自我磷酸化，所以建構了兩株基因缺損突變株，分別為 *rcsD* Hpt 區域以及 *rcsD* HK 區域去觀察其推測。

#### 3.1.1 建構 *rscC*、*rscD*、*rscD* Hpt、*rscD* Hk、*rscF* 基因缺損突變株

如圖一 A，RcsC 為一磷酸激酶，線上軟體 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 分析 RcsC 除了磷酸激酶活性外還具有調控子的接受區域 (Response regulator receiver domain)；RcsD 除了組氨酸磷酸根轉移位 (histidine phosphotransfer domain) 外也還有磷酸激酶的活性 (圖一 B)。為了了解 RcsC、RcsD 及 RcsF 在克雷白氏肺炎桿菌莢膜生合成的調控角色，我分別建構 *rscC*、*rscD*、 $\Delta rcsD$ -hpt、 $\Delta rcsD$ -hk、

*rscF* 基因缺損突變株。首先，利用 PCR 增幅各個基因前後約 1000 鹼基對的 DNA 片段（圖二 A、圖三 A、B、C、圖四 A），將其結合成一段後接入自殺性載體 pKAS46 中，分別得到載體 pPKN009、pPKN010、pPKN035、pPKN055、pPKN031，再以接合作用分別將各個載體送入克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中，藉由同源序列重組互換及抗生素篩選而得到基因缺損的突變株，最後利用 PCR 及專一的引子對來確認各個基因的缺損。圖二 D、圖三 D、E、F、圖四 D 分別比較 CG43 和突變株的 PCR 產物核酸長度的改變，確認了  $\Delta rscC$ 、 $\Delta rscD$ 、 $\Delta rscD-hpt$ 、 $\Delta rscD-hk$ 、 $\Delta rscF$  各個缺損的片段。

### 3.1.2 *rscB*、*rscC*、*rscD* 及 *rscF* 基因缺損對表現型的影響

為了探討基因缺損會對細菌的生長造成什麼影響，所以利用光學儀器測量細菌密度，在 12 小時內每隔 1 小時做一次記錄；如圖五 A，*rscC* 及 *rscF* 基因缺損後，OD<sub>600</sub> 吸光值與 CG43 無明顯差異，但是 *rscB* 及 *rscD* OD<sub>600</sub> 吸光值明顯比 CG43 高，顯示了，*rscB* 及 *rscD* 基因缺損後生長速度變快，再分析各個基因缺損株外觀（圖五 B），*rscB* 及 *rscD* 基因缺損後菌落變得較小、菌落周圍變得較無光澤；而 *rscC* 及 *rscF* 基因缺損後與 CG43 相比沒有明顯的差異。進一步分析其莢膜生合成能力（圖六 A），利用低速沉降物理性實驗發現，*rscB* 及 *rscD* 基因缺損後較容易被沉澱下來；定量莢膜多醣體後（圖六 B），也發現 *rscB* 及 *rscD* 基因缺損後莢膜多醣體顯著下降；*rscC* 及 *rscF* 基因缺損在低速沉降實驗、莢膜多醣體定量與野生型相比沒有顯著差異存在。推測 *rscB* 及 *rscD* 基因缺損後莢膜生合成減少，能量消耗減少，使其生長速度加快。

### 3.1.3 *rcsD* Hpt domain 基因缺損突變株莢膜表現量下降

為了驗證克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中的 RcsD 是否會自我磷酸化，所以建構在 *rcsD* 上兩個區域各別缺損的 *rcsD* Hpt 區域以及 *rcsD* HK 區域基因缺損突變株，並觀察其莢膜的表現量。如圖七，*rcsD* Hpt 區域莢膜表現量下降達顯著差異；相對將預測出的 *rcsD* HK 區域移除，發現莢膜表達量與野生型相比沒有明顯的改變，說明了 RcsD Hk 區域不會自我磷酸化；RcsD Hpt 是重要的位置，且其磷酸根來自於其他的蛋白質上。

### 3.1.4 *rcsCrcsF* 雙基因缺損突變株對莢膜生成沒有影響

在沙門氏菌中 RcsC 以及 RcsF 扮演者接受訊號的角色[71]。從莢膜表現中發現，*rcsC*、*rcsF* 基因缺損突變株發現與 CG43 沒有顯著的差異，所以推測 RcsC、RcsF 當其中一種缺失時，另一種便會補上其功能。因此，建構 *rcsCrcsF* 雙基因缺損突變株（圖四 C），並測量其莢膜多醣體含量（圖八），結果發現雙基因缺損時對莢膜多醣的形成沒有影響。

### 3.1.5 *rcsB*、*rcsD* 及 *rcsF* 基因缺損株對多粘菌素 B 敏感度下降

粘菌素是一種從多粘芽孢桿菌（*Bacillus polymyxa*）所分離出來的抗生素，他通常用來抑制格蘭氏陰性菌的生長，粘菌素屬於一種抗菌肽並且帶正電，他會附著於細菌的外膜上形成孔洞，破壞細菌細胞滲透壓，使其細胞死亡[72,73]。在沙門氏菌中，RcsF 鑲嵌在外膜上，並可以偵測來自於外界的訊號並將訊號傳自於下游（附圖四），文獻指

出，當外膜被破壞，使其外膜上 RcsF 更接近內膜上的 RcsC 可以誘導 Rcs 系統活化[74]。在本實驗所使用的多粘菌素 B 是將多粘菌素的疏水性尾端移除，移除後的多粘菌素 B 還是會辨識細菌外膜並鑲嵌，但不會殺死細菌；在沙門氏菌的研究中常用來當莢膜生合成調控系統的活化劑[73]。將隔夜培養菌以 200 倍稀釋，加入 4 單位 (4 unit, 4U) 多粘菌素 B 的培養 12 個小時，在 CG43 中發現，加入多粘菌素 B 細菌莢膜多醣體升高，並達到顯著差異。*rscB*、*rscD* 以及 *rscF* 缺損在多粘菌素 B 的壓力下莢膜多醣體與野生型相比沒有顯著的升高 (圖九)，這也說明了克雷白氏肺炎桿菌的 RcsF 扮演偵測外界環境壓力，並將訊號向下游傳遞的角色。

### 3.1.6 *rscB* 及 *rscD* 基因缺損株對第三型線毛表現及生物膜型成的影響

第三型線毛常表現於細菌表面，長度約 0.5-2  $\mu\text{m}$  寬度約為 2-4  $\mu\text{m}$ ，在野生型的克雷白氏肺炎桿菌上會大量表達[75,76]；主要是由 *mrkABCDF* 這幾個基因主成及調控[77]。有研究指出，第三型線毛的表達與生物膜的形成有者重要的關聯性。而細菌在醫療器材上形成生物膜對於院內感染而言，也扮演著一個非常重要的角色。除此之外，第三型線毛也被證明可以幫助細菌附著於氣管上皮細胞、腎小管上皮細胞、胞外的基質蛋白、肺組織基底膜，使細菌更容易感染宿主[78,79]。根據先前的研究，*rscB* 基因缺損會使其第三型線毛表達量下降，依據圖十顯示，將 *rscB* 缺損後與野生型相比，會有顯著的下降 (約只剩下 54%)；在 *rscD* 缺損後也可以看見下降的趨勢 (約只剩下 63%)，但是在 *rscC*、*rscF* 缺損後看不見明顯的差異。由於第三型線毛在克雷白氏

肺炎桿菌中，扮演者一個重要的黏附因子，因此，變去觀察基因缺損後生物膜的行程變化，分別使用了玻璃試管以及 96 塑膠孔盤兩種不同材質做測試。在玻璃材質中（圖十一 A）將隔夜培養菌以 200 倍稀釋，培養 12 個小時觀察到，*rscB* 以及 *rscD* 缺損後，在玻璃試管上形成的生物膜有明顯的減少；*rscC*、*rscF* 缺損後看不見明顯的差異。再一樣的條件下，將菌液放入 96 塑膠孔盤中培養，分別觀察了培養 12 小時（圖十一 B）以及 24 小時（圖十一 C），利用結晶紫染色，並使用 0.1% SDS 水溶液將生物膜洗下，利用 OD<sub>595</sub> 的波長觀察到 *rscB* 以及 *rscD* 缺損後，在 96 塑膠孔盤上形成的生物膜有明顯的上升，並且達到顯著差異，在 12 小時以及 24 小時皆有一樣的結果。使用了這兩種材質得到了相反的結果，也說明了克雷白氏肺炎感菌 CG43 在不同的環境中，會使用不同的黏附因子形成生物膜，而 *rscB* 以及 *rscD* 缺損後是會影響生物膜的形成。

### 3.1.7 克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中 RcsC 扮演去磷酸化的角色

在沙門氏菌中，雙分子調控系統通常不只有激酶的活性還會有磷酸酶的活性存在[80]。在 Pfam 中也預測出了反應調節子接受區域（圖一 A），猜測這一個區域會扮演者去除磷酸根的角色，但是在 *rscC* 基因缺損突變株中看不見與野生型的差異，所以便利用質體回補並大量表達 RcsC 觀察其結果。圖十二 A，利用質體在克雷白氏肺炎桿菌中大量表達 RcsC，將隔夜培養菌以 200 倍稀釋後培養 16 個小時，觀測其莢膜表達量。結果發現大量表達 RcsC 會使莢膜表達量下降，而移除 *rscC* 基因與野生型沒有太大差異；觀察 MrkA 蛋白質表達中也發現（圖十



二 B)，大量表達 RcsC 發現 MrkA 顯著下降 (56%)，依結果發現，克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中似乎扮演者去除磷酸化的角色，所以當 RcsC 大量表達時，被磷酸化的 RcsB 下降，莢膜表現量也下降。沙門氏菌中 RcsF 與 RcsC 分別扮演著感應外界環境、細胞週質 (periplasm) 或是細胞中壓力的感應子[71]。

### 3.1.8 回補 RcsD 以及 RcsD hpt 區域莢膜表現量

將 CG43  $\Delta rcsD$ 、CG43  $\Delta rcsD$  Hpt 莢膜表現量與 CG43 相比下降許多，利用質體 pRK415 回補 RcsD 以及 RcsD Hpt 區域。結果指出 (圖十三)，在 CG43  $\Delta rcsD$  中回補 RcsD，莢膜多醣會上升；但回補 RcsD Hpt 與回補空質體 pRK415 沒有差異，在 CG43  $\Delta rcsD$  Hpt 中有一樣的趨勢。

### 3.1.9 酸性環境下 Rcs 系統的調控方式

克雷白氏肺炎桿菌是一株腸內菌科的細菌，通常會經由口腔到胃再到腸道，也因為他進入宿主細胞的過程必須經過胃部，所以必須要抵抗酸性環境的壓力。根據文獻指出，大腸桿菌的 *rscB* 缺損後，細菌在酸性環境下的存活率下降[46]。而克雷白氏肺炎桿菌也沒有辦法存活在 pH2.0 以下的環境，目前，我們尚不知克雷白氏肺炎桿菌的抗酸機制，所以依照文獻[81]，將細菌培養於 pH4.4 LB 培養液中 90 分鐘，再將細菌放入 pH3.0 M9 培養液中 45 分鐘，觀察其存活率 (圖十四 A)。研究指出，*rscB* 表現量並不會受到 pH 值得變化而改變，因此利用了生物資訊的方式找尋了幾個幾個酸性環境下表達的基因，其中發現了一個基因，其基因上游有許多個 RcsB 結合位置，推測其酸性表達蛋白與

RcsB 有密切關西，將它命名為 *yfdX*，在克雷白氏肺炎桿菌 GC435S3 中也驗證，將 *yfdX* 移除後細菌在酸性環境下存活率會下降，表明了莢膜生合成調控系統以及 *yfdX* 在酸性環境中有重要的關聯性[68]。將細菌培養於 pH5.5 溶液中，使用靜置培養模擬微氧環境培養 12 小時，利用 *yfdX* 抗體進行雜合（圖十四 B），結果指出，在 pH5.5 微氧環境下 *rcsB* 的缺損會使 *yfdX* 表現量消失，而在 *rcsC*、*rcsD*、*rcsF* 的缺損並不會影響 *yfdX* 的表達；同樣在 pH5.5 溶液中，使用搖晃培養模擬充氧環境培養 12 小時，利用 *yfdX* 抗體進行雜合（圖十四 C），結果指出，在 pH5.5 充氧環境下，*rcsB*、*rcsD* 的缺損會使 *yfdX* 表現量消失，而在 *rcsC*、*rcsF* 的缺損並不會影響 *yfdX* 的表達。以上的結果說明，Rcs 系統在微氧以及充氧的環境下會有不同的調控路徑，RcsB 缺損 *yfdX* 便不會表達；RcsD 必須在 pH5.5 充氧環境下才會參與調控。

### 3.1.10 *rcsB*、*rcsC*、*rcsD* 及 *rcsF* 啟動子活性分析

以線上軟體 Softberry 分析 *rcsB*、*rcsC*、*rcsD* 及 *rcsF* 基因上游非轉譯區（圖十五 A），進一步將分析出的幾個片段  $P_{rcsB}$ 、 $P_{rcsC}$ 、 $P_{rcsD}$ 、 $P_{rcsF}$  分別與 LacZ 報導系統結合，並放入 *LacZ* 基因缺損的克雷白氏肺炎桿菌中，並去觀測其載體是否具有活性，在 *LacZ* 基因缺損後放入沒有啟動子片段的載體便無法將無色的 5-溴-4-氯-3-吲哚半乳糖苷（5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside, X-gal）代謝為藍色，而帶有啟動子活性片段的載體就會產生藍色的代謝產物（圖十五 B）。以酸性環境及多黏菌素 B 進行處理，*rcsB* 啟動子在酸性環境以及黏菌素 B 處理後均有顯著的上升，表示 *rcsB* 會受到酸性環境以及黏菌

素 B 的活化 (圖十六 A)。 *rscC* 啟動子在多黏菌素處理後顯著上升 (圖十六 B)。 *rscDB* 啟動子在酸性環境處理後顯著上升 (圖十六 C)。 *rscF* 啟動子在酸性環境以及黏菌素 B 處理後均有顯著的上升 (圖十六 D)。綜合以上結果， *rscB* 啟動子與其他三個啟動子相比有較高活性，說明了 RcsB 在這套系統中扮演者重要的角色 (圖十六 E)。

### 3.2 克雷白氏肺炎桿菌 RcsC-RcsD 區域中磷酸根的傳遞路徑

#### 3.2.1 RcsC 與 RcsD 間細胞外磷酸根傳遞

利用 PCR 原理夾出 *rscC* HK、*rscC* Hpt、*rscD* Hpt 區域，將其片段接入蛋白質表達質體 pET30 中，將此質體放入大腸桿菌 BL21 表達，並使用管柱層析回收蛋白。Pro-Q<sup>®</sup> Diamond 磷酸化蛋白質染劑染色對象為蘇氨酸/絲氨酸 (Threonine/Serine) 激酶，而我們想要利用 Pro-Q<sup>®</sup> Diamond 染組氨酸激酶，所以將回收後的 RcsC Hpt 蛋白質依照不同濃度進行 SDS 電泳膠分離，分離後將 SDS 膠以 Pro-Q<sup>®</sup> Diamond 染劑染色 (圖十六 A)，結果指出，Pro-Q<sup>®</sup> Diamond 染劑可以染上 RcsC Hpt，並且濃度的改變也可以觀測的到，圖十六 B 為使用孔雀藍染劑染色的結果。接著，觀察 RcsD HK 蛋白是否會自我磷酸化，利用 ATP 處理後觀察是否會自我磷酸化，圖十六 C 為 Pro-Q<sup>®</sup> Diamond 染劑染色結果，圖十六 D 為使用孔雀藍染劑染色的結果，利用分析軟體進行分析比較圖十六 E，將 ATP 處理前與處理後結果顯示沒有差異。

## 4. 討論

細菌感染成功的關鍵在於其是否有能力可以在不利的環境中生存及複製，而這些不利的環境存在著時常變動的挑戰，例如：氧氣的濃度、pH 值的變化，及滲透壓的改變等，而細菌藉由改變基因的表現來對抗這些挑戰。雙分子系統廣泛分佈於所有細菌中，在細菌生理中扮演多樣性的調控角色，例如：壓力抵抗、毒性調控、能量代謝、養分取得，及群體感應（quorum sensing, QS）等 [71,82-86]。Rcs 系統亦屬於雙分子調控系統的一種，最早被發現參與大腸桿菌莢膜多醣體合成的調控 [38]。目前 Rcs 系統在克雷白氏肺炎桿菌確認參與莢膜多醣的生合成，*rscB* 基因缺損突變株的莢膜多醣生成量會減少 [64]。我們的結果顯示 *rscB* 缺失後細菌生長在對數生長時期以及穩定生長時期較 CG43 快（圖六），可能是因能量不必用於莢膜生成，而加快生長速率。

CG43 的 *rscD* 基因缺損也會降低莢膜表現量，但 *rscC* 及 *rscF* 缺失對莢膜多醣生成量變化沒有顯著的影響（圖六），可能是在 LB 及 37 度的生長條件下，RcsF 和 RcsC 的表現量很低，因此其基因缺失的影響無法測知，所以尋找 RcsF 和 RcsC 表現的最佳條件後應該可以確認 RcsF 和 RcsC 在此磷酸根傳遞系統是否扮演重要角色。然而，與沙門氏菌不同 [55,61]，在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中 RcsC 在一般環境下看不出差異，所以利用生物資訊工具預測 RcsC 的蛋白質功能（圖一 A），在 RcsC 中預測到反應調節子接受區域（Response regulator receiver domain），推測 RcsC 在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中扮演去磷酸化的角色；利用質體回補並大量表現 RcsC 時發現，莢膜多醣體（圖十二 A）及第三型線毛的單位蛋白 MrkA（圖十二 B）表達量的下降，其結果說

明 RcsC 在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中扮演負調控的角色。

但在同樣的培養條件下，缺乏 *rscD* 和缺乏 *rscB* 一樣，莢膜多醣量顯著下降，第三型線毛的單位蛋白 MrkA 表達量下降（圖十），及在玻璃材質的管子中生物膜的產量下降（圖十一 A），有趣的是，在塑膠 96 孔盤生物膜的生成結果發現（圖十一 B 及 C），缺乏 *rscD* 和缺乏 *rscB* 生物膜產量上升，這說明了在不同材質中，生物膜的生成會使用不同的因子。為了確認 *rscD* 基因缺失結果不是因為連動效應（polar effect），我們另外構築 *rscD-hpt*、*rscD-hk* 核酸片段缺損株，結果顯示克雷白氏肺炎桿菌 CG43 RcsD 中的 Hpt 區域是將磷酸根給予 RcsB 的重要角色，當期缺乏時，下游便會被阻斷（圖七）。依據這些結果說明克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中莢膜生合成系統的訊息傳遞，不單單只是 RcsF→RcsC→RcsD→RcsB 一個調控路徑。

抗菌劑中有許多功能是可以鑲嵌於細菌細胞，破壞其外膜使其細菌滲透壓失調導致細菌死亡。RcsF 在細胞外膜上，研究指出當細胞外膜被破壞導致外膜上的 RcsF 向內摺疊靠近 RcsC，而當兩蛋白間距離越近時，莢膜生合成系統下游所調控的基因越被活化，增加其莢膜表達 [74]。在本研究中，將 RcsF 移除後莢膜生合成在一般培養環境中看不見差異（圖六），但加入會鑲嵌於外膜上的藥物多黏菌素 B 後（圖九），RcsF 缺損的細胞株就偵測不到多黏菌素 B 的存在，所以在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中，RcsF 需要特殊的環境因子才可以看見其活性存在。

近期有文獻指出 [46]，在大腸桿菌中，*rscB* 基因缺損，會降低其抗酸能力；而克雷白氏肺炎桿菌亦屬於腸內菌，且有莢膜生合成系統的同源基因存在，因此我們懷疑，莢膜生合成系統在克雷白氏肺炎桿菌

中，亦與抗酸能力有關；先前的研究指出，在克雷白氏肺炎桿菌中，RcsB 是否也與抗酸能力有關；結果是 *rscB* 缺損株中，在酸性壓力下存活率會下降[4]；但在其它的基因缺損株中則沒有看出差異（圖十四 A）。*yfdX* 基因缺損突變株其抗酸能力較野生型下降許多，因此可以確認 *yfdX* 的確與抗酸相關[4,87]；根據 YfdX 抗體發現，YfdX 蛋白的表現受到 RcsB 的正向調控，當 RcsB 缺損後便無法觀測到 YfdX 蛋白的表現（圖十四 B、C），結果指出不管在有氧環境或是無氧環境下，RcsB 都扮演著一個很重要的調控角色；在微氧環境中的調控發現，*rscD* 缺失並不會影響 YfdX 蛋白的表現（圖十四 B），也與圖十四 A 的結果吻合。特別的是當氧氣充足時 RcsD 在調控路徑中扮演者重要的角色，當 RcsD 缺失時 YfdX 蛋白的表現變下降（圖十四 B），以上結果說明莢膜生合成系統在不同的環境中會使用不同的調控路徑來調控下游基因。

從先前的結果發現，RcsB 的調控扮演者很重要的角色，利用啟動子報系統觀察其基因的表達量，結果發現 *rscB* 基因的表達量比其他三個基因還要高（80 倍以上），結果說明 RcsB 在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中的重要性（圖十六 E）。在使用不同環境處理後觀察到 *rscB* 以及 *rscF* 基因會受到酸性以及多黏菌素 B 的活化（圖十六 A、D），而 *rscC* 基因在多黏菌素 B 處理後也會有上升（圖十六 B），*rscDB* 基因在酸性壓力下會上升（圖十六 C）；這結果指出在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 的莢膜生合成調控系統在不同環境壓力下會表達不同的基因去偵測壓力及調控下游基因。

先前研究指出[71]，RcsD 的磷酸根會來自於 RcsC，在本實驗中卻看不到這樣的結果，所以利用生物資訊工具預測 RcsD 後發現有一

個組氨酸激酶的活性區域，所以推測克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中 RcsD 具有自我磷酸化的能力；然而，將組氨酸激酶的活性區域移除之後（圖七），卻發現對 CG43 莢膜生合成沒有明顯影響，此暗示 RcsD 的組氨酸激酶活性區域沒有酵素功能。研究指出 RcsF、RcsC 會偵測壓力後傳遞訊號給 RcsD [41]，但 RcsC 基因缺損時對 CG43 莢膜多醣體生合成沒有影響（圖六），所以，我們推測 RcsD 磷酸化的磷酸根來源可能由未知的激酶提供，而此磷酸根由 RcsF 居中傳遞，然而，CG43 $\Delta$ rscD $\Delta$ rscF 雙基因缺損的突變株，其莢膜多醣體生成量與 CG43 相差不多（圖八），此結果暗示 RcsF 不參與由未知激酶提供給 RcsD 的磷酸根傳遞。

最後，利用體外磷酸轉移系統建立的結果顯示：磷酸根染劑 Pro-Q 可以染上不同濃度的 RcsC Hpt（圖十七 A），並將 RcsC Hpt 與 RcsC Hk 位置蛋白混和，並利用 ATP 處理，結果顯示將來可以利用這個方式探討磷酸根自 RcsC 經由 RcsD 至 RcsB 傳遞路徑的標記（圖十八）。

Rcs 系統在大腸桿菌及沙門氏菌，目前已有相當多的研究，參與相當多的生理調控；而在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中，目前只知其參與調控莢膜多醣體的生合成、酸性壓力、多黏菌素 B 相關。本研究證實，在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中，RcsF 參與多黏菌素 B 調控，RcsC 可能以去磷酸根扮演負調控的角色。而其調控的可能相關機制如圖十九所示。另外，本研究也證明 Rcs 系統受到不同壓力時會有不同的傳遞路徑，至於下游 RcsB 在克雷白氏肺炎桿菌中，是否還參與其他生理的調控，則需作進一步的研究。

## 5. 參考文獻

1. 樊力成 (2012) YfdX 在克雷白氏肺炎菌 CG43 抗酸反應中所扮演的角色. 國立交通大學碩士論文.
2. 鄭新耀 (2010) 克雷白氏肺炎桿菌 CG43 雙分子系統與多黏菌素 B 抗性及莢膜多醣體生合成之調控. 國立交通大學博士班論文.
3. 黃盈蓉 (2006) 克雷白氏菌之第三型纖毛特性之研究. 國立交通大學博士班論文.
4. 林志桓 (2009) 蛋白質在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中抗酸能力所扮演的角色: 國立交通大學碩士論文.
5. Podschun R, Ullmann U (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 11: 589-603.
6. Bergogne-Berezin E (1995) Treatment and prevention of nosocomial pneumonia. *Chest* 108: 26S-34S.
7. Carpenter JL (1990) *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev Infect Dis* 12: 672-682.
8. McCallum KL, Schoenhals G, Laakso D, Clarke B, Whitfield C (1989) A high-molecular-weight fraction of smooth lipopolysaccharide in *Klebsiella* serotype O1:K20 contains a unique O-antigen epitope and determines resistance to nonspecific serum killing. *Infect Immun* 57: 3816-3822.
9. Domenico P, Schwartz S, Cunha BA (1989) Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. *Infect Immun* 57: 3778-3782.
10. Domenico P, Tomas JM, Merino S, Rubires X, Cunha BA (1999) Surface antigen exposure by bismuth dimercaprol suppression of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. *Infect Immun* 67: 664-669.
11. Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S (1998) Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains.



- Infect Immun 66: 2887-2894.
12. de Lorenzo V, Martinez JL (1988) Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7: 621-629.
  13. Nassif X, Sansonetti PJ (1986) Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect Immun* 54: 603-608.
  14. Pan YJ, Fang HC, Yang HC, Lin TL, Hsieh PF, et al. (2008) Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. *J Clin Microbiol* 46: 2231-2240.
  15. Tsai FC, Huang YT, Chang LY, Wang JT (2008) Pyogenic liver abscess as endemic disease, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 14: 1592-1600.
  16. Liao CH, Huang YT, Lai CC, Chang CY, Chu FY, et al. (2011) *Klebsiella pneumoniae* bacteremia and capsular serotypes, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 17: 1113-1115.
  17. Chang HY, Lee JH, Deng WL, Fu TF, Peng HL (1996) Virulence and outer membrane properties of a *galU* mutant of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microb Pathog* 20: 255-261.
  18. Ho JY, Lin TL, Li CY, Lee A, Cheng AN, et al. (2011) Functions of some capsular polysaccharide biosynthetic genes in *Klebsiella pneumoniae* NTUH K-2044. *PLoS One* 6: e21664.
  19. Wacharotayankun R, Arakawa Y, Ohta M, Hasegawa T, Mori M, et al. (1992) Involvement of *rscB* in *Klebsiella* K2 capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 174: 1063-1067.
  20. Whitfield C, Roberts IS (1999) Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 31: 1307-1319.
  21. Brill JA, Quinlan-Walshe C, Gottesman S (1988) Fine-structure mapping and identification of two regulators of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 170: 2599-2611.
  22. Galperin MY, Higdon R, Kolker E (2010) Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Mol Biosyst* 6: 721-728.
  23. Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69: 183-215.
  24. Mascher T, Helmann JD, Uuden G (2006) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 910-938.
  25. Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* 53:

- 450-490.
26. Mizusawa S, Gottesman S (1983) Protein degradation in *Escherichia coli*: the lon gene controls the stability of sulA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 358-362.
  27. Alex LA, Simon MI (1994) Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet* 10: 133-138.
  28. Varughese KI (2002) Molecular recognition of bacterial phosphorelay proteins. *Curr Opin Microbiol* 5: 142-148.
  29. Hoch JA, Varughese KI (2001) Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *J Bacteriol* 183: 4941-4949.
  30. Skerker JM, Prasol MS, Perchuk BS, Biondi EG, Laub MT (2005) Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol* 3: e334.
  31. Laub MT, Goulian M (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* 41: 121-145.
  32. Wolanin PM, Thomason PA, Stock JB (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* 3: REVIEWS3013.
  33. Attwood PV, Piggott MJ, Zu XL, Besant PG (2007) Focus on phosphohistidine. *Amino Acids* 32: 145-156.
  34. Bilwes AM, Alex LA, Crane BR, Simon MI (1999) Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* 96: 131-141.
  35. Vierstra RD, Davis SJ (2000) Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* 11: 511-521.
  36. Markovitz A (1964) Regulatory Mechanisms for Synthesis of Capsular Polysaccharide in Mucoïd Mutants of *Escherichia Coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51: 239-246.
  37. Trisler P, Gottesman S (1984) lon transcriptional regulation of genes necessary for capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 160: 184-191.
  38. Gottesman S, Trisler P, Torres-Cabassa A (1985) Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J Bacteriol* 162: 1111-1119.
  39. Torres-Cabassa AS, Gottesman S (1987) Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis. *J Bacteriol* 169: 981-989.

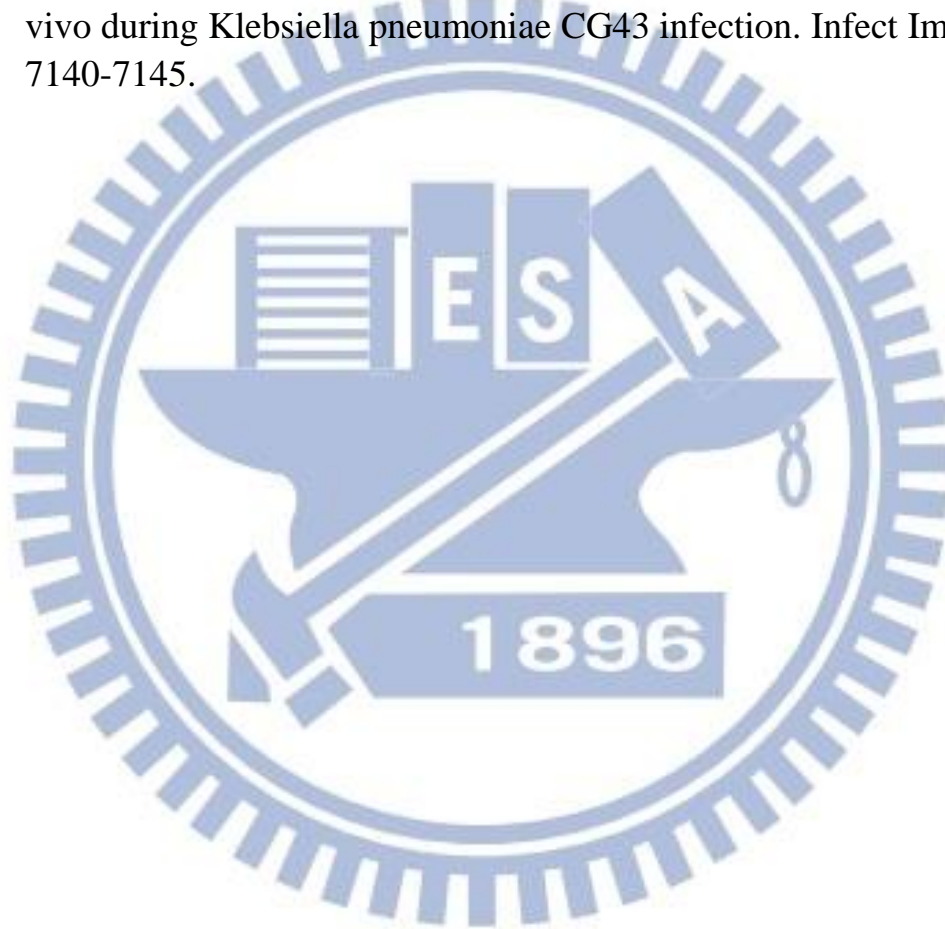
40. Stout V, Gottesman S (1990) RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 659-669.
41. Hagiwara D, Sugiura M, Oshima T, Mori H, Aiba H, et al. (2003) Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185: 5735-5746.
42. Clavel T, Lazzaroni JC, Vianney A, Portalier R (1996) Expression of the tolQRA genes of *Escherichia coli* K-12 is controlled by the RcsC sensor protein involved in capsule synthesis. *Mol Microbiol* 19: 19-25.
43. Kelley WL, Georgopoulos C (1997) Positive control of the two-component RcsC/B signal transduction network by DjlA: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 25: 913-931.
44. Chen MH, Takeda S, Yamada H, Ishii Y, Yamashino T, et al. (2001) Characterization of the RcsC-->YojN-->RcsB phosphorelay signaling pathway involved in capsular synthesis in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 2364-2367.
45. Conter A, Sturny R, Gutierrez C, Cam K (2002) The RcsCB His-Asp phosphorelay system is essential to overcome chlorpromazine-induced stress in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184: 2850-2853.
46. Castanie-Cornet MP, Treffandier H, Francez-Charlot A, Gutierrez C, Cam K (2007) The glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*: essential and dual role of the His-Asp phosphorelay RcsCDB/AF. *Microbiology* 153: 238-246.
47. Laubacher ME, Ades SE (2008) The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *J Bacteriol* 190: 2065-2074.
48. Majdalani N, Heck M, Stout V, Gottesman S (2005) Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 6770-6778.
49. Pruss BM, Besemann C, Denton A, Wolfe AJ (2006) A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188: 3731-3739.
50. Francez-Charlot A, Laugel B, Van Gemert A, Dubarry N, Wiorowski F, et al. (2003) RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively

- regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 49: 823-832.
51. Davalos-Garcia M, Conter A, Toesca I, Gutierrez C, Cam K (2001) Regulation of *osmC* gene expression by the two-component system *rcsB-rcsC* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 5870-5876.
  52. Schwan WR, Shibata S, Aizawa S, Wolfe AJ (2007) The two-component response regulator *RcsB* regulates type 1 piliation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189: 7159-7163.
  53. Carballes F, Bertrand C, Bouche JP, Cam K (1999) Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system *rscC-rscB*. *Mol Microbiol* 34: 442-450.
  54. Garcia-Calderon CB, Casadesus J, Ramos-Morales F (2007) *Rcs* and *PhoPQ* regulatory overlap in the control of *Salmonella enterica* virulence. *J Bacteriol* 189: 6635-6644.
  55. Wang Q, Zhao Y, McClelland M, Harshey RM (2007) The *RcsCDB* signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes. *J Bacteriol* 189: 8447-8457.
  56. Garcia-Calderon CB, Casadesus J, Ramos-Morales F (2009) Regulation of *igaA* and the *Rcs* system by the *MviA* response regulator in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*.
  57. Mariscotti JF, Garcia-del Portillo F (2009) Genome expression analyses revealing the modulation of the *Salmonella Rcs* regulon by the attenuator *IgaA*. *J Bacteriol* 191: 1855-1867.
  58. Virlogeux I, Waxin H, Ecobichon C, Lee JO, Popoff MY (1996) Characterization of the *rscA* and *rscB* genes from *Salmonella typhi*: *rscB* through *tviA* is involved in regulation of Vi antigen synthesis. *J Bacteriol* 178: 1691-1698.
  59. Arricau N, Hermant D, Waxin H, Ecobichon C, Duffey PS, et al. (1998) The *RcsB-RcsC* regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Mol Microbiol* 29: 835-850.
  60. Garcia-Calderon CB, Garcia-Quintanilla M, Casadesus J, Ramos-Morales F (2005) Virulence attenuation in *Salmonella enterica rscC* mutants with constitutive activation of the *Rcs* system. *Microbiology* 151: 579-588.
  61. Cano DA, Dominguez-Bernal G, Tierrez A, Garcia-Del Portillo F, Casadesus J (2002) Regulation of capsule synthesis and cell motility in *Salmonella enterica* by the essential gene *igaA*. *Genetics* 162:

- 1513-1523.
62. Erickson KD, Detweiler CS (2006) The Rcs phosphorelay system is specific to enteric pathogens/commensals and activates ydeI, a gene important for persistent Salmonella infection of mice. *Mol Microbiol* 62: 883-894.
  63. Huang YH, Ferrieres L, Clarke DJ (2006) The role of the Rcs phosphorelay in Enterobacteriaceae. *Res Microbiol* 157: 206-212.
  64. Lai YC, Peng HL, Chang HY (2003) RmpA2, an activator of capsule biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, regulates K2 cps gene expression at the transcriptional level. *J Bacteriol* 185: 788-800.
  65. Joseph S, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual* — 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  66. Skorupski K, Taylor RK (1996) Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene* 169: 47-52.
  67. Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* 70: 191-197.
  68. Hall HK, Foster JW (1996) The role of fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J Bacteriol* 178: 5683-5691.
  69. Lin CT, Huang TY, Liang WC, Peng HL (2006) Homologous response regulators KvgA, KvhA and KvhR regulate the synthesis of capsular polysaccharide in *Klebsiella pneumoniae* CG43 in a coordinated manner. *J Biochem* 140: 429-438.
  70. Miller JH (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  71. Majdalani N, Gottesman S (2005) The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol* 59: 379-405.
  72. Cardoso LS, Araujo MI, Goes AM, Pacifico LG, Oliveira RR, et al. (2007) Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb Cell Fact* 6: 1.
  73. Pescaretti Mde L, Lopez FE, Morero RD, Delgado MA (2010) Transcriptional autoregulation of the RcsCDB phosphorelay system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* 156: 3513-3521.
  74. Farris C, Sanowar S, Bader MW, Pfuetzner R, Miller SI (2010)

- Antimicrobial peptides activate the Rcs regulon through the outer membrane lipoprotein RcsF. *J Bacteriol* 192: 4894-4903.
75. Duguid JP (1959) Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. *J Gen Microbiol* 21: 271-286.
  76. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA (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: 5016-5024.
  77. Allen BL, Gerlach GF, 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.
  78. Ong CL, Ulett GC, Mabbett AN, Beatson SA, Webb RI, et al. (2008) Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. *J Bacteriol* 190: 1054-1063.
  79. Hornick DB, Allen BL, Horn MA, Clegg S (1992) Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infect Immun* 60: 1577-1588.
  80. Eguchi Y, Utsumi R (2005) A novel mechanism for connecting bacterial two-component signal-transduction systems. *Trends Biochem Sci* 30: 70-72.
  81. Gueriri I, Bay S, Dubrac S, Cyncynatus C, Msadek T (2008) The Pta-AckA pathway controlling acetyl phosphate levels and the phosphorylation state of the DegU orphan response regulator both play a role in regulating *Listeria monocytogenes* motility and chemotaxis. *Mol Microbiol* 70: 1342-1357.
  82. Stock JB, Stock AM, Mottonen JM (1990) Signal transduction in bacteria. *Nature* 344: 395-400.
  83. Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1993) Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539-544.
  84. Scarlato V, Arico B, Domenighini M, Rappuoli R (1993) Environmental regulation of virulence factors in *Bordetella* species. *Bioessays* 15: 99-104.
  85. Fabret C, Feher VA, Hoch JA (1999) Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol* 181: 1975-1983.
  86. Perraud AL, Weiss V, Gross R (1999) Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Microbiol* 7: 115-120.

87. Fan L-C (2012) YfdX role in acid-resistance response of *Klebsiella pneumoniae*. Hsinchu, Taiwan R.O.C.: National Chiao Tung University.
88. de Lorenzo V, Timmis KN (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* 235: 386-405.
89. Peng HL, Wang PY, Wu JL, Chiu CT, Chang HY (1991) Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae*. *Chinese journal of microbiology and immunology* 24: 264-271.
90. Lai YC, Peng HL, Chang HY (2001) Identification of genes induced in vivo during *Klebsiella pneumoniae* CG43 infection. *Infect Immun* 69: 7140-7145.



表一：本研究所使用的菌株

細菌菌株	基因型或相關特性	來源或 參考文獻
<b><i>E. coli</i>:</b>		
JM-109	<i>RecA1 supE44 endA1 hsdR17</i>	Laboratory stock
	<i>gyrA96 rolA1 thi Δ(lac-proAB)</i>	
S17-1 $\lambda$ <i>pir</i>	Tp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> <i>recA, thi, pro, hsdR<sup>-</sup>M<sup>+</sup></i> [PR4-2-Tc::Mu:Km <sup>r</sup> Tn7]( <i>pir</i> )	[88]
<b><i>K. pneumoniae</i>:</b>		
CG43	K2 serotype	[89]
CG43 $\Delta$ <i>rscB</i>	<i>rscB</i> deletion mutant in CG43, Sm <sup>r</sup>	[64]
Z01	<i>lacZ</i> deletion mutant in CG43, Sm <sup>r</sup>	[69]
CG43 $\Delta$ <i>yfdX</i>	<i>yfdX</i> deletion mutant in CG43, Sm <sup>r</sup>	[4]
CG43 $\Delta$ <i>mrkA</i>	<i>mrkA</i> deletion mutant in CG43, Sm <sup>r</sup>	[3]
CG43 $\Delta$ <i>rscC</i>	<i>rscC</i> deletion mutant in CG43, Sm <sup>r</sup>	This Study
CG43 $\Delta$ <i>rscD</i>	<i>rscD</i> deletion mutant in CG43, Sm <sup>r</sup>	This Study
CG43 $\Delta$ <i>rscD</i> Hk	<i>rscD</i> Hk domain deletion mutant in CG43, Sm <sup>r</sup>	This Study
CG43 $\Delta$ <i>rscD</i> Hpt	<i>rscD</i> Hpt domain deletion mutant in CG43, Sm <sup>r</sup>	This Study
CG43 $\Delta$ <i>rscF</i>	<i>rscF</i> deletion mutant in CG43, Sm <sup>r</sup>	This Study
CG43 $\Delta$ <i>rscC</i> $\Delta$ <i>rscF</i>	<i>rscC rscF</i> mutant in CG43, Sm <sup>r</sup>	This Study



表二：本研究所使用的質體

質體	相關特性	來源或 參考文獻
pKAS46	Suicide vector, <i>rpsL</i> , Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	[66]
pLacZ15	A derivative of pYC016 [90], containing a promoterless <i>lacZ</i> from <i>K. pneumoniae</i> CG43S3, Cm <sup>r</sup>	[69]
pRK415	broad-host-range IncP cloning vector, <i>mob</i> <sup>+</sup> , Tc <sup>r</sup>	[67]
yT & A	PCR cloning vector, Ap <sup>r</sup>	Yeastern Biotech Co.
pPKN09	1253 bp fragment of upstream and 963 bp fragment of downstream region of <i>rscC</i> cloned into pKAS46, Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	This Stud
pPKN010	965 bp fragment of upstream and 869 bp fragment of downstream region of <i>rscD</i> cloned into pKAS46, Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	This Stud
pPKN035	563 bp fragment of upstream and 865 bp fragment of downstream region of <i>rscD</i> HK cloned into pKAS46, Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	This Stud
pPKN055	865 bp fragment of upstream and 536 bp fragment of downstream region of <i>rscD</i> Hpt cloned into pKAS46, Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	This Stud
pPKN031	1035 bp fragment of upstream and 986 bp fragment of downstream region of <i>rscF</i> cloned into pKAS46, Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	This Stud

質體	相關特性	來源或 參考文獻
pRK415- <i>rscC</i>	<i>rscC</i> complement plasmid, Tc <sup>r</sup>	This Stud
pRK415- <i>rscD</i>	<i>rscD</i> complement plasmid, Tc <sup>r</sup>	This Stud
pRK415- <i>rscD</i> Hpt	<i>rscD</i> Hpt complement plasmid, Tc <sup>r</sup>	This Stud
pRK415- <i>rscF</i>	<i>rscF</i> complement plasmid, Tc <sup>r</sup>	This Stud
P <i>rscB</i>	356 bp PCR product carrying putative <i>rscB</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm <sup>r</sup>	This Stud
P <i>rscC</i>	426 bp PCR product carrying putative <i>rscC</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm <sup>r</sup>	This Stud
pHY064	424 bp PCR product carrying putative <i>rscDB</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm <sup>r</sup>	Laboratory stock
P <i>rscF</i>	245 bp PCR product carrying putative <i>rscF</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm <sup>r</sup>	This Stud
pHY123	<i>rscB</i> complement plasmid, Tc <sup>r</sup>	Laboratory stock

表二：本研究所使用的引子

引子	序號(5'→3')
KN001	<u>CTCGAGAAGCAGTTATGTGAAACGCTTGA</u>
KN002	<u>GAATTC</u> CCTAATATGGATGGTTATCGCCTG
KN003	<u>TCTAGAAAGCAGTTATGTGAAACGCTTGAG</u>
KN004	<u>CTCGAGCCTAATATGGATGGTTATCGCCTG</u>
KN013	TTCACCCACTCAATTTGCTC
KN014	AATTCTCCCTGATCCCCG
KN015	ACTACCTCTCTTCCGTCTCGC
KN016	ATCGCCACATTGAAATATCTTGC
KN017	<u>TCTAGATTTACCCCTATTTCAACCGGATG</u>
KN018	<u>GAATTC</u> CCTTCTACAGCAAGCTCTTGACG
KN019	<u>TCTAGATATTTTCCCGGCCCTTTTG</u>
KN020	<u>GAATTC</u> TATTCCCGCCCTTTACGCA
KN031	<u>CTCGAGACAGATCGGTAAAGCACGCATAGTATT</u>
KN032	<u>TCTAGAAAGTCGGCGTTATCGTCGGG</u>
KN033	<u>CTCGAGCTTAACGTCTCGGCGCAATGA</u>
KN034	<u>GAATTC</u> TGCCCAGCCTGAAACAAAAAAA
KN035	CTGGCTGGCGTAAGTGGTGTT
KN036	AACGTTTCGCCCTAATCCCATC
KN040	GCCACTTCCCGGATCTGTCTGA
KN041	GAGAGACGCTTTCCGGGGTGA
KN042	GGGGATAAAAATGCGCCGCT
KN043	CTGAAAAAAAGCCTCTCGCCGTC
KN044	CACCCAGATCGCGGAACGG

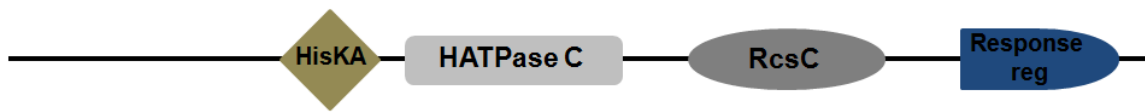
---

引子	序號(5'→3')
KN047	AGATCTTGGTCATCGGCAATAATTACGTTC
KN048	AGATCTCTCGTGCAGCGCGTTGAC
KN049	GGATCCTGAAAACGTGGTGGGTCTGCA
KN052	AGATCTGAATATTCTCAGCGGCGCGA
KN053	AGATCTGGCCAGTGCGGAAAATAGCC
KN054	AGATCTGAACTTTAATATTAGCACGGCGATG
KN056	CTCGAGGTGAACGAGCAGCCCCAGCG
KN057	CTCGAGGCAAACGCCCTTACCTTCTGG
KN058	GAATTCAAAGTTGACCCGCAGTTGGC

---

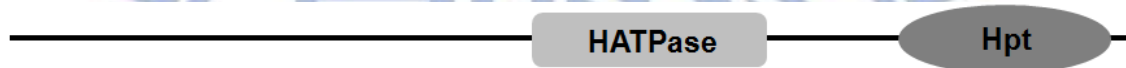


(A)



Family	Description
HisKA	His Kinase Adomain
HATPase C	Histidine kinase
RcsC	RcsC Alpha-Beta-Loop(ABL)
Response reg	Response regulator receiver domain

(B)

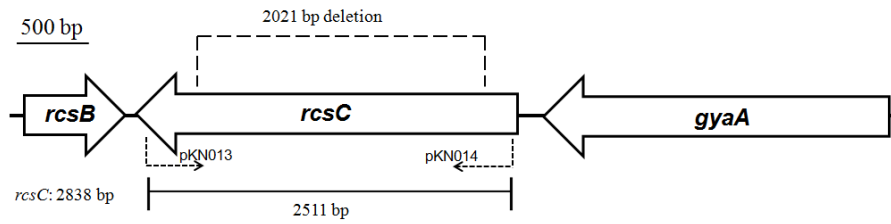


Family	Description
HATPase	Histidine kinase
Hpt	Hpt domain

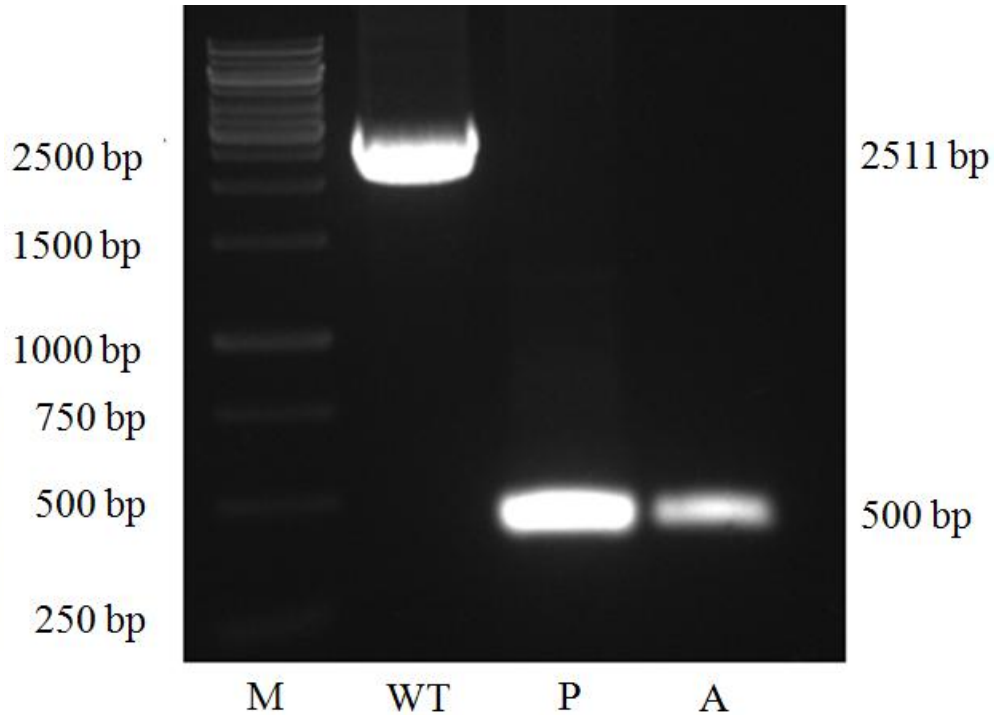
圖一：Rcs C 及 RcsD 蛋白質功能區域預測

利用線上軟體 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 預測 Rcs C (A) 及 RcsD (B) 的功能及區域。

(A)



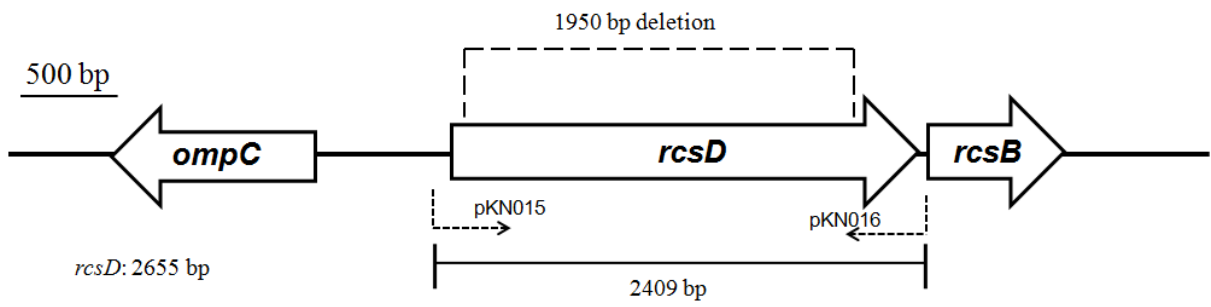
(B)



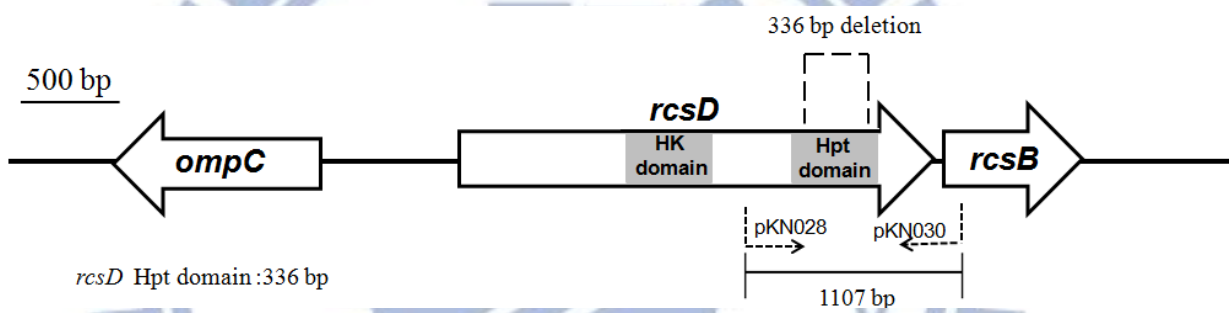
圖二、建構 *rcsC* 基因缺損突變株

(A) *rcsC* 及兩側基因示意圖 pKN013/pKN014 為設計來確認  $\Delta rcsC$  突變株的引子；虛線部分表示基因缺損位置。(B) 利用 PCR 原理確認  $\Delta rcsC$  突變株。M：DNA 分子大小標記物，WT：野生型菌株，P：帶有突變片段的 pKAS46 載體 (pPKN009)，A： $\Delta rcsC$  突變株。基因缺損的詳細方法於實驗材料與法中。

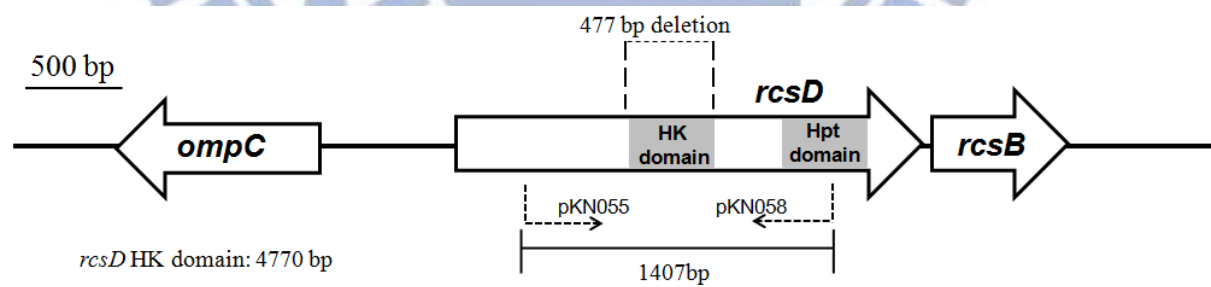
(A)



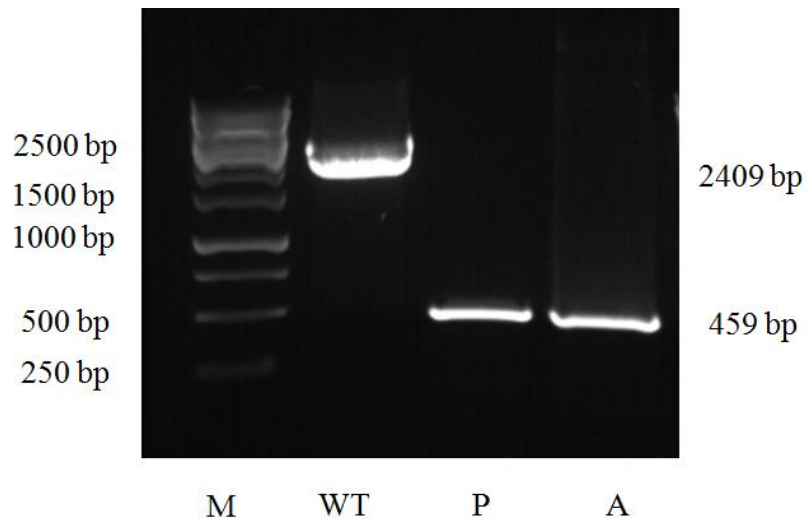
(B)



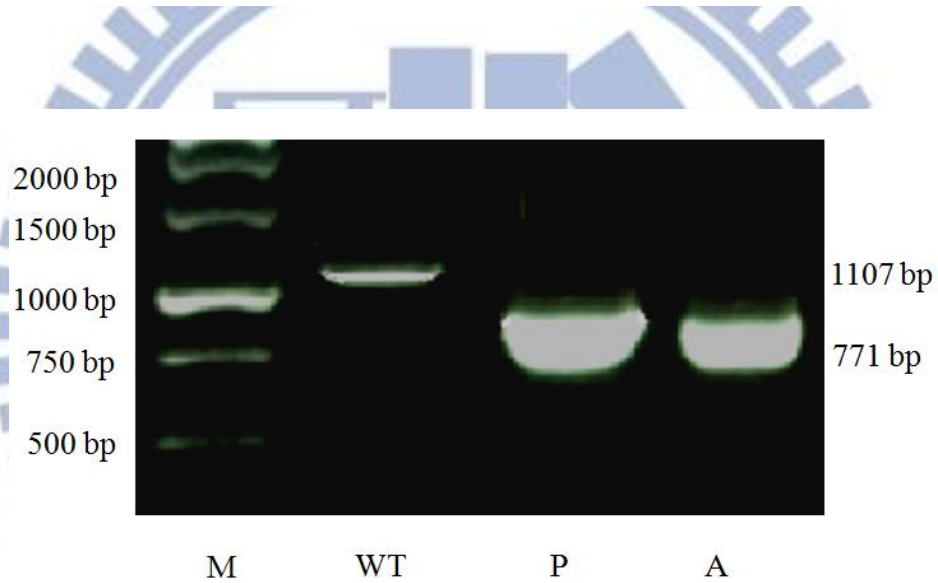
(C)



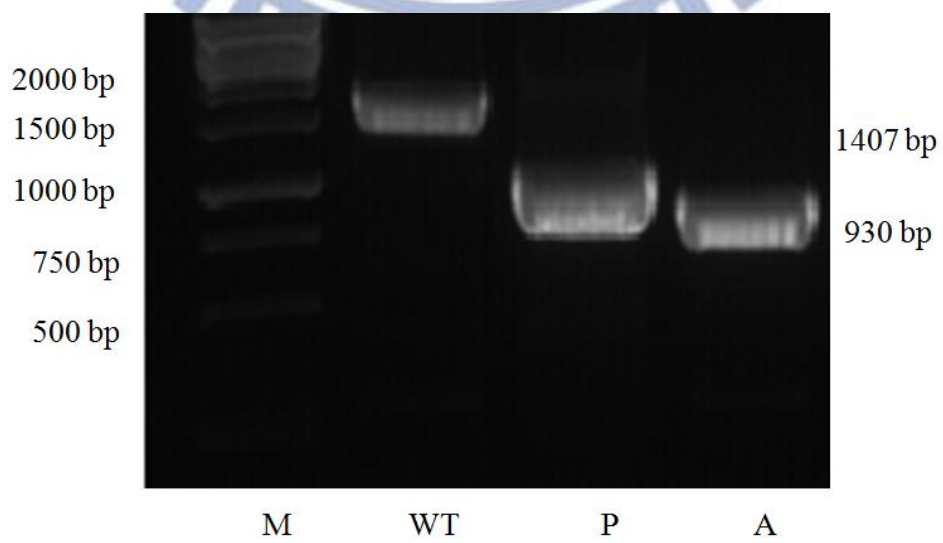
(D)



(E)



(F)

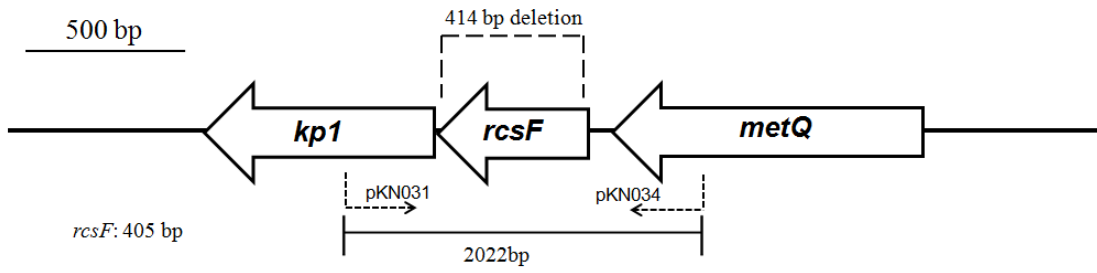




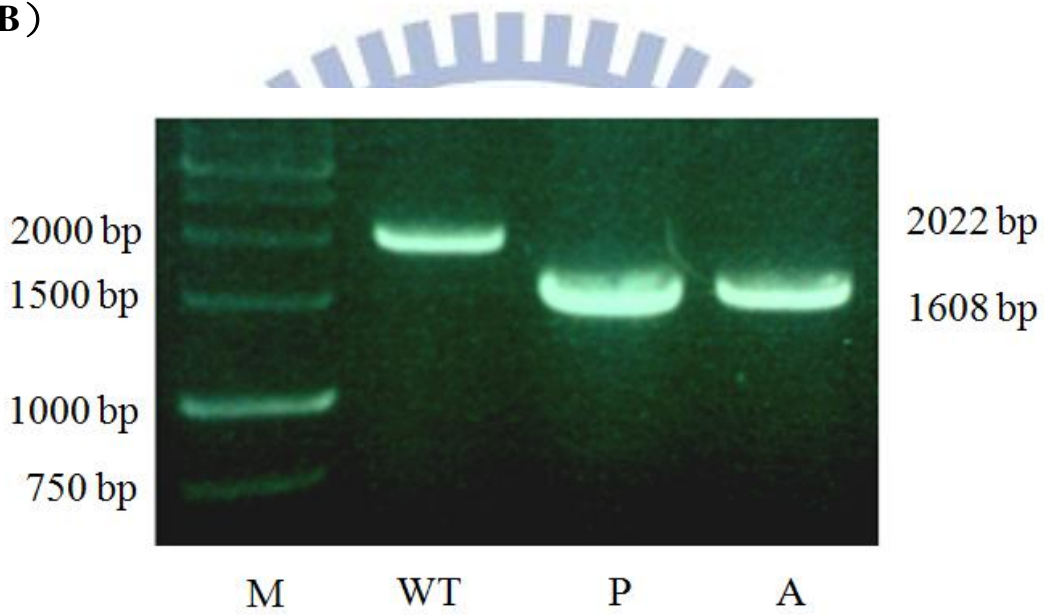
### 圖三、建構 *rcsD*、*rcsD-hk* 及 *rcsD-hpt* 基因缺損突變株

(A) *rcsD* 及兩側基因示意圖，pKN015/pKN016 為確認 *rcsD* 基因缺失的引子；虛線部分表示基因缺損位置。(B) *rcsD* histidine phosphotransfer (hpt) domain 及兩側基因示意圖，引子對 pKN028/pKN030 作為確認  $\Delta rcsD-hpt$  的核酸片段缺失，虛線部分表示基因缺損位置。(C) *rcsD* histidine kinase (hk) domain 及兩側基因示意圖，pKN055/pKN058 為確認  $\Delta rcsD-hk$  核酸片段缺失的引子，虛線部分表示基因缺損位置。(D) 利用 PCR 確認  $\Delta rcsD$  突變株。M：DNA 分子大小標記物，WT：野生型菌株，P：帶有突變片段的 pKAS46 載體 (pPKN010)，A： $\Delta rcsD$  突變株。(E) 利用 PCR 確認 RcsD-Hpt domain 的缺失。M：DNA 分子大小標記物，WT：野生型菌株，P：帶有突變片段的 pKAS46 載體 (pPKN035)，A： $\Delta rcsD-hpt$  突變株。(F) 利用 PCR 確認 RcsD-HK domain 的缺失。M：DNA 分子大小標記物，WT：野生型菌株，P：帶有突變片段的 pKAS46 載體 (pPKN055)，A： $\Delta rcsD-hk$  突變株。建構基因缺損株的詳細方法描述於實驗材料與方法。

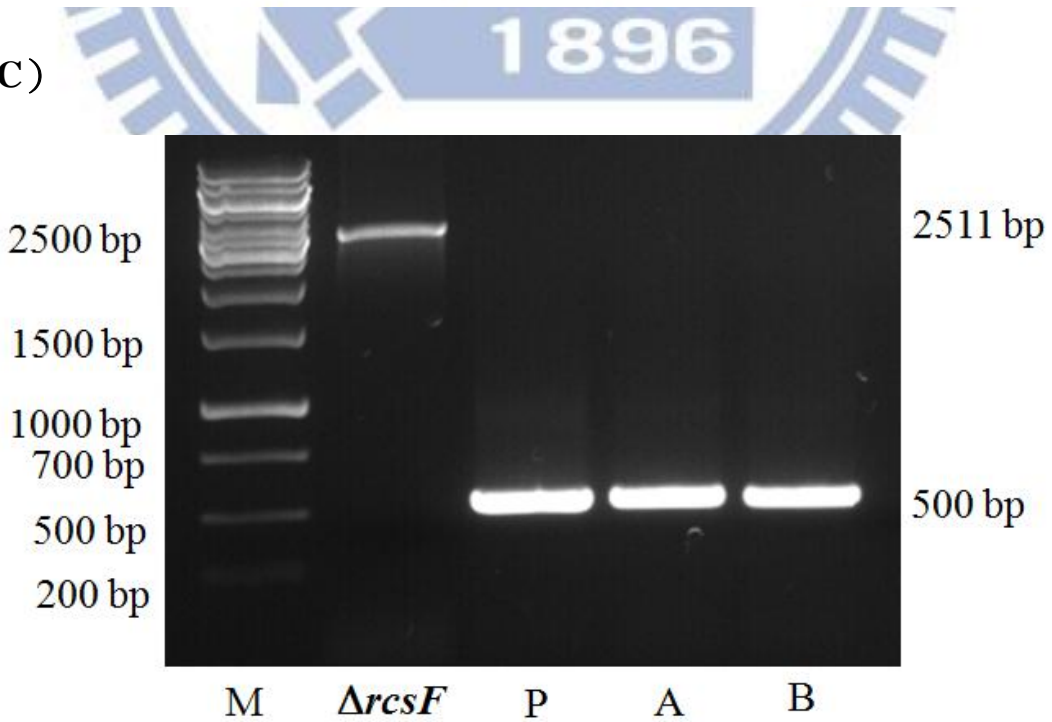
(A)



(B)



(C)

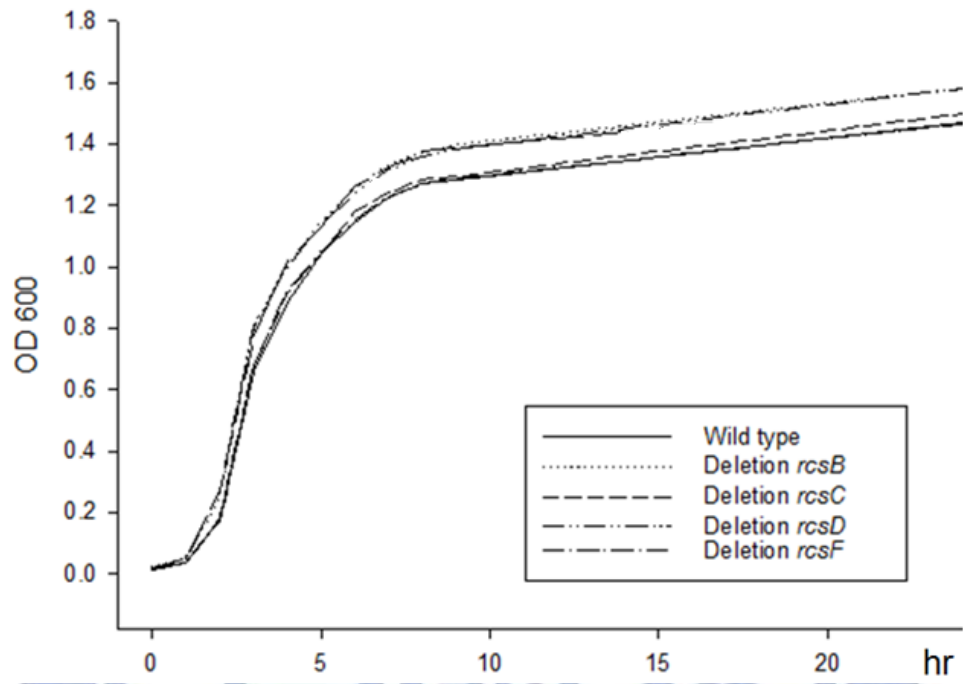


#### 圖四、建構 *rcsF*、*rcsCrcsF* 基因缺損突變株

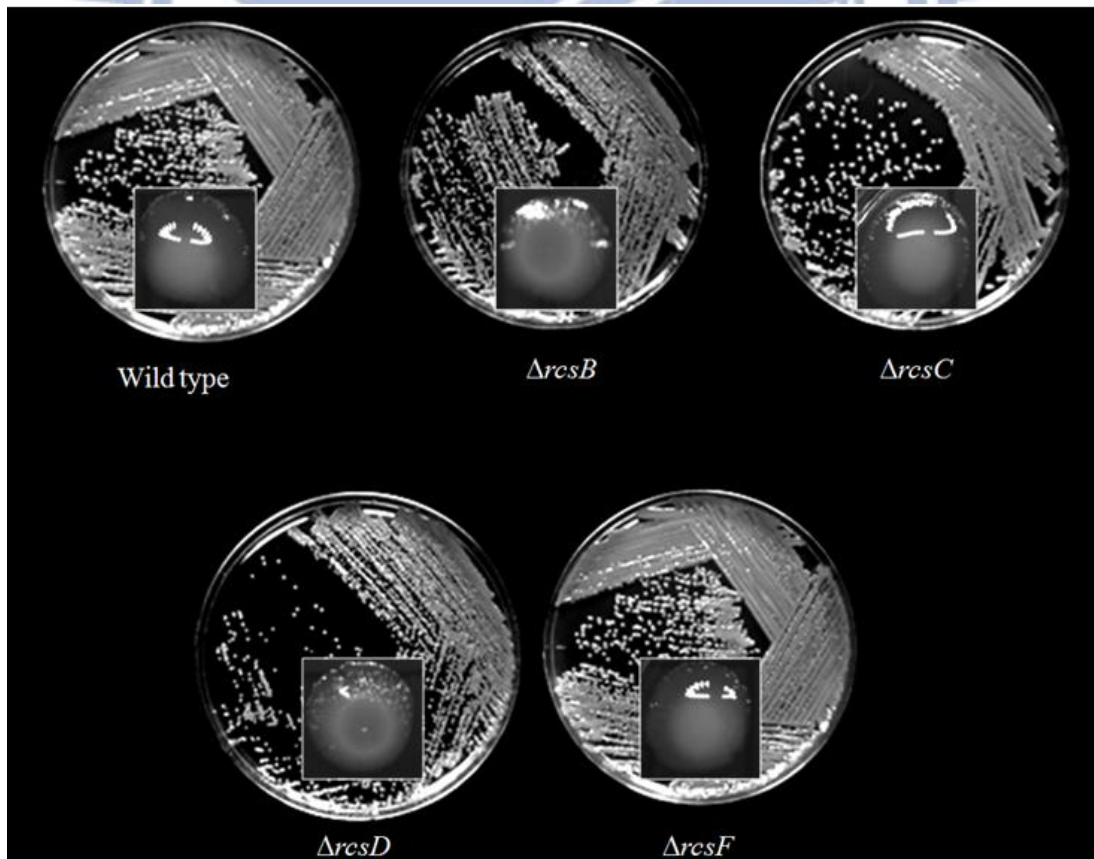
(A) *rcsF* 及兩側基因示意圖 pKKN031/pKKN034 為設計來確認  $\Delta rcsF$  突變株的引子；虛線部分表示基因缺損位置。(B) 利用 PCR 原理確認  $\Delta rcsF$  突變株。M：DNA 分子大小標記物，WT：野生型菌株，P：帶有突變片段的 pKAS46 載體 (pPKN031)，A： $\Delta rcsF$  突變株。(C) 利用 PCR 原理確認  $\Delta rcsF \Delta rcsC$  突變株。M：DNA 分子大小標記物， $\Delta rcsF$ ：*rcsF* 基因缺損突變株，P：帶有突變片段的 pKAS46 載體 (pPKN009)，A： $\Delta rcsC$  突變株，B： $\Delta rcsF \Delta rcsC$  突變株。基因缺損的詳細方法於實驗材料與法中。



(A)



(B)

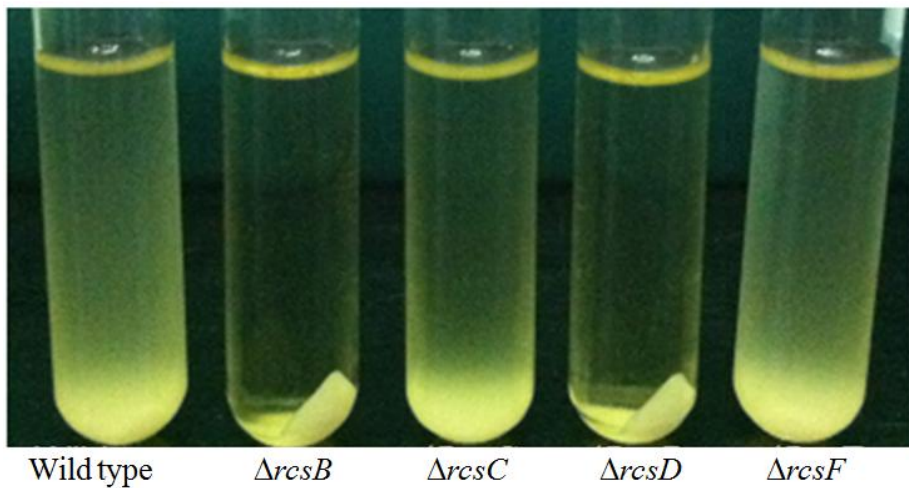


圖五、*rcsB*、*rcs C*、*rcs D*及 *rcs F*基因缺損株的生長曲線 (A) 和菌落  
型態 (B)

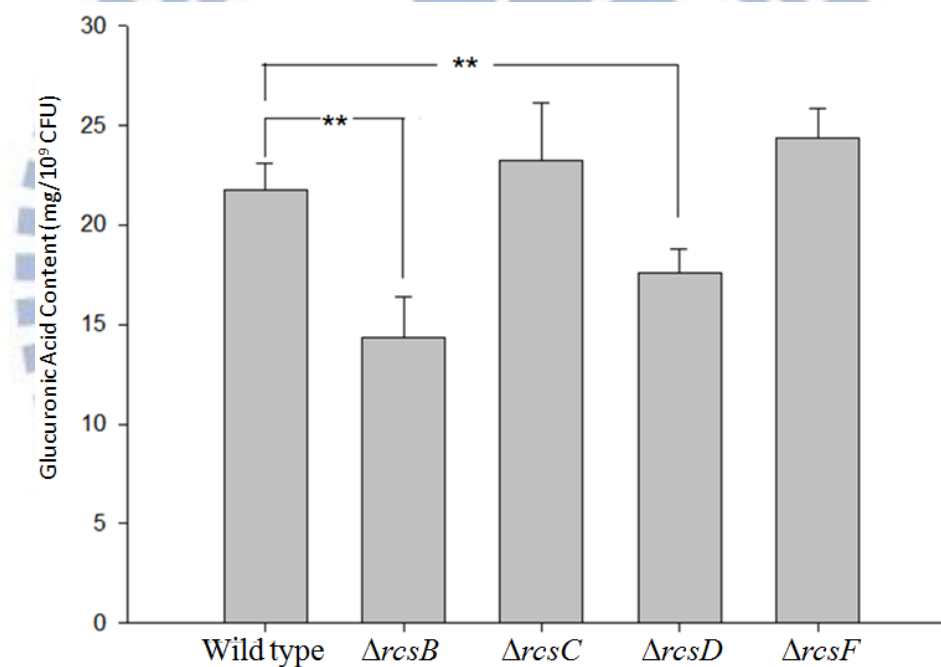
(A) 細菌在 LB 培養液中隔夜培養後，取 20  $\mu$ l 菌液至 4 ml LB 中，  
在置於 37°C 培養，每隔 1 小時測量其波長 600 nm 下吸光值。(B) WT  
及各個基因缺損後的菌落型態。



(A)

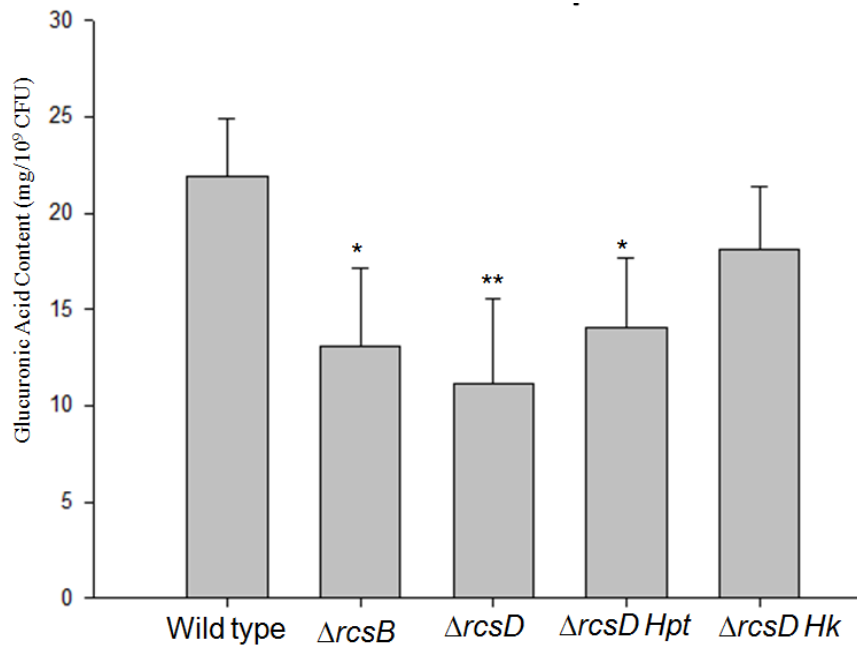


(B)



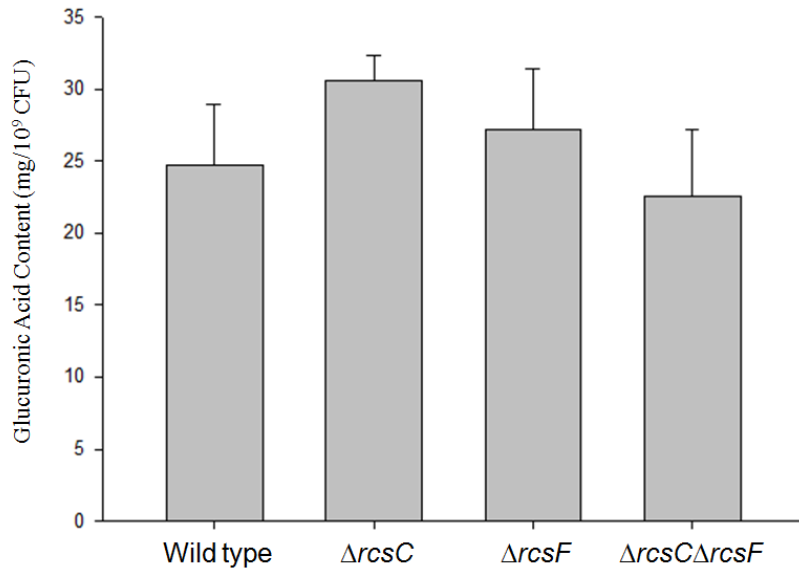
圖六、*rcsB*、*rcsC*、*rcsD*及*rcsF*基因缺損株對莢膜表現的影響

(A) WT 及各個基因缺損突變株菌液以 4000 轉離心 5 分鐘。(B) 細菌在 LB 培養液中培養隔夜，取 500  $\mu$ l 菌液萃取其莢膜多醣體，利用呈色劑呈色，量其在波長 520 nm 下的吸光值，並計算在  $1 \times 10^9$  CFU 含有多少莢膜多醣體。\* \* : p value < 0.01。



圖七、*rcs D*及 *rcs D* Hpt 基因缺損株莢膜表現量下降

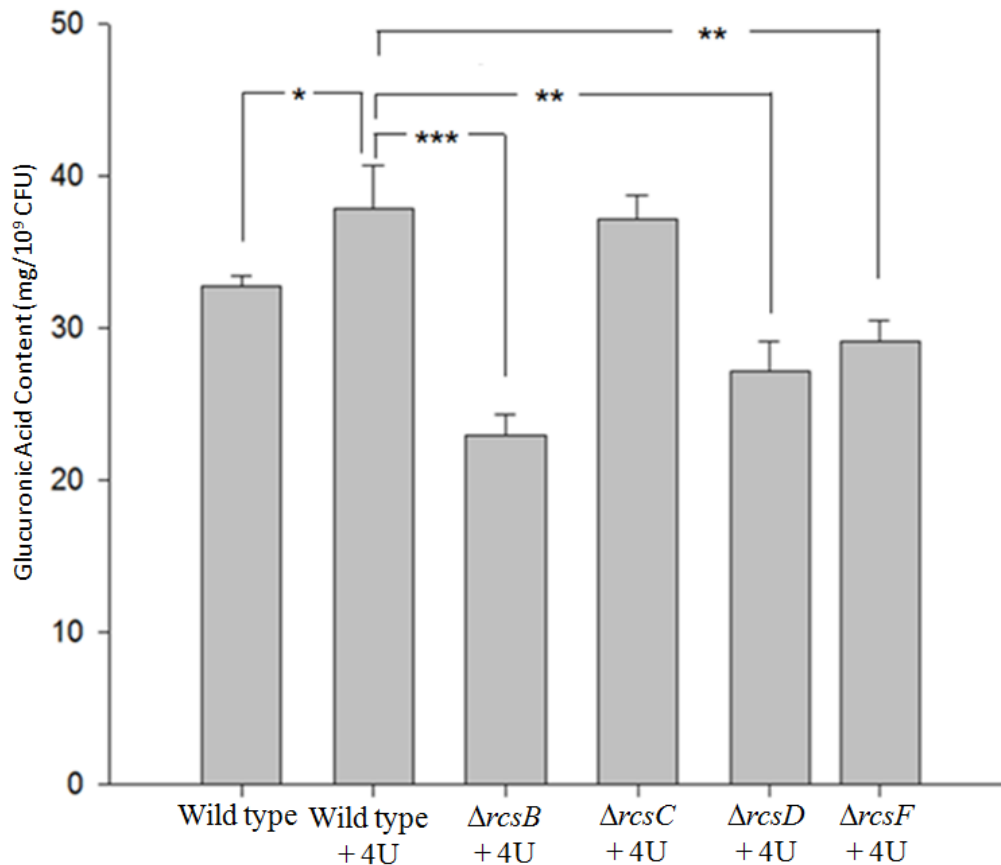
比較 *rcs D* 上 Hpt 以及 Hk 區域缺損時莢膜表現量。將細菌在 LB 培養液中培養隔夜，取 500  $\mu$ l 菌液萃取其莢膜多醣體，利用呈色劑呈色，量其在波長 520 nm 下的吸光值，並計算在  $1 \times 10^9$  CFU 含有多少莢膜多醣體。\* : p value < 0.05、\*\* : p value < 0.01。



圖八、 *rcsCrcsF* 雙基因缺損突變株對莢膜生合成沒有影響

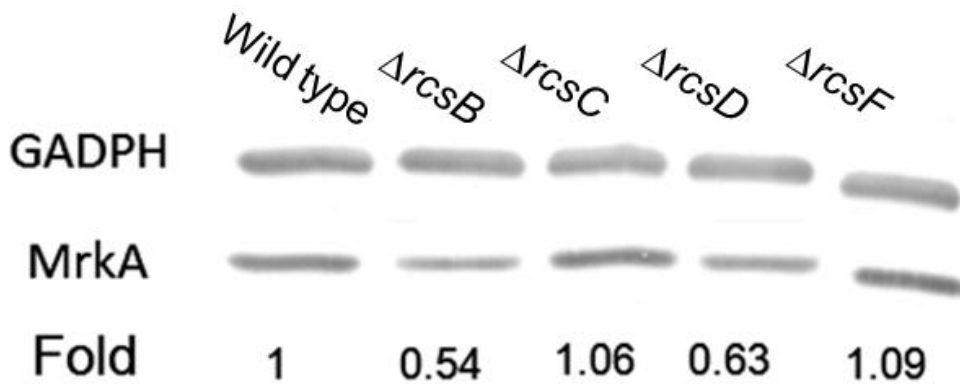
比較 *rcsC*、*rcsF* 單基因缺損以及 *rcsCrcsF* 雙基因缺損突變株對莢膜生合成的影響。取 500  $\mu$ l 菌液萃取其莢膜多醣體，利用呈色劑呈色，量其在波長 520 nm 下的吸光值，並計算在  $1 \times 10^9$  CFU 含有多少莢膜多醣體。





圖九：*rcsB*、*rcsC*、*rcsD*及*rcsF*基因缺損株對多粘菌素B的敏感度  
 取 200  $\mu$ l 隔夜培養後的菌液稀釋於 4 ml LB 試管中，培養至 OD<sub>600</sub> 為  
 0.6 時加入 4 單位的多黏素 B 培養 14 小時，取 500  $\mu$ l 菌液萃取其莢膜  
 多醣體，利用呈色劑呈色，量其在波長 520 nm 下的吸光值，並計算在  
 1 $\times$ 10<sup>9</sup>CFU 含有多少莢膜多醣體。\* : p value < 0.05、\*\* : p value <  
 0.01、\*\*\* : p value < 0.001

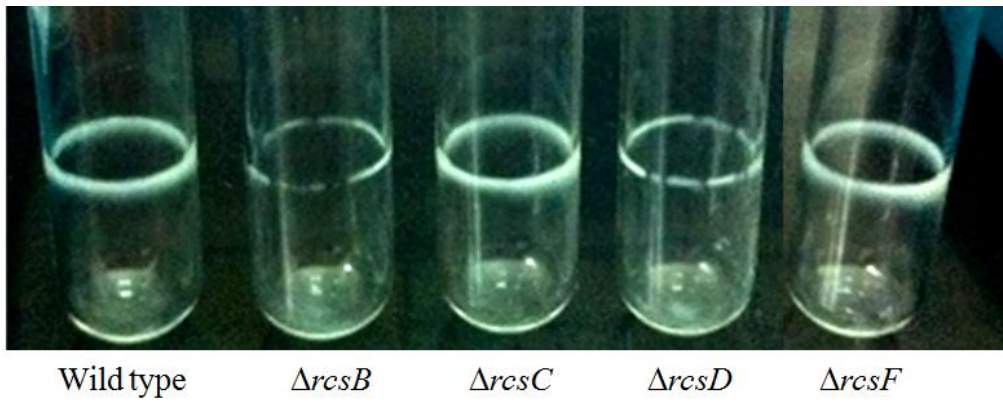
(A)



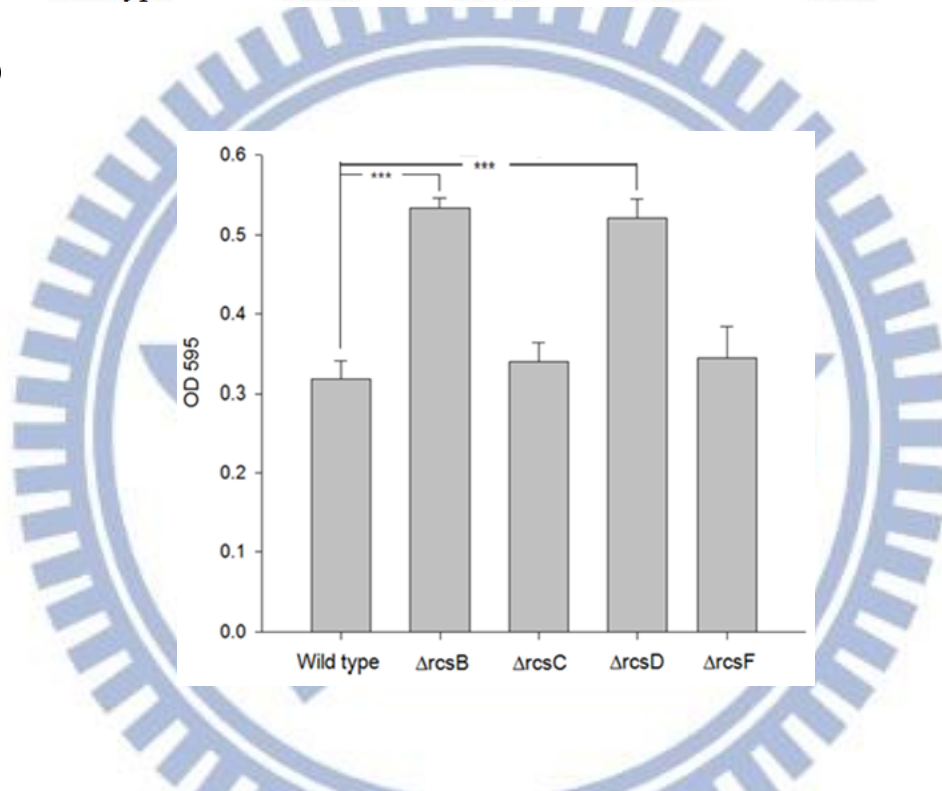
圖十：*rscB* 及 *rscD* 基因缺損株後第三型線毛 MrkA 單位蛋白生成量下降

MrkA 為第三型線毛的單位蛋白，*rscB* 及 *rscD* 基因缺損株使其表現量下降。取 400  $\mu$ l 隔夜培養後的菌液，離心後回溶於 100  $\mu$ l 二次水中，加入蛋白質染劑加熱使其蛋白質變性，蛋白質經過膠電泳分離後，將膠上之蛋白質以電泳 100 分鐘（140V、400 mA）轉漬於聚篇二氟乙烯膜，利用呈色劑呈色。

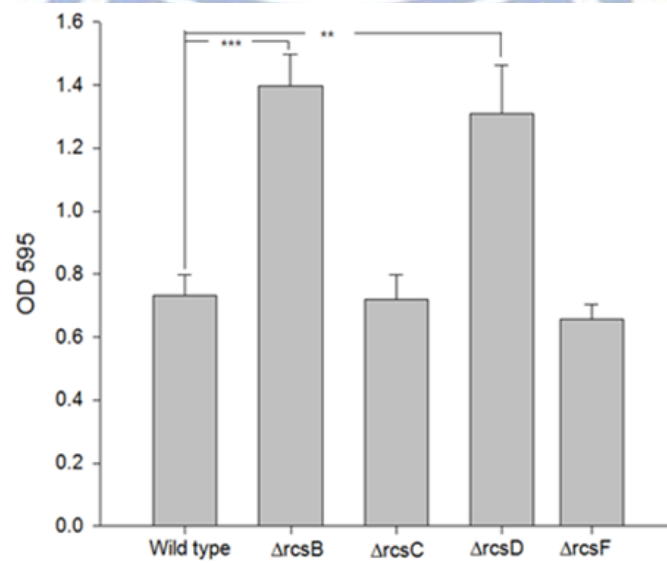
(A)



(B)



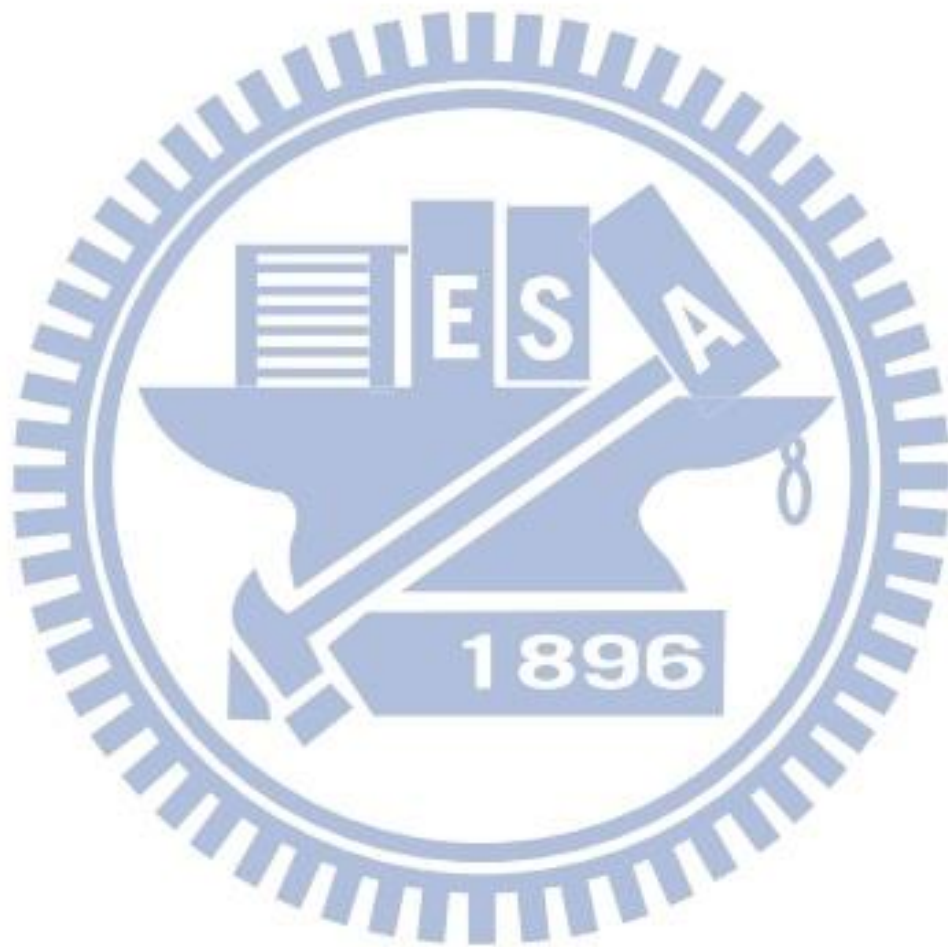
(C)



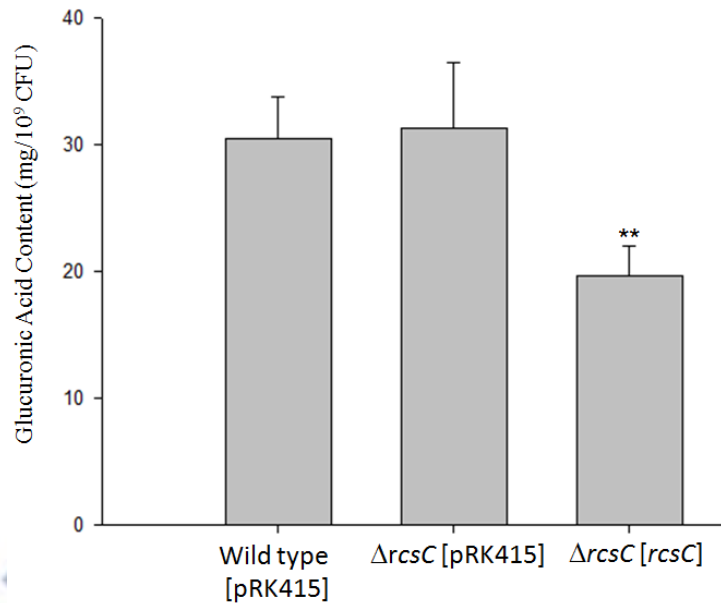
圖十一：*rcsB*、*rcsC*、*rcsD*及 *rcsF*基因缺損株對生物膜型成的影響

WT 及各個基因缺損突變株在靜態培養下，在玻璃管 (A) 生物膜的形  
成，或在 96 孔盤內培養 12 小時 (B) 或 24 小時 (C) 生物膜的形

\*\* : p value < 0.01、\*\*\* : p value < 0.001。



(A)

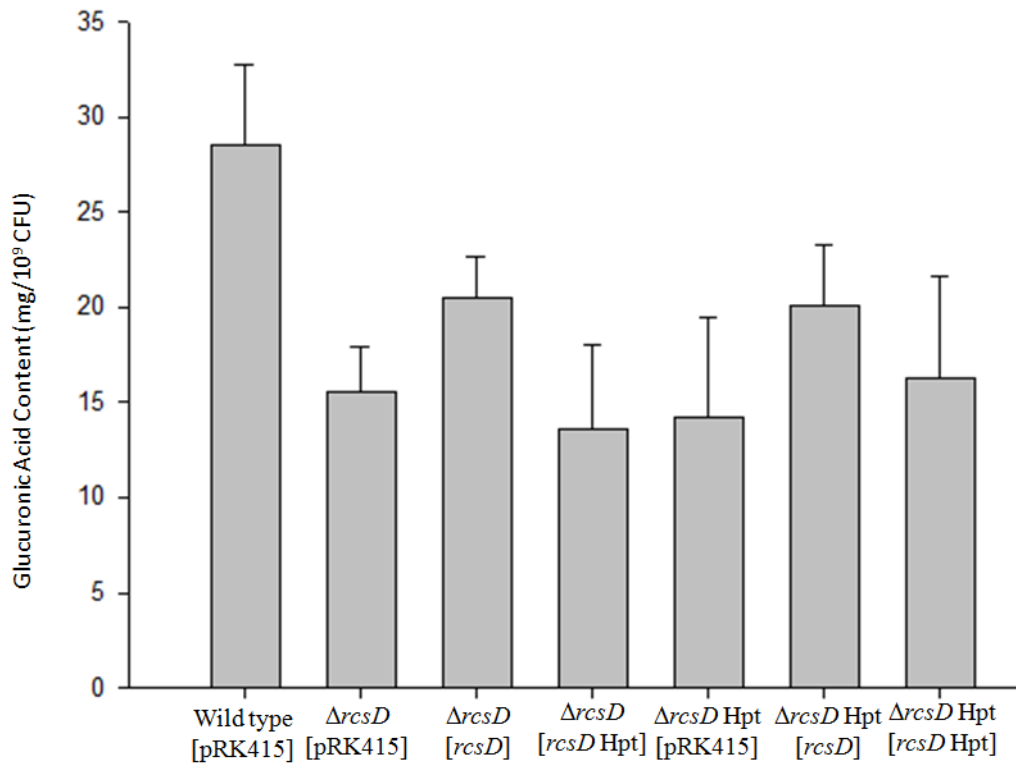


(B)



圖十二、RcsC 大量表達使對莢膜表現增加以及 MrkA 表達量上升

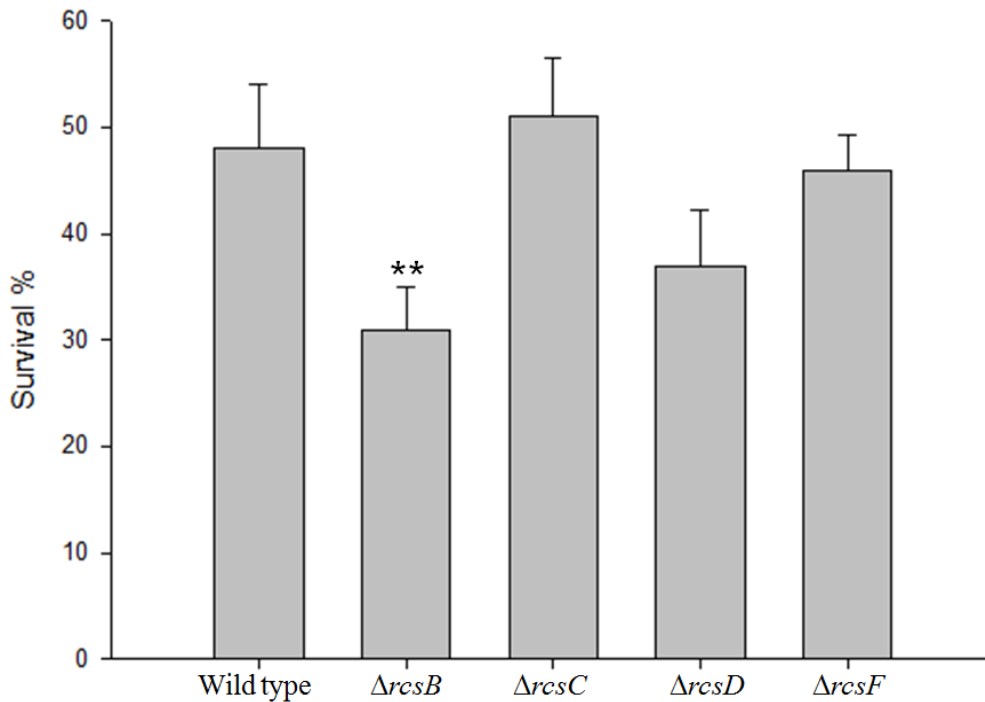
利用質體 pRK415 回補 *rcsC* 並大量表達，觀測其結果。(A) 細菌在 LB 培養液中培養隔夜後，取 500  $\mu$ l 菌液萃取其莢膜多醣體，利用呈色劑呈色，量其在波長 520 nm 下的吸光值，並計算在  $1 \times 10^9$  CFU 含有多少莢膜多醣體。 $1 \times 10^9$  CFU 中含有多少莢膜多醣體。(B) RcsC 大量表達時第三型線毛單位蛋白 MrkA 的表達量。\* \* : p value < 0.01



圖十三、回補 RcsD 以及 RcsD Hk 區域莢膜表現量

利用質體 pRK415 在  $\Delta rcsD$  及  $\Delta rcsD$  Hpt 中回補 *rscD* 或 *rscD* Hk 區域，觀測其結果。細菌在 LB 培養液中培養隔夜後，取 500  $\mu$ l 菌液萃取其莢膜多醣體，利用呈色劑呈色，量其在波長 520 nm 下的吸光值，並計算在  $1 \times 10^9$  CFU 含有多少莢膜多醣體。 $1 \times 10^9$  CFU 中含有多少莢膜多醣體。

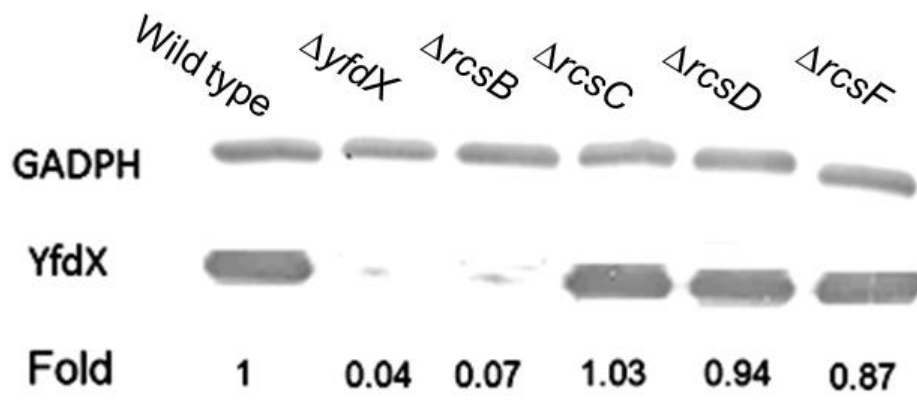
(A)



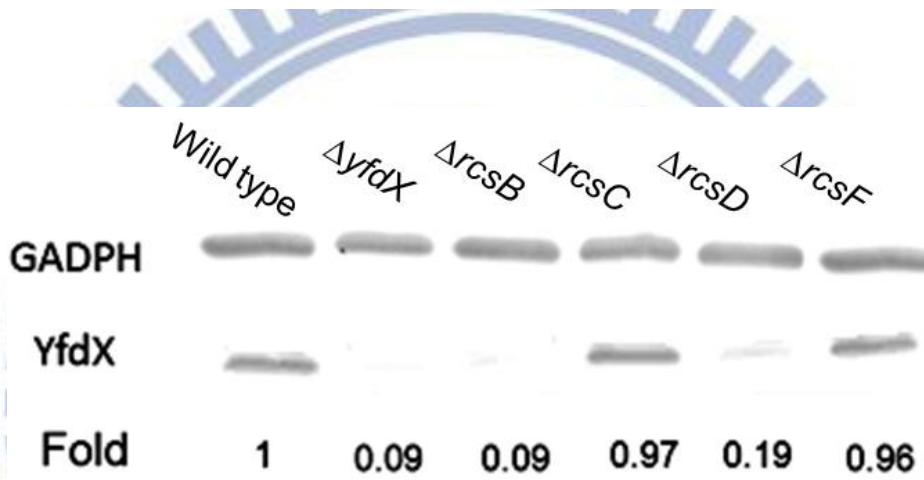
圖十四 A：*rcsB*、*rcsC*、*rcsD*及 *rcsF* 基因缺損株後酸性環境下的存活率

細菌在 LB 培養液隔夜培養後，20 倍稀釋至新鮮的 LB 培養液中，再培養 3 個小時至  $OD_{600}$  約為 0.6~0.8，之後將菌體移至 pH 4.4 的 LB 培養液中，適應 1 小時後，再移至 pH 3.0 的 M9 培養液中，培養 1 小時後，取適當菌液稀釋塗盤後，計算菌數；存活率是根據在 45 分鐘或 1 小時後，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。\* \* : p value < 0.01

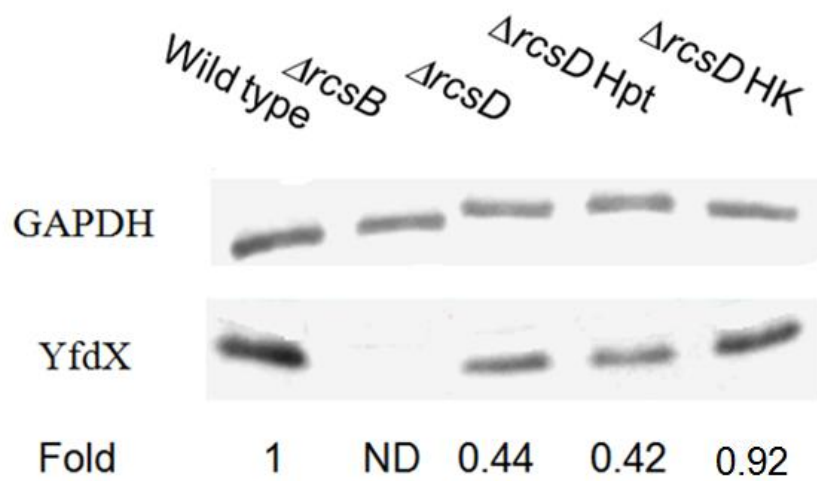
(B)



(C)



(C)



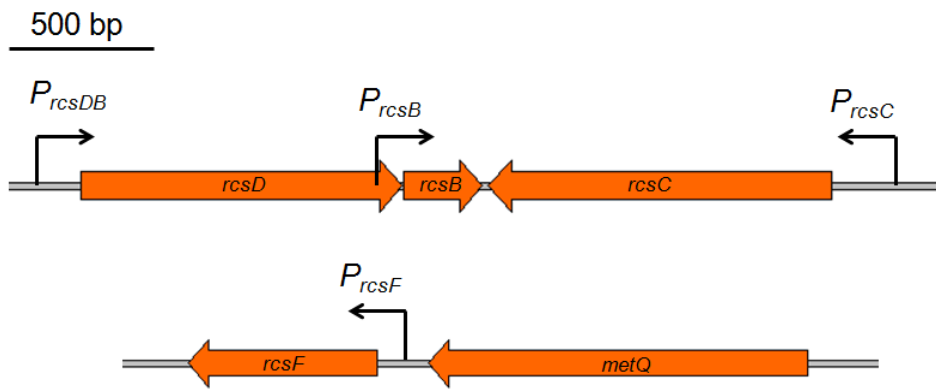


圖十四 B 以及 C : *rcsB*、*rcs C*、*rcs D*及 *rcs F*基因缺損株對膜間質伴  
隨蛋白 YfdX 蛋白表達量

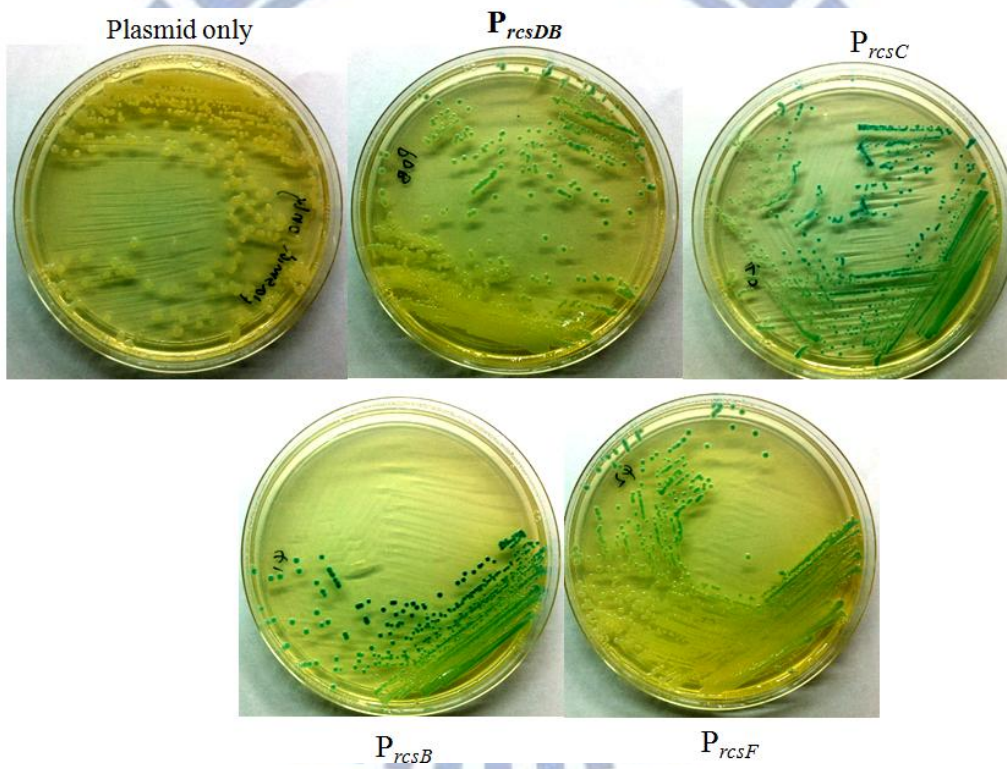
YfdX 為膜間質伴隨蛋白。取 400  $\mu$ l 隔夜培養後的菌液，離心後回溶於 100  $\mu$ l 二次水中，加入蛋白質染劑加熱使其蛋白質變性，蛋白質經過膠電泳分離後，將膠上之蛋白質以電泳 100 分鐘 (140V、400 mA) 轉漬於聚篇二氟乙烯膜，利用呈色劑呈色。(B) pH5.5 下，以 LB 培養液靜置培養 (C) pH5.5 下，以 LB 培養液搖晃培養 (C) *rcsD* Hpt 及 *rcs D* Hk 基因缺損株於 pH5.5 下，以 LB 培養液靜置培養。\* : p value < 0.05、\*\* : p value < 0.01



(A)



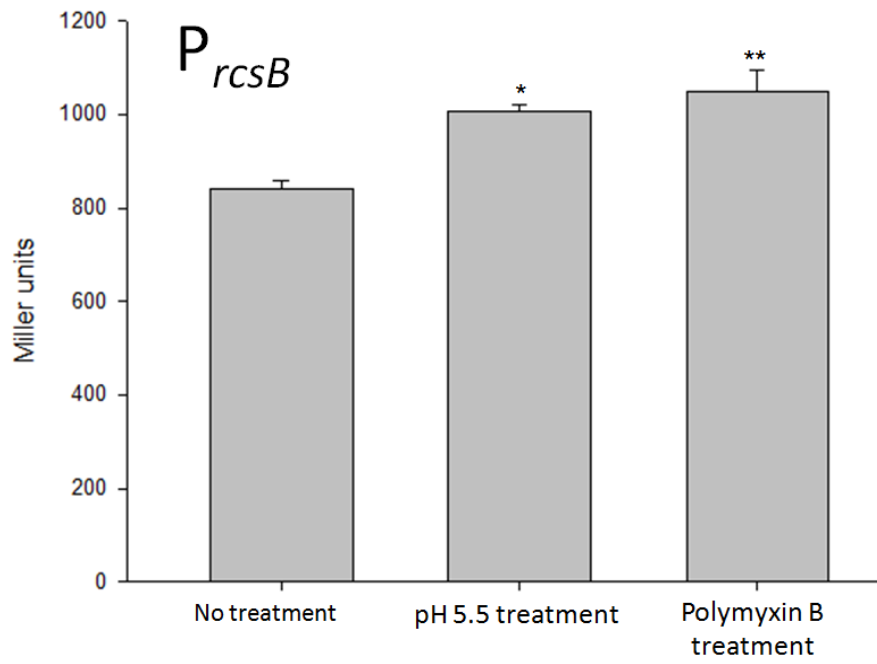
(B)



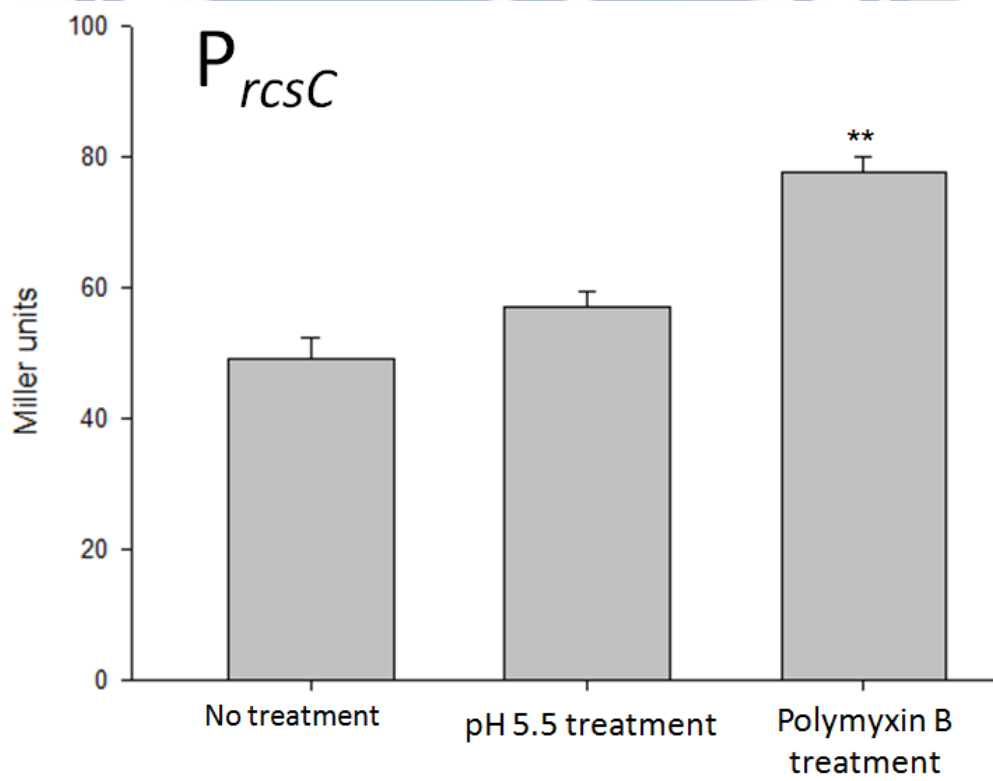
圖十五：*rcsB*、*rcsC*、*rcsD*及 *rcsF* 啟動子分析及建構

利用線上軟體 SoftBerry (<http://linux1.softberry.com/>) 預測其啟動子位置。(A) *rcsB*、*rcsC*、*rcsD*、*rcsF* 基因前啟動子預測結果蛋白質預測結果 (B) 將其預測片段放入 LacZ 載體中，並在 LacZ 缺損的細菌中表達，有功能的載體即可產生藍色產物。

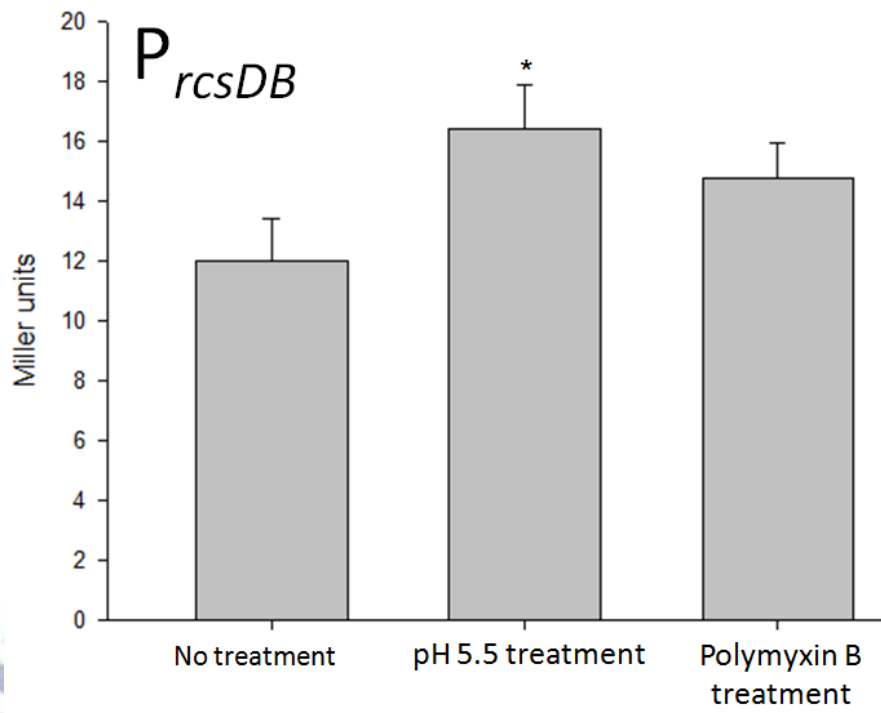
(A)



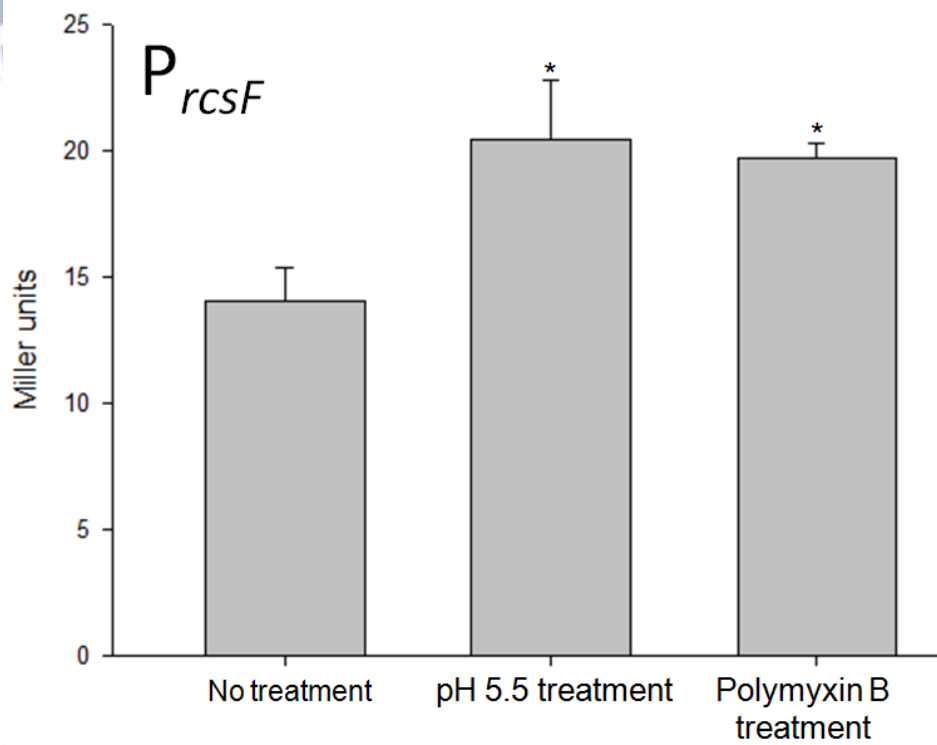
(B)



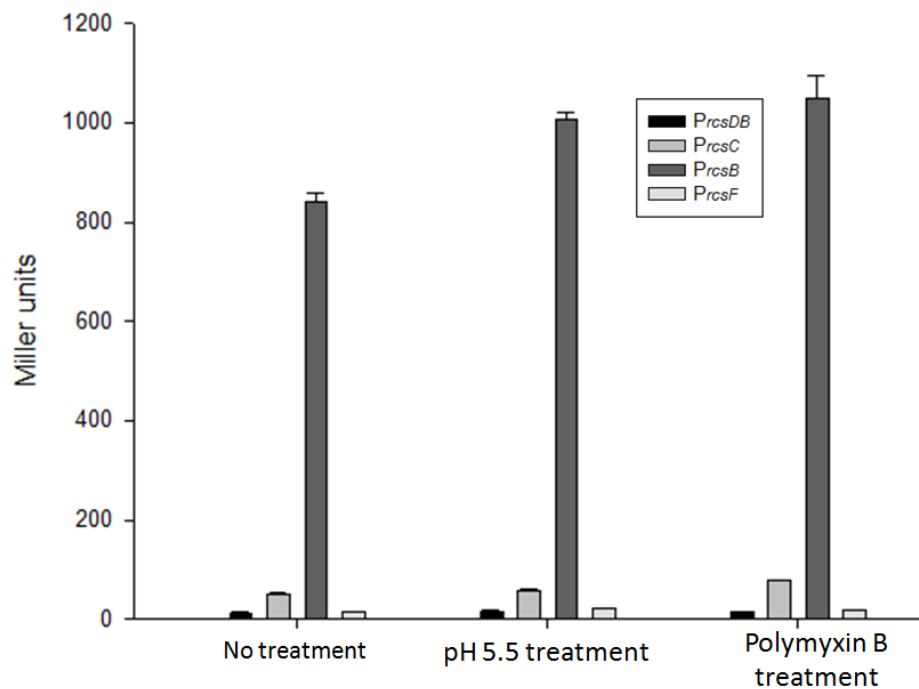
(C)



(D)



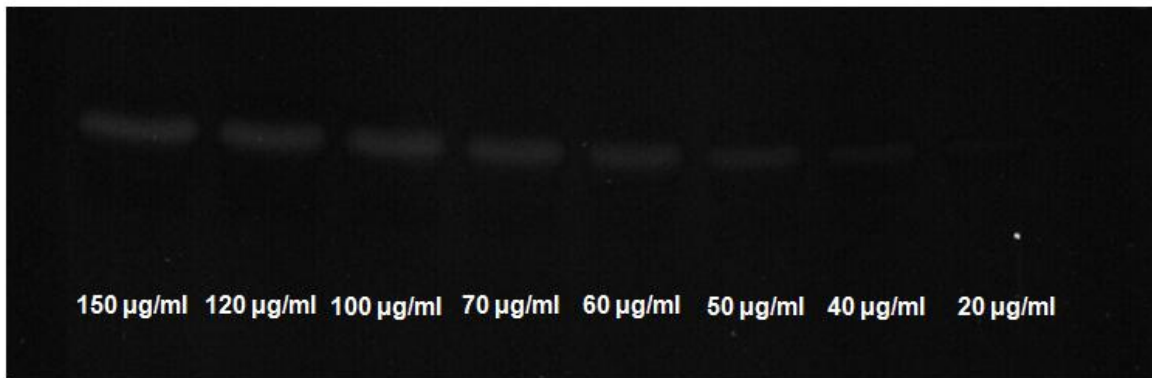
(E)



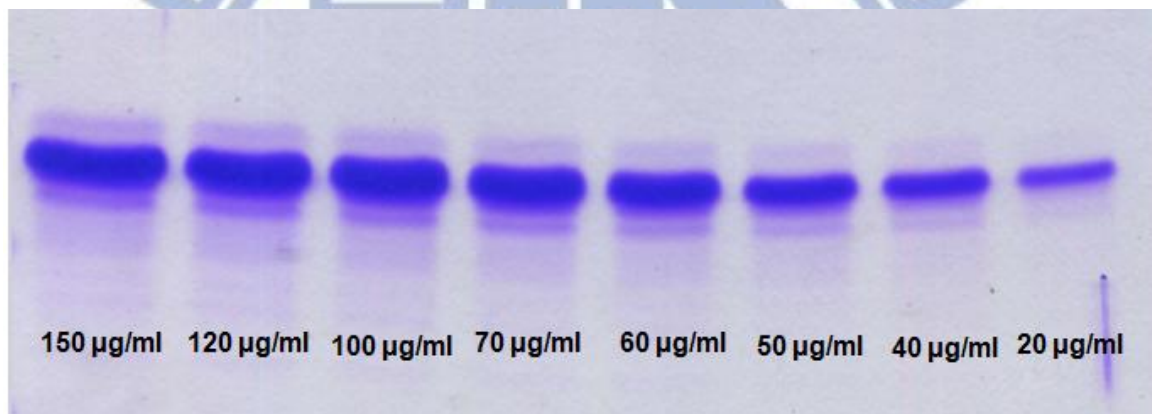
圖十六：微酸或多黏素處理下 *rscB*、*rscC*、*rscD*及 *rscF* 啟動子活性變化

隔夜培養之菌液以 200 被稀釋，再將細菌加入不同壓力下的 LB 中，培養 16 小時後，再分別測定其啟動子活性。隔夜培養之菌液以 200 被稀釋，再將細菌加入不同壓力下的 LB 中，培養 16 小時後，再分別測定其啟動子活性。\* : p value < 0.05、\* \* : p value < 0.01、\* \* \* : p value < 0.001

(A)



(B)

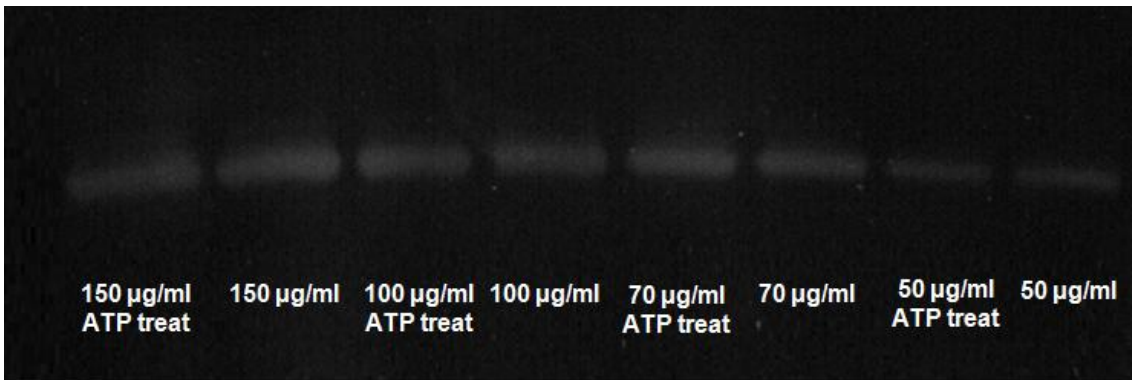


圖十七 A 及 B、RcsC Hpt 區域蛋白於 Pro-Q 呈色劑染色結果

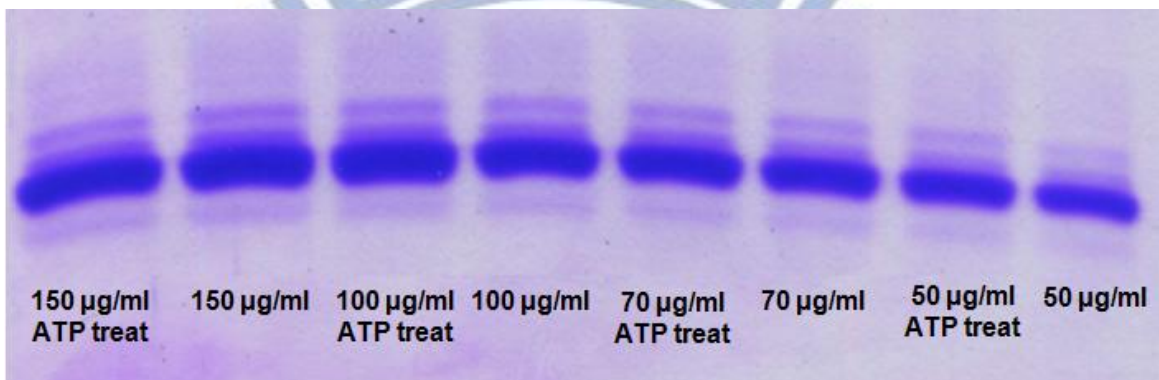
(A) 利用大腸桿菌大量表達克雷白氏肺炎桿菌 RcsC Hpt 區域蛋白，將蛋白純化後，稀釋為不同濃度後進行 SDS 電泳膠分離，將電泳後的膠以 Pro-Q Diamond 磷酸蛋白質螢光染劑染色，以波長 595 進行觀測。

(B) RcsC Hpt 區域蛋白，將蛋白純化後，稀釋為不同濃度後進行 SDS 電泳膠分離，利用孔雀藍 (Coomassie brilliant blue) 染色後的結果。

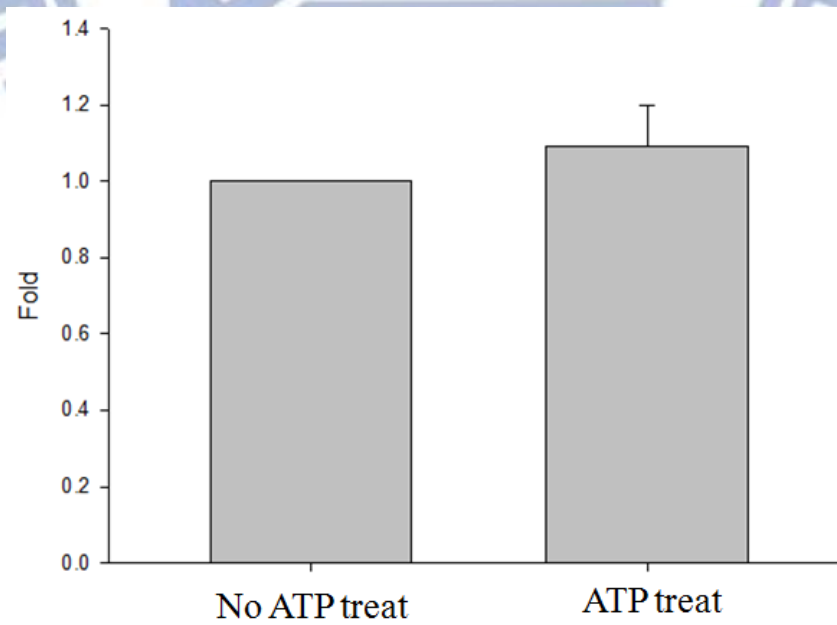
(C)



(D)



(E)



## 圖十七 C 及 D、RcsC Hk 區域蛋白於 ATP 處理後 Pro-Q 呈色劑染色

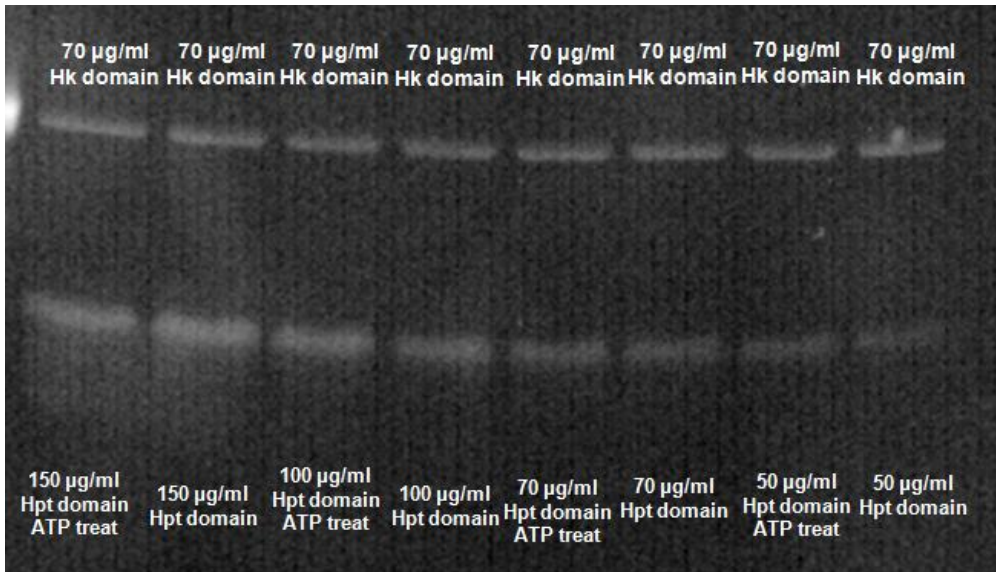
### 結果

(C) 利用大腸桿菌大量表達克雷白氏肺炎桿菌 RcsC Hk 區域蛋白，將蛋白純化且稀釋為不同濃度，之後分為兩組，一組使用 ATP 處理；另一組則無，處理後進行 SDS 電泳膠分離，將膠以 Pro-Q Diamond 磷酸蛋白質螢光染劑染色，以波長 595 進行觀測結果。(D) RcsC Hk 區域蛋白，將蛋白純化後，稀釋為不同濃度後進行 SDS 電泳膠分離，利用孔雀藍 (Coomassie brilliant blue) 染色後的結果。(E) 使用軟體 ImageJ 定量後結果，ATP 處理後不會有差異。

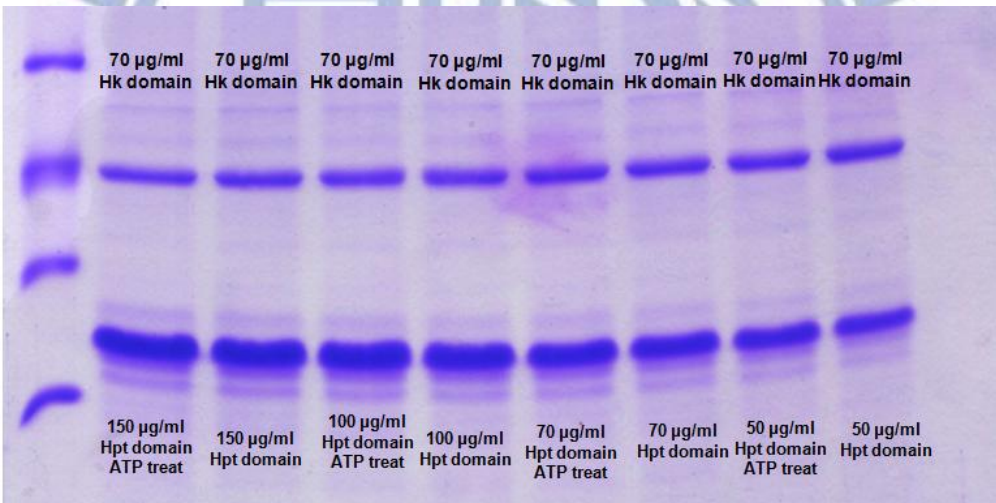




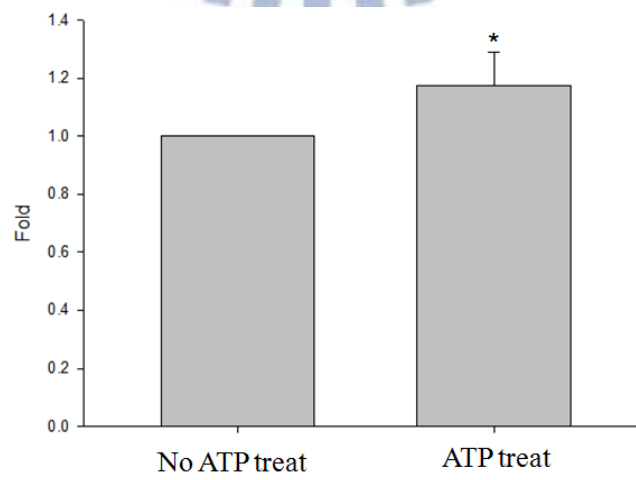
(A)



(B)

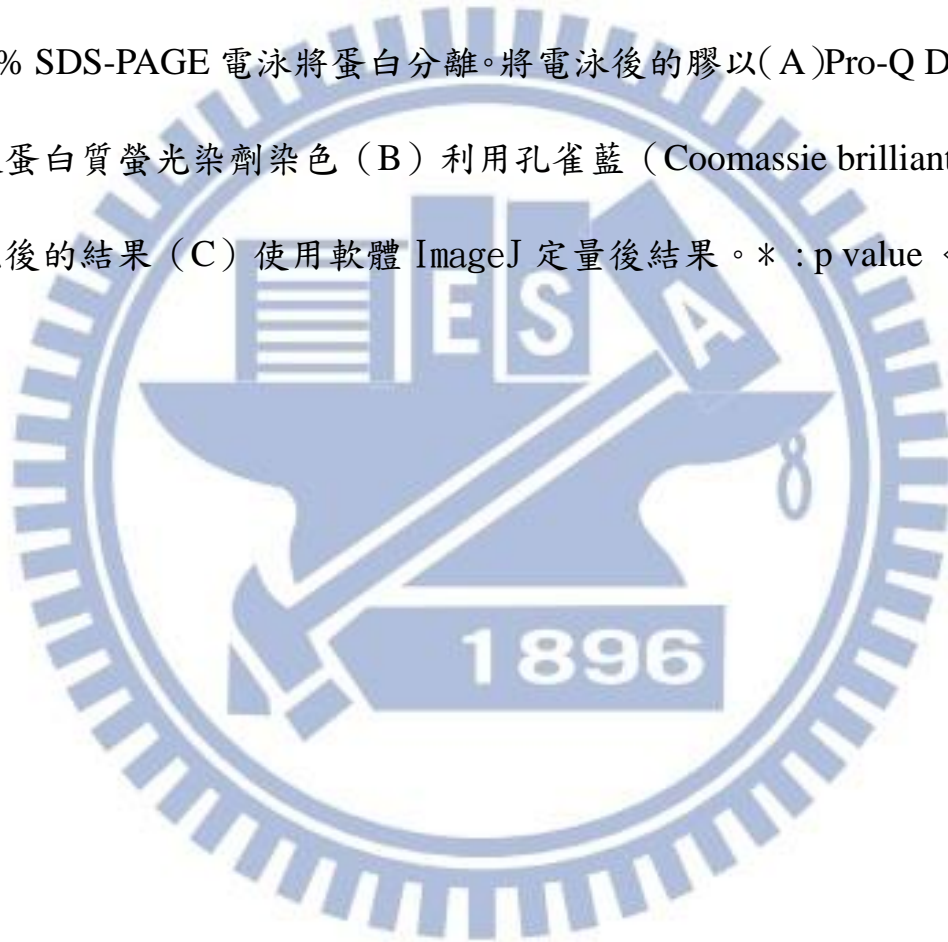


(C)

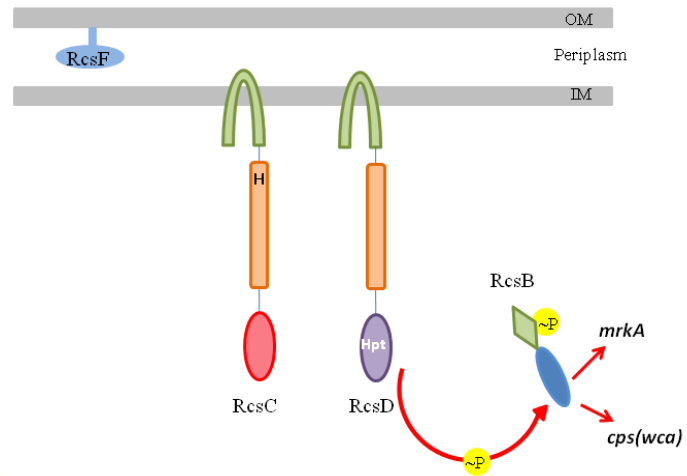


圖十八、RcsC Hk 與 RcsC Hpt 區域蛋白混和後於 ATP 處理後 Pro-Q  
呈色劑染色結果

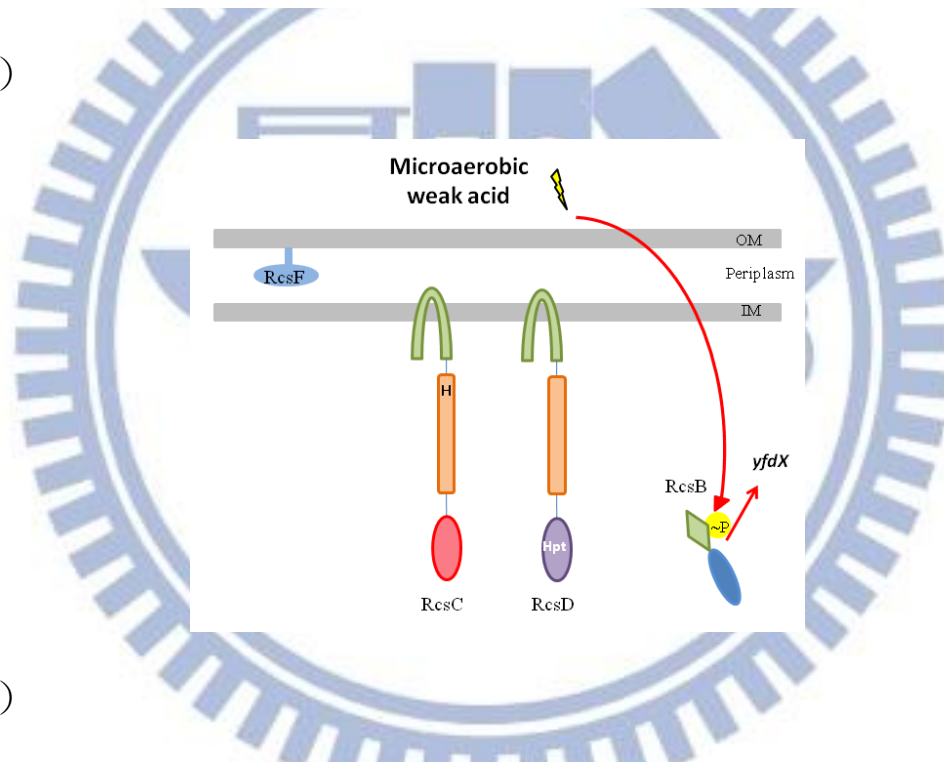
將 RcsC Hk 與 RcsC Hpt 區域蛋白混和並加入緩衝溶液（10 mM ATP、25 mM Tris-HCl、1 mM DTT、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA、pH7.0）中，於 37°C 水浴槽中反應 30 分鐘，隨後以 95°C 加熱 10 分鐘終止反應，以 13.5% SDS-PAGE 電泳將蛋白分離。將電泳後的膠以 (A) Pro-Q Diamond 磷酸蛋白質螢光染劑染色 (B) 利用孔雀藍 (Coomassie brilliant blue) 染色後的結果 (C) 使用軟體 ImageJ 定量後結果。\* : p value < 0.05



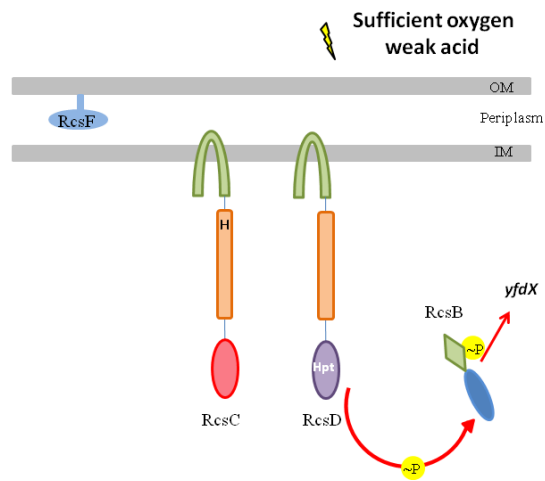
(A)



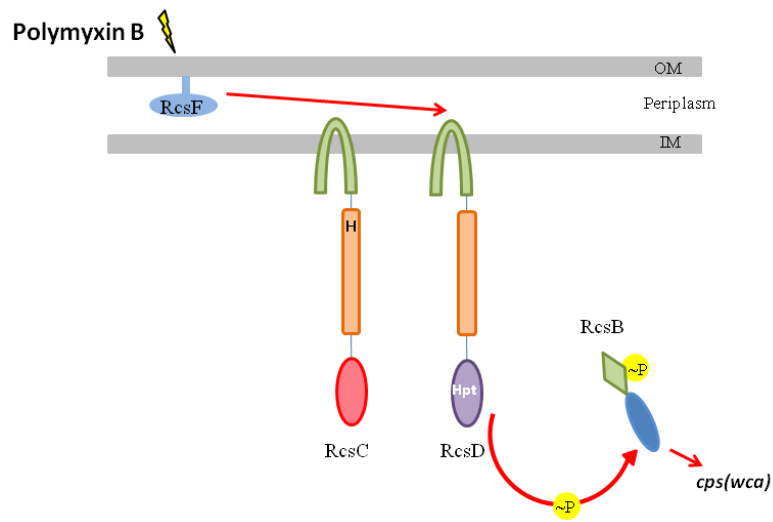
(B)



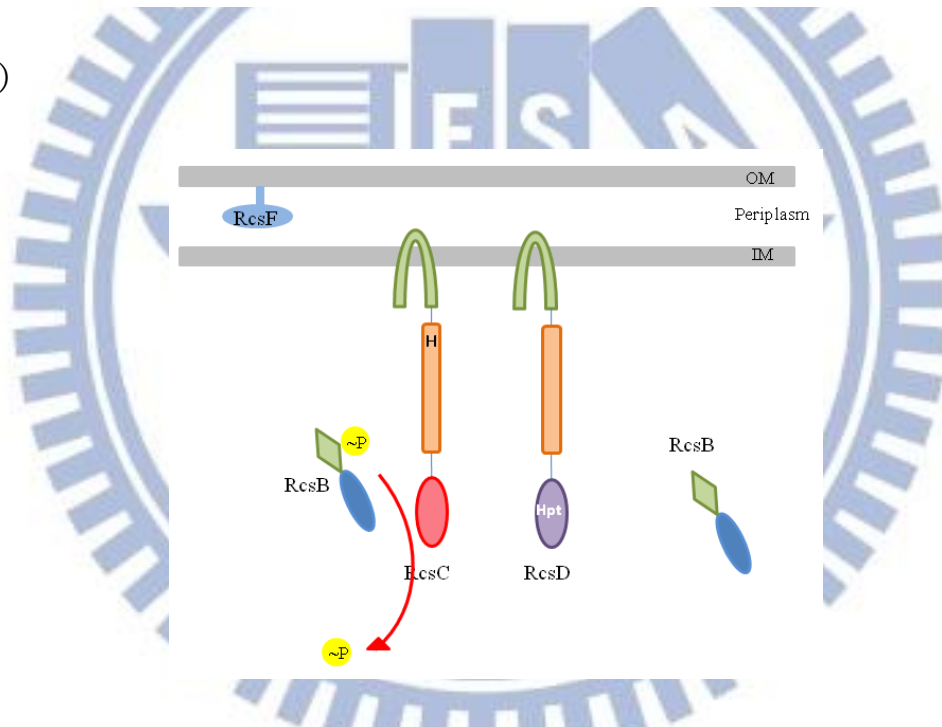
(C)



(D)



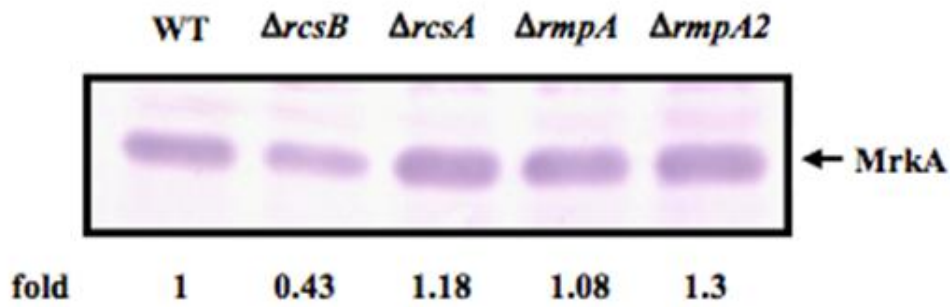
(E)



圖十九、雙分子調控系統於不同壓力下的調控路徑

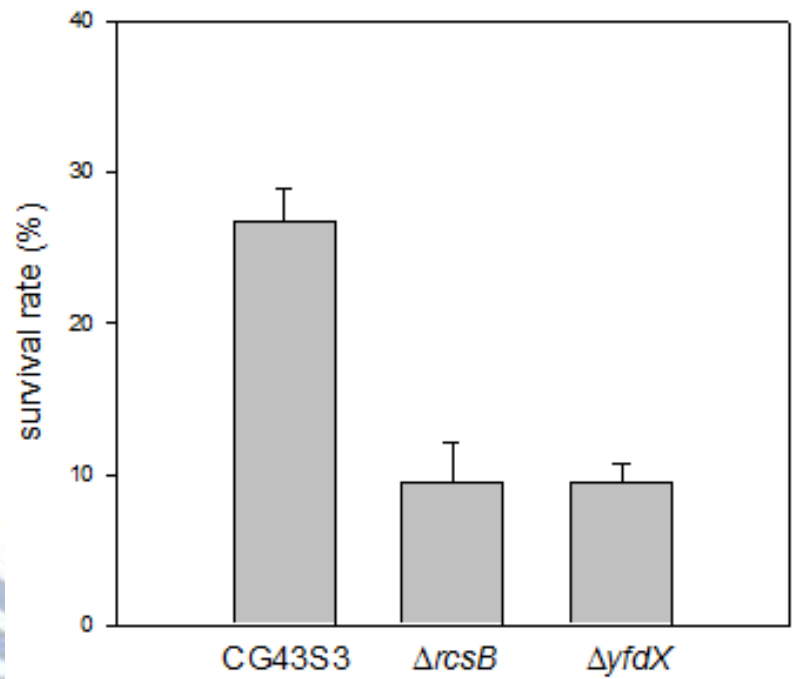
(A) 雙分子調控系統於一般環境中的調控路徑 (B) 雙分子調控系統於微氧環境下的調控路徑 (C) 雙分子調控系統於氧氣充足環境中的調控路徑 (D) 雙分子調控系統於多黏菌素 B 環境中的調控路徑 (E)

RcsC 於雙分子調控系統中所扮演的角色。



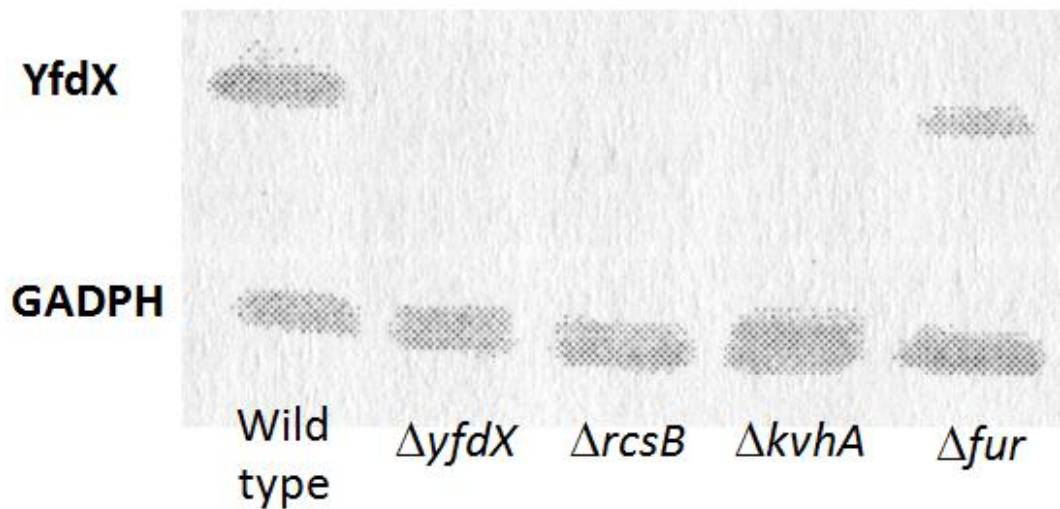
附圖一、MrkA 基因的缺損降低 YfdX 的表現量

MrkA 為第三型線毛的單位蛋白，*rscB* 基因缺損株使其表現量下降。取 400  $\mu$ l 隔夜培養後的菌液，離心後回溶於 100  $\mu$ l 二次水中，加入蛋白質染劑加熱使其蛋白質變性，蛋白質經過膠電泳分離後，將膠上之蛋白質以電泳 100 分鐘（140V、400 mA）轉漬於聚篇二氟乙烯膜，利用呈色劑呈色。



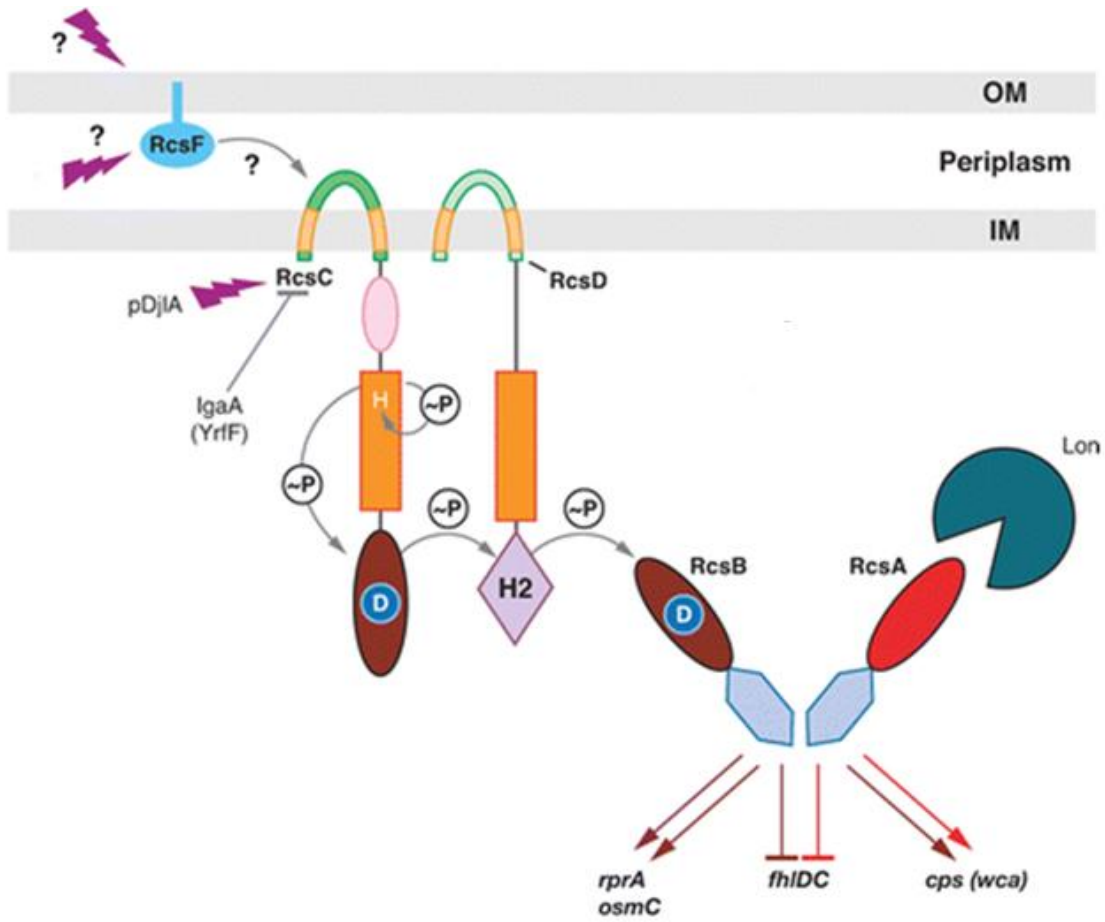
附圖二、*rcsB* 或 *yfdX* 基因的缺損降低 CG43S3 的抗酸能力

細菌在 LB 靜置培養 20 小時後，移至 pH 3.0 的 M9 培養液中，培養 45 分鐘後，取適當菌液稀釋塗盤後，計算菌數；存活率是根據在 45 分鐘後，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。



附圖三、*rcsB* 基因的缺損降低 YfdX 的表現量

不同基因剔除株在 pH5.0 LB 靜置培養 24 小時，取 400  $\mu$ l 隔夜培養後的菌液，離心後回溶於 100  $\mu$ l 二次水中，加入蛋白質染劑加熱使其蛋白質變性，蛋白質經過膠電泳分離後，將膠上之蛋白質以電泳 100 分鐘（140V、400 mA）轉漬於聚篇二氟乙烯膜，利用呈色劑呈色。



附圖四、沙門氏菌 RcsFCDB 系統的調控方式[71]