

National Chiao Tung University Thesis for the Degree of Master

國立交通大學碩士學位論文

克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中

第六型分泌系統-I 組成蛋白質

Hcp、ClpV 和 VgrG 之功能性探討

Functional Characterization of the Type VI

Secretion System-I Component Proteins

Hcp, ClpV and VgrG in

***Klebsiella pneumoniae* CG43**

分子醫學與生物工程研究所

碩士班

學生：韓子祥(0057114)

Student: Tzu-Hsiang Han

指導教授：彭慧玲 博士

Advisor: Hwei-Ling Peng, Ph.D

中華民國一百零二年十一月

November, 2013

謝誌

韶光荏苒，碩班生涯轉瞬已到尾聲，回想兩年多來的收穫和成長，感激之情不禁油然而生。謝謝指導教授彭慧玲老師對我的諄諄教誨和包容，無論於公於私，您的經驗分享、如媽媽般的循循善誘以及嚴師般的訓誡，皆在學生不管於研究上或人生規劃上的想法產生衝擊，不斷激勵著學生，使學生得以成長。還記得老師您時常說，您希望從您實驗室畢業的學生，在各方面都能帶著無比的信心踏入社會，謝謝老師，學生這兩年多來縱有過低潮，有過自我懷疑，都在即將離開校園踏入社會的前夕煙消雲散，只因老師不斷地給學生機會證明自己，沒放棄過學生，學生也將帶著勇於探索以及更堅定的精神力面對瞬息萬變的未來。

此外，還要感謝交通大學梁美智老師在百忙之中撥冗為學生修正論文、進行口試，更謝謝梁老師平時在校園生活中對學生的提攜和照顧。也謝謝清華大學張晃猷教授和張老師實驗室的同仁，在實驗上提供了相當多的協助與建議。

感謝實驗室的大家，除了實驗上的相助，更謝謝你們在生活中的相挺相授。謝謝靜柔學姊總是不厭其煩地與我討論實驗上的問題，並總能給我相當有用的意見；偉豐、蕙瑜、珍儀、俐君、瑋芝、家睿，很幸運有你們這群美觀與實用性兼具的學弟妹，謝謝你們時常提醒我

要注意身體健康，也謝謝你們肯定我的面惡心善；美麗的同学燕曦，謝謝妳總在我低落的時候分享妳多采多姿的生活和積極的態度給我；而最親愛的冠男，謝謝你在生活上、心境上和實驗上的扶持、協助和鞭策，認識你這個能伴著我哭陪著我笑的朋友，絕對是我這兩年多來最重要的收穫，與聰明又善解人意的你共事，事情都能高效率地完成，過程卻又不失樂趣，相當佩服你讓人如沐春風的人際處理能力！

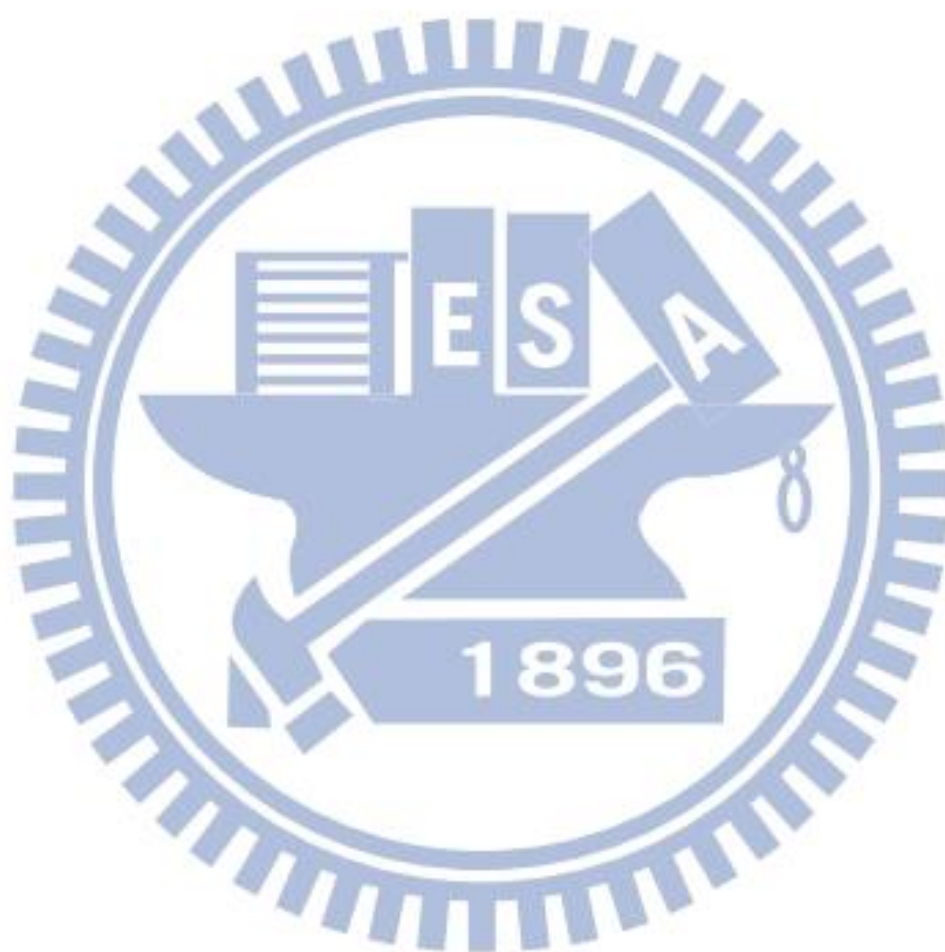
逸翔和俊輝，很慶幸能有你們兩位室友，總是能理性地給我情緒上的建議，也謝謝因認識你們才得以認識的明儒、于馨和辰翰，你們絕對是最貼心的學弟妹和朋友。

而最重要的，必須感謝我的爸媽和弟妹，總是無條件地支持、鼓勵我堅持並追求自己的夢想，並在我陷入困境時即時地伸出援手，正因為有你們，我才能在無數次接近放棄的邊緣又有了再拚的動力，終於如願以償地拿到碩士學位。

最後，謝謝自己給了自己一次成長與進步的機會，完成了人生的第一本著作，並在過程中學到了許多寶貴的經驗，結交了令人稱羨的朋友們，省思了許多從來未曾深思過的想法，並做了一次次至今仍不後悔的重大決定。未來踏入職場肯定還有更嚴峻的挑戰，但這兩年多的用心生活和學習，讓我有信心帶著這些經驗值和充沛的能量，面對

未來的挑戰、戰勝任何可能的挫折並實現長久以來所追求的梦想！

子祥



中文摘要

第六型分泌系統(Type VI secretion system; T6SS)由 Hcp 和 VgrG 兩種主要結構蛋白質所構成，並以 ClpV 蛋白質之 ATP 水解酶活性為系統運作之主要能量來源，且已被證實與細菌之致病能力密切相關。先前之研究報導指出，在以小鼠為動物模型之研究中，將克雷白氏肺炎桿菌之 T6SS 基因進行插入突變，會使其感染小鼠之能力減弱。其他菌種之基因體中通常含有多組 T6SS 基因群集，在克雷白氏肺炎桿菌具有 2-3 套 T6SS 基因組。本論文旨在探討克雷白氏肺炎桿菌 CG43 之 T6SS-I 組成蛋白 Hcp、ClpV 和 VgrG 的功能性。首先，以同源置換原理建構了 CG43S3 Δhcp 、CG43S3 $\Delta clpV$ 、CG43S3 $\Delta vgrG$ 和 VgrG C 端基因片段缺失(CG43S3 $\Delta vgrG$ -C)突變株，接著分析這些突變菌株與其親本株 CG43S3 之表現型後發現： Δhcp 和 $\Delta vgrG$ 之生長曲線和菌落型態無明顯變化， $\Delta clpV$ 之生長則較為遲緩，且其莢膜多醣生成量降低約 35%； Δhcp 和 $\Delta vgrG$ 於玻璃材質介面上生物膜形成能力明顯上升，而 $\Delta clpV$ 和 $\Delta vgrG$ 於 PVC 界面上形成的生物膜量增加約 1.7 倍； Δhcp 、 $\Delta clpV$ 、 $\Delta vgrG$ 和 $\Delta vgrG$ -C 在酸性環境壓力下存活率分別下降 70%、21%、90% 和 68%。進一步以 LacZ 報導系統分析 T6SS-I 基因組中經預測的啟動子 P₁、P₂ 和 P₃ 的活性，結果顯示 P₁ 活性會被弱酸誘導，此暗示 T6SS-I 由 P₁ 啟動子調控其表現。為了偵測 T6SS-I

的表現，先以 PCR 增幅其主要結構蛋白基因 *hcp* 並選殖於表現載體 pET30b，接著將此重組質體 pET30b-*hcp* 於大腸桿菌 Noveblue(DE3) 中大量表現後以鎳離子樹脂來純化此 His-標記之 Hcp 蛋白質，最後，以此純化後的蛋白多次注射兔子後獲得 Hcp 之多株抗體。然而，以西方墨點法分析結果顯示此多株抗體專一性和靈敏度都不足。未來可以定量 PCR 量測 *hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 於酸環境中，或於抗酸反應相關的調控基因缺失之菌株：如 $\Delta rcsB$ 或 Δfur 中的轉錄表現量，藉以了解 T6SS-I 的表現調控。



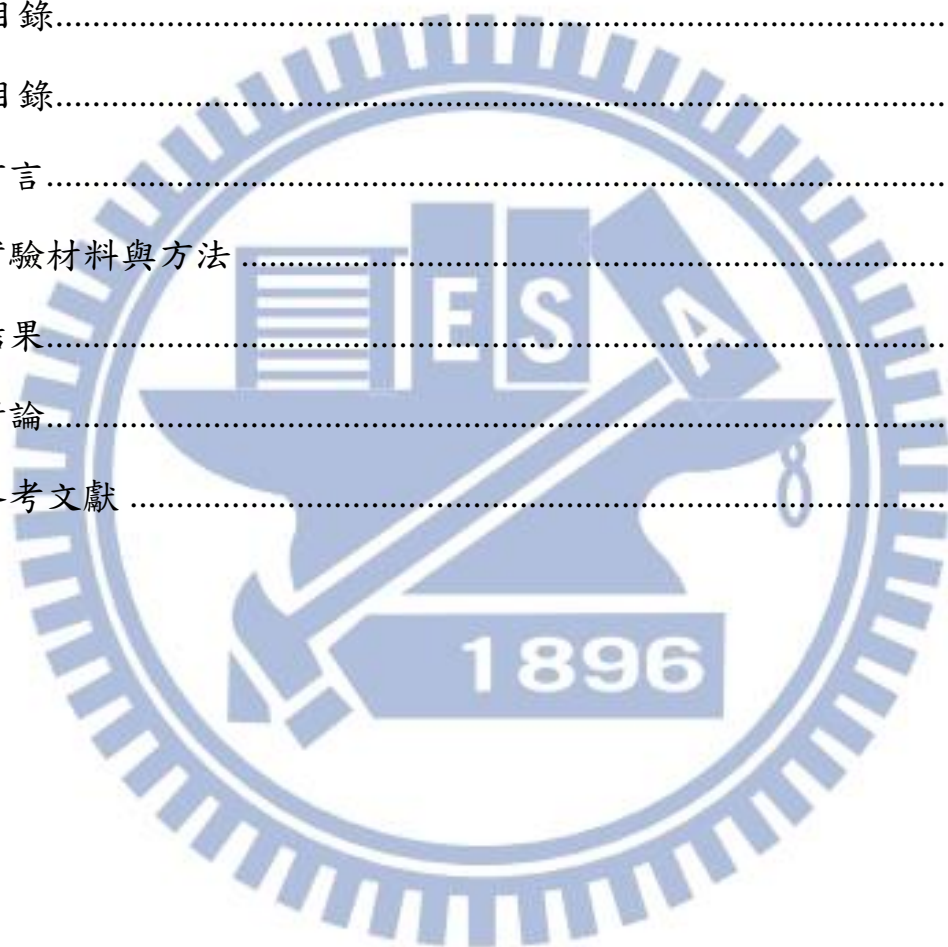
Abstract

The type six secretion system (T6SS), which composed of two major structural proteins Hcp and VgrG, and the energy generating ATPase ClpV, has been reported as an important pathogenicity factor. Using a mouse model, an attenuated *Klebsiella pneumoniae* mutant with a transposon insertion in the putative T6SS encoding gene has recently been reported. As reported for other bacterial genomes which often contain multiple T6SS-encoding gene clusters, the sequenced *K. pneumoniae* genomes also harbored two to three T6SS gene clusters. Here we study functional roles of Hcp, ClpV and VgrG of the T6SS-I of *K. pneumoniae* CG43. Firstly, we generate *K. pneumoniae* CG43S3 Δhcp , CG43S3 $\Delta clpV$, CG43S3 $\Delta vgrG$ and CG43S3 $\Delta vgrG$ -C (carrying an incomplete *vgrG* gene without the DNA coding for the C-terminal variation region) mutant strains. The deletion effect analysis showed that CG43S3 Δhcp and CG43S3 $\Delta vgrG$ exerted similar phenotype on growth curve and colony appearance as that of the parental strain CG43S3. On the other hand, the deletion of *clpV* retarded the bacterial growth and had 35% decrease of the capsular polysaccharide production. The mutants Δhcp and $\Delta vgrG$ exhibited elevated biofilm formation ability on glass tubes, while the deletion of *clpV* and *vgrG* increased approximately 1.7-fold of the biofilm formation activity on PVC 96-well compared to CG43S3. Under acid stress treatment, Δhcp , $\Delta clpV$, $\Delta vgrG$ and $\Delta vgrG$ -C

respectively showed 70%, 21%, 90% and 68% decrease of the survival rate. We have also measured the activity of the putative promoters namely P₁, P₂ and P₃ using LacZ as the reporter. The P₁ activity is inducible by weak acid which suggesting that the expression of T6SS-I is P₁-dependent. Finally, we have isolated the major component encoding gene *hcp* by PCR and the amplicon cloned to the expression vector, pET30b. The recombinant plasmid pET30b-*hcp* was introduced for the protein overexpression in *Escherichia coli* Novablue(DE3), and then the recombinant His-tagged proteins purified using nickel resin column. Aliquot of the purified proteins was used to immunize rabbits to raise anti-Hcp antibody. The subsequent Western blot analysis using the anti-Hcp antibody revealed that the antibody has low specificity and sensitivity. In order to study the expression of T6SS-I, quantitative PCR could be used to measure the expression level of *hcp*, *clpV* and *vgrG* in CG43S3 upon treatment of acid or in acid stress response related regulatory gene deletion mutants such as $\Delta rcsB$ or Δfur .

目錄

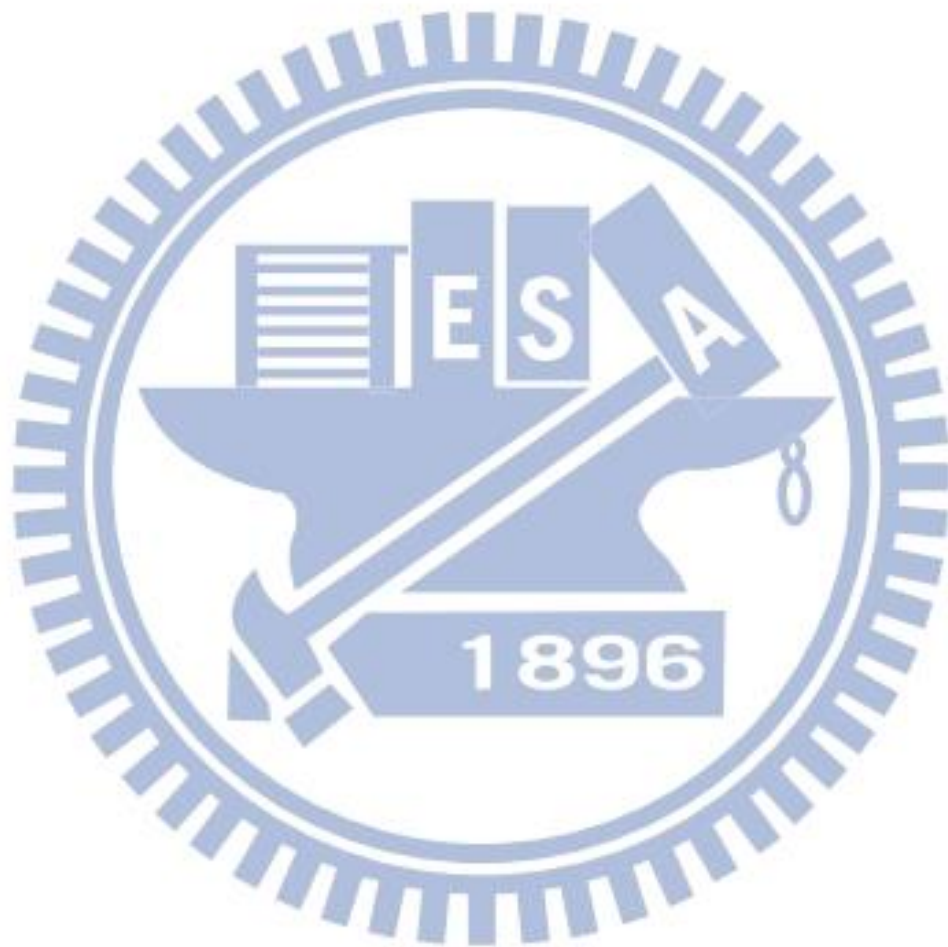
謝誌.....	I
中文摘要	IV
Abstract.....	VI
目錄.....	VIII
表目錄.....	IX
圖目錄.....	X
1.前言.....	1
2.實驗材料與方法	9
3.結果.....	17
4.討論.....	25
5.參考文獻	28



表目錄

表一：本研究所使用的菌株..... 34

表二：本研究所使用的質體..... 36



圖目錄

圖一：克雷白氏肺炎桿菌之 T6SS 基因組成示意圖.....	37
圖二：Hcp、ClpV 與 VgrG 蛋白質功能區域分析.....	38
圖三：建構 <i>hcp</i> 基因缺損突變株.....	39
圖四：建構 $\Delta clpV$ 基因缺損突變株.....	40
圖五：建構 $\Delta vgrG$ 與 $\Delta vgrG$ -C 端變異區基因缺損突變株.....	41
圖六 A： <i>hcp</i> 、 <i>clpV</i> 及 <i>vgrG</i> 基因缺損株之生長曲線.....	43
圖六 B： <i>hcp</i> 、 <i>clpV</i> 及 <i>vgrG</i> 基因缺損株之菌落型態.....	43
圖七： <i>hcp</i> 、 <i>clpV</i> 及 <i>vgrG</i> 基因缺損對莢膜表現之影響.....	44
圖八： <i>hcp</i> 、 <i>clpV</i> 及 <i>vgrG</i> 基因缺損對生物膜形成之影響.....	45
圖九： <i>hcp</i> 、 <i>clpV</i> 及 <i>vgrG</i> 基因缺損對菌種競爭能力之影響.....	47
圖十 A： <i>hcp</i> 、 <i>clpV</i> 、 <i>vgrG</i> 及 <i>vgrG</i> -C 端變異區基因缺損株於酸性環境下之存活率.....	48
圖十 B： <i>hcp</i> 、 <i>clpV</i> 及 <i>vgrG</i> 基因缺損對膜間質伴隨蛋白質 YfdX 表達量之影響.....	49
圖十一：T6SS-I、 <i>hcp</i> 、 <i>clpV</i> 和 <i>vgrG</i> 基因之啟動子區域分析.....	50
圖十二：Hcp 抗體製備.....	51
圖十三：Hcp 抗體專一性測試.....	53
圖十四：Hcp 抗體敏感度測試.....	56

前言

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

克雷白氏肺炎桿菌為一革蘭氏陰性菌、菌體成桿狀且在表面帶有厚重莢膜，與腸桿菌科其他細菌之基因起源相當接近；依其生長特性歸屬於兼性厭氧菌，菌體表面具有線毛，可附著宿主造成感染，但不具鞭毛而不具移動性[1]。克雷白氏肺炎桿菌廣泛存在於自然環境中，例如：水域和土壤；該菌亦屬於人體之正常菌叢，常存在於人類口腔、皮膚、腸道和呼吸道等處，並在免疫力低下的個體造成伺機性感染，進而造成肺炎、腦膜炎、化膿性感染、尿道感染和菌血症[2-4]。在台灣較受關注的是，克雷白氏肺炎桿菌與糖尿病患導致肝膿瘍之嚴重併發症具高度關聯性[5]。此外，由於抗生素之濫用，克雷白氏肺炎桿菌亦演化出可製造廣效性乙內醯胺酶(Extended-spectrum β -lactamase, ESBLs)[6]以及對 Carbapenems 類抗生素具有抗性之菌株(KPC)[7-9]，最近更於新德里醫院分離出除對 Carbapenems 類抗生素具有抗性且會製造新的金屬性乙內醯胺酶(metallo-b-lactamase)之菌株[10,11]。

1.2 克雷白氏肺炎桿菌之毒力因子

克雷白氏肺炎桿菌的毒力因子可分為三大類：一、細菌表面抗原：包括莢膜多醣體(Capsular polysaccharide, CPS)、脂多醣體

(Lipopolysaccharide, LPS)。根據莢膜多醣體構造的不同，可將克雷白氏肺炎桿菌分成 77 種血清型，其中以 K1 和 K2 血清型具有最高之毒性。莢膜多醣體可協助細菌對抗多型態有核顆粒細胞的吞噬作用 (Phagocytosis) 以及血清中補體系統 (Complement system) 的殺菌作用 [12-16]；脂多醣體除與莢膜多醣體具類似功能外，還會誘發宿主體內的強烈免疫反應，進而造成敗血性休克 [2,17]。二、黏附因子：細菌為了在宿主體內和體外環境達到附著的目的，常以菌體表面之黏附蛋白進行與宿主細胞表面受器之專一性辨識並結合或非專一性黏附，例如第一型線毛 (type 1 fimbriae) 和第三型線毛 (type 3 fimbriae) 及非線毛型之黏附蛋白 CF29K 與 KPF28 [18-20]。三、細菌競爭宿主體內鐵質來源的能力：即鐵離子攝取系統 (Iron acquisition system)，主要為螯鐵分子 (Siderophores)，此類小分子對鐵離子具極高親和力，會與宿主之蛋白質競爭鐵離子之使用，而目前於克雷白氏肺炎桿菌中發現之螯鐵分子包括 enterochelin 和 aerobactin [15,21,22]。

1.3 第六型分泌系統 (Type VI Secretion System, T6SS)

革蘭氏陰性菌常須將某些巨分子運送至菌體外，與其環境物質、其它菌種或寄主體交互作用而達其生存目的，這些巨分子必須透過某些奈米級裝置才能達到穿越菌體雙層膜細胞膜之目的，這些裝置即稱為分泌系統，其複雜程度因構造組成及其調控方式而異 [23,24]。除了

一直以來認知的五套分泌系統外，兩組研究團隊於 2006 年分別在霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*) 和綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 發現新的分泌系統，將其命名為第六型分泌系統 (T6SS) [25,26]。近年來的相關研究顯示：T6SS 與細菌對宿主之交互作用和種間競爭之調控有關[27-33]，細菌可透過直接接觸的方式，藉由 T6SS 將用以對抗其他菌種之作用蛋白直接注入目標細菌之膜間質，進而達到殺死鄰近之他種細菌之目的[27,31]；此外，也可透過 T6SS 在特定的植物、魚類、動物和人體環境中提昇其附著能力，進而對宿主之免疫反應產生抗性或生成毒素，間接地提昇細菌的致病能力。然而，由於毒素的運送可能受真核細胞之細胞骨架干擾，目前僅確知少數菌種之 T6SS 與其致病能力直接相關[34]。

而細菌是否具有 T6SS 可由是否具 ClpV 這種 AAA⁺ ATPase 之存在，以及是否分泌 Hcp (Hemolysin co-regulated protein) 和 VgrG (Valine Glycine repeat protein G) 這兩種蛋白質於培養液之上清液中做為辨別之特徵[34-37]。分析 Hcp 和 VgrG 之結構可發現，其與噬菌體用來將病毒 DNA 運送至目標細菌之細胞穿刺裝置具有相當高的演化相關性，兩者皆與噬菌體的尾部構造具有結構上之同源性[38-41]。其中 Hcp 會形成六元環，六元環間則以雙硫鍵共價結合，進而聚合堆疊成一直徑約為 85Å，長約為 100 nm 之管狀構造[25,42]，值得注

意的是，Hcp 的蛋白質結構，與形成噬菌體尾管構造之 gpV 相當類似[40]，並且也與形成 T4 噬菌體尾管構造之 gp19 具有演化相關性[38,39]。而 VgrG 則與形成 T4 噬菌體尾部刺突構造，其用途為刺穿細菌表面，進而使噬菌體尾管得以插入，最終輸入病毒 DNA 的 (gp27)₃-(gp5)₃ 複合體具有結構相似性[38,39,41,43]。所有 VgrG 具保守性的核心區域皆由 gp27 和 gp5 集結而成，並以三聚體的方式構成一用以穿刺宿主細胞膜之針狀構造。若根據此模型，與 T6SS 相關之毒性分子必須在細胞與細胞直接接觸的狀況下才得以展現其毒力[26]。目前對於 T6SS 的模型描繪為，針頭狀的 VgrG 三聚體位於由 Hcp 構成之類似線毛結構的頂部[39]，而後隨著 Hcp 管狀構造的向外增長，VgrG 終將被暴露於菌體外之環境，而 Hcp 管狀構造於外膜外的繼續延伸增長，則可能只是單純地透過已與目標細胞接觸之 VgrG 對目標細胞膜的穿刺能力[41,44]。然而，目前仍缺乏對於 Hcp 和 VgrG 之間有直接交互作用的證據。某些 VgrG 在 C 端具有在目標細胞質中可能產生作用的功能性結構域延伸片段，稱為 Evolved VgrGs[41]，這些功能性結構域的活性非常多樣，並可能影響細胞骨架之組織或者信息傳遞途徑，例如：*V. cholerae* 的 VgrG1 在被運送到目標細胞內後，會透過其 C 端的 RtxA 結構域調控與肌動蛋白交聯之活性[45,46]。類似的現象亦在 *Aeromonas hydrophila* 中發現，*A. hydrophila* 的 VgrG1

之 C 端存在一 VIP-2 功能性結構域，具有使肌動蛋白中 ADP 核苷核醯化之活性[47]。

數篇報導指出 T6SS 的供能元件 ClpV，其 ATPase 活性對於 T6SS 能否正常運作影響甚鉅[25,44,48,49]。ClpV 為一隸屬於 AAA⁺(ATPase associated with various cellular activities)超級家族中之 Hsp 100/Clp 家族的蛋白質，此類蛋白質通常可以具保守性之 AAA 結構域與 ATP 結合，並將 ATP 水解產生之能量用於將目標蛋白質去摺疊化，以利之後經分泌系統之管道狀構造進行運輸，然而 ClpV 並不對 Hcp 和 VgrG 這兩種外蛋白質進行類似反應，但會與 T6SS 中另外兩種具保守性且必須之組成分 VipA 和 VipB 有交互作用[48]。而 VipA/VipB 複合體可形成一直徑約為 300 Å，內部管徑約為 100 Å 之齒輪狀管道構造，此管道構造會經 ClpV 六聚環的中空部位，以 ATP 水解之能量驅動拆解作用，ClpV 於此展現典型 Hsp100/Clp 家族之蛋白質活性[48]。而雖然對於 VipA/VipB 之結構分析結果並未發現其與噬菌體之尾鞘蛋白有何相似性，其管徑卻與噬菌體之尾鞘管徑相仿，並足以容納 Hcp 所形成之管狀結構，若以噬菌體的感染過程類比之，VipA/VipB 管狀構造之收縮，可能提供 Hcp 與 VgrG 形成之針狀結構對目標細胞進行穿刺作用所需之能量。目前仍未有 VipA/VipB 與 Hcp 具直接交互作用之證據，然而由於其基因組成通常位於附近，或許暗示著兩者之間

可能存在功能上之協同作用[50]。

1.4 T6SS 生物功能的相關研究

T6SS 可影響細菌的表現型，例如 *Burkholderia cenocepacia* 對小鼠之毒性、*Burkholderia mallei* 和 *Aeromonas hydrophila* 在巨噬細胞中的存活率、*Vibrio cholerae* 抵抗阿米巴變形蟲掠食之能力、enteroaggregative *Escherichia coli* 的生物膜合成能力、*Francisella tularensis* 和 *Salmonella enterica* 在巨噬細胞內的胞內生長情形、*Vibrio anguillarum* 對環境壓力之感測能力以及 *Yersinia pseudotuberculosis* 對抗酸性環境壓力之調控等[26,51-60]。通常 T6SS 並不扮演決定細菌的致病能力的關鍵角色，反而是在某些階段改善菌之增殖能力和感染效率，研究指出，多數菌種具有不只一套 T6SS 基因組[61]，而不同菌種間所具有之 T6SS 基因組數相差極大，例如 *Burkholderia* 屬甚至多達四至六套 T6SS 基因組，然而目前仍不清楚這種單一個體中存在多套 T6SS 基因組的現象，究竟是源自基因複製抑或基因轉移，不過於 *P. aeruginosa* 的研究顯示，其三套 T6SS 基因組之演化歷史相當不一致，故可能是透過基因轉移而來，而這種現象或許暗示著細菌可針對不同環境運行不同 T6SS 基因組，以利其生存[61]。正因 T6SS 可協助不同細菌適應不同環境條件，其運作必須受到嚴謹、精確的調控，近年來的研究結果亦證實，T6SS 的確受複雜的調控網路所精準調控其

表現[62,63]。以 enteroaggregative *E.coli* (EAEC) 為例，其 T6SS 之表現，依其所處環境之鐵離子濃度，以非隨機性之表觀基因開關方式進行調控。在鐵離子充足的環境條件下，其 Fur 蛋白質會與 *sciI* Type VI secretion gene cluster 的啟動子結合，使啟動子中 GATC 結合位點模體 (motif) 無法進行甲基化；而限鐵環境下，Fur 則會離開啟動子，*sciI* Type VI secretion gene cluster 得以表現，同時也使得 GATC 結合位點模體可進行甲基化，以避免 Fur 再次與啟動子結合，進而達到持續表現之目的[64]。

1.5 具體研究目標

在 NCBI 基因資料庫中已有完整基因體序列的臨床菌株 *K. pneumoniae* MGH78578 具有三套 T6SS 基因組，*K. pneumoniae* NTUH K-2044 則具有兩套 T6SS 基因組，兩菌之基因組皆以 T6SS 核心組成分之完整性命名，最完整者為基因組 T6SS-I。而比較兩菌之 T6SS 基因組發現，NTUH K-2044 的兩套 T6SS 基因組分別與 MGH78578 之基因組-I 和基因組-III 非常相似，但 NTUH K-2044 不具有類似 MGH78578 基因組-II 之 T6SS 基因組，故 NTUH K-2044 之兩組 T6SS 基因組分別以 T6SS-I 和 T6SS-III 命名之[65]。

本研究探討最近完成定序的克雷白氏肺炎桿菌臨床菌株 CG43 的 T6SS-I 中 Hcp、ClpV 和 VgrG 之功能及其可能調控機制。首先，建

構 *hcp*、*clpV*、*vgrG* 以及 *vgrG* -C 端變異區基因缺損突變株，接著分析這些基因缺損對生長、莢膜多醣生成量、生物膜形成能力以及抗酸反應等表現型活性的影響；另外，也建構 Lac-Z 報導系統（Lac-Z reporter system）分析 Hcp、ClpV 和 VgrG 的表現活性；同時，製備 anti-Hcp 抗體，並結合與壓力調節相關之調控基因缺損株以及過度表現株，描繪其可能的調控途徑。



2. 實驗材料與方法

2.1 菌株本研究使用之克雷白氏肺炎桿菌 CG43 為長庚大學紀念醫院
林

口分院之臨床分離菌株，而後於實驗室篩選出對鏈黴素(Streptomycin) 具有抗性之 CG43S3 突變菌株[66]。本研究所使用之菌株及質體詳列於表一及表二。所有菌株均於 37°C 下，震盪培養在已加入適量抗生素之 Luria-Bertani (LB) 培養液或培養基上。使用之抗生素及其濃度分別為：鏈黴素 500 µg/ml、氨比西林(ampicillin)100 µg/ml、卡那黴素(kanamycin) 25 µg/ml、四環黴素(tetracycline)12.5 µg/ml 及氯黴素(chloramphenicol) 35 µg/ml。

2.2 基因重組技術基因重組實驗係參考標準流程[67]。PCR 所使用之
引子由生工公

司(MDBio, Inc, Taiwan)合成並詳列於表三。PCR 使用之酵素為 Blend Taq polymerase(TOYOBO, Japan) 和 Taq DNA polymerase (MDBio)，PCR 產物則以 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) 抽取，質體 DNA 使用 High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) 抽取，而限制酶及 DNA 修飾酵素則分別向 New England Biolab (Beverly, MA) 或 MBI Fermentas (Hanover, MD) 購置，並依照供應商提供之使用說明進行操作。

2.3 生物資訊分析目標基因以 NCBI 網站結合 Vector NTI 軟體進行比

對分析；而針

對啟動子區域以及轉錄因子結合位點之預測與分析則以 Softberry(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 進行；基因產物之功能域分析則以 Pfam(<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 進行預測。

2.4 基因缺損突變株之建構先利用 PCR 增幅目標基因上下游各 1000

bp 之 DNA 片段，再將

兩片段結合並送入自殺性載體 pKAS46[68]，隨後將重組質體以電穿孔(electroporation)方式送入 *E.coli* S17-1 λ pir，再與克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3 行接合作用，使 CG43S3 獲得重組質體，並以含卡那黴素及氨比西林之 M9 固態培養基，篩選出因同源置換作用而將 DNA 插入染色體之接合株(transconjugants)，接著隨機挑選單一接合株菌落，將其震盪培養在 LB 培養液中並於 37°C 隔夜培養。以 PCR 確認質體已插入染色體後，取 75 μ l 菌液於含鏈黴素之 LB 培養液中 37°C 培養 8 小時，序列稀釋至 10⁻⁶ 倍，取 100 μ l 菌液均勻塗抹於含有鏈黴素之 LB 固態培養基上，隔夜培養後，以滅菌牙籤隨機挑選單一菌落，分別畫於含鏈黴素以及含卡那黴素和氨比西林之 LB 固態培養基上，並挑選出對鏈黴素具有抗性，但對卡那黴素和氨比西林不具有抗性之

菌落，最終利用 PCR 確認基因缺損突變株之建構完成。

2.5 基因回補菌株之建構先以 PCR 增幅目標基因並植入 yT&A 載體，

再透過次選殖

(subclone)至 pRK415 廣寄主載體[69]，並以電穿孔方式將質體送入 *E.coli* S17-1 λ pir，接著以接合作用將質體轉入 CG43 中。將菌液塗抹於含四環黴素之 M9 固態培養基，37°C 隔夜培養後，以滅菌牙籤隨機挑選單一菌落，分別畫於含鏈黴素和四環黴素之 LB 固態培養基上，最終挑選同時具有鏈黴素和四環黴素抗性之菌落，完成基因回補菌株之建構。

2.6 生長曲線量測

將在 LB 培養液中隔夜培養之菌液，200 倍稀釋至 LB 培養液中，再置於 37°C 下培養，並每間隔 1 小時測量其在 600 nm 之吸光值。每次獨立實驗以三重複之數據換算出平均值及標準差，呈現之數據為三次獨立實驗中最具代表性者。

2.7 莢膜多醣定性與定量

定性測定：將待測菌株於 LB 培養液中隔夜培養後，200 倍稀釋於 LB 培養液中，再置於 37°C 下培養 16 小時，以 4000 rpm 離心 5 分鐘後觀察其結果。

定量測定：將待測菌株於 LB 培養液中隔夜培養後，取 500 μl 菌液與含有 1% 兩性洗滌劑 (Zwittergent 3-14 detergent) 之 100 mM 檸檬酸 (citric acid) 溶液混合於 1.5 ml 微量離心管中。以 50°C 加熱 20 分鐘後，以 14000 rpm 離心 2 分鐘，取 250 μl 上清液與 1 ml 絕對酒精混合並置於 4°C，30 分鐘後再以 14000 rpm 離心 5 分鐘並去除上清液，再以 200 μl 二次水將沉澱物回溶，並與 1.2 ml 含 12.5 mM 硼 (borax) 之硫酸 (sulfuric acid) 溶液混合，接著以 100°C 加熱 5 分鐘，待冷卻後加入 20 μl 之 0.15% 3-羥基二酚 (3-hydroxy diphenol) 呈色劑，並立即測量其在 520 nm 下之吸光值。將測得之數值，以莢膜多醣體含量與吸光值之標準曲線計算之，即可獲得莢膜多醣體之含量。圖表數值以 1×10^9 CFU 之菌量中含有多少莢膜多醣體表示。

2.8 生物膜染色

將待測菌株於 LB 培養液隔夜培養後，100 倍稀釋於 LB 培養液中，取 150 μl 菌液於 37°C 分別靜置培養於 96 孔盤中 12 和 24 小時，接著移除菌液，以一次水清洗 96 孔盤後加入 1% 結晶紫 (crystal violet)，並置於迴轉式振盪器以 60 rpm 染色 50 分鐘，隨後移除結晶紫，再以一次水清洗 96 孔盤後加入 1% SDS，並置於迴轉式振盪器以 60 rpm 振盪 1 小時，最後測量其在波長 595 nm 下之吸光值。

2.9 菌種競爭能力測試將 *lacZ* 基因缺損之待測菌株與 *E. coli* MG1655

培養於 LB 培養

液，待 OD₆₀₀ 達約 0.8，分別將待測菌株與 *E. coli* MG1655 於硝化纖維膜上混合並置於 LB 固態培養基上培養 6 小時，再將菌液序列稀釋至 10⁻⁷ 倍，各濃度之菌液分別取 5 μl 菌液滴於已均勻塗佈 X-gal 之 LB 固態培養基，於 37°C 隔夜培養後觀察其結果。

2.10 抗酸能力評估

菌株培養方式參考文獻[70]，並於部分步驟略做修飾：待測菌株於 LB 培養液在 37°C 隔夜培養後，20 倍稀釋於 LB 培養液中，待 OD₆₀₀ 達約 0.6~0.8，取 1 ml 菌液以 15000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，再加入 1 ml pH4.4 之 LB 培養液使菌適應 1 小時，最後移至 pH3 之 M9 培養液中再培養 45 分鐘，取 100 μl 菌液序列稀釋至 10⁻⁶ 倍，並均勻塗抹於 LB 固態培養基上，置於 37°C 隔夜培養後數菌落數；存活率是以在 pH3 之 M9 培養液中培養 45 分鐘後，每 1 ml 存活之菌數與培養 0 小時 1 ml 菌液中的菌數比值定義之。每次獨立實驗以三重複數據計算平均值及標準差。

2.11 啟動子報導質體建構

將預測之啟動子片段以 PCR 增幅後，接入 yT&A 選殖載體中，

再轉殖至啟動子報導質體 pLacZ15[71]中，使啟動子片段與 *lacZ* 報導基因黏合，最後藉由 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)之活性評估啟動子之活性。

2.12 β -半乳糖苷酶活性評估

實驗流程根據 Miller 方法[72]，將隔夜培養之菌液 100 倍稀釋於 LB 培養液中，帶菌液 OD₆₀₀ 達約 0.8，以 15000 rpm 離心後去除上清液，並加入 pH=4.4 之 LB 培養液於 37°C 下震盪培養 1 小時，隨後取 100 μ l 待測菌液與 900 μ l Z buffer (60 mM Na₂HPO₄、40 mM NaH₂PO₄、10 mM KCl、1 mM MgSO₄ 及 50 mM β -mercaptoethanol)、0.1% SDS 及三氯甲烷 (chloroform) 混合，並於 30°C 水浴槽靜置 10 分鐘，隨後立即加入 200 μ l 4 mg/ml 的鄰硝基苯- β -D-半乳糖苷 (o-nitrophenyl, β -D-galactopyranoside, ONPG)，混合均勻後靜置於 30°C 水浴槽，並開始計時至混合液呈黃色，再加入 500 μ l 1M 碳酸鈉終止反應，最後測量波長 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 蛋白質大量表現質體之建構

先將欲大量表現之蛋白質片段

DNA 以 PCR 增幅並接入 yT&A 選

殖載體中，再轉殖至蛋白質表現載體 pET30b 中，隨後將質體送入大

腸桿菌 NovaBlue(*E.coli* NovaBlue)，並以異丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside, IPTG) 誘導目標基因之表現，進而大量表現目標蛋白質。

2.14 蛋白質純化

將含帶有目標 DNA 片段之質體的 NovaBlue 細菌在 LB 培養液中於 37°C 隔夜培養後，20 倍稀釋至含有卡那黴素之 LB 培養液中，並培養至 OD₆₀₀ 達 0.6~0.8 區間時，加入異丙基- β -D-硫代半乳糖苷誘導 6 小時，而後以 14000 rpm 離心 5 分鐘並去除上清液，再將之回溶於緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、5 mM imidazole、pH7.9) 中，續以超音波震盪破菌，再以 13000 rpm 離心 10 分鐘，去除沉澱於底部之細胞碎片後，將上清液通入管柱層析，大量表現之蛋白質會留滯於管柱中，再以緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、1M imidazole、pH7.0) 將管柱中之蛋白質溶下，回溶收集之蛋白質以 13.5% SDS-PAGE 電泳分離並確認。

2.15 西方免疫墨點法(Western blot)

將蛋白質與蛋白質染劑 (0.0626 M Tris-HCl pH6.8、2% SDS、10% glycerol、0.01% bromophenol blue 以及 100 mM dithiothreitol) 以等比例混合，並於 95°C 加熱 10 分鐘後，取適量蛋白質(約 15 μ g)以

13.5% SDS-PAGE 進行垂直電泳分離 (100V、200 mA、120 分鐘)。

以垂直電泳分離蛋白質後，將膠上之蛋白質以電泳 (140V、400 mA、100 分鐘) 轉漬於聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene difluoride, PVDF; Millipore, Billerica, MA, USA) 上，再以 5% 脫脂牛奶為阻斷劑於 4°C 處理隔夜，接著加入一級抗體 anti-Hcp 於室溫下反應 2 小時，隨後加入 2500 倍稀釋之二級抗體：鹼性磷酸酶偶聯之抗兔免疫球蛋白 G (alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G) 於室溫下反應 1 小時後，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) 於避光環境中進行呈色。

3. 結果

3.1 克雷白氏肺炎桿菌之 T6SS 基因組成

以 BLAST 分析克雷白氏肺炎桿菌 CG43 之基因序列，發現其具有兩組 T6SS 基因組，經比對後發現其中一組基因組與克雷白氏肺炎桿菌 NTUH K-2044 和克雷白氏肺炎桿菌 MGH78578 具有高相似度。該基因組在克雷白氏肺炎桿菌 NTUH K-2044 和克雷白氏肺炎桿菌 MGH78578 中，因具有完整 T6SS 核心組成分，故皆以 T6SS 第一基因組(T6SS locus-I)稱之。克雷白氏屬之 T6SS-I 核心組成分中，與形成針狀結構相關之組成分，皆可見於克雷白氏肺炎桿菌 CG43、克雷白氏肺炎桿菌 NTUH K-2044 和克雷白氏肺炎桿菌 MGH78578；如圖一所示，13 個核心組成分依其功能區分為 *vgrG* gene cluster 和 *icmF* gene cluster，其中，克雷白氏肺炎桿菌 CG43 T6SS-I 之 *vgrG* gene cluster 與克雷白氏肺炎桿菌 NTUH K-2044 和克雷白氏肺炎桿菌 MGH78578 具有極高相似度，而克雷白氏肺炎桿菌 CG43 T6SS-I 之 *icmF* gene cluster 則與 *K.variicola* At-22 具較高相似度。

3.2 Hcp、ClpV 和 VgrG 之蛋白質區域預測

為了確認克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中 Hcp、ClpV 和 VgrG 轉譯蛋白保留完整的功能域，進一步以線上軟體 Pfam

(<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 分析其胺基酸序列，如圖二所示，分析結果並未預測出 Hcp 功能性區域；而 ClpV 保有 ATP 水解酶活性區域；VgrG 的 N 端則具有與 T4 噬菌體尾部構造之 gp5 和 gp27 類似的保守區域；C 端的變異區域則沒有明確的功能性區域(圖二)。

3.3 建構 *hcp*、*clpV*、*vgrG* 和 *vgrG* - C 端變異區基因缺損突變株

為了探討 Hcp、ClpV 和 VgrG 在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 所扮演的角色，以重組基因取代方式分別建構了源自 CG43S3 的 *hcp*、*clpV*、*vgrG* 基因缺損突變株；同時，為確認 VgrG - C 端變異區之功能，也建構了 *vgrG* - C 端變異區缺損的突變株。首先，以 PCR 增幅出各目標基因上下游約 1000 個鹼基對之 DNA 片段(圖三 A、圖四 A、圖五 A、C)，將上下游片段結合後接入自殺性載體 pKAS46，分別得到載體 pKAS46-hAB、pKAS46-cAB、pKAS46-vAB 和 pKAS46-vcAB，隨後以接合作用將各載體送入克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3 中，藉由同源序列重組置換和抗生素篩選得到基因缺損突變株，最後以 PCR 和具專一性之引子對確認各目標基因確實遭剔除無誤。圖三 B、圖四 B、圖五 B、D 分別顯示 CG43S3 與各突變株之 PCR 產物長度差異，進而確認了 Δhcp 、 $\Delta clpV$ 、 $\Delta vgrG$ 和 $\Delta vgrG$ - C 端變異區突變株之建構。

3.4 *hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 基因缺損對外表型之影響

為了瞭解目標基因缺損是否會對細菌生長造成影響，首先將這些突變菌株與 CG43S3 分別以 LB 和 M9 培養基培養 12 小時，每隔 1 小時以光學儀器測量細菌密度。圖六 A 顯示， Δhcp 和 $\Delta vgrG$ 無論於 LB 或 M9 培養基之 OD₆₀₀ 吸光值與 CG43S3 均無明顯差異，但 $\Delta clpV$ 於 LB 培養基之 OD₆₀₀ 吸光值卻在對數增殖期的晚期、生長減衰期和定常期的早期低於 CG43S3，意味著 *clpV* 缺損使得細菌生長速度變得較為遲緩； $\Delta clpV$ 於 M9 培養基之 OD₆₀₀ 吸光值在進入定常期後較 CG43S3 高，顯示 *clpV* 缺損使細菌生長較佳。隨後觀察各基因缺損株外觀， Δhcp 和 $\Delta vgrG$ 之菌落外觀與 CG43S3 並無明顯差異，然而 $\Delta clpV$ 則出現菌落大小不一的現象(圖六 B)。進一步以低速沉降物理性實驗分析各基因缺損突變株之莢膜生合成能力，圖七 A 顯示 Δhcp 和 $\Delta vgrG$ 與 CG43S3 皆不容易因離心而產生沉澱， $\Delta clpV$ 則較容易被沈澱下來，暗示 $\Delta clpV$ 莢膜多醣體生成量較低，而進一步定量莢膜多醣體之結果證實， $\Delta clpV$ 之莢膜多醣體生成量確實較 CG43S3 低(圖七 B)。

3.5 *hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 基因缺損株之生物膜形成能力

克雷白氏肺炎桿菌可藉由形成生物膜適應逆境挑戰，例如抗藥性，亦可在醫療器材上形成生物膜，造成院內感染源。以玻璃試管試驗觀察 *hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 基因剔除株的生物膜形成能力，如圖八 A

顯示， $\Delta clpV$ 生物膜形成能力與 CG43S3 並無明顯差異，相對的， Δhcp 和 $\Delta vgrG$ 所形成之生物膜明顯較厚；進一步以 96 孔微量培養盤分別培養 12 小時及 24 小時，將其生物膜形成能力量化結果顯示 Δhcp 與 CG43S3 生物膜形成能力無顯著差異，而 $\Delta clpV$ 和 $\Delta vgrG$ 於 12 或 24 小時的生物膜形成能力遠高於 CG43S3(圖八 B、C)。使用不同材質做為生物膜形成界面得到的不同結果暗示 CG43S3 可以不同因子黏附材質迥異的界面，T6SS-I 的組成會影響其生物膜形成能力。值得注意的是 $\Delta vgrG$ 在兩種材質上的生物膜形成能力皆顯著提高。

3.6 *hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 基因缺損株之菌種競爭能力 由於 T6SS 所形成之穿刺構造與噬菌體具有相當高的演化相關性，推測細菌可能透過 T6SS 的獨特作用機制直接將作用蛋白質或毒素送入其他細菌，以創造自身生存之利基。最近對於 *P. aeruginosa* 可以 T6SS 之作用機制鎖定並殺死它種細菌之研究，即為 T6SS 可為細菌在競爭環境中建立特殊之利基一說，提供了有力的證據[27,31,73]。我們利用 *lacZ* 為報導基因，將 CG43S3 各基因缺損突變株之 *lacZ* 基因剔除，使之無法代謝 X-gal；並以在 *P. aeruginosa* 之菌種競爭能力相關研究中，確定與 *P. aeruginosa* 具有競爭關係，且可產生 β -galactosidase 以代謝 X-gal 之 *E. coli* MG1655，做為克雷白氏肺炎桿菌 CG43 於菌種競爭能力測試實驗中之競爭對象。結果顯示，無論菌數密度高低， Δhcp 、 $\Delta clpV$

和 $\Delta vgrG$ 相較於 CG43S3 與 *E. coli* MG1655 之競爭現象並無明顯差異 (圖九)，換言之，*hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 基因可能不影響克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3 與 *E. coli* MG1655 菌種競爭的能力。

3.7 T6SS 於酸性環境下之調控

克雷白氏肺炎桿菌屬於腸內菌科，由口腔進入宿主體內到達腸道的過程，必須具有抵抗胃酸壓力的能力才得以於腸道中生存。據文獻指出，*Y. pseudotuberculosis* 之 T6SS 缺損造成其在酸性環境中之存活率下降[60]。目前，僅知克雷白氏肺炎桿菌無法存活於 pH2.0 以下之環境，而其抗酸機制仍未完全了解，為了瞭解 T6SS-I 是否影響其抗酸能力，分別將 CG43S3 及衍生的 T6SS-I 缺失菌株先於 pH4.4 之 LB 培養液中培養 60 分鐘，再將這些菌株移至 pH3.0 之 M9 培養液中培養 45 分鐘，再塗盤隔夜培養後計數菌落數並比較其存活率[74]。圖十 A 顯示， Δhcp 在酸性環境壓力下之存活率較 CG43S3 降低 70%， $\Delta clpV$ 存活率降低 21%， $\Delta vgrG$ 則降低 90%，為了確認 CG43S3 之 VgrG -C 端變異區功能是否與其對酸逆境的反應能力相關，因此也分析了 $\Delta vgrG$ -C 端變異區之基因缺損突變株在酸性環境下之存活率，結果顯示，將 VgrG 之 C 端剔除的確會造成克雷白氏肺炎桿菌 CG43 對抗酸性環境壓力能力下降 68%，然而 *vgrG* -C 端變異區缺失未使存活率降低至與 $\Delta vgrG$ 一樣，而 $\Delta vgrG$ -C 端變異區存活率介於 Δhcp 和

$\Delta clpV$ 之間(圖十 A)。前人研究指出，將克雷白氏肺炎桿菌 CG43 的 *yfdx* 基因移除，使其無法產生 YfdX 膜間質伴隨蛋白質，致克雷白氏肺炎桿菌 CG43 於酸性環境下之存活率大為下降[70]。因此，為了探討 YfdX 是否參與 *hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 在酸性環境下之調控，我們將待測菌株於 pH4.4 之 LB 培養液中培養 12 小時，並於西方墨點法中以 YfdX 抗體[75]進行雜合(圖十 B)，結果顯示，在 pH4.4 之酸性環境下 *hcp* 的缺損並不影響 *yfdX* 之表現，而 *clpV* 或 *vgrG* 缺損使得 *yfdX* 表現量增加。然而，將酸性環境之存活率及 *yfdX* 之表現量比較無法得到正相關性，暗示 *hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 在酸性環境下的表現經不同途徑所調控。

3.8 T6SS-I、*hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 之啟動子活性分析

利用線上軟體 Softberry 分析 T6SS-I、*hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 基因上游非轉譯區，得到三個預測的啟動子區域 P₁、P₂ 和 P₃，其中 *clpV* 和 *vgrG* 共用同一啟動子(圖十一 A)，進一步將 P₁、P₂ 和 P₃ 核酸片段與 LacZ 報導系統結合後，轉型送入 *lacZ* 基因缺損之克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3Z01 中，接著將菌分別培養於 LB 和 pH4.4 之 LB 培養液中量測其啟動子活性。結果顯示，P₁ 無論是否在酸性環境下，活性皆遠高於 P₂ 和 P₃，且酸性環境壓力會使 P₁ 啟動子的活性升高(圖十一 B)，此結果暗示克雷白氏肺炎桿菌 CG43 的 T6SS-I 以 P₁ 啟動子活化其表

現，並被酸性環境壓力所影響。

3.9 T6SS-I 之表現調控

3.9.1 Hcp 抗體製備

為了製備 T6SS-I 的主要結構蛋白 Hcp 之抗體，先以 PCR 增幅 *hcp* 基因片段後接入蛋白質表達質體 pET30b 中，再將此重組質體轉型送入大腸桿菌 Novablue(DE3) 中並以 IPTG 誘導表現重組之 Hcp 蛋白質。如圖十二 A 所示，重組之 Hcp 與 6 個 His-tag 融合，分子量大小較原 Hcp 增大約 9 kDa，為 27 kDa。接著以管柱層析將蛋白質純化回收(圖十二 B)，以濃度最高者為抗原製備抗體。待抗體製備完成，先以重組大腸桿菌 Novablue(DE3)[pET30-*hcp*] 與稀釋 5000 倍之 Hcp 抗體雜合去除非專一性的抗體後作為偵測 Hcp 表現的探針，如圖十三 A 所示，於 27 kDa 位置之蛋白可被 Hcp 抗體偵測，顯示此 Hcp 抗體具有專一性。

3.9.2 T6SS-I 與調節壓力相關之轉錄調控因子蛋白之關係 目前相關

研究證實不同菌種之 T6SS 可受不同環境壓力誘導表現，而不同轉錄調控蛋白對 T6SS 的調控機制亦迥異。如圖十三 B 之左圖顯示，西方墨點法分析 $\Delta rpoS$ 、 $\Delta soxRS$ 、 $\Delta pecS$ 和 $\Delta pecS\Delta pecM$ 的全蛋白圖譜與 CG43S3 並無明顯差異；有趣的是 Δfur 的全蛋白圖譜與

CG43S3 或其他菌株明顯不同，缺少了 18 kDa 蛋白，並於約 30 kDa 位置出現一未知蛋白；而圖十三 B 右圖結果確認回補 *fur* 基因後，出現 18 kDa 蛋白，暗示此抗體會非專一地辨認 Fur 蛋白。為了瞭解 T6SS-I 是否與外膜蛋白或第三型線毛的表現相關，如圖十三 C 的西方墨點分析結果顯示，Hcp 抗體可以非專一性地分辨 OmpA 外膜蛋白。如圖十四所示，為了降低非專一性的干擾，將抗體稀釋 30000 倍後的西方墨點法分析結果顯示，雖然非專一性的蛋白帶明顯減少，此抗體卻無法偵測出於 CG43S3 中大量表現約 34 kDa 的重組 Hcp 融合蛋白，顯示此抗體的專一性和靈敏度太低。



4. 討論

T6SS 自 2006 年首度被發現後，已被證實存在於超過四分之一的已定序菌種中[76]。近年來相關研究發現一個基因體中通常帶有不只一套 T6SS 基因組，而在某些細菌中甚至可多達 5~6 套，而一菌種中帶有多套基因組似乎具有不同功能性[50]。而這種潛在的多分工性暗示著 T6SS 基因組會在遭遇到特定環境條件刺激時，經由嚴謹的調控迴路進行反應。目前已知 T6SS 具有相當廣泛的功能性，從致病力、生物膜形成能力到環境壓力感知能力和與它種微生物競爭之能力，皆有相關研究支持[27,33,37,51,61]。而我們的研究結果顯示，克雷白氏肺炎桿菌 CG43 具有兩套 T6SS 基因組 T6SS-I 和 T6SS-III，然而 T6SS-III 的組成不完整，缺少 *hcp* 基因，顯示可能已喪失功能性。CG43 之 T6SS-I 和 NTUH K-2044、MGH78578 依樣具有分別與 T6SS 的結構形成和傳遞作用之蛋白生成相關的 *vgrG* 和 *icmF* gene cluster[65]。VgrG 之功能域預測分析結果則在其 C 端發現一功能未知之區域，此 VgrG-I 為一 evolved VgrG(圖二)。

clpV 基因缺失使克雷白氏肺炎桿菌 CG43 在對數增殖期的晚期、生長減衰期和定常期的早期生長較遲緩(圖六 A)，可能因為缺少了 ClpV 的 ATP 水解酶活性，造成生長時能量供給不足，造成菌數增長較為緩慢、菌落大小不一的現象(圖六 B)，而能量不足亦可能是造成

莢膜多醣體表現量降低的原因。*vgrG* 基因缺損使菌株於不同材質表面的生物膜生成能力提高，是否與其 VgrG C 端變異區功能有關亦是一值得探討的課題。而 *hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 基因缺失後，對大腸桿菌 MG1655 均無競爭能力消長，可能是尚未找到合適之競爭對象或觸發其菌種競爭能力之環境條件。

Y. pseudotuberculosis 的研究指出，ClpV 之 ATP 水解酶活性不僅為 T6SS 正常運作所必須，亦為 *Y. pseudotuberculosis* 對抗酸性環境壓力，於酸性環境中之存活所必須[60]。克雷白氏肺炎桿菌 CG43 缺失 *hcp*、*clpV* 或 *vgrG* 基因降低其於酸性環境下之存活率(圖十 A)，然而對照酸壓力伴隨蛋白 YfdX 表現量(圖十 B)並無正相關性，暗示 Hcp、ClpV 和 VgrG 於抗酸反應之功能與影響 YfdX 的表現可能是不同調控路徑。分析啟動子活性後發現 T6SS-I 可能在酸性環境下由 P₁ 啟動子調控表現(圖十一)。在 LB 培養液和酸性培養液中測試啟動子活性之結果顯示 P₁ 啟動子可能調控 T6SS-I 之表現。然而對於 *hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 是否處於同一操縱子中，遭遇酸性或其他環境壓力時 T6SS-I 中是否亦具有內生性啟動子等問題仍有待深入研究探討。

我們嘗試以西方墨點法分析與壓力調節相關之轉錄調節因子是否會影響 *hcp* 基因表現之消長，希望藉此反向推導出可誘導 *hcp* 表現之環境壓力，進而描繪其調控途徑。然而如圖十三所示，Hcp 抗體專

一性不足，無法明確辨識 Hcp 蛋白質；大量表現 *hcp* 或 *fur* 之菌株也無法確認 Hcp 的表現。未來可以再純化(re-purification)方式改善抗體專一性的問題，有鑑於抗體之專一性和敏感度不足，未來可以 q-PCR 方式探討 T6SS-I 之調控途徑，明確反映 *hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 之表現量，進而描繪出 T6SS-I 之調控途徑。



1. Topley WWC, Wilson GS, Collier LH, Balows A, Sussman M, et al. (1998) Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. London; New York; Arnold; Oxford University Press.
2. Podschun R, Ullmann U (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 11: 589-603.
3. Bergogne-Berezin E (1995) Treatment and prevention of nosocomial pneumonia. *Chest* 108: 26S-34S.
4. Carpenter JL (1990) *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev Infect Dis* 12: 672-682.
5. Wang JH, Liu YC, Lee SS, Yen MY, Chen YS, et al. (1998) Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis* 26: 1434-1438.
6. Colodner R, Raz R, Chazan B, Sakran W (2004) Susceptibility pattern of extended-spectrum beta-lactamase producing bacteria isolated from inpatients to five antimicrobial drugs in a community hospital in Northern Israel. *Int J Antimicrob Agents* 24: 409-410.
7. French GL, Shannon KP, Simmons N (1996) Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 34: 358-363.
8. Hirsch EB, Tam VH (2010) Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 65: 1119-1125.
9. Nordmann P, Cuzon G, Naas T (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 9: 228-236.
10. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, et al. (2010) Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 10: 597-602.
11. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, et al. (2009) Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 5046-5054.
12. Amako K, Meno Y, Takade A (1988) Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol* 170: 4960-4962.
13. Mizuta K, Ohta M, Mori M, Hasegawa T, Nakashima I, et al. (1983) Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their

- capsular (K) types. *Infect Immun* 40: 56-61.
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. Podschun R, Fischer A, Ullmann U (1992) Siderophore production of *Klebsiella* species isolated from different sources. *Zentralbl Bakteriol* 276: 481-486.
 16. Williams P, Lambert PA, Brown MR, Jones RJ (1983) The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J Gen Microbiol* 129: 2181-2191.
 17. 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.
 18. Domenico P, Schwartz S, Cunha BA (1989) Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. *Infect Immun* 57: 3778-3782.
 19. 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.
 20. Sebhathi TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S (1998) Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect Immun* 66: 2887-2894.
 21. de Lorenzo V, Martinez JL (1988) Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7: 621-629.
 22. 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.
 23. Gerlach RG, Hensel M (2007) Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* 297: 401-415.
 24. Saier MH, Jr. (2006) Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol* 214: 75-90.
 25. Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, et al. (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312: 1526-1530.
 26. Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, et al. (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1528-1533.

27. Hood RD, Singh P, Hsu F, Guvener T, Carl MA, et al. (2010) A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe* 7: 25-37.
28. Jani AJ, Cotter PA (2010) Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell Host Microbe* 8: 2-6.
29. MacIntyre DL, Miyata ST, Kitaoka M, Pukatzki S (2010) The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 19520-19524.
30. Murdoch SL, Trunk K, English G, Fritsch MJ, Pourkarimi E, et al. (2011) The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes type VI secretion to target bacterial competitors. *J Bacteriol* 193: 6057-6069.
31. Russell AB, Hood RD, Bui NK, LeRoux M, Vollmer W, et al. (2011) Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* 475: 343-347.
32. Schwarz S, Hood RD, Mougous JD (2010) What is type VI secretion doing in all those bugs? *Trends Microbiol* 18: 531-537.
33. Schwarz S, West TE, Boyer F, Chiang WC, Carl MA, et al. (2010) Burkholderia type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. *PLoS Pathog* 6: e1001068.
34. Pukatzki S, McAuley SB, Miyata ST (2009) The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr Opin Microbiol* 12: 11-17.
35. Bingle LE, Bailey CM, Pallen MJ (2008) Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol* 11: 3-8.
36. Das S, Chaudhuri K (2003) Identification of a unique IAHP (IcmF associated homologous proteins) cluster in *Vibrio cholerae* and other proteobacteria through in silico analysis. *In Silico Biol* 3: 287-300.
37. Filloux A, Hachani A, Bleves S (2008) The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* 154: 1570-1583.
38. Aksyuk AA, Leiman PG, Kurochkina LP, Shneider MM, Kostyuchenko VA, et al. (2009) The tail sheath structure of bacteriophage T4: a molecular machine for infecting bacteria. *EMBO J* 28: 821-829.
39. Leiman PG, Basler M, Ramagopal UA, Bonanno JB, Sauder JM, et al. (2009) Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4154-4159.
40. Pell LG, Kanelis V, Donaldson LW, Howell PL, Davidson AR (2009) The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*

106: 4160-4165.

41. Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ (2007) Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15508-15513.
42. Ballister ER, Lai AH, Zuckermann RN, Cheng Y, Mougous JD (2008) In vitro self-assembly of tailorable nanotubes from a simple protein building block. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3733-3738.
43. Kanamaru S, Leiman PG, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Mesyanzhinov VV, et al. (2002) Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature* 415: 553-557.
44. Zheng J, Leung KY (2007) Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. *Mol Microbiol* 66: 1192-1206.
45. Ma AT, McAuley S, Pukatzki S, Mekalanos JJ (2009) Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe* 5: 234-243.
46. Ma AT, Mekalanos JJ (2010) In vivo actin cross-linking induced by *Vibrio cholerae* type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 4365-4370.
47. Suarez G, Sierra JC, Erova TE, Sha J, Horneman AJ, et al. (2010) A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. *J Bacteriol* 192: 155-168.
48. Bonemann G, Pietrosiuk A, Diemand A, Zentgraf H, Mogk A (2009) Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. *EMBO J* 28: 315-325.
49. Schlieker C, Zentgraf H, Dersch P, Mogk A (2005) ClpV, a unique Hsp100/Clp member of pathogenic proteobacteria. *Biol Chem* 386: 1115-1127.
50. Boyer F, Fichant G, Berthod J, Vandenbrouck Y, Attree I (2009) Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics* 10: 104.
51. Weber B, Hasic M, Chen C, Wai SN, Milton DL (2009) Type VI secretion modulates quorum sensing and stress response in *Vibrio anguillarum*. *Environ Microbiol* 11: 3018-3028.
52. Suarez G, Sierra JC, Sha J, Wang S, Erova TE, et al. (2008) Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog* 44: 344-361.
53. Aschtgen MS, Bernard CS, De Bentzmann S, Lloubes R, Cascales E (2008) *SciN*

- is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190: 7523-7531.
54. Schell MA, Ulrich RL, Ribot WJ, Brueggemann EE, Hines HB, et al. (2007) Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. *Mol Microbiol* 64: 1466-1485.
 55. Santic M, Molmeret M, Barker JR, Klose KE, Dekanic A, et al. (2007) A *Francisella tularensis* pathogenicity island protein essential for bacterial proliferation within the host cell cytosol. *Cell Microbiol* 9: 2391-2403.
 56. Parsons DA, Heffron F (2005) *sciS*, an *icmF* homolog in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence. *Infect Immun* 73: 4338-4345.
 57. Lauriano CM, Barker JR, Yoon SS, Nano FE, Arulanandam BP, et al. (2004) *MglA* regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4246-4249.
 58. Hunt TA, Kooi C, Sokol PA, Valvano MA (2004) Identification of *Burkholderia cenocepacia* genes required for bacterial survival in vivo. *Infect Immun* 72: 4010-4022.
 59. Bladergroen MR, Badelt K, Spaik HP (2003) Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 53-64.
 60. Zhang W, Wang Y, Song Y, Wang T, Xu S, et al. (2013) A type VI secretion system regulated by *OmpR* in *Yersinia pseudotuberculosis* functions to maintain intracellular pH homeostasis. *Environ Microbiol* 15: 557-569.
 61. Cascales E (2008) The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep* 9: 735-741.
 62. Leung KY, Siame BA, Snowball H, Mok YK (2011) Type VI secretion regulation: crosstalk and intracellular communication. *Curr Opin Microbiol* 14: 9-15.
 63. Bernard CS, Brunet YR, Gueguen E, Cascales E (2010) Nooks and crannies in type VI secretion regulation. *J Bacteriol* 192: 3850-3860.
 64. Brunet YR, Bernard CS, Gavioli M, Lloubes R, Cascales E (2011) An epigenetic switch involving overlapping *fur* and DNA methylation optimizes expression of a type VI secretion gene cluster. *PLoS Genet* 7: e1002205.
 65. Sarris PF, Zoumadakis C, Panopoulos NJ, Scoulica EV (2011) Distribution of the putative type VI secretion system core genes in *Klebsiella* spp. *Infect Genet Evol* 11: 157-166.
 66. 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.
67. Joseph S, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*—3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 68. Skorupski K, Taylor RK (1996) Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene* 169: 47-52.
 69. 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.
 70. 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.
 71. 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.
 72. Miller JH (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 73. Li M, Le Trong I, Carl MA, Larson ET, Chou S, et al. (2012) Structural basis for type VI secretion effector recognition by a cognate immunity protein. *PLoS Pathog* 8: e1002613.
 74. 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.
 75. Fan L-C (2012) YfdX role in acid-resistance response of *Klebsiella pneumoniae*. Hsinchu, Taiwan R.O.C.: National Chiao Tung University.
 76. Basler M, Pilhofer M, Henderson GP, Jensen GJ, Mekalanos JJ (2012) Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature* 483: 182-186.
 77. 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.
 78. 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.

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
<i>E. coli</i>:		
JM-109	<i>RecA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96</i> <i>rolA1 thi Δ(lac-proAB)</i>	Lab stock
S17-1 λ <i>pir</i>	Tp ^r Sm ^r <i>recA, thi, pro, hsdR⁻ M⁺</i> [PR4-2-Tc::Mu:Km ^r Tn7](<i>pir</i>)	[77]
K-12 MG1655	F ⁻ λ rph-1	
Novablue(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB(rB⁻mB⁻)gal</i> <i>dcm</i> (DE3), Tc ^r	Novagen Co.
<i>K. pneumoniae</i>:		
CG43S3	K2 serotype, Sm ^r	[78]
Z01	<i>lacZ</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	[71]
CG43 Δ <i>yfdX</i>	<i>yfdX</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>hcp</i>	<i>hcp</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	This Study
CG43 Δ <i>clpV</i>	<i>clpV</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	This Study
CG43 Δ <i>vgrG</i>	<i>vgrG</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	This Study
CG43 Δ <i>vgrG</i> C-ter	<i>rcsD</i> Hk domain deletion mutant in CG43, Sm ^r	This Study
CG43 Δ <i>rcsB</i>	<i>rcsB</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>mrkA</i>	<i>mrkA</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock

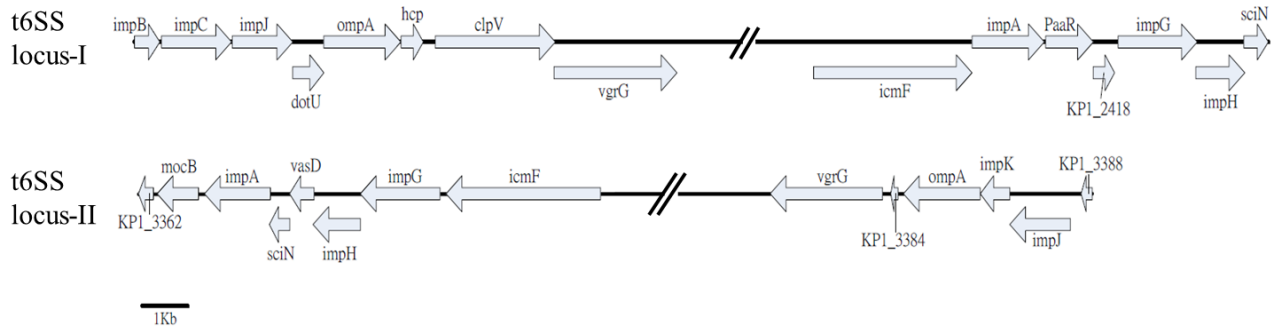
CG43 Δ <i>ompA</i>	<i>ompA</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>ompC</i>	<i>ompC</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>ompF</i>	<i>ompF</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>ompN</i>	<i>ompN</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>yjcC</i>	<i>yjcC</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>mrkH</i>	<i>mrkH</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>mrkI</i>	<i>mrkI</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>mrkJ</i>	<i>mrkJ</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>fur</i>	<i>fur</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>rpoS</i>	<i>rpoS</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>soxRS</i>	<i>soxRS</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>pecS</i>	<i>pecS</i> deletion mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>pecS</i> Δ <i>pecM</i>	<i>pecS pecM</i> mutant in CG43, Sm ^r	Lab stock
CG43 Δ <i>lacZ</i> Δ <i>hcp</i>	<i>lacZ hcp</i> mutant in CG43, Sm ^r	This study
CG43 Δ <i>lacZ</i> Δ <i>clpV</i>	<i>lacZ clpV</i> mutant in CG43, Sm ^r	This study
CG43 Δ <i>lacZ</i> Δ <i>vgrG</i>	<i>lacZ vgrG</i> mutant in CG43, Sm ^r	This study

表二：本研究所使用的質體

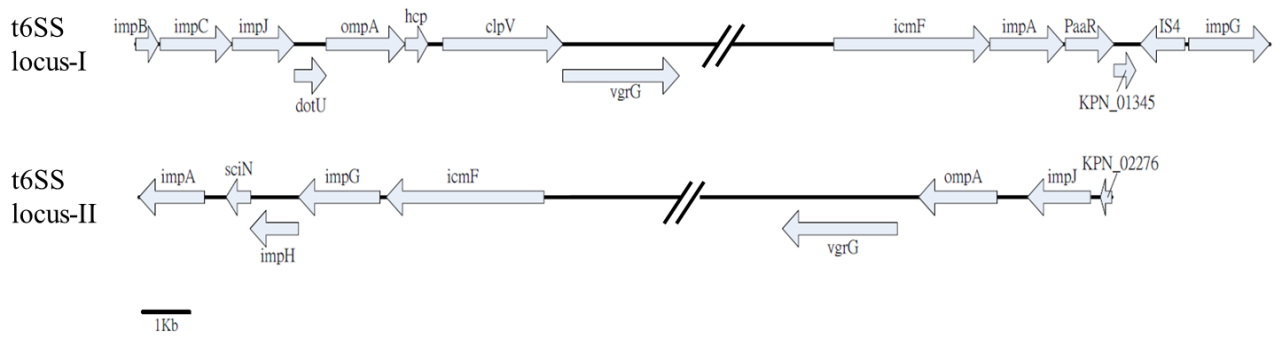
質體	相關特性	來源或 參考文獻
yT&A	PCR cloning vector , Ap ^r	Yeastern Biotech Co.
pET30b	Km ^r , His-tagged protein expression vector	Novagen Co.
pBAD202	Km ^r , His-tagged protein expression vector	Invitrogen Co.
pKAS46	Ap ^r , Km ^r , suicide vector, <i>rpsL</i>	Lab stock
placZ15	Cm ^r , promoter selection vector, <i>lacZ</i> ⁺	Lab stock
pET30b-Hcp	Km ^r , His-tagged protein expression vector, 492-bp fragment encoding full-length Hcp cloned into pET30b	This study
pBAD ₂₀₂ -Hcp	Km ^r , His-tagged protein expression vector, 492-bp fragment encoding full-length Hcp cloned into pBAD ₂₀₂	Y. C. Lai, CSMU

(A)

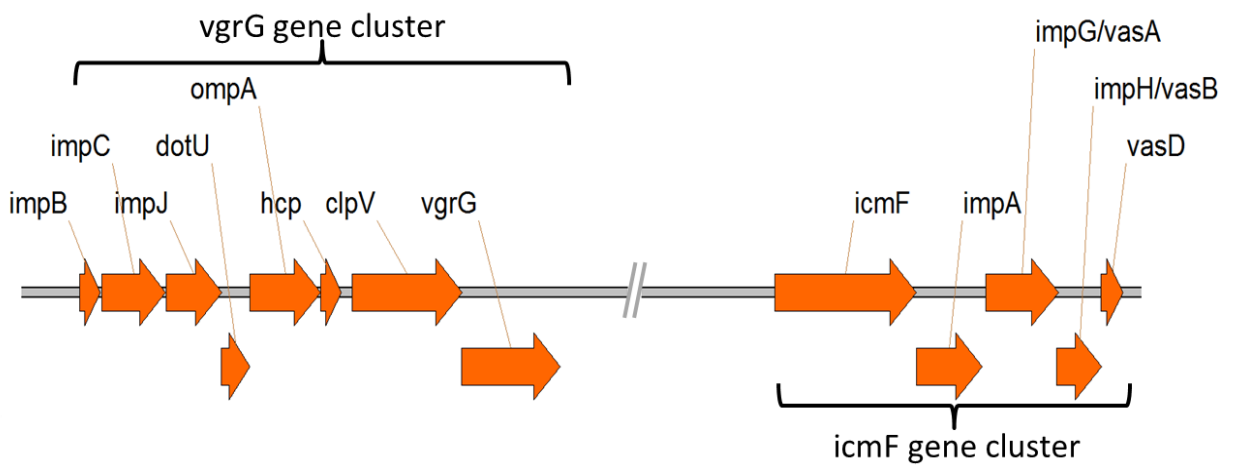
NTUH K-2044



MGH78578



(B)



圖一：克雷白氏肺炎桿菌之 T6SS 基因組成示意圖

Hcp



Family	Description
DUF796	Protein of unknown function

ClpV



Family	Description
Clp N	Clp amino terminal domain
AAA	ATPase family associated with various cellular activities
AAA 2	AAA domain (Cdc48 subfamily)
D2	C-terminal, D2-small domain of ClpB protein

VgrG

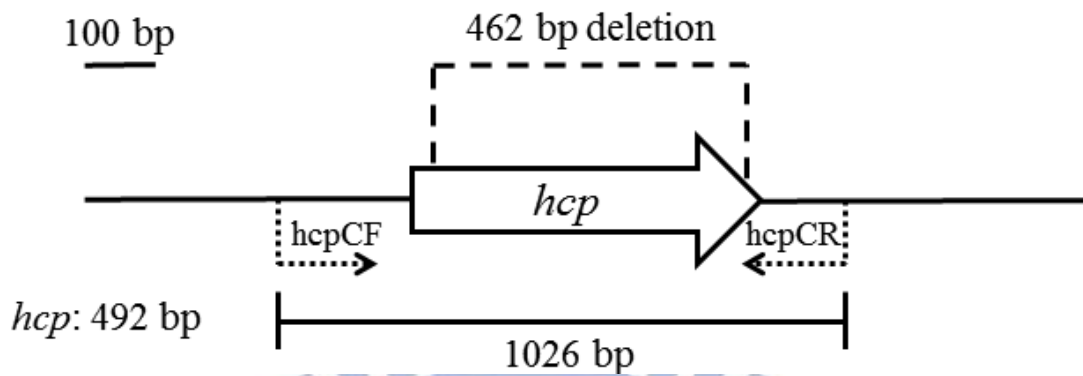


Family	Description
Phage GPD	Phage late control gene D protein
Phage base V	Phage-related baseplate assembly protein
T6SS Vgr	Putative type VI secretion system Rhs element Vgr
DUF2345	Uncharacterized protein conserved in bacteria

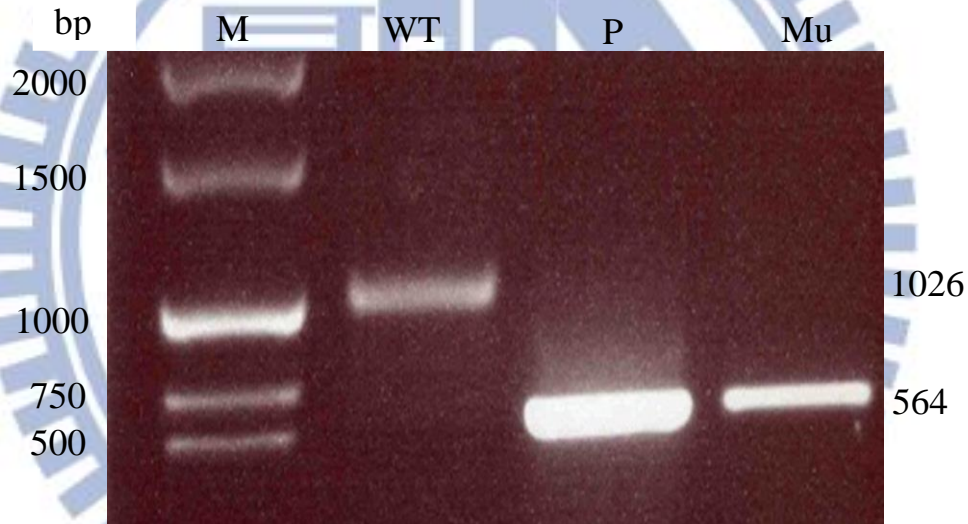
圖二：Hcp、ClpV 與 VgrG 蛋白質功能區域分析

以線上軟體 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 分析 Hcp、ClpV 和 VgrG 之胺基酸序列並對其功能域進行預測。

(A)



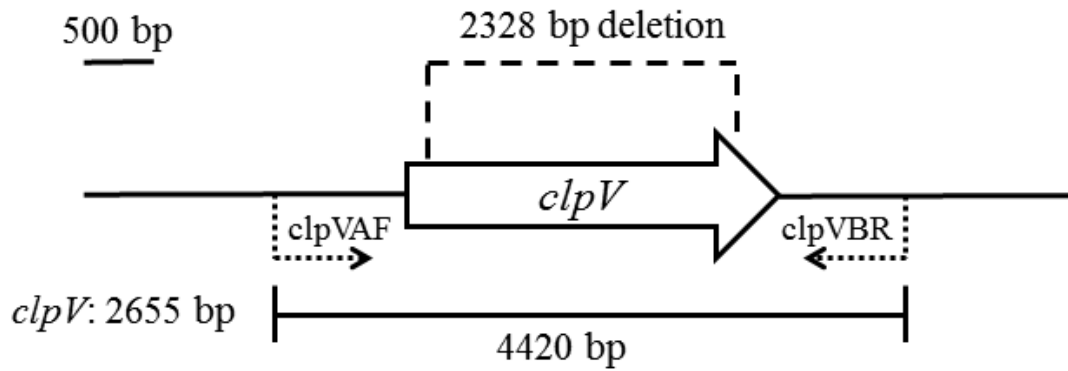
(B)



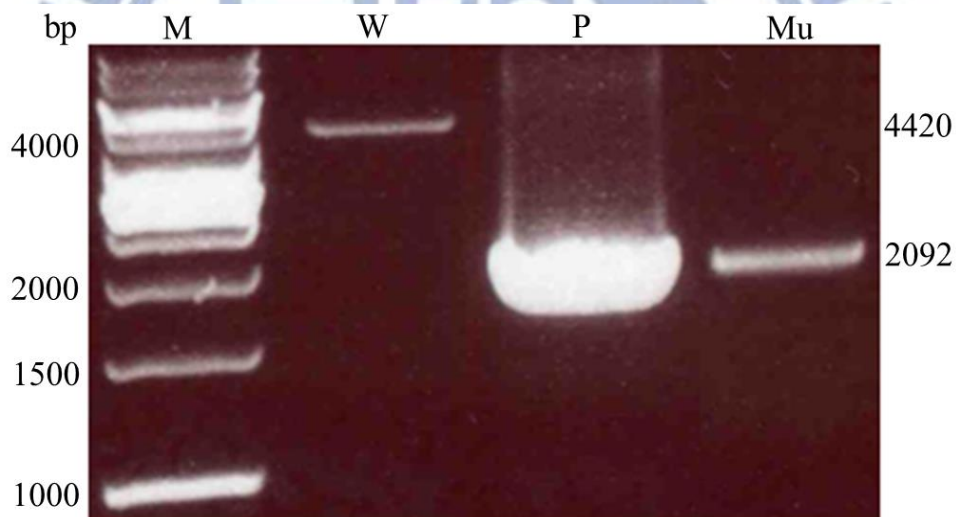
圖三：建構 *hcp* 基因缺損突變株

(A) *hcp* 基因示意圖 *hcpCF/hcpCR* 為設計來確認 Δhcp 突變株之引子；虛線部分表示基因缺損位置。(B) 利用 PCR 原理確認 Δhcp 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，Mu： Δhcp 突變株。基因缺損的詳細流程於實驗材料與方法中。

(A)



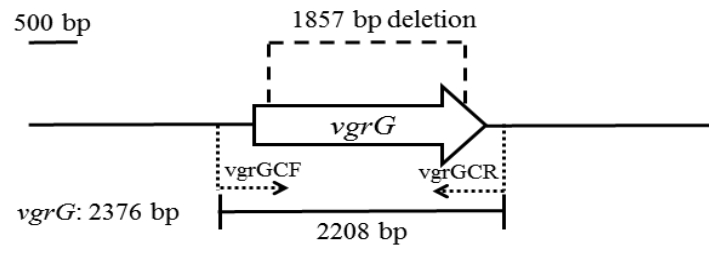
(B)



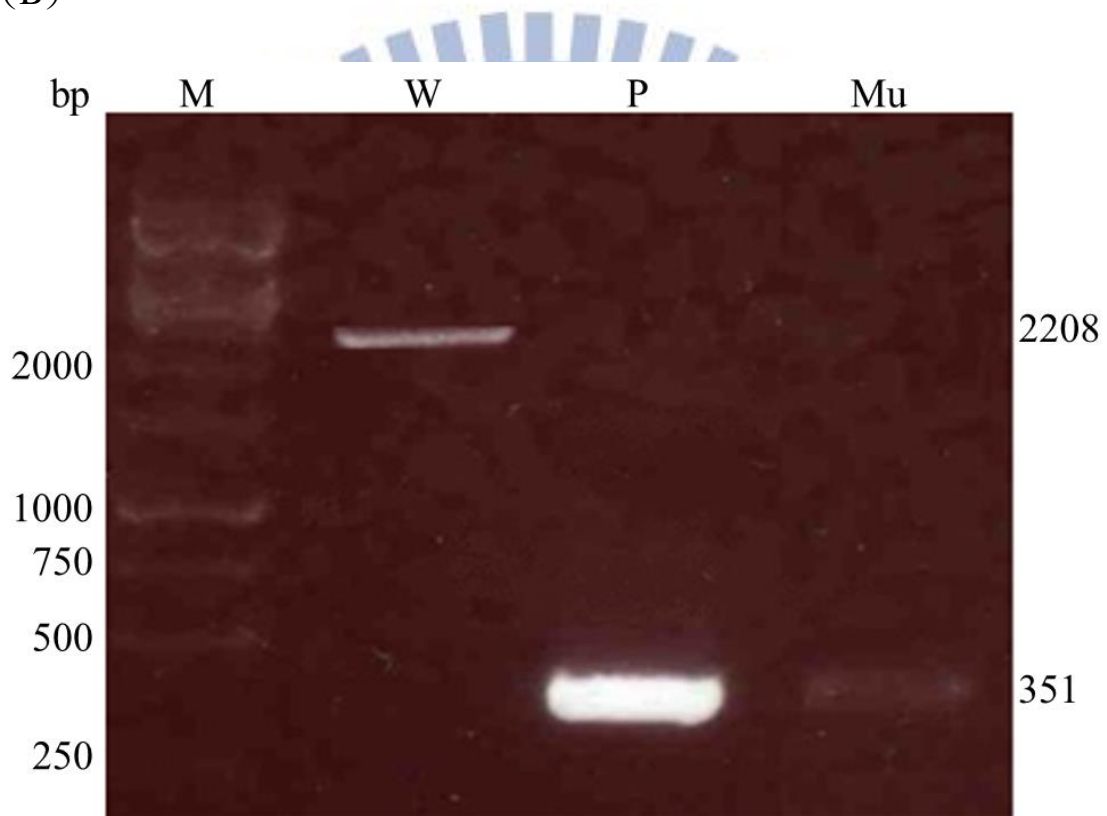
圖四：建構 $\Delta clpV$ 基因缺損突變株

(A) *clpV* 基因示意圖 *clpVAF/clpVBR* 為設計來確認 $\Delta clpV$ 突變株之引子；虛線部分表示基因缺損位置。(B) 利用 PCR 原理確認 $\Delta clpV$ 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，Mu： $\Delta clpV$ 突變株。基因缺損的詳細流程於實驗材料與方法中。

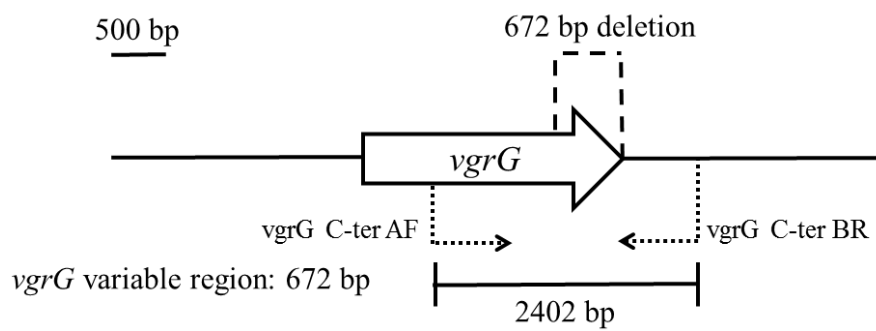
(A)



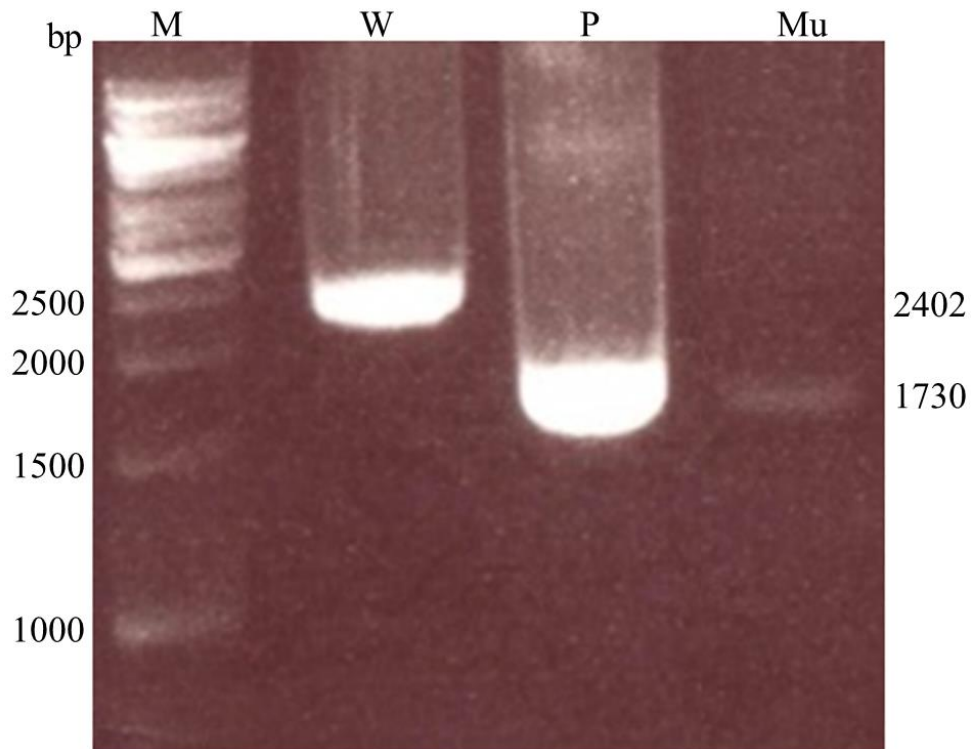
(B)



(C)



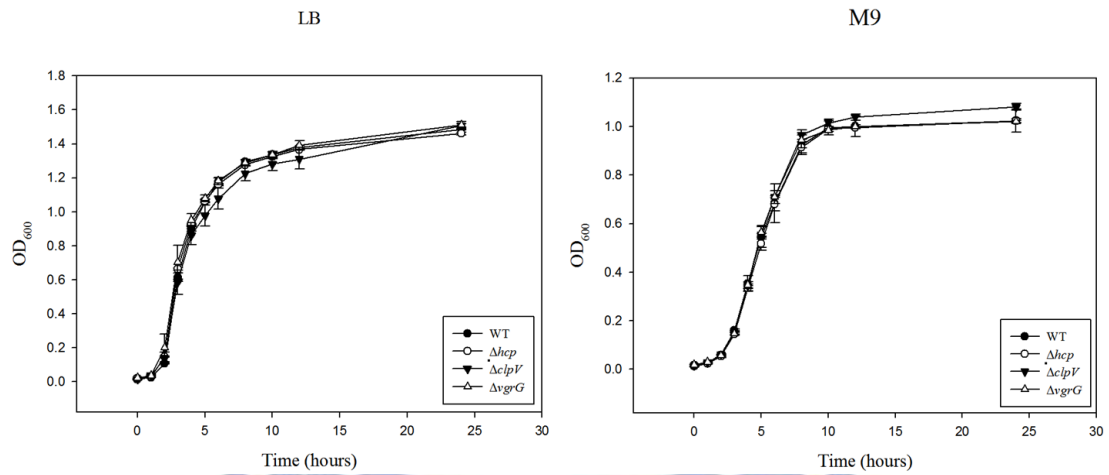
(D)



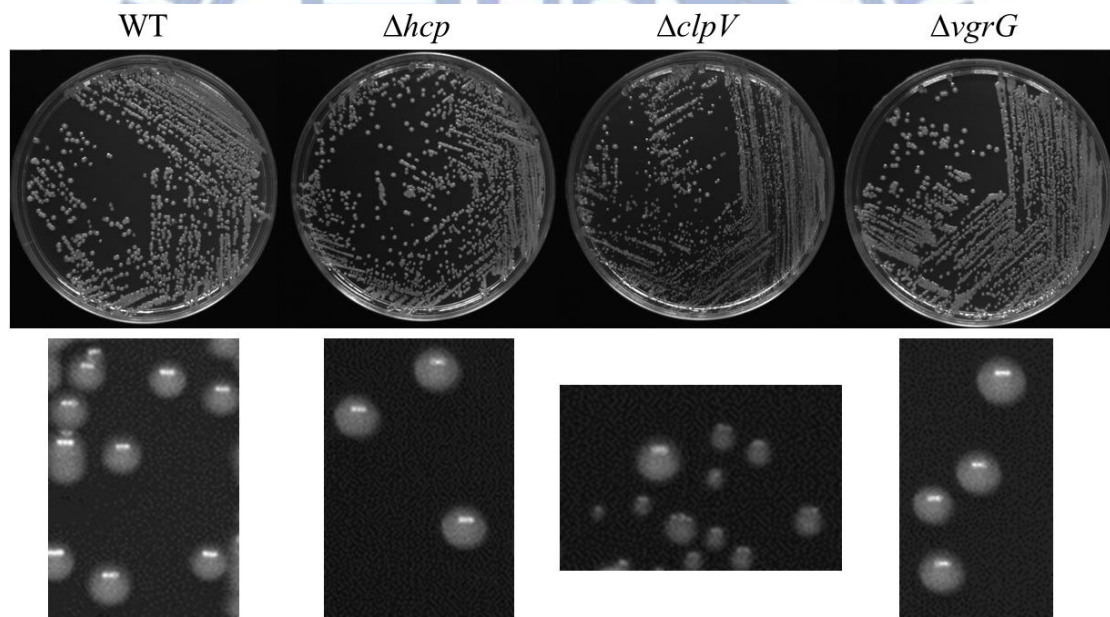
圖五：建構 $\Delta vgrG$ 與 $\Delta vgrG$ - C 端變異區基因缺損突變株

(A) *vgrG* 基因示意圖 *vgrG*C_{CF}/*vgrG*C_{CR} 為設計來確認 $\Delta vgrG$ 突變株之引子；虛線部分表示基因缺損位置。(B) 利用 PCR 原理確認 $\Delta vgrG$ 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，Mu： $\Delta vgrG$ 突變株。(C) *vgrG* 基因-C 端變異區示意圖 *vgrG* C-ter AF/*vgrG* C-ter BR 為設計來確認 $\Delta vgrG$ -C 段變異區突變株之引子；虛線部分表示基因缺損位置。(D) 利用 PCR 原理確認 $\Delta vgrG$ -C 端變異區突變株。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，Mu： $\Delta vgrG$ -C 端變異區突變株。基因缺損的詳細流程於實驗材料與方法中。

(A)



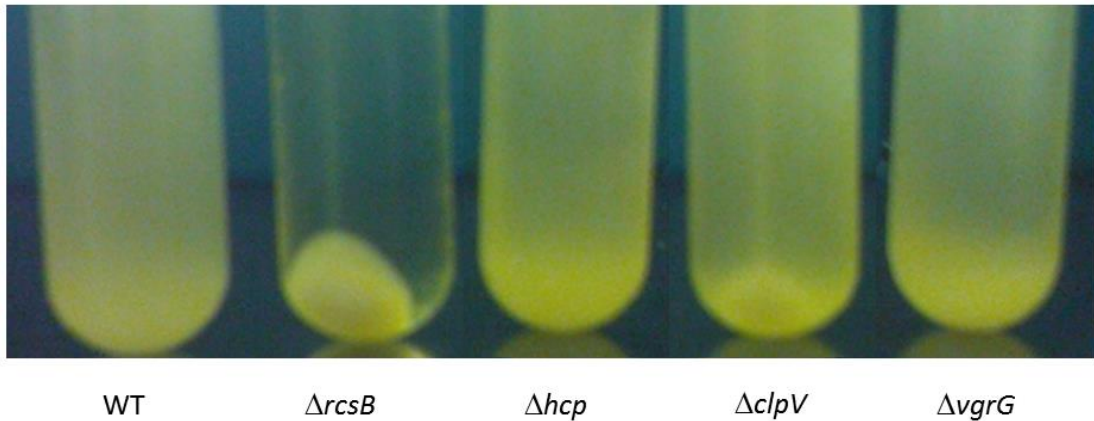
(B)



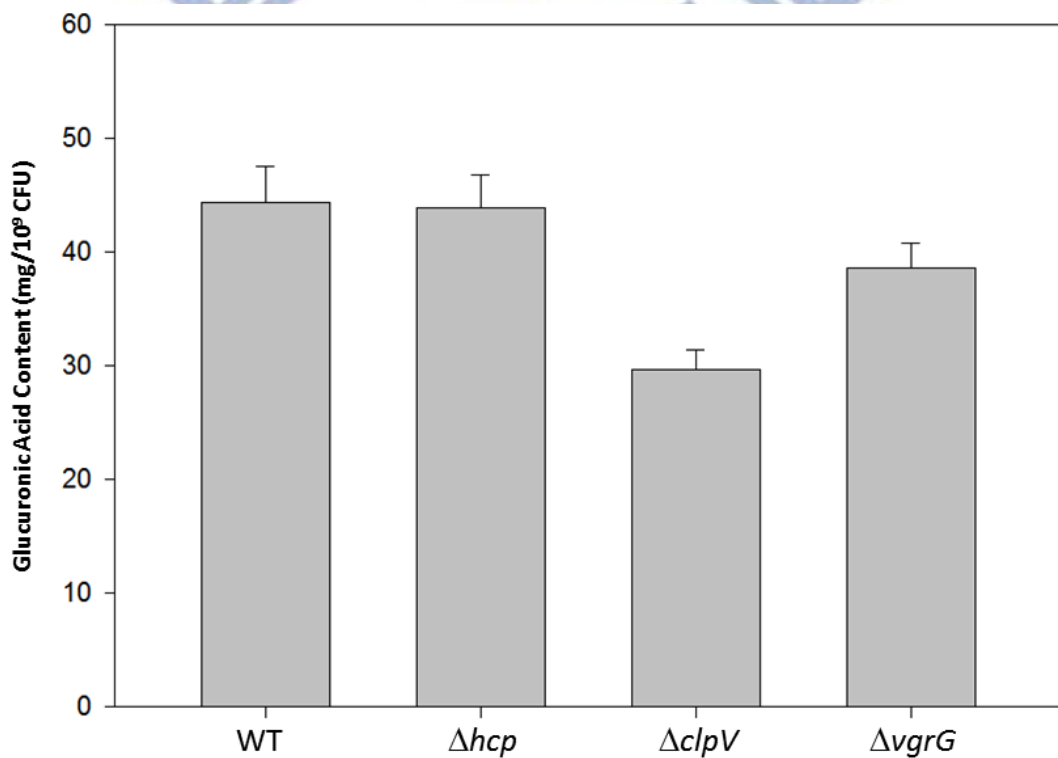
圖六：*hcp*、*clpV* 及 *vgrG* 基因缺損株之生長曲線(A)和菌落型態(B)

(A) 將菌在 LB 培養液中隔夜培養後，分別取 20 μ l 菌液至 4 ml LB 和 M9 培養液中，並置於 37°C 震盪培養，每隔 1 小時測量其波長 600 nm 下吸光值。(B) WT 及各基因缺損後的菌落型態。

(A)



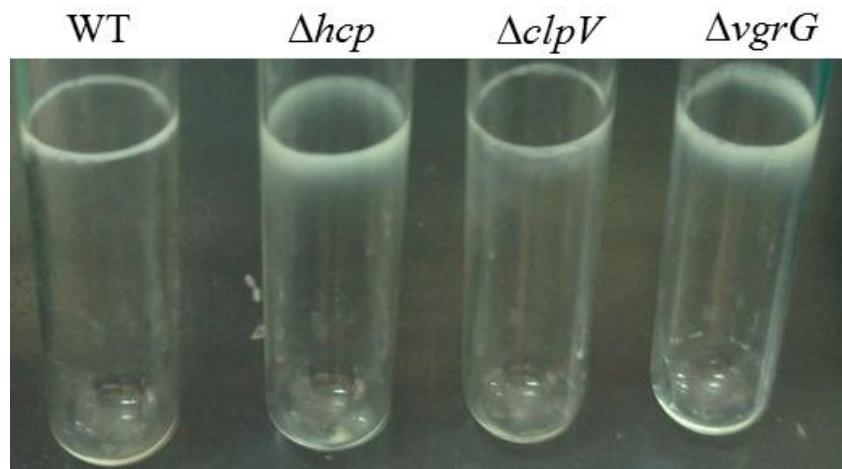
(B)



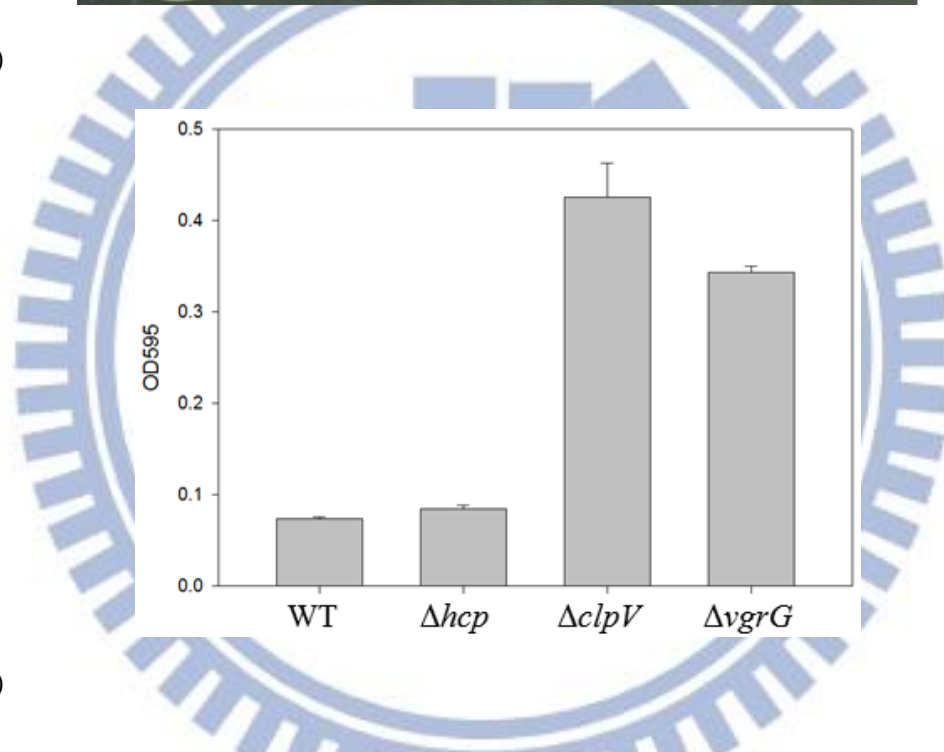
圖七：*hcp*、*clpV* 及 *vgrG* 基因缺損對莢膜表現之影響

(A) WT 及各基因缺損突變株菌液以 4000 轉離心 5 分鐘。(B) 將菌在 LB 培養液中隔夜培養後，取 500 μ l 菌液萃取其莢膜多醣體，並利用 3-羥基二酚為呈色劑，測量其在波長 520 nm 下的吸光值，計算其在 1×10^9 CFU 中含有多少莢膜多醣體。

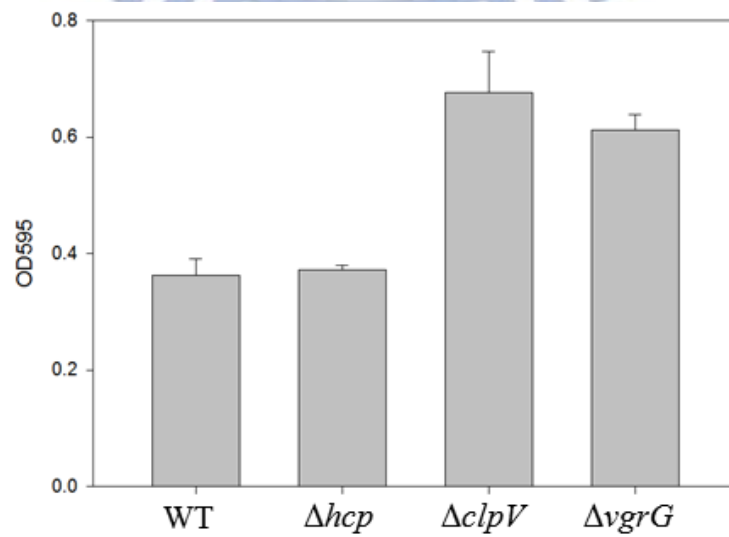
(A)



(B)

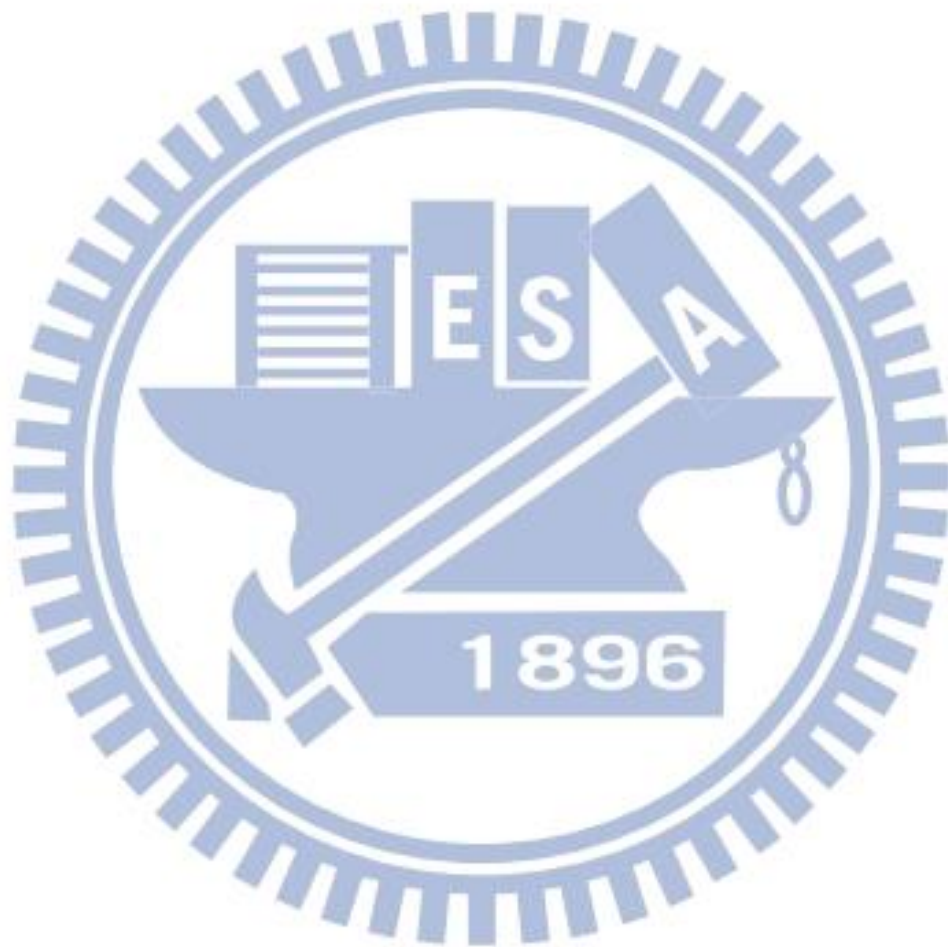


(C)

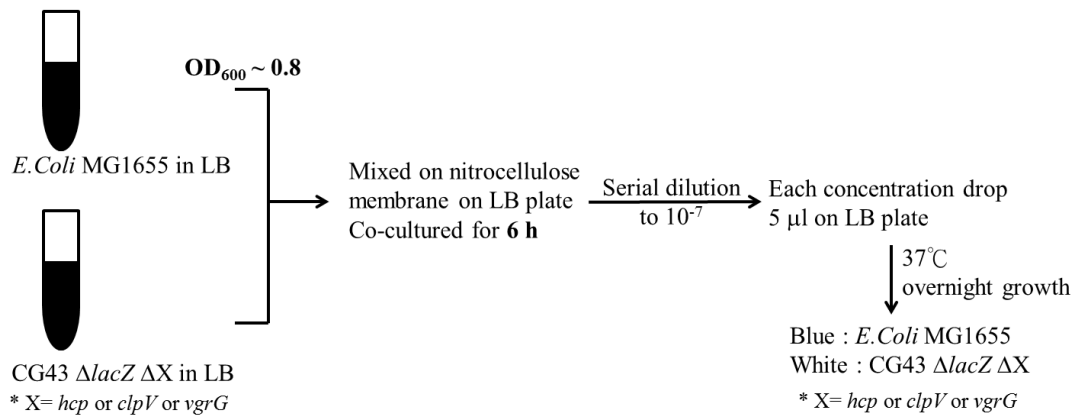


圖八：*hcp*、*clpV* 及 *vgrG* 基因缺損對生物膜形成之影響

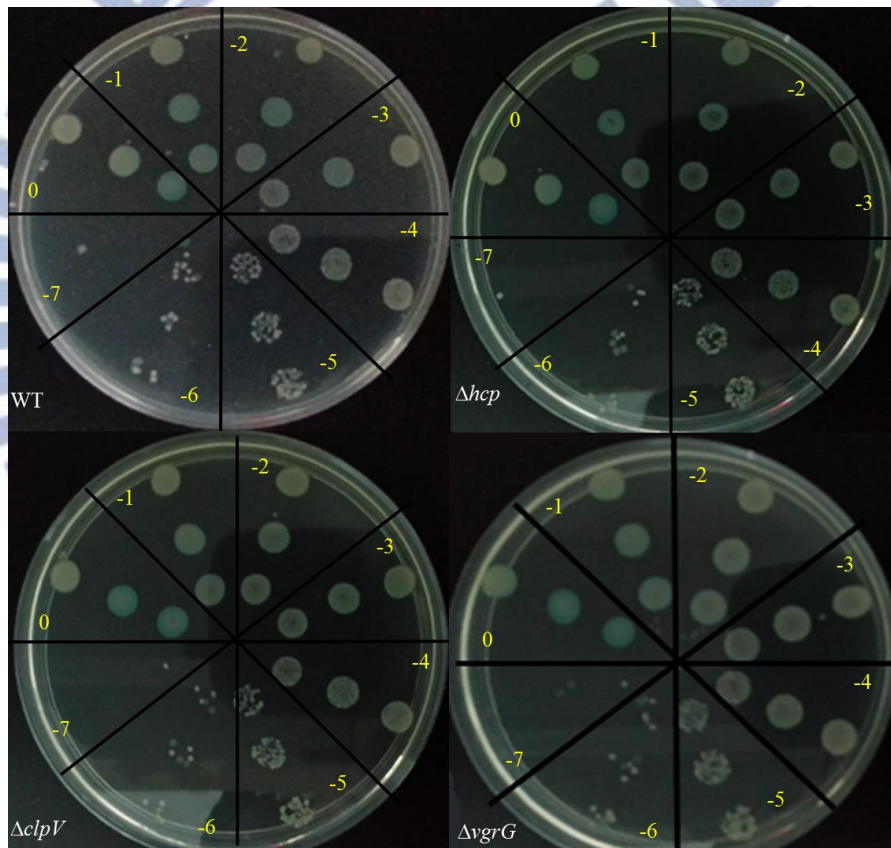
WT 及各基因缺損突變株於靜態培養下，在玻璃管 (A)、在 96 孔盤內培養 12 小時 (B) 以及 24 小時 (C) 生物膜的形成。



(A)



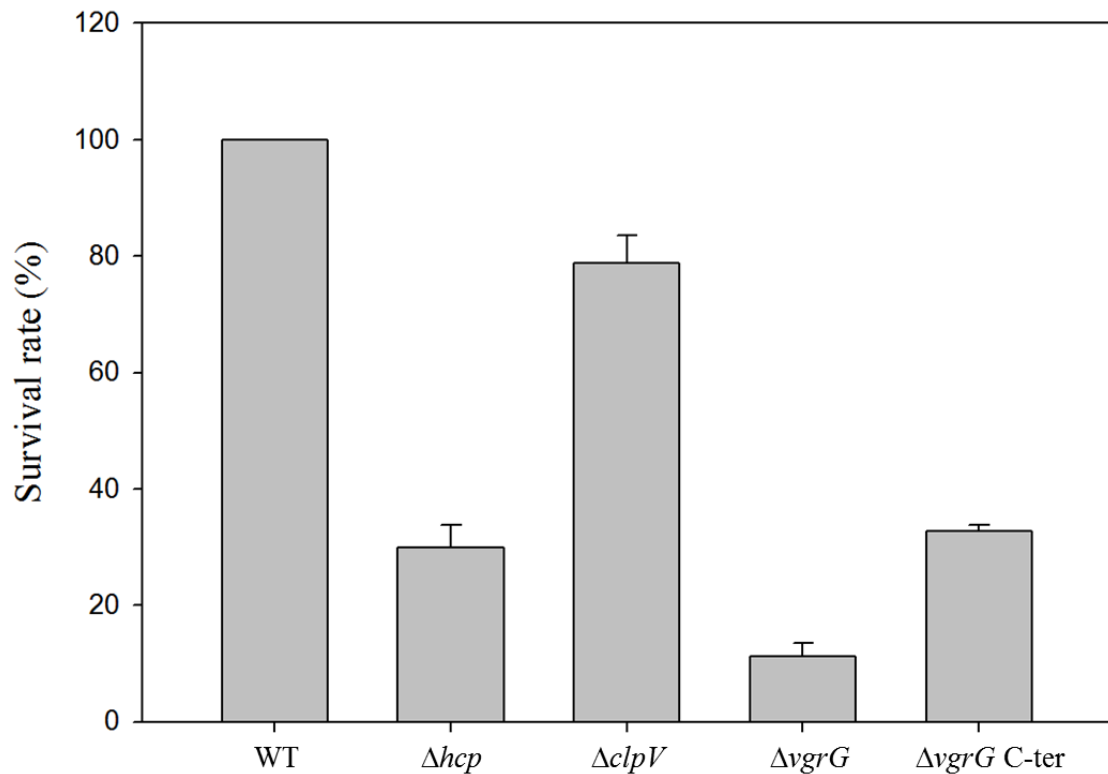
(B)



圖九：菌種競爭能力測試

(A) 菌種競爭能力測試流程示意圖。(B) *hcp*、*clpV* 及 *vgrG* 基因缺損對菌種競爭能力之影響，數字依順時針方向分別為稀釋倍率 10^0 倍至 10^{-7} 倍

(A)

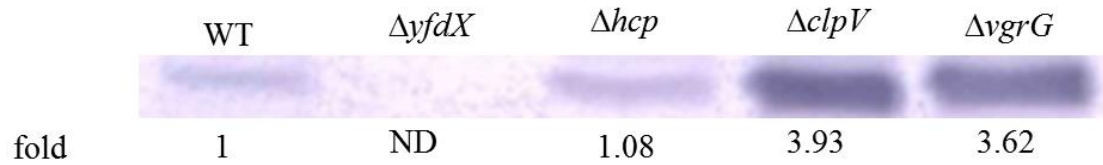


圖十 A: *hcp*、*clpV*、*vgrG* 及 *vgrG* -C 端變異區基因缺損降低 CG43S3

於酸性環境下之存活率

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，而後將菌體移至 pH 4.4 的 LB 培養液中適應 1 小時，再移至 pH 3.0 的 M9 培養液中培養 45 分鐘，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之比值再與野生株相比之比率。

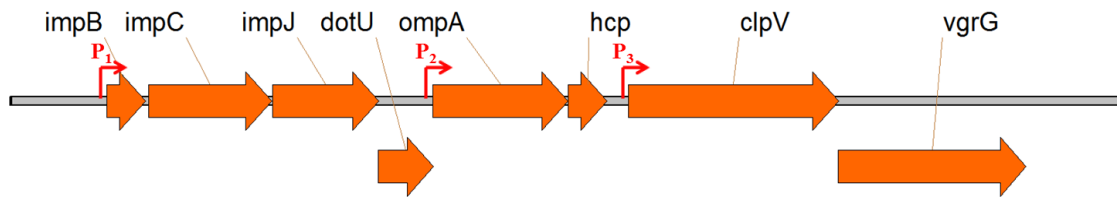
(B)



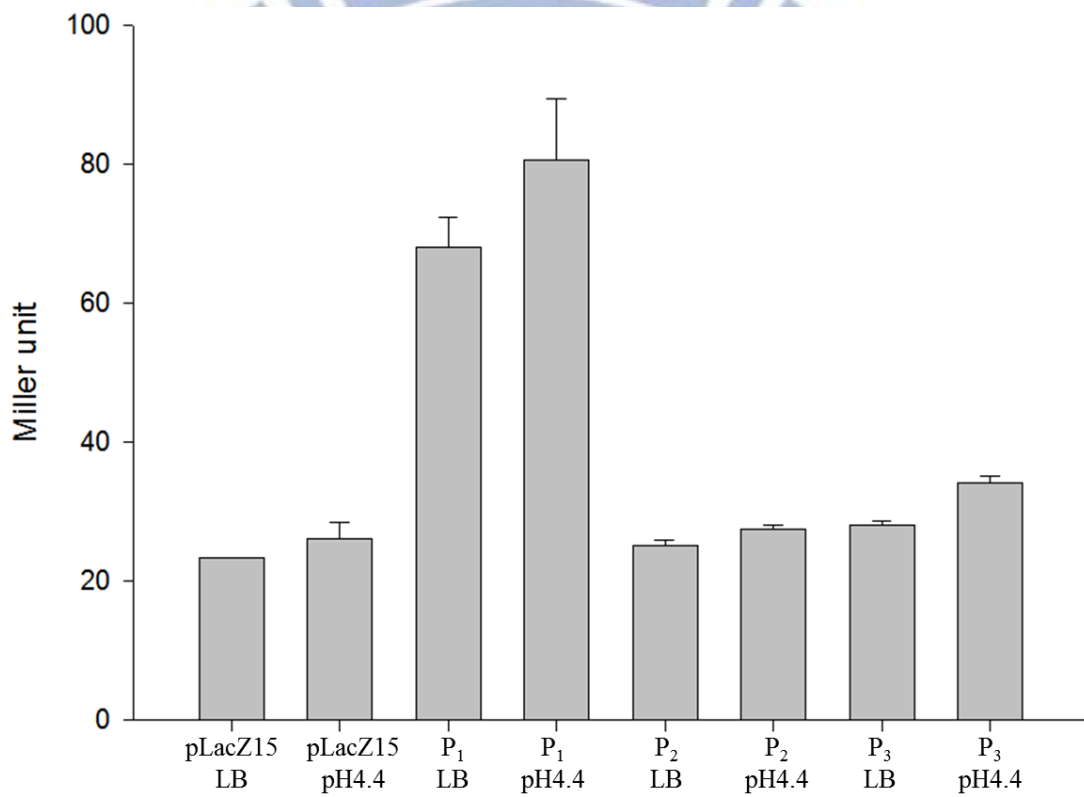
圖十 B：*clpV* 及 *vgrG* 基因缺損提高 YfdX 的表現量

YfdX 為膜間質伴隨蛋白。取 400 μ l 隔夜培養後的菌液，離心後回溶於 100 μ 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）轉漬於聚偏二氟乙烯膜，利用呈色劑呈色。

(A)



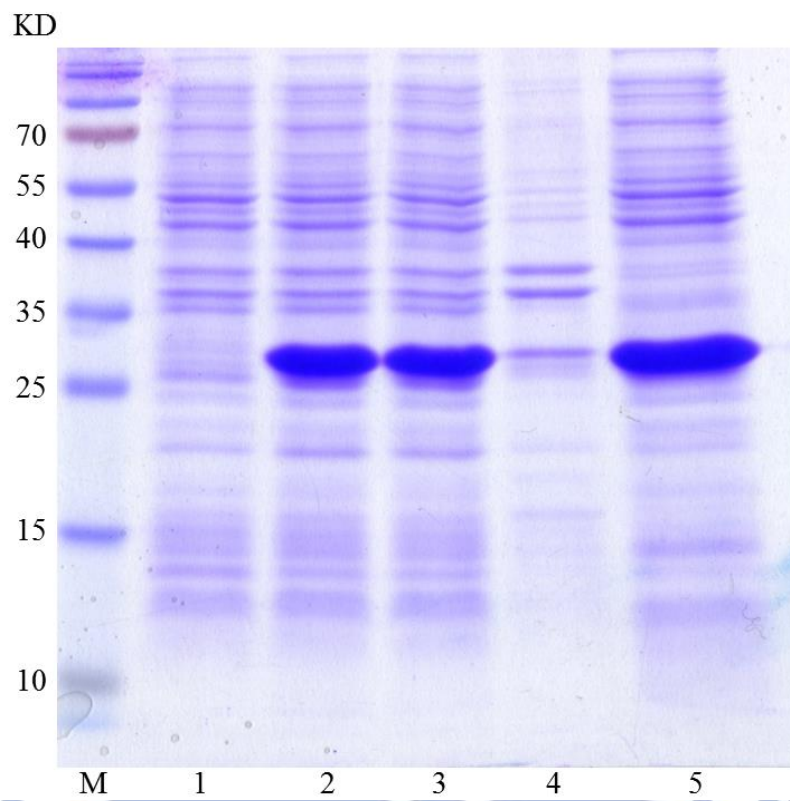
(B)



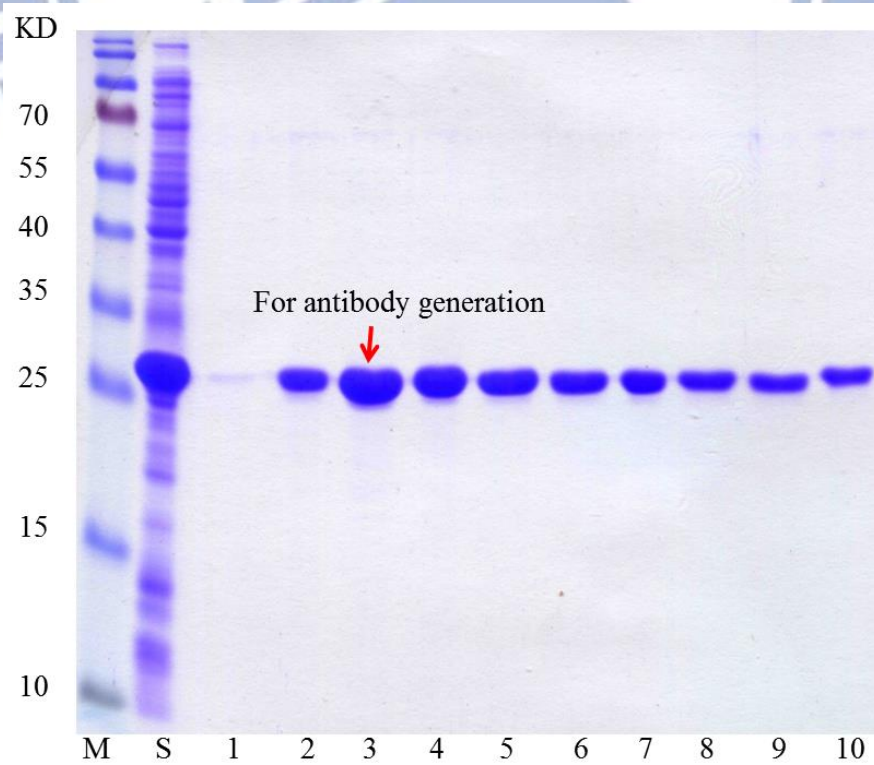
圖十一：T6SS-I、*hcp*、*clpV* 和 *vgrG* 基因之啟動子區域分析

(A) 以線上軟體 SoftBerry (<http://linux1.softberry.com/>) 預測啟動子位置。(B) 各啟動子於酸性環境下之活性消長

(A)



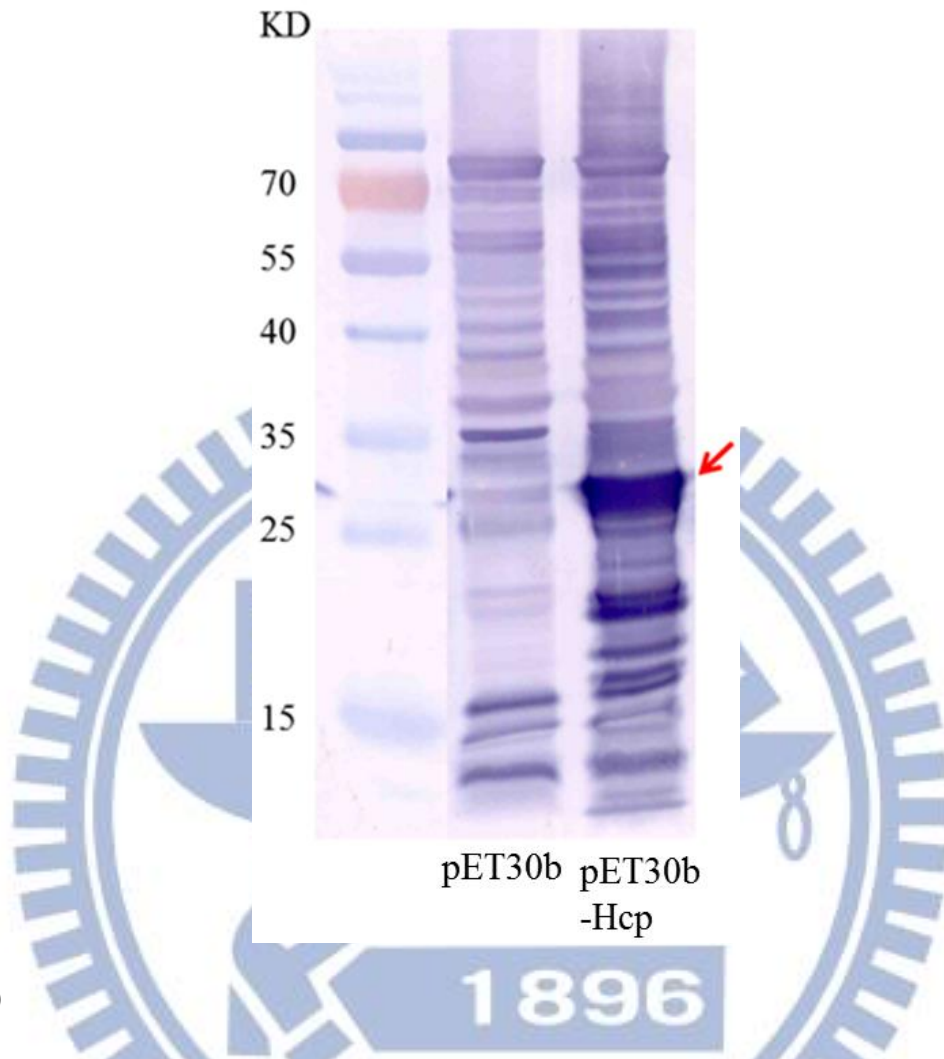
(B)



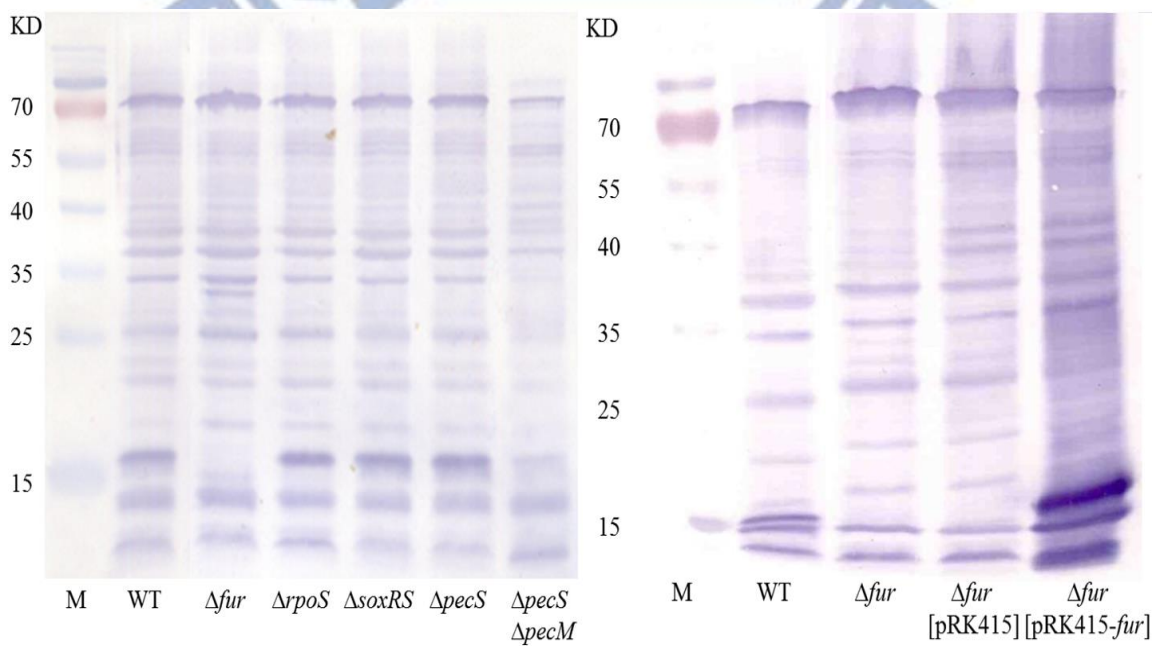
圖十二：Hcp 抗體製備

(A)將以 IPTG 誘導大腸桿菌大量表現克雷白氏肺炎桿菌之 Hcp 重組蛋白質進行 SDS 電泳膠分離，並以孔雀藍 (Coomassie brilliant blue) 染色之結果。M：蛋白質分子大小標記物，1： *E.coli* Novablue(DE3) [pET30b]，2：以 0.5mM IPTG 誘導 Hcp 在 *E.coli* Novablue(DE3) [pET30b-Hcp] 中的表現，3~5 分別為以 1mM IPTG 誘導 Hcp 在 *E.coli* Novablue(DE3) [pET30b-Hcp] 中表現之總蛋白圖譜、沉澱蛋白圖譜和上清液蛋白圖譜。(B)重組之 Hcp 蛋白質，以 1mM IPTG 對 *E.coli* Novablue(DE3) [pET30b-Hcp] 進行誘導並以超音波震盪破菌後，再以 13000 rpm 離心 10 分鐘，對所得之上清液部分進行純化。M：蛋白質分子大小標記物，S：未純化前之上清液，1~10：各分割收集區段。

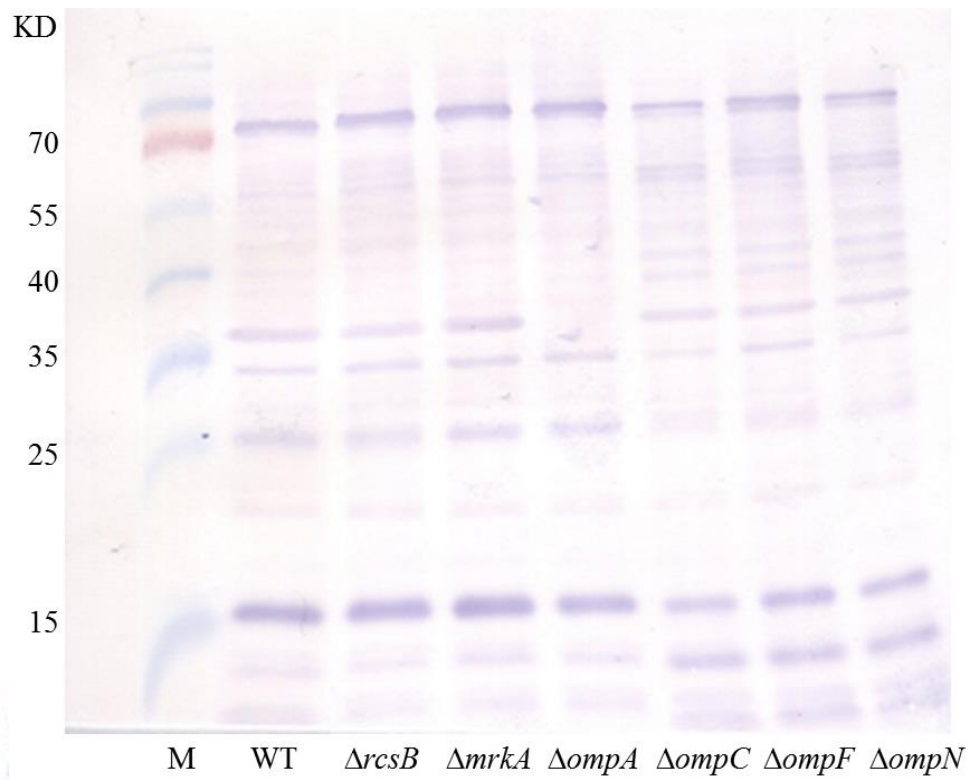
(A)



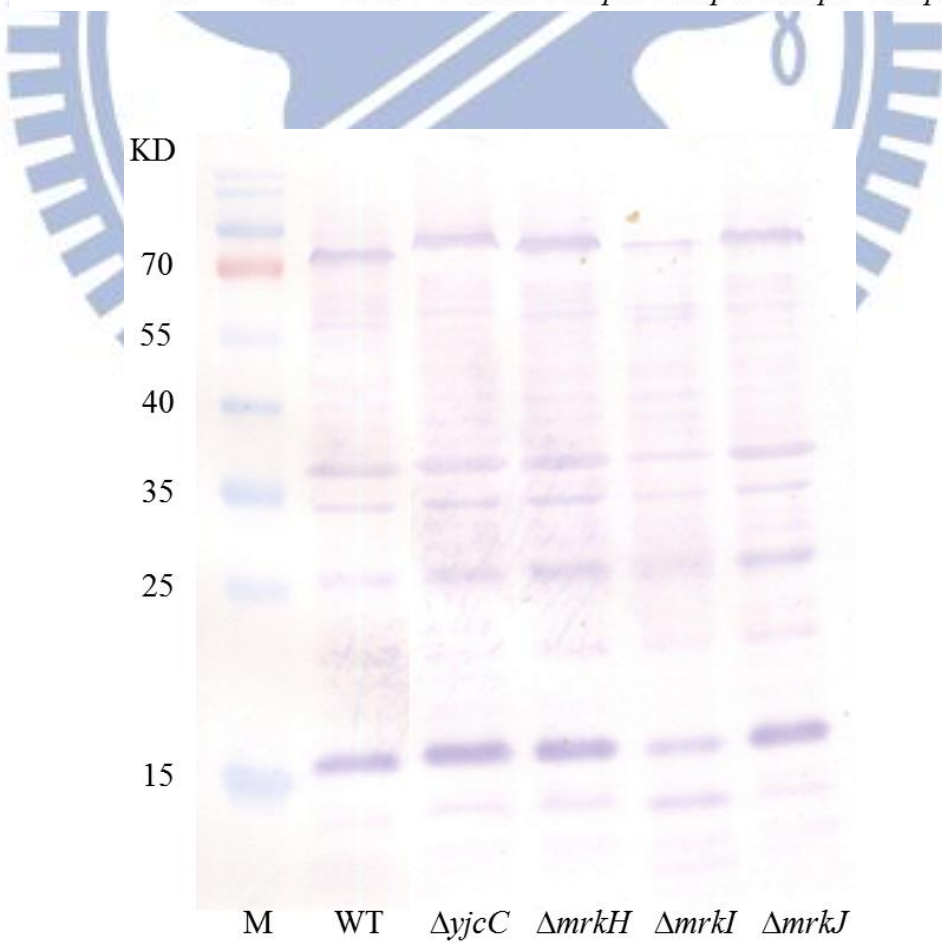
(B)



(C)



(D)

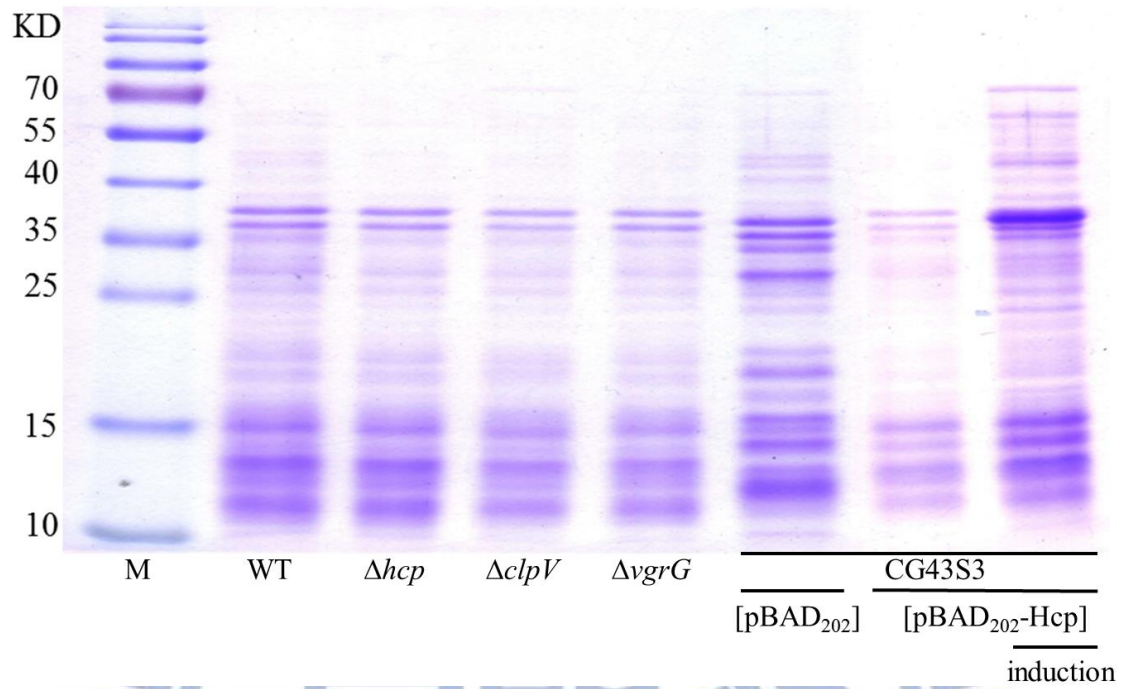


圖十三：Hcp 抗體專一性測試

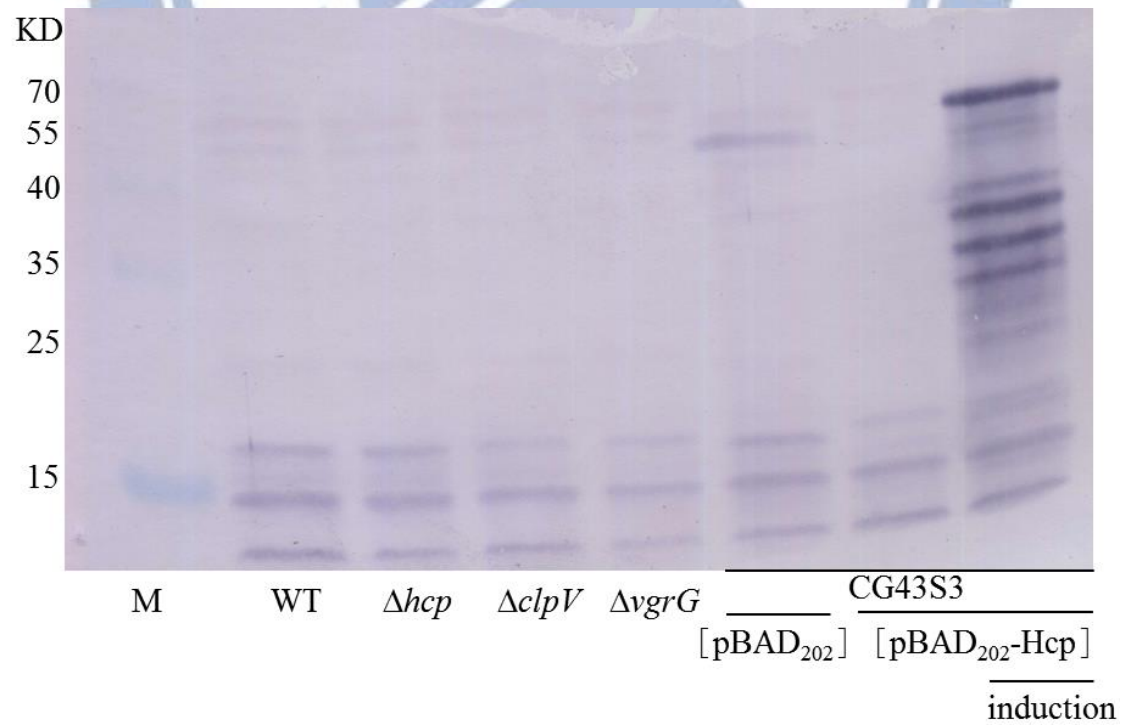
(A)以大量表現 Hcp 菌株測試抗體專一性，抗體稀釋倍率：5000X。
(B 左)與壓力調節相關之轉錄調節因子基因缺損突變株的 Hcp 表現。
(B 右)*fur* 基因缺損突變株和 *fur* 基因回補株之 Hcp 表現。(C)與細菌表面組成分相關之轉錄調節因子基因缺損突變株的 Hcp 表現。(D)與環鳥苷二磷酸水平調節相關之轉錄調節因子基因缺損突變株的 Hcp 表現。M：蛋白質分子大小標記物，WT：野生型菌株。



(A)



(B)



圖十四：Hcp 抗體敏感度測試

(A) T6SS-I 基因缺損突變株及 *hcp* 基因大量表現株所表現之蛋白質，經 SDS 電泳膠分離後，以孔雀藍 (Coomassie brilliant blue) 染色後之結果。(B) T6SS-I 基因缺損突變株及 *hcp* 基因大量表現株之 Hcp 表現，抗體稀釋倍率：30000X。M：蛋白質分子大小標記物，WT：野生型菌株，CG43S3[pBAD₂₀₂-Hcp] 以 0.2% arabinose 誘導表現。

