


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 HdeA、HdeB、HdeD 伴隨蛋白

在抗酸反應中所扮演的角色

**Roles of HdeA, HdeB, and HdeD chaperone proteins in the acid
stress response of *Klebsiella pneumoniae* CG43**



生物科技學系
碩士班

研究生：林珍儀

Student: Chen-Yi Lin

指導教授：彭慧玲 博士

Advisor: Hwei-Lin Peng, Ph.D

中華民國一百零三年七月

July, 2014

克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中 HdeA、HdeB、HdeD 伴隨蛋白
在抗酸反應中所扮演的角色

**Roles of HdeA, HdeB, and HdeD chaperone proteins in the acid
stress response of *Klebsiella pneumoniae* CG43**

研究生：林珍儀

Student: Chen-Yi Lin

指導教授：彭慧玲

Advisor: Hwei-Ling Peng, Ph.D



National Chiao Tung University

Department of Biological Science and Technology

中華民國一百零三年七月

July, 2014

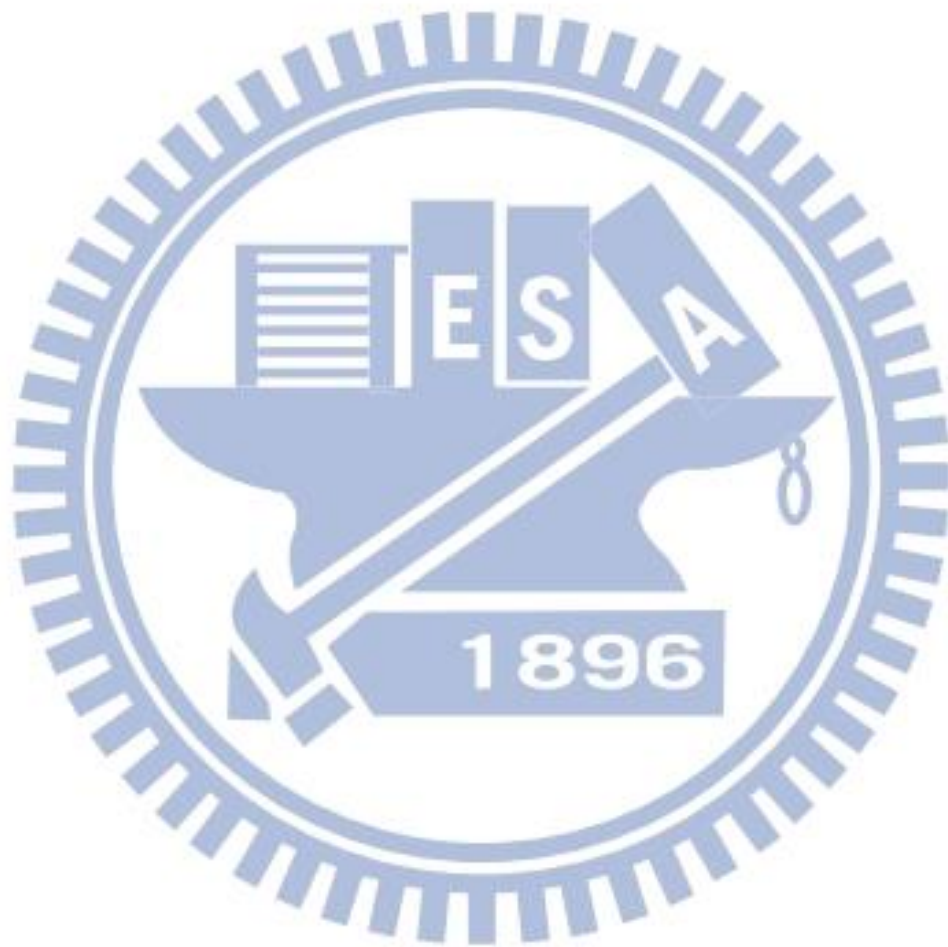
中文摘要

胃酸是對抗經口而入人體病原菌的第一道防線，在這極酸的環境下，腸道菌具有特定抗酸機制來抵禦胃酸的傷害。大腸桿菌 HdeA、HdeB 座落在抗酸島嶼上，當面臨酸壓力時 HdeA、HdeB 在膜間質執行伴隨蛋白功能保護受質蛋白質不受到酸傷害。克雷白氏肺炎桿菌 CG43 具有兩套抗酸島嶼 AFI-I 和 AFI-II，有趣的是，AFI-II 在 NTUH-K2044 和 MGH78578 並不存在。AFI-I 上有 *hdeDB*、*hdeB1*、*yfdX* 和 *kvhAS*；AFI-II 上有 *hdeA*、*hdeD1B2*、*kvgAS* 和 *kvgA1S1*。先前研究指出這些基因缺損株的抗酸能力依序為 $\Delta hdeB1 > \Delta hdeD > \Delta yfdX > \Delta hdeB$ ；重組蛋白 HdeB 與 YfdX 皆具伴隨蛋白活性；AFI-I 上的基因會受到弱酸誘導，*yfdX* 的表現量在靜置培養下會受 RcsB 調控。本研究建構了 *hdeA* 及 *hdeB2D1* 基因缺損株，其抗酸能力依序為 $\Delta hdeB1 > \Delta hdeD > \Delta hdeB > \Delta hdeB2D1$ ，*hdeA* 基因缺損只有在穩定生長期對細菌的抗酸能力有明顯影響；此外，在 *yfdX*、*hdeB*、*hdeDhdeD1* 或 *rscB* 基因缺損株中增加 HdeA 表現皆可回補其抗酸能力，但當 HdeA 與受質結合的 44 苯丙氨酸點突變後即無法增加細菌抗酸能力，顯示 HdeA 具很強的伴隨蛋白活性，且第 44 個胺基酸對於其伴隨蛋白活性是很重要的。最後， P_{hdeA} 或 $P_{hdeB2D1}$ 活性不會受到弱酸誘導，在震盪培養或靜置培養下 *rscB* 和 *rpoS* 的基因缺失皆不影響 P_{hdeA} 和 $P_{hdeB2D1}$ 的活性。

Abstract

Acid resistance or acid tolerance is an important adaptation for enterobacteria in order to evade the stomach acid before the intestinal tract colonization. *Escherichia coli* HdeA and HdeB, encoded on the acid fitness island (AFI) that is activated by acidic stress, function as chaperone in the periplasmic space to protect the proteins from damage. Analysis of the genome sequence of *K. pneumoniae* CG43 revealed two AFI homologs namely AFI-I and AFI-II. Interestingly, AFI-II is not found in the genome of NTUH-K2044 or MGH78578. The AFI-I contains *hdeDB*, *hdeB1*, *yfdX* and *kvhAS*, while AFI-II contains *hdeA*, *hdeD1B2*, *kvgAS* and *kvgA1S1*. The previous study of the specific gene deletion mutants revealed that the acid survival activity could be ranked as $\Delta hdeB1 > \Delta hdeD > \Delta yfdX > \Delta hdeB$. Both the recombinant HdeB and YfdX exhibit chaperone activity, and the expression of the AFI-I gene is acid-inducible and positively regulated by RcsB under statically cultured condition. Here, the specific gene deletion mutants including $\Delta hdeA$ and $\Delta hdeB2$ have been generated. The order of acid stress survivals is $\Delta hdeB1 > \Delta hdeD > \Delta hdeB > \Delta hdeB2$, while $\Delta hdeA$ had no apparent change of the sensitivity when compared to the parental strain CG43S3. Nevertheless, the *hdeA* deletion exerts a profound reduction of the acid stress (pH2.5) survivals when the bacteria were grown to stationary phase. Increasing expression of *hdeA* could rescue the deletion defect of *yfdX*, *hdeB*, *hdeDD1*, or *rscB* suggesting HdeA exhibits a strong chaperone activity. Moreover, phenylalanine 44 of HdeA was critical for the chaperone activity. Finally, the expression of *hdeA* and *hdeB2D1* was not

acid inducible and not affected by the deletion of *rcsB* or *rpoS* under shaking or static cultures.



誌謝

一晃眼，兩年碩士生涯即將結束。從大學應化系來到生科所，從專題做的癌細胞跨到微生物，許多生物背景知識不足，覺得這是個很大的挑戰，加上又要修教育學程，比同學多三十幾學分，早已抱著要讀三年才能畢業的心理準備，不論有多難，開始努力衝刺，深怕不小心就要讀四年。雖然要修很多課，仍然想辦法在實驗上努力跟上同學的腳步，先是設立與同學一起貼 poster 這個小目標，再設立與同學一起畢業這個大目標，最後能跟同學一起畢業，這是無法用言語形容的喜悅與成就感。這一切都要非常感謝彭慧玲老師辛苦的指導和鞭策，在我實驗一頭霧水的時候，給予許多實驗上的建議讓我可以突破盲點；在我選擇未來的路時給我支持和鼓勵；在寫論文這段水深火熱的時候，老師還花時間和心力幫我修訂論文，彭老師辛苦了！

感謝清大張晃猷老師在預口試時給我許多報告上的建議。感謝口試委員鄧文玲老師在 Joint meeting 和口試時給我許多指導和明確建議，讓我可以順利口試畢業。感謝梁美智老師平常製作精美可口的蛋糕給我們加油打氣，且在口試時指導讓我對研究有更深廣的了解。

這兩年很感恩能進入彭家大家庭。謝謝當初一進來就負責帶我的力成學長，我的生物背景不夠紮實，學長總是很耐心負責的教導我實驗邏輯和技術。謝謝靜柔學姊當我的 cloning 老師，很感恩學姐手把手帶著我做分生實驗，在我很慌亂做實驗時，一次一次仔細地幫我看實驗結果，給我鼓勵，讓我安心放心地順利完成實驗。謝謝燕曦大正妹的正面能量，你總是很樂觀穩定地把實驗做得美美的，許多實驗小撇步都從你那邊學到的，懷念一起去吃可愛老闆的開心日子。謝謝冠軍在溯溪跳溪時你的搭救，抱歉把你壓在水裡 XD，去花蓮玩有你和偉豐真的玩得很盡興，每次看到你跟曾世穎的互動方式就很有趣，希望你的補習班越開越大間，賺大錢變成彭董。謝謝子祥幫我們安裝 Vector NTI。謝謝哲充學長總是義無反顧的為我們解惑和給予我們實驗上的幫助，學長豐厚的實驗 data 和經驗是學

弟妹的大靠山，有什麼疑難雜症你絕對可以找到方向。謝謝同姓同一天生日運動兼園藝兼素食好朋友偉豐林，活字典小博士 PTT 王子又是老師殺手，興趣是逛大潤發?!偉豐林堪稱奇人一位，你的一生經歷可以寫一本傳記了，很開心這兩年有你的陪伴，不管去哪裡只要找你一起去你都會說好，太給力了！謝謝嬌小可愛溫柔體貼的前室友兼實驗鄰居 Liching Kok，同是狗狗愛好者，很懷念一起走回宿舍看到小可愛、大小耳的日子，每次實驗遇到瓶頸你總是很正面的鼓勵我，並且一起研究問題出在哪裡；有人向你求救，你總是不管自己有多忙，都會放下手邊工作幫助別人，犧牲小我完成大我的精神令人為之動容。謝謝認識達六年的蕙瑜同學，碩士這兩年我們一起成長，雖然遇到許多挫折考驗，你的拼命三郎個性實在令我佩服，也很熱心服務幫我收實驗，其實有時候像你這樣少根筋也沒什麼不好 XD 情緒來得快去得也快，揮一揮衣袖不帶走一片雲彩。謝謝新任實驗室大支柱家睿，常看到你默默替實驗室做許多事，比如倒垃圾、掃地、環安，雖然事情很多，但你總是不疾不徐的步調完成，希望你實驗順順利利。謝謝子芸、瑋芝、若迪、啟翔、銘軒、容毓的加入，實驗室有你們又是一片新氣象，充滿各種歡笑聲。謝謝吳家的子傑同學，每次看到你都神采飛揚，一起走路一起吃菩提心的日子很開心，一起加油打氣很開心有你這個朋友。

謝謝伙食團的學長姐學弟妹們這兩年的照顧，讓我在新竹有個家一樣的地方可以窩著。謝謝小明的陪伴和傾聽，雖然分隔兩地光復與博愛，但是有空就可以一起吃飯還是很感恩。最後，謝謝最愛我的父母親，沒有你們無條件的付出愛與支持，我無法走到今天，謝謝你們在家裡好好的生活，讓我無後顧之憂的追求我的夢想。每次回家總是有滿漢全席像辦桌一樣的媽媽味好料，瞬間一掃壓力和挫折，回家充電之後重新出發，又是一條好漢，將來我會努力賺錢，多回家陪你們的。感謝土地公，感謝天恩師德！

珍儀 謹致於

交通大學生物科技學系 中華民國一〇三年七月

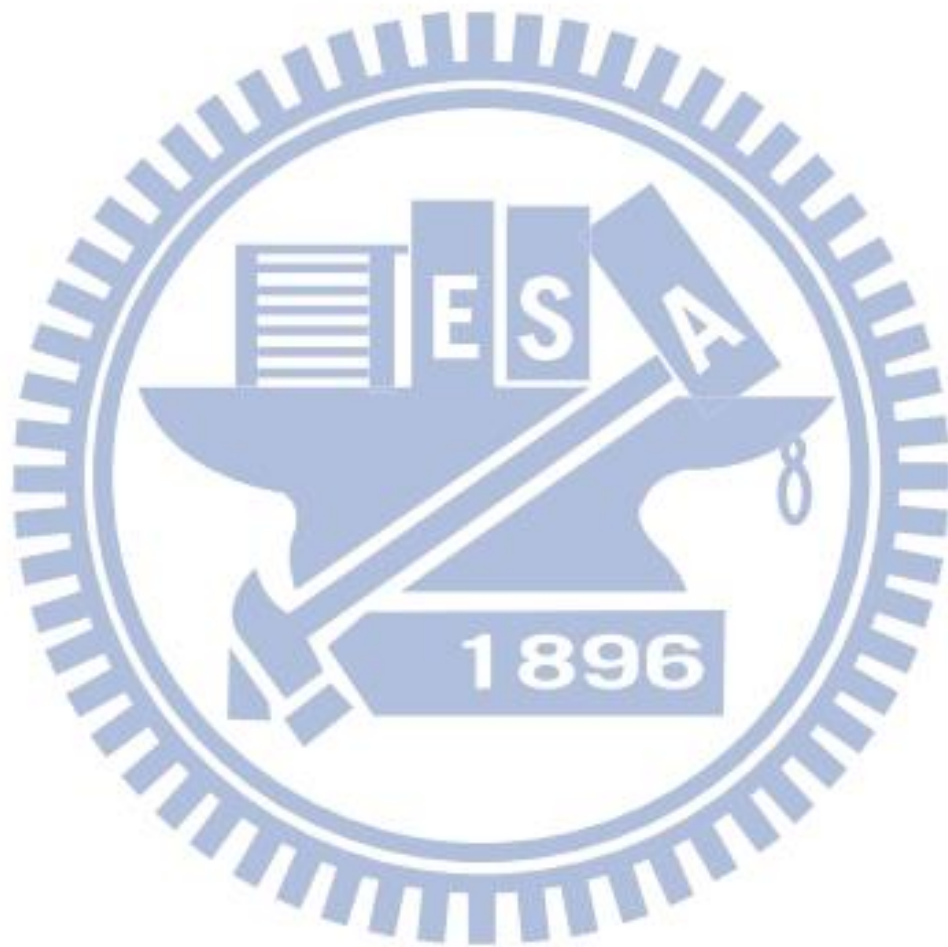
目錄

中文摘要.....	i
Abstract	ii
誌謝.....	iv
目錄.....	vi
表目錄.....	viii
圖目錄.....	ix
縮寫表.....	xi
一、前言.....	1
1.1 克雷白氏肺炎桿菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i>).....	1
1.2 腸胃道病原菌的抗酸機制.....	1
1.3 調控抗酸機制表現的雙分子訊息傳遞系統.....	4
1.4 革蘭氏陰性菌膜間質 (periplasmic space) 的抗酸機制.....	6
1.5 大腸桿菌抗酸島嶼.....	8
1.6 克雷白氏肺炎桿菌抗酸島嶼 AFI-I.....	9
1.7 研究目標.....	9
二、材料與方法.....	11
2.1 菌株、質體及生長環境.....	11
2.2 基因重組技術.....	11
2.3 生物資訊分析.....	11
2.4 細菌抗酸能力分析.....	12
2.5 基因缺損突變株的建構.....	12
2.6 基因回補質體體建構.....	13
2.7 HdeA 點突變建構.....	13
2.8 啟動子報告質體建構.....	13
2.9 β -半乳糖苷酶活性評估.....	13

三、實驗結果.....	15
3.1 克雷白氏肺炎桿菌 CG43 與 NTUH K2044 的抗酸能力.....	15
3.2 HdeA 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測.....	15
3.3 HdeB 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測.....	15
3.4 HdeD 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測.....	16
3.5 KvgA 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測.....	16
3.6 克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中建構 <i>hdeA</i> 、 <i>hdeB2</i> 、 <i>hdeB2D1</i> 、 <i>kvgA1</i> 基因缺損突變株.....	16
3.7 <i>hdeA</i> 、 <i>hdeB2</i> 、 <i>hdeB2D1</i> 和 <i>kvgA1</i> 基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌 CG43 生長的影響.....	17
3.8 對數生長期抗酸相關基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌 CG43 抗酸能力的影響.....	17
3.9 穩定生長期相關基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌 CG43 抗酸能力的影響.....	18
3.10 CG43S3 表現 <i>hdeA</i> 、 <i>hdeB</i> 和 <i>yfdX</i> 的抗酸能力分析.....	18
3.11 Trans-complementation 分析 HdeA 的伴隨蛋白活性.....	19
3.12 HdeA F44A 點突變建構.....	20
3.13 苯丙胺酸 44 點突變對於 HdeA 伴隨蛋白活性的影響.....	20
3.14 CG43S3 表現 <i>hdeB</i> 、 <i>hdeD</i> 和 <i>hdeBD</i> 的抗酸能力分析.....	21
3.15 <i>hdeA</i> 、 <i>hdeB2D1</i> 、 <i>hdeBD</i> 、 <i>hdeB1</i> 、 <i>yfdX</i> 啟動子分析.....	21
3.16 細菌生長不同時期 <i>hdeA</i> 、 <i>hdeB2D1</i> 啟動子活性分析.....	22
3.17 弱酸培養條件下 <i>hdeA</i> 、 <i>hdeB2D1</i> 、 <i>yfdX</i> 啟動子活性比較.....	22
3.18 <i>rcsB</i> 和 <i>rpoS</i> 基因缺損對 <i>hdeA</i> 、 <i>hdeB2D1</i> 啟動子活性的影響.....	22
四、結論.....	24
五、參考文獻.....	27

表目錄

表 一、 Bacteria strains used in this study	35
表 二、 Plasmid used in this study	36
表 三、 Primers used in this study	38



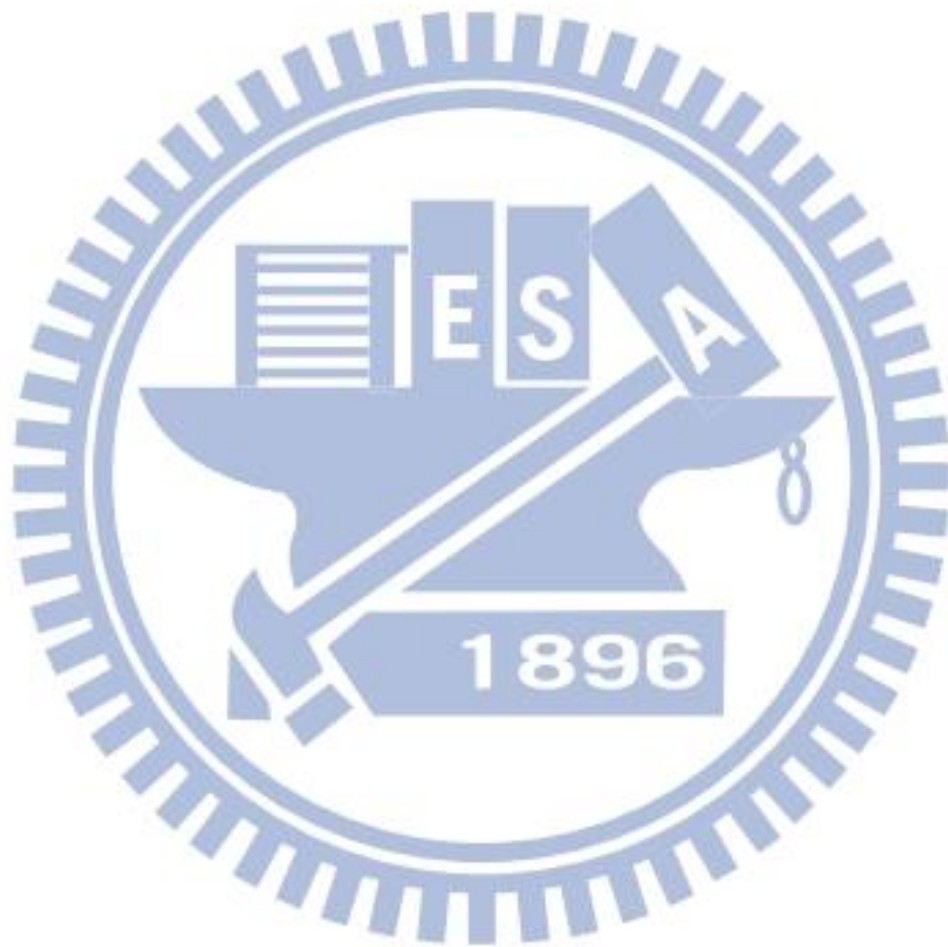
圖目錄

圖一、(A)大腸桿菌 AFI(B)克雷白氏肺炎桿菌 CG43 AFI-I 與 AFI-II 的基因組	40
圖二、克雷白氏肺炎桿菌 CG43 與 NTUH K2044 抗酸能力分析	41
圖三、HdeA 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測	42
圖四、HdeB 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測	43
圖五、HdeD 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測	44
圖六、KvgA 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測	45
圖七、克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中建構 <i>hdeA</i> 、 <i>hdeB2</i> 、 <i>hdeB2D1</i> 、 <i>kvgA1</i> 基因缺損突變株	46
圖八、 <i>hdeA</i> 、 <i>hdeB2</i> 、 <i>hdeB2D1</i> 和 <i>kvgA1</i> 基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌 CG43 生長曲線的影響	48
圖九、對數生長期抗酸相關基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌 CG43 抗酸能力的影響	49
圖十、穩定生長期抗酸相關基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌 CG43 抗酸能力的影響	50
圖十一、基因回補質體(pRK415)建構	51
圖十二、CG43S3 表現 <i>hdeA</i> 、 <i>hdeB</i> 和 <i>yfdX</i> 的抗酸能力分析 以接合作用將回補	52
圖十三、Trans-complementation 分析 HdeA 的伴隨蛋白活性	54
圖十四、HdeA 苯丙胺酸 44(phenylalanine44)點突變建構	55
圖十五、苯丙胺酸 44 點突變對於 HdeA 伴隨蛋白活性的影響	56
圖十六、CG43S3 表現 <i>hdeB</i> 、 <i>hdeD</i> 和 <i>hdeBD</i> 的抗酸能力分析	57
圖十七、 <i>hdeA</i> 、 <i>hdeB2D1</i> 、 <i>hdeBD</i> 、 <i>hdeB1</i> 、 <i>yfdX</i> 啟動子分析	58
圖十八、細菌生長不同時期 <i>hdeA</i> 、 <i>hdeB2D1</i> 啟動子活性分析	59
圖十九、弱酸培養條件下 <i>hdeA</i> 、 <i>hdeB2D1</i> 、 <i>yfdX</i> 啟動子活性比較	60

圖二十、*rcsB* 和 *rpoS* 基因缺損對 *hdeA*、*hdeB2D1* 啟動子活性的影響61

圖二十一、AFI-I 和 AFI-II 上 HdeA、HdeB 和 HdeD 的相關調控與功能.....62

附圖一、(A)大腸桿菌 AFI (B)克雷白氏肺炎桿菌 CG43 AFI-I (C)克雷白氏肺炎桿菌 CG43 AFI-II.....763



縮寫表

AFI	acid fitness island
IPTG	isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
ONPG	phosphate-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside
SDS	sodium dodecyl sulfate
Rcs	regulator of capsular synthesis
TCS	two component system
PCR	polymerase chain reaction
AR	acid resistance
ATR	acid tolerance response
CRP	cAMP receptor protein
GABA	gamma-amino butyric acid
HK	histidine kinase
RR	response regulator
HNS	histone-like nucleoid structuring
Hde	hns-dependent expression
GABA	gamma-amino butyric acid

一、前言

1.1 克雷白氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)

克雷白氏肺炎桿菌是革蘭氏陰性、兼性厭氧菌，外被厚重夾膜、呈桿狀外型的伺機性腸內病原菌。存在正常人體的口和腸道中，其感染好發於免疫力低下的中、高年齡層病患、慢性病患、酒精成癮者、或是接受治療病患，造成的症狀包括上呼吸道感染、肺炎、敗血症、尿路感染及腦膜炎；也是造成院內感染的常見的菌種之一(Su, Wu et al. 2001)。在台灣，克雷白氏肺炎桿菌感染與糖尿病患的肝膿瘍及其它嚴重併發症有高度的相關性(Tsai, Huang et al. 2008)。近年來，新種的抗藥性菌株在院內感染病例中明顯增加，使得藥物使用受到限制(Yong, Toleman et al. 2009)。流行病學研究指出，無論最終感染部位為何，造成最初感染的克雷白氏肺炎桿菌經常源自病患腸胃道的常駐細菌(endogenous colonization)(De Champs, Sauvart et al. 1989; Maroncle, Rich et al. 2006)。胃酸(pH 1-3)是對抗經口而入人體病原菌的第一道防線，在這極酸的環境下，許多病原菌如大腸桿菌(*Escherichia coli*)、沙門氏菌(*Salmonella enterica*)或胃幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)要感染胃腸道須具備特定抗酸機制來抵禦胃酸的傷害(Smith 2003)。而從胃到小腸，除了酸鹼度的變化外，腸內菌發酵產生的有機酸也是病原菌面臨的酸壓力(Rode, Moretro et al. 2010)，另外，腸內菌還需面臨滲透壓與氧氣濃度的改變，因此，腸內病原菌如何感應環境中可能的致命威脅並經特定基因的調控表現來規避傷害，是感染宿主致病的關鍵。

1.2 腸胃道病原菌的抗酸機制

幽門螺旋桿菌已知是造成胃潰瘍和胃癌的主要危險因子，腸出血性大腸桿菌可引起溶血性尿毒症，甚至導致休克死亡(Bavaro 2009)，這些病原菌如何克服宿主體內酸性環境而存活並進一步造成感染是最大關鍵。細胞膜對於離子的通透性小，可以防止細胞外的物質自由進出細胞，但是高濃度的氫離子可以滲透細胞

膜使細胞內的酸鹼值降低(Richard and Foster 2004)，酸性環境不利的影響包括蛋白質變性(denature)、未摺疊(unfolding)和聚集(aggregation)，進而破壞正常的生理功能或細胞結構，最終導致細胞死亡(Small, Blankenhorn et al. 1994; Smith 2003)。因此，細菌的抗酸程度與感染宿主的劑量呈負相關，大腸桿菌和痢疾桿菌(*Shigella flexneri*)最耐酸，只需低劑量即造成感染(Lin, Lee et al. 1995; Foster 2004)，而霍亂弧菌(*Vibrio cholerae*)較不抗酸，需要較高的劑量才能感染(Schmid-Hempel and Frank 2007)。

胃幽門桿菌可在胃黏膜生存並形成群體(Amieva and El-Omar 2008)，在弱酸條件下會產生大量尿素分解酵素(urease)來消耗氫離子，進而將氨(ammonia)轉換成銨根(amine)來中和細胞質與膜間質的(periplasm)的酸鹼度(Pflock, Kennard et al. 2006)。然而，此抗酸機制也只能使幽門桿菌在低酸鹼值的環境存活數分鐘。為了能長期存活胃中，幽門桿菌藉感知 pH 值梯度而游向胃黏膜上皮細胞的趨中性區以遠離胃酸極酸環境(Boot, Cash et al. 2002)。

阪崎氏腸桿菌(*Cronobacter sakazakii*)為革蘭氏陰性菌，是一種新興食源性病原菌，可存活於嬰兒配方奶粉中。其 CpxR 和 OmpR 突變株會對酸敏感，由 OmpR 回補實驗證明其於抗酸反應扮演重要角色(Alvarez-Ordenez, Cummins et al. 2014)。同屬食源性病原的沙門氏菌具有多個酸誘導系統，在低酸鹼值環境下幫助其生存(Lin, Lee et al. 1995; Kieboom and Abee 2006)，廣為研究的參與酸耐受性反應(Acid tolerance response)的蛋白包含 AtrB、AtrC (PolA)、AtrD 和 AtbR，當細菌暴露適度酸當中會合成多種酸休克蛋白(acid shock protein)，雖然大部分的蛋白功能尚且未知，但是他們會共同減輕低酸鹼值時過多氫離子造成的壓力(Foster 1993)。酸耐受反應蛋白會受到一些廣泛調控蛋白所調控，在穩定生長期(stationary phase)，RpoS 是酸耐受反應蛋白的主要調控蛋白(Lee, Lin et al. 1995; Bearson, Wilson et al. 1998)；外膜蛋白 OmpR 對於酸耐受性反應蛋白也是一個酸誘導調控者，在酸性環境下的 OmpR 轉錄會受到 H-NS(histone-like-protein)抑制

且會受到 OmpR-P 自我誘導(Bang, Audia et al. 2002)。在對數生長期(log phase)，沙門氏菌的毒性蛋白 PhoP、PhoQ 和 Fur 會調控酸耐受反應蛋白。Fur 在細胞面臨有機酸時調控酸休克蛋白保護細胞，然而 PhoP 和 PhoQ 則是保護細胞免於無機酸的傷害(Hall and Foster 1996; Bearson, Wilson et al. 1998)。

大腸桿菌有五種抗酸途徑分別為 AR(acid resistance)1~AR5。AR1 的活性受 RpoS 與 CRP(cAMP receptor protein)調控，並受葡萄糖抑制(Kashiwagi, Miyamoto et al. 1992)。AR2~AR5 都是以胺基酸去梭酸基酵素(amino acid decarboxylase)消耗特定胺基酸與氫離子，產生終產物胺類與二氧化碳而提高 pH 值。一般而言，厭氧的酸性環境能夠誘導胺基酸去梭酸酵素的作用。AR2 及 AR3 作用於 pH2.5 的強酸環境；AR4 及 AR5 的抗酸系統則與細菌在 pH4.5 環境下的生存相關。AR2 為谷胺酸(glutamate)去梭酸酵素系統，其為大腸桿菌對抗極酸環境(pH2.5)的主要系統。AR2 包含 GadA、GadB 與位於內膜的反向轉運蛋白(antiporter)GadC，另外 GadE 為 AR2 主要的轉錄啟動因子。作用機制是 GadA 及 GadB 藉由消耗細胞內的氫離子提升細胞質之酸鹼值，同時把麩胺酸轉換成胺基丁酸(γ -amino butyric acid, GABA)與二氧化碳，GadC 再將胺基丁酸送至細胞外，並交換麩胺酸進入細胞使反應持續(Bergholz, Tarr et al. 2007)。AR3 為精胺酸(arginine)去梭基酵素系統，由精胺酸去梭基酵素 AdiA 與反向運輸蛋白 AdiC，其作用機制類似 AR2。AR3 消耗精胺酸與氫離子以增加細胞內酸鹼值，AdiA 轉換精胺酸為胍丁胺(agmatine)與二氧化碳，AdiC 則將胍丁胺運送至細胞外，並交換精胺酸進入細胞使反應持續。在 pH2.5 極酸環境時，AR2 與 AR3 能夠提升細胞至約 pH4.5，而失去 AR2 與 AR3 的菌株細胞降為 pH3.5(Zhao and Houry 2010)。AR4 為離胺酸(lysine)去梭酸基酵素系統，其包含離胺酸去梭酸基酵素 LdcI(CadA)與反向轉運蛋白 CadB，CadA 轉換離胺酸為屍胺(cadaverine)與二氧化碳，以降低細胞內氫離子濃度，CadB 將屍胺運送至細胞外並交換離胺酸進入細胞內(Moreau 2007)。

霍亂弧菌和創傷弧菌也同樣具有酸耐受性反應(Acid tolerance response, ATR)來對抗酸壓力。其 ATR 包括 CadA 和 CadB，與大腸桿菌的 Cad 系統有類似功能(Merrell and Camilli 1999; Zhao and Houry 2010)。福氏志賀菌有 AR1 和 Gad 系統，但其 Gad 系統與大腸桿菌的 Gad 系統差別在於志賀菌在酸性環境基本培養基中培養至穩定生長期(stationary phase)時需要 RpoS(Zhao and Houry 2010)。

Asr(acid shock RNA)可轉譯一百個胺基酸，在腸內菌科細菌普遍存在，可在 pH<5.0 之下被誘導表現，並且被發現在 M9 培養液中的表現量比在 LB 培養液中高(Seputiene, Suziedelis et al. 2004)。大腸桿菌將 Asr 送到膜間質過程中會先去掉訊號序列(signal peptide)，到了膜間質時，N 端部分被切割，剩下的 C 端才真正具有抗酸能力(Seputiene, Motiejunas et al. 2003)。一旦 *asr* 突變，除了使細菌對酸的敏感性增加外，會影響大腸桿菌在老鼠腸道的群聚(Armalyte, Seputiene et al. 2008)。沙門氏桿菌 Asr 的表現會受雙分子訊息傳遞系統(two component system, TCS) RstA/RstB 和可感應磷離子變化的 TCS PhoB/PhoR 所調控(Suziedeliene, Suziedelis et al. 1999)；另有研究指出在穩定生長期，*asr* 的轉錄與 RpoS 有關(Seputiene, Suziedelis et al. 2004)。沙門氏桿菌 RstA/RstB 除了可調控受 RpoS 影響的三個基因表現(*narZ*、*spvA*、*bapA*)外，也影響 RpoS 的降解，還可抑制生物膜的生合成(Cabeza, Aguirre et al. 2007)。而在克雷白氏肺炎桿菌中，*rstA*、*rstB* 或 *asr* 的缺損對細菌在酸性環境的生長或酸逆境下存活率影響不大，但 Asr 在生成過程中也會有被切割的情形(蔡雅雯，2009)。另外，啟動子活性分析結果顯示 *rstA* 的基因缺損不會影響其他和酸有關的 *hdeD*、*yfdX*、*yfiD* 的表現；PhoP/PhoQ 會調控 RstA/RstB 的表現；Fur 會使 *rstA*、*asr* 啟動子的活性明顯減少(Cabeza, Aguirre et al. 2007)。

1.3 調控抗酸機制表現的雙分子訊息傳遞系統

細菌、酵母菌可以藉細胞表面的激酶接收環境壓力，再將訊號傳至下游的感

應蛋白，而做出有效且快速的反應來因應其變化(Galperin, Higdon et al. 2010)。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反應藉以對抗來自外界的環境壓力(Stock, Robinson et al. 2000)。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)(Mascher, Helmann et al. 2006);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。

Rcs (Regulator of Capsular Synthesis)系統亦屬於 TCS 的一種，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 RcsF 與細菌細胞內膜上的偵測子 RcsC 接受來自於細胞外、細胞內的訊號，接著 RcsC 自我磷酸化，並將磷酸根傳遞於下游的 RcsD，RcsD 再將訊號傳遞於在最下游的反應調控因子 RcsB，磷酸化該蛋白的第 56 個胺基酸天冬胺酸鹽(Aspartate)並使 RcsB 活化(Volz 1993)，RcsB 可以單獨形成複合體影響下游。最早被發現參與大腸桿菌莢膜多醣體生合成的調控(Gottesman, Trisler et al. 1985)，在沙門氏菌、克雷白氏菌、志賀氏菌當中也有被發現。在大腸桿菌中研究發現 RcsB 會影響 AR2 谷氨酸抗酸機制(Castanie-Cornet, Treffandier et al. 2007)。在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 研究顯示 *rscB* 與 *rscD* 基因剔除皆會使酸壓力下存活率下降，啟動子活性 P_{rscB} 、 P_{rscDB} 、 P_{rscF} 會被弱酸誘導，且 P_{rscB} 活性遠高於其它三個啟動子(彭冠男，2013)。另外在 RcsB 磷酸化對於抗酸相關研究發現模擬持續磷酸化的 RcsB-D56E 會和 GadE 形成綜合體(complex)調控許多抗酸途徑，例如 *gadA*, *gadBC*, *hdeAB*, *hdeD*, *slp-dctR*, *adiA*, *adiC*, *cadBA* 和 *gltBD* (Krin, Danchin et al. 2010)。RcsB-D56A 模擬無法接受磷酸根的 RcsB 會正向調控酸逆境伴隨蛋白，可回補 *rscB* 基因缺損造成的抗酸缺陷(鄭燕曦，2013)。

TCS 系統中 EvgA/EvgS 是對數生長期主要調控抗酸的系統 (Masuda and

Church 2003; Ma, Masuda et al. 2004; Itou, Eguchi et al. 2009)。EvgA/EvgS 活化會誘導抗酸(AR)相關基因、TCS-PhoP/PhoQ 系統和 *yfdX* (Masuda and Church 2003; Eguchi, Okada et al. 2004)。而克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中有多套 EvgAS 相似的 TCS：KvgAS、KvhAS 和 KvgA1S1，可能扮演不同的調控角色。當壓力調節主控子 RpoS 基因突變或鎂離子濃度升高時，*kvhAS* 的啟動子活性明顯上升，暗示著 KvhAS 和 PhoPQ 有交互作用。*kvhA* 突變株也發現會降低抗酸存活率，亦降低 *yfdX* 啟動子以及蛋白質之表現量，顯示 *kvhA* 在抗酸的功能，主要在於調控 *yfdX* (樊力成，2012)。

1.4 革蘭氏陰性菌膜間質 (periplasmic space) 的抗酸機制

革蘭氏陰性菌具有雙層膜結構，膜間質是位於外膜與內膜之間的區域，外膜上包含非專一通道蛋白(porins)，允許分子量小於 600Da 之分子自由擴散，包含氫離子，使得膜間質承受較大的環境壓力(Schirmer 1998)。膜間質與細胞質一樣包含參與養分代謝的重要酵素與轉運蛋白。當面臨酸壓力時，膜間質內的蛋白質直接暴露於比細胞質更酸的環境，故膜間質內的蛋白受到酸傷害比細胞質嚴重。體內(in vivo)與體外(in vitro)研究皆指出在酸性條件下膜間質蛋白會變性(denature)並聚集(aggregation)(Malki, Le et al. 2008)。

分子伴隨蛋白(molecular chaperone)參與新生成蛋白質的折疊、多元體聚合、或幫助壓力下失去活性的蛋白重新折疊，使其具有活性構型(Merdanovic, Clausen et al. 2011)。在革蘭氏陰性菌的抗酸系統中，除了細胞質的去梭酸基酵素外，特殊的伴隨蛋白能夠辨認並保護蛋白質，使其維持活性狀態而避免沉澱發生。大腸桿菌中，已知主要參與膜間質抗酸反應的伴隨蛋白為 HdeA 及 HdeB。在正常生理條件下，HdeA 和 HdeB 會被表現；在弱酸條件下他們的表現會被誘導(Tucker, Tucker et al. 2002)。不只在在大腸桿菌，福氏志賀菌和布魯氏菌也發現當在酸壓力下干擾了 *hdeAB* 操縱子表現會導致嚴重的生存問題(Waterman and Small 1996; Gajiwala and Burley 2000; Valderas, Alcantara et al. 2005; Kern, Malki et al.

2007)。

在中性環境，HdeA 形成同型二聚體(homodimer)但沒有伴隨蛋白活性，不會與受質作用；而細菌進入 pH 小於 3 的環境時，HdeA 二聚體會快速地分離成單體(monomer)，並暴露出蛋白質疏水面與受質結合形成異形二聚體(heterodimer)，以保護受質避免蛋白質受到酸傷害而變性聚集。許多受質在酸性環境受 HdeA 和 HdeB 保護避免蛋白質聚集而變性，此時，蛋白質仍然是不活化、去摺疊狀態，當細菌離開酸性胃酸環境回到中性腸道環境後，去摺疊蛋白需重新摺疊回原本結構和恢復活性(Tapley, Franzmann et al. 2010)。HdeA 和 HdeB 也被發現有助於受質恢復活性(Malki, Le et al. 2008; Tapley, Franzmann et al. 2010)，在中性環境，HdeA 與受質緩慢分離，比 HdeA 結合受質的過程慢許多，而藉此避免容易聚集的蛋白釋放之後因累積過高濃度而造成聚集變性，因此有更多機會再次摺疊(refold)回原本的結構。利用蛋白質光交聯探針(protein photocrosslinking probe)去偵測體內蛋白質交互作用的方法，發現轉運蛋白、代謝酶、伴隨蛋白、脂蛋白、蛋白酶等膜間質蛋白，在酸性環境下會與 HdeA 作用(Zhang, Lin et al. 2011)。在酸性環境，膜間質伴隨蛋白 DegP 和 SurA 是 HdeA 的主要受質(Zhang, Lin et al. 2011)，而在中性環境，DegP 和 SurA 會幫助與外膜蛋白生合成有關的受質蛋白的再摺疊使其恢復活性(Sklar, Wu et al. 2007; Hagan, Kim et al. 2010)，被稱為「伴隨蛋白保護的伴隨蛋白(Chaperone-protecting-chaperone)」，是細菌對抗極端環境的健全策略。另外，HdeA 和 HdeB 的最佳活性條件不同，體外結果顯示在 pH2 時，HdeA 功能效率比 HdeB 強；HdeB 則是在 pH3 會有比較好的效率；相對的，HdeB 二聚體分離成單體會在 pH3 時會完全分離，HdeA 則是在更低的 pH 下會分離完全(Kern, Malki et al. 2007)。

在中性環境下的 HdeA 和 HdeB 結晶結構已經被解出來(Gajiwala and Burley 2000; Wang, Rasmussen et al. 2012)。儘管 HdeA 和 HdeB 的序列相似度極低，但它們單體結構卻有極高相似度，兩者都是單域蛋白(single-domain proteins)，核

心由四個 α -螺旋(α -helix)包覆著成疏水區。在中性環境下兩者都會形成同型二聚體(homodimer)，然而此二聚體中單體的組成排列非常不同。HdeA 的兩個 α -螺旋呈現平行相對；HdeB 則是幾乎垂直(Wang, Rasmussen et al. 2012)，但兩者的二聚體皆包覆著大範圍的疏水表面。在 HdeA 中二聚體疏水表面是用來與受質結合的部分(Tapley, Korner et al. 2009)，當此疏水表面的胺基酸被取代，則 HdeA 失去結合受質的能力(Wu, Hong et al. 2008)。在末端極性高的 N 端與 C 端有助於「伴隨蛋白-受質二聚體」的溶解度(Hong, Jiao et al. 2005; Wu, Hong et al. 2008)，使蛋白不易聚集沉澱。此特別結構包含了內部疏水端和兩個極性 N 端 C 端區域被稱為「兩親性特性(amphiphilic feature)」，其他物種的 HdeA 同源基因也都具有此特性，所以此特性對於細菌抗酸很重要。特別的是在酸性環境下 HdeA 單體結構可塑性很高，其結構會根據不同受質結構而改變來符合受質並與受質結合。故，HdeA 的受質結合特異性極廣(Tapley, Korner et al. 2009)。

大腸桿菌 HdeA 和 HdeB 基因座落抗酸島嶼(acid fitness island, AFI)，也和大腸桿菌在酸性環境的存活相關(Malki, Le et al. 2008)。

1.5 大腸桿菌抗酸島嶼

大腸桿菌除了 AR 系統外，尚有一組由 12 個基因組成的酸適應島嶼，包含 *gadA/E/W/X*、*hdeA/B/D*、*slp*、*yhiF/D/U/V*(如附圖一 A)，其中大部分基因在酸性環境下會被誘導，有些突變基因在 pH 2 下會使細菌存活率下降(Lee, Slonczewski et al. 1994; Krin, Danchin et al. 2010; Zhao and Houry 2010)。GadA 是谷氨酸脫羧酶的同功異構酶(isozyme)；GadE 是 AR2 的活化蛋白；GadX 和 GadW 會調控 GadE、GadABC 的表現；Slp 是外膜的脂蛋白；YhiF 是轉錄調控子；YhiD 和 HdeD 推測為穿膜蛋白(Lee, Slonczewski et al. 1994; Krin, Danchin et al. 2010; Zhao and Houry 2010)。在乳酸、琥珀酸和甲酸的低酸鹼值環境，Slp、YhiF 和 HdeA 對於細菌對抗酸鹼值依賴性毒性作用是需要的(Zhao and Houry 2010)。然而 HdeD 和

YhiD 是在細菌生長密度較高時對抗酸反應具重要性(Lee, Slonczewski et al. 1994)。

1.6 克雷白氏肺炎桿菌抗酸島嶼 AFI-I

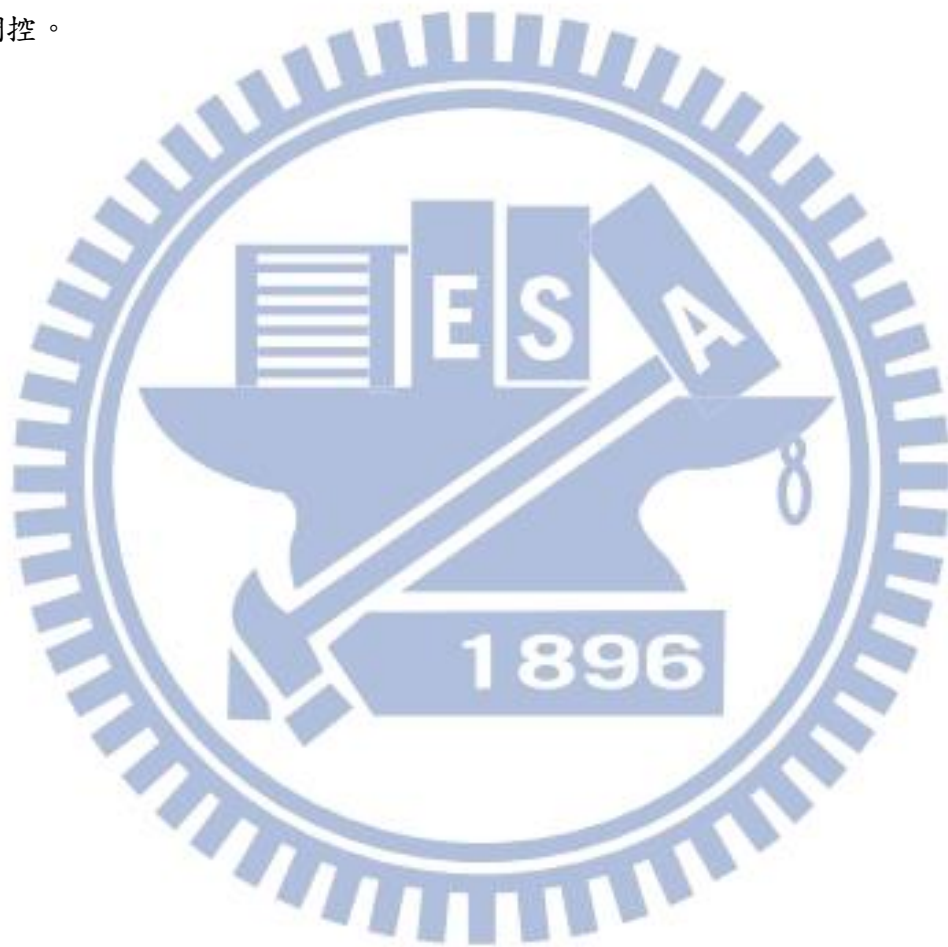
克雷白氏肺炎桿菌與大腸桿菌同屬腸內菌科。痢疾桿菌不具備 AR3 及 AR4，於 pH3~4.5 之酸性環境下只有極低的存活率。沙門氏菌及霍亂弧菌缺少 AR2，無法在小於 pH2.5 之極酸環境存活；相對的，克雷白氏肺炎桿菌缺乏 AR2 和 AR3，無法像大腸桿菌在極酸環境(pH 2)仍可生存(林志桓，2009)。

實驗室先前研究指出雙分子訊息調控系統的調控基因 *rscB* 的缺損，導致克雷白氏肺炎桿菌 CG43 在 pH 3 下的存活率顯著降低；而且，RcsB 會調控克雷白氏肺炎桿菌中的伴隨蛋白 *hdeBD* 與 *yfdX* 的表現量(林志桓，2009)，這兩個基因皆座落於類似大腸桿菌的抗酸島嶼 AFI-I (附圖一 B)：克雷白氏肺炎桿菌的抗酸島嶼包含 *ureaseABCDEFGF*、*hdeB*、*hdeB1*、*hdeD*、*kvhAS* 及 *yfdX*。已知剔除克雷白氏肺炎桿菌的尿素酵素基因並不影響其於酸性環境下的存活率，但可降低在腸胃道中與野生菌株的競爭能力(Maroncle, Rich et al. 2006)。在 pH3 抗酸能力評估結果顯示對於酸敏感度的大小分別為 $\Delta hdeB1 > \Delta hdeD > \Delta yfdX > \Delta hdeB$ ，YfdX 與 HdeB 在體內及體外實驗分別證實其伴隨蛋白的活性(曾品瑄，2011、樊力成，2012)。但是 *hdeB1* 及 *hdeB-hdeD* 的啟動子在有氧且經過酸適應的情況下，均沒有明顯活性(曾品瑄，2011)。但在靜置培養下，*yfdX* 啟動子活性顯著增加，且在此培養狀態 *yfdX* 才會受到酸誘導(樊力成，2012)。

1.7 研究目標

2013 年，克雷白氏肺炎桿菌 CG43 基因體定序完成，而序列分析結果發現一個類似於大腸桿菌抗酸島嶼的同源基因群(附圖一 C)(林芳瑜，2013)，因而將先前研究的抗酸島嶼命名為 AFI-I，後來發現的同源基因組命名為 AFI-II。有趣

的是，AFI-II 只在 CG43 被發現，在 NTUH-K2044 和 MGH78578 基因體上只有 AFI-I 基因組。因此，為了探討 AFI-II 在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 抗酸反應所伴演的角色，建構 AFI-II 上的伴隨蛋白相關的基因缺損株，分析比較其與 AFI-I 上的伴隨蛋白基因缺損株抗酸能力的差異，同時以基因回補實驗，利用抗酸能力分析來評估其伴隨蛋白活性；另外，也利用 LacZ 活性評估系統分析 AFI-II 伴隨蛋白基因的啟動子是否受弱酸誘導，及 TCS-RcsB 及 RpoS 對 AFI-II 伴隨蛋白基因的調控。



二、材料與方法

2.1 菌株、質體及生長環境

本研究所使用的菌株及體分別列於表一與表二。克雷白氏肺炎桿菌 CG43 是長庚紀念醫院林口分院的臨床分離株。菌株震盪或靜置培養於 37°C 已加入適當抗生素的 Luria-Bertani [LB: 10 g/L 胰蛋白胨 (tryptone)、5 g/L 酵母萃取物 (yeast extract) 及 10 g/L 氯化鈉 (sodium chloride)] 培養液或培養基; 而使用的抗生素及濃度分別為: 鏈黴素 (streptomycin) 500 µg/ml、氨比西林 (ampicillin) 100 µg/ml、氯黴素 (chloramphenicol) 35 µg/ml、卡那毒素 (kanamycin) 25 µg/ml 及四環黴素 (tetracycline) 12.5 µg/ml。

2.2 基因重組技術

聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 所使用的引子由生工公司 (MDBio, Inc, Taiwan) 或每得 (IDT) 公司合成, 並詳列於表三; 而 PCR 使用的酵素為 Blend Taq DNA polymerase (TOYOBO, Japan); PCR 產物及 DNA 片段則使用 Gel/PCR DNA fragments Extraction Kit (Geneaid) 抽取; 限制酵素及 DNA 修飾酵素分別由 New England Biolab (Braverly, 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; 啟動子預測以 Softberry 網站

(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) 分析。

2.4 細菌抗酸能力分析

待測菌分別採取震盪或靜置培養方式測試抗酸能力：震盪培養方式參考文獻 (Castanie-Cornet, Penfound et al. 1999)，並修飾部分步驟。細菌在 LB 培養液隔夜培養後，稀釋 20 倍後加入新鮮 LB 培養液中，再培養 2~3 小時直到 $OD_{600}=0.85$ ，之後將菌體移至 pH4.4 LB 培養液中，適應 1 小時後移至 pH2.5 的 M9 培養液培養 35~45 分鐘，最後，將菌液稀釋至適當濃度並滴 5 μl 於 LB 固態培養基上，另取 100 μl 均勻塗佈於 LB 固態培養基上；存活率是根據在 M9 培養 35~45 分鐘後，每毫升存活的菌數和培養前每毫升的菌數的比值；每次獨立實驗以三重複數據求得平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中具代表性的一次。

2.5 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)，將前後兩片段結合後接入自殺性載體 pKAS46，再將此重組質體以電穿孔 (electroporation) 送入 *E. coli* S17-1 λpir ，以接合作用 (conjugation) 將此質體送入克雷白氏肺炎桿菌 CG43S3 中，塗佈含有卡那黴素 (kanamycin) 及氨苄青黴素 (ampicillin) 的 M9 固態培養基，篩選出經由同源互換作用的轉接合子 (transconjugants)，之後，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，以 PCR 確認該質體插入染色體中，再取 100 μl 菌液於含有鏈黴素 (streptomycin) 的 LB 培養液 37°C 培養八小時後，系列稀釋至 10^{-6} 倍，取 100 μl 菌液均勻塗抹在還有鏈黴素的 LB 固態培養基上培養隔夜，最後以滅菌牙籤挑選約 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，再以 PCR 檢查是否置換成功。

2.6 基因回補質體建構

利用 PCR 增幅目標基因植入 yT&A 載體中，經由次選殖(subclone)至 pRK415 廣寄主載體後以電穿孔送入 *E. coli* S17-1 λ pir，再以接合作用轉入 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數顆單一菌落，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。

2.7 HdeA 點突變建構

利用 yT&A-HdeA(pRK415)當作模板，重新設計新的引子 HdeA F44A(+)/HdeA F44A(-)，使用 PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase (agilent Technologies)建構點突變。首先利用 PCR 增幅，產物跑膠、切膠、溶膠加入 *DpnI* 兩個小時以去除模板植體，之後以電穿孔方式送入大腸桿菌 JM109 塗盤。挑出單一菌落送定序以確定是否點突變成功。點突變成功之後將質體從 yT&A 切下，與 pRK415 黏合，再電穿孔至大腸桿菌 JM109。

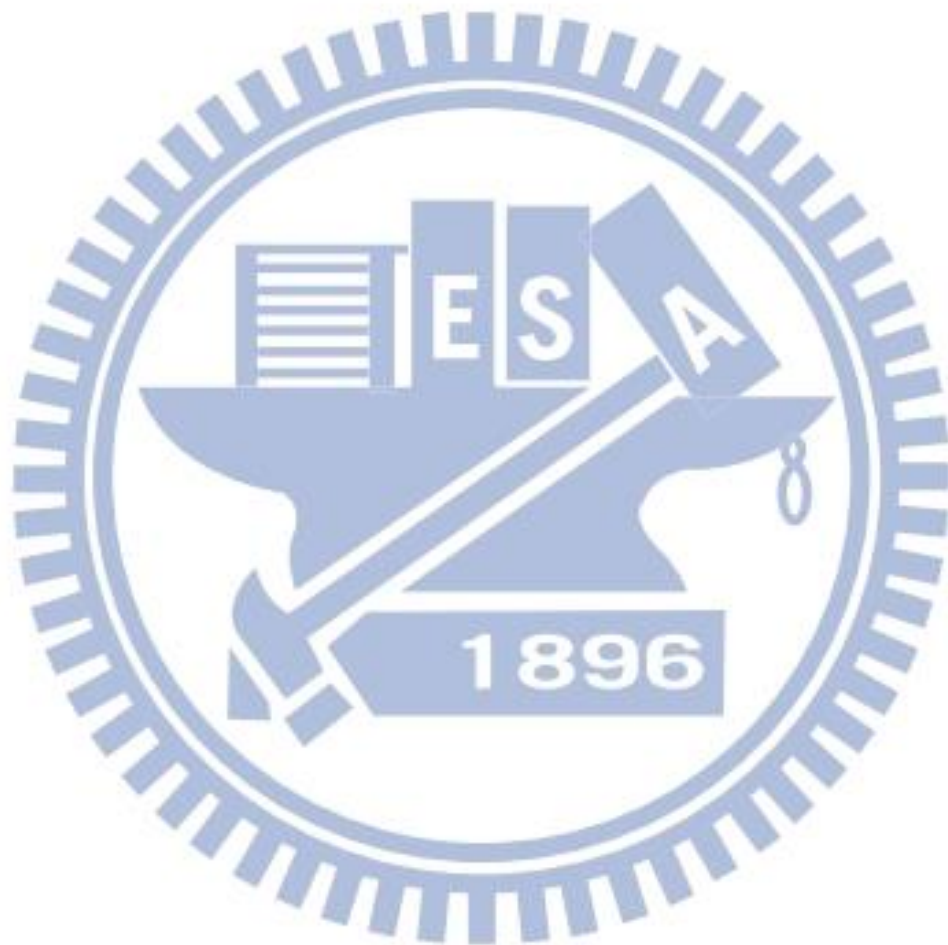
2.8 啟動子報告質體建構

將預設的啟動子片段以 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 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)活性評估報告測量啟動子的活性。

2.9 β -半乳糖苷酶活性評估

根據 Miller 方法[Meller JH, 1972]，將隔夜培養之菌液以 20 倍稀釋於 LB 培養液中，待菌液 OD₆₀₀ 約 0.8~1.0 左右，取 100 μ l 的待測菌液加入 900 μ l Z buffer (60 mM Na₂HPO₄、40 mM NaH₂PO₄、10 mM KCl、1 mM MgSO₄ 及 50 mM β -mercaptoethanal)、0.1% SDS 及三氯甲烷(chloroform)混合液中，並於 30°C 水

浴槽靜置十分鐘，之後加入 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，並開始計時至混和液體變成黃色，再加入 500 μ l 1M 碳酸鈉終止反應，測量波長 OD₄₂₀ 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。



三、實驗結果

3.1 克雷白氏肺炎桿菌 CG43 與 NTUH K2044 的抗酸能力

分析基因體定序結果，克雷白氏肺炎桿菌 CG43 較其他已定序的克雷白氏肺炎桿菌株多了一套類似於大腸桿菌抗酸島嶼的同源基因群-我們命名為 AFI-II(圖一)，在 AFI-II 上，除了具有 AFI-I 沒有的 HdeA 基因外，還多了 HdeB、HdeD 和 KvgA 的同源基因，分別被命名為 *hdeD1B2*、*kvgAS*、*kvgAIS1*。為了探討 CG43 多了 AFI-II 是否有助其抗酸能力，首先，以抗酸能力分析來比較 CG43 與只帶 AFI-I 的 NTUH-K2044 在酸環境 pH2.5 的存活率，如圖二所示，兩者抗酸能力並無明顯差異。

3.2 HdeA 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測

為了確認 AFI-II 上 HdeA 的活性，利用 Vector NTI 軟體比對 Kp-HdeA 與 Ec-HdeA 胺基酸序列，如圖三所示，其相似度達 62.2%，而 Ec-HdeA 執行伴隨蛋白功能的重要胺基酸和與受質結合的重要胺基酸(Zhang, Lin et al. 2011)都被保留，除了一個在大腸桿菌為苯丙氨酸(phenylalanine)的在 Kp-HdeA 被取代為纈氨酸(valine)；此顯示 Kp-HdeA 可能具有伴隨蛋白的活性。為了探討 Kp-HdeA 蛋白質功能區域，因此將 Kp-HdeA 放入線上軟體 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search;jsessionid=7F4EB4E31A0CD0BA8FA85BA2D2FFBAC7>)預測結果如圖三，除了具有典型 Ec-HdeA 的功能區外，Kp-HdeA 在 1-20 胺基酸區域有訊號序列(signal peptide)，顯示 Kp-HdeA 可能如 Ec-HdeA 是在膜間質執行伴隨蛋白功能。

3.3 HdeB 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測

利用 Vector NTI 軟體比較 AFI-I 與 AFI-II 共有的同源蛋白 HdeB、HdeB1 和 HdeB2 胺基酸序列，圖四 A 顯示 AFI-II 上的 Kp-HdeB2 與 Ec-HdeB 的相似度最

高為 40.2%，暗示其親緣性；而 InterProScan 預測 HdeB2 蛋白質具有 Ec-HdeB 蛋白功能且在 1-27 胺基酸區域具有訊號序列。圖四 B 的親緣關係分析顯示 HdeB 與 HdeB2 二者親緣關係最近，HdeB 與 HdeB2 胺基酸的相似度為 47.1%；HdeB 與 HdeB1 為 19.8%；HdeB1 與 HdeB2 為 19%。

3.4 HdeD 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測

圖五 A 顯示 AFI-II 上的 HdeD1 胺基酸 18-37、43-63、75-94、100-125 的位置具有穿膜結構(transmembrane region)，1-17、64-74、126-135 的位置為細胞質區域(cytoplasmic domain)，38-42、95-99 的位置為非細胞質區域(non-cytoplasmic domain)。而與 AFI-I 上的 HdeD 胺基酸序列比對顯示彼此間相似度只有 23%；Kp-HdeD、Kp-HdeD1 與 Ec-HdeD 的序列相似度也只有 28.3%、17.9% (圖五 B)。

3.5 KvgA 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測

在 AFI-II 上的雙分子訊息傳遞系統反應蛋白 KvgA1 的胺基酸 7-129 的位置為接受區域(receiver domain)，屬於 CheY superfamily；143-208 的位置有 helix-turn-helix 區域可與 DNA 結合，屬於 LuxR superfamily。比對 KvhA、KvgA 與 KvgA1 顯示 KvhA 和 EvgA 的相似度最高達 66.7%；相對的，AFI-II 上的 KvgA、KvgA1 和 EvgA 的相似度分別為 47.9%與 63.8%；KvhA 與 KvgA 為 45.5%；KvhA 與 KvgA1 為 59%；KvgA 與 KvgA1 為 51.7%(圖六 B)。

3.6 克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中建構 *hdeA*、*hdeB2*、*hdeB2D1*、*kvgA1* 基因缺損突變株

欲探討 *hdeA*、*hdeB2*、*hdeB2D1*、*kvgA1*、*hdeDhdeD1* 是否也與細菌抗酸能力相關，所以建構其基因缺損突變株。利用 PCR 增幅其前後約 1000bp 的 DNA 片段，再將此兩片段結合，並接入自殺性質體 pKAS46 (Skorupski and Taylor 1996)

中，分別得到 pKAS46-*hdeA*(A+B)、pKAS46-*hdeB2*(A+B)、pKAS46-*hdeB2D1*(A+B) 和 pKAS46-*kvgA1*(A+B)，再利用接合作用分別將質體送入克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中，利用同源互換作用而得到基因缺損突變株。欲剔除的 *hdeA* 基因大小為 321 個鹼基對，HdeA-check(+)/HdeA-check(-)引子用來確認 *hdeA* 基因缺損突變株，總長為 1049 個鹼基對，所以成功踢除 *hdeA* 基因 PCR 確認後的總長為 728 個鹼基對(圖七 A)；欲剔除的 *hdeB2* 基因大小為 282 個鹼基對，HdeB2-check(+)/HdeB2-check(-)引子用來確認 *hdeB2* 基因缺損突變株，總長為 796 個鹼基對，所以成功踢除 *hdeB2* 基因 PCR 確認後的總長為 514 個鹼基對(圖七 B)；欲剔除的 *hdeB2D1* 基因大小為 787 個鹼基對，HdeD1-check(+)/HdeD1-check(-)引子用來確認 *hdeB2D1* 基因缺損突變株，總長為 1416 個鹼基對，所以成功踢除 *hdeB2D1* 基因 PCR 確認後的總長為 629 個鹼基對(圖七 C)；欲剔除的 *kvgA1* 基因大小為 642 個鹼基對，KvgA1-check(+)/KvgA1-check(-)引子用來確認 *kvgA1* 基因缺損突變株，總長為 1175 個鹼基對，所以成功踢除 *kvgA1* 基因 PCR 確認後的總長為 533 個鹼基對(圖七 D)。

3.7 *hdeA*、*hdeB2*、*hdeB2D1* 和 *kvgA1* 基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌 CG43 生長的影響

在建構 $\Delta hdeA$ 、 $\Delta hdeB2$ 、 $\Delta hdeB2D1$ 和 $\Delta kvgA1$ 後，首先確認其基因缺損是否會影響細菌的生長。細菌隔夜培養後，稀釋 200 倍至新的 LB 培養液中，每隔一個小時測細菌生長狀況，結果如圖八，*hdeA*、*hdeB2*、*hdeB2D1*、*kvgA1*、*hdeDhdeD1* 基因缺損後對細菌的生長沒有明顯影響。

3.8 對數生長期抗酸相關基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌 CG43 抗酸能力的影響

在確認 *hdeA*、*hdeB2*、*hdeB2D1*、*kvgA1*、*hdeDhdeD1* 基因缺損不會影響細菌的生長後，接著測試其基因缺損是否影響細菌的抗酸能力。由於克雷白氏肺炎

桿菌直接培養於 pH2.5 的 M9 培養液中幾乎無法存活，無法看出差異，因此參考 (Hall and Foster 1996) 的方法；細菌隔夜培養之後，稀釋 20 倍至菌液生長至 $OD_{600}=0.6$ 時將菌液培養於 pH4.4 的 LB 培養液適應 1 小時後，再移至 pH 2.5 的 M9 培養液中，測試其抗酸能力。分析的菌株包括 CG43S3、 $\Delta rcsB$ 、 $\Delta hdeB$ 、 $\Delta hdeB1$ 、 $\Delta yfdX$ 、 $\Delta kvgA1$ 、 $\Delta hdeA$ 、 $\Delta hdeB2$ 、 $\Delta hdeD$ 以及 $\Delta hdeD1B2$ 。結果如圖九 A、B，基因缺損株對於酸敏感度的排序為 $\Delta rcsB > \Delta hdeD > \Delta yfdX > \Delta hdeB1 > \Delta hdeB > \Delta hdeB2 > \Delta hdeD1B2$ ；以 AFI-I 上的 *hdeD*、*yfdX*、*hdeB1* 影響抗酸能力最為顯著。然而， $\Delta hdeA$ 在此條件下的抗酸能力與親本株 CG43S3 沒有明顯差異。

3.9 穩定生長期相關基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌 CG43 抗酸能力的影響

在大腸桿菌與沙門氏菌中，HdeA 伴隨蛋白活性為二者在小於 pH 3.0 的環境中生長所必需 (Waterman and Small 1996; Gajiwala and Burley 2000; Mates, Sayed et al. 2007)；在穩定生長期和 37°C 環境，HdeA 扮演更重要的角色 (Carter, Louie et al. 2012)。相對的，HdeB 的抗酸保護條件卻因不同菌株研究而有不同，例如在大腸桿菌 BW25113 菌株 HdeB 在酸壓力 pH 2~3 是重要的伴隨蛋白 (Kern, Malki et al. 2007)；但在大腸桿菌 MG1655 於 pH 2.5 環境卻不需要 HdeB 蛋白來達成抗酸目的 (Mates, Sayed et al. 2007)。為了確定 Kp-HdeA 是否為穩定生長期時抗酸所必需，將稀釋 20 倍的隔夜培養細菌於 LB 再培養至菌液 $OD_{600}=0.85$ 時，再將細菌轉至 pH 4.4 的 LB 培養液適應培養 1 小時後，移至 pH 2.5 的 M9 培養液中 45 分鐘，最後塗盤測試其抗酸能力，圖十顯示這些基因缺損株對於酸敏感度的排序依次為 $\Delta rcsB > \Delta hdeD > \Delta yfdX > \Delta hdeB1 > \Delta hdeA > \Delta hdeB > \Delta hdeB2 > \Delta hdeD1B2$ ，其中 $\Delta hdeA$ 在此生長時期會表現明顯的對酸敏感的現象。

3.10 CG43S3 表現 *hdeA*、*hdeB* 和 *yfdX* 的抗酸能力分析

由於樊力成 (2012) 在論文中報告 HdeB 及 YfdX 的伴隨蛋白活性，並提出

YfdX 比 HdeB 有更強的伴隨蛋白活性的實驗結果(樊力成, 2012)。為了確認 HdeA 伴隨蛋白的活性, 將含有 *hdeA* 與其啟動子的核酸片段接到廣寄主質體 pRK415 藉以表現 *hdeA*(圖十一)。進一步比對 CG43S3[pRK415-*hdeA*]、CG43S3[pRK415-*yfdX*]、CG43S3[pRK415-*hdeB*]三者的抗酸能力, 圖十二結果顯示 CG43S3[pRK415-*hdeA*] 的抗酸能力最強, 此暗示 HdeA 的伴隨蛋白活性比 YfdX 高出許多。

3.11 Trans-complementation 分析 HdeA 的伴隨蛋白活性

為了再確認 HdeA 的伴隨蛋白活性, 接著將 pRK415-*hdeA* 轉型至 $\Delta yfdX$ 或 $\Delta hdeB$ 測試提高 *hdeA* 的表現是否能回補 $\Delta yfdX$ 或 $\Delta hdeB$ 的抗酸能力, 圖十三 A 比較 CG43S3、 $\Delta yfdX$ 、CG43S3[pRK415]、 $\Delta yfdX$ [pRK415]、 $\Delta yfdX$ [pRK415-*yfdX*]、 $\Delta yfdX$ [pRK415-*hdeA*]、 $\Delta yfdX$ [pRK415-*hdeB*]抗酸能力, 結果顯示藉由表現 YfdX 和 HdeA 可以分別回補或增加 *yfdX* 基因缺損株的抗酸能力; 圖十三 B 比較結果顯示 *hdeB* 基因缺損所造成的抗酸缺陷可藉由表現 YfdX 和 HdeA 來增加其抗酸能力, 而且, 表現 HdeA 所增加的細菌抗酸存活率比表現 YfdX 更強。

由於 $\Delta hdeD$ 對酸的敏感度僅次於 $\Delta rcsB$, 顯示 HdeD 在抗酸反應中扮演極重要角色, 但是除了其穿膜結構暗示為膜蛋白外其功能不明, 由於 *hdeDB* 與 *hdeD1B2* 坐落 operon 的結構顯示二者很可能有協同功能的作用, 因此我們提出 HdeD 扮演協同角色來活化 HdeB 伴隨蛋白活性, 而 HdeA 的伴隨蛋白活性不需 HdeD 協同的假說。為了驗證此可能性, 我們將 pRK415-*hdeA* 轉型至 $\Delta hdeD$ 或 $\Delta hdeD1$, 圖十三 C 顯示 HdeA 表現能顯著回補 *hdeD*、*hdeD1* 或 *hdeDhdeD1* 基因缺損所造成的抗酸缺陷, 此結果暗示 HdeA 執行伴隨蛋白功能不需要穿膜蛋白 HdeD 或 HdeD1 的輔助。

林志桓(2009)在論文中指出 RcsB 正向調控 AFI-I 上 *yfdX* 與 *hdeBD* 的表現量, 而鄭燕曦(2013)接著在 RcsB 第 56 個胺基酸做定點突變 D56E 模擬持續磷酸化與

無法被磷酸化 D56A 的狀態，結果發現 RcsB-D56A 會正向調控 *yfdX* 與 *hdeBD* 的表現及回補 $\Delta rcsB$ 造成的抗酸缺陷，因而提出 RcsB 以去磷酸化型來正向調控抗酸反應的假說。如圖十三 D 所示 $\Delta rcsB$ 的抗酸缺陷只可被 pRK415-*rcsB* 或 pRK415-*rcsB* D56A 的表現回補，再次證明前述 RcsB 以去磷酸化型來正向調控抗酸反應的說法；有趣的是 HdeA 的表現也可以回補 *rcsB* 基因缺損所造成的抗酸缺陷，此暗示 RcsB 是經由增加伴隨蛋白活性來調控抗酸反應；另外，RcsBD56E 無助於抗酸反應也暗示 Rcs 磷酸根的傳遞扮演負調控角色。

3.12 HdeA F44A 點突變建構

根據 Lin 等人在 2011 年的預測，HdeA 伴隨蛋白在酸性環境會從同型二聚體分開成單體並暴露出中間疏水部份去保護受質蛋白，而其表面有三個重要胺基酸(圖三標註*的胺基酸)決定其與受質蛋白的結合，其中一個胺基酸在大腸桿菌為苯丙氨酸(phenylalanine)，KP-HdeA 突變成為纈氨酸(valine)；另外兩個胺基酸皆與大腸桿菌相同，分別為苯丙氨酸與丙氨酸。為了證明 HdeA 的伴隨蛋白活性不受此胺基酸變化影響，進一步將 HdeA 第 44 個決定伴隨蛋白活性的重要胺基酸苯丙氨酸點突變成丙氨酸後，再藉由測試轉型菌的抗酸能力來確認 HdeA 的伴隨蛋白活性是否受到影響。圖十四 A 說明 HdeA-44A 之建構方式是：先以引子對 HdeA F44A(+)/HdeA F44A(-)利用 yT&A-HdeA(pRK415)當作模板，經 PCR 增幅定點突變的 HdeA 後，將產物片段切下電穿孔至大腸桿菌 JM109，抽質體切下並黏合至回補質體 pRK415 上。圖十四 B 顯示以電泳膠確認片段大小為 747 個鹼基對，最後，再送定序確認成功突變第 44 個胺基酸。

3.13 苯丙胺酸 44 點突變對於 HdeA 伴隨蛋白活性的影響

圖十五 A 比較抗酸能力結果發現 pRK415-*hdeA* F44A 無法如 pRK415-*hdeA* 明顯回補 $\Delta yfdX$ 抗酸缺陷，顯示此活性位置突變影響 HdeA 保護細菌在酸壓力下

的存活。圖十五 B 顯示將 pRK415-*hdeA* F44A 利用接合作用轉型 $\Delta hdeB$ 、 $\Delta hdeD$ 、 $\Delta hdeD1$ 或 $\Delta rcsB$ 後做抗酸能力分析，結果也再次證明 pRK415-*hdeA* F44A 無法如 pRK415-*hdeA* 明顯回補 $\Delta hdeB$ 、 $\Delta hdeD$ 、 $\Delta hdeD1$ 及 $\Delta rcsB$ 的抗酸缺陷，更確認第 44 個位置之苯丙胺酸對於 HdeA 伴隨蛋白活性很重要，而 HdeA 的高量表現可以伴隨蛋白活性來保護克雷白氏肺炎桿菌 CG43 躲過強酸的攻擊。

3.14 CG43S3 表現 *hdeB*、*hdeD* 和 *hdeBD* 的抗酸能力分析

在 AFI-I 的伴隨蛋白 *hdeB* 與 *hdeD* 是同一個操縱子，共用一個啟動子，在過去實驗室研究發現 HdeB 具有伴隨蛋白活性(曾品瑄, 2011)。然而在圖十二實驗發現 CG43S3 表現 pRK415-*hdeB*，並沒有增加細菌抗酸能力。為了證明 HdeB 需要 HdeD 協同輔助其伴隨蛋白活性才能增加細菌的抗酸能力，進一步比較 CG43S3[pRK415-*hdeB*]、CG43S3[pRK415-*hdeD*]與 CG43S3[pRK415-*hdeDB*] 的抗酸能力，結果如圖十六，HdeB 必須要有 HdeD 的表現才會增加細菌的抗酸能力，有趣的是 CG43S3[pRK415-*hdeD*]與 CG43S3[pRK415-*hdeDB*]一樣可以增加細菌的抗酸能力，此暗示高量的輔助蛋白表現除了協同 HdeB 外也可能協同 YfdX 伴隨蛋白的活性。

3.15 *hdeA*、*hdeB2D1*、*hdeBD*、*hdeB1*、*yfdX* 啟動子分析

為了探討抗酸島嶼上的基因會受到哪些蛋白所調控，將 *hdeA*、*hdeB2D1*、*hdeBD*、*hdeB1* 與 *yfdX* 的啟動子序列以線上軟體 Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>)分析，圖十七顯示 *hdeA* 啟動有 DnaA、ArcA、Ihf、Fis、Crp、Fnr 和 RcsB 結合位；*hdeBD* 啟動子預測有 Lrp 與 RcsB 結合位；*hdeB1* 啟動子預測到有 Ihf、ArcA 和 RcsB 結合位；*hdeB2D1* 啟動子有 Fnr、ArgR、TyrR 和 RcsB 結合位；*yfdX* 啟動子預測到有 EvgA、Lrp、PurR 和 RcsB 結合位。綜觀以上，發現

AFI 上基因 *hdeA*、*hdeB2D1*、*hdeBD*、*hdeB1* 與 *yfdX* 的啟動子皆有預測到 RcsB 的結合位 GAnnnnC，推論 RcsB 藉由調控 AFI 基因表現來因應酸性壓力。

3.16 細菌生長不同時期 *hdeA*、*hdeB2D1* 啟動子活性分析

為了探討 *hdeA*、*hdeB2D1* 啟動子活性與調控，將分析出的片段 P_{hdeA} 、 $P_{hdeB2D1}$ 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，建構示意圖如圖十八 A， P_{hdeA} 的長度為 441 個鹼基對； $P_{hdeB2D1}$ 的長度為 579 個鹼基對。細菌培養隔夜之後，稀釋 20 倍之後收 2、4、6 小時菌液分析啟動子活性，圖十八 B 顯示 P_{hdeA} 、 $P_{hdeB2D1}$ 皆會隨著時間而增加其活性。

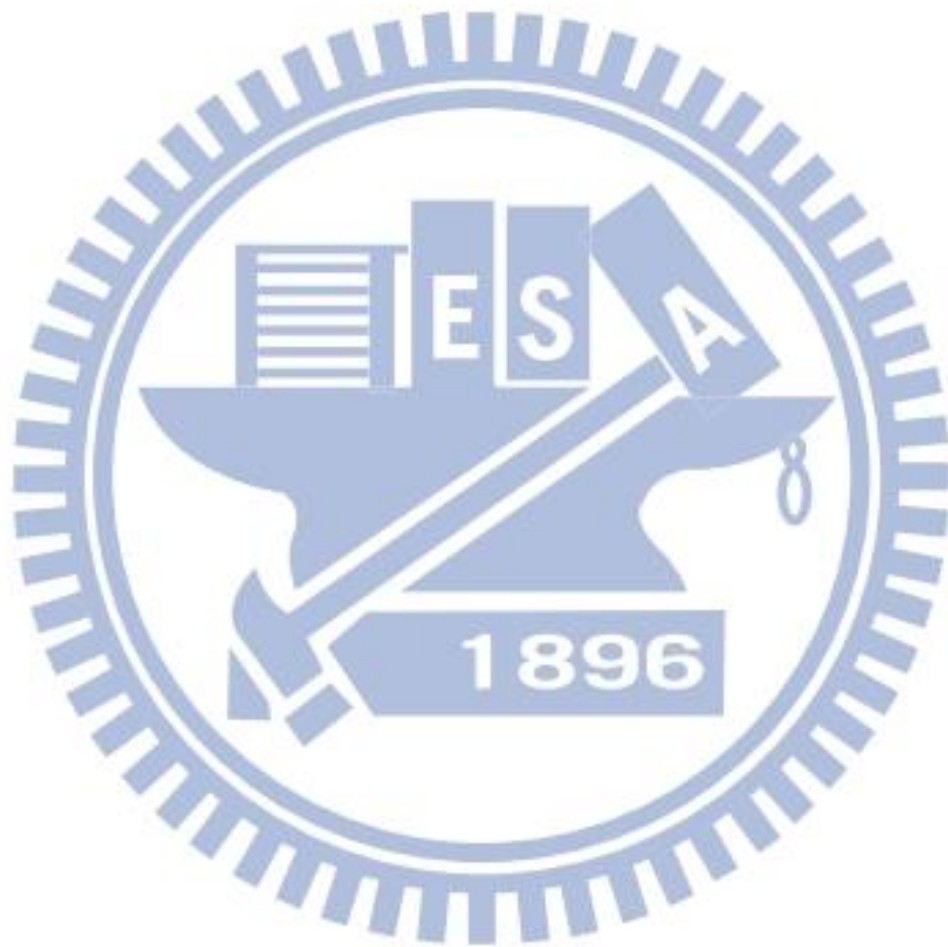
3.17 弱酸培養條件下 *hdeA*、*hdeB2D1*、*yfdX* 啟動子活性比較

克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力必須經過弱酸(pH4.4)適應後，細菌抗酸能力顯提高許多，因此推測伴隨蛋白的表現量會受弱酸誘導提高，進而提高克雷白氏肺炎桿菌的抗酸能力。已知 P_{yfdX} 在靜置培養下會受到弱酸誘導表現(樊力成，2012)，圖十九 A、B 分別將 P_{hdeA} 、 $P_{hdeB2D1}$ 在 pH4.4 與 pH7.0 做比較，結果發現無論是震盪培養或者靜置培養條件， P_{hdeA} 、 $P_{hdeB2D1}$ 啟動子活性皆不會受到弱酸誘導而增加表現量。

3.18 *rscB* 和 *rpoS* 基因缺損對 *hdeA*、*hdeB2D1* 啟動子活性的影響

圖十七啟動子分析結果顯示 AFI 上的 *hdeA*、*hdeB2D1*、*hdeBD*、*hdeB1* 與 *yfdX* 啟動子皆有 RcsB 結合位，另外，RpoS 為細菌生長穩定生長期之主要調控因子，並負責一般性壓力反應基因的調控(Audia et al. 1998)。為了探討 AFI 基因是否受 RcsB 及 RpoS 調控，圖二十 A、B，同時分析 P_{hdeA} 、 $P_{hdeB2D1}$ 、 P_{hdeBD} 、 P_{hdeB1} 與 P_{yfdX} 啟動子在 $\Delta lacZ$ 、 $\Delta lacZ \Delta rcsB$ 及 $\Delta lacZ \Delta rpoS$ 三株菌株中，以震盪培養與靜置培養條件下的活性變化。結果發現震盪培養下 P_{hdeA} 、 $P_{hdeB2D1}$ 、 P_{hdeBD} 、 P_{hdeB1}

與 P_{yfdX} 啟動子活性皆不會受到 RcsB 與 RpoS 所調控；在靜置培養下，只有 P_{yfdX} 會受到 *rscB* 基因剔除而影響活性，而其他啟動子活性皆不受 *rscB* 與 *rpoS* 基因剔除影響。



四、結論

胃酸是人體對抗細菌感染的第一道天然屏障，而從胃到達小腸之後，養分經過腸內細菌發酵，產生的有機酸以及短鏈脂肪酸，使得細菌在腸道也承受到酸的壓力。因此，抗酸的能力與腸內細菌的感染能力，有很大的相關性。

在大腸桿菌中具有一組由 12 個基因組成的抗酸島嶼，而突變掉某些抗酸島嶼基因，則會造成大腸桿菌失去在 pH2 的環境下存活的能力(Mates, Sayed et al. 2007)。2013 年克雷白氏肺炎桿菌 CG43 基因體定序完成，而序列分析結果發現一個類似於大腸桿菌抗酸島嶼的同源基因群 AFI-II(林芳瑜, 2013)，此基因群只在 CG43 被發現，在 NTUH-K2044 和 MGH78578 基因體上只有 AFI-I 基因組(圖一 A、B)。克雷白氏肺炎桿菌 CG43 AFI-II 上有多一套 *urease* 基因組、*hdeA*、*hdeB2D1*、*kvgA* 和 *kvgA1*，其中 AFI-I 上的 *urease* 與克雷白氏肺炎桿菌 K2044 和 MGH 78578 *urease* 有 100% 相似度；然而 AFI-II 上的 *urease* 與克雷白氏肺炎桿菌 K2044 和 MGH 78578 *urease* 僅有 58% 相似度(林芳瑜, 2013)，特異性較高。AFI-II 上的基因 *hdeA* 與大腸桿菌 *hdeA* 有 62.2% 相似度；*hdeB2* 與大腸桿菌 *hdeB* 有 40.2% 相似度；*hdeD1* 與大腸桿菌 *hdeD* 有 17.9% 相似度；*kvgA1* 與大腸桿菌 *EvgA* 有 63.8% 相似度。然而克雷白氏肺炎桿菌 CG43 多了 AFI-II 對於其抗酸能力並無明顯增強(圖二)，且 AFI-II 上的基因 *hdeA*、*hdeB2D1*、*kvgA1* 基因缺損不論在對數生長期或穩定生長期，在細菌面臨酸壓力時也不會造成致命影響。推測本實驗分析所使用的抗酸條件不是 AFI-II 上基因的作用環境。

hdeA 和 *hdeB* 存在於許多腸道出血性大腸桿菌。在 *E. coli* O145 中 *hdeA* 和 *hdeB* 基因缺損會使細菌抗酸能力下降 100 至 1000 倍(Carter, Louie et al. 2012)。大腸桿菌 HdeA 伴隨蛋白的作用機制與酸壓力下保護的受質也已經被報導(Zhang, Lin et al. 2011)。為了瞭解克雷白氏肺炎桿菌 CG43 AFI-II 上的 *hdeA* 基因是否具有伴隨蛋白功能，將 *hdeA* 基因建構於回補質體中，接合作用送入克雷白

氏肺炎桿菌 CG43 野生株，發現 *hdeA* 回補之後顯著增加細菌抗酸存活率(圖十二)，推測克雷白氏肺炎桿菌 CG43 *hdeA* 具有伴隨蛋白活性。

GroEL 伴隨蛋白在大腸桿菌中的功能是摺疊特定蛋白質，但其功能在輔助伴隨蛋白 GroES 的幫助下蛋白質摺疊速度與穩定度會更好；熱休克蛋白 Hsp70 和 Hsp90 會與許多輔助蛋白交互作用調控他們的表現，或者協助摺疊特定受質蛋白 (Young, Barral et al. 2003)。圖十三回補實驗顯示克雷白氏肺炎桿菌 CG43HdeA 伴隨蛋白活性不需要輔助伴隨蛋白的輔助。有文獻指出，*hdeD* 基因缺損會降低大腸桿菌在高菌體密度的抗酸能力 (Mates, Sayed et al. 2007)，然而 HdeD 如何影響抗酸能力，其功能未明。圖十六顯示 *hdeB* 與 *hdeD* 同時表現才具有增加細菌抗酸的能力，因此推測 HdeD 可能具有輔助 HdeB 伴隨蛋白的活性。

在正常生理條件下，大腸桿菌 HdeA 和 HdeB 會被表現；在弱酸條件下他們的表現會被誘導 (Tucker, Tucker et al. 2002)。但在本實驗中卻發現 P_{hdeA} 、 $P_{hdeB2D1}$ 不受 pH4.4 弱酸誘導(圖十九)，可能原因是伴隨蛋白功能是在蛋白質轉譯後，遇到強酸環境從同型二聚體變成單體結構保護受質蛋白，與表現量較無關係，與蛋白質結構關係較大。在酸性環境下，HdeA 單體結構可塑性很高，其結構會根據不同受質結構而改變來符合受質並與受質結合。故 HdeA 受質結合特异性極廣 (Tapley, Korner et al. 2009)。本研究將克雷白氏肺炎桿菌 CG43 HdeA 單體疏水端與受質結合的第 44 個重要胺基酸突變後即顯著降低了其抗酸能力(圖十五)，顯示克雷白氏肺炎桿菌 CG43 HdeA 具有伴隨蛋白活性。

大腸桿菌中，RpoS 是常見的壓力反應調控蛋白，包括氧化壓力、高溫壓力、酸壓力等 (Battesti, Majdalani et al. 2011)；*rscB* 基因會影響抗酸島嶼之基因 *gadA* 以及 *gadX* 的表現 (Tramonti, De Canio et al. 2008)。在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 的抗酸能力研究顯示在震盪培養以及靜置培養的條件下 $\Delta rcsB$ 對細菌存活率皆有顯著影響；RcsB 在靜置培養的酸性環境下正向調控 *yfdX* (樊力成, 2012)，而 P_{hdeA} 、 $P_{hdeB2D1}$ 、 P_{hdeBD} 、 P_{hdeB1} 雖然都有預測到 *rscB* 結合位，實驗結果顯示在震盪培養

或靜置培養皆不會受到 RcsB、RpoS 調控(圖二十)，所以推測尚有其他如圖十七預測的調控因子參與調控，在 AFI-II 上的 P_{hdeA} 、 $P_{hdeB2D1}$ 皆預測到 Fnr 結合位，暗示 AFI-II 的可能在無氧環境下才有明顯功能。另外，在文獻中也有提到在大腸桿菌中 EvgA 會藉由調控 *ydeO* 活化 *hdeAB*(Masuda and Church 2003)；克雷白氏肺炎桿菌 CG43 的 *kvhA* 突變株也會降低其抗酸存活率，而 *yfdX* 啟動子及蛋白質之表現量也會降低(樊力成，2012)，此結果顯示 KvhA 的抗酸功能，可能經由調控 *yfdX*。然而，RcsB 與 KvhA 如何交互調控 *yfdX* 的表現進而影響細菌的抗酸反應，還有 P_{hdeA} 、 $P_{hdeB2D1}$ 是否由 KvhA、KvgA 或 KvgA1 調控尚待進一步探討。

在大腸桿菌中，Hns(histone-like nucleoid structuring)是一個類核關聯蛋白(nucleoid-associated protein)，是常見的調控蛋白，調控至少 250 個基因，其中大多是與環境壓力相關的細胞反應(Hommais, Krin et al. 2001)，主要的影響為 *hns* 基因缺損會使細菌失去鞭毛運動並增加抗酸能力(Bertin, Terao et al. 1994; Hommais, Krin et al. 2001)。H-NS 抑制許多抗酸反應基因導致抗細菌抗酸能力下降，其中包括 *hdeA*(HNS-dependent expression A)、*hdeB*(HNS-dependent expression B)和 *hdeD*(HNS-dependent expression D)(Hommais, Krin et al. 2001)。H-NS 也被發現會藉由抑制 *rscD* 間接調控 *rscB*。在克雷白氏肺炎桿菌中 *hns* 在抗酸能力上是否如大腸桿菌中扮演重要調控抗酸角色還需要進一步探討。

圖二十一綜合本實驗結果，克雷白氏肺炎桿菌 CG43 AFI-I 在此實驗分析條件下對抗酸能力的影響較顯著，而 AFI-II 抗酸作用的環境條件尚待探討；AFI-I 上的 *YfdX*、*HdeB* 與 AFI-II 上的 *HdeA* 基因產物具有伴隨蛋白活性，至於 HNS 是否參與調控 *hdeA* 的表現還需進一步研究。

五、參考文獻

1. 蔡雅雯 (2009) 克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中 RstA/RstB 雙分子訊息傳遞系統的特性分析，未出版碩士論文，國立交通大學，新竹市
2. 林志桓 (2009) RcsB 蛋白質在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中抗酸能力所扮演的角色，未出版碩士論文，國立交通大學，新竹市
3. 曾品瑄 (2011) HdeB、HdeB1、HdeD 蛋白質參與克雷白氏肺炎桿菌 CG43 抗酸反應的探討，未出版碩士論文，國立交通大學，新竹市
4. 樊力成 (2012) YfdX 在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 抗酸反應中所扮演的角色。未出版碩士論文，國立交通大學，新竹市
5. 彭冠男 (2013) 克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中 RcsFCDB 訊息傳遞所扮演的角色。未出版碩士論文，國立交通大學，新竹市
6. 鄭燕曦 (2013) 雙分子系統反應調節因子 RcsB 在克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中所扮演的角色，未出版碩士論文，國立交通大學，新竹市
7. 林芳瑜 (2013) 克雷白氏肺炎桿菌 CG43 全基因體解序、抗酸轉錄體分析與尿素酶基因群功能探討，未出版碩士論文，國立清華大學大學，新竹市
8. Alvarez-Ordenez, A., C. Cummins, et al. (2014). "Acid stress management by *Cronobacter sakazakii*." *Int J Food Microbiol* **178**: 21-28.
9. Amieva, M. R. and E. M. El-Omar (2008). "Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection." *Gastroenterology* **134**(1): 306-323.
10. Armalyte, J., V. Seputiene, et al. (2008). "An *Escherichia coli* *asr* mutant has decreased fitness during colonization in a mouse model." *Res Microbiol* **159**(6): 486-493.
11. Bang, I. S., J. P. Audia, et al. (2002). "Autoinduction of the *ompR* response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance

- response." Mol Microbiol **44**(5): 1235-1250.
12. Battesti, A., N. Majdalani, et al. (2011). "The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*." Annu Rev Microbiol **65**: 189-213.
 13. Bavaro, M. F. (2009). "*Escherichia coli* O157: what every internist and gastroenterologist should know." Curr Gastroenterol Rep **11**(4): 301-306.
 14. Bearson, B. L., L. Wilson, et al. (1998). "A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress." J Bacteriol **180**(9): 2409-2417.
 15. Bergholz, T. M., C. L. Tarr, et al. (2007). "Recent gene conversions between duplicated glutamate decarboxylase genes (*gadA* and *gadB*) in pathogenic *Escherichia coli*." Mol Biol Evol **24**(10): 2323-2333.
 16. Bertin, P., E. Terao, et al. (1994). "The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*." J Bacteriol **176**(17): 5537-5540.
 17. Boot, I. R., P. Cash, et al. (2002). "Sensing and adapting to acid stress." Antonie Van Leeuwenhoek **81**(1-4): 33-42.
 18. Cabeza, M. L., A. Aguirre, et al. (2007). "Induction of RpoS degradation by the two-component system regulator RstA in *Salmonella enterica*." J Bacteriol **189**(20): 7335-7342.
 19. Carter, M. Q., J. W. Louie, et al. (2012). "Evolutionary silence of the acid chaperone protein HdeB in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." Appl Environ Microbiol **78**(4): 1004-1014.
 20. Castanie-Cornet, M. P., T. A. Penfound, et al. (1999). "Control of acid resistance in *Escherichia coli*." J Bacteriol **181**(11): 3525-3535.
 21. Castanie-Cornet, M. P., H. Treffandier, et al. (2007). "The glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*: essential and dual role of the His-Asp phosphorelay RcsCDB/AF." Microbiology **153**(Pt 1): 238-246.

22. De Champs, C., M. P. Sauvant, et al. (1989). "Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae in an intensive care unit." J Clin Microbiol **27**(12): 2887-2890.
23. Eguchi, Y., T. Okada, et al. (2004). "Signal transduction cascade between EvgA/EvgS and PhoP/PhoQ two-component systems of *Escherichia coli*." J Bacteriol **186**(10): 3006-3014.
24. Foster, J. W. (1993). "The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins." J Bacteriol **175**(7): 1981-1987.
25. Foster, J. W. (2004). "*Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile." Nat Rev Microbiol **2**(11): 898-907. Gajiwala, K. S. and S. K. Burley (2000). "HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria." J Mol Biol **295**(3): 605-612.
26. Galperin, M. Y., R. Higdon, et al. (2010). "Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems." Mol Biosyst **6**(4): 721-728.
27. Gottesman, S., P. Trisler, et al. (1985). "Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes." J Bacteriol **162**(3): 1111-1119.
28. Hagan, C. L., S. Kim, et al. (2010). "Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components." Science **328**(5980): 890-892.
29. Hall, H. K. and J. W. Foster (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**(19): 5683-5691.
30. Hommais, F., E. Krin, et al. (2001). "Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein,

- H-NS." Mol Microbiol **40**(1): 20-36.
31. Hong, W., W. Jiao, et al. (2005). "Periplasmic protein HdeA exhibits chaperone-like activity exclusively within stomach pH range by transforming into disordered conformation." J Biol Chem **280**(29): 27029-27034.
32. Itou, J., Y. Eguchi, et al. (2009). "Molecular mechanism of transcriptional cascade initiated by the EvgS/EvgA system in *Escherichia coli* K-12." Biosci Biotechnol Biochem **73**(4): 870-878.
33. Kashiwagi, K., S. Miyamoto, et al. (1992). "Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the *potE* gene of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4529-4533.
34. Kern, R., A. Malki, et al. (2007). "*Escherichia coli* HdeB is an acid stress chaperone." J Bacteriol **189**(2): 603-610.
35. Kieboom, J. and T. Abee (2006). "Arginine-dependent acid resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*." J Bacteriol **188**(15): 5650-5653.
36. Krin, E., A. Danchin, et al. (2010). "Decrypting the H-NS-dependent regulatory cascade of acid stress resistance in *Escherichia coli*." BMC Microbiol **10**: 273.
37. Krin, E., A. Danchin, et al. (2010). "RcsB plays a central role in H-NS-dependent regulation of motility and acid stress resistance in *Escherichia coli*." Res Microbiol **161**(5): 363-371.
38. Lee, I. S., J. Lin, et al. (1995). "The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*." Mol Microbiol **17**(1): 155-167.
39. Lee, I. S., J. L. Slonczewski, et al. (1994). "A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **176**(5): 1422-1426.
40. Lin, J., I. S. Lee, et al. (1995). "Comparative analysis of extreme acid survival in

- Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*." J Bacteriol **177**(14): 4097-4104.
41. Ma, Z., N. Masuda, et al. (2004). "Characterization of EvgAS-YdeO-GadE branched regulatory circuit governing glutamate-dependent acid resistance in *Escherichia coli*." J Bacteriol **186**(21): 7378-7389.
 42. Malki, A., H. T. Le, et al. (2008). "Solubilization of protein aggregates by the acid stress chaperones HdeA and HdeB." J Biol Chem **283**(20): 13679-13687.
 43. Maroncle, N., C. Rich, et al. (2006). "The role of *Klebsiella pneumoniae* urease in intestinal colonization and resistance to gastrointestinal stress." Res Microbiol **157**(2): 184-193.
 44. Mascher, T., J. D. Helmann, et al. (2006). "Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases." Microbiol Mol Biol Rev **70**(4): 910-938.
 45. Masuda, N. and G. M. Church (2003). "Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **48**(3): 699-712.
 46. Mates, A. K., A. K. Sayed, et al. (2007). "Products of the *Escherichia coli* acid fitness island attenuate metabolite stress at extremely low pH and mediate a cell density-dependent acid resistance." J Bacteriol **189**(7): 2759-2768.
 47. Merdanovic, M., T. Clausen, et al. (2011). "Protein quality control in the bacterial periplasm." Annu Rev Microbiol **65**: 149-168.
 48. Merrell, D. S. and A. Camilli (1999). "The cadA gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance." Mol Microbiol **34**(4): 836-849.
 49. Moreau, P. L. (2007). "The lysine decarboxylase CadA protects *Escherichia coli* starved of phosphate against fermentation acids." J Bacteriol **189**(6): 2249-2261.
 50. Pflock, M., S. Kennard, et al. (2006). "Acid-responsive gene regulation in the human pathogen *Helicobacter pylori*." J Biotechnol **126**(1): 52-60.

51. Richard, H. and J. W. Foster (2004). "*Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential." J Bacteriol **186**(18): 6032-6041.
52. Rode, T. M., T. Moretro, et al. (2010). "Responses of *Staphylococcus aureus* exposed to HCl and organic acid stress." Can J Microbiol **56**(9): 777-792.
53. Schellhorn, H. E., J. P. Audia, et al. (1998). "Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli*." J Bacteriol **180**(23): 6283-6291.
54. Schirmer, T. (1998). "General and specific porins from bacterial outer membranes." J Struct Biol **121**(2): 101-109.
55. Schmid-Hempel, P. and S. A. Frank (2007). "Pathogenesis, virulence, and infective dose." PLoS Pathog **3**(10): 1372-1373.
56. Seputiene, V., D. Motiejunas, et al. (2003). "Molecular characterization of the acid-inducible *asr* gene of *Escherichia coli* and its role in acid stress response." J Bacteriol **185**(8): 2475-2484.
57. Seputiene, V., K. Suziedelis, et al. (2004). "Transcriptional analysis of the acid-inducible *asr* gene in enterobacteria." Res Microbiol **155**(7): 535-542.
58. Sklar, J. G., T. Wu, et al. (2007). "Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*." Genes Dev **21**(19): 2473-2484.
59. Skorupski, K. and R. K. Taylor (1996). "Positive selection vectors for allelic exchange." Gene **169**(1): 47-52.
60. Small, P., D. Blankenhorn, et al. (1994). "Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH." J Bacteriol **176**(6): 1729-1737.
61. Smith, J. L. (2003). "The role of gastric acid in preventing foodborne disease and

- how bacteria overcome acid conditions." J Food Prot **66**(7): 1292-1303.
62. Stock, A. M., V. L. Robinson, et al. (2000). "Two-component signal transduction." Annu Rev Biochem **69**: 183-215.
63. Su, L. H., T. L. Wu, et al. (2001). "Outbreaks of nosocomial bloodstream infections associated with multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric intensive care unit." Chang Gung Med J **24**(2): 103-113.
64. Suziedeliene, E., K. Suziedelis, et al. (1999). "The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: transcriptional control by the *phoBR* operon." J Bacteriol **181**(7): 2084-2093.
65. Tapley, T. L., T. M. Franzmann, et al. (2010). "Protein refolding by pH-triggered chaperone binding and release." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(3): 1071-1076.
66. Tapley, T. L., J. L. Korner, et al. (2009). "Structural plasticity of an acid-activated chaperone allows promiscuous substrate binding." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(14): 5557-5562.
67. Tramonti, A., M. De Canio, et al. (2008). "GadX/GadW-dependent regulation of the *Escherichia coli* acid fitness island: transcriptional control at the *gady-gadW* divergent promoters and identification of four novel 42 bp GadX/GadW-specific binding sites." Mol Microbiol **70**(4): 965-982.
68. Tsai, F. C., Y. T. Huang, et al. (2008). "Pyogenic liver abscess as endemic disease, Taiwan." Emerg Infect Dis **14**(10): 1592-1600.
69. Tucker, D. L., N. Tucker, et al. (2002). "Gene expression profiling of the pH response in *Escherichia coli*." J Bacteriol **184**(23): 6551-6558.
70. Valderas, M. W., R. B. Alcantara, et al. (2005). "Role of HdeA in acid resistance and virulence in *Brucella abortus* 2308." Vet Microbiol **107**(3-4): 307-312.
71. Volz, K. (1993). "Structural conservation in the CheY superfamily." Biochemistry **32**(44): 11741-11753.

72. Wang, W., T. Rasmussen, et al. (2012). "Salt bridges regulate both dimer formation and monomeric flexibility in HdeB and may have a role in periplasmic chaperone function." J Mol Biol **415**(3): 538-546.
73. Waterman, S. R. and P. L. Small (1996). "Identification of sigma S-dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*." Mol Microbiol **21**(5): 925-940.
74. Wu, Y. E., W. Hong, et al. (2008). "Conserved amphiphilic feature is essential for periplasmic chaperone HdeA to support acid resistance in enteric bacteria." Biochem J **412**(2): 389-397.
75. Yong, D., M. A. Toleman, 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**(12): 5046-5054.
76. Young, J. C., J. M. Barral, et al. (2003). "More than folding: localized functions of cytosolic chaperones." Trends Biochem Sci **28**(10): 541-547.
77. Zhang, M., S. Lin, et al. (2011). "A genetically incorporated crosslinker reveals chaperone cooperation in acid resistance." Nat Chem Biol **7**(10): 671-677.
78. Zhao, B. and W. A. Houry (2010). "Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria: an aptitude for survival." Biochem Cell Biol **88**(2): 301-314.

表一、Bacteria strains used in this study

Strains	Descriptions	Reference or source
<i>E. coli</i> :		
JM-109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR18 gyrA96rolA1 thiΔ(lac-proAB)</i>	Laboratory stock
S17-1	<i>recA thi pro hsdR⁻M⁺[RP4-2-Tc::Mu:Km^RTn7](pir)</i>	De Lorenzo et al., 1994
<i>K. pneumoniae</i> :		
CG43	clinical isolate of K2 serotype	Laboratory stock
CG43S3	<i>rspL</i> mutant, Sm ^R	Laboratory stock
NTUHS3	clinical isolate of K1 serotype	Laboratory stock
Z01	<i>lacZ</i> deletion mutant derived from CG43S3	Laboratory stock
Z01Δ <i>rcsB</i>	<i>rcsB</i> deletion in Z01, Sm ^R	Laboratory stock
Z02Δ <i>rpoS</i>	<i>rpoS</i> deletion in Z01, Sm ^R	Laboratory stock
CG43S3Δ <i>hdeB</i>	<i>hdeB</i> deletion in CG43S3, Sm ^R	Laboratory stock
CG43S3Δ <i>hdeB1</i>	<i>hdeB1</i> deletion in CG43S3, Sm ^R	Laboratory stock
CG43S3Δ <i>hdeD</i>	<i>hdeD</i> deletion in CG43S3, Sm ^R	Laboratory stock
CG43S3Δ <i>rcsB</i>	<i>rcsB</i> deletion in CG43S3, Sm ^R	Laboratory stock
CG43S3Δ <i>yfdX</i>	<i>yfdX</i> deletion in CG43S3, Sm ^R	Laboratory stock
CG43S3Δ <i>hdeA</i>	<i>hdeA</i> deletion in CG43S3, Sm ^R	This study
CG43S3Δ <i>hdeB2</i>	<i>hdeB2</i> deletion in CG43S3, Sm ^R	This study
CG43S3Δ <i>hdeB2D1</i>	<i>hdeB2D1</i> deletion in CG43S3, Sm ^R	This study
CG43S3Δ <i>kvgA1</i>	<i>kvgA1</i> deletion in CG43S3, Sm ^R	This study
CG43S3Δ <i>hdeD</i> Δ <i>hdeD1</i>	<i>hdeD</i> and <i>hdeD1</i> deletion in CG43S3	This study

表二、Plasmid used in this study

Plasmid	Relevant characteristic	Source or reference
yT&A	PCR cloning vector, Ap ^R	Yeastern Biotech Co.
pKAS46	Suicide vector, <i>rspL</i> , Ap ^R , Km ^R	Skorupski and Taylor, 1996
pRK415	Broad-host-range IncP plasmid, Tc ^R	Keen et al., 1998
pET30a	overexpression of His6 fusion protein, Km ^R	Novagen
pRK415- <i>yfdX</i>	<i>yfdX</i> complement plasmid, Tc ^R	Chih-Huan Lin
pRK415- <i>hdeB</i>	<i>hdeB</i> complement plasmid, Tc ^R	Pin-Shuan Tzeng
pRK415- <i>hdeD</i>	<i>hdeD</i> complement plasmid, Tc ^R	Pin-Shuan Tzeng
pRK415- <i>hdeA</i>	<i>hdeA</i> complement plasmid, Tc ^R	This study
pRK415- <i>hdeB2D1</i>	<i>hdeB2D1</i> complement plasmid, Tc ^R	This study
pRK415- <i>hdeA F44A</i>	<i>hdeA F44A</i> complement plasmid, Tc ^R	This study
pRK415- <i>rcsB</i>	<i>rcsB</i> complement plasmid, Tc ^R	yenxi tay
pRK415- <i>rcsB-D56E</i>	<i>rcsB</i> D56E complement plasmid, Tc ^R	yenxi tay
pRK415- <i>rcsB-D56A</i>	<i>rcsB</i> D56A complement plasmid, Tc ^R	yenxi tay
pLacZ15	A derivative of pYC016, containing a promoterless <i>LacZ</i> from <i>K. pneumoniae</i> CG43S3, Cm ^R	
Py <i>yfdX</i>	417 bp PCR product carrying putative <i>yfdX</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^R	Chih-Huan Lin
ph <i>deBD</i>	417 bp PCR product carrying putative <i>yfdX</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^R	Chih-Huan Lin
ph <i>deB1</i>	409 bp PCR product carrying putative <i>yfdX</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^R	Chih-Huan Lin
ph <i>deA</i>	441 bp PCR product carrying putative <i>yfdX</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^R	This study
ph <i>deB2D1</i>	579 bp PCR product carrying putative <i>yfdX</i> promoter cloned into pLacZ15, Cm ^R	This study
pKAS46- <i>hdeA</i> (A+B)	1034 bp fragment of upstream and 1095 bp fragment of downstream region of <i>hdeA</i> cloned into pKAS46, Km ^R Ap ^R	This study
pKAS46- <i>hdeB2</i> (A+B)	1144 bp fragment of upstream and 1088 bp fragment of downstream region of <i>hdeA</i> cloned into pKAS46, Km ^R Ap ^R	This study
pKAS46- <i>hdeB2D1</i> (A+B)	983 bp fragment of upstream and 1035 bp fragment of downstream region of <i>hdeA</i> cloned into pKAS46,	This study

	Km ^R Ap ^R	
pKAS46-kvgA1(A+B)	1037 bp fragment of upstream and 1095 bp fragment of downstream region of <i>hdeA</i> cloned into pKAS46, Km ^R Ap ^R	This study
pET30a-hdeA	<i>Bam</i> HI/ <i>Hin</i> DIII-DNA from yT&A-HdeB2D1(pET30A) subcloned into pET30a, Km ^R	This study
pET30a-hdeB2D1	<i>Bam</i> HI/ <i>Hin</i> DIII-DNA from yT&A-HdeA(pET30A) subcloned into pET30a, Km ^R	This study

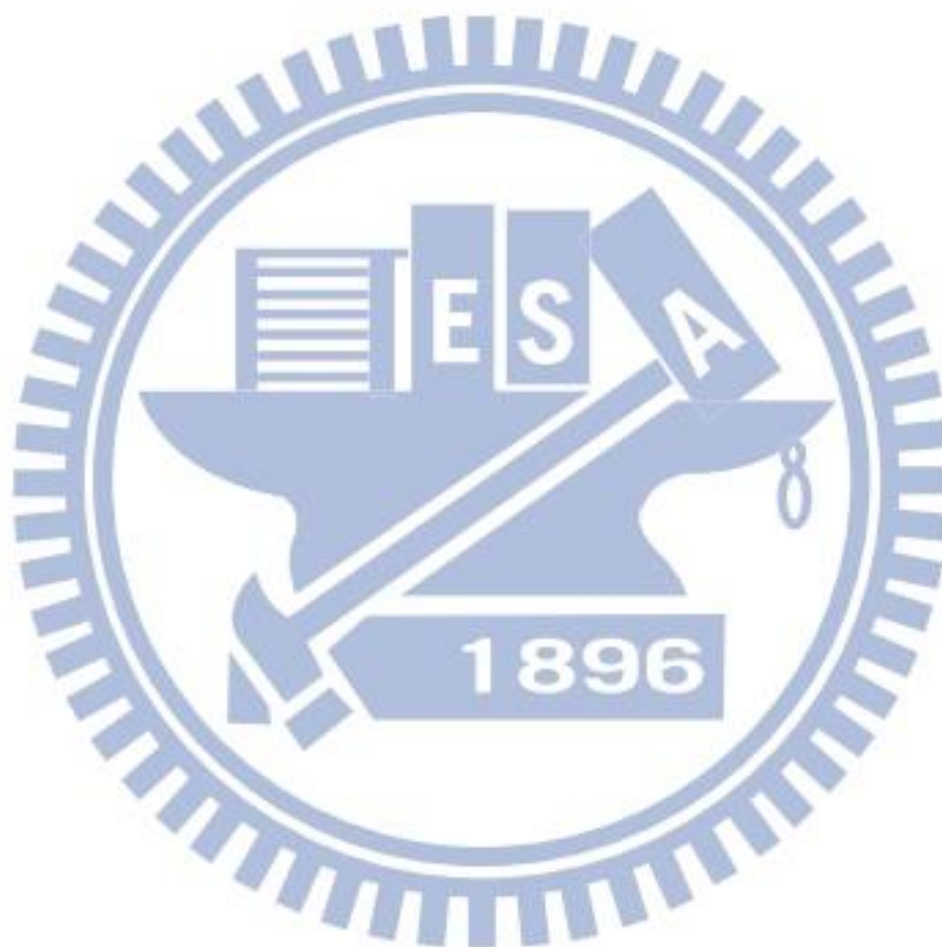


表三、Primers used in this study

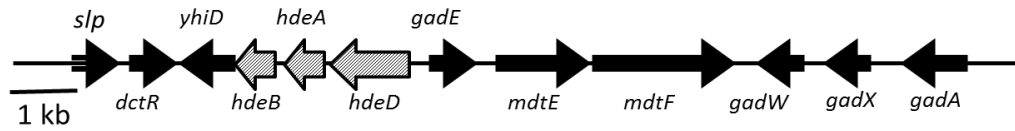
Primer	Sequence(5' to 3')	Company
HdeA-A(+)	ATGAATTCGGGGTGCTATGGGTAAC	生工
HdeA-A(-)	ATGGTACCTCGTGCTGAATGGGA	生工
HdeA-B(+)	ATGGTACCGTGCGCCGATGG	生工
HdeA-B(-)	ATTCTAGAGCGTCACTGGGCGGATA	生工
HdeA-check(+)	AACGCACATTTAACCCCTTTTCGCA	生工
HdeA-check(-)	ATTACGCTGTGCTGATTTTGACCTTC	生工
HdeB2-A(+)	GAATTCCTTACCTGTCGGCTGGC	生工
HdeB2-A(-)	GAGCTCCATGATGTTTTCTGTTG	生工
HdeB2-B(+)	GAGCTCATCCTGCGCAGTTTATTCT	生工
HdeB2-B(-)	GATATCACTCCCCATTTCCGCCAGC	生工
HdeB2-check(+)	TAAAGATCGGGCTATGAAGGGTCGTT	生工
HdeB2-check(-)	AGAGTGGATACCCGCATGAGTCAT	生工
pET30a-HdeA(+)	GGATCCATGAAAGTTAAATCATTGGTTTTTGGT	生工
pET30a-HdeA(-)	AAGCTTATTCCCCTGGGATTAATAGATTTCCCTTTT	生工
pET30a-HdeB2(+)	GGATCCATGAAAAAATTATCCACTCTGTTTCTCA	生工
pET30a-HdeB2(-)	AAGCTTTTATCGAATATCATTACCCATTGCAT	生工
pRK415 HdeA(+)	TGGATCCGAATAGCTTAACTCTATCGTAAATCGC	生工
pRK415 HdeA(-)	TGGTACCATTGTGGCATTCCCCTGG	生工
pRK415 HdeB2(+)	TGGATCCCTTAATGCTTGTCATCTATCAGGCC	生工
pRK415 HdeB2(-)	TGAATTCGCGCAGGATTATCGAATATCATTCC	生工
HdeD1-A(+)	TGAATTCCTTGCGGTTCGCTGTTTCTT	IDT
HdeD1-A(-)	TTCTAGAGAATATCAATGCCATCGCCACAGA	IDT
HdeD1-B(+)	TTCTAGAATCCTGCGCAGTTTATTCTTTTCTGC	IDT
HdeD1-B(-)	TGATATCGCAGTAAACCAGAAGTGTCCAGAAGGT	IDT
HdeD1-check(+)	CATACTACAATCGTTGCCGTCCCCGC	IDT
HDeD1-check(-)	CCGCATGAGTCATACCCATCCTACTGGT	IDT
KvgA1-A(+)	TGAATTCAGCTGAACCTCATGCTGGAT	IDT
KvgA1-A(-)	TGGTACCAAATCGGATAATGCGATGTGC	IDT
KvgA1-B(+)	TGGTACCGCTTAAATTTGCCGTTTTACTCA	IDT
KvgA1-B(-)	TTCTAGACATTGCGTTGTGCAAGATACCCC	IDT
KvgA1-check(+)	CCTACACGGGAACATGAAGGCATCGTT	IDT
KvgA1-check(-)	TGCAGGTTAATTCTTACGTGTGTAATCCCAGTG	IDT
HdeA F44A(+)	CTGCCGTAGGCTGAGCATCTTCATTTACC	IDT
HdeA F44A(-)	GGTAAATGAAGATGCTCAGCCTACGGCAG	IDT
lacZ-HdeA(-)	TAGATCTCCGATGGCACCAAAAACCAATG	IDT

lacZ-HdeB2D1(-)	<u>TAGATCT</u> ATGAATATCAATGCCATCGCCACAGA	IDT
lacZ-KvgA1(+)	T <u>GGATCCT</u> CATGATGAATCTTATTCCATTCGT	IDT
lacZ-KvgA1(-)	<u>TAGATCT</u> AATAATCGCGCTTAAATTTGCCGTTTT	IDT

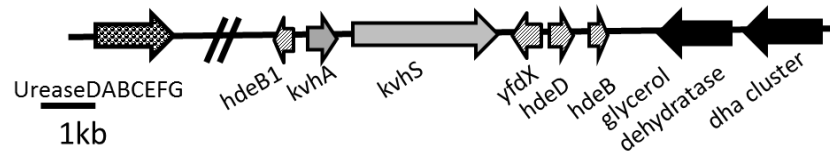
* 標示底線為酵切位



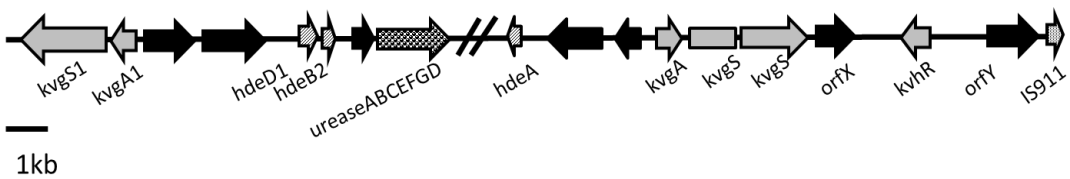
(A) *E.coli* AFI



(B) KP CG43 AFI-I

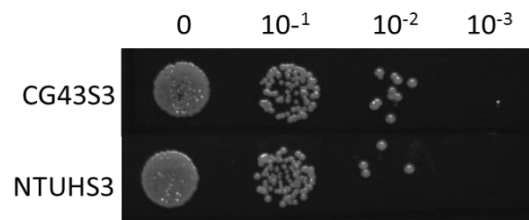


KP CG43 AFI-II

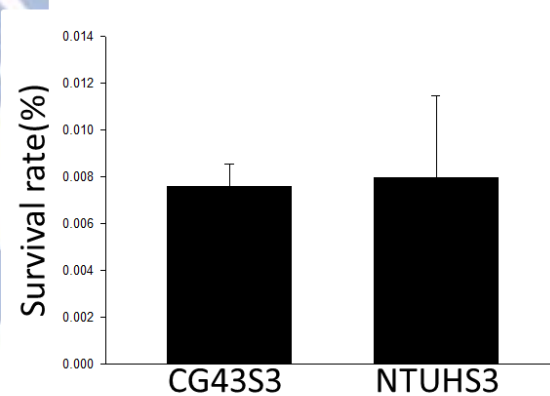


圖一、(A)大腸桿菌 AFI(B)克雷白氏肺炎桿菌 CG43 AFI-I 與 AFI-II 的基因組

(A)

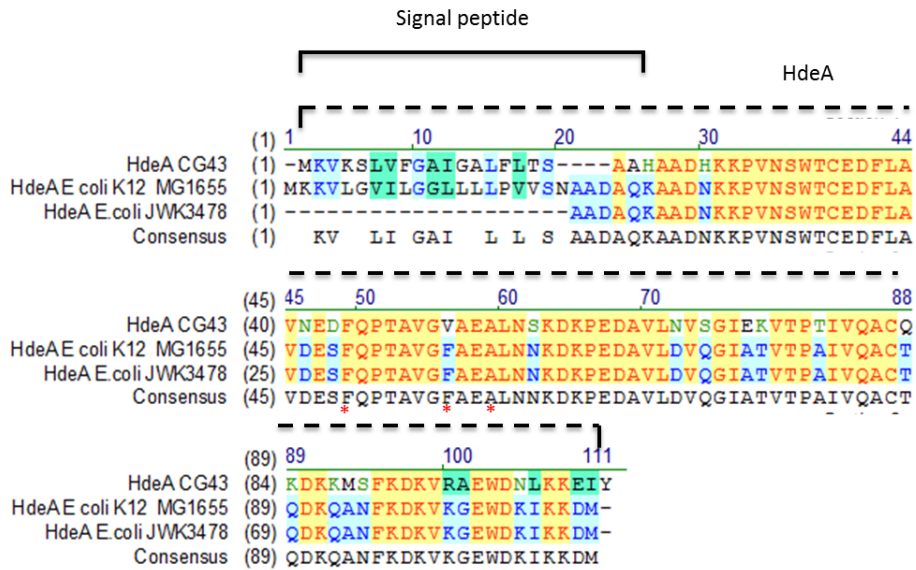


(B)



圖二、克雷白氏肺炎桿菌 CG43 與 NTUH K2044 抗酸能力分析

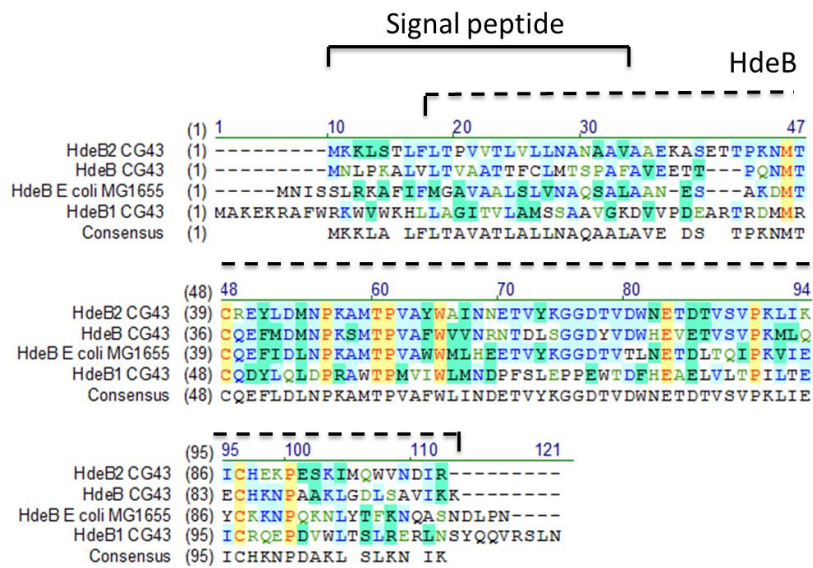
細菌在 LB 培養液隔夜培養後，稀釋 20 倍至新鮮的 LB 培養液中，在培養 2 個小時至 OD₆₀₀ 約為 0.6~0.8，之後將菌體移至 pH4.4 的 LB 培養液中，適應 1 小時後，再移至 pH2.5 的 M9 培養液中，培養 40 分鐘後，序列稀釋後取 5 μl 滴盤分析(A)，取 100 μl 塗盤計算菌數(B)；存活率是根據 40 分鐘後，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。



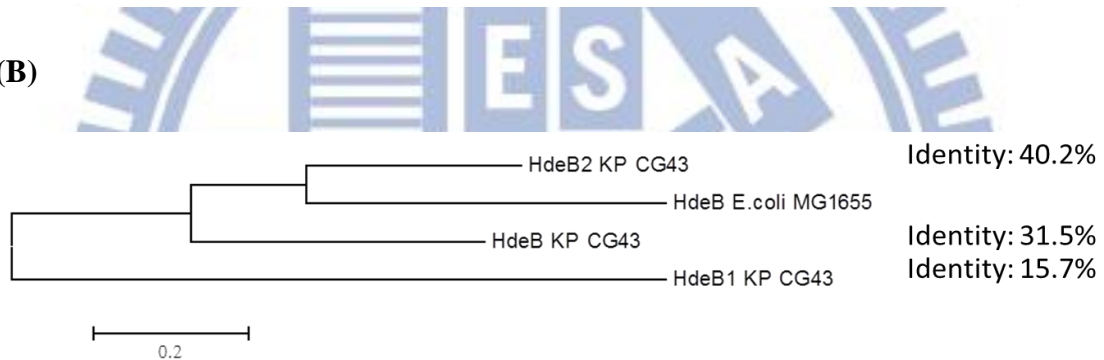
圖三、HdeA 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測

將胺基酸序列放入 Vector NTI 軟體中比對。較深顏色的字母為此四株菌種不同的胺基酸位置。蛋白質功能區域預測是利用 InterProScan 線上網站預測的結果；實線框的胺基酸位置為訊息序列；虛線框的胺基酸位置為 HdeA；*號為 HdeA 伴隨蛋白的疏水端與受質結合位置。

(A)



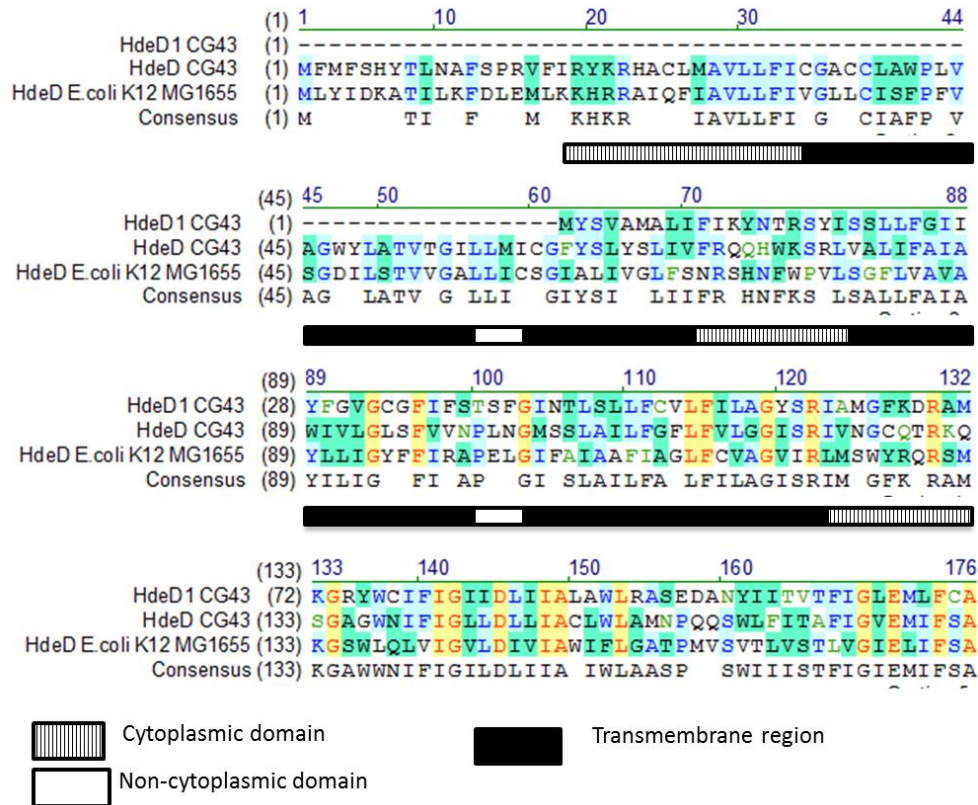
(B)



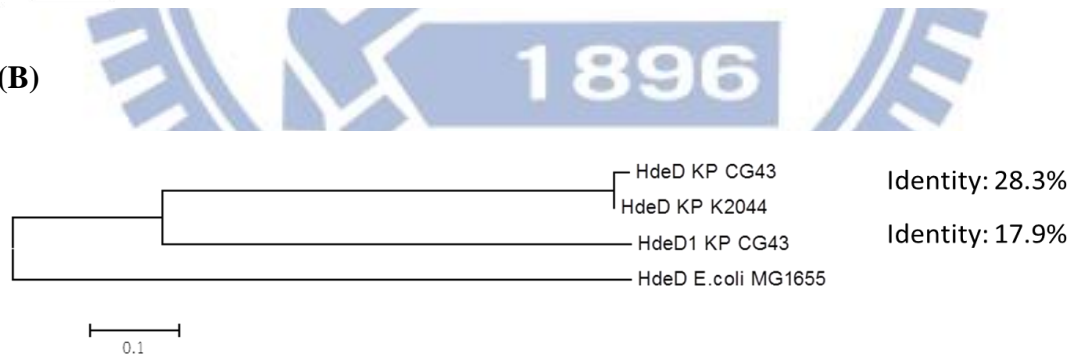
圖四、HdeB 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測

(A)將胺基酸序列放入 Vector NTI 軟體中比對。較深顏色的字母為此四株菌種不同的胺基酸位置。蛋白質功能區域預測是利用 InterProScan 線上網站預測的結果；實線框的胺基酸位置為訊息序列；虛線框的胺基酸位置為 HdeB；(B)將胺基酸序列放入 Mega4 軟體中比對產生的胺基酸比對關係圖。右邊數字(%)分別為 HdeB CG43、HdeB1 CG43、HdeB2 CG43 與 HdeB E coli MG1655 的胺基酸相似度

(A)



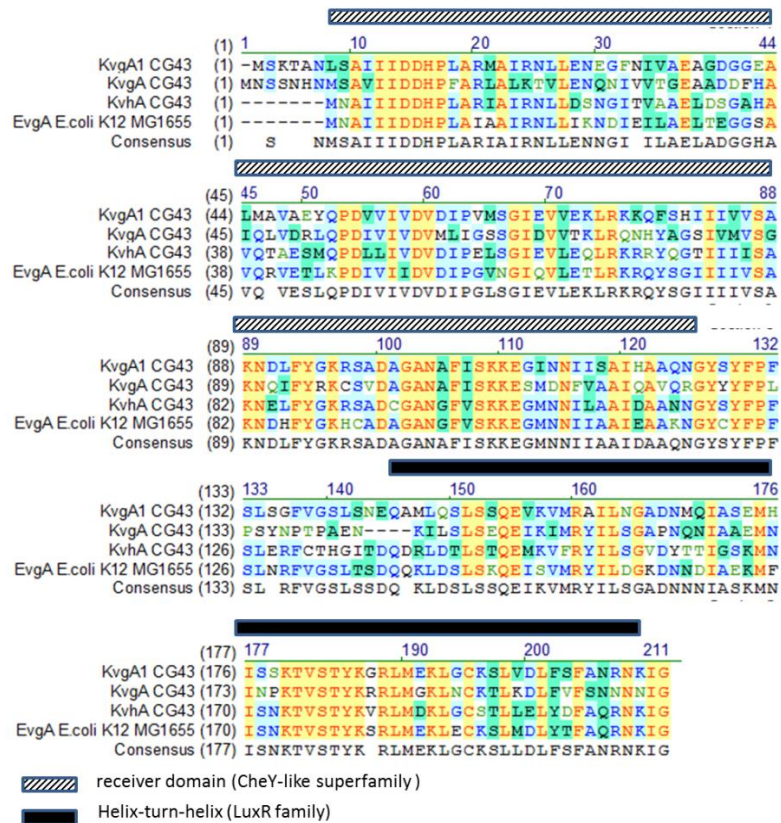
(B)



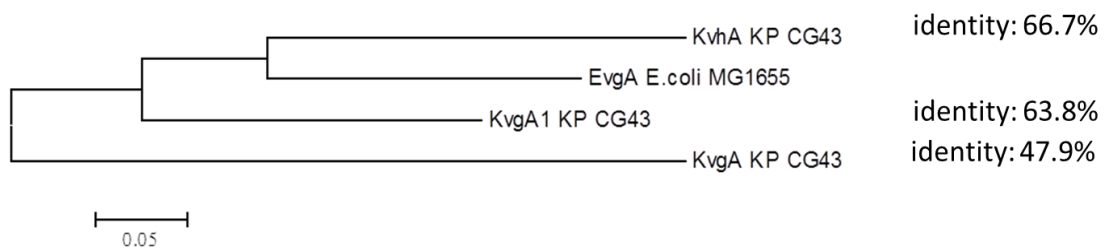
圖五、HdeD 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測

(A)將胺基酸序列放入 Vector NTI 軟體中比對。較深顏色的字母為此四株菌種不同的胺基酸位置。蛋白質功能區域預測是利用 InterProScan 線上網站預測的結果；條紋區域為細胞質區域、黑色區域為穿膜結構、白色區域為非細胞質區域(B)將胺基酸序列放入 Mega4 軟體中比對產生的胺基酸比對關係圖。右邊數字(%)分別為 HdeD CG43、HdeD1 CG43 與 HdeD E coli K12 MG1655 的胺基酸相似度

(A)

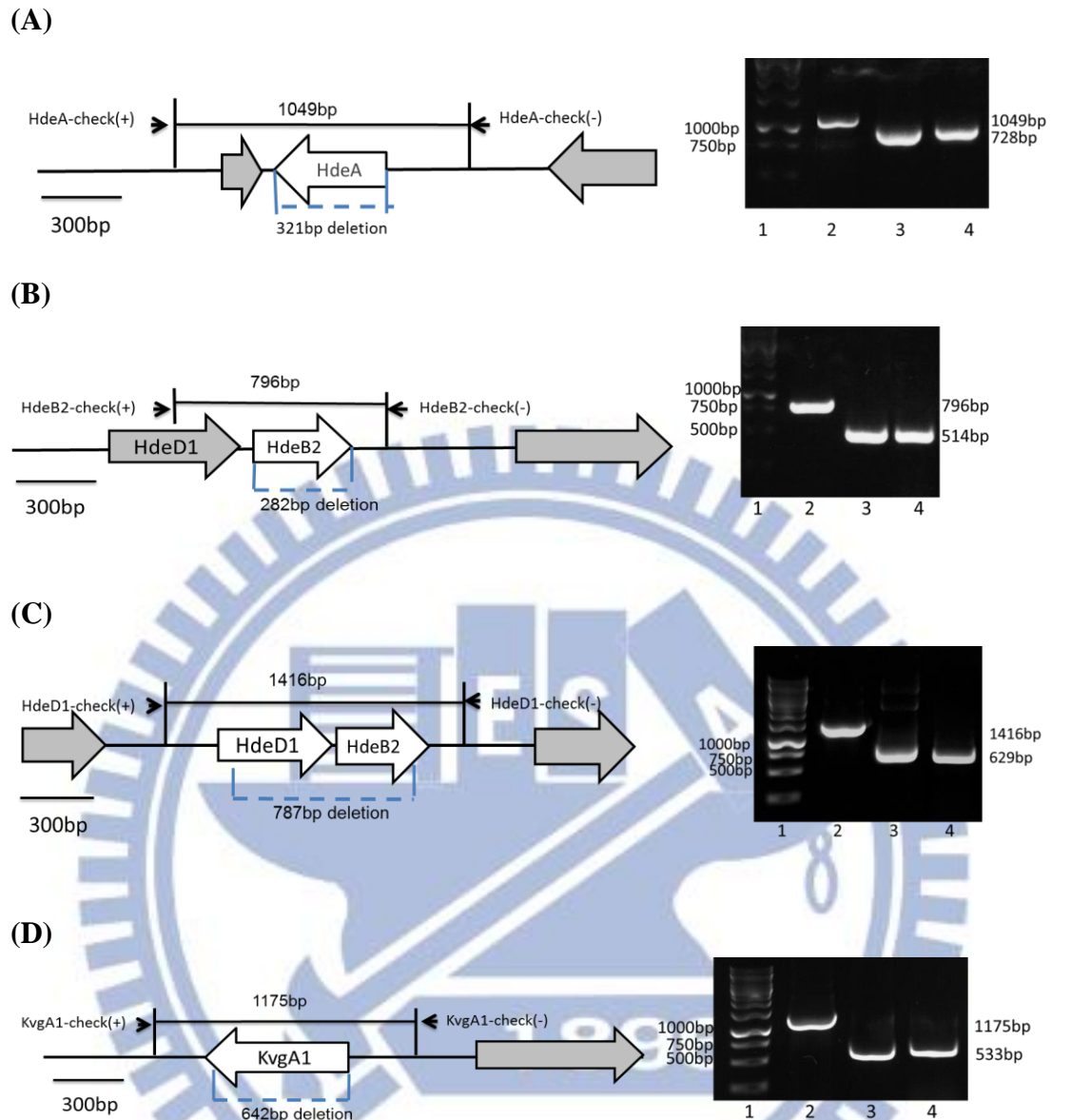


(B)



圖六、KvgA 胺基酸序列分析與蛋白質功能區域預測

(A)將胺基酸序列放入 Vector NTI 軟體中比對。較深顏色的字母為此四株菌種不同的胺基酸位置。蛋白質功能區域預測是利用 InterProScan 線上網站預測的結果；條紋區域為接收區域、黑色區域為 DNA 結合區、白色區域為非細胞質區(B) 將胺基酸序列放入 Mega4 軟體中比對產生的胺基酸比對關係圖。右邊數字(%)分別為 KvgA CG43、KvgA1 CG43、KvhA CG43 與 EvgA *E. coli* K12 MG1655 的胺基酸相似度

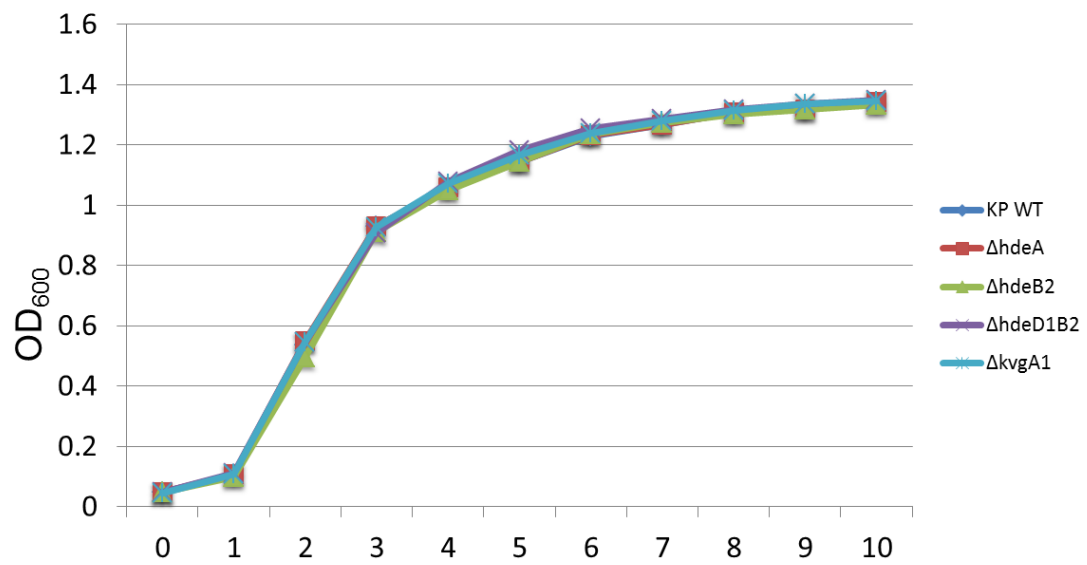


圖七、克雷白氏肺炎桿菌 CG43 中構建 *hdeA*、*hdeB2*、*hdeB2D1*、*kvgA1* 基因缺損突變株

(A)左為 *hdeA* 及兩側基因示意圖，箭頭為引子 HdeA-check(+)/HdeA-check(-)用來確認 $\Delta hdeA$ 突變株的引子；虛線部分表示基因缺損位置。右為 PCR 確認 $\Delta hdeA$ 突變株。1:DNA 分子大小標記物，2:WT 野生行菌株，3:帶有突變片段的 pKAS46 載體，4: $\Delta hdeA$ 突變株(B)左為 *hdeB2* 及兩側基因示意圖，箭頭為引子 HdeB2-check(+)/HdeB2-check(-)用來確認 $\Delta hdeB2$ 突變株的引子；虛線部分表示基因缺損位置。右為 PCR 確認 $\Delta hdeB2$ 突變株。1:DNA 分子大小標記物，2:WT 野生行菌株，3:帶有突變片段的 pKAS46 載體，4: $\Delta hdeB2$ 突變株(C)左為

hdeB2D1 及兩側基因示意圖，箭頭為引子 HdeB2D1-check(+)/HdeB2D1-check(-) 用來確認 $\Delta hdeB2D1$ 突變株的引子；虛線部分表示基因缺損位置。右為 PCR 確認 $\Delta hdeB2D1$ 突變株。1：DNA 分子大小標記物，2：WT 野生行菌株，3：帶有突變片段的 pKAS46 載體，4： $\Delta hdeB2D1$ 突變株(D)左為 *kvgA1* 及兩側基因示意圖，箭頭為引子 KvgA1-check(+)/KvgA1-check(-) 用來確認 $\Delta kvgA1$ 突變株的引子；虛線部分表示基因缺損位置。右為 PCR 原理確認 $\Delta kvgA1$ 突變株。1：DNA 分子大小標記物，2：WT 野生行菌株，3：帶有突變片段的 pKAS46 載體，4： $\Delta kvgA1$ 突變株。

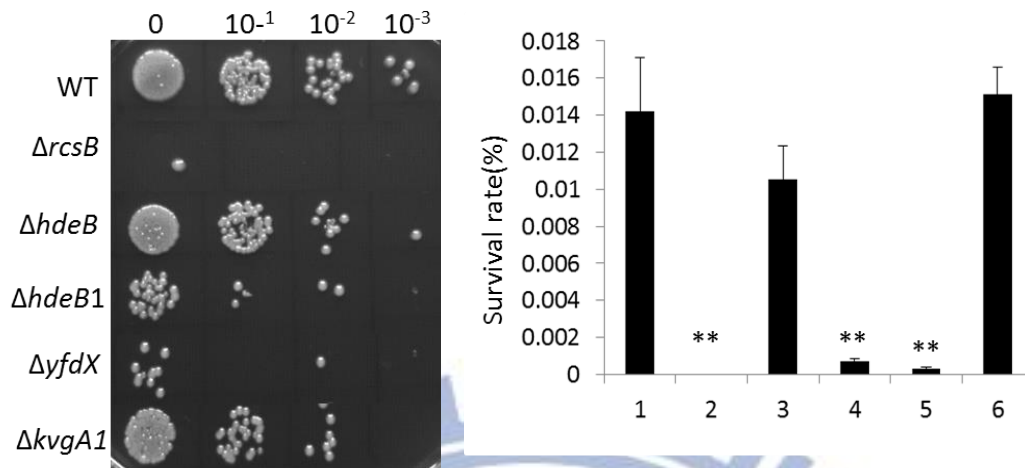




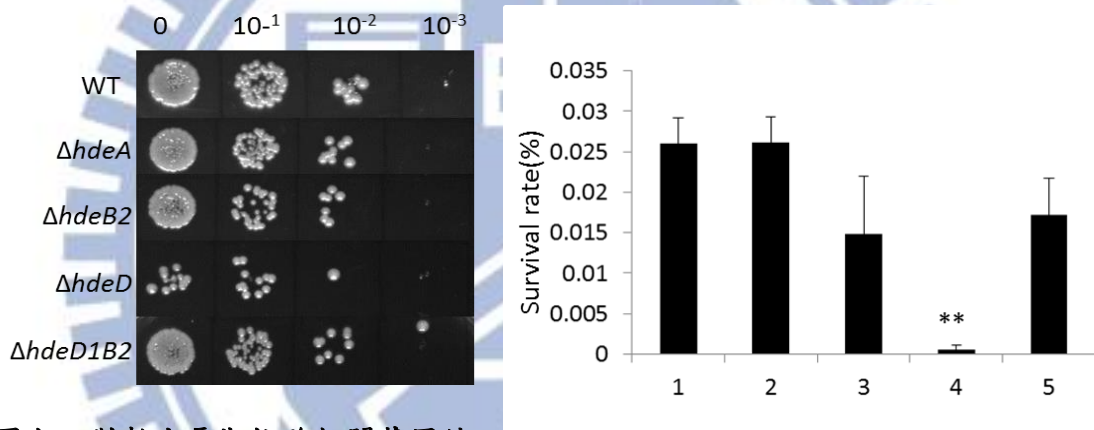
圖八、*hdeA*、*hdeB2*、*hdeB2D1* 和 *kvgA1* 基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌 CG43 生長曲線的影響

細菌在 LB 培養液中隔夜培養後，取 20 μ l 菌液至 4 ml LB 中，再置於 37°C 培養，每隔 1 小時測量其波長 600 nm 下吸光值。

(A)



(B)

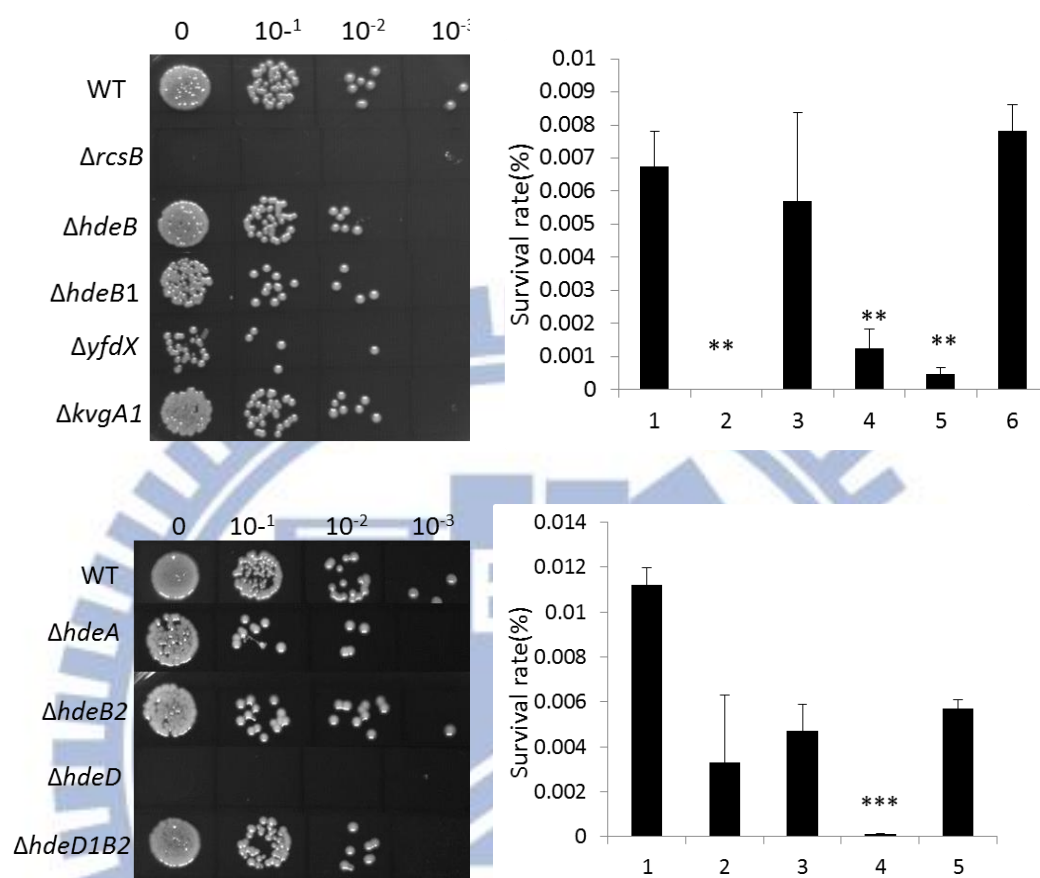


圖九、對數生長期抗酸相關基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌 CG43 抗酸能力的影響

細菌在 LB 培養液隔夜培養後，稀釋 20 倍至新鮮的 LB 培養液中，在培養 2 個小時至 OD_{600} 約為 0.6，之後將菌體移至 pH4.4 的 LB 培養液中，適應 1 小時後，再移至 pH2.5 的 M9 培養液中，培養 40 分鐘後，左：序列稀釋後取 5 μ l 滴盤分析，右：取 100 μ l 塗盤計算菌數；存活率是根據 40 分鐘後，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。

* : p value < 0.05 、** : p value < 0.01 、*** : p value < 0.001

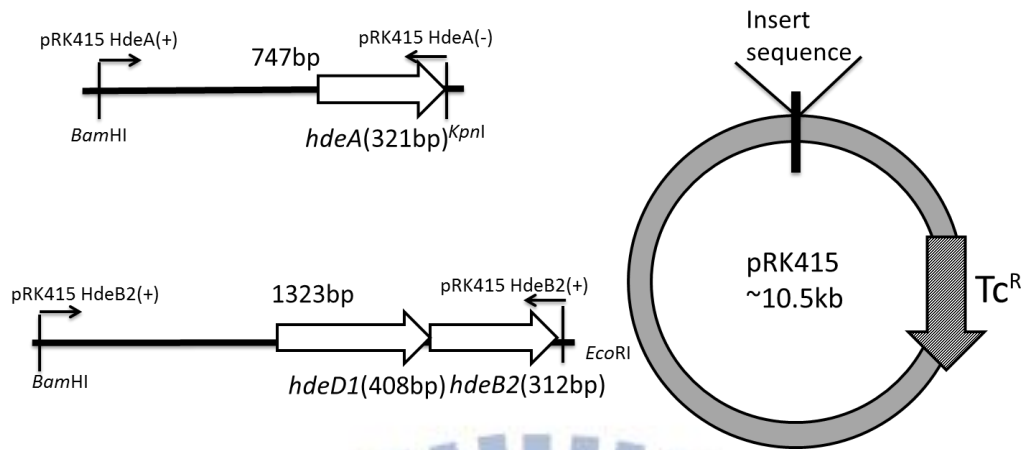
(A)



圖十、穩定生長期抗酸相關基因缺損對克雷白氏肺炎桿菌 CG43 抗酸能力的影響

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，在培養 2 個小時至 OD_{600} 約為 0.85，之後將菌體移至 pH4.4 的 LB 培養液中，適應 1 小時後，再移至 pH2.5 的 M9 培養液中，培養 40 分鐘後，左：序列稀釋後取 5 μ l 滴盤分析，右：取 100 μ l 塗盤計算菌數；存活率是根據 40 分鐘後，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。

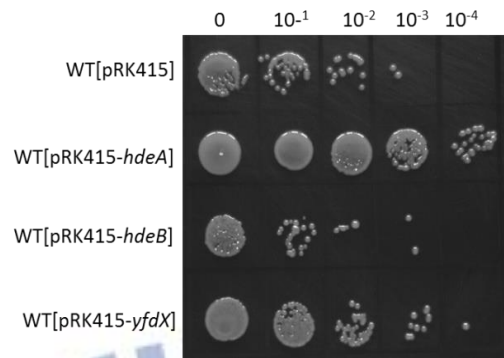
* : p value < 0.05 、 ** : p value < 0.01 、 *** : p value < 0.001



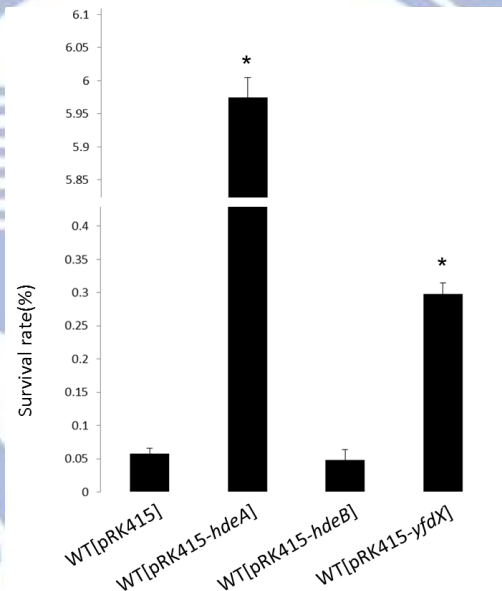
圖十一、基因回補質體(pRK415)建構

箭頭為引子 pRK415-HdeA(+)/pRK415-HdeA(-)、
 pRK415-HdeB2(+)/pRK415-HdeB2(-)。hdeA 回補 DNA 片段大小為 747 個鹼基對；
 hdeB2D1 回補 DNA 片段大小為 1323 個鹼基對。

(A)



(B)

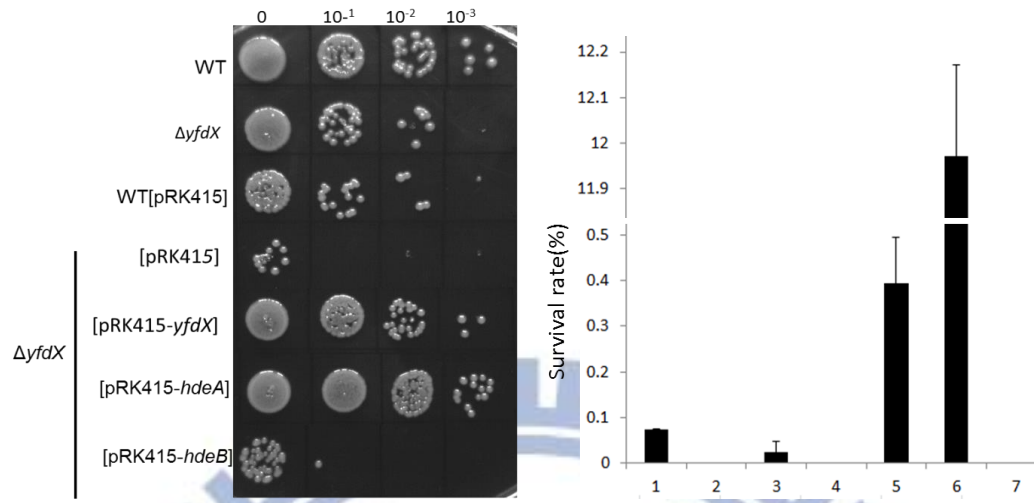


圖十二、CG43S3 表現 *hdeA*、*hdeB* 和 *yfdX* 的抗酸能力分析

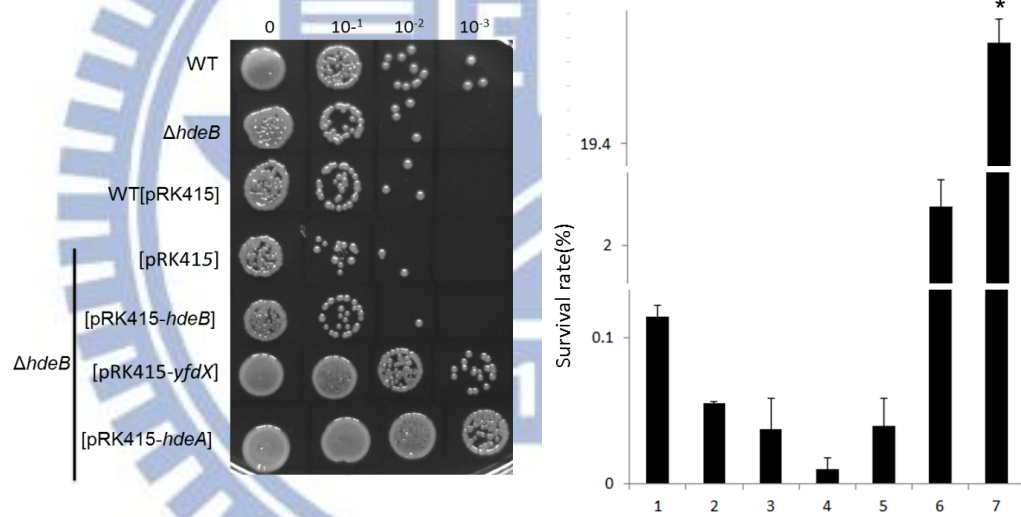
以接合作用將回補質體送入野生株中再進行抗酸能力分析。細菌在 LB 培養液隔夜培養後，稀釋 20 倍至新鮮的 LB 培養液中，在培養 2 個小時至 OD₆₀₀ 約為 0.85，之後將菌體移至 pH4.4 的 LB 培養液中，適應 1 小時後，再移至 pH2.5 的 M9 培養液中，培養 35 分鐘後，(A) 序列稀釋後取 5 μ l 滴盤分析與 (B) 100 μ l 塗盤計算菌數；存活率是根據 35 分鐘後，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。

* : p value < 0.05、** : p value < 0.01、*** : p value < 0.001

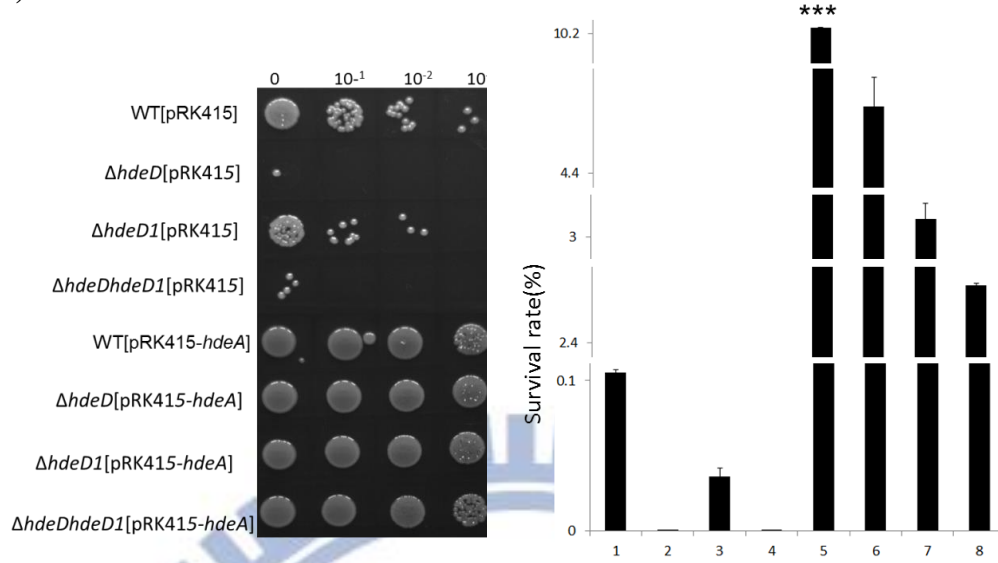
(A)



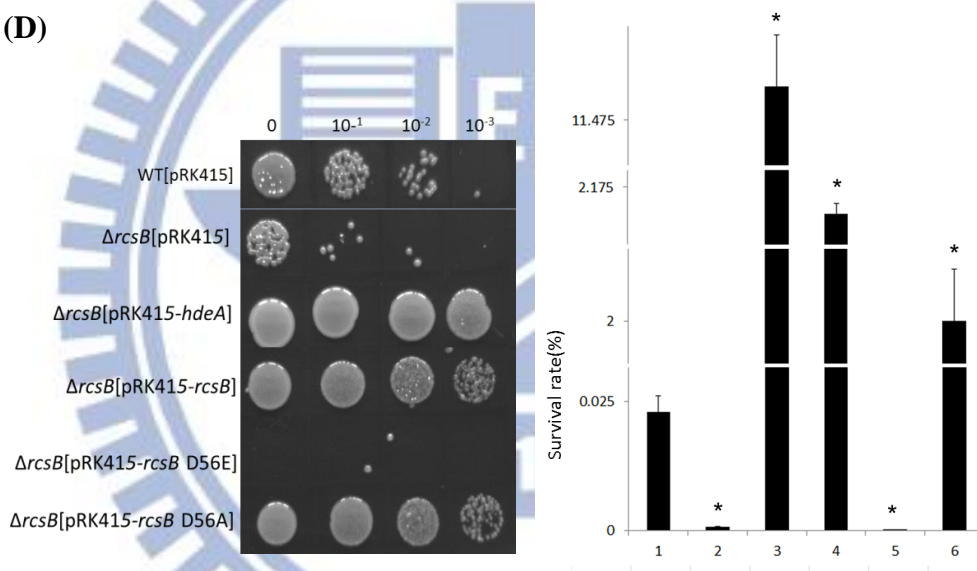
(B)



(C)



(D)

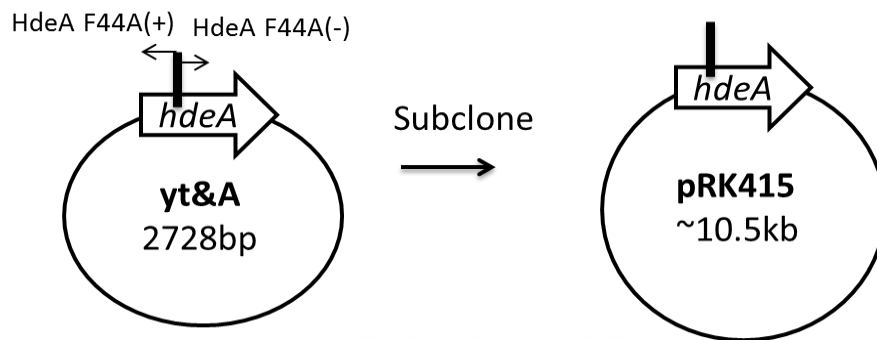


圖十三、Trans-complementation 分析 HdeA 的伴隨蛋白活性

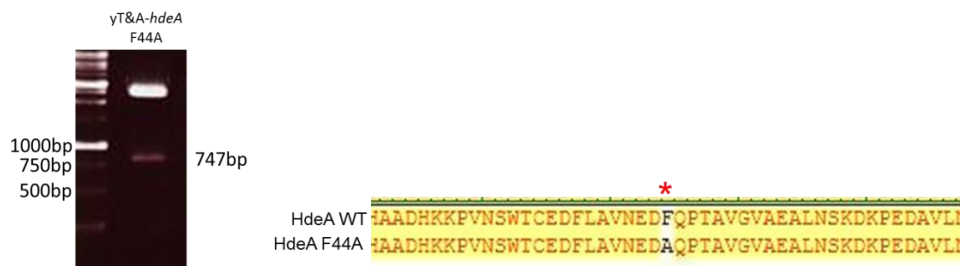
以接合作用將質體送入野生株中再進行抗酸能力分析。細菌在 LB 培養液隔夜培養後，稀釋 20 倍至新鮮的 LB 培養液中，在培養 2 個小時至 OD₆₀₀ 約為 0.85，之後將菌體移至 pH4.4 的 LB 培養液中，適應 1 小時後，再移至 pH2.5 的 M9 培養液中，培養 35 分鐘後，序列稀釋後取 5 μl 滴盤分析與 100 μl 塗盤計算菌數；存活率是根據 35 分鐘後，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。

* : p value < 0.05 、** : p value < 0.01 、*** : p value < 0.001

(A)



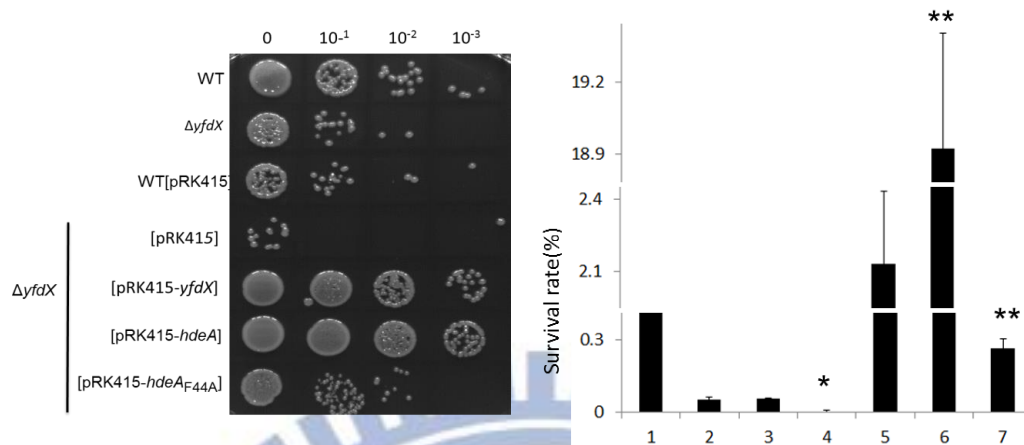
(B)



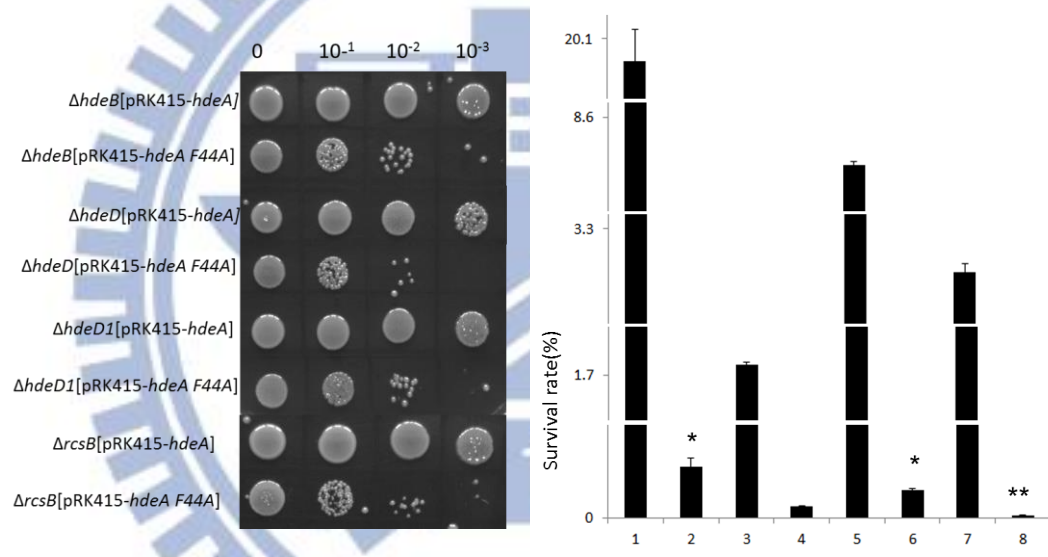
圖十四、HdeA 苯丙胺酸 44(phenylalanine44)點突變建構

(A)利用 yT&A-HdeA(pRK415)當作模板，設計引子 HdeA F44A(+)/HdeA F44A(-)，PCR 增幅後，將片段切下電穿孔至 *E.coli* JM109，抽質體切下並黏合至回補質體 pRK415 (B)抽質體切下正確的片段與送定序成功突變的序列結果。

(A)



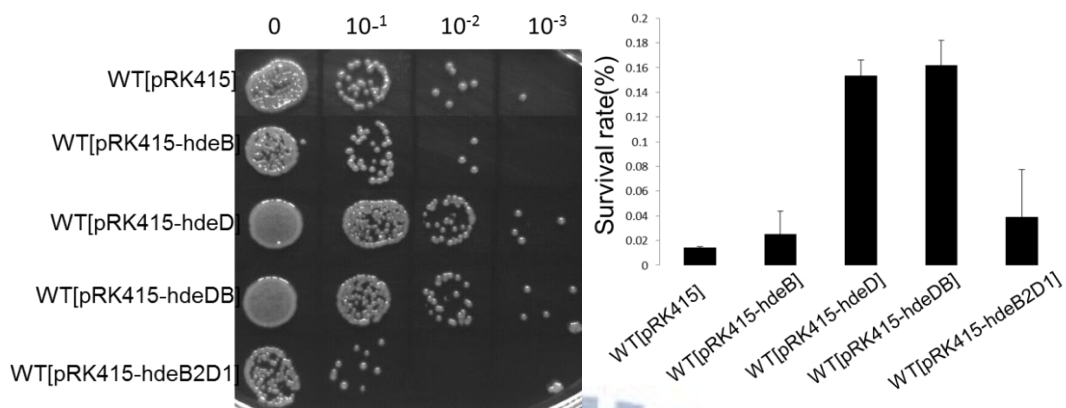
(B)



圖十五、苯丙胺酸 44 點突變對於 HdeA 伴隨蛋白活性的影響

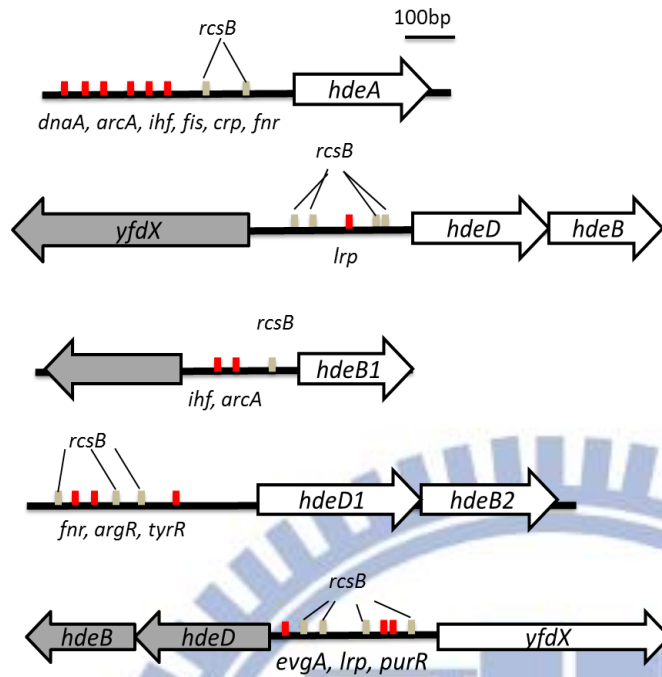
以接合作用將質體送入野生株中再進行抗酸能力分析。細菌在 LB 培養液隔夜培養後，稀釋 20 倍至新鮮的 LB 培養液中，在培養 2 個小時至 OD₆₀₀ 約為 0.85，之後將菌體移至 pH4.4 的 LB 培養液中，適應 1 小時後，再移至 pH2.5 的 M9 培養液中，培養 35 分鐘後，序列稀釋後取 5μl 滴盤分析與 100μl 塗盤計算菌數；存活率是根據 35 分鐘後，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。

* : p value < 0.05 、 ** : p value < 0.01 、 *** : p value < 0.001



圖十六、CG43S3 表現 *hdeB*、*hdeD* 和 *hdeBD* 的抗酸能力分析

以接合作用將質體送入野生株中再進行抗酸能力分析。細菌在 LB 培養液隔夜培養後，稀釋 20 倍至新鮮的 LB 培養液中，在培養 2 個小時至 OD600 約為 0.85，之後將菌體移至 pH4.4 的 LB 培養液中，適應 1 小時後，再移至 pH2.5 的 M9 培養液中，培養 35 分鐘後，序列稀釋後取 5 μ l 滴盤分析與 100 μ l 塗盤計算菌數；存活率是根據 35 分鐘後，每毫升存活的菌數和初始菌數的比值。

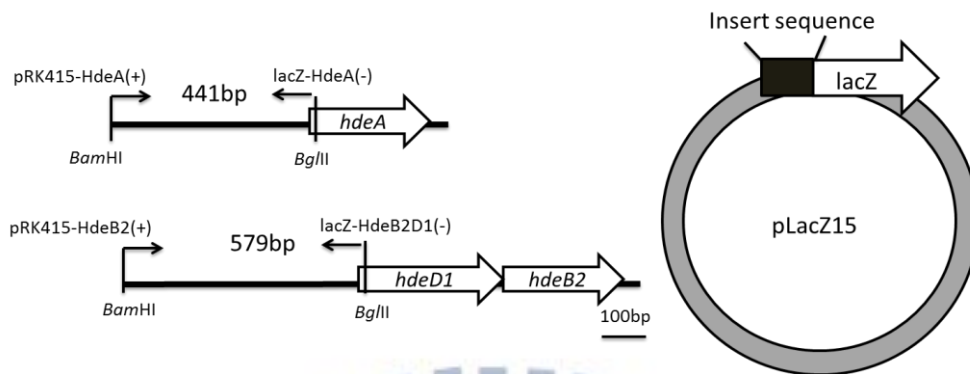


圖十七、*hdeA*、*hdeB2D1*、*hdeBD*、*hdeB1*、*yfdX* 啟動子分析

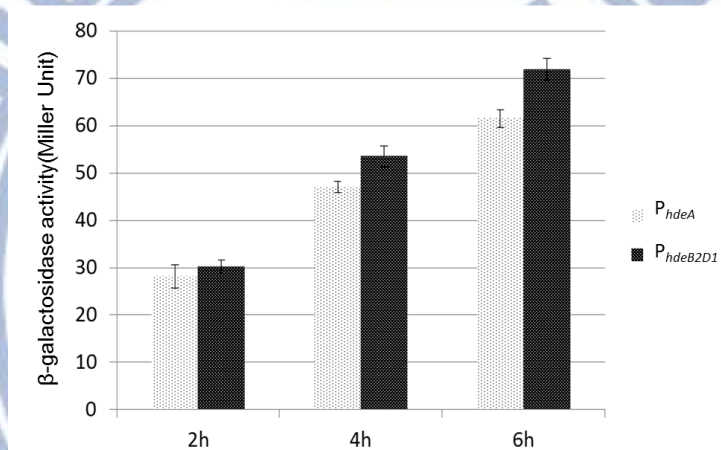
將基因啟動子區域的鹼基對放入線上軟體

Softberry(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>)中進行預測，預測 *hdeA*、*hdeB2D1*、*hdeBD*、*hdeB1*、*yfdX* 啟動子的基因結合位。

(A)



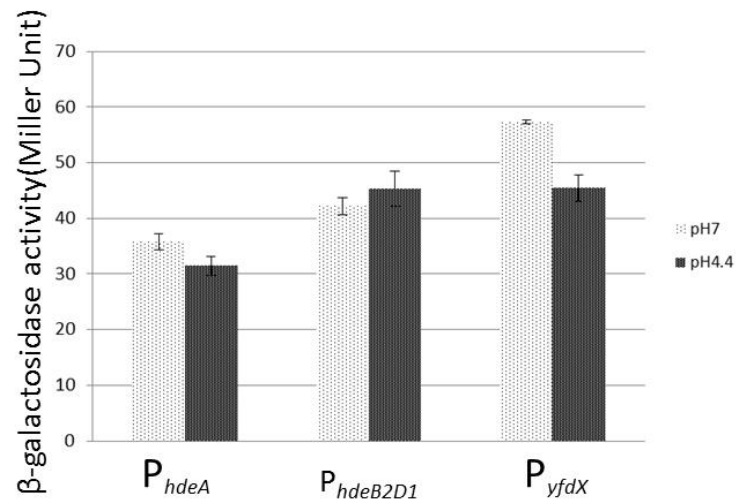
(B)



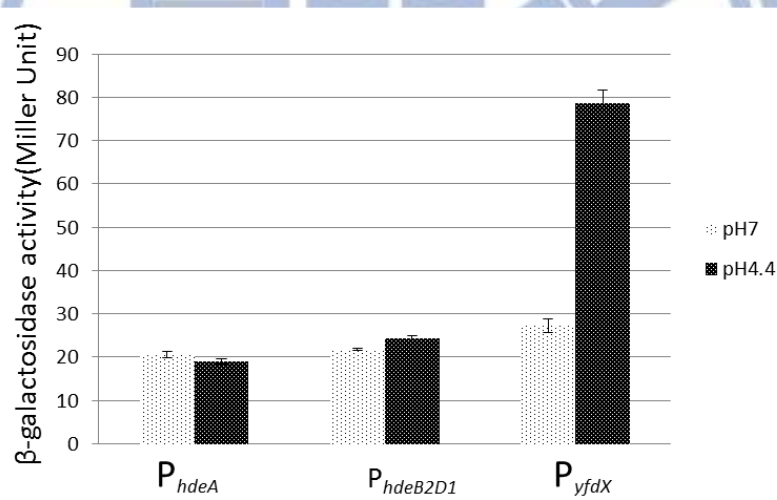
圖十八、細菌生長不同時期 *hdeA*、*hdeB2D1* 啟動子活性分析

(A) P_{hdeA} 、 $P_{hdeB2D1}$ 建構示意圖，利用引子 pRK415-HdeA(+)/lacZ-HdeA(-)、pRK415-HdeB2(+)/lacZ-HdeB2D1(-)將片段 PCR 增幅之後黏合至 yT&A 載體，抽質體切下片段與 LacZ 報導系統結合(B)細菌隔夜培養之後，稀釋 20 倍之後收 2、4、6 小時菌液分析啟動子活性。

(A) Shaking



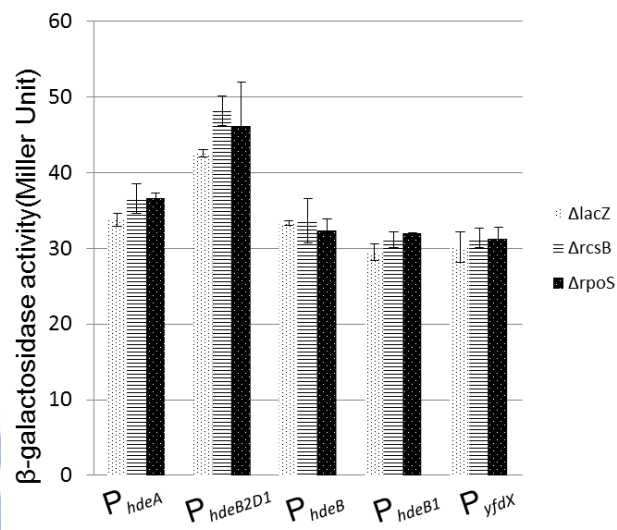
(C) Static culture



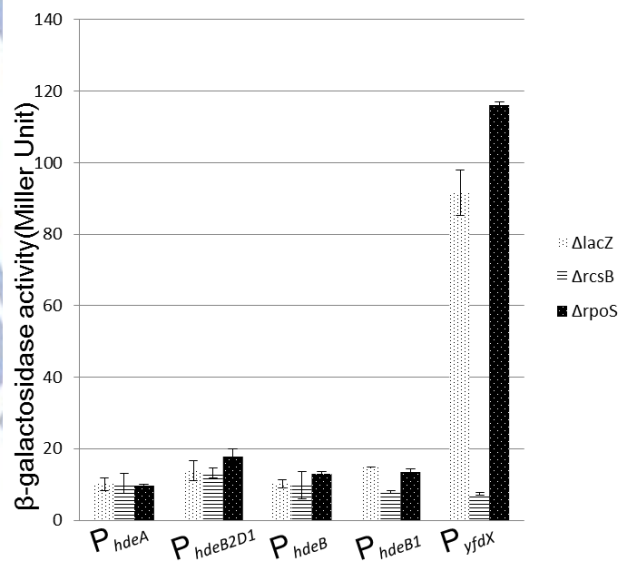
圖十九、弱酸培養條件下 *hdeA*、*hdeB2D1*、*yfdX* 啟動子活性比較

(A)細菌隔夜培養後，稀釋 20 倍至 $OD_{600}=0.8\sim 1.0$ ，將菌液移至 pH4.4 LB 培養液震盪培養 1 小時，再分別測定其啟動子活性(B)細菌隔夜培養後，稀釋 10 倍於 pH4.4 與 pH7.0 LB 培養液靜置培養 24 小時，再分別測定其啟動子活性。

(A) Shaking culture

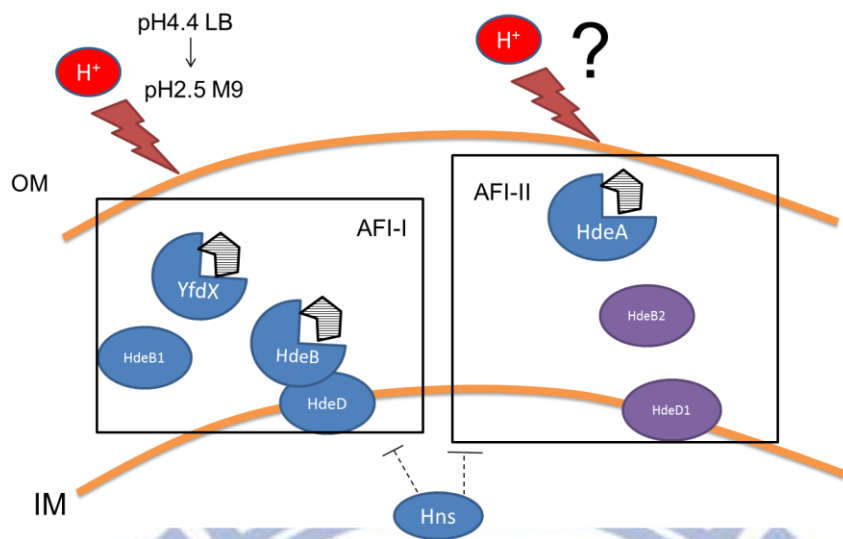


(B) Static culture



圖二十、*rcsB* 和 *rpoS* 基因缺損對 *hdeA*、*hdeB2D1* 啟動子活性的影響

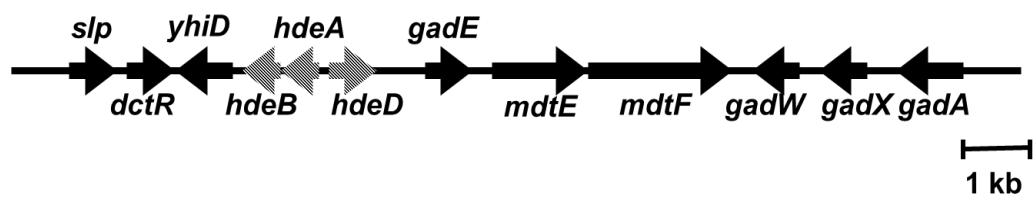
(A)細菌隔夜培養後，稀釋 20 倍震盪培養至 $OD_{600}=0.8\sim 1.0$ ，再分別測定其啟動子活性(B)細菌隔夜培養後，稀釋 10 倍新鮮 LB 培養液靜置培養 24 小時，再分別測定其啟動子活性。



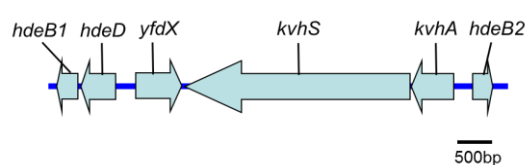
圖二十一、AFI-I 和 AFI-II 上 HdeA、HdeB 和 HdeD 的相關調控與功能

在酸壓力下，AFI-I 的 YfdX、HdeB 與 AFI-II 的 HdeA 具有伴隨蛋白活性，保護位於膜間質的蛋白不受酸傷害而失去活性。在此研究所使用的抗酸能力分析的環境中 AFI-I 上的伴隨蛋白扮演主要角色，而 AFI-II 的確切作用環境尚須進一步探討。AFI-I 和 AFI-II 的 HdeA、HdeB 和 HdeD 是否會受到 Hns 調控也尚須確認。

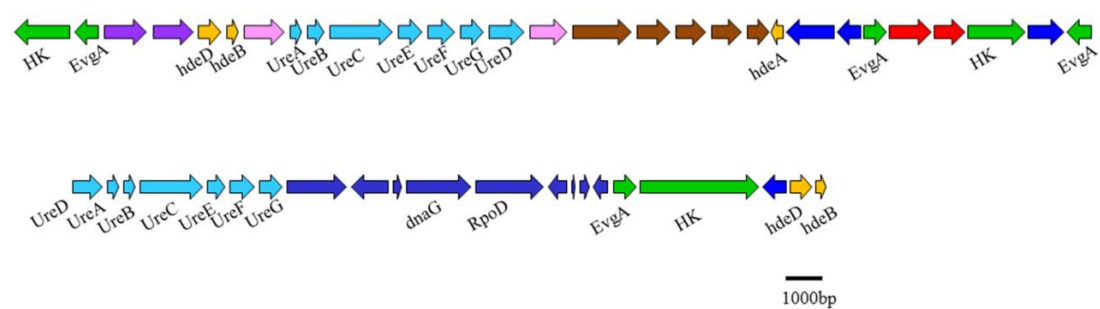
(A)



(B)



(C)



附圖一、(A)大腸桿菌 AFI (B)克雷白氏肺炎桿菌 CG43 AFI-I (C)克雷白氏肺炎桿菌 CG43 AFI-II