

中國醫藥大學
醫學檢驗生物技術學系碩士班
碩士學位論文

SmeVWX多重藥物輸出幫浦之過度表現
導致*Stenotrophomonas maltophilia*多重抗藥性之表型

**Overexpression of Resistance Nodulation Division Efflux Pump
SmeVWX Confers the Multidrug Resistance Phenotype of
*Stenotrophomonas maltophilia***

指導教授：楊翠青 博士

Tsuey-Ching Yang, Ph.D

共同指導教授：陳昭賢 博士

Chao-Hsien Chen, PhD

研究生：黃姜敬

Chiang-Ching Huang

中華民國 一 百 年 七 月

誌謝

感謝 楊翠青老師對我在研究邏輯上的訓練和感謝老師總是認真、



細心以及不厭其煩的教導，使得我在這兩年學習到很多。感謝實驗室的奕瑋學長、昕潔學姊、瑜姿同學、凱旋學妹、欣妤學妹、俊



銘學弟、孟凱學

弟以及祐任學弟謝謝你們的相伴，還有實驗助理媚蓉學姊和郁婷讓實驗室變得更加熱鬧。接著就是感謝研究所



的同學們對我在學業以及生活上的幫助以及在我求學過程中所結交的朋



友們，謝謝你們一直對我默默的關心。感謝

陳昭賢老師、林振文老師以及林老師實

驗室的詩雯學姊、鎧任、宗翰、奕潔學妹、

祐鈞學弟、千甄學妹和家鳳學妹在我碩士



二年生活上的陪伴與照顧，謝謝你們。

黃孝敬 謹誌於中國醫藥大學

中華民國 一 百 年 七 月

中文摘要

Stenotrophomonas maltophilia 是一株具有多重抗藥性(MDR)之特性的重要伺機性感染致病菌株。在革蘭氏陰性桿菌中，多重藥物輸出幫浦系統的過度表現是一個造成多重抗藥性表型的重要因素。在本研究論文中，探討利用一個 chloramphenicol 抗生素所篩選到之 *S. maltophilia* 突變菌株 KJ09C 之表型。這株突變菌株 KJ09C 除了對 chloramphenicol 抗生素有抗性外，更能夠對 quinolone 類和 tetracyclines 類抗生素有抗性。令人驚訝的是突變菌株 KJ09C 相較於原生菌株 KJ 對 aminoglycoside 類抗生素之感受性卻上升。由即時定量 PCR (qRT-PCR) 的結果說明突變菌株 KJ09C 之 *smeUI-V-W-U2-X* operon 有過度表現的現象。突變菌株 KJ09C 之 SmeVWX 多重藥物輸出幫浦失去活性後會使突變菌株 KJ09C 的感受性恢復至原生菌株一樣的層級，顯示突變菌株 KJ09C 之 SmeVWX 多重藥物輸出幫浦的過度表現有助於多重抗藥性之表型。在 *smeUI-V-W-U2-X* 基因上游有一屬於 LysR 家族之轉錄調控基因 *smeRv*，並藉由轉錄融合分析的結果顯示這調控基因所轉譯之調控蛋白 SmeRv 在 *smeUI-V-W-X-U2* 基因的過度表現中扮演正調控的角色。在原生菌株 KJ 的背景下，調控蛋白 SmeRv 扮演一個自我負調控的角色；在突變菌株

KJ09C 的背景下，則是扮演一個自我正調控的角色。為了更進一步了解 *smeU1-V-W-U2-X* 基因中每一個基因在突變菌株 KJ09C 中所扮演的角色，分別構築 KJ09CΔ*SmeU1*、KJ09CΔ*SmeVW*、KJ09CΔ*SmeU2*、KJ09CΔ*SmeX* 等突變菌株。結果顯示突變菌株 KJ09C 之 *smeU1* 基因與多重抗藥性表現的關係不大，而且突變菌株 KJ09C 的 *smeV-W* 基因失活會破壞 *SmeVWX* 多重藥物輸出幫浦將 chloramphenicol、quinolone 類和 tetracycline 類藥物排出的功能。為了進一步釐清 *smeU2* 和 *smeX* 基因對抗藥性所扮演的角色，分別將 *smeU2* 和 *smeX* 基因在 KJ09CΔ5 菌株（菌株 KJ09C 之 *smeU1-V-W-U2-X* 基因刪除突變菌株）中過度大量表現來評估其意義。結果發現 *SmeU2* 的角色似乎在 *SmeVWX* 多重藥物輸出幫浦過度表現的情況下才有意義；只要突變菌株 KJ09C 的 *smeX* 基因單獨過度表現就能夠讓突變菌株 KJ09C 對 aminoglycoside 類的感受性下降。

Abstract

Stenotrophomonas maltophilia is an important opportunistic pathogen characterized by the phenotype of multidrug resistance (MDR). Overexpression of the resistance nodulation division (RND) efflux systems is a critical cause of the MDR phenotype in gram-negative bacteria. A chloramphenicol-selective *S. maltophilia* MDR mutant, KJ09C, was characterized in this study. In addition to chloramphenicol, KJ09C was cross-resistant to quinolones and tetracyclines. Surprisingly, mutant KJ09C increased aminoglycoside susceptibility compared to wild-type KJ. The results of qRT-PCR demonstrated that *SmeVWX* pump was overexpressed in mutant KJ09C. Inactivation of *smeU1-V-W-U2-X* operon of mutant KJ09C restored the antimicrobial susceptibility of KJ09C to the level as that of wild-type KJ, indicating that overexpression of *SmeVWX* pump contributes to the MDR phenotype of KJ09C. A LysR-type transcriptional regulator gene, *smeRv*, divergently located upstream of *smeU1-V-W-U2-X* operon. The results of transcriptional fusion assay showed that the *SmeRv* plays a positive role in the overexpression of *smeU1-V-W-X-U2* operon, and that *SmeRv* has a characteristic of negative autoregulation in wild-type background and positive autoregulation in KJ09C background. To elucidate the role of each component of *smeU1-V-W-U2-X* operon in the resistance, a series of mutants were constructed, including KJ09C Δ *SmeU1*, KJ09C Δ *SmeVW*, KJ09C Δ *SmeX*, and KJ09C Δ *SmeU2*. The results showed the *smeU1* of KJ09C had no effect

on antibiogram resistance, and inactivation *smeVW* of KJ09C abolished SmeVWX pump activity for extrusion of chloramphenicol, quinolone, and tetracycline. To further clarify the role of *smeU2* and *smeX* on the antibiotics resistance, *smeU2* and *smeX* overexpression mutants were constructed in KJ09C Δ 5, including KJ09C Δ 5L2::*SmeU2* and KJ09C Δ 5L2::*SmeX*. The role of SmeU2 seems significant only when the SmeVWX pump is overexpressed. The *smeX* overexpression of KJ09C is responsible for the decreased aminoglycoside resistance of KJ09C.



目 錄

誌 謝.....	i
中 文 摘 要.....	ii
Abstract.....	iv
目 錄.....	vi
圖 目 錄.....	viii
表 目 錄.....	ix
第一章 前言.....	1
第一節 研究背景.....	1
1.1.1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 的介紹.....	2
1.1.2. <i>S. maltophilia</i> 的抗藥性機轉.....	3
1.1.3.多重藥物輸出幫浦 (Multidrug efflux pump)	5
1.1.4. RND-Type多重藥物輸出幫浦 (RND-type efflux pump)	7
1.1.5. <i>S. maltophilia</i> 之RND-type多重藥物輸出幫浦.....	8
1.1.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 之MexEF-OprN多重藥物輸出幫浦.....	10
第二節 研究目的.....	12
第二章 研究方法.....	13
第一節 研究設計.....	13
第二節 研究材料.....	14
2.2.1 本論文所構築與分析之質體與菌株列於表 1.....	14
2.2.2 PCR引子.....	14
2.2.3 培養基.....	14
2.2.4 實驗藥品.....	15
2.2.5 抗生素.....	15
2.2.6 試劑與緩衝溶液.....	16
2.2.7 儀器設備.....	18
第三節 實驗方法.....	19
2.3.1 菌種的培養與保存.....	19
2.3.2 洋菜膠體電泳分析 (agarose gel electrophoresis)	19
2.3.3 DNA之製備.....	20
2.3.4 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)	23
2.3.5 <i>Escherichia coli</i> 勝任細胞 (competent cell) 之備製.....	24
2.3.6 勝任細胞之轉形作用 (transformation)	25
2.3.7 接合作用 (conjugation)	25
2.3.8 構築質體 pKJΔSmeRv、pKJΔSmeU1、pKJΔSmeVW、pKJΔSmeU2 以 及pKJΔSmeX.....	26

2.3.9 KJ09CΔ <i>SmeRv</i> 、KJ09CΔ <i>SmeU1</i> 、KJ09CΔ <i>SmeVW</i> 、KJ09CΔ <i>SmeU2</i> 以及KJ09CΔ <i>SmeX</i> 突變株之獲得與確認	29
2.3.10 菌落快速檢驗聚合酶連鎖反應 (Colony PCR)	29
2.3.11 抗生素感受性試驗	30
2.3.12 即時定量聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR)	31
2.3.13 C23O (Catechol 2,3-dioxygenase) 活性測試	32
第三章 研究結果	34
第一節 利用抗生素篩選的方法，篩選自發性突變之多重抗藥性突變株	34
第二節 多重抗藥性突變株KJ09C的 <i>SmeVWX</i> efflux system過度表現	34
第三節 β-lactam類之抗生素非 <i>SmeVWX</i> pump 的受質	35
第四節 <i>SmeU1-V-W-U2-X operon</i> 的序列分析	36
第五節 <i>SmeVWX</i> 多重藥物輸出幫浦在內生性和後天抗性之扮演角色	39
第六節 轉錄調控基因 <i>smeRv</i> 在 <i>smeU1-V-W-U2-X genes</i> 中所扮演的角色	40
第七節 <i>SmeRv-smeU1-smeV-smeW-smeU2-smeX operon</i> 調控方式分析	41
第八節 突變株KJ09C中 <i>smeRv</i> 基因與 <i>smeU1</i> 基因間intergenic區域沒有任何的突變點	43
第九節 分析突變菌株KJ09C之 <i>smeU1-V-W-U2-X operon</i> 的基因在抗生素性中扮演之角色	44
第十節 <i>smeU1</i> 、 <i>smeU2</i> 和 <i>smeX</i> 基因過度表現對抗藥性的影響	46
第四章 討論	48
第五章 結論	56
參考文獻	81
研討會壁報論文	85

圖 目 錄

Fig. 1. The organisation and operation of antimicrobial efflux pumps of Gram-negative bacteria.....	71
Fig. 2. Comparison between <i>smeRv-smeU1-V-W-U2-X</i> operon of <i>S. maltophilia</i> and its homologues.....	72
Fig. 3. Construction of pKJ Δ 5.....	73
Fig. 4. Construction of pKJ Δ SmeRv.....	74
Fig. 5. Construction of pKJ Δ SmeU1.....	75
Fig. 6. Construction of pKJ Δ SmeVW.....	76
Fig. 7. Construction of pKJ Δ SmeU2.....	77
Fig. 8. Construction of pKJ Δ SmeX.....	78
Fig. 9. Double cross-over recombination between exotic plasmid and the chromosome of host bacteria (KJ09C Δ 5 as a representative).....	79
Fig.10. The possible role of SmeU2 in SmeVWX pump module.....	80

表 目 錄

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study	58
TABLE 2. The primers used in this study	60
TABLE 3. Antibiotics used in this study.....	62
TABLE 4. Antimicrobial susceptibilities of <i>S. maltophilia</i> KJ, its chloramphenicol-selected mutant KJ09C and their derived deletion mutants	63
TABLE 5. The ΔCt value of the genes of RND-efflux pumps for strains KJ, KJ09C and its derived mutant, determined by qRT-PCR.....	64
TABLE6. Comparison of the SmeU1 of <i>S. maltophilia</i> K279a with other homologues	65
TABLE7. Comparison of SmeV of <i>S. maltophilia</i> K279a with other homologues	66
TABLE8. Comparison of SmeW of <i>S. maltophilia</i> K279a with other homologues	67
TABLE 9. Comparison of the SmeU2 of <i>S. maltophilia</i> K279a with other homologues	68
TABLE 10. Comparison of SmeX of <i>S. maltophilia</i> K279a with other homologues	69
TABLE11. The determination of C23O activities of the KJ, KJ09C, and their derived mutants containing different transcriptional fusion constructs.....	70

第一章 前言

第一節 研究背景

抗生素的發現是醫療史上的一項重大突破。自從西元1928年英國細菌學家弗萊明發現了青黴素後，人類就此拉開了使用抗生素的序幕。過去人類將抗生素使用在傳染病，不但使細菌無法繼續傳播，也使得人類的死亡率下降。但也因為抗生素的使用而使得現今許多人對抗生素產生相當大的依賴性與迷思。也因不當的使用，以致造成具抗藥性的細菌越來越多。因此，細菌抗藥性的產生，不僅是公共衛生上的一大問題，同時也加重在治療上的困難度。

目前在臨床醫療中，綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、嗜麥芽糖黃單胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、鮟鱇不動桿菌 (*Acinetobacter baumannii*) 等非葡萄糖發酵性細菌，與生俱來之多重抗藥性，一旦感染，在治療上十分棘手。因此，研究細菌抗藥性機轉，進而發展出能對抗細菌抗藥性的藥物或治療方法，已是當前重要之課題。

本實驗室以 *Stenotrophomonas maltophilia* 作為研究菌種，並致力於該菌之細菌抗藥性機制的探討。

1.1.1 *Stenotrophomonas maltophilia* 的介紹

非醱酵性的嗜氧革蘭氏陰性桿菌 *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) 最早從環境中分離出來時，被歸類命名為 *Pseudomonas maltophilia* (Hugh & Ryschenkow, 1961) [1]，後來改分類命名為 *Xanthomonas maltophilia* (Sutter, 1968) [2]。直到近幾年分子生物學技術進步的進步，經科學家重新分析其遺傳資訊和 DNA 序列後將其更名為 *Stenotrophomonas maltophilia* (Palleroni & Bradbury, 1993) [3]。

S. maltophilia 屬於葡萄糖非發酵性革蘭氏陰性桿菌，具有單極鞭毛，廣泛存在於環境中。該菌喜好以麥芽糖為主要之營養碳源，可以耐受銀線導管 (silverlined catheters)，其生長溫度範圍從 4~40°C，而最適宜的生長溫度約 35°C。

S. maltophilia 也普遍生存在人體中，一般在健康的正常人身上並非致病菌，但是在醫院中卻經常在免疫力低下的病人檢體裡被分離出來，許多的感染症狀和該菌皆有相關性。這是因為在醫院中，*S. maltophilia* 會藉由許多媒介物，如處方用的隱形眼鏡鏡片、各類治療插管、空調系統等，或是因進行器官移植而使用之免疫抑制藥物，而感染免疫力缺陷或低下之病患，並造成院內感染。導致病人產生呼吸道感染、菌血症、心內膜炎和尿道感染 (Maningo & Watanakunakorn, 1995) [4]。一些研究認為，*S. maltophilia* 所產生的胞外蛋白酶，可能會破壞受感染的組織，

是一種重要的致病因子 (Windhorst, et al., 2002) [5]。 *S. maltophilia* 對許多抗生素皆具抗藥性，如 β -lactam、aminoglycoside、macrolide 類，這使得 *S. maltophilia* 在臨床治療上一直是棘手的問題。

關於 *S. maltophilia* 的研究，目前有兩株 *S. maltophilia* 菌株已完成其基因體定序。一株為 *S. maltophilia* R551-3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，G+C content 為 66%，序列全長為 4,544,233 bp；另一株為 *S. maltophilia* K279a (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_maltophilia/) (Crossman, et al., 2008) [6]，G+C content 為 66.32%，序列全長為 4,851,126 bp。

1.1.2. *S. maltophilia* 的抗藥性機轉

革蘭氏陰性桿菌 *S. maltophilia* 目前已知有四種抗藥性機制。分別如下：

- (1). 產生可分解或修飾抗生素活性之酵素，如細菌會產生 β -lactamase，可以來破壞 β -lactam 類抗生素的環狀結構，使 *S. maltophilia* 能夠抵抗 β -lactam 類抗生素的威脅 (Richmond, and Sykes, 1973) [7]。目前已知 *S. maltophilia* 能製造出兩種可誘導產生的 β -lactamases，分別為 L1 β -lactamases 和 L2 β -lactamases 2 型 (Krueger, et al., 2001) [8]。L1 β -lactamase 是個鋅依賴型 (Zn^{2+} -dependent) 酵素，可水解 penicillins、cephalosporins 和 carbapenems，但不能水解

monobactams，L2 β -lactamase 是種 cephalosporinase，可水解 aztreonam。另外，*S. maltophilia* 的染色體基因上也有存在著其他抗藥性基因，能產生修飾抗生素的酵素，像是 aminoglycoside acetyltransferases 4 (Lambert, et al., 1999)^[9]，和 erythromycin inactivating enzyme (Alonso, et al., 2000)^[10]。

- (2). 細菌細胞內自行修飾抗生素所辨認的受器標的。如 β -lactam 類抗生素的殺菌原理主要是藉由抗生素與細菌之 penicillin binding protein (PBP) 結合，進而抑制菌體細胞壁的合成，以達到殺菌的效果。而細菌可透過修飾、改變 PBP 的結構，使抗生素無法和 PBP 結合作用，因而產生抗藥性 (Livermore, 1995)^[11]。
- (3). 細菌改變自身細胞膜的通透性，使抗生素難以進入到細胞膜內作用。像 *S. maltophilia* 等革蘭氏陰性菌能改變細胞膜上的 porin，使抗生素無法順利進入細胞內部 (Valdezate, et al., 2001)^[12]。
- (4). 細菌在細胞膜上發展出特殊的多重藥物輸出幫浦 (efflux pump) 結構。使抗生素一進入到細胞膜內部則馬上藉 pump 打到細胞膜外部 (Li, et al., 2002; Zhang, et al., 2001)^[13-15]。此系統可以利用消耗 ATP 能量或使用鈉-鉀離子差能 (gradient)，將抗生素從細菌體內排出至菌體外，以減少抗生素堆積，可同時導致多種抗生素抗藥性的發生。本研究論文將以探討多重藥物輸出幫浦系統之過度

表現與抗藥性之間的關係。

1.1.3. 多重藥物輸出幫浦 (Multidrug efflux pump)

過去有很多的多重抗藥性現象是被認為由很多的機轉而造成的，但近年來的研究發現這些病原體之內生性及後天性的多重抗藥性現象很多是由細菌細胞膜上輸出幫浦系統過度表現所造成的，且這些輸出幫浦系統廣泛出現在許多病原菌之中。這些輸出幫浦系統不僅能夠將進入到細胞內部的抗生素藉幫浦打到細胞膜外部，更能夠將一些對細菌有害之物質打到細胞膜外部，使細菌得以生存下來，而造成這現象是因為在細胞膜上有多重藥物運輸體 (Multidrug transporter) 所組成的幫浦，依其運輸體的氨基酸序列與結構可區分為五大類 (Schweizer, 2003) [16]：

- (1). 多重藥物運輸體以氫離子為動力的 MFS 家族 (major facilitator superfamily)，也就是從細菌內排出有毒物質時會同時伴隨氫離子的交換。此家族一般由 400 多個氨基酸殘基組成，包含 12 或 14 個跨膜 α -螺旋，平均分子量 45~50kD，目前了解 MFS 家族和營養物質和代謝物質的轉運、細菌抗藥性以及神經信號傳導有關係 (如圖一)。

- (2). 多重藥物運輸體以依賴 ATP 做為能量來源的 ABC 家族 (ATP-binding cassette family)，也就是從細菌內排出有毒物質時會以水解 ATP 為能量來源。這個家族通常含有 12 個跨膜片段，目前已知 ABC 家族大多是負責將各式各樣在細胞表面之糖複合物中的糖鏈往外送 (如圖一)。
- (3). 多重藥物運輸體以氫離子為動力的 RND 家族 (resistance-nodulation division)，也就是從細菌內排出有毒物質時會同時伴隨氫離子的交換。本研究論文所探討之 SmeVWX 多重藥物輸出幫浦亦屬於這個家族 (如圖一)。
- (4). 多重藥物運輸體以氫離子為動力的 SMR 家族 (small multi-drug resistance)，也就是從細菌內排出有毒物質時會同時伴隨氫離子的交換。其細胞膜轉運蛋白相當小，約 100~120 個氨基酸殘基，通常由 4 個足夠跨膜長度的 α -螺旋結構形成的緊實反向平行結構組成 (如圖一)。
- (5). 多重藥物運輸體以鈉離子為動力的 MATE 家族 (multi-drug and toxic compound extrusion)，也就是從細菌內排出有毒物質時會同時伴隨鈉離子的交換，此家族一般含有 12 個跨膜區，目前只知與陽離子有毒溶劑的排出有關係 (如圖一)。

而在革蘭式陰性菌中最常見的是屬於 RND 家族 (resistance-nodulation

division) 多重藥物輸出幫浦。

1.1.4. RND-Type 多重藥物輸出幫浦 (RND-type efflux pump)

臨床上對抗生素及其他許多抗生物製劑而言，最常見也是最重要的就是 RND-Type 幫浦家族。最早發現的 RND-Type 幫浦家族是與革蘭氏陰性桿菌的 fluoroquinolone 之抗藥性有關 (Jalal, et al., 2000) [17]。但後來研究發現，RND-Type 幫浦除了可以廣泛的將抗生素 (如 ciprofloxacin, chloramphenicol, carbenicillin 和 tetracycline) 排出至細胞膜外，更可以將染料 (如 ethidium bromide)、清潔劑 (如 sodium dodecylsulfate)、消毒劑 (如 triclosan)、有機溶劑 (如 *p*-xylene)、毒性脂肪酸和代謝的抑制劑排出，因此在臨床上對抗生素和消毒劑產生抗性中扮演了重要的角色。RND-type 幫浦家族是由在內膜上一須依賴能量的運送子 (energy-dependent transporter)、外膜蛋白質 (outer membrane protein [OMP]) 和連接內膜及外膜蛋白的膜融合蛋白質(membrane fusion protein) 等三種蛋白質所組成三合體的多重藥物運輸體結構。這三合體所組成的結構就像是一個通道，當抗生素進到細胞膜的濃度達一定後，會經由鑲在內膜的蛋白所辨識到進而排出至細胞膜外。RND-Type 多重藥物輸出幫浦，不僅廣泛存在於人類、動植物相關之細菌上，在許多非致病性細菌上也具有此幫浦。

RND-Type 多重藥物輸出幫浦所組成三合體的結構其在基因的組裝上大多為一 operon 的型態，且有些 RND-type operon 上游會有一基因走向相反之調控基因，且此調控基因所轉錄之調控蛋白會影響 RND-type operon 之表現。

1.1.5. *S. maltophilia* 之 RND-type 多重藥物輸出幫浦

S. maltophilia 是革蘭氏陰性桿菌，會感染免疫低下之病人，在臨床所分離的菌株中常可發現此細菌具有多重抗藥性。在近年來，*S. maltophilia* 之基因體的完全定序，發現有 8 套可能的 nodulation cell division (RND) 多重藥物輸出幫浦基因，分別為 *smeABC*、*smeDEF*、*smeGH*、*smeIJK*、*smeMN*、*smeOP*、*smeVWX* 和 *smeYZ* (Crossman, et al., 2008)^[6]，這些 operons 中只有 3 個 operons 具有外膜蛋白基因：*smeAB-smeC*、*smeDE-smeF* 和 *smeVW-smeX*，其餘之多重藥物輸出幫浦可能搭配這 3 個外膜蛋白，也可能會與其他蛋白形成一三合體之結構。

在 *S. maltophilia* 中可能的八套 RND-type 多重藥物輸出幫浦中，共有 6 套的 RND-type 多重藥物輸出幫浦其基因上游有調控基因。分別為 *smeABC* 及 *smeYZ* 上游有 two component regulatory system，*smeDEF*、*smeGH* 及 *smeOP* 上游有 TetR 型轉錄調控因子，*smeVWX* 上游有 LysR 型轉錄調控因子。茲就三型的調控因子簡述如下：

- (1).LysR 型轉錄調控因子：LysR-type 轉錄調控蛋白在 N 端可形成特殊立體結構 helix-turn-helix 的 motif 結構，可與欲調控基因上游之調控區結合；在 C 端的部分則為 co-inducer-binding 的 domain 區域，可與相關誘導物結合。大多的 LysR-type 轉錄調控蛋白是扮演一活化子的角色，但對自身基因則扮演抑制子的角色，可抑制自身的表現 (Henikoff, et al., 1988)^[18]。本研究論文之調控蛋白 SmeRv 亦屬於此類型。
- (2).TetR 型轉錄調控因子：TetR-type 轉錄調控蛋白在 C 端可形成特殊立體結構 helix-turn-helix 的 motif 結構，可與欲調控基因上游之調控區結合。大多的 TetR-type 轉錄調控蛋白是扮演一 repressor 的角色。在 *S. maltophilia* 菌株中，SmeDEF、SmeGH 和 SmeOP 等多重藥物輸出幫浦之上游調控蛋白皆為此型。
- (3).Two component 型轉錄調控因子：Two component regulatory system (TCS) 是由 histidine protein kinase (HPK) 以及 response regulator(RR) 兩種蛋白組成。HPK 是嵌於膜上的蛋白，如同真核生物的受器，可接收環境訊息的刺激而活化。RRs 位於細胞內，受 HPK 磷酸化而調控其活性，活化後的 RRs 具有基因轉錄因子或活化子的功能，結合到 DNA 上以調控基因的轉錄。在 *S. maltophilia* 菌株中，SmeABC 和 SmeYZ 等多重藥物輸出幫浦之上

游調控蛋白皆為此型。

在這些多重藥物輸出幫浦之系統中，現已知 SmeABC 之多重藥物輸出幫浦過度表現時會將 aminoglycoside 類、 β -lactam 類和 fluoroquinolone 類等藥物輸出。SmeABC 輸出幫浦系統的表現會受到 two-component 系統之 SmeSR 所調控 (Li, et al., 2002) [13]。SmeDEF 多重藥物輸出幫浦在先前的研究報導中指出 *smeDEF* operon 的表現會受到的一調控蛋白 SmeT 的調控。當 *smeT* 基因失去功能後，*smeDEF* operon 就會過度表現，並且會減少對抗生素的敏感性 (Gould, and Avison, 2006) [19]；而目前對 SmeGH、SmeIJK、SmeMN、SmeOP、SmeVWX 和 SmeYZ 等多重藥物輸出幫浦在抗藥性的角色未明。本研究論文探討所篩選到的突變株 KJ09C 過度表現 SmeVWX 多重藥物輸出幫浦與抗藥性間的關係。

1.1.6. *Pseudomonas aeruginosa* 之 MexEF-OprN 多重藥物輸出幫浦

在先前的研究報導中指出 *S. maltophilia* 之 SmeVWX 多重藥物輸出幫浦與 *P. aeruginosa* 之 MexEF-OprN 多重藥物輸出幫浦相似度最高 (Crossman, et al., 2008) [6]。在 *P. aeruginosa* 菌中具有 11 個屬於 RND 家族之多重藥物輸出幫浦，分別是 MexAB-OprM (Li, et al., 1995) [20]、MexCD-OprJ (Poole, et al., 1996) [21]、MexEF-OprN (Köhler, et al., 1997)

[22]、MexGHI-OpmD (Aendekerk, et al., 2002 ; Sekiya, et al., 2003)^[23, 24]、
MexJK-OprM (Chuanchuen, et al., 2002)^[25]、MexMN (Mima, et al., 2005)
^[26]、MexPQ-OpmE (Mima, et al., 2005)^[26]、MexVW-OprM (Li, et al., 2003)
^[27]、MexXY-OprM (Masuda, et al., 2000)^[28]、TriABC-OpmH (Mima, et
al., 2007)^[29] 和 MuxABC-OpmB 幫浦 (Mima, et al., 2009)^[30]。

MexEF-OprN 多重藥物輸出幫浦在一般的實驗室生長條件下是不表現或是表現量很低 (Maseda, et al., 2000)^[31]，其功能也與內生性之抗藥性無關，這項發現與其他之 *P. aeruginosa* RND-type 的多重藥物輸出幫浦不同。但是在 *P. aeruginosa* 的過度表現之 *nfxC*-type 突變株中，此多重藥物輸出幫浦卻能將 quinolones 類、chloramphenicol 和 trimethoprim 等藥物排出去 (Köhler, et al., 1997)^[22]。

mexEF-oprN operon 的調控與其他的多重藥物輸出幫浦不同，可被屬於 LysR 型轉錄調控因子 MexT 調控蛋白正調控。*mexT* 基因位於 *mexEF-oprN* operon 上游，並與 *mexEF-oprN* 基因相同的方向進行轉錄。而調控蛋白 MexT 的過度表達可誘導 *mexEF-oprN* operon 的表達，並減少 OprD 的表達 (Ochs, et al., 1999)^[32]。

第二節 研究目的

在臨床上，受細菌感染之病人一般都會投予抗生素來治療，然而，長時間使用抗生素下容易使細菌產生突變，進而產生抗藥性。

S. maltophilia 屬好氧性革蘭氏陰性桿菌，為一種重要的院內感染菌，其特徵在於對許多抗生素都具有抗藥性(如： β -actam 類、aminoglycoside、quinolone...等)，因此，常常造成臨床治療與院內感染管制上的困難。

本論文的研究主題是模擬臨床投予藥物的治療來探討投藥後產生突變之 *S. maltophilia* 菌對藥物具有抗藥性之情形。在先前的研究中也曾指出利用高濃度之抗生素來篩選細菌不僅容易使細菌突變會對所使用之抗生素具有抗藥性，更是容易會對其他種類之抗生素也具有抗藥性之現象。因此，利用一高濃度抗生素 chloramphenical 來篩選本實驗室所分離之 *S. maltophilia* 菌株 KJ 後得一突變株 KJ09C，並經過抗生素感受性試驗得知 KJ09C 菌株具有多重抗藥性現象。

此外，有研究指出用此策略篩選到之突變株經常會過度表現多重藥物輸出幫浦。因此，想要進一步探討 KJ09C 菌株產生多重抗藥性是否與多重藥物輸出幫浦過度表現有關外，並分析此過度表現多重藥物輸出幫浦之每一基因在抗藥性中的貢獻與所扮演之角色，進而提供在臨床上治療受 *S. maltophilia* 感染而長使用此抗生素可能會引起此套多重藥物輸出幫浦過度表現之資訊。

第二章 研究方法

第一節 研究設計

本研究論文之第一部份是先利用高濃度之 chloramphenicol 抗生素篩選到一 MDR 突變菌株 KJ09C，並利用 qRT-PCR 和抗生素感受性試驗來證明此突變株 KJ09C 是過度表現 *SmeVWX* 這套多重藥物輸出幫浦 (multidrug efflux pump)。接著對於 *S. maltophilia* K279a 之 *SmeVWX* 多重藥物輸出幫浦作生物資訊的分析。接著利用 promoter-*xylE* transcription fusion assay 的策略來評估 *smeRv* 基因與 *smeU1-V-W-U2-X* operon 之間 371-bp 之 intergenic region 內 *smeRv* 基因與 *smeU1-V-W-U2-X* operon 之啟動子的調控方式。

本研究論文之第二部份是探討 *smeU1-V-W-U2-X* operon 中每一個基因在突變菌株 KJ09C 中所扮演的角色。構築 pKJΔ*SmeRv*、pKJΔ*SmeU1*、pKJΔ*SmeVW*、pKJΔ*SmeU2* 以及 pKJΔ*SmeX* 之質體，然後利用基因替換 (gene replacement) 的策略，將欲突變之基因 deletion，形成 KJ09CΔ*SmeRv*、KJ09CΔ*SmeU1*、KJ09CΔ*SmeVW*、KJ09CΔ*SmeU2* 以及 KJ09CΔ*SmeX* 突變株，並利用 qRT-PCR 方法分析所刪除基因及其下游基因之 RNA 表現量，並與其相對應之 parent strains KJ09C 及原生菌株(wild type) KJ 進行抗生素感受性試驗。此外，利用過度表現系統將 *smeU1*、*smeU2* 和 *smeX*

基因過度表現，來釐清 *smeU1-V-W-U2-X* operon 中每一個基因在突變菌株 KJ09C 中所扮演的角色。

第二節 研究材料

2.2.1 本論文所構築與分析之質體與菌株列於表 1。

2.2.2 PCR 引子

實驗中所使用的 PCR 引子序列皆詳列於表 2，其中 stock solution concentration 為 100 Mm；而 working concentration 為 10 μ M。

2.2.3 培養基

本實驗使用的培養基購自 MDBio, Inc. (參照 Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 所記載之配方)。

1. Luria-Bertani broth (LB) :每 1 公升的水中含

10 g tryptone
5 g yeast extract
10 g NaCl
pH: 7.0 \pm 0.05

2. Luria-Bertani agar (LA) : Luria-Bertani broth 成份中額外加入 1.5% agar.

3. Mueller Hinton II Agar：每 1 公升的水中含

- 2 g beef extract
- 17.5 g acid hydrolysate of casein
- 1.5 g starch
- 17 g agar

2.2.4 實驗藥品

本實驗菌種所使用的藥品購自 Difco Laboratories 或 Accumedia manufacturers, Inc. 而其他的化學藥品及有機溶劑則購自 E. Merk, J. T. Backer Company、Severva Frvafeinrobiochemica、Boehringer mannhrim GmhH Biochemical、Pharmacia、Sigma Chemical Company、Biosolve 及日本和光藥廠。限制酶以及其它酵素是購自 TaKaRa Shuzo Co. Ltd.、New England Biolabs (NEB)、promega company 和 Bethesda Research Laboratories。T4 DNA ligase 購買自 promega Co.。

2.2.5 抗生素

所有抗生素皆購自 sigma 公司，並依照實驗所需配置成適當濃度，並詳列於表 3。

2.2.6 試劑與緩衝溶液

1. 質體 DNA 抽取之試劑

抽取質體 DNA 之技術是利用 alkaline lysis method 進行，所需試劑如下：

(1) Solution I : 10 mM EDTA (pH 8.0) , 50 mM Glucose 及 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)。

(2) Solution II : 1% SDS 及 0.2 N NaOH。

(3) Solution III : 3 M potassium acetate (pH 4.8) 及 5 M glacial acetic acid。

2. 染色體抽取之試劑

(1). STE buffer : 10 mM Tris-HCl , 100 mM NaCl 及 1 mM EDTA (pH 8.0)。

(2). Proteinase K (10 mg/ml)。

3. Agarose gel 電泳之試劑

(1). TAE running buffer : 預先配製 50X 濃度的 TAE buffer , 取 242 g Tris base , 57.1 ml glacial acetic acid , 100 ml 之 0.5 M EDTA (pH 8.0) , 加水至 1 L 。使用時加水稀釋至 0.5X , 濃度為 40 mM Tris-acetate , 1 mM EDTA (pH 8.0)。

(2). 6X loading dye : 溶劑中含 0.25% xylene cyanol , 30% glycerol ,
0.25% bromophenol blue 。

(3). Staining buffer : 於染盆中先加入少許之蒸餾水 , 再加入 5 μ l 的
ethidium bromide (EtBr) 、 1 ml 1 mM EDTA (pH 8.0) 及 200 μ l
RNase A , 最後再加蒸餾水至總體積為 150 ml , 充份混合。於使
用時染盆中約含有 0.5 μ g/ml ethidium bromide 。

4. C23O (Catechol 2,3-dioxygenase) 活性測試所需試劑

(1). Sodium phosphate buffer, 0.1M pH 7.5 預先配製

Solution A : 27.2 g KH_2PO_4 per liter (0.2 M)

Solution B : 45.6 g K_2HPO_4 per liter (0.2 M)

然後再以 solution A 39 ml 搭配 solution B 61 ml 之比例 , 使其 pH
值為 7.0 , 最後加去離子水至總體積為 200 ml 即完成。

(2). Assay buffer

取 200 ml 0.1 M pH 7.0 sodium phosphate buffer , 加上 60 ml 去
離子水 , 再加入 40 ml acetone , 配製成 400 ml assay buffer 。

(3). 0.1M catechol

秤取 1.1 g catechol 溶至 100 ml assay buffer , 使其完全混和溶解。

最後保存於 4°C 冷藏備用。

2.2.7 儀器設備

1. 聚合酶連鎖反應器
2. 恆溫培養箱
3. 恆溫乾浴器
4. 離心機
5. 電泳設備
6. 分光光度計
7. 即時定量聚合酶連鎖反應器
8. 超音波細胞破碎機



第三節 實驗方法

2.3.1 菌種的培養與保存

1. 短期保存

將實驗用菌株培養於不含抗生素的 Luria-Bertani agar (LA) 固態培養基中，置於 37°C 隔夜培養後，放置 4°C 保存 5~7 天，予以備用。

2. 長期保存

將本實驗所用的菌株培養於含有合適抗生素濃度的 Luria-Bertani broth (LB) 培養液中，37°C 震盪隔夜培養。視菌種的生長速度，在生長對數期間(log phase)取 0.7 ml 的菌液並加入 0.3 ml 87% 無菌 glycerol，混合均勻存放於抗凍管中，並在管上貼上標籤註明編號、菌種名稱和製作日期，存放於 -80°C 備用。

2.3.2 洋菜膠體電泳分析 (agarose gel electrophoresis)

秤取適量之 agarose powde 加入 0.5X TAE buffer 中，利用微波爐加熱使之溶解，agarose 的濃度依欲分析之 DNA 片段大小而定。一般使用濃度範圍約 0.8%~2.0% (w/v)。等 agarose 溶液降溫至 50°C~60°C 時將之倒入鑄膠槽並插上齒梳 (comb)。待 agarose 溶液冷卻凝固後緩慢拔除齒

梳，即完成 agarose gel 製作。

將 agarose gel 置於水平式電泳槽裝置，並加入 0.5X TAE buffer 至淹蓋過 gel 為止。把欲分析之 DNA 樣品與 6X loading dye 以 5 : 1 混合之比例混勻後，加入 agarose gel 的溝槽 (well) 內。開啟電源，以 5V/cm 的電壓進行電泳，泳動的時間視 DNA 片段長度而定。待分離完畢後，將 agarose gel 置於含 ethidium bromide (0.5 µg/ml) 的染盆中染色 10~15 分鐘後，再置於紫外燈箱中觀察 DNA 泳動的位置並與 DNA marker 比對，以評估 DNA 片段的大小及濃度。

2.3.3 DNA 之製備

1. 質體 DNA 之抽取

將含有質體之菌株培養於 3 ml 液態培養基中，可視情況加入合適濃度之抗生素以預防污染。經 37°C 震盪隔夜培養，視菌種的生長速度，在生長對數期間(log phase)取出，分裝至 1.5 ml eppendorf 中，以 12,000 rpm 5 分鐘離心，去除上清液後加入 100 µl solution I 溶液，使菌體重新懸浮，靜置於室溫中 5 分鐘。接著加入 200 µl solution II 溶液，溫和上下倒置數次後，置於冰上 5 分鐘。之後再加入 150 µl solution III 溶液，上下倒置數次後再置於冰上 6 分鐘。接著以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，將上清液取至新的 eppendorf 中，再加入 1:1 之 phenol/chloroform 以 vortex 混合均勻，

經 12,000 rpm 離心 5 分鐘後取上清液至另一 eppendorf 中，重複數次。使溶液分界層無雜質後再加入等量之 chloroform 以 vortex 混合均勻，經 12,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液至新的 eppendorf 中加入二倍體積之 95 % 酒精，用 vortex 混合均勻後靜置於冰上 10 分鐘。最後再以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，去除酒精後得沉澱之 DNA，待酒精揮發後用無菌之去離子水回溶備用。

2. 染色體 DNA 之抽取

將菌株培養於 3 ml 液態培養基中，37°C 震盪隔夜培養，視菌種的生長速度，在生長對數期間 (log phase)，移 1.5 ml eppendorf 中，以 8000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後再到入剩餘的菌液離心 5 分鐘後，去除上清液。加入 1 ml 之 1X STE buffer，並 vortex 使菌體重新懸浮，以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，重複一次此步驟。去上清液後，先加入 200 μ l 1X STE vortex 均勻。接著緩慢加入 40 μ l 10% SDS，慢慢上下倒置 eppendorf，直至澄清。接著靜置 65°C 30 分鐘，待降溫後加入 Proteinase K(2 mg/ml) 20 μ l (final conc. 40 ng/ml) 於 37°C 作用 3~4 小時，接著加入 400 μ l 1X STE buffer 放大體積。加入 1:1 比例之 phenol/chloroform 用 vortex 混合均勻，以 12,000 rpm 離心 5 分鐘後取上清液至另一 eppendorf 中，重複此步驟數次使溶液分界層無雜質。再加入等量之 chloroform 用 vortex 混合均勻，

以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液至另一 eppendorf 中加入二倍體積之 95% 酒精，用 vortex 混合均勻後置於冰上 10 分鐘，最後利用 tip 捲出染色體晾乾，再加入無菌去離子水 200 μ l 回溶，以 65°C 加熱 30 分鐘去除 DNase 後，置於 4°C 保存備用。

3. DNA 片段之回收

DNA 片段的回收使用 GeneMark DNA Clean/Extraction Kit，將要分離的 DNA 片段先以洋菜膠體電泳分離，於 EtBr 染色 10 分鐘，置於紫外線箱上觀察。使用刀片將目標片段切取下來放入 eppendorf 中，加入 700 μ l Binding solution 置於乾浴器 65°C 15 分鐘，時而上下倒置搖晃直至膠體完全融化。再吸取溶液至 Kit 所提供之 Spin column 中，此 Spin column 下接 Collection column，並以 12,000 rpm 離心 1 分鐘後再加入 700 μ l Binding solution 並以 12,000 rpm 離心 1 分鐘。接著加入 700 μ l Washing Solution 12,000 rpm 離心 1 分鐘，重複此步驟二次。並再以 12,000 rpm 離心 3.5 分鐘以將液體完全去除，接著打開 Spin column 蓋子等待 3 分鐘使酒精揮發，最後加入適量無菌去離子水於 Spin column 中，靜置數分鐘後以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，即得回收產物。回收所得之 DNA 保存於 4°C 備用。

4. 切割反應

選擇合適的限制酶，配合廠商建議的緩衝溶液，和所建議之反應溫度，進行 DNA 切割反應。反應時的 DNA 濃度約為 $1 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ，而反應時間則視選擇的限制酶而調整，完成後利用洋菜膠體電泳分析切割情形。

5. DNA 黏合反應 (ligation)

將所選擇的載體經限制酶切割處理後，再與需接黏的 DNA 片段以適當比例混合均勻，並加入廠商建議的 ligation buffer 和 $1 \mu\text{l}$ T4 ligase，並補上無菌去離子水使最後總體積為 $20 \mu\text{l}$ 。混合均勻後，置於 16°C 下作用 12~16 小時，即可完成黏合作用。

2.3.4 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

取 $1/10 \times$ 體積的 DNA 當做模板，加入 $1/10 \times$ 體積的 dNTP mixture (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、 $1/10 \times$ 體積的 $10 \times$ Taq buffer 以及分別為 $1/10 \times$ 體積最終濃度 $1 \mu\text{mole}$ 的正、反向引子，和 $1/10 \times$ 體積的 DMSO 與 $1 \mu\text{l}$ 的 Taq DNA polymerase 2.5 U/ml ，最後加無菌去離子水到總體積為 $20 \mu\text{l}$ 。利用 TECHNE/England TC312 進行聚合酶連鎖反應。設定條件為第一階段 94°C ，10 分鐘，使模板 DNA 產生變性 (denaturation)；再以第二階段 94°C ，1 分鐘； $(50^\circ\text{C} \sim 65^\circ\text{C})$ 適合引子之溫度，1 分鐘，使引子與

模板 DNA 進行黏合作用 (annealing); 72°C, 0.5 分鐘到 5 分鐘 (視 PCR amplicon 片段長度而定) 進行 DNA 延長作用 (extension), 此反應重複 25 到 35 循環; 最後第三階段 72°C, 10 分鐘使 DNA 充分延長。

2.3.5 *Escherichia coli* 勝任細胞 (competent cell) 之備製

將 *E. coli* 菌株 (DH5 α 或 S17-1) 接種於 3 ml LB 之培養液中, 置 37°C 震盪隔夜培養。之後取 500 μ l 菌液到 20 ml LB 中, 於 37°C 震盪培養。培養至 O.D₆₀₀ 約為 0.8~0.9 時, 將菌液於 8000 rpm 4°C 下離心 5 分鐘收集菌體。去上清液, 加入約 15 ml 之以預冷為 4°C 之 0.1 M CaCl₂ 使菌體懸浮於其中, 靜置冰浴 30 分鐘, 之後再以 8000 rpm 4°C 下離心 10 分鐘。小心倒去上清液, 最後加入 1 ml 以預冷為 4°C 之 0.1 M CaCl₂, 搖勻後即可冷藏備用。未使用之勝任細胞可以加入 87% 經滅過菌的甘油 (Glycerol) 至最終濃度為 15%, 輕輕混勻後置入 -80°C 下保存備用。

2.3.6 勝任細胞之轉形作用 (transformation)

取 100 μ l 之勝任細胞加入適量之 DNA 或質體，於冰上作用 10 分鐘後，快速放入 42°C 水浴槽中進行熱休克 (heat shock) 反應 2 分鐘，接著再快速移回冰上靜置 5 分鐘。然後加入 500 μ l LB，於 37°C 震盪培養約 2 小時。吸取適量菌液塗於含合適之抗生素的固態培養基中，置 37°C 隔夜培養。如果質體之載體上帶有 *lacZ* 基因，則視所需加入 50 μ l IPTG (20 mg/ml) 及 50 μ l X-gal (20 mg/ml) 均勻塗在含適當抗生素的培養基中隔夜培養，進行藍白篩選 (Blue-white selection)。

2.3.7 接合作用 (conjugation)

首先，將 recipient 菌株 (*S. maltophilia*) 與 donor 菌株 (*E. coli* S17-1) 分別以 3 ml 的 LB broth 於 37°C 震盪培養約 12-14 小時，而後把 recipient 菌液與 donor 菌液各以 1.5 ml 分別加入內含 20 ml LB 的三角錐瓶(flask) 中，以 37°C 震盪培養至菌液量約為 OD₄₅₀ 為 0.7~0.8 間。接著將兩菌液分別倒入離心管，以 8000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，再各加入 2 ml LB broth 回溶菌體。然後將 recipient : donor 以 4 : 1 之比例混合於 1.5 ml 之微量覆蓋離心管，並使其混合均勻。再以 8000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後，加入少量的 LB broth 與菌體充分混合。最後以微量吸管將混合

之菌液置於 LA 瓊脂培養基內之無菌的 nitrocellulose membrane 上，且以 37°C 隔夜培養。經接合作用後之菌株以含有 tetracycline (30 µg/ml) 和 norfloxacin (2.5 µg/ml) 抗生素的瓊脂培養基 (LB agar plate) 進行篩選。所得的轉殖菌株(transconjugant)為含有外來質體之 *S. maltophilia* 菌株。而若為得特定的 isogenic 突變株，需將經接合作用所得之轉殖菌株 (transconjugant)再進一步以含有 10% sucrose 的 LB 瓊脂培養基(LB agar) 進行篩選，之後利用 PCR 和 DNA 定序來確定其正確性。

2.3.8 構築質體 pKJΔSmeRv、pKJΔSmeU1、pKJΔSmeVW、pKJΔSmeU2 以及 pKJΔSmeX

1. pKJΔSmeRv：以 *S. maltophilia* KJ 分離菌株之染色體為模板，利用 PCR(引子為 SmeRv-F/ SmeRv-R) 將菌株 KJ 之 *smeRv* 基因片段(此 PCR 產物為 1308-bp) 大量複製並選殖到 pEX18Tc vector 中，得一重組質體 pKJSmeRv，且將其 DNA 基因片段定序以確保其正確性。再將 pKJSmeRv 質體利用 *Pst*I 限制酶經 self-ligation 處理(刪除 294-bp *smeRv* 基因片段)，得一重組質體 pKJΔSmeRv (如圖 4)。

2. pKJΔSmeU1: 以 *S. maltophilia* KJ 分離菌株之染色體為模板，利用PCR (引子為 SmeU1-F/ SmeU1-R) 將菌株 KJ 之 *smeU1* 基因片段(此 PCR 產物為 1359-bp) 大量複製並選殖到 pEX18Tc vector 中，得一重組質體 pKJSmeU1，且將其 DNA 基因片段定序以確保其正確性。再將 pKJSmeU1 質體利用 *Pst*I 限制酶經 self-ligation 處理(刪除 173-bp *smeU1* 基因片段)，得一重組質體 pKJΔSmeU1 (如圖 5)。

3. pKJΔSmeU2: 以 *S. maltophilia* KJ 分離菌株之染色體為模板，利用PCR (引子為 SmeU2-F/ SmeU2-R) 將菌株 KJ 之 *smeU2* 基因片段(此 PCR 產物為 1132-bp) 大量複製並選殖到 pOK12 vector 中，得一重組質體 pOKSmeU2，且將其 DNA 基因片段定序以確保其正確性。再將重組質體 pOKSmeU2 利用 *Hinc*II / *Stu*I(partial) 限制酶經 self-ligation 處理(刪除 103-bp *smeU2* 基因片段)，得一重組質體 pOKΔSmeU2。最後將 pOKΔSmeU2 質體與 pEX18Tc vector 分別以 *Xba*I/*Sac*I，*Xba*I/*Sac*I 限制酶處理後，進行黏合反應，得到重組質體 pKJΔSmeU2 (如圖 7)。

4. pKJΔSmeVW：以 *S. maltophilia* KJ 分離菌株之染色體為模板，利用 PCR (引子為 SmeU1-F/ SmeU1-R) 將菌株 KJ 之 *smeU1* 基因片段(此 PCR 產物為 1359-bp) 大量複製並選殖到 pEX18Tc vector 中，得一重組質體 pKJSmeU1。以 *S. maltophilia* KJ 分離菌株之染色體為模板，利用 PCR (引子為 SmeU2-F/ SmeU2-R) 將菌株 KJ 之 *smeU2* 基因片段(此 PCR 產物為 1132-bp) 大量複製並選殖到 pOK12 vector 中，得一重組質體 pOKSmeU2，且將其 DNA 基因片段定序以確保其正確性。將質體 pKJSmeU1 與 pOKSmeU2 分別以限制酶 *XbaI/SacI*，*XbaI/SacI* 處理，進行黏合反應(刪除 4500-bp *smeV* 和 *smeW* 基因片段)，得到重組質體 pKJΔSmeVW (如圖 6)。

5. pKJΔSmeX：以 *S. maltophilia* KJ 分離菌株之染色體為模板，利用 PCR (引子為 SmeX-F/ SmeX-R) 將菌株 KJ 之 *smeX* 基因片段(此 PCR 產物為 1591-bp) 大量複製並選殖到 pEX18Tc vector 中，得一重組質體 pKJSmeX，且將其 DNA 基因片段定序以確保其正確性。再將之前已構築好之 pKJSmeU2 與 pEX18Tc vector 分別以 *PstI/XhoI*，*PstI/SalI* 限制酶處理後，進行黏合反應，得到重組質體 pKJSme2C。最後將 pKJSme2C 質體與 pKJSmeX 分別利用 *SmaI/EcoRI* 和 *EcoRV/EcoRI* 限制酶處理，得一重組質體 pKJΔSmeX (如圖 8)。

2.3.9 KJ09CΔSmeRv、KJ09CΔSmeU1、KJ09CΔSmeVW、KJ09CΔSmeU2 以及 KJ09CΔSmeX 突變株之獲得與確認

利用接合作用 (conjugation) 將重組質體 pKJΔSmeRv、pKJΔSmeU1、pKJΔSmeVW、pKJΔSmeU2 以及 pKJΔSmeX 送入 *S. maltophilia* 篩選突變株 KJ09C 中，再使 *S. maltophilia* 篩選突變株 KJ09C 的染色體基因與重組質體進行同源互換 (double homologous recombination) 以獲得 KJ09CΔSmeRv、KJ09CΔSmeU1、KJ09CΔSmeVW、KJ09CΔSmeU2 以及 KJ09CΔSmeX 突變株，之後利用 PCR 和 DNA 定序來確保其正確性(如圖 9)。

2.3.10 菌落快速檢驗聚合酶連鎖反應 (Colony PCR)

1. 檢驗大腸桿菌 (*E. coli*)

每管 PCR tube 中加入 dNTP 2 μl，引子 (primer-F, primer-R) 各 2 μl，DMSO 2 μl，10X Taq buffer 2 μl，Taq polymerase 1 μl，最後補上無菌去離子水使總體積為 20 μl。之後，利用無菌牙籤沾取菌落在 PCR tube 內稍微攪動，然後進行 PCR 反應。反應完後取 PCR 產物進行 agarose 電泳和 EtBr 染色後，將膠片置於紫外燈箱觀察 DNA 片段大小。

2. 檢驗嗜麥芽糖黃單胞菌 (*S. maltophilia*)

每管 PCR tube 中加入 dNTP 4 μ l, 引子 (primer-F, primer-R) 各 4 μ l, DMSO 4 μ l, 10X Taq buffer 4 μ l, Taq polymerase 1 μ l。另外, 在無菌操作下取 200 μ l 無菌去離子水注入 1.5 ml eppendorf 中, 利用無菌牙籤沾取菌落在 eppendorf 的無菌水內稍微攪動, 然後將 eppendorf 置於超音波震盪機震盪 15 分鐘。再將 eppendorf 以 12,000 rpm 離心 20 分鐘。之後取 pellet 上方之菌液 20 μ l 至預備好的 PCR tube, 使最後總體積為 40 μ l, 然後進行 PCR 反應。反應完後取 PCR 產物進行 agarose 電泳和 EtBr 染色後, 將膠片置於紫外燈箱觀察 DNA 片段大小。

2.3.11 抗生素感受性試驗

1. Agar dilution test

使用 Mueller-Hinton II 培養基, 以瓊脂稀釋法 (agar dilution method) 進行。作法是將新鮮且隔夜培養之菌液, 以濁度為 McFarland 0.5 做 3 倍稀釋, 利用多點接種器 (multipoint inoculator) 將其接種至含不同梯度濃度抗生素的培養基上。抗生素分別是 chloramphenicol、quinolone 類 (nalidixic acid 和 moxifloxacin)、tetracycline 類 (tetracycline 和 doxycyline) 及 aminoglycoside 類 (kanamycin、gentamycin 和 tobramycin), 濃度範圍為 1~2048 μ g/ml。而每一接種點上有 1.0×10^4 的菌落數 (10^4 /spot), 接

著於 37°C 培養 24 小時後觀察並記錄其生長情形，藉此判讀該菌株對 chloramphenicol、quinolone 類 (nalidixic acid 和 moxifloxacin)、tetracycline 類 (tetracycline 和 doxycycline) 及 aminoglycoside 類 (kanamycin、gentamycin 和 tobramycin) 抗生藥的最低抑制濃度 (minimum inhibitory concentration)。

2. Etest

預先配置 Mueller-Hinton II 培養基，將新鮮且隔夜培養之菌液稀釋到 0.5 turbidity McFarland，用滅過菌的棉棒沾取稀釋過的菌液，均勻塗佈在 Mueller-Hinton II 培養基上，此時拆開 (AB BIODISK 公司生產) Etest strip，小心夾住，將含有抗生藥那一面朝向培養基放入，接著於 37°C 培養 24 小時後觀察並記錄其生長情形，依菌株在培養基上產生的抑制圈判斷該抗生藥的最小抑制濃度。

2.3.12 即時定量聚合酶連鎖反應 (qRT-PCR)

將 37°C 隔夜培養之菌液接種至 5ml 之新鮮 LB broth，以菌液濃度 OD₄₅₀ 為 0.15 開始預養，經 2 小時培養後，取 1ml 之菌液用 PureLink™ Total RNA Purification System 抽出 RNA，另外，在 50 µg 的 RNA 抽出物中添加 1U 的 RNase-free DNaseI 作用 15 分鐘，以去除 DNA 之殘留。

然後測量 260nm 和 280nm 之吸光值來檢測 RNA 的純度與濃度，再以 2% 洋菜膠體(agarose gel)電泳來測定 RNA 的完整性。接著使用 MMLV Reverse Transcriptase 1st Strand cDNA Synthesis Kit 將 1 μ g 無 DNA 殘留之 RNA 轉成 cDNA，以其為 qRT-PCR 之樣本。50 μ g 的 qRT-PCR 反應混合物中含有 25 μ g 的 2X Smart Quant Green Master Mix，正、反向引子各 0.5 μ M 和 1000 倍稀釋的 cDNA。而 PCR 之反應條件與參數為：第一階段 95 $^{\circ}$ C，15 分鐘；再以第二階段 95 $^{\circ}$ C，15 秒鐘；60 $^{\circ}$ C，1 分鐘，此反應進行 40 個循環，然後利用 ABI Prism 7000 SDS software 評估所得之數據資料。qRT-PCR 所用之引子陳列於表一。本實驗所待測之基因表現程度利用 comparative Δ Ct method 以 rRNA 基因為 internal control 來計算其 cDNA 量。而每個實驗皆經三重複且最後之數據結果取其平均值。

2.3.13 C230 (Catechol 2,3-dioxygenase) 活性測試

將待測之菌株接種於 3 ml LB 之培養液中，置 37 $^{\circ}$ C 震盪隔夜培養。之後以 O.D.₄₅₀ = 0.15 做為調整菌液起始濃度標準，於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中懸浮震盪培養至 O.D.₄₅₀ 約為 0.8~0.9 時，將菌液於 8000 rpm 4 $^{\circ}$ C 下離心 5 分鐘收集菌體。

將收集到之菌體以 C230 buffer 稀釋至適合測量之倍數後，取 480 μ l 至石英比色管 (cuvette) 中，以此菌液製備液做為 blank，於 375nm 波長

下將分光光度計歸零。歸零後加入 20 μl 之 0.1 M catechol 均勻混合，立即置於分光光度計中進行分析，測量於 A375 下之單位時間吸光值變化量。本實驗設定條件為每隔 10 秒紀錄一次吸光值，總測量時間為 3 分鐘。所得之吸光值變化以 extinction coefficient 常數 ($\epsilon_{\Delta 375} = 20,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 換算每分鐘 substrate (0.1 M catechol) 被水解的量。活性單位 1U 為每分鐘 1 nmole substrate 被水解所需要之酵素量。最後 C23O specific activity ($\text{U}/\text{O.D.}_{450 \text{ nm}}$) 以 1 O.D._{450} 菌量中含有多少酵素活性 (U) 表示之。



第三章 研究結果

第一節 利用抗生素篩選的方法，篩選自發性突變之多重抗藥性突變株

將 *S. maltophilia* KJ 菌株塗在含有 50 µg/ml chloramphenicol 的 LB medium 上並培養於 37°C 中。經過 48 小時後長出一顆菌落，將其挑出並命名為 KJ09C。

利用抗生素感受性試驗比較 *S. maltophilia* KJ 原生菌株與 KJ09C 突變菌株對不同種類抗生素之敏感性。結果顯示：相較於原生菌株 KJ，KJ09C 突變菌株對於 chloramphenicol、quinolone 類及 tetracycline 類抗生素之 MIC 值有明顯上升的現象；aminoglycoside 類的抗生素之 MIC 值則是下降的情況；而對於 erythromycin 抗生素之 MIC 值則不變（如表 4）。

第二節 多重抗藥性突變株 KJ09C 的 SmeVWX efflux system 過度表現

研究發現經由抗生素篩選方式所篩選之多重抗藥性突變株，其細胞膜上之 RND-type 多重藥物輸出幫浦系統(efflux pump) 常有過度表現的現象（Pumbwe, et al., 2006）^[33]。為了了解 *S. maltophilia* KJ09C 突變株所表現的多重抗藥性現象是否是由於 RND-type 多重藥物輸出幫浦系統過度表現所致。因此，分別針對 8 組可能的 RND-type 多重藥物輸出幫浦

系統之 RND-transporter 基因及外膜蛋白基因設計 primers，並利用即時定量 PCR(qRT-PCR)評估原生菌株 KJ 及突變株 KJ09C 此系列基因之 RNA 量。結果顯示 *S. maltophilia* KJ09C 突變菌株 *smeW* 和 *smeX* 基因之 ΔCt 值分別為 12.33 ± 0.6 和 13.36 ± 0.5 相對於 wild-type KJ 菌株的 18.21 ± 0.8 和 18.00 ± 0.9 都有明顯下降的現象(如表 5)，顯示在 KJ09C 菌株中其 *smeW* 及 *smeX* 基因之表現量較在原生菌株 KJ 中多。

第三節 β -lactam 類之抗生素非 SmeVWX pump 的受質

在先前的研究文獻中報導 *S. maltophilia* KJ 菌株中有 2 個可受 β -lactam 類抗生素 誘導表現的 β -lactamase 基因 L1 和 L2 (Hu, et al., 2008)^[34]，以致可能遮蔽 *S. maltophilia* KJ09C 突變株對 β -lactam 類的抗生素的貢獻。因此，分別構築 KJ 及 KJ09C 菌株之 L1 及 L2 的刪除突變菌株 (deleted mutant)，KJ Δ L1 Δ L2 和 KJ09C Δ L1 Δ L2，並對 KJ Δ L1 Δ L2 和 KJ09C Δ L1 Δ L2 進行 β -lactams 抗生素感受性試驗。結果顯示 KJ Δ L1 Δ L2 之 β -lactams MIC 值與 KJ09C Δ L1 Δ L2 菌株之值相近，顯示 β -lactam 類抗生素非 SmeVWX pump 的受質。

第四節 *SmeU1-V-W-U2-X operon* 的序列分析

本實驗所使用的 *S. maltophilia* KJ 菌株與已定序之 *S. maltophilia* K279a (Crossman, et al., 2008)^[6] DNA 序列有高相同度(≥97%)。因此，本研究以 *S. maltophilia* K279a 菌株之基因體序列為藍本，分析 *SmeVWX* 鄰近基因。分析結果發現 *SmeVWX* pump 與熟知的 RND-type efflux pump 不同。在基因體序列中發現，此 *smeV*、*smeW* 及 *smeX* 基因座落於一 5 個基因所組成的 operon 中。*SmeV*、*smeW* 及 *smeX* 基因所轉譯之蛋白分別為組成 RND-type efflux pump 之膜融合蛋白 (membrane fusion protein)；內膜轉運蛋白 (inner membrane transporter) 和外膜蛋白 (outer membrane protein)。除此之外，還有二個註釋為 short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) 的基因分別位在 *SmeV* 基因上游 (命名為 *smeU1*) 和位於 *smeW* 和 *smeX* 基因之間 (命名為 *smeU2*) (如圖 2)。而且 2 個 SDR 基因所轉譯之 SDR 蛋白其蛋白序列僅有 21.1% 相同度。

在 *smeU1* 基因上游有一屬於 LysR 家族之轉錄調控基因，將其命名為 *smeRv*。*SmeRv* 基因之走向與 *smeU1-V-W-U2-X* operon 走向相反，且之間有一 371-bp 的 intergenic region (IG)。

將 *S. maltophilia* K279a 菌株的 *smeU1* 基因所轉譯的 putative short-chain dehydrogenase/reductase 蛋白之胺基酸序列與其他菌種之蛋白胺基酸序列做比較。在所有分析的菌株中，*S. maltophilia* K279a 菌株

smeU1 基因所轉譯的 putative short-chain dehydrogenase/reductase 蛋白與 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. ATCC33913 菌株之 *dauE* 基因所轉譯的 aklaviketone reductase 蛋白序列相同度最高，有 52% 的相同度。與其他菌種的 putative short-chain dehydrogenase/reductase 蛋白相同度大約在 24~51% 之間，分別為 *Xanthomonas* sp. : 27~51% ; *Streptomyces* sp. : 27~40% (如表 6)。

將 *S. maltophilia* K279a 菌株的膜融合蛋白 *SmeV* 之胺基酸序列與 *S. maltophilia* K279a 菌株之其他 RND-type efflux pump 的膜融合蛋白和其他菌種之蛋白胺基酸序列做比較。在所有分析的菌株中，*S. maltophilia* K279a 菌株的膜融合蛋白 *SmeV* 與 *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* NCPPB4381 之 *XcampmN_010100017039* 基因所轉譯的 RND multidrug efflux membrane fusion protein 蛋白序列相同度最高，有 80% 的相同度。與 *S. maltophilia* K279a 菌株之其他 RND-type efflux pump 的膜融合蛋白相同度約在 26~34% ; 與其他菌種的膜融合蛋白相同度大約在 46~79% 之間，分別為 *Pseudomonas* sp. : 49~50% ; *Klebsiella* sp. : 66~58% (如表 7)。

將 *S. maltophilia* K279a 菌株的內膜轉運蛋白 *SmeW* 之胺基酸序列與 *S. maltophilia* K279a 菌株之其他 RND-type efflux pump 的內膜轉運蛋白和其他菌種之蛋白胺基酸序列做比較。在所有分析的菌株中，*S. maltophilia*

K279a 菌株的內膜轉運蛋白 *SmeW* 與 *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* NCPPB4381 之 *XcampmN_010100017034* 基因所轉譯的 RND superfamily protein MexF 蛋白序列相同度最高，有 81% 的相同度。與 *S. maltophilia* K279a 菌株之其他 RND-type efflux pump 的內膜轉運蛋白相同度約在 22~40%；與其他菌種的內膜轉運蛋白相同度大約在 59~82% 之間，分別為 *Xanthomonas* sp.：81~82%；*Klebsiella* sp.：78~79%；*Burkholderia* sp.：60~71%（如表 8）。

將 *S. maltophilia* K279a 菌株的 *smeU2* 所轉譯的 putative short-chain dehydrogenase/reductase 蛋白之胺基酸序列與其他菌種之蛋白胺基酸序列做比較。在所有分析的菌株中，*S. maltophilia* K279a 菌株 *smeU2* 基因所轉譯的 putative short-chain dehydrogenase/reductase 蛋白與 *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* NCPPB702 之 *XcampvN_010100007935* 基因所轉譯的 short chain dehydrogenase 蛋白序列相同度最高，有 77% 的相同度。與其他菌種的 putative short-chain dehydrogenase/reductase 蛋白相同度大約在 38~68% 之間，分別為 *Streptomyces* sp.：40~57%；*Burkholderia* sp.：41~50%（如表 9）。

將 *S. maltophilia* K279a 菌株的外膜蛋白 *SmeX* 之胺基酸序列與 *S. maltophilia* K279a 菌株之其他 RND-type efflux pump 的外膜蛋白和其他菌種之蛋白胺基酸序列做比較。在所有分析的菌株中，*S. maltophilia* K279a

菌株的外膜蛋白 SmeX 與 *Xanthomonas axonopodis* pv. citri str. 306 之 *oprN* 基因所轉譯的 outer membrane protein 蛋白序列相同度最高，有 74% 的相同度。與 *S. maltophilia* K279a 菌株之其他 RND-type efflux pump 的外膜蛋白相同度約在 30~32%；與其他菌種的 SmeX 蛋白相同度大約在 36~55% 之間，分別為 *Pseudomonas* sp. : 42~55%；*Burkholderia* sp. : 36~39% (如表 10)。

在所有分析中，最值得注意的是在 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 菌株中有一多重藥物輸出幫浦系統 MexEF-*oprN* (*dauE-mexE-mexF-Xcc1441-oprN*) 的組裝與 *S. maltophilia* K279a 菌株之多重藥物輸出幫浦系統 SmeVWX (*smeU1-V-W-U2-X*) 的組裝極為相似且兩 operon 中其相對應的基因所轉譯的蛋白亦有高相同度。(如圖 2)

第五節 SmeVWX 多重藥物輸出幫浦在內生性和後天抗性之扮演角色

為了評估 *S. maltophilia* KJ 菌株和 KJ09C 突變株之 *smeU1-V-W-U2-X* operon 對於多重抗藥性的貢獻，分別利用 homologous recombination 方式將 KJ 和 KJ09C 之 *smeU1-V-W-U2-X* genes knockout，將所得之突變菌株分別命名為 KJ Δ 5 和 KJ09C Δ 5。接著對 KJ Δ 5 和 KJ09C Δ 5 與其相對應之 parent strains KJ 及 KJ09C 進行抗生素感受性試驗。結果顯示：(1) *S. maltophilia* KJ Δ 5 突變菌株相較於原生菌株 KJ 之

chloramphenicol、quinolone 類 (nalidixic acid 和 moxifloxacin)、tetracycline 類 (tetracycline 和 doxycycline) 及 aminoglycoside 類 (kanamycin、gentamycin 和 tobramycin) 之 MIC 值沒有明顯的變化，顯示 SmeU1-V-W-U2-X 系統對 *S. maltophilia* 內生性的抗性 (intrinsic resistance) 沒有明顯貢獻。(2) 將 *S. maltophilia* KJ09C 菌株之 *smeU1-V-W-U2-X* genes knockout (KJ09CΔ5) 後所有測試抗生素之 MIC 值即可恢復至與原生菌株 KJ 一樣之 MIC 值 (如表 4)，顯示 SmeVWX 幫浦過度表現是造成 KJ09C 突變株多重抗藥性現象的最主要因素。

第六節 轉錄調控基因 *smeRv* 在 *smeU1-V-W-U2-X* genes 中所扮演的角色

在先前的文獻報導中報導一個多重藥物輸出幫浦的表現常常受到 global 調控蛋白和鄰近的調控蛋白所調控 (Ma, et al., 1996) [35]。在 *smeU1-V-W-U2-X* genes 之上游有一屬於 LysR 家族之轉錄調控基因 *smeRv*，高度的支持鄰近的調控蛋白會調控 SmeU1-V-W-U2-X 之系統表現的論點。為了證實此論點，利用即時定量 PCR 評估原生菌株 KJ 及突變株 KJ09C 之 *smeRv* 基因的 RNA 量，並為了進一步了解此轉錄調控基因在 *smeU1-V-W-U2-X* genes 中所扮演的角色，利用 KJ09CΔ*smeRv* knockout 突變菌株與其原生菌株進行抗生素感受性試驗。結果顯示：(1) 由 qRT-PCR 結果顯示 *S. maltophilia* KJ09C 突變菌株的 *smeRv* 基因之 ΔCt

值為 11.14 ± 0.5 相對於 wild-type KJ 菌株的 17.44 ± 0.8 有明顯下降的現象 (如表 5), 顯示此基因在 *smeU1-V-W-U2-X* operon 過度表現的 KJ09C 菌株中之表現量有明顯上升的現象。(2) 將 *S. maltophilia* KJ09C 菌株之 *smeRv* 基因 knockout 後, KJ09C Δ *smeRv* 菌株之所測試抗生素的 MIC 值即可恢復至與原生菌株 KJ 一樣之 MIC 值 (如表 4), 顯示轉錄調控基因 *smeRv* 在 *smeU1-V-W-U2-X* operon 過度表現的 KJ09C 突變株中扮演一個正調控的角色。

第七節 *SmeRv-smeU1-smeV-smeW-smeU2-smeX* operon 調控方式分析。

為了了解 *smeRv* 基因與 *smeU1-V-W-U2-X* operon 之間 371-bp 之 intergenic region 內 *smeRv* 基因與 *smeU1-V-W-U2-X* operon 之啟動子的調控方式, 利用 promoter-*xylE* transcription fusion assay 的策略來評估此區域之啟動子表現。分別構築 P_{smeRv} 與 *xylE* 基因之轉錄融合質體 pRK371R_{*xylE*} 與 P_{smeU1} 與 *xylE* 基因之轉錄融合質體 pRK371U_{*xylE*}。將此兩質體送入原生菌株 KJ 及突變株 KJ09C、KJ Δ *SmeRv* 及 KJ09C Δ *SmeRv* 並分析轉錄融合質體在不同菌株中 C230 活性的表現量。由 C230 活性分析的結果顯示:(1) KJ Δ *SmeRv* (pRK371R_{*xylE*})之 C230 活性值為 58 ± 6.1 Uc/OD_{450nm} 相對於菌株 KJ (pRK371R_{*xylE*}) 的 5 ± 0.7 Uc/OD_{450nm} 活性值明顯高於 10 倍。顯示調控基因 *smeRv* 在原生菌株 KJ

中扮演著負向自我調控的角色 (如表 11)。(2) 在 KJ09C 背景下，KJ09C Δ SmeRv (pRK371Rv_{xylE}) 之 C23O 的活性值為 21 ± 1.9 Uc/OD_{450nm} 相對於 KJ09C(p371smeRv_{xylE}) 的 305 ± 41 Uc/OD_{450nm} 活性值明顯低。顯示調控基因 *smeRv* 在 KJ09C 菌株中扮演著正向自我調控的角色(如表 11)。

(3) 在原生菌株 KJ 的背景下，KJ Δ SmeRv (pRK371U1_{xylE}) 突變株之 C23O 活性值為 3 ± 0.7 Uc/OD_{450nm} 相對於原生菌株 KJ (pRK371U1_{xylE}) 的 1 ± 0.4 Uc/OD_{450nm} 活性值沒有明顯的活性變化。更進一步證實 *smeU1-V-W-U2-X* operon 在原生菌株 KJ 是不表現的 (如表 11)。(4) 在 KJ09C 背景下，KJ09C Δ SmeRv (pRK371U1_{xylE}) 之 C23O 活性值為 2 ± 0.5 Uc/OD_{450nm} 相對於 KJ09C(p371smeU1_{xylE}) 的 25 ± 3.1 Uc/OD_{450nm} 活性值明顯低。顯示在 KJ09C 菌株中 *SmeU1-V-W-U2-X* 系統的過度表現必須要調控蛋白 SmeRv 的幫助 (如表 11)。

在先前的研究文獻中報導在有些 RND-type efflux pump operon 中，其外膜蛋白基因有獨立的 promoter (Zhao, et al., 1998)^[36]，為了評估 *SmeX* 外膜蛋白是否擁有 promoter，將 *smeX* 基因上游 323 bp 之 DNA 片段與 *xylE* 基因構築一轉錄融合質體 pRK323SmeX_{xylE}。將此質體送入原生菌株 KJ 及突變株 KJ09C、KJ Δ SmeRv 及 KJ09C Δ SmeRv 並分析轉錄融合質體在不同菌株中 C23O 活性的表現量。由 C23O 活性分析的結果顯示：

(1) 在原生菌株 KJ 的背景下，KJ Δ SmeRv (pRK323SmeX_{xylE}) 突變株之

C23O 活性值為 6 ± 0.7 Uc/OD_{450nm} 相對於原生菌株 KJ (pRK323SmeX_{xyIE}) 的 4 ± 0.4 Uc/OD_{450nm} 活性值沒有明顯的活性變化 (如表 11)。顯示 *smeX* 基因上游 323 bp 區域內沒有啟動子活性。(2) 在過度表現的 KJ09C 背景下, KJ09CΔ*SmeRv* (pRK323SmeX_{xyIE}) 之 C23O 活性值為 5 ± 0.4 Uc/OD_{450nm} 相對於 KJ09C(pRK323SmeX_{xyIE}) 的 5 ± 0.5 Uc/OD_{450nm} 活性值沒有明顯的活性變化 (如表 11)。顯示在 KJ09C 的背景下, *smeX* 上游 323 bp 區域內沒有啟動子活性。

第八節 突變株 KJ09C 中 *smeRv* 基因與 *smeU1* 基因間 intergenic 區域沒有任何的突變點

為了釐清造成突變菌株 KJ09C 之 *smeU1-V-W-U2-X* operon 的過度表現是否是因為 *smeRv* 基因與 *smeU1* 基因間 intergenic 區域內的啟動子區域有突變點。利用 PCR 取得菌株 KJ 及 KJ09C 中 *smeRv* 基因與 *smeU1* 基因間 371 bp 的區域, 定序結果顯示: 菌株 KJ 及 KJ09C 的 371-bp IG region DNA 序列完全相同, 所以突變株 KJ09C 之 *smeU1-V-W-U2-X* operon 的過度表現並非是 *smeRv* 基因與 *smeU1* 基因間 intergenic 區域內的突變點所造成的結果。

第九節 分析突變菌株 KJ09C 之 *smeU1-V-W-U2-X* operon 的基因在抗生素性中扮演之角色

為了更進一步了解 *smeU1-V-W-U2-X* operon 中每一個基因在突變菌株 KJ09C 中所扮演的角色。利用 homologous recombination 方式分別將 KJ09C 菌株中之 *smeU1*、*smeVW*、*smeU2* 及 *smeX* 基因分別 knockout (KJ09C Δ SmeU1、KJ09C Δ SmeVW、KJ09C Δ SmeU2、KJ09C Δ SmeX)。利用 qRT-PCR 評估 KJ09C 菌株和 knockout 突變菌株所刪除基因及其下游基因之 RNA 表現量，並與其相對應之 parent strains KJ09C 及 KJ 進行抗生素感受性試驗。結果顯示：(1) KJ09C Δ SmeU1 菌株之 *smeV*、*smeW*、*smeU2* 及 *smeX* 基因之 Δ Ct 值分別為 14.18 ± 0.9 、 12.82 ± 0.6 、 11.05 ± 0.8 和 12.88 ± 0.5 相對於 KJ09C 菌株的 13.07 ± 0.8 、 12.33 ± 0.6 、 10.24 ± 0.7 、 13.36 ± 0.5 沒有明顯的變化 (如表 5)，說明 *smeU1* 基因 deletion 對 *smeU1-V-W-U2-X* operon 下游基因的表現沒有 polar effect 的現象。在抗生素感受性試驗中，相較於 KJ09C，KJ09C Δ SmeU1 突變菌株之 chloramphenicol、quinolone 類 (nalidixic acid 和 moxifloxacin)、tetracycline 類 (tetracycline 和 doxycycline) 及 aminoglycoside 類 (kanamycin、gentamycin 和 tobramycin) 之 MIC 值沒有明顯的變化 (如表 4)。(2) KJ09C Δ SmeVW 菌株之 *smeU2* 和 *smeX* 基因之 Δ Ct 值分別為 11.04 ± 0.9 和 13.94 ± 0.7 相對於 KJ09C 菌株的 10.24 ± 0.7 和 13.36 ± 0.5 沒有明顯的變化 (如表 5)，說明 *smeVW* 基因

deletion 對 *smeU1-V-W-U2-X* operon 下游基因的表現沒有 polar effect 的現象。在抗生素感受性試驗中，相較於 KJ09C，KJ09C Δ SmeVW 突變菌株之 chloramphenicol、quinolone 類 (nalidixic acid 和 moxifloxacin)、tetracycline 類 (tetracycline 和 doxycyline) 之 MIC 值有明顯的下降並恢復至與 wild-type KJ 菌株一樣之 MIC 值，在 aminoglycoside 類 (kanamycin、gentamycin 和 tobramycin) 之 MIC 值相對於 KJ09C 菌株則沒有明顯的變化 (如表 4)，顯示 SmeV-W 連結的 efflux pump 對 chloramphenicol、quinolone 類 (nalidixic acid 和 moxifloxacin)、tetracycline 類抗生素有貢獻，但對 aminoglycoside 類 (kanamycin、gentamycin 和 tobramycin) 似乎沒有明顯的貢獻。(3) KJ09C Δ SmeU2 菌株之 *smeX* 基因的 ΔC_t 值為 15.99 ± 0.9 相對於 KJ09C 菌株的 13.36 ± 0.5 有上升的現象 (如表 5)，說明 *smeU2* 基因 deletion 對 *smeU1-V-W-U2-X* operon 下游基因的表現有 polar effect 的現象。在抗生素感受性試驗中，相較於 KJ09C，KJ09C Δ SmeU2 突變菌株之 chloramphenicol、quinolone 類 (nalidixic acid 和 moxifloxacin)、tetracycline 類 (tetracycline 和 doxycyline) 之 MIC 值有下降但未恢復至與 wild-type KJ 菌株一樣之 MIC 值，但 aminoglycoside 類 (kanamycin、gentamycin 和 tobramycin) 之 MIC 值相對於 KJ09C 菌株則有明顯的下降 (如表 4)。(4) 相較於 KJ09C，KJ09C Δ SmeX 突變菌株之 chloramphenicol、quinolone 類 (nalidixic acid 和 moxifloxacin)、tetracycline 類 (tetracycline 和 doxycyline)

之 MIC 值有明顯的下降但未恢復至與 wild-type KJ 菌株一樣之 MIC 值，但 aminoglycoside 類 (kanamycin、gentamycin 和 tobramycin) 之 MIC 值相對於 KJ09C 菌株則有明顯的上升並恢復至原生菌株 KJ 一樣之 MIC 值 (如表 4)。

第十節 *smeU1*、*smeU2* 和 *smeX* 基因過度表現對抗藥性的影響

由上述結果發現，KJ09CΔ*SmeU2* 菌株之 aminoglycoside 類 (kanamycin、gentamycin 和 tobramycin) 之 MIC 值相對於 KJ09C 菌株有明顯的下降。但 KJ09CΔ*SmeX* 之 aminoglycoside 類的 MIC 值則恢復至與原生菌株 KJ 一樣之 MIC 值。為了進一步釐清 *smeU2* 和 *smeX* 基因對抗藥性所扮演的角色，將 *smeU2* 及 *smeX* 基因在 KJ09CΔ5 菌株 (*smeU1-V-W-U2-X* operon deletion mutant of KJ09C) 中過度大量表現來評估其意義。同時，也將 *smeU1* 基因加入分析。過度大量表現系統是利用先前本實驗室所發現的 *ampR-L2* 調控組裝特性做為設計 (Lin, et al.,2009)^[37]。在先前的研究中發現，L2 基因可經由 β-lactam 類抗生素之誘導，在 AmpR 蛋白的幫忙下，大量表現 (Lin, et al.,2009)^[37]。因此，將所欲大量表現的基因利用 double cross-over 的方式 *in-situ* 取代 L2 基因，得到構築菌株 KJ09CΔ5L2::*SmeU1*、KJ09CΔ5L2::*SmeU2* 和 KJ09CΔ5L2::*SmeX*，並對 KJ09CΔ5 與此系列突變菌株進行抗生素感受

性試驗。表 4 結果顯示：(1) 在 30 µg/ml cefoxitin 存在下，*S. maltophilia* KJ09CΔ5L2::*SmeU1* 突變菌株之 chloramphenicol、quinolone 類 (nalidixic acid 和 moxifloxacin)、tetracycline 類 (tetracycline 和 doxycycline) 及 aminoglycoside 類 (kanamycin、gentamycin 和 tobramycin) MIC 值相較於 KJ09CΔ5 菌株之 MIC 值沒有明顯的變化 (如表 4)，顯示 *smeU1* 基因大量表現對所測試抗生素之抗性沒有影響。(2) KJ09CΔ5L2::*SmeU2* 突變菌株之 MIC 值相較於 KJ09CΔ5 菌株之 chloramphenicol、quinolone 類 (nalidixic acid 和 moxifloxacin)、tetracycline 類 (tetracycline 和 doxycycline) 及 aminoglycoside 類 (kanamycin、gentamycin 和 tobramycin) 之 MIC 值沒有明顯的變化 (如表 4)，顯示 *smeU2* 基因在 KJ09CΔ5 的背景下，大量表現對所測試抗生素之抗性沒有影響。(3) KJ09CΔ5L2::*SmeX* 突變菌株之 MIC 值相較於 KJ09CΔ5 菌株之 chloramphenicol、quinolone 類 (nalidixic acid 和 moxifloxacin)、tetracycline 類 (tetracycline 和 doxycycline) 之 MIC 值沒有明顯的變化，但 aminoglycoside 類 (kanamycin、gentamycin 和 tobramycin) 之 MIC 值卻有大幅度下降，顯示單獨 *smeX* 基因大量表現時即能讓 KJ09C 菌株 aminoglycoside 類抗生素的感受性上升。(如表 4)

第四章 討論

長期以來，抗生素的使用造成後續之抗藥性問題始終是研究的焦點，也因為抗藥性的問題，使得受感染之病患在給予藥物治療上增添了許多困難。*S. maltophilia* 是院內重要感染之致病菌，也由於它有很多不同之抗藥機制，使得抗藥性的控制更是複雜，而日趨嚴重。而本研究論文是利用抗生素篩選一突變株KJ09C 且證實其是過度表現一RND-type的SmeVWX多重藥物輸出幫浦，並進而探討SmeVWX多重藥物輸出幫浦過度表現對多重抗藥性之貢獻。

S. maltophilia 之 SmeVWX 多重藥物輸出幫浦在基因體序列中發現此*smeV*、*smeW* 及*smeX* 基因座落於一5個基因所組成的operon中，且這operon之上游有一走向相反之調控基因*smeRv*。而特別的是有2個註釋為short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) 的基因，分別是位在 *smeV* 基因上游的*smeU1*基因和位於 *smeW* 和 *smeX* 基因之間的*smeU2*基因（如圖2）。這2個 SDR基因所轉譯之SDR 蛋白其蛋白序列僅有 21.1% 相同度。與 *P. aeruginosa* 之多重藥物輸出幫浦MexEF-OprN(*mexE-mexF-oprN*)（Köhler, et al., 1999）^[38]的基因組裝不同，*P. aeruginosa* 之 *mexEF-oprN* operon 沒有註釋為SDR之基因。*P. aeruginosa* 之 *mexE-mexF-oprN*

operon 之上游也有一調控基因 *mexT*，而這調控基因的走向卻是與此 operon 走向相同。 *S. maltophilia* 之調控基因 *smeRv* 所轉譯之蛋白 SmeRv 與 *P. aeruginosa* 之 MexT 調控蛋白有21.2%的相似度；組成多重藥物輸出幫浦之 *smeV*、*smeW* 及 *smeX* 基因所轉譯之蛋白與相對應之 *mexE*、*mexF* 及 *oprN* 所轉譯之蛋白分別有51%、56%及48%的相似度 (Crossman, et al., 2008) [6]。在所有分析中，最值得注意的是在 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 菌株中也有一多重藥物輸出幫浦系統 MexEF-*oprN* (*dauE-mexE-mexF-Xcc1441-oprN*) 的組裝與 *S. maltophilia* 之多重藥物輸出幫浦系統 SmeVWX (*smeU1-V-W-U2-X*) 的組裝極為相似。且兩 operon 中其相對應的基因所轉譯的蛋白分別有44.5%、73.5%、80.4%、69.8%和71.4%的相似度。*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 之多重藥物輸出幫浦系統 MexEF-*oprN* (*dauE-mexE-mexF-Xcc1441-oprN*) 和 *S. maltophilia* 之 SmeVWX (*smeU1-V-W-U2-X*) 多重藥物輸出幫浦系統上游都有一走向相反的調控基因 *Xcc1437* 和 *smeRv*，而這兩個調控基因所轉譯之蛋白有80.6%的相似度，但是目前的文獻中並未有 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 之 MexEF-*oprN* 多重藥物輸出幫浦相關報導。

在*smeU1-V-W-U2-X* operon 之上游有一屬於 LysR 家族之轉錄調控基因 *smeRv*，而且此調控基因與*smeU1-V-W-U2-X* operon有371 bp 的 intergenic region (IG) 區域片段。而為了了解 *smeRv* 基因與 *smeU1-V-W-U2-X* operon 之間 371-bp 之 IG 內 *smeRv* 基因與 *smeU1-V-W-U2-X* operon 之啟動子的調控方式，利用 promoter-*xylE* transcription fusion assay 的策略來評估此區域之啟動子表現。結果發現在原生菌株KJ中調控基因*smeRv* 扮演著負向自我調控的角色，此特點與一般 LysR家族轉錄調控基因的特性相吻合 (Henikoff, et al., 1988)^[18]。也由實驗數據顯示 *smeU1-V-W-U2-X* operon 在原生菌株KJ是不表現的，所以在原生菌株中 *SmeRv* 對 *smeU1-V-W-U2-X* operon 的表現，扮演一 repressor 的角色。而在MDR突變株的KJ09C背景下調控基因 *smeRv* 卻是扮演著正向自我調控的角色，而且由實驗數據亦顯示 *SmeU1-V-W-U2-X* 系統的過度表現必須要調控蛋白 *SmeRv*的幫助。這個實驗面向也與先前的文獻 *P. aeruginosa* 之 MexEF-OprN多重藥物輸出幫浦的調控方式有高度相同處 (Köhler, et al.,1999) ^[38]。*P. aeruginosa* MexEF-OprN 多重藥物輸出幫浦在一般的實驗室生長條件下是不表現或是表現量很低，但在過度表現之 *nfxC*-type 突變株中此多重藥物輸出幫浦也可被 *mexEF-oprN* operon 上游一屬於 LysR 型轉錄調控因子 MexT 調控蛋白正調控。此外，在文獻報導中有些屬於 LysR-type 轉錄調控蛋

白，其會因參與調控的小分子 (ligand) 種類不同，而可扮演 activator 或 repressor 的角色 (Maddocks, and Oyston, 2008) [39]。因此，造成 SmeRv 在原生菌株 KJ 的背景下和MDR突變株KJ09C 的背景下扮演的不同的角色亦可能是因不同的小分子參與而造成有SmeRv 不同的角色。

RND-type 幫浦家族是由在內膜上一須依賴能量的運送子 (energy-dependent transporter)、外膜蛋白質 (outer membrane protein [OMP]) 和連接內膜及外膜蛋白的膜融合蛋白質(membrane fusion protein) 等三種蛋白質所組成三合體的多重藥物運輸體結構。在先前的研究文獻中報導在有些 RND-type efflux pump operon 中，其外膜蛋白基因有獨立的 promoter 可以獨自啟動表現而與其它蛋白搭配形成三合體之結構 (Zhao, et al.,1998) [36]。因此，本實驗為了評估 SmeX 外膜蛋白是否擁有 promoter，亦構築 *smeX* 基因上游區域片段，並藉由 C23O 活性分析。由實驗結果顯示，*smeX* 基因上游區域片段並沒有明顯的啟動子活性，意味著外膜蛋白 SmeX 在一般的實驗室生長條件是不單獨表現的。但當 *smeU1-V-W-U2-X* 系統表現時，SmeX 除了可與 SmeV 及 SmeW 形成三合體之結構，亦可能會支援其它已表現的外膜蛋白質和膜融合蛋白質形成三合體之結構，進而將藥物打出去。

利用 one step 的方法，將實驗室原生菌株KJ塗在含有高濃度抗生素之chloramphenicol的培養基中，導致一自發性突變菌株KJ09C，並由抗生素感受性試驗與原生菌株KJ相比較下發現此突變菌株KJ09C能夠抗chloramphenicol、quinolone 類 (nalidixic acid和moxifloxacin)、tetracycline 類 (tetracycline 和 doxycycline) 但對 aminoglycoside 類 (kanamycin、gentamycin和tobramycin) 的抗生素卻有感受性上升的現象。為了了解所篩選到的MDR突變株KJ09C 之 *smeU1-V-W-U2-X* operon 的每一個基因在抗生素性中扮演之角色，利用 homologous recombination 方式分別將KJ09C菌株中之 *smeU1*、*smeVW*、*smeU2* 及 *smeX* 基因分別knockout (KJ09CΔ*smeU1*、KJ09CΔ*smeVW*、KJ09CΔ*smeU2*、KJ09CΔ*smeX*)。

由結果可以推論：

- (1). *smeU1*基因的knockout後不僅不會影響下游基因的表現 (如表5 之 KJ09C 和 KJ09CΔ*U1*)，更是在抗生素感受性試驗中，對抗生素的MIC值並沒有明顯的變化 (如表4 之 KJ09C 和 KJ09CΔ*U1*)。因此，暗示著 MDR突變株KJ09C之 *smeU1*基因和KJ09C菌株多重抗藥性表型的關係不大。
- (2). *smeVW*基因knockout後也不會影響下游基因的表現 (如表5 之 KJ09C 和 KJ09CΔ*VW*)，但是 KJ09CΔ*VW* 菌株對 chloramphenicol、quinolone 及 tetracycline 類抗生素感受性試驗的

MIC值卻可恢復至與原生菌株KJ相近或相同的數值，但對aminoglycoside類 (kanamycin、gentamycin和tobramycin) 抗生素的MIC值似乎沒有明顯的變化 (如表4之KJ09C和KJ09CΔVW)。此觀察說明著*smeVW*基因的過度表現與chloramphenicol、quinolone及tetracycline類抗生素的抗性上升有關，但似乎與aminoglycoside類抗生素的感受性上升沒有明顯的相關性。

(3). *smeX* 基因knockout後會使KJ09C對chloramphenicol、quinolone及tetracycline類抗生素感受性部分恢復但卻未完全的恢復至原生菌株KJ一樣的MIC值 (如表4之KJ09C和KJ09CΔX)，我們推測這外膜蛋白SmeX一旦失去了功能，SmeVW蛋白可能會有其它的外膜蛋白來支援以形成三合體的結構，進而將藥物打出去。此論點可由*P. aeruginosa*的例子獲得支持。在先前文獻所報導*P. aeruginosa*之MexAB-OprM (Li, et al., 1995)^[20]多重藥物輸出幫浦中，外膜蛋白OprM可以支援MexJK (Chuanchuen, et al., 2002)^[25]、MexVW (Li, et al., 2003)^[27]、MexXY等多重藥物輸出幫浦 (Masuda, et al., 2000)^[28]形成一三合體結構進而將藥物排出去。

另外，*smeX* 基因knockout後，aminoglycoside類 (kanamycin、gentamycin和tobramycin) 的MIC值則恢復至原生菌株KJ一樣的MIC值，似乎暗示著造成對aminoglycoside類抗生素感受性上升的

原因可能是來自於外膜蛋白 SmeX過度表現。此論點更進一步由菌株 KJ09CΔ5L2::X 之感受性試驗的結果 (如表4) 得到證實。KJ09CΔ5L2::X 菌株是利用先前本實驗室所發現的 *ampR-L2* 調控組裝特性做為設計(Lin, et al.,2009)^[37]，將所欲大量表現的基因利用 double cross-over 的方式 *in-situ* 取代 L2 基因所得到的突變菌株。KJ09CΔ5L2::X 菌株對 chloramphenicol、quinolone 類、tetracycline 類之抗生素感受性試驗 MIC 值皆沒有明顯的變化，但對 aminoglycoside 類抗生素之 MIC 值卻有大幅度下降 (如表4)。至於過度表現 SmeX 蛋白造成 KJ09C 對 aminoglycoside 類抗生素抗性下降之原因可能是外膜蛋白 SmeX 可作為 aminoglycoside 類抗生素進入細菌體內的管道，導致對 aminoglycoside 類抗生素抗性下降。

- (4). *smeU2* 基因 knockout 後會影響下游 *smeX* 基因的表現 (如表5 之 KJ09C 和 KJ09CAU2)，且在抗生素感受性試驗中發現 KJ09CAU2 菌株對於 chloramphenicol、quinolone 及 tetracycline 類抗生素的感受性有部分恢復的現象，但對 aminoglycoside 類抗生素之感受性相較於 KJ09C 卻是更上升 (如表4 之 KJ09C 和 KJ09CAU2)，這項結果暗示著 *smeU2* 基因可能同時參與 SmeVWX 多重藥物輸出幫浦對 chloramphenicol、quinolone 及 tetracycline 類抗生素的

排出及過度表現 SmeX 所造成的aminoglycoside類抗生素感受性上升。於是，利用先前本實驗室所發現的 *ampR-L2* 調控組裝特性做為設計(Lin, et al., 2009)^[37]，將 *smeU2* 基因利用double cross-over的方式*in-situ* 取代 L2 基因並藉由β-lactam 類抗生素之誘導下大量表現 *smeU2*基因，進一步釐清 *smeU2* 基因所扮演的角色。結果發現此突變菌株 KJ09CΔ5L2::*U2*對chloramphenicol、quinolone 及 tetracycline 類抗生素之MIC值沒有明顯的變化，而且對於aminoglycoside類抗生素的MIC值亦沒有明顯變化。似乎暗示著 *SmeU2* 對 KJ09C 抗性變化的影響 必須在 *SmeVWX*多重藥物輸出幫浦過度表現時，才有意義；若單獨只有*SmeU2* 過度表現，並未對 KJ09C 抗性有明顯貢獻。因此，我們提出了一個可能的模組，在 MDR 突變株 KJ09C 中 *smeU2* 基因所轉譯之 short-chain dehydrogenase/reductase (SDR)的酵素蛋白扮演著修飾*SmeX* 蛋白的角色，而修飾後之 *SmeX* 蛋白可能造成二層面的影響，(i) 增強 *SmeVWX* 多重藥物輸出幫浦的活性，將chloramphenicol、quinolone 及 tetracycline 類抗生素排出，使得 KJ09C 對chloramphenicol、quinolone類及 tetracycline類抗生素抗性上升。。(ii) 增進 *SmeX* 將 aminoglycoside 送入細菌體內的效率，使得 KJ09C 對aminoglycoside類抗生素感受性上升（如圖10）。

第五章 結論

本研究論文是利用一高濃度抗生素 chloramphenicol 篩選到一突變株 KJ09C，並由抗生素感受性試驗得知此 KJ09C 菌株具有多重抗藥性之現象，能夠抗 chloramphenicol、quinolone 類及 tetracycline 類抗生素，但對 aminoglycoside 類抗生素之感受性卻上升。利用 qRT-PCR、刪除突變菌株 (deletion mutant) 及抗生素感受性試驗證明此突變株 KJ09C 是過度表現 SmeVWX 這套多重藥物輸出幫浦 (multidrug efflux pump)。SmeVWX 多重藥物輸出幫浦是由 5 個基因 *smeU1*、*smeV*、*smeW*、*smeU2* 及 *smeX* 基因組成一 operon，且此幫浦之表現受上游一屬於 LysR 家族之轉錄調控基因 *smeRv* 正向調控。

分析突變菌株 KJ09C 之 *smeU1-V-W-U2-X* operon 的基因在抗生素性中扮演之角色，結果發現：(i) *smeU1* 基因和 KJ09C 菌株多重抗藥性表型的關係不大；(ii) *smeVW* 基因的過度表現與 chloramphenicol、quinolone 及 tetracycline 類抗生素的抗性上升有關，但與 aminoglycoside 類抗生素的感受性上升沒有明顯的相關性；(iii) *smeX* 基因過度表現會導致 KJ09C 對 aminoglycoside 類抗生素抗性下降；(iv) *smeU2* 基因過度表現可能會增強 SmeVWX 多重藥物輸出幫浦的活性，將 chloramphenicol、quinolone 及 tetracycline 類抗生素排出，使得 KJ09C 對 chloramphenicol、

quinolone 類及 tetracycline 類抗生素抗性上升。另外，*smeU2* 基因過度表現可能會增進 SmeX 將 aminoglycoside 送入細菌體內的效率，使得 KJ09C 對 aminoglycoside 類抗生素感受性上升。



TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype or properties	Source or reference
<i>S. maltophilia</i>		
KJ	Wild type, a clinical isolate from Taiwan	34
KJΔ5	<i>S. maltophilia</i> KJ <i>smeU1-V-W-U2-X</i> operon deletion mutant	This study
KJ09C	<i>S. maltophilia</i> KJ MDR mutant	This study
KJ09CΔL1ΔL2	<i>S. maltophilia</i> KJ09C L1 and L2 genes double mutant	This study
KJ09CΔ5	<i>S. maltophilia</i> KJ09C <i>smeU1-V-W-U2-X</i> operon deletion mutant	This study
KJ09CΔRv	<i>S. maltophilia</i> KJ09C <i>smeRv</i> deletion mutant	This study
KJ09CΔU1	<i>S. maltophilia</i> KJ09C <i>smeU1</i> deletion mutant	This study
KJ09CΔVW	<i>S. maltophilia</i> KJ09C <i>smeV-smeW</i> deletion mutant	This study
KJ09CΔU2	<i>S. maltophilia</i> KJ09C <i>smeU2</i> deletion mutant	This study
KJ09CΔX	<i>S. maltophilia</i> KJ09C <i>smeX</i> deletion mutant	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F- φ80dlacZΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>phoA supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
S17-1	<i>recA pro thi hsdR</i> with inte grated RP4-2-tc::Mu-kan::Tn7; Tra+TrrSmr	40
plasmids		
pEX18Tc	sacB oriT, Tc ^r	41
pRK415	Mobilizable broad-host-range plasmid cloning vector, RK2 origin; Tc ^r	42
pX1918GT	Plasmid containing the <i>xylE</i> -gentamicin resistance cassette; Amp ^r Gm ^r	43
pΔ5	pEX18Tc vector with a 1982-bp DNA fragment of <i>S. maltophilia</i> KJ, containing the partial 5'-terminus of <i>smeU1</i> gene and a partial 3'-terminus of <i>smeX</i> gene; Tc ^r	This study
pKJΔRv	pEX18Tc vector with an internal-deletion <i>smeRv</i> gene; Tc ^r	This study
pKJΔU1	pEX18Tc vector with an internal-deletion <i>smeU1</i> gene; Tc ^r	This study

pKJΔVW	pEX18Tc vector with a 2426-bp DNA fragment of <i>S. maltophilia</i> KJ, containing the <i>smeU1</i> gene, partial 5'- terminus of <i>smeV</i> gene, and partial 3'- terminus of <i>smeW</i> gene and <i>smeU2</i> gene; Tc ^r	This study
pKJΔU2	pEX18Tc vector with an internal-deletion <i>smeU2</i> gene; Tc ^r	This study
pKJΔX	pEX18Tc vector with an internal-deletion <i>smeX</i> gene; Tc ^r	This study
p371R _{v_{xylE}}	pRK415 vector with a 371-bp intergenic region of <i>smeRv</i> and <i>smeU1</i> genes and a transcriptional fusioned- <i>xylE</i> gene; <i>smeRv::xylE</i> fusion construct	This study
p371U1 _{xylE}	pRK415 vector with a 371-bp intergenic region of <i>smeRv</i> and <i>smeU1</i> genes and a transcriptional fusioned- <i>xylE</i> gene; <i>smeU1::xylE</i> fusion construct	This study
p323X _{xylE}	pRK415 vector with a 323-bp upstream of <i>smeX</i> gene and a transcriptional fusioned- <i>xylE</i> gene; <i>smeX::xylE</i> fusion construct	This study

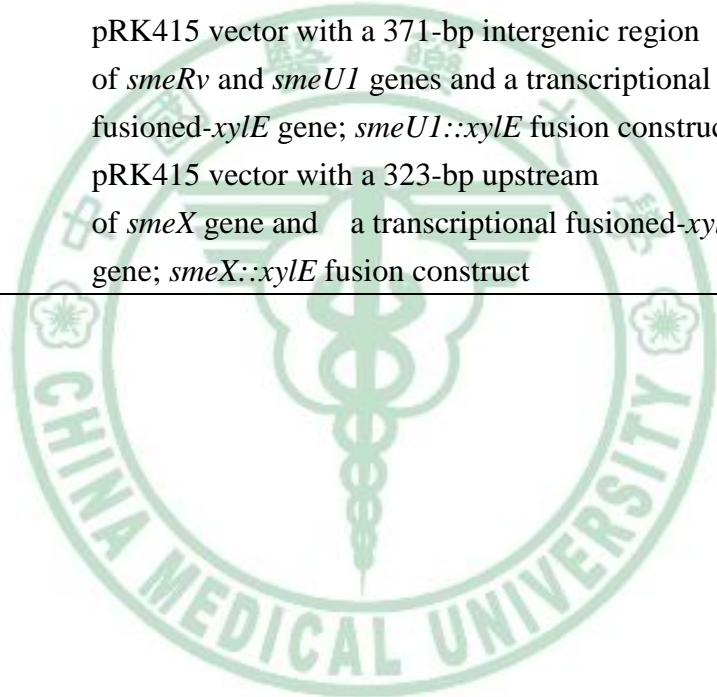


TABLE 2. The primers used in this study

Primer name	Sequence 5'→3'	Length	Purpose
SmeRv-F	GATGGTACCGCCACGCTGCTGAC	1308	Cloning
SmeRv-R	CAGAATAAGCTTGCCGCTGCTTTCC		
SmeU1-F	CGATTAAGCTTCGGCAATGAAG	1341	Cloning
SmeU1-R	ACGTTCTAGAGTGGTATTGGGG		
SmeU2-F	GATGATATCCATCGCGTTCATCGCC	1074	Cloning
SmeU2-R	TGACAGAGCTCGCCAGCACCAG		
SmeX-F	GGCTCTAGAGAAATCAGCGAAG	1591	Cloning
SmeX-R	AGAAGAAAGGTACCGAAGCCAC		
SmeBQ-F	CGCCATCTCGCTGCTGTTC	198	qRT-PCR
SmeBQ-R	ATGCCGTTCTTCGCTGCC		
SmeCQ-F	GCGATGCCAACAGCGAGACC	190	qRT-PCR
SmeCQ-R	GTCGCCACTTCAGCCACCAG		
SmeEQ-F	TCCTGCCCAACGAAGACC	203	qRT-PCR
SmeEQ-R	CTTGACGAACGCCATGCC		
SmeFQ-F	CCCGAGCATCTCGCTGAC	207	qRT-PCR
SmeFQ-R	AAGCCCACCTGGATCGAC		
SmeHQ-F	GGCTACTCGGCGATCAAC	207	qRT-PCR
SmeHQ-R	CAGGCACAGGAACACCAC		
SmeJQ-F	GTCAGCCACCAGCAGCAG	192	qRT-PCR
SmeJQ-R	CAGCAGCCACACCACGTC		
SmeKQ-F	AACTCCGACCCCAGCGAC	191	qRT-PCR
SmeKQ-R	GCGATCATCGAGATCACCGAC		
SmeNQ-F	CAAGACCTCCACTGCCAAC	198	qRT-PCR
SmeNQ-R	AACAGCCAGATCACCGCC		
SmePQ-F	GTCAGCCAGTTCCTGTCC	191	qRT-PCR
SmePQ-R	TACTCCATCGTCGCCACC		
SmeZQ-F	TGTCCAGCGTCAAGCACC	218	qRT-PCR
SmeZQ-R	GCCGACCAGCATCAGGAAG		
SmeRvQ-F	TCGACGAACGCACGCACC	213	qRT-PCR
SmeRvQ-R	CCCGCTGATGACCGCCAAC		
SmeU1Q-F	CGGCGAGACCTCGATCAC	201	qRT-PCR
SmeU1Q-R	CAACCATCCAGCAGCGAG		
SmeVQ-F	GCGTGACAGCGAACTGCC	219	qRT-PCR
SmeVQ-R	TCATCGATCAGCAGCGCC		

SmeWQ-F	GCCCACACCATCTCGTTCCC	221	qRT-PCR
SmeWQ-R	TAGCCGTTGCCGTTGCC		
SmeU2Q-F	GGTCGAGCAGGTACGCCAG	153	qRT-PCR
SmeU2Q-R	ACCGCCACCAGCGCATAG		
SmeXQ-F	TACGACCGCCGCAAGCAACC	219	qRT-PCR
SmeXQ-R	CAGCTCGAAGTAGTTGCGTGCC		
rDNA-F	GACCTTGC GCGATTGAATG	75	qRT-PCR
rDNA-R	CGGATCGTCGCTTGTT		
415-F	CGACGACACCCGAAAAAAG	281	qRT-PCR
415-R	CATTAGCAACATTATCGCACAG		



TABLE 3. Antibiotics used in this study

Antibiotics	Type	Solubility	Stock concentration	Storage	Abbreviation
Chloramphenicol		ethanol	25 mg/ml	-20°C	CHL
Nalidixic acid	Fluoroquinolones	water	100 mg/ml	-20°C	NAL
moxifloxacin	Fluoroquinolones			-20°C	MXF
Tetracycline	Tetracycline	ethanol	5 mg/ml	-20°C	TET
Doxycycline	Tetracycline	water	50 mg/ml	-20°C	DOX
Kanamycin	Aminoglycosides	water	25 mg/ml	-20°C	KAN
Gentamycin	Aminoglycosides	water	15 mg/ml	-20°C	GEN
Tobramycin	Aminoglycosides	water	50 mg/ml	-20°C	TOB
Erythromycin	Macrolides	ethanol	10 mg/ml	-20°C	ERY



TABLE 4. Antimicrobial susceptibilities of *S. maltophilia* KJ, its chloramphenicol-selected mutant KJ09C and their derived deletion mutants

strain	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)								
	Quinolone			Tetracycline		Aminoglycoside			
	CHL	NAL	MXF	TET	DOX	KAN	GEN	TOB	ERY
KJ	8	8	0.094	16	1	256	1024	512	64
KJ09C	128	256	0.25	64	2	64	256	256	64
KJ Δ 5	8	8	0.094	16	1	256	1024	512	64
KJ09C Δ 5	8	16	0.094	16	2	128	512	512	64
KJ09C Δ Rv	8	8	0.094	16	1	256	512	512	64
KJ09C Δ U1	128	256	0.38	32	2	64	512	128	64
KJ09C Δ VW	4	4	0.047	16	0.5	64	256	256	64
KJ09C Δ U2	32	64	0.19	32	2	32	128	128	64
KJ09C Δ X	32	32	0.064	32	2	512	1024	512	64
KJ09C Δ 5 ^a	8	8	0.094	16	2	128	512	512	64
KJ09C Δ 5L2::U1 ^a	8	8	0.094	16	2	128	512	512	64
KJ09C Δ 5L2::U2 ^a	8	8	0.125	16	2	256	512	512	64
KJ09C Δ 5L2::SmeX ^a	4	4	0.064	8	1	8	32	8	64

CHL, Chloramphenicol; NAL, Nalidixic acid; MXF, moxifloxacin ; TET, Tetracycline; DOX, Doxycycline; KAN, Kanamycin; GEN, Gentamycin; TOB, Tobramycin; ERY, Erythromycin;

^aThe Mueller-Hinton agar contains 30 $\mu\text{g/ml}$ cefoxitin in addition to the antibiotic indicated.

TABLE 5. The ΔCt value of the genes of RND-efflux pumps for strains KJ, KJ09C and its derived mutant, determined by qRT-PCR

Gene	ΔCt value						
	KJ	KJ09C	KJ09C Δ Rv	KJ09C Δ U1	KJ09C Δ VW	KJ09C Δ U2	KJ09C Δ X
<i>smeB</i>	16.97±0.5	15.28±0.8					
<i>smeC</i>	12.88±0.7	14.2±0.7					
<i>smeE</i>	20.17±0.6	18.16±0.9					
<i>smeF</i>	12.73±0.5	11.04±0.8					
<i>smeH</i>	14.34±0.4	14.13±0.6					
<i>smeJ</i>	17.10±0.6	17.63±1.1					
<i>smeK</i>	14.54±0.5	14.28±0.6					
<i>smeN</i>	17.64±0.6	16.85±0.8					
<i>smeP</i>	22.20±0.9	21.88±1.4					
<i>smeZ</i>	11.76±0.5	12.57±0.8					
<i>smeRv</i>	17.44±0.8	11.14±0.5	18.56±0.6	11.08±0.8	10.01±0.5	11.75±0.7	11.88±0.5
<i>smeU1</i>	17.11±0.9	12.01±0.4	17.35±0.8	16.01±0.5	12.51±0.6	11.54±0.5	11.51±0.4
<i>smeV</i>	17.56±0.6	13.07±0.8	18.56±0.3	14.18±0.9	16.78±0.7	13.13±0.6	13.97±0.6
<i>smeW</i>	18.21±0.8	12.33±0.6	18.07±0.7	12.82±0.6	18.07±0.7	13.94±0.5	13.83±0.7
<i>smeU2</i>	18.53±1.0	10.24±0.7	17.85±0.7	11.05±0.8	11.04±0.9	20.95±1.1	11.77±0.5
<i>smeX</i>	18.00±0.9	13.36±0.5	17.57±0.9	12.88±0.5	13.94±0.4	15.99±0.9	18.68±0.9

^aThe difference of Ct (critical threshold cycle) values between the gene assayed and 16S rDNA.

TABLE6. Comparison of the SmeU1 of *S. maltophilia* K279a with other homologues

Strain / protein	No.of aa	Similarity (%)	Identity (%)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a / putative short chain dehydrogenase	256	100	100%
<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14 / aklaviketone reductase	256	99	98%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	256	99	95%
<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i> 11-1 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	262	63	50%
<i>Xanthomonas gardneri</i> ATCC 19865 / short-chain dehydrogenase of unknown substrate specificity	255	68	51%
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913 / aklaviketone reductase	272	69	52%
<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	254	45	27%
<i>Haliangium ochraceum</i> DSM 14365 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	225	46	33%
<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	244	49	33%
<i>Bordetella petrii</i> DSM 12804 / short chain dehydrogenase	251	42	32%
<i>Roseiflexus</i> sp. RS-1 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	292	47	33%
<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	293	48	39%
<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998 / putative oxidoreductase	282	45	27%
<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> ATCC 25486 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	276	49	39%
<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	272	49	40%
<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 11379 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	272	48	40%
<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	244	40	27%

TABLE7. Comparison of SmeV of *S. maltophilia* K279a with other homologues

Strain / protein	No.of aa	Similarity (%)	Identity (%)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a / putative multidrug efflux protein, HlyD family	391	100	100
<i>Stenotrophomonas sp.</i> SKA14 / RND multidrug efflux membrane fusion protein	410	99	99
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3 / RND family efflux transporter MFP subunit	408	99	99
<i>Xanthomonas gardneri</i> ATCC 19865 / RND family efflux transporter, MFP subunit	396	89	78
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913 / RND multidrug efflux membrane fusion protein	396	90	80
<i>Klebsiella variicola</i> At-22 / efflux transporter RND family, MFP subunit	391	82	68
<i>Klebsiella pneumoniae</i> / RND multidrug efflux membrane fusion protein OqxA	391	81	66
<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i> 11-1 / efflux transporter, RND family, MFP subunit	399	85	73
<i>Enterobacter sp.</i> 638 / RND family efflux transporter MFP subunit	391	83	70
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501 / RND multidrug efflux membrane fusion protein MexE precursor	409	70	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 / RND multidrug efflux membrane fusion protein MexE precursor	414	69	51
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 39016 / RND multidrug efflux membrane fusion protein MexE precursor	414	69	51
<i>Burkholderia sp.</i> 383 / HlyD family secretion protein	414	69	52
<i>Burkholderia sp.</i> TJI49 / RND family efflux transporter MFP subunit	388	68	53
<i>Pantoea vagans</i> C9-1 / RND efflux system, membrane-fusion protein	384	82	69
<i>Klebsiella sp.</i> 1_1_55 / RND multidrug efflux membrane fusion protein OqxA	391	82	68

TABLE8. Comparison of SmeW of *S. maltophilia* K279a with other homologues

Strain / protein	No.of aa	Similarity (%)	Identity (%)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a / putative drug resistance membrane fusion protein	1056	100	100%
<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14 / RND transporter, HAE1 family	1056	99	99%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3 / hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family transporter	1056	99	98%
<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 / transporter, hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family	1052	90	82%
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913 / RND multidrug efflux transporter MexF	1056	90	82%
<i>Xanthomonas gardneri</i> ATCC 19865 / hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family transporter	1057	90	81%
<i>Alcanivorax</i> sp. DG881 / RND transporter, HAE1 family	1064	89	81%
<i>Marinobacter algicola</i> DG893 / Hydrophobe/amphiphile efflux-1 HAE1	1067	90	80%
<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i> 11-1 / transporter, hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family	1059	89	79%
<i>Klebsiella variicola</i> At-22 / transporter hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family	1050	89	79%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342 / RND family multidrug efflux permease protein OqxB	1050	88	78%
<i>Escherichia coli</i> / OqxB integral membrane protein	1050	88	78%
<i>Burkholderia ambifaria</i> IOP40-10 / transporter, hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family	1057	84	71%
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 / putative quinoxaline efflux system transporter protein	1057	83	71%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> / RND family multidrug efflux permease protein OqxB	1050	88	78%
<i>Acidobacterium</i> sp. MP5ACTX8 / transporter, hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family	1058	84	71%

TABLE 9. Comparison of the SmeU2 of *S. maltophilia* K279a with other homologues

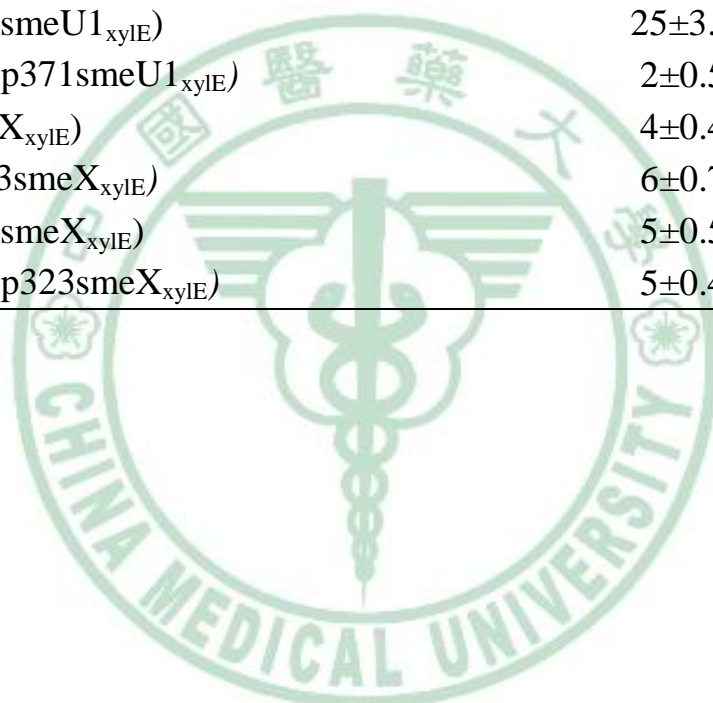
Strain / protein	No.of aa	Similarity (%)	Identity (%)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a / putative short-chain dehydrogenase/reductase	258	100	100%
<i>Stenotrophomonas sp.</i> SKA14 / short chain dehydrogenase	245	99	98%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	245	98	93%
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vasculorum NCPPB702 / short chain dehydrogenase	243	87	77%
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri str. 306 / short chain dehydrogenase	243	88	76%
<i>Xanthomonas gardneri</i> ATCC 19865 / short-chain alcohol dehydrogenase like protein	243	87	75%
<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i> 11-1 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	243	82	68%
<i>Streptomyces sp.</i> AA4 /2-hydroxycyclohexanecarboxyl-CoA dehydrogenase	245	74	57%
<i>Streptomyces ambofaciens</i> / putative ketoacyl reductase	237	58	44%
<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877 / putative ketoacyl reductase	237	58	43%
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 / putative short-chain dehydrogenase/oxidoreductase	245	66	50%
<i>Burkholderia gladioli</i> BSR3 / short chain oxidoreductase	241	56	43%
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 / putative short-chain dehydrogenase/reductase	257	62	43%
<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellin6076 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	250	70	53%
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5 / putative short-chain dehydrogenase	265	70	46%
<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	243	65	49%
<i>Beutenbergia cavernae</i> DSM 12333 / short-chain dehydrogenase/reductase SDR	244	67	50%

TABLE 10. Comparison of SmeX of *S. maltophilia* K279a with other homologues

Strain / protein	No.of aa	Similarity (%)	Identity (%)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a / putative outer membrane efflux protein	472	100	100%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3 / NodT family RND efflux system outer membrane lipoprotein	473	99	98%
<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14 / outer membrane efflux protein	473	99	98%
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri str. 306 / outer membrane protein	474	83	74%
<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. aurantifolii str. ICPB 10535 / outer membrane protein	474	83	74%
<i>Burkholderia</i> sp. H160 / RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family	489	53	37%
<i>Burkholderia</i> sp. 383 / RND efflux system outer membrane lipoprotein	507	54	39%
<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i> 11-1 / RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family	482	75	66%
<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756 / NodT family RND efflux system outer membrane lipoprotein	469	71	55%
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. aesculi str. 2250 / outer membrane efflux protein	465	67	51%
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. syringae 642 / RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT	465	67	50%
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48 / multidrug efflux RND outer membrane protein OprN	471	66	49%
<i>Achromobacter piechaudii</i> ATCC 43553 / multidrug efflux RND outer membrane protein OprN	513	65	46%
<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50 / outer membrane component of multidrug efflux system	487	61	44%
<i>Bordetella parapertussis</i> 12822 / outer membrane component of multidrug efflux system	487	61	44%
<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1 / RND efflux system outer membrane lipoprotein	477	61	45%

TABLE11. The determination of C23O activities of the KJ, KJ09C, and their derived mutants containing different transcriptional fusion constructs.

strain	C23O activity (Uc/OD _{450nm})
KJ(p371smeR _{xyIE})	5±0.7
KJ△Rv(p371smeR _{xyIE})	58±6.1
KJ09C(p371smeR _{xyIE})	305±41
KJ09C△Rv(p371smeR _{xyIE})	21±1.9
KJ(p371smeU1 _{xyIE})	1±0.4
KJ△Rv(p371smeU1 _{xyIE})	3±0.7
KJ09C(p371smeU1 _{xyIE})	25±3.1
KJ09C△Rv(p371smeU1 _{xyIE})	2±0.5
KJ(p323smeX _{xyIE})	4±0.4
KJ△Rv(p323smeX _{xyIE})	6±0.7
KJ09C(p323smeX _{xyIE})	5±0.5
KJ09C△Rv(p323smeX _{xyIE})	5±0.4



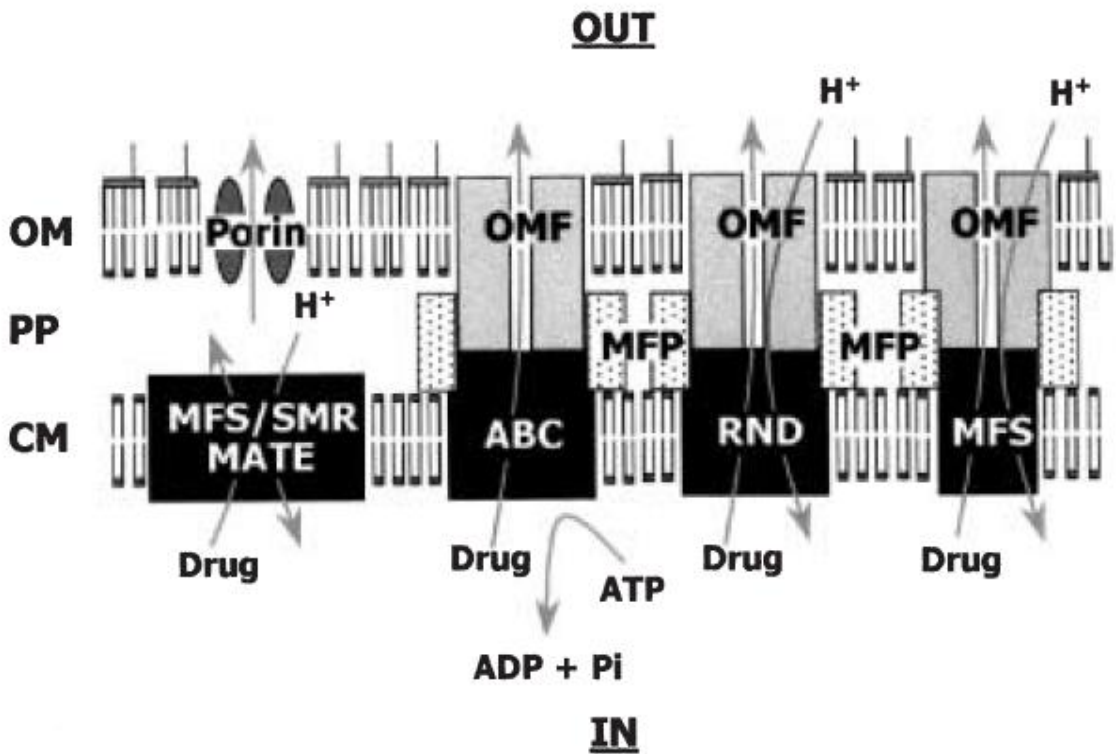


Fig.1. The organisation and operation of antimicrobial efflux pumps of Gram-negative bacteria.

OM, outer membrane; PP, periplasmic space; CM, cytoplasmic membrane; MFS, major facilitator superfamily; ABC, ATP-binding cassette family; RND, resistance-nodulation division; SMR, small multi-drug resistance; MATE, multi-drug and toxic compound extrusion

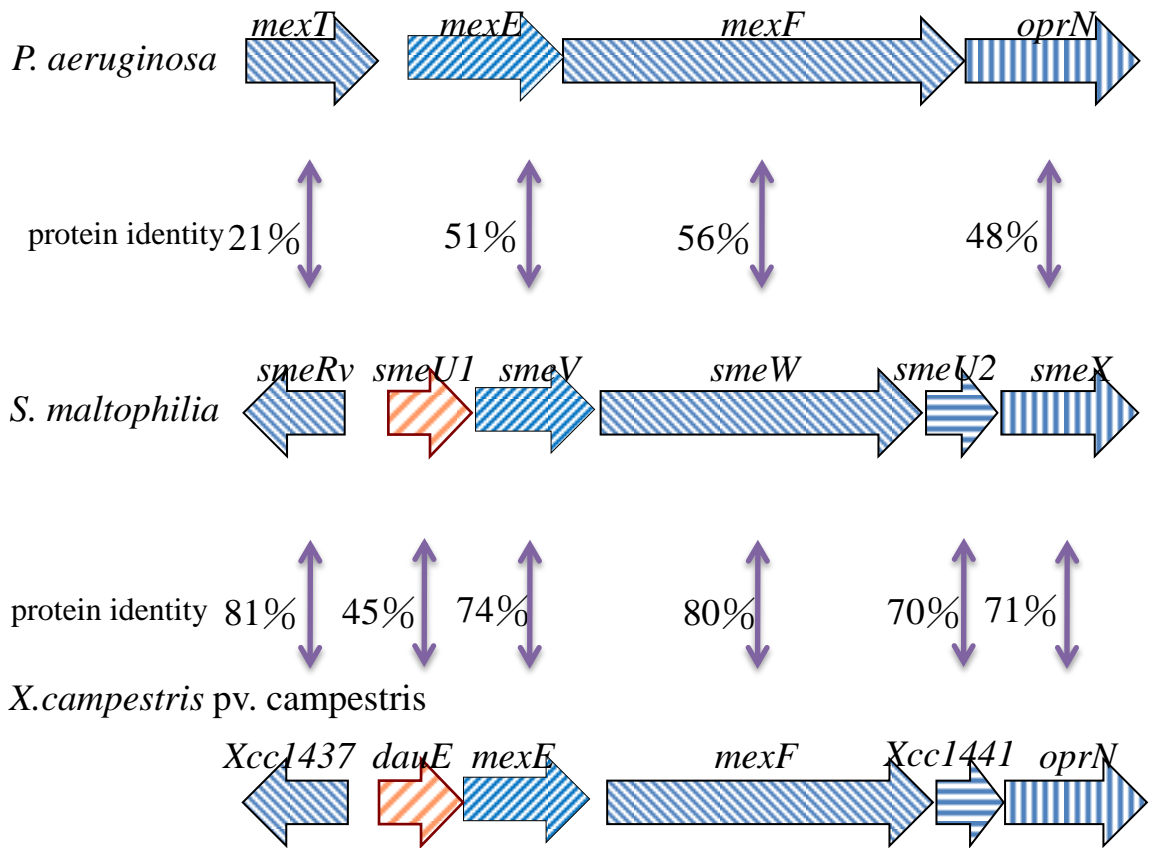


Fig.2. Comparison between *smeRv-smeU1-V-W-U2-X* operon of *S. maltophilia* and its homologues.

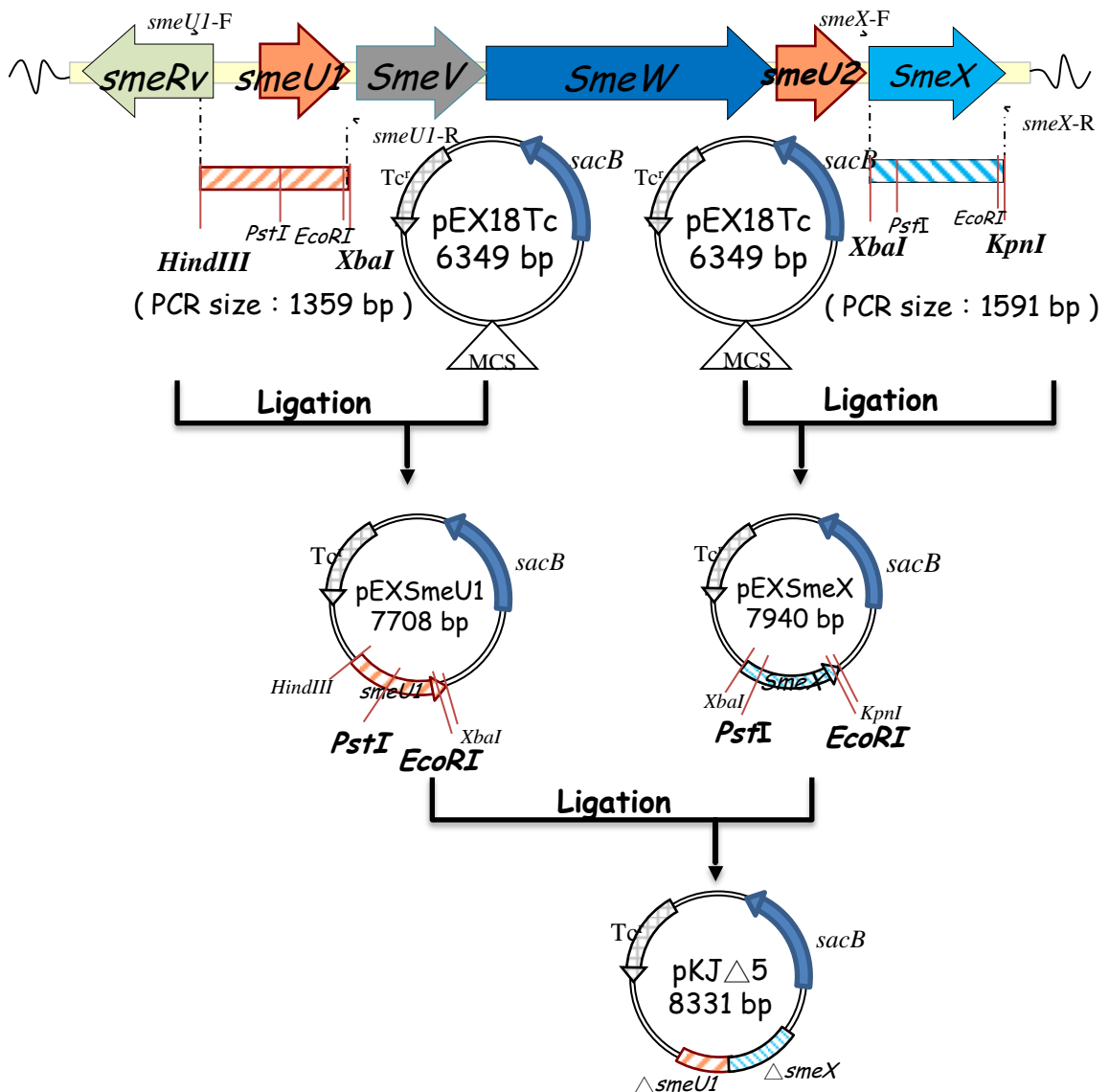


Fig. 3. Construction of pKJ Δ 5.

The 1359-bp DNA fragment containing *smeU1* and partial *smeRv* genes was obtained by PCR amplification using primers *smeU1-F/smeU1-R*. *HindIII* and *XbaI* restriction sites were used to facilitate the cloning into vector pEX18Tc to yield plasmid pEXSmeU1. The 1591-bp DNA fragment containing *smeX* gene was obtained by PCR amplification using primers *smeX-F/smeX-R*. *XbaI* and *KpnI* restriction sites were used to facilitate the cloning into vector pEX18Tc to yield plasmid pEXSmeX. A 1330-bp partial *smeX* gene was retrieved from pEXSmeX, and inserted into the *PstI* and *EcoRI* site of pEXSmeU1, generating plasmid pKJ Δ 5.

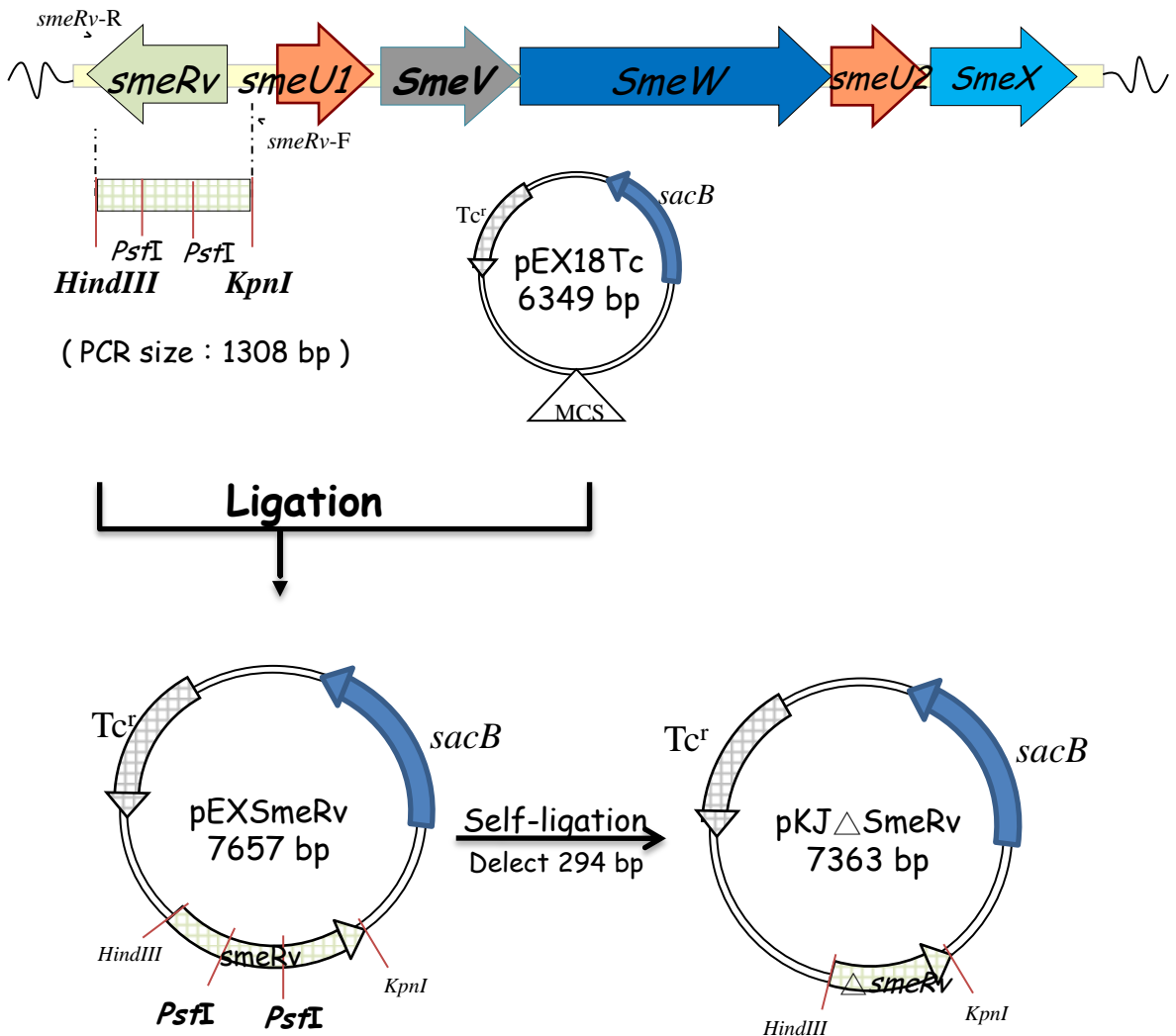


Fig. 4. Construction of pKJΔSmeRv.

The 1308-bp DNA fragment containing *smeRv* gene was obtained by PCR amplification using primers *smeRv-F/smeRv-R*. *HindIII* and *KpnI* restriction sites were used to facilitate the cloning into vector pEX18Tc to yield plasmid pEXSmeRv. Plasmid pEXSmeRv was digested by *PstI* to delete a 294-bp internal fragment of the *smeRv* gene, generating plasmid pKJΔ*smeRv*.

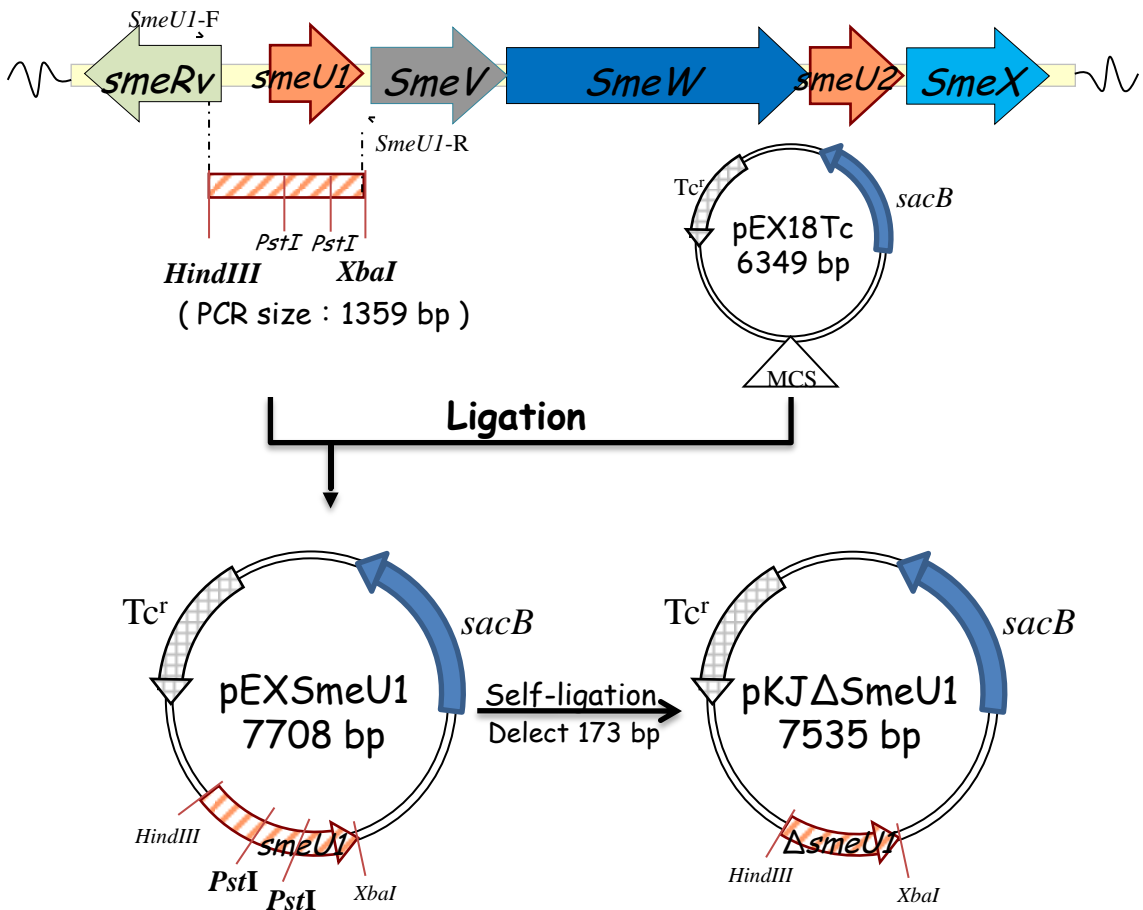


Fig. 5. Construction of pKJΔSmeU1.

The 1359-bp DNA fragment containing *smeU1* and partial *smeRv* genes was obtained by PCR amplification using primers *smeU1-F/smeU1-R*. *HindIII* and *XbaI* restriction sites were used to facilitate the cloning into vector pEX18Tc to yield plasmid pEXSmeU1. Plasmid pEXSmeU1 was digested by *PstI* to delete a 173-bp fragment internal to the *smeU1* gene, generating plasmid pKJΔsmeU1.

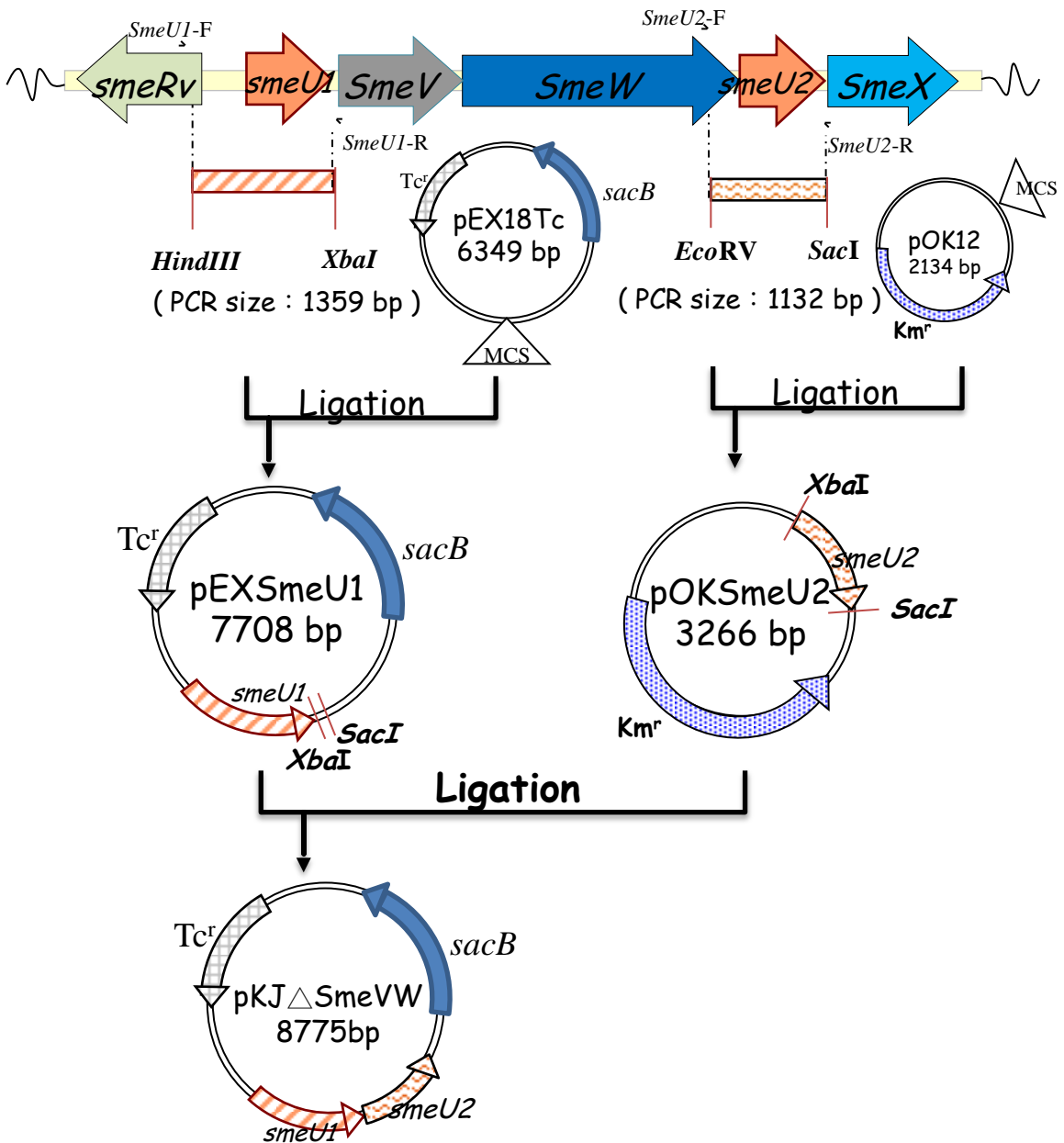


Fig. 6. Construction of pKJΔSmeVW.

The 1359-bp DNA fragment containing *smeU1* and partial *smeRv* genes was obtained by PCR amplification using primers *smeU1-F/smeU1-R*. *HindIII* and *XbaI* restriction sites were used to facilitate the cloning into vector pEX18Tc to yield plasmid pEXSmeU1. The 1132-bp DNA fragment containing *smeU2* gene was obtained by PCR amplification using primers *smeU2-F/smeU2-R*. *EcoRV* and *SacI* restriction sites were used to facilitate the cloning into vector pOK12 to yield plasmid pOKSmeU2. A 1132-bp *smeU2* gene cassette was retrieved from pOKSmeU2, and inserted into the *XbaI* and *SacI* site of pEXSmeU1, generating plasmid pKJΔSmeVW.

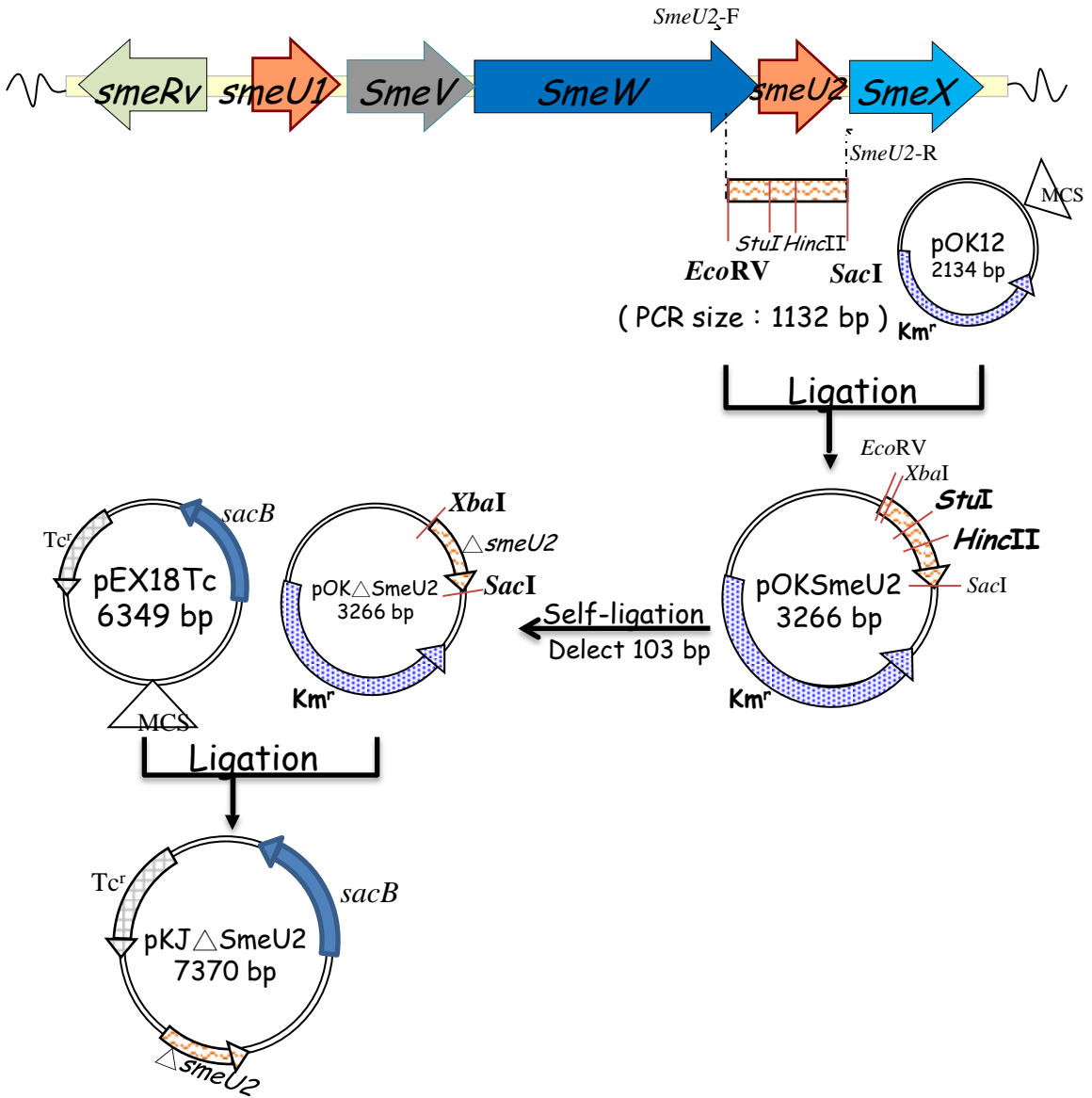


Fig. 7. Construction of pKJΔSmeU2.

The 1132-bp DNA fragment containing *smeU2* gene was obtained by PCR amplification using primers *smeU2*-F/*smeU2*-R. *EcoRV* and *SacI* restriction sites were used to facilitate the cloning into vector pOK12 to yield plasmid pOKSmeU2. Plasmid pOKSmeU2 was digested by *StuI* and *HincII* to delete a 103-bp internal fragment of the *smeU2* gene, generating plasmid pOKΔ*smeU2*. The 1029-bp DNA fragment retrieved from plasmid pOKΔ*SmeU2* was used to clone into vector pEX18Tc to yield plasmid pKJΔ*SmeU2*.

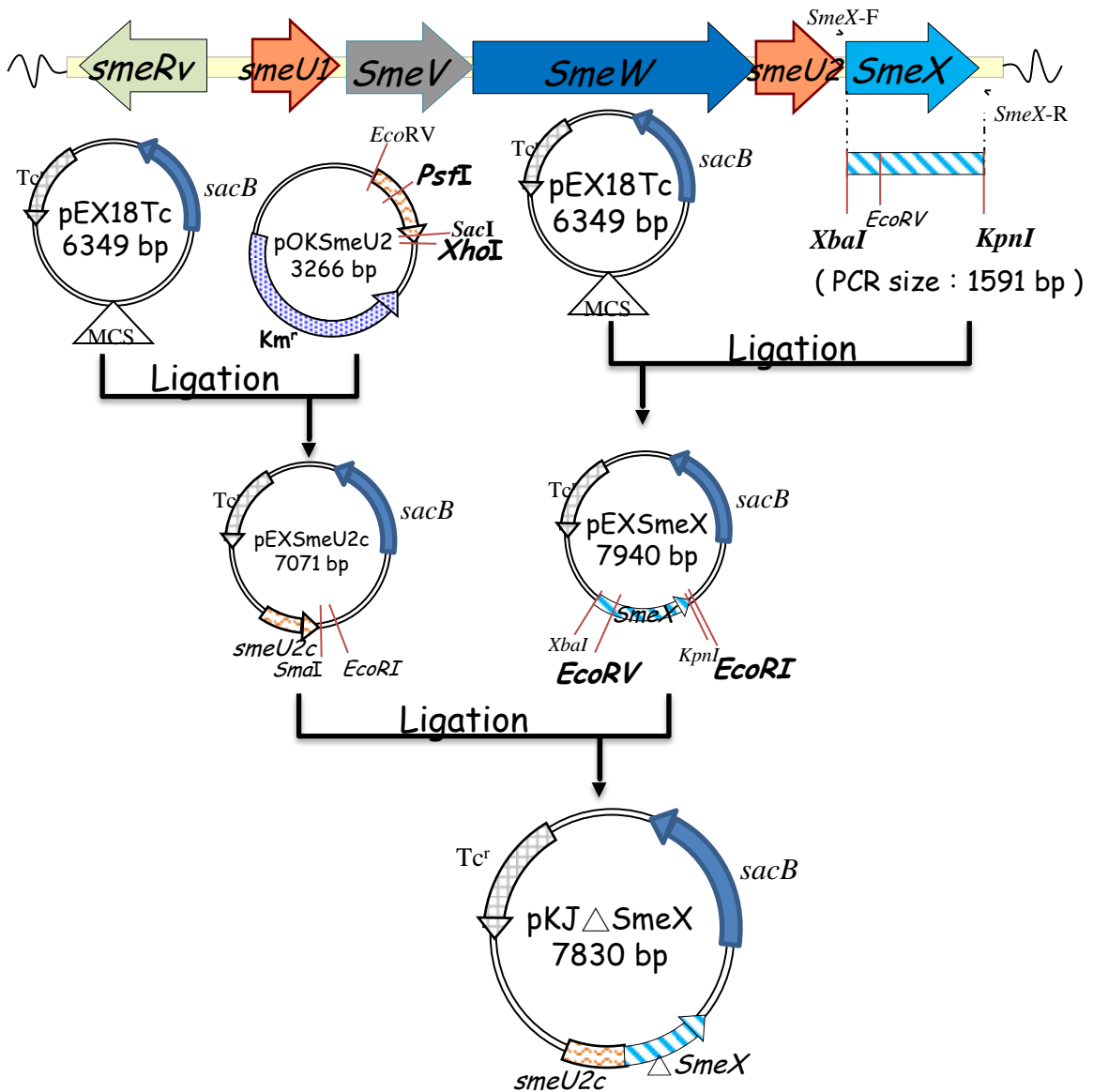


Fig. 8. Construction of pKJΔSmeX.

The 1591-bp DNA fragment containing *smeX* gene was obtained by PCR amplification using primers *smeX-F/smeX-R*. *XbaI* and *KpnI* restriction sites were used to facilitate the cloning into vector pEX18Tc to yield plasmid pEXSmeX. The 722-bp DNA fragment retrieved from plasmid pOKSmeU2 was cloned into vector pEX18Tc to yield plasmid pEXSmeU2c. A 770-bp *smeX*-containing DNA fragment was retrieved from pEXSmeX, and inserted into the *SmaI* and *EcoRI* site of pEXSmeU2c, generating plasmid pKJΔSmeX

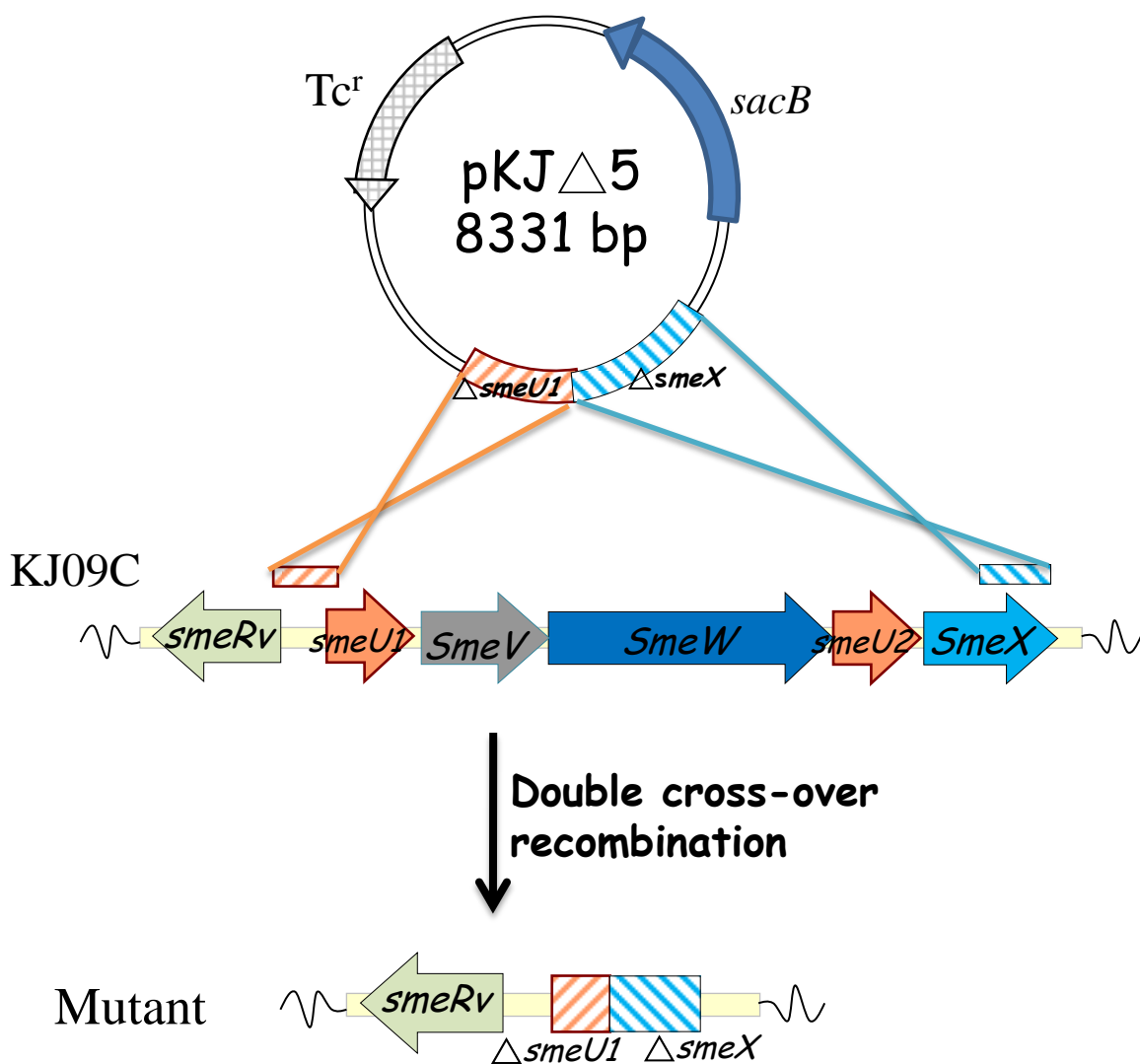


Fig. 9. Double cross-over recombination between exotic plasmid and the chromosome of host bacteria (KJ09C Δ 5 as a representative).

Conjugation was carried out between *E. coli* S17-1(pKJ Δ 5) and *S. maltophilia* KJ09C. Transconjugants were firstly selected on the LA medium containing 30 μ g/ml tetracycline and 2.5 μ g/ml norfloxacin. The double cross-over recombinant was obtained by further selection on the LA medium containing 10% sucrose.

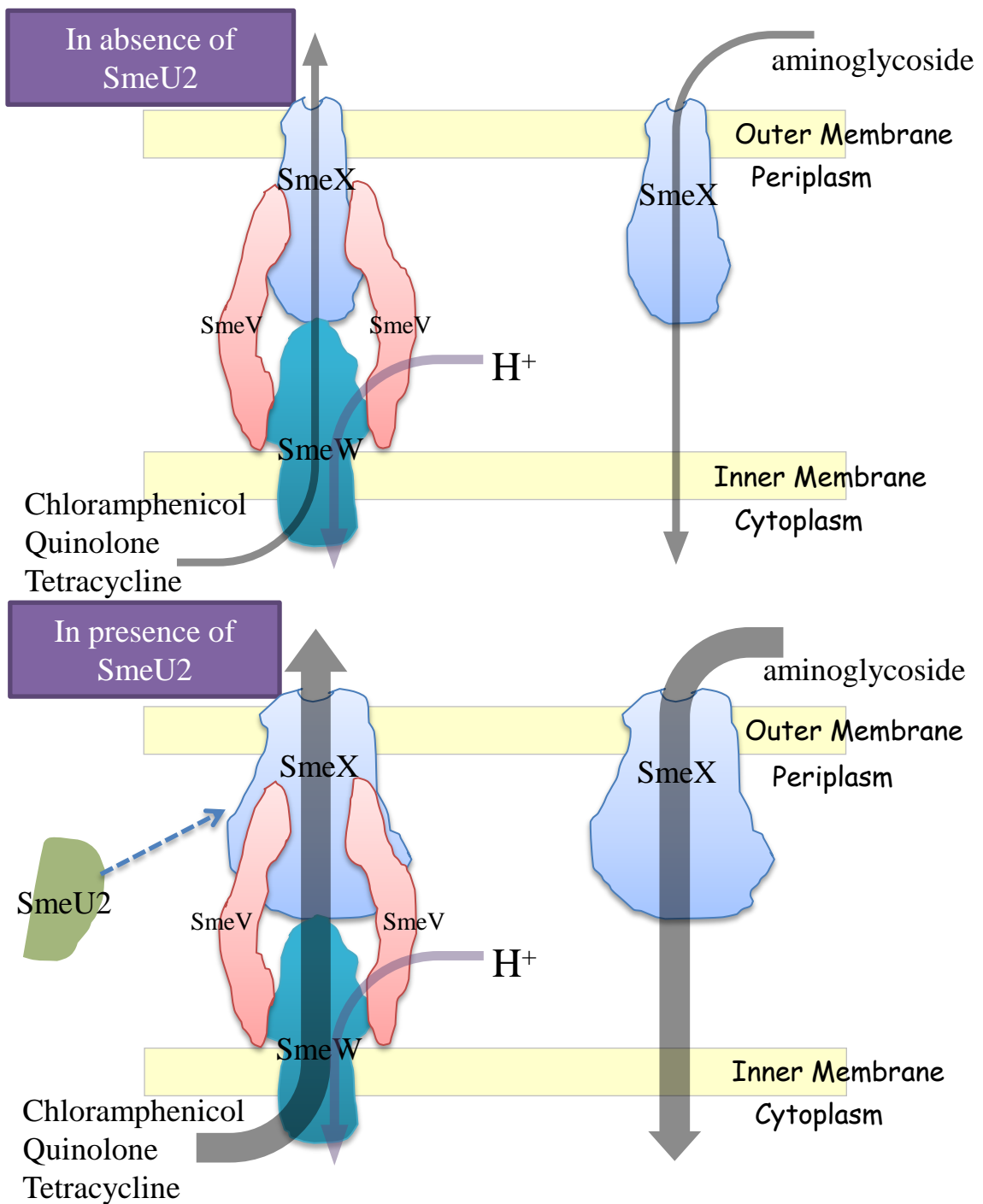


Fig. 10. The possible role of SmeU2 in SmeVWX pump module.

參 考 文 獻

1. Hugh, R. and Ryschenkow, E., *Pseudomonas maltophilia* an alcaligenes-like species. *Journal of General Microbiology*, 1961. **26**: p. 123-32.
2. Sutter, V.L., Identification of *Pseudomonas* species isolated from hospital environment and human sources. *Applied Microbiology*, 1968. **16**(10): p. 1532-8.
3. Palleroni, N.J. and Bradbury, J.F., *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1993. **43**(3): p. 606-9.
4. Maningo, E. and Watanakunakorn, C., *Xanthomonas maltophilia* and *Pseudomonas cepacia* in lower respiratory tracts of patients in critical care units. *Journal of Infection*, 1995. **31**(2): p. 89-92.
5. Windhorst, S., Frank, E., Georgieva, D.N., Genov, N., Buck, F. and Borowski, P., The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*: characterization of the protein and molecular cloning of the gene. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(13): p. 11042-9.
6. Crossman, L.C., Gould, V.C., Dow, J.M., Vernikos, G.S., Okazaki, A. and Sebahia, M., The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biology*, 2008. **9**(4): p. R74.
7. Richmond, M.H. and Sykes, R.B. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Advances in Microbial Physiology*, 1973. **9**: p. 31-88.
8. Krueger, T.S., Clark, E.A., and Nix, D.E., In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* to various antimicrobial combinations. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2001. **41**(1-2): p. 71-8.
9. Lambert, T., Ploy, MC., Denis, F., and Courvalin, P., Characterization of the chromosomal *aac(6)-Iz* gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999. **43**(10): p. 2366-71.
10. Alonso, A., Sanchez, P., and Martinez, J.L., *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000. **44**(7): p. 1778-82.

11. Livermore, D.M., beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 1995. **8**(4): p. 557-84.
12. Valdezate, S., Vindel, A., Loza, E., Baquero, F., and Cantón, R., Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001. **45**(5): p. 1581-4.
13. Li, X.Z., Zhang, L., and Poole, K., SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002. **46**(2): p. 333-43.
14. Sanchez, P., Alonso, A., and Martinez, J.L., Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002. **46**(11): p. 3386-93.
15. Zhang, L., Li, X.Z., and Poole, K., SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001. **45**(12): p. 3497-503.
16. Schweizer, H.P., Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genetics and Molecular Research*, 2003. **2**(1): p. 48-62.
17. Jalal, S., Ciofu, O., Hoiby, N., Gotoh, N., and Wretling, B., Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000. **44**(3): p. 710-2.
18. Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M., and Wallace, J.C., A large family of bacterial activator proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988. **85**(18): p. 6602-6.
19. Gould, V.C., and Avison, M.B., SmeDEF-mediated antimicrobial drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates having defined phylogenetic relationships. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006. **57**(6): p. 1070-6.
20. Li, X.Z., Nikaido, H., and Poole, K., Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995. **39**(9): p. 1948-53.
21. Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J., Li, X.Z., and Nishino, T., Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 1996. **21**(4): p. 713-24.
22. Köhler, T., Michéa-Hamzeshpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L.K., and Pechère, J.C., Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 1997. **23**(2): p. 345-54.

23. Aendekerck, S., Ghysels, B., Cornelis, P., and Baysse, C, Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology*, 2002. Aug;**148**(Pt 8): p. 2371-81.
24. Sekiya, H., Mima, T., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T., Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, mexHI-opmD, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003. **47**(9): p. 2990-2.
25. Chuanchuen, R., Narasaki, C.T., and Schweizer, H.P., The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *Journal of Bacteriology*, 2002. **184**(18): p. 5036-44.
26. Mima, T., Sekiya, H., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T., Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Immunology*, 2005. **49**(11): p. 999-1002.
27. Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T., A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003. **52**(4): p. 572-5.
28. Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., and Nishino, T., Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000. **44**(9): p. 2242-6.
29. Mima, T., Joshi, S., Gomez-Escalada, M., and Schweizer, H.P., Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *Journal of Bacteriology*, 2007. **189**(21): p. 7600-9.
30. Mima, T., Kohira, N., Li, Y., Sekiya, H., Ogawa, W., Kuroda, T., and Tsuchiya, T., Gene cloning and characteristics of the RND-type multidrug efflux pump MuxABC-OpmB possessing two RND components in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 2009. **155**(Pt 11): p. 3509-17.
31. Maseda, H., Yoneyama, H., and Nakae, T., Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000. **44**(3): p. 658-64.
32. Ochs, M.M., McCusker, M.P., Bains, M., and Hancock, R.E., Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999. **43**(5): p. 1085-90.

33. Pumbwe, L., Glass, D., and Wexler, H.M., Efflux pump overexpression in multiple-antibiotic-resistant mutants of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006. **50**(9): p. 3150-3.
34. Hu, R.M., Huang, K.J., Wu, L.T., Hsiao, Y.J., and Yang, T.C., Induction of L1 and L2 beta-lactamases of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008. **52**(3): p. 1198-200.
35. Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H., and Hearst, J.E., The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Molecular Microbiology*, 1996. **19**(1): p. 101-12.
36. Zhao, Q., Li, X.Z., Srikumar, R., Poole, K., Contribution of outer membrane efflux protein OprM to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independent of MexAB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998. **42**(7): p. 1682-8.
37. Lin, C.W., Huang, Y.W., Hu, R.M., Chiang, K.H., Yang, T.C., The role of AmpR in regulation of L1 and L2 beta-lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Research in Microbiology*, 2009. **160**(2): p. 152-8.
38. Köhler, T., Epp, S.F., Curty, L.K., Pechère, J.C., Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 1999. **181**(20): p. 6300-5.
39. Maddocks, S.E. and Oyston, P.C.. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 2008. **154**(Pt 12): p. 3609-23.
40. Simon, R., O'Connell, M., Labes, M., Pühler, A. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods in Enzymology*, 1986. **118**: p. 640-59.
41. Hoang, T.T., Karkhoff-Schweizer, R.R., Kutchma, A.J., and Schweizer, H.P., A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, 1998. **212**(1): p. 77-86.
42. Keen, N.T., Tamaki, S., Kobayashi, D., and Trollinger, D., Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene*, 1988. **70**(1): p. 191-7.
43. Schweizer, H.P. and Hoang, T.T. An improved system for gene replacement and xylE fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 1995. **158**(1): p. 15-22.



Overexpression of Resistance Nodulation Division Efflux Pump *SmeVWX* Confers to the Multidrug Resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*

Chiang-Ching Huang¹, Chao-Hsien Chen¹, Tsuey-Ching Yang^{1*}

¹Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, China Medical University

Abstract

Stenotrophomonas maltophilia is an important opportunistic pathogen characterized by the phenotype of multidrug resistance (MDR). Overexpression of the resistance nodulation division (RND) efflux systems is a critical cause of the MDR phenotype in gram-negative bacteria. Whole genome analysis revealed that *S. maltophilia* harbors as many as eight possible RND efflux systems, including *SmeABC*, *SmeDEF*, *SmeGH*, *SmeIJK*, *SmeMN*, *SmeOP*, *SmeVWX*, and *SmeYZ*. A chloramphenicol-selective *S. maltophilia* MDR mutant, KJ09C, was characterized in this study. In addition to chloramphenicol, KJ09C was cross-resistant to quinolones and tetracyclines. Surprisingly, mutant KJ09C increased aminoglycoside susceptibility compared to wild-type KJ. The qRT-PCR assay demonstrated that *SmeVWX* pump was overexpressed in mutant KJ09C. Inactivation of *smeVWX* pump of mutant KJ09C restored the antimicrobial susceptibility of KJ09C to the level as that of wild-type KJ, indicating that overexpression of *smeVWX* pump contributes to the MDR phenotype of KJ09C.

Results

1. Selection and susceptibility of the chloramphenicol-selective multidrug resistance (MDR) mutants, KJ09C

A spontaneous chloramphenicol-selection mutant, KJ09C, was isolated by selecting strain KJ on the LB medium containing 50 µg/ml chloramphenicol. Compared to its parental strain KJ, the KJ09C mutant showed an MDR profile with cross-resistance to chloramphenicol, quinolones, and tetracyclines. Notably, KJ09C was more susceptible to aminoglycosides, whereas its susceptibility to erythromycin was not affected (Table 1).

Table 1. Antimicrobial susceptibilities of *S. maltophilia* KJ and its derived mutants

Antimicrobial	MIC (µg/ml)		
	KJ	KJ09C	KJ09CΔ5
Chloramphenicol	8	>256	8
Quinolone			
nalidixic acid	8	>256	8
norfloxacin	16	>256	16
Tetracycline			
tetracycline	8	64	8
doxycycline	1	8	1
Aminoglycoside			
kanamycin	256	128	256
gentamicin	512	256	512
Macrolide			
erythromycin	64	64	64

2. Overexpression of *SmeVWX* efflux system in the MDR mutant KJ09C.

The multidrug-resistant nature of mutant KJ09C is reminiscent of the overexpression of multidrug efflux system of resistance nodulation cell division (RND) family. Genome analysis revealed that *S. maltophilia* encodes as many as eight possible RND efflux systems, including *SmeABC*, *SmeDEF*, *SmeGH*, *SmeIJK*, *SmeMN*, *SmeOP*, *SmeVWX*, and *SmeYZ*. Therefore, qRT-PCR was used to evaluate the transcript expression of each efflux pump. The *smeV*, *smeW*, and *smeX* transcripts were elevated in strain KJ09C compared to those in strain KJ. The *SmeVWX* pump was thus considered as responsible for the MDR phenotype of the mutant KJ09C.

3. Sequence analysis of the *SmeS1-V-W-S2-X* efflux pump

The sequence analysis surrounding the *SmeVWX* was performed using the genome sequence of *S. maltophilia* K279a as a reference. Unlike other gram-negative tripartite MDR efflux pumps, the *SmeVWX* pump consisted of a membrane fusion protein (*SmeV*), an inner membrane transporter (*SmeW*), an outer membrane protein (*SmeX*), and two additional annotated short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) genes which located upstream the *smeV* gene (designated as *smeS1*) and between *smeW* and *smeX* genes (designated as *smeS2*), respectively (Fig. 1). A putative LysR family transcriptional regulator gene, designated as *SmeRv* hereafter, was transcribed divergently from *smeS1-V-W-S2-X* module and located 371 bp from the *smeS1* gene start codon.



Fig. 1. Genomic organization of *smeRv-smeS1-smeV-smeW-smeS2-smeX* RND-type regulon of *S. maltophilia*.

4. The role of the *SmeS1-V-W-S2-X* efflux pump in the acquired resistance of KJ09C

To assess the contribution of *SmeS1-V-W-S2-X* pump activity to the acquired antibiotic resistance of KJ09C, an unmarked deletion mutant of *smeS1-V-W-S2-X* pump, KJ09CΔ5, was constructed in strains KJ09C. Strain KJ09CΔ5 showed MIC values returned to the level of wild strain KJ (Table 1), indicating *smeS1-V-W-S2-X* pump is the major determinant contributing to the MDR phenotype of KJ09C.

