

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

Stenotrophomonas maltophilia 的 *ampR-L2* 組裝
之特性分析

Characterization of *ampR-L2* module of
Stenotrophomonas maltophilia

指導教授：楊翠青 博士

Tsuey-Ching Yang, Ph.D

研究生：黃奕璋

Yi-Wei Huang

中華民國九十八年一月

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

Stenotrophomonas maltophilia 的 *ampR-L2* 組裝
之特性分析

Characterization of *ampR-L2* module of
Stenotrophomonas maltophilia

指導教授：楊翠青 博士

Tsuey-Ching Yang, Ph.D

研究生：黃奕瑋

Yi-Wei Huang

中華民國九十八年一月

誌謝

本論文的撰寫終於接近尾聲了，意味著離畢業之期已不遠矣。回想起這兩年多來的碩士生活，我只能說其精彩度與偶像劇相比絲毫不顯遜色，這其中的曲折說來話長，可是點滴在我的心中卻是永生難忘。還記得剛進實驗室尚懵懂無知我，跟在老師身邊學習，學習老師的思考模式、還有對待事情專注、認真的態度，著實讓我受益良多。而平時老師亦師亦母，也很關心我的生活與人格的發展，我好慶幸能在這個實驗室，所以首先要感謝的就是我的指導教授楊翠青老師，我要謝謝老師不厭其煩的教育我、包容我，讓我學會以更寬廣的視野去看事情、做研究。還要謝謝醫技系林振文老師與張益銓老師不時的關心、指教。我亦感謝研究室的許多伙伴們：冠傑學長和盈如學姐的指導與鼓勵；一路上相互扶持的凱弘；紹晟、瑜姿熱心的幫忙；還有許多學長姐、同學、學弟妹們的關心，謝謝你們！因為你們，做研究的日子並不枯燥乏味。我還要感謝一直很關心我，給我溫暖的舅舅、舅媽、外婆，以及在天上的外公。最後，最要感謝的就是我的家人，尤其是最疼愛我媽媽，因為你們的支持，使我可以無後顧之憂地朝著夢想步步邁進。

奕瑋謹誌

中華民國九十八年一月

主 目 錄

誌 謝.....	I
主 目 錄.....	II
圖 目 錄.....	IV
表 目 錄.....	VI
中文摘要.....	VII
Abstract.....	IX
第一章 前言	1
第一節 研究背景	1
第二節 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 的介紹	2
第三節 <i>S. maltophilia</i> 的抗藥性機轉	3
第四節 β -lactamase 的分類	5
第五節 β -lactam 型抗生素	6
第六節 <i>S. maltophilia</i> 的 L1 與 L2 β -lactamase	7
第七節 染色體形式的 <i>ampR-ampC</i> 系統	9
第八節 染色體形式的 <i>ampR-class A</i> β -lactamase 系統.....	12
第九節 <i>S. maltophilia</i> 染色體上之 <i>ampR-L2</i> 系統	13
第十節 研究目的	14

第二章 研究方法	16
第一節 研究設計	16
第二節 研究材料	17
第三節 實驗方法	21
第三章 研究結果	40
第四章 討論	54
圖	65
表	93
參考文獻	106
附錄	112



圖 目 錄

圖一	Restriction enzyme map of a segment of the <i>S. maltophilia</i> KH chromosome surrounding the <i>ampR-L2</i> module	65
圖二	Construction of pKHR _{xyIE} 174L2	66
圖三	Construction of pKHR174L2 _{xyIE}	67
圖四	Construction of pKHΔRL2	68
圖五	Construction of pKHΔR.....	69
圖六	Construction of pKHΔL2	70
圖七	Construction of pKHΔL1	71
圖八	Restriction enzyme maps of the <i>ampR-L2</i> modules of the <i>S. maltophilia</i> strains KJ, KH, YW, and KS.....	72
圖九	Construction of pKH174L2 _{xyIE}	73
圖十	Construction of pYW175L2 _{xyIE}	74
圖十一	Construction of pKS174L2 _{xyIE}	75
圖十二	Restriction enzyme maps of the recombinant plasmids pKJ175L2 _{xyIE} , pKJ125L2 _{xyIE} , pKJ102L2 _{xyIE} , pKJ72L2 _{xyIE} , and pKJ79L2 _{xyIE}	76
圖十三	Construction of pKJ175L2 _{xyIE}	77
圖十四	Construction of pKJ125L2 _{xyIE}	78
圖十五	Construction of pKJ72L2 _{xyIE}	79

圖十六	Construction of pKJ79L2 _{xyIE}	80
圖十七	Construction of pKJ102L2 _{xyIE}	81
圖十八	Restriction enzyme maps of the recombinant plasmids pKJΔR, pKJ175R, pKJ79R, and pKJ36R	82
圖十九	Construction of pKJ175R	83
圖二十	Construction of pKJ79R	84
圖二十一	Construction of pKJ36R	85
圖二十二	Construction of pKJΔR.....	86
圖二十三	Dendrograms showing the relationship of L2 and AmpR proteins of <i>S. maltophilia</i> KH with related β-lactamases and AmpR proteins.....	87
圖二十四	Alignment of <i>ampR</i> -β-lactamase intergenic regions (IGs) with that of <i>S. maltophilia</i> KH	88
圖二十五	Dendrograms showing the relationships of L2 β-lactamase proteins and <i>ampR</i> -L2 IG regions among sixteen <i>S.</i> <i>maltophilia</i> isolates	89
圖二十六	Protein sequences alignment of the <i>S. maltophilia</i> AmpR proteins from sixteen different clinical isolates	90
圖二十七	DNA sequences alignment of <i>ampR</i> -L2 IG regions from <i>S.</i> <i>maltophilia</i> strains YW, KJ, KH, and KS.....	92

表 目 錄

表一	Bacterial strains, plasmid, and primers used in this study.....	93
表二	The C23O activity of <i>E. coli</i> and <i>S. maltophilia</i> harboring recombinant plasmid pKHR174L2 _{xyIE}	96
表三	The β -lactamase activity of <i>S. maltophilia</i> mutants KH Δ L2 and KH Δ RL2	97
表四	The β -lactamase activity of <i>S. maltophilia</i> mutants KH Δ R and KH Δ L1	98
表五	The C23O activity of <i>S. maltophilia</i> KH and KH Δ RL2 harboring recombinant plasmid pKHR _{xyIE} 174L2	99
表六	Characteristics of L2 proteins, IG regions and AmpR proteins of <i>ampR-L2</i> modules from sixteen <i>S. maltophilia</i> isolates	100
表七	Expression of C23O activity and MICs in <i>S. maltophilia</i> KJ and KH harboring different recombinant plasmids.....	101
表八	Expression of C23O activity in <i>S. maltophilia</i> KJ harboring different recombinant plasmids.....	102
表九	The MIC values of <i>S. maltophilia</i> strains harboring different recombinant plasmids	103
表十	The MIC values of <i>S. maltophilia</i> KJ Δ R harboring different recombinant plasmids	104
表十一	The MIC values of <i>S. maltophilia</i> strains harboring different recombinant plasmids	105

中文摘要

Stenotrophomonas maltophilia 可產生兩種可被誘發表現的 β -lactamases 蛋白，分別為 L1 和 L2 蛋白。而 *L1* 與 *L2* 基因的表現通常受 LysR 型轉錄調控因子 AmpR 蛋白所調控。在分類上，*L2* 基因屬於 class A 型 β -lactamase，而 *ampR* 基因位於 *L2* 基因的上游形成一 *ampR-L2* 組裝，且兩基因間含有一 174(或 175)-bp 的 intergenic (IG) 區域，此組裝與腸內菌屬的 *ampR-ampC* 組裝相似。L1 蛋白則屬於 class B 型 β -lactamase，但其鄰近並無類似 *ampR* 之調控基因。

本論文的第一部份是將 *S. maltophilia* KH 的 *ampR-L2* 組裝與其它微生物的 *ampR- β -lactamase* 組裝做進一步的分析，比較其 AmpR 蛋白、 β -lactamase 蛋白和 *ampR- β -lactamase* IG 片段。在所有被分析的菌株中，*S. maltophilia* 與 *Xanthomonas campestris* 的演化關係最為相近。接著在評估 AmpR 蛋白對於 *L1* 與 *L2* 基因表現所扮演的調控角色方面發現，沒有誘發物的情況下，AmpR 蛋白可活化 *L1* 基因的表現，抑制 *L2* 基因的表現；然而在有誘發物的情況下，AmpR 蛋白對於 *L1*、*L2* 兩基因表現皆扮演著活化者的角色。另外 *L1*、*L2* 兩基因的誘發表現需要依靠 AmpR 蛋白的幫助 (AmpR-dependent)，而 *ampR* 基因的轉錄作用是微弱且持續表現的，並無自我調控的現象。

本論文的第二部份將 16 株 *S. maltophilia* 臨床分離菌株的

ampR-L2 組裝進行分析，並且將其 AmpR 蛋白、*ampR-L2* IG 區域和 L2 蛋白分組。結果發現，其 L2 蛋白和 *ampR-L2* IG 區域之變異度高達 32%，然而 AmpR 蛋白序列在這 16 株 *S. maltophilia* 分離菌株中卻被高度保留。接著利用縮短 IG 區域的 DNA 片段來鑑定足以誘發 L2 基因表現之區域和 *ampR* 基因之啟動子區域。結果證實 *S. maltophilia* 之 *ampR* 基因的啟動子與 AmpR 蛋白的結合區域並無重疊，說明 AmpR 蛋白對其 *ampR* 基因並無自我調控。然後將不同的 IG-L2_{xyIE} transcriptional fusion 質體送入 *S. maltophilia* 原始菌株中以評估 AmpR 蛋白對不同的 *ampR-L2* IG 區域之誘發能力。另外，將一段突變之 102-bp 的 IG 片段送入 *S. maltophilia* 原始菌株中，即可同時減弱其染色體上 *L1* 和 *L2* 基因之表現，此 oligo-nucleotides attenuator 可發展為控制 *S. maltophilia* 菌株 β -lactam 抗藥性之新策略。

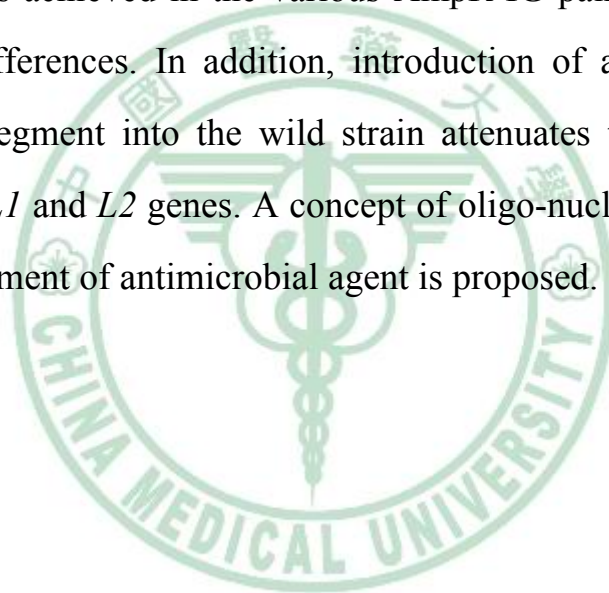
Abstract

Stenotrophomonas maltophilia is known to produce at least two chromosomal-mediated inducible β -lactamases, L1 and L2. Expression of the *L1* and *L2* β -lactamase genes responsible for β -lactams resistance is generally regulated by a LysR type regulator of AmpR. Gene *L2*, which encodes a class A β -lactamase, and the *ampR* gene is located immediately upstream of *L2* and is transcribed divergently, forming an *ampR-L2* module with a 174 (or 175)-bp intergenic (IG) region. *L1* belongs to the class B β -lactamase and has no neighbor *ampR*-like regulatory gene.

Firstly, the *ampR-L2* module from *S. maltophilia* KH was compared with *ampR- β -lactamase* modules from several microorganisms with respect to the AmpR and β -lactamase proteins and the intergenic (IG) region. *S. maltophilia* and *Xanthomonas campestris* showed the most closely phylogenetic relationship among the microorganisms considered. The regulatory role of AmpR towards *L1* and *L2* was further analysed. In the absence of inducer, AmpR acted as an activator for *L1* expression and as a repressor for *L2* expression, whereas AmpR was an activator for both genes in an induced state. In addition, inducibility of *L1* and *L2* genes depended on the presence of AmpR. The *ampR* transcript was weakly and constitutively expressed, but was not autoregulated.

Secondly, the *ampR-L2* modules of sixteen *S. maltophilia* isolates were analyzed in respect of AmpR protein, *L2* protein, and the IG region. The results demonstrate that *L2* proteins and IG regions show a significantly genetic diversity (up to 32% diversity) among *S. maltophilia* species, whereas AmpR proteins are highly conserved with identity of

98%. The DNA segments in the IG region, which are sufficient to support the *L2* induction and *ampR* mutant complementation, were identified by deletion constructs assays. The AmpR binding domain and the *ampR* promoter were found to be not overlapped in the *ampR-L2* IG region of *S. maltophilia*, signifying the fact that *ampR* gene is hardly autoregulated. Furthermore, the induction potential of AmpR toward the different *ampR-L2* IG regions was evaluated by introducing the various IG- $L2_{xyIE}$ transcriptional fusion constructs into a wild *S. maltophilia* strain. The induction levels achieved in the various AmpR-IG pairs display marked quantitative differences. In addition, introduction of a 102-bp mutated *ampR-L2* IG segment into the wild strain attenuates the expression of chromosomal *L1* and *L2* genes. A concept of oligo-nucleotides attenuator for the development of antimicrobial agent is proposed.



第一章 前言

第一節 研究背景

自一九二八年英國科學家 Alexander Fleming 發現青黴素後，隨著時代的進步，有越來越多種抗生素陸續被發現、合成並大量使用於醫療、畜牧養殖業上。但是「物競天擇，適者生存」，細菌在人類使用近一世紀抗生素的歲月裡，為了繼續生存，已陸續發展出許多抗藥機轉來抵抗抗生素的威脅。因此，細菌抗藥性的產生，不僅是公共衛生上的一大問題，同時也加重人類對疾病治療和新藥研發的壓力與困難度。

目前在臨床醫療中，我們特別注意造成院內感染排行前幾名的革蘭氏陰性桿菌，如綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、嗜麥芽醣黃單胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、鮑氏不動桿菌 (*Acinetobacter baumannii*) 等非葡萄糖發酵性細菌，其與生俱來之多重抗藥性，使得在治療上十分困難。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，實為當前迫切之課題。

本實驗室以 *Stenotrophomonas maltophili* 作為研究菌種，並致力於該菌產生 β -lactamase 抗藥性機制之探討。至目前為止，已累積相當

的成果。

第二節 *Stenotrophomonas maltophilia* 的介紹

Stenotrophomonas maltophilia 最早從環境中分離出來時，被歸類命名為 *Pseudomonas maltophilia* (Hugh R. *et al.*, 1961)⁽¹⁾，後來改分類命名為 *Xanthomonas maltophilia* (Sutter VL. 1968)⁽²⁾。直到近幾年拜分子生物學技術進步之賜，經科學家重新分析其遺傳資訊和DNA序列，最後又更名為 *Stenotrophomonas maltophilia* (Palleroni NJ. *et al.*, 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。該菌嗜以麥芽糖為主要之營養碳源，可以耐受 silverlined catheters (Ubeda P. *et al.*, 1998)⁽⁴⁾，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，為常見的 normal flora。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 E. *et al.*, 1995)⁽⁵⁾。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 S. *et al.*, 2002) ⁽⁶⁾。 *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/)。G+C content 為 66.32%，序列全長為 4,851,126 bp。

第三節 *S. maltophilia* 的抗藥性機轉

Stenotrophomonas maltophilia 目前已知有四種抗藥性機制。第一種是產生可分解或抑制抗生素活性之酵素，例如產生 β -lactamase，其可破壞 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 MH. *et al.*, 1973) ⁽⁷⁾。目前已知 *S. maltophilia* 能製造出兩種不同型的 β -lactamases，分別為 L1 和 L2 (Krueger TS. *et al.*, 2001) ⁽⁸⁾。另外，亦發現 *S. maltophilia* 的染色體基因上也存在著其他抗藥性基因，能產生水解抗生素的酵素，像是 aminoglycoside acetyltransferases (Lambert T. *et al.*, 1999) ⁽⁹⁾ 和

erythromycin inactivating enzyme (Alonso A. *et al.*, 2000) ⁽¹⁰⁾。第二種是細菌細胞內自行修飾抗生素所辨認的受器標的，例如 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 (penicillin binding protein) 的結構，使抗生素無法與 PBP 結合作用，因而產生抗藥性 (Livermore DM. 1995) ⁽¹¹⁾。第三種抗藥機制是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 S. *et al.*, 2001) ⁽¹²⁾。第四種抗藥性機轉則是細菌在細胞膜上發展出特殊的 efflux pump (multidrug pump) system 結構，使抗生素一進入到細胞膜內部則馬上藉由 pump 打到細胞膜外部 (Li XZ. *et al.*, 2002; Sanchez P. *et al.*, 2002; Zhang L. *et al.*, 2001) ⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾。目前在 *S. maltophilia* 已發現兩種多重抗藥排出幫浦系統，分別為 SmeABC 和 SmeDEF 兩型 (Morita Y. *et al.*, 2006) ⁽¹⁶⁾。SmeABC 與 SmeDEF 運作機制相當類似，它們是細菌消耗自身的 ATP 能量或使用鈉-鉀離子差能 (gradient) 驅動幫浦而將抗生素自菌體內排出至菌體外。SmeDEF 能夠將 macrolides、tetracyclines、chloramphenicol 和 quinolones 等多種抗生素排出菌體外而達到生存的目的。

第四節 β -lactamase 的分類

學術界對 β -lactamase 已發展出許多分類系統，而目前主要沿用兩種分類系統。一是 1986 年提出的 Bush 分類 (Bush K. *et al.*, 1986)⁽¹⁷⁾，另一種是 1980 年提出的 Ambler 分類 (Ambler RP. 1980)⁽¹⁸⁾。Bush 分類法主要是依據受質 (Substrate) 種類與其活性受何種抑制物 (Inhibiter) 抑制這兩種主要因素，分成 Group 1 到 Group 4 四大類。第一類 (Group 1) 酵素屬於 cephalosporinase，其酵素受質為 cephaloridine 和 cephalothin，酵素活性不受 clavulanic acid 所抑制。第二類 (Group 2) 分為五個亞型，2a 到 2e。Group 2a 屬於 penicillinases；Group 2b 屬於 broad-spectrum 和 extended-broad-spectrum 類 β -lactamases；Group 2c 屬於 carbenicillin-hydrolyzing β -lactamases，其受質為 cephalosporins；Group 2d 是屬於 cloxacillin-hydrolyzing β -lactamases，受質為 cloxacillin；最後之 Group 2e 則是屬於 cephalosporin-hydrolyzing β -lactamases。而 Group 2a 到 2e 型的 β -lactamases 活性均會被 clavulanic acid 所抑制。第三類 (Group 3) 為 metallo- β -lactamase，其活化型的酵素需要鋅離子的加入，所以又稱為金屬酵素 (metallo-enzyme)。此類型的 β -lactamase 活性不受 clavulanic acid 抑制，但是會被 EDTA 所抑制。最後第四類 (Group 4) 為 penicillin-hydrolyzing β -lactamases，其特性目前尚未完全定論。而

Ambler 的分類法主要是依據 β -lactamase 的胺基酸序列進行分類 (Ambler RP. 1980)⁽¹⁸⁾，分為 Class A 到 Class D 四類；其中 Class A、C 和 D 三類是以 serine 作為催化機制之酵素 (serine active site enzyme)，均具有 S-X-X-K motif 的結構。而 Class B 則是需要鋅離子才具有活性的酵素，所以會受 EDTA 所抑制。科學界於 1995 年將這兩種主要分類法綜合整理成一個完整的總表，並列出具有該分型之 β -lactamase 的菌種與基因。其資料整理於附錄一。

第五節 β -lactam 型抗生素

β -lactam 型抗生素是一種廣泛被使用在醫療上的抗生素，而分子結構中包含 β -lactam ring 的抗生素均屬於 β -lactam 型抗生素。 β -lactam 類抗生素屬於殺菌劑，其殺菌原理是能抑制細菌細胞壁中肽聚糖 (peptidoglycan) 的形成，而合成肽聚糖則需要 transpeptidase (penicillin-binding protein, PBP)、carboxypeptidase 和 transglycosylase 等酵素。其中在細菌細胞膜上的 PBP 就是 β -lactam 型抗生素的作用標的。目前 β -lactam 型抗生素主要分為四大類：penicillin、cephalosporin、carbapenem 和 monobactam。Penicillin 類抗生素有 benzylpenicillin (penicillin G)、oxacillin、ampicillin、carbenicillin、piperacillin..... 等。Cephalosporin 類抗生素包括 cephalexin、

cephalexin、cephalothin.....等。Carbapenem 類抗生素則有 imipenem、meropenem、faropenem等。而 monobactam 類抗生素目前市面上則主要是 aztreonam。

目前發現 β -lactam 類抗生素的副作用包括：腹瀉、頭暈、疹塊、蕁麻疹、重疊感染（包括念珠菌），偶爾還會導致發燒、嘔吐、紅斑、皮膚炎、血管性水腫和偽膜性腸炎。 β -lactam 類抗生素與 β -lactamase inhibitor 同時使用時，其注射處往往會有疼痛和發炎之情形。臨床上，約 10% 的病人對 β -lactam 類抗生素產生過敏，約 5-10% 的病人對青黴素衍生物、頭孢菌素和碳青黴烯類抗生素產生交叉敏感性反應。所以當病患對一種 β -lactam 類抗生素會產生嚴重過敏反應的話，如果需要再給予使用其它 β -lactam 類抗生素時就必須慎重考慮（Rossi S. *et al.*, 2004 年）⁽¹⁹⁾。

第六節 *S. maltophilia* 的 L1 與 L2 β -lactamase

S. maltophilia 為一革蘭氏陰性桿菌，易感染免疫力低下的病人（Denton M. *et al.*, 1998）⁽²⁰⁾。其可產生兩種可被誘發表現之 β -lactamases 蛋白，分別為 L1 蛋白和 L2 蛋白，進而提高 *S. maltophilia* 對 β -lactam 類抗生素之抗藥性（Alonso A. *et al.*, 1997）⁽²¹⁾。目前已知由 *S. maltophilia* 染色體上產生出來的 β -lactamase 之 N 端大約有 20 個

胺基酸的訊號胜肽 (signal peptide) (Walsh TR. *et al.*, 1997) ⁽²²⁾。首先，在細菌細胞質產生的 β -lactamase 還是屬於前趨物，而到最後成熟型的 β -lactamase 會被送到細胞膜的外膜與內膜之間。通過細胞內膜時， β -lactamase 的 signal peptide 會經過修飾作用而被切除，signal peptide 具有一個 hydrophobic core region 方便將 secreted polypeptide 插入內膜，在 hydrophobic core region 前 N-terminal 帶有正電荷的胺基酸，它會與細胞膜上帶有負電荷的 phospholipids 互相吸引，而 core region 另一端的 C-terminal 則帶有極性的胺基酸。這時帶正電荷的胺基酸 N 端與 hydrophobic core region 會形成具有功能性的 signal peptide，在進行修飾作用時會被 signal peptidase 切斷。

L1 β -lactamase 為一需要二價鋅離子 (Zn^{2+}) 才具有活性的 metallo-beta-lactamase。它對於抗生素 imipenem 具有很強的水解性，且酵素活性會受到 EDTA 所抑制。目前的文獻指出 L1 β -lactamase 為一四聚體 (tetramer) 之蛋白分子，而一個分子可以結合 2 個 Zn^{2+} 。因此一個完整的 L1 β -lactamase 可以結合 8 個 Zn^{2+} (Saino Y. *et al.*, 1982) ⁽²³⁾。依照 Bush 分類法，L1 β -lactamase 屬於 Group 3。而依照 Ambler 分類法，則是把 L1 β -lactamase 歸類為 Group B。L1 β -lactamase 能水解的抗生素主要為 penicillin 型抗生素，和部份的 cephalosporin 型抗生素以及 carbapenem 型抗生素，但 L1 β -lactamase 不能水解 monobactam

型抗生素。目前在 *S. maltophilia* 臨床分離菌株中發現 *L1* 基因具有 8~12% 的變異性，其基因的序列長度約 873 bp，能編碼出 291 個胺基酸，蛋白分子量約 115 kDa，pI 值約為 7，屬於酸性蛋白質 (Crowder MW. *et al.*, 1998) ⁽²⁴⁾。

而 *L2* β -lactamase 主要能水解 cephalosporins 類抗生素，是屬於 serine active-site cephalosporinase。其酵素活性會受到 clavulanic acid、tazobactam、sulbactam ... 等化合物所抑制 (Crowder MW. *et al.*, 1998) ⁽²⁴⁾。*L2* β -lactamase 在 Bush 分類中屬於 Group 2e，能水解的抗生素主要為 cephalosporin 型抗生素，和部份 penicillin 型抗生素及 monobactam 型抗生素，但無法水解 carbapenem 型抗生素。而在胺基酸的序列分析中發現 *L2* β -lactamase 具有 S-T-D-K、S-D-N、K-T-G 的高度保留序列 (Walsh TR. *et al.*, 1997) ⁽²²⁾，以 Ambler 之分類為 Group A。目前在 *S. maltophilia* 臨床分離菌株中發現 *L2* 基因具有 9~25% 的變異性，其基因序列長度為 909bp，能編碼出 303 個胺基酸，蛋白分子量為 31.5 kDa，pI 值約為 8.2，屬於鹼性蛋白質 (Avison MB. *et al.*, 2001) ⁽²⁵⁾。根據文獻整理 *L1* 與 *L2* β -lactamases 於附錄二。

第七節 染色體形式的 *ampR-ampC* 系統

革蘭式陰性菌中常見一 LysR 型轉錄調控因子 (LysR transcriptional regulator) 之基因與一可被誘發表現的 β -lactamase 基

因所形成的組裝 (*ampR-β-lactamase module*)，通常 *ampR* 基因與其相鄰的 *β-lactamase* 基因走向相反，且 *ampR* 基因與 *β-lactamase* 基因中間的基因片段 (IG) 包含兩基因的啟動子與 AmpR 蛋白結合區域 (Hanson N. *et al.*, 1999) ⁽²⁶⁾。有兩種不同分型的 *ampR-β-lactamase* 組裝已被報導，一為 *ampR-ampC* 組裝，另一為 *ampR-class A β-lactamase* 組裝。

染色體形式的 *ampR-ampC* 系統最早是在 *Citrobacter freundii* (Lindberg F. *et al.*, 1985) ⁽²⁷⁾ 中發現，其後陸續在 *Enterobacter cloacae* (Honoré N. *et al.*, 1986) ⁽²⁸⁾、*Yersinia enterocolitica* (Seoane A. *et al.*, 1992) ⁽²⁹⁾、*Morganella morganii* (Poirel L. *et al.*, 1999) ⁽³⁰⁾、*Hafnia alvei* (Girlich D. *et al.*, 2000) ⁽³¹⁾、*Ochrobactrum anthropi* (Nadjar D. *et al.*, 2001) ⁽³²⁾、*Buttiauxella agrestis* (Bauernfeind A. *et al.*, 1996) ⁽³³⁾、*Serratia marcescens* (Mahlen SD. *et al.*, 2003) ⁽³⁴⁾ 和 *Pseudomonas aeruginosa* (Lodge JM. *et al.*, 1990) ⁽³⁵⁾ 中看到其相關報導，這些菌大多屬於腸桿菌科，報導中對於此系統的調控機制也有相當的了解 (Jacobe C. *et al.*, 1997; Lindberg F. *et al.*, 1987; Normark S. *et al.*, 1995; Wiedemann B. *et al.*, 1998) ⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾。以 *Citrobacter freundii* 為例，其 *ampR-ampC* 組裝的誘發機制與肽聚糖的循環有關，至少有三種以上的基因產物與其有關聯，分別為 *ampG*、*ampD* 和 *ampR* 基

因。 *ampG* 基因產生一穿膜蛋白，可將細胞壁瓦解後的 anhMurNac-tripeptide，從細胞間質傳送至細胞質內。*ampD* 基因產生一 cytosolic N-acetyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase，可將 anhMurNac-tripeptide 水解成 UDP-MurNac-tripeptide 而促進其循環再利用。而 *C. freundii* 的 *ampC* 基因之誘發機制已被清楚報導，且其 LysR 型轉錄調控因子 (LysR transcriptional regulator) 如何誘發與其調控基因相鄰的 β -lactamase 基因也為一典型的模式。Lindquist et al. (Lindquist S. et al., 1989) ⁽⁴⁰⁾ 發現 *ampR* 基因會持續且微弱地表現，且其產生的 AmpR 蛋白無論有無誘發物的存在，都會直接結合在 IG 區域上，更進一步的清楚指出有種信號 ligand (實際的誘發物) 與 AmpR 蛋白的相互作用會決定 *ampC* 基因表現被抑制或者被誘發；UDP-MurNac-pentapeptide 為一抑制 *ampC* 基因表現之 ligand，反之，anhMurNac-tripeptide 使 *ampC* 基因活化 (Hu RM. et al., 2008) ⁽⁴¹⁾。

ampR 基因產生一 LysR 型的調控因子，其可控制 *ampC* 基因的轉錄作用，而 LysR 型的調控因子通常會結合在其調控基因上游的啟動子上，再由一小分子 (ligand) 進一步去活化其調控的基因 (Schell MA. et al., 1993) ⁽⁴²⁾。另有報導指出，*ampR* 基因亦與細菌的生長、處於壓力下之反應、致病因子和抗藥性有關 (Kong KF. et al., 2005; Schell MA. et al., 1993) ⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾，而 LysR 型的調控因子需要結合在 DNA 序列

T-N11-A 上。以 *Citrobacter freundii* 為例，其 *ampR* 基因和 *ampC* 基因的啟動子位於兩基因之中間區域(IG)，走向相反且有重疊之現象，而 LysR-motif T-N11-A 序列位於 *ampR* 基因的啟動子上 (Lindquist S. *et al.*, 1989) ⁽⁴⁰⁾，造成了 *ampR* 基因的負向自我調控 (negative autoregulation) 現象。在此組裝中，AmpR 蛋白在沒有抗生素的情況下當作一抑制者，抑制 *ampC* 基因的表現；而當抗生素存在時，則扮演著活化 *ampC* 基因的角色 (Jacobe C. *et al.*, 1997; Lindberg F. *et al.*, 1985; Lindberg F. *et al.*, 1987) ⁽²⁷⁾⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾。

除了染色體上的 *ampR-ampC* 組裝，亦有在細菌中發現由質體帶來的持續表現、非誘發型的 *ampC* 基因 (Bradford PA. *et al.*, 1997; Gaillot O. *et al.*, 1997; Nadjar DM. *et al.*, 2000; Papanicolaou GA. *et al.*, 1990; Philippon AG. *et al.*, 2002) ⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾，但是最近又有在臨床菌株中發現帶有 *ampR-ampC* 組裝之質體，而 *ampR* 基因的存在使 *ampC* 基因回復其被誘發性 (Barnaud G. *et al.*, 1998; Fortineau N. *et al.*, 2001; Nakano R. *et al.*, 2004; Reisbig MD. *et al.*, 2002; Verdet C. *et al.*, 2006) ⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾。

第八節 染色體形式的 *ampR*-class A β -lactamase 系統

除了 *ampR-ampC* 系統外，另有一相似之 *ampR*-class A β -lactamase 組裝，此組裝存在於 *Rhodopseudomonas capsulate* sp108

(Campbell JIA. *et al.*, 1989)⁽⁵⁴⁾、*Enterobacter cloacae* NOR-1 (Naas T. *et al.*, 1994)⁽⁵⁵⁾、*Proteus vulgaris* B317(Datz M. *et al.*, 1994)⁽⁵⁶⁾、*Serratia marcescens* S6 (Naas T. *et al.*, 1995)⁽⁵⁷⁾、*Burkholderia cepacia* 249 (Trepanier S. *et al.*, 1997)⁽⁵⁸⁾、*Xanthomonas campestris* (Weng SF. *et al.*, 2004)⁽⁵⁹⁾、*Citrobacter sedlakii* 2596 (Saino Y. *et al.*, 1982)⁽²³⁾ 和 *Stenotrophomonas maltophilia* (Hu RM. *et al.*, 2008)⁽⁴¹⁾ 中，此組裝到目前為止只有存在於染色體形式的被報導。在 *ampR*-class A β -lactamase 組裝的 IG 片段與 *ampR-ampC* 組裝的 IG 片段相較之下，*ampR*-class A β -lactamase 組裝的 IG 片段更具多樣化，例如 *Serratia marcescens* S6 的 *ampR* 基因與 class A β -lactamase 基因之啟動子非但沒有重疊，還是一面對面走向 (face to face) 的結構 (Naas T. *et al.*, 1995)⁽⁵⁷⁾。除此之外，在 *ampR*-class A β -lactamase 組裝中，其 AmpR 蛋白的調控規則亦有所不同，以 *Enterobacter cloacae* NOR-1 (Naas T. *et al.*, 1994)⁽⁵⁵⁾ 和 *Serratia marcescens* S6 (Naas T. *et al.*, 1995)⁽⁵⁷⁾ 為例，AmpR 蛋白不管在有無誘發物的情況下，都當作一活化者；而 *Burkholderia cepacia* 249 的 AmpR 蛋白在有無誘發物的條件下都扮演著一抑制者的角色 (Trepanier S. *et al.*, 1997)⁽⁵⁸⁾。

第九節 *S. maltophilia* 染色體上之 *ampR-L2* 系統

最近，L1 蛋白和 L2 蛋白的誘發表現證明由 LysR 型轉錄調控因

子 (LysR transcriptional regulator) AmpR 蛋白所調控 (Okazaki A. *et al.*, 2008) ⁽⁶⁰⁾。而 *ampR* 基因位於 *L2* 基因的上游，且兩基因的走向相反，形成一 *ampR-L2* 組裝 (Hu RM. *et al.*, 2008) ⁽⁴¹⁾。因為 *ampR-L2* 組裝與 *ampR-ampC* 組裝的構造非常相似，所以 AmpR 蛋白和 *ampR-L2* IG 區域之間的結合，可能是 *L2* 基因表現的關鍵。

第十節 研究目的

Stenotrophomonas maltophilia 為一革蘭氏陰性桿菌，廣泛存在於週遭環境，其容易伺機性的引發院內感染 (Denton M. *et al.*, 1998) ⁽²⁰⁾，此菌已知有兩型由染色體基因所產生的可誘發型 β -lactamases 蛋白，分別為 *L1* 與 *L2* 蛋白 (Avison MB. *et al.*, 2001; Saino Y. *et al.*, 1984; Saino Y. *et al.*, 1982) ^{(23) (25) (61)}。此兩個 β -lactamases 基因之 DNA 序列已在實驗室先前的研究中構築與分析 (Hu RM. *et al.*, 2008) ⁽⁴¹⁾，但是對於 AmpR 蛋白對 *L1* 基因與 *L2* 基因的調控機制還不甚清楚 (Okazaki A. *et al.*, 2008) ⁽⁶⁰⁾。本論文將研究主題分為兩部份，第一部份是要更進一步確認 *S. maltophilia* 在有與無誘發物的情況下，探討 AmpR 蛋白對於 *L1* 與 *L2* 基因的調控情形，與評估 AmpR 蛋白是否有自我調控現象。另外，在對於 *ampR-ampC* 組裝與 *ampR-class A* β -lactamases 組裝這兩系統作更深入的探討與比較。此外，在 *S. maltophilia* 菌株中，*ampR* 基因與 *ampR-L2* IG 區域的序列差異度尚未

有其研究報導，可以合理的預期在不同分離菌株中，其 AmpR 蛋白和 *ampR-L2* IG 基因間的差異，可能會影響 *L2* 基因的誘發能力。所以，本論文第二部份將 16 株 *S. maltophilia* 臨床分離株的 *ampR-L2* 組裝進行分析，且將其 AmpR 蛋白、*ampR-L2* IG 區域和 *L2* 蛋白之差異度分組。讓不同群組的 AmpR 蛋白和 *ampR-L2* IG 區域相互作用，測量其不同組合的誘發能力。同時，說明 *ampR-L2* IG 之 DNA 片段對 *ampR* 基因表現和對 *L2* 基因誘發之情形。最後，評估傳入一段 trans-acting *ampR-L2* IG DNA 片段對宿主菌株染色體上之 *L1* 與 *L2* 基因的影響。



第二章 研究方法

第一節 研究設計

本論文之第一部份是先利用生物資訊作 *ampR*- β -lactamase 組裝之分子演化分析。接著構築 *S. maltophilia* KH 的 *ampR*-L2 組裝之質體，且送入 *E. coli* 系統中觀察其表現情形。然後利用基因替換 (gene replacement) 的策略，將欲突變之基因 deletion，形成 KH Δ L2、KH Δ RL2、KH Δ R 和 KH Δ L1 之突變株，之後定量突變菌株之 β -lactamase 活性以釐清 AmpR 蛋白對 L1 和 L2 基因表現所扮演的角色。最後將構築好的 pKHR_{xyIE}174L2 質體送入 KH 和 KH Δ RL2 突變株中，測量其 C230 活性以評估 *ampR* 基因的自我調控。

本論文之第二部份則是先構築 16 株 *S. maltophilia* 分離菌株的 *ampR*-L2 組裝之質體，且利用生物資訊作其 *ampR*-L2 組裝之分子演化分析。然後構築一系列包含完整 *ampR*-L2 IG 片段與 *xyle* 基因形成之 transcriptional fusion 的重組質體，分別送入 *S. maltophilia* 分離菌株 KJ 和 KH 中測量其 C230 活性，以評估兩不同型的 AmpR 蛋白對不同演化分群的 *ampR*-L2 IG 片段之誘發能力。接著構築五個包含不同長度 *ampR*-L2 IG 片段與 *xyle* 基因形成之 transcriptional fusion 的重組質體，分別送入 *S. maltophilia* KJ 菌株中測量其 C230 活性，以

定位 *ampR-L2* IG 區域中可誘發 *L2* 基因表現之最小區域。利用基因替換 (gene replacement) 的策略，將 *ampR* 基因 deletion，形成 KJΔ*R* 之突變株，然後將重組質體 pKJ175*R*、pKJ79*R* 和 pKJ36*R* 送入 KJΔ*R* 突變株中，利用互補試驗以定位 *ampR* 基因之啟動子區域。利用 error-prone PCR 對 *ampR-L2* IG DNA 片段任意突變，篩選能同時降低 *L1* 和 *L2* 基因表現之 IG 突變片段。

第二節 研究材料

一. 本論文所構築與分析之質體與菌株列於表一。

二. PCR 引子

實驗中所使用的 PCR 引子序列皆詳列於表一，其中 stock solution concentration 為 100 μ M；而 working concentration 為 10 μ M。

三. 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±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

四. 實驗藥品

本實驗菌種所使用的藥品購自 Difco Laboratories 或 Accumedica 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.。

五. 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。

六. 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 1X , 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. 檢測 β -lactamase 活性所需試劑

(1) Sodium phosphate buffer, 0.1 M pH 7.0

預先配製

Solution A : 27.6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ per liter (0.2 M)

Solution B : 28.3 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ per liter (0.2 M)

然後再以 solution A 9.8 ml 搭配 solution B 15.3 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) Nitrocefin

1 mg Nitrocefin powder 加入 2 ml phosphate buffer solution，使其完全溶解後，再加入 2 ml 0.1 M pH 7.0 之 Sodium phosphate buffer，使其 final stock concentration 為 0.5 mM，最後保存於 -20°C 。

(3) Protein determination dye

Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate

(4) EDTA (0.5 M pH 8.0)

取 146.125 g EDTA 和 67.41 g NaOH，將兩者溶於 1 L 去離子水中，最後調整 pH 值為 8.0。

6. 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 : 27.6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ per liter (0.2 M)

Solution B : 28.3 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ per liter (0.2 M)

然後再以 solution A 16 ml 搭配 solution B 84 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 100 ml 0.1 M pH 7.5 sodium phosphate buffer，加上 80 ml 去離子水，再加入 20 ml acetone，配製成 200 ml assay buffer。

(3) 0.1 M 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。

七. 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

第三節 實驗方法

一. 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。

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

秤取適量之 agarose powder 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。

三. 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 10 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)，移至 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 500 μ l Binding solution 置於乾浴器 65°C 30 分鐘，時而上下倒置搖晃。再吸取溶液至 Kit 提供的 Spin column 中，Spin column 下接 Collection column，以 12,000 rpm 離心 3 分鐘。再加入 500 μ l Washing Solution 12,000 rpm 離心 5 分鐘，重複此步驟二次。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 10 分鐘，即得回收產物。回收所得之 DNA 保存於 4°C 備用。

4. DNA 切割反應

選擇合適的限制酶，配合廠商建議的緩衝溶液，和所建議的反應溫度，進行 DNA 切割反應。反應時的 DNA 濃度約為 1 μ g/50 μ 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 μ l T4 ligase，再補上無菌去離子水使最後總體積為 20 μ 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。

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

取 1/10 X 體積的 DNA 當做模板,加入 1/10 X 體積的 dNTP mixture (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1/10 X 體積的 10 X Taq buffer 以及分別為 1/10 X 體積最終濃度 1 μ mole 的正、反向引子,和 1/10 X 體積的 DMSO 與 1 μ l 的 Taq DNA polymerase 2.5 U/ml,最後加無菌去離子水到總體積為 20 μ l。利用 GeneAmp PCR system 9600 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°C~65°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。

五. *E. 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 離心 5 分鐘收集菌體。去上清液,加入約 15 ml 之 4°C 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 離心 10 分鐘。小心倒去上清液,最後加入 1 ml 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。

六. 勝任細胞之轉形作用 (transformation)

取適量之 DNA 或質體加入 100 μ l 勝任細胞中，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)。

七. 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 16 小時，而後把 recipient 菌液與 donor 菌液以 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 0.7~0.8。接著將兩菌液分別倒入離心管，以 5000 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 之微量附蓋離心管，並使其混合均勻。再以 5000

rpm 離心 5 分鐘，去除大部分上清液後，預留少量的 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 (40 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。

八. 質體快速篩檢法 (Rapid screen method)

使用已滅菌的牙籤挑選單一菌落的轉型菌株，接種於含有合適抗生素 1 ml 的液態培養基中，37°C 震盪培養 6-8 小時。以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液。加入含有 1% SDS 的 loading dye，並劇烈震盪使沉澱物完全打散，接著加入等體積比例的 phenol/choroform，混合均勻後，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘。吸取上層溶液 10 µl，利用 agarose gel 電泳分析，也可將僅含有載體的轉型菌株依上述同樣方法製備後，注入同一 agarose gel 中，做為對照組。

九. 抗生素感受性試驗

本論文中之抗藥性試驗主要使用 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 cefoxitin 和 aztreonam，濃度範圍為 8~2048 $\mu\text{g/ml}$ 。而每一接種點上有 1.0×10^4 的菌落數 ($10^4/\text{spot}$)，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 cefoxitin 和 aztreonam 抗生素的最低抑制濃度 (minimum inhibitory concentration)。

十. 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 μl ，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。

十一. 構築質體 **pKHR174L2_{xylE}**、**pKH Δ RL2**、**pKH Δ L2**、**pKH Δ R**、**pKHR_{xylE}174L2**、和 **pKH Δ L1**

圖一顯示 *S. maltophilia* KH 的 *ampR-L2* 組裝之限制酶切位圖。

(1) **pKHR_{xylE}174L2** 與 **pKHR174L2_{xylE}**: 將質體 pTXylEE 與 pKHR174L2 分別以限制酶 *Sma*I 和 *Sph*I 處理後進行黏合作用 (ligation)，而得重組質體 pKHR_{xylE}174L2 和 pKHR174L2_{xylE}。

質體 pTXylE 包含一段約 1.3kb 之 *xylE* 基因片匣，其分別插入質體 pKHR174L2 之 *ampR* 基因 (*Sma*I site) 與 *L2* 基因 (*Sph*I site) 上，且 *xylE* 基因片匣與被插入的基因走向相同 (圖二、三)。

(2) **pKH Δ RL2**: pKHR174L2 用 *Stu*I 限制酶處理，切掉 797-bp 的 DNA 片段 (圖四)。

(3) **pKHΔR**: pKHR174L2 用 *Pst*I 限制酶處理, 切掉 486-bp 的 DNA 片段 (圖五)。

(4) **pKHΔL2**: 將 pKHR174L2 用 *Sma*I-*Stu*I 限制酶處理, 得一 468-bp 之基因片段, 將此基因片段與用 *Sma*I 限制酶處理之 pEX18Tc 質體黏合後, 再進一步與用 *Sph*I-*Hind*III 限制酶處理 pKHR174L2 質體後得到之 854-bp 基因片段黏合, 得重組質體 pKHΔL2 (圖六), 並且將其 DNA 基因片段定序以確保其正確性。

(5) **pKHΔL1**: 以 *S. maltophilia* KH 分離菌株之染色體為模板, 用 5-AAG GAG GCC CAT GCT AGT TT -3 和 5-TTC TGA CCG GCA CCC TTC-3 為 primers 進行 PCR, 所得之完整 *L1* 基因片段與 T-vector 黏合, 得一 pTKHL1 質體, 再將其與 pEX18Tc 質體利用 *Hind*III-*Pst*I 與 *Xba*I-*Sph*I 限制酶經兩步驟之切黏處理, 得一重組質體 pKHΔL1 (圖七), 且將其 DNA 基因片段定序以確保其正確性。

十二. KHΔL2、KHΔRL2、KHΔR、KHΔL1 突變株之獲得與確認

利用接合作用 (conjugation) 將重組質體 pKHΔL2、pKHΔRL2、pKHΔR 和 pKHΔL1 送入 *S. maltophilia* KH 中, 再使 *S. maltophilia* KH 的染色體基因與重組質體進行同源互換 (double homologous

recombination) 以獲得 KH Δ L2、KH Δ RL2、KH Δ R、KH Δ L1 突變株，之後利用 PCR 和 DNA 定序來確保其正確性。

十三. 質體 pKH174L2_{xyIE}、pYW175L2_{xyIE} 和 pKS174L2_{xyIE} 的構築

構築一系列的重組質體 (圖八) 來評估 AmpR 蛋白對不同的 *ampR-L2* IG 片段之誘發能力，這些重組質體的設計是包含一完整的 *ampR-L2* IG 片段，其後的 *L2* 基因以 *xyIE* 基因取代之。首先將 *S. maltophilia* KH、YW 和 KS 菌株的 *ampR-L2* DNA 片段以 PCR 技術放大，將其 PCR 產物與 T-vector 黏合，而產生質體 pTKHRL2、pTYWRL2 和 pTKSRL2。然後質體 pTKHRL2、pTYWRL2 和 pTKSRL2 分別以 *SmaI-StuI*、*NotI-XhoI* 和 *XhoI-XbaI* 限制酶處理，再將其與用同限制酶或可相黏合之限制酶處理的 pEX18Tc 質體進行黏合作用，得到質體 pKH174L2、pYW175L2 和 pKS174L2，再分別將質體上的 *L2* 基因用 *xyIE* 基因取代，然後利用 DNA 定序來確認 *xyIE* 基因與被置換的 *L2* 基因走向相同，最後得到重組質體 pKH174L2_{xyIE} (圖九)、pYW175L2_{xyIE} (圖十) 和 pKS174L2_{xyIE} (圖十一)。

十四. 構築 *L2* 基因與 *ampR* 基因的啟動子區域

L2 基因的誘發需要 *ampR-L2* IG 區域的存在，構築五個包含不同長度 *ampR-L2* IG 片段，且 *L2* 基因以 *xyIE* 基因取代的質體 pKJ175L2_{xyIE}、pKJ125L2_{xyIE}、pKJ102L2_{xyIE}、pKJ79L2_{xyIE} 和 pKJ72L2_{xyIE}

(圖十二)。首先以 pTKJRL2 為模板，用 175-F/IG-R、125-F/IG-R 和 72-F/IG-R 為 primers 進行 PCR，分別放大 175-bp、125-bp 和 72-bp 的 DNA 片段，然後將 PCR 產物個別與 pEX18Tc 質體黏合，得到 pKJ175、pKJ125 和 pKJ72，再用限制酶從質體 pTXylE 切出 *xylE* 基因片匣，並插入 pKJ175、pKJ125 和 pKJ72 質體，而得到質體 pKJ175L₂*xylE* (圖十三)、pKJ125L₂*xylE* (圖十四) 和 pKJ72L₂*xylE* (圖十五)。質體 pKJ79 和 pKJ102 是將質體 pKJ175 以 *XhoI-MluI* 限制酶處理所得之 79-bp 片段和用 *MluI-SphI* 限制酶處理所得之 102-bp 片段分別經兩步驟之切黏處理；先與 pOK12 質體黏合再轉到 pEX18Tc 質體，最後再插入 *xylE* 基因片匣而得質體 pKJ79L₂*xylE* (圖十六) 和 pKJ102L₂*xylE* (圖十七)。為了測定 *ampR* 基因的啟動子區域，需構築質體 pKJ175R、pKJ79R 和 pKJ36R (圖十八)。首先將質體 pTKJRL2 以 *SphI-HindIII* 限制酶處理得一 1.2kb 的基因片段，與同為 *SphI-HindIII* 限制酶處理的質體 pEX18Tc 黏合得到 pKJ175R (圖十九)，然而其啟動子與質體 pEX18Tc 的 *lacZ* 基因啟動子走向相反。相同的，pKJ79R 質體 (圖二十) 除了包含一段較短的 79-bp *ampR-L2* IG 片段外，其構築方式同 pKJ175R 質體的構築。以質體 pTKJRL2 為模板，用 AmpR36-F 和 AmpR36-R 為 primers 進行 PCR，放大一 916-bp 的 DNA 片段，然後將 PCR 產物與 pEX18Tc 質體黏合，得到

pKJ36R 質體（圖二十一），然後將其定序以確保 36-bp *ampR-L2* IG 片段與質體 pEX18Tc 的 *lacZ* 基因啟動子走向相反。

十五. KJΔR 突變株之獲得與確認

將包含有 *ampR-L2* 基因的質體 pTKJRL2 經兩步驟之切黏處理，先以 *SphI* 限制酶處理去除 *L2* 基因，再用 *PstI* 限制酶處理除去 *ampR* 基因中間部份 468-bp 的基因片段，而得到質體 pTKJΔR。然後將質體 pTKJΔR 以 *SphI-EcoRI* 限制酶處理所得之 1.2-kb 片段與 pEX18Tc 質體黏合而得重組質體 pKJΔR（圖二十二）。將此質體利用轉殖作用（transformation）送入 *E. coli* S17-1，再利用接合作用（conjugation）轉入 *S. maltophilia* KJ 中，再使 *S. maltophilia* KH 的染色體基因與重組質體 pKJΔR 進行同源互換（double homologous recombination）以獲得 KJΔR 突變株，之後利用 PCR 和 DNA 定序來確定其正確性。

十六. Error-prone PCR of *ampR-L2* IG

利用 175-F 和 IG-R 為 primers 進行 PCR 來使 *S. maltophilia* KJ 的 175-bp *ampR-L2* IG 片段產生任意突變，PCR 反應物包含 10ng 的 pKJ175 模板 DNA，0.2μM 的正、反向引子，1X 的 PCR buffer，0.2mM 的 dNTP mixture (ATP、dGTP、dCTP 和 dTTP)，1/10 X 體積的 DMSO，0.5Mm 的 MnCl₂ 和 5U 的 proTag polymerase；而 PCR 之反應條件與參數為：第一階段 94°C，5 分鐘；再以第二階段 94°C，1 分鐘；58°C，1 分鐘；72°C，0.5 分鐘，此反應進行 30 個循環；最後第三階段 72°C，

10 分鐘。然後將 PCR 產物以 *XhoI-SphI* 限制酶處理，再與其用同限制酶處理的 pEX18Tc 質體進行黏合作用，所得之質體利用轉殖作用 (transformation) 送入 *E. coli* S17-1，再利用接合作用 (conjugation) 轉入 *S. maltophilia* KJ 中。而經接合作用後之混合液塗在含有 tetracycline (40 μ g/ml) 和 norfloxacin (2.5 μ g/ml) 抗生素的瓊脂培養基 (LB agar plate) 上，待其長出單一菌落時將其接種至一母本培養基 (master plate)，再經由母本培養基將菌株分別接種至含有 cefoxitin (50 μ g/ml) 和 aztreonam (50 μ g/ml) 抗生素的培養基上，挑選在這兩種培養基上不長之菌株作進一步研究。

然後將經接合作用後帶有 175-bp *ampR-L2* IG 突變質體之 *S. maltophilia* KJ 作 DNA 定序，作法是將所挑選之菌株以 M13-F 和 M13-R 為引子進行 colony-PCR。首先為 PCR 樣本之製備：在 1.5 ml eppendorf 中注入 200 μ l 之無菌去離子水，然後利用無菌牙籤沾取菌落在 eppendorf 內的無菌水中攪拌使之均勻分佈，再把 eppendorf 置於超音波震盪機震盪約 15 分鐘，最後將 eppendorf 以 12,000 rpm 離心 20 分鐘，取 pellet 上方之 20 μ l 菌液為 PCR 樣本，加入 dNTP 4 μ l，M13-F 和 M13-R 引子各 4 μ l，DMSO 4 μ l，10X Taq buffer 4 μ l，*Pfu* polymerase 1 μ l，最後總體積約 40 μ l 進行 PCR。然後將 PCR 產物以 *XhoI-SphI* 限制酶處理，再與其用同限制酶處理的 pEX18Tc 質體進行

黏合作用，最後將 PCR 產物之 DNA 完整定序。

十七. 利用超音波破菌法 (Sonicator method) 破菌收集 β -lactamase

將隔夜培養的菌液次培養至 20 ml LB 中 (使細菌濃度達 $OD_{450} = 0.15$)，先以 37°C 震盪培養 30 分鐘後，加入 β -lactam 類抗生素 (final conc. = $50\ \mu\text{g/ml}$) 為誘發物，繼續於 37°C 震盪培養 2 小時。將菌液裝於 50 ml 離心管，以 12,000 rpm 離心 5 分鐘後去上清液，用 50 mM pH 7.0 Sodium phosphate buffer 洗菌三次。接著將收集的菌體以 2 ml Sodium phosphate buffer 回溶。利用 vortex 把菌體均勻打散，將菌液置於冰上並將超音波探針伸入菌液液面下進行破菌。設定條件為 6W，5 分鐘 (震 10 秒停 10 秒)。破完菌後，將菌液以 12,000 rpm 離心 30 分鐘，收集上清液 (cell extracts)。

十八. 蛋白質濃度定量

以 780 μl 的去離子水與 200 μl Bio-Rad protein assay dye reagent 均勻混合後至石英 curvet 作 blank，之後加入 20 μl 經適當稀釋之 cell extract，於 A_{595} 測量其吸光值。

十九. β -lactamase 活性分析

將 cell extract 以二次水稀釋至適合測量之倍數後，取 450 μl 至石英比色管 (cuvette) 中歸零 (blank)，歸零後加入 50 μl 之 0.5 mM nitrocefin 均勻混合，立即置於分光光度計中進行分析，測量於 A_{486}

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 nitrocefin 之 extinction coefficient 常數 ($\epsilon_{\Delta 486} = 20,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 換算每分鐘 nitrocefin 被水解的量。活性單位 1Un 為每分鐘 1 nmole nitrocefin 被水解所需要之酵素量。最後 β -lactamase specific activity (Un/mg) 以每 1 mg cell extracts protein 中含有多少酵素活性 (Un) 表示之。

二十. Catechol 2,3-dioxygenase (C23O) 活性分析

C23O 活性的測量是不需要破菌 (Karkhoff-Schweizer *et al.*, 1994)，其活性分析是直接將菌體用 assay buffer (50Mm sodium phosphate buffer, 10% acetone) 回溶，以 0.1M catechol 作為受質，利用分光光度計以 OD_{375} 測量，所得之吸光值變化以 catechol 之 extinction coefficient 常數 ($\epsilon_{\Delta 375} = 44,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 換算每分鐘 catechol 被水解的量。活性單位 1Uc 為每分鐘 1 nmole catechol 被水解所需要之酵素量。最後 C23O specific activity (U/ $\text{OD}_{450\text{nm}}$) 以每 3.6×10^8 cell 中含有多少酵素活性 (Uc) 表示之。 ($A_{450\text{nm}}$ 測得數值 1 相當於每 1 ml 之菌液有 3.6×10^8 cell)

二十一. 生物資訊分析

使用 PubMed 功能找到具有 *ampR*- β -lactamase 組裝的菌種，再利用 National Center for Biotechnology Information 網站

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 BLASTP 功能，分別輸入 *S. maltophilia* KH 的 AmpR 和 L2 蛋白序列來搜尋文獻中菌種之 AmpR 和 L2 蛋白，進而獲得不同組裝的 *ampR*- β -lactamase 之 DNA 序列，然後利用 ClustalX 程式將需分析的 DNA 和蛋白分別做序列之比對，之後以 neighbor-joining methods 建構其演化樹。將彼此蛋白相同度 \geq 96% 的 L2 或 AmpR 蛋白定義為同一群 (cluster)。

S. maltophilia KH 之 AmpR 蛋白與其他菌株之 AmpR 蛋白之比較整理於附錄三。*S. maltophilia* KH 之 L2 蛋白與其他菌株之 β -lactamase 蛋白之比較整理於附錄四。

二十二. 核苷酸序列之編號

本論文所定序之 *S. maltophilia* 的 *ampR*-L2 組裝和 *L1* 基因之核苷酸序列儲存於 GenBank，其編號呈現於附錄五。

二十三. 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 0.15 開始預養，半小時後添加誘發物 (inducer)，再經 1.5 小時培養後，取 1ml 之菌液用 PureLink™ Total RNA Purification System 抽出 RNA，另外，在 50 μ g 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。Q-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 $\Delta\Delta$ 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。

第三章 研究結果

3.1 不同菌種間 *ampR*- β -lactamase 組裝之分子演化分析

S. maltophilia KH 分離菌株之 L2 蛋白具有 Amber class A β -lactamase 的特徵，所以 *ampR*-L2 組裝是屬於 *ampR*-class A β -lactamase 型。將其與其他九株不同種細菌的 *ampR*-*ampC* 組裝與七株不同種菌株之 *ampR*-class A β -lactamase 組裝做比較，依其 β -lactamase 蛋白與 AmpR 蛋白分別比較分析所得之演化樹狀圖呈現於圖二十三。

β -lactamase 蛋白演化樹狀圖明顯將 *ampR*-*ampC* 組裝與 *ampR*-class A β -lactamase 組裝中的 β -lactamase 蛋白分成兩群演化分枝。*S. maltophilia* KH 分離菌株之 L2 蛋白與 *ampR*-class A β -lactamase 的 β -lactamase 蛋白有 39~50% 的相同度（圖二十三之 A）。但 *S. maltophilia* 之 L2 蛋白則與 *ampR*-*ampC* 組裝之 AmpC 蛋白沒有明顯有意義的相同度。

而 *S. maltophilia* KH 分離菌株之 AmpR 蛋白與其他所分析菌株之 AmpR 蛋白則有 46~67% 的相同度（圖二十三之 B），經由序列比對，發現其保留區域隨意分佈，並無明顯聚集區域，然而在所有 AmpR 蛋白的 N 端皆發現有一 helix-turn-helix 的構造。

在所分析的菌株中，*S. maltophilia* KH 的 AmpR 和 L2 蛋白與 *X. campestris* 之 AmpR 與 L2 蛋白相同度最高，分別為 67% 和 50%。而且有一值得注意的現象，在這些菌株中，其 AmpR 蛋白的演化分型並不都與其 β -lactamase 蛋白演化分型趨勢相同。例如 *S. maltophilia* KH 的 L2 是屬於 class A β -lactamase，但是其 AmpR 蛋白卻和 *ampR-ampC* 系統的 AmpR 蛋白（如 *P. aeruginosa*，*O. anthropi*）相似程度更甚於 *ampR-classA* β -lactamase 組裝之 AmpR 蛋白（如 *P. vulgaris* B317 和 *E. cloacae* NOR-1）（圖二十三之B）。

圖二十四顯示 *S. maltophilia* KH 和 15 株具有 *ampR*- β -lactamase 系統的菌株其 *ampR*- β -lactamase IG 片段之比對分析。*ampR*- β -lactamase IG 片段的長度範圍從第 86 到 212 個核苷酸不等，觀察 *ampR*- β -lactamase IG 片段的結構特徵發現 *ampR-ampC* 組裝的 IG 片段較 *ampR-classA* β -lactamase 組裝的 IG 片段更具有高度保留性。通常在大部份 *ampR*- β -lactamase 系統，*ampR* 基因的啟動子和其相鄰 β -lactamase 基因的啟動子走向相反且有重疊之現象

（Maningo E. *et al.*, 1995; Krueger TS. *et al.*, 2001; Zhang L. *et al.*, 2001; Denton M. *et al.*, 1998; Alonso A. *et al.*, 1997; Avison MB. *et al.*, 2001; Hanson N. *et al.*, 1999; Seoane A. *et al.*, 1992; Normark S. *et al.*, 1995; Wiedemann B. *et al.*, 1998; Gaillot O. *et al.*, 1997; Nadjjar DM. *et al.*,

2000; Philippon AG. *et al.*, 2002) (5.8.15.20.21.25.26.29.38.39.45.46.48)。而 *S. marcescens* S6 除外，其兩啟動子是面對面走向，且無重疊現象 (Naas T. *et al.*, 1995) (57)。然而，*S. maltophilia* KH 的174-bp IG片段與這些被報導過的序列有些許差異，將其序列用軟體分析 (<http://www.fruitfly.org>)，預測 *ampR* 和 *L2* 基因可能的 -10 和 -35 啟動子區域並標記於圖二十四，發現其 *ampR* 及 *L2* 兩基因啟動子相離50個核苷酸，走向相反且呈現背對背的構型。而 AmpR 可能結合的區域 T-N11-A 以底線標記於圖二十四，此區域與 *L2* 基因所預測的啟動子 -35 區域重疊。

3.2 *S. maltophilia* KH 的 *ampR*-*L2* 組裝在 *E. coli* 系統之表現情形

過去的參考文獻通常使用 *E. coli* 當宿主來觀察 *ampR*-*ampC* 或 *ampR*-classA β -lactamase 組裝之表現。因此本實驗之初，亦先將包含 *ampR* -*L2* 組裝的質體 pKHR174L2 經轉殖作用送入 *E. coli* 中評估其誘發情形。很不幸地 pKHR174L2 質體在 *E. coli* 系統無法測到 β -lactamase 活性表現，為了更進一步證實此現象，將另一用 *xyIE* 基因取代 *L2* 基因的 pKHR174L2_{xyIE} 質體送入 *E. coli* DH5 α 與 *S. maltophilia* KH 中，結果發現不管有無添加誘發物，其質體在 *E. coli* 系統中測不到 C23O 活性，不過將此質體送入 *S. maltophilia* KH 中

則可測到受誘發的 C23O 活性（表二）。

3.3 AmpR 蛋白對 *L1* 基因表現所扮演的角色

既然 *E. coli* 系統不適用於分析 *ampR*-*L2* 組裝，只好考慮使用原 *S. maltophilia* 菌來擔任宿主。因此，需構築 KHΔR、KHΔRL2 突變株，再加上實驗室已有之 KHΔL1、KHΔL2 突變株。為了釐清 AmpR 對 *L1* 基因表現所扮演的角色，可利用 KHΔL2 (*ampR*⁺, *L1*⁺, *L2*⁻) 和 KHΔRL2 (*ampR*⁻, *L1*⁺, *L2*⁻) 突變株之 β-lactamase 活性表現來評估。結果在不管有無誘發物的情況下，其 KHΔL2 的細胞萃取物測得的 β-lactamase 活性皆高於 KHΔRL2 細胞萃取物的 β-lactamase 活性，顯示 AmpR 對於 *L1* 的表現不管有無誘發物，都扮演著一活化者 (activator) 的角色。此外，KHΔL2 的細胞萃取物在無誘發物的情況下表現了低 β-lactamase 活性 (2 Un/mg)，在同條件下 KHΔRL2 則測不到活性，其顯示 *L1* β-lactamase 的基本表現 (basal expression) 需要 AmpR 幫忙 (AmpR-dependent)。而在有誘發物的情況下，KHΔL2 的誘發能力明顯的上升，相反的，KHΔRL2 失去誘發能力，所以，AmpR 在 *L1* 基因的誘發上是必需的 (表三)。

3.4 AmpR 蛋白對 *L2* 基因表現所扮演的角色

為了更進一步說明 AmpR 對 *L2* 基因表現的作用，就以 $KH\Delta R$ ($ampR^-$, $L1^+$, $L2^+$) 和 $KH\Delta L1$ ($ampR^+$, $L1^-$, $L2^+$) 突變株在有無添加 10 ug/ml cefuroxime 的條件下，測量其 β -lactamase 活性表現 (表四)。從表四可明顯看到， $KH\Delta RL2$ 在有添加誘發物的情形下，沒有測到 β -lactamase 活性，其結果顯示 *ampR* 基因之突變將會完全失去 *L1* 基因之表現，所以在 $KH\Delta R$ 菌株中所測得的 β -lactamase 活性是 *L2* β -lactamase 之活性。而沒有誘發的 $KH\Delta R$ 菌株之活性稍高於沒有誘發的 $KH\Delta L1$ (12 vs 4 Un/mg)，顯示在沒有誘發物的情況下，AmpR 對於 *L2* 表現是為一微弱的抑制者。而在有誘發物的情況下， $KH\Delta L1$ 的 β -lactamase 活性明顯高於 $KH\Delta R$ ，其表示在有誘發物的情況下，AmpR 對於 *L2* 基因的表現扮演一活化者的角色。然而不管有無誘發物， $KH\Delta R$ 細胞萃取物可測得一基本的 β -lactamase 活性。所以在沒有 AmpR 蛋白之情況下，*L2* 基因有一持續但微弱之表現 (basal constitutive but weak expression)。而 *S. maltophilia* $KH\Delta L1$ 表現一可誘發之表現型，相反的， $KH\Delta R$ 失去 *ampR* 基因，也失去其誘發的能力 (表四)，這顯示出 *L2* 酵素的誘發必須要靠 AmpR 蛋白的幫助。

3.5 評估 *ampR* 的自我調控

一般認為 Lys R 型的調控因子擁有自我調控的特性，因此，值得探討 *S. maltophilia* 的 *ampR* 是否具有自我調控的能力。將構築好的 pKHR_{xy1E174L2} 質體送入 KH 和 KH Δ RL2 突變株去檢測 AmpR 蛋白對 *ampR* 基因轉錄的影響。在有無誘發物下測量 KH(pKHR_{xy1E174L2}) 和 KH Δ RL2(pKHR_{xy1E174L2}) 的 C23O 活性。其中 KH(pKHR_{xy1E174L2}) 測得的 C23O 活性當作其 AmpR 蛋白對 *ampR* 基因轉錄的影響。然而，KH Δ RL2(pKHR_{xy1E174L2}) 的 C23O 活性可用以模擬 *ampR*-L2 IG 區域在沒有 AmpR 蛋白結合的情況下，*ampR* 基因啟動的情形。表五顯示 KH(pKHR_{xy1E174L2}) 和 KH Δ RL2(pKHR_{xy1E174L2}) 的 C23O 活性不論在有無添加誘發物的情況下，皆無明顯差異。顯示不管有無誘發物，*ampR* 基因會持續其微弱地表現轉錄作用。此外，KH(pKHR_{xy1E174L2}) 和 KH Δ RL2 (pKHR_{xy1E174L2}) 的 C23O 活性表現量相當，說明了 AmpR 蛋白的存在幾乎不影響 *ampR* 基因的表現，所以 *ampR* 沒有自我調控的現象。

3.6 序列分析 16 株 *S. maltophilia* 分離菌株之 *ampR*-L2 組裝

針對 16 株 *ampR*-L2 組裝的 *S. maltophilia* 分離菌株之 L2 蛋白、

IG 區域和 AmpR 蛋白相互比較。首先利用 PCR 將 16 株 *S. maltophilia* 分離菌株的 *ampR-L2* 之 DNA 片段放大，並將其 PCR 產物定序。結果發現 *L2* 基因有三種不同的長度，分別為 906、912 和 915 bp，扣除預測的 27 個胺基酸之訊號胜肽（signal peptide）後，利用 Phylip 演化樹建構系統（Phylip program）將成熟的 *L2* 蛋白分型。如圖二十五之 A 所示，將 16 株 *S. maltophilia* 分離菌株的 *L2* 蛋白分成 *L2-1*、*L2-2*、*L2-3* 和 *L2-4* 四群演化分枝，其中 *L2-1* 和 *L2-2* 的長度同為 912 個核苷酸，而 *L2-3* 和 *L2-4* 分別為 906 和 915 個核苷酸（表六、圖二十五）。值得注意的是，在這些 *S. maltophilia* 分離菌株中，其 *L2* 蛋白的變異度為 5-31%。為了瞭解這些不同分群的 *L2* 蛋白之特性，在本實驗中分別挑選 *S. maltophilia* 分離菌株 KJ、KH、YW 和 KS 代表 *L2-1*、*L2-2*、*L2-3* 和 *L2-4* 四群演化分枝。

而 16 株 *S. maltophilia* 分離菌株依其 *ampR-L2* IG 之 DNA 序列也分成四群演化分枝，分別為 *IG-1*、*IG-2*、*IG-3* 和 *IG-4*，而其基因演化樹狀圖（圖二十五之 B）與 *L2* 蛋白演化樹狀圖（圖二十五之 A）大致相似。在 *IG* 分型上，*IG-2* 和 *IG-4* 其 *IG* 區域之長度為 174 bp，另外兩型 *IG-1* 及 *IG-3* 則為 175 bp。而屬於同一群演化分枝的菌株，其 *ampR-L2* *IG* 之 DNA 相同度為 96-100%，不同群菌株的 *ampR-L2* *IG* 之 DNA 相同度則為 68-91%，這趨勢亦與 *L2* 蛋白相似，而不同的

是在於 G+C content。 *S. maltophilia* 整個基因體的 G+C content 高達 70%，而其 *ampR-L2* IG 的 G+C content 特別低，大概只有 52%。

然而 AmpR 蛋白序列在這 16 株 *S. maltophilia* 分離菌株中被高度保留，這點明顯與 L2 蛋白和 *ampR-L2* IG 區域不同。在這 16 個 AmpR 蛋白的 N 端，都有發現一 helix-turn-helix 的結構。把這 16 株菌的 AmpR 蛋白做 protein alignment (圖二十六)，所得結果以三處明顯不同的胺基酸作為鑑別的準則，將其分為兩型，分別以 AmpR1 和 AmpR2 表示之 (表六)。用以區別 AmpR1 和 AmpR2 兩型的主要胺基酸分別為 Gly¹⁸⁴/Ser²⁵⁴/Arg²⁷⁷ 和 Ala¹⁸⁴/Gly²⁵⁴/Lys²⁷⁷。雖然亦有觀察到在 AmpR 蛋白上有一些較少數的胺基酸變異，如 *S. maltophilia* KJ 的 Ala-5 和 *S. maltophilia* KH 的 Asn-83，但這幾乎不會影響 AmpR 蛋白的分類。

3.7 AmpR 蛋白對四種分型的 *ampR-L2* IG 之誘導分析

S. maltophilia 能製造出兩個可被共同誘發的 β -lactamases 蛋白，分別為 L1 和 L2 蛋白。如將 16 株 *S. maltophilia* 分離菌株以 cefuroxime (50 μ g/ml) 處理，可測得其誘發 β -lactamases 之活性範圍從 826-3472 Un/mg 不等。由此發現 *S. maltophilia* 的 β -lactamases 誘發能力有很高的差異性。而 *S. maltophilia* 之 *ampR-L2* 組裝不僅與腸桿菌科的 *ampR-ampC* 組裝在結構上相似，其誘發機制亦很雷同。所以，AmpR

蛋白和 *ampR-L2* IG 區域必定對 *L2* 基因的誘發能力扮演著極關鍵的角色。

將本實驗所用之 16 株 *S. maltophilia* 分離菌株分析後，分類成兩種之 AmpR 蛋白，AmpR1 和 AmpR2；四型的 *ampR-L2* IG，分別為 IG-1、IG-2、IG2-3 和 IG-4(表六、圖二十五)。所以，挑選 *S. maltophilia* 分離菌株 KJ 和 KH 為 AmpR1 和 AmpR2 的代表，而 *S. maltophilia* 分離菌株 KJ、KH、YW 和 KS 分別為 IG-1、IG-2、IG2-3 和 IG-4 四群演化分枝的代表。首先，將重組質體 pKJ175L2_{xyIE}、pKH174L2_{xyIE}、pYW175L2_{xyIE} 和 pKS174L2_{xyIE} 經接合作用，分別送入 *S. maltophilia* 分離菌株 KJ 和 KH 中。所得之轉殖菌株 (transconjugant) 在有與無誘發物的情況下，測量其 C23O 活性。同時也將 pKJ175L2_{xyIE} 質體以同樣方式送入 *S. maltophilia* KJΔR 突變株中，將其視為沒有 AmpR 蛋白的對照組(表七)。這些含有上述不同外來質體之 *S. maltophilia* KJ 和 KH 轉殖菌株，在沒有誘發物的情況下，只有測量到基本值 (basal-level) 的 C23O 活性。相反的，在有誘發物的情況下，測得之 C23O 活性明顯上升。另外，轉殖菌株 KJΔR (pKJ175L2_{xyIE}) 連在有誘發物的情況下，都只有測量到微弱的 C23O 活性。所以在重組質體上之 *xyIE* 基因的誘發表現和誘發能力需要 AmpR 蛋白的幫助 (AmpR-dependent)，且其誘發表現之模式與染色體上之 *L2* 基因相

仿。因此，在此系統中測得之 C23O 活性可視為宿主之 AmpR 蛋白對重組質體上 *ampR-L2* IG 區域的誘發能力的表現（表七）。

AmpR 蛋白對於 *L1* 與 *L2* 基因的表現扮演著一關鍵轉錄調控因子的角色，而重組質體 pKJ175L2_{xyIE}、pKH174L2_{xyIE}、pYW175L2_{xyIE} 和 pKS174L2_{xyIE} 的存在是否會影響 *L1* 和 *L2* β -lactamases 的表現，就值得深入探討。所以，將上述之轉殖菌株分別以 cefoxitin (*L1* 蛋白酵素的專一受質) 和 aztreonam (*L2* 蛋白酵素的專一受質) 抗生素進行感受性試驗。結果顯示，將 *ampR-L2* IG 片段送入 *S. maltophilia* 菌株中，只降低其對 aztreonam 抗生素的最低抑制濃度 (MICs)，代表 *ampR-L2* IG 片段使 *L2* β -lactamases 的活性減少，而對 *L1* β -lactamases 的活性則沒有明顯影響（表七）。

為了進一步說明 aztreonam 抗生素的最低抑制濃度 (MICs) 下降是調控在 *L2* 基因轉錄層面，或是與 *L2* 蛋白酵素的活性有關。因而利用即時定量聚合酶連鎖反應 (QRT-PCR) 來定量 *S. maltophilia* KH 及 KH(pKS174L2_{xyIE})的 *L2* RNA 量。結果顯示在誘發情況下，*S. maltophilia* KH 菌株的 *L2* RNA 量是菌株 KH(pKS174L2_{xyIE})的 525 倍。由此證明，因 pKS174L2_{xyIE} 質體的存在而使 *L2* 活性降低是影響在 *L2* 基因轉錄層面。

3.8 定位 *ampR-L2* IG 區域中可誘發 *L2* 基因表現之最小區域

首先，構築一系列質體，其包含不同 *ampR-L2* IG 區域長度的 DNA 片段之 *xylE*-transcriptional fusion 質體 (pKJ175L2_{*xylE*}、pKJ125L2_{*xylE*}、pKJ102L2_{*xylE*}、pKJ79L2_{*xylE*} 和 pKJ72L2_{*xylE*})。將此系列質體分別送入 *S. maltophilia* KJ 菌株中。這些不同長度的 IG 片段與 *ampR* 和 *L2* 基因的相關位置，和推測的 AmpR 蛋白結合區域 A-N11-T binding motif (I-IV)，呈現於圖十二和圖二十七。然後將此系列的重組菌株以 50 µg/ml cefuroxime 為誘發物的情況下，測量其所產生的 C23O 活性(表八)。結果顯示，所含質體為 175-、125-和 102-bp IG 片段的 KJ 菌株測得相同之 C23O 活性，而帶有 pKJ79L2_{*xylE*} 和 pKJ72L2_{*xylE*} 質體的 KJ 菌株則測得不到明顯 C23O 活性。由此得知，102-bp 的 DNA 片段就足以誘發相鄰的 *xylE* 基因 (亦即 *S. maltophilia* 染色體上之 *L2* 基因)。之後將 KJ(pKJ102L2_{*xylE*}) 以 cefoxitin 和 aztreonam 抗生素進行感受性試驗 (表九)，藉其說明 102-bp 的 DNA 片段是否與 175-bp 的 DNA 片段 (pKJ175L2_{*xylE*}) 一樣可以減弱 *L2* 基因的表現。結果證實，KJ(pKJ102L2_{*xylE*}) 和 KJ(pKJ175L2_{*xylE*}) 的確對 cefoxitin 和 aztreonam 抗生素測得相同的 MIC 值。

3.9 定位 *ampR* 基因之啟動子區域

由先前的實驗得知，*ampR* 基因不管在有無誘發物的存在下，都會持續且微弱地表現。在此，為了更清楚瞭解 *ampR* 基因的表現作用，我們試圖利用 primer extension 來定位 *ampR* 基因的轉錄起始點，可是並未成功。由於 LysR 型轉錄調控因子的表現相當微弱，所以，欲藉由 primer extension 鑑別出其基因的轉錄起始點是很困難的。因此，在啟動子後面接上報導基因的方式，也不適合用來定位 *ampR* 基因的啟動子區域，因為報導基因的表現可能太過微弱，以至於無法明確的將其測定。因此，在此我們利用互補試驗（complementation assay）的策略，藉由 AmpR 蛋白的表現與否來確認 *ampR* 基因的啟動子區域。首先，將重組質體 pKJ175R 和 pKJ79R 送入 *S. maltophilia* KJΔR 突變株中，即可回復其對 β-lactam 抗生素之抗藥性（表十）。由此顯示，質體 pKJ79R 所含之 79-bp 的 *ampR*-L2 IG 片段即可使其 *ampR* 基因表現。相反的，質體 pKJ36R 所含之 36-bp 的 *ampR*-L2 IG 片段太短，無法使 *ampR* 基因的啟動子起作用。所以，KJΔR(pKJ36R) 和 KJΔR 菌株顯示出一樣的表現型。

3.10 *ampR*-L2 IG 區域之 error-prone PCR

從上述的實驗結果證明，將 102-bp 的 IG 片段送入 *S. maltophilia* 原始菌株中，即可降低其染色體上 *L2* 基因的表現，但對 *L1* 基因的

表現無明顯的影響。因此，我們設想：是否可開發一 DNA 片段，使其能同時降低 *L1* 和 *L2* 基因之表現，進而抑制 *S. maltophilia* 對 β -lactam 抗生素之抗藥性。所以，我們利用 error-prone PCR 的策略，希望能篩選一 DNA 片段，其可同時降低 *L1* 和 *L2* 基因之表現。利用 error-prone PCR，將突變後的 IG 片段轉殖送入原生菌株 KJ 中，再利用轉殖菌株在含有 50 μ g/ml cefoxitin 或 50 μ g/ml aztreonam 抗生素的培養基上的生長情形進行篩選。結果得到一轉殖菌株 KJM，其在含有 cefoxitin 和 aztreonam 抗生素的培養基上不會生長；此 KJM 之表現型說明其轉殖質體所含的 DNA 片段可能具有同時降低 *L1* 和 *L2* 基因之表現的能力。然後以 colony-PCR 方式獲得 KJM 菌株所含質體之 IG 片段的 PCR 產物，經構築得到一 pKJ175ML2_{xyIE} 質體。再將 pKJ175ML2_{xyIE} 質體之 175-bp 的 IG DNA 片段定序，定序結果與 KJ 菌株的 *ampR-L2* IG 序列相比對，發現在-95 位置之鹼基由 A 替換成 G（圖二十七）。之後將 pKJ175ML2_{xyIE} 質體之 175-bp 的 DNA 片段縮減成 102bp，且命名為 pKJ102ML2_{xyIE}。所以，質體 pKJ175ML2_{xyIE} 和 pKJ102ML2_{xyIE} 與質體 pKJ175L2_{xyIE} 和 pKJ102L2_{xyIE} 相對應，其差別只在一個鹼基的不同。表十一為 KJ (pKJ102ML2_{xyIE}) 的 MIC 值，其 cefoxitin 抗生素的 MIC 值為 32 μ g/ml，而 aztreonam 抗生素則小於 8 μ g/ml，此結果與轉殖菌株 KJM 之 MIC 一致。所以說明 KJM 所呈

現低 MIC 的表型確實與此 175-bp mutated IG DNA 有關。為了進一步釐清這突變的 102-bp 之 DNA 片段是否也可以有效降低其他 *S. maltophilia* 分離菌株的抗藥性。首先，將質體 pKJ102ML2_{xyIE} 送入其他的 *S. maltophilia* 代表菌株中，如 KH、YW 和 KS。表七為這些重組菌株的 MIC 值，其表示帶有 pKJ102ML2_{xyIE} 質體的菌株對 cefoxitin 和 aztreonam 抗生素為敏感性。結果證明這一突變的 102-bp 之 DNA 片段可以有效的使 *S. maltophilia* 分離菌株之抗藥性減弱。



第四章 討論

以染色體形式存在的 *ampR-ampC* 系統在許多不同種的菌株中被廣泛注意，如 *Citrobacter freundii* (Lindbery F. *et al.*, 1985)⁽²⁷⁾、*Enterobacter cloacae* (Honore N. *et al.*, 1986)⁽²⁸⁾、*Yersinia enterocolitica* (Seoane A. *et al.*, 1992)⁽²⁹⁾和 *Pseudomonas aeruginosa* (Lodge JM. *et al.*, 1990)⁽³⁵⁾。而早期文獻大都利用 *E. coli* 菌株為 heterologous experimental system 來研究 *ampR-ampC* 系統的調控。結果顯示，在有 *ampR* 基因存在的情況下，*E. coli* 的 AmpG 和 AmpD 蛋白可以協助其質體上之 *ampC* 基因的誘發表現。而相似的策略在某些 *ampR*-class A β -lactamase 組裝中亦可運作 (Datz M. *et al.*, 1994; Naas T. *et al.*, 1994; Naas T. *et al.*, 1995; Nordmann P. *et al.*, 1993; Rasmussen BA. *et al.*, 1996; Trepanier S. *et al.*, 1997)^{(55) (56) (57) (58) (62) (63)}，除了 *X. campestris* (Weng SF. *et al.*, 2004)⁽⁵⁹⁾之外。在本論文中，質體 pKHR174L2 和 pKHR174L2_{xy1E} 在 *E. coli* 系統中無法測得 β -lactamase 和 C23O 活性，這與 *X. campestris* 菌株的 *ampR1* 和 *blaX_{CC-1}* 基因亦無法在 *E. coli* 系統測得活性之結果一致 (Weng SF. *et al.*, 2004)⁽⁵⁹⁾。演化樹狀圖顯示，在所有受分析的菌株中，*S. maltophilia* 與 *X. campestris* 菌株的 β -lactamase 和 AmpR 蛋白有最接近的演化

分型(圖二十三), 意味著 *S. maltophilia* 與 *X. campestris* 可能有較相近的調控方式, 兩者皆無法在 *E. coli* 系統中表現。而 *E. coli*(pKHR174L2) 測不到 β -lactamase 活性, 暗示著可誘發 β -lactamase 表現的調控因子可能無法在 *E. coli* 與 *S. maltophilia* 中兼用。

在不同的微生物中, AmpR 蛋白之功能普遍被認定為一調控因子, 可調控其相鄰的 β -lactamase 基因之表現。不過, 在不同種的細菌中, AmpR 蛋白亦扮演著不同的角色。在已報導之 *ampR-ampC* 系統, AmpR 蛋白在沒有誘發物的情況下當作一微弱的抑制者; 而當有誘發物時, 則扮演著活化者的角色 (Honore N. *et al.*, 1986; Kong KF. *et al.*, 2005; Lindbery F. *et al.*, 1985; Poirel L. *et al.*, 1999)^{(27) (28) (30) (43)}。相較之下, 在某些 *ampR*-class A β -lactamase 系統, 如 *E. cloacae* NOR-1 (Naas T. *et al.*, 1994)⁽⁵⁵⁾、*S. marcescens* S6 (Naas T. *et al.*, 1995)⁽⁵⁷⁾ 和 *X. campestris* (Weng SF. *et al.*, 2004)⁽⁵⁹⁾, 其 AmpR 蛋白不管在有無誘發物的情況下, 都當作一正向調控者。而 *Burkholderia cepacia* 249 (Trepanier S. *et al.*, 1997)⁽⁵⁸⁾ 則表現一特別的模式, 其 AmpR 蛋白不論有無誘發物, 都扮演著一抑制者的角色。在本論文中, AmpR 蛋白對 *L2* 基因的調控模式比較像 *ampR-ampC* 系統中 AmpR 對 *ampC* 基因的調控方式, 比較不像 *ampR*-class A β -lactamase 組裝中 AmpR

對 class A β -lactamase 基因的調控方式。

同一微生物中有兩個以上的染色體形式之 β -lactamase 基因共存，是很常見之現象 (Hu RM. *et al.*, 2008 ; Kong KF. *et al.*, 2005 ; Naas T. *et al.*, 1994 ; Naas T. *et al.*, 1995 ; Nordmann P. *et al.*, 1993 ; Rasmussen BA. *et al.*, 1996) ⁽⁴¹⁾ ⁽⁴³⁾ ⁽⁵⁵⁾ ⁽⁵⁷⁾ ⁽⁶²⁾ ⁽⁶³⁾。在這些菌中，有些 β -lactamase 基因擁有獨立的 *ampR*- β -lactamase 組裝，像是 *E. cloacae* NOR-1 (Naas T. *et al.*, 1994 ; Nordmann P. *et al.*, 1993) ⁽⁵⁹⁾ ⁽⁶²⁾ 的 *ampR-ampC* 和 *nmcR-nmcA* 組裝、*E. cloacae* 1413B (Rasmussen BA. *et al.*, 1996) ⁽⁶³⁾ 的 *ampR-ampC* 和 *imiR1-imiA1* 組裝和 *S. marcescens* S6 (Naas T. *et al.*, 1995) ⁽⁵⁷⁾ 的 *ampR-ampC* 和 *smeR-smeA* 組裝。此類之系統，其個別 β -lactamase 基因之表現主要受到與其相鄰之 *ampR* 基因的調控。不過，*P. aeruginosa* 顯示了另一種的調控模式；其發現 *P. aeruginosa* 的 *ampR* 基因不只調控與其相鄰的 *ampC* 基因，也調控了與其不相連的 *poxB* 基因 (Kong KF. *et al.*, 2005) ⁽⁴³⁾。而本論文所研究的 *S. maltophilia* 與 *P. aeruginosa* 有其相似之處，*S. maltophilia* 的 AmpR 可同時調控相鄰的 *L2* 基因及不相鄰的 *L1* 基因 (Okazaki A. *et al.*, 2008) ⁽⁶¹⁾。然而，以 *P. aeruginosa* 而言，其 AmpR 蛋白對兩 β -lactamase 基因的調控方式不同：對於 *ampC* 基因的表現是為一活化者，對於 *poxB* 基因的表現是為一抑制者 (Kong KF. *et al.*, 2005) ⁽⁴³⁾。不同於 *P.*

aeruginosa, *S. maltophilia* 菌株在有誘發物的情況下，其 AmpR 蛋白對 *L1* 和 *L2* 基因的表現皆為正向之調控作用。

評估 AmpR 蛋白之自我調控，在 *C. freundii* (Lindquist S. *et al.*, 1989)⁽⁴⁰⁾ 和 *S. marcescens* S6 (Naas T. *et al.*, 1995)⁽⁵⁷⁾ 中發現，當有 AmpR 蛋白存在的情況下，會使其 *ampR* 基因的表現量減少三倍，顯示 *C. freundii* 及 *S. marcescens* 的 AmpR 蛋白有負向自我調控 (negative autoregulation) 的特性。在 Kong *et al.* 文獻中，*P. aeruginosa* 不管在有無誘發物的情況下，其 AmpR 蛋白都沒有自我調控現象 (Kong KF. *et al.*, 2005)⁽⁴³⁾。而本論文顯示，*S. maltophilia* 的 AmpR 蛋白對其 *ampR* 基因的表現並無自我調控現象，這結果與 *P. aeruginosa* 之 *ampR* 基因的特性一致。

Lindquist *et al.* (Lindquist. *et al.*, 1989)⁽⁴⁰⁾ 文獻指出，*C. freundii* 菌株的 AmpR 蛋白之結合區域 (AmpR-binding site) 與 *ampR* 基因之啟動子有重疊的現象，此為 *C. freundii* 菌株之 *ampR* 基因具有負向自我調控特性之主要原因。相較之下，*S. maltophilia* 菌株的 AmpR 蛋白對其 *ampR* 基因並無自我調控現象。由圖十二和表八顯示，靠近 *L2* 基因之 102-bp 的 *ampR-L2* IG 片段即足以誘發 *L2* 基因表現，意指此 102-bp 的 *ampR-L2* IG 片段包含 AmpR 蛋白之結合區域 (AmpR-binding site)。此外，*ampR* 基因的啟動子位於靠近 *ampR*

基因之 79-bp 的 *ampR-L2* IG 片段（表十和圖十八）。顯然的，*ampR* 基因的啟動子與 AmpR 蛋白的結合區域並無重疊；因此，AmpR 蛋白對其 *ampR* 基因並無自我調控。此結果與我們先前利用生物資訊預測：*ampR* 和 *L2* 基因之啟動子在 *ampR-L2* IG 區域上為一背對背（back to back）的走向相吻合。就我們所知，此一特殊的 *ampR*- β -lactamase IG 之組裝構造是首次被發現。

AmpR 蛋白為一可同時誘發 *L1* 和 *L2* 基因的調控者 (Okazaki A. *et al.*, 2008) ⁽⁶⁰⁾，不過其誘發方式可能不同。(1) *L1* β -lactamase 的基本表現 (basal expression) 需要 AmpR 蛋白存在，而 *L2* β -lactamase 的基本表現 (basal expression) 則不需要 AmpR 幫忙 (AmpR-independent) (表三、表四)。(2) 在沒有誘發物的情況下，AmpR 蛋白對 *L1* 和 *L2* 基因有不同的調控作用；其對 *L1* 基因的表現為一活化者，對 *L2* 基因的表現則為抑制者。(3) 在 *L2* 基因的上游有發現一高度保留的 LysR binding motif (Schell MA. *et al.*, 1993) ⁽⁴²⁾，而 *L1* 基因之上游並無此區域。經由 *ampR-ampC* 系統推斷 (Jacobe C. *et al.*, 1997; Normark S. *et al.*, 1995; Wiedemann B. *et al.*, 1998) ⁽³⁶⁾⁽³⁸⁾ ⁽³⁹⁾，AmpR 蛋白對 *L2* 基因的調控方式，可能是直接結合在 *L2* 基因之上游區域。而對於 *L1* 基因的誘發，AmpR 蛋白可能是先藉由活化其他的調控物，再經由其他的調控物活化 *L1* 基因。所以，AmpR 蛋白

調控 *L2* 基因的誘發作用似乎與腸桿菌科的 *ampR-ampC* 系統較為相似。同時，*L1* 基因的誘發可能是藉由另一個與 AmpR 相關的調控機制，但目前對此機制所知較為有限。

S. maltophilia 屬於一基因高度變異之菌種 (Hauben L. *et al.*, 1999)⁽⁶¹⁾，本實驗所分析的 16 株分離菌株中，其 *L2* 蛋白和 *ampR-L2* IG 區域之變異度高達 32%，然而 AmpR 蛋白序列在這 16 株 *S. maltophilia* 分離菌株中卻被高度保留，這點明顯與 *L2* 蛋白和 *ampR-L2* IG 區域不同。AmpR 蛋白為一 LysR 型之轉錄調控因子 (LysR transcriptional regulator)，有報導指出此型之調控因子可同時調控數個不同功能的基因 (Henikoff S. *et al.*, 1988; Jacobs C. *et al.*, 1997; Kong KF. *et al.*, 2005)⁽³⁷⁾⁽⁴³⁾⁽⁶⁵⁾。因為 AmpR 蛋白在微生物中可執行許多不同之功能，所以推測其胺基酸序列需要被高度保留，不可有太大之變動。而 *ampR-L2* 組裝之構成要素：*ampR* 基因、IG 區域和 *L2* 基因的 G+C content 分別約為 70%、52% 和 69%。由於其 G+C % 有所差異，暗示著此三要素可能來自不同的演化起源。先前已有許多研究探討細菌的調控因子與結構基因可能來自不同的演化來源 (Cases I. *et al.*, 2001; de LV. *et al.*, 1996; Grkovic S. *et al.*, 2001)⁽⁶⁶⁾⁽⁶⁷⁾⁽⁶⁸⁾，本論文所研究之 *ampR-L2* 組裝具有相似的特徵。在本論文中發現 KH、YW 和 KS 菌株的 AmpR 蛋白有著一樣的演化分群，但是 KH 菌株的

L2 蛋白和 *ampR-L2* IG 區域之演化分群卻與 KJ 菌株較為相近，這意味著 *ampR-L2* 組裝之構成組件並非同時演化：*ampR* 基因的演化最不明顯，而 *ampR-L2* IG 區域和 *L2* 基因有著相當的演化速度。所以，當 *S. maltophilia* 菌株遭受 β -lactam 抗生素威脅時，其為了生存而較容易在 *ampR-L2* IG 區域及 *L2* 基因發生突變，較不易以 *ampR* 基因的突變來對抗環境中的壓力。

經由 *ampR-L2* 組裝之序列分析與先前所釐清之 AmpR 蛋白的調控作用發現，*L2* β -lactamase 的調控方式與 *ampR-ampC* 系統較為相像。所以，染色體上 *ampR-L2* 組裝所產生的 AmpR 蛋白可對重組質體上的 *ampR-L2_{xylE}* IG 區域作用，進而誘發 *xylE* 基因表現（表七）。利用測量 C230 活性來評估 AmpR 蛋白對不同的 *ampR-L2_{xylE}* IG 區域之誘發能力（表七）。經由這誘發實驗觀察到許多有趣的資料。(1) 即使 IG 序列的變異度高達 32%，AmpR 蛋白依然可對不同菌株的 *ampR-L2_{xylE}* IG 區域作用，因此可將不同之 *ampR-L2* IG DNA 片段與不同的 AmpR 相互作用，定量 C230 活性來評估其誘發程度。不過，此誘發實驗需要考慮到染色體上亦有 *ampR-L2* IG 區域，所以此誘發表現分析是 AmpR 蛋白對染色體上 *ampR-L2* IG 區域和質體上 *ampR-L2_{xylE}* IG 區域誘發能力動態平衡下的呈現結果。以上述之方式所獲得的誘發能力表現為：KJ 菌株的 AmpR 蛋白（AmpR1 型）對四

型 *ampR-L2_{xylE}* IG 區域的誘發能力為 IG-3 > IG-1 > IG-4 > IG-2; 而 KH 菌株的 AmpR 蛋白 (AmpR2 型) 則為 IG-4 > IG-3 > IG-2 > IG-1。結果發現, 最理想的誘發能力似乎不存在於原始菌株之 AmpR-IG 配對中, 例如 KH 菌株的 AmpR 蛋白對其本身的 *ampR-L2_{xylE}* IG 區域(IG-2) 的誘發能力並非最佳。(2) 在某些例子上, 將外來的 *ampR-L2* IG 片段轉殖到原始菌株中, 會影響其染色體上 *L2* 基因之誘發表現, 此反映在 aztreonam 抗生素的 MIC 上 (表七)。經由表四可以發現一趨勢: 將 *ampR-L2* IG 片段轉殖到 *S. maltophilia* 菌株中, 其 *xylE* 基因的誘發與 aztreonam 抗生素的 MIC 值下降程度成正比。也就是說, 染色體所產生的 AmpR 蛋白對轉殖之 *ampR-L2_{xylE}* IG 片段展現較高的誘發能力, 而染色體上 *L2* 基因的誘發表現就會明顯減少。此結果意味著可藉由轉殖一段外來的 DNA 片段之策略, 減弱 *S. maltophilia* 菌株對某些 β -lactam 抗生素的抗藥性 (如 aztreonam), 其可作為一治療的新概念 (oligo-nucleotides attenuator)。(3) 包含 *ampR-L2* IG 片段之重組質體的存在, 看似不會影響 *L1* β -lactamase 的活性, 其顯示在 cefoxitin 抗生素的 MIC 上 (表七)。

AmpR 蛋白為一 LysR 型轉錄調控因子, 一般認定其會結合在欲調控基因之上游的 T-N11-A motif 上 (Schell MA. *et al.*, 1993)⁽⁴²⁾。而 *ampR-L2* IG 區域中發現有四個類似 T-N11-A motif (在圖二十七以

I-IV 表示之)，欲確認哪一 motif 與 AmpR 蛋白誘發 *L2* 基因相關，其結果清楚呈現於表八。在有 AmpR 蛋白的存在下，質體 pKJ102L2_{xyIE} 所包含的 102-bp 的 IG 片段即足以誘發 *xyIE* 基因表現，顯示此 102-bp 的 IG 片段已包含 AmpR 蛋白的結合區域。Schell 指出 LysR 型調控因子會結合在兩個明顯的區域，一為 recognition binding site (RBS) 和 activation binding site (ABS) (Schell MA. *et al.*, 1993)⁽⁴²⁾。在抑制的情況下，調控物主要結合在 RBS 上，同時發現當有誘發物 (inducer-dependent) 活化轉錄作用時，調控物與 ABS 會形成另一微弱的結合 (Porrua OM. *et al.*, 2007; Schell MA. *et al.*, 1993)⁽⁴²⁾⁽⁶⁹⁾。如果此現象適用於 *ampR-L2* 組裝上，那麼 motif III 和 IV 就分別像是 RBS 和 ABS 的角色。Motif III 為一 15-bp 之區域，具有局部對稱的特徵 (partially dyad symmetry)，其內包含 LysR 型轉錄調控因子欲結合的 T-N11-A motif (圖二十七)。而 Motif IV 卻是一 AT 居多 (AT rich) 的 T-N11-T 區域，且與預測之 *L2* 基因啟動子的 -35 box 重疊，此兩特徵是為 ABS 之特性 (Schell MA. *et al.*, 1993)⁽⁴²⁾。在不包含完整的 motif III 之 KJ(pKJ72L2_{xyIE}) 菌株中無法測得 C23O 活性，其意味著單獨只有 motif IV (圖二十七) 並不足以使 AmpR 蛋白誘發 *xyIE* 基因表現。過去文獻指出 LysR 型蛋白之誘發表現需要 RBS 和 ABS 的存在，其與以上所觀察到的結果相符合 (Porrua OM. *et al.*, 2007)

⁽⁶⁹⁾。既然 motif III 和 IV 為決定 *L2* 基因活化之關鍵，將實驗所分析的 16 株 *S. maltophilia* 分離菌株之 *ampR-L2* IG 區域作 multiple alignment，其 motif III 和 IV 之保留序列分別為 T(T/G)A(A/G)TT(C/G)A(A/C)(C/T)T(T/C/A)A 和 T(T/C)TT(T/C)GCG CTGGT。

質體 pKJ102L2_{xyIE} 所包含之 102-bp 的 *ampR-L2* IG 區域即足以誘發 *L2* 基因表現，同時此質體轉殖 *S. maltophilia* KJ 菌株後，會使 KJ 菌株的 *L2* 基因誘發程度下降（表九）。所以，造成 KJ 菌株的 *L2* 基因表現下降之機制可能為 oligo-nucleotides attenuator 與染色體上之 *ampR-L2* IG 區域共同競爭 AmpR 蛋白。若 oligo-nucleotides attenuator 與 AmpR 蛋白有較佳之親合力，即可使得與染色體上 *ampR-L2* IG 區域結合之 AmpR 蛋白相對減少。此論點可由 Porrua et al. 之前的研究結果獲得支持。Porrua et al. 等人在文獻中指出，LysR 型調控物與 RBS 的親合力較弱，而導致欲調控之基因被活化程度較少之結果一致（Porrua OM. et al., 2007）⁽⁶⁹⁾。所以，當 AmpR 蛋白與 oligo-nucleotides attenuator 展現出較佳之親合力（C23O 活性較高），進而使 *L2* 基因被活化程度降低，結果菌株 KJ(pKJ102L2_{xyIE}) 對 aztreonam 抗生素的 MIC 值下降。因此，AmpR 蛋白與 oligo-nucleotides attenuator 之親合力對於減少 *L2* 基因表現是很重要的。

一般以 *ampR-ampC* 系統而言，不論有無誘發物的存在，其 AmpR 蛋白通常會與 IG 區域上之操作子 (operator) 結合 (Bartowsky E. *et al.*, 1993) ⁽⁷⁰⁾。所以，將 oligo-nucleotides attenuator 經轉殖到細菌中，其與 AmpR 蛋白之高度親合力會減少可誘發 *L1* 和 *L2* 基因表現之 AmpR 蛋白量。而 oligo-nucleotides attenuator 的存在會影響菌株 *L2* 基因之表現，卻不影響菌株的 *L1* 基因，這意味著誘發 *L2* 基因表現所需的 AmpR 蛋白濃度大於誘發 *L1* 基因表現所需的濃度。由此推斷，如果 attenuator 有足夠的親合力與大部分的 AmpR 蛋白結合，而所剩之 AmpR 蛋白可能濃度太低而不足以誘發 *L1* 和 *L2* 基因之表現。突變之 102-bp 的 IG 片段 (pKJ102ML2_{xyIE}) 可能就是此一情況。

在本論文中雖然沒有直接的證據可清楚說明為何突變之 102-bp 的 IG 片段可同時減少 *L1* 和 *L2* 基因表現。不過，實驗結果證實，經轉殖的 attenuator 確實可以有效的抑制 *L1* 和 *L2* 基因的表現，其可作為控制 *S. maltophilia* 菌株 β -lactam 抗藥性的新策略。

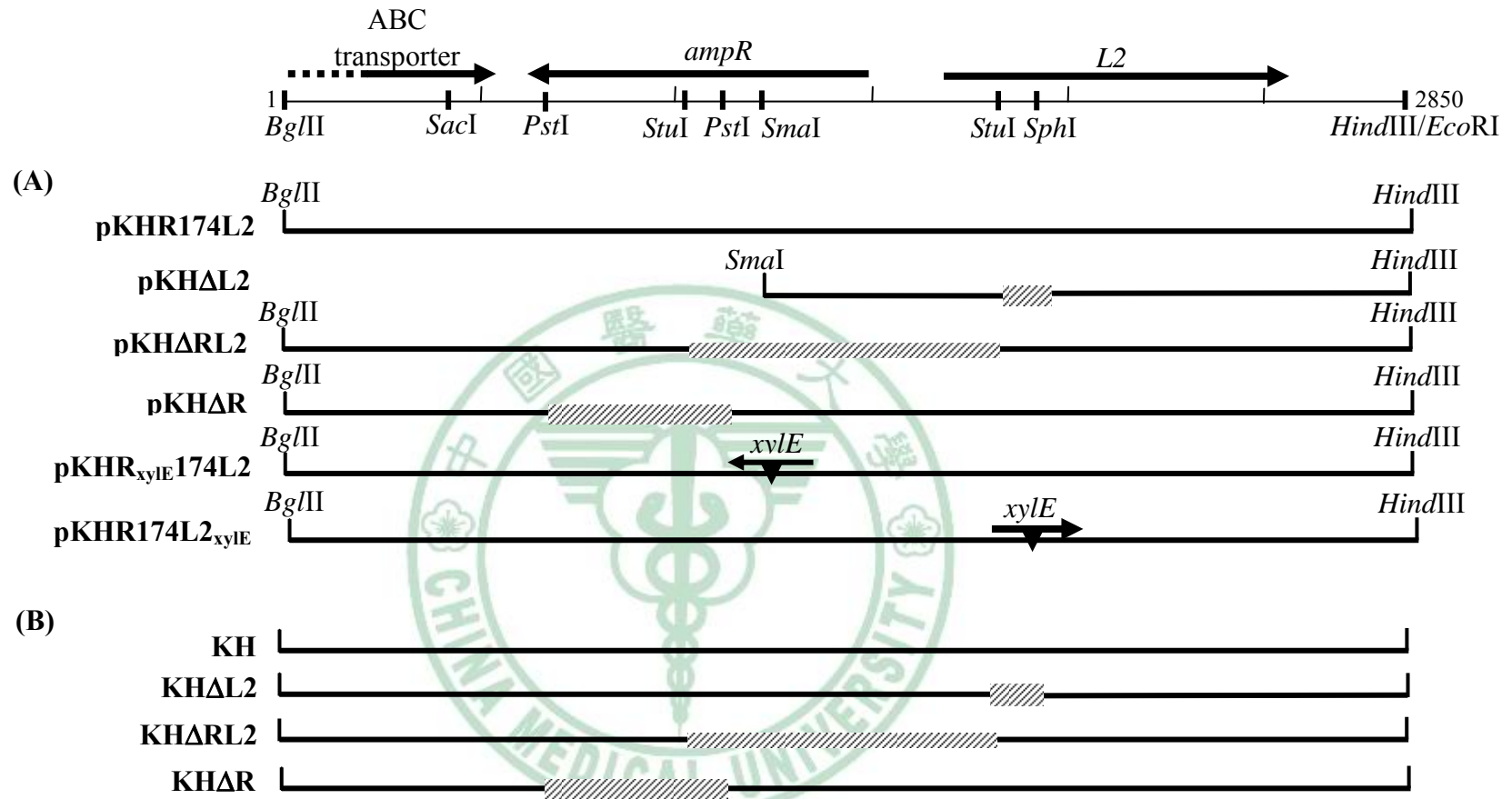


Fig. 1. Restriction enzyme map of a segment of the *S. maltophilia* KH chromosome surrounding the *ampR*-*L2* module. (A) The DNA inserts of plasmids pKHR174L2, pKHR174L2_{xylE}, pKHΔL2, pKHΔRL2, pKHΔR, and pKHR_{xylE}174L2. All plasmids are derivatives of pEX18Tc. The crosshatched box indicates the deleted region. The inserted site of *xylE* cassette is marked by (▼) and the direction of *xylE* gene is indicated by the arrow. (B) The genomic organization of wild strain KH and its isogenic mutants KHΔL2, KHΔRL2 and KHΔR.

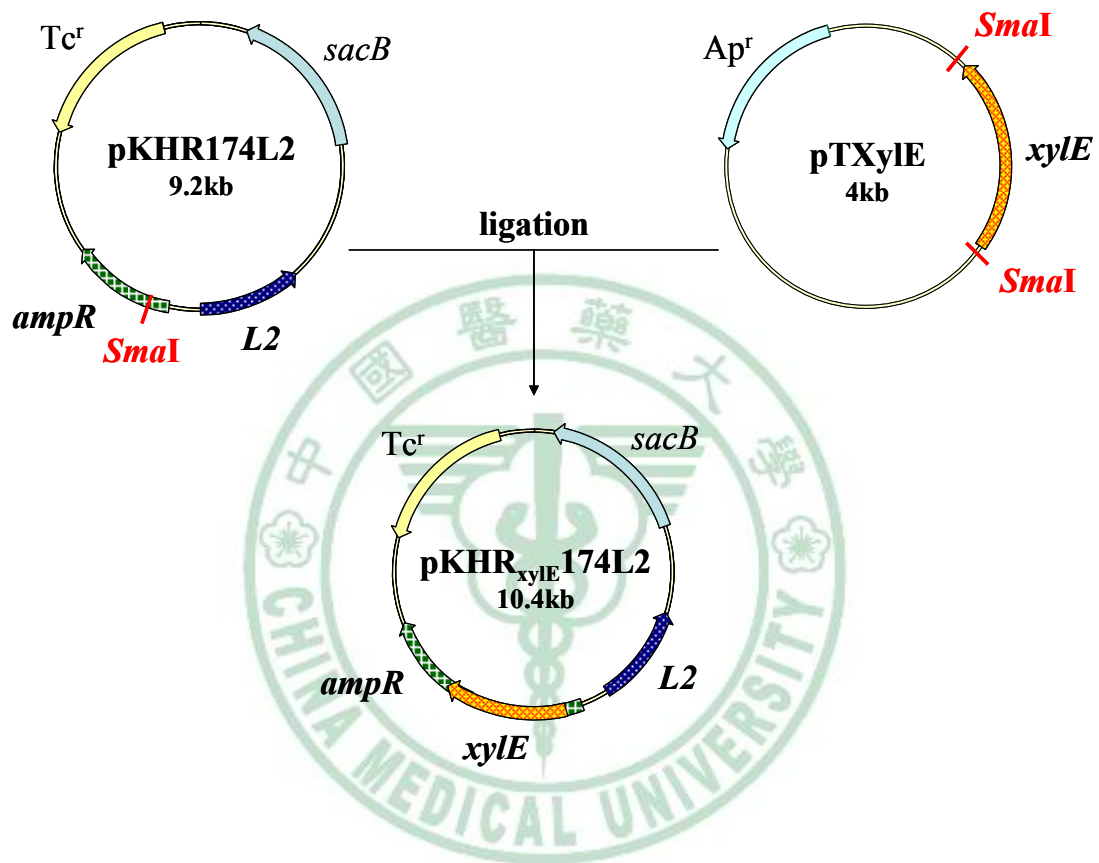


Fig. 2. Construction of $pKHR_{xylE}174L2$.

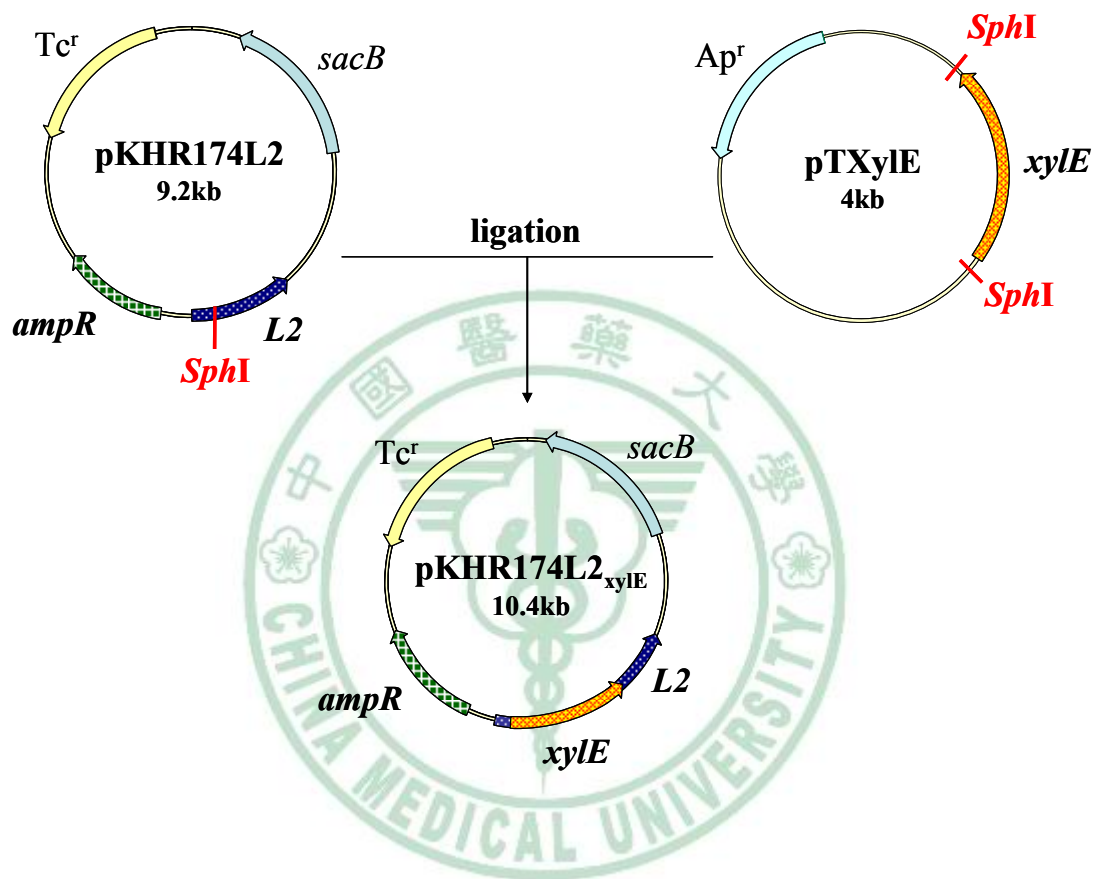


Fig. 3. Construction of pKHR174L2_{xylE}.

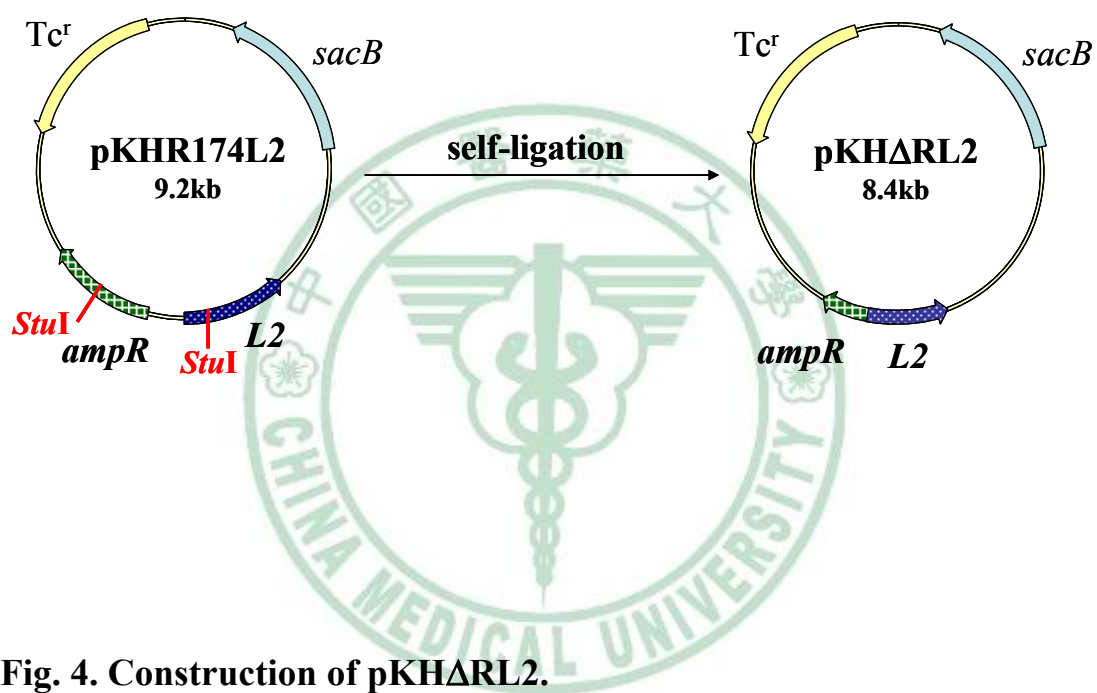


Fig. 4. Construction of pKHΔRL2.

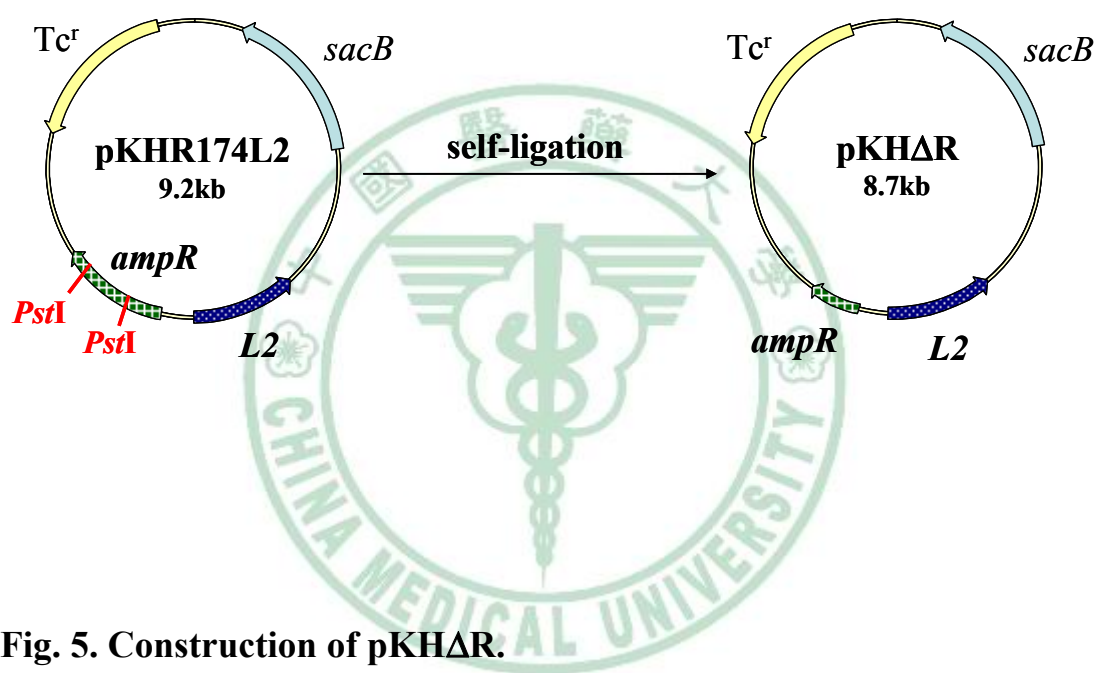


Fig. 5. Construction of pKHΔR.

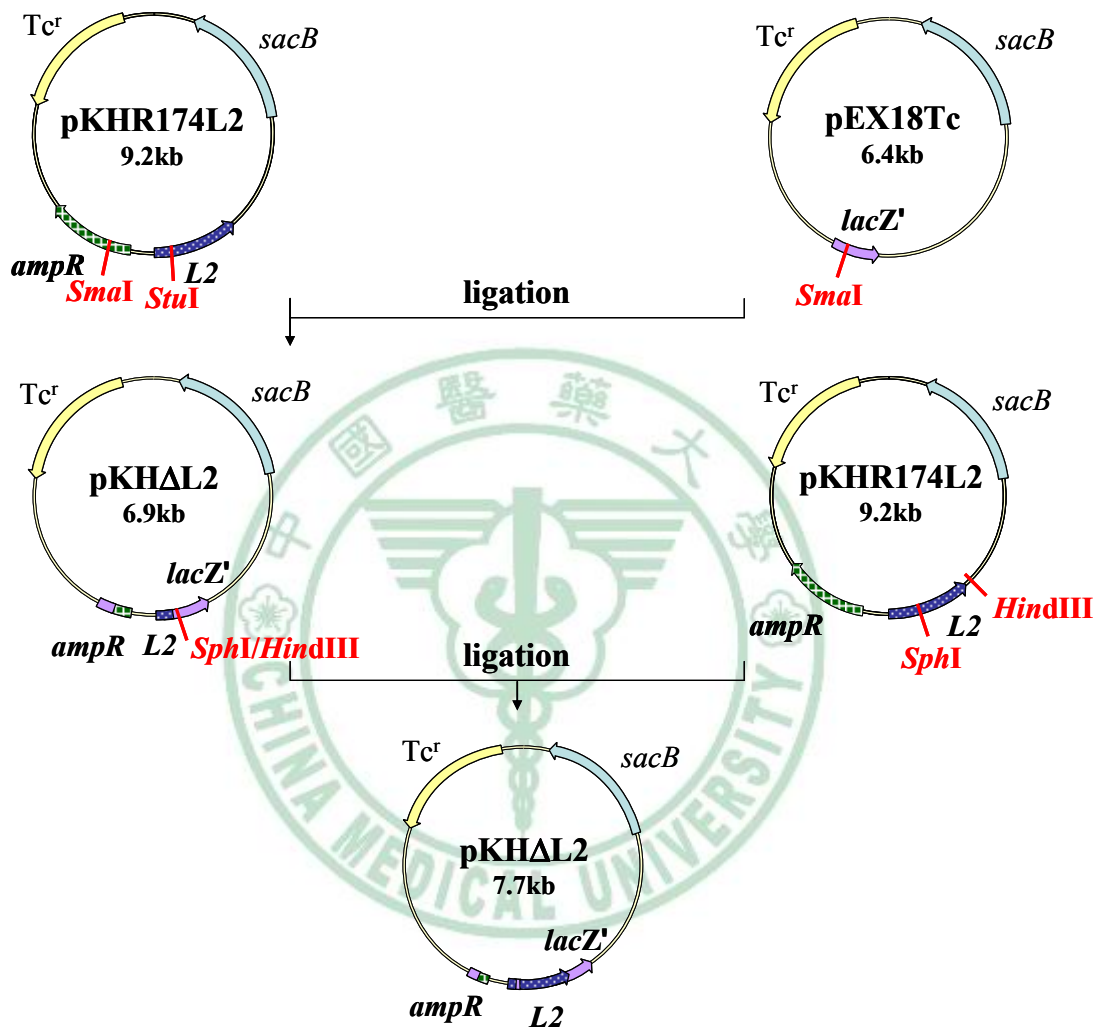


Fig. 6. Construction of pKHΔL2.

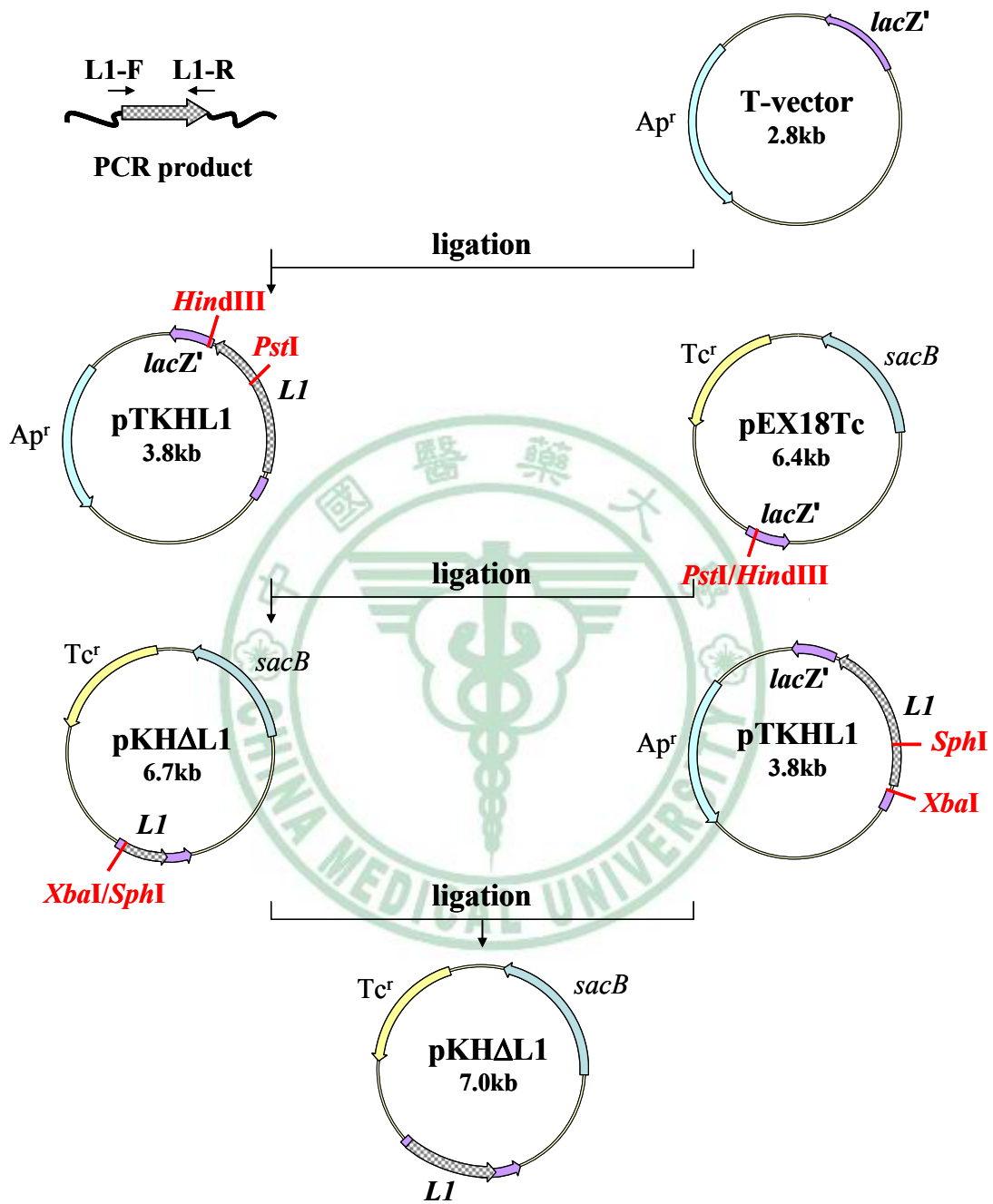
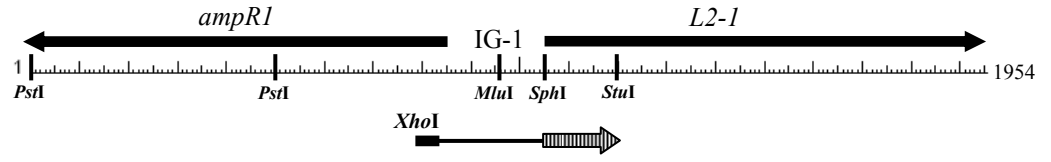


Fig. 7. Construction of pKHΔL1.

KJ strain



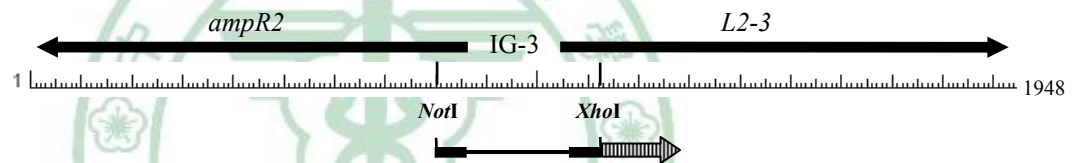
pKJ175L2_{xyIE}

KH strain



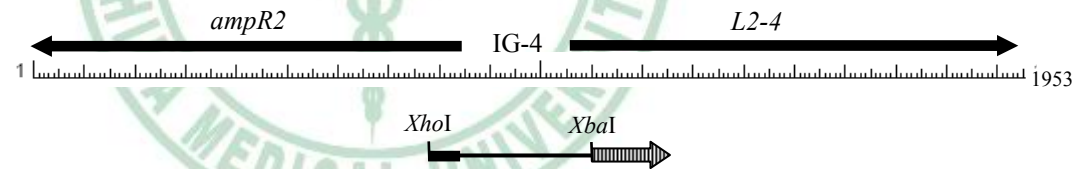
pKH174L2_{xyIE}

YW strain



pYW175L2_{xyIE}

KS strain



pKS174L2_{xyIE}

Fig. 8. Restriction enzyme maps of the *ampR-L2* modules of the *S. maltophilia* strains KJ, KH, YW, and KS. All plasmids are derivatives of pEX18Tc. The orientation of gene is indicated by the arrow. The dashed line indicates the deleted region. The crosshatched arrows represent the *xylE* cassette.

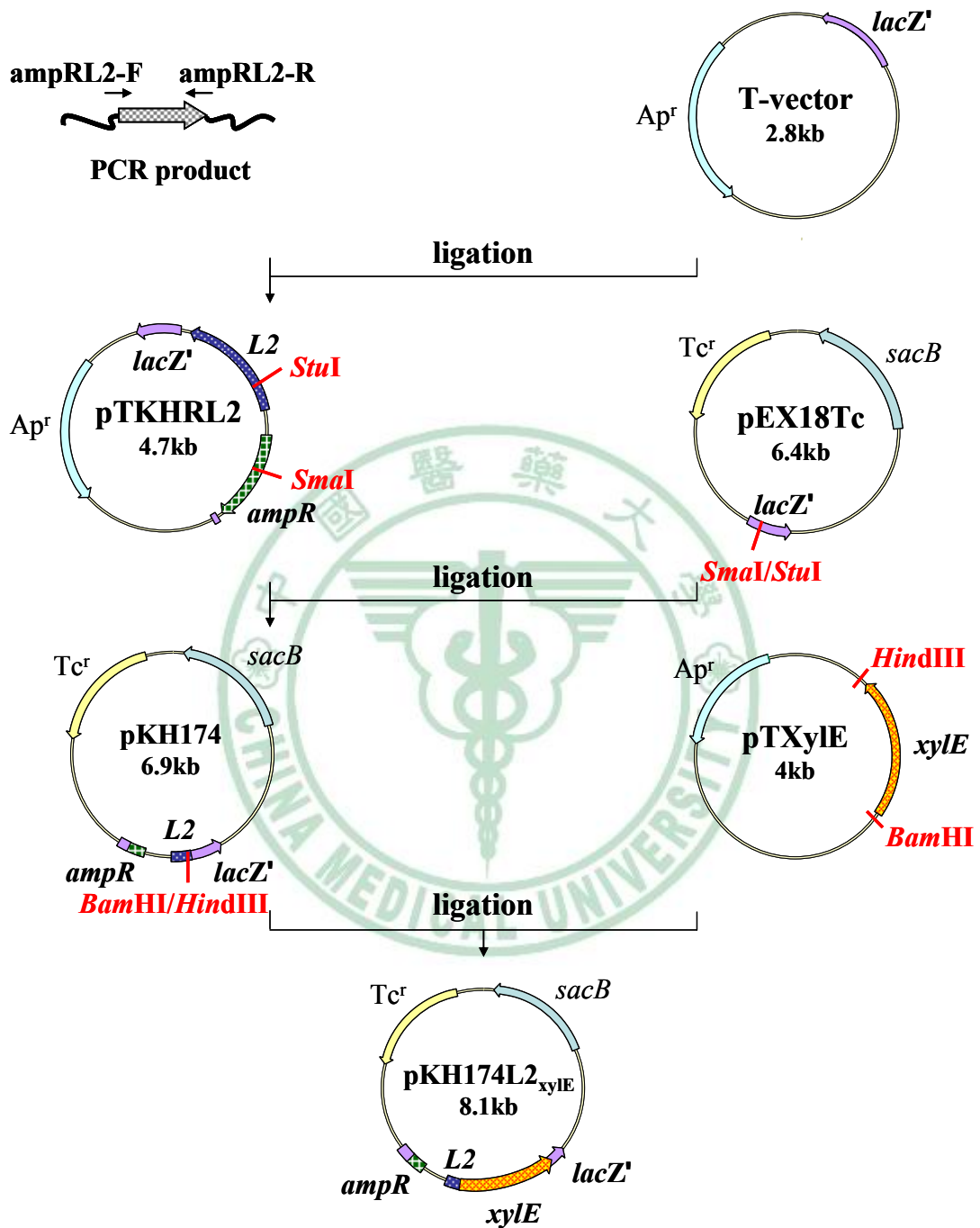


Fig. 9. Construction of pKH174L2_{xylE}.

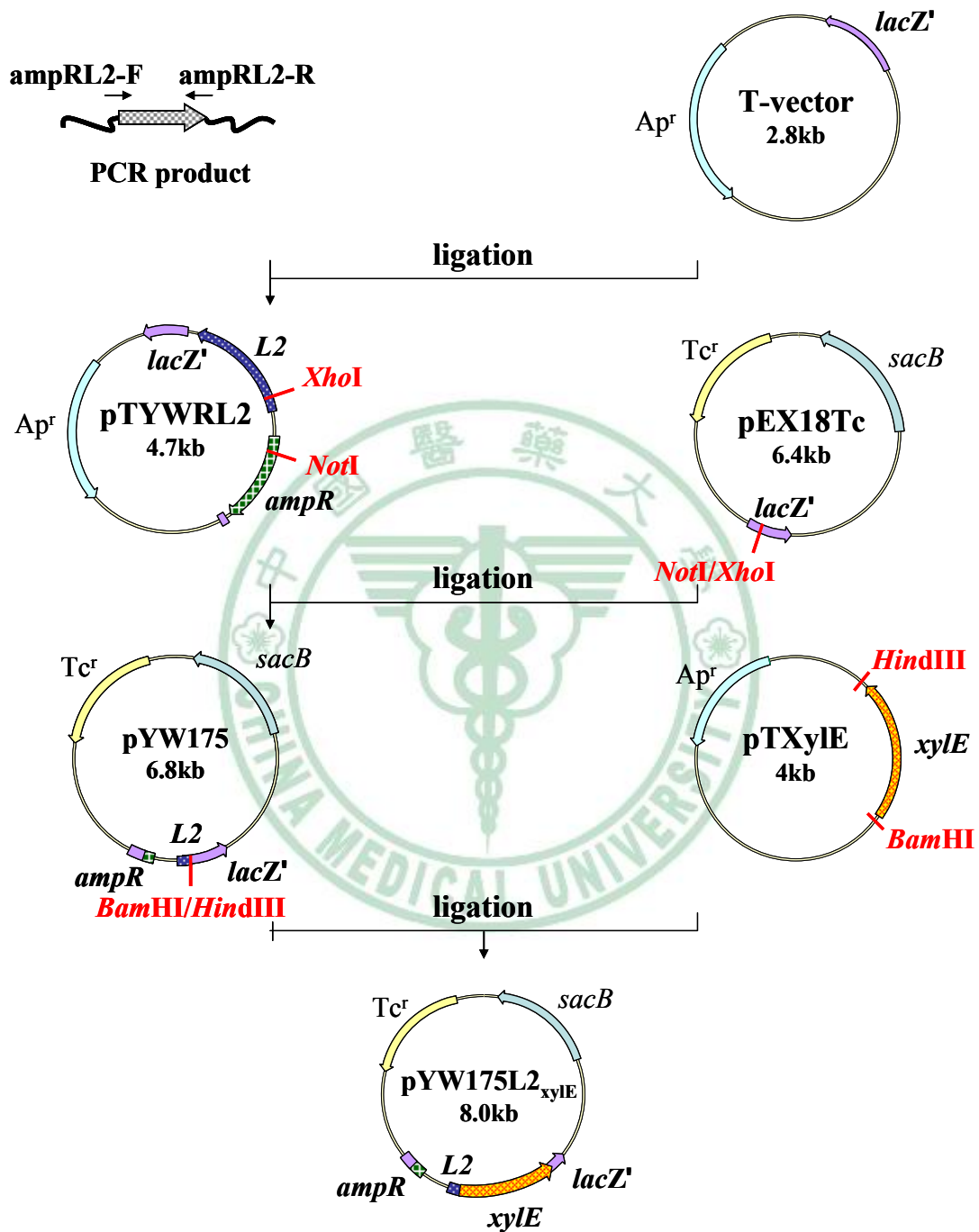


Fig. 10. Construction of pYW175L2_{xylE}.

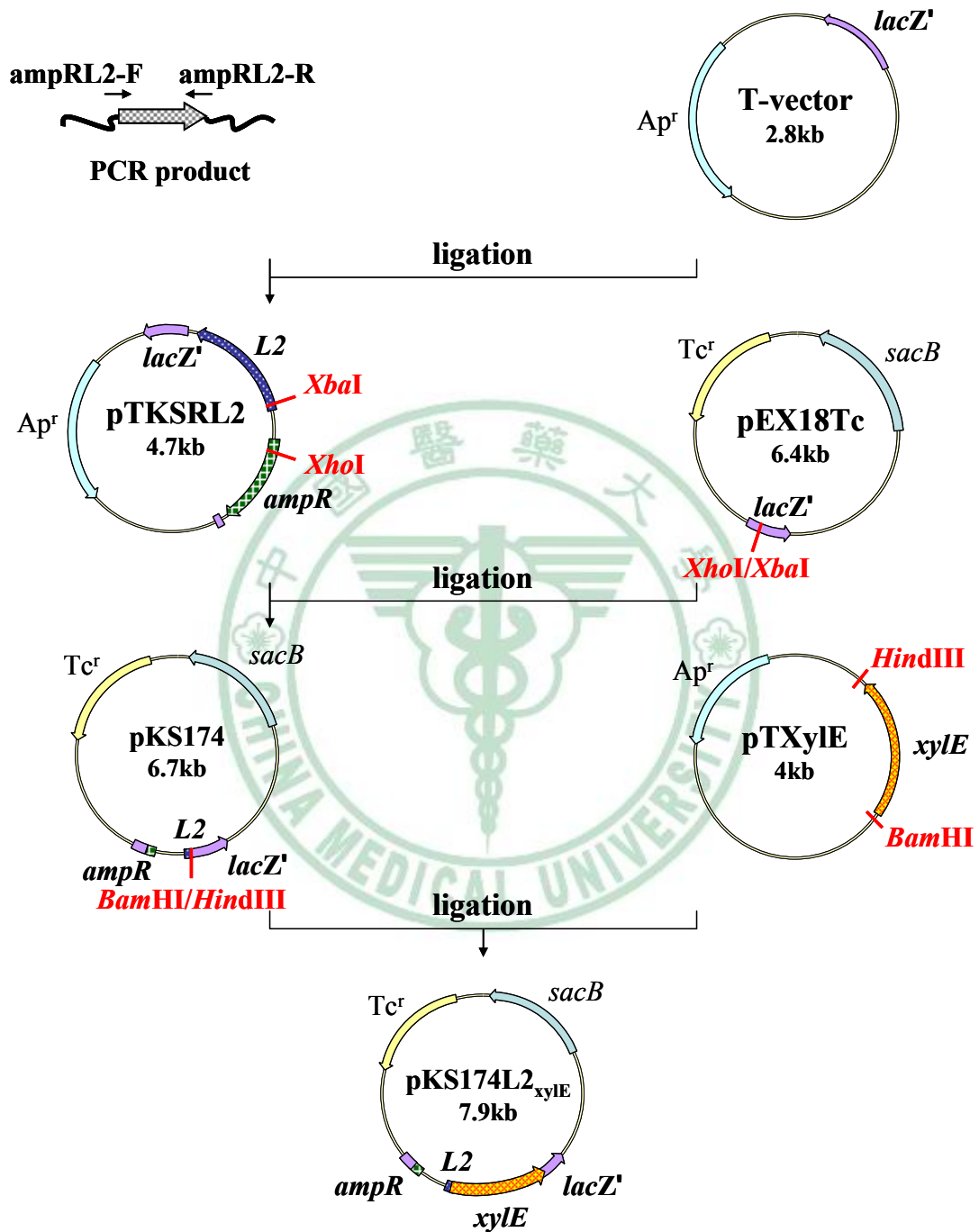


Fig. 11. Construction of pKS174L2_{xylE}.

KJ strain

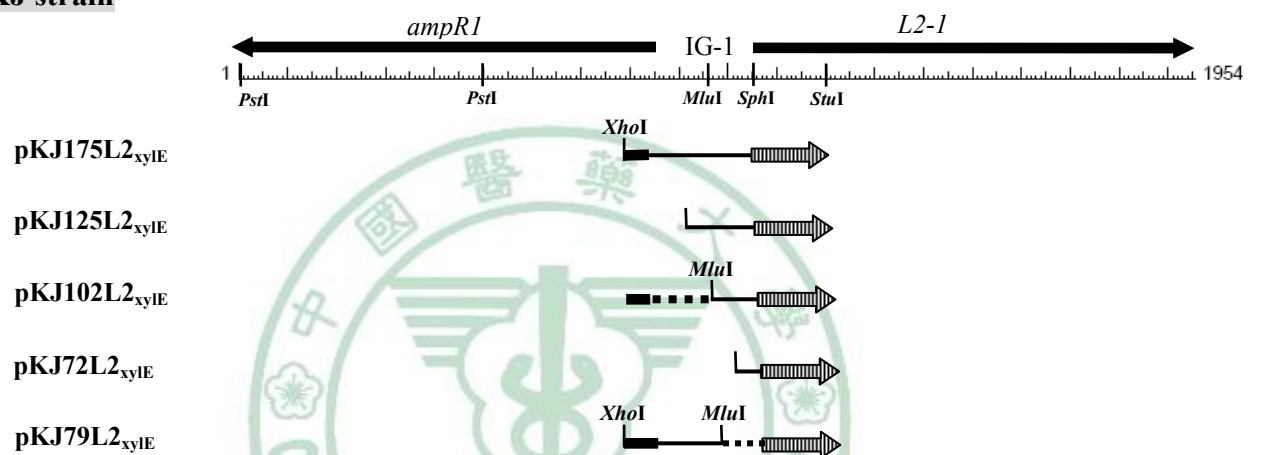


Fig. 12. Restriction enzyme maps of the recombinant plasmids pKJ175L2_{xyIE}, pKJ125L2_{xyIE}, pKJ102L2_{xyIE}, pKJ72L2_{xyIE}, and pKJ79L2_{xyIE}. All plasmids are derivatives of pEX18Tc. The orientation of gene is indicated by the arrow. The dashed line indicates the deleted region. The crosshatched arrows represent the *xyIE* cassette.

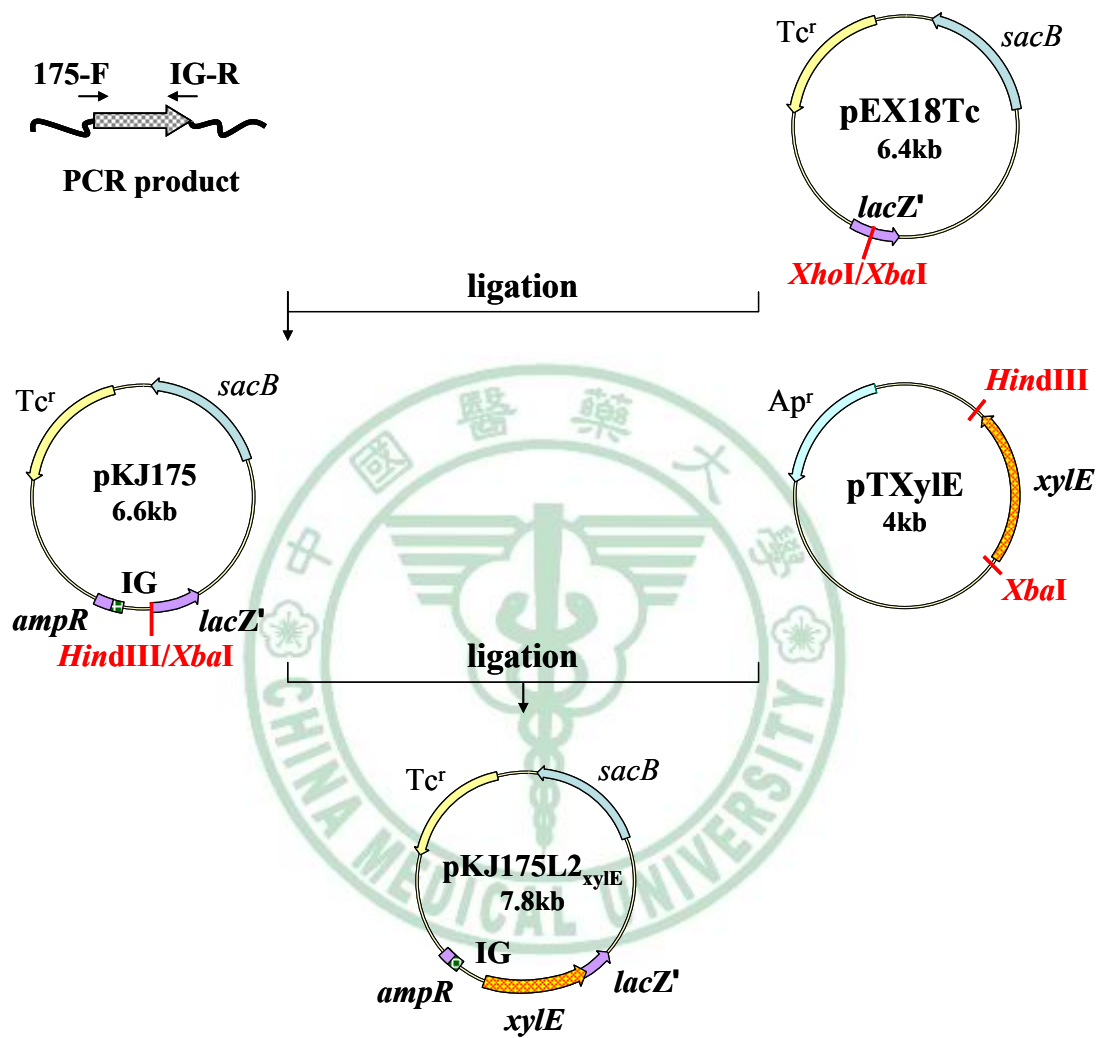


Fig. 13. Construction of pKJ175L2_{xylE}.

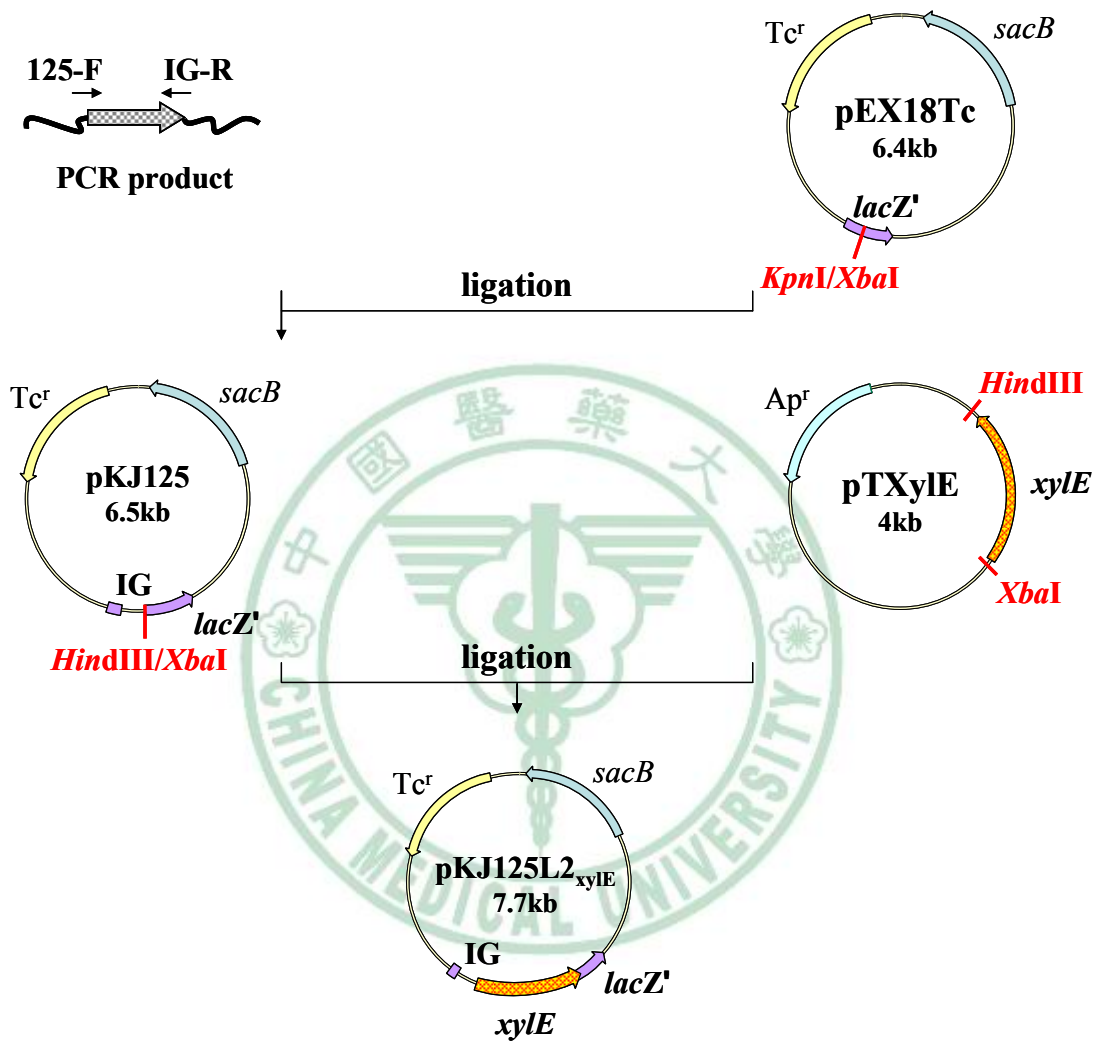


Fig. 14. Construction of pKJ125L2_{xylE}.

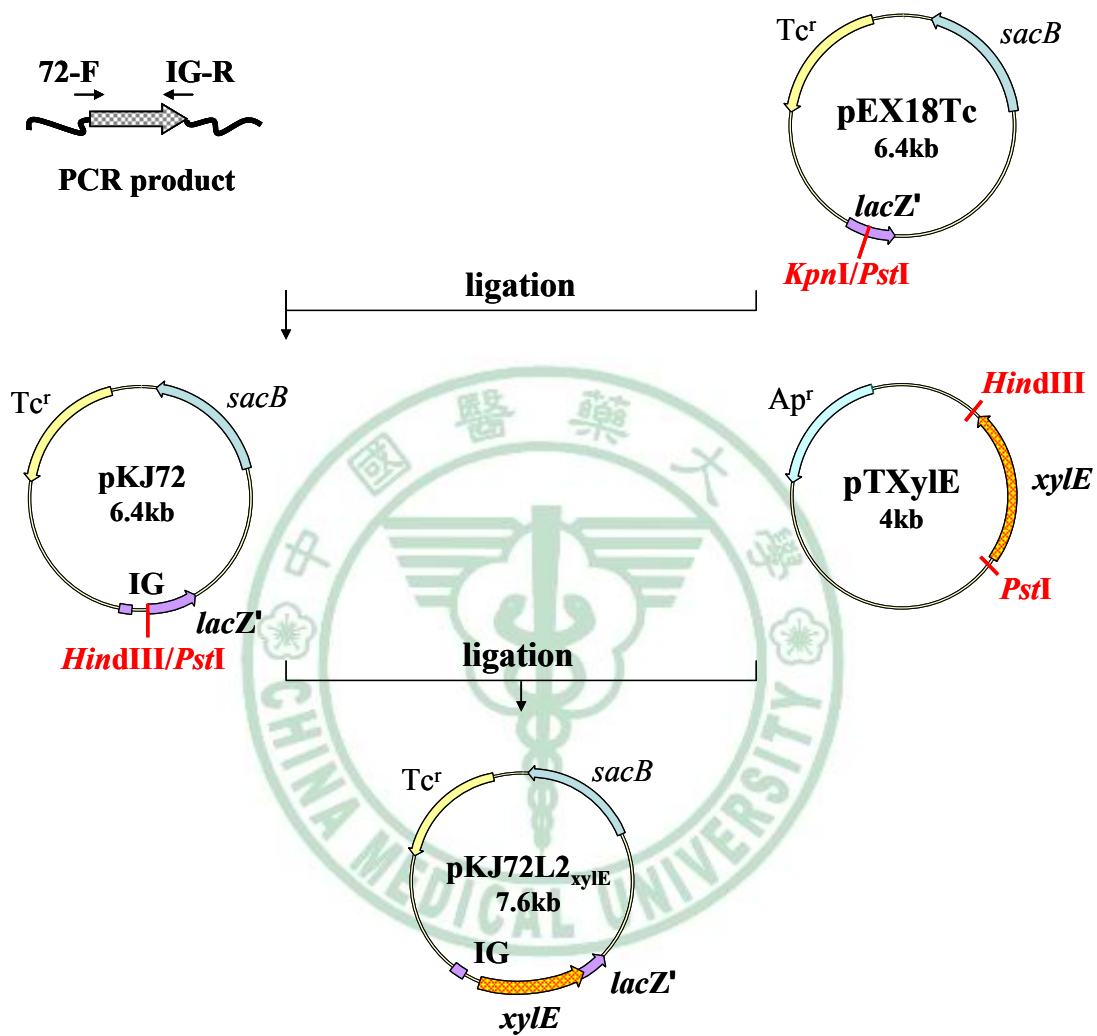


Fig. 15. Construction of pKJ72L2_{xylE}.

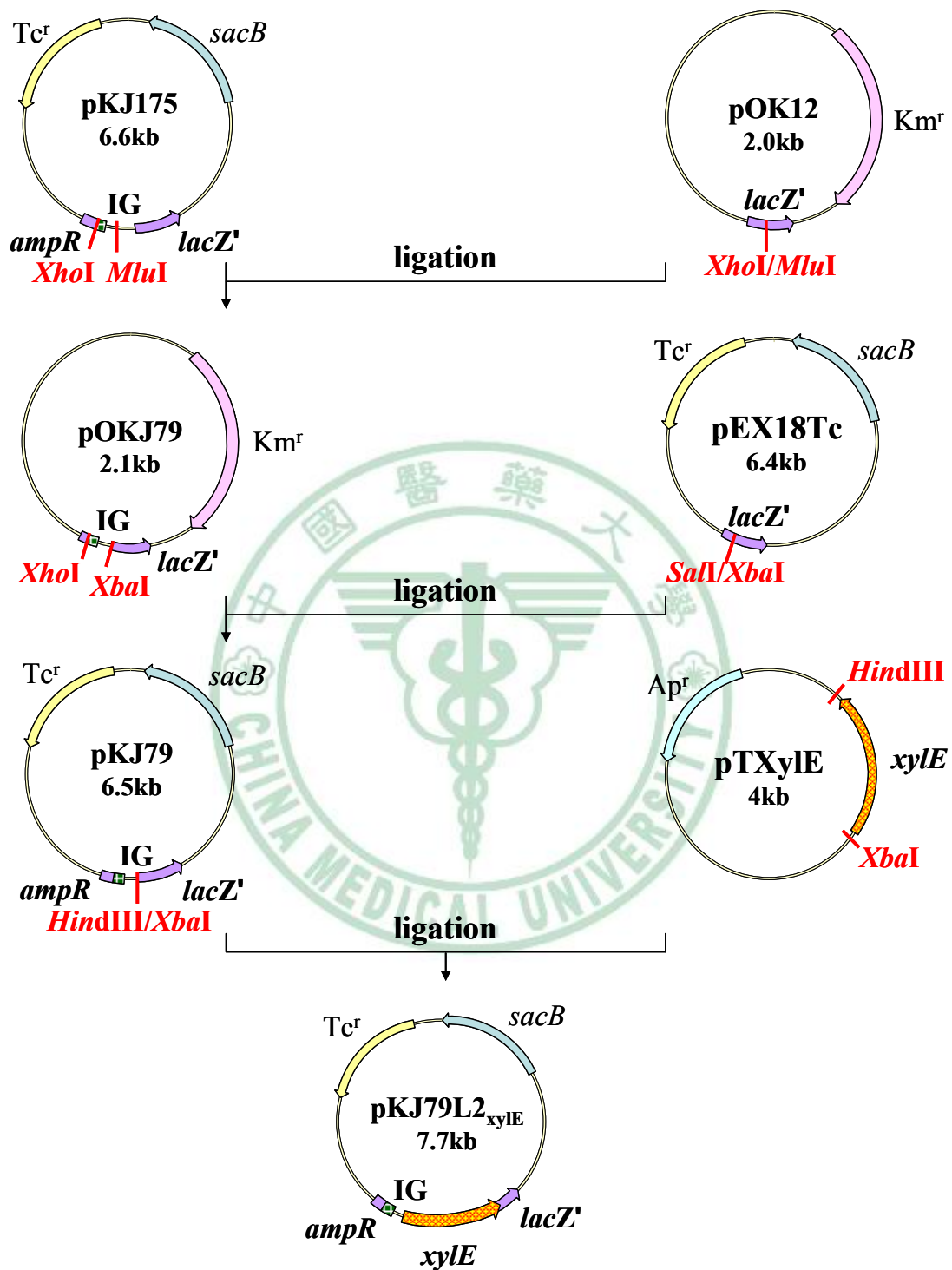


Fig. 16. Construction of pKJ79L2_{xylE}.

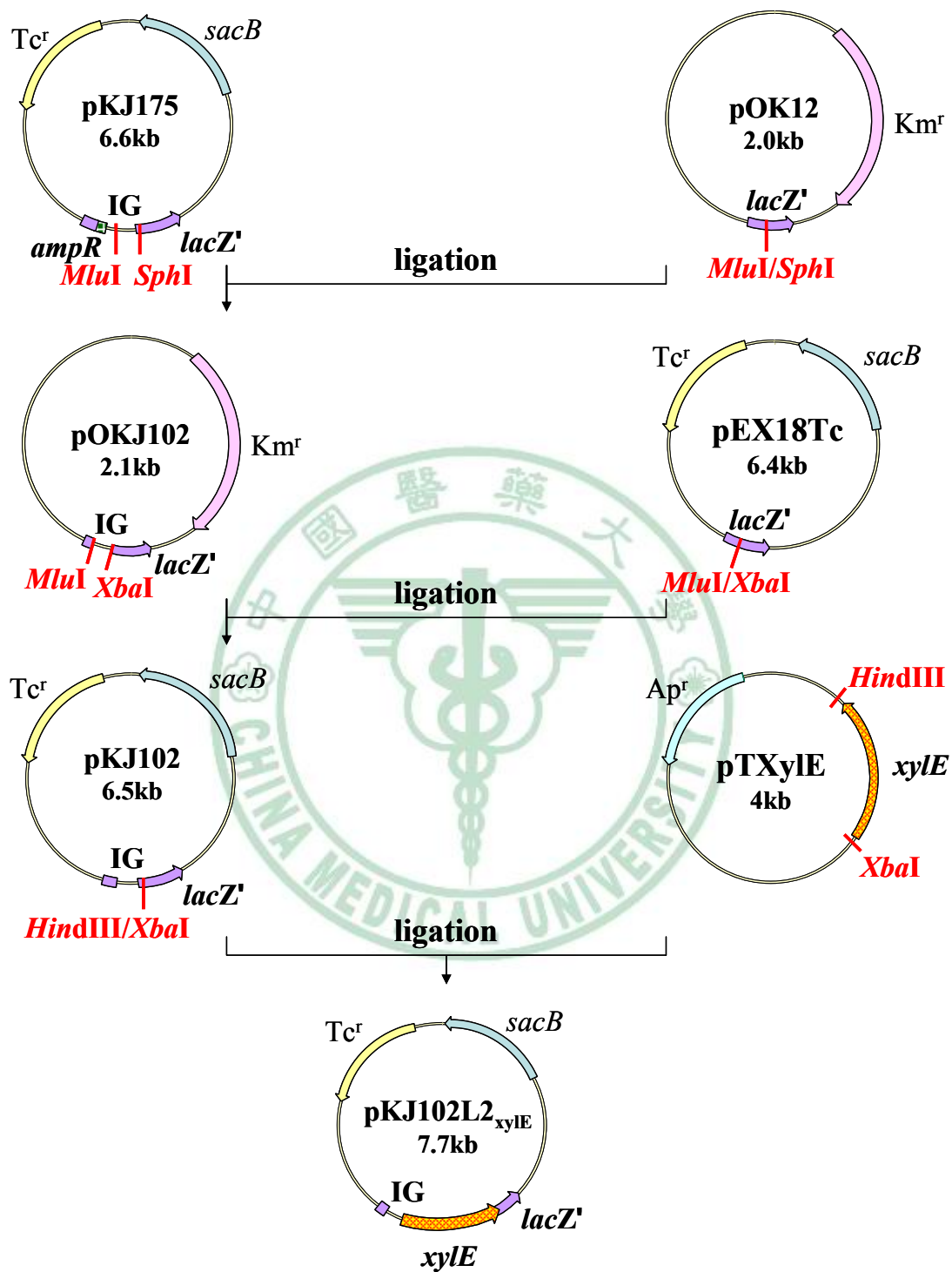


Fig. 17. Construction of pKJ102L2_{xylE}.

KJ strain

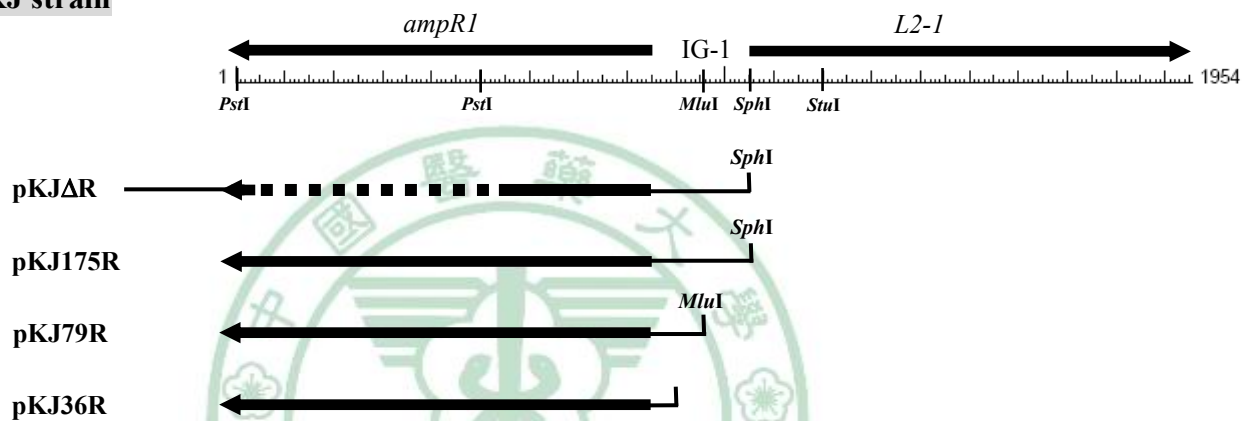


Fig. 18. Restriction enzyme maps of the recombinant plasmids pKJΔR, pKJ175R, pKJ79R, and pKJ36R. All plasmids are derivatives of pEX18Tc. The orientation of gene is indicated by the arrow. The dashed line indicates the deleted region.

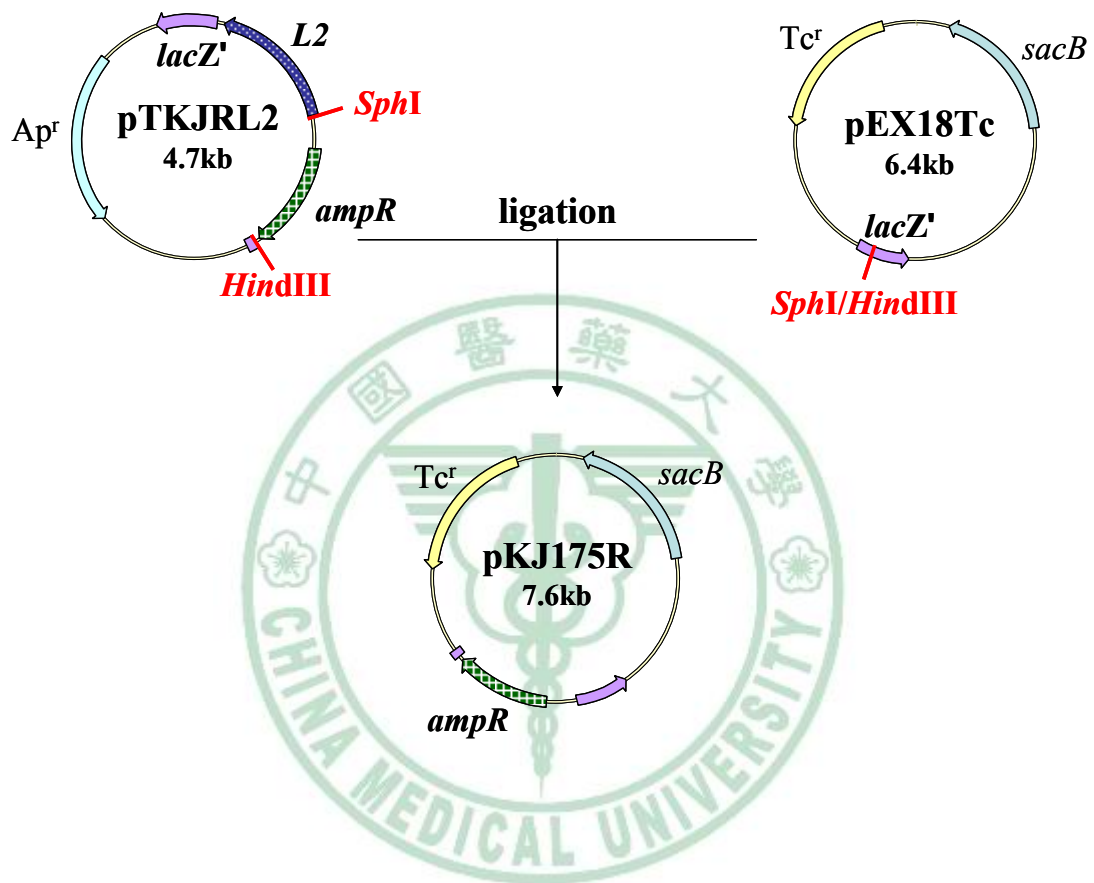


Fig. 19. Construction of pKJ175R.

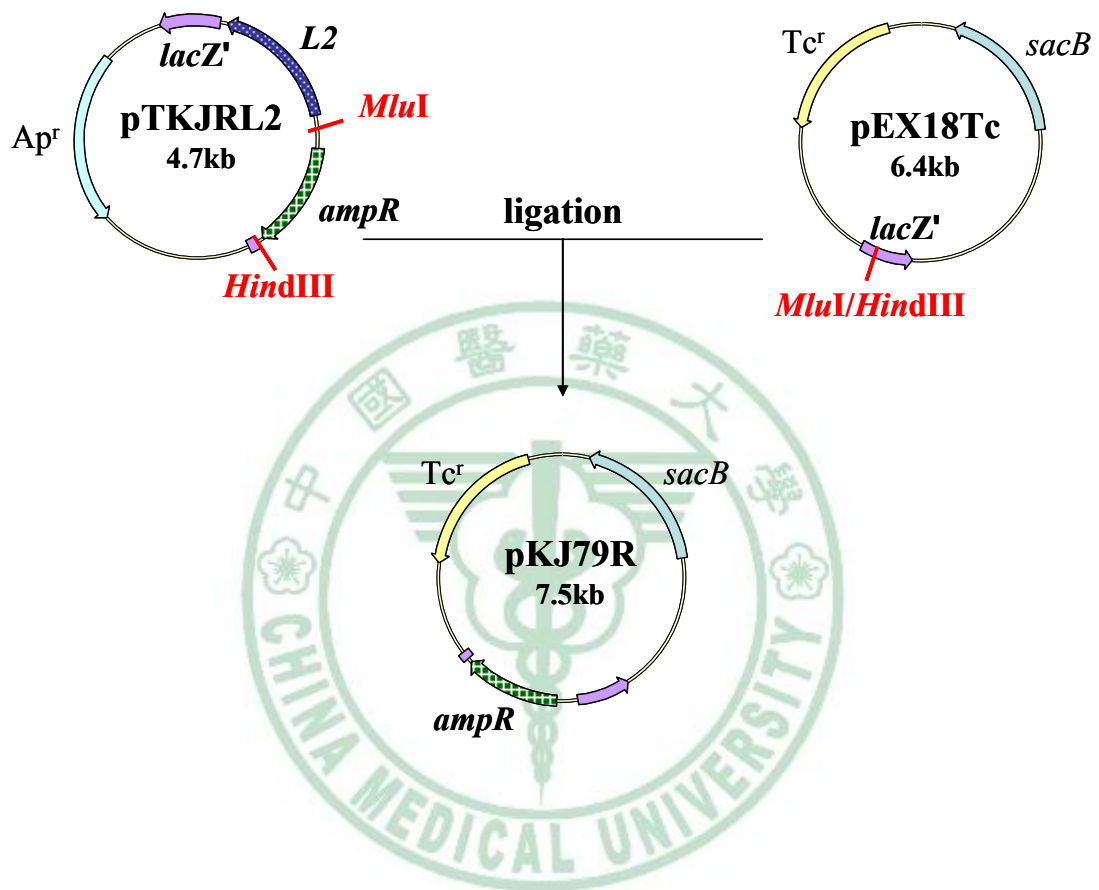


Fig. 20. Construction of pKJ79R.

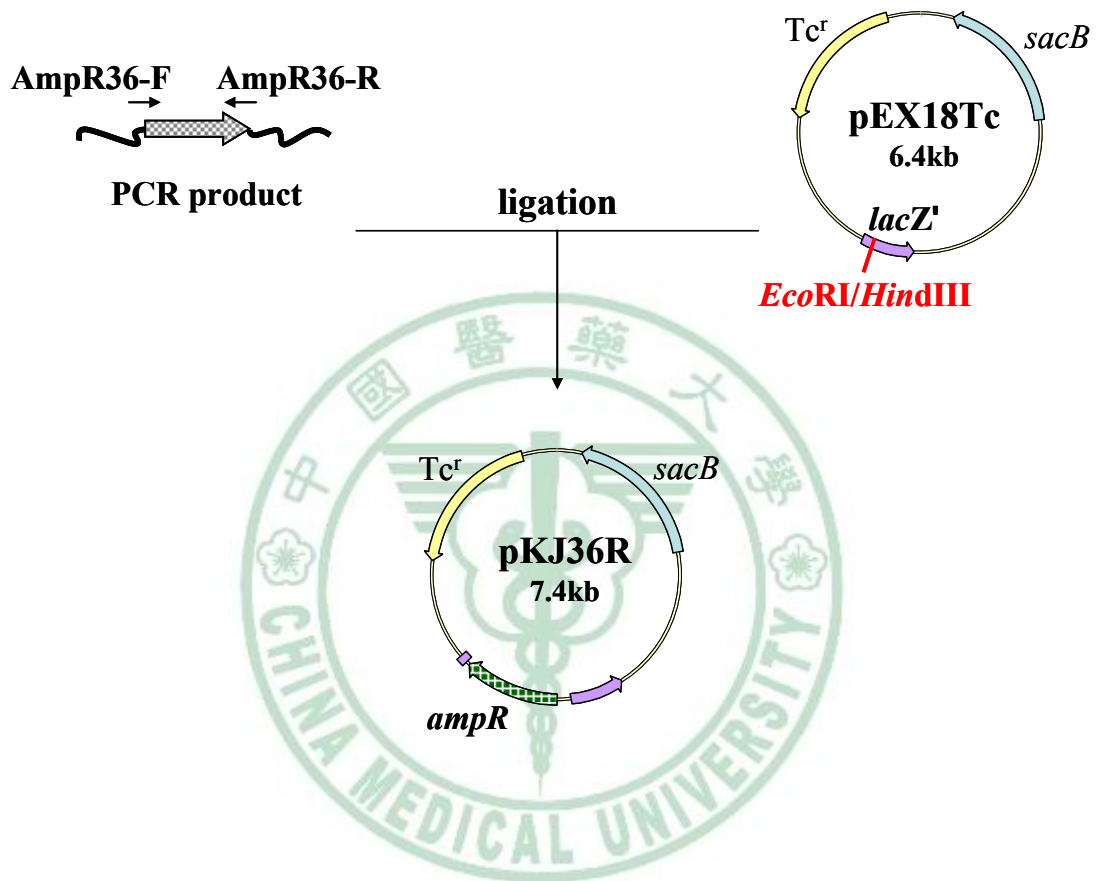


Fig. 21. Construction of pKJ36R.

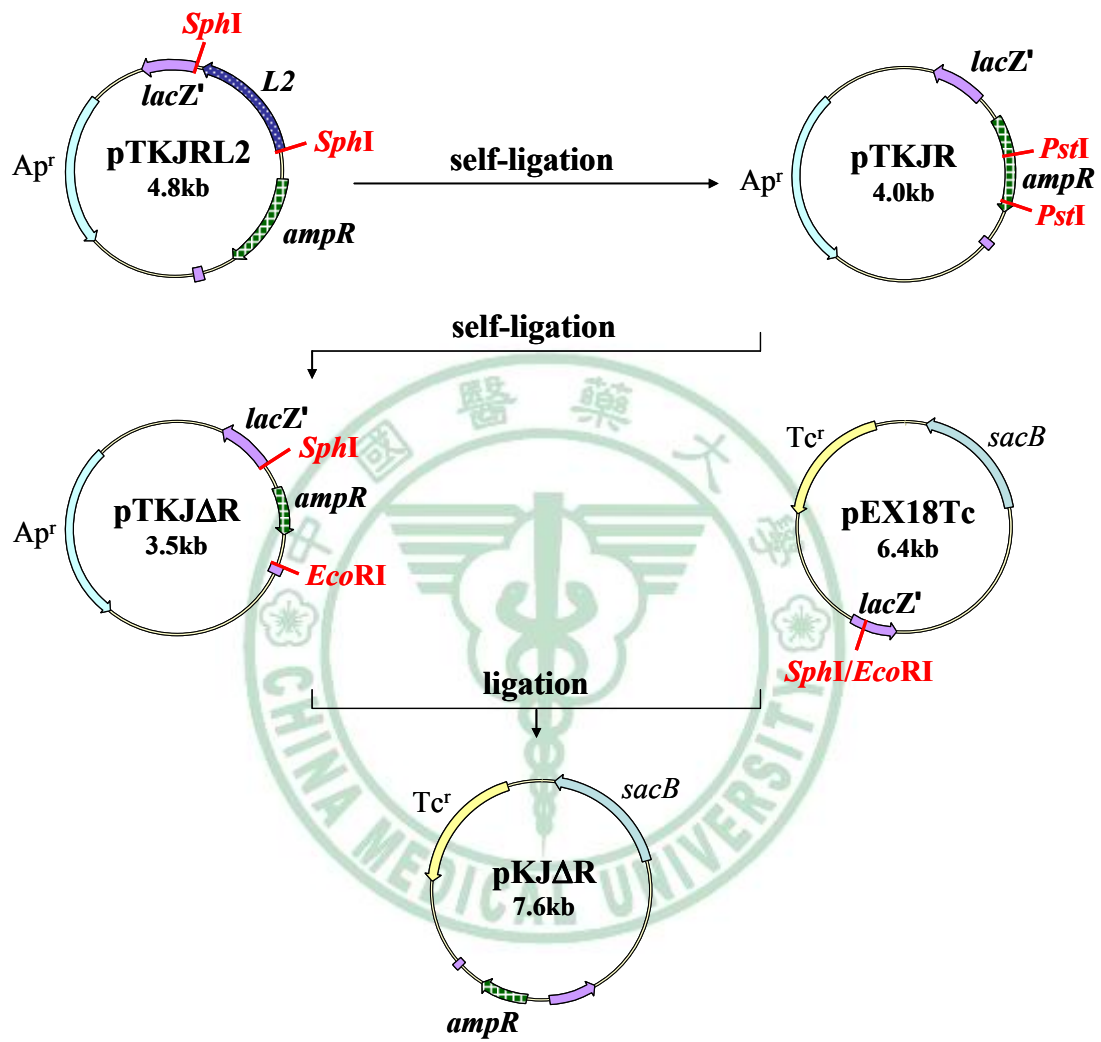


Fig. 22. Construction of pKJΔR.

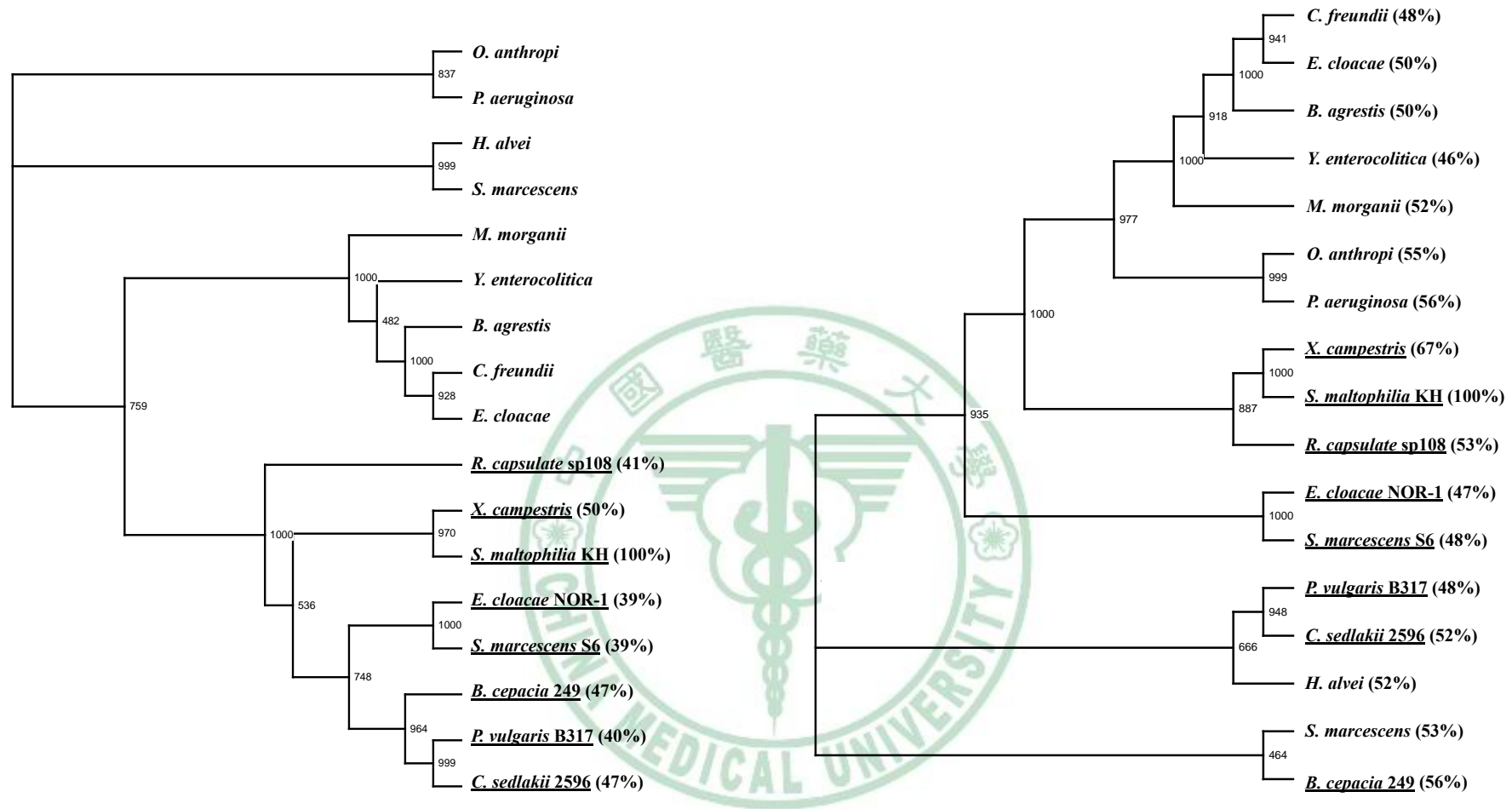


Fig. 23. Dendrograms showing the relationship of L2 and AmpR proteins of *S. maltophilia* KH with related β -lactamases and AmpR proteins. Species harboring class A β -lactamases are underlined. The others carry AmpC β -lactamases. (A) Dendrogram of chromosomally encoded class C and class A β -lactamases. The numbers in brackets denote percentage of identity between the indicated β -lactamase and *S. maltophilia* KH L2. (B) Dendrogram of chromosomally encoded AmpR proteins. The numbers in brackets denote percentage of identity between the indicated AmpR and AmpR of *S. maltophilia* KH.

<i>C. freundii</i>	<u>cat</u>	-N8- <u>TTAGAAAACTTA</u>	-N12- <u>AATTTA</u> ACCGTTTGTCAACACG <u>GTGCAA</u> ATCAAACACACT	-N55- <u>atg</u>
<i>E. cloacae</i>	<u>cat</u>	-N10- <u>TTAGAAAAATTA</u>	-N12- <u>AATTTA</u> ACCGTTTGTCAAGGCAC <u>AGTCAA</u> ATCCAACAGACT	-N56- <u>atg</u>
<i>Y. enterocolitica</i>	<u>cat</u>	-N16- <u>TTTTCTATTATCA</u>	-N7- <u>AATATA</u> ATCGATTGTTATCCAT <u>AGTCAA</u> TCATTGCAGAAT	-N71- <u>atg</u>
<i>M. morgani</i>	<u>cat</u>	-N10- <u>TAAGTTTTTCTTT</u>	-N12- <u>TAATTA</u> ACCGTTTGTCTGTCT <u>GGTGAA</u> TCTGACGATACT	-N35- <u>atg</u>
<i>H. alvei</i>	<u>cat</u>	-N24- <u>AAGATTTTCTTTA</u>	-N11- <u>TTTTAT</u> CTCGCTTGTCAATCAG <u>GCGGCG</u> ATAGCGGATATT	-N123- <u>atg</u>
<i>O. anthropi</i>	<u>cat</u>	-N6- <u>CCAAATTTTTTC</u>	-N16- <u>ATAACG</u> TCGTTTGTGCGGCCA <u>GCGCAA</u> GCATT GTATAT	-N99- <u>atg</u>
<i>B. agrestis</i>	<u>cat</u>	-N11- <u>TAGAAAATCTTAA</u>	-N11- <u>AATTTA</u> ATCGTTTGTTCGCCAC <u>AGTCAA</u> ATCCCGCAGACT	-N11- <u>atg</u>
<i>S. marcescens</i>	<u>cat</u>	-N12- <u>TAAGTTTTTCTTTA</u>	-N9- <u>AAATTA</u> TTATCGCTTGTCAACCCGG <u>GCGCAA</u> AATCCGATATT	-N130- <u>atg</u>
<i>P. aeruginosa</i>	<u>cat</u>	-N10- <u>AAATTTTTCTAAT</u>	-N10- <u>AGTATT</u> CGTCGTTTGGCGCAAATCCT <u>GCGCAA</u> GCCTAGATT	-N74- <u>atg</u>
<i>R. capsulate</i> sp108*	<u>cat</u>	-N5- <u>TACCTCAGCTAAT</u>	-N13- <u>ATTTGT</u> CGT TTGATGGCTGCG <u>ATCAAG</u> CCGAAATATA	-N70- <u>atg</u>
<i>E. cloacae</i> NOR-1*	<u>cat</u>	-N8- <u>AAAGAAAAAGTTA</u>	-N13- <u>ATTATA</u> TTGCTTCAAAGAAAAAA <u>TAACAA</u> CTGTATAAT	-N69- <u>atg</u>
<i>P. vulgaris</i> *	<u>cat</u>	-N15- <u>TAGATTTTCTATA</u>	-N10- <u>ATTTATT</u> ATCGATTGTCAATA <u>AATCAA</u> TTAAATAGGATATT	-N86- <u>atg</u>
<i>S. marcescens</i> S6*	<u>cat</u>	-N8- <u>AAGATAAACTTAT</u>	-N22- TTTAAA -N16- TATAAT -N54- <u>ATGAC</u>	-N17- <u>atgtcaaac</u>
<i>B. cepacia</i> 249*	<u>cat</u>	<u>AAGGTTTTCTTT</u> -N11-	<u>AATTAT</u> CGTTGC TTGTCG GGTAACC <u>GTAAA</u> GTGACGATAGT	-N63- <u>atg</u>
<i>X. campestris</i> *	<u>cat</u>	-N9- <u>TTAGTTCAATTCA</u>	-N13- <u>AACATT</u> GCGGTGGTCGCCAGC <u>GCGCCG</u> GCCCC GATACT	-N26- <u>atg</u>
<i>S. maltophilia</i> KH*	<u>act</u>	-N38- <u>CTTCAA</u> -N15-	<u>AATTA</u> -N44- GATTTTTTGGCGTGGT -N16- TTCAAT	-N27- <u>atg</u>

Fig. 24. Alignment of *ampR*- β -lactamase intergenic regions (IGs) with that of *S. maltophilia* KH. The start codon and promoter (-10 and -35 regions) for the *ampR* genes are boxed, and those for *L2* genes are shaded. The putative AmpR binding motif is underlined. Strains marked with asterisks carry *ampR*-class A β -lactamase modules. The other strains carry *ampR*-*ampC* systems.

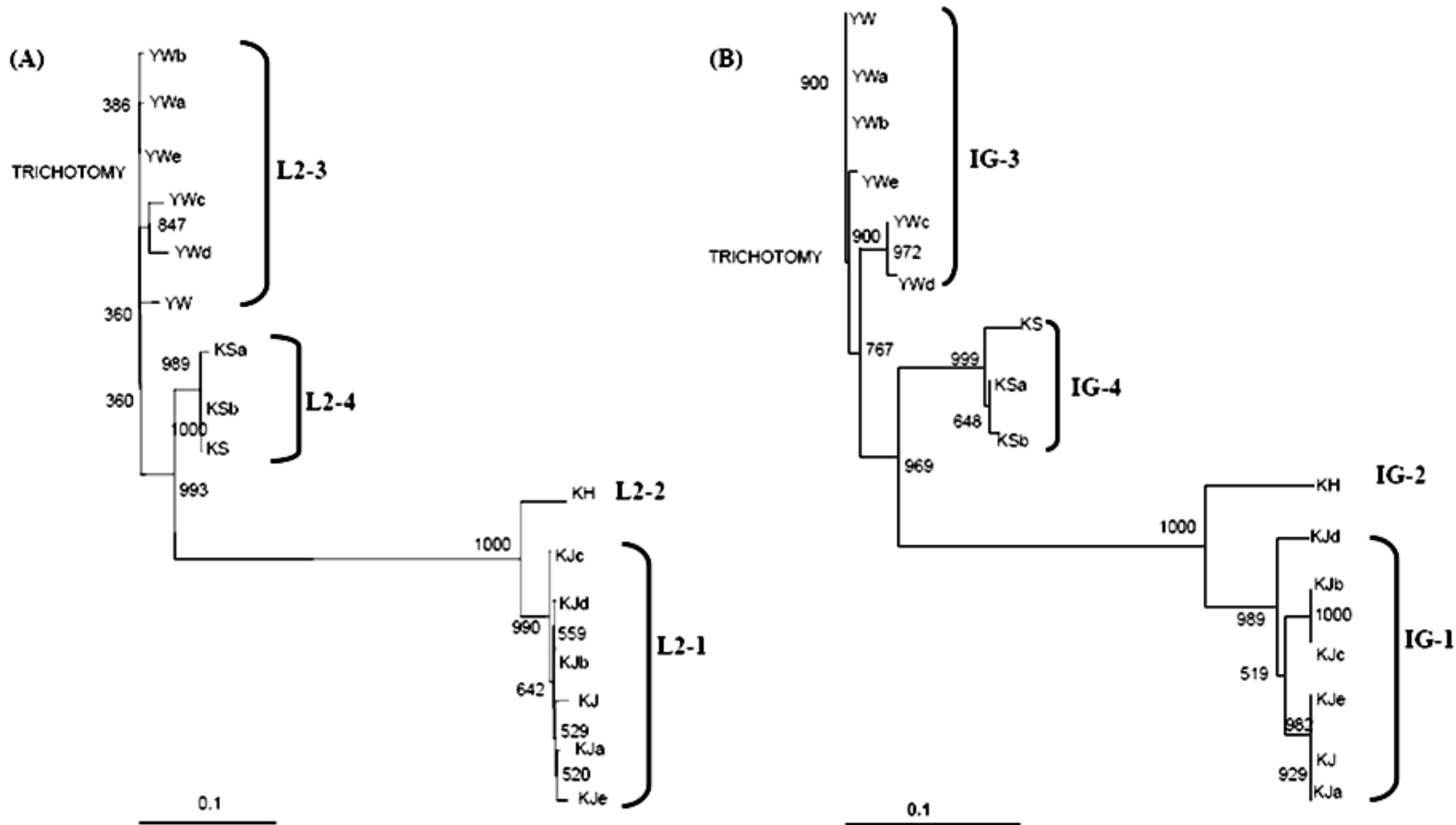


Fig. 25. Dendrograms showing the relationships of L2 β-lactamase proteins and *ampR-L2* IG regions among sixteen *S. maltophilia* isolates. (A) Dendrogram of L2 β-lactamase proteins. (B) Dendrogram of *ampR-L2* IG regions.

	10	20	30	40	50	60
KJ	MLHPALPLNALRAFEAAARH	QNFTRAALELCVSOAALSHQIRGLEDR	LGIRLFHRLPRGV			
KJ e	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KJ a	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KJ b	---T-	-----	-----	-----	-----	-----
KJ c	---T-	-----	-----	-----	-----	-----
KJ d	---T-	-----	-----	-----	-----	-----
KH	---T-	-----	-----	-----	-----	-----
YW	---T-	-----	-----	-----	-----	-----
YWa	---T-	-----	-----	-----	-----	-----
YWc	---T-	-----	-----	-----	-----	-----
YWd	---T-	-----	-----	-----	-----	-----
YWe	---T-	-----	-----	-----	-----	-----
YWb	---T-	-----	-----	-----	-----	-----
KSa	---T-	-----	-----	-----	-----	-----
KS	---T-	-----	-----	-----	-----	-----
KSb	---T-	-----	-----	-----	-----	-----

	70	80	90	100	110	120
KJ	ALTDEGAALYPVLNESFERI	SASIAARYTGGPAREVLT	LGVVGT	FATGWLLPRLAAFEAAH		
KJ e	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KJ a	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KJ b	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KJ c	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KJ d	-----	-----	-----	---T-A---	---S---	-----
KH	-----	---N---	-----	-----	-----	-----
YW	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YWa	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YWc	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YWd	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YWe	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YWb	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KSa	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KS	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KSb	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	130	140	150	160	170	180
KJ	PDIELRLQTHNNRIDLAGEGLDLA	IRFGDGDWQGQACTA	ILDAPFAPL	CAPALARRLKQP		
KJ e	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KJ a	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KJ b	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KJ c	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KJ d	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KH	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YW	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YWa	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YWc	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YWd	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YWe	-----	-----	-----	-----	-----	-----
YWb	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KSa	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KS	-----	-----	-----	-----	-----	-----
KSb	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	190	200	210	220	230	240
KJ	RDLGTLPL	LLRSYRSDEW	PRWLQAAGV	SGVEARGP	VFDSSLTV	AMAAAGGAGVALLPLRMF
KJe	--G-	-----	-----	-----	-----	-----
KJa	--G-	-----	V-	-----	-----	-----
KJb	--G-	-----	-----	-----	-----	-----
KJc	--G-	-----	-----	-----	-----	-----
KJd	--G-	-----	-----	-----	-----	-----
KH	--A-	-----	-----	-----	-----	-----
YW	--A-	-----	-----	-----	-----	-----
YWa	--A-	-----	-----	-----	-----	-----
YWc	--A-	-----	-----	-----	-----	-----
YWd	--A-	-----	-----	-----	-----	-----
YWe	--A-	-----	-----	-----	-----	-----
YWb	--A-	-----	-----	-----	-----	-----
KSa	--A-	-----	-----	-----	-----	-----
KS	--A-	-----	-----	-----	-----	-----
KSb	--A-	-----	-----	-----	-----	-----

	250	260	270	280
KJ	EQELAEGRLLQ	PFSTTLELGRY	WLTRLRSRAERE	PARRFREWLAQQA
KJe	-----	S-	-----	R-
KJa	-----	S-	S-	R-
KJb	-----	S-	-----	R-
KJc	-----	S-	-----	R-
KJd	-----	S-	-----	R-
KH	-----	G-	-----	K-T
YW	-----	G-	-----	K-
YWa	-----	G-	-----	K-
YWc	-----	G-	-----	K-
YWd	-----	G-	-----	K-
YWe	-----	G-	N-	K-
YWb	-----	G-	-----	K-
KSa	-----	G-	-----	K-
KS	-----	G-	-----	K-
KSb	-----	G-	-----	K-

Fig. 26. Protein sequences alignment of the *S. maltophilia* AmpR proteins from sixteen different clinical isolates. Only the amino acid differences from strain KJ AmpR sequence are shown. The three major amino acid residues used to classify the AmpR type are indicated in boldface. The amino acid residues of N-terminal helix-turn-helix motif are boxed.

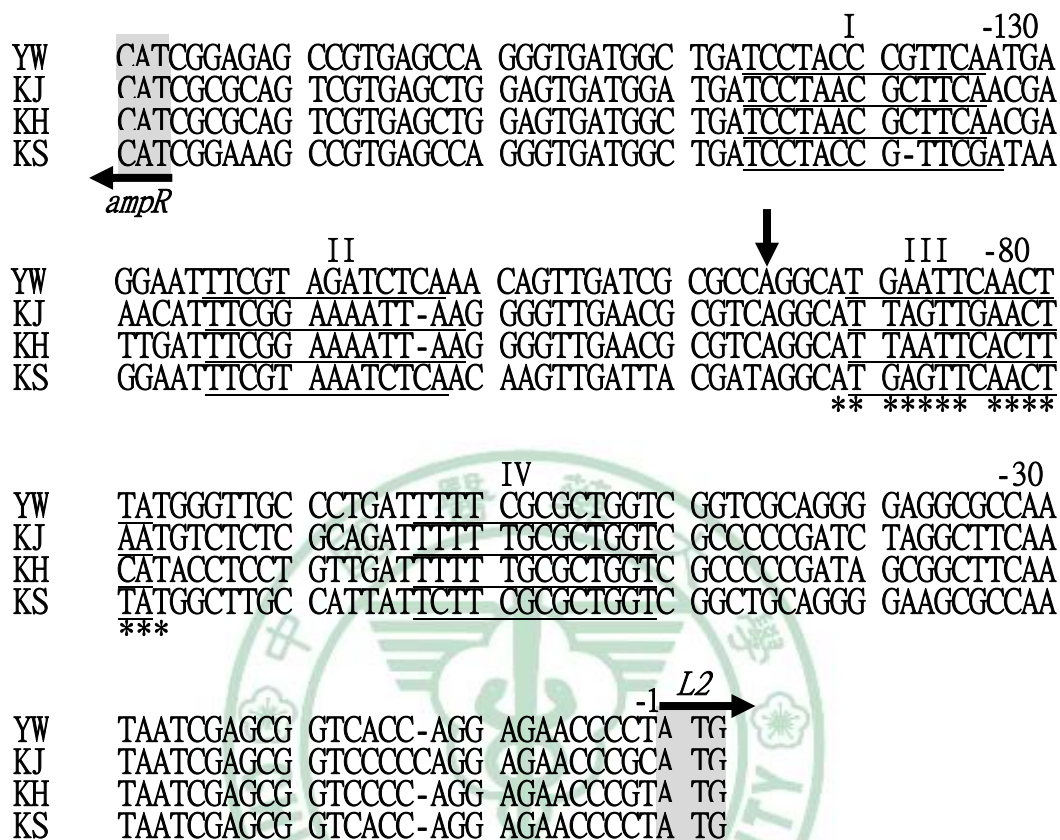


Fig. 27. DNA sequences alignment of *ampR-L2* IG regions from *S. maltophilia* strains YW, KJ, KH, and KS. Gray-shaded characters represent the start codon of *ampR* and *L2* genes and the orientations of these genes are indicated with arrows. The four possible AmpR binding domains with the LysR motif T(A)-N11-A(T) are underlined and marked as I, II, III, and IV respectively. The vertical arrow indicates the mutated nucleotide in pKJ102ML2_{xyIE}, with a mutation from A to G. The inverted repeats within domain III are indicated by asterisks using strain KJ as a representative.

TABLE 1. Bacterial strains, plasmid, and primers used in this study

Strain or plasmid	Genotype or properties
<i>S. maltophilia</i>	
KH	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
KHΔL1	<i>S. maltophilia</i> KH isogenic mutant of <i>L1</i> gene
KHΔL2	<i>S. maltophilia</i> KH isogenic mutant of <i>L2</i> gene
KHΔRL2	<i>S. maltophilia</i> KH double mutant of <i>L2</i> and <i>ampR</i> genes; deletion 797 bp <i>StuI-StuI</i> DNA fragment which including partial 5' terminus of <i>ampR</i> , intergenic region of <i>ampR</i> and <i>L2</i> , and partial 5' terminus of <i>L2</i>
KJ	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
KJa	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
KJb	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
KJc	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
KJd	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
KJe	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
KH	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
YW	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
YWa	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
YWb	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
YWc	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
YWd	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
YWe	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
KH	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
KHa	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
KHb	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
KJΔR	<i>S. maltophilia</i> KJ <i>ampR</i> isogenic mutant
<i>Escherichia coli</i>	
DH5α	F- φ80dlacZΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺)
S17-1	<i>phoA supE44λ thi-1 gyrA96 relA1 λ pir</i> + mating strain
Plasmids	
pEX18Tc	<i>sacB oriT</i> , Tc ^r
pKHR174L2	pEX18Tc vector with a 2.8-kb PCR amplicon containing the partial 3' terminus of ABC transport protein gene, <i>ampR</i> gene, 174-bp IG region, and <i>L2</i> gene; Tc ^r
pKHR174L2 _{xyIE}	Derived from pKHR174L2, inserting an <i>xylE</i> cassette of the same orientation as <i>L2</i> gene into the <i>SphI</i> site of <i>ampR</i> gene; Tc ^r
pKHΔL1	pEX18Tc vector with a 298-bp <i>XbaI-SphI</i> DNA fragment of 5' terminus of <i>L1</i> gene and a 336-bp <i>PstI-HindIII</i> DNA fragment of 3' terminus of <i>L1</i> gene, deleting the internal 407-bp DNA fragment of <i>L1</i> gene
pKHΔL2	Derived from pKHR174L2, deleting the 107-bp <i>StuI-SphI</i> DNA

	fragment; Tc ^r
pKHΔR	Derived from pKHR174L2, deleting the 468-bp <i>PstI-PstI</i> DNA fragment; Tc ^r
pKHΔRL2	Derived from pKHR174L2, deleting the 797-bp <i>StuI-StuI</i> DNA fragment; Tc ^r
pKHR _{xyIE} 174L2	Derived from pKHR174L2, inserting an <i>xyIE</i> cassette of the same orientation as <i>ampR</i> gene into the <i>SmaI</i> site of <i>ampR</i> gene; Tc ^r
pKJ175L2 _{xyIE}	pEX18Tc vector with a 1479-bp DNA fragment, containing the partial 5' terminus of <i>ampR</i> gene, 175-bp <i>ampR-L2</i> IG region of <i>S. maltophilia</i> KJ and a fused <i>xyIE</i> gene; Tc ^r
pKJ125L2 _{xyIE}	pEX18Tc vector with a 1322-bp DNA fragment, containing 125-bp <i>ampR-L2</i> IG region of <i>S. maltophilia</i> KJ and a fused <i>xyIE</i> gene; Tc ^r
pKJ102L2 _{xyIE}	pEX18Tc vector with a 1381-bp DNA fragment, containing the partial 5' terminus of <i>ampR</i> gene, 102-bp <i>ampR-L2</i> IG region of <i>S. maltophilia</i> KJ and a fused <i>xyIE</i> gene; Tc ^r .
pK79L2 _{xyIE}	pEX18Tc vector with a 1377-bp DNA fragment, containing the partial 5' terminus of <i>ampR</i> gene, 79-bp <i>ampR-L2</i> IG region of <i>S. maltophilia</i> KJ and a fused <i>xyIE</i> gene; Tc ^r .
pKJ72L2 _{xyIE}	pEX18Tc vector with a 1280-bp DNA fragment, containing 72-bp <i>ampR-L2</i> IG region of <i>S. maltophilia</i> KJ and a fused <i>xyIE</i> gene; Tc ^r
pKJ175ML2 _{xyIE}	pEX18Tc vector with a 1479-bp DNA fragment, containing the partial 5' terminus of <i>ampR</i> gene, 175-bp mutated <i>ampR-L2</i> IG region of <i>S. maltophilia</i> KJ and a fused <i>xyIE</i> gene; Tc ^r
pKJ102ML2 _{xyIE}	pEX18Tc vector with a 1381-bp DNA fragment, containing the partial 5' terminus of <i>ampR</i> gene, 102-bp mutated <i>ampR-L2</i> IG region of <i>S. maltophilia</i> KJ and a fused <i>xyIE</i> gene; Tc ^r
pKJ175R	pEX18Tc vector with a 1535-bp DNA fragment of <i>S. maltophilia</i> KJ, containing the complete <i>ampR</i> gene and 175-bp <i>ampR-L2</i> IG region, the <i>ampR</i> gene with an opposite orientation to <i>lacZ</i> promoter of vector; Tc ^r
pKJ79R	pEX18Tc vector with a 1210-bp DNA fragment of <i>S. maltophilia</i> KJ, containing the complete <i>ampR</i> gene and 79-bp partial <i>ampR-L2</i> IG region, the <i>ampR</i> gene with an opposite orientation to <i>lacZ</i> promoter of vector; Tc ^r
pKJ36R	pEX18Tc vector with a 916-bp DNA fragment of <i>S. maltophilia</i> KJ, containing the complete <i>ampR</i> gene and 36-bp partial <i>ampR-L2</i> IG region, the <i>ampR</i> gene with an opposite orientation to <i>lacZ</i> promoter of vector; Tc ^r
pKJΔR	pEX18Tc vector with a 1215-bp DNA fragment of <i>S. maltophilia</i> KJ, containing the <i>ampR</i> gene with an internal 486-bp deletion and the 175-bp <i>ampR-L2</i> IG region; Tc ^r
pKH174L2 _{xyIE}	pEX18Tc vector with a 1926-bp DNA fragment, containing the partial 5' terminus of <i>ampR</i> gene, 174-bp <i>ampR-L2</i> IG region and partial 5' terminus of <i>L2</i> gene of <i>S. maltophilia</i> KH and a fused <i>xyIE</i> gene; Tc ^r

pYW175L2 _{xylE}	pEX18Tc vector with a 1508-bp DNA fragment, containing the partial 5' terminus of <i>ampR</i> gene, 175-bp <i>ampR-L2</i> IG region and partial 5' terminus of <i>L2</i> gene of <i>S. maltophilia</i> YW and a fused <i>xylE</i> gene; Tc ^r
pKS174L2 _{xylE}	pEX18Tc vector with a 1484-bp DNA fragment, containing the partial 5' terminus of <i>ampR</i> gene, 174-bp <i>ampR-L2</i> IG region and partial 5' terminus of <i>L2</i> gene of <i>S. maltophilia</i> KS and a fused <i>xylE</i> gene; Tc ^r

Primer

ampRL2-F	5' - AAGCCGCCTGGATGGAAC -3'
ampRL2-R	5' - ATGCCGATGATGCCGAAC -3'
175-F	5' - CGTTCAGCTCGAGGGTAGGGTG -3'
125-F	5' - CGCTTCCTCGAGACATTTTCG -3'
72-F	5' - CTCCTCGAGGATTTTTTGCCTG -3'
IG-R	5' - GGGCGAGCATGCGGGTTCTC -3'
AmpR36-F	5' - TTAGGATAAGAATTCCTCCAGCTCACGACTGCGCG -3'
AmpR36-R	5' - CGGCCGGGAAAGCTTACGTGCCCTGCGCCTGCA -3'
L2Q-F	5' - AACGCACCCACCGATGCC -3'
L2Q-R	5' - CGCCTGTCCAGCAATGCC -3'
16rDNAQ-F	5' - GACCTTGCGCGATTGAATG -3'
16rDNAQ-R	5' - CGGATCGTCGCCTTGGT -3'



TABLE 2. The C23O activity of *E. coli* and *S. maltophilia* harboring recombinant plasmid pKHR174L2_{xyIE}

Strain(plasmid)	Genotype Strain/plasmid	C23O activity (Uc ^a /OD ₄₅₀)	
		Uninduced	Induced
<i>E. coli</i> DH5 α			
KH(pKHR174L2 _{xyIE})	Wild type / <i>ampR</i> ⁺ , <i>L2::xylE</i>	0	0
<i>S. maltophilia</i>			
KH(pKHR174L2 _{xyIE})	Wild type / <i>ampR</i> ⁺ , <i>L2::xylE</i>	2	52

^aOne unit of catechol 2,3-dioxygenase is defined as one nanomole of catechol hydrolyzed per minute per 3.6×10^8 cells. Results are geometric means of three independent determinations. Standard derivations were within 10% of the geometric means in all cases.

TABLE 3. The β -lactamase activity of *S. maltophilia* mutants KH Δ L2 and KH Δ RL2

Strain	Genotype Strain/plasmid	β -lactamase activity (Un ^a /mg)	
		Uninduced	Induced
<i>S. maltophilia</i>			
KH Δ L2	<i>ampR</i> ⁺ , <i>L1</i> ⁺ , <i>L2</i> ⁻	2	136
KH Δ RL2	<i>ampR</i> ⁻ , <i>L1</i> ⁺ , <i>L2</i> ⁻	0	0

^aOne unit of β -lactamase is defined as one nanomole of nitrocefin hydrolyzed per minute per mg protein. Results are geometric means of three independent determinations. Standard derivations were within 10% of the geometric means in all cases.

TABLE 4. The β -lactamase activity of *S. maltophilia* mutants KH Δ R and KH Δ L1

Strain	Genotype Strain/plasmid	β -lactamase activity (Un ^a /mg)	
		Uninduced	Induced
<i>S. maltophilia</i>			
KH Δ R	<i>ampR</i> ⁻ , <i>L1</i> ⁺ , <i>L2</i> ⁺	12	12
KH Δ L1	<i>ampR</i> ⁺ , <i>L1</i> ⁻ , <i>L2</i> ⁺	4	382

^aOne unit of β -lactamase is defined as one nanomole of nitrocefin hydrolyzed per minute per mg protein. Results are geometric means of three independent determinations. Standard derivations were within 10% of the geometric means in all cases.

TABLE 5. The C23O activity of *S. maltophilia* KH and KH Δ RL2 harboring recombinant plasmid pKHR_{xylE}174L2

Strain(plasmid)	Genotype Strain/plasmid	C23O activity (Uc ^a /OD ₄₅₀)	
		Uninduced	Induced
<i>S. maltophilia</i>			
KH(pKHR _{xylE} 174L2)	Wild type / <i>ampR::xylE, L2</i> ⁺	4.1	4.0
KH Δ RL2(pKHR _{xylE} 174L2)	<i>ampR</i> ⁻ , <i>L1</i> ⁺ , <i>L2</i> ⁻ / <i>ampR::xylE, L2</i> ⁺	4.0	4.2

^aOne unit of catechol 2,3-dioxygenase is defined as one nanomole of catechol hydrolyzed per minute per 3.6×10^8 cells. Results are geometric means of three independent determinations. Standard derivations were within 10% of the geometric means in all cases.

TABLE 6. Characteristics of L2 proteins, IG regions and AmpR proteins of *ampR-L2* modules from sixteen *S. maltophilia* isolates

<i>S. maltophilia</i> isolates	L2 protein		IG region		AmpR protein	
	Length (aa)	Cluster type ^a	Length (nt)	Cluster type ^b	Length (aa)	Type ^c
KJ, KJa, KJb, KJc, KJd, KJe	303	L2-1	175	IG-1	288	1
KH	303	L2-2	174	IG-2	288	2
YW, YWa, YWb, YWc, YWd, YWe	301	L2-3	175	IG-3	288	2
KS, KSa, KSb	304	L2-4	174	IG-4	288	2

^aaccording to the phylogenetic analysis in Fig. 23(A)

^baccording to the phylogenetic analysis in Fig. 23(B)

^cThe key amino acid residues in AmpR1 are Gly184, Ser254, and Arg277 and those in AmpR2 are Ala184, Gly254 and Lys277.

TABLE 7. Expression of C23O activity and MICs in *S. maltophilia* KJ and KH harboring different recombinant plasmids

Strain(plasmid)	Genotype Strain / Plasmid	C23O activity			
		Uc ^a /OD _{450nm}		MIC ^c (μg/ml)	
		Uninduced	Induced ^b	FOX	ATM
<i>S. maltophilia</i>					
KJ(pEX18Tc)	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} /	0	0	1024	>2048
KJ(pKJ175L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} :: <i>xyIE</i>	3	130	1024	1024
KJ(pKH174L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / <i>IG</i> _{KH} , <i>L2</i> _{KH} :: <i>xyIE</i>	2	71	1024	1024
KJ(pYW175L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / <i>IG</i> _{YW} , <i>L2</i> _{YW} :: <i>xyIE</i>	2	191	1024	1024
KJ(pKS174L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / <i>IG</i> _{KS} , <i>L2</i> _{KS} :: <i>xyIE</i>	3	105	1024	1024
KJΔR(pKJ175 L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} :: <i>xyIE</i>	3	1	32	<8
KH(pEX18Tc)	<i>ampR</i> _{KH} , <i>IG</i> _{KH} , <i>L2</i> _{KH} /	0	0	512	512
KH(pKJ175L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KH} , <i>IG</i> _{KH} , <i>L2</i> _{KH} / <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} :: <i>xyIE</i>	2	123	512	512
KH(pKH174L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KH} , <i>IG</i> _{KH} , <i>L2</i> _{KH} / <i>IG</i> _{KH} , <i>L2</i> _{KH} :: <i>xyIE</i>	2	139	512	512
KH(pYW175L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KH} , <i>IG</i> _{KH} , <i>L2</i> _{KH} / <i>IG</i> _{YW} , <i>L2</i> _{YW} :: <i>xyIE</i>	3	181	512	128
KH(pKS174L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KH} , <i>IG</i> _{KH} , <i>L2</i> _{KH} / <i>IG</i> _{KS} , <i>L2</i> _{KS} :: <i>xyIE</i>	2	394	512	<8

^aOne unit of catechol 2,3-dioxygenase is defined as 1 nanomole of catechol hydrolyzed per minute per 3.6×10^8 cells. Results are geometric means of three independent determinations. Standard derivations were within 12% of the geometric means in all cases.

^b50 μg/ml cefuroxime as the inducer

^cFOX, cefoxitin; ATM, aztreonam

TABLE 8. Expression of C23O activity in *S. maltophilia* KJ harboring different recombinant plasmids

Strain/plasmid	Genotype Strain / Plasmid	C23O activity Uc ^a /OD _{450nm}	
		Uninduced	Induced ^b
<i>S. maltophilia</i>			
KJ(pEX18Tc)	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ}	0	0
KJ(pKJ175L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / 175-bp <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} :: <i>xyIE</i>	1	130
KJ(pKJ125L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / 125-bp <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} :: <i>xyIE</i>	2	134
KJ(pKJ102L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / 102-bp <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} :: <i>xyIE</i>	2	127
KJ(pKJ79L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / 79-bp <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} :: <i>xyIE</i>	0	0
KJ(pKJ72L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / 72-bp <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} :: <i>xyIE</i>	0	0

^aOne unit of catechol 2,3-dioxygenase is defined as 1 nanomole of catechol hydrolyzed per minute per 3.6×10^8 cells. Results are geometric means of three independent determinations. Standard derivations were within 12% of the geometric means in all cases.

^b50 µg/ml cefuroxime as the inducer

TABLE 9. The MIC values of *S. maltophilia* strains harboring different recombinant plasmids

Strain/plasmid	Genotype Strain / Plasmid	MIC ^a (μg/ml)	
		FOX	ATM
<i>S. maltophilia</i>			
KJ(pEX18Tc)	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ}	1024	>2048
KJ(pKJ175L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / 175-bp <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} :: <i>xyIE</i>	1024	1024
KJ(pKJ102L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / 102-bp <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} :: <i>xyIE</i>	1024	1024

^aFOX, cefoxitin; ATM, aztreonam

TABLE 10. The MIC values of *S. maltophilia* KJΔR harboring different recombinant plasmids

Strain/plasmid	Genotype Strain / Plasmid	MIC ^a (μg/ml)	
		FOX	ATM
<i>S. maltophilia</i>			
KJ		1024	>2048
KJΔR	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ}	32	<8
KJΔR(pKJ175R)	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / <i>ampR</i> _{KJ} , 175-bp <i>IG</i> _{KJ}	1024	>2048
KJΔR(pKJ79R)	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / <i>ampR</i> _{KJ} , 79-bp <i>IG</i> _{KJ}	1024	>2048
KJΔR(pKJ36R)	<i>ampR</i> _{KJ} , <i>IG</i> _{KJ} , <i>L2</i> _{KJ} / <i>ampR</i> _{KJ} , 36-bp <i>IG</i> _{KJ}	32	<8

^aFOX, cefoxitin; ATM, aztreonam



TABLE 11. The MIC values of *S. maltophilia* strains harboring different recombinant plasmids

Strain/plasmid	Genotype Strain / Plasmid	MIC ^b (μg/ml)	
		FOX	ATM
<i>S. maltophilia</i>			
KJ(pEX18Tc)	<i>ampR</i> _{KJ} , IG _{KJ} , L2 _{KJ}	1024	>2048
KJM	<i>ampR</i> _{KJ} , IG _{KJ} , L2 _{KJ} / 175-bp IG _{KJ} M ^a ,	32	<8
KJ(pKJ175L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , IG _{KJ} , L2 _{KJ} / 175-bp IG _{KJ} , L2 _{KJ} :: <i>xyIE</i>	1024	1024
KJ(pKJ102L2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , IG _{KJ} , L2 _{KJ} / 102-bp IG _{KJ} , L2 _{KJ} :: <i>xyIE</i>	1024	1024
KJ(pKJ175ML2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , IG _{KJ} , L2 _{KJ} / 175-bp IG _{KJ} M ^a , L2 _{KJ} :: <i>xyIE</i>	32	<8
KJ(pKJ102ML2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KJ} , IG _{KJ} , L2 _{KJ} / 102-bp IG _{KJ} M ^a , L2 _{KJ} :: <i>xyIE</i>	32	<8
KH(pKJ102ML2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KH} , IG _{KH} , L2 _{KH} / 102-bp IG _{KJ} M ^a , L2 _{KJ} :: <i>xyIE</i>	32	<8
YW(pKJ102ML2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{YW} , IG _{YW} , L2 _{YW} / 102-bp IG _{KJ} M ^a , L2 _{KJ} :: <i>xyIE</i>	32	<8
KS(pKJ102ML2 _{xyIE})	<i>ampR</i> _{KS} , IG _{KS} , L2 _{KS} / 102-bp IG _{KJ} M ^a , L2 _{KJ} :: <i>xyIE</i>	32	<8

^aThe mutated *ampR*-L2 IG region has a base substitution (A→G) occurring at the -95 position when compared with the *ampR*-L2 IG sequences of stain KJ (Fig. 27)

^bFOX, cefoxitin; ATM, aztreonam

參考文獻

1. Hugh R, Ryschenkow E. *Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species. J Gen Microbiol. 1961 Sep;26:123-32.
2. Sutter VL. Identification of *Pseudomonas* species isolated from hospital environment and human sources. Appl. Microbiol. 1968 Oct;16(10):1532-8.
3. Palleroni NJ, Bradbury JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. Int J Syst Bacteriol. 1993 Jul;43(3):606-9.
4. Ubeda P, Salavert M, Giner S, Jarque I, López-Aldeguer J, Pérez-Bellés C, Gobernado M. Bacteraemia from *Stenotrophomonas maltophilia*: clinical epidemiological study and resistance profile. Rev Esp Quimioter. 1998 Sep;11(3):205-15.
5. Maningo E, Watanakunakorn C. *Xanthomonas maltophilia* and *Pseudomonas cepacia* in lower respiratory tracts of patients in critical care units. J. Infect. 1995 Sep;31(2):89-92.
6. Windhorst S, Frank E, Georgieva DN, Genov N, Buck F, Borowski P, Weber W. The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*: characterization of the protein and molecular cloning of the gene. J Biol Chem. 2002 Mar 29;277(13):11042-9. Epub 2002 Jan 16.
7. Richmond MH, Sykes RB. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. Adv Microb Physiol. 1973;9:31-88.
8. Krueger TS, Clark EA, Nix DE. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* to various antimicrobial combinations. Diagn Microbiol Infect Dis. 2001 Sep-Oct;41(1-2):71-8.
9. Lambert T, Ploy MC, Denis F, Courvalin P. Characterization of the chromosomal aac(6')-Iz gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 1999 Oct;43(10):2366-71.
10. Alonso A, Sanchez P, Martínez JL. *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Jul;44(7):1778-82.
11. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995 Oct;8(4):557-84.
12. Valdezate S, Vindel A, Loza E, Baquero F, Cantón R. Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. Antimicrob Agents Chemother. 2001 May;45(5):1581-4.
13. Li XZ, Zhang L, Poole K. SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of

- Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Feb;46(2):333-43.
14. Sánchez P, Alonso A, Martínez JL. Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Nov;46(11):3386-93.
 15. Zhang L, Li XZ, Poole K. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Dec;45(12):3497-503.
 16. Morita Y, Cao L, Gould VC, Avison MB, Poole K. nalD encodes a second repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2006 Dec;188(24):8649-54. Epub 2006 Oct 6.
 17. Bush K, Sykes RB. Methodology for the study of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1986 Jul;30(1):6-10.
 18. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1980 May 16;289(1036):321-31.
 19. Rossi S, Zoller M, Steurer J. Research interest by general practitioners: a survey. Praxis (Bern 1994). 2006 Dec 6;95(49):1913-7.
 20. Denton, M. and K. G. Kerr. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clin. Microbiol. 1998 Rev.11:57-80.
 21. Alonso, A., Martínez, J.I. Multiple antimicrobial resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicro. Agents Chemother. 1997 41, 1140-1142.
 22. Walsh TR, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Jul;41(7):1460-4.
 23. Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 1982 Oct;22(4):564-70.
 24. Crowder MW, Walsh TR, Banovic L, Pettit M, Spencer J. Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 1998 Apr;42(4):921-6.
 25. Avison MB, Higgins CS, von Heldreich CJ, Bennett PM, Walsh TR. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 beta-lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Feb;45(2):413-9.
 26. Hanson, N., Sanders, C.C. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. Curr. Pharm. Des. 1999 5, 881-894.

27. Lindberg, F., Westman, L., Normark, S. Regulatory components in *Citrobacter freundii* ampC beta-lactamase induction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985 2, 4620-4624.
28. Honore, N., Nicolas, M.H., Cole, S.T. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. EMBO J. 1986 5, 3709-3714.
29. Seoane, A., Francia, M.V., Lobo, J.M.G. Nucleotide sequence of the ampC-ampR region from the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. Antimicro. Agents Chemother. 1992 36, 1049-1052.
30. Poirel, L., Guibert, M., Girlich, D., Naas, T., Nordmann, P. Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of ampC-ampR from *Morganella morganii* clinical isolates. Antimicro. Agents Chemother. 1999 43, 769-776.
31. Girlich, D., Naas, T., Bellais, S., Poirel, L., Karim, A., Nordmann, P. Biochemical-genetic characterization and regulation of expression of an ACC-1 like chromosome-borne cephalosporinase from *Hafnia alvei*. Antimicro. Agents Chemother. 2000 44, 1470-1478.
32. Nadjar, D., Labia, R., Cerceau, C., Bizet, C., Philippon, A., Arlet, G. Molecular characterization of chromosomal class C β -lactamase and its regulatory gene in *Ochrobactrum anthropi*. Antimicro. Agents Chemother. 2001 45, 2324-2330.
33. Bauernfeind, A., Stemplinger, L., Jungwirth, R., Giamarellou, H. Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance, Antimicro. Agents Chemother. 1996 40, 221-224.
34. Mahlen, S.D., Morrow, S.S., Abdalhamid, B., Hanson, N.D. Analyses of ampC gene expression in *Serratia marcescens* reveal new regulatory properties. J. Antimicro. Chemother. 2003 51, 791-802.
35. Lodge, J.M., Minchin, S.D., Piddock, L.J.V., Busby, S.J.W. Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal ampC β -lactamase. Biochem. J. 1990 272, 627-631.
36. Jacobs, C., Frere, J.-M., Normark, S. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible β -lactam resistance in gram-negative bacteria. Cell. 1997 88, 823-832.
37. Lindberg, F., Normark, S. Common mechanism of ampC β -lactamase induction in enterobacteria: regulation of the cloned *Enterobacter cloacae* P99 β -lactamase gene. J. Bacteriol. 1987 169, 758-763.
38. Normark, S. β -lactamase induction in gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. Microb. Drug Resist. 1995 1, 111-114.
39. Wiedemann, B., Pfeifle, D., Wiegand, I., Janas, E. β -lactamase induction and cell wall recycling in gram-negative bacteria. Drug Resistance Updates. 1998

- 1,223-226.
40. Lindquist, S., Lindberg, F., Normark, S. Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible *ampC* β -lactamase gene. *J. Bacteriol.* 1989 171, 3746-3753.
 41. Hu, R.-M., Huang, K.-J., Wu, L.-T., Hsiao, Y.-J., Yang, T.-C. Studies on induction of L1 and L2 β -lactamases of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicro. Agents Chemother.* 2008 52, 1198-1200.
 42. Schell, M.A. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 1993 47, 597-626.
 43. Kong, K.-F., Jayawardena, S.R., Idulkar, S.D., del Puerto, A., Koh, C.-L., Hoiby, N., Mathee, K. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB β -lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factor. *Antimicro. Agents Chemother.* 2005 49, 4567-4575.
 44. Bradford, P.A., Urban, C., Mariano, N., Projan, S.J., Rahal, J.J., Bush, K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACCT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicro. Agents Chemother.* 1997 41, 563-569.
 45. Gaillot, O., Clement, C., Simonet, M., Philippon, A. Novel transferable β -lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1997 39, 85-87.
 46. Nadjar, D.M., Rouveau, M., Verdet, C., Donay, J., Herrmann, J., Lagrange, P.H., Philippon, A., Arlet, G. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing transferable AmpC-type β -lactamase (ACC-1) originating from *Halfnia alvei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000 187, 35-40.
 47. Papanicolaou, G.A., Medeiros, A.A., Jacoby, G.A. Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and α -methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicro. Agents Chemother.* 1990 34, 2200-2209.
 48. Philippon, A.G., Arlet, G., Jacoby, G.A. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicro. Agents Chemother.* 2002 46, 1-11.
 49. Barnaud, G., Arlet, G., Verdet, C., Gaillot, O., Lagrange, P.H., Philippon. *Salmonella enteritidis* : AmpC plasmid-mediated inducible β -lactamase (DHA-1) with an *ampR* gene from *Morganella morganii*. *Antimicro. Agents Chemother.* 1998 42, 2352-2358.
 50. Fortineau, N., Poirel, L., Nordmann, P. Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001 47, 207-210.

51. Nakano, R., Okamoto, R., Nakano, Y., Kaneko, K., Okitsu, N., Hosaka, Y., Inoue, M. CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC β -lactamase with an *ampR* gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicro. Agents Chemother.* 2004 48,1151-1158.
52. Reisbig, M.D., Hanson, N.D. The ACT-1 plasmid-encoded AmpC β -lactamase is inducible: detection in a complex β -lactamase background. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002 49, 557-560.
53. Verdet, C., Benzerara, Y., Gautier, V., Adam, O., Ould-Hocine, Z., Arlet, G. Emergence of DHA-1-producing *Klebsiella* spp. in the Parisian region: genetic organization of the *ampC* and *ampR* genes originating from *Morganella morganii*. *Antimicro. Agents Chemother.* 2006 50, 607-617.
54. Campbell, J.I.A., Scahill, S., Gibson, T., Ambler, R.P. The phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas capsulate* sp108 encodes an indigenous class A β -lactamase. *Biochem. J.* 1989 260, 803-812.
55. Naas, T., Nordmann, P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994 91, 7693-7697.
56. Datz, M., Joris, B., Azab, E.A.M., Galleni, M., Van Beeumen, J., Frere, J.-M., Martin, H.H. A common system of *Proteus vulgaris* and the enterobacterial class-C β -lactamase. *Eur. J. Biochem.* 1994 226, 149-157.
57. Naas, T., Livermore, D.M., Nordmann, P. Characterization of an LysR family protein, SmeR from *Serratia marcescens* S6, its effect on expression of the carbapenem-hydrolyzing β -lactamase Sme-1, and comparison of this regulator with other β -lactamase regulators. *Antimicro. Agents Chemother.* 1995 39, 629-637.
58. Trepanier, S., Prince, A., Huletsky, A. Characterization of the *penA* and *penR* genes of *Burkholderia cepacia* 249 which encode the chromosomal class A penicillinase and its LysR-type transcriptional regulator. *Antimicro. Agents Chemother.* 1997 41, 2399-2405.
59. Weng, S.-F., Lin, J.-W., Chen, C.-H., Chen, Y.-Y., Tseng, Y.-H., Tseng, Y.-H. Constitutive expression of a chromosomal class A (BJM group 2) β -lactamase in *Xanthomonas campestris*. *Antimicro. Agents Chemother.* 2004 48, 209-215.
60. Okazaki, A., Avison, M.B. Induction of L1 and L2 β -lactamase production in *Stenotrophomonas maltophilia* is dependent on an AmpR-type regulator. *Antimicro. Agents Chemother.* 2008 52, 1525-1528.
61. Saino, Y., Inoue, M., Mitsuhashi, S. Purification and properties of an inducible cephalosporinase from *Pseudomonas maltophilia* GN12873. *Antimicro. Agents Chemother.* 1984 25, 362-365.

62. Nordmann, P., Mariotte, S., Naas, T., Labia, R., Nicolas, M.-H. Biochemical properties of a carbapenems-hydrolyzing β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicro. Agents Chemother.* 1993 37, 939-946.
63. Rasmussen, B.A., Bush, K., Keeney, D., Yang, Y., Hare, R., O’Gara, C., Medeiros, A.A. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicro. Agents Chemother.* 1996 40, 2080-2086.
64. Hauben, L., L. Vauterin, E. R. B. Moore, B. Hoste, and J. Swings. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999 49:1749-1760.
65. Henikoff, S., G. W. Haughn, J. M. Calvo, and J. C. Wallace. A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988 85:6602-6606.
66. Cases, I., and V. de Lorenzo. The black cat/white cat principle of signal integration in bacterial promoters. *EMBO J.* 20:1-11.
67. de Lorenzo, V., and J. Perez-Martin. Regulatory noise in prokaryotic promoters: how bacteria learn to respond to novel environmental signals. *Mol. Microbiol.* 1996 19:1177-1184.
68. Grkovic, S., M. H. Brown, and R. A. Skurray. Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 12:225-237.
69. Porrua, O., M. Garcia-Jaramillo, E. Santero, and F. Govantes. The LysR-type regulator AtzR binding site: DNA sequences involved in activation, repression and cyanuric acid-dependent repositioning. *Mol. Microbiol.* 2007 66:410-427.
70. Bartowsky, E. and S. Normark. Interactions of wild-type and mutant AmpR of *Citrobacter freundii* with target DNA. *Mol. Microbiol.* 1993 13:555-565.

附錄一 β -lactamases 的 Ambler 和 Bush 分類總表

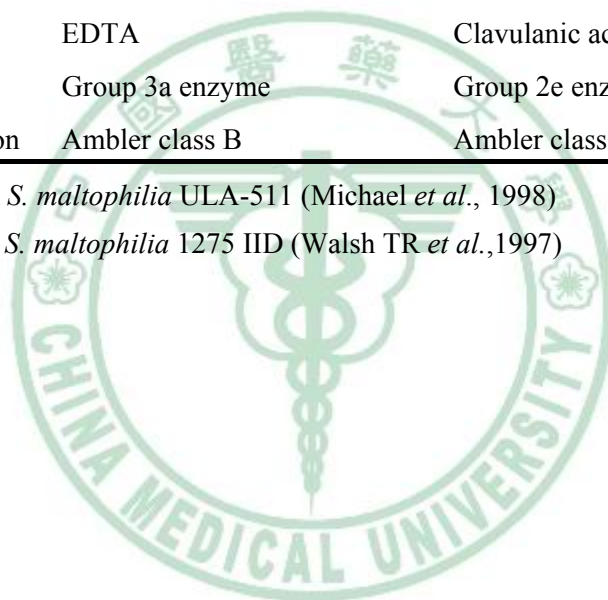
BJM group	Molecular class	Preferred substrates	Inhibited by		Representative enzyme
			CA	EDTA	
1	C	cephalosporin	-	-	AmpC, plasmid-encoded cephalosporinases(Gram-negative bacteria), CMY-1
2a	A	penicillin	+	-	Penicillinase from Gram-positive bacteria
2b	A	penicillin, cephalosporin	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	penicillin, cephalosporin, monobactam	+	-	TEM-3.... TEM-105, SHV-2.... SHV-39
2br	A	penicillin,	+/-	-	TEM-30..... TEM-39(IRT1-IRT-26), SHV-10
2c	A	penicillin,	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	penicillin,	+/-	-	OXA-1...OXA-40, OXA-10=PSE-2
2e	A	cephalosporin,	+	-	Inducible cephalosporinase from <i>P. vulgaris</i> , SFO-1, L2 from <i>S. maltophilia</i>
3	B	carbapenems, cephalosporin, penicillin,	-	+	L1 from <i>S. maltophilia</i> , CfiA/CcrA from <i>B. fragilis</i> , VIM-1, IMP-1.... IMP-9
4	-	, penicillin,	-	-	Penicillinase from <i>B. cepacia</i>

附錄二 *S. maltophilia* 的 L1 和 L2 β -lactamase 的特性比較

	L1 ^a	L2 ^b
Sequence analysis	873 bp (G+C content: 68.4%) tetramer	909 bp (G+C content: 71.6%) Dimer molecular mass of 63
Structural analysis	molecular mass of ca. 115 kDa bound two Zn ²⁺ per monomer	kDa/L2 STXK active-site, SDN motif, KTG loop motif
Substrate	Penicillin; cephalosporin; carbapenem	Cephalosporin; monobactam
Inhibitor	EDTA	Clavulanic acid
BJM classification	Group 3a enzyme	Group 2e enzyme
Ambler classification	Ambler class B	Ambler class A

^a This enzyme from *S. maltophilia* ULA-511 (Michael *et al.*, 1998)

^b This enzyme from *S. maltophilia* 1275 IID (Walsh TR *et al.*, 1997)



附錄三 Comparison of AmpR of *S. maltophilia* KH with other homologues

Strain / protein	No. of aa	Similarity (%)	Identity (%)
<i>Stenotrophomonas. maltophilia</i> KH / LysR transcriptional factor	288	100	100
<i>Xanthomonas campestris</i> / AmpR	289	76	67
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / AmpR, β -lactamase regulatory protein	296	69	56
<i>Burkholderia cepacia</i> 249 / LysR-type transcriptional regulator	300	68	56
<i>Ochrobactrum anthropi</i> / AmpR transcriptional activator	291	71	55
<i>Serratia marcescens</i> / AmpR transcriptional regulator	293	69	53
<i>Rhodopseudomonas capsulatus</i> sp108 / HTH-type transcriptional activator AmpR	289	64	53
<i>Morganella morganii</i> / transcriptional activator AmpR	291	66	52
<i>Hafnia alvei</i> / transcriptional activator AmpR	288	67	52
<i>Citrobacter sedlakii</i> 2596 / transcriptional regulator SedR	286	67	52
<i>Enterobacter cloacae</i> / AmpR transcriptional regulator	291	64	50
<i>Buttiauxella agrestis</i> / AmpR	290	64	50
<i>Citrobacter freundii</i> / AmpR transcriptional regulator	291	65	48
<i>Proteus vulgaris</i> B317 / β -lactamase regulatory protein blaA	292	66	48
<i>Serratia marcescens</i> S6 / SmeR, LysR-type protein	292	65	48
<i>Enterobacter cloacae</i> NOR-1 / β -lactamase transcriptional activator	295	64	47
<i>Yersinia enterocolitica</i> / AmpR regulatory protein	294	63	46

附錄四 Comparison of L2 β -lactamase of *S. maltophilia* KH with other homologues

Strain / protein	No. of aa	Similarity (%)	Identity (%)
<i>Stenotrophomonas. maltophilia</i> KH / L2 β -lactamase	303	100	100
<i>Xanthomonas campestris</i> / β -lactamase	295	66	50
<i>Burkholderia cepacia</i> 249 / class A β -lactamase precursor	307	61	49
<i>Citrobacter sedlakii</i> 2596 / class A β -lactamase Sed1	295	59	47
<i>Rhodopseudomonas capsulatus</i> sp108 / β -lactamase	293	59	41
<i>Proteus vulgaris</i> B317 / β -lactamase	300	55	40
<i>Enterobacter cloacae</i> NOR-1 / β -lactamase	292	56	39
<i>Serratia marcescens</i> S6 / Carbapenem-hydrolyzing β -lactamase Sme-1	294	56	39
<i>Citrobacter freundii</i> / β -lactamase; AmpC	381	No significant similarity	
<i>Enterobacter cloacae</i> / class C β -lactamase	381	No significant similarity	
<i>Yersinia enterocolitica</i> / β -lactamase	388	No significant similarity	
<i>Morganella morganii</i> / cephalosporinase	379	No significant similarity	
<i>Hafnia alvei</i> / AMPC cephalosporinase ACC-2	390	No significant similarity	
<i>Ochrobactrum anthropi</i> / AmpC β -lactamase class C	390	No significant similarity	
<i>Buttiauxella agrestis</i> / AmpC	397	No significant similarity	
<i>Serratia marcescens</i> / β -lactamase; AmpC	378	No significant similarity	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / β -lactamase	397	No significant similarity	

附錄五 The accession numbers of the deposited sequences in GenBank Databases

<i>S. maltophilia</i> isolate / nucleotide sequence	Accession number
KH / <i>ampR-L2</i> module	EU032534
KH / <i>L1</i> β -lactamase	EU441218
KJa / <i>ampR-L2</i> module	EF126076
KJb / <i>ampR-L2</i> module	EF126073
KJc / <i>ampR-L2</i> module	EF126074
KJd / <i>ampR-L2</i> module	EF126071
KJe / <i>ampR-L2</i> module	EF126084
YWa / <i>ampR-L2</i> module	EF126070
YWb / <i>ampR-L2</i> module	EF126069
YWc / <i>ampR-L2</i> module	EF126082
YWd / <i>ampR-L2</i> module	EF126077
YWe / <i>ampR-L2</i> module	EF126079
KS / <i>ampR-L2</i> module	EF126086
KSa / <i>ampR-L2</i> module	EF126078
KSb / <i>ampR-L2</i> module	EF126081

