

中國醫藥大學
醫學檢驗生物技術學系碩士班

碩士論文

Stenotrophomonas maltophilia 誘發 *L1* 及 *L2*

乙內醯胺酶基因表現之探討

Induction studies of *L1* and *L2* β -lactamases in

Stenotrophomonas maltophilia

指導教授：楊翠青 副教授

Tsuey-Ching Yang

學生姓名：蕭盈如

Ying-Ju Hsiao

學生學號：9473005

中華民國九十六年七月六日

目 錄

致謝.....	i
中文摘要	ii
英文摘要	v
第一章 研究背景與研究動機	
第一節 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 介紹.....	1
第二節 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 的抗藥性機轉.....	2
第三節 β -lactam 抗生素.....	3
第三節 β -lactamase 分類及命名.....	4
第四節 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 之 <i>L1</i> 及 <i>L2</i> 基因.....	5
第五節 <i>L1</i> 及 <i>L2</i> 基因誘導分析.....	7
第六節 β -lactamase 抑制劑.....	7
第二章 研究目的.....	11
第三章 研究重要性.....	12
第四章 研究方法	
第一節 研究材料	13
第二節 實驗方法	19
第五章 研究結果	29
第六章 結果討論.....	48

第七章 結論.....	60
參考文獻	61
圖	67
表	79
附錄一	88
附錄二	89
附錄三.....	90
附錄四.....	91
附錄五.....	92

致謝

論文完成了！在這兩年多的生活中，過的非常快樂及充實，雖然在求知的過程中也有不愉快及沮喪的時候，但總覺得自己的決定是對的。首先謝謝我敬愛的老師楊翠青博士，謝謝妳兩年多的來的細心指導，無論是實驗上，報告或課業上，還是生活上的建議都令我收穫良多。感謝吳禮字及胡若梅兩位老師抽空修改論文以及對實驗的寶貴建議。再謝謝郭雅音老師對我的教誨與鼓勵。

謝謝實驗室的夥伴：善恩及冠勳學長、冠傑、詩雯、佳芳、素連、明宏、婉麗、世娟及學弟妹們等。還有鼓勵我的好友：楹奇、小瓊、羿謹、永成等，在我難過沮喪時給我勇氣去面對挫折。真的很感謝我的阿嬤，及父母親默默的為我付出。因為他們的鼓勵及容忍讓我曾想放棄的念頭打消，然後繼續堅持下去。努力不見得可以成功，但不努力就更難成功了。

每個人都有其優缺點，在人生過程中，讓我慢慢知道自己所擅長的與不擅長的事物，謝謝自己能不斷給自己機會，我想，做自己擅長的事才能有成就感及信心。我將帶著這些回憶，繼續人生的旅程。

中文摘要

Stenotrophomonas maltophilia 為多重抗藥性的細菌，其位於染色體上的 *L1*, *L2* 二基因可經由誘發(induction) 產生高活性 β -lactamase，可水解 β -lactam 類的抗生素。本實驗菌株來源為中國醫院大學附設醫院細菌檢驗室所提供臨床菌株，*S. maltophilia* N。利用基因替換方式(Gene replacement mutagenesis)突變 N 菌的 *L1*, *L2* 二基因取得 NL1⁻及 NL2⁻ 之突變株，分別在 *L1*, *L2* 二基因起始氨基酸 (Met)下游置入一個和 *L1*, *L2* 二基因轉錄方向一致的報導基因, *xlyE*。因此可以觀察報導基因, *xlyE* 的表現來評估 *L1*, *L2* 二基因啟動子分別被誘發(induction)的能力。為了評估 *L1* 及 *L2* 基因是否會因為在培養基中加入 5%人類血清或因改變生長環境中的碳源而誘發(induction)或影響二基因表現，我們在培養 NL1⁻及 NL2⁻突變株過程中加入 5%人類血清及在培養 NL1⁻及 NL2⁻突變株過程中分別加入 1%的碳源，不會對 *L1* 及 *L2* 基因產生誘發情形。為了評估 clavulanate 是否會誘發 *S. maltophilia* 的 Class B L1 β -lactamase，Class A L2 β -lactamase 二基因表現而導致 clavulanate 和其他 β -lactam 抗生素一起治療時產生拮抗(antagonism)或協同(synergism)作用，因此分別測試 2、8、10、16、50 $\mu\text{g/ml}$ clavulanate 對 *L1*, *L2* 基因誘發的能力，分別得知 clavulanate 對 *L1*, *L2* 二基因表現的誘發能力為 concentration

dependent。因此我們利用抗生素感受性的結果並分別測試在不同濃度的 clavulanate 及搭配不同 β -lactams 抗生素而產生共同或拮抗誘發 *L1*，*L2* 二基因啟動子表現。得知 NL1⁻ 在濃度為 Cab/CA(8/4) $\mu\text{g/ml}$ ，對 *L1* 基因有 induction synergism 的情形。NL2⁻ 在濃度 Azt /CA(32/16) $\mu\text{g/ml}$ ，對 *L2* 基因有 induction synergism 的情形發生。因 clavulanate/ β -lactams 抗生素組裝方式所引起的 *L1*，*L2* 二基因 induction 表現，可提供在選擇治劑上會影響療效的因素：1.選擇適當 β -lactams 抗生素與 clavulanate 的組裝 2.選擇治劑組裝的適當比例。



Abstract

Stenotrophomonas maltophilia has assumed an increasingly important role as a nosocomial pathogen in compromised patients. *S. maltophilia* isolates are resistant to many clinically useful antibiotics, with β -lactam resistance mediated through two β -lactamases, L1 and L2, whose expression is induced when cells are exposed to β -lactam antibiotics. Little is known about the induction of L1 and L2 β -lactamases. A clinical *S. maltophilia* isolate, *S. maltophilia* N, was obtained in China Medical University Hospital. The PCR amplicons containing L1 and L2 β -lactamase genes, respectively, were sequenced and analyzed. The L1⁻ and L2⁻ mutants of *S. maltophilia* N were constructed by gene replacement strategy, respectively. A reporter gene, *xylE*, is inserted into the L1 and L2 gene, down-strand the promoter of L1 and L2 gene and with the same orientation as that of L1 and L2 gene, respectively. The induction of L1 and L2 gene promoters can be monitored by analyzing the catechol 2,3-dioxygenase (C23O) activities in different induced conditions. The studies in the thesis were designed to elucidate the factors that affect the induction of L1 and L2 gene promoters. The induction potency of cefuroxime against NL1⁻ and NL2⁻ is independent on the type of carbon source in growth medium and the addition of 5% human serum. Clavulanic acid acts as an inducer toward the L1 and L2 gene promoters, and its induction potency against L1 and L2 genes is concentration dependent. The susceptibility test of *S. maltophilia* N against different combined regimens of β -lactams/clavulanate was evaluated. The factors affected the effect of combination regimens were elucidated using the isogenic mutants, NL1⁻ and

NL2⁻, as the assayed systems. To be a successful combined regimen, three important elements must be considered: (1) The hydrolytic ability of L1 toward the selected β -lactam. (2) The minimal concentration of clavulanate needed to inhibit the activity of induced L2 enzyme. (3) The occurrence of induction synergy by the combination of β -lactam and clavulanate.



第一章 研究背景與研究動機

第一節 *Stenotrophomonas maltophilia* 介紹

Stenotrophomonas maltophilia 早期稱 *Pseudomonas maltophilia* (Hugh & Ryschenkow, 1961)，後改名為 *Xanthomonas maltophilia* (Sutter, 1968)，最近這幾年才命名為 *Stenotrophomonas maltophilia* (Palleroni & Bradbury, 1993)。*S. maltophilia* 是屬於非發酵性、好氧的革蘭氏陰性桿菌，嗜以麥芽糖為碳源，*Stenotrophomonas maltophilia* 可以耐 silverlined catheters (Ubeda *et al.*, 1998) 且可生長於4-40°C，最適合的生長溫度為35°C。*S. maltophilia* 在健康人的身上並非致病菌，但常在醫院內病人的檢體中分離出來，和許多的不同的感染症狀都有相關性，但卻沒有明顯臨床上的特性。*S. maltophilia* 常藉由許多媒介物，例如：醫療器材；治療用的各種插管，或使用不當的隱形眼鏡，甚至不通氣的空調系統，皆會引起免疫力缺陷及因器官移植而使用了免疫抑制藥物的病患感染 (Denton & Kerr, 1998)，甚至造成院內感染。此菌與呼吸道的感染也有關，最後可能會導致菌血症，心內膜炎，及尿道感染 (Maningo & Watanakunakorn, 1995)，在一些觀察中認為此菌的胞外蛋白分解酵素可能會導致感染的組織受損，是重要的一種致病因子 (Windhorst *et al.*, 2002)。目前有兩株 *S. maltophilia* 的菌株其基因體定序工作已完成。一

株為 *S. maltophilia* R551-3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，*S. maltophilia* R551-3 的 GC content 平均為 66%，序列全長為 4,544,233 nt；另一株為 *S. maltophilia* K279a (<http://www.sanger.ac.uk/>)。 *S. maltophilia* K279a 的 GC content 平均為 66.32%，序列全長為 4,851,126 bp。

第二節 *Stenotrophomonas maltophilia* 的抗藥機轉

革蘭氏陰性(Gram-negative) 菌的菌株有四種抗藥機制。一、細菌產生可分解或抑制抗生素活性之酵素。如很多細菌會產生 β -lactamase 的酵素，破壞 β -lactam 類抗生素的環狀構造，而對 β -lactam 型的抗生素產生抗藥性(Rkhiomod *et al.*, 1973)。二、變更抗生素所辨認的受器目標。例如 β -lactam 型的抗生素其殺菌的方式主要是藉由抗生素與細菌之 penicillin binding proteins (PBPs) 結合，而抑制細菌細胞壁的合成，進而達到殺菌的效果。菌可改變 PBPs (penicillin binding proteins)，而使得抗生素無法和 PBPs 結合，而產生抗藥性(Livermore *et al.*, 1995)。三、改變細胞膜的通透性，使抗生素難以進入到細胞膜內部，格蘭氏陰性菌可改變細胞膜的 porin，使抗生素無法順利進入細胞內部 (Krueger *et al.*, 2001)。四、細菌細胞膜上有 efflux pump (multidrug pump) 的結構，使抗生素一進入到細胞膜內部則馬上藉 pump 打到細胞膜外部

((Li *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2001)。根據研究報導指出 *S. maltophilia* 對於一些藥物，如：aminoglycosides, quinolones, β -lactams, chloramphenicol, rifampin, tetracycline, trimethoprim 等，皆會產生抗藥性(Avison *et al.*, 2001)。目前已知 *S. maltophilia* 基因體上存有數個抗藥性基因，可產生對抗抗生素的酵素： β -lactamase(Walsh *et al.*, 1997)，aminoglycoside acetyltransferases (Lambert *et al.*, 1999)，及 erythromycin inactivating enzyme (Alonso *et al.*, 2000)。其中L1、L2 β -lactamase 的表現及 efflux system (SmeABC and SmeDEF)的機制與 *S. maltophilia* 的多重抗藥性有密切的關係(Gould *et al.*, 2006)。

第三節 β -lactam 抗生素

β -lactam為全世界廣泛應用於醫療上的抗生素。 β -lactam抗生素包括四大類：penicillins、cephalosporins、carbapenem、monobactam Penicillins類的抗生素包括有：benzylpenicillin (penicillin G)，oxacillin，ampicillin，piperacillin，carbenicillin…等。Cephalosporins類的抗生素包括有cephaloridine，cefuroxime，cefoxitin，ceftriaxone，cefotaxime，cefoperazone，cefepime…等。Carbapenem類的抗生素包括有imipenem，meropenem …等。而aztreonam則屬於monobactam類的抗生素。此四類

β -lactam 抗生素都有一共同的 β -lactam ring 結構。

第四節 β -lactamase 的分類及命名

對於 β -lactamase 分類的方式繁多，目前學者常以 Bush 所提出的分類方式將 β -lactamase 區分為四大類 (Bush & Sykes, 1986)。主要依 β -lactamase 的功能作為分類的標準：包括受質的種類及其活性是否可被抑制物抑制而分為四大類。第一類 (Group 1) 酵素受質為 cephaloridine 及 cephalothin，不受 clavulanic acid 抑制，第二類 (Group 2) 酵素均可被 clavulanic acid 抑制，又依其受質種類不同而分為五個次分型，依序從 2a 到 2e: Group 2a 是屬於 penicillinases 但會被 clavulanic acid 抑制，Group 2b 是屬於 broad-spectrum β -lactamases 其受質為 penicillin 及 cephalosporins 類抗生素但會被 clavulanic acid 抑制，Group 2c 是屬於 carbenicillin-hydrolyzing β -lactamases 其受質為 cephalosporins，也會被 clavulanic acid 抑制，Group 2d 是屬於 cloxacillin-hydrolyzing β -lactamases 其受質為 cloxacillin，也會被 clavulanic acid 抑制，Group 2e 是屬於 cephalosporin-hydrolyzing β -lactamases 其受質為 cephalosporin 也會被 clavulanic acid 抑制。第三類 (Group 3) 酵素為含有鋅的酵素，又稱為金屬酵素 (metallo-enzyme)，不受 clavulanic acid 抑制，受 EDTA 所抑制其酵素受質為 imipenem。第四類 (Group 4) 是一群不受 clavulanic

acid 抑制的 penicillin-hydrolyzing β -lactamases，其特性目前仍在研究中，尚未定論。除了 Bush 的分類方式外，Ambler 提出依酵素胺基酸序列分類的方式 (Ambler *et al.*, 1980)，大致可將 β -lactamase 分為 A, B, C, D 四類：A、C、D 是屬於以 serine 作為催化機制的酵素 (serine active-site enzyme)，皆有 S-X-X-K motif 結構，而胺基酸 Ser 是 active site residue。B 是屬於含鋅的酵素，受 EDTA 所抑制 (Ambler *et al.*, 1980)。整理於附錄 (一)

第五節 *S. maltophilia* 之 L1 及 L2 基因

位於 *S. maltophilia* 染色體上含有兩個可以 encode 出 β -lactamase 的 L1 及 L2 基因。不論是 L1 或 L2 β -lactamases，其 N 端包含大約 20 個胺基酸的訊號胜肽鍊 (signal peptide) (Walsh *et al.*, 1997)，在細胞質產生的 β -lactamase 是前趨物，最後成熟的 β -lactamase 會被送到細胞膜的外膜與內膜間，在通過細胞內膜時 signal peptide 會被切除，signal peptide 具有一個 hydrophobic core region 以利將 secreted polypeptide 插入內膜，在 hydrophobic core region 前 N-terminal 帶有正電荷胺基酸，會與細胞膜上帶有負電荷的 phospholipids 產生吸引，而 core region 後的 C-terminal 則會有帶極性的胺基酸，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 以讓 signal peptidase 切斷 (Izard &

Kendall, 1994)。根據報導知道 L1 是一個需要鋅 (Zn^{2+}) 的 metallo-beta-lactamase, 一個分子可以結合約 2 分子的 Zn^{2+} (Bush *et al.*, 1995), 依 Bush 的 β -lactamases 分類來說, L1 是屬於 Group 3, 且會受 EDTA 的抑制 (Yush *et al.*, 1982), 在 Ambler 的 β -lactamases 分類是屬於 Group B, 而以 Bush-Jacoby-Medeiros 分類是屬於 Group 3a, (Bush *et al.*, 1995)。L1 可水解的抗生素受質主要為 penicillins 型的抗生素, 部份 cephalosporins 型的抗生素及 carbapenems 型抗生素亦可被水解, 但 L1 不能分解 monobactam 型的抗生素。L1 蛋白為 homotetramer 的結構, 分子量約 118 kDa, 為 neutral 或 acidic 的蛋白, *S. maltophilia* 的 L1 的 GC content 平均 68.4% 左右, 在臨床分離菌株發現 *S. maltophilia* 的 L1 基因具有 8~12% 的變異性 (Avison *et al.*, 2001)。而 L2 是 serine active-site cephalosporinase, 在 Ambler 的 β -lactamases 分類是屬於 Group A, 而以 Bush-Jacoby-Medeiros 分類是屬於 Group 2e, 會受 clavulanic acid, tazobactam, sulbactam 等所抑制 (Denton *et al.*, 1998), L2 可水解的抗生素受質主要是 cephalosporins 類的抗生素、部分 penicillins 型的抗生素及 monobactams, L2 不能水解 cefoxitin 這個抗生素及 carbapenem 型的抗生素 (Saino *et al.*, 1984)。L2 的蛋白為 dimer 的結構, 分子量約 56 kDa, 為 basic 的蛋白, GC content 約為 71.6%, 具有 S-T-D-K、S-D-N、K-T-G 的高度保留序列 (Walsh, *et al.*, 1997), 在臨床分離菌株發現 *S. maltophilia* 的 L2 基因具有 9~25% 的變異性 (Avison, *et al.* 2001)。L1

與L2 蛋白整理於附錄四。

第六節 L1與L2基因誘導分析

在 Paton ,1994 報導研究中指出 *S. maltophilia* 的 L1 和 L2 基因是共同被誘導產生 β -lactamases。但是在 Avison 等人(Avison *et al.*, 2002) 的報導研究間接知道 L1 和 L2 是透過不同的誘導機制產生 β -lactamases。為了更進一步去了解 L1 與 L2 基因是被 β -lactam 抗生素共同誘導(co-induction)或是個別被誘導(differential induction)；在本研究中，藉由不同的誘發條件，分別分析 L1 及 L2 基因被誘發的程度，希望能對 L1 及 L2 基因的誘導機制有更清楚地瞭解。

第七節 β -lactamase 抑制劑

β -lactamase 抑制劑有 clavulanic acid、penicillanic acid sulfones sulbactam、EDTA、iodine、YTR 830、7-acetylmethylenepenicillanic acid (AMPA)、或一些離子...等。這些 β -lactamase 抑制劑在抑制 β -lactamase的機制上不盡相同。如：EDTA可以和活化 β -lactamase 所需之二價陽離子產生螯合作用，而使 β -lactamase 失活，如 *S. maltophilia* 的 L1 β -lactamase 即會受到 EDTA 而失去活性。文獻指出(Saino *et al.*, 1982)將菌株 *S. maltophilia* GN12873 的 L1

β -lactamase純化後，在50 mM phosphate buffer (pH 7.0)的環境下，將L1 β -lactamase水解 100 μ M penicillin G 的水解能力視為 100%；但純化之L1 β -lactamase和 0.1 mM EDTA 作用後，其水解 100 μ M penicillin G 的活性只剩約 3%，所以0.1 mM EDTA可抑制97% L1 β -lactamase的活性。文獻(Saino *et al.*, 1984)報導中菌株 *S. maltophilia* GN12873 L2 β -lactamase純化後，在50 mM phosphate buffer (pH 7.0)的環境下，將L2 β -lactamase水解100 μ M cephaloridine 的活性視為 100%；L2 β -lactamase和 1 mM EDTA作用後，L2 β -lactamase 對100 μ M cephaloridine 的水解活性約為原來的 96%，所以1 mM EDTA 可抑制4% L2 β -lactamase的活性。此類型的抑制機制，EDTA 不會和 β -lactamase的受質產生競爭的效果。而另一種抑制 β -lactamase的機制如：clavulanic acid、sulbactam... 等抑制劑，是在結構上相似於 β -lactam，因此會和 β -lactamase的受質產生競爭的效果，而這類抑制劑跟 β -lactamase的親和性皆很好，因此容易結合在 β -lactamase的活化位置上，進而使 β -lactamase 酵素無法水解受質。在以往的文獻 (Saino *et al.*, 1982)，曾經評估 *S. maltophilia* GN12873 所純化之 L1 β -lactamase 受 clavulanic acid 及 sulbactam 抑制的情形。以 100 μ M penicillin G 做為分析受質，clavulanic acid 及 sulbactam 對 L1 酵素之 K_i 值分別為 $>100 \mu$ M 及 24.5μ M。所以對 L1 β -lactamase

而言，clavulanic acid 及 sulbactam 皆不是很好的抑制物。而在L2 β -lactamase 部份，(Saino *et al.*, 1984)曾經評估 *S. maltophilia* GN12873 所純化之L2 β -lactamase 受 clavulanic acid 及 sulbactam 抑制的情形。以100 μ M cephaloridine做為分析受質，clavulanic acid 及 sulbactam 對 L2 酵素之 K_i 值分別為 0.58 μ M 及1.87 μ M。所以對 L2 β -lactamase 而言，clavulanic acid 及 sulbactam 皆是好的抑制物。臨床上有些 β -lactamase 抑制劑常會和併 β -lactam型的抗生素作為用藥，例如：ticarcillin/ clavulanic acid、amoxicillin/clavulanic acid、ampicillin/sulbactam、aztreonam/ clavulanic acid..等。這樣的合併使用常用於會產生 β -lactamase 的菌株。如：*Pseudomonas aeruginosa*、*Bacteroides fragilis*、*Citrobacter diversus*...等。關於 *Stenotrophomonas maltophilia*對於合併藥物治療在文獻中有報導(Arpi *et al.*, 1996) 作者收集124個臨床菌株，從agar dilution的方法發現124個臨床菌株對藥物比例為 aztreonam/ clavulanic acid (1/1) 呈現85%感受性；trimethoprim-sulfamethoxazole (1/19)呈100%藥物感受性；對 amoxicillin/clavulanic acid (2/1)及ampicillin/sulbactam(2/1)皆呈現100%抗性結果；(Mun~oz Bellido *et al.*, 1997)作者收集32個臨床菌株，從agar dilution的方法發現32個臨床菌株對aztreonam/ clavulanic acid (2/1)呈現100%抑制、對amoxicillin/clavulanic acid (2/1)及ampicillin/sulbactam

(2/1)皆呈現100%抗性結果。文獻中(Smit *et al.*, 1994) 作者收集55個臨床菌株，從 agar dilution 的方法發現，55個臨床菌株對 trimethoprim/sulfamethoxazole (1/19) 藥物呈 94% 感受性，對 ticarcillin/clavulanic acid (clavulanic acid 固定濃度在 2 μ g/ml) 藥物呈 71% 感受性；對 Amoxicillin/clavulanic acid (2/1) 藥物呈 100% 抗性。文獻中(García-Rodríguez *et al.*, 1991) 作者收集42個臨床菌株，以 agar dilution 的方法發現，*S. maltophilia* 對 trimethoprim/sulfamethoxazole (1/19) 藥物呈 100% 感受性，對 aztreonam/clavulanic acid (1/1) 呈 32.4% 感受性，對 aztreonam/clavulanic acid (2:1) 呈 100% 感受性。所以作者推測在治療 *S. maltophilia* 當 aztreonam/clavulanic acid (2:1) 有 synergistic activity。文獻中報導(Wang *et al.*, 2004) 作者收集1999到2003年台灣北部醫院的檢體，利用 agar disk diffusion 的方式發現72個檢體中有36個檢體對 ticarcillin/ clavulanic acid 固定濃度在 2 μ g/ml) 藥物呈感受性；60個檢體中有30個檢體對 trimethoprim/sulfamethoxazole (1/19) 藥物呈感受性。相關 β -lactams /clavulanic acid 整理於附錄五。

第二章 研究目的

將臨床所收集到的菌株 *S. maltophilia* N，前人利用 gene replacement 策略分別得到突變株 NL1⁻及 NL2⁻，分別改變不同的誘發條件研究 *L1*, *L2* 二基因受誘發的情形。所研究的誘發條件包括：(1)在培養基中加入人類血清(2)在培養基中加入不同濃度的 clavulanic acid (3)改變培養基中碳源的成份(4)在培養基中中加入能抗癌的藥物 hesperetin 及能治療 benign prostatic hypertrophy (BPH)的疾病的 β -sitosterol。另一方面，評估不同組裝的療方(combination regimen) 對菌株 N, NL1⁻ 及 NL2⁻ 抗生素感受性的影響。

第三章 研究的重要性

目前，對於*S. maltophilia* 染色體中的兩個基因*L1*, *L2* 的誘發調控研究甚少，在本篇研究中利用原菌分別將*L1*, *L2* 基因以插入突變法分別得*L1*⁻ 及 *L2*⁻ 突變株。將所得的*NL1*⁻ 及 *NL2*⁻ 突變株，設計不同的誘發條件分別使*L1*, *L2* 基因被誘發(induction)後，評估*L1*, *L2* 基因promoter 分別被誘發(induction)的情形。進而了解*L1*, *L2* 兩個基因在*S. maltophilia* 中之誘發表現之機制。在感染*S. maltophilia*時，常使用β-lactamase的抑制劑合併其他β-lactam抗生素一起治療。本研究評估多種不同組裝 *L2* 抑制劑/β-lactam 藥物對臨床 *S. maltophilia* 分離菌株的抗生素感受性。並以菌株 *S. maltophilia* N 及其 isogenic mutants *NL1*⁻ 及 *NL2*⁻ 突變株作為材料，研究藥物組合為拮抗(antagonism)或協同(synergism)作用的可能機制。

第四章 研究方法

第一節 研究材料

一、 菌種及質體列於附錄一。

二、 藥品

本實驗中所使用的藥品及有機溶劑購自 E. Merck, J. T. Backer Company, Sevrva Frvafeinrobiochemica, Boehringer mannhrim GmhH Biochemical, Pharmacia, Sigma Chemical Company, Biosolve 及日本和光藥物公司。

細菌培養基使用的藥品購買自 Difo Laboratories 和 Accumedia manufacturers, Inc.。抗生素藥品是向 Sigma Chemical Company, BBL™ 購買。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、DNA polymerase I Klenow fragment 購買自 promega Co.。β-sitosterol 及 hesperetin 由林振文老師實驗室提供。結構列於圖十、十一。

三、 引子

本實驗所使用的引子

(stock solution concentration 100 μM, working concentration 10μM)

1. M13-F (20 mers)

5'-ACATTGCCTACTACACCTCC-3'

2. M13-R (20 mers)

5'-GGCTCGACTCTGTAAAGAGC-3'

3. Tc-F (18 mers)

5-CGTCAGGTGGCACTTTTC -3

4. Tc-R(19 mers)

5-GGCTTCCATTCAGGTCGAG-3

四、培養基

本實驗中所使用的培養基配方是參照 Sambrook *et al.* (1989)。

1. Luria-Bertani broth medium (LB)：其成分為每 1 公升水中含有 10g tryptone，5g 的 yeast extract 及 5g 的 NaCl。
2. Luria-Bertani agar (LA)：於 LB broth medium 中加入 1.5% agar。
3. Mueller-Hinton agar(MHA): 其成分為每 1 公升水中含有 17.5g acid hydrolysate of casein，2g 的 beef extract 及 17g 的 agar。
4. XOL medium：每公升的水中含有 0.7 克 K_2HPO_4 、0.2 克的 KH_2PO_4 、1 克的 $(NH_4)_2SO_4$ 、0.1 克的 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、0.1 克 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、及 0.001 克 $MnCl_2$ (pH7.0)。並外加適當濃度之醣類作為碳源。
5. XOLN medium：在 XOL medium 中，加入 0.0625% yeast extract、

0.0625%tryptone，並外加適當濃度之醣類作為碳源。

五、血清

1. 依標準抽血程序抽取健康人血液約 20cc 將血液置於無凝固劑的無菌試管中。
2. 將試管放置於室溫 30min 後，以 3000rpm，5min 離心取上清液。
3. 將剩餘血清檢體保存於-20℃。

六、試劑與緩衝溶液

1. 抽取質體 DNA 試劑

質體 DNA 之抽取是依照 Birnboim & Doly (1979) 所述之 alkaline method 修飾後進行。所需試劑如下：

(1) Solution I : 25 mM Tris HCl (pH 8.0)，10mM EDTA (pH8.0) 及 50 mM glucose。

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

(3) Solution III : 3 M potassium acetate (pH4.8) 及 5 M glacial acetic acid。

2. DNA 電泳試劑

(1) 6× Loading dye : 0.25% (w/v) bromophenol blue，0.25

% (w/v) xylene cyanol 及 30% (w/v) glycerol 。

- (2) 0.5× TAE running buffer : 40 mM Tris-acetate (pH 8.0) 及 2 mM EDTA (pH 8.0) 。
- (3) Staining buffer : 1mM EDTA (pH8.0) , 10mg/ml EtBr , 100μl EtBr , 100μl RNase A 及 150 ml 去離子水 。

3. catechol 2,3-dioxygenase 活性測試所需試劑

- (1) Potassium phosphate buffer, 0.1M pH7.5

Solution A : 27.2g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ per liter(0.2M)

Solution B : 34.9g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ per liter(0.2M)

再以 solution A 16 ml 加 solution B 84 ml, 後加去離子水至 200 ml

- (2) Assay buffer

取 80 ml 0.1M pH7.5 potassium phosphate buffer 及 20 ml 10% acetone , 後加去離子水至 200 ml

- (3) 0.1M catechol

1.1g catechol 粉末溶至 100ml Assay buffer , 使用其完全溶解後 , 再保存於 4°C 。

4.β-lactamase 活性測試所需試劑

(1) Sodium phosphate buffer, 0.1M pH7.0

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

Solution B : 53.65g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ per liter(0.2M)

再以 solution A 39 ml 加 solution B 61 ml, 後加去離子水至 200 ml

(2) Potassium phosphate buffer, 0.1M pH7.0

Solution A : 27.2g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ per liter(0.2M)

Solution B : 34.9g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ per liter(0.2M)

再以 solution A 39 ml 加 solution B 61 ml, 後加去離子水至 200 ml

(3) Nitrocefin

1 mg Nitrocefin 粉末溶至 100 μl dimethylsulfoxide (DMSO), 使用其完全溶解後, 再加入 1.9 ml phosphate buffer 至 2ml, 保存於 -20°C 。

(4) CENTA

25g CENTA粉末溶至46ml 50 mM Potassium phosphate

(pH 7.0)，使用其完全溶解後，再分裝0.8ml於eppendrof
中，保存於-20°C。

(5) Protein determination

Bio-Rad 200 μ l，Cell extract 20 μ l，去離子水 780 μ l，再以
OD 595nm 測試。

5. EDTA ，0.5M pH8.0

146.125g EDTA 及 67.41g NaOH 粉末溶至去離子水中
調整 pH 值為 8.0，總體積為 1L。



第四章 研究方法

第二節 實驗方法

一、菌種的培養與保存

1. 短期保存

將 *S. maltophilia* 菌株培養於不含抗生素的固態培養中，放置於 37°C 培養箱培養一晚後，可放置 4°C 短暫保存 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液態培养基中，37°C 震盪培養一晚，視菌種的生長速度，在對數期間 (log phase) 取 0.7ml 的菌液加入 0.3ml 87% 無菌 glycerol，使細菌與甘油的比例為 3:1，混合均勻存放於抗凍管中，並在管上貼上標籤註明編號、菌種名稱和製做日期，存放於 -80°C 備用。

二、質體之抽取

將含有質體之菌株培養於 3ml 液態培养基的小空瓶中，可視情況加入合適濃度之抗生素，37°C 震盪培養一晚，視菌種的生長速度，在對數期間 (log phase)，分裝至 1.5ml eppendorf 中，以 8000rpm 5 分鐘離心，去除上清液後加入 100ul solution I 溶液，使菌體重新懸浮，置於室溫中 5

分鐘。再加入 200 ul solution II 溫和上下倒置數次後，置於冰上 5 分鐘。再加入 150ul solution III 上下倒置數次後再置於冰上 10 分鐘。接著以 12000rpm 10 分鐘離心，取上清液至另一新的 eppendorf 中以 1 比 1 比例加入 phenol/chloroform 混合均勻以 12000rpm 5 分鐘離心後取上清液至另一 eppendorf 中，重複數次使界層無雜質後再加入等量 chloroform 混合均勻，12000rpm 5 分鐘離心，取上清液至另一 eppendorf 中加入二倍體積 95%酒精，混合均勻置於冰上 10 分鐘後，再以 12000rpm 10 分鐘離心，去除酒精得沉澱質體 DNA，等酒精揮發乾後回溶適當無菌水中儲存於 4 °C 或 -20°C 備用。

三、 洋菜膠體電泳分析

取洋菜粉(agarose)加熱溶於 0.5 倍的 TAE 電泳緩衝液中，配置成 0.8 %或 1.0%的膠體後，待膠體冷卻至 50-60°C 時，倒入鑄膠槽中並插上齒梳(comb)。待洋菜膠體冷卻凝固後，拔掉齒梳，將樣品 DNA 與 1/6 體積的 6 倍的 loading dye 混合均勻後，加入膠體之溝槽中，並於同一片膠體的另一溝槽中注入適量之 1kb DNA marker 作為對照，以 50 或 100 伏特通電經適量時間後，取出膠體，將其浸泡於含 0.5 μ g/ml ethidium bromide(EtBr)之水溶液中經適當時間後再將膠體取出以去離子水退染 3-5 分鐘，置於 UV 燈下觀察並照相。可藉由與 DNA marker 已知的片

段的量與分子大小。

五、DNA 片段回收

DNA 片段回收使用 GeneMark DNA Clean/Extraction Kit，將要分離的 DNA 片段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，使用刀片切取欲回收 DNA 片段的膠體，分裝至 eppendorf 中，加入 500-700 ul Binding solution，置於乾浴機 65°C 加熱 30 分鐘，時而上下倒置搖晃，待膠體完全溶解後，再吸取溶液至 Kit 提供的 Spin column 中，下接 Collection column，以 12000rpm 3 分鐘，再加入 500ul Washing Solution 12000rpm 5 分鐘，重複二次，打開 Spin column 蓋子待酒精揮發後，再視情況加入適量無菌水於 Spin column 中，於室溫作用數分鐘後，以 12000rpm 離心 10 分鐘，即得回收產物，置於 4°C 備用。

六、限制酶切割

利用限制酶可辨認特定序列的特性，將 DNA 與所需要的一至兩種限制酶及配合廠商建議的緩衝溶液混合，以及廠商所建議限制酶的反應溫度，進行 DNA 切割反應，反應時的 DNA 濃度約為 1ug/50ul，反應時間視選擇限制酶的種類而調整，完成後再以洋菜膠體電泳分析切割情形。

七、DNA 片段之黏合反應

將所選擇的載體經限制酶切割後，再與需接黏的 DNA 片段以適當比例混合均勻，並加入 1ul T4 黏接酶及廠商建議的緩衝溶液，最後用無菌水補齊體積為 20ul，混合均勻，置於 16°C 下作用 12-16 小時，即完成連接作用(Ligation)。

八、*E coli* DH5 α 勝任細胞 (competent cell) 之備製

先將隔夜培養的 *E coli* DH5 α 菌液以合適比例接種至 40ml 液態培養基中，37°C 震盪培養至 OD₆₀₀ 0.5-1.0，將菌液以 4°C, 8000rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，再加入 20ml 100mM CaCl₂ 混合，置於冰上 30 分鐘，再以 4°C 8000rpm 離心 10 分後，去除上清液，再以 100mM CaCl₂ 回溶至適當的濃度，使菌種懸浮於其中就成為勝任細胞即可使用，未使用之勝任細胞可至於 4°C 中備用。

九、*E coli* DH5 α 之轉形作用

取適量 DNA 或質體加入 100ul 勝任細胞，置於冰上作用 10 分鐘後，再置於 42°C 水浴槽中進行熱休克(heat shock)反應 2 分鐘，再快速移回冰上再作用 2 分鐘，再加入 500ul 液態培養基，37°C 震盪培養約 2 小時，再 8000rpm 5 分鐘離心，最後再塗於含有篩選抗生素的固態培養基上。37

°C 隔夜培養。如果質體帶有 β -galactosidase 基因，則視所需加入 IPTG(0.8mg/ml)及 X-gal(0.8mg/ml)以進行藍白篩選。

十、質體快速篩檢法

使用已滅菌的牙籤挑選各個單一的轉形菌株，分別接種於含有合適抗生素 1ml 的液態培養基中，37°C 震盪培養 6-8 小時，以 12000rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入含有 20ul 1%SDS 的 loading dye，劇烈震盪使沉澱物完全打散，再各加入等體積的 phenol/chloroform，混合均勻後，以 12000rpm 10 分鐘離心，吸取 10ul 上層液進行洋菜膠電泳分析，並將僅含有載體的菌株以上述同樣方法注入同一洋菜膠體中，做為對照組。

十一、聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction , PCR)

取 5ul 的染色體或 DNA 片段當作模板，加入 5ul 的 1.25mM dNTPs (dATP、dTTP、dGTP、dCTP)，加入 10X Taq DNA polymerase buffer 5ul，再個別加入適當引子 5ul，DMSO 5ul 和 1ul 的 polymerase，最後加無菌水至 50ul。均勻混合後，再視條件設定反應所需的循環溫度，最後完成 PCR 產物置於 4°C 備用。

十二、破菌法：

1. 超音波破菌法(sonocator)

將隔夜培養的菌液以 OD₅₅₀ 0.2 接種至 20ml 液態培養基中，37°C 震盪培養至 OD₅₅₀ 0.7~0.8，加入抗生素(inducer)或不加抗生素(no inducer)誘導，在誘導的時間後，將菌液裝於 50 ml 的離心管，將菌體離心 12000 rpm(5~15 分鐘)，用 0.33 M NaOH 當做緩衝濃液洗菌三次，再將菌體離心 12000 rpm (5~15 分鐘)將菌體上清液倒去。將菌體以適當的緩衝溶液 (Sodium phosphate 或 Tris-HCl) 回溶 2 ml，將菌體劇烈搖晃倒菌體散開，將菌液置於冰上並將破菌的探針插入菌液液面下破菌，破菌條件為 2.5 W，10 分鐘(打 10 秒停 10 秒)，破完菌後，將菌液以 12000 rpm 離心 20 分鐘，收上清液。

2. 外膜破菌收蛋白法(Lysozyme):

將隔夜培養的菌液以 OD₅₅₀ 0.2 接種至 20ml 液態培養基中，37°C 震盪培養至 OD₅₅₀ 0.7~0.8，並用抗生素給予誘導反應後，再以 8000rpm 5 分鐘離心，取 pellet，加入 2ml 0.33M NaCl 使菌體重新懸浮，以 8000rpm 5 分鐘離心，重複三次上步驟，加入 1.2ml(含 1mM EDTA，1mg/ml lysozyme，20% sucrose/30mM Tris-HCl(pH8.0)) 回溶，置冰上作用 1 小時。再以 12000rpm 離心 30 分，取上清液分裝至 eppendorf 中，保存於 -80°C 中備用。

十五、抗生素感受性試驗

1. 抗生素培養基之配製

本實驗抗藥性測試的方法主要是依照 agar dilution method。

泡製 2 倍數系列稀釋的抗生素濃度的 Mueller-Hinton 培養基。

所使用的抗生素包括：pencillin 類抗生素（如 carbenicillin, piperacillin、amoxicillin、ticarcillin、piperacillin）、clavulanate、aztreonam、trimethoprim、sulfamethoxazole 泡製的濃度為 2-256 $\mu\text{g/ml}$ 。

2. 將隔夜新鮮培養，濁度為 0.5 McFarland 的菌液稀釋 3 倍，以 multipoint inoculator 接種至含有不同濃度抗生素的 Mueller-Hinton 培養基上，使得每一接種點有 10^4 的菌落數($10^4/\text{spot}$)，以 *E. coli* DH5 α 菌株做為為陰性對照組，培養於 37°C 培養箱中，24 小時後觀察並紀錄其生長情形。

3. Synergy 及 antagonism 的定義

對一菌株而言，若該菌株進行抗藥性感受性試驗，對 β -lactam/inhibitor 所表現之 MIC 與對單一該 β -lactam 所表現之 MIC 的比值 ($\text{MIC } \beta\text{-lactam/inhibitor}/\text{MIC } \beta\text{-lactam}$) ≤ 2 時，定義為 Synergy; 若此比值 2 時定義為 antagonism。(Lecso-Bornet M & Bergogne-Bérézin E, 1997)

十六、生長曲線測定

將待測之菌株培養於 LB 或 XOLN 液體培養基培養隔夜，取些許液體培養基懸浮菌體以適當濃度在 OD₄₅₀ 中測其吸光值，將菌液接種至新鮮 LB 或 XOLN 液體培養基中，調整菌液起始濃度使其 OD₄₅₀ 之吸光值為 0.3-0.35 之間，置於 37°C 培養箱震盪培養，每隔 30min 取出菌液，每株分析樣本皆取樣兩份，測其 OD₄₅₀ 吸光值。

十七、catechol-2, 3-dioxygenase 酵素活性分析

將菌液的起始濃度 OD₄₅₀ 調整為 0.3-0.35 之間，加入依實驗需求不同之條件變化，置於 37°C 培養箱震盪培養。約培養 40-60 min 後加入不同濃度的抗生素或藥品試劑後，繼續培養依不同時間收菌液，每次所收取的菌液皆為 1 ml，以 8000 rpm，5 min 離心去除上清液，回溶於 1 ml 的 C230 assay buffer 中，調適當反應濃度後置於石英管中以 OD₃₇₅ 先 Blank 後，在加入受質 (0.1 M catechol) 於 375 nm 測其吸光值。catechol-2, 3-dioxygenase 酵素活性分析皆維持低溫環境中。酵素活性定義一單位(U)為在室溫下，50 mM potassium phosphate (pH7.5) 環境下，一分鐘內水解 1 nmole catechol 所需的 catechol-2, 3-dioxygenase 量。

十八、β-lactamase 酵素活性分析

1. 取待測液 450 μ l 加入 50 μ l nitrocefin 混合均勻至比色計石英管中利用比色計測定在 486 nm 波長時吸光值的變化，每 10 秒紀錄一次，總測量時間為 3 分鐘。所得之吸光值變化以 extinction coefficient 常數 ($\epsilon_{\Delta 486} = 16,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 換算在每一分鐘 nitrocefin 被分解的量。蛋白質定量利用 Bio-Rad protein assay kit 測得。最後 β -lactamase 酵素活性 specific activity (U/mg) 以菌液蛋白量每一 mg 中含有多少酵素活性 (U) 表示之。酵素活性定義一單位(U)為在室溫下， sodium phosphate (pH7.0) 環境下，一分鐘內水解 1 nmole nitrocefin 所需要的 β -lactamase 量。

2. 取待測液 450 μ l 加入 50 μ l CENTA 混合均勻至比色計石英管中利用比色計測定在 405nm 波長時吸光值的變化，每 10 秒紀錄一次，總測量時間為 3 分鐘。所得之吸光值變化以 extinction coefficient 常數 ($\epsilon_{\Delta 405} = 6400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 換算在每一分鐘 CENTA 被分解的量。蛋白質定量利用 Bio-Rad protein assay kit 測得。最後 β -lactamase 酵素活性 specific activity (U/mg) 以菌液蛋白量每一 mg 中含有多少酵素活性 (U) 表示之。酵素活性定義一單位(U)為在室溫下， sodium phosphate (pH7.0) 環境下，一分鐘內水解 1 nmole CENTA 所需要的 β -lactamase 量。(Bebrone *et al.*, 2001)

十九、抑制劑分析

1. 取 $200\ \mu\text{l}$ 的 EDTA (0.5M , $\text{pH}8.0$) 加入已稀釋好的 Cell extract $800\ \mu\text{l}$, 混合均勻後使之 EDTA 濃度為 $100\ \text{mM}$ 置室溫 10 分鐘後, 以 CENTA 為受質, 取 $490\ \mu\text{l}$ 至比色管中加入 $10\ \mu\text{l}$ CENTA 利用分光光度計在 $405\ \text{nm}$ 波長下測定吸光值的變化, 測試 EDTA 濃度依序為 100 、 150 、 200 、 $250\ \text{mM}$ 。

2. 取 $0.4\ \mu\text{l}/\text{ml}$ 的 clavulanic acid 加入已稀釋好的 Cell extract $999\ \mu\text{l}$, 混合均勻後使之 clavulanic acid 濃度為 $4\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 置室溫 10 分鐘後, 以 ENTA 為受質, 取 $490\ \mu\text{l}$ 至比色管中加入 $10\ \mu\text{l}$ CENTA 利用分光光度計在 $405\ \text{nm}$ 波長下測定吸光值的變化, 測試 clavulanic acid 濃度依序為 8 、 10 、 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

十九、蛋白質濃度測定

取 $200\ \mu\text{l}$ Bio-Rad protein assay 染劑加入 dd H₂O $780\ \mu\text{l}$, 加入已稀釋好的 Cell extract $20\ \mu\text{l}$, 混合均勻後至比色管中利用分光光度計在 $595\ \text{nm}$ 波長下測定吸光值的變化, 並分析蛋白質濃度。

第五章 研究結果

第一節 重組質體之構築

質體 pOKXT_{HindIII} 之構築(*xylE-Tc* 基因套組)

以質體 pEX18Tc 當作模板,利用 Tc-F (5-CGTCAGGTGGCA CTTTTC -3) 及 Tc-R (5-GGCTTCCATTCAGGTCGAG-3)當引子進行 PCR。條件為 94°C 10 分鐘; 30 個循環的 94°C 1 分鐘, 50°C 1 分鐘, 72°C 1 分鐘; 最後 72°C 5 分鐘。PCR 產物以 0.8% 洋菜膠體電泳分離確定, 所得產物片段大小為 1408 bp, 回收 1408 kb 的 DNA 片段後, 以 T-Vector 承接後經轉形作用送入 *E.coli* DH5 α 勝任細胞內。以含有 ampicillin 100 μ g/ml 及 tetracyclin 10 μ g/ml 的 LB 平板培養基進行篩選, 得到具有抗 ampicillin 及 tetracyclin 的轉殖株。抽取其質體 DNA, 以限制酶切割檢查確定無誤後, 將構築的質體命名為 pTTc。

將質體 pTTc 以限制酶 *Bam*HI 與 *Xba*I 處理後, 回收約 1480 kb 的 DNA 片段, 將此片段與已經被 *Bgl*II 與 *Xba*I 處理後的載體 pTXylERI(前人所構築, 具 *xylE* 基因, 可表現 C23O 活性) 承接後, 經轉形作用送入 *E. coli* DH5 α 勝任細胞內。以含有 ampicillin 100 μ g/ml 及 tetracyclin 10 μ g/ml 的 LB 平板培養基進行篩選, 得到具有抗 ampicillin 及 tetracyclin 的轉殖株。抽取其質體 DNA, 以限制酶切割檢查後, 將構築的質體命名為 pTXylETc。

將質體 pTXylETc 轉殖於載體 pOK12，經轉形作用送入 *E. coli* DH5 α 勝任細胞內。以含有 kanamycin 100 μ g/ml 及 tetracyclin 10 μ g/ml 的 LB 平板培養基進行篩選，得到具有抗 kanamycin 及 tetracyclin 的轉殖株。將構築的質體命名為 pOKXylETcRI。

將質體 pOKXylETcRI 轉殖於載體 pX1918GT，經轉形作用送入 *E. coli* DH5 α 勝任細胞內。以含有 ampicillin 100 μ g/ml 及 tetracyclin 10 μ g/ml 的 LB 平板培養基進行篩選，得到具有抗 ampicillin 及 tetracyclin 的轉殖株。可得在 *xylE-Tc* 基因套組兩側有一系列對稱的多重限制酶切位，將此構築的質體命名為 pXXT。

將具 *xylE-Tc* 基因套組的質體 pXXT 轉殖於載體 pOK12，經轉形作用送入 *E. coli* DH5 α 勝任細胞內。以含有 kanamycin 100 μ g/ml 及 tetracyclin 10 μ g/ml 的 LB 平板培養基進行篩選，得到具有抗 kanamycin 及 tetracyclin 的轉殖株。將構築的質體命名為 pOKXT_{HindIII}。如圖一

第二節 *S. maltophilia* N isogenic mutant NL1⁻ 及 NL2⁻ 獲得

菌株 *S. maltophilia* N 的來源來自中國醫藥大學附屬醫院臨床細菌室，前人利用 gene replacement 策略分別將 *L1*, *L2* 基因以 *xylE-Tc* 基因套組插入，得到突變株 NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株。如圖二及圖三所示。

第三節 誘發 (induction) *Stenotrophomonas maltophilia* 菌株 *L1* 及 *L2*

基因啟動子表現因素之研究

一、人類血清對 *Stenotrophomonas maltophilia* 菌株 *L1* 及 *L2* 基因啟動子誘發 (induction) 的影響

將 NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株，分別培養在兩種培養基中，一種為 LB 培養基，另一種為加入 5% 的健康人血清之 LB 培養基。在這兩種培養基中又分有加入抗生素 (cefuroxime, 50 µg/ml) 及不加抗生素的對照組。將這兩個突變株培養於上述四種培養基後於一定時間後收菌，以 OD₄₅₀ 測得 *S. maltophilia* 的生長情形，並以 C230 assay buffer 破菌測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。由實驗結果得知 N strain 的 NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株在有加入 5% 的健康人血清的 LB 培養基培養後，對於菌株的生長上是沒有差異的。所以，將 NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株培養於有加入 5% 的健康人血清的

LB 培養基中，不會影響到菌株的生長。加入抗生素(cefuroxime, 50 µg/ml)後對於 NL1⁻及 NL2⁻這兩個突變株的生長情形也是沒有差異。所以，將 NL1⁻及 NL2⁻突變株培養於加抗生素(cefuroxime, 50 µg/ml)的 LB 培養基中，不會影響到菌株的生長。從實驗中也發現 NL1⁻及 NL2⁻這兩個突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 的活性，在 5%的健康人血清培養基中沒有明顯可測得的活性，顯示只有 5% 健康人血清並不能誘發 *L1* 或 *L2* 基因啟動子的表現。加入抗生素(cefuroxime, 50 µg/ml)後， NL1⁻及 NL2⁻這兩個突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 的活性有增加，但其活性的表現量與加有 5%的健康人血清及抗生素(cefuroxime, 50 µg/ml)的實驗組相比，並沒有明顯的差異，所以，5% 的健康人血清對 cefuroxime 誘發 *L1*、*L2* 基因啟動子表現的能力沒有明顯的影響。此外，在受到 cefuroxime 誘發表現的 NL1⁻ 及 NL2⁻ 菌株，catechol-2,3- dioxygenase 活性的表現量都是 NL2⁻大於 NL1⁻。所以，由實驗中可知 cefuroxime 對 *L2* 基因啟動子的誘發能力大於對 *L1* 基因啟動子的作用。NL1⁻及 NL2⁻突變株在 5% 人類血清的影響下其生長情形及 catechol-2,3-dioxygenase 的活性列於表一。

二、不同濃度的 clavulanic acid 對 *Stenotrophomonas maltophilia* 菌株 *L1* 及 *L2* 基因啟動子誘發 (induction) 的影響

1. 分別將 NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株培養在含有三種不同濃度 clavulanic acid (10, 50, 100 µg/ml) 的 LB 培養基中，另一以不加 clavulanic acid 的 LB 培養基為對照組，預養到 2.5 小時後收菌，以 OD₄₅₀ 測得 *S. maltophilia* 的生長情形，並以 C230 assay buffer 破菌測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。實驗結果發現與對照組相比，NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株培養在含有濃度為 100 µg/ml clavulanic acid 的培養基中生長緩慢，在含有 50 µg/ml 及 10 µg/ml clavulanic acid 的培養基中生長情形和對照組生長情形一致。所以，高濃度 clavulanic acid (100 µg/ml) 對 *S. maltophilia* 的生長有明顯的抑制效果。從實驗中也發現 clavulanate 會誘發 NL1⁻ 及 NL2⁻ 這兩個突變株 catechol-2,3-dioxygenase 活性的表現，顯示 clavulanate 對 *L1* 及 *L2* 基因的表現是一有效的誘發子 (inducer)。分別比較 NL1⁻ 及 NL2⁻ 在不同濃度 clavulanate 作用下，其 catechol-2,3-dioxygenase 活性被誘發程度。結果顯示，不論對 *L1* 或 *L2* 基因啟動子而言，50 µg/ml clavulanic acid 的誘發力較 10 µg/ml clavulanic acid 強。NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株在不同濃度 clavulanate 影響下，其生長情形及誘發 catechol-2,3-dioxygenase 的活性列於表二。

2. 分別將 NL1⁻及 NL2⁻突變株培養在含有五種不同濃度 clavulanic acid (2, 8, 10, 16, 50 µg/ml) 的 LB 培養基中，以及培養於加抗生素 (cefuroxime, 50 µg/ml) 的 LB 培養基中，另一以不加 clavulanic acid 及 cefuroxime 的 LB 培養基為對照組，預養到 2.5 小時後收菌，以 OD₄₅₀ 測得 *S. maltophilia* 的生長情形，並以 C230 assay buffer 破菌測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。實驗結果發現與對照組相比，NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株培養在含有五種不同濃度 clavulanic acid，及培養於加抗生素 (cefuroxime, 50 µg/ml) 的 LB 培養基中生長情況一致。

從實驗中發現不同濃度的 clavulanate 誘發 NL1⁻ 及 NL2⁻ 這兩個突變株 catechol-2,3-dioxygenase 活性的表現不同，NL1⁻ 在分別含有 clavulanic acid 2, 8, 10 µg/ml 的 LB 培養基中，catechol-2,3-dioxygenase 活性的表現隨 clavulanic acid 濃度增加而增加活性表現，但在分別含有 clavulanic acid 16, 50 µg/ml 的 LB 培養基中，catechol-2,3-dioxygenase 活性表現不隨 clavulanic acid 濃度增加而增加活性表現。NL2⁻ 在分別含有 clavulanic acid 2, 8, 10, 16, 50 µg/ml 的 LB 培養基中，catechol-2,3-dioxygenase 活性的表現隨 clavulanic acid 濃度增加而增加活性表現。顯示不同濃度 (2, 8, 10, 16, 50 µg/ml) clavulanate 對 *L2* 基因的誘發能力大於 *L1* 基因的誘發能力。分別比較 NL1⁻ 及 NL2⁻ 在不同濃度 clavulanate 作用下，及培養於抗生素

(cefuroxime, 50 µg/ml)的 LB 培養基中其 catechol-2,3-dioxygenase 活性被誘發程度。結果顯示，不論對 L1 或 L2 基因啟動子而言，50 µg/ml cefuroxime 的誘發力較這五種濃度(2, 8, 10, 16, 50 µg/ml)clavulanate 強。NL1⁻ 及 NL2⁻突變株在不同濃度 clavulanate 及抗生素的影響下，其誘發 catechol-2,3-dioxygenase 的活性整理於圖十二。

三、Clavulanic acid (50 µg/ml) 對 *Stenotrophomonas maltophilia* NL1⁻ 及 NL2⁻ 菌株誘發 (induction)動力學的研究

分別將 NL1⁻及 NL2⁻突變株培養在含有 clavulanic acid (50 µg/ml) 的 LB 培養基中，每 30 min 收菌連續監測四小時後，將其隔夜培養後再收一次菌。每次分析樣本以 OD₄₅₀ 測得 *S. maltophilia* 的生長情形，並以 C230 assay buffer 破菌測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。實驗結果發現培養在含有 clavulanic acid (50 µg/ml) 的 LB 培養基中，所測得的 NL1⁻及 NL2⁻突變株生長情形相近，且經隔夜培養後，NL1⁻及 NL2⁻突變株並沒有死亡。實驗結果發現 NL1⁻突變株及 NL2⁻突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 的活性皆在含有 clavulanic acid (50 µg/ml)的培養基中培養兩小時後出現活性高峰，隨後，NL1⁻突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 的活性會隨培養時

間增加而逐漸衰退，但 NL2⁻突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 活性則沒有明顯衰退情形。NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株在 Clavulanic acid (50 µg/ml) 影響下其生長情形及誘發 catechol-2,3-dioxygenase 的活性列於圖四、五。

四、 培養基中碳源的成份對 *Stenotrophomonas maltophilia* 菌株 L1 及 L2 基因啟動子誘發 (induction) 的影響

分別將隔夜培養在含有 1% 碳源的 XOLN medium (碳源分別為 maltose, sucrose, glucose, lactose, glycerol) 中的 NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株菌液，接種至新鮮相同的培養基，使菌液濃度 OD₄₅₀ 約為 0.2 到 0.4 後。再分別加入抗生素(cefuroxime, 50 µg/ml)，預養 2.5 小時後收菌。以 OD₄₅₀ 測得 *S. maltophilia* 的生長情形，並以 C230 assay buffer 破菌測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。實驗結果發現 NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株培養在含有 maltose 的培養基中生長情形最佳。從實驗中得知培養基中碳源種類對 cefuroxime 誘發 NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 活性並沒產生明顯影響。結果整理於表三。

五、 抗癌的藥物 hesperetin 及能治療 benign prostatic hypertrophy (BPH) 的疾病的β-sitosterol 對 *Stenotrophomonas maltophilia* 菌株 L1 及 L2 基因啟

動子誘發 (induction) 的影響

1. Hesperetin 對 *Stenotrophomonas maltophilia* 菌株 *L1* 及 *L2* 基因啟動子誘發 (induction) 的影響

分別將 NL1⁻及 NL2⁻突變株隔夜培養在 LB 培養基中，將其隔夜培養菌液接種至新鮮相同的培養基，使菌液濃度 OD₄₅₀ 約為 0.2 到 0.4 後，分別將 NL1⁻及 NL2⁻突變株培養在含 hesperetin (0.5 mg/ml) LB 培養基中、抗生素 (cefuroxime, 50 µg/ml) 的 LB 培養基中、及加 hesperetin (0.5 mg/ml) 和抗生素 (cefuroxime, 50 µg/ml) 的 LB 培養基中的實驗組，以及不加任何抗生素及試劑的對照組，每 30 min 收菌連續監測四小時後，將其隔夜培養後再收一次菌。每株分析樣本以 OD₄₅₀ 測得 *S. maltophilia* 的生長情形，並以 C230 assay buffer 破菌測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。實驗結果發現在這三組實驗組中其 NL1⁻及 NL2⁻突變株生長情形皆相近於對照組的生長情形。所以，NL1⁻及 NL2⁻突變株生長情形並不因培養於含有 hesperetin (0.5 mg/ml)、抗生素 (cefuroxime, 50 µg/ml)、hesperetin (0.5 mg/ml) 及抗生素 (cefuroxime, 50 µg/ml) LB 培養基中而引響。實驗結果發現 NL1⁻及 NL2⁻突變株在加有 hesperetin (0.5 mg/ml) 的培養基中並沒測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性，顯示 hesperetin (0.5 mg/ml) 並不能誘發 *L1* 或 *L2* 基因啟動子的表現。而加了 hesperetin (0.5 mg/ml) 及抗

生素(cefuroxime, 50 $\mu\text{g/ml}$)的培養基實驗組中，其 NL1⁻及 NL2⁻突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 的活性，並沒有和只加抗生素(cefuroxime, 50 $\mu\text{g/ml}$)於培養基所測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性有明顯差異。因此，在加了 hesperetin (0.5 mg/ml)並不會對抗生素(cefuroxime, 50 $\mu\text{g/ml}$)誘發 (induction) NL1⁻及 NL2⁻突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 的活性表現有加成或抑制的效果。結果整理於圖六、七、八、九。

2. β -sitosterol 對 *Stenotrophomonas maltophilia* 菌株 L1 及 L2 基因啟動子誘發 (induction) 的影響

分別將 NL1⁻及 NL2⁻突變株隔夜培養在 LB 培養基中，將其隔夜培養菌液接種至新鮮相同的培養基，使菌液濃度 OD₄₅₀ 約為 0.2 到 0.4 後，分別將 NL1⁻及 NL2⁻突變株培養在含 β -sitosterol (10 mg/ml) LB 培養基中、抗生素(cefuroxime, 50 $\mu\text{g/ml}$)的 LB 培養基中、及加 β -sitosterol (10 mg/ml) 和抗生素(cefuroxime, 50 $\mu\text{g/ml}$)的 LB 培養基中的實驗組，以及不加任何抗生素及試劑的對照組，預養 2.5 小時後，每株分析樣本以 OD₄₅₀ 測得 *S. maltophilia* 的生長情形，並以 C230 assay buffer 破菌測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。實驗結果發現在這三組實驗組中其 NL1⁻及 NL2⁻突變株生長情形皆相近於對照組的生長情形。所以，NL1⁻及

NL2⁻突變株生長情形並不因培養於含有 β -sitosterol (10 mg/ml) 、抗生素 (cefuroxime , 50 μ g/ml) 、 β -sitosterol (10 mg/ml)及抗生素(cefuroxime , 50 μ g/ml) LB 培養基中而影響。實驗結果發現 NL1⁻及 NL2⁻突變株在加有 β -sitosterol (10 mg/ml)的培養基中並沒測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性，顯示 β -sitosterol (10 mg/ml)並不能誘發 *L1* 或 *L2* 基因啟動子的表現。而加了 β -sitosterol (10 mg/ml)及抗生素(cefuroxime , 50 μ g/ml)的培養基實驗組中，其 NL1⁻及 NL2⁻突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 的活性，並沒有和只加抗生素(cefuroxime , 50 μ g/ml) 於培養基所測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性有明顯差異。因此，加了 β -Sitosterol (10 mg/ml)並不會對抗生素(cefuroxime , 50 μ g/ml)誘發 NL1⁻及 NL2⁻突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 的活性表現有加成或抑制的效果。結果整理於表四。

第四節、Clavulanic acid 合併不同 β -lactam 抗生素的組裝，對菌株 NL1⁻ 及 NL2⁻基因啟動子誘發 (induction) 的影響

一、 菌株 N, NL1⁻ 及 NL2⁻的抗生素感受性測試

本實驗抗藥性測試的方法主要是依照 agar dilution method。選擇 β -lactamase 抑制劑為: clavulanic acid(CA)； β -lactam 類抗生素的選擇包括：(1) penicillin 類抗生素，如 Cab, carbenicillin; Amo, amoxicillin; Tic, ticarcillin; PP, piperacillin (2) monobactam 類抗生素，如 Azt, aztreonam。

在 clavulanic acid 合併不同 β -lactam 抗生素的組裝比例為:Azt/CA(2/1) ; Cab/CA(2/1) ; Amo/CA(2/1) ; 以及將 clavulanic acid 濃度固定為(2 μ g/ml) 搭配不同濃度 Amo。以半自動多點接種機 (Mast Scan 400) 接種一定量菌液至含有不同抗生素濃度之 Mueller-Hinton 培養基，所測菌株除了 N, NL1⁻ 及 NL2⁻，並在實驗過程中以 *E. coli* DH5 α 做為陰性對照組，結果整理於表五。

結果顯示菌株 N 對 Cab、Amo、Tic、PP、Azt MIC 值皆大於 256 μ g/ml，合併抑制劑 clavulanic acid 後，菌株 N 對這些組裝治劑 (combination regimen) 的 MIC 值分別降為 Cab/CA(64/32) μ g/ml、Amo/CA(128/64) μ g/ml、Tic/CA(16/4) μ g/ml、PP/CA(128/64) μ g/ml、Azt/CA(16/8) μ g/ml。因此培養基中含有 clavulanic acid 合併 Cab、Amo、Tic、PP、Azt 抗生素後對 N 菌有明顯抑制生長，且五種 β -lactam/CA 比上五種 β -lactam 的 MIC 的比值皆 ≤ 2 ，所以將 CA 分別搭配這五種抗生素後，對 N 菌有協同抑制的效果。

菌株 NL1⁻ 對 Cab、Amo、Tic、PP、Azt MIC 值皆大於 256 μ g/ml，合併抑制劑 clavulanic acid 後，菌株 NL1⁻ 對這些組裝治劑 (combination regimen) 的 MIC 值分別降為 Cab/CA(8/4) μ g/ml、Amo/CA(8/4) μ g/ml、Tic/CA(4/2) μ g/ml、PP/CA(32/16) μ g/ml、Azt/CA(32/16) μ g/ml。

菌株 NL2⁻ 對 Cab, Amo, Tic, PP, Azt MIC 值分別為 128, >256, 32, >256, 16 μ g/ml，合併抑制劑 clavulanic acid 後，菌株 NL2⁻ 對這些組裝治劑 (combination regimen) 的 MIC 值分別降為 Cab/CA(32/16) μ g/ml、Amo/CA(128/64) μ g/ml、Tic/CA(32/16) μ g/ml、PP/CA(128/64) μ g/ml、Azt/CA(16/8) μ g/ml。

N、NL1⁻、NL2⁻對 clavulanic acid MIC 值皆為 128 μ g/ml。因此將 N、NL1⁻、NL2⁻培養於 clavulanic acid 濃度為 128 μ g/ml 培養基中 24 小時後，

會抑制 N、NL1⁻、NL2⁻的生長。

二、 β -lactams 抗生素合併 clavulanic acid，對菌株 NL1⁻ 及 NL2⁻基因
啟動子誘發 (induction) 的影響

1. 評估 aztreonam (32 μ g/ml) /clavulanic acid (16 μ g/ml)對菌株 NL1⁻ 及
NL2⁻基因啟動子誘發 (induction) 的影響

分別將 NL1⁻及 NL2⁻突變株隔夜培養菌液接種至新鮮相同的培養基，使菌液濃度 OD₄₅₀ 約為 0.2 到 0.4 後，分別將 NL1⁻及 NL2⁻突變株分三個實驗組培養在第一組含 clavulanic acid (16 μ g/ml)、第二組含 aztreonam (32 μ g/ml)及第三組含 aztreonam (32 μ g/ml) /clavulanic acid (16 μ g/ml)的 LB 培養基中的、以及不加任何抗生素及試劑的對照組，預養 2.5 小時後收菌，每株分析樣本以 OD₄₅₀ 測得 *S. maltophilia* 的生長情形，並以 C230 assay buffer 破菌測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。實驗結果發現 NL1⁻在這三組實驗組中其及生長情形皆相近於對照組的生長情形。而 NL2⁻在第二及第三組實驗組中其及生長情形皆較對照組的生長情形差。所以，NL1⁻生長情形在培養於含有 clavulanic acid (16 μ g/ml)、aztreonam (32 μ g/ml)及 aztreonam (32 μ g/ml) /clavulanic acid (16 μ g/ml)LB 培養基中不受影響；但 NL2⁻生長情形在 clavulanic acid (16 μ g/ml)不受影響，在 aztreonam (32 μ g/ml)及 aztreonam (32 μ g/ml) /clavulanic acid (16

µg/ml) LB 培養基中生長會明顯抑制結果，符合 NL2⁻ 的 Azt MIC 值為 16 µg/ml 而 aztreonam /clavulanic acid 為 32/16 (µg/ml) 的結果。實驗結果顯示 NL1⁻ 在第一組及第三組實驗中皆測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。但 NL1⁻ 在第二組實驗中並沒有測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。因此 clavulanic acid (16 µg/ml) 及 aztreonam (32 µg/ml) /clavulanic acid (16 µg/ml) 可誘發 *L1* 基因表現；但 NL1⁻ 菌株在含有 aztreonam (32 µg/ml) 培養基中無法測得 C23O 活性表現。比較 NL1⁻ 在三組中所產生的 catechol-2,3-dioxygenase 活性。結果發現 NL1⁻ 的 catechol-2,3-dioxygenase 活性表現在 aztreonam (32 µg/ml) /clavulanic acid (16 µg/ml) 比 aztreonam (32 µg/ml) 為 1.9 倍。因此， aztreonam (32 µg/ml) /clavulanic acid (16 µg/ml) 對 *L1* 基因不具 induction synergy 現象。NL2⁻ 在第一組、第二組及第三組實驗中皆測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。因此 NL2⁻ 培養於含有 clavulanic acid (16 µg/ml) 、 aztreonam (32 µg/ml) 及 aztreonam (32 µg/ml) /clavulanic acid (16 µg/ml) 的培養基中會誘發 *L2* 基因。比較 NL2⁻ 在三組中的 catechol-2,3-dioxygenase 活性。發現 NL2⁻ 的 catechol-2,3-dioxygenase 活性表現在第三組為第二活的 2.5 倍。因此， aztreonam (32 µg/ml) /clavulanic acid (16 µg/ml) 對 *L2* 基因具 induction synergy 現象。結果整理於表六

2. 評估 carbenicillin (8 $\mu\text{g/ml}$) / clavulanic acid (4 $\mu\text{g/ml}$)對菌株 NL1⁻ 及 NL2⁻基因啟動子誘發 (induction) 的影響

分別將 NL1⁻及 NL2⁻突變株隔夜培養菌液接種至新鮮相同的培養基，使菌液濃度 OD₄₅₀ 約為 0.2 到 0.4 後，分別將 NL1⁻及 NL2⁻突變株分三個實驗組培養在第一組含 clavulanic acid (4 $\mu\text{g/ml}$)、第二組含 carbenicillin (8 $\mu\text{g/ml}$)及第三組含 carbenicillin (8 $\mu\text{g/ml}$) / clavulanic acid (4 $\mu\text{g/ml}$)的 LB 培養基中的、以及不加任何抗生素及試劑的對照組，預養 2.5 小時後收菌，每株分析樣本以 OD₄₅₀ 測得 *S. maltophilia* 的生長情形，並以 C230 assay buffer 破菌測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。實驗結果發現 NL1⁻突變株生長情形在第三組實驗中生長緩慢其餘兩組實驗生長情形皆相近於對照組的生長情形,符合 NL1⁻ 對 Cab/CA 之 MIC 只有 8/4 ($\mu\text{g/ml}$)。所以 NL1⁻突變株並不因培養於含有 clavulanic acid (4 $\mu\text{g/ml}$)、carbenicillin (8 $\mu\text{g/ml}$) LB 培養基中，而改變生長情形。但 NL1⁻ 在 carbenicillin (8 $\mu\text{g/ml}$) / clavulanic acid (4 $\mu\text{g/ml}$)的 LB 培養基中的生長會受抑制。NL2⁻突變株生長情形也不因培養於含有 clavulanic acid (4 $\mu\text{g/ml}$)、carbenicillin (8 $\mu\text{g/ml}$)及 carbenicillin (8 $\mu\text{g/ml}$) / clavulanic acid (4 $\mu\text{g/ml}$)LB 培養基中而影響生長情形。實驗結果顯示 NL1⁻、NL2⁻ 在第二組及第三組實驗中皆測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。但在第一組實驗中並沒有測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。因此將 NL1⁻、NL2⁻培

養於含有 carbenicillin (8 µg/ml) 培養基中會誘發 *L1*、*L2* 基因；但在含有 clavulanic acid (4 µg/ml) 培養基中不會誘發 *L1*、*L2* 基因。比較 NL1⁻、NL2⁻ 在三組實驗中所產生的 catechol-2,3-dioxygenase 活性。結果發現 NL1⁻、NL2⁻ 的 catechol-2,3-dioxygenase 活性表現皆為第三組大於第二組。將 NL1⁻ 培養於含有 carbenicillin (8 µg/ml) / clavulanic acid (4 µg/ml) 比 carbenicillin (8 µg/ml) 的培養基中所誘發 *L1* 基因能力約 3.6 倍；NL2⁻ 在培養於含有 carbenicillin (8 µg/ml) / clavulanic acid (4 µg/ml) 比 carbenicillin (8 µg/ml) 的培養基中誘發 *L2* 基因能力約 1.3 倍。因此 carbenicillin (8 µg/ml) / clavulanic acid (4 µg/ml) 對 *L1* 基因有 induction synergy 現象；但對 *L2* 基因沒有 induction synergy 現象。結果整理於表六

3. 評估 amoxicillin (8 µg/ml) / clavulanic acid (4 µg/ml) 對菌株 NL1⁻ 及 NL2⁻ 基因啟動子誘發 (induction) 的影響

分別將 NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株隔夜培養菌液接種至新鮮相同的培養基，使菌液濃度 OD₄₅₀ 約為 0.2 到 0.4 後，分別將 NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株分三個實驗組培養在第一組含 clavulanic acid (4 µg/ml)、第二組含 amoxicillin (8 µg/ml) 及第三組含 amoxicillin (8 µg/ml) / clavulanic acid (4 µg/ml) 的 LB 培養基中的、以及不加任何抗生素及試劑的對照組，預養 2.5 小時後收菌，每株分析樣本以 OD₄₅₀ 測得 *S. maltophilia* 的生長情形，

並以 C230 assay buffer 破菌測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。實驗結果發現 NL1⁻突變株生長情形在第三組實驗中生長緩慢其於實驗組生長情形皆相近於對照組的生長情形。將 NL1⁻培養於 amoxicillin (8 µg/ml) / clavulanic acid (4 µg/ml)較單獨培養於 amoxicillin (8 µg/ml) , clavulanic acid (4 µg/ml)培養基中生長受抑制，符合 NL1⁻ MIC amoxicillin / clavulanic acid 為 8/4 的結果。NL2⁻突變株生長情形皆相近於對照組的生長情形。所以 NL2⁻突變株生長情形並不因培養於含有 amoxicillin (8 µg/ml) / clavulanic acid (4 µg/ml)及 carbenicillin (8 µg/ml) / clavulanic acid (4 µg/ml)LB 培養基中而影響生長情形。實驗結果顯示 NL1⁻、NL2⁻ 在第二組及第三組實驗中皆測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。但在第一組實驗中並沒有測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。因此將 NL1⁻、NL2⁻培養於含有 amoxicillin (8 µg/ml)培養基中會誘發 *L1*、*L2* 基因；但在含有 clavulanic acid (4 µg/ml)培養基中不會誘發 *L1*、*L2* 基因。比較 NL1⁻、NL2⁻在第二組及第三組中所產生的 catechol-2,3-dioxygenase 活性。比較 NL1⁻的 catechol-2,3-dioxygenase 活性在第三組比第二組表現為 1.8 倍。而 NL2⁻的 catechol-2,3-dioxygenase 活性在第三組比第二組表現為 1.1 倍，因此 amoxicillin (8 µg/ml) / clavulanic acid (4 µg/ml)有對誘發 *L1*、*L2* 基因表現沒有 induction synergy 現象。結果整理於表六

4. 評估 aztreonam (8 µg/ml) /clavulanic acid (4µg/ml)對菌株 NL1⁻ 及 NL2⁻基因啟動子誘發 (induction) 的影響

分別將 NL1⁻及 NL2⁻突變株隔夜培養菌液接種至新鮮相同的培養基，使菌液濃度 OD₄₅₀ 約為 0.2 到 0.4 後，分別將 NL1⁻及 NL2⁻突變株分三個實驗組培養在第一組含 clavulanic acid (4 µg/ml)、第二組含 aztreonam (8 µg/ml)及第三組含 aztreonam (8 µg/ml) /clavulanic acid (4 µg/ml)的 LB 培養基中的、以及不加任何抗生素及試劑的對照組，預養 2.5 小時後收菌，每株分析樣本以 OD₄₅₀ 測得 *S. maltophilia* 的生長情形，並以 C230 assay buffer 破菌測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。實驗結果發現在這三組實驗組中其 NL1⁻及 NL2⁻突變株生長情形皆相近於對照組的生長情形。所以，NL1⁻及 NL2⁻突變株生長情形並不因培養於含有 aztreonam (8 µg/ml)、clavulanic acid (4 µg/ml)及 aztreonam (8 µg/ml) /clavulanic acid (4 µg/ml)LB 培養基中而影響。實驗結果顯示 NL1 第三組實驗中皆測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。NL1⁻在第一、二組實驗中並沒測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。因此將 NL1⁻培養於含有 aztreonam (8 µg/ml)培養基中沒有測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性；在含有 clavulanic acid (4 µg/ml)培養基中不會誘發 *L1* 基因。在 NL2⁻的第一組實驗中，沒有測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。因此將 NL2⁻培養於含有 clavulanic acid (4 µg/ml)中不會誘發 *L2* 基因。NL2⁻在第二、三

組實驗中測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。比較 NL2⁻在第二、三組實驗中所測得 catechol-2,3-dioxygenase 的活性。NL2⁻培養於含有 aztreonam (8 µg/ml)比 aztreonam (8 µg/ml) /clavulanic acid (4 µg/ml)培養基中所誘發 L2 基因能力為 1.6 倍。可說明 aztreonam (8 µg/ml) /clavulanic acid (4 µg/ml) 有對 L2 基因沒有 induction synergy 現象。結果整理於表六。



第六章 結果討論

一、

Johansson *et al.*, 2005 曾報導 *Streptococcus pyogenes* 培養於在 Todd-Hewitt broth 及 Todd-Hewitt broth 加有 5% 正常人的血漿，藉由二維電泳及質譜儀的分析平台來比較在兩種不同成份的生長培養基中，*S. pyogenes* 菌體蛋白的表現情況，結果發現 *S. pyogenes* 在具有血漿的生長環境下，會影響到毒力因子 M1 蛋白，及具代謝及運送功能的蛋白。因此我們想了解 *S. maltophilia* N 培養於加入 5% 的健康人類血清培養基後是否也會誘發 N 菌的 *L1* 及 *L2* 基因啟動子表現。從表一中得知在 LB 培養基中加入健康人類血清，並不會誘發 N 菌的 *L1* 及 *L2* 基因啟動子表現，顯示正常人類血清中並沒有足以誘發 *L1* 及 *L2* 基因啟動子表現的物質。此外，健康人類血清對 cefuroxime 誘發 N 菌的 *L1* 及 *L2* 基因啟動子的能力沒有加成或抑制效果。此外，LB 能提供足夠細菌生長的營養成份，所以在 LB 培養基中加入健康人類血清，NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株細菌生長情形並不會有明顯差異。推測 1. *S. pyogenes* 和 *S. maltophilia* 屬於不同菌種，當培養於血清中所誘發的基因及蛋白表現會呈現不同。2、血清中缺少某些能誘導 *L1* 及 *L2* 基因啟動物質 (Carlsson *et al.*, 2005)。3. 實驗的分析平台不同，實驗中只評估 *L1* 及 *L2* 基因是否誘發表現並沒考慮其它基因或蛋白表現是否受人類血清影響。

二、

從表二中得知在培養基中含有 clavulanic acid(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 時對 *S. maltophilia* 菌株生長產生明顯影響，以往的研究結果顯示: clavulanic acid 對 *P. aeruginosa* 的 MIC 為 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Stephen *et al.*, 1991)；對 *S. maltophilia* GN12873 之 MIC 為 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Saino *et al.*, 1982)。但本研究結果顯示，clavulanic acid 對菌株 *S. maltophilia* N 之 MIC 值為 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，而在 clavulanic acid 為 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 時，對 NL1⁻ 及 NL2⁻ 有抑制生長的效果。從表二中得知 clavulanic acid 對 *S. maltophilia* 菌株 L1 及 L2 基因啟動子有誘發 (induction) 的能力，推測 clavulanic acid 在化學結構上有 β -lactam ring (Bush *et al.*, 1988)，因此能誘發 N 菌的 L1 及 L2 基因啟動子表現。而增加 β -lactam 抗生素誘發子的濃度對 *S. maltophilia* IID1275 β -lactamase 誘發皆有明顯增加(Rosta S & Metth H, 1989)。因此想了解不同濃度的 clavulanic acid 對誘發 *S. maltophilia* 菌株 L1 及 L2 基因啟動子表現是否有影響。培養基中含有 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ clavulanic acid 時，N 菌的 L1 及 L2 基因啟動子表現誘發力較培養基中含有 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ clavulanic acid 強。推測 clavulanic acid 對 L1 及 L2 基因啟動子的誘發能力與其濃度有關。關於 clavulanate 對 AmpC β -lactamase 誘發的相關研究發現：16 及 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ clavulanic acid 對 *S. marcescens* 及 *P. aeruginosa* 的 AmpC β -lactamase 的誘發能力較對 *C. freundii* 及 *E. cloacae* 的 AmpC

β -lactamase 誘發能力強。且在 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的clavulanate濃度下，對任何菌株之 AmpC β -lactamase 皆沒誘發表現(Stephen *et al.*, 1991)。為了解從2, 8, 10, 16, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 五種濃度的clavulanate 對L1及L2基因啟動子表現。從圖十二得知，NL1⁻及NL2⁻在含有依序增加clavulanic acid濃度的LB培養基中，catechol -2,3-dioxygenase 活性的表現隨clavulanic acid濃度增加而增加活性表現，符合Stephen *et al.*, 1991所論述的clavulanate對AmpC β -lactamase誘發為concentration dependent的情況。推測，誘發L1及L2基因啟動子表現機制是獨立，所以clavulanic acid濃度增加對誘發L1基因啟動子表現相關性弱；而對L2基因啟動子表現相關性強。NL1⁻及NL2⁻在clavulanic acid濃度為2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 皆測不到catechol -2,3-dioxygenase 活性的表現，推測：clavulanate 誘發L1及L2基因啟動子表現的最低濃度 >2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，而將同是50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度的clavulanate及cefuroxime所誘發L1及L2基因啟動子表現比較後，從圖十二中得知不論是誘發L1或L2基因啟動子表現上，cefuroxime的誘發能力皆大於clavulanate。推測，1. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度的clavulanate 可能不是誘發L1或L2基因啟動子表現上最適合的濃度。

2. cefuroxime及clavulanate化學結構不同，或是誘發L1或L2基因方式不同，因此在誘發L1或L2基因啟動子表現也會不同。

三、

文獻中提出(Rosta S & Mett H, 1989) *S. maltophilia* IID1275 培養於 imipenem 的時間從 2 小時增加為三小時，因 L1 β -lactamase 會水解 imipenem，作者推測培養基中 imipenem 會因 L1 β -lactamase 水解而濃度下降，所以導致 L1 β -lactamase 活性減少但 L2 β -lactamase 不會水解 imipenem 所以活性變化不明顯。因此想了解 clavulanic acid 誘發 *S. maltophilia* 菌株 L1 及 L2 基因啟動子表現情形。從圖四、五結果中得知將 N 菌之 NL1⁻ 及 NL2⁻ 菌株在培養基中含有 clavulanic acid (50 μ g/ml) 時，*S. maltophilia* 菌株可正常生長。在 clavulanic acid 的誘發下，NL1⁻ 突變株及 NL2⁻ 突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 的活性皆在誘發兩小時後出現活性高峰，隨後，NL1⁻ 突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 的活性會隨培養時間增加而逐漸衰退，而 NL2⁻ 突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 活性則沒有明顯衰退情形。推測 NL1⁻ 菌株受 clavulanic acid 誘發後，*xyIE* 基因與 L2 基因會同時被誘發表現。因 clavulanic acid 為 L2 β -lactamase 之抑制物，且對 L2 蛋白之 K_i 值極低，只有 0.58 μ M (Saino *et al.*, 1984)。所以 clavulanic acid 會結合 L2 β -lactamase，導致 clavulanic acid 的濃度會在誘發過程中隨時間增加而逐漸下降，而使 clavulanic acid 對 NL1⁻ 突變株誘發 (induction) 能力下降。而 NL2⁻ 突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 活性則沒有明顯衰退情形，推測因為培養基中 clavulanic acid 不會結合抑

制 L1 β -lactamases 的活性因此培養基中的 clavulanic acid 濃度在誘發過程中不會明顯改變，而使 NL2⁻突變株誘發的 catechol-2,3-dioxygenase 活性沒有明顯衰退情形。

四、

將 *E. cloacae* 培養於 "poorer" 培養基比培養於營養培養基(例如：BHI)中會產生較多的 β -lactamases(Then RL, 1987)。因此想了解 *S. maltophilia* 菌株 L1 及 L2 基因啟動子誘發是否和培養基成份有關。從表三中結果中得知當培養基中的碳源為 1% 的 maltose 時，NL1⁻ 及 NL2⁻ 菌株生長的情況較其他含有 1% 的 sucrose、glucose、lactose、glycerol 培養基中佳。此表現與以往所知 *S. maltophilia* 對 maltose 有較好的利用效率的特性(Denton & Kerr, 1998)吻合。從表三所呈現的結果顯示因培養基中碳源種類不同而導致 NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株的生長情形的差異，不影響 cefuroxime 誘發 NL1⁻ 及 NL2⁻ 突變株的 catechol-2,3-dioxygenase 活性。推測 *S. maltophilia* 在利用不同碳源的過程中所牽涉的相關蛋白與機制並不會誘導 N 菌的 L1 及 L2 基因啟動子表現亦不會影響 cefuroxime 的誘發能力。

六、

Hesperetin 屬 flavonoids 中的 flavanone (Borradaile *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999), 此物質大量存在於生活食用的檸檬及橘子中。Hesperetin 的作用為抗氧化、抗發炎、抗過敏、可保護血管及抗癌。Hesperetin 的作用機轉不清楚。曾有文獻中指出合併 flavonoids 的藥物包括 hesperetin, 可抗 *Helicobacter pylori* 的活性(Bae *et al.*, 1999) 。因此想 hesperetin 是否也可用來當 *S. maltophilia* 菌株的治療藥品。從圖四、五結果中顯示, NL1⁻及 NL2⁻突變株在含有 hesperetin 的 LB 培養基中生長情形並不會受到抑制, 推測:(1) hesperetin 適用在真核細胞上, 而不適在原核細胞當作治療的藥物。因此 NL1⁻及 NL2⁻突變株生長情形並不會受到抑制。(2) 0.5mg/ml 的 hesperetin 濃度要抑制 NL1⁻及 NL2⁻突變株的生長可能太低, 所以不能抑制 NL1⁻及 NL2⁻突變株的生長。圖六、七結果顯示, hesperetin 不能誘發 *L1* 或 *L2* 基因啟動子的表現, 推測:因 hesperetin 在結構上為 C₁₆H₁₄O₆ 不具 β-lactam ring 的結構(如圖十所示), 或是 hesperetin 無法影響能誘發 *L1* 或 *L2* 基因啟動子的表現的其它蛋白或物質。從圖四、五結果中顯示在培養基中加入 hesperetin 與 cefuroxime 培養後, NL1⁻及 NL2⁻突變株在 hesperetin/ cefuroxime LB 培養基中生長情形並不會受到抑制以及圖六、七結果顯示 hesperetin/cefuroxime 不會加成或抑制 cefuroxime 誘發 *L1* 或 *L2* 基因啟動子的表現。可能是(1) 兩種藥物 hesperetin/ cefuroxime 沒產

生 synergy 或 antagonism 的效果。(2) 兩種藥物 hesperetin/ cefuroxime 的比例搭配沒有產生良好的 synergy 效果。

七、

β -sitosterol 大量存在三種植物中：*Serenoa repens*、*Curcubita pepo*、*Pygeum africanum* (Wilt *et al.*,1999; Normé n *et al.*, 2000)。 β -sitosterol 可使用來促進前列腺健康，也可降低膽固醇，常用於治療 benign prostatic hypertrophy (BPH) 的疾病。 β -sitosterol 對於促進前列腺健康的作用機轉不清楚。因此想了解 β -sitosterol 是否也可用來當 *S. maltophilia* 菌株的治療選擇之一。從表四結果中顯示，NL1⁻及 NL2⁻突變株在含有 β -sitosterol 的 LB 培養基中生長情形並不會受到抑制，推測：(1) β -sitosterol 適用在真核細胞上，而不適在原核細胞當作治療的藥物，因此 NL1⁻及 NL2⁻突變株生長情形並不會受到抑制。(2) 10 mg/ml 的 β -sitosterol 濃度要抑制 NL1⁻及 NL2⁻突變株的生長可能太低，所以不能抑制 NL1⁻及 NL2⁻突變株的生長。表四結果顯示， β -sitosterol 不能誘發 L1 或 L2 基因啟動子的表現，推測：因 β -sitosterol 在結構上不具 β -lactam ring 的結構(如圖十一所示)，或是 β -sitosterol 無法影響能誘發 L1 或 L2 基因啟動子的表現的其它蛋白或物質，所以不能誘發 L1 或 L2 基因啟動子的表現。從表四結果中顯示在培養基中加入 β -sitosterol 與 cefuroxime 培養後，NL1⁻及 NL2⁻突變

株在 β -sitosterol/ cefuroxime LB 培養基中生長情形並不會受到抑制以及 β -sitosterol/cefuroxime 不會加成或抑制 cefuroxime 誘發 L1 或 L2 基因啟動子的表現。可能是(1)兩種藥物 β -sitosterol/ cefuroxime 沒產生 synergy 或 antagonism 的效果。(2)兩種藥物 β -sitosterol/ cefuroxime 的比例搭配沒有產生良好的 synergy 效果。

八、

從表五結果菌株 *S. maltophilia* N 對 β -lactam/clavulanate (以 2:1 搭配方式合併)合併療法 (combination regimen)的感受性測試,顯示 *S. maltophilia* N 對 Amo/CA(128/64) $\mu\text{g/ml}$ 呈現抗性,對 Azt/CA(16/8) $\mu\text{g/ml}$ 呈現感受性的現象。此結果與之前的研究結果吻合(Mun~oz Bellido *et al.*, 1997)。但菌株 N 對 Tic/CA(16/4) $\mu\text{g/ml}$ 呈現感受性,此結果則與先前 J. *et al.* 的結果有所出入。在 Mun~oz Bellido *et al.* 的研究中,菌株對 Tic/CA(固定為 2 $\mu\text{g/ml}$)皆產生抗性結果。由本研究的另一組實驗所呈現的面向,恰可給予此相異點一個合理的解釋。由表五所示:固定 clavulanate 濃度為 2 $\mu\text{g/ml}$, 搭配不同濃度 Amo 時,此類型的合併療法並未達到協同效果 (synergy), 所以菌株 *S. maltophilia* N 仍對此類型的合併療法仍產生高抗藥性。此現象暗示著, 2 $\mu\text{g/ml}$ clavulanate 是不足以抑制菌株 *S. maltophilia* N 所誘發的 L2 β -lactamase 之活性。在 Mun~oz Bellido *et al.* 的實驗系統中, Tic 所搭配使用的 clavulanate 皆為 2 $\mu\text{g/ml}$, 但本研究所使用的 Tic/CA 的濃度比例為 2/1 $\mu\text{g/ml}$, 而使菌株 *S. maltophilia* N 產生感受性的濃度比例為 16/4 $\mu\text{g/ml}$ 。所以當 clavulanate 的濃度提昇至 4 $\mu\text{g/ml}$ 時, 其濃度就足以抑制 L2 β -lactamase 活性, 所以就有機會產生 synergy 的效果。由此可知, 在組裝 β -lactam/clavulanate 合併

治劑時，最低但足以抑制 L2 活性的 clavulanate 濃度應審慎評估，此可使合併治劑 (combination regimen) 達到最佳的治療成效。

在 NL1- 對不同組裝治劑的感受性試驗中，因菌株 NL1- 受 β -lactam 及 clavulanate 所誘發產生的 β -lactamase 只有 L2，所以此組感受性試驗所呈現的 MIC 值應可解讀成下列意義：此 MIC 值中所顯示的 clavulanate 濃度應為可抑制 L2 β -lactamase 活性所需的最小 clavulanate 濃度。如：表五，在 Cab(8)/CA(4) $\mu\text{g/ml}$ 組裝中，受到 Cab(8) $\mu\text{g/ml}$ 及 CA(4) $\mu\text{g/ml}$ 誘發產生的 L2 活性需 4 $\mu\text{g/ml}$ 的 clavulanate 才足以抑制 L2 活性。至於抑制不同組裝治劑產生的 L2 β -lactamase 活性所需的最低 clavulanate 濃度不盡相同，可能是由於不同組裝治劑對 L2 蛋白的誘發強度不同。

在 NL2- 對不同組裝治劑的感受性試驗中，因菌株 NL2- 受 β -lactam 及 clavulanate 所誘發產生的 β -lactamase 只有 L1，而 L1 β -lactamase 在本研究中顯示其活性不受 clavulanate 的影響 (表五)。所以此組感受性試驗所呈現的 MIC 值應可解讀成下列意義：此 MIC 值中所顯示的 β -lactam 濃度應為誘發之 L1 β -lactamase 不能水解大於等於此濃度的 β -lactam。如：如在 Cab(32)/CA(16) $\mu\text{g/ml}$ 組裝中，受到 Cab(32) $\mu\text{g/ml}$ 及 CA(16) $\mu\text{g/ml}$ 誘發產生的 L1 活性不足以水解 32 $\mu\text{g/ml}$ 的 Cab，所以才使得 NL2- 會對 Cab/CA (32/16) $\mu\text{g/ml}$ 的組裝治劑有感受性的結果。由此可知，在組裝 β -lactam/clavulanate 合併治劑時，L1 β -lactamase 對所選擇的 β -lactam 的水解能力越小，則此合併治劑可達到的治療成效可能較佳。

九、

表七結果顯示，菌株 NL1⁻在 MIC 結果中，得知 clavulanate 在 16 µg/ml 的濃度下能抑制 Azt32/CA16(µg/ml)所誘發的 L2 β-lactamase 活性。從菌株 NL2⁻ MIC 結果中，因 L1 β-lactamases 不受 clavulanate 所抑制，可得知 L1 β-lactamases 無法水解濃度為 32 µg/ml 的 Azt。從 C23O 活性結果顯示，clavulanate 在 16 µg/ml 的濃度下皆可誘發 L1 及 L2 基因啟動子的表現，呼應先前以不同濃度 clavulanate 對 L1 及 L2 基因啟動子的表現的結果。在 Azt 濃度為 32 µg/ml 時，測不到 NL1-的 C23O 活性，推測 Azt 誘發 NL1-的 L2 β-lactamases 水解 Azt，使培養基中的 Azt 濃度快速下降，導致 NL1⁻無法在低濃度 Azt 下成功誘發 L1 基因啟動子的表現。這樣的結果同 NL1⁻在 clavulanate 的動力學表現。在 Azt/CA 對誘發 L1 基因啟動子的表現上，不具 induction synergy 現象。NL2-所產生的 L1 β-lactamases 不水解 Azt，使培養基中 Azt 濃度不會產生變化。在 Azt/CA 對誘發 L2 基因啟動子的表現上，具 induction synergy 現象。因此評估 aztreonam / clavulanic acid 對菌株 NL2⁻而言，要抑制 L1 β-lactamases 活性的，Azt 最低濃度為 16 µg/ml，而對菌株 NL1⁻，要抑制 L2 β-lactamases 活性的，CA 最低濃度為 16 µg/ml，因 Azt32(µg/ml) /CA16(µg/ml)會 induction synergy L2 基因啟動子表現，使更多 L2 β-lactamases 產生，迫使 CA 濃度從 4 µg/ml 提高至 16 µg/ml，才能達到抑制 L2 β-lactamases 活性。所以 Azt/CA 在 Wild Strain N 在 MIC 結果為 Azt32(µg/ml) /CA16(µg/ml)。推測將 Azt32(µg/ml) /CA16(µg/ml)的比例搭配更改為 Azt 16(µg/ml) /CA 8(µg/ml)，可能是一組好的組裝治療選擇

十、

表八結果顯示，菌株 NL1⁻在 MIC 結果中，得知 clavulanate 在 4 µg/ml 的濃度下能抑制 Cab8/CA4 的培養基中所誘發的 L2 β-lactamases 活性。從菌株 NL2⁻MIC 結果中，因 L1 β-lactamases 不受 clavulanate 所抑制，可知 L1 β-lactamases 可水解小於濃度為 128 µg/ml 的 Cab。從 C23O 活性結果顯示，clavulanate 在 4 µg/ml 的濃度下無法誘發 *L1* 及 *L2* 基因啟動子的表現，對照先前以不同濃度 clavulanate 對 *L1* 及 *L2* 基因啟動子的表現的結果。推測 clavulanate 大於 4 µg/ml 的濃度時可能誘發 *L1* 及 *L2* 基因啟動子的表現。當 Cab 濃度為 8 µg/ml 時皆可測得 NL1⁻、NL2 的 C23O 活性。Cab/CA 比 Cab 對誘發 *L1* 基因啟動子的表現上，約 3.6 倍的 induction synergy 現象。而 Cab/CA 對誘發 *L2* 基因啟動子的表現上，不具 induction synergy 現象。評估 carbenicillin/ clavulanic acid 對菌株 NL2⁻而言，要抑制 L1 β-lactamases 活性，Cab 最低濃度為 32 µg/ml，對菌株 NL1，要抑制 L2 β-lactamases 活性，CA 最低濃度為 4 µg/ml，雖然 Cab/CA 不會 induction synergy *L2* 基因啟動子的表現，但 Cab/CA 會 induction synergy *L1* 基因啟動子的表現，迫使 Cab 濃度要提高，才能達到抑制細菌生長。推測將 Cab/CA 組裝比例更改為 32µg/ml /4µg/ml 可能是一組好的組裝治療選擇。

十一、

表九結果顯示，菌株 NL1⁻在 MIC 結果中，得知 clavulanate 在 4 µg/ml 的濃度下能水解 Amo8/CA4 的培養基中所誘發的 L2 β-lactamases 活性，。從菌株 NL2⁻在 MIC 結果中，因 L1 β-lactamases 不受 clavulanate 所抑制，L1 β-lactamases 可水解大於濃度為 256µg/ml 的 Amo。從 C23O 活性結果顯示，clavulanate 在 4 µg/ml 的濃度下無法誘發 *L1* 及 *L2* 基因啟動子的表

現。當 Amoxicillin 濃度為 8 $\mu\text{g/ml}$ 時皆可測得 NL1⁻、NL2⁻ 的 C23O 活性。Amoxicillin/Clavulanic acid 對 *L1*、*L2* 基因啟動子的表現上不具 induction synergy 結果。因此評估 amoxicillin / clavulanic acid 對菌株 NL2-而言，要抑制 *L1* β -lactamases 活性，Amoxicillin 最低濃度為大於 128 $\mu\text{g/ml}$ ，要抑制 *L2* β -lactamases 活性，CA 最低濃度為 4 $\mu\text{g/ml}$ ，雖然 Amoxicillin/CA 不會 induction synergy *L1*、*L2* 基因啟動子的表現，*L1* β -lactamases 易水解 Amoxicillin，因此在 Wild Strain N MIC 結果為 Amoxicillin128($\mu\text{g/ml}$) /CA64($\mu\text{g/ml}$) 才能達到抑制細菌生長。因此 Amoxicillin/CA 可能不是一組好的組裝治療選擇。



第七章 結論

在本實驗所研究的誘發條件：(1)在培養基中加入人類血清(2)改變培養基中碳源的成份(3)在培養基中中加入能抗癌的藥物 hesperetin 及能治療 benign prostatic hypertrophy (BPH)的疾病的 β -sitosterol，皆不會誘導 *L1* 和 *L2* 基因啟動表現亦不加成或抑制 Cfu 50 $\mu\text{g/ml}$ 對 *L1* 和 *L2* 基因誘導啟動的表現。結果證實 clavulanate 是可誘發 class A 及 class B β -lactamase 表現。當培養基中 clavulanate 的濃度增加，分別對 *L1* 和 *L2* 基因誘導表現為 concentration dependent。從菌株 N, NL1, NL2 對 β -lactams/clavulanate 感受性試驗結果，發現 aztreonam/clavulanate 這組裝治劑似乎有 synergism 現象產生。分別從 aztreonam ; carbenicillin ; amoxicillin 組裝 clavulanate 及 aztreonam ; carbenicillin ; amoxicillin 對 *L1* 和 *L2* 基因誘導啟動的表現結果發現。Aztreonam 32 $\mu\text{g/ml}$ /clavulanate 16 $\mu\text{g/ml}$ 對 *L2* 基因有 induction synergy 的現象。Carbenicillin 8 $\mu\text{g/ml}$ / clavulanate 4 $\mu\text{g/ml}$ 對 *L1* 基因有 induction synergy 的現象。amoxicillin 8 $\mu\text{g/ml}$ / clavulanate 4 $\mu\text{g/ml}$ 對 *L1* 和 *L2* 基因誘導啟動無 induction synergy 的現象。推測有兩個因素：(1)所選擇的 β -lactams 抗生素種類 (2) β -lactams/clavulanate 的組裝比例。會影響治劑對 *S. maltophilia* 的療效結果。

參考文獻

- Ambler RP. 1980. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **289**:321-331.
- Alonso A, Sanchez P, Martinez JL. 2000. *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**:1778-1782.
- Arpi M, Victor MA, Mortensen I, Gottschau A, Bruun B. 1996 . In vitro susceptibility of 124 *Xanthomonas maltophilia* (*Stenotrophomonas maltophilia*) isolates: comparison of the agar dilution method with the E-test and two agar diffusion methods. *APMIS.* **104(2)**:108-14.
- Avison MB, Higgins CS, von Heldreich CJ, Bennett PM, Walsh TR . 2001. Plasmid Location and Molecular Heterogeneity of the L1 and L2 beta-Lactamase Genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**:413-419
- Bae EA, Han MJ, Kim DH. 1999. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Med.* **65**:442-443
- Bebrone C, Moali C, Mahy F, Rival S, Docquier JD, Rossolini GM, Fastrez J, Pratt RF, Frere JM, Galleni M. 2001. CENTA as a Chromogenic Substrate for Studying β -Lactamases . *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 1868 – 1871
- Borradaile NM, Carroll KK, Kurowaska EM. 1999. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids.* **34**:591-598
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7(6)**:1513-1523
- Bush K, Sykes RB. 1986. Methodology for the study of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* **30** : 6-10.
- Bush K. 1988. β -Lactamase Inhibitors from Laboratory to Clinic. *Clin Microbiol Rev.* **1**: 109-123
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**:1211 – 1233.

Carlsson F, Sandin C, Lindahl G. 2005. Human fibrinogen bound to *Streptococcus pyogenes* M protein inhibits complement deposition via the classical pathway. *Mol Microbiol.* **56**: 28-39

Clark NM, Patterson J, Lynch JP. 2003. Antimicrobial resistance among Gram-negative organisms in the intensive care unit. *Curr Opin Crit Care.* **9**:413-423.

Crowder MW, Walsh TR, Banovic L, Pettit M, Spencer J. 1998. Overexpression, Purification, and Characterization of the Cloned Metallo- β -Lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**: 921-926

Denton M, and Kerr KG. 1998. Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev.* **11(1)**:57-80

García-Rodríguez JA, García Sánchez JE, García García MI, García Sánchez E, Muñoz Bellido JL. 1991. Antibiotic susceptibility profile of *Xanthomonas maltophilia*. In vitro activity of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **14(3)**:239-43

Gould VC, and Avison MB. 2006. SmeDEF-mediated antimicrobial drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates having defined phylogenetic relationships. *J Antimicrob Chemother.* **57** : 1070 – 1076

Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP. 1998. A broad-host-range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene.* **212**:77-86.

Hugh R, and Ryschenkow E. 1961. *Pseudomonas maltophilia*, an *Alcaligenes*-like species. *J Gen Microbiol.* **26**:123-132.

Izard JW, and Kendall DA. 1994. Signal peptides: exquisitely designed transport promoters. *Mol Microbiol.* **13(5)**:765-773

Johansson BP, Levander F, von Pawel-Rammingen U, Berggård T, Björck L, James P. 2005. The Protein Expression of *Streptococcus pyogenes* Is Significantly Influenced by Human Plasma. *J Proteome Res.* **4**: 2302- 2311

- Juhnke ME, and des Jardin E. 1989. Selective Medium for Isolation of *Xanthomonas maltophilia* from Soil and Rhizosphere Environments. *Appl Environ. Microbiol.* **55**: 747-750
- Kobayashi Y, Sugaya Y, Tokue A. 1998. Clinical effects of β -sitosterol (phytosterol) on benign prostatic hyperplasia: preliminary study. *Hinyokika Kiyo.* **44**:865-868.
- Krueger TS, Clark EA, Nix DE. 2001. In vitro susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* to various antimicrobial combinations. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **41**:71-78.
- Lai CH, Chi CY, Chen HP, et al. 2004. Clinical characteristics and prognostic factors of patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect.* **37(6)**: 350-358.
- Lambert T, Ploy MC, Denis F, Courvalin P. 1999. Characterization of the chromosomal *acc(6)-Iz* gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**:2366-2371.
- Lee S-H, Jeong T-S, Park YB. 1999. Hypocholesterolemic effect of hesperetin mediated by inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase in rats fed high-cholesterol diet. *Nutr Res.* **19**:1245-1258.
- Lecso-Bornet M, and Bergogne-Bérézin E. 1997. Susceptibility of 100 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* to three β -lactams and five β -lactam - β -lactamase inhibitor combinations. *J Antimicrob Chemother.* **40**:717-720
- Livermore DM. 1995. Bacterial resistance to carbapenems. *Adv Exp Med Biol.* **390**:25-47
- Li XZ, Zhang L, Poole K. 2002. SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:333-343
- Lister PD, Gardner VM, Sanders CC. 1999. Clavulanate Induces Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC Cephalosporinase at Physiologically Relevant Concentrations and Antagonizes the Antibacterial Activity of Ticarcillin . *Antimicrob Agents Chemother.* **43**: 882 - 889
- Micozzi A, Venditti M, Monaco M, Friedrich A, Taglietti F, Santilli S, Martino P. 2000. Bacteremia due to *Stenotrophomonas maltophilia* in patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis.* **31**:705-711

Muñoz Bellido JL, Muñoz Criado S, García García I, Alonso Manzanares MA, Gutiérrez Zufiaurre MN, García-Rodríguez JA. 1997. In Vitro Activities of β -Lactam – β -Lactamase Inhibitor Combinations against *Stenotrophomonas maltophilia*: Correlation between Methods for Testing Inhibitory Activity, Time-Kill Curves, and Bactericidal Activity. *Antimicrob Agents Chemother.* **41**: 2612-2615

Normén L, Dutta P, Lia A, Andersson H . 2000. Soy sterol esters and β -sitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel. *Am J Clin Nutr.* **71**:908-913.

Palleroni NJ, and Bradbury JF. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int. J Syst Bacteriol.* **43**:606 – 609.

Pankuch GA, Jacobs MR, Rittenhouse SF, Appelbaum PC. 1994. Susceptibilities of 123 *Xanthomonas maltophilia* Strains to Clinafloxacin, PD 131628, PD 138312, PD 140248, Ciprofloxacin, and Ofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:369-370

Paton R, Miles RS, Amyes SG. 1994. Biochemical Properties of Inducible β -Lactamases Produced from *Xanthomonas maltophilia* . *Antimicrob Agents Chemother.* **38**: 2143-2149

Richmond MH, Sykes RB . 1973. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol.* **9**:31-88.

Rosta S, Mett H. 1989. Physiological Studies of the Regulation of β -Lactamase Expression in *Pseudomonas maltophilia* . *Journal of Bacteriology.* **171**: 483-487

Saino Y, Inoue M, Mitsunashi S. 1984. Purification and properties of an inducible cephalosporinase from *Pseudomonas maltophilia* GN12873. *Antimicrob Agents Chemother.* **25**:362 – 365.

Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsunashi S. 1982. Purification and Properties of Inducible Penicillin β -Lactamase Isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **22**:564-570

Sánchez P, Alonso A, Martínez JL. 2002. Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* Multidrug efflux pump SmeDFF. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**:3386-3393.

Schweizer HP, and Hoang TT.1995. An improved system for gene replacement and *xyIE* fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*. **158**: 15-22

Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology*. **1**:784-791.

Stephen J. Cavalieri, Christine C. Sanders, and Charles new.1991. Influence of β -Lactamase Inhibitors on the Potency of Their Companion Drug with Organisms Possessing Class I Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. **35**:1343-1347

Smit WJ, Boquest AL, Geddes JE, Tosolini FA.1994. The antibiotic susceptibilities of *Xanthomonas maltophilia* and their relation to clinical management. *Pathology*. **26(3)**:321-4

Sutter VL. 1968. Identification of *Pseudomonas* species isolated from hospital environment and human sources. *Appl Microbiol*. **16**:1532 – 1538.

Then RL. 1987. Ability of newer β -lactams to induce β -lactamase production in *Enterobacter cloacae*. *Eur J Clin Microbiol*. **4**:451-455.

Ubeda P, Salavert M, Giner S, Jarque I, Lopez-Aldeguer J, Perez-Belles C, Gobernado M.1998. Bacteraemia from *Stenotrophomonas maltophilia*.clinical epidemiological study and resistance profile. *Rev Esp Quimioter*. **11**:205 – 215

Valdezate S, Vindel A, Loza E, Baquera F, Canton R. 2001 Antimicrobial susceptibilities of unique *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*. **45**:1581—1584.

Villanova PA .1990. National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically—Second Edition. Approved Standard M7-A2. NCCLS.

Walsh TR, MacGowan AP, Bennett PM.1997. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine β -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother*. **41**: 1460 – 1464.

Wang WS, Liu CP, Lee CM, Huang FY. 2004. *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in adults: four years' experience in a medical center in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. **37(6)**:359-65

Wilt TJ, MacDonald R, Ishani A. 1999. β -sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *BJU Int.* **83**:976-983.

Windhorst S, Frank E, Georgieva DN, Genov N, Buck F, Borowski P, Weber W. 2002. The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*: characterization of the protein and molecular cloning of the gene. *J Biol Chem.* **277**:11042-11049.

Zhang L, Li XZ, Poole K. 2001. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**:3497-3503.



圖

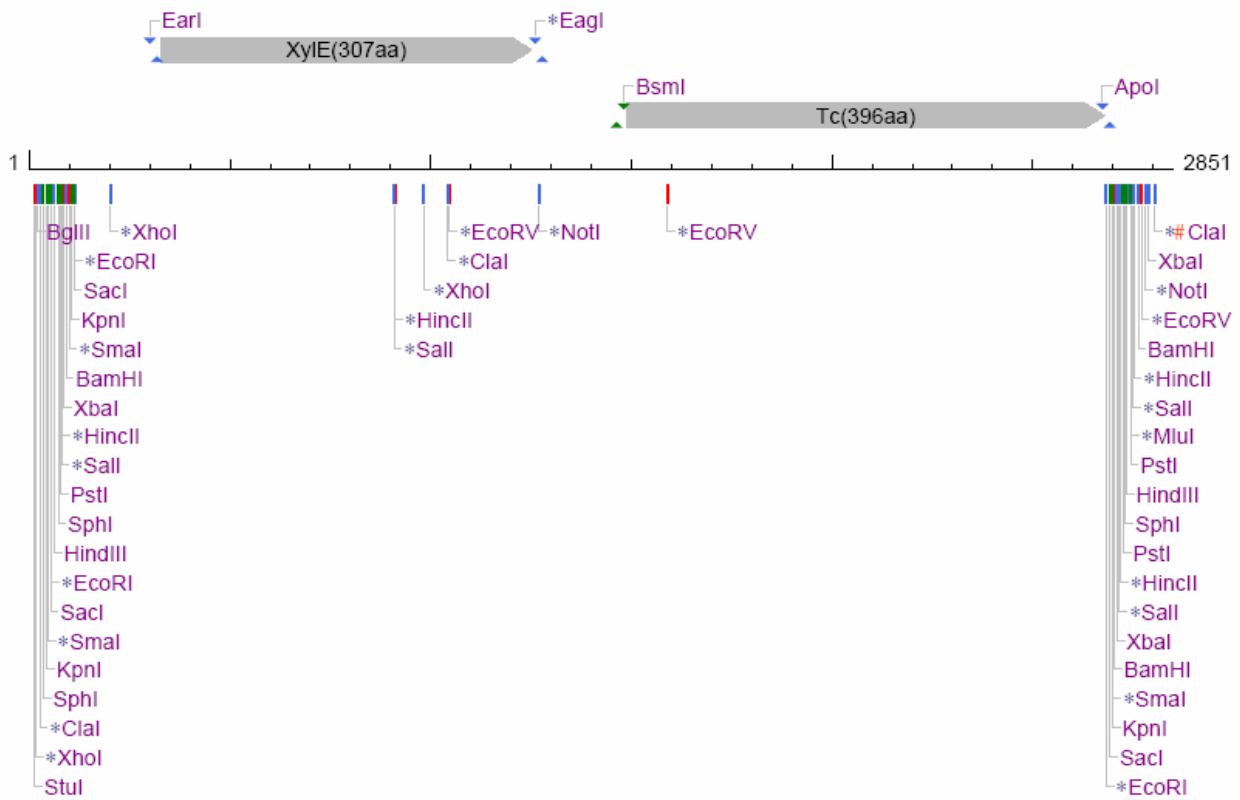


Fig. 1. Physical map of inserted *xylE-Tc* cassette of plasmid pOKXT_{HindIII}

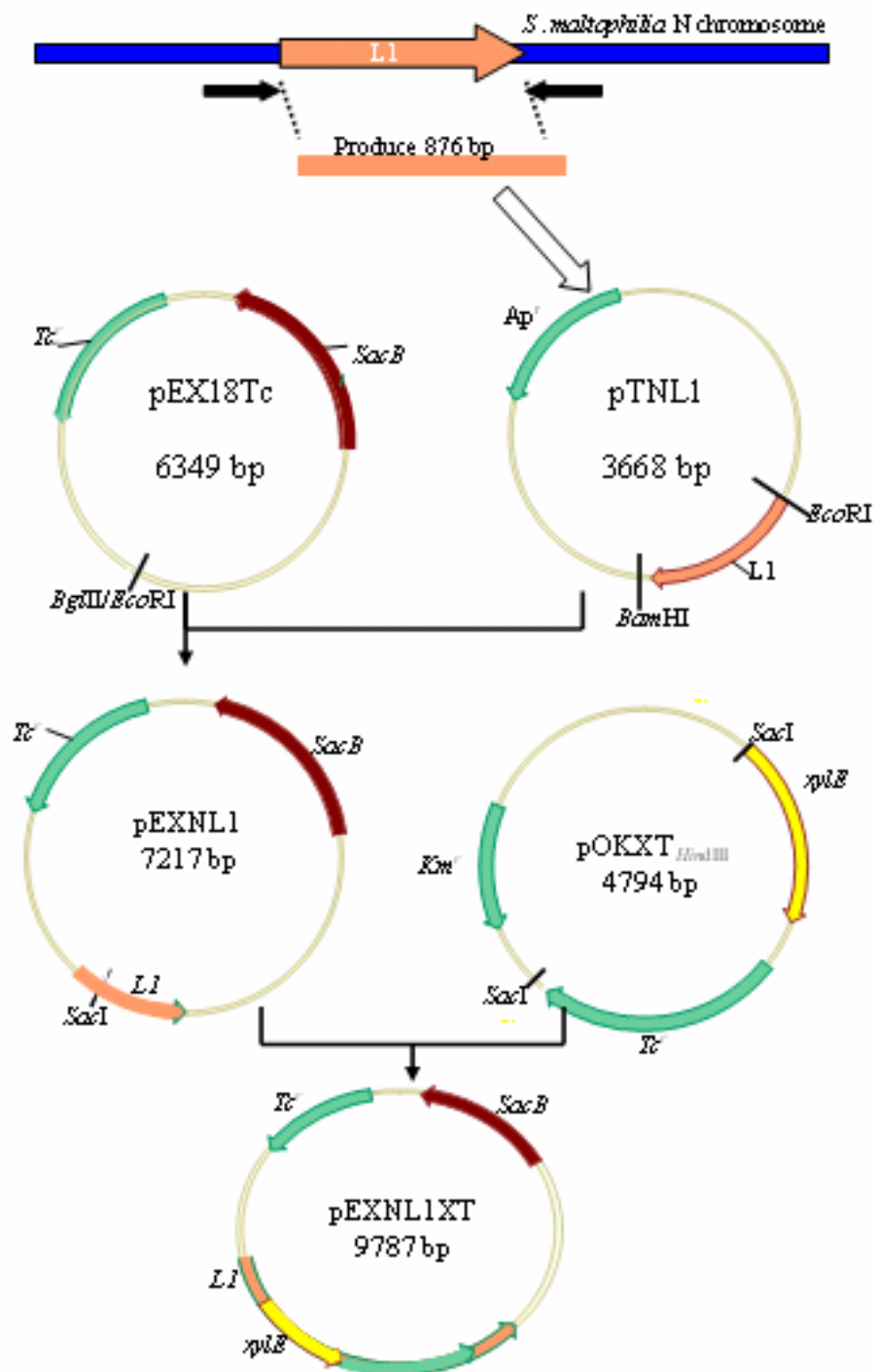


Fig. 2. Construction of plasmid pEXNL1XT.

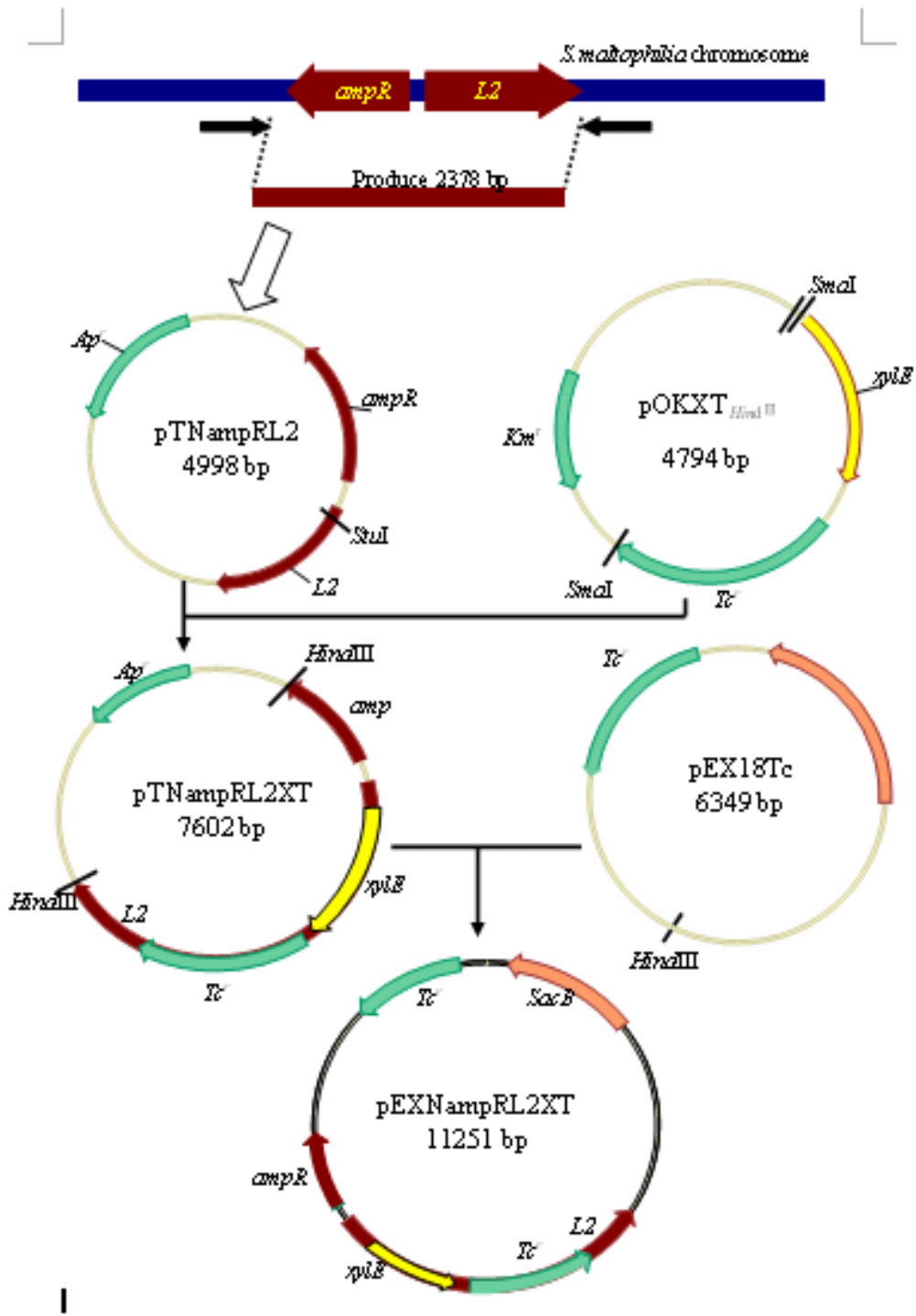


Fig. 3. Construction of plasmid pEXNL2XT.

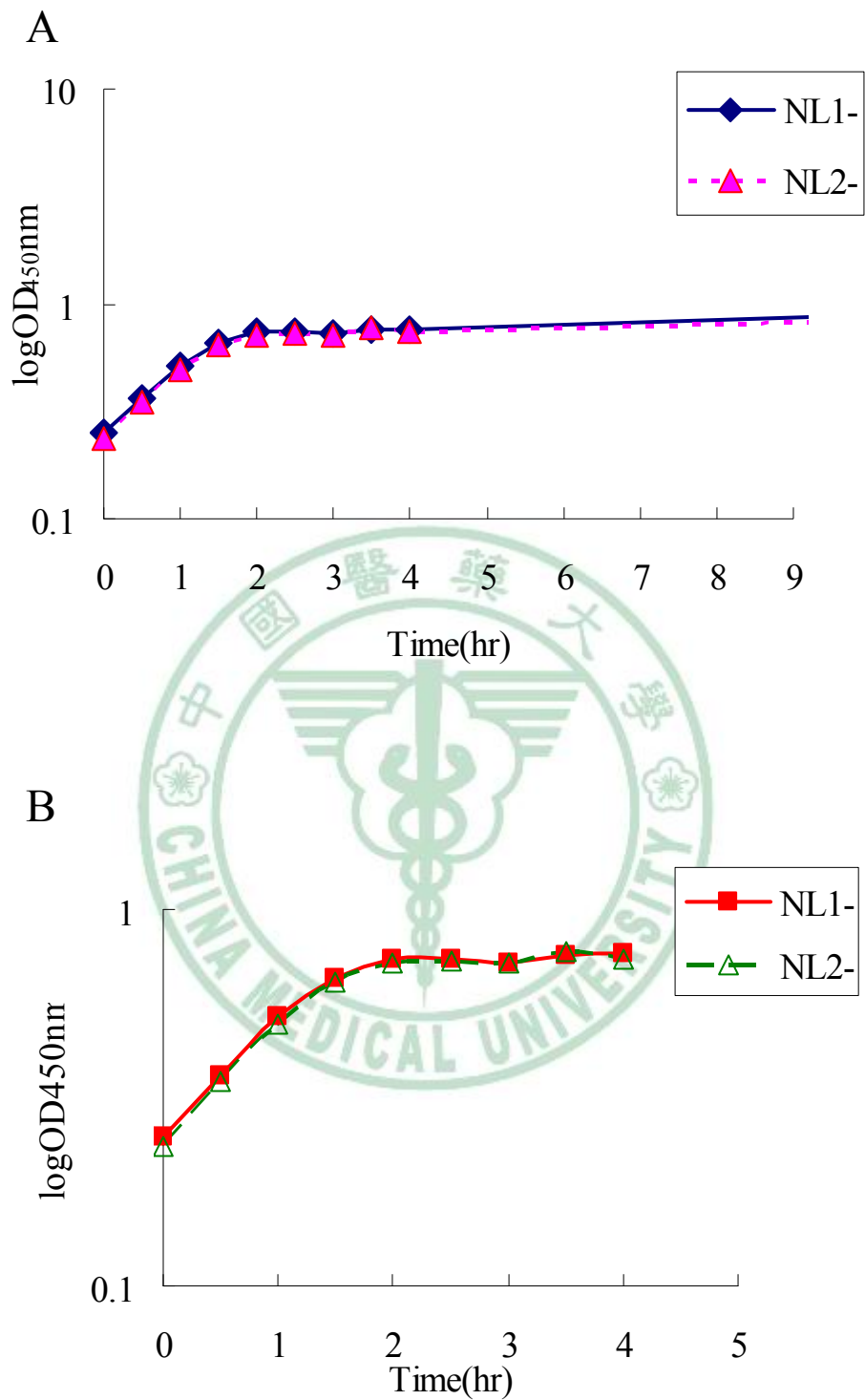


Fig. 4. Growth curves of the strains NL1⁻ and NL2⁻ in LB medium with clavulanic acid of 50 μ g/ml. Overnight culture (A) and four hours culture (B) of the strains NL1⁻ and NL2⁻.

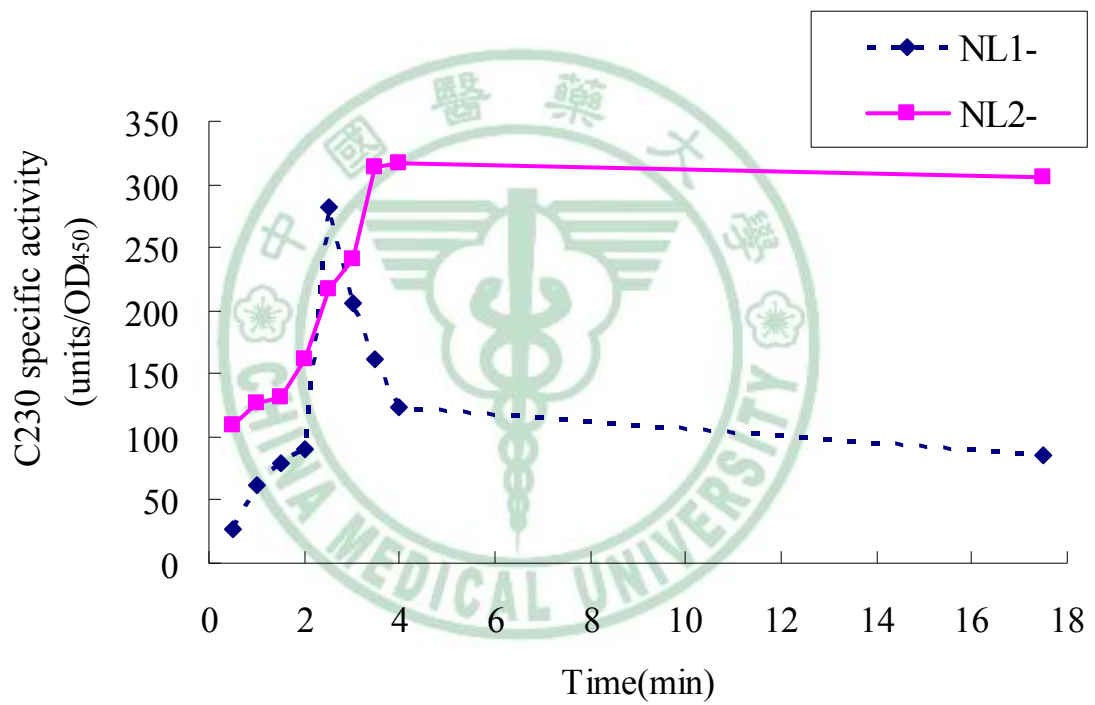


Fig. 5. Induction kinetics of strains NL1⁻ and NL2⁻ by clavulanic acid of 50 µg/ml

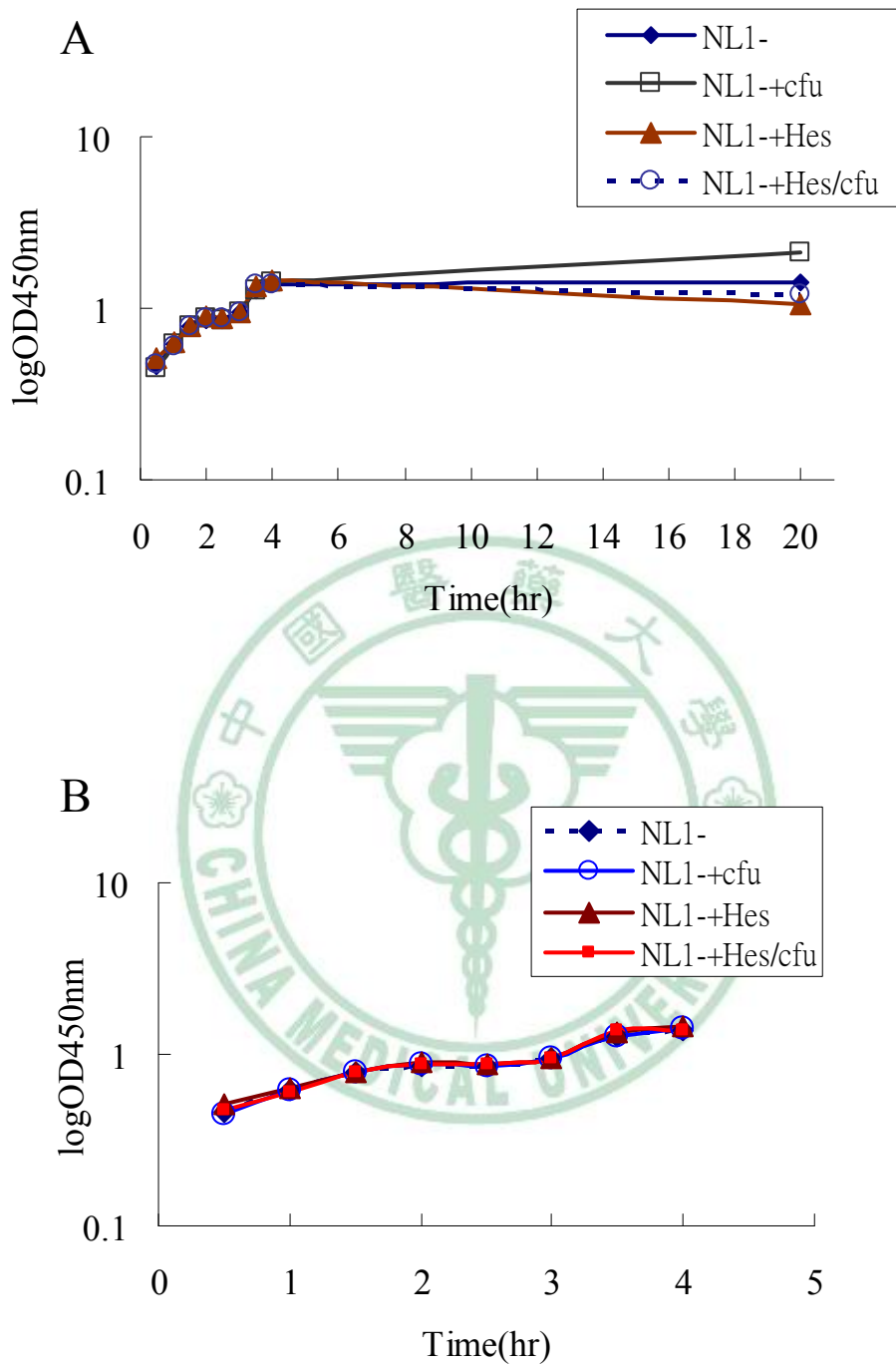


Fig. 6. Growth curves of the strain NL1⁻ in LB medium and LB medium containing cefuroxime (50 $\mu\text{g/ml}$), hesperetin (500 $\mu\text{g/ml}$) and hesperetin/cefuroxime (500 $\mu\text{g/ml}$ / 50 $\mu\text{g/ml}$), respectively. Overnight culture (A) and four hours culture(B) of the strain NL1⁻.

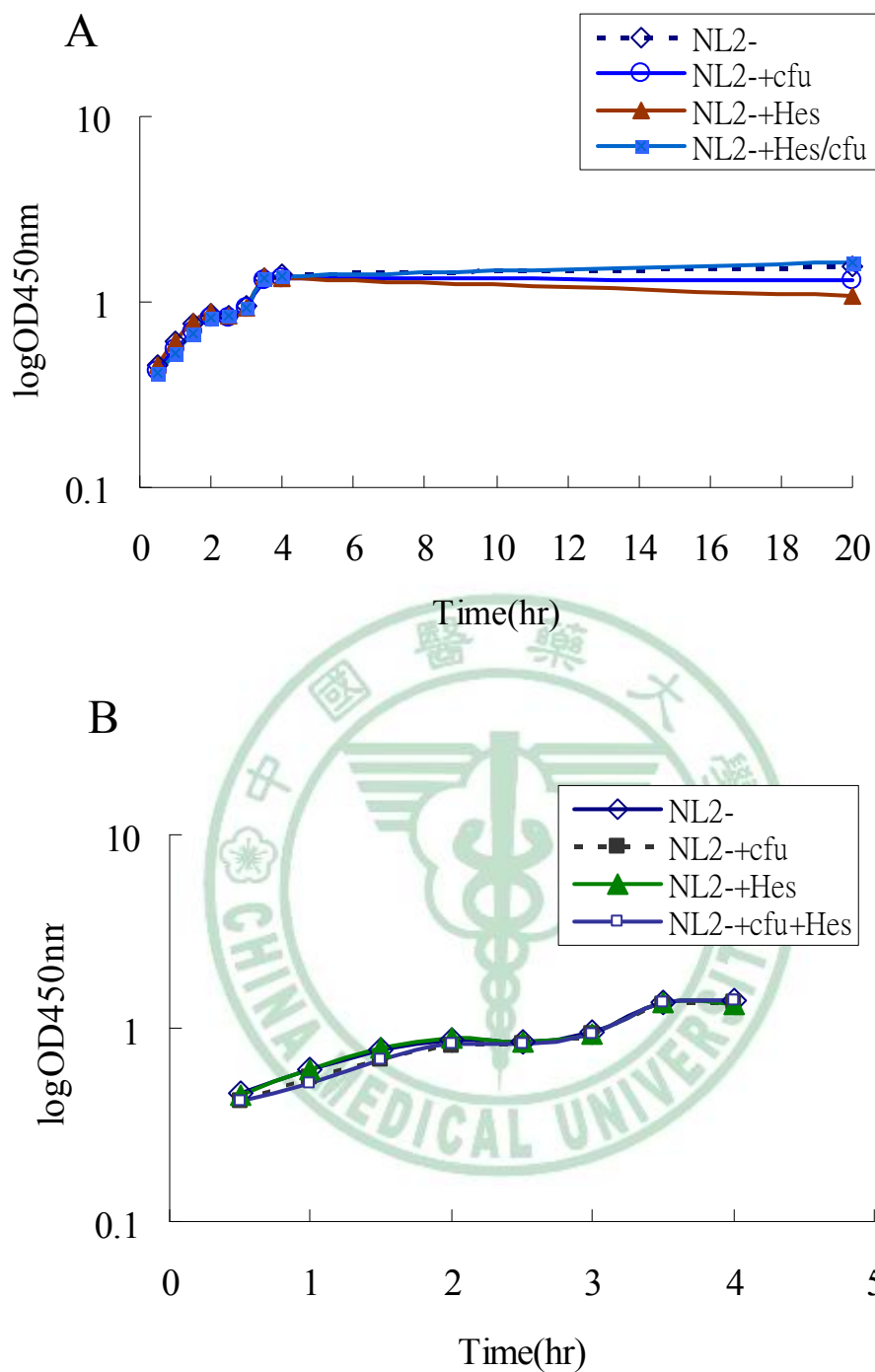


Fig. 7. Growth curves of the strain NL2⁻ in LB medium and LB medium containing cefuroxime (50 μg/ml), hesperetin (500 μg/ml) and hesperetin/cefuroxime (500 μg/ml/50 μg/ml), respectively. Overnight culture (A) and four hours culture (B) of the strain NL2⁻.

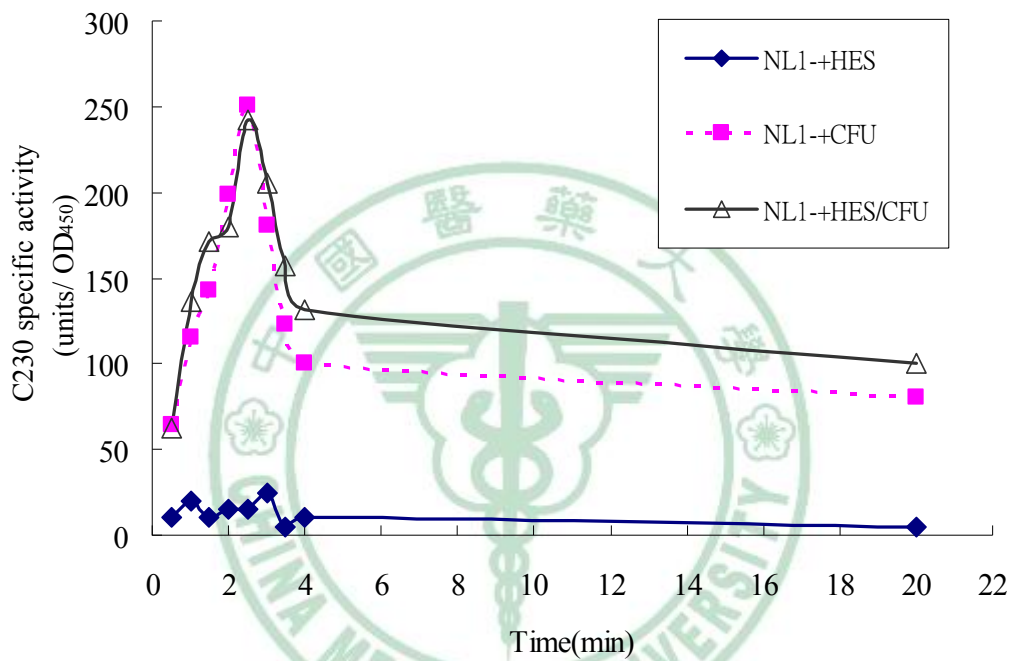


Fig. 8. Induction kinetics of strain NL1⁻ in LB medium and LB medium containing cefuroxime(50 $\mu\text{g/ml}$), hesperetin (500 $\mu\text{g/ml}$), and hesperetin /cefuroxime (500 $\mu\text{g/ml}/50 \mu\text{g/ml}$), respectively.

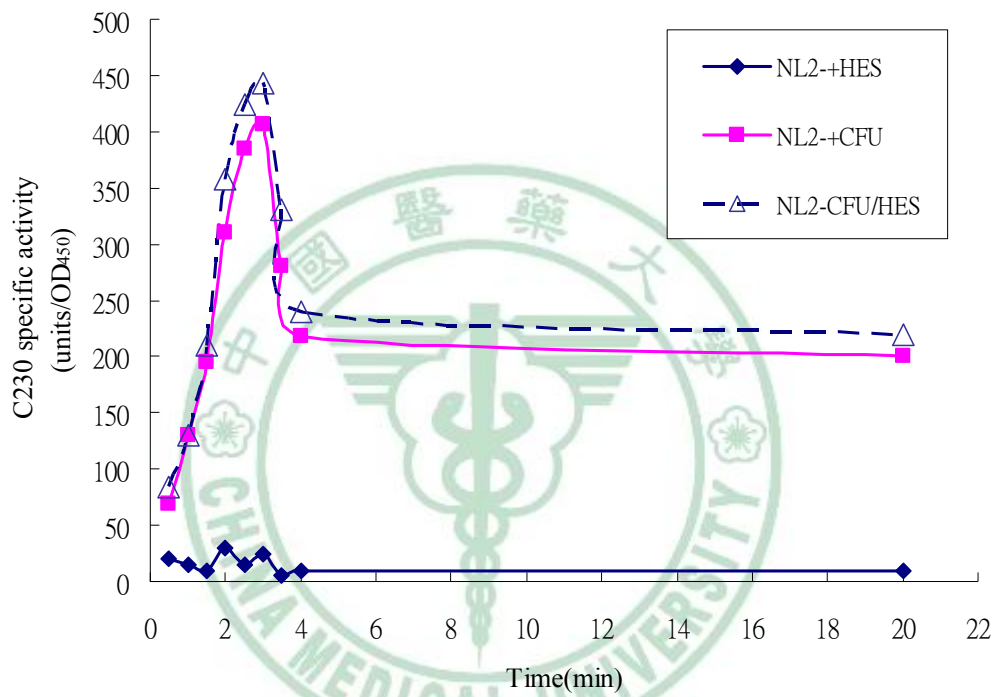


Fig. 9. Induction kinetics of strain NL2⁻ in LB medium and LB medium containing cefuroxime (50 $\mu\text{g/ml}$), hesperetin (500 $\mu\text{g/ml}$) and hesperetin/cefuroxime (500 $\mu\text{g/ml}/50 \mu\text{g/ml}$), respectively.

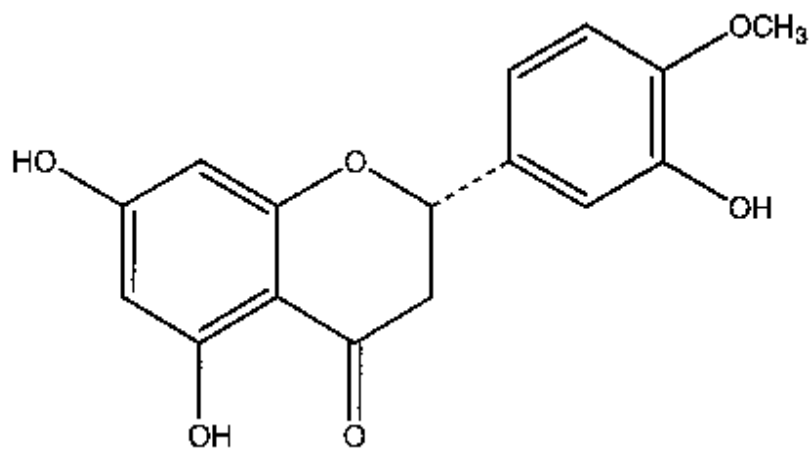


Fig. 10. The chemical structure of hesperetin

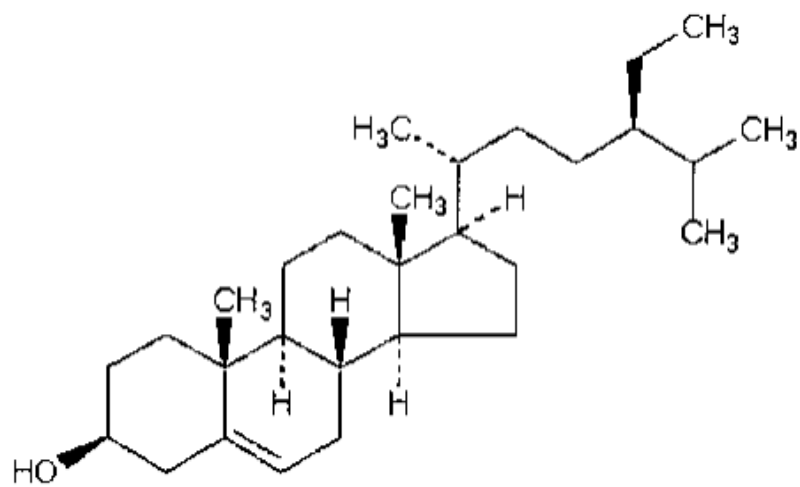


Fig. 11. The chemical structure of β -sitosterol

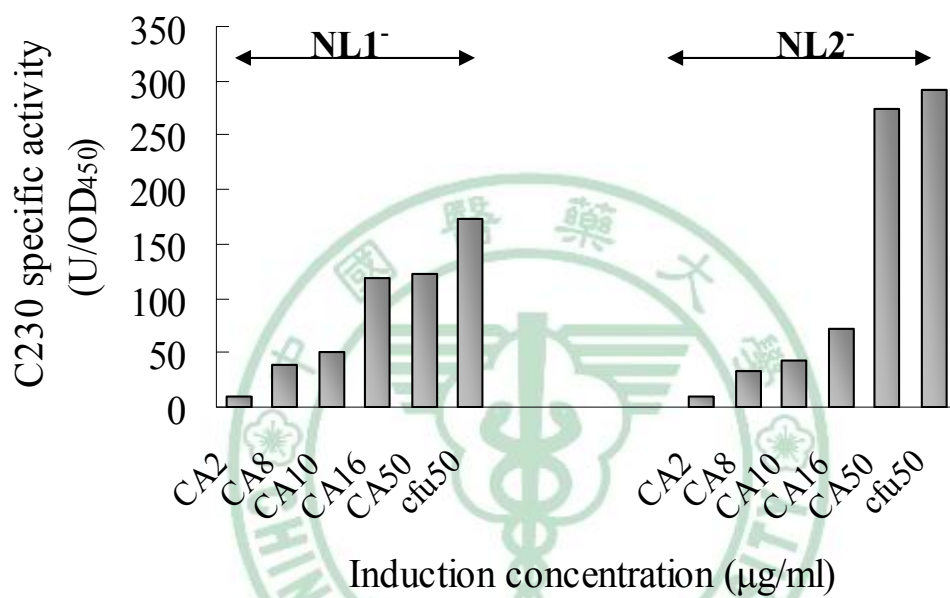


Fig. 12. Induction of C23O activity of strains NL1⁻ and NL2⁻ grown in LB medium containing clavulanic acid (2, 8, 10, 16, 50 µg/ml) and cefuroxime (50 µg/ml), respectively.

表

TABLE 1. The optimal density at 450 nm and the induced C23O activity of strains NL1⁻ and NL2⁻ grown in LB medium containing different additives.

Medium	NL1 ⁻		NL2 ⁻	
	OD ₄₅₀	C23O activity (U ^c /OD ₄₅₀)	OD ₄₅₀	C23O activity (U ^c /OD ₄₅₀)
LB	1.1434	ND ^b	1.0786	ND
LB + 5% serum	1.3592	ND	1.1790	ND
LB +cfu ^a	1.3414	115	1.1256	208
LB +cfu ^a + 5% serum	1.1234	134	1.0274	201

^acfu: cefuroxime at concentration of 50 µg/ml;

^bND: Non-Detectable

^cU: One unit of enzyme activity was designated as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 nmol of catechol per min at 25 °C, pH7.5.

TABLE 2. The optimal density at 450 nm and the induced C23O activity of strains NL1⁻ and NL2⁻ grown in LB medium containing clavulanate of different concentrations.

Clavulanate concentration (mg/ml)	OD ₄₅₀		C23O activity (U ^a /OD ₄₅₀)	
	NL1 ⁻	NL2 ⁻	NL1 ⁻	NL2 ⁻
10	1.456±0.409	1.723±0.741	57±16.8	41±14.9
50	0.847±0.126	0.824±0.157	164±32.9	246±23
100	0.140±0.001	0.287±0.105	90±18	337.5±13

^aU: One unit of enzyme activity was designated as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 nmol of catechol per min at 25 °C, pH7.5.

TABLE 3. The optimal density at 450 nm and the induced C23O activity of strains NL1⁻ and NL2⁻ grown in XOLN medium containing 1% different carbon sources.

Carbon source (1%)	OD ₄₅₀		C23O activity (U ^a /OD ₄₅₀)	
	NL1 ⁻	NL2 ⁻	NL1 ⁻	NL2 ⁻
Sucrose	0.52	0.5424	106	173
Glucose	0.6495	0.6887	119	178
Maltose	0.7501	0.7553	126	188
Lactose	0.482	0.4799	123	178
Glycerol	0.3658	0.38	101	176

^aU : One unit of enzyme activity was designated as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 nmol of catechol per min at 25 °C, pH7.5.

TABLE 4. The optimal density at 450 nm and the induced C23O activity of strains NL1⁻ and NL2⁻ grown in LB medium containing different additives.

Medium	OD ₄₅₀		C23O activity (U ^d /OD ₄₅₀)	
	NL1 ⁻	NL2 ⁻	NL1 ⁻	NL2 ⁻
LB	1.275	1.257	ND ^b	ND
LB+β-S ^c	1.335	1.282	ND	ND
LB+cfu ^a	1.358	1.278	195	265
LB+cfu ^a /β-S ^c	1.326	1.183	185	260

^acfu: cefuroxime at concentration of 50 µg/ml.

^bND: Non-Detectable.

^cβ-S:β-sitosterol at concentration of 10 mg/ml.

^dU: One unit of enzyme activity was designated as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 nmol of catechol per min at 25 °C, pH7.5.

TABLE 5. Susceptibility test of strains N, NL1⁻, and NL2⁻.

Antimicrobial	MIC ^a (µg/ml)		
	N	NL1-	NL2-
clavulanate	128	128	128
Cab	>256	>256	128
Cab/CA(2/1) ^b	64/32	8/4	32/16
Azt	>256	>256	16
Azt/CA(2/1) ^b	32/16	32/16	16/8
Amo	>256	>256	>256
Amo/CA(2/1) ^b	128/64	8/4	128/64
Amo/CA(2 µg/ml) ^c	>256	>256	>256
Ticarcillin	>256	>256	32
Tic/ CA(2/1) ^b	16/8	4/2	32/16
pp	>256	>256	>256
PP/ CA(2/1) ^b	128/64	32/16	128/64

^aMICs were measured by agar dilution method recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards.

^b2/1 β-lactams : inhibitor ration of 2:1

^c2 µg/ml clavulanate concentration were fixed of 2 µg/ml

Abbreviations: Cab: carbenicillin; CA: clavulanate; Amo; amoxicillin; Azt; aztreonam ; Tic:Ticarcillin; pp:piperacillin

TABLE 6. The optimal density at 450 nm and the induced C23O activity of strains NL1⁻ and NL2⁻ grown in LB medium containing different additives.

Additives (µg/ml)	NL1 ⁻		NL2 ⁻	
	OD450	C23O activity (U ^a /OD ₄₅₀)	OD450	C23O activity (U ^a /OD ₄₅₀)
Clavulanate(16)	1.2122	99	1.0656	76
Aztreonam (32)	1.2026	ND ^b	0.6935	295
Azt/CA((32/16)	1.0072	192	0.4919	391
Clavulanate(4)	1.15	ND ^b	1.1464	ND ^b
Carbenicillin (8)	1.2044	55	0.957	158
Cab/CA(8/4)	0.5384	201	1.0566	220
Amoxicillin (8)	1.0226	83	1.0916	118
Amo/CA(8/4)	0.2251	152	1.19	134
Clavulanate(4)	1.1684	ND ^b	1.0514	ND ^b
Aztreonam (8)	1.0818	ND ^b	1.0304	215
Azt/CA(8/4)	1.115	134	1.052	297

^aU : One unit of enzyme activity was designated as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 nmol of catechol per min at 25 °C, pH7.5.

^bND: Non-Detectable.

Abbreviations: Cab: carbenicillin; CA: clavulanate; Amo; amoxicillin; Azt; aztreonam ; Tic:Ticarcillin; pp:piperacillin

TABLE 7. Susceptibility test and the induced C23O activity of strains N, NL1⁻ and NL2⁻.

	MIC ^c (µg/ml)			C23O activity(U ^a /OD ₄₅₀)		
	AZT	CA	AZT/CA	AZT32	CA16	AZT32/CA16
N	>256	128	32/16			
NL1 ⁻	>256	128	32/16	ND ^b	99	192
NL2 ⁻	16	128	16/8	159	76	391

^aU : One unit of enzyme activity was designated as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 nmol of catechol per min at 25 °C, pH7.5.

^bND: Non-Detectable.

^c MICs were measured by agar dilution method recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Abbreviations: CA: clavulanate; Azt; aztreonam

TABLE 8. Susceptibility test and the induced C23O activity of strains N, NL1⁻ and NL2⁻.

	MIC ^c (μg/ml)			C23O activity(U ^a /OD ₄₅₀)		
	Cab	CA	Cab/CA	Cab8	CA4	Cab8/CA4
N	>256	128	64/32			
NL1 ⁻	>256	128	8/4	55	ND ^b	201
NL2 ⁻	128	128	32/16	158	ND	220

^aU: One unit of enzyme activity was designated as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 nmol of catechol per min at 25 °C, pH7.5.

^bND: Non-Detectable.

^c MICs were measured by agar dilution method recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Abbreviations: CA: clavulanate; Cab: carbenicillin;

TABLE 9. Susceptibility test and the induced C23O activity of strains N, NL1⁻ and NL2⁻.

	MIC ^c (µg/ml)			C23O activity (U ^a /OD ₄₅₀)		
	Amo	CA	Amo/CA	Amo8	CA4	Amo8/CA4
N	>256	128	128/64			
NL1 ⁻	>256	128	8/4	83	ND ^b	152
NL2 ⁻	>256	128	128/64	118	ND	134

^aU : One unit of enzyme activity was designated as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 nmol of catechol per min at 25 °C, pH7.5.

^bND: Non-Detectable.

^c MICs were measured by agar dilution method recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Abbreviations: CA: clavulanate; Amo; amoxicillin

附錄 一、 Classification schemes for bacterial β -lactamase

Functional group	Molecular class	Preferred substrates ^a	Inhibited by		Representative enzymes
			CA ^b	EDTA	
1	C	Ceph	-	-	AmpC, plasmid-encoded cephalosporinases (Gram-negative bacteria), CMY-1
2a	A	Pen	+	-	Penicillinase from Gram-positive bacteria
2b	A	Pen, ceph	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Pen, Ceph, extended-spectrum ceph, monobactam	+	-	TEM-3.... TEM-105, SHV-2.... SHV-39
2br	A	Pen	+/-	-	TEM-30.... TEM-39...(IRT 1-IRT-26), SHV-10
2c	A	Pen, carbencillin	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Pen, cloxacillin	+/-	-	OXA-1...OXA-40, OXA-10=PSE-2
2e	A	Ceph	+	-	Inducible cephalosporinase from <i>Pr.vulgaris</i> , SFO-1, L2
2f	A	Ceph, pen, carbapenems	+	-	NMC-A, SME-1, IMI-1
3	B	Carbapenems, Often, all ceph, pen, No monobactam	-	+	L1 from <i>S. maltophilia</i> , CfiA/CcrA from <i>B. fragilis</i> , VIM-1, IMP-1.... IMP-9
4	Not determined	Pen	-	-	Penicillinase from <i>B. cepacia</i>

^a Ceph : cephalosporine ; Pen : penicillin

^b CA : clavulanic acid

Source : (Bush, Jacoby and Medeiros , 1995)

附錄 二、 本實驗所使用菌株

Strain	Characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F- Φ 80d <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ (<i>lacZ</i> YA-argF)U169 <i>endA1 recA1 hasdR17</i> (rk ⁻ mk ⁺) deoR <i>thi-1 supE44lgyA96relA1</i>	Hanahan,1983
S17-1	<i>thi pro recA hasdR⁻</i> , RP4:2Tc:Mu:Km T7 , λ <i>pir</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>S. maltophilia</i>		
N	Clinical isolate was obtained in China Medical University Hospital.	Our laboratory, Yang
NL1 ⁻	N <i>L1</i> mutant constructed by inserting a <i>xylE-Tc</i> cassette into the <i>SacI</i> restriction site of the <i>L1</i> gene	Our laboratory, Yang
NL2 ⁻	N <i>L2</i> mutant constructed by inserting a <i>xylE-Tc</i> cassette into the <i>StuI</i> restriction site of the <i>L2</i> gene	Our laboratory, Yang

,

附錄三、本實驗所使用質體

Plasmids	Characteristics	Source or reference
pEX18Tc	6,349bp, pMB1 replicon, <i>oriT</i> , <i>lacZα</i> , <i>SacB</i> , <i>Tc^r</i>	Hoang et al.,1998
pOK12	2,134 bp, P15A replicon, <i>lacZα</i> , <i>Km^r</i>	Messing & Vieira, 1991
pX1918GT	5,154 bp, <i>lacZα</i> , <i>Gm^r</i> , <i>AP^r</i> <i>xylE</i>	Schweizer <i>et al.</i> , 1995
pTTc	A 1.4-kb PCR amplicon containing tetracycline resistance (<i>Tc^r</i>) gene was cloned into a T-vector; <i>Ap^r</i>	This study
pTXylERI	B1.3-kb PCR amplicon containing <i>xylE</i> gene was cloned into a T-vector; <i>Ap^r</i>	Yang laboratory
pTXylETc	An <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I DNA fragment (1.4-kb) from plasmid (A) was cloned into the <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I site of (B); <i>Tc^r</i> , <i>AP^r</i>	This study
pOKXylETcRI	An <i>Eco</i> RI DNA fragment (2.7-kb) from plasmid pTXylETc was cloned into the <i>Eco</i> RI site of pOK12; <i>Tc^r</i> , <i>Km^r</i>	This study
pXXT	An <i>Eco</i> RI DNA fragment (2.7-kb) from plasmid pOKXylETcRI was cloned into the <i>Eco</i> RI site of pX1918GT; <i>Tc^r</i> , <i>Ap^r</i>	This study
pOKXT _{HindIII}	An <i>Hind</i> III DNA fragment (2.7-kb) from plasmid pXXT was cloned into the <i>Hind</i> III site of pOK12; <i>Tc^r</i> , <i>Km^r</i>	This study
pEXNL1XT	Derivatives of pEX18Tc, containing the <i>L1</i> gene inserted an <i>xylE-Tc</i> cassette.	Yang Laboratory
pEXNL2XT	Derivatives of pEX18Tc, containing the <i>L2</i> gene inserted an <i>xylE-Tc</i> cassette.	Yang Laboratory

附錄四、

S. maltophilia produces at least two chromosomally mediated β -lactamases, L1 and L2

	L1 ^a	L2 ^b
Structural analysis	Tetramer, molecular mass of ca. 115 kDa , bound Zn(II) per monomer	Dimer , molecular mass of 63 kDa, STXK active-site motif, SDN loop motif
Sequence analysis	873 bp (GC content: 68.4%)	909 bp (GC content : 71.6%)
Substrate	penicillins ; cephalosporins; carbapenem	penicillins ; cephalosporins; monobactams
Inhibitor	EDTA	clavulanic acid

^a This enzyme from *S. maltophilia* ULA-511

^b This enzyme from *S. maltophilia* 1275 IID

附錄五、

Susceptibility of *S. maltophilia* to β -lactams/ β -lactamase inhibitor combinations

Antimicrobial agent	Test of strains	%(no.) of resistant strains	Ref.
Amo	99	100	Valdezate <i>et al.</i> , 2001
Amo/CA (2 μ g/ml) ^b	99	100	Valdezate <i>et al.</i> , 2001
Tic	99	73.7	Valdezate <i>et al.</i> , 2001
Tic/CA (2 μ g/ml)	99	46.5	Valdezate <i>et al.</i> , 2001
Azt	99	91.9	Valdezate <i>et al.</i> , 2001
Azt/CA (2 μ g/ml)	99	65.7	Valdezate <i>et al.</i> , 2001
Amo/CA (2/1) ^a	124	100	Arpi <i>et al.</i> , 1996
Azt/CA (2/1)	124	0	Arpi <i>et al.</i> , 1996
Azt/CA (1/1)	42	100	García-Rodríguez <i>et al.</i> , 1991
Azt/CA (2/1)	42	0	García-Rodríguez <i>et al.</i> , 1991
Tic/CA (2 μ g/ml)	55	29	Smit <i>et al.</i> , 1994

^a2/1 β -lactams : inhibitor ration of 2:1

^b2 μ g/ml clavulanate concentration were fixed of 2 μ g/ml

Abbreviations: Cab: carbenicillin; CA: clavulanate; Amo; amoxicillin; Azt; aztreonam ; Tic:Ticarcillin