

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 之 AmpH 蛋白
以 Dose-Dependent 方式調控
L1 及 L2 β -lactamases 之表現

**AmpH Regulates the Expression of the Chromosomal L1
and L2 β -lactamases of *Stenotrophomonas maltophilia*
in a Dose-Dependent Manner**

指導教授：楊翠青 博士

Tsuey-Ching Yang, Ph.D

研究生：黃紹晟

Shao-Cheng Huang

中華民國九十八年六月

致謝

隨著論文的完稿，我的心也慢慢的沉澱，回想起這兩年來的點點滴滴，或許當初選擇念碩士班是對的。雖然大學部的期間也是在楊翠青老師的實驗室裡面胡搞瞎搞，但是老師還是很有耐心的教導我不只是實驗上的技巧也讓我對於自己的人生目標有了新的追尋方向。所以，我真的很感謝在這兩年裡有老師的耐心指導，雖然有時候有酸酸甜甜的感覺，但這不是一般人可以體會到的滋味。再來就要感謝實驗室的好夥伴啦，冠傑、凱弘、奕瑋和盈如可以說是帶我走過磨合期的超級好學長姐阿，我常聽到別人家實驗室有多糟的學長姐，但這在我們家是看不到的啦；還有瑜姿、昕潔、凱旋、欣好和景翔這幾個好學妹的陪伴，不只是實驗上還有平常嘻嘻哈哈的超級快樂的談天說地，讓我這嘴巴停不下來的人可以說是過的超 happy，不過要強調一點就是，我的工作不是打雜的啦；接著就是只有待半年的永瑞了，雖然只有短短半年，但卻好像頻率極合讓我們變成無話不說的好兄弟，實驗室誰最挺你…兄弟；最後要感謝林振文老師及林振文老師實驗室的一大群學長姐、同學以及學弟妹們了，先感謝明璋、俊瑋、依芸、美秀和姿穎這些學長姐們讓我在實驗之餘不忘娛樂；還有心元、于楨和曼慈在我最失意的時候拉我一把，但在平時也不忘調侃我一番，真的是讓我又愛又恨的麻吉拉；最後就是偉生、妍冠、京伶和莉馨這群學弟妹的

關心還有”照顧”拉，說真的在實驗室裡缺少哪一塊都不完美。而我覺得我在的這個實驗室就是一個最完美的實驗室。最後最後就是要感謝我的爸媽，當然沒有他們也沒有我摟，但是最重要的是如果沒有他們的養育及教導也不會有現在的我。能在中國醫藥大學完成我碩士的學業，很高興也覺得很幸運。最後一句就是，我畢業啦！



中文摘要

Stenotrophomonas maltophilia 有一誘發型的 L2 β -lactamase，其誘發表現通常會被位於上游的 *ampR* 基因所調控。本論文中，利用即時定量 PCR(QRT-PCR)、反轉錄酶 PCR(RT-PCR)、實驗去證實 *L2* 基因及其下游 *ampH* 基因型成一 operon。而 *ampH* 基因的表現依靠 *ampR* 基因調控的啟動子(P_{L2}) 及其自己的啟動子(P_{ampH})。在菌株 *S. maltophilia* 的基因體序列中，*ampH* 基因被命名為 putative Na^+/H^+ antiporter；卻發現其功能對於維持鈉鹽類的平衡關係似乎不大，反而是調控 *L1* 和 *L2* β -lactamases 基因的誘發表現。而 AmpH 蛋白對於調控 *L1* 和 *L2* 基因的誘發表現與劑量有關；當 AmpH 蛋白表現量不足會使 *L1* 基因的誘發表現量下降，但 AmpH 蛋白表現量太多也會使 *L2* 基因的誘發表現量下降。因此，細菌菌株為了達到 *L1* 及 *L2* β -lactamases 蛋白的最佳誘發量，很巧妙地以 *L2-ampH* operon 的形式組裝，使得 AmpH 蛋白在 P_{L2} 啟動子的誘發下足量表現，此可增加 *L1* β -lactamase 的誘發量卻又不因過多的 AmpH 蛋白被誘發產生，而折損 *L2* β -lactamase 蛋白的誘發量。所以，以 *L2-ampH* operon down-regulation 調控的模式，控制 AmpH 蛋白的誘發量足以增加 *L1* β -lactamase 的誘發量但不會減少 *L2* β -lactamase 的誘發量。

Abstract

The *L2* β -lactamase gene of *Stenotrophomonas maltophilia* has been shown to be involved in resistance of the β -lactams and its expression is regulated by the *ampR* gene, which divergently locates upstream of the *L2* gene. In this study, *L2* and its downstream gene, *ampH*, has been shown to be an operon as revealed by Quantitative Real-Time PCR (QRT-PCR), Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCT), and chromosomal transcriptional fusion assay. The expression of *ampH* gene depends on the *ampR*-regulated *L2* promoter (P_{L2}) and its own promoter (P_{ampH}). The *ampH* gene previously annotated as a putative Na^+/H^+ antiporter in the genome project of *S. maltophilia* was found to be less involved in the sodium homeostasis, but more prominent in the regulation of the induction of *L1* and *L2* β -lactamase genes. The role of AmpH protein in the regulation of *L1* and *L2* genes induction is does-dependent. The induction of *L1* gene in the absence of the AmpH protein proceeds to fewer extents, indicating the optimal *L1* induction occurs with the support of sufficient AmpH. In contrast, the presence of surplus AmpH protein reduces the induction of *L2* gene, while hardly influences the induction of *L1* gene. Consequently, the optimal *L1* and *L2* induction is exquisitely

controlled by an appropriate amount of AmpH protein, which may be cleverly administered by the down-regulated *L2-ampH* operon.



主目錄

致謝.....	i
中文摘要.....	iii
Abstract.....	iv
主目錄.....	vi
圖目錄.....	x
表目錄.....	xi
第一章 前言.....	1
第一節 研究背景.....	1
1.1.1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 的介紹.....	2
1.1.2 革蘭式陰性菌對 β -lactam 類抗生素之抗藥性機轉.....	3
1.1.3 β -lactamase 的分類.....	5
1.1.4 β -lactam 型抗生素.....	6
1.1.5 <i>S. maltophilia</i> 的 L1 與 L2 β -lactamase.....	7
1.1.6 腸內桿菌 β -lactamase 表現之 <i>ampR-ampC, ampD,</i> <i>ampG</i> 系統.....	10
1.1.7 <i>S. maltophilia</i> L1, L2 β -lactamases 表現之 <i>ampR-ampC,</i> <i>ampDI, ampG(?)</i> 系統.....	12
1.1.8 <i>S. maltophilia</i> 染色體上之 <i>ampR-L2-ampH-hp</i> 基因組裝	13

第二節 研究目的.....	15
第二章 研究方法	16
第一節 研究設計.....	16
第二節 研究材料.....	17
2.2.1 本論文所構築與分析之質體與菌株列表一。	17
2.2.2 PCR 引子	17
2.2.3 培養基.....	17
2.2.4 實驗藥品.....	19
2.2.5 抗生素.....	19
2.2.6 試劑與緩衝溶液.....	19
2.2.7 儀器設備.....	21
第三節 實驗方法.....	21
2.3.1 菌種培養與保存.....	21
2.3.2 DNA 之製備	22
2.3.3 洋菜膠體電泳分析.....	25
2.3.4 聚合酶鏈鎖反應.....	25
2.3.5 <i>Escherichia coli</i> 勝任細胞 (competent cell) 之備製....	26
2.3.6 勝任細胞之轉形作用 (transformation)	27
2.3.7 接合作用 (conjugation)	27

2.3.8 構築質體 pEXKJAmpH _{xyIE} 、pRKKJAmpH _{xyIE}	28
2.3.9 KJAmpH _{xyIE} 突變株之獲得與確認.....	29
2.3.10 菌落快速檢驗聚合酶連鎖反應 (Colony PCR)	29
2.3.11 利用超音波破菌法 (Sonicator method) 破菌收集 β-lactamase.....	30
2.3.12 蛋白質濃度定量.....	31
2.3.13 β-lactamase 活性分析	31
2.3.14 Catechol 2,3-dioxygenase (C23O) 活性分析	31
2.3.15 即時定量聚合酶連鎖反應 (QRT-PCR)	32
2.3.16 生長曲線 (growth curve).....	33
第三章 研究結果.....	34
第一節 <i>L2-ampH</i> 基因組裝為一操縱組(operon).....	34
第二節 <i>ampH</i> 基因有自己的啟動子(promoter).....	36
第三節 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> KJ <i>ampH</i> 基因分析.....	37
第四節 AmpH 蛋白主要的功能不是鹽類耐受性 (Sodium tolerance).....	38
第五節 鈉鹽 (NaCl) 濃度會影響 <i>L2</i> 和 <i>ampH</i> 基因啟動子的強 度.....	39
第六節 AmpH 蛋白影響 <i>L1</i> 與 <i>L2</i> β-lactamase 的表現.....	40
第四章 討論.....	42

第五章 結論與建議	50
第一節 討論	50
第二節 建議	50
參考文獻	68



圖目錄

- 圖一 Restriction enzyme maps of the *S. maltophilia* KJ chromosome surrounding the L2-ampH operon
- 圖二 Construction of pEXKJAmpH_{xyIE}
- 圖三 Construction of pRK567AmpH_{xyIE}
- 圖四 The relative mRNA transcript in *L2*, *ampH*, and *hp* of the basal and induced *S. maltophilia* KJ, KJ Δ DI, and KJ Δ R.
- 圖五 The amplicons of reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) of the *S. maltophilia* KJ.
- 圖六 The predicted transmembrane domains of AmpH protein.
- 圖七 The growth curves of strains KJ, KJAmpH_{xyIE}, and KJ Δ DI in XOLN containing 10% glucose and 0 M, 0.2 M, and 0.5 M NaCl.
- 圖八 The proposed model for the β -lactamase expression in *S. maltophilia*. (A) Repression condition (B) Derepression condition

表目錄

- 表一 Bacterial strains, plasmids, and primers used in this study
- 表二 The basal and induced C23O activities of KJL2_{xyIE} and
KJAmpH_{xyIE}
- 表三 The basal and induced C23O activities of KJ(pRK415) and
KJ(pRK567NaH_{xyIE})
- 表四 The homologous protein of AmpH protein
- 表五 The basal and induced C23O activities of KJL2_{xyIE} and
KJAmpH_{xyIE}
- 表六 The basal and induced β -lactamase activities of KJ, KJAmpH_{xyIE},
KJ(pRKAmpH)
- 表七 Bioinformatics analysis of the possible homologue of the
 β -lactamase
- 表八 Bioinformatics analysis of the predicted operon

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*)、嗜麥芽糖黃單胞菌 (*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 maltophilia* 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。

1.1.1 *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。該菌喜好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/) (Crossman, L.C., et al., 2008) [7]，G+C content 為 66.32%，序列全長為 4,851,126 bp。

1.1.2 革蘭氏陰性菌對 β -lactam 類抗生素之抗藥性機轉

革蘭氏陰性菌對 β -lactam 類抗生素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) [8]。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) [9]。第二種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 *Klebsiella* 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)^[10]。第三種抗藥機制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)^[12-14]。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)^[15]。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。

1.1.3 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)^[16]，另一種是 1980 年提出的 Ambler 分類 (Ambler RP. 1980)^[17]。Bush 分類法主要是依據受質 (Substrate) 種類與其活性受何種抑制物 (Inhibitor) 抑制這兩種主要特性，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)^[17]，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。

1.1.4 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。其中在細菌細胞內膜上的 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、

ampicilli、carbenicillin、piperacillin..... 等。Cephalosporin 類抗生素包括 cephaloridine、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。整理於附錄二。

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)^[18]。

1.1.5 *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)^[19]。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)

[20]。

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) [21]。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 會被送到細菌的外膜與內膜之間。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) [22]。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 Class 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 290 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)^[23]。

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)^[23]。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)^[21]，以 Ambler 之分類為 Class 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 909-bp，能編碼出 302 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)^[24]。根據文獻整理 L1 與 L2 β -lactamases 於

附錄三。

1.1.6 腸內桿菌 β -lactamase 表現之 *ampR-ampC*, *ampD*, *ampG* 系統

革蘭式陰性菌中染色體上常見一 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)^[25]。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 (Lin, C.W., et al., 2009)^[26]。

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* (Honore 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)^[36-39]。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-peptide，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-peptide 水解並進一步形成 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-peptide 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 ; Lindbery F. et al., 1985 ; Lindberg F. et al., 1987)^[27, 36, 37]。

1.1.7 *S. maltophilia* L1, L2 β -lactamases 表現之 *ampR-ampC*, *ampDI*, *ampG*(?) 系統

對於 *S. maltophilia* 這株細菌的 *ampR*、*ampDI* 及 *ampDII* 基因，

在本實驗室中已由學長研究分析並了解其特性及機制。 *ampR* 基因其產物屬於一調控蛋白，調控 *L1* 及 *L2* 基因的表現；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(Lin, C.W., et al., 2009) [26]。而 *ampDI* 基因其產物的功能則是水解能與 AmpR 蛋白結合的 Ligand；當沒有誘發物的條件下且 AmpDI 蛋白功能正常，AmpR 蛋白無法與 Ligand 結合使 *L1* 及 *L2* 基因不表現；當沒有誘發物的條件下且 AmpDI 蛋白失去功能，AmpR 蛋白會與 Ligand 結合使 *L1* 及 *L2* 基因大量且過度表現 (Yang, T.C., et al., 2009)[44]。 *ampDII* 基因及其產物的功能特性，在本實驗室中只觀察到其與 *L1* 及 *L2* 基因表現關係不明顯。而 *ampG* 基因及其產物的功能特性則是還在進行研究分析。

1.1.8 *S. maltophilia* 染色體上之 *ampR-L2-ampH-hp* 基因組裝

最近，*L1* 蛋白和 *L2* 蛋白的誘發表現已證明由 LysR 型轉錄

調控因子 (LysR transcriptional regulator) AmpR 蛋白所調控 (Okazaki A. et al., 2008)^[45]。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]。利用生物資訊分析，在 *L2* 基因的下游找到兩個基因分別為 Na^+/H^+ antiporter (*nha*) 基因和 hypothetical protein (*hp*) 基因，而 *L2-nha-hp* 基因之間的時間十分相近分別相距 85-bp 及 53-bp，因此推測此三基因組裝有可能形成一 operon。本論文中，我們證實 *L2* 與其下游之 *nha* 基因形成一 operon。並對 *L2* 下游之 *nha* 基因及其產物作研究分析，發現其 *nha* 基因之主要功能與鈉鹽之平衡無明顯之關聯，而是跟 β -lactamases 的表現有關。因為 *S. maltophilia* 之 β -lactamases 表現的系統 *ampR-L2*, *ampDI(II)*, *ampG* 與腸內桿菌之 *ampR-ampC*, *ampD*, *ampG* 功能相似，而 *S. maltophilia* 的 *nha* 基因又與 β -lactamases 的表現有關。因此，接續腸內桿菌的命名，將 *nha* 基因改命名為 *ampH* 基因。

第二節 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)^[19]，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)^[22, 24, 46]。此兩個 β -lactamases 基因之調控機制已在實驗室先前的研究中得到初步的了解 (Yang, T.C., et al., 2009; Lin, C.W., et al., 2009)^[26, 44]。

本論文的研究主題，主要是想了解 *L2-ampH-hp* 此基因組裝是否為一 operon，對於 *ampH* 基因及其產物功能作進一步的分析與研究。

第二章 研究方法

第一節 研究設計

由於 genome project 將 *S. maltophilia* K279a 之基因序列全部解開，藉此找到 *L2* 基因下游的 Na-H^+ antiporter (*ampH*) 及 hypothetical protein (*hp*) 基因。為了釐清 *L2-ampH-hp* 是否為一 operon，利用實驗室已有的菌株 KJ、KJ Δ R 和 KJ Δ DI 作即時定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative Real-Time PCR; QRT-PCR) 及反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcriptase PCR; RT-PCR)，去證明 *L2-ampH-hp* 是否為一 operon。

利用基因替換 (gene replacement) 的策略，將目標基因插入 *xyIE* 基因 (reporter gene)，形成 KJAmpH_{xyIE} 之突變株。以實驗室已有菌株 KJL2_{xyIE} 與 KJAmpH_{xyIE} 在沒有誘發物及有誘發物 (30 μ g/ml cefoxitin) 的條件下，測量 C230 的活性去觀察 *L2*、*ampH* 基因啟動子的表現。

為了釐清 AmpH 蛋白其主要功能是否為對鈉鹽類 (NaCl) 具有耐受性，以菌株 KJ、KJAmpH_{xyIE}、KJ Δ DI 在不同的鈉鹽類 (NaCl) 環境下，觀察其生長曲線的差異；接著在含有 10% glucose 的 XOLN 培養液中加入不同濃度的鈉鹽去分析菌株 KJL2_{xyIE} 和 KJAmpH_{xyIE} 所表現的 C230 活性，去釐清不同濃度的鈉鹽是否會影響 *L2* 及

ampH 基因啟動子的表現。

最後，為了釐清 AmpH 蛋白的功能，去分析 AmpH 蛋白表現量不同的 *S. maltophilia* 菌株其所誘發之 L1 及 L2 β -lactamase 活性。以菌株 KJ、KJAmpH_{xyIE}、KJ(pRKampH) 為檢體，測量其 L1 及 L2 β -lactamase 的活性。

第二節 研究材料

2.2.1 本論文所構築與分析之質體與菌株列表一。

2.2.2 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。

2.2.3 培養基

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

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

10 g tryptone

5 g yeast extract

10 g NaCl

pH: 7.0±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

4. XOL medium

: 每 1 公升的水中含

0.7 g K_2HPO_4

0.2 g KH_2PO_4

1.0g $(NH_4)_2SO_4$

0.1g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

0.1g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

0.1 g $MnCl_2$

5. 10% glucose-XOLN medium : XOL medium 加入 0.0625% yeast

extract 及 0.0625% trypton, 再加入 5 ml 40% Glucose。

2.2.4 實驗藥品

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

2.2.5 抗生素

所有抗生素皆購自 sigma 公司，並依照實驗所需配置成適當濃度。

2.2.6 試劑與緩衝溶液

1. 質體 DNA 抽取之試劑

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

- (1) Solution I : 10 mM EDTA (pH 8.0)、50 mM Glucose 及 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)。
- (2) Solution II : 1% SDS 及 0.2 N NaOH。
- (3) Solution III : 3 M potassium acetate (pH 4.8) 及 5 M glacial

acetic acid。

2. 染色體抽取之試劑

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

(2) Proteinase K : 10 mg/ml。

3. Agarose gel 電泳之試劑

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

2.2.7 儀器設備

1. 聚合酶連鎖反應器
2. 恆溫培養箱
3. 恆溫乾浴器
4. 離心機
5. 電泳設備
6. 分光光度計

第三節 實驗方法

2.3.1 菌種培養與保存

1. 短期保存

將 *S. maltophilia* 菌株培養於不含抗生素的固態培養基中，放置於 37°C 靜置培養一晚後，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養基中，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，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。

2.3.2 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，緩慢的上下倒置數次後，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，將要回收的 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下來放入 eppendorf 中，

加入 500 μ l Binding solution 置於乾浴器 65°C 30 分鐘。再吸取溶液至 Spin column 中，Spin column 下承接 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 DNA 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。

2.3.3 洋菜膠體電泳分析

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。

2.3.4 聚合酶鏈鎖反應

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 µmole 的正、反向引子,和 1/10 X 體積的 DMSO 與 1 µl 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 $^{\circ}$ C，10 分鐘，使模板 DNA 產生變性 (denaturation)；再以第二階段 94 $^{\circ}$ C，1 分鐘；(50 $^{\circ}$ C~65 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C，10 分鐘使 DNA 充分延長。

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

將 *Escherichia coli* 菌株 (DH5 α 或 S17-1) 接種於 3 ml LB 之培養液中，置 37 $^{\circ}$ C 震盪隔夜培養。之後取 500 μ l 菌液到 20 ml LB 中，於 37 $^{\circ}$ C 震盪培養。培養至 O.D₆₀₀ 約為 0.8~0.9 時，將菌液於 8000 rpm 4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘收集菌體。去上清液，加入約 15 ml 之 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 離心 10 分鐘。小心倒去上清液，最後加入 1 ml 之 4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 下保存備用。

2.3.6 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。如果質體上帶有 lacZ 基因，則視所需加入 50 μ l IPTG (20 mg/ml) 及 50 μ l X-gal (20 mg/ml) 均勻塗在含適當抗生素的培養基中隔夜培養，進行藍白篩選 (Blue-white selection)。

2.3.7 接合作用 (conjugation)

首先，將 recipient 菌株 (*S. maltophilia*) 與 donor 菌株 (*E. coli* S17-1) 分別以 3 ml 的 LB broth 於 37°C 震盪培養約 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。

2.3.8 構築質體 pEXKJAmpH_{xyIE}、pRKKJAmpH_{xyIE}

(1) pEXKJAmpH_{xyIE}：利用 PCR 的方式，以 primer AmpH-F/AmpH-R 將菌株 KJ 染色體上 *ampH* 基因大量複製，並與 pEX18Tc 質體進行黏合反應，形成 pEXKJAmpH。再將質體 pEXKJAmpH 與 pOKXT_{HindIII} 分別以限制酶 *SphI* 處理後，進行黏合反應，得到重組質體 pEXKJAmpH_{xyIE} (圖 2)。

(2) pRKKJAmpH_{xyIE}：將質體 pEXKJAmpH_{xyIE} 與 pRK415 分別以限制酶 *BglII/HindIII*, *BamHI/HindIII* 處理後，進行黏合反應，得到重組質體 pRKKJAmpH_{xyIE} (圖 3)。

2.3.9 KJAmpH_{xyIE} 突變株之獲得與確認

利用接合作用 (conjugation) 將重組質體 pEXKJAmpH_{xyIE} 送入 *S. maltophilia* KJ 中，再使 *S. maltophilia* KJ 的染色體基因與重組質體進行同源互換 (double homologous recombination) 以獲得 KJAmpH_{xyIE} 突變株，之後利用 PCR 和 DNA 定序來確保其正確性。

2.3.10 菌落快速檢驗聚合酶連鎖反應 (Colony PCR)

1. 檢驗大腸桿菌 (*E. coli*)

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

2. 檢驗嗜麥芽糖黃單胞菌 (*S. maltophilia*)

每管 PCR tube 中加入 dNTP 4 μ l，引子 (primer-F, primer-R) 各 4 μ l，DMSO 4 μ l，10X Taq buffer 4 μ l，Taq polymerase 1 μ l。另外，在

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

2.3.11 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 OD450 = 0.15)，先以 37°C 震盪培養 30 分鐘後，加入合適濃度的 β -lactam 類抗生素為誘發物，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)。

2.3.12 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 curvet 作 blank，之後加入 20 μl 經適當稀釋之 cell extract，於 A595 測量其吸光值。

2.3.13 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 A486 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。

2.3.14 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/ $OD_{450\text{nm}}$) 以每 3.6×10^8 cell 中含有多少酵素活性 (Uc) 表示之。(A450nm 測得數值 1 相當於每 1 ml 之菌液有 3.6×10^8 cell)

2.3.15 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 20 ml 之新鮮 LB broth，以菌液濃度 $OD_{450} 0.15$ 開始預養，半小時後添加誘發物 (inducer)，再經 2 小時培養後，取 1ml 之菌液用 illustra RNAspin Mini RNA isolation Kit 抽出 RNA。將抽出的 RNA 測量 $OD_{260\text{nm}}$ 和 $OD_{280\text{nm}}$ 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 $1\mu\text{g}$ 無 DNA 殘留之 RNA 轉成 cDNA，將此作為 QRT-PCR 之樣本。50 μl 的 QRT-PCR 反應混合物中含有 25 μl 的 2X Smart Quant Green Master Mix，正、反向引子各 $0.1 \mu\text{M}$ 和 100 倍稀釋的 cDNA。而 PCR 之反應條件與參數為：第一階段 95°C ，15 分鐘；再以第二階段 95°C ，15 秒鐘； 60°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 $\Delta\Delta C_t$ method 以 rRNA 基因為 internal control 來計算其 cDNA 量。而每個實驗皆經三重複且最後之數據結果取其平均值。

2.3.16 生長曲線 (growth curve)

將 37°C 隔夜培養之菌液接種至 20 ml 之新鮮 10% glucose-XOLN broth (分別含有 0, 0.2%, 0.5% NaCl) 中，以菌液濃度 $OD_{450nm} = 0.15$ 開始預養，每隔 1 hr 取出適量菌液去測量 OD_{450} 的吸光值，記錄菌株之生長曲線圖。

第三章 研究結果

第一節 *L2-ampH* 基因組裝為一操縱組(operon)

在以往的文獻中有提到 *S. maltophilia* 此細菌中的 AmpR 蛋白為一個調控蛋白，調控 *L1* 及 *L2* 基因的表現 (Lin, C.W., et al., 2009)^[26]。而本論文中 *L2* 基因及其下游之 Na-H⁺ antiporter (*ampH*) 及 hypothetical protein (*hp*) 基因，其彼此間之 intergenic region (IG) 只有 85 bp 及 53 bp (圖 1)，所以高度懷疑 *L2-ampH-hp* 三個基因可能為一個 operon。

為了釐清此三基因是否為一 operon，所使用的策略為 Quantitative Real-Time PCR (QRT-PCR) 及 Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)。QRT-PCR 以菌株 KJ, KJΔR, KJΔDI 為檢體，分別分析在沒有誘發及有誘發 (30μg/ml cefoxitin) 的情況下，*L2*, *ampH* 及 *hp* 基因之 RNA 的表現量。菌株 KJ 為 wild-type 菌株；KJΔR 為一在有誘發物情況下，*L2* 基因亦不能被誘發的突變株 (non-inducibility mutant) (Lin, C.W., et al., 2009)^[26]；KJΔDI 為一在無誘發物情況下，*L2* 亦會持續表現的突變株 (constitutive expression mutant) (Yang, T.C., et al., 2009)^[44]，所以此兩突變株可作為 *L2* 基因啟動子 (promoter of *L2* gene, *P_{L2}*) 不表現及持續表現的 negative 和 positive controls。

結果如圖 4 所示，*L2* 基因 RNA 的表現量，在 wild-type strain KJ 有明顯的誘發現象，而在突變菌株 KJ Δ DI 及 KJ Δ R 中，*L2* 基因 RNA 的表現情形則呈現 constitutive expression 及 non-inducibility 的表型，此與以前的結果相吻合 (Yang, T.C., et al., 2009)^[44]。而 *ampH* 基因 RNA 的表現情形不論在 KJ, KJ Δ DI 或 KJ Δ R 菌株中，皆呈現與 *L2* 基因相仿的表現型態；此結果高度建議 *ampH* 基因與 *L2* 基因受同一啟動子的調控，其兩者可能形成一 operon 之組裝。然而 *hp* 基因 RNA 的表現情形則呈現不同的結果。不論在 KJ, KJ Δ DI 或 KJ Δ R 菌株中，*hp* 基因 RNA 的表現量並無顯著的變化，因此，*hp* 基因與 *L2* 及 *ampH* 基因並未位於同一 operon。

因上述的 QRT-PCR 的結果支持 *L2* 與 *ampH* 基因為一 operon，為了更明確確認 *L2-ampH* RNA transcript 的存在，所以利用 RT-PCR 作確認。PCR 引子 L2-ampH-F/L2-ampH-R 及 ampH-hp-F/ampH-hp-R，分別為針對 *L2-ampH* 及 *ampH-hp* IG 區域所設計的引子；若有 *L2-ampH* 及 *ampH-hp* RNA 產物存在，則 RT-PCR 的結果應可見一 276-bp 及 365-bp 的 PCR 產物。圖 5 顯示僅有一約 276-bp 的 RT-PCR 產物存在，所以可以更確認 *L2* 與 *ampH* 基因形成一 operon。

第二節 *ampH* 基因有自己的啟動子(promoter)

為了觀察 *L2-ampH* 此 operon 的基因表現，所使用的策略為構築 KJL2_{*xylE*} 及 KJAmpH_{*xylE*} 突變株，菌株 NL2_{*xylE*} 為 *L2* 基因內插入一 *xylE* 基因 (reporter gene) 的突變株；菌株 KJAmpH_{*xylE*} 為 *ampH* 基因內插入一 *xylE* 基因的突變株，所以此兩突變株所表現之 C230 活性可作為 *L2* 基因及 *ampH* 基因表現量。以菌株 KJL2_{*xylE*} 和 KJAmpH_{*xylE*} 為檢體，分別分析在沒有誘發物及有誘發物 (30 μ g/ml cefoxitin) 的情況下，此兩菌株之 catechol 2,3-dioxygenase (C230) 的表現量。結果如表 2 所示，在有誘發物的條件下 *L2* 基因的表現量明顯比 *ampH* 基因表現量多，表示此 operon 有 down-regulation 的現象。但是在沒有誘發物的情況下，*ampH* 基因表現量居然比 *L2* 基因還多。因此懷疑 *ampH* 基因有可能有啟動子的存在。

為了釐清 *ampH* 基因是否有啟動子的存在，所使用的策略為 plasmid transcriptional fusion assay。以菌株 KJ(pRK415) 和 KJ(pRK567AmpH_{*xylE*}) 為檢體，分別分析在沒有誘發物及有誘發物 (30 μ g/ml cefoxitin) 的情況下，此兩菌株之 catechol 2,3-dioxygenase (C230) 的表現量。結果如表 3 所示，在有無誘發物的情況下菌株 KJ(pRK567AmpH_{*xylE*}) C230 的活性皆呈現一微量的表現；與 control

菌株 KJ(pRK415) 相比對後，可以發現此 *ampH* 基因的啟動子(P_{ampH}) 呈現一持續性微量的表現且為 non-inducibility。

第三節 *Stenotrophomonas maltophilia* KJ *ampH* 基因分析

在以往的文獻中，沒有對於 *S. maltophilia* 之 *ampH* 基因及其產物的特性分析，所以對於此基因了解甚少。為了釐清 *ampH* 基因及其產物的特性，以菌株 KJ 為檢體，PCR 引子 AmpH-F/AmpH-R，利用 PCR 將菌株 KJ 之部分 *L2* 基因、完整 *ampH* 基因及部分 *hp* 基因的片段大量複製並選殖到 γ T&A vector 中，得一重組質體 pTKJAmpH (圖 1)。再將此重組質體定序得其完整序列後，結果如圖 6 所示，分析結果顯示此 AmpH 蛋白為一個有 404 個氨基酸及 12 個穿膜區的穿膜蛋白，其 N 端與 C 端都位於細胞質內 (TMHMM Server v. 2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)。

為了進一步了解 AmpH 蛋白的特性，將菌株 KJ 之 AmpH 蛋白序列進行資料庫 BlastP 分析。結果如表 4 所示，*S. maltophilia* KJ 之 AmpH 蛋白與 *S. maltophilia* K279a 與 R551-3 菌株 Na^+/H^+ antiporter 蛋白相同度分別為 100% 及 98%。而與 *Xylella fastidiosa* 9a5c 菌株之 Na^+/H^+ antiporter 蛋白相同度為 70%。但是，這些蛋白皆沒有文獻報導過其功能特性。反倒是與文獻報導已知具有 Na^+/H^+ antiporter

功能的蛋白相同度不高 (30 - 65%)。如 *E. coli* 之 NhaA, NhaB, ChaA, 及 MdfA ; *Vibrio cholera* 之 NhaA, NhaB, 及 NhaD ; *P. aeruginosa* 之 NhaP (Pinner, Kotler et al. 1993; Utsugi, Inaba et al. 1998; Lewinson, Padan et al. 2004)^[47-49]。其分別的蛋白相同度標示於表 3。所以，菌株 KJ 之 AmpH 蛋白預測其為一穿膜蛋白並且其功能可能不是一 Na^+/H^+ antiporter。

第四節 AmpH 蛋白主要的功能不是鹽類耐受性 (Sodium tolerance)

S. maltophilia KJ 的 AmpH 蛋白在經過資料庫比對過後，是一個 putative Na^+/H^+ antiporter，而文獻中 Na^+/H^+ antiporter 的主要功能是維持鹽類的平衡，與細菌對鈉鹽之耐受性有關 (Pinner, Kotler et al. 1993)^[47]。

所以為了釐清 AmpH 蛋白的主要功能，是否為維持鹽類的平衡，所使用的策略為觀察不同突變菌株在不同鈉鹽濃度下的生長情形 (growth curves)。以菌株 *S. maltophilia* KJ、KJAmpH_{xyIE}、KJΔDI 為檢體，培養在 10% glucose-XOLN 分別含有 0、0.2 和 0.5 M NaCl 的培養基中。菌株 KJ、KJAmpH_{xyIE}、KJΔDI 則分別代表是 AmpH 蛋白表現量正常、沒有表現和過多表現的菌株。結果如圖 7 所示，當菌株轉換至含有 NaCl 的培養液中，菌株 KJ、KJAmpH_{xyIE}、

KJΔDI 的生長曲線會有一停滯期，尤其是在 0.5 M NaCl 的條件下，停滯期明顯延長許多。然而在不同濃度的 NaCl 培養液中，此三菌株的生長曲線是相似的，並沒有受到 NaCl 濃度的影響。

因此，AmpH 蛋白的主要功能似乎不是幫助 *S. maltophilia* 適應高鈉鹽 (NaCl) 的環境，而 *S. maltophilia* 系統中，可能有其他 Na^+/H^+ antiporters 或機制幫忙其適應較高鈉鹽的環境。

第五節 鈉鹽 (NaCl) 濃度會影響 *L2* 和 *ampH* 基因啟動子的強度

在一般細菌生物體，其 Na^+/H^+ antiporter 基因之啟動子強弱與 NaCl 的濃度成正比。本論文中的 *ampH* 基因本在基因體序列中命名為 Na^+/H^+ antiporter 基因，且其表現受 *L2*、*ampH* 啟動子控制。為了釐清 *ampH* 基因啟動子強弱是否跟鈉鹽濃度有關，所使用的策略為 chromosomal transcriptional fusion assay。在含有 10% glucose 的 XOLN 培養液中加入不同濃度的鈉鹽去分析菌株 KJL2_{xyIE} 和 KJAmpH_{xyIE} 所表現的 C23O 活性。所測試的鈉鹽濃度為 0 M 和 0.2 M NaCl。有誘發物條件下所測得 KJL2_{xyIE} 之 C23O 活性以及沒有誘發物條件下所測得的 KJAmpH_{xyIE} C23O 活性分別代表 *L2* 和 *ampH* 基因啟動子的強度。結果如表 5 所示，當菌株 KJL2_{xyIE} 在有誘發物存在的條件下，其在 0.2 M NaCl 培養基中所表現的 C23O 活

性比在 0 M NaCl 培養基中所表現的 C23O 活性低；菌株 KJAmpH_{xyIE} 在沒有誘發物的條件下，亦呈現相同的趨勢。結果顯示 NaCl 濃度影響 L2 及 *ampH* 基因的啟動子強度，然而，培養基中 NaCl 濃度跟 L2 及 *ampH* 基因啟動子的強度是呈現反比的關係。這個現象與之前的認知在有較高濃度 NaCl 的環境下會增加 Na⁺/H⁺ antiporter 基因的表現是不相符合的。由生長曲線及 chromosomal transcriptional fusion assay 之結果支持 AmpH 蛋白的主要功能與維持鈉鹽類平衡較不相關。因此基因體定序資料庫中將此基因命名為 Na⁺/H⁺ antiporter 基因不適合用來解釋 *ampH* 基因的特性。

第六節 AmpH 蛋白影響 L1 與 L2 β -lactamase 的表現

上述結果顯示，AmpH 蛋白主要功能似乎不是幫助 *S. maltophilia* 適應高鈉鹽(NaCl) 的環境。而 *ampH* 基因位於 L2 基因的下流形成一 operon 的基因組裝，因此推測 AmpH 蛋白是否與 β -lactamase 的表現量有關。為了釐清 AmpH 蛋白的功能，所使用的策略為分析 AmpH 蛋白表現量不同的 *S. maltophilia* 菌株其所誘發之 β -lactamase 活性。以菌株 KJ、KJAmpH_{xyIE}、KJ(pRKampH) 為檢體，去分析其 β -lactamase 的活性。菌株 KJ、KJAmpH_{xyIE}、KJ(pRKampH) 則分別代表是 AmpH 蛋白表現量正常、沒有表現和

過度表現的菌株。結果如表 6 所示，菌株 KJAmpH_{xyIE} 相對於 KJ 的 total β -lactamase 活性明顯下降，進一步利用 Nitrocefin-EDTA 方法分析發現是 L1 β -lactamase 下降；菌株 KJ(pRKampH) 相對於 KJ 的 total β -lactamase 活性也明顯下降，進一步去分析發現是 L2 β -lactamase 下降。此實驗結果顯示出 AmpH 蛋白無論過度表現或是不表現都會影響 β -lactamase 的表現，但影響的層面略有不同。在沒有 AmpH 蛋白的情況下，L1 的表現量下降；而在 AmpH 過量的情況下，L2 的表現量下降。



第四章 討論

在已定序之 *Stenotrophomonas maltophilia* K279a 基因體序列中發現在 *L2* β -lactamase 基因下游有一 *ampH* 基因。首先去證明 *L2-ampH* 此基因組裝為一 operon。利用 QRT-PCR 策略，定量菌株 KJ, KJ Δ R, 及 KJ Δ DI 在有無誘發物的情況下，*L2* 及 *ampH* 下游 hypothetical protein 基因之 RNA transcript 的量。KJ 為 wild-type 菌株；KJ Δ R 為一在有誘發物情況下，*L2* 基因亦不能被誘發的突變株 (non-inducibility mutant) (Lin, C.W., et al., 2009)^[26]；KJ Δ DI 為一在無誘發物情況下，*L2* 亦會持續表現的突變株 (constitutive expression mutant) (Lin, C.W., et al., 2009)^[26]。結果顯示：*ampH* 基因的 RNA 表現量無論在何種菌株皆會隨著 *L2* 基因的 RNA 表現量平行的上升或下降 (圖 4)，但 hypothetical protein RNA 的量則沒有明顯的變化。此結果支持了 *L2-ampH* 基因組裝為一 operon 的論點。此外，RT-PCR 及 agarose 電泳分析證實在菌體中確實存在有一 RNA transcript 其可橫跨 *L2* 與 *ampH* 基因，涵蓋 *L2-ampH* 之 intergenic region (IG)。所以，證實了 *L2-ampH* 基因組裝的確為一 operon。

為進一步了解是否在其他菌體中，亦有相似之 β -lactamase-*ampH*

operon 組裝，將 L2 β -lactamase 蛋白序列利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 網站比對搜索，比對到在有些菌體其染色體上存有與 L2 β -lactamase 相似的 β -lactamase 基因 (表 7)。而進一步分析這些菌種的 β -lactamase 基因之下游基因，皆未發現其存在有類似 AmpH 的蛋白。所以，在 *S. maltophilia* 存在之 *L2-ampH* operon 是一個獨特的組裝。

Operon 這個名詞最早是在原核生物及線蟲動物門被發現，以 operon 來說，包含兩個或以上的結構基因，這些結構基因會被轉錄成為一個多基因性的 mRNA。而在結構基因的上游是 promoter 的序列，能給予 RNA polymerase 提供結合點及引發轉錄 (Platt, T., et al., 1970)^[50]。第一個被發現有 operon 存在的是 *Escherichia coli* 的 *lac*-operon (Jacob, F., et al., 1960)^[51]。以現有的技術平台要預測是否有 operon 的存在有幾種方法，(1) 藉由觀察基因與基因之間的間隔 (intergenic region) 去預測 (Ermolaeva, White et al. 2001)^[52]；(2) 從已解開的基因序列的菌株去分析，有一個分析網站可以提供資訊 (OperonDB ; <http://operondb.cbcb.umd.edu/cgi-bin/operondb/operons.cgi>) (表 8)。在本論文中利用此兩種方法去預測 operon，兩種方法預測結果都支持 *L2-ampH-hp* 基因組裝是一個 operon。但是，實驗結果則是支持 *L2-ampH* 此兩基因組裝才是一 operon。

接著對於 *L2* 及 *ampH* 基因的表現量做分析，去了解此 operon 的表現模式，實驗結果顯示在沒有誘發物的條件下菌株 KJAmpH_{xyIE} 所表現的 C230 活性略高於 KJL2_{xyIE} 所表現的 C230 活性 (65 vs 3 Uc/OD_{450nm}，表 2)，此說明 *ampH* 基因有自己的啟動子。有誘發物 (30 μl/mg cefuroxime.) 的條件下，菌株 KJL2_{xyIE} C230 活性明顯比 KJAmpH_{xyIE} 高 (411 vs 183 Uc/OD_{450nm}，表 2)，這代表 *L2* 基因的表現量比 *ampH* 基因多；所以此 operon 的表現屬於 down regulation 的模式。所以就此 operon 的表現型式而言，*L2* 與 *ampH* 基因之表現同時受 *L2* promoter (P_{L2}) 的驅使，且 P_{L2} 啟動 *L2* 與 *ampH* 基因的方式為 inducible 且 down-regulation。此外，*ampH* 基因之表現除了受 P_{L2} 啟動子影響外，*ampH* 基因有自己的啟動子 (P_{ampH})，但相較於 P_{L2} 啟動子， P_{ampH} 啟動子的強度明顯小很多 (表 2)。

雖然 *ampH* 最早命名為 Na⁺/H⁺ antiporter，但實驗結果發現其功能與鈉鹽平衡的相關性並不明顯。*S. maltophilia* 之 *L2* 基因其調控機制已在本實驗室中分析研究 (Lin CW. *et al.*, 2009)^[26]，對於 *ampH* 基因及其產物的功能特性則沒有文獻報導過。所以，先以 bioinformatics 去分析 AmpH 蛋白序列，想對於 *ampH* 基因及其產物有初步的認識。利用 PCR 將菌株 KJ 之 *ampH* 基因轉殖出來，

定出其蛋白序列並分析。分析結果顯示此 AmpH 蛋白為一個 N 端與 C 端都位於細胞質內的穿膜蛋白，有 404 個氨基酸及 12 個穿膜區。之後再將 AmpH 蛋白序列進行資料庫 BlastP 分析，結果顯示此蛋白與 *S. maltophilia* K279a、R551-3 和 *Xylella fastidiosa* 9a5c 這三株細菌的類似蛋白 (homologues) 相同度很高 (100%、98%、70%，表 4)，但此三株細菌都只將定序序列發表，並未對該基因之功能特性有所報導。而文獻中已確知與維持鈉鹽類平衡有關之蛋白，如 *E. coli* 之 NhaA, NhaB, ChaA, 及 MdfA；*Vibrio cholera* 之 NhaA, NhaB, 及 NhaD；*P. aeruginosa* 之 NhaP，其與 AmpH 蛋白之相同度並不高 (30-65%，表 4)。這樣的結果顯示 AmpH 蛋白的主要功能不是維持鈉鹽類平衡，而 *S. maltophilia* 中應有其他的 Na^+/H^+ antiporter 蛋白主導鈉鹽類平衡。在一般的情況下，細菌體內會存在多個 Na^+/H^+ antiporters 幫忙協助體內 pH 值和鈉鹽的平衡。藉由分析 *S. maltophilia* K279a 菌株的基因體序列發現到共有三個基因命名為 Na^+/H^+ antiporters，其基因編號分別為 Smlt3721、Smlt1521 和 Smlt0555，而本論文中的 *ampH* 基因即為 Smlt3721。對於此三基因蛋白做比對，發現 Smlt1521 和 Smlt0555 與 Smlt3721 的相同度分別只有 45% 及 29%，其主要蛋白序列差異很大。這意味著此三個 Na^+/H^+ antiporters 在生理學的角色上可能有不同的定位，而且也支持

AmpH 蛋白的功能似乎與維持鈉鹽類平衡關係不明顯。

接著想了解 AmpH 蛋白與鈉鹽類之間的關係，利用觀察不同 AmpH 蛋白表現量的突變株 (菌株 KJ, KJ Δ AmpH, KJ(pRKampH)) 在不同鈉鹽類濃度下的生長曲線 (growth curve)。結果顯示，無論 AmpH 蛋白的表現量是正常、沒有表現或是多量表現，其生長曲線不受鈉鹽濃度的影響 (圖 7)。所以，生長曲線實驗說明 AmpH 蛋白的功能似乎與維持鈉鹽類平衡關係不明顯。

此外，在一般細菌生物體，其 Na⁺/H⁺ antiporter 基因之啟動子強弱與生長環境中 NaCl 的濃度成正比。本論文中的 *ampH* 基因本在基因體序列中命名為 Na⁺/H⁺ antiporter 基因，且其表現受 *L2*、*ampH* 啟動子控制。因此想要了解鈉鹽類濃度是否會調控 *ampH* 基因啟動子的強弱。利用 chromosomal transcriptional fusion assay，結果顯示當 KJAmpH_{xyIE} 在沒有誘發物的條件下，C23O 活性在 0M NaCl 略比 0.2M NaCl 高 (21 vs 14 Uc/OD_{450nm}，表 5)；在有誘發物的條件下，KJL2_{xyIE} C23O 活性在 0M NaCl 比 0.2M NaCl 高 (153 vs 120 Uc/OD_{450nm}，表 5)。可以確定的是 NaCl 濃度的確影響 *L2* 及 *ampH* 基因的啟動子強度。然而，培養基中 NaCl 濃度跟 *L2* 及 *ampH* 基因啟動子的強度卻是呈現反比的關係。這個現象與之前的認知在有較高濃度 NaCl 的環境下會增加 Na⁺/H⁺ antiporter 基因的表現 (Pinner,

Kotler et al. 1993; Utsugi, Inaba et al. 1998; Lewinson, Padan et al. 2004)

[47-49]是不相符合的。

所以經由上述三個實驗結果，(1) bioinformatics 分析 (2) growth curve 分析 (3) P_{L2} 及 P_{ampH} promotor 分析，支持 AmpH 蛋白的主要功能與維持鈉鹽類平衡較不相關。而基因體定序資料庫中將此基因命名為 Na^+/H^+ antiporter 基因不適合用來解釋 *ampH* 基因的功能特性。

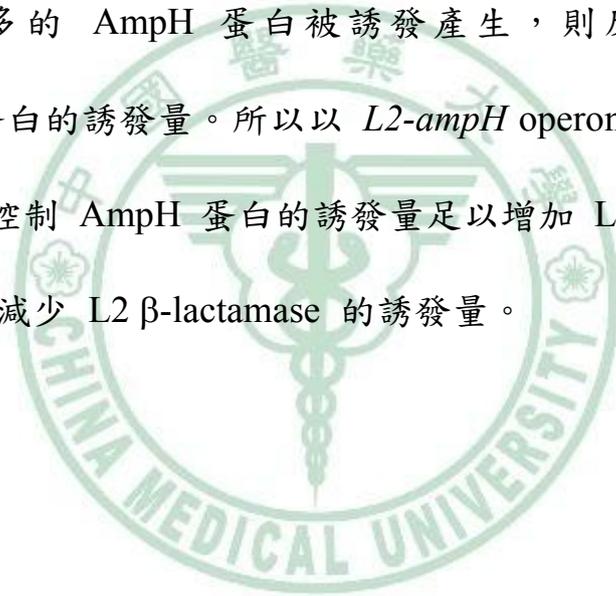
既然 AmpH 蛋白的功能與之前在基因體序列中命名為 Na^+/H^+ antiporter 基因的功能不符合，又因為 *ampH* 基因位於 *L2* 基因的下游，所以直接聯想到 AmpH 蛋白的功能或許與 β -lactamase 的表現有關。接著觀察不同突變株的 β -lactamase 活性分析，去了解 AmpH 蛋白與 β -lactamase 的關係。結果顯示，在有誘發物存在的條件下，AmpH 蛋白表現量正常的原生菌株其 β -lactamase 活性比 AmpH 蛋白沒有表現的突變株 (KJ Δ AmpH) 還高 (1076 vs 888 Un/mg，表 6)，進一步去分析發現下降的是 *L1* β -lactamase 的活性；而在有誘發物存在的條件下，AmpH 蛋白表現量正常的原生菌株其 β -lactamase 活性也比 AmpH 蛋白過度表現的突變株 (KJ(pRKampH)) 還高 (1076 vs 665 Un/mg，表 6)，進一步去分析發現下降的是 *L2* β -lactamase 的活性。所以，不管 AmpH 蛋白的表現

量是不表現還是過度表現，都會導致 β -lactamase 的活性下降。此實驗支持 AmpH 蛋白的主要功能可能是影響 β -lactamase 的表現。

經過一系列的實驗，證明了 *L2-ampH* 基因組裝為一 operon 且此 operon 之基因 *L2* 與 *ampH* 之表現同時受 *L2* promoter (P_{L2}) 的驅使，且 P_{L2} 啟動 *L2* 與 *ampH* 基因的方式為 inducible 且 down-regulation。此外，*ampH* 基因之表現除了受 P_{L2} 啟動子影響外，*ampH* 基因有自己的啟動子 (P_{ampH})，而 AmpH 蛋白的主要功能可能為影響 β -lactamase 的表現量。

接著再以有無誘發物的情況來探討此 operon 的調控機制。如圖 8 所示，在沒有誘發物存在下， P_{L2} 啟動子不表現，但 P_{ampH} 啟動子微弱地表現，所以會有少量的 AmpH 蛋白被製造出來。而此少量的 AmpH 蛋白對於 L1 及 L2 β -lactamases 的誘發表現性 (inducibility) 並沒有明顯的影響，所以在沒有誘發物時，L1 及 L2 β -lactamases 呈現 non-inducibility 的表型。而當有誘發物存在的情況下， P_{L2} 啟動子誘發表現，除了表現大量的 L2 β -lactamase 外，亦誘發表現足量的 AmpH 蛋白，此足量的 AmpH 蛋白可使 L1 β -lactamase 誘發的表現量增加。在 P_{L2} 啟動子表現，但沒有 AmpH 蛋白的情況下，L1 β -lactamase 的誘發性 (inducibility) 不受影響，但誘發的量減少 (表 7, induced KJ 及 $KJ\Delta AmpH$ 的 L1 活性)。但若以 L2

β -lactamase 誘發表現量來看，經由 *ampR-dependent P_{L2}* 啟動子所誘發的 AmpH 蛋白量不宜過多，過多的 AmpH 蛋白反而減少了 L2 β -lactamase 蛋白的誘發量 (表 7, induced KJ 及 KJ(pRKAmph) 的 L2 活性)。所以細菌菌株為了達到 L1 及 L2 β -lactamases 蛋白的最佳誘發量，很巧妙地以 *L2-amph* operon 的型式組裝，使得 AmpH 蛋白在 *P_{L2}* 啟動子的誘發下足量表現，此可增加 L1 β -lactamase 的誘發量。但若過多的 AmpH 蛋白被誘發產生，則反而會折損 L2 β -lactamase 蛋白的誘發量。所以以 *L2-amph* operon down-regulation 調控的模式，控制 AmpH 蛋白的誘發量足以增加 L1 β -lactamase 的誘發量但不會減少 L2 β -lactamase 的誘發量。



第五章 結論與建議

第一節 討論

實驗結果證實 *L2-ampH* 基因組裝為一 operon 且此 operon 之基因 *L2* 與 *ampH* 之表現同時受 *L2* promoter (P_{L2}) 的驅使，且 P_{L2} 啟動 *L2* 與 *ampH* 基因的方式為 inducible 且 down-regulation。此外，*ampH* 基因之表現除了受 P_{L2} 啟動子影響外，*ampH* 基因有自己的啟動子 (P_{ampH})，而 AmpH 蛋白的主要功能可能為影響 β -lactamase 的表現量。

第二節 建議

本論文中能確定 *L2-ampH* 基因組裝會被 AmpR 蛋白調控，但是否有其他的調控機制尚未能確定。不過能確定的是 AmpH 蛋白會影響 β -lactamase 的表現量，或許將 *ampH* 基因的調控完全解開可以提供另一個新藥開發的面向。

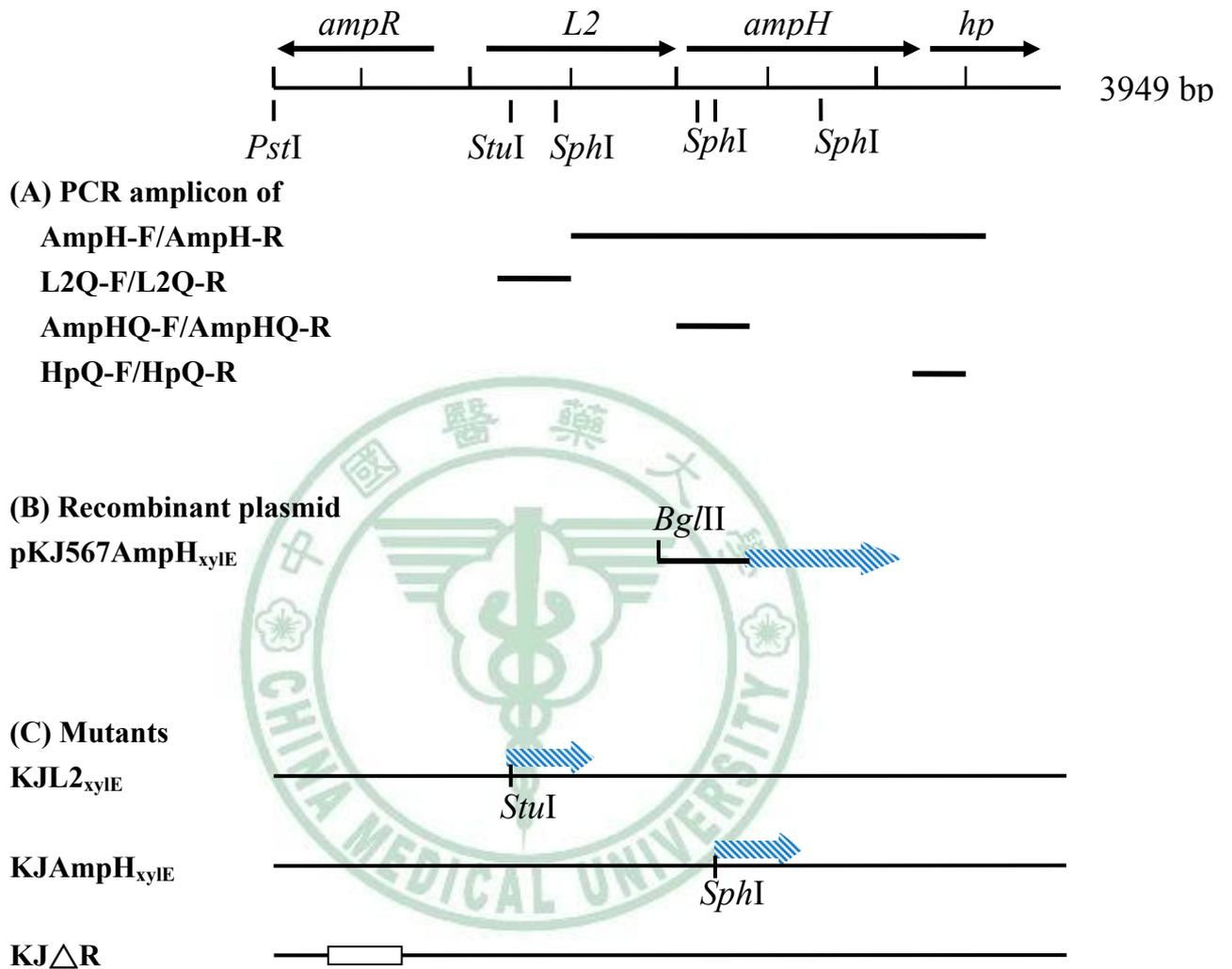


Fig1. Restriction enzyme maps of the *S. maltophilia* KJ chromosome surrounding the *L2-ampH* operon. The empty box indicates the deleted region. The directed of *xylE* gene is indicated by the arrow.

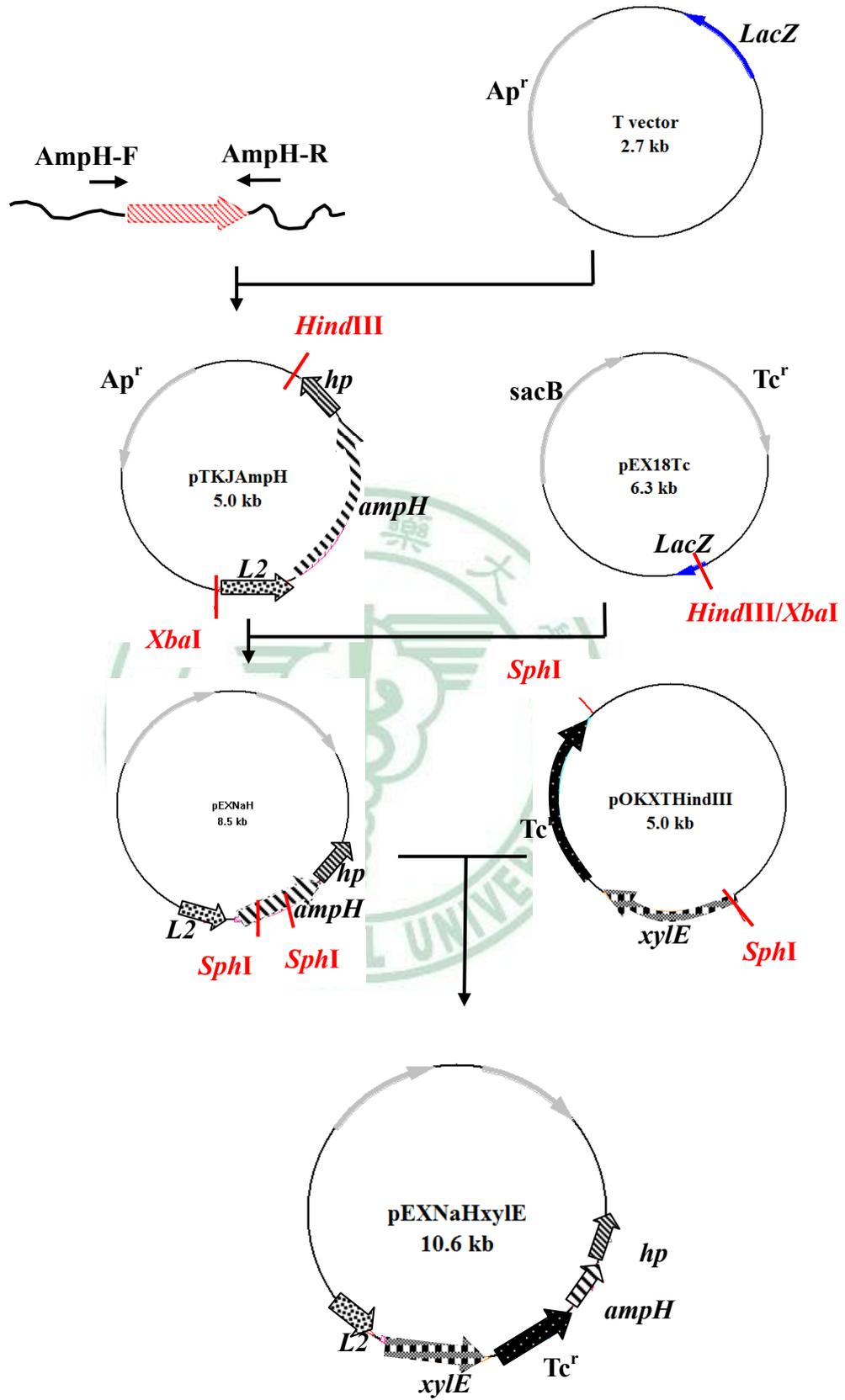


Fig2. Construction of pEXKJAmpH_{xylE}

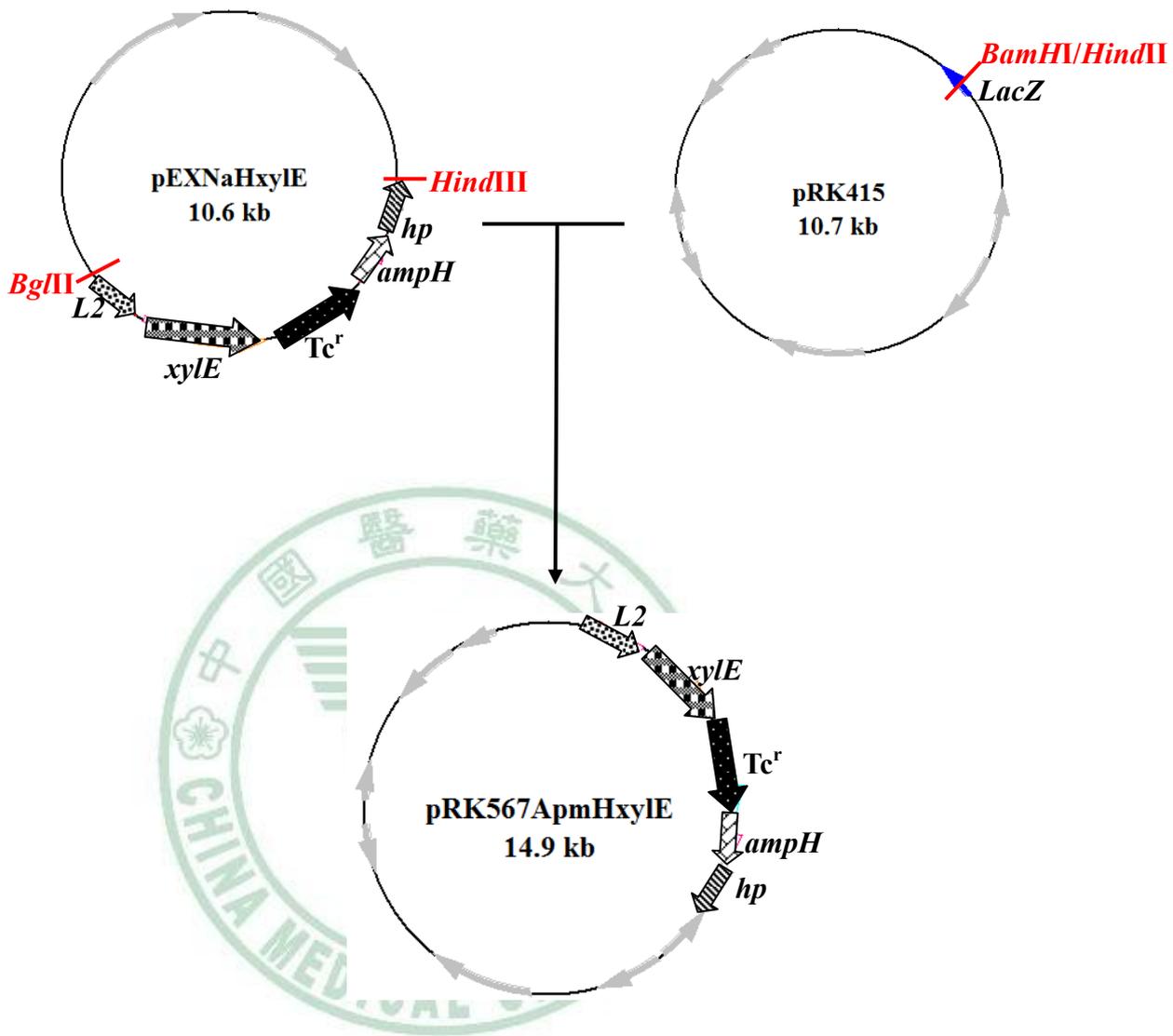


Fig3. Construction of pRK567ApmH_{xylE}

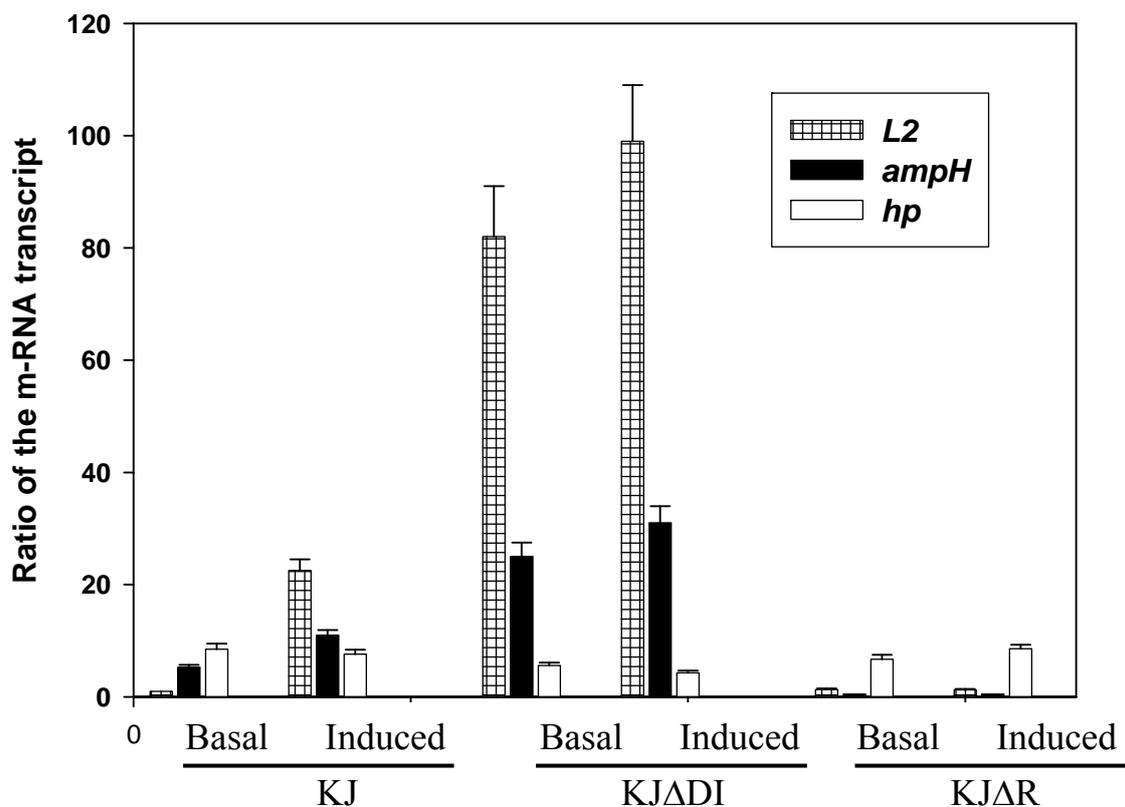


Fig4. The relative mRNA transcript in *L2*, *ampH*, and *hp* of the basal and induced *S. maltophilia* KJ, KJΔDI, and KJΔR. The bar indicates the ratio of the mRNA transcript of a specific gene to that of the strain KJ basal *L2*, as measured by QRT-PCR. The induced condition is 30 μg/ml cefuroxime for 2 h. The mean value is based on three independent experiments. The line indicates the standard deviation.

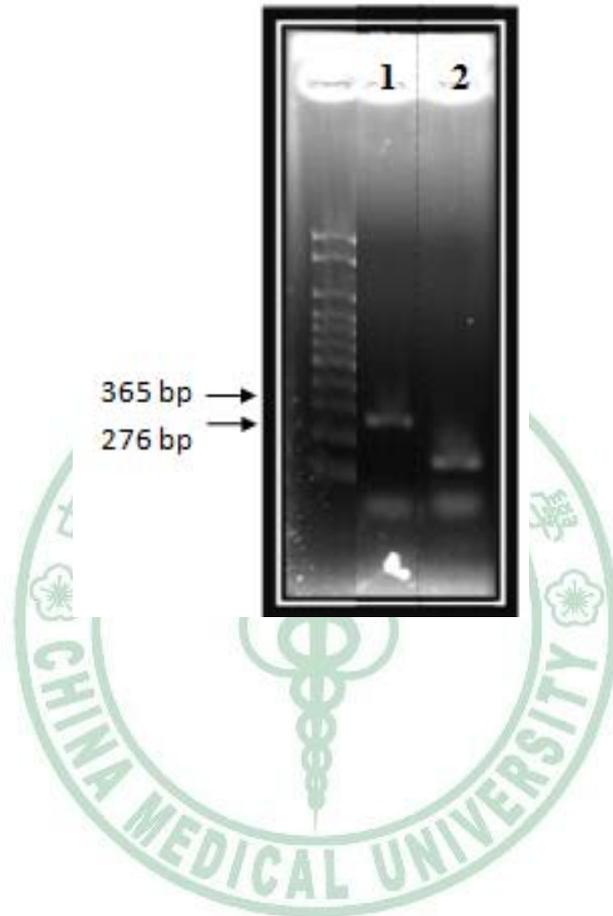


Fig5. The amplicons of reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) of the *S. maltophilia* KJ. The template is the mRNA transcript of the induced *S. maltophilia* KJ. The cefuroxime of 30 $\mu\text{g/ml}$ was added as the inducer. Primer sets for lane 1: L2-ampH-F / L2-ampH-R ; for lane 2: AmpH-Hp-F / AmpH-Hp-R.

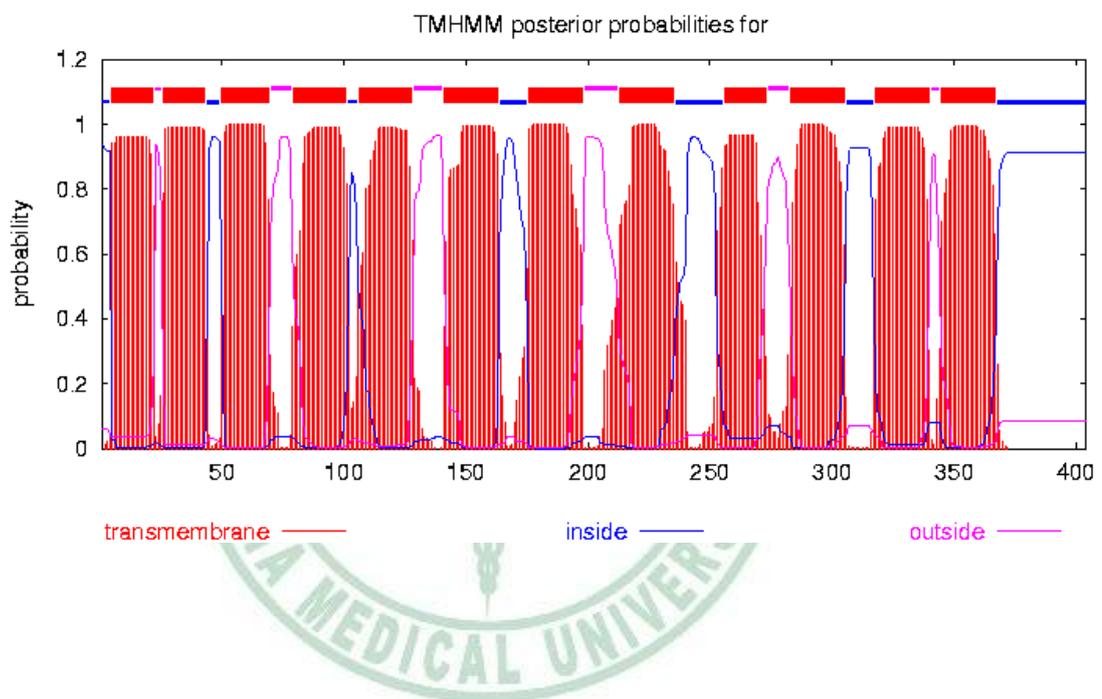


Fig6. The predicted transmembrane domains of AmpH protein.
Prediction by tool TMHMM-2.0.
 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)

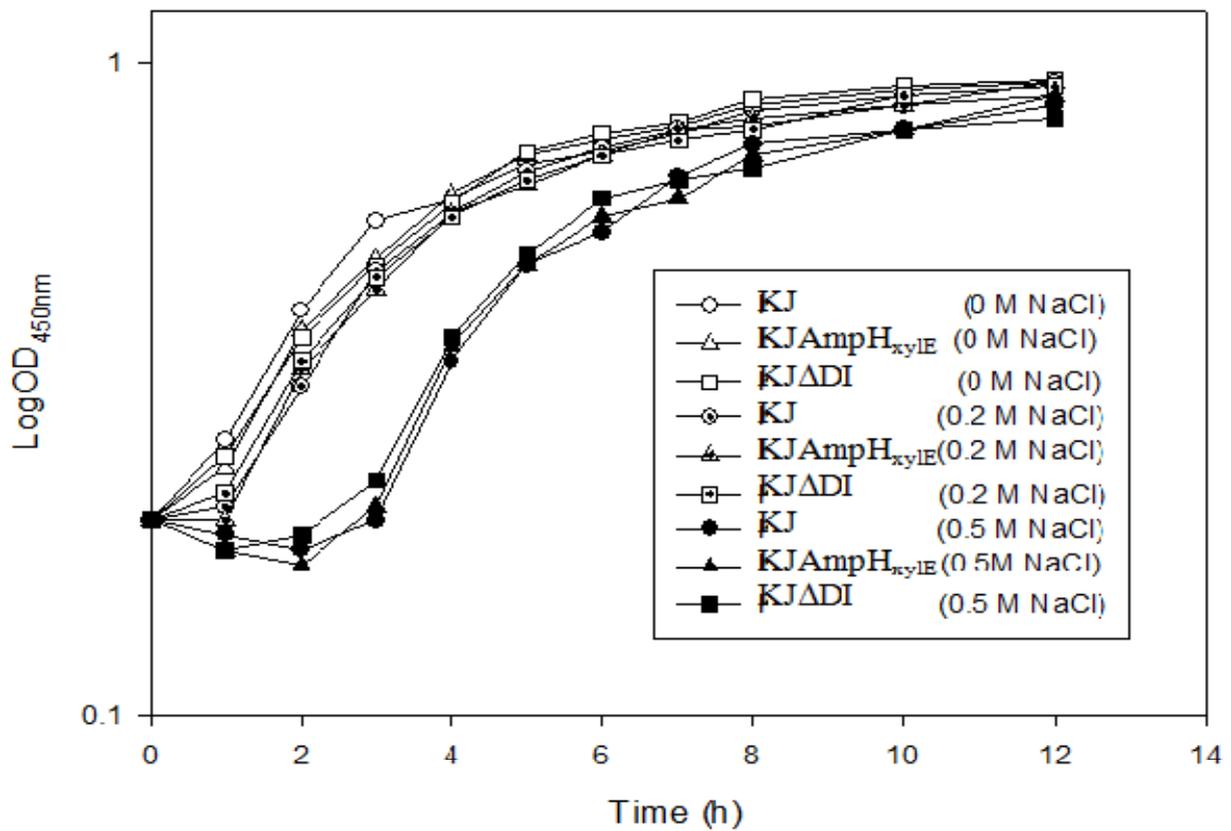
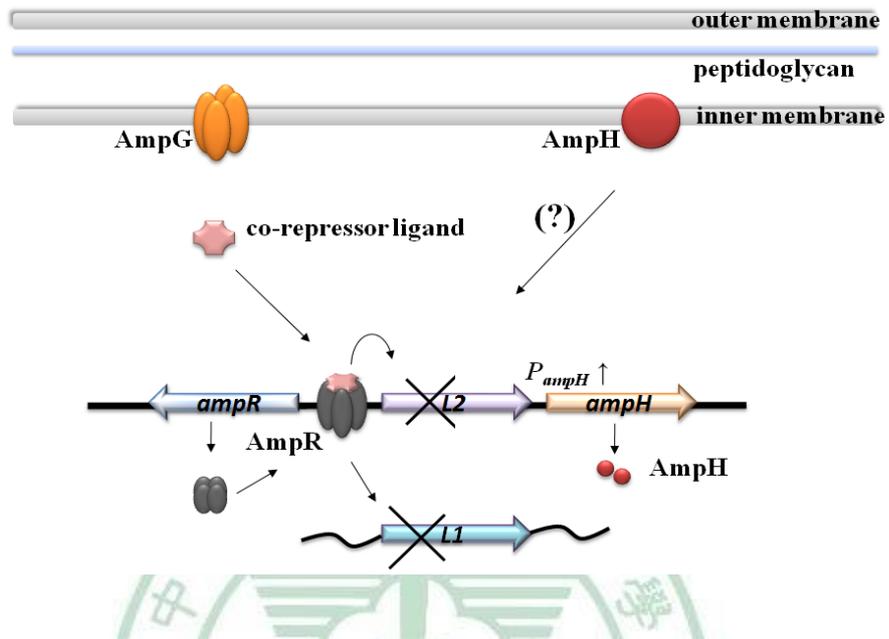


Fig7. The growth curves of strains KJ, KJAmpH_{xyIE}, and KJΔDI in XOLN containing 10% glucose and 0 M, 0.2 M, and 0.5 M NaCl. Cell growth was measured by recording O.D.₄₅₀ at an interval of 1 h. Each experiment was repeated three times.

(A)

Repression condition



(B)

Derepression condition

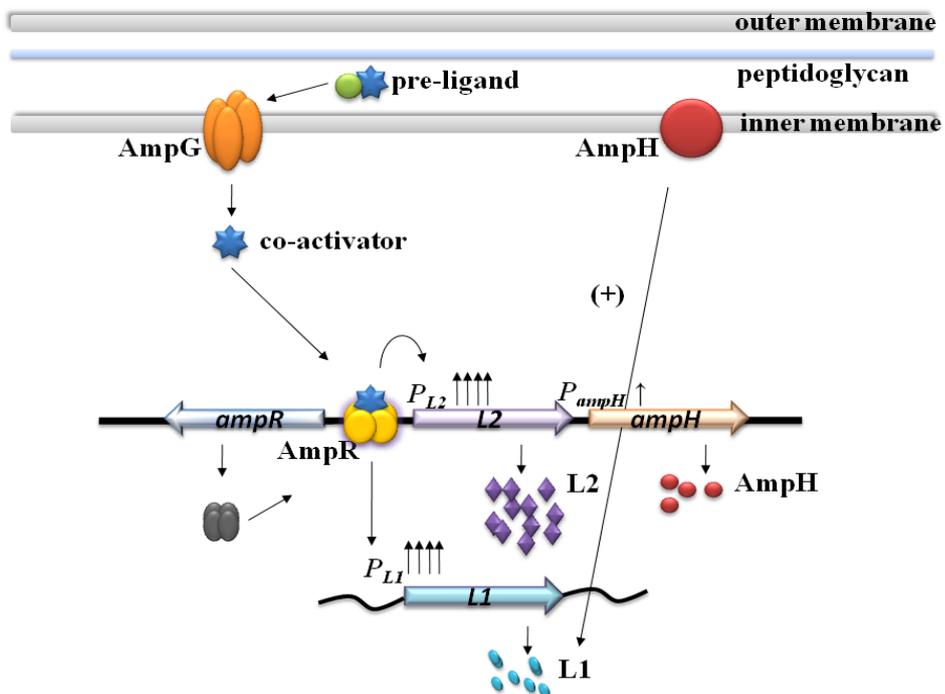


Fig8. The proposed model for the β -lactamase expression in *S. maltophilia*. (A) Repression condition (B) Derepression condition.

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

Strain or plasmid	Genotype or properties
<i>S. maltophilia</i>	
KJ	Wild type, a clinical isolate from Taiwan
KJΔR	<i>S. maltophilia</i> KJ <i>ampR</i> isogenic mutant
KJΔDI	<i>S. maltophilia</i> KJ <i>ampDI</i> isogenic mutant
KJAmpH _{xylE}	<i>S. maltophilia</i> KJ <i>ampH</i> isogenic mutant, inserting a <i>xylE</i> gene cassette into the <i>ampH</i> gene
<i>Escherichia coli</i>	
DH5α	F- Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk ⁻ mk ⁺)
S17-1	<i>phoA supE44λ- thi-1 gyrA96 relA1 λ pir</i> + mating strain
Plasmids	
pEX18Tc	<i>sacB oriT</i> , Tc ^r
pRK415	oriV, oriT, Tc ^r
pKJAmpH	pEX18Tc vector with a 2280-bp DNA fragment, containing the partial 3' terminus of <i>L2</i> gene, 1215-bp <i>ampH</i> gene and partial 5' terminus of <i>hp</i> gene of <i>S. maltophilia</i> KJ ; Tc ^r
pKJAmpH _{xylE}	pEX18Tc vector with a 4271-bp DNA fragment, inserting an <i>xylE</i> cassette into the <i>SphI</i> site of <i>ampH</i> gene of pKJAmpH plasmid
Primers	
AmpH-F	5' - ACAACACCGCCGCCAACC - 3'
AmpH-R	5' - TTCAGCCGCAGCCCGTTC - 3'
L2Q-F	5' - AACGCACCCACCGATGCC - 3'
L2Q-R	5' - CGCCTGTCCAGCAATGCC - 3'
NaQ-F	5' - CCCCATGAGCCATGAAC - 3'
NaQ-R	5' - GCGAACAGGAACAGCGAG - 3'

3720-F	5' - ATTGCCGTTGCCACTACC - 3'
3720-R	5' - GTCCTCCACCACCTTGCC - 3'
L2-Nah-F	5' - GCGATCAGCACGAGCAAC - 3'
L2-Nah-R	5' - ATGCCGATGATGCCGAAC - 3'
Nah-Hp-F	5' - CTGACCACGCTGTTGCCG - 3'
16rDNAQ-F	5' - GACCTTGCGCGATTGAATG - 3'
16rDNAQ-R	5' - CGGATCGTCGCCTTGGT - 3'



TABLE 2. The basal and induced C23O activities of KJL2_{xyIE} and KJAmpH_{xyIE}

Strain	C23O activity (Uc ^a /OD _{450nm})	
	Basal	Induced
KJL2 _{xyIE}	3	411
KJAmpH _{xyIE}	65	183

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

TABLE 3. The basal and induced C23O activities of KJ(pRK415) and KJ(pRK567NaH_{xy}IE)

Strain	C23O activity (Uc ^a /OD _{450nm})	
	Basal	Induced
KJ(pRK415)	0	0
KJ(pRK567NaH _{xy} IE)	40	35

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

TABLE 4. The homologous protein of AmpH protein

Protein source Strain/protein	No. of aa	Similarity (%)	Identity (%)
<i>S. maltophilia</i> K279a /putative transmembrane Na ⁺ /H ⁺ antiporter (Smlt_3721)	404	100	100
<i>S. maltophilia</i> R551-3 / sodium/hydrogen exchanger (Smal_3135)	404	99	98
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c / Na ⁺ /H ⁺ exchange protein (NP_298687)	406	80	70
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 / NhaP (NP_252576)	424	65	65
<i>Anaeromyxobacter</i> sp. K / sodium/hydrogen exchanger (AnaeK_0544)	407	64	47
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C / Sodium/hydrogen exchanger (Adeh_0511)	410	62	46
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335 / transporter, CPA2 family (S7335_1904)	683	46	28
<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655 / sodium-proton antiporter (NP_414560)	388	39	30
<i>Vibrio cholerae</i> O1 / hypothetical protein (VC1510)	140	54	41
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913 / NdvB protein (XCC4077)	798	40	26

TABLE 5. The basal and induced C23O activities of KJL2_{xyIE} and KJAmpH_{xyIE}

Strain	C23O activity (Uc ^a /OD ₄₅₀)			
	0 M NaCl		0.2 M NaCl	
	Basal	Induced	Basal	Induced
KJL2 _{xyIE}	5	153	3	120
KJAmpH _{xyIE}	21	109	14	69

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

TABLE 6. The basal and induced β -lactamase activities of KJ, KJAmpH_{xyIE}, KJ(pRKAmpH)

Strain(plasmid)	Basal	β -lactamase activity (Un ^a /mg)		
		Induced ^b		
		L1+L2 ^c	L1 ^c	L2 ^c
KJ	6	1076	241	835
KJAmpH _{xyIE}	6	888	100	788
KJ(pRKAmpH)	11	665	236	429

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

^b30 μ g/ml cefuroxime as the inducer

^cThe total (L1 and L2), L1, and L2 β -lactamase activity is determined by nitrocefin-EDTA method (Hu, R.M., et al., 2008) ^[53].

TABLE. 7. Bioinformatics analysis of the possible homologue of the β -lactamase

Stains	β -lactamase homolog	Downstream of the β -lactamase	Similarity (%)	Identity (%)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	NP_643470.1 (<i>bla</i>)	NP_643469.1	69	54
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> KACC10331	YP_200009.1 (<i>bla</i>)	YP_200010.1 (<i>xynB</i>)	69	54
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10	YP_365024.1 (<i>penP</i>)	YP_365023.1	69	54
<i>Burkholderia dolosa</i> AUO158	YP_002100403.1	-	67	53
<i>Acidobacterium capsulatum</i> ATCC 51196	YP_002756419.1	YP_002756420.1	66	53
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18	YP_532595.1	YP_532596.1	62	48
<i>Caulobacter</i> sp. K31	YP_001682625.1	YP_001682624.1	63	49
<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081	YP_001006271.1 (<i>blaA</i>)	YP_001006270.1 (<i>Tau</i>)	65	51
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	YP_575796.1	YP_575797.1 (Arginase)	62	46
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	NP_945715.1 (<i>penP</i>)	NP_945716.1 (endonuclease/exonuclease)	65	51
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Nb-255	YP_316970.1	YP_316971.1 (Arginase)	64	51

TABLE. 8. Bioinformatics analysis of the predicted operon.

Upstream	Downstream	confidence ^a & n ^b
YP_001973421 hypothetical protein	YP_001973422 putative transmembrane Na ⁺ /H ⁺ antiporter	confidence=56 n=1
YP_001973421 hypothetical protein	YP_001973423 putative beta-lactamase	confidence=56 n=1
YP_001973422 putative transmembrane Na ⁺ /H ⁺ antiporter	YP_001973423 putative beta-lactamase	confidence=56 n=1

^aConfidence is an estimation of the lower boundary of the probability that the two corresponding genes are located in the same operon

^bn is a number of other genomes that have the same pair of genes located in the same direction

參考文獻

1. Hugh, R. and E. Ryschenkow, *Pseudomonas maltophilia, an alcaligenes-like species*. J Gen Microbiol, 1961. **26**: p. 123-32.
2. Sutter, V.L., *Identification of Pseudomonas species isolated from hospital environment and human sources*. Appl Microbiol, 1968. **16**(10): p. 1532-8.
3. Palleroni, N.J. and J.F. Bradbury, *Stenotrophomonas, a new bacterial genus for Xanthomonas maltophilia (Hugh 1980) Swings et al. 1983*. Int J Syst Bacteriol, 1993. **43**(3): p. 606-9.
4. Ubeda, P. Salavert, M. Giner, S. Jarque, I. Lopez-Aldeguer, J. Perez-Belles, C. Gobernado, M., [*Bacteremia caused by Stenotrophomonas maltophilia: a clinical-epidemiological study and resistance profile*]. Rev Esp Quimioter, 1998. **11**(3): p. 205-15.
5. Maningo, E. and C. Watanakunakorn, *Xanthomonas maltophilia and Pseudomonas cepacia in lower respiratory tracts of patients in critical care units*. J Infect, 1995. **31**(2): p. 89-92.
6. Windhorst, S. Frank, E. Georgieva, D. N. 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. **277**(13): p. 11042-9.
7. LC, C., et al., *The complete genome, comparative and functional analysis of Stenotrophomonas maltophilia reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants*. Genome Biology, 2008. **9**(4): p. R74.

8. Richmond, M.H. and R.B. Sykes, *The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role*. Adv Microb Physiol, 1973. **9**: p. 31-88.
9. Krueger, T.S., E.A. Clark, and D.E. Nix, *In vitro susceptibility of Stenotrophomonas maltophilia to various antimicrobial combinations*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2001. **41**(1-2): p. 71-8.
10. Valdezate, S., et al., *Antimicrobial susceptibilities of unique Stenotrophomonas maltophilia clinical strains*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(5): p. 1581-4.
11. Livermore, D.M., *beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance*. Clin Microbiol Rev, 1995. **8**(4): p. 557-84.
12. Li, X.Z., L. Zhang, and K. Poole, *SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(2): p. 333-43.
13. Sanchez, P., A. Alonso, and J.L. Martinez, *Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the Stenotrophomonas maltophilia multidrug efflux pump SmeDEF*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(11): p. 3386-93.
14. Zhang, L., X.Z. Li, and K. Poole, *SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(12): p. 3497-503.
15. Morita, Y., et al., *nalD encodes a second repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon of Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2006. **188**(24): p. 8649-54.
16. Bush, K. and R.B. Sykes, *Methodology for the study of*

- beta-lactamases*. Antimicrob Agents Chemother, 1986. **30**(1): p. 6-10.
17. Ambler, R.P., *The structure of beta-lactamases*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1980. **289**(1036): p. 321-31.
 18. Rossi, S., M. Zoller, and J. Steurer, [*Research interest by general practitioners: a survey*]. Praxis (Bern 1994), 2006. **95**(49): p. 1913-7.
 19. Denton, M. and K.G. Kerr, *Microbiological and clinical aspects of infection associated with Stenotrophomonas maltophilia*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(1): p. 57-80.
 20. Alonso, A. and J.L. Martinez, *Multiple antibiotic resistance in Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(5): p. 1140-2.
 21. Walsh, T.R., A.P. MacGowan, and P.M. Bennett, *Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(7): p. 1460-4.
 22. Saino, Y., et al., *Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from Pseudomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother, 1982. **22**(4): p. 564-70.
 23. Crowder, M.W., et al., *Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-beta-lactamase L1 from Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(4): p. 921-6.
 24. Avison, M.B., et al., *Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 beta-lactamase genes of Stenotrophomonas*

- maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(2): p. 413-9.
25. Hanson, N.D. and C.C. Sanders, *Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae*. Curr Pharm Des, 1999. **5**(11): p. 881-94.
 26. Lin, C.W., et al., *The role of AmpR in regulation of L1 and L2 beta-lactamases in Stenotrophomonas maltophilia*. Res Microbiol, 2009. **160**(2): p. 152-8.
 27. Lindberg, F., L. Westman, and S. Normark, *Regulatory components in Citrobacter freundii ampC beta-lactamase induction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(14): p. 4620-4.
 28. Honore, N., M.H. Nicolas, and S.T. Cole, *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**(13): p. 3709-14.
 29. Seoane, A., M.V. Francia, and J.M. Garcia Lobo, *Nucleotide sequence of the ampC-ampR region from the chromosome of Yersinia enterocolitica*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(5): p. 1049-52.
 30. Poirel, L., et al., *Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of ampC-ampR from Morganella morganii clinical isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(4): p. 769-76.
 31. Girlich, D., et al., *Biochemical-genetic characterization and regulation of expression of an ACC-1-like chromosome-borne cephalosporinase from Hafnia alvei*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(6): p. 1470-8.
 32. Nadjar, D., et al., *Molecular characterization of chromosomal class*

- C beta-lactamase and its regulatory gene in Ochrobactrum anthropi*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(8): p. 2324-30.
33. Bauernfeind, A., et al., *Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**(1): p. 221-4.
34. Mahlen, S.D., et al., *Analyses of ampC gene expression in Serratia marcescens reveal new regulatory properties*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(4): p. 791-802.
35. Lodge, J.M., et al., *Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the Pseudomonas aeruginosa chromosomal ampC beta-lactamase*. Biochem J, 1990. **272**(3): p. 627-31.
36. Jacobs, C., J.M. Frere, and S. Normark, *Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria*. Cell, 1997. **88**(6): p. 823-32.
37. Lindberg, F. and S. Normark, *Common mechanism of ampC beta-lactamase induction in enterobacteria: regulation of the cloned Enterobacter cloacae P99 beta-lactamase gene*. J Bacteriol, 1987. **169**(2): p. 758-63.
38. Normark, S., *beta-Lactamase induction in gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling*. Microb Drug Resist, 1995. **1**(2): p. 111-4.
39. Wiedemann, B., et al., *beta-Lactamase induction and cell wall recycling in gram-negative bacteria*. Drug Resist Updat, 1998. **1**(4): p. 223-6.

40. Lindquist, S., F. Lindberg, and S. Normark, *Binding of the Citrobacter freundii AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible ampC beta-lactamase gene*. J Bacteriol, 1989. **171**(7): p. 3746-53.
41. Hu, R.M., et al., *Induction of L1 and L2 beta-lactamases of Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(3): p. 1198-200.
42. Schell, M.A., *Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators*. Annu Rev Microbiol, 1993. **47**: p. 597-626.
43. Kong, K.F., et al., *Pseudomonas aeruginosa AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(11): p. 4567-75.
44. Yang, T.C., et al., *AmpDI is Involved in Expression of the Chromosomal L1 and L2 {beta}-lactamases of Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother, 2009.
45. Okazaki, A. and M.B. Avison, *Induction of L1 and L2 beta-lactamase production in Stenotrophomonas maltophilia is dependent on an AmpR-type regulator*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(4): p. 1525-8.
46. Saino, Y., M. Inoue, and S. Mitsuhashi, *Purification and properties of an inducible cephalosporinase from Pseudomonas maltophilia GN12873*. Antimicrob Agents Chemother, 1984. **25**(3): p. 362-5.
47. Lewinson, O., E. Padan, and E. Bibi, *Alkalitolerance: a biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis*. Proc Natl

- Acad Sci U S A, 2004. **101**(39): p. 14073-8.
48. Pinner, E., et al., *Physiological role of nhaB, a specific Na⁺/H⁺ antiporter in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1729-34.
49. Utsugi, J., et al., *Cloning and sequencing of a novel Na⁺/H⁺ antiporter gene from Pseudomonas aeruginosa*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1398**(3): p. 330-4.
50. Platt, T., J.H. Miller, and K. Weber, *In vivo degradation of mutant lac repressor*. Nature, 1970. **228**(5277): p. 1154-6.
51. Jacob, F., et al., [*Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator.*]. C R Hebd Seances Acad Sci, 1960. **250**: p. 1727-9.
52. Ermolaeva, M.D., O. White, and S.L. Salzberg, *Prediction of operons in microbial genomes*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(5): p. 1216-21.
53. Hu, R.M., et al., *Modified nitrocefin-EDTA method to differentially quantify the induced L1 and L2 beta-lactamases in Stenotrophomonas maltophilia*. Lett Appl Microbiol, 2008. **47**(5): p. 457-61.

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、 β -lactam 藥物的分型與種類

β -lactam

Penicillins

Extended spectrum	Aminopenicillins: Amoxicillin, Ampicillin (Pivampicillin, Hetacillin, Bacampicillin, Metampicillin, Talampicillin), Epicillin Carboxypenicillins: Carbenicillin (Carindacillin) · Ticarcillin · Temocillin Ureidopenicillins: Azlocillin , Piperacillin, Mezlocillin other: Mecillinam (Pivmecillinam) · Sulbenicillin
Narrow spectrum	Beta-lactamase sensitive Benzylpenicillin : Azidocillin , Penamecillin Clometocillin, Benzathine benzylpenicillin , Procaine benzylpenicillin Phenoxymethylpenicillin : Propicillin , Benzathine phenoxymethylpenicillin , Pheneticillin Beta-lactamase resistant Oxacillin, Cloxacillin , (Dicloxacillin, Flucloxacillin) , Meticillin, Nafcillin

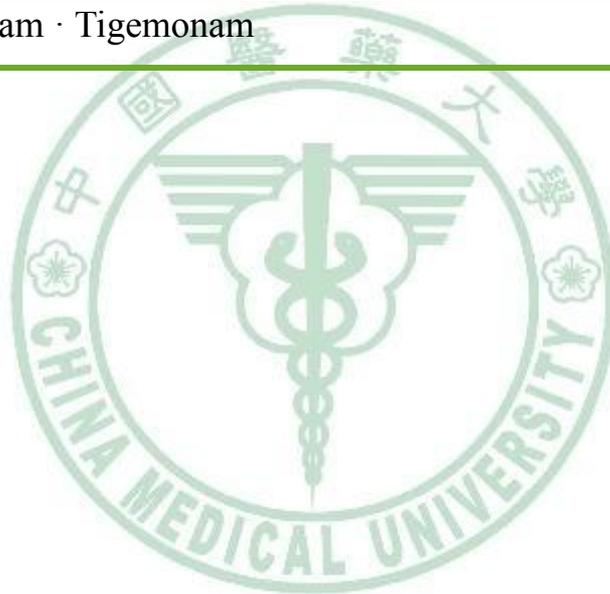
Carbapenems Biapenem , Doripenem , Ertapenem , Imipenem · Meropenem , Panipenem

Cephalosporins

1th generation (PEcK)	Cefacetrile , Cefadroxil , Cefalexin , Cefaloglycin , Cefalonium · Cefaloridine , Cefalotin , Cefapirin , Cefatrizine , Cefazedone · Cefazaflur, Cefazolin , Cefradine , Cefroxadine , Ceftezole
2th generation	Cefaclor , Cefamandole , Cefminox , Cefonicid ·

(HEN)	Ceforanide , Cefotiam, Cefprozil , Cefbuperazone · Cefuroxime , Cefuzonam , cephamycin (Cefoxirtin, Cefotetan, Cefmetazole) , carbacephem (Loracarbef)
3th generation	Cefcapene , Cefdaloxime , Cefdinir , Cefditoren , Cefetamet , Cefixime, Cefmenoxime , Cefodizime, Cefoperazone , Cefotaxime , Cefpimizole , Cefpiramide, Cefpodoxime , Cefsulodin , Ceftazidime, Cefteram , Ceftibuten , Ceftiolene , Ceftizoxime , Ceftriaxone, oxacephem (Flomoxef, Latamoxef)
4th generation	Cefepime , Cefozopran , Cefpirome , Cefquinome
5th generation	Ceftobiprole

Monobactams Aztreonam · Tigemonam



附錄三、*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%)	909 bp (G+C content: 71.6%)
Structural analysis	Tetramer molecular mass of ca. 115 kDa bound two Zn ²⁺ per monomer	Dimer molecular mass of 63 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

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

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