

國立台灣大學生命科學院植物科學研究所

碩士論文

Institute of Plant Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

大腸桿菌DUF28蛋白質在氧化逆境反應之功能

研究

Functional study of *Escherichia coli* DUF28
proteins in oxidative stress response

賴芸璐

Yun-Lu Lai

指導教授：鄭秋萍 博士

Advisor : Dr. Chiu-Ping Cheng

中華民國一百年一月

January, 2011

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

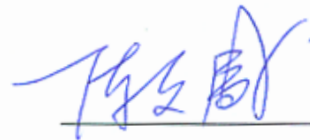
大腸桿菌 DUF28 蛋白質在氧化逆境反應之功能分析

Functional study of *Escherichia coli* DUF28 proteins
in oxidative stress response

本論文係賴芸璐君 (R97B42011) 在國立臺灣大學植物科學研究所完成之碩士學位論文，於民國一百年一月二十日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員： 陽明大學基因體科學研究所

陳文盛 博士



台灣大學植物科學研究所

葉開溫 博士



中央研究院農業生物科技研究中心

葉國楨 博士



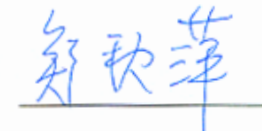
台灣大學農業化學系暨研究所

林乃君 博士



台灣大學植物科學研究所

鄭秋萍 博士 (指導教授)



謝誌

兩年半在植科所的日子，漫長卻又匆促。時間的腳步不會停留，轉眼間也到了離別的時刻。這些日子以來非常感謝秋萍老師孜孜不倦地細心指導，從進入實驗室開始，定期的討論、實驗的規劃、邏輯性的思考、學習著面對問題並加以解決，這都是我在 942 實驗室所學習到的。除此之外，也學習到了許多人生的哲理，讓我在跌跌撞撞的實驗生活中，不至於失去方向也能夠適時的增加一些信心，讓我可以繼續行走在這條顛簸的路上。念研究所這條路，因為有許多學長姐們、同學們的陪伴，所以我並不孤單。感謝怡君師傅，懵懵懂懂的碩一時期，因為有妳嚴謹的實驗態度讓我可以加快腳步進入狀況，而當我沒頭沒腦的提出問題時，妳也願意聽我說跟我一起討論，感謝妳總是能給予適時的安慰與建議。感謝玉梅，除了實驗上的建議，在生活中也受到妳許多照顧，妳默默地收拾著實驗室使得實驗室可以維持一定的整齊，感謝妳的吆喝讓我記得要吃飯。感謝安琪，雖然平常跟你講垃圾話的時間居多，但在實驗遇到問題時總能給予一些建議，行動 NCBI 及解問題達人你當之無愧。感謝千惠、文潔、鐸俊、巧燕、冠中，感謝你們在實驗上的協助，在生活及閒暇之餘的歡樂，因為有你們所以這段日子也增加了許多色彩。我的夥伴們，雅婷、季穎跟宗霖，能夠認識你們真好，同甘共苦的生活有你們的陪伴，讓我可以化辛苦成歡笑。盈如、張芯、泳竹跟益敏，雖然只能跟你們相處半年，但你們的可愛跟機車是我永遠不會忘記的，祝你們的未來能夠順利、幸福。

感謝各位口委，陳文盛老師、葉開溫老師、葉國楨老師及林乃君老師，在口試時給予許多有用的建議，這本論文也在您們的指導下更佳的完整。

感謝我辛苦的家人，謝謝爸爸媽媽讓我在忙碌的研究生生活中能夠衣食無虞，讓我回到溫暖的家好好的放鬆休息，謝謝你們三不五時的接送，讓我能免於舟車勞頓之苦，謝謝你們的關懷，在我跌倒時扶我一把替我加油打氣。謝謝妹妹跟弟弟，因為你們我才能夠耍耍大姐的威風。

感謝于超，你的陪伴讓我堅強，你的細心跟嘮叨讓我可以跟你討論，提出質疑，也謝謝你在你忙碌的時刻，幫我準備我的論文及口試。

最後，感謝身邊許許多多一直給予我支持及關懷的人，因為有你們，讓我的生命更加豐富。祝福大家平安健康，朝著自己的目標及理想邁進吧。

芸璐 一百年二月

中文摘要

除了在細菌之外，DUF28 蛋白質家族廣泛存在各物種，但對其功能所知甚少，僅知此蛋白在 *Pseudomonas aeruginosa* 中參與 swarming 泳動性與調節菌量感應反應 (quorum sensing)，在哺乳類動物中則扮演 COX I 的轉譯活化子 (translation activator) 的角色。本研究發現部分細菌具有兩個 DUF28 蛋白質，十分特別，故針對大腸桿菌之兩個 DUF28 蛋白 YeeN 及 YebC 進行功能分析，尤著重在氧化逆境反應之功能。序列發現在不同菌種的胺基酸序列相似度不盡相同，推測此蛋白質保有相似的立體結構。突變株特性分析結果顯示 $\Delta yeeN$ 及 $\Delta yebC$ 之泳動能力都有明顯增加，但唯有 $\Delta yeeN$ 抵抗 paraquat 氧化逆境的耐受度有明顯增加，互補實驗亦進一步證實這些結果；此外，YeeN 量的累積與逆境因子易造成此蛋白質在細胞質中呈點狀分布，而 YebC 除在生長死亡期會有段狀分佈的情況外，大多均勻分佈；啟動子分析結果顯示，*yeeN* 具有自己的啟動子且會受氧化逆境的抑制，而 *yebC* 啟動子則在細胞生長後期才具活性且不會受到氧化逆境的影響。進一步分析可能調節 *yeeN* 表現量之上游基因發現，*recA* 在氧化逆境下可調節 *yeeN*；*relA* 在正常情況下可正向調控 *yeeN*，但並未直接參與 *yeeN* 在氧化逆境條件之調控；*hns* 於生長後期會抑制 *yeeN*，並可能參與 *yeeN* 負調控鞭毛合成相關基因之功能。綜合以上結果可知，大腸桿菌中 YeeN 與 YebC 皆可調節細菌之泳動力，但目前確認 YeeN 也同時參與氧化逆境反應，本研究首次報導兩個同為 DUF28 蛋白質家族成員之基因，彼此功能有同也有異。

關鍵詞：大腸桿菌、DUF28 蛋白、*yeeN*、*yebC*、氧化逆境、泳動力

Abstract

DUF28 protein family ubiquitously exists in all organisms, except Archaea; however, information on their function is very limited. Previous studies demonstrated that DUF28 is involved in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility and quorum sensing, and functions as a translational activator of COX I in mammals. Interestingly, this study revealed the existence of two DUF28 homologs in some eubacteria. The aim of this study was to investigate functions of the two *E. coli* DUF28 proteins, namely YeeN and YebC, particularly their function in oxidative stress responses. Sequence comparisons revealed that bacterial DUF28 proteins shared low similarity, implying these proteins may preserve conserved tertiary structure. Null mutants $\Delta yeeN$ and $\Delta yebC$ both displayed increased swarming and swimming activities, while only $\Delta yeeN$ conferred increased tolerance to paraquat. Complementation assays further confirmed functions of these two proteins in motility and paraquat tolerance. Promoter analysis demonstrated that *yeeN* has its own promoter that can be repressed by oxidative stress. *yebC* promoter functioned only later growth phase and was not regulated by the test oxidative stress treatments. Protein localization analysis showed that accumulation and stress conditions could lead to polar distribution of YeeN in cytosol, while YebC uniformly distributed in cytosol and became polar distribution in a fragmented manner only at the death growth phase. Furthermore, by investigating the putative regulatory genes that may be involved in *yeeN* regulation, this study showed that *recA* could regulate *yeeN* under oxidative stress treatment. *relA* could upregulate *yeeN* expression under normal condition, but may not be involved in *yeeN* regulation under oxidative stress. On the other hand, *hns* could downregulate *yeeN* expression in late growth phase, and may regulate *yeeN* in flagella biosynthesis. Taken together, these results indicate that YeeN and YebC both function in bacterial motility, while YeeN also plays an

important role in oxidative stress responses. This study is the first to uncover common as well as distinct functions of two bacterial DUF28 proteins.

Keywords : *Escherichia coli*, DUF28 protein, *yeeN*, *yebC*, oxidative stress, motility



常用名詞之縮寫與全名對照表

縮寫	全名
BSA	Bovine serum albumin
bp	Base pair
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
HOO •	Hydroperoxyl radical
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
LB medium	Luria-Bertani medium
MOPS	3- (N-morpholino) propanesulfonic acid
O ₂ ⁻ •	Superoxide anion
OH •	Hydroxyl radical
PCR	Polymerase chain reaction
PEG4000	Polyethylene glycol 4000
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rotation per minutes
RT-PCR	Reverse transcription-PCR
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superoxide dismutase
tBOOH	Ter-butylhydroperoxide
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

目次

口試委員會審定書	i
謝誌	ii
中文摘要	iii
Abstract.....	iv
常用名詞之縮寫與全名對照表	vi
目次	vii
表目次	x
圖目次	xi
附錄目次	xii
第一章 前言	1
I. 大腸桿菌	1
II. 氧化逆境	1
III. 活性氧化物質 (reactive oxygen species, ROS) 的生合成及來源.....	2
IV. 大腸桿菌氧化逆境調控機制	3
1. OxyR Regulon	3
2. SoxRS Regulon	4
3. KatF (RpoS) Regulon	5
V. 鐵與鐵硫錯化合物對於氧化逆境調節之影響	5
VI. 大腸桿菌之泳動能力與鞭毛構造	6
VII. 大腸桿菌鞭毛的生合成及調控機制	8
VIII. DUF28 (Domain of Unknown Function 28) 蛋白家族與相關研究.....	9
IX. 研究目標	10
第二章 材料與方法	11
I. 供試菌株、質體及菌株培養條件	11
II. 大腸桿菌野生株與突變株生物特性分析	11
1. 生長曲線分析	11
2. 生物膜形成分析 (biofilm formation assay)	11
3. 泳動能力測定 (swimming and swarming motility)	12
4. 逆境反應分析	12
III. YeeN 及 YebC 蛋白質分析	12

1. DUF28 蛋白質於大腸桿菌中表現位置之分析	12
2. western blotting	13
IV. 構築互補質體及 Promoter fusion lacZ 質體	14
1. 萃取大腸桿菌 genomic DNA	14
2. 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)	15
3. 限制酶消化酵素水解及膠體純化	15
4. 載體與目標片段接合	15
5. 大腸桿菌熱休克轉型作用	16
6. 萃取大腸桿菌質體 DNA	16
7. 製備大腸桿菌電穿孔勝任細胞	16
8. 大腸桿菌電穿孔轉型作用	17
V. 大腸桿菌 RNA 樣本置備	17
1. 收取大腸桿菌 RNA 樣本	17
2. 大腸桿菌 RNA 萃取	17
3. 1% 甲醛電泳膠體置備	18
4. 反轉錄酶反應	18
5. 即時定量聚合酶連鎖反應	19
VI. <i>yeeN</i> 及 <i>yebC</i> 啟動子活性分析	19
VI. 生物統計分析 (Statistic analysis)	20
第三章 結果	21
I. 生物資訊功能性分析	21
1. DUF28 蛋白質在不同物種間之演化樹分析與蛋白質 domain 分析	21
2. 不同菌種間 DUF28 同源性蛋白質及演化樹之分析與胺基酸序列之比較	21
3. 大腸桿菌 <i>yeeN</i> 及 <i>yebC</i> 基因於微陣列資料庫中基因表現	22
II. 大腸桿菌突變株 $\Delta yeeN$ 及 $\Delta yebC$ 之生物特性分析	23
1. 生長曲線、生物膜形成及泳動能力測定	23
2. 逆境耐受性測試及相關基因表現	23
III. 驗證 <i>yeeN</i> 及 <i>yebC</i> 基因功能	24
1. 互補株之分析	24
IV. <i>YeeN</i> 及 <i>YebC</i> 蛋白質表現位置之觀察	25
1. <i>YeeN</i> 蛋白質表現位置及分布情形	25
2. <i>YebC</i> 蛋白質表現位置及分布情形	26
V. <i>yeeN</i> 、 <i>yebC</i> 之 operon 組成與調控	27
1. <i>yeeN</i> 之 operon 組成與調控	27
2. <i>yebC</i> 之 operon 組成與調控	28
VI. 上游可能參與調控 <i>yeeN</i> 或 <i>yebC</i> 基因表現之突變株特性分析	29
1. 泳動能力分析 (swimming motility)	29

2. 氧化逆境測試 (paraquat).....	29
3. <i>yeeN</i> 之啟動子在不同突變株中受 paraquat 處理後其表現情形	30
第四章 討論	31
I. DUF28 蛋白質廣泛存在於各物種中，且立體結構十分相似	31
II. <i>yeeN</i> 與 <i>yebC</i> 在調節泳動能力上具有相似的功能.....	32
III. <i>yeeN</i> 參與大腸桿菌氧化逆境的調控.....	33
IV. <i>yeeN</i> 可能不參與抗生素逆境之調節	35
V. <i>yebC</i> 可能參與逆境之調節	35
VI. <i>yebC</i> 與 <i>yeeN</i> 是否參與 quorum sensing 之調節.....	36
VII. 參與泳動力及氧化逆境調節之上游基因特性分析	37
VIII. <i>recA</i> 在氧化逆境下可能參與調節 <i>yeeN</i> 基因	38
IX. <i>relA</i> 於正常環境中正向調控 <i>yeeN</i> ，但在氧化逆境下並無直接參與調節 <i>yeeN</i>	38
X. 在鞭毛生合成過程中 <i>hns</i> 基因可能參與調節 <i>yeeN</i>	39
XI. 結語	40
第五章 未來展望	41
參考文獻	42



表目次

表一、在不同菌種中之 DUF28 蛋白質家族	49
表二、搜尋微陣列資料庫中大腸桿菌 <i>yebC</i> 及 <i>yeeN</i> 於不同逆境處理之基因表現量	51
表三、生物資訊搜尋微陣列資料庫中大腸桿菌 <i>yebC</i> 及 <i>yeeN</i> 之基因表現量	52



圖目次

圖一、不同菌種 DUF28 蛋白質之親緣關係及胺基酸序列相似性	54
圖二、大腸桿菌 DUF28 蛋白質胺基酸序列比對	56
圖三、大腸桿菌 DUF28 蛋白質突變株 ($\Delta yebC$ 及 $\Delta yeeN$) 之生物特性分析.....	57
圖四、大腸桿菌 $\Delta yebC$ 及 $\Delta yeeN$ 突變株對 paraquat 生長抑制濃度之測試	58
圖五、大腸桿菌 $\Delta yebC$ 及 $\Delta yeeN$ 突變株對不同抗生素生長抑制濃度之測試	59
圖六、 $yeeN$ 突變株與其互補株對 paraquat 氧化逆境耐受度測試	60
圖七、YeeN 蛋白質於不同濃度 IPTG 處理下之分佈情形	61
圖八、YeeN-GFP 蛋白質處理 paraquat 環境中於不同濃度 IPTG 之分佈情形	62
圖九、YeeN 蛋白質於低養環境(M9)中處理不同濃度 IPTG 之分佈情形	63
圖十、YebC 蛋白質於不同濃度 IPTG 處理下之分佈情形	64
圖十一、YebC 蛋白質處理 paraquat 環境中於不同濃度 IPTG 之分佈情形.....	65
圖十二、YebC 蛋白質於低養環境(M9)中處理不同濃度 IPTG 之分佈情形	66
圖十三、YeeN-GFP 及 YebC-GFP 蛋白質含量檢測.....	67
圖十四、 $yeeN$ 操縱子 (operon) 組成及調控	68
圖十五、 $yebC$ 操縱子 (operon) 組成及調控	69
圖十六、檢測可能位於 $yeeN$ 或 $yebC$ 上游之基因其突變株的生物特性分析	70
圖十七、 $yeeN$ 啟動子在不同突變株中處理 paraquat 之表現活性	71

附錄目次

附錄一、本論文中所使用之菌株及質體	72
附錄二、本論文中所使用之引子及序列	74
附錄三、本研究中所使用培養基及藥劑配方	76
附錄四、生物資訊分析 DUF28 蛋白質家族	79
附錄五、大腸桿菌 $\Delta yebC$ 及 $\Delta yeeN$ 突變株對 H_2O_2 及 tBOOH 生長抑制濃度之測試	80
附錄六、以 RT-qPCR 方式檢測野生株與 $yeeN$ 突變株氧化逆境相關基因之表現	81
附錄七、大腸桿菌 $yeeN$ 及 $yebC$ 基因參與調控鞭毛生合成	82
附錄八、酵母菌 DUF28 基因 (<i>hah1</i>) 參與氧化逆境之調節	83
附錄九、本實驗所使用進行互補實驗之質體	84
附錄十、 $\Delta yeeN$ 互補株 paraquat 氧化逆境檢測	85
附錄十一、 <i>asps-nudB-yebC-ruvC</i> 、 <i>amn</i> 、 <i>yeeN</i> 預測之啟動子片段及其與轉錄因子結合之序列。	86
附錄十二、 <i>E. coli</i> 在正常環境下可能被 $yeeN$ 或 $yebC$ 所影響的基因群其功能分類	88
附錄十三、綜合 YeeN-GFP 及 YebC-GFP 蛋白質分佈情形之整理	89
附錄十四、大腸桿菌微陣列資料庫中可能參與調控 $yeeN$ 或 $yebC$ 基因表現之上游基因，其突變株生物資訊、特性分析及 $yeeN$ 啟動子在不同突變株中於貧瘠培養基 (M9) 之表現情形	90

第一章 前言

I. 大腸桿菌

大腸桿菌屬於革蘭氏陰性菌 (Gram-negative)，分類上屬 γ 變型菌綱 (Gammaproteobacteria) 的腸桿菌科 (Enterobacteriaceae)，為兼性厭氧性 (facultative anaerobic) 桿菌，常見於恆溫動物的腸道中。大部分的大腸桿菌菌種是無害的，在腸道內普遍存在的菌群會幫助生成有利於寄主的維他命 K₂ (Bentley R. & Meganathan R., 1982)，並且維持寄主體內正常的微生物相，防止病原菌入侵 (Hudault S., *et al.*, 2001) 只有少數如菌種 O157:H7 會造成人類出現嚴重的食物中毒症狀 (Olsvik O, *et al.*, 1991)。目前在實驗室最常使用的菌種為 K-12 衍生出的菌系如 W3110 或 MG1655，這些菌系已喪失於腸道內繁殖的能力 (Fux C.A., *et al.*, 2005)，作為模式生物其基因組在 1994 年就已部分解序 (Fujita N., *et al.*, 1994)，在 1997 年完成整個基因組的解序 (Blattner F. R., *et al.*, 1997)。

II. 氧化逆境

環境中普遍存在著許多不同的逆境因子影響著生物的生長例如溫度、紫外光或者是營養匱乏等等，微生物在面對外在環境的刺激會啟動不同的細胞功能藉以因應環境中的變化 (Allen R. G., and Tresini M., 2000)。而對於好氧性的細菌來說，利用氧氣作為氧化磷酸化過程最終的電子接受者，在正常的代謝過程中便會產生許多活性氧化物質 (Reactive oxygen species, ROS)，如超氧陰離子 (superoxide anion, O₂^{·-})、過氧化氫 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 及氫氧根離子 (hydroxyl radical, HO·) 等等，這些高活性物質會破壞蛋白質、核酸及細胞膜。累積過多的活性氧化物質除了造成細胞損壞之外甚至會使細胞死亡，並且會誘發許多疾病的產生。這種暴露在過多活性氧化物質下的環境變異就是氧化逆境 (oxidative stress) (Storz G., and Imlay J.A., 1999)。

III. 活性氧化物質 (reactive oxygen species, ROS) 的生合成及來源

氧氣可以自由的穿過細胞膜，細胞內的氧氣與電位低於自身的還原性輔酶一旦接觸就會產生電子轉移。若氧氣接受到電子傳遞酵素中的電子，就有機會形成活性氧化物質 (Storz G. *et al.*, 1990)。除了細胞會有內生性的活性氧化物質產生外，環境中也會有不同的活性氧化物生成，其中又以超氧陰離子最容易產生，這與氧分子的自然特性有關。氧分子具有偶數個電子，但在氧分子的電子軌域上具有兩個不成對的電子，因為電子旋轉方向上的限制使得氧分子在一般情況下除自由基外很難氧化其他化合物。如果氧分子吸收能量讓不成對電子轉移至較高的軌域上時，這些不成對的電子為了避免自由基的產生必須接受旋轉方向互補的電子，這種情況增加了氧分子獲得電子的可能性如此一來就有可能產生超氧化物 (Farr S. B. & Kogoma T., 1991)。

當氧分子還原後，會生成超氧陰離子 ($O_2^{\cdot-}$) 及氫氧根離子 ($OH\cdot$) 除了會氧化硫醇 (thiols)、抗壞血酸 (ascorbate)、生育酚 (tocopherol)、兒茶酚胺 (catecholamines) 外 (Fridovich I., 1989)，在細胞內含有 ($Fe-S$)₄ 硫鐵群之蛋白質也非常容易遭受到超氧陰離子的攻擊 (Gardner, P., & Fridovich I., 1991)。在中性環境下超氧陰離子經超氧歧酶 (superoxide dismutase, SODs) 催化後生成活性相對較低的過氧化氫 H_2O_2 (hydrogen peroxide) 及 O_2 (Fridovich I., 1989)。過氧化氫是不帶電物質，可穿過細胞膜並可作為弱氧化劑，會攻擊蛋白質中的硫氫基 (thiol group) 或是還原穀胱甘鈦 (glutathione, GSH)。過氧化氫經過過氧化氫酶 (catalases) 作用後會產生水與氧氣 (Korshunov S., and Imlay J.A., 2010)。但若是過氧化氫與過渡金屬如二價鐵離子 (Fe^{2+}) 反應，便會產生氫氧根離子 (hydroxyl radical, $HO\cdot$)，此即有名的 Fenton reaction (Henle E. S., *et al.*, 1999)。另外，在酸性環境下超氧陰離子獲得質子後便會產生過氧氫根離子 (hydroperoxyl radical, $HOO\cdot$)，其活性又較超氧陰離子高。而由於氫氧根離子活性非常高，除了臭氧外幾乎所有物質都會被氫氧根離子所氧化，這類的氫氧根離子會攻擊 DNA，造成

DNA 受損斷裂，並增加自體突變的機會造成細胞死亡 (Imlay J. A., 2008)。

呼吸作用是藉由在細胞膜上多種不同的酵素進行電子傳遞鏈，將氧分子轉變成水，進而獲得能量的過程；在呼吸作用進行時就會產生許多內生性的活性氧化物質，因此氧化逆境可說是需氧性生物在正常生理代謝功能中的副產物。在大腸桿菌中，有許多進行呼吸作用的酵素在反應時會產生超氧陰離子，例如會自身氧化的 NADH dehydrogenase、succinate dehydrogenase 及 D-lactate dehydrogenase。另外，細胞中的 glutathione reductase 在接收 NADH 的電子後也會產生超氧陰離子 (James A. Imlay, *et al.*, 1988)。過氧化氫的來源包含從超氧歧化酶催化超氧陰離子而來及許多氧化酵素如 D-amino acid oxidase 反應而成；另外，在近紫外光的輻射下也會產生過氧化氫 (Eisenstark, A. 1989)。氫氧根離子的來源有許多，細胞中過氧化氫與還原態的鐵進行 Fenton reaction 時，便會產生氫氧根離子。

除了呼吸作用外，暴露在輻射、光線、金屬或是氧化還原反應藥劑如 paraquat、plumbagin、menadione 的環境之中也會造成氧化逆境。當微生物遭遇環境中的競爭者時，他們也會利用製造 ROS 來抑制其他競爭者的生長。將 viologen、phenazines、quinoes 等氧化還原循環的化合物分泌至細胞外讓這些物質反應生成超氧陰離子，藉此來提升競爭者體內的活性氧化物質含量 (Farr S. B. & Kogoma T., 1991)。

IV. 大腸桿菌氧化逆境調控機制

目前在大腸桿菌中有三類已知針對不同氧化逆境進行調節的操縱組 (regulons)，分別為 *oxyR* regulon、*soxR* regulon 及 *katF* regulon，以下分別對這三類操縱組進行介紹。

1. OxyR Regulon

OxyR 蛋白質為轉錄因子，隸屬於 LysR 蛋白家族，具有自身負調節的功能。在細胞遭受到過氧化氫逆境時會啟動 *oxyR* 基因的表現 (Zheng M., *et al.*, 2001)，

細胞中的過氧化氫濃度增加時會使 OxyR 蛋白質氧化，使得蛋白質中的 Cys199 胺基酸側基與 Cys208 側基形成雙硫鍵，藉此使 OxyR 蛋白質轉變為氧化態，此時的 OxyR 蛋白質才是具有活性的狀態，活化後的 OxyR 蛋白質進而啟動下游基因轉錄使基因表現量增加 (Zheng M. & Storz G., 2000)。由此可知在遭受過氧化氫的氧化逆境時 OxyR 蛋白質同時扮演了感應及訊息傳遞者的角色。在處於過氧化氫逆境中，活化態的 OxyR 蛋白質會與 RNA 聚合酶結合並正向調控下游基因的表現，受到 *oxyR* 調控的基因包含 catalase (HPI)、NADPH-dependent alkyl hydroperoxide reductase (Ahp)、SufABCDE'、Fur、glutathione reductase 等 (Kehres D. G., 2000; Zheng M. & Storz G., 2000; Helmann J. D., *et al.*, 2003)，而 HPI 及 Ahp 在細胞中扮演清除 H₂O₂ 及有機過氧化物的功能，所以 *oxyR* 啟動這些基因表現後，其酵素活性可進一步幫助消除細胞中過多的過氧化氫。

2. SoxRS Regulon

在細胞遭受到超氧陰離子所產生的氧化逆境時，SoxR 蛋白質可以感應到這類的氧化逆境，而作為轉錄因子的 SoxS 蛋白質可以啟動下游基因表現並作正向調控 (Greenberg J. T., *et al.*, 1990; Tsaneva I. R. & Weiss B., 1990; Pomposiello P. J., *et al.*, 2001)。SoxR 蛋白質是一個同型二聚體 (homodimer) 的蛋白質，在每個次單元中具有一鐵硫錯合物 [2Fe-2S]⁺。當環境中出現氧化還原劑時，SoxR 蛋白質中還原態的鐵硫錯合物 [2Fe-2S]⁺ 會被氧化成為 [2Fe-2S]²⁺ 使 SoxR 蛋白質的構型改變，讓 SoxR 蛋白質轉變為活性態，增加 *soxS* 基因的表現，而當 SoxS 蛋白質增加後便可啟動整個操縱組基因的表現 (Zheng M. & Storz G., 2000; Pomposiello P.J. & Dimple B., 2001)。受到 SoxS 蛋白質影響其表現量的基因有 *sodA*、*nof* 及 *zwf* 其酵素功能分別為含錳離子的超氧歧酶 (MnSOD)、核酸內切酶 (endonuclease IV) 及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) (Imlay J. A., 2008)。超氧歧酶可將超氧陰離子轉變為過氧化氫，再經由過氧

化氫酶催化成氧氣及水；核酸內切酶是在 DNA 的去氧核糖遭受氧化攻擊時修補 DNA 的損傷；而葡萄糖-6-磷酸脫氫酶則是在酵素如 glutathione reductase 進行還原作用時提供 NADPH (Greenberg J. T., *et al.*, 1990; Tsaneva I. R. & Weiss B., 1990)。

3. KatF (RpoS) Regulon

大腸桿菌中有兩種過氧化氫酶 HPI 及 HPII，其基因分別為 *katG* 及 *katE*。已知 *KatG* 的酵素活性會被 OxyR 所調控，但 *KatE* 並不會被過氧化氫誘導表現，而且其調控及表現與生長時期有密切的關係 (Triggs-Raine B. L., *et al.*, 1988)。過氧化氫酶 *KatE* 的合成需要 *katF* 基因的表現作為正調控因子。*KatF* 蛋白質為 σ factor，*KatF* 的合成與 *KatE* 的表現皆在細胞進入停滯期 (stationary phase) 時。在細胞接受到進入停滯期的訊號後促使 *KatF* 的合成進一步啟動 RNA 聚合酶使 *katE* 基因進行轉錄並表現 (Loewen P. C. & Triggs B. L., 1984)。細胞在受到過氧化氫所生成的逆境時，*xthA* 基因產物 Exonuclease III (Exo III) 在修復 DNA 上扮演非常重要的角色。*KatF* 除了調控 *KatE* 的表現之外同時也會調控 *XthA* 的表現 (Demple B., *et al.*, 1983; Sak B. D., *et al.*, 1989)。此外，先前研究中已知 *katF* 會調節 *appA* 及 *bola* 基因的表現，*appA* 基因功能為 acid phosphatase；*bola* 基因則是參與在調節細胞不同生長時期的型態轉變。雖然這些基因不一定直接參與氧化逆境的調節，但在進入停滯期及葡萄糖缺乏的細胞中，*katE* 及 *xthA* 在抵禦過氧化氫逆境上，確實扮演重要角色 (Lange R., & Hengge-Aronis R., 1991)。由此可知，進入停滯期的細胞在面對不同種類的逆境時有其獨特的調節機制。

V. 鐵與鐵硫錯化合物對於氧化逆境調節之影響

在 Fenton reaction 中還原態的鐵離子 (Fe^{2+}) 與過氧化氫作用產生活性較高的超氧陰離子，因此當細胞中的二價鐵離子增加時，Fenton reaction 的反應速率

會增加，使得細胞受到活性氧化物質的攻擊 (Halliwell B. & Gutteridge J. M. C., 1984)。故細胞內鐵離子的吸收與代謝受到嚴密的調控，防止細胞內累積過多的鐵離子促使氧化逆境的生成。在大多數的細菌中，Fur 蛋白質參與調節與鐵吸收相關的基因表現，*fur* 基因缺失的突變株對過氧化氫有高敏感性，細胞內的二價鐵離子增加，進而促使 Fenton reaction (Touati D., 2000)，損害 DNA 使細胞生長受到影響。Fur 為二聚體蛋白質，每個次單元中具有一個二價鐵離子及一個與鋅活性作用區 (Jacquamet L., et al., 1998)。當細胞缺鐵時，Fur 蛋白質活性降低使得下游相關的基因 (參與運送 Fe^{3+} 之相關蛋白質) 表現量降低 (Crosa J. H., 1989)。研究指出許多細菌的 Fur 蛋白質會調節超氧歧酶，當 Fur 蛋白質活性降低時，含錳離子超氧歧酶 (MnSOD) 的表現量增加，但含鐵離子超氧歧酶則需 Fur 蛋白活化時表現量才會增加 (Touati D., 2000)。

含鐵硫錯合物之蛋白質 (Fe-S protein) 為一群非常古老且重要的蛋白質 (Beinert H., 2000)，鐵硫錯合物在大部分生物的電子傳遞過程中扮演相當重要的角色。常見的鐵硫錯合物可分為三種 [2Fe-2S]、[3Fe-4S] 和 [4Fe-4S]。大部分鐵硫錯合物是藉由半胱氨酸 (cysteine) 上的硫醇基與蛋白質結合 (吳, 2005)。大腸桿菌中 Isc 及 Suf 蛋白質對於鐵硫錯合物的生合成扮演重要的角色 (Takahashi Y. & Tokumoto U., 2002)。Suf 基因群包含 *sufABCDSE* 其功能主要與細胞調節活性氧化物質如 H_2O_2 及 O_2^- 有關 (Lee J. H., et al., 2004)。大腸桿菌的 SoxR 蛋白質中含有鐵硫錯合物，且需要鐵硫錯合物存在才可行使其感應過氧化物質 (superoxide) 及正常的轉錄功能 (Kiley P. J. & Beinert H., 2003)，因此可知鐵硫錯合物在大腸桿菌氧化逆境的調節機制中也扮演相當重要的角色。

VI. 大腸桿菌之泳動能力與鞭毛構造

細菌在感受到外界環境的變化時 (如營養物質或有害化學物質的存在、溫度、酸鹼值與滲透壓等) 可藉由泳動能力 (motility) 來接近或遠離這些環境的改變並

藉此來適應不同的環境並與其它微生物競爭，而細菌的泳動能力及趨化性與鞭毛的生合成息息相關 (Blair D.F., 1995)。鞭毛除了在細菌的泳動能力上扮演重要角色外，在附著 (adhesion)、生物膜的生合成 (biofilm formation) 與 colonisation 的功能上都是不可或缺的 (Soutourina O. A. & Bertin P. N., 2003)。鞭毛是一種細胞膜上特化的構造，目前已知參與鞭毛生合成與趨化性的調節基因超過 50 個，並且隸屬於 17 個操縱組 (operon)，依照在大腸桿菌基因組上的區域不同分為三大群，第一群基因包含了負責合成鞭毛構造的蛋白質；第二群則是調控鞭毛生合成與鞭毛運動的基因 *motA* 與 *motB*，還有與趨化性相關的基因；第三群包括鞭毛構造蛋白、與運送相關蛋白及合成鞭毛時作用之特有的 σ factor (Chilcott G. S. & Hughes K. T., 2000)。

在大多數的微生物中，鞭毛是由三種不同的次級結構所組合而成，分別為 filament、hook 及 basal structure (Silverman M. & Simon M. I., 1977)。Filament 是由單個蛋白質次單元 flagellin 所組成，一般情況下 flagellin 次單元蛋白排列呈圓柱狀，而藉由 flagellin 次單元排列上的改變可以讓 filament 轉變為超螺旋態 (superhelical form)。當細菌往同一個方向游動 (swimming) 時，flagella 會集成一束；若鞭毛轉變以滾動 (tumble) 的方式運動時，細胞會停止游動 (Terashima H., *et al.*, 2008)。Hook 位於鞭毛的基部其結構穩定，普遍認為 hook 在 filament 基部是作為 universal joint 的功能使旋轉運動可以有效的傳送至鞭毛其餘的構造 (Dimmitt K. & Simon M., 1971)。Basal body 是鞭毛結構中最複雜的部份，一般而言在革蘭式陰性菌中 hook 的末端包覆著 4 層環狀結構，由細胞外而內分別為 L、P、S 和 M-ring。L-ring 與細胞的多醣體接合，而 P-ring 與 peptidoglycan 連接，最內層的 S 及 M-ring 則是和細胞膜緊密相連 (Ueno T. *et al.*, 1992; Schoenhals G. J. & Macnab R. M., 1996)。負責鞭毛運動的 motor (MotA、MotB) 附著於 basal body 外，利用細胞內外的質子濃度差轉換成化學能使鞭毛轉動 (Thormann K. M. & Paulick A., 2010)。

VII. 大腸桿菌鞭毛的生合成及調控機制

鞭毛的生合成是由細胞內至細胞外依序合成，最先合成的是由 FilM 蛋白質構成位於細胞膜上的 M 及 S-ring，接下來合成 basal structure (由 FlgB、C、F、G 組成)，FlgI、FlgH 生成 P 及 L-ring。組成 hook 的次單元會由 basal structure 運送並聚合，hook 聚合的過程需要 FlgD 的幫助，最後依序加上 filament 才形成鞭毛 (T. Minamino, *et al.*, 2008)。

調控鞭毛生合成的基因可分為 class 1、2、3。Class 1 的啟動子負責轉錄早期表現的 *flhDC* 操縱組，*flhD* 及 *flhC* 負責調節鞭毛的生合成，是非常重要的調節因子。因此 class 1 的啟動子會被許多不同的環境因子調控例，如溫度、滲透壓、酸鹼值及生長時期等等，另外像廣泛性調節因子如 H-NS、cAMP-CAP (catabolite gene activator protein) 都會影響 class 1 啟動子進而影響 *flhD*、*flhC* 之基因表現 (Chilcott G.S. & Huges K.T., 2000; Apel D. & Surette M. G., 2008)。

FliD、FliC 負責啟動 class 2 基因群，class 2 包含與鞭毛運送及組成 basal body 的相關蛋白，其中 *fliA* 生成的 σ factor σ^{28} (RpoF) 會正調控 class 3 的基因，而細胞內另外一個 anti- σ factor (FlgM) 會與 FliA 結合以抑制 class 3 基因的表現，待合成鞭毛 basal body 及 hook 後，FlgM 便會使 σ^{28} 活化啟動 class 3 基因。class 3 基因包含生成 flagellin 蛋白的 FliC，與調控 filament 聚合有關的 FliD 與 hook、motor 及趨化性相關的蛋白質 (Soutourina O. A. & Bertin P. N., 2003)。微生物在泳動時除了需要鞭毛的生合成外，鞭毛的轉動才是讓微生物可以泳動的力量來源，許多研究中指出五個基因 *motA*、*motB*、*fliG*、*fliM* 及 *fliN* 可能參與在調節鞭毛的轉動。MotA 及 MotB 是細胞膜上形成質子運送通道過程中不可或缺的蛋白質，MotB 使 motor 在鞭毛轉動時可以穩定、牢固的附著在細胞壁上，並且有效的傳遞轉動的力量讓鞭毛運動。每個 motor 都具有多個 MotA-MotB 複合體使 motor 可以獨立行使轉動功能 (T. Minamino, *et al.*, 2008)。

VIII. DUF28 (Domain of Unknown Function 28) 蛋白家族與相關研究

大腸桿菌基因 *yebC* 及 *yeeN* 隸屬於 DUF28 (Domain of Unknown Function 28) 蛋白質家族，而其功能未知。就生物資訊分析發現在許多物種基因組中都有屬於 DUF28 蛋白質家族的基因存在，包含人類、老鼠、果蠅、阿拉伯芥、酵母菌皆存在 DUF28 之基因 (附錄四)。

在先前的研究中，發現利用跳躍子 Tn5 插入破壞青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 基因組後，得到 RSc2190 (DUF28 蛋白質家族) 突變株，針對其病原性進行分析後發現在三周大的蕃茄當中其致病力並沒有改變，但於四周大的阿拉伯芥中 RSc2190 突變株的致病力明顯減弱，故推測該基因可能與青枯病菌之宿主適應性有關。2008 年發表的文獻中指出 *Pseudomonas aeruginosa* 基因 PA0964 屬於 DUF28 家族蛋白 (又稱為 YebC 家族蛋白) 成員之一，該文獻將其命名為 *pmpR*。PmpR 蛋白質會與調控 quorum-sensing 的 *pqsR* 啟動子區域結合進行負調控，而 *pmpR* 基因的突變株會影響 *P. aeruginosa* swarming 泳動力及生物膜生合成的能力。該研究中指出 PmpR 蛋白質參與調節 *P. aeruginosa* quorum sensing 是藉由與上游基因片段結合的方式進行負調節控 (Liang. H., et al., 2008)。另外，在針對哺乳類的粒腺體疾病 (萊氏症, Leigh dyndrome) 之研究中發現，哺乳類中 DUF28 同源蛋白 CCDC44 (coil-coiled domain containing protein 44) 的基因一旦突變，會造成細胞 COX I 單元蛋白及細胞色素 C 氧化酶 (cytochrome c oxidase) 缺失並影響粒腺體 DNA 合成的功能。因為發現 CCDC44 蛋白質在粒腺體中扮演 COX I 的轉譯活化子的角色，因此又將之命名為 TACO1 (translational activator of mitochondrially encoded COX I)，但在酵母菌當中所找到的同源基因 *YGR021w* 若產生突變卻不會影響粒腺體的轉譯功能 (Weraarpachai W., et al., 2009)。

IX. 研究目標

大部分的物種都有 DUF28 蛋白質，顯示 DUF28 蛋白質具有高度保留性，在實驗室先前研究中指出酵母菌當中的 DUF28 基因 (*hah1*) 缺失後，會影響酵母菌對不同氧化逆境的反應，顯示 DUF28 蛋白質會參與酵母菌調節氧化逆境的能力 (附錄八)。由於 DUF28 蛋白質普遍存在於個物種間，在酵母菌中參與調節氧化逆境，因此想要了解在原核生物中 DUF28 蛋白質究竟扮演何種功能。而某些菌種具有兩個 DUF28 同源蛋白，進而利用模式生物大腸桿菌研究其兩個 DUF28 蛋白質 (YeeN、YebC) 是具有相同或者是相異的功能，並期望進一步了解在不同細菌間 DUF28 蛋白質是否都保留相似的功能。



第二章 材料與方法

I. 供試菌株、質體及菌株培養條件

論文所使用野生株為 *Escherichia coli* K-12 BW25113，突變株有 $\Delta yeeN$ 、 $\Delta yebC$ 、 $\Delta recA$ 、 $\Delta relA$ 、 $\Delta norR$ 、 $\Delta glnG$ 、 $\Delta parC$ 、 Δfur 、 Δhns 、 $\Delta yliH$ 、 $\Delta yceP$ 、 $\Delta baeR$ ，特性及來源請見附錄一。本研究中所用之大腸桿菌菌株皆從保存於 -80°C 的菌株取出，劃菌至豐富固態培養基（Luria Bertani agar, LB agar）上或劃至加入適當抗生素之培養基，於 37°C 生長箱培養一天後進行實驗。本論文所使用之質體參照附錄一，實驗設計之引子序列參照附錄二，實驗所需培養基、藥劑及其他溶液成分參照附錄三。

II. 大腸桿菌野生株與突變株生物特性分析

1. 生長曲線分析

取單一菌落培養於 LB 或 LB 加 kanamycin 抗生素液態培養基中， 37°C 震盪培養 16 小時測量 OD_{600} 吸光值，於 150 mL LB 液態培養基中加入 $\text{OD}_{600} < 0.01$ 之菌液以 37°C 震盪培養每半小時測量 OD_{600} 吸光值培養至 36 小時後結束測量。若是在 M9 培養基中，先將菌液以無菌水洗兩次後回溶於 1 mL 的無菌水中測量 OD_{600} 吸光值，於 50 mL M9 液態培養基中加入 $\text{OD}_{600} = 0.01$ 之菌液於 37°C 震盪培養至 4 小時後開始每兩小時測量其吸光值至 32 小時後結束測量。

2. 生物膜形成分析 (biofilm formation assay)

取單一菌落於 LB 或 LB 加 kanamycin 液態培養基 37°C 震盪培養 16 小時，將菌液 100 倍稀釋後加入 96 孔盤中每孔菌液體積 150 μL ，於 28°C 靜置培養 48 小時後將菌液混勻後以 ELISA reader（Beckman Culture AD340）測量 OD_{570} 吸光值後吸去菌液。加入 160 μL 1% 結晶紫（crystal violet）後靜置 20 分鐘後吸除並回收結晶紫，取 190 μL 無菌水以 pipetting 的方式清洗三次，將 96 孔

盤浸入無菌水中清洗兩次，置於 70°C 烘箱 3 分鐘後取出。加入 180 μ L 1% SDS 以 pipetting 的方式混勻將結晶紫洗下，測量 OD₅₇₀。

3. 泳動能力測定 (swimming and swarming motility)

將單一菌落劃在 LB 或 LB 加 kanamycin 抗生素的固態培養基上培養於 37°C 16 小時。以牙籤將菌刮下回溶於 60 μ L 無菌水後，取 5 μ L 菌液滴於 0.3% 或 0.5% 洋菜膠培養基 (配方見附錄)，靜置培養於 37°C 12 ~ 14 小時後測量菌落半徑。

4. 逆境反應分析

分別取野生株及突變株之單一菌落培養於 LB 或 LB 加 kanamycin 液態培養基中於 37°C 震盪培養 16 小時。取 1.5 mL 菌液於微量離心管中以 6000 rpm 離心三分鐘後去除上清液，加入 1 mL 無菌水混合均勻後，以 6000 rpm 離心三分鐘重複上步驟一次，去除上清液後加入 1 mL M9 液態培養基均勻混合，取 45 μ L 菌液加入 3 mL M9 液態培養基中 37°C 震盪培養 6.5 ~ 7 小時後測量 OD₆₀₀ 吸光值。取最終濃度 OD₆₀₀ 0.2 之菌液 0.5 mL 加入 1.5 mL 含測試藥劑之 M9 液態培養基中，37°C 震盪培養 16 小時後測量 OD₆₀₀ 吸光值。

III. YeeN 及 YebC 蛋白質分析

1. DUF28 蛋白質於大腸桿菌中表現位置之分析

利用 ASKA system 具有 GFP 螢光蛋白之質體植入野生株 BW25113 後，取單一菌落培養於 2 ~ 2.5 mL LB 加 chloramphenicol 抗生素液態培養基中，37°C 震盪培養 16 小時。取 1.5 mL 菌液於微量離心管中以 6000 rpm 離心三分鐘後去除上清液，以無菌水清洗兩次。去除上清液後加入 1 mL 無菌水均勻混合測量吸光值 OD₆₀₀ 於 2.5 mL 液態培養基 (LB 或是 M9 加入 0.1 mM 或 0.3 mM IPTG) 加入最終濃度小於 OD₆₀₀ 0.01 之菌液分別培養 3.5、5、6、7、9、16、24 小時後以螢光顯微鏡觀察 (Olympus AX70, UPlan Apo 100X / 1.35 oil iris)，以 cooled

charged-coupled device (CCD) camera 拍攝，並於不同時間點收取樣本置於 -80°C 保存備用。

2. western blotting

(1) 蛋白質萃取：

視菌量多寡以 $50\ \mu\text{L} \sim 150\ \mu\text{L}$ ddH₂O 回溶後加入等體積 4 X SSB 以 pipetting 方式充分混合後置於 95°C 5 分鐘。以 13000 rpm 離心 10 分鐘後保留上清液，取 $20\ \mu\text{L}$ 至新的微量離心管進行系列稀釋後以 BSA kit 定量，在其餘樣品中加入 $10\ \mu\text{L}$ β -mercaptoethanol 混勻後置於 -20°C 冰箱保存。

(2) SDS-PAGE 置備：

用 Bio-Rad 之 Mini-PROTEIN 4 Multi-Casting Chamber 系統進行小型 SDS-PAGE。將玻璃板以 95% EtOH 擦拭乾淨，組裝塑膠模型置於墊片上，配置 separating gel。於 $4.3\ \text{mL}$ 去離子水加入 40% acrylamide $3\ \text{mL}$ 、 $1.5\ \text{M}$ Tris pH 8.8 $2.5\ \text{mL}$ 、10% SDS $0.1\ \text{mL}$ 、10% APS $0.1\ \text{mL}$ 最後加入 TEMED $4\ \mu\text{L}$ 均勻混合後注入 $8\ \text{mL}$ 至模型後立即加入 95% EtOH 壓平，待膠體凝固後倒掉 EtOH。配置 stacking gel，於 $2.92\ \text{mL}$ 去離子水中加入 40% acrylamide $0.5\ \text{mL}$ 、 $1\ \text{M}$ Tris pH 6.8 $0.5\ \text{mL}$ 、10% SDS $40\ \mu\text{L}$ 、10% APS $40\ \mu\text{L}$ 最後加入 TEMED $4\ \mu\text{L}$ 混合均勻後於模型中注入 $3\ \text{mL}$ 立即插入齒梳等待凝固。每個蛋白質樣本皆取 $10\ \text{mg}$ 加入適量 2 X loading dye 連同 prestained marker 於 95°C 加熱 5 分鐘後置於冰上 3 分鐘後注入孔洞中。以 80V 電壓進行電泳 120 ~ 130 分鐘後進行 SDS-PAGE 染色及西方墨點轉漬。

(3) 蛋白質染色：

取下 SDS-PAGE 膠片去除 stacking gel 的部分置於保鮮盒中，加入 comassie blue R-250 染劑蓋過膠體，染色至隔夜後以退染劑 (30% methanol, 10% acetic acid) 退染。

(4) 西方墨點法：

將 SDS-PAGE 取下去除 stacking gel 後浸泡於 transfer buffer 中。裁剪適當大小的 3MM Whatman filter paper 與轉漬用 PVDF membrane (Polyscreen, PerkinElmer), 先將 PVDF membrane 以 methanol 浸溼再與 filter paper 浸泡於 transfer buffer 中。將 transfer buffer 倒入塑膠盆中放入固定夾, 由負極開始依序放入多孔海綿、filter paper、SDS-PAGE 膠體、PVDF membrane、filter paper 及多孔海綿去除氣泡後將固定夾夾好放入 cassette 中, 將 transfer buffer 倒入電泳槽內至八分滿, 並放入磁石後, 於 4°C 供給 20V 電壓及 90 mA 電流轉漬過隔夜。轉漬完後取下 PVDF membrane, 加入 Ponceau S 染劑染色先行偵測蛋白質轉漬效率, 而後以清水洗去染劑。加入含 5% 脫脂奶粉之 20 mL TBST buffer 室溫下震盪搖晃 2~2.5 小時後去除 buffer, 再加入 15 mL TBST buffer 室溫震盪清洗 5 分鐘兩次。於 10 mL 含 3% 脫脂奶粉之 TBST buffer 加入 1:10000 稀釋倍數之抗體 (mouse monoclonal IgG α His-HRP) 室溫震盪搖晃 2 小時後去除 buffer 後加入 20 mL TBST buffer 清洗 5~15 分鐘重覆清洗三次。加入 ECL detection reagent (Peroxide solution : Luminol reagent = 1 : 1), 使用 (Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore), 反應 1 分鐘後以 LAS3000 (Fujifilm) 偵測訊號。

IV. 構築互補質體及 Promoter fusion lacZ 質體

1. 萃取大腸桿菌 genomic DNA

取單一菌落培養於 LB 液態培養基中, 於 37°C 震盪培養 16 小時。取一微量離心管將 1.5 mL 菌液以 13000 rpm 離心 3 分鐘後去除上清液。加入 200 μ L lysis buffer 以 pipetting 方式混合均勻, 再加入 66 μ L 5 M NaCl 以 pipetting 方式充分混合後以 13000 rpm 離心 15 分鐘, 取出上清液至新的微量離心管後加入等體積 chloroform 輕輕反轉數次, 混勻後離心 13000 rpm 5 分鐘將上層液取出, 加入兩倍體積 100% EtOH 而後離心 13000 rpm 10 分鐘, 去除上清液以 70% EtOH

清洗兩次，小心移去上清液後置於桌上待乾，乾燥後以 50 μ L 1 X TE buffer 或 1/2 X TE buffer 回溶。

2. 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

設計特定引子以聚合酶連鎖反應增幅目標基因或目標基因 promoter 至 5' 端部分序列，取 2 μ L 10 倍稀釋的 genomic DNA 當模板，再加入 10 μ L 5X Phusion HF buffer、10 μ L 10 mM dNTP、10 μ M forward 及 reverse 引子各 2.5 μ L 及 0.5 μ L Phusion DNA 聚合 (2U/ μ L)。均勻混合後放入聚合酶連鎖反應器中進行反應。反應溫度及時間如下：

Cycle #	Denature	Annealing	Extension
1	95°C, 5 分鐘		
34	95°C, 30 秒	T°C, 30 秒	72°C, t 分鐘
1			72°C, 5 分鐘

T：溫度依據引子之 T_m 值，t：時間依據增幅長度設定 (1 kb/ min)

PCR 之產物取 2 μ L 進行 0.8% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (90V, 30 分鐘) 以確認基因長度。

3. 限制酶消化酵素水解及膠體純化

將載體與目標 DNA 片段利用限制酶消化水解。取 5 ~ 8 μ L 的 DNA 混合 0.5 μ L (20 U/ μ L) 限制酵素、2 μ L 10 X NEB buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT pH 7.9)、2 μ L 1/10 X BSA，最後加入無菌去離子水使總體積為 20 μ L。均勻混合後於 37°C 反應 2~3 小時，以 1% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (90V, 30~35 分鐘) 確定基因之長度後以 Micro-Elute DNA clean/ Extraction Kit (Gene Mark) 進行膠體純化，再以 0.8% 瓊脂糖凝膠電泳分析 (90V, 30 分鐘) 以確認 DNA 片段長度。

4. 載體與目標片段接合

將載體 DNA 與目標片段 DNA 利用接合酶 (T4 DNA ligase, New England

Biolabs, U.S.A.) 接合。載體與目標 DNA 片段比例為 1:3，加入 2 μL 10X T4 ligation buffer 及 0.5 μL T4 DNA ligase (400 U/ μL)，以無菌去離子水補至最終體積 20 μL ，均勻混合後置於室溫 2 小時或隔夜後進行熱休克轉型。

5. 大腸桿菌熱休克轉型作用

將勝任細胞自 -80°C 保存取出放置冰上待融，於 30~50 μL 勝任細胞中加入 10~15 μL 的接合產物，放置冰上 30 分鐘後給予 42°C 熱休克處理 45 秒，立即置於冰上 3 分鐘，接著加入 1 mL SOC 培養液，於 37°C 震盪培養 1 小時，6000 rpm 離心 3 分鐘去除 800 μL 上清液，將 pellet 以剩餘上清液混勻後塗佈於含適當抗生素的固態培養基上， 37°C 培養 16 小時，挑選單一菌落進行實驗。

6. 萃取大腸桿菌質體 DNA

取單一菌落培養於 2~3 mL LB 液態培養基中，於 37°C 震盪培養 16 小時。取一微量離心管將菌液以 13000 rpm 離心 3 分鐘後去除上清液。加入 200 μL solution I，混合均勻（可震盪）再加入 400 μL solution II，輕輕反轉數次放置於冰上 5~10 分鐘。加入 300 μL solution III，輕輕反轉數次後放置於冰上 5~10 分鐘。以 13000 rpm 離心 20~30 分鐘後小心取出上清液放入新的微量離心管。加入等體積 isopropanol 及 1/10 X 體積 3M NaOAc，混合均勻後放置於 -20°C 2 小時或隔夜。以 13000 rpm 離心 5~10 分鐘，去除上清液後加入 1 mL 75% 酒精搖晃數次後將酒精盡量吸乾後放置於桌上 5~10 分鐘待乾，加入 ddH₂O 或 elution buffer 20~50 μL 回溶。

7. 製備大腸桿菌電穿孔勝任細胞

取 3 至 4 個單一菌落於 LB 或 LB 加 kanamycin 抗生素之液態培養基中 37°C 震盪培養 16 小時，測量 OD₆₀₀ 吸光值，於 100 mL LB 液態培養基中加入 OD₆₀₀ 小於 0.01 之菌液， 37°C 震盪培養 2~2.5 小時待 OD₆₀₀ 0.3~0.5，以 6500 rpm 4°C 離心 15 分鐘，去除上清液後放置於冰上再加入 40 mL 冰的 10% glycerol，用力搖晃均勻；6500 rpm 4°C 離心 15 分鐘，去除上清液加入 20 mL

冰的 10% glycerol，用力搖晃均勻；6500 rpm 4°C 離心 20 分鐘，去除上清液加入 10 mL 冰的 10% glycerol，用力搖晃均勻；6500 rpm 4°C 離心 25 分鐘，將上清液取出剩下約 1.5 ~ 2 mL 將 pellet 混勻後分裝至無菌微量離心管每管 100 ~ 200 μ L，置於液態氮中冷凍後保存於 -80°C 備用。

8. 大腸桿菌電穿孔轉型作用

將勝任細胞自 -80°C 保存取出放置冰上待融，每管加入 3 ~ 5 μ L 的質體 DNA 混合後放入 cuvette 中，以 2.5kV、電壓 5 ms 進行電穿孔後立即加入 1 mL SOC 培養基於 37°C 震盪培養 1 小時，6000 rpm 離心 3 分鐘後留下 200 μ L 上清液，將 pellet 混勻塗佈於含適當抗生素的固態培養基上以 37°C 培養 16 小時，挑選單一菌落進行實驗。

V. 大腸桿菌 RNA 樣本置備

1. 收取大腸桿菌 RNA 樣本

取單一菌落培養於 2 mL LB 或 LB 加 kanamycin 抗生素之液態培養基 37°C 震盪培養 16 小時後，而後取 1.5 mL 菌液至無菌微量離心管離心 6000 rpm 3 分鐘，去除上清液加入 1 mL 無菌水以 vortex 方式混勻，離心 6000 rpm 3 分鐘重複上步驟後去除上清液，加入 1 mL 無菌水混勻。於 6 mL M9 液態培養基中加入 90 μ L 之菌液，37°C 震盪培養 6 ~ 7 小時測量 OD₆₀₀ 吸光值，將菌液稀釋於 7 mL M9 液態培養基最終濃度 OD₆₀₀ 0.2 後加入 3 mL 上述菌液至含適當濃度 paraquat 之 M9 液態培養基中，使 paraquat 最終濃度為 1 μ M、菌液最終濃度為 OD₆₀₀ 0.05 而總體積為 12 mL。分別收取於 37°C 震盪培養 8 小時及 16 小時之菌液並測量該時間點之 OD₆₀₀ 吸光值，將菌液取至無菌微量離心管後加入 1/10 X 體積之 stop solution 混勻後離心 6000 rpm 3 分鐘，完全去除上清液置於液態氮中急速冷凍後保存於 -80°C。

2. 大腸桿菌 RNA 萃取 (使用 High Pure RNA Isolation Kit, Roche)

將上述收取之 pellet 以 200 μ L 10 mM Tris pH 8.0 含 4 μ L 50 mg/mL Lysozyme 回溶，於 37°C 放置 10 分鐘。加入 400 μ L lysis/-binding 混合均勻，將混合液吸取置於 High Pure Filter Tube 中，與 Collection Tube 合併後，離心 1000 rpm 30 秒重複此步驟完全至去除上清液。將 10 μ L DNase I 加入 90 μ L DNase Incubation buffer pipetting 混合均勻後小心加入 Filter tube 中，放置室溫 1 ~ 2 小時。加入 500 μ L Wash buffer I 離心 1 分鐘 10000 rpm 去除上清液後再加入 500 μ L Wash buffer II 離心 10000 rpm 1 分鐘後倒掉上清液，加入 200 μ L Wash buffer II 離心，13000 rpm 2 分鐘去除剩餘 Wash buffer。將 Filter tube 置於乾淨無菌微量離心管中，在 Filter tube 內加入 50 ~ 100 μ L Elution buffer，離心 10000 rpm 1 分鐘。取 1.5 μ L RNA 以 Nanodrop 測量 RNA 濃度及 A_{260}/A_{280} 之比例，另取 2 μ L RNA 進行電泳確認 RNA 是否有降解之情形。

3. 1% 甲醛電泳膠體置備 (1% formaldehyde gel)

取 0.4 g agarose 加入 28.844 mL 的去離子無菌水後微波加熱至完全溶解。待稍微冷卻後立即加入 4 mL 10 X MOPS 及 7.156 mL formaldehyde 均勻混合後倒入模具中，並插入齒梳待涼凝固備用。取 2 μ L RNA 加入 1 μ L 10 X MOPS、5 μ L formamide、2 μ L formaldehyde、1 μ L 200 μ g/ μ L EtBr、1 μ L loading dye 放置於 65°C 10 分鐘後再置冰上 2 分鐘。將上述樣本取出注入膠體中以 1 X MOPS 作為 running buffer 以電壓 80V 進行電泳 15 分鐘。

4. 反轉錄酶反應 (Reverse Transcription 使用 Reverse Transcription System, Promega)

將 RNA 稀釋為最終濃度 1 mg、總體積 10.2 μ L 後置於乾淨無菌之 200 μ L 微量離心管中加熱至 70°C 放置 10 分鐘，立即置於冰上 2 ~ 3 分鐘。於該反應液中再加入 25 mM MgCl₂ 4 μ L、10 X Reverse Transcription buffer 2 μ L、10 mM dNTP Mixture 2 μ L、Random primer 1 μ L、Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor 0.4 μ L、AMV Reverse Transcriptase 0.4 μ L，最終總體積為 20 μ L。反

應流程為 42°C 1.5 小時、95°C 5 分鐘、4°C 終止反應。反應完成後取 1.5 μ L cDNA 以 Nanodrop 定量並置於 -20°C 保存。

5. 即時定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative RT-PCR)

取待測基因 10 μ M forward 及 reverse prime 各 0.5 μ L，加入 2 X KAPA SYBR fast q-PCR master mix 以 pipetting 混合均勻，每管分裝 10 μ L。將 cDNA 取出以乾淨無菌去離子水稀釋成 200~400 ng/ μ L，取 8 μ L 加入至上述反應液中最終體積為 18 μ L，混合均勻後放入 Real-Time PCR Detection 反應器 (Bio-Rad) 中進行反應，以 iQ5 軟體 (Bio-Rad) 分析。

VI. yeeN 及 yebC 啟動子活性分析

啟動子活性測試 (β -galactosidase activity assay)

將帶有預測啟動子片段的質體植入野生株中，取單一菌落培養於含 tetracycline 抗生素之 LB 液態培養基以 37°C 震盪培養 16 小時，取 1.5 mL 菌液於微量離心管中以 6000 rpm 離心 3 分鐘後去除上清液，加入 1 mL 無菌水混合均勻後 6000 rpm 離心 3 分鐘，重複此步驟一次，加入 1 mL M9 液態培養基均勻混合，測量其 OD₆₀₀ 吸光值。若是測量其 operon 組成，於 2 mL M9 液態培養基中加入最終濃度 OD₆₀₀ 0.05 之菌液 37°C 震盪培養 6 小時；若是測量啟動子之調控，則於 1.5 mL M9 液態培養基中加入適當濃度之測試藥劑後加入 0.5 mL OD₆₀₀ 0.2 之菌液 37°C 震盪培養 6 小時，取 600 ~ 800 μ L 次培養之菌液以 13000 rpm 離心 3 分鐘，去除上清液加入 300 μ L Z buffer 震盪懸浮細胞後取出 150 μ L 懸浮液測量 OD₆₀₀ 吸光值。剩餘 150 μ L 懸浮液加入 20 μ L chloroform 及 10 μ L 0.1% SDS，震盪 10 秒打破細胞，於 28°C 放置 5 分鐘。加入 30 μ L 4 mg/mL ONPG 並反轉數次，記錄時間此為 t_0 。待反應液略呈黃色後加入 75 μ L Na₂CO₃ 終止反應，將微量離心管放置冰上並記錄時間，此為 t_f 。於 13000 rpm 離心 10 分鐘，取出 150 μ L 上清液測量 OD₄₂₀ 及 OD₅₅₀ 後依照式一計算

β -galatósídase 活性。

$$U = \frac{[(OD420 - 1.75 \times OD550) \times 1000]}{[(tf - t0) \times OD600 \times V]} \dots\dots\dots \text{式一}$$

VI. 生物統計分析 (Statistic analysis)

以不同批次實驗數值利用 SAS 統計軟體進行 student's t-test，若機率值 (P 值) 小於 0.05，表示有顯著差異，若機率值 (P 值) 小於 0.01，表示有高度顯著差異，若機率值 (P 值) 大於 0.05，表示無顯著差異。



第三章 結果

I. 生物資訊功能性分析

1. DUF28 蛋白質在不同物種間之演化樹分析與蛋白質 domain 分析

為了瞭解 DUF28 蛋白質結構上的特性，及在不同物種之分佈，利用 EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) InterPro 資料庫分析 DUF28 蛋白質家族，結果顯示除了古細菌 (表一)，在真核與原核物種都具有 DUF28 蛋白質。DUF28 蛋白質 domain 包含約 230 個胺基酸，*Aquifex aeolicus* DUF28 蛋白質 (Aq1575) 的立體結構分為三個 domain，domain 1 有 α -helix、domain 2 和 3 為 α -helix 與 β -sheet 混合而成 (Shin D. H., *et al.*, 2002)，而該蛋白質立體結構與大腸桿菌 *Escherichia coli* 的 DUF28 蛋白質 YebC 頗為相似 (附錄四)，顯示 DUF28 蛋白質在不同物種間具有高度保留性且在細菌中該蛋白質保有相似的立體結構。

2. 不同菌種間 DUF28 同源性蛋白質及演化樹之分析與胺基酸序列之比較

為了瞭解在細菌中 DUF28 同源蛋白質的相似性及關聯性，利用 PEC (Prolifling of *E. coli* chromosome) 生物資訊網站 (<http://tinyurl.com/2cp8sh3>) 及軟體 VectoNTI 進行分析。從表一中可發現在大多數真細菌當中至少具有一個屬於 DUF28 蛋白質家族的同源性蛋白，只有極少部份的菌系沒有 DUF28 同源蛋白質，而在某些細菌當中 (如腸道菌 *E. coli*) 則具有兩個 DUF28 同源蛋白。

利用 EMBL-EBI 生物資訊分析及 vector-NTI 將大腸桿菌的兩個 DUF28 蛋白質 YeeN 及 YebC 與其它不同菌種之 DUF28 蛋白質進行演化分析及胺基酸序列比對 (圖一)，結果顯示在親緣關係的分群上可將表現 DUF28 蛋白質的細菌大致分做兩群，一群是 DUF28 同源蛋白與 YebC 較相似之菌種，另一群則是 DUF28 蛋白質與 YeeN 較為相像之菌種。具有兩個 DUF28 蛋白質之菌種有 *Shigella boydii* (soby)、*Shwanella oneidensis* (sone) 及 *Pseudomonas syringae* (P syr)，

而其中同為腸道菌的 *soby* 與 *E. coli* 的相同度高達 99% (*soby* 2 : YeeN ; *soby* 1 : YebC)。但只具有一個 DUF28 同源蛋白之菌種則會各與 YeeN 或 YebC 相像，如 *Yersinia pestis* (*ype*) 其蛋白質與 YebC 非常相像 (相同度 93%)，但與 YeeN 相似度只有 50%。在親緣關係較遠之菌種如 *Aquifex aeolicus* 及 *Thermotoga lettingae*，其 DUF28 蛋白質序列與大腸桿菌胺基酸序列相似度則偏低許多。利用 Bio-editor 軟體分析比較在大腸桿菌中兩個 DUF28 蛋白質 (YeeN、YebC) 序列相似度，發現這兩個蛋白質序列相似度約有 50%，相同度只有 38% (圖二)。這些結果顯示不同的菌種所保留的胺基酸序列不盡相同，並不會只與大腸桿菌其中一個 DUF28 蛋白質相似。

3. 大腸桿菌 *yeeN* 及 *yebC* 基因於微陣列資料庫中基因表現

為了進一步了解大腸桿菌 *yeeN* 及 *yebC* 基因可能參與哪些功能，利用微陣列資料庫 (NCBI 及 Ecogene database <http://ecogene.org/EcoarrayStat.php>) 搜尋 *yeeN* 及 *yebC* 在轉錄層次上之表現情況。結果顯示在不同逆境處理下如 (抗生素、溫度、 H_2O_2) *yeeN* 的基因表現量有明顯變化 (上升或下降至少兩倍以上)，而 norfloxacin 及 spectinomycin 抗生素、溫度或是紫外光處理會使 *yebC* 基因表現量有兩倍左右的變化量。這些結果指出 *yeeN* 會受到較多種類之逆境影響，而改變其基因表現量 (表二)，顯示 *yeeN* 可能與逆境調節較為相關。

另外在搜尋大腸桿菌基因突變株之微陣列資料也可發現，在某些基因突變株中 *yeeN* 或 *yebC* 基因表現量有明顯的變化。在 $\Delta relA$ 、 $\Delta recA$ 、 $\Delta yliH$ 、 $\Delta yceP$ 、 $\Delta gyrB$ 及 $\Delta parC$ 突變株中 *yeeN* 基因表現有明顯的變化 (上升或下降至少兩倍以上)，*yebC* 則在 $\Delta baeR$ 、 Δhns 、 $\Delta recA$ 、 $\Delta glnG$ 、 $\Delta norR$ 、 Δfur 及 $\Delta parC$ 這些突變株中，其基因表現量有兩倍左右之變化。較特別的是 *yeeN* 及 *yebC* 其基因表現在與逆境相關之突變株 $\Delta recA$ 都有上升的趨勢，而在 $\Delta parC$ 中兩基因表現量都有下降的趨勢 (表三)。這些結果顯示 *yeeN* 及 *yebC* 基因表現會受到上述這些基因缺失的影響，推測這些基因可能是可調控 *yeeN* 或 *yebC* 功能

的上游基因。

II. 大腸桿菌突變株 $\Delta yeeN$ 及 $\Delta yebC$ 之生物特性分析

1. 生長曲線、生物膜形成及泳動能力測定

為了瞭解大腸桿菌中 DUF28 基因缺失後是否影響其正常生長，測量兩突變株在豐富 (LB) 及貧瘠 (M9) 培養基之生長曲線，可以發現只有 $\Delta yeeN$ 其吸光值稍微偏低，但不論是在豐富或是貧瘠培養基中， $\Delta yeeN$ 及 $\Delta yebC$ 其生長曲線與野生株並沒有太大的差異，顯示 *yeeN* 或 *yebC* 基因缺失後並不會影響大腸桿菌的生長情況 (圖三 A、B)。

生物膜之形成對於微生物的生長及其抵抗環境中逆境的能力扮演重要角色，為了瞭解 *yeeN* 或 *yebC* 基因在大腸桿菌生物膜的生成功能是否改變，進一步測定野生株及突變株 ($\Delta yeeN$ 及 $\Delta yebC$) 生物膜形成，結果顯示兩突變株之生物膜生成能力都只有些微的增加，顯示 *yeeN* 或是 *yebC* 基因在生物膜的形成上並非扮演關鍵性的角色 (圖三 C)。

泳動能力對於微生物在環境適應性上扮演重要角色，進一步測定 *yeeN* 及 *yebC* 突變株之泳動能力。試驗結果中可以發現，兩突變株 ($\Delta yeeN$ 及 $\Delta yebC$) 之泳動力都有極為顯著的增加 (圖三 D)。顯示 *yeeN* 及 *yebC* 基因參與調控大腸桿菌的泳動能力，並且扮演重要的角色。

2. 逆境耐受性測試及相關基因表現

在先前的研究中指出在酵母菌中 DUF28 基因 (*hah1*) 參與在抵抗氧化逆境之調控，因此測試野生株與突變株 ($\Delta yeeN$ 及 $\Delta yebC$) 抵抗氧化逆境能力有何改變。發現在 paraquat 處理 16 小時 $\Delta yeeN$ 對於 paraquat 的抵抗能力有明顯增加的現象 (圖四)，結果顯示 *yeeN* 參與調節 paraquat 所產生的氧化逆境；但在 H_2O_2 及 tertiary-butylhydroperoxide (tBOOH) 處理下，由於菌落之間結果差異過大，分析多

次實驗所得結果目前尚無法確認兩突變株對於此兩種氧化逆境因子之耐受性是否增加 (附錄五)。

微陣列資料庫顯示 *yeeN* 或 *yebC* 之基因表現會受到不同抗生素處理有明顯的變化 (表二)，進一步測試 $\Delta yeeN$ 及 $\Delta yebC$ 對於抗生素逆境的耐受性有何變化。發現在野生株及突變株 ($\Delta yeeN$ 及 $\Delta yebC$) 中，處理抗生素 rifampicin、spectinomycin、norfloxacin 及 novobiocin 之生長情形並沒有明顯的差異 (圖五)，顯示 *yeeN* 或 *yebC* 基因並沒有參與大腸桿菌抵抗這些抗生素的耐受性。

由氧化逆境特性分析結果中發現 *yeeN* 突變後可能影響氧化逆境的調節，為進一步了解 *yeeN* 是否參與調控氧化逆境相關基因之表現，利用即時定量 PCR 比較野生株與 *yeeN* 突變株中與調控氧化逆境相關基因 (*soxR*、*soxS*、*oxyR*、*fumC*、*katG* 及 *sodA*) 的 RNA 表現量是否有改變。發現 *yeeN* 突變株與野生株在未處理 paraquat 時這些基因的表現量都沒有明顯的變化，但 *yeeN* 突變株在處理 paraquat 八小時後上述基因之表現量都有明顯增加的現象 (附錄六)，但由於目前僅只有一次結果，尚無法有一定論。

III. 驗證 *yeeN* 及 *yebC* 基因功能

1. 互補株之分析

為了進一步驗證 *yeeN* 缺失確實會影響大腸桿菌之泳動能力，利用帶有 *yeeN* 基因的 IPTG 誘導質體 pCA24N 植入 $\Delta yeeN$ 中，測試其泳動能力結果顯示在加入 0.3 mM IPTG 誘導 YeeN 表現後，泳動能力有明顯下降的趨勢 (附錄七)。為驗證 *yeeN* 缺失確實會影響大腸桿菌抵抗 paraquat 之氧化逆境的能力，利用帶有 *yeeN* 基因的 IPTG 誘導質體 pCA24N 植入 $\Delta yeeN$ 中，但由於影響因子眾多 (IPTG、抗生素及 paraquat)，結果並無法下一定論。因此改採用低複製數之泛寄主質體 pUFR047 質體將 *yeeN* 基因及其啟動子片段放入該質體，植入 *yeeN* 突變株進行互補，實驗結果發現互補株抵抗 paraquat 的能力有下降 (圖六、附錄

十)，顯示 *yeeN* 基因確實參與大腸桿菌泳動能力及抵抗 paraquat 的能力之調節。

利用帶有 *yebC* 基因的 IPTG 誘導質體 pCA24N 植入 $\Delta yebC$ 中，測試其泳動能力結果顯示在加入 0.3 mM IPTG 誘導 YebC 表現後，泳動能力有明顯下降的趨勢 (附錄七)，因此可說明 *yebC* 基因在大腸桿菌調控泳動能力上確實扮演重要角色。

IV. YeeN 及 YebC 蛋白質表現位置之觀察

為了瞭解 YeeN 及 YebC 在細胞內之功能，利用 YeeN、YebC 與綠螢光蛋白 (GFP) 融合法分析 YeeN 及 YebC 蛋白質於大腸桿菌中分布情形，以螢光顯微鏡觀察其分布，並以西方墨點檢測其蛋白質表現量。

進行觀察時同時處理對照組 (empty vector, pCA24N)，結果顯示對照組並不會產生螢光，利用 VectorNTI 檢測後確認 pCA24N 上 GFP 序列具有 start codon，但由西方墨點法分析結果中得知，pCA24N 並不會生成 GFP，以上結果顯示若 pCA24N 質體未攜帶任何基因，則 GFP 不會表現，因此不會有 GFP 生成。

1. YeeN 蛋白質表現位置及分布情形

(1) YeeN 蛋白質於不同濃度 IPTG 處理下之分佈情形

在 0.1 mM IPTG 處理時，YeeN 蛋白質在生長對數期早期 (early log phase) 會均勻分布在細胞質中，到對數期中期 YeeN 蛋白質開始呈點狀分布並且持續至生長停滯後期 (stationary phase) 皆觀察到有點狀分布的現象 (圖七 A、C)。於 0.3 mM IPTG 誘導下在生長對數期早期 (early log phase) 便有出現點狀分布的情形，且持續至生長後期皆然 (圖七 B、D)，顯示 YeeN 蛋白質於細胞中分佈呈點狀分布的形式。

(2) YeeN 蛋白質處理 paraquat 環境中於不同濃度 IPTG 之分佈情形

處理 0.6 M paraquat 情況下，細胞生長延遲，在 0.1 mM IPTG 的條件中

YeeN 蛋白質在生長延遲期 (lag phase) 便有點狀聚集的現象 (圖七 A, 圖八 A), 並且至生長對數期 (log phase) 皆有點狀聚集的情形。而處理 0.6 M paraquat 情況下, 於 0.3 mM IPTG 條件中, 同樣在生長延遲期早期 (early lag phase) 便有點狀聚集的現象, 並持續至生長對數期 (log phase) 皆然 (圖七 B, 圖八 B)。顯示 YeeN 蛋白質在處理 paraquat 氧化逆境中, 亦會促使點狀聚集的情形。

(3) YeeN 蛋白質於低養環境中處理不同濃度 IPTG 之分佈情形

於貧瘠培養基 (M9) 中 0.1 mM IPTG 處理下, YeeN 蛋白質在生長進入對數期 (log phase) 時會出現聚集的情形 (圖九 A、C), 而在 0.3 mM IPTG 情況下, YeeN 蛋白質在生長延遲期 (lag phase) 便開始聚集 (圖九 B、D)。顯示 YeeN 蛋白質在低營養環境下亦會促使點狀聚集的情形。

(4) YeeN 蛋白質於不同濃度 IPTG 處理下蛋白質含量之分析

比較 YeeN 在生長對數早期 (early log phase) 處理 0.1 mM (尚未聚集) 及 0.3 mM IPTG (已聚集) 之蛋白質量變化, 結果顯示 YeeN 在 0.3 mM IPTG 處理下, 蛋白質量較多, 推測 YeeN 蛋白質含量會影響 YeeN 於細胞內點狀聚集之情形 (圖十三)。

由以上結果顯示, YeeN 蛋白質在細胞中當蛋白質量達一定程度後, 會開始出現點狀聚集, 且 YeeN 蛋白質在 paraquat 氧化逆境及低養環境的情況下會促使點狀聚集之分佈情形。

2. YebC 蛋白質表現位置及分布情形

(1) YebC 蛋白質於不同濃度 IPTG 處理下之分佈情形

0.1 mM IPTG 處理下, YebC 蛋白質在生長停滯期後期 (late stationary phase) 出現聚集的情形, 其聚集的型態與 YeeN 不同, 呈現分段的現象 (圖十 A、C), 而在 0.3 mM IPTG 處理下, YebC 蛋白質同樣在生長停滯期後期 (late stationary phase) 出現分段聚集的現象 (圖十 B、D), 結果顯示 YebC 蛋白質在生長停滯

後期會出分段聚集的情形。

(2) YebC 蛋白質處理 paraquat 環境中於不同濃度 IPTG 之分佈情形

處理 0.6 M paraquat 情況下，細胞生長延遲，0.1 mM IPTG 的條件中 YebC 蛋白質在不同生長時期皆不會有分段聚集的現象 (圖十 A，圖十一 A)。而同樣處理 0.6 M paraquat 情況下，於 0.3 mM IPTG 條件中，YebC 蛋白質亦不會有分段聚集的情況 (圖十 B，圖十一 B)，結果顯示 YebC 蛋白質不會受到 paraquat 氧化逆境影響而改變分佈情形。

(3) YebC 蛋白質於低養環境中處理不同濃度 IPTG 之分佈情形

在貧瘠培養基 (M9) 中 0.1 mM IPTG 濃度處理下，不論細胞處於何種生長時期時，YebC 蛋白質不會有分段聚集的情形 (圖十二 A、B)，在 0.3 mM IPTG 處理中亦然 (圖十二 A、C)，結果顯示 YebC 蛋白質不會受到低養環境影響而改變分佈情形。

(4) YebC 蛋白質於不同濃度 IPTG 處理下蛋白質含量之分析

分析 0.1 mM IPTG 處理下 YebC 蛋白質於停滯期 (16 小時，尚未聚集) 與停滯後期 (24 小時，分段聚集) 的蛋白質量並無明顯的改變。但在 0.3 mM IPTG 處理下，停滯後期 (24 小時，分段聚集) 的蛋白質量有明顯變多的情形 (圖十三)，結果顯示 YebC 蛋白質分段聚集的情形與蛋白質含量無關。

由以上結果顯示，YebC 蛋白質不論在 paraquat 氧化逆境或低養環境的處理下，都不會出現聚集的情形。但在細胞進入停滯期後期 (late stationary phase) 時，YebC 便會出現分段聚集的情形，且這種分段聚集的現象與蛋白質含量無關。

V. *yeeN*、*yebC* 之 operon 組成與調控

1. *yeeN* 之 operon 組成與調控

利用 KEGG 網站分析發現 *yeeN* 與其前面兩個基因 *shiA* 及 *amn* 有相同的轉錄方向 (圖十四 A)，Softberry 生物資訊分析預測 *yeeN* 前端可能有自己的啟

動子 (附錄十一)。利用 β -galatósídase 分析啟動子活性之實驗結果顯示 *yeeN* 及 *amn* 皆具有可調控自身轉錄表現的啟動子 (圖十四、B)。進一步分析不同生長時期之 *yeeN* 及 *amn* 啟動子活性，發現在貧瘠培養基 (M9) 中 *yeeN* 及 *amn* 的啟動子在生長對數期 (log phase) 就有很高的表現活性，而隨著進入不同生長時期，其活性也會隨之增加 (圖十四 C)。

在先前實驗中已知 $\Delta yeeN$ 突變株對於不同氧化逆境的抵抗力有明顯增加的現象，為了進一步瞭解 *yeeN* 基因是否受到這些逆境調控，利用不同逆境處理加以測試 *yeeN* 啟動子的活性是否有改變。結果顯示在不同氧化逆境 (H_2O_2 、paraquat、tBOOH) 處理後 *yeeN* 的啟動子活性有明顯下降的趨勢，但在處理抗生素 norfloxacin 的測試中 *yeeN* 的啟動子活性與對照組並無明顯差異，因此氧化逆境確實會影響 *yeeN* 的啟動子的活性 (圖十四 D)。

2. *yebC* 之 operon 組成與調控

利用 KEGG 網站分析可知 *yebC* 與其前後三個基因 *aspS*、*nudB* 及 *ruvC* 有相同的轉錄方向 (圖十五 A)，Softberry 生物資訊分析預測 *aspS* 及 *nudB* 基因有自己的啟動子，而 *yebC* 及 *ruvC* 則無 (附錄十一)。利用 β -galatósídase 分析 *aspS*、*nudB*、*yebC* 及 *ruvC* 啟動子活性，實驗結果顯示在生長對數期 (log phase) *aspS* 前端有一強烈啟動子，故 *aspS-nudB-yebC-ruvC* 可能屬於同一操縱子 (圖十五 B)。進一步分析不同生長時期之各基因啟動子活性，發現 *aspS* 的啟動子活性會持續表現並隨著生長時期而增加，*nudB* 則是完全沒有偵測到其啟動子活性，*yebC* 及 *ruvC* 的啟動子則在生長進入對數期 (log phase) 時才有明顯增加並持續表現的現象 (圖十五 C)，結果顯示 *yebC* 啟動子會受到生長時期而有所變動。

進一步瞭解 *aspS-nudB-yebC-ruvC* operon 是否受到氧化逆境或抗生素逆境調控，利用不同氧化逆境 (H_2O_2 、paraquat、tBOOH) 及抗生素 norfloxacin 處理

分析在不同生長期各基因啟動子活性的變化。結果顯示 *aspS* 啟動子活性在生長早期會受到不同氧化逆境有些微抑制的情形，但不會受到 norfloxacin 抗生素的影響。而 *yebC* 及 *ruvC* 啟動子不論在氧化逆境或抗生素逆境下，皆不會有明顯的改變 (圖十五 D)。顯示 *aspS-nudB-yebC-ruvC* operon 不會受到氧化或抗生素逆境的影響而改變其啟動子活性。

VI. 上游可能參與調控 *yeeN* 或 *yebC* 基因表現之突變株特性分析

搜尋大腸桿菌基因突變株之微陣列資料，結果顯示 *yeeN* 及 *yebC* 基因表現會受到 ($\Delta relA$ 、 $\Delta recA$ 、 $\Delta norR$ 、 $\Delta glnG$ 、 $\Delta parC$ 、 Δfur 、 Δhns 、 $\Delta yliH$ 、 $\Delta yceP$ 及 $\Delta baeR$) 上述基因缺失的影響 (表三)，推測這些基因可能是調控 *yeeN* 或 *yebC* 功能的上游基因。而由於先前發現 *yeeN* 及 *yebC* 突變株在泳動力及抵抗 paraquat 氧化逆境之能力有明顯增加，因此為了瞭解這些基因在泳動力及抵抗氧化逆境上是否參與調節 *yeeN* 或 *yebC*，先進行突變株 ($\Delta relA$ 、 $\Delta recA$ 、 $\Delta norR$ 、 $\Delta glnG$ 、 $\Delta parC$ 、 Δfur 、 Δhns 、 $\Delta yliH$ 、 $\Delta yceP$ 及 $\Delta baeR$) 特性分析，並進一步分析 *yeeN* 啟動子在這些突變株於氧化逆境下之表現情形。

1. 泳動能力分析 (swimming motility)

為了瞭解上述突變株在泳動能力上有何變化，進行泳動能力分析發現在 $\Delta relA$ 、 $\Delta glnG$ 、 Δhns 、 $\Delta yceP$ 及 $\Delta baeR$ 突變株的泳動能力都有明顯增加， $\Delta recA$ 及 $\Delta parC$ 之泳動力則有些微降低的情形，而 $\Delta norR$ 、 Δfur 及 $\Delta yliH$ 的泳動能力則與野生株 (BW25113) 無明顯差異 (圖十六 A)。顯示 *relA*、*glnG*、*hns*、*yceP*、*baeR*、*recA* 及 *parC* 這些基因可能參與泳動能力之調節。

2. 氧化逆境測試 (paraquat)

為了瞭解上述突變株在抵抗 paraquat 氧化逆境有何改變，進行 paraquat 逆境

測試，結果顯示突變株 $\Delta recA$ 、 $\Delta norR$ 、 $\Delta parC$ 及 Δhns 對 paraquat 耐受性明顯較野生株強，而 $\Delta relA$ 對 paraquat 之耐受性則較野生株低。突變株 $\Delta glnG$ 、 Δfur 、 $\Delta yliH$ 、 $\Delta yceP$ 及 $\Delta baeR$ 則與野生株無顯著差異 (圖十六 B)。顯示 $recA$ 、 $norR$ 、 $parC$ 、 hns 及 $relA$ 可能參與氧化逆境之調控。

3. $yeeN$ 之啟動子在不同突變株中受 paraquat 處理後其表現情形

為了解在細胞遭受氧化壓力下， $yeeN$ 基因會受到哪些基因影響，進一步檢測於 paraquat 氧化逆境下有明顯反應之突變株 ($\Delta recA$ 、 $\Delta norR$ 、 $\Delta parC$ 、 Δhns 及 $\Delta relA$) 中 $yeeN$ 啟動子之表現情形。結果顯示在正常情況下於生長早期， $yeeN$ 啟動子活性在 $\Delta recA$ 及 $\Delta relA$ 突變株中明顯受到抑制，在其他突變株 $\Delta norR$ 、 $\Delta parC$ 及 Δhns 中則無顯著差異。但於生長早期處理 paraquat 的情況下，所測定突變株中只有 $\Delta relA$ 突變株的 $yeeN$ 啟動子活性沒有受到抑制；而在 Δhns 中 $yeeN$ 啟動子只受到些微的抑制 (圖十七 A)。正常情況下於生長後期，只有 Δhns 突變株中 $yeeN$ 啟動子活性有明顯增加。於生長後期處理 paraquat 之結果顯示，在 $\Delta recA$ 突變株中 $yeeN$ 之啟動子不會受到抑制。因此在正常情況下， $recA$ 及 $relA$ 基因會於生長早期正調控 $yeeN$ 啟動子活性，在生長後期 hns 基因則會負調控 $yeeN$ 啟動子表現。而在 paraquat 氧化逆境中，生長早期 $relA$ 及 hns 基因可能參與調節 $yeeN$ 啟動子活性；在生長後期 $yeeN$ 啟動子則會受到 $recA$ 基因之調節 (圖十七 B)。

第四章 討論

I. DUF28 蛋白質廣泛存在於各物種中，且立體結構十分相似

在表一中可見在目前已知序列的古細菌中都不含有 DUF28 的同源性蛋白，而大部份真細菌都具有至少一個屬於 DUF28 蛋白質家族的同源性基因，只有極少部份的真細菌不含有 DUF28 蛋白質。古細菌與真細菌在構造、代謝及演化上都有明顯的區別，推測 DUF28 蛋白質可能在古細菌與真細菌歧異調節中扮演重要的角色，才會被廣泛保留在各種真細菌甚至是各個物種中。文獻指出 YidC 蛋白質為一膜蛋白，在細菌中其功能主要是幫助其他蛋白質運送至膜內，且在粒腺體及葉綠體當中都存在其同源蛋白，並且經由互補實驗證明在細菌及葉綠體中具有相似的功能 (Chen M., *et al.*, 2002)。在某些細菌如腸道菌中同時存在著兩個隸屬於 DUF28 蛋白質的成員，有可能是因為它們所生存的環境所需才會同時存在著兩個，例如 *Escherichia coli*、*Shigella boydii*、*Shewanella oneidensis* 及 *Pseudomonas syringae*。除了 *E. coli* 與 *S. boydii* 同為腸道菌，*S. oneidensis* 主要生存在深海中，為厭氧菌；*P. syringae* 則為好氧性植物病原菌。但在這些同時存在著兩個隸屬於 DUF28 蛋白質成員的菌種除同為革蘭氏陰性菌外並無特殊共通點。因此未來可以利用 heterologous complementation 的方式，進行跨菌種表現基因進一步了解這些同樣擁有兩個 DUF28 蛋白質的菌種，其 DUF28 蛋白質是否與大腸桿菌中的 DUF28 蛋白質有相似功能。

由圖二結果顯示，YeeN 及 YebC 蛋白質的胺基酸序列上的相同性不高。先前文獻 (Shin D. H. *et al.*, 2002) 中指出 DUF28 蛋白質的立體結構中預測有兩個活化位置，該活化位置的胺基酸 (Thr-103 及 Cys-129) 在不同菌種中具有高度保守性。並且預測這個活化位置有可能會與受質或金屬離子結合，例如氯離子、硫離子、醋酸鹽離子、鈣離子及鎂離子等等。雖然 DUF28 蛋白質的胺基酸序列在同一菌種相同度不高 (圖二)，但在立體結構部分，由先前研究顯示大腸桿菌的

YebC 蛋白質其立體結構與 *Auifex aeolicus* 中的 DUF28 蛋白質 (Aq1575) 十分相似，因此推測 DUF28 蛋白質可能在不同物種中保留的是其立體結構，而非保留相同的胺基酸序列。先前針對鐵硫錯合物結構之研究顯示，含有鐵硫錯合物的蛋白質若功能相近會有保留相似的半胱胺酸側基 (cysteine) 的分布甚至保留相似的結構 (吳，2005；Beinert H., 2000)。亦有文獻指出 YidC、Oxa1 及 Alb3 insertases 這三個蛋白質在細菌、粒腺體及葉綠體當中保留類似的結構及相近的功能 (Funes S., et al., 2011)。而在 *Pseudomonas aeruginosa* 中已用 EMSA 實驗證實 DUF28 蛋白質會與 DNA 序列 (*pqsR* promoter 序列) 結合，並藉此調控基因表現 (Liang H., et al., 2008)，未來需利用 EMSA 驗證在大腸桿菌中 DUF28 蛋白是否會與調節 quorum sensing 或氧化逆境相關啟動子之序列結合進而調控基因表現。

II. *yeeN* 與 *yebC* 在調節泳動能力上具有相似的功能

在 *yeeN* 或 *yebC* 突變株的生物特性分析中， $\Delta yeeN$ 及 $\Delta yebC$ 泳動力明顯增加，但 *yeeN* 或 *yebC* 基因突變後並不會影響大腸桿菌的生長，且 *yeeN* 或 *yebC* 突變株生物膜形成只有些微增加，故在兩突變株中泳動力的增加與生長速度及生物膜形成並無明顯關聯。檢測與鞭毛生合成相關基因表現得知，在 *yeeN* 及 *yebC* 突變株中這類基因表現都有明顯增加的現象 (附錄七，Chou I.C.)，可以推測在大腸桿菌調節鞭毛生合成過程中，DUF28 基因有負調控的功能。而藉由互補實驗進一步驗證 *yeeN* 及 *yebC* 的基因功能，可以確知這兩基因對於大腸桿菌的鞭毛生合成功能有顯著的影響。而以上結果推論這兩基因在鞭毛生合成上有基因功能重複 (function overlapping) 的現象。

文獻指出調控鞭毛的 *flhDC* 轉錄因子會受不同環境因子及全面性調控因子影響期表現，例如溫度、滲透壓、酸鹼值、H-NS 及 cAMP-CAP (catabolite gene activator protein) (Soutourina O. A. & Bertin P. N., 2003)。鞭毛生合成會受到外在環境因子影響，或許可以說明為何 *yeeN* 基因同時具有負調節氧化逆境及鞭毛生合

成的能力，當氧化壓力存在時 *yeeN* 基因表現量下降，進而影響鞭毛生合成相關基因表現量上升。如此可藉由氧化逆境相關基因表現量增加，使細胞耐受性增加；鞭毛合成加速，也可使細胞遠離氧化壓力較高的環境。

III. *yeeN* 參與大腸桿菌氧化逆境的調控

藉由突變株特性分析發現 *yeeN* 缺失後抵抗 paraquat 氧化逆境的能力增加 (圖四)，利用互補實驗進一步驗證 *yeeN* 基因功能實驗結果顯示，互補株抵抗 paraquat 氧化逆境的能力有明顯下降的現象 (圖六)，進一步檢測 *yeeN* 啟動子活性及其調控結果顯示，*yeeN* 的啟動子在每個生長時期都有表現，且在不同氧化逆境處理下 *yeeN* 的啟動子活性皆有明顯降低的情形 (圖十四)。因此得知 *yeeN* 確實會受到氧化逆境的影響，進而降低基因表現量，由此實驗結果推測 *yeeN* 基因在氧化逆境的調控上可能扮演負調節的角色。除了外生性氧化逆境外，細胞在代謝過程中也會產生內生性的氧化壓力 (Storz G., and Imlay J.A., 1999)，藉此說明 *yeeN* 基因表現量，在不同生長時期及氧化壓力存在下會受到不同的調控。另外由蛋白質位置分析結果顯示，YeeN 蛋白質超過一定量之後呈點狀分布的現象，且在 paraquat 氧化逆境及低養環境下都會促使 YeeN 聚集 (圖七至九)。有文獻指出，當細菌遭遇到環境中的逆境或生長時期改變時，部分蛋白質會出現聚集的現象 (Sabate R., *et al.*, 2010 ; Ziętkiewicz S. & Liberek K., 2010)，因此推論當大腸桿菌遭遇環境的變化如氧化逆境或是低養的情況，YeeN 蛋白質會因應這些改變進而聚集。先前實驗結果顯示 *yeeN* 基因在抵抗氧化逆境的過程中可能扮演負調節的角色，進一步推測當細胞中的 YeeN 負調節蛋白表現過量時，會促使這些蛋白質產生聚集，使細胞可以行使正常功能。因此當細胞遭遇環境壓力時會促使 YeeN 進行聚集，讓大腸桿菌得以調節自身基因表現來因應環境改變，因此推論 YeeN 蛋白質可能參與大腸桿菌對環境適應上的功能調節。未來需利用即時定量 RT-qPCR 進一步檢測氧化逆境相關基因表現，找出 *yeeN* 可能參與的調控路徑，並檢測

YeeN 蛋白質於逆境之表現量，驗證細胞處於逆境中會促使 YeeN 蛋白質聚集。

研究指出生物膜的形成對於細菌抵抗環境中的逆境扮演重要的角色 (Ito A., *et al.*, 2009)。但由生物膜生成分析發現 *yeeN* 基因突變後其生合成能力只有些微增加，顯示 *yeeN* 基因在生物膜的形成上並非扮演關鍵性的角色，因此推論 *yeeN* 缺失會增加抵抗 paraquat 這類的氧化逆境，但與生物膜的形成並無關連。

綜合以上實驗結果發現 *yeeN* 基因與調節氧化逆境有關，這與酵母菌中的 DUF28 基因 *hah1* 具有相似的功能。實驗室先前研究觀察到酵母菌的 DUF28 基因位於粒線體中，而其突變株 ($\Delta hah1$) 抵抗 H_2O_2 氧化逆境的能力有明顯增加的趨勢，但對於 paraquat 及 tBOOH 兩種氧化逆境較為敏感，結果顯示 *hah1* 確實會因應不同氧化逆境來調節氧化逆境相關基因的表現 (附錄八；陳，2009)。綜合在大腸桿菌及酵母菌中的實驗結果，發現在不同物種 (原核或真核生物) 當中，DUF28 基因扮演著調節氧化逆境之功能。內共生學說 (Endosymbiotic theory) 提出粒線體及葉綠體之胞器，是源自細胞將細菌包吞至胞內衍生而成；粒腺體是源自 proteobacteria，而葉綠體由 cyanobacteria 演變而來 (Sagan L., 1967 ; Blanchard J. L. & Lynch M., 2000)。由此假說推測，細菌中 DUF28 基因參與在氧化逆境的調節，在演化至真核生物的過程中 DUF28 蛋白質家族同樣保留了類似的功能。亦有文獻指出革蘭氏陰性菌及粒腺體的外膜蛋白質 porin 具有類似的聚合及運送模式 (Zeth K., & Thein M., 2010)。哺乳類之罕見疾病萊式症，為粒腺體基因點突變造成電子傳遞鏈中酵素缺失所致，文獻指出哺乳類中 DUF28 同源蛋白 (CCDC44) 基因位於粒腺體當中，當 CCDC44 突變會使 COX I 單元蛋白及細胞色素 C 氧化酶 (cytochrome c oxidase) 缺失並影響粒腺體 DNA 合成的功能 (Weraarpachai W. *et al.*, 2009)，顯示 DUF28 蛋白質在哺乳類中位於粒腺體且扮演重要角色。以上結果得知在酵母菌粒腺體中 DUF28 基因與大腸桿菌中的 *yeeN* 基因功能相近，且在哺乳類中 DUF28 蛋白質位於粒腺體中，因此推論在不同物種中 DUF28 基因保留的功能皆與調節氧化逆境相關。未來或許可利用跨物種表

現基因的方式，進一步驗證 DUF28 基因於不同物種中皆保留調節氧化逆境之功能性。

綜合以上結果，*yeeN* 基因參與大腸桿菌對氧化逆境之調節並扮演負調控的角色，與生物膜調節無關，且在不同物種中可能保留參與氧化逆境調節之功能。

IV. *yeeN* 可能不參與抗生素逆境之調節

在微陣列資料庫顯示 *yeeN* 基因會受到不同抗生素所調控，但經實驗測試後發現， $\Delta yeeN$ 對不同抗生素的耐受性並無明顯增加 (圖五)。另外 *yeeN* 基因表現在本實驗中並不會受到抗生素所調節，這個結果與微陣列資料庫中的結果不符，可能因為在本實驗使用的條件與資料庫文獻中的不同所致。文獻指出這類殺菌型 (bactericidal) 抗生素主要是藉由產生有害的氫氧根離子 (hydroxyl radicals, OH^\cdot)，進行 Fenton 反應進而殺死細菌 (Kohanski M.A., *et al.*, 2007)。但在本實驗中發現 *yeeN* 突變株抵抗 paraquat 氧化逆境的能力較佳，但對於這類抗生素的耐受性並無明顯增加，故推測 *yeeN* 突變株對於調節氫氧根離子含量的能力並無增加，因此猜測 *yeeN* 基因是由 OxyR 或 SoxRS 轉錄因子進行氧化逆境的調控。但由於氫氧根離子在細胞中存在時間非常短暫，因此難以測量氫氧根離子在細胞內的含量，未來可能需進一步測定 *yeeN* 突變株中，與調節氫氧根離子相關基因之表現才能確認 *yeeN* 基因是否參與其中。

V. *yebC* 可能參與逆境之調節

在特性分析中，*yebC* 基因缺失後在氧化、抗生素逆境耐受性及生物膜生合成上都與野生株並無明顯差異，因此推測 *yebC* 基因與逆境調節並無直接關連。測定不同生長時期 *yebC* 啟動子活性結果顯示，但 *yebC* 的啟動子則要在對數期至停滯期才會開始表現 (圖十五)，*yebC* 基因在生長後期表現時，亦不會受到氧化逆境或是抗生素處理而影響其表現量，進而推測 *yebC* 基因與大腸桿菌抵禦逆境並無直接關連。但特別的是在實驗室先前的研究中，針對兩突變株 ($\Delta yeeN$ 、

ΔyebC) 與野生株 (BW25113) 進行 DNA 微陣列分析，經生物資訊搜尋並以功能性做分 (附錄十二)，結果顯示與碳水化合物、胺基酸、核酸及脂質代謝相關的基因在 *ΔyeeN* 或 *ΔyebC* 突變株中基因表現量會有兩倍以上的變化。其中尚有與逆境相關的基因如運輸蛋白 (transporter、ABC transporter) 及 stress response protein 也都會有兩倍以上的改變。而與氧化逆境調節相關的基因如 *soda*、*soxS*、*fumC* (fumarate hydratase)、*fecA* (ferric citrate outer membrane transporter) 及 *sufA* (Fe-S cluster assembly protein) 也包含其中。這些基因在正常情況培養下的 *yebC* 突變株中，基因表現就會有改變，因而推測雖然 *yebC* 突變株對 paraquat 氧化逆境的耐受性並未明顯增加，但可能還是參與調節部分逆境相關基因的表現。另外，在 *yeeN* 突變株中過度表現 *yebC* 基因之互補株其抵抗 paraquat 氧化逆境的能力也會下降 (圖六)。由結果推測，雖然 *yebC* 基因沒有參與在抵抗氧化逆境的調節上，但過度表現同為 DUF28 家族的基因 *yebC*，藉由基因表現量的增加也可以補強 *yeeN* 基因功能。可能由於蛋白質立體結構上的相似性，造成這樣的現象。最近研究指出具病原性之大腸桿菌菌系 O157:H7 (EHEC)，其外膜蛋白質 intimin，與另一菌系 (EPEC) 的外膜蛋白十分相似可以互補並且與宿主受體蛋白 Tir 接合 (Yong Yi, et al., 2010)。因此推測同類的蛋白質過度表現的情況下，可以補足缺乏其中一個蛋白質不足的功能。綜合上述兩實驗結果進一步說明，在逆境調節上，*yebC* 還是會參與部分基因調節。因此推測 *yebC* 與 *yeeN* 基因在氧化逆境調節上可能還是具有部分功能上的重複性。未來可進一步檢測 *yebC* 突變株對於其他逆境之反應，並利用 EMSA 進一步檢測，*YeeN* 及 *YebC* 蛋白質所調節的基因區域是否相同；或是檢測蛋白質交互作用，找出 *YeeN* 及 *YebC* 共同作用的蛋白質，進而了解這兩個蛋白質如何進行功能上的互補。

VI. *yebC* 與 *yeeN* 是否參與 quorum sensing 之調節

在特性分析發現 *yebC* 基因與逆境調節並無直接關連。測定不同生長時期 *yebC* 啟動子活性結果顯示，但 *yebC* 的啟動子則要在對數期至停滯期才會開始表

現(圖十五)，可以推論 *yebC* 及 *yeeN* 基因可能具有不同的功能所以才會有不同的調控方式。YebC 蛋白質位置結果發現，YebC 蛋白質不論在何種處理下，蛋白質皆均勻分布於細胞質中不會有聚集的情形，但在停滯期後期 YebC 則會出現分段聚集的現象，進一步利用西方墨點法檢測蛋白質含量推測 YebC 分段聚集的現象可能與蛋白質的含量並無關連，而可能與細胞的生長時期有關。先前實驗顯示 *yebC* 會負調節鞭毛的生合成，其啟動子於對數期才會開始有活性且在生長至停滯期達最高，而 YebC 蛋白質在細胞進入停滯期後期才有聚集的現象。先前文獻指出 *P. aeruginosa* 中 DUF28 基因 (PA0964)，會參與調節細菌的 quorum sensing (Liang H., *et al.*, 2008)，而 quorum sensing 是細菌調節族群數量的方式之一，當細菌由對數期生長至停滯期時，細菌便會藉由 quorum sensing 進行族群量的調節 (Ahmer B. M. M., 2004)，綜合以上結果推論 *yebC* 可能與調節 quorum sensing 有關。因此，大腸桿菌中的 *yebC* 基因可能與 *P. aeruginosa* 的 DUF28 基因 (PA0964) 有類似的功能。但 *yeeN* 是否參與調節 quorum sensing，則需進一步實驗證實。未來需利用 EMSA 來檢測 YebC 及 YeeN 蛋白質是否與 PA0964 同樣有與調節 quorum sensing 啟動子結合之能力，藉此確認大腸桿菌中 YebC 及 YeeN 確實參與調節 quorum sensing。

VII. 參與泳動力及氧化逆境調節之上游基因特性分析

經由微陣列資料庫所搜尋可能參與調節 *yeeN* 或 *yebC* 的基因，檢測這些基因突變株的泳動力及氧化逆境的特性後，結果發現 $\Delta relA$ 、 $\Delta glnG$ 、 Δhns 、 $\Delta yceP$ 及 $\Delta baeR$ 突變株之泳動能力有增加， $\Delta recA$ 及 $\Delta parC$ 則些微降低。目前已知在大腸桿菌中 *recA* 缺失會影響鞭毛推進的能力，而 *recA* 參與調節 swarming motility (Gómez-Gómez J.M., *et al.*, 2007)，針對 *hns* 的研究指出 *hns* 基因會正調節鞭毛生合成相關基因 *flhDC* (Krin E., *et al.*, 2010)。另有文獻指出 *yceP* 缺失會使鞭毛生合成相關基因表現量上升，且參與調節大腸桿菌生物膜生成 (Domka J., *et*

al., 2006)。對於 *relA*、*glnG*、*baeR* 及 *parC* 如何參與調節泳動力之研究甚少，未來可進一步針對上述基因進行泳動力調節相關研究。在氧化逆境部分， $\Delta recA$ 、 $\Delta norR$ 、 $\Delta parC$ 及 Δhns 突變株對 paraquat 氧化逆境耐受性增加，而 $\Delta relA$ 較為敏感。已知在 H_2O_2 氧化逆境下 *recA* 表現量上升，參與修復遭受氧化逆境損害之 DNA (Takechi S., et al., 2009) 目前 *norR*、*parC*、*hns* 及 *relA* 於 paraquat 氧化逆境中所扮演的角色並不清楚，相關研究較少，本論文首次發現這些基因可能參與調節 paraquat 所生成之氧化逆境，未來可進一步針對這些基因於氧化逆境之調節作較深入之研究與探討。

VIII. *recA* 在氧化逆境下可能參與調節 *yeeN* 基因

yeeN 啟動子的活性分析結果顯示，正常環境中 $\Delta recA$ 中 *yeeN* 啟動子活性有明顯降低的現象，推測在正常生長情況下 *recA* 會正調控 *yeeN* 之啟動子表現。先前研究中指出 *recA* 參與在 DNA 複製及修復上，一旦 *recA* 突變後會使細胞較易產生自體突變 (Cox M. M., 2003) 且 *recA* 突變株對於 UV 及 H_2O_2 的逆境較為敏感，另外也有文獻指出 *recA* 基因不會受到 paraquat 的誘導但會受到 H_2O_2 誘導使表現量增加 (Storz G., et al., 1990)，進一步推測 *yeeN* 基因可能參與 DNA 複製及修復功能。與 *yebC* 屬同一操縱子的 *ruvC* 基因已知為核酸內切酶是 RuvABC resolvosome 成員之一，參與切除 Holliday junction，*ruvC* 突變株對於 UV 也具有高度敏感性，因此猜測 *yebC* 有可能參與調節 DNA 修復。綜合上述現象可進一步推測大腸桿菌中 DUF28 基因 (*yeeN* 及 *yebC*) 可能參與修復 DNA 的功能。在未來須以實驗證實，例如檢測 $\Delta yeeN \Delta yebC$ double mutant 對 UV 之耐受性，及與 DNA 修復之相關基因表現來加以驗證。

IX. *relA* 於正常環境中正向調控 *yeeN*，但在氧化逆境下並無直接參與調節 *yeeN*

yeeN 啟動子的活性分析結果顯示，正常環境中 $\Delta relA$ 中 *yeeN* 之啟動子活性有明顯降低的現象，推測在正常生長時 *relA* 會正調控 *yeeN* 之啟動子表現。*relA* 為

(p)ppGpp synthetase，在大腸桿菌中 ppGpp 已知為全面性調控因子，在缺乏胺基酸時會抑制 rRNA 的合成 (Magnusson L. U., 2005)；除此之外，也作為細胞感受外界環境變化之訊息分子 (Foster. P. L., 2007)。目前研究僅指出 *relA* 基因缺失對於 H₂O₂ 之氧化逆境耐受性增加 (DiDonato L. N., *et al.*, 2006)，但並未有研究指出 *relA* 基因對於 paraquat 氧化逆境之反應為何。由實驗結果得知，於生長早期正常環境中 *yeeN* 啟動子會受到抑制，因此推測 *yeeN* 之表現會受到 *relA* 的正調控。由文獻得知 *relA* 參與調節細胞遭受營養匱乏之相關逆境反應 (stringent response)，因此進一步推測 *yeeN* 可能也會參與細胞調節營養匱乏之逆境反應，但 *relA* 是否直接調節 *yeeN* 之表現則需利用互補的方式加以驗證，也可能是由 ppGpp 調控因子感應周遭環境後，間接由其他基因影響 *yeeN* 啟動子的活性。而 *relA* 突變株經 paraquat 逆境處理後，其 *yeeN* 啟動子與在正常情況下的表現並沒有差異皆受到抑制，但 *relA* 突變株抵抗 paraquat 氧化逆境的能力較差，因而推測在氧化逆境下 *relA* 基因並無直接參與調節 *yeeN*。進一步推測 $\Delta relA$ 對於 paraquat 較敏感與 *yeeN* 調節氧化逆境之方式無關，而 *relA* 如何藉由其他途徑參與 paraquat 氧化逆境的調節則需進一步研究加以了解。

X. 在鞭毛生合成過程中 *hns* 基因可能參與調節 *yeeN*

在泳動力、氧化逆境特性分析結果顯示 *hns* 基因缺失對於 paraquat 氧化逆境的耐受性有明顯上升，但目前對於 *hns* 基因與氧化逆境之間的關聯性並不清楚。但在生長後期 *yeeN* 啟動子活性在 *hns* 突變株中不論是正常情況或是處理 paraquat 情況下都有明顯增加的現象，顯示不論正常環境或氧化逆境下 *hns* 負調節 *yeeN* 之啟動子活性，因而推測 *hns* 與 *yeeN* 調節氧化能力並無直接關聯性。但有許多研究指出在鞭毛生合成上，*hns* 扮演重要的調節角色，當 *hns* 缺失時 *E. coli* 泳動力下降，與鞭毛生合成相關基因如 *flhDC* 表現量也明顯下降，鞭毛生合成能力因此降低 (Bertin P., *et al.*, 1994 ; Ko M. & Park C., 2000)。藉由先前研究進一

步推論 *hns* 基因在生長後期會負調控 *yeeN* 啟動子，使 *yeeN* 基因無法抑制 *flhDC* 的基因表現，讓鞭毛生合成能力增加，而 *hns* 基因也會啟動 *flhDC* 基因表現促使鞭毛生成。另外也有部份研究指出，*hns* 會受到不同環境因子影響，如冷休克或生長時期的調節等等，但 *yeeN* 基因是否與這些環境因子有關需做進一步的實驗瞭解。

XI. 結語

綜合以上結果，*yeeN* 參與氧化逆境調節；而 *yebC* 則對氧化逆境耐受性不會有直接影響，在啟動子組成及調節上也可發現，*yeeN* 具有自身的啟動子並且會受到氧化逆境影響而被抑制；*yebC* 則在生長後期才会有啟動子的表現，其啟動子活性也不會受到氧化逆境影響而有變化，可以推論 *yebC* 及 *yeeN* 基因可能具有不同的功能所以才會有不同的調控方式。*YeeN* 蛋白質的分布情形呈現點狀聚集，並會受到氧化逆境及低養環境的影響促使聚集；*YebC* 蛋白質除在生長後期會有分段聚集的情形外，其他生長時期皆是均勻分布，且不會受到氧化逆境及低養環境的影響而有所變化。進一步推論，*yeeN* 及 *yebC* 基因同屬 DUF28 蛋白質家族成員，在調節鞭毛生合成上具有功能重複性，但這兩者在大腸桿菌中同時也具有不一樣的功能，*yeeN* 可能與環境中逆境的調節有關，尤其是參與在氧化逆境的調節，而 *yebC* 基因可能參與在族群數量上的調控 (quorum sensing)。

第五章 未來展望

未來需製作 *yeeN* 及 *yebC* 同時突變之 double mutants 突變株，進一步確認大腸桿菌中 DUF 28 基因在生長、氧化及抗生素逆境上有何影響。

針對不同菌種中 DUF28 蛋白質之功能可利用 heterologous complementation 進行跨菌種或跨物種間表現基因，進一步推測有 DUF28 蛋白質的菌種或物種，其 DUF28 蛋白質是否與大腸桿菌中的 DUF28 蛋白質有相似（參與調節氧化逆境）的功能。

大腸桿菌 *yeeN* 基因參與調節氧化逆境，檢測 YeeN 蛋白質於氧化逆境之表現量，驗證細胞處於逆境中會促使 YeeN 蛋白質聚集。對於 *yeeN* 可能參與之調控路徑，可利用即時定量 RT-qPCR 檢測氧化逆境及調節氫氧根離子相關基因表現，推測其調節氧化逆境之相關機制，並針對氧化磷酸化相關基因進一步做測試。可藉由 *relA* 之互補株測定其中 *yeeN* 之表現量驗證 *relA* 是否直接調節 *yeeN*。對於 ppGpp 是否與參與調節 *yeeN* 基因表現可利用測定細胞內在正常環境下之 ppGpp 的含量，並藉由添加 ppGpp 檢測 *yeeN* 基因表現量有何變化，進一步找出 ppGpp 與 *yeeN* 基因調節上有何關聯。

對於其他可能位於上游調節之基因突變株參與泳動力及氧化逆境之調節，可進行更多功能性的研究做進一步探討。

參考文獻

- 陳巧燕。2009。未知功能 DUF28 protein 及色胺酸調控途徑在酵母菌氧化逆境反應之功能分析。國立台灣大學植物科學研究所碩士論文。
- 吳淑祿 (2005). 鐵硫簇的生物合成. Chemistry (The Chinese Chem. Soc., Taipei). **63**, 141-148.
- Abed N., Bickle M., Mari B., Schapira M., Sanjuan-España R., Sermesant K. R., Moncorgé O., Mouradian-Garcia S., Barbry P., Rudkin B. B., Fauvarque M. O., Michaud-Soret I., and Colas P.** (2007). A Comparative analysis of perturbations caused by a gene knock-out, a dominant negative allele, and a set of peptide aptamers. Mol Cell Proteomics **6**, 2110-2121.
- Å berg A., Fernández-Vázquez J., Cabrer-Panes J. D., Sánchez A., and C. Balsalobre** (2009). Similar and divergent effects of ppGpp and DksA deficiencies on transcription in *Escherichia coli*. J Bacteriol **191**, 3226–3236.
- Abram D., and Koffler H.** (1964). In vitro formation of flagella-like filaments and other structures from flagellin. J Mol Biol **9**, 168-185.
- Ahmer B. M. M.** (2004). Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enteric*. Mol Microbiol **52**, 933-945.
- Allen R. G., and Tresini M.** (2000). Oxidative stress and gene regulation. Free Radic Biol Med **28**, 463-499.
- Apel D., and Surette M. G.** (2008). Bringing order to a complex molecular machine: The assembly of the bacterial flagella. Biochim Biophys Acta **1778**, 1851-1858.
- Atlung T., and Ingmer H.** (1997). H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. Mol Microbiol **24**, 7-17.
- Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K. A., Tomita M., Wanner B. L., and Mori H.** (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol Syst Biol doi:10.1038/msb4100050
- Beinert H.** (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. J Biol Inorg Chem **5**, 2-15.
- Bentley R., and Meganathan R.** (1982). Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. Microbiol Rev **46**, 241-280.
- Berg H. C.** (2003). The rotary motore of bacterial flagella. Annu Rev Biochem **72**, 19-54.
- Bertin P., Terao E., Lee E. H., Lejeune P., Colson C., Danchin A., and Collatz E.** (1994). The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*. J Bacteriol **176**, 5537-5540.
- Blanchard J. L., and Lynch M.** (2000). Organellar genes: why do they end up in the

- nucleus? Trends Genet **16**, 315-20.
- Blattner F. R., Plunkett III G., Bloch C. A., Perna N. T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J. D., Rode C. K., Mayhew G. F., Gregor J., Davis N. W., Kirkpatrick H. A., Goeden M. A., Rose D. J., Mau B., Shao Y.** (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science **277**, 1453-1462.
- Blair D.F.** (1995). How bacteria sense and swim. Annu Rev Microbiol **49**, 489-522.
- Chen M., Xie K., Jiang F., Yi L., and Dalbey R.E.** (2002). YidC, a newly defined evolutionarily conserved protein, mediates membrane protein assembly in bacteria. Biol Chem **383**, 1565-1572.
- Chilcott G. S, and Hughes K. T.** (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. Microbiol Mol Bio Rev **64**, 694-708.
- Courcelle J., Khodursky A., Peter B., Brown P. O., and Hanawalt P. C.** (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. Genetics **158**, 41-64.
- Cox. M. M.** (2003). The bacterial reca protein as amotor protein. Annu Rev Microbiol **57**, 551-77.
- Crosa J. H.** (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. Microbiol Rev **53**, 517-530.
- Datsenko K.A., and Wanner B. L.** (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A **97**, 6640-6645.
- De Feyter R., Yang Y., and Gabriel D.W.** (1992). Gene-for-genes interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* avr genes. Mol Plant Microbe Interact **6**, 225-237.
- Demple B., Halbrook J., and Linn S.** (1983). *Escherichia coli* xth mutants are hypersensitive to hydrogen peroxide. J Bacteriol **153**, 1079-1082.
- DiDonato L. N., Sullivan S. A., Methé B. A., Nevin K. P., England R., and Lovley D. R.** (2006). Role of Rel_{Gsu} in stress response and Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. J Bacteriol **188**, 8469-8478.
- Dimmitt K., and Simon M.** (1971). Purification and thermal stability of intact *Bacillus subtilis* flagella. J Bacteriol **105**, 369-375.
- Domka J., Lee J., and Wood T. K.** (2006). YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. Appl Environ Microbiol **72**, 2449-2459.
- Eisenstark, A.** (1989). Bacterial genes involved in response to near-ultraviolet radiation. Adv Genet **26**, 99-147.
- Fridovich I.** (1989). Superoxide dismutases. J Biol Chem **264**, 7761-7764.

- Fujita N., Mori H., Yura T., and Ishihama A.** (1994). Systematic sequencing of the *Escherichia coli* genome: analysis of the 2.4-4.1 min (110,917-193,643 bp) region. *Nucleic Acids Res* **22**, 1637-1639.
- Funes S., Kauff F., van der Sluis E. O., Ott M., and Herrmann J.M.** (2011). Evolution of YidC/Oxa1/Alb3 insertases: three independent gene duplications followed by functional specialization in bacteria, mitochondria and chloroplasts. *Biol Chem* (in press).
- Fux C.A., Shirliff M., Stoodley P., and Costerton J.W.** (2005). Can laboratory reference strains mirror 'real-world' pathogenesis? *Trends Microbiol* **13**, 58-63.
- Gadgil M., Kapur V., and Hu W. S.** (2005). Transcriptional Response of *Escherichia coli* to Temperature Shift. *Biotechnol Prog* **21**, 689-699.
- Gardner, P., and Fridovich I.** (1991). Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J Biol Chem* **266**, 1478-1483.
- Greenberg J. T., Monach P., Chou J. H., Josephy P. D., and Demple B.** (1990). Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6181-85.
- Gómez-Gómez J. M., Manfredi C., Alonso J. C., and Blázquez J.** (2007). A novel role for RecA under non-stress: promotion of swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *BMC Biol* **28**, 5-14.
- Hagieara D., Yamashino T., and Mrzumo T.** (2004). A genome-wide view of the *Escherichia coli* BasS-BasR two-component system implicated in iron-responses. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 1758-1767.
- Halliwell B., and Gutteridge J. M. C.** (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**, 1-14.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **166**, 557-80.
- Helmann J. D., Wu M. F. W., Gaballa A., Kobel P. A., Morshedi M. M., Fawcett P., and Paddon C.** (2003). The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. *J Bacteriol* **185**, 243-253.
- Henle E. S., Han Z., Tang N., Rai P., Luo Y., and Linn S.** (1999). Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated Fenton reactions has possible biological implications. *J Biol Chem* **274**, 962-971.
- Hommais F., Krin E., Laurent-Winter C., Soutourina O., Malpertuy A., Le Caer J. P., Danchin A., and Bertin P.** (2001). Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol* **40**, 20-36.
- Hudault S, Guignot J, Servin A. L.** (2001). *Escherichia coli* strains colonising the

- gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut* **49**, 47-55.
- Imlay J. A., Chin S. M., Linn S.** (1988). Toxic DNA Damage by Hydrogen Peroxide through the Fenton Reaction in vivo and in vitro. *Science* **240**, 640-642.
- Imlay J. A.** (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* **77**, 755-76.
- Ishii A., Oshima T., Sato T., Nakasone K., H. Mori, and Kato C.** (2005). Analysis of hydrostatic pressure effects on transcription in *Escherichia coli* by DNA microarray procedure. *Extremophiles* **9**, 65-73.
- Jacquamet L., Aberdam D., Adrait A., Hazemann J. L., Latour J. M., and Michaud-Soret I.** (1998). X-ray Absorption Spectroscopy of a New Zinc Site in the Fur Protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 2564-2571.
- Jeong K. S., Xie Y., Hiasa H., and Khodursky A. B.** (2006). Analysis of pleiotropic transcriptional profiles: a case study of DNA gyrase inhibition. *PLoS Genet* **2**, e152 1464-1476.
- Kaldalu N., Mei R., and Lewis K.** (2004). Killing by ampicillin and ofloxacin induces overlapping changes in *Escherichia coli* transcription profile. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 890-896.
- Kehres D. G., Zaharik M. L., Finlay B. B., and Maguire M. E.** (2000). The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol* **36**, 1085-1100.
- Kiley P. J., and Beinert H.** (2003). The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6**, 181-185.
- Kitagawa M., Ara T., Arifuzzaman M., Ioka-Nakamichi T., Inamoto E., Toyonaga H., and Mori H.** (2005). Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library unique resources for biological research. *DNA Res* **12**, 291-299.
- Ko M., and Park C.** (2000). Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **303**, 371-382.
- Kohanski M. A., Dwyer D. J., Hayete B., Lawrence C. A., and Collins J. J.** (2007). A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* **130**, 797-810.
- Korshunov S., and Imlay J.A.** (2010). Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **75**, 1389-401.
- Krin E., Danchin A., and Soutourina O.** (2010). RcsB plays a central role in H-NS-dependent regulation of motility and acid stress resistance in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **161**, 363-371.
- Lange R., and Hengge-Aronis R.** (1991). Identification of a central regulator of

- stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 49-59.
- Lee J. H., Yeo W. S., and Roe J. H.** (2004). Induction of the *sufA* operon encoding Fe-S assembly proteins by superoxide generators and hydrogen peroxide: involvement of OxyR, IHF and an unidentified oxidant-responsive factor. *Mol Microbiol* **51**, 1745–1755.
- Liang H., Li L., Dong Z., Surette M. G., and Duan K.** (2008). The YebC family protein PA0964 negatively regulates the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal system and pyocyanin production. *J Bacteriol* **190**, 6217-6227.
- Loewen P. C., and Triggs B. L.** (1984). Genetic mapping of *katF*, a locus that with *katE* affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **160**, 668-675.
- Macnab R. M.** (2004). Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 207–217.
- Magnusson L. U., Farewell A., and Nyström T.** (2005). ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **13**, 236-242.
- Merrikh H., Ferrazzoli A. E., and Lovett S. T.** (2009). Growth Phase and (p)ppGpp Control of *IraD*, a Regulator of RpoS Stability, in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **191**, 7436-7446
- Minamino T., Imada K., and Namba K.** (2008). Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 693–701.
- Miller J.** (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Mukhopadhyay P., Zheng M., Bedzyk L. A., LaRossa R. A., and Storz G.** (2004). Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 745-750.
- Nishino K., Honda T., and Yamaguchi A.** (2005). Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system. *J. Bacteriol* **187**, 1763-1772.
- Olsvik Ø., Wasteson Y., Lund A., and Homes E.** (1991). Pathogenic *Escherichia coli* found in food. *Int J Food Microbiol* **12**, 103-114.
- Peter B. J., Arsuaga J., Breier A. M., Khodursky A. B., Brown P. O., and Cozzarelli N. R.** (2004). Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol* **5**, R87.
- Pham P., Rangarajan S., Woodgate R., and Goodman M. F.** (2001). Roles of DNA polymerases V and II in SOS-induced error-prone and error-free repair in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8350–8354.
- Pomposiello P. J., Bennik M. H., and Demple B.** (2001). Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate.

- J Bacteriol **183**, 3890-3902.
- Pomposiello P.J., and Demple B.** (2001). Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. Trends Biotechnol **19**,109-114.
- Prüß B. M., Besemann C., Denton A., and Wolfe A. J.** (2006). A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. J Bacteriol **88**, 3731-3739.
- Sabate R., de Groot N. S., and Ventura S.** (2010). Protein folding and aggregation in bacteria. Cell Mol Life Sci **67**, 2695-2715.
- Sabina J., Dover N., Templeton L.J., Smulski D. R., Söll D., and LaRossa R. A.** (2003). Interfering with different steps of protein synthesis explored by transcriptional profiling of *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol **185**, 6158-6170.
- Sagan L.** (1967). On the Origin of Mitosing Cells. J. Theoret. Biol. **14**, 225-274.
- Sambrook J. Fritsch E.F., and Maniatis T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Ed 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, U.S.A.
- Sangurdekar D. P., Srienc F., and Khodursky A. B.** (2006). A classification based framework for quantitative description of large-scale microarray data. Genome Biol **7**, R32.
- Sak B. D., Eisenstark A., and Touati D.** (1989). Exonuclease III and the catalasehydroperoxidase II in *Escherichia coli* are both regulated by the katF gene product. Proc Natl Acad Sci U S A **86**, 3271-3275.
- Schoenhals G. J., and Macnab R. M.** (1996). Physiological and biochemical analyses of FlgH, a lipoprotein forming the outer membrane L ring of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol **178**, 4200-4207.
- Shaw K. J., Miller N., Liu X., Lerner D., Wan J., Bittner A., and Morrow B. J.** (2003). Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents. J Mol Microbiol Biotechnol **5**, 105-122.
- Shin D. H., Yokota H., Kim R., and Kim S. H.** (2002). Crystal structure of conserved hypothetical protein Aq1575 from *Aquifex aeolicus*. Proc Natl Acad Sci U S A **99**, 7980-7985.
- Silverman M., and Simon M.** (1977). Bacterial flagella. Annu Rev Microbiol **31**, 397-419.
- Storz G., and Imlay J. A.** (1999). Oxidative stress. Curr Opin Microbiol **2**, 188-194.
- Storz G., Tartaglia L. A., FARR S. B., and Ames B. N.** (1990). Bacterial defenses against oxidative stress. Trends Genet **6**, 363-368.
- Soutourina O. A., and Bertin P. N.** (2003). Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev **27**, 505-523.
- Takahashi Y., and Tokumoto U.** (2002). A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. J Biol Chem **277**,

28380-28383.

- Terashima H., Kojima S., and Homma M.** (2008). Flagellar motility in bacteria: structure and function of flagellar motor. *Int Rev Cell Mol Biol* **270**, 39-85.
- Thormann K. M., and Paulick A.** (2010). Tuning the flagellar motor. *Microbiology* **156**, 1275-1283.
- Touati D.** (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **373**, 1-6.
- Tsaneva I. R., and Weiss B.** (1990). *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **172**, 4197-4205.
- Ueno T., Oosawa K., and Aizawa S.** (1992). M ring, S ring and proximal rod of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium* are composed of subunits of a single protein, FliF. *J Mol Biol* **227**, 672-677.
- Walters M., and Sperandio V.** (2006). Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* **296**, 125-131.
- Weraarpachai W., Antonicka H., Sasarman F., Seeger J., Schrank B., Kolesar J. E., H. Lochmüller, Chevrette M., Kaufman B. A., Horvath R. and Shoubridge E. A.** (2009). Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat Genet* **41**, 833-837.
- Wick L. M., and Egli T.** (2004). Molecular components of physiological stress responses in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Engin / Biotechnol* **89**, 1-45.
- Yi Y., Ma Y., Gao F., Mao X., Peng H., Feng Y., Fan Z., Wang G., Guo G., Yan J., Zeng H., Zou Q., and Gao G. F.** (2010). Crystal structure of EHEC intimin: insights into the complementarity between EPEC and EHEC. *PLoS One* **5**, e15285.
- Zeth K., and Thein M.** (2010). Porins in prokaryotes and eukaryotes: common themes and variations. *Biochem J* **431**, 13-22.
- Zheng M., Wang X., Templeton L. J., Smulski d. R., Larossa R. A., and Storz G.** (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **183**, 4562-4570.
- Zheng M., and Storz G.** (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol* **59**, 1-6.
- Ziętkiewicz S., and Liberek K.** (2010). Dispose to the pole—protein aggregation control in bacteria. *EMBO J* **29**, 869-870.
- Zimmer D. P., Soupene E., Lee H. L., Wendisch V. F., Khodursky A. B., Peter B. J., Bender R. A., and Kustu S.** (2000). Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: Scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14674-14679.

表一、在不同菌種中之 DUF28 蛋白質家族

Phylum	Order	No. of species / strains analyzed ^a	No. of DUF28 proteins present ^b	
Archaea				
Crenarchaeota	Sulfolobales	2/4	0	
Euryarchaeota	Halobacteriales	4/5	0	
	Methanococcales	2/6	0	
	Thermococcales	2/4	0	
Eubacteria				
Acidobacteria	Acidobacteriales	2/2	1	
Actinobacteria	Actinobacteriales	20/48	1	
Bacteroidetes	Flavobacteriales	3/4	0 ~ 2	
Chlorobi	Chlorobiales	9/15	1	
Chlamydia	Chlamydiales	2/13	1	
Cyanobacteria		9/30	0 ~ 1	
Chloroflexi	Chloroflexales	4/7	1	
Deinococcus-Thermus		2/4	1	
Firmicutes	Bacillales	5/42	1 ~ 2	
	Clostridiales	11/29	1	
	Lacterobacillales	7/45	1 ~ 2	
Tenericutes		6/18	0 ~ 1	
Fusobacteria	Fusobacteriales	2/2	1	
Proteobacteria	Caulobacterales	1/2	1	
	α subdivision	Rhizobiales	14/35	1
		Rhodobacterales	8/11	1
		Rhodospirillales	3/6	1
		Rickettsiales	7/23	1
		Sphingomonadales	5/5	1
	β subdivision	Burkholderiales	12/36	1
		Hydrogenophilales	1/1	1
		Methylophilales	1/1	1
		Neisseriales	2/6	1
Nitrosomonadales		2/3	1	
	Rhodocyclales	3/4	1	

續表一

δ subdivion		11/17	1 ~ 2
ε subdivion		7/20	0 ~1
γ subdivion	Enterobacteriales	14/49	0 ~2
	Aeromonadales	1/2	1
	Alteromonadales	7/23	1 ~ 2
	Cardiobacteriales	1/1	1
	Chromatiales	3/3	1
	Legionellales	2/4	1
	Methylococcales	1/1	2
	Oceanospirillales	4/4	1 ~ 2
	Pasteurellales	4/11	1
	Pseudomonadales	3/19	1 ~2
	Thiotrichales	2/9	1
	Vibrionales	2/8	1 ~ 2
	Xanthomonadales	2/10	1
Spirochaetes	Spirochaetales	3/12	1
Thermotogae	Thermotogales	3/6	1

利用 PEC (Prolifling of *E. coli* chromosome) 生物資訊網站 (<http://tinyurl.com/2cp8sh3>) 進行分析。a. 本表中所分析同一目的菌種 / 菌系個數。b. 在該目的菌種中 DUF28 同源蛋白的個數。

表二、搜尋微陣列資料庫中大腸桿菌 *yebC* 及 *yeeN* 於不同逆境處理之基因表現量

Treatment / Experiment	Expression level ^a (fold increase or decrease)		References ^c
	<i>yebC</i>	<i>yeeN</i>	
kanamycin or w/ spectinomycin	2.46	3.55	(1)
ampicillin or w/ spectinomycin	2.45	2.23 ~ 3.83	(1)
norfloxacin	-2.17 ~ 2.46	2.43 ~ 16.17	(1) , (2) , (3)
norfloxacin or w/ spectinomycin	--- ^b	19.66 ~ 35.99	(1)
ofloxacin	---	7.89	(4)
novobiocin	---	15.77 ~ 17.28	(2)
rifampin	---	-2.00	(3)
0.1MPa vs 30MPa	---	-3.70	(5)
37°C vs 28°C or 37°C vs 33°C	2.04	-5.78 ~ -2.22	(6)
hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	---	-2.73 ~ -2.35	(7)
No UV vs UV	2.14 ~ 2.67	---	(8)

a. *yebC* 或 *yeeN* 基因表現量在處理逆境後之改變倍率。

b. --- 表示在該文獻中 *yebC* 或 *yeeN* 基因表現量並未有兩倍以上或以下之變化。採用微陣列資料庫(NCBI 及 Ecogene database <http://ecogene.org/EcoarrayStat.php>)搜尋並分析。

c. references 以編號代表內容如下，

(1) Kohanski M.A., *et al.*, 2007 (2) Peter B.J., *et al.*, 2004 (3) Shaw K.J., *et al.*, 2003 (4) Kaldalu N., *et al.*, 2004 (5) Ishii A., *et al.*, 2005 (6) Gadgil M., *et al.*, 2005 (7) Zheng M., *et al.*, 2001 (8) Courcelle J., *et al.*, 2001。

表三、生物資訊搜尋微陣列資料庫中大腸桿菌 *yebC* 及 *yeeN* 之基因表現量

Experiment	Gene description	Fold of expression change ^a		Ref. ^d
		<i>yebC</i>	<i>yeeN</i>	
Purine metabolism				
<i>ΔrelA</i>	ppGpp synthetase I/GTP pyrophosphokinase		-7.9~26	(1), (2)
<i>ΔrelAspoT</i>	bifunctional (p)ppGpp synthetase II/ pyrophosphohydrolase	2.14	-3.1	(1), (3)
Homologous recombination				
<i>ΔrecA</i> (also stress related)	DNA strand exchange and recombination protein	↑ ^b	↑	(4)
Biofilm related				
<i>ΔbssR (yliH)</i>	conserved protein (biofilm regulator)		3.4	(5)
<i>ΔbssS (yceP)</i>	predicted protein (biofilm regulator)		4.1	(5)
<i>ΔbasS basR</i>		2.2		(6)
Two component systems				
<i>ΔglnG</i>	fused DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with GlnL	2.1		(7)
<i>ΔbaeR</i>	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with BaeS	15		(8)
Unknown				
<i>ΔnorR</i>	DNA-binding transcriptional activator	-2.2		(9)
<i>Δhns</i>	global DNA-binding transcriptional dual regulator H-NS	6.3		(10)
<i>ΔgyrB</i>	DNA gyrase, subunit B		2.7~ 4.7	(11)
<i>Δfur</i>	DNA-binding transcriptional dual regulator of siderophore biosynthesis and transport	2. ~ 2.3		(12)
<i>ΔparC</i>	DNA topoisomerase IV, subunit A	↓ ^c	↓	(13)

a. *yebC* 或 *yeeN* 基因在該突變株中表現量改變之倍率。

b. 在該突變株中 *yebC* 或 *yeeN* 基因表現量有兩倍以上之變化。

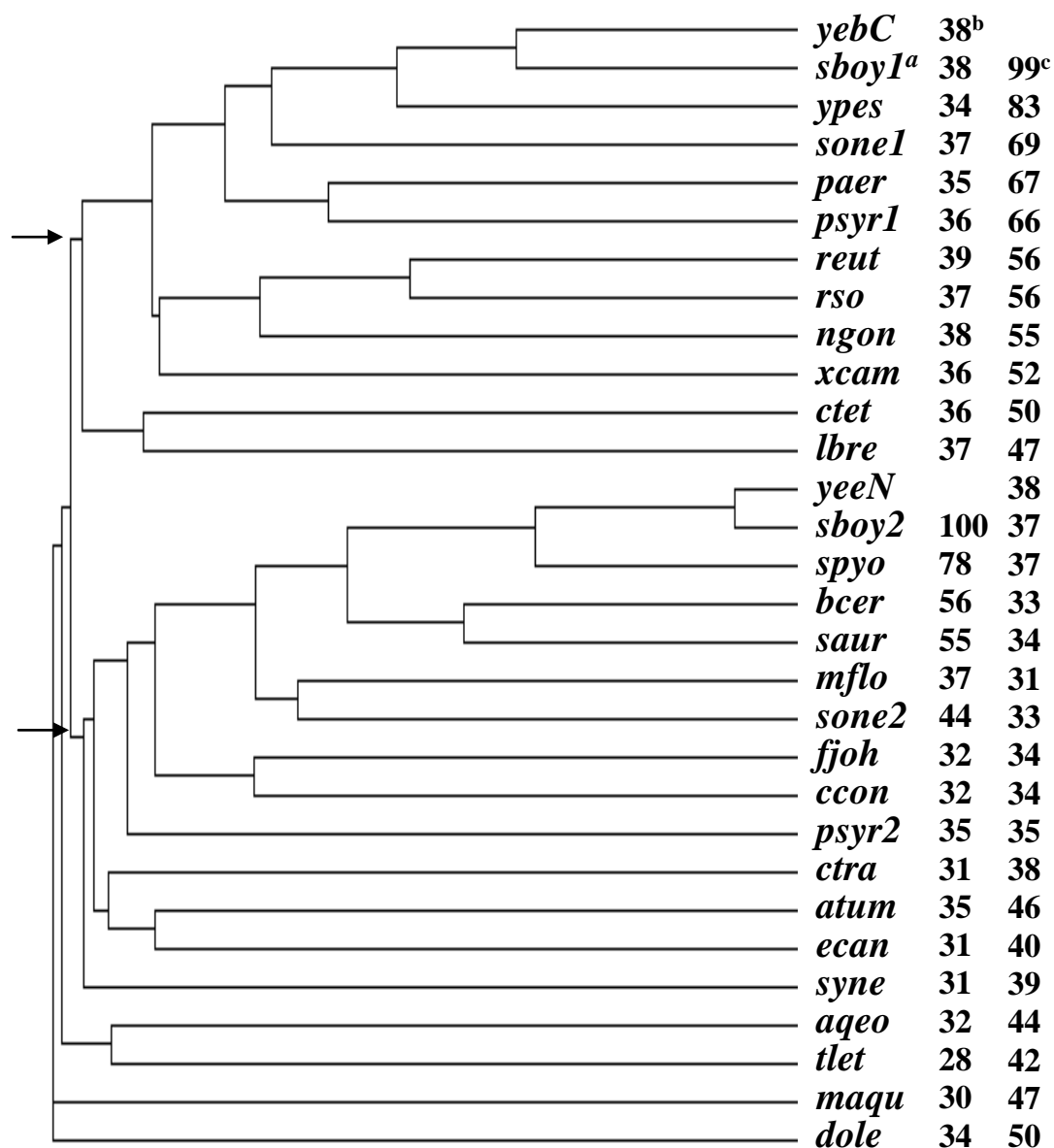
c. 在該突變株中 *yebC* 或 *yeeN* 基因表現量有兩倍以下之變化。

利用微陣列資料庫(NCBI 及 Ecogene database <http://ecogene.org/EcoarrayStat.php>)
搜尋並分析。

d. references 以編號代表內容如下，

(1) Traxler M.F., *et al.*, 2008 (2) Sabina J., *et al.*,2003 (3) Aberg A., *et al.*,2009 (4)
Jeong K. S., *et al.*,2006 (5) Domka J., *et al.*, 2006 (6) Hagiwara D., *et al.*, 2004 (7)
Zimmer D.P., *et al.*, 2000 (8) Nishino K., *et al.*, 2005 (9) Mukhopadhyay P., *et al.*, 2004
(10) Hommais F., *et al.*, 2001 (11) Peter B.J., *et al.*, 2004 (12) Abed N., *et al.*, 2007 (13)
Sangurdekar D. P., *et al.*, 2006。





圖一、不同菌種 DUF28 蛋白質之親緣關係及胺基酸序列相似性

- a. 菌種名稱之縮寫，若該菌種中有兩個 DUF28 同源蛋白分別以 1、2 表示。菌種全名分別為 *sboy*: *Shigella boydii*、*ypes*: *Yersinia pestis*、*sone*: *Shwanella oneidensis*、*paer*: *Pseudomonas aeruginosa*、*psyr*: *Pseudomonas syringae*、*reut*: *Ralstonia eutropha*、*rso*: *Ralstonia solanacearum*、*ngon*: *Neisseria gonorrhoeae*、*xcam*: *Xanthomonas ctetcampestris* pv. *Campestris*、*ctet*: *Clostridium tetani*、*lbre*: *Lactobacillus brevis*、*spyo*: *Streptococcus pyogenes*、*bcer*: *Bacillus cereus*、*saur*: *Staphylococcus aureus*、

mflo : *Mesoplasma florum* 、*fjoh* : *Flavobacterium johnsoniae* 、*ccon* : *Campylobacter concisus* 、*ctra* : *Chlamydia trachomatis* 、*atum* : *Agrobacterium tumefaciens* 、*ecan* : *Ehrlichia canis* 、*syne* : *Synechococcus sp.* 、*aqeo* : *Aquifex aeolicus* 、*tlet* : *Thermotoga lettingae* 、*maqu* : *Mycobacterium avium* 、*dole* : *Desulfococcus oleovorans* 。

b. YebC 的胺基酸序列與其他菌種之 DUF28 胺基酸序列其相同度 (%)。

c. YeeN 的胺基酸序列與其他菌種之 DUF28 胺基酸序列其相同度 (%)。

以 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> 網站分析親緣關係圖，利用 Vector NTI 軟體比較胺基酸序列相同及相似度。

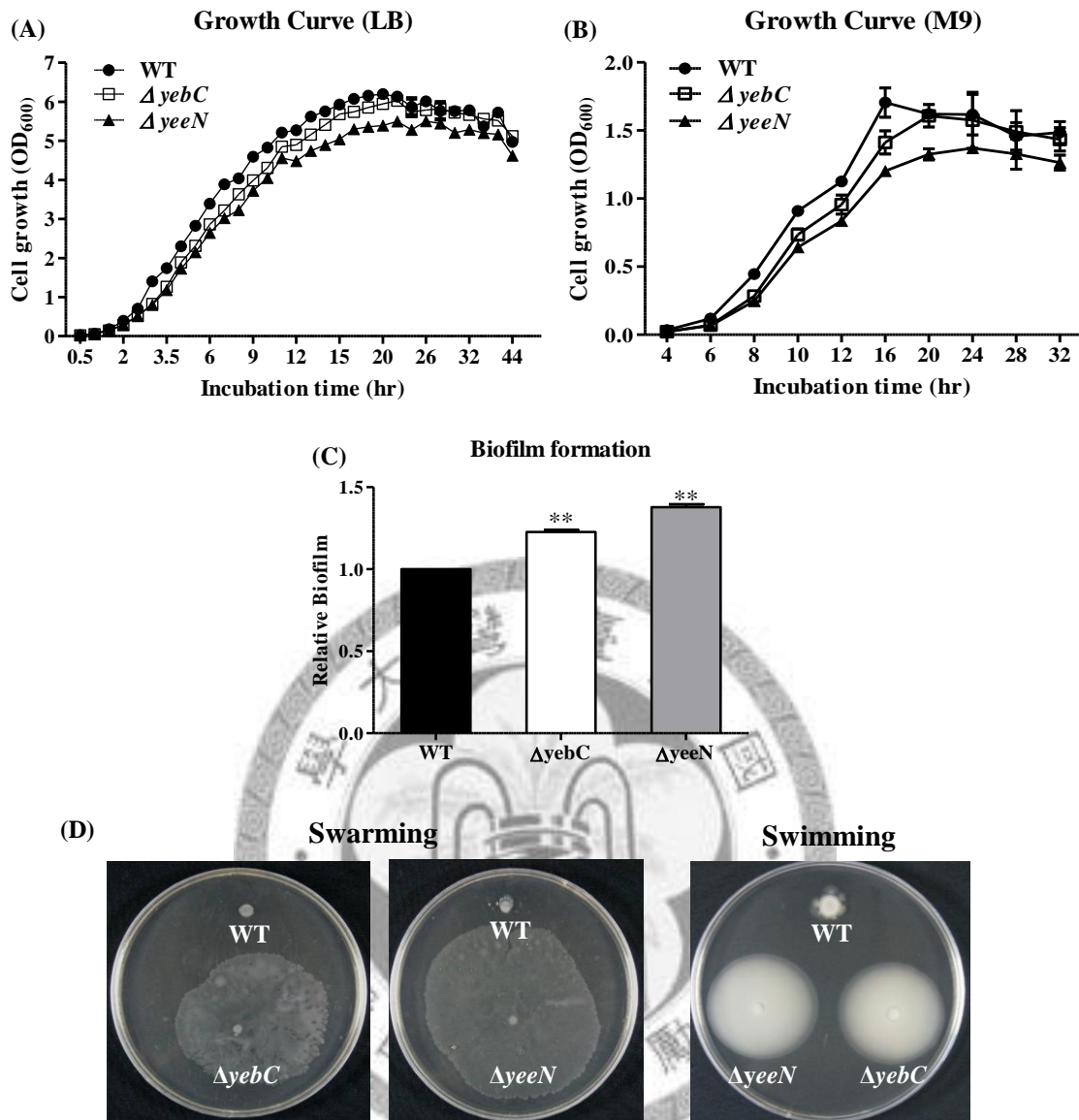


YebC	MAGHSKWANTRHRKAADAKRGGKIFTKIIRELVTAAKLGGGDPDANPRLR	50
YeeN	MG--RKWANIVAKKTAKDGATSKIYAKFGVEIYAAAKQGE PDPELNTSLK	48
YebC	AAVDKALSNMTRDNLNRAIARGVGGDDANMETIIEYEGYGPGGTAIMIE	100
YeeN	FVIERAKQAQVPKHVIDKAIKAKGGGDETFVQG-RYEGFGPNGSMIIAE	97
YebC	CLSDNRNRTVAEVRHAFSKCGGNLGT DGSVAYLFSKKGVI SFEKGD E D T I	150
YeeN	TLT SNVNRTIANVRTIFNKKGGNIGAA GSVSYMFDNTGVI VFKGTDPDHI	147
YebC	MEAALEAGAED-VVTYDDGAI DVYTAW EEMGKVRDALEAAGLKADS-AEV	198
YeeN	FEILLEAEVDVRDVT EEEGNIVIYTEPTDLHKGIAALKAAGIT EFSTTEL	197
YebC	SMIPSTKADMDAETAPKLMRLIDMLEDCDDVQEVYHNGEISDEVAATL	246
YeeN	EMI AQSEVELSPEDLEIF E GLVDALED DDDVQKVYHN-----VANL	238

圖二、大腸桿菌 DUF28 蛋白質胺基酸序列比對

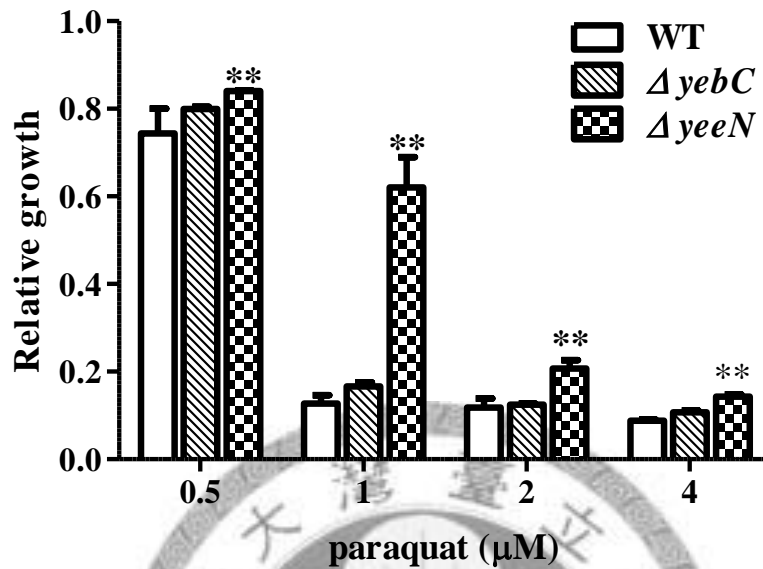
利用 Bioeditor 軟體分析 YeeN 及 YebC 胺基酸序列相同及相似度。黑色表示相同胺基酸，灰色表示具有相似特性之胺基酸。





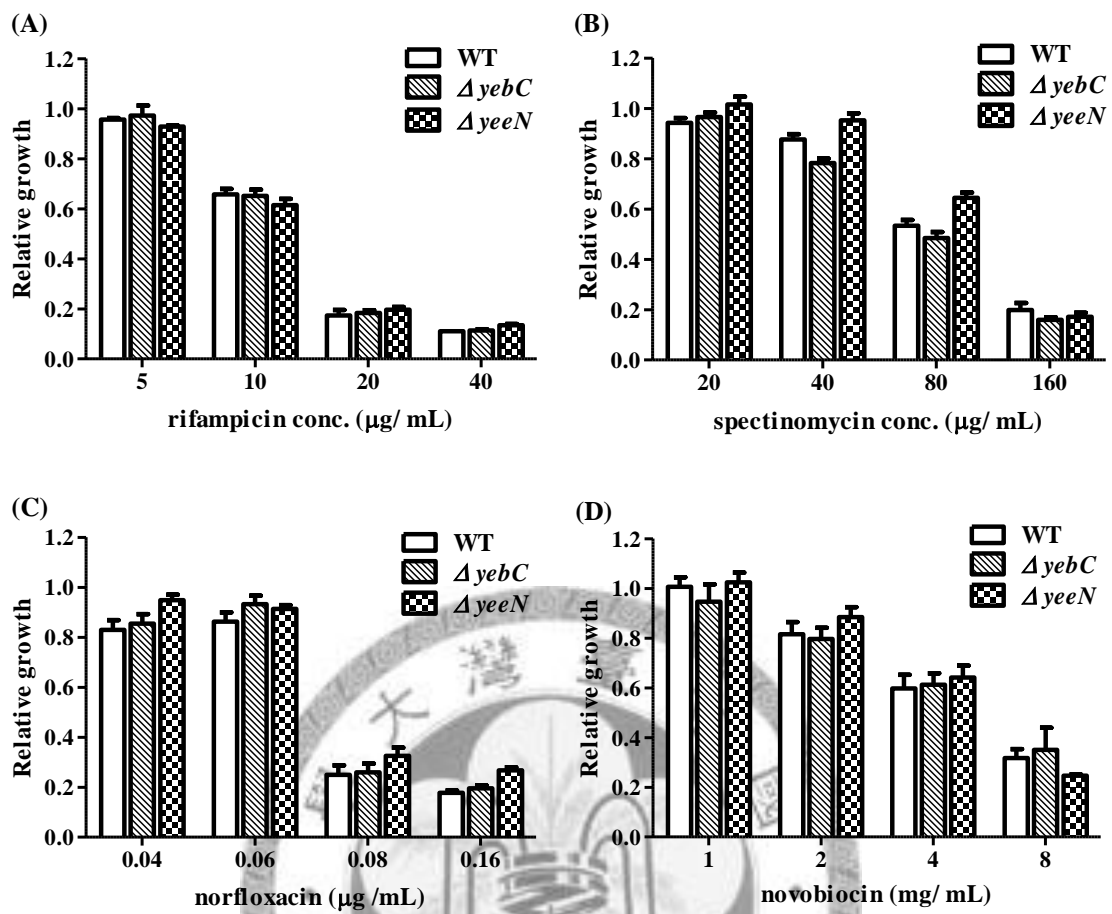
圖三、大腸桿菌 DUF28 蛋白質突變株 ($\Delta yebC$ 及 $\Delta yeeN$) 之生物特性分析

(A) 野生株、 $\Delta yebC$ 及 $\Delta yeeN$ 在豐富液態培養基(LB)之生長曲線，本實驗共重複兩次，每重複中均有四次個別數值，由兩次結果計算其平均及標準誤(SE)。(B) 野生株與 $\Delta yebC$ 及 $\Delta yeeN$ 在貧瘠液態培養基(M9)之生長曲線，本實驗共重複兩次，每重複中均有三次個別數值，由兩次結果計算其平均及標準誤(SE)。(C) 生物膜生成能力之分析本實驗重複三次共 30 個數值，取所有實驗結果計算平均及標準誤(SE)。(D) 在泳動能力測試中，利用 0.3% agar 培養基或是 0.5% agar 培養基進行泳動力測試，共重複四次且趨勢一致。*為顯著差異($P < 0.05$)，**為高度顯著差異($P < 0.01$)。



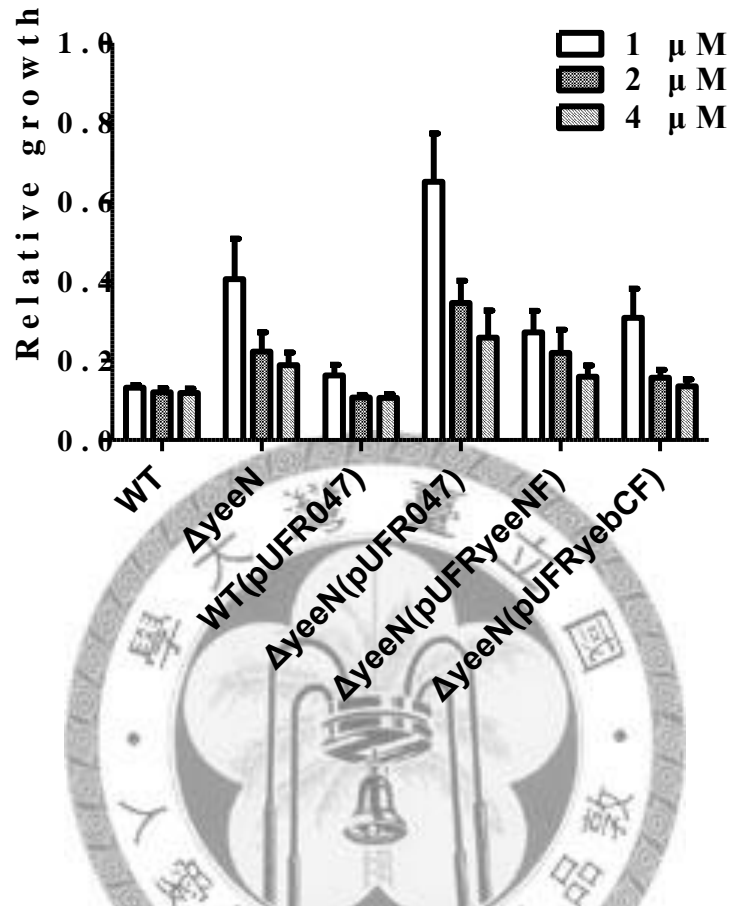
圖四、大腸桿菌 $\Delta yebC$ 及 $\Delta yeeN$ 突變株對 paraquat 生長抑制濃度之測試

在液態貧瘠培養基(M9 medium)中加入不同濃度的 paraquat 藥劑，測試突變株與野生株之生長抑制情形，本實驗共重複三次以上共取 25 個數值計算其與未處理組相除之相對生長量、平均及標準誤(SE)，*為顯著差異($P < 0.05$)，**為高度顯著差異($P < 0.01$)。



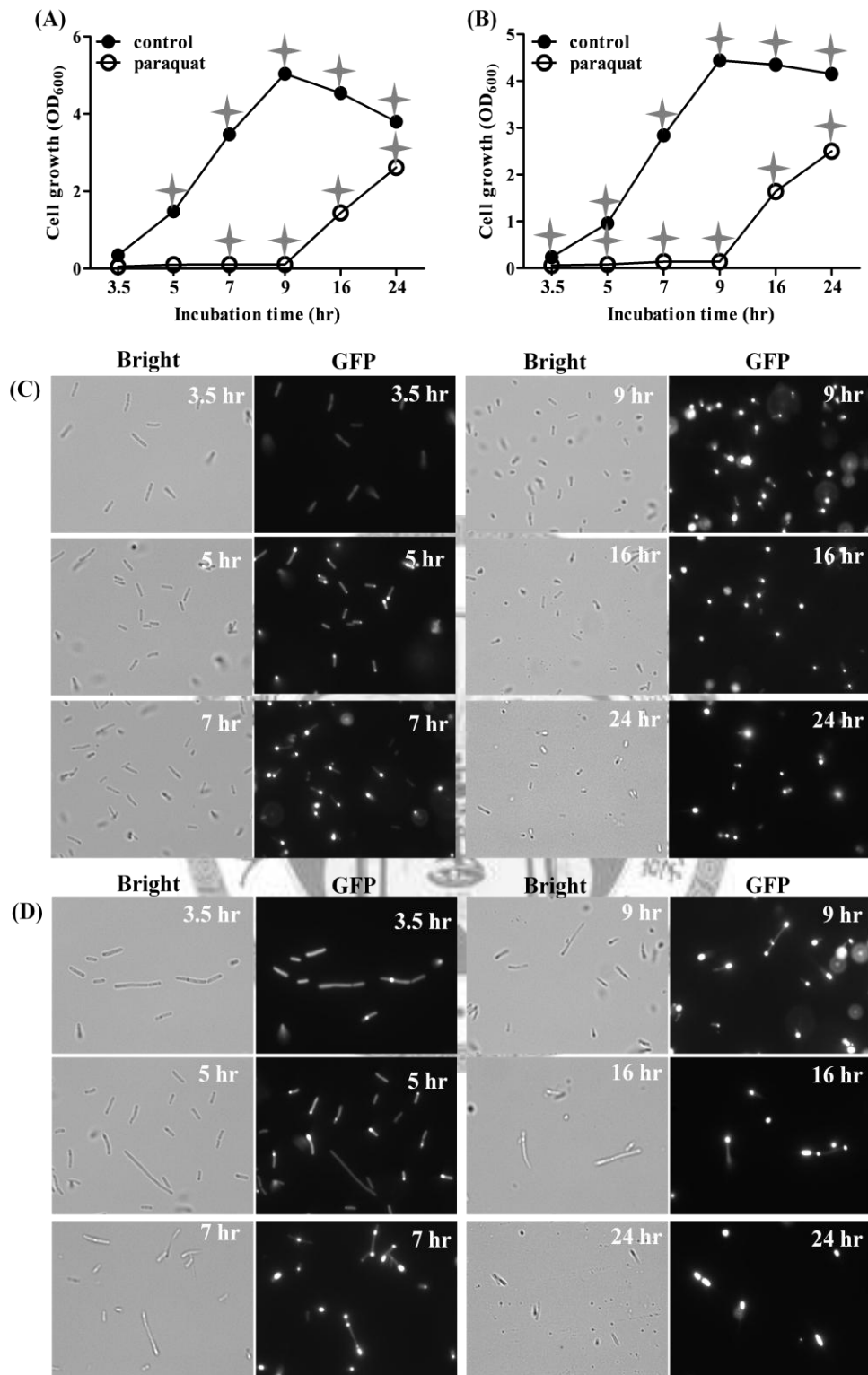
圖五、大腸桿菌 $\Delta yebC$ 及 $\Delta yeeN$ 突變株對不同抗生素生長抑制濃度之測試

在液態貧瘠培養基(M9 medium)中加入不同濃度的抗生素，測試突變株與野生株之生長抑制情形，本實驗共重複三次共9個數值計算與未處理組相除之相對生長量、平均及標準誤(SE)。



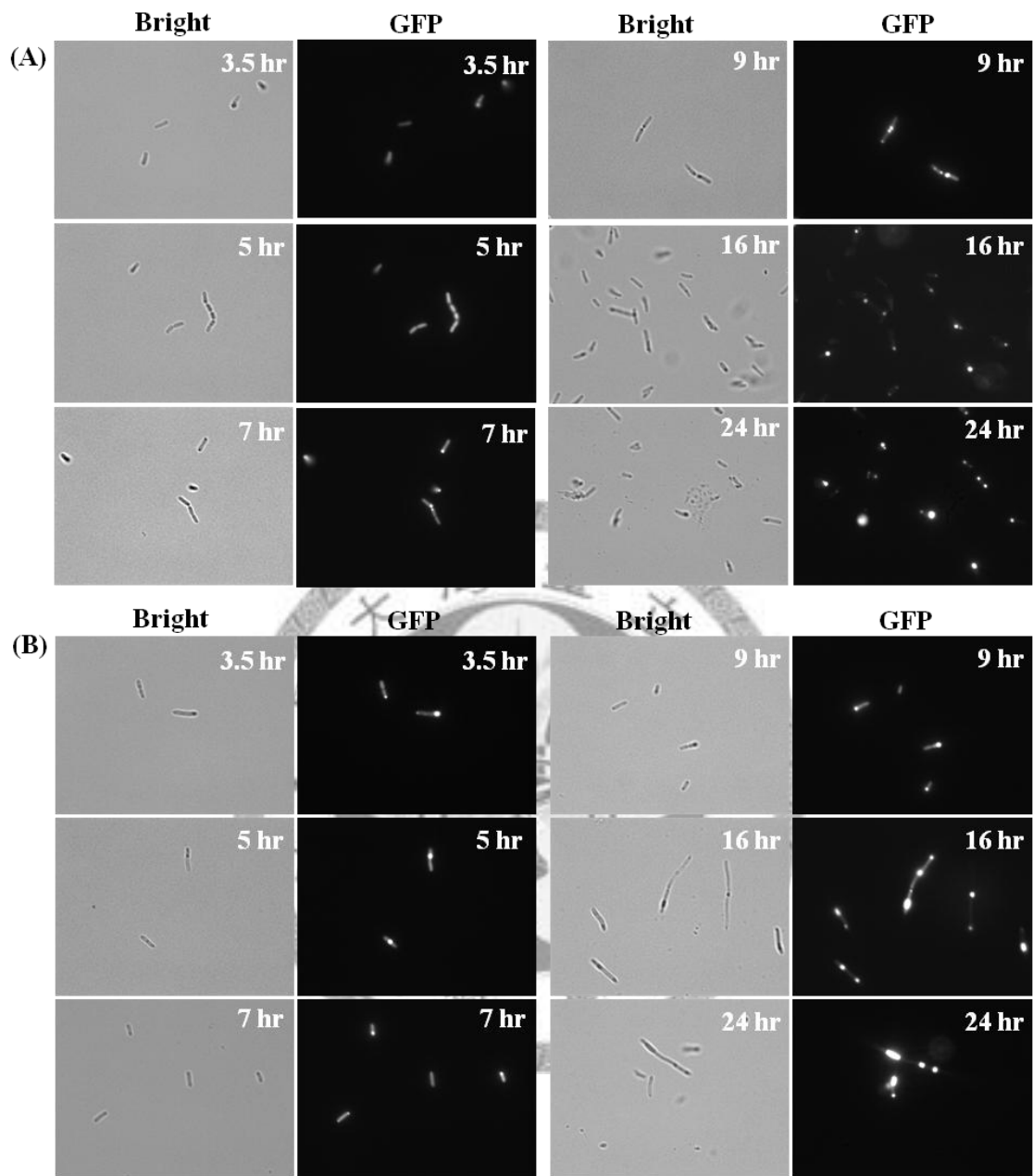
圖六、*yeeN* 突變株與其互補株對 paraquat 氧化逆境耐受度測試

在液態貧瘠培養基(M9 medium)中加入不同濃度的 paraquat 藥劑，測試突變株與其互補株之生長抑制情形，本實驗共重複兩次共取六個數值計算與未處理組相除之相對生長量、平均及標準誤(SE)。

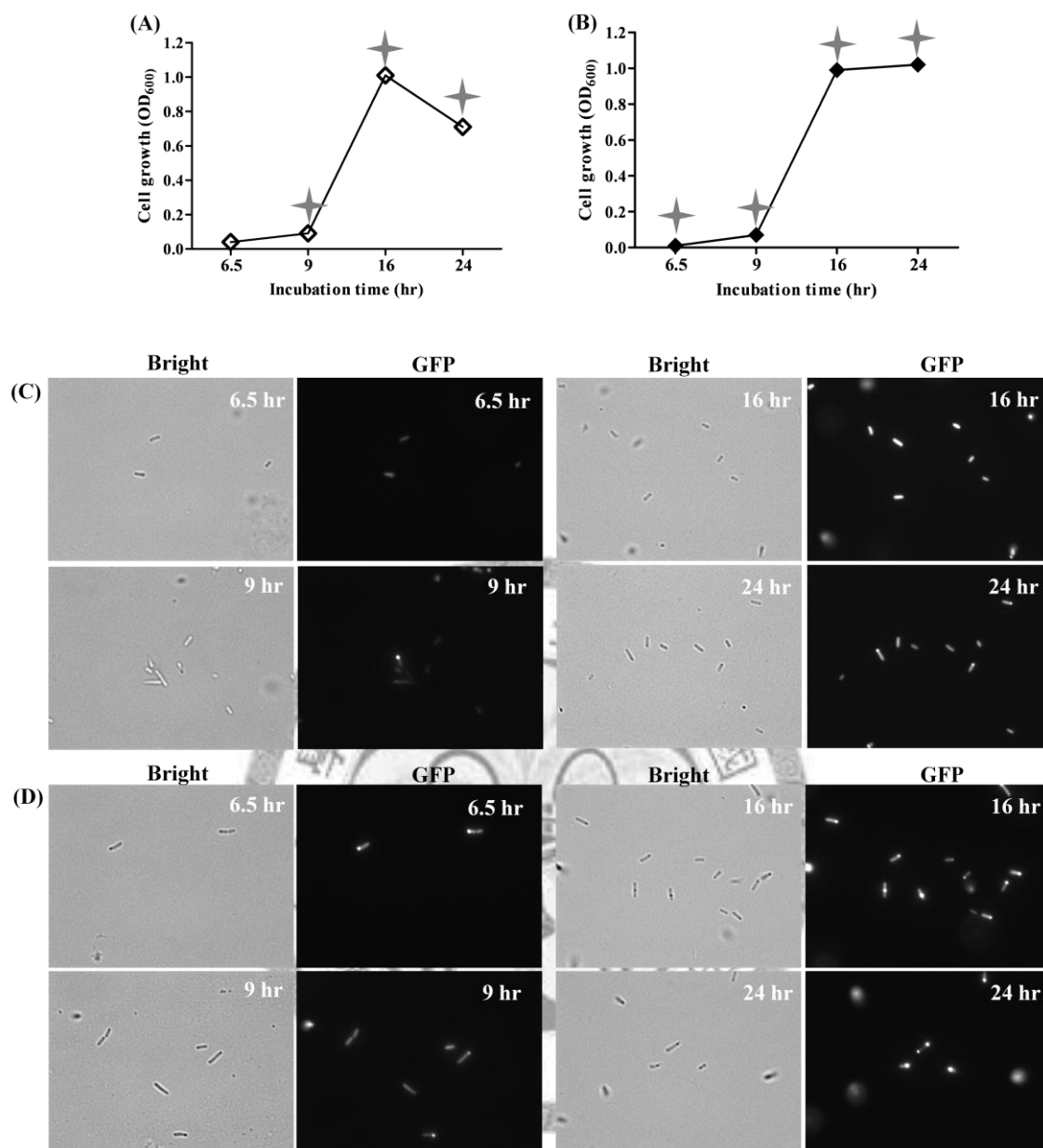


圖七、YeeN 蛋白質於不同濃度 IPTG 處理下之分佈情形

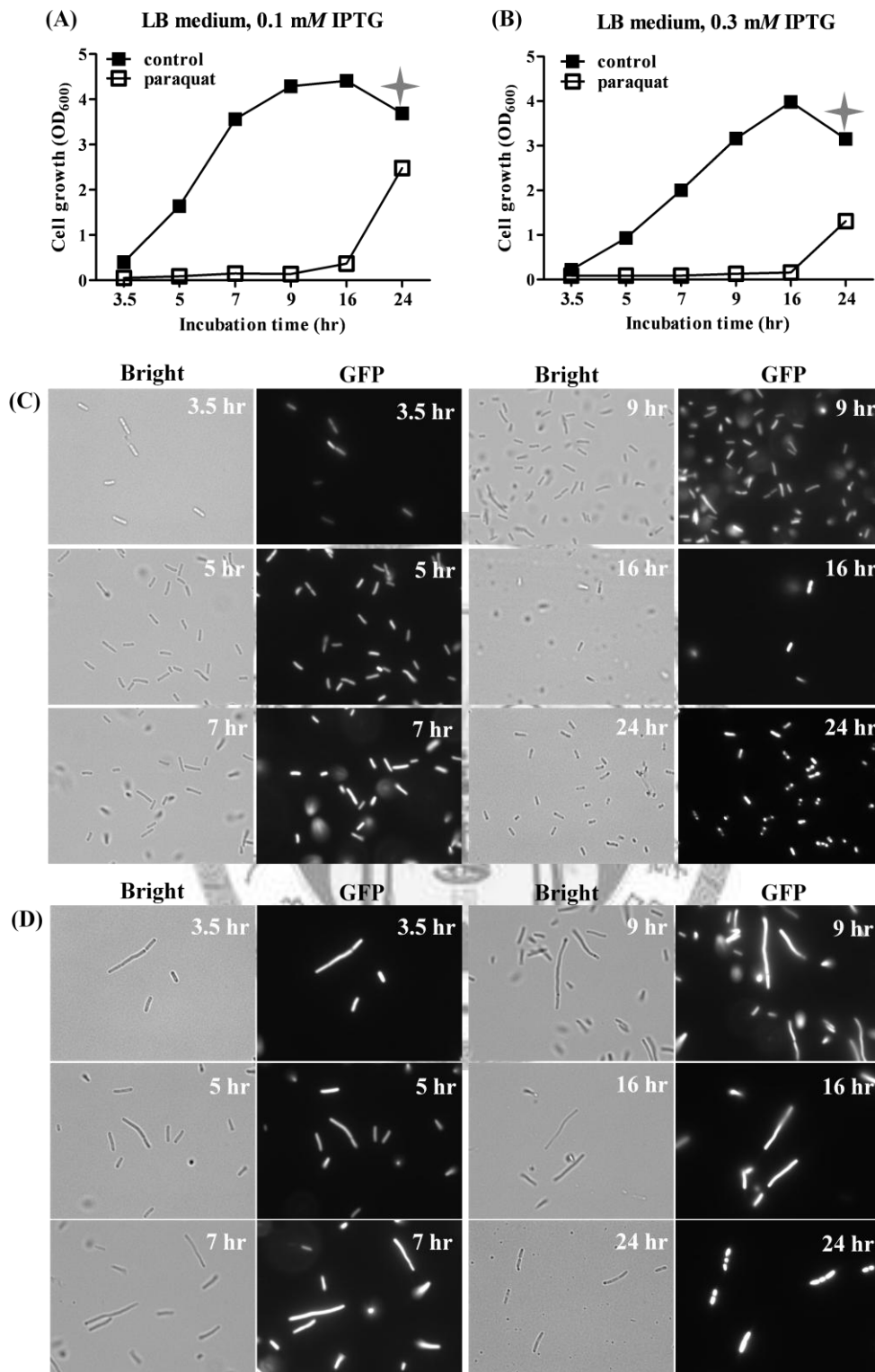
在豐富培養基(LB)中處理 (A) 0.1 mM IPTG (B) 0.3 mM IPTG 之生長曲線。✦：表示聚集。(C) 0.1 mM IPTG (D) 0.3 mM IPTG 於不同生長時期觀察之蛋白質表現分佈。本實驗均重複兩次以上趨勢一致，呈現一次數值或結果作為代表。



圖八、YeeN-GFP 蛋白質處理 paraquat 環境中於不同濃度 IPTG 之分佈情形
 在豐富培養基(LB)中處理 0.6 M paraquat 添加 (A) 0.1 mM IPTG (B) 0.3 mM IPTG
 於不同生長時期觀察之蛋白質分佈。本實驗均重複兩次以上趨勢一致，呈現一次
 結果作為代表。

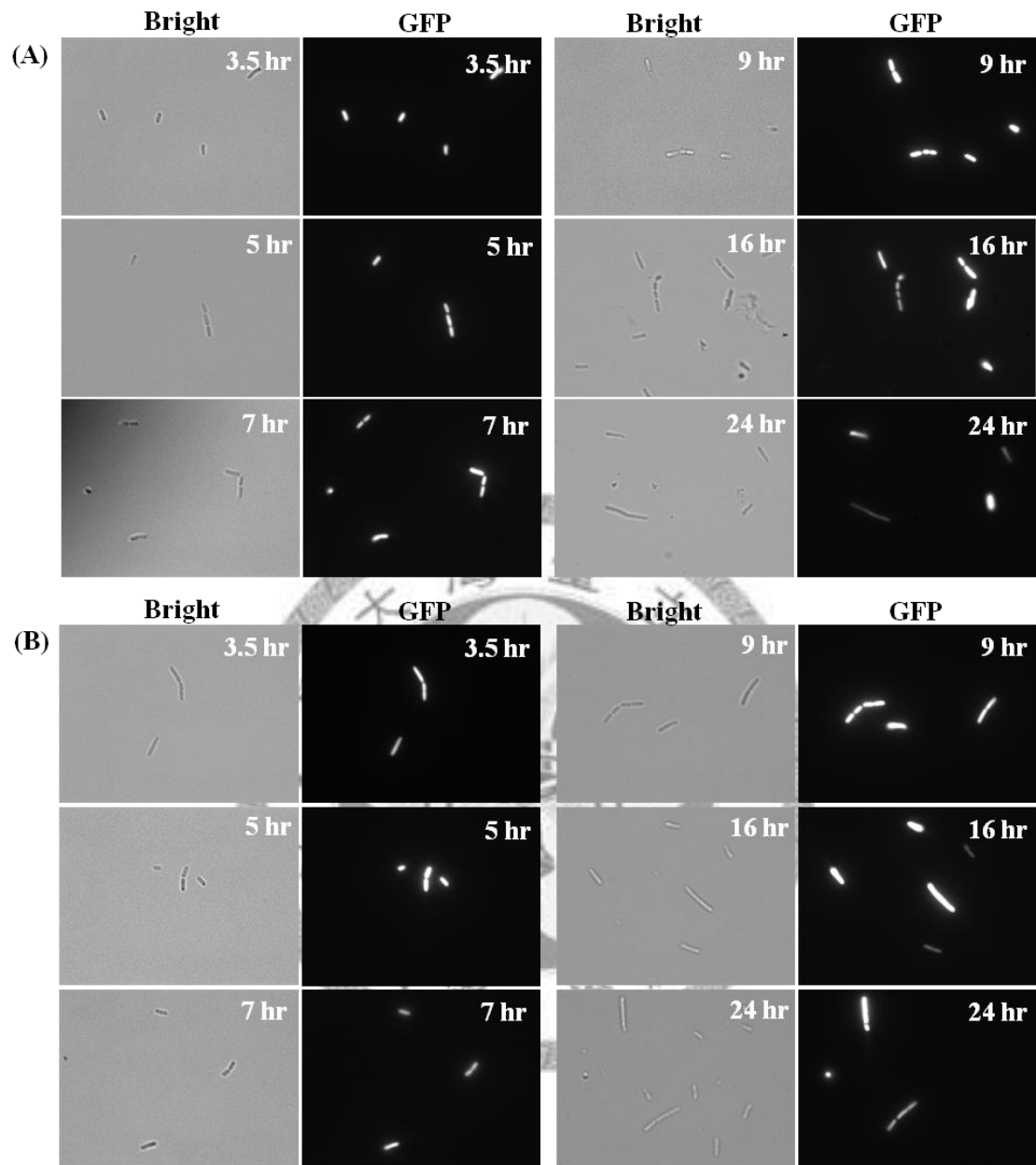


圖九、YeeN 蛋白質於低養環境(M9)中處理不同濃度 IPTG 之分佈情形
 在貧瘠培養基(M9)中處理 (A) 0.1 mM IPTG 或 (B) 0.3 mM IPTG 之生長曲線。(C)
 0.1 mM IPTG, (D) 0.3 mM IPTG 於不同生長時期觀察之蛋白質分佈。✦：表示聚
 集。本實驗均重複兩次以上趨勢一致，呈現一次數值或結果作為代表。



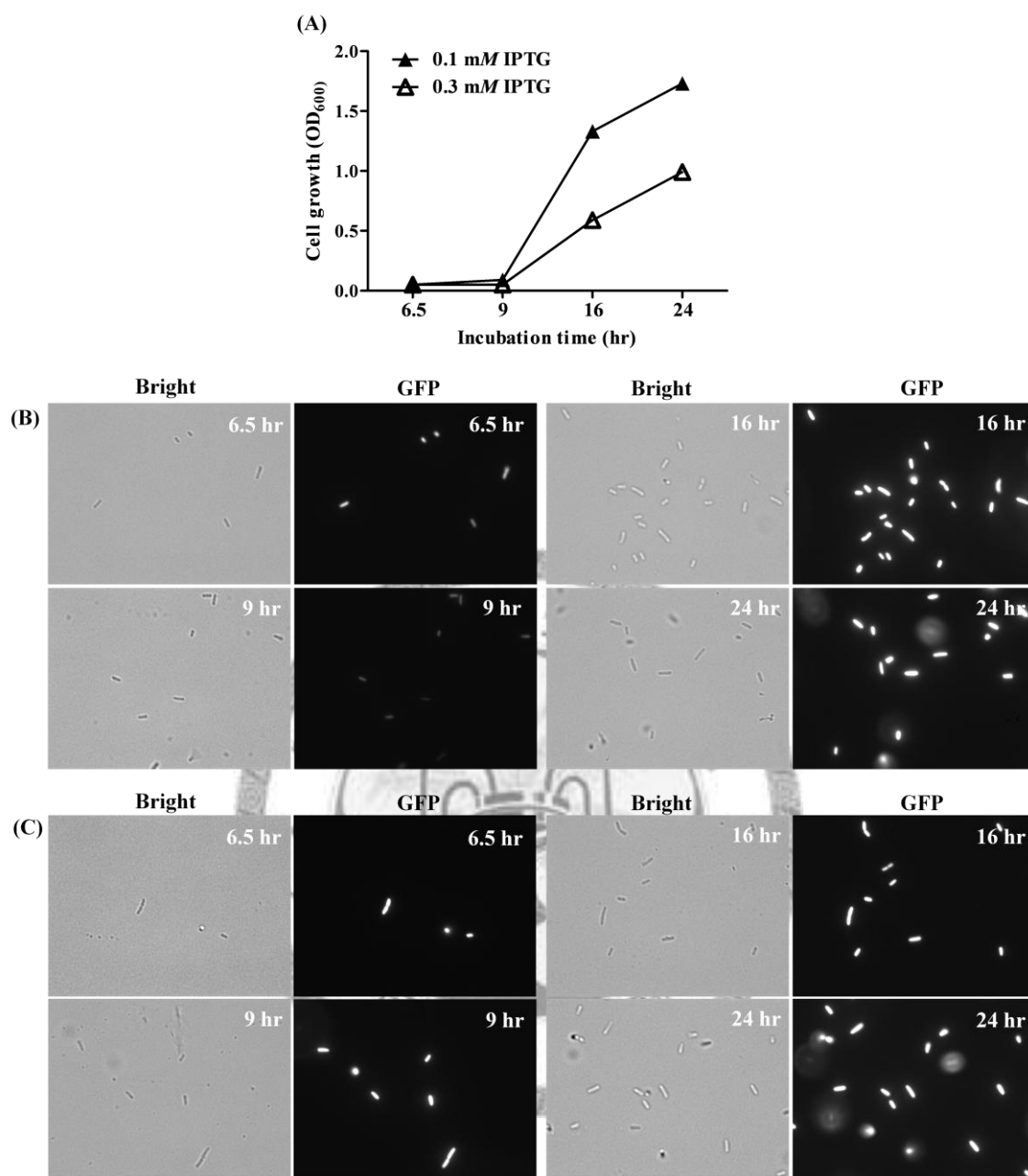
圖十、YebC 蛋白質於不同濃度 IPTG 處理下之分佈情形

在豐富培養基(LB)中處理 (A) 0.1 mM IPTG (B) 0.3 mM IPTG 之生長曲線。✦：表示聚集。(C) 0.1 mM IPTG (D) 0.3 mM IPTG 於不同生長時期觀察之蛋白質表現分佈。本實驗均重複兩次以上趨勢一致，呈現一次數值或結果作為代表。



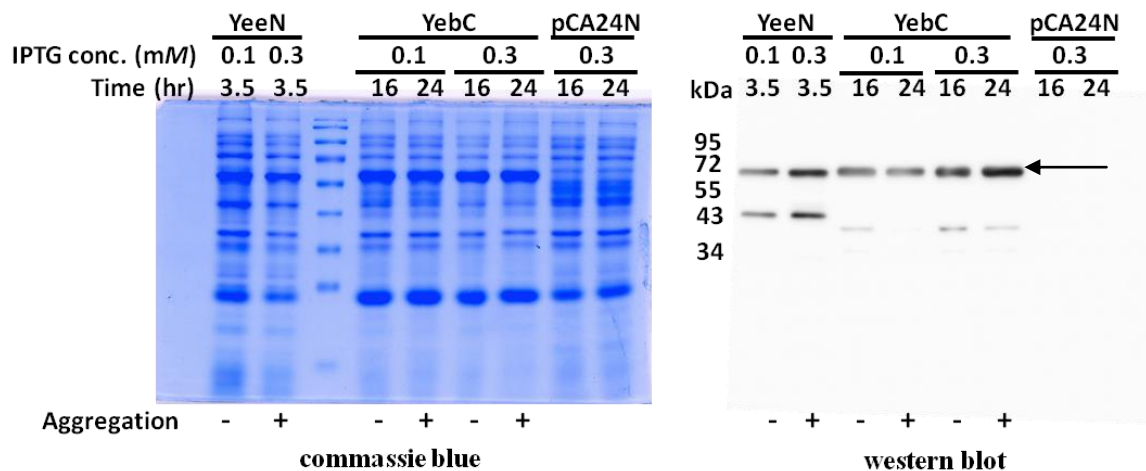
圖十一、YebC 蛋白質處理 paraquat 環境中於不同濃度 IPTG 之分佈情形

在豐富培養基(LB)中處理 0.6 M paraquat 添加 (A) 0.1 mM IPTG (B) 0.3 mM IPTG 於不同生長時期觀察之蛋白質分佈。本實驗均重複兩次以上趨勢一致，呈現一次結果作為代表。

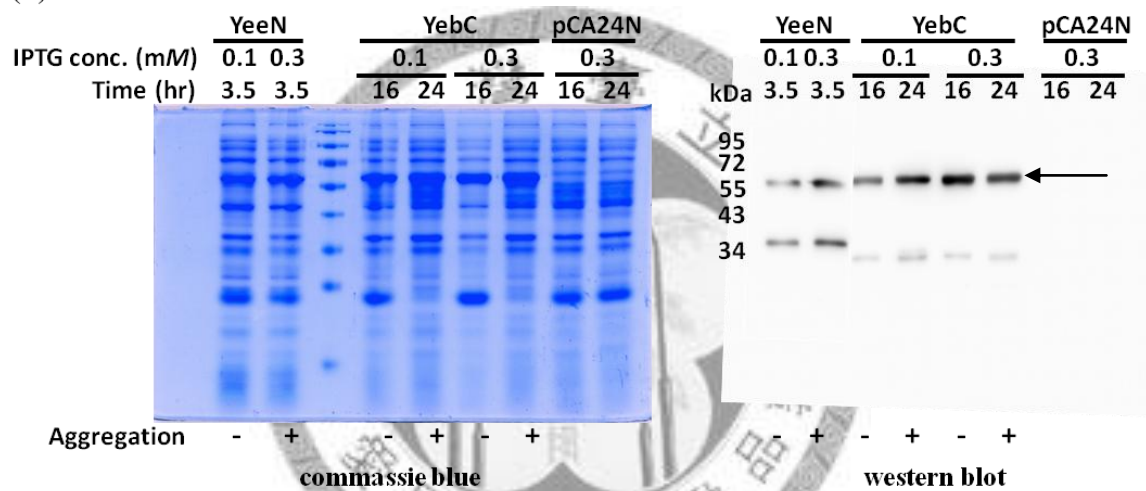


圖十二、YebC 蛋白質於低養環境(M9)中處理不同濃度 IPTG 之分佈情形
 在貧瘠培養基(M9)中處理 (A) 0.1 mM IPTG 或 0.3 mM IPTG 之生長曲線。(B) 0.1 mM IPTG, (C) 0.3 mM IPTG 於不同生長時期觀察之蛋白質分佈。✦：表示聚集
 本實驗均重複兩次以上趨勢一致，呈現一次數值或結果作為代表。

(A) Batch 1

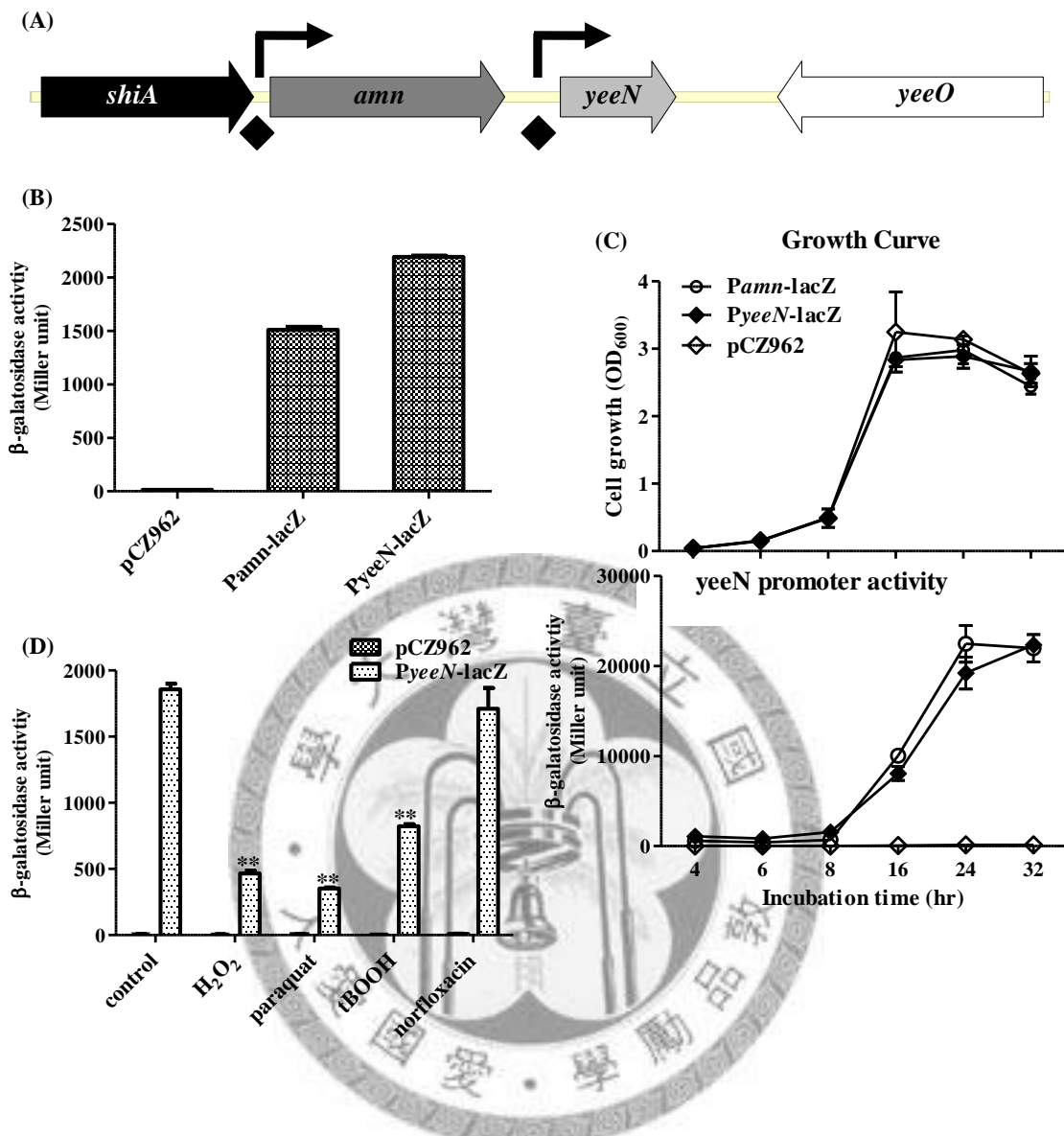


(B) Batch 2



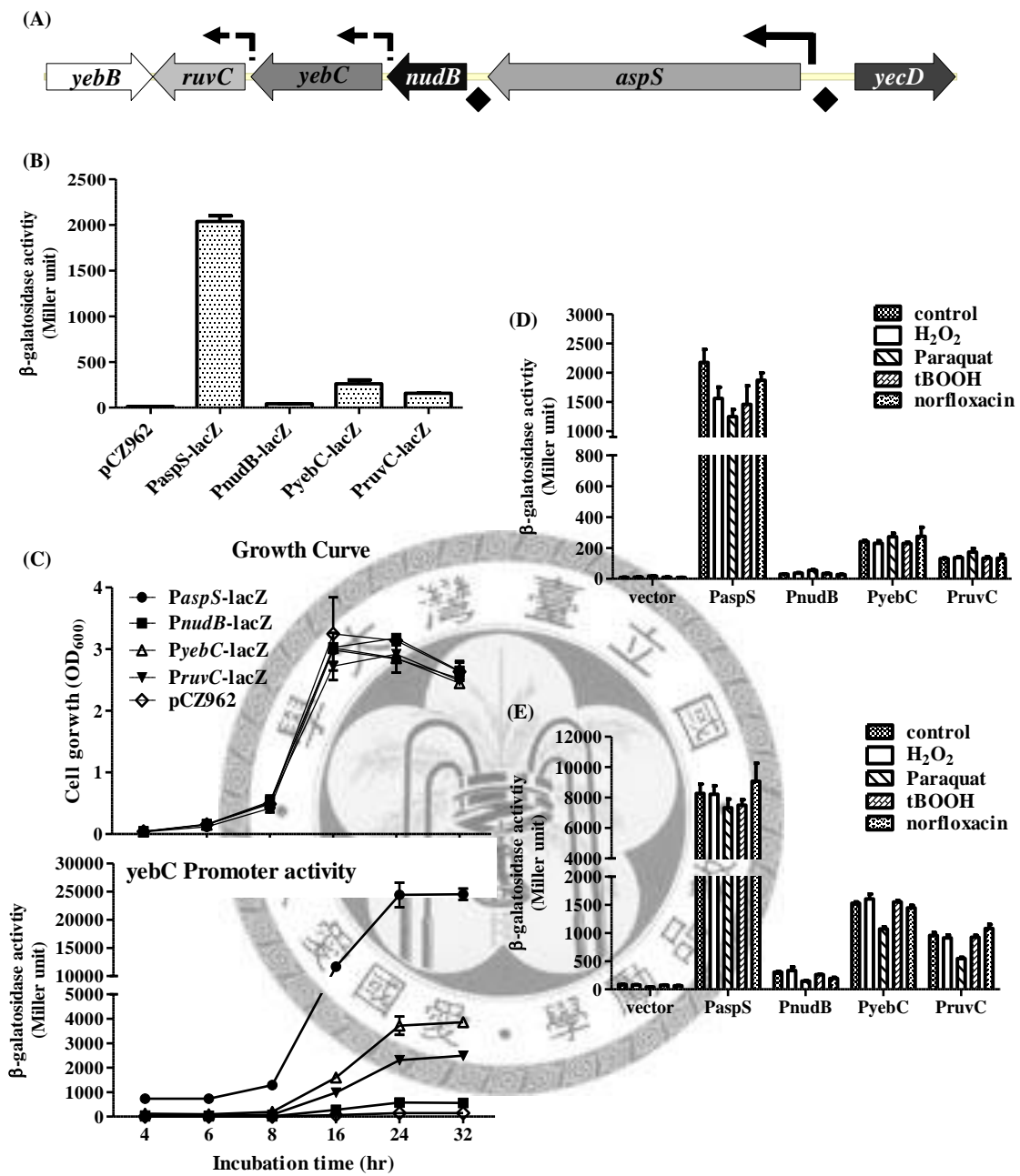
圖十三、YeeN-GFP 及 YebC-GPF 蛋白質含量檢測

抽取不同時間點之 YeeN-GFP 及 YebC-GFP 蛋白質進行蛋白質膠體電泳分析及西方墨點法。每個樣本皆取 10 mg 進行電泳，以 His-HRP 作為抗體本實驗共重複兩次，呈現兩次結果 (A)，(B)。pCA24N 為空載體作為 negative control。Aggregation -：表示已觀察該蛋白質未有聚集的現象。Aggregation +：表示已觀察該蛋白質有聚集的現象。



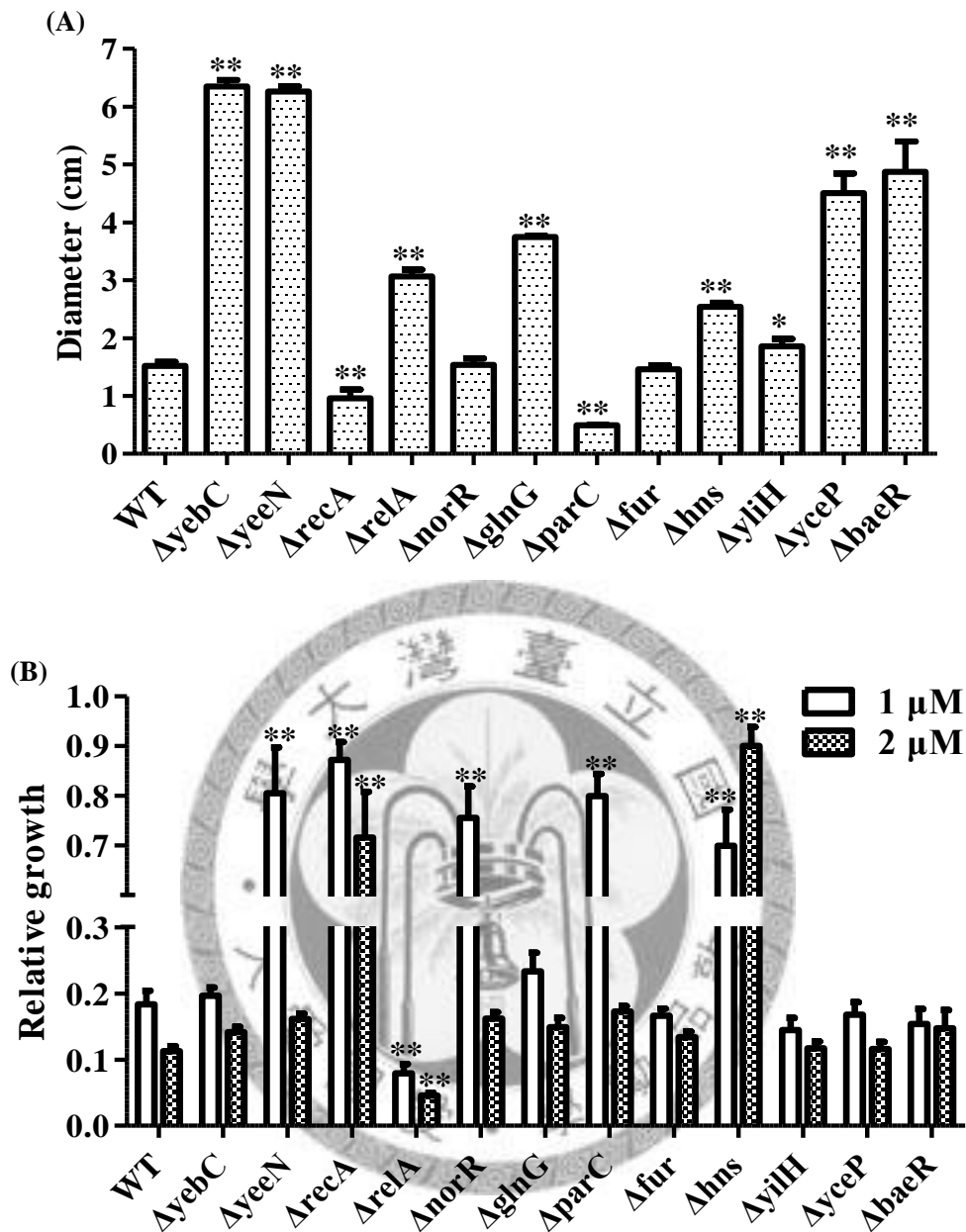
圖十四、*yeeN* 操縱子 (operon) 組成及調控

利用 β -galactosidase 分析法檢測 *yeeN* 操縱子結構及其調控。(A) *yeeN* 操縱子組成圖， \Rightarrow 表示轉錄方向； \blacklozenge 表示經軟體預測具有啟動子之片段； \curvearrowright 表示在生長早期即有啟動子活性。(B) *yeeN* 操縱子組成。(C) 不同生長時期 *yeeN* 及 *amn* 之啟動子表現活性及生長曲線。(D) *yeeN* 啟動子受到不同逆境之調控情形。本實驗均至少重複兩次以上，每次均有三個數值趨勢一致，呈現其中一次的結果。
*為顯著差異($P < 0.05$)，**為高度顯著差異($P < 0.01$)



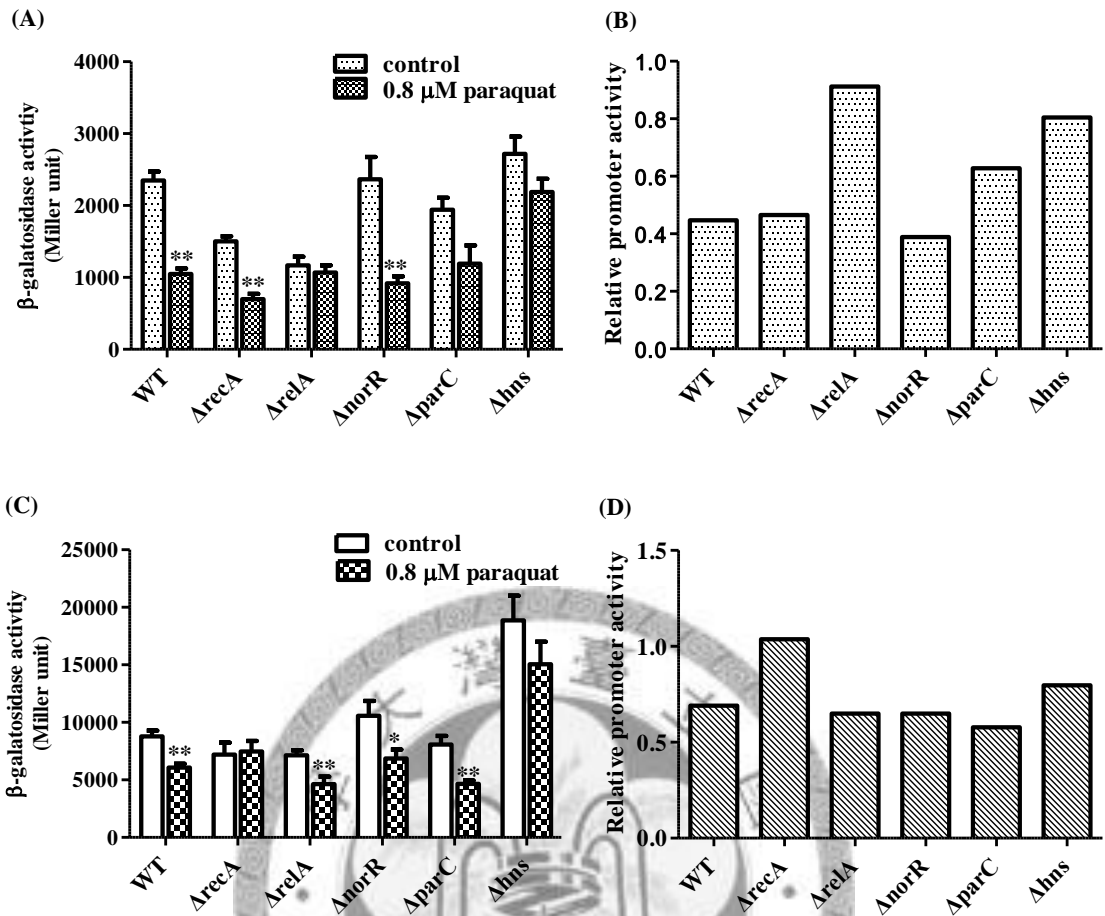
圖十五、*yebC* 操縱子 (operon) 組成及調控

利用 β -galactosidase 分析法檢測 *yebC* 操縱子結構及其調控。(A) *yebC* 操縱子組成圖， \Rightarrow 表示轉錄方向； \blacklozenge 表示經軟體預測具有啟動子之片段； \Leftarrow 表示在生長早期即有啟動子活性； \Leftarrow (dotted) 表示在生長後期才開始有啟動子活性表現。(B) 利用 β -galactosidase 分析法檢測 *yebC* 操縱子組成。(C) 不同生長時期 *aspS-ruvC* 之啟動子表現活性及生長曲線。(D) *apsS-ruvC* 啟動子受到不同逆境之調控情形。本實驗均至少重複兩次以上，每次均有三個數值趨勢一至，呈現其中一次的結果。



圖十六、檢測可能位於 *yeeN* 或 *yebC* 上游之基因其突變株的生物特性分析

(A) 分析不同突變株泳動力(swimming motility)，利用 0.3% agar 培養基培養 14 小時後測量菌落半徑，本實驗共進行兩次，每次六重複，取所有實驗數值計算平均與標準誤(SE)。(B) 於貧瘠培養基(M9)中不同突變株對 paraquat 之耐受性，本實驗共進行兩次以上，每次三重複，所至少五個數值計算與未處理組相除之相對生長量、平均及標準誤(SE)。*為顯著差異($P < 0.05$)，**為高度顯著差異($P < 0.01$)。



圖十七、*yeeN* 啟動子在不同突變株中處理 paraquat 之表現活性

利用 β -galactosidase 分析法檢測 *yeeN* 啟動子在不同突變株中以 0.8 μM paraquat 處理 6 小時(A)及 24 小時(C)其活性表現，並計算其與未處理組相除之相對啟動子表現量 6 小時及(B)24 小時(D)，本實驗共重複三次以上，每次均有三個數值，趨勢一致，取 9 個數值計算平均及標準誤(SE)。*為顯著差異(P<0.05)，**為高度顯著差異(P<0.01)。

附錄一、本論文中所使用之菌株及質體

Strains or plasmids	Genotype and description ^a	References
<i>Escherichia coli</i> strains		
K-12 BW25113	<i>lacI^q rrnB_{T14} ΔlacZ_{WT16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}</i>	Datsenko K.A. & Wanner B. L., 2000
K-12 BW25113 <i>ΔyeeN</i>	K12 BW25113 <i>ΔyeeN</i> Ω Km ^r	Baba T., <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>ΔyebC</i>	K12 BW25113 <i>ΔyebC</i> Ω Km ^r	Baba T., <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>ΔrecA</i>	K12 BW25113 <i>ΔrecA</i> Ω Km ^r	Baba T., <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>ΔrelA</i>	K12 BW25113 <i>ΔrelA</i> Ω Km ^r	Baba T., <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>ΔnorR</i>	K12 BW25113 <i>ΔnorR</i> Ω Km ^r	Baba T., <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>ΔglnG</i>	K12 BW25113 <i>ΔglnG</i> Ω Km ^r	Baba T., <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>ΔparC</i>	K12 BW25113 <i>ΔparC</i> Ω Km ^r	Baba T., <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>Δhns</i>	K12 BW25113 <i>Δhns</i> Ω Km ^r	Baba T., <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>Δfur</i>	K12 BW25113 <i>Δfur</i> Ω Km ^r	Baba T., <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>ΔyceP</i>	K12 BW25113 <i>ΔyceP</i> Ω Km ^r	Baba T., <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>ΔyliH</i>	K12 BW25113 <i>ΔyliH</i> Ω Km ^r	Baba T., <i>et al.</i> , 2006
K-12 BW25113 <i>ΔbaeR</i>	K12 BW25113 <i>ΔbaeR</i> Ω Km ^r	Baba T., <i>et al.</i> , 2006
DH5α	Transient host of different construct	Hanahan, 1983
Plasmids		
pCA24N	Cm ^r ; lacI ^q , pCA24N	Kitagawa M., <i>et al.</i> , 2005
pCA24N- <i>yeeN</i>	Cm ^r ; lacI ^q , pCA24N P _{T5-lac} :: <i>yeeN-gfp</i>	Kitagawa M., <i>et al.</i> , 2005
pCA24N- <i>yebC</i>	Cm ^r ; lacI ^q , pCA24N P _{T5-lac} :: <i>yebC-gfp</i>	Kitagawa M., <i>et al.</i> , 2005

		2005
pUFR047	Low copy number and broad host range cloning vector for gene transfer, Amp ^r , Gm ^r	De Feyter <i>et al.</i> , 1993
pUFRyeeNF	pUFR047 carrying <i>yeeN</i> and <i>yeeN</i> putative promoter region in <i>HindIII</i> , <i>PstI</i>	This study
pUFRyebCF	pUFR047 carrying <i>yebC</i> and <i>yebC</i> putative promoter region in <i>HindIII</i> , <i>PstI</i>	This study
pCZ962	Middle copy number vector containing a promoterless LacZ reporter for promoter activity assay, Ter ^r	Provided by C. Boucher
pCZ962-PaspS	pCZ962 containing putative promoter sequence upstream of <i>aspS</i> in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
pCZ962-PnudB	pCZ962 containing putative promoter sequence upstream of <i>nudB</i> in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
pCZ962-PyebC	pCZ962 containing putative promoter sequence upstream of <i>yebC</i> in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
pCZ962-PruvC	pCZ962 containing putative promoter sequence upstream of <i>ruvC</i> in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
pCZ962-Pamn	pCZ962 containing putative promoter sequence upstream of <i>amn</i> in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study
pCZ962-PyeeN	pCZ962 containing putative promoter sequence upstream of <i>yeeN</i> in <i>HindIII</i> and <i>XbaI</i>	This study

a. Km^r, Cm^r, Amp^r, Gm^r, Ter^r are kanamycin, chloramphenicol, ampicillin, gentamycin, tetracycline resistance, respectively.

附錄二、本論文中所使用之引子及序列

Primer	Sequence ^a (5' - 3')
Check of mutant genomic DNA and construct	
k1	GAGTCATAGCCGAATAGCCT
k2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
kt	CGGCCACAGTCGATGAATCC
M13-F	GTAAAACGACGGCCA
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC
Construct for complementation	
<i>yeeNF</i> -047-F	GGAAGCTTTAAGTTCTGAACCTTC
<i>yeeNF</i> -047-R	GGCTGCAGTTAGAGATTTGCGACGTTATGA
<i>yebCF</i> -047-F	CCAAGCTTTGGTTCTGTCTTGCGCTTCC
<i>yebCF</i> -047-R	GGCTGCAGTCAGAGAGTCGCTGCGACCT
Construct for promoter activity assay	
<i>PaspS</i> -F	CCAAGCTTATCGACCGGCTGTTTTTG
<i>PaspS</i> -R	GCTCTAGAATTACGCAGTTCAGAGGCCA
<i>PnudB</i> -F	CCAAGCTTTATCCGTGACGTTATCGCCT
<i>PnudB</i> -R	GCTCTAGATCTTCCTTACTTCGCGCAT
<i>PyebC</i> -F	CCAAGCTTTGGTTCTGTCTTGCGCTTCC
<i>PyebC</i> -R	GCTCTAGATTGCATCATCATCACCGCCC
<i>PruvC</i> -F	CCAAGCTTTTTCATGATCCCGTCTACC
<i>PruvC</i> -R	GCTCTAGAACTGGGTGATGATTTCCGTC
<i>Pamn</i> -F	CCAAGCTTGCCGCTGCACTCATCACTTA
<i>Pamn</i> -R	GCTCTAGAATTGGTTGTGCTACCGTCCC
<i>PyeeN</i> -F	GGAAGCTTTAAGTTCTGAACCTTC

<i>PyeeN</i> -R	<u>CCTCTAGAT</u> TGGAATGATCTCCTCG
Primer for RT-qPCR assay	
<i>katG</i> -RT-F	TCACCAGCATTGTCGGTTTA
<i>katG</i> -RT-R	CGACCCAGTGGAGCAACTAT
<i>sodA</i> -RT-F	GTTGCGCAGTACGGTTTTCT
<i>sodA</i> -RT-R	GGAAATCCACCACACCAAAC
<i>soxR</i> -RT-F	GTATCCGTAACAGCGGCAAT
<i>soxR</i> -RT-R	CATTGGGACGAAAGCTGTTT
<i>soxS</i> -RT-F	ACATAACCCAGGTCCATTGC
<i>soxS</i> -RT-R	ATTGACCAGCCGCTTAACAT
<i>oxyR</i> -RT-F	GAGCCAATGTTGCTGGCTAT
<i>oxyR</i> -RT-R	CGCGGAAGTGTGTATCTTCA
<i>fumC</i> -RT-F	ACCCTAACGACGACGTGAAC
<i>fumC</i> -RT-R	CCTGCAAGTGAGTACGACCA
<i>gor</i> -RT-F	GCCGATTGGTACTGTTGGTT
<i>gor</i> -RT-R	GCCGTGAATACCGACAATCT
<i>E. coli</i> 16S-RT-F	CAGAAGAAGCACCGGCTAAC
<i>E. coli</i> 16S-RT-R	ACCTGAGCGTCAGTCTTCGT

a. 底線標示部分為限制酶切位序列

附錄三、本研究中所使用培養基及藥劑配方

1. 培養基

LB medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Component	per Liter
Typtone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
→ Adjust pH to 7.0	
Additional 15 g agar for agar medium	

SOC medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Component	per Liter
Typtone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
250 mM KCl	
→ Add H ₂ O to 900 mL, adjust pH to 7.0, add water to 990 mL	
→ Autoclave	
1 M MgCl ₂	10 mL
1 M Glucose	20 mL
Additional 15 g agar for agar medium	

M9 medium (Sambrook *et al.*, 1989)

5X M9 salt	
Component	per Liter
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	42.63 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	2.5 g
NH ₄ Cl	5 g
→ Autoclave	
M9 medium	
Component	per Liter
5X M9 salt	42.63 g
1 M MgSO ₄	15 g
1 M CaCl ₂	2.5 g
40% Glucose	5 g

H ₂ O	787.9 mL
------------------	----------

Motility agar medium (Gómez-Gómez J., *et al.*, 2007)

Swimming motility assay	Swarming motility assay
1% Tryptone	1% Tryptone
0.5% NaCl	0.5% NaCl
0.5% yeast extract	0.5% yeast extract
0.3% agar	0.5% agar
→Autoclave	0.5% glucose
	→Autoclave

2. 化學藥劑

β-galactosidase activity

Z buffer (Miller, 1972)

Components	per Liter
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	16.1 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5.5 g
KCl	0.75 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.246 g
β-mercaptoethanol	2.7 mL

Genomic DNA extraction

Lysis buffer

Components	per 100 mL
50 X TAE	2 mL
3 M NaOAc	0.67 mL
20% SDS	5 mL

Alkaline lysis (Sambrook *et al.*, 1989)

Solution I

Components	per 100 mL
50 mM Glucose	2.27 mL
10 mM EDTA	2 mL
25 mM Tris-HCl (pH 8.0)	2.5 mL

Solution II

Components	per 100 mL
10 N NaOH	2 mL
20% SDS	5 mL

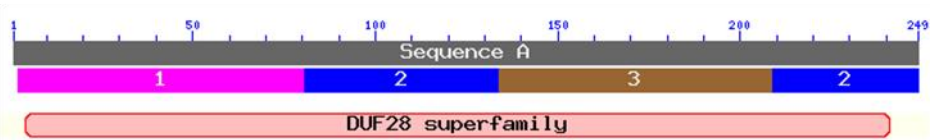
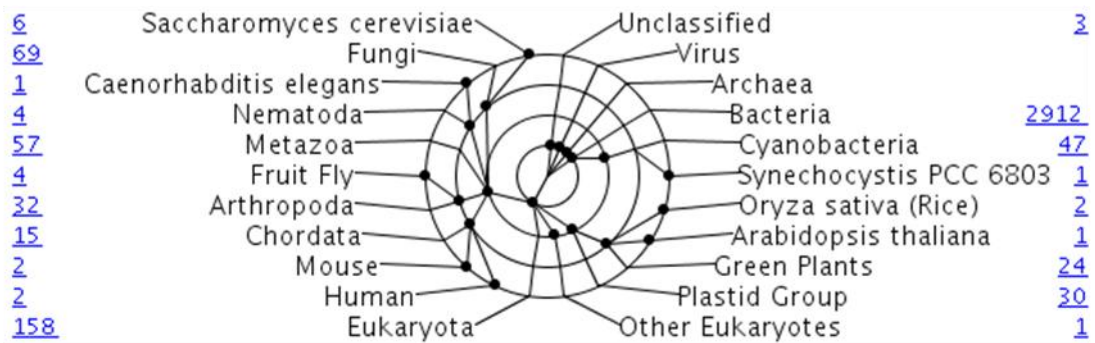
Freshly prepared

Solution III

Components	per 100 mL
KOAc	29.4 g
Glacial acetic acid	11.5 mL



(A)



(B)



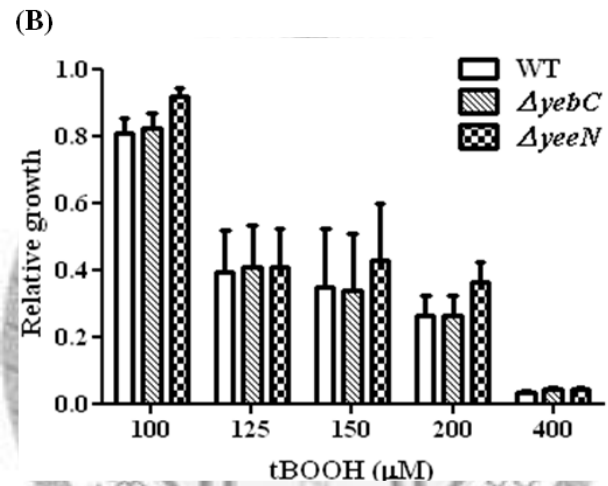
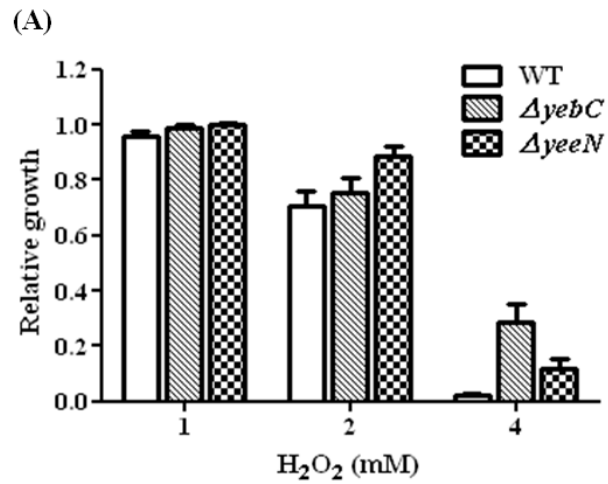
Aq : *Aquifex aeolicus*

E. coli YebC protein structure

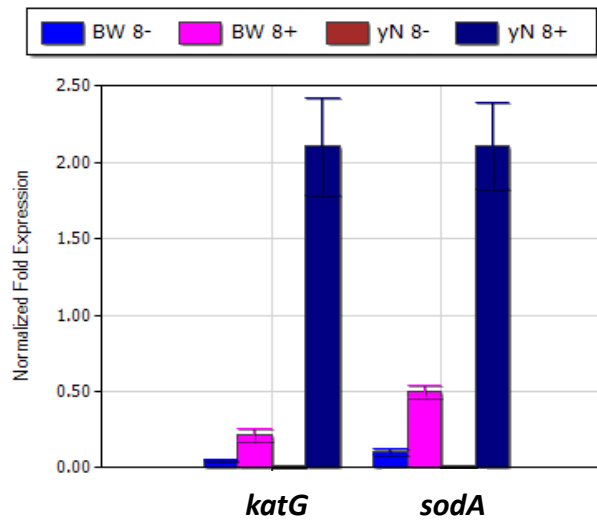
(PNAS, 2002, 99: 7980–7985)

附錄四、生物資訊分析 DUF28 蛋白質家族

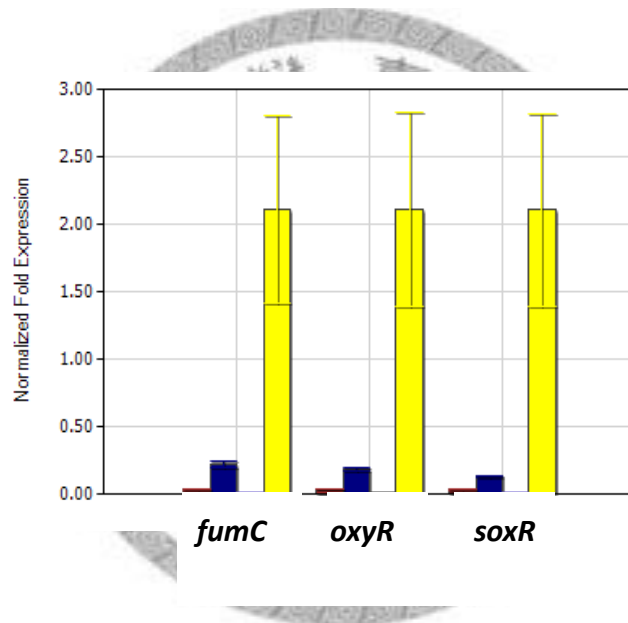
(A) 生物資訊網站 www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR002876 分析發現 DUF28 家族蛋白質普遍存在於各個物種，且並無特殊 domain。(B) 在先前研究中發現 DUF28 蛋白質其立體結構相似性頗高。



附錄五、大腸桿菌 $\Delta yebC$ 及 $\Delta yeeN$ 突變株對 H_2O_2 及 tBOOH 生長抑制濃度之測試
 (A) 在液態貧瘠培養基(M9 medium)中加入不同濃度 H_2O_2 或 (B) tBOOH，測試突變株與野生株之生長抑制情形， H_2O_2 實驗共重複十八次、tBOOH 共重複二十一次，每次均有三個數值，取所有數值計算與未處理組相除之相對生長量、平均及標準誤(SE)。

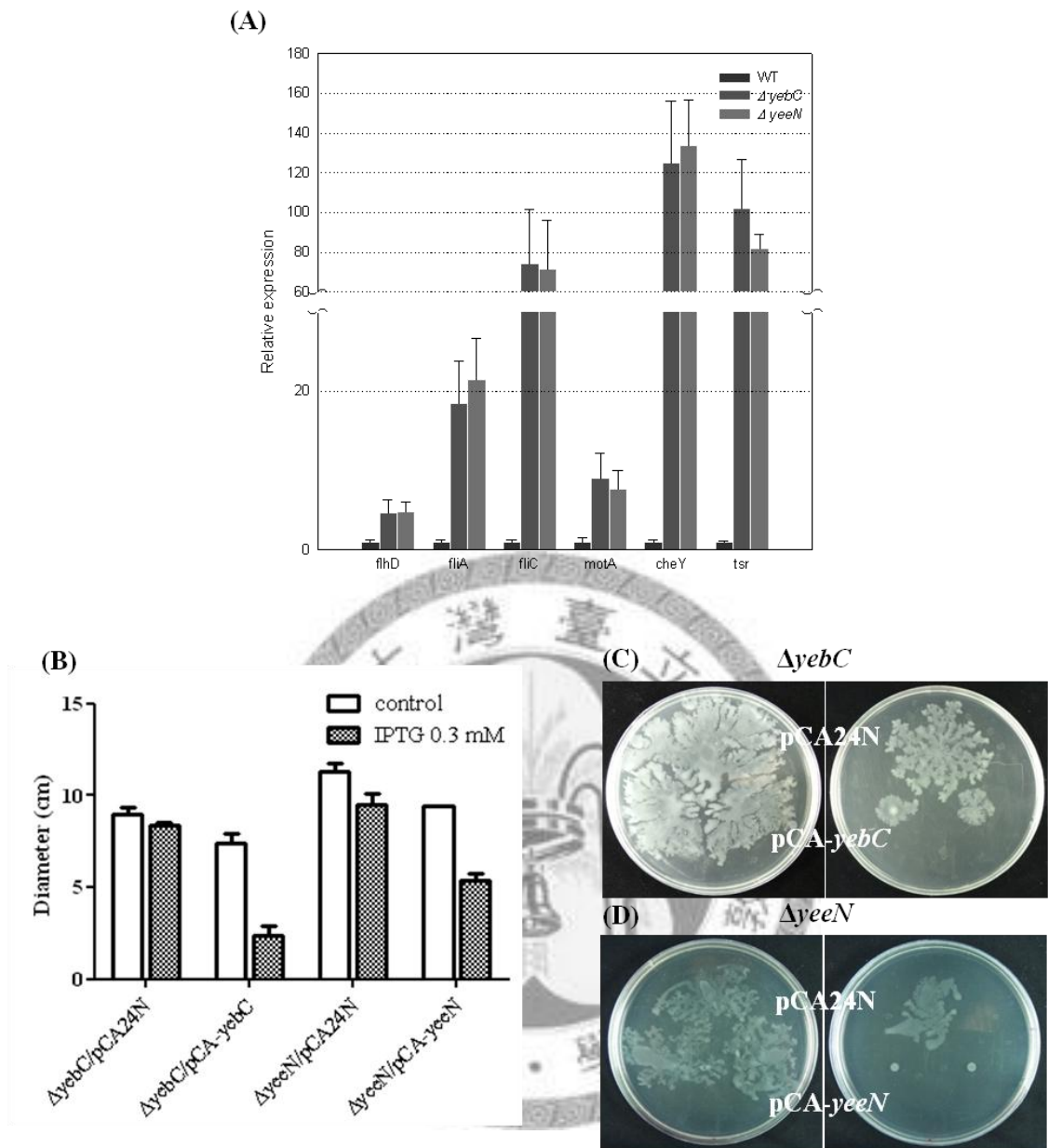


(one batch)



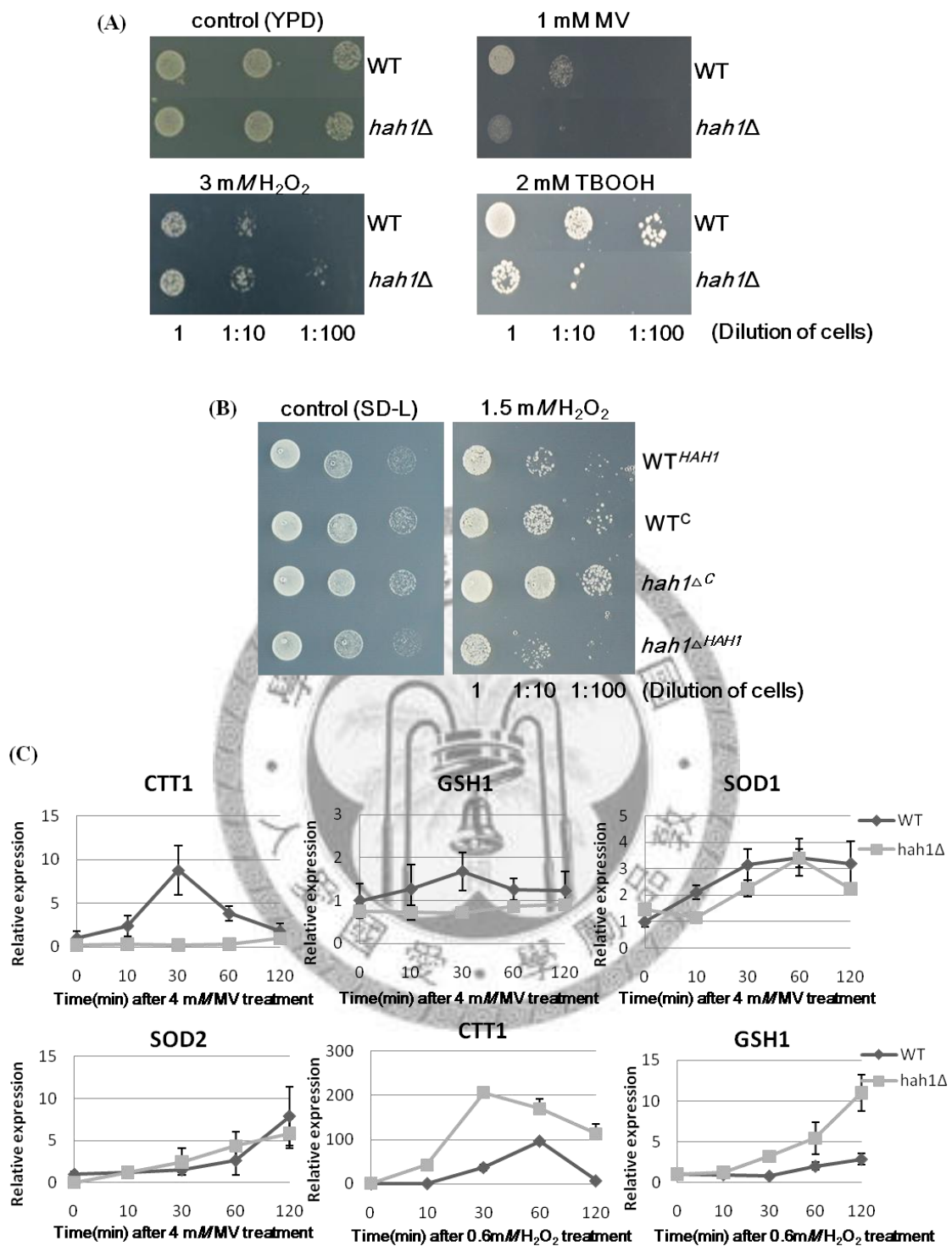
(one batch)

附錄六、以 RT-qPCR 方式檢測野生株與 *yeeN* 突變株氧化逆境相關基因之表現
 在貧瘠液態培養基(M9)添加 1 μ M paraquat 處理 8 小時進行氧化逆境相關基因(*soxR*、
fumC、*sodA*、*oxyR*、*katG*)表現量之檢測。本實驗目前僅有一次的結果。



附錄七、大腸桿菌 *yeeN* 及 *yebC* 基因參與調控鞭毛生合成 (data from Chou I.C.)

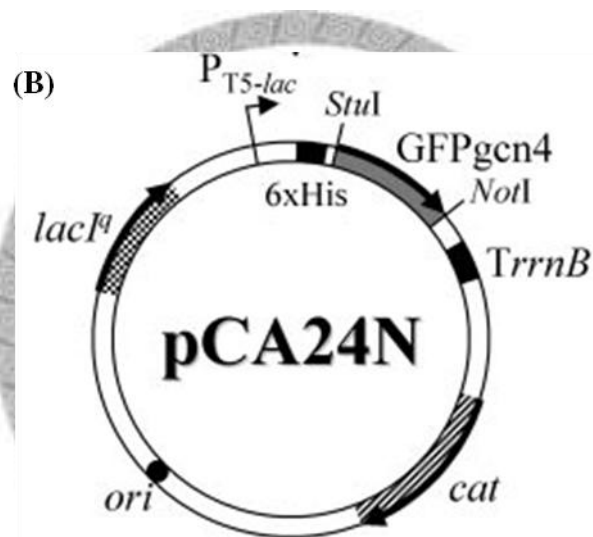
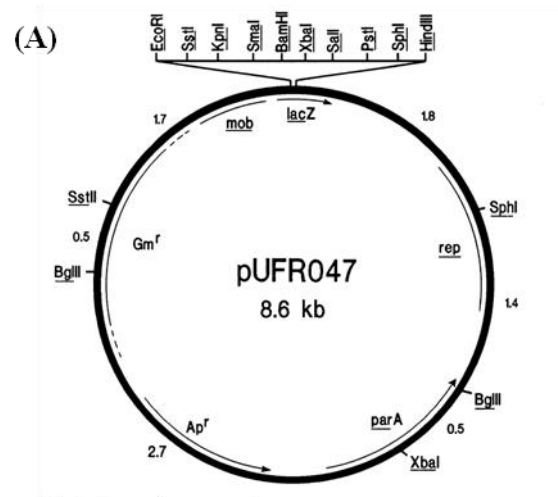
(A) 在 *yeeN* 及 *yebC* 突變株中與鞭毛生合成相關基因之表現。(B) ~ (D) 分析泳動力 (swimming motility、swarming motility) 之互補實驗驗證 *yeeN* 及 *yebC* 基因功能。



附錄八、酵母菌 DUF28 基因 (*hah1*) 參與氧化逆境之調節 (陳, 2009)

(A) $\Delta hah1$ 於不同氧化逆境之特性分析。(B) 互補實驗進一步驗證 *hah1* 之功能。

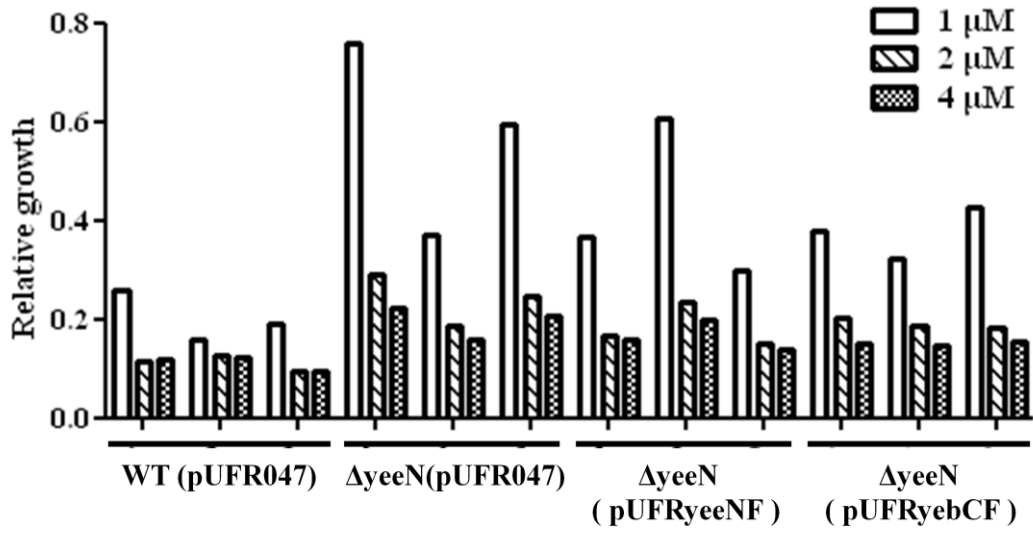
(C) 在 $\Delta hah1$ 處理不同氧化逆境下，與調節氧化逆境相關基因之表現量分析。



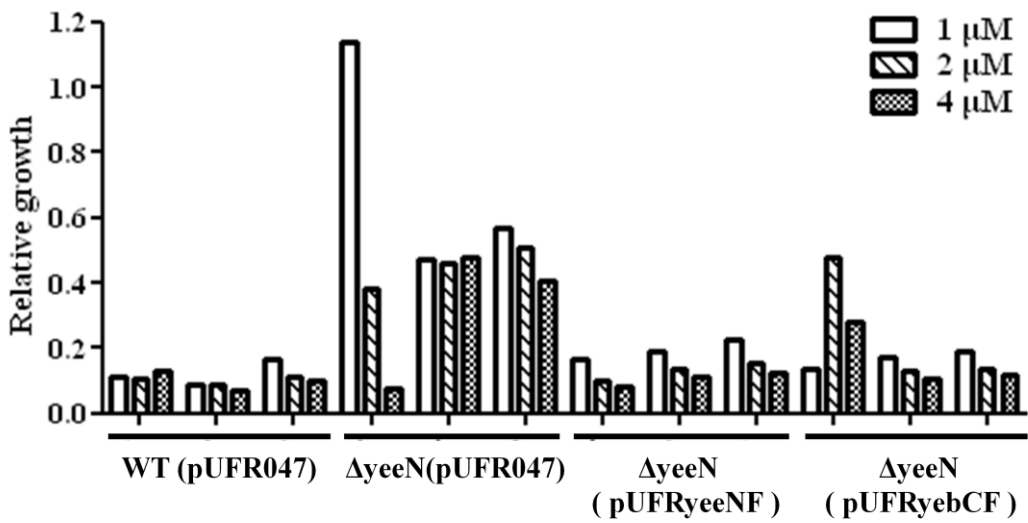
附錄九、本實驗所使用進行互補實驗之質體

(A) 泛寄主低複製數質體 pUFR047 (B) 高複製數 IPTG 誘導質體 pCA24N。

(A) Batch 1



(B) Batch 2



附錄十、 $\Delta yeeN$ 互補株 paraquat 氧化逆境檢測

(A) batch 1 實驗結果，每互補株各有三個數值。(B) batch 2 實驗結果，每互補株各有三個數值。

(A) *aspS* putative promoter sequence

tcgaccggctgttttaatgcttcagcgtaatcggcagaccagccaacgcgcaccagaaacacgggctgaccgctggcgcga
aatccgccccagctcccggcgcgattaactacctcatcgcgagatgtggaccaccggcaaaaggtaagatgcctcttgt
aaatcgatcaccaccagcgcagtggttttagcattaagttcaagcataatgactcctgaaaaacaaaatcgtgcctcacacctt
aatgcgattagccgatggcggaacgacaaatttgttaatttttatgagttcgggcaacacctttatagcaaaactggcgtagagtc
tgatttcaggccccgatataaagtggtaacgagggcgtccagcgcgggcccaggtct**ttacgg**tgccgagaat**ttc****cagtata**
atagc**cgcc****tttttc**attcagttgtacatacagctaacgctgcgacttggctacctgcgcagcagggggcatccgccggca
gctaagttaaggatattctcatgcgtacagaatattgtggacagctccgttgtcccacgtggggcagcaggtgactctgtgtg
ttgggtcaaccgtcgtcgtgatcttggtagcctgatcttcatgatatgcgcgaccgcgaaggtatcgtgcaggtattttcgatc
cggatcgtgcggacgcgttaaagctggcctctgaactgcgtaatgagttctgcaatcaggtcacgggcaccgtacgtgcgct
gacgaaaaaataattaaccgcgatatggcgaccggcgaaatcgaagtgtggcgtcctcgtgactatcatcaaccgcgcag
a

(B) *nudB* putative promoter sequence

tatccgtgacgttatcgccttcccgaaccacggcggcagcgtgctgatgactgaagcaccgagctttgctaaccgactg
cactggtgagctgagcattcaggttgaagaaggctgagaataactgatgactcaatacacgaaatcattcgcgttgat
cgaggcggcaactgagtgaaactcccatgagcatagataactatgtgaatgggatgagcgaaggcag**tcaacg**aagaggca
gcgtgaa**ggataaag****gtataagcgt**cccgtttgatetttagtggtcatctacgcacaagatacgaaacgggtgctgatgtg
cagcggcgtgacgatcccgatttctggcagtcggaaccggcagcgtggaagagggtgaaaccgcgccgaagctgccat
gcgcgaagtaaggaaga

(C) *yebC* putative promoter sequence

tgacgcgtaatacgaatcatggttctgtcttgcgctccgcacgagcggcagatcgtttcactgaacatctggttacaagt
gcttgatgcgctgctgcggcggcgtcactaagtctggagcaaccggcaggcgattgaacagtttgaattaacgctgcct
gaacaggcagggctatctggagatattttatggcaggtcatagtaaatgggccaacaccagacatc**gtaaag**ctgcgcagg
atgctaagc**cggtaaaa**ttcactaaaatcattcgtgagctgtaaccgcggctaagctggcggtggcgatccggacgc
taaccgcgctctgcgtgcggcgggtggataaagcactgtctaacaacatgaccggtgacacactgaaccgcgcaattgcacgt
gggtggtggcgggtgatgatgcaa

(D) *ruvC* putative promoter sequence

gaagtttccatgatcccgtctaccaagctgatatggatgcagaaaccgcaccgaaactgatgcgtctgatcgatgctggaa
gatt**gcga**cgcagctgcaggaag**gtttaccat**aacgggtgaaatctctgatgaggtcgcagcactctctgatgaggcctgctaa
acagcaaaacggagacgcgtgatggctattattctcggcattgatccgggttcgcgcgtgaccggctacggcgtcatccgcca
ggtaggtaggcaactgtcctacctgggtagcggatgatccgcaccaaagtggatgatttaccgtctcgtctgaaactcatctat
gcgggcgtgacggaaatcatcaccagt

附錄十一、 *asps-nudB-yebC-ruvC*、*amn*、*yeeN* 預測之啟動子片段及其與轉錄因子結合之序列。

(E) *amn* putative promoter sequence

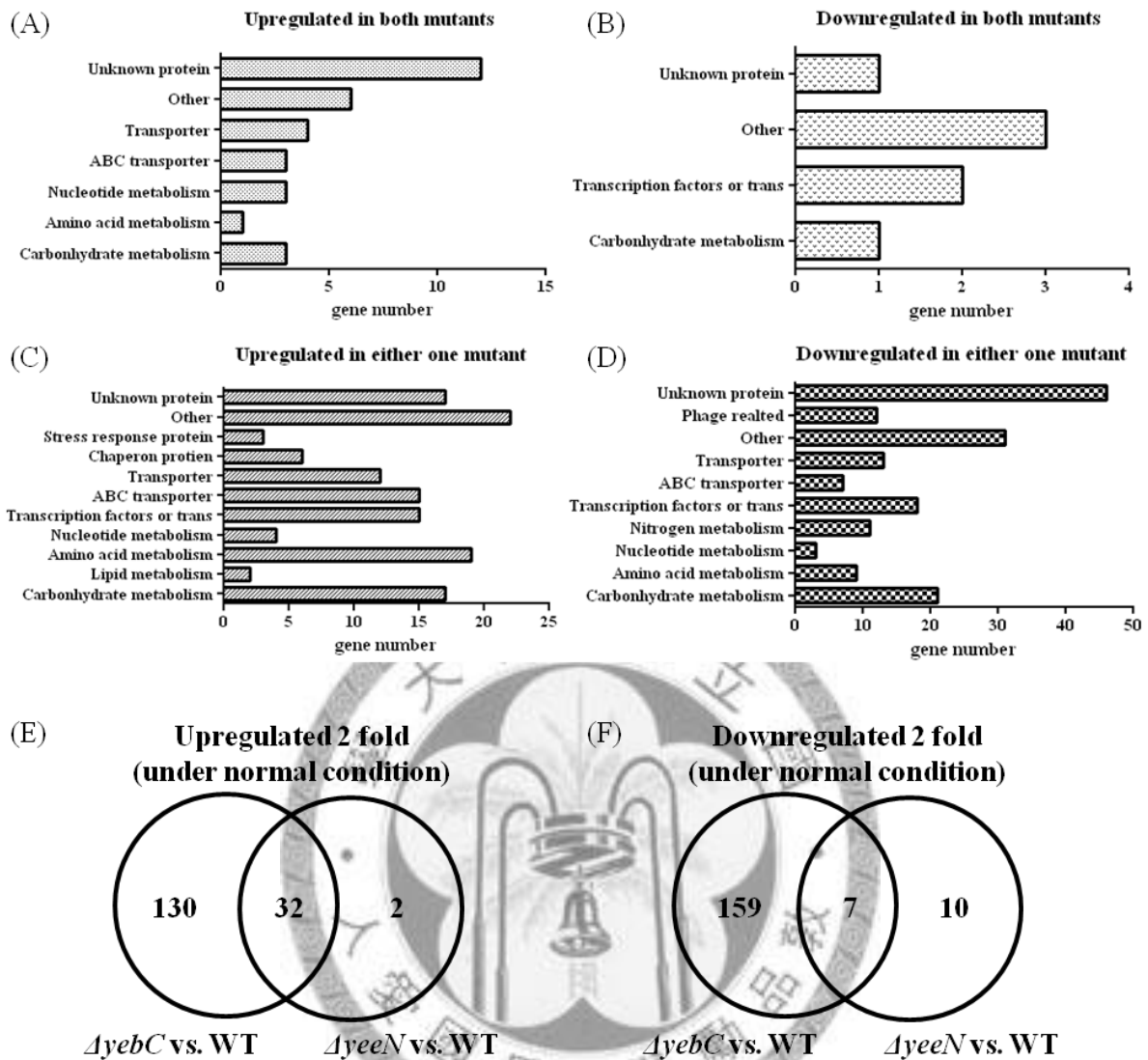
gccgctgcactcacttactttgccgggaactggcatagcgtccatttattgctggctggatgcctgattccgcaatgac
cgctttgtgatgaaagacagtcacgcgcttgatagcctggcgaagatcatccgatcttcgccttacactttgttcacatttc
tgtgacatactatcggatgtgcggttaattgatggaacaggagacacacatgaataataagggctccggctgaccccagctc
aggcactggataaactcgacgcgctgtatgagcaatctgtagtcgcattacgcaacgccattggcaactatattacaagtggcg
aattacctgatgaaaacgcccgcaacaaggtcttttctatccatcactgaccgtaacctgggacggtagcacaaccaat

(F) *yeeN* putative promoter sequence

taatgagccgccgttcgataataagttctgaaccttctatcagaaatagatgtgaaggagtaagtaagacacctggcaaatag
cctgcaataatcgtgggctgttgtcttcttgggcggatacagagtttattatcgtcttaatgattccacatataaaagcaagtatg
ctttcaaacacaaattataaaaaatcccgccaacaatataagttttataaaattaaatataagattatggctttagaataTTTTATT
tctaatagacgagTTTTTCTGTATGATATAATatgctgaattaacacatgtaacgatttaccagtaatgtaaataaatttctg
aggagatcattccagtgggacgtaaattggccaatattgt

附錄十一、 *asps-nudB-yebC-ruvC*、*amn*、*yeeN* 預測之啟動子片段及其與轉錄因子
結合之序列 (續)

nnnn：表示預測 -35 box 序列；nnnn：表示預測 -10 box 序列；nnnn：表示預測
rpoD 15、16、17 或 18 結合序列；nnnn：表示預測 *metR* 結合序列；nnnn：表示
預測 *metJ* 結合序列；nnnn：表示預測 *deoR* 結合序列；nnnn：預測 *argR2* 或 *inf*
結合序列。



附錄十二、 *E. coli* 在正常環境下可能被 *yeeN* 或 *yebC* 所影響的基因群其功能分類
大腸桿菌野生株與突變株 ($\Delta yeeN$ 及 $\Delta yebC$) 在豐富液態培養基 (LB medium) 中
培養 2~3 小時後收取樣本並抽取 RNA 進行微陣列分析(microarray analysis)。(A)
在兩突變株中其基因表現皆較於野生株提高兩倍之基因群。(B) 在兩突變株中相
較於野生株其基因表現皆降低兩倍之基因群。(C) 在 $\Delta yeeN$ 或 $\Delta yebC$ 中該基因表
現皆有較野生株提高兩倍之基因群。(D) 在 $\Delta yeeN$ 或 $\Delta yebC$ 中該基因表現皆有較
野生株降低兩倍之基因群。(E) 基因表現提升兩倍之基因群維恩交集圖。(F) 基
因表現降低兩倍之基因群維恩交集圖。

附錄十三、綜合 YeeN-GFP 及 YebC-GFP 蛋白質分佈情形之整理

			YeeN		YebC	
Medium	IPTG conc.	0.6 mM paraquat treatment	Cell size and morphology	Aggregation	Cell size and morphology	Aggregation
LB	0.1 mM	-		對數期 (log phase) 出現聚集		停滯後期 (late stationary phase) 出現聚集
	0.1 mM	+	較小，部分呈鏈狀	延遲期 (lag phase) 出現聚集	較小，部分呈鏈狀	未聚集
	0.3 mM	-	較長	對數早期 (early log phase) 出現聚集	較長	停滯後期 (late stationary phase) 出現聚集
	0.3 mM	+	較小，部分呈鏈狀，16 小時後略為延長	延遲早期 (early lag phase) 出現聚集	較小，部分呈鏈狀，16 小時後略為延長	未聚集
M9	0.1 mM	-	較 LB 中略短	延遲期 (lag phase) 出現聚集	較 LB 中略短	
	0.3 mM	-	較 LB 中略短	延遲期 (lag phase) 出現聚集	較 LB 中略短	

附錄十四、大腸桿菌微陣列資料庫中可能參與調控 *yeeN* 或 *yebC* 基因表現之上游基因，其突變株生物資訊、特性分析及 *yeeN* 啟動子在不同突變株中於貧瘠培養基(M9)之表現情形

Gene name	<i>recA</i>	<i>relA</i>	<i>norR</i>	<i>glnG</i>
Function	DNA strand exchange and recombination protein with protease and nuclease activity -- enzyme; DNA replication, repair, restriction/modification	---(p)ppGpp synthetase I/GTP pyrophosphokinase ---enzyme; Global regulatory functions	---DNA-binding transcriptional activator ---putative regulator; Not classified	---fused DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with GlnL: sigma54 interaction protein ---regulator; Amino acid biosynthesis: Glutamine
Mutants phenotype ^a	Temperature, UV sensitive	Pleiotropic phenotype temperature sensitive	Sensitive to nitroprusside & NO; resistance to quinolones	Temperature sensitive increase nitrogen regulator I
Swimming motility ^b	1.05 cm	3 cm	1.35 cm	4.23 cm
Paraquat tolerance ^c	↑	↓	↑	=
<i>yebC</i> expression ^d	↑	---	-2.22	2.14
<i>yeeN</i> expression ^e	↑	-7.941~26	---	---
<i>yeeN</i> promoter activity (6hr, -) ^f	0.64	0.5	1.01 / 0.39	---
<i>yeeN</i> promoter activity (6hr, +) ^g	0.47	0.91	0.39	---
<i>yeeN</i> promoter activity (24hr, -) ^h	0.82	0.81	1.2	---
<i>yeeN</i> promoter activity (24hr, +) ⁱ	1.04	0.65	90 0.65	---

附錄十四、大腸桿菌微陣列資料庫中可能參與調控 *yeeN* 或 *yebC* 基因表現之上游基因，其突變株生物資訊、特性分析及 *yeeN* 啟動子在不同突變株中於貧瘠培養基(M9)之表現情形 (續)

Gene name	<i>fur</i>	<i>parC</i>	<i>hns</i>	<i>baeR</i>
Function	---DNA-binding transcriptional dual regulator of siderophore biosynthesis and transport ---regulator; Global regulatory functions	---DNA topoisomerase IV, subunit A ---enzyme; DNA replication, repair, restriction/modification	---global DNA-binding transcriptional dual regulator H-NS ---regulator; Basic proteins - synthesis, modification	---DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with BaeS ---regulator; RNA synthesis, modification, DNA transcription
Mutants phenotype ^a	Slow growth hypersensitive to acid and H ₂ O ₂	---	Decrease in motility and flagella number delay growth	---
Swimming motility ^b	1.35 cm	0.55 cm	2.08 cm	1.3 cm
Paraquat tolerance ^c	=	↑	↑	=
<i>yebC</i> expression ^d	2.03 ~ 2.28	↓	6.31	15
<i>yeeN</i> expression ^e	---	↓	---	---
<i>yeeN</i> promoter activity (6hr, -) ^f	---	0.82	1.12	---
<i>yeeN</i> promoter activity (6hr, +) ^g	---	0.63	0.8	---
<i>yeeN</i> promoter activity (24hr, -) ^h	---	0.92	2.15	---
<i>yeeN</i> promoter activity (24hr, +) ⁱ	---	0.58	91	0.8

附錄十四、大腸桿菌微陣列資料庫中可能參與調控 *yeeN* 或 *yebC* 基因表現之上游基因，其突變株生物資訊、特性分析及 *yeeN* 啟動子在不同突變株中於貧瘠培養基(M9)之表現情形 (續)

Gene name	<i>yliH (bssR)</i>	<i>yceP (bssS)</i>
Function	---conserved protein ---putative factor; Not classified (Blast =>biofilm regulator)	---predicted protein (Blast =>biofilm regulator)
Mutants phenotype ^a	Increase in biofilm formation,	Increase in biofilm formation, motility increase
Swimming motility ^b	1.83 cm	4.55 cm
Paraquat tolerance ^c	=	=
<i>yebC</i> expression ^d	---	---
<i>yeeN</i> expression ^e	3.38	4.06
<i>yeeN</i> promoter activity (6hr, -) ^f	---	---
<i>yeeN</i> promoter activity (6hr, +) ^g	---	---
<i>yeeN</i> promoter activity (24hr, -) ^h	---	---
<i>yeeN</i> promoter activity (24hr, +) ⁱ	---	---

a. 經文獻報導，大腸桿菌中該基因突變其突變株之特性。---表示未搜尋該突變株之特性分析

b. 突變株經泳動能力特性分析之半徑測量結果，單位為公分，野生株 (BW25113) 為 1.5 ~ 2 cm。

c. 測試突變株對 paraquat 氧化逆境之生長抑制情形，計算與對照組相除後之相對生長量。↑ 表示與野生株相比其耐受度增加，↓ 表示與野生株相比其耐受度降低，= 表示與野生株相比耐受度相當。

- d. 微陣列資料庫中 *yebC* 於該突變株之表現量。數值表示基因變化量（倍率），負號表示表現量下降，未標示則為表現量上升，--- 表示在該突變株中 *yebC* 基因表現並未有兩倍上下的變化。
- e. 微陣列資料庫中 *yeeN* 於該突變株之表現量。數值表示基因變化量（倍率），負號表示表現量下降，未標示則為表現量上升，--- 表示在該突變株中 *yeeN* 基因表現並未有兩倍上下的變化。
- f. 生長早期突變株除以野生株之 *yeeN* 啟動子相對表現量，- 表示正常生長情況未處理氧化逆境，--- 表示未測定。
- g. 生長早期處理 paraquat 除以 no treat 之 *yeeN* 相對表現量，+ 表示處理 0.8 μM paraquat，--- 表示未測定。
- h. 生長後期突變株除以野生株之 *yeeN* 啟動子相對表現量，- 表示正常生長情況未處理氧化逆境，--- 表示未測定。
- i. 生長後期處理 paraquat 除以 no treat 之 *yeeN* 相對表現量，+ 表示處理 0.8 μM paraquat，--- 表示未測定。



