

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis



探討造成社區性感染及院內感染之克雷伯氏肺炎桿菌

對氨苄青黴素抗藥性之機制

Ampicillin resistant mechanism (s) in

community-acquired and nosocomial infection *Klebsiella*

pneumoniae strains

詹佳育

Chia-Yu Chan

指導教授：王錦堂 博士

Advisor: Jin-Town Wang, Ph.D.

中華民國 112 年 7 月

July 2023



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書
MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

(論文中文題目) (Chinese title of Master's thesis)

探討造成社區性感染及院內感染之克雷伯氏肺炎桿菌對氟苄青黴素
抗藥性之機制。

(論文英文題目) (English title of Master's thesis)

Ampicillin resistant mechanism(s) in a community-acquired and nosocomial infection
Klebsiella pneumoniae strain.

本論文係 詹佳育 (姓名) R09445106 (學號) 在國立臺灣大學
微生物學 (系/所/學位學程) 完成之碩士學位論文，於民國 112 年
7 月 25 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Department / Institute of Microbiology
on 25 (date) 7 (month) 2023 (year) have examined a Master's thesis entitled above presented
by Chan chia yu (name) R09445106 (student ID) candidate and hereby certify
that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

王錦堂

(指導教授 Advisor)

賴信志


林炳毅
李信志
李信志

系主任/所長 Director: 蔡

誌謝

時光荏苒，歲月如梭，沒想到在台大念碩班的日子就這樣到尾聲了。感謝當初王錦堂老師答應了我的請求，讓我能夠進入到 R739 這個有歸屬感的實驗室，讓我能往後的兩年能夠平順的專注在我的專題上。感謝佩芳學姊總是包容我的騷擾，在我有疑惑時，不厭其煩的為我解答，替我想到解方；除了課業上，平常也很關心我的身體健康，以及替我操心各種我遺漏的小細節，真的很榮幸遇見這麼好的大學姐，我會非常想念妳的！感謝宗璇和禦寒也總是接納我的提問，你們總是很耐心的教導我所有實驗的細節，遇到難題也會幫我想辦法解決。除了學業方面，你們也很積極的提升實驗室的氣氛，讓工作環境變得很愉快，經常幫忙籌畫實驗室旅遊的所有行程，根本是超級可靠大姊姊，接下來無法經常聽到你們的玩笑話，我肯定會不習慣的！感謝已經畢業的庭萱跟漢甦，將自己做實驗跟寫論文的經驗傳授給我們，平常也都陪我們聊天紓壓一起話家常。還很謝謝柏佑手把手教了我很多實驗小撇步，過去的一年中互相分享了很多心事，而且你總是呈現陽光正向的一面，給了我很多建議，雖然目前還沒履行我們的約定，但也希望未來你可以成功完成自己的目標，加油！很謝謝我最給力的夥伴們，士瑄和曉蝶，這兩年能和你們一起度過碩班各種歡樂以及艱難的時光我真的很幸運了，志同道合的工作夥伴真的是件難能可貴的事，謝謝你們的善解人意、鼓勵還有耐心傾聽，我真的捨不得跟你們說再見，未來有空一定要再聚首！謝謝鬧哄哄的彥茹、好軒、小庭萱和惠萱，你們的鬥嘴與嬉鬧帶給實驗室許多歡笑，也在我需要的時候給我幫助，願意聽我分享生活中的喜怒哀樂，你們真的是一群很勾錐的學妹，你們接下來的各種報告及考驗都會順利通過的，別擔心！謝謝 R739 這個大家庭，大家都和樂融融的相處，不分你我之外還會互相照顧，讓我在研究所的這兩年充滿歡笑，我一定會銘記這段時光的。

中文摘要



克雷伯氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 是現今常見於院內感染及社區型感染的病原菌，其抗藥性發展日益嚴重，不只已經對廣譜的乙內醯胺 (β -lactam) 類抗生素產生大幅的抗藥性，連原本能有效治療具有廣效性乙內醯胺酶 (Extended spectrum β -lactamases) 之克雷伯氏肺炎桿菌感染的碳青黴烯類 (Carbapenem) 抗生素也失去功效。最早被發現克雷伯氏肺炎桿菌具有抗藥性的抗生素是隸屬於青黴素類 (Penicillin) 的氨苄青黴素 (Ampicillin)，起因於克雷伯氏肺炎桿菌染色體上本來就有編碼盤尼西林酶 (Penicillinase) 的基因 *shv-1*，因此能水解這類抗生素。本研究想了解在台大醫院收集到之臨床菌株 NTUH-K2044 對於氨苄青黴素具有抗藥性，其機制為何。因此透過先前實驗室已建立好帶有 mini-Tn5 跳躍基因的 NTUH-K2044 菌株跳躍子突變株庫 (Transposon mutant library) 來篩選目標突變株，篩到了兩株突變株在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青黴素下生長情況相對不佳，進而定序比對結果。發現跳躍子插入 *guaB* 基因中，此基因的產物為肌苷單磷酸去氫酶 (Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, IMPDH)，在三磷酸鳥苷 (Guanosine triphosphate, GTP) 和鳥嘌呤 (Guanine) 的合成途徑上是重要的催化酵素，也會進而影響 DNA 和 RNA 合成以及細胞增生。因此，我們將此基因剔除，觀察其最小抑菌濃度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 變化。接著對剔除 *guaB* 基因後的菌株做了鳥嘌呤回補試驗，發現無論氨苄青黴素加入與否，都不影響突變株，因此推論 *guaB* 基因影響 NTUH-K2044 生長，並非參與對氨苄青黴素的抗藥機制。之後利用 NTUH-K2044 已知的全基因序列 (Whole genome sequence) 進行比對，找出其基因體上和乙內醯胺酶相關的基因 *shv11*，建構缺失突變株後測試其氨苄青黴素的最小抑菌濃度，比起參考菌株下降了 32 倍，表示 *shv11* 確實參與了 NTUH-K2044 對氨苄青黴素的抗藥機制。此外，也針對一株造成院內感染的碳青黴烯類耐藥克雷伯氏肺炎桿菌菌株 (carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP) CB28 進行乙內醯胺酶相關

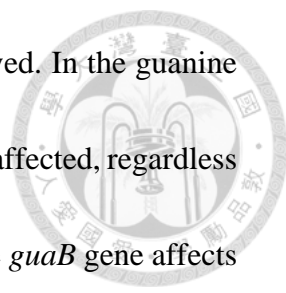
基因的剔除，分別是 *shv1*、*shv2*、*toho1*、*kpc* 基因，已成功獲取 *shv1*、*toho1*、*kpc* 等三株缺失突變株及 *kpc*、*toho1* 雙重基因缺失突變株，但進行抗生素感受試驗時，其最小抑菌濃度皆沒有下降，直到使用舒巴坦 (Sulbactam) 乙內醯胺酶抑制劑輔助氨基青黴素活性時 *shv1*、*kpc* 基因缺失突變株及 *kpc*、*toho1* 雙重基因缺失突變株才有下降大於 4 到 8 倍的現象。

關鍵詞: 克雷伯氏肺炎桿菌、抗藥性、氨基青黴素、*guaB*、IMPDH 及 *shv11*

Abstract



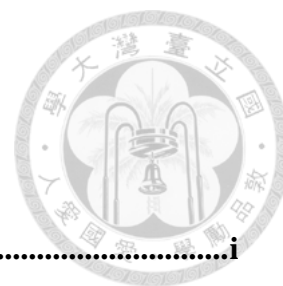
Klebsiella pneumoniae is a common pathogen responsible for both hospital-acquired and community-acquired infections. The development of antimicrobial resistance in this bacterium has become a serious concern, as it has not only acquired extensive resistance to broad-spectrum β -lactam antibiotics but also rendered carbapenem, which were once effective against extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *K. pneumoniae* infections. The initial discovery of antibiotic resistance in *K. pneumoniae* was associated with ampicillin, a member of the penicillin class, due to the presence of the gene *shv1* encoding penicillinase on the bacterial chromosome, which could hydrolyze such antibiotics. This study aimed to understand the mechanisms of resistance to ampicillin in clinical strain NTUH-K2044 collected from National Taiwan University Hospital. To investigate this, a transposon mutant library of NTUH-K2044 containing mini-Tn5 transposons was employed for screening target mutants. Two mutants with compromised growth under 100 μ g/mL of ampicillin were identified and subjected to sequencing analysis. The insertion of the transposon in the *guaB* gene was found, which encodes inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH), a critical catalytic enzyme involved in the synthesis of guanosine triphosphate (GTP) and guanine, affecting DNA and RNA synthesis as well as cell proliferation. However, the deletion of the *guaB* gene in NTUH-K2044 was performed, and the changes in the



minimum inhibitory concentration (MIC) of ampicillin were observed. In the guanine supplementation test, the growth of the *guaB* mutant strains was not affected, regardless of the presence of ampicillin. Consequently, we hypothesize that the *guaB* gene affects the growth condition of NTUH-K2044 but does not participate in the resistance mechanism. Further analysis using the whole-genome sequence of NTUH-K2044 identified the presence of the β -lactamase-associated gene *shv11*. Constructing a *shv11* deletion mutant and testing its MIC against ampicillin showed a 32-fold decrease compared to the reference strain, indicating the involvement of *shv11* in ampicillin resistance in NTUH-K2044. Additionally, the study focused on a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) strain, CB28, causing hospital-acquired infections. Deletion β -lactamase-associated genes, including *shv1*, *shv2*, *toho1* and *kpc* were performed. Although three single gene deletion mutants (*shv1*, *toho1* and *kpc*) and one double gene deletion mutant (*kpc* and *toho1*) were obtained, none of them showed reduced MIC against ampicillin. However, the combination of sulbactam, a β -lactamase inhibitor, and ampicillin led to a significant 4 to 8-fold decrease in MIC for *shv1*, *kpc* single gene deletion mutants and *kpc*. *toho1* double gene deletion mutant.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Intrinsic resistance, Ampicillin, guanine, *guaB* and *shv11*.

目錄



口試委員會審定書	i
誌謝.....	ii
中文摘要	iii
Abstract.....	v
目錄.....	vii
表目錄	x
圖目錄	xi
第一章、 緒論.....	1
1.1 克雷伯氏肺炎桿菌簡介 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	1
1.2 乙內醯胺酶	1
1.3 具廣效性乙內醯胺酶之克雷伯氏肺炎桿菌	3
1.4 碳青黴烯類耐藥克雷伯氏肺炎桿菌出現	3
1.5 乙內醯胺酶分型命名	4
1.6 克雷伯氏肺炎桿菌的固有抗藥性	4
1.7 SHV 型別乙內醯胺酶	5
1.8 克雷伯氏肺炎桿菌多重抗藥性及用藥演進	5
1.9 氮苄青黴素	6
1.10 舒巴坦	7
1.11 肌苷單磷酸去氫酶	8
1.12 細菌之肌苷單磷酸去氫酶藥物發展現狀	9
1.13 研究動機	10
第二章、 實驗材料與方法	11

2.1	實驗材料	11
2.1.1	菌株及跳躍子突變株庫 (Strains and transposon mutant library)	11
2.1.2	質體 (Plasmids)	11
2.1.3	培養基 (Media)	11
2.1.4	抗生素 (Antibiotics)	11
2.1.5	化合物與試劑 (Chemicals and reagents)	11
2.1.6	引子 (Primers)	11
2.1.7	儀器 (Instrument)	11
2.2	實驗方法	12
2.2.1	抗生素感受性試驗 (Antibiotic susceptibility test)	12
2.2.2	跳躍子突變菌株之篩選 (Transposon mutant library)	13
2.2.3	菌落生成單位計數 (Colony forming unit counting)	13
2.2.4	半隨機聚合酶鏈反應 (Semi-random polymerase chain reaction, Semi-random PCR)	14
2.2.5	定序分析 (Sequence analysis)	15
2.2.6	聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)	16
2.2.7	反向聚合酶連鎖反應 (Inverse polymerase chain reaction, Inverse PCR)	17
2.2.8	瓊脂糖凝膠電泳 (Agarose gel electrophoresis)	17
2.2.9	細菌質體 DNA 之萃取 (Plasmid DNA extraction)	17
2.2.10	製作勝任細胞 (Competent cell)	18
2.2.11	電穿孔 (Electroporation)	19
2.2.12	建構缺失突變株 (Construction of deletion mutant)	19
2.2.13	測量生長曲線 (Growth curve)	21

2.2.14	體外補充鳥嘌呤試驗 (Supplement with guanine)	21
第三章、	實驗結果	23
3.1	篩選具氨基青黴素低抗性之 NTUH-K2044 跳躍子突變株	23
3.2	目標突變株之跳躍子插入位置分析	23
3.3	建構 <i>guaB</i> 基因缺失突變株	23
3.4	突變株之菌落型態及生長曲線	24
3.5	體外補充鳥嘌呤培養及觀察生長曲線	24
3.6	建構 <i>shv11</i> 基因缺失突變株	25
3.7	觀察 CB28 的乙內醯胺酶基因對其氨基青黴素抗藥性的影響	25
3.8	觀察舒巴坦抑制乙內醯胺酶之效果	26
第四章、	討論及未來展望	28
參考文獻		30
表		38
圖		56

表目錄

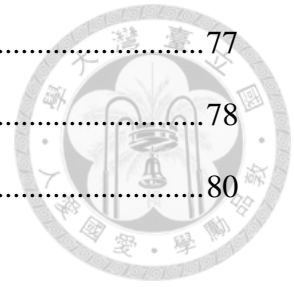


表 一、本研究使用之菌株	38
表 二、本研究使用之質體	39
表 三、本研究使用之培養基	40
表 四、本研究使用之抗生素	41
表 五、氯苄青黴素培養盤不同濃度之配置	42
表 六、氯苄青黴素和舒巴坦複方培養盤不同濃度之配置	43
表 七、本研究使用之化合物與試劑	44
表 八、本研究使用之引子	45
表 九、半隨機聚合酶連鎖反應之配置與反應條件	50
表 十、各菌株對氯苄青黴素的最小抑菌濃度	52
表 十一、加入鳥嘌呤後各菌株對氯苄青黴素的最小抑菌濃度	53
表 十二、CB28 菌株中和乙內醯胺酶相關之基因	54
表 十三、加入舒巴坦後各菌株對氯苄青黴素的最小抑菌濃度	55

圖目錄

圖 一、篩選對氯苄青黴素具有較低抗藥性 NTUH-K2044 跳躍子突變株	56
圖 二、對氯苄青黴素具有低抗性之 NTUH-K2044 跳躍子突變株分析	57
圖 三、目標突變株之跳躍子插入基因位置	59
圖 四、建構 NTUH-K2044 菌株 <i>guaB</i> 基因缺失之 pKO3-Km: Δ <i>guaB</i> 質體	60
圖 五、 <i>guaB</i> 基因缺失突變株建構之示意圖	61
圖 六、NTUH-K2044 之 <i>guaB</i> 基因缺失突變株	62
圖 七、菌落型態差異	63
圖 八、突變株培養基之生長曲線	64
圖 九、觀察補充鳥嘌呤後各菌株生長情形變化	65
圖 十、突變株在含有鳥嘌呤之培養基之生長曲線	67
圖 十一、利用不含抗生素 MH 培養基確認 NTUH-K2044 跳躍子突變株生長情形	68
圖 十二、建構 NTUH-K2044 菌株乙內醯胺酶 <i>shv11</i> 基因缺失之 pKO3-Hyg: Δ <i>shv11</i> 質體	69
圖 十三、Beta lactamase 基因缺失突變株建構示意圖	70
圖 十四、NTUH-K2044 之 <i>shv11</i> 基因缺失突變株	71
圖 十五、CB28 菌株 <i>shv1</i> 基因和 NTUH-K2044 菌株 <i>shv11</i> 基因及側翼區域核 甘酸序列比對結果	72
圖 十六、建構 CB28 菌株乙內醯胺酶 <i>kpc</i> 基因缺失之 pKO3-Hyg: Δ <i>kpc</i> 質體 ..	74
圖 十七、建構 CB28 菌株乙內醯胺酶 <i>toho1</i> 基因缺失之 pKO3-Hyg: Δ <i>toho1</i> 質 體	75
圖 十八、建構 CB28 菌株乙內醯胺酶 <i>shv2</i> 基因缺失之 pKO3-Hyg: Δ <i>shv2</i> 質體	76
圖 十九、建構 CB28 菌株乙內醯胺酶 <i>shv2</i> 基因內有卡納黴素卡匣插入之	

pKO3-Hyg-shv2::Km 質體	77
圖 二十、CB28 菌株之 beta lactamase 相關基因缺失突變株.....	78
圖 二十一、CB28 菌株之 <i>kpc</i> 及 <i>toho1</i> 雙重基因缺失突變株.....	80



第一章、緒論



1.1 克雷伯氏肺炎桿菌簡介 (*Klebsiella pneumoniae*)

克雷伯氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 是隸屬於腸內桿菌科 (*Enterobacteriaceae*) 的革蘭氏陰性菌，會行兼性厭氧作用，普遍存在環境中，是一種伺機性感染的病原細菌，平時少量存在於健康人體的呼吸道或腸道中，對免疫力下降的病人會造成嚴重感染，像是肺炎、尿道感染 (Urinary Tract Infection)、菌血症 (Bacteremia) 以及化膿性肝膿瘍 (Pyogenic liver abscess, PLA) [1, 2]。而且除了院內感染之外，近年來社區型感染更逐漸攀升。在台灣，克雷伯氏肺炎桿菌是在糖尿病病患中引起化膿性肝膿瘍的最常見的病原體，和糖尿病人發生肝膿瘍後併發眼內炎也具有相關聯性，嚴重者可能會失明；也可能併發肺部敗血性栓塞或是造成腦膜炎[3]。

克雷伯氏肺炎桿菌造成疾病常見的致病因子之一是細菌的表面抗原[4]，菌體的表面包含兩種類型的抗原，一是 K 抗原，由莢膜多醣體 (Capsule polysaccharide, CPS) 所組成，其成分中含有尿羧基酸 (Uronic acid)，CPS 上的酸性組成可以使菌體表面具有黏性表現[5]。目前依照傳統血清分類法已得知有 77 種不同型別，再加上基因分型，總數約有 134 種之多[6, 7]。二是 O 抗原，成分為脂多醣 (Lipopolysaccharide, LPS)，目前已發現 9 種型別以及 2 種亞型存在[6, 8]。莢膜可使細菌對抗免疫細胞吞噬 (Phagocytosis) 以及對抗補體殺菌的能力。

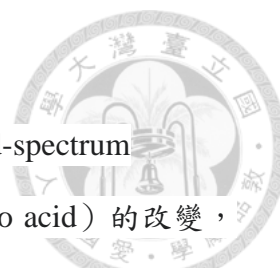
1.2 乙內醯胺酶

起初治療克雷伯氏肺炎桿菌最常使用的抗生素是屬於乙內醯胺 (β -lactam) 類的抗生素，乙內醯胺類的抗生素至今已廣泛使用，且其種類多樣，凡是化學結構內含有乙內醯胺環狀結構 (β -lactam ring) 都隸屬於此類，像是青黴素 (Penicillin)、頭芽孢菌素 (Cephalosporine)、單醯胺環類 (Monobactam) 及碳

青黴烯類 (Carbapenem) 抗生素。乙內醯胺類的抗生素屬於殺菌劑 (Bactericidal agent)，其作用機轉為抑制細菌細胞壁中肽聚糖 (Peptidoglycan) 的形成，因此通常兼用於對抗革蘭氏陽性菌與革蘭氏陰性菌[9]。然而這類抗生素存在著勁敵，某些革蘭氏陰性菌體內存在著乙內醯胺酶 (β -lactamase)，是一種可破壞乙內醯胺類抗生素結構的水解酶，進而產生強大的抗藥性，為臨床上帶來一大難題[10]。近幾十年來，這個現象也出現在克雷伯氏肺炎桿菌上，目前已知對乙內醯胺類抗生素產生抗藥性的機轉，除了利用乙內醯胺酶分解藥物而失去活性以外，還能通過外膜通道孔蛋白 (Outer membrane porin) 突變造成藥物通透性降低，以及從菌體內運出藥物進而達到目的，但其中還是以乙內醯胺酶為主流[11]。

編碼乙內醯胺酶基因的名稱為 *bla*，坐落在細菌的染色體或質體上；乙內醯胺酶可根據受質的不同以及序列的差異產生眾多不同的分型。乙內醯胺酶的分類系統多樣，主要是根據 Ambler 分類法，透過酵素胺基酸序列的不同以及系統發育關係來做分類；或是根據 Bush-Jacoby 分類系統，透過不同的化學活性及受質特性來做分類。依照 Ambler 分類方式來看，可將乙內醯胺酶分成 A、B、C、D 四大類；B 類乙內醯胺酶作用時需要金屬鋅的輔助，其是透過類似於金屬蛋白酶 (Metalloproteases) 的機制裂解乙內醯胺藥物，A、C、D 類則是透過類似於絲氨酸 (Serine) 蛋白酶的機制裂解乙內醯胺抗生素[12]。

首先，廣譜 (Broad spectrum) 乙內醯胺酶被歸類在 A 大類中的主要分型有 TEM、SHV、CTX-M，可分解的抗生素有氨苄青黴素、盤尼西林及第三代頭孢菌素 (Cephalosporin)；B 類中沒有一般的廣譜乙內醯胺酶，皆為強勁的碳青黴烯酶 (Carbapenemases)；C 類中則內含可以分解頭黴素 (Cephamicin) 及第三代頭孢菌素的廣譜乙內醯胺酶，分型主要有 AmpC 等等；D 類則包含 OXA，也能水解氨苄青黴素、苯唑西林 (Oxacillin)、盤尼西林及第三代頭孢菌素。後來隨著抗藥性演進還發展出碳氫黴烯酶能夠水解所有乙內醯胺類抗生素，其具有不同的分型，可根據特性不同被歸類在 A、B、D 三類的乙內醯胺酶中。



1.3 具廣效性乙內醯胺酶之克雷伯氏肺炎桿菌

在 1980 年代，更初次發現了廣效性乙內醯胺酶（Extended-spectrum β -lactamase; ESBL），這些酵素經由一個到多個胺基酸（Amino acid）的改變，就能水解更多頭孢菌素、盤尼西林及安達菌素類（Aztreonam）的抗生素[13]。而且 ESBL 是由位於質體上 *bla* 基因的突變所產生，可藉由質體以水平基因轉移（Horizontal gene transfer）的方式在不同菌種間傳播，因此很快地傳到世界各地，造成全球性嚴重的公衛問題。

目前 ESBL 的分型有 Ambler A 類中的 TEM 和 SHV 的部分型別、CTX-M 以及 D 類中的 OXA 些許型別等等。另外，ESBL 鑑別的方法是當乙內醯胺酶抑制劑，例如克拉維酸（Clavulanic acid）與廣效型頭芽孢菌素共存時能提高頭芽孢菌素對抗 ESBL 菌株的活性[14]。

當被具有 ESBL 之克雷伯氏肺炎桿菌感染時，乙內醯胺類抗生素對其治療效果有限，而且 ESBL 的產生，會讓接受不當抗生素治療的病人無法避免治療失敗，甚至可能提升死亡的機率，因此是個迫切需要被解決的問題。

1.4 碳青黴烯類耐藥克雷伯氏肺炎桿菌出現

由於攜帶 ESBLs 基因的細菌種類逐漸增加，因此臨床開始給予碳青黴烯類（Carbapenem）抗生素做治療，其中包含 Ertapenem、Imipenem 及 Meropenem 等，但這同時也導致臨床上產生乙內醯胺酶的菌株數量增加，這些乙內醯胺酶具有水解碳青黴烯的能力，即碳青黴烯酶（Carbapenemases） [15]，而帶有碳青黴烯酶的克雷伯氏肺炎桿菌則被稱為碳青黴烯類耐藥克雷伯氏肺炎桿菌（Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP） [16]。

但細菌對碳青黴烯的抗藥性可以細分成三種機制，第一類是細菌製造出能夠分解碳青黴烯的酵素碳青黴烯酶，第二種則為排出幫浦蛋白質（Efflux pump）的突變，將抗生素排出菌體外，第三種則是大量表現 AmpC β -lactamase 合併細

菌外膜蛋白質 (Porin) 的缺失，使得抗生素無法有效進入菌體內。然而碳青黴烯酶的產生是目前最令人憂心的抗生素抗藥性機轉。[17]

而不同分型的碳青黴烯酶也在 Ambler 分類系統中被分入 A、B、D 類當中，碳青黴烯酶被分在 A 類之中的分型為 KPC、IMI、SME；B 類之中則有 NDM、VIM、IMP；D 類則有 OXA-23、OXA-40、OXA-48、OXA-58 及 OXA-181 等等這幾種型別[18]。

在亞洲以 KPC 此類碳青黴烯酶最為常見，且其具有水解所有乙內醯胺藥物的能力，帶有 *bla_{KPC}* 基因的菌株通常對其他抗生素都具有抗藥性，易使細菌發展成多重抗藥性菌株，且此基因位於質體上，可以透過基因轉移的方式快速傳播到其他細菌中，以致能夠有效對抗病原菌的抗生素都漸漸失效，其中最常出現的分型是 KPC-2 和 KPC-3，研究發現，在台灣有很大比例的 CRKP 帶有 KPC，其中又以 KPC-2 分型最為常見[19, 20]。

1.5 乙內醯胺酶分型命名

以上多種不同的乙內醯胺酶其名稱由來多變，舉常見的分型做介紹:TEM 源自於小女孩的名字 Temoniera，是第一位被表現乙內醯胺酶 TEM-1 分型的菌株感染的患者。SHV 是 sulphhydryl variable 的縮寫，推估為其官能基多變；CTX-M 是對頭孢噻肟 (Cefotaxime) 水解能力很強的意思[21]。OXA (Oxacillinase) 起源於能水解苯唑西林 (Oxacillin)。KPC 全名為 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase，是在克雷伯氏肺炎桿菌中的碳青黴烯酶。NDM-1 (New-Delhi metallo beta-lactamase) 是在新德里發現的金屬乙內醯胺酶。IMP (active on imipenem) 則是可水解亞胺培南的酵素。

1.6 克雷伯氏肺炎桿菌的固有抗藥性

近年來，克雷伯氏肺炎桿菌對不同種類的抗生素的抗藥性皆有所增加。大多數這些抗藥機制都是通過水平基因轉移獲得的，進而造成對乙內醯胺類和喹諾酮（Quinolone）類抗生素的嚴重抗藥性[22]。

但除了藉由其他細菌水平基因轉移賦予抗藥性以外，克雷伯氏肺炎桿菌本來的菌體內也具有一些酵素可以水解抗生素，造成他的固有抗藥性（Intrinsic resistance）。就在 1970 年代，在克雷伯氏肺炎桿菌的染色體上發現 SHV-1 青黴素酶（Penicillinase）序列的存在，其是造成對氨苄青黴素（Ampicillin）、阿莫西林（Amoxicillin）和替卡西林（Ticarcillin）有內在抗藥性的原因[23-25]。

1.7 SHV 型別乙內醯胺酶

1970 年代，SHV-1 的乙內醯胺酶首先在克雷伯氏肺炎桿菌的染色體上被發現；SHV-2 則在 1980 年代被發現，並被鑑定為 ESBL，與 SHV-1 在序列上只有一個胺基酸的不同。往後隨著抗生素的發展快速，SHV 的型別也逐漸增多，而且各個分型幾乎都是以 SHV-1 為基準在結構蛋白質上進行一到數個胺基酸的替換，編號則是根據發現的順序做編排，目前已發現 117 種型別[13, 26]。

在眾多的 SHV 型別乙內醯胺酶中，只有 SHV-1 和 SHV-11 屬於一般的廣譜乙內醯胺酶，其他大部分分型都屬於 ESBL，但 SHV-10 則屬於對抑制劑具有抗性的乙內醯胺酶（Inhibitor-resistant beta-lactamase），因此當抗生素和抑制劑併用時，對抑制 SHV-10 沒有效果[13]。具有 SHV 乙內醯胺酶的不同菌株內其 SHV 型別會不盡相同。

1.8 克雷伯氏肺炎桿菌多重抗藥性及用藥演進

在抗生素發展初期，很少有抗藥性出現，對於克雷伯氏肺炎桿菌，有很多種藥物可以用來治療感染，但隨著時間的推進及抗生素不當使用，克雷伯氏肺炎桿菌漸漸出現對各類藥物的抗性。當出現具有 ESBLs 的細菌時，其中大多數都會同時對氨基糖苷類（Aminoglycosides）以及氟喹諾酮類（Fluoroquinolone）抗生

素具有抗藥性；但此時碳青黴烯類(Carbapenem)藥物可以用來解決這個難題的，這類藥物包含厄他培南(Ertapenem)、亞胺培南(Imipenem)、美羅培南(Meropenem)及多尼培南(Doripenem)等等[27]。

但隨著碳青黴烯類頻繁使用，具有碳青黴烯抗藥性的克雷伯氏肺炎桿菌(Carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)出現了，並且在不同地區出現帶有不同基因型的CRKP，像是NDM-1、KPC、OXA48，他們使得碳青黴烯類抗生素變得無效。而在這種多重抗藥性的窘境下，治療克雷伯氏肺炎桿菌變得幾乎無藥可用[28-30]。

但目前在台灣對於多重抗藥性克雷伯氏肺炎桿菌(Multi-Drug Resistant *Klebsiella pneumoniae*, MDR-KP)還有具備治療功效的藥物，為老虎黴素(Tigecycline)及黏菌素(Colistin)[31]，細菌對此類藥物敏感性高，對治療超級細菌扮演重要角色。老虎黴素會作用在細菌的30S核糖體亞基(30S subunit)以抑制其蛋白質合成；黏菌素主要是作用在細菌的脂多醣上，改變細菌細胞膜的通透性進而殺死革蘭氏陰性菌，但其對腎和神經系統具有毒性，因此常被擺在最後一線使用[32]。

1.9 氨苄青黴素

氨苄青黴素(Ampicillin)，是一種乙內醯胺類抗生素，屬於青黴素類衍生藥物，被歸類在氨基青黴素(Aminopenicillin)家族，在碳原子上加了一個氨基(-NH₂)而得名，也會增強其在酸性環境下的穩定性，可幫助抗生素通過革蘭氏陰性菌外膜[33]。在1958年被發現，1961開始廣泛使用於對抗細菌感染[34]，可對抗格蘭氏陽性的葡萄球菌(*Staphylococci*)及鏈球菌(*Streptococci*)；同時對革蘭氏陰性菌的殺傷作用也不錯，可用來對抗流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)或大腸菌群，用途多樣。氨苄青黴素會在細胞繁殖期起殺菌作用，其作為轉肽酶(Transpeptidase)的抑製劑，可干擾細菌合成細胞壁，使細菌失去

細胞壁的滲透屏障。除此之外，他也會抑制細菌分裂階段的細胞壁合成，達到使細菌裂解的效果。

氨苄青黴素用於治療許多革蘭氏陽性和革蘭氏陰性細菌的感染，是第一個對革蘭氏陽性菌具有活性的廣譜青黴素。也是少數能對抗多重抗藥性的糞腸球菌（*Enterococcus faecalis*）和屎腸球菌（*Enterococcus faecium*）的抗生素之一。對抗革蘭氏陰性的腦膜炎奈瑟菌（*Neisseria meningitidis*）和一些腸桿菌科（*Enterobacteriaceae*）也具有活性。氨苄青黴素也可以和一種乙內醯胺酶抑制劑舒巴坦（Sulbactam）合併使用，可增強其活性[35]。或者有時會和其他具有不同功能的抗生素聯合使用增強抗菌效果，像是萬古黴素（Vancomycin）等等[36]。

氨苄青黴素在臨床疾病上則可用於呼吸道感染、泌尿道感染、腦膜炎。也能用於預防新生兒的B型鏈球菌（Group B streptococci）感染，或是治療懷孕婦女得到的李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）。

1.10 舒巴坦

現今臨床經常使用的乙內醯胺酶抑制劑（ β -lactamase inhibitor）主要有四種，分別是克拉維酸（Clavulanic acid）、泰比培南酯（Tebipenem）、舒巴坦（Sulbactam）以及他唑巴坦（Tazobactam），他們可以透過結合細菌的乙內醯胺酶，防止乙內醯胺抗生素被分解，和抗生素併用時可增強藥物抗菌的效果，適用於治療中度至重度細菌感染[37]。目前使用的乙內醯胺酶抑制劑主要針對Ambler分類系統中A類中大部分的乙內醯胺酶能夠有效抑制，部分則能針對C、D類有抑制作用，但由於B類乙內醯胺酶裂解乙內醯胺藥物的機制和A、C、D類不同，因此目前市面上的乙內醯胺酶抑制劑的作用機制不適用於抑制B類乙內醯胺酶。

最常和氨苄青黴素偕同使用抗菌的乙內醯胺酶抑制劑即為舒巴坦，根據美國臨床檢驗室標準委員會（National Committee for Clinical Laboratory

Standards, CLSI) 所公告之準則，氨基青黴素和舒巴坦合併使用的最佳濃度比例為 2:1，例如使用 128 μ g/mL 的氨基青黴素時需搭配 64 μ g/mL 的舒巴坦。若使用舒巴坦不同時併用乙內醯胺類抗生素製劑，則無意義，因為其本身不具任何滅菌作用[38]。由於舒巴坦本身也被歸類在乙內醯胺類藥物中，因此其仍有可能被少數強勁的乙內醯胺酶所水解。根據文獻指出，目前有 14 種不同分型的乙內醯胺酶不會被舒巴坦所抑制，反而會水解舒巴坦，依照 Ambler 分類系統來看，在 A 類之中的有 CTX-M-15、KPC-2、SHV-5 及 TEM-1；B 類有 IMP-1, NDM-1, and VIM-1；C 類有 ADC-7、AmpC 及 P99；D 類中的 OXA-10, OXA-23, OXA-24, and OXA-48[39]。

1.11 肌苷單磷酸去氫酶

肌苷單磷酸去氫酶 (Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, IMPDH)，是三磷酸鳥苷 (Guanosine triphosphate, GTP) 從頭合成途徑 (De novo biosynthesis pathway) 的速率限制酵素，其也參與生成鳥嘌呤 (Guanine) 的第一步驟，可藉由 NAD^+ 的氧化反應傳遞電子，幫助 IMPDH 將 Inosine monophosphate (IMP) 催化成 Xanthosine monophosphate (XMP)，才能接續後面的步驟。IMPDH 是細胞內鳥嘌呤核苷酸庫 (Nucleotide pool) 的調節因子，因此對於 DNA 和 RNA 的合成、信號轉遞、能量轉移、糖蛋白合成以及維持正常細胞功能和生長來說至關重要。因此現在臨床上針對這個靶的發展出不少藥物來對抗癌症、病毒、寄生蟲以及在器官移植時進行免疫抑制等等功效[40]。

抗癌方面，因在某些異常增生的癌細胞中發現 IMPDH 有上調 (Upregulation) 的現象，透過抑制 IMPDH 活性，能抑制細胞增生或消耗鳥嘌呤核苷酸庫。在免疫系統中，淋巴細胞的合成會依賴從頭合成途徑，也會在增生時大量表達 IMPDH，因此 IMPDH 可做為抗發炎的靶的，進而開發出免疫抑制劑，應對器官移植時產生的排斥反應以及自體免疫疾病，常用例子為黴酚酸 (Mycophenolic acid, MPA)

[41, 42]。對付病毒時，病毒的增生會仰賴宿主體內的核苷酸，然而抑制 IMPDH 可以減少供應 GTP 以及鳥嘌呤，造成病毒增生速度被拖延；現在常用來治療人類呼吸道融合病毒（Respiratory Syncytial Virus）的利巴韋林（Ribavirin）即是以 IMPDH 為靶的。

但在真核生物和原核生物中，除了編碼出 IMPDH 的基因不同以外，IMPDH 的結構和酵素動力學也不同。在人類中，*imd1*、*imd2* 基因編碼兩種不同的同功酶（Isozyme）；在細菌中，基因名稱為 *guaB*。可惜的是由於結構及酵素動力都不同，所以目前藥物是無法共用的，像黴酚酸用在細菌上就是無效的。由於物種間的差異，開發特異性的 IMPDH 抑制劑成為了抗細菌與抗寄生蟲新的標的，而且對於現今細菌抗藥性日益嚴重的狀況，也許可以彌補抗生素的不足[40]。

1.12 細菌之肌苷單磷酸去氫酶藥物發展現狀

雖然 IMPDH 是一個很好的藥物標的，但是針對細菌及寄生蟲所發展的 IMPDH 抑制劑，目前只找到能對付小隱孢子蟲（*Cryptosporidium parvum*）的藥物。雖然寄生蟲屬於真核生物，但根據系統發育分析（Phylogenetic analysis）的結果發現，小隱孢子蟲的 IMPDH（*CpIMPDH*）是透過基因水平轉移，從細菌中獲得的[43, 44]，因此和真核生物的 IMPDH 相似性很低。並且通過高通量藥物篩選來找出抗小隱孢子蟲活性的 IMPDH 抑制劑，發現比原先拿來對抗寄生蟲感染的抗菌劑巴龍黴素（Paromomycin）更有效。雖然還未進入臨床使用，但儼然已成為目前較有可能針對隱孢子蟲症（Cryptosporidiosis）本身做治療的藥物[45, 46]。

然而，有研究發現 *CpIMPDH* 中有的 Ala165 and Tyr358 胺基酸位點，也廣泛的存在於多種病原菌的 IMPDH 中，從革蘭氏陽性的金黃色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）到革蘭氏陰性的淋病雙球菌（*Neisseria gonorrhoeae*）都包含在內，因此使用 *CpIMPDH* 抑制劑測試一些病原菌的感受性，結果序列中帶有 Ala165 and Tyr358 位點的細菌幾乎都會被抑制，像是幽門螺旋桿菌

(*Helicobacter pylori*) 等等；但不具有此位點的細菌對抑制劑就具有抗性，例如大腸桿菌 (*Escherichia coli*) [47]。接著幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) 和藥庫中的抑制劑做篩選，發現她會被一個以苯並咪唑 (Benzimidazoles) 為基底所衍生的 IMPDH 抑制劑所抑制，目前藥物暫時命名為 C91[48]。

IMPDH 相對於現有抗生素，擁有不同的標的物，也許抑制 IMPDH 可以為開發新的廣譜抗生素提供目標，並且對抗一些尚未開發出有效療法的病原菌，更能為對抗多重抗藥性菌株找到新的希望，但 IMPDH 對細菌的特異性抑制劑能在臨床如何表現，尚需要進一步研究。

1.13 研究動機

雖然氨苄青黴素 (Ampicillin) 是個普及使用的抗生素，但由於克雷伯氏肺炎桿菌的固有抗藥性使得氨苄青黴素在治療克雷伯氏肺炎桿菌上無用武之地，但在不同菌株間也許會發現不一樣的基因來影響這個現象，因此我們想透過跳躍基因隨機插入染色體位點，來了解哪些基因會影響克雷伯氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 菌株對氨苄青黴素的抗藥性；另外也想透過全基因序列來分析會影響 CB28 菌株對氨苄青黴素的抗藥性的基因。

第二章、實驗材料與方法



2.1 實驗材料

2.1.1 菌株及跳躍子突變株庫 (Strains and transposon mutant library)

本研究所使用的細菌菌株與跳躍子突變株庫之來源及說明，列於(表一)，帶有抗生素抗藥性或需抗生素選殖之菌株，以含相對應抗生素之肉湯 (Broth) 或瓊脂培養基 (Agar) 於 37°C 培養，或依照質體性質不同，放入 30°C 培養。

2.1.2 質體 (Plasmids)

本研究所使用的質體之說明及來源，列於(表二)，其載體皆帶有各自的抗生素抗藥性片段，需以含有相對應抗生素之肉湯或瓊脂培養基於 37°C 或 30°C 培養。

2.1.3 培養基 (Media)

本研究所使用之培養基及其成分皆列於(表三)

2.1.4 抗生素 (Antibiotics)

本研究進行之菌株篩選或抗生素感受性試驗需於培養基中添加抗生素，所使用之品項及常用濃度皆列於(表四)。

2.1.5 化合物與試劑 (Chemicals and reagents)

本研究所使用的化學藥品、化學試劑及緩衝溶液皆列於(表七)

2.1.6 引子 (Primers)

本研究所使用之引子及用途皆列於(表八)。

2.1.7 儀器 (Instrument)

- 
1. 雙波紫外燈箱，型號: MUV26-254/365，Major Science，Taiwan
 2. 250V 電源供應器，型號: MP-250N，Major Science，Taiwan
 3. 超微量分光光度計，NanoDrop™ Lite Spectrophotometer，型號: ND-LITE-PR，Thermo Scientific，U.S.A.
 4. 桌上型離心機，型號: MC-C2500，Labnet International，U.S.A.
 5. 桌上型高速冷凍微量離心機，型號: Kitman-T24，TOMY，Japan
 6. 落地型高速泛用冷凍離心機，型號: KUBOTA 5922，KUBOTA，Japan
 7. 分光光度計，型號: Genesys 30，Thermo Scientific，U.S.A.
 8. 電穿孔儀器，型號: ECM630，BTX，U.S.A.
 9. 三槽聚合酶連鎖反應儀，型號: TProfessional TRIO，Biometra，Germany
 10. 即時核酸偵測系統 CFX connect，型號: 185-5200，BIO-RAD，U.S.A.

2.2 實驗方法

2.2.1 抗生素感受性試驗 (Antibiotic susceptibility test)

抗生素感受性試驗的目的在於了解微生物對各種抗生素的耐受程度，得以合理選用抗生素藥物及其濃度。主要常用的實驗有兩種：一是用來定性的抗生素紙錠擴散法 (Disk diffusion)，測量抑菌環直徑的大小；另一個則是可用於定量的瓊脂稀釋法 (Agar dilution) 或微量稀釋法 (Broth microdilution test)，測量抗生素最小抑菌濃度 (Minimum inhibitory concentration, MIC)。其設定及判斷則是依據美國臨床檢驗室標準委員會 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, CLSI) 所公告之準則，包含感受性 (Susceptible)，中間性 (Intermediate)，及抗藥性 (Resistant) 之臨床指標，以決定測試臨床細菌對不同抗生素之抗藥性。


由於本實驗需要測量抗生素多種濃度之結果，主要是使用瓊脂稀釋法用來檢測 NTUH-K2044 對氯苄青黴素之最小抑菌濃度，且附上抗生素感受性試驗標準參考菌株 *Escherichia coli* ATCC 25922 做為比對。依照 CLSI 2018 年版本標準，克雷伯氏肺炎桿菌判讀結果以 MIC \geq 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 者為具有抗藥性，標準參考菌株 *Escherichia coli* ATCC 25922 之最小抑菌濃度則介於 2-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間。

不同氯苄青黴素濃度的培養基之配方如 (表五) 所示，或是氯苄青黴素合併舒巴坦使用之不同濃度的培養基配方如 (表六) 所示。實驗的方法主要是將欲測試的病原菌於 37°C 進行隔夜培養，接著取 100 μL 菌液加至 900 μL LB 肉湯，以分光光度計測量其吸光值 OD₆₀₀。若 OD₆₀₀ 大於 1，則以生理食鹽水 (Normal saline) 稀釋至 OD₆₀₀ 等於 1，此時的菌量約為 10⁹ CFU/mL。之後以生理食鹽水將菌液 10 倍序列稀釋至 1000 倍，取約 10⁴ CFU 的菌量點在含有不同濃度之氯苄青黴素的 MH 瓊脂培養基上，將其置於 37°C 培養 16-18 小時，即可讀取 MIC 結果。

2.2.2 跳躍子突變菌株之篩選 (Transposon mutant library)

克雷伯氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 菌株的跳躍子突變菌株庫先前已由本實驗室學長姐建構完成，是利用帶有卡納黴素 (Kanamycin) 抗藥基因的 mini-Tn5 跳躍子進行隨機跳躍子突變來建構突變菌株庫，共收穫 2500 個突變菌株貯存於 -80°C。取 4 μL 突變株菌液及參考菌株 NTUH-K2044 菌液培養於 96 孔盤並含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡納黴素的 200 μL LB 肉湯中，置於 37°C 培養箱中隔夜培養。隔日取 2 μL 的培養菌液點在含有氯苄青黴素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 15 公分 MH 瓊脂培養基上，置於 37°C 培養箱中隔夜培養。以參考菌株 NTUH-K2044 作為對照，若突變株生長情況較差，表示耐受性較弱，則留下來做進一步的分析。

2.2.3 菌落生成單位計數 (Colony forming unit counting)




由於不同突變菌株之生長幅度以及 OD₆₀₀ 等於 1 時的菌量有所不同，但測量 MIC 時會需要取同樣的菌量做對照，因此需要此實驗的結果輔助。首先，將欲測試的病原菌於 37°C 進行隔夜培養，接著取 100 μL 菌液加至 900 μL LB 肉湯，以分光光度計測量其吸光值 OD₆₀₀，用生理食鹽水稀釋菌液至 OD₆₀₀ 等於 1，接著繼續用生理食鹽水將菌液 10 倍序列稀釋至 10⁷ 倍，然後分別取 10⁵、10⁶、10⁷ 倍稀釋的菌液 100 μL 塗在 LB 瓊脂培養基上，置於 37°C 培養 16~18 小時後，即可計數得到的 CFU 數，進而估算不同菌株在 OD₆₀₀ 等於 1 時的菌量，做 MIC 時更能精準地評估 10⁴ CFU 的菌量所需要取用的體積。

2.2.4 半隨機聚合酶鏈反應 (Semi-random polymerase chain reaction, Semi-random PCR)

由於前一步篩選目標跳躍子突變菌株得到之結果，其跳躍子插入基因體的位置尚未知曉，為了判斷跳躍子插入的位置以及確定此基因庫的多樣性，需進行半隨機聚合酶連鎖反應。首先利用跳躍子 pUT-miniTn5 上的序列設計引子 Km3022longR 或 Km4523longF 為搭配隨機序列引子 CEKG2C 對突變株進行第一次聚合酶連鎖反應；接下來再以跳躍子上的引子 Km2921R 或 Km4647F 搭配引子 CEKG4 再進行第二次聚合酶連鎖反應，所需的引子序列皆列於 (表八)，最後將第二次聚合酶連鎖反應所得的反應產物進行定序分析，由於隨機引子通用性強，適合未知基因序列的擴增，因此即可得知跳躍子插入基因體的位置。

本實驗使用 LA Taq DNA polymerase 試劑組 (Cat#RR002M, Takara, Japan) 進行反應，其中結合了 Taq DNA 聚合酶和 DNA 校正聚合酶，具有 3 端至 5 端核酸外切酶活性，可以對很長的 DNA 模板進行 PCR 擴增。



實驗步驟如下，先取 3 μL 37°C 隔夜培養之菌液，以 95°C、15 分鐘的條件加熱裂解細菌體，或是加入 1 μL DNazol Direct 試劑 (Cat#DN131, MRC, U.S.A.) 可免於萃取 DNA 且直接進行 PCR，依照 (表九) 配置及設定反應條件來進行第一輪聚合酶連鎖反應，將第一輪聚合酶連鎖反應產物以 ddH₂O 稀釋 50 倍後，取 1 μL 作為第二次聚合酶連鎖反應之模板，再依照 (表九) 配置及設置反應條件來進行第二輪聚合酶連鎖反應，最後將反應產物用電泳系統分析並將放大的片段，以引子 Km2921R 或 Km4647F 分別定序分析比對跳躍子插入的位置。

2.2.5 定序分析 (Sequence analysis)

以 NTUH-K2044 作為模板，以引子 Km2921R 或 Km4647F 及 CEKG4，並以具有校對活性 (Proofreading activity) 且錯誤率較低 (Error rate) 的 KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase 試劑組 (Cat#71975, Sigma-Aldrich, U.S.A.) 進行聚合酶連鎖反應，然後將 PCR 產物回收並進行定序。

定序分析委託明欣生物科技股份有限公司 (Mission, Taiwan)，該公司以儀器 Applied Biosystems 3730xl 毛細管電泳自動定序儀 (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) 進行桑格法 (Sanger sequencing) 為 DNA 定序。

將定序的結果複製到由美國國家生物技術資訊中心 (NCBI) 所建立之 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) 網站上，和參考菌株 NTUH-K2044 之 DNA 序列進行比對，找出跳躍子插入位置位於哪個開放閱讀框架 (Open reading frame)，進一步進行分析。另一個分析途徑則是透過分析軟體 Vector NTI® software (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) 將定序結果和參考菌株 NTUH-K2044 基因序列做比對，找出有無突變或不吻合之處。

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

根據不同目標基因設計之特異性引子，使用之引子請參照（錯誤！找不到參照來源。）。本實驗採用 KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase 試劑組和 2X SuperRed PCR Master Mix 試劑組（Cat#TE-SR01，BioTools，Taiwan）。

KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase 試劑組配方：

取 10 至 20 ng 之細菌基因體 DNA 加入 PCR 反應管中，並加入 10 μL 2x Xtreme buffer、4 μL 2mM dNTP、0.6 μL 20mM Forward primer、0.6 μL 20mM Reverse primer、0.4 μL DNA polymerase，並補 ddH₂O 至體積為 20 μL 。

2X SuperRed PCR Master Mix 試劑組配方：

取 10 至 20 ng 之細菌基因體 DNA 加入 PCR 反應管中，再加入 1 μL 20mM Forward primer、1 μL 20mM Reverse primer、10 μL SuperRed PCR Master Mix，並補 ddH₂O 至體積為 20 μL 。

反應條件為 96 °C 加熱 3 分鐘 (Initial denaturation)，接著以 96°C 加熱 30 秒 (Denaturation)，依引子適切溫度約 55°C 到 60°C 之間加熱 30 秒 (Annealing)，以及 72°C 加熱 (Elongation)，此階段加熱時間依據目標產物長度調整，通常 1 kb 長度的產物需要 1 分鐘，重複上述三步驟 30 個循環，最後以 72°C 加熱 10 分鐘 (Final Extension)，25°C 冷卻 10 分鐘。

另外，菌落 PCR (Colony PCR) 與一般 PCR 原理步驟相同，不同的是 DNA 模板使用 1 μL OD₆₀₀ 值約為 0.5 之菌液即可。可利用特定的引子進行基因序列放大反應，配合電泳確認產物大小，挑選出成功帶有目標基因的質體。特點是菌落 PCR 可不必萃取基因體 DNA，而是直接將細菌體加熱裂解後其暴露的 DNA 作為模板進行 PCR 擴增；或是加

入可破壞細菌細胞壁，使其釋放 DNA 的試劑 DNAzol，較為節省時間，實驗室通常也會利用此方法進行重組體的篩選。



2.2.7 反向聚合酶連鎖反應 (Inverse polymerase chain reaction, Inverse PCR)


Inverse PCR 具有與常規 PCR 方向相反的引子，且其擴增方向與普通 PCR 反向，因此而得名。Inverse PCR 可將待擴增片段環化，通過一對方向背道而行的引子將已知序列的兩邊側翼區域序列擴增，若需將其基因產物黏合成為環狀 DNA，則可進一步做自我連接作用 (Self-ligation)，以利後續實驗進行。本實驗也採用 KOD Xtreme™ Hot Start DNA Polymerase 試劑組，除了引子設計不同，可參照 (表八)，其他試劑配方及反應條件和一般 PCR 相同。

2.2.8 瓊脂糖凝膠電泳 (Agarose gel electrophoresis)

常用於 PCR 產物大小之分析，也可做為樣本前處理，像是選殖作用 (Cloning)、DNA 定序、限制酶剪切後都會需要。取適量 PCR 產物和核酸樣本染劑混合，置入以 1×TAE buffer 為基底製成的 1% Agarose 膠孔中，在含有 1×TAE buffer 的水平電泳槽中進行反應，反應條件為：電壓 150V，電流 400 mA，18 分鐘，反應完成後置入溴化乙錠染劑 (Ethidium bromide, EtBr) 中進行外染色 10 分鐘，接著放到照膠系統紫外光透照儀內，進行結果分析。

2.2.9 細菌質體 DNA 之萃取 (Plasmid DNA extraction)

質體是細胞內環狀 DNA 片段，在宿主細胞核外仍然能進行 DNA 複製，因此可以萃取其作為實驗中重要的載體。本實驗使用 EazyPure Plasmid DNA Mini Kit (Cat#PM300, Bioman, Taiwan)，其原理為鹼性溶解法 (Alkaline lysis)。實驗流程為前一天將細菌養入約 5 mL 帶



有適當抗生素的 LB 肉湯中，在 37°C 的培養箱中隔夜培養 16 小時。以 10,000×g 離心 10 分鐘，去除上清液，加入 200 μL PD1 將菌體懸浮於溶液中並震盪，將液體取至 1.5 mL 微量離心管中。加入 200 μL PD2 將細胞裂解，上下翻轉 1.5 mL 微量離心管勿震盪，靜置 2 分鐘或放入乾浴槽中加熱直到澄清。加入 300 μL PD3 用來中和強鹼，清除細胞內雜質，上下翻轉 1.5 mL 微量離心管勿震盪，以最高轉速離心 10 分鐘將 pellet 集中於底部，取上清液至離心柱，以 10,000×g 離心 30 秒，丟棄廢液，接著加入 400 μL W1 buffer 沖洗離心柱，以 10,000×g 離心 30 秒，丟棄廢液，加入 600 μL Wash buffer 清洗多餘鹽類，以 10,000×g 離心 30 秒，丟棄廢液。接著將離心柱換至新的 1.5 mL 微量離心管上，以 10,000×g 離心 3 分鐘去除殘留液體也風乾薄膜，將離心柱再次換至新的 1.5 mL 微量離心管上，分兩次加入預熱 40μL ddH₂O 可將管柱內吸附於膜上之 DNA 洗脫 (Elute)，靜置 10 分鐘後，以最高轉速離心 3 分鐘，即可得到細菌之質體 DNA，並置於-20°C 保存。

2.2.10 製作勝任細胞 (Competent cell)

製作流程依勝任細胞來源不同而異，本實驗則以 *Klebsiella pneumoniae* 為主，前一天將菌接種於 20 mL LB 肉湯中，在 37°C 下隔夜培養。首先在 4°C 下以 8,000×g 離心 15 分鐘，去除上清液後加入 10 mL 已滅菌的 ddH₂O 均勻混合，在 4°C 下以 8,000×g 離心 15 分鐘，接著去除上清液，加入 10 mL 10% Glycerol 均勻混合，再於 4°C 下以 8,000×g 離心 15 分鐘，之後去除上清液，加入 1 mL 10% Glycerol 混合均勻。最後分裝 200 μL 至 1.5 mL 微量離心管中，保存於-80°C。使用 Glycerol 的目的除了能凍存菌體以外，也能將原本菌液內的培養液清洗乾淨，避免培養液中的離子或鹽類存在影響後續電穿孔效率；同時提高液體黏稠度防止勝任細胞受到震動而被破壞。

製作 DH5 α 的步驟大致相同，唯有第二步由 10% Glycerol 均勻混合改成用 100 mM CaCl₂ 混合。菌體以 CaCl₂ 溶液處理後，由於鈣離子帶正電荷會聚集在細胞膜帶負電的離子通道上，細胞膜的通透性發生變化，接續進行熱休克 (Heat shock) 更能容許外源質體 DNA 通過。

2.2.11 電穿孔 (Electroporation)

電穿孔是透過短時間的高電壓脈衝，製造能讓細胞膜表面瞬間產生孔洞的電場，並使得 DNA 穿過細胞膜進入細胞，因此可將帶有目標基因之質體 DNA 送入勝任細胞中。電場則可以透過儀器設定電流或是調整溶液中成分而改變，不同的細胞也需要透過不同的電場達成最佳的通透效果，像是 *Klebsiella pneumoniae* 電穿孔的條件為：電壓 2500 V，電阻 200 Ω ，電容 50 μ F。在無菌操作的條件下，將約 1000 ng 的質體和勝任細胞液混合，置於冰上靜置 20 分鐘。接著將混合液轉移至電穿孔比色管中，依照上述條件進行電穿孔。電穿孔完成後，將細胞混合液迅速轉移至 2 mL LB 肉湯中培養，放入適合質體生長之溫度的培養箱回復 (Recover) 1 小時，接著將其以 10,000 \times g 離心 10 分鐘，去除上清液，最後用 100 μ L 至 200 μ L LB 肉湯回溶沉澱菌體，然後將菌液塗盤培養。若隔日有菌落生成，表示有成功將質體 DNA 送入勝任細胞中。

2.2.12 建構缺失突變株 (Construction of deletion mutant)

以建構 *guaB* 基因缺失突變株為例，首先設計帶有限制酶 *NotI* 切位的引子，以 NTUH-K2044 為模板進行 PCR，將目標基因片段夾出，藉由電泳分析產物，然後利用 Easy Pure PCR/Gel Extraction Kit (Cat#PG100, Bioman, Taiwan) 從膠體中純化 DNA。測量濃度後以適量目標基因 DNA 和 pJET1.2/blunt cloning vector 進行連接 (Ligation) 形成質體，再以熱休克 (Heat shock) 的方式把質體轉形 (Transform) 到勝任細胞 DH5 α

中。

轉形過程為先將質體與 DH5 α 溫和混和，冰上靜置 20 分鐘後，以 42°C 及 90 秒鐘的條件進行熱休克，將質體送入勝任細胞，於 4°C 靜置 2 分鐘，加入 500 μ L LB 培養液後，於 37°C 培養 1 小時，再取 100 μ L 的菌液均勻塗平於含抗生素的 LB 培養基上，於 37°C 隔夜培養，隔天取菌落以引子 IMPDH F 及 IMPDH R 以菌落 PCR 確認有預期大小的基因產物。

取上一步的正確菌落為模板，利用 Inverse PCR 剔除目標基因，但保留左右側總長度約 2,000 bp 的基因側翼區 (Flanking region)，產物跑膠後進行 Gel extraction，加入 T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK, Cat#M0201S, New England Biolabs, U.S.A.) 及其緩衝液，使 DNA 之 5 端磷酸化，利於後續之連接。之後利用接合酶 (Ligase) 將含基因側翼區的 pJET1.2 質體進行自我連接 (Self ligation)，接著將質體轉形到勝任細胞 DH5 α 中；取引子 pJET1.2 F 及 pJET1.2 R 以菌落 PCR 確認有預期約 2000 bp 大小的基因產物。

從前一步的正確菌落中萃取帶有基因側翼區的 pJET1.2 質體 DNA 以及 pKO3-Km 質體 DNA，用限制酶 *NotI* 剪切 (Restriction enzyme digestion) 基因側翼區後，並在 pKO3-Km 中加入 Quick Calf intestinal alkaline phosphatase (Quick Cip, Cat#M0525S, New England Biolabs, U.S.A.) 避免載體自我連接。接著載體和目標基因側翼區進行連接組成目標質體，轉形到勝任細胞 DH5 α 中；以引子 pKO3 L 以及 IMPDH F 或 IMPDH R 用菌落 PCR 確認有預期約 2000bp 大小的基因產物。

從正確菌落中萃取目標質體 DNA，以電穿孔的方式送進 *Klebsiella pneumoniae* 製成的勝任細胞中，之後確認質體有成功進入細胞中，在 43°C 培養，促使質體利用同源置換 (Homologous recombination) 的方式

嵌入細菌染色體中，再利用含有 50 μ g/mL 卡納黴素的 LB 瓊脂培養基篩選質體成功嵌入 (Integration) 細菌染色體的菌落，並搭配引子 pKO3 L、Km F Inverse、IMPDH RF outer 以及 IMPDH LF outer，以菌落 PCR 確定質體嵌入目標基因片段。再利用含有 5% 蔗糖 (Sucrose) 的 LB 瓊脂培養基在 30 $^{\circ}$ C 培養，篩選將質體切出 (Excision) 的突變株並利用菌落 PCR 及定序確定是否得到目標基因缺失的突變株。

2.2.13 測量生長曲線 (Growth curve)

突變株在一般情況培養下生長狀況不佳，因此想評估參考菌株 NTUH-K2044、缺失突變株 Δ *guaB* 及跳躍子突變株 *guaB*::miniTn5 的生長曲線是否有很大的差距，才會導致生長不良之結果。參考菌株 NTUH-K2044、缺失突變株 Δ *guaB* 及跳躍子突變株 *guaB*::miniTn5 培養於 10 mL LB 肉湯中，培養溫度 37 $^{\circ}$ C。接種一致的起始菌量，約為 1 \times 10⁸ CFU，根據克雷伯氏肺炎桿菌的倍增時間 (doubling time) 約是 40 至 50 分鐘之間[49]，因此之後以 45 分鐘為單位，用分光光度計測量 OD₆₀₀ 之菌液濃度，同時取 100 μ L 菌液進行序列稀釋後塗盤，隔日計算菌落生成單位 (CFU/ml)，持續至第 180 分鐘結束。數據以軟體作圖，比較菌株的生長幅度。後續也另外測量突變株在含有 1mM 鳥嘌呤之培養基中生長的生長曲線。

2.2.14 體外補充鳥嘌呤試驗 (Supplement with guanine)

由於 Guanine 幾乎不溶於水，但溶於強酸強鹼，因此在室溫下，以 1 M 的氫氧化鈉 (NaOH) 溶解成 100 mM 的 Guanine，再以 1% 的體積加入 LB 或 MH 瓊脂培養基中製成培養盤，Guanine 的最終濃度則成 1 mM。最後將目標菌株培養至 OD₆₀₀=1，並且一律稀釋調整菌量至 10⁹ CFU/mL，之後以 10 倍序列稀釋至 10² CFU/mL，每個稀釋倍數皆取 2 μ L

菌液點在各式培養基上，以 37°C 隔夜培養，然後觀察 $\Delta guaB$ 突變株的生長狀況有無改善[50]。



第三章、實驗結果



3.1 篩選具氯苄青黴素低抗性之 NTUH-K2044 跳躍子突變株

首先，測試克雷伯氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 菌株對氯苄青黴素的抗藥程度，確定之後使用的抗生素濃度。抗生素感受性試驗之標準參考菌株 *E.coli* ATCC 25922 作為負控制組，測試對氯苄青黴素的感受性時，在濃度 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時即被抑制，對 NTUH-K2044 的最小抑菌濃度則是 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表十)。

先前本實驗室學長姐利用跳躍基因建構成共約 2500 株的克雷伯氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 菌株之突變株庫，因此我們想藉由此突變株庫篩選出與氯苄青黴素抗藥性有關的基因。以常用濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氯苄青黴素在篩選突變株的過程中，觀察到其中有 2 株突變菌株生長狀況較差，抗藥性較弱，分別是編號 16-46 及 17-95 的菌株 (圖一)。

3.2 目標突變株之跳躍子插入位置分析

在突變菌株篩選完成後，進行半隨機聚合酶連鎖反應放大突變株中跳躍基因所插入的位點 (Transposon insertion site) (圖二)，將 2 株目標突變株之基因片段進行定序分析，並將定序結果和國家生物技術資訊中心 (NCBI) 之 BLAST 線上資料庫進行比對，來確認跳躍子突變基因處，結果雖然 2 株突變株的跳躍基因插入不同位點，但是插在同個基因上 (圖三)，基因名稱為 *guaB*，其蛋白質產物為肌苷單磷酸去氫酶 (Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, IMPDH)。確認跳躍子插入基因位置後，計算突變株 $\text{OD}_{600}=1$ 的菌量等於多少 CFU/mL，然後序列稀釋取 10^4 CFU 的菌量，做最小抑菌濃度分析，發現 NTUH-K2044 和突變株 16-46 會在 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，17-95 則是在 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 就被抑制生長 (表十)，認為跳躍子插入的基因和對氯苄青黴素耐受性較弱有關。

3.3 建構 *guaB* 基因缺失突變株

由跳躍子突變株的實驗結果我們知道 *guaB* 似乎在克雷伯氏肺炎桿菌的氨基青黴素抗藥性上扮演某種角色，因此本研究想藉由建構 NTUH-K2044 之 *guaB* 基因剔除突變株，以確認 *guaB* 基因在對氨基青黴素為低抗性之菌株中的抗藥機轉是否重要。利用 pKO3-Km 質體，並透過同源重組的方式剔除 *guaB* 基因（圖四、圖五），再經由 PCR 去確認我們成功的將 *guaB* 基因剔除；首先用 *guaB* 基因外圍的引子與基因內序列設計的引子進行 PCR，若有出現預期大小的產物，則表示剔除基因不成功。另外，以一對同源重組側翼區外的引子與進行 PCR，較大的基因產物為野生株（Wild type, WT），較小的產物則為缺失突變株（圖六）。而後利用此 Δ *guaB* 菌株進行氨基青黴素的最小抑菌濃度檢測，結果顯示 NTUH-K2044 之 *guaB* 基因缺失突變株的最小抑菌濃度為 128 μ g/mL（表十），和之前篩選所得到的 16-46、17-95 突變株之最小抑菌濃度有 2 倍差異，但由於缺失突變株的生長並不好，因此我想進一步確認菌株們生長狀況的差異。

3.4 突變株之菌落型態及生長曲線

首先將 NTUH-K2044 參考菌株、*guaB* 跳躍子突變株及 *guaB* 缺失突變株在 LB 瓊脂培養基盤上 37°C 隔夜培養。發現 NTUH-K2044 參考菌株的菌落尺寸較大、顏色純白不透光、質地厚；*guaB* 跳躍子突變株尺寸明顯較小、菌落邊緣些許透光、厚度變薄；*guaB* 缺失突變株尺寸則和跳躍子突變株差不多、但菌落變得更清澈透光、厚度也變薄（圖七）。除此之外，生長曲線也有差距，NTUH-K2044 參考菌株成長幅度大，且菌量超越其他突變株（圖八），*guaB* 缺失突變株則是生長情況最差的菌株，時間越長生成菌數的差異越大。

3.5 體外補充鳥嘌呤培養及觀察生長曲線

由於 *guaB* 基因的存在與否會影響生長狀況，若是將基因剔除容易影響部分微生物生存[50]，因此我們在培養基中加入 1 mM 鳥嘌呤，看 *guaB* 突變株之生長情形是否會被改善，結果顯示鳥嘌呤的補充使得突變株成長茁壯，幾乎和 NTUH-

K2044 參考菌株的生長結果一樣 (圖 九)。因此可推測 *guaB* 基因會影響克雷伯氏肺炎桿菌的生長。為了進一步證實此推測，在氨苄青黴素的培養基中加入鳥嘌呤後進行抗生素感受性試驗，發現菌株在未加入鳥嘌呤的培養基生長不佳；但在加入鳥嘌呤後，在只有 MH 培養基和含氨苄青黴素培養基上的生長狀況皆大幅改善，氨苄青黴素濃度選擇 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，是根據 *E.coli* ATCC 25922 菌株的最小抑菌濃度。此外，在添加鳥嘌呤後的培養基觀察生長曲線之變化，發現 *guaB* 突變菌株的生長曲線能追上跟參考菌株 NTUH-K2044 一樣的幅度 (圖 十)。

添加鳥嘌呤後，各突變菌株對氨苄青黴素最小抑菌濃度提高許多 (表十一)。後來使用不含抗生素的培養基進行一樣的突變株庫點盤，再次驗證了這個結果 (圖 十一)。表示突變菌株之生長狀況不良並非由氨苄青黴素所抑制，而是 *guaB* 基因的缺失導致其本身無法正常生長，因此得知 *guaB* 基因和克雷伯氏肺炎桿菌對於氨苄青黴素產生抗藥性的機制沒有相關。

3.6 建構 *shv11* 基因缺失突變株

利用 NTUH-K2044 已具備全基因體序列 (whole genome sequence, WGS) 之優勢[51]，序列比對之後發現基因體上具有 beta lactamase 相關的基因，為 *shv11* 基因。因此本研究想藉由建構 NTUH-K2044 之 *shv11* 基因剔除突變株，以確認 *shv11* 基因在對氨苄青黴素為低抗性之菌株中的抗藥機轉是否重要。透過同源重組的方式，利用 pKO3-Hyg 質體剔除 *shv11* 基因 (圖十二、圖十三)，再經由 PCR 去確認我們成功的將 *shv11* 基因剔除 (圖十四)，而後利用此 $\Delta shv11$ 菌株進行氨苄青黴素的最小抑菌濃度檢測，結果顯示 NTUH-K2044 之 *shv11* 基因缺失突變株的最小抑菌濃度為 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表十)，相比起 NTUH-K2044 參考菌株，將近減少了 32 倍。因此由上述結果可以總結，*shv11* 在 NTUH-K2044 中對氨苄青黴素具有抗藥性的機轉中扮演十分重要的角色。

3.7 觀察 CB28 的乙內醯胺酶基因對其氨苄青黴素抗藥性的影響

由於先前實驗室學長已將 CB28 菌株送去進行全基因體定序，因此想觀察 CB28 中相關的乙內醯胺酶基因是否會對氨苄青黴素抗藥性有影響，經由序列比對後發現，相關的基因有四個，分別是在染色體上的 *shv1*、*shv2* 基因，及在質體上的 *toho1*、*kpc* 基因（表十二）。本實驗也是想透過建構缺失突變株來觀察抗藥性是否改變。由於 CB28 菌株之 *shv1* 基因和 NTUH-K2044 菌株之 *shv11* 基因序列高達 99% 相似，因此建構 CB28 *shv1* 缺失突變株之質體是使用 pKO3-Hyg: $\Delta shv11$ ，進行 PCR 確認剔除基因結果時也能夠使用 *shv11* 基因側翼區域上的引子（圖十五）。透過同源重組的方式，利用 pKO3-Hyg 載體分別建構 *shv2*、*toho1*、*kpc* 基因突變的質體（圖十六~十九），再經由 PCR 去確認成功的將基因剔除（圖二十、圖二十一）。已成功剔除 *shv1* 基因、*toho1* 基因，及成功建構 CB28 $\Delta kpc \Delta toho1$ 雙重基因缺失菌株，而後利用此 CB28 $\Delta shv1$ 、CB28 $\Delta toho1$ 、CB28 Δkpc 及 CB28 $\Delta kpc \Delta toho1$ 菌株進行氨苄青黴素的最小抑菌濃度檢測，結果顯示 CB28 之 *shv1*、*toho1*、*kpc* 單獨基因缺失突變株（single deletion mutant）和 CB28 $\Delta kpc \Delta toho1$ 雙重基因缺失突變株（double deletion mutant）的最小抑菌濃度皆為 $>1024 \mu\text{g/mL}$ （表十），和 CB28 參考菌株的最小抑菌濃度一致，表示單獨剔除 *shv1*、*toho1*、*kpc* 基因，或是一併剔除 *toho1* 和 *kpc* 基因並不會影響克雷伯氏肺炎桿菌對氨苄青黴素的抗藥性。*shv2* 缺失突變株及四重基因缺失突變株沒能成功建構，無從比較對氨苄青黴素的抗藥性的差異。

3.8 觀察舒巴坦抑制乙內醯胺酶之效果

舒巴坦（Sulbactam）為一種乙內醯胺酶抑制劑，和氨苄青黴素協同使用時可以抑制細菌中乙內醯胺酶的活性，提高氨苄青黴素活性及抗菌效果，最小抑菌濃度會因此而降低，因此可用來再次確認 NTUH-K2044 菌株及 CB28 菌株內被剔除的乙內醯胺酶基因，的確是對氨苄青黴素產生抗藥性的關鍵。首先，把舒巴坦和氨苄青黴素協同使用的結果，和氨苄青黴素單獨作用的結果來比較，氨苄青黴素原本對 NTUH-K2044 參考菌株最小抑菌濃度是 $1024 \mu\text{g/mL}$ （表十），加入舒巴

坦作用後降低至 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (表十三)；然而 NTUH-K2044 $\Delta shv11$ 菌株在舒巴坦使用前後的最小抑菌結果並無改變，表示乙內醯胺酶抑制劑的靶的不存在了，再次驗證 *shv11* 確實為 NTUH-K2044 菌株中造成氨基青黴素抗藥性之主因。

由於 CB28 屬於 CRKP，因此舒巴坦加入氨基青黴素協同作用時仍無法明顯降低 WT 的最小抑菌濃度。單獨基因缺失突變株中 $\Delta toh1$ 最小抑菌濃度也沒有明顯改變，僅有 $\Delta shv1$ 、 Δkpc 菌株由 $>1024 \mu\text{g}/\text{mL}$ 變成 $256\mu\text{g}/\text{mL}$ ，下降超過 4 倍；雙重基因缺失突變株 $\Delta kpc \Delta toh1$ 則下降超過 8 倍 (表十) (表十三)。

可以觀察出 *shv1*、*kpc* 基因對 CB28 的氨基青黴素抗性佔有相對重要的地位，雖然 $\Delta toh1$ 的最小抑菌濃度在使用舒巴坦前後皆 $>1024 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，但是因為抗生素配製限制，最高濃度只到 $1024 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，因而無法確認其中的變化。在單獨剔除 Δkpc ，和雙重剔除 $\Delta kpc \Delta toh1$ 之最小抑菌濃度差兩倍，也許可以推測為 *toh1* 基因有些微參與 CB28 對氨基青黴素產生抗藥性的機制。

第四章、討論及未來展望

在跳躍子突變株庫所篩選到可以讓克雷伯氏肺炎桿菌對氯苄青黴素呈現低抗性的基因和文獻中所提到的乙內醯胺酶 SHV 不同[23]，雖然跳躍子的多樣性可能無法普及全部基因，但幫助我們找到 *guaB* 這個會影響其生長狀況的基因，也許可以開發新的克雷伯氏肺炎桿菌藥物靶的。

在（表十）中，當把 *guaB* 基因剔除後，其在氯苄青黴素的最小抑菌濃度比跳躍子突變株高，但仍是 2 倍差距內，一般視為無顯著差異，其實 Δ *guaB* 菌株在 MH 瓊脂培養基沒有外加抗生素的控制組培養下，其生長狀況非常差，呈現非常淡又薄的菌液痕跡。只是在抗生素濃度增加的情況下， Δ *guaB* 菌株非常淡薄的菌液痕跡一直持續存在，因此在判讀結果時，無法準確評估其最小抑菌濃度。

參考文獻中建議將鳥嘌呤補充至培養基和 *guaB* 缺失突變株共同培養後可改善其生長情形[50]，（圖九）的結果是相符的，因此可確定跳躍子突變株一開始被篩選到的最大主因是生長不佳，而不是對氯苄青黴素較具有感受性，後來使用不含抗生素的培養基進行一樣的突變株庫點盤，再次驗證了這個結果（圖十一）。

未來也許可以針對 IMPDH 為靶的，往改變克雷伯氏肺炎桿菌的致病因子方向前進。因為以前的報導指出，缺少鳥嘌呤相關基因後，可能會導致對鳥嘌呤有需求的克雷伯氏肺炎桿菌菌株沒有感染能力[52]；另一篇研究發現剔除 IMPDH 相關的基因之後能使新型隱球菌（*Cryptococcus neoformans*）的莢膜變小[50]。雖然 *guaB* 突變株可能可以做為減毒疫苗（Attenuated vaccine）的菌株，但目前已知對具莢膜之細菌最有效之疫苗為莢膜多糖結合型疫苗（CPS conjugate vaccine），因此 *guaB* 暫時不是本實驗室目前發展的方向。

在 NTUH-K2044 基因體中確實找出和 SHV 相關的基因 *shv11*，且證明其基因參與了克雷伯氏肺炎桿菌對氯苄青黴素的抗藥性。此外，也利用實驗室已有全基因序列的 CRKP 菌株 CB28，找出和乙內醯胺酶相關的基因，但個別剔除 *shv1*、*toho1*、*kpc* 基因後，其對氯苄青黴素的最小抑菌濃度都沒有下降。

原本欲剔除 *shv2* 基因以及將 CB28 菌株四個基因一同剔除進行抗生素感受性試驗，但卡在 Integration 及 Excision 的步驟許久，*shv2* 缺失突變株卡關的原因可能是其側翼區域和必需基因 (essential gene) 相關，無法進行剔除。建構多重基因缺失突變株卡關在剔除三重基因的步驟，比起單獨基因的剔除，多重基因剔除的效率降低許多，沒有挑到成功多重基因被剔除的菌株。

加入舒巴坦後 CB28 突變株對氨苄青黴素的最小抑菌濃度有些許下降，但對 CB28 WT 卻沒有顯著變化，且是乙內醯胺酶靶的皆存在的狀況下，推測是因其帶有四個乙內醯胺酶基因，因此舒巴坦抑制乙內醯胺酶的效果仍無法勝過 CRKP 對藥物有嚴重抗藥的現象。

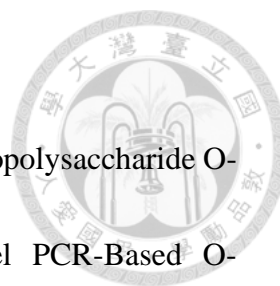
氨苄青黴素和舒巴坦合併使用後 CB28 $\Delta shv1$ 、 Δkpc 缺失突變株由 ≥ 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 變成 $256\mu\text{g}/\text{mL}$ ，下降超過 4 倍；根據文獻指出舒巴坦無法抑制 KPC 分型的乙內醯胺酶[53]，但 CB28 $\Delta shv1$ 菌株內仍含有 *kpc* 基因，最小抑菌濃度卻也有下降，若非實驗誤差，表示 *shv1*、*kpc* 基因都有可能透過未知的機制共同造成 CB28 對氨苄青黴素的抗藥性。

原本欲做其他實驗確認兩株菌株之乙內醯胺酶基因被剔除後，其蛋白質功能有無被去除，但因為生技公司販售的乙內醯胺酶抗體目前只有 TEM 型別適用，SHV 型別沒有人生產，即便有客製化抗體的選項也是時間及金錢成本高昂。此外因為實驗中出現的乙內醯胺酶型別，其蛋白質大小相近，因此也不易透過大小辨別蛋白質缺失。

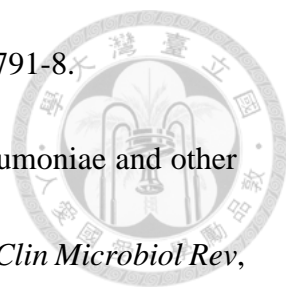
參考文獻



1. Carpenter, J.L., Klebsiella pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev Infect Dis*, 1990. **12** (4) : p. 672-82.
2. Podschun, R., *et al.*, Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*, 1998. **11** (4) : p. 589-603.
3. Ejikeme, C., *et al.*, Hepatosplenic Abscess From Klebsiella pneumoniae in Poorly Controlled Diabetic. *J Investig Med High Impact Case Rep*, 2021. **9**: p. 23247096211033046.
4. Khaertynov, K.S., *et al.*, Virulence Factors and Antibiotic Resistance of Klebsiella pneumoniae Strains Isolated From Neonates With Sepsis. *Front Med (Lausanne)*, 2018. **5**: p. 225.
5. Mike, L.A., *et al.*, A systematic analysis of hypermucoviscosity and capsule reveals distinct and overlapping genes that impact Klebsiella pneumoniae fitness. *PLoS Pathog*, 2021. **17** (3) : p. e1009376.
6. Choi, M., *et al.*, The Diversity of Lipopolysaccharide (O) and Capsular Polysaccharide (K) Antigens of Invasive Klebsiella pneumoniae in a Multi-Country Collection. *Front Microbiol*, 2020. **11**: p. 1249.
7. Pan, Y.J., *et al.*, Capsular types of Klebsiella pneumoniae revisited by wzc

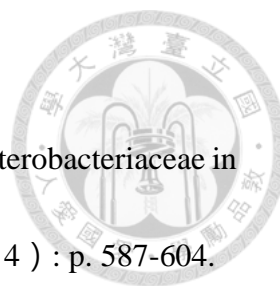


- sequencing. *PLoS One*, 2013. **8** (12) : p. e80670.
8. Fang, C.T., *et al.*, Rapid and Accurate Determination of Lipopolysaccharide O-Antigen Types in *Klebsiella pneumoniae* with a Novel PCR-Based O-Genotyping Method. *J Clin Microbiol*, 2016. **54** (3) : p. 666-75.
 9. Bush, K., *et al.*, β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016. **6** (8) .
 10. Livermore, D.M., Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*, 1995. **8** (4) : p. 557-84.
 11. Rawat, D., *et al.*, Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis*, 2010. **2** (3) : p. 263-74.
 12. Somboro, A.M., *et al.*, Diversity and Proliferation of Metallo- β -Lactamases: a Clarion Call for Clinically Effective Metallo- β -Lactamase Inhibitors. *Appl Environ Microbiol*, 2018. **84** (18) .
 13. Bradford, P.A., Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, 2001. **14** (4) : p. 933-51, table of contents.
 14. Paterson, D.L., *et al.*, Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 2005. **18** (4) : p. 657-86.
 15. Nordmann, P., *et al.*, Global spread of Carbapenemase-producing

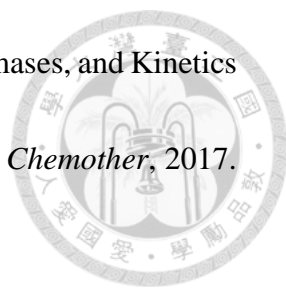
- 
- Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*, 2011. **17** (10) : p. 1791-8.
16. Tzouveleki, L.S., *et al.*, Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*, 2012. **25** (4) : p. 682-707.
17. Papp-Wallace, K.M., *et al.*, Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55** (11) : p. 4943-60.
18. Nordmann, P., *et al.*, Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis*, 2019. **69** (Suppl 7) : p. S521-s528.
19. Pfeifer, Y., *et al.*, Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, 2010. **300** (6) : p. 371-9.
20. Chiu, S.K., *et al.*, Carbapenem Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: Dissemination and Increasing Resistance of Carbapenemase Producers During 2012-2015. *Sci Rep*, 2018. **8** (1) : p. 8468.
21. Castanheira, M., *et al.*, Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC Antimicrob Resist*, 2021. **3**(3): p. dlab092.
22. Ruiz, J., Transferable Mechanisms of Quinolone Resistance from 1998 Onward. *Clin Microbiol Rev*, 2019. **32** (4) .
23. Wyres, K.L., *et al.*, *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance

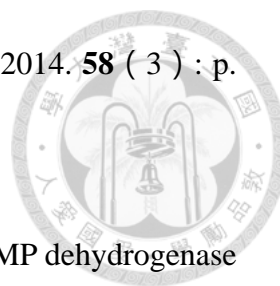


- genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2018. **45**: p. 131-9.
24. Chaves, J., *et al.*, SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. **45** (10) : p. 2856-61.
25. Fu, Y., *et al.*, Differential expression of bla (SHV) related to susceptibility to ampicillin in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*, 2007. **29** (3) : p. 344-7.
26. Thai, Q.K., *et al.*, SHV Lactamase Engineering Database: a reconciliation tool for SHV β -lactamases in public databases. *BMC Genomics*, 2010. **11**: p. 563.
27. Castanheira, M., *et al.*, Antimicrobial susceptibility patterns of KPC-producing or CTX-M-producing Enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist*, 2010. **16** (1) : p. 61-5.
28. Mathers, A.J., *et al.*, The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*, 2015. **28** (3) : p. 565-91.
29. Yong, D., *et al.*, Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob*



- Agents Chemother*, 2009. **53** (12) : p. 5046-54.
30. Mairi, A., *et al.*, OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018. **37** (4) : p. 587-604.
31. Gupta, N., *et al.*, Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*, 2011. **53** (1) : p. 60-7.
32. Yahav, D., *et al.*, Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect*, 2012. **18** (1) : p. 18-29.
33. Cunha, B.A., Aminopenicillins in urology. *Urology*, 1992. **40** (2) : p. 186-90.
34. Acred, P., *et al.*, Pharmacology and chemotherapy of ampicillin--a new broad-spectrum penicillin. *Br J Pharmacol Chemother*, 1962. **18** (2) : p. 356-69.
35. Akova, M., Sulbactam-containing beta-lactamase inhibitor combinations. *Clin Microbiol Infect*, 2008. **14 Suppl 1**: p. 185-8.
36. Suleyman, G., *et al.*, Safety and efficacy of commonly used antimicrobial agents in the treatment of enterococcal infections: a review. *Expert Opin Drug Saf*, 2016. **15** (2) : p. 153-67.
37. Tooke, C.L., *et al.*, β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol*, 2019. **431** (18) : p. 3472-3500.
38. Noguchi, J.K., *et al.*, Sulbactam: a beta-lactamase inhibitor. *Clin Pharm*, 1988. **7** (1) : p. 37-51.

- 
39. Shapiro, A.B., Kinetics of Sulbactam Hydrolysis by β -Lactamases, and Kinetics of β -Lactamase Inhibition by Sulbactam. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. **61** (12) .
40. Hedstrom, L., IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition. *Chem Rev*, 2009. **109** (7) : p. 2903-28.
41. Chong, C.R., *et al.*, Identification of type 1 inosine monophosphate dehydrogenase as an antiangiogenic drug target. *J Med Chem*, 2006. **49** (9) : p. 2677-80.
42. Glander, P., *et al.*, Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activity as a biomarker in the field of transplantation. *Clin Chim Acta*, 2012. **413** (17-18) : p. 1391-7.
43. Striepen, B., *et al.*, Gene transfer in the evolution of parasite nucleotide biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101** (9) : p. 3154-9.
44. Striepen, B., *et al.*, Genetic complementation in apicomplexan parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99** (9) : p. 6304-9.
45. Umejiego, N.N., *et al.*, Targeting a prokaryotic protein in a eukaryotic pathogen: identification of lead compounds against cryptosporidiosis. *Chem Biol*, 2008. **15** (1) : p. 70-7.
46. Gorla, S.K., *et al.*, Validation of IMP dehydrogenase inhibitors in a mouse



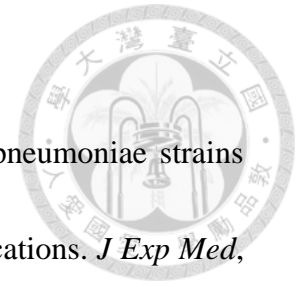
- model of cryptosporidiosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014. **58** (3) : p. 1603-14.
47. Hedstrom, L., *et al.*, The antibiotic potential of prokaryotic IMP dehydrogenase inhibitors. *Curr Med Chem*, 2011. **18** (13) : p. 1909-18.
48. Gollapalli, D.R., *et al.*, Structural determinants of inhibitor selectivity in prokaryotic IMP dehydrogenases. *Chem Biol*, 2010. **17** (10) : p. 1084-91.
49. Hafza, N., *et al.*, Competition assays between ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates collected from Lebanese elderly: An additional cost on fitness. *J Infect Public Health*, 2018. **11** (3) : p. 393-397.
50. Morrow, C.A., *et al.*, De novo GTP biosynthesis is critical for virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog*, 2012. **8** (10) : p. e1002957.
51. Wu, K.M., *et al.*, Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J Bacteriol*, 2009. **191** (14) : p. 4492-501.
52. Garber, E.D., *et al.*, The Virulence of Biochemical Mutants of *Klebsiella Pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1952. **38** (8) : p. 693-7.
53. Papp-Wallace, K.M., *et al.*, Inhibitor resistance in the KPC-2 beta-lactamase, a preeminent property of this class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents*

Chemother, 2010. **54** (2) : p. 890-7.

54. Fang, C.T., *et al.*, A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med*,

2004. **199** (5) : p. 697-705.

55. Hsieh, P.-F., *et al.*, Serum-Induced Iron-Acquisition Systems and TonB Contribute to Virulence in *Klebsiella pneumoniae* Causing Primary Pyogenic Liver Abscess. *J. Infect. Dis.*, 2008. **197** (12) : p. 1717-27.



表

表 一、本研究使用之菌株



菌株	說明	來源及參考文獻
<i>K. pneumoniae</i>		
NTUH-K2044	K1 莢膜型菌株；自患有肝膿瘍併發敗血症、腦膜炎及眼內炎之病人血液檢體分離的臨床菌株	臺大醫院臨床菌株 [54]
NTUH-K2044 transposon mutant library	由本實驗室所建立之跳躍子突變株庫，本實驗用於氯苳青黴素之抗生素感受性試驗	本實驗室所建構
CB28	K47 莢膜型菌株，屬於碳青黴烯類耐藥肺炎克雷伯菌 (CRKP) 菌株	臺北榮民總醫院臨床菌株
CB28 Δkpc	將 <i>kpc</i> 基因剔除之 CB28 菌株	佩芳學姊所建構
<i>E. coli</i>		
DH5 α	勝任細胞	Cat#RH617, RBC Bioscience, Taiwan
ATCC 25922	抗生素感受性試驗之標準參考菌株	American Type Culture Collection [®] , U.S.A.

表 二、本研究使用之質體

質體	說明	來源及參考文獻
pJET1.2/blunt Cloning Vector	<ol style="list-style-type: none"> Commercial cloning plasmid 具有 Ampicillin 抗藥性基因卡匣 (cassettes) 	Cat# K1231, Thermo Fisher Scientific, USA
pCR-Blunt II- TOPO	<ol style="list-style-type: none"> Commercial cloning plasmid 具有 Kanamycin 抗藥性基因卡匣 (cassettes) 	Cat# K280002, Thermo Fisher Scientific, USA
pKO3-Km	<ol style="list-style-type: none"> pKO3 derived plasmid 具有 Kanamycin 抗藥性基因卡匣 (cassettes) 	本實驗室所建構 [55]
pKO3-Hyg	<ol style="list-style-type: none"> pKO3 derived plasmid 具有 Hygromycin 抗藥性基因卡匣 (cassettes) 	本實驗室所建構
pKO3-Hyg: Δkpc	<ol style="list-style-type: none"> pKO3 derived plasmid 具有 Hygromycin 抗藥性基因卡匣 (cassettes) 	由佩芳學姊建構提供

表 三、本研究使用之培養基

培養基	說明 (每公升內含物)		來源
Luria-Bertani (LB) agar	Trypton	10 g	Cat#LBL406 ,
	Yeast extract	5 g	BioShop® , Canada
	Sodium chloride (NaCl)	5 g	
	Agar	15 g	
Luria-Bertani (LB) broth	Trypton	10 g	Cat#LBL405 ,
	Yeast extract	5 g	BioShop® , Canada
	NaCl	5 g	
Mueller-Hinton (MH) agar	Beef extract	3 g	Cat#211443 , BD life
	Acid digest of casein	17.5 g	science , U.S.A.
	Starch	1.5 g	
	Agar	15 g	Cat#AGR001 , BioShop® , Canada

表 四、本研究使用之抗生素

抗生素	常用濃度及用途	參考文獻或來源
Kanamycin	50 µg/mL 跳躍子突變株培養， pKO3-Km質體培養， 基因選殖實驗（Cloning）。	Cat#KAN201.10， BioShop， Canada
Ampicillin	100 µg/mL 抗生素感受性試驗， pJET1.2質體培養。	Cat#AMP201， BioShop， Canada
Hygromycin B	100 µg/mL， 200 µg/mL， pKO3-Hyg質體培養， 基因選殖實驗（Cloning）。	Cat#HYG005， BioShop， Canada
Sulbactam (β-lactamases inhibitor)	50 µg/mL， 和Ampicillin協同使用， CLSI建議濃度比例為2:1。	Cat#S9701， Sigma-Aldrich， U.S.A.

表 五、氨苄青黴素培養盤不同濃度之配置

Ampicillin			
編號	50 μ g/mL 氨苄青 黴素所取用之體 積 (μ L)	MH agar (mL)	最終濃度 (μ g/mL)
1	1	50	1
2	2	50	2
3	4	50	4
4	8	50	8
5	16	50	16
6	32	50	32
7	64	50	64
8	128	50	128
9	256	50	256
10	512	50	512
11	1024	50	1024

註：

每盤培養基體積為 16.5 mL

表六、氨苄青黴素和舒巴坦複方培養盤不同濃度之配置

Ampicillin : Sulbactam				
編號	50 μ g/mL 氨苄青黴素所 取用之體積 (μ L)	50 μ g/mL 舒巴坦 取用之體積 (μ L)	MH agar (mL)	氨苄青黴素: 舒巴坦 最終濃度 (μ g/mL)
1	1	0.5	50	1:0.5
2	2	1	50	2:1
3	4	2	50	4:2
4	8	4	50	8:4
5	16	8	50	16:8
6	32	16	50	32:16
7	64	32	50	64:32
8	128	64	50	128:64
9	256	128	50	256:128
10	512	256	50	512:256
11	1024	512	50	1024:512

註:

1.每盤培養基體積為 16.5 mL

2.根據 CLSI 標準，氨苄青黴素和舒巴坦最佳合併使用濃度比例為 2:1

(Ampicillin : Sulbactam = 2:1)

表 七、本研究使用之化合物與試劑

化合物或試劑	濃度或配方	用途	來源
Agarose	1%	分離 PCR 不同大小之基因產物	Cat#75510-019, Invitrogen, U.S.A.
Ethidium bromide (EtBr)	適量	外染 Agarose gel	Cat#ETB444.10, BioShop, Canada
Glycerol	60% 10%	凍存細菌 製作勝任細胞	Cat# GLY001, BioShop, Canada
Guanine	1 mM	使突變株正常生長 的物質	Cat# G11950, Sigma-Aldrich, U.S.A.
Normal saline (Sodium chloride)	0.95%	稀釋菌液	Cat# SOD004, BioShop, Canada
TAE buffer	1×	電泳反應之緩衝劑以及製成 Agarose gel	Cat#TAE501000, Bioman, Taiwan
Sucrose	5%	篩選缺失突變菌株	Cat# SUC507, BioShop®, Canada
Sodium hydroxide (NaOH)	1 M	溶解 Guanine	Cat#141687.1210, PanReac Appli Chem, Spain

表 八、本研究使用之引子

引子名稱	引子序列 (5'→3')	用途 (說明)
Km3022longR (P1)	GCGCGCTGCGCAGGGCTTTATTGATT CCATTTTAC	
Km2921R (P3)	GTACCGAGCTCGAATTCGGC	
Km4523longF (P1')	CCTTGCCATCACGACTGTGCTGGTCA TTAAACGCG	Semi-random PCR
Km4647F (P3')	CCTGCAGGCATGCAAGCTTC	
CEKG2C (P2)	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNN NNNNNGATAT	
CEKG4 (P4)	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	



表 八、本研究使用之引子 (續)



引子名稱	引子序列 (5'→3')	用途 (說明)
IMPDH F (Not I)	ATAGTCCATCGCCATTTGCGGCCGCTGC TGTCC	
IMPDH R (Not I)	CTTTACCGGTGGCGGAAGCGGCCGCCT CGATAACGTC	
Inverse L	TGATTTCTTCGCCCCGACCTTGCGTCGGG CGATTTATTTAC	
Inverse R'	CTACCCTTTTTTGCAAATAATACTTGCC ATCCCCTC	
pJET1.2 F	CRACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Construction of
pJET1.2 R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	NTUH-K2044
pKO3-L	AGGGCAGGGTCGTAAATAGC	<i>guaB</i> gene deletion
Km F Inverse	TCCCGTTGAATATGGCTCAT	mutant
IMPDH RF outer	GCTTAAGCTGTGACTCCACG	
IMPDH LF outer	GACGGTAGAGCATGTCGTAC	
IMPDH inner primer	CGTTTTCTTCGGTAACCACCG	
pJET outer F	CCCAATTAGTAGCATCACGC	
pJET outer R	GGATGCTATTAACCCTG	Sequencing
IMPDH insert seq	GTTGCGGAACATCGCGCAG	

表 八、本研究使用之引子 (續)



引子名稱	引子序列 (5'→3')	用途 (說明)
SHV11 F (Not I)	GCT GAC GCG GCC GCG AAT GAC GGC CAA TC	
SHV11 R (Not I)	CTT CAG ATG GGC GGC GCG GCC GCT CTC	
SHV11 Inverse L	TAA CCC GGC GGT GGC CGC GCG CGT TAT CCG GCC CGT AGC	
SHV11 Inverse R	AAT ACA TCC TTG AGT GAG GGC CGA TAA AGG CGA GTA AAG	
Hyg R Com	CGC CTG AAA TCG AAT TCC CG	Construction of
Shv11 LF outer	GTC GAG CAT CAA TAG CTG GTA C	NTUH-K2044 <i>shv11</i> gene
Shv11 RF outer	GTC GGC AAG GAT TTC ATG C	deletion mutant
SHV11 inner primer	GTC AAG GCG GGT GAC GTT GTC	
P1 (right)	GCA TTA ACG AGC TGA CGG AG CAC	<i>shv11</i> gene
P2 (right)	CAT CAT TAC CGA CAG GC	deletion mutant
P3 (left)	CGT TAG GGC CGA AGA CAA TG	sequencing
SHV1 F (Not1)	CTG AAA GGC GGC CGC GAG ATT CTG GCC ATC	Construction of CB28 <i>shv1</i> gene
SHV1 R (Not1)	CAC CGT CAT GTC GCC GGC GGC CGC TTT CAC	deletion mutant

表 八、本研究使用之引子 (續)



引子名稱	引子序列 (5'→3')	用途 (說明)
SHV1 Inverse L	AAC CAC AAT ACA TCC TTG AGT GAG	
SHV1 Inverse R	GAG CAC TGG CAA CGC TAA CCC G	
SHV2 F	GAA CGG CAT CTA ACA GGC GG	
SHV2 R	CAC ATT CAG TAT CAT GCC CAG TC	
SHV2 Inverse L	GCA GGA CAT CCG CGT CAT CC	
SHV2 Inverse R	ACC ATC GCC ATG ATC ATT TTG CG	Construction of
Km F	ATG AGC CAT ATT CAA CGG GA	CB28 <i>shv2</i> gene
Km R	GCG TAA TGC TCT GCC AGT GT	insertion mutant
Km F1	GGA AAC GTC TTG CTC GAG GC	
Km R1	GCC TGA GCG AGA CGA AAT ACG	
SHV2 LF	GAGCACTTCACCTTCCACGG	
SHV2 RF	CGAAGAGGTGATCGCGAAACG	
SHV2 inner	CAG TGC TTC AAA GCC CAG CTC	
Toho1 F (NotI)	TGA CCA GCG GCC GCT GCT CCT CCA GTT TAC	
Toho1 R (NotI)	GAT AAT CGC GGC CGC GCT GGG ATT TAA ATC	

表 八、本研究使用之引子 (續)

引子名稱	引子序列 (5'→3')	用途 (說明)
Toho1 Inverse L	CGC CCG GGC AGT GTC ATT CA	Construction of
Toho1 Inverse R	TCA GGC CGG CAT GCC GCT G GCA GAG ACG TTA TGA GGC TTA TGG	CB28 <i>toho1</i> gene deletion mutant
pKO3 L	AGG GCA GGG TCG TTA AAT AGC	
New toho1 LF outer	GGA CTG GGT TCA ATG GGC ATG G	
New toho1 RF outer	CCC GCG ATT CAT CAA CAC GG	
New toho1 inner primer	CAA GTA CTG TTC CAC TTT CGA CAG	
KPC FR	GAG TCT CCT GAA GAC AAG TC	
KPC RR	GGA CGA ATT GCA TTG CGA GAT C	Check CB28 <i>kpc</i> gene deletion
KPC F	GCA GTT TGT TGA TTG GCT AAA GG	mutant
KPC RR1	GAA ACC ATG ACC GAA CAT AAG GC	

表 九、半隨機聚合酶連鎖反應之配置與反應條件



第一輪反應配置

Bacteria liquid	3 μ L
20 μ M Km3022-longR or Km4523-longF	2 μ L
20 μ M CEKG2C	2 μ L
25 mM dNTP	1.6 μ L
25 μ M MgCl ₂	2 μ L
10 \times LA Taq buffer	2 μ L
LA Taq	0.5 μ L
ddH ₂ O	6.9 μ L
Total volume	20 μ L

第一輪反應條件

1. 94°C , 2分鐘
2. 94°C , 30秒
3. Initial temperature: 42°C , 30秒
(-1°C for each subsequent cycle)
4. 72°C , 3分鐘
5. Go to step 2 , for 5 cycles
6. 94°C , 30秒
7. 65°C , 30秒
8. 72°C , 3分鐘
9. Go to step 6 , for 24 cycles
10. 4°C pause

表 九、半隨機聚合酶連鎖反應之配置與反應條件 (續)



第二輪反應配置

50× diluted PCR product	1 μ L
20 μ M Km2921R or Km4647F	2 μ L
20 μ M CEKG4	2 μ L
25 mM dNTP	1.6 μ L
LA Taq	0.5 μ L
10× LA Taq buffer	2 μ L
25 μ M MgCl ₂	2 μ L
ddH ₂ O	8.9 μ L

Total volume	20 μ L
--------------	------------

第二輪反應條件

1. 94°C , 30秒
2. 65°C , 30秒
3. 72°C , 30秒
4. Go to step1, for 29 cycles
5. 4°C pause

表 十、各菌株對氨苄青黴素的最小抑菌濃度

菌株	MIC (µg/mL)
<i>E.coli</i> ATCC 25922	8
NTUH-K2044 WT	1024
NTUH-K2044 16-46	64 *
NTUH-K2044 17-95	64 *
NTUH-K2044 Δ <i>guaB</i>	128 *
NTUH-K2044 Δ <i>shv11</i>	32
CB28 WT	≥ 1024
CB28 Δ <i>shv1</i>	≥ 1024
CB28 Δ <i>kpc</i>	≥ 1024
CB28 Δ <i>toho1</i>	≥ 1024
CB28 Δ <i>toho1</i> Δ <i>kpc</i>	≥ 1024

註

1. CLSI criteria---Ampicillin

Susceptible : MIC ≤ 8 µg/mL

Intermediate : MIC=16 µg/mL

Resistant : MIC ≥ 32 µg/mL

2. *E.coli* ATCC 25922 為負控制組， NTUH-K2044 為正控制組，其他菌株為實驗組。

3. * :因 NTUH-K2044 之 *guaB* 突變株在一般狀況下就生長不佳，在加入抗生素後其 MIC 結果較難以判讀。

表 十一、加入鳥嘌呤後各菌株對氨苄青黴素的最小抑菌濃度

菌株	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>E.coli</i> ATCC 25922	8
NTUH-K2044 WT	≥ 1024
NTUH-K2044 16-46	≥ 1024
NTUH-K2044 17-95	≥ 1024
NTUH-K2044 ΔguaB	≥ 1024



註

1. CLSI criteria---Ampicillin

Susceptible : $\text{MIC} \leq 8 \mu\text{g/mL}$

Intermediate : $\text{MIC} = 16 \mu\text{g/mL}$

Resistant : $\text{MIC} \geq 32 \mu\text{g/mL}$

4. *E.coli* ATCC 25922 為負控制組， NTUH-K2044 為正控制組， 16-46、17-95 及 ΔguaB 為實驗組。

表 十二、CB28 菌株中和乙內醯胺酶相關之基因

基因名稱	產物	位置	分類及分型
<i>shv1</i> (<i>bla1</i>)	Beta-lactamase SHV-1	2799485~2800345bp of chromosome	Class A SHV
<i>toho1</i> (<i>bla2</i>)	Beta-lactamase Toho-1	49440~50315bp of plasmid	Class A CTX-M
<i>kpc</i> (<i>bla3</i>)	Carbapenem- hydrolyzing beta- lactamase KPC	110543~111424bp of plasmid	Class A KPC
<i>shv2</i> (<i>bla4</i>)	Beta-lactamase SHV-2	119412~120272bp of chromosome	Class A SHV

註

1. 本實驗室 CB28 菌株全基因定序結果
2. 分類依據為 Ambler 分類系統

表 十三、加入舒巴坦後各菌株對氨苄青黴素的最小抑菌濃度

菌株	Ampicillin:Sulbactam MIC (µg/mL)
<i>E.coli</i> ATCC 25922	8:4
NTUH-K2044 WT	64:32
NTUH-K2044 $\Delta shv11$	32:16
CB28 WT	$\geq 1024:512$
CB28 $\Delta shv1$	256:128
CB28 Δkpc	256:128
CB28 $\Delta toh1$	$\geq 1024:512$
CB28 $\Delta toh1\Delta kpc$	128:64

註

1. CLSI criteria:

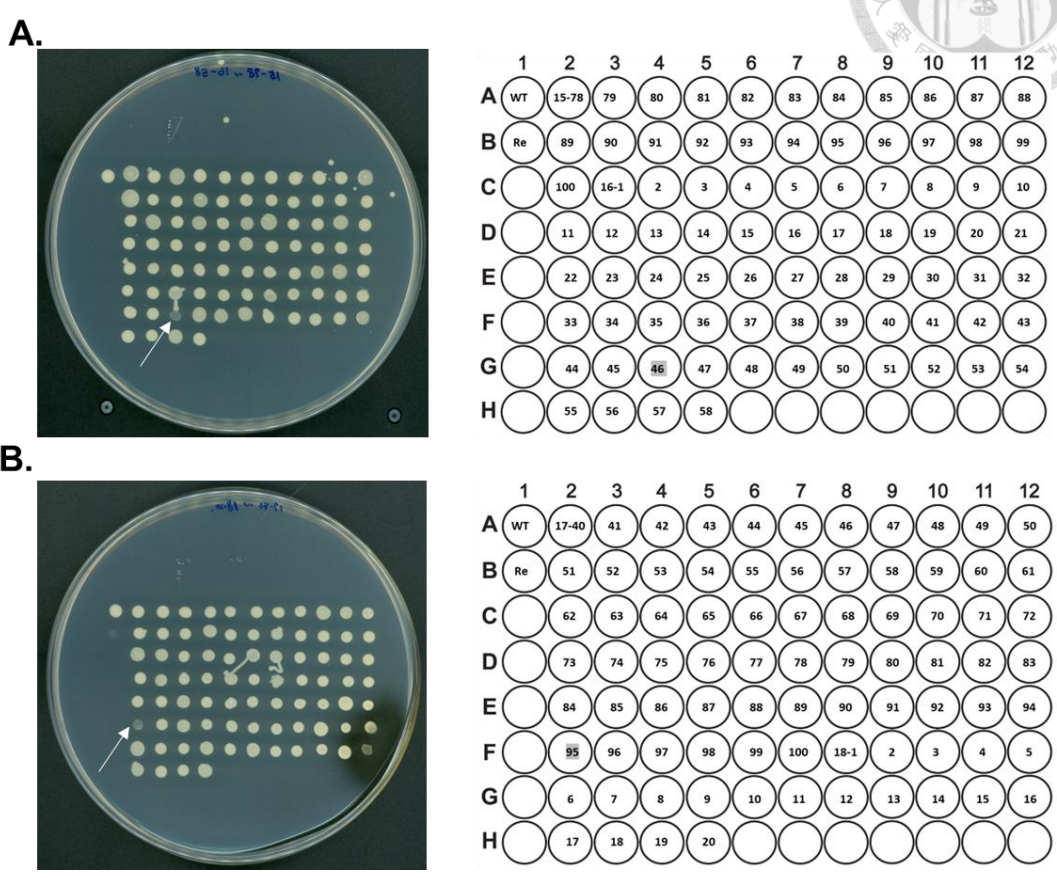
Ampicillin : Sulbactam 最佳合併使用比例為 2:1，Ampicillin MIC 表示方法須加上 sulbactam 之濃度，如上。

2. *E.coli* ATCC 25922 為負控制組， NTUH-K2044 為正控制組，其他菌株為實驗組。

3. 使用 Ampicillin : Sulbactam 時，*E.coli* ATCC 25922 的 MIC QC range 為 2:1~8:4 µg/mL



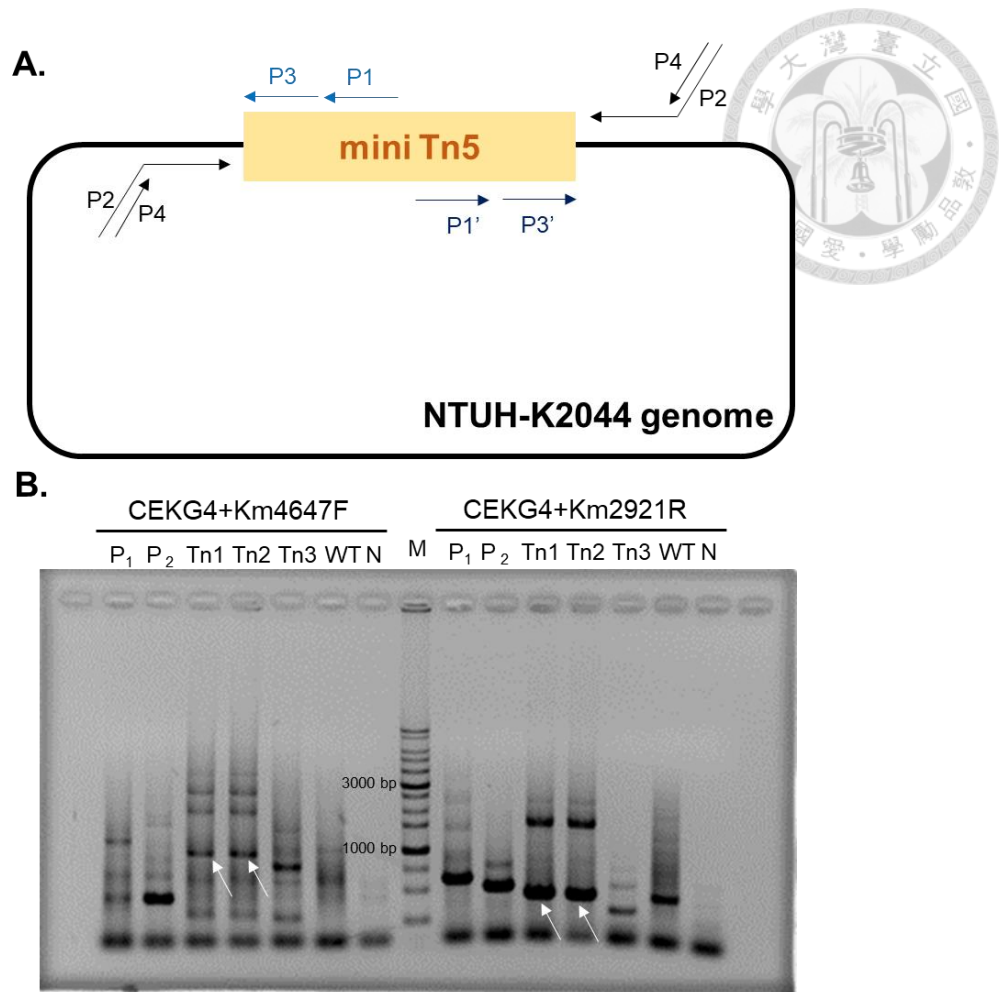
圖



圖一、篩選對氨基青黴素具有較低抗藥性 NTUH-K2044 跳躍子突變株

(A) 編號 15-78~16-58 突變株，(B) 編號 17-40~18-20 突變株。

將隔夜培養之跳躍子突變株庫依序點至含有 100 µg/mL 氨基青黴素的 15 公分 MH 瓊脂培養基上，在 2500 株突變菌株中出現兩株突變株對氨基青黴素有相對高感受性的菌株，分別是 (A) 箭頭所指的 16-46 及 (B) 箭頭所指的 17-95，右圖中以灰底標記序號。位置 A1 為 NTUH-K2044 參考菌株，位置 B1 的 Re 為 MIC 參考菌株 *E.coli* ATCC 25922。



圖二、對氯苄青黴素具有低抗性之 NTUH-K2044 跳躍子突變株分析

(A)半隨機聚合酶反應引子設計示意圖。引子 P1(Km3022longR)、P3(Km2921R)、P1'(Km4523longF)及 P3'(Km4647F)為利用 miniTn5 之序列進行設計；引子 P2(CEKG2C)為包含一半隨機序列和一半已知序列，10 個 N 序列能和多種鹼基配對，可順利結合到鹼基序列些微不同的 DNA，辨認多元的跳躍子插入位置。P4(CEKG4)引子序列則和與 P2 的已知序列相同。(B)此為帶有跳躍子之 NTUH-K2044 突變株的半隨機聚合酶連鎖反應，透過此實驗確認對氯苄青黴素具有低抗性的跳躍子突變菌株片段大小，由左到右，P₁ 及 P₂ 為佩芳學姊提供確定帶有 miniTn5 的突變株，為正控制組；Tn1、Tn2 分別目標突變株 16-46 及 17-95；Tn3 為突變株庫中對氯苄青黴素具有正常抗藥性的跳躍子突變菌株，作為對照；WT 是 NTUH-K2044 參考菌株；M 為 1 kb DNA ladder marker；N 使用水當做負控制

組。以引子 P1 (P1') 與 P2 進行第一輪 PCR，再以引子 P3 (P3') 與 P4 進行第二輪 PCR，將產物跑膠，結果顯示目標突變菌株 16-46 及 17-95 夾出之片段大小相似。將箭頭指標處切膠送定序，確認跳躍子插入位置。



A.

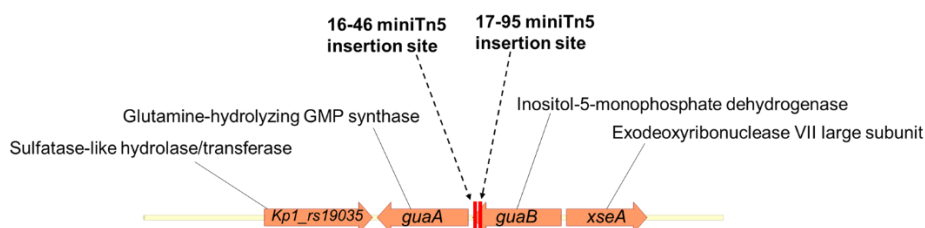
16-46

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> IMP dehydrogenase [Klebsiella]	Klebsiella	219	219	77%	3e-71	100.00%	488	WP_004151980.1
<input checked="" type="checkbox"/> inositol-5-monophosphate dehydrogenase [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTU...]	Klebsiella pneumoniae subsp. pn...	219	219	77%	5e-71	100.00%	510	BAHG4631.1

17-95

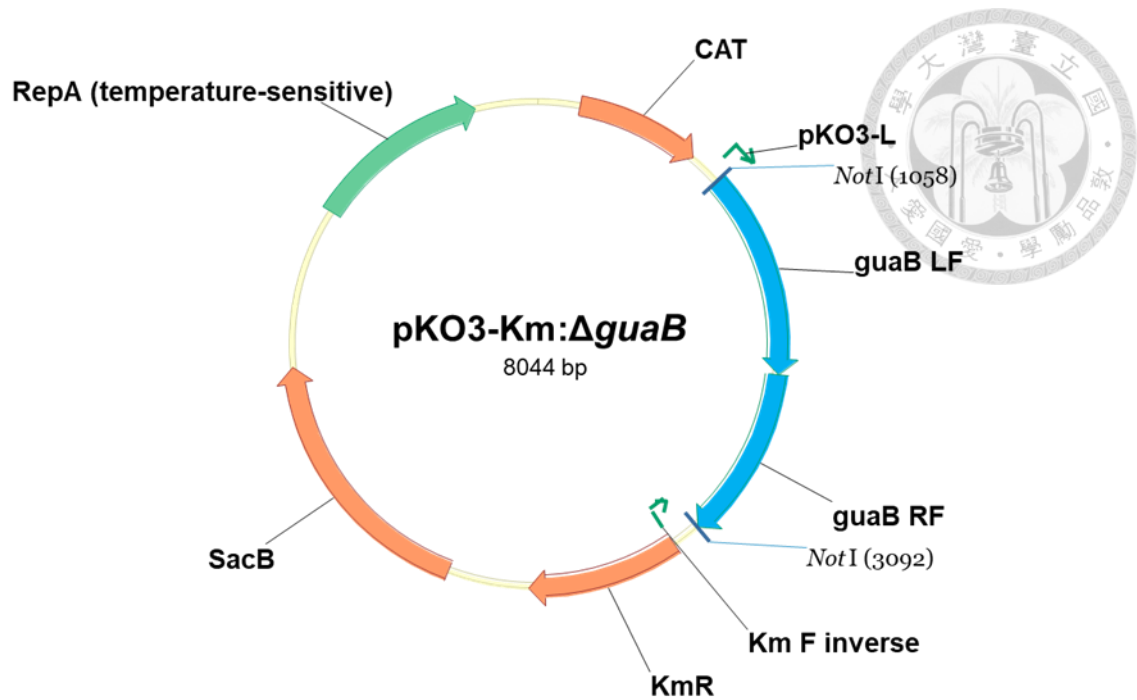
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> IMP dehydrogenase [Klebsiella]	Klebsiella	205	205	71%	4e-66	100.00%	488	WP_004151980.1
<input checked="" type="checkbox"/> inositol-5-monophosphate dehydrogenase [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTU...]	Klebsiella pneumoniae subsp. pn...	206	206	71%	5e-66	100.00%	510	BAHG4631.1

B.

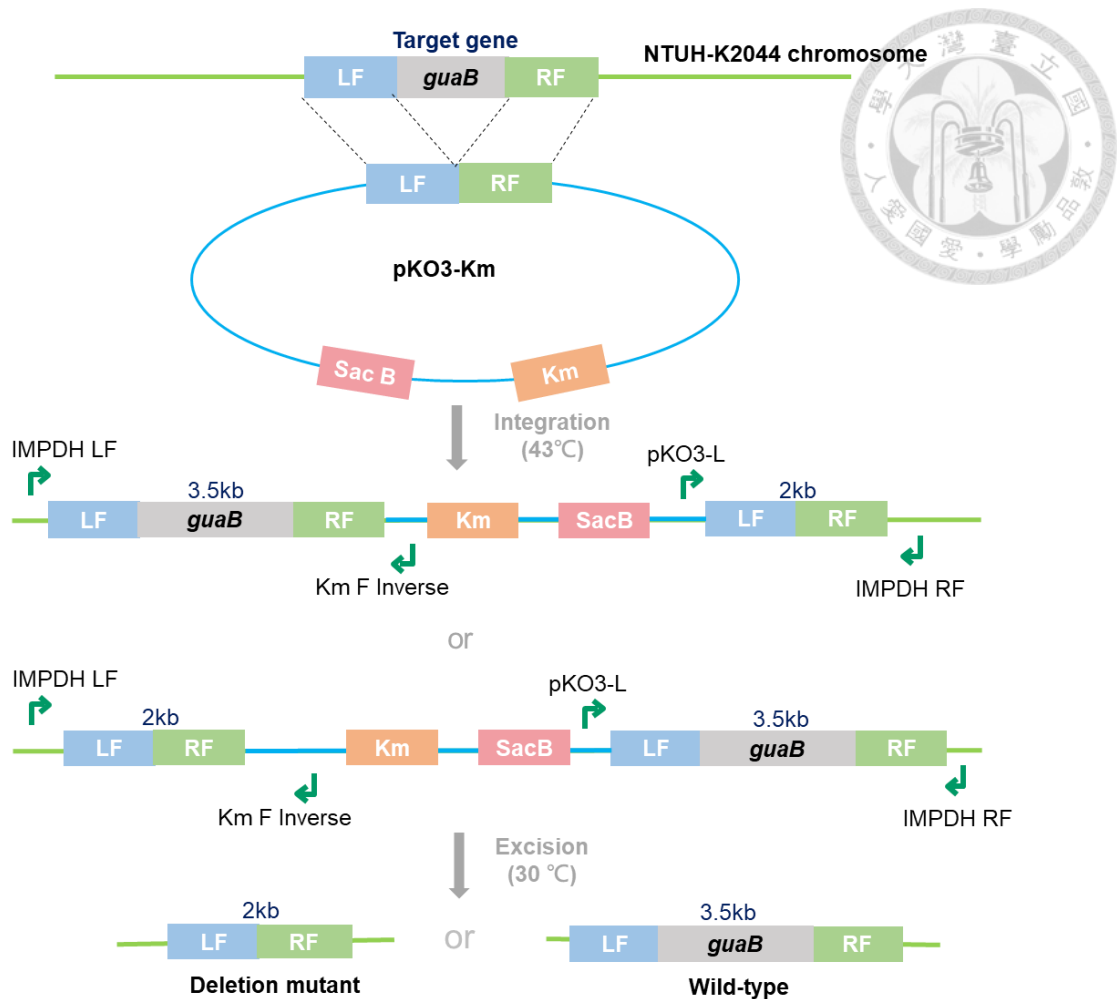


圖三、目標突變株之跳躍子插入基因位置

(A) 將定序結果放至 NCBI 建立的 BLAST 網站上進行分析，得知跳躍子插入位置在 NTUH-K2044 的 IMPDH 蛋白質序列上。(B) 將跳躍子插入位置之序列在 Vector NTI 上分析，紅色粗體線即為跳躍子插入處，16-46 及 17-95 皆插入 *guaB* 基因中。截取跳躍子插入的基因位置約上下游共 10 kb 的序列，分析其基因名稱及對應的蛋白質產物。橘色箭頭內為基因名稱，直線往外延伸者為其蛋白質產物。

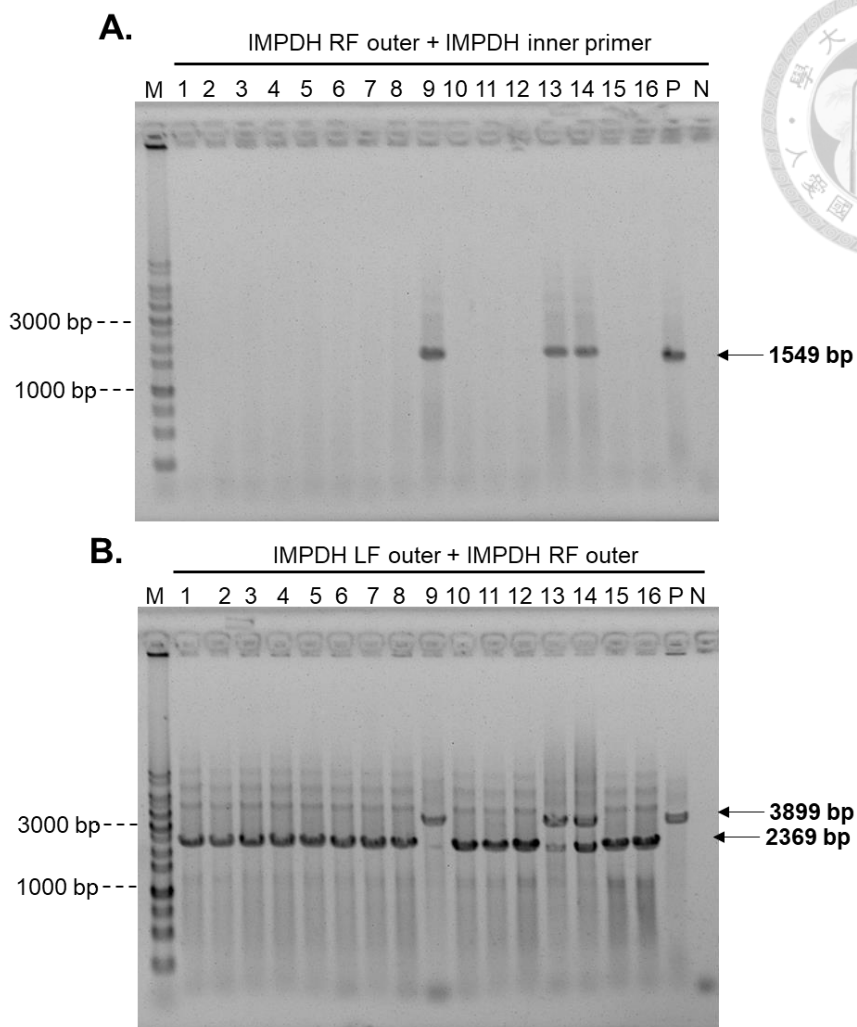


圖四、建構 NTUH-K2044 菌株 *guaB* 基因缺失之 pKO3-Km:Δ*guaB* 質體
 建構完成的 pKO3-Km:Δ*guaB* 內含長度約為 6000 bp 的 pKO3-Km 載體以及插入不帶有 *guaB* 基因之外圍側翼區域的片段，約為 2kb，總長度約為 8044bp。↻ 代表各個引子的方向，➡ 及 ➡ 則分別代表不同的閱讀開放框架，➡ 則為 *guaB* 基因左右側之側翼區域。



圖五、*guaB* 基因缺失突變株建構之示意圖

利用同源重組反應 (Homologous recombination) 進行基因剔除。*guaB* 為欲刪除之目標基因，LF：目標基因左側同源重組側翼區 (Flanking region)，RF：目標基因右側同源重組側翼區，同源重組側翼區一側通常設計為 1 kb 左右的片段。pKO3-Km 質體帶有 Kanamycin resistance cassette，可正向篩選目標菌落；且其複製起點 (Origin) 為溫度感受性，在 30°C 的環境下可進行複製；但在 43°C 下無法進行複製，會插入細菌染色體中。而 *sacB* 基因會將蔗糖 (Sucrose) 轉換成生成毒素，對細菌有害，因此可外加蔗糖，作為負向篩選，刺激細菌將質體排出體外。綠色箭頭為可確認 Integration 片段大小之相對應引子。



圖六、NTUH-K2044 之 *guaB* 基因缺失突變株

此為透過同源重組反應建構的 *guaB* 缺失菌株，挑選 16 個菌落，並以聚合酶連鎖反應確認剔除 NTUH-K2044 之 *guaB* 基因。由左到右，M 為 1 kb DNA ladder marker；P 為使用 NTUH-K2044 參考菌株當模板，是正控制組；N 為使用水當做負控制組。(A) 以一邊同源重組側翼區外的引子 IMPDH RF outer 與 *guaB* 基因內的引子 IMPDH inner primer 進行 PCR，產物大小為 1549 bp。(B) 以一對同源重組側翼區外的引子 IMPDH LF outer 與 IMPDH RF outer 進行 PCR。WT 產物大小為 3899 bp， Δ *guaB* 產物大小則為 2369 bp。兩張膠圖對照後可確認，除了編號 9、13、14 菌落以外，其他菌落皆為 *guaB* 基因缺失突變株。

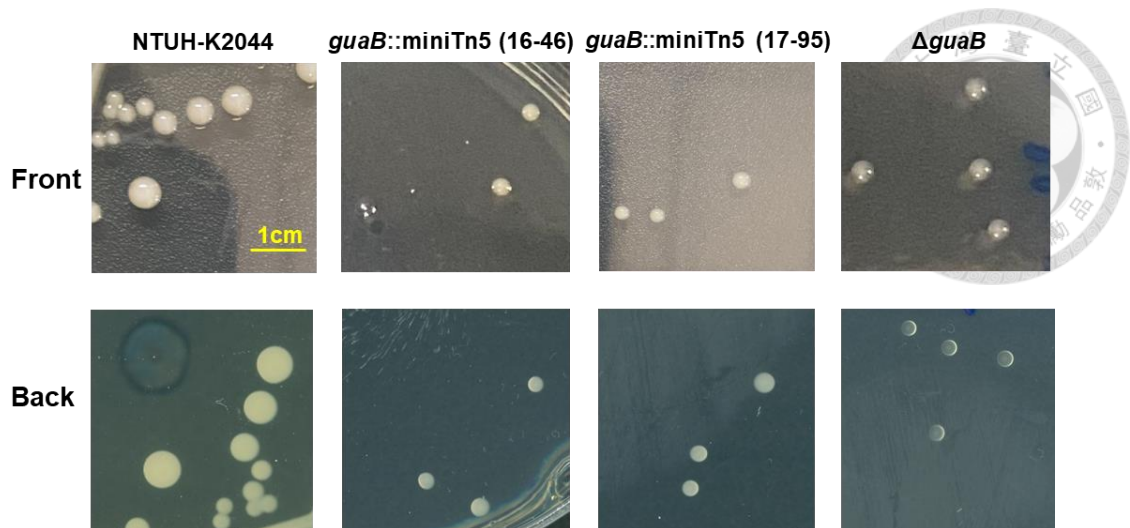


圖 七、菌落型態差異

將 NTUH-K2044 參考菌株、*guaB* 跳躍子突變株及 *guaB* 缺失突變株在 LB 瓊脂培養基盤上 37°C 隔夜培養，觀察其菌落型態的不同。上排為正面圖，下排為背面影像。

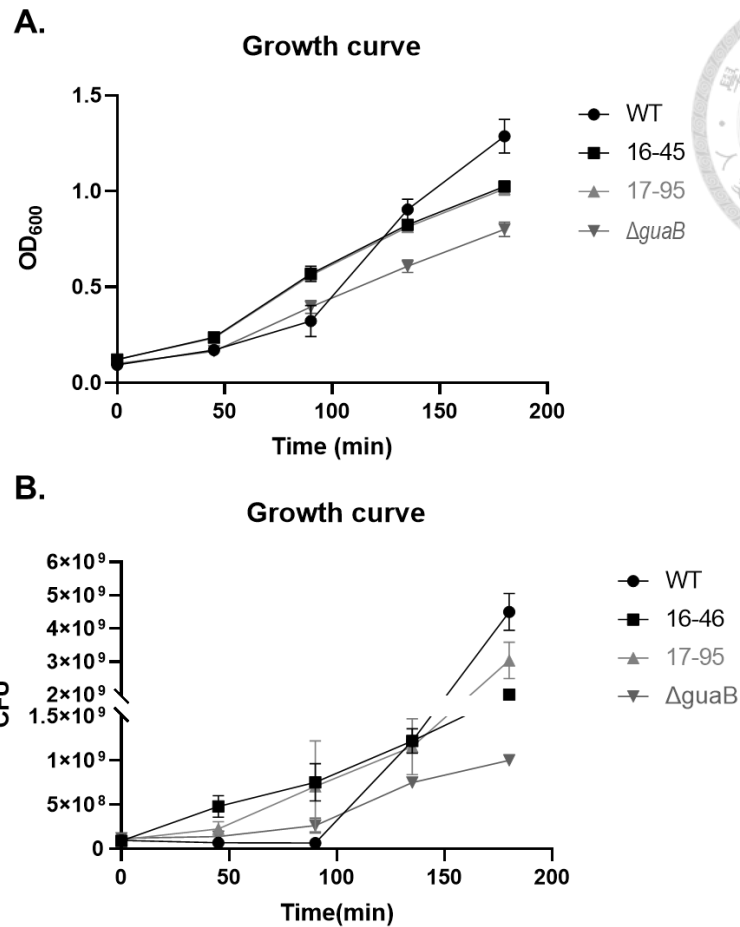
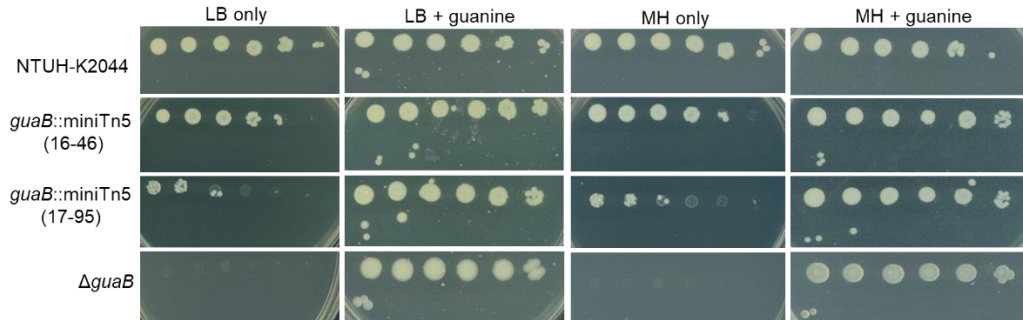
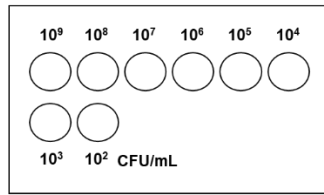


圖 八、突變株培養基之生長曲線

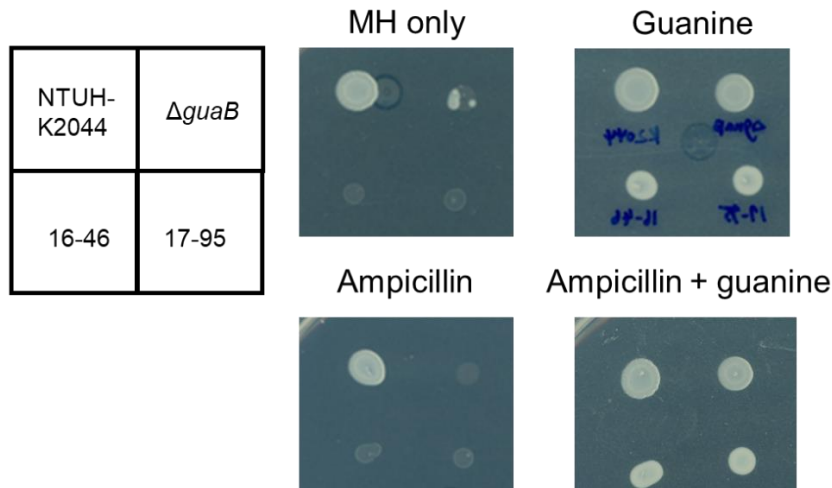
NTUH-K2044 參考菌株、跳躍子突變株及缺失突變株皆在 LB 肉湯中以 37°C 培養，45 分鐘為單位，連續測量四個單位，意即 180 分鐘，通過 OD₆₀₀ 吸光值以及菌落計數的方式測量跳躍子突變株和缺失突變株的生長曲線是否有差異。(A) x 軸為時間，y 軸為 OD₆₀₀ 數值的變化 (B) x 軸為時間，y 軸為菌落計數 CFU 數值的變化。實驗結果皆為三次重複實驗結果之平均 (means ± SDs)。



A.



B.



圖九、觀察補充鳥嘌呤後各菌株生長情形變化

(A) 將四種菌株培養至 $OD_{600}=1$ ，並且一律稀釋調整菌量至 10^9 CFU/mL，之後以 10 倍序列稀釋至 10^2 CFU/mL，每個稀釋倍數皆取 2 μ L 菌液點在各式培養基上，以 37°C 隔夜培養，觀察生長狀況。培養基由左至右列分別為，LB 瓊脂培養基、LB 瓊脂培養基外加鳥嘌呤、MH 瓊脂培養基、MH 瓊脂培養基外加鳥嘌呤；菌株由上至下行分別為 NTUH-K2044 參考菌株作為負控制組，跳躍子突變株 16-46、17-95 和 *guaB* 缺失突變株則為實驗組。結果發現，比起 LB 瓊脂培養基，在 MH 瓊脂培養基上，突變株都長得較薄較小。另外，相對於一般培養基，補充鳥嘌呤後，三個突變菌株生長狀況皆改善，表示 *guaB* 基因會影響細菌整體生長狀

況。(B)將同樣四種菌株稀釋並取 10^4 CFU/mL 菌量進行抗生素感受試驗，分別點在 MH 培養基、含有 8 μ g/mL 氨苄青黴素以及皆外加鳥嘌呤的 MH 培養基上。發現不論有無氨苄青黴素的培養基，菌株在未加入鳥嘌呤的培養基皆生長不佳；但在加入鳥嘌呤後，在 MH 培養基和含抗生素培養基上的生長狀況皆大幅改善。表示突變菌株之生長狀況不良並非由氨苄青黴素所抑制，而是 *guaB* 基因的缺失導致其本身無法正常生長。

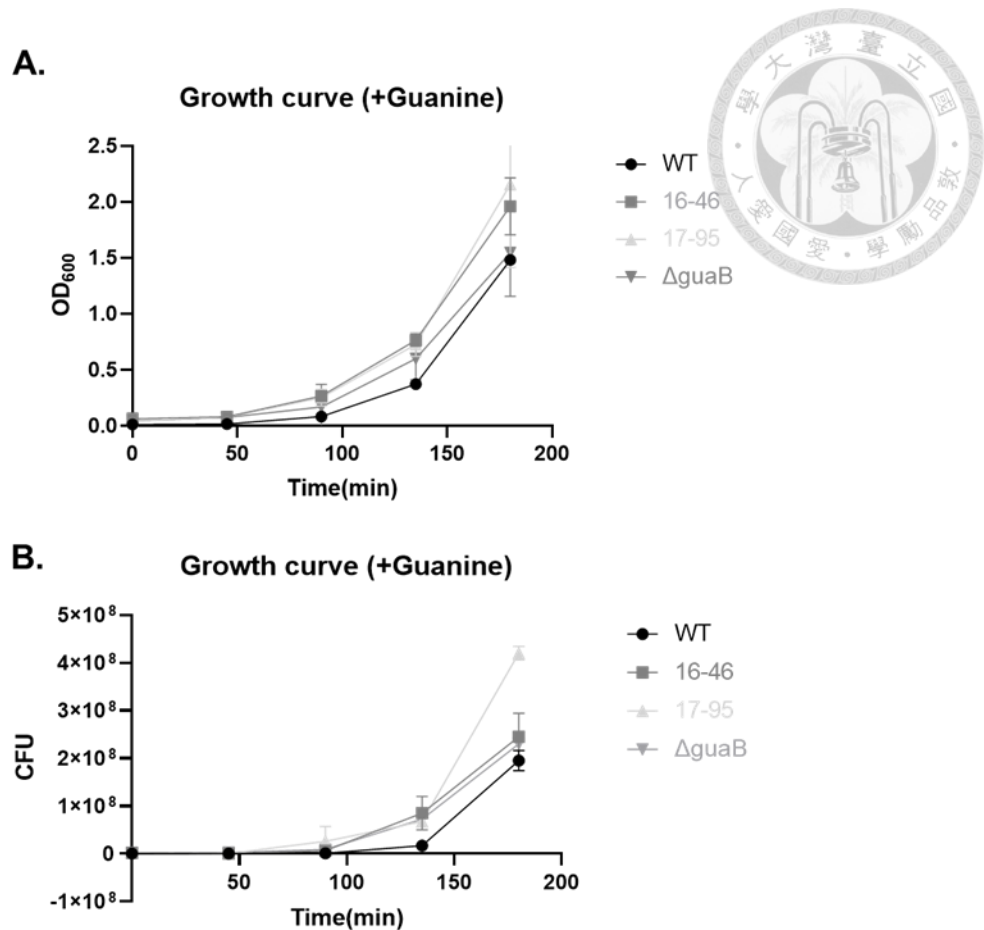


圖 十、突變株在含有鳥嘌呤之培養基之生長曲線

NTUH-K2044 參考菌株、跳躍子突變株及缺失突變株皆在含有 1mM 鳥嘌呤的 LB 肉湯中以 37°C 培養，45 分鐘為單位，連續測量四個單位，意即 180 分鐘，通過 OD₆₀₀ 吸光值以及菌落計數的方式測量跳躍子突變株和缺失突變株的生長曲線是否有差異。(A) x 軸為時間，y 軸為 OD₆₀₀ 數值的變化 (B) x 軸為時間，y 軸為菌落計數 CFU 數值的變化。實驗結果皆為三次重複實驗結果之平均 (means ± SDs)。

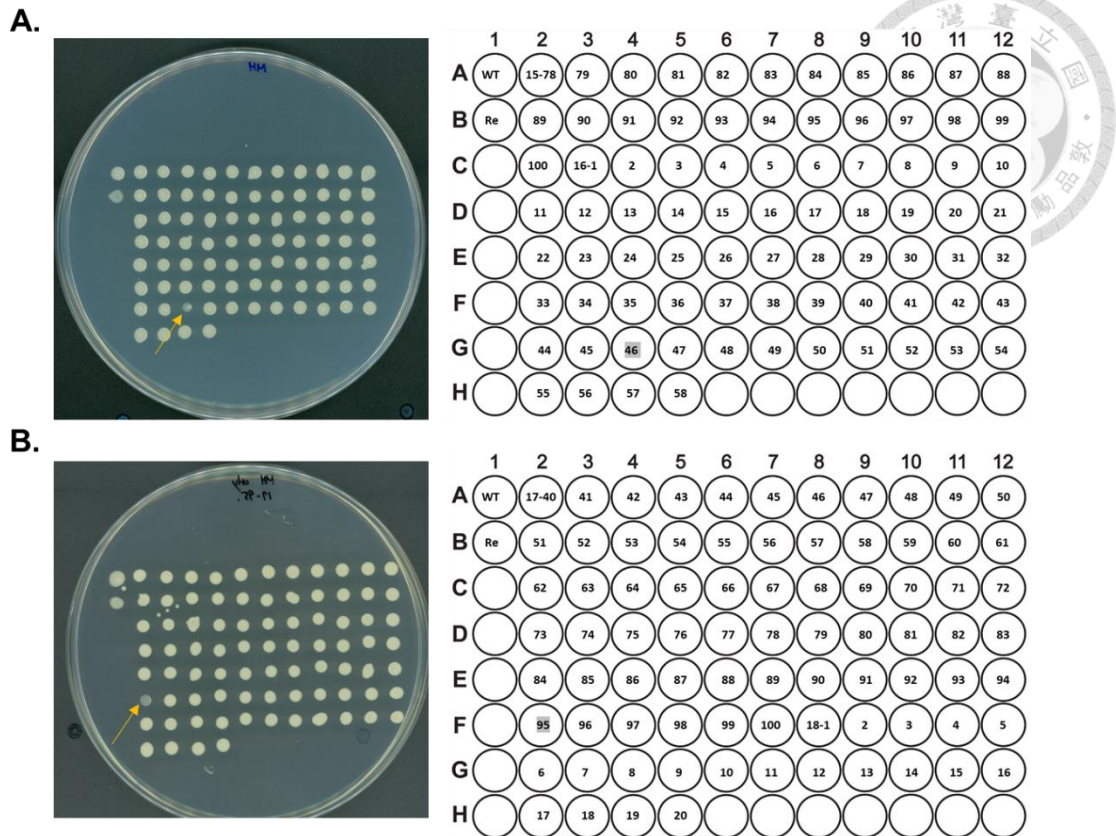


圖 十一、利用不含抗生素 MH 培養基確認 NTUH-K2044 跳躍子突變株生長情形

(A) 編號 15-78~16-58 突變株，(B) 編號 17-40~18-20 突變株。

將隔夜培養之跳躍子突變株庫依序點至不含抗生素之 15 公分 MH 瓊脂培養基上，

(A) 箭頭所指的 16-46 及 (B) 箭頭所指的 17-95，右圖中以灰底標記序號，實驗結果和在含有氨基青黴素培養基一致，生長狀況不佳。位置 A1 為 NTUH-K2044 參考菌株，位置 B1 的 Re 為 MIC 參考菌株 *E.coli* ATCC 25922。

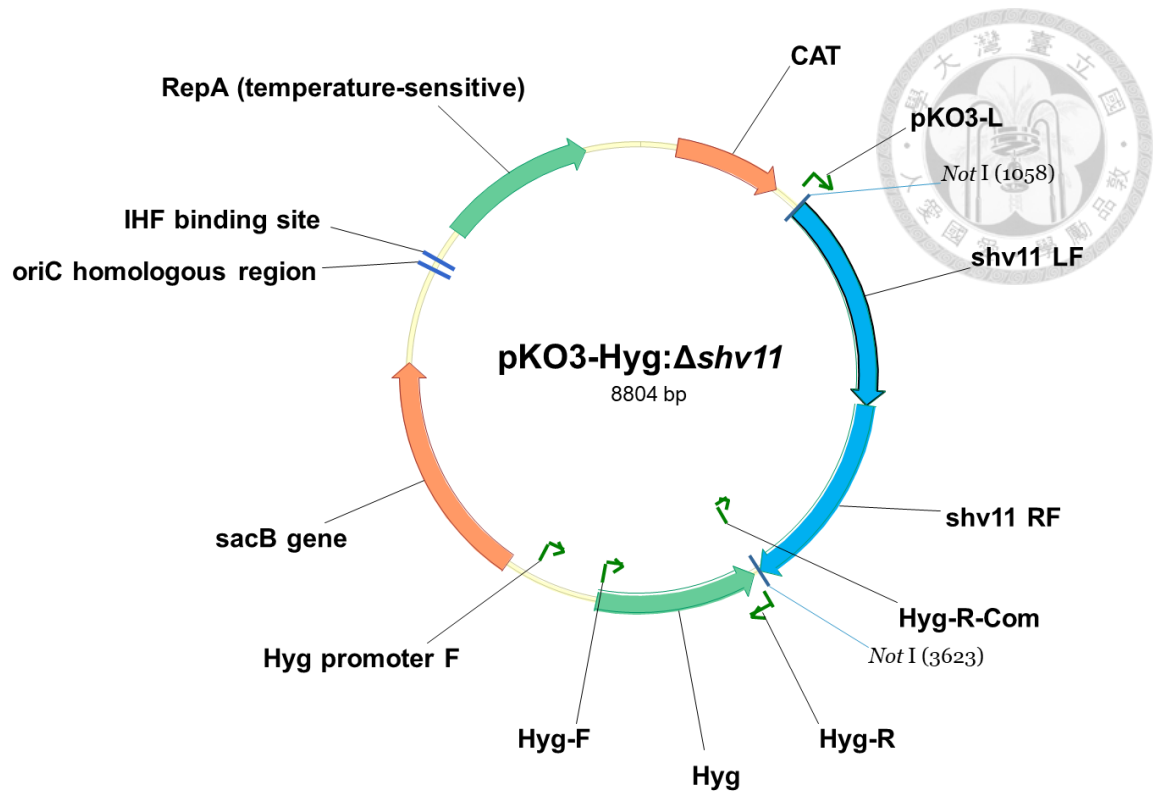


圖 十二、建構 NTUH-K2044 菌株乙內醯胺酶 *shv11* 基因缺失之 pKO3-Hyg: $\Delta shv11$ 質體

建構完成的 pKO3-Hyg: $\Delta shv11$ 內含長度約為 6000 bp 的 pKO3-Hyg 載體以及插入不帶有 *shv11* 基因之外圍側翼區域的片段，約為 2.6 kb，總長度約為 8804 bp。

↻ 代表各個引子的方向、→ 及 → 則分別代表不同的開放閱讀框架，→ 則為 *shv11* 基因左右側之側翼區域。

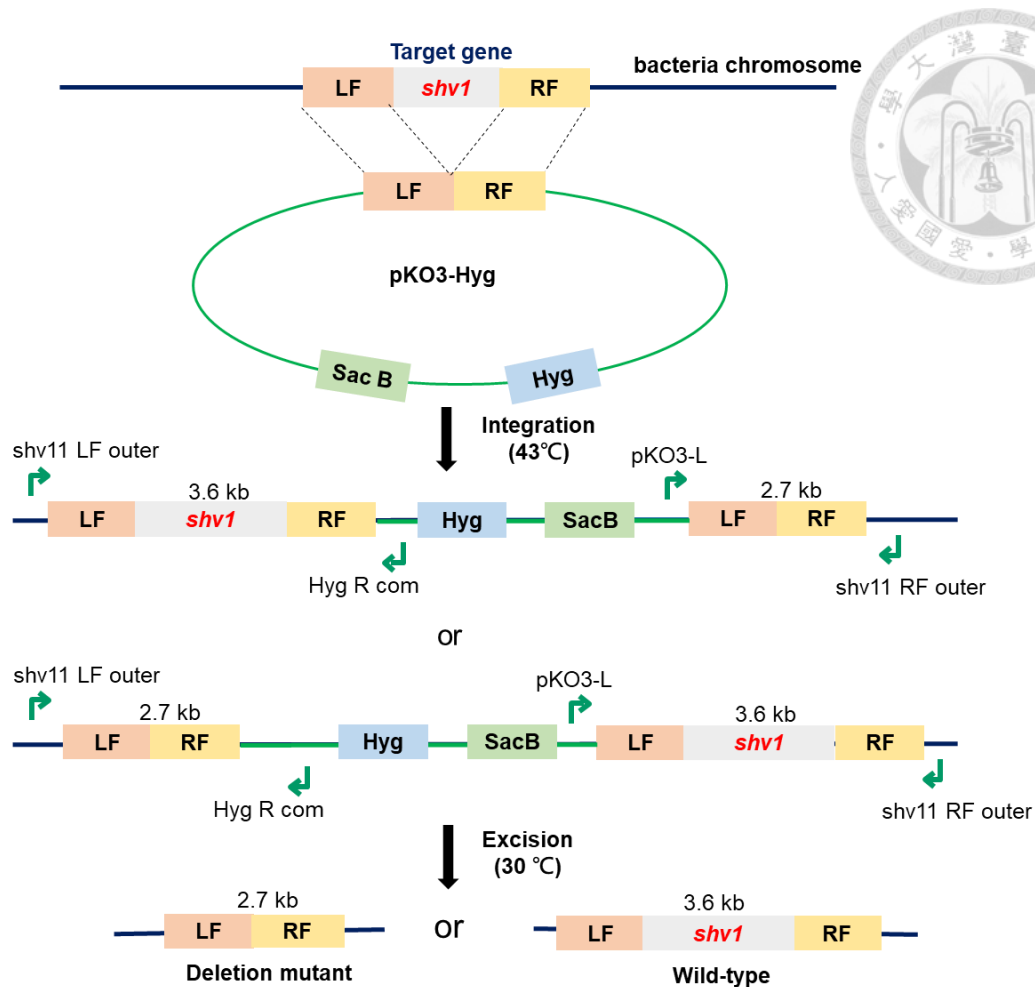


圖 十三、Beta lactamase 基因缺失突變株建構示意圖

利用同源重組反應 (Homologous recombination) 進行基因剔除。*shv1* 為欲刪除之目標基因，LF：目標基因左側同源重組側翼區 (Flanking region)，RF：目標基因右側同源重組側翼區，同源重組側翼區一側通常設計為 1 kb 左右的片段。pKO3-Hyg 質體帶有 Hygromycin resistance cassette，可正向篩選目標菌落；且其複製起點 (Origin) 為溫度感受性，在 30°C 的環境下可進行複製；但在 43°C 下無法進行複製，會插入細菌染色體中。而 *sacB* 基因會將蔗糖 (Sucrose) 轉換成生成毒素，對細菌有害，因此可外加蔗糖，作為負向篩選，刺激細菌將質體排出體外。綠色箭頭為可確認 Integration 片段大小之相對應引子。

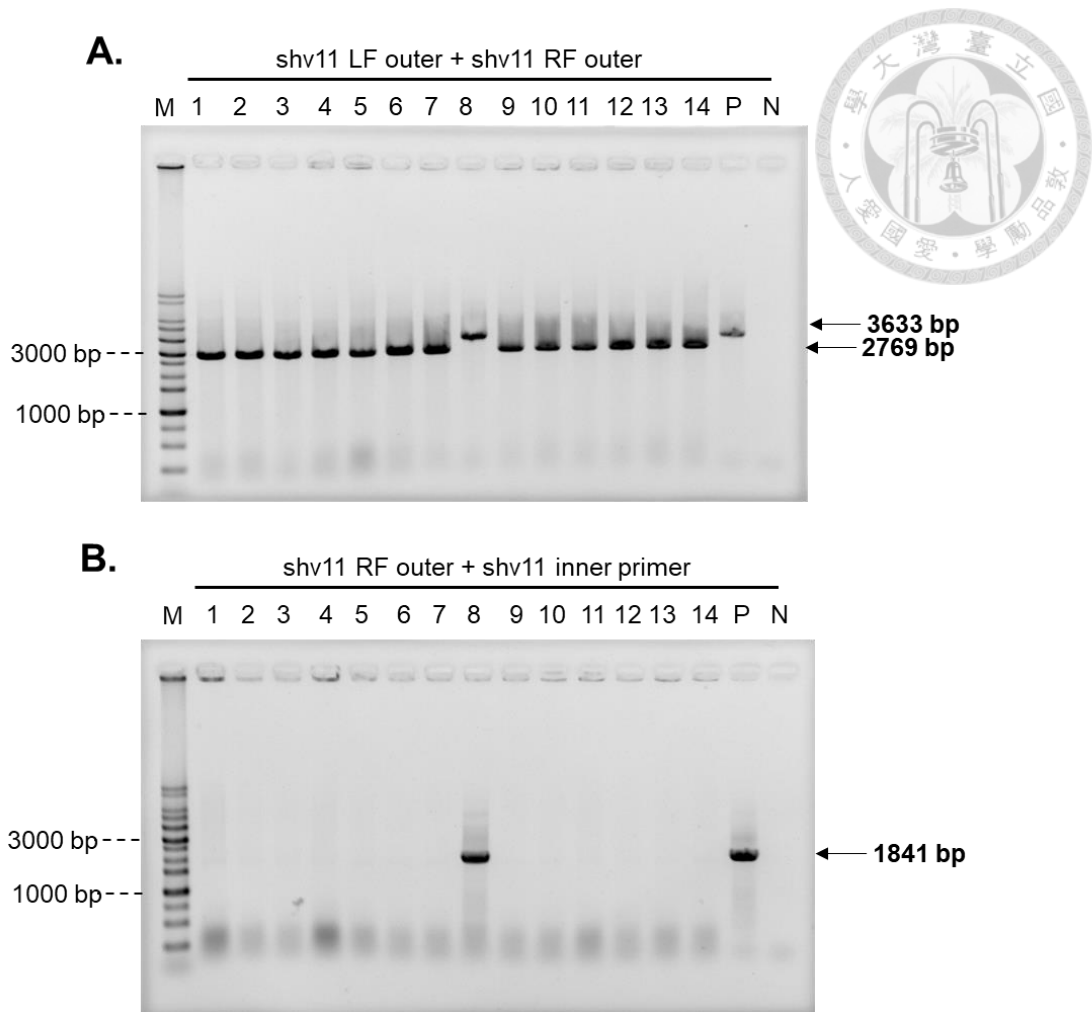


圖 十四、NTUH-K2044 之 *shv11* 基因缺失突變株

此為透過同源重組反應建構的 NTUH-K2044 *shv11* 缺失菌株，挑選 14 個菌落，並以聚合酶連鎖反應確認剔除 NTUH-K2044 之 *shv11* 基因。由左到右，M 為 1 kb DNA ladder marker；P 為使用 NTUH-K2044 參考菌株當模板，是正控制組；N 為使用水當做負控制組。（A）以一對同源重組側翼區外的引子 shv11 LF outer 與 shv11 RF outer 進行 PCR。WT 產物大小為 3633 bp， $\Delta shv11$ 產物大小則為 2769 bp。（B）以一邊同源重組側翼區外的引子 shv11 RF outer 與 *shv11* 基因內的引子 shv11 inner primer 進行 PCR，產物大小為 1841 bp。兩張膠圖對照後可確認，除了編號 8 的菌落以外，其他菌落皆為 *shv11* 基因缺失突變株。

shv1 LF-RF	1	GTCCAGCATCAATAGCTGGTACTCCGCCAGCGCCCTCGCAATGGCCGTGAGCATCGCGGAGGCGATGGTGGACGACACCATCACGACAGTCCGCCGCTTCAGATGGCGGGCGAGCGCCGCT	120
shv11 LF-RF	1	GTCCAGCATCAATAGCTGGTACTCCGCCAGCGCCCTCGCAATGGCCGTGAGCATCGCGGAGGCGATGGTGGACGACACCATCACGACAGTCCGCCGCTTCAGATGGCGGGCGAGCGCCGCT	120
shv1 LF-RF	121	CTCCGCCAAGCAGGATCCCCCGACCTGGCGGGCATTGACCCACAGCAGCAACAATGCATCCAGTTCGCGGGCGAAGCCAGCCGCGCTGGGGCCCGCGCCTTTGGCGCCCGCCGACGAC	240
shv11 LF-RF	121	CTCCGCCAAGCAGGATCCCCCGACCTGGCGGGCATTGACCCACAGCAGCAACAATGCATCCAGTTCGCGGGCGAAGCCAGCCGCGCTGGGGCCCGCGCCTTTGGCGCCCGCCGACGAC	240
shv1 LF-RF	241	TGCGCGACAGTTGTCCGGGATTGATGTCAACGCCCGAGGTGTTCAAGCCCGCCGTGAGCGAGCGCGCGGGCGCGCCCATGCCCATTTGAACCCAGTCCAATCACGCGAGCGTTAGTGTGTGC	360
shv11 LF-RF	241	TGCGCGACAGTTGTCCGGGATTGATGTCAACGCCCGAGGTGTTCAAGCCCGCCGTGAGCGAGCGCGCGGGCGCGCCCATGCCCATTTGAACCCAGTCCAATCACGCGAGCGTTAGTGTGTGC	360
shv1 LF-RF	361	AGCCATGCTGGTCTCCCTGTGAACATTAGTAAATAATGTGATTAATGATAGAATAAAGCGTTATCATGTGAATTTATGTGAGAGTTATCACGAATAACCCACATGAATATAAAAAAT	480
shv11 LF-RF	361	AGCCATGCTGGTCTCCCTGTGAACATTAGTAAATAATGTGATTAATGATAGAATAAAGCGTTATCATGTGAATTTATGTGAGAGTTATCACGAATAACCCACATGAATATAAAAAAT	480
shv1 LF-RF	481	CACAGCGGAAAGAGGCTGCACAACGGCGATTCTTGCCTAAAAAGCCATAAAACAGCGGCAAGCGCGATAACCAACACCGGGTGTCCGCAAGCGCGCGTGCCTGAGTGTGACGCCCTGG	600
shv11 LF-RF	481	CACAGCGGAAAGAGGCTGCACAACGGCGATTCTTGCCTAAAAAGCCATAAAACAGCGGCAAGCGCGATAACCAACACCGGGTGTCCGCAAGCGCGCGTGCCTGAGTGTGACGCCCTGG	600
shv1 LF-RF	601	TGTGAAAAATGGTAAGGGGAGAGCGGTGATTCCAATGAAACGACATCAGCGTATTTAGCCCTGGTGGAGCAGCGTGGGGCGGTAAGCATTAAACGAGTGCAGGAGATCCTCGCGCTGT	720
shv11 LF-RF	601	TGTGAAAAATGGTAAGGGGAGAGCGGTGATTCCAATGAAACGACATCAGCGTATTTAGCCCTGGTGGAGCAGCGTGGGGCGGTAAGCATTAAACGAGTGCAGGAGATCCTCGCGCTGT	720
shv1 LF-RF	721	CCCATATGACCATCCGTGGGACGTTAGTAACTGGAGGAGCAGGGGCTGCTGGTCAGCGCTCGGGCGGGCTGGCGGCGCTCAGCCGGCTGGCCCGGAACCCAGTCACTGGTGAATA	840
shv11 LF-RF	721	CCCATATGACCATCCGTGGGACGTTAGTAACTGGAGGAGCAGGGGCTGCTGGTCAGCGCTCGGGCGGGCTGGCGGCGCTCAGCCGGCTGGCCCGGAACCCAGTCACTGGTGAATA	840
shv1 LF-RF	841	GCACGCTGCAGAGTGGAGGAAACAGCGCATCGCCGCGCTGGCGGCGATCATATCGCCAAAAACAGTTGCATTTATCTGGATGCCGGGACTACCACCTGGCGCTGGCGGGGCGATCC	960
shv11 LF-RF	841	GCACGCTGCAGAGTGGAGGAAACAGCGCATCGCCGCGCTGGCGGCGATCATATCGCCAAAAACAGTTGCATTTATCTGGATGCCGGGACTACCACCTGGCGCTGGCGGGGCGATCC	960
shv1 LF-RF	961	TCCAGCCGAGCAGTCCAGTGGTCAACCAATGATTTGAGATAACCCAGCTGCTGATCGATGCCAGCCAGTGGCGGTGATCCACACCGGGCGACTGTGTGCCGGGAAACCGCTCT	1080
shv11 LF-RF	961	TCCAGCCGAGCAGTCCAGTGGTCAACCAATGATTTGAGATAACCCAGCTGCTGATCGATGCCAGCCAGTGGCGGTGATCCACACCGGGCGACTGTGTGCCGGGAAACCGCTCT	1080
shv1 LF-RF	1081	CGGTGGCGAATCGCGCGCGTACGTTACGCCACCTGGCTATCGATACGGCCTTTATCTCCGCCAGCGGGTGGGACAGTCCGGGATTTTACCCTGATGAGAACAGGTTACCGTCA	1200
shv11 LF-RF	1081	CGGTGGCGAATCGCGCGCGTACGTTACGCCACCTGGCTATCGATACGGCCTTTATCTCCGCCAGCGGGTGGGACAGTCCGGGATTTTACCCTGATGAGAACAGGTTACCGTCA	1200
shv1 LF-RF	1201	AGGAGACCGTACGACAGTCAAGCGGAGGAGATCCCTGCTGTCGACAGTTTCAAAACAACAGTGGCCAGTTCATGGCTTACCTTTGACCCGGTACCACCACTTATCCGACG	1320
shv11 LF-RF	1201	AGGAGACCGTACGACAGTCAAGCGGAGGAGATCCCTGCTGTCGACAGTTTCAAAACAACAGTGGCCAGTTCATGGCTTACCTTTGACCCGGTACCACCACTTATCCGACG	1320
shv1 LF-RF	1321	GGCATCTTCCGATGCCCGCCGACGTCATATCGCCGGCAGCGCTGCGAGGTGCTACGGGCGGATAACCGCGCGGGCACCCCGGGTTAGCGTTGCCAGTGTGATCAGCGCGCGC	1440
shv11 LF-RF	1321	GGCATCTTCCGATGCCCGCCGACGTCATATCGCCGGCAGCGCTGCGAGGTGCTACGGGCGGATAACCGCGCGGGCACCCCGGGTTAGCGTTGCCAGTGTGATCAGCGCGCGC	1440
shv1 LF-RF	1441	CGATCCCGCGATTGCTGATTTGCTCGCTGGCCACTCTCGCCGGGTATCCCGCAGATAAATCACACAATGCGCTCTGCTTTGTTATCCGGGCAAGCAGGGCGACAACTCCGCGCGCAC	1560
shv11 LF-RF	1441	CGATCCCGCGATTGCTGATTTGCTCGCTGGCCACTCTCGCCGGGTATCCCGCAGATAAATCACACAATGCGCTCTGCTTTGTTATCCGGGCAAGCAGGGCGACAACTCCGCGCGCAC	1560
shv1 LF-RF	1561	CCCGTTCGCCAGCTCCGGTCTTATCGCGGATAAACAGCCCGCGCGCAGCAGGAGCGGATCAACCGTCCCGGCAACCGATGCTCCACCACCACTGCGAGCAGCTCCGCTTCCGAAACGG	1680
shv11 LF-RF	1561	CCCGTTCGCCAGCTCCGGTCTTATCGCGGATAAACAGCCCGCGCGCAGCAGGAGCGGATCAACCGTCCCGGCAACCGATGCTCCACCACCACTGCGAGCAGCTCCGCTTCCGAAACGG	1680
shv1 LF-RF	1681	CGCTCAGACGCTGGCTGGTACGAGCTTGCAGAGGTCGCGGCCATGCTGCCCGGGATGTTGGTGTCCGCGGCGTCCGCCGGGAAAGCGCTCATTGATCCGTTCCCGAGCGTCAAGG	1800
shv11 LF-RF	1681	CGCTCAGACGCTGGCTGGTACGAGCTTGCAGAGGTCGCGGCCATGCTGCCCGGGATGTTGGTGTCCGCGGCGTCCGCCGGGAAAGCGCTCATTGATCCGTTCCCGAGCGTCAAGG	1800
shv1 LF-RF	1801	GGGTGACGTTGTCCCGGATCGCGCAGAAAGGCGAGTCAATCTCGCGGGCCCGCGAGTGGCCAGCAGAGATTGGCGGGCTGTTATCGCTCATGGTAATGGCGCGCGCAGAGTT	1920
shv11 LF-RF	1801	GGGTGACGTTGTCCCGGATCGCGCAGAAAGGCGAGTCAATCTCGCGGGCCCGCGAGTGGCCAGCAGAGATTGGCGGGCTGTTATCGCTCATGGTAATGGCGCGCGCAGAGTT	1920
shv1 LF-RF	1921	CGCCGACCGTATGCCGTCGGCAAGTGTGTTTTCGCTGACCGCGGAGTAGTCCACCAGATCCTGCTGGGATAGTGGATCTTTCGCTCCAGCTGTTGCTCAGCGGATCCACCAGCGCCA	2040
shv11 LF-RF	1921	CGCCGACCGTATGCCGTCGGCAAGTGTGTTTTCGCTGACCGCGGAGTAGTCCACCAGATCCTGCTGGGATAGTGGATCTTTCGCTCCAGCTGTTGCTCAGCGGATCCACCAGCGCCA	2040
shv1 LF-RF	2041	GCATGCGCCGACAGGACTACTTTAAAGTGCTCATATGGAAAGCGTTCATCGCGCGCCAGCGGTCAGCGTGCGGCCGCTGGCCAGATCCATTTTATCATGCTCAGCGCGCCG	2160
shv11 LF-RF	2041	GCATGCGCCGACAGGACTACTTTAAAGTGCTCATATGGAAAGCGTTCATCGCGCGCCAGCGGTCAGCGTGCGGCCGCTGGCCAGATCCATTTTATCATGCTCAGCGCGCCG	2160
shv1 LF-RF	2161	ACAGCTGGCTTCGCTTTGTTAAATTTGCTCAAGCGGCTCGCGGCTGGCGTGTACCCCGAGCGCGAGGTTGCTAACAGGAGATAAATACAGCGGCAATTAAGCGATAACCAACAAT	2280
shv11 LF-RF	2161	ACAGCTGGCTTCGCTTTGTTAAATTTGCTCAAGCGGCTCGCGGCTGGCGTGTACCCCGAGCGCGAGGTTGCTAACAGGAGATAAATACAGCGGCAATTAAGCGATAACCAACAAT	2280
shv1 LF-RF	2281	ATCCTTGAAGTGGGGCGATAAAGGCGAGTAAAGAGCGCAAAATAAGAAATAACCCGGCGTTTGGTGTATCAAAATTCCTCTTTTTCCTTCATCATTGTGCATCTTTTATTCGAATA	2400
shv11 LF-RF	2281	ATCCTTGAAGTGGGGCGATAAAGGCGAGTAAAGAGCGCAAAATAAGAAATAACCCGGCGTTTGGTGTATCAAAATTCCTCTTTTTCCTTCATCATTGTGCATCTTTTATTCGAATA	2400
shv1 LF-RF	2401	ATCAATATCTAGCCCTGCTAAGCAGCTATTTTTGACTCAAGCGGTCGATGAACATAAAGAAAGTAAATACCCAGTCTGTCGGCGTGGCTGTTGGCGATCACGCCCGCC	2520
shv11 LF-RF	2401	ATCAATATCTAGCCCTGCTAAGCAGCTATTTTTGACTCAAGCGGTCGATGAACATAAAGAAAGTAAATACCCAGTCTGTCGGCGTGGCTGTTGGCGATCACGCCCGCC	2520
shv1 LF-RF	2521	GGTCCCTCGGGTTCGCCAACGCTATATGCCATCCCGGGGAGAACTGGTGCACCCGATAAATAGGTCATGCTGGTGGGCGGTAAGCGGACGGGCTGTGGTCAAGCTCGCCGATGACG	2640
shv11 LF-RF	2521	GGTCCCTCGGGTTCGCCAACGCTATATGCCATCCCGGGGAGAACTGGTGCACCCGATAAATAGGTCATGCTGGTGGGCGGTAAGCGGACGGGCTGTGGTCAAGCTCGCCGATGACG	2640
shv1 LF-RF	2641	GACCGAGGTCGCTGGTACGCTGCGCAGTACGGTGGCTATCCGGCAACCGTTGAGCTACCGAATTTGATAGCCAAACATTGACGATGAACGCTATTTTTGGCGTTTTCAGCGACAC	2760
shv11 LF-RF	2641	GACCGAGGTCGCTGGTACGCTGCGCAGTACGGTGGCTATCCGGCAACCGTTGAGCTACCGAATTTGATAGCCAAACATTGACGATGAACGCTATTTTTGGCGTTTTCAGCGACAC	2760
shv1 LF-RF	2761	CCATCAGGATAGCGATAAGCTGACCGGGTCCGCTGACCCGTCGAAATGAAAAAAAGTTCTGTTAAACCCGCGCGAAAGGGGCGTAAGAGGGTATGCCGGGCGCGCTGTGCTACTG	2880
shv11 LF-RF	2761	CCATCAGGATAGCGATAAGCTGACCGGGTCCGCTGACCCGTCGAAATGAAAAAAAGTTCTGTTAAACCCGCGCGAAAGGGGCGTAAGAGGGTATGCCGGGCGCGCTGTGCTACTG	2880
shv1 LF-RF	2881	TGGCAGCCTTCTATTTCCAGGGCGGACGCAATAAGTTCAGTACATTCGATTTCAAATTTTCGCTCAGTGAAGGATATCGCGCTGGAGCTGGGGCGCTGAACATTGTCTCGGCCCT	3000
shv11 LF-RF	2881	TGGCAGCCTTCTATTTCCAGGGCGGACGCAATAAGTTCAGTACATTCGATTTCAAATTTTCGCTCAGTGAAGGATATCGCGCTGGAGCTGGGGCGCTGAACATTGTCTCGGCCCT	3000
shv1 LF-RF	3001	AACGGCTCGGGTAAATCCAATTTATAACGCCATCCACTGCTGACCGCTGCGCGTGGGGCAGGCTTTCGGGGTTTATCAGCGAAGAGGGCGGCTGGAGAAATGATGTGGTCCGGG	3120
shv11 LF-RF	3001	AACGGCTCGGGTAAATCCAATTTATAACGCCATCCACTGCTGACCGCTGCGCGTGGGGCAGGCTTTCGGGGTTTATCAGCGAAGAGGGCGGCTGGAGAAATGATGTGGTCCGGG	3120
shv1 LF-RF	3121	GAGCGTTCGCCCTCGATGCTCACCCCGCGGGTCAAAATCGCTGCGCGACCGACAGCTTCGATTTAGGTCGAGATAGGCTTCCTGAAAAATGGCCATCCGACCGCAATTCATG	3240
shv11 LF-RF	3121	GAGCGTTCGCCCTCGATGCTCACCCCGCGGGTCAAAATCGCTGCGCGACCGACAGCTTCGATTTAGGTCGAGATAGGCTTCCTGAAAAATGGCCATCCGACCGCAATTCATG	3240
shv1 LF-RF	3241	CTCGATCTATCGTTAAAGAGAGAAATATCGGCTGGCGGCTACTCCCGCGGCTTCCCGCGGCTTCCCGCGGCTACTCGAGCGCAAGAAATCAGCGCGGCTTCTCGCTCGATGTCACCGGGGAGAAA	3360
shv11 LF-RF	3241	CTCGATCTATCGTTAAAGAGAGAAATATCGGCTGGCGGCTACTCCCGCGGCTTCCCGCGGCTTCCCGCGGCTACTCGAGCGCAAGAAATCAGCGCGGCTTCTCGCTCGATGTCACCGGGGAGAAA	3360
shv1 LF-RF	3361	AGTACTTTCCAGGAGATTTATGAAAAAGTGGTGGTTCGGTCAAGTGGCGAGCCGACCGCTTCCCGGAAATTCGCGAGTGGCGGAGACCTTGGCGGCTTGGCGGTTTATCAT	3480
shv11 LF-RF	3361	AGTACTTTCCAGGAGATTTATGAAAAAGTGGTGGTTCGGTCAAGTGGCGAGCCGACCGCTTCCCGGAAATTCGCGAGTGGCGGAGACCTTGGCGGCTTGGCGGTTTATCAT	3480
shv1 LF-RF	3481	GAATTCGCGATTGGCCGCTATTCGCGCTGGCTCAGCGCGCGTGGGTACCGTTCGCGAGTCTCGACAGCGATGGCCAGAAATTCGCGCGCGCTTTCAGACCAATGTGCGAGATCGG	3600
shv11 LF-RF	3481	GAATTCGCGATTGGCCGCTATTCGCGCTGGCTCAGCGCGCGTGGGTACCGTTCGCGAGTCTCGACAGCGATGGCCAGAAATTCGCGCGCGCTTTCAGACCAATGTGCGAGATCGG	3600
shv1 LF-RF	3601	CGGGAGGAGATTTTGCATGAAATCTTCCGCGAC 3633	
shv11 LF-RF	3601	CGGGAGGAGATTTTGCATGAAATCTTCCGCGAC 3633	

圖 十五、CB28 菌株 *shvI* 基因和 NTUH-K2044 菌株 *shvII* 基因及側翼區域核甘酸序列比對結果

附圖為 CB28 菌株 *shvI* 基因和 NTUH-K2044 菌株之 *shvI1* 基因及左右兩側側翼區域核苷酸序列比對結果，長度約為 3633 bp。黑色字體代表核苷酸完全一致；紅色代表核苷酸不同。兩者序列比對之 Identity 為 99.2%，Similarity 為 99.2%，具高度相似性。



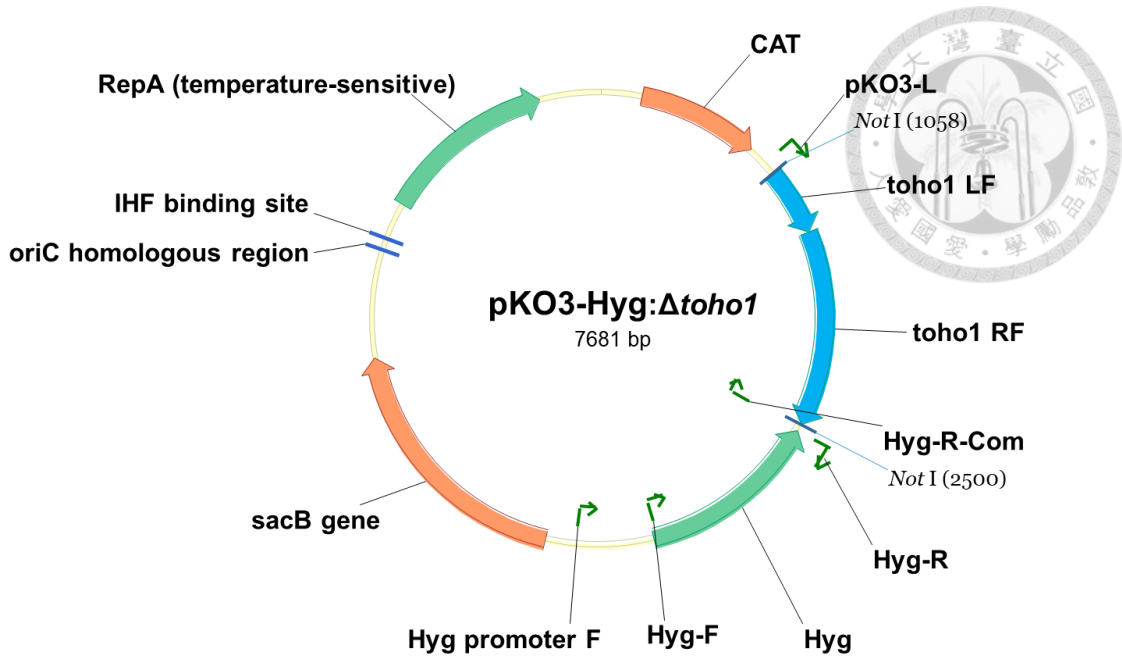


圖 十七、建構 CB28 菌株乙內醯胺酶 *toho1* 基因缺失之 pKO3-Hyg:Δ*toho1* 質體

建構完成的 pKO3-Hyg:Δ*toho1* 內含長度約為 6000 bp 的 pKO3-Hyg 載體以及插入不帶有 *toho1* 基因之外圍側翼區域的片段，約為 1.5 kb，總長度約為 7681 bp。

↻ 代表各個引子的方向、→ 及 → 則分別代表不同的閱讀開放框架，→ 則為 *toho1* 基因左右側之側翼區域。

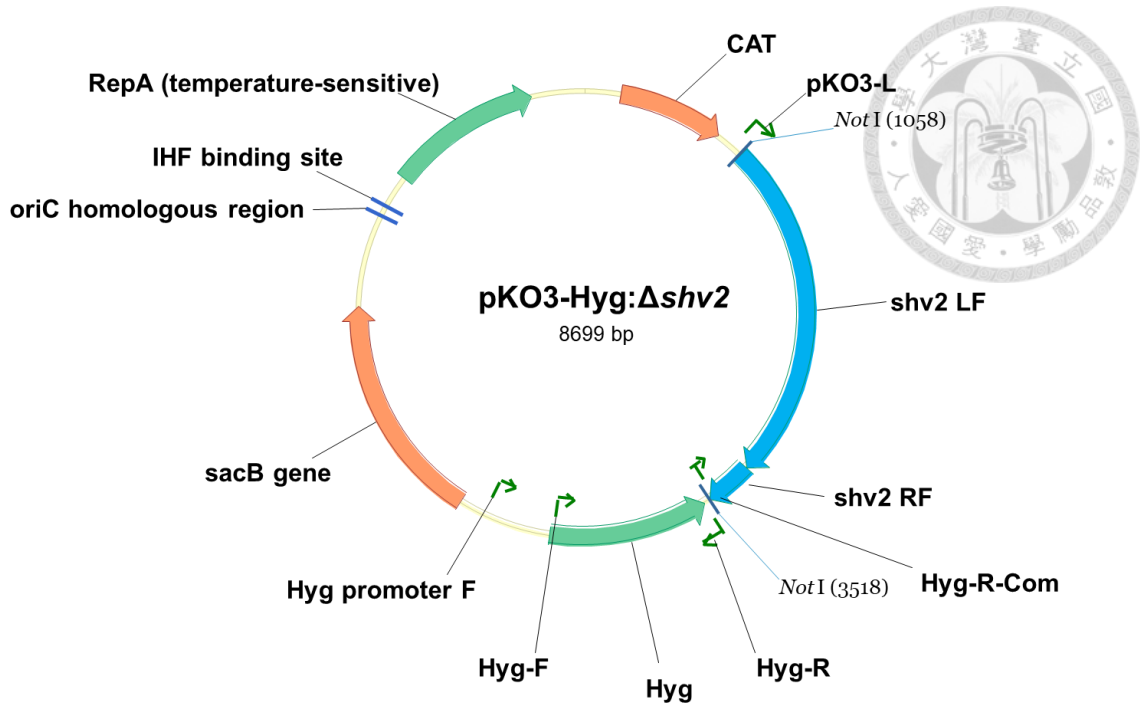


圖 十八、建構 CB28 菌株乙內醯胺酶 *shv2* 基因缺失之 pKO3-Hyg:Δ*shv2* 質體
 建構完成的 pKO3-Hyg :Δ*shv2* 內含長度約為 6000 bp 的 pKO3-Hyg 載體以及插入不帶有 *shv2* 基因之外圍側翼區域的片段，約為 2.5 kb ，總長度約為 8699 bp。

↻ 代表各個引子的方向、→ 及 → 則分別代表不同的閱讀開放框架，→ 則為 *shv2* 基因左右側之側翼區域。

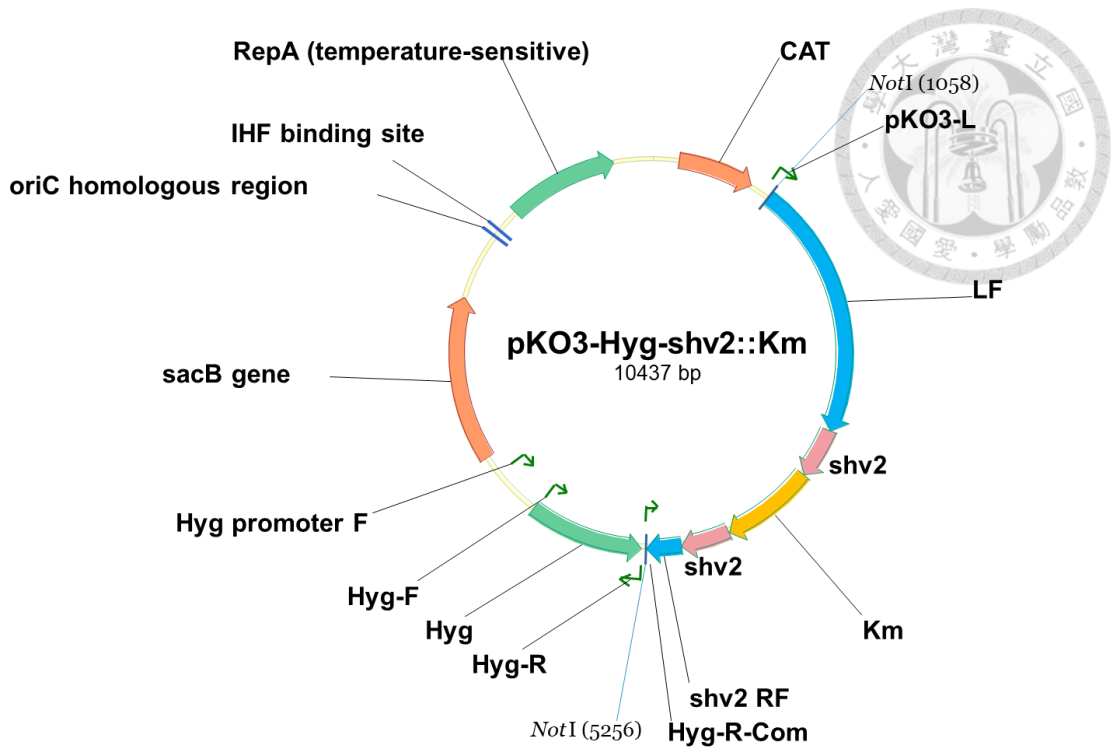
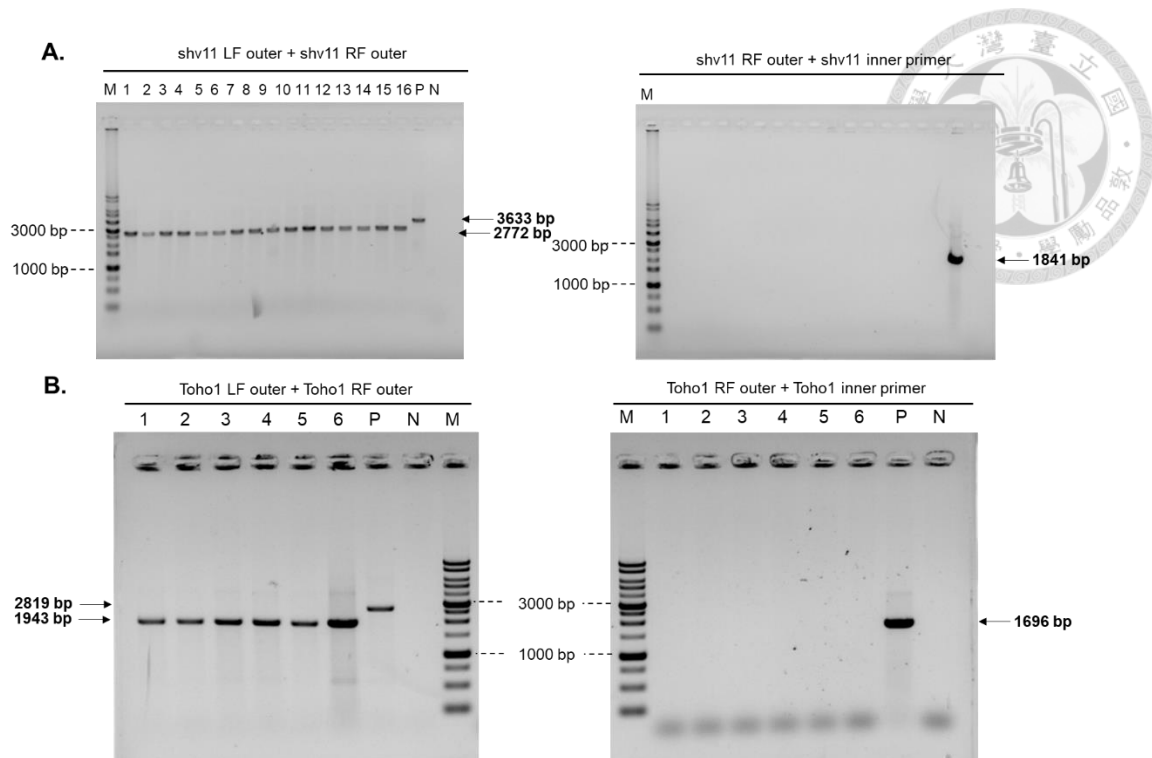


圖 十九、建構 CB28 菌株乙內醯胺酶 *shv2* 基因內有卡納黴素卡匣插入之 pKO3-Hyg-*shv2*::Km 質體

建構完成的 pKO3-Hyg-*shv2*::Km 內含長度約為 6000 bp 的 pKO3-Hyg 載體，並連接了卡納黴素 (Kanamycin resistant cassette) 插入 *shv2* 基因中之片段，以及基因外圍之側翼區域的片段，約為 4.2kb，總長度約為 10437 bp。↻ 代表各個引子的方向、→ 及 → 則分別代表不同的閱讀開放框架，→ 則代表卡納黴素卡匣，→ 則為 *shv2* 基因左右側之側翼區域，→ 是被卡納黴素卡匣分隔開的 *shv2* 基因。

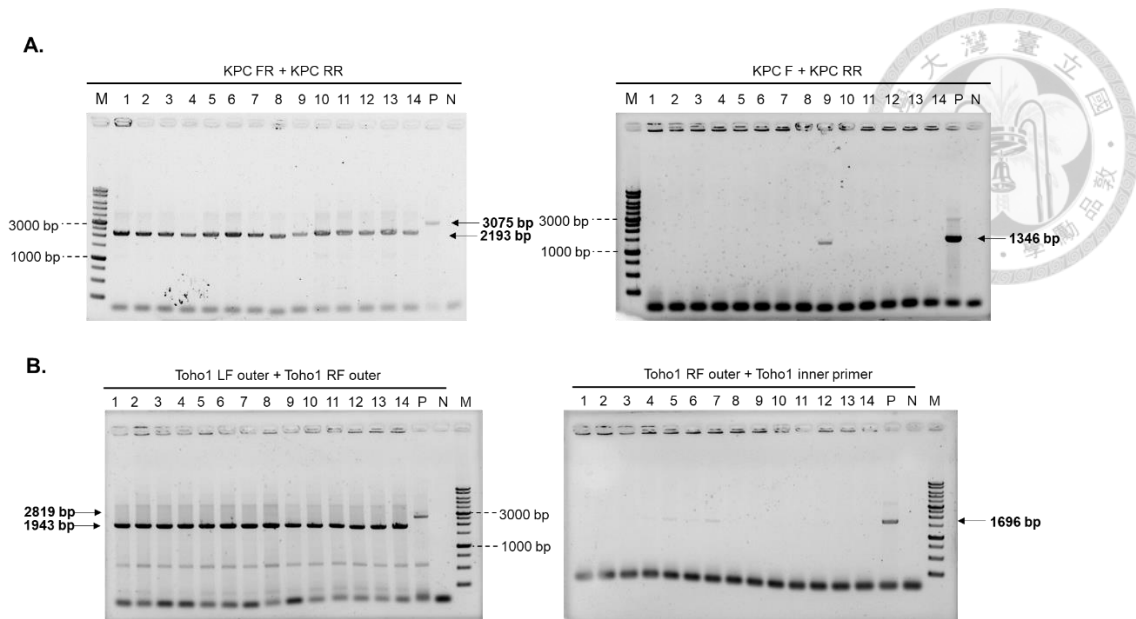


圖二十、CB28 菌株之 beta lactamase 相關基因缺失突變株

此為透過同源重組反應建構的 CB28 之 beta-lactamase 相關基因缺失菌株。(A) 建構 *shvI* 基因缺失菌株，挑選 16 個菌落，並以 PCR 確認剔除 CB28 之 *shvI* 基因。由左到右，M 為 1 kb DNA ladder marker；P 為使用 CB28 參考菌株當模板，是正控制組；N 為使用水當做負控制組。由於 CB28 菌株 *shvI* 基因及側翼區域的序列和 NTUH-K2044 菌株 *shvII* 基因及側翼區域高度相似，因此質體和引子可共通使用。左圖先以一對同源重組側翼區外的引子 shv11 LF outer 與 shv11 RF outer 進行 PCR。WT 產物大小為 3633 bp， $\Delta shvI$ 產物大小則為 2772 bp。右圖則以一邊同源重組側翼區外的引子 shv11 RF outer 與 shv11 基因內的引子 shv11 inner primer 進行 PCR，產物大小為 1841 bp。兩張膠圖對照後可確認，所有菌落皆為 *shvI* 基因缺失突變株。(B) 建構 *tohI* 基因缺失菌株，挑 6 個菌落，並以 PCR 確認剔除 CB28 之 *tohI* 基因。由左到右，P 為使用 CB28 參考菌株當模板，是正控制組；N 為使用水當做負控制組。左圖先以一對同源重組側翼區外的引子 toh1 LF outer 與 toh1 RF outer 進行 PCR。WT 產物大小為 2819 bp， $\Delta tohI$ 產物大小則為 1943 bp。右圖則以一邊同源重組側翼區外的引子 toh1 RF outer 與

toh1 基因內的引子 toh1 inner primer 進行 PCR，產物大小為 1696 bp。兩張膠圖對照後可確認，所有菌落皆為 *toh1* 基因缺失突變株。





圖二十一、CB28 菌株之 *kpc* 及 *toh1* 雙重基因缺失突變株

將先前建構完成之 pKO3-Hyg: Δkpc 質體電穿孔進入 CB28 *toh1* 基因缺失突變株中，接續也透過同源重組反應建構 CB28 之 beta-lactamase 雙重基因缺失菌株。建構 CB28 $\Delta kpc \Delta toh1$ 基因缺失菌株，先挑選 14 個菌落，並以 PCR 確認剔除 CB28 之 *kpc* 基因。由左到右，M 為 1 kb DNA ladder marker；P 為使用 CB28 參考菌株當模板，是正控制組；N 為使用水當做負控制組。(A) 左圖先以一對同源重組側翼區外的引子 KPC FR 與 KPC RR 進行 PCR。WT 產物大小為 3075 bp， Δkpc 產物大小則為 2193 bp。右圖則以一邊同源重組側翼區外的引子 KPC RR 與 *kpc* 基因內的引子 KPC F 進行 PCR，產物大小為 1943 bp。兩張膠圖對照後可確認，除了 9 號菌落以外，其他菌株之 *kpc* 基因皆已被剔除。(B) 接著確認原本 CB28 $\Delta toh1$ 菌株之 *toh1* 基因仍維持突變狀態，將同樣的 14 個菌落以 PCR 確認。左圖先以一對同源重組側翼區外的引子 *toh1* LF outer 與 *toh1* RF outer 進行 PCR。WT 產物大小為 2819 bp， $\Delta toh1$ 產物大小則為 1943 bp。右圖則以一邊同源重組側翼區外的引子 *toh1* RF outer 與 *toh1* 基因內的引子 *toh1* inner primer 進行 PCR，產物大小為 1696 bp。兩張膠圖對照後可確認，所有菌落仍維持 *toh1* 基因缺失狀態。因此獲得 CB28 $\Delta kpc \Delta toh1$ 基因缺失菌株。