

國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系

碩士論文

Department of Agricultural Chemistry  
College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

大腸桿菌 *gspS* 基因表現之調控

Regulation of *gspS* gene expression  
in *Escherichia coli*

陳宣合

Hsuan-He Chen

指導教授：吳蕙芬 博士

Advisor: Whei-Fen Wu, Ph.D.

中華民國 九十八 年 七 月

July, 2009

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

大腸桿菌 *gspS* 基因表現之調控

Regulation of *gspS* gene expression in *Escherichia coli*

本論文係陳宣合君 (R96623008) 在國立臺灣大學農業化學系、  
所完成之碩士學位論文，於民國九十八年七月二十九日承下列考試  
委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

吳蕙芬

(簽名)

林信平 (指導教授)

劉俊民

陳建德

系主任、所長

李進源

(簽名)

## 摘要

Glutathionylspermidine synthetase (GspS) 是一種具有雙重功能的酵素，具有合成酶 (synthetase) 活性，可催化 glutathione 與 spermidine 間醯胺鍵的形成，產生 glutathionylspermidine (Gsp)，也有醯胺酶 (amidase) 活性，可使 Gsp 的醯胺鍵水解成 glutathione 及 spermidine。由於 Gsp 為原生動物病原蟲與大腸桿菌等生物中所特有，與其相關之酵素遂成為研究對抗此類病原蟲藥物的目標。目前 GspS 的蛋白質之結晶結構已被解出，對蛋白質活性區域以及反應機制有更進一步的認識，但是 GspS 在大腸桿菌中扮演何種角色、*gspS* 基因表現受到哪些因子調控，皆尚未清楚。

為了瞭解 *gspS* 的調控方式，首先以 5'RACE (Rapid-Amplification of cDNA Ends) 確認轉錄起始點 (transcription start site)，並進一步分析 *gspS* 上游的 promoter 區域及 *cis*-binding site 位置，包含預測之 BaeR binding site。利用不同長度及 BaeR binding site 突變之 *gspS-lacZ* operon fusion 進行  $\beta$ -galactosidase 活性分析，發現在大腸桿菌中 BaeR 大量表現可誘導 *gspS* 表現量上升，顯示 BaeR 為一可能之轉錄因子，而且即使 BaeR 大量表現，預測之 BaeR binding site 突變仍然無法使 *gspS* 表現量增加，推測 BaeR 跟 *gspS* 上游的 *cis*-binding site 應為直接結合造成 *gspS* 表現量上升。

利用不同濃度  $H_2O_2$  對 *gspS*<sup>-</sup> 及一系列對抗氧化壓力 (oxidative stress) 相關突變株 (*trxA*<sup>-</sup>、*trxB*<sup>-</sup>、*grxA*<sup>-</sup>、*grxB*<sup>-</sup>) 的影響，發現 *gspS*<sup>-</sup>*grxA*<sup>-</sup> 與 *gspS*<sup>-</sup>*grxB*<sup>-</sup> 之雙重突變株對  $H_2O_2$  造成之氧化壓力耐受程度較 wild type 和 *gspS*<sup>-</sup>、*grxA*<sup>-</sup>、*grxB*<sup>-</sup> 單一突變株低，推測 GspS 和 GrxA、GrxB 在功能上可能可以互相替代。

**關鍵字：** GspS、Gsp、BaeR、氧化壓力、GrxA、GrxB

## Abstract

Glutathionylspermidine synthetase (GspS) is a bifunctional enzyme. Synthetase activity catalyzes the amide bond formation between glutathione and spermidine forming glutathionylspermidine (Gsp). The amidase activity catalyzes the reverse reaction, hydrolysis of glutathionylspermidine back to glutathione and spermidine. Gsp only exists in protozoal pathogens and *Escherichia coli*, but not in their hosts. Therefore, Gsp related enzymes become the target for development of anti-parasitic drugs. Although the crystal structure of GspS, catalytic region and mechanism of the enzyme have been revealed, there is few information about the role of GspS in *E. coli*. In addition, how *gspS* is regulated in cells remains unknown.

To investigate the expression of *gspS*, the transcription start site of *gspS* was identified by 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). We also defined the promoter region as well as predicting a BaeR binding site of *gspS* in the upstream region. Based on the different construct in *gspS-lacZ* operon fusion, the gene expression of *gspS* was found to increase when BaeR is overexpressed. However, once the mutation was introduced in the BaeR binding site, no activation of *gspS-lacZ* expression. This result suggests that *gspS* is induced owing to a BaeR direct interaction.

Futhermore, the *gspS* mutation with a combination of a set of oxidative matations (*trxA*<sup>-</sup>, *trxB*<sup>-</sup>, *grxA*<sup>-</sup>, and *grxB*<sup>-</sup>), the *gspS*<sup>-</sup>*grxA*<sup>-</sup>, *gspS*<sup>-</sup>*grxB*<sup>-</sup> double mutants display the more sensitivity to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. With treatment of

different  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations,  $gspS^-grxA^-$  and  $gspS^-grxB^-$  double mutants were more sensitive to  $\text{H}_2\text{O}_2$  than the  $gspS^-$ ,  $grxA^-$ ,  $grxB^-$  single mutants, suggesting that GspS is aligned with the function of GrxA and GrxB in *E. coli*.

**Keywords:** GspS 、 Gsp 、 BaeR 、 Oxidative stress 、 GrxA 、 GrxB



# 目錄

口試委員會審定書 .....	i
摘要.....	ii
Abstract .....	iii
目錄.....	v
表目錄 .....	viii
圖目錄 .....	ix
<b>第一章、前人研究 .....</b>	<b>1</b>
1.1 Trypanothione.....	1
1.2 Glutathione .....	3
1.3 Spermidine.....	3
1.4 Glutathionyl spermidine, Gsp.....	4
1.5 Glutathionyl spermidine synthetase, GspS.....	5
1.6 雙成分控制系統 (two component system).....	5
1.7 氧化壓力 (Oxidative stress) 與抗氧化系統.....	7
1.8 研究動機與目的 .....	9
<b>第二章、材料與方法 .....</b>	<b>10</b>
2.1 一般研究材料 .....	10
2.1.1 菌株及質體 .....	10
2.1.2 藥品及試劑 .....	10
2.2 一般實驗方法 .....	11
2.2.1 質體製備及轉殖 .....	12

2.2.2 勝任細胞 (competent cell) 製備 .....	13
2.2.3 轉形作用 (transformation).....	13
2.3 選殖基因表現系統之建立 .....	15
2.3.1 載體 (vector)製備 .....	15
2.3.2 選質基因片段之製備 .....	16
2.3.3 選殖片段之處理 .....	17
2.3.4 接合反應 (ligation) .....	18
2.3.5 <i>gspS</i> promoter 點突變之質體建構.....	18
2.4 嗜菌體一般實驗方法 .....	19
2.4.1 製備嗜菌體.....	19
2.4.2 Titer the lysate .....	20
2.4.3 P1 轉導作用 (P1 transduction).....	20
2.4.4 $\lambda$ 特定轉導作用 (specialize transduction).....	22
2.5 建構 <i>gspS</i> <sup>-</sup> 突變株 .....	23
2.6 $\beta$ -galactosidase 活性分析 .....	25
2.7 cDNA 末端快速增幅 (rapid amplification of cDNA ends, RACE)....	26
2.8 西方墨點分析 (Western Blotting).....	27
2.8.1 SDS 蛋白質膠體電泳 (SDS-PAGE).....	27
2.8.2 轉印 (Transfer).....	29
2.8.3 免疫雜交 (Hybridization).....	30
<b>第三章、結果 .....</b>	<b>34</b>
3.1 <i>gspS</i> 上游啟動子 (promoter) 區域及 <i>cis</i> -element 位置之分析.....	34
3.2 <i>gspS</i> 受到 BaeR 轉錄因子 (transcription factor) 的調控.....	35

3.3 以 <i>gspS</i> 突變株探討 <i>gspS</i> 之表現型 (phenotype).....	37
<b>第四章、討論.....</b>	<b>40</b>
4.1 <i>gspS</i> promoter.....	40
4.2 BaeR 對 <i>gspS</i> 的調控.....	40
4.3 其他調控 <i>gspS</i> 之轉錄因子.....	42
4.4 <i>gspS</i> 之表現型.....	42
<b>第五章、參考文獻.....</b>	<b>44</b>





## 表目錄

表一、本論文所使用的菌株與嗜菌體.....	49
表二、本論文所使用的質體.....	50
表三、本論文所使用之聚合酶連鎖反應引子.....	51



## 圖目錄

圖一、 <i>E. coli</i> MG1655 <i>gspS</i> 基因上游序列圖譜.....	52
圖二、不同長度的 <i>gspS-lacZ</i> fusion (242、195、161、130 bp) 建構.....	53
圖三、不同長度的 <i>gspS</i> (286、236、116、20) 建構及蛋白質表現情形.....	54
圖四、轉錄因子 BaeR 對不同長度及突變的 <i>gspS-lacZ</i> fusion 基因表現量的影響.....	55
圖五、 <i>gspS</i> 之 BaeR binding site 突變設計.....	56
圖六、indole 處理下對 wild type 及 <i>BaeR</i> <sup>-</sup> 突變株之 <i>gspS-lacZ</i> fusion 基因表現量的影響.....	57
圖七、 <i>gspS::bla</i> 突變株之確認.....	58
圖八、H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 對 wild type 及各突變株生長之抑制.....	59
圖九、不同濃度之 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 對 wild type 及各突變株在不同菌液稀釋度下生長的影響.....	60

# 第一章、前人研究

## 1.1 Trypanothione

錐蟲 (trypanosomes) 是一類單細胞寄生性的原生動物，錐蟲科 (*Trypanosomatida*) 包括 *Trypanosoma*、*Leishmania*、*Crithidia* 等，這類病原蟲通常生活史中有兩個宿主，即脊椎動物及無脊椎動物，無脊椎動物宿主通常藉由叮咬而作為傳播脊椎動物之媒介。病原蟲藉由蚊蟲叮咬進入人體血液和淋巴腺繁殖，然後經血液入侵腦中樞神經系統，嚴重者甚至會導致死亡。常見的疾病包括由 *Trypanosoma* 造成之錐蟲病 (trypanosomiasis)，主要分美洲錐蟲病 (Chagas' disease) 和非洲昏睡病 (African sleeping sickness) 以及 *Leishmania* 造成的一類疾病，通稱為利什曼原蟲症 (leishmaniasis)，每年有數以萬計的人因為這些疾病而喪生。

一般生物體是主要由 glutathione (GSH) 來維持細胞中氧化還原平衡 (Meister *et al.*, 1983)，透過 glutathione reductase (GR) 以及 thioredoxin reductase (TrxR) 分別使 GSH 和 thioredoxin (Trx) 維持在還原態，進而調整其他物質的氧化還原。而 trypanosomes 這一類的原生動物缺乏 GR 和 TrxR 兩種酵素，取而代之的是利用 trypanothione [N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(glutathionyl)spermidine, T(SH)<sub>2</sub>]/ trypanothione reductase (TR) 與 tryparedoxin (Txn) 來調節細胞內的氧化還原 (Fairlamb *et al.*, 1985, Shames *et al.*, 1986)。在 trypanosomes 中，GSH 大部分是以 T(SH)<sub>2</sub> 形式存在，另外有少部分是以 glutathionylspermidine (Gsp) 形式存在，而大部分氧化物的代謝是透過 T(SH)<sub>2</sub> 而非 GSH (Thomson *et al.*, 2003)。Comini 等人利用 RNAi 方式將 *Trypanosoma brucei* 中合成 T(SH)<sub>2</sub> 之 trypanothione synthetase (TryS) knockdown 之後發現 *T. brucei* 生長能力受損且

增生受阻，對過氧化氫 ( $H_2O_2$ ) 的敏感度也提高，也就是 TryS 對 *T. brucei* 的生長增生和抗氧化能力而言是重要的 (Comini *et al.*, 2004)。TR 可以將  $T(SH)_2$  從氧化態還原，把 *T. brucei* 與 *Leishmania donovani* 的 TR knock-out 或 knock-down 之後，發現對其生存與致病性都造成很大的影響，顯示了還原態的  $T(SH)_2$  對這類病原蟲的重要性 (Krieger *et al.*, 2000, Tovar *et al.*, 1998)。而哺乳動物並無  $T(SH)_2$  系統存在，因此參與  $T(SH)_2$  生合成之相關酵素成為發展治療此類原生動物疾病之研究目標。

$T(SH)_2$  之生合成分為兩步驟，由 GSH 與 spermidine 間先合成 Gsp，再和另一 GSH 結合形成  $T(SH)_2$ 。由於 *Trypanosoma* 並無 glutathionylspermidine synthetase (GspS) 基因的存在，合成 Gsp 及  $T(SH)_2$  皆利用 TryS 來進行 (Comini *et al.*, 2003, Oza *et al.*, 2002b)；*Leishmania* 和 *Trypanosoma* 一樣都是以 TryS 來合成 Gsp 和  $T(SH)_2$ ，但 *Leishmania* 還保有一套退化的 GspS 基因 (*gspS* pseudogene) (Oza *et al.*, 2005)；*Crithidia* 中，GspS 或 TryS 皆可用來合成 Gsp，而  $T(SH)_2$  之合成為 TryS 所負責 (Oza *et al.*, 2002a, Smith *et al.*, 1992, Tetaud *et al.*, 1998)。

而 *Escherichia coli* 只利用 GspS 來合成 Gsp，並沒有  $T(SH)_2$  的存在 (Smith *et al.*, 1995, Tabor *et al.*, 1975)。GspS 與 TryS 的性質相近，都具有合成酶 (synthetase) 和醃胺酶 (amidase) 的活性，兩者的胺基酸序列亦相似 (Pai *et al.*, 2006, Tetaud *et al.*, 1998)。根據親源分析 (phylogenetic analysis) 結果，*E. coli*、*Crithidia* 及 *Leishmania* 的 GspS 都非常相似，而 GspS 與 TryS 的相似度也很高，兩者在樹狀圖中的位置也很相近 (Comini *et al.*, 2005)，因此藉由研究 *E. coli* *gspS* 基因，可以更了解 *gspS* 及 *tryS*，並有助於 *Trypanosomatida* 相關之研究。

## 1.2 Glutathione

GSH 由 L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine 組成之 tripeptide，藉由還原細胞內之雙硫鍵或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等其他過氧化物，來維持細胞氧化還原狀態的平衡，還原態 GSH 可將物質還原，本身則變成氧化態的 glutathione disulphide (GSSG)，GR 利用 NADPH 將氧化態的 GSSG 還原成 GSH，細胞內大部分 GSH 維持在還原態 (reduced, thiol form)，亦即 GSH，其他則以 GS-S-protein、GSSG、thioester 形式存在 (Pai *et al.*, 2006)。GSH 也是生物體內最主要的低分子量硫醇 (low molecular weight thiol)，細胞內濃度約為 0.1 至 10 mM。

## 1.3 Spermidine

細菌細胞中主要的多胺類 (polyamine) 為 putrescine (1,4-diaminobutane) 與 Spermidine [N-(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine]。Putrescine 為 Spermidine 的前驅物，Spermidine 為維持細胞正常生長所需，在細菌細胞中作用廣泛，可和核酸及核糖體結合以維持其正常功能，也可和磷酯質、脂肪酸結合以達到穩定細胞膜或其他膜結構的效果。多胺類物質亦可刺激調控蛋白生成或調控基因的表現來對抗氧化壓力或其他逆境，如 RpoS、OxyR、*katG* 等，RpoS 則與生長遲滯期 (stationary phase) 的許多基因表現有關，OxyR 可誘導抗氧化相關基因的表現，*katG* 則和抗氧化有關 (Jung *et al.*, 2003, Tkachenko *et al.*, 2003, Yohannes *et al.*, 2005, Yoshida *et al.*, 2002)。此外 Rider 等人的研究也指出當細胞耗盡 GSH 與 spermidine 會比只耗盡 GSH 的細胞對 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 更敏感，因而認為多胺類在保護細胞對抗氧化壓力扮演的角色可能和 GSH 有所不同 (Rider *et al.*, 2007)。

#### 1.4 Glutathionyl spermidine, Gsp

GSH 與 spermidine 以醯胺鍵鍵結形成 Gsp，可由 GspS 或 TryS 進行合成。將 *E. coli* 以 M9 minimal medium 通氣震盪培養到遲滯期時停止震盪，可在菌體中偵測到 GspdSH 的存在 (Tabor *et al.*, 1975)，Tabor 等人偵測厭氧培養到生長遲滯期後，二十分鐘內細胞中 GspdSH 和 spermidine 濃度不變，但 Gsp 處在持續生成與分解的動態平衡，他們也發現進入遲滯期後，大部分的 spermidine 都和 GSH 結合以 Gsp 的形式存在。若將遲滯期的 *E. coli* 培養液用新鮮培養基稀釋，會使 Gsp 快速分解成 GSH 及 spermidine，因此他們推測 Gsp 在生長遲滯期累積的原因可能是 Gsp 可能在所有生長期皆可生成，但在指數生長期時 Gsp 的分解速度快或者是遲滯期細胞內的酸鹼值或氧化還原狀態改變，造成合成 Gsp 的酵素活性改變使 Gsp 累積。

Smith 等人觀察 *E. coli* 所有生長期中 GSH 與 Gsp 含量變化 (Smith *et al.*, 1995)，在 aerobic/ M9 minimal medium 狀態下，整個生長期中的 GSH 含量穩定，指數生長期中期 (mid-log phase) 會生成微量 Gsp，約佔 GSH 總量的 3%，到了遲滯期，Gsp 生成量增加，佔 GSH 總量的 11%。在 aerobic/M9 minimal medium 狀態下培養 *E. coli* 至指數期，再更換到厭氧狀態 (anaerobic) 培養 6 小時，測得 Gsp 逐漸增加，最後 80% 以上的 GSH 轉變成 GspdSH。此外他們在 GR 中加入不同的基質，發現 GR 除了還原 GSH 之外，也可以還原 Gsp 與 GSH 間的雙硫鍵 (Gsp-SG)，所以 Smith 等人推測，Gsp 的作用可能是調節 GSH 或 spermidine 含量，或者 Gsp 就像 T(SH)<sub>2</sub> 在 *Trypanosoma* 中，是一種比 GSH 更好的抗氧化物，由於 Gsp 在遲滯期會累積，也可能和壓力反應 (stress response) 有關。

## 1.5 Glutathionyl spermidine synthetase, GspS

*E. coli* 利用 GspS 來合成 Gsp，Dubin 及 Tabor 等人發現在大腸桿菌中也有 Gsp 的存在 (Dubin, 1959, Tabor *et al.*, 1975)。Bollinger 等人將 GspS 純化並做更深入的了解，發現 GspS 不只具有催化 GSH 與 spermidine 間醯胺鍵的形成產生 Gsp 之合成酶 (synthetase) 活性，還有將 Gsp 水解成 GSH 及 spermidine 的醯胺酶 (amidase) 活性，其為一具有雙重功能的酵素 (bifunctional enzyme) (Bollinger *et al.*, 1995)。研究發現 amidase 與 synthetase domain 分別位於 GspS 蛋白質的 N 端與 C 端，N 端 1-195 號胺基酸為 amidase domain，C 端 206-619 號胺基酸為 synthetase，而結晶結構的解出發現 GspS 在大腸桿菌中是以 dimer 形式存在，對其反應機制也有更多的了解 (Kwon *et al.*, 1997, Pai *et al.*, 2006)。

## 1.6 雙成分控制系統 (two component system)

細菌可以利用各種雙成份控制系統來感受環境的刺激，並藉由控制不同基因表現來適應環境的改變，典型的雙成分控制系統包含兩種蛋白，kinase sensor 與 response regulator。雙成分控制系統控制許多基因表現，與細菌的營養狀態，致病性，抗藥性等息息相關。大腸桿菌中已知的雙成分控制系統大約有 30 種，但許多雙成分控制系統的功能尚未明白。

Nagasawa 等人在 1993 年藉由抑制三種 response regulator EnvZ、PhoR 及 CreC，發現一新的雙成分控制系統 BaeSR (Nagasawa *et al.*, 1993)。Raffa 等人發現 envelope stress 發生時，不只 CpxAR 系統，BaeSR 也可以誘導 *spy* (spheroplast protein Y，是一種 periplasmic protein，與 envelope 的形成有關) 的表現 (Raffa *et al.*, 2002)，BaeSR 並不會影響已知 CpxAR 調控基因的表現，且 *BaeR* 與 *CpxR* 雙重突變對 envelope stress 的抵抗能力比各別單一突變還差。

另外根據 Garbe 等人在 2000 年的研究結果顯示，indole 可誘導 superoxide dismutase 及 alkylhydroperoxide 生成，此兩者和氧化毒性相關 (Garbe *et al.*, 2000)，因此認為 indole 會破壞細胞膜造成氧化損害 (oxidative damage)，使細胞的氧化還原電位發生改變，產生過氧化物誘發 superoxide dismutase 及 alkylhydroperoxide 生成。因此，Raffa 等人推論，BaeSR 可能對細胞膜的改變或 envelope 氧化還原電位的破壞有反應，進而引發下游基因表現。

此外 Baranova 等人亦發現，BaeR 大量表現時，大腸桿菌的抗藥性增加，並經由實驗證實 *baeSR* 位於 multidrug transporter gene cluster *mdtABCD* 下游，且 BaeR 可直接與 *mdtA* 的 promoter 結合 (Baranova *et al.*, 2002)。

Hirakawa 等人探討 indole 如何誘導 multidrug exporter genes，證明了兩種基因 *acrD* 和 *mdtA* 的表現受 BaeSR 與 CpxAR 控制，並且發現 BaeSR 所產生的誘導不需 CpxAR 的幫助，但 CpxAR 所產生的誘導需要 BaeSR。並且找出兩種 response regulator (BaeR 和 CpxR) 與 *acrD* 及 *mdtA* promoter 結合的位置 (Hirakawa *et al.*, 2005)，他們認為 indole 可刺激 BaeS 和 CpxA，兩者分別與 BaeR 及 CpxR 作用之後，BaeR 直接誘導 *acrD* 及 *mdtA*，CpxR 則可增強 BaeR 的影響。

Nishino 等人利用生物晶片分析方式對 BaeSR 做一全面性的瞭解，發現將 BaeR 過量表現，可誘發 59 個基因表現 (Nishino *et al.*, 2005)，他們將這些基因分為五大類，分別是 two component system、chemotactic response、flagellar biosynthesis、maltose transport 以及 multidrug transport，其中 *gspS* 的表現增強為原來的 13 倍，但未明確歸類。比較 wild type 和 *BaeSR*<sup>-</sup> 兩種情況下 *gspS* 表現量，在 *BaeSR*<sup>-</sup> 中 *gspS* 表現量相對於 wild type 中下降了 1.7 倍，沒有顯著不同；而加入 indole 培養之實驗中，加與不加 indole 時 *gspS* 表現量之比值：在



wild type 中為 1.2，在 *BaeSR*<sup>-</sup> 為 0.8，兩者差異並不大。他們利用此三種條件：會被 BaeR 過量表現誘導、wild type 和 *baeSR*<sup>-</sup> 兩種情況下的基因表現比值大於 2、在 wild type 中加與不加 indole 的表現量比值大於 2，篩選出直接受 BaeSR 調節的 BaeSR regulon，*gspS* 並未包含在此 regulon 當中，因此認為 indole 經由 BaeSR 對 *gspS* 的誘導可能並非直接作用 (Nishino *et al.*, 2005)。他們在比對 BaeSR regulon 基因的啟動子區域之後，歸納出 BaeR binding motif，但此區的序列，與前述 Hirakawa 等人在 2005 年經實驗所得之 BaeR binding site 稍有不同 (Hirakawa *et al.*, 2005)。

### 1.7 氧化壓力 (Oxidative stress) 與抗氧化系統

一般生物體藉由呼吸作用或將養分氧化以獲得能量，細胞在行有氧呼吸時會持續產生反應副產物如  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$  等活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS)，這些 ROS 主要來自於生物體中之氧分子經電子傳遞鏈接受電子之後所形成。其他環境因素如 UV 輻射或其他會產生  $O_2^-$  的化合物也可使細胞內 ROS 濃度升高，而免疫細胞在進行吞噬作用 (phagocytosis) 時也是利用 NADPH 氧化酶 (NADPH oxidase enzyme) 產生大量 ROS 對抗入侵的病菌。這些因素皆會產生對細胞具有高毒性的 ROS 因而造成氧化壓力 (Cabiscol *et al.*, 2000)。

生物體內之 DNA、RNA、蛋白質及脂質皆是 ROS 的攻擊目標，大部分損傷是由  $H_2O_2$  經 Fenton reaction 產生的  $\cdot OH$  造成。

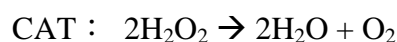
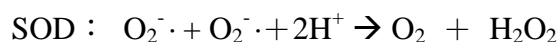


這些自由基主要會攻擊細胞或胞器膜上之不飽和脂肪酸，造成脂質氧化而改變膜的性質，同時脂質氧化也會產生醛類分子 (aldehydes)，這些醛類在

細胞停留的時間更長，對蛋白質造成更多的傷害。DNA 被 ROS 攻擊會造成單股或雙股斷裂、鹼基被改變或是產生 cross-link，使 DNA 無法正常複製。ROS 也會對蛋白質造成影響，如硫醇基被氧化、胺基酸被氧化等改變蛋白質正常構形，使蛋白質無法正常作用。

因此生物體發展出抗氧化系統來清除過多的 ROS，生物體內有些小分子不需酵素作用本身就可以持續維持細胞內還原狀態或清除部分 ROS，其中包括 GSH，藉由 GR 與 NADPH 將 GSH 保持在還原態以對其他蛋白質或物質進行還原作用；另外涉及細胞質內蛋白質雙硫鍵 (thiol-disulfide) 形成、還原及恆定—調節硫醇基的氧化還原，主要由一群具有 Cys-X-X-Cys 活性區域的蛋白質所調節，依其特性分為 Thioredoxin 及 Glutaredoxin。Thioredoxin (Trx) 具高度保守性，廣泛存在各生物體。除了相似胺基酸序列 (>30%)，更包含了保守的活性區域 Cys-Gly-Pro-Cys (CGPC)。 *E. coli* 中 thioredoxin 系統包含了 *trxB* 之產物 thioredoxin reductase (TR) 及兩種 thioredoxin (TrxA、TrxC)。而 Glutaredoxin 在 *E. coli* 中已發現四種 glutaredoxin，分別是 Grx1、Grx2、Grx3、Grx4，其的基因名稱為 *grxA*、*grxB*、*grxC*、*grxD* (Fernandes et al., 2005)。

此外也有許多酵素有著清除 ROS 的作用，如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 與過氧化氫酶 (catalase, CAT)。



細胞還可以利用轉錄因子 OxyR 與 SoxRS 等系統來調控抗氧化相關基因的表現，SoxRS 可調控 Mn-SOD、核酸內切酶 IV (endonuclease IV)、葡萄糖-6-磷酸鹽脫氫酶 (glucose-6-P dehydrogenase)、fumarase、aconitase、鐵氧化

還原蛋白還原酶 (ferredoxin reductase)、micF RNA (影響外膜蛋白表現之 small RNA) 的基因，而 oxyR 可調控 HPI catalase、glutaredoxin、glutathione reductase、NADPH-dependent alkyl hydroperoxide reductase 以及保護 DNA 的結合蛋白 Dps (Farr *et al.*, 1991)，這些作用都可以提高細胞對氧化壓力的抵抗，使細胞得以正常生長。

## 1.8 研究動機與目的

*E.coli* 的 *gspS* 長 1860 bp 產物為 619 個胺基酸，分子量約 70kD 之 Glutathionylspermidine synthetase (GspS)，為一種具有雙重功能的酵素，具有合成酶 (synthetase) 與醃胺酶 (amidase) 活性。由於 Gsp 為原生動物病原蟲與大腸桿菌等生物中所特有，與其相關之酵素遂成為研究對抗此類病原蟲藥物的目標。目前 GspS 的蛋白質之結晶結構已被解出，對蛋白質活性區域以及反應機制有更進一步的認識，但是 GspS 在大腸桿菌中扮演何種角色、*gspS* 基因表現受到哪些因子調控，皆尚未清楚。我們希望藉由了解 *gspS* 基因調控的方式以及 *gspS* 表現型的探討來了解 GspS 在大腸桿菌中的生理意義。

## 第二章、材料與方法

### 2.1 一般研究材料

#### 2.1.1 菌株及質體

菌株及質體詳列於表一及表二。

##### 2.1.1.1 建構 *lacZ* fusion 載體

使用 pRS414 及 pRS415 載體，分別進行 operon、protein fusion 的建構。先轉殖不同長度之 *gspS* promoter 區域 (如圖 2) 其與下游 *lacZ* 黏合，再利用同源重組交換至  $\lambda$ RS45 噬菌體中，藉由形成 lysogen 插入 MC4100 / NR754 的染色體之中，以觀察此基因在染色體上單套的實際表現狀況。

##### 2.1.1.2 誘導表現載體

使用 pBAD24 及 pBAD33 作為轉殖目標基因之載體。此兩種質體之 MCS (multiple cloning site) 上游，有一段 arabinose operon 之  $P_{BAD}$  promoter 及調控基因 *araC*。*araC* 轉譯出活化蛋白 (activator protein) AraC，當阿拉伯糖 (L-arabinose) 存在時可與 AraC 結合進而促進  $P_{BAD}$  promoter 表現，而當葡萄糖 (D-glucose) 存在時則會抑制  $P_{BAD}$  promoter 表現。

### 2.1.2 藥品及試劑

#### 2.1.2.1 一般藥品

主要購自 Sigma Co. (St. Louis, U.S.A.)，Riedie-dehaen Co. (Heidelberg,

Germany)，及和光純藥工業株式會社 (Osaka，Japan)。

#### 2.1.2.2 相關酵素

限制酶及 T4 DNA ligase 購自 TakaRa Co. (Kusatsu, Japan)。

PCR 反應套組購自萬造公司 (台北市，台灣)。

DNA 純化套組購自 Viogene Co. (台北市，台灣)。

#### 2.1.2.3 PCR 引子

PCR 引子由基龍米克斯公司、富聯公司 (台北市，台灣) 所合成，詳列於表三。

#### 2.1.2.4 培養基

Luria-Bertani (LB) Broth

購自 BD Biosciences Co. (U.S.A.)，用於一般之大腸桿菌培養。



#### 2.1.3 器材設備

微量離心機 (Kubota KM-15200，雙鷹公司，台北，台灣)

冷凍離心機 (CF 15D2, Hitachi Co., Japan)

PCR 反應槽 (T3 Thermocycler, Biometra, Rudolf-Wissell Co., Gottingen)

DNA 電泳槽 (伯昂公司，台北，台灣)

分光光度計 (Ultraspec 2000, Pharmacia Co., H.K.)

### 2.2 一般實驗方法

## 2.2.1 質體製備及轉殖

### 2.2.1.1 質體製備

#### Mini-preparation of plasmid DNA from bacteria (小量製備)

相關套組 (Kits) 購自 Viogene Co.以及 Qiagen Co.，詳細實驗步驟參考套組之使用手冊。

#### Midi-preparation of plasmid DNA from bacteria (大量製備)

相關套組 (Kits) 購自 Qiagen Co.，詳細實驗步驟參考套組之使用手冊。

### 2.2.1.2 質體轉殖

#### 限制酶 (restriction enzyme) 反應

選用適當之限制酶，反應溫度視限制酶種類而定，反應時間 60 分鐘。將反應溶液加入適當之追蹤染劑，進行 DNA 瓊脂膠體電泳。

#### DNA 瓊脂膠體 (agarose gel) 電泳

以 1x TAE 緩衝液配製 0.8~1.0 % 之瓊脂膠體，以 100 伏特之電壓進行電泳，反應 30 分鐘，用 ethidium bromide (EtBr) 進行外染，退染後再以紫外光觀察 DNA 產物。

#### DNA 瓊脂膠體 (agarose gel) 電泳回收 DNA

進行 DNA 瓊脂膠體電泳後，經 EtBr 染色，退染後，使用長波長之紫外光源 ( $\lambda=365\text{ nm}$ )，觀察並挖取欲回收之 DNA 位置，再使用 Gel Extraction Kit (購買自 Viogene Co.，詳細實驗步驟參考套組之使用手冊。) 回收 DNA。

### 接合反應 (DNA ligation)

經限制酶反應回收後之 DNA，依載體與欲插入之 DNA 片段濃度比約 3 : 1 的比例加入 DNA。Ligase 取用 0.5  $\mu\text{L}$ ，10X ligation buffer 2  $\mu\text{L}$ ，1  $\mu\text{L}$  10 mM ATP，總體積 20  $\mu\text{L}$ ，以 16  $^{\circ}\text{C}$  反應 16 - 20 小時。

### 定序 (sequencing)

本實驗所建構的質體均經台大醫學院醫學研究部 (台灣) 或基龍米克斯公司 (台北市，台灣) 定序確認序列正確。

## 2.2.2 勝任細胞 (competent cell) 製備

### 2.2.2.1 氯化鈣法

1. 將菌體於 37  $^{\circ}\text{C}$  恆溫培養箱中培養隔夜(12 - 16 小時)。
2. 以 1 mL 菌體接種於 100 mL LB 培養基，重新震盪培養至 OD<sub>600</sub> 吸光值為 0.6 - 0.8。
3. 將菌液平分至兩管，4000 rpm、4  $^{\circ}\text{C}$  離心 10 分鐘，去除上清液。
  - ◆ 此後步驟均保持低溫操作。
4. 以每管 1 - 2 mL 冰的 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 懸浮菌體，再加入 3 - 5 mL 冰 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 混勻，冰浴 30 分鐘。
5. 以 4000 rpm、4  $^{\circ}\text{C}$  離心 10 分鐘，後倒掉上清液。
6. 重複 3 及 4 步驟一次。
7. 每個離心管加入 2 mL 冰 0.1 M CaCl<sub>2</sub>/15 % glycerol，懸浮菌體。
8. 每 0.2 mL 菌液分裝至菌種保存管中，儲存於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

## 2.2.3 轉形作用 (transformation)

### 2.2.3.1 Heat shock transformation

1. 取 50  $\mu\text{L}$  competent cell 與 20  $\mu\text{L}$  質體接合產物 (ligation, 見 2.2.1.2 質體轉殖)(或 5  $\mu\text{L}$  小量製備的質體) 混合, 冰浴 40 分鐘。
2. 於 42  $^{\circ}\text{C}$  下, 進行熱休克反應 (Heat shock) 90 秒。
3. 加入 0.5 mL LB, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  培養箱中震盪培養 1 小時。
4. 以 6000 - 8000 rpm 離心 5 分鐘, 去除上清液, 留下約 50  $\mu\text{L}$  懸浮菌體。
5. 塗於含適當抗生素之培養基上, 置於 37  $^{\circ}\text{C}$  培養箱培養隔夜。

### 2.2.3.2 Electroporation transformation

#### SOC medium

Tryptone	20.0 g
Yeast extract	5.0 g
NaCl	4.0 g
ddH <sub>2</sub> O, 滅菌後再加入 20 mL 1M glucose 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存	1 L

1. 取 2  $\mu\text{g}$  的質體 (約 0.5  $\mu\text{L}$  之小量製備的質體) 加入預先準備好之 50 $\mu\text{L}$  電穿孔勝任細胞中。
2. 將步驟 1 混勻的勝任細胞加入 P/N 620 cuvette 中, 以 2500 V 之電壓進行電擊穿孔反應。
3. 反應結束後, 迅速加入 1 mL SOC 培養液, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  培養箱中震盪培養 1 小時。
4. 以 6000 - 8000 rpm 離心 5 分鐘, 去除上清液, 留下約 50  $\mu\text{L}$  懸浮菌體。
5. 塗於含適當抗生素之培養基上, 置於 37  $^{\circ}\text{C}$  培養箱培養隔夜。



### 2.2.3.3 TSS- transformation

#### 2X TSS (Transformation and storage solution)

PEG 8000 (Polyethylene glycol 8000)	20.0 g
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	10.0 mL
1 M MgSO <sub>4</sub>	4.0 mL

1. 取 30  $\mu$ L 隔夜培養菌液加入 3 mL LB 培養液中，培養至 OD<sub>600</sub> 0.6~0.8。
2. 將菌液以 3000 rpm，離心 5 分鐘，倒掉上清液。
3. 以 300  $\mu$ L 2X TSS 溶液將菌體懸浮，冰浴 10 分鐘。
4. 加入 5  $\mu$ L 質體混勻，置於冰上 30 分鐘。
5. 於 37 °C 下，進行熱休克反應 (Heat shock) 2 分鐘。
6. 加入 0.5 mL LB，在 30 °C 培養箱中震盪培養 1 小時。
7. 以 6000 ~ 8000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，留下約 50  $\mu$ L 懸浮菌體。
8. 塗於含適當抗生素之培養基上，置於 37 °C 培養箱培養隔夜。

## 2.3 選殖基因表現系統之建立

將選殖的 DNA 片段接合至質體 pRS415 或 pRS414 中，先轉殖至大腸桿菌 XL1-Blue 中作篩選，再將純化過具選殖基因 DNA 片段的質體藉由噬菌體帶至欲表現的菌體染色體中進行表現及特性分析。

### 2.3.1 載體 (vector) 製備

利用 pRS415 或 pRS414 為載體，將選殖基因片段插入 *EcoRI* 及 *BamHI* 的限制酶切點中。

1. 將載體 pRS415 或 pRS414 先轉殖至 XL1-blue 中大量複製，再以 Qiagen Plasmid Midi Kit 萃取質體 DNA。

2. 將萃取所得的部分質體以限制酶 EcoRI 及 BamHI 於 37 °C 下載切 1 小時。
3. 加入等量 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)，劇烈震盪至乳液狀。
4. 室溫下以 14000 rpm 離心 15 秒，轉移上清液至新微量離心管。
5. 重複步驟 3、4 (乙次) 直到有機層與水層間沒有蛋白質存在。
6. 添加與剩餘溶液等量的 chloroform 及重複步驟 3、4。
7. 將已轉移至新微量離心管的上清液進行酒精沉澱。

#### ◆ 酒精沉澱

8. 加入 2.5 倍體積的 95 % 酒精以及 0.1 倍體積的 3.0 M NaOAc (pH 5.2)，置於 -80 °C 下至少 30 分鐘使 DNA 沉澱。
9. 於 4 °C 下，以 14000 rpm 離心 20 分鐘，沉澱 DNA。
10. 將 DNA 沉澱物以 70 % 酒精清洗後，真空乾燥 DNA，再以 20 µL 的無菌二次水溶解，保存於 4 °C 或 -20 °C。

### 2.3.2 選質基因片段之製備

利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅產生不同長度 *gspS* promoter 區域的片段。

直接使用 MG1655 的染色體作為 DNA 模板，並設計 5' 端點帶有限制酶切位點的引子對 (表三) 進行聚合酶連鎖反應，使增幅出的 PCR 產物兩端，帶有選殖到載體 (vector) 時所需的適當限制酶切位。

### PCR 反應物

Template: MG1655 chromosome	2.0 $\mu$ L
10X PCR buffer	5.0 $\mu$ L
dNTP (10 mM each)	1.0 $\mu$ L
Forward primer (5') : 表三	1.0 $\mu$ L
Reversed primer (3') : 表三	1.0 $\mu$ L
Taq DNA polymerase	1.0 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	39.0 $\mu$ L
<hr/>	
Total	50.0 $\mu$ L

### PCR 反應條件

1. Denaturation 95 °C : 5 分鐘。
2. Denaturation 95 °C : 1.5 分鐘。
3. Annealing 50~65 °C : 1 分鐘。
4. 溫度由引子 T<sub>m</sub> 值 - 5 °C 決定，大多使用 50 °C。
5. Extension 72 °C : 由產物大小決定，1 Kb 之產物使用 1 分鐘，依此類推。
6. 重複步驟 2、3、4 共 30 個循環。
7. 72 °C，10 分鐘。
8. 4 °C，中止反應。

### 2.3.3 選殖片段之處理

利用 PCR 增幅反應的專一性引子，於 5'端及 3'端加上限制酶 EcoRI 及 BamHI 上可截切的序列，可將此增幅片段透過接合酶，接合於具 EcoRI 及 BamHI 截切點的載體中。本實驗係將 PCR 增幅反應之 DNA 片段經純化處理，以進行接合反應。

1. 將 PCR 選殖的 DNA 片段以限制酶 EcoRI 及 BamHI 截切反應 1 小時後，經 DNA 電泳分析，利用 EtBr 染色後，於長波長紫外線 ( $\lambda=365$  nm) 下將含有

所需 DNA 片段的區塊切下。

2. 將此 DNA 經由 Viogene Gel-M gel extraction kit 回收。

### 2.3.4 接合反應 (ligation)

1. 將限制酶截切處理過後的選殖片段及載體 DNA，於 1% 洋菜瓊脂 (agarose) 進行 DNA 電泳，以達到分離 DNA 片段的目的是。
2. 將膠片上位於正確分子量位置的 DNA 切下來，經由 Viogene Gel-M gel extraction kit 回收。
3. 將萃取過的 PCR 選殖的 DNA 片段及載體 DNA 加入 ligase，於 16 °C 下進行接合 (ligation) 反應 14-16 個小時，反應後保存於 4 °C。

#### 反應物組成

Vector DNA	4.0 μL
Insert DNA	10.0 μL
10X Ligation buffer	2.0 μL
10 mM ATP	1.0 μL
T4 DNA Ligase (TaKaRa)	1.0 μL
ddH <sub>2</sub> O	2.0 μL
<hr/>	
Total	20.0 μL



### 2.3.5 *gspS* promoter 點突變之質體建構

1. 先以 195-*gspS*-EcoRI(F) 與 3'-BaeRtg 及 5'-BaeRtg 與 *gspS*-39-BamHI(R) 為引子 (表三)，PCR 增幅所得到的產物做為新反應的模板，再以 195-*gspS*-EcoRI(F) 與 *gspS*-39-BamHI(R) 夾出突變 *gspStg* 的片段。
2. *gspSir* 亦為此種方式，獲得突變的 promoter region。
3. 再經截切、黏合於 pRS415 中。

4. 最後藉由 $\lambda$ 噬菌體轉導入染色體中，分析其表現。

## 2.4 嗜菌體一般實驗方法

### 試劑

#### Tris-magnesium (TM) buffer

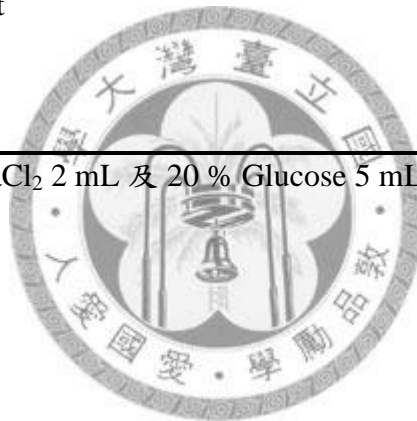
1M Tris-HCl (pH7.5)	20 mL
MgSO <sub>4</sub>	0.4 g
ddH <sub>2</sub> O, 滅菌後 4°C 保存	400 mL

#### R-Top Agar

Bacto tryptone	10 g
Bacto yeast extract	1 g
Difco agar	8 g
NaCl	8 g
滅菌後,加 1 M CaCl <sub>2</sub> 2 mL 及 20 % Glucose 5 mL	1 L

Chloroform

20% maltose



### 2.4.1 製備嗜菌體

1. 取隔夜培養菌液 0.2 mL，加入 2 - 3 個 plaques，37 °C 靜置培養 15 分鐘。
2. 將 R-Top Agar 3 mL 隔水加熱溶解，待其降溫至 45°C。
3. 將 2 倒入 1 混勻，再倒入 LA plate，搖晃使其攤平，待乾。
4. 37 °C 倒置培養 5 - 8 小時，此時培養皿上會長出許多 plaques。

步驟 5 - 8 為收集 lysate

5. 加 5 mL TM buffer 於培養皿內，靜置於 4 °C 數小時。
6. 將培養皿內的溶液吸到試管內，加 400  $\mu$ L chloroform。
7. 4°C 下靜置 30 min 後離心，取上清液到乾淨試管，再加 400  $\mu$ L chloroform，

此步驟重複兩次。

8. 取得之 lysate 保存於 4°C。

## 2.4.2 Titer the lysate

1. 以 1:100 的倍數，用 TM buffer 將 lysate 稀釋成  $10^{-2}$ ， $10^{-4}$ ， $10^{-6}$ ， $10^{-8}$  (視需要調整濃度)。
2. 將 R-Top Agar 3 mL 隔水加熱溶解，待其降溫。
3. 在 2 內加入 0.2 mL 隔夜培養菌液，並加入所需濃度的 lysate (例：加入  $10^{-2}$  100  $\mu$ L 則濃度為  $10^{-3}$ )，混勻。
4. 將 3 倒入 LA plate，待乾，37°C 培養隔夜。

此方法也可用於製備新鮮的 plaques。

## 2.4.3 P1 轉導作用 (P1 transduction)

### 試劑

1M CaCl<sub>2</sub>

P1 stock:  $10^9 - 10^{10}$  pfu/mL

P1 salts solution: 10mM CaCl<sub>2</sub>/5 mM MgSO<sub>4</sub>

1 M Sodium citrate

選擇性培養基 (可加入 5 mM Sodium citrate)

### 2.4.3.1 P1 溶胞產物 (lysate) 製備

1. *E. coli* donor strain 接種至 5 mL LB，震盪隔夜培養於生長溫度。

生長溫度通常為 37 °C 或 30 °C，依菌株特性決定。

2. 再將隔夜培養以 1:100 接種於含 50  $\mu$ L 20 % Glucose (最終濃度 0.2 %)、25  $\mu$ L

1M CaCl<sub>2</sub> (最終濃度 5 mM) 的 5 mL LB 培養基中，於所適溫度震盪培養 30-45 分鐘。◆ 鈣離子為病毒吸附所必須。

3. 加入 100 μL 新製備的 P1vir stock (10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> pfu/mL) 後，繼續震盪培養約 3 小時，直到細胞溶解 (lysis)。
4. 加入 200 μL CHCl<sub>3</sub>，連續搖動數分鐘，使其充分經過液體，以確保培養基中無細菌，置於冰上 20 分鐘。
5. 以 3500 rpm 離心 10 分鐘後，轉移上清液至新試管，再重複步驟 4 一次後，將上清液轉移至新試管，標記 lysate 種類 (如：P1vir/C600) 後，置於 4 °C 保存。◆ 溶胞產物可於 4 °C 保存數年，但 CHCl<sub>3</sub> 會減低病毒存活率。

#### 2.4.3.2 P1 轉導作用

1. *E. coli* recipient strain 接種至 5 mL LB，震盪隔夜培養於生長溫度。
2. 再將隔夜培養 1.6 mL 使用微量離心管以 14000 rpm 離心 2 分鐘，移除上清液。
3. 加入 0.8 mL 的 P1 salts solution 打散細胞後，以 100 μL 分裝至新微量離心管中。
4. 混合 100 μL 欲轉導的 lysate，靜置 30 分鐘於生長溫度中，使其吸附於細胞。
5. 添加 1 mL LB 及 200 μL 1M Sodium citrate 後，繼續震盪培養 1 小時於生長溫度中。◆ Sodium citrate 可嵌合鈣離子，避免剩餘病毒的二次感染。
6. 以 14000rpm 離心 2 分鐘，移除上清液後，加入 100 μL LB 混合，塗抹於適合的選擇性培養基，培養於生長溫度中 1-2 日。
7. 將所得的菌落劃線純化出單一菌落 2 次，避免殘存的 P1 病毒感染。
8. 依據 genotype 及 phenotype 確認轉導至正確基因。◆ 可使用 colony PCR 確認轉導基因是否於正確位置上。



## 2.4.4 $\lambda$ 特定轉導作用 (specialize transduction)

### 2.4.4.1 $\lambda$ 溶胞產物製備

1. 將 *E. coli* donor strain (質體內含有可插入片段) 接種至含適當抗生素、30  $\mu$ L 20 % Maltose (最終濃度 0.2 %) 的 LB 培養基，37  $^{\circ}$ C 震盪隔夜培養。
2. 進行 confluent lysate (2.4.1)。
3. 接種不含有質體的 donor strain 於含 30  $\mu$ L 20 % Maltose 的 LB 培養基，37  $^{\circ}$ C 震盪培養隔夜。◆ 之後每日均需重複此步驟 3。
4. 收集 lysate (目標 DNA 序列已交換至  $\lambda$ RS45 的機率為  $10^{-4}$ )，以 TM buffer 稀釋至  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  等稀釋度，使用步驟 3 的隔夜培養，Titer the lysate (2.4.2) 於 X-Gal / LA 上。◆ 目標 DNA 序列後面融合 *lacZ* 基因，如已自質體交換至  $\lambda$ RS45，則 plaques 呈藍色。
5. 挑所得的數個藍色 plaques，加入 500  $\mu$ L TM buffer 混合均勻後，重複步驟 4，以取得單獨的藍色 plaques。
6. 使用步驟 5 獲得單獨的藍色 plaque 進行 confluent lysate (2.4.1)。
7. 收集 lysate，重複步驟 4，但只需  $10^{-4}$  稀釋度，確認 X-Gal / LA 上的 plaques 皆為藍色。

### 2.4.4.2 $\lambda$ 轉導作用

1. *E. coli* recipient strain 接種至 3 mL LB，37  $^{\circ}$ C 震盪隔夜培養。
2. 將 R-Top Agar 3 mL 隔水加熱溶解，待降溫後，加入隔夜培養 0.2 mL 混勻，倒在 LA 培養基上，傾斜使均勻分布，待乾。
3. 將 100  $\mu$ L 製備好的 lysate 滴在上步驟 2 的培養基上，放置於 37  $^{\circ}$ C 培養。
4. 自明顯溶菌環的邊緣取菌，劃於 X-Gal / LA 上，再多次純化直到得到單一



藍色菌落。

5. 分別測試不同菌落的  $\beta$ -galactosidase 活性分析，保存活性最低、僅插入單套的菌落。

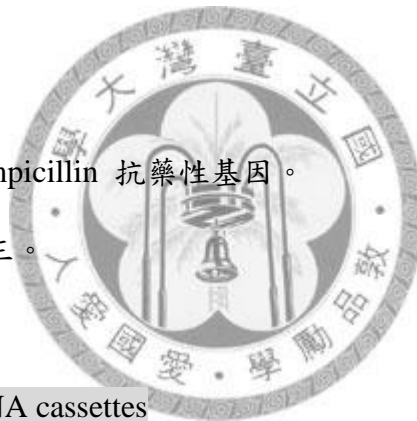
## 2.5 建構 *gspS*<sup>-</sup>突變株

利用 PCR 增幅反應產生兩側帶有 50 nt 與目標基因具同質性的抗藥性基因片段，將其使用電穿孔法送入細菌細胞中，此時再誘導可剔除的重組酶質體，使此抗藥性基因，能藉由重組作用與目標基因置換，再利用溫度、抗性篩選，得到目標基因剔除的突變株 (Baba *et al.*, 2006, Datsenko *et al.*, 2000)。

### 材料

質體 pKD46：具有 ampicillin 抗藥性基因。

PCR 引子設計：見表三。



### Preparation of linear DNA cassettes

Template: pKD 46 for amp <sup>r</sup>	2.0 $\mu$ L
10X Ex Taq buffer	5.0 $\mu$ L
dNTP (2.5 mM)	4.0 $\mu$ L
Forward primer (5') : 表三 knock-out primer	1.0 $\mu$ L
Reversed primer (3') : 表三 knock-out primer	1.0 $\mu$ L
TaKaRa Ex Taq	0.5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	36.5 $\mu$ L
<hr/> Total	<hr/> 50.0 $\mu$ L

## PCR 反應條件

1. Denaturation 94 °C : 0.5 分鐘。
2. Annealing 59 °C : 0.5 分鐘。
3. Extension 72 °C : 2 分鐘。
4. 重複步驟 1、2、3 共 30 個循環。
5. 72 °C , 2 分鐘。
6. 4 °C , 中止反應。

1. 使用設計的 primer 經由 PCR 增幅抗生素基因片段，再經由 Millipore PCR clean kit 清理 PCR 產物，回收 20  $\mu$ L。

4. 隔夜培養 DY330 菌株於 1 mL LB。

5. 接種此隔夜培養 400  $\mu$ L 至 20 mL LB 培養於 30°C。

6. 約 3 小時後，OD<sub>600</sub> 達 0.4-0.6，轉移至離心管中放置於冰上。

◆此後步驟均放置於冰上操作。

7. 於 4 °C 以 5500 xg 離心 8 分鐘。

8. 添加 2 mL 之冰無菌水後，分裝至兩支微量離心管中。

9. 於 4 °C 以 12000 rpm 離心 20 秒後，移除上清液。

10. 各添加 1 mL 冰無菌水。

11. 重複步驟 9、10 三次。

◆此時電穿孔勝任細胞製成。

12. 取步驟 3 之稀釋 DNA 5  $\mu$ L 加入製備好之 50  $\mu$ L 電穿孔勝任細胞中。

13. 將混勻的勝任細胞加入 P/N 620 cuvette 中，以 2500 V 之電壓進行電擊穿孔反應。

14. 反應結束後，迅速加入 1 mL SOC 培養液，在 37 °C 培養箱中震盪培養 1 -

2 小時。

15. 以 6000 - 8000 rpm 離心五分鐘，去除上清液。
16. 加入 100  $\mu$ L 無菌水懸浮菌體，塗於適當抗生素培養基，置於 37  $^{\circ}$ C 培養箱培養隔夜。
17. 經由 colony PCR 確認抗生素基因置換至目標基因。

## 2.6 $\beta$ -galactosidase 活性分析

利用 *gspS::lacZ*-fusion gene 為報導基因，藉由與其融合的 *lacZ* 基因表現  $\beta$ -galactosidase，分解 ONPG (O-Nitrophenyl  $\beta$ -D-Galactopyranoside) 的活性，來判斷 *gspS* 基因的表現。本實驗參考 Miller (1972) 所發表的分析方法，將菌體於 LB 中培養隔夜，第二天以 1:100 稀釋培養至對數期中期進行分析。

### 試劑

#### ONPG (O-Nitrophenyl $\beta$ -D-Galactopyranoside)

ONPG	40.0 mg
ddH <sub>2</sub> O	10 mL

新鮮配製，置於 4  $^{\circ}$ C 保存

#### Z buffer

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.53 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	6.22 g
MgSO <sub>4</sub>	0.12 g
$\beta$ -mercaptoethanol	2.7 mL
KCl	0.75 g
ddH <sub>2</sub> O	1 L

調整 pH 至 7.0，保存於 4 $^{\circ}$ C 下。

Stop solution: 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，保存於室溫。

0.1% SDS (需新鮮配製)、Chloroform

## 方法

1. 取隔夜培養菌液 30  $\mu$ L 加入 3 mL LB broth 中，視有無質體的存在，加入抗生素 (ampicillin、chloramphenicol) 及碳源 (glucose、arabinose)。
2. 於 30  $^{\circ}$ C 下培養約 3-4 個小時至對數生長期 ( $OD_{600} = 0.3 - 0.7$ )。
3. 紀錄  $OD_{600}$  後，取適當菌液 (菌液與 Z buffer 之總體積為 1 mL，一般取菌液 0.2 mL，可視變色速度改變之) 加入 30  $\mu$ L 0.1 % SDS、40  $\mu$ L chloroform 及 0.8 mL Z buffer 中進行破菌。
4. 置於 28  $^{\circ}$ C 水浴槽中預反應 5 分鐘。
5. 加入 200  $\mu$ L ONPG 開始計時，待顏色變為黃色 ( $OD_{420}$  之值約在 0.6 - 0.9) 後，加入 0.5 mL stop solution (1M  $Na_2CO_3$ ) 終止反應，記錄反應時間。
6. 取隔夜培養的菌液 30  $\mu$ L 加入 3 mL LB 中，於 30  $^{\circ}$ C 下培養約 3 個小時至對數生長期 (log phase) ( $OD_{600} = 0.28-0.7$ )。
7. 測定呈色結果之  $OD_{420}$  及  $OD_{550}$  值。
8. 活性的計算公式為：

$$1000 \times (OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}) / (T \times V \times OD_{600}) = \text{Units of } \beta\text{-galactosidase}$$

T：反應時間 (分)

V：反應體積 (ml)

單位定義：每分鐘每個菌體所產生之 O-Nitrophenol (Miller 1972)。

## 2.7 cDNA 末端快速增幅 (rapid amplification of cDNA ends, RACE)

利用 TaKaRa 5'-Full RACE Core Set 套組。經設計一位於目標基因下游，帶有磷酸根的 primer 反轉錄合成目標基因 mRNA 之 cDNA，藉由 T4 RNA Ligase 接合成環狀或重複構造。再使用兩組對目標基因專一性的 primers 放大未知之 5' 起始區域，再經定序了解其起始位置。

## 材料

RT-Primer: 表 3, 12-15 nt with 5' phosphorylation。

PCR primers: 表 3, 20 nt。

### Total RNA

1. 將隔夜培養菌株 30  $\mu\text{L}$  接種於 3 mL LB 中。
2. 約 2 小時後  $\text{OD}_{600}$  達 0.6 後, 取 500  $\mu\text{L}$  菌液加入 1000  $\mu\text{L}$  RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen Co.)。
3. 依據 RNAprotect Bacteria Reagent 操作手冊抽取 total RNA。
4. 依據 5'-Full RACE Core Set (TaKaRa Co.) 操作說明進行反應。
5. 將反應所得產物黏合至 pTA 質體上, 定序所得片段。

## 2.8 西方墨點分析 (Western Blotting)

### 2.8.1 SDS 蛋白質膠體電泳 (SDS-PAGE)

1. 測量菌液  $\text{OD}_{600}$  吸光值。
2. 取 3 mL 菌液, 以 3000 rpm 離心 10 分鐘, 移除上清液。
3. 以 1 mL 無菌水清洗菌體, 再次離心, 移除上清液, 收集菌體。
4. 加入 70  $\mu\text{L}$  的 2X SDS sample buffer 懸浮菌體, 於  $100^{\circ}\text{C}$  下反應 10 分鐘, 得到含粗萃蛋白的 SDS-PAGE 樣品溶液。
5. 取約含等量菌數 (由  $\text{OD}_{600}$  吸光值換算) 之含粗萃蛋白樣品溶液, 於 12.5% 的 SDS-PAGE 膠片中進行蛋白質電泳。
6. 先以 100 伏特電泳 30 分鐘, 再以 120 伏特電泳約 60 分鐘。

## 試劑

SDS-PAGE 電泳膠片 (12.5%)	Running gel	Stacking gel
H <sub>2</sub> O	3.3 mL	3.4 mL
30% Acrylamide	4.0 mL	0.83 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 mL	-- mL
1.0 M Tris (pH 6.8)	-- mL	0.63 mL
10% SDS	0.1 mL	0.05 mL
10% APS	0.1 mL	0.05 mL
TEMED	0.004 mL	0.005 mL

此份量約可配 0.75 mm 厚 10 x 7 cm 的膠片兩片

### 30% 丙烯醯胺液 (Acrylamide)

40% Acrylamide / Bis solution	75.0 mL
ddH <sub>2</sub> O	25.0 mL
避光，置於 4°C 保存	100 mL

### 1.5 M Tris (pH 8.8)

Tris base	36.34 g
ddH <sub>2</sub> O	150 mL
先溶解後，調整 pH 至 8.8，再加水至總體積為 200 mL	200 mL

### 1.0 M Tris (pH 6.8)

Tris base	24.22 g
ddH <sub>2</sub> O	150 mL
先溶解後，調整 pH 至 6.8，再加水至總體積為 200 mL	200 mL

### 10% APS 溶液 (Ammonium persulfate)

APS	50.0 mg
ddH <sub>2</sub> O	0.5 mL

每次使用前新鮮配製

### 2X SDS sample buffer

10% SDS	20.0 mL
Glycerol	10.0 mL
$\beta$ -mercaptoethanol	5.0 mL
1.0 M Tris-HCl (pH6.8)	6.25 mL
Bromophenol blue	1.25 mg
加水至總體積為 50 mL，保存於室溫	50.0 mL

### 5X Gel running buffer

Tris base	15.0 g
Glycine	72.0 g
SDS	5.0 g
加水至總體積為 1000 mL，室溫保存，稀釋後使用	1000 mL

### 2.8.2 轉印 (Transfer)

本實驗利用 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) 將蛋白質由 SDS-PAGE 膠片轉印至 Nitrocellulose membrane (Millipore Co.) 上固定。轉印方法參考 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell 及 Nitrocellulose membrane 所提供之使用說明書。

1. 裁減與 SDS-PAGE 膠片大小相似之 Nitrocellulose membrane，先於 100% methanol 中潤濕，再於滅菌過二次水浸潤 2 分鐘，接著放入 transfer buffer 中平衡約 10 分鐘。
2. 裁減與 SDS-PAGE 膠片大小相似之 3 mm 濾紙六張，與二片海綿一同浸泡於 transfer buffer 中平衡約 10 分鐘。
3. 取出轉印用夾板，先將一片海綿置於黑色夾板上，再放上三張濾紙；接著將剛跑完電泳之膠片小心取下，於 transfer buffer 中潤濕後，放置於濾紙上

並以玻棒小心趕出氣泡。

4. 將 Nitrocellulose membrane 完全覆蓋於膠片上，趕出氣泡後，再依次放上三張濾紙及另一片海綿；最後，闔上夾板卡緊，將夾板放入轉印槽中。以上步驟均戴手套操作。
5. 以 400 mA 之電流轉漬約 1.5 小時，轉漬時蛋白質由負極向正極的 Nitrocellulose membrane 移動。每 20 分鐘更換融化之冰塊，避免轉漬溫度過高而產生氣泡。

#### Transfer buffer

Tris base	3.03 g
Glycine	14.4 g
Methanol	200.0 mL
10% SDS	5.0 mL
加水至總體積為 1000 mL，保存於室溫	

### 2.8.3 免疫雜交 (Hybridization)

本實驗採用 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Co.) 操作手冊所提供方法進行免疫雜交。

1. 將轉印後的轉漬膜 Nitrocellulose membrane 以 PBS 浸潤後，置入 blocking reagent 中，於室溫下搖洗反應一小時。
2. 將轉漬膜於室溫下以 PBST 搖洗三次，第一次 15 分鐘，第二、三次 5 分鐘。
3. 將轉漬膜置於含一次抗體的 blocking reagent 中，於室溫下搖洗反應一小時，或置於 4°C 反應隔夜，進行雜交。
4. 將轉漬膜於室溫下以 PBST 搖洗三次，第一次 15 分鐘，第二、三次 5 分鐘，以去除非專一性雜交訊號。



5. 將轉漬膜置於含二次抗體的 blocking reagent 中，於室溫下搖洗反應一小時，或置於 4°C 反應隔夜，使二次抗體與一次抗體產生雜交反應。
6. 將轉漬膜於室溫下以 PBST 搖洗三次，第一次 15 分鐘，第二、三次 5 分鐘，以去除非專一性雜交訊號。

### **PBS**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.45 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2.96 g
NaCl	5.84 g
加水至總體積為 1000 ml，保存於室溫	1000 mL

### **PBST (PBS-Tween)**

於 PBS 中加入 0.1% 的 Tween-20，保存於室溫。

### **Blocking reagent**

PBST	100 mL
Skim milk	7.0 g

使用前配製，需充分溶解。

### **一次抗體**

(適用於本實驗)

Monoclonal mouse anti-FLAG	1 : 5000 稀釋
Polyclonal rabbit anti-GspS IgG	1 : 5000 稀釋

### **二次抗體**

(適用於本實驗)

Goat anti-mouse IgG-HRP	1 : 6000 稀釋
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1 : 6000 稀釋

#### 2.8.4 免疫呈色反應 (Detection)

本實驗使用 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Co.) 套組進行雜交訊號的偵測。訊號產生的原理，是利用標示於二次抗體上的 peroxidase 與套組中的 detection solution 反應而發出螢光，然後再以 autoradiography film (Classic Blue, MIDSCI Co.) 於暗室中顯影，以偵測雜交訊號。

Immobilon™ Western (Millipore Co.) 套組中含有 Solution I: HRP Substrate Peroxide Solution 及 Solution II: HRP Substrate Luminol Reagent。

1. 取相同體積之 Solution I 及 Solution II 分別置於試管中 (每片轉漬膜各需約 0.5 ml 的 Solution I 及 Solution II)，將 Solution I 及 Solution II 混合成 detection reagent，靜置反應五分鐘。
2. 取透明投影片置於壓片盒內，將轉漬膜上的 PBST 滴乾，平鋪於投影片上；接著將 detection reagent 均勻滴灑於轉漬膜上，再覆蓋另一張投影片，保持投影片表面乾燥。
3. 以下步驟於暗房中操作。將 autoradiography film 置於轉漬膜上壓片。(壓片時間視訊號強弱決定，10 秒至 30 分鐘均可)。
4. 將壓片後的底片 (autoradiography film)，放入顯影劑中顯影，顯影時間視訊號強弱而定，約 30 秒至 5 分鐘。
5. 以清水潤洗除去底片上的顯影劑，將水滴乾；再將底片放入定影劑中定影，以清水潤洗除去底片上的定影劑，最後將底片晾乾保存。

#### 2.8.5 Stripping

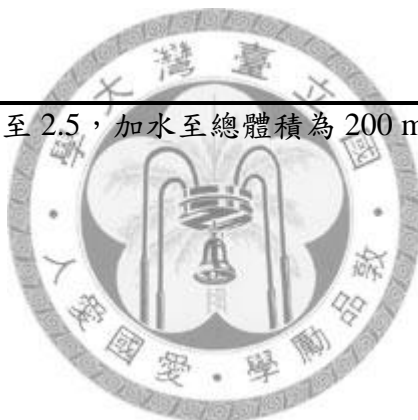
如欲以同一張轉漬膜再次進行免疫雜交反應，可使用 Stripping buffer 洗去

轉漬膜上抗體，以進行第二次的免疫雜交。以 Stripping buffer 處理過的轉漬膜可能會導致蛋白質訊號稍微減弱。

1. 偵測過訊號之轉漬膜，以蒸餾水潤洗 5 分鐘。
2. 將轉漬膜置於 stripping buffer 中，於室溫下搖洗反應 30 分鐘。
3. 將轉漬膜於室溫下以蒸餾水搖洗三次，每次 5 分鐘，以去除非專一性雜交訊號。
4. 轉漬膜以 PBS 潤洗後，即可進行第二次的免疫雜交。

### Stripping buffer

Glycine	3.0 g
Tween-20	0.1 mL
以 HCl 調整 pH 至 2.5，加水至總體積為 200 mL	200 mL



## 第三章、結果

### 3.1 *gspS* 上游啟動子 (promoter) 區域及 *cis*-element 位置之分析

藉由生物資訊方式先對 *gspS* 上游序列分析，利用 BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) 網站的 NNPP (Neural Network Promoter Prediction, version 2.2 (March 1999)) 對 *gspS* 上游 500 bp 進行分析，參數設定為：prokaryote, not include reverse strand, minimum promoter score = 0.8，其預測結果為 TGGAGAATTGATCGCCATCGCCA，底線部分為預測的，轉錄起始點 (transcription start site)，位於 start codon 上游 -459 nt 的位置。

再利用 SoftBerry 的 BPROM - Prediction of bacterial promoters (Last modification date: 24 Jul 2007)，對 *gspS* 上游 500 bp 進行分析，得到結果轉錄起始點位於 start codon 上游 -195 nt 的位置，TTCGCG-N<sub>17</sub>- TGTCATAGT 可能為  $\sigma^{70}$  的辨識區域。

而根據 5'RACE 實驗定序後比對的結果，確認轉錄起始點在距離 start codon -88 nt 的位置，由 +1 G 處開始轉錄，依此結果往其上游部分尋找啟動子位置，推測 -35 為 TTGCGC，而 -10 為 TATGAT，中間間隔 19 個核苷酸 (TTGCGC-N<sub>19</sub>-TATGAT)，另外 Shine-Dalgarno 序列為鄰近 start codon 上游的 AAGG (圖 1)。

此外，SoftBerry BPROM 也預測出 RpoH (-225 CTGATAAG)、Tus (-222 ATAAGTAT)、PhoB (-210 CTGTCATA) 為可能的 *cis*-binding site。而 Nishino 等人利用生物晶片分析 BaeR 大量表現對 *E. coli* 基因表現的影響，結果發現包含 *gspS* 在內的 59 個基因會受 BaeR 的影響而增加其表現量，並由實驗數據歸

納出 BaeR-binding motif, 5'-TTTTTCTCCATDATTGGC-3' (D 代表 G, A 或 T)(Nishino *et al.*, 2005)。另外 Hirakawa 等人也利用 DNase I footprinting 分析方式, 找出 BaeR 在 *acrD*、*mdtA* 上的結合區域 (Hirakawa *et al.*, 2005)。將以上結果和 *gspS* 上游區域進行序列比對, 找出兩個可能與 BaeR 結合的位置: BaeR1、BaeR2 (圖 1)。

### 3.2 *gspS* 受到 BaeR 轉錄因子 (transcription factor) 的調控

由於在生物晶片分析中觀察到 BaeR 大量表現可誘導 *gspS* 的表現增強為原來的 13 倍 (Nishino *et al.*, 2005)。為了對 *gspS* promoter site 做更進一步的分析, 先針對預測的 BaeR binding site 建構四組帶有不同 5'UTR (untranslated region) *gspS* 的質體 (pBAD33-286*gspS*、pBAD33-236*gspS*、pBAD33-116*gspS*、pBAD33-20*gspS*) (圖 3); 接著設計四組不同長度之 DNA 片段: *gspS* 前 39 個 bp 及 ATG 上游 242、195、161、130 bp 分別與 *lacZ* 融合成 operon fusion (圖 2) 及 protein fusion, 但 protein fusion 可能因為 *lacZ* 活性太低而無法篩選出藍色溶菌斑。

#### 3.2.1 BaeR 誘導 *gspS* 表現量上升

首先將四種帶有不同 5'UTR (untranslated region) *gspS* 質體 (pBAD33-286*gspS*、pBAD33-236*gspS*、pBAD33-116*gspS*、pBAD33-20*gspS*) (圖 3A) 分別與 pBAD24-*baeR*<sup>+</sup> 轉殖入 NM6001, 以 arabinose 來誘導質體上蛋白質表現, 再以西方墨點法偵測 GspS 蛋白質表現的情形。結果顯示在 BaeR 被 arabinose 誘導大量表現後, 帶有較長 5'UTR 的三種 GspS 蛋白質表現量有明顯增加, 而 5'UTR 最短的蛋白質表現量增加則不如前三種 (圖 3B)。

接下來將 pBAD24-*baeR*<sup>+</sup> 轉殖入帶有不同轉錄融合基因之溶原菌 (lysogen) HA60051 (*gspS242-lacZ*)、HA60052 (*gspS195-lacZ*)、HA60053 (*gspS161-lacZ*)、HA60054 (*gspS130-lacZ*)，利用 arabinose 誘導或 glucose 抑制之 BaeR 大量表現，藉由  $\beta$ -galactosidase 活性分析，以瞭解在 *E. coli* 中，BaeR 對 *gspS* 表現量的影響。從  $\beta$ -galactosidase 活性分析結果 (圖 4A) 可以發現，以 arabinose 誘導 BaeR 大量表現後，HA60051 (*gspS242-lacZ*)、HA60052 (*gspS195-lacZ*)、HA60053 (*gspS161-lacZ*) 之活性均增加 30~40 倍，顯示大量表現的 BaeR 在 *E. coli* 菌體中是可以誘導 *gspS* 的表現量上升；而 HA60054 (*gspS130-lacZ*) 卻只增加了 2 倍，可能是因為沒有完整的 BaeR binding site，導致 BaeR 雖大量表現但無法使 *gspS* 的表現量上升。

從西方墨點法及  $\beta$ -galactosidase 活性分析的結果可得知，不管是直接以 GspS 全長的方式還是以 *lacZ* fusion 的方式，BaeR 大量表現可以使 promoter region 長度在 161 bp 以上的片段被誘導而增加表現量，也確認 BaeR 在 *E. coli* 菌體中可以誘導 *gspS* 表現量上升。

### 3.2.2 BaeR binding site

比較  $\beta$ -galactosidase 活性分析結果和預測的兩個 BaeR binding site，推測 BaeR2 較有可能為 BaeR 結合的位置。將 BaeR2 與 Nishino 等人和 Hirakawa 等人提出的 BaeR binding site 進行序列的分析，其共同特色為包含一段 TTTTTT 的序列，或是以 TTTTTT 為中心兩側有類似反轉重複 (inverted repeat) 的序列。我們所預測 *gspS* 的 BaeR 位置為相鄰 -35 promoter 之位置 (圖 1)，其序列為 GTACAGAATGTGAATTTTTTAACCCTTTGCGCC。

為了瞭解 BaeR 對 *gspS* 基因表現的誘導是否因為 BaeR 與 *gspS* 上游

*cis*-binding site 結合而加強其基因表現，建構了兩組 BaeR binding site 的突變菌株：HA60055 (*gspStg-lacZ*，*gspS195-lacZ* 上之 T 置換為 G，5'-GTACAGAATGTGAAGGGGGGAACCCTTTGCGC-3') 以及 HA60056 (*gspSir-lacZ*，*gspS195-lacZ* 上類似反轉重複之一側置換掉，5'-TTAACGCATTGGAATTTTTTAACCCTTTGCGC-3') (圖 5)，再將 pBAD24-*baeR*<sup>+</sup> 轉殖入這些溶原菌中，利用 arabinose 誘導或 glucose 抑制 BaeR 大量表現，偵測其  $\beta$ -galactosidase 活性。從結果可以看出，HA60055 (*gspStg-lacZ*) 無法被 BaeR 誘導增加表現，但 HA60056 (*gspSir-lacZ*) 還是會因 BaeR 誘導而使表現量增加 (圖 4B)。因此推測 BaeR 是直接和 *gspS* 上之 *cis*-binding site 結合而加強 *gspS* 基因表現，而且 *gspS* 上游的 TTTTTT 序列應為 BaeR 辨識的重要區域，將 T 置換成 G 後便無法誘導基因表現。

### 3.2.3 indole 對 *gspS* 表現量的影響

一般認為 indole 可以誘發 BaeSR 系統，使 BaeR 大量表現進而調控相關之基因表現 (Hirakawa *et al.*, 2005, Nishino *et al.*, 2005)，為了瞭解 indole 是否也會藉由誘導 BaeR 大量表現使得 *gspS* 表現量上升，另外建構了一組 operon fusion 在 *BaeR*<sup>-</sup> 突變株上相對應之溶原菌：HA60151 (*gspS242-lacZ*)、HA60152 (*gspS195-lacZ*)、HA60153 (*gspS161-lacZ*)、HA60154 (*gspS130-lacZ*)，在 *BaeR*<sup>+</sup> 及 *BaeR*<sup>-</sup> 之溶原菌分別加入 DMSO (溶劑，控制組) 或 2 mM indole 培養，再進行  $\beta$ -galactosidase 活性分析。結果顯示 indole 處理均會 *BaeR*<sup>+</sup> 及 *BaeR*<sup>-</sup> 表現量上升 1.1~1.4 倍 (圖 6)，BaeR 存在與否並不會讓 indole 對 *gspS* 表現量造成影響。

### 3.3 以 *gspS* 突變株探討 *gspS* 之表現型 (phenotype)

在大腸桿菌中發現 GspS 的存在之後，有很多關於大腸桿菌 GspS 功能的探討及研究，但是 GspS 在大腸桿菌中扮演何種角色，其生理意義尚未完全清楚。為了對 *gspS* 有更深入的认识，建構了 *gspS*<sup>-</sup> 的突變株希望能藉此了解 *gspS* 之表現型，以利後續對 *gspS* 的研究。

首先以兩側帶有 *gspS* 同質性序列的 amp<sup>r</sup> 抗性片段 (*bla* cassette)，藉由同源重組作用與 *gspS* 置換以得到 *gspS*::*bla* 突變株，利用 colony PCR 初步確認，*bla* cassette 嵌入到 *gspS* 基因中 (圖 7A)，抽取 RNA 之後再以 RT-PCR 確認 wild type 之 *gspS* mRNA 並不存在於突變株內 (圖 7B)，以 P1 轉導作用將 *gspS*::*bla* 置換到 HA61001 (MG1655 *gspS*-3xFLAG) 菌株中，另外將帶有可誘導 BaeR 之質體 (JW2064 ASKA) 轉形至 P1 轉導作用置換與未置換之菌株，以西方墨點法的方式藉由 anti-FLAG 抗體偵測 GspS 的存在，確認突變株沒有 GspS-3xFLAG 被 anti-FLAG 抗體所偵測到 (圖 7C)。

生物在有氧呼吸的狀態下，O<sub>2</sub> 經過電子傳遞本身就會產生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Imlay, 2008)，因此以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 來測試對 *gspS*<sup>-</sup> 以及其他和抗氧化壓力相關之突變株的影響。首先以浸泡過 8.8M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的紙錠放置在塗有不同菌株的培養基上，觀察細菌生長受到抑制的情形，在 wild type 及 *gspS*<sup>-</sup>、*trxA*<sup>-</sup>、*trxB*<sup>-</sup>、*grxA*<sup>-</sup> 中抑制圈的大小均相似，而 *grxB*<sup>-</sup> 的抑制圈比 wild type 稍大 (圖 8)，而將單一突變結果和 *gspS*<sup>-</sup> 雙重突變比較，可以發現在 *gspS*<sup>-</sup> *grxA*<sup>-</sup> 及 *gspS*<sup>-</sup> *grxB*<sup>-</sup> 突變株中，抑制圈有增大的現象。進一步以序列稀釋來觀察菌株在含不同濃度之 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培養基上生長的情形，在 wild type 及 *gspS*<sup>-</sup> 突變株中，稀釋至 10<sup>-4</sup> 都還可生長，*grxA*<sup>-</sup> 只有到稀釋度為 10<sup>-3</sup> 可以生長，*grxB*<sup>-</sup> 更只有稀釋度為 10<sup>-1</sup> 才能生長，而 *gspS*<sup>-</sup> *grxA*<sup>-</sup> 及 *gspS*<sup>-</sup> *grxB*<sup>-</sup> 突變株均對 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 較敏感，在細菌稀釋濃度為 10<sup>-1</sup> 就幾乎無法生長 (圖 9A、B)。在培養 36 小時後，*grxB*<sup>-</sup> 到稀釋度為 10<sup>-3</sup> 又可以生長，



*gspS*<sup>-</sup> *grxA*<sup>-</sup>在稀釋度為 10<sup>-1</sup> 開始有菌落，但生長較差 *gspS*<sup>-</sup> *grxB*<sup>-</sup>則還是無法生長 (圖 9C)。由此可推論 *gspS* 在對抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成之氧化壓力可能和 *grxA*、*grxB* 之功能具有互補的效果。



## 第四章、討論

### 4.1 *gspS* promoter

經由實驗結果確認轉錄起始點在距離 start codon -88 nt 的位置 (圖 1), 由 +1 G 處開始轉錄, 預測之 *gspS* promoter -35 為 TTGCGC, 而 -10 為 TATGAT, 中間間隔 19 個核苷酸 (TTGCGC-N<sub>19</sub>-TATGAT), 此結果與 Finch 等人在 protease III (*ptr*) 的研究中提出之 *ptr* promoter 序列 (Finch *et al.*, 1986): TTGCGC-N<sub>17</sub>-TATGAT, 其-35 及-10 完全相同, 而中間間隔僅有 2 bp 的差異。除了這段為  $\sigma^{70}$  所辨認的 promoter 之外, 並無和其他  $\sigma$  factor 辨認的序列相似, 如  $\sigma^{32}$ : -35 為 TTGAAA, -10 為 CCCCATWT (W 為 A 或 T) (Nonaka *et al.*, 2006)、 $\sigma^{28}$ : TAAA-N<sub>13-16</sub>-GCCGATAA (Zhao *et al.*, 2007)。

### 4.2 BaeR 對 *gspS* 的調控

在先前 Nishino 等人的生物晶片分析中觀察到 BaeR 大量表現可使 *gspS* 的表現增強; 比較 wild type 和 *BaeSR*<sup>-</sup> 兩種情況下 *gspS* 表現量, 在 *BaeSR*<sup>-</sup> 中 *gspS* 表現量相對於 wild type 中下降了 1.7 倍, 沒有顯著不同; 而加入 indole 培養之實驗中, 加與不加 indole 時 *gspS* 表現量之比值: 在 wild type 中為 1.2, 在 *BaeSR*<sup>-</sup> 為 0.8, 兩者差異並不大。他們利用此三種條件: 會被 BaeR 過量表現誘導、wild type 和 *baeSR*<sup>-</sup> 兩種情況下的基因表現比值大於 2、在 wild type 中加與不加 indole 的表現量比值大於 2, 篩選出直接受 BaeSR 調節的 BaeSR regulon, *gspS* 並未包含在此 regulon 當中 (Nishino *et al.*, 2005)。

實驗結果顯示, 在大腸桿菌中 BaeR 確實可以誘導 *gspS* 的表現量上升 (圖 4A), 在 indole 加入與否 *gspS* 表現量之測試也發現, wild type 和 *BaeR*<sup>-</sup> 菌株中

基因表現量上升的比值也無太大差異 (圖 6)，與生物晶片分析結果符合。高濃度的 indole 可能會因產生超氧化物 (superoxide) 導致細胞膜改變而對大腸桿菌有毒性 (Garbe *et al.*, 2000)，一般認為 indole 可以誘發 BaeSR 系統，使 BaeR 大量表現進而調控相關之基因表現 (Hirakawa *et al.*, 2005, Nishino *et al.*, 2005)，因此 BaeR 雖然可以誘導 *gspS* 表現量稍微增加，但在 indole 培養實驗可能暗示 indole 對於 *gspS* 的誘導並非經由 BaeSR 直接作用。

為了釐清 BaeR 對 *gspS* 的誘導是否為直接作用，將可能的 BaeR binding site 序列改變，觀察 BaeR 對 *gspS* 的誘導是否會造成影響，若是間接作用 BaeR binding site 突變應該不會改變對 *gspS* 的誘導，但若是直接作用，BaeR binding site 序列改變就可能造成 BaeR 無法與之結合，導致 BaeR 無法誘導 *gspS* 表現上升或是表現量增加的幅度下降。而從實驗結果可以看到，當 *gspS* 上游的 5'-GTACAGAATGTGAATTTTTTAAACCCCTTGCGCC-3' 當中之 TTTTTT 序列置換成 GGGGGG 後 BaeR 便無法誘導基因表現 (圖 4B)，因此 BaeR 應該是直接與 *gspS* 上之 *cis*-binding site 結合以增強 *gspS* 之基因表現，這部分還需要進一步的實驗證明，透過 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) 來證實 BaeR 可以和 *cis*-binding site 的 DNA 片段結合，或是利用 DNase I footprinting 來確認 BaeR binding site 的位置。此外，也可抽取這些 *gspS-lacZ* fusion 之 RNA 進行 RT-PCR，進一步確認 BaeR 誘導可以使 *gspS* 產生更多 mRNA。

另一方面，indole 對 *gspS* 的影響是透過和其他雙成分控制系統交互作用或是有其他因素造成則要再更多的研究探討。

### 4.3 其他調控 *gspS* 之轉錄因子

除了 BaeR 之外，目前並沒有關於調控 *gspS* 轉錄因子之研究。利用 SoftBerry BPROM 對 *gspS* 上游 500 bp 進行分析之後，預測出 RpoH、Tus、PhoB 為可能的轉錄因子 (圖 1)，但預測的 RpoH ( $\sigma^{32}$ ) binding site 與 RpoH 保守序列的差異太大，而 tus 主要是專一性的跟 *Ter* site 結合以中止細菌 DNA 的複製 (Neylon *et al.*, 2005)，兩者對 *gspS* 調控的可能性不高。但 PhoB 為雙成分控制系統之 response regulator，且其辨認的 pho-box 前半部分和 *gspS* 上之序列極為相似：CTGTCATA(A/T)A(A/T)CTGTCAC (底線部分之序列) (Makino *et al.*, 1986, Sanderson *et al.*, 2003)，後續可以對 PhoB 和 *gspS* 之間的關係做更進一步的研究。



### 4.4 *gspS* 之表現型

大腸桿菌 GspS 酵素的功能，目前已知主要是可進行 GSH 和 spermidine 之間醯胺鍵的合成與分解，其合成產物 Gsp 可還原雙硫鍵且還原能力比 GSH 更強 (Ariyanayagam *et al.*, 2001)，因此 Gsp 可能也像其他小分子硫醇類 (GSH、Trx、Grx) 一樣，參與細胞內對抗氧化壓力的部分。

但在以  $H_2O_2$  造成細胞大量 ROS 情況下，對 wild type 和 *gspS*<sup>-</sup> 的影響沒有太大差異，由此結果推測 Gsp 可能和 Trx 和 Grx 系統一樣，在大腸桿菌中可以部分取代各自抗氧化的功能，因而建構了 *gspS* 與對抗氧化相關基因 *trxA*、*trxB*、*grxA*、*grxB* 之雙重突變，從實驗結果可看出在 *gspS*<sup>-</sup> *grxA*<sup>-</sup>、*gspS*<sup>-</sup> *grxB*<sup>-</sup> 突變株，對  $H_2O_2$  更為敏感 (圖 8、9)，推測 Gsp 和 Grx 在細胞內可能有部分功能是重疊的。後續可以做更進一步的研究，將帶有 *gspS*、Gsp amidase 或 Gsp synthetase 的質體放入這些雙重突變株中，觀察  $H_2O_2$  對其是否有所改變，

如果 Gsp 確實參與細胞對抗氧化壓力，放入 *gspS* 與 Gsp synthetase 質體回復其功能時，突變株應該更能抵抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 帶來的氧化壓力，而 Gsp amidase 無法合成 Gsp，可能就沒有抵抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的能力。



## 第五章、参考文献

- Ariyanayagam, M. R., and Fairlamb, A. H.,** (2001) Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **115**: 189-198.
- 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* **2**: 2006.0008.
- Baranova, N., and Nikaido, H.,** (2002) The BaeSR two-component regulatory system activates transcription of the *yegMNOB* (*mdtABCD*) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J Bacteriol* **184**: 4168-4176.
- Bollinger, J. M., Jr., Kwon, D. S., Huisman, G. W., Kolter, R., and Walsh, C. T.,** (1995) Glutathionylspermidine metabolism in *Escherichia coli*. Purification, cloning, overproduction, and characterization of a bifunctional glutathionylspermidine synthetase/amidase. *J Biol Chem* **270**: 14031-14041.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., and Ros, J.,** (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* **3**: 3-8.
- Comini, M., Menge, U., and Flohe, L.,** (2003) Biosynthesis of trypanothione in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol Chem* **384**: 653-656.
- Comini, M., Menge, U., Wissing, J., and Flohe, L.,** (2005) Trypanothione synthesis in *Crithidia* revisited. *J Biol Chem* **280**: 6850-6860.
- Comini, M. A., Guerrero, S. A., Haile, S., Menge, U., Lunsdorf, H., and Flohe, L.,** (2004) Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target. *Free Radic Biol Med* **36**: 1289-1302.
- 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.
- Dubin, D. T.,** (1959) Evidence for conjugates between polyamines and glutathione in *E. coli*. *Biochem Biophys Res Co* **1**: 262-265.

- Fairlamb, A. H., and Cerami, A.,** (1985) Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **14**: 187-198.
- Farr, S. B., and Kogoma, T.,** (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* **55**: 561-585.
- Fernandes, A. P., Fladvad, M., Berndt, C., Andresen, C., Lillig, C. H., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., Holmgren, A., and Vlamis-Gardikas, A.,** (2005) A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *J Biol Chem* **280**: 24544-24552.
- Finch, P. W., Wilson, R. E., Brown, K., Hickson, I. D., and Emmerson, P. T.,** (1986) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli ptr* gene encoding protease III. *Nucleic Acids Res* **14**: 7695-7703.
- Garbe, T. R., Kobayashi, M., and Yukawa, H.,** (2000) Indole-inducible proteins in bacteria suggest membrane and oxidant toxicity. *Arch Microbiol* **173**: 78-82.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., and Beckwith, J.,** (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P<sub>BAD</sub> promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121-4130.
- Hirakawa, H., Inazumi, Y., Masaki, T., Hirata, T., and Yamaguchi, A.,** (2005) Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **55**: 1113-1126.
- Imlay, J. A.,** (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* **77**: 755-776.
- Jung, I. L., and Kim, I. G.,** (2003) Transcription of *ahpC*, *katG*, and *katE* genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun* **301**: 915-922.
- 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 (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res* **12**: 291-299.

- Krieger, S., Schwarz, W., Ariyanayagam, M. R., Fairlamb, A. H., Krauth-Siegel, R. L., and Clayton, C.,** (2000) Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol Microbiol* **35**: 542-552.
- Kwon, D. S., Lin, C. H., Chen, S., Coward, J. K., Walsh, C. T., and Bollinger, J. M., Jr.,** (1997) Dissection of glutathionylspermidine synthetase/amidase from *Escherichia coli* into autonomously folding and functional synthetase and amidase domains. *J Biol Chem* **272**: 2429-2436.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., and Nakata, A.,** (1986) Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* **190**: 37-44.
- Meister, A., and Anderson, M. E.,** (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**: 711-760.
- Nagasawa, S., Ishige, K., and Mizuno, T.,** (1993) Novel members of the two-component signal transduction genes in *Escherichia coli*. *J Biochem* **114**: 350-357.
- Neylon, C., Kralicek, A. V., Hill, T. M., and Dixon, N. E.,** (2005) Replication termination in *Escherichia coli*: structure and antihelicase activity of the Tus-Ter complex. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 501-526.
- 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.
- Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C. A., and Rhodius, V. A.,** (2006) Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, sigma32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev* **20**: 1776-1789.
- Oza, S. L., Ariyanayagam, M. R., and Fairlamb, A. H.,** (2002a) Characterization of recombinant glutathionylspermidine synthetase/amidase from *Crithidia fasciculata*. *Biochem J* **364**: 679-686.
- Oza, S. L., Shaw, M. P., Wyllie, S., and Fairlamb, A. H.,** (2005) Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **139**: 107-116.



- Oza, S. L., Tetaud, E., Ariyanayagam, M. R., Warnon, S. S., and Fairlamb, A. H.**, (2002b) A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **277**: 35853-35861.
- Pai, C. H., Chiang, B. Y., Ko, T. P., Chou, C. C., Chong, C. M., Yen, F. J., Chen, S., Coward, J. K., Wang, A. H., and Lin, C. H.**, (2006) Dual binding sites for translocation catalysis by *Escherichia coli* glutathionylspermidine synthetase. *EMBO J* **25**: 5970-5982.
- Raffa, R. G., and Raivio, T. L.**, (2002) A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**: 1599-1611.
- Rider, J. E., Hacker, A., Mackintosh, C. A., Pegg, A. E., Woster, P. M., and Casero, R. A., Jr.**, (2007) Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids* **33**: 231-240.
- Ruiz, N.**, (2008) Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15553-15557.
- Sanderson, A., Mitchell, J. E., Minchin, S. D., and Busby, S. J.**, (2003) Substitutions in the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 factor that affect recognition of extended -10 elements at promoters. *FEBS Lett* **544**: 199-205.
- Shames, S. L., Fairlamb, A. H., Cerami, A., and Walsh, C. T.**, (1986) Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases. *Biochemistry* **25**: 3519-3526.
- Simons, R. W., Houman, F., and Kleckner, N.**, (1987) Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85-96.
- Smith, K., Borges, A., Ariyanayagam, M. R., and Fairlamb, A. H.**, (1995) Glutathionylspermidine metabolism in *Escherichia coli*. *Biochem J* **312**: 465-469.
- Smith, K., Nadeau, K., Bradley, M., Walsh, C., and Fairlamb, A. H.**, (1992) Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetases from *Crithidia fasciculata*. *Protein Sci* **1**: 874-883.

- Tabor, H., and Tabor, C. W.**, (1975) Isolation, characterization, and turnover of glutathionylspermidine from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **250**: 2648-2654.
- Tetaud, E., Manai, F., Barrett, M. P., Nadeau, K., Walsh, C. T., and Fairlamb, A. H.**, (1998) Cloning and characterization of the two enzymes responsible for trypanothione biosynthesis in *Crithidia fasciculata*. *J Biol Chem* **273**: 19383-19390.
- Thomson, L., Denicola, A., and Radi, R.**, (2003) The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys* **412**: 55-64.
- Tkachenko, A. G., and Nesterova, L. Y.**, (2003) Polyamines as modulators of gene expression under oxidative stress in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc)* **68**: 850-856.
- Tovar, J., Cunningham, M. L., Smith, A. C., Croft, S. L., and Fairlamb, A. H.**, (1998) Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5311-5316.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., and Bossi, L.**, (2001) Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15264-15269.
- Yohannes, E., Thurber, A. E., Wilks, J. C., Tate, D. P., and Slonczewski, J. L.**, (2005) Polyamine stress at high pH in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiol* **5**: 59.
- Yoshida, M., Kashiwagi, K., Kawai, G., Ishihama, A., and Igarashi, K.**, (2002) Polyamines enhance synthesis of the RNA polymerase sigma 38 subunit by suppression of an amber termination codon in the open reading frame. *J Biol Chem* **277**: 37139-37146.
- Yu, D., Ellis, H. M., Lee, E. C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., and Court, D. L.**, (2000) An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5978-5983.
- Zhao, K., Liu, M., and Burgess, R. R.**, (2007) Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to 'foraging'-like behavior in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* **35**: 4441-4452.

表一、本論文所使用的菌株與嗜菌體

Strains	Relevant genotype	Construction, sources
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
MC4100	F <sup>-</sup> <i>araD139</i> Δ( <i>argF-lac</i> )U169 <i>rpsL150 relA1 fibB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Silvia Marques
NR754	MC4100 <i>ara</i> <sup>+</sup>	Ruiz (2008)
HA60051	NR754 λRS45 <i>gspS242-lacZ</i> (op)	This study
HA60052	NR754 λRS45 <i>gspS195-lacZ</i> (op)	This study
HA60053	NR754 λRS45 <i>gspS161-lacZ</i> (op)	This study
HA60054	NR754 λRS45 <i>gspS130-lacZ</i> (op)	This study
HA60055	NR754 λRS45 <i>gspStg-lacZ</i> (op)	This study
HA60056	NR754 λRS45 <i>gspSir-lacZ</i> (op)	This study
HA60151	NR754 <i>baeR</i> λRS45 <i>gspS242-lacZ</i> (op)	This study
HA60152	NR754 <i>baeR</i> λRS45 <i>gspS195-lacZ</i> (op)	This study
HA60153	NR754 <i>baeR</i> λRS45 <i>gspS161-lacZ</i> (op)	This study
HA60154	NR754 <i>baeR</i> λRS45 <i>gspS130-lacZ</i> (op)	This study
NM6001	F <sup>-</sup> <i>araD139 lamda<sup>-</sup> lac<sup>-</sup> leu<sup>+</sup></i>	Silvia Marques
DY330	W3110 Δ <i>lacU169 gal490 pglΔ8</i> λ [p]cI857 Δ( <i>cro-bioA</i> )	Yu <i>et al.</i> (2000)
BW25113	<i>lacI<sup>f</sup> rrnB<sub>T14</sub> ΔlacZ<sub>WJ16</sub> hsdR514 ΔaraBAD<sub>AH33</sub> ΔrhaBAD<sub>LD78</sub></i>	Datsenko <i>et al.</i> (2000).
JW2064 KO	BW25113 <i>baeR</i> <sup>-</sup>	Baba <i>et al.</i> (2006)
HA61002	NR754 <i>gspS::bla</i>	This study
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>f</sup>ΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene Co.
MG1655	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , <i>rph-1</i>	Silvia Marques
HA61001	MG1655 <i>gspS-3xFLAG</i>	This study
<b>Bacteriophage</b>		
λRS45	<i>imm21 ind<sup>+</sup> bla'-lacZ<sub>sc</sub></i>	Simons <i>et al.</i> (1987)

op:operon fusion

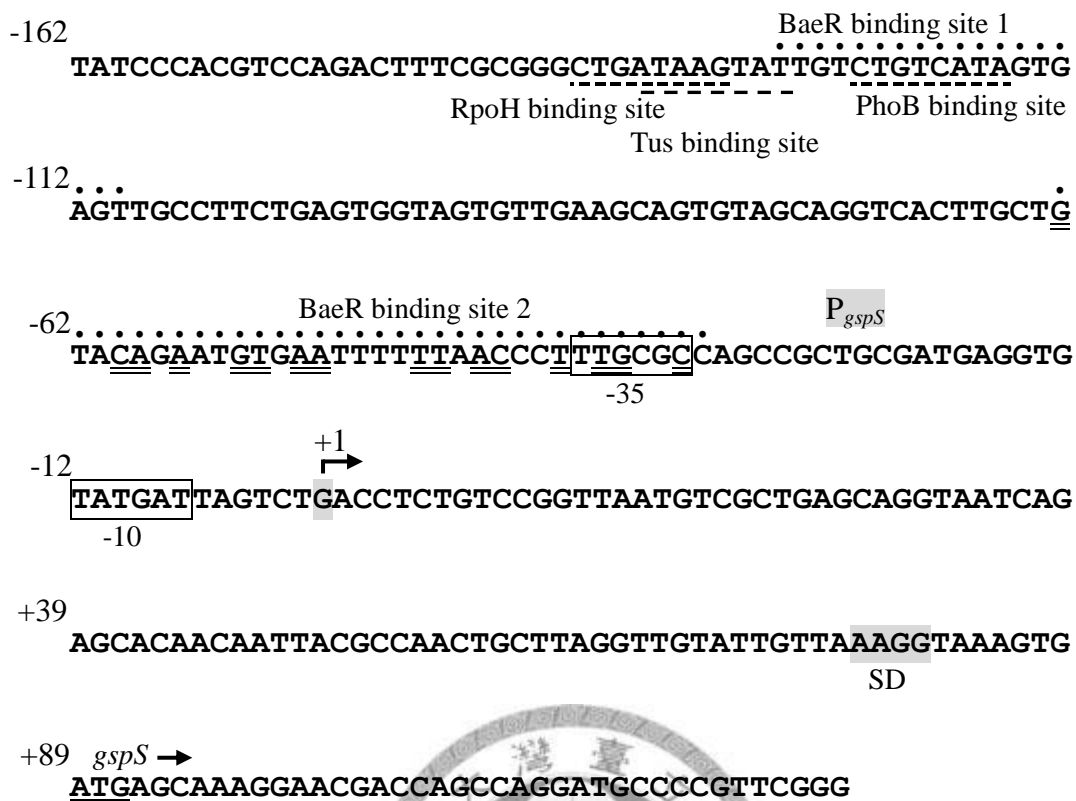
表二、本論文所使用的質體

Plasmids	Relevant genotype and comment	Fusion type or sources
<b>Plasmids</b>		
pRS415	<i>bla</i> -T1 <sub>4</sub> <i>Eco</i> RI- <i>Sma</i> I- <i>Bam</i> HI <i>lac</i> Z	operon fusion
pRS414	<i>bla</i> -T1 <sub>4</sub> <i>Eco</i> RI- <i>Sma</i> I- <i>Bam</i> HI <i>lac</i> Z	protein fusion
pBAD24	<i>ori</i> (pBR322) <i>ara</i> C P <sub>BAD</sub> <i>amp</i> <sup>r</sup>	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pBAD33	<i>ori</i> (pACYC184) <i>ara</i> C P <sub>BAD</sub> <i>cm</i> <sup>r</sup>	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pSUB11	3xFLAG tag <i>kan</i> <sup>r</sup>	Uzzau <i>et al.</i> (2001)
JW2064 ASKA	<i>cm</i> <sup>r</sup> <i>bae</i> R <sup>+</sup>	Kitagawa <i>et al.</i> (2005)



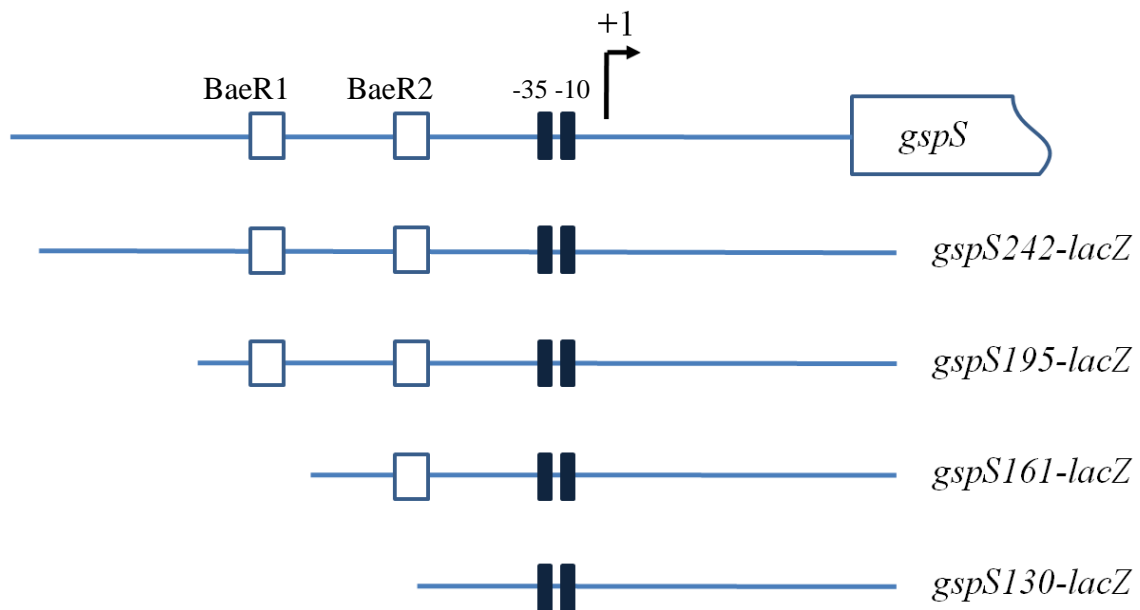
表三、本論文所使用之聚合酶連鎖反應引子

Primers	DNA sequences	Notes
242- <i>gspS</i> -EcoRI(F)	5'-CGGAATTCGTCCAGACTTTCGCGG-3'	242 <i>gspS-lacZ</i>
195- <i>gspS</i> -EcoRI(F)	5'-CGGAATTCCTTCTGAGTGGTAGT-3'	195 <i>gspS-lacZ</i>
161- <i>gspS</i> -EcoRI(F)	5'-CGGAATTCGTCACTTGCTGTACAG-3'	161 <i>gspS-lacZ</i>
130- <i>gspS</i> -EcoRI(F)	5'-CGGAATTCACCCTTTCGCGCCAGCC-3'	130 <i>gspS-lacZ</i>
<i>gspS</i> -39-BamHI(R)	5'-CGGGATCCCCGAACGGGGCATCCTGGCTG-3'	3'- <i>gspS-lacZ</i>
3'-BaeRtg	5'-AAAGGGTTC <del>CCCCCT</del> TACATTCTGTACAGCA-3'	<i>gspStg-lacZ</i>
5'-BaeRtg	5'-AATGTGAAGGGGGGAACCCCTTTCGCGCCAGCCG-3'	<i>gspStg-lacZ</i>
3'-BaeRir	5'-AAAAATTC <del>CAATGCGTTA</del> AAGCAAGTGACCTGCTACA-3'	<i>gspSir-lacZ</i>
5'-BaeRir	5'-CACTTGCT <del>GTACAGAATGT</del> GAATTTTTTAACCCTTTG-3'	<i>gspSir-lacZ</i>
5 <i>gspS</i> bla	5'-CAGACGGAAGATACTGAATACAGCTTACCGCAGCCGGAA ATTGCAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTG-3'	<i>gspS::bla</i>
3 <i>gspS</i> bla	5'-GCCTTTGTTTTCCAGGCGCGCTCCGCTGATTTTCAGCAGC TCGCCATTTTTTATAACCTCCTTAGAGC-3'	<i>gspS::bla</i>
<i>gspS</i> -286-KpnI(F)	5'-GGGGTACCGGCGATTGATATTGGCGAACG-3'	286 <i>gspS</i>
<i>gspS</i> -236-KpnI(F)	5'-GGGGTACCACTTTCGCGGGCTGATAAGTA-3'	236 <i>gspS</i>
<i>gspS</i> -116-KpnI(F)	5'-GGGGTACCCCGCTGCGATGAGGTGTATGA-3'	116 <i>gspS</i>
<i>gspS</i> -20-KpnI(F)	5'-GGGGTACCGTATTGTTAAAGGTAAAGTGA-3'	20 <i>gspS</i>
<i>gspS</i> -HindIII(R)	5'-CCCAAGCTTGTACTTTTTACCACAATT-3'	3'- <i>gspS</i>
<i>gspS</i> -5'RACE-P	5'-(P) AGAAAATCTCCACGCCATA-3'	For R.T.
<i>gspS</i> -5'RACE A1	5'-TGCGGATCGAGAGAACTGTA-3'	Set 1
<i>gspS</i> -5'RACE A2	5'-AGCCCAATAATGTCCCGAAC-3'	Set 2
<i>gspS</i> -5'RACE S1	5'-GATGACGCCGTATTCCGTAG-3'	Set 1
<i>gspS</i> -5'RACE S2	5'-CTCGCCGTTTTCTTTCTG-3'	Set 2
<i>gspS</i> -3xFLAG(F)	5'-AAGAGAGTGATATTGAACCGTTAATTGTGGTGAAAAAGT AAGACTACAAAGACCATGACGG-3'	<i>gspS</i> -3xFLAG
<i>gspS</i> -3xFLAG(R)	5'-TATTGAATATTTTGATTAATCCCCGTACTGATTATTCTTC CATATGAATATCCTCCTTAG-3'	<i>gspS</i> -3xFLAG



圖一、*E. coli* MG1655 *gspS* 基因上游序列圖譜

左邊數字標示為轉錄起始點+1 往上游計算之相對位置。P<sub>gspS</sub> 為 *gspS* 的 promoter 位置，轉錄起始點為轉折箭頭標示+1 處，-10 及-35 位置分別標示在方框部分下方。標有底線之 ATG 為 *gspS* 之 start codon，網底標有 SD 之 AAGG 為 Shine-Dalgano 序列；虛線部分為 BPROM 預測之 *cis*-binding site，其下方標示轉錄因子種類；上方打點部分為兩個預測的 BaeR binding site；雙底線部分為一類似反轉對稱的序列。



圖二、不同長度的 *gspS-lacZ* fusion (242、195、161、130 bp) 建構

白色方框表示可能之 BaeR binding site，黑色方框為 promoter 區域，不同長度之 fusion 也以方框表示包含的 BaeR binding site 及 promoter 區域。

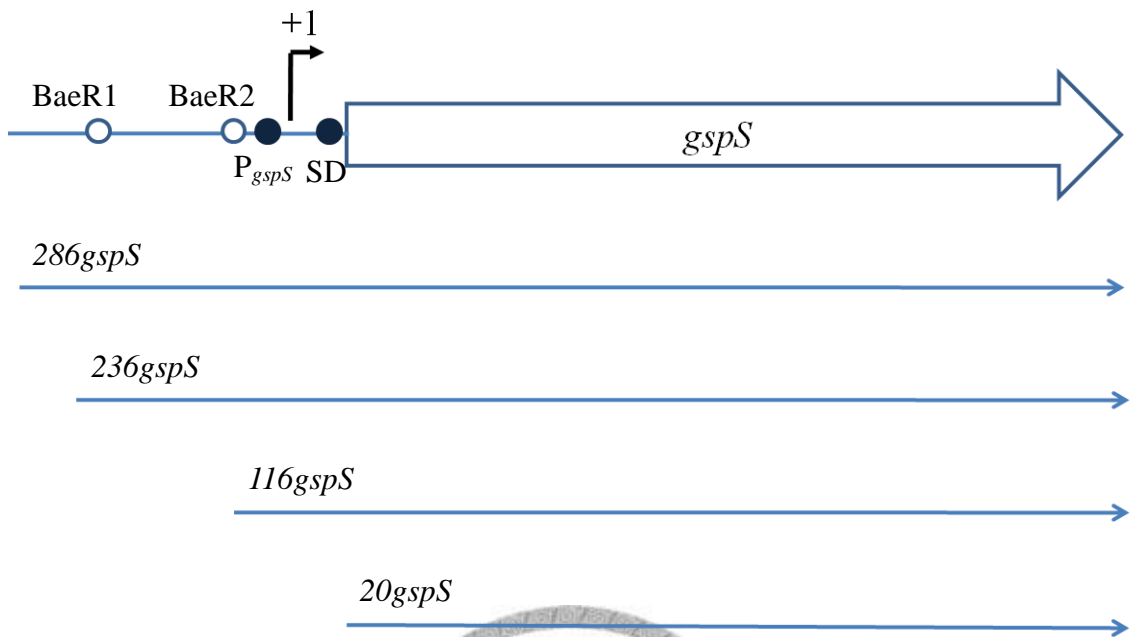
*gspS242-lacZ*：含有兩個 BaeR binding site 之序列。

*gspS195-lacZ*：含有兩個 BaeR binding site 之序列，比 *gspS242-lacZ* 稍短。

*gspS161-lacZ*：含有一個 BaeR binding site 之序列。

*gspS130-lacZ*：不含 BaeR binding site 之序列。

A



B

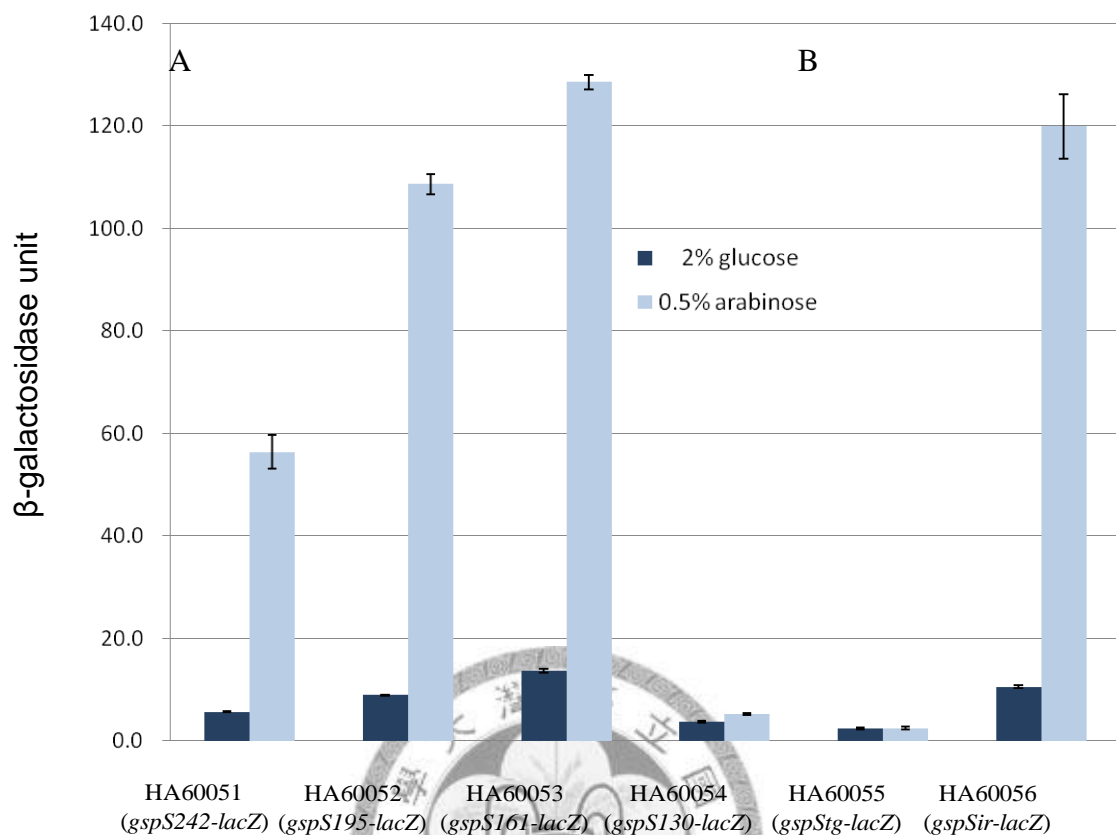


圖三、不同長度的 *gspS* (286、236、116、20) 建構及蛋白質表現情形

A) pBAD33 上不同長度的 *gspS* 示意圖，空心圓為預測之 BaeR binding site，實心圓分別為 *gspS* promoter 與 SD。

B) 將四種不同長度之 *gspS* 轉殖到 pBAD33 質體上，分別與 pBAD24-*baeR*<sup>+</sup> 一起轉形到 NM6001，經 arabinose 誘導蛋白質表現，以西方墨點法偵測 GspS 蛋白質。

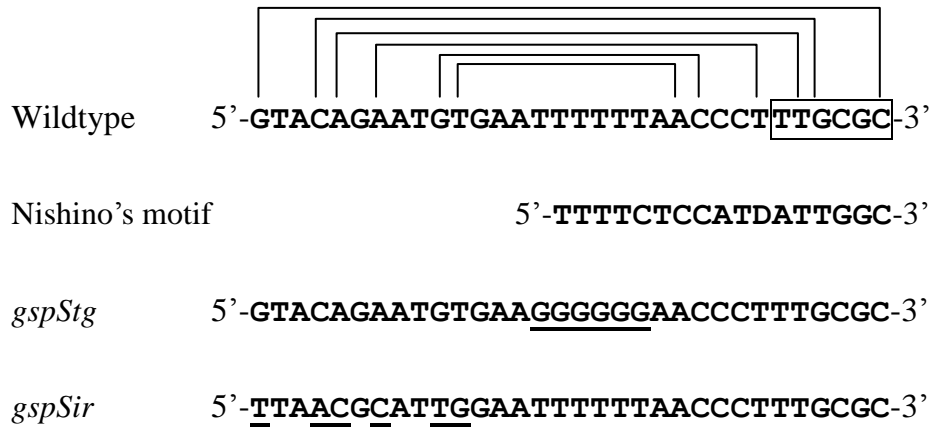




圖四、轉錄因子 BaeR 對不同長度及突變的 *gspS-lacZ* fusion 基因表現量的影響

A) 四種不同長度之 *gspS-lacZ* fusion: *gspS242-lacZ*、*gspS195-lacZ*、*gspS161-lacZ*、*gspS130-lacZ*，在 2% glucose 抑制（深色）或 0.5% arabinose 誘導（淺色）pBAD24-*baeR*<sup>+</sup>之 BaeR 表現下，β-galactosidase 活性分析結果。

B) 兩組 BaeR binding site 的突變株：*gspStg-lacZ*、*gspSir-lacZ* 在 glucose 抑制或 arabinose 誘導 BaeR 表現下，β-galactosidase 活性分析結果。

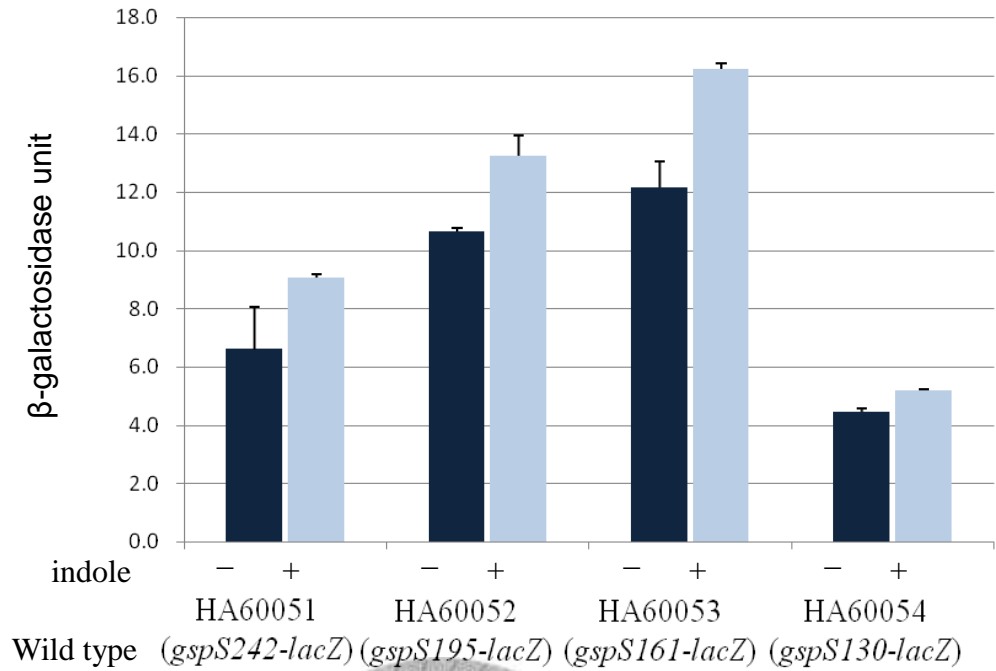


圖五、*gspS* 之 BaeR binding site 突變設計

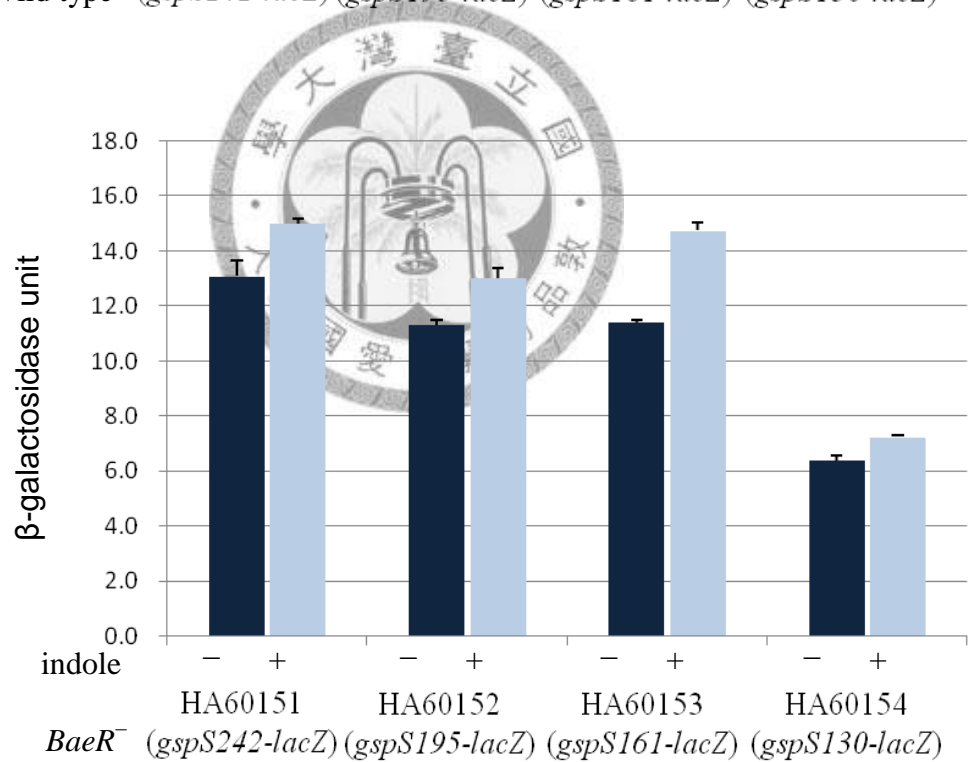
*gspS* 基因上游預測之 BaeR binding site 序列，由上至下為 wild type、Nishino 等人提出之 BaeR binding motif、*gspStg* 突變株、*gspSir* 突變株。上方實線表示互補的兩個鹼基，底線標示之序列為置換核苷酸之位置，方框為-35 的位置。



A



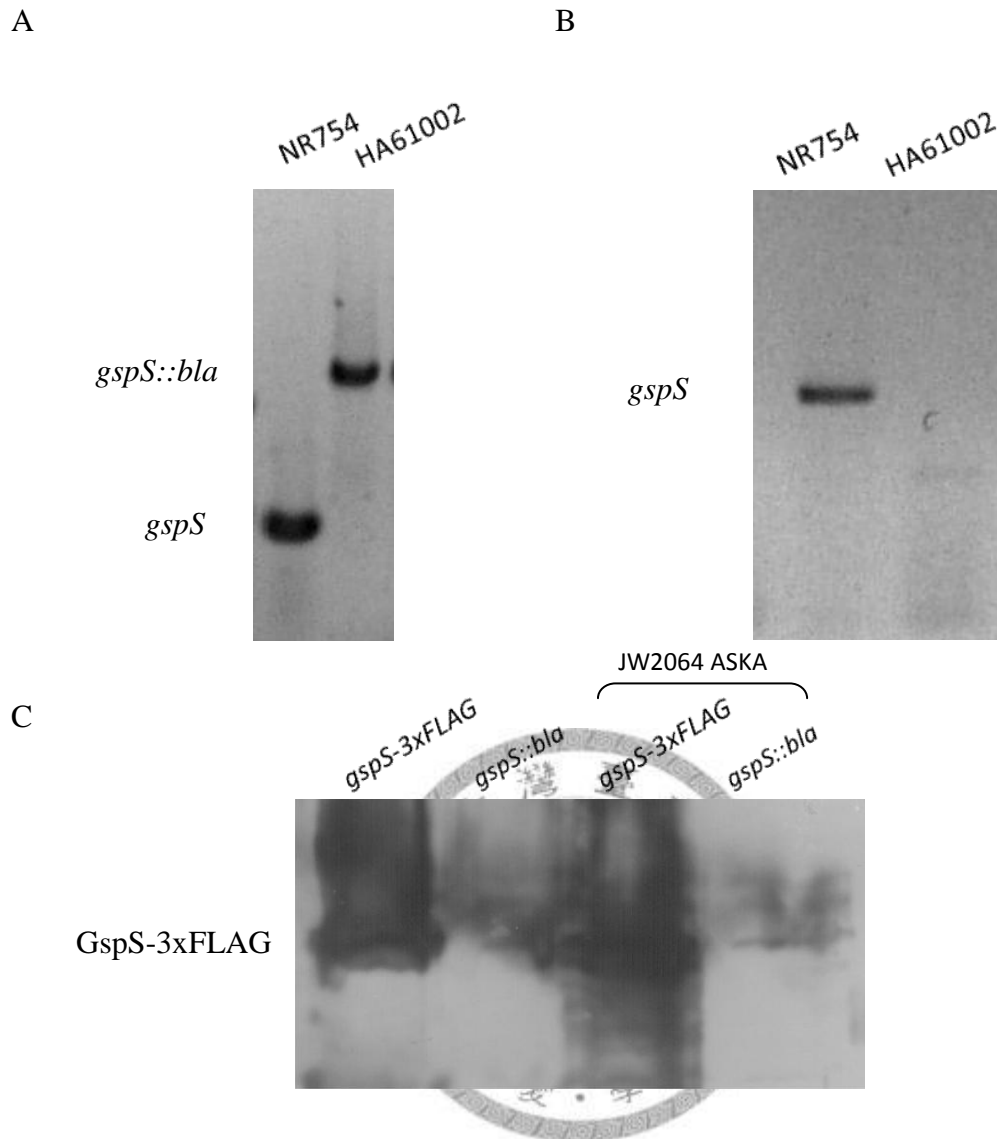
B



圖六、indole 處理下對 wild type 及 *BaeR*<sup>-</sup> 突變株之 *gspS-lacZ* fusion 基因表現量的影響

A) wild type *gspS-lacZ* fusion 之  $\beta$ -galactosidase 活性分析結果。

B) *BaeR*<sup>-</sup> *gspS-lacZ* fusion 之  $\beta$ -galactosidase 活性分析結果。

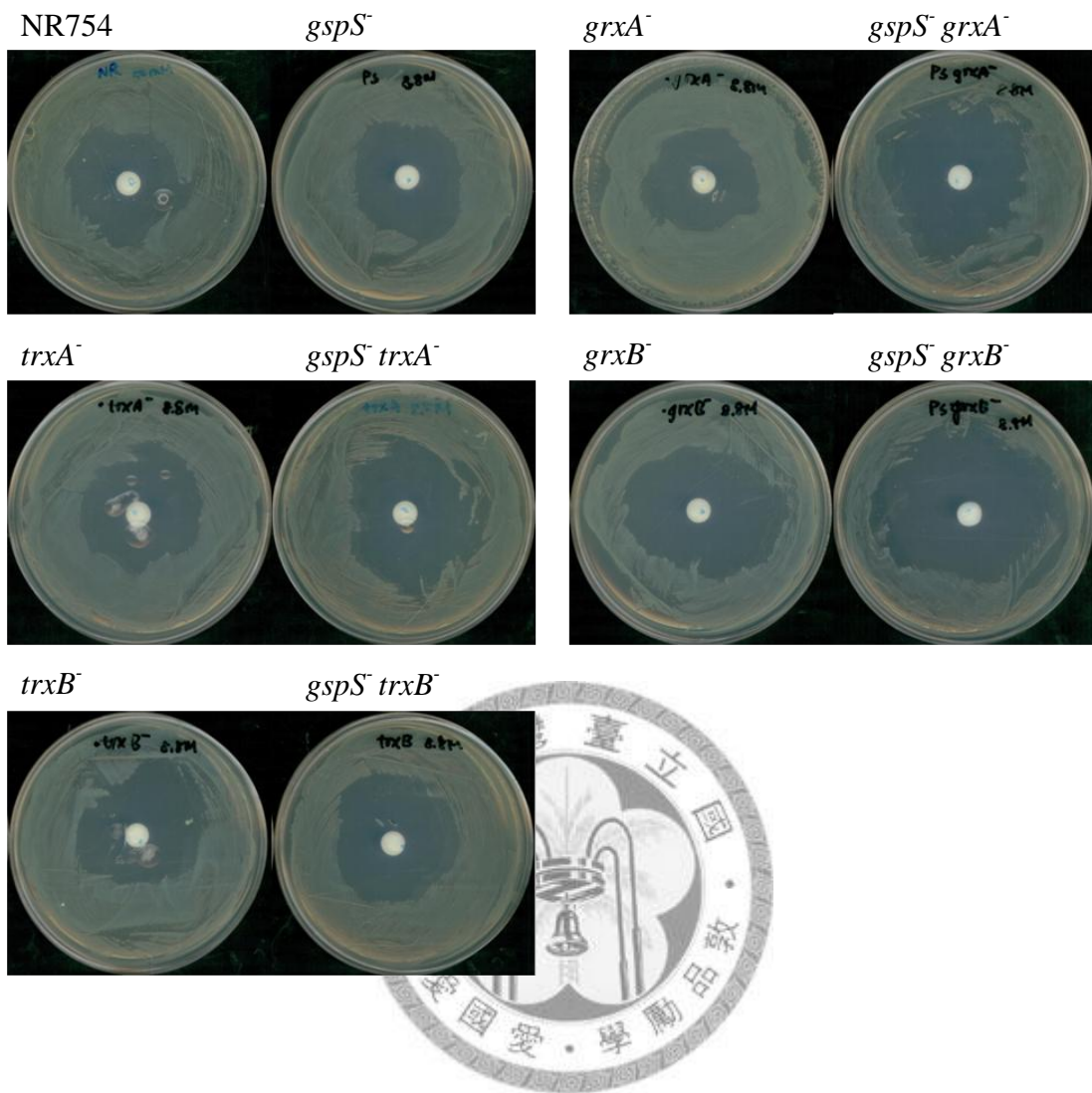


圖七、*gspS::bla* 突變株之確認

A) NR754 (wild type) 與 HA61002 (*gspS::bla*) 利用 *gspS* 上抗性基因前後之引子作 colony PCR，HA61002 之 DNA 因帶有抗性基因而片段較大。

B) 抽取 NR754 與 HA61002 之 RNA 進行 RT-PCR，突變株沒有 wild type RNA 的存在。

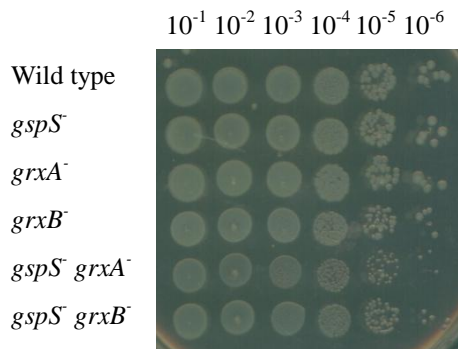
C) 利用 P1 轉導作用將 *gspS::bla* 帶入 MG1655 *gspS-3xFLAG* 菌株，另外一組帶有可誘導 BaeR 之質體 (JW2064 ASKA)，經 IPTG 誘導後，以 anti-FLAG 抗體偵測是否有 GspS-3xFLAG 存在。



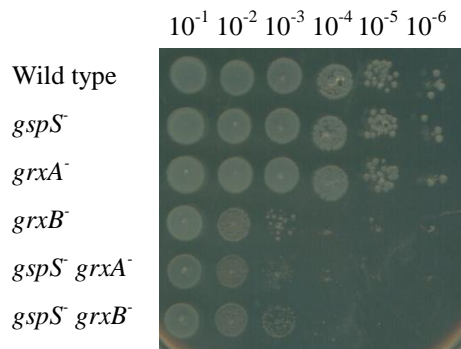
圖八、 $H_2O_2$  對 wild type 及各突變株生長之抑制

將浸泡過 8.8M  $H_2O_2$  紙錠，放置在塗布不同突變株 (NR754,  $gspS^-$ 、 $trxA^-$ 、 $trxB^-$ 、 $grxA^-$ 、 $grxB^-$  單一突變與  $gspS^- trxA^-$ 、 $gspS^- trxB^-$ 、 $gspS^- grxA^-$ 、 $gspS^- grxB^-$  雙重突變) 菌液之培養基中，中間透明區域即為受  $H_2O_2$  抑制後無法生長的區域，透明區域的大小可代表該菌株對  $H_2O_2$  的耐受程度，透明區域愈大表示菌株對  $H_2O_2$  愈敏感。

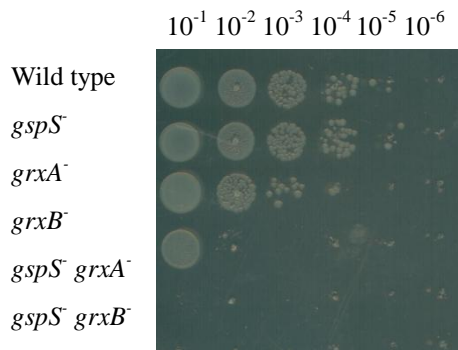
0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 24hr



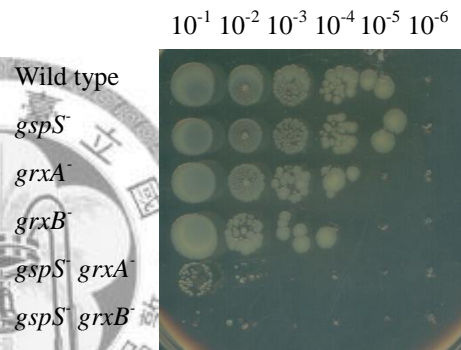
0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 24hr



1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 24hr



1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 48hr



圖九、不同濃度之 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 對 wild type 及各突變株在不同菌液稀釋度下生長的影响

不同濃度之 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0、0.5、1 mM) 及培養時間條件下，wild type 及各突變株在不同稀釋度下生長情形，縱軸為菌株，橫軸為不同之稀釋度。可以觀察到 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度愈高，生長就愈容易受到抑制，而 *gspS*<sup>-</sup> *grxA*<sup>-</sup> 與 *gspS*<sup>-</sup> *grxB*<sup>-</sup> 雙重突變之生長情況比 *grxA*<sup>-</sup>、*grxB*<sup>-</sup> 單一突變差。而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度為 1 mM 之 *grxB*<sup>-</sup> 突變株經過 48 小時培養後，生長情況改善。