

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 Bio-Resources and Agriculture
National Taiwan University
Master Thesis

沙門氏菌 *metE* 基因表現受到 FnrS 之調控
Regulation of *Salmonella* Typhimurium *metE* gene expression

by FnrS

簡嘉葳

Chia-Wei Chien

指導教授：吳蕙芬 博士

Adivisor : Whei-Fen Wu, Ph. D.

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

沙門氏菌 *metE* 基因表現受到 FnrS 之調控
Regulation of *Salmonella* Typhimurium *metE* gene
expression by FnrS

本論文係簡嘉葳君 (R99623025) 在國立臺灣大學農業化學系(所)完成碩士學位論文，於民國一百零一年七月十六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：

林淑端

林淑端 博士

中央研究院分子生物研究所
教授兼特聘研究員

鍾仁賜

鍾仁賜 博士

國立台灣大學農業化學系(所)
教授兼系主任

李佳音

李佳音 博士

國立臺灣大學農業化學系(所)
教授

陳佩貞

陳佩貞 博士

國立臺灣大學農業化學系(所)
助理教授

吳蕙芬

吳蕙芬 博士

國立臺灣大學農業化學系(所)
副教授(本論文指導教授)

謝誌

從開始到結束都非常地感謝這一切美好事物的發生，2010年3月，「不可思議」四個字貼切地形容上榜的心情；接下來的兩年隨著實驗結果過著喜怒哀樂無常的生活，然而在每次沮喪、挫折，總是有親愛的你（妳）們陪著；2012年7月，「不可思議」四個字再度形容即將完成碩士班生涯的喜悅，在這裡發生的每一件事情都使我有全新的心態，跟隨著要求而成長的我，再度感謝這一趟的旅程。

感謝吳蕙芬老師總是辛勤的指導、照顧，給了我要求也讓我成長，實驗之餘的關心也總讓人感到溫暖。感謝林淑端老師、李佳音老師、鍾仁賜老師及陳佩貞老師，擔任我的口試委員，給予我論文上諸多建議，也開啟了更多豐富的思考方向。感謝實驗室的大家，親愛的智瑄姊，謝謝有妳在的右邊，總是能即時撫平實驗室生活的喜怒哀樂；齡誼姊，謝謝妳帶領著懵懂無知的我開始進入狀況，並細心的照顧著我們；汎擎哥，謝謝你像個大哥哥般的照顧大家，給的建言也常常直白的相當中肯；鈞暘哥，同是調控人生，謝謝你一路來給了很多建議；惠婷姊，感謝妳的好，讓我更加懂事；祿高哥，老梗用不膩，兩年了，我真的曬黑了；慈芳及謝馨，有你們在總是充滿嘰哩瓜啦的歡笑聲，讓實驗室總能充滿能量。

最後，感謝最親愛的家人：親愛的爸爸、媽媽，感謝你們從小到大的愛，從台中一日遊-國道VIP，到台大公園VIP，謝謝你們一路身、心、靈的相伴；姊姊，在碩士班生涯，妳完成了兩件人生大事，過著幸福快樂的日子，從小到大，妳都比我淡定、成熟，謝謝你做我的好榜樣；叮寶，我的天使帥寶貝，善解人意的你，現在一定也跟著我一起驕傲喔；嚙寶，妳總是柔柔弱弱，但其實堅強無比，請繼續這麼可愛的陪著；小鼻，媽咪的蝙蝠俠帥兒子，謝謝你告訴我不要假規假怪的想要躺在床上或是熬夜以為可以看書。千言萬語，我愛你們，也謝謝你們那麼愛我。

很幸運的，在人生道路上的每一站總能深刻的體認自己的成長，眼前這一站即將進入尾聲，感謝一路上相陪伴的人、事、物，我帶著滿身的收穫展開下一趟旅程。

摘要

甲硫胺酸在生物體中作為多種生長代謝過程中不可或缺的前驅物及中間產物，於人體中是需額外攝取的必需胺基酸之一，對微生物來說，則是可以透過複雜的生合成及利用調控機制自行生合成。其中，*metE* 基因所編碼的蛋白質為催化其生合成最終步驟的關鍵酵素。本研究以 *Salmonella Typhimurium* LT2 為研究背景，探討一受到厭氧調控蛋白 FNR 影響，並於厭氧下誘導表現的非編碼小片段核糖核酸-FnrS 與 *metE* 在微生物適應厭氧環境下所進行的調控作用。本研究藉由 *metE::lacZ* 之融合菌株的建立，以及 *metE* 與 *fnrS* 基因及其突變基因之選殖質體的建構，透過於 *fnrS* 及其相關調控因子缺失株在氧氣轉換時的表現差異，探討 *metE* 基因與 FnrS 之間的關係。在豐富培養基或限制培養基添加甲硫胺酸，透過 β -galactosidase 及西方轉漬法試驗，證實 FnrS 於厭氧狀態下，與 *metE* 基因間具有負向調控的關係。藉由其相關的調節蛋白 FNR 及 Hfq，促使 *metE* 基因間接負向調節的表現結果，輔助理解 FnrS 於厭氧狀態下對 *metE* 基因的調控。接著，觀察到 FnrS 自身結構完整是必要的，且發現 *metE*-5' mRNA 之 Shine-Dalgarno (SD) 序列的位置對 FnrS 結合是重要的；而 RT-PCR 的試驗亦呈現與 β -galactosidase 相符的結果；最後，觀察到 *metE* 基因本身於豐富或限制培養基添加甲硫胺酸之表現差異，顯示 *metE* 基因於豐富培養基中，應存在其他因子進行調控作用。透過本研究對 *metE* 基因之調控有更進一步的探討，幫助對鼠傷寒沙門氏菌之 *metE* 調控機制的瞭解，並期許能在未來作為類似基因研究之輔助，使之成為類似病原菌之對應的模式菌株。

關鍵字: 鼠傷寒沙門氏菌、甲硫胺酸、*metE* 基因、非編碼小片段核糖核酸、FNR、*fnrS*。

Abstract

Methionine is critical for the variety of metabolic processes in the organism, such as a precursor or intermediate for the final products. As an essential amino acid, methionine is not synthesized de novo in humans, and it must be ingested through food. In microorganisms, methionine is synthesized via a complicated biosynthetic pathway. The last step for the synthesis of methionine is the methylation of homocysteine, which is catalyzed by the MetE. We use the *Salmonella* Typhimurium LT2 as a model, to test the regulation of the *metE* gene by an anaerobically induced small non-coding RNA-*fnrS*, whose expression is strictly dependent on the anaerobic regulator-FNR. In this study, we constructed the *metE::lacZ* fusion gene, and established various plasmids which carry the complete *metE* or *fnrS* gene or their derivatives. We investigate the relations between *metE* and *fnrS*, through the wild-type, *fnrS* and/or *fnr* as well as *hfq* deficient strains under the oxygen-limited state. The results of the β -galactosidase assays and Western blotting analyses showed that FnrS down-regulate *metE* gene expression in an anaerobic condition. Accordingly, the *fnr* and *hfq* genes were down regulating the *metE* gene indirectly; we proved the *fnrS*-mediated *metE* expression. Furthermore, we observed that the secondary structure of *fnrS* is necessary for the regulation, and we also noted that the SD sequence of *metE* is important for the base-pairing with *fnrS*. Through the results of RT-PCR, we also found out the mRNA expressions were coincided with the results from β -galactosidase analyses. Additionally, the negative regulation of *metE* by *fnrS* was obviously observed under the unlimited-methionine condition. Through this study, it would be helpful for understanding of the regulation of other gene expressions, which have a similar regulatory mechanism.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium, Methionine, *metE*, small non-coding RNA, FNR, *fnrS*

目錄

口試委員會審定書.....	i
謝誌.....	ii
摘要.....	iii
Abstract	iv
目錄.....	v
表目錄.....	viii
圖目錄.....	ix
附圖目錄.....	x
一、前言.....	1
(一) 沙門氏桿菌屬之簡介.....	1
(二) 甲硫胺酸之簡介.....	2
1. 甲硫胺酸之重要性.....	2
2. 甲硫胺酸之生合成及其相關代謝路徑.....	3
(三) MetE 之簡介.....	4
1. MetE 之調控作用.....	5
2. MetE 於氧氣轉換之間.....	5
(四) FNR 之簡介.....	6
1. FNR 之氧氣偵測.....	7
2. FNR 於微氧 (micro-aerobic condition) 代謝之意義.....	7
(五) 小分子 RNA 之簡介.....	8
(六) FnrS 之簡介.....	9
(七) 研究動機與目的.....	10

二、材料與方法	12
(一) 試驗材料	12
1. 菌株及質體	12
2. 培養基	12
3. 藥品及試劑	13
4. 器材設備	14
(二) 一般性試驗方法	14
1. 微生物之培養	14
2. DNA 之萃取 (DNA extraction)	15
3. 表現質體之建立 (construction of expression plasmid).....	17
4. 質體之轉形作用 (transformation).....	19
5. 噬菌體一般試驗方法	21
(三) 選殖基因表現系統之建構	23
1. 載體及選殖基因片段之製備	24
2. 選殖片段之處理	25
3. 接合反應 (ligation reaction)	26
(四) 基因剔除突變株之建構	26
1. 溶胞產物之製備	27
2. P1 轉導作用	27
3. FLP 重組反應 (FLP recombination).....	28
(五) <i>PmetE::lacZ</i> 融合菌株之建構與分析	29
1. λ 溶胞產物 (lysate) 的製備	29
2. λ 轉導作用	30
3. Beta-galactosidase 活性分析	31
(六) 蛋白質誘導表現分析	32

1. 蛋白質粗萃取	32
2. 蛋白質膠體電泳分析 (SDS-PAGE)	33
3. 蛋白質轉印 (transfer)	34
4. 雜交反應 (hybridization)	35
5. 雜交訊號的偵測 (detection)	36
(七) RNA 表現分析	37
1. RNA 之萃取	37
2. RT-PCR	38
3. One-Step RT-PCR	38
4. Quantitative RT-PCR	39
三、結果	40
(一) <i>metE::lacZ</i> 融合基因於 λ RS45 中之表現	40
(二) FnrS 對 <i>metE::lacZ</i> 表現之影響	41
(三) FnrS 相關調控因子對 <i>metE::lacZ</i> 表現之影響	43
(四) FnrS 及相關因子 FNR、Hfq 缺失株之生長曲線測試	45
(五) MetE 基因蛋白質分析之表現	45
(六) <i>metE::lacZ</i> 基因之 RNA 於野生株及突變株之測試	46
(七) FnrS 之不同區域對 <i>metE</i> 表現之影響	46
(八) FnrS 鹼基配對至 <i>metE</i> 基因 5' 端未轉譯區域	47
四、討論	49
五、結論	53
六、參考文獻	54

表目錄

表一、本論文所使用之菌株	58
表二、本論文所使用之質體及嗜菌體	61
表三、本論文所使用之引子對	62



圖目錄

圖一、 <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2 <i>metE</i> 基因上游序列圖譜	64
圖二、 <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2 FnrS 基因結構圖	65
圖三、MetE 於氧氣轉換間受到 <i>fnrS</i> 調控表現之影響	66
圖四、FnrS 及其相關因子缺失對 <i>metE</i> 之表現影響	67
圖五、FnrS 及其相關因子缺失株之生長曲線測試	68
圖六、FnrS 及其相關因子缺失對 MetE 表現影響之西方轉漬法試驗	69
圖七、FnrS 及其相關因子缺失對 <i>metE</i> 表現影響之 RT-PCR 試驗	70
圖八、FnrS 不同區域對 <i>metE</i> 基因之表現影響	71
圖九、沙門氏菌 <i>metE</i> mRNA 與 FnrS 之序列比對結果及 FnrS 點突變基因選殖 質體對 <i>metE</i> 之表現影響	72
圖十、MetE 相對應 <i>fnrS</i> 點突變之互補株	73



附圖目錄

附圖一、甲硫胺酸之生合成路徑..... 74



一、前言

(一) 沙門氏桿菌屬之簡介

沙門氏桿菌屬 (*Salmonella*) 屬於腸道細菌科 (*Enterobacteriaceae*)，為革蘭氏陰性桿菌，不產生芽孢，絕大多數有鞭毛結構，具泳動力，為兼性好氣菌，與模式微生物大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 同為腸道細菌科中被廣泛研究者，兩者基因組成 90% 相同，被認為於一億多年前源自於相同祖先 (Wray *et al.*, 2000)。血清型依照微生物的抗原結構不同，將沙門氏菌分為兩種 (species)：*S. bongori* 及 *S. enterica*，以後者佔大多數，並依不同的生化特性再細分為六種不同亞種 (subspecies)，其中，腸道沙門氏菌 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*) 為所有沙門氏菌中最常見者 (Brenner *et al.*, 2000)。

腸道沙門氏菌為常見的人畜共通傳染病源菌，經由糞口或食用遭汙染之食品傳染，並於感染後聚集在小腸腸道處，或侵入腸道上皮細胞，最後透過淋巴系統及血液系統造成系統性感染 (Carter and Collins, 1974)，廣泛存在環境中，為世界重要的公共衛生問題來源之一。除了引起傷寒和副傷寒的 *S. Typhi*、*S. Paratyphi*，其他所有沙門氏菌引起的疾病，統稱沙門氏菌病 (Salmonellosis) (McClelland *et al.*, 2001)，為台灣兒童常見的腸內致病菌，嚴重時會造成敗血症、腦膜炎、關節炎等嚴重的全身性感染。

其中，鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella enterica* subspecies serovar *Typhimurium*) 為全球常引起食物中毒的沙門氏菌之一，除了人畜以外，包含爬蟲類、鳥類及昆蟲等皆可為其感染宿主，屬於宿主範圍廣泛性之腸道沙門氏菌血清型 (Roy and Malo, 2002)。而其模式菌株 LT2 之基因組已被定序完成，結果顯示與大腸桿菌的 DNA 相似性約 80%，胺基酸相似性約 90%，利用相關之病原細菌試驗於模式動物小鼠，可引起類似人類因感染傷寒沙門氏菌而產

生的傷寒症狀，為利用老鼠來研究人類傷寒的主要模式細菌 (McClelland *et al.*, 2001)。

透過進一步調控機制的研究，有助於鼠傷寒沙門氏菌成為流行病學之人類病原菌微生物。此外，沙門氏菌於致病機制、微生物病原菌、基因演化及許多基因表現及代謝基礎路徑等已在過去蛋白質體學盛行的年代被廣泛研究，在這探討 RNA 調控層級的年代，也逐漸被視為重要的模式微生物之一 (Vogel, 2009)。

(二) 甲硫胺酸之簡介

甲硫胺酸 (methionine) 為一含硫的 α -胺基酸，有一個大且疏水性的側鏈，為非極性胺基酸，化學式為 $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 。於哺乳類動物中被歸類為必須胺基酸之一，無法於體內自行生成，需藉由攝食含有甲硫胺酸的相關蛋白來幫助體內維持正常生理機能；於植物及微生物中，具備生合成所需的關鍵酵素，故能自行合成，提供細胞生存所需。

1. 甲硫胺酸之重要性

於大腸桿菌及沙門氏菌中，甲硫胺酸為生物體中多項物質之前驅物及中間產物，而其所涉及與維持生命必須及延續的機制相當多，當中包括：一、作為蛋白質生成的基礎原料；二、其甲醯化形式為所有蛋白質轉譯起始之必須；三、與 ATP 作用生成的 SAM (*S*-adenosyl-methionine, AdoMet) 為細胞中重要之甲基提供來源，更參與了生物體中廣泛生合成路徑 (biosynthetic pathways)、趨化控制 (chemotactic control) 之相關的基因調控與 RNA 修飾作用 (Hondorp and Matthews, 2009)。因此，甲硫胺酸自身之生合成路徑受到多種調節機制所

控制，其生合成中更涉及了多個反應步驟，並由特定基因編碼之酵素所催化，於大腸桿菌中，發現這群共同調控甲硫胺酸合成路徑的基因，散佈於染色體的一些區域，將其命名為甲硫胺酸調節組 (*met regulon*) (Weissbach and Brot, 1991)。於過去研究顯示，生合成過程中多項代謝物被證實於轉錄層級受到調節組中 MetJ 及 MetR 兩個系統嚴密的調控 (Augustus and Spicer, 2011; Urbanowski *et al.*, 1987)。

此外，甲硫胺酸與活性氧化物之氧化反應也具關連，提出含有硫的胺基酸殘基-甲硫胺酸對於活性氧化物敏感，特別容易成為攻擊對象而被氧化 (Berlett and Stadtman, 1997; Stadtman and Berlett, 1998)。另外，甲硫胺酸的氧化還原作用亦被認為與細胞功能的調節有關 (Hoshi and Heinemann, 2001)。而近年來的研究指出，甲硫胺酸在遭遇氧化壓力 (oxidative stress) 時，會產生缺乏的現象，成為細胞生長的限制因子 (Hondorp and Matthews, 2004)。

2. 甲硫胺酸之生合成及其相關代謝路徑

甲硫胺酸新合成 (*de novo*) 的代謝路徑需要相當的能量損耗，共需要 7 ATPs 及 8 NADPHs，而於大腸桿菌及沙門氏菌中，由三種胺基酸提供其生合成原料來源：一、甲硫胺酸之硫原子來自半胱胺酸 (cysteine)，為硫酸鹽經由同化路徑 (sulfate assimilation pathway, SAP) 還原硫原子而來；二、碳骨架則衍生自天門冬胺酸 (aspartic acid)；三、甲基團的提供則由絲胺酸 (serine) 經由以葉酸 (folate) 為中心的單碳循環代謝路徑 (one-carbon metabolism pathway) 而來 (Saint-Girons *et al.*, 1988)。主要經由四個步驟完成其生合成，分別由 *metA*、*B* 及 *C* 基因所編碼之酵素催化，首先將 homoserine 醯基化形成 *O*-succinyl-homoserine，促使縮合反應將 cysteine 與之縮合產生 cystathionine，再水解生成 homocysteine，最後，經由 *metE* 或 *metH* 所編碼之基因產物

methionine synthase 催化甲基團由 5-methyl-THF (tetrahydrofolate) 轉移至 homocysteine，而 5-methyl-THF 則是 10-methylene-THF 經 *metF* 所編碼的蛋白質催化所產生，進而完成甲基化作用，完成甲硫胺酸生合成反應 (Dev and Harvey, 1984; Saint-Girons *et al.*, 1988) (附圖 1)。

另外，甲硫胺酸經由 *metK* 所編碼之合成酵素 (SAM synthetase) 催化 SAM 生成，並可進行 SAM 循環反應 (SAM cycle)，經 SAM 依賴型酵素生成 S-adenosyl-homocysteine (SAH)，藉由 S-adenosylhomocysteine hydrolase 水解成 homocysteine，提供甲硫胺酸合成之受質，最後利用 methionine synthase 完成甲基化作用，重新生成甲硫胺酸，並再度轉換為 SAM，完成循環 (Wang *et al.*, 2008) (附圖 1)。



(三) MetE之簡介

MetE 為一編碼甲硫胺酸合成酵素 (methionine synthase) 的基因，又稱為維生素 B₁₂ 非依賴型的甲硫胺酸合成酶 (cobalamin-independent methionine synthase)，基因全長 2,265 kb，由 754 個胺基酸組成，蛋白質大小約為 84.68 kDa，催化甲硫胺酸合成最後一個步驟，即甲基團由 5-methyltetrahydrofolate 轉移至同半胱胺酸 (homocysteine) 之甲基化作用。

於大腸桿菌及沙門氏菌中，同時存在 *metH* 基因之產物來執行 MetE 於甲硫胺酸生合成中之相同催化步驟，兩者間主要由對維生素 B₁₂ 的依賴作為主要的調控機制區分，*metH* 基因所編碼的為維生素 B₁₂ 依賴型的甲硫胺酸合成酶 (cobalamin-dependent methionine synthase)，利用 mono-或 triglutamate 形式之葉酸 (folate) 作為甲基提供者，須以維生素 B₁₂ 作為輔因子，共同形成活化狀態之完整酵素形式 (holoenzyme)；而 *metE* 基因所編碼的則為非維生素 B₁₂ 依賴型酵素，不需要維生素 B₁₂ 作為輔因子，僅利用 triglutamate 型式之葉酸作為

甲基提供者。然而，微生物本生並不能合成足夠量之維生素 B₁₂，使得 *metH* 無法活化。因此，當不存在外源維生素 B₁₂ 的狀態下，MetE 成為完成甲硫胺酸合成最終步驟的唯一酵素 (Hondorp and Matthews, 2009)。

1. MetE 之調控作用

MetE 存在於 *met* regulon 中，於調節甲硫胺酸生合成扮演關鍵性角色，於過去探討其基因調控的因子眾多，當中包含 *met* regulon 內的調控因子：一、MetJ，在 *met* regulon 中結合於特定的保守 DNA 結合序列 (*met*box) 做為抑制蛋白 (repressor protein)，調節甲硫胺酸生合成及運輸過程中的基因表現，而甲硫胺酸衍生物 SAM (AdoMet) 為其輔抑制因子 (corepressor)，共同形成活化態酵素後對 *metE* 基因進行負調控作用 (Augustus and Spicer, 2011)；二、MetK，編碼著 AdoMet 的合成酵素 (AdoMet synthetase)，協助 MetJ 的調控機制進行，對 *metE* 產生間接調控 (Weissbach and Brot, 1991)；三、MetH，因催化相同反應路徑，且於活化時具有較高之酵素活性，因此，當 MetH 活化時會壓抑 *metE* 表現 (Urbanowski *et al.*, 1987)。四、MetR，以 homocysteine 作為輔活化因子 (coactivator)，在 *metR* 缺失下，*metE* 的活性受到完全抑制，指出兩者之正向調控作用 (Urbanowski *et al.*, 1987)；

2. MetE 於氧氣轉換之間

於過去的研究指出，甲硫胺酸於面臨氧化壓力下產生缺乏之情形，為 MetE 避免活化部位受到更深層的氧化損害而失活所造成 (Hondorp and Matthews, 2004)，並發現是透過 MetE 上 cysteine 645 的氧化所引起 (Hondorp and Matthews, 2009)。然而，當由厭氧環境轉換為有氧狀態時，MetE 蛋白質含量上升為總細胞蛋白含量的 5%，成為細胞內豐富的蛋白質之一 (Gyaneshwar *et*

al., 2005; Smith and Neidhardt, 1983), 顯示氧化壓力下由於甲硫胺酸的缺乏, 促使 *metE* 基因大量表現, 以維持細胞所需的甲硫胺酸含量。於轉錄階層調控的研究, 證實甲硫胺酸的生合成機制於適應長時間暴露於有氧環境時會遭到崩壞, 據推測, 是由於 MetE 失活, 而造成甲硫胺酸缺乏, 並於氧化壓力受到調節後, methionine 含量逐漸穩定, 使得 *metE* 表現下降 (Partridge *et al.*, 2006)。另外, *metE* 的表現量在硫、氮缺乏下皆有受到抑制之情形。研究顯示, 由於硫、氮的缺乏導致轉錄因子 MetR 表現量下降及 MetJ 誘導表現, 且於此狀態下會誘發氧化壓力的形成, 種種原因都間接造成 *metE* 於缺乏硫及氮的狀態下表現量降低 (Gyaneshwar *et al.*, 2005)。

此外, 於大腸桿菌的研究顯示, 培養於限制培養基, 在厭氧調控蛋白 FNR 缺失下, *metE* 的 mRNA 及蛋白質表現量均會顯著上升。然而, 卻無法於 *metE* 基因上游序列觀察到 FNR 的 DNA 結合序列, 顯示 FNR 透過未知機制調控 *metE* 表現 (Constantinidou *et al.*, 2006)。

(四) FNR之簡介

FNR 為厭氧環境下重要的轉錄因子, 全名為 Fumarate Nitrate Reductase, 首先, 發現於 *fnr* 缺失下, 微生物之 fumarate 及 nitrate 的還原作用無法順利進行, 因而命名 (Lambden and Guest, 1976)。接著, 於氧氣存在狀態間的轉換, 微生物能順利的開關有氧、厭氧所需之基因表現, 發現 FNR 於其中扮演關鍵的調節角色 (Partridge *et al.*, 2007)。另外, FNR 能抑制一些被氧化壓力所誘導的基因表現 (Kang *et al.*, 2005; Salmon *et al.*, 2003), 而 *metE* 基因於過去亦被發現, 於限制培養基培養下, 在 FNR 缺失時, 其 mRNA 及蛋白質會有五倍上升的表現 (Constantinidou *et al.*, 2006)。

1. FNR 之氧氣偵測

FNR 蛋白具有 Fe-S 簇和物結構，藉由氧化還原直接偵測氧氣的存在，能於有氧轉換為厭氧環境時被活化。活化態的 FNR 含有 $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ 簇和物，以二聚體的結構存在，才能進行特定位置的 DNA 結合及轉錄調控；若氧氣存在，Fe-S 簇和物會被氧化而經由可逆步驟形成 $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ 簇和物，以此 Fe-S 簇和物形式則無法形成二聚體，同時也失去 DNA 結合之能力，使得 FNR 失活；當再度轉換為氧氣缺乏時，細胞內的一些還原劑得以將 FNR 再度可逆的回到還原狀態；據此，FNR 得以作為氧氣的直接偵測者 (Green *et al.*, 2009; Jervis *et al.*, 2009)。

2. FNR 於微氧 (micro-aerobic condition) 代謝之意義

大腸桿菌及沙門氏菌均屬於兼性厭氧菌，於大腸桿菌的研究指出，其能順應環境之氧氣存在量的變化。根據生長環境，依照呼吸作用中最終電子接受者的存在，適當的於有氧呼吸、厭氧呼吸或發酵作用中做調適 (Partridge *et al.*, 2006)。其中，有氧呼吸能產生最多能量，為細菌最優先利用之模式，而當存在其他可利用之電子接受者 (e.g. NO_3^-) 時，微生物能在 O_2 含量低時利用相對低產能效率的代謝模式作為生存之替代；當不存在其他電子接受者時，則藉由發酵作用經受質階層磷酸化將能量保存，為最少能量釋放之代謝路徑 (Trotter *et al.*, 2011)。

因此，微生物於微氧環境 (micro-aerobic condition) 下，藉由對 O_2 親合性較高之 heme protein cytochrome *bd* 的生成，並進行厭氧呼吸作用，利用 PFL (pyruvate formate-lyase) 酵素取代 PDHC (pyruvate dehydrogenase complex) 來代謝丙酮酸，生成 acetyl-CoA 及 formate，使得微生物得以利用相對低的 O_2 存在量，於微氧狀態存在並維持氧化還原之平衡 (Partridge *et al.*, 2007; Trotter

et al., 2011)。

於大腸桿菌中，FNR 即為適應氧氣存在量改變的重要轉錄調節蛋白，能夠對 O₂ 有直接偵測的功能，抑制許多關於有氧功能的基因並活化更多厭氧代謝路徑的相關酵素編碼基因 (Khoroshilova *et al.*, 1997)，使得一些兼氧性微生物得以在有氧、厭氧狀態下存活，與另一間接氧氣偵測者-ArcA/B (aerobic respiratory control) 共同改變能量代謝機制以適應環境變化 (Georgellis *et al.*, 2001)。

(五) 小分子RNA之簡介

小分子非轉譯型 RNA (small non-coding RNA, sRNA) 序列一般介於 80-200 核苷酸的單股轉錄本，在近年來被發現具有調控功能，於微生物體內進行多種生化代謝反應過程中，扮演輔助調控作用進行的角色，並多涉及於環境因子改變的調控，也解釋多項於轉錄階層透過未知機制調控基因的例子 (Durand and Storz, 2010)。

一般 sRNA 與目標 mRNA 可能以 *cis* 或 *trans* 編碼形式存在。其中，*cis* 編碼形式的 sRNA 一般位於其目標基因上，以反方向編碼於目標 mRNA 之 5' 端未轉譯區域上，具有高度序列互補特性；另外，*trans* 編碼形式的 sRNA，一般編碼於目標 mRNA 不同之位置，利用有限的互補特性與目標基因結合，而大部分具有調控功能的 sRNA 多屬於 *trans* 編碼形式的 sRNA (Waters and Storz, 2009)。

sRNA 被認為可以透過和目標 mRNA 進行鹼基配對或是結合至蛋白質以修飾其活性的機制來影響下游基因表現，在許多的代謝調控路徑中扮演關鍵性角色。研究顯示，有三類主要的作用機制，並分別對目標 mRNA 形成負調控及正調控；一、大部分的 sRNA 會鍵結於目標 mRNA 的 5' 端未轉譯區域

(5'UTR)，影響到核糖體結合位 (RBS)，使核糖體無法順利結合，導致蛋白質無法生成，屬於最多類型的負調控；二、經由有限的鹼基配對形成複合體的 sRNA 及 mRNA 吸引 RNases 的作用，造成 mRNA 降解；三、sRNA 也有可能避免 mRNA 序列形成阻礙核糖體結合位 (RBS) 的形式，使目標基因的轉譯作用得以順利進行，因而正向調控目標 mRNA (Waters and Storz, 2009)。

另外，Hfq (RNA chaperone) 也被發現能參與 sRNA 的調控作用，幫助 sRNA 和 mRNA 之間的鹼基配對 (base pairing) 機制。細菌中有一部分 sRNA 需要 Hfq 的幫助才能正確的與目標 mRNA 進行配對，而有些 sRNA 在 Hfq 的幫助下能加強和目標 mRNA 的結合，因此，Hfq 在調控特定 mRNA 的穩定性中扮演重要的角色 (Waters and Storz, 2009)。Hfq 與內切酶 RNase E 一樣對於 A/U 較多的序列有較高的親和力，所以 Hfq 會和 RNase E 競爭 RNA 上的序列進而保護 mRNA 免於被 RNase E 分解。由此可知，Hfq 除了可以幫助 sRNA 找到目標 mRNA 並分解也可以和 mRNA 結合並保護 RNase E 的切位，使 mRNA 不被分解而維持其穩定性 (Valentin-Hansen *et al.*, 2004)。

(六) FnrS之簡介

FnrS 為一 FNR (the anaerobic transcriptional fumarate and nitrate reductase regulator) 依賴型之小分子 RNA，基因全長 122 bp，位於 *ydaN* 及 *dbpA* 兩基因之間的基因間隔區域 (intergenic region, IGR)，於大腸桿菌及沙門氏菌等相關腸桿菌 (*Enterobacteria*) 中具有保守性，且其基因上游的啟動子區域存在 FNR 的 DNA 結合位，參與多種編碼並涉及能量代謝酵素、有氧功能及氧化壓力相關的 mRNA 基因於後轉錄層級的調控作用，其中，不乏是被 FNR 以未知機制進行調控作用之基因，幫助微生物因應環境缺氧的改變，並增加 FNR 調控組於厭氧環境下的調控 (Boysen *et al.*, 2010; Durand and Storz, 2010)。

序列結構上，FnrS 具有三個富含 GC 的莖-環結構 (stem-loop structure)，且於大腸桿菌中，藉由有限的鹼基配對特性和目標 mRNA 形成互補的複合體，進而影響其表現；同時，FnrS 的調控也被認為受到伴隨蛋白-Hfq 的影響，藉由提高 FnrS 於細胞中的穩定性，並促進目標 mRNA 複合體的結合，在 FnrS 調控目標 mRNA 中為重要的調控因子，其序列中端具有多個尿嘧啶所組成的單股片段，為一典型的 Hfq 結合辨認位；在其序列尾端有非依賴 ρ 因子型的終止子，以連續的尿嘧啶鹼基作為轉錄終止訊號，屬於非轉譯型的調控 sRNA (Boysen *et al.*, 2010)。

近年，則發現 FnrS 與 *metE* 之表現也具有相關性，於厭氧條件下，當 FnrS 存在時會抑制 *metE* 之表現量；反之，當 FnrS 被剔除，*metE* 之表現量則會增加 (Boysen *et al.*, 2010)。



(七) 研究動機與目的

鼠傷寒沙門氏菌為一非轉譯型小分子RNA廣泛研究對象的病原菌之一，其基因組及演化上與模式微生物大腸桿菌相似，相較於大腸桿菌為非致病的菌種，沙門氏菌利用 *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs) 能侵入並在真核生物中複製，造成多種哺乳類及非哺乳類宿主致病，使之被視為RNA相關研究的重要對象，藉由瞭解其他生理意義，已對其研究更加瞭解。

綜合過往的研究，*metE*，非維生素B₁₂依賴型的甲硫胺酸合成酶 (Cobalamin-independent methionine synthase) 受到多重因子調控，在缺乏維生素B₁₂的狀態下，於甲硫胺酸生成過程中扮演關鍵性的角色，並發現其於氧氣存在狀態不同間有表現差異。本研究探討*metE*基因與一受厭氧環境誘導之非編碼小片段核糖核酸 (small non-coding regulatory RNA) - *fnrS*間的調控作用。其中，沙門氏菌與大腸桿菌同屬於格蘭氏陰性菌的腸桿菌，其*metE*在序列上

有84%的相似特性，藉由對大腸桿菌的研究背景，探討沙門氏菌中*metE*與FnrS之間的關係，瞭解此一高度保守於腸道菌中之sRNA是否於沙門氏菌也具類似的調控機制或是其他與致病相關的未知作用方式有相關。



二、材料與方法

(一) 試驗材料

1. 菌株及質體

本研究所使用之菌株與質體詳列於表一及表二。

■ 建構 *lacZ* fusion 之載體

本研究使用 pRS414 及 pRS415 分別作為建立目標基因與 *lacZ* 報導基因之 protein fusion 及 operon fusion 載體，將 *Salmonella* Typhimurium LT2 之 *metE* 基因 promoter 區域與質體 MCS (multiple cloning site) 下游之 *lacZ* 接合，以建構融合菌株。

■ 選殖基因之誘導表現載體

本研究使用 pBAD33 作為轉殖目標 *metE* 基因之表現載體，將基因與質體 MCS 上游之 P_{BAD} 啟動子接合，藉由阿拉伯糖 (L-arabinose) 誘導啟動子下游基因之表現。另外，利用 pBRLac 做為轉殖目標 *fnrS* 基因之表現載體，將基因接合於質體之 Plac 啟動子下游 MCS 位置，藉由 IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 誘導啟動子下游基因之表現。

2. 培養基

■ Luria Bertani Broth medium (LB)

本論文所使用之豐富培養基，其成分為每公升水中含 10 g 的 tryptone，5 g 的 NaCl。

■ Minimal medium

本論文以 GM 代稱以葡萄糖做為單一碳源之限制培養基。

5x M63 salts

(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
KH ₂ PO ₄	68 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2.5 mg
ddH ₂ O	至 1 L
<hr/>	
以 KOH 調 PH7.0	1 L

GM (glucose minimal medium)

5x M63 salts	40 mL
ddH ₂ O	157.78 mL
<hr/>	
高溫高壓滅菌，待冷卻後再加入	
40 % glucose (sterile)	2 mL
1M MgSO ₄ · 7H ₂ O (sterile)	0.2 mL
1% B1 (sterile)	0.02 mL
<hr/>	
混勻至無白色懸浮物後保存於 4°C。	200 mL
視條件添加 L-methionine (終濃度：80 µg/mL)。	

■ 抗生素

所使用之濃度為每毫升含 100 µg ampicillin，25 µg kanamycin 及 17 µg chloramphenicol。

3. 藥品及試劑

■ 化學藥品

Sigma (St. Louis, USA)，Riedie-dehaen (Heidelberg, Germany) 及和光純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)。

■ 限制酶及 T4 DNA ligase

New England Biolabs (Beverly, USA) 及 TakaRa (Japan)。

■ PCR 反應套組購

生工公司 (台灣) 以及 Qiagen (Avenue Stanford, USA)。

- DNA 純化套組
BRL (Richmond, CA, USA) 及 Viogene。
- PCR 引子
基龍米克斯 (台灣)。
- RT-PCR 套組
Taigene、Yeastern biotech、ABI。

4. 器材設備

- 分光光度計 (Ultraspec 2000, Pharmacia, H.K.)
- 全波長掃描式微盤分析儀 (SpectraMax 340PC384, CA, U.S.A.)
- 微量離心機 (Kubota KM-15200, 雙鷹公司, 台北, 台灣)
- 冷凍離心機 (CF 15D2, Hitachi, Japan)
- DNA 電泳槽 (伯昂公司, 台北, 台灣)
- PCR 反應槽 (T3 Thermocycler, Biometra, Rudolf-Wissell, Gottingen)
- 即時螢光定量 PCR 系統 (ABI StepOnePlus)

(二) 一般性試驗方法

1. 微生物之培養

- 培養條件之選擇

依據微生物生長及試驗條件之需求，將微生物接種至豐富 (LB) 及限制培養基 (GM)，依特定條件額外添加抗生素、特殊營養需求及誘導物質；培養至恆溫培養箱，依菌種最適溫度做調整，主要使用 37°C 作為微生物生長溫度，部分試驗則於 30°C 進行培養。

■ 菌體分離

四區畫線法，將微生物劃開於固態培養基，倒置培養於恆溫培養箱，進行隔夜培養，直到單一菌落分離。

■ 前培養

選取已分離之單一菌落，將微生物接種於培養基，並於恆溫培養箱隔夜震盪培養菌體 (12-16 小時)。

■ 稀釋培養

取隔夜培養菌液，以 1:100 之比例稀釋於新鮮培養液，再次進行菌體培養，依試驗需求培養菌體至所需生長條件，利用分光光度計測定菌液吸光值，作為微生物生長時期監測依據。

2. DNA之萃取 (DNA extraction)

依試驗需求分別以商業套組進行小量及大量的質體分離，並以傳統試驗方法抽取沙門氏菌 (*Salmonella* Typhimurium LT2) 之染色體 DNA，所有萃取結果皆經由酵素截切及瓊脂膠體電泳等一般 DNA 試驗方法確認萃取品質。

■ 質體 DNA 的小量萃取 (mini-preparation of plasmid DNA from bacteria)

小量製備細菌質體，使用商業套組 (Viogene) 進行 DNA 的純化，詳細試驗步驟參考套組之使用建議。

■ 質體 DNA 的大量萃取 (midi-preparation of plasmid DNA from bacteria)

大量製備細菌質體，使用商業套組 (Qiagene) 進行 DNA 的純化，詳細試驗步驟參考套組之使用建議。

■ 染色體 DNA 的萃取 (preparation of chromosomal DNA from bacteria)

製備細菌染色體之 DNA，依照以下試驗步驟進行萃取。

【方法】

- a. 接種欲製備之目標微生物至 LB 培養液中，於恆溫培養箱震盪隔夜培養。
- b. 以 1:100 之比例將隔夜培養菌液稀釋至 3 mL LB 培養液，重新震盪培養至 OD₆₀₀ 吸光質為 0.6-0.8。
- c. 取 1.5 mL 菌液至微量離心管，離心 13,000 rpm/2 min，移除上清液。
- d. 加入 567 μL TE 緩衝液，懸浮菌體。
- e. 加入 30 μL 10% SDS、8.3 μL RNase A (10 mg/mL) 以及 3 μL Proteinase K (20 mg/mL)，反覆上下搖動離心管均勻混合液，水浴 37°C/1 h。
- f. 加入 100 μL 5M NaCl，以八字型翻轉離心管，充分將混合液混勻 (約翻轉一百次)。
 - ✓ 剛加入時會有稠狀物產生，混勻至稠狀物消失。
- g. 加入 80 μL CTAB/NaCl，均勻混勻，水浴 65°C/10 min。
 - ✓ CTAB/NaCl 以 65°C 預熱處理。
- h. 加入等倍體積之 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 下層溶液，以上下翻轉離心管方式混勻溶液至無分層，離心 9,000 rpm/5 min，提取上層溶液至新的微量離心管。
- i. 加入等倍體積之 chloroform/isoamyl alcohol (24:1)，以上下翻轉離心管方式混勻溶液至無分層，離心 9,000 rpm/5 min，提取上層溶液至新的微量離心管。
- j. 加入 0.6 倍體積之 isopropanol，溫和地反轉離心管至 DNA 沉澱產生，離心 13,000 rpm/5 min，移除上清液。
- k. 加入 300 μL 70% 酒精，溫和地清洗 DNA 沉澱物，離心 13,000 rpm/5 min，

移除上清液。

l. 重複步驟 (k.) 一次。

m. 真空乾燥 DNA，並加入 50 μ L TE 緩衝液溶解 DNA，於 4°C 保存。

【試劑】

CTAB/NaCl solution

NaCl	4.1 g
CTAB	10 g
ddH ₂ O	80 mL
NaCl 溶於水後，於 65°C 加入 CTAB，加熱攪拌溶解再補水。	
	100 mL

TE buffer (pH7.4)

0.5M EDTA	0.2 mL
1M Tris-HCl (pH7.4)	1 mL
ddH ₂ O	98.8 mL
高溫高壓滅菌，保存於 4°C。	
	100 mL

3. 表現質體之建立 (construction of expression plasmid)

藉由基本的 DNA 剪接方法，建構能夠在目標微生物中大量表現特定基因之表現質體。將 DNA 以適當的限制酵素截切後，經過分離、純化、回收及接合等步驟，選殖至表現載體的多重選殖位 (multiple cloning site, MCS)，並經由定序確認，完成表現質體的建立。

■ DNA 片段之截切 (DNA digestion)

選用特定的限制酵素 (restriction enzyme)，將純化後的質體 (vector) 及目標 DNA 片段以適當比例添加水及緩衝液混合均勻，反應條件視限制酵素種類而定。反應結束後加入適量的追蹤染劑，以 DNA 瓊脂膠體電泳進行確認及回收。

■ DNA 片段之分離 (DNA agarose gel electrophoresis)

以 1xTAE 緩衝液配製 1.0-2.0% 之瓊脂膠體，將混合追蹤染劑之樣品及 DNA marker 加入樣片槽，以 100 伏特電壓進行 DNA 樣品分離，反應 25-35 分鐘。使用 EtBr (ethidium bromide) 進行外染，並以蒸餾水退染，最後經紫外光來觀察 DNA 產物。

■ DNA 片段之純化 (DNA purification)

使用長波長之紫外光源 (365 nm) 照射瓊脂膠體，依 DNA marker 判斷目標 DNA 片段大小，觀察並截切。利用商業套組進行純化，詳細試驗步驟參考套組之使用建議。

■ DNA 片段之接合 (DNA ligation)

將帶有特定限制酵素切位之載體 (vector) 及欲轉殖之 DNA 片段 (insert) 依比例與接合酵素 (ligase) 混合液混勻，於 16°C 水浴槽反應 16-20 小時。

【反應物組成】

Vector DNA	4 μ L
Insert DNA	12 μ L
10 x ligation buffer	2 μ L
10mM γ ATP	1 μ L
T4 DNA Ligase (Takara)	1 μ L
Total	20 μ L

註：Vector 與 insert 之比例大致維持 1 : 3，可調整。

■ 定序 (sequencing)

本試驗所建構的質體均經基龍米克斯公司或明欣生物科技公司進行定序分析，確認序列正確。

4. 質體之轉形作用 (transformation)

藉由轉形作用 (transformation)，將表現質體引入細菌體中，藉由寄主細菌的系統來達成複製或進行基因表現的目的。寄主細菌的選擇，則視質體的種類及目的而定。本研究利用熱休克及 TSS 兩種試驗方法進行質體的轉形，並以 CaCl_2 法製備熱休克轉形作用的勝任細胞。

■ 勝任細胞之製備 (preparation of competent cell)

【方法】 註：氯化鈣法。

- a. 接種欲製備之目標微生物至 LB 培養液，於恆溫培養箱震盪隔夜培養菌體。
- b. 以 1:100 之比例將隔夜培養菌液稀釋至 100 mL LB 培養液中，重新震盪培養至 OD_{600} 吸光質為 0.6-0.8。
- c. 將菌液平均分裝置兩管微量離心管，冰浴 10 min
✓ 此後步驟均保持低溫操作。
- d. 於 4°C 下，離心 6,000 rpm/10 min，移除上清液。
- e. 每管以 2 mL 冰的 0.1 M CaCl_2 懸浮菌體，再各加入 3 mL 冰的 0.1 M CaCl_2 混勻，冰浴 40 min。
- f. 於 4°C 下，離心 4,000 rpm/10 min，移除上清液。
- g. 重複步驟 (e.)、(f.) 一次。
- h. 每管各加入 1 mL 冰的 15% glycerol/0.1 M CaCl_2 懸浮菌體。
- i. 每 0.1 mL 菌液分裝至滅菌過的微量離心管，保存於 -80°C 。

■ 熱休克轉形作用 (heat shock transformation)

【方法】

- a. 將 50 μL 適用之勝任細胞與 20 μL 質體接合反應產物 (或 5 μL 已純化之質體) 混合均勻，冰浴 1 h。
- b. 於 42°C 下，進行熱休克反應 90 s。
- c. 置於冰上，冰浴 2 min。
- d. 加入 0.5 mL LB，恆溫培養箱/1 h，震盪培養。
- e. 離心 6,000 rpm/5 min，移除上清液，留下約 0.1 mL 來懸浮菌體。
- f. 塗盤於含有適當抗生素的培養基，置於恆溫培養箱隔夜培養。

■ TSS轉形作用 (TSS-transformation)

【方法】

- a. 接種轉形之目標微生物至 LB 培養液，於恆溫培養箱震盪培養菌體。
- b. 以 1:100 之比例將隔夜培養菌液稀釋至 3 mL LB 培養液中，重新震盪培養至 OD₆₀₀ 吸光質為 0.6-0.8。
- c. 將菌液以 3,000 rpm/5 min，移除上清液。
- d. 以 300 μL 2xTSS 溶液將菌體懸浮，冰浴 10 min。
- e. 加入 5 μL 已純化之質體混勻，置於冰上 1 h。
- f. 於 37°C 下，進行熱休克反應 2 min。
- g. 置於冰上，冰浴 2 min。
- h. 加入 0.5 mL LB，恆溫培養箱 37°C/1 h，震盪培養。
- i. 離心 6,000 rpm/5 min，移除上清液，留下約 100 μL 來懸浮菌體。
- j. 塗盤於含有適當抗生素的培養基，置於恆溫培養箱隔夜培養。

【試劑】

2xTSS 溶液 (transformation and storage solution)

PEG8000 (Polyethylene glycol 8000)	20 g
1M MgSO ₄	4 mL
LB broth	至 190 mL
高溫高壓滅菌，再加入	
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	10 mL
保存於 4°C。	200 mL

5. 噬菌體一般試驗方法

■ 溶胞產物之製備 (preparation of phage plate lysate)

【方法】

- 接種欲製備之目標微生物 (*E. coli* C600) 至 LB 培養液中，添加 0.2% maltose，於 37°C 恆溫培養箱震盪隔夜培養菌體。
- 取 200 μL 隔夜培養菌液至微量離心管，加入 2-3 個溶菌斑 (plaques)，靜置於恆溫培養箱 37°C/15 min。
 - ✓ 同時進行一組未添加溶菌斑，作為試驗對照。
- 將 3 mL R-Top Agar 隔水加熱溶解，待其降溫至不燙手溫度。
- 將菌液混合液 (步驟 b.) 與 R-Top Agar 混勻，傾倒於 LA 固態培養基，搖晃使其均勻鋪平，室溫等待凝固。
- 倒置於恆溫培養箱 37°C/5-8 h，至培養皿上長出溶菌斑。
<步驟 (f.)~(j.) 為收集 lysate>
- 加 5 mL TM buffer 於培養基內，於 4°C 靜置，進行隔夜培養。
- 將培養基內的溶液 (lysate) 吸取至乾淨的試管內，加入 200 μL chloroform，震盪均勻，靜置於 4°C/30 min。

- h. 離心 3000 rpm/10 min，吸取上清液至乾淨試管。
- i. 重複步驟 (g.) 與 (h.)。
- j. 將最後的溶胞產物分裝製滅菌過的微量離心管，並添加微量 chloroform，保存於 4°C。

【試劑】

Tris-magnesium (TM) buffer

1 M Tris-HCl (pH7.5)	20 mL
MgSO ₄	0.4 g
ddH ₂ O	至 400 mL
滅菌後 4°C 保存。	400 mL

R-Top Agar

Tryptone (Bacto)	1.6 g
Yeast extract (Bacto)	0.16 g
Agar (Difco)	1.28 g
NaCl	1.28 g
ddH ₂ O	至 160 mL
Total	160 mL

註：微波加熱溶解後，每 3 mL 分裝置試管，加蓋，高溫高壓滅菌，保存於 4°C。使用時先加熱溶解，待冷卻後再個別加入已滅菌之 6 μL 1 M CaCl₂ 和 15 μL 20% glucose。

■ 溶胞產物病毒劑量之測定 (titer the lysate)

【方法】

- a. 接種野生株 *E. coli* C600 至 LB 培養液，添加 0.2% maltose，於 37°C 恆溫培養箱震盪，隔夜培養菌體。
- b. 以 1:100 的倍數，用 TM 緩衝液將 lysate 序列稀釋成 10⁻²、10⁻⁴、10⁻⁶、10⁻⁸ (視需要調整濃度)。
- c. 將 3 mL R-Top Agar 隔水加熱溶解，待其降溫至不燙手溫度。

- d. 將 200 μL 隔夜培養菌液與所需濃度的 lysate (例：加入 10^{-2} 100 μl 則濃度為 10^{-3}) 加入 R-Top Agar，混勻後傾倒於 LA plate，搖晃使其均勻鋪平，室溫等待凝固。
- e. 於 37°C 培養箱倒置，進行隔夜培養。
- f. 觀察溶菌斑數目，計算溶胞產物之效價 (病毒劑量)。

註:以上方法也適用於製備新鮮的溶菌斑。

(三) 選殖基因表現系統之建構

本研究以沙門氏菌 (*Salmonella* Typhimurium LT2) 染色體作為模板 DNA，設計帶有特定限制酵素切位的引子對 (primers)，利用聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 擴增欲選殖之基因片段，經 DNA 剪接方法將目標 DNA 選殖至特定表現載體，並轉形至大腸桿菌 (*E. coli* XL1-Blue) 中生長表現及保存。另外，以二次 PCR 方式建構特定基因上的點突變。

表現載體的部分，將 *metE* 系列基因轉殖至 pBAD33 之 *Kpn* I 及 *Hind*III 切位間；*fnrS* 系列基因轉殖至 pBRlac 之 *Aat* II 及 *EcoR* I 切位間；將 *metE* 5'端未轉錄區域系列轉殖至 pRS414、pRS415 的 *EcoR* I 及 *BamH* I 切位間。其中，建構 *metE* 與報導基因 *lacZ* 的轉錄 (operon fusion, op) 及轉譯 (protein fusion, pr) 融合質體，以 PCR 方式擴增 *metE* 之啟動子序列，並利用一般性 DNA 選殖方式將片段轉殖至 pRS415 及 pRS414 之 *lacZ* 基因之前，使得 *metE* 基因之啟動子控制 *lacZ* 的表現。另外，將 *metE* 之 5'端未轉譯區域 (*metE* 5'-UTR-184 bps, 包含+1 之前 2 bp) 與下游 *metE* 基因全長序列，以 PCR 方式增殖選殖基因片段 (圖一)，並將此片段與 pBAD33 之 P_{BAD} 啟動子接合，得到選殖質體。

1. 載體及選殖基因片段之製備

■ 載體之製備

將目標載體轉殖至 *E. coli* XL1-Blue，藉由宿主於豐富培養基隔夜培養，於宿主體內大量的複製目標載體 DNA，最後以商業套組將質體 DNA 分離純化，並利用單一限制酵素截位進行截切反應，以 DNA 瓊脂電泳分析質體品質及確認大小。

■ 選殖基因片段之製備 (preparation of target gene)

利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅產生目標 DNA 片段。使用沙門氏菌 (*Salmonella* Typhimurium LT2) 的染色體 DNA 或含有目標基因之選殖基因表現載體作為 DNA 模板，設計 5'端點帶有限制酶切位的引子對進行聚合酶連鎖反應，使增幅出的 PCR 產物兩端，帶有選殖到載體時所需的適當限制酵素切位。最後，藉由 DNA 瓊脂膠體電泳確認 PCR 產物大小並利用商業套組回收、純化 DNA 片段。

【PCR 反應物組成】

Template DNA	1 μ L
10 x PCR buffer	5 μ L
10 mM dNTP	1 μ L
2.5 μ M Forward primer (5')	1 μ L
2.5 μ M Reversed primer (3')	1 μ L
Taq DNA polymerase	1 μ L
ddH ₂ O	40 μ L
Total	50 μ L

【PCR 反應條件】

- a. 95°C (denaturation) : 5 min。
- b. 95°C (denaturation) : 1.5 min。
- c. 50~65°C (annealing) : 1 min, 溫度由引子 $T_m - 5^\circ\text{C}$ 決定。
- d. 72°C (extension) : 由產物大小決定, 1 Kb 之產物使用 1 min, 依此類推。
- e. 重複步驟 (b.)、(c.)、(d.) 共 30 個循環。
- f. 72°C, 10 min。
- g. 4°C, 中止反應。

2. 選殖片段之處理

以特定限制酵素截切製備好的載體 (vector) 及欲選殖 DNA 片段 (insert), 經酵素反應完成後可依兩種方法到達最終的接合反應: (1) 經由 DNA 瓊脂膠體電泳回收, 並利用商業套組純化截切過後的 DNA 產物。(2) 利用添加酚及氯仿混合液 (phenol/chloroform) 至截切過後的產物, 除去蛋白質及其他成分 (殘留酵素等蛋白質), 並利用酒精沉澱得到純化的 DNA。

■ phenol/chloroform DNA extraction

【方法】

- a. 將截切完成之載體 (vector) 及 DNA 片段 (insert) 混合於同一乾淨微量離心管。
- b. 加入等倍體積之 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 混合液, 反覆上下搖動離心管均勻混合, 直至呈現乳液狀。
- c. 室溫下離心 14,000 rpm/15 s, 吸取上清液至新的微量離心管。
- d. 重複步驟 b、c 一到兩次, 直到有機層與水層間沒有蛋白質存在。
- e. 加入與剩餘溶液等倍體積的 chloroform, 反覆上下搖動離心管均勻混合, 直至沒有分層。
- f. 室溫下離心 14,000 rpm/15 s, 吸取上清液至新的微量離心管。

- g. 重複步驟 (e.)、(f.) 一到兩次，確認有機層的去除。
- h. 將已轉移至新的微量離心管之上清液進行酒精沉澱。
- <酒精沉澱>
- i. 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 /1 h (至少 1 h)，使 DNA 沉澱。
- j. 於 4°C 下，離心 14,000 rpm/ 20 min，沉澱 DNA。
- k. 將 DNA 沉澱以 70 % 酒精清洗後，真空乾燥 DNA，再以 16 μL 的無菌二次水溶解，保存於 4°C 或添加其餘接合反應混合液進行接合反應。

3. 接合反應 (ligation reaction)

【反應物組成】

Vector DNA	12 μL
Insert DNA	4 μL
10X Ligation buffer	2 μL
10 mM ATP	1 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
Total	20 μL

(四) 基因剔除突變株之建構

使用一般性傳導作用 (generalized transduction) 來建構試驗所需的缺失菌株，利用 P1 phage 同源染色體重組之特性，將目標基因的 DNA 片段置換為一抗性基因，再利用 pCP20 上之 FLP 重組酶剔除抗性基因，藉由 pCP20 上之 ampicillin 抗性基因作為篩選條件，進行特定基因剔除 (gene knockout)。

1. 溶胞產物之製備

【方法】

- a. 接種 *E. coli* donor strain 至 LB 培養液中，於 37°C 恆溫培養箱震盪隔夜培養。
- b. 以 1:100 之比例將隔夜培養菌液稀釋至 5 mL LB 培養液中，並添加 50 μ L 20% glucose (最終濃度：0.2%) 及 25 μ L 1 M CaCl_2 (最終濃度：5 mM)，於恆溫培養箱震盪培養 37°C/30-45 min。
- c. 加入 100 μ L 新鮮的 P1 vir stock (P1 vir/C600, 10^9 - 10^{10} pfu/mL)，繼續恆溫震盪培養 37°C/3-5 hr，直到菌體細胞溶解 (lysis)。
- d. 加入 200 μ L chloroform，震盪均勻，靜置於 4°C/30 min。
- e. 離心 3,000 rpm/10 min，吸取上清液至乾淨試管。
- f. 重複步驟 (d.) 與 (e.)。
- g. 將最後的溶胞產物分裝製滅菌過的微量離心管，並添加微量 chloroform，保存於 4°C。

2. P1轉導作用

【方法】

- a. 接種 *E. coli* 受體菌株 (recipient strain) 至 LB 培養液，於 37°C 恆溫培養箱震盪隔夜培養
- b. 取 800 μ L 隔夜菌液至滅菌過的微量離心管，離心 14,000 rpm/2 min，移除上清液。
- c. 重複步驟 (b.)，共收集 1.6 mL 菌液。

- d. 加入 0.8 mL 的 P1 salts solution 打散細胞。
- e. 取 200 μ L 步驟 (d.) 的混合液至滅過菌的微量離心管，並加入 100 μ L 欲轉導基因片段之溶胞產物，於恆溫培養箱培養 37°C/1 h。
- f. 加入 1 mL LB 及 200 μ L 1 M sodium citrate 後，繼續震盪培養 37°C/1 h。
- g. 離心 14,000 rpm/2 min，徹底的移除上清液，加入 100 μ L LB 混合，塗抹於適合的選擇性培養基，隔夜培養於生長溫度。
- h. 取單一菌落於 LB 中繼代培養數代，再以三區畫線法畫於 LA 固態培養基，37°C 隔夜培養。
- i. 挑數顆單一菌落畫於抗性 plate 上。
- j. 以單一菌落替代 DNA 模板來確認抗藥性基因片段是否位於正確位置。

【試劑】

P1 salts solution

CaCl ₂	0.44 g
MgSO ₄	0.24 g
ddH ₂ O	至 400 mL
高溫高壓滅菌後保存於室溫。	400 mL

3. FLP重組反應 (FLP recombination)

利用質體 pCP20 帶有 FLP 重組酶 (flippase)，辨認 FRT 位置 (FLP recognition target site) 進行重組反應，將 kanamycin 抗性基因剔除。由於 pCP20 對溫度敏感特性，高溫下 (37°C 或 42°C) 會被丟棄，而質體本身帶有 ampicillin 抗性，故可做為篩選之用。

【方法】

- a. 進行 TSS 轉形作用 (TSS transform) 將 pCP20 質體帶入帶有抗性之突變菌株 (P1 transduction 所得產物)，於 30°C 進行培養。
- b. 取單一菌落接種於 LB 培養液，在 37°C 下繼代培養數代。
- c. 分別劃於 LA、含有 ampicillin 及 kanamycin 抗性的固態培養基，於 37°C 進行隔夜培養，確認 kanamycin 抗性基因及質體 pCP20 是否均被去除。

(五) *PmetE::lacZ* 融合菌株之建構與分析

經由選殖載體之建立，得到 pRS415-*metE* 5'-UTR::*lacZ* 及 pRS414-*metE* 5'-UTR::*lacZ* 之接合質體，分別為轉錄及轉譯融合菌株所使用。接著，進行 λ 轉導作用 (specialize transduction) 至換於 λ RS45 嗜菌體，透過由藍白篩選法製備帶有 *metE* 5' 端未轉譯區域之 λ RS45 *metE* 5'-UTR::*lacZ* 溶胞產物 (lysate)，最後將此溶胞產物感染表現菌株 DJ480 ($\Delta lacX74$)，並純化出溶原菌 (lysogen)，建立以 *metE* 啟動子調控 *lacZ* 基因的表現菌株，其差異於轉錄融合菌株保留 *lacZ* 之 SD 序列，能於轉譯階層產生自身蛋白質；而轉譯融合菌株則沒有，能於轉譯階層形成 *metE::lacZ* 之雜交蛋白 (hybrid protein)。利用 *PmetE::lacZ* 菌株表現 *metE::lacZ* 基因，藉由報導基因產物 β -galactosidase 分解 ONPG (O-Nitrophenyl β -D-Galactopyranoside) 產生帶有黃色物質的方式，分析 β -galactosidase 活性，並以此來判斷 *metE::lacZ* 基因的表現情形。

1. λ 溶胞產物 (lysate) 的製備

【方法】

- a. 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 μ L 20% maltose (最終濃度 0.2%) 的 LB 培養基，37°C 震盪隔夜培養。

- b. 進行 confluent lysate。
- c. 接種不含有質體的 donor strain 於 30 μL 20% Maltose 的 LB 培養基，37 $^{\circ}\text{C}$ 震盪隔夜培養。
 - ✓ 接下來的每日均需重複步驟 (c.)。
- d. 收集 lysate (目標 DNA 序列已交換至 λ 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 2 的隔夜培養，Titer the lysate 於 X-gal/LA 上。
 - ✓ 目標 DNA 序列後面融合 *lacZ* 基因，如自己質體交換至 λ RS45，則 plaques 呈藍色。
- e. 挑所得的數個藍色 plaques，加入 500 μL TM buffer 混合均勻後，重複步驟 (d.)，以取得單獨的藍色 plaques。
- f. 使用步驟 (e.) 獲得單獨的藍色 plaque 進行 confluent lysate。
- g. 收集 lysate，重複步驟 (e.)，但只需 10^{-4} 稀釋度，確認 X-gal/LA 上的 plaques 皆為藍色。

2. λ 轉導作用

【方法】

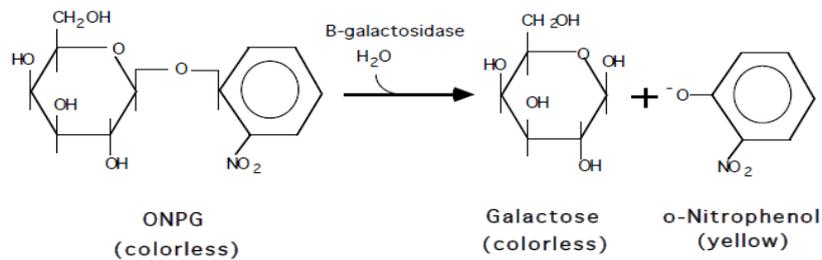
- a. 將 *E. coli* recipient strain 接種至 3 mL LB，37 $^{\circ}\text{C}$ 震盪隔夜培養。
- b. 將 R-Top agar 3 mL 隔水加熱溶解，待降溫後，加入隔夜培養 0.2 mL 混勻，倒在 LA 培養基上，傾斜使均勻分布，待乾。
- c. 將 100 μL 製備好的 lysate 滴在上步驟 (b.) 的培養基上，放置於 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養。
- d. 自明顯溶菌環的邊緣取菌，劃於 X-gal/LA 上，再多次純化直到得到單一

藍色菌落。

- e. 分別測試不同菌落的 β -galactosidase 活性分析，保存活性最低、僅插入單套的菌落

3. Beta-galactosidase 活性分析

藉由目標基因與其融合的 *lacZ* 基因表現 β -galactosidase，分解 ONPG (O-nitrophenyl β -D-galactopyranoside) 的活性，來判斷目標基因的表現情形。



【方法】

- 測量菌液的 OD_{600} 吸光度，並記錄。
- 取適當菌液（菌液與 Z buffer 之總體積為 1 mL，一般取菌液 200 μ L，可視變色速度改變之）加入 30 μ L 0.1% SDS、40 μ L chloroform 及 0.8 mL Z buffer 中進行破菌。
- 於水浴槽 28 $^{\circ}$ C 水浴槽中預反應八分鐘。
- 加入 200 μ 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 1 M Na_2CO_3 終止反應，記錄反應時間。
- 靜置 30 min，待細胞碎片沉降。
- 取 200 μ L 上層液測量並記錄個反應樣品之呈色結果 (OD_{420} 及 OD_{550} 值)。
- 活性的計算公式為：

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

T：反應時間 (min)，V：反應體積 (mL)

【試劑】

ONPG

ONPG	0.04 g
ddH ₂ O	至 10 mL
需新鮮配製，4°C 保存。	10 mL

Z 緩衝液

Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	16.1 g
Na ₂ H ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	5.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.246 g
β-mercaptoethanol	2.7 mL
KCl	0.75 g
ddH ₂ O	至 1 L
調整 pH 至 7.0，保存於 4°C。	1 L

(六) 蛋白質誘導表現分析

將建構好之 pBAD33-*metE* 系列選殖基因表現系統，於 *metE* 3'端加上一段序列，使 MetE 蛋白質 C 端帶有 HA 胜肽片段標記，讓辨識 HA 之抗體得以與之結合。以 TSS 轉形作用送入野生株及基因缺失菌株，藉由阿拉伯糖 (L-arabinose) 誘導表現，分別觀察不同基因缺失對 *metE* 蛋白質表現的影響以及不同 *metE* 上的相對突變對 *fnrS* 調控的影響。

1. 蛋白質粗萃取

【方法】

- 接種目標微生物至 LB 培養液，於恆溫培養箱震盪隔夜培養菌體。

- b. 以 1:100 依比例稀釋至 3 mL 新鮮培養基，重新震盪培養至特定生長條件，並適時添加誘導物質。
- c. 測量菌液的 OD₆₀₀ 吸光度，並記錄。
- d. 取 1 mL 菌液於微量離心管，離心 13,000 rpm/3 min，去除上清液。
- e. 以 1 mL 蒸餾水清洗菌體，離心 13,000 rpm/3 min，去除上清液。
- f. 重複步驟 (e.) 一次，並徹底清除上清液。
- g. 加入 50 μ L 的 2 XE 液，乾浴 100°C/10 min。
- h. 冰浴/3 min，得到含粗萃蛋白的 SDS-PAGE 樣品溶液。

【試劑】

2xSDS 電泳樣品緩衝液

10% SDS	20 mL
Glycerol	10 mL
β -mercaptoethanol	5 mL
1M Tris-HCl (pH 6.8)	6.25 mL
Bromophenol blue	1.25 mL
ddH ₂ O	至 50 mL
室溫保存。	50 mL

2. 蛋白質膠體電泳分析 (SDS-PAGE)

【方法】

- a. 定量，取約含等量菌數（由 OD₆₀₀ 吸光度換算）之含粗萃蛋白的 SDS-PAGE 樣品溶液於特定濃度之 SDS-PAGE 進行蛋白質電泳。
- b. 以 100 volt/20 min，直到所有樣品落於同一起始位置。
- c. 以 120volt/75 - 80 min，利用蛋白質 maker 觀察目標蛋白質位置。

【試劑】

5x 膠體電泳緩衝液

Tris base	15 g
-----------	------

Glycine	72 g
SDS	5 g
ddH ₂ O	至 1 L
使用時稀釋至 1x，室溫保存。	1 L

3. 蛋白質轉印 (transfer)

【方法】

- 利用 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) 將蛋白質由 SDS-PAGE 膠片轉印至 nitrocellulose membrane (Amersham) 上固定。
- 裁減大小與 SDS-PAGE 膠片相似之 HATF 濾膜 (Hybridization Nitrocellulose Filter, Millipore)，3 mm 濾紙六張，與兩片海綿分別浸泡於轉印緩衝液中平衡。
- 取出轉印用夾板，黑色面至於下方，依序放上一片海綿，三張濾紙，SDS-PAGE 膠片，HATF 濾膜 (放上膠片及濾膜後皆須將氣泡趕出)，三張濾紙以及一片海綿；闔上夾板並卡緊，放入轉印槽中 (夾板與轉印槽之黑色面對黑色面)。
 - ✓ 以上步驟均需配戴手套進行操作。
- 以 400 mA/90 min，每 15 min 更換一次融化之冰塊，確保避免因轉漬溫度過高而產生的氣泡。

【試劑】

轉印緩衝液 (Transfer buffer)

Tris base	3.03 g
Glycine	14.4 g
Methanol	200 mL
10% SDS	5 mL
ddH ₂ O	至 1 L
室溫保存。	1 L

4. 雜交反應 (hybridization)

【方法】

- a. 將轉印後的轉漬膜以 PBS 潤濕後，置入 blocking reagent 中，於室溫下搖洗反應一小時或者置於 4°C 冰箱中反應隔夜。
- b. 將轉漬膜於室溫下以 PBST 洗三次，第一次 15 分鐘；第二、三次洗 5 分鐘。
- c. 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，進行雜交。
- d. 將轉漬膜以 PBST 於室溫下洗三次，第一次 15 分鐘；第二、三次洗 5 分鐘，以去除非專一性雜交訊號。
- e. 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。
- f. 將轉漬膜以 PBST 於室溫下洗三次，第一次 15 分鐘；第二、三次洗 5 分鐘，以去除非專一性雜交訊號。

【試劑】

10xPBS

Na ₂ HPO ₄	57.25 g
NaH ₂ PO ₄	14.8 g
NaCl	29.2 g
ddH ₂ O	至 500 mL
<hr/>	
使用時稀釋至 1x，室溫保存。	500 mL

PBST

PBS	1 L
Tween-20	0.8 mL
<hr/>	
室溫保存	1 L

Blocking reagent

PBST	10 mL
脫脂奶粉	0.7 g
需要時現配使用。	10 mL

5. 雜交訊號的偵測 (detection)

本試驗使用 Hybond ECL (Amersham) 套組進行雜交訊號的偵測。訊號產生的原理為：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 (HyperfilmTM MP, Amersham) 於暗室中顯影，以偵測雜交訊號。

【方法】

- 取相同體積之 Solution I 及 Solution II 分別置於試管中（每片轉漬膜約各需 1.5 ml 的 Solution I 及 Solution II）。
- 取保鮮膜置於壓片盒上，將轉漬膜上的 PBST 滴乾，平鋪於保鮮膜上，然後將 Solution I 及 Solution II 混合成 detection reagent，靜置反應一分鐘。
- 將 detection reagent 以滴管均勻滴灑於轉漬膜上再覆以保鮮膜。
- 以下步驟於暗房中操作。將 autoradiography film 置於轉漬膜上，顯影 15 秒（顯影時間視訊號強弱決定）。
- 將顯影後的底片（autoradiography film），置於顯影劑中顯影，顯影時間視訊號強弱而定。
- 以水潤洗除去底片上的顯影劑，水滴乾後，再將底片置於定影劑中定影。
- 以水潤洗除去定影劑，將底片晾乾保存。

(七) RNA表現分析

1. RNA之萃取

【方法】

- a. 接種欲製備之目標微生物至培養液，於恆溫培養箱震盪隔夜培養菌體。
- b. 以 1:100 之比例將隔夜培養菌液稀釋至 100 mL 培養液中，重新震盪培養至 OD₆₀₀ 吸光質為 0.3-0.5。
- c. 以 12,000 rpm 於 4°C 離心 2 分鐘，收集 10 mL 菌液於離心管，去除上清液。
- d. 將菌體懸浮於 1 mL lysis buffer (65°C 預熱) 中，震盪混合均勻。
- e. 加入等體積 (1 mL) acid phenol (65°C 預熱)，震盪混合均勻。
- f. 將 lysis buffer 及 acid phenol 的混合液分裝至兩個微量離心管。
- g. 12,000 rpm，4°C，離心 10 分鐘，將上清液吸至新的微量離心管。
- h. 重複步驟 (f.) 及 (g.) 三次。
- i. 加入 2.5 倍純酒精，及 0.1 倍體積 3M NaOAc，置於-80°C 下靜置隔夜，沈澱 RNA。
- j. 以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，棄上清。
- k. 以 75 % 酒精 0.5mL 清洗 RNA，再以 12,000 rpm 離心 5 分鐘，棄上清。
- l. 重複步驟 (k.) 一次。
- m. 室溫下風乾，以 100 μ L DEPC - ddH₂O 溶解 RNA
- n. 以 OD₂₆₀ 測 RNA 濃度，並儲存於-80°C。

【試劑】

Acid-phenol (Amersco,USA,購自波仕特)

Lysis buffer

Sucrose	0.15M
Sodium acetate pH4.5	0.01M
SDS	1%

滅菌後常溫保存

DEPC-ddH₂O

二次水於 0.1 % DEPC (diethylpyrocarbonate) 靜置隔夜或 37°C 1hr 後，滅菌。

2. RT-PCR (Taigene)

【反應物組成】

10 x RT mix	1 μ L
dNTP	1 μ L
RT primer (10 mM)	2 μ L
Transcriptase	0.5 μ L
RNA (2 μ g) + RNase-free H ₂ O	5.5 μ L
37°C，PCR 槽反應 60 min	10 μ L

3. One-Step RT-PCR (Yeastern biotech)

【反應物組成】

2 x one step RT-PCR premix	12.5 μ L
5 μ M Forward primer (5')	2.5 μ L
5 μ M Reversed primer (3')	2.5 μ L
Template RNA+ RNase free water	7.5 μ L
Total	25 μ L

【PCR 反應條件】

- 48°C : 37 min。
- 95°C : 10 min。
- 94°C (denaturation) : 0.5 min。
- 55°C (annealing) : 0.5 min。
- 72°C (extension) : 1 min。
- 重複步驟 (c.)、(d.)、(e.) 共 35-40 個循環。

4. Quantitative RT-PCR (ABI)

【反應物組成】

SYBR Master mix	10 μ L
5 μ M Forward primer (5')	1.2 μ L
5 μ M Reversed primer (3')	1.2 μ L
Template cDNA (1-10ng) + RNase free water	7.6 μ L
Total	20 μ L

【PCR 反應條件】

- 95°C : 10 min。
- 95°C : 15 s。
- 60°C : 1 min。
- 重複步驟 (b.)、(c.) 共 40 個循環。



三、結果

本研究以基因組與沙門氏菌接近之模式微生物大腸桿菌 (*Escherichia coli*, MG1655) 作為研究之表現宿主，探討沙門氏菌 (*Salmonella* Typhimurium LT2) 中之 *fnrS* 與 *metE* 之間的調控關係。首先，以沙門氏菌之染色體 DNA 作為模板，建構帶有 *metE* 基因啟動子與 *lacZ* 報導基因之融合菌株。接著，利用帶有 P_{BAD} 啟動子的 pBAD33 作為載體，建立 *metE* 基因選殖質體，並以轉形作用送至宿主微生物。以上述兩套系統作為偵測 *metE* 之表現工具，並以兩方面進行試驗分析；建構 *fnrS* 及相關調節因子之缺失菌株 (knockout strain)，於有氧及厭氧培養下，觀察不同相關因子的突變菌株彼此間 *metE* 基因之表現差異。並以帶有 P_{lac} 啟動子之 pBRIac 作為載體，建立 FnrS、FnrS 結構突變基因以及 FnrS 預測結合至 *metE* 之點突變基因的選殖質體，觀察大量表現 *fnrS* 及突變系列質體之下，對 *metE* 調控的影響，並利用 *metE* 基因上相對應之突變基因選殖載體，確認 *metE*-mRNA/*fnrS* 互補關係。

(一) *metE::lacZ* 融合基因於 λ RS45 中之表現

為了監測 *Salmonella* Typhimurium *metE* 基因在宿主菌株中的表現，建構了 *metE* 與報導基因 *lacZ* 的轉錄 (operon fusion, op) 及轉譯 (protein fusion, pr) 融合菌株。以 PCR 方式擴增 *metE* 之啟動子序列，並利用一般性 DNA 選殖方式將片段轉殖至 pRS415 及 pRS414 之 *lacZ* 基因之前，使得 *metE* 基因之啟動子控制 *lacZ* 的表現 (圖一)。所建構好的兩組質體分別為 pRS415-*metE* 5'-UTR::*lacZ* (op) 及 pRS414-*metE* 5'-UTR::*lacZ* (pr)，接著利用 λ RS45 嗜菌體及藍白篩選法製備帶有 *metE* 5'端未轉譯區域之 λ RS45 *metE* 5'-UTR::*lacZ* 溶胞產物 (lysate)，以此溶胞產物感染表現 菌株 DJ480 (Δ *lacX74*)，並純化出

溶原菌 (lysogen) 得到菌株 : DJ480 λ *metE::lacZ* (op) 以及 DJ480 λ *metE::lacZ* (pr)。而後，為避免宿主染色體上之 *metE* 干擾選殖質體之 *metE* 基因表現，利用 P1 嗜菌體進行一般性轉導作用，使宿主菌株染色體上之 *metE* 基因剔除，並置換為 kanamycin 抗性基因，最後利用帶有 FLP 酵素之質體 pCP20 將抗性基因剔除，得到 *metE* 缺失株 : DJ480 λ *metE::lacZ* Δ *metE* (op) 以及 DJ480 λ *metE::lacZ* Δ *metE* (pr)，分別利用上述 *metE*⁺ 及 *metE* 的菌株建構成 operon fusion 及 protein fusion 系列試驗之野生株，再分別以相同方法建立兩個系統下 *fnrS* 及其相關因子的缺失菌株，包含 FNR 及 Hfq (Δ *fnrS*、 Δ *fnr* 及 Δ *hfq*)，還有 *fnrS* 與之的雙重缺失菌株 (Δ *fnrS* Δ *fnr*、 Δ *fnrS* Δ *hfq*)。

觀察 *metE::lacZ* 基因表現，利用 *lacZ* 基因產物 β -galactosidase 活性來偵測 MetE 之表現趨勢，將所得之活性分析結果以活性值及不同的樣品為座標，劃出趨勢圖表示。整體試驗結果顯示，轉錄融合菌株 (圖三 B) 所得之基因表現量較轉譯融合菌株稍高 (圖三 A)。儘管如此，兩者於不同菌株間的 β -galactosidase 活性差異類似，指出此兩種融合菌株 *metE::lacZ* 基因具有相似的表現趨勢。

(二) FnrS對*metE::lacZ*表現之影響

欲瞭解 *fnrS* 與 *metE* 之間的關係，以 *metE* 與報導基因 *lacZ* 之轉錄及轉譯融合菌株做為野生株 (wild-type)，並與個別之 *fnrS* 缺失菌株 (Δ *fnrS*) 在氧氣轉換以及不同時間點下進行培養，利用 β -galactosidase 試驗分析 *metE::lacZ* 之表現，探討 *fnrS* 與 *metE* 之間的調控作用。

首先，將野生株與 *fnrS* 缺失株接種於 LB 培養基，震盪培養於 37°C 恆溫培養箱，監控菌體生長直到 OD₆₀₀ 值達 0.4 (initial logarithmic growth phase)。接著，將菌液分裝置多管微量離心管，將菌液填滿整個容器，並以離心方式

收集菌體，再以新鮮培養基重新懸浮菌體，同樣將整個容器填滿，以封口膜纏繞閉口處，以直立放置法於 37°C 恆溫培養箱靜置培養，期間避免搖晃，待培養基內微量氧氣被耗盡後即達厭氧狀態。將靜置開始設定為 0 分鐘，厭氧培養分別於每 30 分鐘收集樣品菌液，至第 180 分鐘進行一組氧氣轉換對照組，以新鮮培養基重新震盪培養 30 分鐘。

觀察整體 *metE::lacZ* 基因表現 (圖三)， β -galactosidase 活性皆小於 100，顯示其於 LB 培養下表現受到壓抑。試驗將 0 分鐘視為轉換起始之有氧培養對照組，偵測到隨著厭氧時間增長，*fnrS* 缺失株之 *metE::lacZ* 基因表現逐漸上升；於正向控制株中之表現亦受到誘導而緩慢上升，但漸漸趨於平緩。於第 180 分鐘轉換有氧培養 30 分鐘的有氧對照組，無論缺失株及控制株皆觀察到 *metE::lacZ* 表現呈現下降的趨勢。整體顯示，*metE* 本身於 LB 培養下受到表現壓抑，而於進入厭氧狀態時，受到其他因子誘導表現。

此外，觀察野生株與 *fnrS* 缺失株彼此之間 *metE::lacZ* 基因表現差異。結果顯示，於 0 分鐘之有氧培養對照組下，此二菌株表現量沒有顯著差別。然而，轉譯融合株系列於第 120 分鐘厭氧培養開始，於 *fnrS* 缺失株有接近 2 倍高於野生株的表現差異。轉錄融合株則於第 180 分鐘以後也觀察到相似的表現情形。最後，觀察厭氧轉換有氧培養之對照組，比較同一菌株之厭氧培養 210 分鐘之活性差異，*fnrS* 缺失情況下，於轉譯及轉錄融合菌株 *metE::lacZ*，分別有 2 倍及 1.7 倍大於野生株差異值。試驗結果顯示 *metE* 本身於厭氧狀態受到誘導表現，然而隨著厭氧培養時間增長，於 *fnrS* 缺失株與野生株間的表現差異，以及分別於有氧及厭氧狀態下，菌株自身的表現量差異，觀察到 *fnrS* 存在時，於厭氧狀態，對 *metE* 基因產生抑制作用。

(三) FnrS相關調控因子對*metE::lacZ*表現之影響

據研究指出，FNR 在限制培養基 (minimal medium) 中以未知機制負向調控 *metE* 基因表現。並於大腸桿菌中的相關研究指出，FNR 於厭氧狀態下對目標基因的調節主要是利用 *fnrS* 作為媒介，並以試驗證明 *fnrS* 所進行之調控作用與 RNA 伴隨蛋白 Hfq 關係密切，多個例子顯示 Hfq 能在 *fnrS* 調控目標基因中扮演輔助角色 (Waters and Storz, 2009)。

欲更深入探討 *Salmonella* Typhimurium LT2 之 *fnrS* 與 *metE* 之間的調控關係，為了避免染色體之 *metE* 干擾，利用轉譯融合的 *metE* 缺失菌株 (DJ480 λ *metE::lacZ* Δ *metE*, pr) 作為正向控制株，並建構為 *fnrS* 及相關基因之缺失株 (Δ *metE* Δ *fnrS*、 Δ *metE* Δ *fnr*、 Δ *metE* Δ *hfq*)，以及 *fnrS* 與相關基因之雙重缺失株 (Δ *metE* Δ *fnrS* Δ *fnr*、 Δ *metE* Δ *fnrS* Δ *hfq*)。厭氧條件試驗分別於豐富培養基 (LB) 及添加 80 μ g/mL L-methionine 之限制培養基 (M63 salts，以 0.4% glucose 作為碳源) 培養，將菌體於厭氧靜置培養隔夜後，以 1:100 之比例稀釋培養於微量離心管，將其以新鮮培養基重新填滿並以封口膜密封，分別進行 120 分鐘及 24 小時的靜置培養，並另外收集有氧培養下同樣生長時期之菌體，作為氧氣存在之對試驗對照組，進行 β -galactosidase 試驗，偵測 *metE::lacZ* 基因於不同缺失株與野生株間的表現差異。

首先，於 LB 培養基培養下，比較以有氧轉換培養至厭氧 120 分鐘的試驗數據 (圖 1A)，以及厭氧培養培養 120 分鐘的結果 (圖四 A) 中 *fnrS* 缺失株與個別之野生株 (分別為 *metE*⁺ 及 *metE*⁻ 菌株)，因為培養條件的差異，造成 *metE* 系列菌株 OD₆₀₀ 及整體表現量較低；然而，皆觀察到 *fnrS* 的缺失造成表現量上升接近兩倍的情形；於 LB 培養基培養當中 (圖四 A)，比較個別菌株自身於有氧、厭氧 120 分鐘及厭氧 24 小時 *metE::lacZ* 之表現，皆顯示，所有菌株皆隨厭氧培養時間增長，表現量逐漸上升；其中，正向控制株於厭氧 120 分鐘

培養，表現量為有氧培養的二倍，之後的表現量即開始趨緩，*fnrS* 及 *fnr* 缺失株則很顯著的以倍數持續上升；*hfq* 的缺失造成相同試驗條件下生長較慢，而表現量極低，但仍於厭氧第 24 小時升高。另外，於厭氧條件下，觀察 *fnrS* 及 *fnr* 缺失株與正向控制株間 *metE::lacZ* 的表現差異，當進入厭氧 24 小時培養時，差異趨勢更為顯著；而 *hfq* 的缺失造成持續偏低的表現量，使得表現值無論在有氧或無氧狀態下皆相對低落，在 *fnrS*、*hfq* 雙重缺失菌株下，也不容易觀察到此雙突變基因對 *metE* 調控的影響；然而，隨著厭氧培養時間增長，*hfq* 缺失株生長之 OD₆₀₀ 值逐漸升高，逐漸可以觀察到 *fnrS*、*hfq* 雙重缺失株的表現量逐漸高於 *hfq* 缺失株，顯示 *fnrS* 的缺失造成 *metE* 之表現影響。

而於 GM+L-met 培養基中厭氧培養 120 分鐘 (圖四 B)，觀察到 *metE* 系列菌株因為 *fnrS* 缺失有四倍高於正向控制株之表現差異。顯示染色體上之 *metE* 對菌株間 *metE::lacZ* 的表現差異沒有影響，且無論於 LB 或 GM+L-met 培養基於厭氧培養皆能觀察到 *fnrS* 的缺失造成表現量高於其相對應之野生株的情形。

其次，於 GM+L-met 添加養基培養 (圖四 B)，觀察 *metE::lacZ* 於相關 *fnrS* 缺失菌株與正向控制株間的表現差異不甚明顯。然而，於厭氧培養時，野生株之 *metE::lacZ* 基因表現量明顯受到壓抑，而 *fnrS* 缺失株、*fnr* 缺失株以及 *fnrS*、*fnr* 雙重缺失株則呈現與有氧培養下類似的高表現值，並發現 *fnr* 的缺失與 *fnrS* 缺失有類似的表現量。另外，*hfq* 的缺失，於厭氧培養時，*hfq* 缺失株與野生株皆有高於有氧培養達四倍的表現量，而 *fnrS*、*hfq* 雙重缺失的表現約只有三倍左右差距，顯示厭氧培養下，*fnrS* 對 *metE* 基因表現具有影響。

試驗結果顯示，無論培養於 LB 或是 GM+L-met 培養基，進行厭氧培養，*fnrS* 與 *fnr* 的缺失能觀察到類似之 *metE::lacZ* 表現，相較之下野生型 *metE::lacZ* 表現受到壓抑，顯示 *fnrS* 與 FNR 間對 *metE* 負向調節的關係；*hfq* 的缺失造成 *metE::lacZ* 整體基因表現受到抑制，僅於較長時間培養或於 GM+L-met 培養基

下觀察到較明顯之 *fnrS* 缺失對 *metE* 基因的負向調控作用。

(四) FnrS及相關因子FNR、Hfq缺失株之生長曲線測試

欲探討 *hfq* 的缺失造成的影響，進行正向控制株與 FnrS 相關基因缺失株的生長曲線測試。於豐富培養基下培養，根據大腸桿菌之細胞分裂時間，設計以每 30 分鐘進行菌液收集，以 OD₆₀₀ 偵測不同時間點各個菌株之吸光值，各個菌株從延遲時期 (lag growth phase) 進入對數生長期 (log growth phase)，直到偵測至穩定生長期 (stationary growth phase)。

結果顯示 (圖五)，*fnrS*、*fnr* 以及 *fnrS*、*fnr* 雙重缺失株的生長曲線類似於正向控制株，在相似的時間進入對數生長時期；*hfq* 及 *fnrS*、*hfq* 雙重缺失株則觀察到較長的延遲生長期，進入對數生長期所需的時間明顯的較正向控制株長，然而，在對數生長期後仍可以與其他菌株一樣，進入穩定的生長期。

(五) MetE基因蛋白質分析之表現

將 pBAD33-5'-UTR-*metE*-HA 轉形至各個缺失菌株與野生株，以 0.02% 阿拉伯糖進行 *metE* 基因誘導表現，利用西方轉漬法進行試驗分析，觀察 FnrS 及其相關因子缺失時對 *metE* 基因之蛋白質表現情形。

結果顯示 (圖六)，於有氧狀態下正向控制株與 *fnrS* 相關基因缺株的表現情形趨於相似；然而，以厭氧狀態培養後進行試驗分析，觀察到相較於 *fnrS*、*fnr* 及兩者之雙重缺失株，正向控制株明顯受到壓抑；特別的是，*hfq* 的缺失造成了類似於 *fnrS* 缺失之 *metE* 蛋白表現情形，顯示在厭氧長時間的培養之下，*hfq* 的缺失會影響 FnrS 調控 *metE* 之表現情形。

(六) *metE::lacZ* 基因之 RNA 於野生株及突變株之測試

根據上述結果，欲更深入探討 FnrS 調控 *metE* 基因表現之現象，利用萃取於 LB 培養下菌體之總 RNA (total RNA)，進行 RNA 的試驗分析。透過定量反轉錄 PCR (RT-PCR) 分析相對應之 cDNA 基因之表現，利用一步反應之反轉錄 PCR 試驗 (One-step RT-PCR) 以及及時定量反轉錄 PCR (quantitative RT-PCR) 進行 cDNA 之定量。試驗以於大腸桿菌中穩定表現之基因 *rrsA* 作為內生性控制組，偵測 *metE::lacZ* 融合菌株之 RNA 表現情形，以瓊脂膠體電泳觀察 PCR 增幅結果；另外，以 sybr green 作為螢光染劑，及時定量 *metE::lacZ* 基因表現量，藉由與 *rrsA* (16sRNA) 所得之試驗結果進行相對定量公式換算得到 *fnrS* 對 *metE* 具有負向調節的試驗結果。

結果顯示 (圖七 B)，於 250 ng RNA 之濃度下，以 One-Step ART-PCR 進行 35 個循環放大，以 2% 瓊脂膠體作為試驗分析工具，觀察到同 β -galactosidase 試驗之相似的表現結果 (圖七 A)；另外 (圖七 C)，分別在 1 ng 及 10 ng 皆觀察到 *fnrS* 缺失對 FnrS 於厭氧狀態下負調控 *metE* 之表現。

(七) FnrS 之不同區域對 *metE* 表現之影響

於 2010 年 Durand 及 Storz 的研究指出，FnrS 之二級結構能形成三個莖環構造 (stem-loop)，自轉錄起始點開始，依序命名為 loop 1、loop 2 及 loop 3 (圖二)。因此，本研究利用 *Salmonella* Typhimurium LT2 萃取所得之染色體 DNA 為模板，並以帶有 P_{lac} 啟動子之質體 pBRLac 作為選殖載體。試驗首先以 PCR 方式增幅 FnrS 片段，並將選殖基因片段接合至載體 P_{lac} 啟動子之後，得到選殖質體 pBRLac-FnrS、pBRLac-FnrS Δ loop 3 及 pBRLac-FnrS Δ loop 2-3，並藉由轉形作用將質體引入 Δ *fnrS* 缺失株。將菌體培養至對數生長期，以 1mM IPTG

為最終濃度，誘導基因表現 30 分鐘，並藉由 β -galactosidase 試驗，探討 FnrS 不同區域對於調控 *metE* 基因表現的影響。

結果顯示（圖八），以 1mM IPTG 大量誘導 FnrS 全長基因表現 (pBRlac-FnrS)，所得表現量與控制組 (pBRlac) 比較，顯著的觀察到 *fnrS* 對 *metE* 基因之抑制作用；然而，無論 FnrS 去除結構中之 loop 3 或 loop 2-3，並以同樣條件大量誘導表現時，無法有效地抑制 *metE::lacZ* 基因表現量。

(八) FnrS 鹼基配對至 *metE* 基因 5' 端未轉譯區域

研究指出，FnrS 能藉由鹼基配對 (base-pairing) 機制對目標基因進行調控作用，並藉由相關研究指出其二級結構中 loop 1-loop 2 之間的序列為與目標基因鹼基配對的主要區域，並利用 FnrS 上三個突變位置確認與不同目標基因進行配對之重要鹼基 (Boysen *et al.*, 2010)。於湛 (2010) 之研究顯示，沙門氏菌 *metE* 5' 端未轉譯區域對 *metE* 之表現調控是重要的。

首先利用軟體 *TargetRNA* program (Tjaden *et al.*, 2006) 進行 FnrS 與 *metE* 之鹼基配對預測 (圖九 A)。根據預測配對的結果，顯示 FnrS loop 1-loop 2 之間的序列與 *metE* 轉譯起始碼附近的區域具有互補關係，以起始密碼子向 5' 端約 -27 的未轉譯區域，以及向 3' 端約 13 個鹼基延伸的位置有互補的情形。因此，利用 pBRlac 作為載體，建立不同的 FnrS 點突變基因選殖質體，包含引用前人所設計之三個突變位置 (FnrS I、II、III)，以及三個於 FnrS 二級結構 loop 1-loop 2 之間的突變 (FnrS 41、43、54)。其中，FnrS I、II 與預測配對結果位置重複，而 FnrS 41 及 FnrS 43 為 FnrS III 突變點相對於預測配對結果上的位置；另外，FnrS 54 為預測配對至 *metE* SD 序列的點突變。藉由轉形作用將質體引入 *fnrS* 缺失株。將菌體培養至對數生長期，以 1mM IPTG 為最終濃度，誘導基因表現 30 分鐘，並藉由 β -galactosidase 活性觀察 *metE::lacZ*

基因之表現。

結果顯示 (圖九 B、C)，於 loop1-loop2 之間的兩個突變位置對 (FnrS II 及 FnrS54) 於 *fnrS* 與 *metE* 之間的負向調控表現產生顯著影響，並於 *metE* 上建立互補菌株 (DJ480 λ *metE*-2::*lacZ* 及 DJ480 λ *metE*-54::*lacZ*) 觀察到互補突變，可恢復 *metE* 受到調控之觀察 (圖十)。



四、討論

過去研究指出，*metE* 基因於限制培養基培養下，當厭氧環境轉換為有氧培養時，其表現量會上升，成為細胞內豐富的蛋白質之一 (Gyaneshwar *et al.*, 2005; Smith and Neidhardt, 1983)，且 methionine 由於具有含硫的側鏈結構，對活性氧化物敏感，易受攻擊而被氧化 (Hoshi and Heinemann, 2001)；於氧化壓力下，可藉由 MetE 蛋白質結構中特定位置的氧化而失活，間接造成 methionine 缺乏 (Hondorp and Matthews, 2009)；另外，提出 methionine 合成受到氧化壓力及氮化壓力的損傷 (Flatley *et al.*, 2005)，並於轉換至有氧條件時與 methionine 還原相關的基因表現量增加，輔助 methionine 易受到氧化的狀態 (Partridge *et al.*, 2006)；此外，於大腸桿菌的研究顯示，FNR 透過未知機制調控 *metE* 表現 (Constantinidou *et al.*, 2006)，而近年，則發現大腸桿菌於厭氧培養下，FnrS 的存在會抑制 *metE* 之表現量；反之，當 FnrS 被剔除，*metE* 之表現量則會增加 (Boysen *et al.*, 2010)；Pullan 等人 (2007) 也發現存在 NO 時，會影響 FNR 的活性，進而影響其所調控的基因表現。

本研究顯示在限制培養基 (GM)，觀察到經由稀釋培養將菌體培養至對數生長期，偵測到 *metE* 基因具有很高的表現量。然而此時測試厭氧狀態下 *fnrS* 對於 *metE* 的調控作用，並不顯著。此結果暗示，於缺乏 methionine 之情況下，*metE* 的表現較不受 *fnrS* 的調控；然而，在 LB 培養基下，雖然 *metE* 基因表現量因含有豐富 methionine 的影響，受到 MetJ (transcriptional repressor) 轉錄因子調控，造成表現受到壓抑，但當轉換為厭氧環境時，卻逐漸具有表現量上升的趨勢，並且顯著地觀察到 *fnrS* 的缺失造成 *metE* 基因表現量上升的調控作用。因此，於限制培養基下添加 L-methionine，造成 *metE* 基因表現量較無添加降低許多，但還是較於 LB 培養基下 *metE* 基因的表現量高；然而，在此狀態下轉換厭氧培養，即觀察到如同 LB 培養基下 *fnrS* 對 *metE* 基因負調控的影響。

於限制培養基中添加 L-methionine, *metE* 基因表現仍然高於 LB 培養基, 顯示, 仍有其他因子造成 *metE* 基因影響。其中, methionine 生成需要其他胺基酸作為輔助原料。因此, LB 培養基較添加 L-methionine 之 GM 培養基, 更有利於提供更多 methionine 及其他需要之營養源, 造成 *metE* 表現量更為壓抑; 此外, Durand 及 Storz (2010) 於 *fnrS* 的調控作用顯示, 當厭氧轉換為有氧, *fnrS* 的表現呈現下降, 但仍然可偵測得到微量, 然而對目標基因的調控作用即受到影響, 顯示 *fnrS* 之存在量與調控目標基因亦是具有相關聯。而另一方面, 於限制培養基(GM)條件下, 細菌急需合成 methionine 以補不足, 因而促使 *metE* 基因大量表現, 使得觀察到 *fnrS* 的調控作用並不顯著。

同時, 相對的亦觀察到於 LB 培養基內隨著厭氧培養增加, *metE* 基因的表現量隨之上升, 顯示其中亦存在其他因子誘導其基因表現。Trotter 等人 (2011) 於微氧 (micro-aerobic condition) 代謝之路徑, 提出丙酮酸 (pyruvate) 的代謝由 PFL 酵素所催化, 而此 PFL 酵素是於厭氧狀態下經 SAM 做為活化因子而轉變為活化態酵素, 促使 SAM 的消耗, 而 SAM 為 MetJ 之輔抑制因子 (corepressor factor), 在 SAM 含量下降的情況下導致 MetJ 的影響, 可能進而幫助 *metE* 表現提升。在轉錄階層的測試也觀察到 MetK (SAM synthetase) 表現量較 MetJ (transcriptional repressor) 於厭氧狀態下, 高於有氧的表現 (Partridge *et al.*, 2006)。此外, 也認為厭氧狀態下, 經由氮化壓力, 造成 FNR 受損, 推測因而開啟一些特定基因於, 並於厭氧狀態下促使 methionine 損傷 (Pullan *et al.*, 2007), 而間接造成 *metE* 表現量上升的趨勢。本研究於厭氧下 *fnrS* 及 FNR 缺失下, *metE* 基因表現上升非常明顯; 反之, 野生株之 *metE* 表現於有氧下轉換至厭氧, 隨厭氧培養時間逐漸上升, 呈現較緩慢的上升, 顯示 *metE* 基因於 LB 培養基下進行厭氧培養, 會受到其他因子誘導表現; 然而, 藉由於添加 L-methionine 的限制培養基 (GM) 培養下, 觀察到 *fnrS* 及 FNR 缺失菌株等厭氧調控蛋白不存在時, 基因無法被關閉, 在此較單一的環境下, 觀察到

有氧、厭氧表現量類似。因此，於厭氧條件下，*metE* 還是受到以 FNR 為首的厭氧調控蛋白，經由 *fnrS* 調節的抑制作用；也顯示，前人於厭氧轉換有氧培養時，*metE* 基因表現量迅速的上升 (Partridge *et al.*, 2006)，可能來自於 *fnrS* 於厭氧狀態下的調控作用。

綜合上述，藉由不同生理狀態微生物對 methionine 之需求，促使 *metE* 基因表現的差異，也顯示 FNR 於氧氣轉換間的重要性 (Kang *et al.*, 2005)。反之，於厭氧狀態，微生物是否對 methionine 需求較低，且 methionine 於體內之合成需要耗費能量較高，因此，於厭氧狀態下，微生物可能需要開啟合適的低耗能代謝模式，以平衡體內生存所需，使得 FNR 在厭氧下藉由 *fnrS* 將 *metE* 暫時關閉，以適應厭氧生存條件，顯示 *fnrS* 於厭氧狀態下抑制 *metE* 之意義。

目前已知，*fnrS* 調控目標基因於後轉錄階層的調控作用：包括造成目標 mRNA 因為無法順利轉譯而降解，或是直接影響 mRNA 的穩定，也提出 sRNA 主要是藉由鹼基配對機制對目標基因進行調控 (Waters and Storz, 2009)；Durand 及 Storz (2010) 於大腸桿菌 *fnrS* 突變基因對目標基因調控的試驗得知，點突變多少會對 *fnrS* 自身穩定性有影響，然而，應用於其同一標的基因的調控，還是具有調節活性，因此，更確立鹼基配對的存在。本研究觀察到的預測互補以及點突變試驗也經由互補試驗觀察到回復互補的情形，因此，確定點突變與 *fnrS* 調控 *metE* 基因的重要性。經由本研究發現 *fnrS* 與 *metE* 5'端之間的關係，涉及到 *metE* 核糖體結合位，且於 RT-PCR 試驗觀察到調控情形。然而，仍需藉由於不同時間點下進行 *fnrS* 半衰期的測試才能確認其真正作用之方式。

本試驗觀察到 *fnrS* 自身結構若損失 (Δ loop3) 造成負調控 *metE* 的情形明顯受到影響，然而，根據湛 (2010) 及本研究證實，其影響目標基因調控作用主要是藉由 loop1-2 的區域 (Durand and Storz, 2010)。顯示，結構不完整對 *fnrS* 自身穩定性可能相關，並導致其半衰期降低，造成調控目標基因的不完全。

另外，Boysen 等人 (2010) 於半衰期的試驗指出，*fnrS*，於野生株厭氧培養、Hfq 缺失株、轉換為有氧培養及於質體上被大量誘導其表現之半衰期分別測得為 100 分鐘、6 分鐘、2.5 分鐘及 3.2 分鐘。綜合於本試驗，欲觀察到 *metE* 基因於厭氧狀態下受到 *fnrS* 調控至少須達 120 分鐘厭氧培養，認為厭氧條件屬於自然消耗氧氣的方式。相較文獻中之較嚴苛厭氧生存條件，本試驗欲觀察到類似的調控機制需要較長的時間；於 Hfq 缺失下，觀察到 Hfq 對於 *fnrS* 調控 *metE* 機制之影響需於長時間培養後觀察，於較短時間的培養，Hfq 的缺失造成 *metE* 基因表現量偏低且生長延遲的現象，研究指稱 Hfq 對微生物具有多種功能，因此，當缺失下，微生物生長遲滯，另外也推測 Hfq 對於 *metE* 基因具有其他正向調控作用；而於厭氧環境轉換為有氧 30 分鐘的表現，本研究觀察到 *metE* 基因表現量受到 LB 豐富培養基之影響而有下降趨勢，且 *fnrS* 缺失株與野生株表現雖有縮小趨勢，然而仍有差距，顯示前人雖於有氧下 *fnrS* 半衰期只有不到 2.5 分鐘；然而，由於試驗在厭氧環境下的控制不同，且 *metE* 基因所轉錄出訊息 RNA 具有較長且可形成二級結構的 5'端，屬於較穩定之 mRNA (湛，2010)，且為 *fnrS* 於氧氣轉換間偵測的調控對象。因此，此二菌株差異的趨勢尚未完全達到該有的平衡狀態；另外，雖於誘導 20 分鐘，大量表現 *fnrS* 試驗之半衰期為 3.2 分鐘；本試驗於大量表現 *fnrS* 表現以 1 mM IPTG 持續誘導基因表現 30 分鐘，於 β -galactosidase 活性觀察到受到顯著抑制的情形，仍能顯示觀察到 *metE* 基因受到壓抑的表現。

五、結論

本研究透過 β -galactosidase 試驗及西方轉漬法試驗，證實在腸道菌中具有保守性的 sRNA-*fnrS* 與 *Salmonella* Typhimurium LT2 之 *metE* 基因具有負向調控的關係，藉由其相關的調節蛋白 FNR 及 Hfq 促使 *metE* 基因間接負向調節的表現結果，輔助理解 *fnrS* 於厭氧狀態下對 *metE* 基因的調控。

由 *fnrS* 結構缺失及鹼基配對試驗指出，結構的完整對於 *fnrS* 調控 *metE* 是必要的，且 *metE* SD 序列的位置對 *fnrS* 結合是重要的；而 RT-PCR 的試驗亦呈現 *fnrS* 與 *metE* 之間於厭氧狀態下的負向調控關係；推論，兩者之間的差異可能來自於轉譯階層或後轉錄階層的調控，可藉由更深入之 *fnrS* 與 *metE* 基因之半衰期測試，確認其調控機制。另外，由於 *fnrS* 調控 *metE* 是透過鹼基配對的機制，當細胞內 *fnrS* 含量有限，則無法及時對大量的 *metE* 有效的抑制，試驗結果顯示，FnrS 調控 *metE* 的試驗，於自然狀況下，需在 *metE* 需求不大時，才能觀察到較顯著的調控。最後，觀察到 *metE* 基因本身於 LB 及 GM 添加 L-methionine 下之表現差異，顯示 *metE* 基因於豐富培養基中，亦存在其他因子所進行的調控作用。

沙門氏菌 *metE* 基因於有氧狀態下受到不同因子影響的研究在過去已被廣泛討論，本研究探討 *metE* 基因於厭氧狀態下受到一厭氧誘導之 small RNA 的調控機制，可做為日後 *metE* 基因於氧氣缺乏，以及其他 small RNA 相關研究之基礎。

六、參考文獻

- 湛玉鳳, 2010. 沙門氏菌 *metE* 基因之表現調控. 國立台灣大學農業化學研究所.
- Augustus, A.M., and Spicer, L.D. (2011). The MetJ regulon in *gammaproteobacteria* determined by comparative genomics methods. *BMC Genomics* 12, 558.
- Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272, 20313-20316.
- Boysen, A., Moller-Jensen, J., Kallipolitis, B., Valentin-Hansen, P., and Overgaard, M. (2010). Translational regulation of gene expression by an anaerobically induced small non-coding RNA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 285, 10690-10702.
- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. (2000). Guest commentary. *J Clinical Microb* 38 (7):2465-2467.
- Carter, P.B., and Collins, F.M. (1974). The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med* 139, 1189-1203.
- Constantinidou, C., Hobman, J.L., Griffiths, L., Patel, M.D., Penn, C.W., Cole, J.A., and Overton, T.W. (2006). A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 adapts from aerobic to anaerobic growth. *J Biol Chem* 281, 4802-4815.
- Dev, I.K., and Harvey, R.J. (1984). Regulation of synthesis of serine hydroxymethyltransferase in chemostat cultures of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 259, 8394-8401.
- Durand, S., and Storz, G. (2010). Reprogramming of anaerobic metabolism by the FnrS small RNA. *Mol Microbiol* 75, 1215-1231.
- Flatley, J., Barrett, J., Pullan, S.T., Hughes, M.N., Green, J., and Poole, R.K. (2005).

- Transcriptional responses of *Escherichia coli* to S-nitrosoglutathione under defined chemostat conditions reveal major changes in methionine biosynthesis. *J Biol Chem* 280, 10065-10072.
- Georgellis, D., Kwon, O., and Lin, E.C. (2001). Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science* 292, 2314-2316.
- Green, J., Crack, J.C., Thomson, A.J., and LeBrun, N.E. (2009). Bacterial sensors of oxygen. *Curr Opin Microbiol* 12, 145-151.
- Gyaneshwar, P., Paliy, O., McAuliffe, J., Jones, A., Jordan, M.I., and Kustu, S. (2005). Lessons from *Escherichia coli* genes similarly regulated in response to nitrogen and sulfur limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3453-3458.
- Hondorp, E.R., and Matthews, R.G. (2004). Oxidative stress inactivates cobalamin-independent methionine synthase (MetE) in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 2, e336.
- Hondorp, E.R., and Matthews, R.G. (2009). Oxidation of cysteine 645 of cobalamin-independent methionine synthase causes a methionine limitation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 191, 3407-3410.
- Hoshi, T., and Heinemann, S. (2001). Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol* 531, 1-11.
- Jervis, A.J., Crack, J.C., White, G., Artymiuk, P.J., Cheesman, M.R., Thomson, A.J., Le Brun, N.E., and Green, J. (2009). The O₂ sensitivity of the transcription factor FNR is controlled by Ser24 modulating the kinetics of [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4659-4664.
- Kang, Y., Weber, K.D., Qiu, Y., Kiley, P.J., and Blattner, F.R. (2005). Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function. *J Bacteriol* 187, 1135-1160.

- Khoroshilova, N., Popescu, C., Munck, E., Beinert, H., and Kiley, P.J. (1997). Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6087-6092.
- Lambden, P.R., and Guest, J.R. (1976). Mutants of *Escherichia coli* K12 unable to use fumarate as an anaerobic electron acceptor. *J Gen Microbiol* 97, 145-160.
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., et al. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413, 852-856.
- Partridge, J.D., Sanguinetti, G., Dibden, D.P., Roberts, R.E., Poole, R.K., and Green, J. (2007). Transition of *Escherichia coli* from aerobic to micro-aerobic conditions involves fast and slow reacting regulatory components. *J Biol Chem* 282, 11230-11237.
- Partridge, J.D., Scott, C., Tang, Y., Poole, R.K., and Green, J. (2006). *Escherichia coli* transcriptome dynamics during the transition from anaerobic to aerobic conditions. *J Biol Chem* 281, 27806-27815.
- Pullan, S.T., Gidley, M.D., Jones, R.A., Barrett, J., Stevanin, T.M., Read, R.C., Green, J., and Poole, R.K. (2007). Nitric oxide in chemostat-cultured *Escherichia coli* is sensed by Fnr and other global regulators: unaltered methionine biosynthesis indicates lack of S nitrosation. *J Bacteriol* 189, 1845-1855.
- Roy, M.F., and Malo, D. (2002). Genetic regulation of host responses to *Salmonella* infection in mice. *Genes Immun* 3, 381-393.
- Saint-Girons, I., Parsot, C., Zakin, M.M., Barzu, O., and Cohen, G.N. (1988). Methionine biosynthesis in *Enterobacteriaceae*: biochemical, regulatory, and

- evolutionary aspects. *CRC Crit Rev Biochem* 23 Suppl 1, S1-42.
- Salmon, K., Hung, S.P., Mekjian, K., Baldi, P., Hatfield, G.W., and Gunsalus, R.P. (2003). Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR. *J Biol Chem* 278, 29837-29855.
- Smith, M.W., and Neidhardt, F.C. (1983). Proteins induced by aerobiosis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 154, 344-350.
- Stadtman, E.R., and Berlett, B.S. (1998). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 30, 225-243.
- Tjaden, B., Goodwin, S.S., Opdyke, J.A., Guillier, M., Fu, D.X., Gottesman, S., and Storz, G. (2006). Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Res* 34, 2791-2802.
- Trotter, E.W., Rolfe, M.D., Hounslow, A.M., Craven, C.J., Williamson, M.P., Sanguinetti, G., Poole, R.K., and Green, J. (2011). Reprogramming of *Escherichia coli* K-12 metabolism during the initial phase of transition from an anaerobic to a micro-aerobic environment. *PLoS One* 6, e25501.
- Urbanowski, M.L., Stauffer, L.T., Plamann, L.S., and Stauffer, G.V. (1987). A new methionine locus, *metR*, that encodes a trans-acting protein required for activation of *metE* and *metH* in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 169, 1391-1397.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M., and Udesen, C. (2004). The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* 51, 1525-1533.
- Vogel, J. (2009). A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*. *Mol Microbiol* 71, 1-11.
- Wang, J.X., Lee, E.R., Morales, D.R., Lim, J., and Breaker, R.R. (2008). Riboswitches that sense S-adenosylhomocysteine and activate genes involved

in coenzyme recycling. *Mol Cell* 29, 691-702.

Waters, L.S., and Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* 136, 615-628.

Weissbach, H., and Brot, N. (1991). Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5, 1593-1597.

Wray C, Wary A. (2000). Methods for the rapid detection of *Salmonella*. In: *Salmonella* in domestic animals. *CABI publishing*, UK, pp. 373-392.



表一、本論文所使用之菌株

Table 1. Strains used in this study

Strains	Description	Source or reference
<i>Salmonella enterica</i> serovar strain		

Typhimurium LT2	Wild-type	ATCC 700720
<i>Escherichia coli</i>		
strains		
MG1655	F ⁻ λ ⁻ <i>ilvG-rfb-50rph-1</i>	Guyer <i>et al.</i> (1981)
C600	F ⁻ <i>e14⁻ (McrA⁻) thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 fhuA21 glnV44 rfbD1</i>	Appleyard <i>et al.</i> (1954)
XL1-blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F['] [proAB⁺ lacI^q lacZ ΔM15 Tn10 (ter^R)]</i>	Bullock <i>et al.</i> (1987)
BW25113	<i>lacI^q rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ (araBAD)567 Δ (rhaBAD)568 rph-1</i>	Barry L. Wanner
Keio Collection JW3805	BW25113 Δ <i>metE</i> ::kan	Baba <i>et al.</i> (2006)
Keio Collection JW1328	BW25113 Δ <i>fnr</i> ::kan	Baba <i>et al.</i> (2006)
Keio Collection JW4130	BW25113 Δ <i>hfq</i> ::kan	Baba <i>et al.</i> (2006)
DJ480	Δ <i>lacX74</i> (lambda-based <i>lacZ</i> fusions)	D. Jin (NCI)
YF10001	MG1655 Δ <i>metE</i>	Chan. (2010)
YF10002	YF10001Δ <i>fnrS</i>	Chan. (2010)
YF10003	YF10001Δ <i>hfq</i>	Chan. (2010)
CW10001	MG1655 Δ <i>fnrS</i> ::kan	This study
CW10002	MG1655 Δ <i>fnrS</i> Δ <i>fnr</i> ::kan	This study
CW10003	MG1655 Δ <i>fnrS</i> Δ <i>hfq</i> ::kan	This study
CW10004	DJ480 λ <i>metE</i> :: <i>lacZ</i> (pr)	This study
CW10005	DJ480 λ <i>metE</i> :: <i>lacZ</i> Δ <i>fnrS</i> ::kan (pr)	This study
CW10006	DJ480 λ <i>metE</i> :: <i>lacZ</i> Δ <i>fnr</i> ::kan (pr)	This study
CW10007	DJ480 λ <i>metE</i> :: <i>lacZ</i> Δ <i>fnrS</i> Δ <i>fnr</i> ::kan (pr)	This study

op : operon fusion

pr : protein fusion

表一、本論文所使用之菌株 (接續上頁)

Table 1. Strains used in this study (continued)

Strains	Description	Source or reference
CW10004	DJ480 λ <i>metE</i> :: <i>lacZ</i> (op)	This study

CW10005	DJ480 λ metE::lacZ Δ fnrS::kan (op)	This study
CW10006	DJ480 λ metE::lacZ Δ metE::kan (pr)	This study
CW10007	DJ480 λ metE::lacZ Δ metE Δ fnrS::kan (pr)	This study
CW10008	DJ480 λ metE::lacZ Δ metE Δ fnr::kan (pr)	This study
CW10009	DJ480 λ metE::lacZ Δ metE Δ fnrS Δ fnr::kan (pr)	This study
CW10010	DJ480 λ metE::lacZ Δ metE Δ hfq::kan (pr)	This study
CW10011	DJ480 λ metE::lacZ Δ metE Δ fnrS Δ hfq::kan (pr)	This study
CW10012	DJ480 Δ fnrS::kan	This study
CW10013	DJ480 Δ fnrS::kan λ metE-1::lacZ (op)	This study
CW10014	DJ480 Δ fnrS::kan λ metE-2::lacZ (op)	This study
CW10015	DJ480 Δ fnrS::kan λ metE-54::lacZ (op)	This study

op : operon fusion

pr : protein fusion



表二、本論文所使用之質體及嗜菌體

Table 2. Plasmid and bacteriophage used in this study

Plasmids or bacteriophage	Description	Source or reference
---------------------------	-------------	---------------------

Plasmids		
pBAD33	<i>ori</i> (pACYC18) <i>araC</i> P _{BAD} <i>cm^r</i>	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pBRLac	<i>ori</i> (pMB1) P _{lac} <i>amp^r</i>	
pRS414	<i>bla</i> -Tl ₄ <i>EcoR</i> I- <i>Sma</i> I- <i>BamH</i> I <i>lacZ</i> (pr)	Casadaban <i>et al.</i> (1976)
pRS415	<i>bla</i> -Tl ₄ <i>EcoR</i> I- <i>Sma</i> I- <i>BamH</i> I <i>lacZ</i> (op)	Casadaban <i>et al.</i> (1976)
pCP20	<i>FLP⁺</i> <i>lcI857⁺</i> 1P _R <i>Rep^{ts}</i> <i>amp^r</i> <i>cm^r</i>	Cherepanov <i>et al.</i> (1995)
pYF11	pBAD33-184bp 5'-UTR- <i>metE</i> C-term HA	Chan. (2010)
pCW1	pBAD33-184bp 5'-UTR- <i>metE</i> -1 C-term HA	This study
pCW2	pBAD33-184bp 5'-UTR- <i>metE</i> -54 C-term HA	This study
pCW3	pBRLac-FnrS I	This study
pCW4	pBRLac-FnrS II	This study
pCW5	pBRLac-FnrS III	This study
pCW6	pBRLac-FnrS 41	This study
pCW7	pBRLac-FnrS 43	This study
pCW8	pBRLac-FnrS 54	This study
Bacteriophage		
λ RS45	<i>imm21 ind⁺ bla'-lacZ_{sc}</i>	Simons <i>et al.</i> (1937)

表三、本論文所使用之引子對

Table 3. Primers used in this study

Primers	DNA sequences (5'→3')	Notes
----------------	------------------------------	--------------

<i>Kpn</i> I- <i>metE</i> Wt Fw	GGGGTACCGATCATGAAAGTCCTTCACTTC GCC	a.
<i>Hind</i> III- <i>metE</i> C-term-HA Rv	CCAAGCTTGTTAAGCGTAATCTGGAACATC	a.
<i>Sal</i> I- <i>metE</i> Fw	ACGCGTCGACTGGCTGCTCTCCGCA	a.
<i>Sal</i> I- <i>metE</i> Rv	ACGCGTCGACCGGCAGACGTTGATG	a.
<i>EcoR</i> I- <i>metE</i> Fw	CGGAATTCGATCATGAAAGTCCTTC	a.
<i>BamH</i> I- <i>metE</i> Rv	CGCGGATCCACGCGAGGAAAACCGA	a.
<i>S.T</i> LT2 <i>fnrS</i> Fw	ATACTGACGTCGCAGGTGAATGCAACGTC AA	a.
<i>S.T</i> LT2 <i>fnrS</i> Rv	CCGGAATTCAAAAAAAGCCGACTCATCA AAG	a.
<i>S.T</i> LT2 <i>fnrS</i> Δloop3 Rv	CCGGAATTCAAAAAAAGTCGTACGAATC AATTGTGC	a.
<i>S.T</i> LT2 <i>fnrS</i> Δloop2-3 Rv	CCGGAATTCAAAAAAAGGAAGTAAGACA ATA	a.
<i>S.T</i> LT2 <i>fnrS</i> I C5' primer (U57A/U58G/U59A)	CTTACTTCCTAGATGGAATTGCTGC	a.
<i>S.T</i> LT2 <i>fnrS</i> I N3' primer (U57A/U58G/U59A)	AGCAATTCATCTAGGAAGTAAGAC	a.
<i>S.T</i> LT2 <i>fnrS</i> IIC5' primer (C47A/U48A/U49G)	TCCATATTGTAAGACTTCCTTTTGG	a.
<i>S.T</i> LT2 <i>fnrS</i> II N3' primer	AAAAGGAAGTCTTACAATATGGAGC	a.
<i>S.T</i> LT2 <i>fnrS</i> III 5' primer (G4C/G5T)	ATACTGACGTCGCACTTGAATGCAACGTCA	a.
<i>S.T</i> LT2 <i>fnrS</i> 41 C5' primer (U41G)	CGTTGCGCTCCAGATTGTCTTACTTC	a.

a. Primers used for cloning.

b. Primers used for sequencing.

表三、本論文所使用之引子對 (接續上頁)

Table 3. Primers used in this study (continued)

Primers	DNA sequences (5'→3')	Notes
---------	-----------------------	-------

S.T LT2 <i>fnrS</i> 41 N3' primer (U41G)	AAGTAAGACAATCTGGAGCGCAACGC	a.
S.T LT2 <i>fnrS</i> 43 C5' primer (U43G)	TTGCGCTCCATAGTGTCTTACTTC	a.
S.T LT2 <i>fnrS</i> 43 N3' primer (U43G)	GGAAGTAAGACACTATGGAGCGCAAC	a.
S.T LT2 <i>metE-2</i> C5' primer	GAGAGGAAGTTTAATGACAATATTGAC	a.
S.T LT2 <i>metE-2</i> N3' primer	GTCAATATTGTCATTAAACTTCCTCTC	a.
S.T LT2 <i>metE-54</i> C5' primer	GAGAGCAAGTAAAATGACAAG	a.
S.T LT2 <i>metE-54</i> N3' primer	GTCATTTTACTTGCTCTCTTATTTTATTG	a.
S.T LT2 <i>metE</i> 5' seq primer	ACTACATAGTACCGGAGTTC	a.
S.T LT2 <i>metE</i> 3' seq primer.	CGGTCAACATCCCTTTTACC	a.
pBAD33 5' seq primer	TTTCTCCATACCCGTTTTTT	b.
pBAD33 3' seq primer	AGGCTGAAAATCTTCTCTCA	b.
pRS415/415 3' seq primer	GCTGCAAGGCGATTAAGTTG	b.
pBRlac seq 5' primer	TGAGCAAAAACAGGAAGGCA	b.
pBRlac 3' primer	CACCATACCCACGCCGAAAC	b.
<i>E.coli metE</i> Fw	ATTATGGTGCGTTGGCTGC	c.
<i>E.coli metE</i> Rv	TTCAACGCTGATTATCGCCC	c.
<i>E.coli hfq</i> Fw	CGTGACGAAGTATTACAGGT	c.
<i>E.coli hfq</i> Rv	CCATATCTTTGTCTTGCGT	c.
<i>E.coli fnrS</i> Fw	GGTGTTGCTTTATGGTTGCA	c.
<i>E.coli fnrS</i> Rv	GAACAGGATCGCCAGGAAT	c.

a. Primers used for cloning.

b. Primers used for sequencing.

c. Primers used for colony PCR check.

EcoR I

ATCCACTATTCCGCAATGCCTGGAGTGTTTTTCAGATGTTTAATTTCGATCATG

-35

AAAGTCCTTCACTTCGCCATGAACAAATTGCGCTTTGAGGAAATATACAGTAC

metE →

-10 +1

CTTTACATTATGGATGTGTAAACATCCAGACGTCTAAAACTCGTCATATTTC

GACTTGCAGATGCGTTGGCTTCCTTGCTTACCCAGTCACTTACTTCAGTAAG

CTCCTGGGGATGCGCTGTGTCGCCGCCTTCCTGCAAGCCGAACTATTTAGAG

SD Met

TTTTACTTTCAGATTCAATAAAATAAGAGAGGAAAGTAAAATGACAATATTG

fnrS putative binding region

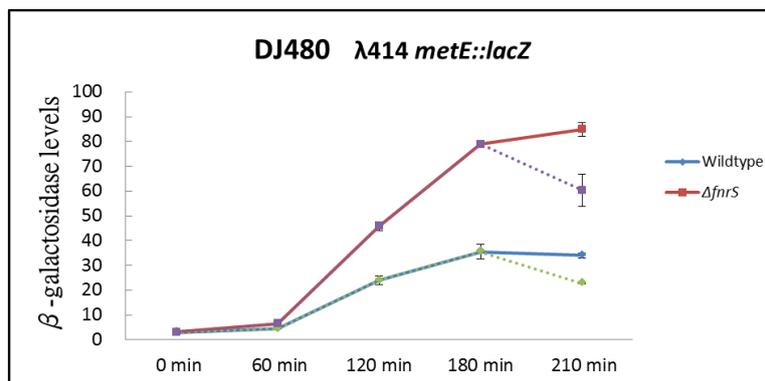
BamH I

ACTCATACCCTCGGTTTTCTCGCGT//

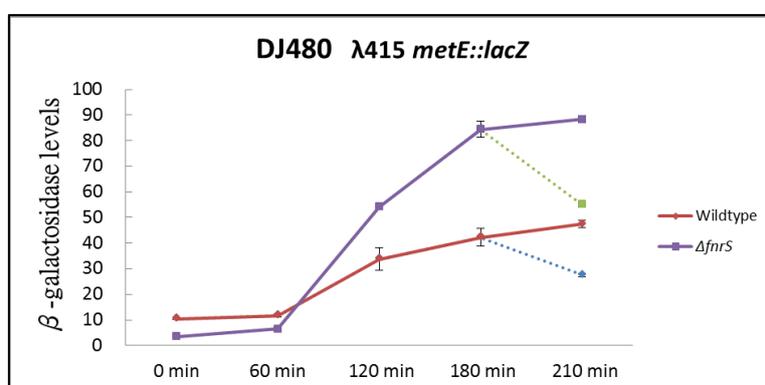
圖一、*Salmonella* Typhimurium LT2 *metE* 基因上游序列圖譜。*metE* 啟動子序列之-35、-10、SD 序列皆用底線標示。+1 為 *metE* 之轉錄起始位置。Met 位置標示為 *metE* 的起始胺基酸。利用 *EcoR* I 及 *BamH* I 將 *metE* 基因轉殖至報導基因 *lacZ* 的下游，建立 *metE::lacZ* 融合質體。序列之下標記的黑點記號為推測之 *fnrS* 結合位置。

Figure 1. The up-stream sequence of the *Salmonella* Typhimurium LT2 *metE* gene. The -35, -10 and the SD sequence of the *metE* are marked by a filled line. The +1 and the Met is marked as the transcriptional start site and the initial amino acid of the *metE* separately. To construct the *metE::lacZ* fusion plasmid, we cloned the *metE* promoter region into the down-stream of the *lacZ* reporter gene by the *EcoR* I and the *BamH* I. The black spots under the sequence are the putative complementary base-pairing sites with the *fnrS*.

A.



B.



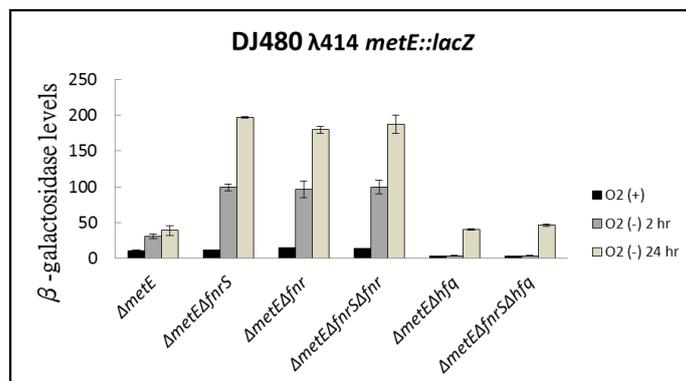
Wildtype : DJ480 $\lambda metE::lacZ$;

$\Delta fnrS$: DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta fnrS::kan$

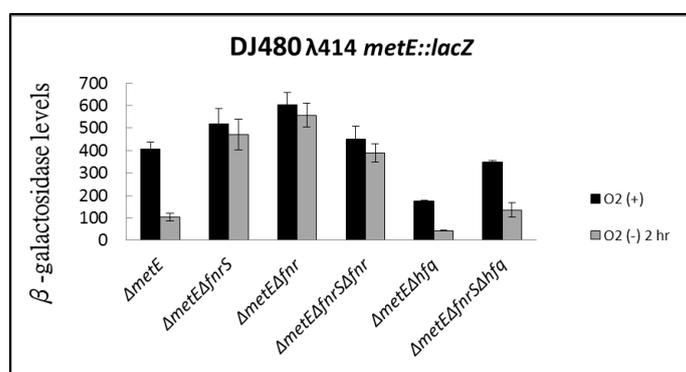
圖三、MetE 於氧氣轉換間受到 *fnrS* 調控表現之影響。於 37°C 下，以 LB 培養基有氧培養至對數生長期 (0 分鐘)，轉換為厭氧培養 60、120、180、210 分鐘 (實線)，以及厭氧培養 180 分鐘後重新轉換為有氧培養 30 分鐘作為有氧培養對照組 (虛線)。A、*metE::lacZ* 轉譯融合基因之 β -galactosidase 活性分析。B、*metE::lacZ* 轉錄融合基因之 β -galactosidase 活性分析。

Figure 3. Effect of *fnrS* on the *metE* expression when transition between the aerobic and anaerobic condition. Culture in LB medium at 37°C under aerobic condition until the log growth phase (0 minute), and then was transited to the anaerobic condition 60、120、180、210 minutes separately (the solid line), and the anaerobically incubate 180 minutes culture was re-transited into the aerobic incubation 30 minutes as the aerobic growth control (the dotted line). A, β -galactosidase assay of *metE::lacZ* protein fusions. B, β -galactosidase assay of *metE::lacZ* operon fusions.

A.



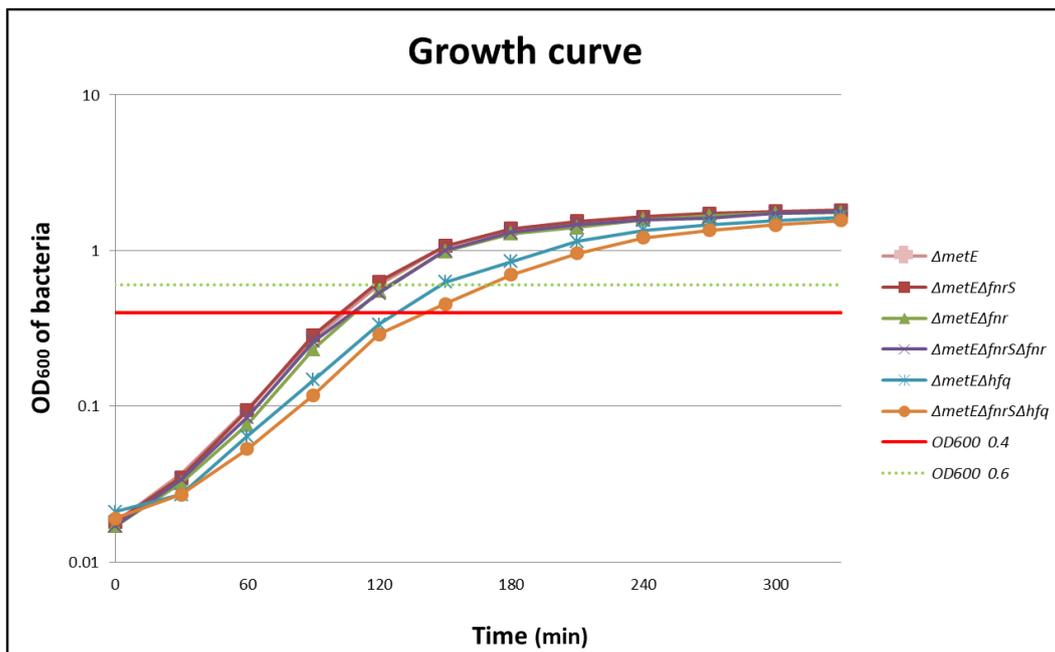
B.



$\Delta metE$: DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta metE::kan$; **$\Delta metE \Delta fnrS$** : DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta metE \Delta fnrS::kan$;
 $\Delta metE \Delta fnr$: DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta metE \Delta fnr::kan$;
 $\Delta metE \Delta fnrS \Delta fnr$: DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta metE \Delta fnrS \Delta fnr::kan$;
 $\Delta metE \Delta hfq$: DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta metE \Delta hfq::kan$;
 $\Delta metE \Delta fnrS \Delta hfq$: DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta metE \Delta fnrS \Delta hfq::kan$

圖四、FnrS 及其相關因子缺失對 *metE* 之表現影響。於 37°C 下，分別以厭氧培養 2 小時、24 小時，以及有氧培養至相對應厭氧培養之微生物生長期。A、培養至 LB 培養基之 β -galactosidase 活性分析。B、培養至添加 80 μ g/mL L-methionine 的限制培養基 (M63 salts，以 0.4% glucose 作為碳源) 之 β -galactosidase 活性分析。

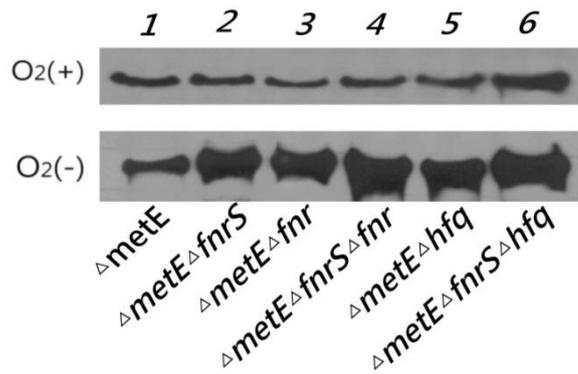
Figure 4. Effect of FnrS and FnrS-related factors on the *metE* expression. Culture at 37°C under anaerobic for 2 hours, 24 hours, and aerobic for the relative growth phase. A, β -galactosidase assay of the incubation on the LB medium. B, β -galactosidase assay of the incubation on the minimal medium with the 80 μ g/mL L-methionine (M63 salts, 0.4% glucose as the carbon source).



- $\Delta metE$: DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta metE::kan$; ■ $\Delta metE\Delta fnrS$: DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta metE\Delta fnrS::kan$;
- ▲ $\Delta metE\Delta fnr$: DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta metE\Delta fnr::kan$;
- ✱ $\Delta metE\Delta fnrS\Delta fnr$: DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta metE\Delta fnrS\Delta fnr::kan$;
- * $\Delta metE\Delta hfq$: DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta metE\Delta hfq::kan$;
- $\Delta metE\Delta fnrS\Delta hfq$: DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta metE\Delta fnrS\Delta hfq::kan$

圖五、FnrS 及其相關因子缺失株之生長曲線測試。於 37°C 下，有氧培養於 LB 培氧基，每隔 30 分鐘測量一次 OD₆₀₀ 吸光值，使用菌株同圖四。實線：OD₆₀₀ 0.4，虛線：OD₆₀₀ 0.6。

Figure 5. The growth curve of the FnrS and FnrS-related factors deficient strains. Culture in LB medium at 37°C under aerobic condition, detecting the OD₆₀₀ absorbance every 30 minutes. The strains used in this assay same as the figure 2. The solid and dotted line is represented as the OD₆₀₀ 0.4 and the OD₆₀₀ 0.6 separately.

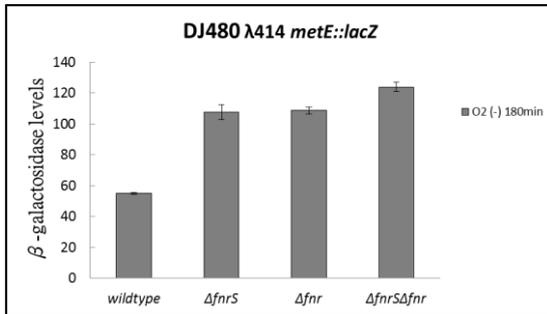


$\Delta metE$: MG1655 $\Delta metE$; **$\Delta metE\Delta fnrS$** : MG1655 $\Delta metE\Delta fnrS$;
 $\Delta metE\Delta fnr$: MG1655 $\Delta metE\Delta fnr$;
 $\Delta metE\Delta fnrS\Delta fnr$: MG1655 $\Delta metE\Delta fnrS\Delta fnr$;
 $\Delta metE\Delta hfq$: MG1655 $\Delta metE\Delta hfq$;
 $\Delta metE\Delta fnrS\Delta hfq$: MG1655 $\Delta metE\Delta fnrS\Delta hfq$

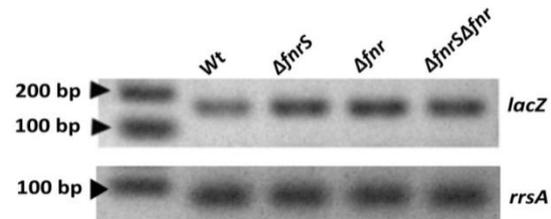
圖六、FnrS 及其相關因子缺失對 MetE-HA 表現影響之西方轉漬法試驗。於 37°C 下培養於 LB 培養基，有氧培養至對數生長期 (O₂+)，並轉換為厭氧培養大於 24 小時 (O₂-)，以 0.02% 阿拉伯糖誘導 P_{BAD} - metE 表現，進行西方轉漬法分析。

Figure 6. Effect of FnrS and FnrS-related factors on MetE expression levels through the Western blotting assay. Culture in LB medium at 37°C under aerobic condition until log growth phase (O₂+), and subsequently transit into the anaerobic condition more than 24 hours (O₂-). The 0.02% arabinose was added as the induced reagent of the P_{BAD} promoter (P_{BAD} - metE), detecting with the HA monoclonal antibody in Western blotting assay.

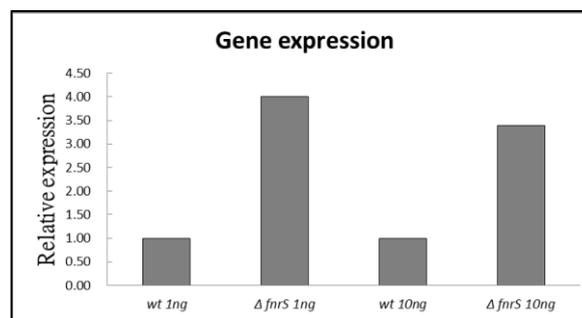
A.



B.



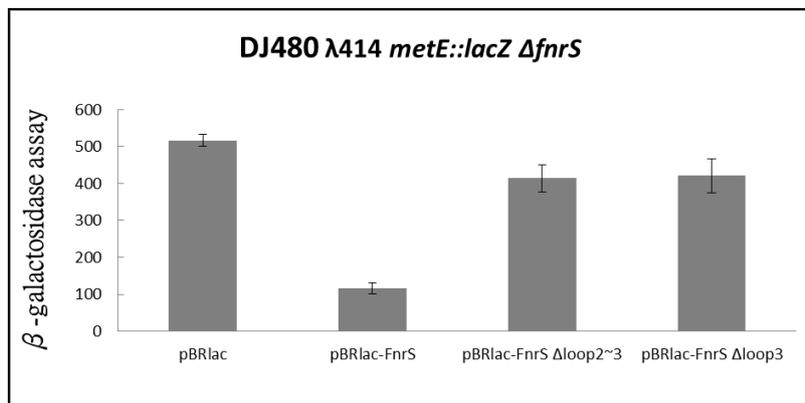
C.



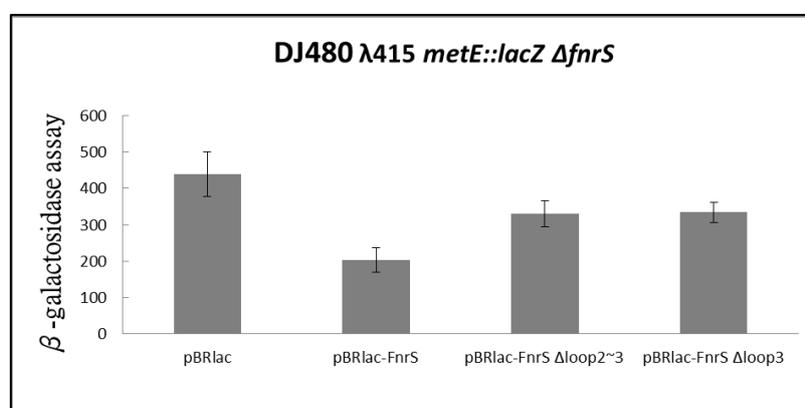
Wild type : DJ480 $\lambda metE::lacZ$; **$\Delta fnrS$** : DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta fnrS::kan$,
 Δfnr : DJ480 $\lambda metE::lacZ \Delta fnr::kan$; **$\Delta fnrS\Delta fnr$** : $\lambda metE::lacZ \Delta fnrS\Delta fnr::kan$.

圖七、FnrS 及其相關因子缺失對 *metE* 表現影響之 RT-PCR 試驗。於 37°C 下，培養於 LB 培養基，以厭養培養 2 小時進行 RNA 之萃取，並進行 RT-PCR 之實驗分析，以 *rrsA* (16sRNA) 作為內生性控制組。A、圖 5B 之相對應 β -galactosidase 試驗。B、利用 One-Step RT-PCR 以 250 ng 總 RNA 的量進行 35 個 PCR 循環，取同體積之樣品進行 2.0% 的瓊脂膠體電泳，將 cDNA 分離。C、分別取 1 ng 及 10 ng 之 cDNA 進行 Quantitative-PCR。Figure 7. Effect of FnrS and FnrS-related factors on *metE* expression through the RT-PCR. Culture in the LB medium at 37°C under the anaerobic for 2 hours. To process the RT-PCR analysis, extracting the total RNA after the specific incubation time, using the *rrsA* gene (16sRNA) as the internal control. A, the relative β -galactosidase data of the figure 7B. B, Using the 250ng of the total RNA to process the 35 PCR cycle of the One-Step RT-PCR, analysis the data through the 2.0% agarose gel electrophoresis with the same volumn of each PCR product, to separate the cDNA. C, Using the 1ng and 10ng of cDNA to process the comercial Quantitative-PCR, the relative quantitative was through the quantitative formular.

A.



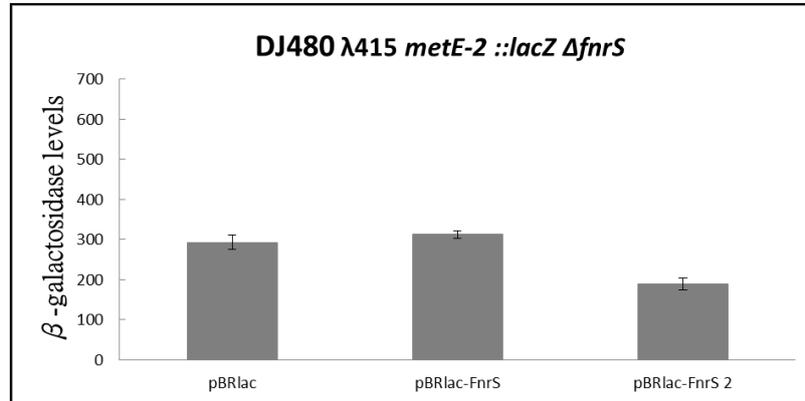
B.



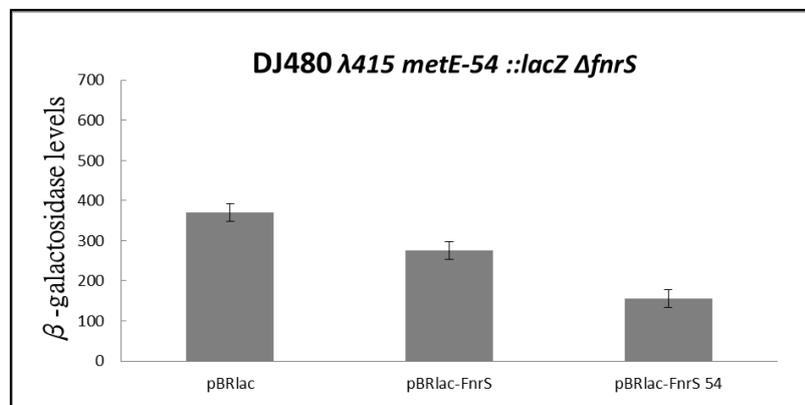
圖八、FnrS 不同區域對 *metE* 基因之表現影響。於含有 80 μ g /mL L-methionine 的限制培養基 (M63 salts, 以 0.4% glucose 作為碳源) 進行有氣培養至對數生長期, 以 1mM IPTG 誘導 P_{lac} 表現 *fnrS* 及結構突變 *fnrS*。A、*metE::lacZ* 轉譯融合基因之 β -galactosidase 活性分析。B、*metE::lacZ* 轉錄融合基因之 β -galactosidase 活性分析。

Figure 8. The effect on *metE* gene by different region of FnrS. Culture in the minimal medium with the 80 μ g /mL L-methionine (M63 salts, with the 0.4% glucose as the carbon source) under the aerobic condition until the log growth phase, using the 1mM IPTG to induce the P_{lac} promoter, and express the *fnrS* and the structure mutation of the *fnrS*. A, β -galactosidase assay of protein fusions. B, β -galactosidase assay of operon fusions.

A.

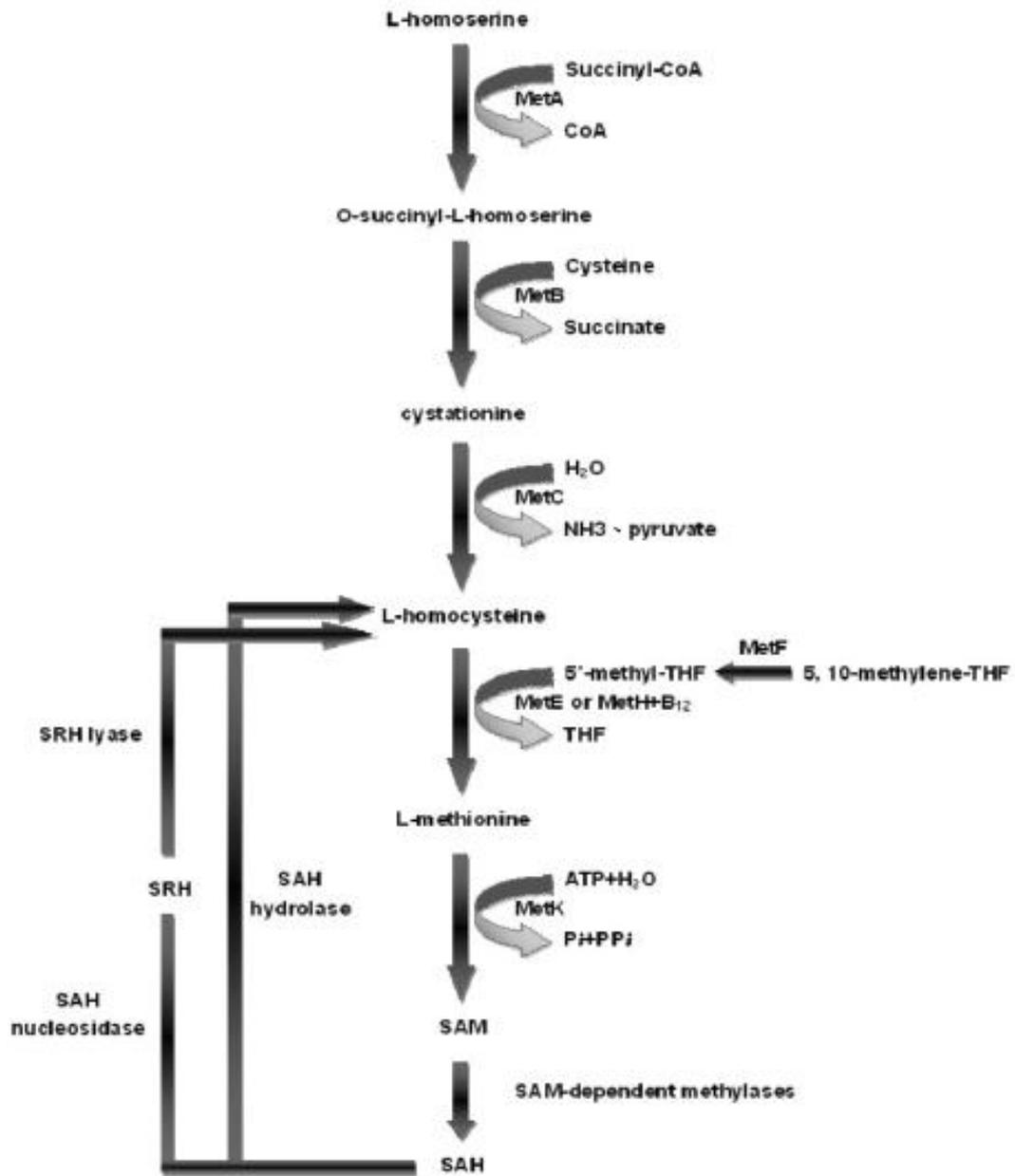


B.



圖十、MetE 相對應 *fnrS* 點突變之互補株。於含有 80 μ g /mL L-methionine 的限制培養基 (M63 salts, 以 0.4% glucose 作為碳源) 進行有氧培養至對數生長期, 以 1mM IPTG 誘導 P_{lac} 。A、*metE-2::lacZ* 轉錄融合基因之 β -galactosidase 活性分析。B、*metE-54::lacZ* 轉錄融合基因之 β -galactosidase 活性分析。

Figure 10. The MetE complementary point mutations to the FnrS. Culture in the minimal medium with the 80 μ g /mL L-methionine (M63 salts, with the 0.4% glucose as the carbon source) under the aerobic condition until the log growth phase, using the 1mM IPTG to induce the P_{lac} promoter, A, β -galactosidase assay of *metE-2::lacZ* operon fusions. B, β -galactosidase assay of *metE-54::lacZ* operon fusions.



(湛，2010)

附圖一、甲硫胺酸之生合成路徑

Appendix figure 1. The biosynthesis pathway of methionine