

國立台灣大學醫學院微生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis



探討 PrsA 在 A 型鏈球菌
所扮演的角色

Investigate the role of PrsA on
M4 *Streptococcus pyogenes*

劉昭賢

Chao-Hsien Liu

指導教授：張永祺 博士

Advisor: Yung-Chi Chung, Ph. D.

中華民國 107 年 7 月

July 2018

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：探討 prsA 在 A 型鏈球菌所扮演的角色

英文題目：Investigate the role of PrsA on M4 Streptococcus pyogenes.

本論文係劉昭賢君 (學號 105445121) 在國立臺灣大學微生物學所完成之碩 (博) 士學位論文，於民國 107 年 7 月 30 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：

張永祺

(簽名)

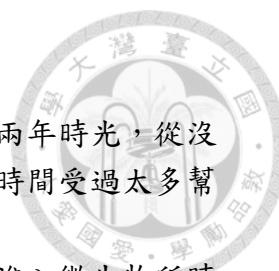
(指導教授)

史有伶

邱浩傑

系主任、所長

董文蓮 (簽名)



致謝

很高興能輪到我寫下這段致謝辭。說長不長說短也不短的兩年時光，從沒進過實驗室的新丁到能獨立操作實驗並且產出一篇論文，這段時間受過太多幫助，有太多事值得感謝。

首先得要感謝的是指導教授張永祺老師。感謝老師在我初進入微生物所時願意收留未曾有過任何研究或專題經驗的我，並在還不清楚實驗室運作方式時包容我犯過的錯。感謝老師溫和而不失嚴謹的治學態度，在實驗遭遇瓶頸時陪同我一起思考解決方式，甚至花上許多時間陪著我回顧實驗的每個環節試圖找出可能影響實驗結果的最細節之處，並在最後依然碰壁時輔導轉換實驗方向。若沒有老師的細心指導，我就算試著努力也找不到方向，或許會在還沒站穩腳步就打退堂鼓也說不定，感謝老師在這兩年的指導與扶助。

感謝中研院生化所的史有伶老師和台大醫技所的邱浩傑老師願意擔任我的口試委員，兩位老師提供了許多實驗數據不足時還有哪些部份需要彌補以及實驗設計該如何改進的建議，在整體故事敘述方式上也給了許多幫助。感謝史有伶老師反覆詰問抓出我對實驗認知的盲點，感謝邱浩傑老師提供實務上的經驗和格式上的建議。

感謝實驗室的同伴們，感謝學長學姊的輔導和同學以及學弟妹的陪伴，在實驗不順利時交流經驗，在壓力襲來時聊天排解，在實驗時程安排撞期時互相掩護讓實驗進度不致於延宕。同時感謝 R1420 實驗室的芳鄰，很多實驗借用他們已經建構好的系統，還有藥品臨時用完還沒到貨的時候臨時借用以免耽誤實驗，實驗結果很奇怪的時候集思廣益修正實驗條件，感謝有這麼多的好夥伴才讓我的實驗順利結尾。

再來當然需要感謝我的家人朋友，感謝我的家人能讓我無後顧之憂地完成碩士學位的攻讀，也感謝我的朋友在我因論文進度而脾氣焦躁時能包容忍耐我。

另外特別感謝 R1420 實驗室的翁瑞鴻翁博士指導我進行質譜儀樣本製備以及質譜儀分析結果的整理與判讀，以及台大貴重儀器中心吳博士體諒我的時間壓力盡快幫我們完成樣本的質譜儀分析。

最後感謝那些在無論大事小事幫助過我但不及備載的諸多貴人們，任何文章任何故事都不是一個人的工作，感謝所有該感謝的人事物。

中文摘要

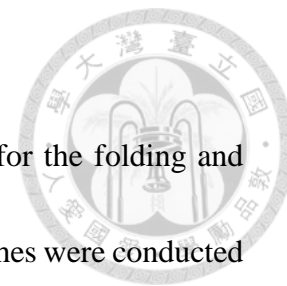
PrsA 是一種負責摺疊與穩定分泌蛋白的膜上脂蛋白，在多種不同的細菌如李斯特菌、枯草桿菌中都有所研究。在 A 型鏈球菌中(*Streptococcus pyogenes*, GAS)存在有 *prsA1*、*prsA2* 兩套 *prsA* 基因，其中 *prsA2* 被認為是主要具有功能的基因。實驗室先前的實驗結果觀察到 Δ *prsA2* 突變株對部分抗生素的耐受性存有差異，為了更加釐清 PrsA 蛋白在實驗用菌株 M4 血清型 GAS 中的角色，我們新建構出剔除 *prsA1* 的突變株及剔除 *prsA1* 與 *prsA2* 的雙重突變株以進行後續實驗。首先觀察野生株與各突變株的 *prsA1* 與 *prsA2* 在 mRNA 的表現量，實驗結果發現當 *prsA2* 剔除後 *prsA1* 的表現量上升，*prsA1* 剔除後 *prsA2* 的表現量下降。接著檢查 GAS 在剔除 PrsA 後對各種抗菌物質如過氧化氫、溶菌酶、抗菌肽 LL-37 的耐受性。我們發現在面對過氧化氫所產生的氧化壓力逆境時野生株的耐受能力較三株突變掉 *prsA* 的突變株來得更差，與之相反的是在面對其他抗菌物質即脂蛋白抗生素 daptomycin、抗菌肽 LL-37、以及破壞細胞壁的溶菌酶時野生株都比突變株有更好的耐受性，顯示 PrsA 在應對這些抗菌物質時提供細菌生存上的優勢。為了找出可能造成上述表徵不同的蛋白，我們以 SDS-PAGE 以及質譜儀分析觀察野生株與 Δ *prsA* 突變株在蛋白組成上的差異。由於 PrsA 主述功能影響細菌分泌蛋白，我們收集 GAS 野生株與突變株的分泌蛋白(secreted proteins)以及膜囊泡(membrane vesicle)進行比較。實驗發現在分泌蛋白的部分 Δ *prsA2* 突變株和 Δ *prsA1/A2* 突變株的蛋白組成較為相似，而野生株與 Δ *prsA1* 突變株各有獨自的蛋白組成。另外在膜囊泡蛋白部分則是僅 Δ *prsA1* 突變株與另三者差異較大。此外從質譜儀的分析數據結合 SDS-PAGE 膠圖結果我們發現 Δ *prsA1* 突變株會有大量成熟 SpeB(*Streptopain*)釋出，而 Δ *prsA2* 突變株與 Δ *prsA1/A2* 突變株則有許多 SpeB 的未成熟前驅物存在，此一結果與過往研究提到 PrsA2 影響 SpeB 成熟活化相似，且暗示 PrsA1 功能可能與成熟 SpeB 的調控有關。總體而言，我們確認了在 M4 GAS 中 PrsA1 確實有表現並發揮功能，其功能可能與分泌蛋白與膜囊

泡分泌相關，並且 *prsA* 突變確實造成 M4 GAS 對多種抗菌物質耐受性差異，但具體透過何種機轉達成我們觀察到的現象尚待後續研究證實。

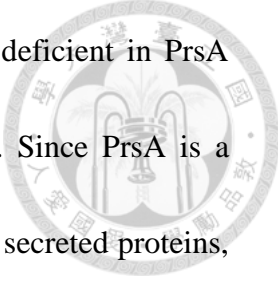


關鍵字：A 型鏈球菌；PrsA；抗菌物質。

Abstract

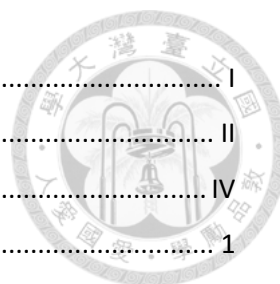


PrsA is a member of membrane-anchored chaperone responsible for the folding and stabilization of secreted proteins. Most of the published PrsA researches were conducted on *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, and many other Gram positive bacteria. Two *prsA* gene copies, *prsA1* and *prsA2*, are found in Group A *Streptococcus* (GAS, also called *Streptococcus pyogenes*), and *prsA2* was considered as the major functional *prsA* gene. We previously observed a moderate alteration of antibiotic susceptibility on GAS Δ *prsA2* isogenic mutants. In order to clarify the role of PrsA on M4 serotype GAS, we generated GAS mutants lacking *prsA1* and both *prsA1* and *prsA2*. We found that expression of *prsA1* and *prsA2* were differentially regulated. Expression of *prsA1* decreased in the absence of *prsA2* while expression of *prsA2* increased in the absence of *prsA1*. We next examined whether PrsA regulates the susceptibility of GAS to various antimicrobial substances. Compared to wild type GAS, GAS deficient in *prsA1*, *prsA2* or both *prsA1* and *prsA2* were more resistant to oxidative stress upon hydrogen peroxide treatment. In contrast, PrsA conferred the survival advantage of GAS upon encountering cell wall destroying lysozyme, membrane targeted daptomycin and host antimicrobial peptides, LL-37. Our results demonstrated that deletion of *prsA* sensitizes GAS to most of the antimicrobial substance tested. To elucidate the protein candidates contributing to the sensitizing phenomenon to lysozyme, daptomycin and LL-37, we



analyzed the protein composition of GAS wild type and mutants deficient in PrsA expression by SDS-PAGE electrophoresis and mass spectrometry. Since PrsA is a protein chaperone known to modulate a broad spectrum of bacterial secreted proteins, secreted proteins and proteins within membrane vesicles were analyzed. Similar protein composition on secreted proteins was observed between $\Delta prsA2$ mutant and $\Delta prsA1/A2$ mutant, while $\Delta prsA1$ mutant and wild type exhibited unique protein patterns. For membrane vesicles, only $\Delta prsA1$ mutant showed very distinct protein composition compare to others. From our preliminary data generated by mass spectrometry analysis, we found that PrsA1 and PrsA2 differentially regulated Streptopain (SpeB) maturation where PrsA2 facilitated and PrsA1 reduced SpeB maturation, respectively. In summary, we demonstrated that *prsA1* is expressing and plays a regulatory role in protein secretion and membrane vesicle protein composition in M4 GAS. In addition, *prsA* deletion altered the sensitivity of GAS to various antimicrobial substances, although the detail mechanisms for this observation needs further investigation.

Key word: group A *Streptococcus*; PrsA; antimicrobial substances.



目錄	
致謝.....	I
中文摘要.....	II
Abstract.....	IV
壹、簡介.....	1
一、A 型鏈球菌.....	1
1.A 型鏈球菌的特性與分型.....	1
2.A 型鏈球菌的疫苗發展.....	1
3.A 型鏈球菌的治療方案—抗生素.....	1
二、PrsA 蛋白.....	2
1.PrsA 蛋白的特性.....	2
2.PrsA 蛋白的功能.....	3
3.A 型鏈球菌的 PrsA.....	4
三、膜囊泡.....	4
四、研究目標與實驗設計.....	6
貳、研究材料與方法.....	7
一、實驗用菌種.....	7
二、設計引子 (Primer; Tri-I Biotech, Inc. Taiwan).....	7
三、勝任細胞製備及電穿孔送入質體.....	7
四、同源重組基因剔除.....	8
五、細菌基因組 DNA 萃取(genomic DNA, gDNA).....	8
六、聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	8
七、洋菜膠體電泳.....	9
八、抗生素最小抑菌濃度(minimum inhibitory concentration, MIC).....	10
九、分泌蛋白收集.....	10
十、膜囊泡收集.....	10
十一、膜蛋白收集.....	10
十二、十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺膠體電泳(SDS-PAGE)及染色.....	11
十三、SpeB 半胱胺酸蛋白酶活性測試.....	11
十四、溶菌酶殺菌能力測試.....	12
十五、過氧化氫殺菌能力測試.....	12
十六、抗菌肽 LL-37 最小抑菌濃度.....	12
十七、膜囊泡回補後抗生素最小抑菌濃度.....	13
十八、質譜儀樣本製備.....	13
十九以流式細胞技術分析 LL-37 及 poly-L-lysine 親和性.....	14
參、研究結果.....	15
肆、討論.....	23
伍、參考文獻.....	28
圖表.....	31



壹、簡介

一、A 型鏈球菌

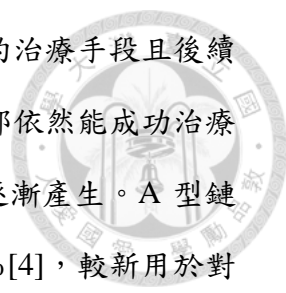
1. A 型鏈球菌的特性與分型

Streptococcus pyogenes 是一種革蘭氏陽性的鏈球菌，按照藍斯菲爾德分類法歸類為 A 型[1]，通常直接以 A 型鏈球菌(Group A *Streptococcus*, GAS)代稱。A 型鏈球菌是以人類作為唯一宿主的病原菌，常見於人類鼻咽部與皮膚表面，容易在兒童或免疫力低下時造成感染，造成表皮感染的咽喉炎和膿皰疹，或進一步侵入人體造成菌血症和壞死性筋膜炎等[2]。A 型鏈球菌可進一步透過細菌表面的 M protein 進行分型，不同血清型的 A 型鏈球菌在感染症狀或細胞特性上有所差異，如 M1 血清型為最常見的 A 型鏈球菌，M4 血清型的 A 型鏈球菌缺乏玻尿酸莢膜等。

2. A 型鏈球菌的疫苗發展

A 型鏈球菌的細菌疫苗開發方向以多種不同的細菌蛋白作為標的，其中最主要也最常見的疫苗開發標的即為分型依據的 M protein，但由於 M protein 的分型眾多，開發出的疫苗效力難以涵蓋足夠多的血清型，且疫苗引發的抗體可能會攻擊人體自身器官，因此 M protein 疫苗尚未足夠可靠用於對抗 A 型鏈球菌。2016 年一篇關於 A 型鏈球菌疫苗的回顧文獻整理了多個疫苗開發的進程，使用細菌表面糖蛋白、細菌 T antigen(線毛)、細菌分泌毒素(包括 exotoxinA/B/C、serine protease SpeB、補體 C5a 分解酶)作為目標的疫苗都在臨床試驗前即告失敗，使用 M protein 抗原決定位(epitope)的疫苗也未進入臨床試驗，而試圖包含多種 M protein 的多價 M protein 疫苗表現最好的一支也在第二期臨床試驗中宣告失敗[3]。在尚未有可靠疫苗的情況下，抗生素為治療 A 型鏈球菌感染的主要方法。

3. A 型鏈球菌的治療方案—抗生素



在 A 型鏈球菌中的感染案例中 penicillin 都被作為最首先的治療手段且後續治療都以抗生素作為主要考量，雖然 penicillin 在大多數時候都依然能成功治療 A 型鏈球菌感染，但抗藥性 A 型鏈球菌也隨著抗生素的使用逐漸產生。A 型鏈球菌感染的 penicillin 治療在部分地區治療失敗的案例已達 40%[4]，較新用於對付 A 型鏈球菌感染的 Macrolides, lincosamides, and streptogramins (MLS) 抗生素也漸有抗藥性產生，截至 2008 年以前的研究指出在部分歐洲國家如芬蘭、法國、義大利等國發現對 Macrolides 類藥物 erythromycin 抗性的 A 型鏈球菌通常超過 20%，而後數篇持續到 2016 年的研究也指出抗 Macrolides 藥物的 A 型鏈球菌在希臘、中國以及保加利亞佔臨床分離菌株的比例漸趨提升[5-7]。在當前抗生素幾為 A 型鏈球菌唯一治療方式的情況下，A 型鏈球菌的抗生素耐受性上升趨勢視為不容忽視的問題。

二、PrsA 蛋白

1. PrsA 蛋白的特性

在 A 型鏈球菌的基因組內有 *prsA* gene，產物 PrsA 蛋白是一種 post-translational chaperon，屬於膜上脂蛋白的一員，主要被認為定錨在細胞膜上，存在於細菌細胞膜與細胞壁之間的周質區域，並影響許多蛋白的成熟，如細胞壁合成蛋白 penicillin-binding protein、分泌性質的細菌致病因子 Erythrogenic toxins SpeB、細菌生長所需蛋白 alpha-amylase 等。PrsA 蛋白或 PrsA-like gene 廣泛存在於革蘭氏陽性菌中，如轉糖鏈球菌(*Streptococcus mutans*)[8]、李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)[9]、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)[10]和枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)[11]等，雖然 PrsA 蛋白在部分細菌如李斯特菌和枯草桿菌的作用機制被研究的較為完整，但在其餘細菌如金黃色葡萄球菌、A 型鏈球菌的研究多停留在性狀描述而機轉尚未明確。在不同的細菌中 *prsA* 基因的複本數有所不同，如在枯草桿菌、轉糖鏈球菌、肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)中 *prsA* 只

有一個複本，但在李斯特菌和 A 型鏈球菌中有 *prsA1* 及 *prsA2* 兩個複本[12]，在李斯特菌的過往研究中 *prsA2* 被認為是主要發揮功能的 *prsA* gene [13]，*prsA1* 被認為沒有功能或功能尚不明確。在 M4 血清型 A 型鏈球菌中 *prsA1* 基因編號為 *spy1240*，而 *prsA2* 的位置是 *spy1825*。

2. PrsA 蛋白的功能

PrsA 在過往研究中有報導會影響許多最終分泌到細胞外介質中的蛋白。在枯草桿菌的研究中，發現 PrsA 蛋白活性是分泌蛋白到胞外的速率限制步驟之一，當抑制 PrsA 蛋白的活性時，PrsA 蛋白的活性受抑制程度正比於分泌蛋白(以 AmyQ alpha-amylase 作為代表)分泌量減少的幅度[14]。在乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)的研究中，類 PrsA 的蛋白 PmpA 會幫助外送的豬葡萄球菌 (*Staphylococcus hyicus*)的分泌型脂肪酶進行折疊，當 PmpA 缺乏時外送表現的豬葡萄球菌脂肪酶會被乳酸乳球菌自身帶有的 HtrA 蛋白酶切割，而過量降解產物的堆積會影響到細菌本身的生長情形[15]。

PrsA 蛋白也被報導會影響許多停留在細胞膜周質間發揮作用蛋白的活性。在李斯特菌的研究中發現 PrsA 蛋白存在與否對重要致病因子 phospholipase C (PC-PLC)的功能相當重要，在正常生理狀況下李斯特菌在細胞膜外周質表現的 metalloprotease (Mpl)會偵測外在環境 pH 值的變化進而活化並切割 PC-PLC 酶原產出正常活性的 PC-PLC，PrsA 此時扮演的角色為包裹摺疊 PC-PLC 酶原停留在細胞膜外周質等待 Mpl 切割，而當 PrsA 蛋白失活時即便 Mpl 活性正常也無法產出成熟的 PC-PLC [16]。在金黃色葡萄球菌的研究中發現 PrsA 蛋白被剔除會影響 penicillin-binding protein 2A (PBP2A)的活性，PBP2A 是一種對 β -lactam 類抗生素有耐受性的 PBP，即使在 oxacillin、methicillin 等抗生素存在的情況下依然保有合成細胞壁的能力，研究中發現剔除掉 PrsA 蛋白後原先具耐受性的 oxacillin-resistant *S. aureus* (ORSA)重新對 oxacillin 敏感，進一步檢視發現編碼

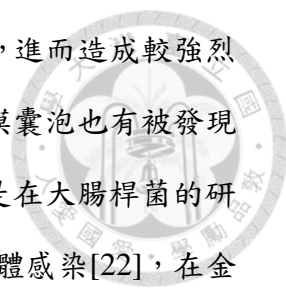
PBP2A 的 *mecA* 表現正常但沒有正常功能的 PBP2A 產出[17]。在枯草桿菌的研究中，PrsA 蛋白被發現會與同樣與 PBP 的成熟有關[18]。在轉糖鏈球菌的研究中發現缺少 PrsA 會造成細菌的 glucosyltransferases (GTF)運送到周質區後不具功能，致使細胞壁合成所需成分葡聚糖(glucan)產量的漸少進而影響細胞壁的合成效率。此外同篇研究中作者將螢光蛋白 GFP 與轉糖鏈球菌表面蛋白 SpaP 融合後觀察螢光強度發現 PrsA 的突變也會影響 GFP 的折疊，推測 PrsA 可能同時參與許多種蛋白的摺疊修飾[8]。

3. A 型鏈球菌的 PrsA

在李斯特菌和 A 型鏈球菌中，*prsA* 有 *prsA1* 及 *prsA2* 兩個複本[12]，在李斯特菌的過往研究中 *prsA2* 被認為是主要發揮功能的 *prsA* gene，*prsA1* 被認為沒有功能或功能尚不明確[13]。在 A 型鏈球菌的研究中發現 PrsA 蛋白與重要致病因子 Erythrogenic toxins SpeB 的活性有關，SpeB 在正常條件下會先以 SpeB 酶原的形式被轉譯出來而後以自身蛋白酶活性切割自己後轉為活化形式釋出到胞外，將會表達 SpeB 的 A 型鏈球菌突變掉 *prsA* 後原先活性 SpeB 消失僅留有大量 SpeB 酶原存在[19]。雖然在其他細菌的研究中 PrsA 蛋白被認為可能可以參與多種不同的蛋白折疊，但在 A 型鏈球菌上 PrsA 蛋白尚未有太多研究僅確認 SpeB 為 PrsA 的折疊標的。

三、膜囊泡

膜囊泡(membrane vesicle)是細菌相當重要的一種分泌蛋白的型式，與單純將蛋白折疊後以懸浮形式釋出到胞外不同，膜囊泡是從細菌的細胞膜釋出小塊脂雙層膜構造，在膜內空腔包裹攜帶水溶性蛋白或在脂質膜上嵌有脂溶性蛋白。膜囊泡帶有許多細菌的致病因子，包括黏附素(adhesins)、細菌外毒素、蛋白酶等各種酵素或非蛋白質抗原如脂多醣(LPS)等，在脂質構造的包覆下這些毒力因子被認



為可能有更好的穩定性或能夠透過膜融合更簡單進入宿主細胞，進而造成較強烈的免疫反應[20,21]。除了釋出致病因子幫助細菌感染宿主外，膜囊泡也有被發現有其他功能。膜囊泡被發現能提供細菌對逆境的抵抗能力，像是在大腸桿菌的研究中膜囊泡能顯著降低噬菌體活性藉此保護細菌本身不被噬菌體感染[22]，在金黄色葡萄球菌的研究中發現分泌出的膜囊泡內帶有能分解 β -lactam 類抗生素的 β -lactamase BlaZ，將該膜囊泡分離後能使 ampicillin 敏感的大腸桿菌對 ampicillin 耐受性上升[23]。膜囊泡也被發現可能達成細菌跟宿主間互動，在伯氏疏螺旋體 (*Borrelia burgdorferi*) 的研究發現膜囊泡可以達成細菌與宿主之間的雙向脂質交換[24]。膜囊泡也有被報導與細菌細菌間交互作用有關，在同種細菌交流部分膜囊泡被發現在淋病雙球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 的案例中會包裹 DNA，從具有特定質體的細菌株傳輸質體給不具該質體的細菌[25]。在不同種細菌的交互作用部分黃色黏球菌 (*Myxococcus xanthus*) 的膜囊泡被發現可以殺死並消化同環境中的大腸桿菌提升黃色黏球菌自己的生存優勢[26]，而同種細菌的交互作用也可藉由膜囊泡介導進而提升生物膜形成效率[27]。此外在膜囊泡的分析中發現其中也可能包裹有金屬收集蛋白存在，藉膜囊泡分泌優勢以更高效率收集環境中微量的金屬成分如鐵、鋅等[28]。

過往研究中認為膜囊泡僅由革蘭氏陰性菌產生，原因在於格蘭氏陰性菌在細胞壁外另有一層外膜存在而膜囊泡便是由外膜釋出，然而革蘭氏陽性菌最外層為細胞壁，膜囊泡很難由內膜產生後通過細胞壁釋出，但在近年的研究中發現許多格蘭氏陽性菌同樣會產生膜囊泡構造，如李斯特菌[29]、肺炎鏈球菌[30]、A 型鏈球菌[31]等。在格蘭氏陽性菌膜囊泡的分泌過程中細胞壁確實是需要克服的阻礙，在枯草桿菌的研究中發現細胞壁的強度與膜囊泡的釋放有關聯，更甚者細菌可能會使用內溶素(endolysin)弱化自身細胞壁促使膜囊泡釋出[32]。在 B 型鏈球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 的膜囊泡研究中發現將單獨分離的 B 型鏈球菌膜囊泡後送入懷孕小鼠絨毛膜即會造成與 B 型鏈球菌陰部感染時相似症狀的早產或

胎兒死亡[33]。




四、研究目標與實驗設計

我們希望透過比較 *prsA* 剔除的 A 型鏈球菌與野生株在不同層面的差異，探討 PrsA 會影響到下游哪些蛋白作用，並觀察 *prsA* 剔除在哪些層面會對 A 型鏈球菌造成影響。

1. 首先以同源重組的方式建構出 PrsA1 剔除的突變株 $\Delta prsA1$ ，以及 PrsA1/A2 雙重剔除的突變株 $\Delta prsA2/prsA1$ ，與原先實驗室的 A 型鏈球菌野生株和 $\Delta prsA2$ 共四株菌進行實驗。
2. 已知 PrsA 蛋白是一種伴隨蛋白，可以影響許多細菌蛋白質的成熟與分泌，如細胞壁生合成蛋白、分泌性質的細菌致病因子與細菌細胞膜周質蛋白等，因此我們初步將廣泛的在多個面向對突變株進行測試，以期了解 PrsA 缺失的 A 型鏈球菌對於處在各式外在環境壓力下的反應，觀察在那些情境下 PrsA 的缺失會有影響。我們會分別觀察 PrsA 缺失是否影響到(1)A 型鏈球菌對氧化壓力的反應，(2)細胞壁生合成與(3)對抗生素的耐受性。
3. 為了找出 PrsA 會影響什麼蛋白的摺疊，我們將收集野生株與 *prsA* 突變株不同位置的蛋白進行分析。由於 PrsA 主要在細胞膜外周質區作用，我們選擇收集細胞膜膜蛋白、分泌蛋白、以及膜囊泡蛋白，進行 SDS-PAGE 後以 silver stain 或 Coomassie blue 染色，接著以質譜儀分析比對那些蛋白受到影響，並選擇有可能解釋前部分性狀差異的相關蛋白進行後續研究。

貳、研究材料與方法

一、實驗用菌種



菌種	特徵	來源
<i>S. pyogenes</i> M4	M4 serotype	CDC 4063-05
<i>S. pyogenes</i> mutant $\Delta prsA2$	Foldase PrsA2 基因剔除	Lab construct
<i>S. pyogenes</i> mutant $\Delta prsA1$	Foldase PrsA1 基因剔除	This study
<i>S. pyogenes</i> mutant $\Delta prsA1/prsA2$	Foldase PrsA1/A2 基因剔除	This study

二、設計引子 (Primer; Tri-I Biotech, Inc. Taiwan)

Primers	Sequences (5'→3')	Target
cat-for	atggagaaaaaatcactggatatacc	cat
cat-rev	ttacgccccgcctgccactcatcgca	cat
UpUp-for- <i>spy1825</i>	gtagtgggaagcagatgctgc	Upstream <i>prsA2</i>
DnDn-rev- <i>spy1825</i>	gtagacatggattatgtgcc	Downstream <i>prsA2</i>
for- <i>spy1825</i>	accttagggaataaactggca	<i>prsA2</i>
rev- <i>spy1825</i>	<u>tataagataacagtaattatta</u>	<i>prsA2</i>
UpUp-for- <i>spy1240</i>	gaacgtggtacggctggg	Upstream <i>prsA1</i>
DnDn-rev- <i>spy1240</i>	tgacagcttgggcaatagc	Downstream <i>prsA1</i>
for- <i>spy1240</i>	ctgattagtcaataaaatcctac	<i>prsA1</i>
rev- <i>spy1240</i>	ataaaaaggagctcagaagtaa	<i>prsA1</i>

實驗中所採用的 primer 儲存濃度皆為 100 μ M。

三、勝任細胞製備及電穿孔送入質體

將 M4 GAS 隔夜培養於含有 20 mM 之 glycine (Bioshop, Cat#GLN011.1) 的 THY 中，稀釋至 A_{600} 為 0.1 後再培養到 A_{600} 為 0.3 (早期對數期)。勝任細胞的製備全程在冰上操作。於 4 °C 以 4000 rpm 離心 10 分鐘將 GAS 沉澱下來，以 25 ml 的 0.625 M sucrose (Sigma, Cat#S1888) 清洗兩次後，再分別以 15 ml 和 10 ml 的 0.625 M sucrose 各清洗一次。最後 GAS 回溶在 300 μ l 的 10% glycerol (Sigma,

Cat#5516) 中。取 50 μ l 勝任細胞與 2 μ g 質體混勻後，轉移至 1 mm gap Electroporation cuvette Plus (BTX, Cat#Model No.610)，再使用 BTX/Harvard Apparatus ECM 630 Exponential Decay Wave Electroporation System (BTX) 以 400 Ω 、25 μ F、1.75 kV 電擊細胞。將電擊後的細胞回溶於 2 ml 的 THY 中，在 30 °C 培養 2 小時。再把菌液均勻塗在含 2 μ g/ml 之 erythromycin 的 THA plate (THB+1.5% Agar) (THA/erm2)，於 30°C 培養進行篩選。

四、同源重組基因剔除

將 THA/erm2 長出的 GAS 培養於 THY/erm5 中，置於 30°C 或 37 °C 生長，等待 GAS 與質體發生同源置換，再以 PCR 確認已發生單點交換(single crossover)。挑選已發生單點交換的菌株在 30 °C 培養於 THY 中，每 5 代塗盤一次並挑選單一菌落分別培養於 THY 和 THY/erm5 中，篩選出只能生長於 THY (雙點交換剔除質體與 cat 基因/目標基因) 的 GAS，再以 PCR 確認是否為目標基因剔除的菌株。

五、細菌基因組 DNA 萃取(genomic DNA, gDNA)

使用 Geneaid DNA isolation kit (Geneaid, Cat#GEE150) 萃取 gDNA，詳細步驟依 kit 說明書指示操作。

六、聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

使用程式溫度控制儀 (BIO-RAD T100TM Thermal Cycler) 進行反應，並依照引子以及目標基因的特性設定不同的反應條件，反應得到的產物會以 DNA 洋菜膠體電泳分析。

(1) 確認 pHY-*spy1240* 質體與 M4 GAS 基因組發生單點交換(single crossover) 使用 UpUp-For-*spy1240* 配 *cat*-Rev 以及 DnDn-Rev-*spy1240* 配 *cat*-For 進行 PCR，反應條件為 95°C 5 分鐘、(95°C 30 秒、58°C 30 秒、72°C 45 秒) 25 循環、68°C 10 分

鐘。

(2) 確認 pHY-*spy1240* 質體與 M4 GAS 基因組發生雙點交換(double crossover)使用 cat-For 配 cat-Rev、For-*spy1240* 配 Rev-*spy1240* 以及 UpUpFor-*spy1240* 配 DnDn-Rev-*spy1240* 進行 PCR，反應條件為 95°C 5 分鐘、(95°C 30 秒、58°C 45 秒、72°C 120 秒) 25 循環、68°C 10 分鐘。

(3) 確認 pHY-*spy1240* 質體與 Δ *spy1825* 突變株基因組發生單點交換(single crossover) 使用 UpUp-For-*spy1240* 配 cat-Rev 以及 DnDn-Rev-*spy1240* 配 cat-For 進行 PCR，反應條件為 95°C 5 分鐘、(95°C 30 秒、58°C 30 秒、72°C 45 秒) 25 循環、68°C 10 分鐘。

(4) 確認 pHY-*spy1240* 質體與 Δ *spy1825* 突變株基因組發生雙點交換(double crossover) 使用 cat-For 配 cat-Rev、For-*spy1240* 配 Rev-*spy1240* 以及 UpUpFor-*spy1240* 配 DnDn-Rev-*spy1240* 進行 PCR，反應條件為 95°C 5 分鐘、(95°C 30 秒、58°C 45 秒、72°C 120 秒) 25 循環、68°C 10 分鐘。

七、洋菜膠體電泳

使用 Tris/Borate/EDTA 緩衝液(TBE 緩衝液，在 1 公升 TBE 緩衝液含有 10.8 g 的 Tris、5.5 g 的 Boric acid、4 ml 的 0.5 M EDTA)。配製 1.2% agarose (UniRegion Bio-Tech，Cat#UR-AGA001)，並且加入 TOOLS DNA View 染劑(TOOLS，Cat#TTDNA01)稀釋 25000 倍。先把洋菜膠和 TBE 緩衝液放在水平式電泳槽內，再將欲分析的 DNA 樣本以及 ExcelBand 1 KB DNA Ladder (SMOBIO，Cat#DM3100)加入洋菜膠凹槽中，於 100 伏特電壓下進行電泳。完成電泳後將洋菜膠置於 Benchtop 2UV Transilluminators (UVP)拍攝由 302 nm 紫外光照射的結果，再與 DNA Ladder 比對 DNA 大小。

八、 抗生素最小抑菌濃度(minimum inhibitory concentration, MIC)

將抗生素稀釋至目標濃度(penicillin 0.125 µg/ ml, daptomycin 1 µg/ ml, gentamycin 256 µg/ ml)備用。將各組 GAS 以 THY medium 37°C 隔夜培養後取 1 ml 加至 9 ml THY medium 中培養至對數期(A_{600} 約為 0.4)，以 3000 g 離心，再用 PBS 沖洗一次後回溶在 5 ml 培養液(serum free DMEM+5% THY)中，測量 A_{600} 後調整濃度為 5×10^6 CFU/ml。將抗生素以 2 倍連續序列稀釋，並分別加入 100 µl 稀釋後的抗生素與菌液到 96 孔盤培養皿，培養 16 小時後觀察細菌無法生長(DMEM 無變色)的最低抗生素濃度並記錄。

九、 分泌蛋白收集

將 M4 GAS 隔夜培養於 THY medium，離心後收取上清液過 0.22 µm 濾紙(Millex®, Cat#SLGV033RS)後備用。取上清液 1.8 ml 加入 0.2 ml 的 100% TCA(SIGMA, #T6399)溶液，混勻後留置冰上 30 分鐘。在 4°C 以 13,000 g 離心 10 分鐘，去上清液後以 400 µl 丙酮沖洗，再次離心 10 分鐘，去上清液並將離心管開蓋放置冰上等待自然風乾。最後以 60 µl 的 SDS-PAGE sample buffer 沖洗回溶蛋白。

十、 膜囊泡收集

將 M4 GAS 隔夜培養於 THY medium，離心後收取上清液過 0.22 µm 濾紙(Millex®, Cat#SLGV033RS)，取約 40 ml 以 150,000 g (使用 sw41 Ti rotor, Beckman Coulter) 4°C 離心後去上清液，以 120 µl SDS-PAGE sample buffer 沖洗回溶蛋白。

十一、 膜蛋白收集

將各組 GAS 以 THY medium 37°C 隔夜培養後取 1 ml 加至 9 ml THY medium 中培養至晚對數期(A_{600} 約為 0.8)，以 2000g 離心，用 PBS 沖洗一次後回溶在 KPN buffer (20mM 磷酸二氫鉀、140mM 氯化鈉、pH7.5)中。調整濃度至 A_{600} 為 0.8 後

加入最終濃度 400 µg/ml 的溶菌酶，37°C作用 3 小時。接著加入最終濃度 6 µg/ml 的 RNase，最終濃度 6µg/ml 的 DNase，最終濃度 1 倍的蛋白酶抑制劑(Roche，#000000004693159001)，室溫作用 10 分鐘。以超音波粉碎儀(Sonics and Materials vibra-cell VCX130)低功率模式 30 秒震盪 30 秒休息進行六個循環，接著以 10,000g 在 4°C離心 10 分鐘，取上清液在 120,000g (使用 100Ti rotor，Beckman Coulter) 4°C離心 45 分鐘，去上清液後以 KPN buffer 潤洗一次最後以 120 µl SDS-PAGE sample buffer 沖洗回溶蛋白。

十二、 十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺膠體電泳(SDS-PAGE)及染色

調配 15% 丙烯酰胺濃度的十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺膠(5 ml 丙烯酰胺(Bio-Rad，#161-0158)，2.5 ml 1.5M Tris-HCl，2.5 ml 水，100 µl 的 10% 十二烷基硫酸鈉，50 µl 過硫酸銨，5 µl TEMED(BioShop，#TEM001)，固定電壓 120V 進行電泳。電泳結束後將膠體裁切後以 Coomassie blue 染劑(F1，#F1RAP500)染色三十分鐘再以二次過濾水退染隔夜，或使用 silver stain plus kit (Bio-rad，#161-0449)染色，接著用 Bio-Rad ChemiDoc™ MP 多重螢冷光影像系統記錄。

十三、 SpeB 半胱氨酸蛋白酶活性測試

將 M4 GAS 隔夜培養於 THY medium，離心後收取上清液過 0.22 µm 濾紙(Millex®，Cat#SLGV033RS)後備用。製備 activation buffer (1mM EDTA、20mM DTT、0.1M sodium acetate buffer pH5.0)。將收取的 GAS 隔夜培養基上清液取 200µl，加入 200µl activation buffer 以及 400µl 的 2% azocasein (SIGMA，#A2765) (in activation buffer)，40°C作用 60 分鐘後加入最終濃度為 15%的 TCA (SIGMA，#T6399)進行沉澱，劇烈震盪後以 15,000g 離心 5 分鐘，取上清液測量 A₄₄₀ 吸光度並記錄數據。



十四、 溶菌酶殺菌能力測試

將 M4 GAS 隔夜培養於 THY medium，離心後以 THY 沖洗一次，離心後回溶在 THY medium 中測量 A_{600} 調整濃度至 0.8 備用。將溶菌酶 (SIGMA, #L6876) 回溶在 THY medium 中調整濃度至 20 mg/ml 與 50 mg/ml 備用。混合 250 μ l 菌液與 250 μ l 溶菌酶，在 37°C 作用 120 分鐘後 10 倍序列稀釋至適當濃度後取 20 μ l 滴在 THB agar plate 上，37°C 隔夜培養紀錄菌落數並換算濃度。

十五、 過氧化氫殺菌能力測試

將 M4 GAS 隔夜培養於 THY medium，離心後以 THY 沖洗一次，離心後回溶在 THY medium 中測量 A_{600} 調整濃度至 0.4 備用。將 stock 濃度 30% 的過氧化氫溶液 (SIGMA, #31642) 以 THY medium 稀釋至 4%、1%、0.25% 三個濃度備用。(a) 混合 450 μ l 菌液與 50 μ l 過氧化氫(4%、1%、0.25%、0%)，在 37°C 作用 30 分鐘後 10 倍序列稀釋至適當濃度後取 20 μ l 滴在 THB agar plate 上，37°C 隔夜培養紀錄菌落數並換算濃度。(b) 混合 450 μ l 菌液與 50 μ l 過氧化氫(1%)，在 37°C 作用 0 分鐘、15 分鐘、30 分鐘後 10 倍序列稀釋至適當濃度後取 20 μ l 滴在 THB agar plate 上，37°C 隔夜培養紀錄菌落數並換算濃度。

十六、 抗菌肽 LL-37 最小抑菌濃度

將抗菌肽 LL-37 (AnaSpec, AS-61302) 回溶至 640 μ M，兩倍序列稀釋至目標濃度 80 μ M 備用。將 M4 GAS 以 THY medium 37°C 隔夜培養後取 1 ml 加至 9 ml THY medium 中培養至對數期 (A_{600} 約為 0.4)，以 3000 g 離心，再用 PBS 沖洗一次後回溶在 5 ml 培養液 (serum free DMEM+20% THY) 中，測量 A_{600} 後調整濃度為 10^5 CFU/ml。將抗生素以 2 倍連續序列稀釋，並分別加入 10 μ l 稀釋後的抗菌肽 LL-37 與 90 μ l 菌液到 96 孔盤培養皿，培養 16 小時後觀察細菌無法生長 (DMEM 無變色) 的最低抑菌濃度並記錄。



十七、 膜囊泡回補後抗生素最小抑菌濃度

將抗生素 daptomycin 稀釋至目標濃度 $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 備用。將 M4 GAS 以 THY medium 37°C 隔夜培養後取 $1\ \text{ml}$ 加至 $9\ \text{ml}$ THY medium 中培養至對數期 (A_{600} 約為 0.4)，以 $3,000\ \text{g}$ 離心，再用 PBS 沖洗一次後回溶在 $5\ \text{ml}$ 培養液 (serum free DMEM+5% THY) 中，測量 A_{600} 後調整濃度為 $5 \times 10^6\ \text{CFU}/\text{ml}$ 。以與膜囊泡收集實驗中相同條件製備膜囊泡，超高速離心後以 $120\ \mu\text{l}$ 培養液 (DMEM+20% THY) 回溶備用。將抗生素 daptomycin 以 2 倍連續序列稀釋，並分別加入 $100\ \mu\text{l}$ 菌液、 $50\ \mu\text{l}$ 回溶膜囊泡、 $50\ \mu\text{l}$ 稀釋後的抗生素到 96 孔盤培養皿，培養 16 小時後觀察細菌無法生長 (DMEM 無變色) 的最低抗生素濃度並記錄。

十八、 質譜儀樣本製備

按實驗九與實驗十條件收集分泌蛋白和膜囊泡後，以實驗十二條件進行十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺膠體電泳，以 coomassie blue 染劑染色後用二次過濾水退染隔夜，將膠體取目標片段後切成邊長約 $0.5\ \text{mm}$ 的立方體備用。配置含有 40% 乙腈 (ACN) 的 $50\ \text{mM}$ 碳酸氫銨溶液 (後稱作溶液 A)，3% 乙腈的 0.4% 甲酸溶液 (溶液 B)，50% 乙腈的 0.4% 甲酸溶液 (溶液 C)，接著以溶液 A 配置 $5\ \text{mM}$ 二硫蘇糖醇 (DTT)、 $20\ \text{mM}$ 碘乙醯胺 (IAA) 備用。將切好的膠體立方塊與溶液 A 混合在室溫作用 10 分鐘，接著吸乾液體後混合 DTT 溶液在 60°C 作用 20 分鐘，移除液體後加入 IAA 溶液在室溫避光作用 10 分鐘。移除 IAA 溶液再加入 100% 乙腈室溫作用 10 分鐘，重複數次確保立方塊完全脫水，接著完全去除乙腈後加入溶於 $50\ \text{mM}$ 碳酸氫銨溶液的適當濃度胰蛋白酶 (約每管蛋白總量的 $1/50$)， 37°C 作用隔夜。次日加入溶液 B 室溫作用 10 分鐘，收集液體並重複一次此步驟，接著加入溶液 C 室溫作用 10 分鐘，同樣收集液體後加入 100% 乙腈室溫作用，重複數次後確保立方塊完全脫水並收集所有液體。將收集的液體室溫抽真空離心乾燥並保存。最後以 C18 column 收集純化蛋白。將 zip tip (Millipore, #ZTC18S960) 用含 50% 乙腈的 0.1%

三氟乙酸溶液吸吐五次活化，接著以 0.1% 三氟乙酸溶液清洗，然後將回溶在 0.1% 三氟乙酸的樣本慢速過 zip tip 使樣本內蛋白結合在 column 中，再用 0.1% 三氟乙酸慢速潤洗除去多餘鹽類，最後以含 75% 乙腈的 0.1% 三氟乙酸沖洗管柱溶出蛋白，收集回溶液體抽真空離心乾燥後樣本送往台大貴重儀器中心進行質譜儀分析，分析結果用 MaxQuant 比對 Uniport 的資料庫得出預測蛋白。

十九、以流式細胞技術(Flow Cytometry)分析 LL-37 及 poly-L-lysine 親和性
將 M4 GAS 隔夜培養於 THY medium，以 1:10 稀釋後培養至對數期(A_{600} 約 0.4)，離心後以 PBS 沖洗兩次，回溶在 PBS 中測量 A_{600} 調整濃度至 0.1。在 V 型 96 孔盤培養盤中加入每格 100 μ l 菌液，再分別加入 0.3 μ g 的 LL-37(AnaSpec, AS-63934)或 1.7 μ g 的 poly-L-lysine(Sigma, P3069)，封膜後在 4°C 作用 30 分鐘，以 PBS 沖洗兩次(4°C 離心)，回溶在 500 μ l PBS 中再以流式細胞儀分析。

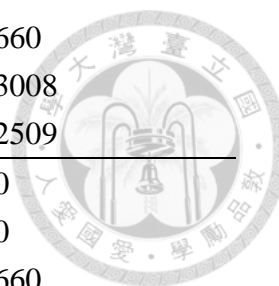
參、研究結果

一、建立剔除 *prsA* 基因之 M4 GAS 突變株

已知 *prsA* 在 GAS 中有 *prsA1* 與 *prsA2* 兩個複本[12]，其中 *prsA2* 被認為是主要發揮功能的基因，但 *prsA1* 的是否有功能或具備什麼功能尚未被研究。實驗室之前已經建立 $\Delta prsA2$ 之突變株，因此我的第一個實驗目標是利用同源置換方式建構 $\Delta prsA1$ 突變株和 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株，以期在 M4 GAS 中建構完整的 PrsA 突變株系統。首先設計帶有目標基因 *prsA1*(*spy1240*)上下游約 1 kb 及 *cat* gene 的載體，以電穿孔方式送入野生 GAS 中，以 THA/erm2 培養在 30°C 中。成功長出的菌代表質體成功送入。將菌繼代以 THY/erm5 培養在 37°C 中，當質體發生單點交換並嵌入細菌基因組的菌才能在 37°C 中生長。以 PCR 確認為上游嵌入或下游嵌入之菌株後，分別取數顆單一菌株畫盤保存。將單點交換的菌以 THY 培養在 30°C 中連續繼代，每五代塗盤挑菌分別養在 THY 及 THY/erm5 中，取僅能在 THY 生長的菌株進行 PCR 確認是否已發生第二次 crossover 發生並剔除目標基因 *prsA1*。在取得 $\Delta prsA1$ 突變株後，對 $\Delta prsA1$ 進行 *prsA2*(*spy1825*)的剔除，步驟同 *prsA1* 剔除方式唯基因上下游片段改為 *spy1825* 片段(圖一 a、圖一 b)。

預期目標產物大小如下

GAS	Forward primer	Reverse primer	redicted size (bps)
Wild type	for- <i>spy1825</i>	rev- <i>spy1825</i>	954
	rev- <i>spy1240</i>	rev- <i>spy1240</i>	1101
	<i>Cat</i> -for	<i>Cat</i> -rev	0
	UpUpfor- <i>spy1825</i>	DnDnrev- <i>spy1825</i>	3008
	UpUpfor- <i>spy1240</i>	DnDnrev- <i>spy1240</i>	2950
$\Delta prsA2$	for- <i>spy1825</i>	rev- <i>spy1825</i>	0
	rev- <i>spy1240</i>	rev- <i>spy1240</i>	1101
	<i>Cat</i> -for	<i>Cat</i> -rev	660
	UpUpfor- <i>spy1825</i>	DnDnrev- <i>spy1825</i>	2714
	UpUpfor- <i>spy1240</i>	DnDnrev- <i>spy1240</i>	2950
$\Delta prsA1$	for- <i>spy1825</i>	rev- <i>spy1825</i>	954
	rev- <i>spy1240</i>	rev- <i>spy1240</i>	0



	<i>Cat</i> -for	<i>Cat</i> -rev	660
	UpUpfor- <i>spy1825</i>	DnDnrev- <i>spy1825</i>	3008
	UpUpfor- <i>spy1240</i>	DnDnrev- <i>spy1240</i>	2509
Δ <i>prsA2/A1</i>	for- <i>spy1825</i>	rev- <i>spy1825</i>	0
	rev- <i>spy1240</i>	rev- <i>spy1240</i>	0
	<i>Cat</i> -for	<i>Cat</i> -rev	660
	UpUpfor- <i>spy1825</i>	DnDnrev- <i>spy1825</i>	2714
	UpUpfor- <i>spy1240</i>	DnDnrev- <i>spy1240</i>	2509

二、以 qRT-PCR 確認目標基因在 Δ *prsA* 突變株之表現量

在基因剔除過後進行 qRT-PCR 鑑定 *prsA* 的 mRNA 表現量，再次確認基因剔除效果的同時希望觀察在單一突變株中同源基因的剔除是否會影響到另一基因的表現。在 Δ *prsA1* 突變株和 Δ *prsA1/A2* 突變株中沒有偵測到 *prsA1* 的 RNA，wild type 及 Δ *prsA2* 突變株中有 Δ *prsA1* 的 RNA 存在，其中 Δ *prsA2* 突變株的 *prsA1* 表現量較 wild type 更少(圖二 a)。在 Δ *prsA2* 突變株和 Δ *prsA1/A2* 突變株中沒有偵測到 *prsA2* 的 mRNA，wild type 及 Δ *prsA1* 突變株中有 Δ *prsA1* 的 mRNA 存在， Δ *prsA1* 突變株的 *prsA2* 表現量較 wild type 更高(圖二 b)。

三、GAS 在兩種 medium 中的生長曲線

為了測試 *prsA* 基因的剔除是否會造成細菌生長上的影響，在後續實驗會使用到的 THY medium 及 high glucose DMEM (5% THY) 中進行了生長曲線測試。在 THY 中可以觀察到 Δ *prsA1/A2* 突變株生長曲線較其他三株 M4 GAS 有明顯的時間延遲，但在 330 分鐘後都能達到相近的濃度(圖三 a)。在 DMEM (5% THY) 中雖然 Δ *prsA1/A2* 突變株前期生長也略有延遲，但在 180 分鐘時達到與 Δ *prsA2* 突變株以及野生株相同濃度，此外 Δ *prsA1* 突變株全程維持較另三株 GAS 高的生長曲線(圖三 b)。總體而言 *prsA* 基因的剔除在 M4 GAS 的生長上影響不大。

四、GAS 對過氧化氫之耐受性

先前研究中有發現 PrsA 缺失雖然在營養環境時不影響細菌生長，但在養分來源較缺乏或代謝廢物累積的逆境時會顯現出細胞生長的劣勢[15]。我們想先知道缺乏 PrsA 表現之突變株在面對外界壓力時是否會影響到 GAS 的生存能力。氧化壓力主要由 reactive oxygen species (ROS)與 reactive nitrogen species (RNS)所造成，這些含氧或是含氮的自由基會對細菌的 DNA、蛋白質、脂質及細胞膜造成傷害。因此我們想要知道在氧化壓力這樣的逆境條件下，PrsA 的缺失是否會影響 GAS 的存活能力。H₂O₂ 是 ROS 中最穩定的形式且可以自由進出細胞膜，所以我們先利用 H₂O₂ 對 GAS 野生株與 *prsA* 突變株進行殺菌測試。在不同濃度的 H₂O₂ 處理 (0%、0.025%、0.1%、0.4% H₂O₂) 下觀察到在 0.4%、0% 時四株 GAS 存活率幾乎沒有差異，在 0.025% H₂O₂ 處理時野生株 GAS 的存活能力小幅弱於 $\Delta prsA2$ 突變株、 $\Delta prsA1$ 突變株、 $\Delta prsA1/A2$ 突變株，但統計上並無顯著差異。在 0.1% 濃度 H₂O₂ 的處理下野生株的存活能力顯著最差，接著依序為 $\Delta prsA1/A2$ 突變株、 $\Delta prsA2$ 突變株、 $\Delta prsA1$ 突變株，三株突變株 GAS 分別與野生株進行統計比較後皆有顯著差異但彼此間的統計並無顯著差異(圖四 a)。在以 0.1% H₂O₂ 刺激 GAS 野生株與 *prsA* 突變株後不同時間(0 分鐘、15 分鐘、30 分鐘)之後記錄各時間點細菌量，發現在 30 分鐘過後 0.1% H₂O₂ 對四株 GAS 都能達成顯著殺菌效果，經統計顯示野生株的細菌量減少幅度顯著較 $\Delta prsA1/A2$ 突變株、 $\Delta prsA2$ 突變株、 $\Delta prsA1$ 突變株更大，而三株突變株之前統計上並無顯著差異(圖四 b)。

五、GAS 對溶菌酶之耐受性

溶菌酶主要作用於分解細胞壁，細菌在細胞壁缺失後僅餘細胞膜作為屏障，在環境中的生存能力下降。在過往研究中觀察到枯草桿菌的 *prsA* 決定了細胞壁合成蛋白 PBP 能否正確摺疊發揮活性[18]，我們好奇在 GAS 中 *prsA* 的缺失是否也會造成細胞壁強度或其他方面有所差異。實驗將溶菌酶直接回溶在 THY medium 中調整濃度(0, 10, 25 mg/ml)再與隔夜培養的細菌作用兩小時觀察殺菌結果。實


驗結果發現無論是較低(10 mg/ml)或較高濃度(25 mg/ml)都可以觀察到四株 GAS 對溶菌酶耐受性有所差異(圖五)，在以溶菌酶作用 120 分鐘後 $\Delta prsA1/A2$ 突變株細菌量最低，野生株次之，而 $\Delta prsA1$ 突變株與 $\Delta prsA2$ 突變株細菌量較高，甚至在低濃度(10 mg/ml)時與沒有溶菌酶處理的組別相比持平甚至略為高出。

六、GAS 對抗生素耐受性的比較

之前的研究顯示枯草桿菌的 PrsA 決定了細胞壁合成蛋白 PBP 能否正確摺疊發揮活性[18]，金黃色葡萄球菌的 PrsA 會影響對 penicillin 耐受性的細胞壁合成蛋白 PBP2A 的活性[17]，顯示 PrsA 可能會影響 GAS 對抗生素的耐受性，所以我們接著測試 *prsA* 基因的剔除是否會影響 M4 GAS 對不同類型抗生素的耐受性。分別選用抑制細胞壁合成的 penicillin、會造成細菌細胞膜穿孔的 daptomycin、以及抑制蛋白質合成的 gentamycin 共三種不同類型抗生素。由於 PrsA 已知位於膜上並與分泌蛋白正確摺疊以通過細胞膜相關，我們推測 *prsA* 的剔除可能在 penicillin 或 daptomycin 耐受性上受到影響，gentamycin 的耐受性則不會變化。實驗結果中野生株與各突變株在 penicillin 及 gentamycin 的最小抑菌濃度(minimal inhibitory concentration, MIC)並沒有很顯著的差異，各株細菌對 penicillin 之 MIC 為 0.015625 到 0.03125 $\mu\text{g/ml}$ 之間，對 gentamycin 之 MIC 為 32 $\mu\text{g/ml}$ 。但在 daptomycin 中四株菌株的 MIC 則有顯著差異， $\Delta prsA1/A2$ 突變株的 MIC 為 0.03125 $\mu\text{g/ml}$ ，較 $\Delta prsA2$ 突變株及 $\Delta prsA1$ 突變株的 MIC 數值 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 低了八倍，較野生株的 MIC 數值 0.125-0.25 $\mu\text{g/ml}$ 也低了四至八倍。(表一)

七、分泌蛋白的收集比較

由於已知 PrsA 與分泌蛋白的折疊釋放有關，我們希望分析比較野生株與各突變株之間分泌蛋白的差異。先以 TCA 沉澱的方式收集蛋白，接著跑 15% SDS-PAGE 比較各株 GAS 之間的差異。在膠圖的比較中，可以看到 $\Delta prsA2/A1$ 突變株與



$\Delta prsA2$ 突變株的分泌蛋白組成較相近，而野生株和 $\Delta prsA1$ 突變株與另兩者都有一定程度的不同(圖六)。進一步將分泌蛋白跑膠以 Coomassie blue 染色，並切取目標片段(圖九 a)後進行 trypsin in-gel digestion，純化後送質譜儀分析，初步分析結果如表四。審視各個 band 的蛋白訊號，考量潛在蛋白分子量是否與膠圖位置相符，剔除目前暫不希望關注的細胞質蛋白(如轉錄轉譯相關蛋白、DNA 表現相關蛋白、細胞內代謝相關蛋白等)後我們總和出各個 band 中初步判斷值得關注的蛋白。band 1 有 Streptolysin O、60 kDa chaperonin、Probable NADH oxidase。band 2 有 Streptolysin O、Foldase protein PrsA1、60 kDa chaperonin、Probable NADH oxidase、Metal ABC transporter substrate-binding lipoprotein、Streptopain(SpeB)、Streptokinase。band 3 有 SpeB。band 4 有 Foldase protein PrsA1、SpeB、Streptolysin O。band 5 有 SpeB。band 6 有 Metal ABC transporter substrate-binding lipoprotein、SpeB。band 7 有 SpeB。band 8 有 SpeB、Exotoxin type C。band 9 有 SpeB。在 band 10 有 60 kDa chaperonin、Probable NADH oxidase、Streptolysin O、Streptokinase。band 11 與 band 10 相同為 60 kDa chaperonin、Probable NADH oxidase、Streptolysin O、Streptokinase。band 12 有 Metal ABC transporter substrate-binding lipoprotein、PTS system mannose-specific EIIAB component、60 kDa chaperonin、Probable NADH oxidase、Streptolysin O、Streptokinase。

八、膜囊泡 (membrane vesicle) 的收集比較

細菌釋放到胞外的蛋白除了直接釋放可溶於水的蛋白外，還會有以帶有蛋白的膜囊泡釋出的型式。在膜囊泡的收集比較中， $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株與 $\Delta prsA2$ 突變株的蛋白質組成也是較為相似，而與野生株相比也可以看到雖有差異但仍可見到有相似的蛋白組成存在。但在 $\Delta prsA1$ 突變株的結果中可以看到與另三者有很大的不同(圖七)。進一步將膜囊泡蛋白進行跑膠並以 Coomassie blue 染色，並切取目標片段後進行 trypsin in-gel digestion，純化後送質譜儀分析(圖九 b)。由於銀染

膠圖顯示除 $\Delta prsA1$ 突變株外三株 GAS 的蛋白分布類似，結合 Coomassie blue 染色膠圖顯示野生株的膜囊泡蛋白量較少，我們在切取目標片段時主要取 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株約 35-70kd 的各個片段，另外切取 $\Delta prsA2$ 突變株約 35-40kd 部分表現較高的片段以及 $\Delta prsA1$ 突變株唯一顯著差異的片段。初步分析結果如表五，與分泌蛋白分析時相同先篩去細胞質蛋白及蛋白大小與膠圖不符者，在 band 1 與 band 2 僅關注 Streptopain(SpeB)，同屬 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株的 band 3-7 之中有 SpeB、Streptolysin O、DEAD-box ATP-dependent RNA helicase CshA、Probable NADH oxidase、60 kDa chaperonin、ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit、Bifunctional protein GlmU、Chaperone protein DnaJ、UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1/2、UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase 等。Band 8 僅有 SpeB。綜合比較各個 band，我們在 band 1、band 2、band 6、band 7、band 8 都有觀察到較強的 SpeB 訊號，在 band 1 及 band 8 更是只有 SpeB 被確認，結合過往研究中對 SpeB 的酶原形式分子量約 40kd 及切割後成熟 SpeB 約 28kd 的認知，我們初步確認 SpeB 成熟與否中確實會受 *prsA* 剔除的影響。此外在 band 2 到 band 7 都有相當數量與細胞代謝相關的蛋白或基因轉錄轉譯蛋白被偵測，此結果與過往研究對 GAS 膜囊泡進行質譜儀分析結果類似[34]，顯示 GAS 的膜囊泡包裹的成分除分泌蛋白外也有相當部分的細胞質組成。

九、膜蛋白的收集比較

雖然過往研究中認為 PrsA 主要影響釋出到胞外的蛋白以及在周質區作用的蛋白，但考量到 PrsA 屬膜上脂蛋白，PrsA 或許亦有可能影響到同樣錨定在細胞膜上的其他蛋白。隔夜培養 GAS 後收集稀釋重新培養至晚對數期，清洗後回溶在 KPN buffer 中，以溶菌酶作用 3 小時分解掉 GAS 的細胞壁留下無細胞壁的原生質體，再以超音波粉碎儀打碎細胞，低速離心去除未破碎的細胞及各胞器等大體積細胞

殘渣後再以超高速離心收集細胞膜的斷片，接著回溶在 SDS-PAGE sample buffer 跑膠分離後染色(圖八)。實驗結果發現 *prsA* 突變與否似乎並不影響膜蛋白的構成，野生株、 $\Delta prsA1$ 突變株、 $\Delta prsA2$ 突變株的蛋白分布幾乎完全一致，而 $\Delta prsA1/A2$ 突變株雖然與其他株 GAS 的膜蛋白分布上有較多差異但也僅止於蛋白條帶強度差異以及多了少量不明顯的蛋白條帶。在沒有觀察到明顯差異的情況下我們不打算對膜蛋白部分進行後續研究與質譜儀分析。

十、補回膜囊泡後 GAS 對 daptomycin 的抗生素耐受性比較

以實驗八相同條件收集膜囊泡後取以 120 μ l DMEM(5% THY)回溶。同實驗六條件製備抗生素耐受性實驗，其中加入 100 μ l 細菌、50 μ l 目標濃度抗生素以及 50 μ l 膜囊泡。隔夜培養後觀察細菌生長情形並記錄 MIC。在補回膜囊泡後 $\Delta prsA1/A2$ 突變株展現了較高的 daptomycin 耐受性。相較於沒有補回膜囊泡的組別，不論是補回野生株或 $\Delta prsA1/A2$ 突變株的膜囊泡在 MIC 部分都有四倍以上差異，其中補回 $\Delta prsA1/A2$ 突變株自身膜囊泡有更高的 MIC 值達 0.5 μ g/ml，是補回 wild type 膜囊泡組別的 2.5 倍(表二)。

十一、比較 GAS 分泌蛋白中 SpeB 蛋白的活性

在質譜儀分析結果中我們注意到在 $\Delta prsA1$ 突變株以中似乎有大量成熟 SpeB 存在(表五)。過往文獻中有指出 *prsA2* 的存在對 SpeB 蛋白的成熟相當重要[19]，但並沒有觀察到 *prsA1* 對 SpeB 成熟是否有影響。為了驗證質譜儀分析結果，我們進一步確認 $\Delta prsA1$ 突變株是否確實有高於其他株 GAS 的具成熟活性 SpeB 存在。由於 SpeB 功能為 cysteine protease，實驗設計中在各株 GAS 的培養後培養基加入 azocasein(偶氮酪蛋白)以及活化反應的 activation buffer，若培養基中有存在 SpeB 則其蛋白酶活性會切割 azocasein 產出 azo-group 和 casein。以 TCA 沉澱抓掉分子量大的 casein 或未切割的 azocasein，懸浮在溶液中的 azo-group 就能以

440 nm 偵測，強度正比於溶液中 SpeB 活性。實驗結果確認 $\Delta prsA1$ 突變株確實有顯著大量成熟活性 SpeB 產生，符合跑膠及質譜儀分析的結果(圖十)。

十二、以流式細胞技術(Flow Cytometry)分析 LL-37 及 poly-L-lysine 親和性
我們好奇 GAS 對 LL-37 敏感性的差異是否源於 LL-37 結合到不同株 GAS 的親和性差異。將螢光標定的 LL-37 與各株 GAS 共同培養適當時間後沖洗掉未結合的 LL-37，以流式細胞儀分析螢光強度觀察 LL-37 與各株 GAS 結合強度(圖十一 A)。我們觀察到四株 GAS 中 LL-37 的結合強弱順序依序為 $\Delta prsA2$ 突變株、野生株、 $\Delta prsA1/A2$ 突變株、 $\Delta prsA1$ 突變株。先前 MIC 實驗中所知對 LL-37 最敏感的 GAS 為 $\Delta prsA1/A2$ 突變株(表三)，但在親和性實驗中 $\Delta prsA1/A2$ 突變株對 LL-37 親和性並非最高，我們認為 PrsA 突變造成 LL-37 敏感性差異並非源於對 LL-37 親和性的改變。

在 poly-L lysine 部分，以與 LL-37 相同作法在四株 GAS 上結合螢光標定的 poly-L-lysine，流式細胞儀分析結果顯示四株 GAS 對 poly-L-lysine 的結合強弱並沒有明顯的差異(圖十一 B)，從中我們推論 PrsA 的突變對 GAS 膜電位並沒有造成變化。

肆、討論

伴隨蛋白 PrsA 蛋白在 A 型鏈球菌(GAS)上的研究甚少，目前研究僅知道 PrsA2 對 GAS 毒力因子 SpeB 的成熟相當重要，但 PrsA2 是否會影響其他蛋白活性尚屬未知，與此同時同源基因複本 PrsA1 在 GAS 上是否有作用，若有作用具體又會影響什麼蛋白也尚未有人研究。本次研究中我們建構出 M4 GAS 的 $\Delta prsA1$ 突變株以及 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株，加上野生株以及過去實驗室已建構好的 $\Delta prsA2$ 突變株共四株不同 GAS，分別觀察 PrsA 缺失是否影響到 GAS 對(1)氧化壓力的反應(2)細胞壁合成的作用與(3)對抗生素的耐受性。同時為了找出 PrsA 具體影響什麼蛋白的功能，我們收集四株 GAS 不同位置的蛋白進行分析。由於 PrsA 主要在細胞膜外周質區作用，我們選擇收集細胞膜蛋白、分泌蛋白、以及膜囊泡蛋白，進行 SDS-PAGE 後以銀染或 Coomassie blue 染色，接著以質譜儀分析比對那些蛋白受到影響，並選擇有可能與前部分實驗觀察到性狀差異的相關蛋白進行後續研究。

在 GAS 中，*prsA* 有 *prsA1* 及 *prsA2* 兩個複本[12]，過往研究中，*prsA2* 被認為是主要發揮功能的 *prsA* 基因，在同為擁有 *prsA1* 及 *prsA2* 兩個複本的李斯特菌中對兩個 *prsA* 基因分別剔除後，僅 *prsA2* 剔除株在毒力因子分析與小鼠感染模型中發現有弱於野生株的表現，而 *prsA1* 剔除株與野生株的表徵沒有差異[13]，為了解在 GAS 中 *prsA1* 及 *prsA2* 是否會相互調節彼此的表現量，我們分別檢測了 *prsA1* 及 *prsA2* 在 GAS 野生株與 *prsA* 突變株中的表現。野生株的 GAS 中可以同時偵測到 *prsA1* 與 *prsA2* 的表現。而比較野生株與 $\Delta prsA2$ 突變株的 *prsA1* 表現量發現當 *prsA2* 被剔除後 *prsA1* 的表現量會上升(圖二 a)，接著比較野生株與 $\Delta prsA1$ 突變株的 *prsA2* 表現量發現 *prsA1* 剔除後 *prsA2* 的表現量下降(圖二 b)，這些結果與過往研究中 *prsA1* 無作用甚至不表現的猜測並不相符。雖然尚不確定 *prsA1* 與 *prsA2* 是否有上下游或互相拮抗的關聯存在，但基於後續實驗中收集蛋

白跑膠觀察到 $\Delta prsA1$ 突變株在蛋白分布上與野生株確有不同的結果(圖六、圖七) 我們猜測 *prsA1* 在 GAS 中確實有表現並實際影響到分泌蛋白與膜囊泡蛋白。

在對抗生素敏感性的比較中，我們發現 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株對 daptomycin 較敏感，但在 penicillin 或 gentamycin 上野生株與 *prsA* 突變株並沒有顯著的差異(表一)。在 penicillin 部分，雖然 PrsA 蛋白在其他細菌上有發現跟 penicillin-binding protein 活性有關，但在過往研究中發現 GAS 長期維持 penicillin 易感性[35]，長期監測 GAS 臨床感染案例中 penicillin 治療失敗比例在 30 年間僅上升約 4% [36]，說明普遍而言 GAS 對 penicillin 不具耐受性，我們猜測實驗用的 GAS 原先對 penicillin 的耐受性即處在相當低的水平，即使突變掉 *prsA* 可能造成 penicillin 耐受性降低也無法在這樣的條件下被觀察到。在 gentamycin 部分，由於 gentamycin 作用在蛋白生合成部分與 PrsA 蛋白功能相距甚遠，*prsA* 突變對 gentamycin 耐受性沒有影響符合預期。在 daptomycin 部分，過去研究認為 PrsA 在細菌細胞膜周質部分作用，確認影響分泌蛋白的同時也可能與部分膜蛋白摺疊有關，因此 *prsA* 的突變對 daptomycin 此類作用於細菌細胞膜的抗生素會有耐受性差異尚合乎預期，在這樣的發現下我們好奇 PrsA 是透過哪種機制影響 daptomycin 活性。過往研究中有發現金黃色葡萄球菌能透過釋出微小脂質雙層膜構造供 daptomycin 結合進而降低 daptomycin 活性[37]，結合過去對 PrsA 會影響分泌蛋白的認知，我們懷疑可能可以在 GAS 分泌物(包括分泌蛋白與膜囊泡)之中找到 daptomycin 耐受性變化的線索。

基於膜囊泡可能對 daptomycin 活性有影響的猜測，我們分離了野生株和 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株的膜囊泡，並在 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株對 daptomycin 耐受性的實驗中加入來源不同的膜囊泡觀察是否有影響(表二)。實驗結果發現加入當加入野生株生產的膜囊泡， $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株對 daptomycin 的耐受性確實提升。

若 daptomycin 耐受性差異確實源於膜囊泡，我們預期在補回 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株自身的膜囊泡時 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株對 daptomycin 耐受性不會提升或提升水平不如補回野生株膜囊泡，但實驗結果顯示對 daptomycin 耐受性提升幅度更強於補回野生株膜囊泡。對此結果我們猜測可能 GAS 野生株與突變株對 daptomycin 的耐受性差異並不源於膜囊泡因此 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株膜囊泡並不弱於野生株，或者 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株產生的膜囊泡較野生株更多，導致實驗時加入的膜囊泡量並不一致。在 daptomycin 的耐受性實驗之後，我們好奇與 daptomycin 作用相近的抗菌肽 LL-37 對 GAS 作用時是不是能觀察到類似的結果。測定 LL-37 的 MIC 數值(表三)後發現 $\Delta prsA2$ 突變株有最好的 LL-37 耐受性， $\Delta prsA1$ 突變株與野生株的耐受性可能稍弱，而 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株明顯弱於其於三株 GAS。此結果與 daptomycin 耐受性的實驗趨勢類似，再次佐證 *prsA* 突變會影響對 membrane-target 抗菌物質耐受性的結論。

在分析膜囊泡蛋白的實驗中發現不同株 GAS 的膜囊泡分泌量存在差異，每次重複實驗時在四株 GAS 的處理手法上一致，但回溶出的膜囊泡蛋白總是 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株多過野生株，由於離心再回溶過程中殘餘 THY medium 量難以保持完全一致故無法定量，但在膜囊泡銀染膠圖(圖七)可以看到 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株的蛋白條帶較野生株更為清晰，Coomassie blue 染色膠圖(圖八 B)可以更明顯的觀察到野生株蛋白量幾乎不夠以較不靈敏的 Coomassie blue 染色但 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株的膜囊泡蛋白清晰明顯。在以 in-solution 胰蛋白酶消化以製備 MS 樣本時有對回溶出的膜囊泡進行單次實驗定量，其中 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株膜囊泡蛋白量約為野生株的 2.5 倍。在過往對格蘭氏陽性菌膜囊泡分泌的研究中有發現細胞壁的弱化可能可以增加膜囊泡的分泌[32]，結合溶菌酶殺菌實驗中 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株對溶菌酶耐受性最低的實驗結果(圖五)，我們猜測兩套 *prsA* 基因皆突變後可能造成 GAS 的細胞壁弱化，進而導致膜囊泡釋出的量增加。在

膜囊泡進行質譜儀分析蛋白組成的實驗中有得到 UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1/2、UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamate ligase 三個與細胞壁合成相關的蛋白訊號，這幾個蛋白有可能是 PrsA 蛋白的作用標的之一，但目前實驗設計上尚無法確認在 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株之中這些蛋白的活性是否正常，只能留待後續研究。

在膜囊泡以及分泌蛋白的膠圖(圖八)結合質譜儀分析結果(表一、表二)都有發現似乎 $\Delta prsA1$ 突變株中具活性的 SpeB(大小約為 28kda)大量增加，後續進行 SpeB 活性測試也確認 $\Delta prsA1$ 突變株確實釋出較多具活性的 SpeB，此點在過去研究中並沒有發現類似現象，在過往研究中僅知道 SpeB 的成熟過程中需要 PrsA2 的參與[19]，但對於 PrsA1 對 SpeB 影響的研究尚屬空白。SpeB 雖然是 GAS 相當重要的毒力因子之一，但因為其蛋白酶活性同時會切割許多 GAS 自身的其他毒力因子故其表現強度受到嚴格調控[38]，我們猜測 PrsA1 可能直接或間接地參與到 SpeB 的調控中。另外在 SpeB 活性實驗中我們發現到實驗室所用 GAS 的野生株與 $\Delta prsA2$ 突變株以及 $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株在活性 speB 的表現量上並沒有顯著差異，結合過往文獻中 *prsA2* 突變後會造成 SpeB 無法正確活化的論述[19]，我們猜測或許實驗所用 M4 GAS 的野生株因品系差異緣故 SpeB 的表現較之前文獻所用的 M1 GAS 來得更低，在以 azocasein 作為 SpeB 切割受質的活性測試中不易觀察到因 *prsA2* 突變導致 SpeB 沒有活性的效應。

總和本次研究中的所有結果，我們觀察到(1)*prsA1* 在 M4 GAS 上確實有發揮功能而其功能可能與分泌蛋白與膜囊泡分泌有關，(2) $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株對 daptomycin 以及 LL-37 兩種 membrane-target 抗菌物質的耐受性明顯最差，(3) $\Delta prsA2/prsA1$ 突變株可能因為細胞壁生合成相關蛋白受影響導致細胞壁較弱進而使得膜囊泡分泌量提升，(4)PrsA2 確實影響 SpeB 的成熟而 PrsA1 可能影響

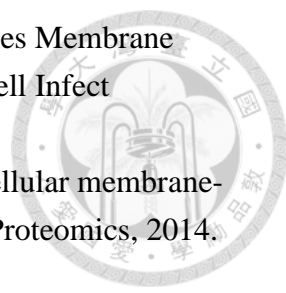
SpeB 的調控。但對 PrsA 實際對 M4 GAS 的影響目前仍只停留在現象描述，實際可能透過什麼途徑造成此現象尚缺乏實驗證據，仍需未來後續研究證明。



伍、參考文獻

1. Lancefield, R.C., A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. *J Exp Med*, 1933. **57**(4): p. 571-95.
2. Carapetis, J.R., et al., The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis*, 2005. **5**(11): p. 685-94.
3. Steer, A.C., et al., Status of research and development of vaccines for *Streptococcus pyogenes*. *Vaccine*, 2016. **34**(26): p. 2953-2958.
4. Brook, I., Penicillin failure in the treatment of streptococcal pharyngotonsillitis. *Curr Infect Dis Rep*, 2013. **15**(3): p. 232-5.
5. Michos, A., et al., Molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* macrolide resistance of paediatric isolates during a 7 year period (2007-13). *J Antimicrob Chemother*, 2016. **71**(8): p. 2113-7.
6. Lu, B., et al., High Prevalence of Macrolide-resistance and Molecular Characterization of *Streptococcus pyogenes* Isolates Circulating in China from 2009 to 2016. *Front Microbiol*, 2017. **8**: p. 1052.
7. Muhtarova, A.A., R.T. Gergova, and I.G. Mitov, Distribution of macrolide resistance mechanisms in Bulgarian clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* during the years of 2013-2016. *J Glob Antimicrob Resist*, 2017. **10**: p. 238-242.
8. Guo, L., et al., Phenotypic characterization of the foldase homologue PrsA in *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol*, 2013. **28**(2): p. 154-65.
9. Cahoon, L.A., N.E. Freitag, and G. Prehna, A structural comparison of *Listeria monocytogenes* protein chaperones PrsA1 and PrsA2 reveals molecular features required for virulence. *Mol Microbiol*, 2016. **101**(1): p. 42-61.
10. Jouselin, A., et al., The posttranslocational chaperone lipoprotein PrsA is involved in both glycopeptide and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. **56**(7): p. 3629-40.
11. Vitikainen, M., et al., Structure-function analysis of PrsA reveals roles for the parvulin-like and flanking N- and C-terminal domains in protein folding and secretion in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(18): p. 19302-14.
12. Cahoon, L.A. and N.E. Freitag, Identification of Conserved and Species-Specific Functions of the *Listeria monocytogenes* PrsA2 Secretion Chaperone. *Infect Immun*, 2015. **83**(10): p. 4028-41.
13. Alonzo, F., 3rd, et al., The posttranslocation chaperone PrsA2 contributes to multiple facets of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun*, 2009. **77**(7): p. 2612-23.
14. Vitikainen, M., et al., Quantitation of the capacity of the secretion apparatus and requirement for PrsA in growth and secretion of alpha-amylase in *Bacillus*

- subtilis. *J Bacteriol*, 2001. **183**(6): p. 1881-90.
15. Drouault, S., et al., The peptidyl-prolyl isomerase motif is lacking in PmpA, the PrsA-like protein involved in the secretion machinery of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 2002. **68**(8): p. 3932-42.
16. Forster, B.M., et al., Posttranslocation chaperone PrsA2 regulates the maturation and secretion of *Listeria monocytogenes* proprotein virulence factors. *J Bacteriol*, 2011. **193**(21): p. 5961-70.
17. Jouselin, A., et al., The *Staphylococcus aureus* Chaperone PrsA Is a New Auxiliary Factor of Oxacillin Resistance Affecting Penicillin-Binding Protein 2A. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015. **60**(3): p. 1656-66.
18. Hyyrylainen, H.L., et al., Penicillin-binding protein folding is dependent on the PrsA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 2010. **77**(1): p. 108-27.
19. Ma, Y., et al., Identification and characterization of bicistronic *speB* and *prsA* gene expression in the group A *Streptococcus*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(21): p. 7626-34.
20. Schwechheimer, C. and M.J. Kuehn, Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol*, 2015. **13**(10): p. 605-19.
21. Ellis, T.N. and M.J. Kuehn, Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010. **74**(1): p. 81-94.
22. Manning, A.J. and M.J. Kuehn, Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol*, 2011. **11**: p. 258.
23. Lee, J., et al., *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles carry biologically active beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013. **57**(6): p. 2589-95.
24. Crowley, J.T., et al., Lipid exchange between *Borrelia burgdorferi* and host cells. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(1): p. e1003109.
25. Dorward, D.W., C.F. Garon, and R.C. Judd, Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*, 1989. **171**(5): p. 2499-505.
26. Berleman, J.E., et al., The lethal cargo of *Myxococcus xanthus* outer membrane vesicles. *Front Microbiol*, 2014. **5**: p. 474.
27. Schooling, S.R. and T.J. Beveridge, Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol*, 2006. **188**(16): p. 5945-57.
28. Lappann, M., et al., Comparative proteome analysis of spontaneous outer membrane vesicles and purified outer membranes of *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol*, 2013. **195**(19): p. 4425-35.

- 
29. Vdovikova, S., et al., A Novel Role of *Listeria monocytogenes* Membrane Vesicles in Inhibition of Autophagy and Cell Death. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 154.
30. Olaya-Abril, A., et al., Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteomics*, 2014. **106**: p. 46-60.
31. Resch, U., et al., A Two-Component Regulatory System Impacts Extracellular Membrane-Derived Vesicle Production in Group A *Streptococcus*. *MBio*, 2016. **7**(6).
32. Toyofuku, M., et al., Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. *Nat Commun*, 2017. **8**(1): p. 481.
33. Surve, M.V., et al., Membrane Vesicles of Group B *Streptococcus* Disrupt Feto-Maternal Barrier Leading to Preterm Birth. *PLoS Pathog*, 2016. **12**(9): p. e1005816.
34. Biagini, M., et al., The Human Pathogen *Streptococcus pyogenes* Releases Lipoproteins as Lipoprotein-rich Membrane Vesicles. *Mol Cell Proteomics*, 2015. **14**(8): p. 2138-49.
35. Horn, D.L., et al., Why have group A streptococci remained susceptible to penicillin? Report on a symposium. *Clin Infect Dis*, 1998. **26**(6): p. 1341-5.
36. Pichichero, M.E. and J.R. Casey, Bacterial eradication rates with shortened courses of 2nd- and 3rd-generation cephalosporins versus 10 days of penicillin for treatment of group A streptococcal tonsillopharyngitis in adults. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007. **59**(2): p. 127-30.
37. Pader, V., et al., *Staphylococcus aureus* inactivates daptomycin by releasing membrane phospholipids. *Nat Microbiol*, 2016. **2**: p. 16194.
38. Aziz, R.K., et al., Invasive M1T1 group A *Streptococcus* undergoes a phase-shift in vivo to prevent proteolytic degradation of multiple virulence factors by SpeB. *Mol Microbiol*, 2004. **51**(1): p. 123-34.

圖表

表一、M4 GAS wild type、 $\Delta prsA2$ 突變株、 $\Delta prsA1$ 突變株、 $\Delta prsA1/A2$ 突變株對 penicillin、daptomycin、gentamycin 三種抗生藥的最小抑菌濃度(MIC)。

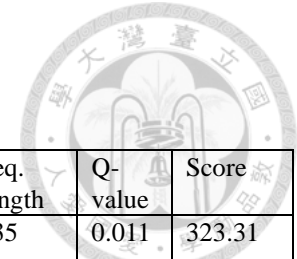
MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Wild type	$\Delta prsA2$	$\Delta prsA1$	$\Delta prsA2/A1$
penicillin	0.015625	0.015625 - 0.03125	0.015625 - 0.03125	0.015625 - 0.03125
gentamycin	32	32	32	32
daptomycin	0.25 - 0.125	0.25	0.25	0.03125

表二、補回膜囊泡對 $\Delta prsA1/A2$ 突變株的 daptomycin 耐受性的影響。

膜囊泡來源	Wild type	$\Delta prsA2/A1$	No
實驗菌種	$\Delta prsA1/A2$ 突變株	$\Delta prsA1/A2$ 突變株	$\Delta prsA1/A2$ 突變株
MIC ($\mu\text{g/ml}$)	0.25	0.5	0.0625

表三、M4 GAS wild type、 $\Delta prsA2$ 突變株、 $\Delta prsA1$ 突變株、 $\Delta prsA1/A2$ 突變株對抗菌肽 LL-37 的最小抑菌濃度。

MIC (μM)	Wild type	$\Delta prsA2$	$\Delta prsA1$	$\Delta prsA2/A1$
LL-37(06/07)	8	>8	8	2
LL-37(07/05)	4	8	2	1

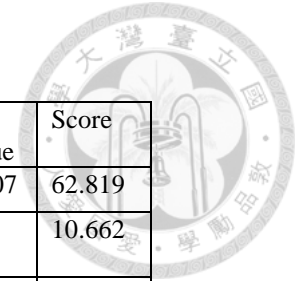


表四、以質譜儀分析軟體 MaxQuant 比對 Uniport 的資料庫分析 GAS 的分泌蛋白(圖九 A)組成。

Fasta headers		Band 1	Band 2	Band 3	Band 4	Band 5	Band 6	Band 7	Band 8	Band 9	Band 10	Band 11	Band 12	MW [kDa]	Seq. length	Q-value	Score
ENO	Enolase	15	15	1	4	6	5	2	2	6	10	9	7	47.35	435	0.011	323.31
CCPA_STRMU	Catabolite control protein A	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	36.61	333	0.006	28.79
PFL_STRMU	Formate acetyltransferase	4	3	0	2	2	2	0	0	0	3	2	2	87.60	775	0	117.26
OLHYD	Oleate hydratase	8	4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	67.41	590	0.008	93.05
TKT	Transketolase	15	10	0	0	1	0	0	0	1	5	2	0	79.31	729	0	181.5
RMLB_STRMU	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	4	3	39.28	348	0	17.7
CYSK	Cysteine synthase	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	33.24	313	0	112.99
PYRC	Dihydroorotase	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	45.29	422	0	1.5797
PURA	Adenylosuccinate synthetase	1	1	0	0	0	0	0	0	0	4	0	1	47.44	430	0	6.1903
LDH	L-lactate dehydrogenase	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	7	35.27	327	0.012	122.3
ARCA	Arginine deiminase	4	3	0	1	1	1	0	0	0	1	2	1	46.30	411	0.008	323.31
KPRS2	ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	5	35.71	326	0.006	6.0298
PEPDB	dipeptidase B	11	9	5	3	8	7	7	7	1	8	2	5	55.55	499	0	85.351
ALR	Alanine racemase	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	39.96	366	0	58.687
DEOB	Phosphopentomutase	6	8	0	0	1	0	0	0	0	2	3	0	44.26	403	0	185.72
PGK_STRA3	Phosphoglycerate kinase	0	2	1	2	1	0	0	0	1	2	2	2	42.13	398	0	323.31

PEPC_STRTR	Aminopeptidase C	5	3	0	0	1	0	0	0	0	3	1	3	50.41	445	0	121.4
MTSA	Metal ABC transporter substrate-binding lipoprotein	0	4	0	1	4	7	0	1	0	0	0	7	34.33	310	0.007	107.47
PTNAB	PTS system mannose-specific EIIAB component	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	35.58	330	0	6.2243
ATPA	ATP synthase subunit alpha	10	6	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	54.68	502	0.008	33.084
ATPB	ATP synthase subunit beta	7	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	51.08	468	0.008	55.954
PRSA1	Foldase protein PrsA1	0	13	0	4	0	0	0	0	3	0	0	0	38.53	351	0	221.62
ADCA	Zinc-binding protein AdcA	5	7	0	1	8	5	0	0	1	8	1	5	58.58	515	0	27.597
DPO1_STRR6	DNA polymerase I	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99.16	877	0	1.573
EFTU	translation elongation factor EF-Tu	8	5	0	4	0	0	0	0	3	7	6	5	43.82	398	0.011	323.31
EFTS	translation elongation factor EF-Ts	0	15	0	8	0	0	0	0	8	8	13	10	37.26	346	0.010	323.31
EFG	translation elongation factor EF-G	3	4	0	0	0	0	0	0	1	6	5	7	76.53	692	0.008	172.71
CH60	60 kDa chaperonin	17	12	0	1	0	1	0	0	1	11	5	4	57.08	543	0.010	323.31
MNMA	tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	41.73	373	0.010	1.8773
RNJ1	Ribonuclease J 1	8	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	61.11	560	0	14.472

RNJ2	Ribonuclease J 2	8	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	61.18	553	0	25.687
SPEC	Exotoxin type C	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	27.37	235	0.006	2.527
SPEB	Streptopain	0	3	4	4	2	2	3	4	4	0	4	4	43.19	398	0	323.31
TACY	Streptolysin	26	30	0	3	0	0	0	0	1	6	4	3	63.67	571	0.006	323.31
C5AP	C5a peptidase	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	126.4 3	1150	0	10.197
STRQ	Streptokinase	2	2	0	1	0	0	0	0	1	2	1	2	49.91	440	0	144.05
NAOX	Probable NADH oxidase	12	9	0	0	0	0	0	0	1	11	3	5	49.63	456	0	178.07
GAPN _STRMU	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4	5	1	1	1	1	0	0	3	2	3	4	51.19	475	0	100.51



表五、以質譜儀分析軟體 MaxQuant 比對 Uniport 的資料庫分析 GAS 的膜囊泡(圖九 B)蛋白組成。

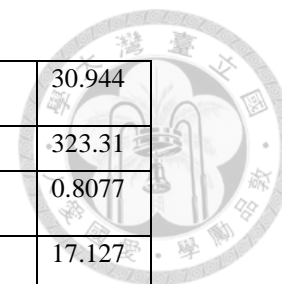
Fasta headers		Band 1	Band 2	Band 3	Band 4	Band 5	Band 6	Band 7	Band 8	MW [kDa]	Seq. length	Q-value	Score
ENO	Enolase	0	0	0	0	15	14	8	0	47.35	435	0.007	62.819
KPYK_LACLA	Pyruvate kinase	0	1	1	6	2	6	3	0	54.25	502	0	10.662
CCPA_STRMU	Catabolite control protein A	0	3	0	0	0	4	7	0	36.61	333	0	150.94
PFL_STRMU	Formate acetyltransferase	1	2	4	5	5	5	7	0	87.60	775	0	28.969
OLHYD	Oleate hydratase	0	0	7	5	4	5	3	0	67.41	590	0	30.371
GLMS	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	0	1	5	9	3	4	6	0	65.59	604	0	38.532
HASC1	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase 1	0	1	0	0	0	0	6	0	33.30	299	0	7.4291
TKT	Transketolase	0	0	4	6	1	1	1	0	79.31	729	0	12.242
LACD1	Tagatose 1,6-diphosphate aldolase 1	0	0	0	0	0	5	2	0	35.98	325	0	5.987
PANE	Putative 2-dehydropantoate 2-reductase	0	0	1	0	0	2	4	0	33.84	307	0	13.505
RMLB_STRMU	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	0	0	0	1	0	10	5	0	39.28	348	0	88.173
AROC	Chorismate synthase	0	0	0	0	0	4	0	0	42.54	388	0.007	5.362
CYSK	Cysteine synthase	0	0	0	0	0	10	14	0	33.24	313	0	168.07
PYRC	Dihydroorotase	0	0	0	0	10	1	1	0	45.29	422	0	15.605
IMDH	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	0	0	3	34	16	15	7	0	52.81	493	0	220.26
PYRG	CTP synthase	0	0	6	7	2	2	1	0	59.51	534	0	122.17
PUR8_STRMU	Adenylosuccinate lyase	0	0	0	0	9	7	1	0	49.38	432	0	43.954

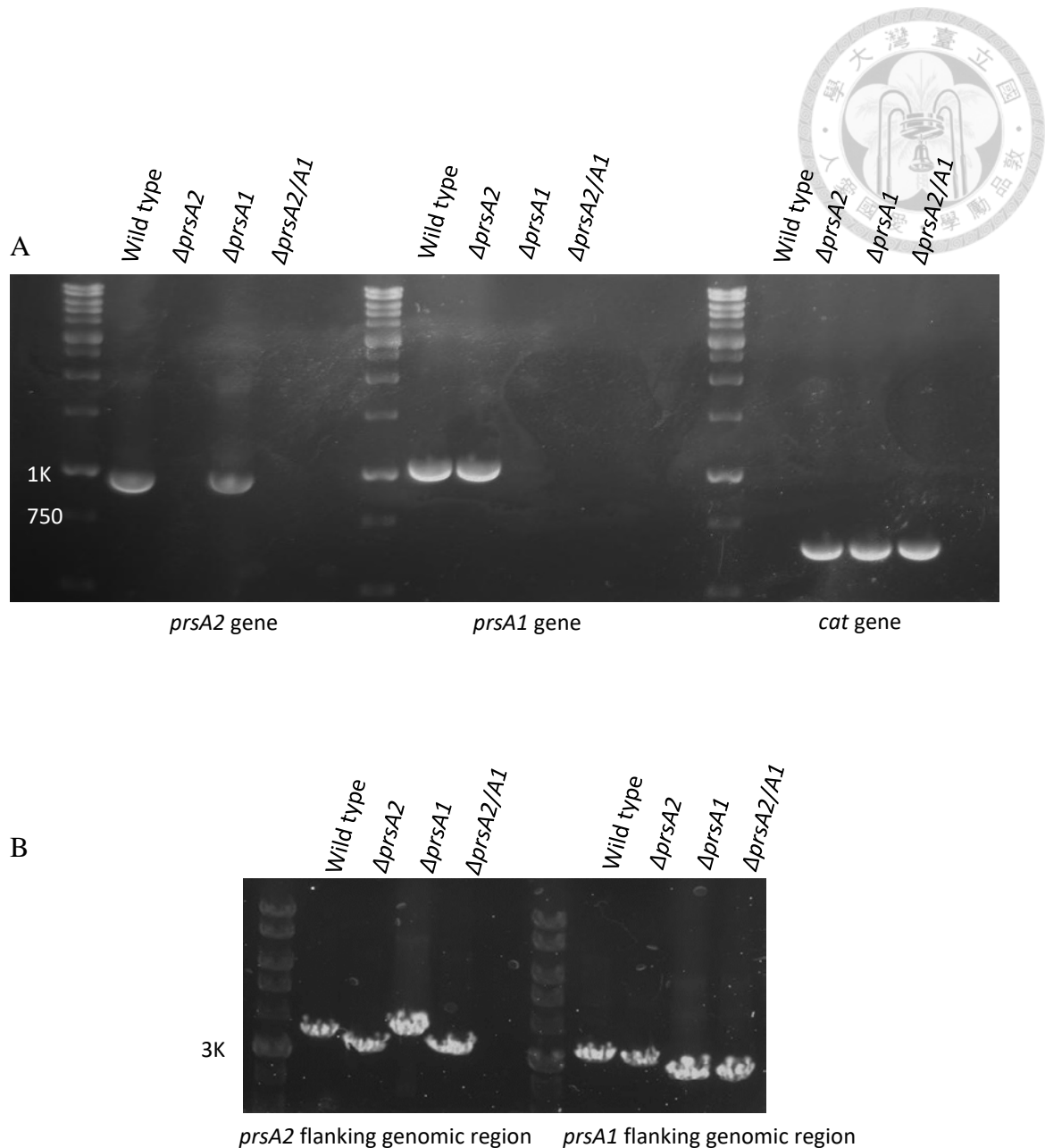
MTSA	Metal ABC transporter substrate-binding lipoprotein	0	1	0	0	0	2	9	0	34.33	310	0	70.426
MSMK_STRMU	Multiple sugar-binding transport ATP-binding protein MsmK	0	0	0	0	0	3	0	0	41.96	377	0	15.253
POTA	Spermidine/putrescine import ATP-binding protein PotA	0	0	0	0	3	0	0	0	43.81	384	0	1.1505
PTNAB	PTS system mannose-specific EIIAB component	0	0	0	0	0	1	12	0	35.58	330	0	29.26
GLMU_STRP8	Bifunctional protein GlmU	0	0	0	6	2	0	0	0	49.63	460	0.004	6.2882
ATPA	ATP synthase subunit alpha	0	0	0	7	2	5	1	0	54.68	502	0	45.673
ATPB	ATP synthase subunit beta	0	0	0	0	11	7	5	0	51.05	468	0.007	30.545
MURE	UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate--L-lysine ligase	0	0	0	7	1	3	1	0	53.51	481	0.004	32.086
MURC	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	0	0	0	0	9	2	2	0	49.59	442	0	78.373
MURA1	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1	0	0	0	0	8	4	3	0	45.67	423	0	10.17
MURA2	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 2	0	0	0	0	0	10	3	0	44.66	419	0	91.546
MURD	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	0	0	0	0	7	1	3	0	48.68	452	0	16.615
DNLJ	DNA ligase	0	0	5	3	1	1	0	0	72.42	652	0.007	17.487
DPO3	DNA polymerase III PolC-type	0	0	1	5	1	0	0	0	164.74	1465	0.004	5.6155
RECA	Protein RecA	0	0	0	0	10	4	4	0	40.65	378	0.004	45.059
RECU_STRMU	Protein RecA	1	0	0	0	0	1	0	0	22.81	197	0	1.1362
UVRB	UvrABC system protein B	0	0	6	2	2	0	0	0	75.65	663	0	6.0925
RADA	DNA repair protein RadA	0	0	0	0	5	3	0	0	49.37	453	0	7.5067

GYRA	DNA gyrase subunit A	0	0	8	10	5	1	4	0	92.70	828	0	27.347
GYRB	DNA gyrase subunit B	0	0	6	5	2	1	2	0	72.27	650	0	21.632
DNAA	Chromosomal replication initiator protein DnaA	0	0	0	3	4	1	0	0	51.70	451	0	28.504
EX7L	Exodeoxyribonuclease 7 large subunit	0	0	0	2	7	2	0	0	50.45	446	0	15.132
MUTS	DNA mismatch repair protein MutS	0	0	1	5	0	3	0	0	95.59	851		
MUTS2	Endonuclease MutS2	0	0	0	4	2	5	1	0	87.80	779	0	10.303
SYT	Threonine--tRNA ligase	0	0	1	6	1	1	0	0	74.30	647	0.004	47.032
SYR	Arginine--tRNA ligase	0	0	1	18	5	7	7	0	63.12	563	0.004	225.29
SYH	Histidine--tRNA ligase	0	0	0	2	9	4	2	0	48.2	426	0.004	35.936
SYP	proline--tRNA ligase	0	0	7	7	4	3	2	0	68.70	618	0.004	1.7334
SYK	lysine--tRNA ligase	0	0	5	19	8	6	3	0	56.62	497	0	323.31
SYFA	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit	0	0	0	0	0	12	0	0	39.18	347	0	69.492
SYC	Cysteine--tRNA ligase	0	0	0	14	2	4	0	0	50.46	447	0	31.22
SYFB	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	0	0	4	8	1	5	3	0	87.54	801	0	64.513
SYW	Tryptophan--tRNA ligase	0	0	0	0	0	1	8	0	38.33	340	0	9.8486
SYS	Serine--tRNA ligase	0	0	0	9	2	1	1	0	48.18	425	0	267.72
SYGB	Glycine--tRNA ligase beta subunit	0	2	15	12	11	7	3	0	74.97	679	0	1.7844
SYA	alanine--tRNA ligase	0	0	4	7	4	3	1	0	96.54	872	0	1.2338
SYN	Asparagine--tRNA ligase	0	0	0	10	2	2	2	0	51.26	448	0	0.99107
SYE	Glutamate--tRNA ligase	0	0	0	23	3	5	2	0	55.09	481	0	132.31
SYL	leucine--tRNA ligase	0	0	2	8	0	5	3	0	93.90	833	0	29.804

SYV	Valine--tRNA ligase	0	0	4	5	4	4	1	0	100.99	882	0	11.346
SYI	Isoleucine--tRNA ligase	0	0	2	7	1	4	1	0	105.04	933	0	13.975
SYM	Methionine--tRNA ligase	0	0	5	6	2	9	2	0	75.13	665	0	23.231
IF2	Translation initiation factor IF-2	0	0	4	7	2	4	3	0	105.51	953	0	83.414
EFTU	translation elongation factor EF-Tu	0	0	0	7	8	10	5	0	43.82	398	0.004	323.31
EFG	translation elongation factor EF-G	1	3	12	31	20	29	18	0	76.53	692	0	299.36
RF1	Peptide chain release factor 1	0	0	0	0	12	10	4	0	40.58	359	0	90.774
RF2 _STRA1	Peptide chain release factor 2	0	0	0	0	7	2	0	0	41.72	365	0.004	8.6633
RS1 _STRR6	30S Ribosomal protein S1	0	0	1	3	6	6	4	0	43.89	400	0	38.106
CH60	60 kDa chaperonin	0	1	2	22	6	12	7	0	57.08	543	0.004	242.9
DNAJ	Chaperone protein DnaJ	0	0	0	0	2	10	3	0	40.49	378	0	114.16
MNMA	tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA	0	0	0	2	0	11	0	0	41.73	373	0.004	31.822
QUEA	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase	0	0	0	0	0	7	6	0	38.38	342	0	20.112
TRMFO	Methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil-5-)-methyltransferase TrmFO	0	0	0	10	2	0	2	0	49.41	448	0	13.957
RNJ1	Ribonuclease J 1	0	0	0	7	0	2	0	0	61.11	560	0	6.5991
RNJ2	Ribonuclease J 2	0	0	3	4	3	3	1	0	61.18	553	0	11.302
DER	GTPase Der	0	0	0	5	8	5	2	0	48.80	436	0	21.34
LPLA2	Lipoate--protein ligase	0	1	0	0	0	1	7	0	38.25	339	0	15.973
SRP54 _STRMU	Signal recognition particle protein	0	0	0	5	0	1	0	0	57.07	516	0	15.581

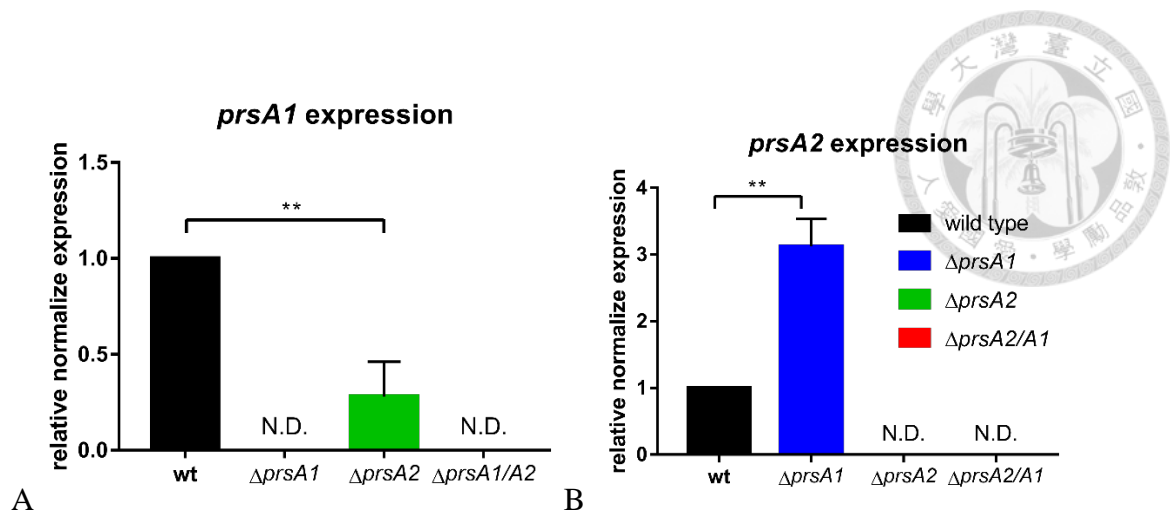
BPPI	phosphatase/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0	0	0	9	0	4	4	0	52.22	470	0	30.944
SPEB	Streptopain	6	9	1	7	4	31	21	7	43.17	398	0	323.31
CLPX	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	0	0	0	0	0	8	1	0	45.00	409	0	0.8077
CLPE	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpE	0	0	7	6	3	10	2	0	83.81	752	0	17.127
CLPC	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	0	0	12	12	8	3	4	0	77.43	699	0	99.179
STRP	Streptokinase A	1	1	0	0	1	1	1	0	50.20	440	0	212.28
TACY	Streptolysin	1	1	5	26	8	17	8	0	63.67	571	0	233.2
CSHA_STRR6	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase CshA	0	0	3	3	5	4	2	0	58.83	524	0	16.776
Y1963	Putative zinc metalloprotease	0	0	0	0	0	4	0	0	45.82	419	0	7.4869
NAOX	Probable NADH oxidase	0	1	3	6	11	11	7	0	49.63	456	0	151.41





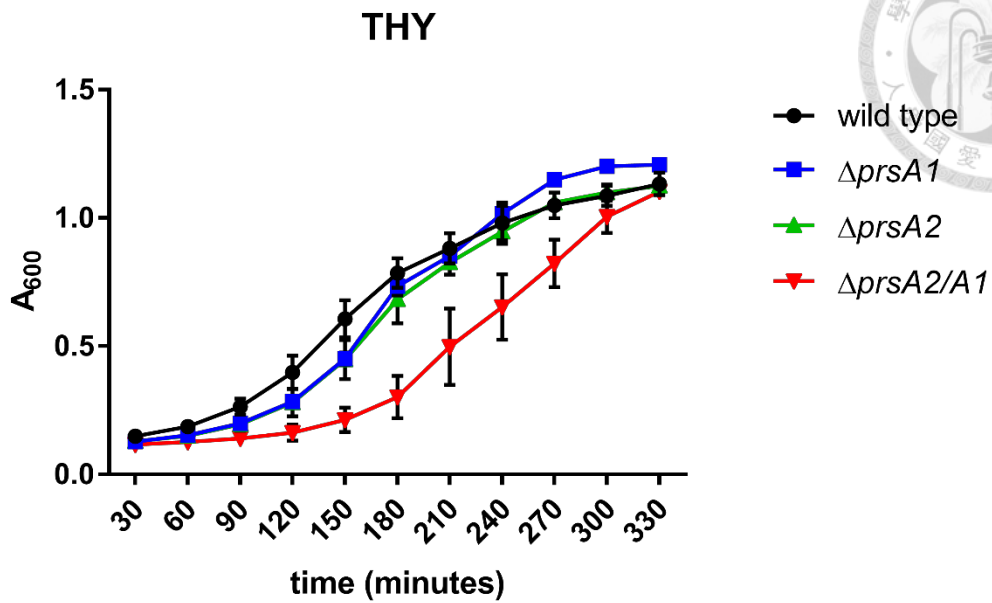
圖一、Wild type、 Δ *prsA2* 突變株、 Δ *prsA1* 株突變株、 Δ *prsA1/A2* 突變株的 PCR 電泳確認圖。

取約 1.5×10^9 CFU 隔夜培養之 GAS，以 Geneaid™ DNA Isolation kit 取得純淨 DNA。透過 PCR 放大目標基因片段後在 0.8% 洋菜膠中進行電泳，以 Benchtop 2 UV Transilluminators(UVP) 確認電泳結果。(a) 以 *spy1825*, *spy1240*, *cat* 三個基因的 forward primer 及 reverse primer 分別進行 PCR。(b) 以 *spy1825*, *spy1240* 的 upstream forward 及 downstream reverse primer 進行 PCR。其中 *prsA2* 基因大小為 954 bps, *prsA1* 基因片段大小為 1101 bps, *cat* 基因大小為 660 bps。

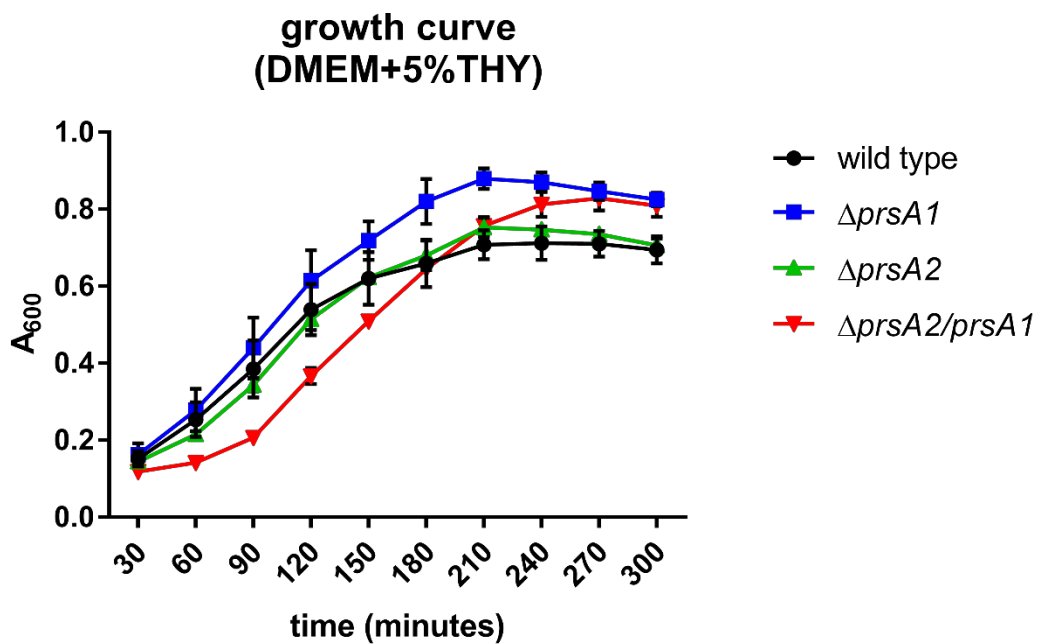


圖二、*prsA1* 和 *prsA2* 基因在 GAS 的 mRNA 表現程度。
 取約 10^8 CFU 隔夜培養之 GAS，以 TRIzol reagent 與 Direct-zol RNA MiniPrep column 純化 RNA，再以 PrimeScript RT reagent 將 RNA 反轉為 cDNA 後，進行 qPCR 測量 *prsA1* 與 *prsA2* mRNA 之表現。(A) Wild type、 $\Delta prsA2$ 突變株、 $\Delta prsA1$ 株突變株、 $\Delta prsA1/A2$ 突變株中 *prsA1* 的表現量。(B) Wild type、 $\Delta prsA2$ 突變株、 $\Delta prsA1$ 株突變株、 $\Delta prsA1/A2$ 突變株中 *prsA2* 的表現量。圖為獨立兩次三重複實驗的合併數據，以 mean \pm SD 表示，*P*-value 統計使用 One-way ANOVA，**表示 $p < 0.005$ 。

A



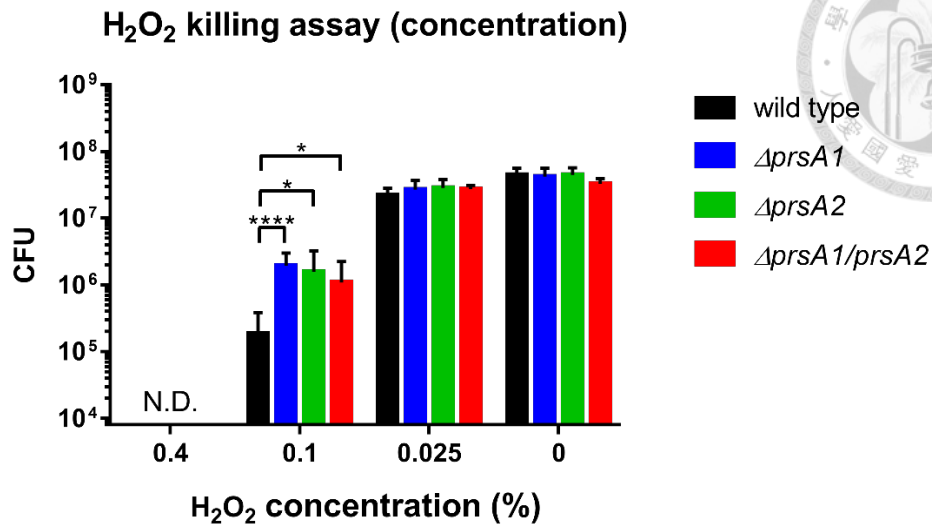
B



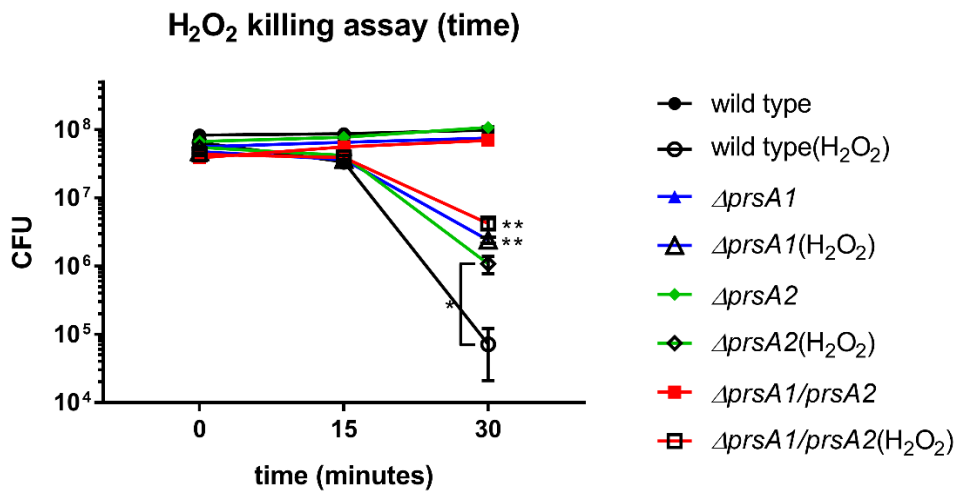
圖三、GAS 的生長曲線。

將隔夜培養的細菌以 PBS 沖洗一次後回溶在對應的培養基中，調整濃度至 OD₆₀₀ 為 0.1，每株菌分三管在 37°C 培養，每 30 分鐘測量一次紀錄數值，紀錄至數值穩定進入穩定期。(A)各株 GAS 在生長用培養基 THY 中的生長曲線。(B)各株 GAS 在測定 MIC 時使用 DMEM(5%THY)中的生長曲線。圖為獨立兩次三重複實驗的合併數據。

A

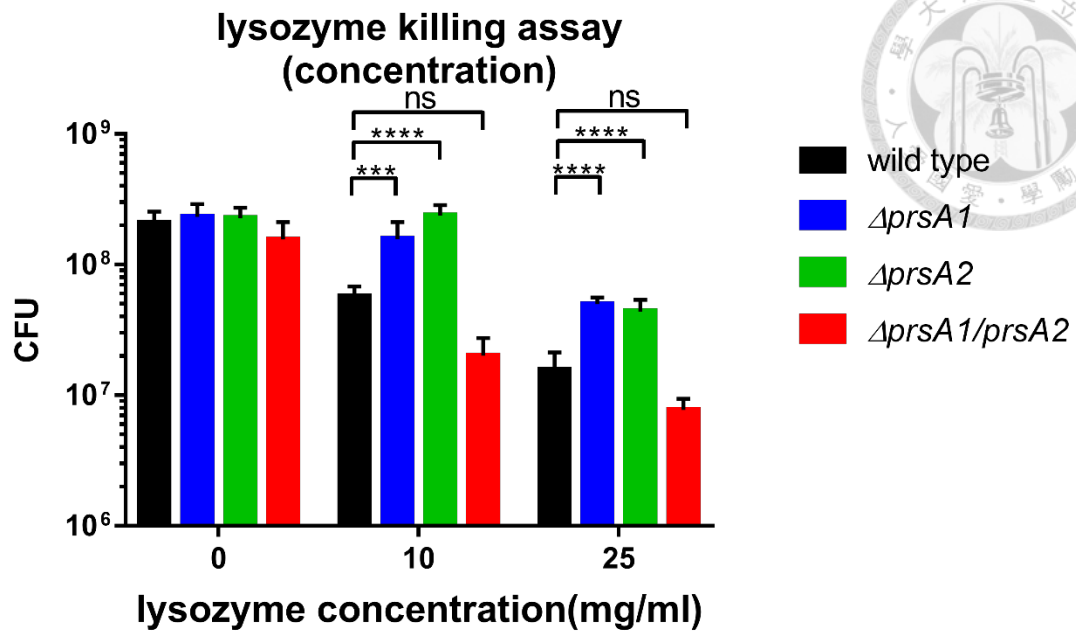


B



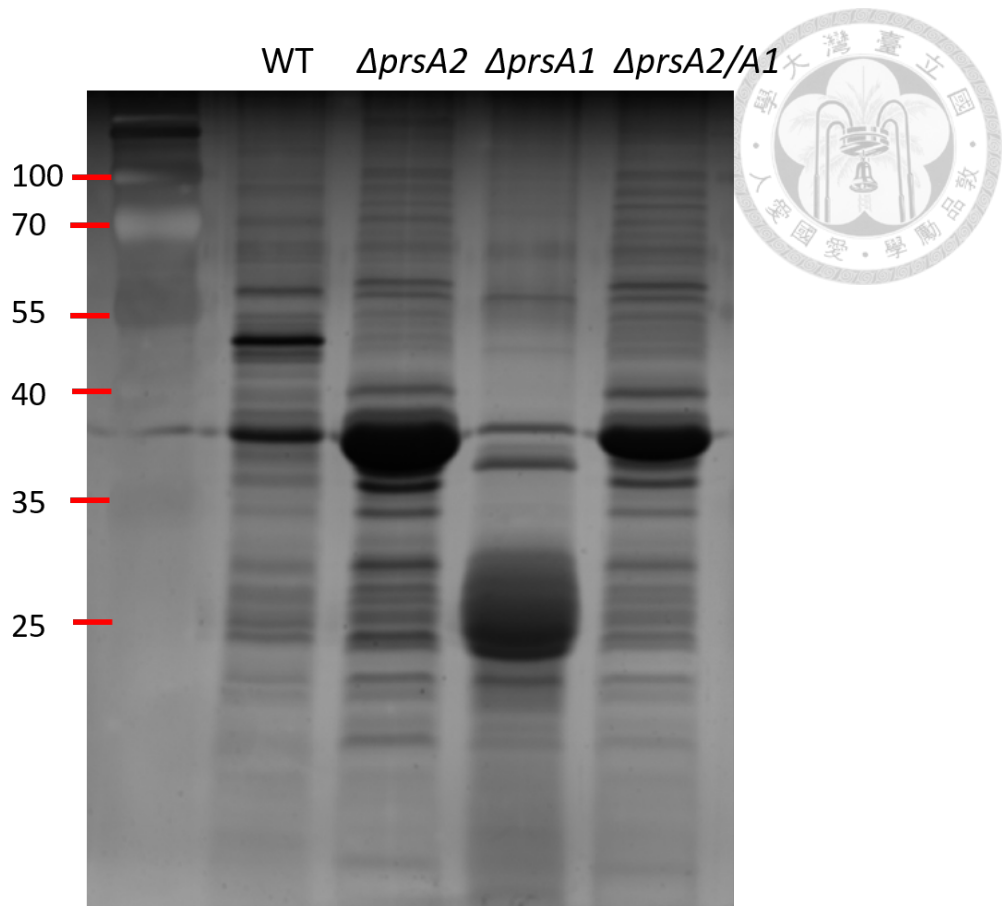
圖四、H₂O₂ 對 GAS 的殺菌能力測試。

將各株 GAS 隔夜培養後離心以培養基沖洗一次，回溶調整濃度至 OD₆₀₀ 為 0.4，(A)取 500 μ l 加入對應濃度的 H₂O₂(最終濃度為 0.4、0.1、0.025、0%)，37 $^{\circ}$ C 培養 30 分鐘後將菌液十倍序列稀釋取適當濃度點在 THA plate 上，37 $^{\circ}$ C 培養隔夜後記錄 wild type、 $\Delta prsA2$ 突變株、 $\Delta prsA1$ 突變株、 $\Delta prsA1/A2$ 突變株菌落數換算 CFU。圖為獨立四次三重複實驗的合併數據，以 mean \pm SD 表示。(B)取 450 毫升加入 50 毫升的 H₂O₂(最終濃度為 0.1%)，取 0、15、30 分鐘的菌液 10 序列稀釋至是當濃度後點盤，37 $^{\circ}$ C 培養隔夜後記錄 wild type、 $\Delta prsA2$ 突變株、 $\Delta prsA1$ 突變株、 $\Delta prsA1/A2$ 突變株菌落數換算 CFU。圖為獨立兩次三重複實驗的代表性數據，以 mean \pm SD 表示。統計使用 t-test，標記三點分別與 wild type(H₂O₂)比較，*、**、***分別表示 p<0.05，p<0.01，p<0.001。

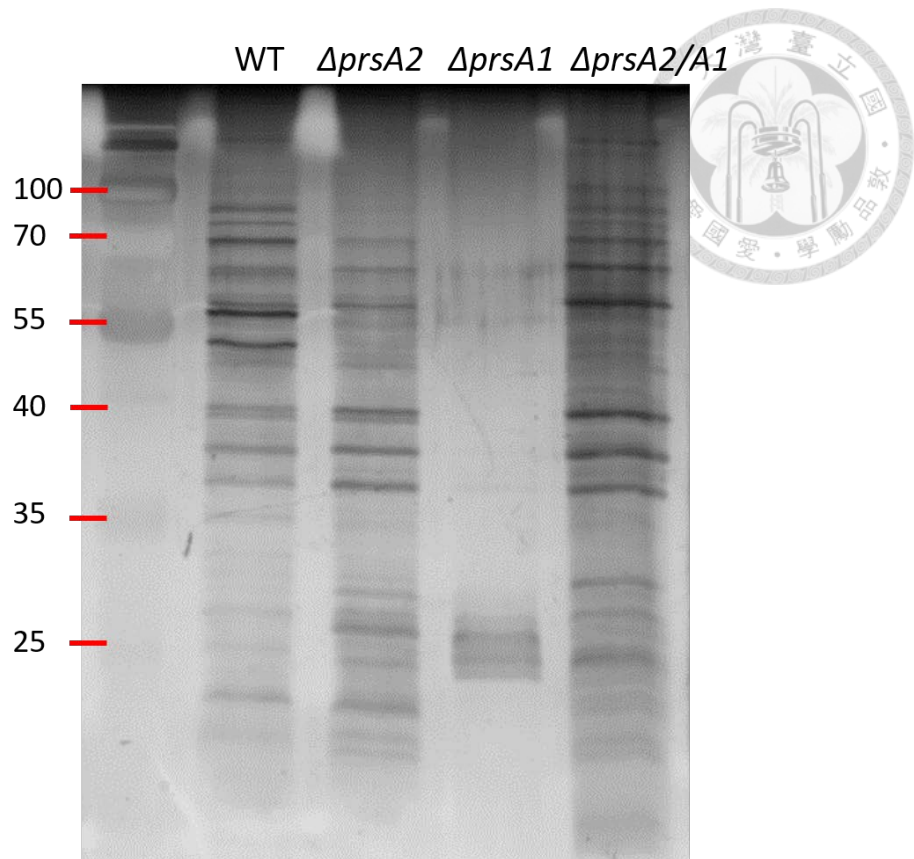


圖五、溶菌酶對 GAS 殺菌能力測試。

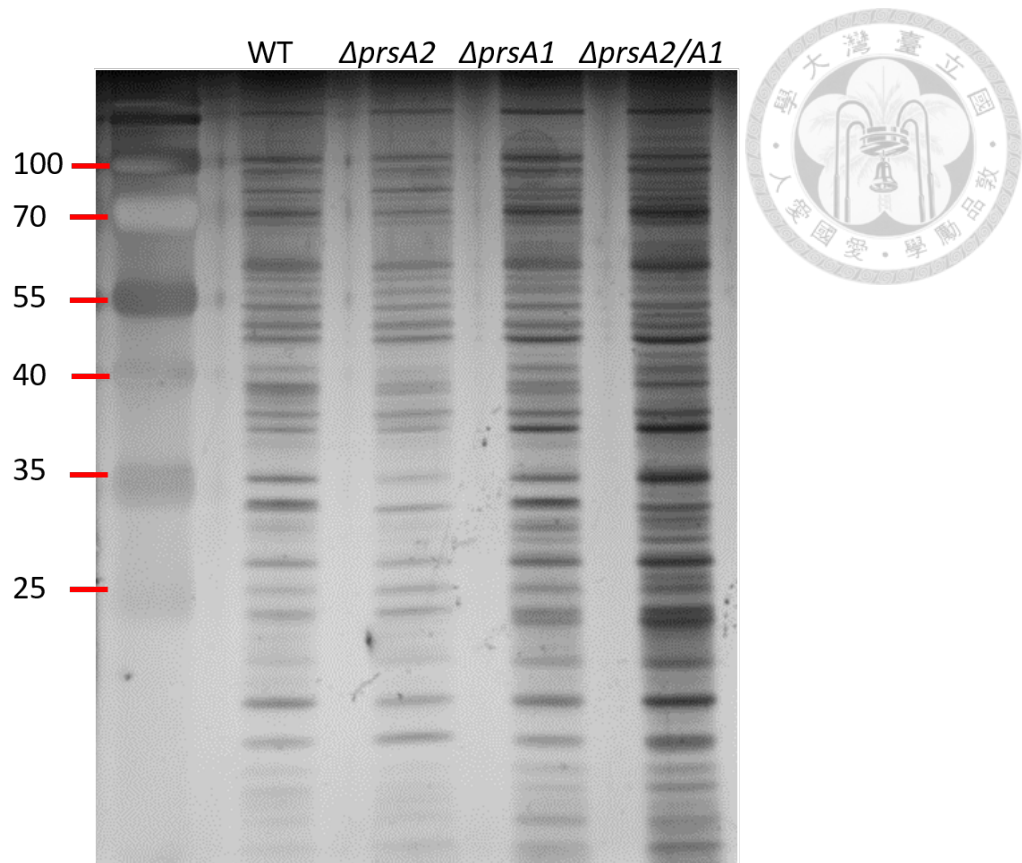
將各株 GAS 37°C 隔夜培養後離心以培養基沖洗一次，回溶後調整濃度至 OD₆₀₀ 為 0.4，取 500 毫升加入對應濃度的溶菌酶(最終濃度為 0、5mg/ml)，37°C 培養 120 分鐘後將菌液十倍序列稀釋取適當濃度點在 THA plate 上，37°C 培養隔夜後記錄 wild type、 $\Delta prsA2$ 突變株、 $\Delta prsA1$ 突變株、 $\Delta prsA1/A2$ 突變株菌落數換算 CFU。圖為獨立兩次三重複實驗的代表性數據，以 mean \pm SD 表示。P-value 統計使用 One-way ANOVA，*和***分別表示 p<0.05 及 p<0.001。



圖六、收取 GAS 分泌蛋白以 SDS-PAGE 分離後 silver stain 染色圖。
37°C 隔夜培養各株 GAS 後以 1：5000 稀釋，37°C 培養 24 小時後離心收取上清液，2 ml 上清液加入最終濃度為 10% 的 Trichloroacetic acid(TCA)，震盪後放置冰上 15 分鐘，15000 g 離心 5 分鐘後留 pellet。以丙酮沖洗後離心，移除丙酮後風乾，最後以 SDS-PAGE sampling buffer 回溶後進行 15% 的 SDS-PAGE。膠體進行銀染並記錄。

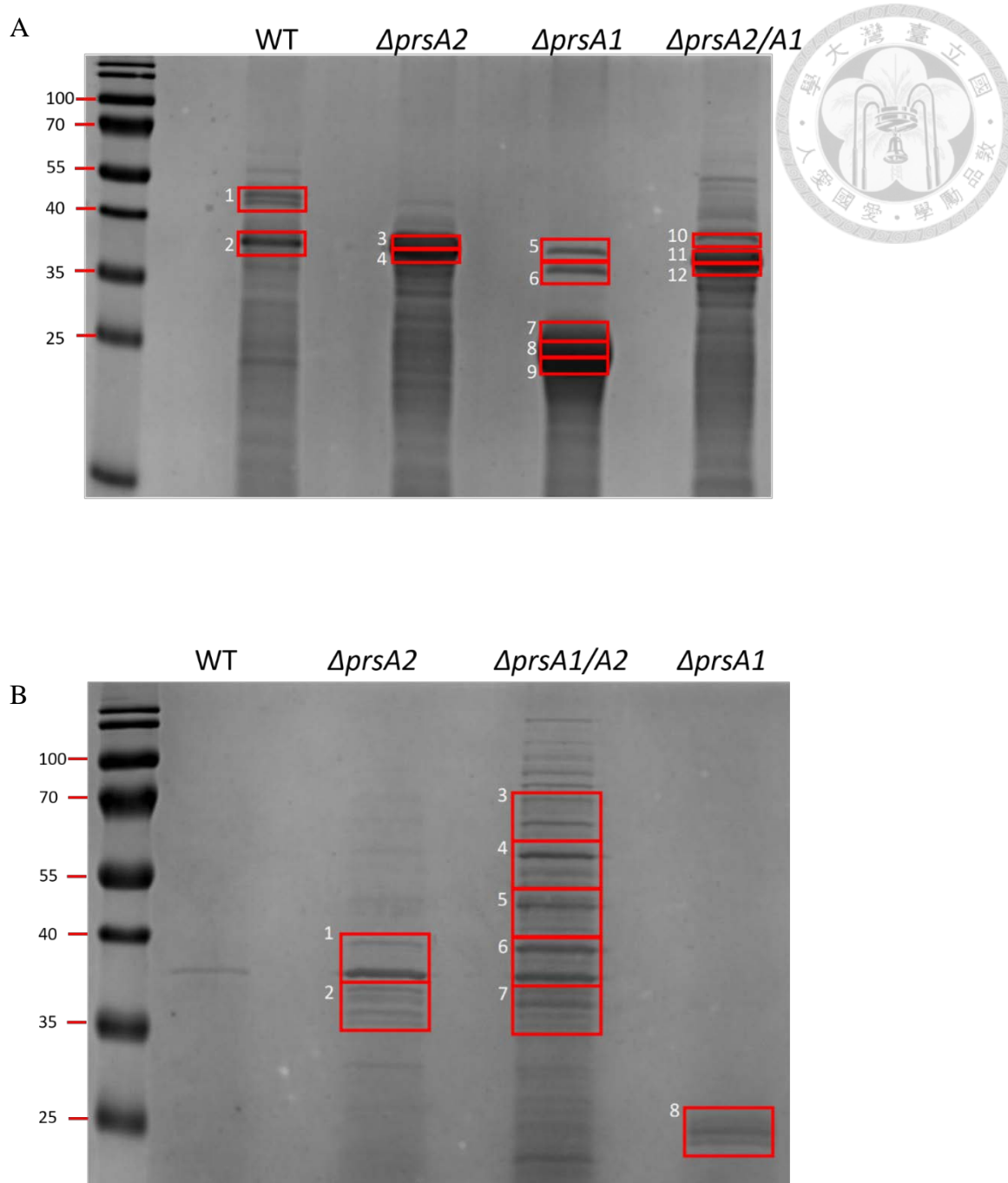


圖七、收取 GAS 膜囊泡以 SDS-PAGE 分離後 silver stain 染色圖。
37°C 隔夜培養各株 GAS 後以 1:5000 稀釋，37°C 培養 24 小時後離心收取上清液
在 4 °C 進行 150,000g 超高速離心三小時，移除上清液之後以 SDS-PAGE sampling
buffer 回溶。進行 15% 的 SDS-PAGE，膠體進行 silver stain 染色並記錄。

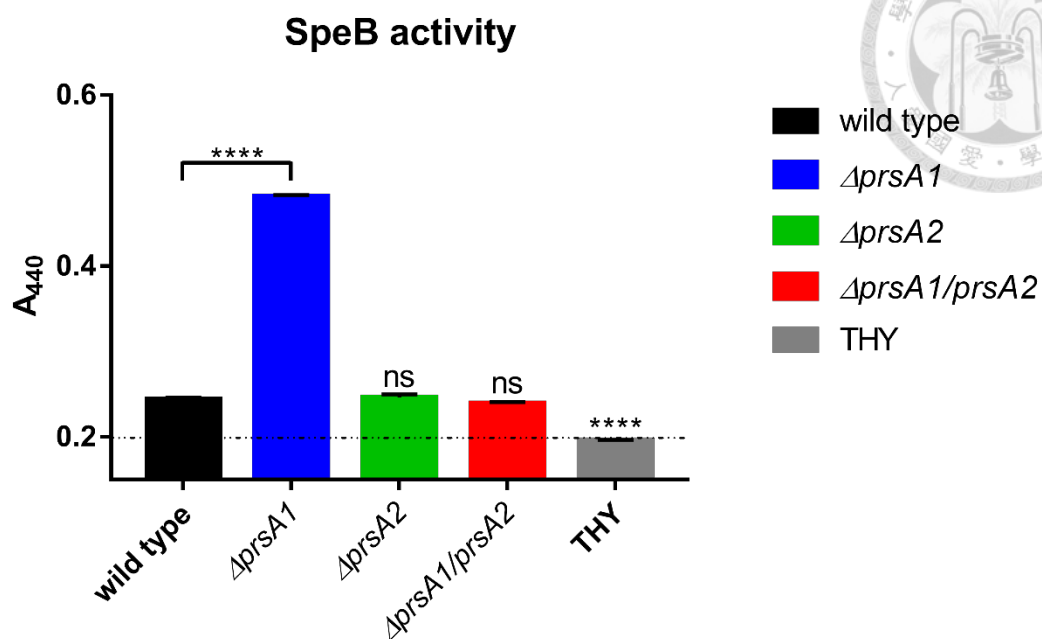


圖八、收取 GAS 膜蛋白以 SDS-PAGE 分離後 silver stain 染色圖。

37°C 隔夜培養各株 GAS 後以 1:9 稀釋，37°C 培養至晚對數期(A_{600} 約為 0.8)後離心並以 PBS 沖洗一次，回溶在 KPN buffer 後以溶菌酶在 37°C 作用 3 小時，加入 DNase、RNase 與蛋白酶抑制劑，以超音波粉碎儀 30 秒 on/30 秒 off 進行六個循環，10000g 低速離心後取上清液進行 120000g 超高速離心 45 分鐘，移除上清液之後以 SDS-PAGE sampling buffer 回溶。進行 15% 的 SDS-PAGE，膠體進行 silver stain 染色並記錄。

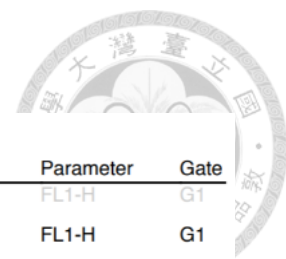


圖九、質譜儀分析用的 GAS 分泌蛋白及膜囊泡 Coomassie blue 染色圖。將收集到的分析蛋白與膜囊泡進行 15% 的 SDS-PAGE 後進行 Coomassie blue 染色，選取希望進行分析的區域(以紅框標示於圖上)切下後進行胰蛋白酶 in-gel digest，純化蛋白後送質譜儀分析。(A)分泌蛋白的 Coomassie blue 染色圖。(B)膜囊泡的 Coomassie blue 染色圖。

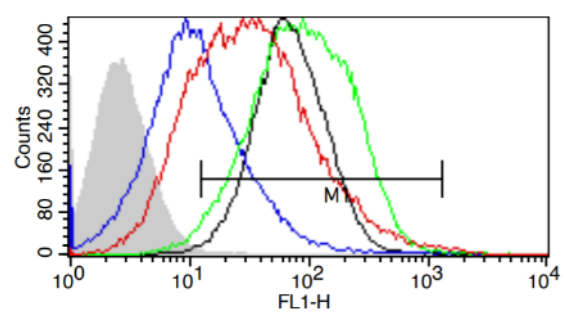


圖十、GAS 的 SpeB 活性測試。

37°C 隔夜培養各株 GAS 後以 1:5000 稀釋，37°C 培養 24 小時後離心收取上清液，上清液加入偶氮酪蛋白到最終濃度為 0.5%，並於 40°C 反應 60 分鐘後加入 TCA 沉澱，離心後取上清液於測量 OD₄₄₀ 數值，以反映 SpeB 切割偶氮酪蛋白活性。圖為三次獨立三重複實驗中的代表性數據，統計使用 one-way ANOVA 分析，各組皆與野生株進行比較，ns 表無顯著差異，****表示 $p < 0.0001$ 。

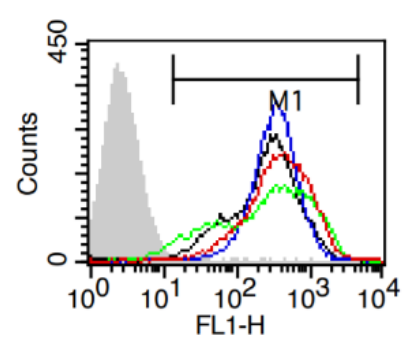


A



Key	Name	Parameter	Gate
■	standardwt.001	FL1-H	G1
—	ll37wt	FL1-H	G1
—	ll37dprsa1	FL1-H	G1
—	ll37dprsa2	FL1-H	G1
—	ll37dko	FL1-H	G1

B



Key	Name	Parameter	Gate
■	standardwt.001	FL1-H	G1
—	polyLwt	FL1-H	G1
—	polyLdprsa1	FL1-H	G1
—	polyLdprsa2	FL1-H	G1
—	polyLdko	FL1-H	G1

圖十一、以流式細胞儀偵測 LL-37 結合到 GAS 表面的親和性
 隔夜培養各株 GAS 後稀釋再培養至對數期(A_{600} 約為 0.4)，離心並以 PBS 沖洗兩次，調整濃度後取 5×10^7 數量的 GAS 加入(A)LL-37 (B)poly-L lysine 並於 4°C 反應 30 分鐘，PBS 低溫沖洗兩次後回溶在 PBS 中並以流式細胞儀分析。圖為兩次獨立實驗中的代表性數據。