

國立交通大學

電子物理研究所

博士論文

應用奈米技術探討克雷白氏肺炎桿菌第三型線毛
的黏附與延展特性

Using Nanotechniques to Explore the Adhesion and Extension Properties of
Klebsiella pneumoniae Type 3 Fimbriae

1896

研究生：詹佳翰

指導教授：徐 琅 教授

中華民國一十年十月

應用奈米技術探討克雷白氏肺炎桿菌第三型線毛的黏附與延展特性

Using nanotechniques to explore the adhesion and extension properties of
Klebsiella pneumoniae type 3 fimbriae

研究生：詹佳翰

Student : Chia-Han Chan

指導教授：徐 琅

Advisor : Long Hsu



October 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一十年十月

應用奈米技術探討克雷白氏肺炎桿菌第三型線毛的黏附與延展特性

學生：詹佳翰

指導教授：徐 琅

國立交通大學電子物理研究所 博士班

摘 要

細菌藉由其表面線毛黏附宿主細胞，因線毛具螺旋彈簧結構的伸縮特性，能降低環境沖刷力的影響，使細菌與宿主保持緊密黏附。克雷白氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)是一株伺機性感染細菌，近年來臨床上發現多種抗藥性菌株，使得治療方式趨於困難，而其表面第三型線毛引起細胞製造生物膜，進而產生抗藥性。本論文將以克雷白氏肺炎桿菌主要致病的因子第三型線毛作為材料，利用雷射鑷夾(OT)、電子顯微鏡(TEM)、原子力顯微鏡(AFM)、基因重組技術、基因標定技術、胺基酸定點突變技術等奈米技術，從生物物理的角度，探討單一根第三型線毛的特性，並進一步分析影響線毛主要蛋白 MrkA 組裝的重要殘基。我們發現第三型線毛的長度約為 1 微米，線毛的螺旋截面並不對稱，截面最大寬度 7.4 奈米和最小寬度 4.2 奈米。第三型線毛頂端黏附蛋白有四個黏附因子，其中 MrkDv3 與膠原蛋白的黏附力最大，約為 4 皮牛頓，是黏附蛋白的重要因子。第三型線毛受力伸展曲線具有三個階段：(1)第一階段表現線性的受力伸長特性，彈性係數為 60.9 皮牛頓/微米，楊氏模數為 100 皮牛頓/微米²；(2)第二階段表現固定力伸展特性，野生株的線毛以固定力 66 ± 4 皮牛頓拆開並伸展數微米長；(3)第三階段表現非線性的受力伸長特性，其受力伸展曲線轉折點為特徵力 102 ± 9 皮牛頓。另外，針對第三型線毛骨幹主要蛋白 MrkA 單體，我們篩選十二個 MrkA 關鍵的胺基酸進行定點突變，以分析其受力伸展物理特性的變化。其中 G189A 突變株具特殊力學性能，其第二階段的拆解力呈現持續增加的拆解力(57~68 皮牛頓)，不同於其他突變株或一般株以固定 66 皮牛頓力拆解。這樣的結果顯示，G189 胺基酸對 MrkA 的結構拆解力穩定度扮演重要的角色。本論文提供一個研究各種線毛的生物力學性能的奈米技術平台，藉由線毛生物物理特性結果與發現，能提供細菌感染致病的資訊，有助於傳統細菌感染與抗藥性的研究。

Using nanotechniques to explore the adhesion and extension properties of
Klebsiella pneumoniae type 3 fimbriae

Student : Chia-Han Chan

Advisors : Dr. Long Hsu

Department of Electrophysics
National Chiao Tung University

ABSTRACT

Fimbriae exhibiting flexible and stretchable properties similar to springs may aid bacteria in remaining attached to host cells by reducing the impact of the flushes in environment. *Klebsiella pneumoniae* is a common pathogen causing both pneumonia and urinary tract infections. Most pathogenic *Klebsiella pneumoniae* strains produce type 3 fimbriae, which are critical for bacterial biofilm formation. In this thesis, we investigated the structural and mechanical properties of *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbriae, which constitute a known virulence factor for the bacterium, and to identify residues in the major pilin MrkA important for pilus assembly. Type 3 fimbria was 1 micron in length, and the largest diameter was 7.4 nm and the smallest was 4.2 nm, have an elliptically cylindrical structure with the largest diameter and smallest diameter of each ellipse-like cross section in fimbrial structures by using transmission electron microscopy. We present type 3 fimbriae MrkD adhesin variants, mrkDV3-, was the best adhesin, and the adhesive force between mrkDV3-expressed fimbriae and collagen IV is about 4 pN. The force-extension curve of type 3 fimbria exhibited a three-phase : (1) the first spring-like phase stretched with increasing force, the spring constant k_p of 60.9 N/ μ m, the estimated Young's moduli (E) were 100 Mpa, (2) the second uncoiling phase, it started to uncoil and extended several micrometers at a fixed force of 66 ± 4 pN, and (3) the final nonlinear phase with a characteristic force of 102 ± 9.8 pN at the inflection point. In addition, we screened twelve critical residues on major pilins MrkA of type 3 fimbriae. By contrast, the G189A mutant remained capable of producing normal amounts of fimbriae. Further investigating the mechanical properties of the G189A fimbriae revealed that the uncoiling force for MrkA-MrkA interaction varied from 58 pN to 67 pN rather than be constant like the uncoiling force of 66 pN measured from the other mutants or wild type. The work has provided a method that allows us to understand of the biomechanical function of different types of pili. The investigation of pili brings information for the design of new drugs to prevent bacterial infections, which is increased bacterial resistance towards antibiotics.

誌 謝

生命是一個無休止向前運轉的巨輪，我們所衝過的每一道關卡，將是下一個目標的起點。感謝恩師 徐琅老師的栽培與包容，還有感謝師母一路關心與鼓勵，尤其待人處事方面，您們的諄諄教誨都是我全方位的明燈，我會銘記在心，在往後的人生裡。感謝國家型奈米計畫的老師們，尤其是生科系彭慧玲老師、清大生科系張晃猷老師、清大動機系劉承賢老師、清大材料系游萃蓉老師，謝謝您們在我的研究上耐心的指導。感謝大師兄博睿學長為跨領域研究開啟先河、生科系盈蓉學姊鼎力相助、最執著於生物物理研究的夥伴豐榮一路相挺，讓我勇敢的渡過許多低潮。還有龍蝦團隊的夥伴們國良、欣瑜、建誠，謝謝你們幫忙催生這篇論文。實驗室的夥伴，不打不相識的勝陽，終於要一起畢業，博真學姊、愛堂、哲良、東銘、士模、頌揚、軒毫、文鴻、庭樵，希望大家繼續在跨領域的研究上發光發熱。最感謝的是我的愛妻慧君，謝謝妳為我打理一切，使我在工作和學業上無後顧之憂，亦要在此對愛女欣歡及愛子欣諺說聲抱歉這陣子對你們疏忽了，你們可愛的臉龐，就是我撐下去的動力。感謝我的家人無怨無悔的付出以及支持，是我得以能完成學業，並且繼續朝我的理想邁進的重要支柱，最後，再次謝謝一路幫助我的朋友們，在這人生短暫交會之際，謝謝你們綻放溫暖的光輝，照亮我前行的道路，幫助我完成人生夢想，感恩。

詹佳翰謹至于

中華民國一百年十月

國立交通大學電子物理研究所

1896

本論文獻給我最敬愛的父母、岳父母、家人以及朋友們，願你們永遠健康快樂

目 錄

中文摘要	i
英文摘要	ii
致謝	iii
目錄	iv
表目錄	v
圖目錄	vi
一	緒論.....	1
二	原理.....	4
2-1	雷射鑷夾捕捉力的特性.....	4
2-2	雷射鑷夾捕捉力的光彈性係數校正.....	5
2-3	功率頻譜密度法.....	5
2-4	四象限光偵測器奈米級解析度的測量技術.....	8
三、	雷射鑷夾的架設.....	10
3-1	雷射鑷夾系統.....	10
3-2	微粒子位置檢測系統.....	12
3-3	樣品平台.....	13
3-4	系統控制程式.....	13
四、	實驗方法.....	15
4-1	第三型線毛與第四型膠原蛋白間黏附力.....	15
4-2	第三型線毛在應力下的機械特性.....	17
4-3	第三型線毛主要蛋白氨基酸序列突變的影響.....	23
五、	結果與討論.....	27
5-1	第三型線毛與第四型膠原蛋白間黏附力.....	27
5-2	第三型線毛在應力下的機械特性.....	32
5-3	第三型線毛主要蛋白氨基酸序列突變的影響.....	40
六、	結論與展望.....	49
參考文獻	51
附錄一	12 株點突變體的電子顯微鏡照片.....	55
附錄二	第三型線毛的串鏈模型.....	61

表 目 錄

表 4-1	點突變所使用的引子.....	26
表 5-1	常見材料的楊氏模數.....	34
表 5-2	第三型線毛與其他型線毛的物理參數之比較.....	40
表 5-3	點突變體重組線毛拆解力.....	46



圖 目 錄

圖 1-1	第三型線毛的構成要素與其三維螺旋形結構示意圖.....	3
圖 2-1	微粒子偏移捕捉中心距離與四象限光偵測器訊號關係圖.....	4
圖 2-2	利用功率頻譜密度測量雷射鑷夾光彈性示意圖.....	7
圖 2-3	利用功率頻譜四象限光偵測器示意圖.....	9
圖 3-1	雷射鑷夾系統的照片.....	11
圖 3-2	雷射鑷夾系統示意圖.....	11
圖 3-3	四象限光偵測器裝置圖.....	12
圖 3-4	樣品平台裝置圖.....	13
圖 3-5	「線毛受外力的伸展曲線」之操作面板.....	14
圖 3-6	「線毛受外力的伸展曲線」之數據分析比較面板.....	14
圖 4-1	雷射鑷夾測量線毛與膠原蛋白間黏附力實驗示意圖.....	16
圖 4-2	雷射鑷夾測量線毛與膠原蛋白間黏附力的訊號曲線.....	17
圖 4-3	利用雷射鑷夾操控黏附線毛的微粒子示意圖.....	19
圖 4-4	單一方向線毛彈力實驗的訊號曲線.....	19
圖 4-5	線毛長度量測實驗示意圖.....	20
圖 4-6	線毛彈性以及楊氏模數實驗數據及示意圖.....	21
圖 4-7	線毛受力而伸長的示意圖.....	22
圖 4-8	第三型線毛骨幹蛋白胺基酸序列示意圖.....	23
圖 4-9	各種線毛的線毛單元體的胺基酸序列比較圖.....	25
圖 5-1	四種大腸桿菌的線毛生長密度電子顯微鏡照片.....	27
圖 5-2	線毛黏附力的數據統計圖.....	28
圖 5-3	黏附力的群組週期分佈圖.....	30
圖 5-4	線毛黏附數量與黏附力圖.....	31
圖 5-5	第三型線毛原子力顯微鏡照片.....	32
圖 5-6	第三型線毛電子顯微鏡照片.....	34
圖 5-7	單一根第三型線毛之典型受力伸長關係圖.....	35
圖 5-8	典型的第三型線毛受外力的伸長示意圖.....	36
圖 5-9	典型的第三型線毛受外力的伸長曲線.....	37
圖 5-10	兩根第三型線毛受外力的伸長曲線.....	38
圖 5-11	兩根第三型線毛受外力的伸長示意圖.....	38
圖 5-12	線毛的拆解力與特徵力頻率直方圖.....	39
圖 5-13	主要蛋白 MrkA 不同點突變體的生物膜形成能力.....	41
圖 5-14	主要蛋白 MrkA 不同點突變體的聚合體電泳圖.....	42
圖 5-15	各種突變線毛電子顯微鏡圖.....	43
圖 5-16	野生菌株與點突變體的線毛數量、平均長度、平均寬度等物理參數.....	44
圖 5-17	重組突變體單一線毛受力伸展曲線.....	46
圖 5-18	重組突變體單一線毛受力伸展曲線比較.....	47
圖 5-19	野生株與 G189A 突變體線毛受力伸展(黑色)和收縮(灰色)曲線.....	48

第一章 緒論

許多細菌的感染與侵入都是從附著人類、動物或植物宿主的細胞表面或黏膜開始發生，大部分的細菌利用它表面絲狀物線毛(或稱為纖毛)去貼附宿主細胞的表面，以感染宿主細胞進而對其造成傷害[1-3]。細菌黏附宿主細胞，一般經由位於線毛頂端或主體的黏附蛋白(adhesin)附著於宿主細胞，且藉由線毛骨幹類似於彈簧的拉伸性能，能幫助細菌緊密黏附，以抵抗環境的衝擊力，例如在尿道或在呼吸道所產生拖曳力。由於不同種類的線毛的形狀與機械特性有所不同，因而造成感染的疾病也各異。其中第一型線毛與P型線毛是大腸桿菌造成感染的主要媒介，其外觀較為粗直，最常被國外研究；而第三型線毛則較為纖細彎曲，常見於引發的肺炎疾病的克雷白氏肺炎桿菌，過去幾乎沒有關於第三型線毛機械特性方面的研究。本論文利用雷射鐳夾(OT)、電子顯微鏡(TEM)、原子力顯微鏡(AFM)、基因重組技術、基因標定技術、胺基酸定點突變技術等奈米技術，從生物物理的角度，探討單一根第三型線毛的特性。

過去，透過電子顯微鏡的觀察，線毛的外觀已經幾乎被確認。雖然這些靜態圖象提供外觀結構的訊息，但是關於細菌線毛在活體的動態的功能的訊息卻無法得知。直到最近，測量材料彈性之奈米技術的發展[4]，第一型與P型線毛的結構和生物力學的角度分析，如受力伸長特性，已被雷射鐳夾[5, 6]與原子力顯微鏡[7, 8]所定量測出，並用以解釋線毛的可伸縮性將影響菌體在黏附宿主細胞時所能承受的剪力(例如尿液沖刷)。線毛的典型尺寸是直徑約為2-10奈米、長度約為1-2微米，黏附分子位於線毛頂端以黏附宿主細胞，而線毛骨幹則由主要蛋白組裝成三維螺旋結構[9-11]。螺旋結構可以使線毛伸展和收縮，而大多數機械特性取決於這螺旋結構的延展特性，用以抵抗外界環境流動的剪切力。根據線毛受力伸展曲線分析顯示，線毛骨幹透過一串主要蛋白單元體蜿蜒連接形成，類似一條螺旋電話線。那些主要蛋白單元體透過層與層之間連續的鍵結結合成穩定架構，當線毛受外力時，線毛骨幹主要蛋白單元體一一被拉開，使線毛將以數倍長度被拉長[12]。特別的是，而當外力停止時，線毛骨幹將恢復原狀，顯然像螺旋形一樣的架構的展開完全可逆[13]。有報導指出，線毛展開的可逆現象，將受到環境酸鹼值影響，而使線毛主要蛋白分子間交互作用力有明顯變化[14]。此外，線毛主要蛋白以及頂端黏附蛋白對於細菌形成生物膜也扮演重要角色[15, 16]。因此，線毛受力伸展的量測，對於線毛的黏附與延展特性的研究是重要的。

多數的細菌皆擁有多種不同形式的線毛，譬如大腸桿菌有第一型線毛、P 型線毛等 [17]，沙門氏菌 (*Salmonella*) 有第一型線毛與第三型線毛 [18]，奈瑟氏腦膜炎雙球菌 (*Neisseria meningitidis*) 與奈瑟氏淋病雙球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 則有第四型線毛 [19]。克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 在臨床上是一株伺機性感染細菌，平常少量存在於健康人體腸道中，在人體免疫不全時會造成感染，而引起肺炎、呼吸道感染、肝膿瘍、尿道感染、敗血症及腦膜炎等症 [20]。最近幾年來，臨床上發現克雷白氏菌具有多種抗藥性的分離菌株 [21]，使得治療方式趨於困難。克雷白氏肺炎桿菌表面有第一型和第三型線毛，其中第三型線毛被認為可能是參與致病的主要因子 [22, 23]，扮演著體外與數種不同形式的細胞和細胞外基質蛋白質鍵結的角色，因此，認是第三型線毛結構是重要的。

第三型線毛長約 1-2 μm ，寬約 4-7 nm，構成第三型纖毛所需的五種蛋白質已被確定。這些蛋白質分別由基因組 *mrkA*、*mrkB*、*mrkC*、*mrkD* 與 *mrkF* 所轉譯 [24, 25]。第三型線毛的構成要素之示意圖顯示在圖 1。*mrkA* 轉譯的蛋白 MrkA 組裝成第三型線毛骨幹的主要單元體；*mrkB* and *mrkC* 所轉譯的 MrkB 和 MrkC 則與在細菌外膜的調控線毛組裝有關，MrkB 則是位於周膜間隙的 chaperone，負責穩定線毛單元體並幫助其正常折疊，MrkC 為位於細菌外膜上的 usher，線毛單元體經此蛋白被運送至膜外，並固著在其上；*mrkD* 基因可以轉譯出位於線毛頂端的黏附蛋白 MrkD，是克雷白氏肺炎桿菌中與紅血球凝集有關之黏附分子；最後，MrkF 經由實驗證實，與維持第三型線毛在細菌外膜上的穩定性有關 [26]，如圖 1-1 所示。然而，不同於被詳加研究的第一型與 P 型線毛，第三型線毛的生物物理特性至今仍大部分未知。第三型線毛組成蛋白的胺基酸序列與 P 型線毛組成蛋白的胺基酸序列差異大，且這類型線毛的結構組織與機械特性也仍尚未了解。另外，由於蛋白質 MrkA 是第三型線毛的主要蛋白分子，我們將主要蛋白 MrkA 進行特定胺基酸之點突變，分析點突變對於線毛堆疊以及線毛正常功能的影響，進而推斷這些胺基酸在線毛組裝的過程中所扮演的角色。研究線毛的組裝機制，除了可以更進一步了解此制病因子的結構與功能、探討其致病原理外，同時也可作為分子生物學中，研究一般單元體組裝成聚合體之調控機制的參考模型 [27, 28]。

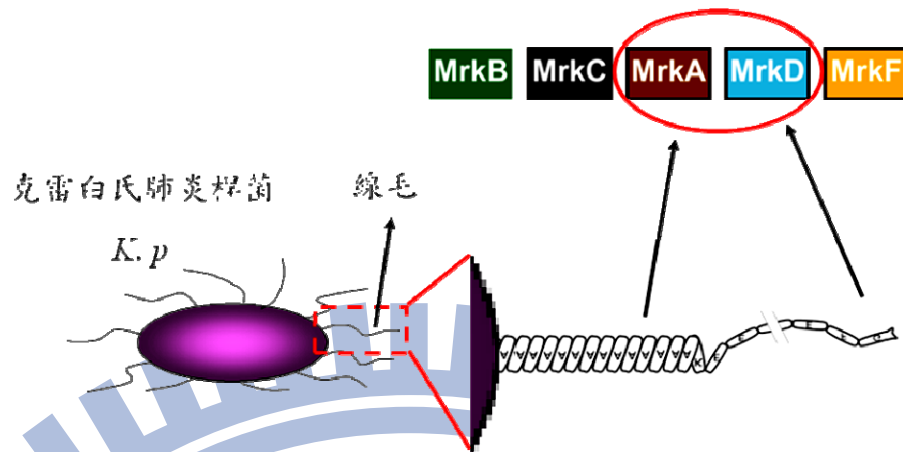


圖 1-1 第三型線毛的構成要素與其三維螺旋形結構示意圖

本論文中，我們以克雷白氏主要致病因子第三型線毛為樣品，利用電子顯微鏡以及原子力顯微鏡觀測線毛微結構包括直徑、長度與密度。接著，利用雷射鑷夾操控微粒子去黏附單一線毛，並且將之拉長至最大可允許移動量，藉由線毛受力伸長的數據，分析得到線毛的黏附以及延展特性。然後，比較第三型線毛與其他類型的線毛，就其結構和力學性能之間的差異，藉此模擬細菌黏附寄主細胞後受到環境剪力，及其與宿主之間的交互作用，期望未來得知克雷白氏肺炎桿菌入侵人體的方式。在第二章，我們介紹雷射鑷夾的捕捉機制，並利用光功率頻譜密度(PSD)檢測器，據此量化雷射鑷夾橫向捕捉力，與微生物位移量的關係。第三章介紹雷射鑷夾系統的架設。第四章測量第三型線毛線毛頂端黏附分子的黏附力，測量單一根第三型線毛在應力作用下的機械特性，並進一步分析第三型線毛主要蛋白單元體 Mrk A 胺基酸序列突變對其生物及機械特性的影響。最後，第五章對這篇論文做一個總結，並敘述未來的展望。

第二章 原理

雷射鑷夾的基本概念是將一道雷射光束經顯微物鏡聚焦，在雷射聚焦處形成一穩定的位能井，使得在此焦點附近的微粒子就會被吸引到焦點，而達到捕捉的目的。當微粒子偏移聚焦處的均衡位置時，將承受一個隨偏移量成正比的虎克定律回復力。雷射鑷夾系統提供奈米級位移解析度以及皮牛頓等級力的測量，非常適合於分子生物間交互作用力的研究。

2-1 雷射鑷夾捕捉力的特性

雷射鑷夾的捕捉力就像線性彈簧的作用力一樣，彈簧彈力大小與彈簧伸長量成正比，兩者的比值即為彈簧的彈性係數，而雷射鑷夾受力變化正比於捕獲物體偏離平衡位置之位移量。因此，雷射鑷夾有如一「光學彈簧」，黏附在被捕捉的微粒子上，具有固定的「捕捉力彈性係數」。在沒有其他外力作用下，被捕捉的微粒子停留在彈簧的平衡點(即雷射光焦點)。如圖 2-1 所示，當被雷射鑷夾捕捉住的微粒子受到外力 F 時，微粒子圓心與雷射鑷夾捕捉中心的偏移距離(D)也隨之改變，就像對彈簧壓縮，會引起彈簧形變，產生對應之彈力。根據「微粒子位移量」與「光學捕捉力」的關係，定量分析雷射鑷夾的「光彈性係數」，進而校正雷射鑷夾捕捉力 $F(OT)$ 。

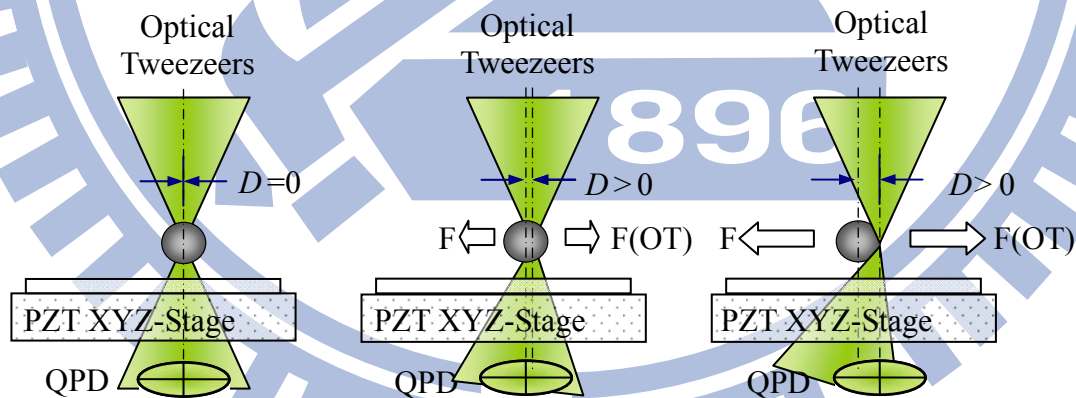


圖 2-1 微粒子偏移捕捉中心距離與四象限光偵測器訊號關係圖

微粒子圓心與雷射鑷夾捕捉中心的偏移距離(D)；

四象限光偵測器(QPD)訊號

2-2 雷射鑷夾捕捉力的光彈性係數校正

為了應用雷射鑷夾於生物黏附及延展實驗。我們首先要校正雷射鑷夾的光彈性係數。我們利用功率頻譜密度分析法(Power spectrum density)量測雷射鑷夾光彈性係數，以校正微粒子的偏移距離與雷射鑷夾捕捉力的關係。接著，測量微粒子的偏移量，再乘上光彈性係數，即可得到雷射鑷夾施於微粒子的力量。

功率頻譜密度分析法的優點是直接利用雷射鑷夾捕捉一個微粒子，即可量出雷射鑷夾作用於這顆微粒子的光彈性係數。當我們利用雷射鑷夾捕捉微粒子時，雖然微粒子會受到捕捉力而限制雷射鑷夾在所建立的光學陷阱之中，但卻因為布朗運動的存在，使微粒子並非穩定地停止在雷射鑷夾的捕捉中心，而會在捕捉中心的附近晃動。

為了得到奈米尺度的解析能力，我們利用四象限光偵測器(QPD)訊號分析的單一粒子追蹤技術[39]，測量微粒子在雷射鑷夾的捕捉中心晃動的範圍與頻率，即可得知雷射鑷夾光彈性係數。雷射鑷夾的光彈性係數越大時，微粒子運動的範圍與頻率也越大。單一粒子追蹤技術，主要是利用四象限光偵測器，偵測被雷射鑷夾捕捉之微粒子的位置，其位置偏移所導致光強度在光偵測器，所造成的電壓值變化。光偵測器的訊號是以電壓值(V)為單位，我們進一步以功率頻譜密度分析法校正光偵測器的訊號，分析其電壓值與微粒子實際的位置(nm)的換算值(nm/V)。而這個換算值，對線毛黏附與延展特性的實驗非常重要。因為在線毛實驗中，我們必須要知道微粒子的位移，來反推微粒子所受的力以及線毛被拉開的長度等。總之，功率頻譜密度分析法是一個相當普遍且方便於雷射鑷夾光彈性係數量測與四象限光偵測器(QPD)校正的方法。

2-3 功率頻譜密度法[29-31]

我們利用朗茲凡方程式(Langevin equation)來描述粒子在雷射鑷夾捕捉位能井中的布朗運動：

$$F(t) - kx(t) - \beta x'(t) = mx''(t), \quad (2.3.1)$$

其中 $F(t)$ 熱擾動形成的力， $x(t)$ 是微粒子在雷射鑷夾位能井中，因布朗運動而隨時間 t 的所在位置， k 則為雷射鑷夾光彈性係數， $kx(t)$ 是雷射鑷夾捕捉力， $x'(t)$ 是微粒子的速度， $\beta = 6\pi\eta r$ 表示水流黏滯力常數， η 為水黏滯係數， r 為微小粒子之半徑， $\beta x'(t)$ 則是微粒子所受的的水流黏滯力的大小， m 是微粒子的質量， $mx''(t)$ 則是微粒子所受的合力。

(2.3.1)式表示一個力平衡的方程式，其中粒子加速度的產生的力與液體的黏滯力以及雷射鑷夾的彈簧恢復力，這與溶液分子隨機撞擊。

由於微粒子在水中的運動其實是一個阻尼很大的運動，所以當微粒子被水分子撞擊時產生的作用力，很快就會達到力平衡，使微粒子到達其終端速度。因此，(2.3.1)式中的三個力的合力 mx'' 項與其他幾項比起來是小很多，我們可以把最後一項 mx'' 忽略為零，

$$\beta x'(t) + kx(t) = F(t), \quad (2.3.2)$$

我們將(2.3.2)式兩邊做傅立葉轉換後可以得到：

$$\beta \cdot FT\{x'(t)\} + k \cdot FT\{x(t)\} = FT\{F(t)\}, \quad (2.3.3)$$

其中 $FT\{\}$ 表示傅利葉轉換運算。又根據傅利葉轉換運算規則，

$$FT\{x'(t)\} = (i2\pi f)FT\{x(t)\}, \text{ 將此關係式代入(2.3.3)可改寫成：}$$

$$\beta \cdot (i2\pi f)FT\{x(t)\} + k \cdot FT\{x(t)\} = FT\{F(t)\}, \quad (2.3.4)$$

我們將(2.3.4)式兩邊取絕對值平方後可以得到：

$$\left[k^2 + (2\pi f\beta)^2 \right] |FT\{x(t)\}|^2 = |FT\{F(t)\}|^2, \quad (2.3.5)$$

其中 $|FT\{x(t)\}|^2$ 代表的是微粒子位置分布 $x(t)$ 的能量頻譜。因為 $F(t)$ 代表隨機的力量，對應時間的平均數是零，其能量頻譜[31,32]為

$$PSD_F(f) = |FT\{F(t)\}|^2 = 4\beta k_B T, \quad (2.3.6)$$

其中 k_B 是波茲曼常數， T 是絕對溫度。

將(2.3.6)中的 $4\beta k_B T$ 代入(2.3.5)式中的 $|FT\{F(t)\}|^2$ 可以得到 $x(t)$ 的能量頻譜

$$PSD_x(f) = \frac{|FT\{F(t)\}|^2}{k^2 + (2\pi\beta f)^2} = \frac{4\beta k_B T}{4\pi^2 \beta^2 \left[\left(\frac{k}{2\pi\beta} \right)^2 + f^2 \right]} = \frac{k_B T}{\pi^2 \beta \left[f_c^2 + f^2 \right]}, \quad (2.3.7)$$

其中 $f_c = \frac{k}{2\pi\beta}$ 為微粒子能量頻譜密度的截止頻率， $\beta = 6\pi\eta r$ 表示微粒子所受的水流黏滯力常數， η 則是的水流黏滯係數。因此我們可以量測一微小球被雷射鐳夾捕捉的布朗運動，接著分析其 Power Spectrum Density，量測 Power Spectrum Density 圖中的截止頻率 f_c 。由 $f_c = k/2\pi\beta$ ，帶入水阻力常數 $\beta = 6\pi\eta r$ ，即可推得此微小球所受雷射鐳夾捕捉之光彈性係數 $k = 2\pi\beta f_c$ ，如圖 2-2。由上述我們可以得到雷射鐳夾光彈簧係數，以及被捕捉的微粒子偏移捕捉中心時所對應的力，我們可以用來量測分子生物間微小的作用力。

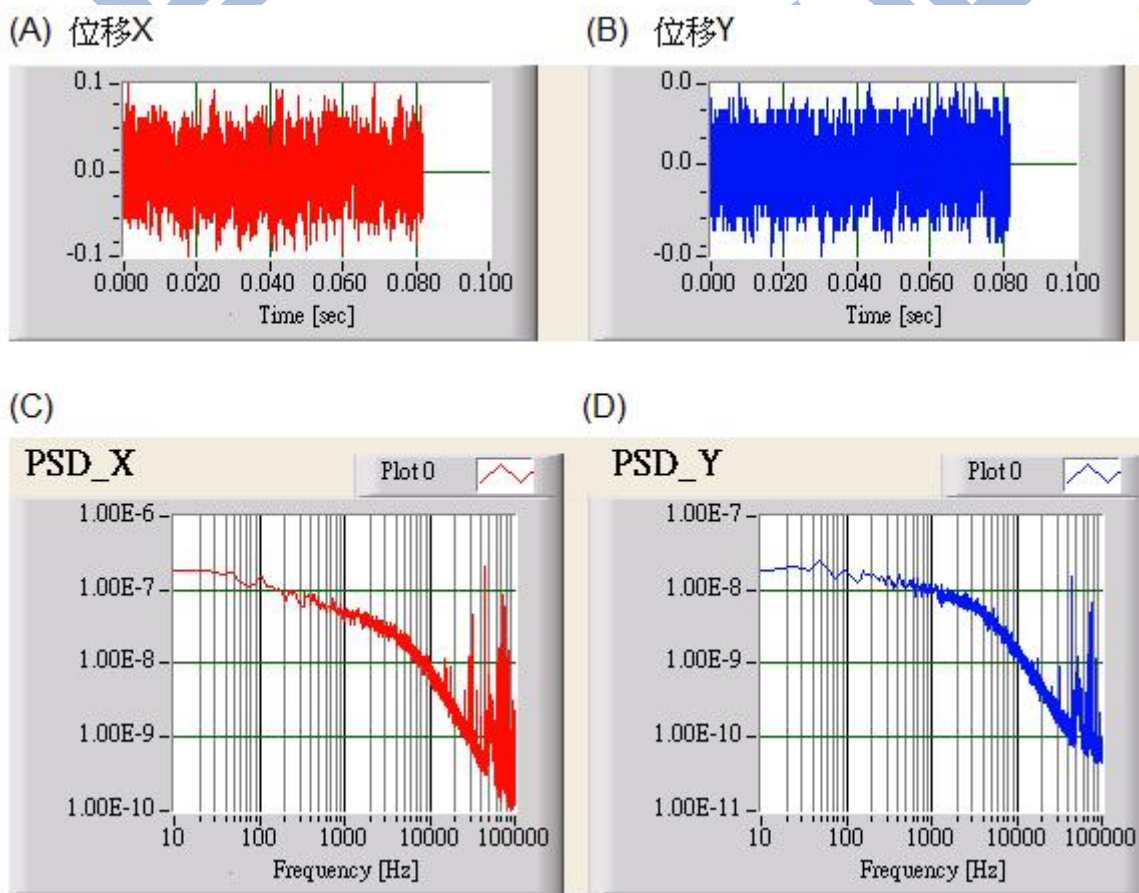


圖 2-2 利用功率頻譜密度測量雷射鐳夾光彈性示意圖

(A)、(B)分別為 X、Y 方向微粒子在一均勻位能井中的布朗運動隨時間的關係圖；
 (C)、(D)由微粒子的布朗運動得到功率頻譜密度對頻率的關係圖，可校正雷射鐳夾光彈性係數 K_x 、 K_y 。

2-4 四象限光偵測器奈米級解析度的測量技術[39]

受限於光學的繞射極限，我們無法利用影像處理的方法來觀察被雷射鐳夾捕捉的微粒子在溶液中微小的布朗運動(Brownian motion)。單一粒子追蹤技術，則為雷射鐳夾開拓一個嶄新的里程碑，首先，我們利用雷射鐳夾操控一顆被捕捉的微粒子，然後去掃描探測雷射光束，並用四象限光偵測器偵測穿過微粒子的探測雷射光束的光分佈，藉由偵測微粒子在溶液中的微小運動，以反推微粒子與捕捉雷射光束焦點之相對位移。而這不僅增加了雷射鐳夾對微小力量測的解析度，同時藉由空間解析與力解析的提升，雷射鐳夾成為研究生物物理與機械特性的新工具。

當被捕捉的微粒子在垂直雷射鐳夾光軸方向的位移時，四象限光偵測器上的四個光偵測器偵測到的光分佈也會產生對應的改變。因此，我們便可以由光強度訊號變化與微粒子位移的關係，推測出微粒子與雷射鐳夾捕捉中心的相對的位移 D ，代入雷射鐳夾光彈性係數，則可以得知雷射鐳夾捕捉力。

如圖 2-3 所示，四象限光偵測器是由四個光偵測器 1、2、3、4 所組合而成。當光照射在四個偵測器上，經過放大器後分別產生 V_1 、 V_2 、 V_3 、 V_4 的電壓訊號。其中光強度與電壓訊號成正比。當光斑往水平方向偏移時，四個光偵測器所偵測到的電壓訊號會產生改變，其中 x 方向的位移可以由四個光偵測器的偵測訊號 $S_x = (V_1 + V_3) - (V_2 + V_4)$ ；同理， y 方向則是 $S_y = (V_1 + V_2) - (V_3 + V_4)$ 。而在平行光軸方向，也就是 z 方向的位移，則由於與四個偵測器所量到的總強度有關，便可以由 $S_z = (V_1 + V_3 + V_2 + V_4)$ 求得。

$$S_x = \frac{(V_1 + V_3) - (V_2 + V_4)}{V_1 + V_2 + V_3 + V_4}, \quad (2.4.1)$$

$$S_y = \frac{(V_1 + V_2) - (V_3 + V_4)}{V_1 + V_2 + V_3 + V_4}, \quad (2.4.2)$$

由(2.4.1)及(2.4.2)式得到光斑在水平方向以及垂直方向的光斑偏移量，我們可以進一步得知微粒子相對雷射光焦點的位移 $\vec{D} = (D_x, D_y, D_z) \propto \vec{S} \equiv (S_x, S_y, S_z)$ ，以及所對應的雷射鐳夾捕捉力。

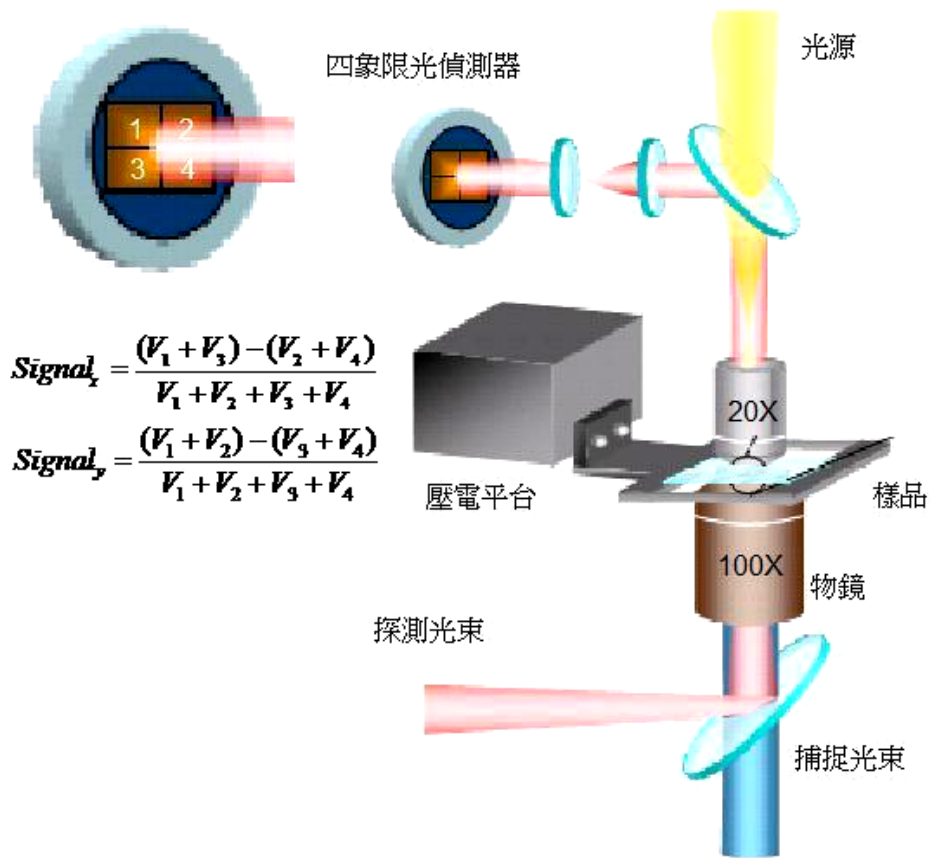


圖 2-3 四象限光偵測器示意圖

四象限光偵測器是由四個光偵測器 1、2、3、4 所組合而成。
 偵測器上的光訊號，經過放大器後分別產生 V_1 、 V_2 、 V_3 、 V_4 的電壓訊號。

1896

第三章 雷射鑷夾的架設

3-1 雷射鑷夾系統

我們的雷射鑷夾系統架設在一台倒立式顯微鏡平台上(DMIRB, Leica, Germany)。如圖 3-1 所示，雷射鑷夾所使用的捕捉光源為一台近紅外波長之固態雷射(10 W, 1064 nm, IRCL-1064-1000-L, CrystaLaser, USA)，其選擇考量在降低光學破壞生物組織的可能性。雷射光束透過一組 12X 擴束器(BE1)擴束後，再由半波長波板(HWP)和偏振分光鏡(PBS)結合以改變雷射功率。將雷射光束透過顯微鏡邊開口引導到一台倒立式的顯微鏡(DMIRB, Leica)。雷射光束進入顯微鏡後，經由分光鏡(DM1)將雷射光反射進入顯微物鏡(OBJ1, 100X, NA=1.25, Leica)，此即為一套雷射鑷夾系統。接著我們將微粒子以及細菌放在兩片蓋玻片之間，再將這組玻片置於一個壓電平台(PZTstage)上作微小且精確的位移操控，此一壓電平台最小步距 1.2 奈米，而最大移動範圍為 80 微米。當雷射鑷夾捕捉微粒子時，我們利用一個聚光物鏡(OBJ2, 20X, NA=0.5, PlanFluor, Nikon)收集微粒子造成的雷射散射光，再利用一個聚焦透鏡(L1, f=50mm)，將聚光物鏡的後焦平面上的雷射散射光，成像在一個四象光偵測器(QPD, G6849, Hamamatsu)的位置上。圖 3-1 所示為雷射鑷夾系統的照片，畫面中雷射鑷夾是架設在一個空氣中漂浮光學平台，以減少振動的影響。攝影機安裝在顯微鏡的高分辨率成像轉接環，而該樣本影像即時顯示在左側屏幕，而樣品數據採集以進行研究則顯示在屏幕右側。我們將四象光偵測器量得的電壓經訊號放大器放大後，由電腦透過資料擷取卡(DAQcard)紀錄，經計算即可獲得微粒子之位移量，如圖 3-2 所示。

為了產生高度聚焦的捕捉光場，我們所使用的物鏡為 100 倍油鏡(NA=1.25, NPLAN, Leica, Germany)，並且把我們的生物樣品固定在一個利用 PZT(P-611, PI, Germany)操控的支架上。而為了建立三維單一粒子追蹤系統並延伸其追蹤範圍[37,39]，我們引入一道探測光束(10 mW, 633 nm)；接著利用一片聚光鏡(20 倍, NA=0.5, PlanFluor, Nikon, Japan)收集探測光經過乳膠珠微擾所產生的前向散射光，最後將散射光打在四象限光偵測器(Si-PIN, S4349, Hamamatsu, Japan)上。

透過四象限光偵測器所收集到的電壓訊號加以分析，我們可以得到電壓訊號 V_i 對乳膠珠偏移捕捉中心點的三維偏移量 Δx_i 之關係($\Delta x_i = \beta_i \times V_i$ ， $i = x, y, z$ ； β_i 為各軸的轉換常數，其單位為[奈米/伏特])；接著我們了解乳膠珠在微小偏移量下所受到雷射鑷夾的

捕捉力可視為一組三維線性彈簧力 $F_i (F_i = k_i \times \Delta x_i)$ ，於是我們將可以得到任何時刻乳膠珠所受到的三維捕捉光之合力。又因為乳膠珠是連結在第三型線毛上，所以我們利用靜力平衡的物理觀點將可求得當時線毛所受到的外力大小。

利用近紅外雷射光源通過高度聚焦的顯微物鏡產生捕捉光點，並利用 PZT 致動器進行微小掃描量測線毛受力實驗；接著引入一道氦氖雷射光束作為探測光束，並利用聚光鏡收光使得前向散射光打在四象限光偵測器上，最後測得乳膠珠對捕捉中心的三維偏移量之量測。

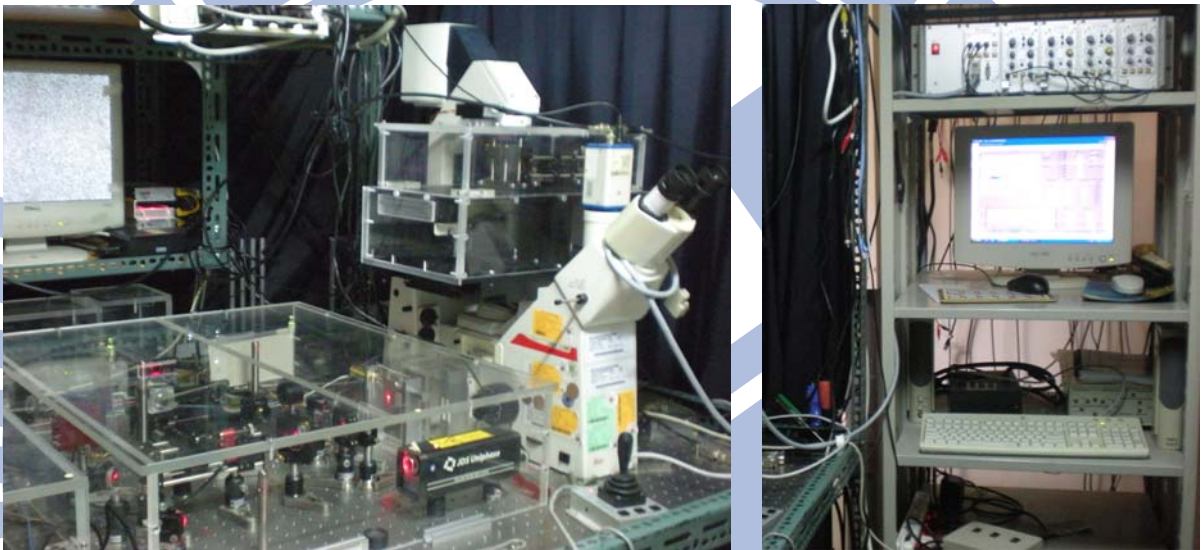


圖 3-1 雷射鐷夾系統的照片

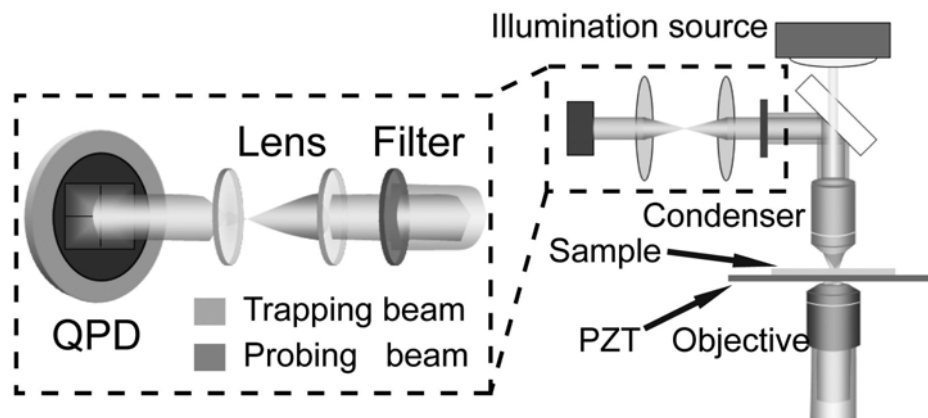


圖 3-2 雷射鐷夾系統示意圖[33]

3-2 微粒子位置檢測系統

如上所述，引入一道氦氖雷射光束作為探測光束，並利用聚光鏡收光使得前向散射光打在四象限光偵測器上，如圖 3-3 所示。四象限光偵測器將探測光轉換為電流，以截取微粒子對捕捉中心的三維偏移量之位移訊號，然後將微粒子位移訊號轉換成雷射鐳夾捕捉力。在這個系統中，四象限光偵測器安裝在顯微鏡上的一個 XY 微米定位平台，被用來作為探測器。當微小球與雷射光焦點重合時，前向散射光斑會均勻的打在四象光偵測器上。當微小球與雷射光焦點不重合時，如圖中有 X 方向的位移時，則光斑不是均勻的打在四象光偵測器上。我們藉由圖中公式推算前向散射光斑打在四象光偵測器上的位置，即可反推微小球的奈米級位移。



圖 3-3 四象限光偵測器裝置圖

為了量測雷射鐳夾的光彈性係數，功率頻捕密度分析法是一個相當簡單的方法。首先，雷射鐳夾捕捉一個微粒子，利用四象限光偵測器測量微粒子，在雷射鐳夾捕捉下的布朗運動，並知道水流黏滯係數，然後將四象限光偵測器偵測到的光訊號轉換為電壓訊號，則我們就可以利用這個方法量得雷射鐳夾的光彈性係數。接著，利用這個方法校正光偵測器量得的電壓值(伏特)，與微粒子實際的位置(奈米)的換算值(奈米/伏特)，我進而得知微粒子對於雷射鐳夾捕捉中心的偏移量，以及所對應的雷射鐳夾捕捉力。

3-3 樣品平台

我們使用一個閉迴路奈米級 XY 定位壓電平台被安裝在顯微鏡的平台上，以提供樣品在幾個奈米解析度的平移運動。透過電腦控制壓電平台精確的移動薄鋁製載具，如圖 3-4，進而操控在薄鋁製載具上方以兩個蓋玻片間距 0.17 毫米厚封裝的生物樣品。其中，薄鋁製載具中央有一個洞在中間，以避免平台移動時，雷射鑷夾捕捉具光的顯微物鏡推動樣品，造成截取訊號干擾。



圖 3-4 樣品平台裝置圖

3-4 系統控制程式

本實驗使用 Labview 軟體操控閉迴路奈米級 XY 定位壓電平台。圖 3-5 為「線毛受外力的伸展曲線」之操作面板，圖左方為微粒子黏附線毛時，線毛受外力伸展曲線的 X 軸即時四象限光偵測器訊號截取；上方為四象限光偵測器電壓訊號所對應的即時雷射鑷夾捕捉力，亦即線毛所受外力；中間為實驗全程的完整訊號；右方則是使用者自由選取訊號截取範圍，進一步分析微粒子 X、Y、Z 軸方向的位移訊號，可以幫助使用者判定線毛是否只受一維方向外力。其中藍色訊號為線毛 X 軸方向受力伸展曲線，紅色訊號為線毛 Y 軸方向受力伸展曲線，而綠色訊號為線毛 Z 軸方向受力伸展曲線。由圖可知線毛在 X 軸方向受力伸展曲線有左右對稱的訊號，此為線毛伸展與收縮曲線，而 Y、Z 軸訊號則呈現趨於平緩的曲線，這表示線毛在 Y、Z 軸方向不受力。

將四象限光偵測器偵測微粒子的位移訊號，換算成雷射鑷夾捕捉力，則可得到線毛受外力的伸展曲線，如圖 3-6 所示。我們進一步將數個線毛受外力的伸展曲線數據分析比較，由圖中可以看到不同長度線毛的受力伸展曲線幾乎有類似的受力伸展行為。由上述操作系統，我們將可以分析線毛受外力的機械特性。

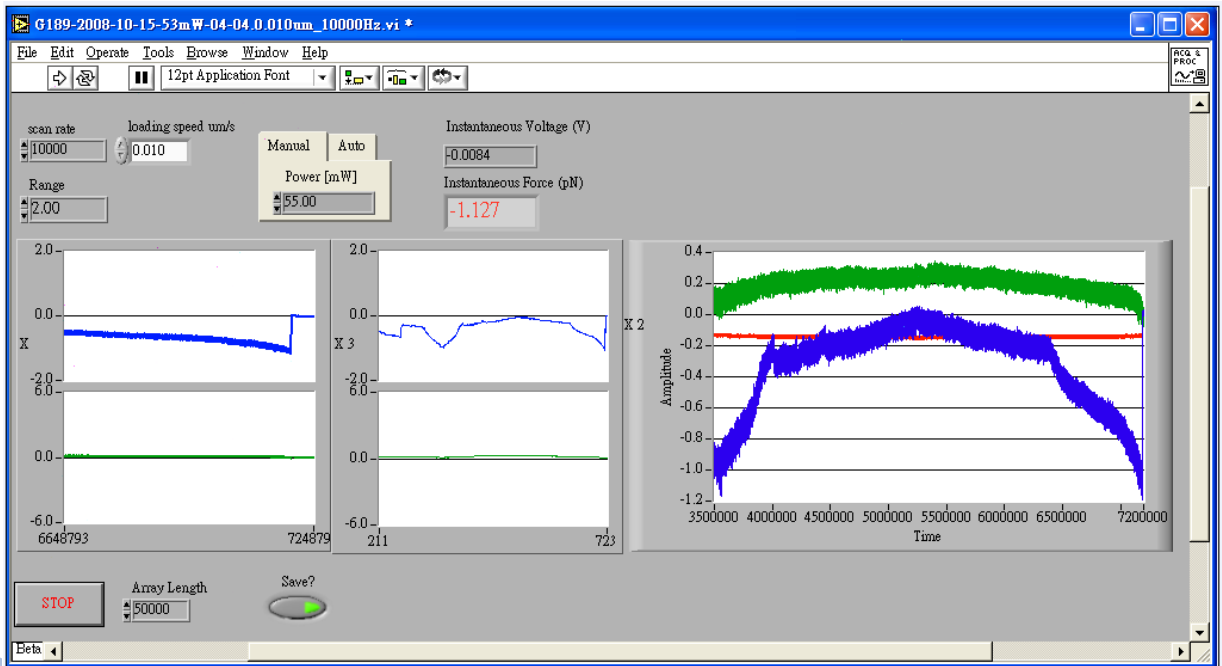


圖 3-5 「線毛受外力的伸展曲線」之操作面板

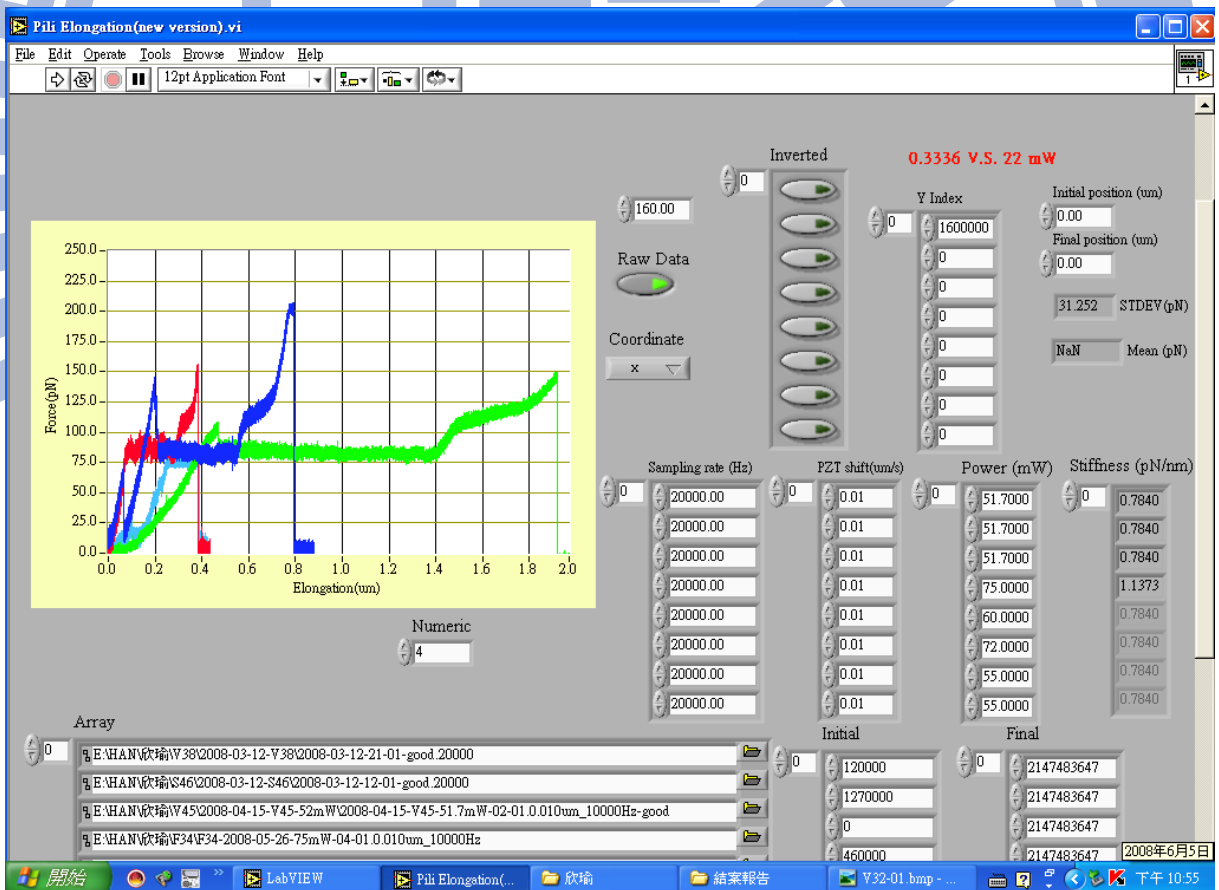


圖 3-6 「線毛受外力的伸展曲線」之數據分析比較面板

第四章 實驗方法

4-1 第三型線毛與第四型膠原蛋白間黏附力

克雷白氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)在臨床上是一株伺機性感染細菌[30]，常在免疫不全的病人身上造成感染。當克雷白氏肺炎桿菌要進行感染時，第一步便是先黏附於宿主細胞上。而第三型線毛被發現是用來黏附的一個重要黏附因子。在第三型線毛上，已經被發現其中有一個叫 *mrkD* 的對偶基因是負責調控線毛頂端的 MrkD 黏著素(adhesin)。雖然對於 MrkD 黏著素的受體還沒有很確定，但是已經發現第三型線毛會黏著於第四型及第五型膠原蛋白。在這個實驗中，我們將用雷射鑷夾來量測不同的黏著素對黏附於第四型膠原蛋白的影響。由於野生型(wild type)的克雷白氏肺炎桿菌一次會表現出許多型的線毛，因此為了真的能量到第三型線毛的黏附力，我們是將載有第三型線毛的基因轉殖到大腸桿菌(*E. coli*) JM 109 菌株上。這一株的大腸桿菌原來並不會表現第三型線毛。

目前已知在第三型線毛頂端有四種黏附蛋白 *mrkD-v1*、*mrkD-v2*、*mrkD-v3* 和 *mrkD-v4*，在本實驗中我們將這四種頂端黏附蛋白分批轉殖在大腸桿菌 JM109 上，使每一批的每隻大腸桿菌只表現出單一種頂端黏附蛋白的線毛。而膠原蛋白是大部分上皮細胞的底膜結構聚合體，普遍存在於宿主表面的細胞受器。接著我們利用雷射鑷夾分別量測這四種黏附蛋白與膠原蛋白的結合力，並找出線毛主要黏附蛋白分子。我們主要的目的是藉由雷射鑷夾測量線毛與膠原蛋白之間的黏附力，進一步分析線毛頂端黏附力。

首先，我們將直徑 1 微米微粒子表面塗覆膠原蛋白，以代替宿主的細胞。接著我們將線毛頂端具有單一種黏附蛋白的大腸桿菌固定於載玻片上，然後用雷射鑷夾捕捉一顆表面塗覆膠原蛋白的微粒子，先從遠處慢慢靠近一隻大腸桿菌，但避免碰觸，隨即拉離，圖 4-1 顯示。倘若微粒子有黏到大腸桿菌的線毛，則在微粒子遠離大腸桿菌的過程中，微粒子偏移雷射鑷夾捕捉中心的偏移量 D 將由四象光偵測器即時反應。因為雷射鑷夾對微粒子的捕捉力等於微粒子表面膠原蛋白與線毛之間的黏附力，所以我們可以根據已校正的雷射鑷夾捕捉力與微粒子偏移量 D 的線性關係，由微粒子偏移量 D 來判斷線毛與膠原蛋白之間的黏附力，圖 4-2 則為其所對應的四象限光偵測器訊號曲線。

起初，線毛尚未被拉直之前，微粒子不受線毛拉力，微粒子一直維持在雷射鐳夾的捕捉中心位置，如圖 4-1(A)所示。在此一階段，因為微粒子未偏移，即偏移量 $D=0$ ，所以四象限光偵測器反應的偏移量 D 訊號曲線隨時間呈現水平直線，如圖 4-2(A)所示。而圖 4-1(B)顯示微粒子剛黏附線毛，而線毛蜷曲尚未被拉直，四象限光偵測器的訊號曲線仍維持平衡位置，如圖 4-2(B)所示。如圖 4-1(C)，當線毛被拉直之後，微粒子被線毛黏著拉離而開始偏移雷射鐳夾的捕捉中心，此時雷射鐳夾的捕捉力隨微粒子偏移量 D 的增加而增大，因此，在這個拉拔階段，四象限光偵測器反應的偏移量 D 隨時間的訊號曲線為一個斜直線，當雷射鐳夾捕捉力達到恰可將微粒子與線毛分開的力量時，四象限光偵測器反應的偏移量 D 訊號曲線達到一個峰值，如圖 4-2(C)。圖 4-1(D)表示雷射鐳夾捕捉力稍大於微粒子與線毛之間黏附力的瞬間，被捕捉的微粒子將與線毛分開，並回到雷射鐳夾的捕捉中心，此時，訊號曲線也會回到平衡位置，如圖 4-2(D)所示。由四象限光偵測器反應的偏移量 D 訊號曲線的峰值，我們可以得到此時所對應的雷射鐳夾對微粒子的捕捉力，即為微粒子表面膠原蛋白與線毛之間的黏附力。

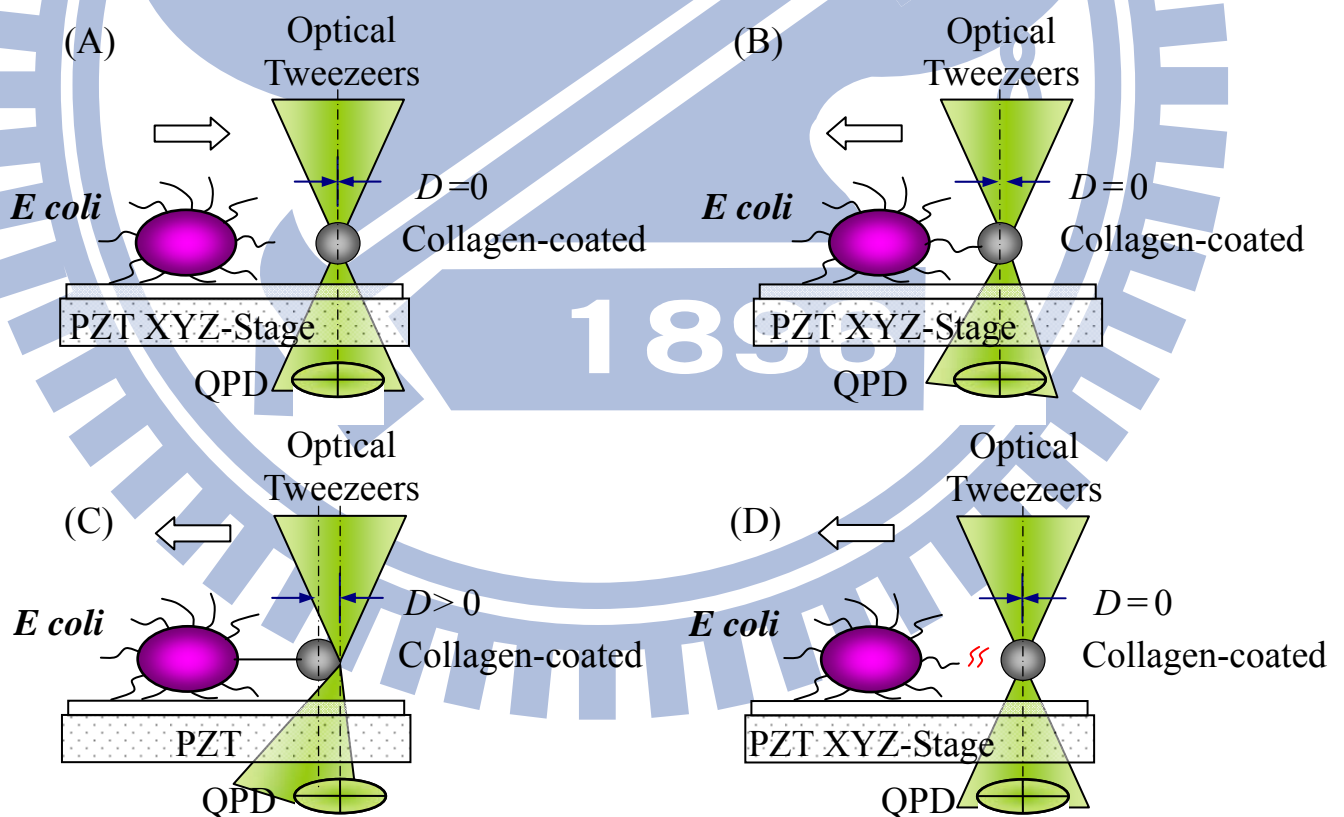


圖 4-1 雷射鐳夾測量線毛與膠原蛋白間黏附力實驗示意圖

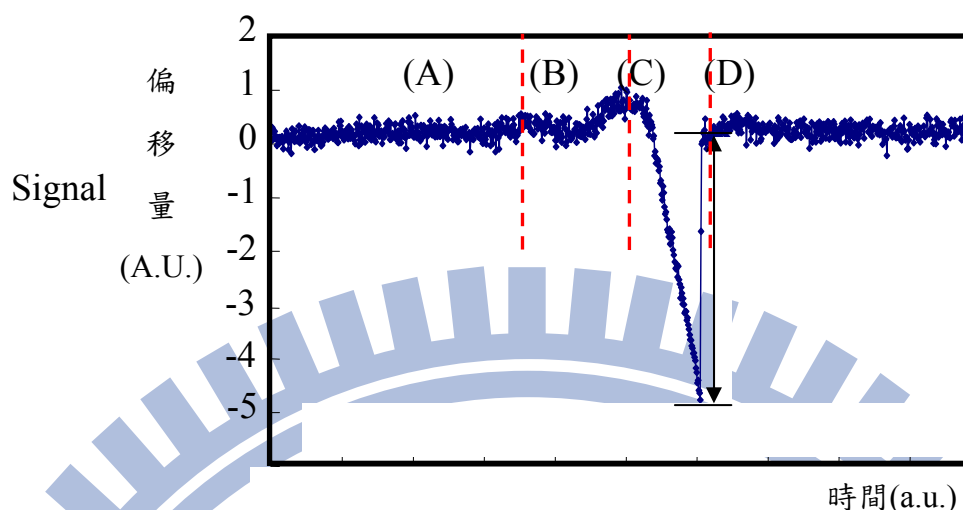


圖 4-2 雷射鐳夾測量線毛與膠原蛋白間黏附力的訊號曲線

4-2 第三型線毛在應力下的機械特性

細菌培養

將載有完整 *mrk* 基因操縱子的質體，利用轉殖技術使克雷白氏肺炎桿菌的第三型線毛表現在大腸桿菌 JM109(*pmrkABCD*)的表面上。主要因為大腸桿菌本身並不具有第三型線毛，而利用這樣轉化方式我們可以分析不同 *mrk* 基因操縱子的表現行為。在線毛量測實驗之前，我們將帶有第三型的大腸桿菌培養在攝氏溫度 37 度的 LB 培養基中搖晃約 20 小時，然後直接用於 TEM 分析。對於彈性實驗，細菌離心 9000 轉/1 分鐘，洗兩次用磷酸鹽緩衝液(10 mM PBS, pH=7.4, 含有 137 mM 氯化鈉、2.7 mM 氯化鉀)，然後懸浮在緩衝液中待後續使用。

電子顯微鏡

細菌在 LB 培養基中於 37°C 培養 16 小時後，以 4,000g 離心收集細胞，並以一倍磷酸緩衝液清洗一次，回溶於等體積之一倍磷酸緩衝液。取在清洗後復溶於磷酸緩衝液的菌液 2.5 微公升，滴在銅網(Formvar carbon-coated glow-discharged grid---200 mesh)上，等待 1 分鐘使細菌沉澱於銅網後，以濾紙沿著銅網邊緣小心地將多餘的菌液吸掉，用 3 滴蒸餾水，沾有 2 滴 2%(質量/體積)醋酸鈷染劑，等待 5 秒鐘後，再以濾紙沿著銅網將染劑盡量吸乾，之後以電子顯微鏡觀察。

乳膠珠製備

黏附於細菌表面線毛的 1 微米橡膠小球，表面塗覆 Protein A (Inc., Warrington, PA)，我們已以下方式處理：首先，我們以 A/G 的緩衝液(0.1M Tris-HCl, 0.15M 氯化鈉)清洗橡膠小球，與反 MrkD 抗體在 4°C 培養 1 小時。接著，將表面塗覆 MrkD 抗體的橡膠小球再次以 A/G 的緩衝液清洗，然後懸浮在磷酸緩衝液 PBS，並保持在 4°C 以備後用。

樣品製備

蓋玻片以去離子水徹底清洗，待完全乾燥後，將兩個蓋玻片之間以兩層雙面膠帶間隔開約 170 微米厚度。接下來，40 μ l 新鮮懸浮在 PBS 大腸桿菌注射到兩個蓋玻片之間的空間，靜置 1 分鐘後，用濾紙完全去除在空間的 PBS，然後離開 30 分鐘，以確保固定細菌於玻片底部。隨後，將內含 1 微米表面塗覆 Protein A 橡膠小球的 PBS 溶液 40 微升，注射到兩個蓋玻片之間。最後，將樣品放入光學顯微鏡樣品平台 1 小時，在彈性測量實驗前，再次確保附著細菌的最底層蓋玻片。

雷射鑷夾

雷射鑷夾裝置圖如前面實驗所示。基本上，捕捉雷射光束和探測雷射光束被引導到一個倒立式光學顯微鏡，然後通過一個高 NA 物鏡，在樣品垂直面上形成一上一下兩個焦點。接著，利用捕捉雷射光束捕捉表面塗覆 Protein A 的橡膠小球。探測雷射光束則用於偵測橡膠小球與捕捉雷射中心的位移，用以分析捕捉雷射捕捉力。

為了量測線毛的彈性以及楊氏模數，我們必須讓細菌固定位置，而其線毛的一端從細菌的外膜生長出來，另一端與微粒子緊密黏附。接著，我們使用雷射鑷夾將已黏附線毛的微粒子捕捉搬運使之遠離大腸桿菌，讓線毛產生形變，進而量測其機械特性。

首先，我們將一隻大腸桿菌黏附固定於玻片底部，再利用雷射鑷夾捕捉一顆 1 微米微粒子去黏大腸桿菌的線毛，微粒子表面塗附 *N*hydroxysuccinimide (NHS)，NHS 對於生物分子有極強的黏附性，因此微粒子與大腸桿菌的線毛將緊密黏附。接著，我們利用雷射鑷夾拉著這顆黏牢線毛的微粒子使之遠離大腸桿菌，如圖 4-3 所示。

當雷射鑷夾捕捉這顆已黏附線毛的微粒子並遠離大腸桿菌時，線毛從蜷曲而拉直最後被拉長。如圖 4-4 所示，在四象限光偵測器的訊號曲線中，一開始線毛蜷曲時的彈力為零，訊號保持水平平衡位置；而線毛被拉直而拉長的過程，訊號開始偏移平衡位置，此時線毛彈力增加，雷射鑷夾對微粒子的捕捉力也增加。最後，當雷射鑷夾對微粒子的捕捉力不足以將微粒子拔離線毛時，微粒子將脫離雷射鑷夾的捕捉中心。

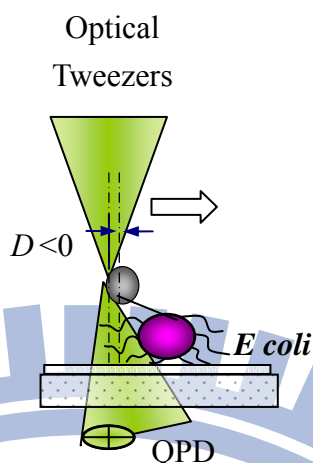


圖 4-3 利用雷射鑷夾操控黏附線毛的微粒子示意圖

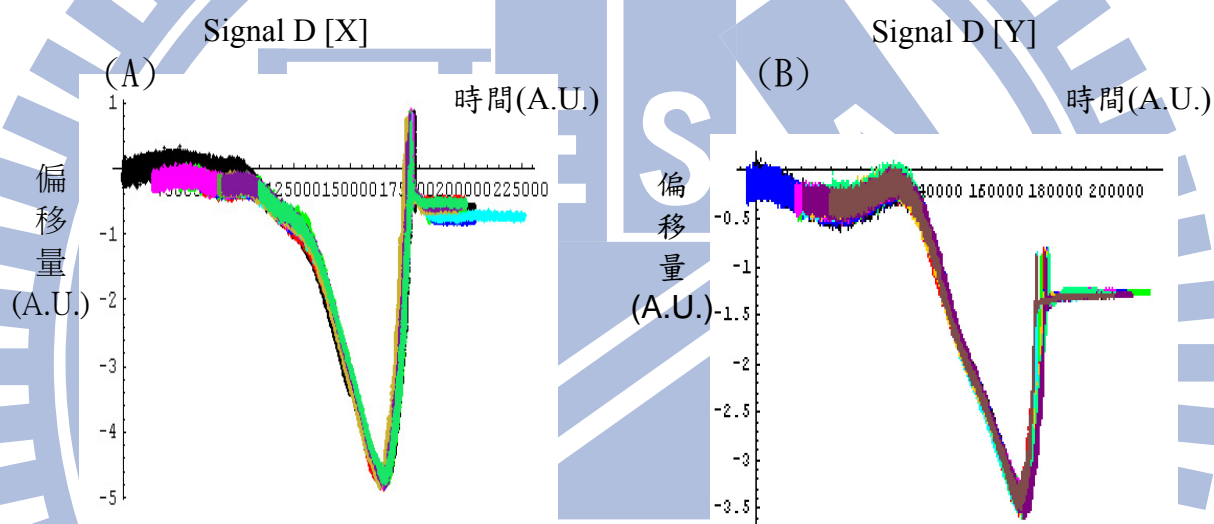


圖 4-4 單一方向線毛彈力實驗的訊號曲線

圖 4-4 為同一根線毛經過數次的單一方向拉拔所得到的數據圖，每一種顏色曲線代表一次拉拔數據，以上共有十次，並顯示出具有高度重複性，這代表此線毛在受力下，仍是具有恢復力。

如圖 4-4(A)所示，我們利用雷射鑷夾捕捉一顆已黏附大腸桿菌線毛的微粒子向+X 軸方向移動，使之遠離大腸桿菌，直到微粒子脫離雷射鑷夾捕捉中心為止，其中不同的顏色是同一顆微粒子的重複實驗數據；而圖 4-4(B)則是我們利用雷射鑷夾捕捉同一顆微粒子向+Y 軸方向移動的重複實驗。我們分別將 X 軸以及 Y 軸方向各九次重複實驗數據重疊比對，發現位移對捕捉力的訊號曲線幾乎重疊在一起。這代表兩個訊息，第一個訊息是證實我們的儀器有高度穩定度，而另一個則表示線毛在重複的拉扯過程中，並沒有從微粒子上脫落，而線毛也保持相同的彈性。

接著，我們利用雷射鑷夾操控一顆微粒子去黏附大腸桿菌的線毛，在相對於大腸桿菌的兩側作來回一次的拉扯實驗，最後回到原來位置。圖 4-5(A)~(E)為雷射鑷夾操控一顆已黏大腸桿菌線毛的微粒子，從大腸桿菌最左側(A)，拉置最右側(E)。

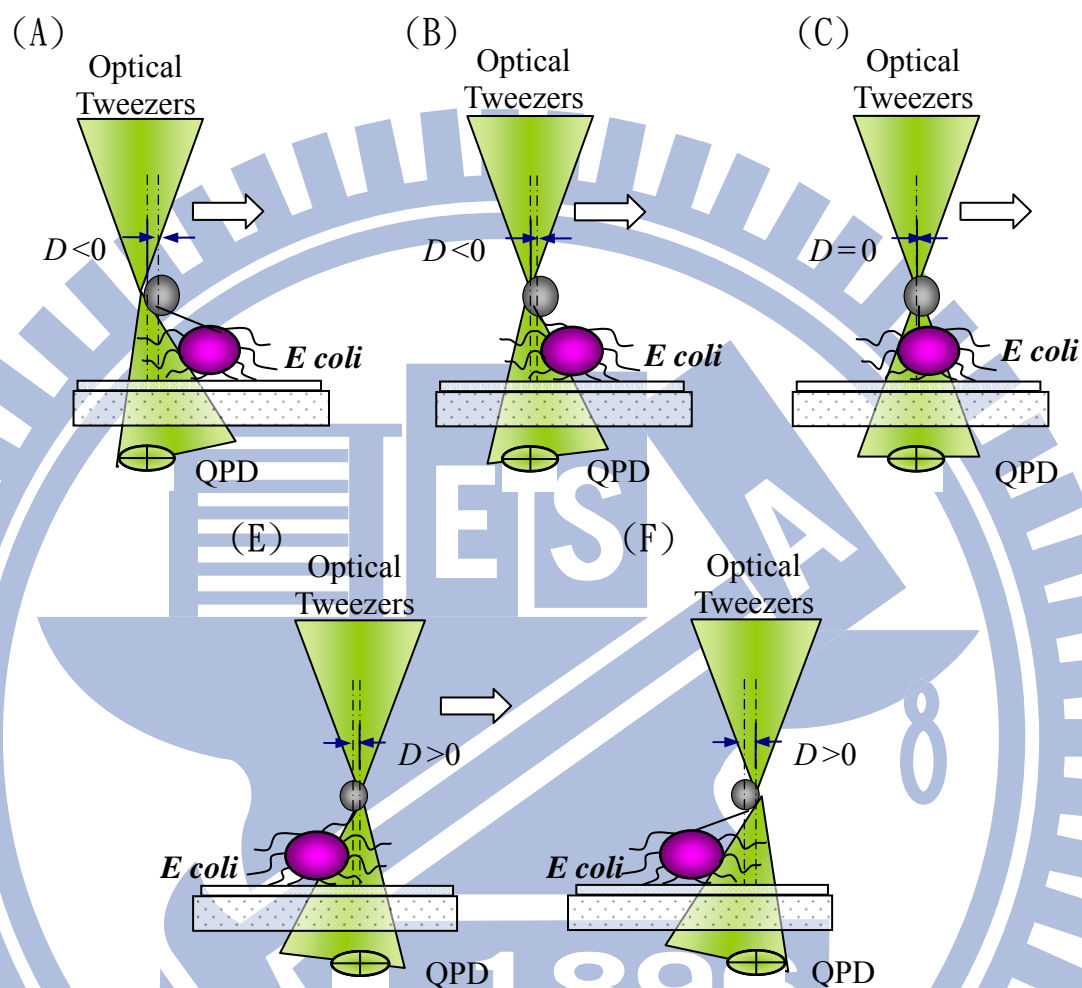


圖 4-5 線毛長度量測實驗示意圖

我們利用雷射鑷夾操控一顆已經黏附大腸桿菌線毛的微粒子，在相對於大腸桿菌 X 軸方向的左右作拉扯，可以發現四象限光偵測器的 X 軸、Y 軸、Z 軸訊號出現有趣的變化。如圖 4-6(A)所示，在四象限光偵測器的訊號曲線中，我們發現訊號會隨著移動的方向改變。

在與雷射鑷夾移動方向相同的 X 軸訊號，有相對於訊號平衡位置的上下對稱性；而另兩維訊號 Y 軸、Z 軸則是相對於紅色虛線左右對稱。當雷射鑷夾捕捉微粒子在細菌位置 X 軸左方移動時，訊號的方向為正，亦即受力方向向右；而在 X 軸右方移動時，訊號的方向為負，亦即受力方向向左。而在 Y 軸、Z 軸方向，四象限光偵測器的訊號方向不變，因此線毛受力方向不會隨著位移方向而改變。

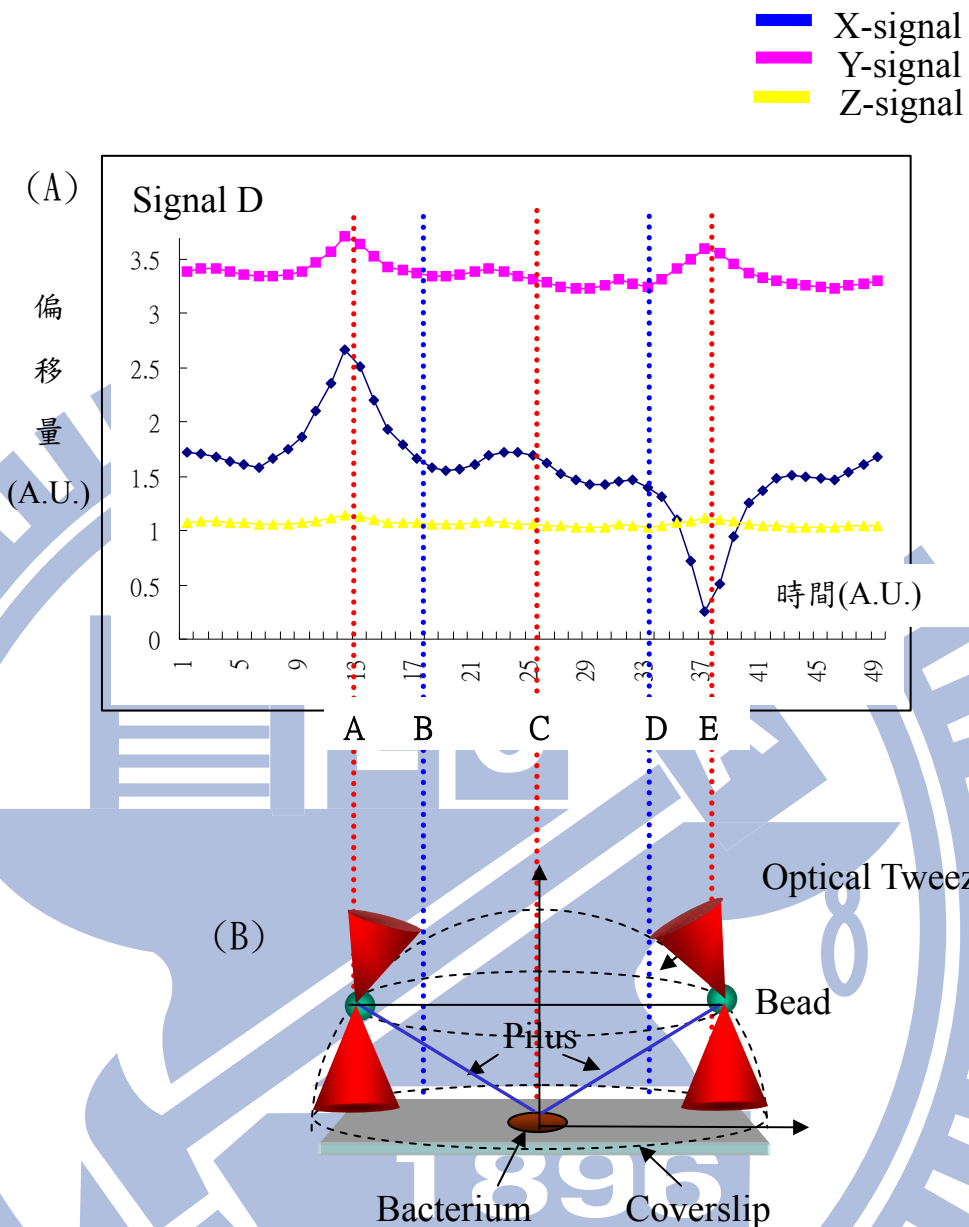


圖 4-6 線毛彈性以及楊氏模數實驗數據及示意圖：(A)訊號變化；(B)線毛受力模型。

另外，在圖 4-6(A)中，我們發現位移對捕捉力的訊號曲線在位移方向的訊號有上下對稱性，而另兩軸則是左右對稱。這些訊號對有助於分析線毛長度、線毛在細菌體表線毛根部生長位置、以及線毛長度。另外國際上在與線毛有關的研究都是一維的生物力分析，我們將發展三維的訊號分析，這樣一來將可以得到一些一維訊號所得不到的訊息。由訊號方向與位移方向相反，而訊號方向即為線毛受力方向，因此我們得知雷射鑷夾捕捉微粒子的位移方向與線毛受力方向相反；而另兩維對應的訊號有相對重複性，代表其受力的方向相同。

我們找出訊號對稱中心位置以虛線 C 標示，在開始有受力訊號的地方以虛線 B 及虛線 D 標示；而受力訊號最大的位置以虛線 A 及虛線 E 標示。其中，訊號對稱中心位置 C 表示線毛根部在雷射鐳夾捕捉微粒子移動直線上的垂足，而 BC 以及 CD 則代表線毛長度在移動直線上的投影長；而 AB 以及 DE 則是線毛受微粒子拉扯的兩端受力訊號，如圖 4-6(A)所示。

如圖 4-6(B)所示為線毛受力模型，利用雷射鐳夾將已黏附線毛的微粒子左右拖曳到恰不能捕捉為止，我們發現在拖曳的過程中有一段線毛不受力的區間，以 BD 表示，此為線毛長度在移動直線上的投影長。而當線毛開始受微粒子拉扯的區間為 AB 以及 DE，此時線毛受外力而拉長，綠色箭頭是微粒子受線毛的張力方向。

利用 AB 及 DE 之間線毛受外力而拉長的受力伸展曲線，我們可以推算出線毛在受力方向上的彈力。圖 4-7 線毛受力而伸長的示意圖，我們假設線毛彈性係數 K_f ，而雷射鐳夾捕捉力常數為 K_t 。線毛伸長量 X_p 以及微粒子偏移雷射鐳夾捕捉中心的位移 d ，兩者的和即為平台位移 X ， $X = X_p + d$ 。線毛伸長量可表示為 $X_p = X - d$

因此線毛彈力可表示為 $F_p = K_f(X - d)$ ，雷射鐳夾捕捉力為 $F_t = K_t d$ 。

而我們由四象限光偵測器的訊號曲線可以求出力對位移訊號的等效係數 K_{eqv} ，則訊號曲線等效的力 $F = K_{eqv} X$ 。而線毛彈力、雷射鐳夾捕捉力以及訊號曲線等效的力都相等 $F = F_p = F_t$ ，最後我們得到等效彈性係數、雷射鐳夾彈性係數、與線毛彈性係數之間的關係 $K_{eqv}^{-1} = K_t^{-1} + K_f^{-1}$ 。

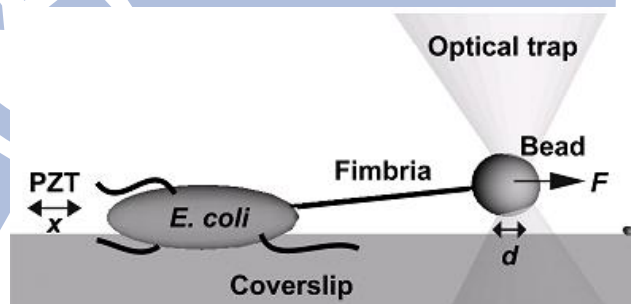


圖 4-7 線毛受力而伸長的示意圖[33]

4-3 第三型線毛主要蛋白氨基酸序列突變的影響[42]

點突變與實驗設計[42]

第三型線毛骨幹是由主要蛋白 MrkA 組成。胺基酸是構成蛋白質的基本單位，賦予蛋白質特定的分子結構形態，使他的分子具有生化活性。蛋白質是由由二十種氨基酸一個個相連組成而在立體空間上摺疊產生複雜的構造，這些胺基酸又被稱為殘基。每一種蛋白質都有自己獨特的胺基酸序列，如圖 4-8 為第三型線毛主要蛋白 MrkA 胺基酸組裝示意圖。我們將第三型線毛主要蛋白特定胺基酸進行點突變，分析胺基酸點突變對於線毛堆疊以及線毛功能的影響，進而推斷這些胺基酸在線毛組裝的過程中所扮演的角色。

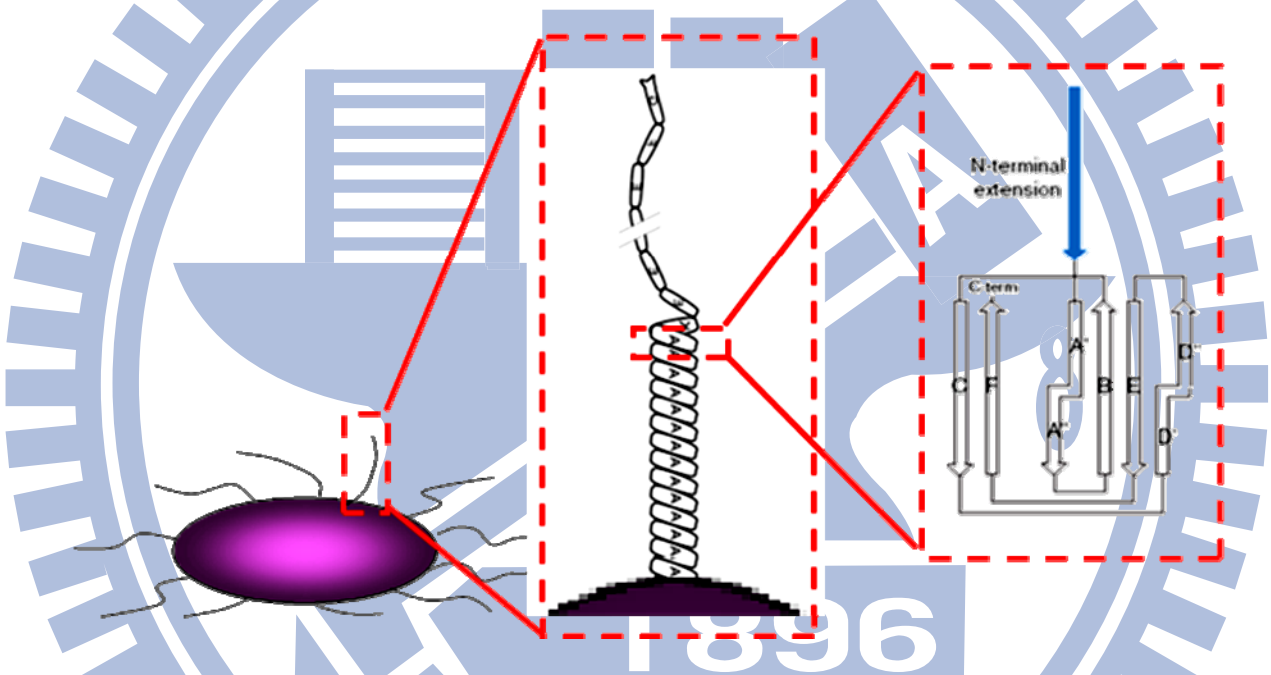


圖 4-8 第三型線毛骨幹蛋白氨基酸序列示意圖

利用定點突變技術，找出線毛主要蛋白分子 MrkA 上與線毛組裝有關的胺基酸位置與區域進行十二個定點突變，再進一步探討不同點突變株對於 MrkA 交互作用以及線毛正常功能的影響，包括進行生物膜(Biofilm)形成能力以及血球凝集能力的測試，此樣品為清華大學生命科學系張晃猷老師實驗室所提供。首先，將大腸桿菌野生株 JM109 和十二個氨基酸點突變體細菌，生長在 LB 培養基 (Luria-Bertani)於 37°C，並依據需要加入 100 µg/ml 的青黴素(ampicillin)。

除了線毛不可或缺的 β -鏈組成結構之外，在其他種類線毛的主要主要蛋白中的幾個保守序列，也在第三型線毛主要蛋白 MrkA 中發現。各種線毛的主要主要蛋白 MrkA, FimA, PapA, LpfA, and MrpA 整個序列一致性極低約 4% (206 個只有 9 個胺基酸序列一

致)。這意味著不同類型的線毛的序列差異可能造成一些明顯的性能相異，例如，力學性能可能會有所不同。為了檢視線毛主要蛋白 Mrk A 的重要殘基，我們選定 MrkA 序列的 12 個位置，以丙氨酸取代 MrkA 殘基作定點突變。

如圖 4-9 所示，從五種類型線毛骨幹主要蛋白比較中，基於兩個標準選擇，分別以丙氨酸的替換的十二個殘基突變體(1)幫助骨幹主要蛋白間相互作用的重要殘基 G30，F34，C87，G189，Y197 和 I199；(2)從五種類型線毛骨幹主要蛋白比較中，找出屬性不一致的六個重要殘基 V38A，V45A，S46A，N192A，T196A，和 Q202A。本研究所使用的菌株與質體之基因型與特性，本實驗所使用的引子如表 4-1 所示。

生物膜形成能力測試

細菌在 LB 中於 37°C 培養 16 小時後，以 LB 將菌液稀釋 10 倍，並調至相同濃度。接著，分別取 100 μ l 的上述菌液加入 96 孔平盤內，於 37°C 靜置培養 48 小時。待生物膜生成後，加入染劑於室溫下 10~15 分鐘，再以清水洗三次，接著加入酒精搖晃均勻後，測定其吸收光值，此方式換算突變株與野生菌株生物膜形成能力的相對數值。

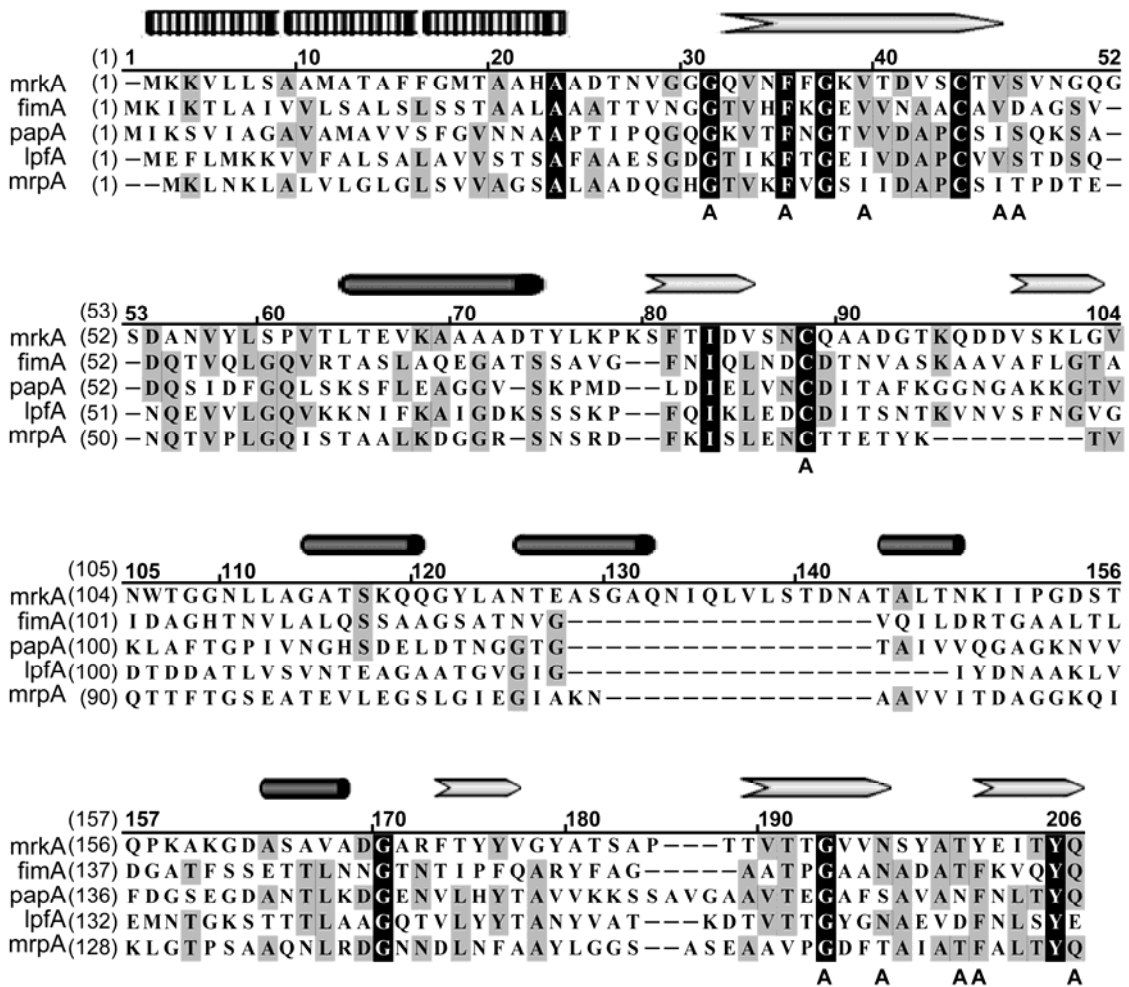


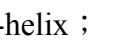


圖 4-9 各種線毛的線毛單元體的胺基酸序列比較圖[42]

比較五大線毛骨幹主要蛋白序列。*mrkA*：克雷白氏肺炎桿菌第三型線毛骨幹主要蛋白；*fimA*：大腸桿菌線毛第一型線毛主要蛋白；*papA*：大腸桿菌 P 型線毛主要蛋白；*lpfA*：沙門氏傷寒桿菌 LPF 線毛主要蛋白；*MrpA*：奇異變形桿菌 PMF 線毛主要蛋白。黑色垂直框表示相同的殘基和灰色的垂直框表示類似殘基。 α -螺旋和 β -鏈被標在序列上面的信號肽，並取代殘留的標有“A”部分。黑色代表相同的胺基酸；灰色代表保留性胺基酸。訊息序列以()作代表。序列上方二級結構()表示 α -helix；()表示 β -strand。序列下方的字母與位置則表示置換成的胺基酸與置換位置。

Strains	Primer	Sequence 5'→3'
G30A	SL1073	AATGTTGGCGGCCGCCAGGTTAATTTCTTCGGTA
	SL1074	TACCGAAGAAATTAACCTGGGCGCCGCCAACATT
F34A	SL1075	GCGGCGGCCAGGTTAATGCCTTCGGTAAAGTTAC
	SL1076	GTAAC TTTACCGAAGGCATTAACCTGGCCGCCGC
V38A	SL1091	AATTTCTTCGGTAAAGCTACCGATGTATCCTGT
	SL1092	ACAGGATACATCGGTAGCTTTACCGAAGAAATT
V45A	SL1095	TGTATCCTGTACTGCTTCCGTTAACGGCCA
	SL1096	TGGCCGTTAACGGAAGCAGTACAGGATAACA
S46A	SL1097	TGTATCCTGTACTGTAGCCGTTAACGGCCAGG
	SL1098	CCTGGCCGTTAACGGCTACAGTACAGGATAACA
C87A	SL1079	ACCGAAATCTTTCACCGCTGACGTCTCTAACTGCCA
	SL1080	TGGCAGTTAGAGACGTCAGCGGTGAAAGATTTTCGGT
G189A	SL1099	CACGGTAACCACCGCTGTGGTTAACAGC
	SL1100	AGCTGTTAACCACAGCGGTGGTTACCGTG
N192A	SL1101	CACCGGTGTGGTTGCCAGCTACGCGACTTA
	SL1102	TAAGTCGCGTAGCTGGCAACCACACCGGTG
T196A	SL1103	GTGGTTAACAGCTACGCGGCTTACGAAATTACTT
	SL1104	AAGTAATTTTCGTAAGCCGCGTAGCTGTAAACCAC
Y197A	SL1081	TTAACAGCTACGCGACTGCCGAAATTACTTACCAG
	SL1082	CTGGTAAGTAATTTTCGGCAGTCGCGTAGCTGTAA
I199A	SL1105	GCTACGCGACTTACGAAGCTACTTACCAGTAATT
	SL1106	AATTACTGGTAAGTAGCTTCGTAAGTCGCGTAGC
Q202A	SL1085	GACTTACGAAATTACTTACGCGTAATTCGTCAGAA
	SL1086	TTCTGACGGAATTACGCGTAAGTAATTTTCGTAAGTC

表 4-1 點突變所使用的引子[42]

第五章 結果與討論

5-1 第三型線毛與第四型膠原蛋白間黏附力

如圖 5-1，我們先以電子顯微鏡觀察 *mrkD-v1*、*v2*、*v3* 和 *v4* 四種帶有不同頂端黏附蛋白線毛的大腸桿菌，我們發現各種大腸桿菌的線毛生長濃密度以及長度並不相同。細菌與宿主細胞之間的黏附力可能會因為線毛表現疏密度而不同，一般來說，單一隻細菌的表面線毛分布較稀疏，對於細菌與宿主細胞的黏附力較小；而線毛表現較密集的細菌，則黏附力提高。我們主要的目的是藉由雷射鑷夾測量不同頂端黏附蛋白線毛與膠原蛋白之間的黏附力，再進一步分析單一線毛頂端黏附力。

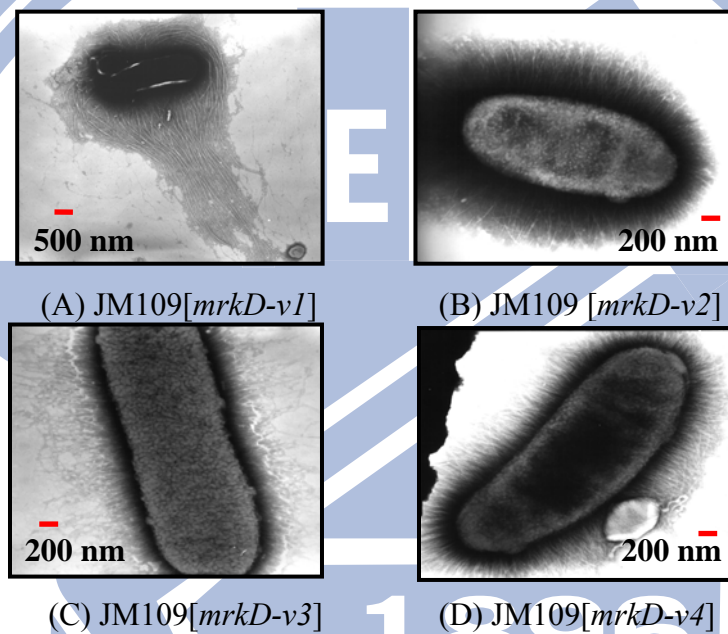


圖 5-1 四種大腸桿菌的線毛生長密度電子顯微鏡照片[43]：

(A)*mrkD-v1*；(B)*mrkD-v2*；(C)*mrkD-v3*；(D)*mrkD-v4*。

我們利用雷射鑷夾分別量測只表現出單一頂端黏附蛋白 *mrkD-v1*、*v2*、*v3* 和 *v4* 的四種大腸桿菌的黏附力各 50 次。其中 *mrkD-v1* 線毛黏附力太小，無法用雷射鑷夾測量出來。接著，我們將 *mrkD-v2*、*v3* 和 *v4* 各 50 次的黏附力數據，作成數據統計長條圖，我們發現 *mrkD-v3* 線毛黏附力數據分佈最廣，而紅色虛線顯示黏力分佈有群組的現象，如圖 5-2。

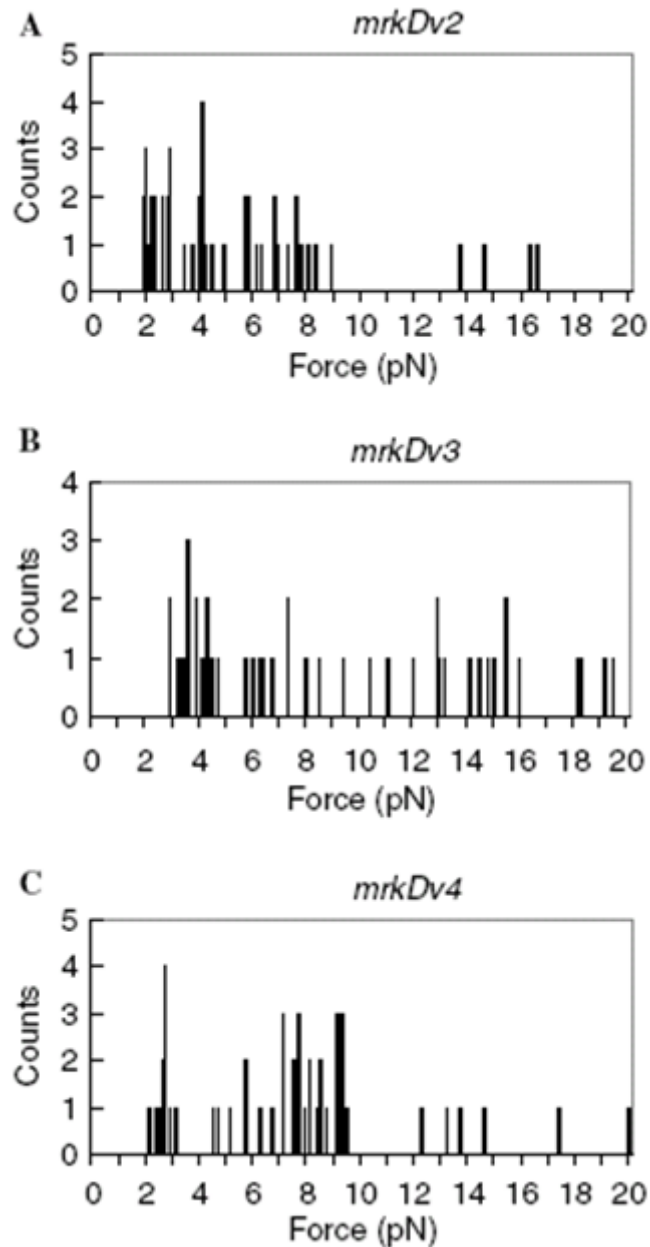


圖 5-2 線毛黏附力的數據統計圖[34]

由上至下分別為：(A) *mrkD-v2*；(B) *mrkD-v3*；(C) *mrkD-v4*。

實驗的次數分別為 51，48，及 53 次。

我們假定每一根線毛的黏力相近但不相等，則黏附相同數量的線毛的黏力也相近。黏力大小與黏附線毛的數量有關，因此，黏力大小應具有週期性且倍數關係的分佈，如圖 5-2 為線毛黏附力的數據統計圖(Histogram)。在黏力分佈統計圖中，每一群組黏力的平均值，彼此之間也會有倍數關係。因此尋找適當的黏力分群將有助於分析單一根線毛的黏附力。

我們進一步將 *mrkD-v2*、*v3* 和 *v4* 三種大腸桿菌線毛黏附力分布圖，再對力的出現頻率作傅立葉轉換，可以得到力出現頻率的大小分佈圖，再將此分佈圖橫軸頻率取倒數，即是力的群組週期分佈圖，如圖 5-3。力的群組週期分佈圖中，力的群組週期強度的最大值對應的是 2 pN、4 pN、以及 2.9 pN。我們以上述三組力的分群週期，作為線毛黏力的分組依據，將黏力分佈統計圖重新分組，並取各組黏力的平均值，則為線毛黏附數量不同的黏附力。

如圖 5-4 所示，我們接著將每一組線毛黏附力的平均值與其對應的線毛黏附數量作圖。線毛黏附力對黏附線毛數量的斜率，即為單一線毛與膠原蛋白間黏附力的大小。我們發現其中 *mrkD-v1* 黏附力太小，無法用雷射鐳夾測量出來，而 *mrkD-v2*、*mrkD-v3* 和 *mrkD-v4* 單一線毛的黏附力分別是 $2.03 \pm 0.03 \text{ pN}$ 、 $3.79 \pm 0.12 \text{ pN}$ 、以及 $2.87 \pm 0.15 \text{ pN}$ 。由此可知 *mrkD-v3* 是克雷白氏肺炎桿菌第三型線毛的四種頂端黏附蛋白之中黏附力最強。



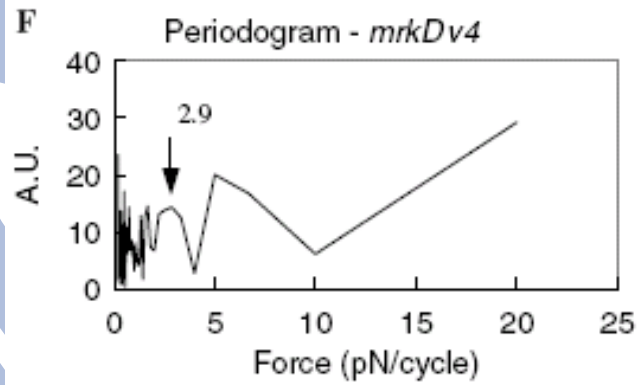
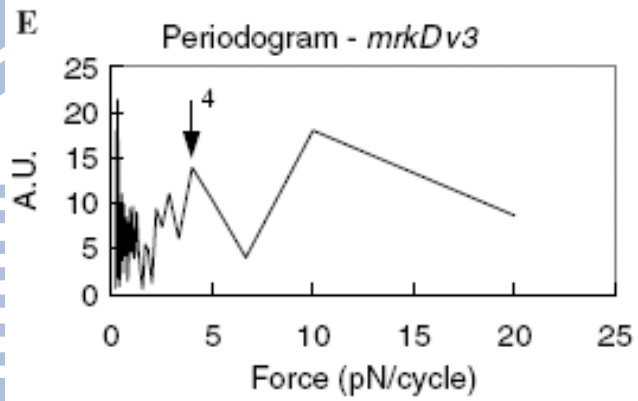
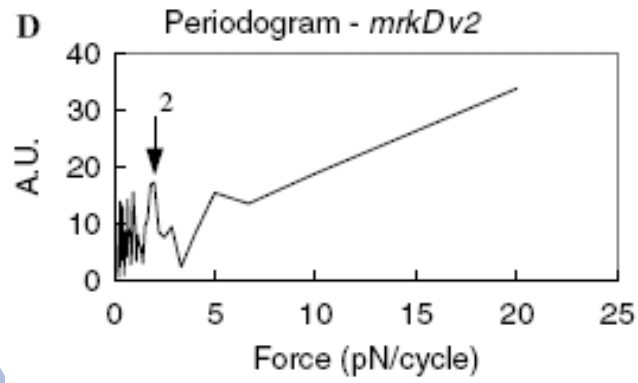


圖 5-3 黏附力的群組週期分佈圖[34]

(A) *mrkD-v2* ; (B) *mrkD-v3* ; (C) *mrkD-v4* 。

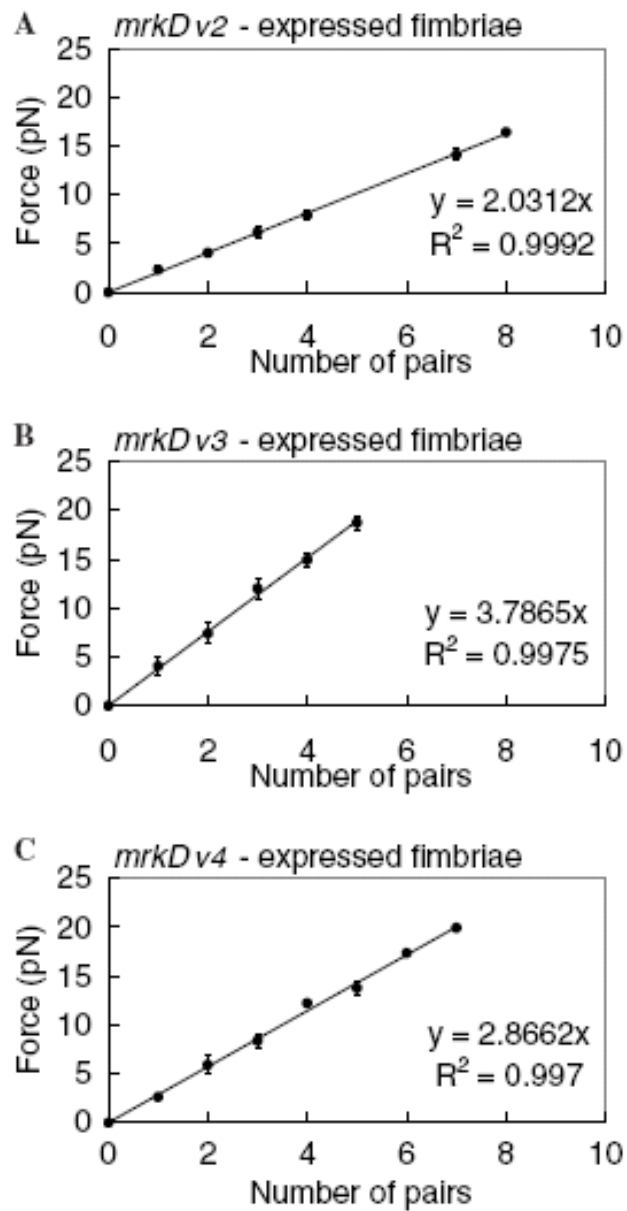


圖 5-4 線毛黏附數量與黏附力圖[34]：

(A) *mrkD-v2* = 2.03 ± 0.03 pN ; (B) *mrkD-v3* = 3.79 ± 0.12 pN ;

(C) *mrkD-v4* = 2.87 ± 0.15 pN 。

5-2 第三型線毛在應力下的機械特性

製備線毛與線毛結構確認

首先，我們完成線毛製備，並利用原子力顯微鏡及電子顯微鏡確認，大腸桿菌表現第三型線毛的外型輪廓，其線毛直徑約 3~4 奈米、長度約 2~3 微米，且線毛生長密度分佈可以控制在數根之內，如圖 5-5 所示。而第一型線毛或 P 型線毛的直徑約為 6.8 奈米、長度約 1 微米，第三型線毛相對於第一型線毛與 P 型線毛較為纖細。

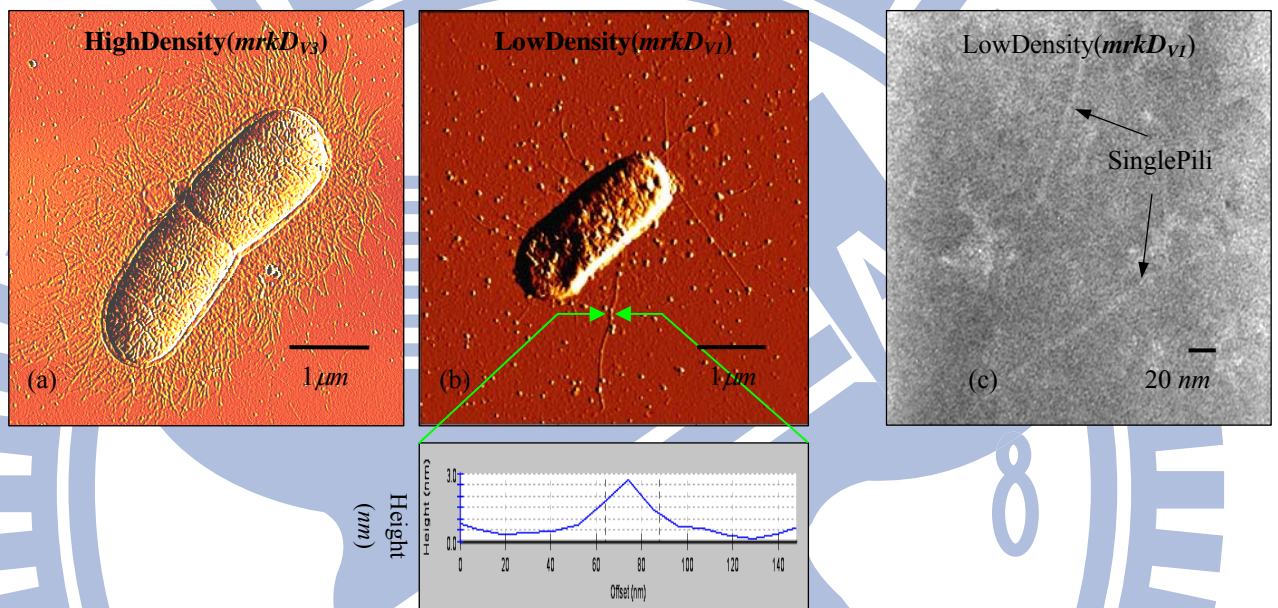


圖 5-5 利用原子力顯微鏡(AFM)以及高解析度電子顯微鏡(HR-TEM)

(清華大學材料科學研究所游萃蓉老師實驗室)

觀測線毛微結構，圖(a) & (b)為原子力顯微鏡影像，

(a)高線毛密度的菌株(b)低線毛密度的菌株，其單一線毛直徑 ~ 3 nm；

(c)則為高解析度電子顯微鏡(HR-TEM)影像。

如圖 5-5 所示，大腸桿菌表現 *pmrkABCD_{V1}F* 之線毛的密度分佈，其菌體分別培養在 LB 培養基(a)或者 GCAA 培養基(b)中。兩種線毛分佈分別可以觀察到在分佈密度上明顯差異，其中培養在 LB 培養基的菌體，其線毛密度較為稀疏，適合應用在單一線毛量測實驗中。

第三型線毛的彈性

當我們利用雷射鑷夾技術，捕捉、搬移一顆黏附有線毛的乳膠珠後，我們發現線毛在外力作用下將被伸長，且當外力消失之後，乳膠珠會受到線毛的彈性影響而被拉回原來的位置附近。因此，當我們對同一顆黏有線毛的乳膠珠向某方向重複拉拔，擷取的訊號具有高度的重複性。而當我們捕捉乳膠珠，並使乳膠珠以原平衡點對稱的兩個相反方向上來回搬移，擷取的訊號具有高度對稱的訊號。

我們利用以上實驗數據結果，我們可以得到該線毛的原長約為 2 微米、線毛所受到最大三維線性捕捉外力為 $F=16.5$ 皮牛頓、線毛後來伸長長度約為 2.271 微米。最後換得該線毛的彈性係數約為 60.9 皮牛頓/奈米 ($k = F / \Delta L$ ， $\Delta L = 2.271 - 2 = 0.271$ 微米)。再利用電子顯微鏡測量線毛的直徑，以及線毛長度等數據，線毛的截面積 $A = \pi \phi^2 / 4$ ，我們可進一步分析線毛的楊氏模數。

第三型線毛的楊氏模數

一個外力 (F) 施加在截面積為 (A)、原長為 (l) 的物體，引發一個伸長量為 (Δl)，楊氏模數可表示為 $E = \frac{F/A}{\Delta l/l} = \frac{k_p \times l}{\pi(D/2)^2}$ ，楊氏模數 E (牛頓/平方公尺) 適用於一維伸長之材料。

外力 F (牛頓) 施加在一根棒狀型的線毛上。其截面積 A (平方公尺) $= \pi (D/2)^2$ ；直徑 D (公尺)； l (公尺) 為未伸長線毛之長度； Δl (公尺) 為受力後之伸長量； k_p (牛頓/公尺) 線毛的彈力常數。

在電子顯微鏡照片用一個高的解析度放大，可清晰的看到第三型線毛骨幹呈條紋狀，如圖 5-6。我們估計線毛的寬度大約 7.4 ~ 4.3 奈米。我們估計第三型線毛線毛直徑寬度的變化，是因為線毛直徑為橢圓形扭轉造成，其結構有類似 P 型線毛或第一型線毛般以主要蛋白為骨幹的的螺旋結構。

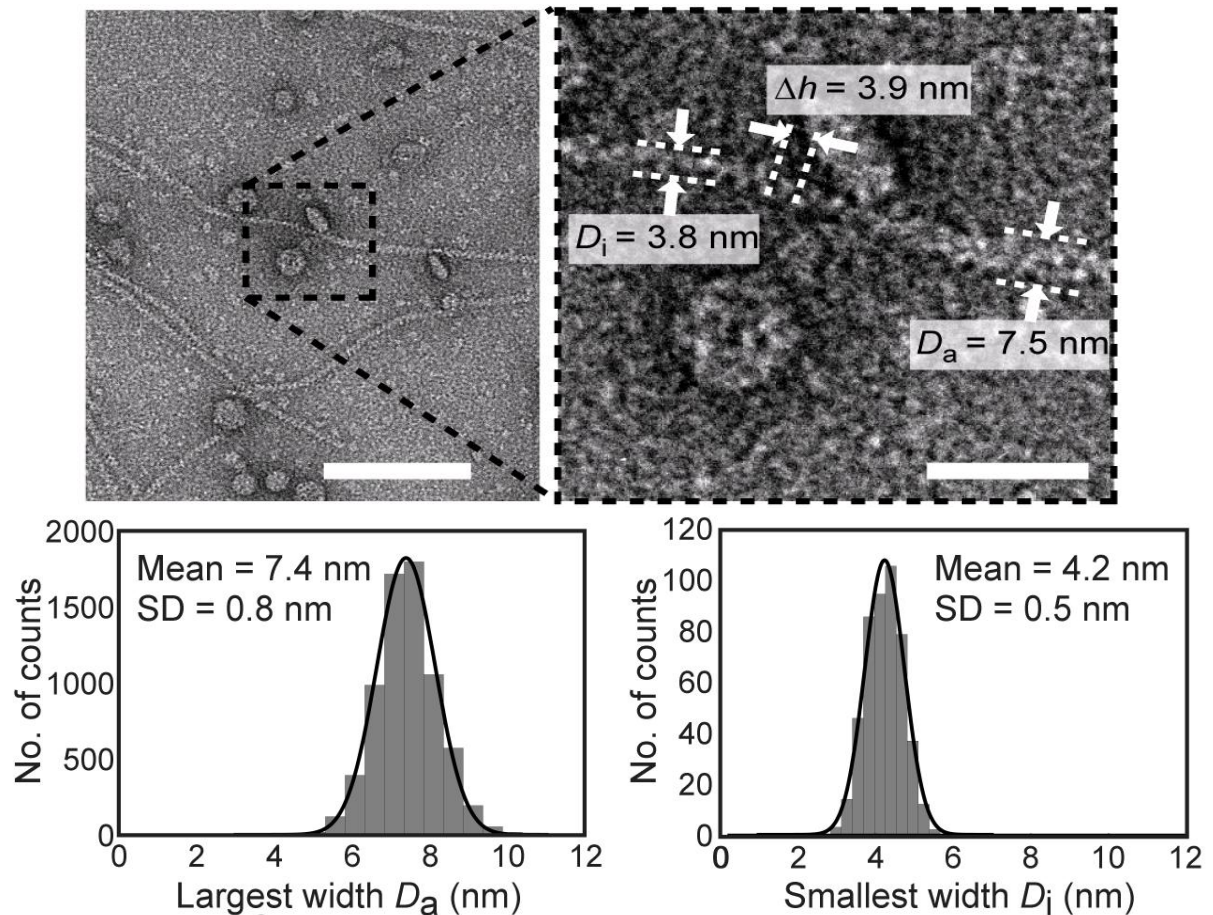


圖 5-6 第三型線毛電子顯微鏡照片，線毛直徑 7.4~4.2 奈米[33]

利用電顯圖所獲得的截面積為 $A = \pi ab$ 平方奈米，初步估計該第三型線毛的截面積為 $A = \pi \times 7.4 \times 4.2$ 平方奈米，而楊氏模數約為 100 MPa。目前相關研究指出，第一型線毛的直徑 6.9 奈米，而楊氏模數約為 100 MPa(皮牛頓/微米²)；而 P 型線毛的楊氏模數與截面積的乘積約為 154 ± 20 皮牛頓，而線毛的直徑 8.2 奈米，可推算出楊氏模數約為 50-400 MPa(皮牛頓/微米²)[5]。因此，對於比較三種線毛的彈力特性，楊氏模數是可以參考比較的指標。以上所估計第三型線毛的楊氏模數相當符合已發表的聚合物之彈性[35]，相關材料的楊氏模數歸奈在表 5-1，其中線毛在類彈簧伸長狀態時的彈性類似橡膠。

材料[36]	鐵	玻璃	木頭	骨骼	聚氯乙稀	橡膠
楊氏模數[MPa]	200000	65000	13000	9000	3000	1-10

表 5-1 常見材料的楊氏模數

上述材料由左置右分別是鐵、玻璃、木頭、骨頭、聚氯乙稀，以及橡膠，所對應的楊氏模數大小的程度由左至右遞減。由此可知，當材料之楊氏模數越大，所呈現出來的機械特性會越堅硬。

第三型線毛的拆解力、特徵力

線毛(或稱線毛)是表現在細菌外膜的附屬物，他們協助細菌黏附宿主細胞並進行建立感染。最近，一些研究聲稱 P 型線毛與第一型線毛的機械特性能幫助維持細菌與宿主細胞間的黏附，他們的伸長彈性已用雷射鑷夾或原子力顯微鏡證實[5-8]。此外，與 P 型線毛、第一型線毛同屬第一類線毛的第三型線毛的機械特性，將在本論文中呈現。

受外力的伸長曲線分為三個階段：(1)第一階段類彈簧階段，(2)第二階段拆解階段，以及(3)第三階段非線性階段，如圖 5-7 所示。除第一階段類彈簧階段，第三型線毛受外力的伸長曲線的定性類似 P 型線毛或第一型線毛。

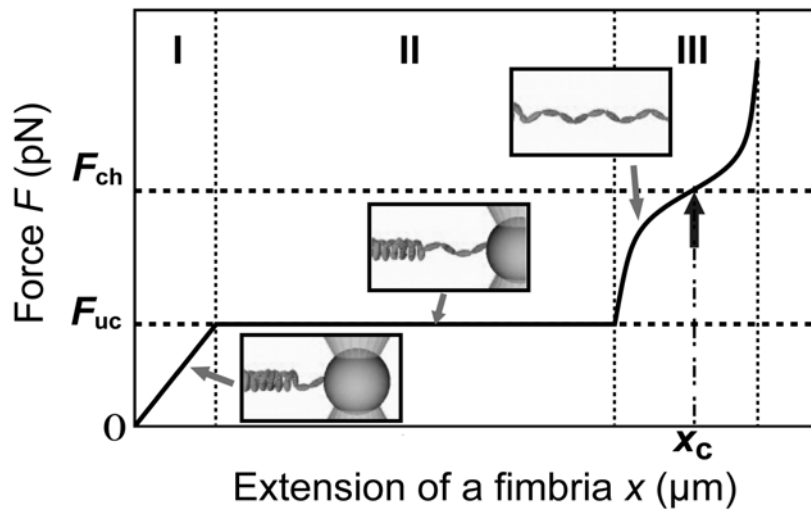


圖 5-7 單一根第三型線毛之典型受力伸長關係圖[33]：

(1)第一階段類彈簧階段，(2)第二階段拆解階段，以及(3)最終非線性階段。

如圖 5-8(A)~(E)為雷射鑷夾操控一顆已黏附大腸桿菌線毛的微粒子，從大腸桿菌附近(A)，將微粒子逐步拉離大腸桿菌至雷射鑷夾捕捉力最大值(E)。其中圖(A)~(B)為線毛受力第一階段類彈簧階段，此時線毛因受外力而有類似虎克彈簧的彈性伸長；圖(C)為線毛受力第二階段拆解階段，此時線毛骨幹因受外力而逐一拆解伸長；圖(D)~(E)為線毛受力第三階段非線性階段，此時線毛骨幹已完全拆解，接著線毛因受外力逐漸增加，其骨幹分子與分子間的夾角隨機地拉開。

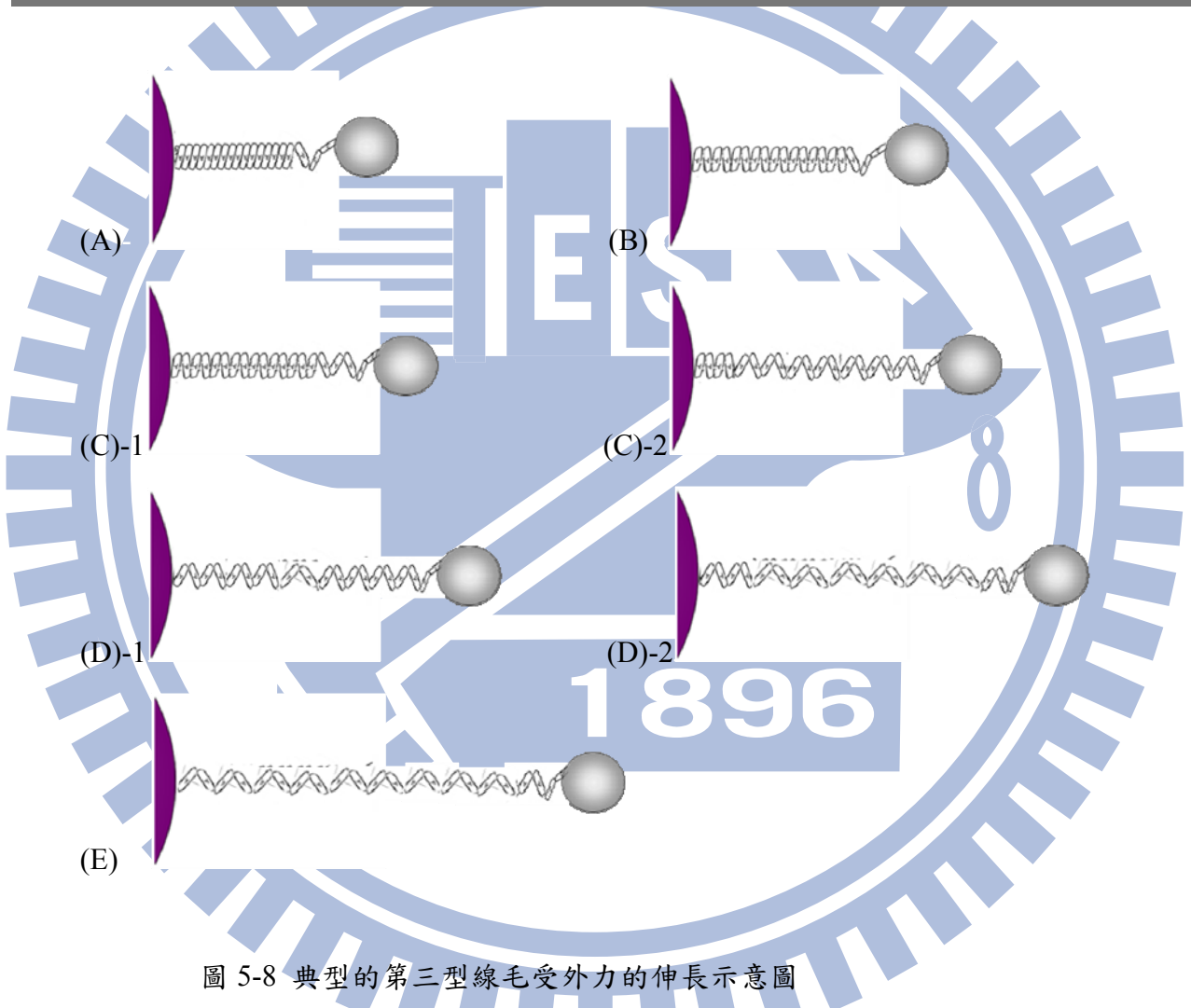
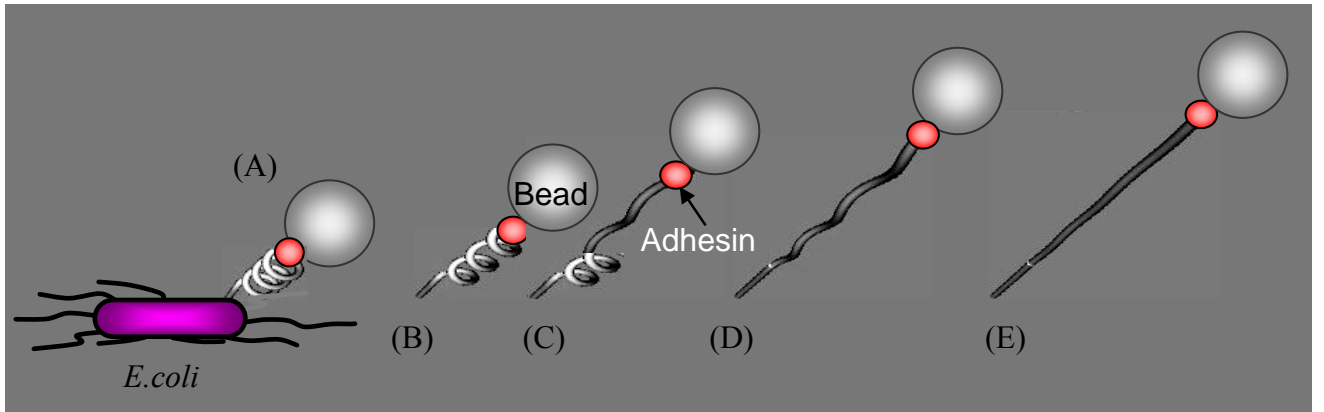


圖 5-8 典型的第三型線毛受外力的伸長示意圖

(A) 彈簧原長 (B) 類似虎克彈簧的彈性伸長(I)

(C) 線毛主要蛋白逐一拆解伸長(II)

(D) 主要蛋白分子間的夾角拉開(III)

(E) 主要蛋白間的夾角完全拉開(III)

如圖 5-9 所示，黑色實線顯示了一個典型的第三型線毛受外力的伸長行為。在第一階段類彈簧階段，第三型線毛隨外力的增加而被拉伸。當外力增加至接近拆解階段，第三型線毛的拉伸行為類似一個彈簧，此時線毛的最大彈性係數為 261.8 皮牛頓/微米。接下來，當外力達到拆解力，第三型線毛切換到拆解階段而大幅延長。在拆解階段，線毛持續以一個穩定的拆解力 70.1 皮牛頓，將其螺旋結構拆解。在拆解階段後，線毛受外力的伸長曲線有一個傾斜的 S 形，此時有一個特徵力 116.4 皮牛頓。當外力超過特徵力之後，拉伸力迅速增加超過幾百皮牛頓。在拆解階段，第三型線毛的拆解力以 0.01 微米/秒或在 0.05 微米/秒的速度拉動，這表示，所有實驗均在穩定狀態下運行。

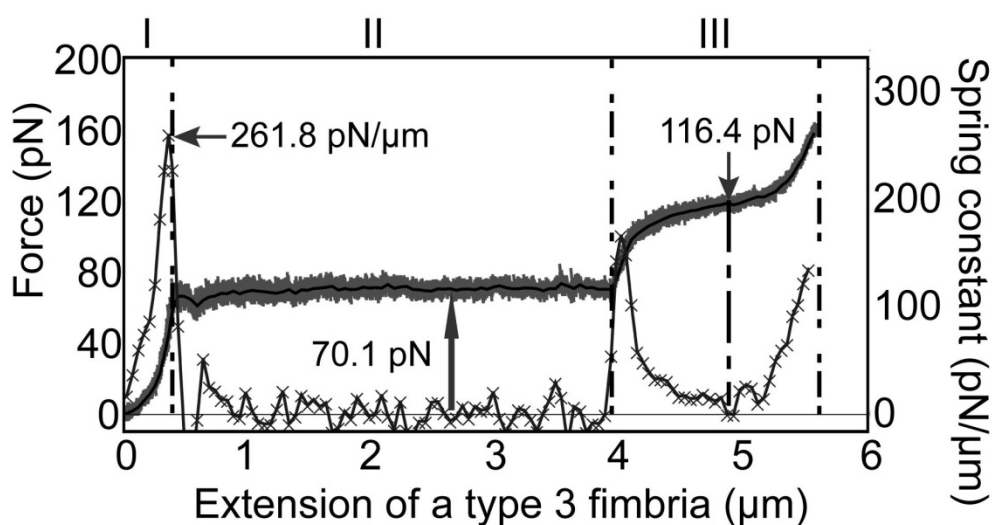


圖 5-9 典型的第三型線毛受外力的伸長曲線[33]

此外，另一個典型的受外力的伸長曲線，顯示了線毛逐一拆解伸展至近 9 微米的拆解階段，如圖 5-10 所示。請注意，在伸展 3 微米的拆解階段，拆解力從 127.0 皮牛頓下降到 67.1 皮牛頓，這表示微粒子黏附兩根線毛，當外力增加時，兩根線毛同時解開，然後依次脫離微粒子，其黏附拆解過程如圖 5-11。

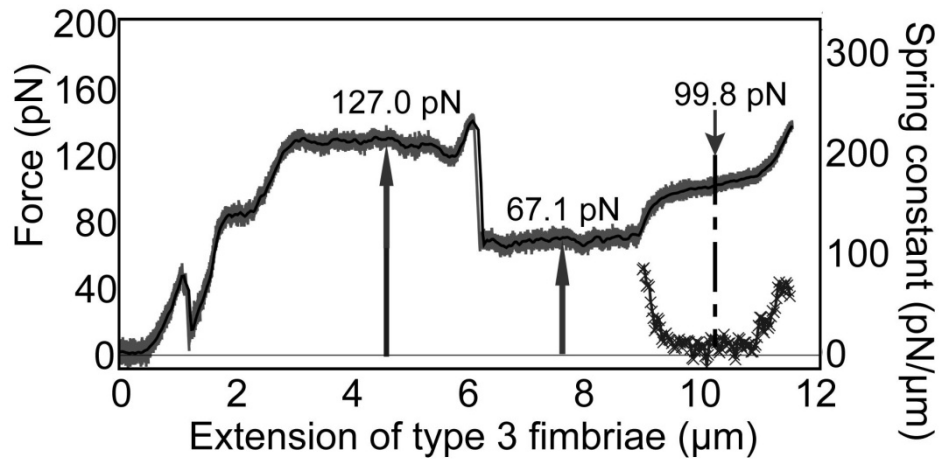


圖 5-10 兩根第三型線毛受外力的伸長曲線[33]

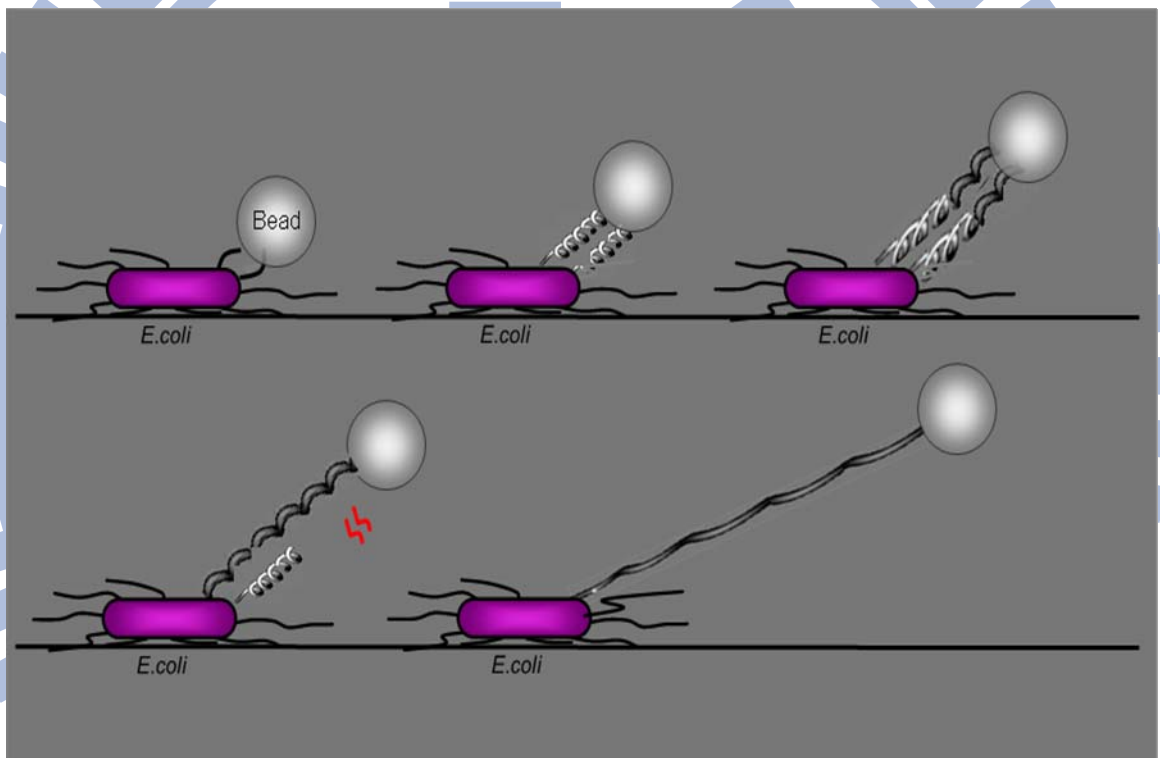


圖 5-11 兩根第三型線毛受外力的伸長示意圖

我們將所有線毛受外力伸長曲線拆解力的測量結果繪製成頻率直方圖。圖 5-12(A) 分別為微粒子黏附一根線毛以及兩根線毛的兩組拆解力。線毛拆解力的平均值分別為 66.8 ± 3.6 皮牛頓(19 根線毛) 和 124.1 ± 8.8 皮牛頓(3 根線毛)。根據拆解力測量的最小公倍數結果，在穩定狀態拆解力平均值為 66.2 ± 4.0 皮牛頓(20 根線毛)。而線毛特徵力發生在最後的非線性階段，如圖 5-12(B)所示，線毛特徵力平均值為 101.9 ± 8.6 皮牛頓(14 根線毛)。

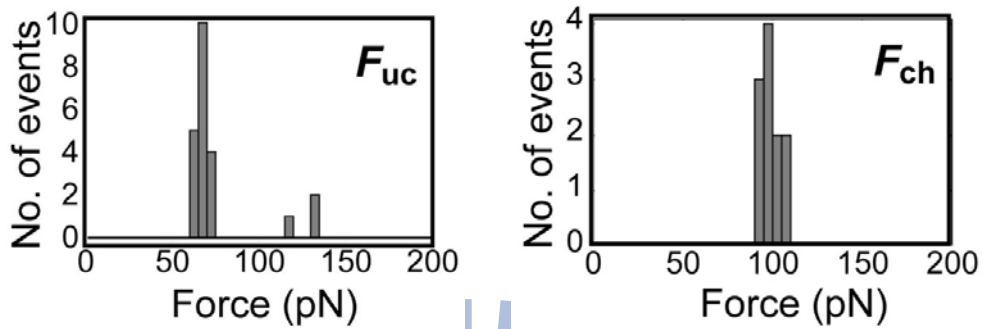


圖 5-12 線毛的拆解力與特徵力頻率直方圖[33]

(A)兩組力量分布分別為一根線毛以及兩根線毛的拆解力；；

(B)線毛的特徵力

第三型線毛的機械特性結果與其他型線毛比較

第一型線毛與 P 型線毛的拆解力分別為 30 皮牛頓與 28 皮牛頓。這兩個拆解力皆小於第三型線毛的拆解力：66.2 皮牛頓。同樣地第一型線毛與 P 型線毛的特徵力皆近似於 67 皮牛頓。這兩個特徵力皆小於第三型線毛的特徵力：101.9 皮牛頓。這顯示第三型線毛主要分子 MrkA 頭尾鍵結力量大於第一型線毛的主要分子 FimA 或 P 型線毛的主要分子 PapA。此外，相對於第一型、P 型線毛而言，第三型線毛雖然截面積的尺寸較小，卻擁有較強的機械特性。一般來說，線毛骨幹的機械特性可以分擔頂端黏附蛋白黏附宿主細胞的負擔，線毛越容易拆解，藉由動態拆解過程，減緩外在剪力的衝擊。例如最常於上尿道發現的大腸桿菌，其表面有 P 型線毛以及第一型線毛，線毛動態拆解過程，可幫助大腸桿菌在大量尿液沖刷後，藉由線毛重新組裝回到原本的位置。克雷白氏肺炎桿菌表面主要是第三型線毛的機械特性較(較不易拆解)，因此，我們推測是其感染致病的环境(肝臟)處於環境瞬間阻力較小的地方的原因之一。

我們將第三型線毛的力學實驗中，包括尺寸、楊氏模數、拆解力、特徵力等四個物理參數與已發表有關 P 型線毛和第一型線毛的物理參數歸納整理在表 5-2。

型態	尺寸	楊氏模數	拆解力	特徵力
第一型線毛[8]	φ 6.9 奈米 長度: ~ 1 微米	100 MPa [10]	30 皮牛頓	67 皮牛頓
P 型線毛[7]	φ 8.2 奈米 長度: 0.3~1.5 微米	50~400 MPa	28 皮牛頓	67 皮牛頓
第三型線毛	φ 4.2~7.4 奈米 長度: 1.5 微米	100 MPa	66.2 皮牛頓	101.9 皮牛頓

表 5-2 第三型線毛與其他型線毛的物理參數之比較[33]

5-3 第三型線毛主要蛋白氨基酸序列突變的影響

研究線毛的組裝機制，除了可以更進一步了解此制病因子的結構與功能、探討其致病原理外，同時也可作為分子生物學中，研究一般單元體組裝成聚合體之調控機制的參考模型[27,28]。由於蛋白質 MrkA 是第三型線毛的主要蛋白分子，因此了解 MrkA 特定胺基酸之點突變對於線毛堆疊以及線毛正常功能的影響，進而推斷這些胺基酸在線毛組裝的過程中所扮演的角色。

利用定點突變法，我們分析第三型線毛主要蛋白 MrkA 氨基酸序列對於之組裝的關鍵的 12 定點突變體，找出線毛組裝的關鍵殘基，並分析其生物物理特性。我們發現線毛主要結構蛋白 MrkA 上不同的胺基酸序列，對線毛組裝能力、拆解力、黏附力、線毛生長密度能力之影響皆有不同。由篩選出來的十二個 MrkA 關鍵殘基定點突變體，與線毛活性分析分析結果，由電子顯微鏡照片可以推論，C87A 突變體體表沒有線毛生長，F34A 突變體線毛密度較稀疏，而 V45A 和 T196A 突變體周圍則有許多斷裂的線毛。相較之下，G189A 突變體的表面線毛外觀以及線毛密度與其他突變株相差不大，而生物膜形成以及紅血球凝集的能力較差。

我們進一步用雷射鑷夾分析 G189A 突變體線毛的力學性能，其線毛機械特性卻有所不同，其拆解力(MrkA - MrkA 相互作用)介於 58 至 67 皮牛頓之間，而不是像其他突變體或一般型以固定 66 皮牛頓力進行線毛拆解並伸長。另外，G189A 突變體的線毛在收縮的時候發生許多組裝失誤的現象，線毛收縮現象不穩定，表示已拆解的線毛不利於快速組裝，甚至抑制線毛的收縮。

另外，由於 G189A 突變體的受力伸展與收縮曲線仍保有類似野生株受力的三個階段，意味著這種變異只會影響 MrkA-MrkA 相互作用，而不是徹底破壞線毛的結構。因此，我們認為 G189A 點突變對第三型線毛力學性能的影響是至關重要的。

測定主要蛋白 MrkA 不同點突變體對於生物膜形成能力

我們將 12 個定點突變體表現在大腸桿菌菌株上，並且檢測其生物膜形成能力。如圖 5-13 所示，大腸桿菌 JM109[pmrkABCD]株的定點突變體，包括 G30A、V38A、S46A、N192A、I199A 和 Q202A，表現出比野生型菌株較強烈的生物膜形成的能力。相比之下，F34A、V45A、C87A、G189A、T196A 和 Y197A 定點突變體顯示較低的生物膜形成能力。

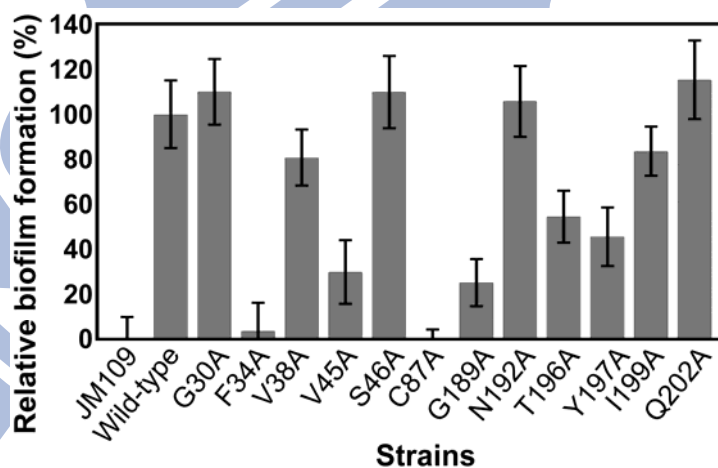


圖 5-13 主要蛋白 MrkA 不同點突變體的生物膜形成能力[42]

主要蛋白 MrkA 點突變體的聚合體表現

我們進一步分析這 12 株點突變體線毛的聚合體電泳，如圖 5-14 所示，除了 C87A 突變體之外，其他 11 個 MrkA 線毛突變體表面都有線毛表現。我們利用電子顯微鏡作進一步分析，如圖 5-15 所示，C87A 突變體沒有產生可檢測第三型菌毛，點突變體 F34A、V45A、和 T196A 只生產數量稀少的線毛，而 V45A 和 T196A 點突變體周圍則觀察到許多斷裂的線毛，其他幾個突變體表面線毛則呈現與野生菌株相同。

如圖 5-15(A)所示，重組大腸桿菌中攜帶 pmrkABCD 的第三型線毛野生菌株表面約 700 根線毛(三個細菌樣品)，平均長度為 1.5 ± 0.6 微米 (290 根線毛)，平均直徑為 7.6 ± 0.8 奈米(844 根線毛)。C87A 突變體沒有觀察到表面線毛，顯示 C87 殘基對於線毛的形成是必不可少，如圖 5-15 (B)所示。圖 5-15 (C)所示，F34A 突變體線毛則表現較少的線毛，平均約 100 根線毛，比野生菌株少很多。另外，V45A 和 T196A 突變體周圍發現了一些被破壞的線毛，用箭頭所示，如圖 5-15(D)和(E)，這暗示這兩種殘基突變體影響重組線毛穩定性。而其他突變體平均長度和直徑的似乎與野生菌株沒有明顯差異。

圖 5-16 為野生菌株與點突變體的線毛數量、平均長度、平均寬度等物理參數，而電子顯微鏡照片另列於附錄一。

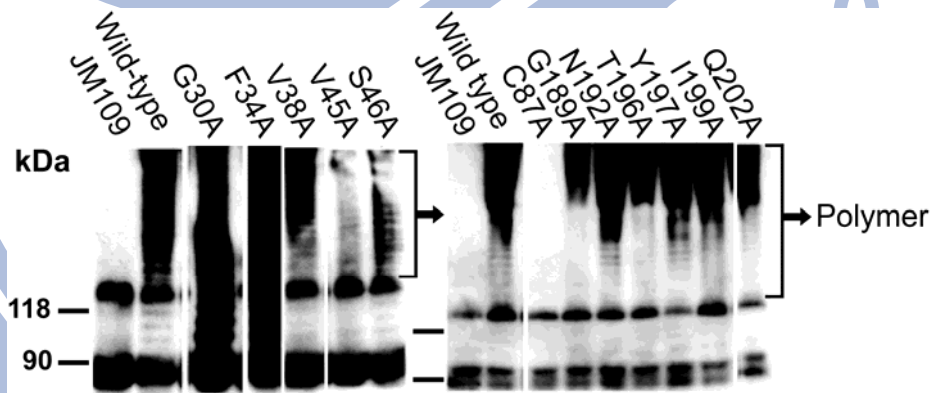


圖 5-14 主要蛋白 MrkA 不同點突變體的聚合體電泳
其中 C87A 點突變體的不存在聚合體[42]

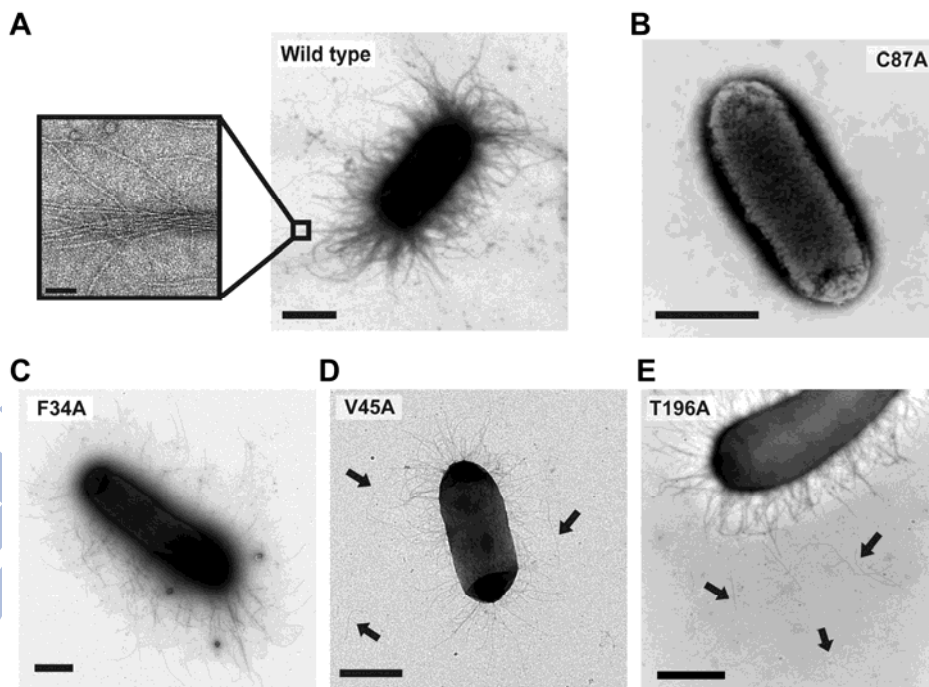


圖 5-15 各種突變線毛電子顯微鏡圖

(A)右邊的圖片是野生型大腸桿菌重組線毛約 700 根線毛。

左側的圖片為右邊正方形框放大的圖片。左側比例尺為 50 奈米；

(B)在 C87A 突變體沒有表面線毛；

(C)在 V45A 和 T196A 突變體細菌周圍發現有些破碎的線毛，用箭頭所示；

(D)F34A 突變體細菌表面線毛較少(約 100 根線毛)，(A)~(E)比例尺是 1 微米。

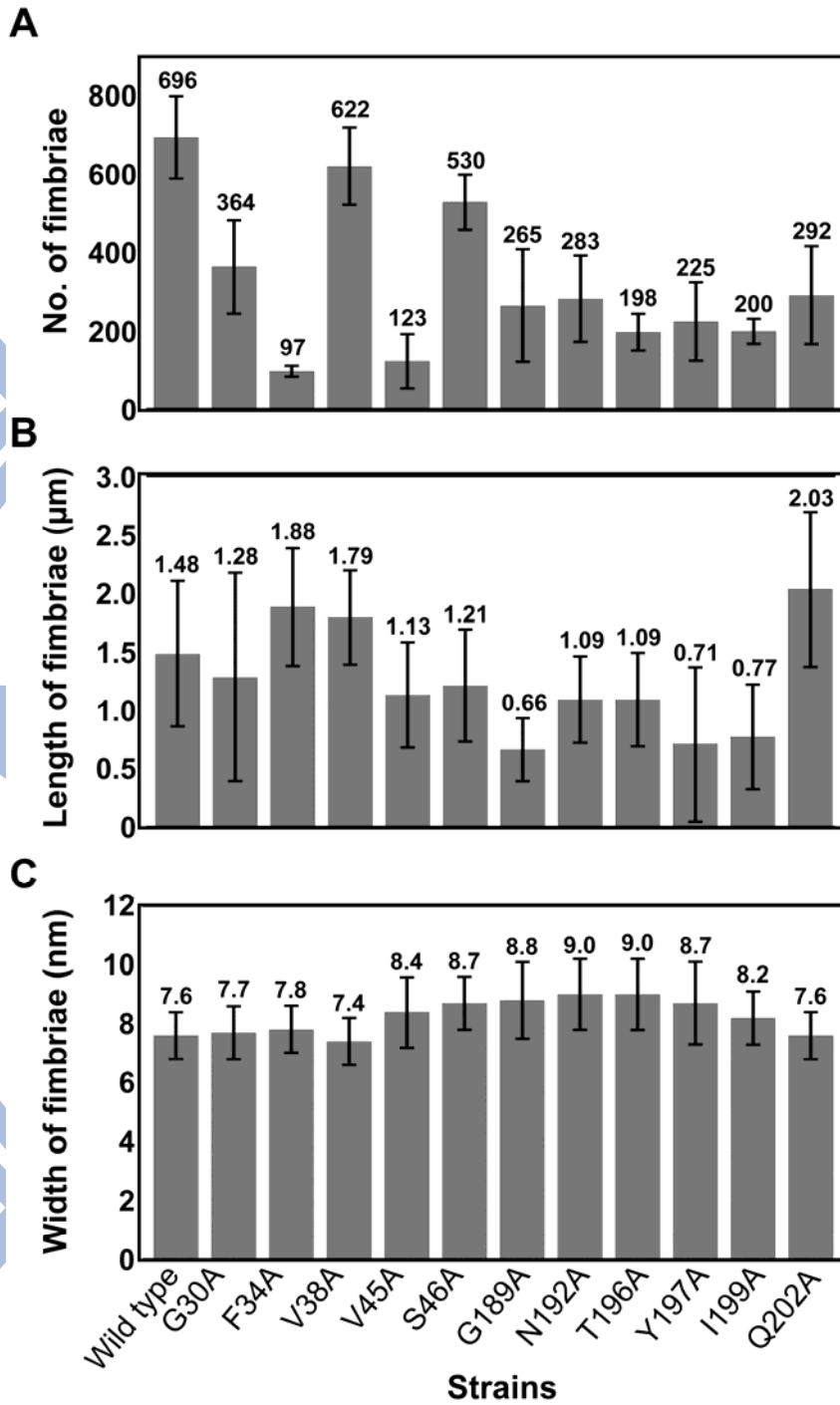


圖 5-16 野生菌株與點突變體的線毛數量、平均長度、平均寬度等物理參數。
(不包括缺乏線毛的 C 87 突變體)

突變體表面第三型線毛的伸展特性

我們利用雷射鑷夾測量突變體表面線毛的受力伸展曲線(FEC)，以確定線毛主要蛋白 Mrk A 突變對突變線毛彈性的影響，並進一步探討對線毛骨幹穩定性的重要殘基。在前一章節，我們敘述攜帶 pmrkABCD 的第三型線毛野生菌株表面線毛的受力伸展曲線分為三個階段。本章所介紹的重組線毛突變體的表面線毛，除電子顯微鏡照片沒有線毛表現的 C87A 突變體之外，其他突變體皆以雷射鑷夾測量其表面線毛的力學性能。

如圖 5-17 所示，我們根據線毛受力伸展曲線的變化，將十一種重組突變體的線毛受力伸展曲線分為兩種類型：其中圖 5-17(A)為野生菌株的線毛受力伸展曲線，大多數突變體的線毛受力為此一類型；而 G189A 突變體線毛則有不同的受力伸展曲線圖，如圖 5-17(B)。而 G189A 突變體表面線毛的受力伸展曲線同樣出現三個階段。第一階段，線毛隨外力增加呈現類彈簧階段，此時線毛受力伸展曲線像一個虎克彈簧，其彈簧常數為 224.6 皮牛頓/微米。當線毛受外力由 60 皮牛頓力逐漸增加至 70 皮牛頓力時，此為 G189A 突變體表面線毛受力伸展曲線的第二個階段拆解階段，此階段線毛的受力為線毛螺旋結構的拆解力。特別的是，G189A 突變體表面線毛受力伸展曲線的拆解階段出現兩個區域。首先，線毛拆解力隨外力增加而逐漸加大，類似一個較軟的彈簧狀態，彈簧常數 30.3 皮牛頓 /微米，然後，當外力達 67.6 皮牛頓時，線毛則以固定的力量被拉長，此時，伸展曲線類似於野生菌株的第二個階段以固定的力量被拉長(66 皮牛頓力)。當外力超過線毛拆解力時，則為受力伸展曲線的第三階段，此時，G189A 突變體線毛與野生菌株線毛，又呈現出相同的 S 型受力伸展曲線以及 98 皮牛頓力的特徵力。

如表 5-5 所示，大多數的突變體的線毛拆解力約 64~70 皮牛頓力之間。若我們將幾個突變體受力伸展曲線重疊來看，則可以發現線毛拆解力均重疊在一起，且出現相同的 S 型伸展曲線以及約 98 皮牛頓力的特徵力，如圖 5-18 所示。特別的是，不同根線毛的受力曲線，其第一階段的彈性、第二階段的拆解長度、以及第三階段的非線性階段的長度皆成比例，這表示線毛突變體的機械特性沒有太大的改變。

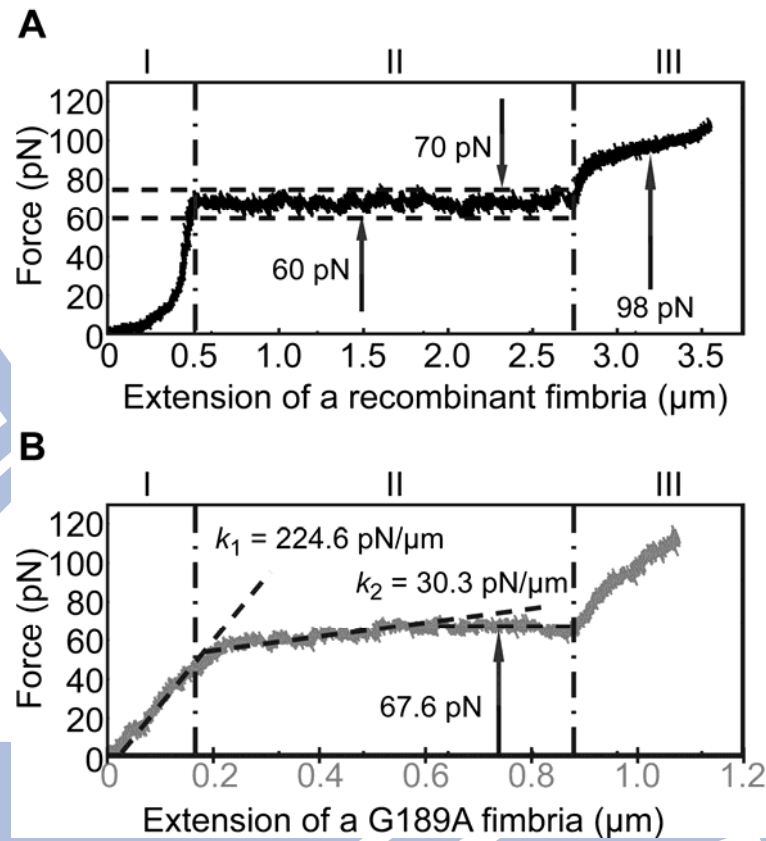


圖 5-17 重組突變體單一線毛受力伸展曲線：(A)野生菌株；(B)G189A 突變體。

E. coli <i>JM109</i> (<i>pmrkABCD</i>)	Wild type	G30A	F34A	V38A	V45A	S46A
<i>Uncoiling force</i> (pN)	66.0 ± 4^a (n = 22)	70.2 ± 2 (n = 5)	70.0 (n = 1)	66.5 ± 6 (n = 25)	68.4 ± 2 (n = 3)	64.2 ± 4 (n = 6)
E. coli <i>JM109</i> (<i>pmrkABCD</i>)	G189A	N192A	T196A	Y197A	I199A	Q202A
<i>Uncoiling force</i> (pN)	$57-68^b$ (n = 3)	64.8 ± 8 (n = 8)	68.9 ± 6 (n = 10)	66.3 ± 2 (n = 3)	66.1 (n = 1)	65.9 ± 2 (n = 4)

表 5-4 點突變體重組線毛拆解力

(其中 G189A 線毛受外力逐步增加，由 57-68 皮牛頓)

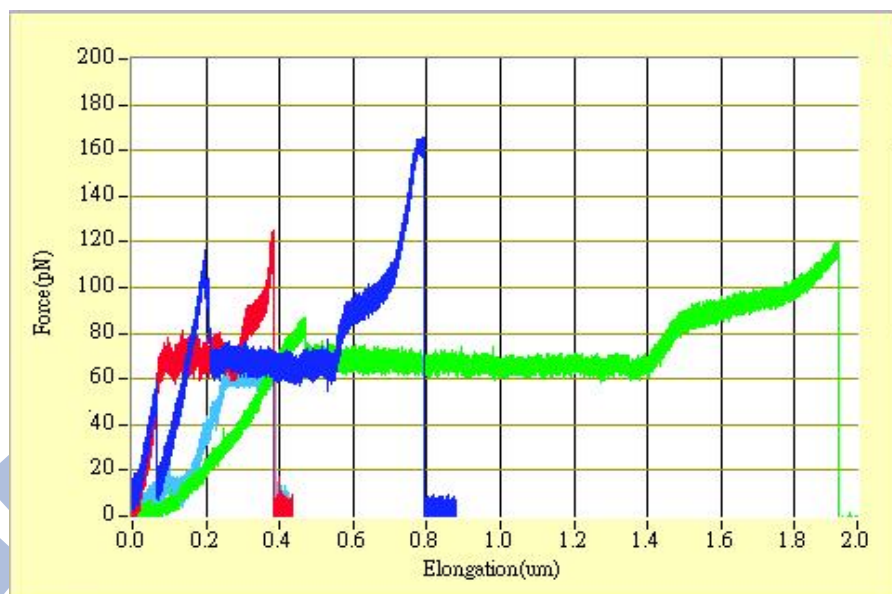


圖 5-18 重組突變體單一線毛受力伸展曲線比較。將幾個突變體受力伸展曲線重疊，突變體線毛拆解力約 66 皮牛頓力，以及約 98 皮牛頓力的特徵力。

野生菌株和 G189A 突變體表面第三型線毛的收縮特性

圖 5-19 分別為野生菌株和 G189A 突變體表面第三型線毛受力的收縮曲線。其中，圖 5-19(A) 野生菌株受力的收縮曲線與伸展曲線有相似的三個階段。具體來說，當野生菌株收縮曲線從第三階段回到第二階段，直到細菌與微粒子相距 1.08 微米至 1.06 微米之間，可能是因為線毛主要蛋白 Mrk A 折疊失誤，造成一個延遲折疊的現象發生。然而，收縮曲線回復力下降到 52.4 皮牛頓力的成核力，一種層與層封閉的鍵結可能會形成一個核內核階段，以促使其他層與層折疊成功。當細菌與微粒子相距縮短至 1.06 微米，線毛回復力呈現一個穩定的 67.9 皮牛頓力，相當於拆解力 66 皮牛頓力，然後線毛回復力持續下降直到線毛恢復其原長。

如圖 5-19(B) 所示，G189A 突變體受力收縮曲線的三個階段與伸展曲線不同，尤其是受力伸展曲線的第二階段。當 G189A 突變體的受力收縮曲線從第三階段回到第二階段，直到細菌與微粒子相距 0.9 微米，受力收縮曲線與伸展曲線相似。然而，與野生菌株收縮曲線不同的是，G189A 突變體受力收縮曲線在細菌與微粒子相距 0.9 微米到 0.2 微米處，發生過幾次延遲折疊。第一個核成核力約為 49.9 皮牛頓力，發生在相距 0.8 微米處。接著，線毛以 56.9 皮牛頓回復力折疊，在此過程中，持續發生延遲折疊的現象。這顯示 G189A 突變體回復力不穩定，這個不穩定的回復力，對於快速回復伸展的線毛是不利的，甚至會抑制線毛的收縮。

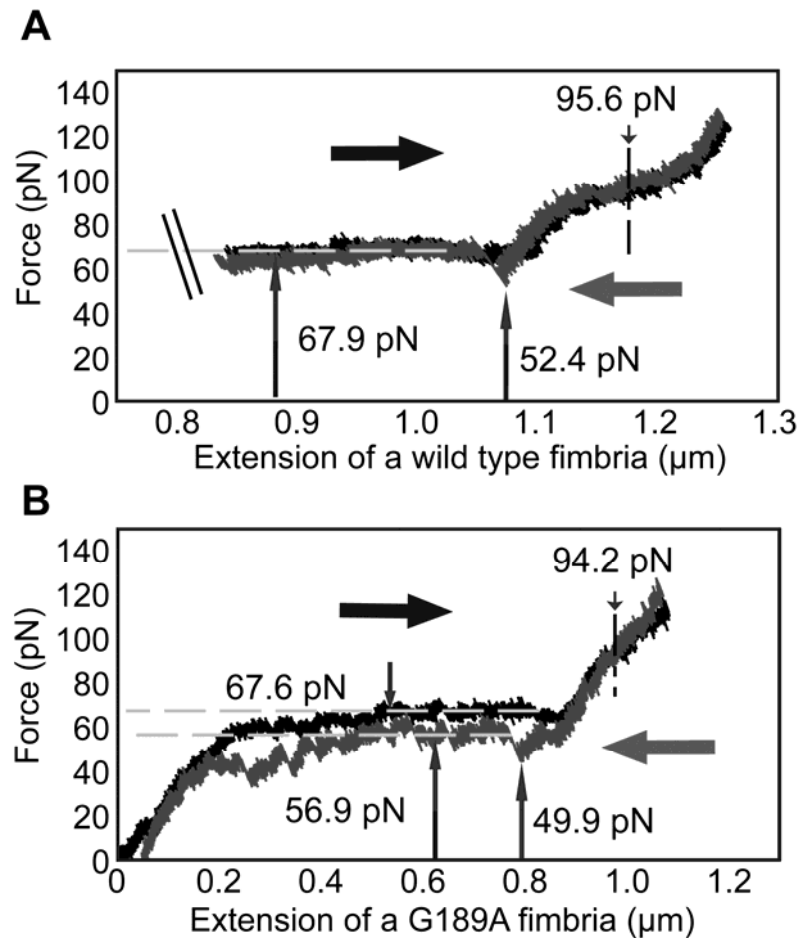


圖 5-19 野生株與 G189A 突變體單一線毛受力伸展(黑色)和收縮(灰色)曲線：
(A)野生菌株和；(B)G189A 突變體。

本研究確定了幾個關鍵的氨基酸殘基 F34A、V45A、C87A、G189A 以及 T196A 突變體影響線毛裝配或結構的穩定性，從而導致生物膜和紅血球凝集活性降低。其中，G189A 突變體線毛展示了獨特的力學性能，尤其是不穩定的收縮。這顯示氨基酸殘基 G189 可能影響線毛螺旋結構的組裝，造成主要蛋白 MrkA 間交互作用力不穩定。這進一步說明，G189A 突變體可能會改變線毛主要蛋白 MrkA 螺旋結構，影響線毛頂端黏附蛋白 MrkD 黏附分子的黏附力，間接導致從生物膜形成和紅血球凝集活性降低。

第六章 結論與展望

長久以來，不論在基礎醫學或微生物學的研究領域中，許多的研究報告都是以探討哪些線毛可能是重要的致病因子，並評估製備疫苗的可行性。因此，細菌線毛的重要性顯而易見。而有關細菌線毛功能的研究，大多數仍局限於巨觀或細菌族群的表現。近年來奈米技術的發展，得以微觀奈米級的分機轉，建立細菌線毛的分析模型而成為最佳的研究平台。

在本論文中，首先延續自己在碩士期間的克雷白氏肺炎桿菌第三型線毛頂端黏附蛋白黏附力實驗，結合雷射鑷夾與單一粒子追蹤系統[37]，使雷射鑷夾的捕捉光束，可以捕捉微粒子，發展出與活體細菌表面單一根線毛黏附並使之伸長延展的生物力學測量。目前，我們已經完成其頂端黏附蛋白的黏附力、線毛骨幹彈性係數、楊氏係數、以及受力伸展力學特性的量測。另外，我們也發現線毛主要結構蛋白上不同的胺基酸序列，對線毛組裝能力、拆解力、線毛生長密度能力之影響皆有不同。這個實驗的成果將使我們能更了解細菌與宿主細胞之間的交互作用，進而加速對抗感染與發炎的新藥與新疫苗的研發。最後，本論文摘錄幾個我們過去或目前進行的生物實驗，以及一些在將來可以深入研究的生物課題，盼能帶給有興趣於跨領域合作的研究者一些參考。

首先，本論文提及第三型線毛具有的特殊橢圓型骨幹螺旋結構，以及擁有較為彎曲皺褶的外型與較強的機械特性。然而，第三型線毛與P型線毛、第一型線毛在人體內生存環境迥異，對於各種細菌引起的發炎感染的原因仍是未知的，因此，需要更多奈米技術的深入研究。

其次，我們發現 G189A 點突變對第三型線毛力學性能的影響是至關重要的。蛋白質 C 端與 N 端交互作用組裝成絲狀聚合物，而絲狀聚合物是否堆疊成螺旋結構，入口處胺基酸序列 G189A 突變點扮演重要角色。因此，針對點突變的位置，建議可以置換附近幾個突變點，以及不同種類胺基酸的置換，進一步以雷射鑷夾或其他奈米技術探討聚合物組裝結構。

至於線毛拆解力的動態行為的分析，此現象與線毛伸長速度有關。因此，藉由外力使線毛以不同速度伸縮，將可以進一步探討，包括分子間相互作用力，以及生物系統的相互作用和結構。另外，在實驗的過程中，我們發現線毛是天然彈性體，且在線毛受力拉長之後移去外力，線毛會迅速回復原狀，我們利用線毛的微結構作為天然微共振器，

接著在線毛中間黏附待測物體，然後讓線毛振動，藉由該振動的共振頻率的變動量，發展出一能測量微量質量的生物感測器，本實驗室陳豐榮同學已深入探討。此外，在奈米材料方面，由於不同線毛是由不同的主要蛋白組裝而成的，其機械特性迥異，因此，我們也可以利用不同的主要蛋白組裝成，利用線毛快速拆解組裝的特性，設計動態奈米線的生物材料。

目前，雷射鑷夾對力量與位移的精確解析，已經成為細胞與分子生物研究時，了解其機械與物理特性的強大工具。不過雷射鑷夾的捕捉力未達數百皮牛頓力等級的分子力，其工作範圍也只有顯微鏡視野下的區域。因此，建構一個捕捉力以及操作範圍更大的系統以協助實驗，便是一個在本篇論文之後重要的工作。對此，本實驗室積極發展濕式原子力顯微鏡系統，結合雷射鑷夾，設置一個既可以達數百皮牛頓力的操作，在微小分子力的量測方面也可以工作的系統，本實驗室蘇益志同學的研究已有初步成果。至於捕捉範圍方面，本實驗室積極發展包括曾勝陽同學的全像光學鑷夾、張愛堂同學的柱形面鏡雷射鑷夾、以及楊士模同學光電鑷夾等系統，皆可強化雷射鑷夾的功能。

最後，運用各種領域的技術探討生物問題，不僅可以發現生物有趣的現象，跨領域得合作更是可以從不同的角度去了解複雜的生物問題。希望藉由本篇論文，不僅是介紹雷射鑷夾對生物科技領域的研究，也希望能夠為對跨領域生物研究有興趣的研究人員，提供一個範例，而激發出更多有趣的方向。

參考文獻

1. E. Bullitt, and L. Makowski, "Structural polymorphism of bacterial adhesion pili," *Nature* **373**, 164-167 (1995)
2. F. G. Sauer, M. Barnhart, D. Choudhury, S. D. Knights, G. Waksman, and S. J. Hultgren, "Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment," *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 548-556 (2000)
3. F. G. Sauer, H. Remaut, S. J. Hultgren, and G. Waksman, "Fiber assembly by the chaperone-usher pathway," *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **1694**, 259-267 (2004)
4. William J. Greenleaf, Michael T. Woodside, and Steven M. Block, "High-Resolution, Single-Molecule Measurements of Biomolecular Motion," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **36**, 171-190 (2007)
5. J. Jass, S. Schedin, E. Fällman, J. Ohlsson, U. J. Nilsson, B. E. Uhlin, and O. Axner, "Physical properties of *Escherichia coli* P pili measured by optical tweezers," *Biophys. J.* **87**, 4271-4283 (2004)
6. M. Andersson, B. Uhlin, and E. Fällman, "The Biomechanical Properties of *E. coli* Pili for Urinary Tract Attachment Reflect the Host Environment," *Biophys. J.* **93**, 3008-3014 (2007)
7. E. Miller, T. Garcia, S. Hultgren, and A. Oberhauser, "The Mechanical Properties of *E. coli* Type 1 Pili Measured by atomic force microscopy Techniques," *Biophys. J.* **91**, 3848-3856 (2006)
8. M. Forero, O. Yakovenko, E. V. Sokurenko, W. E. Thomas, and V. Vogel, "Uncoiling mechanics of *Escherichia coli* type I fimbriae are optimized for catch bonds," *PLoS Biol.* **4**, 1509-1516 (2006)
9. D. Choudhury, A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, and S. D. Knight, "X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*," *Science* **285**, 1061-1066 (1999)
10. X. Q. Mu, and E. Bullitt, "Structure and assembly of P-pili: A protruding hinge region used for assembly of a bacterial adhesion filament," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9861-9866 (2006)

11. G. E. Soto, and S. J. Hultgren, "Bacterial adhesins: Common themes and variations in architecture and assembly," *J. Bacteriol.* **181**, 1059-1071 (1999)
12. M. Andersson, O. Axner, F. Almqvist, B. E. Uhlin, and E. Fallmån, "Physical properties of biopolymers assessed by optical tweezers: Analysis of folding and refolding of bacterial pili," *ChemPhysChem* **9**, 221-235 (2008)
13. F. Erik, S. Schedin, J. Jass, B. Uhlin, and O. Axner, "The unfolding of the P pili quaternary structure by stretching is reversible, not plastic," *EMBO R.* **6**, 52-56 (2005)
14. M. Andersson, O. Axner, F. Almqvist, B.E. Uhlin, and E. Fallmån, "Physical properties of biopolymers assessed by optical tweezers: analysis of folding and refolding of bacterial pili," *Chem Phys Chem* **9**, 221-235 (2008)
15. J. Langstraat, M. Bohse, and S. Clegg, "Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation," *Infect Immun* **69**, 5805-5812 (2001)
16. J. Jagnow, and S. Clegg, "*Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces," *Microbiology* **149**, 2397-2405 (2003)
17. D. Schilling Joel , A. Mulvey Matthew, and J. Hultgren. Scott , "Structure and Function of Escherichia coli Type 1 Pili: New Insight into the Pathogenesis of Urinary Tract Infections," *J. Infect Dis.* **183**, S36-S40 (2001)
18. S. Clegg, LS. Hancox, KS. Yeh , "Salmonella typhimurium fimbrial phase variation and FimA expression," *J. Bacteriol.* **178** (2), 542-545 (1996)
19. AJ. Merz, M. So, "Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes," *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16**, 423-457 (2000)
20. R. Podschun, and U. Ullmann, "Klebsiella spp. As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors," *Clin. Microbiol.Rev.* **11**, 589-603 (1998)
21. P. Di Martino, , V. Livrelli, D. Sirot, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud, "A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections," *Infect. Immun.* **64**, 2266-2273 (1996)

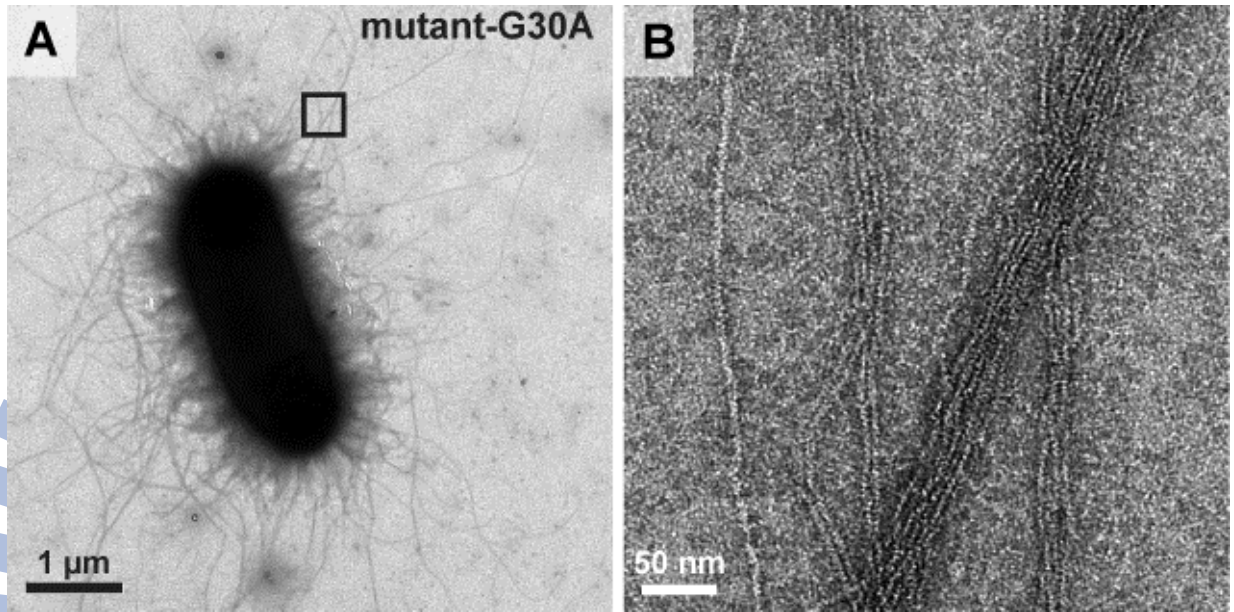
22. Ann-Mari Tarkkanen, Ritva Virkola, Steven Clegg, and K. Korhonen. Timo, "Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells," *Infect. Immun.* **65** (4), 1546-1549 (1997)
23. Podschun R and Ullmann U, "Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors," *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 589-603 (1998)
24. Patrick Di Martino, Nathalie Cafferini, Bernard Joly and Arlette Darfeuille-Michaud, "*Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces," *Res. Microbio.* **154**, 9-16 (2003)
25. Gerlach, G.F., Allen, B.L., and Clegg, S. (1988) Molecular characterization of the type 3 (MR/K) fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*," *J. Bacteriol* **170**: 3547-3553.
26. Allen, B.L., Gerlach, G.F., and Clegg, S. (1991) Nucleotide sequence and unctions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*," *J. Bacteriol* **173**: 916-920.
27. George I. Bell, "Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells," *Science* **200**, 618-527 (1978)
28. A.P. Pugsley, "The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria," *Microbiol. Rev.* **57**: 50-108 (1993)
29. K. Visscher, S. P. Gross, and S. M. Block, "Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing," *IEEE. J. Sel. Top. Quantum Electron* **2**, 1066-1076 (1993)
30. M. E. J. Friese, H. Rubinsztein-Dunlop, N. R. Heckenberg, and E. W. Dearden, "Determination of the force constant of a single-beam gradient trap by measurement of backscattered light," *Appli. Optics* **35**, 7112-7116 (1996)
31. F. Gittes, C. F. Schmidt, "Thermal noise limitations on micromechanical experiments," *Eur. Biophys. J.* **27**, 75-81 (1998)
32. F. Reif, *Fundamentals of Statistical and Thermal Physics* (McGraw-Hill, New York, 1965), Chap. 15.

33. F. J. Chen, C. H. Chan, Y. J. Huang, K. L. Liu, H. L. Peng, H. Y. Chang, G. G. Liou, T. R. Yew, C. H. Liu, K. Y. Hsu, and L. Hsu, "Structural and Mechanical Properties of *Klebsiella pneumoniae* Type 3 Fimbriae," *J. Bacteriol* **193**: 1718-1725 (2011)
34. B. J. Chang, Y. J. Huang, C. H. Chan, L. Hsu, H. L. Peng, H. Y. Chang, T. R. Yew, C. H. Liu, and S. Chi, "Measurement of the adhesive forces between a single *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbriae and collagen IV using optical tweezers," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 33-38 (2006)
35. G. Bao, S. Suresh, "Cell and molecular mechanics of biological materials," *Nature Materials* **2**, 715-725 (2003)
36. J.L. Alonso and W.H. Goldmann, "Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology," *Life Sci.* **72** (23), 2553-2560 (2003)
37. 張宜仁, "雷射鑷夾單一粒子追蹤系統之設計與分析", 國立交通大學, 博士論文, 民國 95 年。
38. 陳嘉齡, "雷射鑷夾捕捉力之量測與分析", 國立交通大學, 碩士論文, 民國 91 年。
39. 張博睿, "應用於生物黏附及延展特性之雷射鑷夾系統設計與研究", 國立交通大學, 博士論文, 民國 95 年。
40. 范家傑, "離焦探測光束式高解析範圍光子力顯微鏡之架設與應用", 國立交通大學, 碩士論文, 民國 94 年。
41. 陳美甄, "克雷白氏肺炎菌 CG43 第三型纖毛黏附蛋白特性", 國立交通大學, 碩士論文, 民國 91 年。
42. 陳欣瑜, "克雷白氏肺炎桿菌第三型線毛主要單元體 MrkA—參與線毛堆疊之重要胺基酸分析以及線毛的疫苗呈現系統之建構", 國立清華大學, 碩士論文, 民國 96 年。
43. 黃盈蓉, "克雷白氏肺炎桿菌中第三型纖毛的特性分析" 國立交通大學, 博士論文, 民國 95 年。
44. M. Andersson, E. Fällman, B. E. Uhlin, and O. Axner, "A Sticky Chain Model of the Elongation and Unfolding of *Escherichia coli* P Pili under Stress," *Biophys. J.* **90**, 1521-1534 (2006)

附 錄

附錄一：12 株點突變體的電子顯微鏡照片。

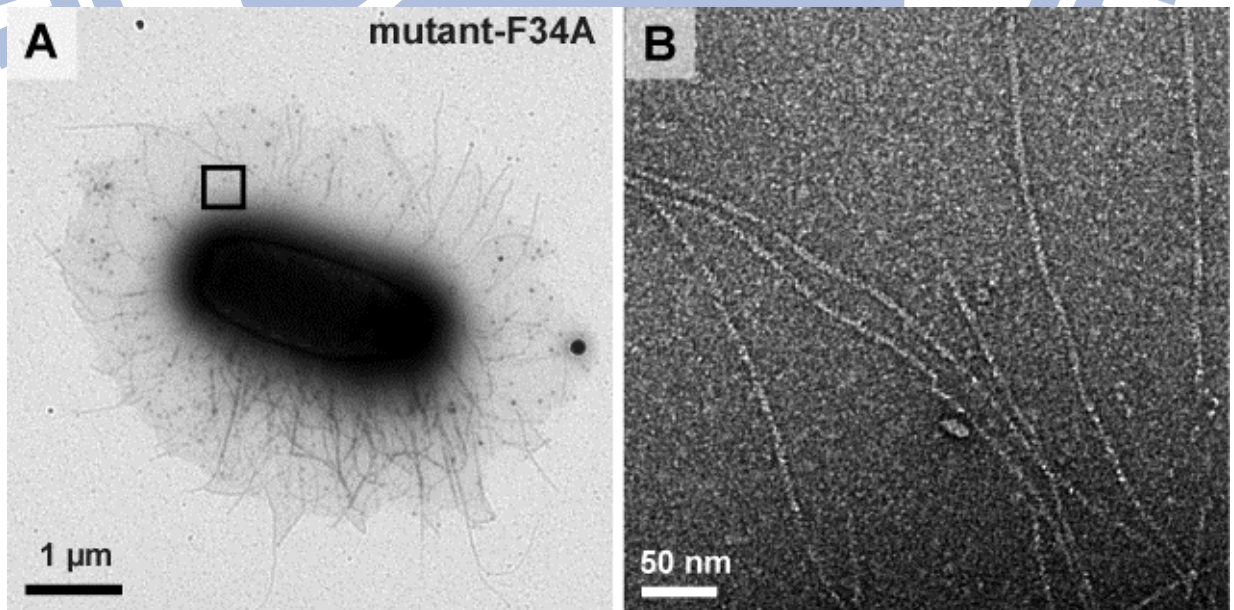
(G30A mutant strain)



G30A 點突變體的電子顯微鏡照片。

從圖 A 方形框的擴大照片。

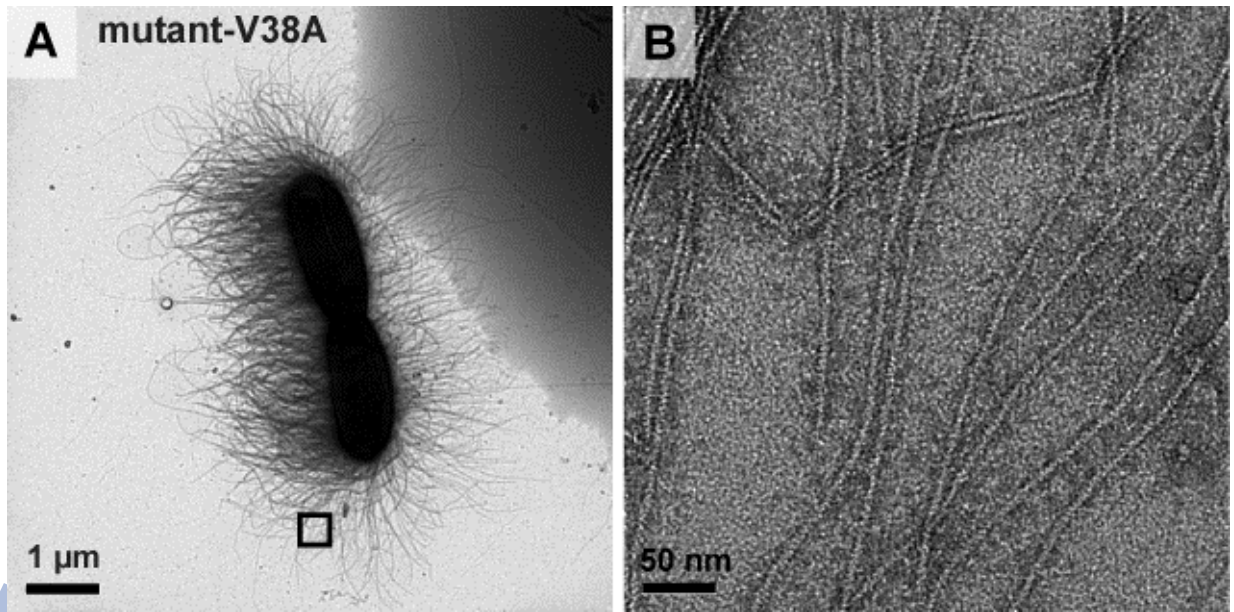
(F34A mutant strain)



F34A 點突變體的電子顯微鏡照片。

從圖 A 方形框的擴大照片。

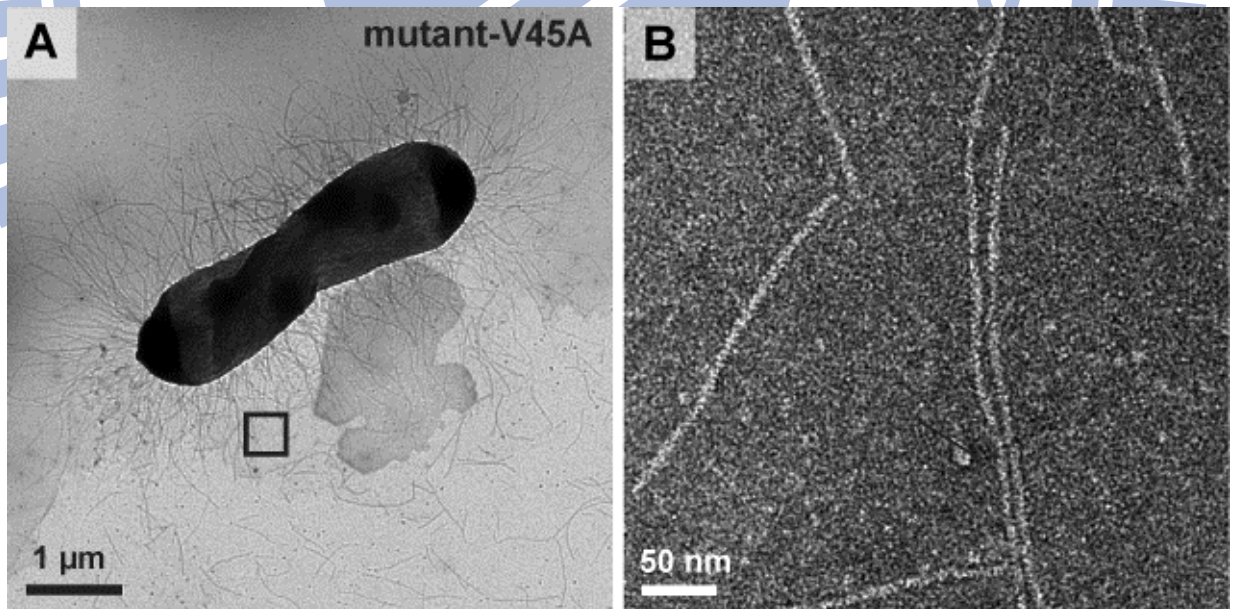
(V38A mutant strain)



V38A 點突變體的電子顯微鏡照片。

從圖 A 方形框的擴大照片。

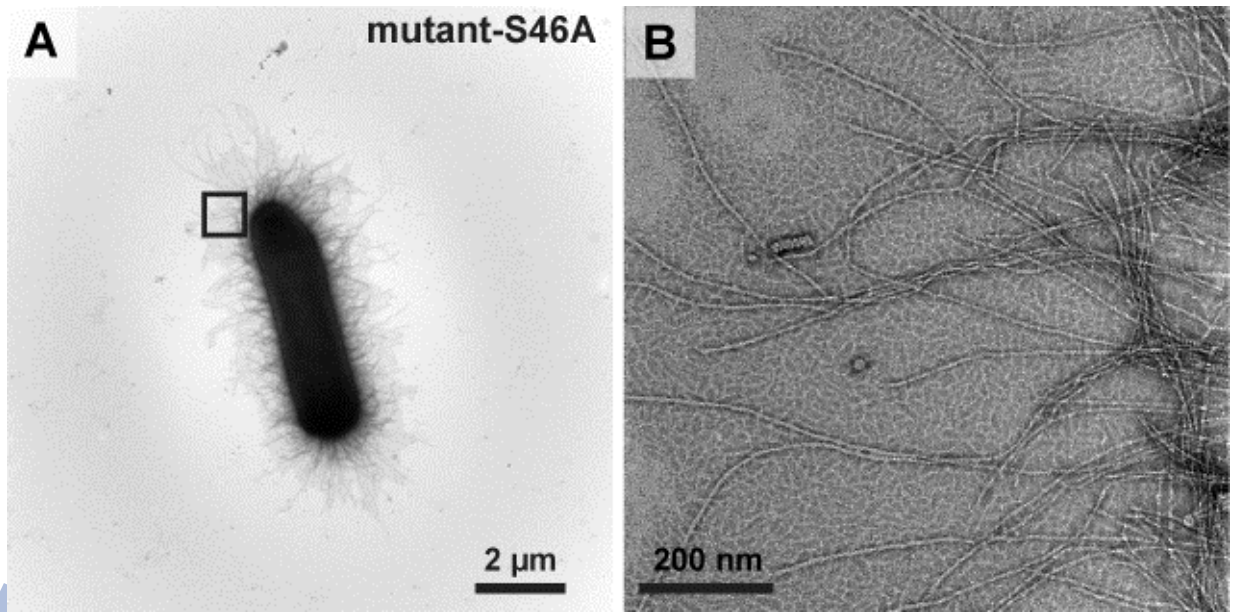
(V45A mutant strain)



V45A 點突變體的電子顯微鏡照片。

從圖 A 方形框的擴大照片。

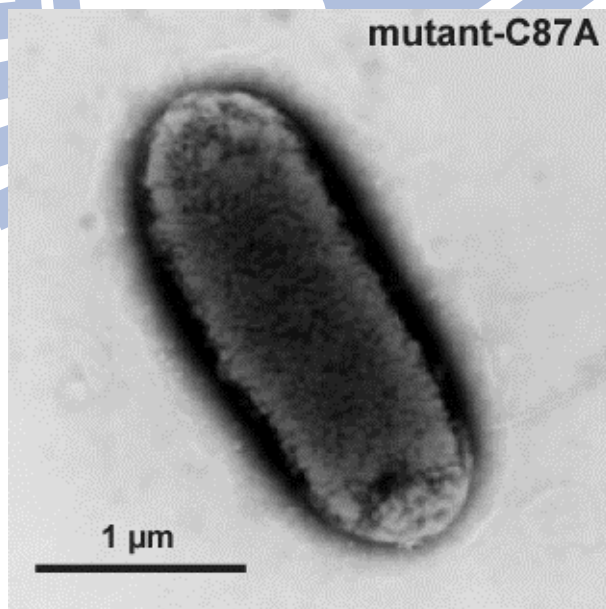
(S46A mutant strain)



S46A 點突變體的電子顯微鏡照片。

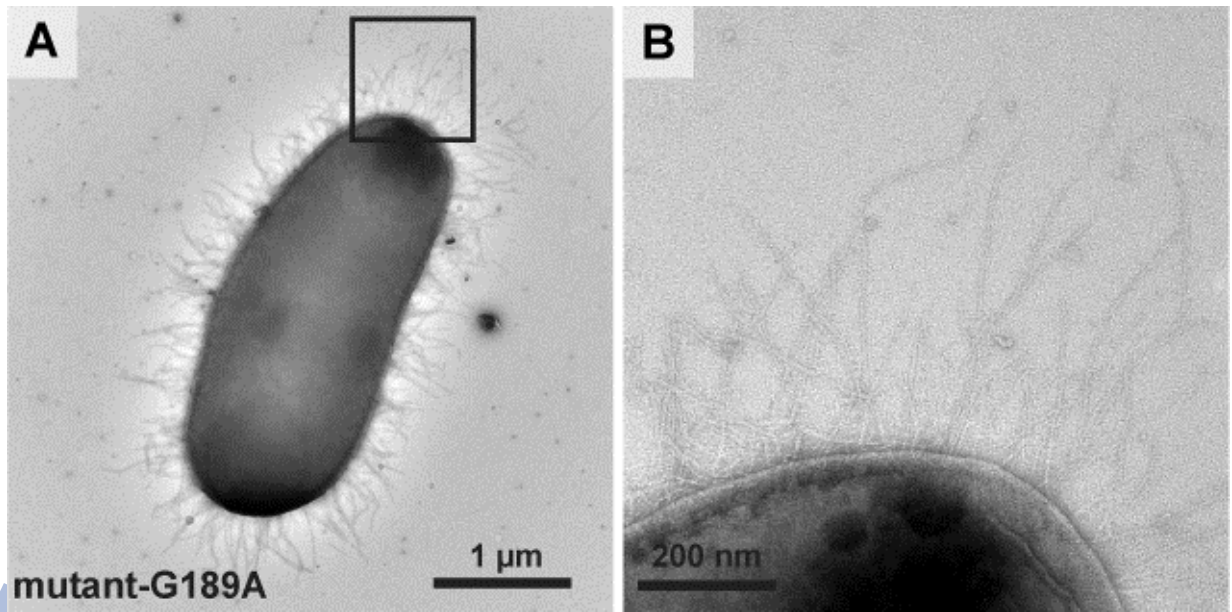
從圖 A 方形框的擴大照片。

(C87A mutant strain)



C87A 點突變體的電子顯微鏡照片。

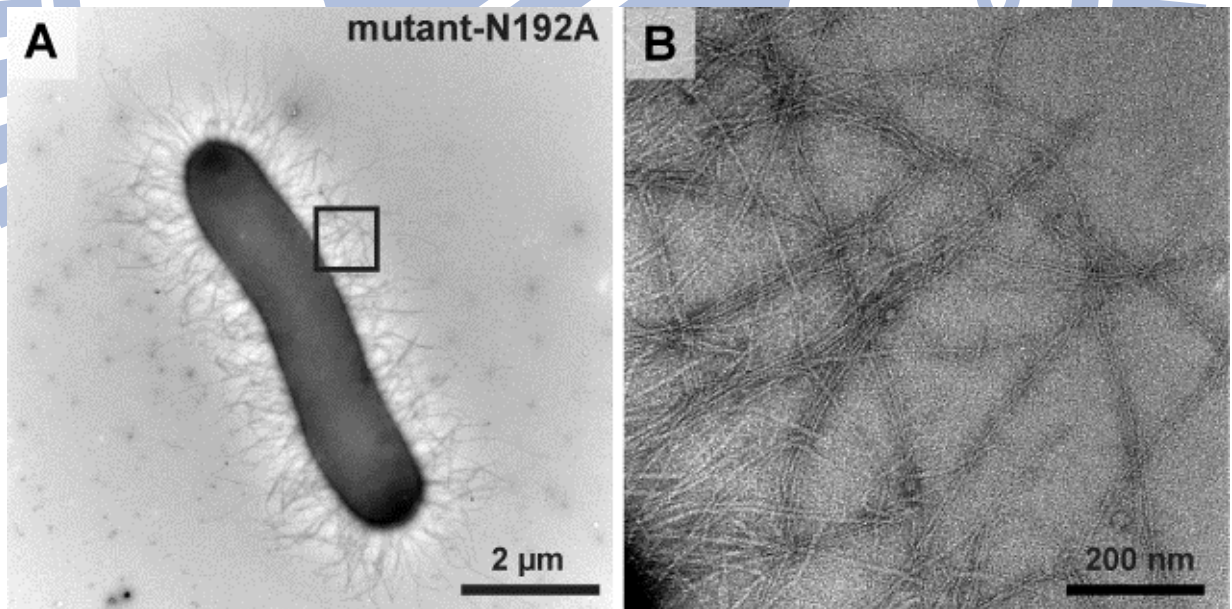
(G189A mutant strain)



G189A 點突變體的電子顯微鏡照片。

從圖 A 方形框的擴大照片。

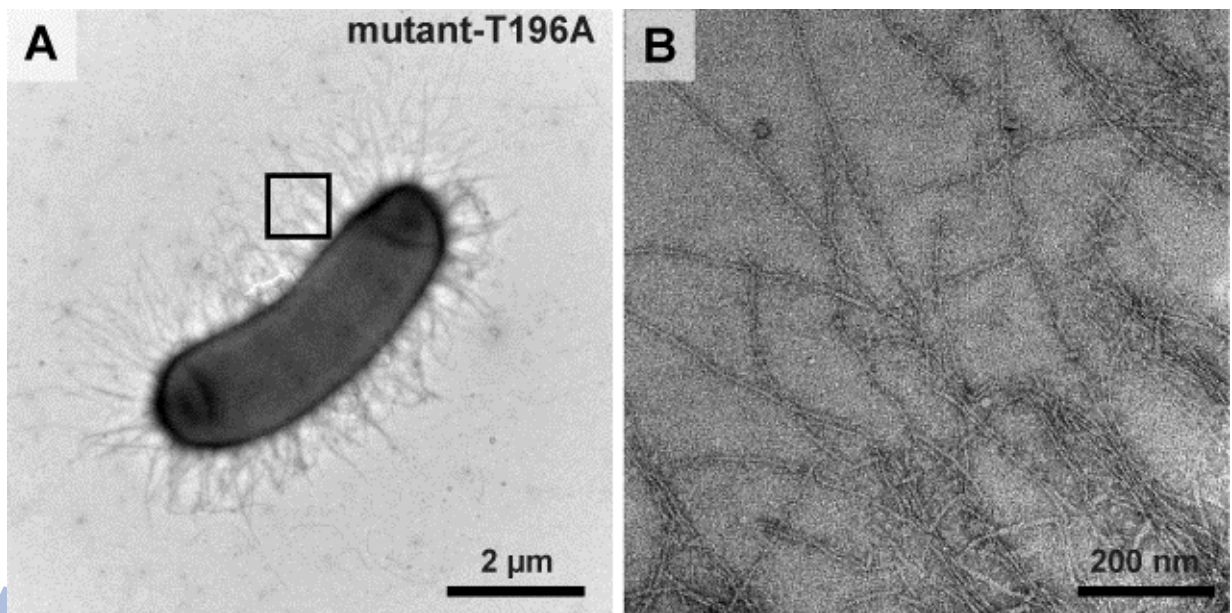
(N192A mutant strain)



N192A 點突變體的電子顯微鏡照片。

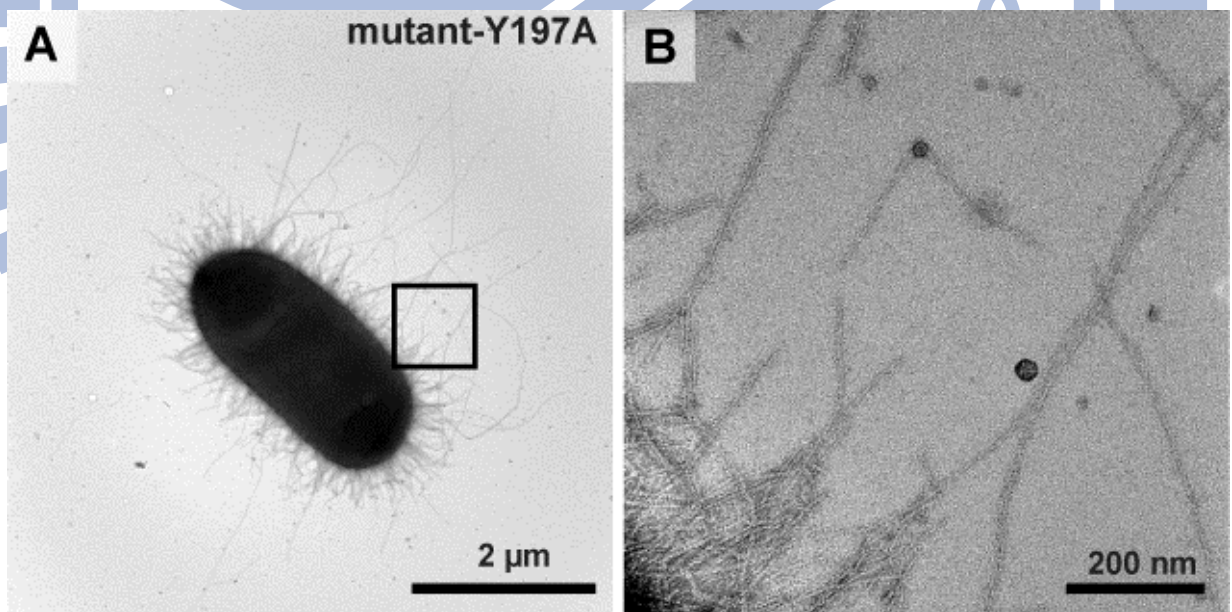
從圖 A 方形框的擴大照片。

(T196A mutant strain)



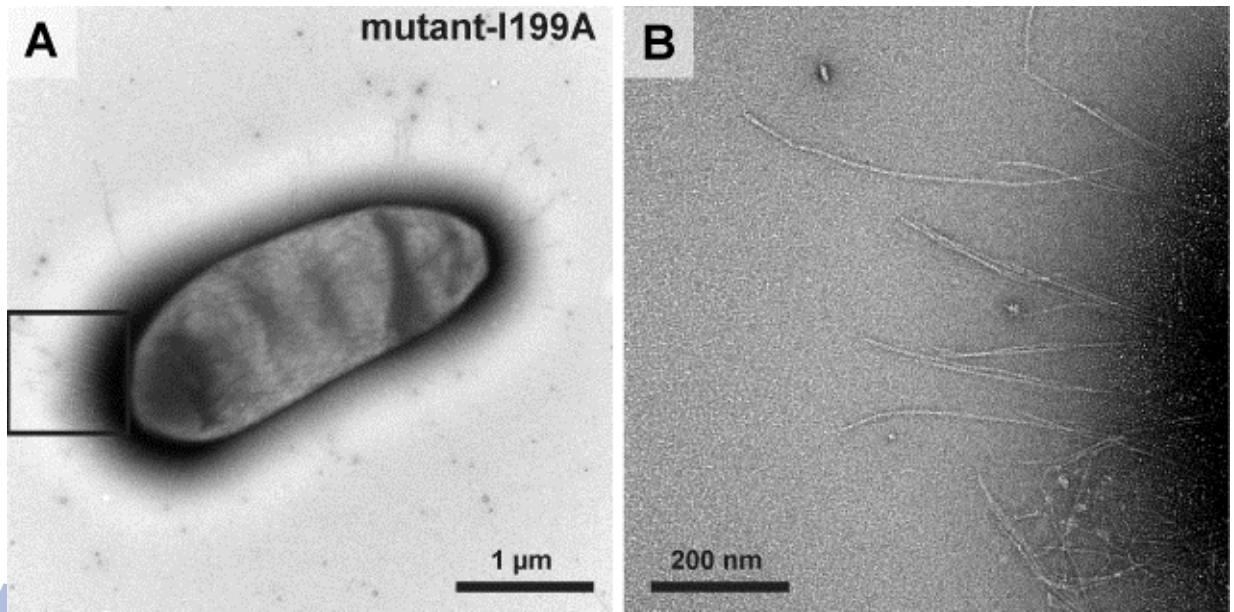
T196A 點突變體的電子顯微鏡照片。 從圖 A 方形框的擴大照片。

(Y197A mutant strain)



Y197A 點突變體的電子顯微鏡照片。 從圖 A 方形框的擴大照片。

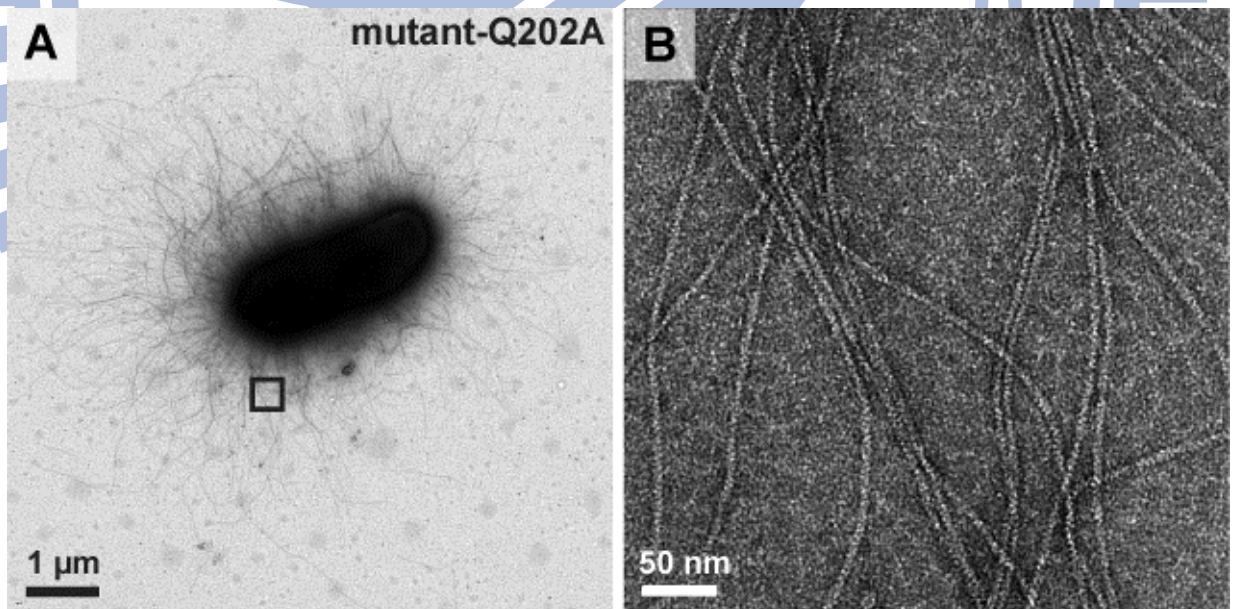
(I199A mutant strain)



I199A 點突變體的電子顯微鏡照片。

從圖 A 方形框的擴大照片。

(Q202A mutant strain)



Q202A 點突變體的電子顯微鏡照片。

從圖 A 方形框的擴大照片。

附錄二：第三型線毛的串鏈模型[27,44]

第三型線毛是由細菌在體內自組裝而成的三維螺旋型結構，主要的骨架是 MrkA 蛋白質所組成，並伴隨著單一頂端黏附分子 MrkD。因此第三型線毛可以視為少量種類分子所組成的鏈狀聚合物。我們以 Sticky Chain 模型去模擬第三型線毛的伸長形變的機械特性。Sticky Chain 模型主要基於兩個理論的結合：(1)分子間的伸長特性符合虎克定律行為；(2)分子間鍵結因外力作用進而影響鍵結開啟之速率方程式，源自於 Bell's 模型。其中分子間鍵結因外力而開啟，速率方程式與統計物理學中的自由能有關。

首先，我們預測在無外力作用下，第三型線毛的單元分子 MrkA 之間的鍵結能階為圖 A.1。此能階圖中有三個有局部穩定態，分別是能階 A，屬於層與層鍵結，以及能階 B、C，屬於頭對尾鍵結。其中，能階 A 代表三維螺旋結構的層與層鍵結在關閉時的穩定狀態，等效預測線毛結構顯示於圖 A.2(A)；能階 B 代表三維螺旋結構的層對層鍵結在開啟時並轉換成頭對尾鍵結關閉時的穩定狀態，等效預測線毛結構顯示於圖 A.2(B)；能階 C 代表三維頭對尾鍵結開啟時的穩定狀態，等效預測線毛結構顯示於圖 A.2(C)。

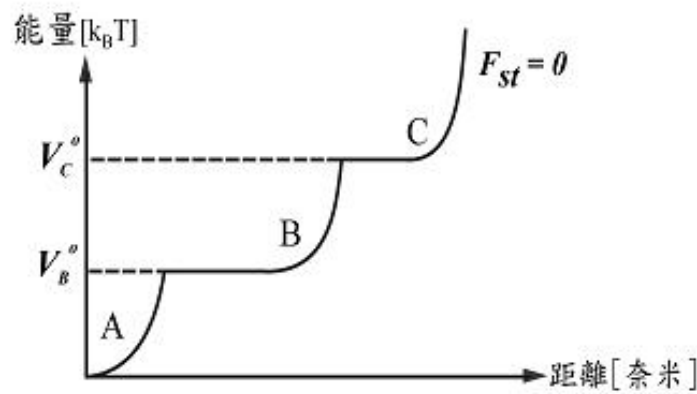


圖 A.1 第三型線毛的單元分子鍵結能階示意圖。

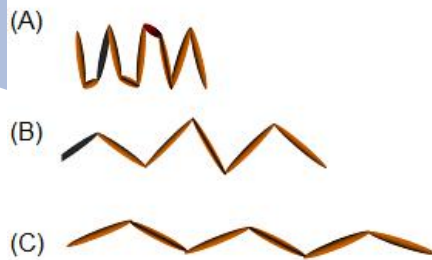


圖 A.2 第三型線毛的單元分子鍵結能階等效線毛鍵結結構示意圖：

(A)能階 A；(B)能階 B 時；(C)能階 C。

一般而言，第三型線毛主要蛋白 Mrk A 單元分子之間的鍵結會處於整體的最穩定狀態，也就是整體的最低能階態。因此，當無外力施加在第三型線毛時，單元分子 MrkA 之間的鍵結總是處在層與層鍵結在關閉時的穩定狀態(能階 A)。一旦外力施加在第三型線毛時，會造成的能階傾斜。一旦造成能階 A 與能階 B 的能量相當接近時，將有機會使 MrkA 之間的層對層鍵結開啟而轉變成頭對尾鍵結關閉狀態(也就是狀態由能階 A 變成能階 B)。一旦外力再度增加使得能階更劇烈傾斜，若造成能階 B 與能階 C 的能量接近時，將會造成 MrkA 之間的鍵結狀態將有機會轉變成頭對尾鍵結開啟狀態(也就是狀態由能階 B 變成能階 C)。這樣的狀態轉變將發生在所有第三型線毛的單元分子 MrkA 之間的鍵結上，其數量可能有數百至數千個左右。

當第三型線毛受到一外力作用，鍵結能階將會受到修改而變成傾斜，大略依照機械位能 $F_{st} \times x$ ，其中 x 為實驗中應力方向的伸長距離。所造成的鍵結能階變化結果顯示於圖 A.3 與圖 A.4。因此，我們可以估計第三型線毛在任何受力時，所有單元分子 MrkA 之間的鍵結的所處狀態，如同估計所有鍵結狀態在能階 A、能階 B 與能階 C 的數量。首先，處在能階 A 的鍵結數量(N_A)由能階 A 變為能階 B(N_B)之時變率可表示為

$$\frac{dN_A}{dt} = -K_{AB}(F_{st}) + K_{BA}(F_{st}) = -\frac{dN_B}{dt}, \quad (\text{A.1})$$

且

$$\begin{cases} K_{AB}(F_{st}) = v_o \cdot \exp[-(V_{TAB}^o - F_{st} \cdot \Delta x_{AT})/k_B T] \\ K_{BA}(F_{st}) = v_o \cdot \exp[-(V_{TAB}^o - V_B^o + F_{st} \cdot \Delta x_{TB})/k_B T] \end{cases}, \quad (\text{A.2})$$

其中， v_o 為試圖速率，一般大約為 10^{10} 赫茲； V_{TAB}^o 為能階 A、B 之間的位能屏障高度； V_B^o 為能階 B 的位能值(假定 $V_A^o = 0$)； F_{st} 為施加在第三型線毛上的外力； Δx_{AT} 為能階 A 與位能屏障之間的距離； Δx_{TB} 為能階 B 與位能屏障之間的距離； $k_B T$ 熱擾能量。式子(A.2)中可以看出，鍵結的狀態轉換與鍵結數量(N_A 或 N_B)無關，這是我們假設螺旋型結構拆解過程(即層對層鍵結開啟機制)是屬於拉鍊模式的拆解狀態，由第三型線毛的最頂端，一次只拆開一個層對層鍵結的方式拆到線毛的最根部。因此，能階 A 的時變率與處在能階 A 的鍵結數量無關。

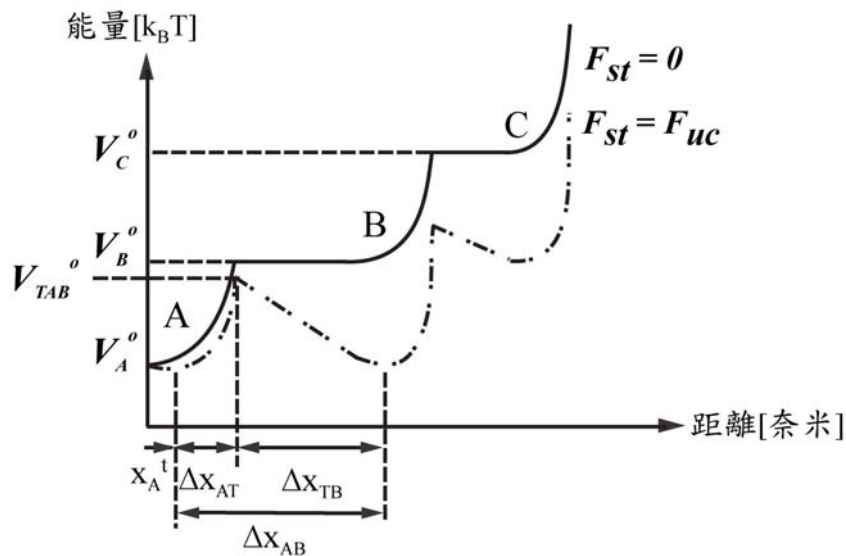


圖 A.3 第三型線毛的單元分子鍵結能階受力傾斜關係圖(能階 A 變成 B)

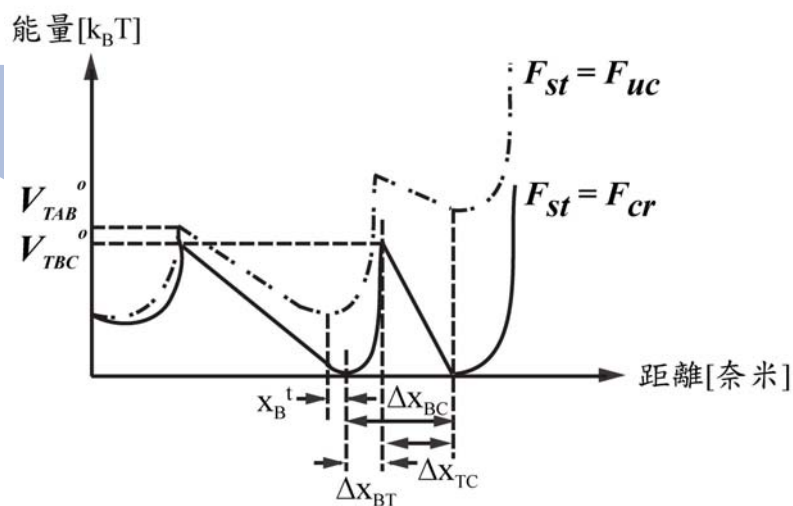


圖 A.4 第三型線毛的單元分子鍵結能階受力傾斜關係圖(能階 B 變成 C)

由式子(A.2)可推得當 $dN_A/dt = 0$ 時(即狀態 A、B 間達到穩定變化)，可以得到一穩定應力表示為

$$F_{uc}^o = F_{st}^o = \frac{V_B^o}{\Delta x_{AT} + \Delta x_{TB}} = \frac{V_B^o}{\Delta x_{AB}}, \quad (\text{A.3})$$

其中 Δx_{AB} 為能階 A 與能階 B 之間的距離。並且定義該力, F_{uc}^o , 為拆解力。

此外，對於全部層對層鍵結拆解完之前的伸長量可以表示為

$$\Delta L_{I,II} = \alpha_A \times L_{c,A} + N_B \cdot \Delta x_{AB}, \quad F_{st} < F_{uc} \Rightarrow N_B = 0, \quad (\text{A.4})$$

且

$$\begin{cases} \alpha_A = \frac{1}{12} \left[9 + f_A - \frac{(3-f_A)^2}{\sigma_A^{1/3}} - \sigma_A^{1/3} \right] \\ \sigma_A = (243 - 27f_A + 9f_A^2 - 4f_A^3 + 12\sqrt{405 - 81f_A + 27f_A^2 - 3f_A^3}), \\ f_A = \frac{F_{st} \cdot p_A}{k_B T} \end{cases} \quad (\text{A.5})$$

其中 $L_{c,A}$ 為第三型線毛在受力螺旋結構未拆解前的線毛輪廓長； α_A 為伸長量相對線毛輪廓長的比例常數； p_A 第三型線毛在受力時，螺旋結構未拆解前的持續長度。以上三個物理參數皆源自於 WLC 模型。如此一來，第三型線毛的受力伸長特性，在第一階段類彈簧階段、第二階段拆解階段，可以由式子(A.5)所解釋。

若考慮全部層對層鍵結拆解完瞬間，第三型線毛的單元分子 MrkA 之間鍵結將全部處在頭對尾鍵結關閉狀態(也就是能階 B)。此時，第三型線毛可以視為完全纖直的線狀結構，但保有頭對尾鍵結，這樣的結構也可以使用 Worm-like Chain 模型解釋，其伸長量可表示為 $\Delta L_{II}^* = \alpha_B \times L_{c,B}$ ，

$$\begin{cases} \alpha_B = \frac{1}{12} \left[9 + f_B - \frac{(3-f_B)^2}{\sigma_B^{1/3}} - \sigma_B^{1/3} \right] \\ \sigma_B = (243 - 27f_B + 9f_B^2 - 4f_B^3 + 12\sqrt{405 - 81f_B + 27f_B^2 - 3f_B^3}), \\ f_B = \frac{F_{st} \cdot p_B}{k_B T} \end{cases} \quad (\text{A.7})$$

其中 $L_{c,B}$ 為第三型線毛在受力螺旋結構完全拆解後的線毛輪廓長； α_B 為伸長量相對線毛輪廓長的比例常數； p_B 第三型線毛在受力時，螺旋結構完全拆解後的持續長度。

式子(A.6)和(A.7)將用來擬合層對層鍵結拆解完瞬間時的實驗數據。一旦第三型線毛的螺旋結構完全拆解後，施加在第三型線毛的外力將增加。所以，處在能階 B 的鍵結數量(N_B)將可能由能階 B 變為能階 C(N_C)之時變率可表示為

$$\frac{dN_B}{dt} = -K_{BC}(F_{st}) + K_{CB}(F_{st}) = -\frac{dN_C}{dt}, \quad (\text{A.8})$$

且

$$\begin{cases} K_{BC}(F_{st}) = N_B \times v_o' \cdot \exp\{-(V_{TBC}^o - V_B^o) - (F_{st} - F_{uc}^o) \cdot \Delta x_{BT}\} / k_B T \\ K_{CB}(F_{st}) = (N_{tot} - N_B) \times v_o \cdot \exp\{-(V_{TBC}^o - V_C^o) + (F_{st} - F_{uc}^o) \cdot \Delta x_{TC}\} / k_B T \end{cases}, \quad (\text{A.9})$$

其中， N_{tot} 為所有鍵結數量； v_o' 為試圖速率，一般大約也是 10^{10} 赫茲； V_{TBC}^o 為能階 B、C 之間的位能屏障高度； V_C^o 為能階 C 的位能值； F_{st} 為施加在第三型線毛上的外力； Δx_{BT} 為能階 B 與位能屏障之間的距離； Δx_{TC} 為能階 C 與位能屏障之間的距離； $k_B T$ 熱擾能量。式子(A.8)和(A.9)中可以看出，鍵結的狀態轉換與鍵結數量(N_B 或 N_C)有關，這代表頭對尾鍵結開啟過程是屬於隨機模式的狀態，任何頭對尾鍵結皆有機會進行開啟或關閉的動作。因此，能階 B 的時變率與鍵結數量有直接關係。並且，進一步可推得當 $dN_B / dt = 0$ 時(即狀態 B、C 間達到穩定變化)，可以得到一個應力表示為

$$F_{st}^o(N_B) = F_{uc}^o + \frac{1}{\Delta x_{BC}} \times [(V_C^o - V_B^o) + k_B T \times \ln(\frac{N_{tot} - N_B}{N_B})], \quad \Delta x_{BC} = \Delta x_{BT} + \Delta x_{TC} \quad (\text{A.10})$$

其中 Δx_{BC} 為能階 B 與能階 C 之間的距離。假設當 $N_{tot} - N_B = N_B / 2$ 時，將可獲得一特徵力, F_{cr}^o , 可表示為

$$F_{cr}^o = F_{st}^o(N_B = N_{tot} / 2) = F_{uc}^o + \frac{V_C^o - V_B^o}{\Delta x_{BC}}. \quad (\text{A.11})$$

此外，對於全部頭對尾鍵結開啟之前的伸長量可以表示為

$$\Delta L = \Delta L_{I,II} + N_B \cdot \frac{F_{st} - F_{uc}^o}{k_B} + (N_{tot} - N_B) \times [\Delta x_{BC} + \frac{F_{cr}^o - F_{uc}^o}{k_B} + \frac{F_{st} - F_{cr}^o}{k_C}], \quad (\text{A.12})$$

其中 $\Delta L_{I,II}$ 來自於式子(A.4)； k_B 能階 B 的彈力常數； k_C 能階 C 的彈力常數。如此可以解釋第三型線毛的受力伸長特性在第三階段非線性階段狀態。