

國立交通大學

生物醫學研究所

碩士論文

克雷白氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 中纖毛黏附蛋白 KpfD

的功能性分析

Characterization of the adhesin KpfD from *Klebsiella*

***pneumoniae* NTUH-K2044**



研究生：鐘純珊

Student: Chun-Shan Chung

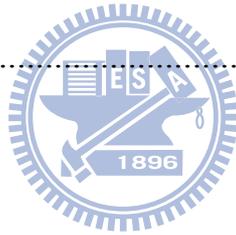
指導教授：彭慧玲 博士

Advisor: Hwei-Ling Peng, Ph.D

中華民國九十八年八月

August, 2009

縮寫表	v
中文摘要	vi
Abstract.....	viii
致謝	x
前言	1
實驗材料與方法	6
結果	15
討論	25
參考文獻	29



圖表目錄

附錄一 第三型纖毛組裝機制	39
附件二 本實驗室預測之克雷白氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 所有纖毛基因組的基因座	40
附件三 重組第三型纖毛表現質體建構方式示意圖	41
圖一、KpfD 與愛德華氏菌 Etf 纖毛黏附蛋白 EtfD 胺基酸序列的比較	42
圖二 (A)、重組第三型纖毛大腸桿菌 MrkA 免疫螢光染色分析	44
圖二(B)、重組第三型纖毛大腸桿菌凝集天竺鼠紅血球分析	45
圖二(C)、重組大腸桿菌 JM109[<i>pmrkABCkpfD</i>]凝集天竺鼠紅血球甘露糖競爭分析	46
圖三(A)、重組 KpfD 表現質體 DNA 建構方式示意圖	47
圖三(B)、重組 KpfD 蛋白質純化膠體電泳圖	48
圖三(C)、專一性抗體 MrkA、MrkD 及 KpfD 分析重組第三型纖毛黏附蛋白表現情形...	49
圖四、重組第三型纖毛大腸桿菌 KpfD 免疫螢光染色分析	50
圖五(A)、克雷白氏肺炎桿菌第一型纖毛黏附蛋白 FimH 與 KpfD 二級結構比對	51
圖五(B)、克雷白氏肺炎桿菌纖毛黏附蛋白 KpfD 三級結構預測	52
圖五(C)、克雷白氏肺炎桿菌纖毛黏附蛋白 KpfD 與大腸桿菌第一型纖毛黏附蛋白 FimH 三級結構 alignment	53
圖六(A)、重組第三型纖毛大腸桿菌 JM109[<i>pmrkABCkpfD</i>]凝集天竺鼠紅血球之甘露糖競爭分析	54
圖六(B)、重組第三型纖毛大腸桿菌 JM109[<i>pmrkABCkpfD</i>]凝集天竺鼠紅血球之 N-acetyl-D-glucoseamine 競爭分析	55

圖六(C)、重組第三型纖毛大腸桿菌 JM109[<i>pmrkABCkpfD</i>]凝集天竺鼠紅血球之 D-fucose 競爭分析	56
圖六(D)、重組第三型纖毛大腸桿菌 JM109[<i>pmrkABCkpfD</i>]凝集天竺鼠紅血球之抗體競爭分 析	57
圖七(A)、不同長度的重組 KpfD 蛋白質表現純化	59
圖七(B)、重組第三型纖毛大腸桿菌 JM109[<i>pmrkABCkpfD</i>]凝集天竺鼠紅血球與不同長度之 KpfD 蛋白質競爭測試	60
圖八、重組第三型纖毛大腸桿菌 JM109[<i>pmrkABC</i>]、JM109[<i>pmrkABCD</i>]、 JM109[<i>pmrkABCkpfD</i>]細胞黏附能力測試	61
圖八(C)、重組第三型纖毛大腸桿菌 JM109[<i>pmrkABC</i>]、JM109[<i>pmrkABCD</i>]、 JM109[<i>pmrkABCkpfD</i>]對肝臟細胞(HepG ₂)黏附之吉姆薩氏染色測試	62
圖九(A)、Kpf 纖毛建構示意圖	63
圖九(B)、Kpf 纖毛表現情形	64
圖十、大腸桿菌表現 Kpf 基因簇的免疫螢光染色分析	65
圖十一(A)、大腸桿菌 JM109[<i>pkpfABCD</i>]及 JM109[<i>pkpfRABCD</i>]凝集天竺鼠紅血球能力測 試	66
圖十一(B)、大腸桿菌 JM109[<i>pkpfRABCD</i>]凝集天竺鼠紅血球之甘露糖競爭分析	67
附錄四 分析 KpfR 可能的 domain	68

縮寫表

APS	Ammonium persulfate
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
CFU	Colony forming unit
DTT	1,4-dithio-threitol
EDTA	<i>N</i> ' <i>N</i> ' <i>N</i> ' <i>N</i> '-ethylenediaminetetraacetate
HA	Hemagglutination
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside
LB	Luria-Bertani broth
NBT	Nitro blue tetrazolium
PCR	Polymerase chain reaction
PVDF	Polyvinylidene fluoride
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	<i>N</i> ' <i>N</i> ' <i>N</i> ' <i>N</i> '-tetramethylethyl-endiamide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's
NEAA	Non-essential amino acid

中文摘要

纖毛在細菌感染時扮演黏附宿主細胞的重要角色。基因體解碼後，序列分析顯示細菌基因體中可比對出多套表現纖毛的基因組，在克雷白氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 中，除了第一、三型纖毛基因組外，也發現其他未曾被報導過的七套纖毛基因組，分別被命名為 *kpa*、*kpb*、*kpc*、*kpd*、*kpe*、*kpf* 及 *kpg* 纖毛。先前實驗室建立第三型纖毛表現系統，並以此系統表現 MrkD 以外的黏附蛋白，藉以探討這些未知黏附蛋白的活性。本論文除了以免疫螢光標定証實此重組纖毛結構蛋白的表現外，還以血球凝集試驗確認 KpfD 凝集天竺鼠紅血球的能力，及可被 0.002 M 甘露糖所抑制凝集作用的黏附特性。同時，我們構築可表現重組 KpfD 蛋白的質體，在大腸桿菌中大量表現並純化 KpfD 重組蛋白來製備多株抗體，進一步利用此專一之 KpfD 抗體藉西方點墨實驗及免疫螢光分析，証實黏附蛋白 KpfD 可以成功的表現於重組纖毛成頂端。接著，我們利用醣類抑制實驗證實 KpfD 黏附蛋凝集天竺鼠紅血球的活性可被 0.001 M 甘露糖抑制，其凝集活性也可被 0.01 M 的 N-acetyl-D-glucosamine 抑制卻不受 D-fucose 的影響；而利用 KpfD 專一性抗體證實此凝集現象確實經由 KpfD 的黏附作用。為了了解 KpfD 與甘露糖交互作用的區域，我們比較分析 KpfD 與第一型纖毛黏附蛋白 FimH 的二級與三級結構，預測 KpfD 與甘露糖交互作用的區域可能在 KpfD D73 至 A83 之間，因此，我們分別表現並純化包含及不含此預測作用區域的 KpfD 截短蛋白，然而，血球凝集競爭試驗顯示兩者皆無法抑制凝集現象。細胞黏附能力測試顯示表現重組第三型纖毛的大腸桿菌具有自我凝集(autoaggregation)

的能力，因此，我們建構表現 *kpf* 纖毛的質體 p*Kpf*ABCD 及 p*Kpf*RABCD，而利用 KpfD 抗體進行西方點墨法及免疫螢光分析，證明 p*Kpf*RABCD 可以使大腸桿菌表現 *kpf* 纖毛；血球凝集測試也證實帶有 p*Kpf*RABCD 質體的大腸桿菌具有凝集天竺鼠血球的活性，而且此凝集活性可受到甘露糖抑制。



Abstract

Fimbriae play an important role in establishing an infection by adhering to specific host tissues. The available genome sequences of many enterobacteria reveal multiple fimbrial loci are commonly contained in a genome. In addition to type 1 and 3 fimbrial gene clusters, seven novel fimbrial operons were identified in *Klebsiella pneumoniae* NTUH K2044 and named *kpa*, *kpb*, *kpc*, *kpd*, *kpe*, *kpf* and *kpg*. We have previously generated a type 3 fimbrial display system by replacing the *mrkD* adhesin gene with each of the fimbrial adhesion genes. In the study, analysis using immuno-fluorescence microscopy (IFM) and western blot hybridization were employed to demonstrate the recombinant type 3 fimbriae expressed properly. The recombinant fimbriae was found to be able to bind to erythrocytes of guinea pig, and the hemaagglutination (HA) activity was inhibited by 0.002 M D-mannose. In addition, the recombinant plasmid for overexpression of KpfD was generated and transformed into *Escherichia coli* NovaBlue (DE3). The heterologous expressed KpfD protein was then purified for polyclone antibody preparation. The antibody was then used to demonstrate the KpfD was assembled on the tip of the recombinant type 3 fimbriae by western blot and IFM analysis. The HA competition analysis revealed that the agglutination activity could be inhibited by 0.001 M

D-mannose or 0.01 M N-acetyl-D-glucosamine, but not affected by D-fucose. Furthermore, the KpfD antibody could inhibit the HA activity indicating KpfD adhesin is responsible for the specific binding activity to erythrocytes of guinea pig. Comparative analysis of the secondary and tertiary structure with *E. coli* FimH revealed a putative mannose binding pocket on KpfD D73 to A83. The recombinant plasmids containing truncation of the KpfD protein with or without the predicted mannose binding pocket were generated and the recombinant proteins purified for competition assay of the HA activity. However, neither recombinant protein could inhibit the HA activity. Cell adherence analysis indicated that the overexpression of the type 3 fimbriae on the surface of the recombinant *E. coli* rendered an autoaggregation phenotype. In order to prevent from the overestimated non-specific cell binding activity, the recombinant plasmid containing *kpfABCD* or *kpfRABCD* was generated and the expression of the recombinant *kpf* fimbriae was assessed by western blot hybridization, IFM assay, and HA activity measurement. The results indicated that the recombinant *E. coli* expressed *kpf* fimbriae on the surface exerted an HA activity that could be inhibited by D-mannose.

致謝

如果人生是首交響曲，這兩年的歷程無疑自成一章樂章；如果人生是旅行，兩年的旅程如今告一段落。

這一小段崎嶇不平的路，最要感謝我的指導老師，彭慧玲，老師。如果沒有您的耐心指導，殷殷教誨，資質駑鈍如我將不會有這篇論文產生；如果沒有您的溫柔愛心，打氣鼓勵，從精神心靈層面給予支持，迷網如我將不知會走向何方。感謝兩位口試委員張晃猶 老師與袁俊傑 老師，細心的審閱論文初稿，認真批改加註意見於初稿，並於口試時提出更多值得我思考的方向，使本篇論文能更臻完善。

兩年來像家一般待著的實驗室，感謝有像家人一般的你們。盈蓉學姊，像實驗室的小太陽，有妳在的地方就有溫暖歡笑，感謝妳在實驗技巧，實驗設計及論文寫作上給予的幫助，以及無數的支持鼓勵。健誠學長、新耀學長、靜柔學姊，是彭家的大支柱，感謝你們對實驗室的一切付出和對問題的解答追求的態度，都是學弟妹們最好的榜樣。智凱、登魁、朝陽幾位已畢業的學長，還是很關心實驗室的大家，總是以過來人的身分鼓勵我們。好同學雅雯、顛峰及志桓，感謝你們兩年來互相幫忙作伙走過。承哲、哲充、家華及佩君，你們的樂觀開朗及活力，帶給處

於碩二的我們莫大的快樂。歲云、品瑄及豪君是彭家的生力軍，彭家的傳承要靠你們了。

感謝張晃猶老師實驗室的諸位學長姐學弟妹，你們在實驗材料上無條件的給予支持，在實驗想法及投影片呈現上給予的指教，讓我在最後階段獲益良多。特別感謝我的好同學芊瑜，除了在細胞實驗材料上麻煩妳甚多，更忘不了每一次報告前的打氣小紙條。欣瑜學姊及婕伶學姊，感謝妳們在實驗上給予的協助以及朋友般的傾聽。感謝吳東昆老師及袁俊傑老師實驗室成員，除了實驗設備的支援外也總不吝嗇給予一個關心的微笑。感謝清大游翠蓉老師實驗室國良學長，可愛的兩位學妹惠櫻及亞璇，也許實驗上沒有幫忙太多，卻是永遠的好夥伴好朋友。

感謝重要的朋友們，姊妹淘嘉怡、牧芸及依蓁，妳們如家人般的存在，聖德及淳安共享歡憂喜樂，大姐姐嘉怡，不因距離而稍損我們的情誼，士杰的陪伴加油，以及最摯愛的爸、媽，是我最堅強的後盾，永遠敞開雙手溫暖安撫我哭泣受創的心。感謝你們，這段旅程因為有你們才能夠走完，下一個旅行將往何方？我也不知道，唯有帶著堅定的心、穩健的腳去實踐旅行的意義，期待受到這麼多人灌溉照顧的小樹苗，有一天也能供一兩人於樹下乘涼。

前言

克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 是一株具有莢膜的革蘭氏陰性桿菌，屬於腸內桿菌科(*Enterobacteriaceae*)，不具鞭毛且無運動性(31)，在LB培養基上會形成大而黏的菌落，在伊紅-甲烯藍瓊脂 (Eosin-Methylene Blue; EMB) 固態培養基上會呈紫紅色。克雷白氏肺炎桿菌也是一伺機性感染病原菌(opportunistic pathogen)，存在人體的腸胃道、呼吸道或泌尿道，由於易造成的人類肺炎而得名，也常引發尿道感染、外科傷口感染、敗血症等疾病，是院內感染及社區性感染的常見病原菌之一(6, 21, 31, 33)。近年來，亞洲各國紛紛報導出現一新型侵襲性的克雷白氏肺炎桿菌感染症狀，會引起健康成人或糖尿病病人的肝膿瘍(pyogenic liver abscess)，有時併發轉移成眼內炎或腦膜炎(22, 44)。自1980年代到1990年代，克雷白氏肺炎桿菌在台灣造成的單一菌種性肝膿瘍之比例持續上升，其嚴重性不容忽視(16, 22, 24, 44)。

目前已知的克雷白氏肺炎桿菌致病因子包括(一) 莢膜 (capsule)：莢膜由多醣類構成，可保護細菌抵抗吞噬細胞的吞噬作用，並且可以抑制血清中補體的活化。被報導過的莢膜有77種血清型，第二型莢膜(K2)是歐美最常見且毒性較高的血清型，而在台灣則以第一型莢膜(K1)血清型居多，引起化膿性肝膿瘍的克雷白氏肺炎桿菌也以K1血清型為主(27)。近年有報導指出，在台灣引起肝膿瘍的克雷白氏肺炎桿菌和*mgaA*與*mpaA*基因有高度相關(46)。(二) 脂多醣 (lipopolysaccharides)：脂多醣

可為克雷白氏肺炎桿菌提供血清抗性(31, 38)。(三) 螯鐵分子 (siderophore):鐵是細菌生長所需的因子，而螯鐵分子和鐵有很強的親和力，可以奪取宿主的鐵為己用(31)。(四) 纖毛 (fimbriae):纖毛為細絲狀毛髮物，突出於菌體外，當細菌進行感染時，會經由纖毛頂端的黏附因子(adhesin) 專一性的黏附宿主細胞而決定感染的細胞種類。除了第一型纖毛 (type 1 fimbriae)、第三型纖毛 (type 3 fimbriae)及KPF-28 纖毛，還有一屬非纖毛的附著因子(non-fimbrial adhesin) CF29K，都曾被報導過能提供專一性的附著能力(10, 11, 15, 31)。

第一型纖毛長約1 μm 寬約7 nm，是由*fimABCDEFGHI*基因群組轉譯表現(39)。第一型纖毛會造成紅血球凝集現象，而添加甘露糖會抑制此纖毛與紅血球的凝集，因此第一型纖毛造成的凝血現象又稱為甘露糖敏感型凝集 (mannose-sensitive hemagglutinins, MSHA)。第一型纖毛可和宿主細胞表面的糖蛋白結合，克雷白氏肺炎桿菌可利用此型纖毛附著於宿主的泌尿道、呼吸道或腸道的黏膜及上皮細胞(12, 14, 31)。第三型纖毛長約0.5~2 μm 寬約2~4 nm，由*mrkABCDF*基因組組成。第三型纖毛只能凝集被單寧酸處理過的紅血球，且此作用不會被甘露糖抑制，因此被歸類為甘露糖抵抗型凝集(mannose-resistant hemagglutinins, MRHA)，但此凝集現象可被亞精胺(spermidine)抑制。克雷白氏肺炎桿菌也可利用第三型纖毛附著於宿主的血管內皮細胞、呼吸道及泌尿道上皮細胞(17, 41)，也有報導指出此纖毛和克雷白氏肺炎桿菌的生物膜(biofilm)形成有

關 (10, 17, 23, 40)。KPF-28纖毛可使克雷白氏肺炎桿菌附著於腸上皮細胞 (11)，CF29K則被發現和人類腸細胞株Int-407與CaCo-2的附著有關 (9)。

關於纖毛組裝機制目前可歸類四種類型：(一)大腸桿菌P pili所代表的chaperon-usher機制；(二)第四型纖毛代表的general secretion機制；(三)以curli為代表的extracellular nucleation-precipitation機制；(四)以CS1及CS2 operon所轉錄的CFA/I纖毛代表的alternate chaperon機制(37)。克雷白氏肺炎感菌的第一型及第三型纖毛其組裝機制類似大腸桿菌的P pili，以第三型纖毛的組裝為例(附錄一)，首先，纖毛單元體MrkA及MrkD以第二型蛋白分泌系統Sec分泌途徑將之送到細菌內膜，與位於周膜間隙的chaperon蛋白MrkB交互作用，幫助纖毛單元體正常折疊並保護其不受周膜間隙的蛋白酶水解，接著chaperon-subunit複合體與細菌外膜的usher蛋白MrkC交互作用，將纖毛單元體送出並固著於外膜，形成毛髮狀結構(5, 35)。位於纖毛頂端的黏附蛋白，除了擔任感染時的黏附功能外，也是纖毛組裝的起始者，本實驗室過去的研究指出，缺少黏附蛋白的第三型纖毛，除了黏附能力缺失外也會造成纖毛結構的改變(18)。典型的黏附蛋白在序列上常具有相似的組成，在蛋白質N端帶有20至30個信號肽(signal peptide)，當纖毛蛋白由細胞質送至周膜間隙時信號肽會被切除。去除信號肽後的黏附蛋白結構可分為兩大部分：受體結合區 (receptor binding domain)及菌毛區 (pilin domain)。受體結合區負責專一性的辨認

黏附蛋白結合目標，菌毛區則與纖毛主要組成蛋白交互作用，使黏附蛋白能座落於纖毛頂端。

許多腸內致病菌株的基因體被解碼後，序列分析顯示這些細菌基因體中都帶有許多套可轉譯表現纖毛的基因組。例如：沙門氏傷寒桿菌

(*Salmonella enterica* serovar Typhi) 除了較廣泛研究的第四型纖毛及 *agf*、*sef*、*fim*、*saf*、*tcf* 纖毛操縱子 (fimbrial operon) 外，由解碼的基因體分析顯示還有 *bcf*、*sta*、*stb*、*stc*、*std*、*ste*、*stg* 及 *sth* 纖毛基因組(8, 42)。大腸桿菌 (*Escherichia coli*) O157:H7 則除了已報導過的 MAT 及 *ppdD* 纖毛基因組外，還帶有 14 套表現纖毛的基因組，這些纖毛基因在一般實驗室培養的條件下大多不表現(25)。奇異變形桿菌 (*Proteus mirabilis*) HI4320 在基因體解碼完成後，除被報導過的 MR/P、UCA (NAF)、PMF (MR/K)、ATF 及 PMP 纖毛外，另有 12 個從未被報導的 chaperone-usher 纖毛基因組 (29)。

本研究中的克雷白氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 菌株分離自國立臺灣大學醫學院附設醫院一名 40 歲男性病患的血液培養，這名病患患有原發性克雷白氏肺炎桿菌肝膿瘍，合併菌血症及轉移性腦膜炎。而克雷白氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 的基因體已被定序註解完畢(45)。本實驗室藉由序列比對發現：在 NTUH-K2044 基因體中具有九套 chaperone-usher pathway 類型的纖毛基因組，包含第一型纖毛、第三型纖毛以及七組未曾被報導的纖毛，分別被命名為 *kpa*、*kpb*、*kpc*、*kpd*、*kpe*、*kpf* 及 *kpg* 纖毛(附錄

二)。同時，分析了105株克雷白氏肺炎桿菌臨床菌株，結果發現*kpb*以及*kpc*纖毛基因組的分佈與K1血清型具有顯著的相關性 ($p < 0.001$) (7)。我們進一步選殖了這些纖毛基因組，將帶有纖毛基因組的重組質體轉型至大腸桿菌中，藉由大量表現這些重組的纖毛，來分析各個纖毛的黏附特性。並且置換纖毛頂端的黏附蛋白進一步建構了重組第三型纖毛(附件二)。透過初步的功能性分析，我們發現重組大腸桿菌 JM109[*pmrkABCkpfD*]對天竺鼠紅血球具有很高的凝集能力，而此黏附活性可被添加甘露糖所抑制(48)。另外有文獻指出，在肝膿瘍菌株的DNA microarray中有一套纖毛基因組的RNA表現量上升(47)，經過本實驗室比對證實此套纖毛基因組為Kpf纖毛基因簇。基於這些原因，本篇論文希望探討Kpf纖毛的功能以及在感染時所扮演的角色，希望能闡明此黏附因子的特性及專一性受質。

實驗材料與方法

生長曲線測試

將隔夜培養的菌液加至新鮮含抗生素的培養液，調整濃度至OD₆₀₀吸光值約0.1後於37°C震盪培養，並在不同時間點測量OD₆₀₀下的吸光值。

染色體 DNA 抽取

將*K. pneumoniae*以LB培養液隔夜培養，12000 rpm離心5分鐘去除上清液，加入800 µl lysis solution (200 mM NaCl, 20 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl, 0.2% Triton X-100, 5 mM DTT, 80 µg lysosome)後劇烈震盪，於37°C下作用30分鐘以打破菌體，之後在Proteinase K濃度為0.1 mg/ml，溫度50°C的水浴槽作用隔夜。次日將樣本放置冰上10分鐘，加入250 µl飽和食鹽水輕微搖晃後繼續放置冰上10分鐘，以12000 rpm離心10分鐘，取400 µl上清液分別加入兩個微量離心管中，每管各加入1000 µl絕對酒精輕輕翻轉，放置冰上20分鐘後，以12000 rpm離心15分鐘，去除上清液，加入75%絕對酒精並將沉澱的DNA搖起，再以12000 rpm離心10分鐘，於37°C烘乾後加入100 µl二次水，放置隔夜後即可使用或放置-20°C冰箱永久保存。

基因表現載體的建構

在本論文中研究的黏附蛋白基因前端皆帶有一段訊息胜肽序列，透過生物資訊軟體SignalP 3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)確認訊息胜肽序列長度後，將引子設計在訊息胜肽序列之後，並於正向引子尾端加上EcoRI限制酵素的切位。利用PCR增幅標地基因後轉殖到yT&A，以定序確認序列的正確性，接著以EcoRI及yT&A上的限制酵素切位切下目標基因，再轉殖於表現載體pET30a上。

質體 DNA 快速篩選

取隔夜培養的菌液500 µl經12000 rpm離心5分鐘後吸去上清液，加入50 µl cracking buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA) 後將菌塊刮散，再加入50 µl等體積混合的phenol/chloroform溶液混合均勻，以15000 rpm離心5分鐘，取適量上清液以1%瓊脂凝膠電湧分析。

微量質體 DNA 萃取及瓊脂電泳膠體回收 DNA

使用High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taiwan)，依照產品建議的使用流程抽取質體DNA。另本研究使用Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan)，依照產品建議使用方式，由瓊脂電泳膠體中回收DNA。

重組蛋白的誘導表現

將帶有目標基因的重組表現質體pET30a轉型到大腸桿菌NovaBlue(DE3)或BL21(DE3)。接著將隔夜培養的重組菌株定量稀釋於新鮮培養液LB至OD₆₀₀約0.1，37°C搖晃培養至OD₆₀₀ 0.4至0.5之間，再以0.5 mM IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)誘導大量表現重組蛋白。重組蛋白的N端皆融合六個His-tag，因此這些重組蛋白接下來將藉由鎳樹脂(nickel resin)的親和力管柱來純化 (Novagen, Madison, WI)。

重組蛋白質之純化

由於本研究中的重組蛋白質皆帶有His-tag，因此能藉由鎳金屬離子和His氨基酸間的親和力純化出目標蛋白質。首先收集誘導表現目標蛋白的菌液，以10 ml lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl)復溶後，以超音波震盪打兩秒停五秒震盪一分鐘，連續震盪三次，再以15000 rpm 4°C離心收集菌塊，去除上清液後加入10 ml wash buffer I (50 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100)復溶後再次離心，並重複此步驟一次。接著將菌塊以10 ml wash buffer II (50 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% sodium deoxycholate)復溶後水平震盪二十分鐘後離心，並重複此步驟一次。離心完的菌塊以10 ml lysis buffer復溶後再次離心，最後以含有6 N尿素的binding buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.9)復溶

並水平震盪隔夜。隔日純化前再次離心，收集含有目標蛋白質的上清液進行接下來的純化。在每次純化前先以一次水充分洗過鎳樹脂，再依序加入12 ml的charge buffer (50 mM NiSO₄)及7 ml binding buffer後，加入離心過的蛋白質溶液，此時帶有His-tag的目標蛋白就能被鎳樹脂抓住而與其他蛋白質分離。接著依序加入25 ml binding buffer, 15 ml wash buffer (60 mM imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.9)及15 ml elute buffer (1 M imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.9)，並且在加入elute buffer 後以1.5 ml離心管蒐集溶離出的蛋白質，最後以7 ml strip buffer (100 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.9)洗去殘留在樹脂上的蛋白質及鎳離子，並將樹脂浸泡於strip buffer中冰於4°C保存。蒐集的蛋白質則以SDS-PAGE 分析目標蛋白質是否被純化出來。



抗體製備

純化的重組KpfD全長蛋白質(濃度約5mg)溶於含有6N 尿素的PBS，經過SDS-PAGE分離後再挖膠純化蛋白質，送波仕特公司施打兔子產生多株抗體。肌肉注射免疫兔子四次後，於免疫後第65日犧牲兔子，取得100 ml 多株抗體。

SDS-PAGE 分析

下層電泳分離膠 (running gel) 的成分為：13.5% gel : deionized water 3.7

ml ; running buffer 1 ml (3 ml Tris-HCl, pH 8.0) ; 10% SDS 80 μ l ; 40% (W/V) acrylamide solution (acrylamide : bis-acrylamide= 27.5 : 1) 3 ml ; TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyl-enediamide) 9 μ l ; 10% APS 100 μ l 。

上層膠 (stacking gel) 的成分為 : 5% gel : deionized water 1.9 ml ; stacking buffer 0.83 ml (1 ml Tris-HCl, pH 8.0) ; 10% SDS 33 μ l ; 40% (W/V) acrylamide solution (acrylamide : bis-acrylamide= 27.5 : 1) 0.4 ml ; TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyl-enediamide) 5 μ l ; 10% APS 60 μ l 。

取需要分析的菌體，加入適量的protein lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) 將菌體復溶後混合2X loading dye，於100°C 加熱10分鐘，插冰冷卻後後取適量滴入電泳膠中，通電140伏特20分鐘後改成90伏特100分鐘，將蛋白質分離後，取出電泳膠，以Coomassie blue (0.25 g Coomassie blue, 45 ml deionized water, 45 ml methanol, 10 ml glacial acetic acid) 進行染色。

Coomassie blue 染色

將凝膠電泳後的上層膠切去，浸泡於染色液(0.25g Coomassie Brilliant Blue R250, 45 ml methanol, 10 ml glacial acetic acid)室溫搖晃10至20分鐘後，將膠體浸於退染液I (40% methanol, 10% acetic acid)中室溫搖晃30分鐘並置換退染液I兩次，再將膠體置於退染液II(5% methanol, 7% acetic acid)中退染至能清楚看見蛋白質。

西方墨點法

蛋白質由SDS-PAGE分離後在緩衝液（25 mM Tris-base, 190 mM glycine, 20% methanol, pH 8.8）於25伏特200安培作用50分鐘轉印到纖維膜（PVDF, Immobilon™-P），進行清洗步驟：在含0.5% Tween-20的磷酸緩衝液中搖晃10分鐘共2次後以磷酸緩衝液清洗纖維膜一次，再置於含5% 脫脂牛奶的磷酸緩衝液中室溫下搖晃2小時或4°C下搖晃至隔日。重複清洗步驟後，將纖維膜置於適當稀釋比例的一級抗體中室溫下搖晃2小時，再重複清洗步驟後將纖維膜置於稀釋10000倍的anti-mouse IgG AP conjugate的二級抗體中搖晃一小時後再重複清洗步驟。最後將纖維膜浸泡在加有NBT 66 μ l和BCIP 33 μ l的緩衝液（100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5）當中呈色，呈色反應以去離子水清洗終止反應。

免疫螢光染色

細菌在LB培養液中於37°C 震盪培養16小時後，取20 μ l溶於磷酸緩衝液（phosphate buffered saline, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3），以12000 rpm離心5分鐘再復溶於磷酸緩衝液的方式，清洗菌體兩次，最後回溶於1ml無菌二次水。取經上述方式處理好的菌液樣品10 μ l滴於載玻片上，過火乾燥進行熱固定，再滴上250倍

稀釋的一級抗體，室溫下反應一小時後，以磷酸緩衝液清洗兩次。待載玻片乾燥後接著滴上100倍稀釋的二級抗體，於室溫下避光反應一小時，再以磷酸緩衝液清洗兩次。最後待載玻片乾燥後滴上10 μ l含有10%甘油的磷酸緩衝液，蓋上蓋玻片並以指甲油固定，於螢光顯微鏡下觀察。

血球凝集測試

參考文獻(2, 43)方法，血球處理：採台大動物實驗中心飼養天竺鼠的血液靜置於4 $^{\circ}$ C至分層，以3000 rpm 4 $^{\circ}$ C離心10分鐘後去除血漿，吸取紅血球經過離心清洗兩次後，以3%的比例稀釋於磷酸緩衝液。另外以丹寧酸(tannic acid)處理的紅血球則在經清洗後溶於含0.001%單寧酸的磷酸緩衝液，於37 $^{\circ}$ C水浴作用15分鐘後，再以PBS清洗兩次。細菌處理：隔夜培養的細菌濃縮至OD₆₀₀約為3，並將菌液經15000 rpm離心5分鐘再復溶於磷酸緩衝液的方式清洗兩次。最後將濃度為3%的天竺鼠紅血球以及3%經單寧酸熱處理過的天竺鼠血球與菌液以1:1混合，在室溫下靜置30分鐘後，觀察紅血球凝集現象。紅血球凝集的判斷方式參考文獻方法，紅血球經30分鐘後沉降於V型盤的底部，若紅血球的範圍和對照組(血球加磷酸緩衝液)相當，則判定為未凝集；若紅血球沉降的範圍大於對照組且輕搖V型盤時紅血球具有顆粒感，則判定為有凝集反應。而同一HA條件下菌液以二分之一倍率稀釋，最後一個判定為有凝集反應的菌液稀釋倍率即定義為此實驗的HA unit。

細胞培養

人類肝癌細胞株 HepG₂ 以含有10% 胎牛血清, 0.22% sodium bicarbonate, 0.03% L-glutamine, 100 unit/ml penicillin/streptomycin, 100 μ M sodium pyruvate及100 μ M NEAA之Dulbecco's modified Eagle's (DMEM)培養液培養。人類結腸細胞株 HCT-8以含有10% 胎牛血清, 0.22% sodium bicarbonate, 0.03% L-glutamine, 100 unit/ml penicillin/streptomycin, 100 μ M sodium pyruvate及100 μ M NEAA的RPMI 1640培養液培養。人類腸道細胞株 Int-407 以含10%胎牛血清的Basal Eagle培養液(BME, Hyclone-SH30159-03)培養。將細胞株置於含5%的37°C恆溫培養箱內培養, 每株細胞約三到四天分盤培養。細胞分盤時, 先將培養皿中舊的細胞培養液吸出, 加入10 ml 磷酸緩衝液沖洗一次後, 加入2 ml胰蛋白酶溶液(0.01% trypsin、0.02% EDTA), 後置於37°C恆溫培養箱內5分鐘, 使細胞脫離培養皿, 接著以10 ml含血清的細胞培養液沖洗細胞培養皿, 將細胞懸浮液吸至15 ml 離心管中, 於常溫離心2000 rpm 5分鐘後, 將上清液去除, 再加入適量細胞培養液, 反覆沖吸細胞塊均勻混合後, 取適量濃度種入培養皿中, 再將培養液補至總體積10 ml。

纖毛黏附細胞能力測試

參考文獻(18)方法，將腸道表皮細胞株Int407、人類大腸癌細胞株HCT-8及人類肝癌細胞株HepG2在37°C並含5% CO₂的恆溫培養箱以24孔細胞培養皿(TPP industries, France)培養，至每格細胞培養皿的細胞數約1X10⁵，以磷酸緩衝液清洗兩次以去除細胞培養液中補體成分，再加入不含胎牛血清的細胞培養液，將細胞置於恆溫培養箱中待用。另一方面欲測試黏附力的細菌菌液離心後以磷酸緩衝液清洗復溶兩次，並調整細菌濃度為1X10⁷ CFU/100 μl。之後每格細胞培養皿加入100 μl細菌，在37°C, 5% CO₂恆溫培養箱下靜置1小時，之後以磷酸緩衝液清洗兩次，每次作用10分鐘，再加入150 μl 0.1% Triton X-100室溫下震盪作用10分鐘將細胞打破，最後取100 μl菌液以磷酸緩衝液做系列稀釋，以塗盤或滴菌10 μl方式計數菌數，再推算原始與細胞黏附的菌數有多少，而黏附能力以推算回收率來代表，將反應前的總菌數與黏附細胞後回收的菌數相除，得到的百分比即代表回收率。

結果

Kpf 與愛德華氏菌 Etf 纖毛黏附蛋白胺基酸序列的比較

由附錄二得知 Kpf 基因組的結構，可發現是由五個基因所組成。KpfA 為纖毛主要的組成次單位，KpfB 為 chaperone 蛋白，KpfC 為 usher 蛋白，KpfD 為纖毛頂端黏附蛋白，KpfR 則是一個轉錄調控子。利用 NCBI BLAST 比對胺基酸序列，我們發現克雷白氏肺炎桿菌 KpfA 在功能上與序列上都與愛德華氏菌(*Edwardsiella tarda*)的 EtfA 相似(34)，而 EtfA 又與 *S. marcescens* 的第一型纖毛 FimA(28)，*Salmonella typhimurium* 的 LpfA(3)及 *Escherichia coli* O157:H7 的 Z4971(30)具有同源性，相似度依序為 68.9%，38.6%及 39.9%，另外我們比對克雷白氏肺炎桿菌黏附蛋白 KpfD 與愛德華氏菌纖毛黏附蛋白 EtfD 蛋白質序列(圖一)，發現具有約 20%相似度，這些證據顯示克雷白氏肺炎桿菌 Kpf 纖毛與愛德華氏菌 Etf 纖毛很可能為同源基因。愛德華氏菌屬於腸道桿菌科，是一伺機性病原菌，會造成魚類及鳥類腸道感染(20)，對 Etf 纖毛的研究不多，目前已知 Etf 纖毛由 *etfABCD* 基因組成(34)，而 Etf 纖毛具有凝集天竺鼠紅血球的能力。

重組第三型纖毛表現及凝血特性分析

重組第三型纖毛表現系統由黃登魁建構(48)，而我們為了確認不同的重組第三型纖毛表現的穩定性及其特性的再現性，分別以 SDS-PAGE 及西方點墨法偵測 MrkA 的單體及聚合體，再以 MrkA 專一性抗體螢光標定偵測細菌表面的重組第三型纖毛表現情形。如圖二(A)顯示，除了大腸桿菌 JM109[pGEMT]表面無法偵測到螢光訊號外，其餘菌株皆可在菌的周圍偵測到 MrkA 的螢光訊號。進一步透過天竺鼠紅血球凝集分析，我們確認重組的第三型纖毛的菌株具有生物活性，結果如圖二(B)顯示，表現 KpfD 纖毛頂端黏附蛋白的菌株 JM109[*pmrkABCkpfD*]觀察到凝集現象最高稀釋倍數可達 32 倍，對照於表現第三型纖毛的 JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*]其凝集現象的最高稀釋倍數為 2，其餘菌株則無觀察到凝集現象。其結果和先前的實驗結果(48)一致，我們再次確認此重組的 KpfD 黏附蛋白確實具有凝集天竺鼠紅血球的特性。而由圖二(C)結果顯示，此重組大腸桿菌 JM109[*pmrkABCkpfD*] 在 0.002M 濃度的甘露糖下凝血功能即受到抑制，表示 KpfD 的凝血現象為類似第一型纖毛 FimH 作用的甘露糖敏感型。

KpfD 專一性抗體製作

我們以 pET30a 為載體建構表現不含訊號胜肽的重組 KpfD 蛋白全長的質體 pCS₃(圖三 A)，將質體 pCS₃ 轉型於大腸桿菌 NovaBlue (DE3) 後隔夜培養於 LB 中，次日以十分之一比例稀釋至新鮮 LB 中，培養至 OD₆₀₀ 0.4~0.5 間，在加入 0.5 mM IPTG 於 37°C 誘導三小時，收集菌液並以鎳離子親合性管柱加以純化後，將蛋白質溶於含 6N 尿素的磷酸緩衝液中，接著進行 SDS-PAGE 分離會與鎳離子親合性管柱結合的雜質，挖膠再次純化(如圖三(B))，並以此回收的蛋白質對兔子進行肌肉免疫，得到 KpfD 專一性多株抗體。兔子免疫部分經由波仕特公司完成。接著我們以獲得的 KpfD 及實驗室過去製備的 MrkA 及 MrkD 專一性抗體分析重組第三型纖毛黏附蛋白表現情形。如圖三(C)所示，菌株 JM109[*pmrkABCkpfD*]可以分別被 MrkA 及 KpfD 抗體偵測到訊號，而菌株 JM109[*pmrkABCD*]則可以分別被 MrkA 及 MrkD 抗體偵測到訊號，結果顯示抗體的專一性良好，並且重組大腸桿菌確實能成功表現並組裝我們置換的頂端黏附蛋白。

利用 KpfD 專一性抗體分析重組第三型纖毛黏附蛋白 KpfD 表現情形

我們分別使用 MrkA 及 KpfD 專一性抗體偵測菌株 JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*]及 JM109[*pmrkABCkpfD*]表面的重組纖毛表現情形。結果如圖四所示，菌株 JM109[*pmrkABCkpfD*]可以 MrkA 及 KpfD 專一性一集抗體於菌體表面偵測到螢光訊號，顯示菌株 JM109[*pmrkABCkpfD*]確實組裝出以第三型纖毛 MrkA 為骨幹並表現 KpfD 黏附蛋白於頂端之重組纖毛。對照組菌株 JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*]可以 MrkA 專一性一集抗體於菌體表面偵測到螢光訊號，但無法以 KpfD 專一性一級抗體偵測到螢光訊號。

第一型纖毛黏附蛋白 FimH 與 KpfD 二級結構比對及 KpfD

三級結構預測



由於 KpfD 凝集活性可被甘露糖競爭，顯示 KpfD 和第一型纖毛的黏附蛋白 FimH 有相同的甘露糖敏感型凝集特性，因此我們進一步比對 KpfD 與大腸桿菌 FimH 的二級與三集結構。我們利用生物資訊工具於 PS² service (<http://ps2.life.nctu.edu.tw/>) 預測克雷白氏肺炎桿菌黏附蛋白 KpfD 二級結構，並與大腸桿菌第一型纖毛黏附蛋白 FimH 二級結構比對。結果如圖五(A)顯示，克雷白氏肺炎桿菌黏附蛋白 KpfD 具有一個 α -helix 和十七個 β -strand，大腸桿菌第一型纖毛黏附蛋白 FimH 則已知有兩個 α -helix 和十七個 β -strand，兩者在二級結構上具一定的相似程度。因此我們進一步以已解出結晶結構的大腸桿菌黏附蛋

白 FimH(4)為模版，同樣以生物資訊工具 PS² service (<http://ps2.life.nctu.edu.tw/>) 預測克雷白氏肺炎桿菌黏附蛋白 KpfD 三級結構，並以軟體 PyMOL 繪圖呈現。結果如圖五(B)顯示，KpfD 的 Receptor domain (第二十六至第一百七十八個胺基酸) 預測的三級結構與 FimH 的 Receptor domain 兩者的β-strand 在結構上高度相似。我們參考 2002 年發表的文獻(19)指出，比對兩百株尿道感染大腸桿菌，發現具有保留性胺基酸序列和甘露糖結合能力相關，並將胺基酸 N46 至 D54 區域稱做 mannose-binding pocket。比對 FimH 與 KpfD 的二級與三級結構，我們發現 KpfD 的胺基酸 D73 至 A83 區域與 FimH mannose-binding pocket 在三級結構上相似(圖五(C))，比對胺基酸序列亦具有保留性，因此我們推測克雷白氏肺炎桿菌黏附蛋白 KpfD 的胺基酸 D73 至 A83 為一段與甘露糖結合特性相關的區域。



重組第三型纖毛大腸桿菌 JM109[*pmrkABCkpfD*]凝集天竺鼠紅血球之醣類競爭分析

由於先前初步的研究指出KpfD對天竺鼠的凝血現象受到甘露糖的抑制，因此我們進一步研究不同醣類對KpfD凝血現象的影響。圖六(A)顯示當甘露糖的濃度為0.001M時，菌株JM109[*pmrkABCkpfD*]的凝血現象受到完全抑制，並隨甘露糖濃度下降有劑量依存性，當甘露糖的

濃度為0.00001M時不具有抑制凝血的能力。由於醣類和血型表面抗原有很大的關係，例如常見的人類血球分型中A型和O型血球只相差一個N-acetyl-D-glucoseamine (GalNAc)表面抗原，而另一種血球分型法Lewis A型及Lewis B型則只相差一個fucose，因此我們選定此兩種醣類進一步研究是否能抑制KpfD凝集活性。圖六(B)顯示當N-acetyl-D-glucoseamine的濃度為0.01M時，JM109[*pmrkABCkpfD*]的凝血現象由32倍下降至8倍，當N-acetyl-D-glucoseamine的濃度為0.001M時則完全不具有抑制凝血的能力。圖六(C)顯示當D-fucose的濃度為0.01M時，菌株JM109[*pmrkABCkpfD*]的凝血現象仍完全不受到抑制。此結果顯示不同醣類對抑制KpfD凝集天竺鼠紅血球的能力不同，以甘露醣抑制凝血的效果最佳，暗指甘露醣可能與KpfD受體結合區域的專一性有關。

重組第三型纖毛大腸桿菌 JM109[*pmrkABCkpfD*]凝集天竺鼠紅血球之抗體競爭分析

我們以KpfD專一性抗體證明在天竺鼠凝血測試中作用造成凝血的確實是KpfD黏附蛋白。圖六(D)顯示當KpfD專一性抗體的稀釋比例為100倍時，能完全抑制菌株JM109[*pmrkABCkpfD*]的凝血現象，並隨

抗體稀釋倍率上升而有劑量依存性，當抗體稀釋至 10000 倍時及失去保護作用。

重組第三型纖毛大腸桿菌 JM109[*pmrkABCkpfD*]凝集天竺鼠紅血球之蛋白質競爭分析

為了驗證我們預測的 KpfD 甘露糖結合區域是否正確，我們構築了兩段 KpfD 蛋白質表現載體(圖三 A)，分別是不包含預測的 KpfD 甘露糖結合區域的 pCS₁ 及包含預測的 KpfD 甘露糖結合區域的 pCS₂。將質體 pCS₁ 及 pCS₂ 轉型於大腸桿菌 NovaBlue (DE3)後隔夜培養於 LB 中，次日以十分之一比例稀釋至新鮮 LB 中，培養至 OD₆₀₀ 0.4~0.5 間，在加入 0.1 mM IPTG 於 37°C 誘導三小時，收集菌液並以鎳離子親合性管柱加以純化後，將蛋白質溶於含 6N 尿素的磷酸緩衝液中，接著進行 dialysis 降低磷酸緩衝液中尿素的濃度，使純化的重組蛋白質進行再折疊(refolding)，再以 18.3%SDS-PAGE 分離蛋白質(圖七 A)。純化後得到可溶性的蛋白質經過濃度分別為：KpfD₁: 0.129 µg/ml 及 KpfD₂: 0.18 µg/ml。接下來我們以不同濃度的重組 KpfD 蛋白進行蛋白質競爭測試，結果如圖七(B)所示，兩蛋白質在濃度 0.1ug/ml 時皆能競爭抑制凝血現象，但當蛋白質濃度更低時則兩蛋白質都無法競爭抑制凝血現象。此一結果無法證明我們預測的 KpfD mannose 結合重要序列正確與否。

重組第三型纖毛大腸桿菌 JM109[*pmrkABCkpfD*]細胞黏附能力測試

為了分析克雷白氏肺炎桿菌黏附蛋白 KpfD 對人類細胞株的黏附能力，我們使用三株不同細胞株：HepG₂ (人類肝癌細胞株)；HCT-8 (人類結腸癌細胞)；Int407 (人類腸道細胞株)，進行細胞黏附試驗，以細菌的回收率代表黏附能力，結果如圖八(A)所示。我們發現三株菌株 JM109[*pmrkABC*]、JM109[*pmrkABCD*]及 JM109[*pmrkABCkpfD*]對三株人類細胞株的黏附力的趨勢大致相同，其中菌株 JM109[*pmrkABCD*]在不同的細胞株中都有相對最高的回收率，而菌株 JM109[*pmrkABC*]及 JM109[*pmrkABCkpfD*]則有相近且相對較低的回收率，而 KpfD 對人類細胞株的黏附能力，與不表現任何黏附蛋白的對照組 JM109[*pmrkABC*]程度相當甚至更低。另外我們比較三株人類細胞株，發現重組大腸桿菌對 HepG₂ 細胞的黏附能力明顯比其他細胞株高，顯示 HepG₂ 細胞是此實驗較佳的細胞株模型。

我們進一步以吉姆薩氏(*geimsa*)染劑染色細胞，於正立式顯微鏡下觀察重組大腸桿菌與 HepG₂ 細胞黏附的情形。結果如圖八(C)顯示，菌株 JM109[*pmrkABCD*]較傾向於細菌之間自我聚集(*autoaggregation*)，造成回收率偏高，而菌株 JM109[*pmrkABC*]及 JM109[*pmrkABCkpfD*]則是以單一隻細菌的方式黏附於細胞上，因此回收率較低卻較有代表

性。

克雷白氏肺炎桿菌 Kpf 纖毛基因組的建構與表現

為了避免重組第三型纖毛過度表現造成菌體自我聚集的問題，我們分別將包含調控區域及不含調控區域的 Kpf 纖毛基因組以專一性引子放大，再接到 yT&A 載體上，送入大腸桿菌 JM109 中表現，其中 *kpfABCD* 以順著載體上 promoter 的方向接入，*kpfRABCD* 則逆著載體上 promoter 的方向接入(圖九 A)。接著我們以 0.5 mM IPTG 誘導表現後進行蛋白質電泳分析，結果如圖九(B)所示，我們可於 16.2% SDS-PAGE 分離出菌株 JM109[*pkpfRABCD*]於分子量約 20 kDa 處大量表現一蛋白質，推測可能是克雷白氏肺炎桿菌 Kpf 纖毛的主要組成次單位 KpfA(分子量為 19.4 kDa)，且此纖毛不需要 IPTG 進行誘導就能表現，而菌株 JM109[*pkpfABCD*]的表現情形則是與送入 yT&A 載體的對照組菌株相同。同時我們以 KpfD 專一性抗體進行西方點墨法，發現菌株 JM109[*pkpfRABCD*]可於分子量約 30 kDa 處偵測到訊號，此大小約為去除信號肽的 KpfD 蛋白質分子量。

我們進一步以 KpfD 專一性抗體利用免疫螢光染色的方式，偵測帶有 Kpf 纖毛基因組質體的大腸桿菌表面纖毛表現情形，結果如圖十所示，菌株 JM109[*pkpfABCD*]無法在菌體表面偵測到螢光訊號，而菌株 JM109[*pkpfRABCD*]則可以在菌體表面偵測到螢光訊號。此結果顯

示，菌株 JM109[*pkpfRABCD*]透過未知的分子調控 *kpfR* 基因，可以成功組裝克雷白氏肺炎桿菌 Kpf 纖毛至菌體表面，並且當菌株缺乏 *kpfR* 基因時 Kpf 纖毛就無法表現，顯示 *kpfR* 基因透過未知的分子及路徑參與調控 Kpf 纖毛的表現。

Kpf 纖毛凝集天竺鼠紅血球特性分析

我們接著以大腸桿菌 JM109[*pkpfABCD*]及 JM109[*pkpfRABCD*]進行天竺鼠紅血球凝集能力測試，分析 Kpf 纖毛的生物活性。圖十一(A)顯示大腸桿菌 JM109[*pkpfRABCD*]具有最高稀釋倍數為 2 的凝集現象，而大腸桿菌 JM109[*pkpfABCD*]則即使在 1 倍菌液濃度也觀察不到凝集現象，此結果與前述實驗結果相吻合。我們進一步以甘露糖競爭凝血現象，圖十一(B)顯示當甘露糖的濃度為 0.001M 時，菌株 JM109[*pkpfRABCD*]的凝血現象受到完全抑制，此結果也與我們重組第三型纖毛 JM109[*pmrkABCkpfD*]的結果得以互相關述。

討論

我們發現表現 KpfD 黏附蛋白的重組大腸桿菌具有很高的凝集天竺鼠紅血球能力，我們可以用 KpfD 專一性抗體去競爭掉此凝集現象，顯示造成重組大腸桿菌凝血現象的確是 KpfD 蛋白質。我們發現此凝血現象會受低濃度的 mannose 所抑制，不同於愛德華氏菌 Etf 纖毛的凝血現象不受 D-mannose 抑制，但對於 fetuin 及 N-acetylneuraminic acid 這兩種醣類的存在敏感(34)，克雷白氏肺炎感菌 Kpf 纖毛的凝血特性和大腸桿菌第一型纖毛的特性相似(13)，因此我們比對了 KpfD 與大腸桿菌 Fim 的胺基酸序列及二級結構，並參考文獻(19, 26, 32, 36)指出的大腸桿菌 FimH 與 mannose 結合的保留序列及重要胺基酸，分別是 N46 至 D54 區域，特別是 Asn46, Asp47 及 Asp54 三個胺基酸，另外還有疏水性胺基酸例如 Phe1, Ile13, Try48, Ile52, Tyr137 及 Phe142，由於當蛋白質折疊成三集結構時分布在重要胺基酸區域四周，對 FimH 結合甘露醣的能力也有不同程度的貢獻。我們根據大腸桿菌 Fim 的 mannose 結合保留位置，推測出克雷白氏肺炎感菌 KpfD 與 mannose 結合的重要序列可能位於 D73 至 A83 之間，因此我們設計兩段不同大小的 KpfD 表現載體，一段不包含我們預測的 KpfD mannose 結合重要序列，另一個則是包含 KpfD 黏附蛋白 mannose 結合重要序列的全長受體結合區域，分別純化蛋白質進行競爭性凝血實驗。實驗結果顯示兩蛋白質在濃度 0.1ug/ml 時皆能競爭抑制凝血現象，

但當蛋白質濃度更低時則兩蛋白質都無法競爭抑制凝血現象。此一結果無法證明我們預測的 KpfD mannose 結合重要序列正確與否，可能的原因推測有三：(一)競爭實驗中純化的蛋白質濃度最高僅 0.1ug/ml，可能因為濃度太低因此不易比較出包含或不包含 mannose 結合區域的蛋白質競爭凝血能力的差別。(二)由於此二蛋白質大量表現後形成不溶性的內含體，因此我們以 6N 尿素使蛋白質變性加以純化，再用透析方式使蛋白質重新折疊，而此過程中蛋白質可能折疊不完全，造成純化的蛋白質構型和天然構型有所不同，例如原本裸露的結合位置可能因錯誤折疊而被包覆至結構裡面，造成兩種蛋白質競爭凝血能力無差別。(三)依照文獻指出(1)，突變 FimH 的 pilin 或受體結合區域會使 mannose 結合區域形成結構上的變構(allosteric)，使 FimH 對 mannose 的親和力大幅增加；另外文獻也指出除了保留性甘露糖結合區域外，其他在三級結構上分布於此區域四周的胺基酸所帶有的特性也會影響 FimH 對 mannose 結合能力(19)，因此除了我們所預測的 mannose 結合位置之外，其他胺基酸可能也扮演 KpfD 對甘露糖結合的重要角色。

我們以大腸桿菌的 FimH 被報導的結晶結構(4)當模版，預測克雷白氏肺炎感菌 KpfD 的三級結構，我們發現 KpfD 黏附蛋白的 receptor 結合區域結構和第一型纖毛的黏附蛋白 FimH 相似度極高，皆為 11 至 12 個 β -strand 以正-反股配對的方式，形成穩定的手套狀結構，兩者間最大差別在於 FimH 有一個 α -helix 在 receptor 結合區域的第五與第六個

β -strand之間，而KpfD的唯一一個 α -helix則在receptor及pilin區域中間連結處。但比對KpfD的pilin區域三級結構，卻和FimH不同反而與克雷白氏第三型纖毛黏附蛋白MrkD的pilin區域結構相似，以 α -helix為主要組成並有較短的 β -strand。由此可以推測本實驗室所建構以重組第三型纖毛表現不同的頂端黏附蛋白有組裝聚合的差異，可能是因為這些被替換的黏附蛋白的pilin區域與第三型纖毛主要組成次單位MrkA在三級結構上的差異，導致黏附蛋白與MrkA次單位在聚合時的交互作用能力改變，進而影響到重組纖毛的聚合及穩定，因此大腸桿菌的重組纖毛表現系統在此也增加我們探討黏附因子特性時的變因。



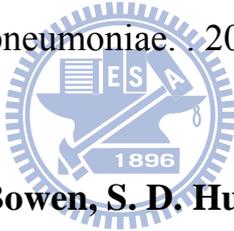
我們進一步選殖克雷白氏肺炎感菌Kpf纖毛的基因組，並於大腸桿菌中表現，我們發現調控子KpfR的存在與否會影響Kpf纖毛的表現。分析KpfR可能的domain(附錄四)，發現KpfR蛋白質C端具有GerE功能性區域(第170個到第227個氨基酸區域)。GerE屬於LuxR/FixJ蛋白質家族，此蛋白質家族依啟動機制不同分為三個次家族：(1) 雙分子調控系統(two-component)中磷酸化活化的蛋白質，例如：調控腸內菌胞外多醣生成的RcsB (2) 受到細菌的quorum sensing分子活化或抑制的蛋白質，例如：調控carbapenem抗生素合成的CarR (3) 不同於

以上兩者，以自我調控方式活化或抑制的蛋白質，例如：Ger，會以 helix-turn-helix 結構形成雙複合體去結合DNA進行活化。未來我們希望盡一步KpfR如何調控Kpf纖毛表現的機制。



參考文獻

1. **Aprikian, P., V. Tchesnokova, B. Kidd, O. Yakovenko, V. Yarov-Yarovoy, E. Trinchina, V. Vogel, W. Thomas, and E. Sokurenko.** 2007. Interdomain interaction in the FimH adhesin of *Escherichia coli* regulates the affinity to mannose. *J Biol Chem* **282**:23437-46.
2. **Barry, E. M., Z. Altboum, G. Losonsky, and M. M. Levine.** 2003. Immune responses elicited against multiple enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae and mutant LT expressed in attenuated *Shigella* vaccine strains. *Vaccine* **21**:333-40.
3. **Baumler, A. J., and F. Heffron.** 1995. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **177**:2087-97.
4. **Bouckaert, J., J. Berglund, M. Schembri, E. De Genst, L. Cools, M. Wuhrer, C. S. Hung, J. Pinkner, R. Slattegard, A. Zavialov, D. Choudhury, S. Langermann, S. J. Hultgren, L. Wyns, P. Klemm, S. Oscarson, S. D. Knight, and H. De Greve.** 2005. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *Mol Microbiol* **55**:441-55.

5. **Bullitt, E., C. H. Jones, R. Striker, G. Soto, F. Jacob-Dubuisson, J. Pinkner, M. J. Wick, L. Makowski, and S. J. Hultgren.** 1996. Development of pilus organelle subassemblies in vitro depends on chaperone uncapping of a beta zipper. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:12890-5.
6. **Carpenter, J. L.** 1990. Klebsiella pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev Infect Dis* **12**:672-82.
7. **Chien-Chen Wu, C.-P. F., and Huei-Ling Peng.** 2005. Comparative analysis and prevalence study of the fimbrial gene clusters in *Klebsiella pneumoniae*. . 2005 年細菌學研討會會議論文.
8. **Clayton, D. J., A. J. Bowen, S. D. Hulme, A. M. Buckley, V. L. Deacon, N. R. Thomson, P. A. Barrow, E. Morgan, M. A. Jones, M. Watson, and M. P. Stevens.** 2008. Analysis of the role of 13 major fimbrial subunits in colonisation of the chicken intestines by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis reveals a role for a novel locus. *BMC Microbiol* **8**:228.
9. **Darfeuille-Michaud, A., C. Jallat, D. Aubel, D. Sirot, C. Rich, J. Sirot, and B. Joly.** 1992. R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. *Infect Immun* **60**:44-55.

10. **Di Martino, P., N. Cafferini, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud.** 2003. Klebsiella pneumoniae type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. Res Microbiol **154**:9-16.
11. **Di Martino, P., V. Livrelli, D. Sirot, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud.** 1996. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing Klebsiella pneumoniae strains involved in nosocomial infections. Infect Immun **64**:2266-73.
12. **Fader, R. C., K. Gondesen, B. Tolley, D. G. Ritchie, and P. Moller.** 1988. Evidence that in vitro adherence of Klebsiella pneumoniae to ciliated hamster tracheal cells is mediated by type 1 fimbriae. Infect Immun **56**:3011-3.
13. **Firon, N., S. Ashkenazi, D. Mirelman, I. Ofek, and N. Sharon.** 1987. Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type 1 fimbriated Escherichia coli to yeast and intestinal epithelial cells. Infect Immun **55**:472-6.
14. **Firon, N., I. Ofek, and N. Sharon.** 1984. Carbohydrate-binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of enterobacteria. Infect Immun **43**:1088-90.
15. **Gerlach, G. F., S. Clegg, and B. L. Allen.** 1989. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of Klebsiella pneumoniae. J Bacteriol **171**:1262-70.

16. **Han, S. H.** 1995. Review of hepatic abscess from *Klebsiella pneumoniae*. An association with diabetes mellitus and septic endophthalmitis. *West J Med* **162**:220-4.
17. **Hornick, D. B., B. L. Allen, M. A. Horn, and S. Clegg.** 1992. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infect Immun* **60**:1577-88.
18. **Huang, Y. J., C. C. Wu, M. C. Chen, C. P. Fung, and H. L. Peng.** 2006. Characterization of the type 3 fimbriae with different MrkD adhesins: possible role of the MrkD containing an RGD motif. *Biochem Biophys Res Commun* **350**:537-42.
19. **Hung, C. S., J. Bouckaert, D. Hung, J. Pinkner, C. Widberg, A. DeFusco, C. G. Auguste, R. Strouse, S. Langermann, G. Waksman, and S. J. Hultgren.** 2002. Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol Microbiol* **44**:903-15.
20. **Janda, J. M., S. L. Abbott, S. Kroske-Bystrom, W. K. Cheung, C. Powers, R. P. Kokka, and K. Tamura.** 1991. Pathogenic properties of *Edwardsiella* species. *J Clin Microbiol* **29**:1997-2001.
21. **Jong, G. M., T. R. Hsiue, C. R. Chen, H. Y. Chang, and C. W. Chen.** 1995. Rapidly fatal outcome of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in alcoholics. *Chest* **107**:214-7.

22. **Ko, W. C., D. L. Paterson, A. J. Sagnimeni, D. S. Hansen, A. Von Gottberg, S. Mohapatra, J. M. Casellas, H. Goossens, L. Mulazimoglu, G. Trenholme, K. P. Klugman, J. G. McCormack, and V. L. Yu.** 2002. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis* **8**:160-6.
23. **Langstraat, J., M. Bohse, and S. Clegg.** 2001. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infect Immun* **69**:5805-12.
24. **Lau, Y. J., B. S. Hu, W. L. Wu, Y. H. Lin, H. Y. Chang, and Z. Y. Shi.** 2000. Identification of a major cluster of *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with liver abscess in Taiwan. *J Clin Microbiol* **38**:412-4.
25. **Low, A. S., N. Holden, T. Rosser, A. J. Roe, C. Constantinidou, J. L. Hobman, D. G. Smith, J. C. Low, and D. L. Gally.** 2006. Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Environ Microbiol* **8**:1033-47.
26. **Madison, B., I. Ofek, S. Clegg, and S. N. Abraham.** 1994. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar-binding specificities of their FimH adhesins. *Infect*

- Immun **62**:843-8.
27. **Nassif, X., and P. J. Sansonetti.** 1986. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect Immun* **54**:603-8.
28. **Nichols, W. A., S. Clegg, and M. R. Brown.** 1990. Characterization of the type 1 fimbrial subunit gene (*fimA*) of *Serratia marcescens*. *Mol Microbiol* **4**:2119-26.
29. **Pearson, M. M., M. Sebahia, C. Churcher, M. A. Quail, A. S. Seshasayee, N. M. Luscombe, Z. Abdellah, C. Arrosmith, B. Atkin, T. Chillingworth, H. Hauser, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, H. Norbertczak, E. Rabinowitsch, D. Walker, S. Whithead, N. R. Thomson, P. N. Rather, J. Parkhill, and H. L. Mobley.** 2008. Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. *J Bacteriol* **190**:4027-37.
30. **Perna, N. T., G. Plunkett, 3rd, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamouisis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch, and F. R. Blattner.** 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*

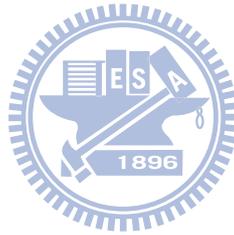
- O157:H7. *Nature* **409**:529-33.
31. **Podschun, R., and U. Ullmann.** 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* **11**:589-603.
 32. **Ponniah, S., R. O. Endres, D. L. Hasty, and S. N. Abraham.** 1991. Fragmentation of *Escherichia coli* type 1 fimbriae exposes cryptic D-mannose-binding sites. *J Bacteriol* **173**:4195-202.
 33. **Sahly, H., and R. Podschun.** 1997. Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. *Clin Diagn Lab Immunol* **4**:393-9.
 34. **Sakai, T., K. Kanai, K. Osatomi, and K. Yoshikoshi.** 2003. Identification of a 19.3-kDa protein in MRHA-positive *Edwardsiella tarda*: putative fimbrial major subunit. *FEMS Microbiol Lett* **226**:127-33.
 35. **Sauer, F. G., M. Barnhart, D. Choudhury, S. D. Knight, G. Waksman, and S. J. Hultgren.** 2000. Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Curr Opin Struct Biol* **10**:548-56.
 36. **Schembri, M. A., H. Hasman, and P. Klemm.** 2000. Expression and purification of the mannose recognition domain of the FimH adhesin. *FEMS Microbiol Lett* **188**:147-51.
 37. **Soto, G. E., and S. J. Hultgren.** 1999. Bacterial adhesins:

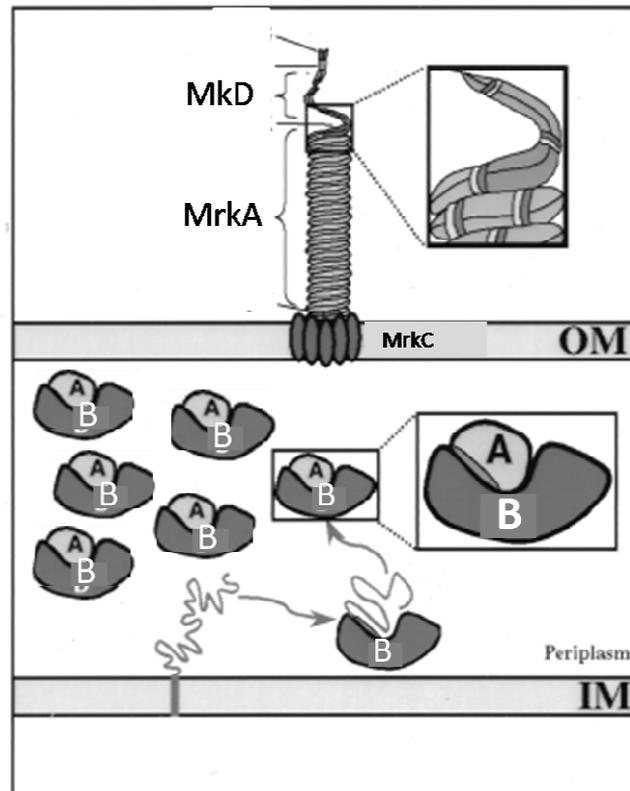
- common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* **181**:1059-71.
38. **Straus, D. C., D. L. Atkisson, and C. W. Garner.** 1985. Importance of a lipopolysaccharide-containing extracellular toxic complex in infections produced by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* **50**:787-95.
39. **Struve, C., M. Bojer, and K. A. Krogfelt.** 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect Immun* **76**:4055-65.
40. **Tarkkanen, A. M., R. Virkola, S. Clegg, and T. K. Korhonen.** 1997. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infect Immun* **65**:1546-9.
41. **Tarkkanen, A. M., B. Westerlund-Wikstrom, L. Erkkila, and T. K. Korhonen.** 1998. Immunohistological localization of the MrkD adhesin in the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* **66**:2356-61.
42. **Townsend, S. M., N. E. Kramer, R. Edwards, S. Baker, N. Hamlin, M. Simmonds, K. Stevens, S. Maloy, J. Parkhill, G. Dougan, and A. J. Baumler.** 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences.

- Infect Immun **69**:2894-901.
43. **Vanterpool, E., F. Roy, and H. M. Fletcher.** 2004. The vimE gene downstream of vimA is independently expressed and is involved in modulating proteolytic activity in Porphyromonas gingivalis W83. Infect Immun **72**:5555-64.
44. **Wang, J. H., Y. C. Liu, S. S. Lee, M. Y. Yen, Y. S. Chen, J. H. Wang, S. R. Wann, and H. H. Lin.** 1998. Primary liver abscess due to Klebsiella pneumoniae in Taiwan. Clin Infect Dis **26**:1434-8.
45. **Wu, K. M., L. H. Li, J. J. Yan, N. Tsao, T. L. Liao, H. C. Tsai, C. P. Fung, H. J. Chen, Y. M. Liu, J. T. Wang, C. T. Fang, S. C. Chang, H. Y. Shu, T. T. Liu, Y. T. Chen, Y. R. Shiau, T. L. Lauderdale, I. J. Su, R. Kirby, and S. F. Tsai.** 2009. Genome sequencing and comparative analysis of Klebsiella pneumoniae NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. J Bacteriol **191**:4492-501.
46. **Yeh, K. M., A. Kurup, L. K. Siu, Y. L. Koh, C. P. Fung, J. C. Lin, T. L. Chen, F. Y. Chang, and T. H. Koh.** 2007. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for Klebsiella pneumoniae liver abscess in Singapore and Taiwan. J Clin Microbiol **45**:466-71.
47. **周慧琦.** 中華民國九十三年六月. 以基因微陣列比較 RNA 表現

發現台灣引起肝膿瘍之克雷伯氏肺炎桿菌與 allantoin 代謝有關之特有的染色體片段. 國立臺灣大學醫學院微生物學研究所
博士論文.

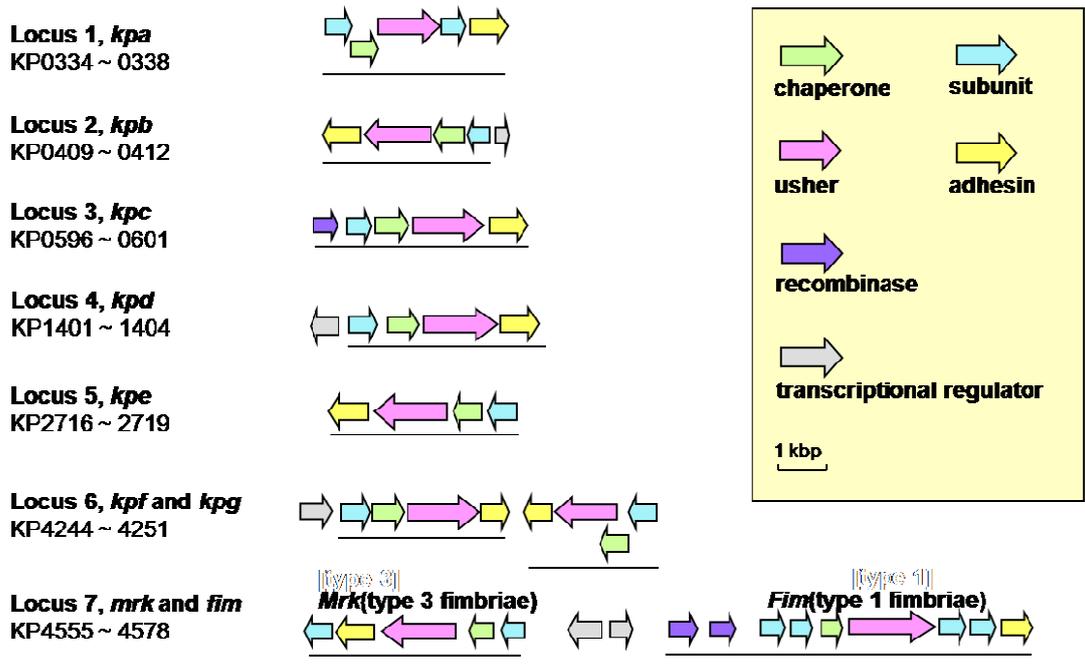
48. 黃登魁. 中華民國九十六年六月. 克雷白氏肺炎桿菌
NTUH-K2044 中纖毛的功能性分析. 國立交通大學生物科技學
系 碩士論文.





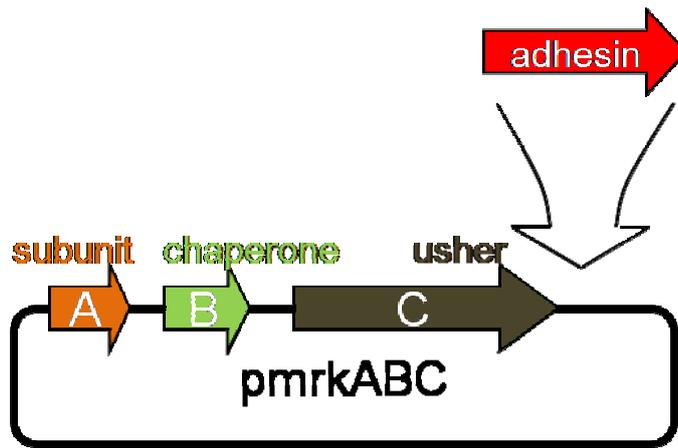
附錄一 第三型纖毛組裝機制

參考大腸桿菌 P 型纖毛組裝機制繪圖。圖中縮寫 A 表示第三型纖毛單元體 MrkA, B 代表 chaperone MrkB, MrkC 為位於細胞膜外的 usher, MrkD 代表纖毛頂端黏附蛋白。纖毛單元體 MrkA 及 MrkD 以第二型蛋白分泌系統 Sec 分泌途徑將之送到細菌內膜, 與位於周膜間隙的 chaperon 蛋白 MrkB 交互作用, 幫助纖毛單元體正常折疊並保護其不受周膜間隙的蛋白酶水解, 接著 chaperon-subunit 複合體與細菌外膜的 usher 蛋白 MrkC 交互作用, 將纖毛單元體送出並固著於外膜, 形成毛髮狀結構的纖毛。



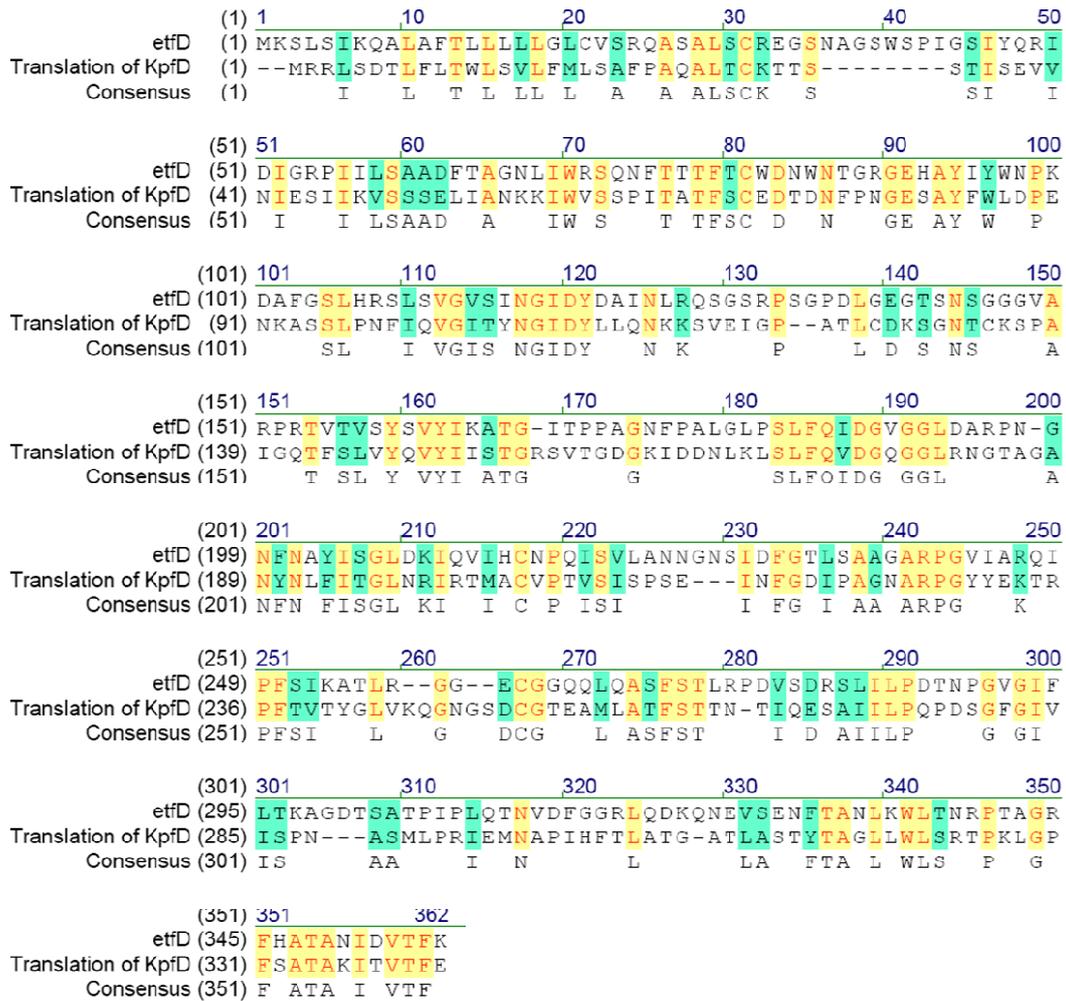
附件二 本實驗室預測之克雷白氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 所有纖毛基因組的基因座

組織侵襲性克雷白氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 完整基因組定序完成後，本實驗室以生物資訊方式分析其基因體，發現除了第一型及第三型纖毛外，另有七套類似纖毛基因組的基因座，分別命名為 *kpa*, *kpb*, *kpc*, *kpd*, *kpe*, *kpf*, *kpg* 基因簇。



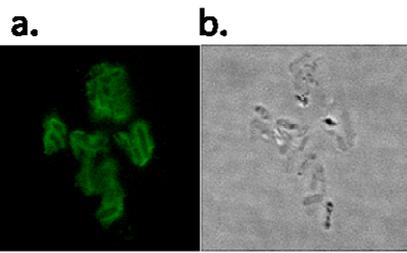
附件三 重組第三型纖毛表現質體建構方式示意圖

本實驗室過去透過置換第三型纖毛頂端的黏附蛋白的方式建構了重組第三型纖毛表現質體，建構方式是將第三型纖毛的 mrkABC 基因與 mrkD，fimH，kpaE，kpbD，kpcD，kpdD，kpeD，kpfD，kpgD 共九套纖毛頂端黏附蛋白基因重組，最後將質體送入大腸桿菌表現。

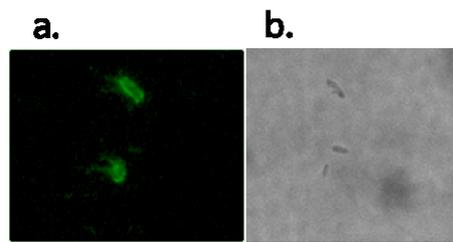


圖一、KpfD 與愛德華氏菌 Etf 纖毛黏附蛋白 EtfD 胺基酸序列的比較。參考文獻(34)所發表的愛德華氏菌 EtfD 黏附蛋白胺基酸序列，利用 NCBI BLAST 比對克雷白氏肺炎桿菌 KpfD 與 EtfD 胺基酸序列。兩種黏附蛋白胺基酸序列相似度約 20%。圖中第三行標示之胺基酸為 EtfD 與 KpfD 具保留性的胺基酸，底色灰色標示的為 EtfD 與 KpfD 不同但具相似屬性的胺基酸。

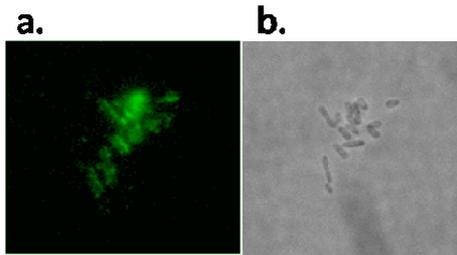
(A) *pmrkABCD*



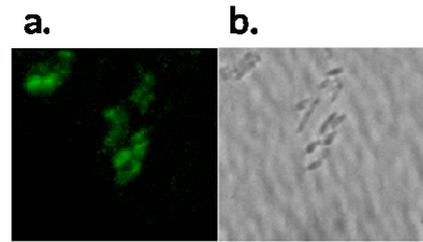
(B) *pmrkABCkpaE*



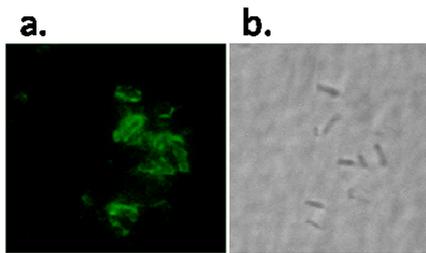
(C) *pmrkABCkpbD*



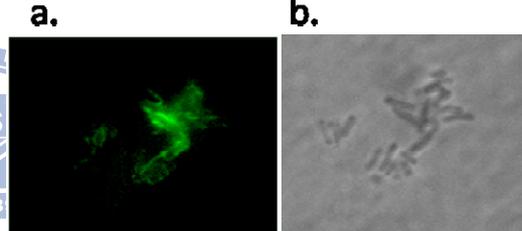
(D) *pmrkABCkpcD*



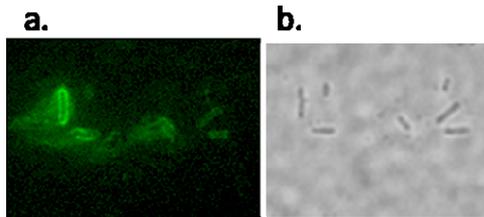
(E) *pmrkABCkpdD*



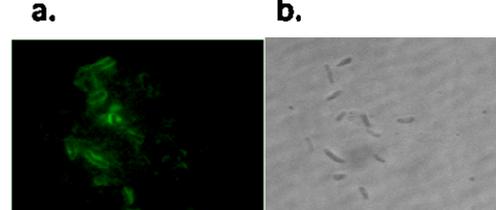
(F) *pmrkABCkpeD*



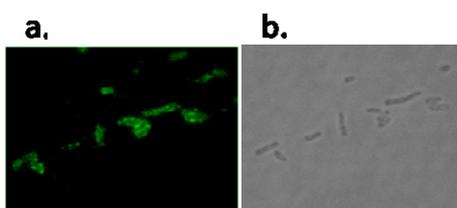
(G) *pmrkABCkpfD*



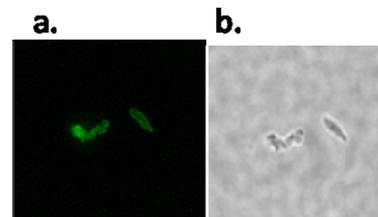
(H) *pmrkABCkpgD*

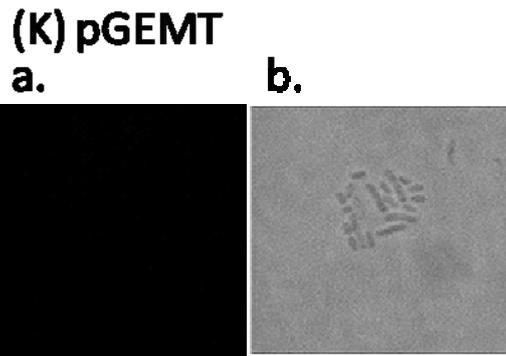


(I) *pmrkABCfimH*

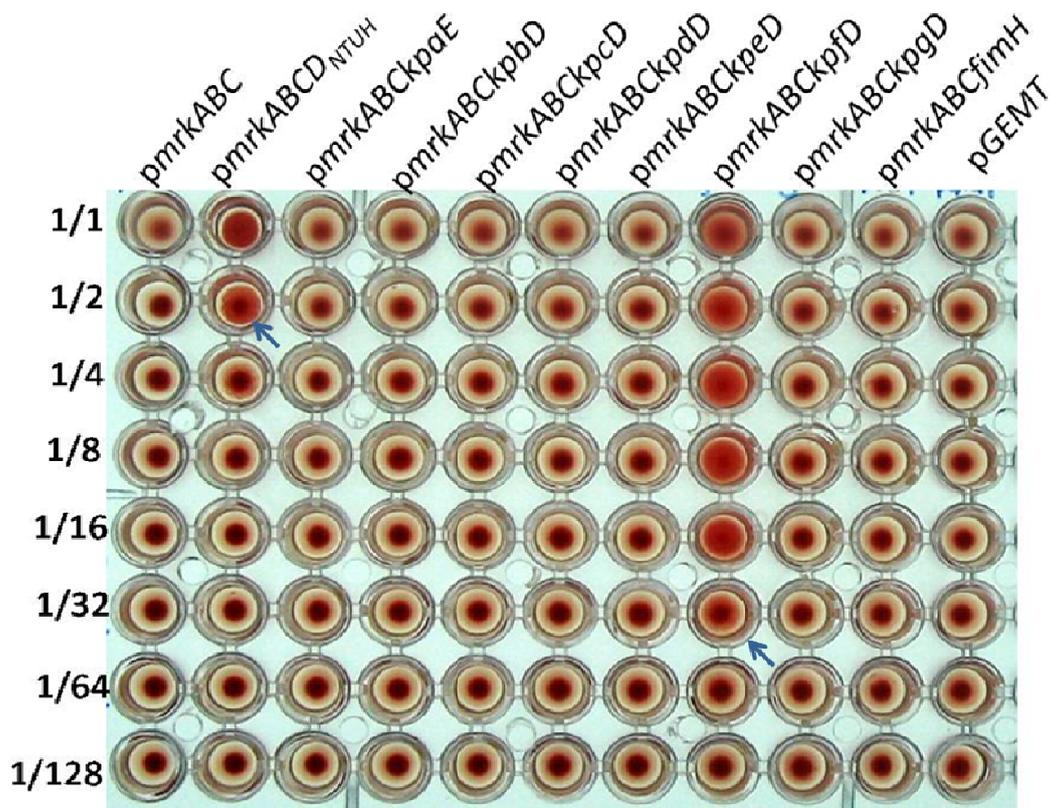


(J) *pmrkABC*



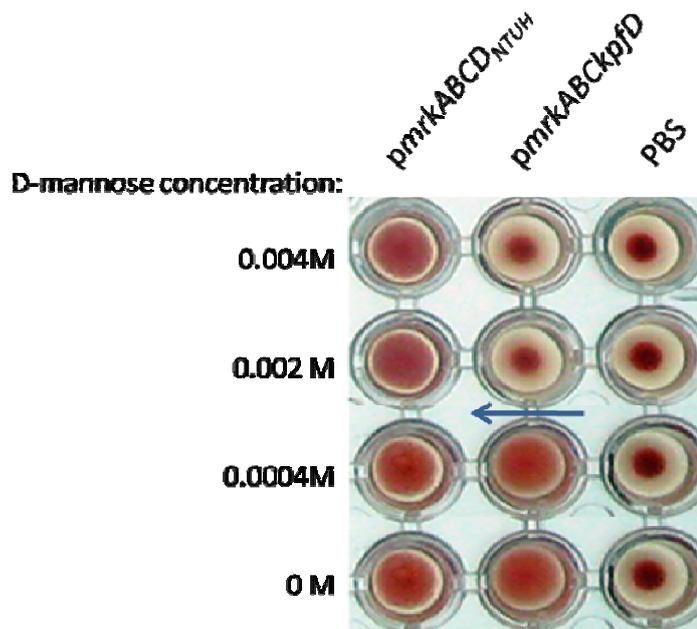


圖二 (A)、重組第三型纖毛大腸桿菌 MrkA 免疫螢光染色分析
 以 MrkA 一級抗體偵測大腸桿菌重組第三型纖毛的表現，並與 FITC
 conjugated anti-mouse IgG 二級抗體反應之後，於螢光顯微鏡下觀察螢
 光訊號。圖中 a 代表螢光訊號觀察結果，圖中 b 代表明視野下觀察結
 果。(A) JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*]; (B) JM109[*pmrkABCkpaE*]; (C)
 JM109[*pmrkABCkpbD*]; (D) JM109[*pmrkABCkpcD*]; (E)
 JM109[*pmrkABCkpdD*]; (F) JM109[*pmrkABCkpeD*]; (G)
 JM109[*pmrkABCkpfD*]; (H) JM109[*pmrkABCkpgD*]; (I)
 JM109[*pmrkABCfimH*]; (J) JM109[*pmrkABC*]; (K) JM109[pGEMT]



圖二(B)、重組第三型纖毛大腸桿菌凝集天竺鼠紅血球分析

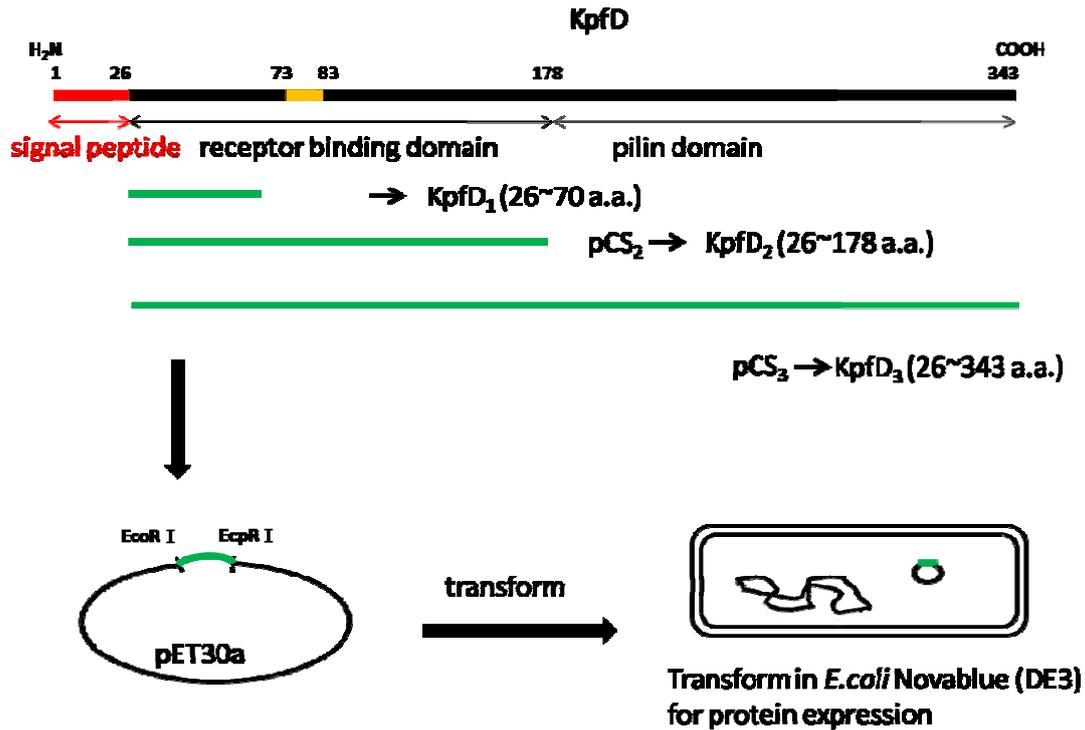
將培養於 GCAA 培養液中二十小時的菌液，系列稀釋後與 3%天竺鼠紅血球以 1:1 體積比例混合，於 96 孔 V 型盤靜置觀察凝集現象。圖中箭頭所指部分為此 HA 試驗中，具凝血現象的最終稀釋倍率。正對照組 JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*]觀察到凝集現象的最高稀釋倍數為 2；負對照組 JM109[*pmrkABC*]及 JM109[pGEMT]在 1 倍菌液濃度下仍無觀察到凝集現象；菌株 JM109[*pmrkABCKpfD*]觀察到凝集現象最高稀釋倍數可達 32 倍；其餘菌株則無觀察到凝集現象。



圖二(C)、重組大腸桿菌 JM109[*pmrkABCkpfD*]凝集天竺鼠紅血球甘露糖競爭分析

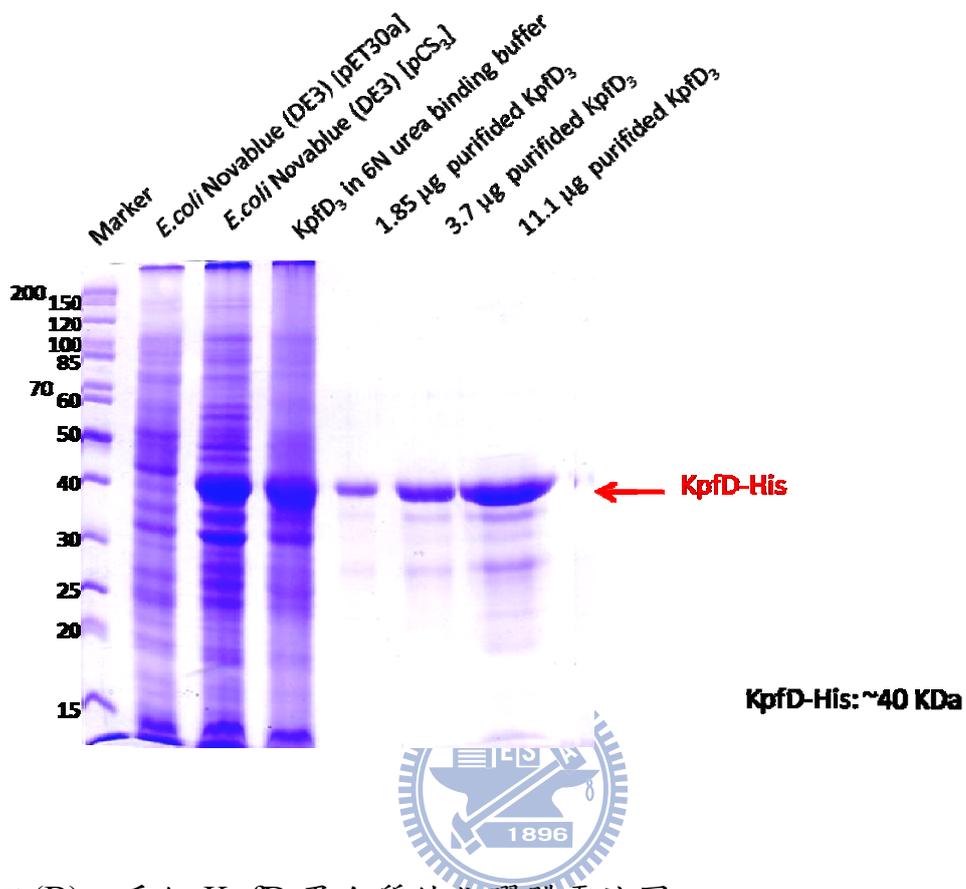
將培養於 GCAA 培養液中二十小時的一倍菌液與不同濃度甘露糖混合後室溫作用一小時，再與 3%天竺鼠紅血球以 1:1 體積比例混合，於 96 孔 V 型盤靜置觀察凝集現象。圖中箭頭所分際部分為此 HA 試驗中，具凝集現象與不具凝集現象的糖類稀釋倍率。菌株

JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*]在不同濃度的甘露糖下凝血功能不受抑制，菌株 JM109[*pmrkABCkpfD*] 在 0.002 M 濃度的甘露糖下凝血功能即受到抑制。



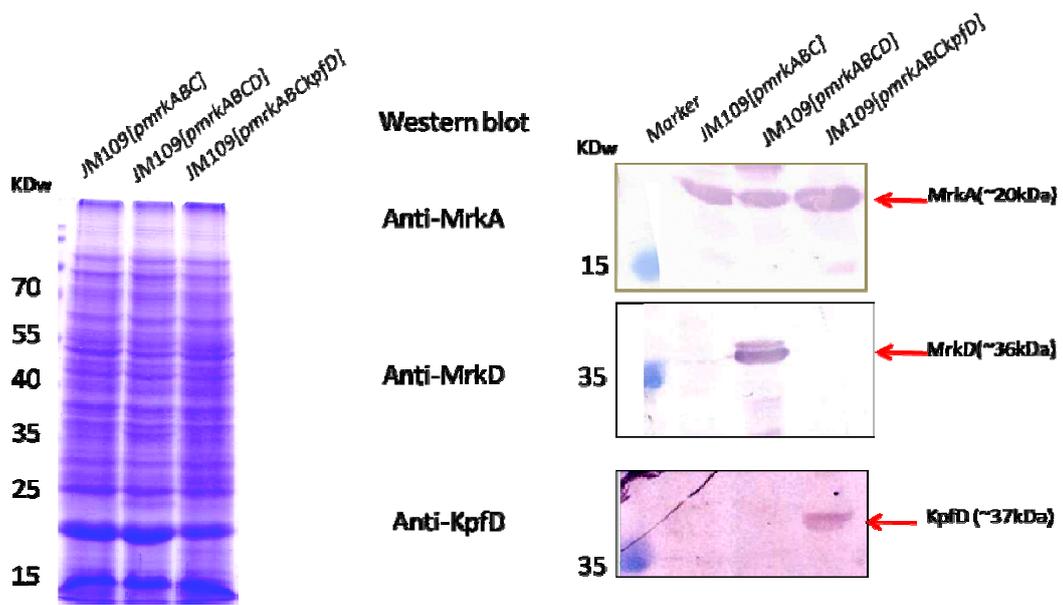
圖三(A)、重組 KpfD 表現質體 DNA 建構方式示意圖

以 *K. pneumonia* NTUH-K2044 染色體 DNA 為模版，以專一性引子 PCR 放大 DNA 片段，以 TA 選殖到 yT&A 載體上，再以引子上帶有的酵素切位轉殖至表現載體 pET30a 上，最終得到表現三種不同長度的重組 KpfD 表現質體，分別命名為 pCS₁、pCS₂ 及 pCS₃。



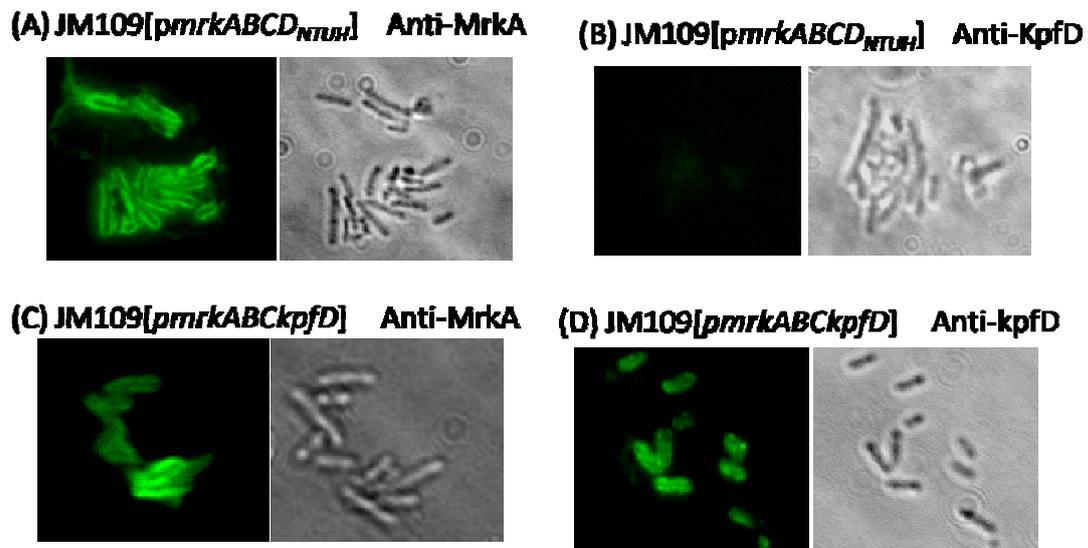
圖三(B)、重組 KpfD 蛋白質純化膠體電泳圖

37°C 下 LB 中隔夜培養的大腸桿菌 Novablue (DE3) 以十分之一比例稀釋至新鮮 LB，培養至 OD₆₀₀ 0.4~0.5 之間，再加入 0.5 mM IPTG 於 37°C 誘導 3 小時，收集菌液並以鎳離子親合性管柱純化目標蛋白，再進行 13.5% SDS-PAGE 分析。



圖三(C)、專一性抗體 MrkA、MrkD 及 KpfD 分析重組第三型纖毛黏附蛋白表現情形

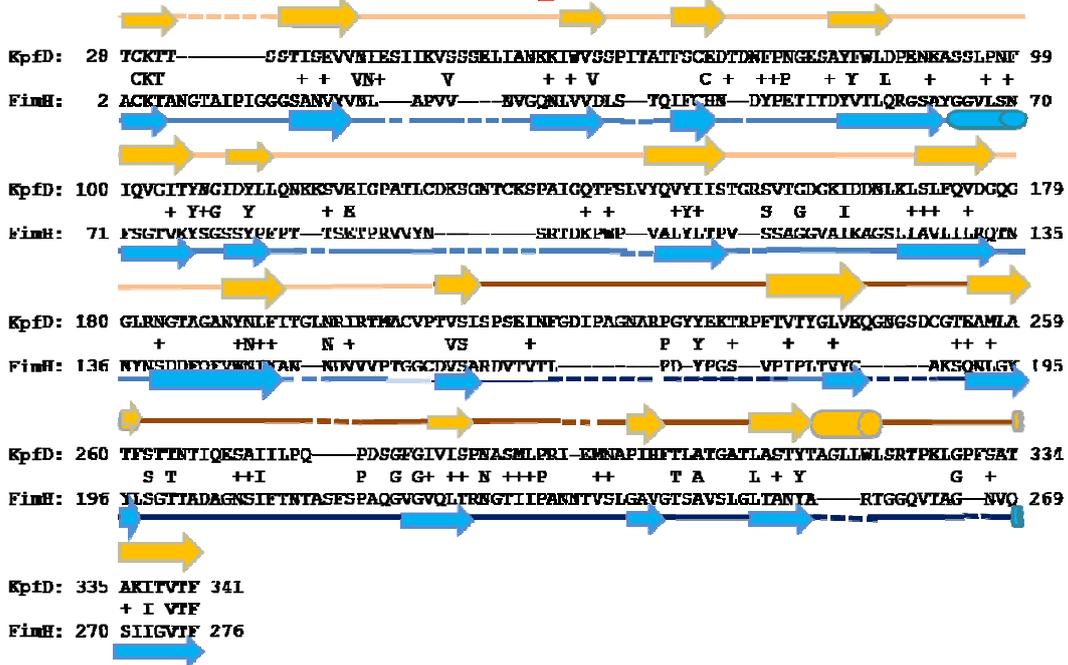
37°C 下 LB 中培養的大腸桿菌表現重組纖毛 JM109[*pmrkABC*]、JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*]及 JM109[*pmrkABCkpfD*]，收集菌液以 13.5% SDS-PAGE 進行分離，再轉漬於 PVDF 纖維膜上，分別以專一性抗體 MrkA、MrkD 及 KpfD 偵測重組第三型纖毛表現情形。



圖四、重組第三型纖毛大腸桿菌 KpfD 免疫螢光染色分析

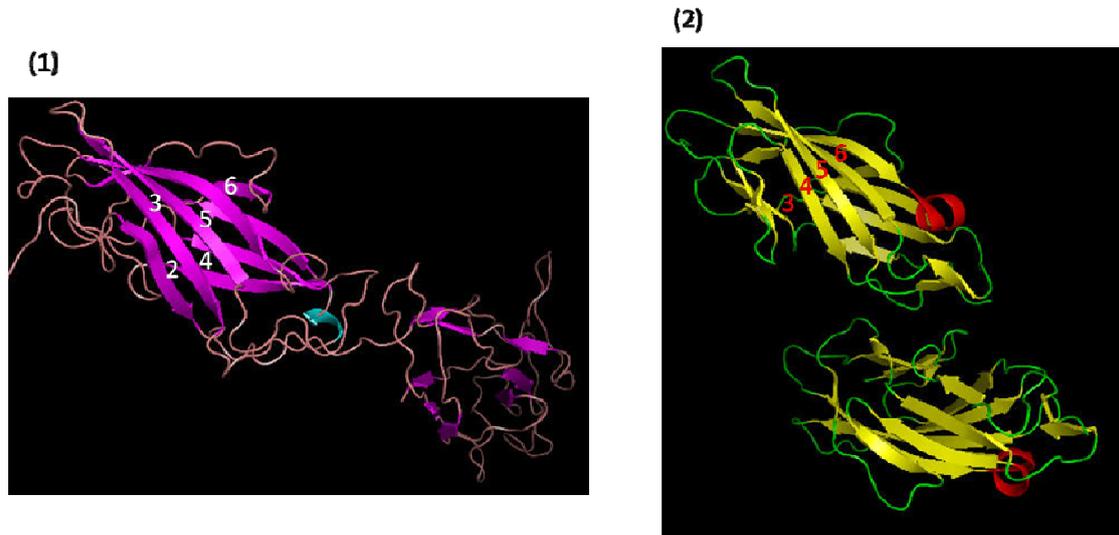
分別使用 MrkA 及 KpfD 一級抗體與 FITC conjugated anti-mouse IgG 二級抗體反應之後，偵測重組大腸桿菌的纖毛表現。菌株 JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*] 為正對照組；菌株 JM109[*pmrkABCkpfD*] 為實驗組。圖中 a 代表螢光訊號觀察結果，圖中 b 代表明視野下觀察結果。

Template = 1klfB, Q_len = 342, S_len = 279, Score = 346.6
 Aligned = 91.81%, Identnties = 12.84%, SS_identities = 59.33%



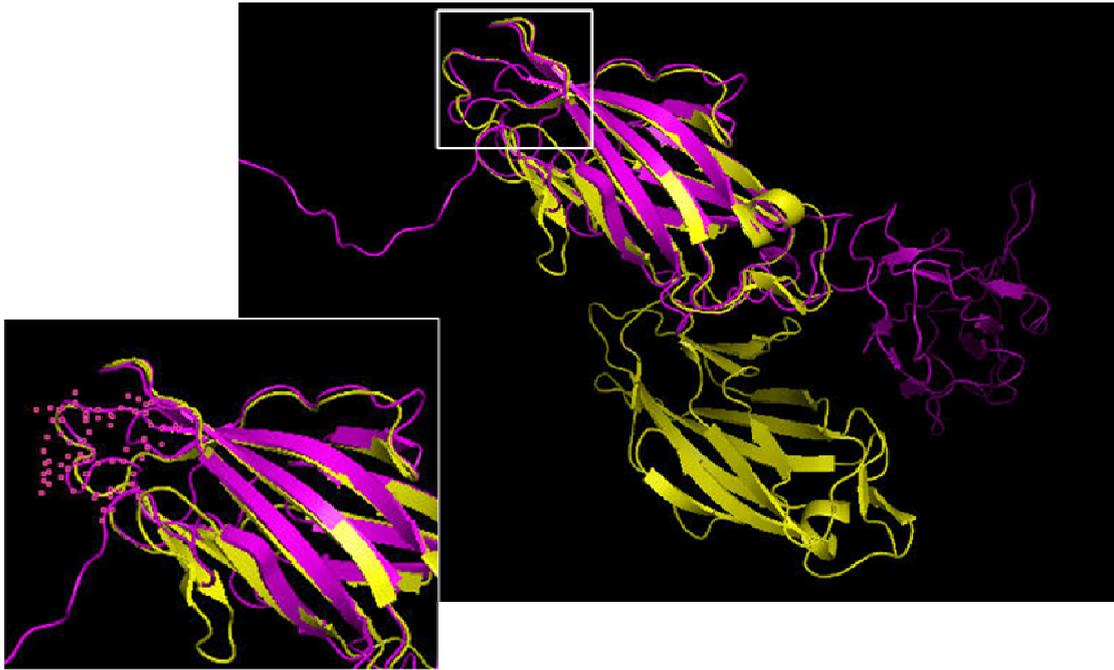
圖五(A)、克雷白氏肺炎桿菌第一型纖毛黏附蛋白 FimH 與 KpFD 二級結構比對

比較大腸桿菌第一型纖毛黏附蛋白 FimH 與克雷白氏肺炎桿菌纖毛黏附蛋白 KpFD 胺基酸序列；預測的二級結構 表示 α -helix； 表示 β -strand。FimH 胺基酸序列來自 NCBI protein databases，二級結構比對於 PS² service (<http://ps2.life.nctu.edu.tw/>) 完成。

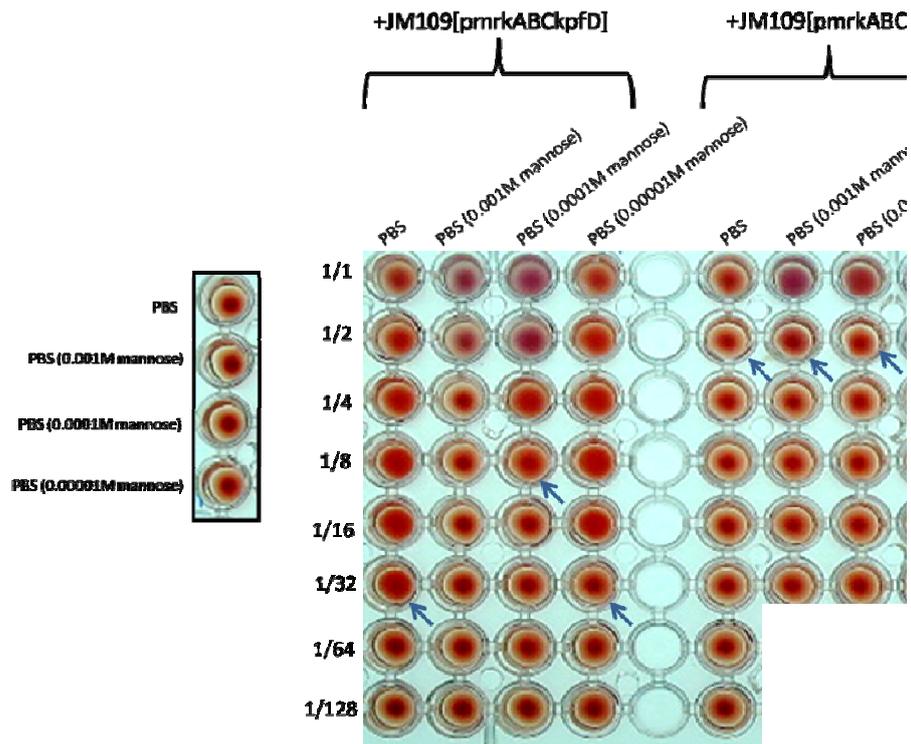


圖五(B)、克雷白氏肺炎桿菌纖毛黏附蛋白 KpfD 三級結構預測

(1)克雷白氏肺炎桿菌纖毛黏附蛋白 KpfD 三級結構預測 (2)大腸桿菌第一型纖毛黏附蛋白 FimH 的結晶結構(4)。KpfD 三級結構預測以 FimH 的結晶結構於 PS² service (<http://ps2.life.nctu.edu.tw/>) 預測，並以 PyMOL 軟體繪圖呈現。



圖五(C)、克雷白氏肺炎桿菌纖毛黏附蛋白 KpfD 與大腸桿菌第一型纖毛黏附蛋白 FimH 三級結構 alignment
將預測的 KpfD 三級結構(深色)與 FimH 三級結構(淺色)針對 receptor binding domain 進行 alignment, 並且針對保留性甘露糖結合區域(大圖白色方框)比對, 結果如左下小圖所示。我們以小點標示出文獻指出的 FimH 甘露糖結合區域在三級結構上的位置, 與 KpfD 的預測三級結構對照顯示 KpfD 可能的甘露糖結合區域。所有結果以 PyMOL 軟體繪圖呈現。



圖六(A)、重組第三型纖毛大腸桿菌 JM109[*pmrkABCkpfD*]

紅血球之甘露糖競爭分析

將菌液與不同濃度的甘露糖混合後室溫作用一小時，再將菌液與 3% 天竺鼠紅血球以 1:1 體積比例混合，於 96 孔 V 集現象。圖中箭頭所指部分為此 HA 試驗中，具凝血現象倍率。當甘露糖的濃度為 0.001M 時，菌株 JM109[*pmrkABCkpfD*] 凝血現象受到完全抑制；對照組菌株 JM109[*pmrkABCD*] 甘露糖抑制凝血現象。