

國立交通大學生物科技學系

碩士論文

克雷白氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 中纖毛的功能性分析

Functional characterization of the novel fimbriae in

***Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044**



研究生：黃登魁

Student : Teng-Kuei Huang

指導教授：彭慧玲博士

Advisor : Hwei-Ling Peng,Ph.D

中華民國九十六年六月

June, 2007

致謝

當初剛踏進實驗室，就有學長姐告誡著我說，碩士班兩年咻一下就過去了，如今我回想起來，彷彿就只是前幾天叮嚀的話語，如今回想起來，兩年的碩士生涯，確實是轉眼間就過去了，但是也從當初剛進實驗室懵懵懂懂的毛頭小子，慢慢的習慣了緊湊卻也十分充實的研究生活，這真的是多虧了我們這個實驗室的每個夥伴以及彭老師，非常的感謝大家，相處的很愉快。

在研究所的兩年當中，讓我覺得成長許多且收獲豐富的兩方面，做事的態度以及實驗的技巧。這有太多太多都必須感謝彭老師了，在討論的時候很尊重我們的想法，卻又不辭辛苦的仔細教導，非常仔細的修改我的論文，然而最讓我佩服和感謝的是老師那認真的教學態度，更是我常常努力想要達到的目標，我覺得這是老師給我最珍貴的寶藏。非常感謝口試委員林志生老師和鄧文玲老師撥空參加，並且花了許多的時間巨細靡遺的修改了我的論文以及提供許多寶貴的建議，十分感謝，而在口試前陣子清大的張晃猷老師也在我口試上場前不少先給了不少建議跟打氣，還好能及時做出一些修正。而實驗室的學長姐們在日常跟實驗上都給我很大的幫助，我很感謝在我剛進實驗室時領我入門的健誠學長、耐心指數直逼彭老師的盈蓉學姊，傳授了不少實驗技術給我，和討論上都能給我很多很好建議的靖婷學姊及新耀學長，和你們的討論中總是讓我獲益良多，還有早我一年畢業的育聖學長、智凱學長和心瑋學姊，和晚我一年進來的靜柔學姊、嘉怡學妹、壯壯的秉熹學弟，風趣的格維和個性認真的朝陽，和你們朝夕相處了這麼一段時間，也算是很有緣分，希望實驗室的夥伴們都能平平安安的，每年都可以一起回來跟老師相聚，儘管十分的不捨，但是我們還會相見的！

還有要感謝我們家人，在我偶有疲憊之時，給了我一個安穩的家，讓我可以耍一耍任性，充電過後再重新出發，謝謝你們支持我才能夠完成學業！

目錄

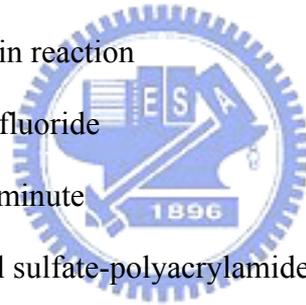
縮寫表.....	3
中文摘要.....	4
英文摘要.....	5
前言.....	6
實驗材料與方法.....	11
結果.....	19
討論.....	28
參考文獻.....	31



圖表目錄

表一、本實驗所使用之菌株和質體.....	37
表二、本實驗所使用之引子列表.....	38
表三、抑制大腸桿菌 JM109[pmrkABCkpfD]凝集天竺鼠紅血球的醣類.....	39
圖一、纖毛基因組示意圖.....	40
圖二、重組纖毛質體 DNA 的製備.....	41
圖三、表現重組纖毛質體分析.....	42
圖四、大腸桿菌表現重組纖毛蛋白質電泳分析.....	43
圖五、穿透式電子顯微鏡觀察重組纖毛大腸桿菌.....	44
圖六、生物膜形成能力測試.....	45
圖七、細胞黏附能力測試.....	46
圖八、重組第三型纖毛質體分析.....	47
圖九、重組第三型纖毛大腸桿菌生長曲線.....	49
圖十、重組第三型纖毛大腸桿菌生物膜形成能力.....	50
圖十一、重組第三型纖毛表現分析.....	51
圖十二、分析重組第三型纖毛的聚合情形分析.....	52
圖十三、血球凝集測試.....	53
圖十四、第一型纖毛黏附蛋白 FimH 與 KpfD 胺基酸序列比對.....	55
圖十五、穿透式電子顯微鏡觀察重組第三型纖毛大腸桿菌.....	56
圖十六、轉位子插入突變株引導子活性分析.....	57
圖十七、轉位子插入突變株菌體沉降測試.....	58
圖十八、轉位子插入序列示意圖.....	59

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
GCAA	Minimal medium containing 1% glycerol and 0.3% casaminoacid
HA	Hemagglutination
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside
LB	Luria-Bertani broth
NBT	Nitro blue tetrazolium
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RPM	Revolution per minute
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	<i>N</i> ' <i>N</i> ' <i>N</i> ' <i>N</i> '-tetramethylethyl-endiamide



中文摘要

纖毛黏附蛋白是一種重要的致病因子，影響著黏附到宿主細胞的專一性。在克雷白氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 的基因體中，藉由 HMMER 找到了九套纖毛基因組，其中包含已知的第一型纖毛 *fim* 基因組和第三型纖毛 *mrk* 基因組，以及七套未曾被報導的纖毛基因組，分別被命名為 *kpa*、*kpb*、*kpc*、*kpd*、*kpe*、*kpf* 和 *kpg*。為了闡明這些新纖毛的功能，我們以聚合酶連鎖反應由 NTUH-K2044 染色體中選殖這些纖毛基因組到無纖毛的大腸桿菌 BL21(DE3)。藉由 SDS-PAGE 分析，我們可以偵測到 *kpa*、*kpb* 以及 *kpe* 纖毛的主要結構蛋白 (pilin)，此外 *kpa* 纖毛基因組重組質體表現可以增進大腸桿菌對細胞的黏附和些許生物膜的生成能力。位於纖毛末端的黏附蛋白為決定細菌黏附專一性的主要因子，為了測試黏附蛋白的活性，我們進一步以過去建立的第三型纖毛表現系統為平台，將 MrkD 黏附蛋白基因分別置換為 *kpa*、*kpb*、*kpc*、*kpd*、*kpe*、*kpf* 或 *kpg* 的黏附蛋白基因，並經西方墨點法確認這些重組第三型纖毛的結構蛋白的表現和組裝正常。而在紅血球凝集測試中，我們發現 KpfD 具有黏附天竺鼠紅血球以及兔子紅血球的能力，而 KpaE、KpbD、KpdD 及 KpgD 對兔子的紅血球也具有不同程度的黏附能力，其中 KpfD 與天竺鼠紅血球的凝集作用可被 0.5 mM 的甘露糖抑制，顯示 *kpf* 纖毛與第一型纖毛同樣具有對甘露糖敏感型的血球凝集活性。

Abstract

Fimbrial adhesin is an important bacterial virulence factor which affects the adherence specificity to host tissues. In the genome of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, we found nine fimbrial gene clusters including *fim*, *mrk*, and seven novel fimbrial operons, namely *kpa*, *kpb*, *kpc*, *kpd*, *kpe*, *kpf*, and *kpg*. These fimbrial gene clusters were cloned into the expression plasmid pET30b and then transformed to an afimbriated *E. coli*. Expression of the major pilin of the recombinant *kpa*, *kpb* or *kpe* fimbriae could be detected by SDS-PAGE analysis. Moreover, the *kpa* fimbriae appeared to confer the bacteria an adherence ability to HCT-8 cell and also biofilm formation capability. The adhesin protein at the tip of fimbriae is a major determinant of the adhesion specificity. To investigate the presence of specific adhesion activity, the *mrkD* adhesin gene of the established type 3 fimbriae expression system was replaced respectively by each of the fimbrial adhesins. Transmission electron microscopy and western blot analysis revealed that most of the recombinant type 3 fimbriae expressed and assembled properly. The hemagglutination (HA) activity assay indicated that the recombinant KpfD could bind to erythrocytes of guinea pig and rabbit. Different binding activity levels of the recombinant adhesins KpaE, KpbD, KpdD and KpgD to rabbit erythrocytes were also demonstrated. Moreover, the HA activity of KpfD to guinea pig erythrocytes was found to be inhibited by 0.5 mM mannose.

前言

細菌是地球上生活範圍最廣泛的生物，除了各種的生態環境外，在人體也可見到細菌的生存。生長在人體內或體表的細菌，依其與疾病的相關性，分為正常菌叢、病原菌和伺機性病原菌，伺機性病原菌在人體免疫力低下或不全時才得以造成感染。在細菌感染過程，許多參與的致病因子中，黏附因子 (adhesin) 決定黏附宿主細胞的起始步驟而造成感染的組織特異性 (tissue tropism)；許多黏附因子的表現也伴隨生物膜形成(15)。

一、伺機性病原菌：克雷白氏肺炎桿菌



克雷白氏肺炎桿菌 (下文中稱之為 *K. pneumoniae*) 為常見的格蘭氏陰性菌，通常會造成社區感染以及院內感染(32)。在臨床上，*K. pneumoniae* 常在免疫不全的病患造成呼吸道及尿道的感染、肝膿瘍及敗血症(32)。在過去二十年，在台灣發現一種由 *K. pneumoniae* 造成的新型疾病，由侵入型 *K. pneumoniae* 造成的社區感染肝膿瘍，在台灣造成的影響日益不容忽視(21, 38)。

過去曾被報導 *K. pneumoniae* 的致病因子有莢膜多醣體(36)、脂多醣類、螯鐵因子(31)及黏附蛋白。莢膜多醣體具有抵抗宿主免疫系統的胞噬作用及血清因子的毒殺作用(36)，可以提高細菌在宿主體內存活能力；此外，莢膜多醣體的生成，被證實具有在空間上阻隔纖毛正常的作用(33)；過去在台灣造成肝膿瘍的 KP，大多為 K1 以及 K2 莢膜血清型，這兩種血清型被認為與 *K. pneumoniae* 所

引起的肝膿瘍疾病有很大的關連性(14, 42)。

二、黏附因子

多數細菌具有不同的黏附因子，大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 具第一型纖毛、P型纖毛、S型纖毛及Dr型纖毛(28)；沙門氏菌 (*Salmonella*) 具第一型纖毛與第三型纖毛(6)；沙門氏菌、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)，退伍軍人桿菌 (*Legionella pneumophila*)、奈瑟氏淋病雙球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、奈瑟氏腦膜炎球菌 (*N. meningitidis*) 及霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*) 具有第四型纖毛(7)；格蘭氏陽性細菌的放線菌 (*Actinomyces naeslundii*)，白喉棒狀桿菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) 以及鏈球菌 (*Streptococcus parasanguis*) 則具有藉由sortase所組裝的纖毛(37)。 *K. pneumoniae* 已知的黏附因子共有四種：第一型纖毛，經常在造成腎盂炎的大腸桿菌發現(30)，是 *K. pneumoniae* 可能參予致病但非必要的因子；第三型纖毛，廣泛分佈於造成尿道感染的大腸桿菌(19)，而在少數的 *K. pneumoniae* 中，被認為與致病有較高的相關性(35)；最近被發現的KPF28纖毛與腸道致病性相關(10)，而非纖毛黏附蛋白CF29K則具黏附腸道細胞株Caco-2的能力(8)。

三、纖毛的組成

纖毛為細菌表面狀似毛髮的構造，*K. pneumoniae* 所具有的第一型纖毛

與第三型纖毛是藉由稱之為 Chaperone/Usher pathway 的路徑所組裝，Chaperone 又稱伴護子，負責在周膜間隙（periplasm）保護未組裝的纖毛結構蛋白（pilin）免於水解並幫助其組裝；Usher 為纖毛固著蛋白，是負責將結構蛋白組裝送出細菌表面的外膜孔道，並將組裝完畢的纖毛固著在細菌的外膜上；擔任黏附功能的黏附蛋白，位於纖毛的頂端，除了黏附的功能，同時也擔任在纖毛組裝時的起始者。缺少黏附蛋白的第三型纖毛，會造成黏附能力及纖毛結構的缺失，對纖毛的功能具有決定性的影響(17)。

第一型纖毛和P型纖毛

第一型纖毛廣泛分佈於腸桿菌科中，已被證實為大腸桿菌造成尿道感染的致病因子。第一型纖毛由 *fimABCDEFGHI* 基因所轉錄，*fimA* 表現第一型纖毛主要的結構蛋白，而 *fimH* 則負責表現纖毛頂端的黏附蛋白。FimH 可與紅血球上的受器作用而產生凝集現象，此凝集活性可藉由加入甘露糖而被抑制，因此，第一型纖毛屬於甘露糖敏感型（mannose-sensitive）的纖毛(30)。對甘露糖特異的黏附能力，使第一型纖毛得以黏附宿主細胞膜上帶有 mannose 的糖蛋白(12)。除了凝集紅血球，*K. pneumoniae* 的第一型纖毛也具有黏附老鼠氣管細胞與老鼠膀胱上皮細胞的能力(11)。

P 型纖毛（pyelonephritis-associated pilus）由 *pap* 基因組所轉譯，在大腸桿菌中造成尿道感染，更進一步入侵腎臟造成腎盂炎。PapG 為纖毛頂端的黏附蛋

白，黏附到含有 α -Gal(1-4)- β -Gal 的醣類受質的尿道表皮細胞(22)。P 型纖毛與第一型纖毛除了同樣在尿道感染的過程中扮演重要角色外，P 型纖毛與第一型纖毛的表現具有互相調控的關係(16)。

第三型纖毛

K. pneumoniae 的第三型纖毛被認為是在感染過程中主要的黏附因子(35)，由 *mrk* 基因組所製造，*mrkA* 為纖毛的主要結構蛋白，*mrkB* 為伴護子，*mrkC* 轉錄 Usher，*mrkD* 為黏附子，*mrkF* 轉錄穩定纖毛結構的蛋白(1)。*K. pneumoniae* 第三型纖毛的表現，可使單寧酸處理的血球發生凝集的現象，凝集血球的現象不受甘露糖的抑制，屬於甘露糖非敏感型 (mannose-resistant) 的纖毛(34)。另外，重組的第三型纖毛可使大腸桿菌對第四型及第五型膠原蛋白具有特異性的黏附能力(34)，然而，目前 *K. pneumoniae* 第三型纖毛的專一性受器仍未闡明。

四、研究目標

根據過去對纖毛的研究，我們得知纖毛對宿主細胞的黏附專一性扮演著重要角色，隨著細菌的基因體被解碼，陸續發現了許多未曾被發現的纖毛基因組存在於細菌的基因體當中，譬如在傷寒沙門氏菌 CT18 菌株定序完畢的基因體中，有 12 套藉 Chaperone/Usher pathway 組裝的纖毛基因組(25)，這些纖毛基因在傷寒沙門氏菌與鼠傷寒沙門氏菌的分佈並不相同，顯示這些纖毛可能受某種選汰的壓

力，因而在不同菌株間的分佈情形有所差異，選汰的壓力包含像是作為被免疫系統所偵測的重要抗原，可能因而在演化過程中缺失(18)。

K. pneumoniae NTUH-K2044為國立台灣大學醫學院附設醫院在罹患化膿性肝膿瘍併發腦膜炎的糖尿病病患身上分離到的菌株(23)，其基因體已被定序完畢 (<http://genome.nhri.org.tw/kp/index.php>)。藉由序列的比對，我們發現在*K. pneumoniae* NTUH-K2044基因體中具有九套chaperone/usher pathway類型的纖毛基因群，包含第一型纖毛以及第三型纖毛，以及七組未曾被發現的纖毛，分別被命名為*kpa*、*kpb*、*kpc*、*kpd*、*kpe*、*kpf*以及*kpg* (圖一)。其中，在傷寒沙門氏菌LT2發現的*sth*纖毛基因群(25)可能為*kpa*的同源基因，胺基酸序列的相同性分別為28%-51%，而*sth*基因群的突變會降低在小鼠以及雞的腸道形成菌落的能力(26, 39)。我們實驗室在初步分析這些纖毛基因在*K. pneumoniae*臨床菌株的分佈情形，發現*kpb*以及*kpc*與*K. pneumoniae* K1血清型具有顯著的相關性 ($p < 0.001$) (4)。

在本論文中，我們選殖分離了數套纖毛基因群，轉型大腸桿菌中大量表現這些重組的纖毛，進一步分析這些重組大腸桿菌表現纖毛的黏附能力和纖毛型態，最終希望能闡明這群纖毛的特性及專一性受質，定義其存在於*K. pneumoniae* 基因體中所扮演的角色。

實驗材料與方法

菌株與質體

本實驗所使用之菌株以及質體列表於（表一），所使用之引子列表於（表二）。

重組纖毛質體DNA的製備

為了在大腸桿菌表現*kpa*、*kpb*以及*kpe*纖毛基因組，我們將整個基因組分別接進表現載體 pET30b，首先利用PCR的增殖DNA片段，再以TA選殖方式，轉殖到yT&A質體。如圖二A，*kpa*以引子dk001(具有*Nde*I切點)與dk002放大後轉殖到yT&A，得到*pkpa*-1；接著，*pkpa*-1以*Bam*HI和*Nde*I切下，轉殖到表現載體pET30b，得到*pkpa*-4；*kpa*以引子dk004與dk005放大後轉殖到yT&A，得到*pkpa*-5；接著，*pkpa*-5以*Kpn*I切下，以*pkpa*-4上*kpaA*基因本身所具有的*kpn*I切點，轉殖到*pkpa*-4，得到*pkpa*-6。如圖二B，*kpb*以引子pcc070(具有*Nde*I切點)與pcc071放大後轉殖到yT&A，得到*pkpb*-1；接著，*pkpb*-1以*Sal*II和*Nde*I切下，轉殖到表現載體pET30b，得到*pkpb*-5；*kpb*以引子pcc072與pcc073放大後轉殖到yT&A，得到*pkpb*-3；*pkpb*-3以*Sal*II切下，轉殖到*pkpb*-5，得到*pkpb*-6。如圖二C，*kpe*以引子dk006(具有*Nde*I切點)與dk007放大後轉殖到yT&A，得到*pkpe*-1；*pkpe*-1以*Nde*I和*Hind*III切下，轉殖到表現載體pET30b，得到*pkpe*-2。

置換第三型纖毛重組質體上的黏附蛋白基因

為了將 *K. pneumoniae* NTUH-K2044 基因體所有纖毛的黏附蛋白基因 *kpaE*、*kpbD*、*kpcD*、*kpdD*、*kpeD*、*kpfD*、*kpgD* 和 *fimH* 分別轉殖到第三型纖毛表現載體上，先以 PCR 反應增幅各個黏附蛋白基因片段：*kpaE* 的引子對為 dk023 (具有 *StuI* 切點) 和 dk024 (具有 *ApaI* 切點)；*kpbD* 為 dk019 (具有 *StuI* 切點) 和 dk020 (具有 *ApaI* 切點)；*kpcD* 為引子對 dk013 (具有 *EcoRV* 切點) 和 dk014 (具有 *ApaI* 切點)；*kpdD* 為 dk025 (具有 *StuI* 切點) 和 dk026 (具有 *ApaI* 切點)；*kpeD* 為 dk021 (具有 *EcoRV* 切點) 和 dk022 (具有 *ApaI* 切點)；*kpfD* 為 dk017 (具有 *EcoRV* 切點) 和 dk018 (具有 *ApaI* 切點)；*kpgD* 為 dk027 (具有 *StuI* 切點) 和 dk028 (具有 *ApaI* 切點)；*fimH* 為 dk015 (具有 *EcoRV* 切點) 和 dk016 (具有 *ApaI* 切點)，這些片段分別以引子上的限制酶截切轉殖到 *pmrkABC*，其中 *pmrkABC* 先以 *EcoRV* 和 *ApaI* 處理，故黏附蛋白基因皆以 *EcoRV* 或 *StuI* 和 *ApaI* 切點，連接到 *pmrkABC*，所得的重組質體分別命名為 *pmrkABCkpaE*、*pmrkABCkpbD*、*pmrkABCkpcD*、*pmrkABCkpdD*、*pmrkABCkpeD*、*pmrkABCkpfD*、*pmrkABCkpgD* 和 *pmrkABCfimH*。

重組蛋白的純化

首先，將要表現的蛋白質基因藉 PCR 分離選殖表現質體 pET30，再將重組後的表現質體轉型到大腸桿菌 NovaBlue (DE3)。接著，這些重組菌株經隔夜培養、定量稀釋於新鮮培養液 LB 後，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端皆帶有His-tag，所以，這些重組蛋白都藉由鎳樹脂(nickel resin)的親和力管柱來純化 (Novagen，Madison，WI)。

抗體血清的製備

從台灣大學動物中心購買約4週大的雌性BALB/c小鼠，飼養在動物房1週後，將純化的纖毛主要結構蛋白KpeA 5-50 μg ，與等體積的弗氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant) 混合至白色乳狀，注射老鼠腹腔；10天後，再以等量混以佐劑的純化蛋白作一次腹腔注射，間隔三天後，在小鼠尾巴採血並以酵素連結免疫分析法確認其抗體效價；最後，以心臟採血犧牲小鼠，採得之血液靜置20分鐘待凝固後，離心取上層澄清血清。



SDS-PAGE分析

下層電泳分離膠(running gel)的成分為：12.5% gel: deionized water 3.7 ml; running buffer 1 ml (3 ml Tris-HCl, pH 8.0); 10% SDS 80 μl ; 40% (W/V) acrylamide solution (acrylamide : bis-acrylamide= 27.5 : 1) 3 ml; TEMED

(N,N,N',N'-tetramethylethyl-enediamide) 9 μl ; 10% APS 100 μl 。上層膠(stacking gel)的成分為：5% gel : deionized water 1.9ml; stacking buffer 0.83 ml (1 ml Tris-HCl, pH 8.0); 10% SDS 33 μl ; 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(約菌液的1/5)的protein lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl)，以劇烈震盪的方式將菌體溶開，之後混合5X loading dye於100°C加熱10分鐘，最後，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。

穿透式電子顯微鏡樣品處理

將菌液濃度調整為 10^9 CFU/ml，以PBS洗兩次後，取20 μ l加到有覆蓋碳膜的銅網 (collodion-coated copper grids, 300 mesh)上，放置1分鐘後以濾紙吸乾後倒置在2% phosphotungstic acid (PBS溶液，pH 7.2)溶液中負染，放置一分鐘後拿起，再以濾紙吸乾、陰乾隔夜並防止落塵。樣品處理完後以長庚大學顯微鏡中心的穿透式電子顯微鏡JEM 1230觀察。

血球凝集測試

血球處理—採實驗室A型血型同學血液靜置30分鐘至分層，離心後取150 μ l血球到5 ml PBS。另外取150 μ l血球到5 ml 0.01% tannic acid PBS靜置在37°C下15分鐘後，以PBS清洗和復溶兩次。細菌處理—隔夜培養的細菌約 10^9 CFU/ml以PBS清洗和復溶兩次。接著，將3% (vol/vol)的A型血球以及3% (vol/vol) tannic acid

處理過的A型血球分別與溶於PBS的菌液以 1:1 混合，在室溫下靜置 30 分鐘後，觀察紅血球凝集現象。

醣類抑制血球凝集測試

將處理過的菌液，與溶解在PBS內的醣類混合均勻，混合後的濃度為抑制濃度，接著靜置在4°C下2小時，以同樣濃度的醣類溶液作序列稀釋後，和3%血球1:1混合後，室溫下靜置30分鐘後，觀察血球凝集現象(27)。

酵母菌凝集測試

隔夜培養的細菌約 10^9 CFU/ml以PBS清洗和復溶2次，然後加入等體積1%酵母菌(冷凍乾燥處理的*Saccharomyces cerevisiae* AH109)的PBS溶液，混合均勻後，滴在載玻片上，震盪10分鐘後，觀察酵母菌凝集的情形。



纖毛黏附細胞能力測試

將腸道表皮細胞株HCT-8在5% CO₂的環境下以24孔細胞培養皿(TPP industries, France)培養至長滿24孔盤，每格細胞培養皿的細胞數約 1×10^5 ；將欲測試黏附力的細菌菌液離心後以PBS清洗和復溶兩次，使細菌濃度調整為 1×10^7 CFU/100 μ l；每格細胞培養皿加入細胞數100倍的細菌，約 1×10^7 CFU，在5% CO₂的環境下靜置1小時，之後以PBS清洗兩次，用0.1% Triton X-100將細胞打破，計算此溶

液所含有的細菌個數。

生物膜形成測試

隔夜培養的菌液以1/100稀釋到新鮮培養液中，加入100 μ l至polystyrene材質的96孔盤，在37度C下培養，靜置一定時間後，以一次水洗過後，加入1%的結晶紫150 μ l，在室溫下靜置30分鐘後，吸出結晶紫，以一次水清洗，加入1% SDS 150 μ l，震盪10分鐘後，測量在595 nm下的吸光值。

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，調整濃度在600 nm的吸光值約0.01、約1/100稀釋後在37°C震盪培養，在不同時間點測量600 nm下的吸光值。



轉位子誘導突變篩選測試

將隔夜培養的大腸桿菌S17-1 λ pir[pUT mini-Tn5 luxCDABE Km2](41)及*K. pneumoniae* CG43[pPkp], 分別與新鮮LB培養液以1:1混合，震盪培養30分鐘後，離心去除上清液，以等體積之生理食鹽水(Saline)洗去LB培養液，將質體提供者與接受者以1 ml:0.5 ml的比例混合後，濃縮成0.1 ml後，將菌液平鋪在LB培養皿上的硝化纖維膜 (nitrocellulose) 上，靜置10小時，取出硝化纖維膜，將膜上細菌懸浮至新鮮LB培養液中，以表面塗有X-gal並添加抗生素的LB培養基篩選出抗氯黴素 (Chloramphenicol) 與康黴素 (kanamycin) 的*K. pneumoniae*，挑選X-gal

呈色反應不同的菌株。

染色體DNA抽取

將*K. pneumoniae*以含0.1 mM EDTA LB培養液，培養16小時或隔夜，離心去除上清液，加入800 μ l lysis solution (200 mM NaCl, 20 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl, 0.2% Triton X-100, 5 mM DTT, 80 μ g lysosome)後劇烈震盪，並在37度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，此時需密封防止溶液蒸發。之後放置冰上10分鐘，加入250 μ l飽和食鹽水，輕微搖晃，繼續放置冰上10分鐘後，以13,200 rpm離心10分鐘，取400 μ l上清液分別加入兩個微量離心管中，每管各加入1000 μ l絕對酒精，輕輕翻轉3次，放置冰上20分鐘後，以13,200 rpm離心15分鐘，倒掉上清液，加入75%絕對酒精，13,200 rpm離心10分鐘，在37°C烘乾去除多餘水分，在尚未完全乾燥前加入100 μ l二次水，放置隔夜後即可使用或繼續放置4°C冰箱保存。

轉位子插入位置分析

為了分析pUT mini-Tn5 *luxCDABE* Km2在染色體的插入位置，將製備完成的染色體DNA以限制內切酶*Pst*I作用隔夜。切碎的染色體基因片換藉連結酶(ligase)轉殖到pUC18，轉殖後的產物藉由電穿孔的方式轉型(transform)到大腸桿菌JM109菌株，並以kanamycin抗生素篩選出含有抗Kanamycin基因片斷的質體。最後，以轉

位子序列為引子確認插入位置附近序列。

西方墨點法

蛋白質由SDS-PAGE分離後在緩衝液（39 mM glycine, 48 mM Tris-Base, 0.037% SDS）在140伏特作用110分鐘轉印到纖維膜(PVDF, Immobilon™-P)，經過清洗步驟：在含0.5% Tween-20的PBS溶液中搖晃10分鐘（2次）之後，置於5%脫脂牛奶的PBS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，將纖維膜置於稀釋後抗體的1%脫脂牛奶的PBS中室溫下搖晃2小時，再重複清洗後將纖維膜置於稀釋5000倍的anti-mouse IgG AP conjugate的二級抗體的PBS溶液中搖晃一小時後並重複清洗步驟。最後將纖維膜浸泡在加有NBT 66 µl和BCIP 33 µl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。

結果

K. pneumoniae NTUH-K2044 九套纖毛基因組

本實驗室藉由 HMMER 搜尋的方法，在 *K. pneumoniae* NTUH K2044 基因體中找到了九套的纖毛基因組，除了被廣泛研究的第一型纖毛與第三型纖毛基因組外，還有七套為新發現的纖毛基因組（圖一），除了第一型纖毛與第三型纖毛基因組相鄰外，*kpf* 與 *kpg* 也是相鄰的基因組。依據 NCBI 網站蛋白質 BLAST 分析，每一套纖毛組皆帶有各自的 chaperon 以及 usher 基因；另外，比對出 C 端具有纖毛蛋白（pilin）的結構區塊的 *kpaE*、*kpbD*、*kpcD*、*kpdD*、*kpeD*、*kpfD* 以及 *kpgD*，可經轉譯為黏附蛋白（adhesin）；除了 *kpa* 具有兩個纖毛結構蛋白基因 *kpaA* 和 *kpaE* 之外，其餘纖毛基因組只帶有一個纖毛結構蛋白基因。



表現 *kpa*、*kpb* 及 *kpc* 纖毛的重組質體分析

為了確認 *kpa*、*kpb* 以及 *kpe* 基因組成功接到 pET30b，我們利用纖毛基因組內部具有的限制內切酶切位（圖三 A），以確認選殖是否為正確之 DNA 片段。如圖三 B 所示，表現重組纖毛質體 *pkpa-6*、*pkpb-6* 及 *pkpe-2* 的 DNA 分別以適當的限制內切酶處理後，以瓊膠電泳分析 DNA 片段大小，可以確認 DNA 片段大小及數量與預期符合，故可認定質體內確實分別含有 *kpa*、*kpb* 以及 *kpe* 等纖毛基因組之 DNA。

大腸桿菌 *kpa*、*kpb* 及 *kpc* 纖毛表現系統

分別將 *kpa*、*kpb* 以及 *kpe* 基因組的表現載體 *pkpa-6*、*pkpb-6* 和 *pkpe-2* 質體轉型到大腸桿菌 BL21(DE3) 菌株，轉殖後的大腸桿菌以 IPTG 誘導蛋白質表現後，藉由 SDS-PAGE 分析，如圖四 A，帶有 *pkpa-6*、*pkpb-6* 和 *pkpe-2* 質體的菌株經 1 mM IPTG 誘導後均有大量表現的蛋白帶，其蛋白質分子量大小 (Lanes 3、5、7) 分別與帶有訊息胜肽 (signal peptide) 或不具訊息胜肽的主要結構蛋白 KpaA 與 KpbA 相近；然而 *pkpe-2* 表現的蛋白質分子量 (Lanes 7) 與預期的 KpeA 分子量 20 kDa 大小不符。

進一步純化細菌表面的蛋白質並將所分離的蛋白經由 17.5% SDS-PAGE 分析，如圖四 B 所示，唯有表現 *kpa* 和 *kpb* 質體的細菌上清液中可觀察且大小相近 KpaA 與 KpbA 的 20 kDa 的主要蛋白，更支持圖四 A 的推論。然而，在表現 *kpe* 的菌體上清液中無法偵測到圖四 A 所表現的蛋白，顯示 *kpe* 纖毛可能並未組裝至細菌體表。值得注意的是在 P (pellet) 中，*kpa* 以及 *kpb* 表現的蛋白質，具有大小相近的兩條蛋白質帶。已知的 usher-chaperone pathway 的纖毛蛋白藉由訊息胜肽 (single peptide) 從細胞質 (cytoplasm) 引導至周膜間隙 (periplasm)，過程中訊息胜肽則被切除，之後才藉由 usher-chaperone pathway 組裝到膜外，我們藉由 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析，訊息胜肽的切除可使的纖毛主要結構蛋白質分子大小相差約 1 kDa，這也說明了為何在圖四 A、B 都可觀察到兩種大小的蛋白質。可能是因為切除訊息胜肽的緣故，而在上清液中 S2 和 S3

中只有分子量較小的片段，則是因為組裝到膜外的纖毛蛋白訊息胜肽皆已則被切除。

穿透式電子顯微鏡的觀察 *kpa* 及 *kpb* 纖毛

為了確認纖毛的組裝和型態，我們藉由穿透式電子顯微鏡的觀察發現對照組 BL21(DE3)[pET30b]並未觀察到纖毛（圖五 A），然而經轉型後的大腸桿菌 BL21(DE3)[*pkpa*-6]與 BL21(DE3)[*pkpb*-6]體表，可以觀察到纖毛（圖五 B、C），證實了纖毛確實的組裝到細菌表面。



kpa 及 *kpb* 纖毛活性測試

為了闡明 *kpa* 以及 *kpb* 纖毛的功能，以生物膜形成能力的測試，我們發現這兩個重組菌株在 polystyrene 材質的 96 孔盤，1 mM IPTG 濃度的 LB 靜置培養 72 小時後，BL21(DE3)[*pkpa*-6]生物膜形成的能力明顯高於對照組（圖六），暗示著 *kpa* 纖毛具有提高 BL21(DE3)菌株形成生物膜的能力。同時，我們也以細胞黏附能力測試來比較 *kpa* 及 *kpb* 纖毛的特性。如圖七所示，相較於對照組 BL21(DE3)[pET30b]，BL21(DE3)[*pkpa*-6]對 HCT-8 細胞株有顯著的黏附的能力，暗示著 *kpa* 纖毛可能在 *K. pneumoniae* 黏附腸道時扮演一定的角色。

第三型纖毛末端黏附蛋白置換之質體製備

為了研究這九套纖毛黏附蛋白的特性，我們利用實驗室已建立的第三型纖毛表現系統的重組質體 $pmrkABC$ 作為選殖黏附蛋白基因的平台。基因 $mrkA$ 、 $mrkB$ 和 $mrkC$ 分別負責轉譯第三型纖毛的主要結構蛋白、chaperone及usher，而在 $mrkABC$ 基因後我們分別接入不同的纖毛黏附蛋白基因，包含 $mrkD_{NTUH}$ 、 $kpaE$ 、 $kpbD$ 、 $kpcD$ 、 $kpdD$ 、 $kpeD$ 、 $kpfD$ 、 $kpgD$ 以及 $fimH$ ，希望藉第三型纖毛的表現將各個黏附蛋白呈現在纖毛頂端，進一步分析這些重組纖毛的黏附活性，提供作為了解這些不同纖毛的黏附特性的依據。為了確認轉殖之黏附蛋白基因的正确性，我們使用限制內切酶確認黏附蛋白基因上的切位，所使用的切位如（圖八A、C）所示，而以限制內切酶處理後的DNA片段以瓊膠電泳分析（圖八B、D），結果顯示限制內切酶處理後的DNA片段之數量、大小與預期符合。



重組第三型纖毛大腸桿菌生長條件

為了找出適合重組第三型纖毛之大腸桿菌的生長環境，我們初步測試了生長曲線以及生物膜形成能力。我們分別使用 GCAA 以及 LB 兩種培養液，測量表現重組第三型纖毛大腸桿菌的生長曲線（圖九），結果發現在 LB 培養液中，JM109[$pmrkABCkpdD$] 的生長出現異常的情形；根據生長曲線，我們認為在 GCAA 培養液的环境下有利於重組第三型纖毛的表現，黏附蛋白的置換似乎並不影響重組細菌在 GCAA 培養液中生長情形，根據此一結果，以下的分析，均採

用在 GCAA 培養液震盪培養 20 小時的菌液進行分析。

重組第三型纖毛大腸桿菌生物膜形成能力

在生物膜的測試中（圖十），唯有 *mrk* 基因加上第三型纖毛本身 *mrkD* 黏附蛋白基因的 JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*] 具有顯著的生物膜形成能力，顯示置換黏附蛋白會影響纖毛的活性。

重組第三型纖毛表現分析

為了分析攜帶不同黏附基因的第三型纖毛主要結構蛋白 MrkA，在轉型大腸桿菌 JM109 之中的表現量，我們使用 rabbit anti-MrkA 多株抗體，以西方墨點法偵測 MrkA 的表現，分析結果顯示，即使我們替換不同的黏附蛋白，並不明顯影響 MrkA 的表現（圖十一）。而同樣的樣本，未施予熱處理，直接以 7.5% SDS-PAGE 分離蛋白質，同樣以西方墨點法偵測 MrkA 的表現，由圖十二可以發現攜帶不同的黏附蛋白，對 MrkA 的聚合能力確實具有影響，其中 JM109[*pmrkABCkpcD*] 與 JM109[*pmrkABCfimH*] 的聚合情形與 JM109[*pmrkABC*] 相仿，顯示 *kpcD* 與 *fimH* 可能不幫助 MrkA 的聚合，所以有較多小分子量的聚合蛋白。

血球凝集測試

為了瞭解黏附蛋白結合之受質，我們使用了綿羊，馬，兔子，天竺鼠以及人類 A

型紅血球進行血球凝集的測試。由圖十三 A 發現JM109[*pmrkABCkpaE*]、JM109[*pmrkABCkpbD*]、JM109[*pmrkABCkpdD*]、JM109[*pmrkABCkpeD*]、JM109[*pmrkABCkpfD*]和JM109[*pmrkABCkpgD*]皆會對兔子紅血球產生血球凝集的反應，稀釋倍率介於 1/2 到 1/4 間；由圖十三 B 發現唯有JM109 [*pmrkABCkpfD*]會對天竺鼠紅血球產生血球凝集的效果，加入菌量為 1×10^9 CFU/ml，以 1/2 倍序列稀釋，稀釋倍率為 1/8 倍時仍可觀察到天竺鼠血球具有凝集的現象。然而，使用馬，綿羊，人類A型紅血球皆未產生血球凝集現象（圖十三C、D、E），可能因為不同動物紅血球表面上的抗原具有數量或種類上的差異性存在；在此JM109 [*pmrkABCfimH*]並未有血球凝集能力，推測因FimH無法藉由第三型纖毛組裝到膜外。



醣類抑制血球凝集

許多被發現的纖毛的專一性受質為醣類，例如最早被發現的第一型纖毛的專一性受質即為 D-mannose，為了更進一步了解這些重組的第三型纖毛的專一性受質，我們使用了生物體內常見的醣類作為纖毛黏附的抑制物，以血球凝集的活性以呈現纖毛的黏附力。我們將菌體分別與不同濃度的各種醣類混合後，靜置在 4°C 下兩小時後進行血球凝集的測試，分析醣類抑制的濃度。所使用的醣類包含 D-arabinose、D-fructose、D-galactose、D-glucose、D-mannose、Maltose、Lactose、Sucrose、N-acetyl-glucosamine，結果顯示 JM109[*pmrkABCkpaE*]、

JM109[*pmrkABCkpbD*]、JM109[*pmrkABCkpdD*]、JM109[*pmrkABCkpeD*]和 JM109[*pmrkABCkpgD*]與兔子紅血球的凝集反應不被我們所使用的醣類抑制，500 mM 的 D-mannose 亦不例外，因此我們可以初步歸類為此類反應為 MSHA (mannose-resistant hemagglutination)。而 JM109[*pmrkABCkpfD*]對天竺鼠紅血球產生血球凝集的效果，不但會被 D-mannose 抑制之外，D-fructose、D-arabinose、Maltose、Sucrose 也會有不同程度的抑制血球凝集的效果。其中 D-mannose 和 D-fructose 的抑制能力較強，在 0.5 mM 濃度下仍有抑制血球凝集的現象，其次是 D-arabinose，最小抑制濃度為 50 mM; Sucrose 75 mM; Maltose 150 mM(表三)。

過去被報導過抑制第一型纖毛的 mannose 衍生物 4-nitrophenyl- α -D-mannoside 和 Methyl- α -D-mannoside 同樣會對第一型纖毛的黏附能力產生抑制的功用，因此進一步對 mannose 衍生物做抑制能力測試，發現 4-nitrophenyl- α -D-mannoside 最小抑制濃度達到 0.005 mM; Methyl- α -D-mannoside 最小抑制濃度達到 0.001 mM(表三)，抑制能力較 D-mannose 為高，顯示出此類衍生物與 KpfD 黏附蛋白的受質結合部位比起 D-mannose 具有更強的結合能力。

在圖十四中，將大腸桿菌的 FimH、*K. pneumoniae* 的 FimH 與 KpfD 進行序列比對，大腸桿菌的 FimH 與 mannose 結合的重要序列已被闡明(5)，以箭頭標示出這些序列，發現 KpfD 並無這些 mannose 結合的重要序列。

穿透式電子顯微鏡分析重組第三型纖毛

為了分析置換黏附蛋白對纖毛組裝的影響，我使用穿透式電子顯微鏡進行觀察。

首先在對照組方面，在我們的觀察中發現JM109[*pmrkABC*]大部分不具有纖毛，但有一小部分的菌可以觀察到菌體表面具有量多但呈現糾結狀態的纖毛(圖十五A)；JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*]每隻菌皆可觀察到表現大量的纖毛(圖十五B)，顯示第三型纖毛本身的黏附蛋白幫助MrkA組裝的能力最強；而在

JM109[*pmrkABCkpfD*]表現的纖毛，在電子顯微鏡下觀察我們發現可粗略分為兩類，一種為糾結狀態(圖十五C)，與JM109[*pmrkABC*]的狀態類似，另一種較長且不呈現糾結態(圖十五D)，顯示出黏附蛋白KpfD的加入，在型態上確實影響了MrkA的組裝情形。



轉位子突變篩選調控 *kpd* 引導子活性基因

從 *kpa* 到 *kpg* 這些在基因體發現的纖毛基因組，直至今日之前未被發現的理由之一，是因為這些纖毛在一般所使用的實驗室養菌環境下並不表現的纖毛。而因 *kpd* 在基因組上游的引導子活性微弱，顯示可能有轉錄抑制因子扮演負向調控 *kpd* 的表現。如圖十六 A，以單一位置隨機突變的方法，配合 *lacZ* 報導轉錄活性的系統，能找出抑制 *kpd* 基因表現的轉錄因子。篩選約 9000 個菌落後，挑出 12 個可使 X-gal 呈色改變的菌落，再將這些菌落挑出，隔夜培養的菌液滴 10 μ l 在塗有 X-gal 的 LB 培養基上隔夜培養，如圖十六 B1、B2 與 B11 明顯具有比對照

組更強的引導子活性。因部分突變株喪失原有的黏性，而進一步的菌體沉降測試發現部分轉位子突變株比對照組更容易藉由離心沉降（圖十七），顯示突變可能影響莢膜多醣體的生合成。根據引導子活性呈色（圖十六）與菌體沉降測試（圖十七）可將這 12 株突變株分為四類，B1 比對照組更不易沉降，B2 和 B11 呈色較深但沉降能力未改變，B3、B6、B7 和 B12 呈色及沉降能力改變皆不明顯，B4、B5、B8、B9、B10 呈色改變皆不明顯但容易沉降，但 B8 沉降能力略有不同。進一步，我選出 B1、B2、B4、B8 進行轉位子插入序列分析。

轉位子插入序列分析



分析轉位子插入序列，發現 B1 為 *hns* 插入突變，B2 被插入位置為 *kvhR* 與 *orfY* 之間的非轉譯區，B4 為 *orf7* 插入突變，B8 為 *gnd* 插入突變；*kvhR* 為一套致病性相關的雙分子調控系統關聯基因，*orf7* 為莢膜多醣體生合成基因組之一，*gnd* 為莢膜多醣體生合成基因組最後一個基因。其中呈色改變最明顯的 B1，插入位置為 *hns*，轉錄廣泛存在於細菌的多功能性調控因子、亦是 DNA 結合蛋白的 Hns，曾在大腸桿菌被報導會影響第一型纖毛的表現(29)。

討論

K. pneumoniae 在台灣造成的感染，成為日益不可忽視的疾病(3, 38)。第三型纖毛被認為是 *K. pneumoniae* 在感染過程中主要的黏附因子(35)，而第一型纖毛的表現則少有在 *K. pneumoniae* 被報導(9, 24)。我們在 *K. pneumoniae* NTUH-K2044 基因體中發現多達九套 usher-chaperone pathway 的纖毛，除了第一型纖毛與第三型纖毛，其他七套未曾被報導。這些纖毛是否參與 *K. pneumoniae* 的感染，為何這些纖毛在一般培養狀況下不表現或存在於 *K. pneumoniae* 有何種功能以及意義，都待闡明。

這七套未曾被報導過的的纖毛當中，根據蛋白質 BLAST 比對的結果發現，*kpa* 與在沙門氏菌中的 *sth* 纖毛最為相似，過去曾報導過 *sthABCDE* 突變株在小鼠盲腸形成菌落的能力降低(39)，而 *sthC* 的突變也會降低附著雞隻腸道的能力(26)，比對後發現 *kpaABCDE* 與 *sthABCDE* 基因的組成結構相同，而組成蛋白的相似度依序是 33%、51%、44%、29%、28%，顯示 *kpa* 與 *sth* 很可能為同源基因，我們也發現 *kpa* 具有幫助生物膜的形成能力以及細胞黏附的能力，也暗示了在演化中 *kpa* 的保留，可能在細菌的生存或是在腸道的黏附上扮演著重要的功能。*kpb* 則是在分析臨床分離株中的分佈時，顯示出與 K1 荚膜血清型有相關性 ()。而藉由大腸桿菌表現的重組 *kpb* 纖毛可以藉由電子顯微鏡觀察到 *kpb* 纖毛組裝到膜外的情形，顯示只要有適當的纖毛活性分析方法，就可以得知 *kpb* 纖毛可能的功能。

替換第三型纖毛末端的黏附蛋白，證實了不是 MrkD 黏附蛋白，也可幫助纖毛組裝到細菌表面，這樣的表現系統可讓我們進一步分析纖毛的黏附能力。重組大腸桿菌 JM109[*pmrkABCkpfD*]對天竺鼠紅血球具有最高的血球凝集能力，而此血球凝集作用會受 mannose 抑制。

已知 mannose 常以寡糖的形式存在哺乳動物細胞表現的糖蛋白，而第一型纖毛的黏附活性會受 mannose 抑制(30)，大腸桿菌的 FimH 的結構以及 mannose 結合的位置已被解開(5)，我們比對了 KpfD 與大腸桿菌 FimH 以及 *K. pneumoniae* FimH 的胺基酸序列，發現 KpfD 與大腸桿菌 FimH 與 mannose 結合相關的重要序列的比對完全找不到相同之處。在過去發現對抑制大腸桿菌第一型纖毛血球凝集的作用，帶有芳香族的 mannose 衍生物 4-nitrophenyl- α -D-mannoside 比 methyl- α -D-mannoside 要強上 500-1000 倍(12)，然而在 KpfD 血球凝集的作用中，雖然 4-nitrophenyl- α -D-mannoside 比 D-mannose 的抑制能力強，但 methyl- α -D-mannoside 的抑制能力更強，這樣的結果類似更接近沙門氏菌的第一型纖毛的活性同樣是 methyl- α -D-mannoside 比 4-nitrophenyl- α -D-mannoside 的抑制能力強(13)，推測是因 mannose 結合位置不利於較大的芳香族的 mannose 衍生物結合。另外，KpfD 會受 D-fructose 抑制特性也跟大腸桿菌的第一型纖毛相似(2)。藉由第三型纖毛的表現系統將黏附蛋白送出，可能造成無法預期的結構改變，進而影響與糖類結合的專一性，此功能分析仍有待進一步驗證，例如使用純化的 KpfD 蛋白作為血球凝集的抑制物。

最後，我們使用單一位置隨機突變的方法，發現一個可能抑制 *kpd* 纖毛轉錄的因子 *hns*，曾被報導為廣泛存在的多功能性調控因子。在 *hns* 與纖毛調控的相關研究中，在大腸桿菌中曾被報導過會影響 P 型纖毛以及第一型纖毛的表現(29, 40)，現有的資訊與證據尚未足以證實 *hns* 與 *kpd* 纖毛調控相關性。除了 *hns*，另有一轉位子突變 B2 的插入位置位於 *kvhR* 與 *orfY* 基因之間的非轉譯區域（見圖十八），插入序列約 4 kDa，可能因而影響周圍的基因表現，例如造成引導子活性的改變，其影響依然未知。



參考文獻

1. **Allen, B. L., G. F. Gerlach, and S. Clegg.** 1991. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **173**:916-20.
2. **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.
3. **Chang, F. Y., and M. Y. Chou.** 1995. Comparison of pyogenic liver abscesses caused by *Klebsiella pneumoniae* and non-*K. pneumoniae* pathogens. *J Formos Med Assoc* **94**:232-7.
4. **Chien-Chen Wu, C.-P. F., and Huei-Ling Peng.** 2005. Comparative analysis and prevalence study of the fimbrial gene clusters in *Klebsiella pneumoniae*.
會議論文.
5. **Choudhury, D., A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, and S. D. Knight.** 1999. X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **285**:1061-6.
6. **Clegg, S., L. S. Hancox, and K. S. Yeh.** 1996. *Salmonella typhimurium* fimbrial phase variation and FimA expression. *J Bacteriol* **178**:542-5.
7. **Craig, L., M. E. Pique, and J. A. Tainer.** 2004. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **2**:363-78.
8. **Di Martino, P., Y. Bertin, J. P. Girardeau, V. Livrelli, B. Joly, and A.**

- Darfeuille-Michaud.** 1995. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun* **63**:4336-44.
9. **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.
10. **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.
11. **Fader, R. C., K. Gondesens, 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.
12. **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.
13. **Firon, N., I. Ofek, and N. Sharon.** 1983. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. *Carbohydr Res* **120**:235-49.
14. **Fung, C. P., F. Y. Chang, S. C. Lee, B. S. Hu, B. I. Kuo, C. Y. Liu, M. Ho, and L. K. Siu.** 2002. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? *Gut* **50**:420-4.
15. **Goto, T., and Y. Ohi.** 1998. Urinary tract infection: bacterial adhesin and biofilm formation. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* **89**:389-98.

16. **Holden, N. J., M. Totsika, E. Mahler, A. J. Roe, K. Catherwood, K. Lindner, U. Dobrindt, and D. L. Gally.** 2006. Demonstration of regulatory cross-talk between P fimbriae and type 1 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **152**:1143-53.
17. **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.
18. **Humphries, A., S. Deridder, and A. J. Baumler.** 2005. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial proteins serve as antigens during infection of mice. *Infect Immun* **73**:5329-38.
19. **Iwahi, T., Y. Abe, M. Nakao, A. Imada, and K. Tsuchiya.** 1983. Role of type 1 fimbriae in the pathogenesis of ascending urinary tract infection induced by *Escherichia coli* in mice. *Infect Immun* **39**:1307-15.
20. **Lin, C. T., T. Y. Huang, W. C. Liang, and H. L. Peng.** 2006. Homologous response regulators KvgA, KvhA and KvhR regulate the synthesis of capsular polysaccharide in *Klebsiella pneumoniae* CG43 in a coordinated manner. *J Biochem (Tokyo)* **140**:429-38.
21. **Liu, Y. C., D. L. Cheng, and C. L. Lin.** 1986. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Arch Intern Med* **146**:1913-6.
22. **Lund, B., F. P. Lindberg, M. Baga, and S. Normark.** 1985. Globoside-specific adhesins of uropathogenic *Escherichia coli* are encoded by similar trans-complementable gene clusters. *J Bacteriol* **162**:1293-301.
23. **Ma, L. C., C. T. Fang, C. Z. Lee, C. T. Shun, and J. T. Wang.** 2005. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. *J Infect Dis*

- 192:117-28.
24. **Matatov, R., J. Goldhar, E. Skutelsky, I. Sechter, R. Perry, R. Podschun, H. Sahly, K. Thankavel, S. N. Abraham, and I. Ofek.** 1999. Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. *FEMS Microbiol Lett* **179**:123-30.
25. **McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**:852-6.
26. **Morgan, E., J. D. Campbell, S. C. Rowe, J. Bispham, M. P. Stevens, A. J. Bowen, P. A. Barrow, D. J. Maskell, and T. S. Wallis.** 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **54**:994-1010.
27. **Moureaux, N., T. Karjalainen, A. Givaudan, P. Bourlioux, and N. Boemare.** 1995. Biochemical characterization and agglutinating properties of *Xenorhabdus nematophilus* F1 fimbriae. *Appl Environ Microbiol* **61**:2707-2712.
28. **Nowicki, B., C. Svanborg-Eden, R. Hull, and S. Hull.** 1989. Molecular analysis and epidemiology of the Dr hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**:446-51.
29. **O'Gara J, P., and C. J. Dorman.** 2000. Effects of local transcription and H-NS on inversion of the *fim* switch of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **36**:457-66.
30. **Old, D. C.** 1972. Inhibition of the interaction between fimbrial

- haemagglutinins and erythrocytes by D-mannose and other carbohydrates. J Gen Microbiol **71**:149-57.
31. **Podschun, R., A. Fischer, and U. Ullmann.** 1992. Siderophore production of *Klebsiella* species isolated from different sources. Zentralbl Bakteriol **276**:481-6.
32. **Podschun, R., and U. Ullmann.** 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev **11**:589-603.
33. **Schembri, M. A., J. Blom, K. A. Krogfelt, and P. Klemm.** 2005. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun **73**:4626-33.
34. **Sebghati, T. A., T. K. Korhonen, D. B. Hornick, and S. Clegg.** 1998. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. Infect Immun **66**:2887-94.
35. **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.
36. **Tomas, J. M., V. J. Benedi, B. Ciurana, and J. Jofre.** 1986. Role of capsule and O antigen in resistance of *Klebsiella pneumoniae* to serum bactericidal activity. Infect Immun **54**:85-9.
37. **Ton-That, H., and O. Schneewind.** 2004. Assembly of pili in Gram-positive bacteria. Trends Microbiol **12**:228-34.
38. **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.
39. **Weening, E. H., J. D. Barker, M. C. Laarakker, A. D. Humphries, R. M. Tsolis, and A. J. Baumler.** 2005. The *Salmonella enterica* serotype

Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infect Immun* **73**:3358-66.

40. **White-Ziegler, C. A., A. Villapakkam, K. Ronaszeki, and S. Young.** 2000. H-NS controls pap and daa fimbrial transcription in *Escherichia coli* in response to multiple environmental cues. *J Bacteriol* **182**:6391-400.
41. **Winson, M. K., S. Swift, P. J. Hill, C. M. Sims, G. Griesmayr, B. W. Bycroft, P. Williams, and G. S. Stewart.** 1998. Engineering the *luxCDABE* genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs. *FEMS Microbiol Lett* **163**:193-202.
42. **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.
43. 陳美甄，國立交通大學碩士論文，克雷白氏肺炎菌CG43第三型纖毛黏附蛋白特性，中華民國九十一年六月。
44. 廖心璋，國立交通大學碩士論文，克雷白氏肺炎菌CG43第三型纖毛組成蛋白MrkD與MrkF之功能探討，中華民國九十五年六月。
45. 黃盈蓉，國立交通大學博士論文，克雷白氏肺炎菌中第三型纖毛的特性分析，中華民國九十六年一月。

表一、本實驗所使用之菌株和質體

細菌菌株	特性敘述	來源與文獻
<i>K. pneumoniae</i>		
CG43S3 <i>lacZ</i>	CG43S3 <i>lacZ</i> 基因缺損株	(20)
質體	敘述	來源與文獻
pLacZ15	帶有缺乏引導子之 <i>lacZ</i> 基因，Cm ^r	(20)
pPkp <i>ΔA</i>	帶有 <i>kpdA</i> 引導子之 <i>lacZ</i> 基因，Cm ^r	實驗室收集
<i>pkpa</i> -1	以引子對dk001 及dk002 增幅，TA選殖到yT&A，Ap ^r	本實驗製備
<i>pkpa</i> -4	<i>kpaA</i> 基因組，以 <i>Nde</i> I 轉殖到 pET30b	本實驗製備
<i>pkpa</i> -5	以引子對dk004 及dk005 增幅，TA選殖到yT&A，Ap ^r	本實驗製備
<i>pkpa</i> -6	<i>kpa</i> 基因組，以 <i>Nde</i> I 轉殖到 pET30b	本實驗製備
<i>pkpb</i> -1	以引子對pcc070 及pcc071 增幅，TA選殖到yT&A，Ap ^r	實驗室收集
<i>pkpb</i> -3	以引子對pcc072 及pcc073，TA選殖到yT&A，Ap ^r	實驗室收集
<i>pkpb</i> -5	<i>kpbAB</i> 基因組，以 <i>Nde</i> I 轉殖到 pET30b	本實驗製備
<i>pkpb</i> -6	<i>kpb</i> 基因組，以 <i>Nde</i> I 轉殖到 pET30b	本實驗製備
<i>pkpe</i> -1	以引子對dk006 及dk007，TA選殖到yT&A，Ap ^r	本實驗製備
<i>pkpe</i> -2	<i>kpe</i> 基因組，以 <i>Nde</i> I 轉殖到 pET30b	本實驗製備
<i>pmrkABC</i>	<i>mrkABC</i> 基因群轉殖到pGEMT，Ap ^r	(17)
<i>pmrkABCkpaE</i>	以引子對dk023 及dk024 增幅 <i>kpaE</i> ，以 <i>EcoRV</i> 和 <i>StuI</i> 轉殖到 <i>pmrkABC</i> ，Ap ^r	本實驗製備
<i>pmrkABCkpbD</i>	以引子對dk019 及dk020 增幅 <i>kpbD</i> ，以 <i>EcoRV</i> 和 <i>StuI</i> 轉殖到 <i>pmrkABC</i> ，Ap ^r	本實驗製備
<i>pmrkABCkpcD</i>	以引子對dk013 及dk014 增幅 <i>kpcD</i> ，以 <i>EcoRV</i> 和 <i>ApaI</i> 轉殖到 <i>pmrkABC</i> ，Ap ^r	本實驗製備
<i>pmrkABCkpdD</i>	以引子對dk025 及dk026 增幅 <i>kpdD</i> ，以 <i>EcoRV</i> 和 <i>StuI</i> 轉殖到 <i>pmrkABC</i> ，Ap ^r	本實驗製備
<i>pmrkABCkpeD</i>	以引子對dk021 及dk022 增幅 <i>kpeD</i> ，以 <i>EcoRV</i> 和 <i>ApaI</i> 轉殖到 <i>pmrkABC</i> ，Ap ^r	本實驗製備
<i>pmrkABCkpfD</i>	以引子對dk017 及dk018 增幅 <i>kpfD</i> ，以 <i>EcoRV</i> 和 <i>ApaI</i> 轉殖到 <i>pmrkABC</i> ，Ap ^r	本實驗製備
<i>pmrkABCkpgD</i>	以引子對dk027 及dk028 增幅 <i>kpgD</i> ，以 <i>EcoRV</i> 和 <i>StuI</i> 轉殖到 <i>pmrkABC</i> ，Ap ^r	本實驗製備
<i>pmrkABCfimH</i>	以引子對dk015 及dk016 增幅 <i>fimH</i> ，以 <i>EcoRV</i> 和 <i>ApaI</i> 轉殖到 <i>pmrkABC</i> ，Ap ^r	本實驗製備

表二、本實驗所使用之引子列表

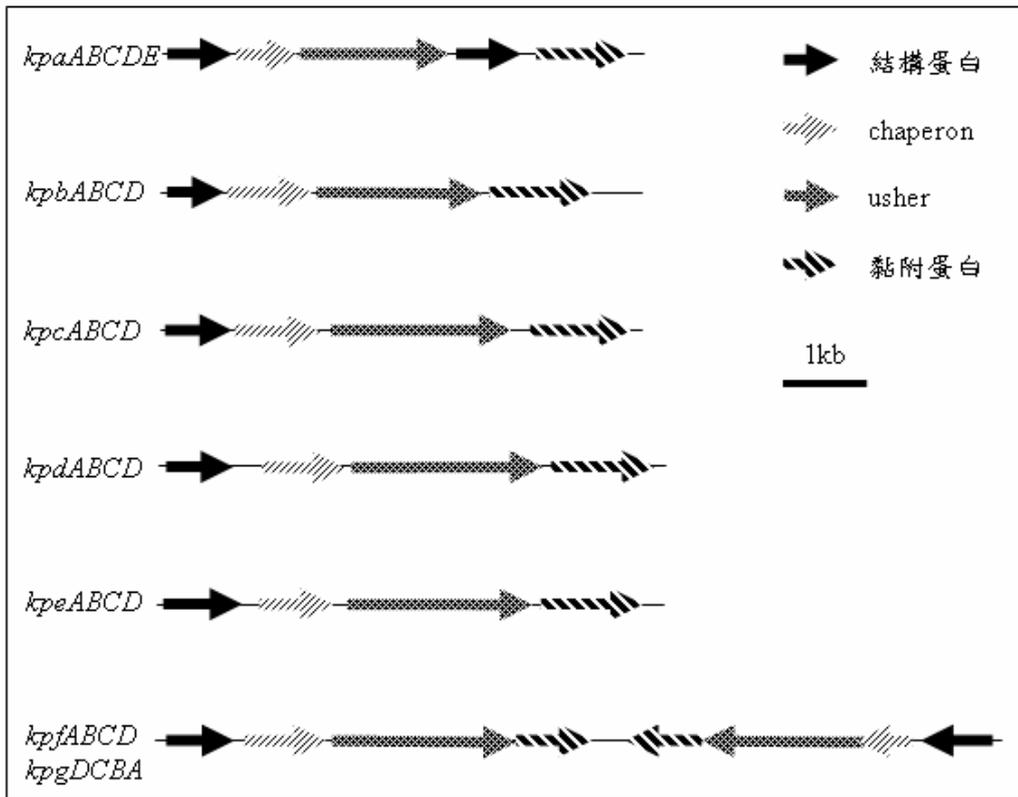
引子	序列(5' → 3')	位置
dk001	5'-TTGTCGTTTCATATGGATATGGGAA-3'	<i>kpaBCDE</i> 5 端
dk002	5'-GATTCCTTTCTCCATTCAACA-3'	<i>kpaBCDE</i> 3 端
dk004	5'-GGGCAATGTGATGAAGAATAACG-3'	<i>kpaBCDE</i> 5 端
dk005	5'-GCCAGGCGCATTAATCGTCTT-3'	<i>kpaBCDE</i> 3 端
dk006	5'-TCATATGAAAGAAAAGGCACCCTG-3'	<i>kpeABCD</i> 5 端
dk007	5'-TCAGAGCAATTCCTTCATCCG-3'	<i>kpeABCD</i> 3 端
dk011	5'-ATTCATTAAGAGGAGAAATTAACATATG-3'	<i>kpaBCDE</i> 5 端
dk012	5'-CATATGTTAATTTCTCCTCTTTAATGAAT-3'	<i>kpaBCDE</i> 3 端
dk013	5'-GGATATC ^a GGAACTGAACAGGAG-3'	<i>kpcD</i> 5 端
dk014	5'-GGGCCC ^a TGCTCTTAAGTGTCGGC3'	<i>kpcD</i> 3 端
dk015	5'-GATATC ^a AAGGCACCATTCAGGCGG-3'	<i>fimH</i> 5 端
dk016	5'-CGAGCAGGGCCC ^a GAGAGGATA-3'	<i>fimH</i> 3 端
dk017	5'-GCCTGGCGTGAGATATC ^a CTTA-3'	<i>kpfD</i> 5 端
dk018	5'-CAATGAGGGCCC ^a AGCAACTT-3'	<i>kpfD</i> 3 端
dk019	5'-TCGCAGGCCT ^a AAGCATCGTTAG-3'	<i>kpbD</i> 5 端
dk020	5'-GGGCCC ^a GGTGCAGAACATTAGGT-3'	<i>kpbD</i> 3 端
dk021	5'-GATATC ^a ACCCCGACGCTGG-3'	<i>kpeD</i> 5 端
dk022	5'-TTCGGGCCC ^a GGCGTGACAAG-3'	<i>kpeD</i> 3 端
dk023	5'-GCACCCAGGCCT ^a TCAATCTATAAA-3'	<i>kpaE</i> 5 端
dk024	5'-GGGCCC ^a AGTTTATCCGTTTACA-3'	<i>kpaE</i> 3 端
dk025	5'-GCAGCAGGCCT ^a TAGCAGCGG-3'	<i>kpdD</i> 5 端
dk026	5'-GGGCCC ^a GATGACCACGTTTAC-3'	<i>kpdD</i> 3 端
dk027	5'-CGGATAAGGCCT ^a CACAGCAGAGTC-3'	<i>kpgD</i> 5 端
dk028	5'-TCCAGGGCCC ^a GAAAGTCACCAT-3'	<i>kpgD</i> 3 端
dk029	5'-GTTGCGCTGCCCGGATTACAG-3'	轉位子插入序列末端

^a, 限制酶截切序列

表三、抑制 JM109[pmrkABCkpfD]凝集天竺鼠紅血球的醣類

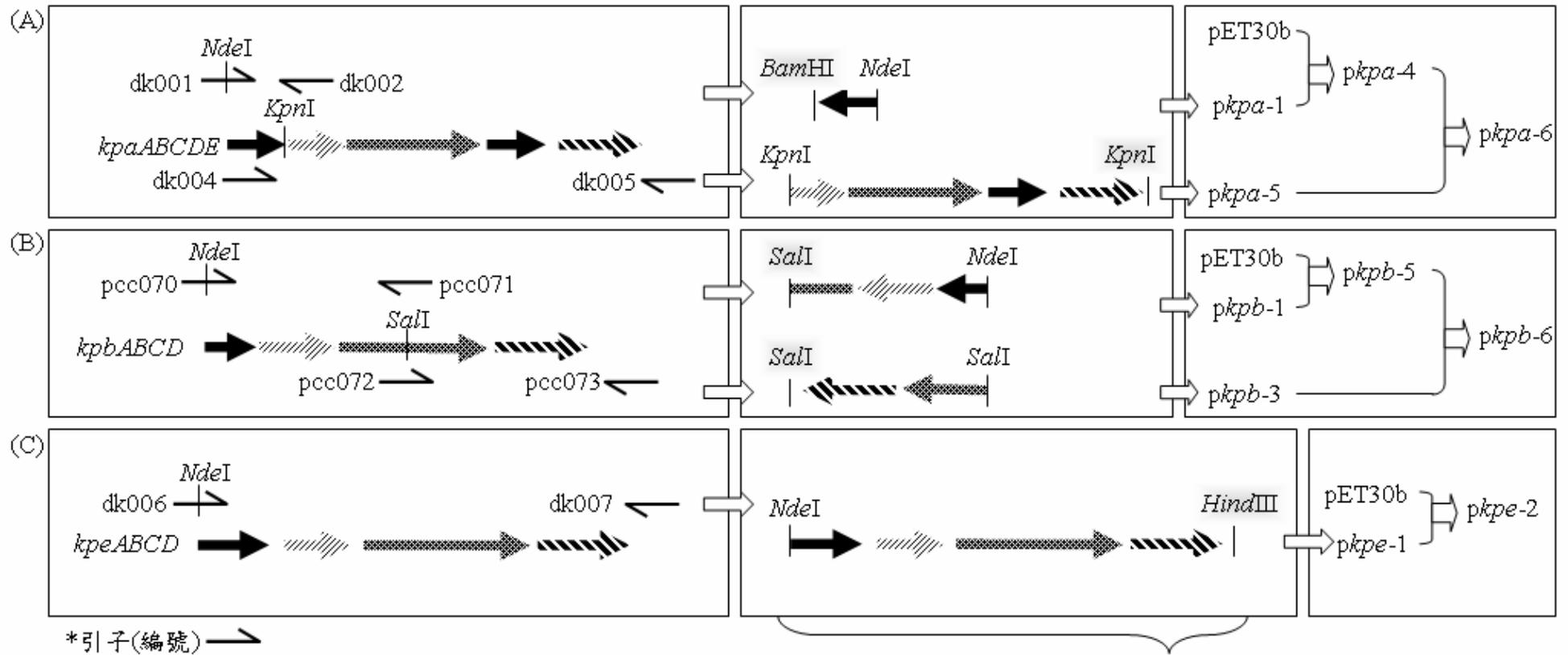
醣類	最小抑制濃度
D-arabinose	50 mM
D-fructose	0.5 mM
D-galactose	-
D-glucose	-
D-mannose	0.5 mM
Maltose	150 mM
Lactose	-
Sucrose	75 mM
N-acetyl-glucosamine	-
N-acetyl-galactosamine	-
4-nitrophenyl- α -D-mannoside	0.005 mM
Methyl- α -D-mannoside	0.001 mM





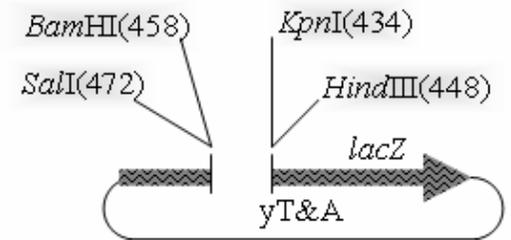
圖一、纖毛基因組示意圖

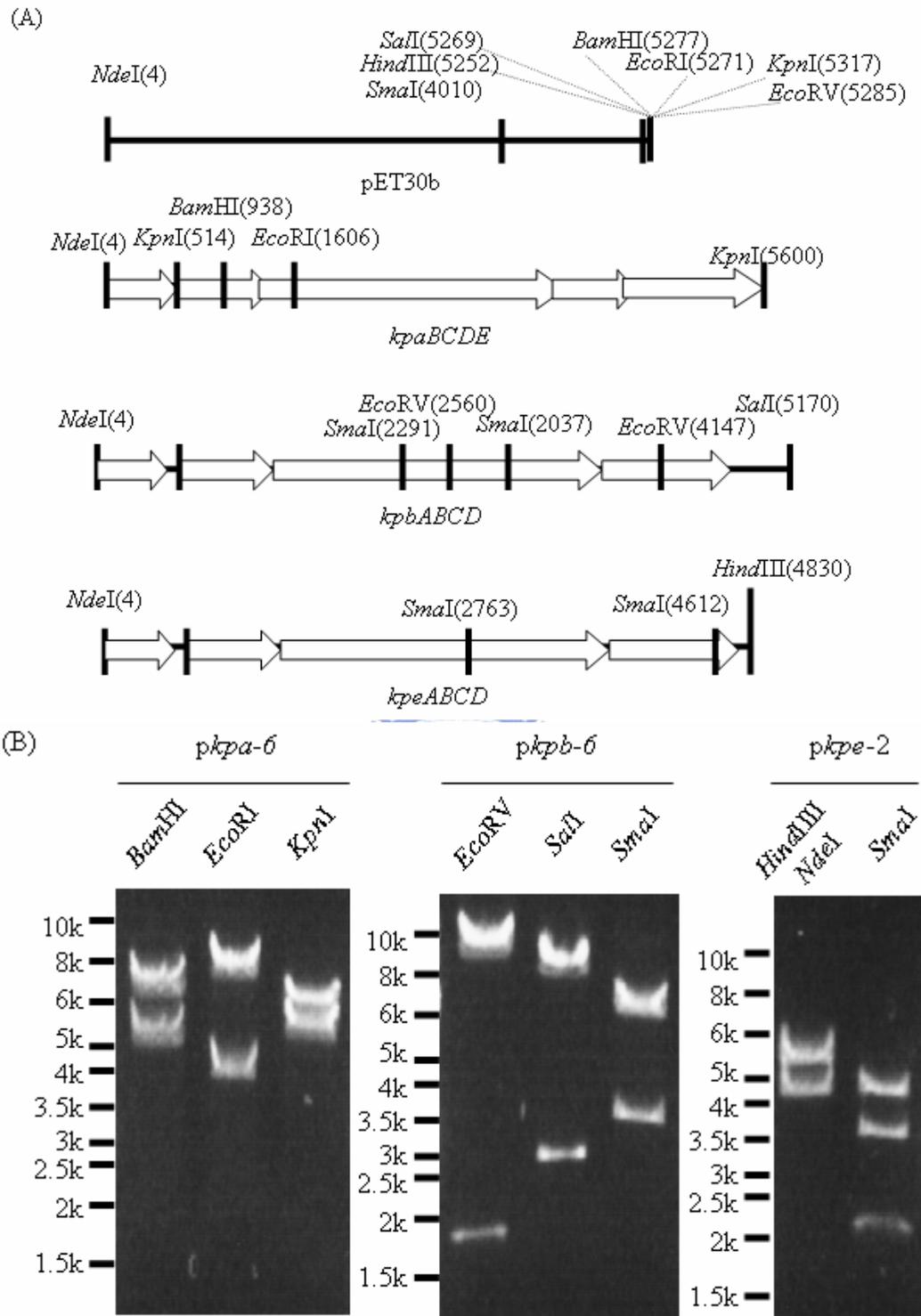
纖毛基因組成之基因功能性如圖所示，分析結果根據 NCBI 網站蛋白質 BLAST 分析。



圖二、重組纖毛質體 DNA 的製備

以 *K. pneumoniae* NTUH-K2044 的染色體 DNA 為模板，以專一性引子以 PCR 放大 DNA 片段(左邊方格)，TA 選殖到 yT&A 載體上，分別以上圖中間方格所示的酵素切點，依序轉殖到表現載體 pET30b 上(右邊方格所示)，最終得到分別帶有 *kpaABCDE*、*kpbABCD* 和 *kpeABCD* 整段基因組在 [pET30b] 表現載體上，分別命名為 *pkpa-6*(A)、*pkpb-6*(B) 以及 *pkpe-2*(C)。

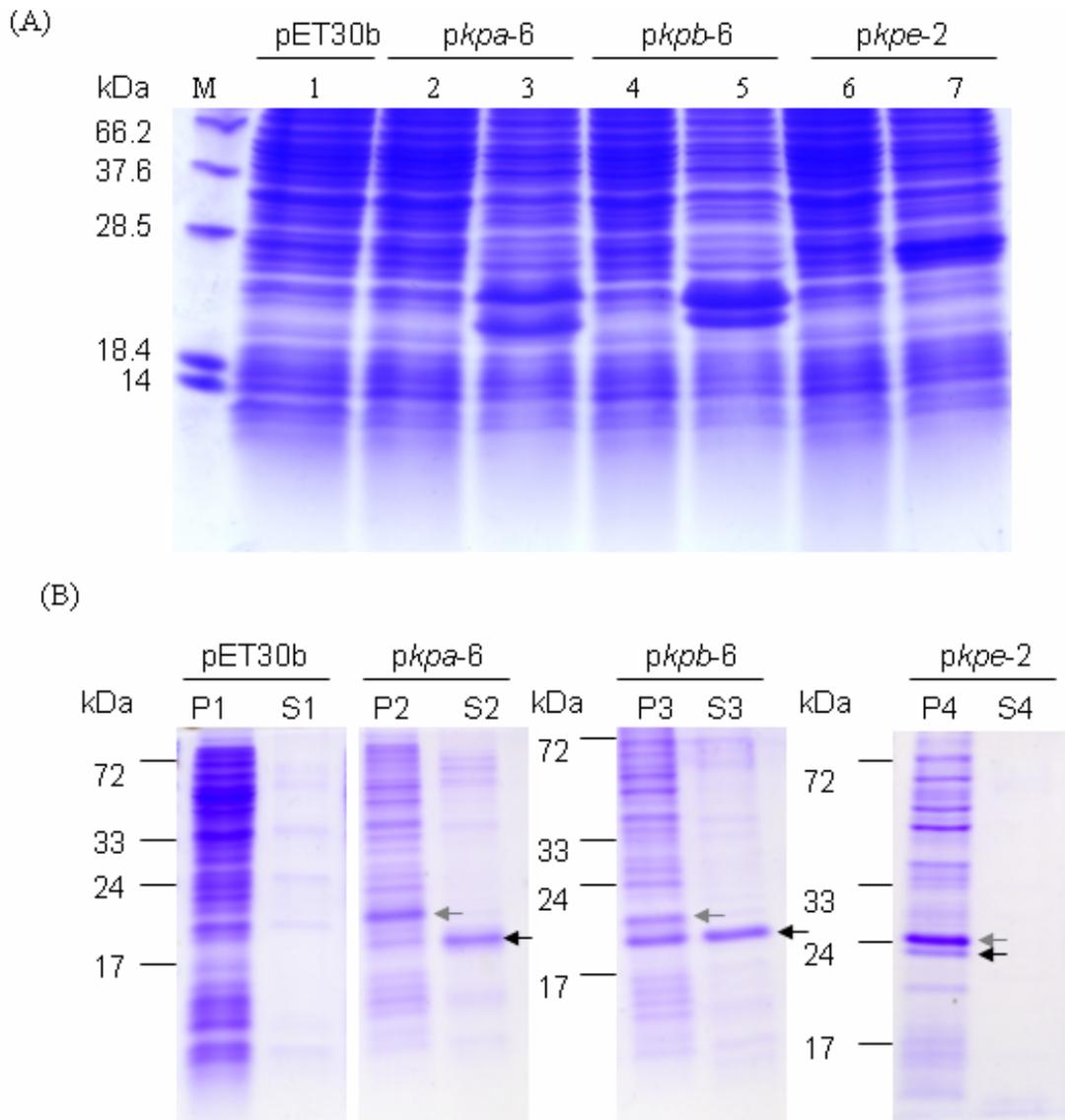




圖三、表現重組纖毛質體分析

(A)分析 *pkpa-6*、*pkpb-6* 以及 *pkpe-2* 所使用之限制內切酶切位示意圖。

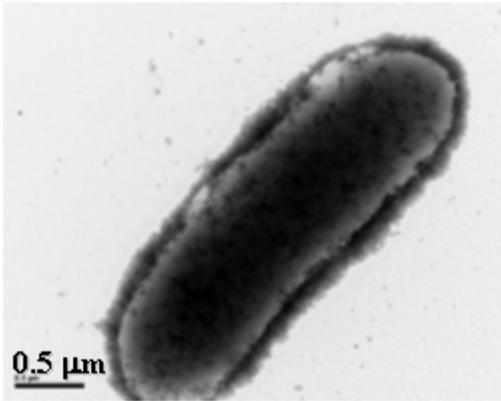
(B)*pkpa-6*、*pkpb-6* 以及 *pkpe-2* 限制內切酶作用片段長度分析。



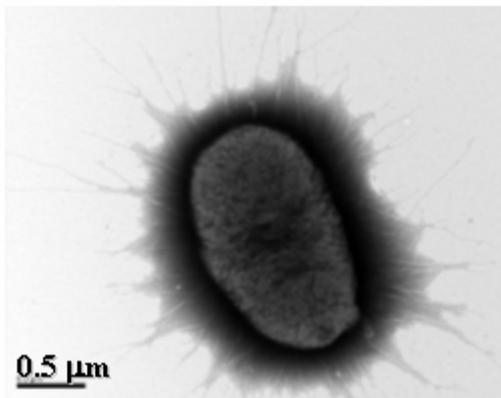
圖四、大腸桿菌表現重組纖毛蛋白質電泳分析

將隔夜在 37°C 下 LB 培養轉型的大腸桿菌菌液 1/20 稀釋到新鮮 LB，震盪培養 2 小時之後，(A) 以 1 mM IPTG 濃度誘導蛋白質表現 3 小時 (lanes 1、3、5、7) 或不加入 IPTG 震盪培養 3 小時 (lanes 2、4、6)，收集全菌蛋白後，以 13.5% SDS-PAGE 分離，再以 Coomassie Blue 染色分析。(B) 收集經 1 mM IPTG 濃度誘導表現的細菌，將細菌表面蛋白分離離心後，經沉澱物 P1、2、3、4 和上清液部分 S1、2、3、4 藉由 17.5% SDS-PAGE 分析。箭頭所示為大量表現之蛋白質帶，其中未去除訊息肽之結構蛋白(P2、3、4 灰色箭頭)只存在於菌體沉澱(P)，而去除訊息肽之結構蛋白(黑色箭頭)在(P2、3、4；S2、3)，KpaA(P2、S2 箭頭)與 KpbA(P3、S3 箭頭)存在於上清液。

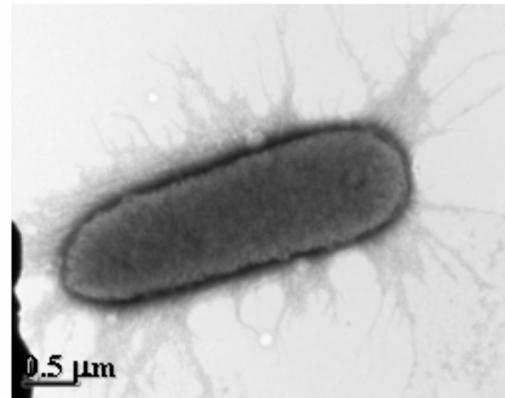
(A) *E.coli* BL21(DE3)[pET30b]



(B) *E.coli* BL21(DE3)[p*kpa-6*]

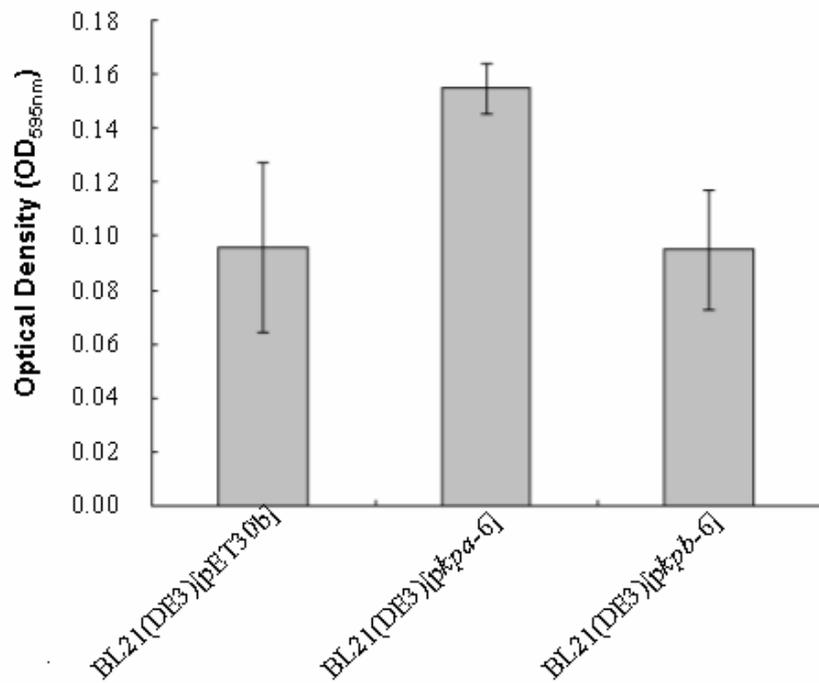


(C) *E.coli* BL21(DE3)[p*kpb-6*]



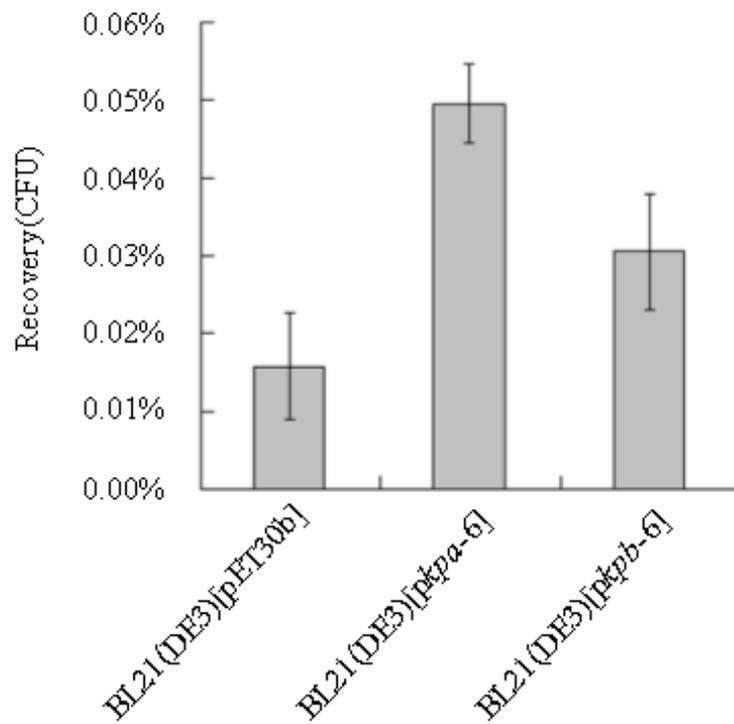
圖五、穿透式電子顯微鏡觀察重組纖毛大腸桿菌

將隔夜在 37°C 下 LB 培養轉型的大腸桿菌菌液 1/20 稀釋到新鮮 LB，震盪培養 2 小時之後，以 1 mM IPTG 濃度誘導蛋白質表現 3 小時，菌體固定在覆蓋碳膜的銅網，以 phosphotungstic acid 溶液進行負染，在 25,000-30,000 倍率下觀察的照片。



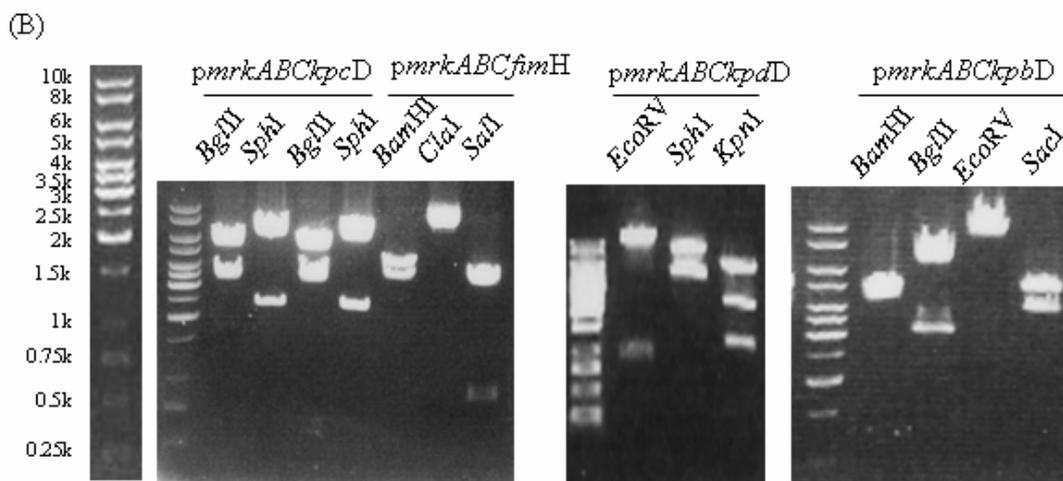
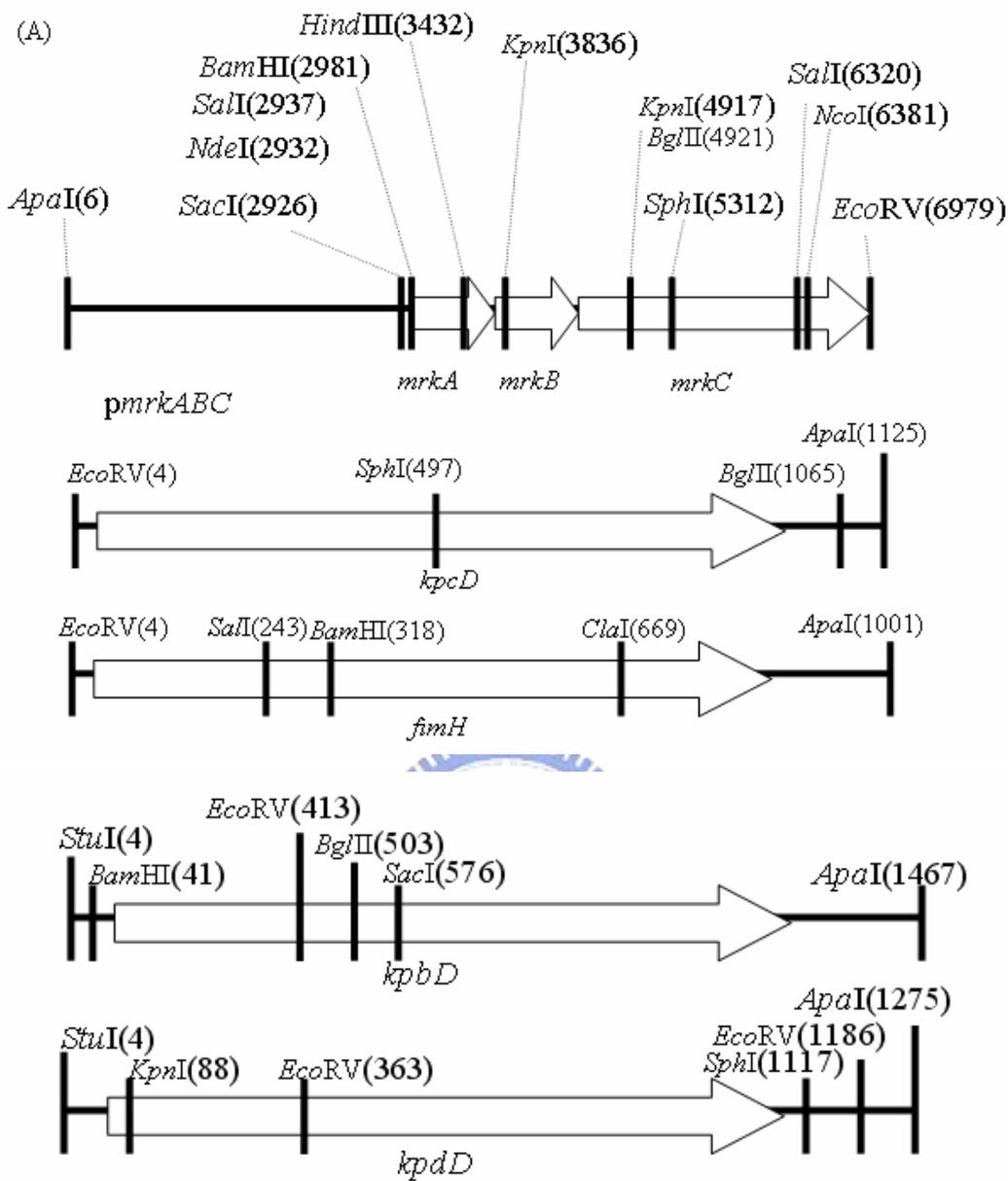
圖六、生物膜形成能力測試

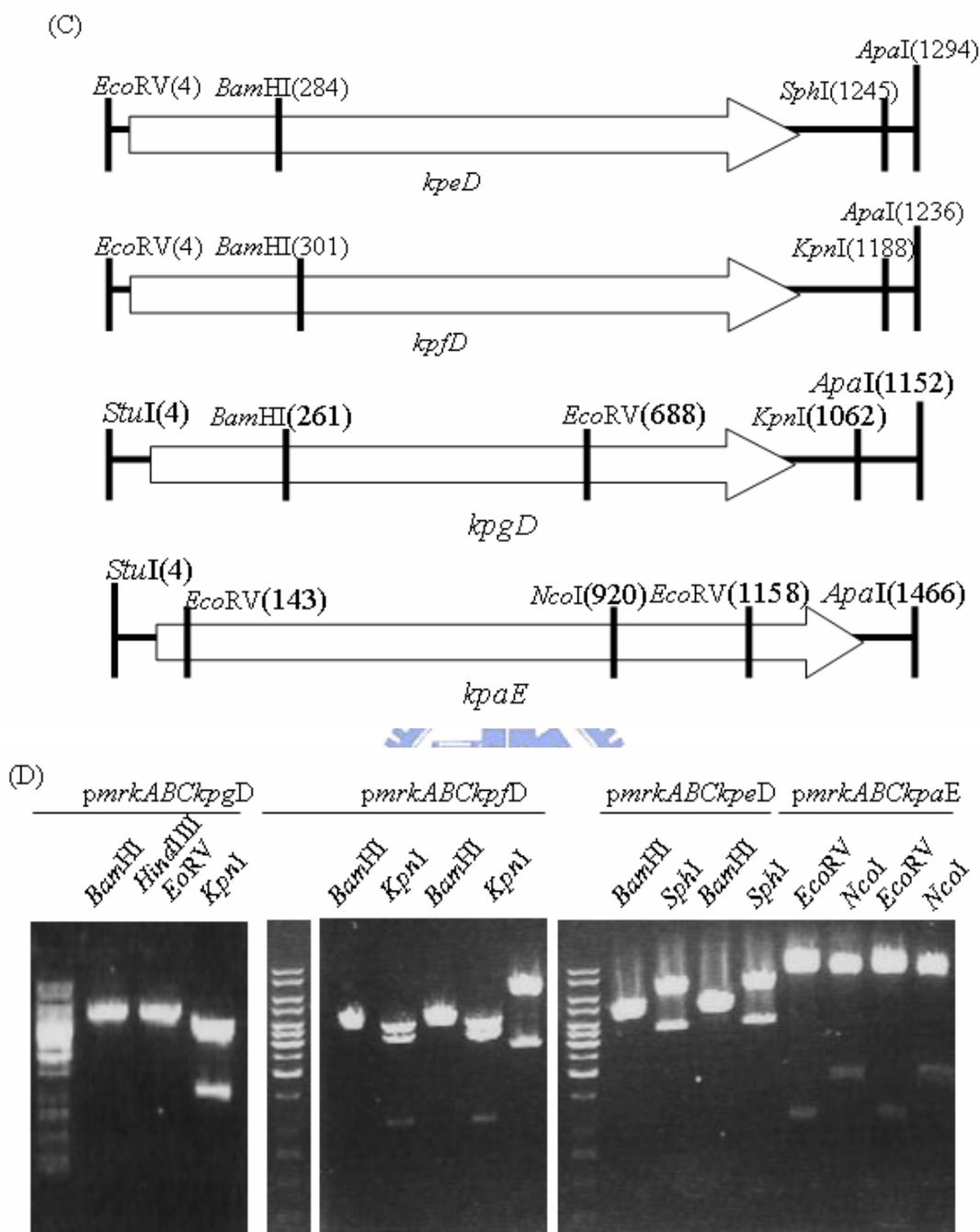
將隔夜在 37°C 下 LB 培養轉型的大腸桿菌菌液 1/100 稀釋到含 1 mM IPTG 新鮮 LB 置於 polystyrene 材質的 96 孔盤中，37°C 靜置培養 72 小時之後，以 1% 結晶紫進行生物膜的染色之後復溶在 SDS 溶液，測量 595 nm 波長下的吸光值。



圖七、細胞黏附能力測試

將隔夜在 37°C 下 LB 培養轉型的大腸桿菌菌液 1/20 稀釋到新鮮 LB，震盪培養 2 小時之後，以 1 mM IPTG 濃度誘導蛋白質表現 3 小時，以此菌液進行 HCT-8 細胞黏附能力測試，以黏附細胞之細菌回收率代表黏附力的強弱。

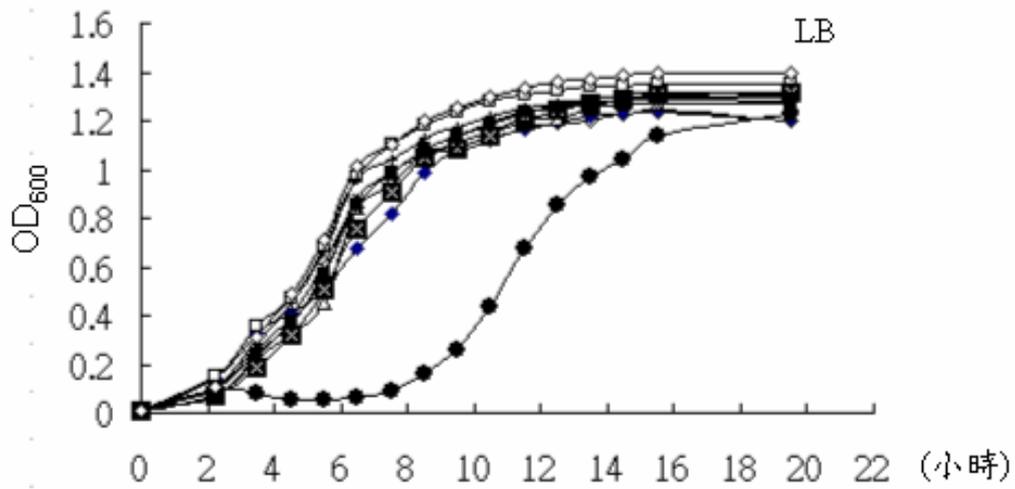
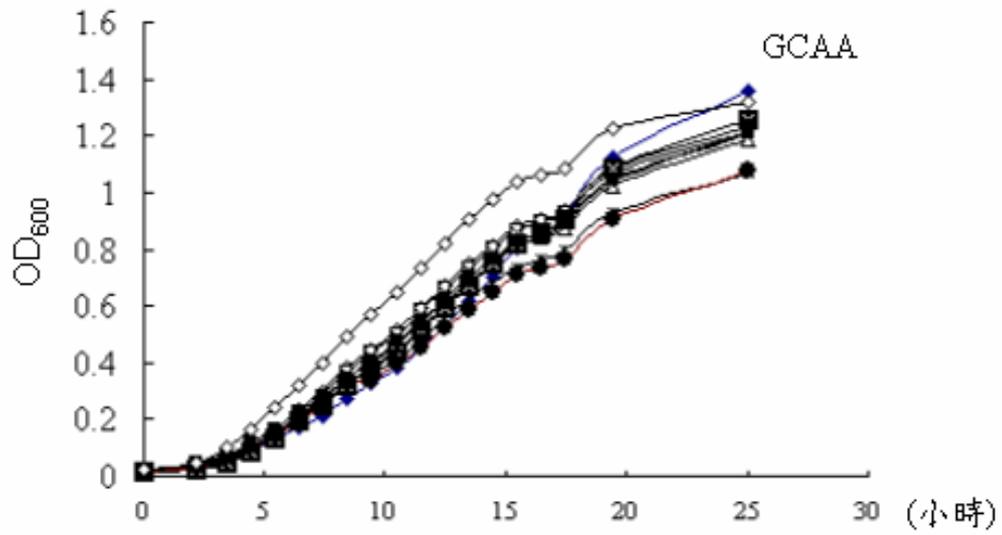




圖八、重組第三型纖毛質體分析

重組第三型纖毛質體 *pmrkABC* 接上不同的黏附蛋白基因，這些黏附基因分別以 *ApaI* 和 *EcoRV* 或 *StuI* 切點，接入 *pmrkABC* 表現重組纖毛載體，限制內切酶切點如 (圖 A、C) 所示。

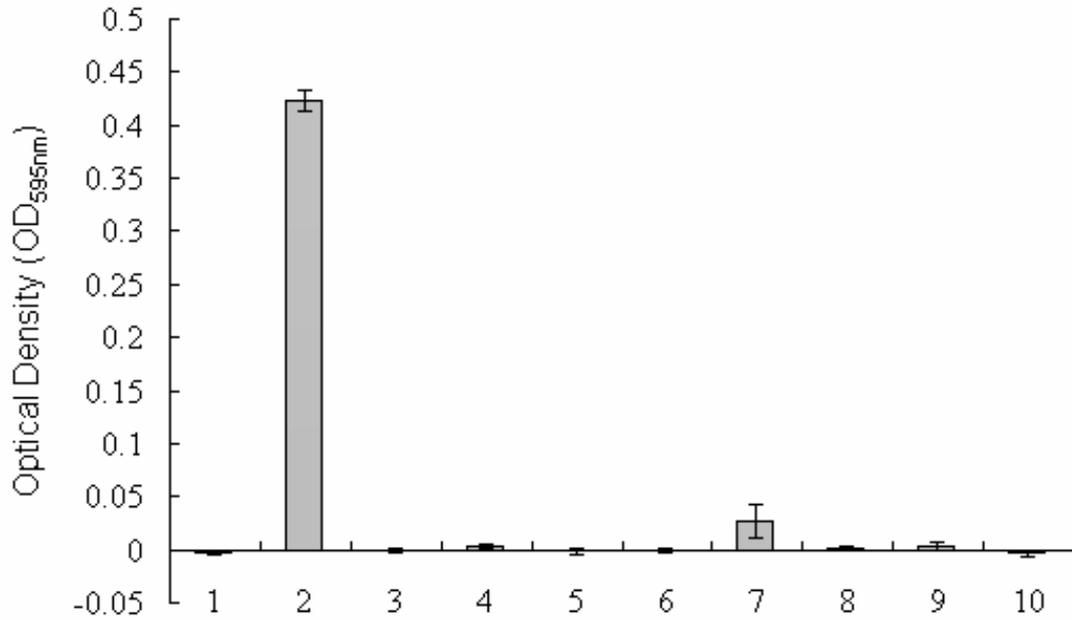
限制內切酶作用片段長度瓊膠電泳分析 (圖 B、D)，限制內切酶處理後的 DNA 片段之數量、大小與預期符合。



- | | |
|---|---------------------------------|
| —◆— JM109[<i>pmrkABC</i>] | —●— JM109[<i>pmrkABCkpdD</i>] |
| —□— JM109[<i>pmrkABCD_{MTUH}</i>] | —+— JM109[<i>pmrkABCkpeD</i>] |
| —△— JM109[<i>pmrkABCkraE</i>] | —■— JM109[<i>pmrkABCkpfD</i>] |
| —▣— JM109[<i>pmrkABCkpbD</i>] | —◇— JM109[<i>pmrkABCkpgD</i>] |
| —*— JM109[<i>pmrkABCkpcD</i>] | —◇— JM109[<i>pmrkABCfimH</i>] |

圖九、重組第三型纖毛大腸桿菌生長曲線

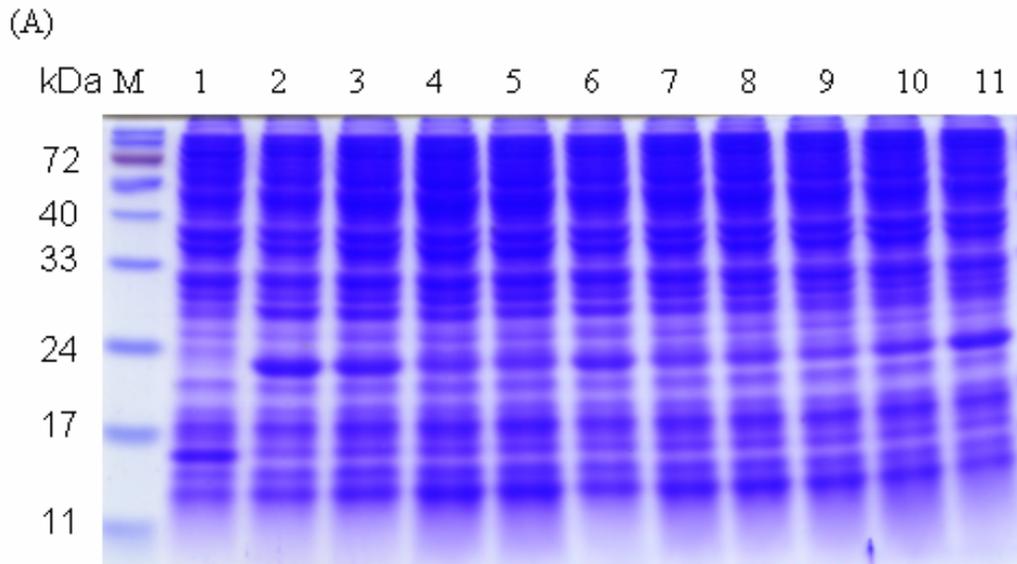
在 GCAA 與 LB 中 37°C 下培養 20 小時的大腸桿菌，以 1/100 稀釋到新鮮 GCAA 或 LB 培養液，測量不同時間點的 600 nm 波長下吸光值。



圖十、重組第三型纖毛大腸桿菌生物膜形成能力

將隔夜在 37°C 下 GCAA 培養轉型的大腸桿菌菌液 1/100 稀釋到含抗生素的新鮮 GCAA 培養液，以 polystyrene 材質的 96 孔盤，靜置培養 72 小時之後，以 1% 結晶紫進行生物膜的染色之後復溶在 SDS 溶液，測量 595 nm 波長下的吸光值。

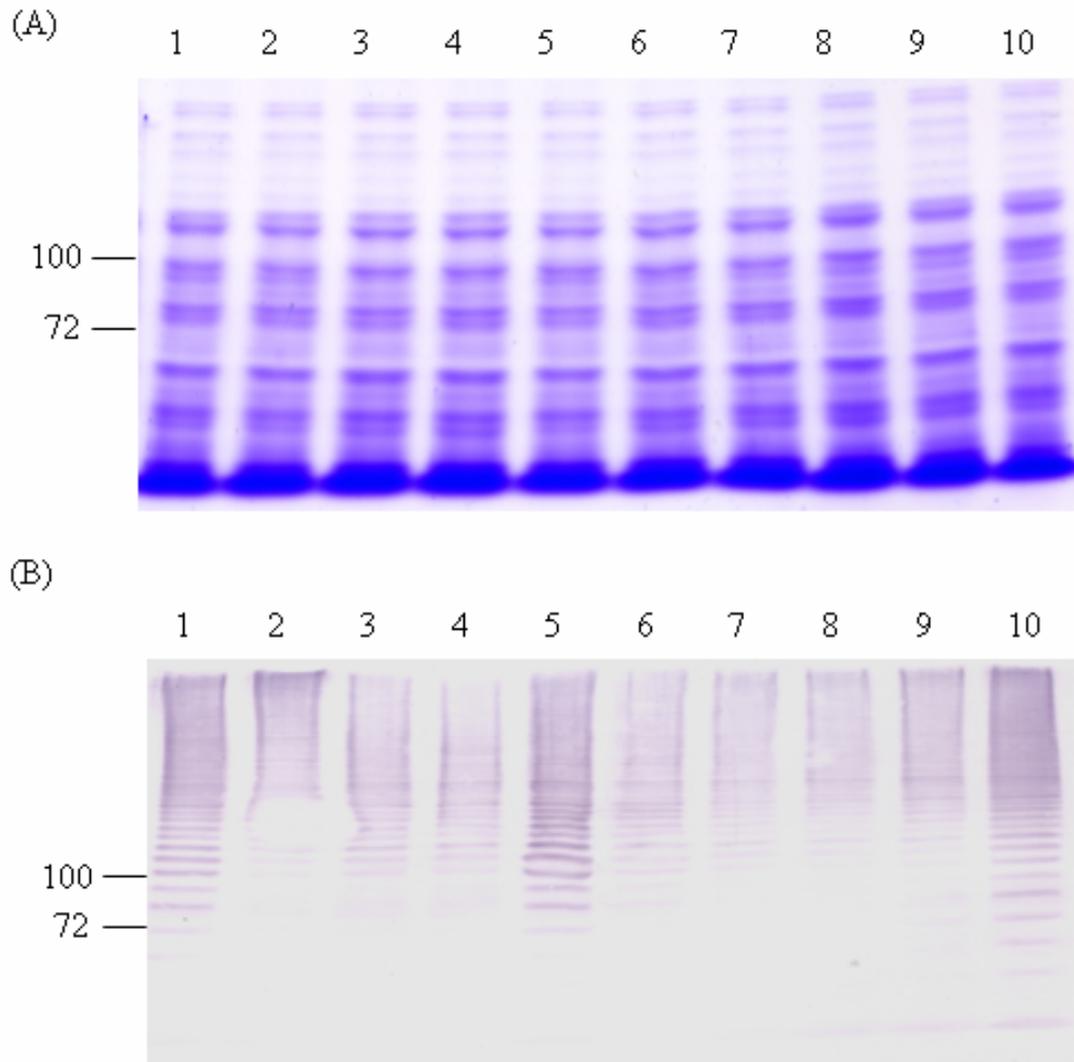
1, JM109[*pmrkABC*]; 2, JM109[*pmrkABCDNTUH*]; 3, JM109[*pmrkABCkpaE*]; 4, JM109[*pmrkABCkpbD*]; 5, JM109[*pmrkABCkpcD*]; 6, JM109[*pmrkABCkpdD*]; 7, JM109[*pmrkABCkpeD*]; 8, JM109[*pmrkABCkpfD*]; 9, JM109[*pmrkABCkpgD*]; 10, JM109[*pmrkABCfimH*]。



圖十一、重組第三型纖毛表現分析

37°C 下 GCAA 中培養 20 小時的大腸桿菌，在 95°C 下加熱 10 分鐘打破菌體，以 13.5% SDS-PAGE 分離菌體蛋白，以 Coomassie Blue 染色(A)；使用 anti-MrkA 多株抗體，以西方墨點法偵測 MrkA 的表現(B)。

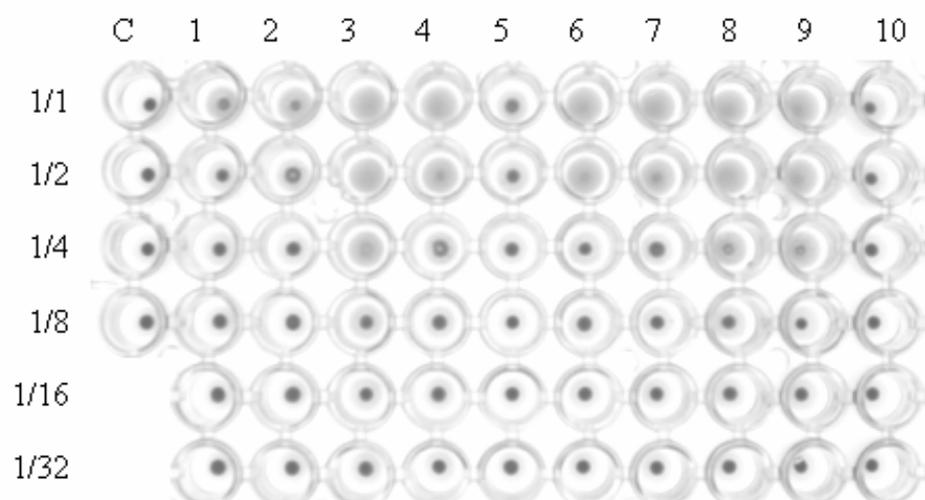
M，蛋白質分子量標記；1，JM109[pGEMT-easy]；2，JM109[*pmrkABC*]；3，JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*]；4，JM109[*pmrkABCkpaE*]；5，JM109[*pmrkABCkpbD*]；6，JM109[*pmrkABCkpcD*]；7，JM109[*pmrkABCkpdD*]；8，JM109[*pmrkABCkpeD*]；9，JM109[*pmrkABCkpfD*]；10，JM109[*pmrkABCkpgD*]；11，JM109[*pmrkABCfimH*]。



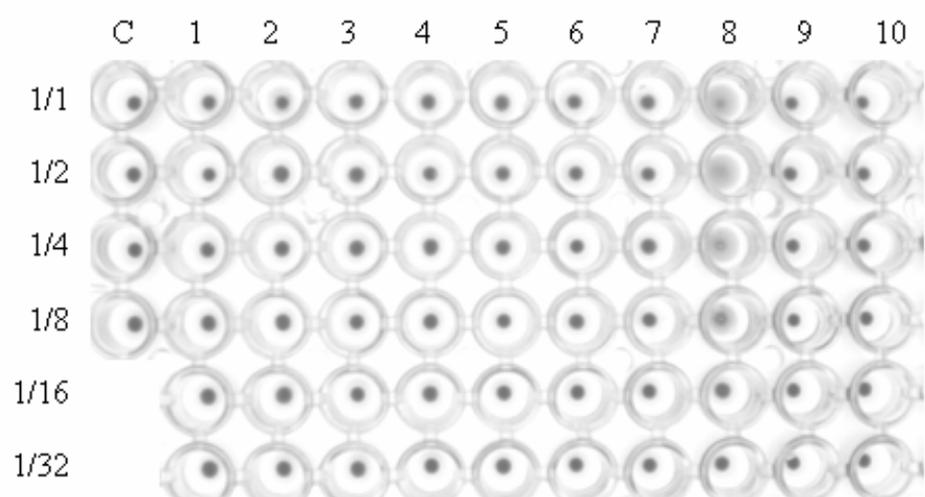
圖十二、分析重組第三型纖毛的聚合情形分析

在 37°C 下 GCAA 培養 20 小時的重組大腸桿菌，以 7.5% SDS-PAGE 分離菌體蛋白，並以 Coomassie Blue 染色 (A) 或使用 anti-MrkA 多株抗體以西方墨點法偵測 MrkA 的表現 (B)。M，蛋白質分子量標記；1, JM109[*pmrkABC*]; 2, JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*]; 3, JM109[*pmrkABCkpaE*]; 4, JM109[*pmrkABCkpbD*]; 5, JM109[*pmrkABCkpcD*]; 6, JM109[*pmrkABCkpdD*]; 7, JM109[*pmrkABCkpeD*]; 8, JM109[*pmrkABCkpfD*]; 9, JM109[*pmrkABCkpgD*]; 10, JM109[*pmrkABCfimH*].

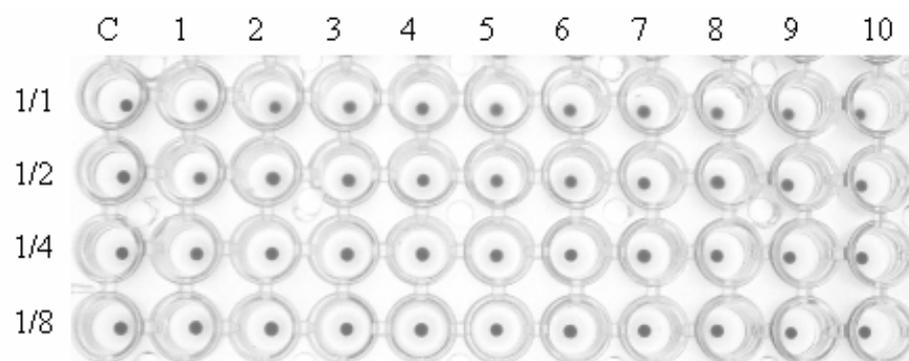
(A)

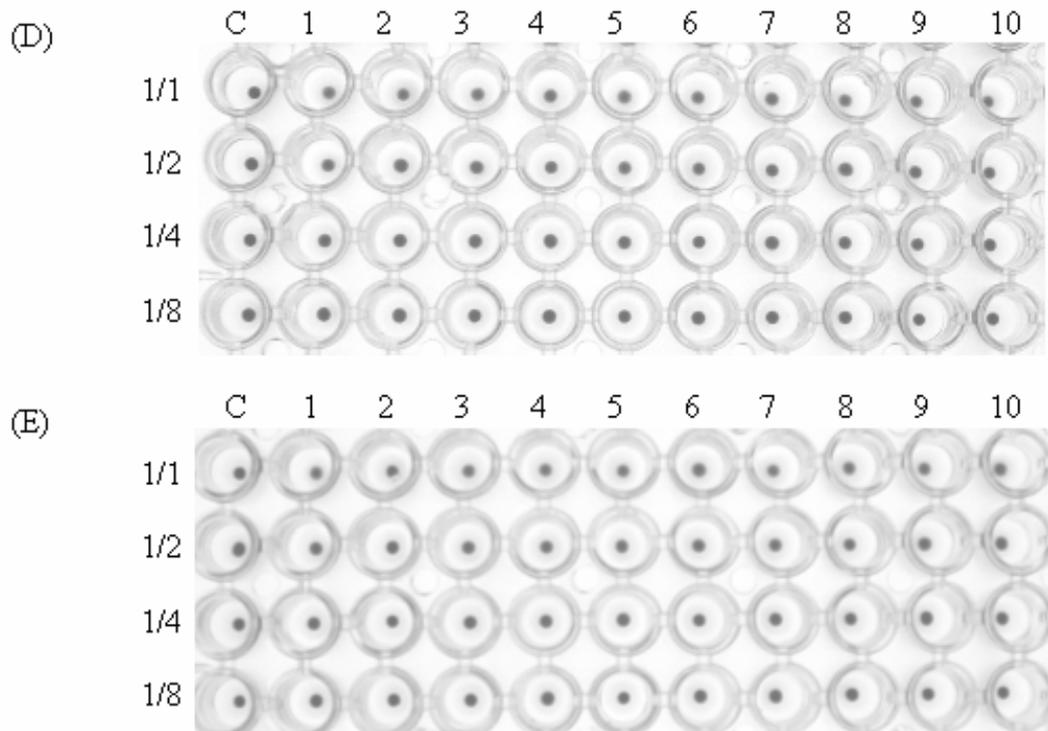


(B)



(C)





圖十三、血球凝集測試

縱軸：加入 1×10^9 CFU/ml 以 1/2 倍率序列稀釋；

C，只加PBS的對照組；1，JM109[*pmrkABC*]；2，JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*]；3，JM109[*pmrkABCkpaE*]；4，JM109[*pmrkABCkpbD*]；5，JM109[*pmrkABCkpcD*]；6，JM109[*pmrkABCkpdD*]；7，JM109[*pmrkABCkpeD*]；8，JM109[*pmrkABCkpfD*]；9，JM109[*pmrkABCkpgD*]；10，JM109[*pmrkABCfimH*]。

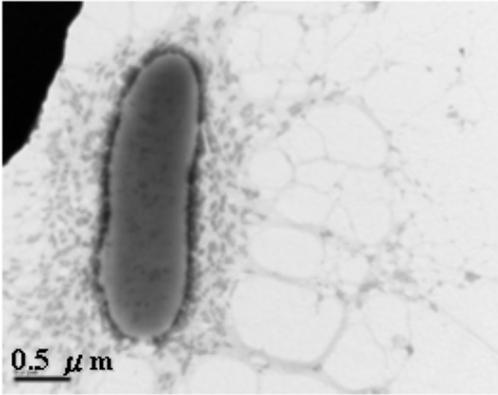
在 37°C 下，GCAA培養 20 小時的大腸桿菌以PBS洗去培養液，取 1×10^9 CFU/ml 的菌液，縱軸為 1/2 倍率序列稀釋，稀釋後與分別與 3% 兔子紅血球(A)、3% 天竺鼠紅血球(B)、人類A型紅血球(C)、馬紅血球(D)以及綿羊紅血球(E)1:1 混合，靜置後觀察血球凝集反應。

		1	10	20	30	40	50	60	70	88	Section 1	
KpfD	(1)	MRRLSDTLFLTWLSVLFMLSAFPAQAL	TCKTTSSTISEVVNIESIIKVS	SSSELIANKKIWVSSPITATF	SCEDTDNFPNGESAYFWLD							
FimH	(1)	---MMKKIIPLFTTLLLLGWSMNAWS	FACKTATGATIPIGGGSANVYVN---	LTPAVNVGQNLVVLDLSTQIF	CHNDYPETITDYVTLQ							
FimH review	(1)	-----	FACKTANGTAIPIGGGSANVYVN---	LAPVVNVGQNLVVLDLSTQIF	CHNDYPETITDYVTLQ							
Consensus	(1)		FACKTANGTAIPIGGGSANVYVN	LAPVVNVGQNLVVLDLSTQIF	CHNDYPETITDYVTLQ							
		(89)	89	100	110	120	130	140	150	160	176	Section 2
KpfD	(89)	PENKASSLPNFIOVGITYNGIDYLLQ	NKKSVEIGPATLCKDSGNTCKSPA	IGQTFSLVYQVYIISTGRSVTGD	GKIDDLKLSLQVD							
FimH	(83)	RGSAYGGVLSNFS	SGTVKYN	GTSYPPF-----	TTTETARVIYD	SRTDKPWP	AVLYLTPV	STAGGVAITAGS	LI	AVLILH		
FimH review	(60)	RGSAYGGVLSNFS	SGTVKYS	GS	SYPPF-----	TTSETPRVVYN	SRTDKPWP	VALYLT	PVSSAGGVAIKAGS	LI	AVLILR	
Consensus	(89)	RGSAYGGVLSNFS	SGTVKYS	GS	SYPPF	TTSETPRVVYN	SRTDKPWP	VALYLT	PVSSAGGVAIKAGS	LI	AVLILR	
		(177)	177	190	200	210	220	230	240	250	264	Section 3
KpfD	(177)	GQGGLRNGTAGANYNLFITGLNR	IRTMACVPTVSI	SPSEINFGDIPAGNARPGY	EKTRPFTVTYGLVKQNGS	DCGTEAMLATF	STT					
FimH	(156)	QTNNYNSDSFHF	FIWNIYANNDVVVPTGGCD--	VSARDVTVTL	PDYPGSMAVPLTVHCAQS	QQLGYLS-----	GTTAD	SANAIFT				
FimH review	(133)	QTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCD--	VSARDVTVTL	PDYPGSVPIPLTVYCAKS	QNLGYLS-----	GTTAD	AGNSIFT					
Consensus	(177)	QTNNYNSDDFQFVWNIYANNDVVVPTGGCD	VSARDVTVTL	PDYPGSVPIPLTVYCAKS	QNLGYLS	GTTAD	AGNSIFT					
		(265)	265	270	280	290	300	310	320	330	343	Section 4
KpfD	(265)	NTIQESAILLPQPD	SGFGIVISPNASMLPRIEMNAP	IHF	TLAGATLASTYTAGLLWLS	RTPKLGPF	SATAKITVTFE-					
FimH	(234)	NTASAS-----	PAQGIGVQLTRNGSAVP---	ANSTVSLGT	VGTS	PNLGLTATYARTTGQVTAGNVQ	SIIGITFVYQ-					
FimH review	(211)	NTASFS-----	PAQGVGVQLTRNGTIIP---	ANNTVSLGAVGTS	AVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQ	SIIGVTFVYQ-						
Consensus	(265)	NTASFS	PAQGVGVQLTRNGTIIP	ANNTVSLGAVGTS	AVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQ	SIIGVTFVYQ						

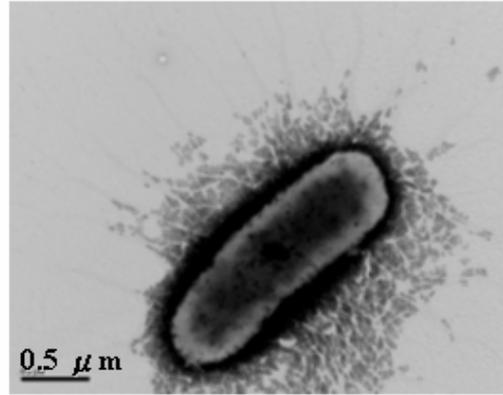
圖十四、第一型纖毛黏附蛋白FimH與KpfD胺基酸序列比對

FimH為*K. pneumoniae* NTUH-K2044所帶有的FimH序列；FimH review為大腸桿菌中被解出結構以及mannose結合序列的FimH(5)。箭頭所示為FimH與mannose結合相關的重要序列。

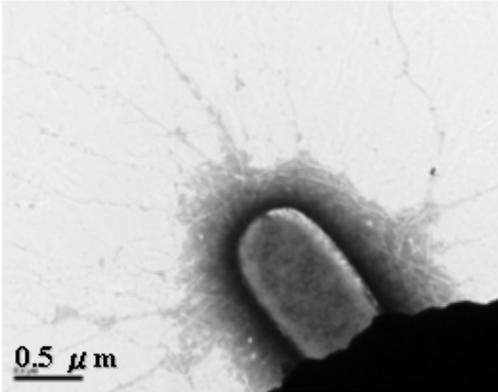
(A) *E. coli* JM109[*pmrkABC*]



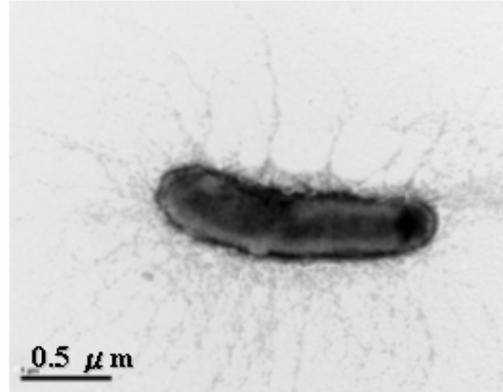
(B) *E. coli* JM109[*pmrkABCD_{NTUH}*]



(C) *E. coli* JM109[*pmrkABCkpfD*]

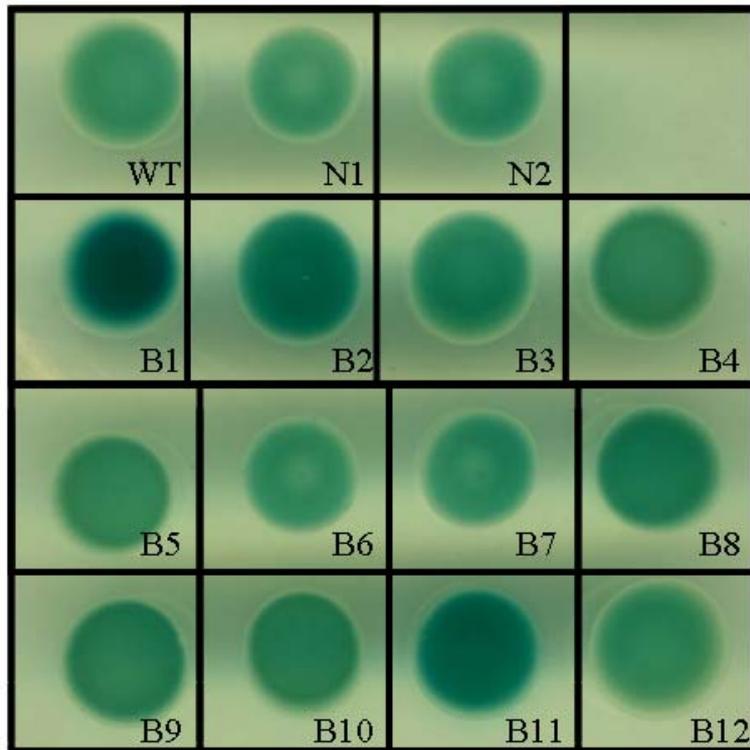


(D) *E. coli* JM109[*pmrkABCkpfD*]



圖十五、穿透式電子顯微鏡觀察重組第三型纖毛大腸桿菌

在 37°C 下，GCAA 培養 20 小時的大腸桿菌以 PBS 洗去培養液，菌體固定在覆蓋碳膜的銅網，以 phosphotungstic acid 溶液進行負染，在 30,000 倍率下觀察的照片。JM109[*pmrkABC*] 菌體大多無法觀察到纖毛，唯有(A)約 1/10 的 JM109[*pmrkABC*] 菌體觀察到具有大量但糾結的纖毛；JM109[*pmrkABCkpfD*] 可觀察到兩種主要型態的纖毛，約各佔 50%，(C)纖毛離菌體約 0.5 μm 即未呈現糾結狀，呈分散型態；(D)距離菌體大於 0.5 μm 的纖毛仍聚集呈束狀，與 JM109[*pmrkABC*] 觀察到的纖毛相似。

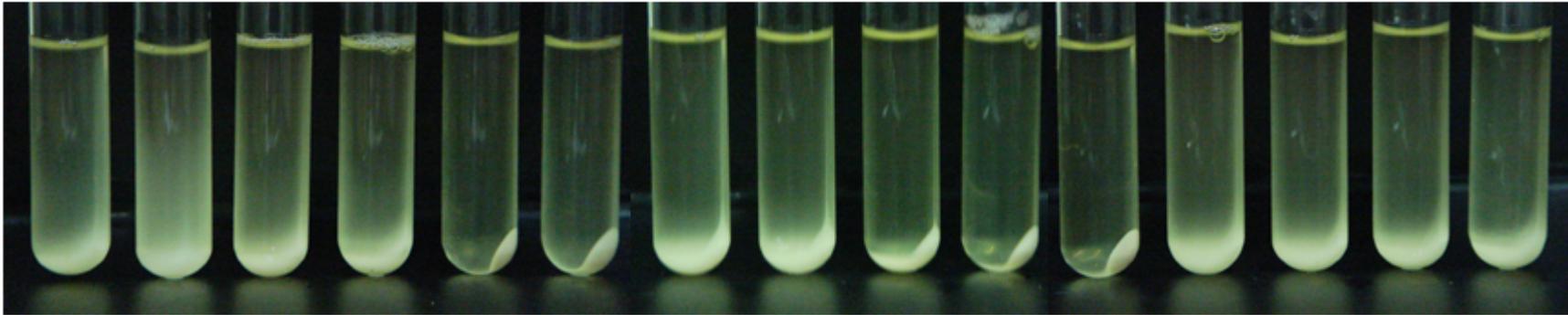


圖十六、轉位子插入突變株引導子活性分析

pPkp_d為帶有*kpd*引導子活性報導系統的質體，以在*K. pneumoniae* CG43 S3*lacZ* [pPkp_d]製造進行轉位子插入突變。將篩選出*kpd*引導子活性增強的轉位子突變株，LB培養隔夜的菌液，滴 10 μl 在表面塗X-gal 50 μl 的培養皿上，生長隔夜的菌落，圖中為X-gal的呈色反應。

WT，沒有轉位子，只帶有pPkp_d；N1~N2，9000 株轉位子突變中隨機挑出；B1~B12，9000 株轉位子突變中挑出變藍的菌落。

WT B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B12 N1 N2

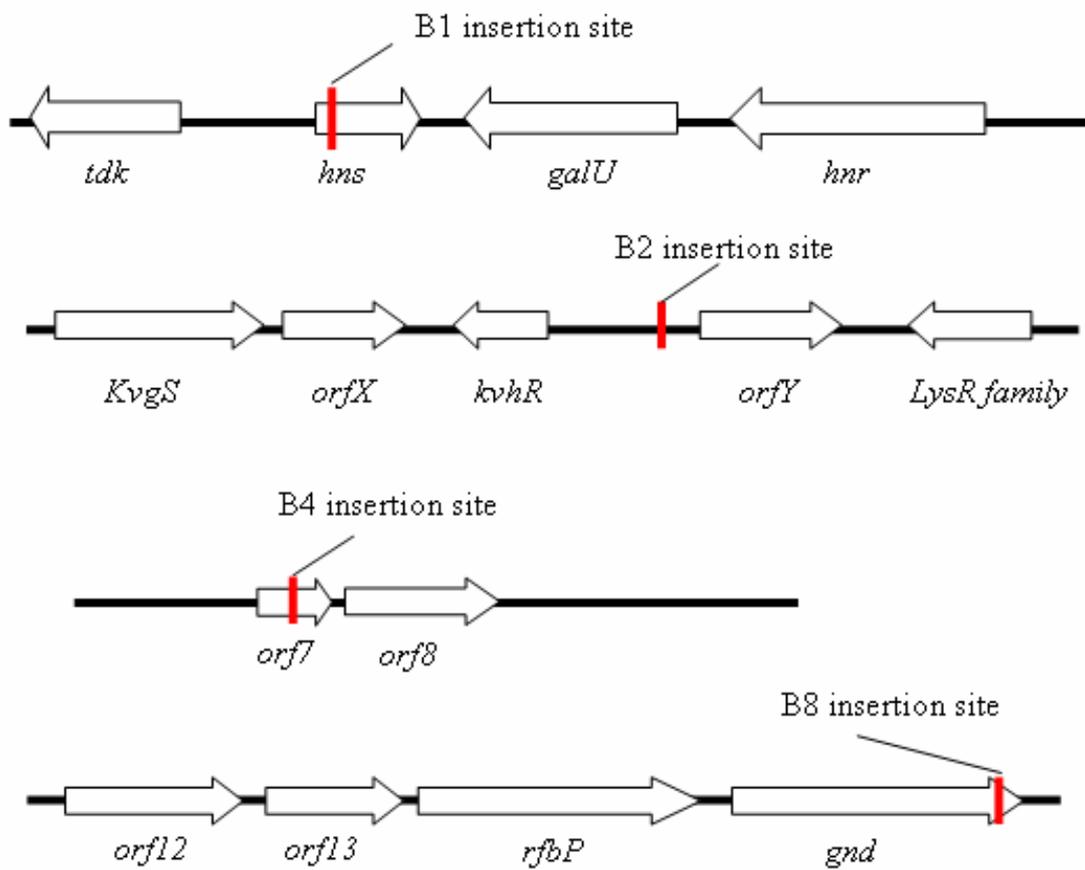


圖十七、轉位子插入突變株菌體沉降測試

pPkp_d為帶有kpd引導子活性報導系統的質體，以在*K. pneumoniae* CG43 S3lacZ [pPkp_d]製造進行轉位子插入突變。將篩選出kpd引導子活性增強的轉位子突變株。在 37°C 下，LB 震盪培養隔夜的*K. pneumoniae*，以 3000 rpm 轉速離心 5 分鐘。

WT ，無轉位子，；N1~N2，9000 株轉位子突變中隨機挑出；B1~B12， 9000 株轉位子突變中挑出變藍的菌落。





圖十八、轉位子插入序列示意圖

根據引導子活性(圖十六)以及離心(圖十七)，我們選出 B1、B2、B4 以及 B8，分析轉位子插入突變的位置，如上圖所示，選出 B1、B2、B4 以及 B8，分析轉位子插入序列。*hns* 為廣泛存在的多功能性調控基因；*kvhR* 為一套致病性相關的雙分子調控系統關聯基因；*orf7* 為莢膜多醣體生合成基因組之一；*gnd* 為莢膜多醣體生合成基因組最後一個基因。