

行政院國家科學委員會補助  
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計畫名稱：克雷白氏肺炎桿菌的引子合成體組裝過程：DnaT 與 PriB 蛋白質間的交互作用之研究 \*  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生： 張家昇  
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-042-B  
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月  
指導教授： 黃晟洋

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 99年04月01日

# 目錄

摘要	4
第一章 緒論	5
1-1 克雷白氏菌	5
1-2 引子合成體 (primosome)	6
1-3 PriB 與 DnaT	6
1-4 研究動機	7
第二章 材料與方法	8
2-1 基因選植 (Gene colony)	8
2-1-1 Vector	8
2-1-2 Insert	8
2-1-3 Growth medium	8
2-1-4 聚合酶連鎖反應 (PCR)	9
2-1-5 PCR 產物純化 (PCR clean up)	9
2-1-6 質體抽取 (Plasmid Miniprep)	10
2-1-7 電泳法回收 DNA 片段 (DNA gel extraction)	11
2-1-8 限制酶處理 (Restriction enzyme digestion)	12
2-1-9 接合反應 (ligation reaction)	12
2-1-10 <i>E. coli</i> Transformation	13
2-1-11 去氧核糖核酸定序 (DNA sequencing)	13
2-2 蛋白質表現、純化與分析 (Protein expression、purification and analysis)	14
2-2-1 蛋白質表現 (Protein expression)	14
2-2-2 蛋白質定量	14
2-2-3 十二磺酸垂直膠電泳 (SDS Vertical Slab Gel Electrophoresis)	15

2-2-4	His-tag 蛋白質純化	16
2-2-5	陰離子交換蛋白質純化 ( anion exchange protein purification )	17
2-2-6	陽離子交換蛋白質純化 ( cation exchange protein purification )	17
2-2-7	膠體過濾蛋白質純化( gel filtration protein purification )	18
2-2-8	鹽析蛋白質純化 ( salting out protein purification )	18
2-2-9	FITC 螢光蛋白質分析 ( FITC protein analysis )	18
2-2-10	膠體過濾法蛋白質分析 ( Gel filtration protein analysis )	19
2-2-11	蛋白質結晶 ( Crystallization )	19
第三章 結果		20
3-1	KpPriBb、KpDnaTb、KpDnaTb $\Delta$ His6、KpDnaTe 之基因選殖	20
3-2	利用 Affinity by Metal Chelate : HisTrap <sup>TM</sup> HP column 純化蛋白質 KpPriBb	20
3-3	利用 Affinity by Metal Chelate : HisTrap <sup>TM</sup> HP column 純化蛋白質 KpDnaTb	21
3-4	利用 Gel filtration : HiLoad <sup>TM</sup> 16 / 60 Superdex 200 pg column、Ion Exchange : HiTrap <sup>TM</sup> Q FF column、HiTrap <sup>TM</sup> SP FF column 和 salting out 純化蛋白質 KpDnaTb $\Delta$ His6	21
3-5	利用 Affinity by Metal Chelate : HisTrap <sup>TM</sup> HP column 純化蛋白質 KpDnaTe	22
3-6	利用膠體分析法分析 KpPriBb	22
3-7	利用膠體分析法分析 KpDnaTb、KpDnaTb $\Delta$ His6 and KpDnaTe	22

3-8 檢測不同濃度的 KpPriBb-FITC 螢光的強度	23
3-9 使用 FITC 技術偵測 KpPriBb 與 KpDnaTb·KpDnaTb $\Delta$ His6 and KpDnaTe 之間的交互關係	23
第四章 討論	24
參考文獻	25
圖	28
附錄	38

## 摘要

克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumonia*) 屬於格蘭氏陰性腸內桿菌科 (*Enterobacteriaceae*) 是經常引起社群及院內感染的重要致病菌，為有效對抗該菌的感染威脅，本計劃欲研究其引子合成體蛋白質群 (primosomal proteins) 的組裝過程，以作為新型抗生素的研發基礎之一。引子合成體是一個核酸與蛋白質群的複合體 (DNA-protein complex)，包含了 SSB、PriA、PriB、PriC、DnaB、DnaC、DnaG、DnaT 等八個相關蛋白質，其功能是在 DNA 複製叉 (replication forks) 上聚集並組裝，以重新啟動 DNA 複製。本計劃以 DnaT 與 PriB 之間的交互作用為研究主軸，目前已利用分子選殖技術來得到 DnaT 與 PriB 重組蛋白質，並進一步大量表現與純化這些蛋白質，最後利用膠體過濾法、螢光分析法發現 DnaT 與 PriB 為直接交互作用之蛋白質。未來預計並已著手實驗為利用突變分析法分析 DnaT 與 PriB 之間的蛋白質結合位置，並以此為出發點作為新型抗生素的研發基礎之一。

# 第一章 緒論

## 1-1 克雷白氏菌

克雷白氏肺炎菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 屬於革蘭氏陰性腸內菌科 (*Enterobacteraceae*) 是一種伺機性感染的病原細菌，平時少量存在於健康人體的呼吸道或腸道中，對免疫力下降的病人會造成嚴重感染，可引起肺炎、敗血症、腦膜炎、肝膿瘍、眼內炎、泌尿系統發炎，或是傷口感染等，若治療不當則死亡率極高<sup>2, 3, 10, 18</sup>。在台灣地區，造成化膿性肝膿瘍的菌株中，以 *Klebsiella pneumoniae* 最為常見，其分離率由早期的 30% (1977 年) 躍升至 80% (1996 年)。在糖尿病患者合併肝膿瘍的致病菌株分析中發現，*Klebsiella pneumoniae* 佔所有分離菌株的 97%，而大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 與其他的腸內菌分別只佔 2% 與 1%，這個現象與西方國家的肝膿瘍致病菌株以大腸桿菌，鏈球菌 (*Streptococcus spp.*) 和厭氧菌為主有很大的差異，因此近年來 *Klebsiella pneumoniae* 的在台灣地區表現的獨特感染行為逐漸引起廣泛注意。

*Klebsiella pneumoniae* 是院內感染常見的菌種之一，且多數的分離株都為多重抗藥性的菌種，在治療上造成極大的困擾，值得注意的是已有 10% - 20% 的院內感染菌株產生廣效性頭孢子黴素水解酵素 (Extended spectrum  $\beta$ -lactamases; ESBLs)<sup>1, 4, 9, 11, 17</sup>，嚴重的抗藥性讓 *Klebsiella pneumoniae* 成為醫療感控問題中的燙手山芋。如何預防 *Klebsiella pneumoniae* 感染，早期診斷以及有效治療受到抗藥菌株感染的病患實是當務之急。然而，發展有效可行的抗菌策略實需仰賴我們對該菌致病機轉的深入瞭解。

根據文獻報告 (附圖二)，已知的 *Klebsiella pneumoniae* 致病相關毒力因子包括：(1) 細菌表面抗原：如莢膜多醣體 (capsular

polysaccharides )，莢膜可使細菌具有抗吞噬 ( anti-phagocytosis )、抗血清殺菌 ( 即補體系統 ) 的能力；此外脂多醣體 ( lipopolysaccharides ) 除具有類似莢膜的作用外亦會引發宿主產生敗血性休克的免疫反應<sup>12,13,15</sup>。(2) 黏附因子：細菌常藉由表面黏附蛋白與宿主細胞受器的作用來達到附著的目的，如第一型與第三型的線毛 ( type I and type III fimbriae )<sup>16</sup> 以及非線毛型的黏附蛋白 CF29K 與 KPF28<sup>6,7,8</sup>。(3) 細菌競爭宿主體內鐵質來源的能力：即奪取鐵的系統 ( iron acquisition system )，主要為 siderophores，此類物質對鐵離子具有極高的親和力，在 *Klebsiella pneumoniae* 中可以分成 enterochelin 以及 aerobactin 兩種<sup>5,14</sup>。除此之外，我們對於 *Klebsiella pneumoniae* 的致病機轉仍不清楚。

## 1-2 引子合成體 ( primosome )

引子合成體是一個核酸與蛋白質群的複合體 ( DNA-protein complex )，包含了 SSB、PriA、PriB、PriC、DnaB、DnaC、DnaG、DnaT 等八個相關蛋白質，其功能是在 DNA 複製叉 ( replication forks ) 上聚集並組裝，以重新啟動 DNA 複製。

## 1-3 PriB 與 DnaT

### 1-3-1 PriB

PriB 為 primosome 的一員，在三級結構上和單股 DNA 結合蛋白 ( Single-stranded DNA binding protein，簡稱 SSB ) 有很高的相似度，但結合方法不一樣。PriB 除了可以直接與單股 DNA 結合外，還扮演了兩個角色 (1) 穩定 PriA 與 DNA-PAS ( Primosome assembly site ) 的結合和 (2) 促進 PriA-DnaT 之間複合體的合成。

### 1-3-2 DnaT

目前 DnaT 的功能尚未被證實，但 DnaT 在 DNA 複製重啟中扮演了一個不可或缺的角色，同時 DnaT 也是 primosome 中的重要一員。<sup>20</sup>

## 1-4 研究動機

目前已知人類和細菌的 DNA restart 機制有很大的不一樣，人類無 primosome 機制而細菌有，因此 primosome 可視為細菌與人類之間物種差異，若可以從 primosome 著手抗生素研發，既可專一性的撲殺細菌，並且對人類無害。本研究目標為革蘭氏陰性菌的克雷白氏肺炎菌 (*Klebsiella pneumoniae*)，*Klebsiella pneumoniae* 對台灣的糖尿病患的肝膿傷併發症有專一性的感染率，這種現象在國外並沒有，因此本實驗室欲對 *Klebsiella pneumoniae* 著手研究，期許可以為其日後抗生素研發有貢獻，則可以大大降低其台灣糖尿病肝膿傷併發症發病率。

*Klebsiella pneumoniae* 的 primosome 有八個成員，包含了 SSB、PriA、PriB、PriC、DnaB、DnaC、DnaG、DnaT 等蛋白質，其功能是在 DNA 複製叉 (replication forks) 上聚集並組裝，以重新啟動 DNA 複製。本實驗著手於 PriB 與 DnaT 之間的交互作用研究。



## 第二章 材料與方法

### 2-1 基因選植 (Gene colony)

#### 2-1-1 Vector

Vector name	Characteristics
pET21 b (+)	lacI ; Ampr ; f1 ori ;
pET21 b (+) $\Delta$ His6	lacI ; Ampr ; f2 ori ;
pET21 e (+)	lacI ; Ampr ; f3 ori ;

Map 參考附錄一

#### 2-1-2 Insert

Item	Source
KpPriB	ABR79946.1
pDnaT	ABR80158.1

#### 2-1-3 Growth medium

(1) LB / Ampicillin medium, 500 ml

Yeast extract      2.5 g

Tryptone            5 g

NaCl                 5 g

Adjust pH 7.2 ~ 7.4 → Autoclave

可冷藏於 4°C 或室溫下

在使用前加入 Ampicillin ( 100 mg / ml ) 250  $\mu$ l

(2) LB / Ampicillin plate, 500 ml

Yeast extract      2.5 g

Tryptone            5 g

NaCl                 5 g

Agar                 7.5 g

Adjust pH 7.2 ~ 7.4 → Autoclave

待溫度降至約 50°C

加入 Ampicillin ( 100 mg / ml ) 250 µl

搖晃使 Ampicillin 均勻後倒入 dish 中 待其冷卻

保存於 4°C 冷藏

## 2-1-4 聚合酶連鎖反應 ( Polymerase Chain Reaction ; PCR )

(1) 依下表配置 PCR master mix ，並加入各管 PCR tube ：

Component	Concentration	Volume ( ul / 50ul )
d.d. H2O	—	18.5 µl
PCR buffer	10X buffer	5 µl
dNTP	2.5 mM	4 µl
5' primer	10µM	1 µl
3' primer	10µM	1 µl
Template DNA	10~50ng/µl	1 µl
PE-taq / Pro-taq	1 unit	1 µl

(2) PCR 程式設定如下：

94°C 5 mins ( hot start )

94°C 15 ~ 30secs

Tm 15 ~ 30secs

72°C 30 secs ~ 2 mins

72°C 10 min

20 ~ 30cycles

註 1：依  $(G + C) \times 4 + (A + T) \times 2 = Tm$  之公式計算。

註 2：denature, annealing, and extension 之時間由產物的片段大小決定。

## 2-1-5 PCR 產物純化 ( PCR clean up )

— 利用 VIogene kit 製備

- (1) 將 PCR 產物或是經限制酶處理的反應物，與 5 倍體積的 Buffer PX 混合均勻。
- (2) 將混合好的反應物加至 column 內，以抽吸的方式使混合物通過column。
- (3) 以 13000 rpm 離心約 1 分鐘。
- (4) 加入 0.5 ml 的 Buffer WN。
- (5) 以 13000 rpm 離心約 1 分鐘。
- (6) 加入 0.5 ml 的 Buffer WS。
- (7) 以 13000 rpm 離心約 1 分鐘。
- (8) 以 13000 rpm 離心約 3 分鐘。
- (9) 加入d.d. H<sub>2</sub>O 50 μl，放置 5 分鐘後以 13000 rpm 離心約 2 分鐘。

## 2-1-6 質體抽取 (Plasmid Miniprep)

—利用 MDBio kit 製備

- (1) 將重組基因成功的單一菌落，接種於 5 ml 含適當 Amp 的 LB 培養基，37°C，250 rpm 培養 12 ~ 16 小時。
- (2) 以 8800 g 離心 15 sec，去除上清液。
- (3) 以 250 μl 的 Solution I 回溶 cell pellet，並放置冰上 2 分鐘。
- (4) 加入 250 μl 的 Solution II，慢慢地上下顛倒混合之，並放於室溫反應 4 ~ 6 分鐘。
- (5) 加入 250 μl 的 Solution III，慢慢地混合，並放於室溫反應 1 分鐘，會有白色塊狀物出現。
- (6) 以 11000 g 離心 10 分鐘。
- (7) 取上清液加入 column 中，避免弄亂白色塊狀物。
- (8) 以 6200 g 離心 1 分鐘。

- (9) 加入 500  $\mu$ l 的 Wash Solution。
- (10) 以 7100 rpm 離心 1 分鐘。
- (11) 以 8800 rpm 離心 1 分鐘。
- (12) 加入無菌水 50  $\mu$ l，放置 5 分鐘後以 13000 rpm 離心 2 分鐘。

## 2-1-7 電泳法回收 DNA 片段 (DNA gel extraction)

### (1) TAE gel 製備

Agarose powder        x g

TAE buffer        100-x g

當欲配製 1% 的 gel 則  $x = 1$  一般多使用 0.8 ~ 2% 的 gel

### (2) 利用 VIOGENE kit 製備

- A. 將 DNA 樣品 (insert DNA, plasmid) 依據大小不同，可使用不同濃度的 gel 來進行膠體電泳分析。
- B. 在 EtBr 之染色後，將 gel 置於紫外燈下，切下欲回的 DNA 片段。
- C. 加入 0.5 ml 的 Buffer GEX 於 60°C 下作用 10 分鐘，2 分鐘 vortex 一次，使其充分溶解。
- D. 將樣本加入 GP column 之中。
- E. 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘。
- F. 加入 500  $\mu$ l 的 Buffer WN。
- G. 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘。
- H. 加入 500  $\mu$ l 的 Buffer WS。
- I. 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘。
- J. 以 13,000 rpm 離心 3 分鐘。
- K. 加入無菌水 50  $\mu$ l，放置 5 分鐘後以 13,000 rpm 離

心約 2 分鐘。

### 2-1-8 限制酶處理 (Restriction enzyme digestion)

在構築質體方面，insert DNA 利用 PCR 分離出 DNA 片段，且創造 5' 端和 3' 端的限制酶 DNA 序列，而載體 (vector) 則以抽取小量質體方式獲得 DNA。在接合反應 (ligation reaction) 之前，需分別將 insert DNA 及載體 (vector) 進行以下的限制酶處理：

(1) 依序加入下列各項成份：

Component	Concentration	Volume ( $\mu$ l )
d.d. H <sub>2</sub> O	—	X $\mu$ l
Enzyme buffer	10 X buffer	2 $\mu$ l
Insert or plasmid	—	Y $\mu$ l
Restriction enzyme	10 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Total volume		20 $\mu$ l

註 1：若 insert 或載體 (vector) 體積不夠，則以 d.d. H<sub>2</sub>O 補到 20  $\mu$ l。

(2) 於 37°C 下反應 2 小時之後，再加入 restriction enzyme 0.5  $\mu$ l，繼續在 37°C 反應 3 小時。

(3) 經限制酶處理的載體 (vector)，利用 gel extraction kit 回收 DNA 片段，insert 則利用 PCR purification kit 回收 DNA。

### 2-1-9 接合反應 (ligation reaction)

依序加入下列各項成份：

Component	Concentration	Volume ( $\mu$ l )
d.d. H <sub>2</sub> O	—	3 $\mu$ l
Ligation buffer	10X buffer	1 $\mu$ l

PCR product	—	0.5 ~ 3 $\mu$ l
vector	25 ng/ $\mu$ l	2 $\mu$ l
T4 DNA ligase	4.0 Weiss units	1 $\mu$ l
Total volume		10 $\mu$ l

置放於 4°C 反應 overnight。

註1：PCR 產物之量以其濃度來決定

## 2-1-10 *E. coli* Transformation

### (1) Competent cell

使用 ECOS™ 21 、 ECOS™ 101

### (2) Transformation

- A. 從 -80°C 冰箱中取出 *E. coli* competent cell 放置冰上約 10 ~ 15 分鐘解凍。
- B. 加入欲 transform 的 plasmid DNA ( 約 1 ng /  $\mu$ l ) 或接合反應產物 ( ligation reaction ) 到菌管內，放置冰上約 30 分鐘。
- C. 將離心管放在 42°C 水浴中約 30 秒 ( heat shock ) 。
- D. 將溶液均勻塗抹於含適當抗生素的 LB plate 上。
- E. 將 plate 放置於 37°C 培養箱中約 12 ~ 16 小時。
- F. 挑起白色菌落 ( colony ) 進行篩選。

## 2-1-11 去氧核糖核酸定序 ( DNA sequencing )

- (1) 本實驗之 DNA 定序皆委由明欣生物科技有限公司進行。
- (2) DNA 定序結果經整合分析後 sequencer ( Gene code CO., Ann Arbor, MI, U.S.A ) 軟體進行分析。
- (3) 同時將 DNA 序列送到 NCBI 網站進行核酸 ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> ) 及蛋白質

( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> ) 相似性的分析。

## 2-2蛋白質表現、純化與分析 ( Protein expression、purification and analysis )

### 2-2-1 蛋白質表現 ( Protein expression )

- (1) 挑取已基因選殖之細胞接種至 4 ml LB 含 ampicillin, 37°C 隔夜震盪培養。
- (2) 將隔夜菌液加至 500 ml LB 含 ampicillin 震盪培養。
- (3) 以分光光度計偵測菌液生長情形，於 OD600 約為 1.6 時，加入 IPTG，使其最終濃度為 1 mM，繼續培養 4 小時。
- (4) 4°C 下，以 11000 rpm 轉速離心 20 分鐘。
- (5) 倒掉上清液，以 20 ml buffer X 重新懸浮。
- (6) 以超音波破碎機將溶於 buffer X 之菌體打破。
- (7) 4°C 下，以 14000 rpm 離心 20 分鐘，收集上清液。

註 1：buffer X 視後續純化方式而有所不同。

### 2-2-2 蛋白質定量

採用Bradford方式進行定量。

- (1) 將10 $\mu$ L 待測試樣，加入990 $\mu$ L 之Bio- Rad protein Assay Dye Reagent 試劑中以振盪 (Vortex) 混合均勻。
- (2) 置於室溫作用10分鐘後，於一個小時內，利用分光光度計測定其在595 nm 波長的吸收值。
- (3) 以不同濃度 (0、5、10、15、20 mg / mL) 之 BSA，加入 Bio-Rad 試劑中，測其 595 nm 波長之吸光值，即可求出標

準曲線，再由標準曲線換算出被測樣本之濃度。

### 2-2-3 十二磺酸垂直膠電泳 (SDS Vertical Slab Gel Electrophoresis)

(1) 分離膠體層 (resolution gel) (12%)

A. 依序加入下列各項成份：

Component	Volume ( $\mu$ l )
d.d. H <sub>2</sub> O	1650
30% Acrylamide	2000
1.5 M Tris-HCl buffer ( pH = 8.8 )	1250
10% APS	50
10% sodium dodecyl sulfate ( SDS )	50
tetramethylethylenediamine ( TEMED )	1.5

B. 均勻混和上述步驟溶液。

C. 加入兩片玻璃之間空隙約 12.5 cm。

D. 加入 1 ml EtOH 去除膠體上方氣泡。

E. 靜置 40 分鐘。

(2) 焦集膠體層 (stacking gel) (4%)

A. 依序加入下列各項成份：

Component	Volume ( $\mu$ l )
d.d. H <sub>2</sub> O	1500
30% Acrylamide	330
0.5 M Tris-HCl buffer ( pH = 6.8 )	630
10% APS	25
10% sodium dodecyl sulfate ( SDS )	25
tetramethylethylenediamine ( TEMED )	1



- B. 均勻混和上述步驟溶液。
- C. 加入兩片玻璃之間空隙至滿為止。
- D. 將鋸齒狀梳子插入其中。
- E. 靜置 20 分鐘。

### (3) SDS - PAGE

- A. 將做好的膠體由架上取下固定在電泳槽上。
- B. 取 450 ml d.d. H<sub>2</sub>O 以及 50 ml 10 X SDS running buffer 混和倒入電泳槽內外兩層中。
- C. 取實驗樣本 20  $\mu$ l 與 3X sample buffer 10 $\mu$ l 混和，於 98.5 °C 下 10 分鐘。
- D. 取 15 $\mu$ l 實驗樣本與 3 $\mu$ l marker 分別加入電泳片上。
- E. 電壓 70 mV 20 分鐘後 150 mV 40 分鐘。
- F. 待跑膠完後將膠片取下放入 Coomassie brilliant blue R-250 中搖擺染色 1 小時。
- G. 將膠體移至退染劑（40% 甲醇加 10% 醋酸）中脫色，直至膠片背景顏色接近透明。

## 2-2-4 His-tag 蛋白質純化

- (1) 將以基因選殖成功且蛋白質成功表現的菌體溶解到 5 mM imidazole、500 mM NaCl、pH7.4 buffer 中，比例為 1000 ml LB 離心後菌體融入 40 ml buffer。
- (2) 將 affinity by metal chelate column : HisTrap<sup>TM</sup> HP 通入 50mM NiSO<sub>4</sub> 30ml。
- (3) 將蛋白質通入 column 中。
- (4) 依序使用 pH7.4、500 mM NaCl 的 5 mM、60 mM、80 mM、100mM、150 mM、200 mM、300 mM、500 mM imidazole

buffer 通入 column。

- (5) 使用 100 mM EDTA、pH 8.00 與 2 M NaCl 清洗 column，最後用 10 % EtOH 保存 column。

### **2-2-5 陰離子交換蛋白質純化 (anion exchange protein purification)**

- (1) 將以基因選殖成功且蛋白質成功表現的菌體溶解到 50 mM NaCl、20 mM Tris、pH8.0 buffer 中，比例為 1000 ml LB 離心後菌體融入 40 ml buffer。
- (2) 將 anion exchange column：HiTrap™ Q FF 通入 50 mM NaCl、20 mM Tris、pH8.0 buffer 30ml。
- (3) 將蛋白質通入 column 中。
- (4) 將 buffer A (50 mM NaCl、20 mM Tris、pH8.0 buffer) 與 buffer B (500 mM NaCl、20 mM Tris、pH8.0 buffer) 利用 Ä KTA prime protein purification system 設定濃度梯度，從 100 % buffer A、0 % buffer B 到 0 % buffer A、100 % buffer B。
- (5) 流速為 3 ml / min，每 5 ml 收集成一管共 500 ml、100 管。

### **2-2-6 陽離子交換蛋白質純化 (cation exchange protein purification)**

- (1) 將以基因選殖成功且蛋白質成功表現的菌體溶解到 50 mM NaCl、20 mM HEPES、pH6.2 buffer 中，比例為 1000 ml LB 離心後菌體融入 40 ml buffer。
- (2) 將 cation exchange column：HiTrap™ SP FF 通入 50 mM NaCl、20 mM HEPES、pH6.2 buffer 30ml。

- (3) 將蛋白質通入 column 中。
- (4) 將 buffer A (50 mM NaCl、20 mM HEPES、pH6.2 buffer) 與 buffer B (500 mM NaCl、20 mM HEPES、pH6.2 buffer) 利用 ÄKTA prime protein purification system 設定濃度梯度，從 100 % buffer A、0 % buffer B 到 0 % buffer A、100 % buffer B。
- (5) 流速為 3 ml / min，每 5 ml 收集成一管共 500 ml、100 管。

### **2-2-7 膠體過濾蛋白質純化 (gel filtration protein purification)**

- (1) 將以基因選殖成功且蛋白質成功表現的菌體溶解到 100 mM NaCl、20 mM Tris、pH7.9 buffer 中，比例為 1000 ml LB 離心後菌體融入 40 ml buffer。
- (2) 將 gel filtration column : HiLoad<sup>TM</sup> 16/60 Superdex 200 pg 通入 100 mM NaCl、20 mM Tris、pH7.9 buffer 30ml。
- (3) 將蛋白質通入 column 中。
- (4) 將 100 mM NaCl、20 mM Tris、pH7.9 buffer 利用 ÄKTA prime protein purification system 設定流速 1 ml / min，每 2 ml 收集成一管直到蛋白質完全通過 column。

### **2-2-8 鹽析蛋白質純化 (salting out protein purification)**

- (1) 配置 1 M、2 M、3 M、4 M、5 M NaCl。
- (2) 混和 NaCl 與蛋白質，比例 1 : 1。
- (3) 使用 13000 rpm 離心，收集上清液。
- (4) 使用 d.d. H<sub>2</sub>O 溶解沉澱物收集。

### **2-2-9 FITC 螢光蛋白質分析 (FITC protein analysis)**

- (1) 使用 Thermo 的 Pierce FITC Antibody Labeling Kit。
- (2) Label KpPriBb。
- (3) 使用 HITACHI F-2700 Fluorescence Spectrophotometer 分析 KpPriBb-FITC 與 KpDnaTb、KpDnaTb  $\Delta$ His6、KpDnaTe 之間的交互作用。

#### **2-2-10 膠體過濾法蛋白質分析 (Gel filtration protein analysis)**

- (1) 使用 gel filtration column : Superdex 200 10/300 GL。
- (2) Buffer 為 100 mM NaCl、20 mM Phosphate、pH7.9。
- (3) 利用 Ä KTA prime protein purification system 設定流速 0.3 ml / min，每 1 ml 收集成一管直到蛋白質完全通過 column。

#### **2-2-11 蛋白質結晶 (Crystallization)**

- (1) 使用中研院公共儀器 - 蛋白質結晶設施來結晶。
- (2) 將數以千種的不同 buffer，各別與目標蛋白質混和。
- (3) 放置室溫數天至數月。
- (4) 使用光學顯微鏡觀察其結晶狀況。

## 第三章 結果

### 3-1 KpPriBb、KpDnaTb、KpDnaTb $\Delta$ His6、KpDnaTe 之 基因選殖

為了要瞭解 KpPriB 與 KpDnaT 的交互作用，我們基因選殖了兩個基因 KpPriB 與 KpDnaT 在三個不同的載體 (vector) 上，分別為 pET21 b (+)、pET21 b (+)  $\Delta$ His6 與 pET21 e (+)，得到四個重組基因：KpPriBb、KpDnaTb、KpDnaTb  $\Delta$ His6 與 KpDnaTe (圖一)。接著將這些重組基因 transform 至 competent cell (*ECOS*<sup>TM</sup> 101) 中，利用 LB / Amp agar plate (含 Ampicillin 50  $\mu$ g / ml) 來篩選，若有成功則以 5 ml 菌液抽取少量質體 DNA 去定序，當 DNA 序列正確無誤時，便可以 transform 至另一個 competent cell (*ECOS*<sup>TM</sup> 21) 中，已備於蛋白質表現。

### 3-2 利用 Affinity by Metal Chelate: HisTrap<sup>TM</sup> HP column 純化蛋白質 KpPriBb

pET21 b (+) 上有 His tag 所以可以用 Affinity by Metal Chelate: HisTrap<sup>TM</sup> HP column 純化。依序使用 pH7.4、500 mM NaCl 的 5 mM、60 mM、80 mM、100mM、150 mM、200 mM、300 mM、500 mM imidazole buffer 通入 column，收集濾液並用 SDS-PAGE (圖二) 分析，發現 pH7.4、500 mM NaCl、200 mM imidazole buffer 的濾液含有高純度且量多的蛋白質。

### 3-3 利用 Affinity by Metal Chelate: HisTrap<sup>TM</sup> HP column 純化蛋白質 KpDnaTb

pET21 b (+) 上有 His tag 所以可以用 Affinity by Metal Chelate : HisTrap<sup>TM</sup> HP column 純化。依序使用 pH7.4、500 mM NaCl 的 100mM、150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、500 mM imidazole buffer 通入 column，收集濾液並用 SDS-PAGE (圖三) 分析，發現 pH7.4、500 mM NaCl、300 mM imidazole buffer 的濾液含有高純度且量多的蛋白質。

### **3-4利用 Gel filtration : HiLoad<sup>TM</sup> 16 / 60 Superdex 200 pg column、Ion Exchange : HiTrap<sup>TM</sup> Q FF column、HiTrap<sup>TM</sup> SP FF column 和 salting out 純化蛋白質 KpDnaTb $\Delta$ His6**

因為 pET21 b (+)  $\Delta$ His6 上沒有 His tag 所以不可以用 Affinity by Metal Chelate : HisTrap<sup>TM</sup> HP column 純化。依序使用 HiTrap<sup>TM</sup> Q FF column、HiTrap<sup>TM</sup> SP FF column、HiTrap<sup>TM</sup> Q FF column、1 M salting out 與 HiLoad<sup>TM</sup> 16 / 60 Superdex 200 pg column 純化 KpDnaTb  $\Delta$ His6。每個過程皆收集濾液並用 SDS-PAGE (圖四、五、六、七) 分析，經過一連串純化後可以得到高純度的蛋白質。第一次 HiTrap<sup>TM</sup> Q FF column 取第 21 管到 63 管濾液做下一步實驗，濾液為 144.5 mM ~ 333.5 mM NaCl、20 mM Tris、pH8.0 buffer。HiTrap<sup>TM</sup> SP FF column 取第 20 管到 48 管濾液做下一步純化，濾液為 140 mM ~ 266 mM NaCl、20 mM HEPES、pH6.2 buffer。第二次 HiTrap<sup>TM</sup> Q FF column 取第 25 管到 51 管濾液做下一步純化，濾液為 162.5 mM ~ 279.5 mM NaCl、20 mM Tris、pH8.0 buffer。1 M NaCl salting out 取上清液，做下一步純化。HiLoad<sup>TM</sup> 16 / 60 Superdex 200 pg column 取第 27 管到 33 管濾液，濾液為 100 mM NaCl、20 mM Tris、pH7.9 buffer。

### 3-5利用 Affinity by Metal Chelate: HisTrap™ HP column

#### 純化蛋白質 KpDnaTe

pET21 e (+) 上有 His tag 所以可以用 Affinity by Metal Chelate : HisTrap™ HP column 純化。依序使用 pH7.4、500 mM NaCl 的 5 mM、100 mM、150 mM、200 mM、300 mM、500 mM imidazole buffer 通入 column，收集濾液並用 SDS-PAGE (圖八) 分析，發現 pH7.4、500 mM NaCl、300 mM imidazole buffer 的濾液含有高純度且量多的蛋白質。

### 3-6利用膠體分析法分析 KpPriBb

使用 Superdex 200 10/300 GL column 測試 KpPriBb 三次，各得單一波峰，數值分別為 18.87 ml、18.74 ml 與 18.71 ml，gel filtration 結果只有單一波峰並無其他波峰，由此可知我們得到一個純度很高的 KpPriBb。(圖九)

### 3-7利用膠體分析法分析 KpDnaTb、KpDnaTb $\Delta$ His6 and KpDnaTe

使用 Superdex 200 10/300 GL column 測試 KpDnaTb、KpDnaTb  $\Delta$ His6 and KpDnaTe 各兩次，將各自兩組數據平均並繪製於同一圖表做比較，可得三種 DnaT 皆有兩個波峰，後來經 SDS-PAGE 確認前面的波峰才是目標蛋白質，後面波峰為目標蛋白質裂解後的產物。KpDnaTb、KpDnaTb  $\Delta$ His6 and KpDnaTe 的分子大小為 KpDnaTb His6 (19.73 ml) > KpDnaTb (19.05 ml) > KpDnaTe (18.06 ml)。(圖十)

### 3-8檢測不同濃度的 KpPriBb-FITC 螢光的強度

使用 HITACHI F-2700 Fluorescence Spectrophotometer 分析 KpPriBb-FITC 在不同濃度時的螢光強度。螢光強度呈現線性關係，後續實驗會取 2.5 nM KpPriBb-FITC 做實驗，2.5 nM KpPriBb-FITC 螢光強度約 1100 左右。(圖十一)

### **3-9使用 FITC 技術偵測 KpPriBb 與 KpDnaTb、 KpDnaTb $\Delta$ His6 and KpDnaTe 之間的交互關係**

使用 HITACHI F-2700 Fluorescence Spectrophotometer 分析 KpPriBb-FITC 在與 KpDnaTb、KpDnaTb  $\Delta$ His6 and KpDnaTe 之間的交互關係，d.d. H<sub>2</sub>O 為控制組。KpDnaTb  $\Delta$ His6 與 KpPriBb-FITC 之間的交互作用最為強烈。(圖十二)



## 第四章 討論

為了要瞭解 KpPriB 與 KpDnaT 的交互作用，我們基因選殖了兩個基因 KpPriB 與 KpDnaT 在三個不同的載體 (vector) 上，分別為 pET21 b (+)、pET21 b (+)  $\Delta$ His6 與 pET21 e (+)，得到四個重組基因：KpPriBb、KpDnaTb、KpDnaTb  $\Delta$ His6 與 KpDnaTe。接著將這些重組基因 transform 至 competent cell (*ECOS*<sup>TM</sup> 101) 中，利用 LB / Amp agar plate (含 Ampicillin 50  $\mu$ g / ml) 來篩選，若有成功則以 5 ml 菌液抽取小量質體 DNA 去定序，當 DNA 序列正確無誤時，便可以 transform 至另一個 competent cell (*ECOS*<sup>TM</sup> 21) 中，已備於蛋白質表現。

KpPriBb、KpDnaTb 與 KpDnaTe 因其 vector pET21 b(+)、pET21 e(+) 上有 His tag 所以可以用 Affinity by Metal Chelate: HisTrap<sup>TM</sup> HP column 純化。並且都在 pH7.4、500 mM NaCl、300 mM imidazole buffer 下收集到高純度且量多的蛋白質。而 KpDnaTb  $\Delta$ His6 上沒有 His tag 所以不可以用 Affinity by Metal Chelate: HisTrap<sup>TM</sup> HP column 純化，依序使用 HiTrap<sup>TM</sup> Q FF column、HiTrap<sup>TM</sup> SP FF column、HiTrap<sup>TM</sup> Q FF column、1 M salting out 與 HiLoad<sup>TM</sup> 16 / 60 Superdex 200 pg column 純化也得到高純度的蛋白質。

利用膠體分析法分析 KpPriBb、KpDnaTb、KpDnaTb  $\Delta$ His6 and KpDnaTe，得知 KpPriBb 為高純度蛋白質並且十分穩定，而 KpDnaTb、KpDnaTb  $\Delta$ His6 and KpDnaTe 有部分裂解。使用 FITC 技術偵測 KpPriBb 與 KpDnaTb、KpDnaTb  $\Delta$ His6 and KpDnaTe 之間的交互關係，發現 KpDnaTb  $\Delta$ His6 與 KpPriBb-FITC 之間的交互作用最為強烈。

## 参考文献

1. Asensio, A., A. Oliver, P. Gonzalez-Diego, F. Baquero, J. C. Perez-Diaz, P. Ros, J. Cobo, M. Palacios, D. Lasheras, and R. Canton. 2000. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clin Infect Dis* 30:55-60.
2. Bergogne-Berezin, E. 1995. Treatment and prevention of nosocomial pneumonia. *Chest* 108:26S-34S.
3. Carpenter, J. L. 1990. *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev Infect Dis* 12:672-82.
4. Christensen, S. C. a. B. K. 1972. An endemic caused by multiresistant *klebsiella* in an urological unit. *Scand J Urol Nephrol* 6:232-238.
5. de Lorenzo, V., and J. L. Martinez. 1988. Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7:621-9.
6. Domenico, P., R. J. Salo, A. S. Cross, and B. A. Cunha. 1994. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 62:4495-9.
7. Domenico, P., S. Schwartz, and B. A. Cunha. 1989. Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. *Infect Immun* 57:3778-82.
8. Domenico, P., J. M. Tomas, S. Merino, X. Rubires, and B. A. Cunha. 1999. Surface antigen exposure by bismuth dimercaprol suppression of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. *Infect Immun* 67:664-9.
9. Hill, H. R., C.E. Hunt, and J.M. Matsen. 1974. Nosocomial colonization with *Klebsiella*, type 26, in a neonatal intensive-care unit associated with an outbreak of sepsis, meningitis, and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 85:415-419.

10. Kaushik, S. L., et al. 1998. Neonatal sepsis in hospital born babies. *J Commun Dis* 30:147-152.
11. Mayhall, C. G., et al. 1980. Nosocomial klebsiella infection in a neonatal unit: identification of risk factors for gastrointestinal colonization. *Infect Control* 1:239-246.
12. McCallum, K. L., G. Schoenhals, D. Laakso, B. Clarke, and C. Whitfield. 1989. A high-molecular-weight fraction of smooth lipopolysaccharide in *Klebsiella* serotype O1:K20 contains a unique O-antigen epitope and determines resistance to nonspecific serum killing. *Infect Immun* 57:3816-22.
13. Merino, S., S. Camprubi, S. Alberti, V. J. Benedi, and J. M. Tomas. 1992. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect Immun* 60:2529-35.
14. 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.
15. Podschun, R., and U. Ullmann. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 11:589-603.
16. 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.
17. Yan, J. J., et al. 2001. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla(IMP-8) in a university medical center in Taiwan. *J Clin Microbiol* 39:4433-4439.
18. Yinnon, A. M., A. Butnaru, D. Raveh, Z. Jerassy, and B. Rudensky. 1996. *Klebsiella* bacteraemia: community versus nosocomial infection. *Qjm* 89:933-41.
19. <http://w3.csmu.edu.tw/~yclai/html/kp.htm>
20. McCool JD, Ford CC, Sandler SJ. 2004. A dnaT mutant with

phenotypes similar to those of a *priA2::kan* mutant in *Escherichia coli* K-12. *Genetics*;167:569–578.

## 圖

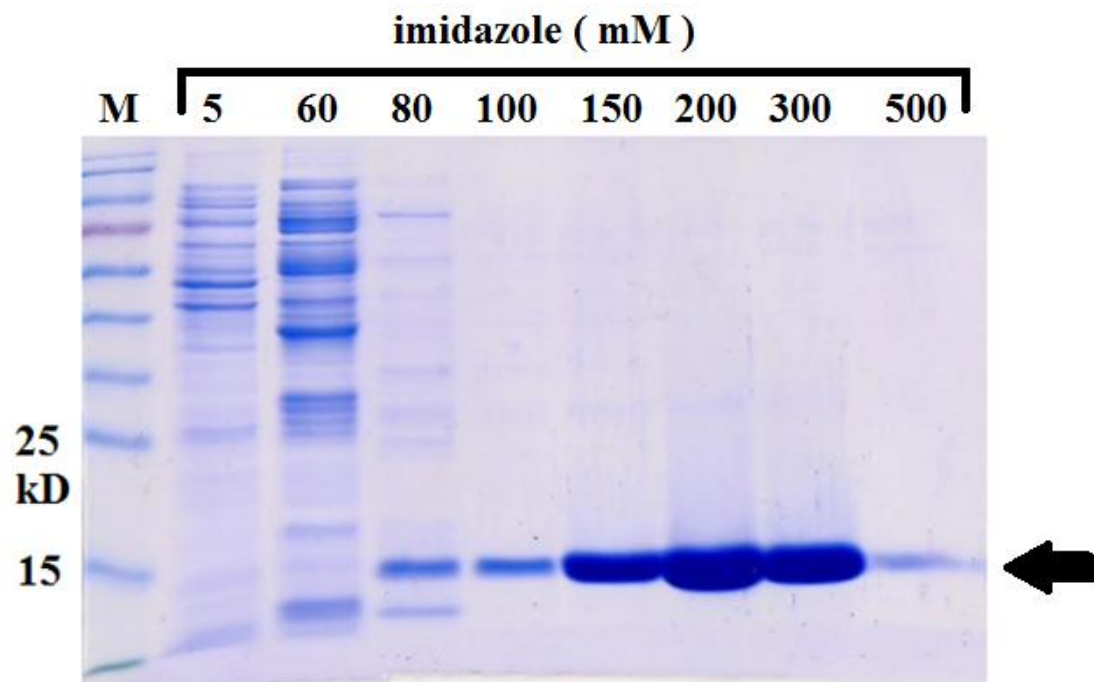
KpPriBb : Met-KpPriB-Gly-Glu-Leu-Glu-His6-STOP

KpDnaTb : Met-KpDnaT-(沒 Gly)-Glu-Leu-Glu-His6-STOP

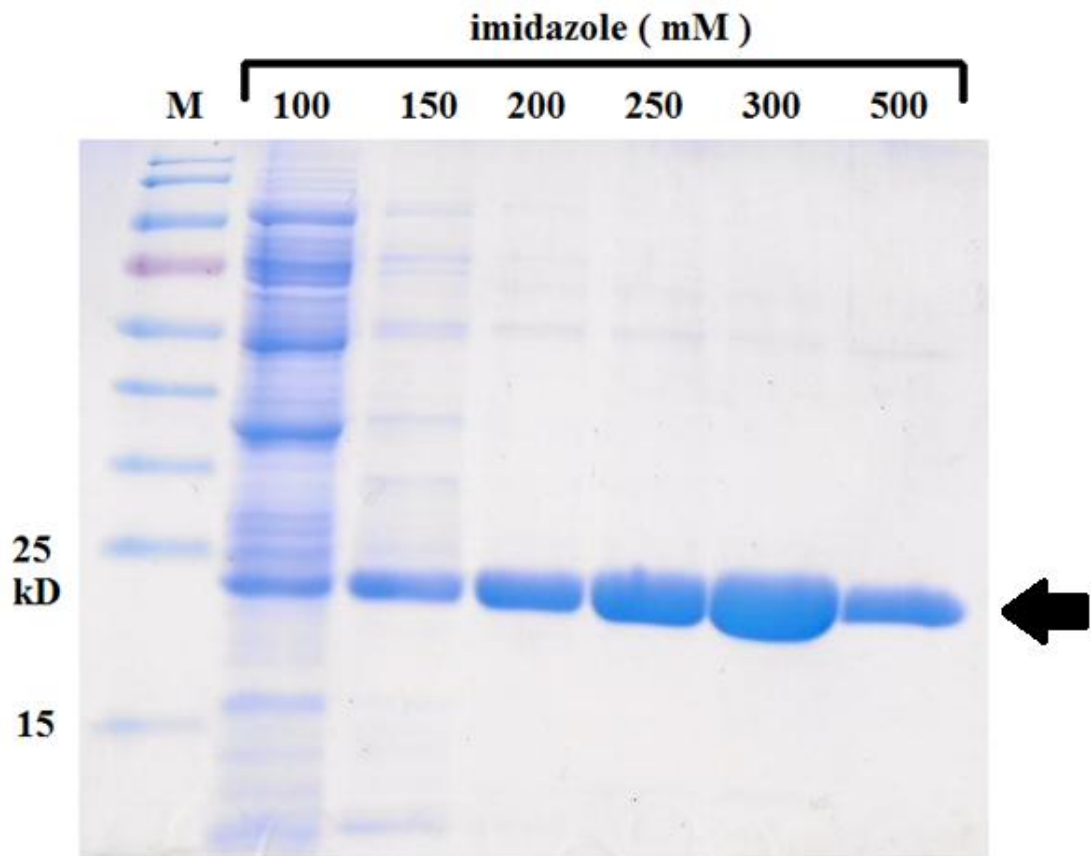
KpDnaTb  $\Delta$ His6 : Met-KpDnaT-STOP

KpDnaTe : Met-Glu-Phe-KpDnaT-Lys-Leu-Ala-Ala-Ala-Leu-Glu-His6-STOP

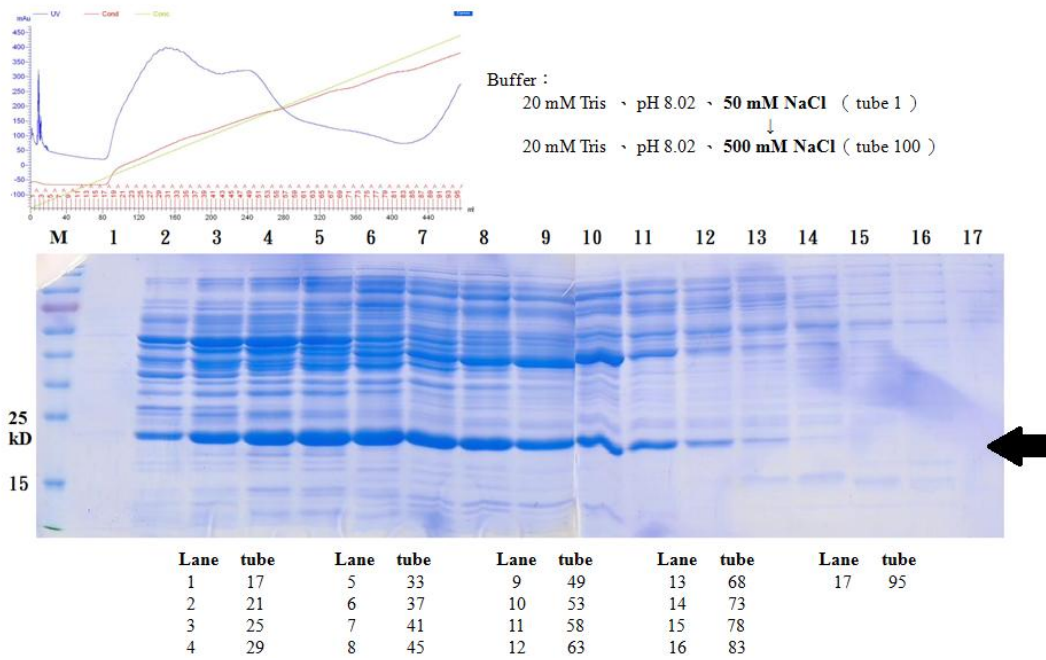
圖一： KpPriBb、KpDnaTb、KpDnaTb  $\Delta$ His6、KpDnaTe 之基因選殖。  
此為 vector 上的 MCS (Multiple colony sites) 位置，KpPriBb、KpDnaTb 與 KpDnaTb  $\Delta$ His6 重組基因的 restriction enzyme site 為 Nde I 和 Xho I；KpDnaTe 重組基因的 restriction enzyme site 為 EcoR I 和 Hind III。



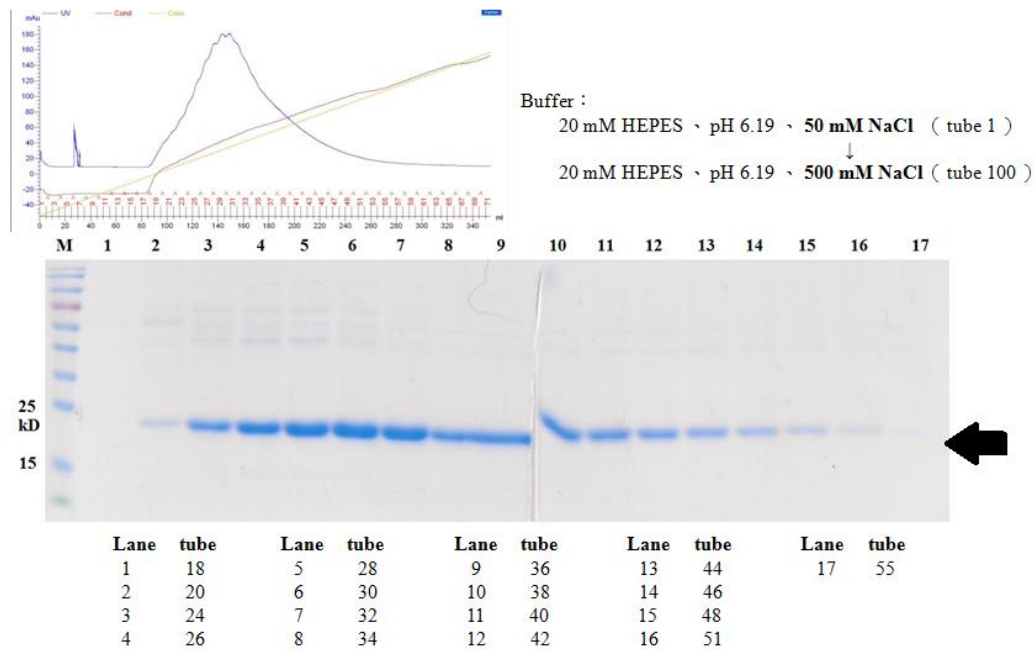
圖二： 利用 SDS-PAGE 分析經由金屬螯合親和層析法純化後的克雷白氏肺炎桿菌的 KpPriBb 重組蛋白質的純度。依序為 Marker；使用 5 mM、60 mM、80 mM、100 mM、150 mM、200 mM、300 mM、500 mM imidazole elution buffer 通過 column 後導出的液體；使用 EDTA 通過 column 後導出的液體。200 mM imidazole elution buffer 沖出純度高且大量的蛋白質。



圖三：利用 SDS-PAGE 分析經由金屬螯合親和層析法純化後的克雷白氏肺炎桿菌的 KpDnaTb 重組蛋白質的純度。依序為 Marker；使用 100 mM、150 mM、200 mM、250 mM、300 mM、500 mM imidazole elution buffer 通過 column 後導出的液體；使用 EDTA 通過 column 後導出的液體。300 mM imidazole elution buffer 沖出純度高且大量的蛋白質。

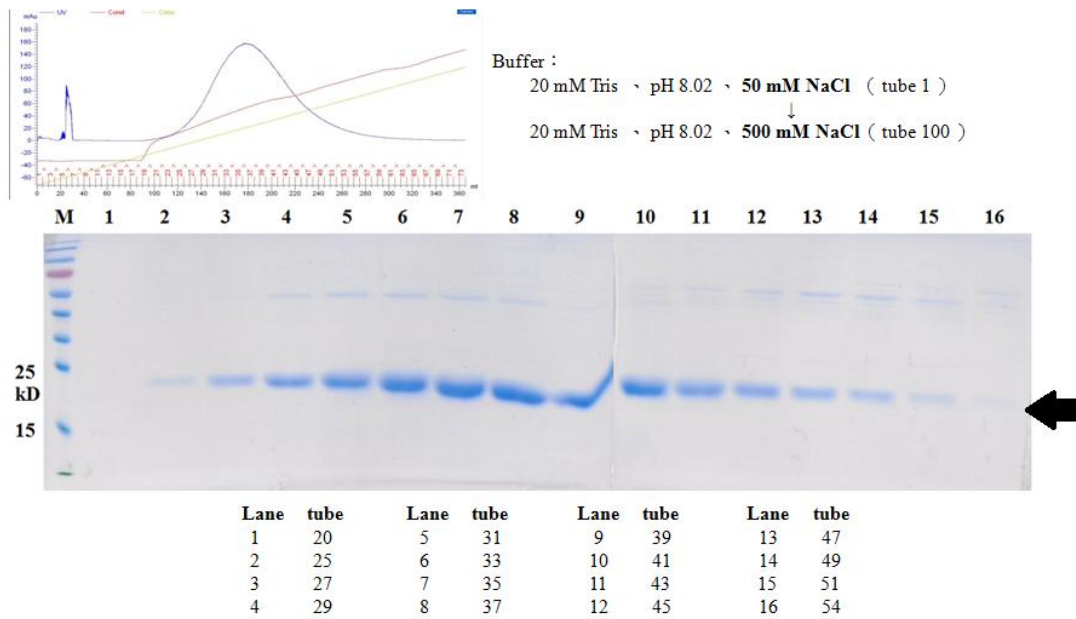


圖四：利用 SDS-PAGE 分析經由陰離子親和層析法純化後的克雷白氏肺炎桿菌的 KpDnaTb  $\Delta$ His6 重組蛋白質的純度。將 buffer A (50 mM NaCl、20 mM Tris、pH8.0 buffer) 與 buffer B (500 mM NaCl、20 mM Tris、pH8.0 buffer) 利用 Ä KTA prime protein purification system 設定濃度梯度，從 100 % buffer A、0 % buffer B 到 0 % buffer A、100 % buffer B。流速為 3 ml / min，每 5 ml 收集成一管共 500 ml、100 管。取第 21 管到 63 管濾液做下一步純化，濾液為 144.5 mM ~ 333.5 mM NaCl、20 mM Tris、pH8.0 buffer。

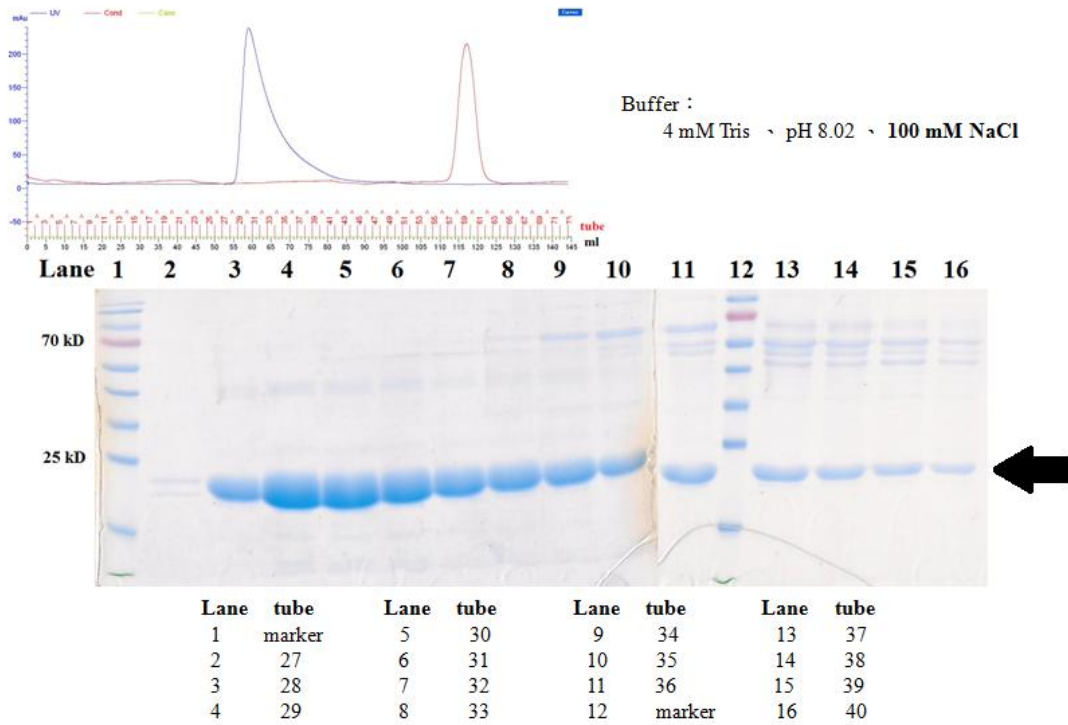


圖五：利用 SDS-PAGE 分析經由陰離子親和層析法純化後再經由陽離子親和層析法純化的克雷白氏肺炎桿菌的 KpDnaTb  $\Delta$ His6 重組蛋白質的純度。將 buffer A ( 50 mM NaCl、20 mM HEPES、pH6.2 buffer ) 與 buffer B ( 500 mM NaCl、20 mM HEPES、pH6.2 buffer ) 利用 Ä KTA prime protein purification system 設定濃度梯度，從 100 % buffer A、0 % buffer B 到 0 % buffer A、100 % buffer B。流速為 3 ml / min，每 5 ml 收集成一管共 500 ml、100 管。取第 20 管到 48 管濾液做下一步純化，濾液為 140 mM ~ 266 mM NaCl、20 mM HEPES、pH6.2 buffer。

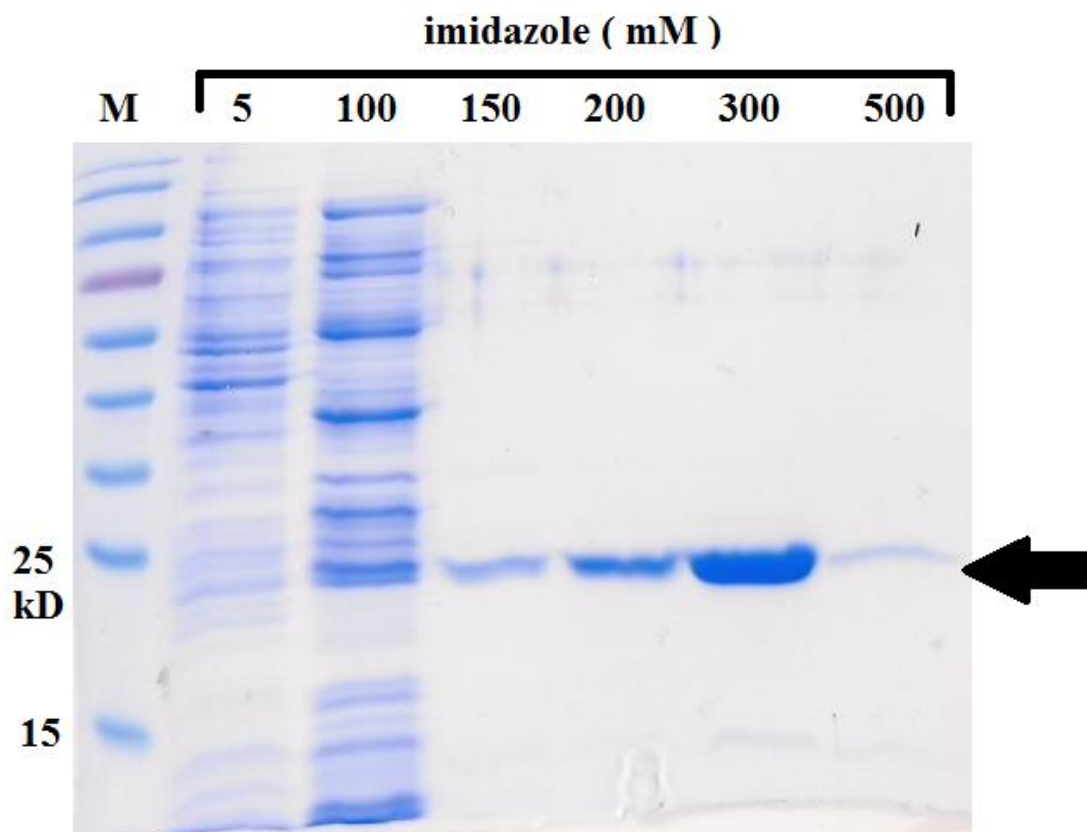




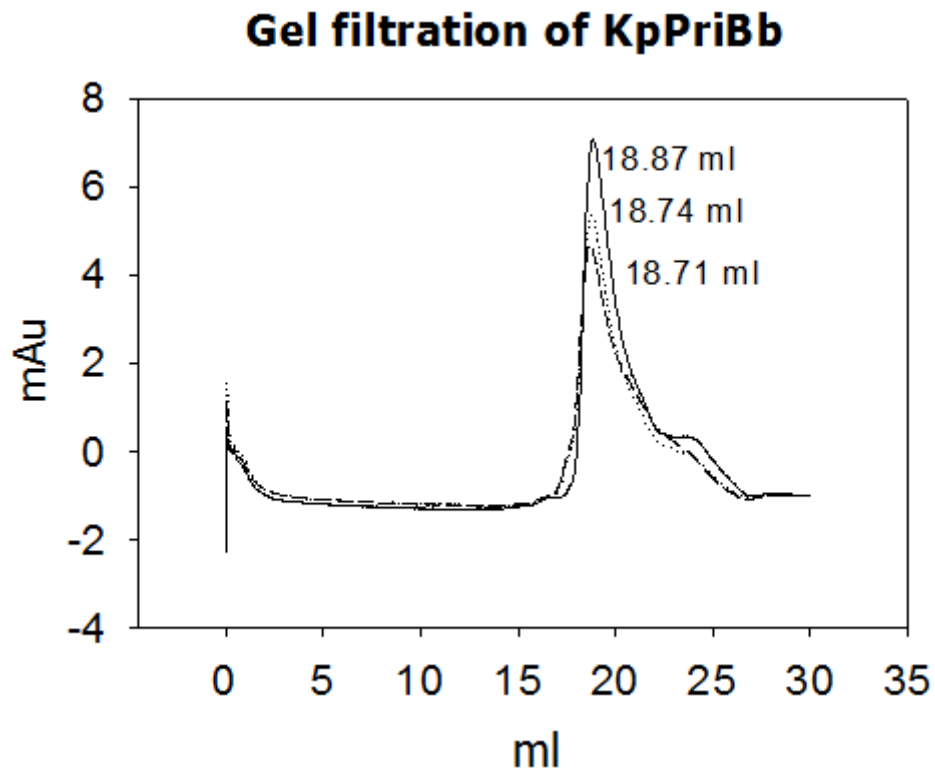
圖六：利用 SDS-PAGE 分析經由陰離子親和層析法純化後再經由陽離子親和層析法、陰離子親和層析法純化的克雷白氏肺炎桿菌的 KpDnaTb  $\Delta$ His6 重組蛋白質的純度。將 buffer A (50 mM NaCl、20 mM Tris、pH8.0 buffer) 與 buffer B (500 mM NaCl、20 mM Tris、pH8.0 buffer) 利用 Ä KTA prime protein purification system 設定濃度梯度，從 100 % buffer A、0 % buffer B 到 0 % buffer A、100 % buffer B。流速為 3 ml / min，每 5 ml 收集成一管共 500 ml、100 管。取第 25 管到 51 管濾液做下一步純化，濾液為 162.5 mM ~ 279.5 mM NaCl、20 mM Tris、pH8.0 buffer。



圖七：利用 SDS-PAGE 分析經由陰離子親和層析法純化後再經由陽離子親和層析法、陰離子親和層析法、1 M NaCl salting out 、gel filtration 純化的克雷白氏肺炎桿菌的 KpDnaTb  $\Delta$ His6 重組蛋白質的純度。將 100 mM NaCl、20 mM Tris、pH7.9 buffer 利用 Ä KTA prime protein purification system 設定流速 1 ml / min，每 2 ml 收集成一管直到蛋白質完全通過 column。取第 27 管到 33 管濾液，濾液為 100 mM NaCl、20 mM Tris、pH7.9 buffer。

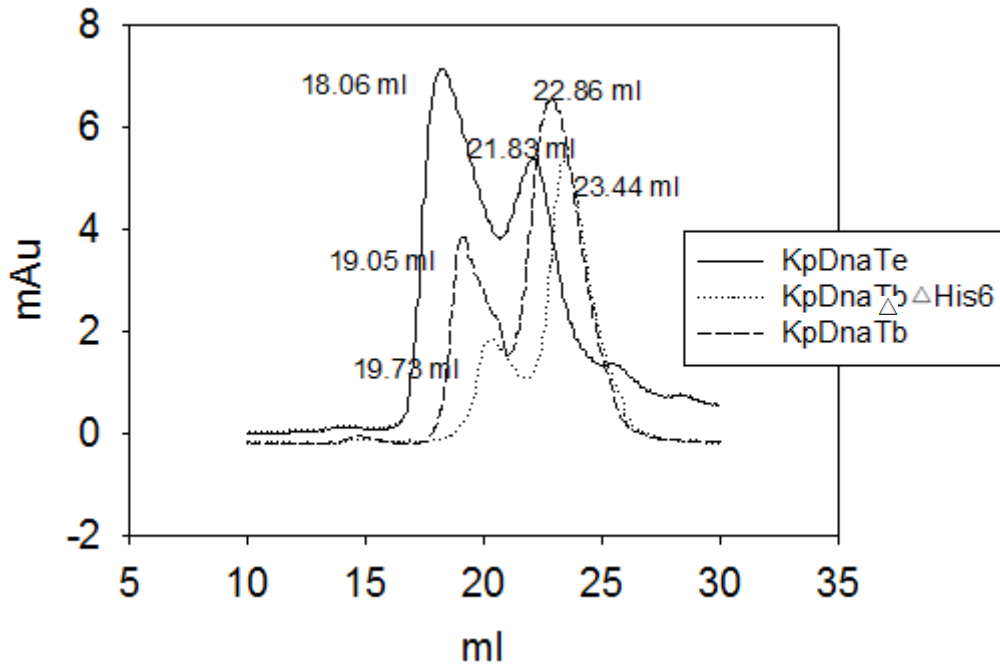


圖八：利用 SDS-PAGE 分析經由金屬螯合親和層析法純化後的克雷白氏肺炎桿菌的 KpDnaTe 重組蛋白質的純度。依序為 Marker；使用 5 mM、100 mM、150 mM、200 mM、300 mM、500 mM imidazole elution buffer 通過 column 後導出的液體；使用 EDTA 通過 column 後導出的液體。300 mM imidazole elution buffer 沖出純度高且大量的蛋白質。

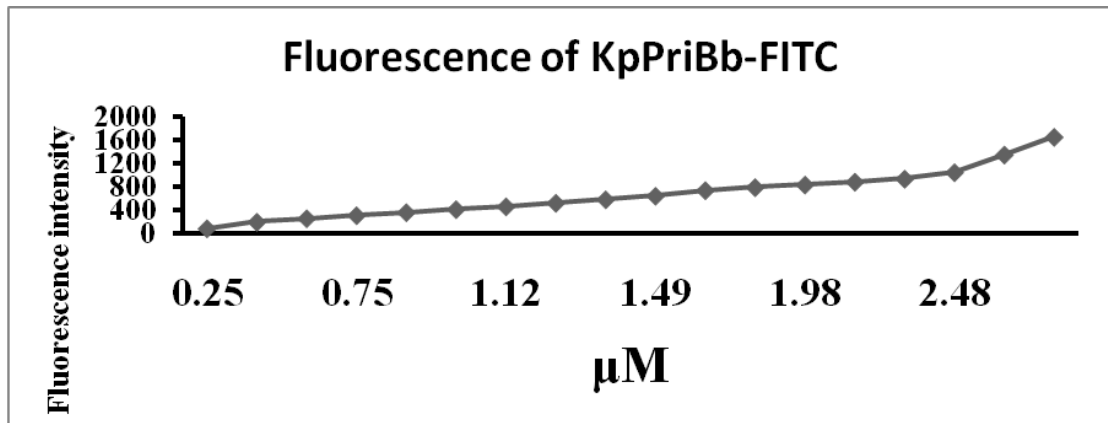


圖九：利用膠體分析法分析 KpPriBb。利用 Superdex 200 10/300 GL column 測試 KpPriBb 三次，各得單一波峰，數值分別為 18.87 ml、18.74 ml 與 18.71 ml，由此可知我們得到一個純度很高的 KpPriBb。

### Gel filtration of KpDnaTb - KpDnaTb $\Delta$ His6 and KpDnaTe

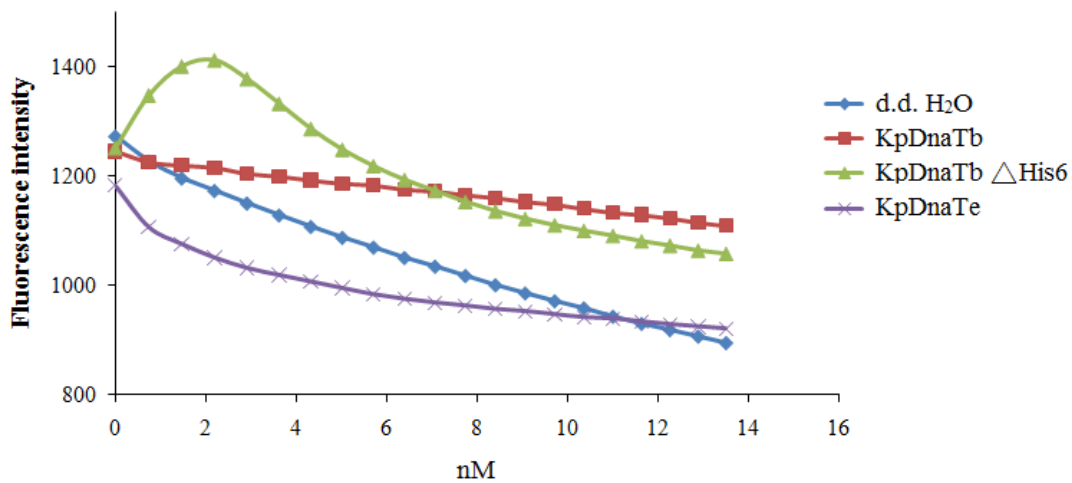


圖十：利用膠體分析法分析 KpDnaTb、KpDnaTb  $\Delta$ His6 and KpDnaTe。使用 Superdex 200 10/300 GL column 測試 KpDnaTb、KpDnaTb  $\Delta$ His6 and KpDnaTe 各兩次，將各自兩組數據平均並繪製於同一圖表做比較，可得三種 DnaT 皆有兩個波峰，後來經 SDS-PAGE 確認前面的波峰才是目標蛋白質，後面波峰為目標蛋白質裂解後的產物。KpDnaTb、KpDnaTb His6 and KpDnaTe 的分子大小為 KpDnaTb His6 (19.73 ml) > KpDnaTb (19.05 ml) > KpDnaTe (18.06 ml)。



圖十一： 檢測不同濃度的 KpPriBb-FITC 螢光的強度。使用 HITACHI F-2700 Fluorescence Spectrophotometer 分析 KpPriBb-FITC 在不同濃度時的螢光強度。

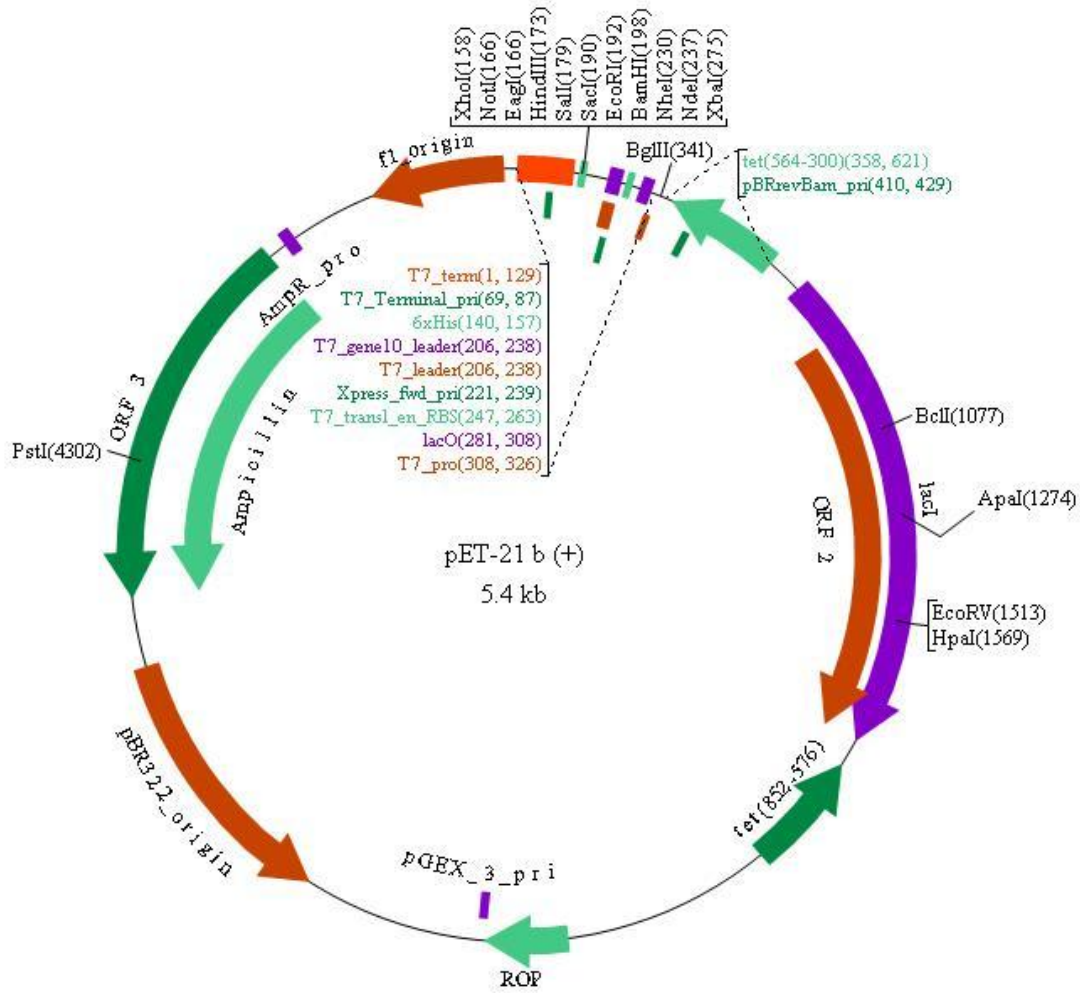
Fluorescence of KpPriBb-FITC interact with d.d. H<sub>2</sub>O、KpDnaTb、KpDnaTb His6 and KpDnaTe



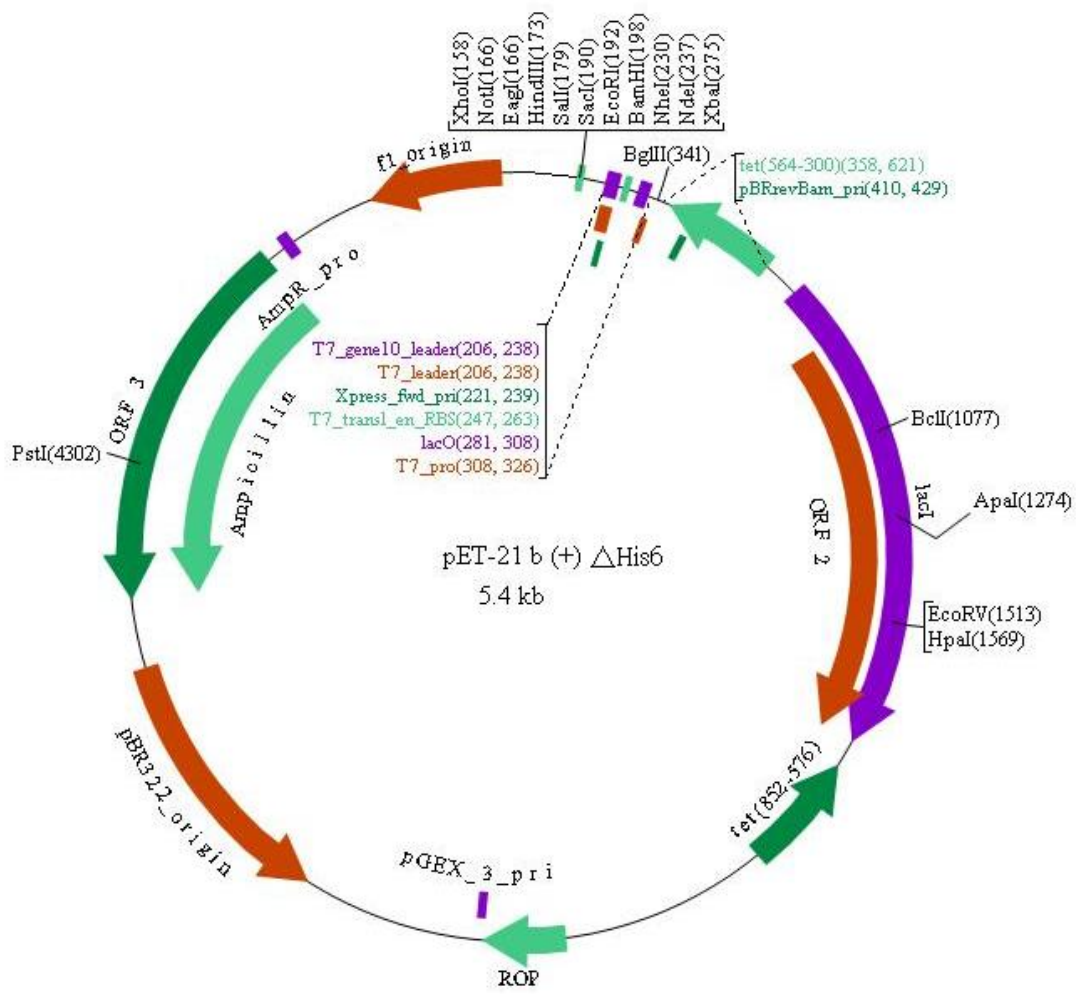
圖十二： 使用 FITC 技術偵測 KpPriBb 與 KpDnaTb、KpDnaTb ΔHis6 and KpDnaTe 之間的交互關係。使用 HITACHI F-2700 Fluorescence Spectrophotometer 分析 KpPriBb-FITC 在與 KpDnaTb、KpDnaTb ΔHis6 and KpDnaTe 之間的交互關係，d.d. H<sub>2</sub>O 為控制組。KpDnaTb ΔHis6 與 KpPriBb-FITC 之間的交互作用最為強烈。

# 附錄

## 一、質體圖譜

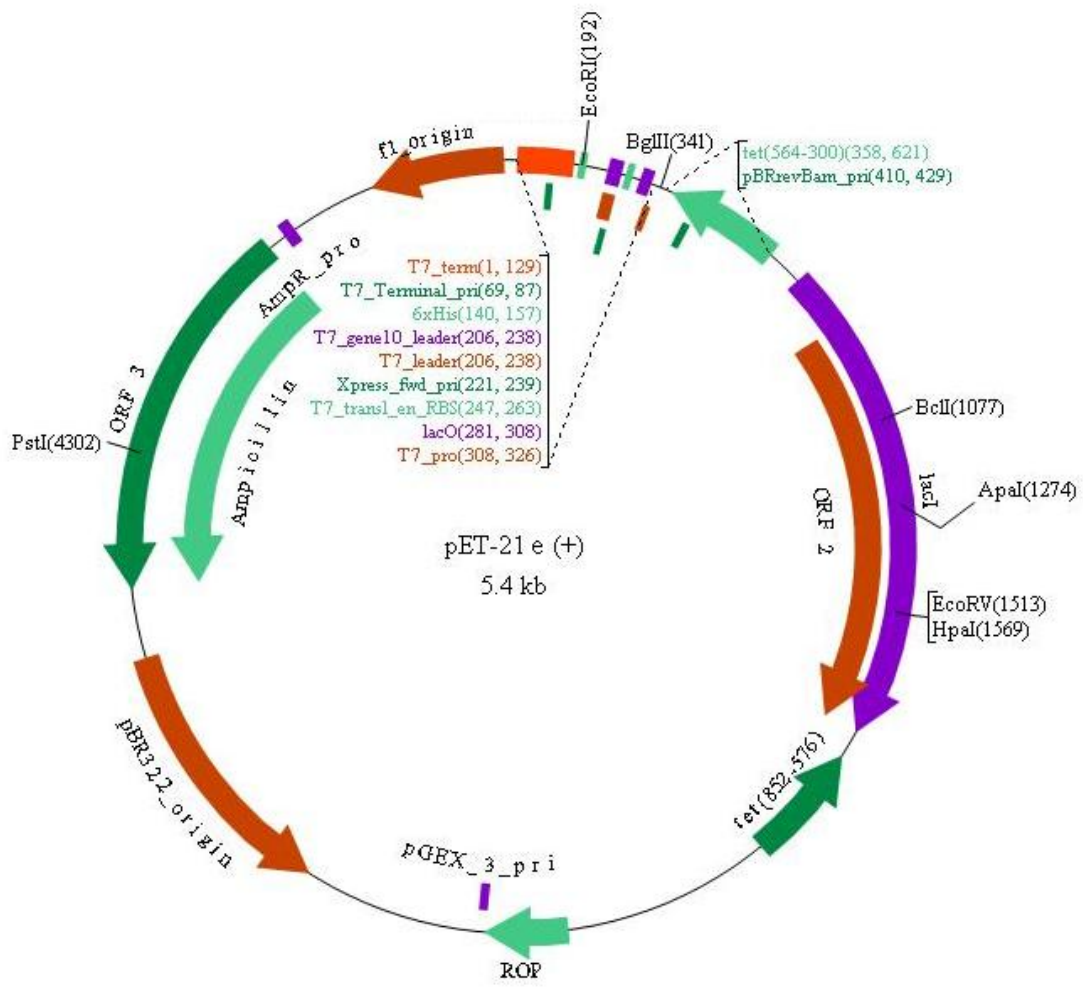


(A) pET21 b (+) vector



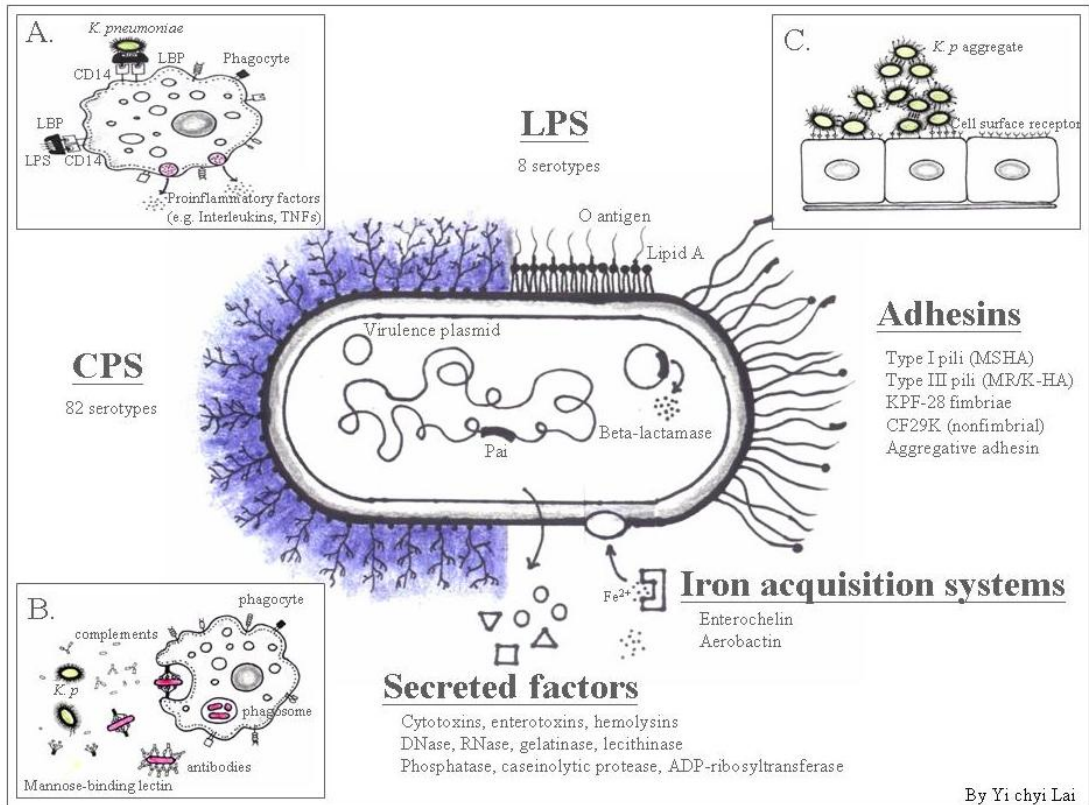
(B) pET21 b (+)  $\Delta$ His6 vector





(C) pET21 e (+) vector

## 二、克雷白氏菌致病相關毒力因子



附圖一：*Klebsiella pneumoniae* 致病相關毒力因子