

計畫編號：DOH93-DC-2031

行政院衛生署疾管局九十三年度研究計畫

計畫名稱：鼠疫桿菌檢測方法之發展及應用

研究報告

執行機構：疾病管制局研究檢驗組

研究主持人：馮天霖

協同主持人：周振英

研究人員：林佳慧、胡門興

執行期間：九十三年一月一日至九十三年十二月三十一日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目錄

	頁數
中文摘要	3
英文摘要	4
前言	5-7
材料與方法	8-15
結果與討論	16-19
結論與建議	20
參考文獻	
圖表	

中文摘要：

鼠疫桿菌是鼠疫病原菌，鼠疫目前在亞洲、非洲、美洲並未絕跡，加上國際交通非常便利，國際生物恐怖事件的陰霾，鼠疫之監控系統快速檢測是不可缺的工作。

本實驗目的為建立本局鼠疫檢驗方法之改進，自行自備抗原、抗體以及純化能力。並改善現行實驗法，以期符合世界衛生組織各種檢驗項目建立完備之鼠疫參考實驗室。

本實驗我們成功的完成純化鼠疫桿菌 17Kd F1 莢膜抗原技術，免疫酵素法標準化製備，免疫動物製備多價抗體，成功的製作二株高表現 F1 IgG 抗體融合瘤細胞株，完成純化抗體及抗體直接螢光標定檢測試劑的製備，建立以 16S rDNA 比對系統，改進及引用即時核酸增幅快速鼠疫桿菌快速診斷技術。另完成 93 年度全國國際港區捕獲之 370 隻野鼠血清鼠疫抗體監測，結果均為陰性。

隨著細菌分子診斷技術的成熟，未來致病細菌的檢驗，分子檢測方法會扮演重要的地位。如何設計引子及 probe，怎樣在不同檢體上抽取得到最大量的核酸模板，是我們實驗室在篩檢和鑑定上未來工作。

關鍵詞：鼠疫、F1 抗原、單株抗體、免疫酵素法

Abstract :

Yersinia pestis is the causative pathogen of plague. This disease is still prevalent to some degree and happens sporadically in Asia, Africa, and Americas. Besides, international travel nowadays is extremely convenient and popular, and bio-terrorism is threatening the entire world. Those factors make an effective and speedy plague control system indispensable.

The objectives of this study are four folds: to set up a standard diagnostic method for *Yersinia pestis* detection and identification, to prepare antigen and antibody ourselves with purification capability, to improve our currently used laboratory methods dealing with the disease to conform with the WHO standards, and to set up a comprehensive plague reference laboratory.

What we have accomplished so far are the followings: having successfully purified 17Kd F1 capsule antigen, made two strains of F1 IgG hybridoma cells in high production, used purified antibody to prepare a direct immunofluorescence assay reagent, used modern real-time PCR technology in developing a fast diagnostic test for plague detection, and established the 16S rDNA sequence as one of its identities. Furthermore, we have completed the 2004 annual serological study by ELISA on 385 field rodents trapped in the international harbor areas of this country. The results are all negative.

Along with the maturing of bacterial molecular technology, molecular detecting methods will inevitably become more important in the days to come. Therefore, our next step in research will focus on something like: how to design suitable primers and probes, and how to extract maximum DNA template from various specimens for the purposes of our laboratory screening and identification work.

Key words : Plague, F1 antigen, monoclonal antibody, ELISA

前言：

鼠疫桿菌是鼠疫的病原菌，鼠疫可經由被感染之動物或其身上之跳蚤叮咬而傳染，在人最常見的臨床症狀為急性發熱性淋巴炎，又稱腺鼠疫，其他較少見的臨床症狀包括敗血性肺和腦鼠疫。鼠疫在 1894 之大流行後，雖然未出現規模大的疫情，但亞洲、非洲、美洲鼠疫並未絕跡。例如美國每年乃約有十幾個鼠疫個案，中國大陸青海、雲南、廣西為其主要疫源區每年的人畜盛行率高達數千個 (1,2)。自然界感染的鼠類各有不同的感受性，在有鼠疫流行區鼠類的大量死亡是有預警作用。鼠疫在野鼠間藉由鼠蚤的傳播行成自然窩。森林鼠種宿主易受感染，但對鼠疫桿菌有抵抗疾病。200 種以上的鼠和鼠疫的流行循環有關，對鼠疫桿菌有抗性鼠抗體調查可達 100%，但大部分易感受鼠種由於已死亡所以稀少 (2)。台灣從 1952 年就未見鼠疫病例之報告。然而現在國際交通非常便利，兩岸交流頻繁，國際生物恐怖事件之陰霾，鼠疫之疫情監控系統不容有任何疏漏。

耶氏菌(*Yersinia spp*) 中有三種會造成人類病原菌，其中以鼠疫桿菌的毒力最強，侵犯淋巴組織後會造成全身性感染，*Yersinia pseudotuberculosis* 和 *Yersinia enterocolitica* 常造成腸胃不適下痢、發燒等疾病。*Y. pseudotuberculosis* 基因分析非常相似，據推測在 5000 至一萬五千年前 *Ypseudotuberculosis* 演化成較強毒力的 *Y. pestis* 。

鼠疫桿菌全部基因體已經被定序(3)。其毒力決定因子主要分佈於三個大小不同的攜帶質體上，質體 1 含 70-Kbp pCD1 攜帶 type III 分泌系統，允許細菌粘附哺乳細胞注入毒性物質入哺乳細胞，包含外膜蛋白(*Yersinia* outer protein: Yop) 和 LcrV 蛋白。質體 2 含 100Kbp pMT1 攜帶 F1 莢膜蛋白以及鼠毒素(murine toxin)。質體 3 含 9.6Kbp pCP 攜帶細菌素(bacteriocin)、蛋白酶(protease)、血清活化蛋白酶(plasminogen activator protease) 於抗凝血作用有關。pCD1 質體存在於 *Y. pestis*、*Y. pseudotuberculosis* 及 *Y. enterocolitica*，而 pMT1、pCP 僅存在 *Y. pestis*。

(4)

一般實驗室診斷檢驗方法不外細菌學培養確認，依菌落特徵對疑似菌株，加以生化鑑定，並以顯微鏡染色檢體或菌落檢查做為判斷的依據，另對鼠疫桿菌感受之 Phage 做噬菌斑鑑定，但是前實驗法容易對 *Yersinia spp* 造成誤判。血清學實驗做為鼠疫之檢驗有：疑似菌落凝集實驗，螢光抗體染色法及血清抗體檢驗二大項。血清抗體檢驗 F1 抗體包括：ELISA、latex 及血球凝集實驗 (PHA) (1,5)。我們實驗室也應用分子生物檢測質體 pMT1 增幅 *caf1* 基因，染色體增幅 *Inv* 基因，質體 pCP 增幅 *pla* 基因，pCD1 增幅 *yopM* 基因，成為 multiplex PCR 工具，可在數小時內即可完成，所以可做為鼠疫桿菌快速診斷

(6)。

F1 莢膜蛋白是鼠疫桿菌上特有的抗原，在 37°C 會形成膠狀蛋白莢膜。抗原性強，感染鼠疫桿菌或接種動物均可產生抗 F1 抗體，鼠疫桿菌缺失 F1 非常少見 (8,9)。因此，檢測血清 F1 抗體效價已成為世界衛生組織標準方法之一 (1,7)。

本局細菌實驗室已建立基本之鼠疫桿菌檢測方法 (17,18)，包含：鼠疫桿菌分離與生化、型態鑑定、噬菌體鑑別、間接螢光抗體檢測、鼠疫桿菌分子生物學診斷(Multiplex PCR)以及血清學診斷鼠疫桿菌 F1 莢膜抗體之被動血球凝集 (PHA) 及被動血球凝集抑制法

(IHA)，F1 抗原為國防醫學院贈與。本計畫為延續：(I) 建立蛋白質純化技術製備抗原，(II) 免疫學製備多價抗體，(III) 以製作融合瘤細胞產生單株抗體，(IX) 純化單株抗體直接標定螢光劑之直接螢光檢測製備，(X) ELISA 抗原標定、標準檢測，(XI) 以 16S RNA 方法全段定序，試圖做種的鑑別，(XIII) 建立分子生物 real time PCR 快速診斷技術。本計畫目的在建立符合世界衛生組織各種檢驗項目完備之鼠疫桿菌參考實驗室，作為鼠疫疫情監測，並有助於未來後續鼠疫研究之基石及技術純熟之相關檢驗的應用。

材料與方法：

一. 菌株和培養條件

本實驗室自備保存之鼠疫桿菌疫苗株 (K/A) (*Yersinia pestis* Yreka, PMBP-0019), A/A 株為本實驗室篩選之遺失 pCP 變異株。參照菌株 *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC6902 和 *Yersinia enterocolitica* ATCC23715。F1 抗原生產方法，選取培養皿中生長良好之鼠疫桿菌，以無菌折彎玻璃棒括取菌落，接種於 5% 含 sheep blood 的 Brain heart infusion agar 37°C，5%CO₂，72 小時培養。

二. 抽取鼠疫桿菌 F1 莢膜蛋白

以磷酸鹽緩衝液潤濕括下菌落，加入二倍體積-70°C 丙酮固定及殺死菌體，隔夜離心沉澱、清洗、乾燥稱重，取 20 克乾燥菌體以 2.5%NaCl 飽和二甲苯抽取，隔夜離心取上清液進行透析，以 Amicon XM300 及 YM 10 及 ultrafiltration membrane 二次高低分子氮氣加壓過濾濃縮，濃縮液經 30% 飽和硫酸銨沉澱，透析後利用 Seperdex-200 Hiload preparative gel filtration column 層析純化，方法參考 Gerand 純化做部份修改 (11)。

三. 免疫動物生產抗血清

1. BALB/c、ICR 老鼠各一批，皮下接種經 37°C 培養 *Y. pestis*(K/A)

菌株調成菌液每隻約接種 10^9 菌體 0.5ml (56°C 60 分鐘去活性)，7-56 天分批間隔採取心臟血，分離血清。

2. 將純化鼠疫桿菌 F1 莢膜抗原 3ml(1mg/5ml)調以等體積 Freund Adjuvant 3ml，以三歧接頭二支 5ml 針筒完全混合成稠狀（滴在水面上不散開），每隻接種 10ug/0.2ml，每週接種一次共四(除第一次須與 Complete Freund Adjuvant 混合，其後接種抗原與等體積之 Incomplete Freund Adjuvant 混合即可)，最後一次接種之 10-14 天抽取血清-20°C 備用，使用時以 56°C 30 分鐘去補體活性 (12)。
3. BALB/c 老鼠一批分三組各接種 *Y. pestis* (K/A)、(A/A) 經 37°C 及 25°C 培養去活化菌液，42 天抽取血清備用。
4. 部分接種後的老鼠打 Pristene 於一週後接種 NS-1 細胞，一至二週抽腹水，目的看是否利用此法可得多量的抗體。

四. 製備 ELISA 檢測標準化

以棋盤法 10、1、0.1 μ g F1 抗原/100 μ l coating 在 96 孔 ELISA 盤，檢測最適抗原抗體標定濃度。以本局港區九十三年搜集之 370 件野鼠血清樣本及 *Y. pestis*、*Y. pseudotuberculosis* 37°C、25°C 培養不活化菌液及 F1 莢膜抗原接種老鼠之抗血清樣本與被動血球凝集法(PHA)

方法比較。抽樣正常港區老鼠血清 40 支，以平均值加 3 個 SD 定 ELISA cut point 值。

製備方法：0.1 μ g F1 Ag/ 100 μ l coating 在 96 孔 ELISA plate，4°C overnight(但不超過 16h)。200 μ l/well Blocking Buffer, 4°C overnight。倒掉 blocking buffer, 加 100 μ l/well 待測檢體，放 37°C，30mins。PBS-T wash 5 次。用 HRP Stabilizer 稀釋 HRP conjugate 成 1:5000，加 100 μ l/well，放 37°C，30mins。PBS-T wash 5 次。加 100 μ l/well TMB substrate，放室溫 15mins，避光。加 100 μ l/well TMB stop solution，混和均勻並小心去除氣泡。放 ELISA reader(MRC TC II, DYNEX)，用 450nm 讀取 OD 值。

五. F1 荚膜抗體之融合瘤細胞製作

5 週大 BALB/c 母鼠 5 隻，將純化鼠疫桿菌 F1 荚膜抗原調以等體積 Complete Freund Adjuvant 完全混合，每隻接種腹腔 50 μ g/0.2ml，14 天後再接種抗原與等體積之 Incomplete Freund Adjuvant 混合，每隻接種腹腔 50 μ g/0.2ml。14 天後每隻接種腹腔抗原溶液 0.2ml(50ug/0.2ml PBS 溶液)。7 日後部分採尾巴血做抗體測定。鼠尾在燈泡溫度環境下操作，27 號針頭每隻接種老鼠鼠尾基部靜脈抗原溶液 0.2ml (30 μ g/0.2ml)。3 至 4 天脾臟摘取做細胞融合。NS-1 細胞為國防醫學院贈

送，在 T-80 培養生長密度約六成。脾臟經篩網過濾脾細胞和紅血球一起收集，直接以 DMEM 洗三次，PEG1000 滅菌後和等量 serum-free DMEM 混合。把 NS-1 與 spleen cell 全量混合，50ml 離心管中，600rpm，10 分鐘離下來，丟棄上清液，以殘留培養液把細胞打散，放在 37°C 保溫準備加入 PEG。

在 2 分鐘內慢慢加入 0.2ml PEG，同時一邊輕搖動，讓 PEG 均勻混合細胞，然後在 2 分鐘內再加 8ml DMEM。離心去上清液，輕輕加入 30ml HAT (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine) -10% DMEM，並均勻懸濁細胞，把細胞放在 37°C incubator 30 分鐘後，均分到 96 well 培養盤，每 well 加 3、4 滴 (200 μ l)。37°C，5% CO₂ 培養箱 3 天後，吸去一半的培養液，加入新 10% FCS 的 HAT-DMEM，連續二次 3 天後再換一半新的 10% FCS 的 HAT-DMEM，此後每 3 天以新的 HT-DMEM 一半取代。當細胞堆形成後再進行 ELISA 篩選。有陽性結果尚需進行 subcloning 及其特性 Ig 免疫球蛋白分型檢測。

六. 製備純化 F1 英膜單株抗體

以 10%FCS DMEM 培養液培養細胞株，以 PBS 清洗細胞，調成 2.5×10^2 /ml 腹腔接種 8 週大 BALB/c 母鼠 15 隻，各 2ml 融合瘤細胞，其前一週該批 BALB/c 老鼠先以 pristane 分別腹腔注射 0.5ml，經腹腔

接種該融合瘤細胞，待產生腹水（一至二週）後收集之，3000rpm，15分鐘，4°C 離心除去不溶物，以等量飽和硫酸銨在磁棒攪拌下徐徐加入，終了再繼續攪拌 2 小時。3000rpm，15分鐘，4°C 離心，沉澱物以 PBS 溶解，在 PBS，4°C 透析，回收透析液 3000rpm，15分鐘，4°C 離心除去不溶物，測定蛋白質量。(19)

七.標定螢光純化螢光抗體

fluorescein isothiocyanate(FITC)以 DMSO 溶成 12.5mg/ml。蛋白質質量 1mg 對 FITC 50ug，室溫遮光轉輪回轉器混合一小時。Sephadex G-20 層析，收集最初黃色部分。即可得螢光標記抗體。(14) 以腸內細菌及 *Y. pestis*、*Y. pseudotuberculosis* 和 *Y. enterocolitica* 模擬檢體抹片之螢光反應，調整最抗體稀釋倍數。

八.16SrDNA 細菌鑑定

參照廠商 (Applied Biosystems) 提供方法。簡略步驟：分離細菌 DNA (DNA 純化)，取適當菌液，加 20 μ l QLAGEN Protease (或 Proteinase K)，Vortexing 15sec，56°C，放至 sample 完全溶解，加 200 μ l Buffer AL，用 pulse-vortexing 15sec，70°C 10min，Spin-down，加 200 μ l (96~100%) ethanol，用 pulse-vortexing 15sec，spin-down，小心 transfer 至 QLAamp Spin Column，8,000rpm 離心

1min，倒掉濾液，換新的 collection tube，加 500 μ l Buffer AW1，
 8,000rpm 離心 1min，倒掉濾液，換新的 collection tube，加 500 μ l
 Buffer AW2，13,500rpm 離心 3min，倒掉濾液，再多離心 1min，
 小心將 QLAamp Spin Column 套上新的 1.5ml tube，加 200 μ l
 Buffer AE 或滅菌水，放室溫 1min，8,000rpm 離心 1min，所得 DNA
 產物放 -20°C 保存。確定 DNA 純化程度。PCR 反應：使用

MicroSeq Full Gene 16SrDNA Bacterial Identification PCR Kit

<PCR 反應條件>

Pre-denature	95°C	10min	
{ Denature (Melt) Annealing	95°C	30sec	} 30 or 32 cycles
	60°C	30sec	
Extension	72°C	45sec	
Post-extension	72°C	10min	
Final	4°C	∞	

→PCR products 保存於 -20°C

分析 PCR products：取 PCR products 10 μ l，使用 2% agarose，電壓 100V
 跑 20~30min。染色完照相應可見三條清楚的 band，一條位於 460~560bp
 左右，二條位於 700~800bp 左右(依不同 sample band 的位置會稍微有
 差異)。PCR products 純化：使用 **QIAquick PCR Purification Kit**。

Cycle Sequencing Reactions：使用 **MicroSeq Full Gene 16SrDNA
 Bacterial Identification Sequencing Kit**

<Sequencing PCR 條件>

Preheating	96°C	1~2min	
Melt	96°C	30sec	} 25 cycles
Extension	60°C	45sec	
Final	4°C	∞	

→products 放 -4°C overnight 或 -20°C 一個星期保存。

Sequencing Products 純化：加 70 μ l 75% ethanol，vortexing，
2,500g(1,800rpm)離心 5min，去除上清液，用 speed vac 70°C 乾燥約
12min，spin-down。Electrophoresis：每管 tube 至少加 10 μ l Hi-Di
Formamide (HD)回溶，Transfer 至 sequencing 專用 96 well plate，設定
sequencing 程式，上機跑約需 2hr 左右，最後將 sequencing files 輸入
MicroSeq 分析軟體中看結果。

九. 以 Real time PCR 方法檢測

1、LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I 方法：

<PCR 反應物>

DNA Master SYBR Green I 2 μ l，MgCl₂ 2.4 μ l，
ddH₂O 0.6 μ l，Primer (S,A) (100 pM / μ l) 各 5 μ l，
Template 5 μ l Total 20 μ l

YpF1 (S) ATG AAA AAA ATC AGT TCC GTT

YpF1 (A) TTG GTT AGA TAC GGT TAC GGT

<PCR 反應條件>

pre-denature : 95°C

cycling :

{	denature	94°C	}	35~60cycle
	annealing	54°C		
	extension	72°C		

Postextension : 72°C

2、引用羅氏 (Roche) 公司開發之 LightCycler-Yersinia pestis Detection Kit

For use with the Roche FastStart reagents run and initial heating for 10 min at 95°C.

Composition of the reaction mix	Parameter	Value	Parameter	Value					
Water	6.6 μl	Cycles	55	Cycles	1				
MgCl ₂	2.4 μl	Analysis Mode	Quantification	Analysis Mode	Melting Curve				
Reagent mix	4.0 μl	Segment							
HybFastStart	2.0 μl	1	2	3	1	2	3		
Sample	5.0 μl	Target Temp [°C]	95	55	72	Target Temp [°C]	95	40	85
Final volume	20 μl	Incubation Time [sec]	10	8	15	Incubation Time [sec]	20	20	0
Final MgCl ₂ concentration:		Transition Rate [°C/s]	20	20	20	Transition Rate [°C/s]	20	20	0.2
MgC	4.0mM	Acquisition Mode	none	single	none	Acquisition Mode	none	none	cont

Finally the Rotor should be cooled to 40°C for 30 s.

結果與討論：

F1 莢膜抗原純化

丙酮乾燥的菌沉渣經由 2.5%NaCl 飽和 Toluene 抽取菌體表面 F1 莢膜抗原，菌體仍維持完整型態。離心之上清液經透析後以 ultrafiltration membrane 加壓過濾濃縮，排除因離心不足的高分子及除去 10Kd 低分子，濃縮液經 30% 飽和硫酸銨沉澱，透析後再利用 Seperdex-200 Hiload preparative gel filtration column 層析純化可得到高純化 F1 17Kd 抗原分子 (fig.1)。

Baker 純化 F1 抗原方法 (20)，在後面重覆進行四次 30% 及 25% 硫酸銨沉澱、離心、透析耗費時間，且 30% 及 25% 硫酸銨濃度差距小技術上不易操作，流失 F1 抗原多。本實驗改良方法可縮短純化時間。

免疫抗血清生產

去活化菌液接種老鼠後一週就可產生抗體，第五週到達最高點 OD 值在 3.501 後下降，56 天以 ELISA 檢測仍然可測到陽性反應 (fig.2)。而在以 PHA 法則以掉到 1:4 以下 (未示)。鼠疫桿菌 F1 莢膜抗原接種 42 天的 F1 抗體 OD 值均 2.098 以上。

BALB/c 及 ICR 老鼠對本研究用鼠疫桿菌疫苗株 (*Yersinia pestis* Yreka, PMBP-0019) 仍有強致死率，在接種後二周內死亡，感染老鼠除毛髮失去光澤、倒豎外肛門口潮濕，解剖胸縱隔腔出血，該檢體可

再培養出原鼠疫桿菌。

鼠疫桿菌 F1 莢膜抗原調以 Freund Adjuvant 之接種在鼠皮下結成硬塊不易完全散開，在做單株抗體時改以打 incomplete Freund Adjuvant 一次，改打腹腔一次及補打鼠尾靜脈一次，均可得到滿意的抗體效價。

圖三 (fig.3) 粗抽取 F1 抗原跑 12% SDS PAGE，以不同抗體標定的 Western blots，可見接種 YP 25°C 血清中乃有少量 F1 抗體反應。

圖四 (fig.4) 純化後的抗原以不同抗體標定的 Western blots，全得到單純的 band，但大於 17Kda 的一條 band 則無法解釋。

直接用 NS-1 接種，希望產生大量多價抗體，結果不理想，因為 NS-1 容易在 BALB/c 長成腫瘤。

製備 ELISA 檢測標準化

經抽樣 40 支檢體在 $10 \mu\text{g}/100\text{ul}$ 、 $1 \mu\text{g}/100\text{ul}$ 及 $0.1 \mu\text{g}/100\text{ul}$ 找出 coating 最適濃度為 $0.1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 。Cut point value average=0.176239。

93 年度在基隆港、中正國際機場、台中港、高雄港、高雄國際機場、花蓮港、蘇澳港、麥寮港、及金門、馬祖港區捕獲野鼠種類包括溝鼠、錢鼠、小黃腹鼠、鬼鼠等共採集 370 隻血清檢體經檢驗均為陰性 (Table 1)。

ELISA 陽性血清抗體的測定需再進行 F1 抗原抗體抑制試驗，以確定 ELISA 反應的特異性。其方法為以適量的抗原中和後再以 ELISA 檢

測，可排除非特異性結果。在 coating well 盤的穩定度上以保鮮膜包好可保存半年以上的穩定 ($P > 0.05$)。和 PHA 法比較：大大的減少 F1 抗原的使用量，減低非特異性偽陽性，不受綿羊血球新鮮度、鞣酸化條件影響。不需經常批次製作標準化及減少實驗煩複費時工作。缺點為：需使用 ELISA reader，檢測人體或鼠類要使用不同二次抗體。嚴重溶血檢體會影響結果。

F1 莢膜抗體之融合瘤細胞製作

在 34 個 well 中形成融合瘤細胞聚落，利用 ELISA 篩成功的選出 1A1 及 1B6 二株高值的 F1 抗體，OD 值均在 3.0 以上。再經 subcloning 確定單一細胞分裂株。利用 IgG HRP conjugate 判定此二株均屬 F1 抗體 IgG 融合瘤細胞 (13,19)。

ATCC 雖可購買到的 F1-3G8-11gA 細胞株之 IgA 抗體產生細胞。在純化上沒有如我們的成功製作之單株抗體細胞株，可利用 protein A column 純化 F1 Ig 抗體球蛋白來得方便。在此計畫中我們實驗室也建立單株抗體製作流程，可做未來生產單株抗體需求。

製備純化 F1 莢膜單株抗體及標定螢光純化螢光抗體

因計畫時間限制因素，直接利用 ATCC F1-3G8-11gA 單株抗體細胞株產生之抗體與以純化。在 *Y. pestis*、*Y. pseudotuberculosis* 參考株塗抹

玻片，以 200 倍稀釋的標定螢光抗體可成功標示 (fig.5)。

原傳統的間接螢光法標定是利用二次抗體的抗老鼠 IgGAM 螢光抗體，改良用直接螢光法後，可對人體或其他動物組織或淋巴腺的塗抹檢體做快速篩檢，減少偽陽性。

16SrDNA 細菌鑑定

Sequencing 結果輸入 MicroSeq Libraries 16S Bacteria Library

(Applied Biosystems) 和資料庫 *Y. pestis* 比對 100% 的相似性，和 *Y. pseudotuberculosis* 有 99.7% 相似性。有一個 bp 的差異。

在 NCBI 網站上全長 1461bp rDNA 在 *Y. pestis*, *Y. pseudoculosis* 是無法區分。rRNA 在演化的速度非常緩慢，這二株菌非常接近，區別應在 1-2bp 內或無法區分。本實驗至少提供在鑑定上縮小範圍剩下上述二株間的差異，同時我們實驗室也建立了以 16S rDNA 細菌鑑定系統提供細菌分類平台。

以 Real time PCR 方法檢測

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I 方法，F1 的 T_m 值在 80.67-81.24 (fig.6)，此 real time PCR 可減少實驗時間，提供快速篩檢工作，缺點是敏感性高，陽性無法同時進行重覆校正功能。

原參考文獻 (15、16) 計畫應用 *Y. pestis* F1 及 LcrV 二基因去選合適 probe 做 real time PCR 反應，更改直接引用羅氏 (Roche) 公司開發之 LightCycler-Yersinia pestis Detection Kit，可提供快速檢測。檢測鼠疫桿菌或 *Y. pseudotuberculosis* 保守 16S rRNA 基因，及 pMT1 或 pCD1 質體。304bp 擴增 16S rRNA 基因利用 LightCycler Red 640 probes 檢測：此 16S rRNA 基因產物以 melting curve(T_m) 應在 68.4-69.0°C。第二組 primer 在 pMT1 質體 caf1 基因夾出 240bp 片段，利用 LC640 probe 雜交： T_m 值在 59.5-60.5°C。第三組 primer 在 pCD1 質體的 LcrV 基因夾出 287bp 以特殊 hybridization probes-LC640 標定： T_m 值在 59.5-60.5°C。

結論與建議：

本計畫成功的建立鼠疫桿菌抗原純化，免疫酵素檢測標準化，單株抗體的製作，螢光抗體的製備，Real time PCR 診斷方法，16S rDNA 細菌鑑定系統。對鼠疫參考實驗室提供快速準確鑑定，以確保防疫迅速處理原則。

隨著細菌分子診斷技術的成熟，由原來數天的細菌培養生化鑑定，到幾小時甚至數十分鐘就可提供結果。未來致病細菌的檢驗，分子檢測方法會扮演重要的地位。如何設計引子及 probe，怎樣在不同型態的檢體得到最大量的核酸模版，是我們實驗室在篩檢和鑑定上未來重要工作之一。

本局在八十九年開始委外調查台灣地區鼠疫鼠類抗體監測，及後來每年三季的定期監測，及至九十三年度監測均未檢出鼠疫抗體陽性鼠類，建議定期監測乃可持續但頻率可減少成每年輪流一季或每二年做一次調查，節省人力用於研發上。

單株抗體是微生物檢驗的一項利器，在抗原抗體檢測上提供有力的應用價值。單株抗體融合瘤細胞的製作，雖然非常費時費工的工作，但對在市場上買不到的抗體，而在防疫檢驗或研究上有需求，除請廠商代工製作外，本局實驗室應有製作的技術及能力。

參考文獻

1. Plague manual : Epidemiology, Distribution, Surveillance and Control
W.H.O. 1999.
2. 俞東征. 新中國鼠疫防制 50 年. 中華流行病學雜誌 2000 年 8 月第
21 卷第 4 期:300-303
3. Shiguo Zhou. et al. 2002. A whole-genome shotgun optical map of
yersinia pestis strain KIM. Applied and Environmental Microbiology,
68:6321-6331
4. Abigail A. Salyers and Dixie D. Whitt. Second edition 2002. Bacterial
Pathogenesis, A Molecular Approach
5. Patrick R. Murray et al. 1999, Manual of Clinical Microbiology 7th
edition, ASM press.
6. Tsukano, Hiroko, K.I. Itoh, S. Suzuki and H. Watanable. Detection
and identification of Yersinia pestis by polymerase chain reaction
(PCR) using multiplex primers. Microbiol. Lmmunol. 1996. 40:
773-775
7. Chen, T.H., and K.F. Meyer. 1966. An evaluation of Pasteurella pestis
fraction-1-specific antibody for conformation of plague infections.
Bull.W.H.O. 34:911-918
8. Friedlander, AM., S.L. Welkos., P.L. Worsham., G.P. Andrews, D.G.
Heath., G.W. Anderson, and K. Davis. 1995 Relationship between
virulence and immunity as related in recent studies of the F1 capsule
of Yersinia pestis. Clin. Infect. Dis. 2(suppl.): 178-81
9. Anderson, G.W., E.D. Williamson., R.W. Titball., S.L. Welkos., P.L.
Worsham., and A.M. Friedlander. 1996. Recombinant V antigen
protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by
F1-capsule-positive and negative strains of Yersini spestis. Infect.
Immun. 64:4580-4585.
10. Holmstrom. A., J. Olsson, P. Cherepanov, E. Maier, R. Nordefelth, J.
Pettersson, R. BenZ., H. Wolf-WatZ., A.A. Forsberg. 2001. LcrV is a
channel size-determining component of the Yop effector translocation
of Yersinia. Mol. Microbiol. 39(3); 620-632
11. Gerard P. Andrews, David G. Heath, George W. Anderson, JP., Susan
L. Welkos, and Arthur M. Friedlander. 1996. Fraction 1 capsular

- antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. *Infection and Immunity*, Vol. 64. No. 6 2180-2187
12. Sosuke Suzuki, Yoshio Chikasato, and Susumu Hotta. 1974. Studies on antiplague haemagglutinating antibodies. *Bull. W.H.O.* 51. 237-243
 13. V. A. Feodorova and Z.L. Devdariani. 2000. Development, characterization and diagnostic application of monoclonal antibodies against *Yersinia pestis* fibrinolysin and coagulase. *J. Med. Microbiol.* 49: 261-269
 14. Fred Ausubel. et al. 1995 *Short protocols in molecular biology*, third edition. Published by John Wiley & Sons, Inc.
 15. Elizabeth A. Mothershed, et al. 2002. Development of a Real-time Fluorescence PCR Assay for Rapid Detection of the Diphtheria Toxin Gene. *J. Clin. Microbiol.* 40:4713-4719
 16. Marco R. Oggioni, Francesca Meacci, Alessandra Carattoli, Alessandra Ciervo, Germano Orru, Antonio Cassone, and Gianni Pozzi. 2002. Protocol for Real-time PCR identification of Anthrax Spores from Nasal Swabs after Broth Enrichment. *J. Clin. Microbiol.* 40:3956-3963
 17. 潘子明、簡淑惠、王添貴、蔡金來、洪其璧，鼠疫桿菌之檢測 中華微免雜誌 1997;30:43-50
 18. 劉文燦、莊傳昌、許蕙玲、梁忠誌、林宏基，鼠疫桿菌荚膜蛋白 (Fraction 1. F1) 抗原、螢光抗體之製備及相關檢測技術之應用，行政院衛生署疾病管制局九十年委託研究計畫 DOH 90-DC-1029
 19. 多田仲彥 單株抗體作製方法 (日文) 1995 學際企劃出版
 20. Baker, E. E., H. Sommer, L. E. Foster, E. Meyer, and K. F. Meyer. 1952. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. *J. Immunol.* 68:131-145.

圖表

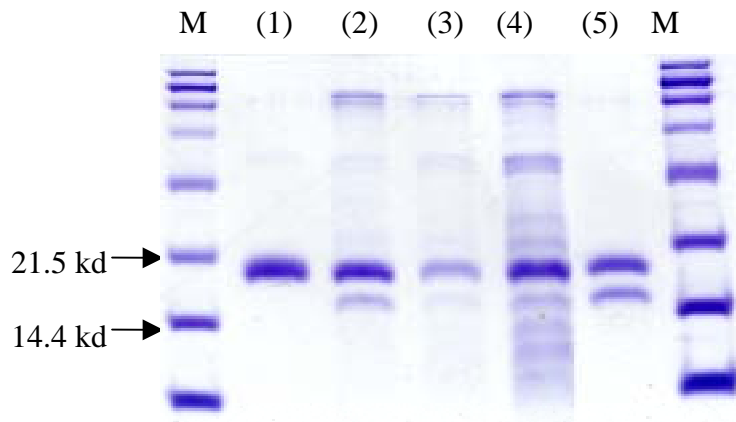


Fig1. F1 抗原純化之 SDS Page : (1)純化 F1 抗原 (2)~(5)分別為依序過濾透析之蛋白質。

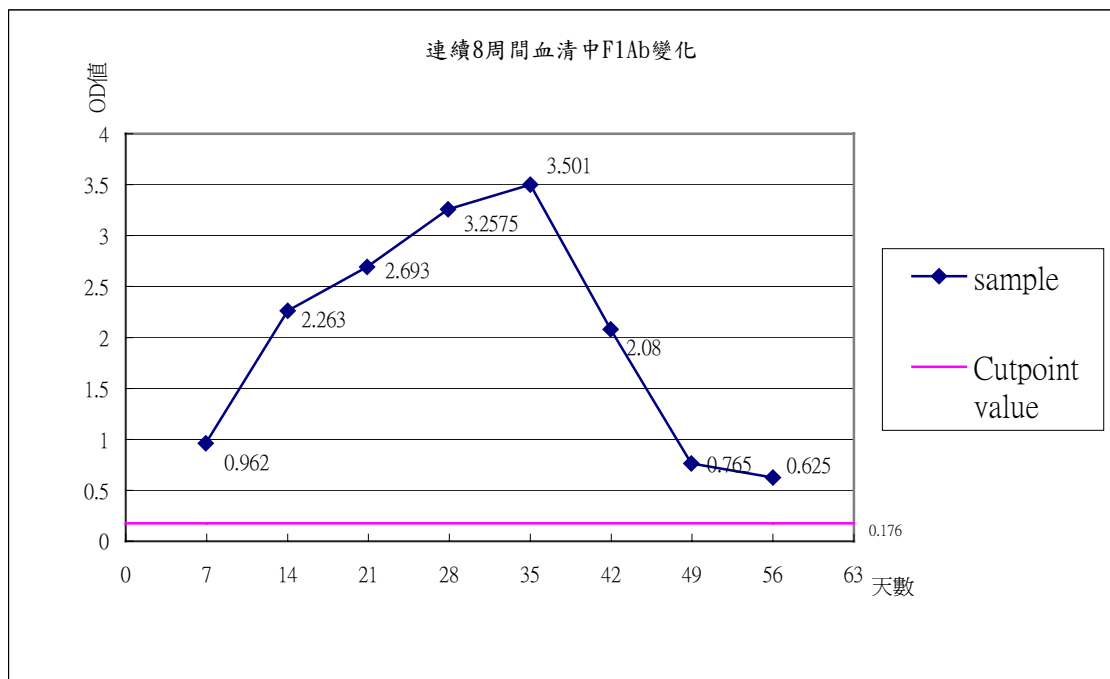


Fig 2. BALB/c 老鼠接種不活化鼠疫桿菌連續 8 周間血清中 F1 抗體變化

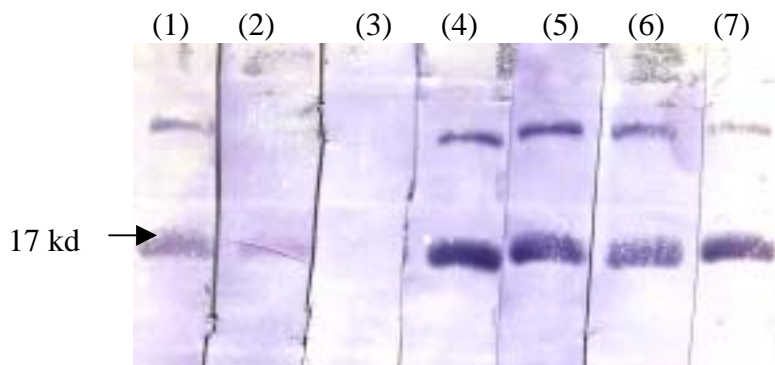


Fig 3. 純化 F1 抗原在不同抗體的 Western blots :
 (1) F1 Ab 單株抗體 (2) Y. pestis (YP) 25°C (blood)
 (3) YP 25°C (Ascites) (4) YP 37°C (blood)
 (5) YP(A/A) 37°C (blood) (6) YP 37°C (Ascites) (7) F1
 hybridoma cell supernatant

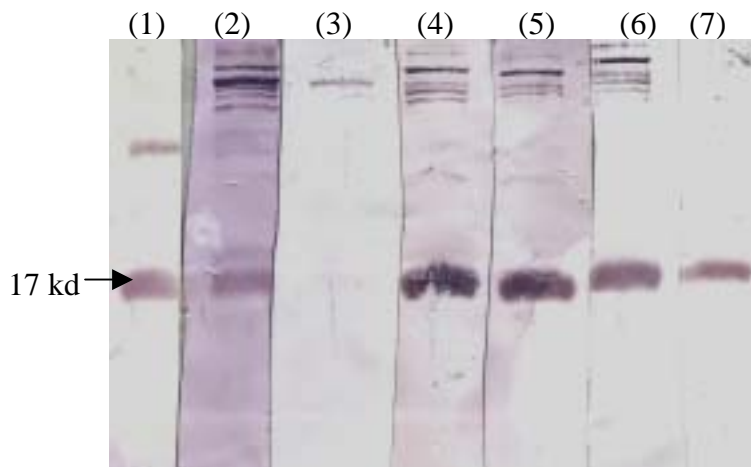


Fig 4. 粗抽取 F1 抗原在不同抗體的 Western blots :
 (1) F1 Ab (2) YP 25°C (blood) (3) YP 25°C (Ascites)
 (4) YP 37°C (blood) (5) YP(A/A) 37°C (blood) (6) YP 37°C
 (Ascites) (7) F1 hybridoma cell supernatant

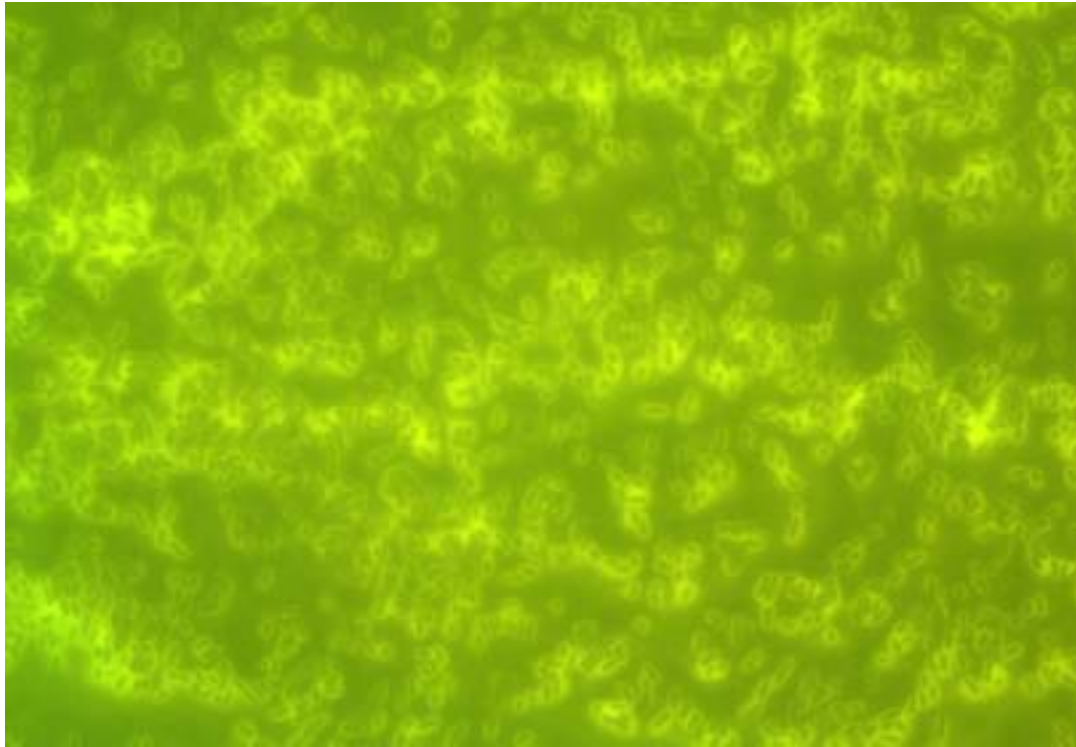


Fig 5. 鼠疫桿菌在 37°C 培養下抹片之直接螢光免疫法染色

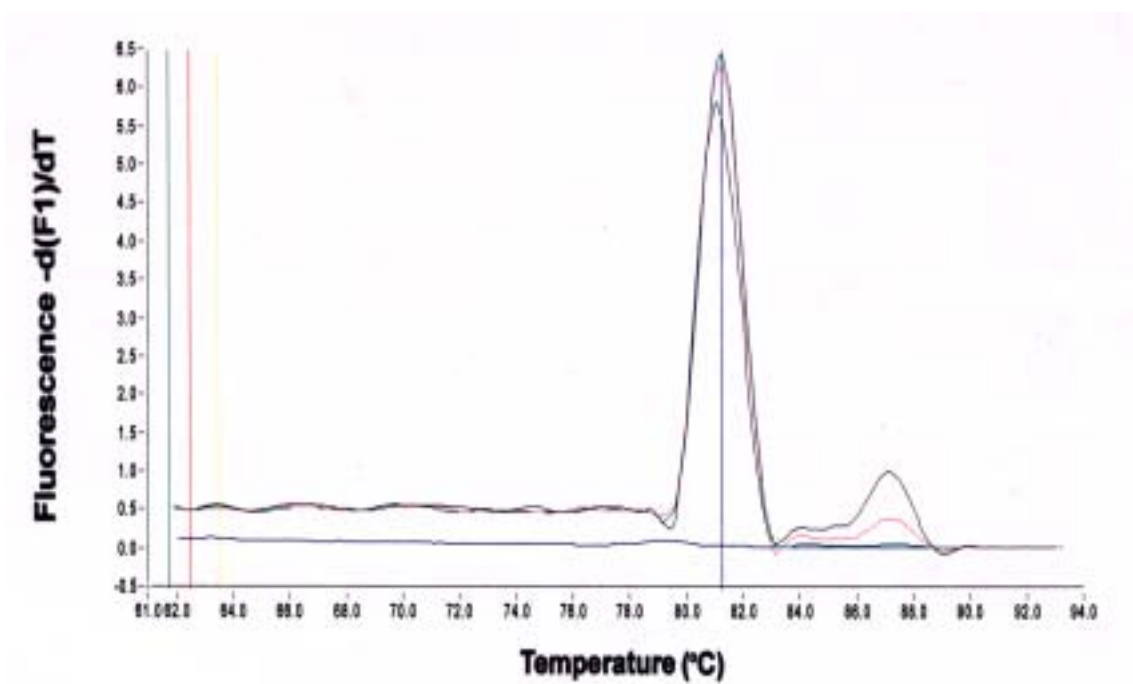


Fig 6. 不同 template 濃度下所夾出 F1 541bp 基因的 Tm 值

Table 1

疾病管制局九十三年度國際機場港區鼠疫桿菌鼠類血清抗體監測工作計畫

	溝鼠	錢鼠	小黃腹 鼠	鬼鼠	家鼠	屋頂鼠	赤背條 鼠	合計	檢驗結 果
基隆港	24	35						59	—
中正機 場	1		12	46			1	60	—
台中港	38	6						44	—
高雄港	85	8			1	1		95	—
高雄機 場	38	17			1			56	—
花蓮港	5			1				6	—
蘇澳港	9							9	—
麥寮港	20	6		1				27	—
金門		6	2					8	—
馬祖	1	5						6	—
合計	221	83	14	48	2	1	1	370	