

計畫編號：DOH94-DC-2020

行政院衛生署九十四年度自行研究計畫

立克次體血清學診斷系統建立

研究報告

執行機構：疾病管制局

研究主持人：舒佩芸

研究人員：黃智雄、呂琇瑩、蔡坤憲、潘秀玲、林鼎翔

執行期間：94年1月1日至94年12月31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 碼
封面	1
目錄	2
中文摘要	3-4
英文摘要	5-6
前言	7-11
材料與方法	12-23
結果	24-28
討論	29
結論與建議	30
參考文獻	31-35
表	36-40
圖	41-49

中文摘要

本計畫的目標在建立一套完整的立克次體血清學診斷系統，以期快速的診斷立克次體疾病，改善現有檢驗及監測系統的不足。目前以實驗室為基礎的快速診斷方法主要有兩種：一種是利用聚合酶鏈反應(Polymerase chain reaction, PCR)為基礎的分子診斷方法，另一種是利用酵素免疫分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)為基礎的血清學診斷方法。本計畫建立以酵素免疫分析法為基礎的立克次體血清學檢驗方法，偵測病人血清中抗立克次體的 IgM 及 IgG 抗體，用以診斷立克次體傳染病。本計畫所使用的酵素免疫分析法，包括 (i) Capture IgM、IgG ELISA 及 (ii) Indirect IgG ELISA。Capture IgM 及 IgG ELISA 是用以檢測病人急性期及恢復期血清中抗立克次體 IgM 及 IgG 抗體，診斷病人是否最近受到立克次體的感染。Indirect IgG ELISA 方法可用以檢測病人急性期及恢復期成對的血清中，抗立克次體 IgG 抗體是否有四倍上升以決定病人是否感染立克次體疾病。此外，這種方法還可應用於血清流行病學的研究。我們利用疾病管制局歷年來分離出之立克次體細菌株及確定病例血清進行研究，並與傳統微量免疫螢光染色法(Indirect microimmunofluorescence, MIF)相互比較，分析 ELISA 的靈敏度與精確度。由於立克次體需在活細胞內生長，菌體產量較少，純化也較困難，因此 ELISA 所需的抗原通常是以重組基因蛋白質為主，其優點除了可大量生產外，也可挑選宿主免疫

反應主要的標的蛋白做為抗原來源，提高試劑的靈敏度及專一性，並降低背景值。本研究目前已表現及純化出數種恙蟲病立克次體重組基因蛋白質，並與花蓮慈濟醫學院合作，並挑選出適合用於 ELISA 檢測之單株抗體 (9-1)，並已完成陽性及陰性檢體約 100 件的測試。目前正持續進行靈敏度及專一性之改良，未來可應用於疾病的早期診斷及流行病學的研究，這對於立克次體傳染病之防治工作是極為重要的。

中文關鍵詞

立克次體，恙蟲病、酵素免疫分析法

ABSTRACT

The laboratory of Vector-borne viral and Rickettsial diseases in the Center of Research and Diagnostics is responsible for the laboratory diagnostics of various reportable Rickettsial diseases in CDC Taiwan. Due to increased international traffic exchanges and global warmer climate, the spread of vector-borne diseases have expanded rapidly in whole world with increased intensity and severity. Similarly, the tendency of these infectious diseases has increased in Taiwan in recent years. Development of rapid diagnostic assay is important for early diagnosis and timely treatment. Currently, the three basic methods used by most laboratories for the diagnosis of Rickettsial infections are Rickettsial isolation and characterization, detection of genomic sequence by nucleic acid amplification technology assay, and detection of specific antibodies.

Until now, laboratory diagnosis of Rickettsial infections was largely relied on serological assay using microimmunofluorescence (MIF) detecting specific antibodies from acute and convalescent phase serum samples. However, there is a trend toward the use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to replace MIF due to its high sensitivity, specificity and simplicity. Therefore, analysis of specific IgM and IgG antibodies based on ELISA will become the new standard assay for the detection and differentiation of Rickettsial infections.

We have developed two different ELISA systems for the screening of Rickettsial infections, a Capture IgM and IgG ELISA and an Indirect IgG ELISA. Capture IgM and IgG ELISA will be used for the detection and differentiation of various Rickettsial infections at the acute and convalescent

phases, while Indirect IgG ELISA will be used for detection of IgG antibodies induced after acute, convalescent and post infections. Preliminary evaluation of in house ELISAs on the screening of *O. tsutsugamushi* using tsa56kD recombinant antigens and a monoclonal antibody (9-1) showed good correlation with MIF and a commercial ELISA kit from PanBio. The development of rapid diagnostic assays for acute phase infection based on the combined analyses of real-time PCR and ELISA would contribute greatly to the early detection and timely treatment of Rickettsial infections.

Key words: Rickettsia, Scrub typhus, ELISA, MIF, protein,

前言

立克次體為革蘭氏陰性，絕對細胞內寄生的細菌，台灣地區的立克次體傳染病主要有恙蟲病及斑疹傷寒，其中又以恙蟲病的病例最多。恙蟲病（又稱叢林性斑疹傷寒），為患者遭帶有病原 *Orientia tsutsugamushi* 之恙蟲幼蟲叮咬，所引起之急性傳染性疾病（1,15,30,32,33）。臨床症狀包括發熱、焦痂(eschar)、紅疹與淋巴腺病等症狀。在缺乏治療的情形下，可能造成患者的無尿、肺水腫與心衰竭，致死率可由 1 到 30%。恙蟲病之地理分佈，北由日本北部與俄羅斯東部，南至澳洲北部與西太平洋群島，西至阿富汗均有病例發生（1,15）。雖然恙蟲病可藉由抗生素治療而痊癒，但由於錯誤的診斷與抗生素的選用不當，世界上每年仍有零星致死的案例發生。而台灣在 1955 年即將此病列為通報傳染病，現歸類為第三類傳染病。近年來恙蟲病病例有逐漸增加的趨勢，民國 89 年至 93 年的確定病例數為 269、371、284、258 及 401 例。且在各縣市均有病例報告，但主要是在金門縣、台東縣、花蓮縣及南投縣，發生月份以每年 5 月至 10 月較多，感染的年齡層多為 20~29 歲。台灣地區的傳播媒介主要為地里恙蟲 (*Leptotrombidium deliense*)。恙蟲的動物宿主主要為齧齒類(rodent)，哺乳類(羊、豬、狗、貓)，鳥類(鳥、雞)等，其中又以齧齒類為最主要的宿主（2,31）。

恙蟲病之潛伏期約 9 至 12 天，特徵為在螫口處形成特有的無痛性

洞穿式潰瘍性焦痂 (eschar) 。併發高燒(39°C 以上甚至 40.5°C)，若未治療高燒可持續約 14 天。局部淋巴腺發炎腫大。自發病日起 4-5 天開始，軀幹先出現紅疹繼而擴至四肢及臉，約第 9-10 病日後會消退。常伴有頭痛、出汗、結膜充血、昏迷、末期心跳衰竭、休克等症狀。本病的死亡率依地區、立克次體株、感染史與治療與否有關，有 1-30%之差異，但若經正確診斷適當用藥則死亡率可低於 1%。有鑑於近年來國內恙蟲病病例逐年增加，如果無法及時確診可能造成國人生命威脅。故有必要建立檢驗新技術，以得到快速準確的診斷及正確的治療以降低死亡率。

地方性(鼠蚤型)斑疹傷寒為 *Rickettsia typhi* (*Rickettsia mooseri*) 引起的疾病，其病程和人蚤型(流行性)斑疹傷寒類似，有頭痛、惡寒、疲勞、發燒、全身性疼痛和出疹等現象，但病情較流行性斑疹傷寒溫和 (34)。在各年齡層的致死率依年齡增加而遞增，但均小於 1%。在缺乏蚤子的侵襲、季節性的分布和疾病的散發性等因素，均有助於和人蚤型斑疹傷寒區別。實驗室診斷通常用 IFA 法，病人血清先和不同的立克次體抗原吸附，以作為鑑別性診斷。或用細胞培養方法分離病原體，再以 IFA 鑑定。

流行通常發生在有大量老鼠存在，且人與鼠居住在同一棟建築物的地區，季節性的尖峰在夏末和秋天。台灣地區有散發性病例，日據時期又稱為兩週熱。傳染窩為鼠類和一些小哺乳類動物，在自然界以鼠—蚤—鼠的循環方式維持傳播，此時鼠為傳染窩(通常為屋頂鼠 *Rattus rattus* 和溝鼠

R. norvegicus)。立克次體在老鼠為不顯性感染，傳染方式為具有傳染性的鼠蚤(通常為 *Xenopsylla cheopis*)在吸血時排出立克次體而污染了叮咬部位或其他新鮮的皮膚傷口，進而造成感染，偶爾也有因吸入了乾的蚤糞而感染的病例。小袋鼠、貓和其他野生或家中動物均可受感染，通常具有自限性，但這些動物可傳播具有傳染性的蚤類給人類。貓蚤 (*Ctenocephalides felis*)也是一種可能的媒介，一旦感染，在蚤體中終生維持(可長至一年)。人感染後潛伏期約 1—2 週，通常為 12 天，並不會直接由人傳染給人。如因災難而導致人口聚集、衛生條件不良，且人、鼠和蚤密集共存時，有可能發生流行，且在這種狀況下，一般會併有其他疾病同時流行。在台灣，斑疹傷寒亦有逐年增加的趨勢，89 年至 93 年的確定病例數為 21、28、35、33 及 97 例，故有必要建立檢驗新技術，以得到快速準確的診斷及正確的治療。

立克次體實驗室的診斷方法主要分為三類：(i) 細菌分離及培養；傳統的方法將菌種或檢體接種到實驗動物如天竺鼠、大白鼠、倉鼠或雞胚胎等，但目前以細胞培養方法最為常用，可使用蝨子或哺乳動物細胞株來培養細菌。培養出之細菌可再以細菌型別特異性(serotype-specific)之單株抗體做免疫螢光染色，以確知被感染細菌之血清型 (5,29)，但是因為檢體需接種至細胞株培養至少 10 天後才能進行免疫螢光染色判讀，檢驗流程耗費時日，是其缺點；(ii) PCR 方法；可以偵測血液、組織等檢體之細

菌核酸分子，可縮短檢驗時間，提升確診時效(3,4,11,12,15,16,18,27);(iii) 血清學方法；傳統的方法如 Weil-Felix test，其原理為立克次體病人產生之抗體可與腸細菌 *Proteus* 屬的菌種有交叉結合反應 (cross-reaction)，如 Typhus group (*Rickettsia prowazekii*, *R. typhi*)及 *R. rickettsii* 可與 *P. vulgaris* OX19 反應，Spotted fever group 之菌種可與 *P. vulgaris* OX2 反應，*O. tsutsugamushi* 則可與 *P. mirabilis* OXK 反應。但此方法缺乏靈敏度及專一性，且有高的偽陽性及偽陰性機率，並不建議使用。目前最常用的立克次體血清學診斷方法為微量免疫螢光染色法(Indirect microimmunofluorescence, MIF)，這種方法的可信度較高，但在區分不同 Spotted fever group 菌種時，仍有困難。此外，酵素免疫分析法(ELISA) 因具有高的靈敏度、特異性、再現性與可自動化的優點，是目前許多實驗室正在努力開發的方法 (6,7,10,13,35)。在細菌感染初期時，病人血清中的 IgM 抗體對所感染的菌種具有較高的專一性，而對不同種的細菌的結合能力較弱，可以利用為區分菌種的型別之用。所以開發 IgM 檢測方法，有助於病人的早期診斷及菌種型別區分的方法，是未來發展的方向之一。立克次體感染之血清學診斷極為複雜，如恙蟲病的致病原 *O. tsutsugamushi*，目前已發現有許多 strains 或 isolates (8,9)，病人感染後，並不產生對不同 strain 具有交叉保護作用的抗體，故病人可能重複被不同 strain 的細菌感染，造成診斷的困難。建立一套完整的血清鑑別診斷系統，

包括區分不同細菌型別感染，分辨初次或多次感染將有助於疾病的治療及防治。

材料與方法

(一) **血液檢體及細菌株**：血液檢體來源為通報自疾病管制局之各種立克次體傳染病之確定病例血液，細菌株為疾病管制局歷年來立克次體分離方法所得者。原型菌株 (prototype)，Gilliam、Karp、Kato 等為購自 ATCC。病人血清及血液檢體包括急性期(症狀出現後 0-7 天)、早恢復期(症狀出現後 8-13 天)、晚恢復期(症狀出現後 14-30 天)之檢體。病人檢體收集後，將進行病原分離、血清學及分子生物學之實驗室診斷，以確認感染源。不同期血清，將用以分析病人對各種抗原之抗體反應，如抗體之效價、種類、特異性及動力學變化，建立免疫保護力及免疫病理機轉之相關性。經實驗室確診為陽性反應之檢體將加以分裝，儲存於 -80°C 冷凍櫃長久保存。

(二) **細菌株的分離與鑑定**：檢體為病患急性期 (1~7 病日) 含 heparin(10U/mL)之全血，取 buffy coat 或 plasma 或周邊血液單核細胞 (PBMC)。再將其接種至 L929 或 Vero 細胞株 (100 μL /25T 細胞培養瓶)。每隔 3~4 天更換培養基，並觀察是否有細胞病變發生，並以間接免疫螢光法偵測是否有立克次體生長。2 週後若無立克次體生長，則將細胞凍解 3 次後再行細胞株接種 1-2 次。所有實驗過程應於 P3 實驗室生物安全操作台內操作，慎防感染自己及他人。培養基中不可添加四環黴素及氯黴素等抗生素。

(三) **單株抗體之製備、純化與分析**：本計畫將收集各種立克次體特異

性之單株抗體。單株抗體之來源將由不同管道取得，包括購買、請求贈與、自行生產或以合作研究方式取得。將分別用於不同型式 ELISA 開發，進行鑑別診斷及細菌分型研究。單株抗體將以 BALB/c 小白鼠之腹水方式生產，再以 protein A sepharose 4B Fast Flow 親和力管柱(Pharmacia Biotech) 純化。

(四) **基因重組蛋白質之製備與純化**：主要是以大量表現於恙蟲病立克次體細胞膜上的蛋白質 (*O. tsutsugamushi* : tsa56kD 或 47kD outer membrane protein) 為標的，構築質體 (plasmid) 表現其基因重組蛋白質。由於大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 可提供便宜、快速且能大量生產蛋白質的多種優點 (Gold, 1990)，本計畫將採用大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 表現重組蛋白質。首先利用 RT-PCR 得到 *O. tsutsugamushi* 的 outer membrane protein: tsa56kD 或 47kD 的 DNA 片段。將此 DNA 片段選殖至 pET 表現系統(Novagen)，產生 N 端 (或 C 端) 為 His-tag 的全長重組蛋白質。利用 mAb against His-tag(正對照組)、老鼠抗立克次體單株抗體等，決定重組蛋白質是否帶立克次體抗原決定位置(Western blot, Immunoprecipitation)。再大量表現、純化之，並利用 ELISA 的方法評估其發展 ELISA 檢驗試劑之可能性。並將有潛力的各種重組蛋白質片段，做適當的混合(cocktail)，製成更高靈敏度、高專一性的酵素免疫診斷試劑。

(五) **表現 *Orientia tsutsugamushi* 56KD 片段基因 (OT56) 之表面蛋白**:

OT56 質體 (ot56/pWM 1) 來自台灣大學獸醫研究所潘銘正老師實驗室，質體構築及分析方法主要參考 Ching et al (1998)，以下簡述 OT56 片段基因之蛋白質表現及分析方法。

(1) OT56 質體小量培養與基因序列確認

將 5 μ l OT56 溶液與 200 μ l TA competent cell 反應物置於冰上 30 分鐘後，混合成一管，改置放於 42 $^{\circ}$ C 水浴槽中 2 分鐘，再移至冰上 2 分鐘。將上述混合產物加入 800 μ l LB 後，於 37 $^{\circ}$ C 培養室中養菌一小時後，將之倒入含 Ampicillin 的 LB plate 上，以圓形小珠珠均勻塗抹於 plate 上，於 37 $^{\circ}$ C 培養室中培養至隔日，再以 quick screen 或 PCR 的方式選取正確菌株，並以 T7 promoter 之 primer 確認方向和序列。選取序列正確之菌株，進行小量培養、質體抽取及儲存。

(2) 大量抽取 Plasmid

選取上述正確菌株，將其點加於玻璃試管內之 5ml LB 中 (加 5 μ l Ampicillin)，培養至隔夜，所收得之菌液 (ot56/pWM 1/TA) 以轉速 8,000 rpm 離心 5 分鐘。去掉上清液後，加入 250 μ l Solution 1 均勻溶散 pellet，再以 250 μ l solution 2 緩和溶離菌液，直到溶離之菌液澄清為止。加入 350 μ l 之 Solution 3 後輕輕搖轉以中和反應液。接著以轉速 8,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液至 Mini-M column (VIOGENE)，並以轉速 8,000 rpm 離心去除溶液，接著以 Wash Buffer I-II 洗滌 Mini-M column，將 Mini-M column

置於 60°C 烘箱中去除多餘的酒精，最後以 50µl DEPC-H₂O 溶出目標質體 DNA。

(3) 更換 Host 為 BL-21(DE3) (蛋白質表現系統)

取 10µl plasmid (ot56/pWM 1) 溶液，改選用 BL-21(DE3) 為 Protein expression host cell，將 200µl BL-21(DE3) 與 10µl plasmid (ot56/pWM 1) 溶液混合成一管置於冰上 30 分鐘後，後改置放於 42°C 水浴槽中 2 分鐘，再移至冰上 2 分鐘。上述混合產物加入 800µl LB 後，於 37°C 培養室中養菌一小時後，將之倒入含 Ampicillin 的 LB plate 上，以圓形小球珠均勻塗抹於 plate 上，於 37°C 培養室中培養至隔日，再以 PCR 或 quick screen 的方式選取正確菌株，並以 T7 promoter 之 primer pairs 定序確認方向。

(4) OT56 蛋白質表現

刮取少量正確的菌株至 5ml 之 LB medium 中，於 37°C 培養室中培養至隔日。取 500µl 上述隔夜培養之菌液，分別加入數管含 5ml 之 LB medium 試管中，加 IPTG (最終濃度為 1mM；對照組未加) 後，於 37°C 培養室中培養 5、6、16 小時，每次收取 1c.c. 菌液供蛋白質表現時間測定。蛋白質之抽取，係將菌液以轉速 12,000rpm 離心 5 分鐘，除去上清液後加入 100µl RIPA (Roche) 萃取蛋白質，再加入 100µl 2X SDS sample Buffer，將之隔水加熱 (95°C) 5 分鐘，隨即放置冰上，並進行 12% SDS-PAGE 確認蛋白質。

(5) OT56 蛋白質純化

取 1L 的 LB 培養液，加入隔夜培養之菌液 20ml，於 37°C 培養室中培養至 OD 值為 0.6 時，取 1c.c. 菌液（未加 IPTG 之對照組）。加入 IPTG（最終濃度為 1mM）後，於 37°C 培養室中培養 4-6 小時後。最後將菌液以轉速 12,000rpm 離心 5 分鐘，除去上清液後加入 30ml Buffer A（20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride），利用冷凍解凍、超音波擊碎法或利用含 2M、4M、8M Urea 的 Buffer A 萃取蛋白質。利用 AKTA Prime 液相層析儀之 DEAE (5 PW) 離子層析管柱進行分析。該儀器主要以 Buffer B(6M urea in Buffer A)和 Buffer C(6 M urea, 2M NaCl in Buffer A) 流洗離子管柱，以分離不同帶電性（分子量）之蛋白質。最後以 SDS-PAGE 判斷結果，並以 NanoDrop 微量分光光度計定量。

(6) OT56 蛋白質重新鍵結 (Refolding)

所收集純度較高的蛋白質流洗液，經 10 kDa 之 SnakeSkin™ (PIERCE) 半透膜以梯度緩衝液滲透方式，將 Urea 及其他鹽類滲透出來。最後再利用 10% PEG 6000 (Polyethlenglycol 6000 FERAK) 多次滲透的方式濃縮蛋白質，所得之蛋白質以 SDS-PAGE 及 NanoDrop 微量分光光度計作分析及定量。

(六) 表現 *Orient tsutsugamushi* 56KD 之全段及片段基因之表面蛋白

(1) *Orient tsutsugamushi* 56kD 基因全長定序

利用引子對 STKPF2 (CA GAT GCC ATG GAA AAA ATT ATG TTA ATT GCT AGT GCA ATG TC) 和 STKPR2 (AG CCG CTC GAG CTA GAA GTT ATA GCG TAC ACC AAA ACT TGC CAT A) 增幅出 *Orient tsutsugamushi* Karp、Kato、Gilliam 和 Taiwan B strains 之 56KD 表面蛋白基因全長(Stover et al., 1990)。聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction; PCR) 之反應溶液配置如下: 50 μ l 反應液(5.0 μ l DNA, 25.5 μ l DEPC-H₂O, 5.0 μ l 10X buffer (15mM MgCl₂ included) (QIAGEN), 10.0 μ l Q solution, 1.0 μ l dNTPs (10 mM each), 1.5 μ l each of 10.0 μ M forward and reverse primers, and 0.5 μ l of *Tag* DNA polymerase (QIAGEN[®]))。BIOMETRA thermocycler 機器之 PCR 條件為 1 min at 95°C, 35 cycles (20s at 95°C, 30s min at 55°C, and 30s at 72°C) and 7 min at 72°C 的條件下進行。

以 TA Cloning 作基因定序。取出 p-GEM[®]-T Easy Vector (Promega) 和上述目標片段 DNA，將之離心至 1.5ml 離心管底部。利用 2X Rapid Ligation Buffer 進行接合反應 (Ligation)，反應一配置如下表。

反應溶液	
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 μ l
p-GEN [®] -T Easy Vector (50ng)	1 μ l
PCR product	X μ l
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ μ l)	1 μ l

Deionized water to a final volume of 10 μ l

反應液於 4°C 冰箱反應隔夜，以 TA cell 為 competent cell，將 200 μ l TA 與 10 μ l 接合反應物置於冰上 30 分鐘後，混合成一管，改置放於 42°C 水浴槽中 2 分鐘，再移至冰上 2 分鐘。混合產物加入 800 μ l LB 後，以圓形小珠珠均勻塗抹於先前準備之二個 LB/ampicillin or kanamycin/IPTG/X-Gal plate 上。於 37°C 培養室中養菌至隔日，再選取白色菌株送定序。

(2) *Orient tsutsugamushi* 56kD 片段基因引子對之設計

定序後之序列經 DNA Star 等軟體排序 (Alignment) 後，選擇保守區段設計引子對，並進行 PCR 測試。

(3) *Orient tsutsugamushi* 56KD 片段基因轉殖

a. 限制酶酶切反應

準備限制酶酶切反應緩衝液二管，內含 45 μ l H₂O，6 μ l Buffer B，2 μ l *Bam*HI，2 μ l *Hind* III (Roche)。各管分別加入上述 PCR 產物及 pET47b (Novagen) 各 5 μ l，於 37°C 水浴槽中反應 2 小時。再加入 140 μ l H₂O 及 200 μ l phenol/chloroform，於室溫下以 12,000rpm 離心 5 分鐘。吸取上清液後加入 200 μ l chloroform，再次以 12,000rpm 離心 5 分鐘。取上清液加入 20 μ l 3M NaOAc 及 500 μ l 100%酒精，均勻混合後，以轉速 12,000 rpm 於 4°C 中離心 15 分鐘，去除溶液後再以 70%酒精洗滌管底 pellet，再次離心、

乾燥後所得之透明膠狀物即為酶切後之 DNA。分別將之溶於 4.5 μ l 之 ddH₂O 中備用。

b. 接合作用 (Ligation)

承上，將兩種 DNA 片段於 65 $^{\circ}$ C 水浴加熱 10 min 後，置冰浴中。取 5 支微量離心管置冰浴中，依下表所列 (單位: μ l) 依序加入各成份，於 16 $^{\circ}$ C 中反應隔夜 (16 小時)。

	#1	#2	#3	#4	#5
Vector : Insert *	1 : 3	1 : 1	3 : 1	1 : 0	-
10X Ligase Buf	1	1	1	1	0
ddH ₂ O	4	4	4	4	9
Eco RI/SalI cut pET 47b	1	2	3	4	Uncut pET47b 1
Kp fragment	3	2	1	0	0
T4 DNA ligase	1	1	1	1	0

* Vector 與 Insert 之比例為莫耳數比，DNA 總量為 100 ng。

#1~#4 置於 16 $^{\circ}$ C 反應過夜，#5 則不加 ligase，直接置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱。

#1~#4 反應過夜後，以 70 $^{\circ}$ C 加熱 10 min，置冰浴中。

c. 轉型作用 (Transformation)

取 10 μ l ligation 溶液，選用 TA 為 competent cell，將 200 μ l TA 與 10 μ l 接合反應物置於冰上 30 分鐘後，混合成一管，改置放於 42 $^{\circ}$ C 水浴槽中 2 分鐘，再移至冰上 2 分鐘。上述混合產物加入 800 μ l LB 後，於 37 $^{\circ}$ C 培養室中養菌一小時後，將之倒入含 Kanamycin 的 LB plate 上，以圓形小球珠均勻塗抹於 plate 上，於 37 $^{\circ}$ C 培養室中培養至隔日，再以 PCR 或 quick screen 的方式選取正確菌株，並以 T7 promoter 之 primer 確認方向，送明

欣公司定序。

d. 大量抽取 Plasmid

選取上述正確菌株，將其點加於玻璃試管內之 5ml LB 中（加 5 μ l Kanamycin），培養至隔夜，所收得之菌液以轉速 8,000 rpm 離心 5 分鐘。去掉上清液後，加入 250 μ l Solution 1 均勻溶散 pellet，再以 250 μ l solution 2 緩和溶離菌液，直到溶離之菌液澄清為止。加入 350 μ l 之 Solution 3 後輕輕搖轉以中和反應液。接著以轉速 8,000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液至 Mini-M column (VIOGENE)，並以轉速 8,000 rpm 離心去除溶液，接著以 Wash Buffer I、II 洗滌 Mini-M column，將 Mini-M column 置於 60°C 烘箱中去除多餘的酒精，最後以 50 μ l ddH₂O 溶出目標 DNA。

e. 更換 Host 為 BL-21 (DE3) (蛋白質表現系統)

取 10 μ l plasmid 溶液，改選用 **BL-21(DE3)** 為 Protein expression host cell，將 200 μ l BL-21(DE3) 與 10 μ l plasmid 溶液混合成一管置於冰上 30 分鐘後，後改置放於 42°C 水浴槽中 2 分鐘，再移至冰上 2 分鐘。上述混合產物加入 800 μ l LB 後，於 37°C 培養室中養菌一小時後，將之倒入含 Kanamycin 的 LB plate 上，以圓形小珠珠均勻塗抹於 plate 上，於 37°C 培養室中培養至隔日，再以 PCR 或 quick screen 的方式選取正確菌株，並以 T7 promoter 之 primer 確認方向，送明欣公司定序。

f. 蛋白質表現

刮取少量正確的菌株至 5ml 之 LB medium 中，於 37°C 培養室中培養至隔日。取 500 μ l 上述隔夜培養之菌液，分別加入數管含 5ml 之 LB medium 試管中，加 IPTG（最終濃度為 1mM；對照組未加）後，於 37°C 培養室中培養 5、6、16 小時，每次收取 1c.c. 菌液供蛋白質表現時間測定。蛋白質之抽取，係將菌液以轉速 12,000rpm 離心 5 分鐘，除去上清液後加入 100 μ l RIPA（Roche）萃取蛋白質，再加入 100 μ l 2X SDS sample Buffer，將之隔水加熱（95°C）5 分鐘，隨即放置冰上，並進行 12% SDS-PAGE 確認蛋白質。

為了瞭解所表現之蛋白質是否為可溶性？首先，取經過 IPTG 誘導之隔夜培養菌液，以轉速 12,000 rpm（4,000g）離心 5 分鐘，除去上清液後加入 5ml lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10mM imidazole, pH 8.0)，利用乾冰反覆冷凍解凍（打破細胞原理）後，並經超音波（200-300W）以 10 秒間歇間隔震盪六次（於冰上操作）。以轉速 12,000 rpm 離心 20-30 分鐘，取上清液即為水溶性蛋白質。沈澱物加 5ml lysis buffer 即為不可溶性蛋白質。將水溶性蛋白質、不可溶性蛋白質分別加入 2X SDS sample Buffer 後，進行 12% SDS-PAGE 分析。

取 500 μ l 上述隔夜培養之菌液以轉速 12,000 rpm（4,000g）離心 20 分鐘，除去上清液後，每 5 克的菌（濕重）加入 5ml Buffer B，於室溫中震盪 1 小時，以轉速 12,000 rpm 離心 20-30 分鐘，取上清液即含目標蛋白

質。每 4ml 上清液加 1ml 50% Ni-NTA resin (Novagen)，於室溫下以 200 rpm 震盪一小時後，再將混合液移至 column，準備進行流洗。利用不同 pH 值之 Buffer 將具有 Ni 親和性之 OT56 蛋白質流洗出來，依序以 4ml 之 Buffer B, C, D, E 各流洗四次，所收集之流洗液以 12% SDS-PAGE 確認。所收集純度較高的蛋白質流洗液，經 10 kDa 之 SnakeSkin TM 半透膜多次水滲透方式，將 Urea 及其他鹽類滲透出來。最後再利用 10% PEG 6000 (Polyethlenglycol 6000 FERAK) 多次滲透的方式濃縮蛋白質，所得之蛋白質以 NanoDrop 微量分光光度計定量。

(七) Capture IgM/IgG 酵素免疫分析法:先以 100 μ l 抗人 IgM 或 IgG 特異性之山羊 IgG (goat IgG against Human IgM or IgG) 在 4°C 下隔夜吸附 (coating) 在 96 孔微量效價盤上。吸附完成後以磷酸緩衝液 (PBS) 清洗，之後再用 200 μ l 之 1% 牛血清白蛋白緩衝液 (1% Bovine serum albumin in PBS) 於 37°C 下進行 1 小時封鎖作用 (blocking)。清洗後，加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照組血清 100 μ l 反應 1 小時。清洗後，加入 100 μ l 細胞培養的細菌抗原 (Gilliam, Karp, Kato, etc.) 或基因重組抗原，在 37°C 下反應 1 小時。清洗後，加入 1/1000 (v/v) 稀釋之抗立克次體之單株抗体 100 μ l。反應 1 小時後，加入 1:1000 稀釋之山羊抗鼠 IgG 抗体-鹼性磷酸酶結合體 100 μ l，於 37°C 反應 1 小時。清洗後，加入 100 μ l 酵素受質體 PNPP (p-nitrophenyl-phosphate) 室溫作用 30 分鐘，再用 Dynatech MR700

微量效價盤判讀儀 (microplate reader) 以波長 405 nm 測吸光度。

(八) **Indirect IgM and IgG ELISA:** 先以 $5 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{l/well}$ of 單株抗体在 4°C 下隔夜吸附 (coating) 在 96 孔微量效價盤上。再用 $200 \mu\text{l}$ 之 1% 牛血清白蛋白緩衝液 (1% Bovine serum albumin in PBS) 於 37°C 下進行 1 小時封鎖作用 (blocking)。清洗後，將立克次體抗原稀釋後加入，在 37°C 下反應 1 小時。清洗後，加入 1:100 稀釋好的待測血清及對照血清反應 1 小時。再加入 1:1000 稀釋之山羊抗人 IgM 或 IgG 抗体-鹼性磷酸酶結合體，於 37°C 反應 1 小時。最後，加入酵素受質體 PNPP 室溫作用 30 分鐘，再以波長 405 nm 測吸光度。

(九) **ELISA 最適化研究:** 為改進 ELISA 之靈敏度 (sensitivity) 及專一性 (specificity)，我們將致力於 ELISA 最適化研究。specificity 的改進可以提高鑑別診斷之可靠性，分辨不同立克次體的感染，取代目前較麻煩的 MIF 方法。Sensitivity 的改進也是重點之一，因為流行病學的應用，需要極高的靈敏度和專一性，才能得到真正可靠的血清抗體陽性率，這也是目前研究上的瓶頸。

結果

(一) 表現 *Orientia tsutsugamushi* 56KD 片段基因 (OT56) 之蛋白質

以 TA-competent cell 轉殖之 OT56 構築質體經小量菌液培養後，質體抽取之分子量為 6,783 bp (Insert: 1.18 kb; Vector: 5,677 bp)，環形結構的分子量估計約為 4,000 bp (如圖一)。

OT56 質體轉殖至蛋白質表達系統 BL-21 (DE3) 後，以 1mM IPTG 誘導標的蛋白質在試管中小量培養，分別收取第 3、6、16 小時之菌液 1 c.c.，以 SDS-PAGE 觀察所表現之蛋白質分子量，結果顯示一段分子量約為 40 kD 的蛋白質片段大量表現 (圖二)，經軟體估算其分子量為 42.376 kD (397 Amino Acids)。大量培養時以錐形瓶培養 1 公升菌液，結果得到相同穩定之蛋白質表現結果 (圖三)。

抽取該菌液蛋白質後，利用 AKTA 液相色層分析儀 (LPLC) 將不同分子量分子加以分離，根據輸出結果顯示吸光值 280 nm 在第 14 管開始升高 (圖四)，經 SDS-PAGE 分析結果顯示，分子量 42kD 之蛋白質主要出現在第 14 管至 20 管 (圖五)。蛋白質濃度約為 266.7-43.7 ng/ml (NanoDrop)。

將純化後收集之第 15 管至第 19 管蛋白質溶液混合後，以梯度透析及 PEG 濃縮等方法，可以得到濃度約為 126.0 ng/ml 之蛋白質溶液 (根據 NanoDrop 之定量結果)。

(二) 表現 *Orientia tsutsugamushi* 56KD 之全段及片段基因之表面蛋白

利用基因轉殖的方式，*Orientia tsutsugamushi* 立克次體四個品系 Kato、Karp、Gilliam、Taiwan B 已完成 56kD 表面蛋白基因全長定序。利用軟體將上述四個品系基因序列排序後，將保守區域設成下列之基因引子對，不同引子對分別增幅不同長短片段及變異區。

Kp1F	<u>GG AAT TCT</u> ATG AAA AAA ATT ATG TTA ATT GCT A	EcoRI
Kp1585R	<u>A CGC GTC</u> GAC CTA GAA GTT ATA GCG	<i>Sal</i> I
Kp238F	<u>CGG GAT CCG</u> ATG ACA ATC GCT CCA GGA T	<i>Bam</i> HI
Kp313F	<u>CGG GAT CCG</u> GGT AAA GTT AAG GCA GAT T	<i>Bam</i> HI
Kp758F	<u>CGG GAT CCG</u> GCT AAT AAA CCT AGC GCT T	<i>Bam</i> HI
Kp408F	<u>CGG GAT CCG</u> CAG CCT ACT ATA ATG CCT A	<i>Bam</i> HI
Kp1076R	<u>CCC AAG CTT CTA</u> AAC AGC TGC TGC TGC TAC TG	<i>Hind</i> III
Kp1224R	<u>CCC AAG CTT CTA</u> CTT GCA GTC ACC TTC ACC T	<i>Hind</i> III
Kp1389R	<u>CCC AAG CTT CTA</u> TTT TCC AGA AGT ATA AGC TAA	<i>Hind</i> III
KP1469R	<u>CCC AAG CTT CTA</u> TTC AGC AGC ATT AAT TGC TA	<i>Hind</i> III

Forward	Reverse	預期片段	涵蓋基因區段
Kp1F	Kp1069R	1069 bp	VDI, II, III
	Kp1224R	1224 bp	VDI, II, III, IV
	Kp1389R	1389 bp	VDI, II, III, IV
	KP1469R	1469 bp	VDI, II, III, IV
	Kp1585R	1585 bp	VDI, II, III, IV
Kp238F	Kp1069R	831 bp	VDI, II, III
	Kp1224R	987 bp	VDI, II, III, IV
	Kp1389R	1152 bp	VDI, II, III, IV
	KP1469R	1232 bp	VDI, II, III, IV
	Kp1585R	1348 bp	VDI, II, III, IV
Kp313F	Kp1069R	757 bp	VDI, II, III
	Kp1224R	912 bp	VDI, II, III, IV
	Kp1389R	1077 bp	VDI, II, III, IV
	KP1469R	1157 bp	VDI, II, III, IV

	Kp1585R	1273 bp	VDI, II, III, IV
Kp408F	Kp1069R	662 bp	VDII, III
	Kp1224R	817 bp	VDII, III, IV
	Kp1389R	982 bp	VDII, III, IV
	KP1469R	1062 bp	VDII, III, IV
	Kp1585R	1178 bp	VDII, III, IV
Kp758F	Kp1069R	312 bp	
	Kp1224R	467 bp	VDIV
	Kp1389R	632 bp	VDIV
	KP1469R	712 bp	VDIV
	Kp1585R	828 bp	VDIV

以 *Orientia tsutsugamushi* Karp 之 DNA 為例，其 PCR 結果可以成功增幅目標片段（圖六）。其片段大小如上表標示。

以 Karp 品系之 DNA 為例，利用 Kp1F&1585R 為引子，增幅之基因全長目標片段，將之轉殖至 pGEM-T 後小量培養，抽取 Karp/pGEM-T 與 pET47b 後同時進行限制酶切反應（圖七），接合反應後轉型至 JM109 competent cell，以快速篩選法挑選之構築質體（Kp/pET47b/JM109）之菌株編號為 6、14、21、33、37、38、42、43、44、79、89 等（圖八）。將上述菌株再以 T7 promoter 為引子對進行 PCR 以確認構築質體（Kp/pET47b）是否含目標片段，並確認其接合方向是否正確，結果顯示編號 14、38、79 等三株菌株（圖九）之 PCR 增幅結果與預期片段大小相符，經基因定序後確認無誤，目前正進行重組蛋白之表現。

（三）抗恙蟲病立克次體單株抗體之測試 結果如表一：單株抗體 9-1、1-2、1-7、8-1 與 3-1 為花蓮慈濟大學陳立光教授所提供。以 IFA 方法，

對不同血清型之病原菌 (Karp, Gilliam, Kato) 進行測試，結果以 9-1 單株抗體對 Karp, Gilliam 及 Kato 靈敏度最高，可做為恙蟲病立克次體之通用抗體，適合用來篩選陽性恙蟲病病人之血清檢體。故作為 ELISA 優先選擇的材料，進行測試。

(四) 恙蟲病確定病例 IFA 與 In-house ELISA 結果之比較 表二為利用 9-1 單株抗體及純化出之 OT56 蛋白質 (結果一) 進行 Capture IgM 及 Indirect IgG ELISA 之結果。ELISA 之 cut-off 值以陰性血清之 OD 值的平均值+3SD 得之。比較 IFA 與 ELISA 結果，IFA IgM 陽性之檢體共有 21 支，而 ELISA 陽性者有 19 支 (cut-off 值為 0.155；陽性率為 90%)。IFA IgG+M+A 陽性之檢體共有 26 支，而 Indirect IgG ELISA 陽性者共有 21 支 (cut-off 值為 0.258；陽性率為 81%)。若比較恙蟲病陽性急性與恢復期配對血清(N0.11-30) 20 支檢體，則 IFA IgM 陽性者有 11 支 (11/20; 陽性率為 55%)，ELISA IgM 陽性者有 13 支 (13/20; 陽性率為 65%)，顯示 Capture IgM ELISA 的靈敏度較 IFA IgM 為高。陰性控制組 11 支血清檢體，其 ELISA IgM 及 IgG 均為陰性，顯示其專一性為 100%。

(五) 比較 In-house 與 PanBio Indirect IgG ELISA 之結果如表三。恙蟲病陽性急性與恢復期配對血清 66 支檢體中，PanBio 有 32 支陽性，其陽性率為 48.5% (32/66)。In-house Indirect IgG ELISA 有 52 支陽性，其陽性率為 78.8% (52/66；cut-off 值為 0.258)。In-house Indirect IgG ELISA

遠較 PanBio ELISA 的靈敏度為高。

討論

本計畫建立以酵素免疫分析法為基礎的立克次體血清學檢驗方法，偵測病人血清中抗立克次體的 IgM 及 IgG 抗體，用以診斷立克次體傳染病。首先我們以恙蟲病確定病例血清進行研究，並與傳統微量免疫螢光染色法(Indirect microimmunofluorescence, MIF)相互比較，分析 ELISA 的靈敏度與精確度，目前已得到初步的成果。IFA 與 ELISA 的結果具有一致性，且較 PanBio 檢驗試劑商品之靈敏度為高。目前本實驗室仍持續進行重組蛋白的表現，以產生較好的抗原，提升檢驗系統的靈敏度及專一性。單株抗體的選擇也是決定檢驗系統品質的重要關鍵，我們仍將持續測試及篩選最佳的抗體作為檢驗試劑的材料。開發靈敏度及專一性更佳的檢驗系統，未來可供立克次體傳染病之快速診斷，使之應用於疾病的早期診斷及流行病學的研究，這對於立克次體傳染病之防治工作是極為重要的。

結論與建議

本計畫的主要目標在建立一套完整的立克次體血清學診斷系統。利用 ELISA 高靈敏度、高特異性、高再現性及可自動化的優點，以取代目前所使用之微量免疫螢光染色法(Indirect microimmunofluorescence, MIF)。這對於立克次體傳染病之早期快速診斷、流行病學之應用、傳染病之防治工作都有極大的幫助。

參考文獻

1. 李淑芳、蔡淑芬、施清河等。一九九三年台閩地區恙蟲病流行病學調查報告。
中華公共衛生雜誌。14(4):334-341，1995。
2. 陳慧玲、謝國珍、陳豪勇等。由病人血液中分離台灣地區 *Rickettsia tsutsugamushi* 之探討。台灣醫誌。94 (suppl2) :S112-119，1995。
3. 謝國珍、陳慧玲、陳豪勇等。以聚合酶連鎖反應來判定恙蟲病立克次氏菌之血清型。中華民國微生物及免疫學雜誌。29(2):116-121，1996。
4. Carl M, Tibbs CW, Dobson ME, Paparello S, Dasch GA. Diagnosis of acute typhus infection using the polymerase chain reaction. J Infect Dis 161:791-793, 1990.
5. Chang WH, Kang JS, Lee WK, Choi MS, Lee JH. Serological classification by monoclonal antibodies of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated in Korea. J Clin Microbiol 28:685-688, 1990.
6. Ching WM, Wang H, Eamsila C, Kelly DJ, Dasch GA. Expression and refolding of truncated recombinant major outer membrane protein antigen (r56) of *Orientia tsutsugamushi* and its use in enzymed-linked immunosorbent assays. Clin Diagn Lab Immunol 5:519-526, 1998..
7. Coleman RE, Sangkasuwan V, Suwanabun N, Eamsila C, Mungviriyaya S, Devine P, Richards AL, Rowland D, Ching WM, Sattabongkot J, Lerdtusnee K.
Comparative evaluation of selected diagnostic assays for the detection of IgG and IgM antibody to *Orientia tsutsugamushi* in Thailand. Am J Trop Med Hyg 67:497-503, 2002.
8. Enatsu T, Urakami H, Tamura A. Phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* strains based on the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. FEMS Microbiol Lett 180:160-169, 1999.

9. Fournier PE, Fujita H, Takada N, Raoult D. Genetic identification of *Rickettsia* isolated from ticks in Japan. *J Clin Microbiol* 41:2176-2181, 2002.
10. Furuya Y, Yamamoto S, Otu M, Yoshida Y, Ohashi N, Murata M, Kawabata N, Tamura A, Kawamura Jr A. Use of monoclonal antibodies against *Rickettsia tsutsugamushi* Kawasaki for serodiagnosis enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 29:340-345, 1991.
11. Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Kawamori F, Yamamoto S, Ohashi N, Tamura A, Kawamura Jr A. Specific amplification of *Orientia tsutsugamushi* DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29:2628-2630, 1991.
12. Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Yamamoto S, Kawamura Jr A. Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31:1637-1640, 1993..
13. Jang WJ, Huh MS, Park KH, Choi MS, Kim IS. Evaluation of an immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Orientia tsutsugamushi* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:394-398, 2003.
14. Jang WJ, Kim JH, Choi YJ, Jung KD, Kim YG, Lee SH, Choi MS, Kim IS, Walker DH, Park KH. First serologic evidence of human spotted fever group Rickettsiosis in Korea. *J Clin Microbiol* 42:2310-2313, 2004.
15. Jiang J, Temenak JJ, Richards AL. Real-time PCR duplex assay for *Rickettsia prowazekii* and *Borrelia recurrentis*. *Ann N Y Acad Sci* 990:302-310, 2003.
16. Kawamori F, Akiyama M, Sugieda M, Kanda T, Akahane S, Yamamoto S, Ohashi N, Tamura A. Two-step polymerase chain reaction for diagnosis of scrub typhus and identification of antigenic variants of *Rickettsia tsutsugamushi*. *J Vet Med Sci.* 55(5): 749-55, 1993.
17. La Scola B, Raoult. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: current approaches to

- diagnosis of old and new Rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 35:2715-2727, 1997.
18. Land MV, Ching WM, Dasch GA, Zhang Z, Kelly DJ, Graves SR, Devine PL. Evaluation of a commercially available recombinant-protein enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies produced in scrub typhus Rickettsial infections. *J Clin Microbiol* 38:2701-2705, 2000.
19. Mahara F. Japanese spotted fever: report of 31 cases and review of the literature. *Emerg Infect Dis* 3:105-111, 1997.
20. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev* 12:518-553, 1999.
21. Mediannikov OY, Sidelnikov Y, Ivanov L, Mokretsova E, Fournier PE, Tarasevich I, Raoult D. Acute tick-borne Rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian far east. *Emerg Infect Dis* 10:810-817, 2004.
22. Odorico DM, Graves SR, Currie B, Catmull J, Nack Z, Ellis S, Wang L, Miller DJ. New *Orientia tsutsugamushi* strain from scrub typhus in Australia. *Emerg Infect Dis* 4: 641-4, 1998.
23. Ohashi N, Nashimoto H, Ikeda H, Tamura A. Diversity of immunodominant 56-kDa type-specific antigen (tsa) of *Rickettsia tsutsugamushi*. *J Biol Chem* 267:12728-12735, 1992.
24. Ohashi N, Koyama Y, Urakami H, Fukuhara M, Tamura A, Kawamori F, Yamamoto S, Kasuya S, Yoshimura K. Demonstration of antigenic and genotypic variation in *Orientia tsutsugamushi* which were isolated in Japan, and their classification into type and subtype. *Microbiol Immunol* 40: 627-38, 1996.
25. Qiang Y, Tamura A, Urakami H, Makisaka Y, Koyama S, Fukuhara M, Kadosaka T. Phylogenetic characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan according to the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. *Microbiol Immunol* 47:577-583, 2003.

26. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 10:694-719, 1997.
27. Saisongkroh W, Chenchittikul M, Silpapojakul K. Evaluation of nested PCR for the diagnosis of scrub typhus among patients with acute pyrexia of unknown origin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98:360-366, 2004.
28. Seong SY, Park SG, Kim HR, Han TH, Kang JS, Choi MS, Kim IS, Chang WH. Isolation of a new *Orientia tsutsugamushi* serotype. *Microbiol Immunol* 41: 437-43, 1997.
29. Shirai A, Coolbaugh JC, Gan E, Chan TC, Huxsoll DL, Groves MG. Serologic analysis of scrub typhus isolates from the Pescadores and Philippine Islands. *Jpn J Med Sci Biol* 35: 255-9, 1982.
30. Tamura A, Makisaka Y, Kadosaka T, Enatsu T, Okubo K, Koyama S, Yu Q, Urakami H. Isolation of *Orientia tsutsugamushi* from *Leptotrombidium fuji* and its characterization. *Microbiol Immunol* 44: 201-4, 2000.
31. Tamura A, Ohashi N, Koyama Y, Fukuhara M, Kawamori F, Otsuru M, Wu PF, Lin SY. Characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan by immunofluorescence and restriction fragment length polymorphism analyses. *FEMS Microbiol Lett* 150: 225-31, 1997.
32. Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Miyamura S. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45: 589-91, 1995.
33. Tsay RW, Chang FY. Serious complications in scrub typhus. *J Microbiol Immunol Infect* 31: 240-4, 1998.
34. Tselentis Y, Psaroulaki A, Maniatis J, Spyridaki I, Babalis T. Genotypic identification of murine typhus *Rickettsia* in rats and their fleas in an endemic area of Greece by the polymerase chain reaction and restriction fragment length

- polymorphism. Am J Trop Med Hyg 54: 413-7, 1996.
35. Wang YC, Jian TY, Tarn LJ, Hung YW, Chao HY, Ji DD, Liu HW. Development of a recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay and its applications in field surveillance of rodent mice for presence of immunoglobulin G against *Orientia tsutsugamushi*. Clin Diagn Lab Immunol 10:451-458, 2003.
36. Zhang JZ, Fan MY, Wu YM, Fournier PE, Roux V, Raoult D. Genetic classification of “*Rickettsia heilongjiangii*” and *Rickettsia hulinii*,” two Chinese spotted fever group Rickettsiae. J Clin Microbiol 38:3498-3501, 2000.

表一、抗恙蟲病立克次體單株抗體之測試

流水號	McAb (1:100)	IFA (FITC-goat anti-mouse IgG)			
		Karp	Gilliam	Kato	L929
1	9-1 (Karp, Tt-3)	+	++	±	-
2	1-2 (Gilliam, HI-2)	+	++	-	-
3	1-7 (Kato)	-	-	-	-
4	Mix (9-1&1-2&1-7)	+	+	+	-
5	8-1 (Tt-3)	-	-	-	-
6	3-1 (Tt-3)	-	-	-	-

表二、恙蟲病確定病例 IFA 與 ELISA 結果之比較

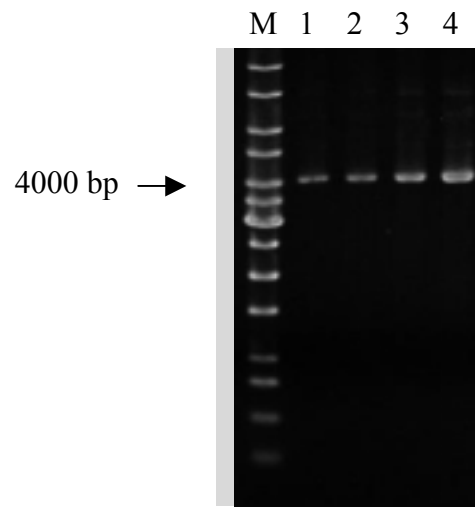
	檢體編號	病日	Ig GAM or Ig G titer			Ig M titer			判定	Capture ELISA		Indirect IgG
			Karp	Gilliam	Kato	Karp	Gilliam	Kato		IgM	IgG	
1	920040A	12	640	640	640	>160	>160	>160	ST 陽性	1.201	0.153	0.273
2	920177A	14	+	+	+	>80	>80	>80	ST 陽性	0.712	0.456	1.424
3	920358A	14	+	+	+	>160	>160	>160	ST 陽性	1.086	0.175	0.369
4	920369A	12	+	+	+	>160	>160	>160	ST 陽性	0.763	0.244	1.197
5	920417A	11	+	+	+	>160	>160	>160	ST 陽性	0.922	0.591	0.875
6	920419A	11	+	+	+	>160	>160	>160	ST 陽性	0.921	0.153	1.114
7	920500A	12	+	+	+	>160	>160	>160	ST 陽性	1.073	0.538	0.996
8	920506A	16	+	+	+	>160	>160	>160	ST 陽性	1.436	0.215	0.452
9	920536A	7	+	+	+	80	80	80	ST 陽性	0.529	0.139	0.885
10	920574A	11	+	+	+	160	160	160	ST 陽性	0.137	0.101	0.207
11	920130A	8	320	160	320	-	-	-	ST 陽性	0.128	0.107	1.12
12	920130B	22	1280	640	1280	80	80	80	ST 陽性	0.24	0.101	1.335
13	920184A	1	320	1280	640	80	>160	>160	ST 陽性	0.157	0.14	0.193
14	920184B	15	320	1280	640	80	>160	>160	ST 陽性	0.147	0.104	0.273
15	920185A	1	160	160	160	-	-	-	ST 陽性	0.195	0.102	1.017
16	920185B	15	640	640	640	80	80	80	ST 陽性	0.252	0.13	1.506
17	920204A	6	80	80	80	-	-	-	ST 陽性	0.283	0.128	0.183
18	920204B	16	>640	640	>640	>160	>160	>160	ST 陽性	1.98	0.172	0.208
19	920205A	1	40	40	40				ST 陽性	0.101	0.109	0.302
20	920205B	16	>640	>640	>640	>160	>160	>160	ST 陽性	0.161	0.091	2.056
21	920249A	3	-	-	-				ST 陽性	0.114	0.091	0.131
22	920249B	67	>640	640	640	80	80	80	ST 陽性	0.242	0.137	1.626
23	920340A	3	160	80	80	-	-	-	ST 陽性	0.13	0.116	0.657
24	920340B	18	>640	>640	>640	80	80	80	ST 陽性	0.178	0.153	2.685
25	920364A	5	-	-	-				ST 陽性	0.242	0.123	0.298
26	920364B	34	320	160	-	>160	80	80	ST 陽性	0.811	0.107	1.851
27	920365A	2	-	-	-				ST 陽性	0.085	0.101	0.116
28	920365B	37	80	-	320	80	80	80	ST 陽性	0.401	0.102	0.703
29	920366A	4	-	-	-				ST 陽性	0.129	0.089	0.156
30	920366B	27	>640	640	640	>160	160	>160	ST 陽性	0.796	0.158	1.328

31	920056A	7	-	-	-				ST 陰性	0.099	0.092	0.154	TF 陽性
32	920079A	7							ST 陰性	0.117	0.126	0.197	TF 陽性
33	920615B	56	-	-	-				ST 陰性	0.108	0.137	0.207	TF 陽性
34	920666A	1	-	-	-				ST 陰性	0.101	0.092	0.174	TF 陽性
35	920719A	8	-	-	-				ST 陰性	0.109	0.084	0.16	TF 陽性
36	920028B	13							ST 陰性	0.091	0.084	0.192	QF 陽性
37	920160C	29	-	-	-				ST 陰性	0.101	0.085	0.122	QF 陽性
38	920178A	17	-	-	-				ST 陰性	0.1	0.085	0.199	QF 陽性
39	920398B	23	-	-	-				ST 陰性	0.086	0.093	0.179	QF 陽性
40	93082403	1				<40	<40		ST 陰性	0.116	0.114	0.222	
41	93090805	16				<40	<40		ST 陰性	0.146	0.087	0.253	

表三、IFA 與 Indirect IgG ELISA (CDC 及 PanBio) 之比較

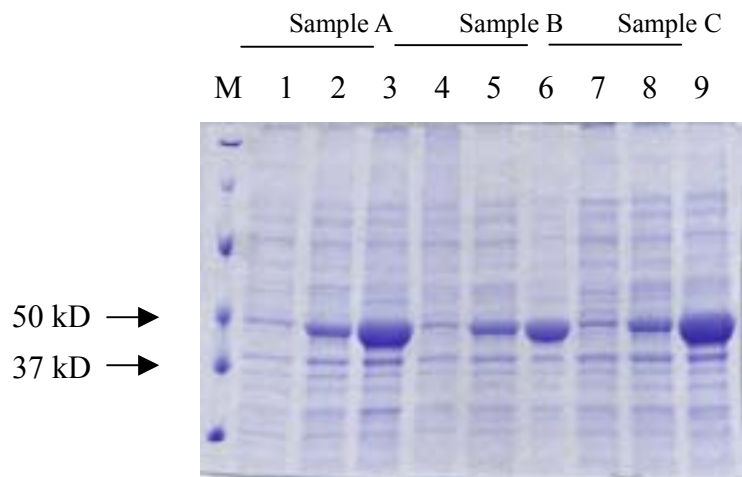
	檢體編號	病日	IgGAM or IgG titer			IgM titer			Indirect IgG ELISA	
			Karp	Gilliam	Kato	Karp	Gilliam	Kato	PanBio kit	CDC-Tw
1	930026A	7	160	160	160	-	-	-	0.172	0.296
2	930026B	21	160	160	160	80	80	-	0.345	0.539
3	930031A	4	-	-	-				0.116	0.29
4	930031B	22	640	640	640	80	80	80	1.413	1.634
5	930284A	2	-	-	-				0.432	0.723
6	930284B	16	640	640	未測	80	80	未測	1.736	1.042
7	930307A	6	40	80	未測	-	-	未測	0.757	1.707
8	930307B	17	640	640	未測	-	-	未測	1.833	1.173
9	930350A	1	-	-	-				0.192	0.294
10	930350B	14	640	160	未測	80	80	未測	0.229	0.244
11	930351A	1	-	-	-				0.058	0.239
12	930351B	16	40	640	未測	-	80	未測	0.287	0.455
13	930354A	4	-	-	-				0.145	0.371
14	930354B	22	160	80	未測	80	80	未測	0.435	0.494
15	930355A	1	-	-	-				0.156	0.329
16	930355B	14	640	640	未測	80	80	未測	1.182	0.675
17	930356A	1	-	-	-				0.134	0.657
18	930356B	18	640	160	未測	80	80	未測	1.304	1.137
19	930370A	7	-	-	-				0.225	0.292
20	930370B	18	640	160	未測	80	160	未測	0.605	0.345
21	930393A	4	-	-	-				0.151	0.944
22	930393B	18	640	320	未測	80	80	未測	1.159	0.813
23	930394A	3	-	-	-				0.263	0.24
24	930394B	23	640	640	未測	80	80	未測	1.413	0.63
25	930399A	1	-	-	-				0.116	0.874
26	930399B	25	-	640	未測	-	80	未測	0.291	0.328
27	930400A	3	-	-	-				0.160	0.219
28	930400B	18	640	640	-	160	160	80	0.926	0.545
29	930412A	7	160	40	未測	-	-	未測	0.969	0.993
30	930412B	19	640	320	未測	80	80	未測	1.585	0.851
31	930421A	5	-	-	-				0.111	0.323
32	930421B	22	320	640	未測	80	80	未測	0.630	0.392
33	930425A	8	-	-	-				0.101	0.188

34	930425B	16	640	640	-	80	80	80	0.977	0.543
35	930427A	6	640	640	未測	-	-	未測	1.603	1.751
36	930427B	27	>2560	>2560	未測	-	80	未測	1.914	1.081
37	930432A	2	-	-	-	-	-	-	0.114	0.195
38	930432B	25	80	640	80	80	160	-	0.423	0.385
39	930433A	3	-	-	-				0.120	0.227
40	930433B	28	640	>640	640	80	160	-	1.555	0.637
41	930475A	2	-	-	-				0.113	0.945
42	930475B	21	640	40	未測	80	80	未測	0.772	0.36
43	930479A	6	+	+	未測	-	-	-	0.461	0.346
44	930479B	16	>640	>640	640	80	80	80	1.495	0.732
45	930491A	2	-	-	-				0.115	0.149
46	930491B	19	640	640	未測	160	160	未測	1.006	0.447
47	930496A	2	-	-	-				0.136	0.381
48	930496B	18	-	640	未測	80	160	未測	0.445	0.487
49	930516A	3	160	-	未測	-	-	未測	1.032	1.418
50	930516B	22	640	-	未測	80	80	未測	1.293	1.457
51	930568A	8	-	-	-				0.155	0.131
52	930568B	21	160	-	未測	80	160	未測	0.590	0.195
53	930570A	8	-	-	-				0.257	0.205
54	930570B	21	640	>640	未測	80	80	未測	0.524	0.21
55	930588A	6	-	-	-				0.115	0.141
56	930588B	14	640	-	未測	80	80	未測	1.493	0.678
57	930612A	1	-	-	-				0.089	0.626
58	930612B	14	-	160	未測	-	80	未測	0.312	0.293
59	930628A	6	-	-	-				0.485	0.67
60	930628B	28	640	640	-	-	-	-	1.828	1.227
61	930699A	3	80	40	40				1.620	2.929
62	930699B	15	>640	>640	>640	-	-	-	1.907	2.384
63	930700A	8	40	40	40				0.192	0.239
64	930700B	29	640	160	160	>160	>160	>160	0.910	0.502
65	930701A	1	160	160	160				0.784	0.847
66	930701B	25	>640	>640	>640	-	-	-	1.926	0.929
								PC	1.246	1.323
								NC	0.096	0.12
								cut off	0.484	0.258



圖一 OT56 質體之環形結構電泳圖

M, 1kb DNA marker



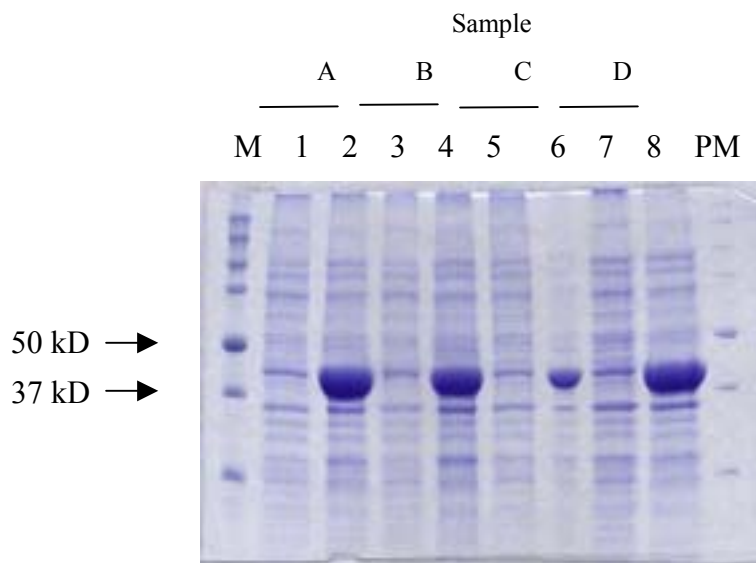
圖二 以 BL-21(DE3) 蛋白質表現系統表現 OT56 蛋白質小量培養之 SDS-PAGE (12%) 分析圖

M : Precision Protein standards prestained Marker (150 kD; 100kD; 75 kD; 50 kD; 37 kD; 25 kD)

Lane 1, 4, 7 : 以 ot56/pWM 1 轉型之 BL-21(DE3) 細胞培養 3 小時，未加 IPTG ；

Lane 2, 5, 8 : 以 ot56/pWM 1 轉型之 BL-21(DE3) 細胞加 IPTG (1mM) 培養 3 小時 ；

Lane 3, 6, 9 : 以 ot56/pWM 1 轉型之 BL-21(DE3) 細胞加 IPTG (1mM) 培養 16 小時。



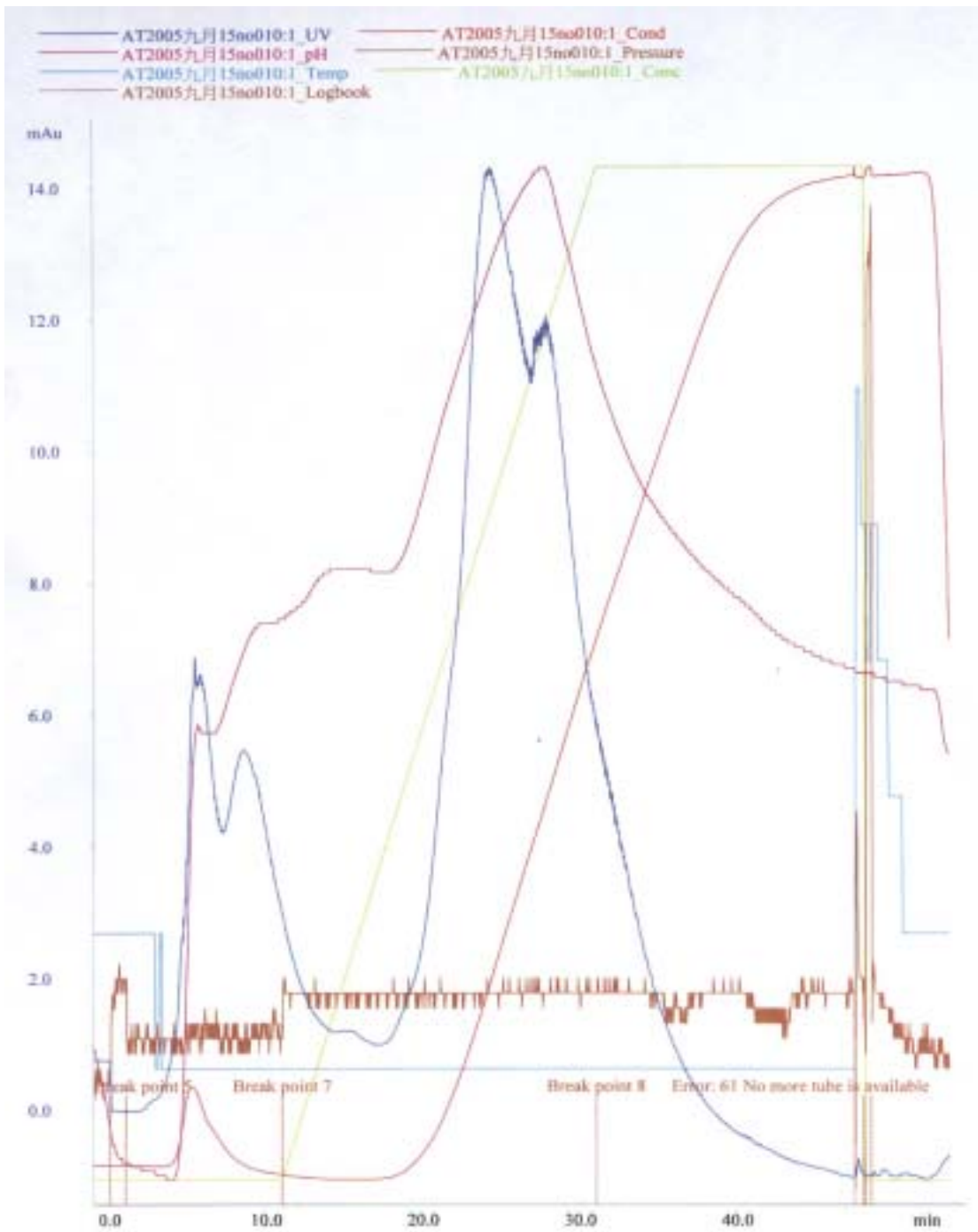
圖三 以 BL-21(DE3) 蛋白質表現系統表現 OT56 蛋白質大量培養之 SDS-PAGE (12%) 分析圖

M: Precision Protein standards Marker (250 kD; 150 kD; 100kD; 75 kD; 50 kD; 37 kD; 25 kD; 15kD; 10kD)

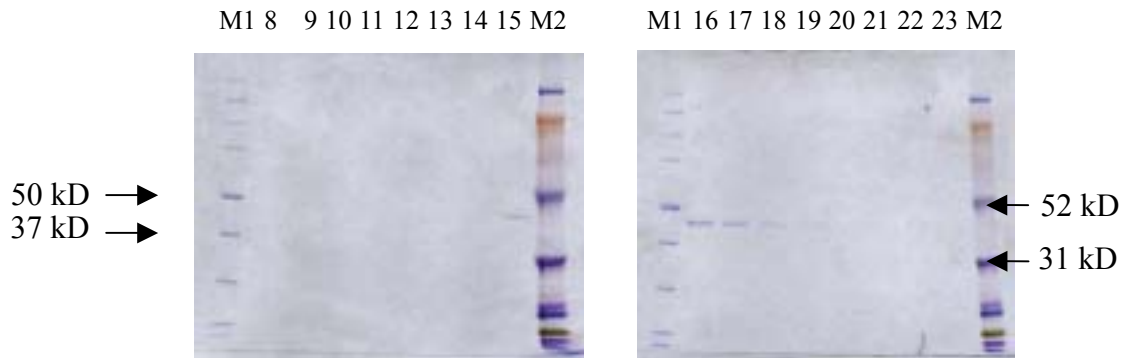
Lane 1, 3, 5, 7: 以 ot56/pWM 1 轉型之 BL-21(DE3) 細胞培養 16 小時，未加 IPTG；

Lane 2, 4, 6, 8: 以 ot56/pWM 1 轉型之 BL-21(DE3) 細胞加 IPTG (1mM) 後培養 16 小時；

PM: Prestain Precision Protein standards Marker (250 kD; 150 kD; 100kD; 75 kD; 50 kD; 37 kD; 25 kD; 15kD; 10kD)



圖四 以 AKTA 液相色層分析儀 (LPLC) 純化 OT56()蛋白質之 280 nm 吸光值輸出圖

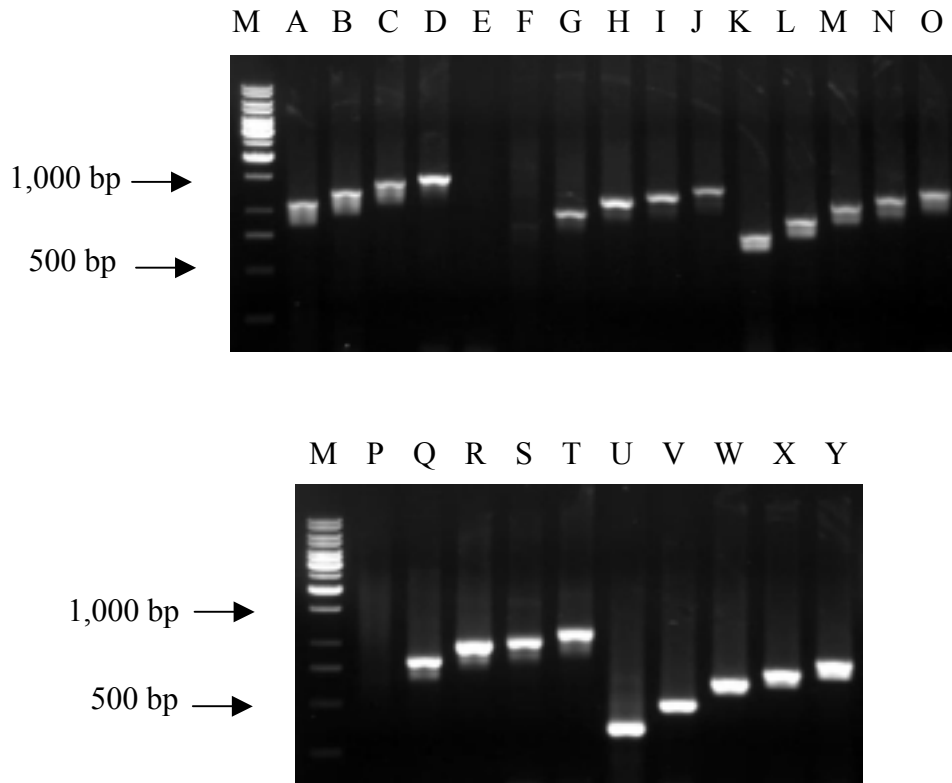


圖五 以 DEAE 管柱之離子交換法純化 OT56 蛋白質之 SDS-PAGE 結果

M1: Precision Protein standards Marker(250 kD; 150 kD; 100kD; 75 kD; 50 kD; 37 kD; 25 kD; 15kD; 10kD)

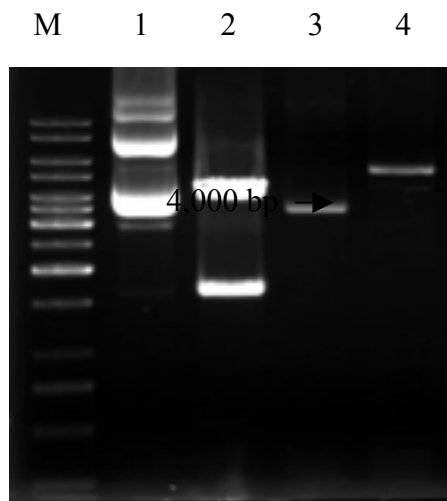
M2 : MultiMark Protein Marker (185 kD; 98 kD; 52 kD; 31 kD; 19 kD; 17 kD; 11 kD; 6 kD)

*編號代表收集管數，每管體積為 1 ml，SDS-PAGE 每個孔槽體積為 10 μ l



圖六 OT56 全長及片段基因之 PCR 結果

A, Kp1F&1069R; B, Kp1F&1224R; C, Kp1F&1389R; D, Kp1F&1469R; E, Kp1F&1585R; F, Kp 238F&1069R; G, Kp 238F&1224R; H, Kp 238F&1389R; I, Kp 238F&1469R; J, Kp 238F&1585R; K, Kp 313F&1069R; L, Kp 313F&1224R; M, Kp 313F&1389R; N, Kp 313F&1469R; O, Kp 313F&1585R; P, Kp 408F&1069R; Q, Kp408F&1224R; R, Kp408F&1389R; S, Kp408F&1469R; T, Kp408F&1585R; U, Kp758F&1069R; V, Kp758F&1224R; W, Kp758F&1389R; X, Kp758F&1469R; Y, Kp758F&1585R.



圖七 目標片段及質體之酶切反應

M, 1 kb DNA marker

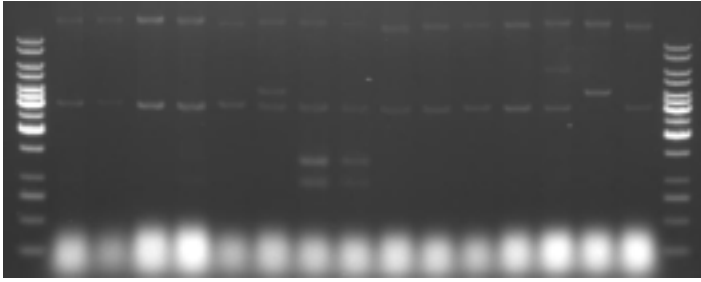
Lane 1, OT56 Karp/pGEM-T 品系全長 (未經酶切)

Lane 2, OT56 Karp/pGEM-T 品系全長 (經 *Eco*RI、*Hind* III 酶切)

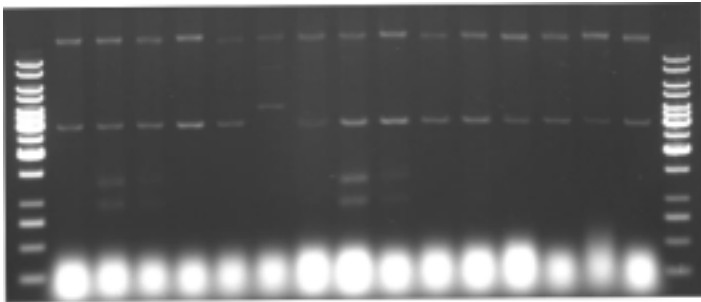
Lane 1, pET 47b 質體 (未經酶切)

Lane 2, pET 47b 質體 (經 *Eco*RI、*Hind* III 酶切)

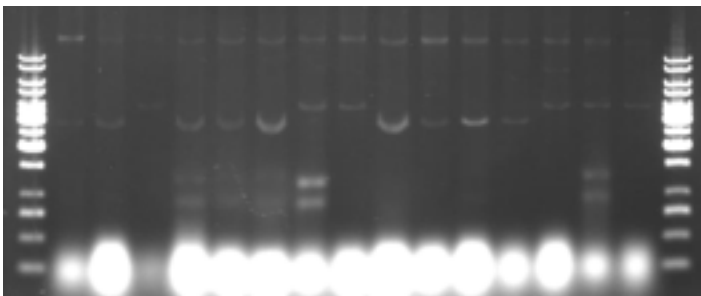
M 1 2 3 4 5 **6** 7 8 9 10 11 12 13 **14** 15



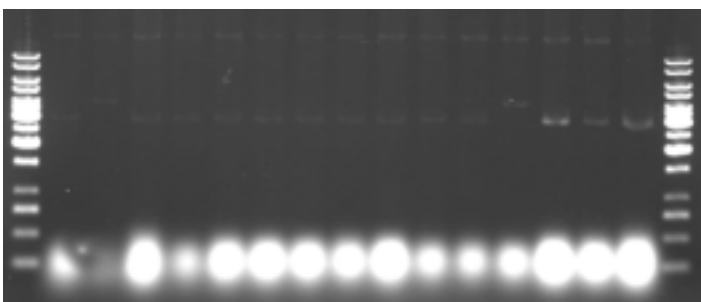
M 16 17 18 19 20 **21** 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M



M 31 32 **33** 34 35 36 **37** **38** 39 40 41 **42** **43** **44** M

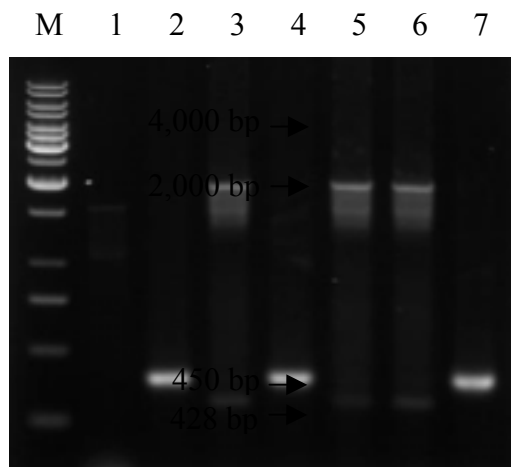


M 78 **79** 80 81 82 83 84 85 86 87 88 **89** 90 91 92 M



圖八 構築質體 (Karp/pET47b) 轉型至 JM109 細胞後，以快速篩選 (Quick Screening) 確認結果

* 粗體數字為成功轉型菌株



圖九 構築質體 (Karp/pET47b) 轉型至 JM109 細胞後，利用 PCR 方法確認目標片段

Line M, 1 kb DNA Marker;

Line 1, Karp DNA 陽性控制組;

Line 2, 編號 3

Line 3, 編號 **14**

Line 4, 編號 41

Line 5, 編號 **38**

Line 6, 編號 **79**

Line 7, 編號 90