

計畫編號：DOH95-DC-1038

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

B 群鏈球菌分子流行病學及表面蛋白致病因子之探討

研究報告

執行機構：國立成功大學

計畫主持人：吳俊忠

研究人員：何月仁、李俊緯、曾鈺晶

執行期間：95 年 01 月 01 日至 95 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	
目錄	1
中文摘要	2-3
英文摘要	4-5
前言	6-10
材料與方法	11-17
結果	18-22
討論	23-25
結論與建議	26
參考文獻	27-32
圖、表	33-43

中文摘要

B 群鏈球菌(GBS)是造成新生兒肺炎(pneumonia)、腦膜炎(meningitis)、敗血症(sepsis)重要的病原菌之一，而成人尤其是罹患慢性疾病的老年人，受到 GBS 的感染也有逐漸增加的趨勢。根據本計畫第一年針對所收集之 156 株血液培養菌株的研究發現 serotype III 是台灣 GBS 感染最 dominant 的血清型(37%)，不管是在新生兒或非懷孕之成年人(79% vs 22%)。而在第二年之 Alp 表面蛋白之研究，證實 GBS 所帶有之表面蛋白的種類與 serotype 有關，在 serotype III 的菌株中有 76% 帶有 *rib* 基因；進一步結合 serotype 與 Alp 表面蛋白進行的 subtype 的分析，共鑑別出 25 種 serovariants，其中最優勢的是 serotype III/*rib*，佔 28%，並且也是造成 78% 新生兒 GBS 腦膜炎主要的 subtype。因此，為進一步探討 Rib 蛋白在 invasive GBS 的致病機制所扮演的角色，本計劃第三年乃進行 *rib* 突變株之構築，由研究的結果發現突變株在生長能力上與野生株沒有明顯差異，顯示 Rib 蛋白並不是 GBS 生長所需的因子；另外在其生物功能的分析上，突變株在細胞附著的能力大約只有野生株的 40% 左右，而在侵入細胞的能力上二者則沒有明顯的差異，顯示 Rib 蛋白可能是在 GBS 的致病機制上扮演附著因子的角色。此外，在 GBS 抗宿主之免疫作用的能力分析上，對抗全血殺菌能力，*rib* 突變株大約只有野生株的 20%，而在抗血清殺菌能力，二者並無明顯差異，顯示 Rib 蛋白在抵抗宿主之免疫作用的機制是經由抗巨噬細胞或中性白血球攻擊的

能力，而不是經由抵抗補體作用的角色，但 Rib 表面蛋白如何抵抗免疫細胞的攻擊，又如何經由附著的過程而感染細胞，都是未來探討 GBS 致病機制非常重要的議題。

Key words: GBS、*rib* 突變株、附著能力、抗吞噬作用

英文摘要

Streptococcus agalactiae, (Group B streptococcus; [GBS]), is one of the the most important pathogens causing neonatal pneumonia, meningitis and sepsis; in recent years, it has become increasingly a causative agent in the nonpregnant adults, in particular the elderly. GBS is subdivided into Ia, Ib, II-VII nine serotypes based on the capsular polysaccharides. According to the findings of our first year investigation, serotype III dominated in the GBS bacteremia of neonates (79%) as well as nonpregnant adults (22%) among the 156 strains collected from two tertiary hospitals of southern Taiwan. In the following year, we studied the prevalence of surface proteins of alp family. It was found that the surface proteins were highly correlated with serotypes, 76% of type III GBS harbored the *rib* gene. When the GBS was subtyped further with four genes of surface proteins *bca*, *rib*, *alp2/3*, and *epsilon*, totally 25 serovariants were identified, with the predominance of subtype III/*rib* (28%), which caused 78% of neonatal meningitis. With the disproportionate importance of *rib* surface protein discovered, the present investigation attempts to delineate the GBS pathogenesis focusing on it. Hence, the construction of *rib* mutants has been completed. Interestingly, growth curve did not show any difference between *rib* mutants and wild types. This implied that *rib* surface protein is not essential for the growth or reproduction of GBS. Invasion study was of no difference in between. However, analysis of adhesion to epithelial cells indicated that the *rib* mutants were 40% less capable of adhesion than the wild types. Therefore, *rib* protein was considered a factor accounting for the adhesion in the early phase of pathogenesis. But further studies revealed that *rib* mutants were 20% less resistant to the killing of whole blood compared with the wild types, with no

difference in the study of serum instead; this indicated that Rib surface protein would have antiphagocytosis function, or capability of resistance to the killing of whole blood cells, and the complement system should not be involved. These would be important issues for further investigation to elucidate the mechanisms of antiphagocytosis and adhesion to epithelial cells attributed by the Rib surface protein.

Keywords: Group B streptococcus, *rib* mutant, adhesion, antiphagocytosis

一、前言

B 群鏈球菌(Group B streptococci GBS) 為一常見的侵襲性(invasive)病原菌，可經由懷孕的婦女的生殖道或在分娩過程中垂直傳染給新生兒，進而造成新生兒腦膜炎 (meningitis)、敗血症 (sepsis)、或肺炎 (pneumonia)(Trijbel-Smeulders *et al.*, 2003)。而在台灣，由於長期相關的調查資料不足，所以對於 GBS 在新生兒的感染並無預防的政策，但根據馬偕與長庚醫院所做該院的調查顯示，台灣新生兒被 GBS 感染的病例數有攀升的趨勢，由 3.26-10.08 (1985-1995) 到 0-1.8 (1996-2001)，值得相關單位的重視。此外，在非懷孕成人的部份，GBS 的感染也有逐漸攀升的趨勢，incidence 由每 1000 位住院病人中 0.53 個案例(1993-1994)上升到 0.96 個案例 (1999-2000) (Blancas *et al.*, 2004)尤其是具有慢性疾病的老年人(Farley *et al.*, 2001; Schuchat, A. 1999)，主要的臨床表徵包括菌血症、心內膜炎 (endocarditis)及壞死性筋膜炎(necrotizing faciitis)等；在台灣，根據本實驗室早期的報告發現在南台灣非懷孕成人造成 GBS 感染之發生率為千分之 1.6 (Liu *et al.* 1997)，而 GBS 菌血症的 incidence rate 每千人也有 0.16-0.3(2001-2003) (Huang *et al.* 2004; Huang, *et al.* 2006)，因此也是不容忽視的公衛議題。

目前，GBS 依據其 polysaccharides capsule 可分為九種不同的 serotypes，其中 types Ia、Ib、II、III 及 V 等五種 serotypes 較常發生於美洲 (Harrison, *et al.* 1998)； types VI 及 VIII 常見於懷孕的日本女性身上 (Lachenauer *et al.* 1999)，根據文獻的報告，serotype 的分布會受到地理、種族及時間而改變(Harrison, *et al.* 1998, Tyrrell, *et al.* 2000)。本實驗室先前針對南台灣之

GBS 進行 8 年 351 病例的流行病學調查，發現其中以 type III (28.5%) 與 type V (27.1%) 分佈較多 (Ko *et al* 2001)；而根據本計劃血液培養所收集的菌株的分析結果，type III 的分佈最多，佔 37.2%，而 type V 的 20.5% 次之，尤其是 type III，在新生兒案例中佔 78.6%，也佔成人案例的 21.9%，顯示 type III GBS 是較 invasive 的；但是根據目前的研究顯示，單獨藉由血清型的表現並不足以造成 invasive 的特性，因此找尋其他致病或影響因子是 GBS 致病機制的探討上非常重要的議題。

細菌的表面蛋白 (surface-associated proteins) 在革蘭氏陽性球菌的致病機制研究中常被視為是重要的致病因子，如 A 群鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*, GAS) 之 M protein，具有抑制補體活性、抗吞噬作用 (antiphagocytosis) 的功能及附著細胞的能力 (Hollingshead, *et al.* 1987; Jones, *et al.* 1988; Fischetti, 1991; Ellen & Gibson 1974)。就 GBS 已知的表面蛋白中，C protein 是第一個被鑑定出來的，其他則如 leucine-rich repeat protein(LRR)、ScpB protein 與 FbsA protein 等 (Seepersaud *et al.*, 2005; Beckmann *et al.*, 2002; Schuchat *et al.*, 2002)也陸續被發現，由於發現在 mouse model 中 C protein 的抗體可以保護小鼠免於 GBS 的感染 (Lancefield *et al.*, 1975)，意味著除莢膜之外，表面蛋白也可以引發 protective immunity，開啟 GBS 表面蛋白的研究方向。

根據 Lindahl *et al.*的報告指出， α C protein 屬於 Alp 表面蛋白的一員，已知 Alp 表面蛋白共可分四種： α C、Rib、R28 與 Alp2 (Fig. 1)，在 DNA 的構造上， α C 蛋白與 Rib 較相似，而 R28 與 Alp2 則多了一段 nonrepeated region (Lindahl *et al.*, 2005)。根據報告顯示： α C 是 non-type III GBS 的主要表面蛋白，如 type Ia、Ib、II，然而相當高比例的 type III 與 type V 都具有 Rib 蛋白(Lachenauer *et al.*,2000; Stalhammar-Carlemalm *et al.*, 1993)，唯現在發現這種關係並不是絕對的。有關 Alp 蛋白的研究，目前仍以 α C protein 為最多；*bca* 為 α C 蛋白的表現基因，其中含有 9 個 identical repeats。而每一個 repeat 由 246 個核苷酸所組成，可 encode 一 82 個胺基酸片段。而 Rib 蛋白質的發現始於 1993 年，其大小約 123-kDa，其表現基因為 *rib*，其中含長的 signal peptide (55 amino acid residues)及 12 repeats(Wastfelt *et al.*, 1996, Stalhammar-Carlemalm *et al.*, 1993)，每個 repeat 由 237 個核苷酸所組成，可 encode 一 79 個胺基酸片段；根據 DNA 序列比對，二者間有 61% identity，而在胺基酸的比對則 N 端有 61 % residue identity，repeat 區域 47 % identity(Fig.2)，但兩者間並沒有免疫交互反應發生 (Wastfelt *et al.*, 1996)；另外由 western blot 分析發現兩者存在一個 regulatory ladder pattern 的現象，顯現蛋白質的 size heterogeneity，這種 heterogeneous polypeptides 的分子量差異與蛋白本身所擁有的 repeat region 數量有關 (Michel, *et al.* 1992)，現

在則發現是由於在 repeat 區域中對酸敏感之 Asp-Pro 鍵被水解所造成，若將蛋白電泳的 pH 值調整到 pH7.0，則 laddering 的現象就消除了 (Stalhammar-Carlemalm *et al.*, 1999)，是否細菌經由水解而造成蛋白質的 size heterogeneity，以利於 GBS 的生存則有待進一步的探討。

根據抗血清的研究發現， α C 蛋白之 immunogenicity 及 protective efficacy 與 repeat 的數目成反比的關係，亦即以含 1 或 9 個 repeat 的 α C 蛋白 immunize 母鼠分別可提供新生鼠 65 及 11% 的免疫保護能力 (Gravekamp *et al.*, 1997)，顯示多重 repeat 的存在會減弱抗體對完整 α C 蛋白以及對 N 端區域之反應，因此推論 repeat 片段具有提供菌株躲避宿主免疫攻擊的能力，其機制則未明。另外，根據最近 type Ia-specific alpha C 蛋白質與人類子宮頸上皮細胞株的研究發現，alpha C protein 會藉由結合到宿主細胞表面之 glycosaminoglycan 而進入細胞中，並且是經由 actin-dependent 的機制進行 (Bolduc, *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2004)。然而 Rib 被認為與 GAS 之 R28 protein 極為類似，而 R28 目前被歸類為 GAS adhesin 之一 (Stalhammar-Carlemalm, *et al.* 1999)，所以 Rib 是否亦與 α C 蛋白或 GAS 之 M protein 扮演如 antiphagocytosis、adhesion 及 internalization 等之生物功能是本計畫主要探討的議題。

根據先前流行病學的研究發現，serotype III 是台灣 GBS 感染最

dorminant 的血清型(37%)，不管是在新生兒或非懷孕之成年人(79% vs 22%)。而在第二年之 Alp 表面蛋白之研究，證實 GBS 所帶有之表面蛋白的種類與 serotype 有關，在 serotypeIII 的菌株中有 76%帶有 *rib* 基因；進一步結合 serotype 與 Alp 表面蛋白進行的 subtype 的分析，共鑑別出 25 種 serovariants，其中最優勢的是 serotype III/*rib*，佔 28%，並且也是造成 78% 新生兒 GBS 腦膜炎主要的 subtype。但有關於 Rib 的生物功能與在 GBS 的致病機轉至今仍不清楚，由同屬 Alp 表面蛋白的 α C protein 的研究顯示， α C protein 具有 immunogenicity 與 protective efficacy，而這種特性也可能與其 tandem repeat 的數目有關，是否 Rib 也具有相同的特性或另有其更 invasive 的角色，是本年度主要探討的議題。因此，為進一步探討 Rib 蛋白在 invasive GBS 的致病機制所扮演的角色，本計劃擬藉由 *rib* 突變株的篩選，來探討 Rib 蛋白的生物功能。

二、材料與方法

染色體DNA之抽取

取新鮮菌落接種至30 ml TSBY (Tryptic soy broth , Yeast extract) , 於37°C 培養箱中隔夜生長，離心取菌體，以10 µg/ml Mutanolysin及5 mg/ml Lysozyme在37°C 作用1小時，再以5 % SDS在65°C 作用30 min，之後以phenol-chloroform萃取DNA，最後以酒精沈澱，乾燥後回溶於500 µl TE buffer，保存於4°C。

聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction ; PCR)

於0.2 ml之微量離心管依序加入染色體DNA、之5'端及3'端的引子（表一）、0.15 mM dNTP、1× Polymerase buffer及1 unit DyNAzyme polymerase (Finzyme OY, Espoo, Finland)，總反應體積為50 µl，於Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400中進行反應。反應條件為95°C變性1分鐘，再以各引子特定的黏合溫度 (annealing temperature) 進行黏合作用1分鐘，接著以72°C 反應2-4分鐘，共進行30個循環後。所得到的產物以洋菜膠體電泳 (agarose gel electrophoresis) 進行分析。

大腸桿菌細胞轉型作用 (Transformation)

將大腸桿菌 (DH5α) 的單一菌落接種於5 ml LB 培養液中隔夜培養，隔日取2 ml 之菌液接種於40 ml LB 培養液中，於37°C 震盪培養3小時直至OD₆₀₀ 值約為0.4~0.5。將菌液放在冰上10分鐘，4°C 離心10分鐘，除

去上清液。以 10 ml 冰的 0.1 M CaCl_2 打散菌體，置於冰上 10 分鐘後， 4°C 離心 10 分鐘去除上清液。最後以 1.6 ml 含 15% glycerol 之 0.1 M CaCl_2 將菌體懸浮，再分裝至 1.5 ml 之微量離心管中，保存於 -70°C 冰箱中備用，此時的細菌即為勝任細胞。DNA 的轉型作用依 Morrison (1979) 的方法稍加修改；將欲進行轉型之質體 DNA 約 50 ng，加入 200 μl 之勝任細胞，混合後靜置於冰上 30 分鐘以上，接著於 42°C 水浴槽中進行熱休克反應 (heat shock) 90 秒鐘，之後置於冰上 5 分鐘，再加入 800 μl 的 LB 培養液，於 37°C 培養箱中培養 1 小時，之後將菌液塗佈於含適當抗生素之培養基上，隔夜培養篩選長出之菌落。

GBS 電極轉形作用 (Electroporation)

採用 Framson 等人 (1997) 之方法加以修改。將細菌塗佈於 THA (Todd-Hewitt agar) 培養基隔夜培養，取單一菌落接種於 5 ml 含有 1% Casamine acid 和 0.3% yeast 的 M9 培養液中隔夜培養，將菌液以適當比例次代培養在 10 ml 含有 1% Casamine acid、0.3% yeast TSBY 和 0.6% glycine 的 M9 培養液中再隔夜培養，再將此菌液以適當比例次代培養在 40 ml 含有 1% Casamine acid、0.3% yeast TSBY 和 0.6% glycine 的 M9 培養液中，於 37°C 下培養 1 小時，離心後以 10 ml 冰的 0.625 M sucrose 溶液懸浮菌體，最後離心加入 0.5 ml 冰的 0.625 M sucrose 溶液，此時的菌液即為 B 型鏈球菌的勝任細胞 (competent cells)。

取 75 μl 的勝任細胞加入 1 μg DNA 混合均勻，並移至預冷過的 1 mm cuvette 中，以 ELECTROCELL MANIPULATOR ECM600 (BPM) 進行電擊轉型，施以 600Ω 、1.25 kV 的電壓約 5 ms，並置於冰上 10 分鐘後，加到 10 ml 含有 0.25 M sucrose 的 TSBY 培養液中，於 37°C 培養 2 小時，最後將菌液塗在含篩選抗生素的 TSBY 培養基上，於 37°C 培養箱中培養。

南方墨漬雜交法 (Southern blotting hybridization)

探針 (probe) 的製備採用非放射性標定方式，以 Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection system (Amersham, Buckinghamshire HP7 9NA, England) 標定之。先將欲標記 DNA 稀釋至 10 ng/μl，取 10 μl 於 100°C 水加熱 5 分鐘後置於冰上 5 分鐘，加入 10 μl 的 reaction buffer，在冰上輕微混合均勻之後，再加入 2 μl 的 labeling reagent 和 10 μl 的 cross-linking solution，輕微混合均勻之後，於 37°C 作用 30 分鐘，加入 50% 的 glycerol 保存於 -20°C 以備用。

DNA 之轉漬部分，將適量的染色體 DNA 經限制酶於 37°C 下作用之後，以 0.8% 洋菜膠體電泳分離切割後的染色體 DNA 片段。之後將洋菜膠體以 Milli-Q 水清洗 3 次後，泡在 0.25 N HCl 溶液中震盪 15 分鐘，接著再以 Milli-Q 水清洗 3 次後，浸在含 0.5 N NaOH 和 1.5 M NaCl 溶液中震盪 30 分鐘，再以 Milli-Q 水清洗 3 次，隨後浸在含 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 和 1.5 M NaCl 溶液中並震盪 30 分鐘，最後再用水清洗 3 次。另外剪取比洋菜膠體稍大的 3 MM paper (Whatman) 及 hybridization transfer membrane (Genescreen Plus)，以甲醇 (methanol) 潤濕並置於 10× SSC 中 5 分鐘，將洋菜膠體與 membrane 置於抽氣式轉漬器上並抽真空，進行 1 小時後取下 membrane 浸於 5× SSC 5 分鐘，最後將 membrane 上的水分吸乾後以 Spectrolinker XL-1000 UV crosslinker (Spectronics Co.) 進行 DNA cross linking 兩次。

隨後進行雜交作用 (Hybridization)。先預熱適量的 hybridization buffer (0.125 ml/cm²) 至 55°C，將 membrane 放置於含 hybridization buffer 的雜交管 (hybrid tube) 中，於 55°C 下進行 pre-hybridization 約 60 分鐘。再加入標記好的 probe (5-10 ng/ml) 到 hybridization buffer 中，於 55°C 下進行雜交作用。

將雜交後之 membrane 以預熱的 primary wash buffer (2-5 ml/cm²) 於 55°C 下清洗 membrane 2 次，每次 20 分鐘。再用 secondary wash buffer 於室溫下將 membrane 清洗 2 次，每次 20 分鐘。最後將 membrane 取出，以乾淨的拭鏡紙瀝乾多餘的水分，加入適量的 detection reagent (30-40 麵μl/cm²) 作用 2-5 分鐘，以保鮮膜覆蓋後置於壓片夾中，以 X-ray film 壓片 3 小時感光呈像。

B 群鏈球菌 RNA 的萃取

取單一菌落接種於 40 ml 的 TSBY 培養液中，將隔夜培養的菌液離心後，用 500 μl 冰的 0.2 M sodium acetate 清洗兩次。最後將菌體懸浮於 500 μl resuspend buffer 中，再加入 200 μl lysozyme (20 mg/ml) 和 50 μl mutanolysin (25 μg/ml) 於 37°C 中作用 1 小時。接著離心 10 分鐘去除上清液，將菌體懸浮於 500 μl pH 4.8 的 acetate buffer，再加入 500 μl 預熱的 acid-phenol，強力震盪後，於 60°C 作用 5 分鐘。再離心 15 分鐘，取上清液並加入等體積的 phenol/chloroform，離心取上清液，並加入 2 倍體積 99.9% 的酒精和 50 μl 3 M sodium acetate，於 -70°C 下沈澱 3 小時以上，之後離心去除上清液，以 75% 酒精清洗一次，於室溫下風乾，回溶於適量的 DEPC-H₂O；接著加入 1× DNase buffer，5 unit RNase-Free DNase 和 2 unit rRNasin (RNase inhibitor) 於 37°C 作用 1 小時，加入等體積之 phenol : chloroform (1 : 1) 震盪均勻後，離心 15 分鐘，取上清液加入 2 倍體積 99.9% 的酒精和 50 μl 3 M sodium acetate，於 -70°C 下沈澱隔夜，於 4°C 下離心 30 分鐘，去除上清液，再以 75% 酒精清洗沈澱物，於室溫下風乾後回溶於適量的 DEPC-H₂O 中備用。

RT-PCR

取 100 μg 之 RNA 為模版，加入 DEPC-H₂O 至 6 μl，加入 2 μl 的 3' 端引子，於 72°C 下反應 10 分鐘後置於 4°C 下 5 分鐘，再加入 3 μl MMLV 5×

buffer、2 μ l dNTP、200 U MMLV reverse transcriptase、20 U RNase inhibitor，於 42°C 下作用 1 小時後，以 70°C 反應 10 分鐘最後置於 4°C 下。得到之 cDNA 以進行 PCR 反應。

生長曲線 (Growth curve) 的測定

取單一菌落接種於 10 ml TSBY 培養液中隔夜培養，再將此菌液以適當的比例次代培養在 40 ml TSBY 培養液中。在第 0、1 小時測其 O.D.₆₀₀ 吸光值，之後每隔 1 小時測定並記錄，測定 12 個小時後依據吸光值畫出細菌的生長曲線。

抗全血殺菌 (Whole blood bactericidal) 能力測試 (Thern *et al.* 1998)

取單一菌落接種於 10 ml TSBY 培養液中隔夜培養，再將此菌液以適當的比例次代培養在新鮮的 TSBY 培養液中，於 37°C 培養 3 小時。將此菌液系列稀釋至 10⁴ 倍，從中取 50 μ l 加入 1 ml 全血中，在 37°C 震盪培養 3 小時。以塗盤 (plating count) 的方式計數原始加入和存活於血中的細菌數目，以比較野生株與突變株之 GBS 存活於全血中的能力，其結果依下列公式表示在 90 min 時之 % killing。

$$\% \text{ killing} = 100 - [\text{CFU at 90 min} \div \text{CFU at 0 min} \times 100]$$

Adhesion assay: 細胞附著能力 (Adhesion) 試驗

採用 Schubert 等人之方法 (2004) 加以修改，取單一菌落接種於 10 ml TSBY 培養液中隔夜培養，以 1× PBS buffer 清洗菌體兩次，最後將菌體懸浮於 1× PBS buffer 並調整菌液為 O.D.₆₀₀=1 (約 2 × 10⁸ CFU/ml)。取 A549 上皮細胞次代培養於 6-well 培養皿隔夜培養，以 1× PBS buffer 清洗兩次，加入 1 ml 不含胎牛血清的 DMEM，再以 MOI = 10 的菌量在 37°C、5% CO₂ 培養箱中感染 120 分鐘。先以 1× PBS buffer 清洗細胞三次，最後用 100 μ l 1% Triton X-100 將細胞打破懸浮，再以 900 μ l 1× PBS

buffer 將剩餘的細胞碎片吸取混合成 1 ml，將這些細胞懸浮液序列稀釋並以塗盤方式 (plating count) 計數附著在細胞上的菌落數目以分析 adhesion 能力是否改變。

侵入細胞能力試驗 (Invasion)

將隔夜培養的野生株或突變株之菌液，以 1× PBS buffer 清洗菌體 2 次，最後將菌體懸浮於 1× PBS buffer 並調整菌液為 O.D.₆₀₀=1 (約 2×10^8 CFU/ml)。A549 上皮細胞次代培養於 6-well 培養皿隔夜培養，以 1× PBS buffer 清洗 2 次，加入 1 ml 不含胎牛血清的 DMEM，再以 MOI = 10 的菌量於 37°C、5% CO₂ 培養箱中感染 A549 上皮細胞 120 分鐘。以 1× PBS 清洗 A549 上皮細胞 3 次，加入 1 ml 含有 1 μg penicillin G 和 100 μg Gentamicin 之 DMEM 於 A549 上皮細胞中，置於 5% CO₂ 之 37°C 培養箱中培養 90 分鐘以殺死吸附在細胞上和細胞外的細菌。再以 1× PBS buffer 清洗細胞 5 次，最後加入 100 μl 1% Triton X-100 打破細胞，並以 900 μl 1× PBS buffer 吸取剩餘的細胞碎片混合均勻後，將細胞懸浮液系列稀釋並以塗盤方式 (plating count) 計數侵入細胞菌落之數目，以比較野生株與突變株 B 群鏈球菌侵入人類上皮細胞的能力。

致病因子之鑑定: 為鑑定 wild-type GBS 與其 Rib 突變株間致病因子表現的差異性，故採用下列幾項實驗證明：

A. Adhesion assay: 細胞附著的能力 (Adhesion)

採用 Schubert 等人之方法 (2004) 加以修改，取單一菌落接種於 10 ml TSBY 培養液中隔夜培養，以 1× PBS buffer 清洗菌體兩次，最後將菌體懸浮於 1× PBS buffer 並調整菌液為 O.D.₆₀₀=1 (約 2×10^8 CFU/ml)。取 A549 上皮細胞次代培養於 6-well 培養皿隔夜培養，以 1× PBS buffer 清洗兩次，加入 1 ml 不含胎牛血清的 DMEM，再以 MOI = 10 的菌量在

37°C、5% CO₂ 培養箱中感染 120 分鐘。先以 1× PBS buffer 清洗細胞三次，最後用 100 μl 1% Triton X-100 將細胞打破懸浮，再以 900 μl 1× PBS buffer 將剩餘的細胞碎片吸取混合成 1 ml，將這些細胞懸浮液序列稀釋並以塗盤方式 (plating count) 計數附著在細胞上的菌落數目以分析 adhesion 能力是否改變。

B. 侵入的細胞能力 (Invasion)

將隔夜培養的野生株或突變株之菌液，以 1× PBS buffer 清洗菌體 2 次，最後將菌體懸浮於 1× PBS buffer 並調整菌液為 O.D.₆₀₀=1 (約 2×10^8 CFU/ml)。A549 上皮細胞次代培養於 6-well 培養皿隔夜培養，以 1× PBS buffer 清洗 2 次，加入 1 ml 不含胎牛血清的 DMEM，再以 MOI = 10 的菌量於 37°C、5% CO₂ 培養箱中感染 A549 上皮細胞 120 分鐘。以 1× PBS 清洗 A549 上皮細胞 3 次，加入 1 ml 含有 1 μg penicillin G 和 100 μg Gentamycin 之 DMEM 於 A549 上皮細胞中，置於 5% CO₂ 之 37°C 培養箱中培養 90 分鐘以殺死吸附在細胞上和細胞外的細菌。再以 1× PBS buffer 清洗細胞 5 次，最後加入 100 μl 1% Triton X-100 打破細胞，並以 900 μl 1× PBS buffer 吸取剩餘的細胞碎片混合均勻後，將細胞懸浮液序列稀釋並以塗盤方式 (plating count) 計數侵入細胞菌落之數目，以比較野生株與突變株 B 群鏈球菌侵入人類上皮細胞的能力。

三、 結果

本計畫第一年針對所收集之 156 株血液培養菌株的研究發現 serotype III 是台灣 GBS 感染最 dominant 的血清型(37%)，不管是在新生兒或非懷孕之成年人(79% vs 22%)。而在第二年之 Alp 表面蛋白之研究，證實 GBS 所帶有之表面蛋白的種類與 serotype 有關，其中 serotype III 的菌株中有 76% 帶有 *rib* 基因；進一步結合 serotype 與 Alp 表面蛋白進行的 subtype 的分析，共鑑別出 25 種 serovariants，其中最優勢的是 serotype III/*rib*，佔 28%，也佔新生兒感染的 69% (表二)；的並且也是造成 78% 新生兒 GBS 腦膜炎主要的 subtype。所以，綜合先前的研究顯示，Rib 蛋白在 serotype III GBS 的感染扮演重要的角色，尤其是在新生兒部份，但有關於 Rib 的功能除了具有 immunogenicity 與 protective immunity 之外，其他還有哪些生物功能與角色目前仍不清楚，是否也與 αC 蛋白同樣具有吸附 (adhesion) 或內移 (internalization) 等可以促進 colonization 的因子，為釐清這個問題，本計劃藉由 *rib* 突變株之構築，進一步比較突變株與野生株對 GBS 的致病能力與生物特性的差異，以藉此探討 Rib 蛋白是否參予 GBS 的致病機轉以及在 GBS 感染的角色。其結果詳述如下：

A. *rib* 基因突變株的構築

由實驗室所收集之臨床菌株 B523，抽取其染色體 DNA，利用設計之引子（表一）進行 PCR 反應，得到 360 bp 之 *rib* 基因部份片段，插入質體 pVA891 中完成重組質體的構築（pMW395）。再利用電擊轉型作用（electroporation）的方式送入到 GBS B523 中。因 pMW395 缺少可在 GBS 複製之 *ori*，故重組質體將會以同源性重組（homologous recombination）的方式插入 GBS 的染色體內，並藉由染色體內之 *ori* 進行複製，所以可以用含有 Erythromycin 的培養基來篩選轉殖株（Fig.2）。

為了驗證重組質體確實插入到 *rib* 基因的位置，分別抽取野生株和轉殖株的染色體 DNA 進行南方墨點法，利用限制酶 *NdeI* 和 *SpeI* 切割染色體 DNA，以洋菜膠體電泳分離後，以 360 bp 之 *rib* 片段基因作為探針進行南方墨點分析。在野生株的部分，染色體 DNA 以限制酶 *NdeI* 和 *SpeI* 作用後有 1 kb 的片段；而轉殖株則會切出大小約 7 kb 的 DNA 片段（Fig.3）。由南方墨點法的結果證實了所篩選出的轉殖株，的確是重組質體藉由 single cross-over 之方式與染色體上之 *rib* 基因進行同源性重組，進入 *rib* 基因並將其中斷，此 Rib 蛋白質突變株命名為 SW701。

為了更進一步驗證南方墨點分析的正確性，並且確認重組質體進入 *rib* 基因並將其中斷後，是否就無法轉錄出 *rib* 基因的 mRNA，我們利用 RT-PCR 來分析 *rib* 基因的表現情況，結果顯示野生株可以正常的轉錄，而 *rib* 基因突變株則無法轉錄（Fig.4），證明篩選出來的突變株的確失去了轉錄的能力。

已知在 *rib* 基因的下游有一個 transcriptional regulator（*sag0432*），為了更進一步確認在 *rib* 基因上所做的改造不會影響到其下游基因的表現，我們再以 RT-PCR 的方法測試 Rib 蛋白質下游基因的表現，結果顯示在 SW701 中 *sag0432* 並沒有受到 *rib* 基因的變異而影響到其表現，因此可以初步排除 polar effect 的現象。

B. *rib* 蛋白與 GBS 生長的關係

由於 Rib 蛋白為 GBS 的表面蛋白質，為了確認不完整的 *rib* 基因是否會影響到突變株菌的生長與存活，於是將野生株與 *rib* 基因突變株培養於 TSBY 培養液進行 *in vitro* 生長速率的分析，每隔一個小時測量其 O.D.₆₀₀ 吸光值來偵測其生長情形，結果發現野生株與 *rib* 基因突變株的生長曲線並無明顯差異 (Fig. 5)，由此可知在只有部分片段的 *rib* 基因並不會影響 SW701 的生長。

C. *rib* 基因對 GBS 致病力的影響

為了探討 *rib* 基因是否參與 B 群鏈球菌的致病機轉，因此利用不同的功能性試驗比較野生株與 *rib* 基因突變株之間致病能力的差異：

a. 抗全血殺菌能力 (Whole blood bactericidal assay) 試驗

當 B 群鏈球菌侵入到人體的血液中，會面對到宿主免疫細胞的攻擊，人體全血中最主要負責清除 B 群鏈球菌的免疫細胞有巨噬細胞 (macrophage)、中性白血球 (neutrophil) 和補體 (complement) 等，由於野生株的來源是血液培養陽性的臨床菌株，所以其本身可能具有抗吞噬之能力，為了釐清 Rib 蛋白在 GBS 中是否具有抵抗全血殺菌的角色，我們分別將野生株和 *rib* 基因突變株 (1×10^4 CFU) 與人的全血於 37 培養 3 小時，比較兩者抵抗全血殺菌能力上的差異。結果顯示野生株具有較強抵抗全血殺菌的能力 (4.5×10^3 CFU)；而突變株抵抗全血殺菌的能力則較弱 (9×10^2 CFU)。進一步量化兩者之間抵抗全血殺菌的能力，發現 *rib* 基因突變

株大約只有野生株的 20% (Fig.6)，顯示 Rib 蛋白質具有抵抗全血殺菌的能力。

b. 抗血清殺菌能力 (Serum bactericidal assay) 試驗

為了更進一步了解 Rib 蛋白質抵抗全血殺菌的能力是針對免疫細胞或補體的作用，我們利用離心的方式將血球與血清分離，之後將野生株和 *rib* 基因突變株分別與經過 56 °C 處理 30 分鐘去除補體活性的血清及未去除補體活性的血清於 37 °C 共同培養 3 小時，分別比較兩者在有無補體的血清中的存活率差異。結果顯示，野生株和 *rib* 基因突變株在沒有補體的血清中其存活率大致相同 (1.5×10^6 vs 1.46×10^5 CFU)，且兩者抵抗血清中補體殺菌能力的差異也並不明顯 (2.5×10^5 vs 2.4×10^5 CFU) (Fig. 6)。

c. 細菌吸附 (Adhesion) 侵入 (Invasion) 上皮細胞的能力

在細菌造成感染的過程中，為了能夠侵入至更深層的組織或是血液中，藉以獲得更多的養分或逃避宿主的免疫清除，第一個步驟就是要利用自己本身的附著因子吸附到宿主細胞上。根據 Stalhammar-Carlemalm 等人(1999) 的研究發現，化膿性鏈球菌的表面蛋白質 R28，其胺基酸序列和 Rib 蛋白質相似度相當高，而 R28 蛋白質為化膿性鏈球菌一附著因子，可以幫助化膿性鏈球菌吸附至人類上皮細胞。為了了解 Rib 蛋白質是否也能幫助 GBS 吸附到人類的上皮細胞，我們以 MOI = 10 的菌量 (10^7 CFU) 感染 A549 上皮

細胞 120 分鐘，之後將細胞打破計算細菌數量來比較野生株與 *rib* 基因突變株附着至 A549 上皮細胞的能力。結果顯示，突變株吸附至 A549 上皮細胞的能力 (2.8×10^5 CFU) 明顯比野生株 (7.9×10^5 CFU) 低，只有野生株附着能力的 35%左右 (Fig.7)。此結果顯示 Rib 蛋白質對於 GBS 附着到人類上皮細胞的能力可能扮演重要的角色。

d. 侵入 (Invasion) 上皮細胞的能力

為進一步探討 Rib 蛋白質是否具有幫助 GBS 侵入人類的上皮細胞的能力，我們將隔夜培養的野生株與 *rib* 基因突變株以 MOI = 10 的菌量 (1.3×10^7 CFU) 感染 A549 上皮細胞 120 分鐘，以 gentamycin 及 penicillin 殺死細胞外的細菌，再將細胞打破後塗盤計算細菌數量來比較野生株與 *rib* 基因突變株侵入 A549 上皮細胞的能力。結果顯示，突變株侵入 A549 上皮細胞的能力 (7.2×10^3 CFU) 和野生株 (7.7×10^3 CFU) 相差不大 (Fig. 8)，表示 Rib 蛋白質可能和 B 群鏈球菌侵入人類上皮細胞的能力並不相關。

四、 討論

由先前的研究發現 serotype III 的菌株中有 76% 帶有 *rib* 基因 的感染，不管是在新生兒或是非懷孕的成年人，顯示 Rib 蛋白可能在 serotype III 之 GBS 致病機制扮演重要的角色；但除了已知 immunogenicity 與 protective immunity 之外，有關於 Rib 的功能與角色目前仍不清楚。本計劃藉由 *rib* 突變株之構築，比較突變株與野生株對 GBS 的致病能力與生物特性的差異，發現 Rib 蛋白可能在 GBS 附著到肺上皮細胞的過程扮演重要的角色，也就是在感染的初期，而不是在後期。另外，在抵抗宿主的免疫反應上，研究的結果顯示 Rib 蛋白的角色可能抗吞噬作用有關，並且其機制排除是經由補體的作用所造成。

在 Rib 蛋白質對於細菌致病能力的探討方面，我們發現突變株與全血在 37 培養 3 小時後，其抵抗全血殺菌的能力大約只有野生株的 20%，顯示 Rib 蛋白質在抵抗全血殺菌扮演重要角色。目前已知 B 群鏈球菌中抵抗全血殺菌的毒力因子為莢膜及 β 蛋白質，其機制分別為抑制補體因子 C3b 鍵結至細菌的表面及阻礙 opsonophagocytosis (Marques et al., 1992; Areschoug et al., 2002; Jarva et al., 2004; Jerlatrom et al., 1996)，所以都是扮演抵抗血清中的補體及免疫細胞的角色。而在本計劃中，我們比較野生株與 *rib* 突變株抵抗血清殺菌能力時，二者並無明顯的差異，證明 Rib 蛋白和過去發現之 GBS 的抗吞噬因子機制並不相同，而是具有抵抗巨噬細胞或中性白血球攻擊的能力。然而 Rib 蛋白抵抗免疫細胞的機制，則仍然需要進一步的實驗證明。

當以 A549 上皮細胞進行吸附性實驗時，發現突變株在細胞附著的能力大約只有野生株的 40% 左右，而在侵入細胞的能力上則沒有明顯的差異，證明 Rib 蛋白質扮演 GBS 附著因子的角色。目前已知 ScpB、Lra1 及 FbsA

等蛋白質為 GBS 重要的附著因子，這些附著因子具有一個很重要的特性：都會經由和 extracellular matrix 的結合來幫助 GBS 的附著，如 ScpB 會結合 fibronectin，Lra1 結合 laminin，而 FbsA 則是和 fibrinogen 結合(Beckmann et al., 2002 ; Cheng et al., 2002 ; Spellerberg et al., 1999 ; Schubert et al., 2002)。而 Rib 蛋白是否也和這些附著因子一樣透過和 extracellular matrix 的結合，或是藉由影響其他附著因子的訊息傳遞來增加其吸附的能力，仍待未來進一步證明。此外，Rib 蛋白質如何與宿主細胞的接受器結合，其機制也是未來值得探討的問題。

根據胺基酸序列的比對發現化膿性鏈球菌的表面蛋白質 R28 與 Rib 蛋白質相似度相當高(Fig.1)，而 R28 蛋白已被證明為化膿性鏈球菌之吸附因子 (Stalhammar-Carlemalm et al., 1999)。由於 R28 同樣存在於 GBS 中，因此，有科學家推測 R28 蛋白是從 GBS 藉由基因轉移的方式進入化膿性鏈球菌中 (Stalhammar-Carlemalm et al., 1999)。2005 年 Lindahl 等人發現 Alp family proteins (包括 R28 蛋白及 Rib 蛋白) 的基因序列主要分為 4 個區域 (Fig.1)，除了 C 端區域已經確定其功能為與細胞壁鍵結，其他區域的功能仍未確定，而這些蛋白究竟是哪一區域與吸附到宿主細胞的功能有關，是未來值得探討的問題；我們將藉由表現不同區域的 Rib 重組蛋白，並且製備 Rib 蛋白質之抗體以進一步探討。

由於 Rib 蛋白是 invasive type III GBS 主要的 Alp 表面蛋白，並且 type III/rib 也是主要造成新生兒 meningitis 的 subtype；已知 Rib 蛋白有 80% 是由 tandem repeat 的區域所構成，而其 tandem repeat 的數目在臨床菌株的表現相當多樣性，所以推測 Rib 之 tandem repeat 可能與 invasive type III GBS 之 virulence 或致病的嚴重程度有關，然而這種不同的 repeat 所代表的意義是如何，是否與 GBS 的 virulence 有關，目前尚無定論。根據過去的研究指出，

α C 之 repeat 部分可能是 protective immunity 的 target 位置(Kling *et al.*, 1997; Madoff *et al.*, 1997); 另外在有抗體的存在情況之下，低 α C repeat 的 GBS 表現較強的 virulence (Gravekam *et al.*, 1998)。所以更加確認 Rib 的 repeat 區域在 GBS 致病機制的重要性。由於本計劃所構築之 *rib* 突變株，主要中斷的是 *rib* 基因的 N 端區域，所以合理的推論這個突變株與中斷 repeat 區域的突變株，在生物功能上與致病機制上可能會呈現完全不一樣的結果。因此，未來我們將著手進行 repeat-deficiency 之 *rib* 突變株的構築，以進一步釐清 Rib 蛋白在 GBS 致病機制上所扮演的角色。

五、結論與建議

本計劃藉由 *rib* 突變株之構築，比較突變株與野生株對 GBS 的致病能力與生物特性的差異，由研究的結果發現 Rib 蛋白可能在 GBS 附著到 A549 上皮細胞的過程扮演重要的角色，也就是在感染的初期，而不是在後期。另外，在抵抗宿主的免疫反應上，研究的結果顯示 Rib 蛋白的角色可能抗吞噬作用有關，並且其機制是經由抵抗巨噬細胞或中性白血球攻擊而不是經由補體的作用所造成。這結果將有助於未來在疫苗或者是藥物研發上提供新的方針，以有效地達到治療及預防 GBS 感染的目的。

- 六、參考文獻：請依台灣醫誌編排方式。(例：Travell JG, Rinzler S, Herman M: Pain and disability of shoulder and arm. *J Am Med Asso* 1942;120:417-22.)
- Areschoug T, Stalhammar-Carlemalm M, Karlsson I, and Lindahl G: Streptococcal beta protein has separate binding sites for human factor H and IgA-Fc. *J Biol Chem* 2002; 277: 12642-23648.
- Baron MJ, Bolduc GB, Godberg MB, Auperin TC, Madoff LC: Alpha C protein of group B streptococcus binds host cell surface glycosaminoglycan and enter cells by an actin-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2004; 279: 24714-23.
- Beckmann C, Waggoner JD, Harris TO, Tamura GS, Rubens CE: Identification of novel adhesions from group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infect Immun* 2002; 70: 2869-76.
- Bolduc GR, Baron MJ, Gravekamp C, Lachenauer CS, Madoff LC: The alpha C protein mediates internalization of group B streptococcus within human cervical epithelial cells. *Cell Microbiol* 2002; 4:751-8.
- Cheng Q, Stafslie D, Purushothaman SS, Cleary P: The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin. *Infect Immun* 2002; 70: 2408-2413.
- Ellen RP, Gibbson RJ: Parameters affecting the adherence and tissue tropisms of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 1974;9:85-91.
- Farley MM: Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin Infect Di.* 2001; 33: 556-61.
- Fischetti VA: Streptococcal M protein. *Scientific American* 1991; 264:58-65.
- Framson PE, Nittayajarn A, Merry J, Youngman P, Rubens CE: New genetic techniques for group B streptococci: high-efficiency transformation,

- maintenance of temperature-sensitive pWV01 plasmids, and mutagenesis with Tn917. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63:3539-3547
- Gase K, Ozegowski J, Malke H: The *Streptococcus agalactiae hylB* gene encoding hyaluronate lyase: completion of the sequence and expression analysis. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1398:86-98.
- Gravekamp C, Rosner B, Madoff LC: Deletion of repeats in the alpha C protein enhances the pathogenicity of group B streptococci in immune mice. *Infect Immun* 1998; 66:4347-54.
- Gravekamp, C, Kasper DL, Michel JL, Kling DE, Carey V, Madoff LC: Immunogenicity and protective efficacy of the alpha C protein of group B streptococci are inversely related to the number of repeats. *Infect Immun* 1997; 65:5216-21.
- Harrison, LH, Elliott JA, Dwyer DM, Libonati JP, Ferrieri P, Billmann L, Schuchat A.: Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. *J Infect Dis* 1998;177:998-1002.
- Hollingshead SK, Fischetti VA, Scott JR: A highly conserved region present in transcripts encoding heterologous M proteins of group A streptococci. *Infect Immun* 1987; 55:3237-9.
- Hung MY, Ko DJ, Chen CC, Huang CB, Chung CH, Chen FS, Hwang KP: Neonatal group B streptococcal infection: a 7-year experience. *Chang Gung Med* 2004; 27:501-508
- Huang PY, Lee MH, Yang CC, Leu HS: Group B streptococcal bacteremia in nonpregnant adults. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39:237-241
- Jarva H, Hellwage J, Jokiranta TS, Lehtinen MJ, Zipfel PF, Meri S: The group B

- streptococcal beta and pneumococcal Hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion. *J Immunol* 2004; 172: 3111-3118.
- Jones KF, Hollingshead SK, Scott JR, Fischetti VA: Spontaneous M6 protein size mutants of group A streptococci display variation in antigenic and opsonogenic epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:8271-5.
- Kling DE, Gravelamp C, Madoff LC, Michel JL: Characterization of two distinct opsonic and protective epitopes within the alpha C protein of the group B *Streptococcus*. *Infect Immun* 1997; 65:1462-7.
- Ko WC, Lee HC, Wang LR, Lee CT, Liu AJ, Wu JJ: Serotyping and antimicrobial susceptibility of group B streptococcus over an eight-year period in southern Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20:334-9.
- Lancefield R, McCarty CM, Everly WN: Multiple mouse-protective antibodies direct against group B streptococci. Special reference to antibodies effective against protein antigens. *J Exp Med* 1975; 142: 165-79
- Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, Tchiman Y, Ohtsuka H, Kaku M, Paoletti, P, Ferrieri LC, Madoff LC: Serotype VI and VIII predominate group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. *J Infect Dis* 1999; 179:1030-3.
- Lachenauer CS, Creti R, Michel JL, Madoff LC: Mosaicism in the alpha-like protein genes of group B streptococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9630-5.
- Lindahl G, Stalhammar-Carlemalm M, Areschoug T: Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:102-27

- Liu JW, Wu JJ, Ko WC, Chuang YC: Clinical characteristics and antimicrobial susceptibility of invasive group B streptococcal infections in nonpregnant adults in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 1997; 96:628-33.
- Madoff LC, Michel JL, Kasper DK. A monoclonal antibody identifies a protective C-protein alpha-antigen epitope in group B *Streptococcus*. *Infect Immun*. 1997; 59:204-10.
- Marques MB, Kasper DL, Pangburn MK, Wessels MR: Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect Immun* 1992; 14:3986-93.
- .
- Michel JL, Madoff LC, Olson K, Kling DE, Kasper DL, Ausubel FM: Large, identical, tandem repeating units in the C protein alpha antigen gene, *bca*, of group B streptococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:10060-4.
- Schubert A, Zakikhany K, Pietrocola G, Meinke A, Speziale P, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ. The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. *Infect Immun* 2004;72: 6197-6205.
- Schubert A, Zakikhany K, Schreiner M, Frank R, Spellerberg B, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ. A fibrinogen receptor from group B streptococcus interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Mol Microbiol* 2002 46: 557-569.
- Schuchat A: Group B streptococcus. *Lancet* 1999;353: 51-6.
- Schuchat A, Zakikhany K, Schreiner M, Frank R, Spellerberg B, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ: A fibrinogen receptor from group B streptococcus interacts with fibrinogen by repetitive unit with novel ligand binding sites. *Mol*

Microbiol 2002; 46: 557-69.

Seepersaud R, Hanniffy SB, Mayne P, Sizer P, Le Page R, Wells JM: Characterization of a novel leucine-rich repeat protein antigen from group B Streptococci that elicit protective immunity. *Infect Immun* 2005; 73: 1671-83

Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Schnitzler N, Luttkick R, and Podbielski A. Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesion family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect Immun* 1999;67: 871-878.

Stalhammar-Carlemalm M, Stenberg L, Lindahl G: Protein Rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *J Exp Med* 1993; 177:1593-603.

Stalhammar-Carlemalm, M, Areschoug T., Larsson C, Lindahl G: The R28 protein of *Streptococcus pyogenes* is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells. *Mol Microbiol* 1999; 331:208-19.

Thern A, Wästfelt M, and Lindahl G: Expression of two different antiphagocytic M proteins by *Streptococcus pyogenes* of the OF⁺ lineage. *J Immunol* 1998; 160: 860-869.

Trijbel-Smeulders MAJM, Adriaanse AH, Gerards LJ, Kimoen LL: Strategy to prevent neonatal early-onset group B streptococcal disease in the Netherlands. *Rev Med Microbiol* 2003; 14:35-9.

Tyrrell GJ, Senzilet LD, Spika JS, Kertesz DA, Alagaratnam M, Lovgren M, Talbot JA: Invasive disease due to group B streptococcal infection in adults: results from a Canadian, population-based, active laboratory surveillance

study-1996. *J Infect Dis* 2000; 182:168-173

Wastfelt M, Stalhammar-Carlemalm M, Delisse AM, Cabezon T, Lindahl G:
Identification of a family of streptococcal surface proteins with extremely
repetitive structure. *J Biol Chem* 1996; 271:18892-7.

七、圖、表。

表一本研究所設計之 Group B Streptococcus PCR 增幅反應引子

Primer	mer	Sequencesa (5'-3')	Location (bp)	Reference
Rib-1	20	AGGCGGCAATTATTTACAC	405-424	Accession No. U58333
Rib-2	20	TATCGGCATCTGTACGTGGA	984-1003	Accession No. U58333
Rib-4	20	TGGAGTTGCATTCTCACCTG	3672-3691	Accession No. U58333
Rib-S1	38	CGCGGATCCGCGTACAGATACTGT GTTTGCAGCTGAAG	216-253	Kong et al., 2002
Rib-A3	41	ACATGCATGCATGTCATCTATTTT ATCTCTCAAAGCTGAAG	530-570	Kong et al., 2002

a: Restriction sites used for cloning purposes are in underline.

^a: Restriction sites used for cloning purposes are in underline.

表二、 Distribution of serovariants among different age groups

Serovariant	Different age groups						Total
	0-7 days	8-90 days	2-15 years	16-50 years	51-70 years	>70 years	
Ia total	2	3	-	5	10	8	28
Ia/ <i>bca</i>	1	2	-	3	1	2	9
Ia/ <i>rib</i>	-	-	-	-	1	1	2
Ia/ <i>alp2/3</i>	-	-	-	1	-	1	2
Ia/ <i>epsilon</i>	1	1	-	-	4	3	9
Ia/ND	-	-	-	1	4	1	6
Ib total	1	1	1	6	1	6	16
Ib/ <i>bca</i>	1	1	1	6 ^c	1	4	14
Ib/ <i>alp2/3</i>	-	-	-	-	-	2	2
II total	-	-	-	1	1	5	7
II/ <i>bca</i>	-	-	-	-	1	1	2
II/ <i>rib</i>	-	-	-	1	-	1	2
II/ <i>alp2/3</i>	-	-	-	-	-	2	2
II/ <i>epsilon</i>	-	-	-	-	-	1	1
III total	8	25	-	6	13	6	58
III/ <i>bca</i>	-	1	-	1	1	1	4
III/ <i>rib</i>	7 ^a	22 ^b	-	3	9	3	44
III/ <i>alp2/3</i>	-	2	-	2	3	2	9
III/ <i>epsilon</i>	1	-	-	-	-	-	1
IV/ <i>alp2/3</i>	-	-	-	-	-	1	1
V total	2	-	-	11	11	8	32
V/ <i>bca</i>	-	-	-	-	-	3	3
V/ <i>rib</i>	-	-	-	-	-	1	1
V/ <i>alp2/3</i>	1	-	-	9 ^d	8	4	22
V/ <i>epsilon</i>	1	-	-	-	2	-	3
V/ ND	-	-	-	2	1	-	3
VI total	-	-	-	2	1	1	4
VI/ <i>bca</i>	-	-	-	1	-	1	2

VI/ <i>epsilon</i>	-	-	-	1	1	-	2
NT total	-	-	-	1	4	5	10
NT/ <i>bca</i>	-	-	-	1	4	2	7
NT/ <i>alp2/3</i>	-	-	-	-	-	3	3
All	13	29	1	32	41	40	156

NT, nontypeable; ND, nondetectable.

^a Refers to serovariant III/*rib* in early-onset infection (53.8%) compared with all other patient age groups (25.9%): P = 0.049, odds ratio (OR) 3.3; 95% confidence interval (CI) 1.06-10.59.

^b Refers to serovariant III/*rib* in late-onset infection (75.9%) compared with all other patient age groups (17.3%): P < 0.000001, odds ratio (OR) 15; 95% confidence interval (CI) 5.7-39.44.

^c Refers to serovariant Ib/*bca* in 16-50y group infection (18.8%) compared with all other patient age groups (6.5%): P = 0.04, odds ratio (OR) 3.35; 95% confidence interval (CI) 1.07-10.47

^d Refers to serovariant V/ *alp2/3* in 16-50y group infection (28.1%) compared with all other patient age groups (10.5%): P = 0.0195, odds ratio (OR) 3.34; 95% confidence interval (CI) 1.28-8.74.

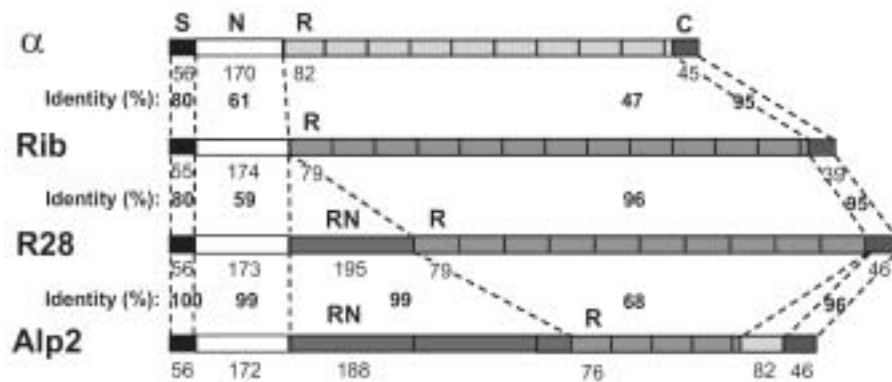


Fig 1. 已知之四種 Group B streptococci Alp 蛋白家族的比較。S, signal peptide; N, nonrepeated N-terminal region; R, repeat region; C, C-terminal region, RN, nonrepeated region。兩者蛋白間所顯示之百分比為其氨基酸相似程度。(Lindahl *et al.*, 2005)

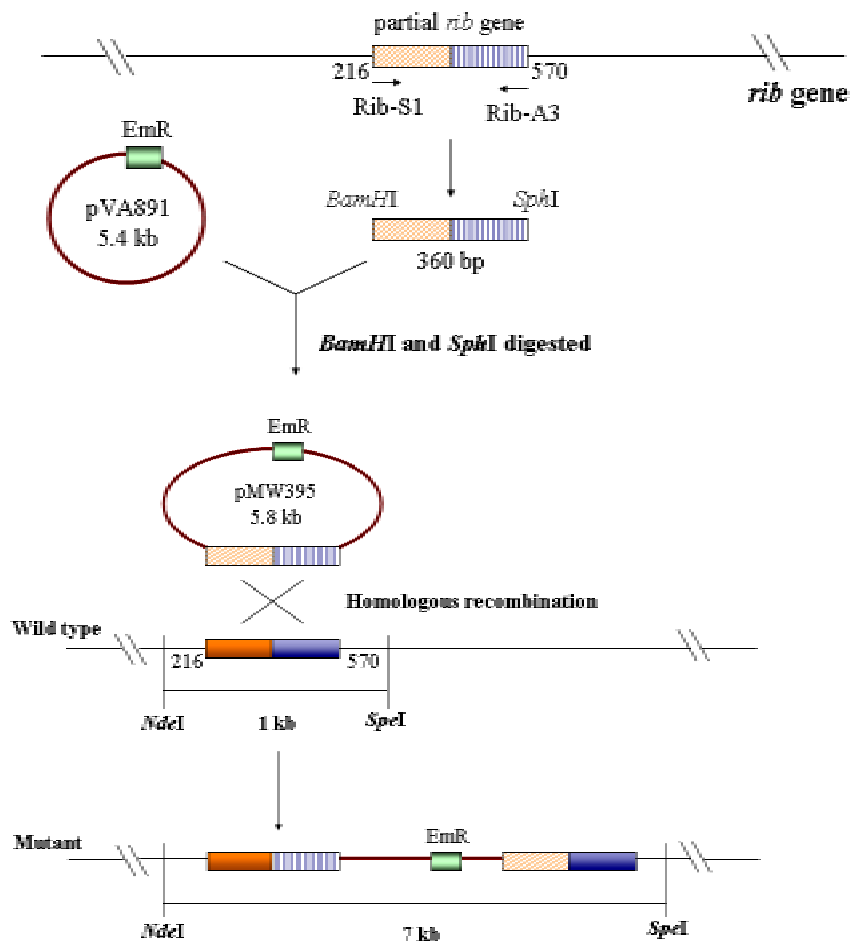


Fig. 2 **Construction of the *rib* isogenic mutant.** (A) The partial *rib* gene was amplified by primers Rib-S1 and Rib-A3. The PCR products were digested with *Bam*HI and *Sph*I then ligated into pVA891 and named pMW395. The plasmid pMW395 was transformed into the wild-type strain by electroporation and integrated into *rib* gene by homologous recombination. The transformants were then screened by the erythromycin-containing TSBY plate and further confirmed by southern blotting hybridization. (B) Southern blotting hybridization of wild-type strain (B523) and *rib* mutant strain (SW701) probed with 0.4 kb fragment of the *rib* gene (216-570). Both of two genomic DNAs were digested with *Nde*I and *Spe*I. Lane 1, λ DNA/*Hind*III marker ; lane 2, B523 ; lane 3, SW701.

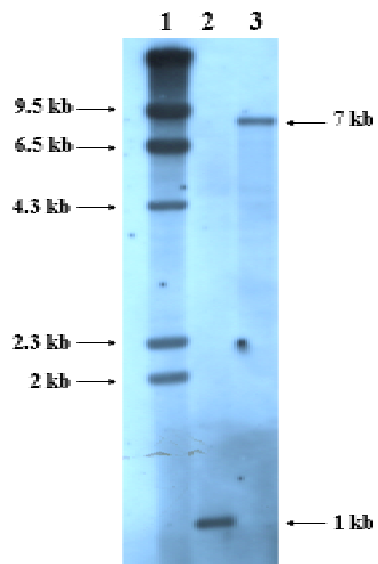


Fig. 3 Southern blotting hybridization of wild-type strain (B523) and *rib* mutant (SW701) probed with 0.4 kb fragment of the *rib* gene (216-570). Both of two genomic DNAs were digested with *Nde*I and *Spe*I. Lane 1, λ DNA/*Hind*III marker ; lane 2, B523 ; lane 3, SW701.

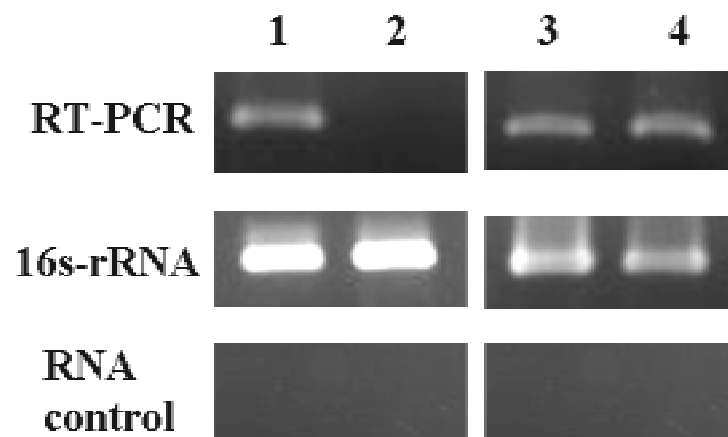


Fig. 4 **RT-PCR analysis of *rib* gene and its downstream gene (*sag0432*)**. Lanes 1 and 3, wild-type strain B523 ; lanes 2 and 4, *rib* mutant strain SW701. Lanes 1 and 2, amplified *rib* gene ; lanes 3 and 4, amplified *rib* downstream gene (*sag0432*) ; 16s rRNA indicated an internal control, and RNA control indicated a negative control.

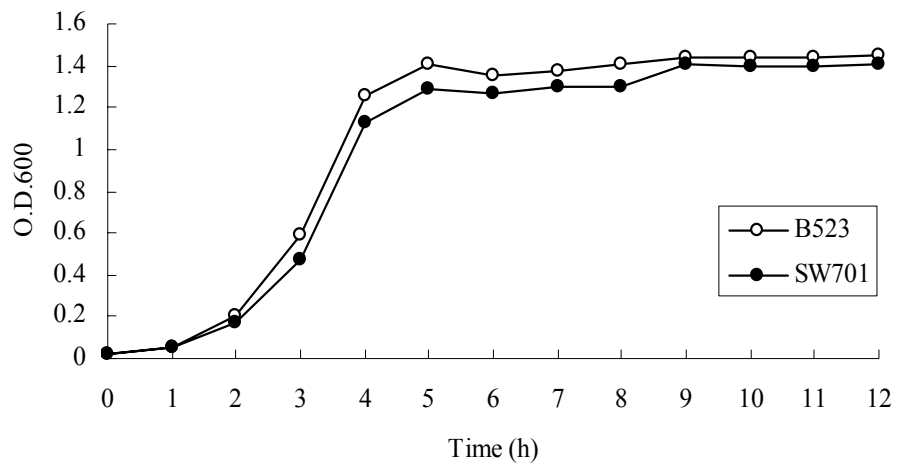


Fig. 5 Growth curves of wild-type strain (B523) and its isogenic mutant (SW701).

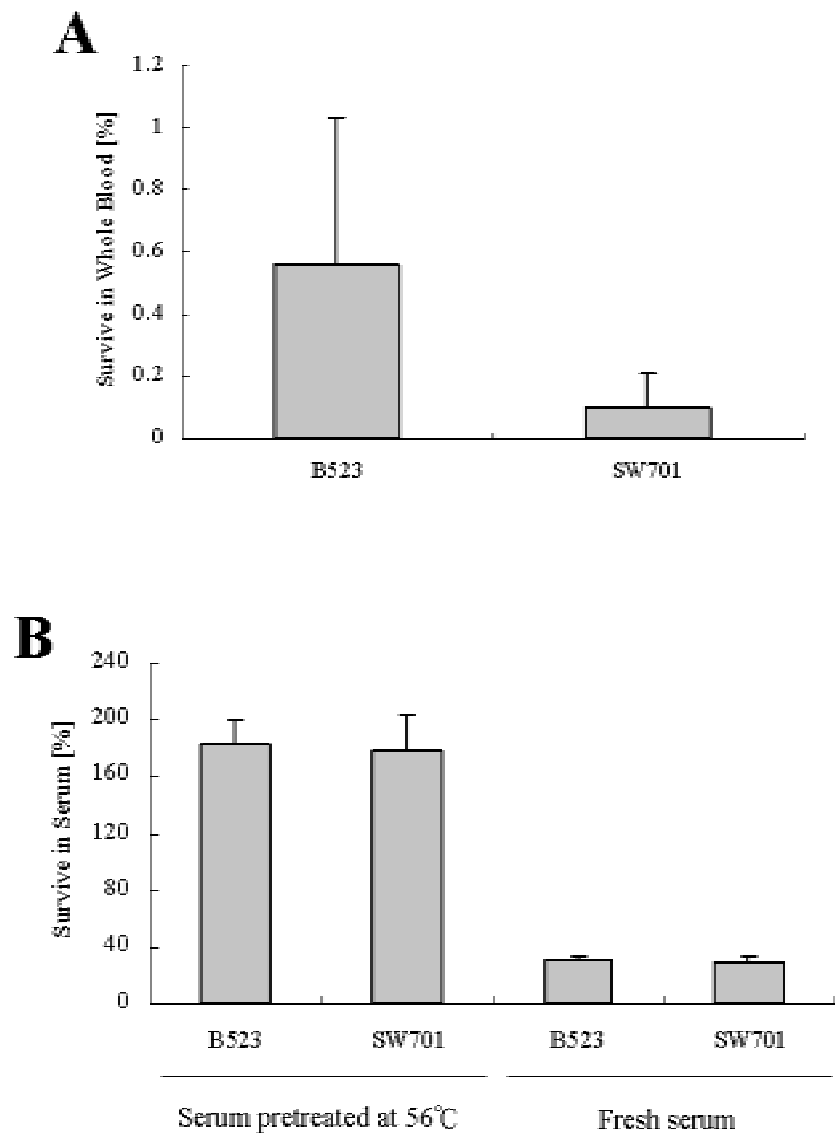


Fig. 6 **Whole blood and serum bactericidal assays of wild-type strain B523 and its mutant strain SW701.** Wild-type strain and its isogenic mutant strain were incubated with (A) whole blood, (B) serum, pretreated at 56 °C for 30 min and fresh serum, in 37 °C for 3 h. The bactericidal activities were compared by plating count and the numbers of survive bacteria were related to the number of input bacteria. The values represent the means \pm standard deviations of the means from at least four independent experiments.

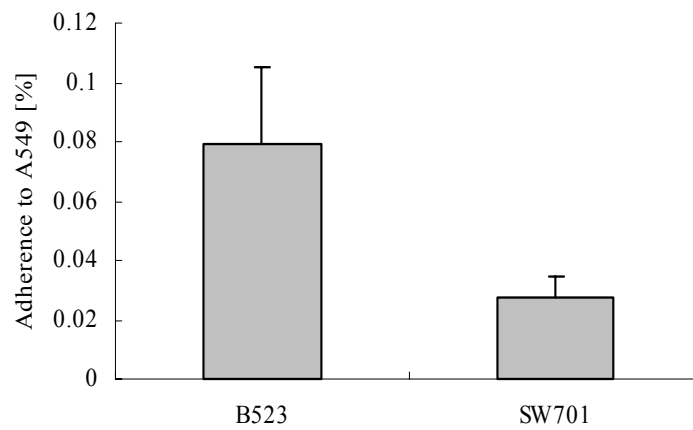


Fig. 7 Adhesion assays of wild-type strain B523 and its mutant strain SW701 to A549 epithelial cells. Wild-type strain and its isogenic mutant strain were infected with A549 cell line for 120 min, and the adhesion activities were compared by plating count. The numbers of cell-adherent bacteria were related to the number of input bacteria. The values represent the means \pm standard deviations of the means from at least four independent experiments.

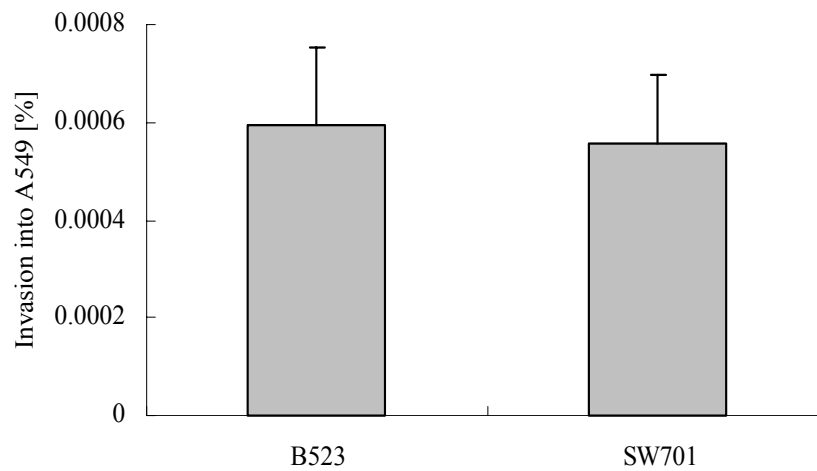


Fig. 8. **Invasion assays of wild-type strain B523 and its mutant strain SW701 to A549 epithelial cells.** A549 cells were infected by the wild-type strain and its isogenic mutant for 120 min, and were then treated with penicillin G and gentamycin to kill the bacteria on cell surface for 120 min. The numbers of intracellular bacteria were related to the number of input bacteria. The values represent the means \pm standard deviations of the means from at least four independent experiments.