

計畫編號：DOH90-DC-1029

行政院衛生署疾病管制局九十年年度委託研究計畫

計畫名稱：鼠疫桿菌莢膜蛋白 (Fraction 1, F1) 抗原、螢光抗體  
之製備及相關檢測技術之應用

委託研究成果報告

執行機構：國防醫學院預防醫學研究所

研究主持人：劉文燦

研究人員：莊傳昌、許蕙玲、梁忠誌、林宏基

執行期間：八十九年一月一日至八十九年十二月三十一日

\*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

摘要

中文摘要

英文摘要

前言

材料與方法

結果

討論

討論與建議

參考文獻

圖表

3

5

5

8

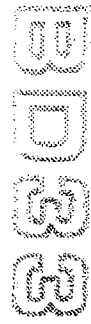
11

17

21

22

32



目錄	頁數
Fig 1. Construction of the capsule protein gene ( <i>caf1</i> ) of <i>Y. pestis</i> on the expression vector.	27
Fig. 2. Schematic demonstration of construction of <i>caf1</i> operon on pUC18.	28
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of recombinant DNA.	29
Fig. 4. Immunoblotting analysis of the whole bacterial cell lysate with anti-F1 monoclonal antibody (YP19).	30
Fig. 5. IFA detection of the antigen expressed on the surface of recombinant <i>S. typhimurium</i> aroA strain with rat anti-F1 polyclonal Ab.	31
Fig. 6. Screening for the virulence gene of <i>caf1</i> , <i>inv</i> , <i>pla</i> and <i>yopM</i> of <i>Y. pestis</i> by multiplex PCR.	32
Fig. 7. PCR amplification of the full-length of <i>caf1</i> gene from the samples of flea DNA.	33
Fig. 8. PHA analysis of anti-F1 antibody of the serum samples.	34

## 中文摘要：

鼠疫桿菌 (*Yersinia pestis*) 屬於革蘭氏陰性、無孢子生成球桿菌，是造成黑死病(plaque)的病原菌。其為一高侵襲力人畜共通疾病 (zoonotic disease)，歷史上曾發生數次世界大流行，導致數千萬人口傷亡。而現代鼠疫在印度、非洲及臨近的中國，局部的流行亦不曾間斷，造成社會經濟重大的損傷。因此鼠疫防治是不可或缺的工作。

本研究，針對鼠疫桿菌(*Yersinia pestis*)上特異性 F1 莢膜抗原，設計偵檢系統；實施被動凝集試驗(PHA)及聚合酶連鎖反應(PCR)等方法試驗，進行血清學及特異抗原分析，檢測樣品中之 anti-F1 抗血體及 F1 構造基因 *caf1*。為了取得優質 F1 抗原，利用基因選殖將 *caf1* 基因群(*caf* operon, 含 R, M, A 和 *caf1*) 構築在高表現載體，在大腸桿菌內生產 F1 抗原，以免疫點漬(Immunoblotting)分析，結果顯示產量可達 2 -3 mg/ml，而且大部分 F1 重組抗原可分泌至細胞外。然而直接從 100 克乾燥的鼠疫桿菌菌體，利用硫酸銨萃取後，再經高效能液相層析純化可得到 3-5 mg/l 產量。

所得之純化 F1 抗原於大白兔中進行免疫，誘導產生之抗血清可以認識培養液中的 F1 蛋白分子量為 15.5 kDa，此外，依據 *caf1* 核酸序列設計之特異性引子進行 PCR，可以檢測到非常微量 (picogram)

的 *caf1* 毒力基因。

我們的研究結果顯示，無論是基因重組或菌體抽取之 F1 蛋白皆為優質抗原，於大白兔進行免疫均能誘導產生專一性 anti-F1 抗血清。另外，配合血清學上以 PHA 檢測樣品中之 anti-F1 抗體，利用 PCR 篩檢 *caf1* 毒力基因，在鼠疫疫情監控中提供一個有效而敏感的偵檢系統。

中文關鍵詞(至少三個)：鼠疫桿菌；F1 莢膜抗原；被動凝集試驗；  
聚合酶連鎖反應

**Abstract:**

The Gram-negative bacterium *Yersinia pestis* is the causative agent of infectious diseases classically referred to as plague and has been responsible human pandemics over Europe and Asia country in history, which resulted in the death of millions of people. Thus there is no doubt that the establishment of a functional diagnostic system is required for surveillance against plague threat as far as the public health and economic concern.

In this study we designed a detection system based on the specific F1 capsule protein of *Yersinia pestis*, and PHA (Passive Hemagglutination assay) and PCR assay were performed to examine the anti-F1 antibody as well as the *cafI* gene of the sample. To obtain sufficient amount of F1 antigen to generate an anti-F antiserum, a 5.3-kb fragment harboring the *cafR*, *cafM*, *cafA* and *cafI* (F1 structural gene) amplified from pMT1 of *Y. pestis* was cloned into the pUC18 and expressed in the in *E. coli*. Immunoblotting analysis showed that the recombinant F1 protein is produced as high as 2-3 mg /l and is secreted to the cell surface by large as determined by immunofluorescence assay. In contrast the production yield is 3-5 mg /l F1 protein from 100g dry weight of *Y. pestis* BHIA culture following FPLC purification after ammonium sulfate extraction. The purified F1 antigen was used as an antigen to immunize the rabbit to raise a polyclonal anti-F1 antiserum. The antisera obtained could specifically recognize the F1 protein with the predicted molecular size of 15.5 kDa. In addition it is able to detect the specific *cafI* DNA as low as several picogram by PCR using primers corresponding to the *cafI* gene sequence.

Our results demonstrated that the purified F1 protein is suitable for PHA

assay and is effective to be an antigen to raise a specific anti-F antiserum. Also, in conjunction with PHA to examine the anti-F1 antibody serologically, screening for the potential *caf1* DNA by PCR provide an effective and yet sensitive detection system for plaque surveillance.

Keyword: F1 antigen, PHA, PCR, *caf1*

前言：

鼠疫菌 (*Yersinia pestis*) 是黑死病 (plague) 的病原菌，在分類上屬於革蘭氏陰性、非活動、非孢子生成的球桿菌 (cocobacillus, 直徑 0.5~0.8um, 1~3um 長)，其生長溫度範圍界於 4~40<sup>0</sup>C 之間(最適溫在 28~30<sup>0</sup>C)，最適生長酸鹼值在 7.2-7.6 (4, 15, 25)。

鼠疫為一高侵襲力人畜共通疾病 (zoonotic disease)，主要感染齧齒類。鼠疫的傳播是由鼠類及其相關的鼠蚤所媒介，主要途徑是鼠蚤吸食感染動物的血再藉叮咬傳遞至其它宿主，而由直接接觸或食入鼠疫菌所造成的感染則較少發生(25, 27)。

人類並非鼠疫菌的天然貯存宿主，對鼠疫長期活存不扮演一重要角色。但鼠疫在歷史上卻曾多次引起大流行，所造成的危害遠遠超過史上任何一種流行病，據估計約有 2 億人口傷亡(8, 16, 17)。

鼠疫菌會侵犯淋巴系統並於其內增生繁殖，所誘導產生的免疫反應會照造成淋巴腫脹稱為腺鼠疫 (bubonic plague)。當造成菌血症時細菌會竄流至肺部，寄生於肺巨噬細胞稱為肺鼠疫 (pneumonic plague)，此時患者可藉飛沫傳染到其他宿主，造成大流行。



最近，鼠疫桿菌 (*Y. pestis* strain C092) 的全部基因體已經完成定序 (24)，其毒力決定因子主要分佈於三個大小不同的質體上：1. 70-75kb 質體載譯 (encode) 著一群變異性很低的外蛋白 (yersinia outer protein, Yop) 和 V 抗原。質體 2 為 100 kb 載譯 F1 莢膜蛋白 (Fraction 1 capsule protein) 以及鼠毒素 (murine toxin)。質體 3 為 9.5 kb，上載譯細菌素 (bacteriocin)、蛋白酶 (protease)、血清活化子蛋白酶 (plasminogen activator protease, Pla)。

質體 1 分佈於毒力較低的不同種鼠疫菌中；例如假結核鼠疫菌 (*Y. pseudotuberculosis*) 和腸病鼠疫菌 (*Y. enterocolitica*)，但是質體 2、3 則只分佈於鼠疫桿菌 (*Y. pestis*) (7, 14)。

F1 莢膜蛋白是鼠疫桿菌 (*Y. pestis*) 上特有的抗原，在 37°C 而非 26°C 時，蛋白會形成膠狀莢膜 (gel-like capsule)。在體外，鈣離子缺乏、菌體生長受限情況下，F1 蛋白的表現受到誘導而大量生產 (10, 11, 18)。F1 的生物活性被認為與細菌的抗吞噬作用有密切的關係 (13, 19)。而且 F1 抗原是一保護抗原，可產生免疫反應對抗鼠疫的侵襲 (2, 29, 30)。因此，利用免疫學及分子生物學方法來檢測抗 F1 抗體或 F1 抗原構造基因 (*cafI*)，是監控鼠疫最重要偵檢依據。

為取得大量質優抗原以生產 anti-F1 抗體或進行免疫分析，本計畫分別採用遺傳工程或傳統方法；利用 PCR 選殖 F1 抗原基因 (*caf1*)，於大腸桿菌中大量表現，或直接從鼠疫菌體中萃取表面抗原。並於大白兔中進行免疫產生 anti-F1 抗體。此外，依據 F1 抗原構造基因，設計 *caf1* 專一性引子，進行 PCR 檢測 *caf1* 基因，配合 anti-F1 抗體資料分析，達成鼠疫偵檢的目標。

## 實驗材料及方法

### 一. 菌株和培養條件

鼠疫桿菌株 (*Yersinia pestis* Yreka strain) 為本所自藏; 分別用來生產 F1 抗原及純化, 轉殖用大腸桿菌 *E. coli* BL-21 購自 Strategen 公司; 細菌除非特別指示, 否則震盪培養於 37°C。鼠疫桿菌質體的抽取參照 Kado & Liu (20) 所提供的方法施行。

### 二. 萃取鼠疫桿菌F1 表面抗原

鼠疫桿菌接種於含 5% blood 的 Brain heart infusion agar, BHIA 中於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養 72 小時以磷酸緩衝液(1xPBS) 洗離菌體, 加入 -70°C 丙酮殺死菌體, 離心沉澱、揮發除去丙酮。乾細胞以二甲苯 (2.5% NaCl 飽和液) 萃取, 離心取上清液進行透析, 再予冷凍乾燥濃縮。

濃縮液利用硫酸銨 (ammonium sulfate) 沉澱法, 進行反覆沉澱、離心萃取 F1 抗原。

### 三. 引子 (primers) 及 PCR 反應條件

作為選殖 F1 重組抗原所用之寡核甘酸表列如下:

Number	Sequence(5' ► 3')
PGF-11	GTTCCGGGATCCATGAAAAAATCAGTTCCGTT
PGF-12	GTTCCGGAATTCTTGGTTAGATACGGTTACGGT
PQF-11	GTTCCGGGATCCATGAAAAAATCAGTTCCGTT
PQF-12	GTTCCGAAGCTTTTGGTTAGATACGGTTACGGT

PCR反應條件：

50ml PCR 反應液中包含有 template DNA 20~50ng、primer 2mM、dNTPs 各 2.5 mM、0.5 U Gold Tag enzyme、5ml 10X PCR buffer、以及 2.5mM MgCl<sub>2</sub> 等。PCR program: 9 min at 95 °C, 1 min at 94 °C, 1 min at 54 °C 2 min at 72 °C for 30 cycle and 5 min at 72 °C.

#### 四. 細胞轉型

新構築的含鼠疫F1抗原基因的質體，可採用CaCl<sub>2</sub>或電脈轉型(electroporation)法(23)，殖入大腸桿菌勝任細胞(competent cells)。再利用含抗生素的培養基，篩選出含F1抗原基因質體之大腸桿菌。

#### 五. 生產及提純 F1 重組抗原

構築於高表現載體 (pGEX, pQE) 之 F1 重組抗原的表現和回收，分別依廠商提供方法，按造指示步驟進行，簡述如下；

### 5.1. Purification of 6xHis-tagged recombinant protein by Ni-resin

取 pQE30-YPVi/DH5 $\alpha$  之 single colony 在 37°C 隔夜培養於 LB broth (含 50  $\mu$ g/ml ampicillin) 中，培養之菌液 1/501 稀釋至新鮮 LB broth 培養 3 至 O.D.<sub>600</sub> 約 0.6~0.7。加入 1M IPTG (final conc. of 0.1~0.5 mM)，培養 3~5 小時，離心收 pellet。加入 10 mM imidazole/sonication buffer (50 mM Na-phosphate pH8.0, 300 mM NaCl)，與 pellet resuspend 至均勻。將菌液隔夜冰在 -70°C 中，菌液回溫解凍，以 French pressure 之方式壓菌將細菌打破。離心 10000xg, 10 分鐘，收取上清液。加入 1 ml 50% slurry 的 Ni-NTA resin (預先用 10 mM imidazole/sonication buffer 洗三次)，於 4°C 中摩天輪旋轉 1 小時。離心 3000xg, 2 分鐘，去除上清液。用 5 ml 10 mM imidazole/wash buffer (50 mM Na-phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH6.0) 清洗 resin 數次，用 2 ml 0.2 M imidazole/wash buffer (50 mM Na-phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH6.0) 洗離 recombinant protein。所得之 recombinant protein 以 BCA Protein Assay (BioRad Co.) 方法，分析其蛋白質濃度。並利用

SDS-PAGE 在 Coomassive blue stain 下，分析重組蛋白的表現量及純度。

## 六. 生產抗血清

將純化之 recombinant protein 以 0.2 M imidazole/wash buffer 調其濃度至 100  $\mu\text{g/ml}$ ，加入等體積之 Complete Freund Adjuvant (Difco, Co.) 完全混合至乳狀，對 BALB/c (20~25 g) 老鼠進行皮下注射，每隻注射量為 0.2 ml (含 10  $\mu\text{g}$  recombinant protein)，每週注射一次，共四次 (除第一次注射抗原須與 Complete Adjuvant 混合，其後注射抗原與等體積之 Incomplete Freund Adjuvant 混合即可)。最後一次注射之 10~14 天，抽取老鼠之心臟血液，待血液凝固後離心取其血清作為 antiF1-fusion protein (anti-6xHis-F1 或 anti-GST-F1) 之 antiserum。大量製備抗血清，則以大白兔代替老鼠進行免疫。

## 七. 檢體分析

### 7.1. ELISA測定老鼠血清抗體

將老鼠以乙醚麻醉後 (不能死掉)，固定於保麗龍墊後，以 1 ml 筒抽心臟血。

以0.1M KCl 在25°C清洗30分後拍倒，再以蒸水洗滌，拍倒。

將不同濃度（100mg, 10mg, 1mg, 0.1mg, 0.01mg/ml）的 F1蛋白溶於coating buffer (sodium bicarbonate pH 9.5), 分注於微量盤 (100µl / well)。再以 parafilm 包好置 4°C coating overnight 後，拍倒。

以1% BSA fraction V in PBST 300 µl / well block nonspecific 連結，置 25°C 反應 45 分鐘。

以PBST 洗 4 次，加入檢體 serum (100 µl, 50 µl) 於 25°C, 反應 2hrs。以PBST 洗 4 次，加HRP conjugate (Anti-mouse IgG, A, M 1:10,000) 置25°C, 反應 2hr進行 Conjugation。

以PBST wash 4 次後，加 substrate (OPD 6mg in 12ml McIvain buffer pH 6.0 加 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 置暗處30分鐘。

加 1 ml 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應，於 ELISA Reader 在492 nm 讀取測定值。

## 7.2. PCR 檢測鼠蚤中之潛在鼠疫桿菌

鼠蚤前處理。按採樣地方，將跳蚤以1~10隻編為一組（每組不得超過10隻）後，將跳蚤先置入95% 酒精中，隨後以鑷子將跳蚤夾出置入含100µl 萃取緩衝液(含10 mM Tris-HCl、50mM EDTA pH7.8、20ng/ml

RNase、0.5% SDS)的研磨器中，以玻棒將跳蚤磨成碎屑，並再加入400 $\mu$ l 萃取緩衝液，混合均勻後，分裝成兩管微量離心管中。再加入500 $\mu$ l 萃取緩衝液沖刷研磨器內的殘渣，並將渣液分裝於上述兩管中，使每管渣液各為500 $\mu$ l。其中一管置-20 $^{\circ}$ C保存，另一管則作PCR反應用。

**萃取鼠蚤DNA.** 將預作PCR反應用之該管渣液置37 $^{\circ}$ C中水浴1小時，加入5 $\mu$ l Proteinase K(20 mg/ml)最後濃度為為100 $\mu$ g/ml，置50 $^{\circ}$ C水浴1小時用一倍體積phenol萃取，vortex，並以桌上型離心機(5415c)，以轉速14000rpm 離心20分鐘，取上清液，用無水酒精沉澱DNA，置-70 $^{\circ}$ C 2小時以上，離心14000rpm(4 $^{\circ}$ C)，30分鐘，去上清液，並以30~50ml 之無菌水溶解DNA沉澱物加入RNase(10mg/ml)1.5 ml處理，置37 $^{\circ}$ C，2小時或室溫overnight，此時即可進行PCR反應。

#### 八. 被動血清凝集試驗 (Passive hemagglutination test, PHA)

PHA 的操作步驟參考WHO (30) 和 Chen & Meyer(6) 所提供之方法進行，簡述如下：

儲存於 Alsever's solution (每升含 4.2 g NaCl, 8.0 gm Na<sub>3</sub>Citrate, 20.5 g Glucose pH 6.1)、5 $^{\circ}$ C 的綿羊紅血球 (sheep RBC)，以生理鹽水 (PBS) 洗3次，以PBS調成 2.5% RBC。加入等量



的 0.005% 新鮮配製 tannic acid (1:20000 w/v )，混和完全，於 37 °C 水浴 15 分。

以 PBS 洗 1 次 離心 (1500 rpm、3 min )，調成 2.5% RBC。加 200  $\mu$ g / ml F1 抗原和等量 tannic erythrocyte，於 25°C 作用 15 分。離心 (1500 rpm、3 min )，去上清液。1:100 (1%) normal rabbit serum 洗 2 次。以調成 1% RBC。對照組 RBC 1% normal rabbit serum 以代替 F1 抗原進行活化。

待檢驗血清先於 56°C、30 分去活化，系列稀釋後，於 "U" 型微量盤中加入活化 RBC 進行凝集試驗。

結果：

### 一、構築 F1 抗原基因 (*caf1*) 於表現載體

利用專一性引子(PGF-11, PGF12; PQF11, PQF12)進行 PCR，自鼠疫桿菌質體 pMT(110Kb) 複製 *caf1* gene, 所得之 PCR product 經限制酶 BamH1 和 Hind3 切割後，接合於經同樣限制酶切割之質體上如圖一所示。

### 二、構築抗原基因群(*caf1* operon)於 pUC18

F1 抗原基因群除了含有構造基因 *caf1* 外，尚包含調控子 *cafR*、細胞內外膜蛋白 *cafM* 及與蛋白結構形成有關之 *cafA* 位於 5.2 kb DNA 片段上，選殖構築分為兩步驟；

先將前半段 *caf1* operon 選殖於 pUC18 上產生 pCaf3.3，然後再利用 PCR 複製 *caf1* operon 下半段(含 *caf1A* and *caf1*, 2.1 kb)，將其選殖在 pCaf3.3 上得到 pF5.3 clone (圖 2 所示)。如圖 3 所示，各重組質體經限制酶切割後確認含有 513-bp *caf1* gene，DNA 序列分析確認是 in-frame sequence (未示)。

### 三、表現 F1 重組抗原

重組質體以 electroporation 轉殖入大腸桿菌進行表現，經核酸限制酶切割，瓊脂電泳膠分析結果證明其結果顯示 *caf1* gene 在 pQE30，pET32a 和 pRSETA 等表現質體，在大腸桿菌中經 IPTG induction，

以 SDS-PAGE 分析，利用 anti-F1 專一性抗體進行偵測發現表現量很少，相對的 pF5.3 具有很高的表現量(圖 4)。而且以專一性 anti-F1 Ab 進行螢光染色偵測，發現 F1 抗原可分泌至細胞外。

#### 四. 鼠蚤 DNA 分析

鼠疫主要是藉由鼠蚤叮咬在動物間傳播，為了解鼠蚤是否攜有鼠疫桿菌(*Y. pestis*)，因此對收集之跳蚤樣本，以 PCR 方法進行鼠疫桿菌 *caf1* (encode F1 抗原)，*yopM* (outer membrane protein)，*inv* (invasive protein in chromosome)，*pla* (plasminogen activator) 等毒力基因之偵檢，分析其是否遭受感染。結果如圖所示在澎湖(肉品市場、農改場)和金門(料羅灣、山后)等地區檢體，*caf1* 基因呈陽性結果，但 *yopM*、*inv* 和 *pla* 等毒力基因呈陰性結果，血清學 PHA 亦為陰性，此外無動物及人間鼠疫病例報告，因此判定為疑似案例。

#### 五. 血清學分析

以 PHA 進行血清中 anti-F1 抗體效價分析，實驗結果如圖八所示，判讀依據是“可以產生血球凝集(與對照組相比較)的最大稀釋度”，潛在鼠疫的血清效價為 1/16。

## 討論:

本實驗，利用遺傳工程的方法及直接從菌體以萃取沉澱法來生產製備 F1 抗原，結果顯示兩者所得之 F1 蛋白，對老鼠、兔子進行免疫均可產生專一性抗體。以基因重組的方法，除了可調控提高抗原產量外，另外亦可避免操作高危險鼠疫桿菌毒力株，目前以質體(pQE30, pGEX pRSET) 的表現量雖不如預期，研究結果顯示以 pUC18 選殖 *caf1* operon (gene cluster)，不但可以產生高濃度的 F1 antigen (3-5 mg/l)，而且 F1 抗原可分泌至細胞外。此特性除有利於純化回收效能外，亦可加強免疫誘導能力，目前已將此重組 DNA (pF5.3) 選殖於沙門氏菌中，進行表現測試並試驗純化回收之方法，並利用老鼠的動物實驗模式(murine infection model)探討其作為疫苗的可行性。

利用 PHA 檢測血清中之 anti-F1 抗體以及使用 PCR 篩檢專一性毒力因子，已成為偵檢鼠疫的標準步驟，因為敏感性高可能因操作不慎導致假陽性，因此在結果判讀上需考量再現性，同時需配合鼠密度及病例報告，綜合上述資料分析再發佈鼠疫疫情，否則易引起不必要之恐慌。

## 結論與建議:

本實驗利用遺傳工程及直接從菌體萃取沉澱，成功生產製備 F1 蛋白抗原，並且對老鼠、兔子進行免疫均可產生專一性抗體。F1 抗原均適用於 PHA、ELISA 等試驗，而 anti-F1 抗體在免疫點漬法 (immunoblotting) 中可產生專一性結合反應。依據 F1 蛋白的構造基因 (caf1) 設計之引子，可以自檢體專一性的檢測到潛在鼠疫桿菌。但因自然界出現具毒力的 F 突變株，因此要達到嚴密而無隙漏的監控鼠疫疫情，除 F1 蛋白外，亦須納入鼠毒素 (murine toxin)、多功能蛋白 (LcrV) 等毒力因子的檢測。

因為檢測方法的敏感性很高，可能因人為操作不慎而導致假陽性，因此在結果判讀上需考量實驗的再現性，同時需配合鼠密度及動物及人間鼠疫病例報告，綜合上述資料分析再發佈鼠疫疫情，以免引起不必要之恐慌。

參考文獻：

1. Anderson, G.W., Jr., S.E.C. Leary., 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 *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* **64**:4580-4585.
2. Andrews, GP., D.G. Heath., G.W. Anderson,Jr., S.L. Welkos., A.M. Friedlander. 1996. Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* C092 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. *Infect. Immun.* **64**:2180-2187.
3. Health, D.G., G.W. Anderson, Jr., J.M. Mauro, S.L. Welkos, G.P. Andrews, J. Adamovicz., and A.M. Friedlander. 1998. Protection against experimental bubonic and pneumonic plague by a recombinant capsular F1-V antigen fusion protein vaccine. *Vaccine* **16**:1131-1137.
4. Brubaker, R. R. 1972. The genus *Yersinia*: biochemistry and genetics of virulence. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* **57**:111-158.
5. Campell, G. L., and J. M. Hughes. 1995. Plague in India: a new warning from and old nemesis. *Ann. Intern. Med.* **122**:151-153.
6. Chen, T. H., and K.F. Meyer. 1966. An evaluation of *Pasteurella*

- pestis* fraction-1-specific antibody for conformation of plaque infections. Bull. W. H. O. **34**:911-918.
7. Cornelis, G.R., A. Boland., A.P. Boyd., C. Geuijen., N.C. Iriate., M.P. Sory., and I. Stainer. 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. Microbiol. Mol. Biol Rev. **62**: 1315-1352.
  8. Duplaix, N. 1988. Fleas- the letheal leapers. *Natl. Geogr.* **173**:672-694.
  9. Doyle, R.J., and N.C. Lee. Microbes, warfare, religion, and human institutions. 1986. *Can. J. Microbiol.* **32**:193-200.
  10. Karlishev, A.V., E.E. Galyov., V.M. Abramov., and V.P. Zav'yalov. 1992. Caf1R gene and its role in the regulation of capsule formation of *Y. pestis*. FEBS Lett. **305**(1):37-40.
  11. Karlishev, A.V., E.E. Galyov., O.Yu. Smirnov., A.P. Guzayev., V.M. Abramov., and V.P. Zav'yalov. 1992. A new gene of fl operon of *Y. pestis* involved in the capsule biogenesis. FEBS Lett. **297**: 77-80.
  12. 葉楓. 鼠疫菌苗研究進展. 中國地方病防治雜誌. 1995. **10**:228-230.
  13. Friedlander, A.M., S.L. Welkos., P.L. Worsham., G.P. Andrews, D.G. Heath., G.W. Anderson, Jr., M.L.M. Pitt., J. Estep., 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.

14. Filippov, A.A., N.S. Solodovnikov., L.M. Kooleva., and O.A. Protsenko. 1990. Plasmid content in *Yersinia pestis* strains of different origin. FEMS Microbiol. Letters. **67**:45-48.
15. 紀樹立主編 .鼠疫. 人民衛生出版社. 中國北京. 1988. p.232-249.
16. 科學月刊 **28 (10)**: 840-844, 1997.
17. 中國地方病防治雜誌.中國北京.1995 **10(4)**:228-230,  
BD40
18. Galyov, E.E., A.V. Karlishev., T.V. Chernovskaya., D.A. Dolgkih., O.Y. Smirnov., K.I. Volkovoy., V.M. Abramov., and V.P. Zav'yalov. 1991.Expression of the envelope antigen F1 of *Yersinia pestis* is mediated by the product of CafIM gene having homology with the chaperone protein PapD of *Escherichia coli*. FEBS Lett. **286(1-2)**: 79-82.
19. Galyov E.E., O.Yu. Smirnov., A.V. Karlishev., K.I. Volkovoy., A.I. Denesyuk., I.V. Nazimov., K.S. Rubtsov., V.M. Abramov., S.M. Dalvadyanz., and V.P. Zav'yalov. 1990. Nucleotide sequence of the *Yersinia pestis* gene encoding F1 antigen and the primary structure of



- the protein. Putative T and B cell epitopes . FEBS Lett. **277(1-2):**  
230-232,
20. Kado, C.J., and S. Y. Liu. Rapid procedure and isolation of plasmids. 1981. J. Bacteriol. **145**:1365-1373,
  21. Meyer, K.F., J.A. Hightower., and F.R. McCrumb. 1974. Plague immunization. VI. Vaccination with the Fraction I antigen of *Yersinia pestis*. J. Infect. Dis. **129(Suppl.)**: S41-S45.
  22. McNeill, D., H. Jenkin., D. Armstrong., Y.S. Chang., J.C. Lien., and K.F. Meyer. 1968. A serological survey of rodent plague in Taiwan and offshore islands. Bull. WHO. **38**:793-798.
  23. Miller, J.F. 1972. Bacterial transformation by electroporation. Methods in Enzymology. **235**:372-385.
  24. Parkhill, J., Wren.B.W., *etal.*, 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. Nature. 413: 523-527.
  25. Perry, D. R., and J. D. Fetherston. 1997. *Yersinia pestis*-etilogic agent of plague. Clin. Microbiol. **10**:35-66.
  26. Russell, P., S. M. Eley., S.E. Hibbs., R.J. Manchee., A.J. Stagg., R.W. Titball. 1995. A comparison of plague vaccine, USP and EV76

圖表:

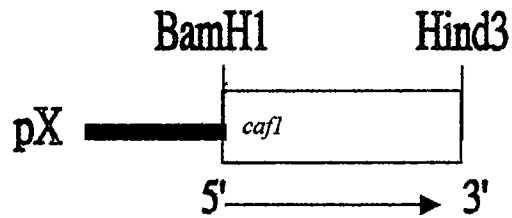


Fig 1. Construction of *Yersinia* capsule protein gene (*caf1*) on expression vector.

*Yersinia* capsule protein gene (*caf1*) was amplified from plasmid (pMT, 110Kb) of *Yersinia pestis* EV76s strain, and was cloned into the expression vector after cleavage with *Bam*H1/*Hind*3 restriction enzymes. pX, representing the plasmids of pQE30, pET32 and PRSET. *Yersinia* capsule protein gene (*caf1*) as blank box indicated.

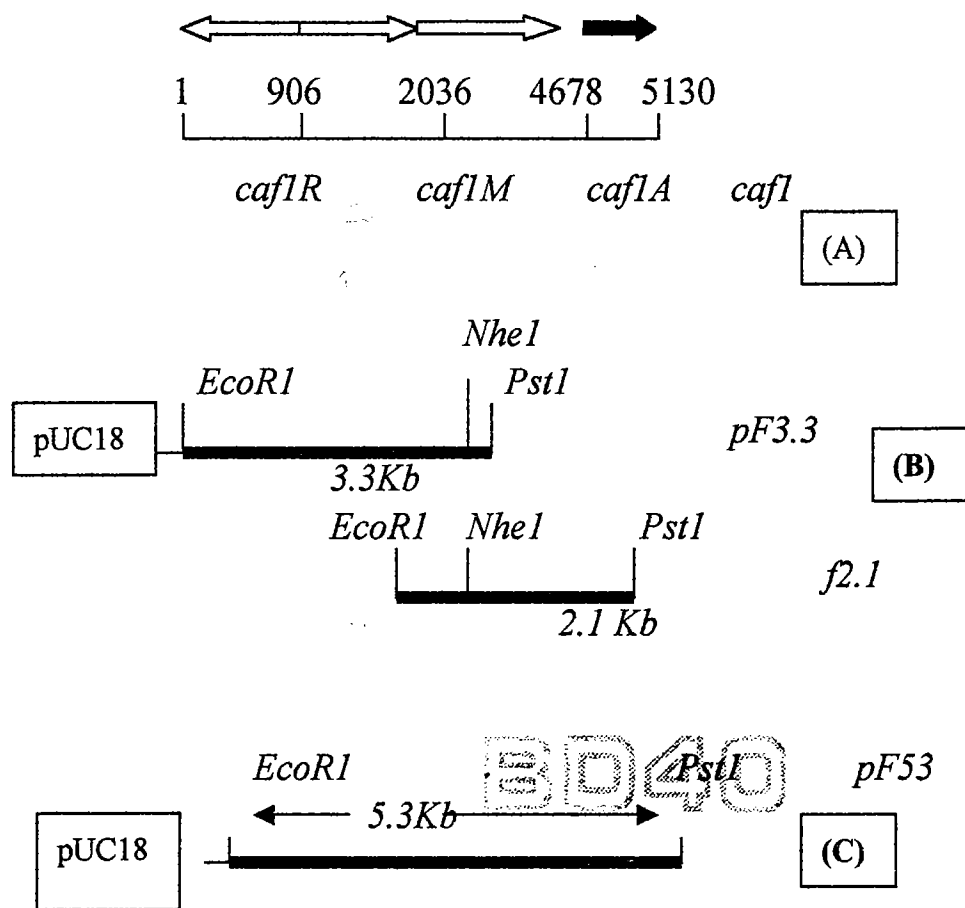


Fig. 2. Schematic demonstration of construction of *cafI* operon on pUC18

(A) Relative location and the molecular size in base pair of individual gene of *cafI* operon (B) The 3.3-kb DNA fragment containing partial *cafI* gene cluster was cloned into pUC18 to generate a pCaf 3.3, into which a 2.1-kb PCR product harboring the partial *cafIA* and *cafI* gene fragment was cloned to give rise to the clone, designated the pF 5.3 (C)

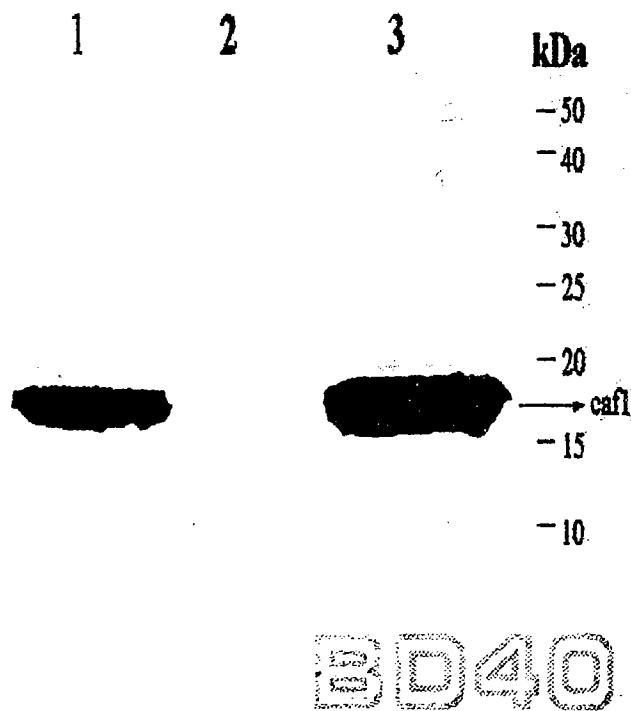
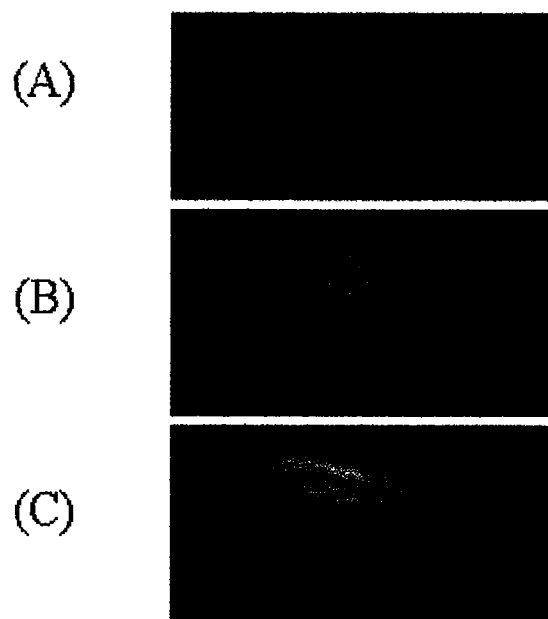


Fig 4. Immunoblotting analysis of whole bacterial cell lysate with anti-F1 monoclonal antibody (YP19).

Bacteria were grown in LB broth at 37°C for overnight. Lane1. *Yersinia pestis* Ev76 cell lysate as F1 antigen positive control; Lane2. *S.typhimurium* aro/pUC18; Lane3. *S. typhimurium* aro/pF53.



**Fig5. IFA detection of the F1 antigen expressed on the surface of recombinant *S. typhimurium* *aroA* strain with rat anti-F1 polyclonal Ab.**

**Panel A.** *Styphimurium* *aroA*/UC18

**Panel B.** EV768 strain (*Yersinia pestis* spp.) as F1 positive control.

**Panel C.** *Styphimurium* *aroA*/UC18-F1

澎湖：

項目\地名	肉品市場	農改場
PCR 結果	F1 positive	F1 positive
跳蚤數	24	1

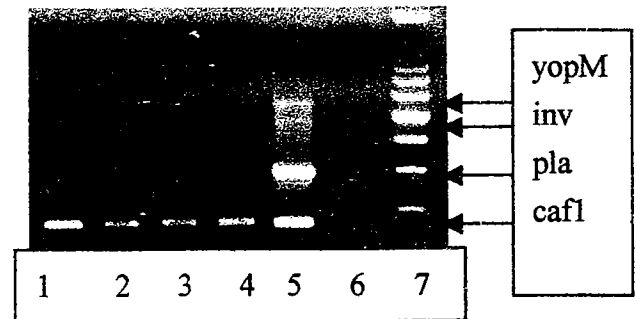


Fig 6. Screening for the virulence gene of *caf1*, *inv*, *pla* and *yopM* of *Y. pestis* by multiplex PCR.

Samples collected from Pan-Hu (88.6.7-11) from the location as indicated. Lane1. 澎湖肉品市場; Lane2. 澎湖農改場; Lane3. 金門料羅灣; Lane4. 金門山后; Lane5. positive control; Lane 6. negative control; Lane7. 100-bp DNA ladder.

金門：

項目\地名	料羅灣	山后
PCR 結果	F1positive	F1positive
跳蚤數	11	1

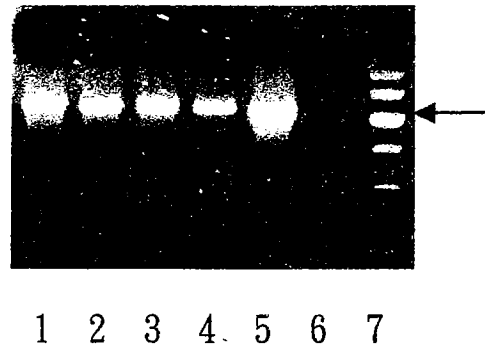


Fig 7. PCR amplification of the full-length of *caf1* gene from the samples of flea DNA.

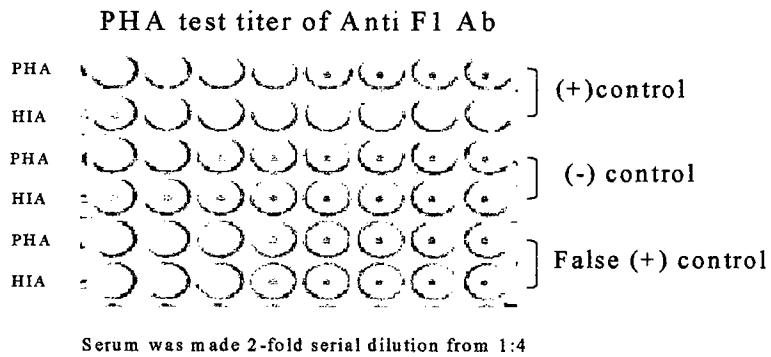
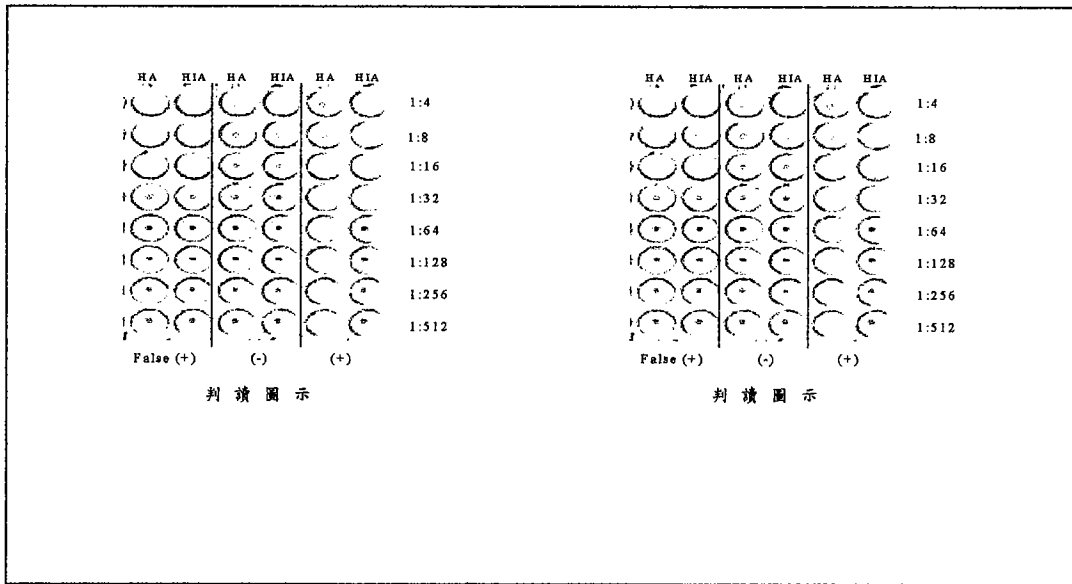
Sample collected from Kim-Man (88.6.21-25) from the location as followed: Lane1. 澎湖肉品市場; Lane2.澎湖農改場; Lane3.金門料羅灣; Lane4.金門山后; Lane5 : positive control; Lane 6.negative control;

Lane7.100-bp DNA ladder.*caf1* DNA as arrow indicated. 各引子使用

之濃度為 : pla, cafl and yopM 為  $0.1 \mu\text{M}$ ; inv 引子為  $0.05 \mu\text{M}$ ,PCR 反

應條件如下 : Denature :  $94^{\circ}\text{C}$ ,30sec; Annealing :  $54^{\circ}\text{C}$ ,1min; Extension :

$72^{\circ}\text{C}$ ,1.5min; Total of 30 cycles.



**Fig. 8. PHA analysis of the anti-F1 antibody of serum samples.**

Following 2-fold serial dilution the serum samples were subjected to microtiter plate in which contained the reference F1-antigen, and the end-point for the agglutination of sheep RBC was examined in comparison to that of the control group.