

## 目 錄

目錄	頁次
中文摘要	2
英文摘要	4
前言	6
材料與方法	9
結果與討論	11
結論與建議	14
參考文獻	16
圖表	
表一、FHA 聚合酶鍊鎖反應	19
表二、FHA 核酸序列變異性	20
表三、FHA 基因變異性與氨基酸序列變異性統計	27
圖一、PCR 分段增福分析	29
圖二、Multiple Sequence Aligment Dendrogram of FHA	30
圖三、菌株間建立之 GrowTree	31

## 摘要

**關鍵詞:**纖維性血球凝集素，基因序列，基因變異性

百日咳是一種高傳染性的急性上呼吸道疾病。雖然預防接種育苗可有效預防，但每一年世界各地皆時有疫情爆發的情形。例如 1995 年發生於荷蘭的百日咳流行便造成 10 倍以上的病例發生。而感染的病患中發現有很大部分是已經接種 4 劑以上疫苗的青少年的。這種跡象顯令人懷疑多年使用的疫苗菌株是否與流行病原間以有很大的基因序列變異，而此種基因變異性使疫苗無法產生適當的抗體以預防百日咳。因此百日咳的抗原變異性分析已成為防疫上重要的資訊。本計畫已就 4 個國外菌株：10536，Tohama（此兩者為疫苗株），ATCC 9340 及 18323，及 8 個本土流行菌株的抗原纖維性血球凝集素(FHA)進行其基因變異性分析。

在經由聚合酶鍊鎖反應、基因選殖、及核酸序列分析後，由所分析之 6803 個 FHA 的蛋白核酸序列中我們發現沒有兩個菌株是完全相同的。國外菌株尤其是 9340 及 18323 基本上可以與本土菌株有相當明顯的基因變異性。而各菌株發生變異之核酸位置又似乎有群聚的現象。換言之，似乎有突變的 hot spot。有些菌株甚至在短短 50 核酸對間便有 3 個以上核酸與其他菌株不同。雖然所分析之菌株有限，但所獲得之結果顯示由 FHA 的基因

變異性是可以一窺流行的趨勢與病源追蹤。

由於菌株之基因核酸序列分析畢竟是較費時且耗費高人力的研究，建議以本計畫所得之結果作為基礎，利用 oligonucleotide polymorphism 的方法，在未來蒐集到臨床菌株時逐步建立基因庫以追蹤感染途徑。同時將目前國內所使用之疫苗菌株都做一次類似的分析，以作為未來疫苗有效性的評估。此基因庫的建立相信對百日咳防疫及國人健康應有很大的貢獻。

## Abstract

**Keywords:** Filamentous hemagglutinin, nucleotide sequence, genetic variation

Whooping cough is a highly contagious acute respiratory disease. Although the disease could be effectively prevented by vaccination, there are worldwide pertussis outbreaks every year. For instance, more than 10 times of cases were reported in the outbreak occurred in Netherlands 1995. Among these cases, a large proportion of them were found to have been vaccinated at least four doses of vaccine. Because of this, it was suspected that a significant genetic variation may emerged between the clinical strains and the vaccine strains that has been long time used for the manufacturing the vaccines. The variation may not any more be able to elicit the high titer of neutralizing antibodies for the effective disease prevention. Therefore, it has become considerably important to analyze the genetic variation among all pertussis strains. Current study has investigated the nucleotide sequence variation of filamentous hemagglutinin among 12 clinical pertussis strains, including 8 domestic strains and 4 strains that were initially obtained from other countries, i.e. strains 10536, Tohama (these two strains are currently used for vaccine production), ATCC 9340 and 18323.

Following the PCR amplification, gene subcloning, and sequencing analysis, we found that no FHA sequence between any two strains were completely identical. In comparison with domestic strains, significant variations were detected in the foreign strains, especially strain ATCC 9340 and 18323.

Among all sequences analyzed, the nucleotide variations seem to cluster in certain regions. In another words, some mutation hot spots seem to be present during bacterium evolution. In addition, from the individual strain point of view, some strains even revealed more than 3 variations within a 50 base pair segment. Although the strains used in this study was limited, the degree of variation was so huge that it is possible to use this to evaluate the trends of disease spreading and the sources of pathogens.

Because the nucleotide sequence analysis apparently is not time and cost effective, it is suggested that a pertussis gene bank may be established based on the results of this study, but use the methodology of oligonucleotide polymorphism to analyze all clinical strains. In the meantime, the investigation should also be performed on the strains that currently has been collected form each outbreak. This will contribute to not only the vaccine evaluation, but the disease prevention and human health.

## 前 言

百日咳是一高傳染性呼吸道疾病，全球每年有超過 355,000 死亡病例。而其中又以未接受免疫注射嬰幼兒佔大部分。雖然在多數開發中國家及已開發國家的預防注射率都很高，世界各地卻時有疫情爆發的情形。根據近來統計發現，台灣及數個歐洲國家[1]病例有大量增加的趨勢。而患者中不乏已完成所有預防接種的小孩及成人。由於低等微生物之自發性突變機率相當高，變異後之百日咳菌株又很可能因抗原 epitope 之結構與疫苗株有所差異，因此部分的感染有可能是因此項原因，避開防疫機制造成疫病。也由於如此，對流行病學及疫情爆發時的監控而言，實應對百日咳菌株及疫苗株之抗原基因變異性作深入探討。同時建立這些抗原基因庫亦可在未來百日咳之預防上題共更完備之菌株型別資料。

目前在開發中國家所使用之非細胞疫苗抗原[2,3]主要含有置病因子：百日咳毒素(pertussis toxin, PT) [4,5]、69 kDa 百日咳外膜蛋白(pertactin) [6,7]及纖維性血球凝集素(filamentous hemagglutinin, FHA) [8]。其中 FHA 及 pertactin 並不具有明顯細胞毒性。一般認為，這兩個蛋白抗原與避免感染有直接的關係。為了解 PT 及 pertactin 對荷蘭於 1996 年所造成的百日咳大流行，Mooi 等[9]的確發現流行菌株之 PT 及 pertactin 基因與荷蘭所使用的疫

苗株抗原有明顯的核酸序列變異性。而在我們先前的研究中，我們以對 20 個本土百日咳菌株之 PT 及 pertactin 之抗原變異性作了基本的研究[10]。然而對另一個抗原—FHA 之基因變異性則並未有文獻發表。

纖維性血球凝集素(FHA)是百日咳菌的主要吸附性蛋白。亦被發現是加強疫苗免疫力的重要成分。因此，國外對 FHA 抗原免疫力及細胞粘著性的相關研究都著力甚多。這些包括 FHA 之抗原 epitope 分析[11,12]，FHA 對人及老鼠的肺部上皮細胞之黏附研究[13]，各種抗原所生成的抗體對百日咳菌粘著作用的影響[14]。以及 FHA 蛋白中 Arg-Gly-Asp motif 對百日咳粘著作用之研究 [8, 15]。值得注意的是，多項研究結果都顯示作為疫苗成分 FHA 比 pertactin 在預防感染上應該是更重要的。

近來對 FHA 於百日咳之感染機制更是愈來愈多元化，也愈來愈發現其對感染過程的關鍵性。其於細胞親和性及侵入性(invasion)目前甚受多個研究機構所重視。根據近來的病理學研究，此抗原在 *in vitor* 及 *in vivo* 之實驗中不但可吸附在人類上表皮細胞上，同時可侵入多種細胞內[16]。此種特性是其他百日咳抗原所沒有的。而此種侵入性也被懷疑可以相當程度地規避受感染者的免疫防疫機制。除此之外，此抗原不但具有細胞親和及侵入所特有之 Arg-Gly-Asp domain 外，另具有 3 種與病理有關之鍵結區域:CR3 [17] 辨識區域，一個醣類辨識區域，及 heparin 和其他 sulfated carbohydrate[18]

的鍵結區域。FHA 還牽涉到所謂的 FHA-associated apoptosis [19]。另外，FHA 及很多革蘭式陽性菌 *Streptococcus pyogenes* (也是一群造成呼吸道疾病的病原) 都被發現可以與人體 complement 之調節因子 C4BP [20]。他們可能在感染過程中具有共通之機制。這些革蘭式陰性菌之基因序列是否有相當程度的 homology 也值得深入研究。由此種種，針對菌株間之 FHA 的基因變異性建立資料庫當然也變得愈來愈有其必要性。

對於各菌株間 FHA 之基因變異性研究較為稀少的主要原因之一可能是 FHA 的結構基因相當長 (估計約有 7kb, code 220 kDa 之蛋白), 且具有相當高的 GC 含量 (有些區域甚至高達 85%)。對於增幅及選殖將較為困難。然而從另一個方向思考, 因為其基因較長, 菌株間之變異系機率理論上也應較大。在不同來源之病原分型亦將有較大之差異與意義。

本計畫已就所蒐集之 10 個本土及兩個疫苗菌株進行 FHA 基因變異性之分析。除了建立一個分析此病原致病因子之序列增值方法以作為未來基因庫建立之基礎外。我們也發現多項變異在未來流行病學之分析上有其價值性。



## 材 料 與 方 法

**菌株來源與染色體 DNA 之製備：**使用於此項計畫之百日咳菌株之染色體 DNA 是純化自 12 株 *Bordetella pertussis*。它們包括兩株目前使用於非細胞疫苗製造之菌株 10536 及 Tohama 及先前我們由 ATCC 所購得之菌株 ATCC 9340。其他的菌株 DNA 則是由衛生署疾病管制局處所獲得的 9 個本土臨床菌株之染色體 DNA(編號：1201, 1439, 1043, 1153, 1404, 277, 685, 215, 18328 (此菌株非本土菌株))。除了菌株 10536 及 ATCC 9340 的染色體 DNA 是以 Qiagen Genomic-tip (c.a. 10223)的方法製備外,其餘菌株之染色體 DNA 是直接來自疾病管制局先前所製備的。

**FHA 結構基因之選殖：**為分析 FHA 之結構基因的核酸序列變異性,我們嘗試了數種聚合酶鍊鎖反應(PCR)之條件以克服 FHA 核酸序列之高 GC 含量之特異性。同時,為了 PCR 所可能造成的低 fidelity 的問題 我們選擇使用 *Taq* 及 *Pfu* 兩種聚合酶的混和酵素去克服前兩項可能發生的問題。在先期的測試中,我們發現可能是太高 GC content 的關係,FHA 的基因序列總長約 7 kb (如果以 FHA 的大約分子量計算) 並無法由單一對核酸引子增幅獲得。我們因此將 FHA 的 coding gene [21]分段增幅。針對每一段 DNA 的增幅,我們都使用總體積 100  $\mu$ L,含有 2 pmol/ $\mu$ L 的引子及 0.6 U *Pfu*/2.5 U *Taq*。除了 preliminary denaturing 5 分鐘及反應 cycle 後的 extension 10 分鐘

外，其餘我們在增幅時所用之條件、核酸引子、片段區間及於 coding region 之位置列出於表一。值得注意的是，每段增幅出來的 DNA 片段前後區域將有一段序列(約 20-50 核酸對)會與 upstream 及 downstream 區域序列重疊，以避免變異性的位置剛好位於核酸引子的序列上而被誤認為沒變異。所有 PCR 增幅後之產物都用 agarose 電泳分析。

**FHA 基因序列分析：**根據先期實驗結果顯示，含高 GC 成分的 PCR 的產物直接作核酸序列分析經常是有困難的。因此我們將所有 PCR 產物(其兩端分別含有兩個以引子加入的方式所特有的限制性酵素切點)利用限制性酵素，i.e. *Bam*HI 及 *Xba*I 切割後，殖入 plasmid pUC19 以進行 DNA 序列分析。

**菌株間 FHA 基因序列之差異性分析：**我們將所獲得的各菌株的各段 PCR DNA 序列分別組合，並利用 GCG program “PileUp”進行 multiple sequence alignment 分析。除此之外，我們也利用 GCGprogram 之 GrowTree program 以各菌株之 FHA 的基因變異程度建構 Alignment Dendrogram 以更清晰的呈現各菌株之間的可能種源關係。

## 結果與討論

根據最近發表的百日咳菌基因組分析，百日咳具有將近 63% 的 GC content。在 FHA 的 coding region 中有數個區域都有超過 75% 的 GC content。甚至有幾個區域還超過 80%，例如由 FHA 核酸序列[21]之 2932 至 3032 核酸對便有 81% 的 GC。因此對每一個菌株，我們無法找到一個適合的 PCR 的條件可將整個 FHA(由核酸對 250-7068; [21])的 coding region 一次增幅出來。經過幾次測試，我們只有將整個 coding sequence 分段用 PCR 增幅。對於每一個菌株的每一段 DNA 片段是經由一對核酸引子在特定的條件下(表一)增幅獲得。而這些 PCR 產物再以 agarose 膠體電泳分析(圖一)。我們發現兩個區域，由核酸對 1996-3690 及 5462-7068，可以一次增幅反應獲得。而另兩個區域，由核酸對 250-2088 及 3635-4638，可能是引子的結構或 GC 含量過高，必須再分段方可增幅成功。除了由 3635-至 5540 之片段外，其餘的區域都可較專一性地被增幅。

由於高 GC 含量的 PCR 片段很有可能造成序列分析上的困難，我們將所獲得的 PCR 片段利用其兩端含有的 *Bam*HI 及 *Xba*I 的限制性酶切點切割後轉殖入質體 pUC19 中，然後用 ABI 3730 核酸列分析儀分析。

在分析完所有菌株之 FHA 的 coding sequence 的 6,803 核酸對後，我們發現在此 12 個菌株間共計有 97 核酸之變異。其中包括 61 個 transition

mutations 及 36 個 transversion mutations (表二)。如我們先前預測的高突變機率，沒有任何一個菌株與發表的文獻中菌株, i.e. BP536 之序列[21]完全相同的。FHA coding sequence 之變異似乎並不是 random 的，有些區域幾乎是完全 conserved (各菌株都沒有變異發生)，例如由核酸對 262 至 605。而有些區域卻有多個菌株都發生變異，雖然變異方式有些差異，例如由核酸對 5325 至 5865。值得注意的是，菌株 ATCC9340 及 18323 所發生的變異中有數個不但在位置上相同，而且變異方式也完全一樣。例如核酸序列位置 723 (T/C)及核酸位置 1024 (G/A)。而有些菌株在短短核酸序列中卻有超過兩個以上的變異。例如菌株 10536 由 765 至 805 便有 6 個變異。若以對 coding 的氨基酸序列影響而言，這些核酸序列的變異性(與發表的序列比較)共有 42 個 silent mutations。對氨基酸 primary sequence 有改變的變異性則列於表三。由於各菌株之最原始來源皆為臨床菌株，因此各菌株在含有細菌黏合上感染細胞所需要的 Arg-Gly-Asp domain 的核酸對區域 3540 至 3560 中皆沒發生任何變異。其中最令人感到興趣的是，其中菌株 18323 在核酸對 1810，菌株 9340 則在核酸對 6676 發生 nonsense mutations。另外，除了菌株 215 及 1201 外，其他本土菌株間的變異性便較小了。

雖然我們不清楚各菌株之確切來源，為了進一步了解各菌株的親緣關係，我們也利用 GCG 系統的”Multiple Sequence Alignment”的 program 進行

分析。如圖二所示，同為國外菌株的 18328 及 9340 在序列之相似度上極為相近。而來自日本的菌株 Tohama 似乎與本土菌株在核酸序列上較相近。而菌株 215 與其他菌株比較是具有更大的差異的。我們雖然也以 GrowTree 來分析各菌株之親緣關係(圖三)，但由於菌株中各 randomized 的突變都計算在內，造成有些結果較難解釋。例如菌株 1201 便是個與其他菌株有相當迥異的核酸變異。若單純只以變異個數建構此關係，可能較不妥。應尋求別種分析方式進行。

## 結 論 與 建 議

本計劃在一年期程中，已利用 PCR 增幅的方法，完成了 12 個百日咳菌株之 FHA 的基因核酸定序。並進一步分析其間之變異性與可能之種源關係。雖然所使用之菌株並不是很多，但已涵蓋了疫苗株/非疫苗株，本土菌株/非本土菌株。根據我們所獲得的結果，我們提出以下之結論與建議：

1. 跟先前我們對另兩個百日咳抗原，PT 及 pertactin，所做的類似研究相比，FHA 的基因變異性的確如我們預期的，有相當大的變異性。雖然我們不知各個本土臨床菌株之來源與背景，本土臨床菌株間確實變異性很小，但與國外菌株 18323 及 9340 有明顯的差異性。而此兩國外菌株間有數相同位置竟有相同之變異，足見利用此變異性之分析可以判斷流行菌株之病原菌來源。惟建議在百日咳流行期間應敦促衛生機關蒐集並記錄各菌株以追蹤監督菌株之變異性，評估疫苗株與當時流行株之異同。。同時可以此計畫之結果作為基礎慢慢建立起基本的資料庫，以作為未來防疫的重要資訊。
2. 雖然由本計畫已獲得各菌株 FHA 的基因變異性，但侷限於時間及人力，也只能完成少數百日咳菌株(本計畫中僅有 12 株)。相信未來並不適合對每一菌株進行此種核酸序列分析。本計畫之結果提供一項於未來可以快速分析此基因變異性的方法。此方法便是所謂的”oligonucleotide

polymorphism”。將本計畫所獲得的核酸變異處建檔，並設計 PCR oligonucleotide 引子使變異的核酸位於其 3'端的最後一個 nucleotide。以此 oligonucleotide 來進行 PCR 增幅分析各菌株。直接由有無 PCR 產物來判斷菌株之關聯性。尤其是某些菌株，例如菌株 685 及 1201，在 50 個核酸對間便有 3 到 6 個變異，在未來分析菌株之流行來源可設計更專一性的引子。

## 參考文獻

1. “疫苗失效，歐洲恐爆發百日咳流行”(1997)民生報 86 年 10 月 10 日。
2. Miller E: Overview of recent clinical trials of acellular pertussis vaccine. *Biologicals* 1999;27:78-86.
3. Sato Y, Sato H: Development of acellular pertussis vaccines. *Biologicals* 1999;27:61-9.
4. Tamura M, Nogimori K, Murai S, Yajima M, Ito K, Katada T, Ui M, Ishii S: Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 1982;21:5516-22.
5. Nicosia A, Perugini M, Franzini C, Caswaglu MC, Borri MG, Antoni G, Almoni M, Neri P, Ratti G, Rappuoli R: Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: Operon structure and gene duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 86: 3075-9.
6. Brennan MJ, Ming LZ, Cowell JL, Bisher ME, Steven AC, Novotny P, Manclark CR: Identification of a 69-kilodalton protein as an agglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1988;56:3189-95.
7. Novotny P, Chubb AP, Cownley K: Biologic and protective properties of the 69-kDa outer membrane protein of *Bordetella pertussis*: A novel formulation for an acellular pertussis vaccine. *J Infect Dis* 1991;164:114-22.
8. Relman DA, Domenighini A, Tuomanen E, Rappuoli R: Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* Nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2637-41.
9. Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HG, Gaastra W, Willems RJ: Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors



- P.69/pertactin and pertussis toxin in the Netherland: temporal trends and the evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun* 1998; 66:670-5.
10. 吳游源、盧政雄 台灣地區百日咳菌抗原變異性與市售疫苗之保護力研究；衛生署 89 年度計畫
  11. Piatti G: Identification of immunodominant epitopes in the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;23:235-41.
  12. Wilson DR, Siebers A, Finlay BB: Antigenic analysis of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin polyclonal antibodies. *Infect Immune* 1998;66:4884-94.
  13. van der Berg BM, Beekhuizen H, Willems RJ, Mooi FR, van Furth R: Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelia cell lines derived from the human respiratory tract. *Infect Immun* 1999;67:1056-62.
  14. van der Berg BM, Beekhuizen H, Willems RJ, Mooi FR, van Furth R: Roles of antibodies against *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* to human bronchial epithelial cells. *Infect Immun* 1999; 67:1050-5.
  15. Alonso S, Reveneau N, Pethe K, Locht C: Eighty-kilodalton N-terminal moiety of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: Adherence, immunogenicity, and protective role. *Infect Immun* 2002;70:4142-7.
  16. Ishibashi Y, Relman DA, Nishikawa A: Invasive of human respiratory epithelial cells by *Bordetella pertussis*: possible role for a filamentous hemagglutinin Arg-Gly-Asp sequence alpha5beta 1 integrin. *Micro Pathog* 2001;30:279-88.

17. Prasad SM, Yin Y, Rodzinski E, Tuomanen E, Masure HR: Identification of carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 1993;61:2780-5.
18. Hannah JH, Menozzu FD, Renauld G, Loch C, Brennan M: Sulfated Glycoconjugated receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect Immun* 1994;62:5010-9.
19. Abramson T, Kedem H, Relman D: Proinflammatory pertussis filamentous hemagglutinin. *Infect Immun* 2001;69:2650-8.
20. Berggard K, Johnsson E, Mooi FR, Lindahl G: *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: Role of filamentous hemagglutinin. *Infect Immun*;65:3638-43.
21. Domenighini M, Relman D, Capiou C, Falkow S, Prugnola A, Scarlato V, Rappuoli R: Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Molec Microbiol* 1990;4:787-800.