

封面式樣

計畫編號：DOH91-DC-1012

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

鼠疫桿菌多功能蛋白,LcrV 抗原之製備及相關檢測技術之研究

計畫名稱

研究報告

執行機構：國防大學醫學院預防醫學研究所

計畫主持人：劉文燦

研究人員：副研究員

執行期間： 91年 1月 1日至 91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

	頁次
中文摘要.....	3
英文摘要.....	4
前言.....	5
材料與方法.....	7
結果.....	8
討論.....	10
結論與建議.....	12
參考文獻.....	13
圖表.....	20

中文摘要：

致病性 *Yersinia spp.* 細菌中含有一共同、毒力所必需的質體, pYV, 其載譯許多屬於第三型分泌系統的外蛋白 (Yops), 負責將毒力因子傳輸至宿主細胞內, 進行抗磷酸化、抗吞噬作用等機制, 造成細胞骨架重組及細胞死亡。LcrV 是一 37kDa 多功能外蛋白, 參與許多外蛋白的表現調控與分泌, 是鼠疫菌不可或缺的毒力因子。此外, LcrV 亦是一重要的保護性抗原。為取得大量質優抗原以生產 anti-LcrV 抗體, 本研究, 利用 PCR 自鼠疫桿菌選殖 LcrV 抗原基因 (*lcrV*), 於大腸桿菌中大量表現, 抗原以親和性管柱層析 (affinity chromatography) 純化後進行動物免疫, 獲得的 anti-LcrV 抗體; 除了可以專一性辨識細胞中的 LcrV 蛋白, 並且可以區別鼠疫菌與其它腸內菌屬的病原菌。另外, LcrV 重組抗原在小白鼠進行主動免疫, 會產生顯著的保護力, 抵抗鼠疫菌的感染。以上結果證明本研究所獲得 LcrV 抗原、抗體, 不但具有專一性而且兼備有效的抗原免疫保護力。因此, 在發展建構基因晶片、蛋白晶片、紙牒和定量 PCR 等鼠疫快速偵檢平台上, 可以提供良好的基礎。

中文關鍵字：鼠疫菌；重組 LcrV 蛋白；親和性管柱層析。

Abstract

The pathogenic *Yersinia spp.* harbors a common plasmid (pYV) essential for virulence. The plasmid encodes a type III secretion system that functions to translocate yersinia outer proteins into host cytosol. Within the cells the Yops carries out the antiphosphorylation and antiphagocytotic mechanisms which resulting in the cytoskeleton rearrangement and apoptosis. The LcrV is a 37kDa protein and has been shown as a protective immunogen and a multifunctional protein relating the regulation of the Yops secretion from the *Yersinia* cells. To obtain LcrV protein, the *lcrV* gene of *Y. pestis* was cloned and expressed in *E. coli*. After affinity gel purification the recombinant LcrV was used as an antigen to raise a rabbit -LcrV antiserum and which was demonstrated able to specifically recognize the predicted size of LcrV protein of *Yersinia* cell lysates in immunoblotting. Further, mice Ip given the LcrV antigen was shown significantly induced protection against lethal plaque infection. Taken together the -LcrV antiserum is suitable to be employed in the detection system to differentiate the *Yersinia spp.* among other's pathogenic *Enterobacteriaceae* such as *Salmonella* and *E. coli*. Also the LcrV protein is a conceivably important sub-unit vaccine candidate for plaque.

Key words : *Yersinia spp.* ; recombinant LcrV ; pathogenic *Enterobacteriaceae*

前言：

鼠疫(plague)又稱黑死病，為一高侵襲力的人畜共通疾病 (zoonotic disease)，其危害遠超過史上任何一種流行病。歷史上曾多次引起大規模流行，據估計約造成 2 億人口傷亡 (10,11,24,25)。近年來，鼠疫對人類的威脅雖不似以往，但是零星局部的人畜鼠疫流行依舊層出不窮，每年仍然有好幾千個病例報告，因此世界衛生組織 (WHO)將鼠疫列為新興傳染性疾病 (4)。

鼠疫菌 (*Yersinia spp.*) 是造成鼠疫的病原菌，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 4~40⁰C 之間 (最適溫在 28~30⁰C)，最適生長在酸鹼值 7.2~7.6 (3,24,34)。宿主範圍廣泛包含人類、牛羊等草食性動物及嚙齒類。

鼠疫菌屬 (*Yersinia spp.*)中有三種是人類的病原菌，皆喜好侵犯淋巴組織；其中以鼠疫桿菌 (*Yersinia pestis*) 的毒力最高，侵襲淋巴組織後會造成全身性感染。假結核鼠疫菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 和腸病鼠疫菌 (*Yersinia enterocolitica*) 常造成腸胃不適、下痢、發燒等自限性的局部性疾病。在遺傳上鼠疫桿菌和假結核鼠疫菌具有較高程度的相似性 (relatedness)。其基因體大小約為 4380±135 kb，G+C content 為 46~47% (34)。

目前已知鼠疫菌的毒力決定因子主要分佈於三個大小不同的質體上(8,9,39)；質體 pYV (70-75kb)普遍存在上述三種鼠疫病原菌中，其載譯 (encode) 著一群變異性很低的外膜蛋白 (yersinia outer membrane protein, Yop) 和 V 抗原，是主要的毒力彈藥庫，如 YopE 負責行使細胞毒殺作用，YopH 具蛋白磷酸化功能與抗吞噬作用有關，YopD, B 和 LcrV 形成管道作為細胞膜內外轉位傳輸的裝置(9,35)。另外，屬於鼠疫桿菌(*Y. pestis*)上特異的質體；pMT (~100Kb)載譯 F1 莢膜抗原及鼠毒素(murine toxin)等毒力因子；質體 pCP 為 9.5 kb，載譯細菌素 (bacteriocin)、蛋白酶 (protease)、血清活化子蛋白酶 (plasminogen activator protease, Pla)等酵素，與抗凝血作用有關。

F1 莢膜蛋白是鼠疫桿菌 (*Y. pestis*) 上特有的抗原，在 37⁰C 而非 26⁰C 時，蛋白會形成膠狀莢膜 (gel-like capsule) (16,20,21)。抗原性強、保護效果良好，以 F1 進行免疫可產生優勢免疫反應，保護動物對抗鼠疫桿菌的侵襲 (7,31,36,44)，因此，檢測血清中 F1 抗體的效價，已成為鼠疫偵檢中的標準步驟。然而近年來，在自然界分離出具毒力的 F1 抗原突變株 (F1⁻ mutant)，因此偵檢 F1 以外的鼠疫抗原，是防止檢疫隙漏不可或缺的工作 (1,4,42)。

在 1950 中期，LcrV 蛋白即被發現可以作為保護抗原對抗 plaque，進一步研究指出，其為一調控蛋白參與 Ca²⁺-dependent Yops 的合成 (39)。胺基酸基序列分析比較，發現 LcrV 的構造在 *Yersinia spp.* 菌中比其它的 Yops 較具多樣性 (polymorphism)，尤其在胺基酸基位置 225-232 區呈現高度變異。

研究結果顯示，LcrV 為一多功能性蛋白，包含調控鼠疫菌體內 Yops 蛋白的合成，作為轉位傳輸裝置 (translocation apparatus) 影響 Yop B 和 Yop D 的分泌 (29,34,35) 以及運送 Yops 至 target cells (12,13,28)，在微生物-宿主反應中抑制細胞 TNF 和 IL2 等 pro-inflammatory 免疫反應 (37,42,43)。此外，LcrV 是一重要毒力因子和，缺乏 LcrV 的突變株喪失大部分的毒力。同時亦為一重要保護性抗原，它誘導產生的抗體可對抗三種人類鼠疫病原菌，是目前研發鼠疫次單元疫苗最重要的標的之一 (6,18)。自 1950 年來，國內雖然鮮少有鼠疫的並病例報告 (32)，但鄰近的中國大陸目前仍是法定的鼠疫疫區，每年的人畜鼠疫的盛行率高達數千個 (23,24,26)，在兩岸交流日益頻繁之際，嚴密的疫情監控系統更不容有任何疏漏。因此，本計劃針對鼠疫菌上之 LcrV 抗原，進行研究並發展其相關之檢測方法，以期能建構一安全的鼠疫監控防護網。

材料與方法：

一. 菌株和培養條件

鼠疫桿菌株 (*Yersinia pestis* EV76S strain) 為本所自藏;用來生產純化質體 pYV,轉殖用大腸桿菌 *E. coli* BL-21 購自 Stratagene 公司; 細菌除非特別指示,否則震盪培養於 37°C。抽取 70 kb pYV 質體自鼠疫桿菌 EV76S 菌株的培養液,參照 Kado & Liu (27) 所提供的方法施行

二. 建構 LcrV 表現質體 (Cloning and construction of the recombinant carrying the *Yersinia pestis* LcrV protein gene, *lcrV*)

依據 *Yersinia pestis* 的 *lcrV* 基因核酸序列, 設計核酸引子 primer; YPVi1F (5'GTTCCGGGATCCATGATTAGGGCCTACGAA 3') 和 YPVi1R (GTTCCGAAGCTTTGTCGTCTCTTGTTCAT 3'), 利用 PCR (94 9 min, 94 1 min, 54 1 min, 72 1.5 min, 30 cycles, 72 5 min, 4) , 以 pYV 為 template, 進行複製選殖出 *lcrV* 基因(981bp)。

將選殖之 *lcrV* 經 *Bam*HI 和 *Hind*III 切割後, 接在 *Bam*HI/*Hind*III cut 之 pQE30 (QIAGEN Co.), 再轉殖入 *E. coli* DH5 得到 pQ30-Vi recombinant (以下簡稱 EQ30-V)。

(1) 純化重組 LcrV 蛋白(Purification of 6xHis-tagged recombinant protein using Ni-resin)

取單一 EQ30-V 菌落接種於 LB broth (含 50 μ g/ml ampicillin)中, 37 隔夜培養 培養液 1/20 稀釋至新鮮 LB broth 中,再培養 3 小時 (OD₆₀₀ 0.6~0.7),加入 IPTG (最後濃度為 1mM)繼續培養 3 小時,。離心後菌體以 French press 打破, 離心收取上清液。

加入 Ni-NTA resin 進行吸附, 用 10 mM imidazole/wash buffer (50 mM Na-phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH6.0)清洗 resin, 再以 0.2 M imidazole/wash buffer (50 mM Na-phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH6.0) 洗離, 重組蛋白以 SDS-PAGE 及 Coomassive blue stain 分析其純度及表現量。

(三) 免疫及動物實驗

將純化之 6xHis-Vi recombinant protein 以 PBS, pH7.4 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 20 g BALB/c 老鼠進行皮下注射, 每隻注射量為 0.2 ml (即 10 μg 6xHis-Vi), 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, 作為 anti-6xHis-Vi 抗體效價分析。挑戰試驗(challenge test)於最後一次免疫注射後 14 天實施, 以 100 倍 LD_{50} 的 *Yersinia pestis* IPM703 (約 10^3 CFU) 進行腹腔注射, 而後觀察 14 天, 並記錄其存活情形。

結果：

一、表現生產重組 LcrV 蛋白(Production of recombinant LcrV protein)

攜有 *lcrV* 基因之重組質體 pQ30-Vi 經核酸序列分析結果, 顯示其正確無誤 (in-frame) 接在表現質體 pQE30 上。

重組 Vi 蛋白 (6xHis-Vi fusion protein)以 Ni-NTA resin 純化, 可得到一個將近 40 kDa 的蛋白質 (圖一), 由於 native Vi antigen 的大小約 37 kDa, 因此純化的 6xHis-Vi 的分子量可說與預期的幾乎相符。另外, 在 90 kDa 附近的位置出現一條 band, 可能是 aggregated 6xHis-Vi。

進一步以 FPLC 純化, 結果如圖二所示, 6xHis-Vi 蛋白的純度顯著的提高。經過透析和濃縮後置於 -20°C 保存, 此重組蛋白作為爾後免疫用抗原及進行 ELISA 和免疫點漬分析用。

二、製備 anti-Vi 抗體

以純化的 6xHis-Vi 對老鼠進行皮下注射免疫, 再取其血清做西方墨點法(Western

blotting)分析,發現 6xHis-Vi 的抗血清不但可以清楚的辨識到純化的 6xHis-Vi 及其分解物 (圖 3 B, lane1 及 lane2), 亦辨識到鼠疫桿菌 EV76S 株中的 native Vi antigen (圖 3A, lane1 及 lane2); 同樣的以鼠疫桿菌菌體免疫所獲得的抗血清(mouse anti-*Y. pestis* antiserum)也可以辨識到純化的 6xHis-Vi (圖 3B, lane3)。此結果證明, 重組抗原 6xHis-Vi 具有有效抗原結構, 誘導產生的抗血清, 可以有效並正確無誤辨識鼠疫桿菌 Vi antigen。以 ELISA 進行效價分析, 結果發現 6xHis-Vi antiserum 的效價均大於 1:16384。

三、保護性試驗

老鼠以重組抗原(6xHis-Vi)進行皮下注射, 四次後的第 14 天, 以 100 倍 LD₅₀ 的鼠疫桿菌毒力株(IPM704)株進行挑戰試驗 (challenge test); 結果發現, 經 6xHis-Vi 免疫的老鼠獲得顯著保護力, 而且抗原的劑量愈高保護效果愈佳; 當劑量大於 10 μg 時, 全部的老鼠均獲得活存。相對的, 以 PBS 做免疫的老鼠皆死亡 (表一)。此結果顯示重組抗原(6xHis-Vi)具有構造與功能上的完整性, 所產生的免疫反應可以保護老鼠對抗鼠疫菌的感染。

四. LcrV 抗原分析

LcrV 分泌性蛋白是 *Yersinia spp.*; 如 *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis* 和 *Y. enterocolitica* 的共同抗原, 其相似性高達 90~95%。其中, *Y. pseudotuberculosis* 和 *Y. pestis* 在 aa 序列 25-40, 108-125, 和 188-207 處更完全相同, 但是在 aa 225-230 處則呈現較大的變異(圖 4)。研究指出, LcrV 在 *Yersinia spp* 有三種主要類型; 一. *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*; 二. *Y. enterocolitica* serotypes O3, O9; 三 *Y.*

enterocolitica serotypes O8 strain。不同類型的 V 抗原亦出現地域分佈的特異性。LcrV 在蛋白構造上呈現多形性(polymorphism)的特性，對於 *Yersinia spp.* 尤其是人類病原菌株，在流行病學上具有非常重要的意義。

分別以 PCR 及免疫點漬進行 V 抗原及 *lcrV* 基因分析，發現有些突變株雖然含有 *lcrV* 基因，但不表現 V 抗原(圖 5,6)。這些菌株發生構造與功能上的歧異性，可能由於構造基因或其上游調控因子產生變異造成，確切原因待進一步研究。同時動物實驗結果顯示，這些突變株在老鼠上的致毒力有明顯的降低的現象。

討論：

在本研究計劃中，我們針對鼠疫菌上重要的毒力因子及保護性抗原 LcrV，成功的將基因選殖並於大腸桿菌中菌進行大量的表現，*lcrV* 在數種不同的表現系統(eg., pET32, pSec etc.)測試結果皆可以表現(未示)，為便利下游產製純化回收及考量 Fusion tag 長度，最後選用 pQE 作為表現生產系統。重組 LcrV 蛋白大部分存在細胞質中呈可溶性，重組蛋白在兔子免疫產生的抗血清，可以區分 *Yersinia spp.* 與其它腸內菌科致病菌如 *Salmonella* 和 *E.coli* 等。但 LcrV 為 *Yersinia spp.* 人類致病菌的共有抗原，雖然在不同種間存在變異性，但同質性高達 90~95%。因此，若以多價體 LcrV 抗血清進行檢測時，*Y. pestis*、*Y. pseudotuberculosis* 和 *Y. enterocolitica* 均會產生陽性反應。就鼠疫 (plaque) 的偵檢目的而言，除了 LcrV 外，需配合檢測鼠疫菌上標特有的標的；諸如 F1、鼠毒素(Mt)和 Pla。

已知，LcrV 抗為一多功能蛋白，不同的部位分別負責不同的功能，研究指出胺基酸基團(amino acid residue)1-125 與蛋白的分泌有密切的關係；胺基酸基團 176-276 是產生免疫保護力的抗原性位置；胺基酸基團 224-266 負責與 LcrG 的連結。在進入宿主細胞後 LcrV 促進細胞素 IL-10 產生，進而壓抑 TNF- 和 IFN- 生產而導致抗吞

噬作用等致病機制(42)。然而，LcrV 是如何進行多功能的機制及在細胞內的作用標的則仍然是個謎。

LcrV 是目前對抗鼠疫最好的次單元疫苗標的，研究指出以 LcrV 抗原免疫動物可產生顯著良好的保護力原來對抗鼠疫感染。目前研發將抗原製成不同的形式的製劑以提高免疫效能如以微膠膜包裝，使抗原能慢慢釋出增加在體內與免疫細胞的相互作用時間 (6)；或採用 F-V 混和疫苗(18)，以不同配比的重組蛋白 F/V 直接免疫；或以活體疫苗形式利用減毒的沙門氏疫苗株為表現系統來傳送 F/V (44)。實驗已獲得不錯的結果，由此可見 LcrV 抗原在鼠疫疫苗的重要性。本計劃所生產的 LcrV 重組蛋白，若考慮作疫苗用途時需先除去 His-tag 已避免不必要的免疫反應。本所已完成 F1-V 混和疫苗體外表現研究，目前正進行動物體內免疫試驗。

在鼠疫偵檢方面，LcrV 標的雖不似 F1、Mt 和 Pla 抗原的專一性高，但 LcrV 為人類致病菌 *Yersinia spp.* 的共有抗原，因此為防止 F1 突變株所照成防疫上的隙漏 LcrV 的檢測亦是不可或缺的。

結論與建議：

本計劃，成功選殖鼠疫菌(*Y.pestis*)多功能蛋白基因(*lcrV*)，並進行表現生產，純化獲得的 LcrV 重組蛋白，進行動物免疫產生之 α -LcrV 抗體；可以專一性辨識細胞中的 LcrV 蛋白，而且可以用來區別鼠疫菌與其他遺傳相近似之腸內菌屬病原菌。利用 PCR 分析 *lcrV* 基因可防止因利用 F1 為基礎的檢測系統，在 F1 莢膜抗原突變株 (F) 所造成的隙漏。此外， α -LcrV 抗體亦可提供製作蛋白晶片(protein chip)、生物探針 (Biosensor)或紙碟製作(strip, smart kit)，進行快速偵檢，配合 F1 莢膜抗原抗體的篩檢，達成有效的鼠疫疫情監測。

參考文獻：

1. Anderson, G.W., E.D. Williamson., R.W. Titball., S.L. Welkos., P.L. worsham., and A.M. Friedlander. 1996. Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and –negative strains of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* **64**:4580-4585.
2. Andrews, GP., D.G. Heath., G.W. Anderson,Jr., S.L. Welkos., and 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. Brubaker, R. R. 1972. The genus *Yersinia*: biochemistry and genetics of virulence. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* **57**:111-158.
4. Campell, G. L., and J. M. Hughes. 1995. Plaque in India: a new warning from and old nemesis. *Ann. Intern. Med.* **122**:151-153.

5. Canoy. C., H. Muller-Alouf., P. Desreumaux., C. Mullet., C. Grangeette., and M. Simonet. 2000. The superantigenic toxin of *Yersinia pseudotuberculosis*: a novel virulence factor? 290(4-5): 477-82.
6. Carr, S., Miller, J., Leary, S.E., Bennett, A.M., Ho, A., and E.D. Williamson. 1999. Expression of a recombinant form of the V antigen of *Yersinia pestis*, using three different expression systems. *Vaccine*. Aug 20;18(1-2):153-9.
7. Chen, T.H., and K.F. Meyer. 1966. An evaluation of *Pasteurella pestis* fraction-1-specific antibody for confirmation of plague infections. *Bull. W. H. O.* **34**:911-918.
8. Cornelis, G.R. 2000. Molecular and cell biology aspects of plague. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 8778-83.
9. 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.
10. Duplaix, N. 1988. Fleas- the lethal leapers. *Natl. Geogr.* **173**:672-694.
11. Doyle, R.J., and N.C. Lee. *Microbes, warfare, religion, and human institutions.* 1986. *Can. J. Microbiol.* **32**:193-200.
12. Fields, K.A. and S.C. Straley. 1999. LcrV of *Yersinia pestis* enters infected eukaryotic cells by a virulence plasmid-independent mechanism. *Infect Immun.* 67(9): 4801-13.

13. Fields, K.A., Nilles, M.L., Cowan, C., and S.C. Straley. 1999. Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface. *Infect Immun.* 67(10): 5395-408.
14. 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.
15. 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.
16. Galyov, E.E., A.V. Karlishev., T.V. Chernovskaya., D.A. Dolgikh., 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 Caf1M gene having homology with the chaperone protein PapD of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **286(1-2)**: 79-82.
17. 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,
18. 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.

19. 10. Holmstrom, A., J. Olsson., P. Cherepanov., E. Maier., R. Nordefelth., J. Pettersson., R. Benz., H. Wolf-Watz., A.A. Forsberg. 2001. LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocation of *Yersinia*. *Mol Microbiol.* 39(3) : 620-632
20. 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.
21. 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 f1 operon of *Y. pestis* involved in the capsule biogenesis. *FEBS Lett.* **297**: 77-80.
22. Lawton, D. G., Longstaff C., Wallace, B.A., Hill, J., and S.E. Leary. 2002. Interactions of the type III secretion pathway proteins LcrV and LcrG from *Yersinia pestis* are mediated by coiled-coil domains. *J Biol Chem.* 11; 277(41): 38714-22.
23. 葉楓.鼠疫菌苗研究進展. 中國地方病防治雜誌. 1995.**10** : 228-230.
24. 紀樹立主編 .鼠疫. 人民衛生出版社. 中國北京. 1988.232-249.
25. 科學月刊 **28 (10)**: 840-844, 1997.
26. 中國地方病防治雜誌.中國北京.1995.**10(4)**:228-230,
27. Kado, C.J., and S. Y. Liu. Rapid procedure and isolation of plasmids. 1981. *J. Bacteriol.* **145**:1365-1373,

28. Lee, V. T., C. Tam., and O. Schneewind. 2000. LcrV, a substrate for yersinia enterocolitica type III secretion, is required for toxin target into the cytosol of HeLa cells. *J Biol Chem.* 275(47): 36869-75.
29. Maston, J. S., and M.L. Nilles. 2002. M.L. Interaction of the *Yersinia pestis* type III regulatory proteins LcrG and LcrV occurs at a hydrophobic interface. *BMC Microbiol.* 28;2 (1):16.
30. Maston, J. S., and M.L. Nilles. 2001. LcrG-LcrV interaction is required for control of Yops secretion in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol.* 183(17): 5082-91.
31. Meyer, K.F., J.A. Hightower., and F.R. McCrumb. 1974. Plague immunization. VI. Vaccination with the Fraction I antigen of *Yersinia pestis*. *J. Infec t. Dis.* **129 (Suppl.):** S41-S45.
32. 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.
33. Miller, J.F. 1972. Bacterial transformation by electroporation. *Methods in Enzymology.* **235:**372-385.
34. Perry, D. R., and J. D. Fetherston. 1997. *Yersinia pestis*- etilogic agent of plaque. *Clin. Microbiol.* **10:**35-66.
35. Pettersson, J., Holmstrom, A., Hill, J., Leary, S., Frithz-Lindsten, E., von Euler-Materll, A., carlsson, E., Titball, R., forsberg, A., and H. Wolf-Watz. 1999. The

V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation.

Mol Microbiol. 32 (5): 961-76.

36. Russell, P., S. M. Eley., S.E. Hibbs., R.J. Manchee., A.J. Stagg., and R.W. Titball. 1995. A comparison of plague vaccine, USP and EV76 vaccine induced protection against *Yersinia pestis* in a murine model. *Vaccine* **13(16)**: 1551-1556.
37. Ruckdeschel, K., S. Harb., A. Rosggenkamp., M. Hornef., R. Zumbihl., S. Koohler., J. Hesemann., and B. Rouot. 1998. *Yersinia enterocolitica* impairs activation of transcription factor NF-kB involvement in the induction of programmed cell death and in the suppression of the macrophage tumor factor production. *J. Exp. Med.* 187 (7): 1069-79.
38. Rudolph, A.E., J.A. Stuckey., Y. Zhao., H.R. Matthews., W.A. Patton., J. Moss., and J.E. Dixon. 1999. Expression, characterization, and mutagenesis of the *Yersinia pestis* murine toxin, a phospholipase D superfamily member. *J Biol Chem.* 274(17): 11824-31.
39. Salyers, A.A., and D.D. Whitt. 1994. *Yersinia* infections. In: Bacterial pathogenesis: A molecular approach. ASM Press, Washington, D. C.
40. Sambrook, J., E.F. Fritsch., and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press.
41. Simpson, W.J., R.E. Thomas., and T.G. Schwan.1990. Recombinant capsular antigen (fraction 1) from *Yersinia pestis* induces a protective antibody response in BALB/c

- mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **43**:389-396.
42. Sing, A., Roggenkamp, A., Geiger, A.M., and J. Heesmann. 2002. *Yersinia enterocolitica* evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice. *J Immunol.* 1;168 (3):1315-21.
43. Sing, A., Rost, D., Tardovskaia, N., Roggenkamp, A., Weidemann, A., Kirschning, C.J., Aedpfelbacher, M., and J. Heesmann. 2002. *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J Exp Med.* Oct 21;196(8):1017-24.
44. Titball R.W., A.M. Howells., P.C.F. Oyston., and E.D. Williamson.1997. Expression of the *Yersinia pestis* capsular antigen (F1 antigen) on the surface of an *aroA* mutant of *Salmonella typhimurium* induces high level of protection against plague. *Infect. Immun.* **65**:1926-1930.
45. WHO Expert Committee on Plague: 4th report. Passive hemagglutination test. 970WHO Tech. Rep. Series. **447**:23-25.

圖表：

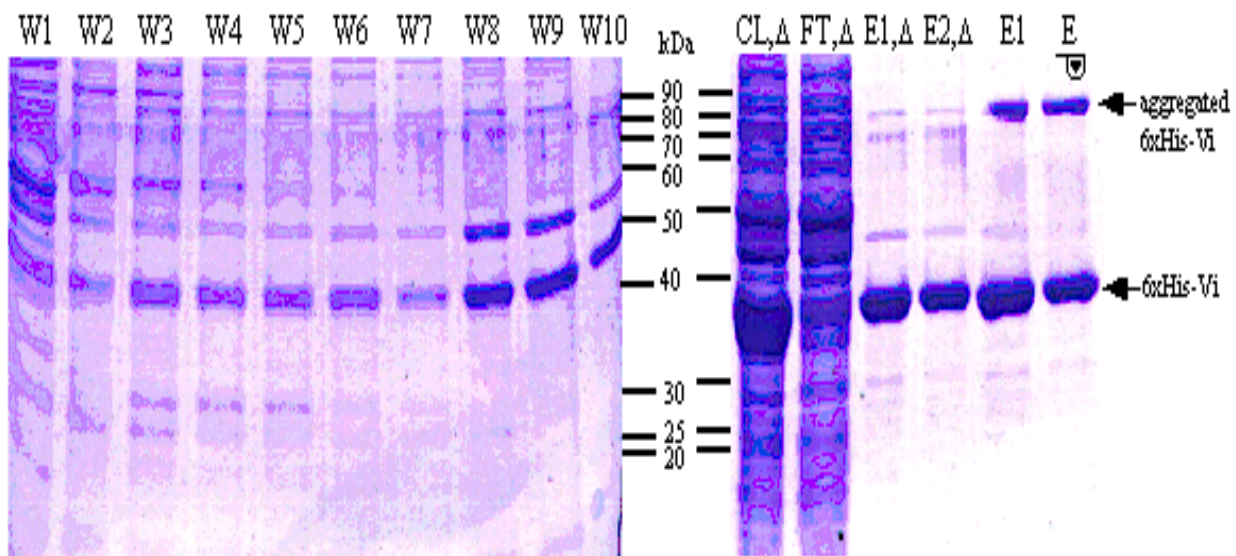
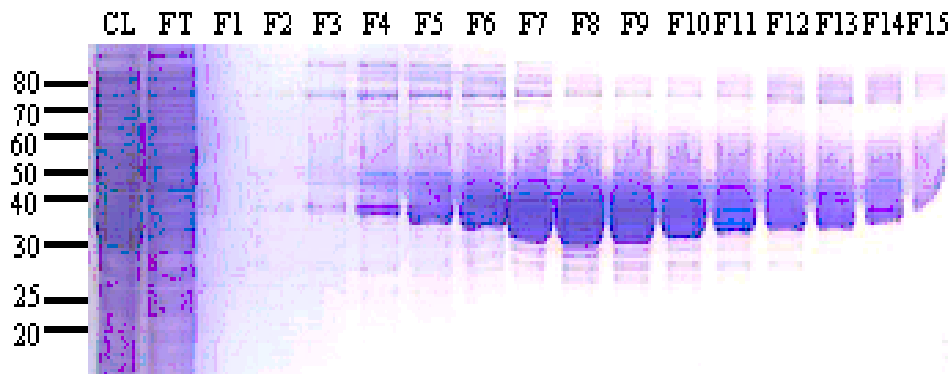


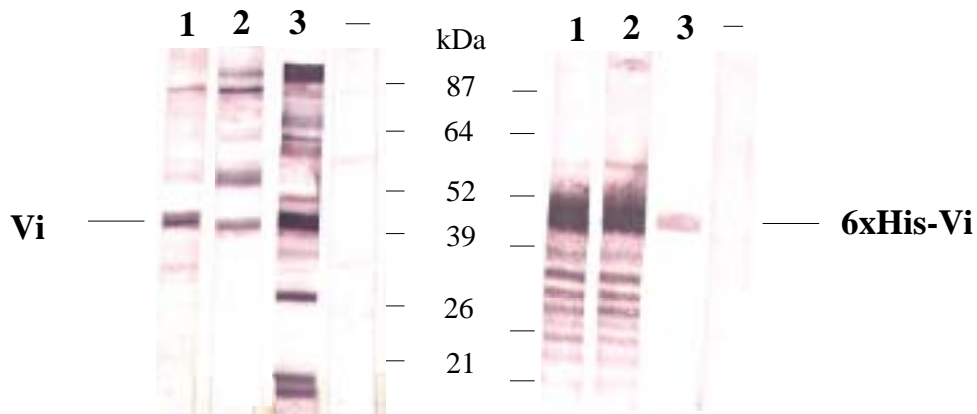
Fig.1 Purification of recombinant 6xHis-Vi fusion protein

Y. pestis Vi antigen was expressed in *E. coli* DH5 as a 6xHis-Vi fusion protein and purified by the Ni-NTA resin affinity chromatography under native condition with varied concentration of imidazole buffers. Proteins were separated by SDS-PAGE and visualized with Coomassie staining. W1& W2: wash without imidazole; W3~W5: 5 mM imidazole wash; W6~W7: 10 mM imidazole wash; W8~W10: 50 mM imidazole wash; CL, D: cell lysate; FT, D: flow-through; E1,D: first 0.2 M imidazole elution; E2, D: second 0.2 M imidazole elution (all above samples were boiling to denature proteins before SDS-PAGE). E1: first 0.2 M imidazole elution; E2: second 0.2 M imidazole elution.

Fig 2. Purification of 6xHis-Vi by FPLC system



6xHis-Vi antigen was purified with FPLC system. Proteins were visualized, by Coomassie staining. CL: cell lysate of pQE30-YPW/DH5 α ; FT: flow-through; F1~F15: 1 ml fractions of gradient of 25 mM~0.3 M imidazole eluent.



A. EV76S

B. 6xHis-Vi

Fig 3. Western blotting analysis of anti-6xHis-Vi polyclonal antiserum

Whole cell lysate of *Y.p.* EV76S (Fig. A) and purified 6xHis-Vi (Fig. B)

were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to NC membrane

for Western blotting. The proteins were probed with different antiserum:

1: mouse polyclonal anti-6xHis-Vi antiserum pool 1

2: mouse polyclonal anti-6xHis-Vi antiserum pool 2

3: mouse polyclonal anti-*Y.p.* antiserum: normal mouse serum

—

表一. 保護性試驗

Concentration of rVi (μ g)	<i>Y. pestis</i> IPM 00703 (cfu)	No.of mice surviving/Total
None	10^3	0/5
None	PBS	5/5
10	10^3	5/5
5	10^3	3/4
2.5	10^3	2/5
1	10^3	0/5

Mice were subcutaneously given with varied doses of recombinant Vi on day 1 and day 30 and challenged on day 60 after the last immunization. Survival was recorded for 14 days.

		50	100
YpsIII/I (Y-P-1)		MIRAYVQNPQHFIKGLKAVVVEQLTGHSSVLSLWQLVKDKMLDLSIKYDFKTSVVFACRVITTSYRGLKRIIAYKLPEDATLKXGVEYQKQLKNGLSR	
Ype (Kim5)		
Ye03 (Y-108)	G.....Q..K.....Q.....D.....	
Ye09 (Y-96)	G.....D.....Q..K.....D.....D.....	
Ye05,27 (Y-5,27)	G.....D.....Q..K.....X.....D.....	
Ye08 (8081)	G.....D.....K.....X.....E.....	
Ye08 (WA-314)	D.....K.....X.....E.....	
Ye08 (NCTC 10938)	D.....K.....R.....	
		150	200
YpsIII/I (Y-P-1)		VKRFVSSPNTQWRLRAFNAVIFPSLTADRINDDTLKVTVDSMNEHGDAKSKGFEELAGELTAEGRKIVYIQARLWKLSSGGTINLHDKSINLMDKMLYQ	
Ype (Kim5)	H.....V.....S.....	
Ye03 (Y-108)	N.....NSD.....	
Ye09 (Y-96)	N.....G.....NSD.....	
Ye05,27 (Y-5,27)	K.....NSD.....	
Ye08 (8081)	K.....Y..NS.....	
Ye08 (WA-314)	K.....S.....E.....	
Ye08 (NCTC 10938)	M.....S.....E.....	
		250	291
YpsIII/I (Y-P-1)		YTLSELPKASAEYVLERMQPTTIQSCSTENK IVSIVKPLSLEKXHTYCALQMLKDSYVYKKNWELSHFATTCSCKSRPLNGLVSGKNTQL	
Ype (Kim5)	VDGS.....D..G..N.....N.....	
Ye03 (Y-108)		--K.....S...K.....N.....LD.....	
Ye09 (Y-96)	K.....N.....LD.....	
Ye05,27 (Y-5,27)		--N.....S...K.....N.....LD.....	
Ye08 (8081)	S...K.....N.....G..A...F.....	
Ye08 (WA-314)	X.....KDELHEVGVLAGAEYQ.....N.....A.....	
Ye08 (NCTC 10938)	X.....KDELHEVGVLAGAEYQ.....N.....A.....	
		326	
YpsIII/I (Y-P-1)		SDITSRPNSAIEALNRFQKVDVSMQRLLDITSGK	
Ype (Kim5)	R	
Ye03 (Y-108)	R	
Ye09 (Y-96)	R	
Ye05,27 (Y-5,27)	R	
Ye08 (8081)	RL	
Ye08 (WA-314)	RL	
Ye08 (NCTC 10938)	RL	

FIG. 1. Comparison of the amino acid sequences of V antigens of different *Yersinia* spp. For the sequence of *Y. pestis* Kim5, see reference 18 and for that of *Y. pseudotuberculosis* serotype III, see reference 4. Yps, *Y. pseudotuberculosis*; Ype, *Y. pestis*; Ye, *Y. enterocolitica*. The strains used for sequencing are in parentheses.

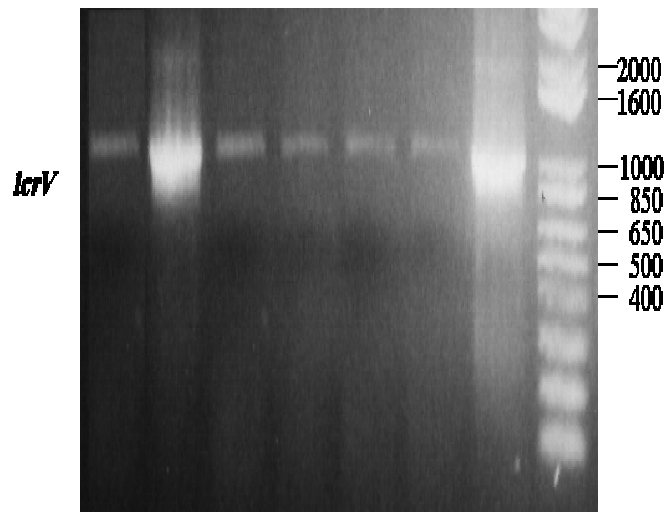
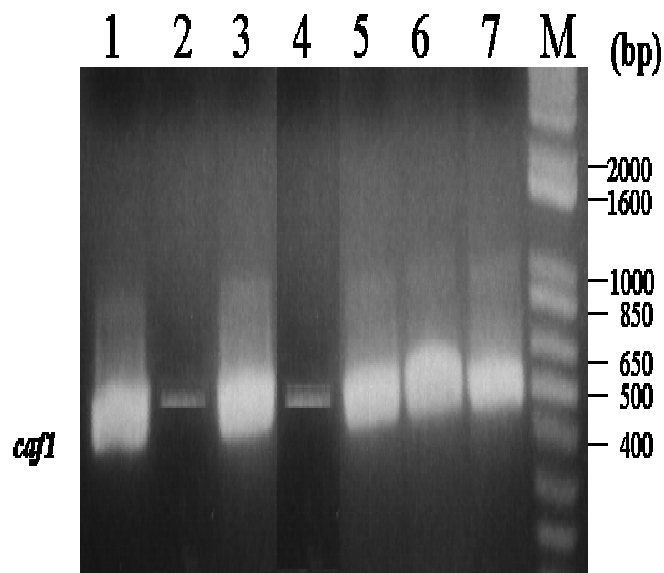


Fig.5. Analysis of virulent genes of varied strains of *Y. pestis* by PCR. A, F1protein gene (*caf1*); B, *lcrV* gene. 1, ATCC23053; 2, EV76G; 3, Miller-2; 4, CDCA3142-1; 5, ATCC23208; 6, ATCC87; 7, EV76S M, 1kb DNA ladder.

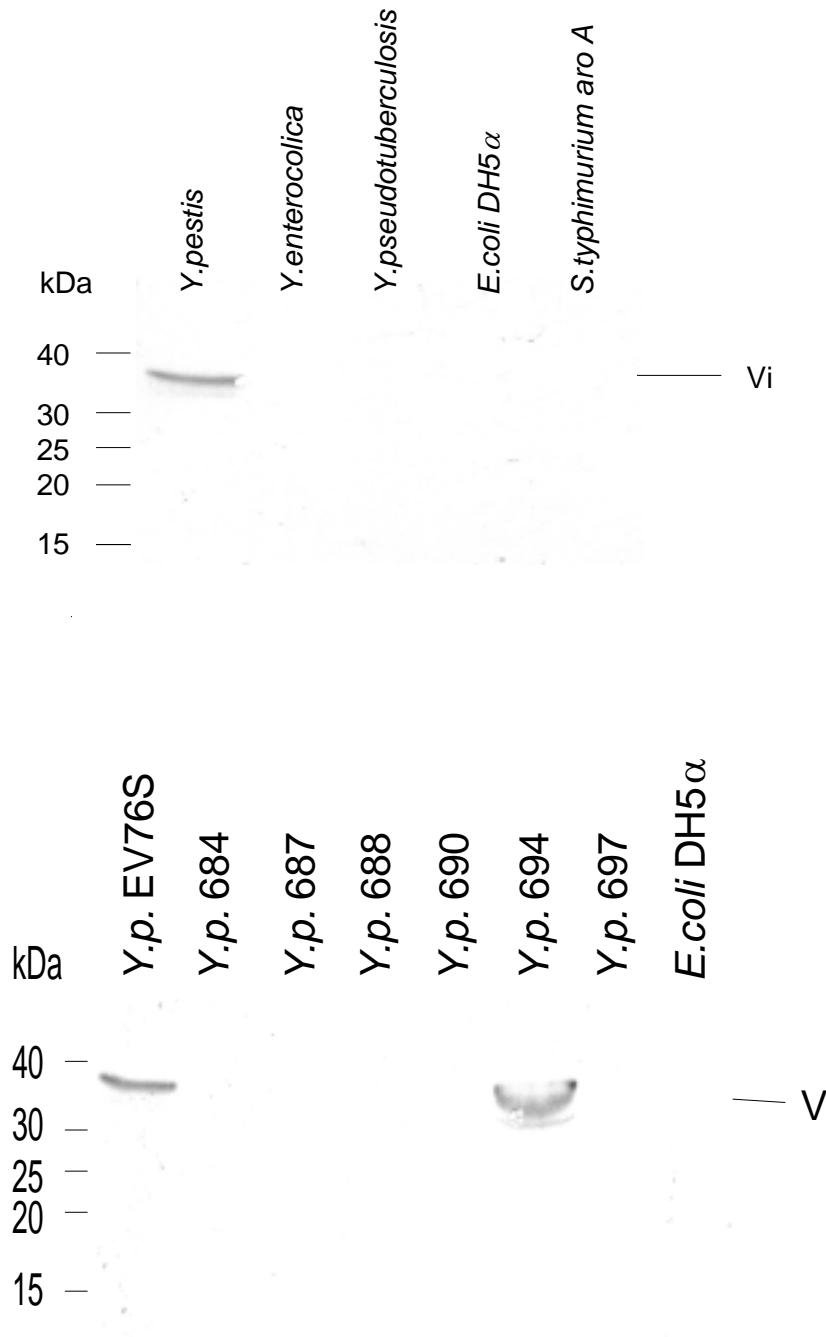


Fig. 6. Immunoblotting analysis of expression of the V protein in bacteria strains A, *Yersinia pestis* strains and *E. coli* strain as indicated. B, *Yersinia spp.* and other genetically closed-related *Enterobacteriaceae* strains

「行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫」

成果資料交付項目一覽表

計畫編號：DC-91-1029

計畫名稱：鼠疫桿菌莢膜多功能蛋白,LcrV 抗原之製備及相關檢測技術之研究

計畫主持人：劉文燦 服務單位：國防大學醫學院預防醫學研究所

聯絡地址：台北郵政 90048~700 信箱 電話：26711082 ext 19841

傳 真：26733025 E-mail：

	項 目	細 項	說 明	請計畫主持人勾填已交項目			
				書面	電腦檔	無	備 註
基 本 資 料 項 目	資料讀我檔案	書面一份 電子檔一份	提供該計畫之簡介、各電腦檔用途及檔名對照表、資料之使用說明等。	V	V		
	成果報告書	書面八份 電子檔一份	書面成果報告一式八份，報告內容電子檔一份。	V	V		
	著作一覽表	書面一份	九十一年度計畫著作一覽表				
	重要研究成果	書面一份	九十一年度重要研究成果	V	V		
	成果產出統計表	書面一份	九十一年度科技計畫重要研究成果產出統計表				
	職級與學歷分析表	書面一份	參與九十一年度計畫研究人力之職級與學歷分析表	V	V		
	空白問卷	書面一份 電子檔一份	該計畫所用之訪視問卷。				
	譯碼簿(CODEBOOK)	書面一份 電子檔一份	該計畫資料之譯碼說明，包括：各題題目描述、各變項名稱及其所對應之欄位、各變數值代碼。				

	電腦資料數據檔	電子檔一份	已經過計畫主持人檢誤過的完整電腦資料數據檔，為確保受訪者隱私權請主持人將可辨認受訪者之姓名、身份證字號、地址、電話等資料抽離。				
	督導或訪員手冊	書面一份 電子檔一份					

行政院衛生署疾病管制局科技研究發展計畫原始數據資料庫
資料讀我檔案

計畫名稱：鼠疫桿菌莢膜多功能蛋白,LcrV 抗原之製備及相關檢測技術之研究

計畫編號：DOH91-DC-1029

執行機構：國防大學醫學院預防醫學研究所

計畫主持人：劉文燦

計畫主持人服務單位：國防大學醫學院預防醫學研究所

計畫主持人職稱：副研究員

研究報告中文摘要：

中文關鍵詞(至少三個)：鼠疫菌；重組 LcrV 蛋白；親和性管柱層析。

致病性 *Yersinia spp.* 細菌中含有一共同、毒力所必需的質體, pYV, 其載譯許多屬於第三型分泌系統的外蛋白 (Yops), 負責將毒力因子傳輸至宿主細胞內, 進行抗磷酸化、抗吞噬作用等機制, 造成細胞骨架重組及細胞死亡。LcrV 是一 37kDa 多功能外蛋白, 參與許多外蛋白的表現調控與分泌, 是鼠疫菌不可或缺的毒力因子。此外, LcrV 亦是一重要的保護性抗原。為取得大量質優抗原以生產 anti-LcrV 抗體, 本研究, 利用 PCR 自鼠疫桿菌選殖 LcrV 抗原基因 (*lcrV*), 於大腸桿菌中大量表現, 抗原以親和性管柱層析 (affinity chromatography) 純化後進行動物免疫, 獲得的 anti-LcrV 抗體; 除了可以專一性辨識細胞中的 LcrV 蛋白, 並且可以區別鼠疫菌與其它腸內菌屬的病原菌。另外, LcrV 重組抗原在小白鼠進行主動免疫, 會產生顯著的保護力, 抵抗鼠疫菌的感染。以上結果證明本研究所獲得 LcrV 抗原、抗體, 不但具有專一性而且兼備有效的抗原免疫保護力。因此, 在發展建構基因晶片、蛋白晶片、紙牒和定量 PCR 等鼠疫快速偵檢平台上, 可以提供良好的基礎。

Research Data Archive, Center for Disease Control, The Executive Yuan,
R.O.C.

Readme file

Project Title: Preparation the outer membrane protein, LcrV of *Yersinia pestis* to generate an anti-LcrV antiserum and the application of related diagnostic technique for plaque

Project Number: DOH91-DC-1029

Executing Institute: Institute of Preventive Medicine

P.I. Position Title: Institute of Preventive Medicine

Principal Investigator (P.I.): Wen-Tssann Liu

P.I. Position Title: Associate Research Fellow

P.I. Institute: National Defense Medical Center

Abstract:

Key words : *Yersinia spp.* ; recombinant LcrV ; pathogenic *Enterobacteriaceae*

The pathogenic *Yersinia spp.* harbors a common plasmid (pYV) essential for virulence. The plasmid encodes a type III secretion system that functions to translocate yersinia outer proteins into host cytosol. Within the cells the Yops carries out the antiphosphorylation and antiphagocytotic mechanisms which resulting in the cytoskeleton rearrangement and apoptosis. The LcrV is a 37kDa protein and has been shown as a protective immunogen and a multifunctional protein relating the regulation of the Yops secretion from the *Yersinia* cells. To obtain LcrV protein, the *lcrV* gene of *Y. pestis* was cloned and expressed in *E. coli*. After affinity gel purification the recombinant LcrV was used as an antigen to raise a rabbit -LcrV antiserum and which was demonstrated able to specifically recognize the predicted size of LcrV protein of *Yersinia* cell lysates in immunoblotting. Further, mice Ip given the LcrV antigen was shown significantly induced protection against lethal plaque infection. Taken together the -LcrV antiserum is suitable to be employed in the detection system to differentiate the *Yersinia spp.* among other's pathogenic *Enterobacteriaceae* such as *Salmonella* and *E. coli*. Also the LcrV protein is a conceivably important sub-unit vaccine candidate for plaque.

Keyword:

資料讀我檔案格式 p3

磁片檔案說明

檔案性質	磁片	檔案名稱	檔案說明	檔案大	修改日
------	----	------	------	-----	-----

	別			小 (bytes)	期
資料讀我檔案		readme.doc			
空白問卷檔案		ques.doc			
訪員手冊檔案		manual.doc			
譯碼簿檔案		codebook.doc			
原始資料數據檔案		data.dbf			
		data.txt			
成果報告檔案		report.doc			

注意事項：

1. 為方便作業，檔案名稱須依上表規定命名，而若遇兩種以上的調查工具，請再附加標示 1、2、3（如範例所示 ques1.doc、ques2.doc），以利區分。
2. 為方便使用者的不同需求，原始資料數據檔案請各交付 dbf 及 txt 檔。
3. 若單一檔案已超過 1.44Mb（相當於一片 3.5”磁片）時，請改用 CD-R 光碟片儲存，將所有檔案燒錄至 CD-R 光碟片後交出(但請不要利用 MO 交付)；若遇燒錄有困難時，亦可將檔案壓縮後交付出，**並請於磁片標籤**

上標示「壓縮檔」。

連絡方式

計畫執行單位：

計畫連絡人：劉文燦

地址：

連絡電話：26711082 ext 19841

傳真：

E-mail：

行政院衛生署科技研究發展計畫原始數據資料庫
資料讀我檔案(範例)

計畫名稱：

計畫編號：DOH91-DC-1012

執行機構：行政院衛生署公共衛生研究所

計畫主持人：洪百薰

計畫主持人服務單位：行政院衛生署公共衛生研究所第一組

計畫主持人職稱：副研究員

研究報告中文摘要：

本檔案請直接利用「[readme.doc](#)」檔直接填寫。內文設定中文字型以「標楷體」、英文字型以「Times New Roman」、字體大小設為「12」；行距設為「單行間距」。

致病性 *Yersinia spp.* 細菌中含有一共同、毒力所必需的質體, pYV, 其載譯許多屬於第三型分泌系統的外蛋白 (Yops), 負責將毒力因子傳輸至宿主細胞內, 進行抗磷酸化、抗吞噬作用等機制, 造成細胞骨架重組及細胞死亡。LcrV 是一 37kDa 多功能外蛋白, 參與許多外蛋白的表現調控與分泌, 是鼠疫菌不可或缺的毒力因子。此外, LcrV 亦是一重要的保護性抗原。為取得大量質優抗原以生產 anti-LcrV 抗體, 本研究, 利用 PCR 自鼠疫桿菌選殖 LcrV 抗原基因 (*lcrV*), 於大腸桿菌中大量表現, 抗原以親和性管柱層析 (affinity chromatography) 純化後進行動物免疫, 獲得的 anti-LcrV 抗體; 除了可以專一性辨識細胞中的 LcrV 蛋白, 並且可以區別鼠疫菌與其它腸內菌屬的病原菌。另外, LcrV 重組抗原在小白鼠進行主動免疫, 會產生顯著的保護力, 抵抗鼠疫菌的感染。以上結果證明本研究所獲得 LcrV 抗原、抗體, 不但具有專一性而且兼備有效的抗原免疫保護力。

因此，在發展建構基因晶片、蛋白晶片、紙牒和定量 PCR 等鼠疫快速偵檢平台上，
可以提供良好的基礎。

中文關鍵字：鼠疫菌；重組 LcrV 蛋白；親和性管柱層析。

中文關鍵詞(至少三個)：

Research Data Archive, Center for Disease Control, The Executive Yuan, R.O.C.

Readme file

Project Title: Preparation the outer membrane protein, LcrV of *Yersinia pestis* to generate an anti-LcrV antiserum and the application of related diagnostic technique for plaque

Project Number: DOH91-DC-1029

Excuting Institute: Institute of Preventive Medicine

Principal Investigator (P.I.): Wen-Tssann Liu

P.I. Position Title: Associate Research Fellow

P.I. Institute: National Defense Medical Center

Abstract:

The pathogenic *Yersinia spp.* harbors a common plasmid (pYV) essential for virulence. The plasmid encodes a type III secretion system that functions to translocate yersinia outer proteins into host cytosol. Within the cells the Yops carries out the antiphosphorylation and antiphagocytotic mechanisms which resulting in the cytoskeleton rearrangement and apoptosis. The LcrV is a 37kDa protein and has been shown as a protective immunogen and a multifunctional protein relating the regulation of the Yops secretion from the *Yersinia* cells. To obtain LcrV protein, the *lcrV* gene of *Y. pestis* was cloned and expressed in *E. coli*. After affinity gel purification the recombinant LcrV was used as an antigen to raise a rabbit -LcrV antiserum and which was demonstrated able to specifically recognize the predicted size of LcrV protein of *Yersinia* cell lysates in immunoblotting. Further, mice Ip given the LcrV antigen was shown significantly induced protection against lethal plaque infection. Taken together the -LcrV antiserum is suitable to be employed in the detection system to differentiate the *Yersinia spp.* among other's pathogenic *Enterobacteriaceae* such as *Salmonella* and *E. coli*. Also the LcrV protein is a conceivably important sub-unit vaccine candidate for plaque.

Keyword:

磁片檔案說明

檔案性質	磁片別	檔案名稱	檔案說明	檔案大小 (bytes)	修改日期
資料讀我檔案	A	readme.doc	資料讀我檔	36,572	
空白問卷檔案	A	ques1.doc	病患問卷	28,672	1999/6/2 PM09:21
	A	ques2.doc	家屬問卷	39,571	1999/6/2 PM08:26
訪員手冊檔案	A	manual1.doc	病患問卷訪員 手冊	33,125	1999/7/2 PM08:36

			手冊		PM08:36
	A	manual2.doc	家屬問卷訪員 手冊	36,487	1999/7/1 2 PM08:26
譯碼簿檔案	A	codebook1.doc	病患問卷譯碼 簿	56,135	1999/10/ 12 PM09:26
	A	codebook2.doc	家屬問卷譯碼 簿	57,542	1999/10/ 12 PM09:26
原始資料數據 檔案	B	data1.dbf	病患問卷原始 資料	1,367,6 22	2000/2/1 3 AM08:2 1
	B	data1.txt	病患問卷原始 資料	67,622	2000/2/1 3 AM08:3 0
	C	data2.dbf	家屬問卷原始 資料	1,265,2 32	2000/2/1 3 AM08:2 6
	C	data2.txt	家屬問卷原始 資料	65,232	2000/2/1 3

					AM08:3 5
成果報告檔案	D	report.doc		264,23 1	2000/6/1 8 AM08:2 6

注意事項：

4. 為方便作業，檔案名稱須依上表規定命名，而若遇兩種以上的調查工具，請再附加標示 1、2、3（如範例所示 ques1.doc、ques2.doc），以利區分。
5. 為方便使用者的不同需求，原始資料數據檔案請各交付 dbf 及 txt 檔。
6. 若單一檔案已超過 1.44Mb（相當於一片 3.5”磁片）時，請改用 CD-R 光碟片儲存，將所有檔案燒錄至 CD-R 光碟片後交出(但請不要利用 MO 交付)；若遇燒錄有困難時，亦可將檔案壓縮後交付出，**並請於磁片標籤上標示「壓縮檔」。**

連絡方式

計畫執行單位：行政院衛生署公共衛生研究所

計畫連絡人：洪百薰

地址：台北縣新莊市長青街 2 號

連絡電話：(02)2997-8616 ext 317

傳真：(02)2276-2156

E-mail：xxxx@mail.tpih.tpg.gov.tw

九十一年度計畫著作一覽表

計畫名稱：鼠疫桿菌莢膜多功能蛋白,LcrV 抗原之製備及相關檢測技術之研究

主 持 人：劉文燦 計畫編號：DOH91-DC- 1029

列出貴計畫於本年度中所有計畫產出於下表，包含已發表或已被接受發表之文獻、已取得或被接受之專利、擬投稿之手稿 (manuscript) 以及專著等。

「計畫產出名稱」欄位請依「臺灣醫誌」參考文獻方式撰寫；「產出形式」欄位則填寫該產出為期刊、專利、手稿或專著等，舉例如下：

序號	計 畫 產 出 名 稱	產出形式	SCI*
1	Travell JG, Rinzler S, Herman M: Pain and disability of shoulder and arm. <i>J Am Med Asso</i> 1942;120:417-22.	期刊	✓
2			
3			
4			
5			
6			
7			

8			
9			
10			

* SCI: Science Citation Index , 若發表之期刊為 SCI 所包含者, 請打「✓」。

九十一年度計畫重要研究成果

計畫名稱：鼠疫桿菌莢膜多功能蛋白,LcrV 抗原之製備及相關檢測技術之研究

主持人：劉文燦 計畫編號：DOH91-DC-1029

1.計畫之新發現或新發明

目前，與鼠疫相關的快速偵檢技術包含 real-time PCR、細胞流測定法(Flow cytometry) 基因晶片、蛋白晶片、紙牒。除了 PCR 篩檢核酸外其餘均在蛋白階程上應用抗原抗體來進行檢測，因此，抗原抗體的良窳可以說是應用這些偵檢技術成敗的關鍵。

由本計劃所建構、生產製備的 LcrV 抗原抗體，實驗證明其專一性及抗體效價均可以用來區別鼠疫菌與其他腸內病原菌，適用於鼠疫偵檢。配合利用 F1 與其它毒力因子，本所正積極開發生物感應晶片、蛋白晶片等快速偵檢技術。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

使民眾對細菌性生物恐怖武器有普遍的認識和了解，平時注意維持居家環境整潔，降低去除有利鼠類滋生環境，阻斷病原菌在鼠蚤、老鼠和人類之間的散播傳播，防範天然性鼠疫的發生。而若面臨危真正的生物恐怖攻擊時，亦能進行適當的處置預防措施，避免不必要的恐慌。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

鼠疫監控，是一經常不容間斷的持續性工作，是防治鼠疫最重要的一環。因此具備完備的偵檢系統，是達成監控目的不可或缺的要素。目前所利用的被動血球凝集試驗（PHA）檢測血清抗體效價的方法，需耗費大量的人力及時間而且實驗變因繁雜，易導至假陽性。因此，在進行例行性檢體篩檢時，可考慮利用快速偵檢如生物感應晶片等操作簡便的方法先行大量篩檢後，疑似病例再以 PHA 確認，藉以提高監控效能。

九十一年度科技計畫重要研究成果產出統計表

計畫名稱：鼠疫桿菌莢膜多功能蛋白,LcrV 抗原之製備及相關檢測技術之研究

主持人：_____

計畫編號：DOH91-DC-

1029

(係指執行本九十一年度計畫之所有研究產出成果)

科技論文篇數			技術移轉			技術報告		
發表地	國內	國外	類 型	經 費	項數	篇		
點						技術創新		
類						項		
型								
期刊論文	篇	篇	技術輸入	千元	項	技術服務 項		
研討會 論文	篇	篇	技術輸出	千元	項	專利權 (核准)	國內	項
							國外	項
專 著	篇	篇	技術擴散	千元	項	著作權 (核准)	國內	項
							國外	項

[註]：

期刊論文：指在學術性期刊上刊登之文章，其本文部分一般包括引言、方法、結果及討論，並且一定有參考文獻部分，未在學術性期刊上刊登之文章（研究報告等）與博士或碩士論文，則不包括在內。

研討會論文：指參加學術性會議所發表之論文，且尚未在學術性期刊上發表者。

專著：為對某項學術進行專門性探討之純學術性作品。

技術報告：指因從事某項技術之創新、設計及製程等研究發展活動所獲致的技術性報告並未公開發表者。

技術移轉：指技術由某個單位被另一個單位所擁有的過程。我國目前之技術移轉包括下列三類：一、技術輸入。二、技術輸出。三、技術擴散。

技術輸入：藉僑外投資、與外國技術合作、投資國外高科技事業等方式取得先進之技術引進國內者。

技術輸出：指直接供應國外買主具生產能力的應用技術、設計、顧問服務及專利等。我國技術輸出方式包括整廠輸出、對外投資、對外技術合作及顧問服務等四種。

技術擴散：指政府引導式的技術移轉方式，即由財團法人、國營事業或政府研究機構將其開發之技術擴散至民間企業之一種單向移轉（政府移轉民間）。

技術創新：指研究執行中產生的技術，且有詳實技術資料文件者。

參與九十一年度計畫研究人力之職級與學歷分析表

計畫名稱：鼠疫桿菌莢膜多功能蛋白,LcrV 抗原之製備及相關檢測技術之研究

主 持 人：劉文燦 計畫編號：DOH91-DC- 1012

學歷別 職級	學歷別							合 計
	博士	碩士	學士	專科	博士 研究生	碩士 研究生	其他	
第 一 級		1						1
第 二 級	1							1
第 三 級		2		1				3
第 四 級								
第 五 級								
第 六 級								
合 計	1	3		1				5

(註)

第一級：研究員、教授、主治醫師、簡任技正，若非以上職稱則相當於博士滿三年、碩士滿六年、或學士滿九年之研究經驗者。

第二級：副研究員、副教授、助研究員、助教授、總醫師、薦任技正，若非以上職稱則相當於博士、碩士滿三年、學士滿六年以上之研究經

驗者。

第三級：助理研究員、講師、住院醫師、技士，若非以上職稱則相當於碩士或學士滿三年以上之研究經驗者。

第四級：研究助理、助教、實習醫師，若非以上職稱則相當於學士或專科畢業目前從式研究發展，經驗未滿三年者。

第五級：指目前在研究人員之監督下從事與研究發展有關之技術性工作，且具備下列資格之一者屬之：具初（國）中、高中（職）、大專以上畢業者或專科畢業目前從式研究發展，經驗未滿三年者。

第六級：指在研究發展執行部門參與研究發展有關之事務性及雜項工作者，如人事、會計、祕書、事務人員及維修、電機人員等。

計畫編號：DOH91-DC-1012

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

計畫名稱

研究報告

執行機構：國防大學醫學院預防醫學研究所

計畫主持人：

研究人員：

執行期間： 年 月 日至 年 月 日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

XXXX 問卷原始資料數據檔案譯碼簿(Codebook)

一般注意事項:

問卷題目編號	變項名稱	變項屬性	起訖欄	變項說明與注意事項	備註

研究編號：S010101

姓名：莊示範

地址：222 台北縣深坑鄉萬順村 1 鄰一心路一號

電話：02-12345678

虛擬問卷

1. 您的出生日期： 1) 民前 2) 民國 ____ 年 ____ 月
____ 日
2. 您的身高：____ 公分
3. 您的體重：____ 公斤
4. 您目前的職業：____
5. 您是否有經醫師診斷過患有糖尿病？
1) 沒有〔跳答第6題〕 2) 有，已經 ____ 年了
- 5-1. 您現在是否有用藥物治療？
1) 無 2) 有，已經 ____ 年了。
6. 您過去有喝茶的習慣嗎？(每週至少 1 次，並且持續半年以上，才算)
0) 沒有〔跳答第 7 題〕 1) 有
- 6-1. 那您現在還有喝茶習慣嗎？ 0) 不喝了 1) 還喝
- 6-2. 若過去或現在有喝茶習慣，一般您都喝哪種茶？ 1) 綠茶
2) 紅茶 3) 其他

6-3. 平常您喝茶時是否有加糖或奶精？

- 0)都沒加 1)只加糖 2)只加奶精或牛奶 3)兩者
都加

6-4. 大部分是喝濃茶還是淡茶？ 1)濃茶 2)普通 3)淡
茶

6-5. 平均而言，您多久喝一次茶？ 1)每週喝 1-2 次 2)每週
喝 3-4 次
3)每週喝 5-6 次 4)每天 1-2 次 5)每天 3-5 次 6)每
天 6 次以上

6-6. 平均而言每天喝幾杯？幾泡？幾 c.c.？

老人茶：_____泡(一泡約120c.c.)； 鐵罐裝：罐(約350c.c.)

小茶杯：_____杯(一杯約150c.c.)； 錫箔裝：_____包(約
300c.c.)

馬克杯：_____杯(一杯約250c.c.)

6-7. 那加起來您喝茶共喝了_____年

7. 請問您的親人是否有經醫師診斷過患有糖尿病？

	祖父	祖母	父	母	子女	兄弟	姐妹
人數							

訪視員簽名：_____

× × × × 問卷原始資料數據檔案譯碼簿(Codebook)範例

一般注意事項:

- 1.標籤姓名、地址、電話可能有錯誤，若發現訪員已在上頭以藍色原子筆更正時，請直接在檔案上做更正。

問卷題目編號	變項名稱	變項屬性	起訖欄	變項說明與注意事項	備註
	FNO	字元型	1-7	<p>研究編號(問卷首頁左上角的檢查編號)</p> <p>第一碼：S=深坑鄉，P=平溪鄉</p> <p>第二~三碼：村別</p> <p>深坑鄉：01 萬順村、02 深坑村、03 昇高村、04 土庫村、05</p>	

				<p>阿柔村</p> <p>平溪鄉：01 薯榔村、02 白石村、</p> <p>03 菁桐村、04 平溪村、05</p> <p>石底村、06 嶺腳村、07 東</p> <p>勢村、08 平湖村、09 南山</p> <p>村、10 新寮村、11 十分</p> <p>村、12 望古村</p> <p>第四~五碼：鄰別</p> <p>例：第一鄰為 01；第十二鄰為</p> <p>12</p> <p>第六~七碼：戶別</p> <p>按地址路名、門牌號碼由小至大</p> <p>排序後編碼。</p>	
1	BROC	字元型	8	<p>出生日期</p> <p>1=民前 2=民國</p>	
1	BIRTH	日期型	9-16	<p>出生日期</p> <p>依民國輸入：月月/日日/年年</p>	
2	HEIGH	數值型	17-1 9	<p>身高</p>	

				單位：cm，小數點以下四捨五入， 999=未填	
3	WEIGHT	數值型	20-2 2	體重 單位：kg，小數點以下四捨五入， 999=未填	
4	JOB	字元型	23	職業分類 請查「中華民國職業標準分類」(詳見附件)一至九大項之細項後輸入 1=0/1 專門性、技術性及有關人員 2=2 行政主管人員 3=3 監督及佐理人員 4=4 買賣工作人員 5=5 服務工作人員 6=6 農、林、漁、牧、狩獵工作人員 7=7/8/9 生產及有關工作人員 8=X 職業不能分類之工作者 9=Y 現役軍人	依照行政院主計處 76年6月編印之「中華民國職業標準分類」

			<p>0=未填</p> <p>例如：若問卷填入”建築師”，依據「職業標準分類表」，找到”建築師”的’小類’碼屬’0-21’，則輸入’1’即可。</p>	
--	--	--	---	--

問 卷 題 目 編 號	變項名稱	變項屬 性	起訖 欄	變項說明與注意事項	備註
5	DMYR	數值型	24-2 5	糖尿病 請輸入患者得病年數：00=沒有 88=不知道 99=未填	若 答 「 沒 有」,則 跳至第 6 題
5-1	DM_DRU G	字元型	26	糖尿病有無吃藥 0=沒有 1=有 9=未填 跳答者 輸入空白	
5-1	DMDRU GYR	數值型	27-2 8	吃藥年數 (單位：年，有小數點時請四捨五 入後取整數) 99=未填	

6	TEA	字元型	29	喝茶的習慣 0=沒有 1=有 9=未填	若 答 「 沒 有」,則 跳至第 7 題
6-1	TEA_NO W	字元型	30	現在還喝茶 0=沒有 1=有 9=未填	
6-2	TEA_K	字元型	31	喝哪種茶 0=沒喝 1=綠茶 2=紅茶 3=花 茶 4=水果茶 5=沒有固定 6= 花果茶 9=未填	
6-3	TEA_A	字元型	32	有加糖或奶精 0=沒喝 1=只加糖 2=只加奶精 或牛奶 3=兩者都加 4=都沒加 9=未填	
6-4	TEA_HL	字元型	33	喝濃茶還是淡茶 0=沒喝 1=濃茶 2=普通 3=淡 茶 9=未填	

6-5	TEA_FR EQ	字元型	34	<p>多久喝一次</p> <p>0=沒喝 1=每週喝 1-2 次 2=每週喝 3-4 次</p> <p>3=每週喝 5-6 次 4=每天 1-2 次</p> <p>5=每天 3-5 次</p> <p>6=每天 6 次以上</p>	
6-6	TEA_CC	數值型	35-3 8	<p>每天喝幾 c.c. ?</p> <p>將每天各種容器的總量相加(註： 老人茶以每泡 120c.c. 計算之)</p> <p>0000=沒喝；9999=未填</p>	
6-7	TEA_YR	數值型	39-4 0	<p>喝茶喝了幾年</p> <p>直接填入年數；00=沒喝 99=未填</p>	
7	FAMILY	字元型	41-4 7	<p>親人是否有經醫師診斷過患有糖尿病</p> <p>請填人數；0=沒有</p> <p>例如：「父」欄下方填"1"、「兄弟」欄下方填"3"其餘均填"0"，則請輸入"0010030"</p>	

	FPG	數值型	48-5 2	研究個案血糖值 Fasting Plasma Glucose (FPG) test 單位為 mg / dl , 計數至小數點下 第一位	
--	-----	-----	-----------	--	--