

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

整合型計畫：生物性危害因子認知與調查

子計畫(一)：*Klebsiella pneumoniae* 溶血蛋白的生化特性研究及細胞

毒性試驗

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：90-IS-07

執行期間：90年1月1日至90年12月31日

計畫主持人：蘇哲弘

共同主持人：陳連輝

計畫參與人員：蘇哲弘、陳連輝

執行單位：工業安全衛生系

中華民國 91 年 02 月 25 日

Klebsiella pneumoniae 溶血蛋白酶的生化特性研究 及細胞毒性試驗

蘇哲弘 陳連輝

嘉南藥理科技大學工業安全衛生系

前言

許多格蘭氏陽性菌 (G⁺) 會產生 thiol- activated hemolysins; 包括 streptolysin O、neumolysin、perfringolysin、cerolysin、listeriolysin, 及 cytolysins [1]。在格蘭氏陰性菌 (G⁻) 的 *K. pneumoniae* 亦被偵測到對氧不穩定的 hemolysin-kleobolysin; *K. pneumoniae* 對人類紅血球細胞而言, 被認為是非溶血性的 [2]; 但是由尿液、糞便、痰、水泡、血液中分離出來的菌株中, 研究結果顯示其對兔血紅血球皆具選擇性的溶血活性 [3]; 利用純化的 hemolysin 則觀察到其對綿羊、狗、人、老鼠之紅血球具輕微溶血活性。此一新 lysin 為氧的不穩定者, 且為 thiol-activated [4, 5]。培養基的組成對溶血反應有些微影響; 因為 serum 或 cholesterol 的存在會抑制溶血反應 [6]; 雙價陽離子也會干擾溶血反應, 溫度超過 60 °C, 10 min 會使 crude hemolysin 的活性降到 0, 但純化的 hemolysin 則對熱為穩定的 [7]。

依溶血特性, 目前將 hemolysin 分成兩大類, 一為 α -hemolysin, 其溶血活性在 blood agar plate (BAP) 上顯示由綠色到棕色且常隨伴有相似著色窄帶環繞 [8]; 多年來, 一般認為乃是經由 hydrogen peroxide 將 hemoglobin 氧化, 形成 methaemo-globin 而造成綠色反應 [9]。但此一機制仍有疑點 [10]; 另一類為 β -hemolysin 其溶血活性在 BAP 上則呈現明顯透明帶, 目前已知當 *Streptococcus pneumoniae* 在無氧狀況培養下, 可展示 β -haemolysis 的活性, 且此活性會因有氧且低溫 4~8°C 的條件而加強 [11,12]。

雖然 kleobolysin 已被純化, 分子量大小及化學性質也都有了初步的研究 [13]。但至目前為止, 只有本實驗室直接由 *K. pneumoniae* 之染色體 DNA 中將溶血基因選殖出來, 且此段選殖之基因可在 *E. coli* 中表現, 並得到一分子量大約為 21 kDa 的溶血蛋白酶 [14], 此蛋白質與 kleobolysin 是否為同一種 hemolysin 則有待研究比較, 而 *K. pneumoniae* hemolysin 的特性更需要進一步的探討, 以便與其他細菌產生之 hemolysin 作比較, 並確認 hemolysin 在 *K. pneumoniae* 的致病機制中是否也扮演了某種重要的角色; 因為 *K. pneumoniae* 常是化膿性肝膿瘍及尿路感染的致病菌, 所以本研究除了檢測此重組 hemolysin 的一般生化特性外, 並將此重組 hemolysin 作用於人類膀胱癌細胞株 TSGH8301, 藉以了解細胞毒性的情形。

我們所使用的菌株，是由成大醫院病人檢體中分離篩選到的 *Klebsiella pneumoniae*。用來進行形質轉換(transformation) 的宿主細胞 *E. coli* BL21 : *hsdS gal (λ cIts857 ind1 Sma7 nin5 lacUV-77 gen1)*，LB 完全培養基 (Luria-Bertani medium) 含 1% Bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract 1% NaCl。質體 DNA 的抽取及質體 DNA 在大腸桿菌之轉形作用 (transformation)皆參照 Sambrook 等人所著 Molecular cloning。

(二) 重組蛋白之構築與純化

溶血蛋白酶前向引導子(forward primer)序列為 5'-AACGAGCTCATTGCATTGCCACTG-3'，其中有限制酶 *SalI* 的切割位置，而逆向引導子(reverse primer)序列為 5'-CCGCCTCGAGTCCGATGATAGAGA-3'，其中限制酶的切位為 *XhoI*。將 PCR 產物分別與載體 pET-21b 相互接合，完成重組蛋白基因之構築。之後，將融合基因藉由轉形作用(transformation) 送入 *E. coli* BL21 中大量表現。含質體的 *E. coli* BL21 培養至 OD₆₀₀ 為 0.6 時，經 1mM IPTG 誘導至少 6 小時，以 sonicator 將菌體打破，用 0.45um 的濾膜過濾，離心 13000rpm，45 分鐘，取上清液，因此蛋白質之 C 端因融合了六個 Histidine，所以可用 Ni²⁺ resin 進行親和性分離管柱 (Affinity chromatography) 予以純化。

(三) 生化特性分析

將純化之 hemolysin 4°C 低溫處理 30 分鐘，以 1 ml 綿羊血為受質，檢測 hemolysin 之活性。並檢測 hemolysin 表現最佳活性的溫度、pH 及二價離子對 hemolysin 活性之影響。

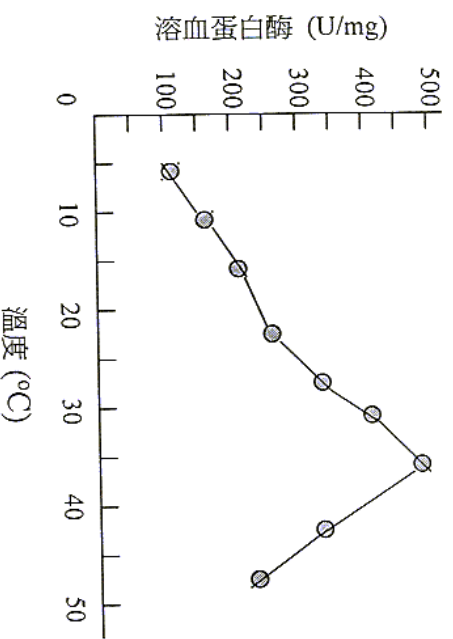
(四) 細胞、培養基和培養條件

人類肝癌細胞株及人類膀胱癌細胞株，分別培養於 10 % 胎牛血清的基本培養液(minimal essential medium)，每毫升培養液另含 100 單位之青黴素(penicillin)，100 微克之鏈黴素(streptomycin)及 2 毫克之碳酸氫鈉(NaOH)，培養瓶置於 37°C 含 5%二氧化碳之培養箱內培養。

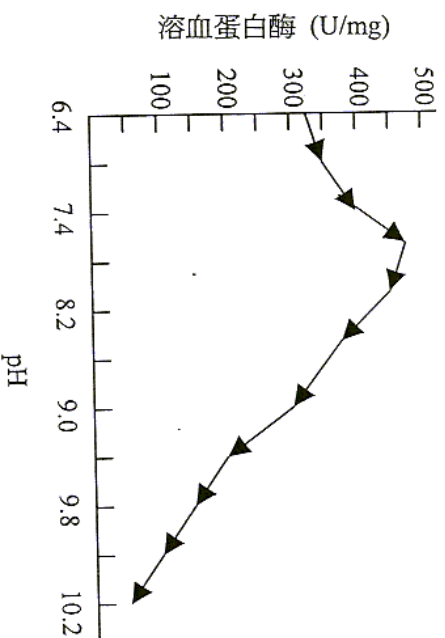
結果與討論

自醫院的一株 *K. pneumoniae*，將其染色體構築在載體 pBR322 上，並進行一連串的篩檢工作，順利的選殖出 hemolysin 基因。經美國國家生物技術資料中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI)資料庫 (database)比對後，並未找到與之有任何相似性或同源性的基因。故本實驗室選殖出之 hemolysin 基因與目前所有文獻報告之溶血蛋白酶，可能大不相同。為了了解其與目前所知之溶血蛋白酶之差異性，所以檢測其生化特性。將純化之 hemolysin 置入含綿羊血之固態培養基 (BAP)，其呈現明顯透明帶，而不產生由綠色到棕色的著色帶；將純化之 hemolysin 以 4°C 低溫處理 30 分鐘，發現其活性可由---提升至---；隨後並測得 hemolysin 表現活性之最佳溫度及 pH，分別為 37°C (圖一)及 8.2 (圖二)，而其活性普遍受二價離子抑制，但不受 Ca²⁺ 之影響，而 Fe²⁺ 卻可以提升其活性(表一)，綜合以上之結果，顯示此 hemolysin 並不屬於 α-hemolysin，依其生化特性應屬於 β-hemolysin-like。

將純化的重組 hemolysin 作用於人類膀胱癌細胞株 TSGH8301(圖三)，經 6 小時作用後，細胞形態上有明顯的改變，而在作用 3、6、9、12、15、18 小時，測細胞的存活率，顯示此 hemolysin 確實對細胞造成毒性。



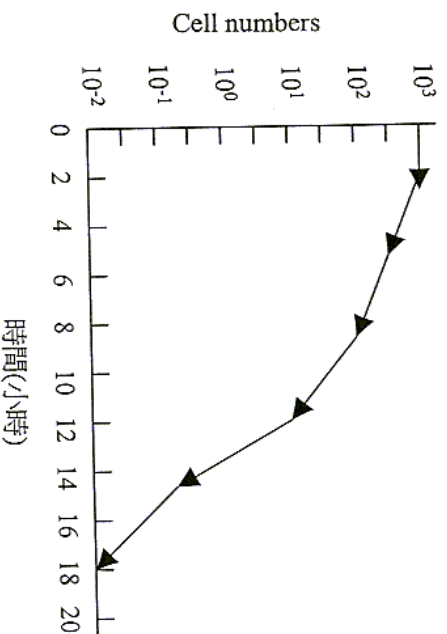
圖一溶血蛋白酶先以4°C處理30分鐘，pH 7.8，測溫度對其活性的影響



圖二溶血蛋白酶先以4°C處理30分鐘，溫度37°C，測 pH 對其活性的影響

表一溶血蛋白酶先以4°C處理30分鐘，在 pH 7.8，溫度37°C條件下，二價離子對其活性的影響

二價離子	溶血蛋白酶活性(U/mg)	二價離子	溶血蛋白酶活性(U/mg)
Mg	250	Fe	550
Cu	220	Zn	300
Zn	270	Cd	70
Hg	40	Ni	350
Ca	460	Mn	280
Ba	180	Co	250



圖三溶血蛋白酶先以4°C處理30分鐘，以1mg/ml的濃度與 TSGH8301細胞作用

本研究承蒙嘉南藥理科技大學校長王昭雄博士之支持與鼓勵(90-IS-07)，得以完成，謹此謝忱。

參考文獻

- [1] Albesa I. 1989; “*Klebsiella pneumoniae* haemolysin adsorption to red blood cells.” *J. Appl. Bacteriol.* 67:263-266.
- [2] Smith J.A., and H. H. Ngui-Yen. 1980; “Augmentation of clostridial partial haemolysis by some bacterial species.” *Can. J. Microbiol.* 26:893-903.
- [3] Albesa I., Barberis L.I., Pajaro M.C., Farnochi M.C., and Eraso A.J. 1985; “A thiol-activated hemolysin in Gram-negative bacteria.” *Can. J. Microbiol.* 31:297-300.
- [4] Albesa I., Barberis L.I., Pajaro M.C., and Eraso A.J. 1985; “Haemolytic activity of *Klebsiella pneumoniae* on rabbit red cells.” *Rev. Latinoam. Microbiol.* 27:83-87.
- [5] Johnson M.K. 1972; “Properties of purified pneumococcal hemolysin.” *Infect. Immun.* 6:755-760.
- [6] Albesa I., Barberis L.I., and Pajaro M.C. 1985; “New oxygen labile hemolysin in *Klebsiella pneumoniae*.” *Rev. Argent. Microbiol.* 17:33-39.
- [7] Wiseman G.M. 1975; “The hemolysins of *Staphylococcus aureus*.” *Bacteriol. Rev.* 39:317-344.
- [8] Rouff K.L., 1991; “The genus *Streptococcus*-medical. In: Balows A, Tuper H, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H, Eds.” *The Prokaryotes*, 2nd Edn. Berlin: Springer Verlag. 1450-1464.
- [9] Cole R.I. 1914; “The production of methemoglobin by *pneumococci*.” *J. Exp. Med.* 20:363.
- [10] Parker M.T. 1983; “*Streptococcus* and *Lactobacillus*. In: Parker M.T. Ed. *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology*” *Virology and Immunity*, 7th Edn. London: Edward Arnold. 173-217.
- [11] Lorian V., Popoola B. 1972; “*Pneumococci* producing beta hemolysis on agar.” *Appl. Microbiol.* 24:44-47.
- [12] Canvin J.R., Paton J.C., Boulnois G.J., Andrew P.W., and Mitchell T.J. 1997; “*Streptococcus pneumoniae* produces a second haemolysin that is distinct from pneumolysin.” *Microbiol. Pathogenesis.* 22:129-132.
- [13] Barberis L.I., Eraso A.J., Pajaro M.C., and Albesa I. 1986; “Molecular weight determination and partial characterization of *Klebsiella pneumoniae* hemolysins,” *Can. J. Microbiol.* 32:884-888.
- [14] 蘇哲弘,張淑玉,陳連輝,張敏政. 1998; “*Klebsiella pneumoniae* hemolysin 基因的選殖.” 第十三屆全國技術及職業教育研討會論文集醫護類, 83-90.