

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CNBT9504

計畫名稱：創傷弧菌蛋白分解酵素疫苗檢測技術之開發

執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 年 12 月 31 日

整合型計畫

個別型計畫

計畫總主持人：

計畫主持人：陳昱仲

子計畫主持人：

計畫參與人員：

中華民國 96 年 03 月 09 日

# 創傷弧菌蛋白分解酵素疫苗檢測技術之開發

計畫主持人：陳昱仲



## 摘要

創傷弧菌(*Vibrio vulnificus*)是一株常存在海產食品的高致死率的致病菌，近年來有許多國家也出現相當多的病例，美國疾病管制中心指出，自 1996 至 2002 年由於弧菌感染的病例已增加了 126% (Centers for Disease Control and Prevention)，而台灣的臨床病例在近年也不斷地持續增加。除此之外，且此菌感染發病病程相當快，往往發病 2 天後患者會休克，進而導致死亡。由於蛋白質分解酵素(EmpV)在創傷弧菌是一個細胞的外毒素蛋白，且是一個可能的致病因子，因此蛋白質分解酵素(EmpV)可能可用來當為抗原，去誘導體內產生抗體或去製造抗體以獲得避免創傷弧菌感染保護力的最佳選擇。在本計劃中，我們已將創傷弧菌的蛋白質分解酵素基因(*empV*)予以選殖，藉由蛋白質表現載體將蛋白質分解酵素(EmpV)進行大量表現生產，希望將此重組蛋白純化後作為往後進行疫苗保護力(protection)的分析或製備抗體作為檢測病患是否遭受創傷弧菌感染的試劑。

## 前言

創傷弧菌(*Vibrio vulnificus*)是一株常存在海產食品的高致死率的致病菌，近年來有許多國家也出現相當多的病例，包括美國、墨西哥、韓國及日本等(Bisharat et al., 1999; Hlady and Klontz, 1996; Paik et al., 1995)，此菌的感染途徑常常是經由傷口侵入或由飲食造成感染，感染後所造成的臨床症狀主要有三種：1.原發性敗血症(primary septicemia)：其感染原因主要是食入生的或未煮熟的海鮮類食品，創傷弧菌經由腸胃道而感染，臨床上病人會有發熱、寒顫、嘔吐等症狀，常常導致菌血症及敗血性休克，其死亡率高達 50%以上(Blake et al., 1979; Klontz et al., 1988; Chuang et al., 1992; Shapiro et al., 1998)，原發性敗血症也常常伴隨著肌肉軟組織及皮膚的壞死(Klontz et al., 1988; Chuang et al., 1992)，除此之外，且此菌感染發病病程相當快，往往發病 2 天後患者會休克，進而導致死亡(Blake et al., 1979; Klontz et al., 1988; Chuang et al., 1992)。2.傷口感染(wound infection)：通常是由於傷口直接碰觸含有創傷弧菌的海水或海產食品，或是由於處理海產食品時遭刺傷而感染，感染部位會有紅腫及水泡，之後很快造成組織壞死、潰爛或嚴重的蜂窩性組織炎，病程若惡化會發展成嚴重的次發性敗血症而導致死亡，死亡率約為 25% (Blake et al., 1979; Klontz et al., 1988; Chuang et al., 1992; Shapiro et al., 1998)。3. 腸胃炎：此症狀較輕微，常導致腹痛及下痢，往往會自然復原。創傷弧菌的感染宿主的特異性一直是造成感染的主要因素，其感染的宿主往往具有潛在的慢性疾病包括肝病或免疫系統低弱，都是容易感染的宿主(Tacket et al., 1984)。近來，美國疾病管制中心指出，自 1996 至 2002 由於弧菌感染的病例已增加了 126% (Centers for Disease Control and Prevention)，而台灣的臨床病例在近年也不斷地持續增加(Chuang et al., 1992; Chang et al., 1994; Hsueh et al., 2004)。

雖然目前有關於創傷弧菌的致病機制仍未清楚，但可能的致病因子也有許多研究報告提出，在夾膜(capsule polysaccharide)方面，夾膜可說是目前創傷弧菌造成感染最重要的因子(Yoshida, et al., 1985 ; Zuppardo and Siebeling, 1998)，它主要是保護菌體避免菌體遭受免疫細胞的破壞，且夾膜本身也會造成體內過度的免

疫反應造成休克，引起死亡；其它可能的致病因子尚有脂解酵素(lipase)、磷酸脂解酵素(phospholipase)、核酸分解酵素(DNase) (Kreger and Lockwood, 1981; Olive et al., 1986)、type IV leader peptidase/N-methyltransferase (Paranjpye et al., 1998)、細胞毒素 cytolysin (Gray and Kreger, 1985)、溶血蛋白 hemolysin III (Chen et al., 2004b)、鉀離子收蛋白 TrkA (Chen et al., 2004a)、蛋白質分解酵素 EmpV (Chuang et al., 1997)等，在這些致病因子中，蛋白質分解酵素是最重要的外毒素蛋白。由於蛋白質分解酵素(EmpV)在創傷弧菌是一個細胞的外毒素蛋白，且是一個可能的致病因子，因此蛋白質分解酵素(EmpV)是一個可以用來當為抗原，誘導體內產生抗體或製造抗體以獲得避免創傷弧菌感染保護力的最佳選擇。

## 目的

在本計劃中，我們計劃將創傷弧菌的蛋白質分解酵素基因(*empV*)予以選殖，藉由蛋白質表現載體將蛋白質分解酵素(EmpV)進行大量表現生產，再將此重組蛋白純化後作為往後進行疫苗保護力(protection)的分析或製備抗體作為檢測病患是否遭受創傷弧菌感染的試劑。

## 材料與方法

### 菌株與質體

海洋弧菌(*Vibrio vulnificus*)是由敗血症病人所分離，用來進行蛋白分解酵素基因選殖的菌株；大腸桿菌(*E. coli* XL1B與*E. coli* BL21)分別用來進行核酸選殖的寄主與蛋白質表現的寄主，pET21 質體被用來當作蛋白質表現的載體。

### 培養基與生長條件

所有的菌株均以 37°C 培養在LB培養基，當需要添加其它藥品時，培養基中抗生素含量為 100 µg/ml，培養液IPTG最終濃度為 1 mM。

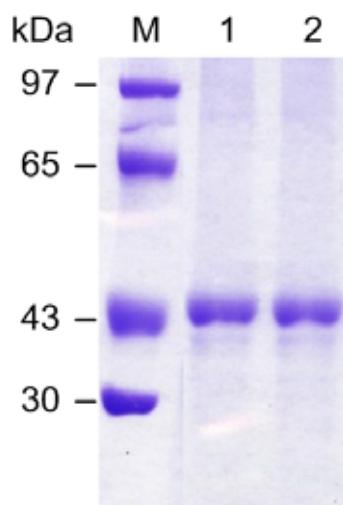
## 大量表現與純化蛋白分解酵素

以蛋白分解酵素基因序列為模板設計引子，藉由聚合酵素鏈反應(PCR)進行蛋白分解酵素基因的擴增，將蛋白分解酵素基因接合至表現載體上，並於大腸桿菌內進行蛋白質表現。聚合酵素鏈反應(PCR)的條件為：反應總體積為 50  $\mu$ l，創傷弧菌染色體模版濃度為 10 ng，引子濃度為 50 pmole，deoxynucleotide triphosphate 濃度為 2.5 mM, 10X 反應緩衝液 5  $\mu$ l, 聚合酵素(Taq DNA polymerase)為 0.5 U，反應循環共 30 次，每次循環條件為：變性條件為 95  $^{\circ}$ C, 1 min，黏和條件為 55  $^{\circ}$ C, 1 min，延長條件為 72  $^{\circ}$ C, 2 min，將聚合酵素鏈反應產物以限制酵素進行切割後接至表現載體 pET21，重組質體於大腸桿菌 *E. coli* BL21 大量表現，並藉由 Ni 管柱純化含有 6 個 His 的重組蛋白(Novagen)。

## 結果與討論

### 蛋白分解酵素 EmpV 的表現與純化

利用引子由創傷弧菌染色體擴增蛋白分解酵素 *empV*，將擴增的蛋白分解酵素 *empV* 以限制切位(*EcoRI* 及 *XhoI*)接合至表現載體 pET21，並將重組質體轉形於 *E. coli* BL21，於 1 mM IPTG 下進行誘導蛋白質的表現，重組蛋白質 EmpV 再藉由 Ni 親和性管柱進行純化，純化結果如下圖



M: protein marker; lane 1 and 2: purified EmpV protein

圖中顯示重組的蛋白分解酵素 EmpV (~50 kDa)已純化完成。



## 參考文獻

- Bisharat, N., Agmon, V., Finkelstein, R., Raz, R., Ben-Dror, G., Lerner, L., Soboh, S., and Colodner, R. (1999) Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *Lancet* **354**: 1421-1424.
- Blake, P.A., Merson, M.H., Weaver, R.E., Hollis, D.G., and Heublein, P.C. (1979) Disease caused by a marine *Vibrio*: Clinical characteristics and epidemiology. *N Engl J Med* **300**: 1-5.
- Bonner, J.R., Coker, A.S., Berryman, C.R., and Pollock, H.M. (1983) Spectrum of vibrio infections in a Gulf Coast community. *Ann Intern Med* **99**: 464-469.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2003) Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses-selected sites, United States, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep* **52**: 340-343.
- Chang, J.J., Sheen, I.S., Peng, S.M., Chen, P.C., Wu, C.S., and Leu, H.S. (1994) *Vibrio vulnificus* infection: report of 8 cases and review of cases in Taiwan. *Chang Gung Med J* **17**: 339-346.
- Chen, Y.C., Chuang, Y.C., Chang, C.C., Jeang, C.L., and Chang, M.C. (2004a) A K<sup>+</sup> uptake protein, TrkA, is required for serum, protamine, and polymyxin B resistance in *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **72**: 629-636.
- Chen, Y.C., Chang, M.C., Chuang, Y.C., and Jeang, C.L. (2004b) Characterization and virulence of hemolysin III from *Vibrio vulnificus*. *Curr Microbiol* **49**: 175-179.
- Chuang, Y.C., Yuan, C.Y., Liu, C.Y., Lan, C.K., and Huang, A.H. (1992) *Vibrio vulnificus* infection in Taiwan: report of 28 cases and review of clinical manifestations and treatment. *Clin Infect Dis* **15**: 271-276.
- Chuang, Y.C., Chang, T.M., and Chang, M.C. (1997) Cloning and characterization of the gene (*empV*) encoding extracellular metaloprotease from *Vibrio vulnificus*.

**Gene** **189:** 163-168.

- Gray, L.D., and Kreger, A.S. (1985) Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **48:** 62-72.
- Hlady, W.G., and Klontz, K.C. (1996) The epidemiology of Vibrio infection in florida, 1981-1993. *J Infect Dis* **173:** 1176-1183.
- Hsueh, P.R. Lin, C.Y., Tang, H.J., Lee, H.C., Liu, J.W., Liu, Y.C., and Chuang Y.C. (2004) Vibrio vulnificus in Taiwan. *Emerg Infect Dis* **10:** 1363-1368.
- Klontz, K.C., Lieb, S., Schreiber, M., Janowski, H.T., Baldy, L.M., and Gunn, R.A. (1988) Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections: Clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. *Ann Intern Med* **109:** 318-323.
- Kreger, A., and Lockwood, D. (1981) Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **33:** 583-590.
- Kumamoto, K.S., and Vukich, D.J. (1998) Clinical infections of *Vibrio vulnificus*: a case report and review of the literature. *J Emerg Med* **16:** 61-66.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Griffin, P.M., and Tauxe, R.V. (1999) Food-releated illness and death in the United States reply to Dr. Hedberg. *Emerg Infect Dis* **5:** 841-842.
- Oliver, J.D., Wear, J.E., Thomas, M.B., Warner, M., and Linder, K. (1986) Production of extracellular enzymes and cytotoxicity by *Vibrio vulnificus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **5:** 99-111.
- Paik, K.W., Moon, B., Park, C.W., Kim, K.T., Ji, M.S., Choi, S.K., Rew, J.S., and Yoon, C.M. (1995) Clinical characteristics of ninety-two cases of *Vibrio vulnificus* infections. *Kor J Infect Dis* **27:** 355-365.
- Paranjpye, R.N., Lara, J.C., Pepe, J.C., Pepe, C.M., and Strom, M.S. (1998) The type IV leader peptidase/N-methyltransferase of *Vibrio vulnificus* controls factors required for adherence to Hep-2 cells and virulence in iron-overloaded mice. *Infect Immun* **66:** 5659-5668.

Shapiro, R.L., Altekruze, S., Hutwagner, L., Bishop, R., Hammond, R., Wilson, S., Ray, B., Thompson, S., Tauxe, R.V., Griffin, P.M., and Vibrio Working Group (1998) The role of gulf coast oysters harvested in warmer months in *Vibrio vulnificus* infections in the United States, 1988-1996. *J Infect Dis* **178**: 752-759.

Tacket, C.O., Brenner, F., and Blake, P.A. (1984) Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. *J Infect Dis* **149**: 558-561.

Yoshida, S., Ogawa, M., and Mizuguchi, Y. (1985) Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **47**: 446-451.

Zuppardo, A.B., and Siebeling, R.J. (1998) An epimerase gene essential for capsule synthesis in *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **66**: 2601-2606.

