

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫編號：CN9722

計畫名稱：巨噬細胞毒殺因子之選殖

執行期間：97 年 1 月 1 日至 97 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 98 年 02 月 27 日

研究動機與研究問題

創傷弧菌的致病因子有夾膜、脂解酵素、磷酸脂解酵素、核酸分解酵素、蛋白質分解酵素及細胞毒素。致病菌在感染人類時，往往可以逃過寄主免疫系統的破壞，其中巨噬細胞是一種非專一性的免疫細胞，常扮演著第一道防線，近年來已有許多研究報告指出，許多致病菌（如 *Shigella*、*Salmonella* 及 *Yersinia*）能藉由細胞毒素而導致巨噬細胞進行凋亡（Navarre and Zychlinsky, 2000; van der Velden et al., 2000; Mills et al., 1997; Zychlinsky et al., 1994），以達到感染的目的，然而有關創傷弧菌是如何毒殺巨噬細胞的機制目前仍然不清楚。

本計畫要藉由轉位子製備基因突變株庫，以巨噬細胞毒殺分析篩選對巨噬細胞毒殺能力下降的突變株，期望能尋找出有效的致病因子當作設計殺菌藥物的標地蛋白，能更有效更快速殺死創傷弧菌或抑制其快速生長以達到治癒效果，並進一步尋找有效抗原蛋白以製備疫苗，以期能達到預防創傷弧菌感染的目的。

研究方法

菌株的培養

E. coli DH5 α 與創傷弧菌均以 LB 培養基或培養液進行菌株培養，培養溫度在 37°C 下培養。

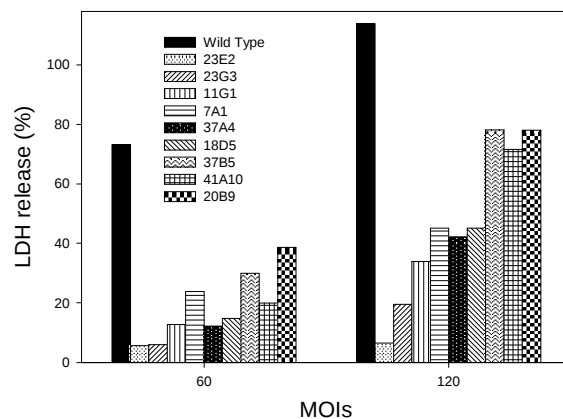
巨噬細胞細胞毒殺分析

將巨噬細胞分注至 96 孔盤，取野生株與菌體聚集缺失突變株加入 96 孔盤內於不同時間反應後，2,000 rpm 離心後取上清液，加入 LDH 的反應受質反應後，以 ELISA 讀取儀分析細胞毒殺結果。

結果

對巨噬細胞毒殺能力缺失的突變株之篩選

藉由 LDH 的釋放量來分析轉位子突變株對巨噬細胞的毒殺能力，以 MOI 60 或 120 的感染條件下，從轉位子突變株庫中共篩選出 9 株對巨噬細胞毒殺能力缺失的突變株（如下圖），這些突變株對巨噬細胞的毒殺能力均比野生株來的低，由這些結果顯示，共篩選出 9 株對巨噬細胞毒殺能力缺失的突變株。



參考文獻

- Mills, S.D., Boland, A., Sory, M.P., van der Smissen, P., Kerbouch, C., Finlay, B.B., and Cornelis, G.R. (1997) *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12638-12643.
- Navarre, W.W, and Zychlinsky, A. (2000) Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol* **2**: 265-73.
- van der Velden, A.W., Lindgren, S.W., Worley, M.J., and Heffron, F. (2000) *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Infect Immun* **68**: 5702-5709.
- Zychlinsky, A., Kenny, B., Ménard, R., Prévost, M.C., Holland, I.B., and Sansonetti, P.J. (1994) IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **11**: 619-627.