

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

以表現基因庫選殖幽門螺旋桿菌環丙沙星相關抗藥

機制

Cloning and Characterization of Ciprofloxacin-
Resistant Gene in *Helicobacter pylori*

黃絹婷

Juan-Ting Huang

指導教授：王錦堂 博士

Advisor: Jin-Town Wang, Ph.D.

中華民國100年6月

June, 2011

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：以表現基因庫選殖幽門螺旋桿菌環丙沙
星相關抗藥機制

英文題目：Cloning and Characterization of Ciprofloxacin-
Resistant Gene in Helicobacter pylori

本論文係黃韻晴君 (學號 R9844511) 在國立臺灣大學
微生物學所完成之碩 (博) 士學位論文，於民國 100 年 6 月 21 日承
下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

王錦堂

(簽名)

(指導教授)

黃信達

李財坤

林維春

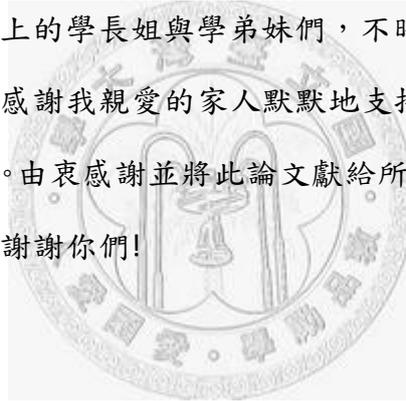
系主任、所長

陳川犁

(簽名)

致謝

兩年的碩士班時光過去，回首這段過程，真的是喜累交織呢。首先感謝指導教授在實驗上所給予的建議與支持，讓我們進行實驗無後顧之憂。也非常感謝口試委員們認真且熱心的指教，真的讓我受益良多。謝謝實驗室熱心開朗的學長姐們，營造實驗室有趣又和諧的氣氛，在實驗以及生活都給了我許多啟發，令我增長不少見聞，也讓我這段期間之中遇到些困難，總能重新滿載活力再出發，另外實驗之餘點心時間的快樂時光也是令人回味呢。也感謝碩士班的好夥伴們在這不算長的時間裡大家互相砥礪，在大報告之前，晚餐時聚在一起苦中作樂一番、給予意見與互相打氣。另外，也很謝謝微生物所所上的學長姐與學弟妹們，不時地關心、聊天，總讓人感到窩心。最後非常感謝我親愛的家人默默地支持、鼓勵與包容，讓我能全心全意的完成學業。由衷感謝並將此論文獻給所有在這兩年過程中關心、鼓勵我的每一個人，謝謝你們！



摘 要

幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) 為外型呈螺旋狀、嗜微好氧環境的革蘭氏陰性桿菌。全世界約有 50% 的受感染人口，此菌的感染也被發現與胃部癌症有顯著的相關性，因此世界衛生組織於 1994 年將幽門螺旋桿菌列為第一類致癌物質。目前隨著第一、二線藥物的菌株耐受性案例增加，臨床治療多選擇以喹諾酮類 (quinolone) 合併其他藥物做為第三線治療，但陸續有報導指出在歐亞地區的喹諾酮類抗藥菌株比例高達 10-33%，並有逐年攀升的趨勢。先前研究發現此類抗藥菌株主要會在喹諾酮藥物的目標位置旋轉酶 (gyrase) 次單元-GyrA 上的胺基酸 67 至 106 之間的區域有胺基酸的改變，致使藥物與旋轉酶間的親和力下降，藉此提高菌株的抗藥性，此區被定義為喹諾酮抗藥決定區域 (quinolone resistance-determining region, QRDR)。然而初步分析近年來於臺大醫院所收集的臨床抗藥菌株，發現約 45% 的喹諾酮類藥物-環丙沙星 (ciprofloxacin) 抗藥菌株並不具有 GyrA QRDR 的突變，這意味著可能存在其他的機制來調控菌株的抗藥能力。本實驗首先檢測台大醫院抗藥性菌株的最小抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC)，然後選擇 NTUH-CIP3 與 11，最小抑菌濃度分別為 8 $\mu\text{g/ml}$ 與 2 $\mu\text{g/ml}$ 的抗藥性菌株，再分別定序 *gyrA* 與 *gyrB* 並利用自然轉型 (natural transformation) 的方法排除旋轉酶突變，最後選定一株 NTUH-CIP3 做為本實驗的主要研究材料。之後將主要研究菌株 NTUH-CIP3 之基因體進行部分酵解 (partial digestion)，構築表現基因庫，保守估計此基因庫可達 90% 的涵蓋比例。之後以環丙沙星篩選基因庫，得到 3 個抗藥菌落，並定序此 3 株載體上的內插片段，皆涵蓋一段 *oorA* 的序列，之後為了評估 *oorA* 在抗藥機制上的重要性，利用自然轉型的方法將三株篩選自 NTUH-CIP3 的質體送入藥物感受性菌株 HP26695 當中，結果並沒有明顯提升感受性菌株的藥物耐受程度。因受限於表現基因庫本身的篩選限制，之後利用二維凝膠電泳分析臨床抗

藥菌株，比較環丙沙星刺激前後的蛋白質體差異，挑選蛋白質表現差異 4 倍以上的蛋白質，以質譜分析後比對資料庫的結果，環丙沙星刺激下可能影響 NTUH-CIP3 的呼吸作用與異戊二烯 (isoprenoid) 類化合物的合成路徑。

關鍵字: 幽門螺旋桿菌; 喹諾酮; 環丙沙星



Abstract

Helicobacter pylori is a spiral gram-negative, microaerophilic bacterium, which causes type B gastritis and is associated with peptic ulcer. Furthermore, some studies have reported the association between *H. pylori* infection and the development of gastric carcinoma and lymphoma. Currently, the failure rate of *H. pylori* eradication with first or second-line therapy accelerated worldwide mainly due to *H. pylori* resistance to antibiotics. For this reason, quinolone-based triple therapy is used to eradicate *H. pylori* infection. Several studies have shown that the mutation in region between amino acids 67 to 106 (also called quinolone resistance-determining region, QRDR) of GyrA which is one of the gyrase subunits resulted in the decreased affinity between antibiotic and gyrase and enhanced the drug resistance. Analysis of ciprofloxacin (CIPRO)-resistant strains collected from National Taiwan University Hospital showed that ~45% resistant strains did not have mutations in GyrA QRDR, implying that there could be other mechanisms involved in quinolone resistance. Two strains, NTUH-CIP3 and 11 which minimum inhibitory concentration of CIPRO were 8 µg/ml and 2 µg/ml respectively, without gyrase mutations confirmed by *gyrA* and *gyrB* sequencing and natural transformation of *gyrA* and *gyrB* to a CIPRO susceptible strain were adopted in this

study. The expression library of NTUH-CIP3 strain was constructed and utilized for identification of CIPRO resistance genes. The coverage of this library was estimated to 90%. Three different clones were selected from the library by CIPRO selection. All three clones covered *oorA*, a 2-oxoglutarate:acceptor oxidoreductase. In order to confirm the role of *oorA* in resistance to CIPRO, we transformed the 3 selected plasmids into CIPRO susceptible strain HP26695. Nevertheless, there was no CIPRO-resistant transformed strain. Because of the limitation of expression library, we used 2D-PAGE to compare proteome differences between CIPRO treated and non-CIPRO treated NTUH-CIP3. Then, we selected 4 fold increasing and decreasing spots, analysed the protein ID by MALDI Q-TOF, and blasting to protein databases. The protein data implied that the stimulation of quinolone might affect NTUH-CIP3 isopenoid-synthesis pathway and TCA cycle.

Keywords: *Helicobacter pylori*;quinolone;ciprofloxacin

目 錄 (Contents)

論文口試委員審定書.....	I
致 謝	II
摘 要	III
ABSTRACT.....	V
第 1 章 導論 (INTRODUCTION)	1
第 2 章 材料與實驗方法 (MATERIALS AND METHODS)	5
2.1 材料.....	5
2.2 實驗方法	8
I. 幽門螺旋桿菌的培養	8
II. 抗生素感受性測試 (antimicrobial susceptibility testing)	8
III. 自然轉型作用 (natural transformation).....	9
IV. 建構表現基因庫 (construction of a expression library)	10
V. 幽門螺旋桿菌的 RNA 萃取 (RNA extraction).....	17
VI. qRT-PCR (quantitative real time polymerase chain reaction)	18
VII. 二維電泳 (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis /2D-PAGE).....	19
第 3 章 結果 (RESULTS).....	22
3.1 挑選臺大醫院對環丙沙星 (ciprofloxacin) 耐受性之臨床菌株.....	22
3.2 4 株臨床菌株之環丙沙星感受性試驗 (antimicrobial susceptibility testing)	22
3.3 臺大醫院臨床環丙沙星抗藥性菌株 <i>gyrA</i> QRDR 序列定序及自然轉型試驗.....	22
3.4 建構表現基因庫 (construction of a expression library)	24
3.4.1 基因體 DNA 的部分酵解與 3-5 kb DNA 片段回收.....	24
3.4.2 幽門螺旋桿菌表現基因庫的建構與其代表性.....	24
3.4.3 篩選表現基因庫 (screening the expression library).....	25
3.4.4 篩選後菌株之再次轉型作用 (retransformation of selected strains)....	26
3.4.5 DNA 序列分析 (DNA sequencing analysis)	26
3.4.6 將攜帶 <i>oorA</i> 之 pBK-CMV 自然轉型作用送入 quinolone 感受型菌株 <i>Helicobacter pylori</i> 26695.....	27
3.5 非 <i>GyrA</i> QRDR 突變之環丙沙星臨床抗藥菌株的 <i>GyrA</i> RNA 表現量.....	27
3.5.1 比對環丙沙星感受型菌株以及 NTUH-CIP3 的 <i>gyrA</i> 啟動子序列.....	27

3.5.2 利用反轉錄-定量 PCR 的方式，比較典型抗藥與非典型抗藥機制兩組臨床菌株 <i>gyrA</i> RNA 的表現差異	28
3.6 二維凝膠電泳分析臨床抗藥菌株的蛋白質體表現 (proteomic analysis of the resistant strain by two dimensional gel electrophoresis)	28
第 4 章 討論 (DISCUSSION)	30
4.1 表現基因庫的基因涵蓋度與篩選	30
4.2 非 QRDR 突變之環丙沙星抗藥菌株的 <i>GYRA</i> RNA 表現量差異	31
4.3 二維凝膠電泳分析臨床抗藥菌株的蛋白質體	32
4.3.1 甲基丁四醇磷酸化路徑 (methylerythritol phosphate (MEP) pathway) 與代謝作用的調控 (metabolic regulation)	32
4.3.2 甲基化作用 (methylation)	33
4.3.3 二維電泳與質譜儀分析及其限制性	34
4.4 結論	35
第 5 章 參考資料 (REFERENCE)	36
第 6 章 附 錄	39
表 1 台大醫院所分離出 15 株臨床對環丙沙星具耐受性幽門螺旋桿菌菌株之初步檢測最小抑菌濃度與 <i>gyrA</i> 定序。	39
表 2 利用自然轉型的方法，分別將帶有臨床菌株 <i>gyrA</i> 或 <i>gyrB</i> 的 TA 載體轉型至環丙沙星感受性菌株 <i>Helicobacter pylori</i> 26695。	40
表 3 臺大醫院臨床抗環丙沙星幽門螺旋桿菌菌株 <i>gyrA</i> QRDR 的序列比對結果。	41
表 4 臺大醫院臨床幽門螺旋桿菌菌株對環丙沙星的感受性試驗。	41
表 5 臺大醫院幽門螺旋桿菌臨床菌株利用自然轉型作用、序列定序以及環丙沙星的感受性試驗，所得到之再次確認結果。	42
表 6 表現基因庫之大腸桿菌菌株的環丙沙星感受性試驗。	43
表 7 利用環丙沙星篩選表現基因庫所得到最小抑菌濃度上升的大腸桿菌菌株。	44
表 8 將攜帶 <i>oorA</i> 之 pBK-CMV 自然轉型作用送入 quinolone 感受型菌株 <i>Helicobacter pylori</i> 26695，並檢測其 CIPRO MIC 以評估 <i>oorA</i> 於非典型抗 quinolone 機制中所扮演的角色。	45
表 9 NTUH-CIP3 經過 1 µg/ml 環丙沙星刺激之後，表現量上升 4 倍的蛋白質。	46
表 10 NTUH-CIP3 經過 1 µg/ml 環丙沙星刺激之後，表現量下降 4 倍的蛋白質。	46
圖 1 環丙沙星藥物結構及大腸桿菌抗藥機制示意圖。	47

圖 2	喹諾酮抗藥決定區域及幽門螺旋桿菌 <i>GyrA</i> 突變熱點位置。.....	48
圖 3	<i>Helicobacter pylori</i> NTUH-CIP3 genomic DNA 以不同酵素濃度反應 20 分鐘後，跑電泳之結果。.....	49
圖 4	<i>Helicobacter pylori</i> NTUH-CIP3 genomic DNA 以稀釋 10 倍的 <i>Sau3AI</i> 做部分酵解後反應 20 分鐘，大量回收後跑電泳之結果。.....	50
圖 5	MIC 提升的 3 株質體，利用質體上的 T3 與 T7 引子做聚合酵素連鎖反應，三株質體的內插片段大小確認。.....	51
圖 6	經由表現基因庫所篩選出的 3 株質體內插片段與 <i>Helicobacter pylori</i> 26695 和 J99 比對後的基因位置圖。.....	52
圖 7	比對環丙沙星感受型菌株與 NTUH-CIP3 <i>gyrA</i> 啟動子序列。.....	53
圖 8	利用反轉錄-定量 PCR (qRT-PCR) 偵測 RNA 的方式，比較典型抗藥機制與非典型抗藥機制兩組臨床菌株 <i>gyrA</i> RNA 的表現差異。.....	54
圖 9	沒有經過環丙沙星作用的 NTUH-CIP3 二維凝膠電泳圖。.....	55
圖 10	經由 1 $\mu\text{g/ml}$ 環丙沙星刺激後的 NTUH-CIP3 二維凝膠電泳圖。.....	55
圖 11	環丙沙星刺激前後，蛋白質表現相差 4 倍以上之 5 種蛋白質，經比對主要參與在甲基丁四醇磷酸路徑與呼吸作用循環之示意圖。.....	56



第1章 導論 (Introduction)

幽門螺旋桿菌 (*Helicobacter pylori*) 最早於 1982 年由 Barry Marshall 與 Robin Warren 兩位醫師自慢性胃炎與消化性潰瘍病患的胃黏膜分離出來[1]。此菌為外型呈螺旋狀的革蘭氏陰性桿菌，菌體長約 2.5-5 μ m，寬約 0.5-1 μ m，嗜微好氧的環境 (N₂:80%, CO₂:15%, O₂:5%)，須將細菌培養在 37°C 的血液培養瓊脂約三至五天。此外因菌體末端帶有 4-6 條端鞭毛，使得細菌具有高度移動的能力 [2,3]。

幽門螺旋桿菌的基因體 (genome) 大小約 1.7 Mb，細菌具有能夠吸收外來的 DNA 片段或是其它幽門螺旋桿菌的 DNA 後與細菌基因體進行交換的特性，因此在長期的細菌感染過程中，細菌能進行基因體內自發性突變[4,5]。

幽門螺旋桿菌由多種致病因子決定細菌對於宿主的致病能力，如: urease、flagella、adhesins、neutrophil activating proteins、Vacuolating cytotoxin 以及 CagA protein 等等。其中尿素酶 (urease) 與鞭毛 (flagella) 為主要決定菌株能否於胃黏膜組織形成穩定菌落的兩個重要因子，並且對後續的感染過程中扮演重要的角色。其中尿素酶被認為會於細胞的表面作用，將尿素 (urea) 分解成氨 (ammonia)、二氧化碳以及水，藉此中和細胞周圍的酸性環境，以利菌體生長[6]。鞭毛則可幫助菌體穿過胃壁黏液層，使之能夠附著於胃上皮細胞[7]。而其他致病因子目前被認為可能與幽門螺旋桿菌的毒性程度有關。

人類為幽門螺旋桿菌的主要宿主，細菌主要經口進行感染。全世界約有 50% 的受感染人口，但感染率在區域之間或不同族群間，卻有明顯的差異；感染率與年齡成正相關，在中年成人的感染率就高達 80%，此外感染率也與社經地位有關，像是在已開發國家的感染盛行率僅有 20-50% [8,9]。

幽門螺旋桿菌感染所引起的病徵，部分會呈現無症狀，但另一部分呈現慢性胃炎、十二指腸潰瘍與胃潰瘍的病人之中，發現約有 70-100%受過幽門螺旋

桿菌的感染，此外幽門螺旋桿菌的感染與胃癌 (gastric adenocarcinoma)、胃黏膜淋巴瘤 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, MALToma) 之間也被發現有顯著的相關性[10,11,12,13,14]，也正因上述種種原因，世界衛生組織於 1994 年將幽門螺旋桿菌列為第一類致癌物質 (Class I carcinogen) (IARC monogr(WHO), 1994)。

臨床上治療並清除幽門螺旋桿菌的第一線藥物多以強效制酸劑例如質子幫浦抑制劑 (protein pump inhibitor, PPI)，合併 2 至 3 種抗生素，如克拉黴素 (clarithromycin)、安默西林 (amoxicillin) 與甲硝唑 (metronidazole)，其目的在於改善病患的潰瘍病徵。第二線藥物多以質子幫浦抑制劑、甲硝唑、四環素 (tetracycline) 以及鉍鹽 (bismuth) 合併使用的四合一療法。近年來無法有效清除幽門螺旋桿菌的案例之中較多是由於細菌同時提高對甲硝唑與克拉黴素的耐受性，此外針對第一二線藥物抗藥比例，根據不同地區的統計結果，甲硝唑抗藥比例為 20-95%，克拉黴素也有高達 50%抗藥比例的報導[15]，故近年來，許多研究都指出以喹諾酮類 (quinolone) 藥物為基礎，並合併其他藥物做為第三線的藥物治療，對於幽門螺旋桿菌的清除有不錯的效果[8,16]。

喹諾酮類藥物 (quinolone) 的第一代藥物以萘啶酸 (nalidixic acid) 為主，但現今因藥物毒性已不常使用，第二、三代分別為環丙沙星 (ciprofloxacin)(圖 1.A) 與左氧氟沙星 (levofloxacin)，而吉米沙星 (gemifloxacin) 為喹諾酮的第四代藥物。喹諾酮類的抗藥性菌株在近年來在有些地區開始有增加的趨勢。歐洲地區的德國自 2003 年的 11.2%到 2005 年攀升到 22.1%[17]，法國與比利時分別為 17%與 16.8%[18,19]，此外葡萄牙地區的抗藥性菌株自 1990 年至 1999 年也由 0% 提升到 20.9%[20]；亞洲地區的日本也有 15% 抗藥菌株比例[21]。韓國自 1994 年的 13.9% 至 2003 年的 33.8% 也可見明顯的提升[22]。而成大醫院針對台灣南部地區的調查結果也發現，環丙沙星的抗藥性比例由 2.8% (1998-2003) 明顯上至 11.8% (2004-2007)[23]。

喹諾酮類藥物主要的抑菌機制是經由藥物、旋轉酶 (gyrase) 的 GyrA 或拓撲異構酶 IV (topoisomerase IV) 的 *parC*、*parE* 與 DNA 三者形成複合體 (圖 1.B)，致使旋轉酶所形成的 DNA 斷端無法再連接，使得 DNA 負性超螺旋 (negative supercoiling) 結構無法順利解開，複製叉 (replication fork) 因而停擺，藉此干擾 DNA 的合成來達到抑制細菌生長 [24,25,26]。在幽門螺旋桿菌基因體中並沒有拓撲異構酶 IV 基因序列[27]，而旋轉酶則主要由 2 個 GyrA 次單元與兩個 GyrB 次單元所組成的四聚體。目前已知幽門螺旋桿菌的喹諾酮類藥物抗藥機制是旋轉酶中的次單元 GyrA，此單元上的胺基酸 67 至 106 之間的區域為喹諾酮抗藥決定區域 (quinolone resistance-determining region, QRDR)(圖 2.A)[28]，此區的核苷酸突變造成胺基酸改變，而常見的突變熱點 (hot spots) 為 Asn87 和 Asp91 兩位點 (圖 2.B)[29]，而 Ala88 及 Ala97 也有零星的報導[15]。此外旋轉酶中的另一個次單元 GyrB 的突變也被認為會造成氟化奎林酮類的抗藥性，但除了出現頻率相較 GyrA 胺基酸突變為低，大多的 GyrB 胺基酸突變會伴隨前述 GyrA 的突變熱點 [21]，而主要由 *gyrB* 突變所造成幽門螺旋桿菌對氟化奎林酮類藥物抗藥性則尚未有相關的報導。*gyrA* QRDR 的點突變會導致 DNA 旋轉酶或拓撲異構酶的結構產生改變，使得奎林酮類藥物無法有效結合至藥物作用位置導致藥物效果下降，造成菌株對藥物的耐受性增加 [30]。

近年來臺大醫院收集的臨床幽門桿菌菌株當中，有 10% 的菌株具有環丙沙星的抗藥性，經由初步分析後發現，其中 45% 的環丙沙星 (ciprofloxacin, CIPRO) 抗藥菌株並不具有 *gyrA* QRDR 的突變，表示這些菌株並非因為旋轉酶胺基酸變異機制而導致抗藥性產生，這也意味著可能存在其他的機制來調控菌株的抗藥能力。本實驗首先篩選台大醫院初步檢測後的高抗藥性菌株做為本實驗主要研究材料，之後利用 *gyrA* 與 *gyrB* 的序列定序以及自然轉型 (nature transformation) 的方法進一步排除菌株抗藥性屬於典型的抗藥機制。此外為了後續研究進行，則再檢測抗藥性菌株的最小抑菌濃度 (minimum inhibitory

concentration, MIC)。之後以表現基因庫的方式篩選可能的抗藥基因，此外也合併觀察這些抗藥菌株在用藥與否的培養環境，利用二維凝膠電泳的方式分析蛋白質體上的表現差異，探討是否存在著其他的抗藥機制致使這些菌株帶有喹諾酮類藥物的抗藥能力。



第 2 章 材料與實驗方法 (Materials and Methods)

2.1 材料(materials)

A. 菌株

品系	來源	遺傳型 (genotype)
<i>E. coli</i>	Stratagene,	$\Delta(mcrA)183\Delta(mcrCB-hsdMR-mrr)173$ endA1
XL1-Blue MRF	La Jolla, USA	supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F:proAB lacIq Δ M15 Tn10 (Tet)]
<i>E. coli</i>	Stratagene,	$\Delta(mcrA)183\Delta(mcrCB-hsdMR-mrr) 173$ end A1 thi ⁻¹
XLOLR	La Jolla, USA	recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacIq Δ M15 Tn10 (Tet)] Su ⁻ (nonsuppressing) λ^r (lambda resistant)
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	ATCC, Manassas, USA	ATCC (American Type Culture Collection) no. 700392
J99		ATCC no. 700824
<i>H. pylori</i>		
NTUH-CIP1		
<i>H. pylori</i>	臺大醫院內科	
NTUH-CIP2	部楊智欽醫師	分離自臺大醫院內科病人
<i>H. pylori</i>	提供	
NTUH-CIP3		
<i>H. pylori</i>		
NTUH-CIP11		

B. 質體 (plasmid)

質體	特徵	來源
pBK-CMV	Prokaryotic expression from <i>lac</i> promoter, Eukaryotic expression from CMV promoter	Stratagene, La Jolla, USA

C. 培養基 (medium)

培養基	說明 (每升溶液內含)	來源
Columbia agar	Bio-Polytone 10g、Bio-Lysat 10g、Bio-Myotone 3g、Cornstarch 1g、NaCl 5g、agar 13.5 g	Becton Drive, Franklin Lakes, NJ USA
Brucella broth	Pancreatic digest of casein 10g、Peptic Digest of animal tissue 10g、Dextrose 1 g、Yeast extract 2g、NaCl 5g、Sodium bisulfite 0.1 g	Becton Drive, Franklin Lakes, NJ USA
LB agar (Luria-Bertani)	10 g NaCl, 10 g tryptone, 5 g yeast extract, 20 g agar	Bioshop, Burlington, Canada
LB broth	10 g NaCl, 10 g tryptone, 5 g yeast extract	Bioshop, Burlington, Canada
NZY TOP agar	5 g NaCl, 2 g MgSO ₄ · 7H ₂ O, 5 g yeast extract, 10 g NZ amine (casein hydrolysate), 0.7%(w/v) agarose	Bioshop, Burlington, Canada
MH agar (Mueller-Hinton)	2 g Beef extract, 17.5 g Acid hydrolysate of casein, 1.5 g Starch, 17 g Agar	Labortatorios CONDA, Madrid, Spain

MH broth	2 g Beef extract, 17.5 g Acid hydrolysate of casein, 1.5 g Starch	Labortatorios CONDA, Madrid, Spain
-----------------	---	------------------------------------

D. 抗生素 (antibiotics)

試劑	說明	來源
Ciprofloxacin (CIPRO)	溶於 0.1N HCl	Sigma, Louis, USA
Tetracycline (Tet)	溶於乙醇，需避光	Sigma, Louis, USA
Kanamycin (Km)	溶於水	Sigma, Louis, USA
Ampicillin (Amp)	溶於水	Sigma, Louis, USA

E. 引子 (primer)

引子名稱	序列 (5'→3')	備註
T3 promoter	AATTAACCCTCACTAAAGGG	
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	
gyrA full F	CCAGTGCAGCCCAACTGATA	<i>gyrA</i> 基因全長
gyrA full R	GATCTTCTAGGGGGCTGAGA	
gyrB full F2	ATGCAATGAGCCTTCTTCGC	<i>gyrB</i> 基因全長
gyrB full R2	GCTTGTAAGCGCAATCCACT	
gyrA -F	TTTRGCTTATTCMATGAGCGT	QRDR region [31]
gyrA- R	GCAGACGGCTTGGTARAATA	
gyrB-F	YGCAAAAGCCAGAGAAGCCA	
gyrB-R	ACATGCCCTTGTTCAATCAGC	
mRNA gyrA F	TGTCGGTGCGGTCGTTATTA	For real-time quantitative PCR
mRNA gyrA R	TGCCAAGCCCGTTTTTCAC	

16s rRNA RT R	TGCGAAGTGGAGCCAATCTT	For real-time quantitative PCR
16s rRNA RT F	GGAACGTATTCACCGCAACA	

2.2 實驗方法

I. 幽門螺旋桿菌的培養

試藥：

5% 綿羊血的哥倫比亞培養基 (columbia medium)

作法：

將幽門螺旋桿菌培養於含 5% 綿羊血的哥倫比亞培養基。將培養皿放置在 37°C 且為微嗜氧的培養箱中 (包含 N₂: 80%, CO₂: 15%, O₂: 5% 的混合氣), 培養約 3 至 4 天, 需利用無菌棉花棒刮起少量菌落次培養於新鮮的 5% 綿羊血哥倫比亞培養基。

II. 抗生素感受性測試 (antimicrobial susceptibility testing)

常見抗生素感受性結果是以最小抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 來表示, 意即能完全抑制細菌生長的最低藥物濃度。目前檢測最低抑菌濃度的方法主要有三種: (1) 紙錠瓊脂擴散試驗 (disc diffusion test)。 (2) 稀釋試驗, 其中又分成肉湯稀釋試驗 (broth dilution test) 與瓊脂稀釋試驗 (agar dilution test)。 (3) 血清殺菌試驗 (serum bactericidal test)。本實驗因同時要測定較多樣本數, 在準確性與方便性的考量下以瓊脂稀釋試驗為主。

根據臨床與實驗室標準協會 (Clinical and Laboratory Standards Institutes, CLSI) 於 2009 年所公布幽門螺旋桿菌最小抑菌濃度標準檢測方法。

試藥：

1. 已滅菌生理食鹽水 (0.95% NaCl, normal saline)
2. 5% 綿羊血的哥倫比亞培養基 (Columbia medium)
3. 5% 綿羊血的 MH 固態培養基 (Mueller Hinton agar), 內含不同序列稀釋的
抗生素濃度

作法：

1. 首先將幽門螺旋桿菌培養在含有 5%綿羊血的哥倫比亞培養基 72 小時。
2. 以 1ml 已滅菌生理食鹽水將培養基上的菌落轉換至 1.5ml 的離心管內以 6000rpm 離心。
3. 去除上清液，再加入 1ml 生理食鹽水以微量吸管將菌落打散，用以清洗菌叢以去除其他雜質，此步驟重複 1-2 次。
4. 取 100 μ l 菌液加至 900 μ l 生理食鹽水中，用以測量 O.D.值 (幽門螺旋桿菌 $OD_{600}=1$ ，菌量為 10^9 CFU/ml)。
5. 稀釋菌量至 10^7 - 10^8 CFU/ml (2.0 McFarland)。
6. 取 1-3 μ l 菌液點至含有 5% 綿羊血的 MH 固態培養基，培養於 37 $^{\circ}$ C 的厭氧環境 3-5 天後觀察菌落生長情形。

III. 自然轉型作用 (natural transformation)

試藥：

1. 5% 綿羊血的哥倫比亞培養基 (Columbia medium)
2. 篩選性 5% 綿羊血的哥倫比亞培養基 (加入篩選用抗生素)

作法：

1. 在培養基上畫直徑約 1 公分的圓。
2. 利用 loop 將培養第三天的菌 (DNA 接受者) 刮至圓圈內均勻塗開。
3. 放入厭氧箱中培養 3-4 小時。
4. 將欲送入的 DNA 片段 (如 plasmid 或 PCR 產物) 以 1-2 ug 的總量，約滴入體積 10 μ l 至培養基的圓圈上，放入厭氧箱培養隔夜。
5. 以 loop 刮下圓圈內的菌後，均勻塗在篩選性培養基上，放入培養箱培養 2-3 天。
6. 利用滅菌後牙籤或 loop 挑起單一菌落，畫至新鮮篩選性培養基中的 16 分格內，挑選數顆後培養 2-3 天，觀察菌落生長情形，有長菌落即表示有成

功送入 DNA 的菌株。

IV. 建構表現基因庫 (construction of a expression library)

4.1 幽門螺旋桿菌染色體 DNA 的萃取

試藥：

1. 1× PBS 或布魯氏液態培養基 (Brucella Broth)
2. Cell Lysis Buffer (200mM Tris-HCl, 100mM EDTA, 35mM SDS, pH 8.5)
3. RNaseA 50mg/ml
4. 10M NH₄OAc
5. Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)
6. Isopropanol
7. 70% ethanol

作法：

1. 將培養 2 至 3 天的幽門螺旋桿菌加入 1ml PBS 或布魯氏菌液態培養基，利用經酒精過火消毒之三角玻璃棒將菌落刮下後收集於 1.5ml 離心管。
2. 離心 13000 rpm (rotor: KUBOTA RA-150AM)、2 分鐘後。
3. 去掉上清液，加入 600μl 的 cell lysis buffer 吹吸均勻打散菌落。
4. 再放至 70°C 水浴槽內 5-10 分鐘，使細胞破裂完全且菌液澄清。
5. 加入 RNase 10μl (每 3ml 菌液)，混勻後放置 37°C 水浴槽作用 30 分鐘，以去除內含 RNA。
6. 加入 200μl NH₄OAc (protein precipitation solution) 之後立刻 vortex 約 50 秒 (避免染色體 DNA 纏繞蛋白，後續沉澱分離蛋白後會造成染色體 DNA 流失) 充分混勻。
7. 12000rpm、4°C 離心 10-30 分鐘 (rotor: KUBOTA RA-150AM)(白色沉澱物確實離下來，上清液呈現透明)。之後進行基因體 DNA 萃取步驟。
8. 吸取上清液轉移至另一乾淨的 1.5ml 離心管。

9. 加入等體積的 Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)，上下搖動離心管以有效萃取 DNA 至水層。
10. 12000rpm、4°C 離心 10-15 分鐘。
11. 吸取上層水層液至另一乾淨的 1.5ml 離心管，重複步驟 9-11 兩到三次，直到上下層之介面透明無雜質。
12. 上清液轉移到另一個乾淨的 1.5 ml 微量離心管中，加入等體積之 isopropanol 後立即上下翻轉使其均勻混合，會有絲狀物的 DNA 出現。
13. 以 12000rpm、4°C 離心 10 分鐘。
14. 去除上清液，加入 1ml 70% ethanol 以 tip 吹吸白色 pellet，將其清洗乾淨，並上下翻轉微量離心管，以有效去除鹽類與雜質。
15. 以 12000rpm、4°C 離心 10 分鐘。
16. 去除上清液，可置於 60-70°C Dry Bath 上將殘餘酒精去除，直到 pellet 由白色轉為透明。
17. 以 30μl ddH₂O 溶解 DNA。可置於 60-70°C Dry Bath 上 10-15 分鐘以加速 DNA 溶解水中。
18. 以 1μl 染色體 DNA 跑電泳，以估計 DNA 的濃度與純度。

4.2 幽門螺旋桿菌表現基因庫的建構

幽門螺旋桿菌 gDNA 的部分酵解 (partial digestion)

試藥：

1. *Sau3AI* (3-5U/μl) 與 buffer A (Roche, Mannheim, Germany)
2. 1% 洋菜膠 (agarose gel)
3. Gel-M Gel Extraction Kit (Biomax)

作法

1. 稀釋不同 *Sau3AI* 濃度或調整步驟 3. 不同的反應時間，觀察步驟 5. 的跑膠結

果，評估部分酵解的最適當條件（以沒有 gDNA 大小的主要片段，酵解 DNA 集中於 3-5 kb 範圍當中為佳）。

gDNA	5μg
<i>Sau3A I</i> (5U/μl)	1μl
buffer A	1μl
ddH ₂ O	(補水至總體積 10μl)
<hr/>	
10μl	

2. 均勻混合，避免酵解不完全。
3. 37°C 水浴槽中反應數分鐘（視樣品 gDNA 的不同調整，直到最佳條件）。
4. 將酵解反應產物注入 1% 洋菜膠，以 70-100 伏特跑膠（低電壓以確定各 DNA 片段移動到正確的位置）。
5. 約 5% EtBr 染膠 5-10 分鐘。
6. 利用 Gel-M Gel Extraction Kit 從洋菜膠中回收 3-5 kb 部分的 DNA 片斷。
7. 將回收產物取 1μl 跑膠確認濃度、大小分布與回收產物的品質。

3-5 kb DNA 與 λZAP vector 的接合作用 (ligation)

試藥：

1. 10 倍 T4 接合酵素緩衝液 (10× T4 Ligase buffer)(Roche, Mannheim, Germany)
2. T4 DNA 接合酵素 (T4 DNA Ligase) (5 U/μl)(Roche, Mannheim, Germany)
3. ZAP 載體 (Predigested ZAP Express BamH I/ CIAP Vector)(Stratagene, La Jolla, USA)

作法：

1. 以 λZAP Express Predigested Gigapack Cloning Kit 內的 λZAP 載體建構出幽門螺旋桿菌的表現基因庫。反應如下：

回收純化的 3-5 kb DNA 片段 (<i>Helicobacter pylori</i> DNA/ <i>Sau3A I</i>)	3 μl
λZAP 載體	1 μl

10 倍 T4 接合酵素緩衝液	0.5 μ l
T4 DNA 接合酵素	0.5 μ l
	5 μ l

(回收純化的 3-5 kb DNA 片段以 150-200 μ g 的接合效果為佳)

2. 4°C 下反應 16-18 小時進行接合作用 (Ligation)。

幽門螺旋桿菌基因的載體組裝 (packaging) 於噬菌體 (phage) 中

試藥：

- I. Gigapack III Gold packaging extracts (Stratagene, La Jolla, USA)
- II. SM buffer (1 升的溶液中含 5.8 g NaCl, 2.0 g MgSO₄ · 7H₂O, 50 ml 1M Tris-HCl (pH7.5), 5 ml 2% gelatin)
- III. Chloroform

作法：

1. 從 -80°C 的冷凍冰箱中將套組所附的 Gigapack III Gold packaging extracts 取出一管，用手溫使之快速融化 (融化後無法多次反覆融化使用)。
2. 立即加入 3.5 μ l 接合完成的 DNA
3. 使其溫和均勻地混合，需小心避免因產生氣泡而降低組裝效果。
4. 低速離心 (spin down) 3-5 秒確認混合液均在微量離心管底部。
5. 置於水浴槽內 22°C 作用 90-120 分鐘，切勿超過兩小時。
6. 加入 500 μ l SM 緩衝溶液
7. 加入 20 μ l chloroform，以去除雜質 (debris)，均勻混合。
8. 低速離心 (spin down) 使雜質沉澱。
9. 取其上清液約 450 μ l。分別同時進行步驟 10.與 11.。
10. 此上清液即包裹完成的噬菌體基因庫 (λ phage library)，將其儲存於 4°C 中。
11. 將上述噬菌體狀態的基因庫 (Phage library) 進行定量分析 (Titering procedure)。

噬菌體基因庫 (Phage library) 的定量分析 (titering procedure)

試藥：

1. LB 固態培養基 (12.5 µg/ml tetracycline)
2. LB-Maltose-MgSO₄ 液態培養基中(0.2% maltose, 10mM MgSO₄, 不含抗生素)
3. NZY Top agar
4. 0.5 M IPTG (isopropyl-1-thio-β-D-galactoside in water)
5. 250 mg/ml X-gal (5-bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-galactoside in dimethylformamide (DMF))
6. SM 緩衝液 (buffer) : 1 升的溶液中含 5.8 g NaCl, 2.0 g MgSO₄ · 7H₂O, 50 ml 1M Tris-HCl (pH7.5), 5 ml 2% gelatin

作法：

1. 取 *E. coli* XL1-Blue MRF' 菌株以三區劃線法接種於 12.5 µg/ml tetracycline LB 固態培養基上，於 37°C 培養 16-18 小時。(此步驟之後的培養基與培養液不能含抗生素，因為抗生素會附著於細菌細胞壁，會干擾病毒感染細菌)。
2. 以接種環挑取單一菌落接種於 50 ml 的 LB-Maltose-MgSO₄ 液態培養基中
3. 於 30°C 200 rpm 下培養 16-18 小時，此較低的溫度是為了避免細菌過度增殖產生死菌，因為噬菌體亦會附著於死菌上而影響定量分析的結果。
4. 第三天將隔夜培養的菌液進行 100 倍稀釋 (即取隔夜培養的菌液 30 µl，加入新鮮 3 ml LB-Maltose-MgSO₄ 液態培養基中)，在 37°C 下培養至 OD₆₀₀=0.5。
5. SM 緩衝液將噬菌體溶液做 10 倍序列稀釋 (1x, 10x, 10²x, 10³x, 10⁴x 稀釋)。
6. 各稀釋濃度的 phage 取 1µl 分別加入 200 µl OD₆₀₀=0.5 的 XL1-Blue MRF' 菌液。
7. 混勻後在 37°C 下培養 15 分鐘，此時噬菌體會附著於細菌表面。
8. 將步驟 6. 的 phage 與菌液的混合液、15µl 0.5 M IPTG 與 50 µl 250 mg/ml X-gal 加入至 50°C 的 5 ml NZY Top agar。
9. 混合均勻之後，倒入 LB 固體培養基上，均勻平鋪於 LB 固體培養基上。
10. 待凝固後再移入 37°C 培養箱中培養。
11. 約 6-8 小時後即可觀察到溶菌斑 (plaque)，計數溶菌斑生成數目來推算噬菌體溶液的濃度 (phage titer, PFU/ml)。

理想噬菌體基因庫濃度： Clear plaque 10⁶-10⁷ PFU/ml； Blue plaque <10⁵ PFU/ml

噬菌體基因庫的增幅 (amplification)

試藥：

1. LB 固態培養基 (12.5 µg/ml tetracycline)
2. 15cm LB 固態培養基
3. LB-Maltose-MgSO₄ 液態培養基中 (0.2% maltose, 10 mM MgSO₄, 不含抗生素)
4. SM 緩衝液 (buffer): 1 升的溶液中含 5.8 g NaCl, 2.0 g MgSO₄ · 7H₂O, 50 ml 1M Tris-HCl (pH7.5), 5 ml 2% gelatin
5. NZY Top agar
6. 10 mM MgSO₄
7. Chloroform
8. DMSO

作法：

1. 取 E. coli XL1-Blue MRF' 菌株以三區劃線法接種於含 12.5 µg/ml Tetracyclin 之 LB 固體培養基上，於 37°C 培養 16-18 小時。
2. 以接種環挑取單一菌落接種於 50 ml 的 LB-Maltose-MgSO₄ 液態培養基中
3. 於 30°C 200 rpm 下培養 16-18 小時，比較低的溫度是為了避免細菌過度增殖產生死菌，因為噬菌體亦會附著於死菌上而影響定量分析的結果。
4. 第三天將隔夜培養的菌液進行 100 倍稀釋 (即取隔夜培養的菌液 30 µl，加入新鮮 3 ml LB-Maltose-MgSO₄ 液態培養基中)，在 37°C 下培養至 OD₆₀₀ = 0.5。
5. 將噬菌體懸浮液以每管約 5x10⁴ PFU 的量分至新的離心管當中 (此處是以同時包含藍色與透明噬菌體的總量來分裝)。
6. 加入 600µl OD₆₀₀=0.5 的 XL1-Blue MRF' 菌液混勻，置於 37°C 下培養 15 分鐘。
9. 然後加入 50°C 的 6.5ml NZY Top agar，混合均勻後，倒入 15cm LB 固態培養基上，並且搖勻使其均勻平鋪於 LB 固體培養基。
10. 凝固後移入 37°C 培養箱中培養，6-8 小時，觀察溶菌斑大小約為 1-2 mm。
11. 加入 8 ml SM 緩衝液於此 NZY Top agar 上，將培養基置於 4°C 震盪隔夜。
12. 次日收取培養皿內的 SM 緩衝液 (內含 phage)，再以 1 ml SM 緩衝液清洗培養皿一次。
13. 將回收液分裝於 1.5 ml 無菌微量離心管各 1 ml。
14. 加入 50 µl chloroform，讓 chloroform 的最後濃度為 5%，混合均勻後置於室

溫 15 分鐘。

15. 再以 12000 rpm 離心 10 分鐘。
16. 吸取上清液約 900 μl 至另一乾淨離心管中，再加入 2.7 μl chloroform 使其最終濃度為 0.3 %，並加入 65 μl DMSO 至最後濃度為 7%，混合均勻後於 70°C 下保存。此外需取增幅後的噬菌體溶液做定量分析，確認其濃度上升 1000 倍以上。

生體切除 (in vivo excision)

基因庫放大後的噬菌體溶液必須再經由輔助噬菌體 (helper phage ExAssist™, Stratagene) 的協同作用下，將含基因庫的載體由噬菌體內的形式 (λ ZAP Express vector) 轉換成在大腸桿菌 XL0LR 菌株內質體的形式 (insert::pBK-CMV phagemid vector)，該過程稱為生體切除。

試藥：

1. LB 固態培養基 (12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetracycline)
2. LB-Maltose-MgSO₄ 液態培養基中 (0.2% maltose, 10 mM MgSO₄，不含抗生素)
3. LB 固態培養基 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin)
4. LB 液態培養基 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin)
5. NZY 液態培養基

作法：

1. 取 *E. coli* XL1-Blue MRF' 與 *E. coli* XL0LR 菌株以三區劃線法接種於含 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tetracyclin 之 LB 固體培養基上，於 37°C 培養 16-18 小時。
2. 第二天以接種環挑取單一菌落分別接種於 3 ml 的 LB-Maltose-MgSO₄ 液態培養基及 NZY 液態培養基中，於 30°C 培養 16-18 小時。
3. 第三天配置 100 倍稀釋的 XL1-Blue MRF' 和 XL0LR 菌液，在 37°C 下培養 2-3 小時至 OD₆₀₀ 約 0.5 左右，用 10 mM MgSO₄ 將其配置成 OD₆₀₀=1.0 (8×10^8 cell/ml)，置於室溫備用。
4. 在無菌微量離心管中加入 200 μl OD₆₀₀=1.0 之 XL1-blue MRF'、250 μl phage stock ($>1 \times 10^5$ phage particles) 及 1 μl ExAssist helper phage ($>1 \times 10^6$ pfu/ μl)

(Stratagene)。

5. 混勻後置 37°C 水浴中反應 15 分鐘。
6. 加至含 3 ml LB-Maltose-MgSO₄ 液態培養基的 15 ml 離心管，再以 37°C 225 rpm 培養 2.5-3 小時。
7. 置於 70°C 水浴中 20 分鐘以打破噬菌體與細菌，而成功生體切除的噬菌體不會受熱的影響。
8. 4°C 離心 6000 rpm 15 分鐘，收集上清液之新的微量離心管，內含 excised phagemid pBK-CMV : packaged as filamentous phage particles。
9. 取兩管新的微量離心管，分別加入 10 µl 與 100 µl excised phagemid pBK-CMV 及 200 µl OD₆₀₀=1.0 之新鮮 XL0LR cell，混勻後於 37°C 水浴中反應 15 分鐘，
10. 加入 300 µl NZY 液態培養基，再以 37°C 225 rpm 培養 45 分鐘 (使 kanamycin-resistance gene 能充分被表現)。
11. 取 200 µl 的混合溶液均勻塗佈於含 50 µg/ml kanamycin 之 LB 固態培養基上，並置於 37°C 培養箱中培養隔夜，待菌落生成。
12. 加入 1.5 ml 含 50 µg/ml kanamycin LB 液態培養基於每個 50 µg/ml kanamycin /LB plate 上，利用三角玻棒洗下培養皿上的所有菌落且將之收下，即成為含有幽門螺旋桿菌基因庫的 pBK-CMV phagemid 的 XL0LR 菌株。

V. 幽門螺旋桿菌的 RNA 萃取 (RNA extraction)

試藥：

1. DEPC ddH₂O (0.1% DEPC, diethyl pyrocarbonate)
2. Cell lysis buffer (20mM NaOAc, sodium acetate; pH 5.5; 1mM EDTA; 0.5% SDS ; 均溶於 DEPC ddH₂O 內)
3. RNeasy Mini Kit 與 RLT (使用前以 10µl 2-mercaptoethanol (2ME) 加至 1ml RLT) (QIAGEN)
4. RNase-free DNase set (QIAGEN)

作法：

1. 培養至第二天的幽門螺旋桿菌，加入 1ml brucella broth，以三角玻棒洗下。

2. 離心 13000rpm 2 分鐘 (幽門螺旋桿菌須避免長時間離心，過度離心會造成菌體破裂導致 RNA 降解)。
3. 移除上清液後的 Pellet，加入 250 μ l lysis buffer，震盪後使細胞完全打破。
4. 100 度乾式加熱 5 分鐘，使菌液澄清。
5. 冷卻至室溫後以 125 μ l 分裝置心的微量離心管內，加入 350 μ l RLT，震盪均勻產生白色混濁。
6. 離心 13000rpm 5-10 分鐘，直至沉澱緊貼於微量離心管壁上。
7. 吸取上清液置新的微量離心管加入 100% EtOH 250 μ l 均勻吹吸。
8. 之後均遵照 RNeasy Mini Kit 所建議之步驟。

VI. qRT-PCR (quantitative real time polymerase chain reaction)

利用 RT-PCR (reverse transcription-PCR) 將 RNA 反轉錄為 cDNA

5x buffer (Invitrogene)	4 μ l
0.1x DTT (Invitrogene)	2 μ l
Random primer (Invitrogene)	150ng (Roche add 2 μ l)
RNase Out (Roche)	0.5 μ l
25mM dNTP (Invitrogene)	1 μ l
RT enzyme (Invitrogene)	1.5 μ l
RNA template	400ng
DEPC ddH ₂ O	補至總體積 20 μ l

Real-time PCR

利用 ABI 的 Power SYBR GREEN PCR Master Mix，每一反應內含物如下

2x Power SYBR GREEN PCR Master Mix	12.5 μ l
5 μ M primer F	1 μ l
5 μ M primer R	1 μ l
ddH ₂ O	5.5 μ l
cDNA (RT product diluted 1/50)	5 μ l
total volume	25 μ l

之後以 SDS 7900 機台測得 Ct 值，計算樣品的相對定量值。

VII. 二維電泳 (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis /2D-PAGE)

試藥：

1. 1× PBS
2. 2D lysis buffer (40 mM Tris, 7M urea, 2M thiourea, 4%CHAPS, pH 9.0)
3. Trichloroacetic acid (TCA)
4. 0.07% 2-mecaptoethenol in acetone
5. Rehydration buffer (8M urea, 0.2% DTT, 0.5% IPG buffer, 0.5%Triton X-100, 0.002% orange G)
6. 2D sample buffer (8M urea, 0.5% IPG buffer, 0.5%Triton X-100, 0.002% Bromophenol blue)
7. Balance buffer (6M urea, 50 mM pH6.8 Tris-HCl, 30% glycerol, 2% SDS, 0.25% DTT, 0.002% Bromophenol blue)
8. Running buffer (250 mM Tris, 1.92M glycine, 1%SDS)
9. Stain solution (Coomassie brilliant blue R-250, 400 mL methanol, 100 mL acetic acid, 500 mL ddH₂O)
10. Destain solution (400 mL methanol, 70 mL acetic acid, 530 mL ddH₂O)

作法：

5.1 萃取幽門螺旋桿菌蛋白體

利用 1ml Brucella Broth 沖洗隔夜培養的克雷伯氏肺炎桿菌以 12000 g 離心 20 分鐘，去除上清液後再 1× PBS 沖洗，此步驟重複三次，再以 200 μL 2D lysis buffer 吹散菌塊在冰上進行超音波震盪打破細胞直至流動性佳，須完全打斷 DNA 纏繞，離心 12000 g 收取上清液，再重複離心一次取較乾淨的上清液，以 20% TCA 4°C 沉澱隔夜後，12000 g 離心 15 分鐘，除去上清液，加入 1 mL 0.07% 2-mecaptoethenol in acetone，室溫震盪 10 分鐘，重複離心以及加 1 mL 0.07% 2-mecaptoethenol in acetone 步驟三次，待乾燥之後再以 150 μL 2D lysis buffer

回溶，依照 2D quant kit (Amersham) 的程序進行蛋白質定量。

5.2 二維電泳 (依台大蛋白質核心所建議之步驟進行)

1. 將膠浸泡於 Rehydration buffer 室溫靜置隔夜使膠片水合。
2. 將 1 mg 蛋白質和 2D sample buffer 等量混合均勻放入超音波震盪器中作用 10 分鐘(維持低溫)，置於 37°C 水浴 30 分鐘，離心 12000g 10 分鐘，收取上清液。
3. 將水合完成的膠架上電極(酸性端在上)並將凹槽放在酸性電極下方，再將已收取之上清液加入凹槽，開始進入 isoelectric focusing (IEF) program(500V 3 小時，1000V 3 小時，2000V 10 小時，2000V 3 小時)使蛋白質依不同 pI 值分離。
4. 以 Balance buffer 潤洗 30 分鐘。
5. 將已經置備好的 12.5% SDS PAGE 架好，加入 Running buffer，快速將潤洗好的膠放入玻璃凹槽內，利用電泳(40 mA, 200V, 4 小時)將不同分子量的蛋白質分離。
6. 以 Coomassie Brilliant Blue 染色至隔天。
7. 換成 destain solution 退染。
8. 以 ddH₂O 潤洗後即可掃描。

5.3 In gel tryptic digestion and MALDI/MS (依中研院蛋白質核心所建議之步驟進行)

將挖取下來的膠進行膠內水解 (In gel tryptic digestion)，過程如下：

1. 浸泡在 100 μ L 50mM Dithioerythritol (DTE)/ 25mM ammonium bicarbonate (pH 8.5) 37°C，1小時進行還原(reduction)反應將蛋白質的雙硫鍵打斷。
2. 置換成 100 μ L 100mM Iodoacetamide (IAA) / 25mM ammonium bicarbonate (pH 8.5) 37°C，避光1小時進行烷化(Alkylation)以避免雙硫鍵再接回，離心 10000g 1 分鐘後去除 IAA。

3. 將膠浸泡在100 μ L 50% acetonitrile / 25mM ammonium bicarbonate buffer (pH 8.5)15分鐘劇烈震盪，離心10000g 1分鐘後去除液體，重複此步驟直到膠的染劑被析出，膠呈現透明為止。
4. 將膠浸泡在100 μ L 100% acetonitrile 5分鐘，離心10000g 1分鐘後去除液體，可見已脫水變白的膠體被離心下來。
5. 真空離心使膠體乾燥。
6. 加入含有0.0225 μ g trypsin 的10 μ L 25mM ammonium bicarbonate (pH 8.5)後將膠搗碎。
7. 作用37 $^{\circ}$ C 16小時。
8. 加入50 μ L of 50% acetonitrile/ 5% TFA ，超音波震盪使多肽析出。
9. 離心10000g 1分鐘，收取上清液。
10. 真空離心使乾燥再加入10 μ L 50% acetonitrile / 0.1% formic acid 回溶。
11. 上機進行MALDI/MS，使用機器為Q-ToF Ultima™ MALDI (Micromass, Manchester, UK)



第3章 結果 (Results)

3.1 挑選臺大醫院對環丙沙星 (ciprofloxacin) 耐受性之臨床菌株

本實驗所使用之菌株，由台大醫院內科楊智欽醫師提供，共有 15 株經過初步分析，具有 ciprofloxacin (CIPRO) 耐受性之菌株 (表 1)。根據臨床與實驗室標準協會 (clinical and laboratory standards institutes, CLSI) 於 2009 年所公布的標準，幽門螺旋桿菌對於 Ciprofloxacin 的最小抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 在 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下為感受型 (susceptible)，濃度介於 1-4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之間為中間型 (intermediate)，濃度 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上定義為抵抗型 (resistant)。從中挑選 002、003、006、009 與 011 共 5 株，在本實驗中分別以 NTUH-CIP2、NTUH-CIP3、NTUH-CIP6、NTUH-CIP9 與 NTUH-CIP11 為命名，此 5 株經初步分析為未有 QRDR 區域胺基酸改變，前三株 CIPRO MIC 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、後兩株 CIPRO MIC 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的環丙沙星抵抗型菌株；另也挑選 001 (NTUH-CIP1)，為 QRDR 上胺基酸改變的抗藥菌株，以此做為之後實驗的對照組。

3.2 4 株臨床菌株之環丙沙星感受性試驗 (antimicrobial susceptibility testing)

為了以利後續實驗的進行，我們依照 CLSI 的方法利用瓊脂稀釋試驗 (agar dilution test) 再次確認我們所挑選的臨床幽門桿菌之環丙沙星最低抑菌濃度，並以環丙沙星感受性菌株 HP26695 及 J99 做為對照。結果 (表 4) 發現 NTUH-CIP1 由先前初步分析 (表 1) 的 CIPRO MIC 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 提高到 MIC 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；NTUH-CIP9 CIPRO MIC <0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，不具有環丙沙星抗藥性，因此排除此菌株，而挑選 NTUH-CIP2、3、6 與 11 做後續的實驗。

3.3 臺大醫院臨床環丙沙星抗藥性菌株 *gyrA* QRDR 序列定序及自然轉型試驗

先前的研究已指出 *gyrA* QRDR 內的突變是造成菌株對環丙沙星抗藥性已知的主要機制[30]。因此為了再次確認自台大醫院所挑選 NTUH-CIP2、3、6 與 11 此 4 株環丙沙星抗藥性菌株的 QRDR 序列變化，利用自然轉型試驗 (natural transformation) 與 *gyrA* 片段的定序分析，以確定所挑選的菌株本身抗藥性並非

源自於 QRDR 的突變，而是由其他的機制所調控。

幽門螺旋桿菌具有吸收外來的 DNA 片段並將 DNA 與細菌基因體進行置換的特性，此一過程稱為自然轉型作用 (natural transformation)，藉此特性，我們可以利用引子將 4 株臨床菌株的 *gyrA* 與 *gyrB* 全長經 PCR 放大後回收，接至 TA 載體上，4 株臨床菌株的 *gyrA* 與 *gyrB* 載體再各選三個 clones，之後萃取出這些質體並分別滴至 ciprofloxacin 感受型菌株 *Helicobacter pylori* 26695，培養一天後再塗盤至 ciprofloxacin 4 μ g/ml 的培養基做篩選，篩選結果 (表 2) 發現 NTUH-CIP1 與 NTUH-CIP2 的 *gyrA* 送至 *Helicobacter pylori* 26695 後，使得原為藥物感受型菌株轉為 ciprofloxacin 抵抗型菌株，而 NTUH-CIP3、NTUH-CIP6 與 NTUH-CIP11 無法使感受性菌株得到 ciprofloxacin 抗藥性。而 4 株抗藥菌株之 *gyrB* TA 載體經轉型後，並不會使 *Helicobacter pylori* 26695 獲得抗藥性。

之後將 NTUH-CIP1 與 NTUH-CIP2 的 *gyrA* 送定序分析，結果再與 26695 *gyrA* QRDR 位置的序列做比對，比對結果 (表 3) 發現，NTUH-CIP1 與 NTUH-CIP2 分別在 *gyrA* 的 QRDR 胺基酸 87 與 91 兩個位置上有胺基酸的改變；另外為了更確認前述自然轉型試驗的結果，也定序 NTUH-CIP3 與 NTUH-CIP6 *gyrA* QRDR 的區域，於胺基酸 87 與 92 上有核苷酸的變化但並沒有胺基酸的改變，可知這兩株並非屬於典型 QRDR 突變的抗藥機制。NTUH-CIP6 雖然帶有抗藥能力，且在自然轉型的結果 (表 2) 顯示 *gyrA* 與 *gyrB* 也不帶有抗藥特異性的氨基酸變化，但在含環丙沙星的綿羊血培養基上畫三區後，觀察其單一菌落發現，其抗藥性是由另一株型態、大小相似，但較為扁平、偏白的菌落所表現，並非一般幽門螺旋桿菌，而將 NTUH-CIP6 的單一菌落培養在含藥培養基上發現，此株幽門螺旋桿菌並不帶有抗藥性。

總括以上兩樣分析的結果 (表 5)，NTUH-CIP2 於 *gyrA* 胺基酸 91 位置具有突變而致使菌株具有環丙沙星的抗藥性，為典型環丙沙星的抗藥機制。NTUH-CIP6 的單一菌落培養結果，此菌並不帶有抗藥性。NTUH-CIP9 並不具有

CIPRO 抗藥性。最後確認 CIPRO MIC 分別為 8 與 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 NTUH-CIP3 與 11，兩株於 *gyrA* QRDR、*gyrA* 及 *gyrB* 序列上並沒有影響環丙沙星感受性的胺基酸變異，因此之後的實驗挑選 CIPRO MIC 8 $\mu\text{g/ml}$ 的 NTUH-CIP3 做為主要研究菌株。

3.4 建構表現基因庫 (construction of a expression library)

為了探討可能的抗藥機制，因此建構幽門桿菌表現基因庫進行篩選，為了能篩選出 NTUH-CIP3 環丙沙星抗藥基因的完整開放閱讀架 (Open Reading Frame, ORF)，因此回收限制酶酵解後細菌基因體的 3-5 kb DNA 片段大小。

3.4.1 基因體 DNA 的部分酵解與 3-5 kb DNA 片段回收

將 NTUH-CIP3 的 genomic DNA 以不同稀釋濃度的 *Sau3AI* (5U/ μl) 進行部份酵解 (partial digestion)，並以電泳方式觀察不同酵素濃度及反應時間，挑選適當條件，最後挑選 10 倍稀釋的 *Sau3AI* (0.5U/ μl) 進行酵解反應 20 分鐘條件 (圖 3)，此條件會使酵解後的 DNA 片段主要分布於 3-5 kb 的區域，再利用同樣酵解條件進行大量酵解反應，之後自洋菜膠 (agarose gel) 上回收 3-5 kb 的區域，回收後的片段再取 1 μl 跑電泳觀察回收產物的品質與濃度，以落於 3-5 kb 且有明顯上下分界為佳 (圖 4)。

3.4.2 幽門螺旋桿菌表現基因庫的建構與其代表性

利用 λ -ZAP Express Predigested Gigapack Cloning Kit 來構築表現基因庫。將幽門螺旋桿菌基因體經過部分酵解後並回收 3-5 kb 的片段大小，將其與 λ -ZAP 載體做連接作用 (Ligation)，再以套組內的 packaging extracts 組裝成噬菌體。初步組裝完成後的菌體懸浮液必須完成定量 (Titering)，且定量所得到的透明溶菌斑 (即有成功接入細菌酵解後的片段) 以達到 1×10^6 pfu/ μg of vector (per μg of λ -ZAP II Express Vector，為接合作用參與反應的 vector 含量) 以上為佳，而藍色溶菌斑 (即未接入細菌酵解後片段) 需小於 1×10^5 PFU/ μg of vector 才符合套組所建議之理想表現基因庫的涵蓋程度，若組裝後的透明溶菌斑數量過低，即表示此表現基因庫的涵蓋度偏低，也意味著此基因庫代表性不足。

實驗經由定量後 (titering)，初步估計所建構的嗜菌體基因庫 (λ phage library) 濃度為 1.2×10^6 PFU/ μg ，又實際上在接合反應之後，只取其中的五分之四的接合產物進行嗜菌體組裝，故嗜菌體總量為 9.6×10^5 PFU，將所有嗜菌體增幅之後，嗜菌體濃度提高到 1.1×10^8 PFU/ml。之後以統計學的方法進行表現基因庫涵蓋程度的評估，結果如下：

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-F)$$

N = Primary Recombinants，即所需的 clone 數量

P = 基因庫得涵蓋百分比，此處期望涵蓋百分比達 99%， $P = 0.99$

F = pBK-CMV phagemid 插入的 DNA 片段 (Insert) 大小/細菌基因體總長
(2.5kb/1700kb)

由以上公式計算結果，至少需要 1.028×10^4 以上的 clone 數才會有 99% 的代表性。此次構築的基因庫雖然有 9.6×10^5 PFU，但插入 phagemid 的 DNA 片段有正接或反接的可能，此外一段序列有三種可能的閱讀架 (reading frame)，故推估所構築出的基因庫只有六分之一的機會能被有效表現，所以預估整體表現 clone 數為 1.6×10^5 PFU，大於由公式所估計所需 clone 數量，故保守估計所構築之表現基因庫有九成以上的涵蓋比例。

3.4.3 篩選表現基因庫 (screening the expression library)

前述所構築的幽門螺旋桿菌表現基因庫會利用大腸桿菌 XL0LR 來表現，此後再利用環丙沙星為篩選策略，篩選出環丙沙星的抗藥基因，因此為了排除 XL0LR 本身對環丙沙星的耐受性而影響基因的篩選，就利用瓊脂稀釋試驗法檢測 XL0LR 對環丙沙星的最低抑菌濃度 (表 6)，MIC 結果介於 0.03125-0.0625 $\mu\text{g/ml}$ ，而後續即以 0.0625 $\mu\text{g/ml}$ 的環丙沙星濃度為後續篩選基因庫之標準。之後取生體切除 (*in vivo* Excision) 後的大腸桿菌 XL0LR 菌株，並塗盤於含有 0.0625 $\mu\text{g/ml}$ Ciprofloxacin 與 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin 的 LB 固態培養基上，篩選出對 Ciprofloxacin 有抵抗性的大腸桿菌 XL0LR 菌株。

經由篩選得到的 16 個菌落，經由三次瓊脂稀釋試驗法確認其對環丙沙星的最小抑菌濃度，結果發現，16 株的最小抑菌濃度均相較於比較組的大腸桿菌 XL0LR (0.03125-0.0625 $\mu\text{g/ml}$)，至少有 4 倍以上的提升 (CIPRO MIC $\geq 0.25\mu\text{g/ml}$) (表 7)，之後萃取這些菌落質體進行再次轉型作用。

3.4.4 篩選後菌株之再次轉型作用 (retransformation of selected strains)

為了確認所篩選出的菌株所帶的 Insert 片段確實在抗藥過程扮演重要的角色，並排除因環丙沙星為篩選標準所誘發大腸桿菌 XL0LR 基因體上 QRDR 的胺基酸突變，導致環丙沙星的抗藥性，我們進一步利用再次轉型作用，將前述篩選自表現基因庫中對環丙沙星抗藥性增加的大腸桿菌 XL0LR 16 株 (表 7)，抽取內部質體後，轉型至環丙沙星敏感性的大腸桿菌 XL0LR 內，之後檢測這 16 株質體轉型後的大腸桿菌 XL0LR 的最小抑菌濃度，結果發現其中 3 株最小抑菌濃度確實提升 2-4 倍。

3.4.5 DNA 序列分析 (DNA sequencing analysis)

將上述經由再次轉型作用後 MIC 提升的 3 株菌株，抽取其質體，利用質體上的 T3 與 T7 引子做聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)，確認三株質體的內插片段大小 (圖 5)，由此排除此三質體為同一質體來源。之後利用定序分析得到質體插入片段的 DNA 序列，再利用 NCBI (national center for biotechnology information) 網站內的 BLAST (basic local alignment search tool) 系統，將質體插入片段 DNA 序列與系統資料庫內已發布的生物序列做比對，結果發現三株質體的 DNA 插入片段均比對到已知完整基因體序列 *Helicobacter pylori* 26695 與 J99 的 *oor* 基因組 (圖 6)。*oor* 為 2-oxoglutarate-acceptor oxidoreductase，主要功能會將電子傳遞至 NADP 的氧化還原酶，也被認為在 acetyl-CoA 轉換成 succinyl-CoA 過程中主要參與的分子之一[32]。

3.4.6 將攜帶 *oorA* 之 pBK-CMV 自然轉型作用送入 quinolone 感受型菌株

Helicobacter pylori 26695

前述實驗所篩選出的三種質體均同時包含 *oor* 內其中一個子單元 *oorA* (圖 6)，故由此推測 *oorA* 可能幫助菌株提升對於環丙沙星的耐受性。先前研究已發現 *oorA* 為幽門螺旋桿菌的必須基因 (essential gene)，因此無法藉由基因剔除的方式來觀察此基因對於抗藥機制的重要性[32]，故為了證明這個假設，我們將前述實驗分離出的三株菌株的質體 (分別為 B3、B4 與 B13) 萃取出來後，利用自然轉型作用送入 quinolone 感受型菌株 *Helicobacter pylori* 26695，再分別利用兩倍序列稀釋的環丙沙星濃度篩選轉型後的感受型幽門螺旋桿菌，若在此兩種藥物濃度下，能成功提升 HP 26695 對於藥物的耐受性，則表示 *oorA* 在環丙沙星抗藥性中扮演著重要的角色。利用不同藥物濃度的培養基培養轉型後的感受型幽門螺旋桿菌三天的結果 (表 8)，與操作組的 HP 26695 比較，沒有觀察到明顯的藥物抗藥性的上升。

3.5 非 GyrA QRDR 突變之環丙沙星臨床抗藥菌株的 GyrA RNA 表現量

蛋白質與基質 (substrate) 的結合存在著一定的濃度比能使兩者的結合可達最佳效率 (efficiency)，因此是否有可能因為 GyrA 的表現量降低，而使得 quinolone 與 GyrA 結合效果下降，但這些降低的程度，仍可支持細菌的基本生理需求，而達到抗藥的效果。為了確認 GyrA 的表現差異，我們比較臨床菌株 *gyrA* 基因前端的啟動子 (promoter) 區域的序列以及利用反轉錄-定量 PCR (qRT-PCR) 的方式來偵測 RNA 層面的變化。

3.5.1 比對環丙沙星感受型菌株以及 NTUH-CIP3 的 *gyrA* 啟動子序列

依照先前研究發表幽門螺旋桿菌 *gyrA* 啟動子-10 box、-35 box 與核糖體 (ribosome) 結合位置 Shine-Dalgarno 區域的序列[30]，我們比對 NTUH-CIP3 與環丙沙星感受性菌株 J99 與 *Helicobacter pylori* 26695 *gyrA* 前端 100 bp 包含前述啟動子區域的序列，結果發現，有 7 個位置具有核苷酸的多型性 (polymorphism)，

但並沒有特異性的核苷酸差異 (圖 7)。

3.5.2 利用反轉錄-定量 PCR 的方式，比較典型抗藥與非典型抗藥機制兩組臨床菌株 *gyrA* RNA 的表現差異

我們選擇 4 株抗 CIPRO 菌株來偵測 RNA 變化。NTUH-CIP1 與 NTUH-CIP2 為已知 *GyrA* QRDR 突變的臨床抗藥菌株 (典型抗藥菌株)；NTUH-CIP3 與 NTUH-CIP11 為沒有 *GyrA* QRDR 突變的臨床抗藥菌株 (非典型抗藥菌株)。比較典型抗藥機制與非典型抗藥兩組是否存在有意義的 RNA 差異。

實驗結果經由統計顯示，典型抗藥與非典型抗藥兩組，各自組內的 RNA 變化就有顯著的差異；典型抗藥性的 NTUH-CIP1 與 NTUH-CIP2 兩株，兩者間的 *GyrA* RNA 表現量也有約 5 倍的差異；非典型抗藥兩株，均與典型抗藥機制 NTUH-CIP1 的值做比較，NTUH-CIP3 *GyrA* RNA 表現量為 0.2 倍，而 NTUH-CIP11 為 2 倍 (圖 8)。以上結果顯示不同臨床菌株的 *gyrA* 表現量並沒有一致的比例變化。

3.6 二維凝膠電泳分析臨床抗藥菌株的蛋白質體表現 (proteomic analysis of the resistant strain by two dimensional gel electrophoresis)

前述利用表現基因庫無法順利篩選到參與環丙沙星抗藥機制的基因，此外在 *GyrA* RNA 表現量上的差異初步觀察並沒有與環丙沙星的抗藥性有明顯的相關性，故之後利用二維凝膠電泳的方式比較 NTUH-CIP3 臨床抗藥菌株受到環丙沙星刺激前後的蛋白質變化，是否有特異性的蛋白質表現程度差異。

將 NTUH-CIP3 分別次培養 (subculture) 於不含藥的 5% 綿羊血培養基與 CIPRO 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 5% 綿羊血培養基，將打破菌體後所得到的細胞蛋白質，以 2D Quant 套組定量蛋白質濃度，之後再以 800 μg 總蛋白量跑第一維等電點聚焦法 (isoelectric focusing, IEF) 以分離不同淨電荷的蛋白質，之後跑第二維 SDS-PAGE 藉此分離不同大小的蛋白質，最後得到兩組二維電泳膠圖 (圖 9、10)。兩電泳膠圖利用影像分析軟體 PDQuest (Bio-Rad)，以比較兩片膠上蛋白質體分布並比較各點於兩片膠上表現量的差異。經由分析後的結果，挑選環丙沙星刺

激前後表現量相差 4 倍以上的 38 個點 (圖 9、10)，經由挖點、膠內水解 (In gel digestion) 及介質輔助雷射脫附離子化質譜法 (MALDI Q-TOF) 得到 MS 與 MS/MS 數據，最後經由電腦進行胜肽質量指紋 (peptide mass fingerprint, PMF) 與 MS/MS 離子搜尋 (MS/MS Ion Search) 分別比對 NCBI nr 與 SwissProt 兩蛋白質資料庫，總共比對出 12 個蛋白質，其中分別有 5 個點與異戊二烯 (isoprenoid) 的合成和檸檬酸循環 (TCA cycle) 有關；2 個點具有甲基化 (Methylation) 功能的甲基轉移酶 (Methyltransferase)；5 個點為假設性蛋白 (hypothetical protein) (表 9、10)。另外有 3 個點可能因外來汙染與內含蛋白質含量過低而比對到 keratin (角質蛋白)，其他 23 個點雖然有比對到蛋白質，但經過資料庫統計後的可信度不足。



第4章 討論 (Discussion)

4.1 表現基因庫的基因涵蓋度與篩選

本實驗利用幽門螺旋桿菌的基因體隨機做部分酵解、構築表現基因庫，再送入至大腸桿菌 XL0LR 內表現，之後雖然利用一般統計學公式估算此基因庫涵蓋度，其估算結果與實際涵蓋度仍然有一定的差距，即使估算數值雖達到 99.99% 以上，計算公式也無法排除構築過程中實驗或人為的疏失，或是菌株間本來存在的差異等等，故估算值也僅能提供初步評估此表現基因庫的代表性。本實驗所構築之表現基因庫篩選到 16 株 CIPRO MIC 上升之大腸桿菌菌株，之後抽取質體作再次轉型作用，將質體送至不帶有質體之大腸桿菌 XL0LR 內，最終檢測只有 3 株大腸桿菌 XL0LR 有 CIPRO MIC 上升的表現型，其他的 13 株大腸桿菌 XL0LR 可能因為利用環丙沙星大量篩選表現基因庫，誘發大腸桿菌 XL0LR 基因體上 QRDR 的胺基酸突變所致。

CIPRO MIC 上升的 3 株質體，實驗結果發現其質體內含的 insert 片段不同，屬 3 個不同的 clones，且均包含 *oorA* 基因，在大腸桿菌系統大量表現下，確實可以使 MIC 上升 2-4 倍，但此現象卻無法於幽門螺旋桿菌系統中表現，以下探究可能的幾項原因影響本表現基因庫所得到的篩選結果以及此基因庫本身篩選之限制：

1. 由於 pBK-CMV 本身帶有很強的 promoter 或載體本身能夠於大腸桿菌達到一定的複製數目 (copy number)，造成一定程度的基因被大量表現，以致於大腸桿菌的系統中 CIPRO MIC 上升，但此載體並不會於幽門螺旋桿菌內複製，可能因此使得基因表現不足以讓我們觀察到 CIPRO MIC 的變化。
2. 抗藥機制並非為單一基因所調控。表現基因庫主要用於篩選單一基因所能調控的表現型 (phenotype)，經由表現型的改變或菌株抗藥性的產生來做為篩選指標，若此臨床菌株抗藥性表現並非單一基因的調控，而是多基因間

的交互作用所達到的抗藥結果，則無法利用表現基因庫的方法篩選出來，故有可能 *oor* 仍須伴隨著其他的基因來達到抗藥能力的表現。而多基因調控模式較宜利用突變基因庫 (mutant library) 來篩選，利用轉位子 (transposon) 隨機插入抗藥性幽門螺旋桿菌的基因體，挑選喪失抗藥表現型之菌株，再進一步探討轉位子插入的基因位置與可能受影響的抗藥路徑。

3. 本實驗所構築之表現基因庫，以臨床抗藥菌株 3-5 kb 的內插基因片段大小為主，若可能的抗藥基因本身或抗藥基因組大於此範圍，則無法有效地以此基因庫篩選出來。
4. 菌種之間的差異。即使環丙沙星耐受性之幽門螺旋桿菌為前述第一點由單一基因所調控其抗藥性，由此菌株所構築的基因庫內的載體也包含完整的基因片段，理論上能夠在幽門螺旋桿菌菌體內正常表現的基因，可能受到幽門螺旋桿菌與大腸桿菌菌種之間的差異，使得載體上的基因無法於大腸桿菌的篩選系統內被表現與篩選出來。
5. 由前述實驗結果可知，CIPRO MIC 均小於 0.5 以下的兩倍稀釋濃度，又觀察 MIC 提升只達到 4 倍，此觀察結果也可能是因為人為測量過程中所造成的誤差。

4.2 非 QRDR 突變之環丙沙星抗藥菌株的 *GyrA* RNA 表現量差異

由臨床抗藥菌株與環丙沙星感受型菌株比較 *gyrA* 啟動子區域的結果，以感受型菌株間的多型性為主，並無發現臨床抗藥性 NTUH-CIP3 有特別的序列多型性可能與 *gyrA* RNA 表現量下降有關。

另外比較典型抗藥與非典型抗藥臨床菌株兩組 *gyrA* RNA 表現量發現 (圖 8)，兩組組內的 RNA 變化就有明顯的差異；典型抗藥機制 NTUH-CIP1 與 NTUH-CIP2 為已知抗藥性為 *GyrA* QRDR 突變所致，預期兩株 *GyrA* 表現量應沒有明顯差異，但結果兩者間存在約 5 倍的顯著表現量差異。原假設 NTUH-CIP3 與 NTUH-CIP11

可能是因為 *gyrA* RNA 的表現量降低所造成抗藥性，兩株分別與 NTUH-CIP1 比較，NTUH-CIP3 表現量下降 0.2 倍與 NTUH-CIP11 上升 2 倍的 *gyrA* RNA 表現。由此結果觀察後發現，*gyrA* RNA 的表現量變化並沒有一致性的比例關係。先前有研究指出幽門螺旋桿菌菌株間在基因體上有明顯差異性[33]，因此由此推測此結果，可能是由於不同菌株間的差別所造成的結果，故 *gyrA* RNA 表現程度與我們欲探討的 NTUH-CIP3 與 NTUH-CIP11 抗藥性機制沒有明顯的相關性。

4.3 二維凝膠電泳分析臨床抗藥菌株的蛋白質體

有鑑於前述表現基因庫篩選基因的限制，另外利用二維凝膠電泳比較抗藥菌株經由環丙沙星刺激前後，蛋白質體層次上的差異。其中有 5 個點與異戊二烯 (isoprenoid) 的合成與檸檬酸循環 (TCA cycle) 有關；2 個點具有甲基化 (Methylation) 功能的甲基轉移酶 (Methyltransferase)，詳細請參考表 9、10。

4.3.1 甲基丁四醇磷酸化路徑 (methylerythritol phosphate (MEP) pathway) 與代謝作用的調控 (metabolic regulation)

2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) cytidylyltransferase 主要參與在甲基丁四醇磷酸化路徑 (methylerythritol phosphate (MEP) pathway) 中合成中間產物 CDPME (4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol)(圖 11)。大部分的細菌多以甲基丁四醇磷酸化路徑 (MEP pathway) 路徑來合成烯焦磷酸 (Isopentenyl diphosphate, IPP) 與二甲基丙烯二磷酸 (dimethylallyl diphosphate, DMAPP)，這兩個產物是組成異戊二烯化合物 (isoprenoid) 的基本骨架，在細菌體當中此化合物為組成細胞膜結構 (如革蘭氏陰性菌內外膜成分 hopanoids)，電子傳遞鏈 (如 qinones) 與蛋白質合成 (tRNA 上的修飾) 等扮演重要的角色[34][36]。

果糖二磷酸醛縮酶 (fructose-bisphosphate aldolase, FBP-aldolase) 則參與在醣解作用 (glycolysis) 的過程中，最後將醣類分解為丙酮酸 (pyruvate) 與甘油三磷酸 (D-glyceraldehyde 3-phosphate)，兩產物除了作為檸檬酸循環的前驅產物外，在細菌體中也是合成異戊二烯化合物的最初原料 (圖 11)。兩蛋白質在

受到環丙沙星刺激之後，表現量為均上升[35]。

另外三個蛋白質經分析後發現均參與在糖解作用 (glycolysis) 到檸檬酸循環 (citric acid cycle) 的路徑當中；受到環丙沙星刺激之後的 NTUH-CIP3 菌株，乙醯輔酶 A 合成酶 (acetyl-coenzyme A synthetase) 與雙稀內酯水解酶家族蛋白 (dienelactone hydrolase family protein) 兩者蛋白質表現量下降；蘋果酸脫氫酶 (malate dehydrogenase, MDH) 的蛋白質表現量上升。功能如下 (圖 11):

1. 乙醯輔酶 A 合成酶的作用位置，於糖解作用末端、進入檸檬酸循環之前，主要能利用 ATP 將醋酸 (Acetate) 轉換為乙醯輔酶 A (acetyl-coenzyme A)、二磷酸 (Diphosphate) 與單磷酸腺苷 (AMP)，之後以乙醯輔酶 A 的形式進入檸檬酸循環[35]。
2. 雙稀內酯水解酶家族蛋白主要參與在 β -keto adipate pathway，主要被發現存在於細菌以及黴菌兩類，此類水解酶能代謝具毒性的芳香族化合物，雙稀內酯水解酶 (dienelactone hydrolase, DLH) 能夠將其轉化為無毒性的檸檬酸循環原料乙醯輔酶 A 與琥珀酸輔酶 A (succinyl CoA)。[36]
3. 蘋果酸脫氫酶作用於檸檬酸循環內，能夠將蘋果酸 (Malate) 與 NAD^+ 轉換為草醯乙酸 (Oxaloacetate) 並且釋放出 NADH 。[35]

4.3.2 甲基化作用 (methylation)

另比對到 2 個蛋白質均具有甲基化功能的甲基轉移酶 (Methyltransferase)，分別為 tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridine biosynthesis bifunctional protein MnmC 與 chemotaxis protein methyltransferase，兩者均能將 AdoMet (s-腺苷甲硫氨酸，S-adenosylmethionine) 上所帶有的甲基轉移至另一個基質上。

1. 在大腸桿菌中，mnmC 能將甲基轉移修飾至 tRNA 上的第 34 個位置 (anticodon 的第一位置，也稱為 wobble position)，使得 tRNA 對 glutamate、lysine 與 glutamine 具有專一性[37]。
2. chemotaxis protein methyltransferase (CheR)，參與在細菌接受外界刺激後產

生的驅化反應。當細菌表面的化學感受器 MCR (methyl-accepting chemotaxis proteins) 接收到外界環境的刺激後，會活化下游訊息傳遞，最終使細菌鞭毛改變方向，以反應外界的刺激，而 CheR 會藉由甲基化 MCR 上的 glutamates，形成 L-glutamate 5-methyl ester 後，藉此持續活化下游的訊息傳遞[38]。

由初步資料顯示 (圖 11) NTUH-CIP3 在經過環丙沙星刺激後，參與糖解作用的果糖二磷酸醛縮酶蛋白表現量上升，其下游丙酮酸與甘油三磷酸可能也會隨之上升，這兩種產物除了是進入檸檬酸循環的前驅物以外，也是甲基丁四醇磷酸化路徑的主要反應成分，能夠合成出異戊烯焦磷酸 (IPP) 與二甲基丙烯二磷酸 (DMAPP) 這兩種異戊二烯類的化合物，而參與其中的 MEP cytidylyltransferase 蛋白質表現量上升，這或許意味著在環丙沙星刺激之後的 NTUH-CIP3 菌株，糖酵解作用以及甲基丁四醇磷酸化這條路徑的活化，使得 IPP 與 DAMPP 合成增加，促使某一類的異戊二烯 (isoprenoid) 化合物合成量增加。

此部分仍需要做重覆實驗去確認結果；另外也需比較臨床抗藥菌株與環丙沙星感受性菌株之間的蛋白質體差異才能更進一步的確定。

4.3.3 二維電泳與質譜儀分析及其限制性

前述的實驗過程中並無法利用二維電泳的方式篩選出直接參與抗藥機制的相關蛋白質，可能因為此篩選方法有其限制性或遇篩選出的物質成分差異：

1. 無法有效分離特定性質的蛋白質 (如:膜蛋白與強酸性或強鹼性蛋白需經特別的前處理；分子量極大或極小之蛋白質)。
2. 無法有效偵測到微量蛋白，如：二維電泳膠的染劑限制 (coomassie blue 敏感度需要 30ng 以上的蛋白質含量才能被染出)[39]。
3. 直接參與抗藥機制之物質非蛋白質，則無法單純由二維電泳分離出來。
4. 本實驗兩組二維電泳分別是以同一株 NTUH-CIP3 以環丙沙星刺激與否比較蛋白質體的變化，若直接參與抗藥機制的相關蛋白質具特異性的表現在此菌株內，藥物刺激前後蛋白質量沒有明顯改變，則無法經由此方法篩選出，

則須改以 NTUH-CIP3 與藥物感受性菌株如 HP26695，比較二維電泳膠所呈現的蛋白質體差異，才有機會被篩選出來。

5. 質譜儀的原理是將蛋白質打碎，碎裂成不同長度的小片段氨基酸，藉由所帶電荷質量的不同，會有不同的訊息偵測時間及強度，所得的數據 MS data 與 MS/MS data 為數字化的形式，需再經由 MATRIX SCIENCE 的 Mascot Search 軟體來計算，最後得到組合後的不同片段氨基酸再去比對資料庫內蛋白質的氨基酸序列。幽門螺旋桿菌菌株間的差異大[33]，這些小片段氨基酸比對時可能只有一部分氨基酸能夠比對到，可能因此在統計上可信度分數低於可信數值，而造成關鍵參與抗藥的蛋白質，可能在 data 選擇過程中有所遺漏。
6. 若此參與抗藥的蛋白質為一新的蛋白質，也可能因此在資料庫中無法比對到類似的蛋白質。

4.4 結論

於 2006 年日本針對為 quinolone 類的其中一種藥物 levofloxacin，共收集了 507 株臨床幽門螺旋桿菌，分析後發現 76 株 (15%) 具有 levofloxacin 的抗藥性，並檢驗 gyrase 上的氨基酸突變發現其中有 16.2% 均沒有 gyrA 與 gyrB 上的氨基酸突變[21]，由這份統計可知，未知的抗藥機制出現比例相較於典型 QRDR 氨基酸突變直接產生抗藥性的發生比例來得低，由此推測此未知的抗藥機制有可能由多個因子共同組成的調控路徑，此外本實驗無法有效以表現基因庫篩選出參與的抗藥基因，故未來應利用突變基因庫的方式來篩選。最後經由環丙沙星刺激後的臨床環丙沙星抗藥菌株的蛋白質體變化，初步觀察環丙沙星能夠影響細菌體內的檸檬酸循環與活化異戊二烯的合成路徑，而此部分仍需重複此實驗以及比較感受性與抗藥性菌株間的蛋白質體來進一步驗證。

第5章 參考資料 (Reference)

1. Marshall BJ, Warren JR (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315.
2. Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA, Wee SH (1985) Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol* 19: 257-267.
3. Goodwin CS, Armstrong JA (1990) Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9: 1-13.
4. Falush D, Kraft C, Taylor NS, Correa P, Fox JG, et al. (2001) Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15056-15061.
5. Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, et al. (1998) Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12619-12624.
6. Mobley HL, Garner RM, Bauerfeind P (1995) *Helicobacter pylori* nickel-transport gene nixA: synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. *Mol Microbiol* 16: 97-109.
7. Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S (1991) Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 59: 2470-2475.
8. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 19: 449-490.
9. RA F, editor (2001) Epidemiologic observations and open questions about disease and infection caused by *Helicobacter pylori*. Wymondham, United Kingdom: Horizon Sientific Press. 29-51 p.
10. Blaser MJ (1987) Gastric *Campylobacter*-like organisms, gastritis, and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 93: 371-383.
11. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, et al. (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 325: 1127-1131.
12. Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, et al. (1991) Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 302: 1302-1305.
13. Forman D (1991) *Helicobacter pylori* infection: a novel risk factor in the etiology of gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 83: 1702-1703.
14. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, et al. (1991)

- Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 325: 1132-1136.
15. Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG (2006) *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis* 6: 699-709.
 16. Nishizawa T, Suzuki H, Hibi T (2009) Quinolone-Based Third-Line Therapy for *Helicobacter pylori* Eradication. *J Clin Biochem Nutr* 44: 119-124.
 17. Glocker E, Kist M (2004) Rapid detection of point mutations in the *gyrA* gene of *Helicobacter pylori* conferring resistance to ciprofloxacin by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR approach. *J Clin Microbiol* 42: 2241-2246.
 18. Cattoir V, Nectoux J, Lascols C, Deforges L, Delchier JC, et al. (2007) Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a *gyrA* polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int J Antimicrob Agents* 29: 389-396.
 19. Bogaerts P, Berhin C, Nizet H, Glupczynski Y (2006) Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* strains from patients living in Belgium. *Helicobacter* 11: 441-445.
 20. Cabrita J, Oleastro M, Matos R, Manhente A, Cabral J, et al. (2000) Features and trends in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Lisbon area, Portugal (1990-1999). *J Antimicrob Chemother* 46: 1029-1031.
 21. Miyachi H, Miki I, Aoyama N, Shirasaka D, Matsumoto Y, et al. (2006) Primary levofloxacin resistance and *gyrA/B* mutations among *Helicobacter pylori* in Japan. *Helicobacter* 11: 243-249.
 22. Kim JM, Kim JS, Kim N, Jung HC, Song IS (2005) Distribution of fluoroquinolone MICs in *Helicobacter pylori* strains from Korean patients. *J Antimicrob Chemother* 56: 965-967.
 23. Hung KH, Sheu BS, Chang WL, Wu HM, Liu CC, et al. (2009) Prevalence of primary fluoroquinolone resistance among clinical isolates of *Helicobacter pylori* at a University Hospital in Southern Taiwan. *Helicobacter* 14: 61-65.
 24. Levine C, Hiasa H, Mariani KJ (1998) DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta* 1400: 29-43.
 25. Mitscher LA (2005) Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. *Chem Rev* 105: 559-592.
 26. Michael A. Kohanski DJDaJJC (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 8: 423-435.
 27. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, et al. (1997) The complete

- genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539-547.
28. Reece RJ, Maxwell A (1991) DNA gyrase: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26: 335-375.
 29. Matsuzaki J, Suzuki H, Tsugawa H, Nishizawa T, Hibi T (2010) Homology model of the DNA gyrase enzyme of *Helicobacter pylori*, a target of quinolone-based eradication therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 25 Suppl 1: S7-10.
 30. Moore RA, Beckthold B, Wong S, Kureishi A, Bryan LE (1995) Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 107-111.
 31. Tankovic J, Lascols C, Sculo Q, Petit JC, Soussy CJ (2003) Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3942-3944.
 32. Hughes NJ, Clayton CL, Chalk PA, Kelly DJ (1998) *Helicobacter pylori* *porCDAB* and *oorDABC* genes encode distinct pyruvate:flavodoxin and 2-oxoglutarate:acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP. *J Bacteriol* 180: 1119-1128.
 33. Garcia-Vallve S, Janssen PJ, Ouzounis CA (2002) Genetic variation between *Helicobacter pylori* strains: gene acquisition or loss? *Trends Microbiol* 10: 445-447.
 34. Testa CA, Lherbet C, Pojer F, Noel JP, Poulter CD (2006) Cloning and expression of *IspDF* from *Mesorhizobium loti*. Characterization of a bifunctional protein that catalyzes non-consecutive steps in the methylerythritol phosphate pathway. *Biochim Biophys Acta* 1764: 85-96.
 35. Wolfe AJ (2005) The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 12-50.
 36. Pathak D, Ashley G, Ollis D (1991) Thiol protease-like active site found in the enzyme diene lactone hydrolase: localization using biochemical, genetic, and structural tools. *Proteins* 9: 267-279.
 37. Bujnicki JM, Oudjama Y, Roovers M, Owczarek S, Caillet J, et al. (2004) Identification of a bifunctional enzyme MnmC involved in the biosynthesis of a hypermodified uridine in the wobble position of tRNA. *RNA* 10: 1236-1242.
 38. Wadhams GH, Armitage JP (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 1024-1037.
 39. NRPGM 蛋白質體暨醣質體分析核心設施 In-gel digestion 膠內水解實作

第 6 章 附 錄

Strain-ID	CIP	gyrA210	gyrA261	gyrA272	gyrA276	gyrA291	gyrA318	gyrA342	gyrA366
001	8	Ser70Cys (AGC→TGC)	Asn87Ile (AAC→ATT)		Ala92Ala(GCA→GCC)				
002	8				Ala92Ala(GCA→GCC)				Ala122Ala(GCA→GCC)
003	8		Asn87Asn (AAC→AAT)		Ala92Ala(GCA→GCC)				
004	8		Asn87Asn (AAC→AAT)	Asp91Gly (GAT→GGT)	Ala92Ala(GCA→GCC)		Leu106Leu(TTA→TTG)		
005	8		Asn87Asn (AAC→AAT)	Asp91Gly (GAT→GGT)	Ala92Ala(GCA→GCC)		Leu106Leu(TTA→TTG)		
006	8		Asn87Asn (AAC→AAT)		Ala92Ala(GCA→GCC)				
007	4			Asp91Gly (GAT→GGT)	Ala92Ala(GCA→GCC)				Ala122Ala(GCA→GCC)
008	2	Ser70Cys (AGC→TGT)	Asn87Asn (AAC→AAT)		Ala92Ala(GCA→GCC)		Leu106Leu(TTA→TTG)		
009	2								
010	2	Ser70Ser (AGC→AGT)	Asn87Lys(AAC→AAA)						Ala122Ala(GCA→GCC)
011	2		Asn87Asn (AAC→AAT)		Ala92Ala(GCA→GCC)		Leu106Leu(TTA→TTG)		
012	1				Ala92Ala(GCA→GCC)			Gly114Gly(GGC→GGT)	
013	1		Asn87Asn (AAC→AAT)		Ala92Ala(GCA→GCC)				
014	1		Asn87Asn (AAC→AAT)		Ala92Ala(GCA→GCC)	Ala97Ala(GCC→GCA)			Ala122Ala(GCA→GCC)
015	1				Ala92Ala(GCA→GCC)	Ala97Ala(GCC→GCA)	Leu106Leu(TTA→TTG)		

表 1 台大醫院所分離出 15 株臨床對環丙沙星具耐受性幽門螺旋桿菌菌株之初步檢測最小抑菌濃度與 gyrA 定序。

(本資料由台大醫院內科楊智欽醫師提供)。CIP, Ciprofloxacin MIC (ug/ml)

Types of DNA fragment	Colony number *(in CIPRO 4 µg/ml BAP)
**NTUH-CIP1 gyrA QRDR PCR product	Numerous
NTUH-CIP1 gyrA TA plasmid	Numerous
NTUH-CIP2 gyrA TA plasmid	Numerous
NTUH-CIP3 gyrA TA plasmid	-
NTUH-CIP6 gyrA TA plasmid	-
NTUH-CIP11 gyrA TA plasmid	-
NTUH-CIP1 gyrB TA plasmid	-
NTUH-CIP2 gyrB TA plasmid	-
NTUH-CIP3 gyrB TA plasmid	-
NTUH-CIP6 gyrB TA plasmid	-
***HP26695 only (ddH ₂ O added)	-

表 2 利用自然轉型的方法，分別將帶有臨床菌株 gyrA 或 gyrB 的 TA 載體轉型至環丙沙星感受性菌株 *Helicobacter pylori* 26695。

*CIPRO (環丙沙星，Ciprofloxacin)、BAP (Blood Agar Plate)

**為本實驗的 Positive Control

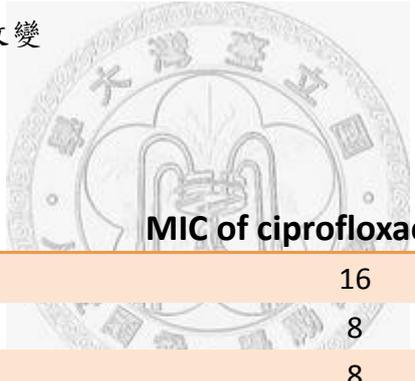
***為本實驗的 Negative Control

	gyrA261	gyrA272	gyrA276
NTUH-CIP1	**Asn87Ile(AAC→AAT)		*Ala92Ala(GCA→GCG)
NTUH-CIP2		**Asp91Gly(GAT→GGT)	*Ala92Ala(GCA→GCG)
NTUH-CIP3	*Asn87Asn(AAC→AAT)		*Ala92Ala(GCA→GCG)
NTUH-CIP6	*Asn87Asn(AAC→AAT)		*Ala92Ala(GCA→GCG)

表 3 臺大醫院臨床抗環丙沙星幽門螺旋桿菌菌株 gyrA QRDR 的序列比對結果。

* 核苷酸 (nucleotide) 有改變但胺基酸 (amino acid) 沒有改變

**核苷酸與胺基酸均有改變



Strains	MIC of ciprofloxacin (µg/ml)
NTUH-CIP1	16
NTUH-CIP2	8
NTUH-CIP3	8
NTUH-CIP6	8
NTUH-CIP9	<0.5
NTUH-CIP11	2
*HP 26695	0.125
*J99	<1

表 4 臺大醫院臨床幽門螺旋桿菌菌株對環丙沙星的感受性試驗。

*為已知的 CIPRO 敏感性 (suceptible) 菌株，做為本實驗的 negative control

no.	CIPRO MIC	gyrA210	gyrA261	gyrA272	gyrA276	gyrA318
1	16	Ser70Cys (AGC->TGC)	Asn87Ile (AAC->ATT)		Ala92Ala (GCA->GCG)	
2	8			Asp91Gly(GAT->GGT)	Ala92Ala (GCA->GCG)	
3	8		Asn87Asn(AAC->AAT)		Ala92Ala (GCA->GCG)	
4	8		Asn87Asn(AAC->AAT)	Asp91Gly(GAT->GGT)	Ala92Ala (GCA->GCG)	Leu106Leu(TTA>TTG)
5	8		Asn87Asn(AAC->AAT)	Asp91Gly(GAT->GGT)	Ala92Ala (GCA->GCG)	Leu106Leu(TTA>TTG)
6	8	contaminating other resistant bacteria				
7	4			Asp91Gly(GAT->GGT)	Ala92Ala (GCA->GCG)	Leu106Leu(TTA>TTG)
8	2	Ser70Cys (AGC->TGC)	Asn87Asn(AAC->AAT)		Ala92Ala (GCA->GCG)	
9	<1	MIC<1, susceptible strain				
10	2	Ser70Ser (AGC->AGT)	Asn87Lys(AAC->AAA)			Leu106Leu(TTA>TTG)
11	2		Asn87Asn(AAC->AAT)		Ala92Ala (GCA->GCG)	

表 5 臺大醫院幽門螺旋桿菌臨床菌株利用自然轉型作用、序列定序以及環丙沙星的感受性試驗，所得到之再次確認結果。

為臺大醫院內科所提供 11 株臨床菌株；灰底部分表示有 gyrA QRDR 胺基酸改變；CIPRO (環丙沙星, Ciprofloxacin) MIC (µg/ml)。

CIPRO*($\mu\text{g/ml}$) \ Strains	ATCC 25922**	XLOLR	XLOLR/pBK-CMV***
0.0078	+	+	+
0.0156	-	+	+
0.03125	-	+/-	+/-
0.0625	-	-	-
0.125	-	-	-
0.25	-	-	-
0.5	-	-	-

表 6 表現基因庫之大腸桿菌菌株的環丙沙星感受性試驗。

* CIPRO (環丙沙星, Ciprofloxacin)

**大腸桿菌 ATCC 25922 為培養基 CIPRO 濃度對照組, CIPRO MIC

0.004-0.015 $\mu\text{g/ml}$

***為大腸桿菌 XLOLR 菌株, 帶有不含 inserts 的 pBK-CMV



CIPRO* ($\mu\text{g/ml}$)	ATCC 25922**	<i>P.a</i> **	XLOLR**	XLOLR/P**	B1	B3	B4	B5	B10	B12	B13	B14	B15	B24
\ Strains														
0.0078	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
0.0156	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.03125	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.0625	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.125	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
0.25	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 7 利用環丙沙星篩選表現基因庫所得到最小抑菌濃度上升的大腸桿菌菌株。

* CIPRO (環丙沙星, Ciprofloxacin)

**大腸桿菌 ATCC 25922 與 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. a*) ATCC 27853 均為本實驗培養基 CIPRO 濃度的對照組, CIPRO MIC 分別為 0.004-0.015 $\mu\text{g/ml}$ 與 0.25-1 $\mu\text{g/ml}$; 大腸桿菌 XLOLR 與不含 inserts 的 pBK-CMV XLOLR 菌株 (XLOLR/P) 為本實驗對照組; B1-B24 為利用 0.0625 $\mu\text{g/ml}$ 環丙沙星篩選表現基因庫, 所篩選出之大腸桿菌菌株。

Stains					DNA fragments of natural transformation			
CIPRO* _(μg/ml)	Normal saline	ATCC25922**	<i>P.a</i> **	HP26695	NTUH-CIP 1 <i>gyrA</i> plasmid	B3***	B4***	B13***
\ Strains	only**	(QRDR mutation)**						
0.03125 (2 ⁻⁵)	-	-	+	+	+	+	+	+
0.0625 (2 ⁻⁴)	-	-	+	+	+	+	+	+
0.125 (2 ⁻³)	-	-	+	-	+	-	-	-
0.25 (2 ⁻²)	-	-	+	-	+	-	-	-
0.5 (2 ⁻¹)	-	-	-	-	+	-	-	-

表 8 將攜帶 *oorA* 之 pBK-CMV 自然轉型作用送入 quinolone 感受型菌株 *Helicobacter pylori* 26695，並檢測其 CIPRO MIC 以評估 *oorA* 於非典型抗 quinolone 機制中所扮演的角色。

* CIPRO (環丙沙星, Ciprofloxacin)。 ** Normal saline only 為只滴入 normal saline 的陰性對照組；大腸桿菌 ATCC 25922 與 *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a*) ATCC 27853 均為本實驗培養基 CIPRO 濃度的對照組，CIPRO MIC 分別為 0.004-0.015μg/ml 與 0.25-1μg/ml；NTUH-CIP 1 *gyrA* plasmid (QRDR mutation) 為自然轉型試驗的陽性對照組。***為送入帶有不完整 *oor* operon (三者均包含 *oorA*) 質體至 quinolone 感受型菌株 HP 26695 的實驗組。

SSP*	Accession Number**	Protein name
3801	B0S2Q8	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase
4304	Q9ZMQ6	Fructose-bisphosphate aldolase (FBP-aldolase)
2305	Q5HTJ5	tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridine biosynthesis bifunctional protein mnmC
5714	Q2RZC8	chemotaxis protein methyltransferase
4514	A3UBV7	malate dehydrogenase
3105	Q41906	Cysteine proteinase inhibitor 3

表 9 NTUH-CIP3 經過 1 µg/ml 環丙沙星刺激之後，表現量上升 4 倍的蛋白質。

*SSP, sample spot number

**Accession number, 為 UniProtKB 資料庫的蛋白質登錄號碼

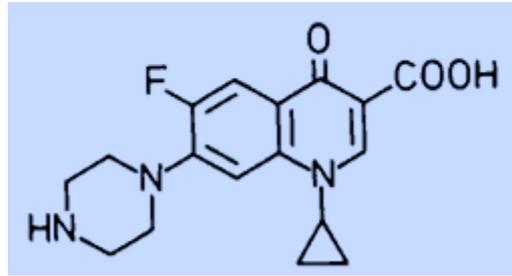
SSP*	Accession Number**	Protein name
6314	Q8UBV5	Acetyl-coenzyme A synthetase (ACS)
6613	CBX92072	dienelactone hydrolase family protein
3210	B1ZS05	hypothetical protein Oter_1396
3504	NP_223788	hypothetical protein jhp1071
4510	YP_004047782	hypothetical protein NLA_1460
3426	NP_001063578	Os09g0500600

表 10 NTUH-CIP3 經過 1 µg/ml 環丙沙星刺激之後，表現量下降 4 倍的蛋白質。

*SSP, sample spot number

**Accession number, 為 UniProtKB 資料庫的蛋白質登錄號碼

A



B

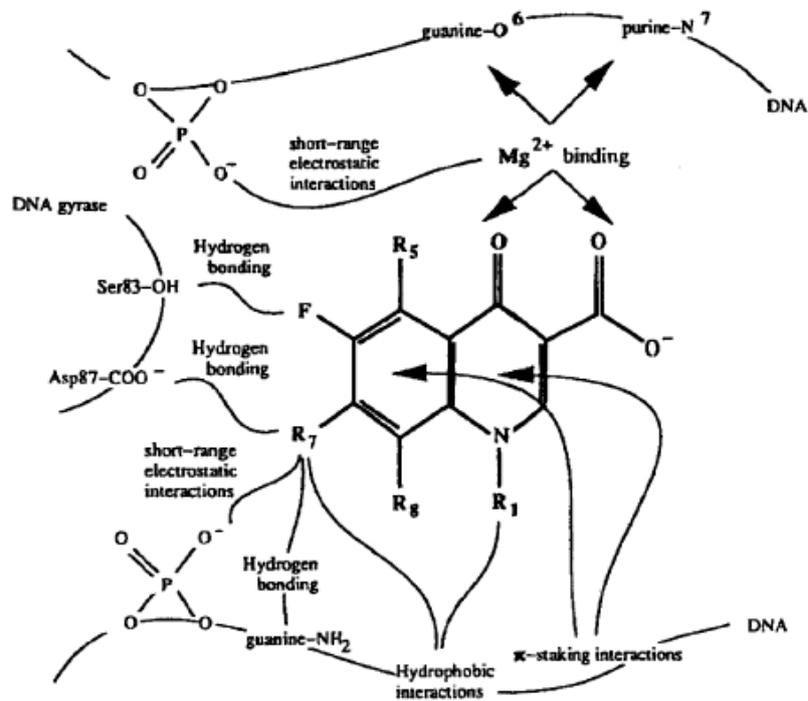
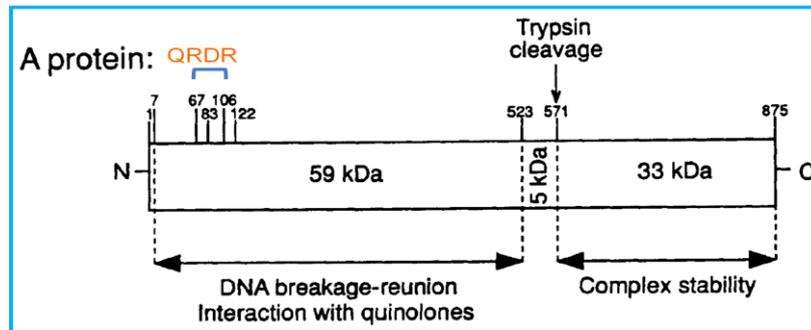


圖 1 環丙沙星藥物結構及大腸桿菌抗藥機制示意圖。

A. Ciprofloxacin 結構[28]。B. 喹諾酮類藥物、大腸桿菌的旋轉酶 (gyrase) 與 DNA 三者形成複合體之示意圖[25]。

A



B

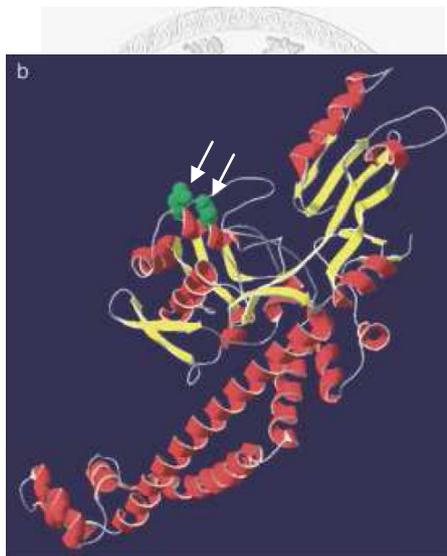


圖 2 喹諾酮抗藥決定區域及幽門螺旋桿菌 GyrA 突變熱點位置。

A. 喹諾酮抗藥決定區域 (quinolone resistance-determining region, QRDR)。QRDR 為旋轉酶中 GyrA 次單元上的胺基酸 67 至 106 之間的區域[28]。B. 幽門螺旋桿菌常見的突變熱點位於 GyrA N 端區域的 Asn87 和 Asp91。(白色箭頭所指的球狀區域)[29]

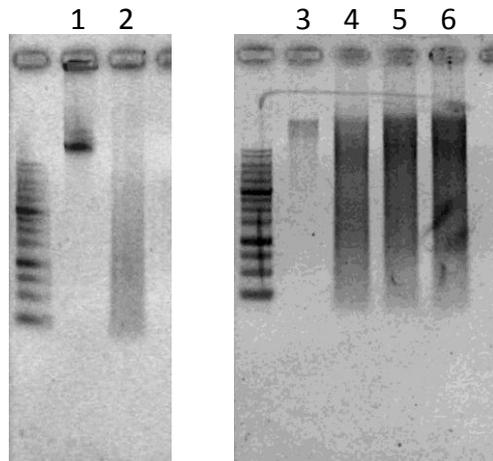


圖 3 *Helicobacter pylori* NTUH-CIP3 genomic DNA 以不同酵素濃度反應 20 分鐘後，跑電泳之結果。

Lane 1、3 為未進行酵解之 genomic DNA，以確定所萃取的細菌染色體 DNA 未發生降解現象。

Lane 2 為利用未稀釋的 *Sau3AI* (5U/μl) 進行細菌染色體 DNA 完全酵解，最為其它稀釋倍數的對照組。

Lane 4-6 分別為以稀釋 10 倍 (0.5U/μl)、20 倍 (0.25U/μl) 及 30 倍 (0.167U/μl) 的 *Sau3AI* 進行染色體 DNA 部分酵解的結果。

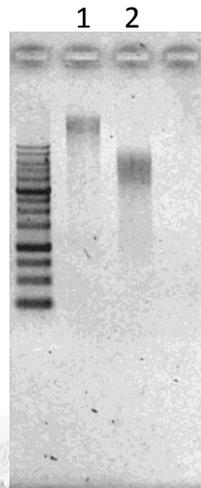


圖 4 *Helicobacter pylori* NTUH-CIP3 genomic DNA 以 $0.5U/\mu l$ 的 *Sau3AI* 做部分
酵解後反應 20 分鐘，大量回收後跑電泳之結果。

Lane 1 為未進行酵解之 genomic DNA。

Lane 2 注入 $1\mu l$ 回收後產物 ($260\text{ ng}/\mu l$) 的結果，可觀察到染色體 DNA 片段主要集中在 3-5kb 的位置。

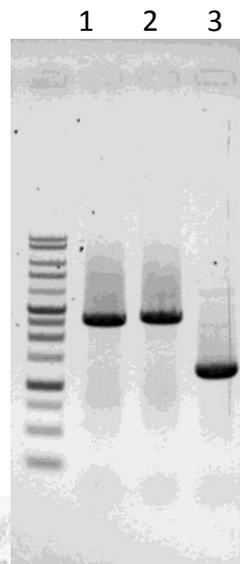


圖 5 MIC 提升的 3 株質體，利用質體上的 T3 與 T7 引子做聚合酵素連鎖反應，三株質體的內插片段大小確認。

Lane 1-3 分別為 strain B3、B4 與 B13，insert 大小分別為 2.5、2.7 與 1.3 kb。

Helicobacter pylori 26695



J99

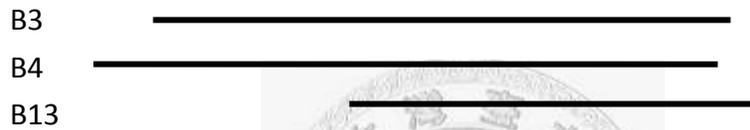


圖 6 經由表現基因庫所篩選出的 3 株質體內插片段與 *Helicobacter pylori* 26695 和 J99 比對後的基因位置圖。

B3、B4 與 B13 分別為 3 株質體內插入的 DNA 片段。oor, 2-oxoglutarate-acceptor oxidoreductase subunits。

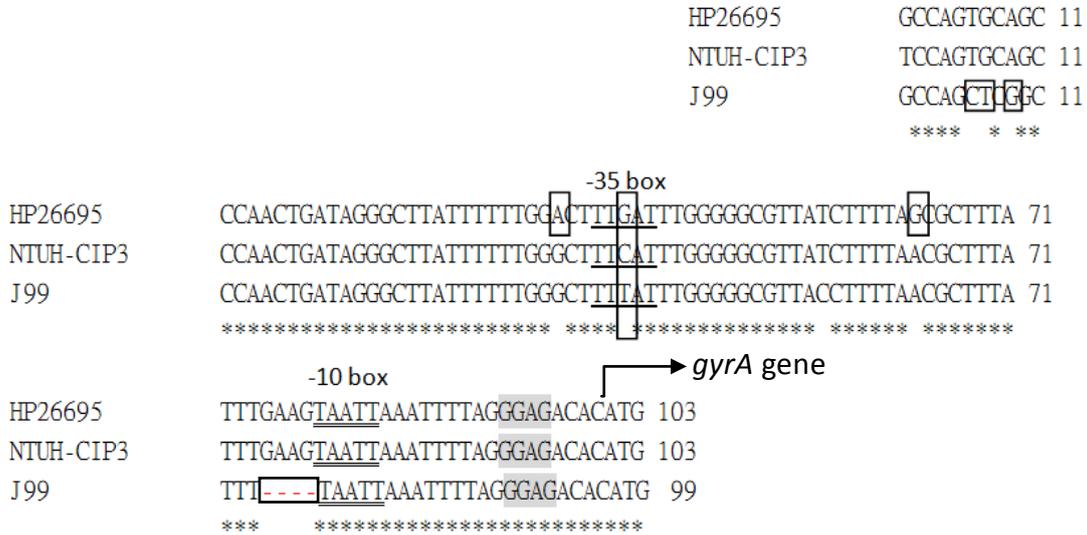


圖 7 比對環丙沙星感受型菌株與 NTUH-CIP3 *gyrA* 啟動子 (promoter) 序列。

HP26695 與 J99 分別為環丙沙星感受性菌株，NTUH-CIP3 為沒有 QRDR 突變之環丙沙星臨床抗藥菌株。框號標示為三株菌株序列比較後所呈現的序列多型性 (polymorphism)。先前研究已指出雙底線區域為幽門螺旋桿菌 *gyrA* 啟動子-10 box；單底線區域為幽門螺旋桿菌 *gyrA* 啟動子的-35 box；灰底部分為核糖體 (ribosome) 結合位置 Shine-Dalgarno 區域[30]。實心箭頭為 *gyrA* 的 ATG 起始位置。

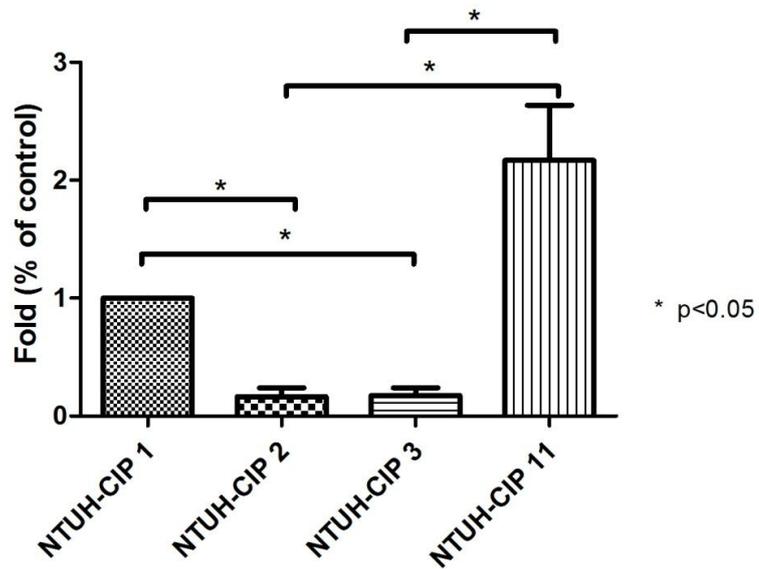


圖 8 利用反轉錄-定量 PCR (qRT-PCR) 偵測 RNA 的方式，比較典型抗藥機制與非典型抗藥機制兩組臨床菌株 *gyrA* RNA 的表現差異。

2 株為已知 GyrA QRDR 上突變株 NTUH-CIP1 與 NTUH-CIP2；NTUH-CIP3 與 NTUH-CIP11 為沒有 GyrA QRDR 上突變之菌株。

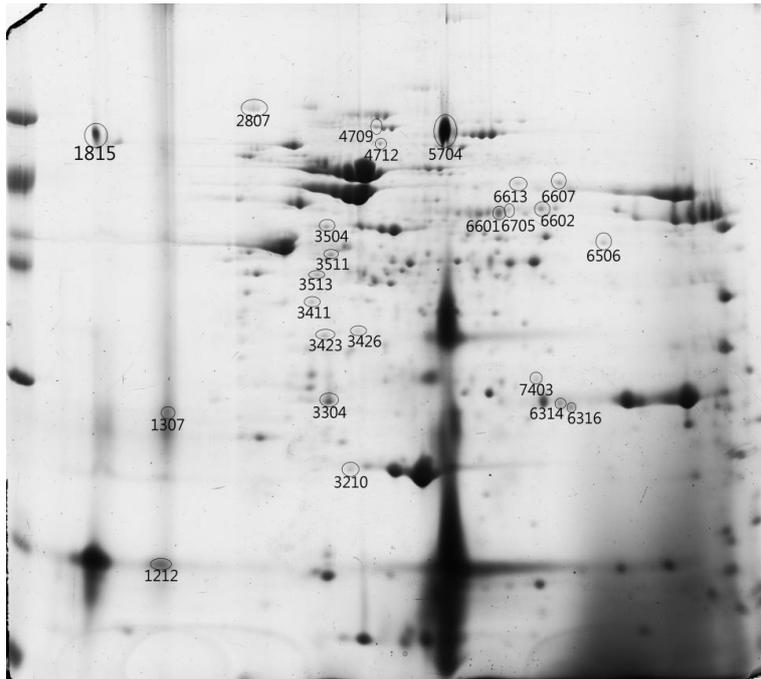


圖 9 沒有經過環丙沙星作用的 NTUH-CIP3 二維凝膠電泳圖。

圈選標號 (SSP, sample spot number) 的點為與圖 8 比較後，蛋白質表現量大於 4 倍的點，共 24 點，之後利用質譜儀進行蛋白質身分鑑定。

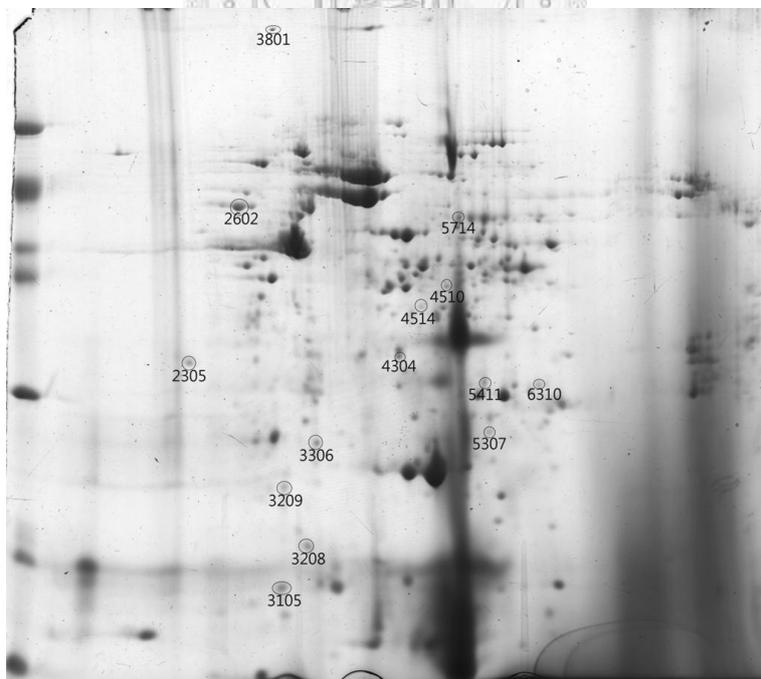


圖 10 經由 1 µg/ml 環丙沙星作用後的 NTUH-CIP3 二維凝膠電泳圖。

圈選標號 (SSP, sample spot number) 的點是與圖 7 比較後，蛋白質表現量大於 4 倍的點，共 14 點，之後利用質譜儀進行蛋白質身分鑑定。

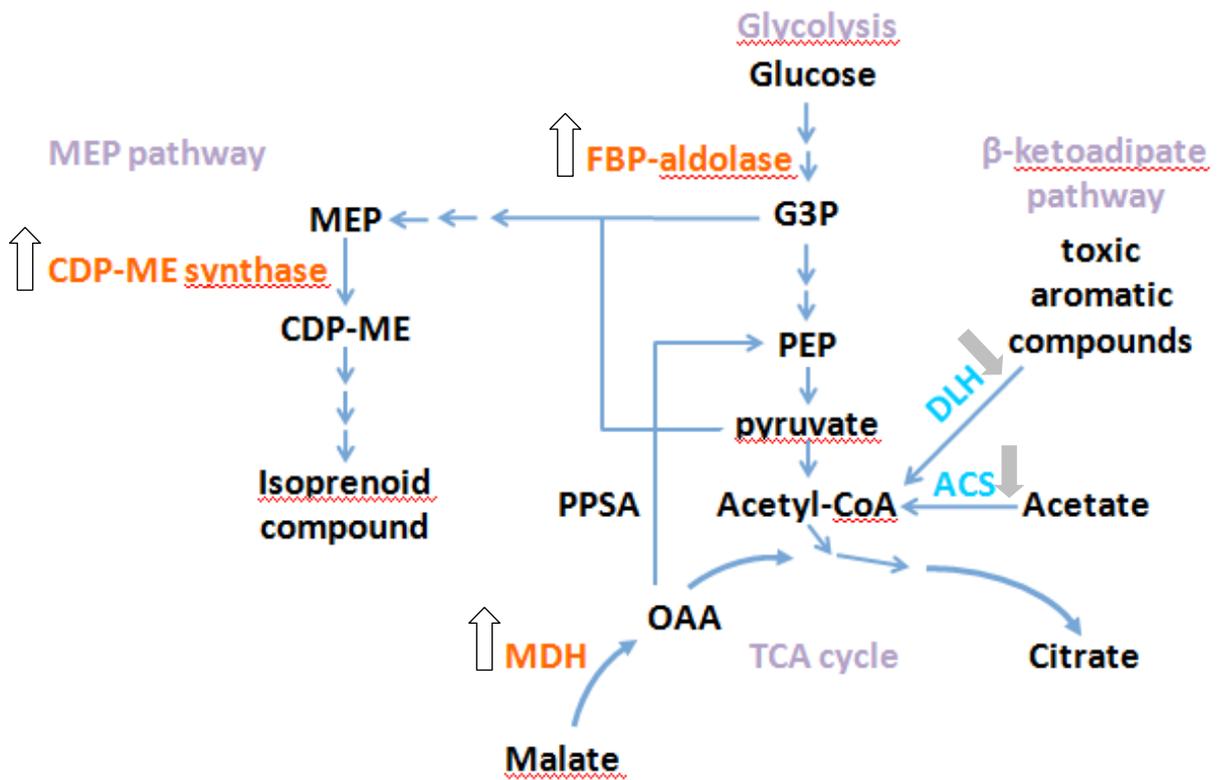


圖 11 環丙沙星刺激前後，蛋白質表現相差 4 倍以上之 5 種蛋白質，經比對主要參與在甲基丁四醇磷酸路徑與呼吸作用循環之示意圖。

- A. 細菌甲基丁四醇磷酸化路徑 (methylerythritol phosphate (MEP) pathway)。
CDP-ME synthase 主要參與在 MEP 路徑中合成下游的異戊二烯化合物。
- B. 醱解作用 (Glycolysis)。果糖二磷酸醛縮酶 (fructose-bisphosphate aldolase, FBP-aldolase) 分解 fructose 1,6-biphosphate 後產生甘油三磷酸 (G3P) 以及丙酮酸 (pyruvate)。
- C. 細菌雙稀內酯水解酶家族蛋白 (DLH) 參與在 β-ketoadipate pathway 的代謝路徑，DLH 與乙醯輔酶 A (acetyl-CoA) 合成酶 (ACS) 均能合成出乙醯輔酶 A。蘋果酸脫氫酶 (MDH) 於檸檬酸循環中合成出 Oxaloacetate。
- 白色箭頭：環丙沙星刺激後表現量上升的蛋白質。灰色箭頭：環丙沙星刺激後表現量下降的蛋白質。