

國立台灣大學醫學院微生物研究所

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis



探討 M4 A 型鏈球菌之線毛在表皮感染中
所扮演的角色

Investigate the Role of M4 Streptococcal Pili in
Superficial Skin Infection

李紹暉

Shao-Hui Li

指導教授：張永祺 博士

Advisor: Yung-Chi Chang, Ph. D.

中華民國 106 年 7 月

July 2017

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：探討 M4 A 型鏈球菌之線毛在表皮感染
中所扮演的角色

英文題目：Investigate the Role of M4 Streptococcal
Pili in Superficial Skin Infection

本論文係 李紹曠 君 (學號 r04445120) 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 106 年 7 月 13 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：

張永祺

(簽名)

(指導教授)

史有伶

邱浩傑

系主任、所長

鄧述謨

(簽名)

致謝



終於也輪到我寫致謝辭了。兩年的時光宛如白駒過隙，轉瞬間羽翼未乾的我要飛離微生物所這個溫暖的家了。

首先我要感謝我的指導教授張永祺老師。除了在實驗方面引領我前進，平時也常給予我們生活上的建議。剛柔並濟且亦師亦友的她，總使實驗室充滿歡笑和披薩，同時亦不失嚴謹的治學態度，更在我跌落人生低谷時拉了我一把，包容任性的我，讓我找到繼續朝目標前進的力量。

也要感謝台大醫技所的邱浩傑老師及中研院生化所的史有伶老師，願意撥冗擔任我的口試委員，在實驗、論文，甚至未來人生規劃上都提供了相當寶貴的意見。

再者我要感謝實驗室的夥伴們：曜誠、鈞棋、逸萱、昭賢，遇見實驗障礙時有他們一起腦力激盪，碰上心情煩悶時有他們一起抒發，遭逢生命瓶頸時有他們為我指點明燈；於公於私，他們都是惠我良多的好夥伴。有他們，生活充滿了淚水和淚水。

最後我要感謝我的家人和朋友，我的阿公、媽媽、兩個妹妹。雖然這兩年可能是我們最辛苦的時光，但幸好我們總是互相體諒，在最無力的時候做彼此最堅強的後盾。

此外，還要感謝台大解剖所的施宏澤助教，提供電子顯微鏡方面的專業技術和指導。以及那些曾在我生命中短暫停留，寬恕我、幫助我的。

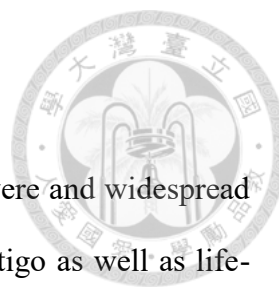


中文摘要

A 型鏈球菌為常見的人類致病菌之一，能造成不同程度的感染，小至輕微的咽喉炎、皮疹，大至侵入性的壞死性筋膜炎、鏈球菌中毒性休克症候群。成功的貼附並侵入宿主表皮細胞是細菌得以造成後續的侵襲感染的重要步驟，目前已經知道 A 型鏈球菌可以表現 M 蛋白、細胞外基質結合蛋白、線毛等多項致病因子來增強其與宿主細胞結合的能力。細菌線毛於 1949 年首次在革蘭氏陰性菌被發現，為由非共價連結的蛋白次單位所組成的長鏈狀聚合體，具有貼附宿主細胞、形成生物膜、電子轉移、接合、運動，還有免疫調節的功能。然而在革蘭氏陽性菌上，則是近十年才開始蓬勃研究其線毛的作用。

組成 A 型鏈球菌線毛所需的基因皆聚在一個稱為 FCT 區域的基因座上，可轉錄出線毛的蛋白次單元及使它們之間產生共價鍵的轉肽酶。不同於革蘭氏陰性菌，革蘭氏陽性菌的蛋白次單位間為共價鍵結，形成的線毛更加纖細。實驗室之前所建構的 A 型鏈球菌 M4 血清型基因剔除株 ($M4 \Delta spy0116$) 係剔除一其具嵌入細胞壁功能的蛋白 Spy0116，因此基因位於 A 型鏈球菌 M4 血清型的 FCT 區域上，故我們猜測突變株的線毛形成應會大受影響。我們的實驗結果發現，*spy0116* 基因與其上下游的基因有被共轉錄的現象， $M4 \Delta spy0116$ 突變株確實缺少表面的長鏈狀構造，其形成生物膜與貼附細胞的能力亦較野生株遜色不少，在小鼠體內實驗中也觀察到此突變株較無法在小鼠皮下存活及造成傷口。綜合以上結果，我們成功的證明線毛對 A 型鏈球菌 M4 血清型要成功的造成表皮感染相關的各項機制均扮演重要角色。未來將繼續研究線毛的表現是否有可能會在其與宿主交互作用時受到影響。

關鍵字：A 型鏈球菌；線毛；生物膜；貼附；表皮感染



Abstract

Group A *Streptococcus* (*Streptococcus pyogenes*, GAS) is a severe and widespread human pathogen that cause mild diseases such as pharyngitis, impetigo as well as life-threatening necrotizing fasciitis and streptococcal septic shock syndrome. Successful colonization and invasion to host epithelial cell is a critical first step for succeeding invasive diseases. Multiple virulence factors have been reported in group A *Streptococcus* to strengthen its interaction with host cells, such as M protein, extracellular matrix-binding proteins and pili. Pili was a long non-covalent proteinaceous structure assembled on bacterial surface first observed in Gram-negative bacteria in 1949 and it is responsible for host cell adherence, biofilm formation, electron transport, conjugation, mobility and immunomodulation. However, functional characterization of pili in Gram-positive bacteria was just began in the past decade.

The genes encoding the streptococcal pilus proteins all cluster in a highly variable pilus island, the fibronectin-binding, collagen-binding, T antigen (FCT) region, which would translate into three pilus subunits and assembly enzymes, sortase. Unlike the non-covalent linkage of pili observed in Gram-negative bacterium, pili in Gram-positive bacteria are composed of covalently linked pilins which polymerize into thin rods with various length. The previously constructed serotype M4 streptococcal mutant, M4 Δ *spy0116*, lacks the cell wall anchor protein encoded by a gene located in the FCT region, therefore, we speculated that the formation of pili in this M4 Δ *spy0116* mutant should be affected. We found that the M4 streptococcal pilus subunits and sortase in the FCT region can be co-transcribed into a polycistronic mRNA. In addition, our data demonstrated that the M4 Δ *spy0116* mutant lacks the long flexible polymers protruding from the bacteria, and are less capable to form biofilm and to adhere to human nasal septum cells. Moreover, in the *in vivo* murine subcutaneous infection model, the pilus-absent mutant resulted in


mild skin infection with reduced bacterium recovery in the lesion compared to the parental wild-type bacteria. In summary, our data suggest that M4 streptococcal pili play a crucial role in all steps responsible for a successful streptococcal skin infection. In the future, we will analyze whether the expression level of pilus components can be modulated during its interplaying with host cells.

Keywords: group A *Streptococcus*; pilus; biofilm; adhesion; skin infection



目錄

口試委員會審定書.....	I
致謝.....	II
中文摘要.....	III
Abstract.....	IV
目錄.....	VI
壹、序論.....	1
一、A 型鏈球菌.....	1
1. A 型鏈球菌 (group A <i>Streptococcus</i> , GAS).....	1
2. 疾病.....	1
二、線毛.....	2
1. 線毛 (pilus; pili).....	2
2. 轉肽酶調控的線毛聚合 (sortase-mediated pilus assembly).....	2
3. A 型鏈球菌的線毛.....	3
三、研究動機.....	3
貳、材料與研究方法.....	5
一、材料.....	5
1. 菌株.....	5
2. 細胞株.....	5
3. 培養基.....	5
4. 抗微生物胜肽.....	6
5. 抗體及 ELISA kit.....	6
6. 引子 (primer).....	7
二、研究方法.....	7
1. 以流式細胞技術分析抗原表現量.....	7
2. 穿透式電子顯微鏡觀察.....	7
3. 免疫金電子顯微鏡觀察.....	8
4. 生物膜形成能力試驗.....	8
5. 細胞貼附能力試驗.....	8
6. 細胞存活試驗.....	9
7. 小鼠皮下感染模型.....	10
8. 抗微生物胜肽感受性試驗.....	10
9. 細菌 RNA 萃取.....	11
10. 細菌互補 DNA 合成.....	11
11. 聚合酶連鎖反應.....	11
12. 洋菜膠體電泳.....	12
參、研究結果.....	13



一、 A 型鏈球菌 M4 血清型基因剔除株的 T 抗原表現量	13
二、 A 型鏈球菌 M4 血清型的線毛表現.....	13
三、 以免疫金電子顯微鏡觀察 A 型鏈球菌 M4 血清型的線毛.....	13
四、 A 型鏈球菌 M4 血清型之 FCT 區域轉錄模式.....	14
五、 生物膜形成能力	14
六、 A 型鏈球菌 M4 血清型的細胞貼附能力	15
七、 A 型鏈球菌 M4 血清型感染後之細胞存活	15
八、 A 型鏈球菌 M4 血清型皮下感染之小鼠模型.....	16
九、 A 型鏈球菌 M4 血清型對抗微生物胜肽之感受性.....	17
肆、 討論	18
圖表目錄	21
參考文獻	33



壹、序論

一、A 型鏈球菌

1. A 型鏈球菌 (group A *Streptococcus*, GAS)

鏈球菌是一種革蘭氏陽性球菌 (Gram-positive cocci)，可按照其在血液瓊脂 (blood agar plate) 上造成的溶血圈將細菌分成 α 、 β 、 γ 三種類別，或依蘭斯菲爾德分類法 (Lancefield classification) 分為 A 到 V 型 (group A~V)¹。其中 A 型鏈球菌，也稱為熱原性鏈球菌 (*Streptococcus pyogenes*)，為一種能造成 β 溶血現象的人類傳染性致病菌。A 型鏈球菌又能再根據其表面的 M 蛋白進一步細分成不同血清型²，且合併血清學及分子生物學方法，時至今日已發現兩百多種不盡相同的菌種。另一種 Lancefield 血清分型是依據抗胰蛋白酶抗原 (trypsin-resistance antigen, T antigen) 將 A 型鏈球菌分成 20 類³，近年來 T 抗原也被證實為 A 型鏈球菌線毛的主成分^{4,6}。

2. 疾病

A 型鏈球菌通常造成皮膚及咽喉的表皮感染，如膿皰病 (impetigo)、咽炎 (pharyngitis)，或因產生的抗體導致急性風濕熱 (acute rheumatic fever)、急性腎絲球腎炎 (acute poststreptococcal glomerulonephritis)，抑或是更侵入性的感染如菌血症 (bacteremia)、壞死性筋膜炎 (necrotizing fasciitis)等。

每年約有 6 億以上人口受到 A 型鏈球菌的侵害，是最常引起咽炎的病原菌。咽炎時常伴隨猩紅熱 (scarlet fever) 發生，患者會感到突如其來的喉嚨痛、高燒、吞嚥困難，喉頭呈深紅色丘疹狀且化膿^{7,8}。另一主要的感染部位為皮膚，可透過直接的皮膚接觸傳染，故常發生在居住於人口集中且衛生落後的熱帶、副熱帶地區的孩童。A 型鏈球菌能往更深更廣的皮下進犯，導致丹毒 (erysipelas)、急性蜂窩性組織炎 (acute cellulitis)。若細菌破壞至筋膜層則會演變為危及生命的壞死性筋膜炎



炎，或侵入血管引發全身性的菌血症，並且造成休克和器官衰竭，稱為鏈球菌中毒性休克症候群 (streptococcal toxic shock syndrome)^{8,9}。

另一方面，A 型鏈球菌的感染可致使免疫併發症的產生，包括急性風濕熱、急性腎絲球腎炎，前者乃起因於分子模倣 (molecular mimicry) 的全身性自體免疫反應，後者為免疫複合物引發的腎臟病變⁸。急性風濕熱約六至八成以關節炎表現，心肌炎次之，而少部分病患會出現神經症狀。由於心肌細胞長時間遭受破壞，使得急性風濕熱成為 A 型鏈球菌高罹病率及致死率的主因^{8,10}。

二、線毛

1. 線毛 (pilus; pili)

線毛是一種長鏈狀，由各種蛋白次單元所組成的構造，這種次單元稱為 pilin。線毛起初於 1950 年代早期在革蘭氏陰性菌上被發現¹¹，其次單元以非共價連結方式組成一聚合物。相較於革蘭氏陰性菌，革蘭氏陽性菌的線毛雖於 1968 年首次被電子顯微鏡觀察到¹²，卻直至 2003 年才藉白喉桿菌 (*Corynebacterium diphtheria*) 發現其生合成方式^{13,14}。革蘭氏陽性菌的線毛直徑約 3 奈米，長度範圍可從 0.1 至 5 微米，一般以 3 種主要的 pilin 組成，之間以共價方式鍵結^{15,16}。革蘭氏陽性菌的線毛基因位在一稱為線毛島嶼 (pilus island) 的致病島嶼 (pathogenicity island) 上^{17,18}，可轉錄出主要的 3 種蛋白次單元：tip pilin、basal pilin、backbone pilin，及一或多種轉肽酶 (sortase)^{19,20}。

線毛有多樣化的功能，包含抽動運動性 (twitching mobility)、接合 (conjugation)、細胞貼附、生物膜 (biofilm) 形成……等^{18,20}。而線毛與細胞間的互動關係，使之亦被認為是多種致病菌的毒力因子之一。

2. 轉肽酶調控的線毛聚合 (sortase-mediated pilus assembly)

截然不同於革蘭氏陰性菌的非共價鍵結，革蘭氏陽性菌的線毛聚合由 pilin 專一性的轉肽酶 (pilin-specific sortase) 切開 tip pilin 上 LPXTG motif (sorting motif)


的蘇胺酸和甘胺酸做為開端，接著裸露出來的部分受到 backbone pilin 上 pilin motif 的離胺酸側鏈攻擊，形成共價鍵。Pilin 專一性的轉肽酶繼續此方式聚合數個 backbone pilin，最後接上 basal pilin。另一種轉肽酶，管家轉肽酶 (housekeeping sortase)，在 basal pilin 和細胞壁上的 lipid II 間創造出類似的共價鍵，終止線毛的合成並使之嵌於細胞壁上^{17,21}。

3. A 型鏈球菌的線毛

繼白喉桿菌後，三種主要的致病性鏈球菌，A 型鏈球菌、B 型鏈球菌、肺炎鏈球菌，亦陸續被指出具有線毛的構造^{4,22-24}。A 型鏈球菌的線毛主要由多個 backbone pilin (BP) 外加一或多的 ancillary pilin (AP) 構成，各個線毛次單位間同樣透過專一的 pilin sortase 生成共價鍵結。BP 為線毛組成時不可或缺的蛋白，其含量的多寡影響了線毛的長度，且是決定 T 抗原血清型的關鍵⁵。而 AP 通常有兩類，AP 1 位在線毛頂端遠離細菌表面處，可促進 A 型鏈球菌的貼附；AP 2 則位於線毛底端，作為線毛和細胞壁肽聚糖連結的橋樑。

A 型鏈球菌的線毛蛋白由一段高度變異的 FCT 區域 (fibronectin-binding, collagen-binding, T-antigen region, FCT region) 轉錄轉譯而成，目前已歸納出 9 種不同的 A 型鏈球菌的 pilus island²⁵，大小範圍約在 11 至 16 kb 間。A 型鏈球菌 M4 血清型具有第五種 FCT 區域 (FCT-5) 所生成的線毛，基因簇的最上游為高保留的熱休克蛋白 33 (*hsp 33*)，下游銜接主要調控線毛基因轉錄的 *rofA*，再往下游為可結合纖維蛋白 (fibronectin) 的 *prtF1* 及 *spy0115*，而 *spy0116*、*spy0117* 可和細胞壁相連，此三個基因依序可能為 *AP1*、*backbone pilin*、*AP2*，最後結束在 3 個轉肽酶基因。不若其他 FCT 區域，FCT-5 尚未被完整的詳細定義其各個基因的功能^{17,20,21,25,26}。

三、研究動機



2005 年發表於美國國家科學院院刊 (PNAS) 的一篇文章，發現不同血清型的 A 型鏈球菌皆有類似線毛的構造，且是由 T 抗原構築而成⁴。而 A 型鏈球菌的線毛基因所在的致病島嶼稱為 FCT 區域 (fibronectin-binding, collagen-binding, T-antigen region, FCT region)，可轉錄出多種結合細胞外基質的蛋白，和可被 Lancefield T-serotyping system 所辨認的抗原。基於基因的種類和組成，目前已知有 9 種多樣的 FCT 區域可歸納不同血清型的 A 型鏈球菌，如：吸引最多研究的 M1 被歸類於 FCT-2，M6 被分類於 FCT-1，FCT-3 包含 M3、M5、M18、M33、M49、M53 等血清型，FCT-4 有 M12 及 M28；而另外二種 FCT 區域 (FCT-5：M4，FCT-6：M2) 則尚未被完整的了解^{6,20,25,26}。

而實驗室先前建構的 GAS M4 Δ *spy0116* 基因剔除株，其基因剔除部分經查找 A 型鏈球菌 M4 血清型之完整基因組 (*Streptococcus pyogenes* MGAS10750)，發現剔除之基因將轉錄出細胞壁嵌入蛋白。我們合理懷疑此基因座落於 M4 血清型的 FCT 區域上，故除去之應會使細菌缺失完整線毛，進而影響其形成生物膜及貼附細胞的能力，並使突變株細菌的毒力下降，相比之下較不具對表皮細胞的感染力。



貳、材料與研究方法

一、材料

1. 菌株

Name		Medium
<i>Streptococcus pyogenes</i> M4	CDC 4063-05	THB / THY
<i>Streptococcus pyogenes</i> M4 <i>Δspy0116</i>	Lab construct	THB / THY
M4 Wild-type + GFP	pDCerm + GFP	THY + 5μg/ml erythromycin
M4 <i>Δspy0116</i> + GFP	pDCerm + GFP	THY + 5μg/ml erythromycin

2. 細胞株

(1) RPMI 2650

RPMI 2650 是人類鼻中膈上皮細胞，培養基為 Minimum Essential Medium with Earle's Balanced Salts (MEM/EBSS)，並添加 10% 去活化的胎牛血清 (FBS)、1mM 丙酮酸鈉、非必需胺基酸及最終濃度為 4.5g/L 的碳酸氫鈉，且置於 37°C、5% CO₂ 培養箱。

(2) A549

A549 是人類肺上皮細胞，培養於添有 10% 去活化的胎牛血清 (FBS) 之 RPMI 1640 培養基，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱。

(3) HaCaT

HaCaT 是人類角質細胞，培養方式同為使用添有 10% 去活化的胎牛血清 (FBS) 之 RPMI 1640 培養基，並置於 37°C、5% CO₂ 培養箱。

3. 培養基

(1) Todd-Hewitt Broth (THB)

是一種常用來培養 A 型鏈球菌的培養基，每公升蒸餾水加入 30 克 THB



粉末即為 THB broth。

(2) THB agar

THB broth 加上 1.5% Agar。

(3) THY broth

THB broth 加上 2% 酵母萃取物 (Yeast Extract)。

(4) C medium

每公升蒸餾水含有 0.5% Proteose Peptone no.3、1.5% Yeast Extract、10mM K_2HPO_4 、0.4mM $MgSO_4$ 、17mM NaCl，並且調整 pH 值至 7.5。

4. 抗微生物胜肽

(1) LL-37 (AnaSpec, Cat. No. AS-61302)

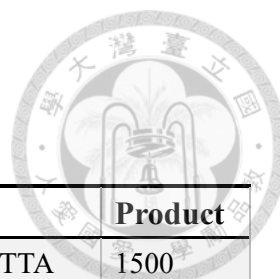
人體內的抗微生物胜肽，屬於抗菌肽類 (cathelicidin)，由 37 個胺基酸組成。廣泛存在於各組織的表皮細胞及免疫細胞中，如：腸胃道、呼吸道、皮膚、睪丸、嗜中性球、單核球、淋巴球等。其序列為 *LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES*

(2) CRAMP (Bachem, Cat. No. H-6526.0001)

Cathelicidin-related antimicrobial peptide，小鼠體內的抗微生物胜肽，由 33 個胺基酸組成。在顆粒球及骨髓系的脊髓細胞有大量表現。其序列為 *GLLRKGGGEKIGEKLLKIGQKIKNFFQKLVPQPEQ*

5. 抗體及 ELISA kit

Name	Catalog Number	Source
Anti-Streptococcus group A antibody [5A1]	ab36303	Abcam
Anti-Streptococcus Group A T4 protein antibody	ab79418	Abcam
Mouse CCL2 ELISA kit	88-7391-88	eBioscience
Mouse CXCL1/KC Quantikine ELISA kit	MKC00B	R&D Systems



6. 引子 (primer)

Working stock 濃度皆為 10 μ M。

Name	Amplified region	Sequences (5'→3')	Product
M4spy114-115F M4spy114-115R	region between <i>spy0114</i> and <i>0115</i>	AGATACGCGTCCGAAGTTA CCTAAGGTAACCATCAGTC	1500
M4spy115-116F M4spy115-116R	region between <i>spy0115</i> and <i>0116</i>	GTACTATGATGGGTATTGCT AAGTCCTGTATAAGTCCCAT	368
M4spy116-117F M4spy116-117R	region between <i>spy0116</i> and <i>0117</i>	CAACTCTTACAATGGGCATA ATCGATAGCATCAAGCGAAT	297
M4spy117-118F M4spy117-118R	region between <i>spy0117</i> and <i>0118</i>	CTAGGTGTCTATCTGGTAC AGGTCTACATCATGCAAACCT	350
qPCR-plr-F qPCR-plr-R	Aldehyde dehydrogenase	CGTGGTGGTGACCTTCG CTCAGTTACTGATCCAGTTG	159
qPCR-GASgyrA-5 qPCR-GASgyrA-3	DNA gyrase subunit A	GAAGTGATCCCTGGACCTGA CCCGACCTGTTTGAGTTGTT	159


二、研究方法

1. 以流式細胞技術 (Flow Cytometry) 分析抗原表現量

將 M4 GAS wild-type 及 Δ *spy0116* 培養在 THY broth 中，置於 37°C 培養箱，隔夜再將之恢復至細菌成長的指數期 ($OD_{600} = 0.4$)。分別取指數期與停滯期細菌，以適量 PBS 清洗 1 次，並回溶於 1% 牛血清白蛋白的 PBS 溶液 (1% BSA/PBS) 中，調整菌液濃度為 2×10^8 CFU/ml。接著各取 100 μ l 上述菌液，加入 2 μ g anti-M4 及 anti-T4 一級抗體，在 4°C 環境下染色 20 分鐘，並以適量 1% BSA/PBS 清洗 2 次。再加入以同樣緩衝溶液 1:1000 稀釋的二級抗體，在 4°C 環境下染色 20 分鐘後，重複清洗動作 2 次。最後以 500 μ l 緩衝溶液回溶之，即可以流式細胞儀分析。

2. 穿透式電子顯微鏡觀察

分別取指數期之 M4 GAS wild-type 及 Δ *spy0116* 5×10^8 顆，以適量 PBS 清洗 2 次。接著以 1 ml 固定液 (0.1M Sodium Cacodylate Buffer，含 4%



Paraformaldehyde、2.5% Glutaraldehyde) 回溶，於室溫中靜置固定 2 小時，後再同樣以適量 PBS 清洗 2 次，最後回溶於 PBS 中。取 5 μ l 之菌液小心滴於網格 (grid, TAAB) 上，靜置 5 分鐘後，以濾紙自網格邊吸乾多餘菌液，陰乾並保存於乾燥箱中。以 1% 磷鎢酸 (Phosphotungstic Acid) 染 60 秒，並以濾紙吸乾多餘染劑，接著以超純水清洗 10 秒，且以濾紙吸乾多餘超純水。最後置於室溫中風乾後便可上機分析。


3. 免疫金電子顯微鏡觀察

分別取指數期之 M4 GAS wild-type 及 Δ spy0116 以適量 PBS 清洗 2 次，回溶於 PBS 中且調整菌液為 4×10^8 CFU/ml。取 5 μ l 之菌液小心滴於鎳網 (nickel grid, TAAB) 上，靜置 5 分鐘後，以濾紙自網格邊吸乾多餘菌液，再以 2% Paraformaldehyde (PFA) 固定 5 分鐘，吸掉多餘液體。接著室溫下以 1% BSA/PBS blocking 30 分鐘後，滴上 1:20 稀釋的 anti-T4 一級抗體染 30 分鐘，並以適量 PBS 清洗 10 秒，重複清洗 2 次。同樣 1:20 稀釋和 18nm 金顆粒結合的二級抗體染 30 分鐘，清洗 2 次。最後再以 2% PFA 固定 10 分鐘後蒸餾水清洗 20 秒，風乾後即可上機分析。

4. 生物膜形成能力試驗

分別取指數期之 M4 GAS wild-type 及 Δ spy0116 以適量 PBS 清洗 1 次，回溶於添有 20 mM 葡萄糖的 C medium 中，且調整菌液為 10^4 CFU/ml 及 10^5 CFU/ml，並於 96 孔細胞培養盤中每格加入 100 μ l 菌液，培養於 37°C 環境下 24、48 小時。一定時間後，先以 PBS 小心清洗 2 次並以甲醇固定後風乾。接著以 0.2% 結晶紫水溶液染色 15 分鐘且清洗 2 次，最後加入 1% SDS 10 分鐘，直至溶解出染上的結晶紫，再以 OD 值 540 nm 測量。生物膜的生成量與 OD 值強度成正比。

5. 細胞貼附能力試驗



RPMI 2650 細胞 (1×10^6 cells/well, 1ml/well) 培養於 24 孔細胞培養盤中，隔日去除培養液並以 PBS 清洗 1 次，換上 400 μ l/well 含 10% FBS 的 RPMI 1640 細胞培養液 (RPMI + 10% FBS)。接著取指數期之帶有 GFP 基因的 M4 GAS wild-type 及 Δ spy0116，同樣以 PBS 清洗 1 次後，再回溶於含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培養基，且調整菌液濃度至 5×10^7 CFU/ml、 1.5×10^8 CFU/ml、 5×10^8 CFU/ml，並分別加入 100 μ l 菌液於每格細胞中。以轉速 1600 rpm 離心 5 分鐘後，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱培養 30 分鐘。取出後先以 PBS 清洗 6 次，再加入 5mM EDTA/PBS，並置於 37°C 培養箱 5 分鐘使細胞脫離培養盤。將取出之細胞最後回溶在 500 μ l FACS 緩衝液 (1% PBS，含 1% FBS、0.1% NaN₃)，以流式細胞儀判讀此實驗結果。

6. 細胞存活試驗

RPMI 2650 (2×10^5 cells/well)、HaCaT (2.5×10^4 cells/well) 分別培養 96 孔細胞培養盤中，隔日去除培養液，換成 100 μ l/well 各自的培養液。接著以細胞培養液回溶清洗過 1 次的 M4 GAS wild-type 及 Δ spy0116，於每格 RPMI2650 細胞中分別加入 100 μ l 菌液，濃度為 10^7 CFU/ml、 3×10^7 CFU/ml、 10^8 CFU/ml，HaCaT 則加入濃度為 2.5×10^6 CFU/ml、 7.5×10^6 CFU/ml、 2.5×10^7 CFU/ml 之菌液 (MOI 依序標示為 10、30、100)，並以轉速 1600 rpm 離心 5 分鐘，置於 37°C、5% CO₂ 培養箱感染 1 小時。之後再添加 50 μ l/well 含有青黴素和鏈黴素 (500 U/ml)、慶大黴素 (500 μ g/ml) 的培養液，繼續於培養箱中培養 5 及 23 小時 (總計 6 及 24 小時)。取出後細胞先以 PBS 清洗 2 次，再以甲醇固定 10 秒。陰乾後以 0.1% 結晶紫水溶液染色 5 分鐘，並以 PBS 清洗 5 次直到完全洗淨多餘染劑。最後以 1% SDS 完全溶解出染上的結晶紫，再以 OD 值 540 nm 測量。細胞存活力計算方式為單格樣本 OD 值除以同時培養之未感染細胞 OD 值。



7. 小鼠皮下感染模型

小鼠為 ICR 六週大的雌鼠，自台大醫學院動物中心繁殖組購得。先於兩天前將小鼠去除下背毛髮及毛根，後取 PBS 清洗一次指數期之 M4 GAS wild-type 及 $\Delta spy0116$ ，再將 2×10^8 顆菌以 50 μ l 無菌的 PBS 回溶。接著，上述菌液以皮下注射方式 (subcutaneous injection) 注入背部，M4 WT 注射於左下側近大腿處， $\Delta spy0116$ 注射於右下側處。觀察注射處三至七天。

(1) 傷口大小

將小鼠之紅腫的注射部位每天以相機記錄，後以 Image J 分析。

(2) 組織病理切片

於皮下感染後第三天及第七天以 isoflurane 犧牲小鼠。收取數隻小鼠的紅腫傷口處放入組織包埋盒中，以 10% 福馬林固定後脫水包埋切片，並拍照記錄其患部皮下狀態。

(3) 傷口菌數

於皮下感染後第三天及第七天以 isoflurane 犧牲小鼠。收取數隻小鼠的紅腫傷口處放入裝有直徑 1mm 震盪珠 (BioSpec, Cat. No. 11079110z) 的試管 (BioSpec, Cat. No. 10832) 中，並利用組織均質機 (MagNa Lyser, Roche) 以 6000 rpm 震盪 30 秒 3 次。磨碎後，其中取出 20 μ l 組織液序列稀釋，再滴於 THB agar 上，回推尚存於傷口的細菌。

(4) 細胞激素

將上一步驟之組織液於 4°C、最高轉速離心 10 分鐘，保留上清液，利用酵素免疫分析法 (ELISA) 分析患部之細胞激素濃度。

8. 抗微生物肽感受性試驗

分別取指數期之 M4 GAS wild-type 及 $\Delta spy0116$ 以適量 PBS 清洗 1 次，回溶於 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 加上 20% THY 的培養液中，且調整菌液為 10^5 CFU/ml。接著在一 96 孔細胞培養盤中每格加入 90 μ l 菌

液，再加入 10 μ l 已 2 倍序列稀釋完畢的 LL-37、CRAMP，並放置於 37°C 培養箱，20 至 24 小時後取出觀察培養液的顏色變化。培養液維持原澄清淡橘色表示細菌未生長，細菌生長則呈混濁黃色，而使細菌不生長的最低濃度即為最小抑菌濃度。

9. 細菌 RNA 萃取

(1) 細菌裂解

分別將指數期之 M4 GAS wild-type 及 Δ *spy0116* 以適量 PBS 清洗 1 次，並取 1×10^8 顆菌回溶於 100 μ l 細菌裂解溶液 (100mM Tris Buffer pH 7.4, 含 25% 葡萄糖、10 mM EDTA、2.5 mg/ml Lysozyme、500 U/ml Mutanolysin、0.5 mg/ml Proteinase K)。接著將上述液體於 37°C 的環境下作用 30 分鐘後，直接加入 1 ml TRIzol Reagent (Ambion, Cat. No. 15596018)，再置於室溫 10 分鐘，成為組織均質液。


(2) RNA 純化

組織均質液依照 Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research, Cat. No. R2052) 說明書中所述 RNA Purification 步驟操作。初步洗出的 50 μ l RNA 萃取物再加入 2.5 μ l RNase-free DNase、10 μ l Buffer RDD (Qiagen, Cat. No. 79254) 及適量的 RNase-free H₂O 補至 100 μ l，溫和混合均勻後靜置室溫下 10 分鐘。接著，再依照 Direct-zol RNA MiniPrep 說明書中所述 RNA Cleanup 步驟操作，得到純淨的 RNA 萃取物。

10. 細菌互補 DNA (complementary DNA, cDNA) 合成

取 0.5 μ g RNA 按照 PrimeScript RT reagent (Perfect Real Time) (Takara, Cat. No. RR037A) 說明書中所述 Reverse Transcription 之 For SYBR Green qPCR assay 步驟操作。

11. 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)



使用的引子如本文材料與研究方法之引子所示。PCR 反應前 M4 GAS wild-type 及 *Δspy0116* 的 genomic DNA 需先稀釋 10 倍，而 RNA 則調整為 0.05 μg/μl。每個 20 μl 的反應包含 1 μl DNA 或 RNA (作為 negative control)、一對前置引子 (forward primer) 及反置引子 (reverse primer) 各 1 μl、去離子水 7 μl，和 EmeraldAmp Max PCR Master Mix (2X premix) (Takara, Cat. No. RR320) 10 μl。溫度條件：首先 95°C 3 分鐘，之後 27 個循環為 95°C 30 秒、56°C 30 秒 (qPCR-GASplr 為 54°C)、72°C 60 秒，最後再 72°C 5 分鐘。

12. 洋菜膠體電泳 (Agarose gel electrophoresis)

分別將 PCR 產物及 100bp Nautia DNA Ladder (Nautia gene) 填入混有適量 DNA View (Tools, Cat. No. TT-DNA01) 的 1.5% (w/v) TBE agarose gel 中，置於水平式 DNA 電泳槽並以 100 伏特進行電泳。最後使用 BioDoc-It Imaging System (UVP) 觀測並記錄結果。



參、研究結果

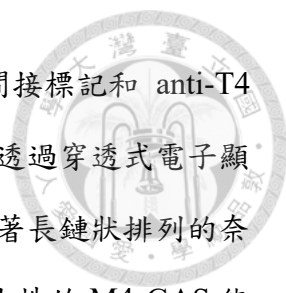
一、A 型鏈球菌 M4 血清型基因剔除株的 T 抗原表現量

實驗室先前建構的 M4 GAS 基因剔除株， $M4 \Delta spy0116$ ，其剔除部分經比對 A 型鏈球菌 M4 血清型之基因組 (*Streptococcus pyogenes* MGAS10750)，發現去除之基因將轉錄出細胞壁嵌入蛋白 (cell wall anchor protein 0116)。我們推測此基因座落於 M4 GAS 的 FCT 區域，其轉錄之蛋白可能為組成線毛的次單元之一，且可被 Lancefield T-serotyping system 所辨認 (T antigen)，故 $M4 \Delta spy0116$ 之 T 抗原表現應受到影響。首先以 anti-M4、anti-T4 抗體分別標記 M4 GAS wild-type 及 $M4 \Delta spy0116$ 表面之 M 抗原、T 抗原，並藉由流式細胞儀分析抗原表現量。由圖一結果可知，兩株細菌於指數期狀態時，其 M4 表現量並無差異，而停滯期的 $M4 \Delta spy0116$ 表現較多的 M 抗原 (圖一、A)；然而無論是指數期或停滯期，M4 WT 的 T4 表現量皆高於 $M4 \Delta spy0116$ 。顯示去除 *spy0116* 基因確實使 $M4 \Delta spy0116$ 之 T 抗原受到影響並減少表現量。

二、A 型鏈球菌 M4 血清型的線毛表現

之前文獻提到不同血清型的 A 型鏈球菌皆有類似線毛的結構，且是由 T 抗原構築而成，故 T 抗原表現量降低的 $M4 \Delta spy0116$ ，其線毛表現理應隨之下降。所以，以常作為穿透式電子顯微鏡技術中負染色的染劑，1% 磷鎢酸 (PTA)，使細菌外圍被重金屬包覆，並與背景呈現強烈對比，再利用穿透式電子顯微鏡觀察。從圖二的電子顯微照片來看，上圖的 M4 WT 表面明顯有數條長短不一的長鏈狀線毛，下圖的 $M4 \Delta spy0116$ 則沒有。可見剔除 *spy0116* 基因不僅讓 $M4 \Delta spy0116$ 之 T 抗原量下降，亦使其無法正常表現線毛。

三、以免疫金電子顯微鏡觀察 A 型鏈球菌 M4 血清型的線毛



另外，我們更進一步利用與奈米金粒子連結的二級抗體，間接標記和 anti-T4 抗體結合的 M4 GAS wild-type 及 M4 Δ *spy0116* 表面 T 抗原，並透過穿透式電子顯微鏡觀察視野下的黑點。由圖三、A 可見 M4 WT 周圍有數顆沿著長鏈狀排列的奈米金粒子堆積，圖三、B 的 M4 Δ *spy0116* 則無。此結果表示野生株的 M4 GAS 能正常表現 T 抗原，且構成細菌的線毛；而基因剔除株缺少 T 抗原表現，也無法生成完整的線毛。

四、A 型鏈球菌 M4 血清型之 FCT 區域轉錄模式

此外，從基因方向去探究剔除 *spy0116* 基因是否會對其他位於 FCT 區域的基因造成影響，能確認 M4 Δ *spy0116* 的線毛缺失係由於 cell wall anchor protein 0116 的缺乏，而非其他 pilin 的轉錄失敗。設計 *spy0114* 至 *spy0118* 間四個基因間區段 (intragenic region) 的引子為實驗組 (圖四、A)，乙醛脫氫酶、DNA 旋轉酶 A 的引子為控制組，再分別以 M4 WT 及 M4 Δ *spy0116* 的 genomic DNA、cDNA、RNA 作為模板 (template)，藉由聚合酶連鎖反應放大目標區段並電泳分析。圖四、B 的電泳結果顯示 M4 WT 僅無法轉錄出第一組基因間區段，可知 *spy0114* 和 *spy0115* 是單基因轉錄 (monocistronic transcription)，彼此間不受影響；*spy0115* 至 *spy0118* 可能是多順反子轉錄 (polycistronic transcription)，故居於之間的三組基因間區段皆可順利轉錄。M4 Δ *spy0116* 因欠缺 *spy0116* 而無法作出第二、三組的產物，第四組基因間區段同樣能成功轉錄，表明縱使為多順反子轉錄方式，缺少 *spy0116* 基因並不連帶影響下游基因的表達。

五、生物膜形成能力

先前文獻指出 A 型鏈球菌的線毛可以促進生物膜 (biofilm) 的形成，進而在侵入宿主時，或許能作為 GAS 用來抵禦宿主免疫反應的武器。因此 M4 GAS 基因剔除株除了缺少完整線毛構造外，形成生物膜的能力也可能下降。分別將 M4 GAS wild-type 及 M4 Δ *spy0116* 培養一至二日後，觀察各別菌株生成生物膜的多寡。結



果無論是 24 小時 (圖五、A) 或 48 小時 (圖五、B)，M4 WT 所形成的生物膜皆顯著多於 M4 $\Delta spy0116$ 。顯示 M4 $\Delta spy0116$ 形成生物膜的能力確實受線毛缺失的影響而降低。

六、A 型鏈球菌 M4 血清型的細胞貼附能力

在細菌感染的過程中，除了一些可促進黏附的黏附素 (adhesin) 外，線毛於一開始的貼附，直至在宿主細胞上形成聚落 (colonization)，皆扮演了關鍵的角色。而 A 型鏈球菌的貼附能力，亦受到 M 蛋白及線毛的影響。GAS 可能會利用表面的長鏈狀線毛初步接觸宿主細胞，藉線毛上的 pilus ancillary protein 拉近本身和細胞的距離後，再由更多的 adhesin 完成 colonization。先前已有文獻探討 A 型鏈球菌 M1 血清型經線毛調節的貼附作用，是以接著使用線毛缺失的 M4 $\Delta spy0116$ 比較線毛存在與否對 M4 GAS 附著宿主細胞造成的影響。分別以不同量之帶有綠色螢光蛋白基因的 M4 GAS wild-type 及 M4 $\Delta spy0116$ 感染人類鼻中膈細胞，RPMI 2650，培養 30 分鐘後，再經由流式細胞儀分析細菌貼附於細胞的程度，其中偵測到的螢光量愈高代表細胞上的細菌愈多。從初步的直方圖 (圖六、A) 和以平均螢光強度繪成的長條圖 (圖六、B)，皆發現隨著菌量的增加，M4 WT 黏附於 RPMI 2650 細胞上的數目明顯增加；而在同樣菌量下，M4 WT 附上細胞的數量也較 M4 $\Delta spy0116$ 多。結果顯示 M4 $\Delta spy0116$ 之附著細胞能力有顯著減弱，可推測線毛在 M4 GAS 感染咽喉上皮細胞時是不可或缺的。

七、A 型鏈球菌 M4 血清型感染後之細胞存活

承接上一個結果，接下來測試剔除 *spy0116* 基因是否會進一步削弱 M4 GAS 的毒力。除 RPMI 2650 細胞之外，另取一株人類角質細胞 HaCaT 作為觀測目標。同樣以不同量之 M4 GAS wild-type 及 M4 $\Delta spy0116$ 分別感染此二種細胞，1 小時後加入青黴素和鏈黴素、慶大黴素清除多餘細菌，且繼續於 37°C 環境下培養至 6、24 小時。之後洗去受細菌感染而死亡的細胞，再以 0.1% 結晶紫水溶液將尚留存


的細胞染成藍紫色，並以吸光值判定存活的細胞量。圖七中，無論何種細胞，在同菌量、同時間點的狀況下，受 M4 WT 感染之細胞存活量皆低於 M4 $\Delta spy0116$ 。此外，隨著感染的菌量和時間增長，RPMI 2650 細胞的死亡量亦有明顯上升。說明相形之下，M4 $\Delta spy0116$ 造成上皮細胞死亡的能力有些許弱化，推論 spy0116 蛋白不僅能構成 M4 GAS 的線毛，也可能是其眾多的毒力因子之一。

八、A 型鏈球菌 M4 血清型皮下感染之小鼠模型

A 型鏈球菌通常能感染人類的咽喉及皮膚上皮組織，造成如咽喉炎或膿疱病 (impetigo)；因此，透過感染小鼠的皮下組織觀察 *spy0116* 基因的有無對 M4 GAS 毒力的影響。首先，將小鼠下背的毛髮和毛根去除乾淨，方便日後察看傷口外觀。再以皮下注射方式於小鼠左下側近大腿處施打 2×10^8 CFU 的 M4 WT，右下側施打等量的 M4 $\Delta spy0116$ ，待三至七天後取下患部製成病理切片觀看免疫細胞聚集的情形，並計算該處尚存活的細菌及分析細胞激素的濃度，同時記錄過程中傷口的外觀變化。

從感染後第二天及第六天的傷口照片來看，M4 WT 能在小鼠皮膚造成較大的傷口，並有明顯膿胞和結痂的情況，而 M4 $\Delta spy0116$ 僅形成紅腫至小範圍的膿胞 (圖八、A)。且分析感染後第二天 (圖八、B) 及第一至第六天 (圖八、C) 的損傷範圍大小，可清楚知道 M4 WT 均能在小鼠皮膚引起顯著較大的傷口。而從感染第三天的病理組織切片會發現，M4 WT 能在局部吸引到較多的發炎細胞，組織潰爛和增厚也較嚴重，相形之下 M4 $\Delta spy0116$ 則引發較輕微的發炎反應 (圖九、A)；感染七天後雖然發炎反應都趨於和緩，仍可見有較多白血球停留於受 M4 WT 感染的組織 (圖九、B)。

其次，完整取下患部並磨碎後回收留存於此的細菌，發覺感染三天後 M4 WT 顯然比 M4 $\Delta spy0116$ 在皮下存活較多 (圖十、A)，感染七天後，其中一部分 M4 WT 的存活率依然較 M4 $\Delta spy0116$ 高，一部分則不然 (圖十、B)。另外，將上述磨碎得到的組織液，離心過後分別偵測傷口的細胞激素濃度：keratinocyte chemoattractant



(KC)、CCL2。前者即為 CXCL1，能引誘嗜中性球至發炎部位，後者能引誘單核球和記憶 T 細胞，但對嗜中性球不具趨化功能。無論感染第三或第七天，M4 WT 局部所累積的 KC 濃度皆比 M4 Δ spy0116 高，而 CCL2 則無明顯差異（圖十一）。

由小鼠皮下感染模型的結果可知，M4 Δ spy0116 在活體內的感染力和存活力皆遜色於 M4 WT，也無法引起較強烈的局部發炎反應。推測 spy0116 蛋白在 M4 GAS 和上皮細胞之間的互動關係扮演了相當重要的角色。

九、A 型鏈球菌 M4 血清型對抗微生物胜肽之感受性

當組織面對入侵者時，釋放抗微生物胜肽 (antimicrobial peptide, AMP) 被認為是對抗病原體的第一道防線。抗微生物胜肽廣泛存在於各種真核細胞，包括消化系統、免疫系統中的上皮和淋巴細胞，亦能在感染時調節免疫反應。故再分別以人類及小鼠的抗微生物胜肽 (LL-37、CRAMP) 測試 M4 GAS 對其的感受程度。將 M4 GAS wild-type 和 M4 Δ spy0116 和 2 倍序列稀釋的 LL-37、CRAMP 各別培養 20 至 24 小時後，隔日判定最小抑菌濃度。儘管 M4 WT 的線毛有正常表現，對 LL-37 和 CRAMP 的感受性仍較缺少線毛的 M4 Δ spy0116 敏感 (表一)，表示線毛可能無法幫助 M4 GAS 躲避此二種抗微生物胜肽的攻擊。



肆、討論

先前文獻指出 A 型鏈球菌 M4、M22 血清型皆缺少 *hasABC* 基因，無法合成由透明質酸 (hyaluronic acid) 組成的莢膜，卻仍舊引起黏膜及呼吸道上皮的疾病，甚至嚴重的侵入性感染^{27,28}。而實驗室之前建構一株無法與 haptoglobin 鍵結的 M4 GAS 基因剔除株，M4 Δ *spy0116*，證實其和 M4 GAS wild-type 對免疫細胞的感受性是有差異的，M4 Δ *spy0116* 相較之下不利於在血液中存活，也較易被嗜中性球清除。有趣的是，*spy0116* 基因經對照 M4 A 型鏈球菌的基因組 (*Streptococcus pyogenes* MGAS10750)，發現剔除的基因將轉錄出 cell wall anchor 蛋白。我們合理懷疑此蛋白即是組成 M4 GAS 線毛的 backbone pilin，且基因座落於 FCT 區域上。故基因剔除株 M4 Δ *spy0116* 應缺乏完整的線毛構造，連帶影響細菌和宿主細胞間的互動關係。

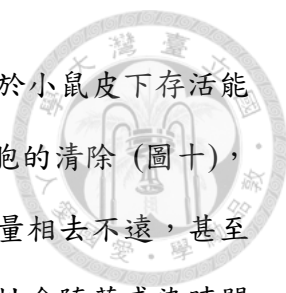
首先，我們從構造層面著手。A 型鏈球菌的 FCT 區域可轉錄出多種結合細胞外基質的蛋白，和可被 Lancefield T-serotyping system 所辨認的抗原 (T antigen)。藉由流式細胞技術發現，不論處在細菌快速複製的指數期或生長和死亡達動態平衡的停滯期，M4 WT 的 T4 抗原表現量皆高於 M4 Δ *spy0116*，顯示 M4 Δ *spy0116* 的 T 抗原轉錄的確受剔除 *spy0116* 基因的影響而減少 (圖一)。而 A 型鏈球菌的線毛係由 T 抗原組成，直接透過穿透式電子顯微鏡所拍攝的照片比較兩株 M4 GAS 的外觀，可清楚看見 M4 Δ *spy0116* 表面不具有如 M4 WT 一般的長鏈狀結構 (圖二)，亦不能與間接標記 T 抗原的奈米金粒子結合，所以不見沿著長鏈狀排列的黑點堆積在 M4 Δ *spy0116* 周圍 (圖三)。是以就細菌構造而言，將 *spy0116* 基因剔除確實使 M4 GAS 無法順利合成線毛。

換個角度切入，聚合酶連鎖反應的結果為 *spy0116* 基因的剔除提供了部分證據：一方面說明去除此基因不會連帶影響其上下游基因的表達，表示 M4 Δ *spy0116* 的線毛缺陷僅是欠缺單一 pilin 的緣故，另一方面則意味著 *spy0115* 至 *spy0118* 基

因也許是轉錄成多順反子 mRNA (polycistronic mRNA) 的形式 (圖四)。儘管遺傳密碼由同一條 mRNA 攜帶, *spy0116* 下游基因仍可在缺乏 *spy0116* 基因的情況下正常表現; 然則經由熱休克法將 *spy0116* 基因以質體送回 M4 Δ *spy0116*, 卻無法使 complement strain 的 T4 抗原表現量回復正常, 暗示 M4 GAS 的線毛合成除了 pilin 基因的完整外, 或許還受到其他未知的調控。而雖然不同於革蘭氏陰性菌的線毛, 革蘭氏陽性菌的線毛是以各個次單元共價聚合而成的長鏈狀結構, 但都有著多樣化的功能, 包含貼附、運動、生物膜 (biofilm) 形成, 甚至調節免疫反應。

再來, 我們探討失去線毛對 M4 GAS 功能層面的改變。在生物膜形成方面, 線毛可促進其生成, 或許能保護細菌躲避宿主的免疫攻擊。既然如此, M4 GAS 基因剔除株的生物膜形成能力應當由於線毛缺陷而降低; 在培養一、二日後, M4 Δ *spy0116* 所形成的生物膜顯著少於 M4 WT (圖五), 與預期相符。在細菌的毒力方面, 曾有人提出 A 型鏈球菌可能會經由延伸出的線毛先觸及宿主細胞, 再完成進一步的附著並形成聚落 (colonization)²⁰, 之後亦有研究證明 M1 血清型的線毛在感染細胞過程中的重要性^{29,30}。無獨有偶的, 目前的實驗結果發現缺失 *spy0116* 基因的 M4 Δ *spy0116* 不能有效地貼附到 RPMI 2650 細胞 (圖六), 並且造成角質和呼吸道上皮細胞死亡的能力也較 M4 WT 低 (圖七)。

延續以上體外實驗的證據, 接著我們觀察 M4 GAS 在小鼠皮下的感染情形。利用以皮下注射方式將兩株 M4 GAS 分別接種於小鼠背部皮膚, 藉以模擬皮膚遭細菌侵入的狀態。初步從外觀上即可分辨 M4 WT 及 M4 Δ *spy0116* 的毒力差異, 感染初期, M4 WT 在小鼠身上致使的傷口自紅腫漸漸發展至潰爛, 且膿腫清晰可見, 直至感染後第四天傷口開始癒合; 而 M4 Δ *spy0116* 在同一隻小鼠身上至多生成顯著較 M4 WT 範圍小的膿腫, 表皮仍維持完整, 傷口並沒有太大變化 (圖八)。另一方面從病理組織切片可見 M4 WT 引發較強烈的發炎反應, 吸引至局部的多形核白血球 (polymorphonuclear leukocyte, PMN) 較 M4 Δ *spy0116* 多 (圖九)。然而在取傷口時發現, M4 Δ *spy0116* 所造成的膿瘍事實上很集中厚實, 並不亞於 M4 WT 的,



也有諸多沾黏。另外，感染後第三天的傷口細菌量顯示 M4 WT 於小鼠皮下存活能力較好，可能 M4 GAS 的線毛有助於其在感染初期抵抗吞噬細胞的清除（圖十），不過 M4 Δ *spy0116* 在感染後第三天至第七天，留存於患部的數量相去不遠，甚至後期的存活率較部分的 M4 WT 佳，或許線毛對 M4 GAS 的重要性會隨著感染時間的拉長而下降。此外，局部的細胞激素濃度也有所區別：如主要趨化嗜中性球的 KC，在 M4 WT 感染的區域比 M4 Δ *spy0116* 高，但引誘單核球、不趨化嗜中性球的 CCL2 在濃度上則沒有差別（圖十一），與病理組織切片的結果相符合。因此以細菌功能來說，結合上述在體外或在體內的實驗，可以說明線毛不僅對 M4 GAS 貼附咽喉及皮膚上皮細胞是關鍵的，也會接連影響細菌的感染能力，乃至於後續引起的免疫反應，是 M4 GAS 相當主要的毒力因子之一。

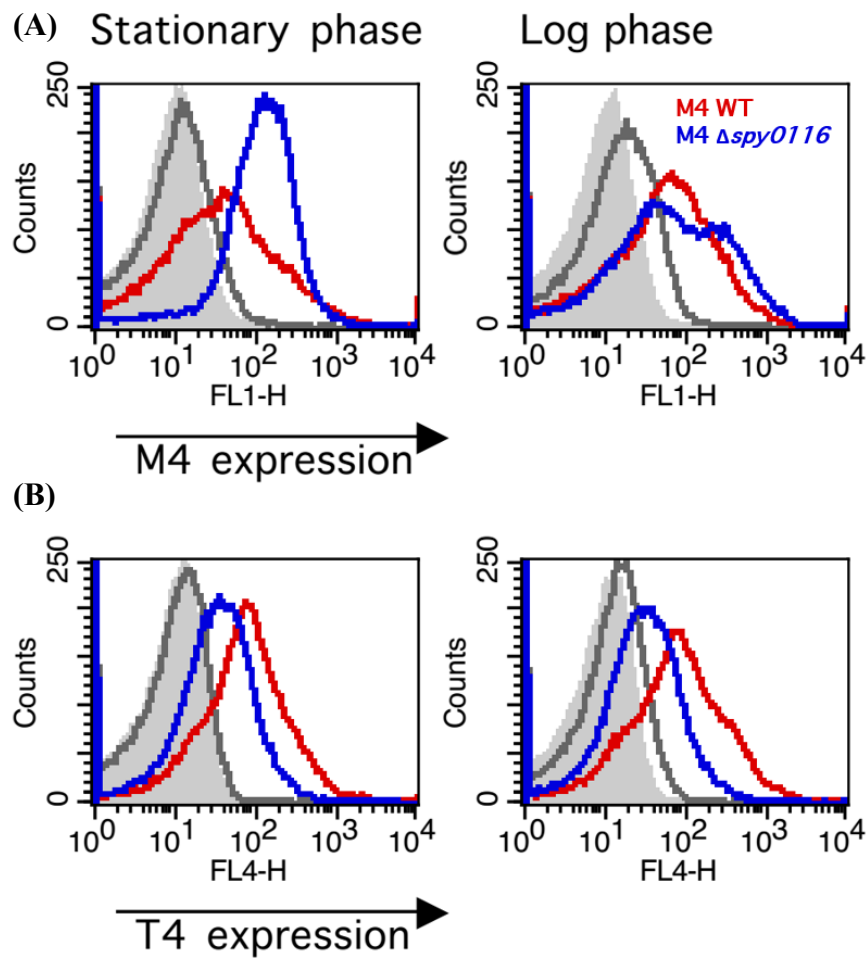


圖表目錄

AMP (μM)	M4 WT	M4 $\Delta\text{spy0116}$
LL-37	2	16
CRAMP	2	8

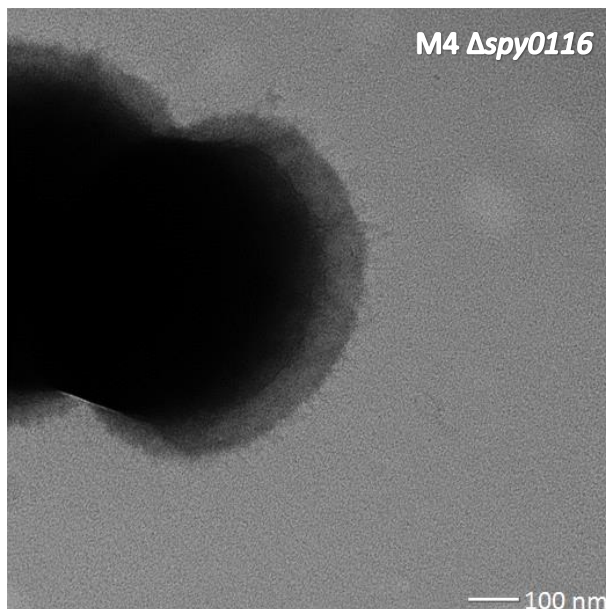
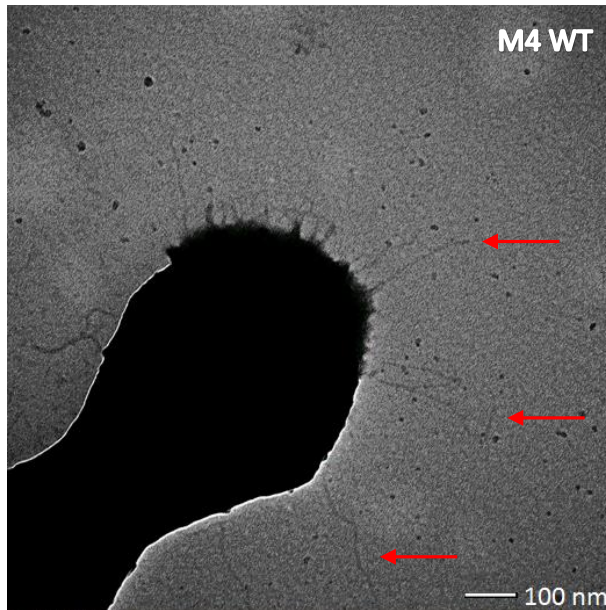
表一、測試抗微生物胜肽對 M4 GAS 之最小抑菌濃度。

分別取回溶於 DMEM + 20% THY medium 裡的 M4 GAS wild-type 及 $\Delta\text{spy0116}$ ，置於 96 孔細胞培養盤中，再加入 2 倍序列稀釋的 LL-37、CRAMP，在 37°C 的環境下培養 20 至 24 小時後，取出觀察不同抗微生物胜肽使細菌不生長的最低濃度，即為最小抑菌濃度。



圖一、以流式細胞儀偵測 M4 GAS 表面的 M4 與 T4 抗原的表現量。

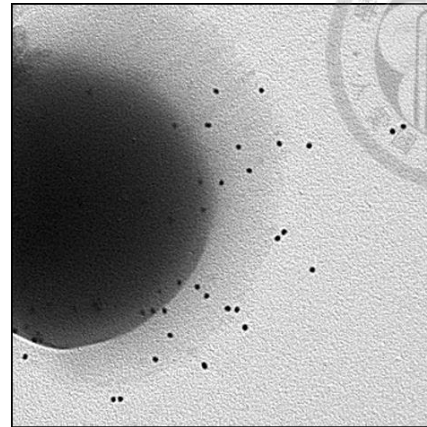
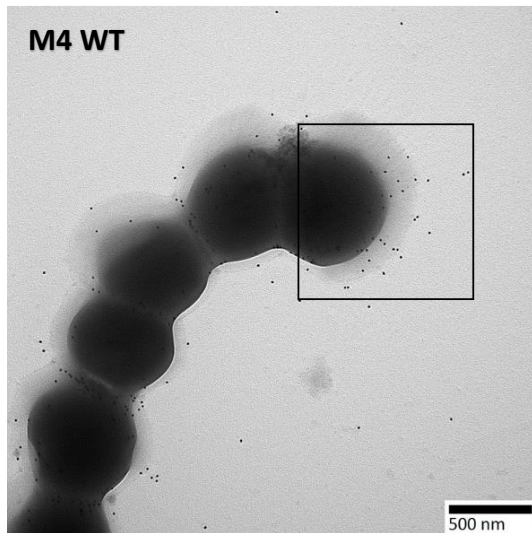
分別取指數期與停滯期之 M4 GAS wild-type 及 Δ spy0116 細菌，以 anti-M4 標示 GAS 表現的 M 蛋白、anti-T4 標示細菌表面的 T4 抗原，再分別以發不同螢光的二級抗體個別標記。洗去多餘未結合的抗體後，最後回溶於適量的 1% BSA/PBS 緩衝溶液，即可使用流式細胞儀分析。(A) 停滯期及指數期之 M4 WT、 Δ spy0116 的 M4 表現量。(B) 停滯期及指數期之 M4 WT、 Δ spy0116 的 T4 表現量。紅色線為 M4 WT，藍色線為 M4 Δ spy0116，灰色線為僅染二級抗體的控制組，實體灰色塊則為未染色的細菌背景值。



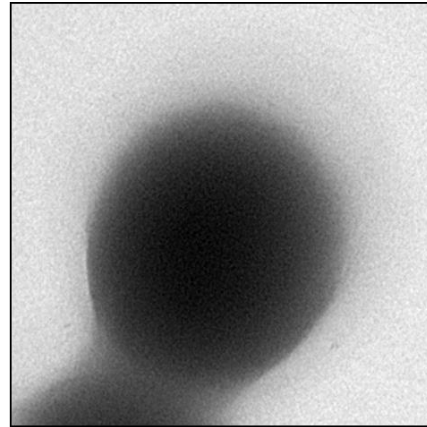
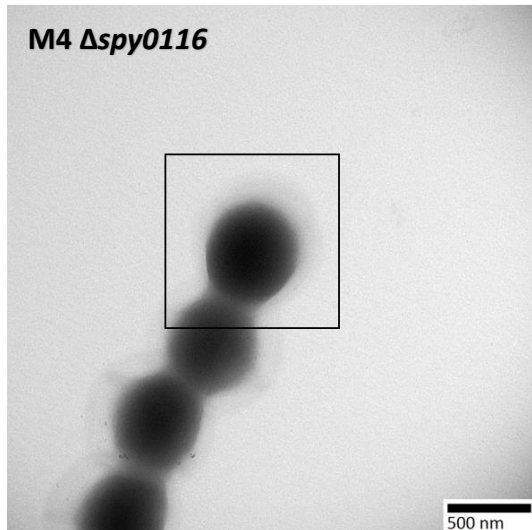
圖二、利用穿透式電子顯微鏡觀測 M4 GAS 表面的線毛。

分別取指數期之 M4 GAS wild-type 及 Δ spy0116 細菌，以適當固定液固定 2 小時，置於 grid 上。陰乾後以 1% Phosphotungstic Acid 染色，清洗多餘染劑並風乾後即可上機觀測 GAS 表面的線毛。圖片箭頭所指為 M4 WT 表現的長條狀線毛。比例尺：100 nm。

(A)

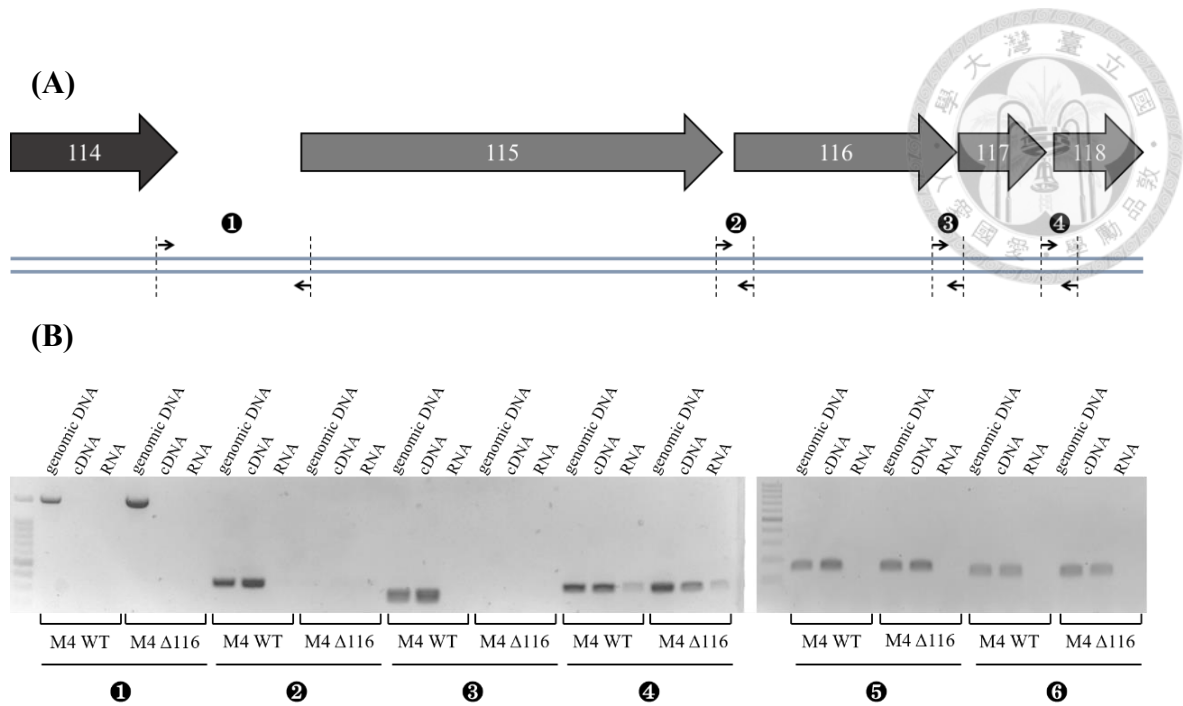


(B)



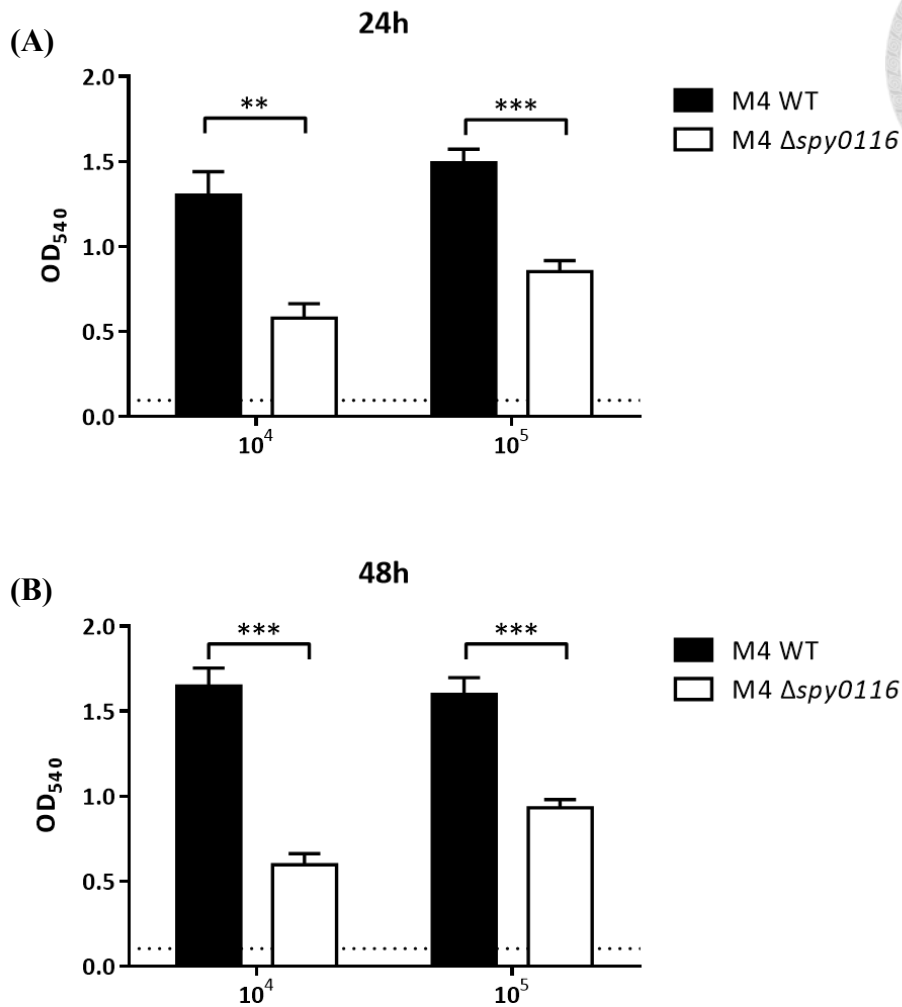
圖三、利用免疫金電子顯微鏡觀察 M4 GAS 表面的線毛。

分別取指數期之 M4 GAS wild-type 及 $\Delta spy0116$ 細菌，以 anti-T4 標記 T4 抗原，再以結合 18nm 金顆粒的二級抗體標示，並洗去多餘、未結合的抗體。最後利用電子顯微鏡觀察細菌表面的線毛是否可被 anti-T4 抗體標記。(A) M4 WT 之電子顯微照片及局部放大圖，照片的黑點即為結合上 GAS T4 抗原的金顆粒。(B) M4 $\Delta spy0116$ 之電子顯微照片及局部放大圖。比例尺：500 nm。



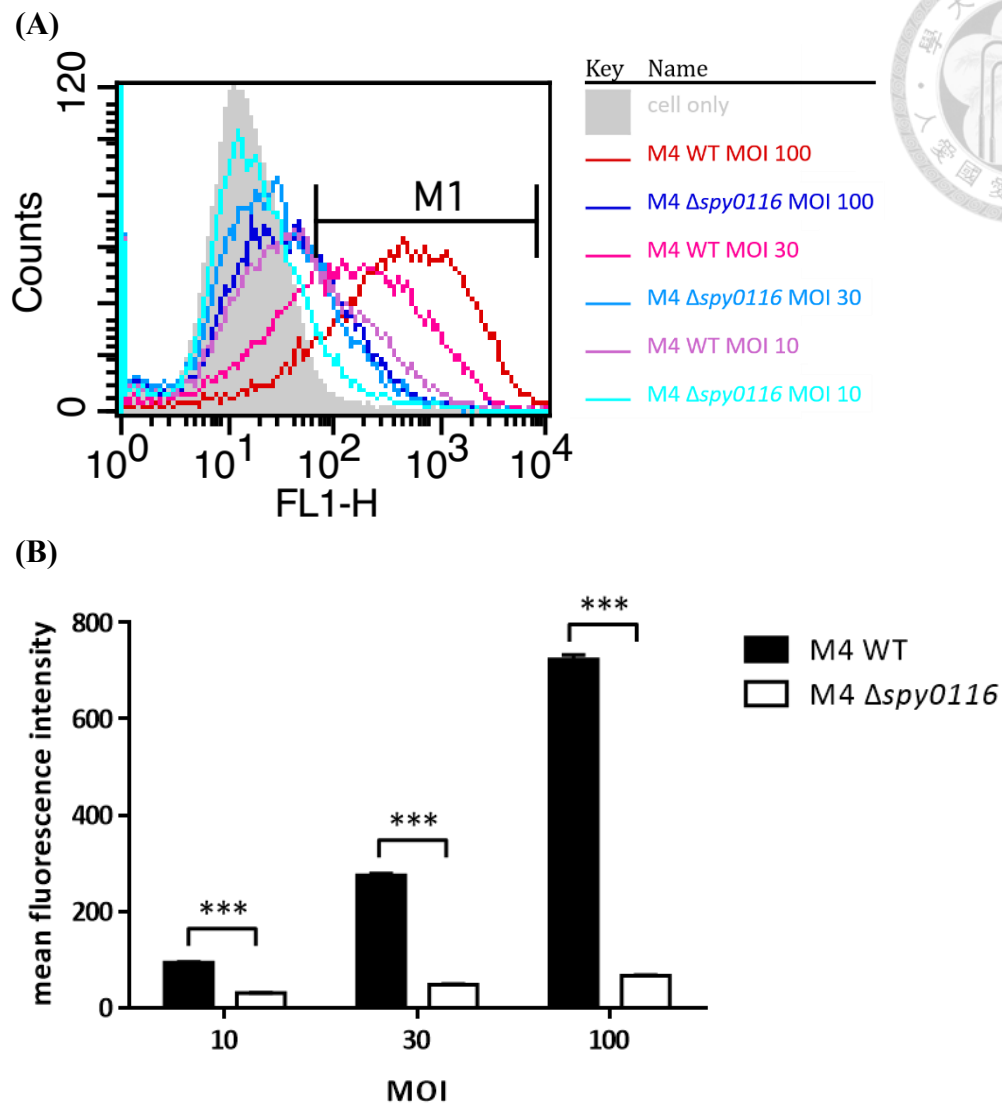
圖四、M4 GAS 之 FCT 區域的轉錄模式分析

分別萃取指數期之 M4 GAS wild-type 及 $\Delta spy0116$ 的 genomic DNA、RNA，並將 RNA 反轉錄成 cDNA。前述三種核酸作為模板，透過聚合酶連鎖反應放大 FCT 區域中 4 段基因間區段，再以 1.5% 洋菜膠體電泳分析之。(A) M4 GAS 的 FCT 區域及引子目標示意圖。(B) DNA 洋菜膠體電泳結果。第 1 組為介於 *spy0114* 與 *spy0115* 間的基因間區段，第 2 組為介於 *spy0115* 與 *spy0116* 間的基因間區段，第 3 組為介於 *spy0116* 與 *spy0117* 間的基因間區段，第 4 組為介於 *spy0117* 與 *spy0118* 間的基因間區段，第 5 組為 *plr*，第 6 組為 *gyrA*。每組皆含有 M4 WT 和 $\Delta spy0116$ 個別的 genomic DNA (lane 1)、cDNA (lane 2)、RNA (lane 3)。



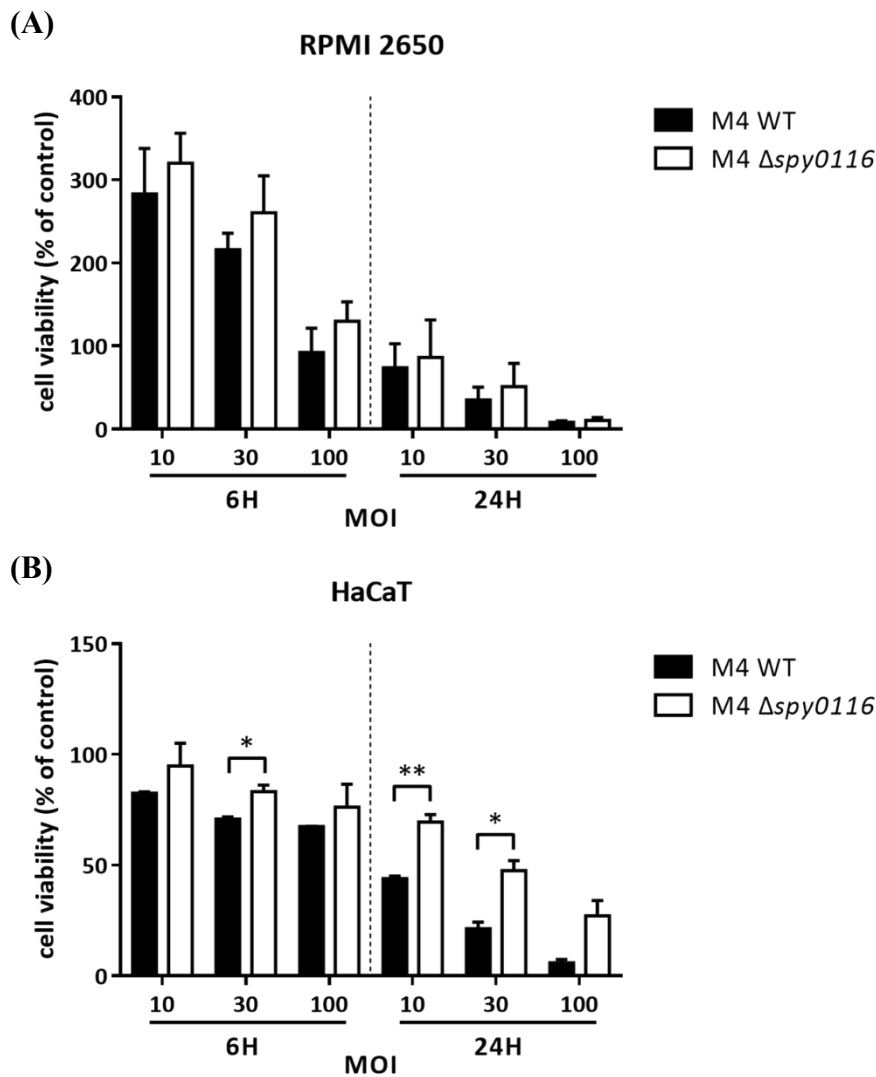
圖五、比較 M4 GAS wild-type 和 Δ spy0116 形成生物膜的能力。

將回溶在 C medium 裡的 10^4 及 10^5 CFU 之 M4 GAS wild-type 和 Δ spy0116，分別於 96 孔細胞培養盤中培養 (A) 24 或 (B) 48 小時後，以 0.1% 結晶紫水溶液染已形成的生物膜，15 分鐘後清洗 2 次，並以 1% SDS 溶解出染上的結晶紫，再測量吸光值。其中生物膜生成量和 OD 值強度成正比。此為獨立兩次三重複實驗中的代表性數據，以 mean \pm SD 表示。P-value 統計使用 Unpaired t test，* <0.05 、** <0.01 、*** <0.001 。



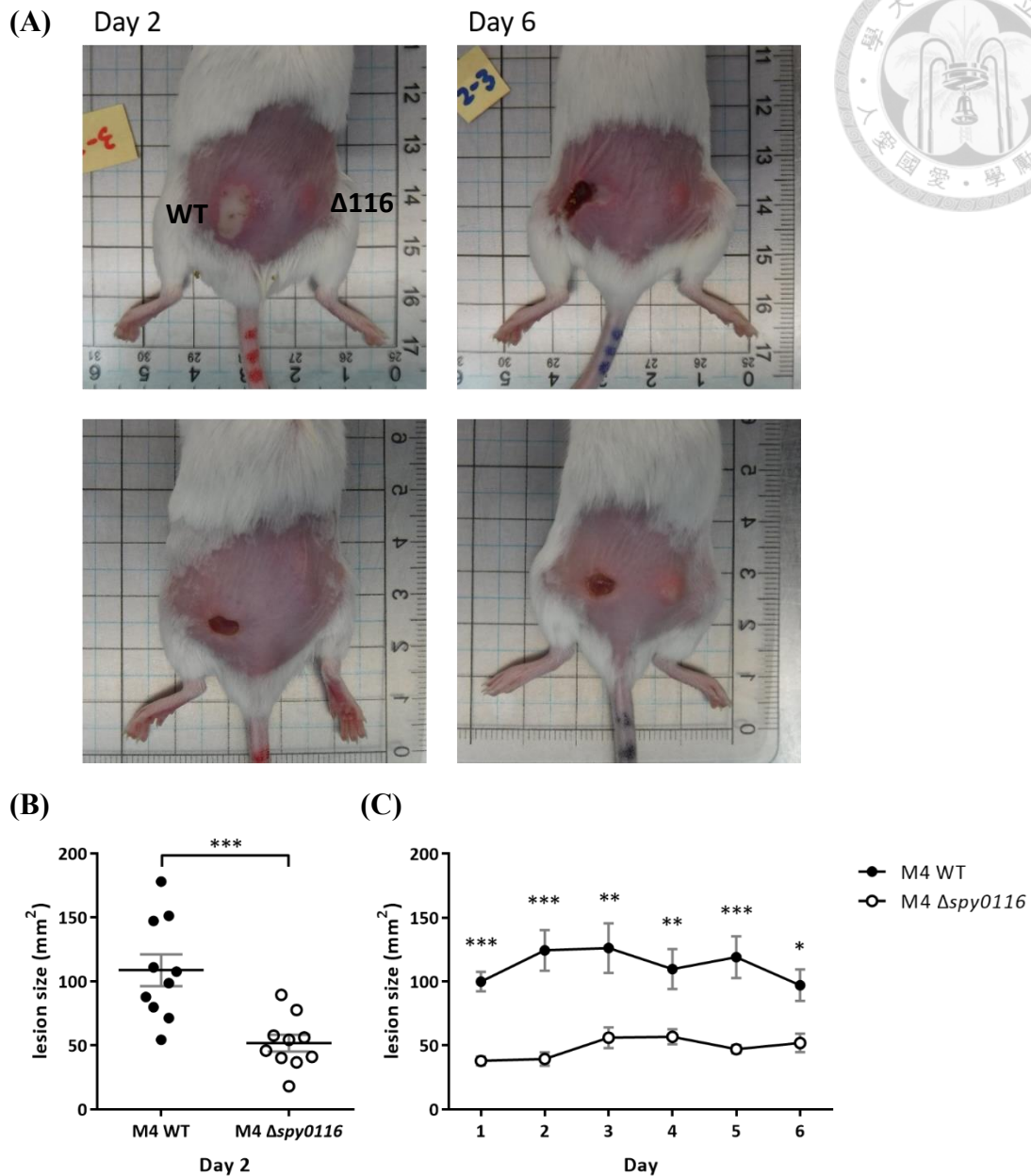
圖六、利用流式細胞儀檢測 M4 GAS 貼附 RPMI 2650 細胞的能力。

以不同量之可發螢光的 M4 GAS wild-type 及 $\Delta spy0116$ 細菌，感染培養於 24 孔細胞培養盤一夜的 RPMI 2650 細胞。30 分鐘後，以 PBS 洗去未貼附在細胞上的細菌，並收取尚貼附於培養盤上的細胞，再以流式細胞儀判讀此實驗結果，且將螢光量製成長條圖表示。(A) M4 WT、 $\Delta spy0116$ 的細胞貼附能力分析，紅色系線條為不同 MOI 下，細胞上的 M4 WT 細菌量；藍色系線條則是 $\Delta spy0116$ 細菌量。(B) 將不同 MOI 下的平均螢光強度繪製成長條圖，其中螢光強度愈高代表貼附上細胞的細菌愈多。此為獨立兩次實驗中的代表性數據，以 mean \pm SEM 表示。P-value 統計使用 Unpaired t test，* < 0.05、** < 0.01、*** < 0.001。



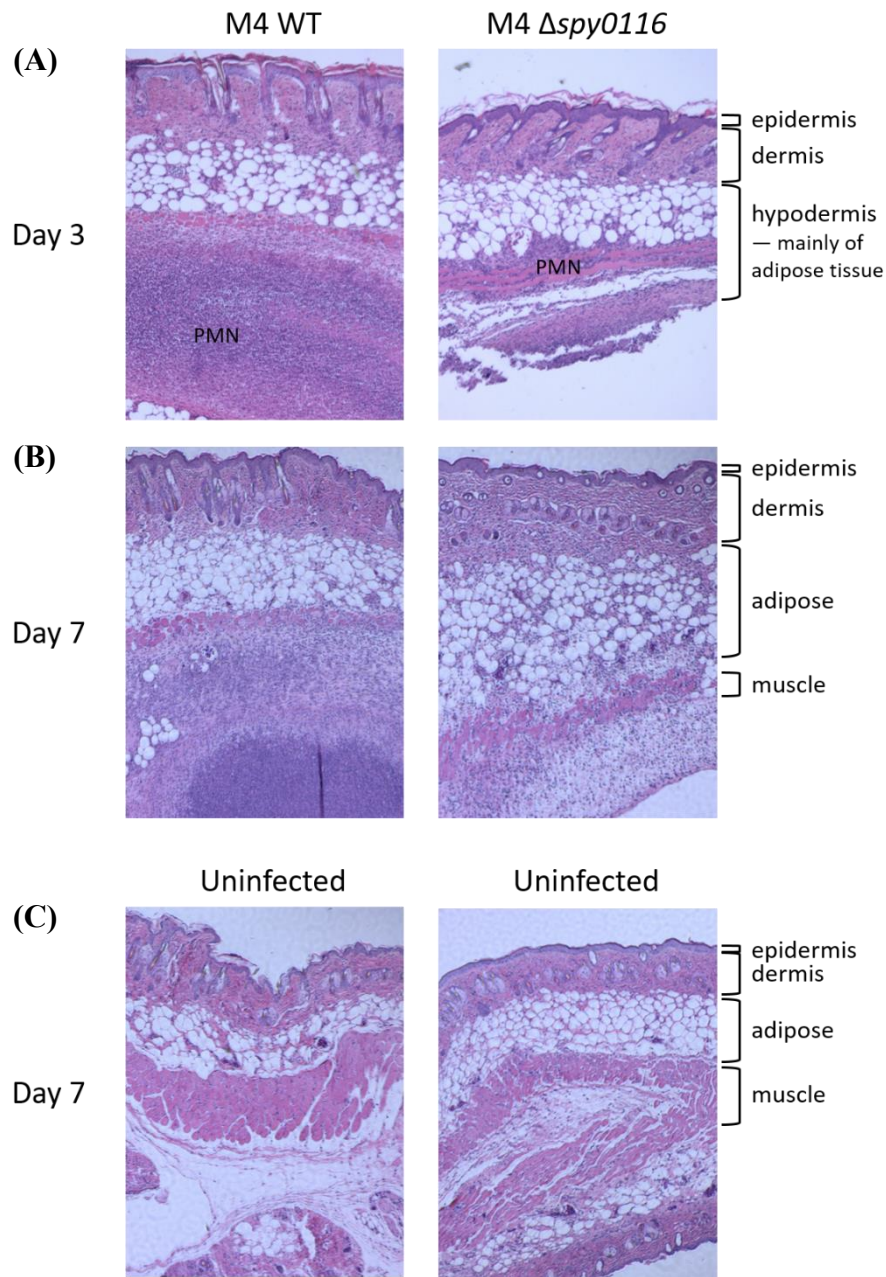
圖七、RPMI 2650、HaCaT 細胞經 M4 GAS 感染後之存活率。

將二種細胞 (RPMI2650、HaCaT) 培養於 96 孔細胞培養盤中一夜，隔天加入一定量之 M4 GAS wild-type 及 Δ spy0116，感染 1 小時後加入抗生素清除多餘細菌且繼續放回培養箱中，直至時間總長 6 或 24 小時後，洗去死亡懸浮的細胞並以甲醇固定尚存於培養盤上的細胞，再以 0.1% 結晶紫水溶液染色。5 分鐘後清洗多於染劑，最後以 1% SDS 溶解出染上的結晶紫，再測量吸光值。(A) RPMI 2650、(B) HaCaT 經 M4 WT 和 Δ spy0116 感染 6、24 小時的細胞生存力，其計算方式為單格樣本 OD 值除以同時培養之未感染細胞 OD 值。此為獨立兩次實驗的合併數據，以 mean \pm SD 表示。 P -value 統計使用 Unpaired t test，* <0.05 、** <0.01 、*** <0.001 。



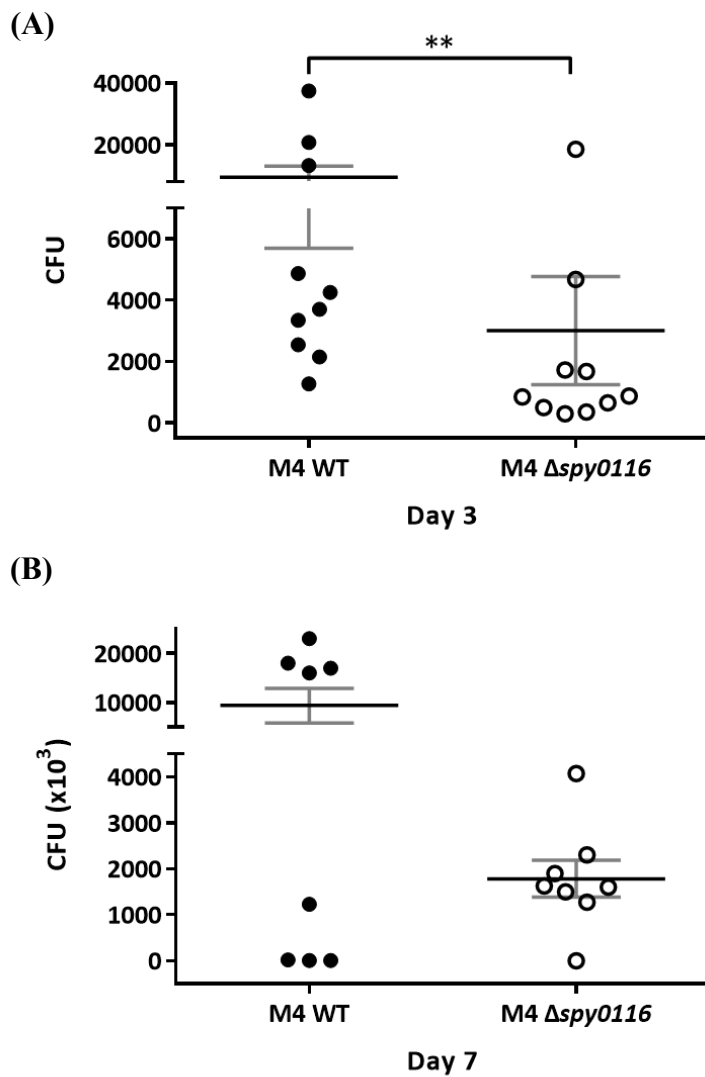
圖八、以小鼠模型觀察 M4 GAS 線毛對造成小鼠皮下感染傷口的重要性。

取 2×10^8 顆 M4 GAS wild-type、 Δ spy0116 以 50 μ l 無菌 PBS 回溶後，利用皮下注射方式注入已去除下背毛髮及毛根的小鼠背部。M4 WT 注射於左下側近大腿處，而 Δ spy0116 注射於右下側。觀察注射處三至七天，並以相機記錄小鼠之紅腫部位，再以 Image J 分析。(A) 感染第 2 天及第 6 天的背部傷口外觀。(B) 感染第 2 天的背部傷口大小， $n=10$ 。(C) 感染第 1 至 6 天的背部傷口大小， $n=8$ 。數據皆以 mean \pm SEM 表示。 P -value 統計使用 Mann-Whitney test，* <0.05 、** <0.01 、*** <0.001 。



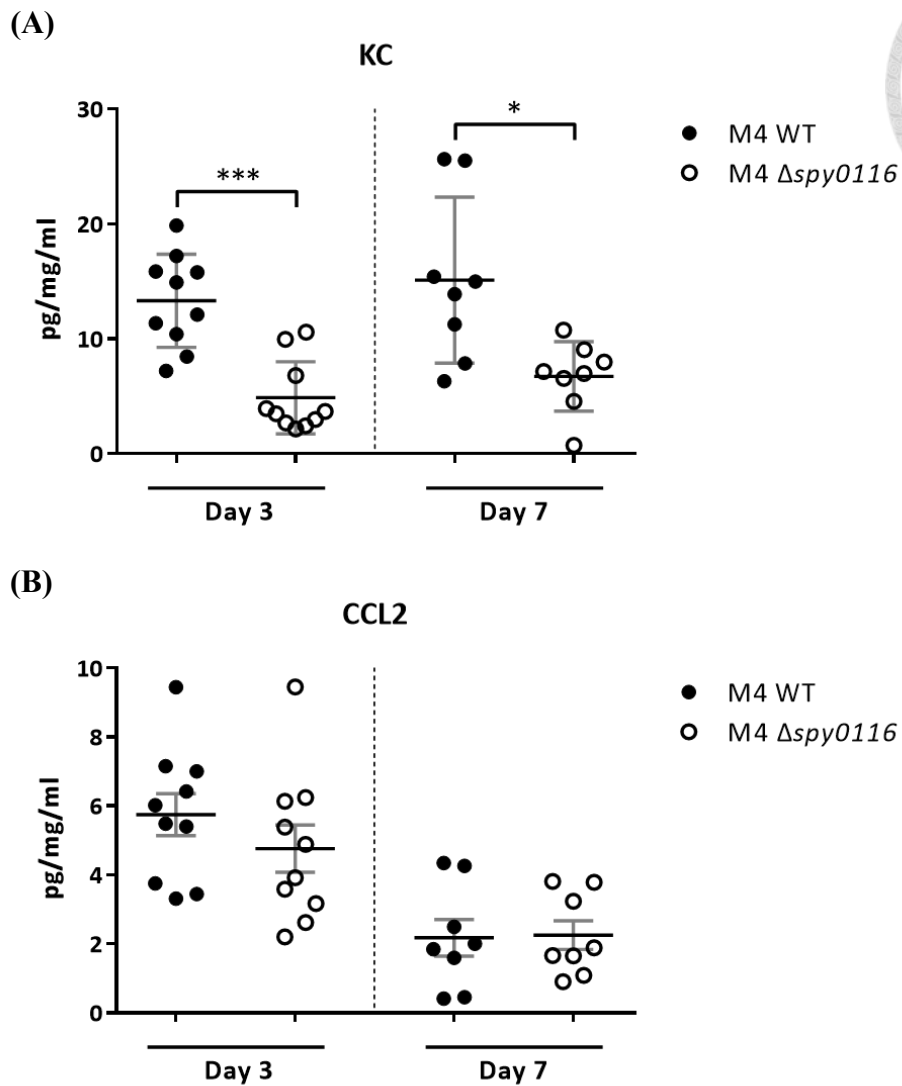
圖九、M4 GAS 之小鼠皮下傷口的病理組織切片。

於 GAS 皮下感染後第三天及第七天以 isoflurane 犧牲小鼠後，收取小鼠的紅腫傷口部位及未感染之皮膚，分別包埋後製作組織切片，經 H&E 染色後觀察感染處傷口的變化與免疫細胞聚集情形。(A) 感染第 3 天的傷口切片，(B) 感染第 7 天傷口切片，左為 M4 WT，右為 M4 Δ spy0116。(C) 感染第七天的小鼠之未感染皮膚切片。



圖十、M4 GAS 造成小鼠皮下感染傷口的存活細菌量。

於 GAS 皮下感染後第三天及第七天以 isoflurane 犧牲小鼠後，收取小鼠的紅腫傷口組織以組織均質機磨碎後，取出 20 μ l 組織液序列稀釋，再滴於 THB agar 上，計算仍存活於小鼠皮下的 M4 WT、 Δ spy0116 細菌量。(A) Day 3 組小鼠數量為 10 隻，(B) Day 7 組為 8 隻。數據皆以 mean \pm SEM 表示。 P -value 統計使用 Mann-Whitney test，**<0.01。




圖十一、M4 GAS 造成小鼠皮下感染傷口的局部細胞激素表現量。

於 GAS 皮下感染後第三天及第七天以 isoflurane 犧牲小鼠後，收取圖九小鼠的紅腫傷口組織以均質機磨碎後，將離心後的上清液利用 ELISA 分別分析 (A) KC 及 (B) CCL2 的濃度。數據皆以 mean \pm SEM 表示。P-value 統計使用 Mann-Whitney test，* $<$ 0.05、*** $<$ 0.001。



參考文獻

1. Lancefield, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med*. **57**, 571-595, (1933).
2. Lancefield, R. C. Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J Immunol* **89**, 307-313, (1962).
3. Lancefield, R. C. & Dole, V. P. The Properties of T Antigens Extracted from Group a Hemolytic Streptococci. *J Exp Med* **84**, 449-471, (1946).
4. Mora, M. *et al.* Group A Streptococcus produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15641-15646, (2005).
5. Falugi, F. *et al.* Sequence variation in group A Streptococcus pili and association of pilus backbone types with lancefield T serotypes. *J Infect Dis* **198**, 1834-1841, (2008).
6. Bessen, D. E. & Kalia, A. Genomic localization of a T serotype locus to a recombinatorial zone encoding extracellular matrix-binding proteins in Streptococcus pyogenes. *Infect Immun* **70**, 1159-1167, (2002).
7. Bisno, A. L. Acute pharyngitis. *N Engl J Med* **344**, 205-211, (2001).
8. Walker, M. J. *et al.* Disease manifestations and pathogenic mechanisms of Group A Streptococcus. *Clin Microbiol Rev* **27**, 264-301, (2014).
9. Bisno, A. L. & Stevens, D. L. Streptococcal infections of skin and soft tissues. *N Engl J Med* **334**, 240-245, (1996).
10. Carapetis, J. R. *et al.* Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Nat Rev Dis Primers* **2**, 15084, (2016).
11. Houwink, A. L. & van, I. W. Electron microscopical observations on bacterial cytology; a study on flagellation. *Biochim Biophys Acta* **5**, 10-44, (1950).
12. Yanagawa, R., Otsuki, K. & Tokui, T. Electron microscopy of fine structure of Corynebacterium renale with special reference to pili. *Jpn J Vet Res* **16**, 31-37, (1968).
13. Ton-That, H., Marraffini, L. A. & Schneewind, O. Sortases and pilin elements involved in pilus assembly of Corynebacterium diphtheriae. *Mol Microbiol* **53**, 251-261, (2004).
14. Ton-That, H. & Schneewind, O. Assembly of pili on the surface of Corynebacterium diphtheriae. *Mol Microbiol* **50**, 1429-1438, (2003).
15. Danne, C. & Dramsi, S. Pili of gram-positive bacteria: roles in host colonization. *Res Microbiol* **163**, 645-658, (2012).
16. Ton-That, H. & Schneewind, O. Assembly of pili in Gram-positive bacteria. *Trends Microbiol* **12**, 228-234, (2004).

- 
17. Mandlik, A., Swierczynski, A., Das, A. & Ton-That, H. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol* **16**, 33-40, (2008).
 18. Proft, T. & Baker, E. N. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci* **66**, 613-635, (2009).
 19. Krishnan, V. Pilins in gram-positive bacteria: A structural perspective. *IUBMB Life* **67**, 533-543, (2015).
 20. Telford, J. L., Barocchi, M. A., Margarit, I., Rappuoli, R. & Grandi, G. Pili in gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**, 509-519, (2006).
 21. Hendrickx, A. P., Budzik, J. M., Oh, S. Y. & Schneewind, O. Architects at the bacterial surface - sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds. *Nat Rev Microbiol* **9**, 166-176, (2011).
 22. Rosini, R. *et al.* Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol* **61**, 126-141, (2006).
 23. Barocchi, M. A. *et al.* A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2857-2862, (2006).
 24. Lauer, P. *et al.* Genome analysis reveals pili in Group B *Streptococcus*. *Science* **309**, 105, (2005).
 25. Kratovac, Z., Manoharan, A., Luo, F., Lizano, S. & Bessen, D. E. Population genetics and linkage analysis of loci within the FCT region of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **189**, 1299-1310, (2007).
 26. Kreikemeyer, B. *et al.* Genomic organization, structure, regulation and pathogenic role of pilus constituents in major pathogenic *Streptococci* and *Enterococci*. *Int J Med Microbiol* **301**, 240-251, (2011).
 27. Flores, A. R., Jewell, B. E., Fittipaldi, N., Beres, S. B. & Musser, J. M. Human disease isolates of serotype m4 and m22 group a streptococcus lack genes required for hyaluronic acid capsule biosynthesis. *MBio* **3**, e00413-00412, (2012).
 28. Henningham, A. *et al.* Mutual exclusivity of hyaluronan and hyaluronidase in invasive group A *Streptococcus*. *J Biol Chem* **289**, 32303-32315, (2014).
 29. Abbot, E. L. *et al.* Pili mediate specific adhesion of *Streptococcus pyogenes* to human tonsil and skin. *Cell Microbiol* **9**, 1822-1833, (2007).
 30. Manetti, A. G. *et al.* *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol Microbiol* **64**, 968-983, (2007).