

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

室內生物性氣膠之採樣分析技術開發(1/2)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-002-170-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學公共衛生學院職業醫學與工業衛生研究所

計畫主持人：黃耀輝

計畫參與人員：劉元蕙

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 6 月 2 日

中文摘要

嗜肺性退伍軍人菌(*Legionella pneumophila*)為一重要之室內生物氣膠，主要透過空氣傳播感染人體，而傳統微生物培養之評估法有其限制存在，因此本研究欲透過對 *L. pneumophila* 蛋白質體分析，嘗試瞭解 *L. pneumohphila* 在不同生長階段下存在之特殊蛋白及其生理意義。

研究發現培養 24 小時處於指數生長期，可培養菌數對數值由 3.94 ± 0.10 增加至 6.24 ± 0.04 ，培養 48 及 72 小時處於停滯生長期，可培養菌數對數值分別為 8.28 ± 0.13 及 8.43 ± 0.14 。不同生長階段之蛋白質總數表現不同，由指數生長期進入停滯生長期隨著營養來源侷限影響，蛋白質總數有逐漸增加之趨勢，24 小時、48 小時及 72 小時分別為 282 點、336 點及 357 點。質量足夠進入質譜分析之蛋白質點共完成 56 點蛋白質身份鑑定，其中包括 flagellin protein 顯示菌體受到環境壓力刺激移動力及毒力特性的表現。

Abstract

Legionella pneumophila is an important indoor bioaerosol. It can be transmitted by airborne to the human. The present study was aimed to explore the protein profile and related physiological functions at different growth stages using proteomic technique.

It was noted that, the log culturable concentration (Log CFU/mL) of *L. pneumophila* was from 3.94 ± 0.10 to 6.24 ± 0.04 (24th hr) at the exponential phase, and continuously raised to 8.28 ± 0.13 (48th hr) and 8.43 ± 0.14 (72nd hr) at the stationary phase. Besides, the expressive protein numbers were gradually increased: 282 protein spots at exponential phase, followed by early stationary phase (336 spots) and stationary phase (357 spots). It might be related to the nutrient deprivation with increased microbial quantity. So far, 56 proteins have been identified. The increased existence of flagellin protein indicated the nutrient-stressed environment may induce *L. pneumophila* to enhance its motility and virulence.

前言

所謂生物性氣膠係指散佈在空氣中的生命體（如：細菌、真菌），以及由生命體產生釋放至空氣中之物質（如：孢子、花粉、生物毒素等）。目前已知暴露在生物性氣膠中，可造成呼吸統疾病，或衍生病大樓症候群，嚴重時亦可能導致死亡。對室內環境如：中央空調式之辦公大樓或醫療院所而言，生物氣膠可能在室內堆積，影響建築物居住者或使用者之健康。國內醫療院所工作人員感染嗜肺性退伍軍人菌(*Legionella pneumophila*)導致腎衰竭即是其中一例。

為評估室內生物氣膠分佈特性，或進一步瞭解暴露劑量與健康效應之關係，甚而為了掌握預防控制介入之成效，常需進行室內生物氣膠之採樣分析。目前，可大致依據是否採用微生物培養並計數菌落者區分採樣分析方式及未以菌落

計數量化之分析方式包括：免疫分析、化學分析、分子生物學分析等。

微生物培養及菌落計數方法具有反應空氣中存活微生物族群的特性，而菌體存活則為其感染人體之必要條件；加以培養為微生物學長久以來之分析基礎，因此至今仍為生物氣膠採樣分析之主要依據。然生物氣膠之可培養力(culturability)受生物特性培養條件及其他因素如：採樣機械外力、共存之生物或化學物質之影響，並非所有活性菌體皆可利用培養方式被觀察。

本研究觀察不同生長階段下嗜肺性退伍軍人菌在 BCYE α agar 上的可培養性，並從微生物蛋白質體表現著手，以瞭解不同生長階段之嗜肺性退伍軍人菌的生理特性。蛋白質體(proteome)研究是分子生物學上另一個新的紀元。在各種生物的基因體(genome)陸續被解開時，除了已知基因結構的組成外，對於基因所表現的功能，更成為大家所關注。簡單的基因組成在經過複雜的調控過程後，可轉譯成一種以上之蛋白質；生物體因所處環境不同或生理情形的改變，都會使得蛋白質有不同的表現，因此基因表現的產物蛋白質更適用於生物體應用的研究上。蛋白質體學是以廣泛的角度觀察生物體，當生物體面臨生理轉變或藥物反應時，整體的蛋白質表現情形及其變化。

研究目的

選擇重要的室內生物氣膠—*L. pneumophila* 為研究對象，首先建立 *L. pneumophila* 之蛋白質體分析方法，進一步探討 *L. pneumophila* 在不同生長階段的蛋白質體表現及生理意義。

文獻探討

一、嗜肺性退伍軍人桿菌(*Legionella pneumophila*)的生長環境及傳播方式

L. pneumophila 普遍存在於水體環境中，如河川、湖泊、濕地、冷卻水塔、冷凝機、浴室蓮蓬頭及自來水水龍頭等都有可能發現它的蹤跡(Shands, *et al.*, 1985)。且其中冷卻水塔與導致退伍軍人症(Legionnaire's disease)的相關性已被清楚地證明(Dondero, *et al.*, 1980)。

L. pneumophila 的傳播方式主要以氣膠型態來傳播(Boyd, 1995)。當受到污染之水塔或水龍頭的水，產生飛散的水體時，則有可能經由空氣的傳播而被人體吸入。菌體以氣膠型態進入人體後，寄生在肺部吞噬細胞(phagocyte)中繼續繁殖，甚至進一步溶解宿主細胞而釋放出更大量的病原體造成人類被感染(Marra, *et al.*, 1990)。

二、蛋白質體學在微生物領域之研究

蛋白質體學中以二維電泳法分離細胞內大量的蛋白質。此法可用於當微生物在面臨不同的環境壓力時，整體蛋白質表現改變的情形，如熱休克(heat shock)(Münchbach, 1999)、有氧或無氧的環境培養(Dainese-Hatt, 1999)、不同的生長階段(Guerreiro, 1999)、pH 值的改變和滲透壓力(Vasseur, 1999)等。另外，亦有應用於醫用微生物的致病性(Niimi, 1999)、免疫反應(Sanchez-Campillo, 1999)、抗生素耐受性(Cash, 1999)，以及微生物的分類學(Jungblut, 1999)。

三、嗜肺性退伍軍人桿菌之蛋白質表現

1994 年 Sadosky 發現胞體漿內(cytoplasm)的過氧鐵歧化酵素 FeSOD(iron superoxide dismutase)與嗜肺性退伍軍人桿菌之存活性(Viability)有關(Sadosky, *et al.*, 1994)。同樣為歧化酵素的過氧銅鋅歧化酵素 CuZnSODs(Copper-zinc superoxide dismutases)位於胞體漿外(periplasma)，則與嗜肺性退伍軍人桿菌在停滯生長期的存活(survival)有關(John and Steinman, 1996)。一些操控毒力(virulence)的蛋白因子受環境之變化而可能改變其毒性；*flaA* 為嗜肺性退伍軍人桿菌鞭毛最主要的單元蛋白，而鞭毛為嗜肺性退伍軍人桿菌具有感染能力之因子；Heuner, K. *et al.*曾發現 *flaA* 會隨著溫度升高（高於 42°C）而不表現，同時也發現隨著生長階段(growth phase)的不同，菌體亦會有不一樣的 *flaA* 表現，由指數生長期→指數生長期後→停滯生長期，蛋白 *flaA* 的表現則愈明顯(Heuner, *et al.*, 1999)。

在指數生長期(exponential phase)之後的嗜肺性退伍軍人桿菌，相較於正處於指數生長期之菌體有較高的細胞毒性、感染力及活動能力(Byrne, 1998)。

嗜肺性退伍軍人桿菌專一的 24-kDa 蛋白質(*L. pneumophila-specific 24-kDa protein*)與造成細胞內感染的能力有關。Cianciotto 發現嗜肺性退伍軍人桿菌的 24-kDa 蛋白質的缺失會顯著地降低感染 U937 細胞及人類肺部巨噬細胞(macrophages)的能力(Cianciotto, 1989)，但直至目前尚未有此菌的蛋白質體學研究。

研究方法

一、菌種

菌種來源：由美國菌種保存中心(ATCC)取得 ATCC 編號 33152 (type strain)，*Legionella pneumophila* serogroup 1 之冷凍乾燥管，於 2~8°C 保存。

二、菌種培養

(一) 實驗菌種起始菌液濃度之調控

取出 -80 °C 冷凍保存之菌體於室溫下解凍，以特殊培養基 BCYE α agar 活化純化菌體後置備懸浮液，利用分光光度計調整菌數濃度，並利用系列稀釋及培養方式確認此起始菌液實際濃度。

(二) 實驗培養條件

將上述起始菌液(100 mL)置於培養箱內，提供 37 °C、5% CO₂，並用 100 rpm 震盪培養。於培養後第 24、48 與 72 小時收取樣本，進行可培養性(culturability)試驗、活性(viability)試驗及蛋白質體(proteomics)試驗。

三、可培養性試驗

將前述收取的樣本，取出 100 μ L 以系列稀釋與塗抹 agar 培養方式觀察菌種的可培養能力(culturability)，觀察不同生長階段下之採樣點，其可培養之菌數濃度(CFU/mL)變化。

四、活性試驗(螢光染色法)

將前述收取之樣本，以 BacLight live/dead bacterial viability kit (Molecular Probes Inc.)觀察其菌種之活性(viability)狀態。

取 3 μL (SYTO 9:Propidium iodide=1:1) 螢光染劑至 1.5 mL 之微量離心管中，加入 1 mL 稀釋之樣本，在室溫下避光靜置反應 15 分鐘，以直徑 25 mm、孔徑 0.22 μm 之滅菌 polycarbonate filter (Millipore) 過濾，過濾完成之濾紙放至玻片上，滴上少許的 BacLight mounting oil，蓋上蓋玻片，利用螢光顯微鏡 (Model: DMR; Leica, Germany) 觀察，1000 X 油鏡，隨機觀察 25 個視野，每個樣本重複 3 次 BacLight 呈色實驗

五、蛋白質分析

(一) 樣本前處理：

將收取之樣本清洗完成後進行冷凍乾燥，加入細胞溶解緩衝液 (Lysis buffer, 7 M urea, 4% Chaps, 2 M thiourea)、dithioerythritol (DTE) 及 Ampholyte IPG buffer 均勻混合，萃取蛋白質進行蛋白質定量及蛋白質體分析。

(二) 蛋白質濃度測定

選用 RC DC Protein Assay (BIO-RAD, Richmond, CA, USA) 為定量方法。

(三) 蛋白質體分析：

細胞溶解處理後之蛋白質萃取液 (上清液) 經蛋白質濃度分析後，進行一維等電位聚焦分析 IEF (First-dimension isoelectric focusing) 及二維電泳分析 (2-D electrophoresis)，再利用 SYPRO Ruby 蛋白質染劑染色後使用影像掃瞄系統 (Amersham Pharmacia Typhoon 9200) 掃瞄膠片，所得圖檔利用軟體進行影像比對分析 (ImageMaster 2D Elite, Amersham pharmacia biotech)。結果可得到蛋白質點總數、蛋白質點標準化體積、密度及面積、等電位點、分子量等訊息。進一步探討不同生長階段的樣本之間蛋白質點出現有無的差異，及相對體積百分比分析。

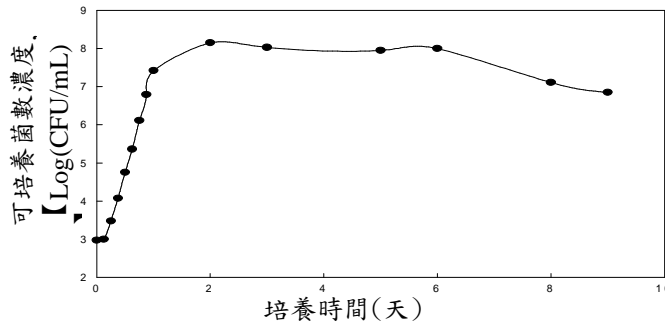
對於足夠進行質譜分析之蛋白質點則以 MALDI-TOF 質譜儀分析及蛋白質身份鑑定。

結果與討論

一、嗜肺性退伍軍人桿菌最適採樣點

採樣點的選擇必須包括指數生長期 (exponential phase) 與停滯生長期 (stationary phase)。

在相同營養條件下指數生長期全程歷經的時間與起始的菌液濃度有關。在本實驗提供的 100 mL 的培養液條件下，培養所能達到最多的菌數濃度約為 10^8 CFU/mL (停滯生長期)。若起始菌液濃度愈高，則愈快進入停滯生長期。因此，本實驗設計固定的起始濃度約為 10^3 CFU/mL (圖一)，培養至第 24 小時為指數生長期的後期，培養至第 48 小時即進入停滯生長期。實驗設計中採樣點需包括指數生長期及停滯生長期，因此選定第 24 小時為我們指數生長期的採樣點，及選定停滯生長期前期第 48 小時及 72 小時為停滯生長期的採樣點。



圖一、培養時間與可培養菌數濃度之關係

二、不同生長階段的可培養性及活性

如圖二及表一所示，當起始之可培養菌液濃度對數值為 3.94 ± 0.10 ，培養 24 小時可培養菌液濃度對數值為 5.28 ± 0.05 處於指數生長期，可培養菌數百分比(可培養菌數/總菌數)為 0.10%，培養 48 及 72 小時可培養菌液濃度對數值分別為 8.28 ± 0.13 及 8.43 ± 0.14 。處於停滯生長期，可培養菌數百分比(可培養菌數/總菌數)為 58.28% 及 71.5%，顯示在營養條件下之停滯生長期有一半以上的菌體是具有可培養能力的。

表一、嗜肺性退伍軍人桿菌菌數濃度與營養條件及培養天數之關係¹

培養時間		0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	
總菌數濃度 ² , T_t	Mean(s.d)	--	8.28(0.13)	8.51(0.06)	8.58(0.06)	
	Log(cell/mL)		CV%	31.51	13.27	13.62
活性菌數濃度 ³ , T_v	Mean(s.d)	--	7.59(0.39)	7.78(0.42)	8.04(0.27)	
	Log(cell/mL)		CV%	10.22	108.49	47.92
可培養菌數濃度 ⁴ , T_c	Mean(s.d)	3.94(0.10)	6.24(0.04)	8.28(0.13)	8.43(0.14)	
	Log(CFU/mL)		CV%	21.68	9.38	26.23
活性菌數比例, $T_v/T_t \times 100, \%$		--	20.52	18.44	29.10	
可培養菌數比例, $T_c/T_t \times 100, \%$		--	0.10	58.28	71.50	

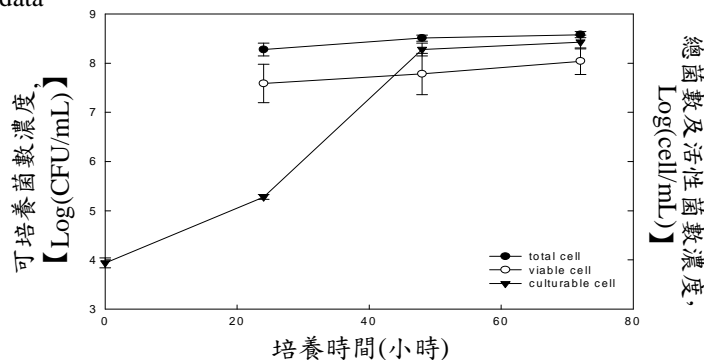
1 以平均菌數濃度表示(n=3)，括弧中為標準差，變異係數(CV%)為標準差除以平均值乘以 100

2 總菌數：以 BacLight 活性染色法判斷，計數 25 個視野，具活性菌(綠色)數加上死菌(紅色)數

3 活性菌數：以 BacLight 活性染色法判斷，螢光顯微鏡下觀察為綠色者

4 可培養菌數：利用 BCYE 培養基培養可長出菌落者

5 -- : no data



圖二、培養時間與菌數濃度之關係

三、不同生長階段的二維電泳膠片比對

在二維膠片上所觀察到蛋白質的總數分別為 282 點(24 小時指數生長期)、336 點(48 小時停滯生長期)、357 點(72 小時停滯生長期)。發現由指數生長期進入停滯生長期，蛋白質數目有逐漸增加的現象，在指數生長期時營養充足，環境有利此菌增生繁殖，當達到停滯生長期時，菌數濃度已相當高，達到飽和的階段，營養來源不敷使用使得菌體為了因應環境改變而產生一些生理變化，活化了一些毒力基因及蛋白質，以利於菌體脫離此不利生存的環境(Salyer, 2001; Byrne, 1998, Hammer, 1999)，導致蛋白質多樣化的增加。

樣本二維電泳蛋白質點表現之再現性，三次重複試驗皆有表現者比例為 74.42%，表現二次以上者比例為 100%。

四、不同生長階段的 MALDI TOF 質譜儀蛋白質身份鑑定

觀察二維膠片上蛋白質點之表現強度，挑選足量之蛋白質點作質譜儀鑑定，鑑定結果於表二~表四，分別為三種生長階段蛋白質表現量最強之蛋白質。在本實驗中，進行蛋白質身份鑑定所使用的搜尋軟體及資料庫為(MasCot/NCBI)，在所鑑定完成的蛋白質點中，點 43 是 flagellin protein，在前人的研究中指出(Salyers, 2002)，可能會出現在環境不利於生存時，菌體會增加本身的移動力，如鞭毛的產生等等，也認為鞭毛為嗜肺性退伍軍人桿菌具有感染能力之因子。Heuner, K 等人也曾發現隨著生長階段(growth phase)的不同，菌體會有不一樣的鞭毛蛋白表現，由指數生長期→指數生長期後→停滯生長期，鞭毛蛋白表現會愈明顯(Heuner, et al., 1999)，在本研究中該蛋白質在 24、48 及 72 小時三種不同生長階段之相對體積百分比為 11.78%、35.94% 及 100%。點 21 為 Heat shock protein 70(dnaK)，當生物體面臨環境壓力時會刺激表現，在實驗結果中顯示培養 48 小時(停滯生長期前期)有最強的表現，可能為營養侷限所造成的環境壓力，其 24、48 及 72 小時三種不同生長階段之相對體積百分比為 51.35%、100% 及 93.99%。本實驗其他蛋白質特性分析仍持續進行中，預計在計畫完成時可提供充分的生理機制探討。

表二、營養環境培養 24 小時蛋白質表現量最強之鑑定結果

Spot no.	gi no. ¹	protein ID	Match ⁵	Score ⁴	Coverage ⁶	M/pI	
						Exp. ²	Theo. ³
1	gi 19554192	hypothetical protein [Corynebacterium glutamicum ATCC 13032] ⁷	8	69	29	59.3~64.6/5.1	55.0/5.31
2	gi 17230053	acetate kinase [Nostoc sp. PCC 7120]	6	49	25	18.8~19.4/3.7~3.8	43.9/6.16
3	gi 23018530	hypothetical protein [Thermobifida fusca]	5	45	28	18.5~19.5/8.2~8.4	27.5/6.82
4	gi 7521690	site-specific DNA-methyltransferase (cytosine-specific) (EC 2.1.1.73) Ball - Brevibacterium albidum FUSOBACTERIUM OUTER MEMBRANE PROTEIN	6	58	36	14.2~14.5/5.5	32.0/6.77
5	gi 27887800	FAMILY [Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii ATCC 49256]	4	44	48	13.7~13.9/5.5	14.5/8.94
6	gi 15843188	transcriptional regulator, LacI	7	59	25	11.9~12.7/8.6~8.7	42.9/9.41

		family [Mycobacterium tuberculosis CDC1551]						
7	gi 10957525	hypothetical protein [Deinococcus radiodurans]	4	54	54	51.8~53.8/5.1	11.6/9.50	
8	gi 1041408	OspA [Borrelia bissettii]	5	42	25	46.3~47.0/5.1	29.0/8.32	
9	gi 21224940	hypothetical protein SC4G2.17 [Streptomyces coelicolor A3(2)]	5	56	44	19.6~20.3/6.7~7.0	20.1/9.15	
10	gi 1260876	methyltransferase [Curtobacterium albidum]	5	48	27	45.4~48.8/5.9~6.0	32.0/6.77	
11	gi 23133407	hypothetical protein [Synechococcus sp. WH 8102]	4	53	58	22.1~22.3/4.4~4.5	8.7/4.55	

1: gi no.: NCBI 針對每一個序列所編的連續性編號

2: Exp:膠片經軟體比對後之實驗值

3: Theo:資料庫中蛋白質理論值

4: Score: 以 MOWES 為主要判斷依據

5: Match:判斷準則至少 4 個以上的 peptide 配對

6: Coverage:蛋白質全長序列覆蓋範圍百分比

7: [:]:蛋白質分離來源

表三、營養環境培養 48 小時蛋白質表現量最強之鑑定結果

Spot no.	gi no. ¹	protein ID	Match ⁵	Score ⁴	Coverage ⁶	M/pI	
						Exp. ²	Theo. ³
12	gi 6729253	DNA gyrase subunit B [Mycobacterium gastrii]	7	57	21	84.6~85.8/5.4~5.5	46.0/8.56
13	gi 21220877	putative integral membrane protein [Streptomyces coelicolor A3(2)]	5	47	32	84.0~85.8/5.4	26.8/9.32
14	gi 19703795	Delta-aminolevulinic acid dehydratase [Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum ATCC 25586]	5	45	29	41.3~44.3/6.4~6.5	36.9/5.87
15	gi 10956628	unknown [Rhodococcus equi]	4	48	59	22.8~24.0/7.2~7.3	13.0/9.49
16	gi 5107348	molybdenum dinitrogenase alpha subunit [nitrogen-fixing bacterium SM1]	4	50	38	67.3~68.3/5.4	17.8/5.55
17	gi 1127200	The Refined Crystallographic Structure Of A Dd-Peptidase Penicillin-Target Enzyme At 1.6 A Resolution	5	48	31	62.7~65.8/5.7	37.4/5.42
18	gi 15643991	conserved hypothetical protein [Thermotoga maritima]	6	48	24	86.5~91.6/4.6~4.8	46.5/5.68
19	gi 23137832	hypothetical protein [Cytophaga hutchinsonii]	5	49	36	69.1~74.2/5.1~5.2	28.0/6.21
20	gi 23465307	holliday junction DNA helicase RuvB [Bifidobacterium longum NCC2705]	6	56	24	60.7~66.3/5~5.2	38.7/5.30
21	gi 15639209	heat shock protein 70 (dnaK) [Treponema pallidum]	6	39	16	48.9~54.3/5.3~5.4	68.0/5.05
22	gi 21218733	hypothetical protein SCJ1.25 [Streptomyces coelicolor A3(2)]	4	46	51	45.3~49.6/5.0~5.2	14.3/5.41
23	gi 29349754	conserved hypothetical protein, with a Metallo-beta-lactamase superfamily domain [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]	5	45	23	33.4~37.5/5.4	36.1/6.6
24	gi 1620876	methyltransferase [Curtobacterium albidum]	5	47	25	30.5~33.4/4.7~4.9	32.0/6.77
25	gi 23131172	hypothetical protein [Prochlorococcus marinus str. MIT 9313]	3	37	44	29.1~32.4/4.3~4.5	8/7.98
26	gi 24213521	Putative methylase [Leptospira interrogans serovar lai str. 56601]	4	43	30	16.2~16.9/4.2~4.3	21.5/9.41
27	gi 15610090	hypothetical protein Rv2953 [Mycobacterium tuberculosis H37Rv]	6	53	22	90.6~94.6/5.2~5.3	45.1/9.22
28	gi 29833735	putative exopolyphosphatase [Streptomyces avermitilis]	6	51	24	50.8~56.3/5.4~5.5	36.2/10.58

		MA-4680]					
29	gi 23336585	hypothetical protein [Bifidobacterium longum DJO10A]	4	32	21	25.6~26.0/4.8~4.9	37.2/5.27
30	gi 15667922	alpha-glucosidase [Bifidobacterium adolescentis]	6	42	16	45.3~46.7/4.9~5.1	66.5/4.75

1: gi no.: NCBI 針對每一個序列所編的連續性編號

2: Exp: 膠片經軟體比對後之實驗值

3: Theo: 資料庫中蛋白質理論值

4: Score: 以 MOWES 為主要判斷依據

5: Match: 判斷準則至少 4 個以上的 peptide 配對

6: Coverage: 蛋白質全長序列覆蓋範圍百分比

7: [:]: 蛋白質分離來源

表四、營養環境培養 72 小時蛋白質表現量最強之鑑定結果

Spot no.	gi no. ¹	protein ID	Match ⁵	Score ⁴	Coverage ⁶	M/pI	
						Exp. ²	Theo. ³
31	gi 4928640	galactose-1-phosphate uridylyltransferase homolog [Thermus brockianus]	5	43	26	19.51~20.2/5.4	39.8/5.95
32	gi 15639671	methylgalactoside ABC transporter, periplasmic galactose-binding protein (mglB-2) [Treponema pallidum]	6	50	24	19.41~19.62/5.2	43.0/5.17
33	gi 29827260	putative glutaryl-CoA dehydrogenase [Streptomyces avermitilis MA-4680]	6	44	21	59.9~63.0/5.2~5.3	45.3/5.37
34	gi 23129376	hypothetical protein [Nostoc punctiforme]	3	48	92	24.1~25.7/6.1~6.2	4.60/4.45
35	gi 15639230	ribosomal protein L1 (rplA) [Treponema pallidum]	4	40	34	55.8~60.0/6.0~6.1	25.0/9.58
36	gi 15606350	gamma-glutamyl phosphate reductase [Aquifex aeolicus]	5	38	20	51.4~56.5/5.5~5.6	50.0/5.54
37	gi 22296799	phytoene synthase [Agromyces mediolanus]	4	43	21	50.0~54.8/6.3~6.5	33.0/6.88
38	gi 23137691	hypothetical protein [Cytophaga hutchinsonii]	5	52	26	47.2~51.9/5.7~5.8	25.3/5.23
39	gi 29347506	putative transcriptional regulator [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]	5	38	20	45.8~50.8/5.8~5.9	37.5/8.74
40	gi 29350170	conserved protein found in conjugate transposon [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]	3	33	32	22.1~24.0/6.9~7.0	16.1/5.39
41	gi 21224795	hypothetical protein SC9C7.27c [Streptomyces coelicolor A3(2)]	4	42	41	16.4~16.9/4.6~4.7	14.6/6.07
42	gi 22449987	nitrogenase Fe protein [uncultured bacterium]	4	50	42	13.5~14.8/4.1~4.2	11.7/4.15
43	gi 939816	flagellin protein [Borrelia garinii]	5	40	23	13.4~14.7/6.0	34.9/5.23
44	gi 16332210	unknown protein [Synechocystis sp. PCC 6803]	4	44	43	13.2~14.5/6.3~6.4	21.5/5.85
45	gi 11356730	hypothetical protein [imported] - Thermomonospora fusca	4	44	35	32.0~35.3/5.6~5.7	14.1/8.01
46	gi 15605964	transcriptional regulator (Crp/Fnr family) [Aquifex aeolicus]	6	62	35	80.6~88.8/5.3~5.4	27.3/8.9
47	gi 29348239	DNA-binding protein HU-beta [Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482]	4	51	40	37.2~41.3/5.7	9.2/9.75
48	gi 4204224	cellulase [Prevotella ruminicola]	5	43	26	32.7~35.8/5.5	37.3/6.09
49	gi 21220330	conserved hypothetical protein SCI8.26 [Streptomyces coelicolor A3(2)]	4	41	29	26.0~26.7/4.8	20.4/5.73
50	gi 15835292	conserved hypothetical protein [Chlamydia muridarum]	6	58	33	57.2~62.2/5.4~5.5	29.5/6.63
51	gi 29827633	putative MarR-family	4	49	37	55.7~60.8/4.9~5.0	17.0/7.82

		transcriptional regulator [<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680]						
52	gi 79763	phycocyanin beta chain - <i>Anabaena</i> sp	4	46	43	51.1~54.9/5.8~5.9	18.3/5.00	
53	gi 25026779	putative RNA polymerase sigma factor [<i>Corynebacterium efficiens</i> YS-314]	5	53	30	50.6~55.4/5.0~5.1	22.7/6.54	
54	gi 28269299	glycerol kinase [<i>Borrelia hermsii</i>]	6	46	21	37.7~42.1/6.3~6.5	55.2/8.64	

1: gi no.: NCBI 針對每一個序列所編的連續性編號

2: Exp: 膠片經軟體比對後之實驗值

3: Theo: 資料庫中蛋白質理論值

4: Score: 以 MOWES 為主要判斷依據

5: Match: 判斷準則至少 4 個以上的 peptide 配對

6: Coverage: 蛋白質全長序列覆蓋範圍百分比

7: [:]: 蛋白質分離來源

參考文獻

1. **Boyd, R.F.** 1995. Basic medical microbiology. 5th ed. Edited by Schnittman, E.R. p. 376
2. **Byrne, B., and M.S. Swanson.** 1998. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. Infection and immunity. **66**:3029-3034.
3. **Cash, P., E. Argo, L. Ford, L. Lawrie, H. McKenzie.** 1999. A proteomic analysis of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Electrophoresis. **20**:2259-2268.
4. **Cianciotto, N.P., B.I. Eisenstein, C.H Mody, G.B. Toews, and N.C. Engleberg.** 1989. A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. American Society for Microbiology. **57**:1255-62.
5. **Dainese-Hatt, P., H-M. Fischer, H. Hennecke, P. James.** 1999. Classifying symbiotic proteins from *Bradyrhizobium japonicum* into functional groups by proteome analysis of altered gene expression levels. Electrophoresis. **20**:3514-3520.
6. **Dondero, T.J., R.C. Rentdorff, G.F. Mallison,; et al.** 1980. An outbreak of legionnaires' disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower. N Engl J Med. **302**:365-70.
7. **Guerreiro, N., M. Djordjevic, B. Rolfe.** 1999. Proteome analysis of the model microsymbiont *Sinorhizobium meliloti*: isolation and characterization of novel protein. Electrophoresis. **20**:818-825.
8. **Hammer, B.K. and M.S. Swanson.** 1999. Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. Molecular Microbiology. **33**:721-731.
9. **Heuner, K., B.C. Brand, and J. Hacker.** 1999. The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors.

- FEMS microbiology letters. **175**:69-77.
10. **John, G.S., and H.M. Steinman.** 1996. Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase of *Legionella pneumophila*: Role in stationary-phase survival. Journal of bacteriology. **178**:1578-1584.
 11. **Jungblut, P., et al.** 1999. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovin* BCG strain: towards functional genomics of microbial pathogens. Mol Microbiol. **33**:1103-1117.
 12. **Marra, A., M.A. Horwitz, and H.A. Shuman.** 1990. The HL-60 model for the interaction of human macrophages with the Legionnaires' disease. J Immunol **144**:2738-44.
 13. **Münchbach, M., P. Dainese, W. Staudenmann, F. Narberhaus, P. James.** 1999. Proteome analysis of heat shock expression in *Bradyrhizobium japonicum*. Eur J Biochem. **263**:39-48.
 14. **Niimi, M., R. Cannon, B. Monk.** 1999. *Candida albicans* pathogenicity: a proteomic perspective. Electrophoresis. **20**:1001-1010.
 15. **Sadosky A.B., J.W. Wilson, H.M. Steinman, and H.A. Shuman.** 1994. The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability. Journal of Bacteriology. **176**:3790-9.
 16. **Salyers, A.A., D.D. Whitt.** 2002. *Legionella pneumophila* and Legionnaires' disease. p. 311-321. In Bacterial pathogenesis a molecular approach. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 17. **Sanchez-Campillo, et al.** 1999. Identification of immunoreactive protein of *Chlamydia trachomatis* by Western blot analysis of a two-dimensional electrophoresis map with patient sera. Electrophoresis. **20**:2269-2279.
 18. **Shands, K.N., J.L. Ho, and R.D. Meyer.** 1985. Potable water source of Legionnaire's disease. JAMA. **253**:1412-6.
 19. **Vasseur, C., J. Labadie, M. Hébraud.** 1999. Differential protein exoression by *Pseudomonas fragi* submitted to various stresses. Electrophoresis. **20**:2204-2213.

計畫成果自評

本研究裡已完成 *L. pneumophila* 之生長曲線提供不同生長階段可培養性的變化，建立蛋白質體分析條件，並完成 56 點蛋白質身份鑑定。藉由整體性的蛋白質體分析技術的介入，可在短時間內大規模的對生物所表現的蛋白作探討，進而尋求具有重要生理意義的指標蛋白。此對於生物氣膠的基本生理機制可提供更多新的科學資訊，以作為未來改善生物氣膠採樣分析之依據。