

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

室內生物性氣膠之採樣分析技術開發(2/2)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-002-138-

執行期間：92年08月01日至93年10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

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 3 月 7 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

室內空氣污染物特性、所致健康影響及其控制研究

室內生物性氣膠之採樣分析技術開發

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2320-b-002-170

NSC 92-2320-b-002-138

執行期間：91年8月1日至93年10月31日

計畫主持人：黃耀輝博士

共同主持人：張靜文博士、陳水田博士

計畫參與人員：劉元蕙

成果報告類型：完整報告

執行單位：台灣大學公共衛生學院職業醫學與工業衛生研究所

中華民國 93 年 11 月 10 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。

研究發現退伍軍人菌在營養環境下培養 24 小時處於指數生長期，可培養菌數對數值(log CFU/ml)由 3.94 ± 0.10 增加至 5.53 ± 0.24 ，培養至第 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 ，其繁殖增生週期為 3 小時。當退伍軍人菌處於無營養提供之環境時，其在培養基上繁殖增生的能力則會隨著時間的增加逐漸喪失，起始可培養之菌數濃度對數值 8.16 ± 0.11 ，第 20 天時已下降至 2.51 ± 0.47 ，第 35 天則完全喪失其在培養基上繁殖增生能力。

蛋白質體分析發現不同生長階段之蛋白質數目表現不同，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，另外，當退伍軍人菌處於無營養提供之壓力環境下，隨著時間的增加蛋白質數目表現則呈現逐漸下降的趨勢，由起始 336 點，經過 1 天即下降至 290 點，至無培養能力階段第 4 天及第 35 天則分別只剩 258 點及 253 點。

質量足夠進入質譜分析之蛋白質點共完成 99 點蛋白質身份鑑定，其中發現一退伍軍人菌之特殊重要蛋白 Mip(macrophage infectivity potentiator)，為退伍軍人菌得以進入宿主體內之毒力因子，且它不僅存在於營養階段，當退伍軍人菌處於無營養的不良環境時，其表現量更是隨著時間而明顯增加，即使在無培養能力之 VBNC 階段，Mip 蛋白質量亦持續增加，不僅證明了 VBNC 狀態的存在，亦顯示了無法培養的退伍軍人菌具有明顯的侵犯宿主的能力。

關鍵字：退伍軍人菌、活性、無營養、蛋白質體

Abstract

Legionella pneumophila is an important indoor bioaerosol. The transmission route of *L. pneumophila* is inhalation of contaminated aerosols. The traditional detection method—culture is encountered several limitations. The aim of this study is to explore the protein profile and related physiological functions at different growth stages using proteomic technique.

The log culturable concentration (Log CFU/ml) of *L. pneumophila* was raised from 3.94 ± 0.10 to 5.53 ± 0.24 at exponential phase, and continuously raised to 8.28 ± 0.13 (48th hr) and 8.43 ± 0.14 (72nd hr) at the stationary phase. The Log CFU/ml of *L. pneumophila* in non-nutrient condition was declined from 8.16 ± 0.11 to 2.51 ± 0.47 at 20th day, and lost its culturability at 35th day.

In the proteomics analyze, the expressive protein numbers were gradually increased in nutrient condition: 282 protein spots at exponential phase, followed by early stationary phase (336 spots) and stationary phase (357 spots). However, the protein number was decreased in non-nutrient condition. It started with 336 spots, declined to 290 spots at day 1st, and reduced to 258 spots and 253 spots at non-culturable day 4th and 35th.

Among 99 identified proteins, an important protein—Mip (macrophage infectivity potentiator) which is related to infection was not only found in nutrient condition but also in non-nutrient condition. With the prolonged starvation period, the expression of Mip protein was mounting. It represented the possibility of infection for non-culturable *L. pneumophila*.

目錄

| | |
|---|----|
| 第一章 前言..... | 1 |
| 第二章 研究目的..... | 2 |
| 第三章 文獻探討..... | 3 |
| 第一節、嗜肺性退伍軍人桿菌(<i>Legionella pneumophila</i>)的生長環境及傳播方式..... | 3 |
| 第二節、退伍軍人菌的環境偵測方法..... | 3 |
| 第三節、退伍軍人菌面臨的 VBNC (Viable but nonculturable)階段..... | 3 |
| 第四節、蛋白質體學在微生物領域之研究..... | 3 |
| 第四章 研究方法..... | 5 |
| 第一節、菌種..... | 5 |
| 第二節、菌種培養..... | 5 |
| (一) 實驗菌種起始菌液濃度之調控..... | 5 |
| (二) 實驗培養條件..... | 5 |
| 第三節、可培養性試驗..... | 5 |
| 第四節、活性試驗(螢光染色法)..... | 5 |
| 第五節、蛋白質分析..... | 6 |
| (一) 樣本前處理..... | 6 |
| (二) 蛋白質濃度測定..... | 6 |
| (三) 蛋白質體分析..... | 6 |
| (四) 質譜分析..... | 6 |
| 第五章 結果與討論..... | 8 |
| 第一節、營養環境最適採樣點..... | 8 |
| 第二節、營養環境下不同生長階段的可培養性及活性..... | 8 |
| 第三節、無營養環境下退伍軍人菌的可培養性及活性..... | 8 |
| 第四節、不同生長階段蛋白質點數的表現情形..... | 9 |
| 第五節、MALDI TOF 質譜儀蛋白質身份鑑定..... | 9 |
| 第六節、結論與建議..... | 11 |
| 第六章 參考文獻..... | 12 |
| 計畫成果自評..... | 29 |

表目錄

| | |
|-------------------------------------|----|
| 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····· | 15 |
| 表二、嗜肺性退伍軍人桿菌菌數濃度與培養天數之關係····· | 16 |
| 表三、完成鑑定之蛋白質····· | 17 |
| 表四、比較營養環境停滯生長期前期及其他生長階段蛋白質抑制之表現情形·· | 20 |
| 表五、比較營養環境停滯生長期前期及其他生長階段蛋白質增加之表現情形·· | 21 |

圖目錄

| | |
|--|----|
| 圖一、培養時間與可培養菌數濃度之關係..... | 22 |
| 圖二、營養環境下培養時間與菌數濃度之關係..... | 22 |
| 圖三、營養環境蛋白質表現數目增減情形..... | 23 |
| 圖四、無營養環境蛋白質表現數目增減情形..... | 23 |
| 圖五、Heat shock protein 群組在不同階段蛋白質相對體積變化情形..... | 24 |
| 圖六、Mip 蛋白在不同階段蛋白質相對體積變化情形..... | 25 |
| 圖七、與存活能力相關之六種蛋白質在不同階段蛋白質相對體積變化情形 (I) | 26 |
| 圖八、與存活能力相關之六種蛋白質在不同階段蛋白質相對體積變化情形 (II) | 27 |
| 圖九、鞭毛相關蛋白在不同階段蛋白質相對體積變化情形..... | 28 |

第一章 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，可造成呼吸系統疾病，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。

本研究觀察營養環境及無營養環境各生長階段下嗜肺性退伍軍人菌活性及可培養性的改變，並從微生物蛋白質體表現著手，以瞭解不同狀態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。

第二章 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，以及 *L. pneumophila* 在無營養供給狀態下所造成的蛋白質體特殊表現。

第三章 文獻探討

第一節、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)。

美國每年約有 8000~18000 個退伍軍人菌感染案例發生，而平均的死亡率為 20~40%，根據台灣疾病管制局的統計資料，台灣確定感染病例九十年及九十一年分別有 40 及 23 個確定感染病例，九十二年 10 月為止亦有 28 個感染案例(資料來源：衛生署疾病管制局 92.11.27)。

第二節、退伍軍人菌的環境偵測方法

L. pneumophila 普遍存在於自然水體之中，水體樣本取得後須經過加酸或加熱前處理步驟(Maiwald, 1998)，再以選擇性培養基培養，選取可能的菌落繼以 L-cystine 營養需求及直接螢光抗體試驗法作進一步確認。

微生物培養法至今仍為退伍軍人菌檢測的標準方法，但檢測過程中除了加熱、加酸等前處理有可能造成菌體的傷害死亡或失去繁殖增生的能力(Maiwald, 1998)，以致造成偵測退伍軍人菌量化上的誤差外，生長速度緩慢亦使得培養法需花費數日方能完成鑑定。

第三節、退伍軍人菌面臨的 VBNC (Viable but nonculturable) 階段

退伍軍人菌與其他一些革蘭氏陰性菌一樣會產生 VBNC 的現象，當退伍軍人菌處於非營養環境或高溫(Hussong, *et al.*, 1987)，或是水體經過加氯消毒等動作使得菌體受傷但未死亡(Camper, 1979)，即有可能使菌體進入 VBNC 的狀態。此時，菌體依然存有活性但卻失去在培養基上繁殖增生的能力。但當環境中有自然宿主如阿米巴原蟲介入時，則會使這些 VBNC 的活菌回復其正常繁殖增生能力，再度擁有潛在的致病能力(Steinert, *et al.*, 1997)。

第四節、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)。對嗜肺性退伍軍人菌而言, 過去十年來僅有數個個別蛋白質被評估(Sadosky, *et al.*, 1994, John and Steinman, 1996, Heuner, *et al.*, 1999, Byrne, 1998, Cianciotto, 1989)。

第四章 研究方法

第一節、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。

第二節、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，取單一菌落溶入滅菌水置備懸浮液，調整菌數濃度至 10^3 CFU/mL，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

營養環境：

將上述起始菌液置於培養箱內，提供 37 °C、5% CO₂ 並震盪培養。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。

無營養環境：

將營養環境培養 48 小時之菌液離心去除上清液後加入滅菌水置於 37°C 培養箱內靜置培養。每 24 小時收取樣本，進行可培養性(culturability)試驗、活性(viability)試驗，同時收取第 24 小時、第 12 天及無培養階段第 4 天與第 35 天樣本進行蛋白質體試驗。

第三節、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。

可培養菌數濃度(Tc)推算公式：

$$Tc = (N \times f) \div V \times 10^3, \text{ 可培養菌數濃度(CFU/mL)}$$

N：平均一個培養基上長出之菌落數(CFU)

f：連續稀釋倍數

V：塗抹在培養基的菌液體積(μ L) = 100 μ L

第四節、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 μ L 螢光染劑至 1.5 mL 之微量離心管中，加入稀釋樣本並在室溫下避光靜置反應，以直徑 25 mm、孔徑 0.22 μ m 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，計算活性菌數及總菌

數，每個樣本重複 3 次 BacLight 呈色實驗

活性菌數、死菌菌數濃度(T)推算公式：

$$T = N \times A/a \div V \times f, \text{ 菌數濃度(cell/mL)}$$

N：平均每一視野下之活性菌數(綠色)或死菌菌數(黃至紅色)

$$A：\text{過濾表面積(mm}^2\text{)} = 286 \text{ mm}^2$$

$$a：\text{顯微鏡下之單一視野面積(mm}^2\text{)} = 0.038 \text{ mm}^2$$

$$V：\text{過濾之樣本體積(mL)} = 1 \text{ mL}$$

f：稀釋倍數

$$\text{總菌數濃度(Tt)} = \text{活性菌數濃度(Tv)} + \text{死菌菌數濃度(Td)}$$

第五節、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，再加入細胞溶解緩衝液利用超音波震盪直至細胞完全溶解，離心後取蛋白質萃取液進行蛋白質定量。

(二) 蛋白質濃度測定

選取 BSA(bovine serum albumin)為蛋白標準品製備檢量線($y = a x + b$, y：吸光值, x：標準溶液濃度)，蛋白質濃度與吸光值成正比線性關係，實驗檢量線濃度範圍為 1.5625 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ ，三次實驗 r^2 皆在 0.9858 以上。

(三) 蛋白質體分析

蛋白質萃取液經蛋白質濃度分析後，再以細胞溶解液調整樣本蛋白質濃度進行一維等電位聚焦分析 IEF (First-dimension isoelectric focusing) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)，最終電壓設定 6000V 及最終總電壓為 30 KVh，取出完成一維聚焦分析之膠片進行二維電泳分析(2-D electrophoresis)(Bio-Rad, Richmond, CA)，電流設定 15 mA，完成後再利用 SYPRO Ruby (Molecular probes)蛋白質染劑將二維膠片染色 3 小時，使用影像掃瞄系統 (Typhoon 9200, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) 掃瞄膠片，所得圖檔利用軟體進行影像比對分析(ImageMaster 2D Elite, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)。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。

(四) 質譜分析

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

樣本送入 MALDI-TOF 質譜儀分析，經雷射激發後之離子在飛行管中飛行。再將偵測到之飛行時間，套入飛行時間及質核比之方程式中換算為質量，質量偵測範圍選擇在 750m/z 到 3000m/z 之間。

利用 Mascot 鑑定軟體(<http://www.matrixscience.com>)將經質譜儀分析所得之蛋白質肽質量，搭配已知的分子量及等電位點值範圍為輔助搜尋條件進行資料庫比對。再根據肽配對數(peptides match)、分子量大小、等電位點和

蛋白質全長序列的覆蓋百分比(coverage percentage)做為判斷的參考。

第五章 結果與討論

第一節、營養環境最適採樣點

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。

第二節、營養環境下不同生長階段的可培養性及活性

如圖二及表一所示，在營養的環境中培養 24 小時後的總菌數濃度對數值為 5.85 ± 0.04 ，培養 48 小時即達停滯生長期，總菌數濃度對數值為 8.51 ± 0.06 。活性細胞數亦呈現同步上升的狀態，不論是指數生長期或停滯生長期約佔總細菌量的 18-23 %。

至於可培養菌數部分，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 5.53 ± 0.24 處於指數生長期，可培養菌數百分比(可培養菌數/總菌數)為 48.36 %，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 %，顯示在營養狀態下能在營養培養基上表現繁殖能力的數目，亦隨著細胞數的增加而顯著上升，可培養比例從指數生長期的 48.36 % 上升至停滯生長期的 71.50 %。

第三節、無營養環境下退伍軍人菌的可培養性及活性

逐日持續觀察退伍軍人菌在無營養環境下的活性與培養能力長達 97 天，顯示繁殖增生的能力大幅下降，從起始可培養菌數濃度對數值為 8.16 ± 0.11 ，經過 20 天無營養之壓力環境後可培養菌數濃度對數值大幅降至僅剩 2.51 ± 0.47 ，而在第 34 天時每毫升液體中可培養菌數低於 1 CFU(colony forming unit)，之後持續觀察 60 天也都無法培養出退伍軍人菌(表二)，退伍軍人菌在無營養之壓力環境下會逐漸失去其可培養能力。

然在無營養狀況下的總細菌數則相對穩定，平均仍維持在對數值 8.47 ± 0.04 ，活性細菌數雖稍有起伏，但相較於可培養性的大幅下降，仍屬相對穩定，平均對數值為 7.74 ± 0.23 ，無培養階段活性菌數比率亦維持在 14-33 % 之間。

結果顯示無營養的壓力環境造成繁殖能力的停滯，以致於無法在培養基上形成菌落，然此時仍有相當大量的細胞具有活性，其落差值則隨著菌體在此壓力

環境中的時間而明顯加大。

第四節、不同生長階段蛋白質點數的表現情形

在營養環境，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 小時停滯生長期前期)、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，若以第 24 小時的退伍軍人樣本為比對基準，發現培養第 48 及 72 小時分別新增了 172 及 168 點，另外亦分別減少了 86 及 58 點(表三)，顯示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多樣生理變化，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。

將停滯生長期初期的退伍軍人菌轉置於無營養之壓力環境下，觀察其蛋白質點數之表現，穩定生長期初期平均呈現的蛋白質數目為 336 個，在無營養狀況下每個階段，不論是培養力的下降期或是無培養力的階段，與處在營養狀態下的蛋白質比較，從其中減少的蛋白質數目均較新增加的蛋白質為多，且隨著在無營養的環境中越久，減少的蛋白質數目越多，在無營養環境下培養第 1 及第 12 天分別減少 130 及 137 種蛋白質，持續觀察至無培養能力第 4 天及第 35 天，蛋白質數目分別減少 154 及 178 種(圖四)，表示有許多原來活動的生理機制，在無營養的環境下均逐漸關閉了，至於新增的蛋白質數目，並無隨著在無營養的時間越久，同樣上述四個時間點增加之蛋白質數目分別為 81、79、75 及 85 種蛋白(圖四)，而有明顯的改變。這顯示出退伍軍人菌在無營養環境中明顯減少其生理活動。

二維電泳膠片上蛋白質點表現之再現性，三次重複試驗皆有表現者比例為 83%，只有一次未表現者比例為 98%，顯示本實驗方法有很高的再現性。

第五節、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，將膠片上足量分析之蛋白質點作質譜儀鑑定，使用 MasCot 搜尋軟體比對 SWISS-Prot 資料庫進行蛋白質身份鑑定，共完成 99 點蛋白質身分鑑定。(表三)

營養環境下培養第 48 小時屬停滯生長期前期，共有 83 點蛋白質完成身分鑑定，持續培養至第 72 小時，其中有 7 點蛋白的表現量相對於第 48 小時減少 3 倍以上；另外，將穩定期前期之退伍軍人菌置於無營養之壓力環境下 1 天，發現有 25 點蛋白表現量相對減少 3 倍以上；到了第 12 天有 24 點蛋白表現量相對減少 3 倍以上；近一步觀察失去培養能力第 4 天及第 35 天之退伍軍人菌，蛋白質表現量相對於停滯生長期前期減少 3 倍以上者分別有 32 點及 25 點，可以發現將停滯生長期前期之退伍軍人菌轉置於無營養環境下大約有 1/3 的蛋白質會減少其表現量(表四)。

另外觀察蛋白質表現增强的部分，發現營養培養第 48 小時進入第 72 小時有 8 點蛋白質呈現 3 倍以上的表現量；而在無營養之壓力環境第 1 天、第 12 天及失去培養能力第 4 天、第 35 天之退伍軍人菌，相對於營養培養第 48 小時表現量增強 3 倍以上者分別有 4、2、9、12 點(表五)。

在所鑑定完成的蛋白質點中，首先發現了一群與退伍軍人菌附著於宿主細胞有關的蛋白質，稱之為 heat shock proteins 群組，共有三個相關蛋白，分別為 HSP60、HSP70 與 GrpE 蛋白質。其中 GrpE 主要調控產生 HSP70 的 DNA，增加其效率以促進產生 HSP70，增加附著能力；至於 HSP60 則是退伍軍人菌非常重要的蛋白質，其功能之一可透過巨噬細胞(macrophage)上特殊的接受器的連接，增加退伍軍人菌附著於巨噬細胞的能力(Hoffman, 1999)。這三種蛋白質都出現在營養與無營養的環境下，包括無培養繁殖能力的退伍軍人菌身上。若從蛋白質相對體積變化所表現的相對強度來看(圖五)，營養條件下生理活動頻繁，相對量上也較在壓力環境下為多，尤其是在停滯生長期階段更是明顯。但即使壓力環境下生理活動下降，這些蛋白質仍持續在出現，且多可維持相當體積，在整體生理活動降低下具有很重要的生理意義。

另外亦發現可促進宿主細胞胞飲作用，使得退伍軍人菌得以進入宿主體內的功能性蛋白 Mip(macrophage infectivity potentiator)，Mip 為退伍軍人菌重要之特殊蛋白質 (genus-ubiquitous and species-specific) (Cianciotto, 1992)，位於退伍軍人菌的表面蛋白質，其主要的功能之一為促進巨噬細胞與自然宿主原蟲的胞飲作用，使其得以進入宿主細胞中，為一重要之毒力因子(Cianciotto, 1992)。實驗中發現它不僅存在於營養階段，當退伍軍人菌處於無營養的不良環境時，其表現量更是隨著時間而明顯增加，即使在無培養能力之 VBNC 階段，Mip 蛋白質量亦持續增加(圖六)，不僅證明了 VBNC 狀態的存在，亦顯示了無法培養的退伍軍人菌具有明顯的侵犯宿主的能力。

另外有 6 種相關蛋白能增加在宿主細胞內生存能力者，或在侵犯宿主後能維持存活甚至增加繁殖，其中 Hsp60 與 Mip 除具前述之功能外，Hsp60 可從退伍軍人菌上釋放出來(Fernandez, 1996)，在吞噬細胞中干擾吞噬細胞與溶解素的結合，維持退伍軍人菌在吞噬細胞中的存活(Hoffman, 1999)，而 Mip 除可抵抗宿主細胞的殲滅外，尚能促進退伍軍人菌在細胞內的增生繁殖(Wintermeyer, et al 1995)。另外，我們也偵測到 intracellular multiplication, IcmX 蛋白質，其功能與 Mip 的繁殖功能相同，主要在吞噬細胞中參與並改變其調控機制，以促進退伍軍人菌在細胞中的繁殖(Brand, et al. 1994; Coers, et al. 2000; Matthews, et al. 2000)，這些蛋白質均可在壓力環境中存在，甚至在無法培養階段亦持續出現，然其中 IcmX 蛋白量有明顯下降趨勢，可能與退伍軍人菌一直無法進入宿主體內且細胞整體走向休眠狀態有關(圖七)。除了前面三個蛋白質外，peroxynitrite reductase 具有保護退伍軍人菌免於遭受不穩定物質的攻擊，使其得以在巨噬細胞中生長(Rankin, 2002)，其在無營養環境中隨著時間增加蛋白質表現量也逐步上升，另外，Rep helicase 則可幫助退伍軍人菌對抗宿主細胞內缺乏 thymine 的狀況，維

持退伍軍人菌在細胞內的存活與生長(Harb and Kwaik, 2000)，雖然 Rep helicase 在無營養環境蛋白質的表現量較營養條件時少，但相對體積仍維持在 50% 的表現，當退伍軍人菌處於低營養環境時 Poly-beta-hydroxybutyrate polymerase(PHB) 可提供其能量來源以維持存活，而 Acetoacetyl-CoA reductase 為合成 PHB 之第二步驟參與酵素，在無營養環境下顯示有最大的蛋白表現量，目的可能為大量合成 PHB 以因應退伍軍人菌在低營養環境下之存活能力(圖八)。

鞭毛的形成主要是為了增加移動能力，退伍軍人菌為了離開不良的生存環境，會產生鞭毛藉以增加運動特性以尋找可以附著的地點或對象，我們發現有三個蛋白質與此有關，第一個是 global regulator 蛋白質，它受到 csrA 基因的調控，協助退伍軍人菌能適應環境的改變，其中的一項功能即是調控鞭毛的形成(Fettes, 2001)，從蛋白質相對量來看，在壓力環境中仍維持著相當高的量，其最大表現量出現在無培養力的階段(圖九)。另外，我們亦在無營養環境中發現組成鞭毛的基座的蛋白質 protein flaC(圖九)，這些數據顯示鞭毛很可能在無營養環境下被合成，以幫助退伍軍人菌尋找適當的宿主或較佳的生存環境。

第六節、結論與建議

根據本研究的結果顯示，嗜肺性退伍軍人菌不僅能存活於營養環境，也能在營養極度缺乏的水體中持續存活，並且維持其細胞膜的完整性，時間可長達 97 天。此外，即使面臨長時間營養極度缺乏的壓力，嗜肺性退伍軍人菌仍能持續進行基因表現，以因應外在環境的變化，在調控產生的蛋白質中也包括了與存活及感染作用有關的重要蛋白質。顯示此菌對環境的耐受性以及侵犯自然宿主甚至人類的可能。

建議未來應針對此種可能造成肺炎甚至死亡的病原菌進行更完整的蛋白質體分析；另外，未來也需要進一步利用分子生物技術評估目前針對退伍軍人菌消毒方法的有效性。如此才能瞭解此種環境耐受性強病原菌是否能藉由消毒處理，控制可能產生的疫情。另一方面，未來也應該利用分子生物技術，建立有效的環境偵測技術，並將其應用於高感染風險族群所活動的室內空氣與污染源監測，以預防病原菌大量散播。

第六章 參考文獻

1. **Brand, B.C., A.B. Sadosky, and H.A. Shuman.** 1994. The *Legionella pneumophila* *icm* locus: a set of genes required for intracellular multiplication in human macrophages. *Molecular microbiology*. **14**:797-808.
2. **Boyd, R.F.** 1995. *Basic medical microbiology*. 5th ed. Edited by Schnittman, E.R. p. 376
3. **Byrne, B., and M.S. Swanson.** 1998. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infection and immunity*. **66**:3029-3034.
4. **Camper, A.K., and G.A. McFeters.** 1979. Chlorine injury and the enumeration of waterborne coliform bacteria. *Applied and environmental microbiology*. **37**:633-641.
5. **Cash, P., E. Argo, L. Ford, L. Lawrie, and H. McKenzie.** 1999. A proteomic analysis of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Electrophoresis*. **20**:2259-2268.
6. **Cianciotto, N.P. and B.S. Fields.** 1992. *Legionella pneumophila mip* gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:5188-5191.
7. **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.
8. **Coers, J., J.C. Kagan, M. Matthewa, H. Nagai, D.M. Zuckman, and C.R. Roy.** 2000. Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. **38**:719-736.
9. **Dainese-Hatt, P., H-M. Fischer, H. Hennecke, and P. James.** 1999. Classifying symbiotic proteins from *Bradyrhizobium japonicum* into functional groups by proteome analysis of altered gene expression levels. *Electrophoresis*. **20**:3514-3520.
10. **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.
11. **Fernandez, R.C., S.M. Logan, S.H.S. Lee, and P.S. Hoffman.** 1996. Elevated levels of *Legionella pneumophila* stress protein Hsp60 early in infection of human monocytes and L929 cells correlate with virulence. *Infection and immunity*. **64**:1968-1976.

12. **Fettes, P.S. V. Forsbach-Birk, D. Lynch, and R. Marre.** 2001. Overexpression of *Legionella pneumophila* homologue of the E. coli regulator *csrA* affects cell size, flagellation, and pigmentation. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:353-360.
13. **Guerreiro, N., M. Djordjevic, and B. Rolfe.** 1999. Proteome analysis of the model microsymbiont *Sinorhizobium meliloti*: isolation and characterization of novel protein. *Electrophoresis.* **20**:818-825.
14. **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.
15. **Harb, O.S., and Y.A. Kwaik.** 2000. Essential role for the *Legionella pneumophila* rep helicase homologue in intracellular infection of mammalian cells. *Infection and immunity.* **68**:6970-6978.
16. **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.
17. **Hoffman, P.S. and R.A. Garduno.** 1999. Surface-associated heat shock proteins of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori*: roles in pathogenesis and immunity. *Infectious diseases in obstetrics gynecology.* **7**:58-63.
18. **Hussong, D., R.R. Colwell, M.O. O'Brien, E. Weiss, A.D. Pearson., R.M. Weiner, and W.D. Burge.** 1987. Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. *Bio/Technology.* **5**:947-950.
19. **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.
20. **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.
21. **Matthews, M. and C.R. Roy.** 2000. Identification and subcellular localization of the *Legionella pneumophila* IcmX proteins: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells. **68**:3971-3982.
22. **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.
23. **Maiwald, M. and J.H. Helbig.** 1998. Laboratory methods for the diagnosis of *Legionella pneumophila* infections. *Journal of microbiological methods.* **33**:59-79.
24. **Münchbach, M., P. Dainese, W. Staudenmann, F. Narberhaus, and P. James.** 1999. Proteome analysis of heat shock expression in *Bradyrhizobium japonicum*.

- Eur J Biochem. **263**:39-48.
25. **Niimi, M., R. Cannon, and B. Monk.** 1999. *Candida albicans* pathogenicity: a proteomic perspective. Electrophoresis. **20**:1001-1010.
 26. **Rankin, S., Z. Li, and R.R. Isberg.** 2002. Macrophage-induced genes of *Legionella pneumophila*: protection from reactive intermediates solute imbalance during intracellular growth. Infection and immunity. **70**:3637-3648.
 27. **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.
 28. **Salyers, A.A., and 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.
 29. **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.
 30. **Shands, K.N., J.L. Ho, and R.D. Meyer.** 1985. Potable water source of Legionnaire's disease. JAMA. **253**:1412-6.
 31. **Steinert, M., L. Emody, R. Amann, and J. Hacker.** 1997. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Applied and environmental microbiology. **63**:2047-2053.
 32. **Vasseur, C., J. Labadie, and M. Hébraud.** 1999. Differential protein exoression by *Pseudomonas fragi* submitted to various stresses. Electrophoresis. **20**:2204-2213.
 33. **Wintermeyer, E., B. Ludwig, M. Steinert, B. Schmidt, G. Fischer, and J. Hacker.** 1995. Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells. Infection and immunity. **63**:4576-4583.
-

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 Log(cell/mL) | Mean(s.d) | -- | 5.85(0.04) | 8.51(0.06) | 8.58(0.06) |
| | CV% | -- | 0.65 | 0.7 | 0.7 |
| 活性菌數濃度 ³ , T _v Log(cell/mL) | Mean(s.d) | -- | 5.21(0.47) | 7.78(0.42) | 8.04(0.27) |
| | CV % | -- | 9.06 | 5.34 | 3.38 |
| 可培養菌數濃度 ⁴ , T _c Log(CFU/mL) | Mean(s.d) | 3.94(0.10) | 5.53(0.24) | 8.28(0.13) | 8.43(0.14) |
| | CV% | 2.6 | 0.87 | 1.57 | 1.66 |
| 活性菌數比例, T _v /T _t ×100, % | | -- | 23.10 | 18.44 | 29.10 |
| 可培養菌數比例, T _c /T _t ×100, % | | -- | 48.36 | 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

表二、嗜肺性退伍軍人桿菌菌數濃度與培養天數之關係¹

| 營養條件 | | 壓力環境培養 ⁶ | | | | | | | | | | |
|--|-----------|---------------------|------------|------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|------------|------------|------------|------------|
| 培養時間 | | 0 hr | 1-9 天 | 10-13 天 | 14-18 天 | 19-24 天 | 25-33 天 | 34 天 ⁷ | 35-47 天 | 48-68 天 | 69-82 天 | 83-97 天 |
| 總菌數濃度 ² , T _t | Mean(s.d) | 8.55(0.10) | 8.49(0.04) | 8.48(0.04) | 8.50(0.02) | 8.46(0.05) | 8.44(0.02) | 8.47(0.04) | 8.48(0.03) | 8.41(0.06) | 8.51(0.02) | 8.50(0.04) |
| Log(cell/mL) | CV% | 1.18 | 0.48 | 0.53 | 0.19 | 0.65 | 0.24 | 0.48 | 0.34 | 0.67 | 0.25 | 0.42 |
| 活性菌數濃度 ³ , T _v | Mean(s.d) | 8.10(0.35) | 8.08(0.19) | 7.74(0.10) | 7.67(0.12) | 7.59(0.15) | 7.54(0.11) | 7.62(0.07) | 7.70(0.09) | 7.62(0.07) | 7.82(0.05) | 7.92(0.10) |
| Log(cell/mL) | CV% | 4.27 | 2.30 | 1.26 | 1.58 | 1.96 | 1.51 | 0.91 | 1.15 | 0.93 | 0.63 | 1.31 |
| 可培養菌數濃度 ⁴ , T _c | Mean(s.d) | 8.16(0.11) | 7.66(0.47) | 6.17(0.78) | 4.01(0.58) | 2.44(0.51) | 1.88(0.30) | | | | | |
| Log(CFU/mL) | CV% | 1.37 | 6.15 | 12.66 | 14.53 | 21.07 | 15.69 | ND | ND | ND | ND | ND |
| 活性菌數比例, T _v /T _t ×100, % | | 35.61 | 38.60 | 17.94 | 14.90 | 13.34 | 12.25 | 14.51 | 16.43 | 16.18 | 20.60 | 26.71 |
| 可培養菌數比例, T _c /T _t ×100, % | | 40.79 | 14.85 | 0.49 | 3.28 × 10 ⁻³ | 9.5 × 10 ⁻⁵ | 2.76 × 10 ⁻⁵ | -- | -- | -- | -- | -- |

1 以平均菌數濃度表示(重複3次實驗,且每1次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

6 取營養環境培養48小時之菌體轉入無菌水中進行壓力環境培養

7 VBNC: viable but non-culturable stage

表三、完成鑑定之蛋白質

| Spot no. on gel | Protein ID | Match ¹ | Score ² | Coverage sequence (%) ³ | Mr(kDa)/pI | | AC no. |
|-----------------|--|--------------------|--------------------|------------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------|
| | | | | | Exp. ⁴ | Theo. ⁵ | |
| 1 | Catalase | 7 | 50 | 15 | 59.3~64.6/5.1 | 55.6/6.11 | P42321 |
| 2 | (3R)-hydroxymyristoyl-[acyl carrier protein] dehydratase | 4 | 40 | 26 | 18.8~19.4/3.7~3.8 | 17.3/6.31 | Q9CJK9 |
| 3 | 30S ribosomal protein S8 | 3 | 32 | 29 | 18.5~19.5/8.2~8.4 | 14.6/9.62 | Q8YHM6 |
| 4 | Outer membrane pore protein E precursor | 6 | 60* | 30 | 14.2~14.5/5.5 | 38.6/4.76 | Q56119-00-00-01 |
| 5 | Chemotaxis protein cheZ | 5 | 51 | 26 | 13.7~13.9/5.5 | 24.0/4.44 | P07366 |
| 6 | Autoinducer synthesis protein vanI | 4 | 36 | 26 | 11.9~12.7/8.6~8.7 | 22.1/8.76 | P74945 |
| 7 | rep helicase # | 5 | 36 | 19 | 51.8~53.8/5.1 | 54.6/8.31 | gi5738205 |
| 8 | Flagellin | 5 | 35 | 15 | 46.3~47.0/5.1 | 36.8/4.85 | P13713 |
| 9 | Hypothetical aldolase class II protein RP493 | 4 | 34 | 20 | 19.6~20.3/6.7~7.0 | 26.8/6.35 | Q9ZD54 |
| 10 | Bifunctional purine biosynthesis protein purH | 4 | 29 | 15 | 45.4~48.8/5.9~6.0 | 56.4/5.77 | Q8YJ53 |
| 11 | ATP-dependent protease hslV | 3 | 31 | 34 | 22.1~22.3/4.4~4.5 | 19.6/5.87 | Q9A239 |
| 12 | UvrABC system protein A | 11 | 80* | 17 | 84.6~85.8/5.4~5.5 | 105.5/6.66 | Q50968 |
| 13 | Putative glycosidase | 6 | 37 | 14 | 84.0~85.8/5.4 | 77.0/5.95 | Q9JN46 |
| 14 | 3-phenylpropionate dioxygenase alpha subunit | 7 | 60* | 28 | 41.3~44.3/6.4~6.5 | 51.1/5.27 | Q47139-00-00-00 |
| 15 | Hypothetical protein ytfI | 4 | 29 | 18 | 22.8~24.0/7.2~7.3 | 35.9/6.14 | P39317 |
| 16 | Hypothetical protein ydiF | 5 | 32 | 14 | 67.3~68.3/5.4 | 57.5/5.53 | P37766 |
| 17 | Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase | 6 | 39 | 16 | 62.7~65.8/5.7 | 65.6/5.57 | P08633 |
| 18 | Chaperone protein dnaK (Heat shock protein 70) | 12 | 114* | 26 | 86.5~91.6/4.6~4.8 | 70.0/4.95 | O32482 |
| 19 | 60 kDa chaperonin | 6 | 43 | 17 | 69.1~74.2/5.1~5.2 | 57.9/5.32 | P26878-00-00-00 |
| 20 | O-succinylbenzoate-CoA synthase | 6 | 51 | 27 | 60.7~66.3/5~5.2 | 35.2/4.78 | P29208-00-00-01 |
| 21 | Phosphomethylpyrimidine kinase | 4 | 36 | 28 | 48.9~54.3/5.3~5.4 | 27.4/5.65 | P56904-00-00-01 |
| 22 | D-hydantoinase | 6 | 44 | 20 | 45.3~49.6/5.0~5.2 | 53.5/6.09 | Q59699-00-00-00 |
| 23 | Hypothetical protein ykgG | 4 | 40 | 28 | 33.4~37.5/5.4 | 25.2/4.96 | P77433 |
| 24 | 3-phenylpropionate dioxygenase alpha subunit | 5 | 36 | 15 | 30.5~33.4/4.7~4.9 | 48.1/5.38 | Q47139-00-00-01 |
| 25 | UPF0234 protein yajQ | 3 | 30 | 20 | 29.1~32.4/4.3~4.5 | 19.0/5.99 | P77482 |
| 26 | DNA-directed RNA polymerase omega chain | 3 | 32 | 38 | 16.2~16.9/4.2~4.3 | 14.4/4.23 | Q9RH70-00-00-01 |
| 27 | Chemoreceptor protein A | 6 | 37 | 14 | 90.6~94.6/5.2~5.3 | 72.9/4.95 | P35841 |
| 28 | Probable geranyltranstransferase | 5 | 42 | 21 | 50.8~56.3/5.4~5.5 | 34.7/5.71 | P55539 |
| 29 | Histidine-binding protein precursor | 4 | 34 | 25 | 25.6~26.0/4.8~4.9 | 27.8/6.48 | Q46125-00-00-01 |
| 30 | Elongation factor Tu | 4 | 30 | 18 | 45.3~46.7/4.9~5.1 | 43.6/5.11 | O69303 |
| 31 | Guanylate kinase | 4 | 35 | 19 | 19.51~20.2/5.4 | 25.2/5.15 | Q8YFQ1 |
| 32 | A chain precursor (NAD(+)--diphthamide ADP-ribosylt | 4 | 39 | 21 | 19.41~19.62/5.2 | 29.3/6.10 | P01555-00-00-04 |
| 33 | Hypothetical protein# | 6 | 41 | 15 | 59.9~63.0/5.2~5.3 | 59.6/5.80 | gi15596276 |

| | | | | | | | |
|----|---|---|----|----|-------------------|------------|-----------------|
| 34 | Molybdenum cofactor biosynthesis protein A | 4 | 32 | 22 | 24.1~25.7/6.1~6.2 | 39.0/6.67 | Q8UERO |
| 35 | Coproporphyrinogen III oxidase, anaerobic 1 | 4 | 30 | 17 | 55.8~60.0/6.0~6.1 | 50.1/5.80 | P33770 |
| 36 | Lysyl-tRNA synthetase, heat inducible | 5 | 35 | 14 | 51.4~56.5/5.5~5.6 | 57.2/5.14 | P14825-00-00-01 |
| 37 | Poly-beta-hydroxybutyrate polymerase | 6 | 40 | 14 | 50.0~54.8/6.3~6.5 | 68.0/5.84 | P50176-00-00-01 |
| 38 | LLY_LEGPN | 4 | 33 | 11 | 47.2~51.9/5.7~5.8 | 38.9/5.85 | Q53407-00-00-00 |
| 39 | Adenylosuccinate lyase J99 | 5 | 35 | 14 | 45.8~50.8/5.8~5.9 | 49.8/6.26 | Q9ZKA2 |
| 40 | GrpE protein (HSP-70 cofactor) | 4 | 34 | 23 | 22.1~24.0/6.9~7.0 | 22.0/5.30 | P55970 |
| 41 | Ferric uptake regulation protein | 3 | 31 | 24 | 16.4~16.9/4.6~4.7 | 16.4/5.96 | O30330 |
| 42 | Nitrogenase iron protein | 3 | 26 | 21 | 13.5~14.8/4.1~4.2 | 31.9/5.04 | Q9ZIE4 |
| 43 | Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase | 4 | 41 | 32 | 13.4~14.7/6.0 | 16.5/5.62 | Q8UEK7 |
| 44 | tRNA pseudouridine synthase B | 4 | 35 | 24 | 13.2~14.5/6.3~6.4 | 33.6/5.33 | P58063 |
| 45 | Inositol-1-monophosphatase | 4 | 30 | 20 | 32.0~35.3/5.6~5.7 | 29.5/6.45 | Q9CNV8 |
| 46 | Type III restriction-modification system StyLTI enzyme res-Salmonella typhimurium | 6 | 32 | 11 | 80.6~88.8/5.3~5.4 | 112.8/6.02 | P40815-00-00-01 |
| 47 | Adenylate kinase -Pasteurella multocida | 4 | 36 | 17 | 37.2~41.3/5.7 | 23.4/5.69 | P57837 |
| 48 | GTP cyclohydrolase I-Xylella fastidiosa | 4 | 42 | 21 | 32.7~35.8/5.5 | 23.0/6.24 | Q9PC02 |
| 49 | Hypothetical protein# | 4 | 35 | 25 | 25.4~27.1/5.0~5.1 | 34.9/5.06 | gi23061353 |
| 50 | Single-strand binding protein | 4 | 33 | 16 | 26.0~26.7/4.8 | 18.9/5.46 | P37435 |
| 51 | Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex | 5 | 38 | 14 | 57.2~62.2/5.4~5.5 | 64.9/5.34 | P10802 |
| 52 | lcmX# | 5 | 45 | 14 | 55.7~60.8/4.9~5.0 | 50.7/6.32 | gi3602929 |
| 53 | Avirulence B protein | 6 | 54 | 25 | 51.1~54.9/5.8~5.9 | 36.0/5.76 | P13835 |
| 54 | Transcriptional regulator nadR | 4 | 31 | 14 | 50.6~55.4/5.0~5.1 | 47.3/5.42 | P27278 |
| 55 | Anticodon nuclease | 5 | 40 | 22 | 37.7~42.1/6.3~6.5 | 45.5/5.31 | P17223 |
| 56 | Glutamyl-tRNA synthetase | 5 | 34 | 15 | 63.7~66/5.4 | 54.8/5.75 | P43818 |
| 57 | Putative glycosidase | 6 | 35 | 13 | 64.3~66/5.3 | 77.0/5.95 | Q9JN46 |
| 58 | Coproporphyrinogen III oxidase | 5 | 50 | 35 | 27.5~29.6/6.4~6.5 | 34.8/5.59 | P43898 |
| 59 | Conserved hypothetical protein with localized similarity# | 5 | 45 | 25 | 26.7~28.5/8.5~8.6 | 33.7/10.27 | Gi16262873 |
| 60 | Glycyl-tRNA synthetase beta chain | 5 | 27 | 12 | 90.8~95.4/5.2~5.3 | 80.6/6.41 | P56454 |
| 61 | Type II restriction enzyme CfrBI | 5 | 42 | 21 | 38.8~43.1/5.1~5.2 | 40.4/5.68 | Q04852 |
| 62 | Flagellar basal-body rod protein flgC-Agrobacterium tumefaciens | 3 | 33 | 31 | 24.5~26.7/4.6~4.7 | 15.5/6.10 | Q44336-00-00-01 |
| 63 | L-aspartate oxidase 1 | 7 | 51 | 18 | 43.7~46.2/5.4 | 58.4/6.31 | Q8XWM7 |
| 64 | GTP cyclohydrolase I | 4 | 40 | 27 | 20.3~21.2/6.3~6.4 | 23.0/6.24 | Q9PC02 |
| 65 | Acetoacetyl-CoA reductase | 4 | 41 | 34 | 16.9~17.8/5.5 | 26.4/6.74 | P14697 |
| 66 | S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme | 4 | 37 | 29 | 15.3~16.8/5.9~6.1 | 30.3/5.16 | Q8ZBJ7 |
| 67 | 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase | 5 | 56 | 41 | 46.1~48.7/5.1 | 23.2/4.88 | P44866 |
| 68 | Elongation factor P | 4 | 40 | 36 | 23.6~24.8/5.8~5.9 | 21.2/6.75 | Q9ZDT7 |
| 69 | Hydrogenase expression/formation protein hupM | 4 | 39 | 26 | 24.1~24.8/5.2~5.3 | 22.8/4.70 | Q43954 |

| | | | | | | | |
|----|---|---|----|----|-------------------|-----------|-----------------|
| 70 | DnaK suppressor protein | 3 | 30 | 33 | 46.6~47.9/5.1~5.2 | 17.5/5.06 | P18274-00-00-00 |
| 71 | Hypothetical protein HI1654 | 5 | 38 | 17 | 51.3~52.3/5.4 | 31.4/5.57 | P45298 |
| 72 | Topoisomerase IV subunit B | 7 | 50 | 17 | 65.6~68.2/5.4 | 70.2/5.48 | P20083-00-01-00 |
| 73 | Glycerol kinase | 3 | 25 | 11 | 69.6~74.8/5.1~5.3 | 55.7/5.53 | O87924 |
| 74 | 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase 2 | 3 | 32 | 25 | 21.9/5.8 | 16.4/5.63 | Q9A8J4 |
| 75 | Sensor protein fixL | 7 | 48 | 18 | 47.8/5.14 | 55.0/5.68 | P10955 |
| 76 | Phosphoribosylformylglycinamide synthase II | 5 | 31 | 10 | 64.9~69.6/5.4~5.5 | 79.2/4.87 | Q92PH7 |
| 77 | Acetyl-CoA acetyltransferase | 5 | 40 | 22 | 28~31.7/5.2~5.3 | 40.7/7.01 | Gi27345337 |
| 78 | HydD protein HydD protein | 3 | 25 | 15 | 23.2~25.9/5.2~5.3 | 17.5/4.46 | P31876 |
| 79 | General secretion pathway protein G precursor | 2 | 24 | 30 | 19.0~20.3/4.4~4.6 | 15.4/5.08 | P15746 |
| 80 | Putative curli production protein csgC precursor | 3 | 36 | 51 | 17.1~18.1/6~6.1 | 12.0/6.54 | P52107 |
| 81 | global regulator # | 4 | 60 | 57 | 13.1~14.6/4.7~4.8 | 7.2/4.94 | gi11837852 |
| 82 | Cell division protein ftsZ | 6 | 50 | 24 | 51.1~56.0/5.1~5.2 | 41.5/4.90 | P72079 |
| 83 | Heme/hemopexin-binding protein precursor | 6 | 35 | 13 | 88.6/4.7 | 100/5.77 | P45355 |
| 84 | Glycerol kinase | 5 | 33 | 13 | 50.6~55.2/4.9 | 56.1/5.36 | P08859-00-01-00 |
| 85 | Dihydroxy-acid dehydratase | 5 | 33 | 15 | 63.5~70.0/5.3~5.4 | 65.0/5.63 | Q8UE43 |
| 86 | Glycyl-tRNA synthetase beta chain | 7 | 50 | 16 | 60.9~63.3/4.9~5.1 | 76.2/4.83 | Q87TP8 |
| 87 | Protein gid homolog | 5 | 38 | 20 | 56.5~61.0/5.3~5.4 | 51.3/6.09 | Q9A566 |
| 88 | Colicin 10 | 6 | 38 | 14 | 40.7~44.7/5.3~5.3 | 53.3/5.33 | Q47125 |
| 89 | D-lactate dehydrogenase | 5 | 34 | 14 | 55.5~58.2/6.3~6.5 | 64.4/6.19 | P06149 |
| 90 | Thiamine biosynthesis protein thiC | 5 | 34 | 13 | 66.6~69.5/5.1 | 70.8/5.63 | Q8FB77 |
| 91 | Chemoreceptor protein A | 5 | 30 | 11 | 49.0~52.2/6.0~6.2 | 72.9/4.95 | P35841 |
| 92 | Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit | 4 | 30 | 19 | 41.4~43.2/5.6~5.7 | 41.2/6.56 | P43850 |
| 93 | Spermidine synthase | 3 | 29 | 25 | 23.9~24.8/4.0 | 32.1/5.28 | Q8ZRS3 |
| 94 | peroxynitrite reductase # | 4 | 40 | 34 | 23.3~24.9/5.6~5.7 | 22.2/5.89 | gi19880968 |
| 95 | Hypothetical 16.7 kDa protein in pahZ1 5'region | 3 | 32 | 38 | 18.9~19.2/4.3~4.4 | 16.7/6.73 | P52089 |
| 96 | S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme | 4 | 39 | 24 | 15.9~16.0/5.5 | 30.3/5.16 | Q8ZBJ7 |
| 97 | Hypothetical protein RP269 | 3 | 31 | 24 | 30.9/3.8 | 17.5/6.29 | Q9ZDQ6 |
| 98 | MIP | 6 | 62 | 32 | 23.5~25.2/8.4~8.7 | 24.9/9.19 | P20380-00-01-00 |
| 99 | Hypothetical 15.0 kDa protein in nqo9-nqo10 intergenic region | 3 | 32 | 35 | 16.1~17.2/5.3 | 15.0/4.95 | P29912 |

1: Match:判斷準則至少 4 個以上的 peptide 配對

2: Score: 以 MOWES 為主要判斷依據, $p < 0.05$ 以*註解, 表示所鑑定的蛋白質有統計上顯著意義

3: Coverage:蛋白質全長序列覆蓋範圍百分比

4: Exp:膠片經軟體比對後之實驗值

5: Theo:資料庫中蛋白質理論值

#: 比對資料庫為 NCBI

表四、比較營養環境停滯生長期前期及其他生長階段蛋白質之抑制表現情形

| Protein ID | Ratio | | | | |
|--|---------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|
| | 72h/48h | N ¹ 1d/48h | N12d/48h | V ² 4d/48h | V35d/48h |
| Hypothetical aldolase class II protein RP493 | 0.3 | ND | ND | ND | ND |
| ATP-dependent protease hslV | ND | ND | ND | ND | ND |
| UvrABC system protein A | 0.2 | ND | ND | ND | |
| Putative glycosidase | 0.1 | ND | ND | ND | |
| D-hydantoinase | 0.2 | | 0.1 | 0.03 | 0.3 |
| UPF0234 protein yajQ | 0.3 | 0.3 | 0.1 | 0.1 | 0.2 |
| Spermidine synthase | 0.3 | | | | |
| (3R)-hydroxymyristoyl | | ND | ND | ND | |
| Chemotaxis protein cheZ | | ND | ND | ND | |
| Autoinducer synthesis protein vanI | | ND | ND | ND | |
| Bifunctional purine biosynthesis protein purH | | ND | | | |
| Hypothetical protein ytfI | | ND | ND | 0.03 | |
| Hypothetical protein ydiF | | ND | ND | 0.1 | |
| 3-phenylpropionate dioxygenase alpha subunit | | ND | | 0.2 | 0.1 |
| Chemoreceptor protein A | | ND | | ND | 0.3 |
| Histidine-binding protein precursor | | ND | 0.1 | ND | ND |
| Elongation factor Tu | | ND | ND | ND | |
| Guanylate kinase | | ND | ND | ND | |
| A chain precursor (NAD(+)-diphthamide | | ND | ND | ND | |
| ADP-ribosylt | | | | | |
| Hypothetical protein# | | 0.1 | ND | 0.3 | |
| Molybdenum cofactor biosynthesis protein A | | 0.1 | 0.1 | ND | |
| Adenylosuccinate lyase | | 0.3 | | | |
| GrpE protein (HSP-70 cofactor) | | ND | ND | | 0.3 |
| Single-strand binding protein | | 0.2 | 0.1 | ND | |
| DnaK suppressor protein | | ND | | ND | |
| Phosphoribosylformylglycinamide synthase II | | ND | | | |
| Glycyl-tRNA synthetase beta chain | | ND | ND | ND | |
| 30S ribosomal protein S8 | | | ND | ND | |
| Probable geranyltranstransferase | | | 0.1 | 0.1 | 0.3 |
| Type III restriction-modification system StyLTI | | | 0.1 | 0.1 | |
| enzyme res | | | | | |
| Protein gid homolog | | | ND | ND | |
| Catalase | | | | 0.3 | |
| Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase | | | | 0.3 | |
| 60 kDa chaperonin | | | | 0.3 | |
| O-succinylbenzoate-CoA synthase | | | | ND | |
| GTP cyclohydrolase I | | | | ND | ND |
| Elongation factor P | | | | ND | ND |
| Chaperone protein dnaK (Heat shock protein 70) | | | | | 0.2 |
| Hypothetical protein ykgG | | | | | 0.2 |
| Coproporphyrinogen III oxidase, anaerobic 1 | | | | | 0.3 |
| LLY_LEGPN | | | | | ND |
| Ferric uptake regulation protein | | | | | 0.2 |
| Nitrogenase iron protein | | | | | 0.3 |
| Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase | | | | | 0.3 |
| tRNA pseudouridine synthase B | | | | | ND |
| Inositol-1-monophosphatase | | | | | 0.3 |
| Dihydroipoamide acetyltransferase component of | | | | | 0.1 |
| pyruvate dehydrogenase complex | | | | | |
| Glutamine synthetase III | | | | | 0.1 |
| Avirulence B protein | | | | | 0.2 |
| Anticodon nuclease | | | | | 0.2 |
| Type II restriction enzyme CfrBI | | | | | ND |

1:N 表示無營養環境下培養

2:V 表示 VBNC(Viable but nonculturable), 無培養能力階段

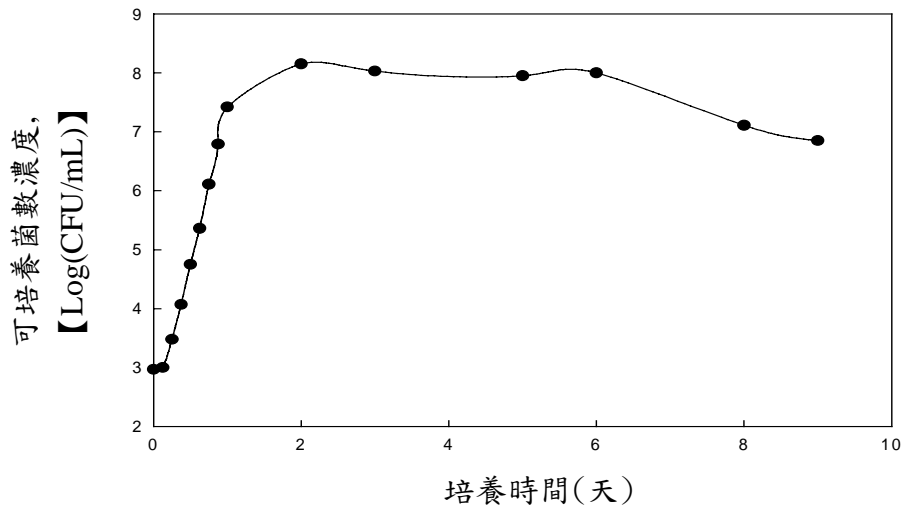
表五、比較營養環境停滯生長期前期及其他生長階段蛋白質之增加表現情形

| Protein ID | Ratio | | | | |
|---|---------|----------------------|----------|-----------------------|----------|
| | 72h/48h | N ¹ d/48h | N12d/48h | V ² 4d/48h | V35d/48h |
| Flagellin | * | | | 3.1 | |
| Adenylosuccinate lyase | 5.5 | | | | |
| GrpE protein (HSP-70 cofactor) | 8.0 | | | | |
| Glutamyl-tRNA synthetase | * | * | | * | |
| Putative glycosidase | * | * | | | |
| Hypothetical protein HI1654 | 4.3 | | | 3.6 | |
| Dihydroxy-acid dehydratase | 8.6 | | | 11.4 | 12.1 |
| Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit | 4.4 | | | 3.1 | 7.4 |
| Flagellar basal-body rod protein flgC | | * | | | * |
| Colicin 10 | | * | | | * |
| Hypothetical 16.7 kDa protein in pahZ1 5' region | | | * | | * |
| S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme | | | * | | * |
| Sensor protein fixL | | | | * | |
| Phosphoribosylformylglycinamide synthase II | | | | 8.6 | |
| Heme/hemopexin-binding protein precursor -Haemophilus influenzae | | | | * | |
| D-lactate dehydrogenase | | | | * | * |
| Glycyl-tRNA synthetase beta chain | | | | | 4.4 |
| Glycerol kinase | | | | | * |
| Chemoreceptor protein A | | | | | 5.3 |
| Hypothetical protein RP269 | | | | | * |
| Hypothetical 15.0 kDa protein in nqo9-nqo10 intergenic region | | | | | 3.6 |

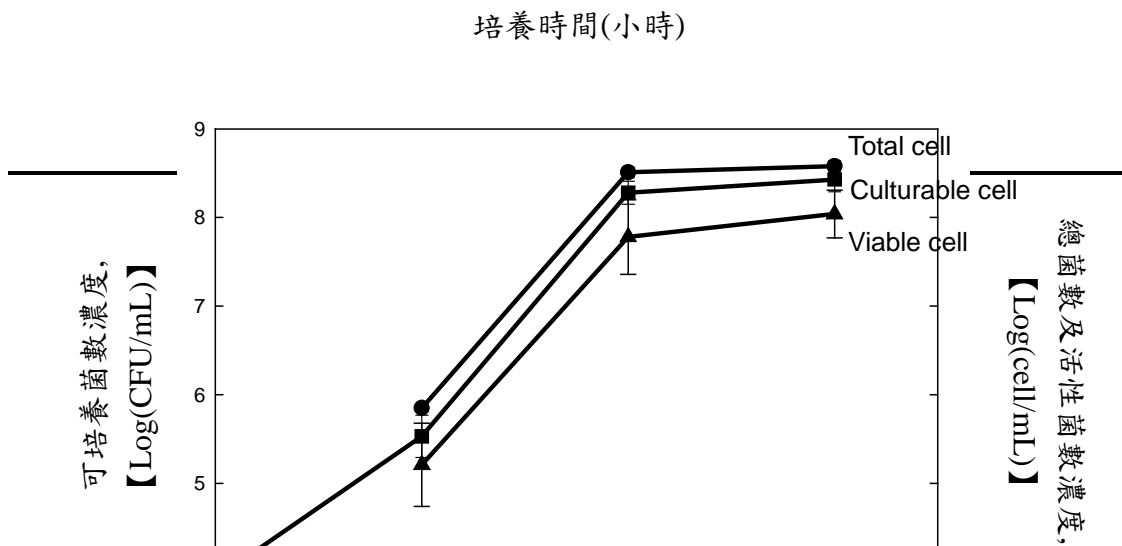
1:N 表示無營養環境下培養

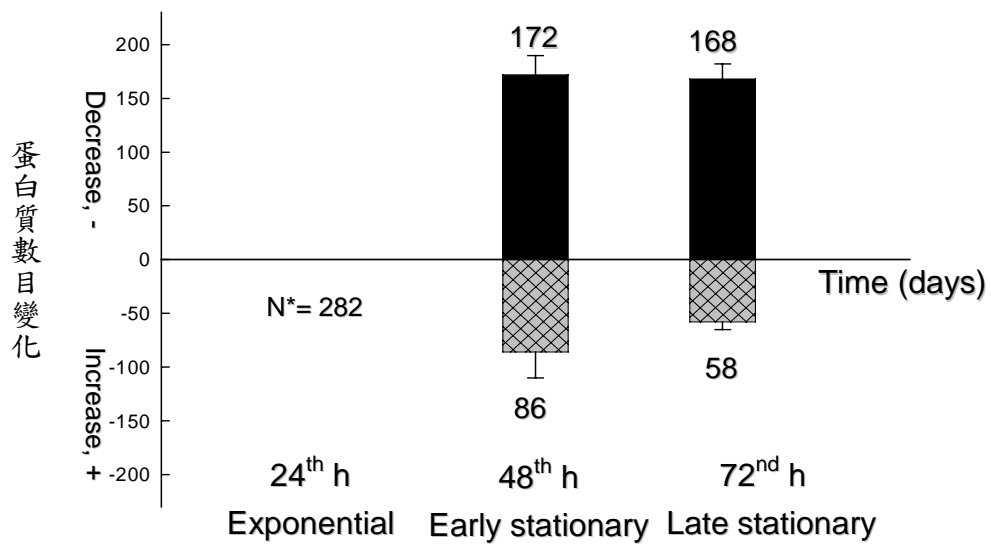
2:V 表示 VBNC(Viable but nonculturable)，無培養能力階段

*營養環境前穩定期(第 48 小時)尚未表現，轉至無營養環境才表現之蛋白質



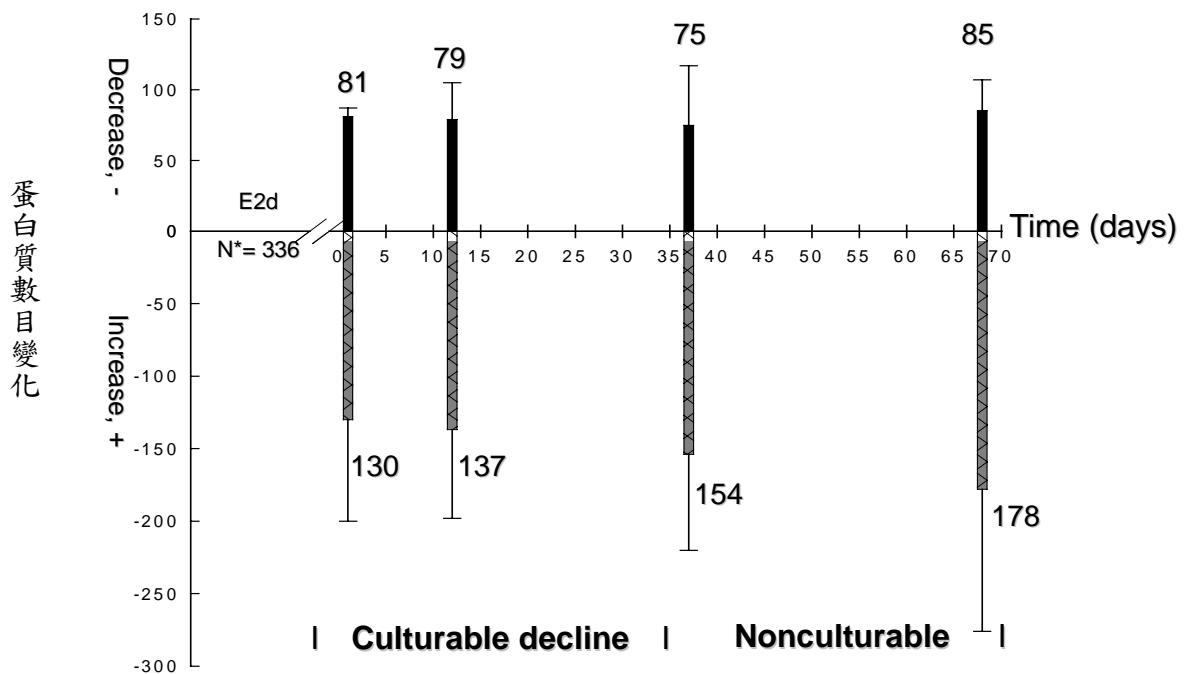
圖一、培養時間與可培養菌數濃度之關係





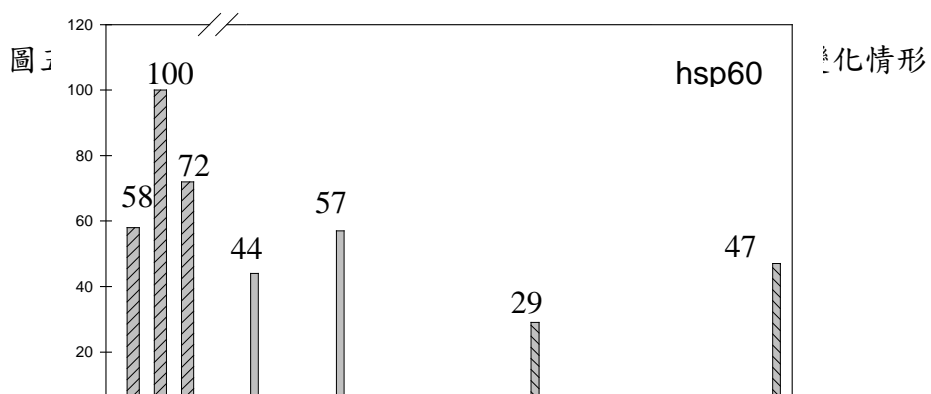
* n: mean number of protein expressed, served as the reference for comparison

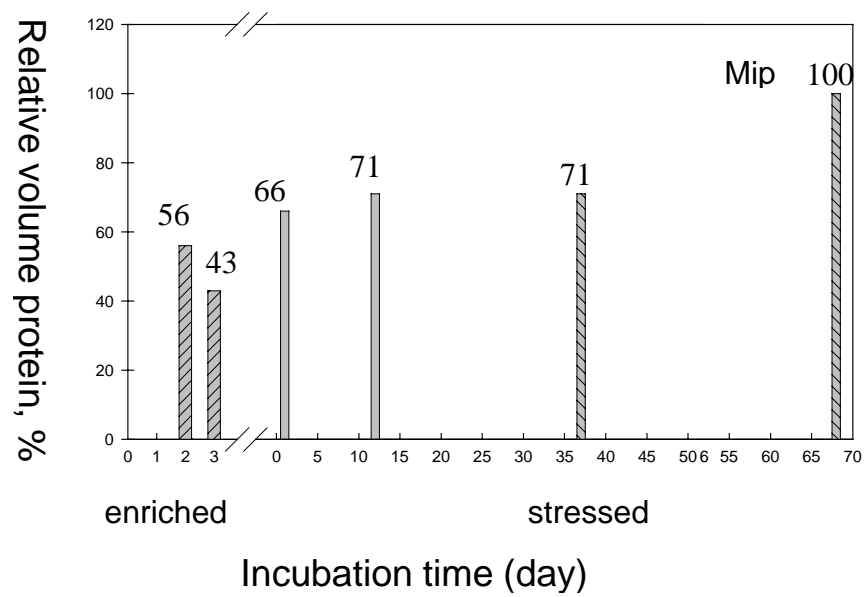
圖三、營養環境蛋白質表現數目增減情形



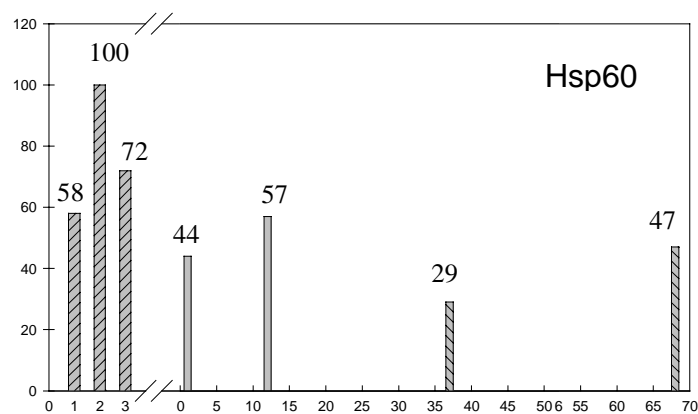
* n: mean number of protein expressed, served as the reference for comparison

圖四、無營養環境蛋白質表現數目增減情形



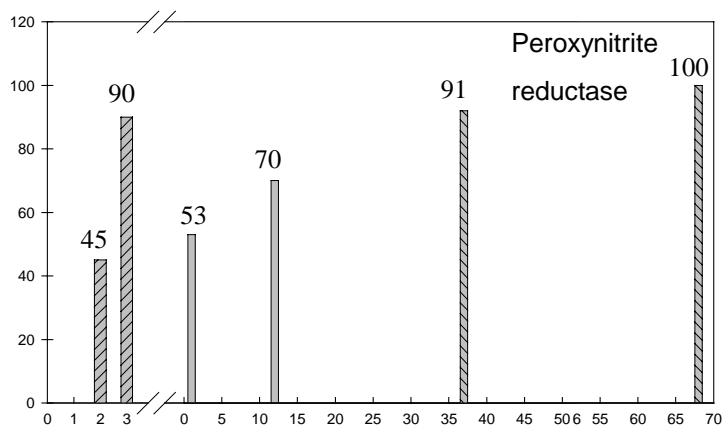


圖七、與存



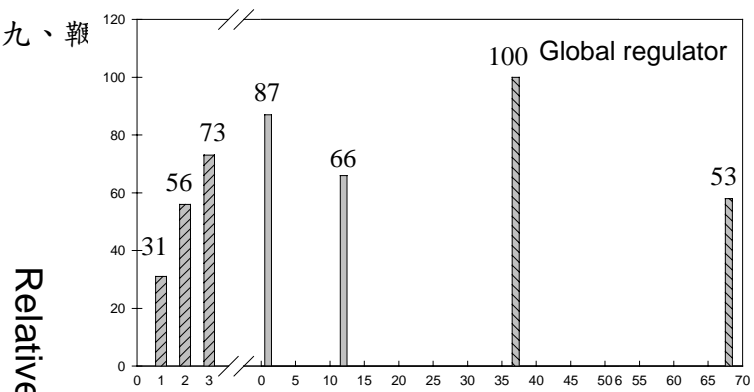
變情形(I)

圖八、與

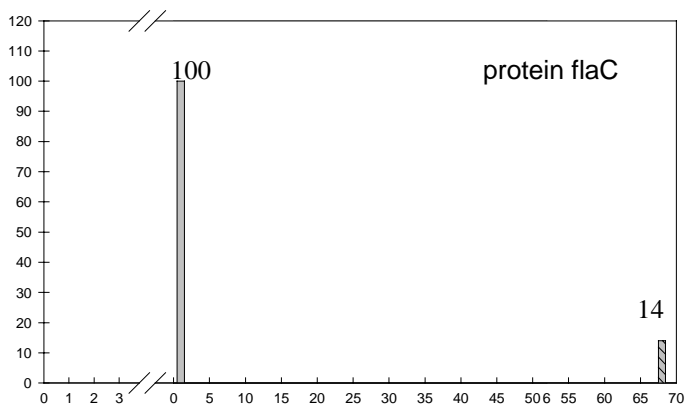


續變化情形(II)

圖九、鞭



Relative volume protein, %



enriched

stressed

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及活性的變化，建立蛋白質體分析條件，並完成 99 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。