

出國報告（出國類別：研習）

建構生物防護及 SARS 等新興傳染病
防治網計畫---呼吸道細菌百日咳檢
驗技術的研習

服務機關：衛生署疾病管制局

姓名職稱：姚淑滿 技士

派赴國家：日本

出國期間：94 年 10 月 1 日

至 94 年 10 月 31 日

報告日期：94 年 11 月 31 日

摘要：

百日咳是一個嚴重威脅嬰幼兒健康的重要呼吸道傳染疾病，台灣每 3 年左右，會有流行的發生。這幾十年間疫苗的有效性評估一直受到世界各國尤其是歐美疫苗普及先進國家的關注，台灣臨床菌株具有那些特性也是我們所關切的，台灣的抗原變異與其他國家是否相同，這個考量非常重要，抗原變異的研究是我們未來需要加強及投注人力去研究，這部分的資料將可以提供台灣決定適合本土疫苗政策的參考。

除了抗原變異的研究分析之外，百日咳菌是一個非常不容易培養的細菌，在診斷上如果要完全依賴細菌培養為確定診斷的依據，其靈敏度不夠對於統計參考上可能會有很大的誤差。此次研習目標希望可以研習新的檢驗技術進而增進本實驗的診斷能力。

目次

內容	頁碼
摘要	2
目次	3
本文	4-33
附錄	

本文

目的：

接受行政院衛生署疾病管制局的 94 年度建構生物防護及 SARS 等新興傳染病防治網計畫之第 11 編號呼吸道細菌性檢驗技術的實習--赴日本國立感染症研究所，學習呼吸道細菌的最新檢驗研究技術-增進百日咳菌的檢驗技術及增進菌株變異特性調查的分析技術。百日咳是一個嚴重威脅嬰幼兒健康的重要呼吸道傳染疾病，這個疾病在過去幾十年來已經廣泛使用疫苗預防，但仍定期會有一些地方爆發流行，全細胞性疫苗在 1940 年代開始使用，使用後因百日咳引起的發生率和死亡率戲劇化的大量減少，但到了 1979 年一些國家如瑞典發現全細胞疫苗的防疫的效率沒有很好而且有一些副作用的發生因而停用，這時也開始了許多非細胞性百日咳疫苗的發展，台灣每 3 年左右，也會有流行的發生。經過這幾年來一些實驗數據的累積，台灣如同歐美國家一樣，百日咳菌株存在有抗原的變異，目前在台灣流行的菌株和一些歐美國家在重要抗原基因表現上一致，不過卻與鄰近的亞洲國家日本有很大的差異，百日咳抗原變異在亞洲國家除了日本曾於 2004 年 *Journal of Clinical Microbiology* 發表其日本菌株抗原特性外，台灣資料我們也已經整理投稿被 *Journal of Clinical Microbiology* 接受了刊登於 *Antigenic Divergence of Bordetella pertussis Isolates in Taiwan. J Clin Microbiol* 2005 Nov;43(11):5457-61，除了這 2 個資料外亞洲國家資料是缺乏不足的，這幾十年間疫苗的有效性評估一直受到世界各國尤其是歐美疫苗普及先進國家的關注，台灣臨床菌株具有那些特性也是我們所關切的，台灣的抗原變異與其他國家是否相同，這個考量非常重要，抗原變異的研究是我們未來需要加強及投注人力去研究，這部分的資料將可以提供台灣決定適合本土疫苗政策的參考。

除了抗原變異的研究分析之外，百日咳菌是一個非常不容易培養的細菌，在診斷上如果要完全依賴細菌培養為確定診斷的依據，其靈敏度不夠對於統計參

考上可能會有很大的誤差，此次研習目標希望可以研習新的檢驗技術進而增進本實驗的診斷能力。

聯繫過程：

感謝疾病管制局呼吸道細菌實驗室負責人周振英博士幫忙，於今年八月初開始與日方聯繫，經由日本國立感染症研究所（National Institute of Infection Diseases）的國際協力室的協力係長松井小姐幫忙下，得到聯繫窗口，我之後到日本研習的單位是日本國立感染症研究所村山廳舍細菌第二部（細菌病原體及感染控制）第五室（百日咳及內毒素控制），室長堀內善信醫學博士（Dr. Horiuchi）指派其主任研究官蒲地一成博士（Dr. Kamachi）為我的指導老師。

取得聯繫窗口之後，與指導老師開始用電子郵件進行研習內容的安排，經過多次的郵件聯繫及給予日前整理好的論文（獲 Journal of Clinical Microbiology 接受）資料，老師知道我們目前已經完成的部分之後，發現由我們現有的資料中，PFGE type IIIa PFGE type IIIb 為近年台灣流行的型別，在抗原變異上依據目前最多研究討論具有抗原變異的兩個基因 *ptxSI* 和 *prn*，在這兩群菌株都具有相同的基因型別，但流行趨勢卻不同，PFGE type IIIa 這群菌株是逐年下降而 PFGE type IIIb 這群菌株是逐年上升，這兩群菌株間有何差異為何有這樣的流行趨勢是我們所關心的，所以，Dr. Kamachi 建議應該朝向蛋白質表現的分析來探討菌株抗原的變異，以前流行菌株和現今流行菌株間蛋白質表現有何差異，這樣將可能可以幫我們了解何種基因在百日咳菌株上扮演重要的毒力因子。

本次另一個重點，是運用先進技術提升檢驗靈敏度，Dr. Kamachi 在日本從事百日咳研究十幾年，有非常豐富的研究經驗及成果，尤其專長於分子生物技術，這次的實驗課程安排中除了蛋白質體研究外，也安排了分子診斷實驗課程。此次研習的重要學習項目：

- 一、 快速診斷百日咳菌的方法：LAMP 新的分子診斷方法。
- 二、 運用蛋白質體學技術探討百日咳菌株的特性：蛋白萃取方法、定量方法、等電點聚焦電泳 IEF、2D-PAGE 分析、蛋白質鑑定運用質譜分析 LC-MS、及免疫西方墨點技術。

實驗過程與結果：

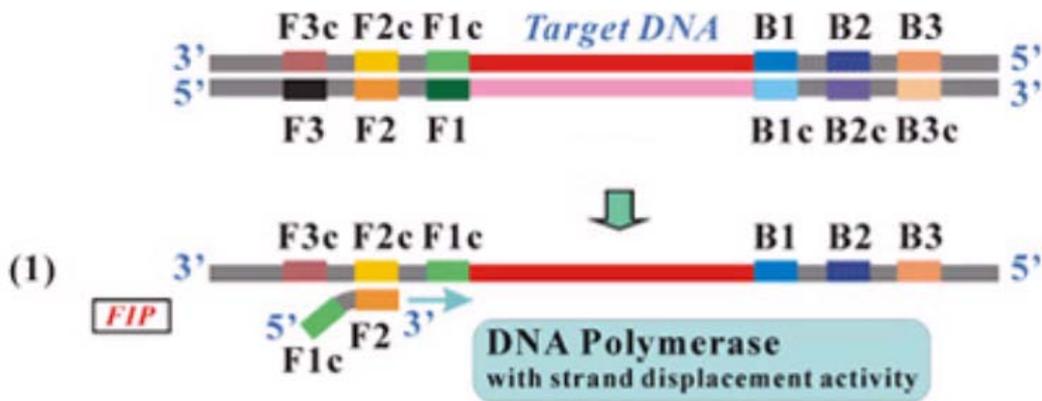
壹、LAMP 介紹：

這個技術大概開始在 2000 年開始發展，而今日已經廣泛的應用於各種領域除了醫學診斷應用外、也應用於植物病蟲害的偵測、動物學方面的應用例如快速偵測胚胎的性別。這個方法的優點是它不需要像傳統 PCR 聚合酶鍊鎖反應有核苷酸雙股打開、黏合、延展三步驟，它利用複雜的引子設計後及特殊聚合酶作用下利用的模板是單股的，所以可以在固定的溫度下，一直進行聚合作用放大訊息，是一個快速且靈敏度與精確度都很好的方法。

目前這個方法成熟應用於各個領域：短短 5 年間就有 51 篇論文的發表，應用醫學診斷上包括：病毒學、細菌學、寄生蟲學的診斷。

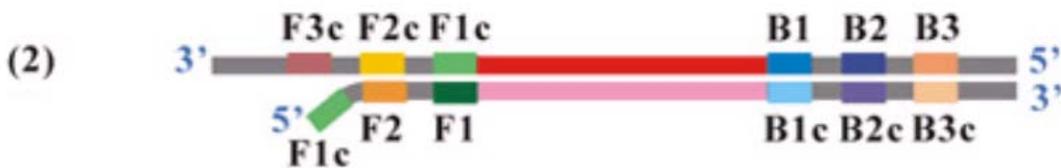
LAMP 基本方法原理敘述：

下面圖示：紅色部分是想要偵測的目標基因片段，LAMP 可以不像一般 PCR 一樣，LAMP 不需要加熱 denaturation 形成單股，因為 LAMP 的 primer 設計組合最後形成的啞鈴結構可以讓模板無法互補形成雙股，這是這方法很大的創意，因而可以節省時間並且不需複雜溫控的機器只需一個可設定溫度的加熱器。這方法同時配合環狀結構的產生可以將目標基因片段，一直的串聯起來，最後的產物是大大小小的片段，這片段中包含有不同數目的目標基因，所以若將產物依傳統 PCR 跑膠鑑定，它不會是一條固定大小的片段，而是一個模糊的條帶。LAMP 這方法最後再利用螢光探針偵測目標基因，所以相對傳統 PCR 是一個需有複雜設計的引子組合，但操作及儀器設備卻非常簡單，並且快速及靈敏、特異的方法。



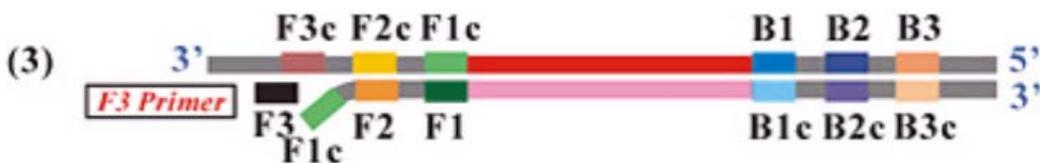
第一步驟

紅色部分是要偵測的目標基因片段，雙股 DNA 在 65°C 下動態平衡，LAMP primer 中的一條，FIP primer 前頭加了一段序列 F1C 這段序列可以和 F1 部分互補，如此設計可以形成的啞鈴結構讓模板無法互補形成雙股。



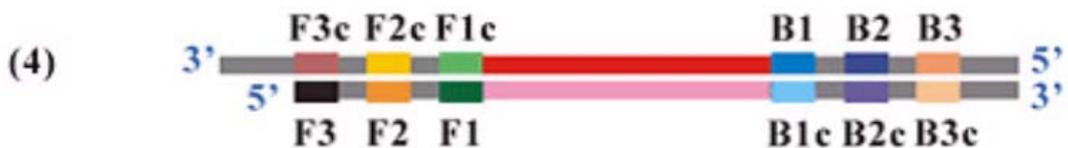
第二步驟

經由 DNA polymerase 的 strand 置換的活性活化，從 FIP 的 F2 部位的 3' 端合成完整的模板。



第三步驟

再利用 F3 的 primer 粘合到 F3c 的位置在 FIP 的外面，開始合成取代 FIP-linked。



第四步驟：

從 F3 部位的 3' 端，開始合成取代 FIP-linked，F3 雙股形成後將 FIP-linked

推下來。



第五步驟：

FIP-linked 這一股完全被 F3 primer 釋放出來形成單股的結構，因其原先設計的 FIC primer 含有 F1c 這部分會和要偵測的基因中的 F1 部位互相互補，故在 5' 端會形成 stem-loop 的結構，因而不會再形成雙股 DNA 的結構。



第六步驟：

利用單股的 FIP-linked 當模板，BIP primer 粘合後由其 3' 端開始合成取代，再利用 B3 的 primer 粘合到 B3c 的位置在 BIP 的外面，開始合成取代 BIP-linked。



第七步驟：

再利用 B3 primer 從外面將他推下來。

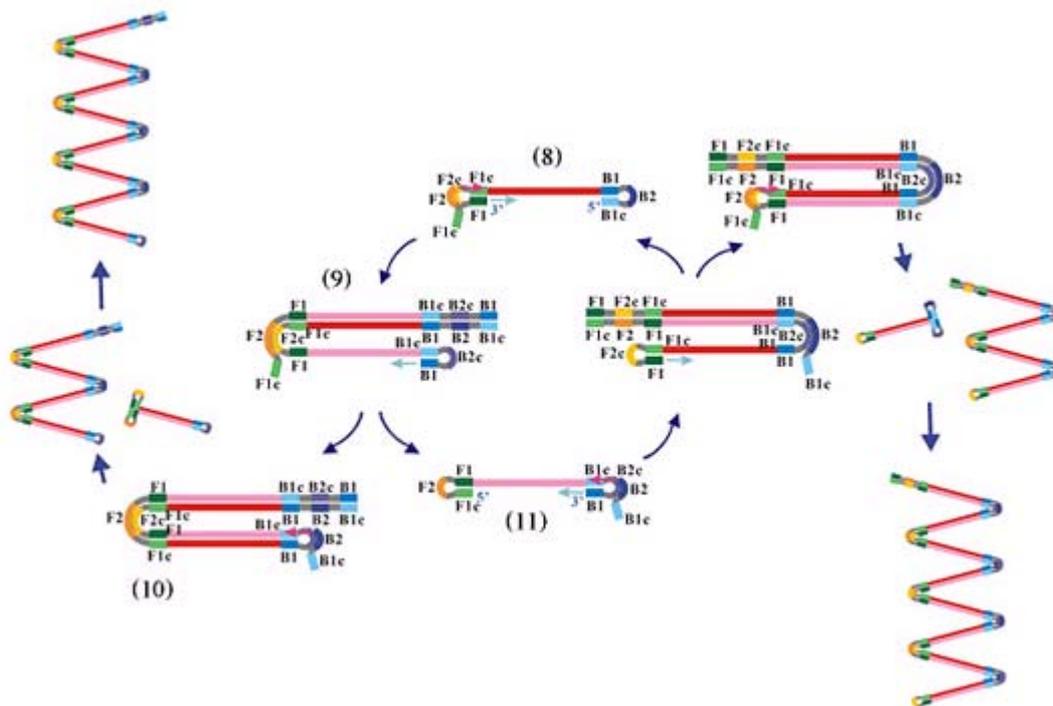


第八步驟：

經上面的步驟後形成 2 端具有 stem-loop 的結構，像啞鈴結構，形成 LAMP 循環的開始結構。

第八到第 11 步驟：循環放大步驟

步驟 8 的 F1-F1c 和 B1-B1c 互相配對的啞鈴結構，在 FIP primer 黏合後從 F2 的 3' 端往後延伸形成步驟 9 的結構，步驟 9 的結構，在 BIP primer 黏合後從 B2 的 3' 端往後延伸後會形成步驟 11 如同步驟 8 的 F1-F1c 和 B1-B1c 互相配對的啞鈴結構及步驟 10 的已經將把想要偵測的目標基因片段串聯起來的結構，如此一直循環就會一直產生 F1-F1c 和 B1-B1c 互相配對的啞鈴結構及大小小包含不同數目的偵測的目標基因片段之串聯結構。



下面網站是一間日本科技公司的網站，對於 LAMP 有詳細的介紹及販售相關試劑。

<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

以下為我實際在日本國立感染症研究所，實際操作的流程：

10/6 LAMP 實驗結果

1、檢體編號及內容：

- 1 B. pertussis Tohama
- 2 B. parapertusis ATCC15237
- 3 B. bronchiseptica R05

- 4 B. hinzii ATCC51730
- 5 B. pertussis Tohama
- 6 B. holmessi ATCC51541
- 7 Positive control
- 8 Negative control

2、步驟：

a、 配製混合反應溶液如下 (25 μ l/1 tube)：

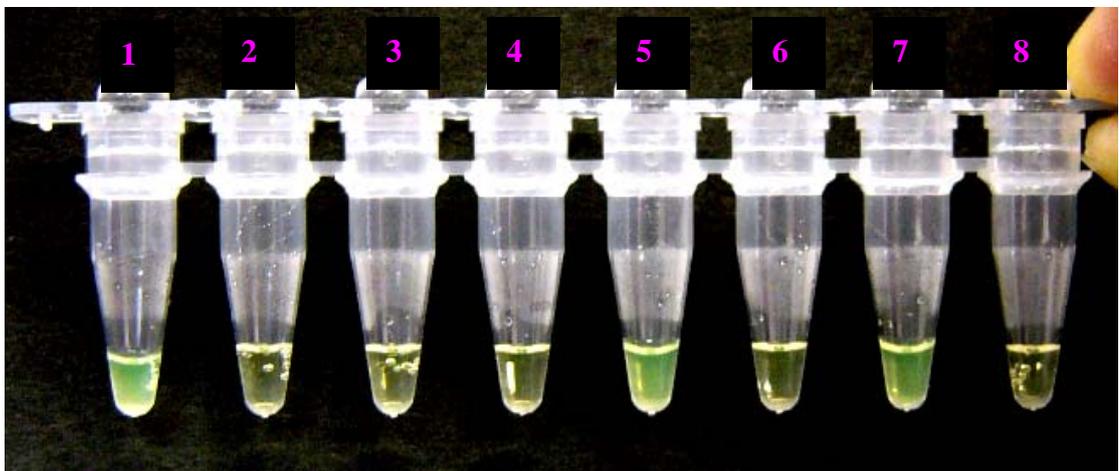
2X reaction mixture	12.5 μ l
mixed primer (6 條 primers)	6 μ l
Bst DNA polymerase	1 μ l
FD (Fluorescent detection reagent)	1 μ l
DW	2.5 μ l
DNA, 陽性對照 DNA 量 (50 pg/ μ l)	2 μ l

Bst DNA polymerase：具有 strand displacement activity

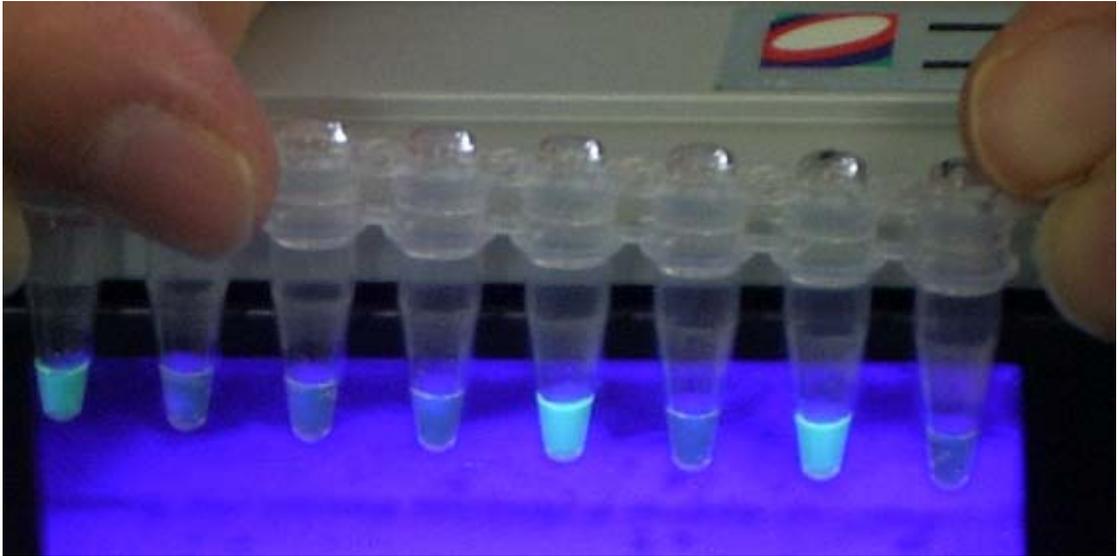
b、 LAMP 增幅反應：

65°C, 40 mins \longrightarrow 80°C, 3 mins, 然後肉眼判讀結果。

3、結果：



圖一、LAMP 實驗結果，在一般光線下直接觀察顏色變化，1、5、7 呈現綠色為陽性反應，其他沒有顏色變化仍為黃色為陰性反應。



圖二、一般結果觀察只要在一般光線下即可見到顏色的不同，但也可以在紫光燈下觀察，LAMP 為陽性反應時，在紫光燈下可見到螢光，LAMP 為陰性反應時，就沒有螢光，是一個非常容易判讀的方法。

10/7 使用 LAMP 法 確認台灣送來的菌株（培養基上的菌落很微細，肉眼幾乎無法辨識），這些菌株是由台灣帶來準備進行蛋白質體分析，分析菌株的特性，這些菌株經由冷凍乾燥後送到國立感染症研究所，或許經由冷凍乾燥後，菌株生長速度緩慢，我想確認菌株的正確性，並且可以感受 LAMP 快速方便操作的好處。

1、DNA 製備：

- a、 微量離心管加入 500 μ l distill water。
- b、 用 loop 在培養基上，來回刮取幾次，放入蒸餾水中混合。
- c、 利用煮沸法，boil 5-10 分鐘。
- d、 離心，10000 rpm，10 分鐘，取上清液。
- e、 反應進行：

2、檢體編號：

1	III a 3778
2	III a 3783
3	III b 3764
4	III b 9302016
5	Positive control
6	Negative control

3、配製混合反應溶液如下 (25 μ l/1 tube):

2X reaction mixture	12.5 μ l
mixed primer	6 μ l
Bst DNA polymerase	1 μ l
FD (Fluorescent detection reagent)	1 μ l
DW	2.5 μ l
DNA, 陽性對照 DNA 量 (50 pg/ μ l)	2 μ l

4、LAMP 增幅反應：

65°C, 40 mins \rightarrow 80°C, 3 mins, 然後肉眼判讀結果。

5、結果判讀：



圖三：1-4 管為台灣臨床菌株 LAMP 為陽性反應，5 管陽性對照，6 管為陰

性對照。本圖在照相時使用閃光燈，照相效果比較差，不過實際上肉眼觀察就非常清楚。

LAMP 實驗結論與心得：

1. 這是一個操作非常簡單的方法，並且等溫環境下作用，可以使用一般的加熱器，不需要使用到較精密昂貴的機器。
2. 反應時間很短，一般只要 40-60 分鐘，即可以使用肉眼直接觀察，依據顏色變化判讀，或於紫外燈下觀察。
3. 目前 LAMP 應用於百日咳診斷未有論文發表，但日方已經成功的將 LAMP 方法應用於百日咳診斷上，並且已完成方法的靈敏度與精確度的比較，正準備論文發表中，雖然目前暫時無法取得 primer 的序列，當 Dr Kamachi 論文發表之後，可以將此資料提供給我，我們的實驗室將會建立此快速的方法，有助於台灣在百日咳檢驗上提供更好的檢驗品質。

貳、蛋白質分析：

背景：收集台灣 1998-2004 年的分離菌株經 PFGE 及 *ptxS1*、*prn* 基因型別分析的分子流行病學調查中，發現 PFGE type III a，PFGE type III b 這兩大群菌株在 *ptxS1*、*prn* 基因型別鑑定上都同屬於 nonvaccine type：*ptxS1A*、*prn2*，而 PFGE type III a 菌株在 1998 為主要流行菌株之後有逐年減少的趨勢，PFGE type III b 自 1999 年出現之後由逐年增加的趨勢，這兩群菌株的流行有明顯的差異，但以目前被重視的兩個特殊抗原基因 *ptxS1*、*prn*，抗原變異位置分析沒有不同，這兩群菌株都同屬於 *ptxS1A*、*prn2*。但這兩群菌株其流行趨勢不同，其差異究竟為何？希望藉由蛋白質表現的不同，探討這兩群菌株的差異。

一、 蛋白質萃取：

1. 細菌培養：將菌液接種於 CSM 培養基上，置於保濕的鐵盒中，將以接種好的培養基放入鐵盒中後，再放入一張用水浸濕的紙，36°C (35°C - 37°C) 培養 2 天，次培養一天後萃取蛋白質。

2. 台灣分離菌株生長狀況：PFGE type III a (ID1：3778、ID2：3783)，PFGE type III b (ID3：3764、ID4：930016) 經冷凍乾燥後寄到日本之菌株，10/4 以 Saline 溶液復溶後接種於 CSM 培養基上，經 36 °C (35°C -37°C) 培養 3 天後，10/7 肉眼檢視下，菌落很小幾乎無法辨識，經 LAMP 確認爲陽性反應，增加培養天數至 10/10 進行次培養。準備 10/11 進行蛋白質萃取，10/11 檢視生長狀況發現 PFGE type III a 生長狀況良好，但 PFGE type III b 生長狀況不佳，ID4：930016 這個菌株生長狀況更差，10/13 因爲 PFGE type III b 在 CSM 培養基上生長狀況不佳，比較其在 Bordet-Gengou agar (B-G plate)，生長狀況。
3. 萃取蛋白質：利用 SDS 煮沸萃取蛋白質方法
 - i. 使用的 buffer 成分組合如下：
buffer 1：casamino acid solution
1% casamino acid，0.6% NaCl，pH=7.1。
buffer 2：SDS solution 稱 extract buffer。
10mM Tris pH=7.01，1% SDS，5% 2-Me。
 - ii. 將培養基上的菌落懸浮於 10 ml 的 buffer 1 中，置於冰上，另外，取 0.5 ml 的懸浮液，利用 boiling 法準備進行基因分析用。
 - iii. 離心轉速 10000 rpm，在 4°C 下，離心 10 分鐘收取 pellets。轉子直徑大約 10 cm。
 - iv. 使用 0.5 ml 的 buffer 2 重新懸浮 pellets，buffer 2 含有 SDS，此步驟之後，檢體被蛋白酵素分解威脅減輕，不需很嚴謹的將檢體置於冰上。
 - v. 超音波震碎 DNA，減少干擾蛋白質分析，視 pellets 的量，大約 1-2 分鐘，將超音波處理過的檢體轉換到微量離心小管。
 - vi. 利用煮沸法和 SDS 作用將蛋白質萃取出來，煮沸 100°C、5 分鐘(3-5 分鐘)。
 - vii. 離心轉速 15000 rpm 在 4°C 下，離心 10 分鐘，取上清液，注意不要取到下層絮狀物。
 - viii. 定量蛋白質量，後儲存於 -85°C。

4. 基因定序用 DNA 製備：

- i. 離心轉速 15000 rpm 下離心 5 分鐘。
- ii. 取 pellet，以 100 μ l 的 DW 復溶。
- iii. boiling 煮沸法 100°C，10 分鐘。
- iv. 離心轉速 15000 rpm 下，離心 10 分鐘。
- v. 取上清液，儲存於 -20°C 以下，我的檢體放在 -80°C。

二、蛋白質定量：利用改良式的 Lowry 方法，此方法的優點是當檢體含有 SDS 時，一般皆會影響蛋白質的定量，這個方法可以先將蛋白質沉澱後，復溶再檢測蛋白質，可以檢測含有 SDS 的檢體。

1. 標準品的製備：

- i. 藥品：BSA FrV pH 7.0 生化學工業株式會社（日本），BSA 濃度 0.5 mg/ml。
- ii. 配製標準品 10 ml，約取 5 mg 溶於 10 ml 的蒸餾水中。
- iii. 利用 A_{280} 吸光值來決定正確的濃度，BSA 濃度 0.5 mg/ml 即 $A_{280}=0.33$ （直徑 1cm 的 microcuvette BSA 濃度 10 mg/ml 即 $A_{280}=6.61$ ）。
注意：microcuvette 要非常乾淨，減少干擾。

2. 需準備的溶液：

- i. 0.15% (w/v) sodium deoxycholate。
- ii. 72% (w/v) trichloroacetic acid (TCA)，小心為強酸溶液。
- iii. Copper tartrate/carbonate (CTC) solution
 - a、Stock solution：配製 50ml 溶液，將 50ml 的 20% sodium carbonate 置於強力攪拌狀況下，慢慢加入以下兩種藥物 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 potassium tartrate，最終濃度皆為 0.2% (w/v)。
 - b、Working solution：以下 4 種溶液等量混合：Stock CTC solution、0.8M NaOH solution、10% SDS(w/v) solution、distill water，例如：需配置體積 8ml 的溶液時，即是各取 2ml 混合後使用，配製後可以使用一天。
- iv. 20% (v/v) Folin-Ciocalteu reagent（藥品購自 Nacalai Tesque Inc KYOTO JAPAN，蛋白質測定用 Phenol reagent solution），藥品配製：例如配製 3 ml 溶液（0.6 ml 加 2.4 ml 的蒸餾水），

配製後可以使用一天。

3. 步驟：

i. 準備標準品及檢體：

a、標準品：標準品濃度 BSA 0.5 mg/ml 即 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

濃度	標準品體積 μl	DW 體積 μl	總體積
5 μg	10	190	200
10 μg	20	180	200
15 μg	30	170	200
20 μg	40	160	200

b、檢體：

檢體編號	檢體量 μl	DW 體積 μl	總體積
ID1 (10/11)	2	198	200
ID2 (10/11)	2	198	200
ID3 (10/11)	5	195	200
ID4 (10/11)	5	195	200
ID3 (10/17)	0.5	199.5	200
ID4 (10/17)	0.5	199.5	200

- ii. 加入 20 μl 的 0.15% (w/v) sodium deoxycholate，室溫停留 10 分鐘。
- iii. 加入 20 μl 的 72% (w/v) trichloroacetic acid (TCA)，vortex。
- iv. 離心，3000 \times g 15 分鐘，然後去掉上清液，蛋白質在這個步驟將會被沉澱下來。
- v. 加入 200 μl 的 DW 溶解蛋白質沉澱，這時需取另一空的微量離心管，一樣加入 200 μl 的 DW 當作空白試驗用。
- vi. 加入 200 μl 的 CTC solution，再室溫下等 10 分鐘，加入 CTC solution 後蛋白質沉澱會溶解。
- vii. 加入 100 μl 的 20% (v/v) Folin-Ciocalteu reagent，立刻 vortex 在室溫下等 30 分鐘。
- viii. 反應完成後，取 100 μl 的反應物，讀取吸光值 A_{750} 。

4. 結果：

標準檢量線：

濃度	A ₇₅₀
5 μg	0.165
10 μg	0.269
15 μg	0.366
20 μg	0.448

(10/17)

濃度	A ₇₅₀
5 μg	0.146
10 μg	0.268
15 μg	0.368
20 μg	0.450

$$y = 0.0755 + 0.01892x, r^2 = 0.997$$

$$y = 0.055 + 0.02420x, r^2 = 0.992 \text{ (10/17)}$$

檢體濃度：

檢體編號	檢體量 μl	A ₇₅₀	蛋白質濃度 μg / μl
ID1 (10/11)	2	0.343	7.1
ID2 (10/11)	2	0.341	7.0
ID3 (10/11)	5	0.257	1.9
ID4 (10/11)	5	0.190	1.2
ID3 (10/17)	0.5	0.297	23.9
ID4 (10/17)	0.5	0.210	15.3

三、檢體處理：Loading 總體積 25 μl，所含蛋白質濃度 10 μg。

1. sample buffer：8.8M Urea，2% Ampholine (pH 3.5-10)，2% NP40，5% 2-Me。

每個檢體做 2 組，準備 2.5 個 (3.5 個) 試驗的量：62.5 μ l / tube (87.5 μ l / tube)。

檢體編號	所需檢體體積 (μ l/each test)	檢體量(μ l) 2.5 tests (4t)	sample buffer (μ l) 2.5 tests (4t)	總體積
ID1 (10/12)	1.4 (10 μ g)	3.5	59	62.5 μ l
ID2 (10/12)	1.4 (10 μ g)	3.5	59	62.5 μ l
ID3 (10/12)	5.3 (10 μ g)	13.3	49.2	62.5 μ l
ID4 (10/12)	8.3 (10 μ g)	20.8	41.7	62.5 μ l
ID3 (10/18)	0.42 (10 μ g)	1.7 (4t)	98.3	100 μ l
ID4 (10/18)	0.66 (10 μ g)	2.6 (4t)	97.4	100 μ l

四、第一維等電焦電泳 IEF：利用垂直電泳法，進行等電焦電泳。

1. 膠體備製-膠體混合物：

成分	個別所需體積 (總體積 6 ml)	加入順序
30% acrylamide : 1.5% Bis	0.8 ml	4
0.04% riboflavin , 0.45% TEMED	0.75 ml	5
10% APS	6 μ l	8
40% Ampholine® pH 5-7	60 μ l	6
40% Ampholine® pH 3.5-10	240 μ l	7
Urea (pure 生化等級)	3.08 g	1
20% NP40	0.6 ml	3
DW	1.284 ml	2

備註：若使用 pH 5-7 時百日咳菌蛋白質點很分散，有一些蛋白質的 pI 值可能已經超過，pH 3.5-10 百日咳菌蛋白質點太過集中，使用這個比例 pH 5-7 : pH 3.5-10 為 1 : 4 百日咳菌蛋白質點的分佈最為恰當。

2. 緩衝液備製：(+) 酸性端：0.01M 磷酸 H_3PO_4 1 L (17.2) (0.58 ml / 1 L)。

下層電泳槽。

(-) 鹼性端：0.02M 氫氧化鈉 NaCl 0.5 L (0.2 g / 0.5 L)。

上層電泳槽。

3. Sample buffer :

成分
8.8 M Urea
2% Ampholine® pH 3.5-10
2% NP40
5% 2-Me

4. 備製 First-dimension gel : 使用 glass tube 內徑有 1 mm 和 2 mm 兩種選擇，膠體凝集需要光線幫助，鑄膠長度依據使用的電泳槽而定，例如：第二維使用寬度 12.5 cm 時，鑄膠長度為 11.5 cm，加入膠體混合物至一定的高度，然後輕輕加入 distill water。大約經過 20 分鐘後膠體聚合不會流動後，移除 distill water，更換為 Sample buffer 之後讓膠體繼續進行聚合反應大約需要一小時以上。這邊需特別注意，移除 distill water 的步驟非常重要，可以避免其改變膠體內的 pH 值分佈，而避免影響第一維的電泳分析。
5. 檢體的 loading : 準備檢體，檢體濃度 10 μg / 25 μl ，檢體加入要避免氣泡，然後要覆蓋保護液 cover solution (5M urea, 2% Ampholine® pH 3.5-10, 2% NP40)，保護液的體積約 15 μl ，但需視使用的 glass tube 的內徑而定，一般高度需 1-2 mm，保護液加入需要技巧不要擾動液面，使用空針將液體送入的方式，不要用推的而要使用旋轉方式慢慢加入，一樣的方法加入 NaOH。
6. 檢體進行第一維等電焦電泳分離，要在 10°C 下進行，無法在更低溫下進行因為檢體含有 Urea，在更低溫下會形成結晶。因此，無法將整個設備移入冷房進行反應，利用循環冷卻系統，下方進水、上方出水。
7. 跑 IEF 設定的條件：
- i. 200 V 1 小時 剛開始電流約 2 mA (一般為 1-2 mA) 之後開始往下降至 1 mA or 0 mA。
 - ii. 400 V 2 小時 剛開始電流約 2 mA (一般為 1-2 mA) 之後開始往下降至 1 mA or 0 mA。

- iii. 800 V 14 小時 剛開始電流約 2 mA (一般為 1-2 mA) 之後開始往下降至 1 mA or 0 mA。
- 8. IEF 結束之後，使用 DTT 和 Iodoacetamide 處理 IEF 膠條，DTT 的作用是打斷雙硫鍵，Iodoacetamide 的作用是進行乙烯化讓已經打斷的雙硫鍵不會再回復。
 - i. 2D-PAGE buffer (50 mM Tris pH 8.8, 2 % SDS, 30 % Glycerol, 6 M Urea) 4°C 保存，大約 3 個月或更短。
 - ii. IEF gel 用空針加水，將 gel 從玻璃管中推出來，置 IEF gel 於 15 ml 的塑膠管中。
 - iii. 每管加入 5 ml 的 DTT 溶液 (DTT 溶於 2D-PAGE buffer 中，最後濃度為 0.25% ，例如配製 40 ml：秤取 0.1 g 的 DTT 溶於 2D-PAGE buffer 中)，在室溫下震盪作用 10 分鐘。
 - iv. 每管加入 5 ml 的 Iodoacetamide 溶液 (Iodoacetamide 溶於 2D-PAGE buffer 中，最後濃度為 0.25% ，例如配製 40 ml：秤取 0.1 g 的 Iodoacetamide 溶於 2D-PAGE buffer 中)，在室溫下震盪作用 10 分鐘。
 - v. 作用完成後，IEF gel 在 Iodoacetamide 溶液一起放置於 -85°C ，直到進行第二維電泳分析。

五、第二維電泳分析：一般使用 12% SDS-PAGE。

1. 第二維電泳膠體配製：使用 12% SDS-PAGE (for two large gel)

成分	Separation gel (ml)	Stacking gel (ml)	次序
30% Acrylamide+0.8% Bis	16	1.5	2
1.5 M Tris pH 8.8	9.88	—	3
0.5 M Tris pH 6.8	—	2.5	3
10% SDS	0.4	0.1	4
DW	13.4	5.83	1
10% APS	0.28	0.1	5
TEMED	0.028	0.008	6
總體積	40	10	

註：留 1.5 cm 的高度配製 Stacking gel，Separation gel 用 DW 來壓平膠面，Stacking gel 用 2-propanol 來壓平膠面，2-propanol 使用後需要用大量的 DW 來洗掉 2-propanol。

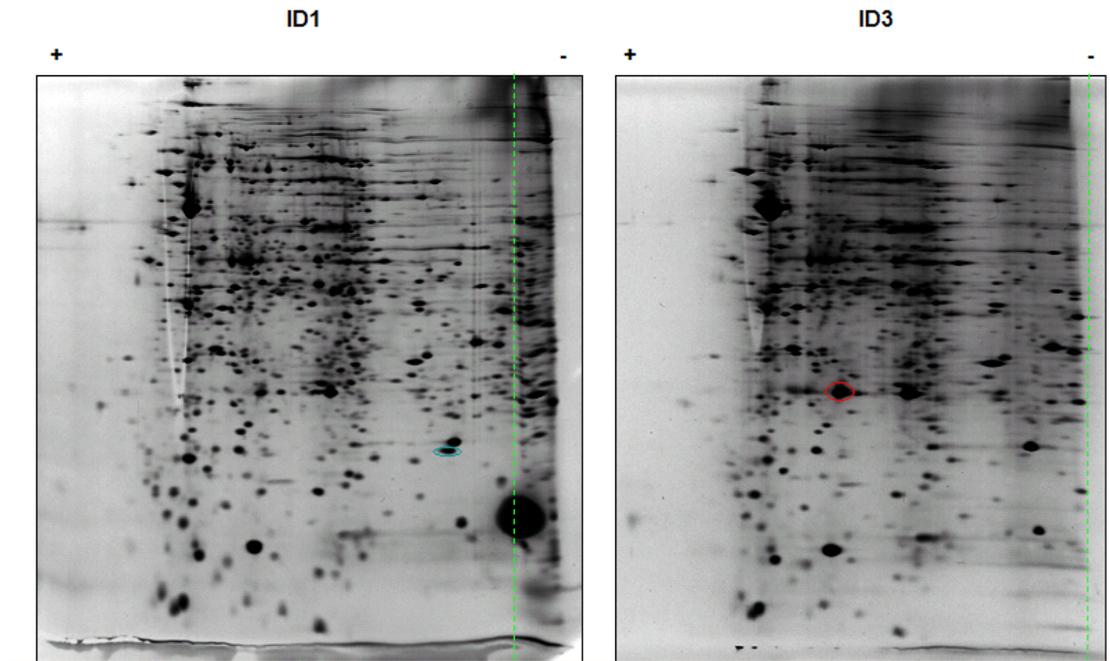
2. 2D-PAGE gel：用來包埋 IEF gel，agarose 溶於 SDS buffer（Running buffer）中，最終濃度 0.5%。
3. Running buffer (1L)：Tris 3.03 g，Glycine 14.4 g，SDS 1.0 g。
4. 電泳條件設定：40 mA（剛開始電壓約 70-80 V），跑到 Separation gel 後（大約需要 30-40 分鐘），再將電流調高至 80 mA（剛開始電壓約 200 V），直到電泳跑到膠體底部，大約需要時間為 1 小時 30 分到 2 小時，結束時電壓大約為 300-315V 左右。

六、銀染分析：Wako silver stain kit 使用這組試劑，其靈敏度很高，但不適用於 LC-MS 分析用。LC-MS 分析時，需要自行配製銀染液（去除固定的步驟）。以下過程置於 shaker 上，速度約為 44-46 rpm。

1. 固定溶液 1 (Fix 1)：甲醇 MeOH 200 ml，醋酸 CH_3COOH 40 ml，蒸餾水 DW 160 ml。固定 15 分鐘，這步驟若實驗忙時也可以放過夜 overnight。
2. 固定溶液 2 (Fix 2)：甲醇 MeOH 20 ml，醋酸 CH_3COOH 20 ml，Fix solution 80 ml，蒸餾水 DW 270 ml。固定 15 分鐘。前 2 個固定溶液可以先配製。
3. 清洗，用大約 600 ml 的 DW 洗 3 次，每次 5 分鐘，此步驟配製增強液及染色液。
4. 增強液 (Enhancing solution)：增強儲存液 Enhancing stock solution 2 ml 加蒸餾水 DW 398 ml。增強液作用 5-10 分鐘，這實驗室操作為 5 分鐘。
5. 清洗，用大約 600 ml 的 DW 洗 1 次，一次 5 分鐘。
6. 染色，(solution A 20 ml + solution B 20 ml 混合後，再加入蒸餾水 DW 360 ml)，作用 15 分鐘。
7. 清洗，用大約 600 ml 的 DW 洗 3 次，每次 5 分鐘，此步驟配製呈色液。
8. 呈色，400 ml Develop stock solution 20 ml 加蒸餾水 DW 380 ml，肉眼目視大約 4-5 分鐘。
9. 終止反應，加入 200 μl 醋酸 CH_3COOH ，大約 2-3 分鐘。
10. 清洗，用大約 600 ml 的 DW 洗 3 次，每次 2 分鐘，結束照相存檔分析。

注意：所有的器具都要非常乾淨，在 NIID 實驗室所有的器具，包括不只用於銀染的器具（塑膠瓶、塑膠盒）都馬上浸泡到含清潔劑的水中，之後有空時，會再用海綿布沾清潔劑清洗裡外，用水沖乾淨後，再用 DW rinse，晾乾待下一次使用。

七、電泳膠圖：

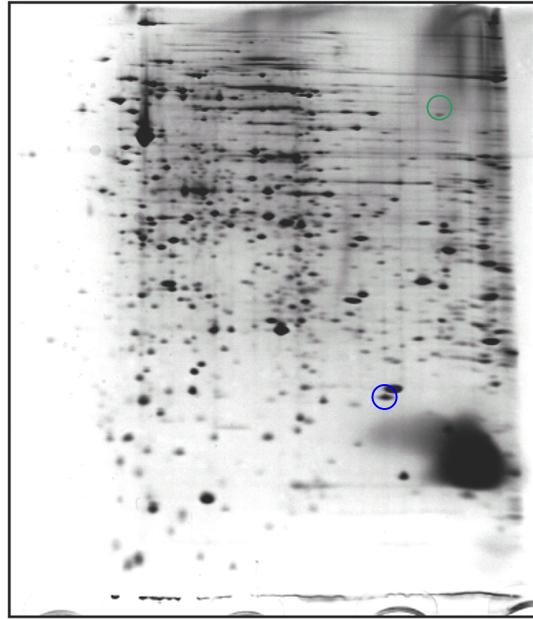


圖一、第一次進行蛋白質點分析比較 ID1 和 ID3，分屬兩個不同的 PFGE type ID1 屬於 PFGE type III a，ID3 屬於 PFGE type III b，紅色圓圈標示為新流行菌株屬於 PFGE type III b，表現增加的蛋白質點。藍色圈圈標示為 PFGE type III a 表現較新流行菌株 PFGE type III b 多的蛋白質點，即是新流行菌株表現減少的蛋白質點。

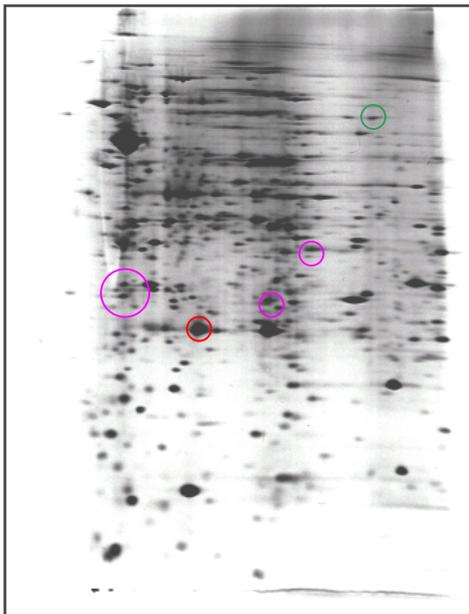
ID1



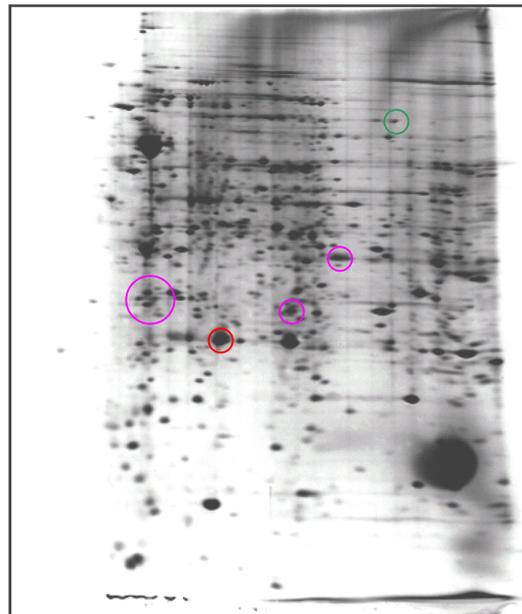
ID2



ID3

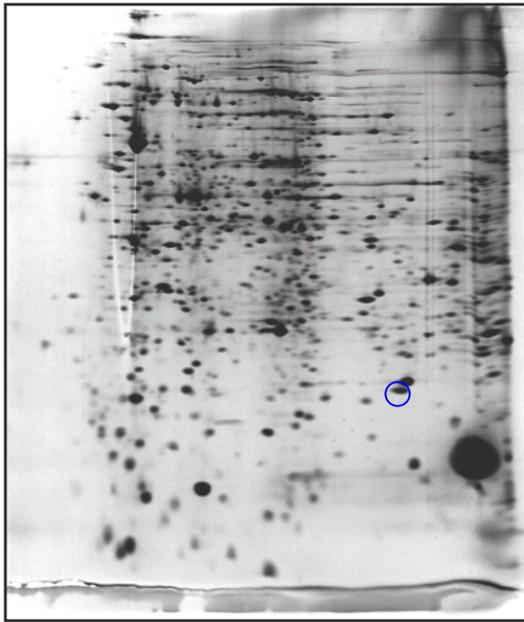


ID4

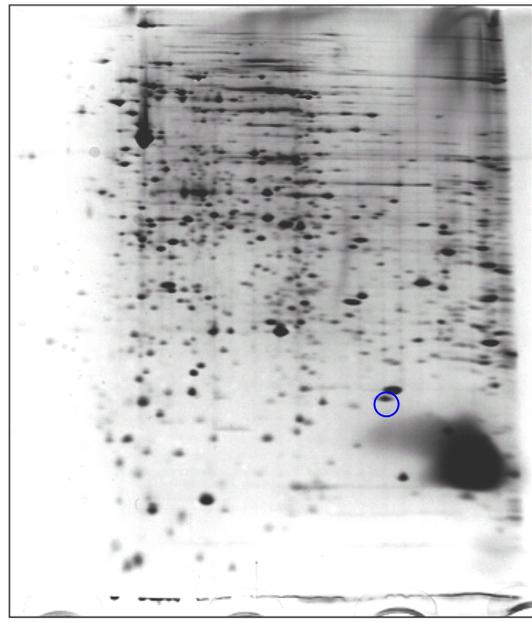


圖二：台灣本土主要流行菌株利用蛋白質體學 2D-PAGE analysis，比較菌株間基因表現的差異。ID1 和 ID2 為 PFGE type III a，ID3 和 ID4 為 PFGE type III b 這兩群菌株在 pertactin（綠色圈圈標示的點）的表現上沒有明顯差異，粉紅色圈圈標示為新的流行菌株表現增加的蛋白質，藍色圈圈標示為新的流行菌株表現減少的蛋白質。

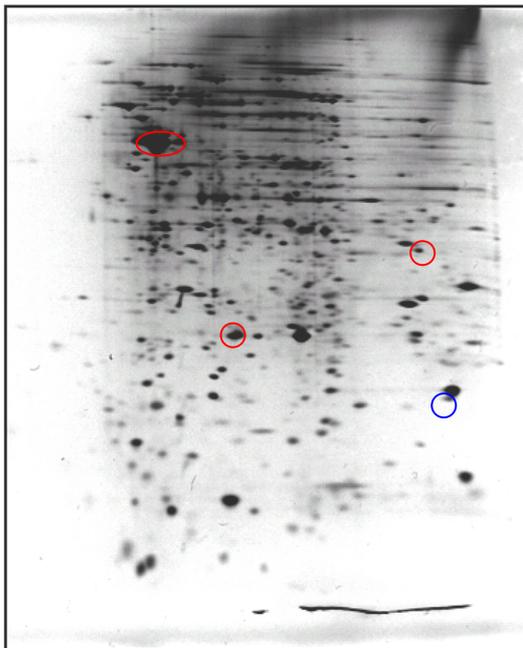
ID1



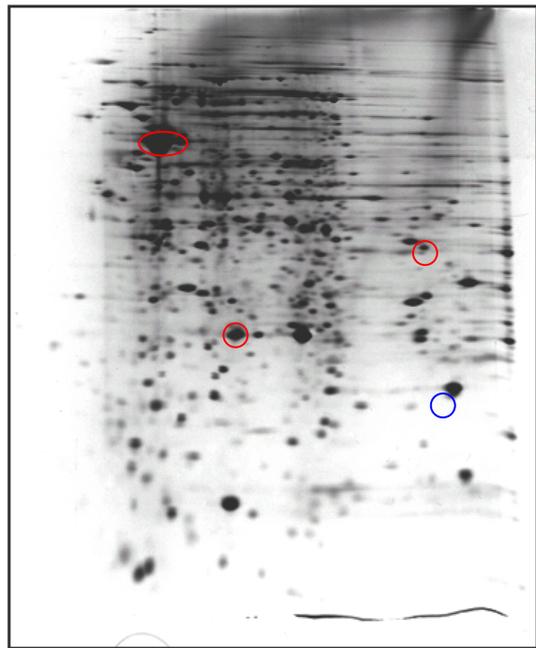
ID2



ID3-2nd

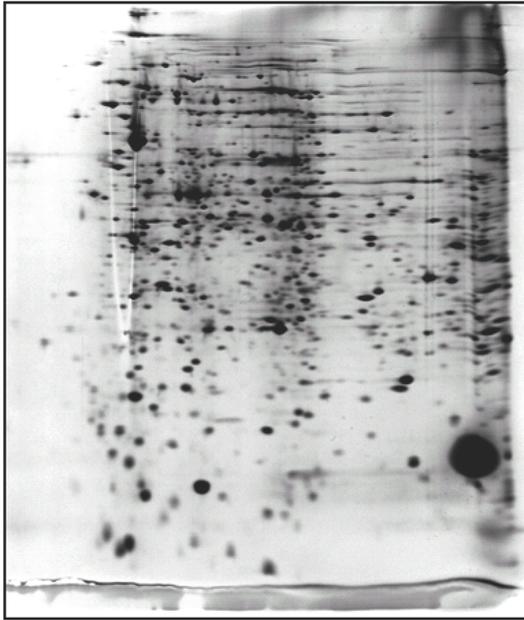


ID4-2nd

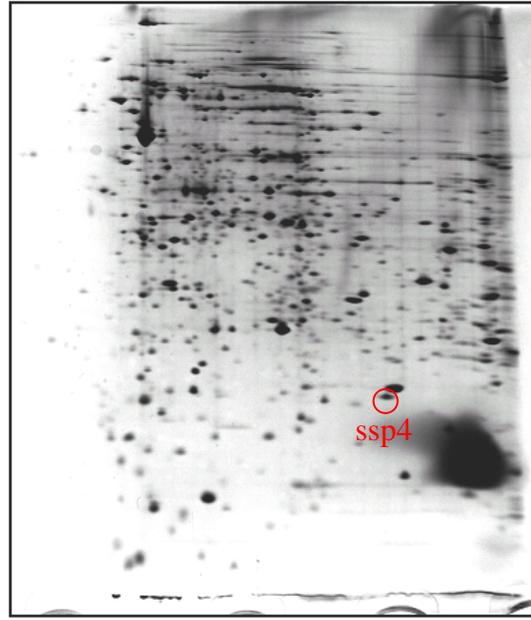


圖三：ID3 和 ID4 這兩株新流行菌株，因為生長速度較為緩慢，第一次萃取的蛋白質濃度比較低，重複實驗萃取蛋白質，進行二維電泳分析，發現一致表現的蛋白質點如圖中所標示的，紅色圈圈標示的是新流行菌株（PFGE type III b）ID3 和 ID4 增加表現的蛋白質點或有 PI shift 的現象，藍色圈圈標示的是新流行菌株 ID3 和 ID4 減少表現的蛋白質點。

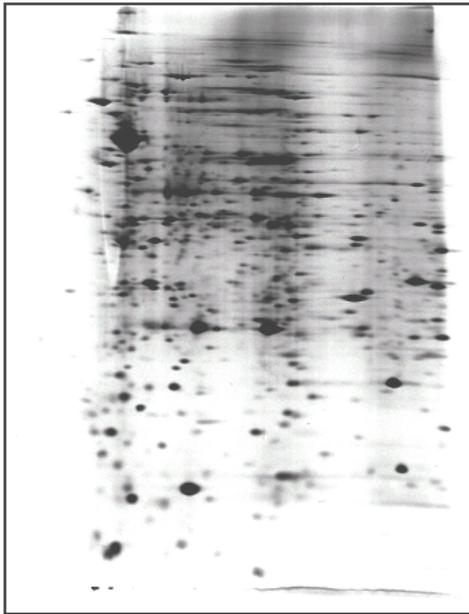
ID1



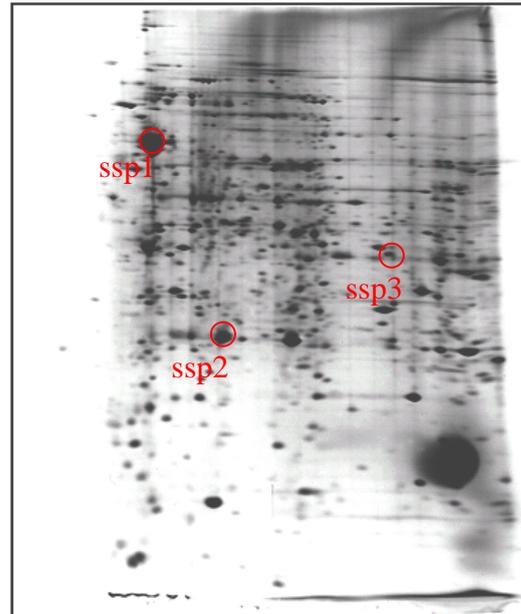
ID2



ID3



ID4



圖四：幾次的比對之後發現，圖中以紅色圈起的點，幾次的實驗比對下有一致性的表現，ssp1，ssp2 這兩個蛋白質是新流行菌株（PFGE type III b）表現增加的蛋白質。ssp3 這個蛋白質在新流行菌株（PFGE type III b）上 PI 值有 shift 現象。ssp4 這個蛋白質在新流行菌株（PFGE type III b）上表現是減少的。這 4 個蛋白質將進行質譜分析鑑定蛋白質。

討論：

1. ID3 解析度較差，因為這個菌株生長速度緩慢，菌量濃度不足，抽取蛋白的濃度比較低，當要進行等電點電泳時，需要檢體體積比較多，會干擾之後分析的解析度。
2. ID1 和 ID3 的蛋白 (total proteins) 表現差異，ID3 以紅色圈起的部分是表現增加的蛋白質點，ID1 圖中以藍色圈起的蛋白質點在 ID3 的表現是減少的，見圖一。
3. 這兩個蛋白質點，可以藉由 LC-MS 鑑定為那一種蛋白質，可以探討究竟是那一個基因表現的差異，這個基因表現的差異和這兩群菌株流行的狀況，有無任何的關聯，其在百日咳菌株抗原變異上扮演何種角色，這部分可繼續深入研究
4. 進一步確認這兩個蛋白質的變化，是否一樣可見於其他歸屬同一個 PFGE type 的其他菌株如 ID2 與 ID1 同屬於 PFGE type III a，ID3 與 ID4 同屬於 PFGE type III b，重複實驗進行 ID2 和 ID4 的二維電泳分析。
5. 完成 ID2 和 ID4 的 2D-PAGE analysis 圖譜分析如圖二，第一次進行分析見到的現象，紅色圈起的部分是新流行菌株 ID3 (PFGE type III b) 表現增加的蛋白質點，以藍色圈起的蛋白質點在新流行菌株 ID3 (PFGE type III b) 的表現減少，比較 ID2 和 ID4 也發現同樣的情況，Dr. Kamachi 研究日本的臨床菌株抗原的變異上發現新流行菌株與舊菌株的比較發現 pertactin 的表現上有差異，但台灣的這兩群菌株進行分析後發現在 pertactin 的表現上沒有差異，粉紅色圈起的標示是目前觀察有差異的地方。
6. ID3，ID4 進行第二次萃取蛋白質進行分析實驗見圖三，比較幾次的分析圖譜後，發現有 2 個蛋白質 ssp1、ssp2 在新流行菌株 PFGE type III b 表現是增加的，一個 1 個蛋白質 ssp3 在新流行菌株 PFGE type III b 表現其 PI 值有 shift 現象。ssp4 這個蛋白質在新流行菌株 PFGE type III b 上表現是減少的見圖四，這四個蛋白質將進行鑑定為何種蛋白質。

八、蛋白質鑑定：

1. 銀染法適用於 LC-MS/MS：
 - i. 溶液：

溶液	成分	體積 (ml)
1. Fixation solution	Methanol	200
	Acetic acid (CH ₃ COOH)	20
	DW	180
2. Wash solution	Methanol	200
	DW	200
3. Enhancing solution	Sodium thiosulfate (Na ₂ S ₂ O ₃)	80mg
	DW	400
4. Silver solution Cool in ice	Silver nitrate (AgNO ₃)	0.4 g
	DW	400
5. Develop solution 0.04% HCHO, 2% Na ₂ CO ₃	Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃)	8 g
	DW	400
	Formaline 37% (HCHO)	400 μl
6. Stop solution 5% CH ₃ COOH	Acetic acid (CH ₃ COOH)	20
	DW	380

ii. 方法：

- a、Fixation solution : shake 20 mins。
- b、Wash solution : shake 10 mins。
- c、DW wash : shake 10 mins。
- d、Enhancing solution : shake 1 min。
- e、DW wash : shake 1 min, 3 times。
- f、Silver solution : shake 20 mins, at 4°C。
- g、DW wash : shake 1 min, 3 times。
- h、Develop solution : shake 2-5 mins or more, this times wait for 11 mins。
- i、Stop solution : shake 10 mins。
- j、DW wash : shake 5 min, 3 times。
- k、Store : at 4°C。

2. In gel digestion

i. 溶液：

溶液	成分	體積
1. 15 mM K [Fe(CN) ₆], 50 mM Na ₂ S ₂ O ₃ Destaining solution	30 mM K [Fe(CN) ₆]	0.5 ml
	100 mM Na ₂ S ₂ O ₃	0.5 ml
2. 100 mM NH ₄ HCO ₃	1M NH ₄ HCO ₃	1 ml
	DW	9 ml
3. 10 mM DTT	1 M DTT (儲存濃度可重複 使用, 儲存溫度-30°C)	5 µl
	100 mM NH ₄ HCO ₃	495 µl
4. 55 mM iodoacetamide 使用前新鮮配製	iodoacetamide	5.1 mg
	100 mM NH ₄ HCO ₃	0.5 ml
5. Digestion buffer	0.1 µg/µl trypsin	20 µl
	1 M CaCl ₂	1 µl
	100 mM NH ₄ HCO ₃	100 µl
	DW	79 µl
6. 5 mM CaCl ₂ 50 mM NH ₄ HCO ₃	1 M CaCl ₂	1 µl
	100 mM NH ₄ HCO ₃	100 µl
	DW	99 µl
7. 1% TFA 50% acetonitrile	TFA	10 µl
	Acetonitrile	500 µl
	DW	490 µl
8. 0.2% TFA 50% acetonitrile	1% TFA, 50% acetonitrile	200 µl
	Acetonitrile	400 µl
	DW	400 µl

註：LC-MS 使用試劑純度等級要非常純一般需用使用 HPLC grade，
trypsin (Promega® sequencing grade modified trypsin)

ii. 方法：

a、 移除膠體上的染色液

- 01、每管加入Destaining solution (100 μ l 15 mM K [Fe(CN)₆], 50 mM Na₂S₂O₃) 處理膠體，在shaking下作用 10 分鐘。
- 02、用 DW 清洗 3 次，每次每管加入 500 μ l 的 DW 在 shaking 下作用 15 分鐘。
2. 用胰酵素酶 Trysin 作用切割蛋白質為 peptide 在進行 LC-MS 分析
 - 01、將已經去除銀染色的膠體，用 100 mM NH₄HCO₃ 體積每管加入 50 μ l 然後在shaking下作用 1 分鐘，移除重新加入 50 μ l 的 100 mM NH₄HCO₃，在shaking下作用 1 分鐘，移除溶液。
 - 02、每管加入 100 μ l 的 acetonitrile，在 shaking 下作用 5 分鐘，之後移除溶液，離心乾燥。(註：此步驟可以暫停，檢體存放 4°C)。
 - 03、加入 50 μ l 的 10 mM DTT 溶液，在 56°C 下，作用 45 分鐘。
 - 04、將膠塊換到新的低吸附性的小管中，加入 50 μ l 的 55 mM iodoacetamide 溶液，在室溫暗的環境下(放在抽屜中)，作用 45 分鐘。
 - 05、用 100 mM NH₄HCO₃ 清洗兩次，加入 50 μ l 的 100 mM NH₄HCO₃ 溶液，靜置約 1 分鐘，吸掉溶液，重複步驟一次。
 - 06、每管加入 100 μ l 的 acetonitrile，作用 5 分鐘之後移除溶液，離心乾燥。
 - 07、完全乾燥的膠塊，加入 20 μ l 的 Digestion buffer，讓膠塊完全覆水，此步驟在冰上操作 10 分鐘(希望酵素在沒活性下)。
 - 08、將上清液移除，然後加入 15 μ l 的 5 mM CaCl₂，50 mM NH₄HCO₃ 溶液，作用時間在 37°C 下，overnight。
 - 09、加入 50 μ l 的 1% TFA、50% acetonitrile 溶液，超音波震盪 5 分鐘中，取另一新的低吸附性的小管，收集上清液。(此時膠塊中的蛋白質已經被酵素切割為 peptide)。

超音波作用是 Elute 膠塊中的 peptide)。

- 10、加入 70 μ l 的 0.2% TFA、50% acetonitrile 溶液，超音波震盪 5 分鐘中，收集上清液於同一管中。
- 11、加入 50 μ l 的 100 % acetonitrile 溶液，室溫下 15 分鐘，收集上清液於同一管中。
- 12、濃縮體積至 10 μ l 以下，使用離心乾燥（加熱、抽真空）。當體積濃縮至很小的體積時，加入 0.1 % formic acid 體積至 10-20 μ l。使用 Vortex 大約 1 分鐘，然後離心 15000 rpm 離心大約 3 分鐘，將液體轉換到 HPLC 專用檢體小管，準備上機。
- 13、LC-MS/MS 為機密的儀器，開機後首先進行管道測試，詳細步驟由於需要專門技術人員訓練，受限於專業知識，此部分無法詳細說明。

3. LC-MS/MS 的結果及未來需進一步進行的工作：

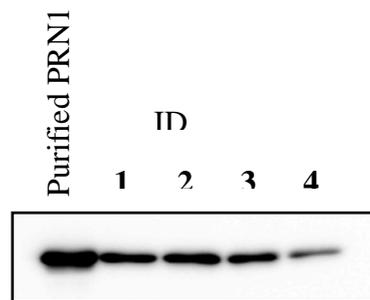
10/24 第一次質譜分析結果：

- 01、SSP1：gi|33594370|ref|NP_882014.1|60 kDa chaperonin。
- 02、SSP2:重作。10/27 重作的結果利用 Bordetella database 無法鑑定為何種蛋白，再利用全部物種的資料庫重新搜尋看是否能鑑定出來，仍無法鑑定出來，Dr. Kamachi 認為這是一個重要的蛋白質，對於了解百日咳菌株特性上非常重要的蛋白質，可利用 N 端定序方法 Edman degradation 定出胺基酸序列，再進行資料庫比對找出為何種蛋白質，進行後續的研究。
- 03、SSP3：
gi|33591876|ref|NP_879520.1|4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase。
- 04、SSP4：gi|33591371|ref|NP_879015.1|thio:disulfide interchange protein DsbA precursor。
- 05、結果討論：

ssp1、ssp3、ssp4 這 3 個相異的蛋白質點，利用 LC-MS/MS 順利鑑定出為何種蛋白質，再利用 DNA 資料庫找出完整的核酸序列，我們將可進一步比較這兩群菌株在這幾個蛋白質基因上有無變異。

4. 西方墨點法結果：

Immuno blot (anti-PRN1)



Total protein: 1 µg/lane

Purified PRN1: 20 ng/lane

在日本現況由 Dr. Kamachi 提供，發現舊菌株 5 株其中 1 株，會表現 pertactin，而新流行菌株皆會表現 pertactin。台灣的菌株不論是 PFGE type III a 或 PFGE type III b 皆會表現 pertactin。

心得感想及建議：

此次在日本的研習收穫非常的多，這邊的人也非常的友善，讓我能夠非常迅速的適應，實驗進行的也非常順利。日本是鄰近台灣的一個國家，同樣是亞洲人、氣候及時差與台灣相距沒有很大，也是一個容易適應的因素。

對日本國立感染症研究所的印象，這是一個對工作充滿熱忱認真的地方，雖有著豐富的資訊設備，但這邊不管是職員或臨時助理，平時除了工作實驗外，很少有人會在網路上，電腦是工作的平台，平時就看到他們使用電腦整理資料，除收取信件外，其他時候電腦就是一台打字機，這樣對工作的熱誠是目前我在台灣看不到的，尤其，佩服這邊的非正式職員，工

作年資都非常的久，對工作的熱誠看不出與正式職員有任何的差異，這點真是讓我非常驚訝，這邊的工作環境是非常穩定的，是否也是因此他們可以產生工作的歸屬感。

這邊的工作內容與台灣目前對傳染病診斷的責任歸屬非常不同，這邊並不做臨床診斷，臨床診斷的工作還是由醫院自行負責，國立感染症研究所是偏向於研究、新方法的開發、疫苗的製造開發或一些疑難問題的解決。也因此這邊沒有繁瑣的臨床診斷工作，如此這邊的研究者是很專心的負責自己領域的研究工作。也因為如此，這邊的研究者可能碰到的問題是研究材料的缺乏，我所在的實驗室主要的研究項目是百日咳，但因為百日咳菌的培養困難，目前在日本臨床醫院對百日咳的診斷幾乎是依賴臨床醫師依據病人症狀做疾病判定，因此在日本近年並沒有很多臨床菌株的分離，目前實驗室與柬埔寨有國際合作計畫，臨床鼻咽檢體由柬埔寨送到日本實驗室進行細菌培養與進行新的分子生物技術檢驗技術的評估，台灣百日咳菌株分離的數目比較起來是多的，這是研究人員很好的材料。

可惜的是目前我所在實驗室的狀況，只有我個人負責臨床檢體的檢驗及分離，並沒有其他研究人力的參與，研究計畫有申請到才可能有研究助理幫忙，人力狀況非常的不穩定，雖然實驗室有很好的材料，但我感覺並沒有充分利用，這一點是非常可惜的。

此次研習之後，發現一般研究幾乎都是一個團隊，這個實驗室我看到有六個人，正式職員與非正式職員各佔一半，工作主要項目很單純只包含百日咳研究及所有疫苗內毒素的相關研究檢驗。而且這邊的非正式職員都是長期的，工作人力幾乎每年都不會有差異。我所在的機關目前現況幾乎都用計畫來增加人力，計畫又是每年申請一次，就是多年計畫也是每年要審核是否能繼續執行，這樣我所在機關的研究工作並沒有延續性，也因此很難養成人力，實驗室的臨時人力幾乎都沒有歸屬感，就因為這樣，我感覺台灣與日本的臨時助理對工作的熱忱差距非常大，研究基礎要往下紮

根，給予非正職人員工作歸屬感是很重要的。

這次，研習的主要收穫是學習快速新進的分子診斷方法 LAMP 並且運用蛋白質體學技術探討百日咳菌株的特性，內容包括：蛋白萃取方法、定量方法、等電點聚焦電泳 IEF、2D-PAGE 分析、蛋白質鑑定運用質譜分析 LC-MS、及免疫西方墨點技術。經由這一個月訓練實習並且學習到這些新的方法，相信今後在百日咳的診斷上及抗原的變異上的監測及調查可以達到更精準。

日本是一個鄰近的國家，氣候及風俗民情與台灣較為接近，對於出國訓練人員有一個非常大的優勢，幾乎不需要花很多的時間去適應，適應問題解決當然有更多的時間去學習新的東西，而且日本本身也是一個科學發達的地方，許多的技術也均可以與世界潮流先趨競爭。基於上述的理由個人認為這是一個適合派遣人員進修學習的地方。

另外一點感想與建議，研究人力的穩定是科學往下紮根的地方，目前服務的機構雖然位於傳染病防治的重要角色，但由於組織編制或一些我無法清楚的原因，研究助理的來源幾乎是要靠申請計畫而來，計畫是每年審核，所以有很高的不確定性。就我目前能力所知，台灣只有中央研究院這種國家最高研究機構，編制有所謂的業務助理，這種助理工作穩定度就高，不需跟隨計畫的有無，而是跟隨業務的需要而更動。這次研習的單位：日本國立感染症研究所，他們的研究助理就類似中央研究院的業務助理，雖然非正式公務人員，而是因為業務需求而增加的約僱人員，像這種人力基本上都非常穩定，所以那邊的助理工作年資也都是一、二十年，研究能量能夠繼續累積，因而在研究上累積很好的成果。這樣的想法，以不增加國家財政負擔，但又可以給助理一個穩定的環境，我認為可以提供機關的最高首長在規劃機關人員編制下，應該可以列入參考。