



計畫編號：DOH90-DC-1007

行政院衛生署疾病管制局九十年度科技計畫

生物可分解性口服卡介苗之研發

研究報告

執行機構：中國醫藥學院

計畫主持人：侯庭鏞

研究人員：項千芸、翁仲男、吳世祿、賴羿如

執行期間：90年2月12日至90年12月31日

\*\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見\*\*

# 目 錄

	頁碼
封面	
目錄	
一、摘要	(1)
二、本文	
(一) 前言	(3)
(二) 材料與方法	(7)
(三) 結果	(12)
(四) 討論	(16)
(五) 結論與建議	(19)
(六) 參考文獻	(21)
(七) 圖表	(26)

## 摘要

本計畫利用生物可分解性基材—poly-DL-(lactide-co-glycolide) (PLGA)—為基礎，併合基因工程技術生產黏膜免疫性佐劑，完成生物可分解性口服卡介苗之開發。首先利用聚合酶連鎖反應及核苷酸定序分析分離自疾病管制局的卡介苗菌株，發現測試的菌株源自於日本株。進一步以疾病管制局的卡介苗菌株，建立最佳培養條件及抗原之製備。卡介苗菌株以 Middlebrook 7H9 為基質所培養出來的細菌數及活性最佳，在接種後第 3 至 15 天之間，細菌呈現對數生長，且在繼代 1~2 代之後，並無明顯的突變發生。在卡介苗菌株的抗原性方面，我們發現在上清液中，可偵測到分子量約 105 kDa 及 45 kDa 的抗原，顯示卡介苗的成分除了菌體外，增加上清液的成分可能可以增加免疫原性。其次進行生物性黏膜佐劑之產製。將大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位基因利用聚合酶連鎖反應選殖，利用大腸桿菌表現系統進行蛋白質的表現及純化，可以自 1 公升細菌液中，純化出約 1.3 公克之忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質，而由 GM1—酵素連結免疫吸附試驗分析，發現重組型忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質具備與野外型忌熱性腸毒素相同的特性。最後進行生物可分解性微球體口服劑型之製作及物化分析。不同的 PLGA 在回收率、蛋白質包裝率方面，並無明顯的差別，利用掃描式電子顯微鏡分析微球體的型態，發現微球體的形狀很均質，幾乎都呈現圓球體，微球體的表面也很光滑，並無明顯孔隙出現，大小皆在 5  $\mu$ m 以下，在抗原釋放分析方面，發現在第 6~9 天及第 12 天會各快速釋放一次，在 12 天之後，蛋白質會慢慢的被釋放出來，顯示以 PLGA 為包覆材質所製成之微球體具有控制釋放的能力。以第一年計畫所完成的三項核心技術為基礎，未來應可順利完成生物可分解性口服卡介苗之研發。

關鍵詞：卡介苗、大腸桿菌忌熱性腸毒素、微球體、口服疫苗

## Abstract

Over the past several years, there has been a concerted effort to develop a new vaccine against tuberculosis. The existing vaccine, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG), has been used for many decades, but meta-analysis of controlled clinical trials has revealed a lack of effectiveness in adults. In order to develop the oral vaccine that could be administered orally, be stable during oral administration and be targeted to M cells, we prepared the poly-DL-(lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres containing BCG by a water-in-oil-in-water emulsion solvent evaporation method. The BCG strain was inoculated in Middlebrook 7H9 broth. By polymerase chain reaction, we found that the BCG strain used in this study was derived from Japanese strain. By Western blotting, two proteins of 105 kDa and 45 kDa were found in the culture media. To further develop the M-cell targeting microspheres, we cloned, expressed, and purified the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin subunit B (LTB) from prokaryotic expression system. The purified recombinant LTB exhibited a similar binding kinetic as the wild-type LTB did, suggested that recombinant LTB was able to bind to the ganglioside on the epithelial cells. The BCG was then encapsulated by solvent evaporation method. The microspheres showed the spherical shape and exhibited monolithic form. *In vitro* release study of BCG-loaded microspheres displayed a controlled release kinetic with a burst effect during the first six days and a sustained release for the next 12 days. These results suggested that the PLGA-based microspheres could serve as a formulation for controlled-release vaccine.

Keywords: Bacillus Calmette-Guerin, *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, microsphere, oral vaccine

## 前言

結核病 (tuberculosis) 是目前全球各種傳染病中造成最多人死亡的疾病。根據世界衛生組織的統計，全世界大約已有 1/3 人口感染結核桿菌，每年約有 800 萬個新發病的結核案例，約有 300 萬人死於結核病，到了公元 2000 年，預計每年死亡人數會達到 350 萬人，而這種情況也隨著抗藥性菌株的產生，及與愛滋病共同感染而更顯嚴重 (CDC, 1993; Kaufmann, 2000; Kochi, 1991; Lagranderie et al., 2000; WHO, 1999)。全球各區域結核病流行情形大不相同，其中以東南亞及非洲流行情況最為嚴重，至於台灣地區，結核病為 2000 年死因之第 12 名，約有 1534 人死於結核病，死亡率為 1.23%。結核防治計畫不完善、愛滋病盛行及全球人口快速流動等原因，都加速了結核病的傳播。

目前使用的結核病疫苗，即卡介苗 (Bacille Calmette-Guerin; BCG)，是由法國科學家 Calmette 及 Guerin 於 1920 年代左右開發的牛結核桿菌 (*Mycobacterium bovis*) 馴化株。卡介苗已經使用至少 70 年，每年約有一億個新生兒接種卡介苗，使得卡介苗成為世界上使用最廣泛的疫苗之一。卡介苗的副作用很少，可以預防年輕人發生粟粒性結核及腦膜性結核，但是卻無法預防成年人肺結核的發生。由臨床試驗的結果也顯示，卡介苗對成年人的保護性差異相當大，其效價可自印度的 0% 至英國的 80% (Fine, 1995)。

早期 Calmette 設計卡介苗的接種方式為直接口服，研究證明在新生動物及新生兒口服卡介苗後，卡介苗可以通過小腸上皮，而誘發特異性的免疫反應 (Calmette et al., 1933)。之後的研究也顯示，卡介苗直接口服後，可由 M 細胞通過小腸障壁進入 Peyer's patches，而誘發黏膜性免疫反應 (Fujimura, 1986; Lagraderie et al., 1997)。雖然卡介苗以直接口服的方式進行免疫，可以刺激良好的黏膜性免疫反應，對抗結核桿菌的感染，也可以降低預防注射的成本。然而，直接口服卡介苗會產生許多缺點，如造成

頸部淋巴腺炎、耳炎、咽後膿瘍、及微弱的結核素反應的發生等 (Lotte et al., 1984)，因此，開發卡介苗的微包覆技術，除了可以經口投與外，也可以降低卡介苗的劑量，同時避免卡介苗吸附於口咽喉上皮，造成菌血症的發生。目前結核病疫苗的研究除了以牛結核桿菌馴化株為主外，許多實驗室也積極朝向次單位疫苗方向研發。例如在結核桿菌生長時所分泌的蛋白質，已被證實相當具有抗原性，這群蛋白質統稱為 culture filtrate proteins (CFP) (Orme et al., 1993; Sonnenberg and Belisle, 1997)。CFP 免疫小白鼠後，可以產生與卡介苗相當的保護性 (Bosio and Orme, 1998)，而保護性的產生主要是藉由引發  $CD4^+$ 、 $CD8^+$  T 細胞反應及  $\gamma$  干擾素的產生 (Wilkinson et al., 2000)，其中， $\gamma$  干擾素對保護人類免於受到結核桿菌的感染是非常重要的細胞素 (Dorman and Holland, 1998)。

本計畫所選用的生物可分解性材質為 poly-DL-(lactide-co-glycolide) (PLGA)。PLGA 具有粘著力特性，且具有以下幾個優點，是一個非常好的口服疫苗微球體包覆材質 (Cox and Coulter, 1997; Morris et al., 1994)。第一，具有生物相容性 (biocompatibility) 且其安全性高 (Hsieh, 1988)。第二，具有生物可分解性 (biodegradation)：PLGA 的酯鍵結可被水解成為 lactic acid 及 glycolic acid，而這兩種成份可經由動物體內的 Krebs cycle 代謝排除。酯鍵結的水解速率取決於分子量、分子表面積、分子立體空間規律性及 lactide/glycolide 比例等因素 (Lewis, 1990)。第三，具有控制釋放 (pulse release-controlled release) 之效果：控制釋放的特性對於疫苗 (尤其是 one shot vaccine) 中抗原的釋放而言，是很重要的。在疫苗投與之後，抗原經過控制性的釋放，可達到類似初次免疫及補強免疫的效果。而控制釋放的特性，除了應用在疫苗上，降低疫苗補強的消耗外，也應用於抗腫瘤藥物、抗生素及抗發炎藥物的劑型上，有效地降低藥物的毒性。以 PLGA 為基質的微粒體可以藉著擴散、基質分解、或基質崩解等方式，使內容物釋放出來 (McGee et al., 1995)。第四，具有增強免疫的效果 (immunopotential)：PLGA 可做為一個抗原的運輸系統，增強黏膜性及全身性免疫反應。PLGA

增強免疫的能力，是由大小及厭水性兩個因素決定，當微粒體小於 10  $\mu\text{m}$  時，可成功地被送到 Peyer's patches，進而輸送到富含 T 細胞及 B 細胞的區域；當微粒體小於 5  $\mu\text{m}$  時，可被位於 Peyer's patches 的巨噬細胞吞噬，輸送到腸繫膜淋巴結，而刺激全身性免疫反應；當微粒體大於 5  $\mu\text{m}$  時，可被 Peyer's patches 抓住而誘發黏膜性免疫反應，至於厭水性的材質可有效地被 Peyer's patches 吸收 (Eldridge et al., 1989; Eldridge et al., 1991)。

口服疫苗除了考慮適當的抗原及材質外，尚須搭配適當的佐劑，方為一完整疫苗開發的考量。大部份的抗原在以黏膜途徑投與時，其免疫原性都相當差，並且會造成免疫耐受性的產生，此時黏膜佐劑就可克服這個缺點，輔助抗原被 M 細胞吸收，誘導黏膜性免疫反應的產生。細菌毒素，包括霍亂毒素及大腸桿菌忌熱性腸毒素等，都具有作為黏膜佐劑的潛能 (Komase et al., 1998)。腸毒性大腸桿菌 (enterotoxigenic *E. coli*) 可藉著特定的致病因子，在小腸上皮增殖，並導致下痢的發生。大部份腸毒性大腸桿菌可以產生一到數種的線毛，這些線毛可吸附在小腸的上皮細胞，使大腸桿菌在小腸內增殖。腸毒性大腸桿菌在吸附到小腸黏膜上皮後，可產生腸毒素，導致小腸上皮細胞內水份及電解質的流失，最後造成下痢。腸毒性大腸桿菌所產生的腸毒素主要為忌熱性腸毒素 (heat-labile enterotoxin; LT)，忌熱性腸毒素是一個高分子量的複合物，由一個 A 次單位及五個 B 次單位以非共價鍵結的方式組成 (Spangler, 1992)，其中 B 次單位對存在於細胞表面的 ganglioside 具有高親合性，而 A 次單位為產生毒素效用的單位。忌熱性腸毒素作為黏膜免疫性佐劑的效用與 A 次單位的 ADP ribosyltransferase 活性有關 (de Haan et al., 1996)，而 B 次單位則可產生 immunological carrier 的效用 (Truitt et al., 1998)。忌熱性腸毒素具有調節免疫的功能，可增加抗原被 M 細胞吸收的機會、增強巨噬細胞及上皮細胞的抗原呈現能力、增加 antigen presenting cell 釋放 interleukin 1 及 interleukin 6、增加 T 細胞反應的分化 (誘發產生  $T_{h1}$ 、 $T_{h2}$  的反應)、刺激 B 細胞 isotype switching 等功能 (Takahashi et al., 1996)。這些特性，可以輔佐微球體在經黏膜途徑投與時

有效地增加被 M 細胞攝入的機會，且可作為良好的黏膜性佐劑，產生良好的黏膜性免疫反應。

為了改善卡介苗的免疫保護性，本計畫結合高分子及蛋白質工程之實驗策略，利用生物可分解性基材為基礎，併合基因工程技術生產黏膜免疫性佐劑，完成生物可分解性口服卡介苗之開發，以使傳統卡介苗經改變此疫苗劑型後，可直接口服以增加疫苗使用之方便性，並藉由添加黏膜性佐劑以加強此疫苗在呼吸道之保護性。未來經由小白鼠、天竺鼠或牛之保護性試驗及人體試驗，應可開發出一具實用價值且可在肺結核的防疫上扮演重要角色的口服卡介苗。



## 材料與方法

### 一、結核桿菌最佳培養條件之建立及抗原之製備

#### (一) 結核桿菌的培養及最佳生長條件的測試

卡介苗疫苗株分讓自行政院衛生署疾病管制局。菌株先培養於 Middlebrook 7H11 agar (Difco) 進行單株化後，保存於 $-80^{\circ}\text{C}$ 。為了測試最佳生長條件，將菌株分別接種於三種液體培養基中，一種為添加 10% albumin-dextrose-catalase 及 0.05% Tween 80 的 Middlebrook 7H9 broth，另一種為添加 10% Dubos medium albumin 的 Dubos broth (Difco)，第三種為 glycerol-alanine salts medium (GAS) (2% glycerol, 0.03% Bacto-Casitone, 0.005% ferric ammonium citrate, 23 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM citric acid, 0.1% L-alanine, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3.4 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 37 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.02% Tween 80, 0.005% anti-foam A)。細菌接種後，將培養基置於 $37^{\circ}\text{C}$ 震盪培養，每3天收集菌液，共收集1個月，以進行細菌濃度的測定。細菌濃度的測定採三種方式，一為利用分光光度計測定 600 nm 波長下的吸光值，另一種方法為將菌液塗抹於 Middlebrook 7H11 agar，測定菌落形成單位 (colony forming unit ; CFU )，第三種為利用 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 為染劑，在 570 nm 波長下測定其吸光值。MTT 的測定方法如下：將 100  $\mu\text{l}$  菌液與 20  $\mu\text{l}$  之 5 mg/ml MTT 混合，於 $37^{\circ}\text{C}$ 下作用 48 小時，所產生不可溶的 formazan 再利用 100  $\mu\text{l}$  extraction buffer (50% dimethyl formamide, 10% SDS)，於 $37^{\circ}\text{C}$ 下溶解 48 小時，最後以 570 nm 波長下測定其吸光值 (Kairo et al., 1999)。

#### (二) 卡介苗菌株的分子鑑定

為了避免因不斷培養，造成卡介苗菌株發生突變，我們利用聚合酶連鎖反應進行偵測。首先製備菌株的染色體 DNA。將卡介苗菌株培養後，

收集菌體，以 lysozyme 酵素在高張溶液下破壞細菌細胞壁，再利用蛋白質分解酵素 proteinase K 破壞細胞膜，以釋放細菌內的蛋白質及核酸。進一步以酚/氯仿溶液去除蛋白質，以 RNaseA 分解 RNA，再藉由酒精沉澱，萃取染色體 DNA (Magdalena et al., 1998)。另一種製備染色體的方法為，將  $10^7$  CFU 的菌體收集後，以 100  $\mu$ l 水混懸，直接取 5  $\mu$ l 進入聚合酶連鎖反應 (Bedwell et al., 2001)。RD1 的偵測，是以 ET1 (5'-AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC-3')、ET2 (5'-CTGGCTATATTCCTGGGCCCCGG-3')、ET3 (5'-GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG-3') 為引子進行反應 (Talbot et al., 1997)。Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs) 的偵測，是以 C5 (5'-GCGCGAGAGCCCCGAACTGC-3')、C3 (5'-GCGCAGCAGAAACGTCAGC-3') 為引子進行反應 (Magdalena et al., 1998)。聚合酶連鎖反應之後的產物，以 3% agarose 電泳進行分析。引子的位置見圖一。

除了聚合酶連鎖反應外，為了分析卡介苗菌株繼代後是否發生突變，我們利用核苷酸定序，分析 RD1 及 MIRUs 區域之序列。將上述方法所增殖出來的片段自 agarose 上回收，加入適當引子，再利用 BigDye terminator cycle sequencing kit 進行定序反應，最後以 ABI 310 Genetic Analyzer 解讀序列。

### (三) 卡介苗菌株抗原之定性分析

將卡介苗菌株培養之後，於適當時間收集上清及菌體，利用蛋白質電泳分析，再利用西方雜合法，以肺結核病人的血清，偵測卡介苗的抗原性。定性結果擬同步用來分析每一批抗原的性質，以達到每批抗原均質化的目的。肺結核病人的血清分讓自台中慢性病防治所。

## 二、生物性黏膜佐劑之產製

### (一) 大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位基因的選殖

取腸毒性大腸桿菌 (enterotoxigenic *E. coli*) 於 37°C 增殖培養後，萃取其質體 DNA，並以分別位於忌熱性腸毒素 B 次單位基因 5'端及 3'端的一對引子 ( 5'-TTCGGGATCCCGTATGAATAAAG-3' ; 5'-ATCGGAATTCCCTCCTCTACC-3' )，進行聚合酶連鎖反應。經增殖後的片段，利用設計於引子上的酵素 *Bam*HI 及 *Eco*RI 切割，選殖到原核表現載體 pET-28a(+) 中，成為 pET-LTB。最後經定序無誤後，進行蛋白質的產製。

### (二) 大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位基因之表現及純化

為了取得大量而且純度很高的忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質，我們利用大腸桿菌表現系統進行蛋白質的大量產製。將構築好的表現質體送入大腸桿菌 BL21(DE3)pLysS 中，這一株大腸桿菌內帶有一個嵌在染色體上的 T7 RNA 聚合酶基因，其表現受 *lacUV5* 啟動子控制，因此可以用異丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖甘 (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside ; IPTG) 誘導 T7 RNA 聚合酶的表現，進而大量轉錄 pET 質體上所帶的基因，產生 RNA 及進一步製造蛋白質。此外，菌體內帶有一個 T7 溶解酶基因的質體，T7 溶解酶可抑制 T7 RNA 聚合酶的活性，防止少量的 T7 RNA 聚合酶在 IPTG 誘導前提早表現外來的蛋白質，而對細菌產生毒性或抑制其生長。在經 IPTG 誘導的狀況下，我們可以進一步經親和性層析，將蛋白質純化出來。

### (三) 大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質特性及功能分析

為了瞭解重組型忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的抗原性及功能方面是否與野外型相同，我們進行 GM1-酵素連結免疫吸附試驗分析 (enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)。因忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質對細胞表面糖蛋白 GM1-酵素連結免疫吸附試驗分析具有極高

的親合性 (Spangler, 1992)，因此我們利用 GM1—ELISA 測定並比較野外型與重組型忌熱性腸毒素結合 GM1 的能力。

#### (四) 大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質大量表現條件之探討及純化製程之設定

為了設定產製忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的最佳條件，我們測定兩個變因。第一個為細菌的濃度，首先將細菌培養在新鮮的培養液中，於不同時間加入加入 0.5 mM IPTG 誘導，並同步收集少許菌液，進行濃度 (OD600) 的測定，最後在誘導後 2 小時，收集細菌，進行蛋白質電泳分析。第二個變因為 IPTG 的濃度，將細菌新鮮培養至上述最佳濃度後，分別加入不同濃度 (0.1、0.25、0.5、0.75、1 mM) 的 IPTG，於誘導後 2 小時，收集細菌，進行蛋白質電泳分析。

### 三、生物可分解性微球體口服劑型之製作及物化分析

#### (一) 以溶劑蒸發法製作生物可分解性微球體

利用溶劑蒸發法製備微球體的方法為：將卡介苗抗原 0.25 mg 溶於 50  $\mu$ l 磷酸鹽緩衝液中，將 PLGA 50 mg 溶於 500  $\mu$ l dichloromethane 中，之後將兩者混合，利用均質機在 8500 rpm 的轉速下，混合 2.5 分鐘，以製成 water-in-oil 的微球體。進一步加入 10 ml 之 8% polyvinyl alcohol，利用均質機在 8500 rpm 的轉速下，混合 2.5 分鐘，以製成 water-in-oil-in-water 的微球體。最後將混懸物置於室溫下，利用磁石攪拌器攪拌 16 小時，使溶劑 polyvinyl alcohol 蒸發。微球體經離心收集，再用水清洗後，以冷凍乾燥機乾燥，置於乾燥箱中保存 (Blanco-Prieto et al., 1997)。PLGA 分讓自工研院化學工業研究所，lactide 及 glycolide 的比例為 82:18、85:15、75:25、100:0，分子量介於 68711 至 197996 之間。

## (二) 微球體物化特性之分析

### 1、微球體大小及型態分析

乾燥後的微球體以掃描式電子顯微鏡觀察微球體之表面結構及其孔隙之分佈狀態，並估計微球體的大小。

### 2、微球體回收率及蛋白質包裝率分析

微球體的回收量是藉量測微球體乾燥後的重量所評估出來的，回收率為微球體乾燥後的重量除以原始重量的百分率。蛋白質包裝量，可用以下方法計算。將 1 mg 微球體懸浮於 200  $\mu$ l 之 0.2 N NaOH/0.1% SDS 溶液中，於 37°C 震盪作用 16 小時，使所有蛋白質自微球體中釋放出來，之後離心 10 分鐘，上清中的蛋白質以 Bradford 的方法，測定濃度。包裝量指的是每 mg 微球體所釋放的蛋白質總量。

### 3、微球體體外釋放試驗

將 1 mg 微球體置於 100  $\mu$ l 磷酸鹽緩衝液中，於 37°C 震盪作用，每 1~3 天吸取 50  $\mu$ l 上清液，再加入 50  $\mu$ l 新鮮的磷酸鹽緩衝液，繼續震盪作用。所收集的上清液一方面以 Bradford 的方式測蛋白質濃度，一方面進行蛋白質電泳分析，觀察在不同時間下抗原釋放的情形。

## 結果

### 一、結核桿菌最佳培養條件之建立及抗原之製備

為了獲得大量且具抗原性的卡介苗菌株，我們測定卡介苗在 3 種不同培養基的生長狀況，其中兩種為培養結核桿菌常用的 Middlebrook 7H9 broth 及 Dubos broth，另一種為 GAS (Sonnenberg and Belisle, 1997)。將細菌接種於培養液中後，於 37°C 培養，以 600 nm 波長、MTT 法及菌落數測定細菌的生長曲線。圖二顯示，不管以哪一種方法測定細菌數，以 Middlebrook 7H9 為基質所培養出來的細菌數及活性最佳，其次為 GAS 及 Dubos。此外，在接種後第 3 至 15 天之間，細菌呈現對數生長，因此由 600 nm 可見曲線呈近乎直線上升，而由 MTT 的結果，也可見到細菌的活性非常旺盛。在培養 15 天後，細菌會進入到 stationary phase。因此以下的實驗我們採取卡介苗菌株接種於 Middlebrook 7H9 培養液中，於 37°C 震盪培養 14 天，以作為菌株來源。

因為卡介苗菌株的出現，為牛型結核桿菌經不斷接種繁殖後，造成突變所馴化出來的疫苗株。因此，為了偵測每一批菌株在基因型上的變異性，同時推論目前使用菌株的來源，我們利用聚合酶連鎖反應進行分子鑑定。首先測試染色體製備的方法，細菌的染色體以傳統的方式抽取，並無法利用聚合酶連鎖反應增殖出預期的片段（圖三（A）），推測可能是在染色體純化的過程中，因操作過劇，導致染色體的斷裂。若是將菌體直接加入反應中，不經抽取染色體的繁瑣步驟，則可以成功增殖出產物（圖三（A））。因此之後的反應，我們採取後者的方式製備染色體 DNA。我們選取分讓自疾病管制局的卡介苗菌株 Tokyo 172A 與取自於台中慢性病防治所的卡介苗菌株，首先利用 ET1、ET2、ET3 為引子，偵測 RD1 的區域。因為 RD1 存在於牛型結核桿菌及結核桿菌的染色體中，但卡介苗菌株並不含有 RD1，因此毒力株可以增殖出 150 bp 的片段，而疫苗株可以增殖出 200 bp 的片段，藉由此片段的長度差異，可區別毒力株及疫苗株。圖三（B）顯示，兩

種菌株皆可如預期般，增殖出長約 200 bp 的產物，因此也確定這兩種菌株失去 RD1 區域。進一步，我們利用偵測 MIRUs 片段的長度，推論菌株的來源。MIRUs 含有數段 77-bp repeat region 及數段 53-bp repeat region，可藉由 repeat region 出現的數量，進行類似人類親子鑑定的分子鑑定。圖三 (B) 顯示，兩種菌株皆可增殖出長約 353 bp 的產物，相當於含有 3 段 77-bp repeat region，而不含 53-bp repeat region。比對 Magdalena 等 (1998) 的報告，卡介苗菌株 1173P2、Glaxo、Russian、Moreau、Danish 的 MIRUs 長度約為 276 bp，而日本株為 353 bp，因此由基因型判斷，這兩株卡介苗菌株是源自於日本株。除了聚合酶連鎖反應外，我們分析 RD1 區域 200 bp 片段的核苷酸序列，發現在繼代 1~2 代後，序列並無明顯變異出現 (圖三 (C))，因此，由本項實驗所建立的基礎，可以用來進行每一批卡介苗的品質管制。

為了了解卡介苗菌株的抗原性，我們利用肺結核病人的血清為抗體，加以偵測。圖四顯示，培養上清液及菌體皆呈現相似的圖譜，但在上清液中，可額外發現分子量約 105 kDa 及 45 kDa 的抗原被偵測出來。這個結果顯示，卡介苗菌株生長時會分泌蛋白質，而這些分布在上清液中的蛋白質可與野外菌株交叉反應，因此這些抗原的存在是否可增加卡介苗的免疫原性，值得在下一年度計劃中探討。

## 二、生物性黏膜佐劑之產製

將腸毒性大腸桿菌於 37°C 增殖培養後，萃取其質體 DNA，並以設計好的引子 (分別位於忌熱性腸毒素 B 次單位基因 5'端及 3'端)，進行聚合酶連鎖反應。利用特異性的引子進行反應，可以增殖出長約 483 bp 的忌熱性腸毒素 B 次單位基因。進一步利用設計於引子上的酵素 *Bam*HI 及 *Eco*RI 切割，送入已利用 *Bam*HI 及 *Eco*RI 切割後的載體 pET-28a(+) 中，成為表現質體 pET-LTB。經定序確定無誤後，進行大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的產製。

為了取得大量而且純度很高的忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質，我們利

用大腸桿菌表現系統進行蛋白質的大量產製。首先進行表現最佳條件之測試：在不同 IPTG 濃度(0.1、0.25、0.5、0.75、1 mM)及細菌濃度(OD<sub>600</sub>=0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0)的變因調整下，發現於 IPTG 濃度 0.5 mM、細菌濃度為 OD<sub>600</sub>=0.7 的條件下，可以產生最大量的蛋白質，蛋白質大小如同預估為 11.5 kDa (圖五)。進一步為了設定純化的流程，我們分析利用原核表現系統產製的忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質是否如預期般，以不可溶的方式存在。由結果顯示，在 IPTG 誘導的狀況下，雖然可誘導多量的蛋白質產生，但都以可溶性的狀態存在，因此在純化時只需將細菌打破，即可進入純化步驟。

因為忌熱性腸毒 B 次單位蛋白質可以與 GM1 上的 galactose 結合，因此我們利用親和性樹脂 immobilized D-galactose resin 進行純化。在三小時的操作時間內，可自 1 公升細菌液中，純化出約 1.3 公克之忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質，其純度至少 99% (圖六)。進一步為了瞭解重組型忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的功能方面是否與野外型相同，我們進行 GM1—酵素連結免疫吸附試驗分析。結果顯示隨著蛋白質濃度的增加，吸光值也隨之增加，顯示野外型與重組型忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質都具備與 GM1 結合的能力，而且結合的動力學也非常相似 (圖七)。因此，利用大腸桿菌大量產製的重組型忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質具備與野外型忌熱性腸毒素相同的特性，並具備有容易生產、容易純化的特性，可以應用於產業界的大量生產用。

### 三、生物可分解性微球體口服劑型之製作及物化分析

我們利用不同 lactide-glycolide 比例及不同分子量的 PLGA，將卡介苗培養上清液及卡介苗菌體包覆成為微球體，再測定其物化特性。不同的 PLGA 在回收率、蛋白質包裝率方面，並無明顯的差別 (表一)，包覆上清或菌體也無明顯差別，顯示卡介苗菌株外層的脂質並不會影響 PLGA 的包覆，也確定將全菌包裝成口服微球體的可行性。利用掃描式電子顯微鏡分析微



球體的型態，發現微球體的形狀很均質，幾乎都呈現圓球體，微球體的表面也很光滑，並無明顯孔隙出現，大小皆在 5  $\mu\text{m}$  以下(圖八)。依據 Eldridge 等 (1991) 的研究指出，當微粒體小於 5  $\mu\text{m}$  時，可被位於 Peyer's patches 的巨噬細胞吞噬，輸送到腸繫膜淋巴結，而刺激全身性免疫反應，因此預期微球體在動物試驗上可以引發適當的全身性免疫反應。為了評估微球體崩解的速度，即抗原釋放速度，將微球體置於磷酸緩衝液中，於 37°C 不同時間收集上清液，以測定上清液中的蛋白質濃度。圖九顯示，在第 6~9 天及第 12 天會各快速釋放一次，在 12 天之後，蛋白質會慢慢的被釋放出來，顯示以 PLGA 為包覆材質所製成之微球體具有控制釋放的能力。

## 討論

本計畫利用生物可分解性材質—PLGA—進行卡介苗的包覆，並利用細菌毒素作為黏膜性佐劑，以製作成口服疫苗劑型，希望藉由劑型的改變，改善卡介苗的免疫效力。

卡介苗是利用活的結核桿菌經冷凍乾燥後所製成的弱毒疫苗，因此疫苗的效果與細菌的活性有關，而這項因素也成為每一批號卡介苗品質管制的監測項目。目前被世界衛生組織建議測定卡介苗中細菌活性的方法為計算菌落形成的數量，即計算 CFU (Donikian et al., 1987)，但因為結核桿菌複製一次的時間約需 24 小時，在細菌接種後到菌落形成，往往需要 3~4 週的時間。因此為了快速測定細菌數量，我們嘗試採用 MTT 的方式 (Kairo et al., 1999)。MTT 已被用來測定抗生素對結核桿菌的最小抑菌濃度 (Franzblau et al., 1998)，此外也被用來測定細胞及細菌的活性 (Sladowski et al., 1993)。其原理是利用染劑被細菌代謝形成具有顏色的 formazan，而顏色的深淺與細菌數成正相關，因此可以在 4 天內藉由分光光度計在 570 nm 波長下，測定顏色的深淺，推論細菌的活性。由圖二可見，在進入細菌對數生長期時（第 3 天起），細菌的代謝活性非常旺盛，MTT 會大量的被代謝，因此吸光值顯著增加。但是，MTT 的測定與傳統測定細菌數的方法之間是否也呈現正相關，仍需進一步的實驗證實。

除了細菌數外，世界衛生組織建議對卡介苗的品管項目還包括利用染色進行顯微鏡觀察、證實結核桿菌的抗酸性等 (Donikian et al., 1987)，但利用這些方法並不能區別卡介苗菌株之間及區別卡介苗菌株與其他具致病性的結核桿菌。卡介苗是源自於牛型結核桿菌，利用不同繼代及保存方式所產生的馴化株，其與牛型結核桿菌在基因型及表現型上都具有歧異性 (Zhang et al., 1995)。在 1926 年之前的卡介苗菌株具有分泌 MPB70 抗原、產生 methoxymycolates 的能力，且在染色體上含有兩段 IS986 序列 (Bedwell et al., 2001)，但在 1926 年之後的菌株已失去上述能力。Mahairas 等 (1996)

發現染色體上有一段區域，命名為 RD1，不存在於 6 種卡介苗菌株中，但存在於 1 株牛型結核桿菌及 62 株結核桿菌中，顯示 RD1 區域可以作為區別疫苗株及野外株的標的。因此，我們利用 Talbot 等 (1997) 的方法，使用三種引子 ET1、ET2、ET3 進行 multiplex 聚合酶連鎖反應，其中 ET2 埋設在 RD1 序列內。當染色體來自於野外株時，這三個引子都會與染色體黏合，而產生出 9650 bp 及 150 bp 的片段，其中 9650 bp 片段過長，無法在聚合酶連鎖反應中成功增殖出來，因此只會出現 150 bp 的片段。若是染色體來自於疫苗株，只有 ET1、ET3 會與染色體黏合，因此只會產生 200 bp 的片段。在我們的結果中也呈現疫苗株確實可以增殖出長約 200 bp 的片度，顯示 RD1 可以用來作為區別疫苗株及野生株。

至於卡介苗菌株之間的區別，Magdalena 等 (1998) 證實結核桿菌染色體上有一段區域，*senX3-regX3* intergenic region (IR)，含有 77 bp 及 53 bp mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRUs)，所有野生株皆含有 53 bp MIRUs，疫苗株沒有，此外不同疫苗株含有數量不等的 77 bp MIRUs，例如卡介苗菌株 1173P2 及 Glaxo 含有兩段 77 bp MIRUs、日本株含有 3 段 77 bp MIRUs、Prague 及 Montreal 含有 1 段 77 bp MIRUs，顯示這段區域可以用來區別疫苗株的來源，同時可以用來作為每一批卡介苗的基因型管制。藉由 C5 及 C3 兩個引子，我們發現卡介苗菌株可增殖出長約 353 bp 的片段，相當於含有 3 段 77 bp MIRUs，因此由基因型層次上，可以推論測試的疫苗株是起源於日本株。另外，由增殖出來的片段，我們利用核苷酸定序分析，發現繼代 1~2 次的卡介苗菌株，並沒有發生突變現象，但當繼代次數增加時，突變序列是否會出現，這些突變的出現是否會影響每一批疫苗的效力呢？值得進一步追蹤。

為了增加卡介苗的黏膜免疫原性，我們利用大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質作為黏膜性佐劑，以增加口服疫苗的效力。我們選擇 pET 系統進行蛋白質的產製，是因為它有兩個重要的特性。一是具有嚴謹的系統以誘導目標基因表現蛋白質。在 pET 表現系統中，IPTG 必須先誘導宿主表

現 T7 RNA 聚合酶後，再藉 T7 RNA 聚合酶結合到 T7 啟動子上，才能進一步進行基因的轉錄及轉譯，以表現出目標基因，同時 pET 系統會分解少量 T7 RNA 聚合酶，以避免在無 IPTG 誘導的狀態下，因為少量 T7 RNA 聚合酶的產生，造成少量目標基因的表現。另一個特性是，pET 載體可以誘導 N 端或 C 端融合 6 到 10 個連續 histidine 的融合蛋白質表現，這種一連串的 histidine 對含鎳金屬鉗合樹脂具有親和性，因此可以利用親和性層析的方法，將蛋白質純化的步驟單純化。

在純化蛋白質的步驟方面，因為重組型忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質為 N 端含有 6 個 histidine 的融合蛋白質，另外因為忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質具有與糖基 galactose 結合的能力，因此我們利用含鎳金屬鉗合樹脂及 galactose resin 兩種樹脂進行親合性色層分析法。經由一連串的純化步驟後，我們發現只有利用 galactose resin 才能純化出忌熱性腸毒素。Sixma 等 (1991) 利用 X-ray 繞射分析忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的結果顯示，在蛋白質立體結構中，N 端被折疊在內部，而 C 端暴露在外，位於 N 端的 histidine 因為無法暴露，所以不能順利與鎳結合，因此經由其他學者的立體結構分析，與我們進行純化的分析，得到相同的結論。

口服劑型包覆材質及包覆方法的選擇是取決於蛋白質的溶解度。本計畫所用的 water-in-oil-water 包覆方法已被用來包覆親水性藥物 (Pradhan and Vasavada, 1994)，在包覆疫苗上，也呈現可以減低發炎反應的副作用而增加疫苗的效力 (Blanco-Prieto et al., 1994)。而利用 PLGA 為包覆材質，可以成功地製作成小於 5  $\mu\text{m}$ 、表現光滑的微球體，在釋放試驗中，顯示微球體會以類似初次免疫及補強免疫作用一般，在第 6~9 天及第 12 天各快速釋放蛋白質一次，而在 12 天之後，微球體會以類似鋁膠佐劑的作用，慢慢地釋放蛋白質。至於微球體在動物試驗中，是否如預期般，可以造成上述的效應，值得進一步研究。

## 結論與建議

本計畫利用生物可分解性基材—poly-DL-(lactide-co-glycolide) (PLGA)—為基礎，併合基因工程技術生產黏膜免疫性佐劑，完成生物可分解性口服卡介苗之開發。由本計畫的執行，得到以下結論：

- 一、菌種的分子鑑定：利用聚合酶連鎖反應及核苷酸定序分析分讓自疾病管制局的卡介苗菌株，發現測試的菌株源自於日本株。因此，由本項實驗所建立的基礎，可以用來進行每一批卡介苗的品質管制。
- 二、卡介苗菌株的最佳培養條件及抗原之製備：卡介苗菌株以 Middlebrook 7H9 為基質所培養出來的細菌數及活性最佳，在接種後第 3 至 15 天之間，細菌呈現對數生長，且在繼代 1~2 代之後，並無明顯的突變發生。在卡介苗菌株的抗原性方面，我們發現在上清液中，可偵測到分子量約 105 kDa 及 45 kDa 的抗原，顯示卡介苗的成分除了菌體外，增加上清液的成分可能可以增加免疫原性。
- 三、生物性黏膜佐劑之產製：將大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位基因利用聚合酶連鎖反應選殖，利用大腸桿菌表現系統進行蛋白質的表現及純化，可以自 1 公升細菌液中，純化出約 1.3 公克之忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質，而由 GM1—酵素連結免疫吸附試驗分析，發現重組型忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質具備與野外型忌熱性腸毒素相同的特性。
- 四、生物可分解性微球體口服劑型之製作及物化分析：不同的 PLGA 在回收率、蛋白質包裝率方面，並無明顯的差別，利用掃描式電子顯微鏡分析微球體的型態，發現微球體的形狀很均質，幾乎都呈現圓球體，微球體的表面也很光滑，並無明顯孔隙出現，大小皆在 5  $\mu$ m 以下，在抗原釋放分析方面，發現在第 6~9 天及第 12 天會各快速釋放一次，在 12 天之後，蛋白質會慢慢的被釋放出來，顯示以 PLGA 為包覆材質所製成之微球體具有控制釋放的能力。

建議:由各種病原基因體定序計畫已揭示重要病原的致病抗原基因。本計畫所使用之卡介苗與巴斯德原始研發之卡介苗菌株在基因體上已有差異，是否在保護力價及臨床使用上會造成影響，值得探討。

## 參考文獻

- Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA: Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine* 2001;19:2146-51.
- Blanco-Prieto MJ, Delie F, Fattal E, Tartar A, Puisieux F, Gulik A, Couvreur P: Characterization of V3 BRU peptide-loaded small PLGA microspheres prepared by a (W<sub>1</sub>/O)W<sub>2</sub> emulsion solvent evaporation method. *Int J Pharm* 1994;111:137-45.
- Blanco-Prieto MJ, Fattal E, Gulik A, Dedieu JC, Roques BP, Couvreur P: Characterization and morphological analysis of a cholecystinin derivative peptide-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by a water-in-oil-in-water emulsion solvent evaporation method. *J Control Rel* 1997;43:81-7.
- Bosio CM, Orme IM: Effective, nonsensitizing vaccination with culture filtrate proteins against virulent *Mycobacterium bovis* infections in mice. *Infect Immun* 1998;66:5048-51.
- Calmette A, Weill-Halle B, Saenz A, Costil L: Demonstration experimentale du passage des bacilles-vaccins BCG a travers la muqueuse de l'intestin chez l'enfant et chez le singe. *Bull Acad Med* 1933;110:203-12.
- Centers for Disease Control: Estimates of future global tuberculosis morbidity and mortality. *Morbidity Mortal Weekly Rep* 1993;42:961-4.
- Cox JC, Coulter AR: Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 1997;15:248-56.
- de Haan L, Holtrop M, Verweij WR, Agsteribbe E, Wilschut J: Mucosal immunogenicity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: role of the A subunit. *Vaccine* 1996;25:260-6.
- Donikian R, Gheorghiu M, Jablokova TB: Requirements for dried BCG vaccine.

*WHO Technical Report Series* 1987;745:60-92.

Dorman SE, Holland SM: Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Invest* 1998;101:2364-9.

Eldridge JH, Gilley RM, Staas JK, Moldoneanu Z, Meulbroek JA, Tice TR: Biodegradable microspheres: vaccine delivery system for oral administration. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989;146:59-66.

Eldridge JH, Meulbrowk JA, Staas JK, Tice TR, Gilley RM: Vaccine-containing biodegradable microsphere specifically enter the gut-associated lymphoid tissue following oral administration and induce a disseminated mucosal immune response. *Adv Exp Med Biol* 1989;251:192-202.

Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, McGhee JR, Tice TR, Gilley RM: Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Mol Immunol* 1991;28:287-94.

Fine PEM: Variation in protection by BCG-implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995;346:1339-45.

Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH: Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol* 1998;36:362-6.

Fujimura Y: Functional morphology of microfold cells (M cells) in Peyer's Patches-phagocytosis and transport of BCG by M cells into rabbit Peyer's patches. *Gastroenterol Jpn* 1986;21:325-35.

Hsieh DST: "Control Release Systems: Fabrication Technology", Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988.

Kairo SK, Bedwell J, Tyler PC, Carter A, Corbel MJ: Development of a



- tetrazolium salt assay for rapid determination of viability of BCG vaccines. *Vaccine* 1999;17:2423-8.
- Kaufmann SHE: Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* 2000;6:955-60.
- Kochi A: The global tuberculosis infections and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991;72:1-6.
- Komase K, Tamura SI, Matsuo K, Watanabe K, Hattori N, Odaka A, Suzuki Y, Kurata T, Aizawa C: Mutants of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 1998;16:248-54.
- Lagranderie M, Balazuc AM, Gicquel B, Gheorghiu M: *Mycobacterium bovis* BCG simian immunodeficiency virus nef induces local and systemic cytotoxic T-lymphocyte responses in mice. *J Virol* 1997;71:2303-9.
- Lagranderie M, Chavarot P, Balazuc AM, Marchal G: Immunogenicity and protective capacity of *Mycobacterium bovis* BCG after oral or intragastric administration in mice. *Vaccine* 2000;18:1186-95.
- Lewis DH: Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems" (M. Chasin and R. Langer, eds.), pp. 1-41. Dekker, New York, 1990.
- Lotte A, Wasz-Hockert O, Poisson N, Dimitrescu N, Vernon M, Couvet E: BCG complications: estimates of the risks among vaccinated subjects and statistical analysis of their main characteristics. *Adv Tuberc Res* 1984;21:107-93.
- Magdalena J, Supply P, Locht C: Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1998;36:2471-6.
- Magdalena J, Vachee A, Supply P, Locht C: Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1998;36:937-43.

- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK: Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996;178:1274-82.
- McGee JP, Stanley SD, O'Hagan DT: Zero order release of protein from poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles prepared using a modified phase separation technique. *J Control Rel* 1995;34:77-86.
- Morris W, Steinhoff MC, Russell PK: Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation. *Vaccine* 1994;12:5-11.
- Orme IM, Andersen P, Boom WH: T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1993;167:1481-97.
- Pradhan RS, Vasavada RC: Formulation and *in vitro* release study on poly(DL-lactide) microspheres containing hydrophilic compounds: glycine homopeptides. *J Control Rel* 1994;30:143-54.
- Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, Wartna ES, van Zanten BAM, Witholy B, Hol WGJ: Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* 1991;351:371-7.
- Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M: An improved MTT assay. *J Immunol Methods* 1993;157:203-7.
- Sonnenberg MG, Belisle JT: Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun* 1997;65:4515-24.
- Spangler BD: Structure and function of cholera toxin and related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 1992;56:622-47.
- Takahashi I, Marinaro M, Kiyono H, Jackson RJ, Nakagawa I, Fujihashi K, Hamada S, Clements JD, Bost KL, McGhee JR: Mechanisms for mucosal immunogenicity and adjuvancy of *Escherichia coli* labile enterotoxin. *J Infect*

*Dis* 1996;173:627-35.

Talbot EA, Williams DL, Frothingham R: PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 1997;35:566-9.

Truitt RL, Hanke C, Radke J, Mueller R, Barbieri JT: Glycosphingolipids as novel targets for T-cell suppression by the B subunit of recombinant heat-labile enterotoxin. *Infect Immun* 1998;66:1299-308.

Wilkinson KA, Belisle JT, Mincek M, Wilkinson RJ, Toossi Z: Enhancement of the human T cell response to culture filtrate fractions of *Mycobacterium tuberculosis* by microspheres. *J Immunol Methods* 2000;235:1-9.

World Health Organization. The world health report 1999: making a difference. Geneva: World Health Organization.

Zhang Y, Wallace RJ, Mazurek GH: Genetic differences between BCG substrains. *Tuberc Lung Dis* 1995;76:43-50.

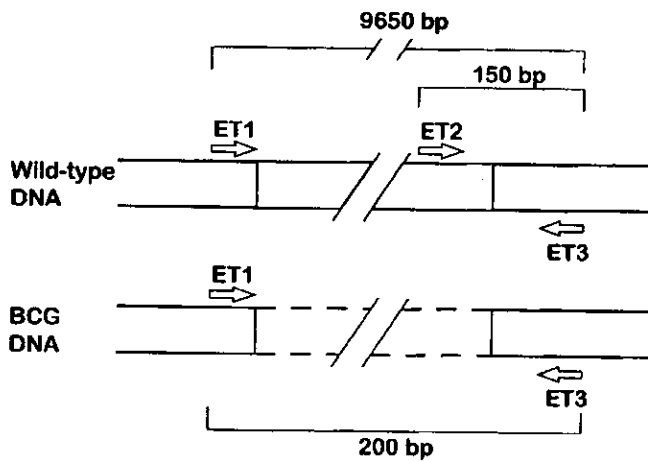
表一 微球體的回收率及包裝量

編號	蛋白質來源	Lactide/ glycolide	PLGA 分子量	回收率 (%) <sup>a</sup>	包裝量 ( $\mu$ g/mg 微球體) <sup>b</sup>
1P	菌體	82/18	197996	22.6 $\pm$ 12.4	31 $\pm$ 1.4
1L	上清	82/18	197996	36.4 $\pm$ 23.5	23 $\pm$ 9.9
2P	菌體	85/15	89015	26.4 $\pm$ 5.4	33 $\pm$ 12.7
2L	上清	85/15	89015	28.7 $\pm$ 2.4	23 $\pm$ 21.2
3P	菌體	85/15	68711	32.9 $\pm$ 11.4	23 $\pm$ 9.9
3L	上清	85/15	68711	32.1 $\pm$ 11.2	20 $\pm$ 14.1
4P	菌體	85/15	163448	32.1 $\pm$ 1.3	20 $\pm$ 11.3
4L	上清	85/15	163448	27.8 $\pm$ 2.3	13.6 $\pm$ 7.9
5P	菌體	75/25	85915	35.8 $\pm$ 11.6	20 $\pm$ 11.3
5L	上清	75/25	85915	32.3 $\pm$ 4.9	10 $\pm$ 5.1
6P	菌體	100/0		25.1 $\pm$ 11.12	33 $\pm$ 4.2
6L	上清	100/0		19.7 $\pm$ 13.2	21 $\pm$ 4.2

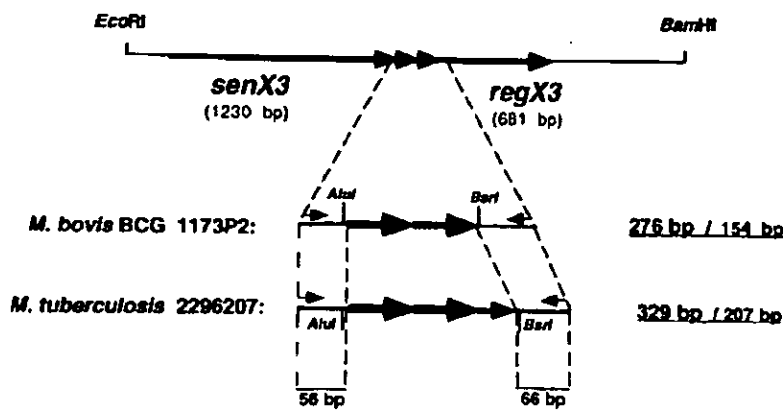
<sup>a</sup> 回收率為微球體乾燥後的重量除以原始重量的百分率，數值為兩次實驗平均值 $\pm$ 標準差。

<sup>b</sup> 包裝量為每 mg 微球體中的蛋白質重量，數值為兩次實驗平均值 $\pm$ 標準差。

(A)

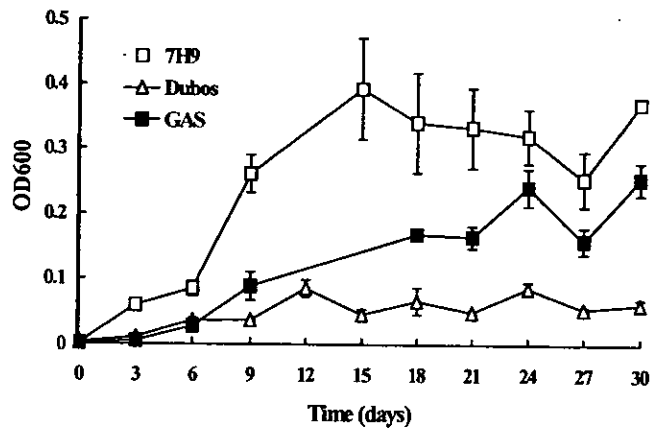


(B)

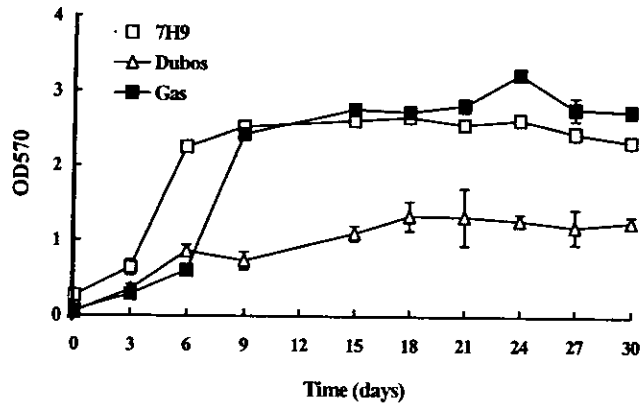


圖一 卡介苗菌株分子鑑定所設計引子的位置。(A) ET1、ET2、ET3 引子的相對位置。這三個引子主要偵測染色體上 RD1 區域的出顯與否，野生株可增殖出長度約 150 bp 的片段，疫苗株可增殖出約 200 bp 的片段 (Talbot et al., 1997)。(B) C5、C3 引子的相對位置。這兩個引子主要偵測染色體上 MIRUs 區域的長度，野生株可增殖出長度約 566、483、406、329 或 207 bp 的片段，疫苗株可增殖出約 353、276、154 bp 的片段 (Magdalena et al., 1998)。

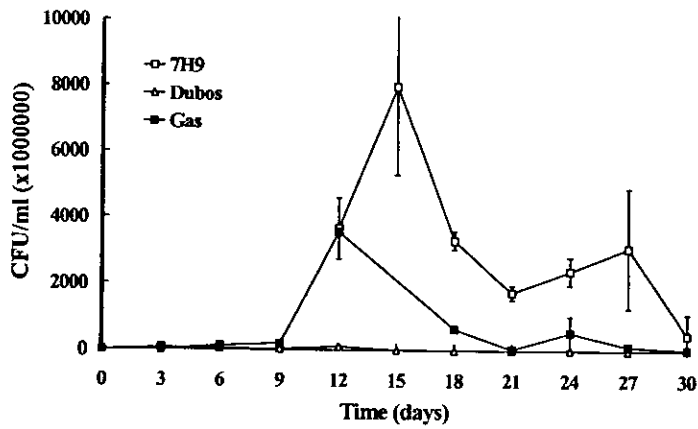
(A)



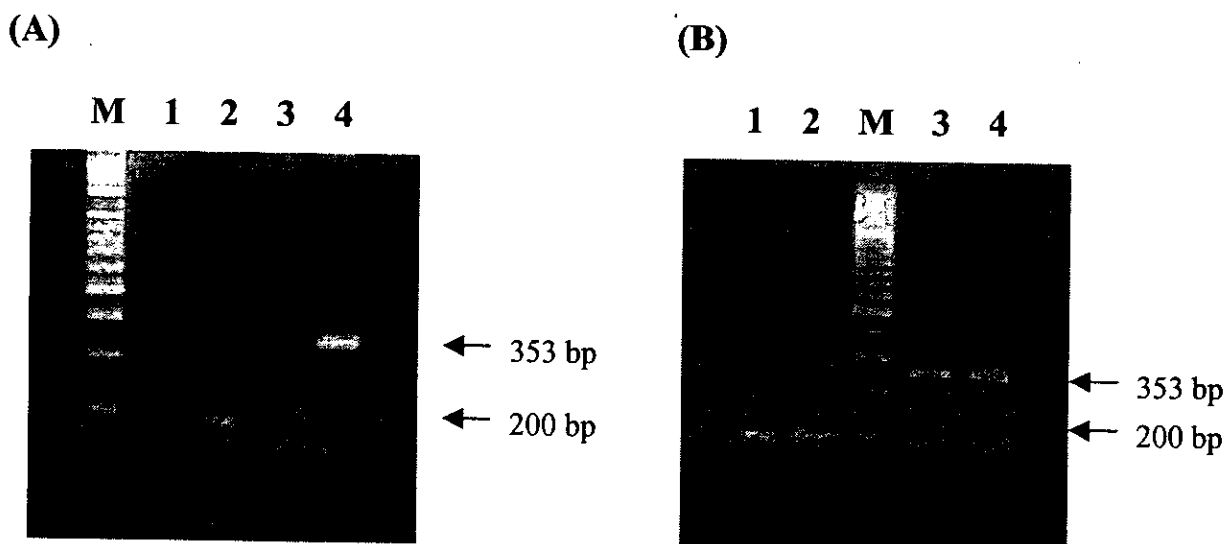
(B)



(C)



**圖二** 卡介苗菌株的生長曲線。將細菌接種於 Middlebrook 7H9、Dubos 及 GAS 中，每三天吸取菌液，利用 (A) 600 nm 波長測定濁度、(B) MTT 在 570 nm 波長下測定細菌數、(C) 菌落數，測定其生長曲線。所有數值為三次實驗的結果，結果以平均值±標準差表示。

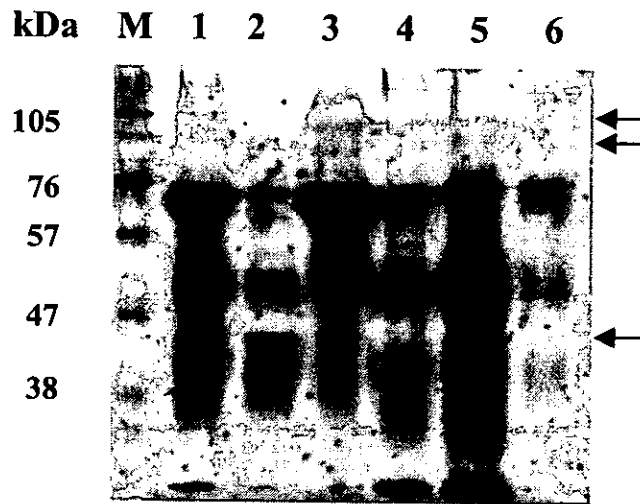


(C)

```
TGCGACGGCGCAGCTCGCTCGCGTTCGTGGTGGAGCGGATTTGCGTC
GTGCTTCTGGTCGACGATTGGCACATCCAGCCGCCCGGATCCAGCATC
TGTCTGGCATAGCTGCCCGTCGGCCTGGTAATACTCATCCCCTACTGCC
CTCCCCAAACCGCCAGATCGCCTCAAAG
```

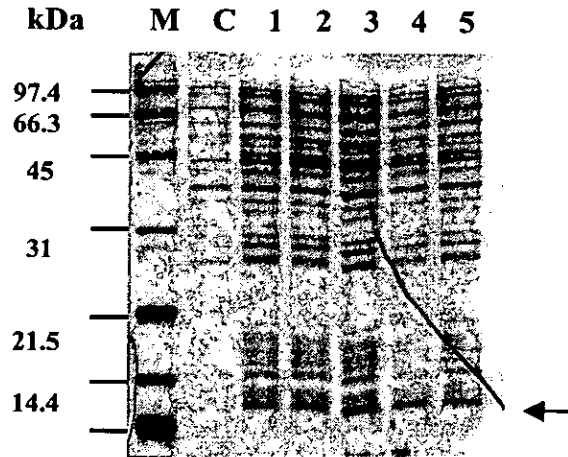
**圖三 卡介苗菌株的分子鑑定。**(A) 染色體製備方式的探討。將卡介苗菌株收集後，利用傳統抽取染色體 DNA 的方法 (lanes 1、3) 或是直接加入菌體至聚合酶連鎖反應中 (lanes 2、4)，以 ET1/2/3 為引子，偵測 RD1 片段 (lanes 1、2)，或是以 C5/C3 為引子，偵測 MIRUs 片段的長度 (lanes 3、4)。(B) 卡介苗菌株 RD1 及 MIRUs 片段的偵測。將取自疾病管制局的卡介苗菌株 Tokyo 172A (lanes 1、3) 與取自於台中慢性病防治所的卡介苗菌株 (lanes 2、4) 收集後，直接加入聚合酶連鎖反應中，以 ET1/2/3 為引子，偵測 RD1 片段 (lanes 1、2)，或是以 C5/C3 為引子，偵測 MIRUs 片段的長度 (lanes 3、4)。聚合酶連鎖反應的產物以 3% agarose 電泳分析後，以 ethidium bromide 染色。Lane M 表示 100-bp 標誌，箭頭表示產物的長度。(C) 核苷酸序列分析。將疾病管制局卡介苗菌株 RD1 區域的 200 bp 片段，以 cycle sequencing 的方式分析其核苷酸序列。



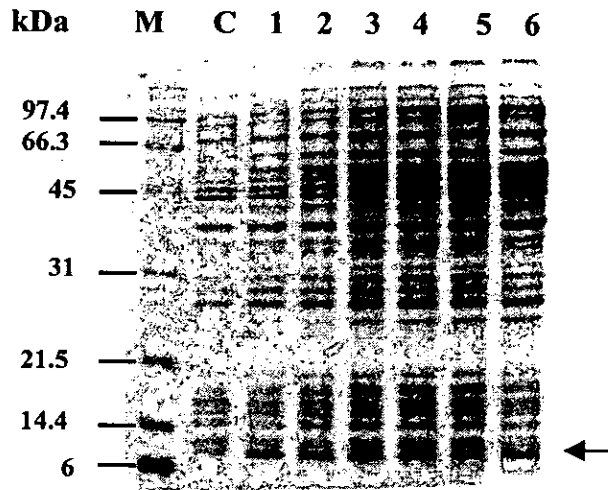


圖四 卡介苗菌株的抗原性分析。將卡介苗菌株接種於 Middlebrook 7H9 (lanes 1、4)、GAS (lanes 2、5)、Dubos (lanes 3、6) 中，於 37°C 培養 14 天後，分別收集上清液 (lanes 1~3) 及菌體 (lanes 4~6)。將蛋白質利用蛋白質電泳分析，轉印到濾紙後，以肺結核病人的血清為抗體，進行西方雜合反應。箭頭所指為在上清液中可被偵測到的抗原。Lane M 為蛋白質標誌，分子量標示在左邊。

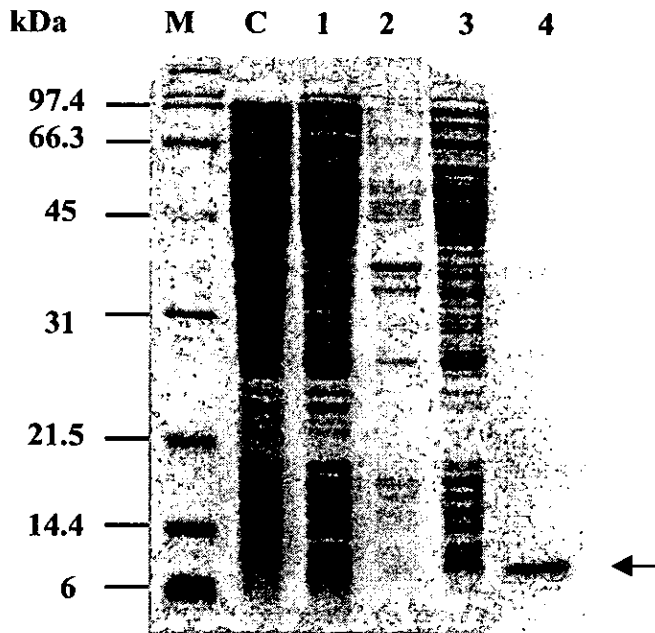
(A)



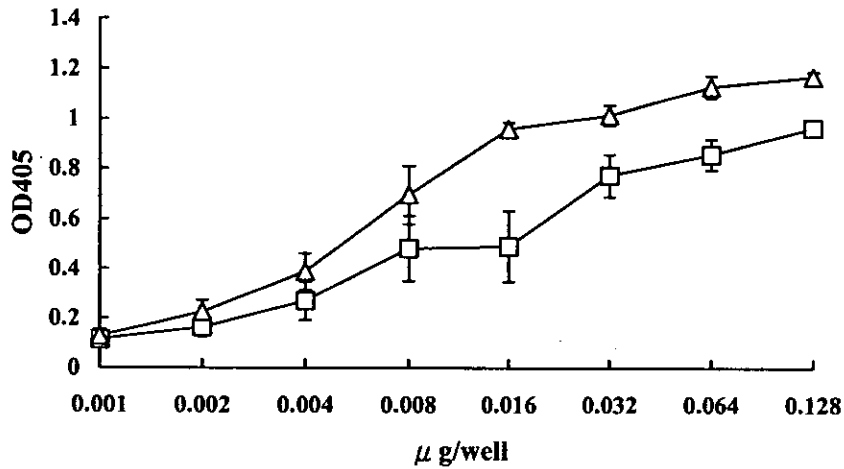
(B)



圖五 大腸桿菌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質最佳表現條件之測試。(A) IPTG 濃度的測試。在細菌濃度為  $OD_{600}=0.7$  時，加入 0.1 mM (lane 1)、0.25 mM (lane 2)、0.5 mM (lane 3)、0.75 mM (lane 4) 及 1 mM (lane 5) 的 IPTG，誘導後 2 小時，收集細菌以蛋白質電泳分析。(B) 細菌濃度的測試。在細菌濃度為  $OD_{600}=0.5$  (lane 1)、0.6 (lane 2)、0.7 (lane 3)、0.8 (lane 4)、0.9 (lane 5)、1.0 (lane 6) 時加入 0.5 mM IPTG，誘導後 2 小時，收集細菌以蛋白質電泳分析。Lane M 表示蛋白質標誌，分子量標示在左。Lane C 為不加 IPTG 之對照組。箭頭表示大腸桿菌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的位置。

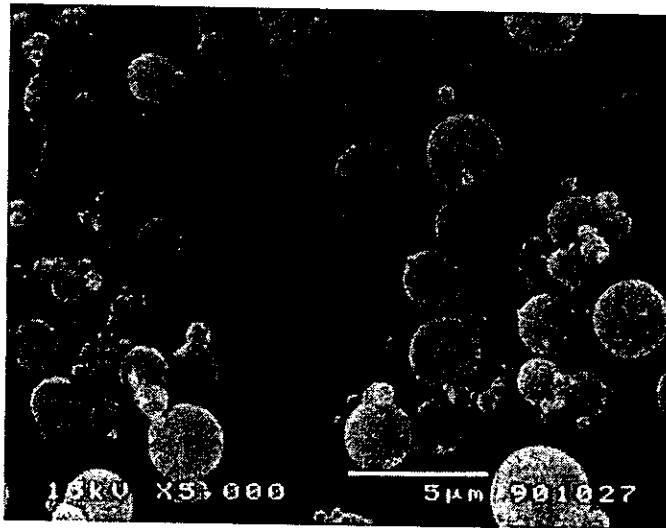


圖六 大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的純化。將細菌誘導後，收集可溶性 (lane 1) 及不可溶性 (lane 2) 蛋白質，再取可溶性蛋白質，利用親合性樹脂加以純化。未與樹脂結合之非特異性蛋白質 (lane 3) 及純化後之蛋白質 (lane 4) 分別用蛋白質電泳分析。Lane M 表示蛋白質標誌，分子量標示在左。Lane C 為不加 IPTG 之對照組。箭頭表示大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的位置。

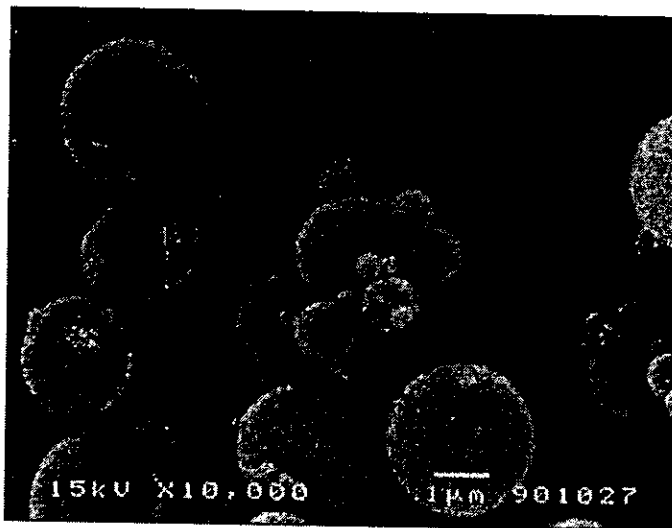


圖七 GM1—酵素連結免疫吸附試驗。酵素連結免疫吸附平盤上先吸附不同濃度的 GM1，再分別加入野生型 ( $\Delta$ ) 及重組型 ( $\square$ ) 大腸桿菌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質進行結合，最後加入受質，於 405 nm 波長下測定吸光值。所列之數值為三次實驗所得之平均值 $\pm$ 標準偏差。

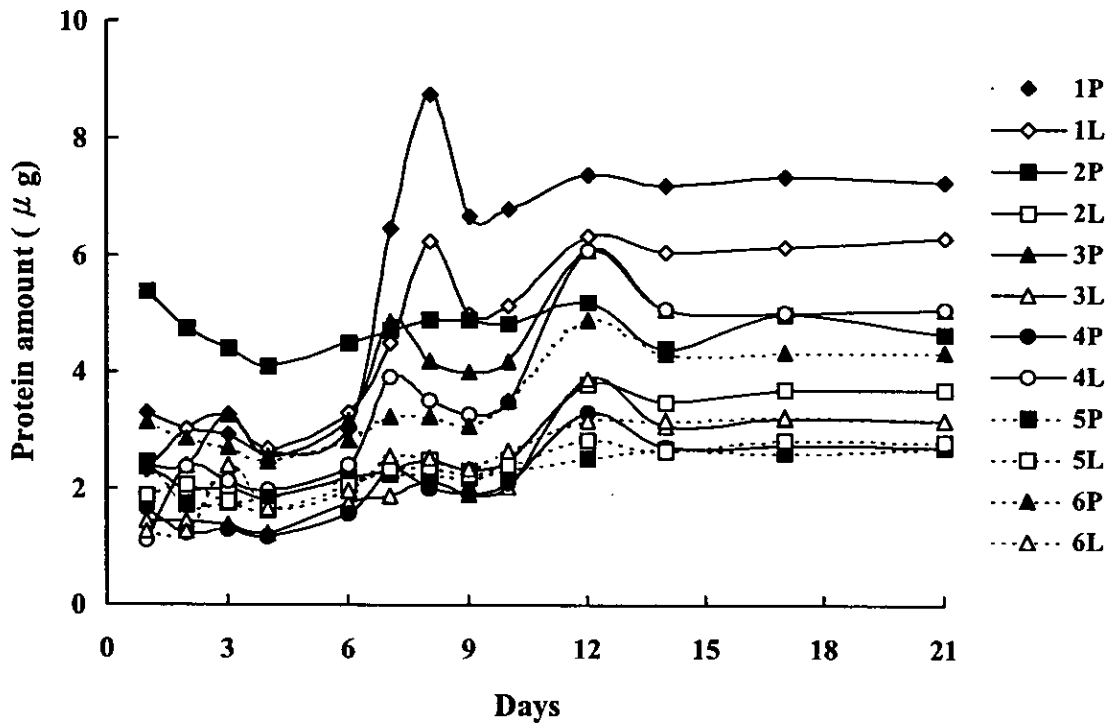
(A)



(B)



圖八 微球體的型態分析。將 1L 的樣品利用掃描式電子顯微鏡放大 5000 倍 (A) 及 10000 倍 (B) 分析，圖中的 bar 分別代表 5  $\mu\text{m}$  及 1  $\mu\text{m}$  的大小。1L 樣品的特性見表一。



圖九 微球體的釋放速率。將 1 mg 微球體混懸於 100  $\mu$ l 磷酸鹽緩衝液中，每 1~3 天收集上清液，測定蛋白質的累積量。組別與表一相同。