

# 發明專利說明書

※申請案號：

※申請日期：

※IPC分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

兩種新基因型態的ESBLs之TEM

二、申請人：共 人

指定為應受送達人

三、發明人：

◎專利代理人：

四、聲明事項

主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

主張專利法第二十六條微生物：

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存

五、中文發明摘要：

本發明提供兩種ESBL之TEM基因型(財團法人食品工業發展研究所，專利微生物寄存編號CCRC910158、CCRC910159)，包括第1-1圖至第1-4圖所示之核酸序列，係由臨床之多重抗藥性葛蘭氏陰性菌分離。此外，本發明亦提出一種篩檢具有廣效性 $\beta$ -內醯胺( $\beta$ -lactame)類抗生素抗藥性菌株之分子檢測法可取代昂貴之DNA序列分析方法，此分子檢測法係根據本發明之ESBL之兩種TEM突變基因型設計雜交探針。另一方面，本發明又提出一種新基因型態TEM所表現之蛋白質，係分別由根據本發明之ESBL之兩種TEM突變基因型之表現而成，可利用此蛋白質對於抗生素的抗藥特性作為新抗生素開發之測試及設計模式。

六、英文發明摘要：

七、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：

(二) 本代表圖之元件代表符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

本發明是有關於兩種TEM突變序列型之ESBL基因，且特別是有關於此兩種突變序列於分子檢測上之應用。

抗藥性細菌隨著新抗生素的發明及大量使用，種類日益增加的問題，已成為一全球性之課題。在台灣，由於用藥習慣以及抗生素濫用情況普遍，抗生素菌株產生之速率相較歐、美等已開發國家快速，且具區域性之特徵。臨床上經常發現各種多重抗藥性的菌株，讓醫生面臨“無藥可用”的困境。

$\beta$ -內醯胺( $\beta$ -lactame)類抗生素是目前臨床上經常使用的一類抗生素，但目前已存在有多種 $\beta$ -

內醯胺分解酵素( $\beta$ -lactamase)，造成抗藥性的問題。其中對廣效性 $\beta$ -內醯胺類抗生素具有抗藥性之菌株，因具有extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs)，且機轉是藉由質體(plasmid)所控制，此種ESBL產生之抗藥性菌株，不但傳播快速，序列又容易產生突變，在臨床的診斷、治療和感染預防控制上，造成相當大的衝擊。

ESBLs之TEM的基因型，在1965年發表第一個TEM-1序列後，因臨床抗生素使用的篩選壓力，時至今日，已產生多達九十種的突變序列型(TEM-1至TEM-90)(Lahey Clinic's table, Last updated Sep-15-2000)。這些不同基因型的TEM，過去多發表於文獻或會議中。未來在抗生素的繼續使用下，將會產生更多不同基因型態的TEM。但目前尚未建立分子檢測方法，利用偵測TEM的序列，做為抗藥性測試依據。

為舒緩抗藥性菌株產生之速度，同時解決抗生素濫用之情形，進而研發新型抗生素對抗新的抗藥性菌株。本發明之主要目的致力於台灣地區ESBLs中TEM基因型之研究，藉由台灣地區新基因型態TEM的發現，利用其特殊序列與抗藥性特徵間之關係，做為新的分子檢測模式，可用來進行臨床抗藥菌株流行病學的篩檢。未來分子快速檢測方法的應用，更可提供臨床用藥前的參考，以避免無效抗生素的濫用，節省醫療成本，減緩抗藥性基因產生的速率。另一方面，新抗藥性基因型的發現，可幫助了解抗藥性基因之發生機轉，應用於新型態抗生素的研發。

有鑑於此，本發明的目的在提供兩種ESBL之TEM基因型，包括第1-1圖至第1-4圖所示之核酸序列，係由臨床之多重抗藥性葛蘭氏陰性菌分離。

根據本發明之另一目的，提出一種篩檢具有廣效性 $\beta$ -內醯胺類抗生素抗藥性菌株之分子檢測法，係根據第1-1圖至第1-4圖所示之核酸序列之ESBL之兩種TEM突變基因型設計雜交探針。

本發明之另一目的在於提出一種ESBL，係分別由包含1-1圖至第1-4圖所示之核酸序列表現而成。為讓本發明之上述目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉一較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

[圖式簡單說明]

第1-1圖至第1-4圖繪示依照本發明之兩種新基因型態的ESBLs之TEM之核酸序列，TypeA與TypeB。

第2圖所示是BMEC001(含TypeA TEM)為偵測標的物進行雜交反應的結果。

第3圖是BMEC002(含TypeB TEM)為偵測標的物進行雜交反應的結果。

## 較佳實施例

實施例一：利用序列分析偵測依照本發明之兩種基因型態的ESBLs之TEM，其檢體來源為台灣北部醫院

收集台灣北部醫院臨床不同來源檢體，由其中分離所得之大腸桿菌及克雷氏肺炎桿菌，經16種抗生素的最低抑制濃度(minimal inhibitory concentrations (MICs)特性測試，所用抗生素種類如第一表所示。

Penicillin	Ampicillin
Cephalosporin	Cefazolin
	Cefoperazone
	Cefotaxime
	Ceftazidime
	Cefonicid
	Ceftriaxone
Aminoglycosides	Amikacin
	Gentamicin
	Tobramycin
Macrolides	Aztreonam
Other Antibiotics	Chloramphenicol
	Flomoxef
	Tetracycline
	Sulbenicillin
	Trimeth-sulfameth

第 1 表

由其中挑選對三種以上抗生素產生抗藥性之多重抗藥性菌株59株，包含29株大腸桿菌及30株克雷氏肺炎桿菌。先於LB培養液中，進行菌株培養及保存，然後進行以下實驗。

#### 1. 質體萃取。

將59株菌於3ml的LB培養液進行隔夜培養，菌體經離心收集後，進行質體萃取。利用Viogene's Plasmid DNA Miniprep System (Mini-M) kit，以Alkaline lysis method萃取質體。

#### 2. PCR。

利用萃取所得之質體為模板，進行PCR。引子序列如下：OT3:ATGAGTATTCAACATTTCCG。

OT4:CCAATGCTTAATCAGTGAGG。

取萃取所得之質體100ng及1  $\mu$ M的引子(OT3和OT4)，再加入200  $\mu$ M的dNTP、5  $\mu$ l緩衝液(10倍)及1U Taq polymerase，最終體積為50  $\mu$ l，進行不同溫度的循環反應。先以95°C加熱90秒，再進行95°C加熱30秒、50°C反應30秒、72°C反應1分鐘的三階段作用，共40個循環，最後以72°C反應7分鐘，即完成。

反應完成後，進行明膠(agoras gel)電泳分析，結果發現59株細菌分離之質體中，有57個樣本(96.6%)可複製出一段824bp的核酸片段，推測其含有TEM之基因。

#### 3. 序列分析。

將57個800 bp的核酸片段，以OT3及OT4引子，分別進行5'端及3'端的核酸序列分析。利用BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI PRISM<sup>®</sup>)以PCR方式進行反應，然後於ABI之PRISM 377 DNA Sequencer分析儀中，進行核酸片段的序列分析。

#### 4. 結果分析。

第1-1圖至第1-4圖顯示，依照本發明之兩種基因型態的ESBLs之TEM，Type A與Type B(財團法人食品工業發展研究所，專利微生物寄存編號CCRC910158、CCRC910159)。此外，所得之核酸序列資料，經整理、排列及比較，其中48個與TEM的序列吻合，但有七個位置核酸發生突變(如第2表所示)。59株多重抗藥性菌株之分析結果，如第3表所示。

Nucleic acid	138	228	244	396	475	545	717
a.a.	46	76	82	132	159	182	239
TEM-1	<u>GAG</u> (Glu)	<u>GGT</u> (Gly)	<u>GTT</u> (Val)	<u>GCG</u> (Ala)	<u>CGC</u> (Arg)	<u>GCA</u> (Ala)	<u>GGA</u> (Gly)
TypeA	A (Glu)	C (Gly)	A (Ile)	G (Ala)	T (Cys)	T (Val)	G (Gly)
TypeB	A (Glu)	T (Gly)	G (Val)	T (Ala)	T (Cys)	C (Ala)	G (Gly)

第 2 表

	Sequence			
	PCR	TypeA	TypeB	
<i>E. coli</i>	29	28	8	17
<i>K.</i>	30	29	17	6
<i>Pneumoniae</i>	59	57	25	23

第 3 表

實施例二：利用序列分析偵測依照本發明之TEM ESBLs，其檢體來源為新竹地區醫院收集新竹地區醫院之臨床不同來源檢體中，分離所得之大腸桿菌及克雷氏肺炎桿菌，經抗生素特性測試，挑選多重抗藥性菌株18株，包含10株大腸桿菌及8株克雷氏肺炎桿菌。先於LB medium中，進行菌株培養及保存。

1. 質體萃取。

將18株培養菌體經離心收集後，進行質體萃取。利用Viogene's Plasmid DNA Miniprep System (Mini-M) kit，以Alkaline lysis method萃取質體。

2. PCR。

利用萃取所得之質體為模板，進行PCR。引子序列如下：OT3:ATGAGTATTCAACATTTCCG。

OT4:CCAATGCTTAATCAGTGAGG。

取萃取所得之質體100ng及1 μM的引子(OT3和OT4)，再加入200 μM的dNTP、5 μl緩衝液(10倍)及1U Taq polymerase，最終體積為50 μl，進行不同溫度的循環反應。先以95°C加熱90秒，再進行95°C加熱30秒、50°C反應30秒、72°C反應1分鐘的三階段作用，共40個循環，最後以72°C反應7分鐘，即完成。

反應完成後，進行明膠(agoras gel)電泳分析，結果發現18株細菌分離之質體中，有14個樣本(77.8%)可複製出一段824bp的核酸片段，推測其含有TEM。

3. 序列分析。

將14個800 bp的核酸片段，以OT3及OT4引子，分別進行5端及3端的核酸序列分析。利用BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI PRISM®)以PCR方式進行反應，然後

於ABI之PRISM 377 DNA Sequencer分析儀中，進行核酸片段的序列分析。

#### 4. 結果分析。

所得之核酸序列資料，經整理、排列及比較，其中12個與TEM的序列吻合，且有七個位置核酸發生突變，皆為TypeA之基因型態(如第2表所示)18株多重抗藥性菌株之分析結果，如第4表所示。

		PCR	Sequence	
			TypeA	TypeB
<i>E. coli</i>	10	7	5	0
<i>K. pneumoniae</i>	8	7	7	0
	18	14	12	0

第 4 表

#### 實施例三：利用雜交反應方式偵測本發明之TEM的基因型態

本發明之特殊基因型態的TEM基因，除利用前兩個實施例所列舉之序列分析方式證明及偵測外，亦可利用本發明TEM之特殊序列製作為核酸探針(probe)，由檢體菌株利用PCR所得之TEM基因片段為標的物(target)，採用雜交反應方式，進行特殊序列的偵測。

##### 1. 方法：1-1. 核酸探針之製備

本發明之新基因型態TEM，其所具有之七個突變點，分別設計專一序列的引子。引子序列較佳地可以如下(5' 含amino-linker)，但不限定於此。



1. oligotemA01-1

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACATCGAGCTGGATCTCA

2. oligotemA01-2

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACATCGAACTGGATCTCA

3. oligotemA02-1

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCTATGTGGTGCGGTATT

4. oligotemA02-2

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCTATGTGGCGCGGTATT

5. oligotemA03-1

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATCCCGTGTTGACGCC

6. oligotemA03-2

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATCCCGTATTGACGCC

7. oligotemA04-1

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAACACTGCGGCCAACTTAC

8. oligotemA04-2

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAACACTGCTGCCAACTTAC

9. oligotemA05-1

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATCATGTAACCCGCCTTGA

10. oligotemA05-2

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATCATGTAACCTCGCCTTGA

11. oligotemA06-1

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGATGCCTGCAGCAATGG

12. oligotemA06-2

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGATGCCTGTAGCAATGG

## 14. oligotemA07-2

TTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGCGTGGGTCTCGCG

## 15. oligotemp

TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGATGCTGAAGATCAGTTGG

## 16. oligotemN

TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTCCAGAGCTCAGAGCCAC

將所合成的引子，以2倍SSC(pH7.0)為緩衝液，固定於經醛基化(-CHO)處理之玻片上。

### 1-2. 標的物之製備 1-2-1. PCR產物製備

由檢體分離之菌株BMEC01(含TypeA TEM)及BMEC02(含TypeB TEM)分別萃取質體，取100ng質體及1  $\mu$ M的引子(OT3和OT4)，再加入200  $\mu$ M的dNTP、5  $\mu$ l緩衝液(10倍)及1U Taq polymerase，最終體積為50  $\mu$ l，進行不同溫度的循環反應。先以95°C加熱90秒，再進行95°C加熱30秒、50°C反應30秒、72°C反應1分鐘的三階段作用，共40個循環，最後以72°C反應7分鐘，完成反應，並進行純化。

### 1-2-2. Cy5-單股DNA標的物製備

以純化後的PCR產物為模板，加入1  $\mu$ M的OT4引子、200  $\mu$ M dNTP (dATP、dTTP、dGTP)、180  $\mu$ M dCTP、20  $\mu$ M Cy5-dCTP，5  $\mu$ l緩衝液(10倍)及1U Taq polymerase，最終體積為50  $\mu$ l，進行不同溫度的循環反應。先以95°C加熱90秒，再進行95°C加熱30秒、50°C反應30秒、72°C反應1分鐘的三階段作用，共40個循環，最後以72°C反應7分鐘，完成反應，並進行純化。

### 1-3. 進行雜交反應

取適量的單股Cy5-DNA為雜交的標的物(target)，利用10x SSC及1%SDS為緩衝液，與方法1-1中固定於玻片上之核酸探針，於30°C培養箱中進行二小時的雜交反應。

反應完成後，以1xSSC，1%SDS緩衝液，於室溫下震盪清洗15分鐘，重覆兩次後，再以1xSSC和清水各清洗一次，烘乾後進行結果偵測。

### 1-4. 訊號偵測

將玻片置放於雷射掃瞄器(MicroArray Analysis System, Scan Array<sup>®</sup> 4000, GSi Lumonics)，以633nm波長進行掃瞄。

## 2. 結果：

第2圖所示是BMEC001(含TypeA TEM)為偵測標的物進行雜交反應的結果，由BMEC001含之TEM的質體所複製放大的PCR產物，與根據TypeA TEM序列所設計的雜交探針，能進行正確的雜交反應。第3圖是BMEC002(含TypeB TEM)為偵測標的物進行雜交反應的結果，由BMEC002含之TEM的質體所複製放大的PCR產物，與根據TypeB TEM序列所設計的雜交探針，能進行正確的雜交反應。此結果證明，我們可以利用雜交方式，偵測不同基因型態的TEM。

### 實施例四建立新基因型態TEM的蛋白質表現系統，做為新藥開發測試模式

臨床檢體分離所得之多重抗藥性菌株，除含有質體TEM外，仍有可能含有其他抗藥性質體或基因體上帶有抗藥基因，為避免這些因素的干擾，因此，利用基因選殖之方式，將TEM之coding region以PCR方式複製，並選殖至一蛋白質表現質體中，較佳的是於大腸桿菌株BL21表現。藉由此一表現系統，進行抗生素特性測試，以了解不同基因型態TEM之抗藥特性，此系統未來可成為新藥開發之測試模式。

### 1. 方法：1-1. 構築新基因型態TEM於pET28載體中表現

設計一對專一性序列的PCR引子-OT5及OT6，以PCR方式複製TEM之基因片段，序列如下：

OT5: ATTCTAGATAAATGCTTCAATAATATTGAA OT6: ATAAGCTTCCAATGCTTAATCAGTGAGG 取由含TypeA及

TypeB之TEM的菌株中，分別萃取所得之質體100ng，以及1  $\mu$ M的引子(OT5和OT6)，再加入200  $\mu$ M的dNTP、5  $\mu$ l緩衝液(10倍)及1U Taq polymerase，最終體積為50  $\mu$ l，進行不同溫度的循環反應。先以95°C加熱90秒，再進行95°C加熱30秒、50°C反應30秒、72°C反應1分鐘的三階段作用，共40個循環，最後以72°C反應7分鐘，即完成。可得一約900bp的DNA片段。

所得之PCR產物，經純化後，以限制酵素XbaI及HindIII作用，針對OT5所設計的XbaI site序列和OT6之HindIII site序列進行切割，此DNA片段再和亦具有XbaI及HindIII site序列之vector-pET28a，於16°C進行隔夜的ligation反應。然後將所得之質體轉殖至E. coli的DH5  $\alpha$  strain中，因pET28a上含有karamysine的selection marker，因此可於含有10  $\mu$ g/ml karamysine的LB plate上，進行篩選，所得之cplony的質體，再以限制酵素XbaI及HindIII作用，若含有一段900bp的insert，即證明此質體帶有TypeA或TypeB之TEM的DNA。

構築完成含TypeA或TypeB之TEM的pET28a之質體後，再將此二質體及一對照用之pET28a質體，分別轉殖至E. coli另一-strain BL21(DE3)中，進行蛋白質表現。

#### 1-2. 進行抗生素特性測試

對含pET28a-TEM(typeA)、pET28a-TEM(typeB)以及pET28a的三株E. coli，進行抗生素最低抑制濃度(MIC (minimum inhibitory concentration))測試。三株菌分別塗抹於三個含10  $\mu$ g/ml karamysine的LB plate上，並貼上含有10  $\mu$ g/ml ampicillin的圓形濾紙，於37°C隔夜培養。觀察ampicillin對細菌生長的影响，由抑菌環產生的大小，了解其對ampicillin是否具有抗藥性。

#### 2. 結果

抑菌環的大小如下：

pET28a-TEM(typeA)	8 mm	
pET28a-TEM(typeB)	8 mm	
pET28a	23 mm	(對照組)

由結果發現本發明之TypeA及TypeB TEM對ampicillin具有抗藥性。

#### 【發明效果】

本發明上述實施例所揭露之兩種新基因型態的ESBLs之TEM，具有以下之特點：1. 本發明除了發現所收集之77株多重抗藥性菌株中，有71株(92%)含兩類新的TEM突變序列型之ESBL基因以外。並比較多重抗藥性與特殊之TEM突變序列型間之關係，依據其特殊的突變序列，設計快速篩檢多重抗藥性菌株之分子檢測方法。取代昂貴之DNA序列分析的方法。

2. 本發明收集台灣北部地區醫院之臨床檢體，由其中分離出同時抗三種以上抗生素之抗藥菌株共77株，經分析其ESBL基因之序列，發現具有兩類新型之TEM變異形式，分別含7個從未被報導過之突變位置。

3. 本發明之兩種新基因型態的ESBLs之TEM，可應用於臨床檢驗，建立快速之感染菌多重抗藥性篩檢方法，輔助醫師選用適當之抗生素。除了檢驗方面之應用外，亦可應用於抗藥機制之研究，及新抗生素之研發。

綜上所述，雖然本發明已以一較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

#### 十、申請專利範圍：

1. 一種TEM基因型基因，其核酸序列如下(財團法人食品工業發展研究所，專利微生物寄存編號CCRC910158)：



1 60  
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCT

61 120  
GTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC  
A

121 180  
CGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC

181 240  
GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCC

241 300  
CGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG

301 360  
GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA

361 420  
TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC

421 480  
GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT

481 540  
GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGAT  
G

541 600  
CCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTTAGCT

601 660  
TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC

661 720

TCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT

721 780  
CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC

781 840  
ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGC  
C

841 858  
TCACTGATTAAGCATTGG

2. 如申請專利範圍第1項所述之TEM基因型基因，係由臨床之多重抗藥性葛蘭氏陰性菌分離。

3. 如申請專利範圍第1項所述之TEM基因型基因，係由臨床之多重抗藥性之大腸桿菌(E. Coli)分離。

4. 如申請專利範圍第1項所述之TEM基因型基因，係由臨床之多重抗藥性之克雷氏肺炎桿菌(K. Pneumoniae)分離。

5. 一種篩檢具有廣效性 $\beta$ -內醯胺類抗生素抗藥性菌株之分子檢測法，係根據申請專利範圍第1項所述之TEM基因型基因設計一雜交探針。

6. 如申請專利範圍第5項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTTACATCGAACTGGATCTCA

7. 如申請專利範圍第5項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTTGCTATGTGGCGCGGTATT

8. 如申請專利範圍第5項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTTATCCCGTATTGACGCC1

9. 如申請專利範圍第5項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTTAACACTGCGGCCAACTTAC

10. 如申請專利範圍第5項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTATCATGTAACCTCGCCTTGA

11. 如申請專利範圍第5項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTTCGATGCCTGTAGCAATGG

12. 如申請專利範圍第5項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTTGAGCGTGGGTCTCGCG

13. 一種新基因型態TEM所表現之蛋白質，係為下列序列之核酸序列表現而成：

1 60  
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCT

61 120  
GTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC  
A

121 180  
CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC

181 240  
GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCC

241 300  
CGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG

301 360  
GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA

361 420  
TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC

421 480  
GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT

481 540  
GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGAT  
G.

541 600  
CCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCT

601 660  
TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC

661 720  
TCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT

721 780  
CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC

781 840  
ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGC  
C

841 858  
TCACTGATTAAGCATTGG

14. 如申請專利範圍第13項之蛋白質，可利用該蛋白質對於抗生素的抗藥特性作為新抗生素開發之測試及設計模式。

15. 一種TEM基因型基因，其核酸序列如下(財團法人食品工業發展研究所，專利微生物寄存編號CCRC910159)：

1 60  
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCT

61 120  
GTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC  
A

121 180

CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCC

181 240  
GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCC

241 300  
CGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG

301 360  
GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA

361 420  
TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATC

421 480  
GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT

481 540  
GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGAT  
G

541 600  
CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCT

601 660  
TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC

661 720  
TCGGCCCTTTCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTTGGACCGGTGAGCGTGGGTCT

721 780  
CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC

781 840  
ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGC  
C

841 858  
TCACTGATTAAGCATTGG

16. 如申請專利範圍第15項所述之TEM基因型基因，係由臨床之多重抗藥性葛蘭氏陰性菌分離。



17. 如申請專利範圍第15項所述之TEM基因型基因，係由臨床之多重抗藥性之大腸桿菌(E. Coli)分離。

18. 如申請專利範圍第15項所述之TEM基因型基因，係由臨床之多重抗藥性之克雷氏肺炎桿菌(K. Pneumoniae)分離。

19. 一種篩檢具有廣效性 $\beta$ -內醯胺類抗生素抗藥性菌株之分子檢測法，係根據申請專利範圍第15項所述之TEM基因型基因設計一雜交探針。

20. 如申請專利範圍第19項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTTACATCGAACTGGATCTCA

21. 如申請專利範圍第19項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTTGCTATGTGGTGCGGTATT

22. 如申請專利範圍第19項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTTATCCCGTGTGACGCC

23. 如申請專利範圍第19項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTTAACACTGCTGCCAACTTAC

24. 如申請專利範圍第19項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTATCATGTAACCTCGCCTTGA

25. 如申請專利範圍第19項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTTCGATGCCTGCAGCAATGG

26. 如申請專利範圍第19項所述之分子檢測法，其中該雜交探針之核酸序列為：TTTTTTTTTTTTTTTTTGAGCGTGGGTCTCGCG

27. 一種新基因型態TEM所表現之蛋白質，係為下列序列之核酸序列表現而成：

1 60  
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCT

61 120  
GTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC  
A

121 180  
CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC

181 240  
GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCC

241 300  
CGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG

301 360  
GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA

361 420  
TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATC

421 480  
GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTT

481 540  
GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGAT  
G

541 600  
CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCT

601 660  
TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC

661 720  
TCGGCCCTTTCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTTGGACCGGTGAGCGTGGGTCT

721

780

CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC

781

840

ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGC  
C

841

858

TCACTGATTAAGCATTGG

28. 如申請專利範圍第27項之蛋白質，可利用該蛋白質對於抗生素的抗藥特性作為新抗生素開發之測試及設計模式。

十一、圖式：

	1		60
TEM-1	ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCT		
TypeA	ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCT		
TypeB	ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCT		
Consensus	ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCT		
	61		120
TEM-1	GTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA		
TypeA	GTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA		
TypeB	GTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA		
Consensus	GTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA		
	121		180
TEM-1	CGAGTGGGTTACATCGAGCTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC		
TypeA	CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC		
TypeB	CGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC		
Consensus	CGAGTGGGTTACATCGA CTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCC		
	181		240
TEM-1	GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCC		
TypeA	GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCC		
TypeB	GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCC		
Consensus	GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGG GCGGTATTATCC		

第 1-1 圖

	241		300
TEM-1	CGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG		
TypeA	CGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG		
TypeB	CGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG		
Consensus	CGT TTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG		
	301		360
TEM-1	GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA		
TypeA	GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA		
TypeB	GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA		
Consensus	GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA		
	361		420
TEM-1	TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC		
TypeA	TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC		
TypeB	TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCTGCCAACTTACTTCTGACAACGATC		
Consensus	TGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGC GCCAACTTACTTCTGACAACGATC		
	421		480
TEM-1	GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCCGCCTT		
TypeA	GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCCGCCTT		
TypeB	GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCCGCCTT		
Consensus	GGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC CGCCTT		

## 第 1-2 圖

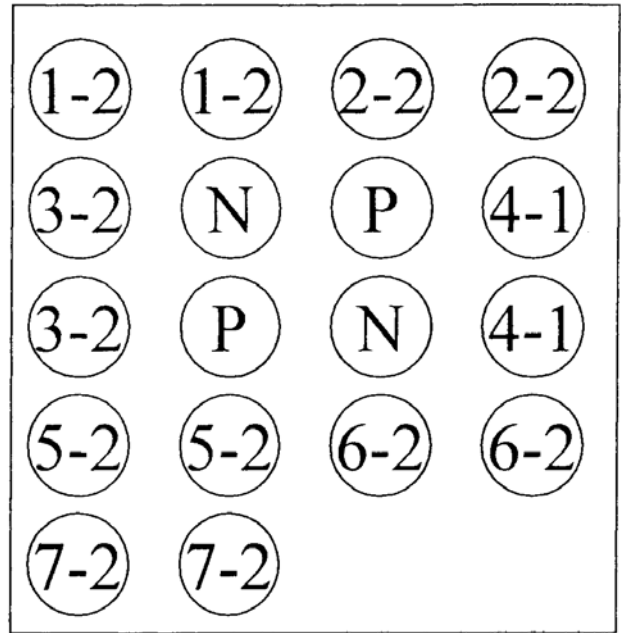
	481		540
TEM-1	GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG		
TypeA	GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG		
TypeB	GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG		
Consensus	GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG		
	541		600
TEM-1	CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCT		
TypeA	CCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCT		
TypeB	CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCT		
Consensus	CCTG AGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCT		
	601		660
TEM-1	TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC		
TypeA	TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC		
TypeB	TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC		
Consensus	TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGC		
	661		720
TEM-1	TCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGATCT		
TypeA	TCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT		
TypeB	TCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT		
Consensus	TCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG TCT		

## 第 1-3 圖

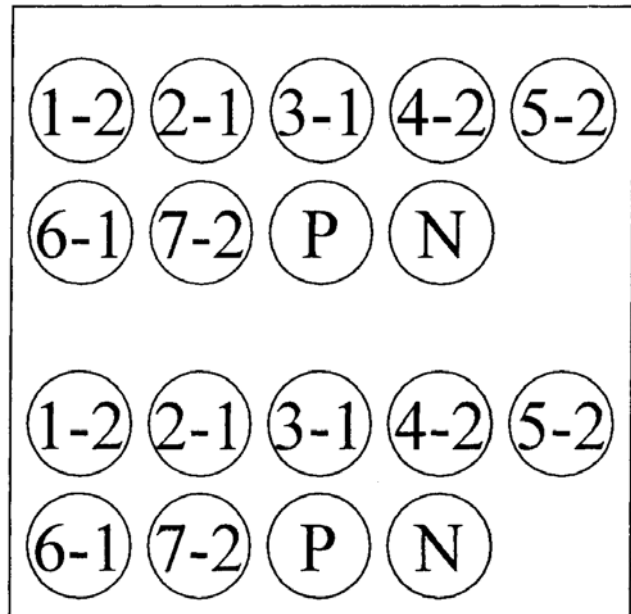
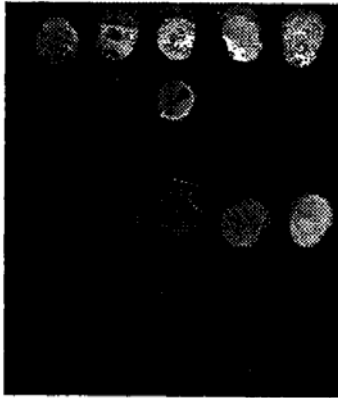


	721		780
TEM-1	CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC		
TypeA	CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC		
TypeB	CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC		
Consensus	CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTAC		
	781		840
TEM-1	ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC		
TypeA	ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC		
TypeB	ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC		
Consensus	ACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCC		
	841	858	
TEM-1	TCACTGATTAAGCATTGG		
TypeA	TCACTGATTAAGCATTGG		
TypeB	TCACTGATTAAGCATTGG		
Consensus (841)	TCACTGATTAAGCATTGG		

## 第 1-4 圖



第 2 圖



第 3 圖