

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

沙門氏豬霍亂桿菌(*Salmonella choleraesuis*) 溶血酶基因 *hly1* 的核苷酸定序及分析

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIS-92-10

執行期間：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

計畫主持人：蘇哲弘

共同主持人：張淑玉

計畫參與人員：

執行單位：生物科技系

中華民國 93 年 2 月 20 日

摘要

溶血酶 *hly1* 基因，經核苷酸序列分析顯示此基因由 756 個核苷酸組成，推論的 252 個氨基酸經過比對，得知它是一種 salt induced outer membrane protein 基因，而其下游含有三個完整的 ORF(open reading fram) ，依序分別對應了 outer membrane protein、inner membrane protein 及 DNase，其中 outer membrane protein 基因的轉錄方向與溶血苷酶 *hly1* 基因相反，inner membrane protein 基因及 DNase 基因間有 25 核苷酸序列是重疊的。

前言

沙門氏桿菌(*Salmonella*)屬中的沙門氏豬霍亂桿菌 (*Salmonella choleraesuis*)，經流行病學的研究，是豬特有的病原菌 (serotype-host specificity)(1,2,3,4)，豬感染後的症狀為高弛張熱，但並無腸胃症狀，細菌可轉移至淋巴組織(Peyer's patch 即小腸淋巴集結)及網狀內皮組織(肝、脾、骨髓)導致系統性的疾病(systemic disease)，並引發致命性的菌血症及敗血症(4,5)。雖然在豬飼料中添加抗菌性的添加物，可以控制經由腸胃道的感染，但卻無法完全杜絕沙門氏豬霍亂桿菌的感染與傳播，其罹患率大約是 10%，但其死亡率卻很高，縱然痊癒，豬隻將變成帶原者(carrier)，進而持續性而不定期的由排泄物釋出病原菌(4)，由於發病期的豬隻及帶原者皆不易診斷及偵測，故造成了豬隻感染的潛在危機及經濟上的損失，非僅如此，感染的豬隻亦是人類感染沙門氏豬霍亂桿菌的病源槽(6)。國外研究指出人類感染沙門氏豬霍亂桿菌，常引發菌血症及敗血症，並多方向轉移，引起膿腫性感染，但並無腸胃性症狀，而死亡率為 16~20%(7,8,9)。

本研究從臨床分離到的 *S. choleraesui* 菌株，選殖到可能的致病因子脂解酶基因 *ly1*，作核苷酸的定序與分析，這對將來 *S. choleraesui* 菌株致病因子之探討，致病機制之解明，皆有相當多的助益。

材料與方法

(1) 構築對人體巨噬細胞致死性較原菌株差之沙門氏豬霍亂桿菌變異株

(a) 以 Transposon Tn5 構築沙門氏豬霍亂桿菌變異株

採用 Hensel 等人所提之方法稍作改變來構築沙門氏豬霍亂桿菌變異株(10)。將帶有 transposon Tn5 質體之大腸桿菌 *E. coli* S17-1 λ pir (Tp^r Sm^r *recA thi pro hsdR* M⁺ RP4:2Tc:Mu:Km T7, λ pir) 和對 Tetracycline 具抗性的 *S. choleraesuis* SC-1 進行接合生殖 (conjugation)。

(b) 篩選對人體巨噬細胞致死性差之沙門氏豬霍亂桿菌變異株

由於被 *Salmonella* spp. 感染之老

鼠或人類巨噬細胞(macrophage)會經由兩個不同的機制引發細胞快速或遲延地凋凌死亡(apoptosis)而釋出 lactate dehydrogenase (LDH) (11)，因此經由巨噬細胞存活試驗(macrophage survival assays)(12)及非放射性細胞毒性試驗(The Cyto Tox 96 non-radioactive cytotoxicity assay) (Promega)(11)試驗，加入 LDH 的受質(substrate)，測 490 nm 的吸光值便可知道 LDH 被巨噬細胞釋出之量，而得知巨噬細胞存活的情形。取 *S. choleraesuis* SC-1 的 Tn5 變異株，感染老鼠的 Bone marrow-derived macrophages(BMMs) 或 Peritoneal macrophages (13)，篩選對老鼠巨噬細胞致死性較原菌株(wild type)差之沙門氏豬霍亂桿菌變異株。

(2) Transposon Tn5 插入位置的分析

抽取各個 Tn5 變異株(*sal*~*sa2* 突變株)的染色體 DNA，分別以 *Bgl*III, *Eco*RI, *Kpn*I, *Pst*I 和 *Sal*I 作切割(transposon 不含有這 5 種限制酶的切割位)，經南方點墨法(Southern hybridization)，以 α -³²P-labeled kanamycin gene 充當探針，選擇經限制酶切割後而含有 transposon 的 DNA 片段，由這些大小不等的 DNA 片段中，找出較適當的長度者(大於 10 kb，小於 20 kb)，經此實驗決定將來的實驗採用 *Eco*RI 來切割 Tn5 變異株的染色體 DNA。

(3) 致病基因(virulence gene)之選殖

以 *Eco*RI 分別切割 Tn5 變異株的染色體 DNA，並將其插入同樣經 *Eco*RI 切割過的 pUC19 質體，將這些重組過的質體 DNA 轉型到 *E. coli* XL1B，經含有 Kanamycin 的培養基篩選得到成功的轉型子(transformant)，將此轉型子的質體 DNA(含有 transposon)抽出，並以 P6 和 P7 引子分別讀出 transposon 側邊之核苷酸序列(10)，此即為致病基因的部分核苷酸序列。

完整致病基因的選殖，乃採用菌落雜交法(colony hybridization)得到，取先前已構築好的 *S. choleraesuis* SC-1 基因庫(將 *S. choleraesuis* SC-1 的染色體 DNA 以 *Sau*3AI 切割成 5~10 kb 大小不等的 DNA 片段，並將其插入經 *Bam*HI 切割過的 pBR322 質體)，轉型到 *E. coli* XL1B，以 α -³²P-labeled 致病基因的部分核苷酸序列充當探針，進行菌落雜交。

結果和討論

接合轉型子(transconjugants)經同時含有 Kanamycin 及 Tetracycline 的培養基篩選得到 2000 株，並檢測其對 Ampicillin 的敏感性，確認其為 *S. choleraesuis* SC-1 的 Tn5 變異株。從這些 Tn5 變異株篩選對老鼠巨噬細胞致死性較原菌株(wild type)差之沙門氏豬霍亂桿菌變異株，得到 6 株 Tn5 變異株分別命名為 *sal*~*sa6* 突變株。用 *Eco*RI 來切割 Tn5 變異株的染色體 DNA，並將其插入同樣經 *Eco*RI 切割過的 pUC19 質體，經含有 Kanamycin 的培養基篩選得到成功的轉型子(transformant)，並以 P6 和 P7 引子分別讀出 transposon 側邊之核苷酸序列。

以 α -³²P-labeled 致病基因的部分核苷酸序列充當探針，進行菌落雜交，將雜交到的菌落質體抽出並加以定序，可得到完整的致病基因。將選殖出含有可能致病基因(virulence gene)的 DNA 片段，進行自動核苷酸序列分析，顯示此 DNA 片段的 Map 圖(Fig. 1)，由四個完整的基因及一個部分的基因所構成。由於 Transposon Tn5 所插入的位置是溶血酶 *hly1* 基因，因此基因的轉型子可使含有綿羊血的培養基產生溶血現象，故命名為溶血酶 *hly1* 基因，而此溶血酶 *hly1* 基因可能是致病基因。

溶血酶 *hly1* 基因，經核苷酸序列分析顯示此基因由 756 個核苷酸組成，推論的 253 個氨基酸經過比對，得知它是一種 salt induced outer membrane protein 基因(Fig. 2)，而其下游含有三個完整的 ORF(open reading fram)，分別對應了轉錄方向與 salt induced outer membrane protein 基因相反的 outer membrane protein 基因(Fig. 3)及轉錄方向與 salt induced outer membrane protein 基因相同的 outer membrane protein 基因(Fig. 4)及 DNase 基因(Fig. 5)，在 DNase 基因之後有一個不完整的 ORF，其對應了 Threonine tRNA synthetase。

由於感染沙門氏豬霍亂桿菌，常引發菌血症及敗血症，而且已知致病基因又常與菌體的滲透壓有關，因此推論溶血酶 *hly1* 基因應該與沙門氏豬霍亂桿菌的致病機制有著密切的關係，而更值得探討的是此基因下游的外膜蛋白基因與內膜蛋白基因的產物，是否與溶血酶的分泌有關，這些相關的證明實驗及此基因與致病機制之關係，則有待將來

進一步的闡明。

參考文獻

1. Lawson, G. H. K., and C. Dow. 1965. The pathogenesis of oral *S. choleraesuis* infection in pigs. J. Comp. Pathol. 75:75-81.
2. Baskerville, A., and C. Dow. 1973. Pathology of experimental pneumonia in pigs produced by *Salmonella choleraesuis*. J. Comp. Pathol. 83:207-215.
3. Griffith, R. W., and T. T. Kramer. 1981. Sensitivity of smooth *Salmonella choleraesuis* var. Kunzendorff field strains to antibody and complement under various conditions. Am. J. Vet. Res. 45:59-66.
4. Wilcock, B. P. and K. J. Schwartz. 1992. Salmonellosis. In diseases of Swine, 7th edn, pp. 570-583. Edited by A. D. Leman and others. Ames, IA: Iowa State University Press.
5. Morehouse, L. G. 1972. Salmonellosis in swine and its control. J. Am. Vet. Med. Assoc. 160:593-601.
6. Berends, B. R., F. van Knapen, J. M. Snijers, and D. A. Mossel. 1997. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. On pork carcasses. Int. J. Food Microbiol. 36:199-206.
7. MacCready, R. A., J. P. Reardon, and I. Saphra. 1957. Salmonellosis in Massachusetts: a sixteen-year

- experience. N. Engl. J. Med. 256:1121-1128.
8. Saphra, I., and J. H. Winter. 1957. Clinical manifestations of Salmonellosis in man: an evaluation of 7,779 human infections identified at the New York Salmonella Center. N. Engl. J. Med. 256:1128-1134.
 9. Schmeiger, H. 1972. Phage P22 mutants with increased or decreased transduction abilities. Mol. Gen. Genet. 119:75-88.
 10. Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, and D. W. Holden. 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. Science 269: 400-403.
 11. Monack, D. M., C. S. Detweiler, and S. Falkow. 2001. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent macrophage death is mediated in part by the host cysteine protease caspase-1. Cell Microbiol. 3(12): 825-837.
 12. Monack, D. M., B. Raupach, A. E. Hromockyj, and S. Falkow. 1996. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 93: 9833-9838.
 13. Warren, M. K. and S. N. Vogel. 1985. Bone marrow derived macrophages: development and regulation of differentiation markers by colony-stimulating factor interferons. J. Immunol. 134: 982-989.

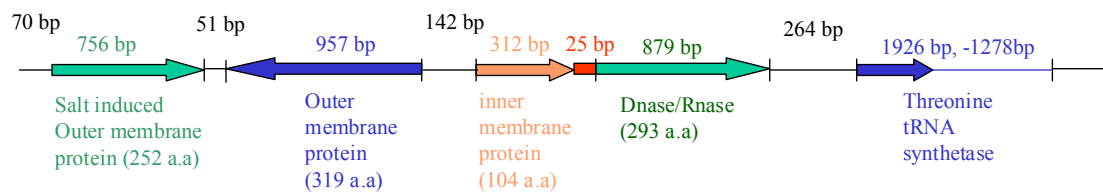


Fig. 1. The map of DNA fragment including virulence gene

GTCATGATCC

CCTATGAAAGTTTCCGGGACCGTCGTGGTCTCTTTTTTAAAGTTGTACGGACTCTATATAA
ATGAAGCTTTTGAAGGCAGTACCCGCTGTAGTTATGCTGGCGGGTGGCGTGTTCGCGTCT 60
M K L L K A V P A V V **M** L A G G V F A S
CTGTATGCCGCCGCGGATGATTCCGTTTTTACTGTC**ATG**GATGATCCCTCCACCGCGAAA 120
L Y A A A D D S V F T V **M** D D P S T A K
AAACCTTTTGAAGGTAATCTGAATGCGGGCTACCTTGCTCAGTCAGGCAACTACTAAAAGT 180
K P F E G N L N A G Y L A Q S G N T K S
TCTTCCTTAACGGCTGACACGGCG**ATG**ACCTGGTATGGACAACGTACCGCCTGGTCATTA 240
S S L T A D T A **M** T W Y G Q R T A W S L
TGGGGCAATGCCAGCAATACCTCCTCTAATGATGAACGCTCTTCAGAAAAATATGCGGTA 300
W G N A S N T S S N D E R S S E K Y A V
GGCGCGGTAACCGTTTTAAT**ATG**ACGGATTATGATTATACCTTTGGCCAGGCCAGTTGG 360
G A R N R F N **M** T D Y D Y T F G Q A S W
CTGACAGACCGTTTTCAACGGTTATCGTCAGCGCGACGTA**CTG**ACC GCCGTTACGGGCGG 420
L T D R F N G Y R Q R D V L T A G Y G R
CAGTTCCTTAATGGTCCAGTGCACAGCTTCCGTTTTGAATTCGGTCCAGGGGTTTCGCTAT 480
Q F L N G P V H S F R F E F G P G V R Y
GACGAACATACGGACGATA**CCACTG**AAACGCAGCCGTTGGGTTATGCTTCCGGTAGCTAT 540
D E H T D D T T E T Q P L G Y A S G S Y
GCCTGGCAGTTAACTGACAATGCTAAGTTTACACAGGGGGTGT**CAGT**ATTTGGCGCAGAA 600
A W Q L T D N A K F T Q G V S V F G A E
GACACCACACTAAATTCGGAAACAGCCCTCAATGTCGCCATTAACGAACATTTTGGTCTA 660
D T T L N S E T A L N V A I N E H F G L
AAGGTGGGGTATAATTTAACGTGGA**ACTCG**CAGCCGCTGAATCAGCGCCTGAACATACC 720
K V G Y N L T W N S Q P P E S A P E H T
GATCGCCGCACTACGGTAACGCTGGGCTATAAG**ATGTA**ATATTGCGCCGGGTTACGTTAC 780
D R R T T V T L G Y K **M *****
GTAACCCGGTTATTCCGTGGT**GACGCTCAGAAGAAGAAGGTGATGTCGCCGTTGATATA**
AGAATAGTCGTCTCCGGTGCGAAATTCGACGTGACTTTGTTTTAAAGAAAGAGAAAA**TGC**

Fig. 2. The nucleotide sequence of salt induced outer membrane protein.

GACTCGCTGCTGGCAGGAGTTTAGTTATATTTAAAGATTCAATAAGCACTGCGCATCATG
 CGGCTGTGCTTATTACTTTGTAAAAATAAGAGTATTCACCTTTCATATTCAGGGGTAAAAA
 ATGAACAAATACAGCTATTGCGCAACGATGATTGCCGCCATACTCAGTACGACCACAATG 60
 M N K Y S Y C A T M I A A I L S T T T M
 GCCAATGCCAGTAGCCTTGCTATTTTCAGTGGCGAATGATGATGCAGGTATATTTCAACCA 120
 A N A S S L A I S V A N D D A G I F Q P
 TCCTTAAATGCCCTTTATGGGCACCCGGCTGCAGACCCGGGGTGATTATACTGCCGGGCTC 180
 S L N A L Y G H P A A D R G D Y T A G L
 TTTTTAGGCTACAGCCACGATCTCACTGACGCCAGTCAACTCTCTTTTCATATCGCGCAA 240
 F L G Y S H D L T D A S Q L S F H I A Q
 GATATTTATTCTCCATCAGGCGCCAATAAGAGAAAAGCCTGAAGCCGTCAAAGGCGACCGC 300
 D I Y S P S G A N K R K P E A V K G D R
 GCGTTCAGCGCCTTTCTTCATACCGGACTGGAGTGGAAATTCATTAGCCACCAATTGGTTA 360
 A F S A F L H T G L E W N S L A T N W L
 CGTTATCGTTTLAGGTACCGATATCGGTGTTATTGGTCCTGACGCAGGTGGTCAGGAGGTT 420
 R Y R L G T D I G V I G P D A G G Q E V
 CAGAATCGGGCGCATCGAATAATAGGCGCAGAAAAATACCCTGCCTGGCAGGATCAAATT 480
 Q N R A H R I I G A E K Y P A W Q D Q I
 GAAAACCGTTATGGTTATACGGCAAAAAGGATGCTCCCTTACGCCAGCTATTGATATT 540
 E N R Y G Y T A K G M V S L T P A I D I
 CTGGGTGTCAATGTGGGCTTCTATCCAGAAGTCTCTGCTGTGCGGCGCAATCTCTTCCAG 600
 L G V N V G F Y P E V S A V G G N L F Q
 TATTTAGGGTACGGCGCAACCGTTGCGCTGGGAAAATGATAAGACCTTCAACTCTGATAAT 660
 Y L G Y G A T V A L G N D K T F N S D N
 GGGTTTGGGTTACTGTCCCGCCGAGGGTTAATACACACTCAAAAAGAGGGATTGATCTAT 720
 G F G L L S R R G L I H T Q K E G L I Y
 AAGGTATTTGCTGGCGTTGAGCGCAGGGGAAGTGGAGGCGTCACCACGGAATAACCGGGT
 K V F A G V E R R G S ***
 TACGTAACGTAACCCGGCGCAATATTACATCTTATAGCCCAGCGTTACCGTAGTGCGGCG
 ATCGGTATGTTCAGGCGCTGATTCAGGCGGCTGCGAGTTCACGTTAAATTATACCCAC

Fig. 3. The nucleotide sequence of outer membrane protein.

TGAATACTCTTATTTTTACAAAAGTAATAAGCACAGCCGCATGATGCGCAGTGCTTATTGA
 ATCTTTAAATATAACTAAACTCCTGCCAGCAGCGAGTCATTGAGAGGATACGTTGCCTTA
 ATGTTGAAAAATGGTGTAAAAAACACGCGCCAGATATTATTGAATATCCATTTTTTCATT 60
 M L K N G V K K H A P D I I E Y P F F I
 CGCTATCTGAGTGCGAGAAATTATTGGCTTCACGATTATGCATATAATACGATGTTTTTT 120
 R Y L S A R N Y W L H D Y A Y N T M F F
 GGTATCAATATGAATATCACGTTGTATTCTTTTGAGCTCATTCTTCTATGATGTCTTCGAT 180
 G I N M N I T L Y S F E L I F Y D V F D
 GTTTATCTGTTATTAATTTTTTACCGTGATAGTGTGTCTTTAATGACGAGCGCATCTAAC 240
 V Y L L L I F T V I V L S L M T S A S N
 GGCTGGCAGGGTAATATAACCAAATTATTGCCATCTGAATTATTAGGGCAGTTATTATTA 300
 G W Q G N I T K L L P S E L L G Q L L L
 AGGAAGAAAAAGTGAATAAAACCATTAATCTGCTAAAATTACTGCCCGTAGTATTATTAA
 R K K K ***
 GCGCATGTACTACATCGTATCCTCCCCAGGATATAATATCGGCACCCGAGTTACCCCATC
 GTAACGTACTCGTTCAGCAACCTGATAACTGTAGCGTTGGCTGTCCTCAAGGAGGAAGTC

Fig. 4. The nucleotide sequence of inner membrane protein.

ATGATGTCTTCGATGTTTATCTGTTATTAATTTTTTACCGTGATAGTGTGTCTTTAATGA
 CGAGCGCATCTAACGGCTGGTAGGGTAATATAACAAATTATTGCCATCTGAATTATTAGG
 ATGGTTATTATTAAGGAAGAAAAAGTGAATAAAACCATTAATCTGCTAAAATTACTGCC 60
 M V I I K E E K V N K T I N L L K L L P
 GTAGTATTATTAAGCGCATGTACTACATCGTATCCTCCCCAGGATATAATATCGGCACCC 120
 V V L L S A C T T S Y P P Q D I I S A P
 GAGTTACCCCATCGTAACGTACTCGTTCAGCAACCTGATAACTGTAGCGTTGGCTGTCCT 180
 E L P H R N V L V Q Q P D N C S V G C P
 CAAGGAGGAAGTCAACAAACAATCTATCGCCATGTCTATACGCTCAATAATAATAGCGCC 240
 Q G G S Q Q T I Y R H V Y T L N N N S A
 ACGAAATTTGCCAACTGGGTTCCTATAGTGTGACAAAAACCAGCCAGGCAAGCGGTCTGT 300
 T K F A N W V A Y S V T K T S Q A S G R
 CCGCGGAACCTGGGCGCAGGACCCCGATTTACCGCCCTCGGATACGTTGGCCCCCTTCGGCC 360
 P R N W A Q D P D L P P S D T L A P S A
 TATAAAAATGCCCATACGCTATTA AAAAGTCGACAGGGGACACCAGGCCCCCGTTGGCAGGA 420
 Y K N A H T L L K V D R G H Q A P L A G
 TTGGGCGGCGTATCGGACTGGCCGTCGTTAAATTATTTATCGAATATTACGCCGCAGAAA 480
 L G G V S D W P S L N Y L S N I T P Q K
 TCCGCCCTGAATCAGGGAGCATGGGCTGCACTGGAAAAACCGGGTGCGGGAACCTTGCCAAA 540
 S A L N Q G A W A A L E N R V R E L A K
 CAGGCTGATGTATCTGTAGTGCACGTAGTGACCGGCCCCCTTTTTGAGCGGCATATCGCC 600
 Q A D V S V V H V V T G P L F E R H I A
 ACATTGCCAGAAGATGCGACGGTAGAAAATCCCAGCGGGTACTGGAAGGTTTTATTCCACC 660
 T L P E D A T V E I P S G Y W K V L F T
 GGAACGGCGCCGTCAAAAAGTGAAGGAAATTACGCTGCGTTTTATTATGGATCAGAATACA 720
 G T A P S K S E G N Y A A F I M D Q N T
 CCCCCTTCGGCGAATTTTTGCGACTATCAGGTTACCGTGGAGGCTATCGAACATAAAACG 780
 P R S A N F C D Y Q V T V E A I E H K T
 AAGCCAGTGCTGACGCTGTGGTCTGCCTTGCTGAAGCGGTAGCCAGCGAGGTGAAAACG 840
 K P V L T L W S A L P E A V A S E V K T
 ACAAAGGGGAGTCTGCCGAGAAGTTAGGTTGTCGATGGAAGCGCTATACGGCGCGTAG
 T K G S L P Q K L G C R ***
 AAAGATAACGGAGAAATCCTGTCAAGGCTCTTGATTTGCTACAGAGTGATGCAATCTCCC
 TTTTTTTAGTGTTACCATCGTCATGCCGGA

Fig. 5. The nucleotide sequence of DNase.