

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

運用聚合酵素鏈鎖反應偵測創傷弧菌 *Vibrio vulnificus*

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：CNFH-91-07

執行期間：91 年 1 月 1 日至 91 年 12 月 31 日

計畫主持人：張淑玉

共同主持人：蘇哲弘

計畫參與人員：

執行單位：食品系

中華民國 92 年 2 月 20 日

摘要

爲了解以聚合^γ鏈反應(PCR)之快速方法，代替傳統生化型及血清型鑑定分離自臨床檢體之創傷弧菌 *Vibrio vulnificus* 之可行性，本研究以 *V. vulnificus* 之藍色螢光基因(*bfp*) 所發展出之 PCR 引子及由成大醫院提供臨床檢體分離出之 44 株 *V. vulnificus* 菌株進行 PCR 檢測，其結果皆爲正反應，而其他 *V. vulnificus* 及非 *V. vulnificus* 之菌株，則大都無 PCR 產物之產生。若直接進行一次聚合^γ鏈反應，則其檢測之靈敏度達 10^3 CFU，然若進行二次聚合^γ鏈反應，則其檢測靈敏度可提高至 10^0 CFU。上述實驗結果顯示 PCR 技術爲一快速、可靠之方法，並可用於臨床分離之 *V. vulnificus* 之快速鑑定。

關鍵詞：聚合^γ鏈反應，創傷弧菌(*Vibrio vulnificus*)

前言

創傷弧菌 *Vibrio vulnificus* 是一種嗜鹽性的革蘭氏陰性菌，海鮮食品甲殼類大都含有創傷弧菌；創傷弧菌感染所造成的臨床病徵有原發性敗血症 (primary septicemia)、傷口感染(wound infection)和急性下痢(acute self-limiting diarrhea)，可經由食入生的或未煮熟而含有創傷弧菌的海鮮，經由腸胃道感染，病人有發熱、寒顫、皮膚病變等症候，死亡率高達 50%，如伴隨敗血性休克，死亡率高達 100%，或者傷口直接接觸含有創傷弧菌的海鮮，造成組織壞死、潰爛或蜂窩性組織炎，時常嚴重到需要做括除手術或截肢手術而急性下痢(acute self-limiting diarrhea)，此症狀則較爲輕微(1-3)。由於創傷弧菌感染後之病程發展快速，以致於常造成治療之不及，因此我們了解到此致病菌之檢驗與防治的重要性，所以食品檢體及臨床快速診斷和偵測方法之開發，乃是刻不容緩之事，除了確保食品之衛生與安全外，更有維護人體健康之意義。

近年來，由於聚合^γ鏈反應技術之發展，已相繼用在許多食品及臨床檢體中病原菌之檢測，例如：病原性大腸桿菌[4]，

李斯特菌[5]，沙門氏菌[6-7]及創傷弧菌[8]等之檢測；其所具之高靈敏度及準確性，提供檢驗人員不需經任何培養過程，即可快速檢出樣品中少量病原菌之可行性，因而大大提高檢驗時效，並且日益受到重視。本實驗室首次經由構築之 *V. vulnificus* 基因庫中，將螢光蛋白基因選殖出來，且利用雙去氧鏈終結法得到完整的螢光蛋白基因的核^γ酸序列[9]，將此序列與 Genbank database 中之所有基因之核^γ酸序列一一比對，企圖了解此基因之同源性 (homology)，雖然得知此螢光蛋白基因與 SDR(short chain dehydroreductase)基因具有相當程度的同源性，但也具有其差異性存在，因此特別選定螢光蛋白基因上特异性之核^γ酸序列，作爲檢測 *V. vulnificus* 之 DNA 探針，應用於聚合^γ鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR)技術之發展。我們依螢光蛋白基因之核^γ酸序列，設計寡核^γ酸引子 (Oligonucleotide primers)，針對臨床檢體分離之 *V. vulnificus* 及其他類別的菌株進行聚合^γ鏈反應檢測，確認其可行性。

材料與方法

一、菌株、菌種之保存與培養

本研究測試之 44 株 *V. vulnificus*、5 株 *Klebsiella oxytoca*、5 株 *Pseudomonas putida*、5 株 *Pseudomonas paucmobilis*、5 株 *K. pneumonia*、及 5 株 *Aeromonas hydrophila* 係由成大醫院之患者檢體中分離而得。其他菌株 *Escherichia coli*、*V. cholerae*、*V. parahaemolyticus*、*V. mimicus*、*V. hollisde*、*V. fluvialis*、*V. damsela*、*V. alginolyticus* 等，購自國內食品工業發展研究所菌種保存及研究中心 (Culture Collection and Research Center; CCRC，新竹，台灣)。*Acinetobacter radioresisten* 由成大醫學院生化所提供。經單離確認之菌株分別以 50% 甘油保存於 -70℃ 冷凍庫中，另以 LB (Luria-Bertani broth) agar plate: 0.5 % yeast extract、1 % trypton、0.1 % NaCl、1.5 % agar，於 4-8℃ 保存作為一般例行培養接種之用。菌種培養至 5ml LB，於 37℃ 隔夜培養(12 小時)，部分菌液作系列稀釋，以計算菌數或作為染色體 DNA 之製備。

二、寡核糖酸引子、PCR 反應

本研究用來檢測 *V. vulnificus* 之 PCR 引子(primers)：Bfp1 / Bfp2，其序列如下：
Bfp1 5'-CGCGTTTAGATGCTAAGCTTG
AAC - 3'
Bfp2 : 5'-AGCCTAAGTGGCACAAGTG
GC - 3'

以上之寡核糖酸引子(Oligonucleotide primers)由快興科技有限公司(台北，台灣)合成。PCR 目標 DNA 之取得係根據 Gonnie 等所發展出之煮沸法行之[10]，取 100μl 系列稀釋菌液至 0.5ml 微量離心管中，加熱煮沸 5 分鐘，離心 14000g，2 分鐘，取 10μl 上清液至 0.5ml 微量離心管中，作為反應模板，每管加入 10mM dATP，dTTP，

dGTP，dCTP 各 1μl，10×PCR reaction buffer 4μl。及各 50pmol 的 Bfp1 及 Bfp2 引子，再加入 1unit 的 DNA polymerase，以無菌水加至終體積為 40μl。而後將微量離心管放入 PCR 反應器，反應溫控條件如下：先昇溫至 94℃，維持 30 秒，使 DNA 分開成雙股(denaturation)，再降溫至 51℃，維持 30 秒，進行黏合作用(annealing)，接著進行延長作用(extension)，於 72℃ 進行 1 分鐘，如此共 30 個循環。取 15μl 反應物，以 2% agarose 於 1×TBE buffer 中電泳，經 Ethidium bromide 染色後，於 UV box 觀察，拍照及記錄。

PCR 之靈敏度試驗，乃取 10μl 分別含 10^2 至 10^7 CFU/ml 之 *V. vulnificus* 菌液，並依上述條件進行 PCR 反應，本研究另探討二次 PCR(double PCR)，以提高檢測靈敏度。其作法如下：取 10μl 第一次 PCR 反應液充當擴增模板，依前述條件進行另一次 PCR 反應，PCR 循環數為 30。

結果與討論

(一) 聚合酶鏈反應確認 *V. vulnificus*

為了解以 PCR 之快速方法，代替傳統生化型及血清型檢測方法，確認分離自臨床檢體之 *V. vulnificus* 菌株的可行性，因此，我們以 PCR 方法來確認所收集菌株之可靠性。使用之 PCR 引子是由 *V. vulnificus* 之螢光蛋白基因(bfp)序列所發展出來的。其中，Bfp1 的序列是相對於核糖酸序列 40 至 64；Bfp2 的序列則是相對於核糖酸序列 669 至 709，其 PCR 產物為 669 bp DNA 片段。本研究除了針對 *V. vulnificus* 做檢測之外，亦選取如前面材料與方法所提到者 30 株非 *Vibrio* 菌及 7 株非 *V. vulnificus* 之 *Vibrio* 菌，進行 PCR 引子特異性(specificity)之探討，其結果顯示，用來選

殖藍色螢光蛋白基因之 *V. vulnificus* 菌株及 44 株收集自成大醫院患者之 *V. vulnificus* 菌株，皆為正反應，部分 PCR 反應之電泳結果，則如圖一所示；而其餘非 *Vibrio* 菌與非 *V. vulnificus* 之 *Vibrio* 菌，其 PCR 反應則皆無專一性的 669 bp DNA 片段產生(圖二)，顯示本研究用之寡核半酸引子之特異性確實可靠。

(二) PCR 之檢測靈敏度

由於應用 PCR 方法於臨床檢體中 *V. vulnificus* 之檢測，除檢測的正確性外，檢測靈敏度亦相當重要，因此，本研究亦探討 Bfp1/Bfp2 引子對的 PCR 檢測靈敏度。各取 $10^2 \sim 10^7$ 稀釋濃度的菌液煮沸之後離心取上清液，進行一次 PCR 反應之後，則其檢測所需最低菌數達到 10^3 CFU(圖四)。而若進行二次 PCR(double PCR)，即以第一次 PCR 產生的 DNA 片段為模板，再進行 PCR，則其靈敏度可提高至 10^0 CFU(圖五)。本研究中，雖然並未探討直接應用此 PCR 系統於血液或其他臨床樣品中之檢測，但本次研究顯示，以 Bfp1/Bfp2 引子對進行二次 PCR 反應，在檢測特異性及靈敏度上均符合要求，因此將可應用於臨床檢體中 *V. vulnificus* 之快速，正確且具高靈敏度之檢測。

綜合以上所述，由於 *V. vulnificus* 的 PCR 檢測結果與傳統生化型及血清型鑑定結果十分相符，故本研究認為 *V. vulnificus* 感染的患者，對其病原菌之檢測而言，PCR 方法不失為一快速，可靠的初步篩檢之方法。

誌謝

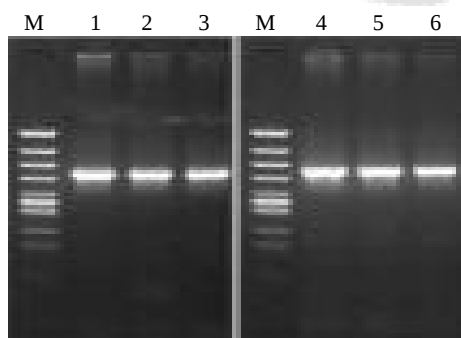
本研究承蒙嘉南藥理學院校長王昭雄博士

之支持與鼓勵，得以完成，謹此謝忱。

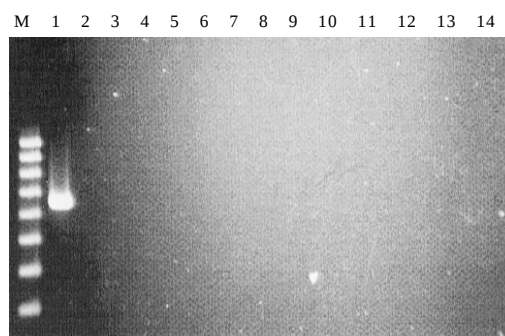
參考文獻

- [1] Brennt, C. E., Wright, A. C., Dutta, S. K. and Morris, Jr. J. G. Growth of *Vibrio vulnificus* in serum from alcoholics: association with high transferrin iron saturation. *J. Infect. Dis.* 164, 1030-1032, 1991.
- [2] Chan, T. Y., Chow, D. P., Ng, K. C., Pan, K. W. and McBride, G. A. *Vibrio vulnificus* septicemia in a patient with liver cirrhosis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 25, 215-216, 1994.
- [3] Linkous, D. A. and Oliver, J. D. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 174(2), 207-214, 1999.
- [4] Gannon, V. P., King, R. K., Kim, J. Y., and T. Golsteyn. "Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like Toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the polymerase chain reaction". *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3809-3815, 1992.
- [5] Besessin, M. T., Luo, Q., Rotbart, H. A., Blaser, M. J. and R. T. Ellison III. "Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction". *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2930-2932, 1990.
- [6] Tsen, H. Y., Liou, J. W. and C. K. Lin. "Possible use of a polymerase chain reaction method for specific detection of *Salmonella* in beef". *J. Ferment. Bioeng.* 77, 137-143, 1994.

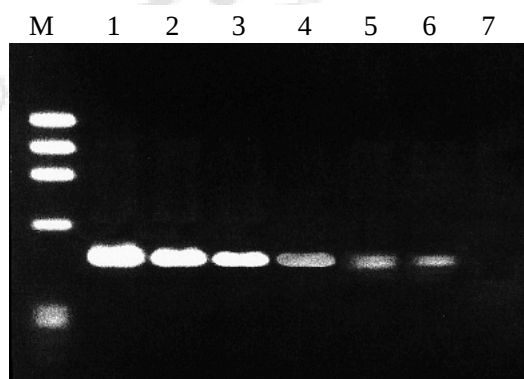
- [7] Song, J. H., Cho, H., Park, M. Y., Na, D. S., Moon, H. B. and C. H. Pai, "Detection of *salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever by polymerase chain reaction". *J. Clin. Microbiol.* 31, 1439-1443, 1993.
- [8] Hill, W. E., Stacey, S. P., Trucksess, M. W., Feng, P., Kaysner, C. A., and K. A. Lampel. "Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters". *Appl. Environ. Micro-biol.* 57, 707-711, 1991.
- [9] 蘇哲弘、陳連輝、張淑玉，"創傷弧菌 *Vibrio vulnificus* 藍色螢光蛋白產光原因之探究"。嘉南學報，26，130-140，2000。
- [10] Cheng DL, Liu YC, Yen MY, Liu CY, Wang RS. "Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess: their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteria in diabetic patients". *Arch. Intern. Med.* 151, pp. 1557-1559, 1991.



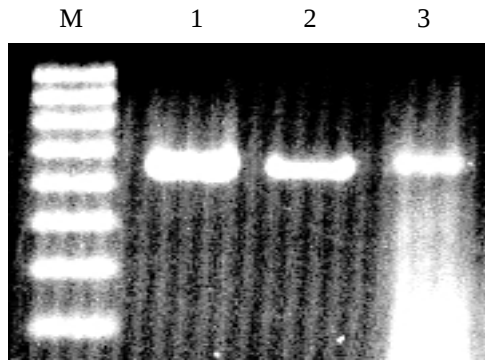
圖一、用 PCR 引子對 Bfp1/Bfp2，對臨床分離出之 *V. vulnificus* 菌株進行 PCR 反應所得的特異性 DNA。LaneM：Marker；Lane1：進行螢光蛋白基因選殖之 *V. vulnificus*；Lane2~6：*V. vulnificus* 2~6。



圖二、利用 PCR 引子對 Bfp1/Bfp2，針對非 *V. vulnificus* 菌株進行 PCR 反應。LaneM: Marker; Lane1: *V. vulnificus*; Lane2: *Aeromonas hydrophila*; Lane3: *Escherichia coli*; Lane4: *Pseudomonas putida*; Lane5: *Pseudomonas paucmobilis*; Lane6: *Acinetobacter radioresistens*; Lane7: *Klebsiella pneumoniae*; Lane8: *V. cholerae*; Lane9: *V. parahaemolyticus*; Lane10: *V. mimicus*; Lane11: *V. hollisde*; Lane12: *V. fluvialis*; Lane13: *V. damsela*; Lane14: *V. alginolyticus*。



圖三、PCR 靈敏度試驗。利用 PCR 引子對 Bfp1/Bfp2，針對 *V. vulnificus* 菌株進行一次 PCR 反應。LaneM：Marker; Lane1：進行螢光蛋白基因選殖之 *V. vulnificus*；Lane2~Lane7：菌數分別為 10^7 (Lane3)； 10^6 (Lane4)； 10^5 (Lane5)； 10^4 (Lane6)； 10^3 (Lane7)； 10^2 。



圖四、PCR 靈敏度試驗。利用 PCR 引子對 Bfp1/Bfp2，針對 *V. vulnificus* 進行二次 PCR 反應。LaneM：Marker；Lane1~Lane3：菌數分別為 10^2 (Lane1)； 10^1 (Lane2)； 10^0 (Lane3)。

