

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沙門氏豬霍亂桿菌 *Salmonella choleraesuis*

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIS-91-10

執行期間：91 年 1 月 1 日至 91 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：工安系

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沙門氏豬霍亂桿菌 *Salmonella choleraesuis* 之可行性，本研究以 *S. choleraesuis* 之脂解^γ基因(*lyp*)所發展出之 PCR 引子及由成大醫院提供臨床檢體分離出之 60 株 *S. choleraesuis* 菌株進行 PCR 檢測，其結果皆爲正反應，而其他沙門氏菌屬及非沙門氏菌屬之菌株，則少數有 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 10^4 CFU，然若進行二次聚合^γ鏈反應，則其檢測靈敏度可提高至 10^1 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沙門氏豬霍亂桿菌之快速鑑定。

關鍵詞：聚合^γ鏈反應，沙門氏豬霍亂桿菌(*Salmonella choleraesuis*)

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)，豬感染後的症狀爲高弛張熱，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)。因此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。

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(7)，李斯特菌(8)，沙門氏菌(9-10)及創傷弧菌(11)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 *S. choleraesuis* 基因庫中，將脂解^γ基因選殖出來，且利用雙去氧鏈終結法得到完整的脂解^γ基因的核^γ酸序列，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)，但是卻無法獲得任何與此脂解^γ基因具有相當程度同源性之基因，此結果顯示此脂解^γ基因乃 *S. choleraesuis* 特異性之基因，可作爲檢測 *S. choleraesuis* 之 DNA 探針，或應用於聚合^γ鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR)技術之發展。我們依脂解^γ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 *S. choleraesuis* 及其他類別的菌株進行聚合^α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 60 株 *S. choleraesuis*、5 株 *Pseudomonas putida*、5 株 *Pseudomonas paucmobilis*、5 株 *Vibrio vulnificus*、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*、*S. typhi*、*S. paratyphi*、*S. typhimurium*、及 *S. enteritidis* 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 radioresistens* 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°C 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°C 保存作為一般例行培養接種之用。菌種培養至 5ml LB，於 37°C 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^α酸引子、PCR 反應

本研究用來檢測 *S. choleraesuis* 之 PCR 引子(primers) : Lyp1 / Lyp2, 其序列如下：

Lyp1: 5'-AGCCCAATTTTGCACAT
GC - 3'

Lyp2: 5'-CCGTATAGCGGTTGAAGA

CCG- 3'

以上之寡核^α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 Gonnig 等所發展出之煮沸法行之(12)，取 100 μ l 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 10 μ l 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 1 μ l，10 \times PCR reaction buffer 4 μ l。及各 50pmol 的 Hly1 及 HLY2 引子，再加入 1unit 的 DNA polymerase，以無菌水加至終體積為 40 μ l。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°C，維持 30 秒，使 DNA 分開成雙股(denaturation)，再降溫至 51°C，維持 30 秒，進行黏合作用(annealing)，接著進行延長作用(extension)，於 72°C 進行 1 分鐘，如此共 30 個循環。取 15 μ l 反應物，以 2% agarose 於 1 \times 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 10 μ l 分別含 10² 至 10⁶ CFU/ml 之 *S. choleraesuis* 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 10 μ l 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^α鏈反應確認 *S. choleraesuis*

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 *S. choleraesuis* 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 *S. choleraesuis* 之脂解基因(*lyp*)序列所發展出來的。其中，Lyp1 的序列是相對於核糖核酸序列 105 至 125；Lyp2 的序列則是相對於核糖核酸序列 333 至 353，其 PCR 產物為 249 bp DNA 片段。本研究除了針對 *S. choleraesuis* 做檢測之外，亦選取如前面材料與方法所提到的非 *Salmonella* 菌及非 *S. choleraesuis* 之 *Salmonella* 菌，進行 PCR 引子特異性(*specificity*)之探討，其結果顯示，用來選殖基因之 *S. choleraesuis* 菌株及 59 株收集自成大醫院患者之 *S. choleraesuis* 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 *Salmonella* 菌皆無專一性的 DNA 片段產生，但非 *S. choleraesuis* 之 *Salmonella* 菌，其 PCR 反應則部分產生了此專一性的 DNA 片段產生(圖二)，顯示本研究之寡核糖核酸引子之特異性需要再稍加改良。

(二) PCR 之檢測靈敏度

由於應用 PCR 方法於臨床檢體中 *S. choleraesuis* 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 Lyp1/Lyp2 引子對的 PCR 檢測靈敏度。各取 $10^2 \sim 10^6$ 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 10^4 CFU(圖三)。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 10^1 CFU(圖

四)。本次研究顯示，以 Lyp1/Lyp2 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，但若要應用於臨床檢體中 *S. choleraesuis* 之檢測，則有必要再尋找更具特異性之寡核糖核酸引子，以提高其專一性。

綜合以上所述，由於 *S. choleraesuis* 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 *S. choleraesuis* 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。

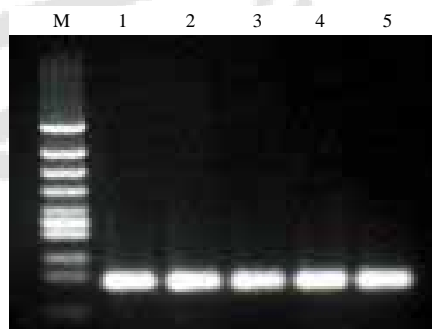
誌謝

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. 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.*

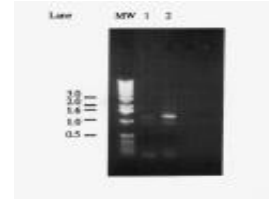
- 45:59-66.
4. Wilcock, B. P. and K. J. Schwartz. 1992. Salmonellosis. In diseases of Swine, 7th edn, pp. 570-583. Edited by A. D. Leman and others. Ames, IA: Iowa State University Press.
 5. Morehouse, L. G. 1972. Salmonellosis in swine and its control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 160:593-601.
 6. Berends, 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. Gannon, V. P., King, R. K., Kim, J. Y., and T. Golsteyn. 1992. 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.
 8. Besessin, M. T., Luo, Q., Rotbart, H. A., Blaser, M. J. and R. T. Ellison III. 1990. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2930-2932.
 9. Tsen, H. Y., Liou, J. W. and C. K. Lin. 1994. Possible use of a polymerase chain reaction method for specific detection of *Salmonella* in beef. *J. Ferment. Bioeng.* 77, 137-143.
 10. Song, J. H., Cho, H., Park, M. Y., Na, D. S., Moon, H. B. and C. H. Pai. 1993. Detection of *salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1439-1443.
 11. Hill, W. E., Stacey, S. P., Trucksess, M. W., Feng, P., Kaysner, C. A., and K. A. Lampel. 1991. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 707-711.
 12. Cheng DL, Liu YC, Yen MY, Liu CY, Wang RS. 1991. Septic meta-static lesions of pyogenic liver abscess: their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteria in diabetic patients. *Arch. Intern. Med.* 151, 1557-1559.



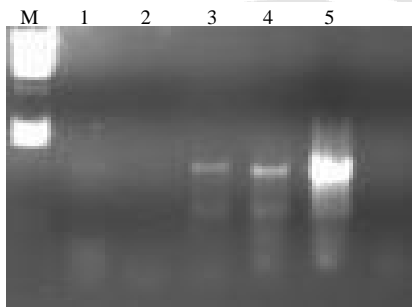
圖一、利用 PCR 引子對 Lyp1/Lyp2，針對臨床分離出之 *S. choleraesuis* 菌株進行 PCR 反應所得的特異性 DNA 產物。LaneM : Marker ; Lane1: 進行脂解^{rw}基因選殖之 *S. choleraesuis* Sc1 ; Lane2~5 : Sc2~Sc5。



圖二、利用 PCR 引子對 Lyp1/Lyp2，針對非 *S. choleraesuis* 菌株及 *Salmonella* 菌屬之菌株進行 PCR 反應。Lane1: Marker; Lane2: *S. choleraesuis*; Lane3: *Aeromonas hydrophila*; Lane4: *Escherichia coli*; Lane5: *Pseudomonas putida*; Lane6: *Pseudomonas paucmobilis*; Lane7: *Acinetobacter radioresistens*; Lane8: *Vibrio vulnificus*; Lane9: *S. typhi*; Lane10: *S. paratyphi*; Lane11: *S. typhimurium*; Lane12: *S. enteritidis*。



圖四、PCR 靈敏度試驗。利用 PCR 引子對 Lyp1/Lyp2，針對 *S. choleraesuis* 進行二次 PCR 反應。Lane1: Marker; Lane2 菌數分別為 10^2 ; Lane3: 菌數分別為 10^1 。



圖三、PCR 靈敏度試驗。利用 PCR 引子對 Lyp1/Lyp2，針對 *S. choleraesuis* 菌株進行一次 PCR 反應。LaneM: Marker; Lane1~Lane5: 菌數分別為 10^2 ; 10^3 ; 10^4 ; 10^5 ; 10^6 。