

# 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*) 溶血酶的生化特性研究及細胞毒性試驗

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIS-92-12

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

計畫主持人：陳連輝

共同主持人：蘇哲弘

計畫參與人員：

執行單位：工安系

中華民國 93 年 2 月 20 日

## 摘要

利用標記基因篩檢法構築溶血酶基因 *hly1* 剔除株，並以聚合酶鏈反應(PCR)加以確認溶血酶基因 *hly1* 剔除株；溶血酶 *hly1* 基因剔除株對 HeLa cell 的黏附作用及侵入作用皆比 *S. choleraesui* SC-1 菌株低，大約是 *S. choleraesui* SC-1 菌株的 30%，顯示溶血酶基因 *hly1* 在 *S. choleraesui* SC-1 菌株的感染機制中扮演了重要的角色。

## 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* SC-1 菌株，針對其可能的致病因子溶血酶基因 *hly1*，作基因的剔除實驗，直接探討此致病因子對感染細胞之影響。

## 材料和方法

### (1) 標記基因篩檢法構築溶血酶基因 *hly1* 剔除株

在溶血酶基因 *hly1* 的核苷酸序列中選取中段(約占全基因長的 1/3)，設計一組引子分別含有 *SphI*、*SalI* 限制酶切割位，經 PCR (polymerase chain reaction) 將此 DNA 片段大量複製，經 *SphI*、*SalI* 限制酶切割，並將其插入同樣經 *SphI*、*SalI* 限制酶切割過的 pCVD442 質體 (suicide vector)(vector for insertional disruption Cm<sup>r</sup>) (15)，將此重組質體 DNA 轉型到大腸桿菌 *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir，透過 *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir，和 *S. choleraesuis* SC-1 的接合生殖

(conjugation), *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir 將此含有部分溶血酶基因 *hly1* 的質體 DNA 導入 *S. choleraesuis* SC-1, 經同時含有 Tetracycline 及 Chloramphenicol 的培養基篩選得到接合轉型子 (transconjugants), 此接合轉型子內的 pCVD442 質體上的部分溶血酶基因 *hly1* 與染色體上的完整溶血酶基因 *hly1* 進行 DNA 同源性的重組作用 (homologous recombination), 將使得接合轉型子 (transconjugants) 染色體上的完整溶血酶基因 *hly1* 遭到破壞, 而成爲溶血酶基因 *hly1* 的剔除株。

## (2) 聚合酶鏈反應(PCR)確認溶血酶基因 *hly1* 剔除株

我們分別選用六組引子(表一), 依據表二之條件進行 PCR 之確認, 並依突變株之染色體圖譜作分析。

## (3) 細胞黏附實驗

培養  $1.5 \times 10^3$  個 HeLa cell, 18 小時, 細胞達到 80% 90% 滿, 分別加入 *S. choleraesuis* SC-1 菌株及溶血酶 *hly1* 基因剔除株, 於 37°C 培養 30 分鐘, 此時細菌會黏附在細胞表面, 用 PBS 將未附在細胞表面的細菌洗掉, 再用 0.5% Triton-100 瓦解細胞, 將此細胞溶液, 於 37°C 培養 16 小時, 可計算出黏附在細胞表面的菌數。

## (4) 細胞侵入實驗

培養  $1.5 \times 10^3$  個 HeLa cell, 18 小時, 細胞達到 80% 90% 滿, 分別加入 *S. choleraesuis* SC-1 菌株及溶血酶 *hly1* 基因剔除株, 於 37°C 培養 2 小時, 此時細菌會侵入細胞, 用 PBS 將未附在細胞表面的細菌洗掉, 再加入含有 Ampicillin  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  的培養液, 於 37°C 培養 2 小時, Ampicillin 會殺死黏附在細胞表面而未進入到細胞裡面的細菌, 用 PBS 將被殺死的細菌洗掉, 再用 0.5% Triton-100 瓦解細胞, 將此細胞溶液, 於 37°C 培養 16 小時, 可計算出侵入細胞的菌數。

## 結果和討論

先前的實驗, 我們成功的選殖到溶血酶 *hly1* 基因, 經核苷酸序列分析顯示此基因是由 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 (圖一), 並利用標記基因篩檢法成功的篩選到可能之溶血酶 *hly1* 基因剔除株。

選擇其中的三株抽取其染色體, 確認是否爲 *S. choleraesuis* SC-1 菌株之溶血酶 *hly1* 基因剔除株, 因此我們以突變株的染色體圖譜(圖二)做爲我們進行 PCR 確認的依據。我們預估以 Cm<sup>+</sup>、Cm<sup>+</sup>-引子會夾出 650 bp 的 DNA 片段(圖三), 以 Cm<sup>+</sup>、sompSphI 引子會夾出 1.5 kb 的 DNA 片段(圖四); 爲了確定重組

質體已插入 *S. choleraesui* SC-1 的染色體而成功的破壞溶血酶 *hly1* 基因，所以分別利用 Cm<sup>+</sup>、sompNdeI 引子；Cm<sup>-</sup>、sompXhoI 引子；及 Cm<sup>-</sup>、aompSalI 確定重組質體插入的位置是正確的，應該夾出分別大約 1.5 kb、6kb 和 5kb 的 DNA 片段(圖四、圖五)，另外由於突變株之溶血酶 *hly1* 基因已被破壞，所以 sompNdeI、sompXhoI 引子無法夾出溶血酶 *hly1* 基因的全長 DNA 片段。

爲了了解溶血酶 *hly1* 基因對 *S. choleraesui* SC-1 菌株在感染機轉中的重要性，所以我們做了細胞黏附實驗及細胞侵入實驗，由實驗結果得知溶血酶 *hly1* 基因剔除株對 HeLa cell 的黏附作用及侵入作用皆比 *S. choleraesui* SC-1 菌株低，大約是 *S. choleraesui* SC-1 菌株的 30%。顯示溶血酶基因 *hly1* 在 *S. choleraesui* SC-1 菌株的感染機制中扮演了重要的角色。

## 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. 10. Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper. N. Engl. J. Med. 256:1128-1134. 1988. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. Infect. Immun. 59: 4310-4317.
9. Schmeiger, H. 1972. Phage P22 mutants with increased or decreased transduction abilities. Mol. Gen. Genet. 119:75-88.

表一、引子的種類，□代表限制酶的切割位，陰影代表置換後的核苷酸

引子	核苷酸序列
sompSphI	5'- GATGACCTG <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">GCATGC</span> ACAACGTAC -3' <i>SphI</i>
sompSall	5'- TCAGTGGT <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">GTCGAC</span> CGTATGTTTCG -3' <i>Sall</i>
Cm+	5'- AATCACTGGATATACCACCGTTGA -3'
Cm-	5'- CTGCCACTCATCGCAGTACTGTTG -3'
sompNdeI	5'- CGGACTCTATA <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CATATG</span> AAGCTTTTGAAG -3' <i>NdeI</i>
sompXhoI	5'- TACATCTT <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CTCGAG</span> CAGCGTTACC -3' <i>XhoI</i>

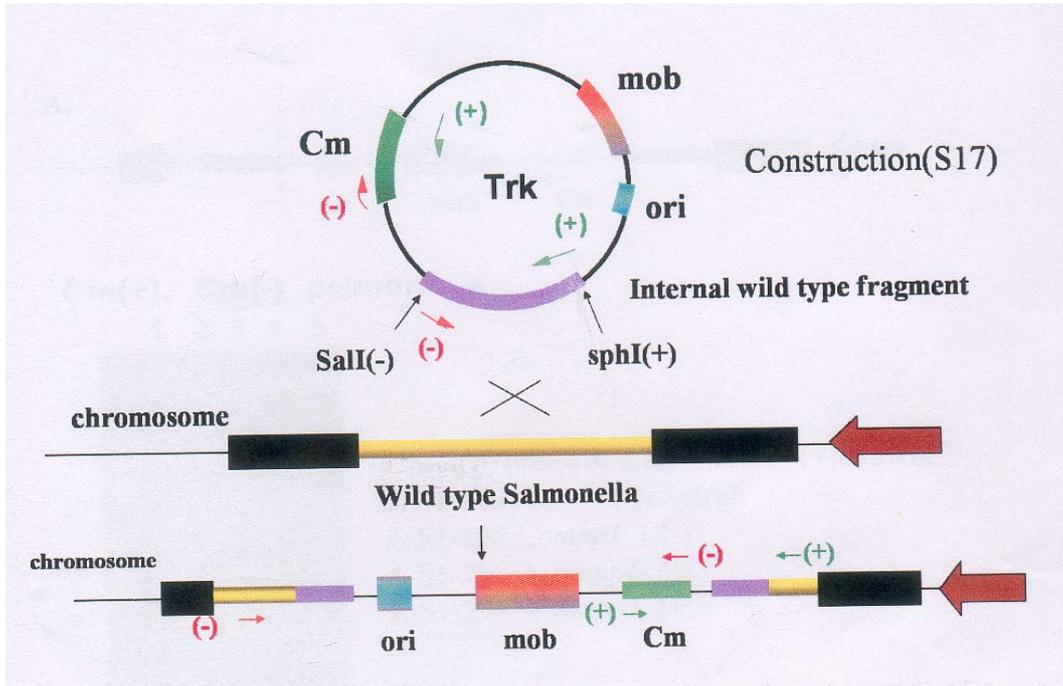
表二、PCR 反應使用的引子對及反應條件

引子	PCR 反應條件	週期
sompSphI、Cm+	96°C 5'→96°C 30''→53°C 30''→72°C 1'→4°C 7'	30
sompSall、Cm-	96°C 5'→96°C 30''→56°C 30''→72°C 4'→4°C 7'	30
Cm+、Cm-	96°C 5'→96°C 30''→54°C 30''→72°C 45''→4°C 7'	30
sompNdeI、sompXhoI	96°C 5'→96°C 30''→54°C 30''→72°C 1'→4°C 7'	30
sompNdeI、Cm+	96°C 5'→96°C 30''→53°C 30''→72°C 4'→4°C 7'	30
sompXhoI、Cm-	96°C 5'→96°C 30''→56°C 30''→72°C 1'→4°C 7'	30

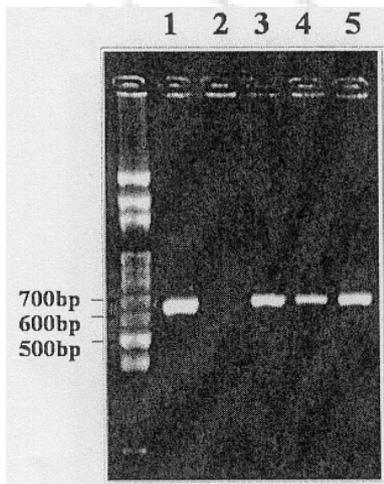
GTCATGATCC

CCTATGAAAGTTTTCCGGGACCGTCTGGTCTCTTTTTTAAAGTTGTACGGACTCTATATAA  
 ATGAAGCTTTTTGAAGGCAGTACCCGCTGTAGTTATGCTGGCGGGTGGCGTGTTCGCGTCT 60  
 M K L L K A V P A V V M L A G G V F A S  
 CTGTATGCCGCCGCGATGATTCCGTTTTTACTGTGATGATGCCCTCCACCGCGAAA 120  
 L Y A A A D D S V F T V M D D P S T A K  
 AAACCTTTTTGAAGGTAATCTGAATGCGGGCTACCTTGCTCAGTCAGGCAATACTAAAAGT 180  
 K P F E G N L N A G Y L A Q S G N T K S  
 TCTTCCTTAACGGCTGACACGGCGATGACCTGGTATGGACAACGTACCGCCTGGTCATTA 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  
 GCGCGCGTAACCGTTTTAATATGACGGATTATGATTATACCTTTGGCCAGGCCAGTTGG 360  
 G A R N R F N M T D Y D Y T F G Q A S W  
 CTGACAGACCGTTTTCAACGGTTATCGTACGCGCAGCTACTGACCGCCGGTTACGGGCGG 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  
 GACGAACATACGGACGATAACCACTGAAACGCAGCCGTTGGGTTATGCTTCCGGTAGCTAT 540  
 D E H T D D T T E T Q P L G Y A S G S Y  
 GCCTGGCAGTTAACTGACAATGCTAAGTTTACACAGGGGGTGTGAGTATTTGGCGCAGAA 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  
 AAGGTGGGGTATAATTTAACGTGGAACCTCGCAGCCGCTGAATCAGCGCCTGAACATACC 720  
 K V G Y N L T W N S Q P P E S A P E H T  
 GATCGCCGCACTACGGTAACGCTGGGCTATAAGATGTAAATATTGCGCCGGGTACGTTAC 780  
 D R R T T V T L G Y K M \*\*\*  
 GTAACCCGGTTATTCCGTGGTACGCCCTCAGAAGAAGAAGGTGATGTCGCCGTTGATATA  
 AGAATAGTCGTCTCCGGTGCAGAAATTCGACGTGACTTTGTTTTAAAGAAAGAGAAAATGC

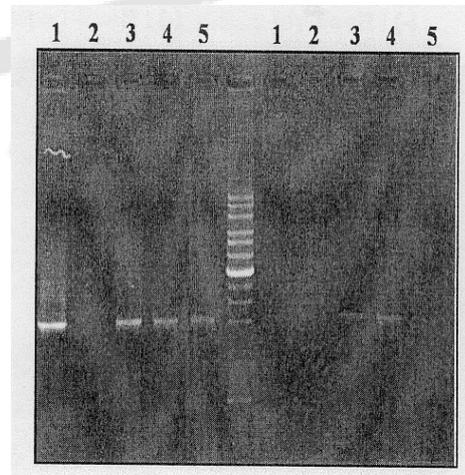
圖一、溶血酶 *hly1* 基因的核苷酸序列



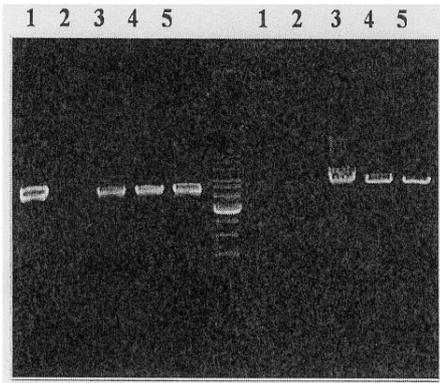
圖二、*S. choleraesui* SC-1 染色體與 pCVD442 質體上的部分溶血酶基因 *hly1* 進行 DNA 同源性重組作用的示意圖



圖三、*Cm*<sup>+</sup>、*Cm*<sup>-</sup>引子會夾出 650 bp 的 DNA 片段。1：positive control；2：negative control；3、4、5：溶血酶 *hly1* 基因剔除株。



圖四、左圖 *Cm*<sup>+</sup>、*sompSphI* 引子會夾出 1.5 kb 的 DNA 片段。右圖 *Cm*<sup>+</sup>、*sompNdeI* 引子會夾出大約 1.5 kb 的 DNA 片段。1：positive control；2：negative control；3、4、5：溶血酶 *hly1* 基因剔除株。



圖五、左圖 Cm-、aompSalI 會夾出 5 kb 的 DNA 片段。右圖 Cm-、sompXhoI 引子會夾出 6 kb 的 DNA 片段。1：positive control；2：negative control；3、4、5：溶血酶 *hly1* 基因剔除株。

