

# 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* 治病因子基因的選殖

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNIS-91-02

執行期間：91 年 1 月 1 日至 91 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 92 年 2 月 20 日

# 沙門氏豬霍亂桿菌 *Salmonella choleraesuis* 治病因子基因的選殖

## 摘要

由臨牀上篩選出 *Salmonella choleraesuis* 菌株，其在 37°C 綿羊血培養基上可表現溶血活性。由 *S. choleraesuis* 的基因庫分別選殖出兩個對老鼠巨噬細胞(macrophage)具有細胞毒性之基因，分別命名為 *sa1* 及 *sa2*，而 *sa1* 及 *sa2* 分別可在 *Escherichia coli* XL1B 中表現溶血<sup>+</sup>及脂解<sup>+</sup>之特性，因此初步歸類為 hemolysin 基因及脂解<sup>+</sup>基因。

**關鍵字：***Salmonella choleraesuis*、基因選殖、hemolysin 基因、脂解<sup>+</sup>基因

## 前言

沙門氏豬霍亂桿菌 (*Salmonella choleraesuis*) 是豬腸道感染的重要菌株 (1-4)，並可經由豬而感染人類，感染的豬隻和人類，皆可引起致命性的菌血症，敗血症及轉移性的系統疾病，但卻少有臨床上的腸胃症狀，儘管抗生素 - 第三代 cephalosporins 和 fluoroquinolones 可治療此菌引起的感染(4-5)。惟因不易診察出豬的帶原者，且其感染人類引致的死亡率高達 20%，顯示豬隻感染了沙門氏豬霍亂桿菌，不但增加了豬隻感染的潛在危機及經濟上的損失，而且受感染的豬隻亦是人類感染沙門氏豬霍亂桿菌的病原槽(6)。因此對沙門氏豬霍亂桿菌感染的偵測、診斷、控制及療法仍有待改善。尤其針對 *S.choleraesuis* 治病因子之研究，解明其在致病機制中所扮演的角色，應該可以有效的防治豬隻受 *S.choleraesuis* 之感染。

經由豬感染致病的模式顯示，*Salmonella choleraesuis* 會依單一菌體，或以 1~3 個菌體所形成的群體，直接侵入腸道的 enterocytes 及巨噬細胞(Macrophage)並大量增生，感染 3 小時後，即可發現由 enterocytes、巨噬細胞(Macrophage)及小腸

淋巴集結(Peyer's patch)處，釋出大量的菌體(7)，而由此腸繫膜淋巴結所釋出的菌體則會經由血液系統轉移至脾臟和肝臟(8)。經由分子遺傳分析，也已清楚的知道會引發系統性疾病的沙門氏菌株，其致病因子的基因多存在於染色體上，而這些致病因子對哺乳類上皮細胞具有黏著(adherence)(9)、侵入(invansion)(10)及轉移性細胞破壞(transcytosis)(11)的能力，故這些因子是有助於腸胃道感染的，而在淋巴組織中，Pho-P 的調節則可用來對抗白血球的吞噬防衛系統，在提高菌株的感染力上相當重要(12-13)，另外平滑的脂多醣體(lipopolysaccharide, LPS)在血液中則可對抗經補體媒介所產生的菌體溶解作用(14)。致病因子對於 *S. choleraesuis* 的感染、致病都是相當重要的。為了有效防治人畜共通傳染致病菌 *S. choleraesuis* 的感染，除了確保食品之衛生與安全外，更有維護人體健康之意義。因此由臨床分離的 *S. choleraesuis* 菌株之生化特性研究、致病因子之探討，菌體如何侵入寄主細胞之追究，致病機制之解明，乃是刻不容緩之事。本研究已由 *S. choleraesuis* 的基因庫中分別選殖出兩個對老鼠巨噬細胞(macrophage)具有細胞毒性之基因，分別

命名為 *sa1* 及 *sa2*，對將來有關 *S. choleraesuis* 致病機制之解明，應有相當大之助益。

## 材料和方法

### (一) *S. choleraesuis* 之分離， $LD_{50}$ 之檢測

首先從感染 *S. choleraesuis* 而呈現敗血症的病友身上分離到之 3 株 *S. choleraesuis* 菌作粗略的 cytotoxin、enterotoxin 及 hemolysin 活性檢測及將菌株以餵食管注入小白鼠的食道，作小白鼠的  $LD_{50}$  實驗。

### (二) 致病因子基因之選殖

將 *S. choleraesui* (SC-1) 菌在 37°C 培養 24 小時後，離心取培養上清液(culture supernatant)以 70% 硫銨沉澱後再透析之，所得 sample 注射小白兔，得其 antibody，另一方面我們以  $\lambda$  gt11 為 vector，構築 SC-1 菌之 genomic library，亦即將 SC-1 genomic DNA 片段化(2-5kb fragment)，將這些 fragment 兩末端接 *EcoRI* linkers 後再接於  $\lambda$  gt11 之 *EcoRI* (15)，導入大腸菌 Y1088，收集 50,000 含重組  $\lambda$  gt11 之大腸菌而成 SC-1 之基因庫。我們以前述 antibody 為 probe，利用 plaque hybridization，從 SC-1 之基因中篩選 positive 的 clones 再經小白鼠的血清(先感染低劑量之 SC-1)確認有正反應的 clones。

### (三) 細胞、培養基和培養條件

老鼠巨噬細胞(macrophage)培養於 10 % 胎牛血清的 Dulbecco modified Eagle medium(DMEM: Gibco BRL)，每毫

升培養液另含  $50 \mu g ml^{-1}$  青黴素 (penicillin)、 $50 \mu g ml^{-1}$  鏈黴素 (streptomycin) 及 2 毫克之碳酸氫鈉 (NaOH)，培養瓶置於 37°C 含 5% 二氧化碳之培養箱內培養。

### (四) 非放射性細胞毒性試驗

在巨噬細胞培養基內，加入 LDH (lactate dehydrogenase) 的受質(substrate) 乳酸鹽，測 490 nm 的吸光值，檢測 LDH 被巨噬細胞釋出之量(18)。

## 結果和討論

分別由臨床分離到 3 株 *S. choleraesuis* SC-1, SC-2, SC-3，其分別在綿羊血培養基上皆可表現溶血活性(data not show)而其對小白鼠的  $LD_{50}$  皆在  $10^4$  cfu 以下(表 1)，而且皆有 cytotoxin 之活性，而細胞毒性的差異不大(圖 1)。

表 1 SC-1, SC-2, SC-3 對小白鼠的  $LD_{50}$

<i>S. choleraesui</i>	$LD_{50}$
SC-1	$1 \pm 10^3$
SC-2	$2 \pm 10^3$
SC-3	$5 \pm 10^3$

我們初步得到二個不同的 clones，因為許多研究指出溶血酶及脂解酶，皆可能是致病菌的致病因子(16-17)，故將選殖到的 clone 分別測定是否有以上酵素之活性，發現其分別可表現 hemolytic 及 lipase 的活性，故暫時將各 clone 分別命名為 *sa1* 及 *sa2*，並初步歸類為 hemolysin 基因及脂解基因。

## 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

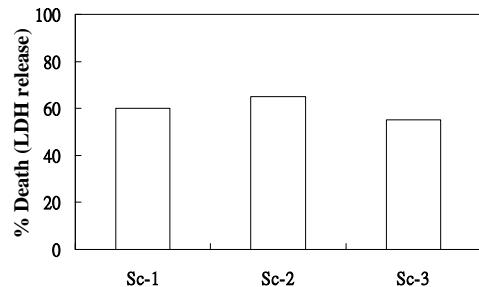


圖 1 SC-1, SC-2, SC-3 分別感染老鼠巨噬細胞 2 小時後，細胞的存活率

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 (LDH)，因此經由巨噬細胞存活試驗(macrophage survival assays)及非放射性細胞毒性試驗(The Cyto Tox 96 non-radioactive cytotoxicity assay) (Promega) 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。分別將含有 *sa1* 及 *sa2* 之質體 DNA) 轉型到 *E. coli* XL1B，發現轉型子(*sa1/E. coli* XL1B 及 *sa1/E. coli* XL1B )感染老鼠巨噬細胞後，細胞的存活率皆比 *E. coli* XL1B 小，可知 *sa1* 及 *sa2* 應該與 *S. choleraesuis* 的致病性有關。

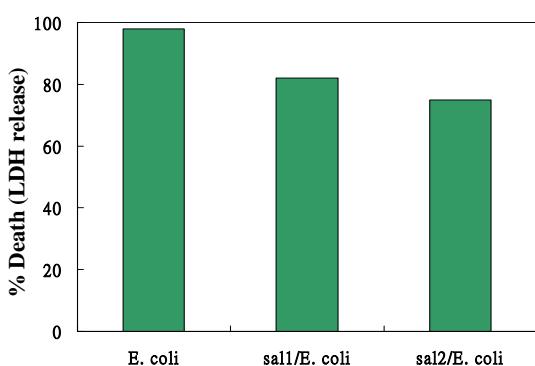


圖 2 *E. coli* XL1B , *sa1/E. coli* XL1B 及 *sa2/E. coli* XL1B , 分別感染老鼠巨噬細胞 2 小時後，細胞的存活率。

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 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. Bolton, A. J., M. P. Osborne, T. S.

- Wallis, and J. Stephen. 1999. Interaction of *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium* with porcine and bovine terminal ileum in vivo. *Microbiology*. 145: 2431-2441.
8. Carter, P. B., and Collins, F. M. 1974. The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med.* 139:1189-1203.
9. Jones, G. W., and Richardson, L. A. 1981. *J. Gen. Microbiol.* 127:361-370.
10. Galan, J. E., and Curtiss, III, R. 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:6383-6387.
11. Finlay, B. B., B. Gumbiner, and S. Falkow. 1988. Penetration of *Salmonella* through a polarized Madin-Darby Canine Kidney epithelial cell monolayer. *J. Cell Biol.* 107:221-230.
12. Fields, P. I., E. A. Groisman, and F. Heffron. 1989. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* 243:1059-1062.
13. Michiels, T., and Cornelis, G. R. 1991. Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. *J. Bacteriol.* 173:1677-1685.
14. Joiner, K. A. 1988. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annu Rev. Microbiol.* 42:201-230.
15. Duguid, J. P., and J. F. Wilkinson. 1953. The influence of cultural conditions on polysaccharide production by *Aerobacter aerogenes*. 9:174-189.
16. Chang, T. M., Y. C. Chuang, J. H. Su, and M.C. Chang. 1997. Cloning and sequence analysis of a novel hemolysin gene (*vly*) from *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(10): 3851-3857.
17. Chuang, Y. C., S. F. Chiou, J. H. Su, M. L. Wu, and M.C. Chang. 1997. Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. *Microbiology* 143, 803-812.
18. 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.