

應用脈衝式電泳方法建立豬霍亂沙氏桿菌基因型別鑑定技術

報告人：郭靜蕙 約聘助理（生物研究組）

壹、緒言

豬霍亂沙氏桿菌 (*Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis*) 為重要之人畜共通傳染病病原，常引起肥育期及肥育前期之肉豬發生敗血症、肺炎、下痢等病症。成豬多為不顯性感染，密飼、換氣不良及衛生條件差或飼料品質不良、病毒感染等因素易誘發本病，造成養豬業經濟重大損失。依臨床症狀與病理學變化，本感染症可分為敗血型、胃腸炎型及其他感染症。近年來豬霍亂沙氏桿菌已逐漸成為人畜共通細菌性傳染病，若感染人會引起嚴重疾病（腸炎、敗血症等），故此種情況已成為世界性公共衛生上的重要問題。分子分型法（molecular methods）具有廣泛鑑定基因型間差異的能力，並且有很好的再現性，但若為多變的表型特徵（如偶而表現的獨立基因或抗原）可能在再現性上會有問題；由於分子生物學的蓬勃發展，陸續有許多基因分型法被開發出來並廣泛的應用，如脈衝式電泳（pulsed-field gel electrophoresis；PFGE）、隨機增幅核酸片段多型性（random amplified polymorphic DNA；RAPD）、限制酵素片段長度多型性（amplified fragment length polymorphism；AFLP）等技術應用於流行病學的分析與研究，然而 PFGE 被認為是最具區別效力的分子分型法，其是一種藉週期性改變電場來分離大片段 DNA 分子的技術，被廣泛的應用在多種細菌病原的流行病學調查研究，在細菌傳染病的爆發流行事件監測上可及時監測細菌性食因性疾病的發生，具有早期偵測流行、及時介入防治的強大功能。

貳、材料與方法

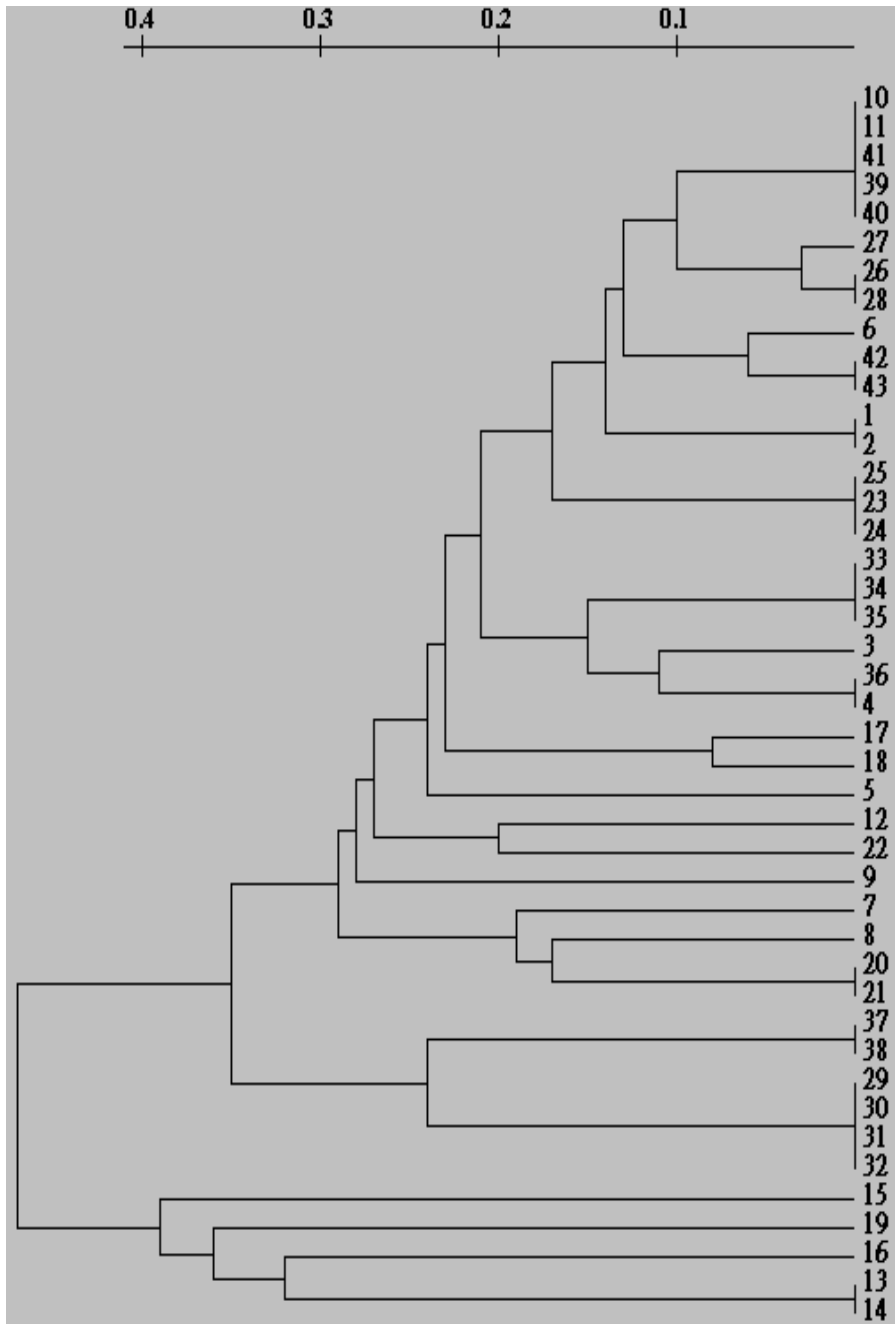
本實驗使用 43 株 *Salmonella Choleraesuis* 菌株，將所有實驗菌株之獨立菌落以革蘭氏染色套組（BD）行染色鏡檢後再行氧化酶（oxidase）、葡萄糖（glucose）、乳糖（lactose）、蔗糖（sucrose）、硝酸鹽（nitrate）還原、運動性（mobility）、吲哚（indole）及尿素酶（urease）等傳統生化試驗並選擇適當之細菌鑑定套組（API 20E）；菌株血清型鑑定則以 Difco 標準之 O 及 H 抗血清進行平板凝集及試管凝集。菌體包埋與清洗方面，取單一菌落劃線培養於血液培養基或 TSA（trypticase soy agarose），37°C 培養 16-18 小時，第二天以棉棒刮取菌落於 cell suspension buffer（100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8.0）中製成懸浮液，調整菌液濃度至 McFarland 4（約 1.2×10^8 CFU/mL），取 400 μ l 菌液至 1.5 ml 之離心管，加入 20 μ l proteinase K（20mg/ml），混合後加入 400 μ l 溶化後回溫至 56°C 的 1% agarose，快速以 pipette 混均勻後注入模具中，放置於室溫 15 分或 4°C 使充分凝固，再將菌塊自模具中推入含有 5 ml cell lysis buffer（50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0, 1% Sarcosine）及 25 μ l proteinase K（20 mg/ml），置於 56°C 恆溫水浴槽搖晃 2

小時，菌塊經酵素處理後，加入 15 ml 預熱至 56°C 的 ddH₂O，置於 56°C 恆溫水浴槽搖晃 15 分鐘，重複 ddH₂O 清洗兩次後，再以 15 ml 預熱至 56°C 的 TE buffer (10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) 清洗四次，膠體最後保存於 5 ml TE buffer 中，置於 4°C 冷藏，以供脈衝電泳分析使用。取出含 chromosome DNA 的膠體置入 200 µl 之限制酶緩衝液，室溫下放置 5 分鐘後再將膠體置入 200 µl 含限制酶之緩衝液於 37°C 水浴槽作用 2 小時。將作用後之膠體置入含有 200 µl 之 0.5X TBE buffer 放置 5 分鐘後取出膠體並以吸水紙吸乾附著於膠體上之緩衝液，再將膠體依序平貼於孔梳 (comb) 上並將孔梳放置於鑄膠台上，倒入溶化回溫至 56°C 的 1% SeaKem Gold agarose，放置室溫 20~30 分鐘待其凝固，並以 Bio-Rad CHEF Mapper 脈衝式電泳儀進行菌體核酸分離。跑膠條件：初始 2.16 秒、結束 63.8 秒、角度變換 120°、voltage 6 v/cm (200 V)、0.5x TBE、14°C、19 hrs，完成跑膠後以 0.5 µg/ml ethidium bromide 染色 15~20 分鐘，再以 ddH₂O 退染。指紋圖譜影像進一步以影像處理系統拍照儲存成數位檔進行比對分析。

參、結果與討論

沙氏桿菌為氧化酶陰性，可發酵葡萄糖，產酸，不發酵乳糖和蔗糖，並產生硫化氫及還原硝酸鹽形成亞硝酸鹽，產氣，具有運動性，吡啶及尿素酶皆為陰性。血清型鑑定使用 Difco 標準之 O 及 H 抗血清進行平板凝集及試管凝集，確認其血清型為 6,7:c:1,5 之 *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis*。以三種酵素處理之 PFGE 圖譜進行分析結果分別為：Xba I 顯示有 7 種不同之基因型別，其中主要相同基因群組有 35 株 (81.3%)，第二及第三群組各有兩株相同基因型 (4.6%)，其餘 4 株各分別獨立為 4 種不同基因型 (2.3%)；以 Spe I 作用後有 8 種不同之基因型別，其中主要相同基因群組有 27 株 (62.8%)，第二群組有 6 種相同基因型 (14.0%)，第三群組有 4 種相同基因型 (9.3%)，第四群組有 2 種相同基因型 (4.7%)，其餘 4 株各分別獨立為 4 種不同基因型 (2.3%)；在 Avr II 作用後有 25 種不同之基因型別，其中主要相同基因群組有 5 株 (11.6%)，第二群組有 4 種相同基因型 (9.3%)，第三群組有 3 種相同基因型 (7.0%)，第四、五、六、七、八群組則各分別獨立成 2 種相同基因型 (4.7%)，其餘 14 株各分別獨立為 14 種不同基因型 (2.3%)。進一步將三種酵素切割結果綜合分析後共得 25 種不同基因型。

本次實驗結果顯示以 Avr II 限制酶所切割之 PFGE 圖譜遠比以 Xba I 及 Spe I 限制酶所切割之 PFGE 圖譜之差異性要大許多；然而在限制酶的選擇上，標準化的 PFGE 操作程序需花費許多時間、人力與經費去決定最好的限制酶；選用適合的限制酶可大大減少使用其他酵素因切位點太少或太多可能造成的染色帶太少或重疊的現象，導致分辨上的困難；須注意的是細菌核酸必須新鮮，且操作條件如電泳進行時之溫度、脈衝時間長短及電壓大小考量均是影響 PFGE 切割酵素核酸指紋圖譜穩定性及再現性之因素。本實驗過程中顯示以 PFGE 分析其穩定性及再現性非常高，證實以 PFGE 方法應用於流行病學研究極具潛力。未來將收集更多 *Salmonella Choleraesuis* 菌株，除增加檢測方法外，風險評估、環境衛生及分子流行病學等相關技術亦將作為主要研究方向。



圖一、以 *Xba*I、*Spe*I 及 *Avr*II 三種酵素之軟體綜合分析結果，顯示有 25 種不同基因型。

