

## 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

郭靜蕙

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

### 緒言

豬霍亂沙門氏菌 (*Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis*) 主感染肥育期及肥育前期之肉豬。其臨床症狀為敗血症及敗血症所引發的腸炎、肺炎及腦炎等症狀；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、病毒感染症等因素易誘發本病，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。近年來豬霍亂沙門氏菌已逐漸成為人畜共通細菌性疾病，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。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。

### 材料與方法

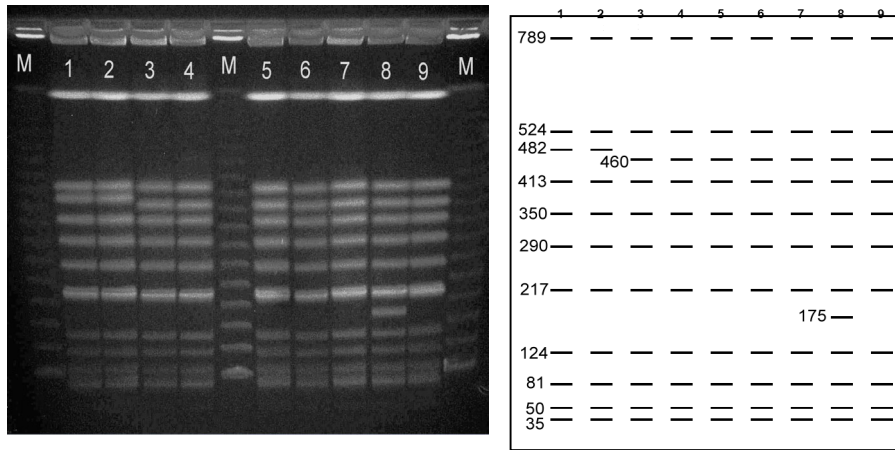
菌株的收集與鑑定方面，本實驗使用 43 株 *Salmonella Choleraesuis* 菌株，將所有實驗菌株進行包括氧化、葡萄糖、乳糖、蔗糖、硝酸鹽還原、運動性、indole 及 urease 等傳統生化試驗；再以 Difco 標準之 O 及 H 抗血清進行平板凝集及試管凝集。脈衝式電場膠體電泳方面則進行 PFGE 包埋與清洗，取單一菌落劃線培養於血液培養基或 TSA (Trypticase Soy Agarose)，37°C 培養 16 小時，第二天以棉棒刮取菌體於 cell suspension buffer (100mM Tris, 100mM EDTA, pH8.0) 中製成懸浮液，調整菌液濃度至 McFarland 4，取 400 µl 菌液至 1.5ml 之離心管，加入 20 µl proteinase K (20 mg/ml)，混合後加入等比例之 1% SeaKem Gold® agarose，快速混勻並注入模具中，待充分凝固後將膠塊自模具中推入含有 5ml cell lysis buffer (50mM Tris, 50mM EDTA, pH8.0, 1% Sarcosine) 及 25 µl proteinase K (20 mg/ml)，置於 56°C 水浴器震盪 2 小時，膠體經酵素處理後，加入 15 ml 預熱至 56°C 之 ddH<sub>2</sub>O，置於水浴器震盪 15 分鐘，重複 ddH<sub>2</sub>O 清洗兩次，再以 15 ml 預熱至 56°C 之 TE buffer (10 mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA, pH 8.0) 重複清洗四次後進行電泳分析。取出清洗過後之膠塊置入 200 µl 的 Xba I 之限制緩衝液中並置於室溫下 5 分鐘，

將膠塊置入 200  $\mu$ l 含 Xba I 限制 之緩衝液於 37°C 水浴槽作用 2 小時，將作用後之膠塊置入含有 200  $\mu$ l 之 0.5 X TBE buffer 放置 5 分鐘取出並以吸水紙盡量吸乾附著於上之緩衝液，再將膠塊依序平貼於孔梳 (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 Gene Navigator™ System 電泳儀進行核酸分離。跑膠條件：初始 2.16 秒、結束 63.8 秒、角度變換 120°、voltage 6v/cm (200V)、0.5 X TBE、14°C、19 hrs。完成跑膠後以 0.5  $\mu$ g/ml 的 ethidium bromide 染色 15~20 分鐘，再以 ddH<sub>2</sub>O 退染，將指紋圖譜影像進一步以影像處理系統拍照儲存成數位檔以供後續比對分析。

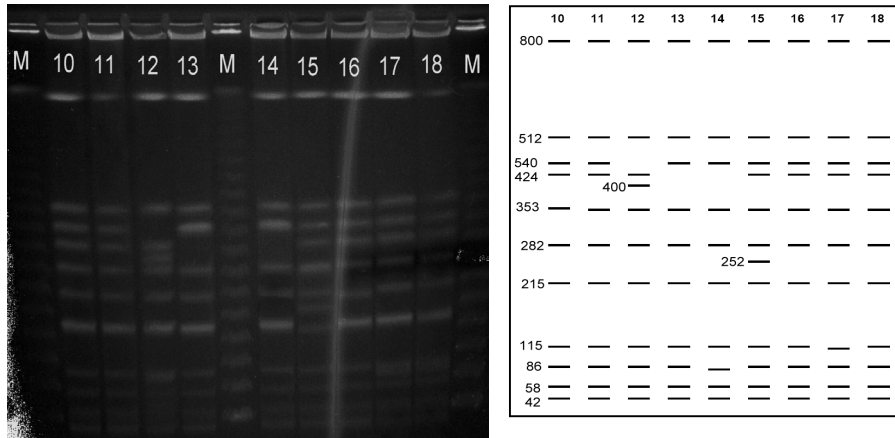
## 結果與討論

本實驗使用 43 株 *Salmonella Choleraesuis* 菌株進行血清學、生化性狀及脈衝式電泳，將所有實驗菌株進行包括氧化、葡萄糖、乳糖、蔗糖、硝酸鹽還原、運動性、indole 及 urease 等傳統生化試驗；再以 Difco 標準之 O 及 H 抗血清進行平板凝集及試管凝集，在確定為相同血清型菌株後進一步進行脈衝式電泳實驗。

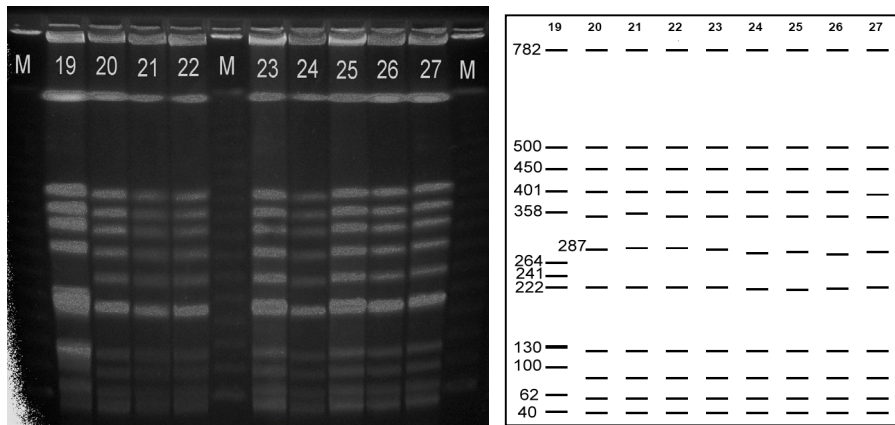
沙氏桿菌之生化性狀為氧化酶陰性，可發酵葡萄糖，產酸，不發酵乳糖和蔗糖，產硫化氫及還原硝酸鹽形成亞硝酸鹽，產氣，具有運動性，indole 及 urease 皆為陰性。血清學經 Difco 標準之 O 及 H 抗血清進行平板凝集及試管凝集，結果確認其血清型為 6,7:c:1,5 之 *Salmonella Choleraesuis*。PFGE 圖譜則利用 GeneProfiler® 及 Treecon ® 軟體進行分析結果顯示有 7 種不同之基因型別，其中主要相同基因群組有 35 株 (81.3%)，第二及第三群組各有兩株相同基因型 (4.6%)，其餘 4 株各分別獨立為 4 種不同基因型 (2.3%)。PFGE 切割酵素核酸指紋圖譜分析法在流行病學上已普遍認為是比較細菌分離株異同時的一種可靠方法，其為分析細菌全基因體限制 片段之技術，操作過程中將細菌體包埋在瓊膠內以避免基因體核酸在操作過程中斷裂，經由酵素與化學藥劑分解細菌基因體及清洗膠體過程逐一將細胞壁及細胞內容物清洗掉，留在瓊膠內之基因體核酸經特定限制酶切割後再使用脈衝電泳儀將巨大的核酸片段依不同大小分子量區分開來並將所得之 PFGE 圖譜以 GeneProfiler® 及 Treecon ® 軟體，然而在近進行 PFGE 時常面臨切割酵素如何選擇，Xba I 是 PFGE 分析 *Salmonella* spp. 第一選擇，減少了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、脈衝時間的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。在本實驗中，發現 PFGE 分析法的穩定性及再現性非常高，證實 PFGE 方法用於流行病學研究極具潛力。



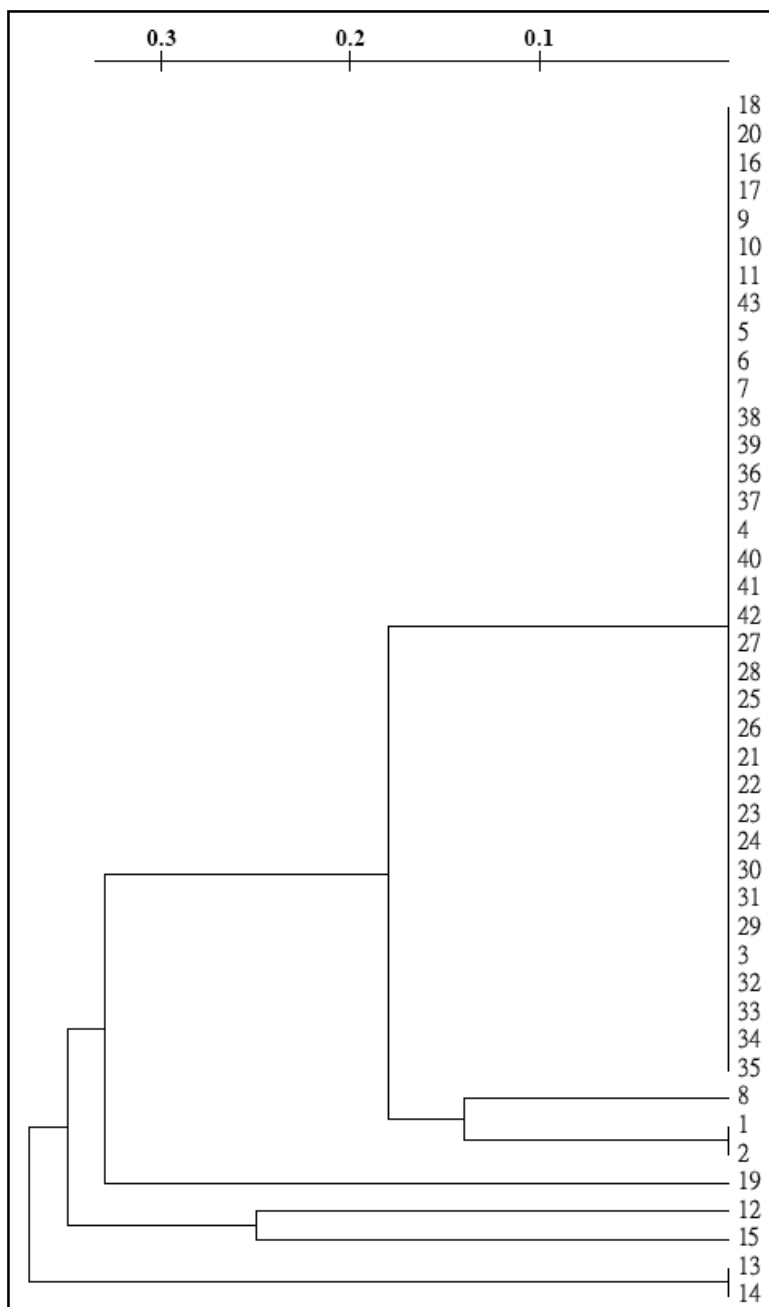
圖表一、菌株 1-9 進行 PFGE 實驗後結果，菌株間可分成 3 種不同基因型，其中菌株 1,2 及 3,4,5,6,7,9 各為同一基因型，菌株 8 則為一獨立基因型。



圖表二、菌株 10-18 進行 PFGE 實驗後結果，顯示菌株間可區分成 4 種不同基因型，其中菌株 13,14 為同一基因型，菌株 12,15 各獨立為一基因型。



圖表三、菌株 19-27 進行 PFGE 實驗後結果，其中菌株 19 可見明顯差異。



表一、菌株 1-43 進行 GeneProfiler®及 Treecon®軟體綜合分析結果，顯示有 7 種不同基因型。