

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

Streptococcus bovis 之 groESL 基因定序 表現及調控(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-002-353-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院醫事技術學系暨研究所

計畫主持人：鄧麗珍

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 5 月 26 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫進度報告

## *Streptococcus bovis* 之 *groESL* 基因定序、表現及調控(1/2) Sequencing, expression and regulation of *groESL* genes of *Streptococcus bovis*

計畫編號：NSC 92-2314-B-002-353

執行期限：92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

主持人：鄧麗珍 國立台灣大學醫學院 醫事技術學系

### 一、中英文摘要

*Streptococcus bovis* group 屬於 D 群鏈球菌，為人體或動物腸道的正常菌叢，但也會引起多種疾病，對於老年人或免疫力低者特別容易造成感染。臨床上 *S. bovis* 菌種鑑定以傳統試驗(bile-esculin, 6.5% NaCl test)，配合套組或自動化鑑定系統為主。由人體分離之 *S. bovis* 可依 mannitol、trehalose、glycogen 等生化反應，再區分為三種生物型：biotype I, II/1, II/2。許多研究發現不同生物型可能與不同疾病有關，特別是 biotype I 與大腸癌有很高相關。因此快速正確的鑑定是重要的。目前鑑定鏈球菌菌種的過程通常都是相當耗時且常有鑑定錯誤情況發生。而分子生物學鑑定已成為目前的趨勢。GroESL 屬熱休克蛋白 (Heat shock proteins, HSPs)，普遍存在於原核生物中，當細胞遭遇外在環境壓力，如溫度改變、養份不足、出現毒素等，會有一系列的蛋白質被大量表現以對抗外來的壓力，度過危機。此基因也常被用來作為菌種鑑定用。我們最近已成功的選殖與定序 *Enterococcus faecalis* (JCM, 2001)與 *Streptococcus* species (JCM, 2002)的 *groESL* 基因序列，且可分別針對 *groES*, spacer, *groEL* 等基因序列區分不同菌種。由於近年來 *S. bovis* 菌種分類與鑑定有許多改變。為能進一步設計涵蓋此多的快速方法，及了解 *groESL* 基因在腸球菌所扮演的角色。因此計劃於第一年針對 *S. bovis* 三種主要生物型(I, II/1, II/2)進行全長 *groESL* 基因選殖及定序。完成定序後分析的 GroES

或 GroEL 序列結果作菌種演化樹分析。並發展臨床快速鑑定或偵測，以 *groESL* 基因為標的分別設計菌種特異的 PCR，應用於菌種的快速鑑定。

**關鍵詞：***Streptococcus bovis*, *groESL* 基因、序列分析、快速鑑定

### Abstract

*Streptococcus bovis* is the causative agent of 5 to 14% of cases of endocarditis. An association between fecal carriage of *S. bovis* endocarditis and carcinoma of the colon has been appreciated for 2.5 decades. Importantly, since the early 1980s, genetic and biochemical diversity has been noted among *S. bovis* isolates. With the increasing incidence of drug-resistant *S. bovis* and the association with carcinoma of the colon, accurate identification becomes very important. The heat shock protein (GroESL) is ubiquitous and highly conserved among bacteria. In our previous study, the full-length sequence of *Enterococcus faecalis* and several *Streptococcus* species has been cloned and sequenced (J Clin Microbiol, 2002). Degenerate PCR primers based on conserved regions of the *groESL* operon were used to amplify the *groESL* of other species. In this project, the *groESL* sequences of different biotypes of *S. bovis* were determined. Phylogenetic analysis of the GroES or GroEL among species was determined. Since the preliminary results show that the *groESL* genes are alternative marker in differentiating closely related

bacterial species. For application of different biotypes of *S. bovis* identification, the specific PCR will be further developed.

**Keywords:** *S. bovis* group, *groESL* genes, sequencing

## 二、緣由與目的

D 群鏈球菌主要為 *Streptococcus bovis* group。為人體或動物腸道的正常菌叢，但也會引起多種疾病，對於老年人或免疫力低者容易造成感染，可造成菌血症、心內膜炎、腦膜炎等<sup>(1-5)</sup>。所引起之心內膜炎佔引起心內膜炎的細菌中約 5% 至 14%。更有許多報告指出 *S. bovis* 感染也可能與大腸癌有相關<sup>(6)</sup>。*S. bovis* 臨床上菌種鑑定以傳統試驗(bile-esculin, 6.5% NaCl)，配合套組或自動化鑑定系統為主<sup>(7-10)</sup>。由人體分離之 *S. bovis* 可依 mannitol、trehalose、glycogen 等生化反應，再區分為三種生物型：biotype I, II/1, II/2。許多研究發現 biotype I 與 colonic carcinoma 具有較高相關性。許多報告均認為不同生物型可能與不同疾病有關，特別是 biotype I 與大腸癌有很高相關。近來由於分子生物學的進步，對細菌的分類更加詳細<sup>(11)</sup>。Clarridge 等人分析 16S rDNA 序列，認為 biotype II/2 與其他生物型有很大不同<sup>(12)</sup>。Poyart 等人利用 superoxide dismutase 基因(*sodA*)及其他基因分析，提出將 *S. bovis* biotype II/2 重新命名為 *Streptococcus pasteurianus* sp. nov.<sup>(13)</sup>。Schlegel 等人提出將 *S. bovis* biotype II/1 重新命名為 *Streptococcus infantarius*。自人體分離的 *S. bovis* biotype I 應歸為 *Streptococcus gallolyticus*<sup>(2)</sup>。此外近來也有不少報告指出 *S. bovis* 的抗藥性有增加趨勢<sup>(14, 15)</sup>。目前臨床上的菌種鑑定方法，仍以傳統試驗為標準<sup>(7, 8)</sup>，但所需時間極長，並不實際。因此許多實驗室利用快速鑑定或自動化鑑定系統，例如 API 20S、API Rapid ID 32 Strep (bioMérieux-Vitek Inc.)、Vitek GPI card、MicroScan GP 等。但有些細菌會因生化特性的改變 (phenotype shifts) 導致重複試驗有不同結

果，或是相同的菌種，可能會有不同的生化特性表現，造成鑑定上的困難<sup>(16)</sup>。近年來，分子生物學方法已漸漸成為很好的輔助方法，其中以 16S rRNA 基因最廣為使用<sup>(17-18)</sup>。但 16S rRNA 基因對某些相近的菌種區分力並不佳<sup>(19)</sup>。熱刺激蛋白 (Heat shock proteins, HSPs) 普遍存在於細菌以至於人類，當細菌遭遇環境壓力下，如熱刺激、養份不足、毒素等，熱刺激蛋白會大量表現，統稱為壓力蛋白 (stress proteins)<sup>(20)</sup>。傳統上，依據分子量的不同，壓力蛋白分為 5 群 (families)—HSP90 (包含 HtpG)、HSP70 (包含 DnaK)、HSP60 (包含 GroEL 和 GroES)、small HSPs (HSPs 15-30) 和其他 HSPs (包含 DnaJ 和 GrpE)；其中，HSP60 又被稱為 chaperonins (cpns, cpn60 和 cpn10)，它和蛋白質的穩定性有關。*groEL* 基因也被發現與核糖體核糖核酸基因有著類似的特性，在各生物間，例如細菌、真菌、以至於哺乳動物，都有部分高度相似性 (highly conserved) 及部分變異性 (variable) 的區域<sup>(20)</sup>，相似性程度比 16S rRNA 基因稍低，也可當作分類或鑑定的工具<sup>(21, 22)</sup>。1989 年，有學者以片段的 65 kDa 分枝桿菌抗原基因 (65 kDa mycobacterial antigen gene, *groEL*) 當作探針 (probe) 來鑑定生長緩慢的分枝桿菌 (*Mycobacterium* species)。1996 年，Goh 等人以片段 *groEL* 基因當作探針，進行點漬雜交法 (dot blot hybridization)，用來鑑定葡萄球菌 (*Staphylococcus* species)<sup>(23, 24)</sup>，1998 年應用於鑑定 *Streptococcus iniae*<sup>(25)</sup>，結果具有相當高的準確性。最近我們也已成功的選殖與定序 *Enterococcus faecalis* (JCM, 2001) 與 *Streptococcus* species (JCM, 2002) 的 *groESL* 基因序列，且可分別針對 *groES*, spacer, *groEL* 等基因序列區分不同菌種<sup>(26, 27)</sup>。且發現不同 biotypes 之 *groESL* 基因序列有差異。因此，本計劃想藉由 *groESL* 基因層面來分析 *S. bovis* 各 biotypes 之間的親屬遠近關係，並發展出快速鑑定方法。至於表現與調控的部份，將參考其他細菌的模式<sup>(28-36)</sup>，於第二年進行。

### 三、結果

**菌株.** *S. bovis* 含參考菌株 6 株與臨床菌株 30 株。臨床菌株主要為收集台大醫院細菌科血液培養分離株。6 株參考菌株為 ATCC 9809 (biotype I)、ATCC43143 (biotype I)、ATCC43144 (II/2)、ATCCBAA102 (II/1)、ATCCBAA103 (II/1) 與 ATCC33317。

**PCR.** 由已知的 *S. bovis* ATCC 8909 *groESL* 基因序列，發現其啟動子區 (promoter region) 與 *groEL* 的某些序列，與其他革蘭氏陽性細菌類似，其啟動子區域亦有調控基因序列-CIRCE。在 *groES* 與 *groEL* 之間有一段 spacer 的區域，各個菌種之間的長度不盡相同。分二段進行 PCR。前段產物(含 *groES* 與 spacer) 結果(圖一)，產物大小有差異。後段產物長度則相同。下圖為圖一。

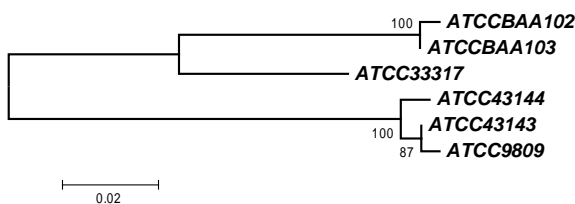
M 1 2 3 4 5 6 7



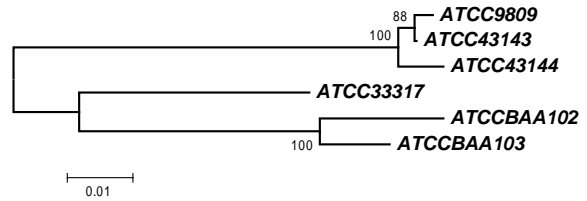
Lanes 1-7: *S. bovis* ATCC 9809 (I)、ATCC 43143 (I)、生化型 II/2 臨床菌株 3004 及 7421、ATCC 33317、ATCCBAA102 (II/1) 及 ATCCBAA103 (II/1). M: 100bp ladder DNA marker (Gibco,BRL)

**Sequencing.** *groESL* 基因序列分析包括 *groES* (282 bp)、spacer、與 partial *groEL*。

#### (A) *groES* (full length, 285 nucleotides)



#### (B) Partial *groEL* (883 to 1571)



#### (C) Spacer

<i>S. bovis</i>	Intergenic spacer sequence (5'-3')	bp
ATCC 9809	GAGAGATTGT	67
(biotype I)	GCTATTAACG TTTATTTAGA	
ATCC 43143	AAATTTATCA ATAGAAATAA	
(biotype I)	AATAGAGGAA ACTAATC	
ATCC 33317	GATAGATTAA TAAAATAGTA	50
	TATTAATAGA AATCAAACAG	
	AGGAATAGAT	
Clinical isolates	GAGAAATTGT GCTATTAATG	66
(biotype II/2)	TTTATTTAGA AAATTTATCA	
	TAGAAATAAA ATAGAGGAAA	
	CTAATC	

### 四、討論

分析與比較 *S. bovis* 三種主要生物型的 *groESL* 序列，發現不同生物型間 *groES* 與 *groEL* 序列的確有差異。

*S. bovis* 三種生物型的 spacer 長度與序列也有顯著不同，biotype I 與 biotype II/2 較接近，biotype II/1 明顯較長。但 ATCC 與臨床菌株是否有一致性，需等臨床菌株 *groESL* 序列都完成後，才能確認。

### 五、成果自評

- (1). PCR：以 PCR 法，發現不同 biotypes 之 PCR 產物(*groES* 加上 spacer)長度不同。partial *groEL* 基因之長度相同。
- (2). 序列分析：我們已順利完成 6 株 ATCC 的 *groES*, spacer, partial *groEL* 基因之 sequencing 30 株臨床菌株之 sequencing 正進行中。等臨床菌株之 sequencing 完成後，將設計 biotype-specific 鑑定方法
- (3). 將於第二年進行 *S. bovis* 之 GroE 表現

及調控。

## 六、參考文獻

- [1] Duval, X. et al. 2001. Definite *Streptococcus bovis* endocarditis: characteristics in 20 patients. *Clin Microbiol Infect* 7:3-10
- [2] Ballet, M., G. Gevigney, J. P. Gare, F. Delahaye, J. Etienne, and J. P. Delahaye. 1995. Infective endocarditis due to *Streptococcus bovis*, A report of 53 cases. *European Heart J.* 16:1975-1980.
- [3] Grant, R. J., T. R. Whitehead, and J. E. Orr. 2000. *Streptococcus bovis* meningitis in an infant. *J. Clin. Microbiol.* 38: 462-463.
- [4] Muhlemann, K., S. Graf, and M. G. Tauber. 1999. *Streptococcus bovis* clone causing two episodes of endocarditis 8 years apart. *J. Clin. Microbiol.* 37:862-863.
- [5] Herrero, I. A. et al. 2002. Reevaluation of *Streptococcus bovis* endocarditis cases from 1975 to 1985 by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40:3848-3850.
- [6] Ellmerich, S. et al. 2000. Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis* 21:753-756.
- [7] Coykendall, A. L. 1989. Classification and identification of the viridans streptococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 315-328.
- [8] Beighton, D., J. M. Hardie, and R. A. Whaley. 1991. A scheme for the identification of viridans streptococci. *J. Med. Microbiol.* 35: 367-372.
- [9] Freney, J., S. Bland, J. Etienne, M. Desmonceaux, J. M. Boeufgras, and J. Fleurette. 1992. Description and evaluation of the semiautomated 4-hour rapid ID 32 strep method for identification of streptococci and members of related genera. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2657-2661.
- [10] Bascomb, S., and M. Manafi. 1998. Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic gram-positive cocci. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 318-340
- [11] Bentley, R. W., J. A. Leigh, and M. D. Collins. 1991. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 487-494.
- [12] Clarridge, J. E., III, S. M. Attorri, Q. Zhang, and J. Bartell. 2001. 16S ribosomal DNA sequence analysis distinguishes biotypes of *Streptococcus bovis*: *Streptococcus bovis* biotype II/2 is a separate genospecies and the predominant clinical isolate in adult males. *J. Clin. Microbiol.* 39:1549-1552..
- [13] Poyart, C., G. Quesne and P. Trieu-Cuot. 2002. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (soda) sequences: reclassification of *Streptococcus infantarius* subsp. Coli as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteuianus* sp. nov. *Int J Syst Evolu Microbiol* 52:1247-1255.
- [14] Teng, L. J., Hsueh PR, Ho SW, Luh KT. 2001. High prevalence of inducible erythromycin resistance among *Streptococcus bovis* isolates in Taiwan. *Antimicrobial Agents Chemother* 45: 3362-3365.
- [15] Poyart, C., C. Pierre, G. Quesne, B. Pron, P. Berche, and P. Trieu-Cuot. 1997. Emergence of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: Characterization of a *vanB* transferable determinant in *Streptococcus bovis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:24-29.
- [16] Tardif, G., M. C. Sulavik, G. W. Jones, and D. B. Clewell. 1989. Spontaneous switching of the sucrose-promoted colony phenotype in *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.* 57: 3945-3948.
- [17] Garnier, F., G. Gerbaud, P. Courvalin,

- and M. Galimand. 1997. Identification of clinically relevant viridans group streptococci to the species level by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2337-2341.
- [18] McClelland, M., C. Petersen, and J. Welsh. 1992. Length polymorphism in tRNA intergenic spacers detected by using the polymerase chain reaction can distinguish streptococcal strains and species. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 1499-1504
- [19] Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, H. Mura, and T. Ezaki. 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 406-408.
- [20] Ellis, R. J. 1996. Chaperonins: introductory perspective, P. 1-25. *In* R. J. Ellis (ed.), *The chaperonins*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- [21] Ellis, R. J. 1996. Stress proteins as molecular chaperones, P. 1-26. *In* W. V. Eden, and D. B. Young (ed.), *Stress proteins in medicine*. Marcel Dekker, Inc., New York, New York..
- [22] Viale, A. M., K. A. Adrián, C. S. Fernando, and G. F. Paúl. 1994. Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 527-533
- [23] Goh, S. H., S. Potter, J. O. Wood, S. M. Hemmingsen, R. P. Reynolds, and A. W. Chow. 1996. HSP60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 818-823.
- [24] Goh, S. H., Z. Santucci, W. E. Kloos, M. Faltyn, C. G. George, D. Driedger, and S. M. Hemmingsen. 1997. Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 3116-3121.
- [25] Goh, S. H., D. Driedger, S. Gillett, D. E. Low, S. M. Hemmingsen, M. Amos, D. Chan, M. Lovgren, B. M. Willey, C. Shaw, and J. A. Smith. 1998. *Streptococcus iniae*, a human and animal pathogen: specific identification by the chaperonin 60 gene identification method. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2164-2166
- [26] Teng LJ, Hsueh PR, Wang YH, Lin HM, Luh KT, Ho SW. 2001. Determination of *Enterococcus faecalis groESL* full-length sequence and application for species identification. *J Clin Microbiol* **39**:3326-3331.
- [27] Teng LJ, Hsueh PR, Tsai JC, Chen PW, Hsu JC, Lai HC, Lee CN, Ho SW. 2002. *groESL* sequence determination, phylogenetic analysis, and species differentiation for viridans group streptococci. *J Clin Microbiol* **40**:3172-3178.
- [28] Narberhaus, F., and H. Bahl. 1992. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *groESL* operon of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **174**: 3282-3289.
- [29] Ohta, T., K. Honda, M. Kuroda, K. Saito, and H. Hayashi. 1993. Molecular characterization of the gene operon of heat shock proteins hsp60 and hsp10 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**: 730-737.
- [30] Segal, G., and E. Z. Ron. 1996. Regulation and organization of the *groE* and *dnaK* operons in eubacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**: 1-10.
- [31] Thies, F. L., A. Weishaupt, and H. Karch. 1999. Cloning, sequencing and molecular analysis of the *Campylobacter jejuni groESL* bicistronic operon. *Microbiology* **145**: 89-98.
- [32] Ohta, T., K. Honda, M. Kuroda, K. Saito, and H. Hayashi. 1993. Molecular characterization of the gene operon of heat shock proteins hsp60 and hsp10 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun. 193: 730-737
- [33] Segal, G., and E. Z. Ron. 1996. Regulation and organization of the *groE* and *dnaK* operons in eubacteria. FEMS Microbiol. Lett. 138: 1-10
- [34] Lemos JAC, Chen YM and RA Burne. 2001. Genetic and physiologic analysis of the *groE* operon and role of the HrcA repressor in stress gene regulation and acid tolerance in *Streptococcus mutans*. J Bacteriol 183: 6074-6084.
- [35] Gahan CGM, J O'Mahony, and C Hill. 2001. Characterization of the *groESL* operon in *Listeria monocytogenes*: utilization of two reporter systems (*gfp* and *hly*) for evaluating in vivo expression. Infect Immun 69:3924-3932
- [36] Broadbent, J. R., C. J. Oberg and L. Wei. 1998. Characterization of the *Lactobacillus helveticus groESL* operon. Res. Microbiol. 149:247-253