

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

製備豬霍亂沙門氏菌 HTRA, AROA 突變株及其做為活菌疫苗之黏膜免疫

計畫編號：NSC88-2313-B-002-053

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：潘銘正 執行機構：國立台灣大學獸醫學系

## 一、中文摘要

豬霍亂沙門氏菌對豬來說是非常重要的細菌性傳染病，為了選殖一個減毒的菌株做為活毒疫苗，利用已發表的沙門氏菌 *typhimurium* 的 *htrA* 基因設計的引子，經多聚合酶連鎖反應增幅選殖出豬霍亂沙門氏菌的 *htrA* 基因，並利用 karamycin 抗藥性基因插入 *htrA* 基因中來不活化該基因。將此不活化基因接入自殺質體 pGP704 中，再轉型入豬霍亂沙門氏菌中，雖利用 karamycin 篩選得到數顆具抗藥性的菌株，但經多聚合酶連鎖反應確無法增幅出該不活化基因片段。

關鍵詞：豬霍亂沙門氏菌、*htrA* 基因、沙門氏菌 *typhimurium*、多聚合酶連鎖反應

## Abstract

*Salmonella choleraesuis* is an important swine infectious disease. In order to produce an attenuated *Salmonella choleraesuis* as a vaccine, we expect to clone a *htrA* gene mutated *Salmonella choleraesuis* to be a attenuated strain. At first, we inactivate *htrA* gene by inserting a karamycine resistant gene to the *htrA* gene containing fragment which is amplified by PCR with primers derived from *Salmonella typhimurium htrA* gene and then ligate the mutated *htrA* gene to suicide plasmid pGP704. After transforming to *Salmonella choleraesuis*, we have selected several colonies. Unfortunately, we are unable to amplify the inactivated *htrA* gene fragment from all the colonies.

Keyword: *Salmonella choleraesuis*, *htrA* gene, *Salmonella typhimurium*, PCR

## 二、緣由與目的

沙門氏菌症為本省養豬業非常重要，且常見之細菌性傳染病[1]。所造成的經濟損失非常嚴重。養豬農民在飼料中添加超量抗菌劑使抗藥性菌株愈來愈多。無法使用抗生素治療，雖然施打疫苗是有效且最經濟的方法，然而因為傳統的死菌疫苗無法產生有效的黏膜免疫和細胞性免疫，因此效果不彰。如果能將沙門氏菌當作載體，攜帶其它抗原基因，甚或接上具增強免疫功能的細胞激素 (cytokine) 基因；使變成多價的活菌複合疫苗 [19][2][11][12][5]，其經濟效益將變的更高。

一般最常用溫度敏感變異株 (temperature-sensitive mutant; TS mutant) 來製造活菌疫苗[7][9]，且可發生減毒的特性，很多研究者均朝此減毒或無毒活菌疫苗的方向發展[13]。本計劃製造 *htrA* 的突變種，*htrA* 是耐高溫的基因，因此 *htrA* 突變菌株不能耐高溫[3][4][6][14][15][17]。高溫對細菌是一種窮境(stress)[10]，而細菌在窮境產生熱休克(heat shock)蛋白質。窮境不只在高溫，在吞食細胞內也是窮境，故帶有 *htrA* 的沙門氏菌可能在吞食細胞內不能產生 *htrA* 因而不能存活。故製成 *htrA* 的沙門氏菌後，將試驗其毒性，如減毒或失去毒性，或許可當作疫苗。豬之沙門氏菌感染也有其他血清型，如海德堡 (Heidelberg) 血清型，而這些均可致病於人，因此也將其他血清型做突變株。本計

畫擬從本地分離株中挑選具高抗原性、高病原性之豬霍亂沙門氏菌，利用核酸增幅、基因選殖、基因互補、及同源性基因交換等技術，來建構幾種充份減毒，但仍具足夠抗原性，而能引發保護性液遞及細胞免疫的變異株。

### 三、結果

#### (一) 豬霍亂沙門氏菌 *htrA* 基因突變株之建構

1. 參考已發表 *typhimurium* 血清型之 *htrA* 基因 (GenBank A18802) 分別設計一對含 *Pst*I 及 *Hind*III 酵素切位的 primer:

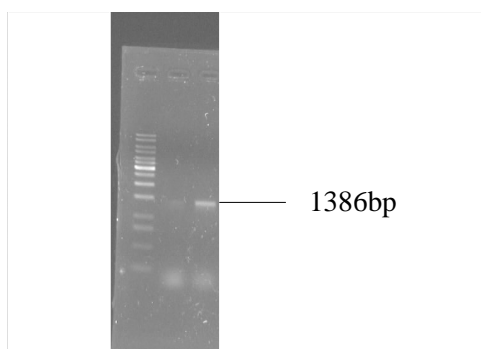
SC1-

GAACTGCAGTATATGAAAAA  
ACCAC

SC2-

TGAAAGCTTCGGCTTGCTGTCG  
GGAATCTT。

2. 以豬霍亂沙門氏菌核酸為模版，以 Takara Ex Taq PCR kit 增殖 *htrA* 基因 (預計產物為 1,368 bp), PCR 條件為 94 1 分鐘、42 1 分鐘、72 1 分鐘。所得產物如下圖



3. 將上述產物選殖到 pCR®II-TOPO 的質體上，再將 *htrA* 基因片段以 *Kpn*I 及 *Xba*I 酵素重覆切割下來。
4. 將上述產物選殖到 pUC18, pUC18

上的限制酶切位 *Nar*I 經切割及再補滿後重新接合篩選到的質體再以 *Kpn*I 及 *Xba*I 酵素重覆切割並與 *htrA* 基因片段接合，轉殖至 *E. coli* Top 10，得到 pUC-*htrA* plasmid。

5. 將其經 DNA 定序已得序列 1338 bp, 經與沙門氏菌 *typhimurium* 的 *htrA* 基因比對有 97.83% 的相似性。
6. 將 pUC-*htrA* plasmid 質體以 *Nar*I 切開後並補滿，接入市售 pUC-4K 質體 (Pharmacia Biotech) 之 Tn 903 即 Kanamycin 抗性基因(以 *Bam*HI 切開並補滿)，可得到 pUC-Tn903-*htrA* 的質體，此時 *htrA* 基因已經被不活化了。
7. 將不活化 *htrA* 基因從質體上以 *Sac*I 及 *Xba*I 切下植入自殺質體 pGP704(以 *Sac*I 及 *Xba*I 切開)[8][16]中得到 pGP-*htrA* 質體。
8. 將 pGP-*htrA* 質體轉殖進入 *E. coli* SY327 中增殖質體，將此質體抽出在轉殖進入豬霍亂沙門氏菌中，此豬霍亂沙門氏菌為經過篩選，對 Kanamycin & Ampicillin 均具有敏感性。

#### (二)、多聚合酶連鎖反應(PCR)及豬霍亂沙門氏菌基因重組株之篩選

1. 將 pGP-*htrA* 質體轉殖至豬霍亂沙門氏菌並以含有 kanamycin 之培養基去篩選因基因交換而產生之 *htrA* 基因變異株，經挑選出來菌株對 Ampicillin 必須具有敏感性。
2. 並以 SC1 及 SC2 引子利用 PCR 增幅 *htrA* 變異基因來確認陽性的豬霍亂沙門氏菌 *htrA* 基因變異株。
3. 經過多次轉殖雖得數株豬霍亂沙門氏菌對 Karamycin 有抗藥性及對 Ampicillin 敏感性的菌株，但

經 PCR 增幅卻無法增幅出 *htrA* 變異基因。

#### 四、討論

利用由沙門氏菌 *typhimurium* 的 *htrA* 基因所設計的引子 SC1 與 SC2 確實可從豬霍亂沙門氏菌增幅出所預定的 DNA 片段，而其序列相似性高達 97.83%。本計劃中利用 Kanamycin 抗性基因插入所選殖基因中雖可造成該基因的突變，但因而將抗藥性基因帶入，亦將減弱其在疫苗上的應用，此缺陷可利用單點突變及相反選擇標記(counter selectable marker)[18]來改善。本計劃中經幾次改造選殖含有不活化 *htrA* 基因的質體利用氯化鈣所製作的 competent cell 或電氣轉型作用將質體送入豬霍亂沙門氏菌，但利用 karamycin 及 PCR 並無法篩選到含有不活化 *htrA* 的豬霍亂沙門氏菌，其原因可能為(1)所選用的豬霍亂沙門氏菌本身可能已含有質體而影響轉型作用的成功率(2)所選用豬霍亂沙門氏菌的基因重組頻率較低，造成不易選殖。若上述推測為真，可利用 liposome 增加轉型的機率並且以相反選擇標記[18]來增加基因重組選殖的機會。

#### 五、計畫成果自評

本計畫已選出殖豬霍亂沙門氏菌之 *htrA* 基因，為建構該菌的活毒疫苗踏出第一步，雖未能成功選殖出含不活化 *htrA* 基因的豬霍亂沙門氏菌，但由本計畫中所累積的經驗可加速未來基因選殖的速度及減少所犯的錯誤，並對染色體基因重組能有更好的操作模式。

#### 參考文獻：

1. 張甘楠及蔡信雄。1996。豬霍亂沙氏桿菌產生之細胞毒素”P65”之定性：(I) P65 對 ICR 小鼠毒性作用之組織病理學研究。《中華獸醫誌》。22: 331-339。
2. Cardenas L. and Clements JD. 1992.

- Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. As carriers of foreign antigen. *Clin. Microbiol. Rev.* 5:328-342.
3. Chabalgoity JA et al., 1996. A *Salmonella typhimurium htrA* live vaccine expressing multiple copies of a peptide comprising amino acids 8-23 of herpes simplex virus glycoprotein D as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C protects mice from herpes simplex virus infection. *Mol. Microbiol.* 19: 791-801.
4. Chatfield SN et al. 1992. Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harbouring defined mutations in *htrA* and *aroA* in the murine salmonellosis model. *Microbial Pathogen.* 12: 145-151.
5. Clements JD et al. 1996. Endogenous and exogenous interleukin-12 augment the protective immune response in mice orally challenged with *Salmonella dublin*. *Infect. Immun.* 64:1437-1440.
6. Elzer, P. H. et al. 1994. Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (*htrA*) deletion mutant. *Infect. Immun.* 62: 4135-4139.
7. Gherardi, MM. et al., 1993. Protective capacity of a temperature-sensitive mutant of *Salmonella enteritidis* after oral and intragastric inoculation in a murine model. *Vaccine*, 11:19-24.
8. Herreo, M. et al. 1990. Transposon vector containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6557-6576.
9. Hooke, AM. Et al., 1993. Genetically stable temperature-sensitive mutants of *Salmonella typhi* induce protection in mice. *Vaccine*, 11:1386-1389.
10. Johnson K et al. 1991. The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. *Mol. Microbiol.* 5: 401-407.
11. Khan CMA et al., 1994. The construction, expression, and

- immunogenicity of the *Shistosoma mansoni* P28 glutathione S-transferase, expressed as C-terminal fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *J. Immunol.* 153: 5634-5642.
12. Khan CMA et al., 1994a. The construction, expression, and immunogenicity of the *Shistosoma mansoni* P28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 11261-11265.
  13. Lee, MD. et al., 1990. Characterization of *Pasteurella multocida* mutants of low virulence. *Avian Dis.*, 34:958-963.
  14. Li, SR et al. 1996. Construction and characterization of a *Yersinia enterocolitica* O:8 high-temperature requirement (*htrA*) isogenic mutant. *Infect. Immun.* 64: 2088-2094.
  15. Loosmore, S. M. et al. 1998. The Haemophilus influenzae *htrA* protein is a protective antigen. *Infect. Immun.* 66: 899-906.
  16. Miller, V. L. and J. J. Mekalanos. 1988. A Novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* require *toxR*. *J. Bacteriol.* 170: 2575-2583.
  17. Philips, R. W. 1997. A *Brucella melitensis* high-temperature-requirement A (*htrA*) deletion mutant is attenuated in goats and protects against abortion. *Res. Vet. Sci.* 63: 165-167.
  18. Reyrat, JM et al. 1998. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect. Immun.* 66: 4011-4017.
  19. Sadoff JC et al., 1988. Oral *Salmonella typhimurium* vaccine expressing circumsporozoite protein protects against malaria. *Science.* 240: 236-238