

## 豬霍亂沙門氏桿菌之染色體中含有與鼠傷寒沙門氏桿菌 *fimY* 基因相同的 DNA 序列

\*葉光勝 張金淑 許熾宜 陳啓銘 鄭益謙

台灣養豬科學研究所病理生物系 苗栗縣竹南鎮  
(收稿日期: 89年3月16日。接受日期: 89年6月19日)

**摘要** 鼠傷寒沙門氏桿菌染色體上的 *fim* 基因組包含了 9 個與第一型線毛結構、運輸、合成、調控有關的基因及 1 個精氨酸 tRNA 基因。*fimY* 是其中一個與線毛表現調控有關的基因，但其氨基酸序列與一般細菌的調控因子不同，相似性很低。本研究希望利用此特性，探討以 *fimY* 做為一偵測沙門氏桿菌工具的可能性。我們根據鼠傷寒沙門氏桿菌 *fimY* 及上游的 DNA 序列，設計一對引子，利用聚合酶鏈鎖反應增殖一段 739 bp 長度的 DNA 片段做為探針，利用點墨雜交技術，先測試 *fimY* 在 165 株臨床上所分離的豬霍亂沙門氏桿菌以及 10 種其他革蘭氏陰性細菌的分佈情形。結果顯示類似 *fimY* 的 DNA 序列存在於所有測試的豬霍亂沙門氏桿菌分離株，而本實驗所測試之其他革蘭氏陰性細菌則無類似之 DNA 序列。利用針對 *fimY* 所設計的引子，聚合酶鏈鎖反應可偵測豬霍亂沙門氏桿菌之靈敏度為 0.04 pg 的菌體 DNA 或是 180 個細菌體。由目前的研究得之，豬霍亂沙門氏桿菌染色體上也含有類似鼠傷寒沙門氏桿菌的 *fimY* DNA 序列，而且聚合酶鏈鎖反應可很靈敏地偵測 *fimY*。如果未來可證實絕大部分的沙門氏桿菌血清型都含有 *fimY* DNA 序列，則在獸醫臨床微生物診斷上，可利用聚合酶鏈鎖反應偵測類似 *fimY* 基因序列的有無，快速區別沙門氏桿菌及其他常見之陰性細菌，值得做進一步的開發研究。[\*葉光勝、張金淑、許熾宜、陳啓銘、鄭益謙。簡訊：豬霍亂沙門氏桿菌之染色體中含有與鼠傷寒沙門氏桿菌 *fimY* 基因相同的 DNA 序列。中華獸醫誌 26 (3): 242-246, 2000。\*聯絡人 TEL: 037-672 352 ext. 521, FAX: 037-692 820, E-mail: ca@mail.prit.org.tw]

**關鍵詞:** 沙門氏桿菌, 線毛, 聚合酶鏈鎖反應

### 緒 言

許多革蘭氏陰性細菌的體表有一種類似髮狀物的結構，稱之為線毛 (fimbriae)。此結構可讓細菌吸附在宿主的黏膜細胞，藉以造成進一步感染或散播的作用 [8]。大部份腸道桿菌屬 (*Enterobacteriaceae*) 的細菌，包括沙門氏桿菌 (*Salmonella* spp.)，會產生第一型線毛 (type 1 fimbriae)，其長度約為 0.2-2.0  $\mu\text{m}$ ，直徑為 7 nm 左右 [1,6]。此型線毛可吸附在紅血球、白血球、腸道細胞、呼吸道細胞、原蟲、酵母菌、黴菌的假根、以及植物的根毛等 [7]。以鼠傷寒沙門氏桿菌 (*S. typhimurium*) 為例，與第一型線毛表現有關的 DNA 片段位於菌體 DNA 上 [2]。此 DNA 片段包含了 9 個可產生蛋白質的基因及 1 個精氨酸 (argi-

nine) tRNA 基因，這 10 個基因合稱為 *fim* 基因群 (Fig. 1) [3]。其中 *fimA*、*fimI*、*fimF* 為線毛次單位蛋白質 (fimbrial subunit protein) 基因，其基因產物為線毛結構的一部份。*fimC* 及 *fimD* 分別是 chaperone 與 usher protein 基因，與線毛次單位的運輸、合成有關。*fimH* 的產物為 adhesin，與線毛的吸附性有關。*fimZ*、*fimY*、*fimW* 與 arginine tRNA 基因 *fimU*，則在線毛的表現調控上扮演重要的角色 [10,11,12]。經過氨基酸序列分析，除了 *fimY* 外，其餘的 9 個基因都能在 GenBank Database 中，找到在其他細菌內相似性很高的相對基因 (counterpart genes) [11]。基於這個發現，本研究希望進一步探討能否利用 *fimY* 的特異性，來做為一鑑別沙門氏桿菌的標的基因。

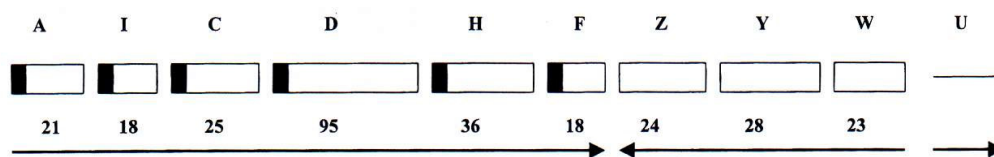


Fig. 1 Genetic organization of the *Salmonella typhimurium* *fim* gene cluster. The predicted sizes of the Fim polypeptides are given in kilodaltons using Arabic figures. The signal peptide region of each gene product is shown as small closed box. The arrows indicate the direction of transcription. The established or postulated functions of the genes are indicated as follows: A, major fimbrial subunit; I, minor fimbrial subunit; C, chaperone; D, molecular usher; H, adhesin; F, minor fimbrial subunit; Z, regulator; Y, regulator; W, regulator; U, arginine tRNA.

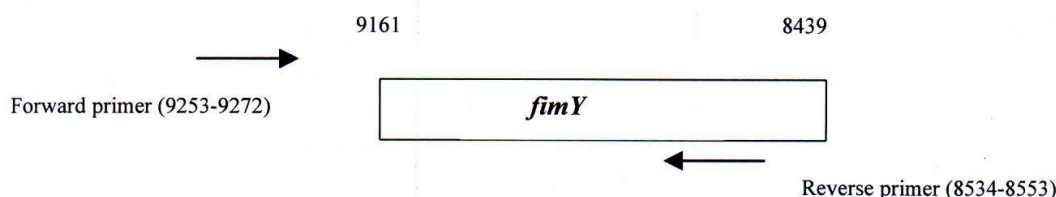


Fig. 2 Schematically illustrated the PCR primers and their related location. The numbers denote the positions in the GenBank accession number L19338. *fimY* starts at 9161 and ends at 8439.

由於豬霍亂沙門氏桿菌 (*S. choleraesuis*) 在獸醫上是豬的重要病原菌，故先以此病原菌為研究對象，探討類似 *fimY* 的 DNA 序列是否存在於豬霍亂沙門氏桿菌中。在鼠傷寒沙門氏桿菌 *fimY* 的上游及 C-terminal 處分別設計正向引子 5'-GAAACATCAGAGCAACGAAG-3' 及逆向引子 5'-GCCGGTAAACTACACGATGA-3' (Fig. 2)，希望能以聚合酶鏈鎖反應增幅一段預測應為 739 bp 長度的 DNA 片段。反應試管內最終濃度為 1 × buffer、200 μM dNTPs、0.5 μM 引子、0.5 U *Taq* DNA polymerase，以及 1 ng 含有整個鼠傷寒沙門氏桿菌 *fim* 基因群的質體 pISF101 為模版 [2]。進行聚合酶鏈鎖反應的條件為：先以 94°C 加熱 2 分鐘，再以 94°C 1 分鐘、56°C 30 秒、72°C 30 秒，進行 30 個循環，然後再以 72°C 反應 10 分鐘。產物經由 0.7% 瓊脂凝膠電泳分析，可見到一段長度約為 739 bp 的 DNA 片段。此段 DNA 經 PCR Purification Kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IL) 純化後，以 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit II (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IL) 所提供的步驟加以標示，做為一個探針 (probe)，然後以點墨雜交 (dot hybridization) 的方法 [9]，分析這一段含有大部份 *fimY* 基因的 DNA 序列在 165 株豬霍亂沙門氏桿菌野外分離株及其他革蘭氏陰性細菌分佈的情形。

其結果如 Table 1 所示，本實驗所測試的豬霍亂沙門氏桿菌分離株都能與探針做雜交反應，顯示其細菌體內具有與探針相似的 DNA 序列，其餘 10 種革蘭氏陰性細菌則無。為了將來可以快速偵測沙門氏桿菌，我們也以聚合酶鏈鎖反應的方法測試這些細菌。取 1 mL 待測細菌的過夜培養液置於微量離心管離心 1 分鐘，傾倒掉上清液，將沉澱的菌體以 500 μL 無菌蒸餾水做成懸浮液。將此配製之細菌懸浮液煮沸 10 分鐘後，取 10 μL 當做模版，加入反應溶液，其餘條件不變如上所示。聚合酶鏈鎖反應可從含豬霍亂沙門氏桿菌溶解產物 (lysate) 的反應管增幅出 739 bp 的 DNA 產物，其他革蘭氏陰性細菌溶解產物則無法增幅出此 DNA 片段 (Table 1)。為了證明這些 DNA 片段並不是非特異性的增幅產物，DNA 經轉移至 nylon membrane 後，以上述從 pISF101 為模版增幅出來的 739 bp DNA 為探針，進行南方雜交 (Southern hybridization) [9] 反應，結果從豬霍亂沙門氏桿菌溶解產物增幅出的 DNA 片段，都能與探針雜交上，證明這些 DNA 片段含有大部份 *fimY* 的 DNA 序列。

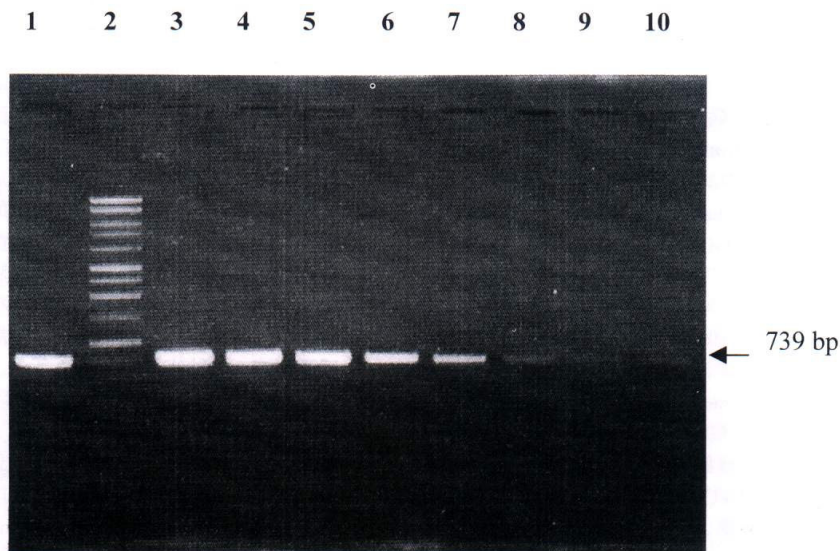
為了測試以聚合酶鏈鎖反應偵測豬霍亂沙門氏桿菌的靈敏度，先以 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI)，萃取 1 野外分離株的菌體 DNA，以 GeneQuant II RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Piscata-



**Table 1.** Detection of *fimY* among *S. choleraesuis* isolates and several other species

Microorganisms	Results of PCR	Dot hybridization with a <i>fimY</i> -derived probe
165 <i>Salmonella choleraesuis</i> clinical isolates	+	+
Other Gram negative bacteria <sup>a</sup>		
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-
<i>Pasteurella multocida</i>	-	-
<i>Serratia plymuthica</i>	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-

a: All the bacterial species were clinical isolates.



**Fig. 3** Sensitivity of PCR amplification. Lane 1. positive control, pISF101 used as template; 2. molecular size markers, 250-10,000 bp ladder (Promega, Madison, WI); Lanes 3-10, extracted genomic DNA of *S. choleraesuis* used as templates. 3, 0.4  $\mu\text{g}$ ; 4, 0.04  $\mu\text{g}$ ; 5, 4 ng; 6, 0.4 ng; 7, 0.04 ng; 8, 4 pg; 9, 0.4 pg; 10, 0.04 pg

away, NJ) 測其濃度，並以無菌蒸餾水稀釋至 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，然後以 10 倍連續方式將濃度稀釋至 0.04  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。使用不同濃度之菌體 DNA 當做模版，分別取 1  $\mu\text{L}$  加入各反應溶液，其餘條件不變，進行聚合酶鏈鎖反應。結果如 Fig. 3 顯示，當豬霍亂

沙門氏桿菌的菌體 DNA 稀釋至 0.04  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  時，使用針對 *fimY* 基因所設計的引子，仍能自菌體 DNA 增幅出 739 bp DNA 片段。除了菌體 DNA 外，也測試了聚合酶鏈鎖反應所能偵測豬霍亂沙門氏桿菌的數目。將 3 mL 的過夜培養液，比照 Mc-

Farland nephelometer standards, 以無菌蒸餾水稀釋至混濁度為 No.6 (約  $1.8 \times 10^9$  個細菌/mL) 的細菌懸浮液, 再以新鮮培養液做 10 倍連續稀釋至每 mL 溶液中含 18 個細菌體。從各不同濃度細菌懸浮液取 1 mL 置於微量離心管離心 1 分鐘, 倒掉上清液, 再將沉澱的菌體以 100  $\mu$ L 無菌蒸餾水做成懸浮液。再將配製之細菌懸浮液煮沸 10 分鐘後, 取 10  $\mu$ L 當做模版, 加入反應溶液, 進行聚合酶鏈鎖反應。針對 *fimY* 基因所設計的引子仍可從 180 個細菌體/mL 的溶解產物, 增幅出此特異的 DNA 片段。

由初期的研究得知, *fimY* DNA 序列存在於鼠傷寒沙門氏桿菌及豬霍亂沙門氏桿菌, 而不見於 Table 1 所列的一般常見之革蘭氏陰性細菌。本實驗室正收集其他沙門氏桿菌血清型, 探討類似 *fimY* DNA 序列在其他沙門氏桿菌血清型分布的情形。若利用聚合酶鏈鎖反應, 樣品中只要含有 180 個以上的豬霍亂沙門氏桿菌細菌體, 即可被偵測到, 相當靈敏, 如果 *fimY* 在其他沙門氏桿菌血清型的普遍性確立後, 則在臨床診斷上, 可直接從選擇性培養基挑選可疑單一菌落當做模版來源, 利用聚合酶鏈鎖反應, 藉由測定類似 *fimY* DNA 序列的有無來快速鑑定沙門氏桿菌屬。目前已有許多基因可用來當作鑑定沙門氏桿菌的標的基因, 而其中與線毛基因有關的包括 *agfA* [5] 與 *fimA* [4]。*agfA* 與 *fimA* 分別是沙門氏桿菌細聚集線毛 (thin aggregative fimbriae) 及第一型線毛的線毛次單位結構基因。*fimY* 則是另一個與線毛基因有關, 而有潛在利用價值可用來鑑定沙門氏桿菌的基因, 值得做進一步的研究開發。

### 參考文獻

1. Brinton CC, Jr. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model of DNA and RNA transport in gram negative bacteria. Trans. N. Y. Acad. Sci. 27: 1003-1054, 1965.
2. Clegg S, Hull S, Hull R, Pruckler J. Construction and comparison of recombinant plasmids encoding type 1 fimbriae of members of the family *Enterobacteriaceae*. Infect Immun 48: 275-279, 1985.
3. Clegg S, Swenson DL. In: Klemm P, ed. Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines. CRC Press, Boca Raton, Fla. *Salmonella* fimbriae, 105-113, 1994.
4. Cohen HJ, Mechanda SM, Lin W. PCR amplification of the *fi-mA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. Appl. Environ. Microbiol. 12: 4303-4308, 1996.
5. Doran JL, Collinson SK, Burian J, Sarlos G, Todd ECD, Munro CK, Kay CM, Banser PA, Peterkin PI, Kay WW. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. J Clin Microbiol 31: 2263-2273, 1993.
6. Duguid JP, Anderson ES, Campbell I. Fimbriae and adhesive properties in salmonellae. J Pathol Bacteriol 92: 107-138, 1966.
7. Duguid JP, Gillies RR. Fimbriae and adhesive properties in dysentery bacilli. J Pathol Bacteriol 74: 397, 1957.
8. Duguid JP, Smith IW, Dempster G, Edmunds PN. Non-flagellar filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. J Pathol Bacteriol 70: 335-348, 1955.
9. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. In Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982.
10. Swenson DL. Ph. D. thesis. The University of Iowa, Iowa City, IA. 1993.
11. Swenson DL, Kim KJ, Six EW, Clegg S. The gene *fimU* affects expression of *Salmonella typhimurium* type 1 fimbriae and is related to the *Escherichia coli* tRNA gene *argU*. Mol Gen Genet 244: 216-218, 1994.
12. Yeh KS, Hancox LS, Clegg S. Construction and characterization of a *fimZ* mutant of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol 177: 6861-6865, 1995.

1. Brinton CC, Jr. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model of DNA and



## Short Communication: The Chromosomal DNA of *Salmonella choleraesuis* Possesses A Homologous DNA Sequence of *Salmonella typhimurium* fimY

\*Kuang-Sheng YEH, Chin-Shu CHANG, Mei-Yi HSU, Chi-Ming CHEN, and Ivan Chen CHENG

Department of Pathobiology, Pig Research Institute Taiwan, Chunan, Miaoli, Taiwan 350, ROC

(Received: March 16, 2000. Accepted: June 19, 2000.)

**ABSTRACT** The phenotypic expression of type 1 fimbriae in *Salmonella typhimurium* is encoded by the *fim* gene cluster located on the chromosomal DNA. There are nine open reading frames, which encode gene products involving the assembly, transport, biogenesis and regulation of fimbrial structures, and one arginine tRNA gene within the *fim* gene cluster. Although the *fimY* gene facilitates the regulation of fimbrial expression, the amino acid sequence of FimY shares little homology with other known prokaryotic regulators in the GenBank database. Therefore, in this study, *fimY* was evaluated as a target gene for detecting the *Salmonella* species. A primer set of oligonucleotides specific for the *fimY* gene of *S. typhimurium* was used to amplify a 739 bp DNA fragment by polymerase chain reaction (PCR). This DNA fragment was then utilized to detect the presence of the homologous *fimY* DNA sequence in 165 *S. choleraesuis* clinical isolates and ten non-*Salmonella* bacteria using DNA dot hybridization. The probe successfully hybridized with all the *S. choleraesuis* isolates, except for non-*Salmonella* bacterial strains. Agarose gel electrophoresis was applied to detect the PCR-amplified products derived from the *fimY* specific primers, resulting in a sensitivity of 0.04 pg in extracted chromosomal DNA for *S. choleraesuis*. The sensitivity for boiled bacteria was 180 cells. Our experimental results indicated that the chromosomal DNA of *S. choleraesuis* possesses a homologous DNA sequence of *S. typhimurium* *fimY*. If most of the *Salmonella* serovars could be confirmed to contain this homologous *fimY* DNA sequence, using PCR to detect the presence of this DNA sequence would be a rapid and reliable means of differentiating *Salmonella* from other Gram negative bacteria. [\*Yeh KS, Chang CS, Hsu MY, Chen CM, and Cheng IC. Short communication: The chromosomal DNA of *Salmonella choleraesuis* possesses a homologous *fimY* DNA sequence of *Salmonella typhimurium*. J Chin Soc Vet Sci 26 (3): 242-246, 2000. \*Corresponding author TEL: 037-672 352 ext. 521, FAX: 037-692 820, E-mail: ca@mail.prit.org.tw]

**Keywords:** *Salmonella*, Fimbriae, Polymerase chain reaction