

以限制酶片段多形分析比較胸膜肺炎放線桿菌血清型間第 1 型細胞毒素基因

張惟茗^{1*} 賴秀穗² 楊喜金¹ 吳義興¹ 蕭終融¹

1. 台灣省家畜衛生試驗所 生物研究系
2. 國立臺灣大學獸醫學系

摘要 利用依照第 1 型細胞毒素結構基因 (*apxIA*) 序列設計的第 1 至 3 對引子 (primer)，與豬胸膜肺炎放線桿菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, Ap) 第 1 至 12 血清型菌體核酸進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)。結果第 1、2 對引子在第 1、5、9、10 和 11 血清型都能分別產生長度為 2.6 kb 和 1.7 kb 的核酸片段，但是由第 3 對引子所作的 PCR 反應所增幅出幾乎完整 *apxIA* 基因約 3 kb 的核酸片段卻只有出現在第 1、9 和 11 血清型。因此 *apxIA* 基因存在於第 1、5、9、10 和 11 血清型，但是第 5 和第 10 血清型之 *apxIA* 基因在 2994 至 3011 bp 處 (第 3 對引子) 之核酸序列與第 1、9 和 11 型者有所不同。

又分別以 Ap 第 1、5、9、10 和 11 血清型菌體核酸為模版，利用第 4 對引子增幅出長約 3.9 kb 的 *apxICA*，再分別以 10 種限制酶切割後發現，第 1、9 和 11 血清型 *apxI* 之 *Hind*III (1489–1494 bp)、*Nae*I (1449–1454 bp)、*Bcl*I (2966–2971 bp)、*Apa*LI (約 3100 bp) 切割位和第 5、10 血清型不同，*Kpn*I, *Aat* II, *Ssp*I, *Nco*I, *Eco*RV, *Bst*II 切割處則無不同。因此 *apxIA* 在約 1.5 kb 和 3 kb 處可能為主要變異區。此外以另外 8 株第 1 血清型分離株菌體核酸為模版增幅之 *apxIA*，使用限制酶切割後，其型態並無差異。

關鍵詞：胸膜肺炎放線桿菌，第 1 型細胞毒素

緒言

在 Ap 12 個血清型菌之培養上清液中有 3 種屬於 RTX (repeats in the structure toxin)–family 的細胞毒素被發現，它們分別是 *Ap*xI (105 kDa)，*Ap*xII (103 kDa) 和 *Ap*xIII (120 kDa)^[13]。這 3 種細胞毒素隨著不同時間、研究者而有不同的名稱，*Ap*xI 舊稱 hemolysin I (*Hly*I)^[5] 或 cytolysin I (*Cly*I)^[13]，*Ap*xII 舊稱 hemolysin (App)^[3]、hemolysin II (*Hly*II)^[5]、cytolysin (*Cyt*)^[2] cytolysin II (*Cly*II)^[13]，*Ap*xIII 舊稱 pleurotoxin (*Ptx*)^[14] 或 cytolysin III (*Cly*III)^[13]，直到 1993 才統一命名為

*Ap*x (*Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin) I、II、III^[8]。*Ap*xI 出現在第 1、5、9、10 和 11 血清型，*Ap*xII 出現在除了第 10 血清型以外的 11 個血清型，*Ap*xIII 則出現在第 2、3、4、6 和 8 血清型^[6, 11, 12, 13]。

*Ap*xI、*Ap*xII 及 *Ap*xIII 各有不同的生物活性 (biological activity)，*Ap*xI 具有較強的溶血能力和細胞毒性，*Ap*xII 則具有微弱的溶血能力和中等強度的細胞毒性，*Ap*xIII 僅具有細胞毒性而無溶血能力^[3, 6, 13]。*Ap*xI 的結構基因 *apxIA* 全長 3072 bp，整個 operon 是由 4 個相連基因 *apxIC*、*apxIA*、*apxIB*、*apxID* 所組成^[8, 9, 10, 11, 15]。

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

Apx II 之結構基因 *apx II A* 全長約 2870 bp^[3]，operon 則是由 *apx II C*、*apx II A* 所組成^[4, 11]。本實驗之目的乃利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 增幅不同血清型和分離株的 *apxIA*，再以多種核酸限制酶切割 PCR 產物，來比較不同血清型及菌株間 *apxIA* 基因之差異。

材料與方法

菌株與培養方法

使用的菌株為胸膜炎放線桿菌 (Ap) 第 1 至 12 血清型，其中第 1 型為台灣分離株 (HS-1)，餘均為由瑞士分讓之標準株。細菌之培養是將細菌接種於含 0.01 % NAD (Sigma) 之 tryptic soy broth (Difco)，在 37 °C，10 % CO₂ 下振盪培養 6 個小時。

細菌 DNA 模版之製備

將收取的菌體培養液 1.5 mL 以 12,000 rpm (BHG Z230M) 離心 20 秒後，棄除上清液。沉澱物以 100 μL 緩衝液 (2 mg / mL lysozyme、50 mM Tris、10 mM EDTA) 製成懸浮液後放置室溫 10 分鐘，再分別加入 100 μL SDS 溶液 (100 mM Tris、150 mM NaCl、2 % SDS) 和 proteinase K 溶液 (20 mg / mL proteinase K、100 mM Tris、100 mM NaCl、1 % SDS) 處理。DNA 之純化則分別以 phenol、chloroform-isoamyl alcohol (24 : 1) 各萃取 2 次。接著以等體積 isopropanol 將 DNA 沉澱，12,000 rpm 離心 1 秒，再用 70 % 酒精清洗沉澱物，經乾燥後以 200 μL TE buffer (10 mM Tris、1 mM Na₂EDTA) 再溶解 (65 °C，10 分鐘)，加入 RNase A (10 μg / mL)，65 °C 作用 10 分鐘。加入 0.1 倍體積醋酸鈉 (3 M) 和 2 倍體積的酒精，充分混合後，12,000 rpm 離心 1 秒，再用 70 % 酒精洗沉澱物。最後加入 200 μL TE buffer 在 65 °C，2 至 3 小時溶解。

聚合酶連鎖反應 (PCR) 之進行

本實驗中程式溫控器是使用 air thermal-cycler (Idaho)，每個標準反應體積為 10 μL，其中包括 1 μL reaction buffer (500 mM Tris、2.5 mg / mL BSA、10 mM MgCl₂)、1 μL dNTP's (各 2 mM)、2 μL primers (0.1 μM)、1 μL Taq (0.4 U、Promega)、1 μL template (200 ng)、4 μL H₂O。以變性反應 (denaturation) 94 °C 1 秒、煉合反應

(annealing) 54 °C 1 秒、合成反應 (elongation) 74 °C 35~60 秒 (視產物長度而定，60 bp / 秒) 等 3 個階段重覆進行 35 個循環。模版使用 Ap 12 個血清型之菌體核酸。引子共使用由文獻參考而來的 4 對引子^[1, 7, 12] 分別位於 *apxIA* 基因上，核酸序列、位置及預期長度詳列於表 1。反應完成後取 5 μL 產物置於 1 % 洋菜膠電泳分析結果，電泳緩衝液使用 TAE buffer，再以 100 V 電泳約 30 分鐘後，再將膠體置入含 0.5 μg / mL ethidium bromide 的水溶液染色 20 分鐘，在紫外線照射下觀察、照相。

Ap 第 1 血清型分離株 *apxIA* 限制酶圖譜之建立

以 Ap HS-1 株與其它 8 株第 1 血清型分離株 (1992~1994 年間收集) 之菌體核酸為模版，利用第 3 對引子 (1L、1R) 進行 PCR 反應所增幅的 3 kb *apxIA* 產物共使用 12 種限制酶，*AatII*、*HindIII*、*BclI*、*BstEII*、*KpnI*、*SspI*、*NcoI*、*NaeI*、*ApaLI*、*EcoRV*、*ApaI* 和 *BamHI* 分別進行切割。限制酶切割是取 PCR 產物 10 μL 加蒸餾水 90 μL 後，以 2 倍體積絕對酒精沉澱、70 % 酒精清洗後，加入 9 μL 蒸餾水溶解，再加 1 μL 10 倍濃度限制酶緩衝液、0.5~1 μL 的不同核酸限制酶在 37 °C 下作用 1 小時 (*BclI* 作用溫度為 50 °C，*BstEII* 為 60 °C)，再以上述洋菜膠電泳分析。

Ap 第 1、5、9、10 和 11 血清型間 *apxIA* 基因限制酶切割之比較

分別以 Ap 第 1、5、9、10 和 11 血清型菌體核酸為模版，利用第 4 對引子 (1CL、1AR) 增幅出 3.9 kb 之 *apxICA*，再分別以 *HindIII*、*KpnI*、*AatII*、*SspI*、*NcoI*、*NaeI*、*ApaLI*、*EcoRV*、*BstEII* 及 *BclI* 等 10 種限制酶切割，切割方法如上所述。

結 果

依照第 1 型細胞毒素結構基因 (*apxIA*) 序列設計的第 1 至 4 對引子 (primer)，與 Ap 第 1 至 12 血清型菌體核酸所進行之 PCR，結果在以 1L、3B 為引子的反應中，Ap 血清型第 1、5、9、10 和 11 都有約 2.6 kb 預期長度的 DNA 片段產生。使用第 2 對引子 (2A、3B) 對血清型第 1、5、9、10 和 11 也都有約 1.7 kb 預期長度的 DNA 片段產

生。但是在以 1L、1R 為引子所作的 PCR 反應中所增幅出約 3 kb 的 *apxIA* DNA 片段只有出現在第 1、9 和 11 血清型 (圖 1)。而以第 1、5、9、10 和 11 血清型菌體核酸為模版由第 4 對 1CL, 1AR 引子均能增幅出完整 *apxIC*, *apxIA* 基因總長約 3.9 kb 的核酸片段 (圖 2), 因此 *apxIA* 存在於第 1、5、9、10 和 11 血清型中, 但是第 5 和 10 血清型之 *apxIA* 基因在引子 1R (2994~3011) 處之核酸序列與第 1、9 和 11 血清型不同。

以第 1 血清型菌體核酸模版利用 PCR 增幅出的 *apxIA* 以 12 種限制酶切割後所得之 DNA 片段長度分別為 2.5 kb 和 0.51 kb (*AatII*), 1.52 kb 和 1.49 kb (*HindIII*), 2.97 kb 和 0.04 kb (*BclI*), 1.28 kb 和 1.73 kb (*BstEII*), 2.83 kb 和 0.18 kb (*KpnI*), 2.01 kb 和 1 kb (*SspI*), 2.21 kb、0.72 kb 和 0.08 kb (*NcoI*), 1.56 kb、1.37 kb 和 0.08 kb (*NaeI*), 1.96 kb 和 1.05 kb (*ApaLI*), 2.26 kb 和 0.75 kb (*EcoRV*), *ApaI* 和 *BamHI* 均沒有切割點 (圖 3)。

以上 HS-1 株之切割片段所得之 *apxIA* 限制酶圖譜與已發表之 *apxIA* 核酸序列比較, 結果相同。由其它 8 株分離株菌體核酸所增幅的 *apxIA*, 經限制酶切割後結果也相同, 顯示同血清型不同分離株間的變異性不大。

以第 1、5、9、10 和 11 血清型菌體核酸為模版由第 4 對 1CL, 1AR 引子增幅出完整 *apxICA* 基因總長約 3.9 kb 的核酸片段, 再經 10 種限制酶切割後, 第 1、9、11 血清型之 *apxICA* 以 *HindIII* 切割可得 2.1 kb 和 1.8 kb, 第 5 和 10 血清型則沒有切割位 (圖 4)。以 *NaeI* 切割第 1、9 和 11 血清型可得 0.6 kb、1.3 kb 和 2 kb, 第 5 和 10 血清型可得 0.6 kb 和 3.3 kb (圖 5)。以 *ApaLI* 切割第 1、9 和 11 血清型可得 2.5 kb 和 1.4 kb, 第 5 和 10 血清型可得 2.5 kb、1.1 kb 和 0.3 kb (圖 5)。以 *BclI* 切割第 1、9 和 11 血清型可得 3.5 kb 和 0.4 kb, 第 5 和 10 血清型則沒有切割位 (圖 6)。以 *EcoRV* 切割, 所有 5 個血清型均可得 2.8 kb 和 1.1 kb。以 *BstEII* 切割, 5 個血清型均可得 2.4 kb 和 1.3 kb。以 *KpnI* 切割 5 個血清型均可得 0.7 kb、3.2 kb。以 *AatII*、*SspI*、*NcoI* 切割後, 5 個血清型均分別可得 2.8 kb 和 1.1 kb; 2.3 kb 和 1.6 kb; 2.8 kb 和 1 kb。總結來說, 第 1、9 和 11 血清型的 *apxIA* 在 *HindIII* (1489~1494 bp)、*NaeI* (1449~1454 bp)、*BclI* (2966~2971 bp) 和 *ApaLI* (約 3100 bp) 切割位和第 5、10 血清型不同, 其它如 *KpnI*、*AatII*、*SspI*、*NcoI*、*EcoRV* 和 *BstEII* 切割處則無不同。

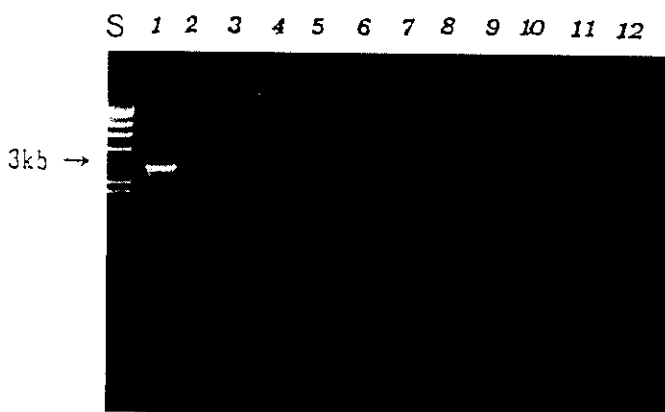


圖 1 應用 PCR 檢測 Ap 第 1 至 12 血清型之 *apxIA* 基因, 引子為 1L、1R。1 至 12 分別以第 Ap 第 1 至 12 血清型菌體核酸為模版。S 為 Lambda *HindIII* marker。分別在第 1、9 及 11 血清型有 3 Kb 的產物。

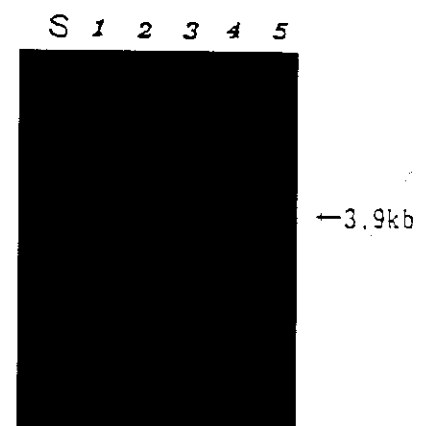


圖 2 應用 PCR 檢測第 1、5、9、10 及 11 血清型之 *apxICA* 基因, 引子為 1CL、1AR。1 至 5 分別以第 1、5、9、10 及 11 血清型菌體核酸為模版。S 為 Lambda *HindIII* marker。5 種血清型均分別得約 3.9 Kb 的產物。

apxIA

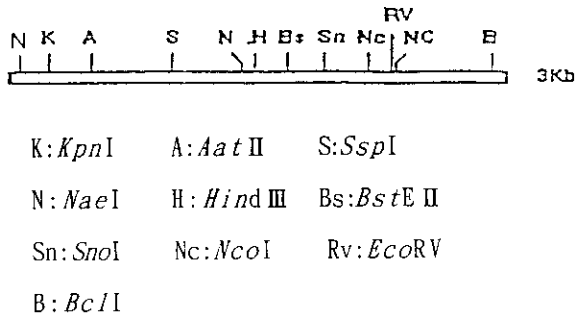


圖 3 Ap 第 1 血清型 HS-1 株 *apxIA* 基因之核酸限制酶圖譜

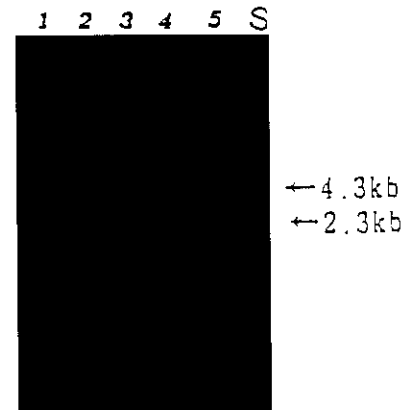


圖 4 以 Ap 第 1、5、9、10 及 11 血清型菌體核酸為模版，1CL、1AR 為引子進行 PCR 所得之 3.9 Kb 產物，以 *Hind*III 切割後所得之 DNA 片段。1. 第 1 血清型菌體核酸模版，2. 第 5 血清型，3. 第 9 血清型，4. 第 10 血清型，5. 第 11 血清型，S 為 Lambda *Hind*III marker。

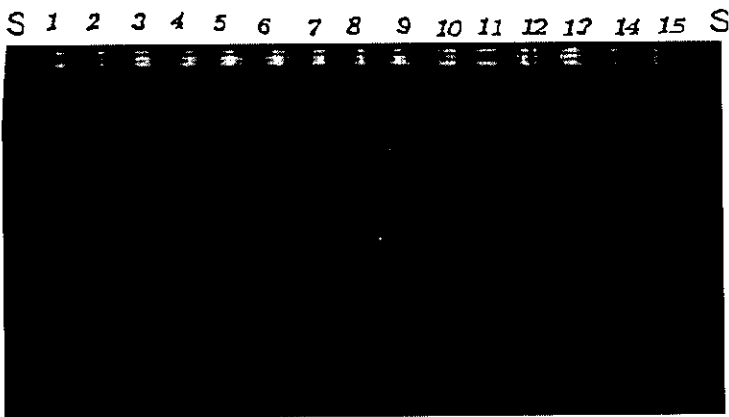


圖 5 以 Ap 第 1、5、9、10 及 11 血清型菌體核酸為模版，1CL、1AR 為引子進行 PCR 所得之 3.9 Kb 產物，以 *Nea*I (1 至 5)、*Apa*LI (6 至 10)、*Eco*RV (11 至 15) 切割後所得之 DNA 片段。1、6、11 第 1 血清型菌體核酸模版，2、7、12。第 5 血清型，3、8、13、第 9 血清型，4、9、14。第 10 血清型，5、10、15。第 11 血清型，S 為 Lambda DNA *Hind*III marker。

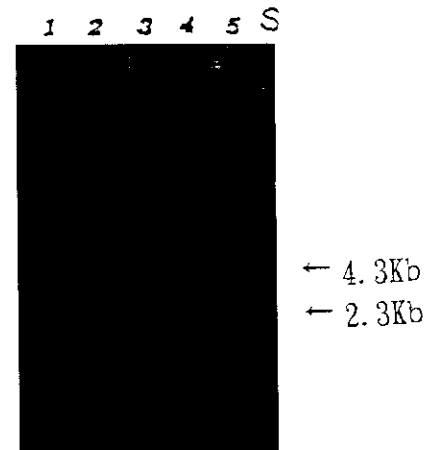


圖 6 以 Ap 第 1、5、9、10 及 11 血清型菌體核酸為模版，1CL、1AR 為引子進行 PCR 所得之 3.9 Kb 產物，以 *Bcl*II 切割後所得之 DNA 片段。1. 第 1 血清型菌體核酸模版，2. 第 5 血清型，3. 第 9 血清型，4. 第 10 血清型，5. 第 11 血清型，S 為 Lambda DNA *Hind*III marker。

表 1 引子之核酸序列、位置與預期長度

引子	核 酸 序 列	基 因 內 位 置 *	PCR產物長度 (bp)
set 1 (apx IA)			2594
1L	5' TGGCTAACTCTAGCTCG3'	2- 19	
3B	5' TCATCATCACCGCCTTCTC3'	2577- 2596	
set 2 (apx IA)			1678
2 A	5' GGTTCGGTCGTAGCATTAGC3'	918- 937	
3 A	5' TCATCATCACCGCCTTCTC3'	2577- 2596	
set 3 (apx IA)			3009
1L	5' TGGCTAACTCTCAGCTCG3'	2- 19	
1R	5' ATAGACTAACGGTCCGCC3'	2994- 3011	
set 4 (apx ICA)			3949
1'CL	5' TGTA AACCTCATATGTAATG3'	-580- -599	
1AR	5' TAGCCAAGCGGTTAGATCTA3'	3331- 3350	

*原點為 abx IA 開放讀碼價構 (open reading frame) 的起始點。

討 論

在以第 1 對 (1L、3B)、第 2 對 (2A、3B)、第 4 對 (1CL、1AR) 為引子的 PCR 反應中，Ap 血清型第 1、5、9、10 和 11 都有預期長度的 DNA 片段產生，與利用抗 *ApxI* 單源抗體與 12 個血清型培養上清液反應的結果相同，因此 *apxIA* 基因如同前人之研究只存在於第 1、5、9、10 和 11 血清型中^[6, 12, 13]。但是在以 1L、1R 為引子所作的 PCR 反應中只有在第 1、9 和 11 血清型有增幅出約 3 kb 的 DNA 片段，第 5 和 10 血清型則無。因此第 5 和 10 血清型之 *apxIA* 基因在引子 1R (2994~3011) 處之核酸序列與第 1、9 和 11 血清型不同。此外利用 10 種不同限制酶切割第 1、5、9、10 和 11 血清型之 *apxICA* 基因後，發現第 1、9 和 11 血清型在 1449~1454 bp (*NaeI*)，1489~1494 bp (*HindIII*)，2966~2971 bp (*BclI*)，約 3100 bp (*ApaLI*) 與第 5、10 血清型不同。因此在分泌 *ApxI* 的 5 個血清型中，第 1、9 和 11 型之 *apxIA*

與第 5、10 型不同。差異處似乎集中於約 1.5 kb 和 3 kb 處。有實驗利用 *AluI* 限制酶切割由 PCR 所增幅不同血清型的 *apxIA*，結果發現 *apxIA* 之相異可分成兩組，1、9 和 11 血清型類似為一組，5、10 型為另一組。2 組間共有 7 個相異點，5 個位於末端約 500 bp 處，另兩個則位於約 2000~3000 bp 處^[12]。但是此種血清型間 *apxIA* 序列上的差異似乎不會影響到 *ApxI* 之抗原性或毒性的表現，因為截至目前為止第 1、9、11 型和第 5、10 型所分泌的 *ApxI* 仍無法區別，也無法區分它們的毒性有何差異。

以 1L、1R 為引子，由第 1 血清型分離株 (HS-1) 利用 PCR 增幅出的 *apxIA*，經 12 種限制酶切割後，定出之限制酶切割圖譜，與第 1 血清型 strain 4074^[6] 比較，結果類似。其它 8 株分離株由 PCR 所增幅的 *apxIA*，經同樣限制酶切割後可得相同結果。因此 *apxIA* 在同血清型間的差異似乎不大。

參考文獻

1. 楊姮媛。豬胸膜肺炎放線桿菌溶血素之性狀分析及其基因之選殖。臺灣大學獸醫學研究所碩士論文。1992
2. Anderson C, Potter AA, Geriach GF. Isolation and molecular characterization of spontaneous occurring cytolysin-negative mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Infect. Immun.* 59 : 4110 – 4116, 1991
3. Chang YF, Young R, Struck DK. Cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *DNA* 8 : 635 – 647, 1989
4. Chang, YF, Young R, Struck DK. The *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin determinant: unlinked AppCA and AppBD loci flanked by pseudogenes. *J. Bacteriol.* 173 : 5151 – 5158, 1991
5. Frey J, Nicolet J. Regulation of hemolysin expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 by Ca. *Infect. Immun.* 53 : 2570 – 2575, 1988
6. Frey J, Nicolet J. Immunological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin I. *Vet. Microbiol.* 28 : 61 – 73, 1991
7. Frey, J, Bosch H, Segers R, Nicolet J. Identification of a second hemolysin in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype I and expression of the gene in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60 : 1671 – 1676, 1992
8. Frey J. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin : uniform designation of hemolysin, cytolysin, pleurotoxin and their genes. *J. Gen. Microbiol.* 139 : 1723 – 1728, 1993
9. Gygi D, Nicolet J, Frey J, Cross MK, Koronakis V, Hughes C. Isolation of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin gene and the activation and secretion of the prohemolysin by the Hly C, Hly B and HlyD proteins of *E.coli*. *Mol. Microbiol.* 4 : 123 – 128, 1990
10. Gygi D, Nicolet J, Huggins C, Frey J. Functional analysis of the Caregulated hemolysin I operon of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype I. *Infect. Immun.* 60 : 3059 – 3063, 1992
11. Jansen, R, Briaire J, Kamp EM, Smith MA. Comparison of the cytolysin II genetic determinants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. *Infect Immun.* 60 : 630 – 636, 1992
12. Jansen R, Briaire J, Kamp EM, Gielkens. Structure analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin-I operon. *Infect. Immun.* 61 : 3688 – 3695, 1993
13. Kamp, EM, Popma JK, Anakota J, Smith MA. Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 59 : 3079 – 3085, 1991
14. Rycroft AN, Williams D, Macdonald J. The cytoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is distinct from the hemolysin and is associated with a 120 kDa polypeptide. *J. Gen. Microbiol.* 137 : 561 – 568, 1991
15. Smits MA, Briaire J, Jansenr, Smith H, Kamp EM, Gielkem ALJ. Cytolysins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9. *Infect. Immun.* 59 : 4497 – 4504, 1991

Comparison of *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin I gene (*apxI*) among serotypes by restriction fragment length polymorphism

W. M. Chang,^{1*} S. S. Lai,² S. C. Yang,¹ Y. S. Wu,¹ J. R. Shiau¹

1. Taiwan Animal Health Research Institute, Taisui, Taipei, Taiwan, ROC

2. Department of Veterinary Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC

SUMMARY Four primers according to the sequence of activator gene (*apxIC*) and structural gene (*apxIA*) of *ApxI* were synthesized and used for polymerase chain reaction (PCR) to amplify specific DNA fragment among 12 Ap serotypes. The results indicated that serotype 1, 5, 9, 10 and 11 had an expected length of amplified DNA fragment with 3 primers. However, serotype 1, 9 and 11 had also obtained a particular length with the other primer according to the sequence of *apxICA* gene. The sequences between 2994 and 3011 of *apxIA* of serotype 5, 10 detected by PCR were found different with those of serotype 1, 9 and 11. The PCR amplified 3.9 kb DNA fragments of *apxICA* from serotype 1, 5, 9, 10 and 11 were analyzed by digestion with 10 restriction enzymes. The *HindIII*, *NaeI*, *BclI*, and *ApaLI* cutting sites of *apxIA* of serotype 1, 9 and 11 were different from those of serotype 5 and 10. The restriction map of the 3 kb DNA fragment of *apxIA* amplified from the local isolate of serotype 1, were identical to those reported previously. Chang WM and Lai SS. Comparison of *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin I gene (*apxI*) among serotypes.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *ApxI*

*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute, Taiwan, R. O. C.