

應用聚合酵素鏈反應診斷豬放線桿菌胸膜肺炎

張惟茗*¹ 賴秀穗² 吳義興¹ 杜文珍¹ 楊喜金¹

1. 台灣省家畜衛生試驗所
2. 國立台灣大學獸醫學研究所

摘要 使用分別位於第 1 型溶血素基因上的第 1~5 對引子和位於第 2 型溶血素基因上的第 6、7 對引子與豬胸膜肺炎放線桿菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, Ap), 第 1~9 血清型菌體核酸進行聚合酵素鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR), 結果均能產生特異性反應。第 1 對引子可檢測出第 1、4、5、6、7 和 9 血清型, 第 2、3 對引子可檢測出第 1、5、9 血清型, 第 4、5 對引子可檢測出第 1、5 血清型, 而第 6、7 對引子則可檢測出所有第 1~9 血清型。這些引子與 *E. coli*、*P. multocida*、*S. choleraesuis*、*B. bronchiseptica* 之菌體核酸在相同反應條件下所進行之 PCR 並無交叉反應。

關鍵詞：聚合酵素鏈反應，放線桿菌胸膜肺炎，第 1 型溶血素

緒言

由豬胸膜肺炎放線桿菌 (Ap) 所引起的胸膜肺炎對臺灣的養豬業造成很重大的經濟損失，目前是發生在豬的主要呼吸道疾病之一。它引起的主要病變為出血性、壞死性、纖維素性胸膜肺炎，已知至少有 12 種血清型⁽³⁾。由剖檢病變和細菌分離、鑑定可診斷本病。但是不管是生化鑑定或血清學鑑定都需經過細菌培養與純化增殖等步驟，往往耗費數天以上。慢性感染或無症狀帶菌豬使用傳統的診斷方法則不易檢查出來⁽⁹⁾，尤其是抗生素的濫用更增加分離和鑑定的困難。聚合酵素鏈反應 (PCR) 目前已被成功的應用在病毒性、細菌性和寄生蟲性疾病，甚至先天遺傳性疾病的診斷。PCR 能將很少量的病原核酸經過 denaturation、annealing、elongation 之循環步驟放大 10⁽¹²⁾ 倍以上⁽⁷⁾，以供應用於不同實驗目的。由於 PCR 藉由使特異引子及 Taq DNA 聚合酶，能從不純的樣品中複製出一段特異 DNA 片段⁽¹⁵⁾。PCR 不僅可偵測到非常少量的病原，並且不需經過病原培養的步驟，因此是一種非常敏感且迅速的工具。本實驗之目的在於應用 PCR 於 Ap 之診斷，以補傳統檢驗法之不足。

材料與方法

菌株與培養方法

使用的菌株為胸膜肺炎放線桿菌 (Ap) 1~9 血清型，其中 1 型為分離株 HS-1，餘均為分讓之標準株。培養方式是將 Ap 菌接種在含 5% 酵母抽出液之腦心浸液培養液 (BHI) 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 離心 20 秒後，棄除上清液。沉澱物以含 lysozyme 之 50 mM Tris、10 mM EDTA 100 μ l 製成懸浮液後，再分別以 SDS 和 proteinase K 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，再用 70% 酒精清洗沉澱物，經乾燥後再以 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM Na₂DETA) 再溶解。

PCR 之進行

本實驗 PCR 之進行是使用 Air thermal-cycler (Idaho)，每個反應體積為 10 μ l，其中包括 1 μ l reaction buffer (10 X)、1 μ l dNTP'S 2 μ l primer's (0.1

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

μM)、 $1\ \mu\text{l}$ Taq (0.4 U, Promega)、 $1\ \mu\text{l}$ template (不同測試濃度)、 $4\ \mu\text{l}$ H_2O 。以 denaturation $94\ ^\circ\text{C}/1$ 秒、annealing $54\ ^\circ\text{C}/1$ 秒、elongation $74\ ^\circ\text{C}/35\sim 60$ 秒 (視產物長度而定) 等三個階段重覆進行 35 個循環。引子共使用 7 對^(1,4) 分別位於 hly IA、app IA 基因上, 核酸序列、位置及預期長度如表 1、圖 1。

PCR 產物之分析

PCR 產物之分析是使用內核酸限制酶切割和洋菜膠電泳來進行。內核酸限制酶切割是取 PCR 產物 $10\ \mu\text{l}$ 加蒸餾水 $90\ \mu\text{l}$ 後, 以 2 倍絕對酒精沉澱、70% 酒精清洗後, 加入 $9\ \mu\text{l}$ 蒸餾水溶解, 再加 $1\ \mu\text{l}$ 10 X 限制酶緩衝液、5 U 的 Sau 3A 在 $37\ ^\circ\text{C}$ 下作用 1 小時, 再以洋菜膠電泳分析。洋菜膠電泳是以 $1\times$ TAE buffer 配製成 0.8~2% 的洋菜膠 (agarose, Sigma), 將欲測樣品 $5\ \mu\text{l}$ 混合 $1\ \mu\text{l}$ loading dye (6 X) 以 100 V 電泳約 20 分鐘後, 再將膠體置入含 $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide 的水溶液染色, 再在紫外線照射下觀察、照相。

PCR 特異性試驗

PCR 特異性之測試是取 *E. coli*、*P. multocida*、*S. choleraesuis*、*B. bronchiseptica* 之 genomic DNA 進行, 核酸抽取和 PCR 方法同上。

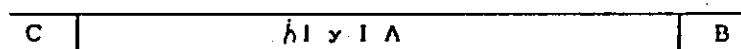
結果

在以 set 1 引子所作的 PCR 中, 第 1、5、9 血清型都只有預期長度的 722 bps 核酸片段產生, 但血清型 4、6、7 不僅有同樣長度的片段產生, 同時還有另外兩段長大約為 900 和 1700 bp 的片段產生, 但量少很多 (圖 2)。以 set 2、set 3 引子所作的 PCR 結果只有血清型 1、5、9 有預期長度的 1016 bps (圖 3) 及 1678 bps (圖 4) 片段產生。但是在以 set 4 為引子所作的 PCR 則只有第 1、9 血清型有預期長度的片段, 這表示第 5 血清型之 hly IA gene 在引子 1 R (3052~3069) 處核酸序列與第 1、9 型不同 (圖 5)。同樣地以 set 5 引子所複製幾乎為完整 3 kb 的 hly IA 結構基因也只有出現在第 1、9 血清型 (圖 6)。所以第 5 型之 hly IA 基因在末端與第 1、9 型不同。由 set 5 引子所複製出的第 1、9 血清型約 3 Kb 的 PCR 產物, 使用 Sau 3A 切割後, 跑電泳觀察所得的圖譜, 結果相同 (圖 7)。

在 app IA gene 也就是 hly IA 方面, 以 set 7 引子, 12 個血清型均有預期長度的片段產生 (圖 8)。同樣地以 set 6 引子所複製長 2.8 Kb 近乎完整 app IA 之結構基因, 9 個血清型都有產生 (圖 9)。將這些 2.8 Kb 的 PCR 產物以 Sau 3A 切割, 結果相同, 顯示它們的序列類似 (圖 10)。以 *E. coli*、*P. multocida*、*S. choleraesuis*、*B. bronchiseptica* 之菌體核酸為模版, 同樣 7 組引子及反應條件下所進行之 PCR, 結果則均為陰性。

表一 引子之核酸序列、位置與預期長度

引子	核 酸 序 列	PCR產物預期長度(bps)
set 1	(hly I)	722
1L	5' TGGCTAACTCTCAGCTCG3'	
1B	5' GATACGGCATCAAACCCAGG3'	
set 2	(hly I)	1016
1A	5' TCGGAAGCATTAGGACAACG3'	
2B	5' ACACGCTCTACCGAATACTC3'	
set 3	(hly I)	1678
2A	5' GGTTCGGTCGTAGCATTAGC3'	
3B	5' TCATCATCACCGCCTTTCTC3'	
set 4	(hly I)	906
3A	5' GAACTTGGGAACGGTATCAG3'	
1R	5' ATAGACTAACGGTCCGCC3'	
set 5	(hly I)	3010
1L	5' TGGCTAACTCTCAGCTCG3'	
1R	5' ATAGACTAACGGTCCGCC3'	
set 6	(app IA)	2800
5L	5' GACATCATTAAAATCGTCC3'	
5R	5' AATATTAAGCGGCTCTAGC3'	
set 7	(app IA)	389
6A	5' TGATGGTAACGATGGTGACG3'	
6B	5' GGTTCGGTCGTAGCATTAGC3'	



-1L-----1B- 722bp

-1A-----2B- 1016bp

-2A-----3B- 1678bp

-3A-----1R- 906bp

-1L-----1R- 3010bp



-6A---6B- 389bp

-5L-----5R- 2800bp

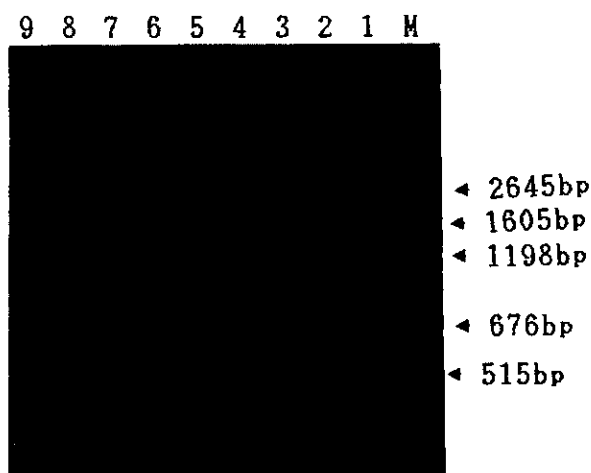


圖 2 應用 PCR 於偵測 AP 第 1~9 血清型之 hly IA 基因。引子為 1L、1B，產物長 722 bps。1~9 分別是以 AP 第 1~9 血清型 genomic DNA 為模版，M 為 pGem molecular marker。

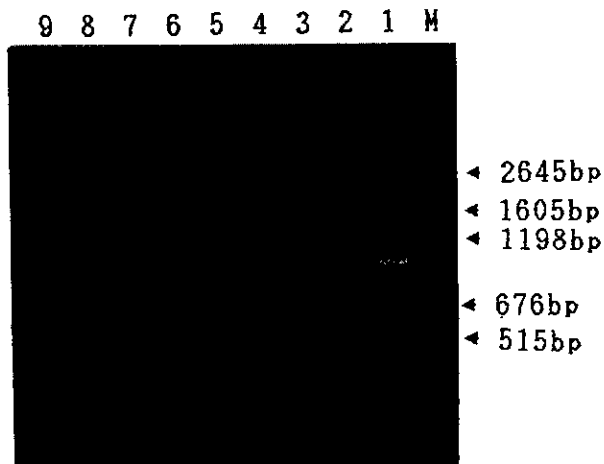


圖 3 應用 PCR 於偵測 AP 第 1~9 血清型之 hly IA 基因。引子為 1A、2B，產物長 1016 bp。1~9 分別是以 AP 第 1~9 血清型 genomic DNA 為模版，M 為 pGem molecular marker。

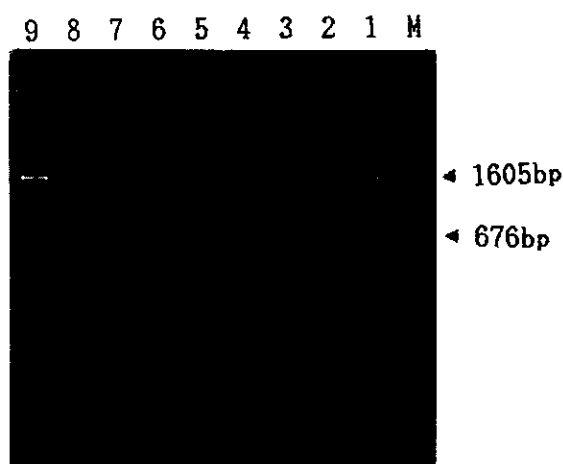


圖 4 應用 PCR 於偵測 AP 第 1~9 血清型之 hly IA 基因。引子為 2A、3B，產物長 1678 bp。1~9 分別是以 AP 第 1~9 血清型 genomic DNA 為模版，M 為 pGem molecular marker。

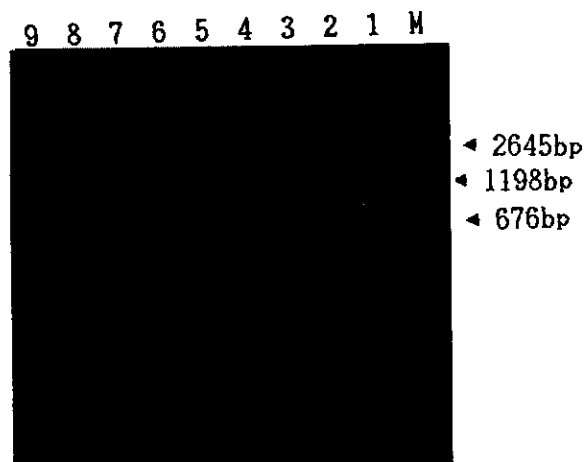


圖 5 應用 PCR 於偵測 AP 第 1~9 血清型之 hly IA 基因。引子為 3A、1R，產物長 906 bp。1~9 分別是以 AP 第 1~9 血清型 genomic DNA 為模版，M 為 pGem molecular marker。

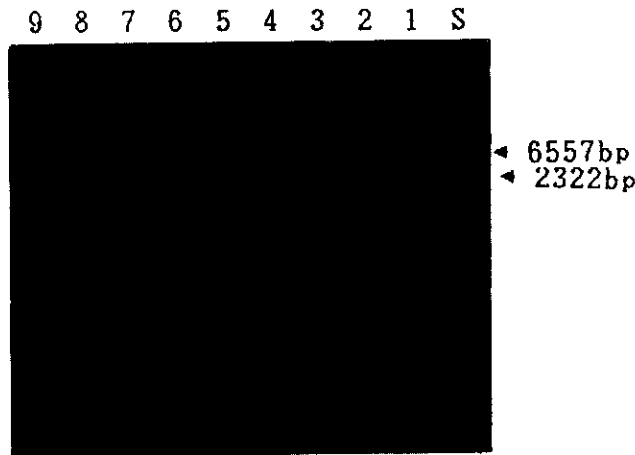


圖 6 應用 PCR 於偵測 AP 第 1~9 血清型之 hly IA 基因。引子為 1L、1R，產物長 3010 bp。1~9 分別是以 AP 第 1~9 血清型 genomic DNA 為模版，S 為 Lambda HindIII molecular marker。

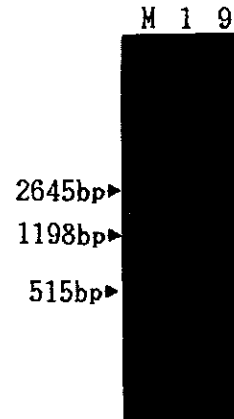


圖 7 PCR 增幅產物以 Sau 3A 切割後之電泳圖譜。引子為 1L、1R，1~9 分別是以 AP 第 1~9 血清型 genomic DNA 為模版，M 為 pGem molecular weight marker。

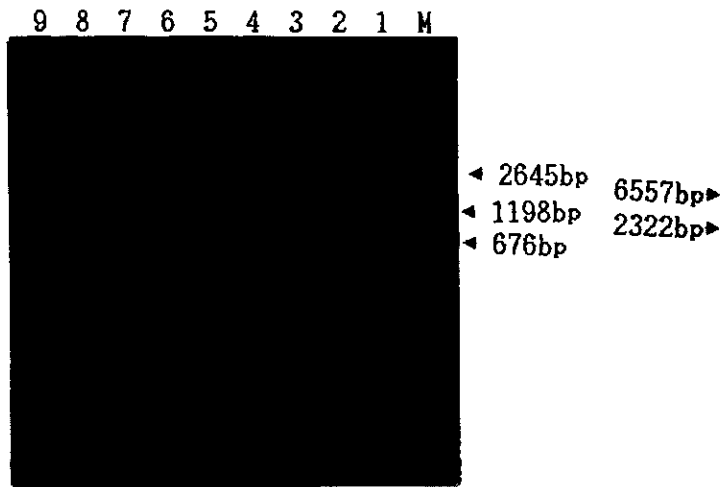


圖 8 應用 PCR 於偵測 AP 第 1~9 血清型之 app IA 基因。引子為 6A、6B，產物長 389 bp。1~9 分別是以 AP 第 1~9 血清型 genomic DNA 為模版，M 為 pGem molecular marker。

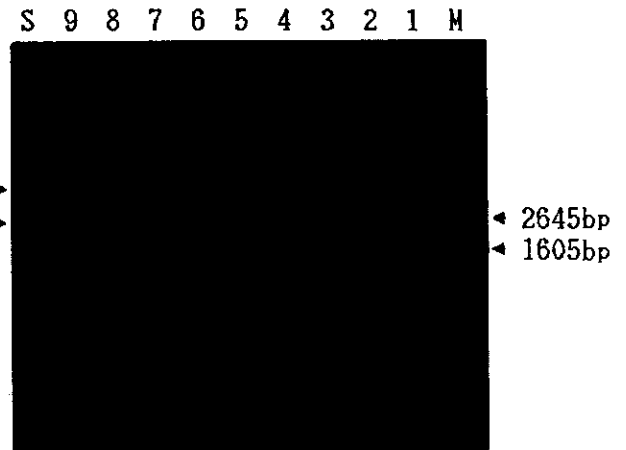


圖 9 應用 PCR 於偵測 AP 第 1~9 血清型之 app IA 基因。引子為 5L、5R，產物長 2800 bp。1~9 分別是以 AP 第 1~9 血清型 genomic DNA 為模版，S 為 Lambda HindIII molecular marker，M 為 pGem marker。

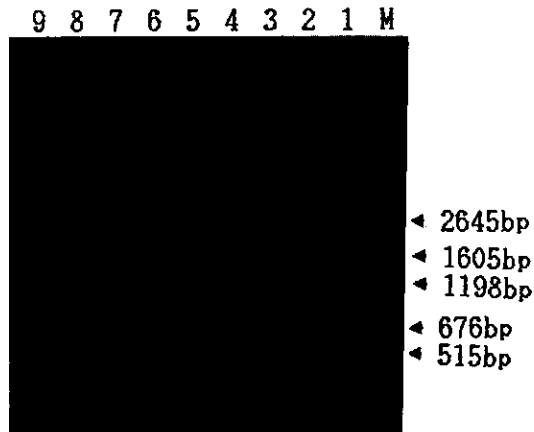


圖 10 PCR 增幅產物以 *Sau* 3A 切割後之電泳圖譜。引子為 5L、5R。1~9 分別是以 AP 第 1~9 血清型 genomic DNA 為模版，M 為 pGem molecular weight marker。

討論

急性豬放線桿菌胸膜肺炎可由臨床症狀、病變和細菌分離作診斷。慢性豬放線桿菌胸膜肺炎則需由血清學屠宰豬檢查來診斷⁽⁹⁾。常用的血清學方法包括補體結合反應⁽⁸⁾，間接血球凝集⁽¹¹⁾，平板或試管凝集^(5,10)，環狀沉澱試驗⁽¹⁰⁾，免疫擴散法⁽⁸⁾，酵素連接免疫吸附試驗⁽¹³⁾，coagglutination test^(6,12)，間接螢光抗體法⁽¹⁴⁾ 等。粗糙、平滑或會自我凝集的菌落不可用於各式凝集試驗。補體結合反應或 ELISA 需使用純化抗原，否則會引起很強之交叉反應。但是不論如何，細菌培養、純化和增殖的步驟都是必須的。由於一些因素如菌數、活性、抗生素、其它雜菌的影響，細菌分離不一定成功，尤其是肺臟以外的採樣處如氣管或鼻腔。

在本實驗所使用的 7 對引子中，由 *Hly* IA 基因而來的 5 對引子中 set 1、2、3 在第 1、5、9 血清型之 PCR 反應均為陽性反應，但 set 1 則在第 4、6、7 型會產生另 2 條“非特異”片段。set 4、5 則只有 1、9 血清型呈陽性反應。由 *App* IA 基因而來的 set 6、7 則所測試的 1~9 血清型均呈陽性反應。其它一些常見的呼吸道病原菌如 *E. coli*、*P. multocida*、*S. choleraesuis*、*B. bronchiseptica* 等均為陰性反應，因此所有 7 組引子均能特異性地應用於 AP 的診斷上。

根據 1990 年的調查，本省有第 1 (80.3%)、2 (3.2%)、5 (12.6%)、7 (3.2%)、和第 8 (0.8%) 等血清型存在⁽²⁾。以臺灣現有血清型為依據，在不出現其它新血清型的前題下，set 6、7 引子可應用於一般 AP 診斷上，因它們可鑑定出所有目前存在於臺灣地區的血清型；set 4、5 引子可應用於第 1 血清型的鑑定；第 5 血清型的鑑定可以 set 1 或 2、3 (陽性反應) 併用 set 4 或 5 引子 (陰性反應)；第 7 血清型可使用 set 1 引子 (3 條核酸片段)。第 2、8 血清型可以使用 set 6、7 引子 (陽性) 併用 set 1 (陰性)，但是第 2 與 8 血清型間無法區別，但因第 8 型只佔 0.3% 所以影響不大。(表 2)

以 set 1 為引子在 4、6、7 型的 PCR 產物除了 722 bp 外尚有大約 900 和 1700 bp，並且重覆多次仍得相同結果，其所代表之意義有待進一步之定序分析。此外 Jensen (1993) 以不同限制酶切割 1、5、9、10 和 11 的 *hly* IA 的 CA PCR 產物發現第 1、9、11 血清型為一群，5、10 血清型為另一群。它們的不同點位於末端 500 bp 處和 2000~3000 之間。本實驗中以 set 4、5 為引子所作的 PCR 試驗中也能獲致類似的結果，即第 1、9 血清型與第 5 血清型在 *hly* IA 基因約 3052 bp 附近有差異。而第 1、9 型以 *Sau* 3A 切割後則無不同。但是由抗 *Hly* I 單源抗體所作的分析結果顯示第 1~9 型間只有第 1、5、9 型會製造 *Hly* I，且三者有共同抗原存在。

表 2 set 1-7 引子與 AP 5 種血清型之 PCR 試驗結果

血清型	引子			
	set 1	set 2、3	set 4、5	set 6、7
1	+	+	+	+
2	-	-	-	+
3	+	+	-	+
4	+	-	-	+
5	-	-	-	+

*有 3 條 DNA 片段，分別為 781、900 和 1700 bps。

參考文獻：

1. 楊姮璘。1992。豬胸膜肺炎放線桿菌溶血素之性狀分析及其基因選殖。臺灣大學獸醫學研究所碩士論文。
2. Chang, C. N., Hsu, F. S. 1991. An epidemicsurvey on swine *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in Taiwan. Proc. symp. Ani. Dis. Prev. Contrl. in Asia. K 1-16
3. Frey, J. and J. Nicolet. 1990. Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 28 : 232-236
4. Frey, J. H. V. D. Bosch, R. Segers and J. Nicolet. 1992. Identification of a second hemolysin (Hly II) in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 and expression of the gene in *E. coli*. Infect. Immun. 60 : 1671-1676
5. Gunnarson, A. et al. 1977. Serological studies on porcine strains of *Haemophilus parahemolyticus* (*pleuropneumoniae*) : Agglutination reaction. Am. J. Vet. Res. 38 : 1111-1114
6. Hunter, D. et al. 1986. Detection of *H. pleuropneumoniae* antigens using the coagglutination test. Vet. Rec. 118 : 137-138
7. Li, H. U. B. Gyllensten, X. Cui, R. K. Saiki, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1988. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. Nature 335 : 414-417
8. Lombin, L. et al. 1984. Biochemical and serological indentification of strains of *H. pleuropneumoniae*. Vet. Microbiol. 10 : 393-397
9. Ma, J and T. J. Inzana. 1990. Indirect enzyme-linked immunosorbant assay for detection of antibody to a 100,000 molecular weight hemolysin of AP. J. Chin. Microbiol. 28 : 1356-1361
10. Mittal KR. et al. 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation test for capsular serotyping of HP. J. Clin. Microbiol. 15 : 1019-1023
11. Mittal, KR. et al. 1983. Determination of antigenic specificity and relationship among *H. pleuropneumoniae* seortypes by an indirect haemaagglutination test. J. Clin. Microbiol. 17 : 787-790
12. Mittal, KR. et al. 1983b. Identification and serotyping of *H. pleuropneumoniae* by coagglutination test. J. Clin. Microbiol. 17 : 787-790
13. Nicolet, J. et al. 1981. An enzyme-linked immunosorbant assay, using a EDTA-extracted antiben for the serology of HP. Am. J. Vet. Res. 42 : 2139-2142
14. Rosendal, S. et al. 1981b. Serotyping and detection of HP by indirect fluorescent antibody technique. Can. J. Comp. Med. 45 : 271-274
15. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf. R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239 : 487-491

Diagnosis of swine *Actinobacillus pleuropneumoniae* by polymerase chain reaction

*Chang, W. M., S. S. Lai, Y. S. Wu, W. J. Tu and C. G. Yang

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

SUMMARY The polymerase chain reaction (PCR) with five (1~5th) oligonucleotieds primers based on the sequence of hemolysin I and two (6, 7th) primers based on the sequence of hemolysin 2 was used to amplified specific DNA fragment for detection and indentification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (AP). Serotype 1, 4, 5, 6, 7 and 9 of AP had a positive reaction with first primers. Serotype 1, 5 and 9 had a postitive reaction with 2, 3th primers, but only Serotype 1 and 9 showed positive with 4, 5th primers. By using 6, 7th primers, all serotype 1~9 were positive. There was no cross reaction among *E. coli*, *P. multocida*, *S. chorelasuis*, *B. bronchiseptica* observed with all 7 primers.

Key words: *polymerase chain reaction, Actinobacillus pleuropneumoniae, hemolysin I*

*Corresponding author

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