

計畫編號：DOH93-DC-2035

行政院衛生署疾病管制局九十三年度自行研究計畫

建立肉毒桿菌 A、B 與 E 型毒素之快速分子診斷技術

## 研究報告

執行機構：衛生署 疾病管制局

研究主持人：蘇勳璧 副主任

研究人員：陳光爐、葉姿暖、邱秀櫻、蔡金來、曾士展

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

\* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 \*

# 目 錄

一、摘要	1
二、本文	
(一)、前言	2
(二)、材料與方法	3
(三)、結果	4
(四)、討論	5
(五)、結論與建議	6
(六)、參考文獻	6
(六)、圖表	
圖一：肉毒桿菌孢子型態染色	9
圖二：肉毒桿菌致病機制簡圖	9
圖三：毒素基因聚合酶分析結果	10
圖四：多套式聚合酶鏈試驗毒素基因分析結果	10
圖五：毒素蛋白 SDS-PAGE 分析結果	11
表一：毒素引子序列一	11
表二：毒素引子序列二	11

## 摘要

關鍵詞：肉毒桿菌 (*Clostridium Botulinum*)、肉毒毒素、多套聚合鏈酶反應 (multiplex-PCR)。

肉毒桿菌毒素能抑制突觸前乙醯膽鹼 (Acetylcholine) 神經傳導物質釋放，導致急性漸進式自主神經傳導阻斷，由於臨床病程很快，常需要快速診斷與檢測。本計劃使用不同區域毒素引子之多套式聚合酶鏈試驗 (multiple-PCR, MP-PCR) 快速檢測，台灣地區常見 A、B、與 E 型三種肉毒桿菌毒素基因，輔以 SDS-PAGE 實驗毒素蛋白型別分析，應用於各種檢體 (包括糞便、嘔吐物或食物) 多重毒素檢測，與中毒案件的快速防疫之需求，並建立實驗室快速分子與毒素蛋白檢測技術。

二組毒素基因引子 PCR 結果顯示，均成功分辨 A、B 與 E 毒素，基因產物分別為 283, 315, 266 bp 與 783, 205, 389bp；多套式聚合酶鏈試驗，可同時夾出三種基因產物。SDS-PAGE 蛋白圖譜也顯示有不同蛋白型態。本研究結果顯示，二組不同引子均可應用毒素基因初步檢測，多套式聚合酶鏈試驗，可同時檢測出三種毒素基因，提供快速防疫實驗室需求，輔以 SDS-PAGE 蛋白圖譜與動物實驗結合提供更明確證據。

## 前言

自 911 事件恐怖攻擊後及美伊戰事期間，世界各國對於生物戰劑均採高度戒備因應，生物戰其中熱門角色之一就是肉毒桿菌，肉毒桿菌所分泌神經毒素具抑制突觸神經傳導物質且極低致死量及易散佈性，使肉毒桿菌毒素幾乎自美容聖品劇變成殺手級產品<sup>(1)</sup>。

肉毒桿菌在台灣地區被列為第四類法定傳染病，歷年均有零星中毒個案發生，毒素型態以 A、B 最常見，個案常因食品處理或保存不當、醃製食物酸度不夠、低溫殺菌不夠或醃製後無冷藏等因素造成毒素產生，攝食含有肉毒毒素所導致。肉毒桿菌屬於厭氧革蘭氏陽性產孢桿菌，特性於高溫、低溫或乾燥的惡劣環境中，會以孢子型態存在，孢子普遍存在泥土、農產品、動物及魚類腸道中，在適當環境狀態下，可發芽成菌，產生毒素。肉毒桿菌中毒依其發病方式，主要可分為四種類型：

一、傳統型或食物型肉毒桿菌中毒 (classical or foodborne botulism)，係為攝食了遭受肉毒毒素污染食物所導致，尤其罐製品不完全殺菌製罐過程或烹飪不充分，或醃製蔬菜、水果、魚、香腸等，在厭氧情形下產生毒素，中毒症狀與神經系統有關，如複視、視覺模糊、對稱性神經麻痺等等。

二、創傷型肉毒桿菌症 (wound botulism)，主要為傷口內部受到肉毒桿菌感染，在無氧情形下產生毒素所導致，如傷口受泥沙污染，症狀與傳統型相似且大多來自二次傷口感染。

三、嬰兒型肉毒桿菌症 (infant botulism)，致病因為肉毒桿菌在腸道增殖並產生毒素，常見於未週歲嬰兒，症狀為昏睡、倦怠、眼瞼下垂、吞嚥困難、頭部失去控制力量、低肌張力等；嬰兒常因攝食含此菌之孢子之食品，而非食品內含有毒素。由於肉毒孢子廣泛存於食品及灰塵中，部分蜂蜜亦含此孢子，故未週歲嬰兒勿使用蜂蜜。

四、兒童或成人型肉毒桿菌症 (child or adult botulism)，常見於一歲以上，腸道肉毒桿菌菌叢產生毒素所致，其致病機制與嬰兒型肉毒桿菌相似，但個案無媒介食物，也可能是食品存有孢子而非毒素造成。

肉毒桿菌為極厭氧之產孢桿菌，其產生之毒素是主要致病因子，依其毒素特性，可分為 A 至 G 共七類型：A 型毒素：常見人類肉毒桿菌中毒毒素，毒性較強，能液化蛋白質。B 型毒素：常見於自然界土壤，毒性較弱，部分液化蛋白質。C 型毒素：僅對家禽、畜動物中毒，不對人類致病，不能液化蛋白質。D 型毒素：僅對家禽、畜動物中毒，極少對人類致病，不能液化蛋白質。E 型毒素：主要存在魚類，中毒案件常與魚類、海鮮類有關，可造成人類中毒，不能液化蛋白質。F 型毒素：1958 發現於丹麥，毒素與 A、B 型相似，部分液化蛋白質。G 型毒素：能液化蛋白質，但不對人類致病。在人類有關肉毒桿菌中毒案件，大部份以 A、B、E 型毒素較常見，極少數為 F 與 G 型，C、D 型常見於家禽、畜或鳥類。

肉毒桿菌致病機制：

肉毒桿菌神經毒素是主要致病因子，主要致病機制，係經由毒素與神經突觸前接受器接合，抑制  $Ca^{++}$  進入細胞內，而抑制乙醯膽鹼 (Acetylcholine) 釋放，導致神經傳導阻斷並產生自主神經功能異常。臨床呈現神經系統的急性漸進性癱瘓，通常誤食遭受肉毒毒素污染食物後，2 小時至 8 天潛伏期，潛伏期愈短病情愈重，死亡率愈高，致死率約 30-60%。

肉毒桿菌毒素分子生物學：

肉毒桿菌中毒症狀與神經系統有關，主要經由毒素抑制神經傳導物質-乙醯膽鹼 (Acetylcholine) 釋放，使自主神經神經傳導阻斷，臨床呈現神經系統的急性漸進性癱瘓，病程很快，常需要快速診斷與檢驗，目前分子技術日新月異，應用於快速肉毒桿菌毒素檢驗技術，包括有 PCR<sup>(4,6,8,11,13)</sup>、ELISA<sup>(9,15)</sup>、Real-time PCR (Quantitative-PCR)<sup>(12,14)</sup> 與自動生化反應<sup>(7)</sup> 等等；這些方法各有其優點與限制，諸如敏感度及特異性問題。近年來，則朝向 Quantitative-PCR 方向發展，以高特異性與敏感度的引子與探針方式進行檢測。

研究計畫緣由與目的：

由於肉毒桿菌中毒個案常需要快速診斷與檢驗，傳統肉毒桿菌的分離與毒素鑑定，需要厭氧培養及動物中和試驗，過程繁瑣且耗時，就防疫時效及快速鑑定而言，是不敷使用；另外，毒素鑑別所需中和抗毒素取得不易與價格昂貴亦是問題。本計劃使用二組不同區域毒素引子，對台灣地區常見 A、B、與 E 型三種毒素型別之肉毒桿菌菌株，進行聚合酶鏈試驗與多套式聚合酶鏈試驗 (multiple-PCR, MP-PCR)，輔以 SDS-PAGE 毒素蛋白型別鑑定，應用於各種檢體 (包括糞便、嘔吐物或食物) 肉毒桿菌多重毒素檢測，以因應案件的快速防疫之實驗室需求，並建立快速分子與蛋白實驗檢測技術。

## 材料與方法

菌株分離及生化、血清鑑定

本實驗選擇由臨床分離的肉毒桿菌菌株包括三株 *C. botulinum* Type A: 編號 6156, 6153, 3502；Type B 一株：編號 CB04；Type E 一株: 編號 5630 等，將菌株培養於 Cooked Meat Medium (CMM)、Cooked Meat Glucose Medium (CMGM)、厭氧 Phenylalanine Egg Yolk Agar (AnPEA)、Egg Yolk Agar (EYA)、Trypticase-Peptone-Glucose-Yeast Extract Broth (TPGY) 等培養基，36-48 小時厭氧培養。

毒素與中和試驗

將菌株置於 5 mL TPGY Broth，36-48 小時厭氧下培養，離心取上清液 0.6 cc，加等量 0.5% Trypsin 37°C 一小時活化，進行進行動物毒素試驗，或

各加入 250  $\lambda$  Anti-toxin A, B, E 及 Poly 等抗毒素，進行動物毒素中和實驗，確認毒素型別。

#### 毒素基因聚合酶試驗

依 Hielm, S 等人<sup>(6)</sup> (Hielm, S et al., 1996) 與 Miia Lindström (Miia et al., 2001)<sup>(13)</sup> 方法進行，使用引子如表一、二，取新鮮 2-3 個菌落，以 100  $\lambda$  滅菌水製成懸浮液，經沸水 10 分鐘後，離心 13000 轉 15 分鐘，抽取上清液 2  $\mu$ L 當作 DNA 板模，10  $\mu$ M 的正向及反向引子各 1  $\mu$ L，2X premix PCR 反應液 25  $\mu$ L (Fermentas, MIB, USA)、21  $\mu$ L 的水，進行毒素基因 PCR 實驗，條件為 94°C 1 分鐘，60°C 1 分鐘，72°C 2 分鐘，進行 30 個循環，產物 7  $\lambda$  進行 1.5% 瓊膠分析，ethidium bromide 染色，照相存檔。

#### 多套式聚合酶鏈試驗

依 Miia Lindström 等人 (Miia et al., 2001)<sup>(13)</sup> 發表多套式聚合酶鏈方法進行。PCR 50  $\mu$ l 反應液包括：1.25  $\mu$ l of template, 0.5  $\mu$ M each primer, 220 nM each deoxynucleotide triphosphate, 32 mM Tris-HCl (pH 8.4), 80 mM KCl, 4.8 mM MgCl, 2U of DNA polymerase。這些反應液以礦物油覆蓋，置於 PCR 儀器進行多套式聚合酶鏈試驗。PCR 反應：變性溫度 (Denature) 95°C 30 秒，煉合溫度 (annealing) 60°C 25 秒與延展 (extension) 72°C 1 分 30 秒，30 個循環，最後在 72°C 3 分鐘，PCR 產物以 2% agarose gels 分析。

#### SDS-PAGE 蛋白電泳實驗

將不同型別菌株接種 50 ml TPGY broth 與 TSB Broth 於 36°C，36-48 小時厭氧培養，4000rpm，15 分鐘，取上清液 5  $\mu$ L 與 2  $\mu$ L Mercaptoethanol 作用後，置於 100°C 沸水中煮 10 分鐘，再置於冰浴裡 10 分鐘，於 12% SDS-PAGE 蛋白膠電泳，200V，1 小時，蛋白圖譜以 Commassie blue 染色。

## 結果

#### 毒素實驗確認與毒素抽取

將菌株培養於 TPGY 與 TSB Broth 之上清液進行老鼠動物實驗，在 24 小時內老鼠死亡，死亡時間以 B 毒素最快約 2 小時內，而 E 毒素最晚在 10 小時或隔夜後動物才死亡。以各抗毒素中和動物試驗分別再予以確認其毒素之型別，並小心將上清液抽取置 -20 保存。

#### 毒素基因聚合酶試驗

二組不同毒素基因 PCR 結果顯示，均可區分出 A、B 與 E 毒素基因，其產物分別為 283，315，266 bp 與 783，205，389bp (圖三,圖四)；

## 多套式聚合酶鏈試驗

依 Miia Lindström 等人 (Miia et al.,2001)<sup>(13)</sup> 發表多套式聚合酶鏈試驗為依據，分別對三種毒素進行檢測，可成功同時夾出 783，205，389bp 三種基因產物 (圖四)。

## 蛋白 SDS-PAGE 實驗：

將 TPGY broth 與 TSB Broth 毒素上清液，以 SDS-PAGE 蛋白電泳分析顯示 (圖五)，不同毒素蛋白有不同蛋白型態，以 B 毒素蛋白差異最大，在 42 kDa 大小有共同蛋白條帶出現。

## 討論

肉毒桿菌分泌外毒素抑制神經傳導物質-乙醯膽鹼 (Acetylcholine) 釋放，使自主神經神經傳導阻斷，呈現急性漸進性癱瘓的臨床症狀，由於病程進展很快，常需要快速診斷與檢驗。目前分子診斷技術日新月異，應用於快速肉毒桿菌毒素檢驗技術，包括有 PCR<sup>(4,6,8,11,13)</sup>、ELISA<sup>(9,15)</sup>、Real-time PCR (Quantitative-PCR)<sup>(12,14)</sup> 與自動生化反應<sup>(7)</sup> 等等；這些方法各有其優點與限制，諸如敏感度及特異性問題等。由於傳統肉毒桿菌的分離與鑑定，需要厭氧培養及毒素中和試驗 (動物實驗)，過程繁瑣且耗時，而毒素型別之中和抗毒素取得不易與價格昂貴亦是問題之一。

本計劃使用二組不同區域毒素引子<sup>(7,13)</sup>，對台灣地區常見 A、B、與 E 型三種毒素型別之肉毒桿菌菌株，進行聚合酶鏈試驗與多套式聚合酶鏈試驗 (multiple-PCR, MP-PCR)，建立快速診斷分子實驗室需求，再輔以 SDS-PAGE 毒素蛋白電泳分析，應用於各種檢體 (包括糞便、嘔吐物或食物) 肉毒桿菌毒素蛋白檢測技術。

二組毒素基因 PCR 結果顯示，其產物分別為 283，315，266 bp 與 783，205，389bp 均可區分出 A、B 與 E 毒素基因，由於 Hielm, S 等人<sup>(6)</sup> 使用引子引導 PCR 產物過於接近，以多套式聚合酶鏈進行分析時，PCR 產物不易在電泳瓊膠片上區分，因此，採用 Miia Lindström 等人 2001<sup>(13)</sup> 發表多套式聚合酶鏈試驗為實驗依據，進行方法修飾，主要修飾如引子、DNA 版模、MgCl<sub>2</sub> 濃度及調整 DNA polymerase 反應濃度等等，再分別對一種及多種毒素基因進行聚合酶反應，結果顯示，成功地在同一試管內同時夾出 783，205，389bp 三種基因產物 (圖四)，而彼次引子對不會相互干擾影響。

不同毒素菌株以 TPGY broth 與 TSB Broth 進行厭氧培養，抽取上清液進行動物實驗顯示，二者含有肉毒桿菌毒素，均能造成動物死亡，再以 SDS-PAGE 蛋白電泳分析顯示 (圖五)，不同毒素蛋白有不同蛋白型態，以 B 毒素蛋白差異最大，且動物死亡時間亦以 B 型毒素最快 (約莫 2 小時內)，顯示 B 型毒素動物致死毒性最強，而 E 型毒素毒性最弱，動物死亡時間通

常在 10 小時或隔夜後，另外，在蛋白圖譜 42 kDa 大小有共同蛋白條帶出現，是否有其特殊意義，須進一步分析。

### 結論與建議

- 1.研究結果顯示，二組不同引子均可應用毒素基因初步檢測，多套式聚合酶鏈試驗，可同時檢測出三種毒素基因，提供防疫時效及快速鑑定需求，輔以 SDS-PAGE 蛋白圖譜與動物實驗結合提供更明確證據。並進一步建立實驗室快速分子與毒素蛋白檢測技術。
- 2.台灣地區歷年均有零星肉毒中毒個案發生，分析中毒成因常因食品處理或保存不當、醃製食物酸度不夠、低溫殺菌不夠或醃製後無冷藏等因素造成，在食品安全衛生教育上，須針對民眾醃製品與未滿一歲小孩使用蜂蜜製品，應加強衛生教育與宣導。

### 參考文獻

- 1.Broussard LA.2001Biological agents: weapons of warfare and bioterrorism Mol iagn. ;6(4):323-33.
- 2.S. K. Sharma, M. A. Ramzan and B. R. Singh. 2003. Separation of the components of type A botulinum neurotoxin complex by electrophoresis. Toxicon 41,.321-331
- 3.Wictome, M., K. Newton, K. Jameson, B. Hallis, P. Dunnigan, E. Mackay, S. Clarke, R. Taylor, J. Gaze, K. Foster, and C. Shone. 1999. Development of an in vitro bioassay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. Appl. Environ. Microbiol. 65:3787-3792
- 4.Aranda, E., M. M. Rodríguez, M. A. Asensio, and J. J. Córdoba. 1997. Detection of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in foods by PCR and DNA probe. Lett. Appl. Microbiol. **25**:186-190.
- 5.Braconnier, A., V. Broussolle, C. Nguyen-The, and F. Carlin. 2001. Screening for *Clostridium botulinum* type A, B, and E in cooked chilled foods containing vegetables and raw material using polymerase chain reaction and molecular probes. J. Food Prot. **64**:201-207

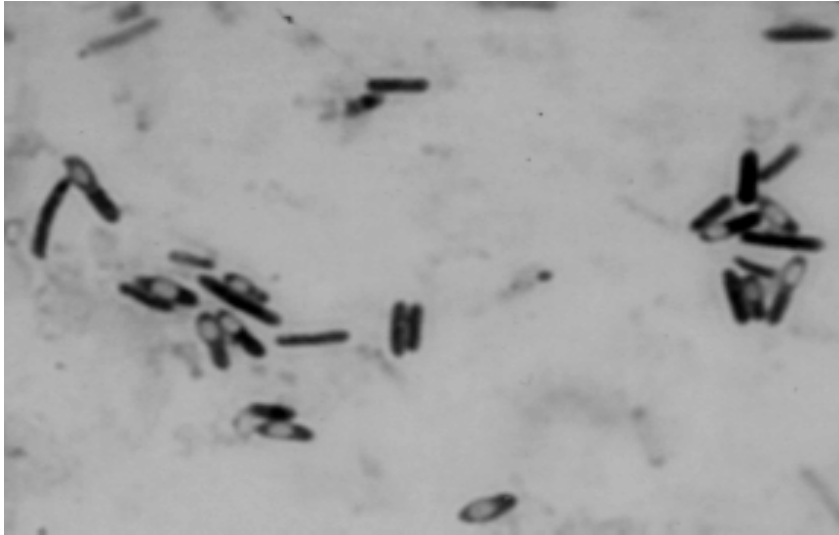


6. Hielm, S., E. Hyytiä, J. Ridell, and H. Korkeala. 1996. Detection of *C. botulinum* in fish and environmental samples using polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.* **31**:357-365
7. Lindström, M., H. Jankola, S. Hielm, E. Hyytiä, and H. Korkeala. 1999. Identification of *Clostridium botulinum* with API 20 A, Rapid ID 32 A and RapID ANA II. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **24**:267-274
8. McGrath, S., J. S. G. Dooley, and R. W. Haylock. 2000. Quantification of *Clostridium botulinum* toxin gene expression by competitive reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1423-1428.
9. Rowman, M. G., J. Y. Humber, P. A. Hall, N. R. Reddy, H. M. Solomon, M. X. Triscott, G. A. Beard, J. D. Bottoms, T. Cheng, and G. J. Doellgast. 1994. Amplified immunoassay ELISA-ELICA for measuring *Clostridium botulinum* type E neurotoxin in fish fillets. *J. Food Prot.* **57**:985-990
10. Poulet, S., D. Hauser, M. Quanz, H. Niemann, and M. R. Popoff. 1992. Sequences of the botulinal neurotoxin derived from *Clostridium botulinum* type E (strain Beluga) and *Clostridium butyricum* (strains ATCC 43181 and ATCC 43755). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**:107-113
11. Sciacchitano, C. J. 1996. Molecular detection of *Clostridium botulinum* type E neurotoxin gene in smoked fish by polymerase chain reaction and capillary electrophoresis. *J. AOAC Int.* **79**:861-865.
12. Oberst, R. D., M. P. Hays, L. K. Bohra, R. K. Phebus, C. T. Yamashiro, C. Paszko-Kolva, S. J. A. Flood, J. M. Sargeant, and J. R. Gillespie. 1998. PCR-based DNA amplification and presumptive detection of *Escherichia coli* O157:H7 with an internal fluorogenic probe and the 5' nuclease (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3389-3396.
13. Miia Lindström, Riikka Keto, Annukka Markkula, Mari Nevas, Sebastian Hielm, and Hannu Korkeala. 2001. Multiplex PCR Assay for Detection and Identification of *Clostridium botulinum* Types A, B, E, and F in Food and Fecal Material *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5694-5699.
14. B. Kimura,<sup>\*</sup> S. Kawasaki, H. Nakano, and T. Fujii. 2001 Rapid, Quantitative PCR Monitoring of Growth of *Clostridium botulinum* Type E in

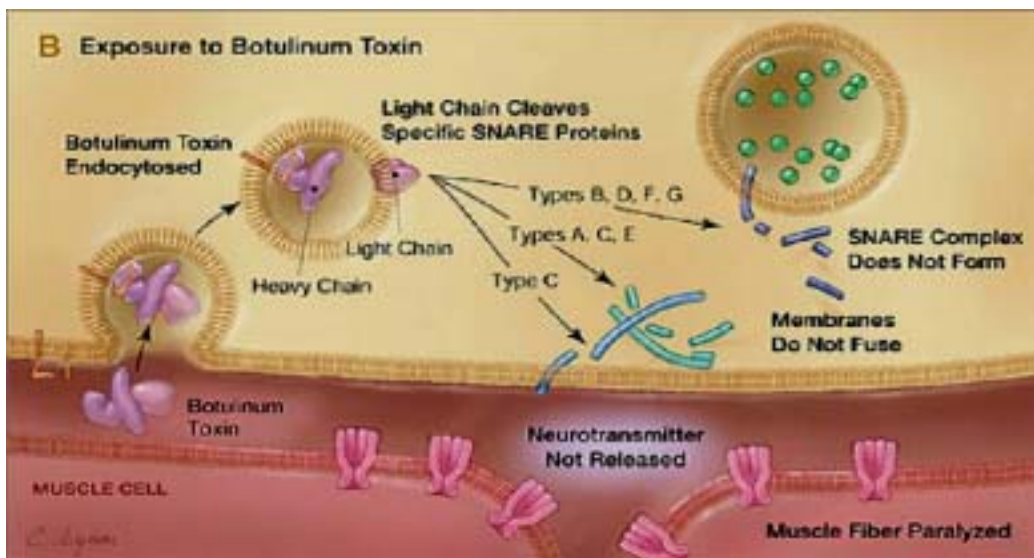
Modified-Atmosphere-Packaged Fish. Appl. Environ. Microbiol. 67:206-216.

15. Doellgast, G. J., M. X. Triscott, G. A. Beard, J. D. Bottoms, T. Cheng, B. H. Roh, M. G. Roman, P. A. Hall, and J. E. Brown. 1993. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. J. Clin. Microbiol. 31:2402-2409.

16 衛生署食品中毒狀況分析 88-90 年



圖一：肉毒桿菌孢子型態染色圖。肉毒桿菌屬於厭氧革蘭氏陽性產孢桿菌，於高溫、低溫或乾燥的惡劣環境中，會以孢子型態存在，孢子普遍存在泥土、農產品、動物及魚類腸道中，在適當環境狀態下，可發芽成菌，產生毒素。



圖二：肉毒桿菌致病機制：肉毒桿菌毒素經由神經突觸前接受器接合，阻止  $Ca^{++}$  進入細胞內，抑制乙醯膽鹼（Acetylcholine）釋放，導致神經傳導阻斷產生自主神經功能異常。

A	B	E	+	-
---	---	---	---	---

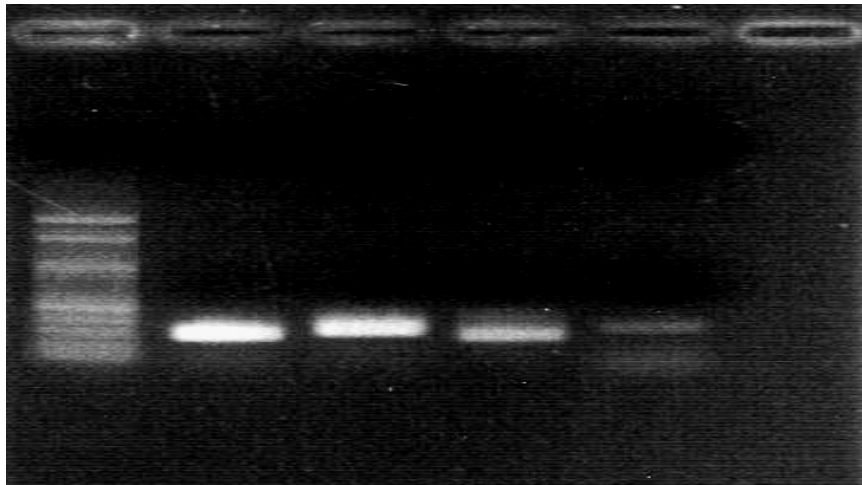


Fig. 3. Electrophoresis of PCR products amplified from different toxin genes of *Clostridium Botulinum* (lane 2-4, ) using CB-specific primers. Lane 1, 100-bp DNA markers, Lane5, 6 as positive and negative control.

A	B	E	A	A	B	A
			B	E	E	B/E

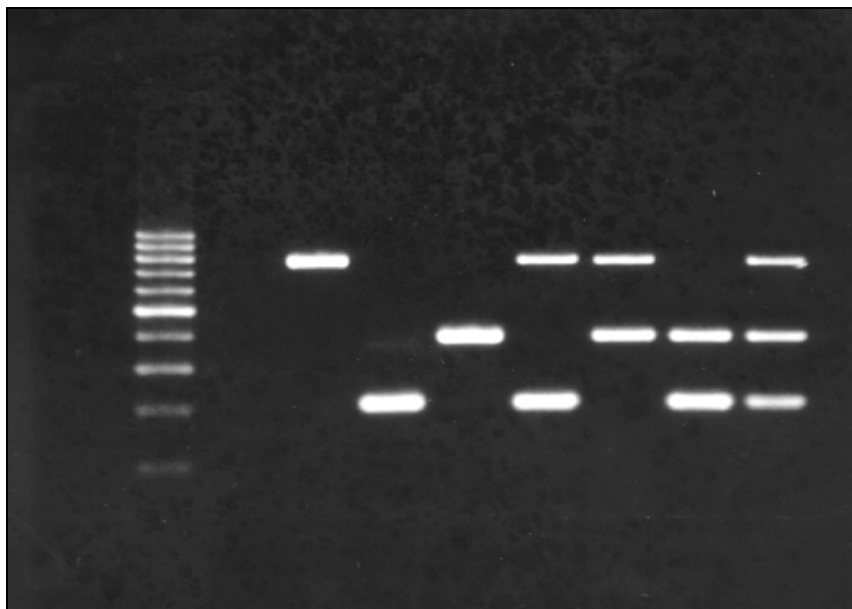


Fig. 4. Electrophoresis of PCR products amplified from different toxin genes of *Clostridium Botulinum* (lane 3-8, ) using CB-specific primers. Lane 1, 100-bp DNA markers, Lane 2, negative control.

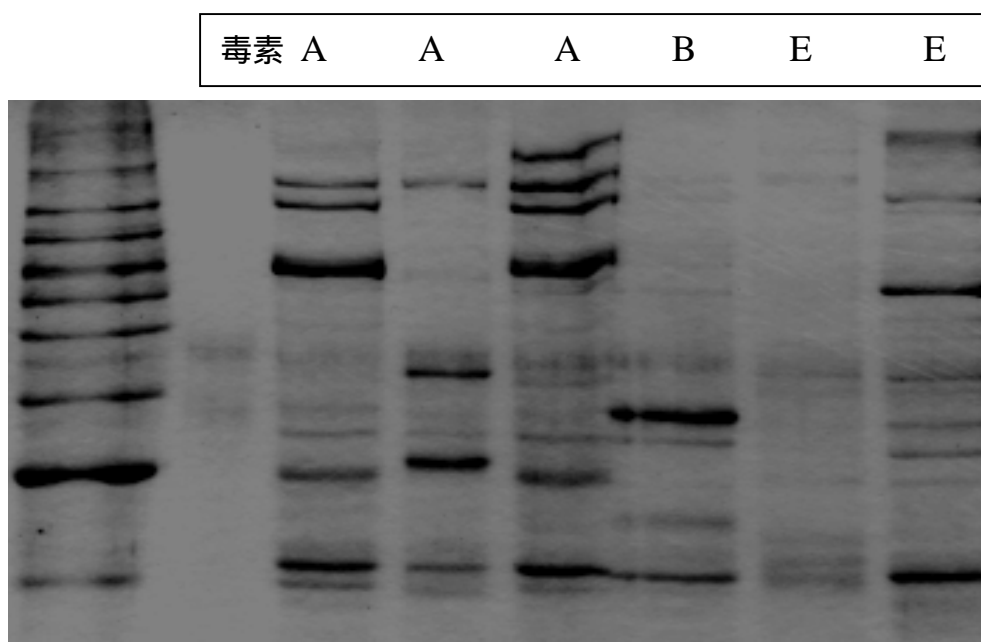


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of different toxin protein of *Clostridium Botulinum* (lane 3-8). using of 12%SDS-PAGE in 1×SDS buffer , 75mA 4.5h Lane 1, 10-220 kDa bench protein markers , Coomassie blue.

表一：依 Hielm, S 等人 (6) 1996 發表文獻，毒素引子如下

	引子序列	標的物	產物大小
<i>CB-A</i>	5'-TGC AGG ACA AAT GCA ACC AGT-3', 21bp	A 毒素	283 bp
	5'-TCC ACC CCA AAA TGG TAT TCC-3', 21bp		
<i>CB-B</i>	5'-CCT CCA TTT GCG AGA GGT ACG-3', 21bp	B 毒素	315 bp
	5'-CTC TTC GAG TGG AAC ACG TCT-3', 21bp		
<i>CB-E</i>	5'-CAG GCG GTT GTC AAG AAT TTT A -3', 22bp	E 毒素	266 bp
	5'-ATT AGC TTT TGA CAG TTC TTC -3', 21bp		

表二：依 Miia Lindström 等人 (6) 2001 發表文獻，毒素引子如下

	引子序列	標的物	產物大小
<i>toxin A</i>	5'-AGC TAC GGA GGC AGC TAT GTT-3', 21bp	A 毒素	783 bp
	5'-CGT ATT TGG AAA GCT GAA AAG G-3', 22bp		
<i>toxin B</i>	5'-CAG GAG AAG TGG AGC GAA AA-3', 19bp	B 毒素	205 bp
	5'-CTT GCG CCT TTG TTT TCT TG-3', 20bp		
<i>toxin E</i>	5'-CCA AGA TTT TCA TCC GCC TA -3', 20bp	E 毒素	389 bp
	5'-GCT ATT GAT CCA AAA CGG TGA -3', 21bp		