

文章编号:1000-0615(2008)06-0945-05

豚链球菌和停乳链球菌类 M 蛋白及其抗原性分析

汪笑宇, 战文斌, 邢婧, 绳秀珍

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 分别用热酸抽提法、碱抽提法和胃蛋白酶消化法分离豚链球菌 NUF849 的类 M 蛋白, 通过 SDS-PAGE 和 Western-blotting 印迹法分析比较三种方法所提类 M 蛋白的组成和抗原性差异。结果表明, 热酸抽提法分离制备的类 M 蛋白得率和纯度都较其它两种方法高, 蛋白的抗原性保持较好。采用热酸抽提法提取 5 株豚链球菌 NUF633、NUF693、NUF701、NUF812、NUF849 和 2 株停乳链球菌 SD 和 L2 的类 M 蛋白, 其 SDS-PAGE 图谱明显不同, 种间差异明显, 豚链球菌主要类 M 蛋白的分子量分别为 60、48、37、30、27、24 和 15 ku, 停乳链球菌主要类 M 蛋白的分子量分别为 68、48、42、37、29、26、23、21、19、17、15、14 和 11 ku。Western-blotting 结果显示, 兔抗豚链球菌血清可与豚链球菌的两条类 M 蛋白带结合, 分子量分别为 60 和 37 ku; 与停乳链球菌的两条类 M 蛋白带结合, 分子量为 68 和 37 ku。两种链球菌主要类 M 蛋白组成及其抗原性差异明显。

关键词: 豚链球菌; 停乳链球菌; 类 M 蛋白; 抗原性

中图分类号: S 948

文献标识码: A

链球菌(*Streptococcus*)是一种广泛分布于自然界的革兰氏阳性菌,可引起水生动物、哺乳动物甚至人类等患链球菌病。鱼类链球菌病最初由日本学者报道,在日本造成极大危害,此后在其他国家也陆续有报道^[1-5],并严重危害各种养殖和野生鱼类。在我国主要危害的养殖鱼类有美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)^[6]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[7]、罗非鱼(*Oreochromis nilotica*)^[8-9]、虹鳟(*Salmo gairdneri*)^[10]、鲮鱼(*Naucrates ductor*)^[11]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[12]等,造成极大的经济损失。

类 M 蛋白是链球菌细胞壁中的蛋白组分,能穿过荚膜延伸至菌体表面成为菌毛,是链球菌重要的表面抗原,能刺激机体产生特异性抗体,具有抗吞噬和抵抗吞噬细胞内的杀菌作用,增强细菌的侵袭力,与致病性和免疫保护性密切相关,是病原细菌亚单位疫苗的重要材料。

若能找到参与血清型反应的主要类 M 蛋白,提取特异性抗原,制备相应疫苗,将会大大提高疫苗的防治效果。国内外对链球菌类 M 蛋白的报道主要集中于马链球菌^[13-15]和猪链球菌^[16-17],已经证实类 M 蛋白不仅具有与抗吞噬作用,还是链球菌良好的免疫原^[13,18]。对水产动物链球菌类 M 蛋白的研究还未见报道。本研究比较了三种分离提取链球菌类 M 蛋白的方法,并提取了多株链球菌的类 M 蛋白,通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 对制备的类 M 蛋白组成及其抗原性进行了分析比较。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验菌株 NUF633、NUF693、NUF701、NUF812、NUF849 均为豚链球菌(*S. iniae*)取自日本长崎大学;SD 为停乳链球菌(*S.*

收稿日期:2007-11-08

资助项目:国家自然科学基金(30771648);国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA100306)

作者简介:汪笑宇(1983-),女,辽宁大连人,硕士,从事水生动物病害学及免疫学研究

通讯作者:战文斌, Tel:0532-82032284, E-mail:wbzhan@ouc.edu.cn

dysgalactiae)取自浙江淡水所;L2菌株,亦为停乳链球菌,由本实验室分离。

纯系新西兰大白兔由青岛市药检所提供。

1.2 免疫血清的制备

菌悬液的制备 将豚链球菌 NUF849 接种于血平板,28℃培养24h,PBS(pH 7.4,10 mmol·L⁻¹)洗涤收集细菌,然后以0.5%福尔马林4℃灭活48h。4℃离心去除福尔马林,PBS重悬。

抗血清的制备 基础免疫为菌悬液与弗氏完全佐剂2:1混匀,采用皮下6点注射纯系新西兰白兔,每点注射0.2 mL;2周后加强免疫,菌悬液与弗氏不完全佐剂2:1混匀,注射方法同基础免疫相同;3周后第2次加强免疫,采用耳缘静脉注射的方法,注射菌悬液0.8 mL,无佐剂;第2次加强免疫后第7天动脉采血,室温倾斜放置1h,转入4℃过夜,次日340×g离心15 min得抗血清,-80℃保存备用。

1.3 类M蛋白的制备

链球菌菌株 NUF849 于28℃血平板培养24h后转接于含0.3%酵母提取物的 Todd Hewitt 液体培养基中培养48h。4℃6 000×g离心20 min收集菌体,PBS洗涤3次。

热酸抽提法 参照文献[19]的方法。将细菌悬液用HCl调至pH 2.5,95℃搅拌10 min,冷却后调pH至7.0,12 000×g离心15 min,收取上清,在超纯水中透析过夜,冻干,溶于适量的PBS中。

碱抽提法 参照文献[20]的方法。将细菌悬液用NaOH调pH至10.0,置于37℃孵育箱中作用30 min,冷却后调pH至7.0,12 000×g离心15 min,收取上清,超纯水透析过夜后冻干,溶于适量的PBS中。

胃蛋白酶消化法 参照文献[21]的方法。将细菌悬液调pH至5.8,加入胃蛋白酶使其浓度为2 mg·mL⁻¹,置于37℃孵育箱中作用30 min,冷却后调pH至7.0,12 000×g离心15 min,收取上清,超纯水透析后冻干,溶于适量的PBS中。

1.4 SDS-PAGE 图谱分析

采用非连续缓冲系统垂直板电泳。丙烯酰胺浓度:分离胶12%、浓缩胶5%。每孔加样18 μL,初始恒流30 mA,直至溴酚蓝前沿进入分离胶后,恒流60 mA至电泳结束,凝胶放入前固定液固定

1 h,考马斯亮蓝 R-250 染色。以低分子量标准蛋白的对数值和电泳迁移率绘制标准曲线,求出各分离蛋白的分子量。

1.5 免疫印迹试验(Western-blotting)

待测样品经 SDS-PAGE 分离后用 Mini-Protean II cell 系统(Bio-rad)转移到孔径为0.45 μm的硝酸纤维素膜上,恒流200 mA通电5 h,4℃。转移结束后,将膜置于5%脱脂奶粉中,4℃过夜封闭,膜在PBST(PBS含0.5%的Tween20)中洗涤3次,每次5 min(下同)。将膜浸于1:100(v/v)兔抗豚链球菌 NUF849 血清中,37℃孵育1 h,PBST洗涤。再将膜浸于1:1 000(v/v)碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 中,37℃孵育1 h,PBST洗涤。将膜于含有66 μL 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、33 μL 5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸(BCIP)的10 mL NBT/BCIP 缓冲液中发色20~30 min。去离子水洗涤,以中止反应。室温干燥,暗处保存。

1.6 多株链球菌类M蛋白的比较

采用热酸抽提法分别提取 NUF633、NUF693、NUF701、NUF812、NUF849、SD 和 L2 七株链球菌的类M蛋白。采用 SDS-PAGE 不连续梯度电泳和免疫印迹法分析比较所得蛋白。

2 结果

2.1 不同方法制备链球菌类M蛋白 SDS-PAGE 图谱和 Western-blotting 结果

以热酸抽提法、碱抽提法及胃蛋白酶消化法分离制备的豚链球菌 NUF849 类M蛋白经 SDS-PAGE 电泳显示,3种不同方法分离制备的类M蛋白 SDS-PAGE 图谱明显不同。

热酸抽提法提取的类M蛋白的分子量在60和15 ku之间,其中主要蛋白质带的分子量分别为60、48、44、39、37、30、27、19和15 ku。碱抽提法提取的类M蛋白分子量在98和22 ku之间,其中主要蛋白质带的分子量分别为98、63、53、40、38、30、28和22 ku。胃蛋白酶消化法提取的类M蛋白的分子量分别为60、48、44、37、30、27和16 ku。

用 Western-blotting 印迹法检测了链球菌类M蛋白与兔抗豚链球菌血清的免疫结合反应。由图1可见,兔抗豚链球菌血清与热酸法抽提的类M蛋白的四条蛋白带结合,其分子量约为60、37、27和19 ku;与碱抽提法的M蛋白的五条蛋

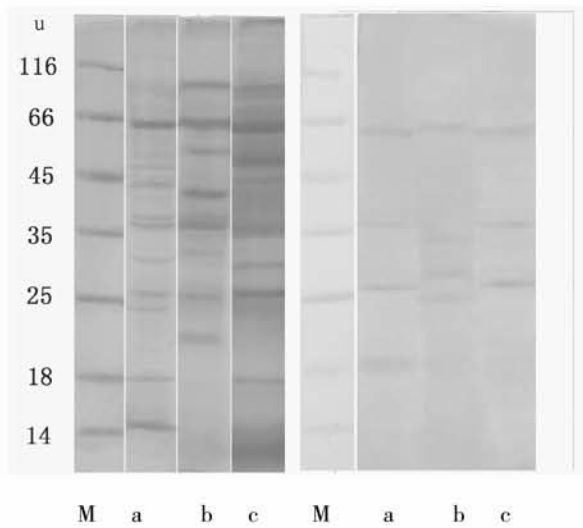


图 1 不同方法提取豚链球菌类 M 蛋白的 SDS-PAGE 和 Western-blotting 结果

M-Marker, a-热酸抽提法, b-碱抽提法, c-胃蛋白酶消化法

Fig. 1 SDS-PAGE and Western-blotting of M-like proteins of *S. iniae* by different ways

M-Marker, a-热酸抽提法, b-碱抽提法, c-胃蛋白酶消化法
a- hot acid extraction, b-alkaline extraction, c- pepsin digestion

白带结合,其分子量分别为 63、30、28 和 24 ku;兔抗链球菌血清与胃蛋白酶消化的类 M 蛋白的三条蛋白带结合,分子量约为 60、37 和 27 ku。本研究表明,60、37 和 27 ku 三条蛋白带具有较强的免疫原性,能刺激机体产生很强的免疫应答。

2.2 两种链球菌的类 M 蛋白 SDS-PAGE 图谱和 Western-blotting 结果

用热酸抽提法提取七株链球菌的类 M 蛋白。经 SDS-PAGE 电泳,凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色脱色后,图谱显示 a、b、c、d、e 五株豚链球菌 SDS-PAGE 图谱相似,有多条共有区带,主要分子量分别为 60、48、37、30、27、24、15 ku(图 2)。f 和 g 两株停乳链球菌类 M 蛋白 SDS-PAGE 图谱相似,有多条共有区带,其中分子量为 68、48 和 42 ku 的蛋白条带较浓,其它分子量在 37~12 ku 之间的蛋白带较浅,分子量分别为 37、29、26、23、21、19、17、15、14 和 11 ku。两种链球菌主要类 M 蛋白组成明显不同。

用 Western-blotting 印迹法检测两种链球菌类 M 蛋白与兔抗豚链球菌抗血清免疫结合反应。由图 3 可知,5 株豚链球菌类 M 蛋白与兔抗豚链球菌抗血清有两条共有的免疫条带,分子量分别

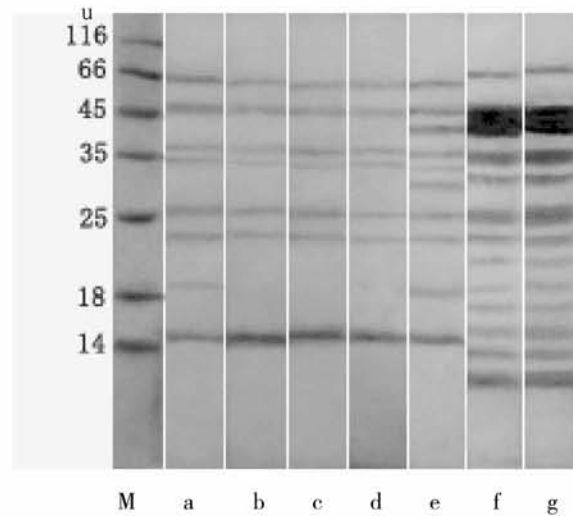


图 2 不同种属链球菌类 M 蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE of M-like proteins of

S. iniae and *S. dysgalactiae*

M-Marker, a-NUF633, b-NUF693, c-NUF701, d-NUF812, e-NUF849, f-SD, g-L2

为 60 和 37 ku。其中 NUF633 和 NUF849 共有另外两条免疫条带,分子量分别为 27 和 19 ku。两株停乳链球菌类 M 蛋白与兔抗豚链球菌血清有两条共同的免疫条带,分子量分别为 68 和 37 ku,L2 株与兔抗血清还有一条分子量为 19 ku 的免疫条带。

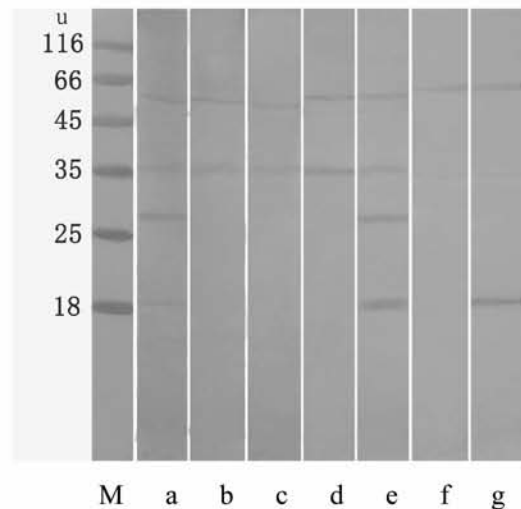


图 3 兔抗链球菌血清对 M 蛋白的免疫印迹

Fig. 3 Western blots of M proteins of

S. iniae and *S. dysgalactiae*

M proteins were detected by antiserum from rabbit immunized with *S. iniae*

M - marker, a-NUF633, b-NUF693, c-NUF701, d-NUF812, e-NUF849, f-SD, g-L2,

3 讨论

链球菌的类 M 蛋白提取方法很多,包括从培养上清中沉淀类 M 蛋白、酶裂解^[21]、热酸法^[19]提取及 SDS 提取^[22]等。本研究采用了热酸法、热碱法和胃蛋白酶消化法三种方法提取豚链球菌 NUF849 的类 M 蛋白,结果显示,热酸抽提法和胃蛋白酶消化法制备类 M 蛋白抗原性一致,蛋白的抗原性保持较好;热碱法制备的类 M 蛋白及其抗原性与其他两种方法明显不同,这可能是由于氨基酸对酸和碱的敏感性不同导致抗原决定簇断裂位置的差异^[23]。由于热酸抽提法所得蛋白得率和纯度显著高于其他两种方法,因此在本实验的后续研究中采用了热酸抽提法提取链球菌类 M 蛋白。

在 A 群、C 群、G 群链球菌^[24-25]中证实,它们的类 M 蛋白分子量都有很大的差别。本实验的结果也证实了这一点,从 SDS-PAGE 和 Western-blotting 图谱中可以看出,两种链球菌类 M 蛋白分子量及其免疫原性差异较大,豚链球菌类 M 蛋白主要分子量分别为 60、48、37、30、27、24 和 15 ku,而停乳链球菌类 M 蛋白 SDS-PAGE 主区带蛋白分子量为 68、48 和 42 ku,其它蛋白带分子量在 37~12 ku 之间。这表明链球菌种间类 M 蛋白结构和分子量差异较大,这在链球菌鉴定上有一定的意义^[24],可以通过观察比较未知菌株与标准菌株类 M 蛋白的 SDS-PAGE 图谱的相似性,确定链球菌的种类。

本研究中发现,37 ku 蛋白是七株链球菌共有的蛋白组分,并且均具有免疫反应性,推测 37 ku 的蛋白组分是链球菌共有的特异性抗原,这为链球菌保护性抗原的筛选和开发研制链球菌类 M 蛋白的亚单位疫苗提供了可能的候选材料。另外,SDS-PAGE 图谱显示 19 ku 的蛋白是 NUF633、NUF849、SD 和 L2 共有的蛋白组分,而 Western blotting 显示 NUF633、NUF849 和 L2 这 3 株链球菌的 19 ku 的蛋白带能发生阳性反应,有较强的免疫原性,推测 4 株链球菌 19 ku 的蛋白组分可能是相同分子量的不同蛋白,这对链球菌亚单位疫苗的研制也有一定的参与意义。NUF633 和 NUF849 有两条分子量为 27 和 19 ku 的不同于其他株豚链球菌的共同条带,表明这两株链球菌种间差异较小,这可能与菌种分离自不

同地区、不同水域、不同年份等条件相关。

参考文献:

- [1] Eldar A, Perl S, Frelie P F, *et al.* Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection [J]. *Dis Aquat Organ*, 1999, 36(2): 121-127.
- [2] Pier G, Madin S. *Streptococcus iniae* sp. nov, a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis* [J]. *Internat J Syst Bacteriol*, 1976, 26(4): 545-553.
- [3] Bowser P R, Wooster G A, Getchell, *et al.* *Streptococcus iniae* infection of tilapia *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility [J]. *J World Aquacult Soc*, 1998, 29: 335-339.
- [4] Eldar A, Frelie P F, Asanta L, *et al.* *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae* [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45: 840-842.
- [5] Colorni A, Diamant A, Eldar A, *et al.* *Streptococcus iniae* infection in Red Sea caged and wild fishes [J]. *Dis Aquat Org*, 2002, 49: 165-170.
- [6] 沈智华, 钱冬, 许文军. 红拟石首鱼(美国红鱼)海豚链球菌分离、鉴定及致病性研究 [J]. *水生生物学学报*, 2005, 29(6): 678-683.
- [7] 杜佳银. 海水养殖鱼类链球菌病 [J]. *渔业现代化*, 2001, 5: 28-29.
- [8] 柴家前, 丁巧玲, 王振龙, 等. 罗非鱼链球菌的分离鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2002, 24(1): 18-20.
- [9] 王琼秋. 罗非鱼链球菌性皮炎的分离鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2001, 23(2): 150-152.
- [10] 郭建坤, 杨雪珍, 景建江. 中药治疗虹鳟鱼链球菌病报告 [J]. *淡水渔业*, 1999, 29(12): 12.
- [11] 纪荣兴, 胡石柳. 杜氏链球菌病及其他常见病害防治的研究 [J]. *福建水产*, 1998, 1: 27-32.
- [12] 杜佳银. 大菱鲆链球菌病 [J]. *河北渔业*, 2001, 118(4): 36-37.
- [13] 苏良科, 陆承平. 马链球菌兽疫亚种 ATCC35246 株类 M 蛋白的提取 [J]. *畜牧与兽医*, 2004, 36(1): 25-26.
- [14] 范红结, 陆承平, 唐家琪. 马链球菌兽疫亚种类 M 蛋白的基因克隆、序列分析及其在猪源链球菌的检测 [J]. *微生物学报*, 2004, 44(5): 617-620.
- [15] Fischetti V A. Streptococcal M protein: molecular

- design and biological behaviour [J]. Clin Microbiol Rev, 1989,2:285-314.
- [16] 欧 瑜, 陆承平. 猪链球菌 2 型溶菌酶释放蛋白基因片段的克隆与表达 [J]. 农业生物技术学报, 2002,10(1):72-75.
- [17] John F T, John W, Mei Z, *et al.* Cloning and sequencing analysis of a protective M-like protein gene from *Streptococcus equi* sub sp. zoonoticus [J]. Infect Immun, 1995,63:1440-1445.
- [18] John H. Michael A. Group A Streptococcal M Proteins: virulence factors and protective antigens [J]. Immunology Today. 1992,13(9): 362-367
- [19] Lancefield R C, Perlmann G E. Preparations and properties of type I haemolytic streptococcus [J]. J Exp Med,1952,96:71-82.
- [20] Fox E N, Wittner M K. New observations on the structure and antigenicity of the M-proteins of the group A streptococcus[J]. Bacteriol Rev,1965,38: 57-86.
- [21] Edwin H B, Gary L C. Peptic digestion of streptococcal M Protein II Extraction of M antigen from group A streptococci with pepsin[J]. Infect Immun,1974,9(5):891-896.
- [22] Boschwitz J S, Groschup M H, Timoney J F. A comparison of different methods of extraction of the M-protein from *Streptococcus equi* [J]. Cornell Vet, 1991,81(1):25-36.
- [23] Timony J F, Mukhtar M M. The protective M proteins of equi group C streptococci [J]. Veterinary Microbiology,1993,37:389-395.
- [24] Fischetti V A, Jones K F. Size variation of the M-protein in group A streptococci [J]. J Exp Med, 1985,161:1384-1401.
- [25] Jones K F, Fischetti V A. Biological and immunochemical identity of M-protein on group A streptococci [J]. Infect Immun,1987,55:502-506.

M-like proteins and antigenicity of M-like proteins in *Streptococcus iniae* and *Streptococcus dysgalactiae*

WANG Xiao-yu, ZHAN Wen-bin, XING Jing, SHENG Xiu-zhen

(Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, Laboratory of Mariculture Ministry of Education of China (LMMEC), Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: M-like protein was reported mostly in *Streptococcus equi* and *S. suis*, and was a kind of important antigen of *Streptococcus*. In order to analyze antigenicity of M-like protein in *S. iniae*, three different extraction methods (hot acid extraction, alkaline extraction and pepsin digestion) were used for preparing M-like proteins from *Streptococcus iniae* and *Streptococcus dysgalactiae*. The M-like proteins of the two streptococci were analyzed by using SDS-PAGE and Western-blotting. By comparing the results of the three methods, the M-like proteins extracted by hot acid had the strongest immunogenicity. The SDS-PAGE diagrams of the M-like proteins of the two streptococci were distinctly different. The M-like proteins extracted from *S. iniae* contained 7 minor protein bands with molecular weights of 60, 48, 37, 33, 27, 24 and 15 ku, the M-like proteins extracted from *S. dysgalactiae* contained 2 minor protein bands with molecular weights of 68 and 42 ku. After SDS-PAGE, in the Western-blotting with rabbit antiserum against *S. iniae* whole cells, only 2 M-like proteins of *S. iniae* with molecular weights of 60 ku and 37 ku were detected, and only 2 M-like proteins of *S. dysgalactiae* with molecular weights of 68 ku and 37 ku. It showed that the M-like proteins of the two streptococci had different composition and antigenicity.

Key words: *Streptococcus iniae*; *Streptococcus dysgalactiae*; M-like protein; antigenicity