

猪链球菌 2 型国内分离株毒力相关蛋白的分析*

欧 瑜 陆承平**

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室 南京 210095)

摘 要:提纯猪链球菌 2 型江苏分离株 HA9801 的毒力相关蛋白溶菌酶释放蛋白(muraminidase-released protein, MRP)和胞外因子(extracellular factor, EF),制备其抗体供免疫转印之用。另提取猪源链球菌 17 株国内分离株、1 株德国分离株及 1 株猪链球菌 2 型人分离株的胞壁和胞外蛋白,经 SDS-PAGE,与 HA9801 株的 MRP 和 EF 的抗体作免疫转印。11 株 MRP 阳性,10 株 EF 及 EF⁺ 阳性,MRP 及 EF 的分布存在 4 种表型:MRP⁺ EF⁺ (8/19),MRP⁺ EF⁻ (1/19),MRP⁻ EF⁺ (1/19),MRP⁻ EF⁻ (10/19)。

关键词:猪链球菌,溶菌酶释放蛋白(MRP),胞外因子(EF)

中图分类号:Q939.11 文献标识码:A 文章编号:0001-6209 (2002) 01-0105-05

猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* type 2)导致猪患败血症、脑膜炎、关节炎等疾病,并可感染人导致死亡,在世界很多国家均受到重视。近十年来,研究的焦点集中在与毒力相关的蛋白上。Vecht 等报道猪链球菌 2 型荷兰分离株存在两种毒力相关蛋白:分子量为 136kD 的溶菌酶释放蛋白(MRP)和 110kD 的胞外因子(EF)^[1],发现欧洲很多国家和美国、澳大利亚的 2 型分离株的这两种蛋白都与毒力有很强的相关性^[2-5]。1998 年,江苏某地暴发了猪链球菌病,经鉴定该病原菌为猪链球菌 2 型^[6]。本试验在提取纯化猪链球菌 2 型江苏 1998 分离株的基础上,对其它 18 株国内分离株的 MRP 及 EF 或相关蛋白进行了分析,以阐明这些毒力因子的分布情况。

1 材料和方法

1.1 菌种

所用 20 株菌株除 1 株为猪链球菌 2 型人分离株外,其余均为分离自病猪的猪源链球菌,其中 12 株为猪链球菌 2 型(江苏 6 株,上海 3 株,北京 2 株,德国 1 株),5 株为马链球菌兽疫亚种(*S. equi* subsp. *zooeidemics*),3 株种名待定。猪链球菌 2 型的 HA9801 株系 1998 年从江苏病猪分离。ATCC 35246 属马链球菌兽疫亚种,购自 ATCC,其余来源见表 1。

1.2 培养

冻存菌种划线接种于鲜血平板(6%兔血,常规方法配制),37℃培养 24h 后,选取典型菌落接种于 Todd-Hewitt 肉汤,37℃培养过夜。

1.3 胞壁蛋白和胞外蛋白的制备

参照 Salasia 和 Vecht 等的方法加以改进^[7,8]。菌液离心,上清液加硫酸铵至饱和度为

* 国家 973 项目子课题(G1999011906)

** 通讯作者

作者简介:欧瑜(1967-),女,江苏盱眙人,南京农业大学讲师,在读博士,主要从事微生物生理生化研究。

收稿日期:2001-01-11,修回日期:2001-03-07

70%,沉淀溶解透析,PEG浓缩, Sephadex G-100 层析后取第 1 峰;菌体洗涤后超声波破碎,超离,沉淀用溶菌酶处理,离心后取上清。

1.4 SDS-PAGE

采用 6% 分离胶, 4% 浓缩胶的不连续垂直平板电泳;考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.5 MRP 和 EF 抗体的制备

HA9801 株的胞壁蛋白和胞外蛋白分别经 SDS-PAGE 后,对照标准分子量切割下分子量为 136kD 和 110kD 的条带, PBS 缓冲液抽提, 浓缩后作为免疫原按常规方法免疫家兔(体重约 2kg, 成年健康新西兰家兔, 购于江苏省农业科学院), 共免疫 4 次, 间隔时间 15d, 末次免疫一周后, 心脏采血, 分离血清, -20℃ 分装保存。

1.6 免疫转印

采用半干转印法, 1.2mA/cm² 转印 1h, 5% 脱脂奶封闭, 制备的抗体为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(Sino-American Biotechnology 公司)为二抗, DAB 显色, TBS 清洗终止反应。

2 结果

2.1 MRP 的提取

菌株 HA9801 培养上清中含有 MRP 和 EF, 但 MRP 含量较低, 而用菌体提取的胞壁蛋白经 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色后可见清晰的 MRP 条带, 因此其余菌株均采用该法提取 MRP。

2.2 SDS-PAGE

19 株猪源链球菌和 1 株猪链球菌 2 型人分离株的胞壁蛋白经 SDS-PAGE 显示数条条带, 其中 12 株有分子量约为 136kD 的条带, 即菌株 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 和 16(图 1); 胞外提取物经 SDS-PAGE 显示, 9 株菌株有 110kD 条带, 包括菌株 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 和 20, 其中菌株 4 在 140~210kD 处有数条条带, 菌株 2 和 7 在约 180kD 处, 菌株 9 在约 175kD 处有条带(图 2)。

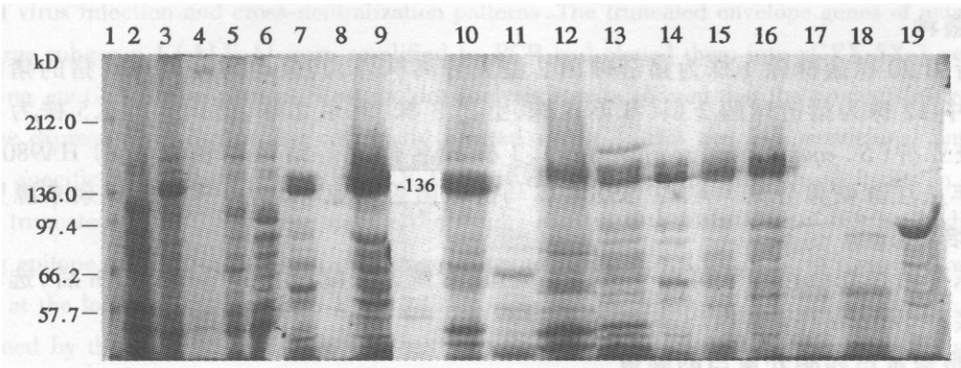


图 1 猪源链球菌胞壁蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE patterns of cell wall proteins extracted from Swine *Streptococcus*

1~19: Marker, strain 11, 8, 20, 4, 1, 2, Marker, strain 5, 9, 12, 16, 7, 6, 10, 3, 18, 19, 13.

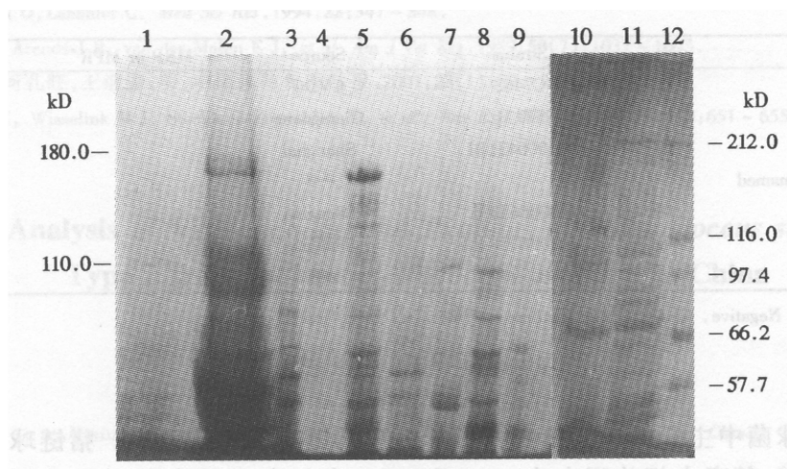


图 2 猪源链球菌胞外蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE patterns of extracellular proteins extracted from Swine *Streptococcus*
1 ~ 12: Strain 8, 7, 3, 9, 2, 6, 10, 5, 12, 20, 4, Marker.

2.3 免疫转印

菌株 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 和 11 产生 MRP(图略), 菌株 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 和 10 产生 EF, 其中菌株 2, 4 和 9 还产生分子量分别为 180kD, 155kD 和 175kD 的 EF*; 菌株 7 只产生分子量为 180kD 的 EF*(图略)。检测结果参见表 1。

表 1 20 株猪源链球菌分离株毒力相关蛋白检测结果

Table 1 Detection of virulence associated proteins in 20 strains of swine *Streptococcus*

No	Strains	Source	MRP or MPR*	EF or EF*
<i>S. suis</i> type 2				
1	HA9801	Jiangsu	+	+
2	HA9802	Jiangsu	+	+
3	HA9803	Jiangsu	+	+
4	HA-R1	Jiangsu	+	+
5	RC9901	Jiangsu	+	+
6	RC9902	Jiangsu	+	+
7	SS2	Germany	+	+
8	BJ9902	Beijing	+	+
9	SH006653I	Shanghai	+	+
10	SH006708I	Shanghai	+	+
11	BJ9901	Beijing	+	-
12	SH0067444I	Shanghai	-	-
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemics</i>				
13	ATCC35246	Sichuan	-	-
14	C55126	CVDC	-	-

(续表 1)

	No	Strains	Source	MRP or MPR ⁺	EF or EF ⁺
	15	C7463	CVDC	-	-
	16	ST171	Guangdong	-	-
	17	SH006431BI	Shanghai	-	-
Strains await to be named					
	18	SH006653 II	Shanghai	-	-
	19	SH006708 II	Shanghai	-	-
	20	BJ9903	Beijing	-	-

注: + Positive, - Negative, CVDC: China Institute of Veterinary Drug Control

3 讨论

在猪源链球菌中主要的病原菌有猪链球菌和马链球菌兽疫亚种。猪链球菌 2 型过去仅在国外有报道,其毒力相关蛋白为 MRP 和 EF。多年来我国检出的主要是马链球菌兽疫亚种,旧称兽疫链球菌,属链球菌兰氏(Lancefield)分群 C 群,其毒力因子为类 M 蛋白。1998 年夏江苏某地猪群爆发了急性败血性传染病,并感染特定人群,经鉴定其病原不是以往的 C 群链球菌,而是猪链球菌 2 型,属于兰氏分群的 R 群。本试验证实江苏分离株 HA9801 存在 MRP 和 EF,直接检出了蛋白条带,与 MRP 及 EF 基因水平检出的结果相互印证^[9]。

在所检测的 20 株猪源链球菌中,除 1 株为来自德国的猪链球菌 2 型参考株外,其余均为国内菌株。菌株是否产生 MRP 和 EF 主要是根据免疫转印的结果判定。菌株 16 的胞壁蛋白,菌株 20 的胞外蛋白,其中 SDS-PAGE 虽然分别有分子量约为 136KD 和 110KD 的条带,但免疫转印未显示,因此判定为阴性。除 HA9801 外,国内其它 9 个分离株也都存在 MRP 及 EF,在已鉴定为猪链球菌 2 型的菌株中占 10/11,说明其普遍性。

本试验检测的 C 群猪源链球菌胞壁蛋白免疫转印未出现抗 MRP 条带,表明猪链球菌 2 型和兰氏 C 群的胞壁蛋白的抗原性不交叉,提示只有使用同型疫苗才会取得良好的免疫效果。

MRP 和 EF 的相关蛋白,其分子量大于 136KD 或 150KD,但与 MRP 和 EF 的抗原性有交叉,分别表示为 MRP⁺ 和 EF⁺,其致病作用已引起研究者的重视。根据 MRP 和 EF 及相关蛋白存在的情况,本试验检出猪链球菌 2 型有 4 种表型,与 Vecht 和 Luque 等报道的相符^[1,4],其中表型为 MRP⁺ EF⁺ 为强致病株,MRP⁺ EF⁻ 及 MRP⁻ EF⁻ 为弱致病株,MRP⁻ EF⁺ 为非致病株^[10],未发现 MRP⁻ EF⁺ 及 MRP⁺ EF⁻ 表型。分析猪链球菌的 MRP 和 EF,可进行流行病学调查,有利于控制猪链球菌病的流行。

参 考 文 献

- [1] Vecht U, Wisselink H J, Jellema M L, et al. *Infect Immun*, 1991, **59**(9): 3156 ~ 3162.
- [2] Galina L, Vecht U, Wisselink H J, et al. *Can J Vet Res*, 1996, **60**: 72 ~ 74.
- [3] Gottschalk M, Lebrun A, Wisselink H J, et al. *Vet Res*, 1998, **62**: 75 ~ 79.
- [4] Luque I, Tarradas C, Astorga R, et al. *Res Vet Scie*, 1999, **66**(1): 69 ~ 72.
- [5] Wisselink H J, Smith H E, Stockhofa-zurwieden N, et al. *Vet Microbiol*, 2000, **74**: 237 ~ 248.
- [6] 姚火春,陈国强,陆承平. 南京农业大学学报, 1999, **22**(2): 67 ~ 70.

- [7] Salasia S I O, Lammeler C. *Med Sci Res*, 1994, **22**: 347 ~ 348.
- [8] Vecht U, Arends J P, van der Molen E J, *et al*. *Am J Vet Res*, 1989, **50**(7): 1037 ~ 1043.
- [9] 倪艳秀, 何孔旺, 王继春, 等. 中国预防兽医学报, 2001, **23**(1): 20 ~ 22.
- [10] Smith H E, Wisselink H J, Stockhofa-Zurwieden N, *et al*. *Adv Exp Med Biol*, 1997b, **418**: 651 ~ 655.

Analysis of Virulence-Related Proteins of *Streptococcus suis* Type 2 from Swine *Streptococcus* Isolated in China

Ou Yu Lu Chengping

(Key Lab Animal Disease Diagnostic & Immunology,
Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Virulence-related proteins, muraminidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* type 2, were extracted from Jiangsu Isolate HA9801 and were used as antigens for preparation of antibodies. Bacterium cell envelope proteins and extracellular proteins of swine *Streptococcus* strains including 17 Chinese isolates, 1 German strain and 1 human isolate of *Streptococcus suis* type 2, were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting using the above antibodies, 11 strains produced MRP and 10 strains possessed EF or EF⁺. They exist four phenotypes: MRP⁺ EF⁺ (8/19), MRP⁺ EF⁺ (1/19), MRP⁺ EF⁻ (1/19), MRP⁻ EF⁻ (10/19).

Key words: *Streptococcus suis* type 2, Muraminidase-released protein (MRP), Extracellular factor (EF)