

福氏痢疾菌膜成分与细菌抗原性和毒力的关系

金 灵 苏 新

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

应用免疫转移技术,用从感染福氏痢疾菌的病人获取的恢复期血清分析了福氏痢疾菌膜成分与细菌抗原性和毒力的关系。发现福氏痢疾菌的膜蛋白 67kD 和 63kD 均含有两种成分,一种和膜蛋白 60kD 都可能是保护性抗原,而另一种与膜蛋白 78kD 和 35kD 一样与福氏痢疾菌的毒力有关。采用微细胞同位素掺入示踪显示这些与病人恢复期血清反应的膜蛋白由质粒编码。

关键词 福氏痢疾菌;膜蛋白;微细胞

痢疾是不发达国家的常见病和多发病,但其发病机理尚不明瞭,亦无有效的预防措施。现已知在痢疾菌致病过程中,某些成分起作用^[1,2]。脂多糖对细菌在肠道中存活以及抵御宿主的免疫机制起作用,还可能有助于细菌粘附肠上皮细胞。细菌侵入上皮细胞则与几种质粒编码的外膜蛋白有关。染色体基因的某些产物对于细菌在上皮细胞内繁殖并向周围扩散是必需的。痢疾菌诱导宿主免疫的成分也是非常复杂的。将某些膜成分经注射免疫可诱导宿主免疫,而且作用是广谱的^[3,4]。我们在本室研究工作的基础上,对福氏痢疾菌膜成分及感染痢疾的病人恢复期血清的抗体成分进行了初步分析,以利于对痢疾致病机理和免疫机理的深入研究。

材料和方法

- (一) 福氏痢疾菌株(见表 1)
- (二) 福氏痢疾菌膜成分的制备^[3]

按本室常规方法制备。经贺氏培养基大量培养的福氏痢疾菌,以超声波破菌,除去菌体后,17000 r/min 离心后的沉淀部分,即为福氏痢疾菌膜成分。

表 1 福氏痢疾菌株		
Table 1 Strains of <i>Shigella flexneri</i>		
菌型 Type	符号 Symbol	毒力 Virulence
1a	F1a	+
1b	M25-8A(pWR110)minI*	+
1b	M25-8AminI*	-
2a	F2a-12	+
2a	T32	-
2a	2457T	+
2a	2457O	-
3a	F3a	+
5b	M90T	+
6	F6	+

* 微细胞产生株 Strains which produce minicell.

(三) 感染痢疾的病人恢复期血清收集

由 302 医院提供。入院治疗的痢疾患者于发病后第 7—8 天静脉抽血,分离血清,低温保存。共收集感染 F2a 的血清 4 份,F3a 的血清 3 份,F1a 的血清 1 份。感染同型菌的血清混合后使用。

(四) 血清吸收

无毒株 2457O 或 T32 接种于贺氏肉汤,37℃ 培养 12h,离心收菌体,将病人血

本文于 1988 年 4 月 12 日收到。

滴与细菌混合 (1ml 血清加 20ml 肉汤培养的细菌), 4℃ 静置 12h, 离心去沉淀, 取上清再与新培养的细菌混合。此过程重复 8 次, 最后 15000r/min 离心 20min, 取出上清, 即为经无毒株 2457O 或 T 32 吸收的血清。

(五) 免疫转移技术

详见另文^[2]。痢疾菌膜成分经 SDS-PAGE 后, 电转移到硝酸纤维素膜上。转移了蛋白的硝酸纤维素膜用 3% 牛血清白蛋白封闭, 与病人血清结合, 漂洗后再与生物素标记兔抗人 IgG (本室制备) 结合, 亲和素-过氧化物酶处理, DAB 显色, H₂SO₄ 终止反应。

(六) 微细胞的分离纯化和标记^[6,7]

微细胞株 M25-8A(pWR110)minI 和 M25-8AminI 接种于贺氏肉汤中培养, 经三次线性蔗糖密度梯度离心, 获得纯化的微细胞。微细胞悬浮于不含酪素的 M9 培养基中, 加入 ³⁵S-甲硫氨酸 (原子能科学院产品), 最终放射强度为 100μCi/ml, 同时加入其它 19 种氨基酸, 于 37℃ 培养 2h。标记后的微细胞经 SDS-PAGE 和转移电泳, 将转移后的硝酸纤维素膜对医用 X 光片曝光 7 天。再将硝酸纤维素膜切割, 用 BA-酶免疫法检测。

(七) 豚鼠角膜被动免疫保护试验

体重 250—300g 雌雄不限的豚鼠 (本院动物场) 分为盐水对照组、正常血清对照组、实验组等数组。取血清滴入豚鼠眼中, 每只眼滴 20μl, 4h 后再滴一次。2h 后将毒株 F2a-12 与血清的混合物 (已在 37℃ 作用 30min), 取 20μl (含菌 2 × 10⁷ 个) 滴入豚鼠眼中。逐日观察豚鼠角膜, 至攻击后第 5 天。

结 果

(一) 病人恢复期血清的免疫转移分

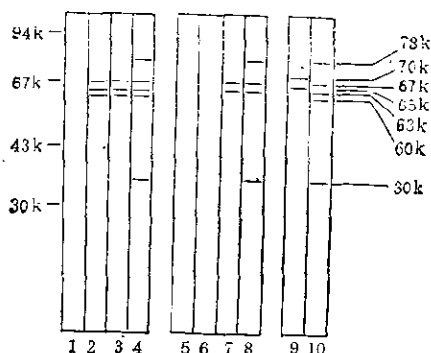


图 1 病人恢复期血清的免疫转移分析示意图

Fig. 1 Sketch map of the immunoblot of the human convalescent sera (HCS)

抗原 Antigens: 1, 5, 2457O; 2, 6, T32; 3, 7, F2a-12, F1a, F3a, F6; 4, 8, M90T; 9, M25-8AminI; 10, M25-8A(pWR110)minI

抗血清 Antisera: 1, 2, 3, 4, 感染福氏 2a, 3a, 1a 的病人恢复期血清 (2457O 吸收前后) HCS infected with F2a, F3a, F1a (absorbed or not by 2457O); 5, 6, 7, 8, 感染福氏 2a 的病人恢复期血清 (2457O 和 T32 吸收后) HCS infected with F2a (absorbed by 2457O and T32); 9, 10, 感染福氏 2a, 3a 的病人恢复期血清 (2457O 吸收后) HCS infected with F2a, F3a (absorbed by 2457O)

析 (图 1)

感染 F2a 和 F3a 的病人血清及经无毒株 2457O 吸收的这些血清, 分别以几株福氏痢疾菌膜成分进行免疫转移分析。结果表明两种病人血清吸收前后及两种血清之间均无显著差异。病人血清与无毒株 2457O 无明显的反应区带, 而与几种福氏痢疾菌有毒株和 T 32 的膜成分有 3 条共同的反应区带, 分子量为 67kD, 63kD 和 60kD。这两种血清与 M90T、F2a-12 的膜成分的反应区带较多, 还有 78kD、35kD 等。

经无毒株 2457O 吸收后的感染 F2a 的病人血清再经 T 32 吸收, 与无毒株 2457O 和 T32 均无反应区带, 而与 F2a-12 有 67 kD、63 kD 两条反应区带, 与 M90T 有 78kD、67kD、63kD 和 35kD 四

条反应区带。

感染 F1a 的病人血清与几株福氏痢疾菌有毒株和 T32 也有 3 条反应区带,分子量亦为 67kD、63kD 和 60kD。

(二) 微细胞的蛋白成分

为了确定与病人血清反应的福氏痢疾菌蛋白是否为质粒编码,采用了微细胞³⁵S-甲硫氨酸掺入试验。由于本实验室没有配套的 F2a 有毒株和无毒株的微细胞株,鉴于 F2a 与 M 90 T 的蛋白有许多相似之处,而 F16 微细胞株 M25-8A(pWR110) minI 含有一从M90T诱动来的大质粒 pWR 110, 因此我们试用 M25-8A(pWR 110) minI 和 M25-8AminI 间接探讨福氏痢疾菌毒力与质粒编码蛋白的关系。M25-8A(pWR110)minI 有毒力,含有大质粒 pWR 110 和一小质粒,M25-8AminI 为无毒株,仅含一小质粒。这两株微细胞的 ³⁵S-甲硫氨酸掺入的 SDS-PAGE 图谱(图 2)显示有毒株在分子量 67kD 处的一条蛋白带,无毒株没有此带。微细胞与病人血清的免疫转移分析(图 1)显示,无毒株与感染 F2a 和 F3a 的病人血清有 2 条反应区带 70kD

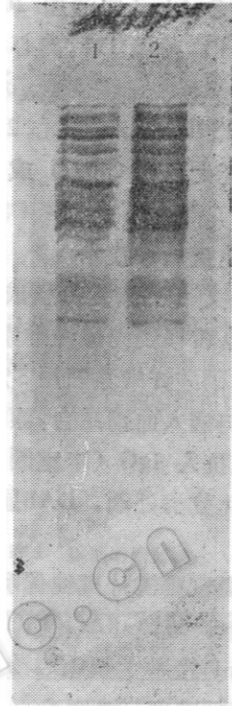


图2 微细胞 ³⁵S-甲硫氨酸掺入的放射自显影

Fig. 2 The autoradiography of ³⁵S-methionine of minicells

1. M25-8AminI; 2. M25-8A(pWR110)minI

和 65kD。有毒株与两种血清的反应区带较多,有 78kD、67kD、63kD、60kD 和 35

表 2 无毒株 2457O 吸收前后的病人恢复期血清对豚鼠角膜被动免疫保护试验

Table 2 Protection against the kerato-conjunctivitis of guinea pigs by passive immunization with the human convalescent sera (HCS) and the HCS absorbed by the avirulent strain 2457O

分 组 Group	免疫用血清 Sera used for immunization	攻击后逐日发病数 No. of illd guinea pigs after inoculation					未发病数/ 攻击数 No. of health/ No. of in- culation
		1	2	3	4	5 天(d)	
1	感染 F2a 人血清(未吸收) HCS from patient infected with F2a	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5
2	感染 F2a 人血清 (2457O 吸收) HCS with F2a absorbed by 2457O	0/5	1/5	1/5	1/5	1/5	4/5
3	感染 F3a 人血清 (2457O 吸收) HCS with F3a absorbed by 2457O	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5
4	感染 F1a 人血清(未吸收) HCS with F1a	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5
5	正常兔血清对照组 Control (normal rabbit sera)	0/5	3/5	4/5	4/5	4/5	1/5
6	盐水对照组 Control (Saline)	0/5	3/5	3/5	4/5	4/5	1/5

表 3 无毒株 2457O、T32 吸收后的病人恢复期血清对豚鼠角膜被动免疫保护试验
Table 3 Protection against the kerat-conjunctivitis of guinea pigs by passive immunization with the human convalescent sera (HCS) absorbed by the avirulent strains 2457O and T32

分组 Group	免疫用血清 Sera used for immunization	攻击后逐日发病数 No. of illd guinea pigs after inoculation					未发病数/攻击数 No. of health/No. of inoculation
		1	2	3	4	5 天(d)	
1	感染 f2a 人血清 (2457O、T32 吸收) HCS from patient infected with F2a (absorbed by 2457O and T32)	0/10	4/10	7/10	7/10	7/10	3/10
2	盐水对照组 Control	1/10	4/10	6/10	7/10	7/10	3/10

kD 等。有毒株的反应区带均在 ³⁵S 放射自显影上出现。

(三) 病人血清的豚鼠角膜被动免疫保护试验

表 2 和表 3 表明病人血清在经无毒株 2457O 吸收前后被动免疫豚鼠角膜，均对 F2a 的攻击有阻断作用，且有交叉阻断作用。但血清经 T32 吸收后，阻断作用消失。本实验没有做正常人血清对照，是因为在我国痢菌发病率很高，难以找到确诊没有感染痢疾的正常人。故以正常兔血清代替做对照实验，以排除正常血清的非特异杀菌作用。

讨 论

痢疾菌通过粘附、穿入上皮细胞而引起结肠炎症，因此位于细菌表面的外脂蛋白和脂多糖必然在致病和诱导宿主免疫中起作用。Hale^[3]等发现细菌的热稳定表面抗原与痢疾菌侵入肠上皮细胞没有明显的关系。而 Hale^[8]和 Bhogale^[9]等均注意到抗热敏感表面抗原的抗体可以减少痢疾菌粘附和侵入细胞，抗热稳定抗原的抗体无此作用。Adamus^[4]等用福氏 3a 和宋内痢疾菌的外膜蛋白皮下免疫豚鼠和家兔，对同型和不同型的痢疾菌攻击角膜均有保护作用，用抗外膜蛋白的血清注射家兔，对

F3a 的眼攻击也有保护作用。但用 F3a 的脂多糖皮下免疫，对 F3a 的眼攻击没有保护作用。本实验室用 F2a 的外膜蛋白免疫豚鼠获得类似结果^[3]。近来 Hale^[10]等的工作表明福氏痢疾菌 140MDa 大质粒编码的四种外膜蛋白 78kD、58kD、43kD、39kD 与细菌毒力有关。因此，在痢疾菌侵入肠上皮细胞的过程中，细菌的外膜蛋白起重要作用，而宿主产生的抗外膜蛋白的抗体可能对痢疾菌侵入上皮细胞有阻断作用。脂多糖在这些过程中可能不起主要作用。

福氏痢疾菌 2a 的无毒株 2457O 和 T32 是两种不同来源的菌株。2457O^[2]是从有毒株 2457T 挑选出来的粗糙型菌落。病人血清经 2457O 反复吸收后，去除了抗脂多糖抗体。这些血清给豚鼠滴眼和处理攻击用毒株，可阻断福氏痢疾菌 2a 侵袭豚鼠角膜的作用。T32^[11]是有毒株 F2a 在胆盐培养基上传代 32 次所获得的无毒株，曾作为减毒活疫苗用于痢疾免疫。病人血清用 T32 吸收后，阻断作用消失。这表明 T32 虽不具有有毒株的毒力成分，但具有有毒株中某些能诱导宿主抗痢疾免疫的成分。因此我们用这几种血清与几株福氏痢疾菌膜成分进行免疫转移分析，以期找出某些有意义的成分。

感染福氏痢疾菌的病人血清, 不论是否经无毒株 2457O 吸收, 均与几株福氏有毒株和 T32 有三条共同的反应区带 67kD、63kD、60kD, 但与 2457O 没有这三条反应区带。因此这三条反应区带可能与福氏痢疾菌诱导宿主免疫有关。需要注意的是感染 F2a 的病人血清再经 T 32 吸收后, 与 T 32 的三条反应区带消失, 与有毒株 F2a-12、M90T 仍有 67kD、63kD 两条反应区带。这可能是在 67kD、63kD 处不仅有与诱导宿主免疫有关的膜蛋白, 还有与细菌毒力有关的蛋白成分。由微细胞 ^{35}S -甲硫氨酸掺入放射自显影图像显示 67kD、63kD、60kD 均为质粒编码蛋白。另外, M90T、M25-8A (pWR110) minI 与病人血清反应都出现的 78 kD、35 kD 区带, 也可能与细菌毒力有关。福氏 2a 等其它菌株没有这两条区带, 可能是所含质粒差异或这两种蛋白表达较弱所致。

本实验发现的毒力相关细菌膜蛋白与

Hale 等的报告不同。因实验条件不同, 所有抗血清缺乏可比性, 故难以对二者的异同进行深入的分析和讨论。

参 考 文 献

- [1] Gemski, P. J. et al.: *Microbiology*-1975, American Society for Microbiology, p. 165, 1975.
- [2] Kopecko, D. J. et al.: *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer-Verlage, Berlin Heidelberg, 118: 71, 1985.
- [3] 苏新等: *军事医学科学院院刊*, 11: 199, 1987.
- [4] Adamus, G. et al.: *Infect. Immun.*, 30: 321, 1980.
- [5] 金 灵等: *生物化学与生物物理进展*, 16: 148, 1989.
- [6] Gemski, P. J. et al.: *Infect. Immun.*, 30: 297, 1980.
- [7] 黄培堂等: *军事医学科学院院刊*, 3: 287, 1980.
- [8] Hale, T. L. et al.: *Infect. Immun.*, 24: 879, 1979.
- [9] Bhogale, S. R. et al.: *J. Med. Microbiol.*, 16: 37, 1983.
- [10] Hale, T. L. et al.: *Infect. Immun.*, 50: 620, 1985.
- [11] Meitert, T. et al.: *Acta Microbiol. Acad. Sci.*, 21: 203, 1974.

MEMBRANE COMPONENT OF *SHIGELLA FLEXNERI* AND THEIR RELATIONSHIP TO BACTERIA ANTIGENICITIES AND VIRULENCES

Jin Ling Su Xin

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy
of Military Medical Sciences, Beijing)

Our previous works have shown that membrane proteins of *S. flexneri* can elicit protection against the bacteria *in vivo*. In this study, we further, using human convalescent sera (HCS) from adult patients infected with *S. flexneri*, investigated the relationship between membrane components of *S. flexneri* and their antigenicities and virulences. It was shown in immunoblotting that 5 virulent strains of *S. flexneri* and avirulent strain T32 derived from *S. flexneri* 2a by Istrati in Romania and used as a live vaccine, had three common proteins bands formed by the components of MW 67kD, 63kD and 60kD with either HCS from patients infected with *S. flexneri* 2a and 3a or HCS absorbed by an avirulent variant strain 24570 of *S. flexneri* 2a, while virulent strains M90T and M25—8A (pWR110)minI shown another two bands of Mw 78kD and 35kD respectively. In contrast, no band was found with strain 24570. HCS from patients infected with *S. flexneri* 1a, 2a and 3a as well as those HCS absorbed by 24570 had blocking effect on the invasiveness of virulent strain of *S. flexneri* to the kerato conjunctiva of guinea pigs; neverthe-

less, HCS absorbed by T32 lost the blocking effect accompanied by disappearance of 67kD, 63kD and 60kD components when T32 was used as antigen indicating that 67kD, 63kD and 60kD membrane components of *S. flexneri* may account for the antigen of *S. flexneri* eliciting protection antibodies *in vivo*. However, HCS absorbed by T32 did still bind the components 67kD, 63kD and 78kD, 35kD of M90T and F2a-12, suggesting that in 67kD and 63kD bands, there exist two kinds of components with same molecular weight but different antigenicities, one may account for the protection antigens and the other, together with 78kD and 35kD components, corresponded to determinants of the virulence of *S. flexneri*. Further studies, using minicell cultivation and autoradiography demonstrated that the membrane components reacting with the HCS in the virulent strains of *S. flexneri* are coded by plasmid.

Key words

Shigella flexneri; Membrane protein; Minicell