

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54(6):656-662; 4 June 2014

ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.06.008

猪链球菌 1、2、14、1/2 型荚膜多糖的单糖组成比较

王楷成¹, 赵峡², 陆承平³, 姚火春³

¹中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032

²中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003

³南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

摘要:【目的】猪链球菌 1、2、14 和 1/2 型间存在单向或双向的交叉抗原性, 这种交叉抗原性的产生原因至今未被揭示。【方法】采用 Sephacryl S-300 凝胶层析柱对猪链球菌 14 和 1/2 型荚膜多糖进行分离纯化, 经苯酚-硫酸检测和 dot-ELISA 辅助鉴定, 确定荚膜多糖成分。采用高效凝胶渗透色谱法测定 14 和 1/2 型猪链球菌荚膜多糖分子量分别为 487.38 kDa 和 512.72 kDa。【结果】经柱前衍生高效液相色谱法、荧光标记液相色谱法和核磁共振测定 14 和 1/2 型猪链球菌荚膜多糖单糖组成分别为: Glc/Gal/GlcNAc/Rha/Neu5Ac (1:2.94:1.35:0.24:0.37) 和 Glc/Gal/GlcNAc/GalNAc/Rha/Neu5Ac (1:1.67:1.05:0.93:0.72:0.7)。并与已知的猪链球菌 1、2 型荚膜多糖的单糖组成进行比较分析, 发现 4 种血清型荚膜多糖都具有 Glc、GlcNAc、Gal 和 Neu5Ac, 但单糖组成和比例并无明显相似性, 这种交叉抗原性可能是由于荚膜多糖的空间结构相似性和(或)细胞表面的其他成分引起的。

关键词:猪链球菌, 血清型, 荚膜多糖, 单糖组成

中图分类号:S852 **文章编号:**0001-6209(2014)06-0656-07

猪链球菌 (*Streptococcus suis*) 据荚膜抗原的不同分为 33 个血清型, 部分血清型细菌间存在交叉抗原性。荚膜多糖分子组成和构型的多样化使其结构极为复杂, 并具有种和型特异性, 可作为血清学分型的基础, 荚膜合成相关的基因簇是荚膜血清型鉴别的分子基础。其中, 1/2 型菌能与 1 型、2 型的血清发生凝集反应^[1], 1/2 型抗血清也能与 1 型、2 型菌发生凝集反应, 但经 1/2 型菌吸附的 2 型抗血清不能与 2 型发生反应, 而经 1/2 型菌吸附的 1 型抗血清仍能与 1 型菌发生反应^[2]; 1 型菌既能与 1 型抗血

清凝集, 也能与 14 型抗血清产生凝集反应, 14 型抗血清经 1 型菌吸附后可去除与 1 型菌凝集的特性, 但仍能与 14 型菌发生凝集^[3]。检测 1 型与 14 型的 PCR 方法无法区分此 2 个血清型, 而 1/2 型菌在 2 型特异性 PCR 反应中也为阳性。

这 4 个血清型 (1、2、14、1/2) 间存在如此复杂的交叉抗原性, 但至今未揭示其产生的原因。Marie-Rose 已报道了猪链球菌 2 型的荚膜多糖结构^[4], 其单糖组成为 Rha/Glc/Gal/GlcNAc/Neu5Ac (1:1.1:2.5:0.9:1.0); BY S. D. 报道了猪链球菌 1

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303041)

作者简介: 王楷成 (1981-), 女, 山东人, 副研究员, 博士, 主要从事动物疫病研究。Tel: +86-532-85633882; E-mail: wangkaicheng@cahec.cn

收稿日期: 2013-09-24; 修回日期: 2013-12-30

型荚膜多糖单糖组成为 Glc/Gal/GlcNAc/GalNAc/Neu5Ac (1:2.42:1:1.39:1.39)^[5]。而猪链球菌 14 和 1/2 型的荚膜多糖分子量、单糖组成、结构等都被进行过研究。本文采用硫酸-苯酚法、高效凝胶渗透色谱法和柱前衍生高效液相色谱法等对 14 和 1/2 型的荚膜多糖组成与结构进行分析和比较研究,以期探索 4 个血清型间交叉抗原性产生的原因。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

THB 肉汤购自美国 BD 公司,溶菌酶购自上海生工生物工程有限公司,蛋白酶 K、DNase、RNase 购自宝生物工程(大连)有限公司,1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)、N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)、N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)、1,2-二氨基-4,5-亚甲二氧基苯(DMB)、 β -巯基乙醇购自美国 Sigma 公司,Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m)购自美国 Agilent 公司。KP-C18 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m)由中冉科技发展有限公司生产;LC-10Ai 型高效液相色谱仪由日本岛津公司生产;UltiMate 3000 型高效液相色谱仪由美国 Dionex 公司生产。

1.2 荚膜多糖的提取

荚膜多糖粗提按 BY S. D. 的方法略加改进^[5]。猪链球菌参考菌株 13730(14 型)、2651(1/2 型)在 5L 的 THB 肉汤中 37 $^{\circ}$ C 生长 18h。离心(8000 \times g, 20 min)获得菌体,在生理盐水(100-150 mL)中洗涤 1 次,离心后沉淀悬浮于包含 100mg 结晶状无盐卵清溶菌酶的 100 mL 甘氨酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 9.2)中,并加入终浓度为 0.02% 的叠氮钠。在不断的搅拌下,让细菌悬浮液在 37 $^{\circ}$ C 裂解 8 h。在溶菌酶裂解消化之后,剩余的猪链球菌残体通过离心(8000 \times g, 20 min)除去。上清中加蛋白酶 K 至 100 μ g/mL,55 $^{\circ}$ C 作用 2 h,加 DNase、RNase,37 $^{\circ}$ C 作用 1 h。处理后的溶液加入 CaCl₂ 溶液至终浓度 0.1 mol/L,搅拌 1 h。加 1/3 体积无水乙醇(25% V/V),4 $^{\circ}$ C 放置 3 h,离心(8000 \times g, 20 min)使核酸从上清液中沉淀除去。最后加 4 倍体积无水乙醇(浓度至 80% V/V),充分振摇后 4 $^{\circ}$ C 放置 16h 以上,再离心(8000 \times g, 20 min)使荚膜多糖从溶液中沉淀下来。

1.3 荚膜多糖的纯化

沉淀的荚膜多糖溶解到 0.1 mol/L NH₄HCO₃ 溶液中,并在同样的溶液中透析 48h 后冻干成粉末。再溶解于 0.1 mol/L NH₄HCO₃ 溶液,采用 Sephacryl S-300 凝胶层析柱对猪链球菌 14 和 1/2 型荚膜粗多糖进行分离纯化,流速为 0.3 mL/min^[4]。同时采用硫酸-苯酚法^[6]进行糖的跟踪检测。

1.4 荚膜多糖鉴定

1.4.1 荚膜多糖特异性血清的制备:为去除 D 群链球菌共有的胞壁酸产生的抗体,采用无荚膜的粪肠球菌(*Streptococcus faecalis*) ATCC29212 菌株吸附猪链球菌 14 型和 1/2 型的高免抗血清中胞壁酸对应的抗体。THB 中培养过夜的 ATCC29212 经 5000 \times g 离心 30 min, PBS 洗涤两次,弃去上清,加入猪链球菌 14 型和 1/2 型的高免抗血清,轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,4 $^{\circ}$ C 过夜,5000 \times g 离心 30 min 除去菌体,所得的血清即为这 2 个血清型荚膜多糖特异性血清。

1.4.2 dot-ELISA 鉴定荚膜多糖:将 Sephacryl S-300 分离得到的各组分做为抗原,荚膜多糖特异性血清作为抗体,采用 dot-ELISA 方法鉴定荚膜多糖^[7]。

1.5 荚膜多糖的分子量测定与分析

采用高效凝胶渗透色谱法^[8]测定 14 和 1/2 型猪链球菌荚膜多糖分子量,并分别用硫酸-苯酚法^[6]和 Folin-酚法^[9]测定 14 和 1/2 型荚膜粗多糖和荚膜多糖的糖含量和蛋白含量。

1.5.1 色谱条件:色谱柱:Shodex OH pak SB-804 HQ 凝胶色谱柱(300 mm \times 7.8 mm);流动相:0.1 mol/L Na₂SO₄;流速:0.5 mL/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样体积:20 μ L;检测器:示差折光检测器(RID)。

1.5.2 标准曲线制作:以系列标准葡聚糖为相对分子质量标准品,分别取 6 个不同相对分子质量的标样,加流动相溶解制成 5 mg/mL 的标准溶液,分别进样 20 μ L,记录色谱图及保留时间 TR,以保留时间为横坐标,以相对分子质量对数值为纵坐标绘制标准曲线。

1.5.3 样品相对分子质量测定:称取适量样品,加流动相溶解成 5 mg/mL 的溶液,用 0.22 μ m 水系微孔滤膜过滤,进样 20 μ L 高效液相色谱(HPLC)分析,记录色谱图。将样品的保留时间代入标准曲线方程计算荚膜粗多糖的相对分子质量。

1.6 荚膜粗多糖的柱前衍生液相色谱法分析

1.6.1 色谱条件: 色谱柱: KP-C18 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸盐缓冲液 (pH 6.7) / CH₃CN (82: 18, V: V); 流速: 1 mL/min; 柱温: 30°C; 进样体积: 20 μL; 检测器: 紫外检测器 (245 nm)。

1.6.2 样品全水解: 取纯化的 14 和 1/2 型荚膜多糖各 5 mg, 溶于 500 μL 的 2 mol/L 氟乙酸 (TFA), 于安瓿瓶中 110°C 封管水解 6 h, 水解液浓缩, 并加甲醇反复蒸干除去 TFA, 至无酸味为止, 用 100 μL 水溶解备用。

1.6.3 标准品 PMP 衍生: 取 0.5 mg 等摩尔配制的 6 单糖标准品 (Man, GlcN, Rha, Gal, Glc, Gal), 加入 100 μL 0.3 mol/L NaOH 和现配的 120 μL 0.5 mol/L PMP, 70°C 水浴反应 1 h 后, 加入 100 μL 0.3 mol/L HCl 中和, 然后用 500 μL 氯仿萃取 3-4 次, 离心取上清, 用 0.22 μm 水系微孔滤膜过滤, 待进样进行 HPLC 分析^[10]。

1.6.4 样品 PMP 衍生: 取上述 100 μL 水解液, 衍生方法同标准品, 待进样进行 HPLC 分析。

1.7 荧光标记液相色谱法测定唾液酸含量

1.7.1 色谱条件: 色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: CH₃OH / CH₃CN / 0.05 % TFA (6: 4: 90, V: V: V); 流速: 1 mL/min; 柱温: 26°C; 进样量: 20 μL; 检测器: 荧光检测器 (Ex: 373 nm, Em: 448 nm)。

1.7.2 样品分步水解: 取样品 1 mg, 溶于 1 mL 0.1 mol/L TFA, 于安瓿瓶中 80°C 封管水解 1 h, 反应结束后用 3 kDa 超滤离心管 10000 × g 离心 10 min, 再加入 500 μL 水, 重复超滤离心 3 次, 收集下层清液并蒸干得到总唾液酸。

1.7.3 样品 DMB 衍生: 将上述蒸干的唾液酸, 加入 200 μL 0.01 mol/L TFA 和现配的 200 μL 7 mmol/L DMB 试剂 (DMB 溶于 5 mmol/L TFA, 其中含有 1 mol/L 巯基乙醇, 18 mmol/L 亚硫酸钠), 60°C 避光反应 2 h, 得到衍生产物 DMB-Sia, 将样品稀释适当的倍数, 用 0.22 μm 水系微孔滤膜过滤, 待进样进行 HPLC 分析^[11]。

1.7.4 标准品 DMB 衍生: 衍生方法同样品, 两种标准品分别为 N-乙酰神经氨酸和 N-羟乙酰神经氨酸, 都取 0.09 mg 衍生后进行 HPLC 分析。

1.8 唾液酸与其他单糖比例的测定

猪链球菌 14 型和 1/2 型的荚膜多糖样品加适量的重水 (D₂O) 交换 3 次, 将多糖中活泼氢置换成重氢 (D), 放入直径为 5 mL 的核磁管底部, 置于 600 Hz 核磁共振仪中测定其氢谱。

2 结果

2.1 荚膜多糖的分离与纯化

从图 1 可见采用 Sephacryl S-300 凝胶渗透层析柱对 14 型的粗多糖进行分离, 得到 3 个组分 (A、B、C)。采用 Sephacryl S-300 凝胶渗透层析柱对 1/2 型的粗多糖进行分离, 得到 2 个组分 (A 和 B)。

2.2 荚膜多糖的鉴定与分析

经苯酚-硫酸检测和 dot-ELISA 鉴定, 14 型和 1/2 型的荚膜多糖均为凝胶层析中产生的 A 组份。14 型和 1/2 型粗多糖和荚膜多糖的糖含量和蛋白含量测定结果见表 1。可见经 Sephacryl S-300 凝胶层析后得到荚膜多糖纯度较高, 仅含极微量的蛋白质成分。

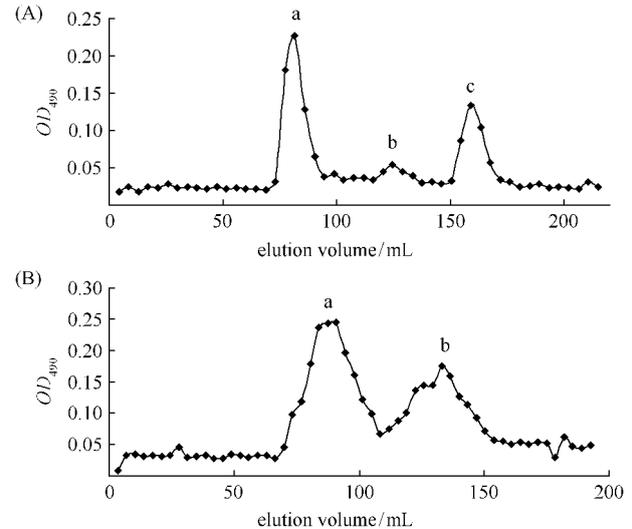


图 1. 猪链球菌 14 型 (A) 和 1/2 型 (B) 粗多糖经 Sephacryl S-300 凝胶层析柱分离后的硫酸-苯酚检测图
Figure 1. Purification of *S. suis* type 14 (A) and 1/2 (B) polysaccharide on Sephacryl S-300 column. Polysaccharides were analyzed by phenol-sulfuric acid assay.

2.3 荚膜多糖的分子量

图 2 为不同相对分子质量的标准葡聚糖 HPLC 的保留时间与相对分子质量对数的线性关系图, 线性回归方程 $\text{Log}(\text{Mw}) = -0.319\text{TR} + 9.736$, $R^2 = 0.9989$ 。

表 1. 猪链球菌 14 和 1/2 型猪链球菌荚膜粗多糖与精多糖的糖含量和蛋白含量

Table 1. The polysaccharides and protein quantitation of the crude polysaccharides and capsular polysaccharides of *S. suis* serotype 14 and 1/2

serotype	polysaccharide / %		protein / %	
	crude polysaccharides	capsular polysaccharides	crude polysaccharides	capsular polysaccharides
14	38.94	53.50	7.42	0.49
1/2	39.98	96.59	14.85	4.3

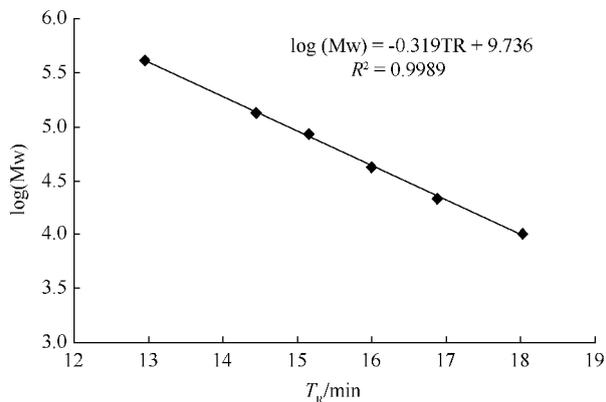


图 2. 系列标准葡聚糖保留时间与相对分子质量对数相关图

Figure 2. The standard curve of the Mw.

图 3 为猪链球菌 14 和 1/2 型 CPS 凝胶柱分离高效液相色谱图。可看出样品峰型单一且较对称, 可进行下一步的分析, 将样品的保留时间代入线性回归方程计算其相对分子质量。测定猪链球菌 14 和 1/2 型荚膜多糖分子量分别为 487.38 kDa 和 512.72 kDa。

2.4 荚膜多糖的柱前衍生液相色谱法分析

6 种单糖 (Glc、Gal、Man、Rha、GlcN、GalN) 标准品与 14 型、1/2 型荚膜多糖全水解产物的 PMP 柱前衍生产物的 HPLC 色谱图见图 4 和图 5。这 2 个血清型

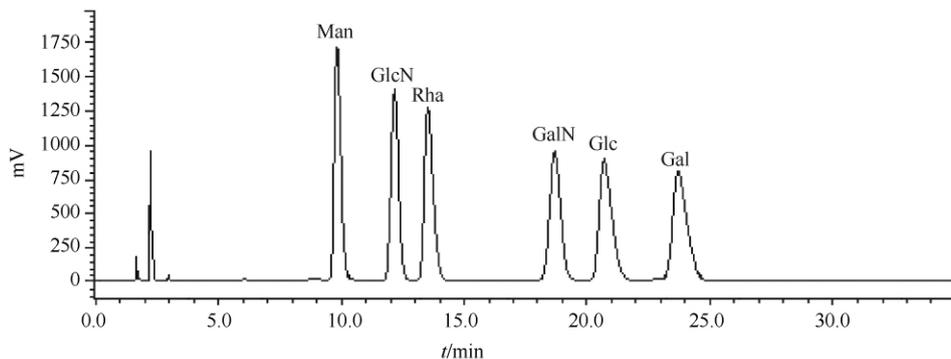


图 4. 单糖标准品 PMP 柱前衍生液相色谱图

Figure 4. Analysis of the standard monosaccharide by the Pre-column derivatization high performance liquid chromatography.

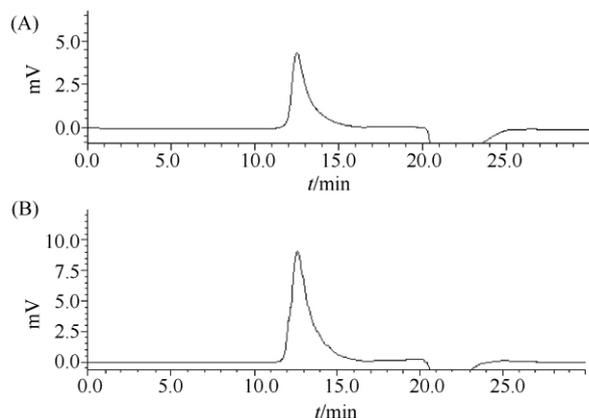


图 3. 猪链球菌 14 型 (A) 和 1/2 型 (B) CPS 的 Shodex OH pak SB-804 HQ 高效液相色谱图

Figure 3. The Shodex OH pak SB-804 HQ HPLC of the *S. suis* serotype 14 (A) and 1/2 (B) capsular polysaccharides.

荚膜多糖中此 6 种单糖的存在情况和比例见表 2。

2.5 唾液酸种类及与其他单糖比例的测定结果

由于唾液酸为 α -酮酸类多糖, 而且稳定性差, 用 PMP 柱前衍生方法并不能有效的测定其含量, 本文采用唾液酸中具有 α -酮羰基结构特点, 选用 DMB (1,2-二氨基-4,5-亚甲二氧基苯) 对猪链球菌 14 型和 1/2 型荚膜多糖中唾液酸进行专属性荧光标记, 然后采用反相液相色谱法分析荚膜多糖的唾

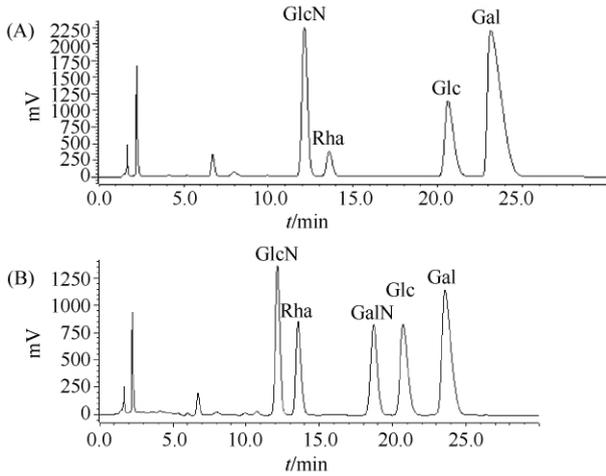


图 5. 猪链球菌 14 型 (A) 和 1/2 型 (B) 荚膜多糖 PMP 柱衍生液相色谱图

Figure 5. Analysis of capsular polysaccharides of *S. suis* serotype 14 (A) and 1/2 (B) by the Pre-column derivatization high performance liquid chromatography.

液酸组成。结果见图 6 和图 7。可见, 14 型和 1/2 型所含唾液酸均为 N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac)。猪链球菌 14 型和 1/2 型荚膜多糖中 Neu5Ac 与其它单糖的比例见表 2。

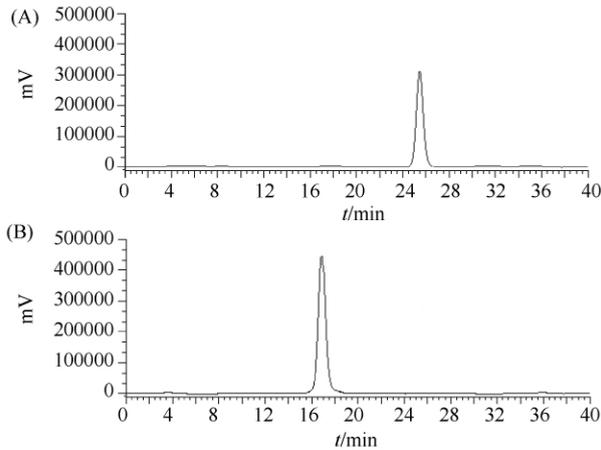


图 6. N-乙酰神经氨酸 (A) 和 N-羟乙酰神经氨酸 (B) 标准品荧光标记液相色谱图

Figure 6. Fluorescent labeling HPLC of Neu5Ac (A) and Neu5Gc (B).

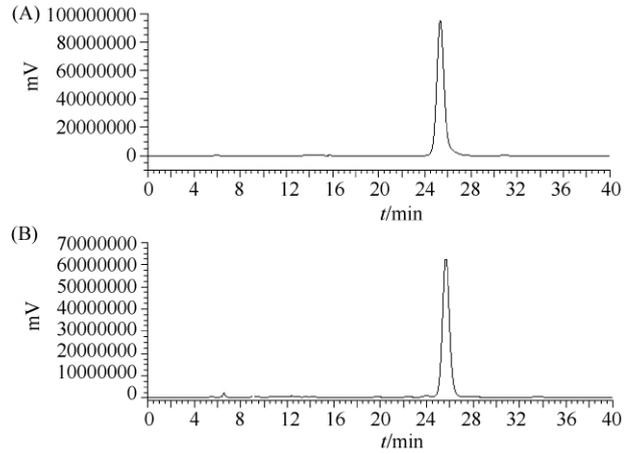


图 7. 猪链球菌 14 型 (A) 和 1/2 型 (B) 荚膜多糖荧光标记液相色谱图

Figure 7. Fluorescent labeling HPLC to the capsular polysaccharides of *S. suis* serotype 14 (A) and 1/2 (B).

3 讨论

本试验采用分子筛纯化和免疫学鉴定的方法, 得到纯化的猪链球菌 14 型和 1/2 型的 CPS, 通过一系列化学分析方法分析 14 型、1/2 型 CPS 的单糖组成, 并与能产生交叉抗原性的 1 型、2 型已知的荚膜多糖组成相比较。

结果显示, 这 4 种血清型荚膜多糖都具有 Glc、GlcNAc、Gal 和 Neu5Ac, 但单糖组成及比例并无明显相似性, 这种交叉抗原性可能是由于荚膜多糖的一级结构或空间结构相似性或细胞表面的其他成分引起的。1/2 型荚膜多糖具有 GalN 和 Rha, 而与其有双向交叉抗原性的 1 型和 2 型菌的荚膜分别具有 GalN 和 Rha。猪链球菌 1/2 型与 1 型、2 型间的双向交叉抗原性是否由此单糖组成上的相关性所引起, 有待进一步探讨。除 4 种血清型都具有的 Glc、GlcNAc、Gal 和 Neu5Ac, 1 型与 14 型还分别含有 GalNAc 和 Rha, 未找到 1 型与 14 型间单向交叉抗原性产生的明显原因。CPS 由单糖通过糖苷键连接而

表 2. 猪链球菌 14 型和 1/2 型荚膜多糖的单糖组成及其与 1 型、2 型荚膜多糖的比较

Table 2. The composition of the *S. suis* serotype 14 and 1/2 CPS with the comparison to that of serotype 1 and 2

serotype	Glc	GlcNAc	Gal	GalNAc	Rha	Neu5Ac
14	1	1.35	2.94	-	0.24	0.37
1/2	1	1.05	1.67	0.93	0.72	0.7
1	1	1	2.42	1.39	-	1.39
2	1	0.82	2.27	-	0.91	0.91

成重复的均多糖或杂多糖,而且有的细菌糖链上还
存在磷酸、核糖醇、唾液酸、甘油、丙酮酸等。任何两
个单糖都可以多种不同的构象相连,形成糖骨架中
的单糖单元。CPS 不仅因包含的单糖而不同,也因
单糖的连接方式而产生差异^[12]。因而,进一步对这
4 种血清型的 CPS 结构进行分析将会对其交叉抗原
性产生的原因有更清晰的认识。

结合 CPS locus 的分析结果^[13],对 1 型、14 型和
1/2 型荚膜多糖的生物合成进行分析。从糖基转移
酶的种类来看,猪链球菌 2 型和 1/2 型都具有表达
磷酸葡萄糖基转移酶、鼠李糖基转移酶、半乳糖基转
移酶、N-乙酰葡萄糖胺转移酶和唾液酸转移酶的基
因,翻译蛋白的序列也极为相似,但 1/2 型比 2 型荚
膜多糖多出 GalNAc 组份,可能由于合成过程中底
物不同,或下游的 IS 转座酶不同所引起。而猪链球
菌 1 型和 14 型都具有表达磷酸葡萄糖基转移酶、半
乳糖基转移酶、N-乙酰葡萄糖胺转移酶和唾液酸转
移酶的基因,翻译蛋白序列也相似,但本研究中的
14 型菌没有 GalNAc,而有微量 Rha。Van
Calsteren^[14]也曾对 14 型菌的荚膜多糖结构进行测
定,认为 14 型菌的荚膜多糖中无 Rha 组份。14 型
菌荚膜多糖是否具有 Rha 组份,还需要进一步的实
验确定,也可能是本试验产生的误差造成。14 型的
CPS locus 中没有 Rha 基转移酶基因,若有 Rha,可
能是该微生物在其他生物合成过程中产生了鼠李糖
基转移酶并在 CPS 合成过程中被利用。而这 4 个
血清型的 CPS 中都含有唾液酸,这也于 CPS locus
的分析结果一致,由 NeuA、NeuB、NeuC、NeuD 和唾
液酸转移酶共同作用产生了唾液酸。

可见,猪链球菌 CPS locus 与 CPS 的合成有一
定的相关性,但可能不是决定 CPS 单糖组成和结构
的唯一因素,猜测在猪链球菌基因组中可能存在
CPS locus 之外的其他基因表达产物参与或调节
CPS 的合成。而各血清型间交叉抗原性一直被认为
是由荚膜多糖产生的^[3,15-16],各血清型间交叉抗原
性很可能是由其荚膜多糖的空间结构或其他细胞表
面物质,甚至某些未知因素产生的,有待进一步研究
证实。

参考文献

[1] Perch B, Pedersen KB, Henrichsen J. Serology of
capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new

serotypes of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical
Microbiology*, 1983, 17(6): 993-996.

- [2] Perch B, Kjems E, Slot P, Pedersen KB. Biochemical
and serological properties of R, S and RS streptococci.
*Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica (Section
B, Microbiology)*, 1981, 89(3): 167-171.
- [3] Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR,
Henrichsen J. Description of 14 new capsular types of
Streptococcus suis. *Journal of Clinical Microbiology*,
1989, 27(12): 2633-2636.
- [4] Van Calsteren MR, Gagnon F, Lacouture S, Fittipaldi N,
Gottschalk M. Structure determination of *Streptococcus suis*
serotype 2 capsular polysaccharide. *Biochemistry and Cell
Biology*, 2010, 88(3): 513-525.
- [5] Elliott SD, Tai JY. The type-specific polysaccharides of
Streptococcus suis. *The Journal of Experimental Medicine*,
1978, 148(6): 1699-1704.
- [6] Lin FM, Pomeranz Y. Effect of borate on colorimetric
determinations of carbohydrates by the phenol-sulfuric acid
method. *Analytical Biochemistry*, 1968, 24(1): 128-
131.
- [7] Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk
M. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in
capsular expression. *Microbiology*, 1998, 144 (Pt 2) :
325-332.
- [8] Wei Y, Fang J. Determination of purity and molecular
weight of polysaccharides by high performance gel
permeation chromatography. *Acta Pharmaceutica Sinica*,
1989, 24(7): 532-536. (in Chinese)
魏延安,方积年. 高效凝胶渗透色谱法测定多糖纯度
及分子量. 药学学报, 1989, 24(7): 532-536.
- [9] Peterson GL. Review of the Folin phenol protein
quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and
Randall. *Analytical Biochemistry*, 1979, 100(2): 201-
220.
- [10] Hao G, Chen S, Zhu S, Yin H, Dai J, Cao Y. Analysis
of monosaccharides and uronic acids in polysaccharides by
pre-column derivatization with p-aminobenzoic acid and
high performance liquid chromatography. *Chinese Journal
of Chromatography*, 2007, 25(1): 75-79. (in Chinese)
郝桂堂,陈尚卫,朱松,尹鸿萍,戴军,曹玉华. 氨基苯
甲酸衍生化高效液相色谱法分析多糖中的单糖及糖醛
酸组成. 色谱, 2007, 25(1): 75-79.
- [11] Tsuruta Y, Matsumoto M, Inoue H, Munemura S,
Yamano S, Iguchi H. Determination of N-ethylglycine in
urine of cancer patients with metastatic bone disease by

HPLC using 4-(5, 6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonil chloride as a fluorescent labeling reagent. *Analytical Sciences*, 2008, 24 (12) : 1629-1631.

- [12] Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 1981, 35: 299-324.
- [13] Wang K, Fan W, Cai L, Huang B, Lu C. Genetic analysis of the capsular polysaccharide synthesis locus in 15 *Streptococcus suis* serotypes. *FEMS Microbiology Letter*, 2011, 324 (2) : 117-124.
- [14] Van Calsteren MR, Gagnon F, Calzas C, Goyette-Desjardins G, Okura M, Takamatsu D, Gottschalk M,

Segura M. Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 14 capsular polysaccharide. *Biochemical Cell Biology*, 2013, 91 (2) : 49-58.

- [15] Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Beaudoin M, Henrichsen J. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, 29 (11) : 2590-2594.
- [16] Higgins R, Gottschalk M, Boudreau M, Lebrun A, Henrichsen J. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1995, 7 (3) : 405-406.

Comparison of monosaccharide composition of capsular polysaccharides in *Streptococcus suis* serotype 1, 2, 14 and 1/2

Kaicheng Wang^{1*}, Xia Zhao², Chengping Lu³, Huochun Yao³

¹ China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, Shandong Province, China

² Ocean University of China, College of Medicine and Pharmaceutics, Qingdao 266003, Shandong Province, China

³ China Nanjing Agricultural University, College of Veterinary, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] There are one-way or two-way cross-reactions among *Streptococcus suis* serotype 1, 2, 1/2 and 14, the reason to which was unknown. [Methods] The capsular polysaccharides of serotype 14 and 1/2 were purified on Sephacryl S-300 column and identified by phenol-sulphuric acid method and dot-ELISA. The molecular weight of the serotype 14 and 1/2 capsular polysaccharides was revealed as 487.38 kDa and 512.72 kDa by high performance gel permeation chromatography, respectively. [Results] The monosaccharide composition of serotype 14 and 1/2 capsular polysaccharides was determined as Glc/Gal/GlcNAc/Rha/Neu5Ac (1:2.94:1.35:0.24:0.37) and Glc/Gal/GlcNAc/GalNAc/Rha/Neu5Ac (1:1.67:1.05:0.93:0.72:0.7) by pre-column derivatization high performance liquid chromatography, fluorescent labeling HPLC and NMR, respectively. These were compared with the composition of serotype 1 and 2 capsular polysaccharides. Glc, GlcN, Gal and Neu5Ac was contained in the capsular polysaccharides of serotype 1, 2 14 and 1/2. But there is no prominent correlation between the monosaccharide composition and cross-reactions. The cross-reactions among them could be induced by the structure of the capsular polysaccharides and/or the other components on the cell wall.

Keywords: *Streptococcus suis*, serotype, capsular polysaccharide, monosaccharide composition

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Special Fund for Public Welfare Industry of Chinese MoA (201303041)

* Corresponding author. Tel: +86-532-85633882; E-mail: wangkaicheng@cahec.cn

Received: 24 September 2013 / Revised: 30 December 2013