

用单克隆抗体展示猪链球菌 2 型溶菌酶释放蛋白 在菌体表面的形态和分布

曾巧英^{1,2}, 陆承平¹

(¹南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095; ²甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

摘要: 用猪链球菌 2 型江苏分离株 HA9801 全菌免疫 Balb/c 小鼠, 取其脾细胞和 Sp2/O 细胞融合, 以电泳纯溶菌酶释放蛋白 (MRP) 为抗原, 间接 ELISA 筛选 MRP 抗体阳性孔并用有限稀释法单克隆化, 剔除与胞壁杂蛋白交叉反应阳性的克隆, 获得 3 株特异针对 MRP 的单克隆抗体细胞株 3A3、4D5 和 6B4。将 HA9801 和 HEp-2 细胞共孵育, 使细菌粘附于细胞表面, 用 3 株 MRP 单克隆抗体联合介导 FITC 标记 HA9801 菌体表面的 MRP, 激光共聚焦显微镜观察, 代表 MRP 的荧光图像显示, MRP 是一线形表面大分子, 一端锚定在细胞壁, 另一端向空中伸展, 其分布状态有单在和丛集 2 种。

关键词: 猪链球菌 2 型; 溶菌酶释放蛋白; 单克隆抗体; 激光共聚焦显微镜

Configuration and Location of Muramidase Released Protein on Bacterial Cell Surface of *Streptococcus suis* Type 2 Demonstrated by Monoclonal Antibodies

ZENG Qiao-ying^{1,2}, LU Cheng-ping¹

(¹Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;

²Faculty of Animal Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

Abstract: Three monoclonal antibody hybridomas (MAbs) named 3A3, 4D5 and 6B4 specially directing to muramidase released protein (MRP), a virulence factor of *Streptococcus suis* type 2 (SS2), were produced. In the procedure, Sp2/O and spleen cells from Balb/c mice immunized with Formalin-killed whole bacteria cells of HA9801, a Jiangsu isolate of SS2, were fused. Then by indirect enzyme-linked immunosorbent assay, the positive hybridomas against MRP were screened using electrophoretically pure MRP as antigen and monoclonalized by limiting dilution, among which, hybridomas clones cross-directing to other cell wall protein portions of HA9801 except MRP were screened out. Bacterial cells of HA9801 were co-incubated with HEp-2 cells to make a adhesion of both cells. Then MRP on cellular surface of HA9801 was labelled with FITC through co-mediation with the three MAbs of MRP. Laser confocal scanning light microscopy revealed that MRP took on a thread-like shape, one end of which was anchored on the cell wall and the other end was free, directing outward singly or in clusters.

Key words: *Streptococcus suis* type 2; Muramidase released protein; Monoclonal antibody; Laser confocal scanning light microscopy

猪链球菌是猪的主要传染病之一, 其病原为猪链球菌, 有 35 个血清型, 其中 2 型 (*Streptococcus suis* type 2, SS2) 是毒力最强、危害最严重、流行最广泛的

血清型之一^[1~3]。SS2 主要引起猪和人的脑膜炎、败血症及突发性死亡, 是重要的人畜共患病病原。1998 年在我国江苏省某猪场暴发急性败血型传染

收稿日期: 2002-10-04

基金项目: 国家“973”资助项目 (G1999011906)

作者简介: 曾巧英 (1968-), 女, 甘肃定西人, 副教授, 博士, 主要从事畜禽病原微生物的分子致病机制及防治研究。Tel: 0931-7631229; Fax: 0931-7631220; E-mail: zqyziyi@yahoo.com.cn。陆承平为通讯作者, Tel: 025-4396517

病,致使数万头生猪死亡,并有相关从业人员感染致死,经鉴定病原为 SS2^[4]。136 kD 的溶菌酶释放蛋白(muramidase released protein, MRP)是 SS2 的胞壁大分子糖蛋白,和菌株的致病力显著相关^[1-3],目前,在 MRP 的基因结构及其表达方面的研究已取得一定进展^[5,6],但其致病作用不明。蛋白质的功能取决于其结构,虽从基因可推知蛋白质结构的单分子信息,但蛋白质的功能还取决于分子间的空间排列及分布,一级结构相同的分子功能不尽相同,因此研究其天然状态时的空间分布和形态是极其必要的。为此,本试验制备 MRP 的单克隆抗体,在其联合介导下用 FITC 标记 SS2 江苏分离株 HA9801 菌体表面的 MRP,进行激光共聚焦显微观察,以期探明 MRP 在菌体表面的形态和分布。

1 材料与方法

1.1 细菌培养

猪链球菌 2 型 HA9801(MRP⁺)系姚火春等从江苏某猪场分离并保存^[4],用 THB 血平板复苏菌株,37 °C 培养 24 h,挑单菌落接种于 THB 肉汤,培养 18 h,再按 1% 量接种于 THB 肉汤,培养 12 h 后 6 000 r/min 离心 15 min,0.1 mol·L⁻¹ pH 7.4 的 PBS(以下同)洗 2 次并制成每毫升 1 × 10⁸ cfu 菌悬液。

1.2 营养液

完全营养液:含 10% 无支原体新生犊牛血清(NCS, Gibico)的 RPMI1640(Gibico),在此基础上再加 5% 胎牛血清(FBS, Gibico),2 mmol·L⁻¹ L-Gln,20 mmol·L⁻¹ Hepes,用于融合细胞和单克隆细胞的培养。HT 培养液:在完全营养液中加入 1 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 次黄嘌呤(H)和 1.6 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 胸腺嘧啶(T)。HAT 培养液:在 HT 培养液中加入 4 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹ 氨基嘌呤(A)。

1.3 细胞培养

Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞和 HEp-2 细胞系本实验室保存。用完全营养液复苏细胞,置于含 5% CO₂ 的饱和湿度细胞培养箱,37 °C 培养(本试验中所有的细胞均在该条件下培养),待其处于对数生长期、活力旺盛时用于试验。

1.4 MRP 的纯化及胞壁杂蛋白的制备

将 HA9801 接种于 6 000 ml THB 肉汤,培养 18 h 后在 6 000 r/min 离心收集并超声波裂解菌体,然后在 40 000 r/min 离心,取沉淀即为细胞壁,用溶菌酶降解细胞壁后得 MRP 粗提物,后者经 pH3-pH10 两性电解质混匀后上样于制备电泳仪(the rotofor sys-

tem, BIO-RAD),电泳 3 h,待电流稳定,电压达 1 000 V 以上时,停止电泳,迅速分部收集,参照 Vecht 等^[1]的方法,对各组分进行 SDS-PAGE 鉴定并分别收集除 MRP 之外的胞壁杂蛋白,置 -20 °C 保存备用。取含 MRP 组分用纯水补足体积至 50 ml,加 1.5 ml pH 3-pH5 两性电解质混匀后再进行第二次制备电泳分离,分部收集,用 SDS-PAGE 鉴定 MRP 组分及其纯度,结果只在 136 kD 位置出现 1 条清晰浓染的条带^[7],将该 MRP 组分静置于 4 °C 使蛋白沉淀析出,弃上清,根据紫外分光光度计(BIO-RAD/Smit Spec^{TEM}3000)依 A₂₈₀制作的 BSA 的标准浓度曲线,将沉淀用 PBS 配制成 0.4 mg·ml⁻¹ 的原液,置 -20 °C 保存。

1.5 MRP 单克隆抗体的制备

参照 Susan 等的方法^[8]。

1.5.1 动物免疫 初次免疫用甲醛灭活 HA9801 菌悬液(1 × 10⁹ cfu·ml⁻¹),1:1 加入弗氏完全佐剂乳化,背部皮下多点注射 Balb/c 雌性纯系小鼠(南京军区总医院实验动物中心提供,清洁级),每只 0.2 ml。再次免疫改用弗氏不完全佐剂,其它和初次免疫同法进行。加强免疫不加佐剂,尾静脉注射相同剂量的灭活菌。每两次免疫间隔时间为 3 周,加强免疫后 48 ~ 72 h 内进行细胞融合。

1.5.2 细胞融合 按常规方法取免疫好的 Balb/c 小鼠的脾细胞和 Sp2/0 细胞混匀,在 50% PEG 1 500(Gibico)介导下融合,然后接种于预先制好饲养细胞的 96 孔细胞板,培养 1 周后换上 HT 营养液,再经 1 周后换成完全营养液。待 96 孔板上杂交瘤细胞长满孔底 1/3,取上清液用于 MRP 为抗原的间接 ELISA 检测,以 P/N 值大于 2.1 为阳性,大于 1.5 为可疑,继续培养重复检测。

1.5.3 MRP 单克隆抗体细胞的筛选

(1) 检测程序 按常规的间接 ELISA 法进行。包被液为 0.05 mol·L⁻¹ pH 9.6 碳酸盐缓冲液,封闭液为 0.1 mol·L⁻¹ 甘氨酸-10% 犊牛血清的 PBS,酶标二抗为 HRP-羊抗鼠抗体,底物为 OPD-H₂O₂。

(2) 最佳抗原包被浓度和抗体稀释度的确定 配制起始浓度为 40 μg·ml⁻¹ 的 MRP 溶液,做 2 倍递倍稀释,取各稀释度包被 ELISA 板,采自融合用 Balb/c 小鼠的阳性抗血清做 1:50,1:100,1:200,1:400,1:800,1:1 600 倍稀释,采自健康 ICR 小鼠的阴性血清作 1:50 稀释,酶标二抗做 1:1 000 稀释,进行方阵 ELISA 试验。

(3) MRP 抗体阳性孔的检测 稀释 MRP 至方

阵 ELISA 试验所确定的最适浓度, 包被 96 孔 ELISA 板, 融合细胞上清作为一抗按孔号对应加入 96 孔 ELISA 板进行检测。

(4) MRP 抗体阳性孔细胞的单克隆化 用有限稀释法进行。

(5) 剔除和杂蛋白有交叉反应的克隆 用紫外分光光度计(BIO-RAD/Smit SpecTM3000)制作 BSA 的 A_{280} 值标准浓度曲线, 测胞壁杂蛋白各组分的浓度, 然后稀释至和 MRP 相近浓度, 包被 40 孔 ELISA 板, 对 MRP 阳性克隆进行间接 ELISA 检测。

(6) MRP 阳性单克隆细胞的扩大培养与冻存

将 MRP 阳性克隆细胞从 96 孔板转到 24 孔板, 长满后再转到 6 孔板, 均制备饲养细胞, 最后转到细胞瓶培养, 传代 5~7 代, 检测其 ELISA 反应效价(P/N 值大于 2.1 的最大稀释倍数), 按常规方法冻存。

(7) 单克隆抗体培养上清和腹水制备 将单克隆细胞接于细胞瓶, 先平卧式培养, 长满后加营养液至瓶颈, 直立培养, 每天摇晃使死细胞脱下, 直到营养液变酸, 离心收集上清, 检测其 ELISA 反应效价, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。用成年 Balb/c 小鼠, 常规方法制备腹水, 检测其 ELISA 反应效价, 和等体积甘油混匀后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.6 SS2 表面 MRP 的荧光标记

将 HA9801 粘附于载体细胞表面于试验前 18 h 将 HEp-2 细胞传代于 24 孔板, 孔内加经鼠尾胶原包被的盖玻片, 待细胞长至 80% 满度后, 给细胞换液, 加入 HA9801 菌悬液, 使其终浓度为 1×10^6 cfu \cdot ml $^{-1}$, 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 弃孵育液, PBS 充分洗涤, 置含 2% 戊二醛和 1.5% 甲醛的 PBS 中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h。

每孔加入 10% NCS-1% BSA 的 PBS 封闭液, 每

孔 $500\text{ }\mu\text{l}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h, 弃去封闭液, 充分洗涤。将 MRP 的单克隆抗体 3A3 和 4D5 的腹水做 1:100 稀释(用 5% NCS-0.05% Tween-20-PBS 为稀释液, 以下同), 混合, 再和 6B4 的细胞培养上清混合, 加入各细胞孔, 每孔 $500\text{ }\mu\text{l}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 h, 洗涤。同时设 HA9801 全菌多抗作对照。

以 FITC-羊抗鼠抗体为二抗, 1:1000 稀释, 加入各细胞孔, 每孔 $500\text{ }\mu\text{l}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 h, 小心夹取细胞飞片, 流水冲洗, 空气干燥, 马上进行检测。

1.7 激光共聚焦显微观察

将 FITC 标记的细胞飞片置激光共聚焦显微镜(laser confocal scanning light microscope, Leica TCS SP), 调 Ar Ion Laser 波长至 488 nm, 调不同的焦距分别收集菌体轮廓和表面蛋白聚焦信息。

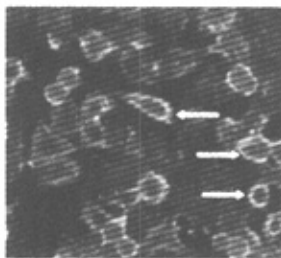
2 结果与分析

2.1 MRP 单克隆抗体的制备

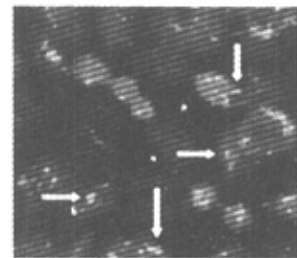
2 次融合, 接 96 孔板 12 块, 总融合率达 75%。以 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ MRP 为最适的抗原包被浓度, 用间接 ELISA 筛选到 7 孔 MRP 抗体阳性孔, 将其单克隆化后, 剔除和胞壁杂蛋白交叉反应阳性的 3 个克隆, 弃去传代过程中失去分泌抗体能力的 1 个克隆, 最后得到 3 株特异针对 MRP 的单克隆抗体细胞, 分别为 3A3, 4D5, 6B4。其培养上清的间接 ELISA 效价分别为: $1:2^{10}$, $1:2^{11}$, $1:2^{11}$, 3A3 和 4D5 腹水的效价分别为: $1:2^{15}$, $1:2^{14}$ 。

2.2 HA9801 表面 MRP 的形态和分布

MRP 单克隆抗体结合介导 FITC 标记的 SS2 表面 MRP 的激光共聚焦图像显示, 细菌轮廓图像中, 特异性荧光在菌体周围呈密集型点状分布(图 1A,



A. 细菌轮廓图像
Bacterial outline of HA9801 ($\times 7\ 500$)



B. 表面蛋白图像
Surface protein of HA9801 ($\times 8\ 000$)

图 1 MRP 单克隆抗体联合介导 FITC 标记 HA9801 表面 MRP 的激光共聚焦图像

Fig. 1 Laser confocal scanning micrograph of MRP on the surface of HA9801 labelled by FITC through co-mediation of monoclonal antibodies against MRP

→所示)。表面蛋白图像中,特异性荧光在菌体表面呈 2 种形态:第一,点状或丛集性点状分布(图 1B, →所示),第二,呈棒状,清晰可见从菌体表面向空中伸展的趋势,其棒状结构由明显的荧光高亮点连接而成(图 1B, →所示)。HA9801 的多抗介导 FITC 标

记的细菌轮廓图像中,特异性荧光在菌体周围弥散状分布(图 2A, →所示);在表面蛋白图像中,特异性荧光在整个菌体表面均匀分布,SS2 的双球菌或单球菌形态呈均匀高亮区清晰可见(图 2B, →所示)。

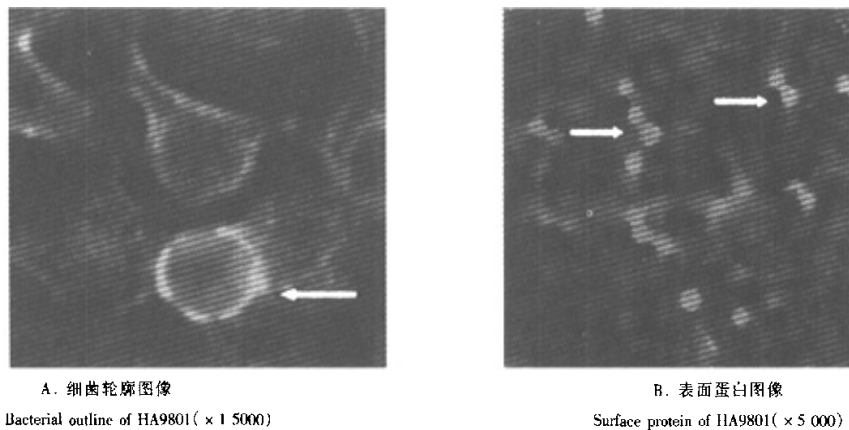


图 2 SS2 多抗介导 FITC 标记的 HA9801 的激光共聚焦图像

Fig.2 Laser confocal scanning light micrograph of HA9801 labelled by FITC through mediation of antisera against HA9801 whole bacterial cells

3 讨论

生物大分子的结构是功能的基础和载体,其功能域的空间结构对疫苗和药物的研制有重要的参考价值。

MRP 是 SS2 的重要毒力因子,其全基因已被测序^[5],但结构图未见报道。欧瑜等用计算机软件技术对其分析表明,MRP 全序列 1209AA, N 末端游离在细胞外, C 末端穿过细胞壁被锚定在细胞膜上^[9], 和本试验观察到的实际形态相吻合。

借助菌体的粘附特性将其连接到载体细胞表面,观察研究表面蛋白的天然形态和分布,其密度适当,便于观察,避免了其它理化连接方法对其天然状态可能造成的破坏。

试验中用 3 株单抗联合介导 FITC 标记,是为尽可能地以特异性多位点结合 MRP,以获取其真实全貌,因所用单克隆抗体在筛选过程中剔除了非特异性克隆,和 SS2 江苏分离株 HA9801 表面的杂蛋白无反应性,从而保证了所获信息的真实性。

激光共聚焦显微图像中,代表 MRP 的荧光亮点

有棒状和点状 2 种形态,原因是聚焦时各个蛋白分子的空间伸展方向不同,垂直横断面方向聚焦成点状,斜向或纵轴方向聚焦成棒状。点状图像有单点状和丛集性点状 2 种,提示 MRP 在 SS2 菌体表面呈单在或成丛 2 种分布状态。棒状图像则表明, MRP 一端锚定在菌体表面,另一端游离,其胞外段存在有抗原表位^[9],也是单克隆抗体的识别位点,其图像中不均匀的高亮点代表单克隆抗体的不同识别位点。

已知 A 群链球菌的 M 蛋白的 C 端被锚定于菌体表面, N 端游离远离菌体表面^[10,11], 和本试验激光共聚焦图像所显示的 MRP 的空间形态非常相似。M 蛋白具有由二聚体形成的纤维状宏观结构^[11],但 MRP 是单体还是多聚体结构,尚未见有报道。聚焦图像中的丛集性点状荧光代表的是单体的物理性丛集,还是化学性多聚体, 2 种分布状态对其功能的发挥各有何作用,均有待研究。

References

- [1] Vecht U, Wisselink H J, Jellema M L, Smit H E. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2.

- Infection and Immunity*, 1991, 59(9):3 156-3 162.
- [2] Wisselink H J, Smith H E, Stockhofe-Zurwieden N, Peperkump K, Vecht U. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74(3): 237-248.
- [3] Berthelot-Herauld F, Morvan H, Keribin A M, Gottschalk M, Kobisch M. Production of muramidase-released protein (MRP), extracellular factor (EF) and suilysin by field isolates of *Streptococcus suis* capsular types 2, 1/2, 9, 7 and 3 isolated from swine in France. *Veterinary Research*, 2000, 31(5):473-479.
- [4] 姚火春, 陈国强, 陆承平. 猪链球菌 1998 分离株病原特性鉴定. 南京农业大学学报, 1999, 22(2):67-70.
Yao H C, Chen G Q, Lu C P. Pathogenic properties of a *Streptococcus suis* strain isolated in 1998. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1999, 22(2):67-70. (in Chinese)
- [5] Smith H E, Vecht U, Gielkens A L, Smits M A. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-kilodalton surface protein of *Streptococcus suis* type 2. *Infection and Immunity*, 1992, 60: 2 361-2 367.
- [6] Smith H E, Reek F H, Vecht U, Gielkens A L, Smits M A. Repeats in an extracellular protein of weakly pathogenic strains of *Streptococcus suis* type 2 are absent in pathogenic strains. *Infection and Immunity*, 1993, 61:3 318-3 326.
- [7] 曾巧英, 陆承平. 猪链球菌 2 型溶菌酶释放蛋白的黏附作用. 南京农业大学学报, 2002, 25(4):67-71.
Zeng Q Y, Lu C P. Role as adhesin of muramidase-released protein of *Streptococcus suis* type 2. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2002, 25(4):67-71. (in Chinese)
- [8] Susan Ker hwe Ou, Paul H P, Terson T. A more efficient and economical approach for monoclonal antibody production. *Journal of Immunological Methods*, 1997, 209:105-114.
- [9] 欣瑜, 陆承平. 猪链球菌 2 型国内分离株毒力相关蛋白的分析. 微生物学报, 2002, 42(1):331-334.
Ou Y, Lu C P. Analysis of virulence related proteins of domestic isolates of *Streptococcus suis* type 2. *Journal of Microbiology*, 2002, 42(1): 331-334. (in Chinese)
- [10] Mogollon J D, Pijouan C, Murtaugh M P. Testing meningeal strains of *Streptococcus suis* to detect M protein genes. *Research of Veterinary Science*, 1992, 53:244-246.
- [11] Robinson J H, Kehoe M A. Group A streptococcal M proteins: Virulence factors and protective antigens. *Immunology Today*, 1992, 13(9):362-366.

(责任编辑 林鉴非)