

# 用 SDS-PAGE 进行鸡败血霉形体结构蛋白分析

于圣青, 刘晓文, 徐步, 丁铲  
(江苏省家禽科学研究所, 扬州 225003)

**摘要:** 利用 SDS-PAGE 方法对禽败血霉形体 R、S6、F 株和 6 株国内分离株进行了结构蛋白比较分析, 电泳凝胶染色扫描结果显示, 各株之间结构蛋白差异较大。R、S6 株 p64 蛋白表达量较高, D9604 株与其相似性较高。D9601、D9603 和 D9605 与 F 株均有一条特异的 75 kDa 条带, 提示我国分离的 MG 强毒株可能存在着多样性。

**关键词:** SDS-PAGE; 鸡败血霉形体; 结构蛋白

中图分类号: S852.62 文献标识码: A 文章编号: 0366-6964(2001)03-0249-04

败血霉形体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG) 通常引起鸡的慢性呼吸道病(Chronic Respiratory Disease, CRD) 和火鸡传染性窦炎(Infectious Sinusitis, IS), 与病毒或细菌混合感染时可引起严重的并发症, 给养禽业带来极大的损害。我们自江苏和江西省的数个发病群中分离了 8 株败血霉形体, 分别命名为 D9601~D9608。在以往的研究中, 我们发现国内分离株无论在生物学特性, 还是在对鸡的致病力方面均存在不同程度的差异性<sup>[1]</sup>。本研究在通过 SDS-PAGE 方法对其结构蛋白差异性进行分析, 进一步验证国内分离株与国际对照株之间的关系, 为免疫预防慢性呼吸道病进行基础研究。

## 1 材料和方法

**1.1 败血霉形体毒株** 自江苏、江西两省的鸡场分离的 8 株鸡败血霉形体代号分别为 D9601、D9603、D9604、D9605、D9606、D9608, 参考株为国际标准抗原株 S6, 弱毒疫苗株 F 株以及国际标准强毒株 R。这 3 个参考株均自美国 ATCC 获得见表 1。

**1.2 电泳样品的制备** 将上述 9 株败血霉形体分别接种 Frey's 液体培养, 置 37℃ 培养 48 h 后, 以 15 000r/min 离心 30 min 沉淀菌体, 以超纯水悬浮离心洗涤 3 次, 以岛津 uv2205 型紫外分光光度计分别测定蛋白浓度, 然后逐一调节至 30 mg/mL。取 25 μl 样品分别与等量的样品缓冲液(含 5% SDS、10% 2-巯基乙醇、30% 丙三醇、4 mg/kg 溴酚蓝、0.2 mol/L pH6.8 Tris-HCl) 混合。同时将低分子量标准蛋白溶于 0.5 mL 样品缓冲液中, 并以超纯水补足至 1 mL。将上述 9 个样品与标准蛋白溶液各取 100 μL, 置 100℃ 水浴 5 min, 置室温冷却后备用<sup>[7]</sup>。

**1.3 SDS-PAGE** 按 Kheyser 等方法配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶<sup>[11]</sup>。浓缩胶厚为 1 mm。

收稿日期: 1999-02-25

基金项目: 江苏省“九·五”重点攻关课题(BE96502)

作者简介: 于圣青(1963~), 女, 汉族, 江苏扬州市人, 副研究员, 博士, 研究方向为预防兽医学。

表1 鸡败血霉形体各株的背景情况

Table 1 *Mycoplasma gallisepticum* strains utilized in this study

MG 株 Strain	分离部位 Origin	类别 Class of strain	分离者 Source
D9601	鸡气管 Trachea	野外分离株 field	自行分离 shovel. Deen
D9603	鸡气管 Trachea	野外分离株 isolator	自行分离 shovel. Deen
D9604	鸡气囊膜 Airsac	野外分离株 isolator	自行分离 shovel. Deen
D9605	鸡气囊膜 Airsac	野外分离株 isolator	自行分离 shovel. Deen
D9606	鸡气管 Trachea	野外分离株 isolator	自行分离 shovel. Deen
D9608	鸡气囊膜 Airsac	野外分离株 isolator	自行分离 shovel. Deen
R	鸡气管 Chicken trachea	标准株 Type strain	D. J. Ritchie
S6	火鸡脑 Turkey brain	标准株 Type strain	D. V. Zander
F	鸡气管 Chicken trachea	疫苗株 Vaccine strain	R. Yamamoto

取 S6 等 9 株 MG 电泳样品各 20  $\mu$ L, 加入凝胶梳孔中。低分子标准蛋白分别为磷酸化酶、牛血清白蛋白、肌动蛋白、碳酸酐酶、烟草花叶病毒外壳蛋白 5 种。以 20 mA 稳流, 待溴酚蓝到达分离胶后电流增加到 30 mA。溴酚蓝到达凝胶底部时停止电泳。取下的凝胶以考马斯亮蓝 R250 置 60  $^{\circ}$ C 染色 15 min, 然后以 10% 醋酸脱色至背景无色。电泳结果以数码扫描。

**1.4 结果分析方法** 在本试验条件下, 以标准分子量蛋白电泳相对迁移率为横轴, 以蛋白分子量为纵轴, 因为蛋白分子量与迁移率的自然对数呈线性关系, 用其相对应的两组数据进行直线回归分析, 对回归系数和相关性检验后, 得出直线回归方程, 再根据各蛋白条带的迁移率代入方程, 取反对数即可得出蛋白的分子量。比较各 MG 株蛋白图谱之间的差异性。

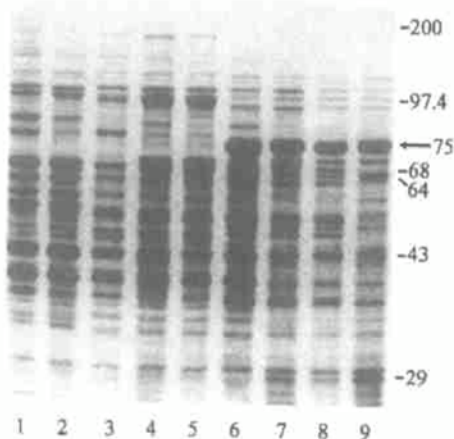


图1 9株败血霉形体的电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE profiles of *Mycoplasma gallisepticum* strains

Lane 1 S6; Lane 2 R; Lane 3 D9606; Lane 4 D9608; Lane 5 D9604; Lane 6 D9601; Lane 7 D9603; Lane 8 D9605; Lane 9 F.

## 2 结果

由图1看出, 各MG株均出现了数量不等的蛋白条带, 均在30余条左右, 其中绝大多数是共有的, 但少数也有不同。其中R与S6株表现出高度的相似性, 其64 kDa蛋白表达量明显高于其它株。在电泳图上, D9608与D9604株相似程度最高, R和S6株与野外分离株D9606、D9608和D9604相似性也较高, 82.7 kDa蛋白条带为这些MG株所特有。D9608和D9604株的97.4 kDa蛋白, 即pMG1的表达量较高。与疫苗株F株相似的有D9601、D9603和D9605, 其中75 kDa蛋白(粘着素之一)为这些MG株所特有, 并出现较高的表达量, 而R、S6、D9606、D9608和D9605株缺乏这种重要的粘着素。D9605具有与S6株相同的87 kDa蛋白条带。D9601的64 kDa蛋白条带与R株和S6也有差异。D9603和D9604的97.4 kDa蛋白条带的

染色强度明显强于其它株。F 株 43 kDa 蛋白条带染色最弱, 而 29 kDa 蛋白条带染色则最强。

### 3 讨 论

应用 SDS-PAGE 电泳进行鸡败血霉形体的结构蛋白分析, 能够发现不同株种之间的细微差别。p64 蛋白是 MG 的主要免疫原和主要构膜蛋白<sup>[3,4]</sup>, 结果表明, 标准株 R 和 S6 株 64 kDa 蛋白的表达量明显高于其它株, 这就证实了在体外培养中强毒株(如 S6、R 株等)与弱毒株(F 株等)相比能够表达大量的 p64 蛋白<sup>[6,8,10]</sup>, 从而为制造 MG 灭活疫苗提供了理论根据。野外分离株中 D9604 与 R 和 S6 株相似性最高, 生物学特性研究证明其属于强毒株<sup>[1]</sup>。

75 kDa 蛋白是一种粘着素, 对鸡红细胞表现有血凝活性。本试验无论是标准强毒株还是强毒分离株结果均未出现该条带, 而这种蛋白在强毒株 R 株应存在<sup>[8]</sup>, 这是否说明不同的强毒株之间该蛋白的存在有此差异, 须应用单抗作进一步研究。疫苗株 F 株及部分分离株均有 75 kDa 蛋白, 并表现出较高的表达量, 这可能表明它们之间存在一定的相关性。

值得注意的是, 野外分离株 D9601、D9603 和 D9605 与疫苗株 F 株之间有较高的相似性, 这些分离株均表现出了一定的致病力<sup>[1]</sup>, 而这些发病场均曾在以前使用过 MG 弱毒苗。这就提示我们, 弱毒疫苗毒株是否会在野外条件下发生毒力返强?

另外, 在我们以往用 RAPD 技术分析 MG 株之间 DNA 的多态性的研究中<sup>[2]</sup>, 毒株之间的相似性在该试验中也得到了证实。野外分离的强毒株的生物学特性不同, 它们表现出的对鸡的致病力也不同, 这说明在我国 MG 对鸡群的感染存在着多样性。

败血霉形体的结构蛋白存在高度的差异性。不少学者对与 MG 粘附过程有关的几种蛋白作了深入的研究, Kahane 等<sup>[8]</sup>用神经氨酸糖肽亲和层析法自 MG S6 株分离了一种 70~75 kDa 的粘附蛋白。Thomas<sup>[13]</sup>等用多克隆抗体方法研究表明在 MG 毒株之间存在着一种 63 KD 的蛋白, 与此同时, Bradley<sup>[7]</sup>等(1988 年)发现特异性针对 S6 株的单克隆抗体能与 69 KD 的血凝素多肽起反应。Avakian 等(1991 年)<sup>[5]</sup>用针对 R 株 64 kDa 条带单特异的鸡血清研究表明, 19 株 MG 均存在主要免疫原 64 kDa 蛋白, 这种位于末端结构底部的蛋白对鸡显示出高度免疫原性、血凝特性, 并且是滑液霉形体所不具有的。Markham 等(1992 年)<sup>[12]</sup>用两种单抗鉴定了 MG 的一种 p67 蛋白, 这种蛋白(pMGA)位于细胞表面, 单抗与之反应时也能抑制血凝活性, 这种 pMGA 或 p67 表面具有高度可变性, 可能在 MG 的免疫逃逸中起决定性的作用, 虽然这种可变膜蛋白不能由它的 pMGA 附着基因共同表达, 但单克隆抗体测定结果表明其仍具免疫显性和保护性表位。Kheyer 等<sup>[11]</sup>(1995 年)表明, p64 抗原为一种脂蛋白, 是一种细胞粘着素(cyladhesin), 包括有血凝活性和生长抑制两种截然不同的表位, 虽然只具有约 50% 左右的粘附作用, 但作为主要免疫原和主要膜蛋白, 在免疫学上仍具有重要意义。

MG 主要寄居于宿主组织上皮表面, 由 MG 粘着素与其相应的宿主细胞受体特异结合而完成粘附, 而粘着是 MG 使宿主细胞发生变化和发病的前提。以富含 p64 蛋白的 MG 株制备疫苗, 应获得较好的免疫效果。进一步研究 MG 结构蛋白及粘附机理, 对研制粘着素亚单位疫苗, 从而控制慢性呼吸道病的发生及传播具有十分重要的意义。

## 参考文献:

- [1] 丁 铲, 于圣青, 等. 鸡败血霉形体的分离和鉴定[J]. 中国家禽学报, 1998, (2): 34~ 37.
- [2] 于圣青, 丁铲, 等. 用 RAPD 方法测定鸡败血霉形体 DNA 的多态性[J]. 中国兽医学报, 1999, (2): 15~ 17.
- [3] Avakian A P, Kleven S H. The humoral immune response of chickens to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* studied by immunoblotting[J]. Vet Microbiol, 1990, 24: 155~ 169.
- [4] Avakian A P, Ley D H. Protective immune response to *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated in respiratory tract washing from *Mycoplasma gallisepticum* infected chickens[J]. Avian Dis, 1993, 37: 697~ 705.
- [5] Avakian A P, Kleven S H, Ley D H. Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains and identification of integral membrane proteins with Triton X-114 by immunoblotting[J]. Vet Microbiol, 1991, 29: 319~ 328.
- [6] Avakian A P, Ley D H. Inhibition of *Mycoplasma gallisepticum* growth and attachment to chick tracheal rings by antibodies to a 64 kilodalton membrane protein of *Mycoplasma gallisepticum*[J]. Avian Dis, 1993, 37: 706~ 714.
- [7] Bradley L D, Snyder D B, Van Deeußen R A. Identification of species-specific and interspecies-specific polypeptides of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*[J]. Am J Vet Res, 1988, 49: 511~ 515.
- [8] Gibbs P S, Kleven S H, Jackwood M W. Analysis and characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from Pennsylvania[J]. Avian Dis, 1993, 38: 475~ 482.
- [9] Kabane I, Granek J, Reischer-Sanda A. The adhesins of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma Pneumoniae*[J]. Ann Microbiol, 1984, 135A: 25~ 32.
- [10] Khan M I, Lam K M, Yamamoto R. *Mycoplasma gallisepticum* strain variations detected by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Avian Dis, 1987, 31: 315~ 320.
- [11] Kheyer A, Reddy S K, Silim A. The 64 kDa lipoprotein of *Mycoplasma gallisepticum* has two distinct epitopes responsible for haemagglutination and growth inhibition[J]. Avian Path, 1995, 24: 55~ 68.
- [12] Markham P F, Brandon M R, et al. Characterization of a major haemagglutinin protein from *Mycoplasma gallisepticum* Infect[J]. Immun, 1992, 60: 3885~ 3891.
- [13] Thomas C B, Sharp P. Detection of antigenic variation among strains of *Mycoplasma gallisepticum* by enzyme-linked immunosorbent inhibition assay (ELISA) and Western blot analysis[J]. Avian Dis, 1988, 32: 749~ 756.

## ANALYSIS OF STRUCTURAL PROTEINS OF MYCOPLASMA GALLISEPTICUM BY SODIUM DODECYL SULFATE—POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

Yu Shengqing, Liu Xiaowen, Xu Bu, Ding Chan

(Institute of Poultry Science of Jiangsu Province, Yangzhou, 225003, China)

**Abstract:** Through the sodium dodecyl sulfate—polyacrylamide gel electrophoresis we analysed and compared the structural proteins of 9 *Mycoplasma gallisepticum* strains, including type strain S6, F, and 6 field isolates from China. The result showed that the protein profiles of all these strains were different, the p64 was expressed in higher amounts *in vitro* in MG strains considered more virulent (S6 and R) than in MG strains of reduced virulence (F, et al). Protein profiles showed similarities of S6 and R. F, D9601, D9603 and D9605 all had a special 75 kDa band, but all virulent strains had not. The result suggests that the virulent field isolates in China maybe diversified.

**Key words:** SDS—PAGE; *Mycoplasma gallisepticum*; Structural protein