

## 羊源肠球菌溶血性的检测

康立超<sup>1,2</sup>, 韩素娟<sup>1</sup>, 王静梅<sup>1</sup>, 薄新文<sup>2</sup>, 马勋<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>石河子大学动物科技学院, 石河子 832003)

(<sup>2</sup>新疆农垦科学院, 新疆兵团绵羊繁育生物技术重点实验室, 石河子 832000)

**摘要:**【目的】了解羊源肠球菌溶血素的特性。【方法】以平板法、接触法、培养法、上清法及 PCR 法, 对 11 株肠球菌临床分离株、30 株健康羊分离株、肠球菌参考株和 G 群链球菌参考株进行了溶血性检测。【结果】接触法和上清法均不能检测到 11 株肠球菌临床分离株对兔血和羊血的溶血; 平板法和培养法测得 11 株肠球菌临床分离株中, 63.6% 对兔血呈现  $\beta$  溶血, 36.4% 对羊血平板呈现  $\alpha$  溶血; 基于检测 *cylA* 基因的 PCR 法, 63.6% 溶兔血菌能扩增出特异性条带, 扩增产物序列与 GenBank (L37110) 中肠球菌同源性达 99.3%。平板法测定 30 株健康羊分离株, 初次分离培养 53.3% 对兔血  $\beta$  溶血, 53.3% 对羊血  $\alpha$  溶血, 43.3% 对羊血  $\beta$  溶血, 但二次传代后只有 6% 对兔血仍有溶血能力, 且 30 株均不能检测到 *cylA*。标准肠球菌对羊血平板有  $\alpha$  溶血, 而对兔血没有溶血性。【结论】提示肠球菌溶血性具有一定的溶血谱, 不同检测方法检测的溶血情况不同; 并且肠球菌溶血素必须在红细胞诱导下, 通过细菌的生长繁殖产生; 溶血素表型和基因型的检测不完全一致, 对二者同时检测能提高肠球菌溶血素检测的准确性。

**关键词:** 肠球菌; 溶血性; 检测

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0924-05

肠球菌 (*Enterococcus*) 是人和动物肠道的正常菌群, 通常不引起发病, 是一种重要的机会致病菌 (opportunistic pathogen)。近年来, 肠球菌的致病性日益为人们所重视, 已报道的致病相关因子有血凝素、溶血素、载铁体、粘附素及侵袭素等。肠球菌的溶血素是肠球菌的一个重要毒力因子与其致病力有关<sup>[1]</sup>, 具有溶解红细胞, 杀死白细胞及毒害心脏的作用。2003 年来, 在新疆生产建设兵团部分规模化羊场, 农八师 141、农七师 129 团及石河子新业羊场等先后发生一种病程很短, 无品种差异, 主要感染羔羊, 可导致死亡的以败血症和神经症状为主的疫病。造成千余只羔羊死亡, 而当前对该病的防治缺乏有效的手段。通过我们初步的常规细菌学分离与鉴定、动物回归实验、血清学实验和 PCR 鉴定, 确认为是由

Lancefield 抗原为 D 群和无法定型的肠球菌所致<sup>[2]</sup>。本实验在新疆羊源肠球菌分离鉴定的基础上, 对其溶血性进行检测, 建立一个检测肠球菌溶血素的方法, 并推测羊源肠球菌溶血素的性质。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 11 株肠球菌为发病羔羊脑、肝、淋巴结等组织分离株<sup>[2]</sup> (简称: 临床分离株), 来自新疆农八师 141 团、农七师 129 团、石河子市新业羊场、石河子西公园发病羔羊 (表 1)。由石河子大学动物科技学院提供。30 株肠球菌为健康羊群肛门、口、鼻分离株 (简称: 健康羊分离株), 采自新疆石河子大学动物科技学院实验站健康羊群。标准 G 群链球菌 (C55950-

\*通讯作者。E-mail: maxun779@126.com

作者简介: 康立超 (1980-), 男, 甘肃武威人, 硕士, 动物传染病的诊断与防治。E-mail: klc003@163.com

收稿日期: 2008-01-17; 修回日期: 2008-03-29

G)购于中国兽医药品监察所。标准肠球菌(F6-1.130)购于中国科学院。

**1.1.2 培养基** :Todd-Hewitt 肉汤(THB)、THB 血平板<sup>[3]</sup>。

**1.1.3 主要生物试剂和仪器** :试剂药品均为分析纯, DTT (二硫苏糖醇)、pMD19-T Vector 质粒、*Hind* 限制性内切酶、*EcoR* 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、DL2000 DNA Ladder Marker 和 150 bp DNA Ladder Marker 均购自 TaKaRa 公司。PCR 产物纯化试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶和 dNTP 购自上海生物工程有限公司。高速冷冻离心机(Sigma ,7703)、PCR 仪(Bio-Rad ,582BR003001)、凝胶成像系统(Bio-Rad ,755/0065)、核酸及蛋白质电泳系统(Bio-Rad,283BR12311)、纯水仪(Millipore)、核酸/蛋白质分析系统(Nitach ,1205-016)、超低温冰箱(Sanyo ,AMVL-300A)、电子天平(Mettler ,AB204-N)等。

**1.1.4 引物设计与合成** :根据 Genebank 中发布的肠球菌激活基因 *cylA* 设计引物,由上海生物工程有限公司合成。P<sub>1</sub> : 5'-GACTCGGGGATTGATAGGC-3' , P<sub>2</sub> : 5'-GCTGCTAAAGCTGCGCTTAC-3' 。

## 1.2 种子液的制备

挑取肠球菌临床分离株、健康羊分离株和参考株单个菌落接种于 THB 培养基,37℃ 静置培养 12~18 h 制成种子液。

## 1.3 溶血性检测<sup>[4]</sup>

**1.3.1 平板法(Plate Assay, PA)** :将种子液接种于含 5% 兔鲜血平板和羊鲜血平板,37℃ ,12 h,观察菌落周围溶血情况。

**1.3.2 上清法(Supernatant Assay, SA)** :将种子液接种于 THB,37℃ ,12 h,10000 r/min 离心 5 min,上清过滤( $\phi$  0.22  $\mu$ m) 除菌后,一份加入终浓度 10 mmol/L DTT 后,与等体积 1% 兔红细胞 37℃ 作用 1 h,观察溶血情况;将种子液接种到含有少量兔鲜血 THB 中 37℃ ,12 h,使红细胞完全溶血后,菌液做 SA 检测;将种子液接种到装有 THB 的透析袋中,并将透析袋放入含 5% 兔鲜血 THB 中 37℃ ,12 h,观察溶血现象。将透析袋中的菌液做 SA 检测。

**1.3.3 接触法(Contact Hemolysis, CH)** :将种子液接种于 THB,37℃ 培养 12 h 与等体积 1% 兔红细胞 37℃ 作用 1 h,观察溶血情况。

**1.3.4 培养法(Culture Hemolysis, CLH)** :将种子液接种于含 5% 兔鲜血 THB 中,37℃ 培养 12 h,观察溶血

情况。

以不接菌的血平板和鲜血 THB 作为阴性对照,以 G 群链球菌(C55950-G)为阳性对照。

## 1.4 肠球菌溶血素激活基因(*cylA*)的检测

将 11 株临床分离株和 30 株健康羊分离株参考文献[5],提取肠球菌基因组 DNA。PCR 反应采用 50  $\mu$ L 体系。上下游引物(400 nmol/L)5  $\mu$ L,PCR 参数:95℃ 5 min,94℃ 60 s,58℃ 60 s,72℃ 60 s,30 个循环;72℃ 10 min。扩增产物为 689 bp 左右的 DNA 片段,用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行提纯。以 pMD19-T Vector 克隆试剂盒进行连接转化。阳性克隆酶切鉴定,由上海生物工程有限公司测序部对 pMD19-T vector 中的插入片段进行测序。利用 Blast 软件进行同源性比较。

## 2 结果

### 2.1 溶血性分析

11 株肠球菌临床分离株初次分离后 PA 检测,对兔血板 90.9% (10/11)的溶血,羊血板 54.5% (6/11)的 $\beta$ 溶血。本试验中,在 PA 和 CLH 检测中有 63.6% (7/11)对兔血有 $\beta$ 溶血,有 36.4% (4/11)在羊血平板上为 $\alpha$ 溶血。CH 和 SA 测得 11 株均不溶血。F6-1.130 对羊血平板有 $\alpha$ 溶血,对兔血没有溶血性。11 株临床分离株中有 27.3% (3/11)与标准肠球菌溶血性一致。PCR 检测结果与 PA 和 CLH 一致。C55950-G 在所有检测方法中均有溶血性(表 1)。

30 株肠球菌健康羊分离株的溶血性不稳定,且对羊血和兔血的溶血能力也有很大差异。初次分离培养 53.3% (16/30)对兔血 $\beta$ 溶血,53.3% (16/30)对羊血 $\alpha$ 溶血,43.3% (13/30)对羊血 $\beta$ 溶血,但二次传代后只有 6% (2/30)对兔血仍有溶血能力。

### 2.2 肠球菌 *cylA* 基因检测

11 株临床分离株中 7 株溶兔血的肠球菌扩增到 689 bp 左右的条带(图 1),但健康羊分离株和标准肠球菌没有检测到。重组质粒用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,切出大约 750 bp 的 DNA 片段 pMD19-T Vector 上 *EcoR* 和 *Hind* 的酶切位点位于克隆位点的两端,相距各 30 个 bp 左右,加上克隆片段 689 bp 大约 750 bp 与预计目的片段大小相同,证实为阳性(图 2),序列分析与 GenBank(L37110)中肠球菌序列同源性可以达到 99.3%。

表 1 羊源临床分离株肠球菌的溶血性实验  
Table 1 Hemolytic assay of clinical isolates *Enterococcus* in sheep

Strain	Host	Source	Hemolysis					
			PA rabbit	CLH rabbit	CH rabbit	SA rabbit	PA sheep	PCR (Fig.1)
E141-X	small-tail Han Sheep	141 Mission of Agricultural eight division	$\gamma$	-	-	-	$\gamma$	-
E142-S	Suffolk Lamb	141 Mission of Agricultural eight division	$\beta$	+	-	-	$\gamma$	+
E129-1	MerinoLamb	129 Mission of Agricultural seven division	$\beta$	+	-	-	$\gamma$	+
E129-2	MerinoLamb	129 Mission of Agricultural seven division	$\beta$	+	-	-	$\gamma$	+
E129-3	MerinoLamb	129 Mission of Agricultural seven division	$\beta$	+	-	-	$\gamma$	+
E129-4	MerinoLamb	129 Mission of Agricultural seven division	$\beta$	+	-	-	$\alpha$	+
E129-5	MerinoLamb	129 Mission of Agricultural seven division	$\beta$	+	-	-	$\gamma$	+
EXY-S1	Suffolk Lamb	ShiHeZi XinYe	$\gamma$	-	-	-	$\alpha$	-
EXY-S2	Suffolk Lamb	ShiHeZi XinYe	$\gamma$	-	-	-	$\alpha$	-
E129-6	MerinoLamb	129 Mission of Agricultural seven division	$\beta$	+	-	-	$\gamma$	+
EXG-H	HuangYang	ShiHeZi West Park	$\gamma$	-	-	-	$\alpha$	-
F6-1.130	unknown	Chinese Academy of Sciences	$\gamma$	-	-	-	$\alpha$	-
C55950-G	unknown	China Institute of Veterinary Drug Control	$\beta$	+	+	+	$\beta$	-

Note:  $\alpha$ -hemolysin incomplete;  $\beta$ -hemolytic completely;  $\gamma$ -not hemolysis; +: positive; -: negative

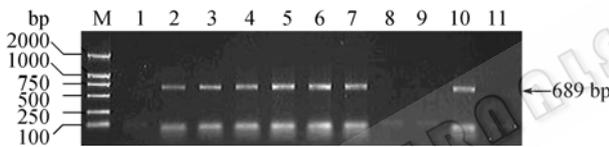


图 1 临床分离肠球菌 *cylA* 基因的检测

Fig. 1 Detection *cylA* gene of clinical isolates of *Enterococci*. M. DL2000 DNA Ladder Marker; 1. E141-X; 2. E142-S; 3. E129-1; 4. E129-2; 5. E129-3; 6. E129-4; 7. E129-5; 8. EXY-S1; 9. EXY-S2; 10. E129-6; 11. EXG-H.

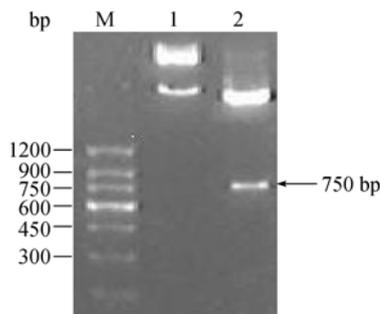


图 2 克隆质粒酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid. M. 150 bp DNA Ladder Marker; 1. The results of cloning plasmid extraction; 2. Enzyme cutting results.

### 3 讨论

肠球菌能产生溶血素已得到普遍认同<sup>[6]</sup>。但利用不同的检测方法,其结果并不一致,实验表明 PA 法和 CLH 法检测的符合率 100% 一致,并且不同羊源肠球菌对兔血和羊血的溶血性不同,这与袁杰利<sup>[7]</sup>和李影林<sup>[8]</sup>报道,检测溶血素不宜用绵羊血一致<sup>[9, 10]</sup>。提示肠球菌的溶血性具有一定的溶血谱,因此在溶血性的测定中首先采用简便易行的 PA 法,进行定性测定,针对不同动物红细胞进行检测才不会出现错误的溶血结果。

有研究表明肠球菌的溶血素是肠球菌的一个重要毒力因子与其致病力有关<sup>[1]</sup>,本试验中 11 株临床分离株溶血性并不相同,却均对小白鼠致病(LD<sub>50</sub> 为  $9.3 \times 10^{10}$ CFU)<sup>[11]</sup>,30 株健康羊分离株大多数对小白鼠不致病(仅有 1 株致小白鼠死亡,此菌株含有毒力因子明胶酶、聚集物质和表面抗原)<sup>[12]</sup>,尽管其中有 2 株传代后仍有溶血能力,提示肠球菌溶血素不是决定致病性的唯一毒力因子,不能作为诊断致病性肠球菌的指标。这与强华等<sup>[13]</sup>和 Stats 等<sup>[14]</sup>的研究一致,但是值得一提的肠球菌溶血素可能与疾病的严重程

度相关,韩素娟的硕士论文显示 63.6%溶兔血肠球菌对小白鼠的致病程度要比其他临床分离株严重<sup>[12]</sup>。

根据 Phillip 等的报道,肠球菌溶血素必须有红细胞诱导才能表达<sup>[16]</sup>,因此对诱导型溶血素的检测不能用 SA 法,但仍能通过 SA 法表明诱导产生的溶血素并不过量表达,红细胞的诱导信号可能不能通过透析袋或溶血素不能通过透析袋。SA 法是定量测定细菌溶血能力的一种方法,当 SA 法不能采用时,CH 法因运而生,但是在本试验中 CH 法也不能进行溶血性的检测,因此自行建立了 CLH 法,通过测定上清的 OD 值,就可以进行溶血能力的比较,为溶血素产生条件的优化,根据溶血素影响因素推测溶血素性质提供了技术支持,并且 CH 和 CLH 法的结果表明肠球菌溶血素要在诱导后,在细菌增殖过程中产生。

肠球菌溶血素基因大约 7 kb,由 *cylA*、B、L、M、I、R 等组成。其中溶血素激活基因 *cylA* 片段高度保守。本研究以致绵羊脑炎型肠球菌基因组 DNA 为模板,扩增 *cylA*,克隆及测序与 GenBank (Plasmid pAD1; L37110) 同源性达 99.3%。仅有六个单个核苷酸突变,并与 GenBank 中对应位置的核苷酸正好配对,这可能由于 *Taq* DNA 聚合酶缺乏 3'-5' 外切酶活性,从而导致其校正功能不强,测序仪器及软件有时也会发生错读或漏读碱基的情况。本次实验结果验证了不同地域以及不同来源分离株的肠球菌溶血素基因基本一致,为进一步研究肠球菌溶血素基因的表达及表达产物生物学活性奠定了基础。

11 株临床分离肠球菌传代后溶血性明显减弱,甚至部分失活。初次分离,有 90.9%溶兔血,但只有 63.3%株能检测到 *cylA* 基因。30 株健康羊分离株初次分离,对兔血和羊血均有 50% 以上的溶血,但传代后不能检测到 *cylA* 基因。溶血素表型和基因型的检测不完全一致,对同时进行表型及基因型的检测,能提高肠球菌溶血素检测的准确性<sup>[15]</sup>。

肠球菌产生的溶血素与其同科的链球菌溶血素不同。对不同动物红细胞的敏感性有很大差别,对小鼠、兔、狗等敏感,对牛、羊等不敏感<sup>[17]</sup>。肠球菌的溶血表型不稳定,初分离溶血,传代后失去溶血能力,这可能与 Colmar I 报道溶血素基因有些在染色体上,有些在质粒上<sup>[18]</sup>有关。在染色体上的较稳定,可以检测到 *cylA*;在质粒上的,当环境条件改变时容易丢失,失去溶血能力。部分有溶血表型但检测不到 *cylA*,提示这与本研究以肠球菌基因组 DNA 为模板,或溶血

素基因在质粒上且易丢失有关,也可能是 PCR 出现假阴性结果;部分能检测到 *cylA*,但没有溶血表型,提示溶血素基因可能在某些条件下处于沉默状态<sup>[15]</sup>。Borderon E 等发现粪肠球菌经紫外线照射后溶血活性丢失,经逆转后又重新获得<sup>[19]</sup>。由于质粒上的溶血基因可以相互转移<sup>[13]</sup>,因此当条件改变时非致病菌也可能成为致病菌,这要引起人们的警惕。

## 参 考 文 献

- [1] Philip A, Wescombe, John R Tagg. Purification and Characterization of Streptin, a Type A1 Lantibiotic Produced by *Streptococcus pyogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, 69 (5): 2737-2747.
- [2] 齐亚银, 剡根强, 王静梅, 等. 致羔羊脑炎型粪肠球菌的分离及鉴定. 石河子大学学报(自然科学版). (*Journal of Shihezi University (Natural Science)*), 2005, 23(2): 200-202.
- [3] 郝士海主编. 现代细菌学培养基和生化试验手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1992. 322-323.
- [4] 葛艳, 陈怀青, 陆承平. 迟缓爱德华氏菌的溶血特性. 中国预防兽医学报(*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 1999, 21 (1): 4-6.
- [5] 刘进元, 常智杰, 赵广荣. 分子生物学实验指导. 北京: 清华大学出版社, 第一版 2002.
- [6] 李光辉, 张婴元. 肠球菌感染研究进展. 国外医学内科学分册 (*Foreign Medical Sciences(Section of Internal Medicine)*), 1999, 26(11): 471-474.
- [7] 袁杰利, 康白等. 肠球菌及有关微生态调节剂. 中国微生态学杂志(*Chinese Journal of Microecology*), 1998, 10(2): 59.
- [8] 李影林. 临床微生物学及检验. 北京: 人民卫生出版社, 1995, 203.
- [9] 强华, 王耿夏, 谢蔓凌, 等. 影响肠球菌溶血素检测的因素. 中国卫生检验杂志(*Chinese Journal of Health Laboratory Technology*), 2002, 12(6): 653-654.
- [10] Nelson GI. Lipid composition of erythrocytes various mammalian species. *Biochim Biophys Acta*. 1967, 144: 221.
- [11] 任晓燕. 粪肠球菌试验性感染小鼠的研究. 石河子大学硕士学位论文, 2006.
- [12] 韩素娟. 绵羊肠球菌毒力因子在不同来源分离株中的检测及克隆测序. 石河子大学硕士学位论文, 2007.
- [13] 强华, 林建银, 蒋明森, 等. 肠球菌溶血素与其致病力的关系. 中国人兽共患病杂志(*Chinese Journal of Zoonoses*), 2001, 17 (6): 68-70.
- [14] Stats JJ, Feder I, Okwumabua O, et al. *Streptococcus suis*. *Past Res Commun*, 1997, 21: 381-407.
- [15] 强华, 刘光英, 李能. 肠球菌溶血素的表型及基因型检测. 福建医科大学学报(*Journal of Fujian Medical University*), 2007,

- 41(3): 197–199.
- [16] Phillip S. Coburn, Christopher M. Pillar, et al. *Enterococcus faecalis* Senses Target Cells and in Response Expresses Cytolysin. *Science*, 2004, 306: 2270–72.
- [17] 康立超, 马勋, 王静梅, 等. 羊源肠球菌溶血素特性分析及其对兔红细胞作用的观察. *中国兽医科学(Veterinary Science in China)*, 2007, 37(12): 1013–1017.
- [18] Colmar I, Horaud T. *Enterococcus faecalis* hemolysin-bacteriocin plasmids belong to the same incompatibility group. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53: 567.
- [19] Borderon E, Bieth G. Genetic and physical studies of *Streptococcus faecalis* hemolysin plasmids. *J Infect Dis*, 1994, 169: 821.

## Detecting hemolysis of *Enterococcus* from sheep

Lichao Kang<sup>1,2</sup>, Sujuan Han<sup>1</sup>, Jingmei Wang<sup>1</sup>, Xinwen Bo<sup>2</sup>, Xun Ma<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Science and technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

<sup>2</sup>Key Lab of Sheep Reproduction Biotechnology, Xinjiang Academy of Agriculture and Reclamation, Shihezi 832000, China)

**Abstract: [Objective]** To characterize hemolysis of *Enterococcus* from sheep. **[Methods]** Using plate assay (PA), contact hemolysis (CH), supernatant assay (SA), culture hemolysis (CLH) and PCR, we studied hemolysis characteristics of 11 *Enterococcus* clinical isolates, 30 isolates from healthy sheep, a standard *G-Streptococcus* and a standard *Enterococcus*. **[Results]** Rabbit blood and sheep blood were not hemolysing in the 11 clinical isolates analyzed by SA and CH. Of the clinical isolates 63.6% had  $\beta$ -hemolysis with rabbit blood and 36.4% had  $\alpha$ -hemolysis with sheep blood analyzed by PA and CLH assay. Of the *cylA* gene 63.6% was detected in clinical isolates, the sequence of *cylA* gene was 99.3% homologous with *cylA* of plasmid pAD1(GenBank accession number: L37110).  $\beta$ -hemolysis had 53.3% in rabbit blood,  $\alpha$ -hemolysis and  $\beta$ -hemolysis in sheep blood had 53.3% and 43.3% respectively in 30 healthy sheep initial isolates with PA. Only 6% had hemolytic capacity in rabbit blood after second generations. The *cylA* gene was not detected in 30 healthy sheep isolates by PCR. Standard *Enterococcus* strain of  $\alpha$ -hemolysis of sheep blood had no hemolysis of rabbit blood. **[Conclusion]** The red blood cells could induce enterococci hemolysis secreting in the bacteria growth. The result was different with the Phenotype and the Genotype.

**Keywords:** *Enterococcus*; hemolysis; detection

\*Corresponding author. E-mail: maxun779@126.com

Received: 17 January 2008/ Revised: 29 March 2008

### 答 作 者 问

问: 贵刊的审稿程序是怎样的? 一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答: (1) 收到来稿后, 首先请将 2 位专家进行初审, 再送主编进行最后的总审, 这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审的 2 位专家的意见分歧较大, 编辑部将再请第 3 位专家进行初审, 之后再送主编总审, 那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。

(2) 完成审稿后(即主编给出总审意见), 编辑会给作者发出 e-mail 告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的), 作者在返回修改稿后经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者不要在远程系统中看到初审意见时就急于修改稿件。

问: 我的文章现已审查完毕, 并收到了编辑部发来的“审稿意见”。我想咨询, 如果文章修改后, 再次投递, 是否还需要交稿件受理费? 是否仍然用原论文编号提交?

答: 这要分两种情况, (1) 如果你的文章已经被通知“退稿”了, 那么修改之后再投来的文章将按“新稿件”处理, 从程序上来讲和新投稿件是一样的, 仍需要缴纳稿件受理费。但是为便于稿件审理, 请作者在投稿时在文题的后面加上“原稿件号+修后再投”字样。(2) 如果是编辑部在审稿意见中要求您修改后再经本刊“复审”, 则不作为新稿处理, 请作者直接将修改稿上传到远程系统中, 不再另交稿件受理费。