

溶脲脲原体 12 个血清型标准株与 6 个地方分离株 主要蛋白组份的分析

叶元康 殷常红 王悦冶 陆德源

(上海第二医科大学微生物学教研室, 200025)

摘要 经 SDS-PAGE 和薄层扫描分析, 18 株溶脲脲原体有从分子量 19—175KD 20 多条蛋白区带。主要蛋白组份分布在 32—140KD 范围之内。其中 32、52 和 94KD 蛋白组份各株间差别较大, 而其余主要蛋白组份各株间较类似。按蛋白组份的不同可将溶脲脲原体分为 A、B 两群。A 群包括 2、5、7、9、10、11、12 血清型标准株和 U_C、U_D、U_E、U_F 地方分离株。B 群包括 1、3、6、13、14 和 U_A、U_B 株。仅用 SDS-PAGE 方法分析溶脲脲原体蛋白组份不能区别菌株间的血清型。

关键词 溶脲脲原体; SDS-PAGE

溶脲脲原体 (*Ureaplasma urealyticum*) 是人泌尿生殖道中能分离到的主要支原体。该支原体常引起非淋球菌性尿道炎、绒毛膜羊膜炎、自发性流产和不育等疾病, 并能通过垂直感染从母亲影响胎儿和新生儿。用代谢抑制试验和菌落间接荧光法可将溶脲脲原体分为 14 个血清型^[1,2]。溶脲脲原体蛋白组成与不同血清型的关系研究不多。本文报道 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色测定 12 个血清型标准株和 6 个地方分离株溶脲脲原体主要蛋白组份及分子量, 同时用薄层扫描分析主要蛋白组份含量的差异和分群的实验结果。

材料与方法

(一) 支原体株

1. 血清型标准株: 溶脲脲原体 1—14 血清型, 缺 4、8 两个血清型, 共 12 株, 由加拿大 Robertson 教授赠送; 2. 地方分离株: 共 6 株, 从男性不育患者精液中分离的溶脲脲原体, 分别编号为 U_A—U_F 株; 3. 肺炎支原体 FH 株: 由

上海市卫生防疫站提供。

(二) 培养基和支原体蛋白制备

1. 培养基: 主要含 1:1 的牛肉浸液和猪胃豚, 5% 小牛血清, 10% 新鲜酵母浸液。

2. 支原体蛋白制备: 18 株溶脲脲原体和肺炎支原体 FH 株分别接种于 30ml 上述培养基中, 37℃ 培养, 溶脲脲原体培养 24 小时, 肺炎支原体培养 7 天。培养物 10000g, 4℃ 离心 30 分钟后, 去上清液。沉淀用 PBS (0.05mol/L, pH7.4) 洗 2 次, 再混悬于含有 5mol/L 尿素、2% SDS 溶解缓冲液中, 在 -20—25℃ 反复冻融 3 次, -70℃ 保存。

(三) SDS-PAGE 及凝胶薄层扫描

采用 Laemmli 的 SDS-PAGE 不连续缓冲系统^[3], 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶为 3%, 上述支原体蛋白样品使用前融化, 加等量样品缓冲液, 100℃ 3 分钟。蛋白最终浓度为 1mg/ml。上样 20μl, 电泳至溴酚蓝指示剂至凝胶下缘 1cm 处终止电泳。考马斯亮蓝 R250 染色, 脱色后经 Backman Appraise 薄层凝胶扫描仪

分析,以扫描峰的面积和高度测出各支原体株主要蛋白组份的含量百分比。分子量标准蛋白是上海东风生化试剂厂产品。

结 果

12个血清型标准株和6个地方分离株溶脲脲原体的全细胞溶解物经10% SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色,可见分子量范围从19—175KD的20多条蛋白区带,其中有主要的8,9两条蛋白区带特别明显,分子量为32、43、52、67、78、94、115、125和140KD。与非同属的肺炎支原体 FH 株比较,两种支原体的蛋白电泳谱完全不同(图1)。主要蛋白区带经薄层扫描测定含量百分比,32、52和94KD 蛋白质各株

间差异较大,而其余主要蛋白质含量在各株间相当恒定,可视为溶脲脲原体种属间共有的蛋白组份。(表1)。

对主要的 SDS-PAGE 蛋白组份进行分析,可大致将溶脲脲原体分为两个群。A群是血清型2、5、7、9、10、11、12标准株和地方分离株 U_C, U_D, U_E, U_F 株。B群是血清型1、3、6、13、14标准株和地方分离株 U_A, U_B 株。A群均含有43和94KD蛋白组份,43KD蛋白组份各株含量均较高,其中 U_E, U_F 株多一条32KD的蛋白组份。B群缺少32和94KD蛋白组份,而且43KD蛋白组份量较低(图2)。结果还表明,SDS-PAGE 分析溶脲脲原体的蛋白组份不能区分各个血清型标准株之间的差别。

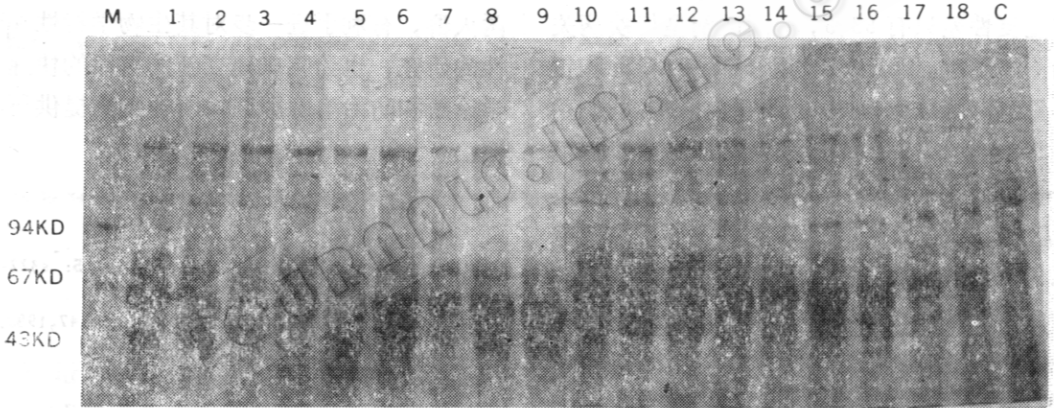


图1 18株溶脲脲原体的 SDS-PAGE

M: 分子量标准,磷酸化酶 B 94KD, 牛血清白蛋白 67KD, 肌动蛋白 43KD

C: 肺炎支原体 FH 株作对照

编号1—18按顺序分别代表血清型标准株1,2,3,5,6,7,9,10,11,12,13,14和地方分离株 U_A, U_B, U_C, U_D, U_E, U_F

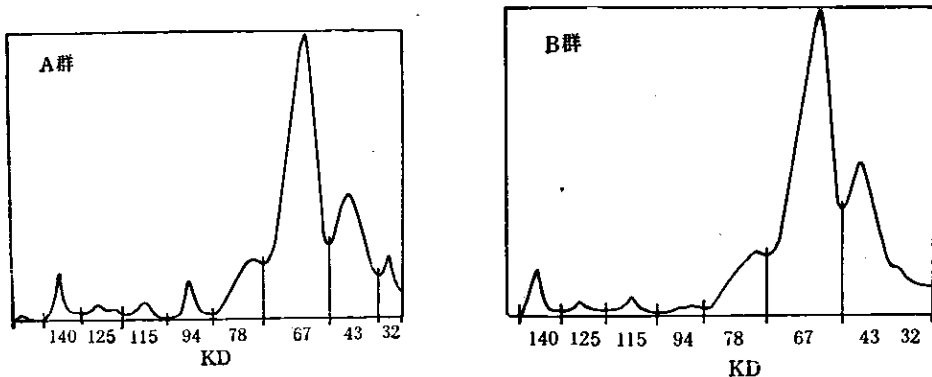


图2 A、B群溶脲脲原体主要蛋白组份的扫描分析

表1 溶脲脲原体 A 和 B 群主要蛋白质的比较

群	溶脲脲原体主要蛋白质的百分比(%)								
	32	43	52	67	78	94	115	125	140 (KD)
A 群	3.4	5.3	21.5	48.6	11.9	2.9	1.9	2.1	3.4
B 群	—	2.5	27.8	49.5	11.4	—	2.4	2.3	4.1

注: A、B 群主要蛋白质比较是各株平均含量的百分比

讨 论

支原体是最小的能人工培养的原核型微生物。溶脲脲原体是唯一能分解尿素的支原体。生物学分类属人支原体科, 脲原体属, 仅一个种。用代谢抑制和菌落间接荧光血清学方法可将溶脲脲原体分为 14 个血清型^[1,2]。Stemke 等^[4]最近指出了血清分型存在的一些问题, 即各型间的重叠现象, 用标准血清对各地的菌株鉴定重复性差只有 83%, 不同血清型与疾病关系尚不能确定。Thirkell^[5]用 SDS-PAGE 和银染可见溶脲脲原体有 30 多条蛋白区带。我们用 10% 不连续 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色可见分子量从 19—175KD 有十分明显的 20 多条蛋白区带。在 32—140KD 之间主要蛋白区带基本与 Thirkell 的报道相同。我们的实验结果中蛋白区带较少和用考马斯亮蓝染色的灵敏度有关, 有些微量的蛋白质可能未能显色。银染和同位素标记方法敏感度是考马斯亮蓝染色的 10—100 倍, 但方法和条件复杂苛刻^[5,6]。经我们多次重复试验表明, SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色基本上可满足溶脲脲原体分群需要。

根据 SDS-PAGE 蛋白区带^[6]、DNA-DNA 杂交^[7]和 DNA 酶切谱^[8]可将不同血清型溶脲

脲原体分为 A、B 两群。我们对 12 个血清型标准株和 6 个地方分离株经 SDS-PAGE 和薄层扫描分析主要蛋白区带的含量百分比, 也可将所测溶脲脲原体分为两群(表 1)。标准血清型溶脲脲原体分群与 Mouches^[6]的结果一致。地方株 U_C, U_D, U_E, U_F 和 U_A, U_B 分属于 A 和 B 群, 其中 U_E, U_F 株还多一条 32KD 的蛋白区带。

溶脲脲原体经蛋白组份的分析, 将其分为两大群, 有利于进一步对其生物学特性和致病性的研究, 也为临床建立新的可靠的快速血清学诊断和防治溶脲脲原体所致疾病提供科学依据。

参 考 文 献

1. Robertson J A: *Pediatr Infect Dis*, 5: s322—324, 1986.
2. 叶元康等: *中国微生物学杂志*, 1(2): 45—47, 1989.
3. Laemmli U K: *Nature*, 277: 680, 1970.
4. Stemke G W: *Diagn Microbiol Infect Dis*, 3: 311—320, 1985.
5. Thirkell D: *Infect Immun*, 57 (6): 1679—1701, 1989.
6. Mouches C: *Ann Microbiol (Paris)*, 132B: 171—196, 1981.
7. Christiansen S: *Int J Syst Bacteriol*, 31 (3): 259—262, 1981.
8. Razin S: *Int J Syst Bacteriol*, 33 (2): 201—206, 1983.

ANALYSIS OF MAJOR PROTEINS OF THE TWELVE STANDARD SEROVARS AND SIX LOCAL ISOLATES OF *UREAPLASMA UREALYTICUM*

Ye Yuankang Yin Changhong Wang Yueye Lu Deyuan

(Department of Microbiology, Shanghai Second Medical University, 200025)

More than 20 protein bands with molecular weights of 19—175 KD in 18 strains of *Ureaplasma urealyticum* were detected by SDS-PAGE and thin layer scanning analysis. The molecular weights of major proteins were between 32 KD and 140 KD. Among them, the percentages of 67, 78 and 140 KD proteins were similar in all strains, but those of 32, 43 and 94 KD proteins were greatly different. Thus, *Ureaplasma urealyticum* can be divided into two groups: group A including serovars 2,5,7,9,10,11,12, and local isolates C, D, E, F; group B including serovars 1,3,6,13,14, and local isolates A, B. The serovars of *Ureaplasma urealyticum* could not be distinguished by using SDS-PAGE alone.

Key words *Ureaplasma urealyticum*; SDS-PAGE.