

Riemerella anatipestifer 外膜蛋白質之電泳圖譜

林文華^{1*} 鄭秀蓮¹ 蘇杰夫¹ 許天來¹ 張照夫² 林士鈺¹

1. 行政院農業委員會家畜衛生試驗所
2. 國立臺灣大學農學院獸醫學系

摘要

由台灣罹患傳染性漿膜炎鴨、鵝分離之 25 株 *Riemerella anatipestifer*，以超音波擊破細胞，用甲基甘膠酸 (sarcosine) 處理抽出細胞外膜蛋白質，經由 SDS-PAGE 電泳染色分析後，可以區分成二類分子量圖譜型態。一類是相似的分子量圖譜型態，有 20 個菌株，其中有 9 個菌株很明顯缺少了一條約 55 kDa 分子量的外膜蛋白質。另一類則為完全不相似的分子量圖譜型態，有 5 個菌株。

關鍵字：*Riemerella anatipestifer*，細胞外膜蛋白質(outer membrane protein)，SDS-PAGE 膠體電泳(sodium dodecylsulfate-poly acrylamide gel electrophoresis)

緒言

鴨、鵝傳染性漿膜炎(infectious serositis) 又稱新鴨病 (new duck disease) [14] 或鴨敗血症 (duck septicemia) [11]，病原菌為 *Riemerella anatipestifer* (RA)，亦感染其它的水禽類造成相同的疾病，導致高低不等之死亡率，尤其在 3~4 週齡的幼禽特別嚴重 [27]。在預防控制本菌感染所發生的疾病上，一般業者常會使用藥物治療 [7,19,25] 和菌苗免疫 [1,21,26]。但由於抗菌劑的使用會隨著產生抗藥性菌株，以及因本菌具有 21 種血清型之多 [5,15,20]，不同血清型的菌苗，不能產生交叉免疫保護的作用 [26]。由此反映出本菌不同血清型間的菌株具有差異的毒力，一直困擾著所有的養鴨和養鵝業。

革蘭氏陰性細菌的細胞外膜與致病性有密切關係 [7]。對於一般致病性細菌附著於宿主細胞表面或侵入細胞內增殖，抵抗宿主的自然防禦機制，干擾宿主的免疫反應，抵制抗体補體媒介的殺菌作用，以及產生毒素破壞宿主的組織等等的的能力，都與細胞外膜的特異性構造有密切的關係 [7]。此外，細胞外膜在細菌與細菌之間互相作用的接合生子 (conjugation) 也扮演很重要的

角色 [16]，同樣地對於細菌的趨化性 (chemotaxis) 亦有間接的影響 [12]。

細胞外膜的組成份除了含有磷脂質，脂多醣外，另有許多的蛋白質包埋於膜的磷脂質雙層 (phospholipid bilayer) 中，形成一種液体嵌合模式 (fluid mosaic model) 的結構，分佈排列於膜上，有大小不等和各種不同功能之別 [18,28]，可以利用各種化學或物理的處理方法分離出來 [17,23]，作為一些蛋白質特性之研究，所以本文主旨係以 SDS-PAGE 法分析台灣地區鴨、鵝臨床分離之 *R. anatipestifer* 菌株之外膜蛋白輪廓。

材料及方法

試驗菌株

供試 25 株 *Riemerella anatipestifer*，皆由台灣地區罹患傳染性漿膜炎之鴨、鵝分離。

細菌培養

將保存於 -80°C 的菌株先劃線培養於 BHI (brain heart infusion agar, Difco) 固體培養基，置於 37°C 恆溫箱培養到菌落形成後，再以一白金耳的細菌量置入於 100 mL BHI

* 抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

液體培養基(brain heart infusion broth, Difco)內，經 37°C 恆溫振盪水浴槽培養過夜。

外膜蛋白質之製備

參照 Snipes 等方法製備〔Snipes *et al.*, 1988〕，大概過程敘述如下。將培養過夜的菌液 100 mL 先置於 55°C 的熱水槽一小時使其不活化後，以 8000 rpm，於 4°C 下離心 20 分鐘，收集菌塊懸浮於 5 mL PBS (pH 7.2) 溶液內，並加入 proteinase K (50 mg / mL, Sigma)，於 37°C 恆溫振盪水浴槽內作用 10 小時，再加入 PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride, 50 mg / mL, Sigma) 抑制 proteinase K 之作用。然後用 PBS 洗二次，再將菌塊懸浮於 4 mL Tris-EDTA (0.05 M Tris + 1 mM EDTA, pH 8.0, Merck) 溶液內，以超音波將細胞擊破 50 秒(間斷輸出 1 次/秒)。經過超音波擊破後的懸浮液以 7000 rpm，在 4°C 下離心 20 分鐘後，收集上層液再以 19000 rpm，於 4°C 離心一小時，沈澱物用 1.5% 甲基甘膠酸(sarcosine, Sigma) 溶液重覆洗二次，最後將沈澱的外膜蛋白質溶於 150 μ L 無菌蒸餾水中，存於 -20°C 以備做 SDS-PAGE 分析。

結果與討論

細菌細胞經超音波擊破，再以各種不同的蛋白質溶解物抽出細菌細胞外膜蛋白質的方法，已運用於許多種類革蘭氏陰性細菌之研究〔6,8,14,24〕。本實驗將 *Riemerella anatipestifer* 各菌株細胞以超音波擊破，再選擇以甲基甘膠酸所抽出的細胞外膜蛋白質，經 SDS-PAGE 電泳染色分析後，所呈現的蛋白質分子量圖譜非常清楚，各菌株的蛋白質分子量帶至少都有 24 條以上，主要分佈在 90、45、35、25 和 14 kDa 左右的地方，如圖 1、圖 2、圖 3。在 25 個菌株的細胞外膜蛋白質分佈圖譜中，可以區分成二類分子量圖譜型態。一類是相似的分子量圖譜型態，如圖 1. 的第 1、2、3、4、5、6、9 條 lane，圖 2. 的第 11、12、14、16、17 條 lane，和圖 3. 的 8 條 lane，計有 20 個菌株，但其中有 9 個菌株很明顯地缺少了一條約 55 kDa 分子量的外膜蛋白質，如圖 1. 的第 1、2、3、4、5、6、9 條 lane 和圖 3. 的第 18、23 條 lane。另一類則為完全不相似的分子量圖譜型態，

如圖 1. 的第 7、8 條 lane 和圖 2. 的第 10、13、15 條 lane，計有 5 個菌株，但是有一個菌株也具 55 kDa 分子量的外膜蛋白質，如圖 2. 的第 10 條 lane。雖然有些報告指出甲基甘膠酸使用於外膜蛋白質抽出時，會有一些主要的外膜蛋白質不被溶解〔4,9,10〕，但是如果我們僅考慮在於各菌株之分析，不比較其蛋白質帶出現之多寡時，本實驗出現的蛋白質帶，其解析度可以說很高。這暗示對於細菌種類之分類，似乎可以以此種方法來建立某些細菌的蛋白質圖譜，做為每一種細菌之分離菌株的對照依據。

雖然甲基甘膠酸很廣泛使用於細胞外膜抽出物的區分，作為細胞外膜蛋白質的製備方法，但是這個方法時有其應注意事項。首先要考慮到試驗之目的是否必須要很純的蛋白質抽出物，因為利用這種清潔劑所抽出的外膜蛋白質，可能會含有一些外膜上的磷脂質影響到後來進行的試驗。其次，雖然前面有提到可用其建立某些細菌的蛋白質圖譜，作為分離菌株之依據，但如果使用於腸道細菌則必須要小心評估〔17〕。這種過程製備所得的抽出物內含一些較小的外膜蛋白質〔9〕。另外亦有報告指出這種過程製備之外膜蛋白質會混合外膜上的一些脂多醣磷脂類(lipopolysaccharide-glycerophospholipid)〔22〕。所以進行外膜蛋白質製備，須視試驗目的及對於日後繼續進行之試驗的影響而定，必須慎重選擇製備方法。

至於圖 1. 的第 7、8 條 lane 和圖 2. 的第 10、13、15 條 lane 的 5 個菌株，其外膜蛋白質分子量，為何會與其他 20 個相類似的菌株不一樣，而且它們之間又互有差異，這種情形似很難解釋。但有一種可能，就是這 5 個菌株並不是 *Riemerella anatipestifer*，因此有必要再進行這些菌株之確定。

本報告發現 20 個相類似之細胞外膜蛋白質分子量的菌株，其中有 9 個菌株除了缺少一條約 55 kDa 分子量的蛋白質外，其餘的大致都相同。它們是否都是屬於 *Riemerella*

anatipestifer，為何會有此蛋白質差異，其有什麼功能，對動物又會造成什麼樣的影響等等的一些問題，都須要待進一步的探索。

一些其他種類的細菌，類似本菌含有多種血清型，其中有些特殊的菌株，它們的某些細胞外膜蛋白質常會受生長環境因素的控制而在試驗中出現。這種蛋白質常常是具有功能性和特異性，能夠產生保護性免疫〔24,29〕。這或許是暗示說明動物接受疫苗免疫後，仍然不能預防本病爆發的原因，可能是與此 55 kDa 分子量之蛋白質有關係，同樣仍待後面試驗來求証。

參考文獻

1. 洪信雄、黃旭田、陳文烈、莊啓增、呂榮修、曾俊憲。水禽傳染性漿膜炎菌苗之研製及田間應用。首屆海峽兩岸禽病防治研討會論文專輯。pp 162 ~ 166, 1995。
2. 莊榮輝、蘇仲卿。蛋白質膠體電泳檢定法，行政院國家科學委員會研討專集(九) pp 69 ~ 85, 1987。
3. 張照夫。*Pasteurella anatipestifer* 對鴨之感染機序及其藥物感受性。台灣省畜牧獸醫學會會報 43 : 40 ~ 46, 1984。
4. Achtman M, Merar A, Kusecek B, Pohl A, Heuzenroeder M, Aarouson W, Sutton A, Silver RP. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect. Immun.* 39 : 315 ~ 335, 1983.
5. Bisgaard M. Antigenic studies on *Pasteurella anatipestifer*, species incertae sedis, using slide and tube agglutination. *Avian Pathology* 11 : 341 ~ 350, 1982.
6. Blackall PJ, Rogers DG, Yamamoto R. Outer membrane proteins of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Disease* 34 : 871 ~ 877, 1990.
7. Buchanan TM. Pathogenic aspects of outer membrane components of gram-negative bacteria. In : Inouye M. ed. *Bacterial outer membranes*. John Wiley & Sons. Inc., New York, pp 475 ~ 514, 1979.
8. Carlone GM, Sottnek FO, Plikaytis BD. Comparison of outer membrane protein and biochemical profiles of *Haemophilus aegyptius* and *Haemophilus influenzae* biotype. *J. Clin. Microbiol.* 22 : 708 ~ 713, 1985.
9. Chopra I, Shales SW. Comparison of the polypeptide composition of *Escherichia coli* outer membranes prepared by two methods. *J. Bacteriol.* 144 : 425 ~ 427, 1980.
10. Filip C, Fletcher G, Wulff JL, Earhart CF. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *J. Bacteriol.* 115 : 717 ~ 722, 1973.
11. Graham R, Brandly CA, Dunlap GL. Studies on duck septicemia. *Cornell Veterinary* 28 : 1 ~ 8, 1938.
12. Hazelbauer GL. The outer membrane and chemotaxis : indirect influences and secondary involvements. In : Inouye M. ed. *Bacterial outer membranes*. John Wiley & Sons. Inc., New York, pp 449 ~ 473, 1979.
13. Hendrickson JM, Hilbert KF. A new and serious septicemia disease of young ducks with a description of the new causative organism, *Pfeifferella anatipestifer*. *Cornell Veterinary* 22 : 239 ~ 252, 1932.
14. Khan MI, Lam KM, Yamamoto R. *Mycoplasma gallisepticum* strain variations detected by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Avian Disease* 31 : 315 ~ 320, 1980.
15. Loh H, Teo TP, Tan HC. Serotype of "*Pasturella*" *anatipestifer* isolate from ducks in Singapore : a proposal of new serotype. *Avian Pathology* 21 : 453 ~ 459, 1992.
16. Manning PA, Achtman M. Cell-to-cell interactions in conjugating *Escherichia coli* : the involvement of the cell envelope. In : Inouye M. ed. *Bacterial outer membranes*. John Wiley & Sons. Inc., New York, pp 409 ~ 447, 1979.

17. Nikaido H. Isolation of outer membrane. *Methods in Enzymology* 235 : 225 ~234, 1994.
18. Nikaido H. Transport across the bacterial outer membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25 : 581 ~ 588, 1993.
19. Pathanasophon P, Tanticharoneyos T, Sawada T. Physiological characteristics, antimicrobial susceptibility and serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. *Veterinary Microbiology* 39 : 179 ~ 187, 1994.
20. Pathanasophon P, Sawada T, Tanticharoneyos T. New sero types of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. *Avian Disease* 24 : 195 ~ 199, 1995.
21. Payne CJ, Cook ME, Nersessian BN, Kounev EV. Duckling mortality and vaccine efficacy following challenge with *Pasteurella anatipestifer*. *Poultry Science* 71 : (suppl. 1) 99, 1992.
22. Poul S, Chaudhuri K, Chatterjee AN, Das J. Presence of exposed phospholipids in the outer membrane of *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.* 138 : 755 ~ 761, 1992.
23. Renswoude Jv, Kempf C. Purification of integral membrane proteins. *Methods in Enzymology* 104 : 329 ~339, 1984.
24. Rycroft AN, Taylor DJ. Preparation and characterization of envelope proteins from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 15 : 303 ~ 314, 1987.
25. Sandhu TS, Dean WF. Effect of chemotherapeutic agents on *Pasteurella anatipestifer* infection in white Pekin ducklings. *Poultry Science* 59 : 1027 ~ 1030, 1980.
26. Sandhu TS. Immunogenicity and safety of a live *Pasteurella anatipestifer* vaccine in white Pekin ducklings : laboratory and field trials. *Avian Pathology* 20 : 423 ~ 432, 1991.
27. Sandhu TS, Rimler RB. *Riemerella anatipestifer* infection. *Diseases of poultry*, 10th ed. In : Calnek BW, Barner HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW Jr., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp 161 ~166, 1997.
28. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. *Science* 175 : 720 ~ 731, 1972.
29. Snipes KP, Hansen LM, Hirsh DC. Plasma-and iron-regulated expression of high molecular weight outer membrane proteins by *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.* 49 : 1336 ~ 1338, 1988

圖 1. RA-1~9 分離株之外膜蛋白質經 SDS-PAGE 電泳染色後的圖譜

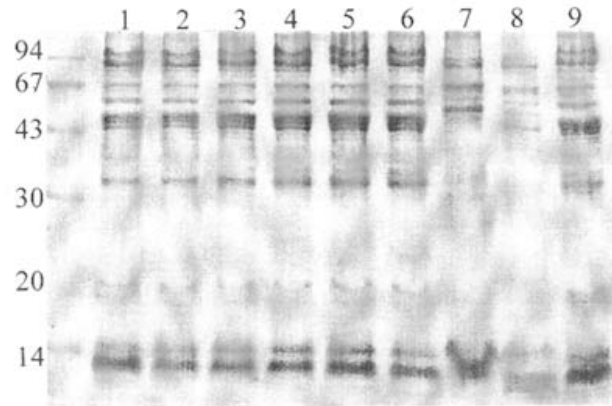


圖 2. RA-10~17 分離株之外膜蛋白質經 SDS-PAGE 電泳染色後的圖譜，箭頭位置為約 55 kDa 分子量

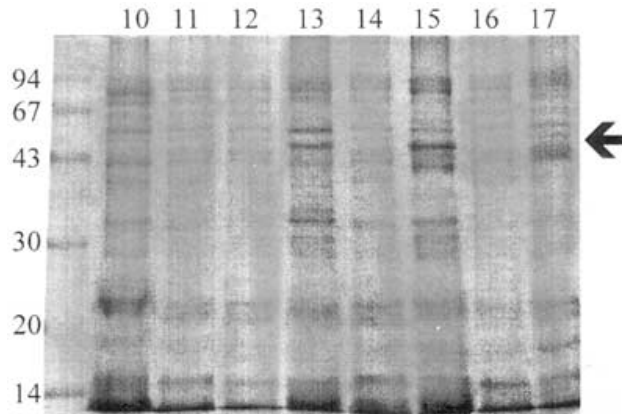
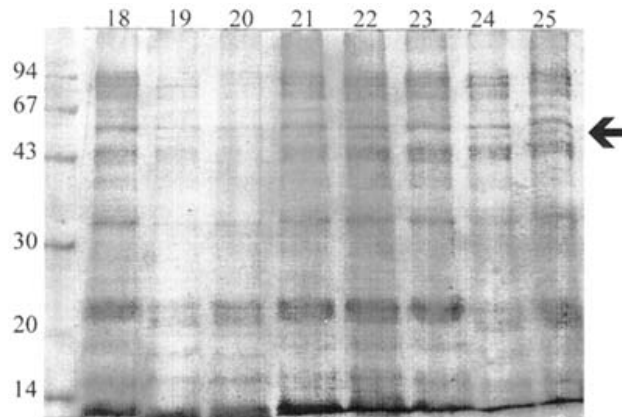


圖 3. RA-18~25 分離株之外膜蛋白質經 SDS-PAGE 電泳染色後的圖譜，箭頭位置為約 55 kDa 分子量



Electrophoresis Patterns of the Outer Membrane Protein in *Riemerella anatipestifer*

Lin, W. H.^{1*}, S. L.Chen¹, J. F. Su¹, T. L. Hsu¹, C. F. Chang², S. Y. Lin¹

1. National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan

2. Department of Veterinary Medicine, National Taiwan University

SUMMARY

These experiments were designed to investigate the biological characteristics of the outer membrane proteins of *Riemerella anatipestifer*. The outer membrane proteins were extracted from 25 strains of *Riemerella anatipestifer*, which were isolated from ducks and geese with infectious serositis. Bacterial cells were sonicated and extracted with sarcosine. The extracted outer membrane proteins were analyzed by SDS-PAGE. The 25 strains of bacteria could be divided into two groups based on electrophoresis patterns of the outer membrane proteins. Group one including 20 strains showed identical patterns on SDS-PAGE, except nine of the 20 strains, an extra band with 55 kDa was observed. Group 2 including 5 strains showed different electrophoresis patterns.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*, Outer membrane proteins, Bacterial cells

* Corresponding Author
National Institute for Animal Health