

SO SÁNH CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÁ HUỖ THÀNH TẾ BÀO VI KHUẨN *Streptococcus iniae* SỬ DỤNG TRONG QUÁ TRÌNH PHÂN TÁCH PROTEIN BẰNG SDS-PAGE

COMPARISON OF METHODS IN DEGRADATION THE CELL WALL OF *Streptococcus
iniae* APPLIED IN PROCESSING OF PROTEIN PROFILES
BY SDS-PAGE

Vũ Đặng Hạ Quyên*, Trần Vũ Hích, Nguyễn Hữu Dũng, Heidrun Inger Wergeland
Khoa Nuôi trồng thủy sản, Trường Đại học Nha Trang
Email: quyenntu@yahoo.com

ABSTRACT

Streptococcus iniae is a recognised pathogen of hemorrhage impacting aquaculture production of Asean seabass *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). However, it is difficult when analyses of bacterial antigens and the immune response after vaccination because *S. iniae* is a Gram-positive bacteria and the cell wall had to be degraded before processing for SDS-PAGE. Different methods for degradation the cell wall of *S. iniae* isolates to perform protein profiles by using SDS-PAGE were evaluated. Characterize isolates of *S. iniae* from *Lates calcarifer* perform the degradation processes included treatment with acetone, lysine, mutanolysine as well as sonication. Each of the degradation process was performed separately or in combinations of sonication. Among the methods had been tested, degradation process by acetone, lysine, sonication or combination showed unclearly band or no band on the electrophoresis gel. Meanwhile, using mutanolysine performed best result with fully detected protein profile as clearly bands between 10 to 100 kDa.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Streptococcus là một trong những tác nhân gây bệnh cho các đối tượng nuôi trồng thủy sản, chúng có thể gây chết cá với số lượng lớn và gây thiệt hại về kinh tế cho người nuôi. Vào năm 1976, *Streptococcus iniae* lần đầu tiên được phân lập từ ổ viêm mủ dưới da của cá heo nước ngọt sông Amazone (*Inia geoffrensis*) nuôi tại San Francisco, Hoa Kỳ (Pier and Madin 1976). Từ đó đến nay, vi khuẩn này được báo cáo là gây rất nhiều dịch bệnh với tỷ lệ chết cao ở cá nước ngọt và nước biển tại nhiều quốc gia trên thế giới như Nhật Bản (Kitao., Aoki. et al. 1981), Israel (Eldar, Frelie et al. 1995), Hoa Kỳ (Perera, Johnson et al. 1994), Úc (Bromage, 1999).

Rất nhiều báo cáo khoa học đề cập đến bệnh do *S.iniae* trên cá rô phi (*Oreochromis spp.*) nuôi công nghiệp tại nhiều quốc gia trên thế giới. Gần đây nhất đã có thông tin *S.iniae* được phân lập từ cá rô phi nuôi tại Việt Nam (Tuan, Nho et al. 2000). Tại Nhật Bản, các loài cá biển nuôi như cá cam (*Seriola quinqueradiata*), cá bơn (*Paralichthys olivaceus*), cá hồng (*Pargrus major*) và một số loài cá nước ngọt như cáayu (*Plecoglossus altivelis*) chịu rất nhiều thiệt hại do *S. iniae*. Một số loài cá nuôi ở các nước châu Á như cá chẻm (*Lates calcarifer*), cá mú (*Epinephelus spp.*), cá hồng (*Lutjanus spp.*) cũng bị nhiễm *S. iniae* (Kitao 1993).

Hiện nay ngành công nghiệp nuôi cá chẻm trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa cũng không tránh khỏi tình trạng dịch bệnh do *S. iniae* gây ra. *S. iniae* gây bệnh đục mắt, lở loét, xuất huyết trên da ở cá chẻm (*Lates calcarifer*) và gây tổn thất lớn cho ngành nuôi trồng thủy sản địa phương. *S. iniae* có dạng hình cầu, có thể riêng lẻ, thành cặp hay tạo thành chuỗi. *S.iniae* là vi khuẩn Gram dương với thành tế bào dày, vì vậy việc phân tích kháng nguyên và đáp ứng miễn dịch sau khi tiêm vaccine là trở ngại lớn.

Hiện nay, SDS-PAGE là phương pháp điện di trên polyacrylamide gel với sự có mặt của SDS (sodium sulfate) đã được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu miễn dịch. Đây là kỹ thuật dùng trong hóa sinh, di truyền và sinh học phân tử để phân tách các protein theo tính linh động điện di của chúng (Deyl 1983). Nghiên cứu này nhằm thử nghiệm các phương pháp phá hủy thành tế bào của các chủng vi khuẩn *S.iniae* được phân lập từ cá chẻm (*Lates calcarifer*),

cụ thể là xử lý bằng acetone, lysine, mutanolysine và dùng sóng siêu âm hoặc kết hợp 3 phương pháp đầu với sóng siêu âm. Từ đó lựa chọn ra phương pháp tối ưu cho việc xử lý thành tế bào của vi khuẩn *S. iniae* để phân tách protein bằng SDS-PAGE.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phân lập vi khuẩn *Streptococcus iniae* từ cá chêm

Cá chêm có dấu hiệu bệnh lở loét trên da, thối đuôi, đục mắt được thu thập tại các ao nuôi trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa từ tháng 8/2009 đến 8/2010. Cá được giải phẫu thu các cơ quan như mắt, não, thận, gan để phân lập vi khuẩn trên các môi trường TSA (Tryptic Soy Agar), (Merk, Đức), và KF (KF Streptococcus Agar), (Merk, Đức). Vi khuẩn phân lập được tiến hành các phương pháp hóa sinh được mô tả trong hệ thống phân loại của Bergey (Brenner et al. 2005), sau đó sử dụng bộ kit STREP 20 và so sánh những tính chất vật lý, hoá học với loài *Streptococcus iniae* chuẩn ATCC-29178. Vi khuẩn *S. iniae* được cất giữ ở nhiệt độ -80°C trong môi trường nuôi cấy TSA (Tryptic Soy Agar) có bổ sung 20% glycerol.

Chuẩn bị mẫu tế bào vi khuẩn cho phân tách protein

Vi khuẩn được đưa vào trong các bình Erlenmeyer chứa 50 ml Tryptic Soy Broth (TSB) và được nuôi cấy trong tủ lắc với tốc độ 180 rpm ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Các tế bào vi khuẩn được thu thập bằng cách ly tâm với tốc độ 4000rpm trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C , sau đó được rửa 2 lần với phosphate buffered saline (PBS) và giữ trong PBS ở -20°C trong 24 giờ.

Tiến trình phá hủy thành tế bào vi khuẩn được xử lý với acetone, lysine, mutanolysin và sóng siêu âm. Mỗi quá trình này có thể được thực hiện đơn lẻ hoặc có thể kết hợp 3 phương pháp với xử lý bằng sóng siêu âm. Điện di protein SDS-PAGE được thực hiện theo phương pháp của Laemmli (Laemmli 1970) với một số điều chỉnh trong quá trình xử lý mẫu được mô tả như sau:

Thí nghiệm 1: thành tế bào được phá hủy bằng cách dùng sóng siêu âm và sự chuyển động của các hạt thủy tinh có kích thước nhỏ. Sử dụng 50 μl PBS (phosphate buffered saline) để rửa những tế bào vi khuẩn. Sau đó, dịch thể được làm lạnh trong đá (khoảng 4°C) trong thời gian 15 phút với sự chuyển động của những hạt thủy tinh nhỏ có kích thước 0,1mm (Thompson và Chassy, 1981). Và dịch vi khuẩn này tiếp tục được xử lý bằng sóng siêu âm và giữ trong đá lạnh, với nhiệt độ khoảng -4°C (Ames 1974). Phương pháp này chính là phương pháp dùng để áp dụng cho cả 1 loại vi khuẩn *Vibrio* (gram âm) gây bệnh cho đối tượng nuôi trồng thủy sản.

Thí nghiệm 2: phá thành tế bào vi khuẩn bằng acetone-SDS (Bhaduri and Demchick 1983). Dịch huyền phù của vi khuẩn (50 μl) hoặc mẫu đã xử lý bằng sóng siêu âm (ở thí nghiệm 1) sẽ được ủ lạnh 5 phút trong 10 ml acetone-SDS lạnh (được giữ ở -20°C) và được ly tâm với tốc độ 4000 rpm trong thời gian 20 phút. Phần dịch bên trên được thu thập sau khi đã loại bỏ tế bào.

Thí nghiệm 3: thành tế bào vi khuẩn được phá hủy bằng lysine, 1,5ml dịch huyền phù của vi khuẩn hoặc mẫu đã xử lý bằng sóng siêu âm (ở thí nghiệm 1) được ủ trong 125 μl dung dịch có chứa lysine (10^5 units/mg – Sigma 62970-5G-F). Sau khi ủ 2 giờ ở nhiệt độ 37°C , quá trình loại bỏ tế bào và thu nhận phần dịch thể cũng giống như các thao tác tiến hành với acetone ở thí nghiệm 2.

Thí nghiệm 4: phá thành tế bào vi khuẩn bằng hỗn hợp mutanolysin (Cole, Djordjevic et al. 2008). 3ml dịch vi khuẩn sau khi ly tâm loại bỏ PBS được thêm 250 μl SDS 1%. Sau đó, hỗn hợp mutanolysin (1 ml TES buffer, 100 μl lysozyme (100 mg/ml in TES), 50 μl mutanolysin (5000 U/ml in 0.1M K_2HPO_4 , pH6.2) được bổ sung với tỷ lệ 2:1 và ủ trong 2 giờ ở 37°C . Dịch thể trước khi loại bỏ tế bào được kết hợp với quá trình dùng sóng siêu âm (như ở thí nghiệm 1) trước khi bổ sung hỗn hợp mutanolysin.

Thí nghiệm 5: thành tế bào của vi khuẩn *S.iniae* được phá hủy bằng acetone, hoặc lysine, hoặc mutanolysine một cách đơn lẻ. Sau đó quá trình loại bỏ tế bào và thu phần dịch thể cũng được tiến hành giống như ở các thí nghiệm đã đề cập ở trên.

Phân tách protein bằng SDS-PAGE

5 μ l của mẫu đã tiến hành ở các thí nghiệm được làm nóng ở nhiệt độ 98°C trong 20 μ l 0.1 M β -mercaptoethanol và ủ trong khoảng 12 phút, sau đó các dịch thể này được đưa vào giếng để chạy điện di acrylamide (12%, 200V trong 50 phút) trên hệ thống Mini Protean II xi slab cell (Bio-Rad). Polyacrylamide Gel được tiến hành nhuộm bạc theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Polyacrylamide Gel Silver Staining – BioRad)

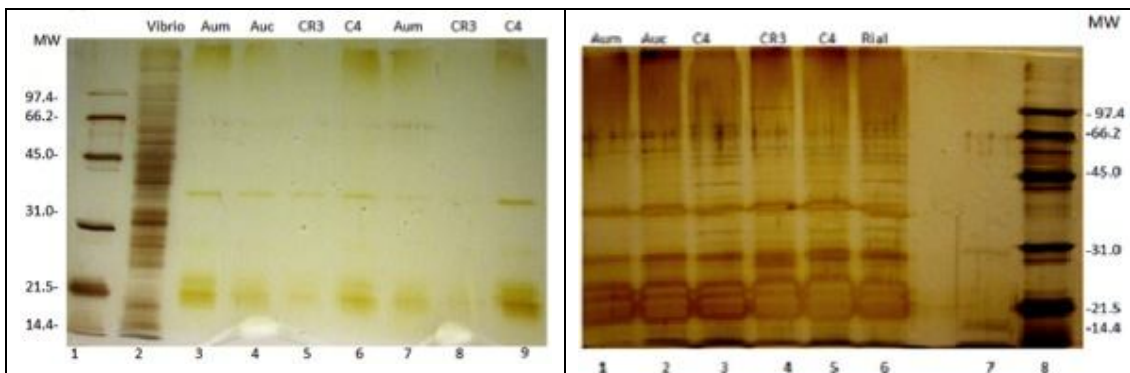
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu này tiến hành so sánh các phương pháp phá hủy thành tế bào của vi khuẩn *S.iniae* phân lập từ cá chêm (*Lates calcarifer*), cụ thể là xử lý bằng acetone, lysine, mutanolysine và dùng sóng siêu âm hoặc kết hợp 3 phương pháp với sóng siêu âm. Hiệu quả của việc phá vỡ màng tế bào được đánh giá dựa trên kết quả phân tách protein bằng SDS-PAGE.

So sánh kết quả các thí nghiệm đơn lẻ

Kết quả thí nghiệm 1 được thể hiện trên hình 1 cho thấy sự phân tách protein trên bảng gel của các dịch tế bào vi khuẩn đã qua xử lý ở thí nghiệm 1 theo quy trình của vi khuẩn *Vibrio*, dùng sóng siêu âm và chuyển động của các hạt thủy tinh. Kết quả thể hiện việc phân tách protein sau khi điện di bằng SDS-PAGE của các vi khuẩn *S. iniae* có ký hiệu chủng là Au_m, Au_c, CR₃, C₄ đã không cho ra hình ảnh các vạch trên bảng gel trừ nhóm vi khuẩn đối chứng *Vibrio* (Hình 1 cột 2). Theo xử lý mẫu đối với vi khuẩn Gram âm *Vibrio* thì kết quả cho thấy phương pháp này đã không phù hợp để phân tách protein.

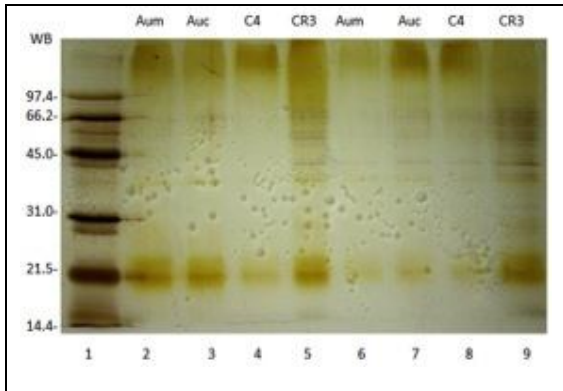
Với việc tăng thời gian làm nóng trong điều kiện có chứa 0.1 M β -mercaptoethanol cũng đã không cho kết quả khả quan hơn. Kết quả đã cho thấy vi khuẩn *Vibrio* (vi khuẩn Gram âm) đã phân tách protein rất tốt với phương pháp xử lý mẫu của Laemmli, trong khi đó phương pháp này đã không thành công với nhóm Vi khuẩn Gram dương *S. niae*.



Hình 1. SDS-PAGE phân tách protein của *Vibrio*, Au_m, Au_c, CR₃, C₄. Thành tế bào được phá hủy từ việc chuẩn bị mẫu bằng sự va đập của các hạt thủy tinh và sóng điều âm (cột 4, 5 and cột 8, 9), bằng cách giữ lạnh 30 phút (cột 3 và cột 6, 7), *Vibrio* (vi khuẩn Gram âm) (cột 2). Cột 1 là maker proteins (MW, kDa). Mẫu được làm nóng với 0.1 M β -mercaptoethanol trong 6 phút (cột 1,2,3,4,5,6 và 12 phút (cột 7,8,9).

Hình 2. SDS-PAGE phân tách protein của những mẫu vi khuẩn xử lý thành tế bào vi khuẩn bằng acetone-SDS với Au_m (cột 1), Au_c (cột 2), C₄ (cột 3, 5), CR₃ (cột 4), R_{ia}I (cột 6). Chỉ acetone-SDS chạy ở cột 7 và cột 8 là maker proteins (molecular weight MW, kDa).

Phân tách protein của các chủng vi khuẩn *S. iniae* có ký hiệu chủng Au_m, Au_c, C₄, CR₃, R_{ia}I chuẩn bị bằng acetone-SDS thể hiện kết quả phân tách protein bằng SDS-PAGE trên Hình 2. Nhìn chung, sự thể hiện các vạch protein trên bảng gel rất là mờ nhạt. Mặc dù phương pháp này cũng đã thành công cho một số nhóm vi khuẩn Gram dương trong những nghiên cứu trước đây như là *Staphylococcus aureus*, , *Bacillus cereus*, và vi khuẩn Gram âm *Escherichia coli* (Bhaduri and Demchick 1983), tuy nhiên, với kết quả thể hiện trên Hình 2 cho thấy phương pháp thử nghiệm với aceton-SDS đã không thành công cho thành tế bào của vi khuẩn Streptococci.

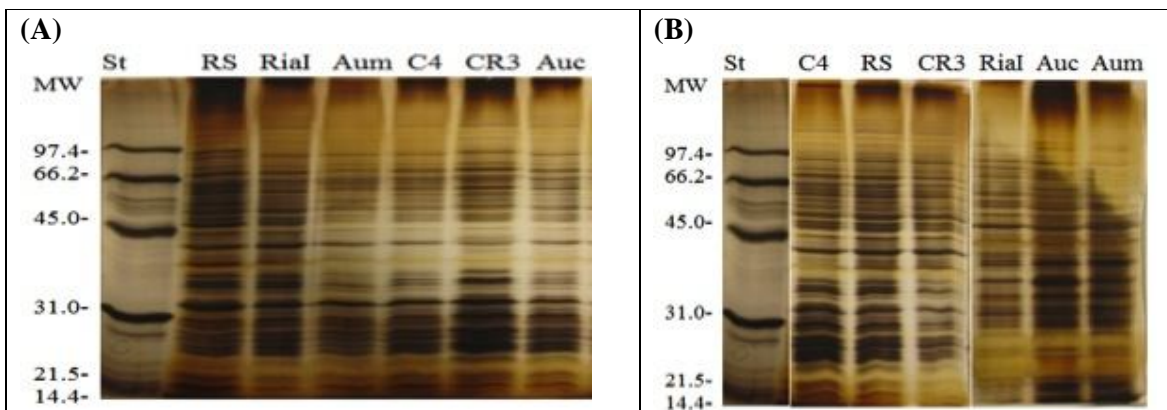


Hình 3. SDS-PAGE phân tách protein của những mẫu vi khuẩn xử lý thành tế bào vi khuẩn bằng lysine với Au_m (cột 2, 6), Au_c (cột 3, 7), C₄ (cột 4, 8), CR₃ (cột 5, 9). Cột 1 là maker proteins (MW, kDa). Tỷ lệ mẫu và buffer là 1:1 (cột 2,3,4,5) và tỷ lệ mẫu và buffer là 1:2 (cột 6,7,8,9).

Mặc dù, theo một số báo cáo trước đây thì thành tế bào vi khuẩn không bền với lysine, nhưng thử nghiệm bằng lysine, việc xử lý mẫu vi khuẩn *S. iniae* đã không chỉ ra những vạch protein của vi khuẩn rõ ràng trên bảng gel (Hình 3). Chứng tỏ, đối với vi khuẩn *S. iniae* được xử lý trong thí nghiệm 3 cho thấy thành tế bào không thể bị tác động bởi lysine.

Qua kết quả bảng gel của hình 4, và 5 cho thấy các vạch protein của những mẫu được xử lý bằng sóng siêu âm hoặc mutanolysin là rõ ràng hơn cả. Phần phân tách protein. Qua kết quả bảng gel của hình 4, và 5 cho thấy các vạch protein của những mẫu được xử lý bằng sóng siêu âm hoặc mutanolysin là rõ ràng hơn cả. Phần phân tách protein của vi khuẩn *S. iniae* ở thử nghiệm bằng mutanolysin đơn lẻ cho kết quả các vạch protein trên bảng gel rõ

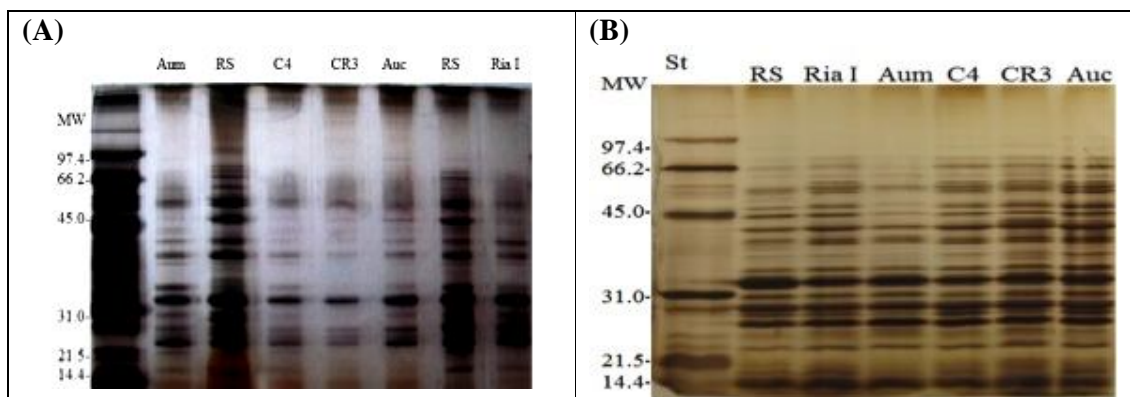
ràng hơn so với kết quả của việc kết hợp mutanolysine với sóng siêu âm (Hình 4, 5). Qua kết quả chạy điện di SDS-PAGE cho thấy vị trí của những vạch protein của các mẫu là tương tự nhau trong khoảng từ 10 đến 100kDa và chỉ khác nhau về cường độ của chúng (Hình 4). Với tỷ lệ của buffer và mẫu cao hơn cho ra kết quả phân tách protein của vi khuẩn rõ nét hơn ở tỷ lệ thấp (Hình 5).



Hình 4. SDS-PAGE phân tách protein của những mẫu vi khuẩn xử lý thành tế bào vi khuẩn bằng mutanolysin (A) và bằng sóng siêu âm (B). Cột St (standard) là maker proteins (MW, kDa).

So sánh kết quả các thí nghiệm kết hợp

Kết quả của việc kết hợp các phương pháp khác nhau ở các thử nghiệm cũng được chỉ ra trên Hình 4 và Hình 5. Kết quả cho thấy việc xử lý mẫu khi kết hợp sóng siêu âm với lysine phá vỡ thành tế bào tốt hơn là lysine hoặc sóng siêu âm hoạt động đơn lẻ. Hỗn hợp mutanolysin trong thí nghiệm 4 cũng chỉ ra được sự thể hiện những vạch protein rõ ràng trên gel và tốt hơn là việc kết hợp mutanolysin và sóng siêu âm (Hình 4). Và với tỷ lệ mẫu và buffer càng cao thì độ rõ nét của các vạch protein trên bảng gel được thể hiện.



Hình 5. SDS-PAGE phân tách protein của những mẫu vi khuẩn xử lý thành tế bào vi khuẩn bằng mutanolysin kết hợp với sóng siêu âm (A) tỷ lệ mẫu với buffer là 2:1 (B) và tỷ lệ cao hơn của mẫu và buffer là 4:1. Cột St (standard) là maker proteins (MW, kDa).

Tóm lại, từ kết quả so sánh các thử nghiệm phá vỡ màng tế bào vi khuẩn theo kiểu đơn lẻ hoặc kết hợp thì hỗn hợp mutanolysin hoạt động đơn lẻ vẫn cho ra kết quả tốt hơn cả. Chính vì vậy, nghiên cứu này cho thấy hỗn hợp mutanolysin có thể phá vỡ cấu trúc thành tế bào để phân tách protein bằng SDS-PAGE.

Sở dĩ phá vỡ thành tế bào bằng mutanolysin cho hiệu quả tốt có thể là do mutanolysin đã tác động lên cấu trúc thành tế bào vi khuẩn *S. iniae*. Như đã biết, cấu trúc thành tế bào của vi khuẩn Gram dương khác với vi khuẩn Gram âm ở lớp peptidoglycan rất dày và không có lớp màng ngoài. Thành tế bào vi khuẩn được cấu tạo từ các đơn phân murein (còn gọi là peptidoglycan hay glucopeptit). (Ton-That, Marraffini et al. 2004). Peptidoglycan là loại polyme xốp, khá bền vững, cấu tạo bởi 3 thành phần N-Acetylglucosamin (G), Acid N-Acetylmuramic (M) và tetrapeptid chứa cả D- và L- acid amin.

Mỗi liên kết giữa các chất trong đơn phân: G và M liên kết với nhau bởi liên kết 1-4 β glucozit. Các axit amin liên kết với nhau và liên kết với M bởi liên kết peptit. Các đơn phân liên kết với nhau để tạo lớp thành vững chắc. Giữa M của đơn phân này với G của đơn phân kế tiếp cũng liên kết với nhau bởi liên kết 1-4 β glucozit tạo thành liên kết chuỗi dọc của thành tế bào. Liên kết 1-4 β glucozit bị enzyme lysosine cắt đứt, do đó thành tế bào bị thủy phân bởi lysosine. (Heijenoort 2001). Chức năng chính của màng tế bào chính là lớp vỏ bao bọc ngoài và thẩm thấu. Thành tế bào duy trì cho các tế bào vi khuẩn có hình dáng xác định và còn đóng vai trò không thể thiếu trong việc vận chuyển protein đến bề mặt tế bào (Sjöquist, Movitz et al. 1972; Navarre and Schneewind 1999). Hầu hết thành tế bào của vi khuẩn Gram dương không có khả năng bền với sự phân hủy của lysozyme (Chassy and Giuffrida 1980). Nên trong các thử nghiệm lysosine được dùng để phá vỡ thành tế bào vi khuẩn.

Mutanolysin, là một loại muralytic enzyme được chiết suất từ *Streptomyces globisporus* 1829 khi phá vỡ liên kết β -1,4 của N-acetylglucosamine trong cấu trúc glycan của peptidoglycan-polysaccharide polymer, một cấu trúc có độ bền cao bảo vệ màng tế bào vi

khuẩn (Yokogawa 1975). Mặc dù mutanolysin cũng là loại enzyme chuyên biệt giống như lysin, nhưng nó có phổ hoạt động với lớp peptidoglycan-polysaccharide rộng hơn hẳn thậm chí tác động đến cấu trúc thành tế bào của các chủng vi khuẩn có sức bền với lysozyme như là *Streptococcus pyogenes* (nhóm A streptococcus), 1 loại vi khuẩn gây bệnh phổ biến ở người. Chính vì vậy mà phương pháp sử dụng mutanolysin được sử dụng để xử lý thành tế bào của vi khuẩn *S. iniae* được lựa chọn trong thử nghiệm này. Và kết quả đã cho thấy việc phân tách protein bằng SDS-PAGE theo phương pháp này đã thành công.

Những nghiên cứu về protein và kháng thể của *S. iniae* còn rất hạn chế. Việc phân tách protein ở các nghiên cứu trước họ cũng từng xử lý bằng sóng siêu âm nhiều lần hoặc dùng 1 số hóa chất như các thí nghiệm trong các nghiên cứu đã thử và cho ra kết quả việc phân tách protein cũng tương tự như kết quả xử lý mẫu với mutanolysin (Barnes, Young et al. 2003). Ưu điểm của việc xử lý bằng mutanolysin là ổn định và cho ra kết quả rõ ràng.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Sau khi tiến hành nghiên cứu so sánh các phương pháp phá hủy thành tế bào của vi khuẩn *S. iniae* phân lập từ cá chêm (*Lates calcarifer*), cụ thể là xử lý bằng acetone, lysine, mutanolysin và dùng sóng siêu âm hoặc kết hợp 3 phương pháp với sóng siêu âm. Hiệu quả của việc phá vỡ màng tế bào được đánh giá dựa trên kết quả phân tách protein bằng SDS-PAGE. Trong các phương pháp đã được kiểm tra, kết quả của việc phá vỡ màng tế bào vi khuẩn bằng lysine, acetone, sóng siêu âm hoặc kết hợp đều không cho những vạch rõ ràng hoặc không có vạch nào trên băng gel điện di. Trong khi đó, sử dụng mutanolysin cho kết quả tốt nhất với các vạch rõ ràng của chuỗi protein nằm trong khoảng từ 10 đến 100 kDa. Từ những kết quả này sẽ tạo điều kiện cho các nghiên cứu về phân tích kháng nguyên và đáp ứng miễn dịch sau khi tiêm vaccine ở vi khuẩn *Streptococcus iniae* vì vi khuẩn này được xác định là tác nhân gây bệnh xuất huyết cho cá chêm *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) và gây tổn thất lớn cho ngành nuôi trồng thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ames, G. F.-L. (1974). "Resolution of Bacterial Proteins by Polyacrylamide Gel Electrophoresis on Slabs." *JB* C249(2): 634-644.
- Barnes, A. C., F. M. Young, et al. (2003). "Streptococcus iniae: serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing." *Diseases of Aquatic Organisms*53(3): 241-247.
- Brenner D.J., Krieg N.R., Garrity G.M. and Staley J.T., (2005) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2: The proteobacteria, New York, Springer
- Bhaduri, S. and P. H. Demchick (1983). "Simple and rapid method for disruption of bacteria for protein studies." *Appl. Environ. Microbiol.*46(4): 941-943.
- Chassy, B. M. and A. Giuffrida (1980). "Method for the lysis of Gram-positive, asporogenous bacteria with lysozyme." *Appl. Environ. Microbiol.*39(1): 153-158.
- Cole, J. N., S. P. Djordjevic, et al. (2008). Isolation and Solubilization of Gram-Positive Bacterial Cell Wall-Associated Proteins. *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation*. A. Posch, Humana Press. 425: 295-311.
- Deyl, Z. (1983). "Electrophoresis: A survey of techniques and applications. Part B: Applications : Edited by , Elsevier Scientific, Amsterdam/New York, 1983, 462 pp. \$104.00." *Analytical Biochemistry*131(1): 284-284.
- Eldar, A., P. F. Frelief, et al. (1995). "Streptococcus shiloi, the Name for an Agent Causing Septicemic Infection in Fish, Is a Junior Synonym of Streptococcus iniae." *Int J Syst Bacteriol*45(4): 840-842.
- Heijenoort, J. v. (2001). "Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan." *Glycobiology*11(3): 25R-36R.
- Kitao, T. (1993). Streptococcal infections. *Bacterial diseases in fish*. R. J. R. a. N. R. B. In: V. Inglis, Editors, Blackwell, Oxford 196-210.

- Kitao., T. Aoki., et al. (1981). "Epizootic caused by beta-haemolytic Streptococcus species in cultured freshwater fish " *Fish Pathol.*15: 301-307.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature*227(5259): 680-685.
- Navarre, W. W. and O. Schneewind (1999). "Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*63(1): 174-229.
- Perera, R. P., S. K. Johnson, et al. (1994). "Streptococcus iniae Associated with Mortality of Tilapia nilotica x T. aurea Hybrids." *Journal of Aquatic Animal Health* 6(4): 335-340.
- Pier, G. B. and S. H. Madin (1976). "Streptococcus iniae sp. nov., a Beta-Hemolytic Streptococcus Isolated from an Amazon Freshwater Dolphin, Inia geoffrensis." *Int J Syst Bacteriol* 26(4): 545-553.
- Sjöquist, J., J. Movitz, et al. (1972). "Localization of Protein A in the Bacteria." *European Journal of Biochemistry* 30(1): 190-194.
- Ton-That, H., L. A. Marraffini, et al. (2004). "Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*1694(1-3): 269-278.
- Tuan, L. A., N. T. Nho, et al. (2000). *Status of cage mariculture in Vietnam*International Symposium on Cage Aquaculture in Asia, Tungkang, Pintung (Taiwan), 2-6 Nov 1999, Manila (Philippines), AFS; WAS-SC.
- Yokogawa, K. (1975). "Purification and properties of lytic enzymes from Streptomyces globisporus 1829." *Agricultural and biological chemistry*39(8): 1533.