

毛细管电泳在细菌分离分析中的应用*

祝 松 何 进** 喻子牛

(华中农业大学生命科学技术学院农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

摘要:介绍了近年来毛细管电泳技术在细菌分离分析方面的研究进展。毛细管电泳以细菌表面的特征信息为分离的基础,可以快速鉴定相应的菌株,可以对微生物进行快速定量,可以反映细菌特殊时期的生理特征,也可以研究微生物与分子之间的相互作用。同时应用该技术可分离分析自然界不能纯培养的微生物。因而毛细管电泳分离与检测细菌方法的建立及其应用在分离科学和微生物学方面都有很大的实际意义。

关键词:细菌,微生物,毛细管电泳,分离,分析

中图分类号:Q 93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654 (2005) 03-0125-04

Separation and Analysis of Bacteria by Capillary Electrophoresis*

ZHU Song HE Jin** YU Zi-Niu

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: Recent developments on separation and analysis of bacterial cells by capillary electrophoresis are reviewed. Based on bacterial surface characterization, capillary electrophoresis technique can be utilized for rapidly identify and quantify intact bacteria and microbes at a certain phase. The microbe-molecule interactions can also be described. The separation of microbes that can not be cultured in lab appears to be possible by this method. It makes profound effects on separation science and microbiology to establish capillary electrophoresis procedure for the separation and analysis of bacterial cells.

Key words: Bacteria, Microbe, Capillary electrophoresis, Separation, Analysis

毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis, CE) 是泛指以高压电场为驱动力,以毛细管为分离通道,依据样品中各组分之间淌度和分配行为的差异而实现分离的一类分离技术。CE 与传统的平板电泳方法相比,具有分离柱效高、分析速度快、自动化程度高等特点。CE 按分离介质和分离原理不同,具有毛细管区带电泳、胶束电动毛细管色谱、毛细管凝胶电泳、毛细管等电聚焦、毛细管电色谱等多种分离模式,因而 CE 应用范围广。CE 不仅能分离带电荷的高分子物质,也适合离子、中性分子以及细菌等颗粒体的分离。

1 细胞电泳

细菌为胶体颗粒,比表面积极大,而且覆盖着许多物质如多糖类、肽聚糖、脂类等。这些化合物在电泳缓冲液中可因解离和吸附形成双电层,因而 CE 能将细菌当作

* 华中农业大学 2003 年大学生科技创新基金 (No. A093)

华中农业大学人才基金 (No. 03047)

** 通讯作者 Tel: 027-87286846, E-mail: hejin@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2004-08-26, 修回日期: 2004-11-06

“离子”看待^[1,2]。细菌在一定的生理条件下,其表面基团的电离状态和双电层的厚度是电泳缓冲液种类、pH 值、离子强度和温度等参数的函数,可以通过优化这些参数分离不同种类的细菌。细菌在电泳过程中受电场力和摩擦力作用,其迁移时间可作定性的依据,其峰高或峰面积则是定量的基础。CE 理论指出,分离柱效随样品分子扩散系数或分子量的增大而上升,这就预示着 CE 在细胞分离中具有独特的优势。

细胞电泳的研究可追溯到 1902,但发展一直很缓慢。早年进行细胞电泳研究也主要集中在血红细胞方面,可提供细胞大小、形状、表面电荷密度以及特殊组分的存在等物理化学和生理信息,从而为疾病的快速诊断提供依据。

20 世纪 80 年代以来,CE 在细菌分析、分离和鉴定中逐渐得到了运用。1987 年 Hjerten 等展示了 CE 在细菌和病毒分析方面的前景,他们成功地分离了干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)^[2]。1988 年 Uhlenbruck 等人首次利用 CE 方法对细菌进行了分类^[2,3]。与此同时,Ebersole 和 McCormick 用 CE 对粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*),化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*),无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*),肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 5 种细菌进行了分离,发现不同发育阶段的菌体细胞对应着不同的特征峰,而且大多数细菌在电泳后仍能保持活体状态^[3]。

CE 以细菌表面的特征信息为分析分离的基础,因而 CE 能反映细菌的特征信息,如基因表达产物在表面积累(表面展示),特殊时期生理特征。同时活体细菌在线检测可为微生物分析提供新的快速分析方法。所以建立 CE 分离和检测细菌的方法在分离科学和微生物学方面有很大的理论和实际意义。

2 细菌电泳分离与应用

细菌电泳在实际操作中要获得很好的准确性和重现性有一定难度。主要原因是细菌表面状况因培养条件的不同而有差异;其次在电泳过程中,有些细菌细胞可能会破碎;同时细菌的代谢产物在表面的积累或释放对电泳缓冲液也有影响;此外,细菌还可能在生长过程中形成紧密相连的聚合体。因此,细菌电泳的关键在于细菌的培养、缓冲液的选择及样品的前处理等。

2.1 电泳条件的探索 Pfetsch 和 Welsch^[4]采用 HCl-NaCl 溶液、磷酸缓冲液及 Tris-硼酸盐-EDTA 缓冲液(TBE 缓冲液)3 种电解质溶液在内径为 250 μm 的毛细管内对 CE 分离细菌的条件作了探索,确定了适宜的电泳条件参数:溶液离子强度为 1.5 mmol/L, pH 值在 7~10 范围内,电场强度为 120 V/cm。在此条件下,他们成功地分离了恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、史氏甲烷短杆菌 (*Methanobrevibacter smithii*) 和真养产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*) 3 种细菌。Glynn 等^[5]以 10 mmol/L 的 3-(N-吗啡啉-丙磺酸)溶液(pH 7.02)作为电泳缓冲液,在电场强度为 350 V/cm 条件下,高效地分离了 3 种细菌。Torimura 等^[6]采用 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0),在电泳电场强度为 125 V/cm 时,确定了大肠杆菌 (*E. coli* K-12)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens* TN-5) 的电泳迁移率和离子强度(19~227 mmol/L)之间的关系。Dai 等^[7]研究了影响大肠杆菌电泳重现性的各种关键因素,同时考察了细菌保存方法和进样前处理对电

泳结果的影响。

上述报道均采用毛细管区带电泳分析模式, 并使用温和的低浓度电解质溶液。这样细菌可以保持较高的存活率, 但分离柱效并不高。表现在电泳图峰较宽, 并且图谱中有一些随机出现的刺状峰。而样品经适当的超声波处理后有所改善。这表示细菌有不同程度的聚集, 聚集数目和状态的不同导致电泳迁移率相差很大。这些问题给细菌分离带来很大的麻烦。Armstrong 研究组^[8-12]发现在 1 mmol/L 的 TBE 电泳缓冲液中加入 0.0125% ~ 0.0250% 的中性高聚物聚环氧乙烷 (PEO, 分子量在 60,000 ~ 100,000 之间) 可使分离柱效提高到每米 1,000,000 理论塔板数。

细菌表面既包含正电荷基团又包含负电荷基团, 因而细菌可被看成两性物质。Armstrong 等^[8]首次将毛细管等电聚焦技术用于细菌的分析分离, 能在 18min 内将 *E. coli*、*P. putida*、和深红沙雷氏菌 (*Serratia rubidae*) 很好地分离, 得到每米 1,600,000 理论塔板数的极限分离柱效。与常规等电聚焦相比, 昂贵两性电解质的微量消耗和高效分离效果是其引人注目的优点。但这种方式不能保证电泳分离后细菌的活性。

2.2 电泳中细菌聚集机制的研究 Girod 和 Armstrong^[13]运用激光诱导荧光检测系统及 CCD 成像系统在优化条件下观察到细菌和酵母在 TBE-PEO 缓冲液中电泳时的聚集现象, 证明了窄峰是由聚集引起的。对于电泳过程中细菌形成聚集带的机制, Zheng 和 Yeung^[14]进行了详细的研究。应用激光诱导荧光成像技术, 他们用装有 CCD 的显微镜在线观察和拍摄了方形毛细管中婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*) 的聚集动态。发现杆状细菌运动方向, 缓冲液的离子强度、电场强度、添加剂等因素对聚集体的大小和形成速度有不同程度的影响。而且他们对 Armstrong 所用的 TBE-PEO 缓冲液体系作用作了合理的解释。一般情况下, 多糖、肽聚糖通过多价阳离子如 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 松散地结合在细菌表面。由于 TBE 缓冲液中 EDTA 对钙镁离子高特异性的络合作用, 使得革兰氏阳性菌的肽聚糖或革兰氏阴性菌脂多糖释放, 这样就降低了细菌表面的疏水性和细胞之间的短程疏水相互作用力, 因而细菌之间的粘附降低。同时硼酸根离子和糖残基的相互作用, 引入了额外的电荷, 增大了细菌间的斥力, 从而阻碍细菌聚集。因此, 细菌聚集速度随着 TBE 缓冲液浓度的增加而减小。而 PEO 的加入部分屏蔽了细菌表面电荷, 减弱了硼酸根离子和 EDTA 对细菌表面的作用力, 并在细菌间架桥形成由非共价键介导的“亚聚体”。由于电渗流与细菌在电场中运动方向相反, 使得同种细菌形成聚焦, 从而得到极窄的区带, 获得罕见的高分离柱效。

2.3 毛细管电泳技术在细菌分离分析方面的应用 与常规稀释纯培养分离计数等费时费力的操作相比, CE 检测法快速、自动化程度高的优点使其具有较大的实际应用价值。微生物与分子之间的相互作用近年来已成为细菌电泳研究的主要内容。下面是几个典型的例子:

Yamada 等^[15]分别采用毛细管区带电泳和毛细管凝胶电泳两种模式对单独和混合培养的强壮纤维单胞菌 (*Cellulomonas cartae*) 和根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 进行了分离。以荧光染色密度法作对比, 细菌数在每毫升 10^{10} ~ 10^{13} 范围内峰面积与细菌浓度呈良好的线性关系。混合菌液经电泳分离后分别收集, 经毛细管区带电泳分离后两种菌纯度均在 90% 以上, 而经毛细管凝胶电泳分离后纯度均达 98% 以上。

该研究为混合菌株发酵过程中生物量实时监控提供了可靠的依据。

Torimura 等^[6]的研究表明,通过二极管阵列检测器在不同波长处分别检测 *E. coli* K-12 和 *P. fluorescens* TN-5 与底物发生氧化还原反应时电子受体浓度的变化,可在线检测细菌的代谢活性。他们还研究了多粘菌素 E、氧氟沙星和 KCN 对 *E. coli* K-12 代谢活性的影响。这些研究工作的展开为研究微生物与分子之间的相互作用提供了一种巧妙的平台,同时也为从混合菌样中选择分离目标微生物提供了新的途径。

在 Armstrong 研究组的工作中,以 TBE-PEO 缓冲液体系从人尿样中快速检测到引起尿路感染的病原菌腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*) 和 *E. coli* 23501^[10]。粉状奶制品添加物中的活性菌婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*) 和药片中的嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 也能快速定性定量分析^[11]。不仅如此,他们通过对细菌进行荧光染色,应用激光诱导荧光检测器,可将细菌的鉴定、浓度的测定和生理状态的检测在十几分钟内的一次电泳中实现^[12]。

3 展望

细菌 CE 技术既是电泳分离技术的进步,又是分析仪器运用的创新。根据研究目的的不同,细菌 CE 技术可有很大改进和延伸空间。既要建立广泛通用的方法平台,又要根据样品的特殊性采取不同的前处理方法和选择不同的添加物。从应用前景来看,该技术提供了即时在线快速诊断病原菌的可能性,还可用于药物的快速筛选和部分药物的代谢动力学研究。同时由于电泳分离过程中大部分细菌保持活性,使不能纯培养的细菌的分离分析成为可能。在分析科学、计算机及自动化技术的共同发展促成分析仪器技术日益成熟的时代,仪器分析技术渗透于生命科学各个领域,将对实验思路和研究方法产生不可估量的影响。

参考文献

- [1] Mehrishi J N, Bauer J. Electrophoresis, 2002, **23**: 1984 ~ 1994.
- [2] Kremser L, Blaas D, Kenndler E. Electrophoresis, 2004, **25**: 2282 ~ 2291.
- [3] Desai M, Armstrong D W. Microbiol Mol Biol R, 2003, **67**: 38 ~ 51.
- [4] Pfetsch A, Welsch T, Fresen J. Anal Chem, 1997, **359**: 198 ~ 201.
- [5] Glynn J R, Belongia B M, Arnold R G, et al. Appl Environ Microbiol, 1998, **64**: 2572 ~ 2577.
- [6] Torimura M, Ito S, Kano K, et al. J Chromatogr B, 1999, **721**: 31 ~ 37.
- [7] Dai D S, Chen Y, Qi L, et al. Electrophoresis, 2003, **24**: 3219 ~ 3223.
- [8] Armstrong D W, Schulte G, Schneiderheinze J M, et al. Anal Chem, 1999, **71**: 5465 ~ 5469.
- [9] Schneiderheinze J M, Armstrong D W, Schulte G, et al. FEMS Microbiol Lett, 2000, **189**: 39 ~ 44.
- [10] Armstrong D W, Schneiderheinze J M. Anal Chem, 2000, **72**: 4474 ~ 4476.
- [11] Armstrong D W, Schneiderheinze J M, Kullman J P, et al. FEMS Microbiol Lett, 2001, **194**: 33 ~ 37.
- [12] Armstrong D W, He L. Anal Chem, 2001, **73**: 4551 ~ 4557.
- [13] Girod M, Armstrong D W. Electrophoresis, 2002, **23**: 2048 ~ 2056.
- [14] Zheng J J, Yeung E S. Anal Chem, 2002, **74**: 4536 ~ 4547.
- [15] Yamada K, Torimura M, Kurata S, et al. Electrophoresis, 2001, **22**: 3413 ~ 3417.