

琼脂扩散溶血试验测定嗜水气单胞菌 HEC 毒素的溶血价*

朱杰青 吉传义 陆承平**

(南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘要:建立琼脂扩散溶血试验用以测定嗜水气单胞菌 HEC 毒素的溶血价,同时与分光光度法及微量溶血试验进行比较。结果表明琼脂扩散溶血试验所测溶血价滴度要高于前两种方法。而且重复性好,结果易于判定。

关键词:嗜水气单胞菌,HEC 毒素,溶血价,测定

中图分类号:Q58.605 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-053-04

MEASURE OF THE HEMOLYTIC TITER OF HEC TOXIN PRODUCED BY *AEROMONAS HYDROPHILA* BY AGAR DIFFUSIVE HEMOLYSIS TEST

ZHU Jie-Qing JI Chuan-Yi LU Cheng-Ping

(Animal Medicine College of Nanjing Agric Univ Nanjing 210095)

Abstract: A new method agar diffusive hemolysis test (ADHT) was established to measure the hemolytic titer of HEC toxin produced by *Aeromonas hydrophila*. The ADHT had also been compared with the spectrophotometry and the microhemolyses test. The results show that the hemolytic titer detected by ADHT was higher than the former methods and the ADHT was characterized by better and more easily determined.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, HEC toxin, Hemolytic titer, Measure

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)能引致多种动物的败血症。大多数致病性 Ah 都能产生外毒素,而且这些外毒素多具有溶血活性^[1]。陈怀青等从发病鲫鱼分离到一株 Ah,命名为 AhJ-1^[2],涂小林等对 AHJ-1 产生的外毒素进行提纯和特性分析,证明其为单一分子量的多肽且具有溶血性(Hemolytic activity)、肠毒性(Enterotoxicity)和细胞毒性(Cytotoxicity),因此定名为 HEC 毒素 HEC^[3]。测定 AhJ-1 HEC 毒素的溶血价可以评价 Ah 的毒素产量和菌株毒力,具有一定的生产应用意义。

目前对 HEC 毒素溶血价的测定有分光光度法和微量溶血试验两种^[3]。两种方法都是在液相体系中进行,所用红细胞溶液不能长期储存,必须现配现用,而且常受非特异溶血的干扰。本试验建立琼脂扩散溶血试验,用琼脂血平板测的溶血价,同时与其它两种方法进行了比较。

1 材料与方 法

1.1 Ah HEC 毒素产物的提取

经复壮后的 AhJ-1 株接种于改良的产毒素培养基^[4],置 28℃ 水浴摇床培养 48h。培养物经

* 家九五攻关子课题(No. 96-005-03-01)

** 通讯作者

收稿日期:1999-09-08,修回日期:2000-01-26

500r/min 离心 30min, 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌得 HEC 毒素产物。

1.2 HEC 毒素溶血价的测定

1.2.1 分光光度法^[5]: 用 50mmol/L pH7.8 的 Tris-HCl 生理盐水缓冲液洗涤正常人 O 型红细胞 3 次, 用该缓冲液配制 1% 的红细胞悬液。HEC 毒素产物 Tris-HCl 生理盐水缓冲液信比稀释, 加入等体积的 1% 红细胞悬液, 37℃ 作用 1 h。5000r/min 离心 10min 取上清测 A₅₄₅ (OD 值, 下同)。同时以热灭活的 HEC 毒素作阴性对照, 以 Tris-HCl 生理盐水缓冲液为空白对照。溶血标准曲线以蒸馏水溶解的同样量红细胞悬液制作。被检样品的溶血价以能产生 50% 溶血的最高稀释度表示。

1.2.2 微量溶血试验: 在 96 孔板上用 Tris-HCl 生理盐水缓冲液将 HEC 毒素产物倍比稀释, 加入等体积的 1% O 型红细胞悬液, 37℃ 作用 1h, 同时以热灭活的 HEC 毒素产物为阴性对照, 以 Tris-HCl 生理盐水缓冲液为空白的对照。溶血价以能产生 50% 溶血的最高稀释倍数表示。

1.2.3 琼脂扩散溶血试验: 用 Tris-HCl 生理盐水缓冲液配制 1% 琼脂溶液, 1.05×10⁵Pa 高压蒸汽灭菌 15min, 待冷却至 40℃ 左右加入用灭菌 Tris-HCl 生理盐水缓冲液洗涤过的 O 型红细胞, 使红细胞终浓度为 3%, 混匀后倾注灭菌平板, 厚度约 3mm。待琼脂凝固后打孔, 孔径 0.5cm。用灭菌 Tris-HCl 生理盐水缓冲液将 HEC 毒素产物倍比稀释, 加入上述血平板的孔中, 50μL/孔, 同时以热灭活的 HEC 毒素产物为阴性对照, 以灭菌 Tris-HCl 生理盐水缓冲液作空白对照。血平板置 37℃ 湿盒中扩散 24h。以能够产生溶血环的最高稀释度作为溶血价。

2 结果

2.1 分光光度法与微量溶血试验

分光光度法所测结果列于表 1。以稀释度为横坐标, A₅₄₅ 为纵坐标作被检样品的溶血曲线(图 1)。以溶血量为横坐标, A₅₄₅ 为纵坐标作溶血标准曲线(图 1)。50% 红细胞溶解对应的 A₅₄₅ 为 0.587, 因此被检 HEC 毒素产物的溶血价应 16(对应 A₅₄₅ 为 0.953)与 32(对应 A₅₄₅ 为 0.534)之间。微量溶血试验测定的 HEC 毒素产物溶血价为 16。

表 1 分光光度法测定 HEC 毒素的溶血价

稀释度	HEC 毒素溶血 A ₅₄₅	溶血量(%)	标准溶血量对应 A ₅₄₅
2	1.097	100	1.101
4	1.094	90	1.006
8	1.071	80	0.915
16	0.953	70	0.817
32	0.534	60	0.697
64	0.057	50	0.587
128	0.011	40	0.506
256	0.018	30	0.362
512	0.015	20	0.248
1024	0.021	10	0.147
NC	0.000	0	0.000
PC	0.000	—	—

表 2 琼脂扩散溶血试验测定 HEC 毒素的溶血价

稀释度	溶血环直径(cm)
2	1.10
4	1.00
8	0.90
16	0.80
32	0.70
64	0.60
128	N
256	N
512	N
1024	N
NC	N
PC	N

注: NC 阴性对照, PC 空白对照

注: NC 阴性对照, PC 空的对照, N 无溶血现象

2.2 琼脂扩散溶血试验

测量每一稀释度所产生的溶血环直径列于表2,以稀释度为横坐标,溶血环直径为纵坐标作溶血曲线(图1),由曲线可以看出溶血环直径的大小与稀释度呈线性关系。能产生溶血环的最高稀释度为64(溶血环直径>0.5cm),所以被检 HEC 毒素的溶血价为64。

3 讨论

用营养琼脂血平板划线培养检测细菌产溶血素特性的方法早已有之,但这方法不能测定溶血价的大小。目前测定溶血价的方法有分光光度法和微量溶血试验两种,这两种方法都是在液相体系中进行,其特点是操作简单,所需时间短,而且分光光度法结果判定较为客观。但这两种方法往往受非特异性溶血干扰,影响结果判定的可靠性,并且所用红细胞必须现配现用,不能长期保存,是为不足之处。本试验用琼脂血平板测定溶血价,将红细胞置于半固体体系中,待检样品在平板上进行扩散溶血,不会受非特性溶血的干扰。而且该方法结果判定更加直观,其敏感性和特异性都优于上述两种方法。所用的琼脂血平板在4℃可存放至少3周而不出现自溶现象,这样便省去了每次洗涤和配制红细胞悬液的步骤。由图1曲线可知溶血环直径的大小与稀释度(毒素含量)呈线性关系,因此也可以用溶血环直径的大小直接表示毒素含量的多少。琼脂扩散溶血试验测定的是存在于细菌培养上清中的溶血素,因此凡是能够产生非细胞结合型溶血素的细菌都可用该方法测定其溶血价。

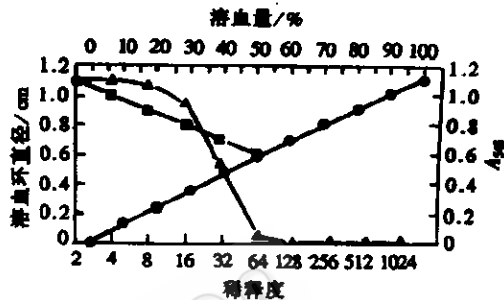


图1 HEC毒素溶血曲线

—■—琼脂扩散实验测定的溶血曲线,--▲--分光光度法测定的溶血曲线,--●--溶血标准曲线

参 考 文 献

- [1] 陈怀青,陆承平.淡水渔业,1994,24(特刊):106~108.
- [2] 陈怀青,陆承平.南京农业大学学报,1991,14(4):87~91.
- [3] 涂小林,陆承平.微生物学报,1992,32(6):432~438.
- [4] 陈怀青,陆承平,赵首.南京农业大学学报,1993,16(增刊):85~87.
- [5] 廖延雄.兽医微生物实验诊断手册.北京:中国农业出版社,1995,292.