

# 葡萄球菌类毒素的组成\*

王保云 冯玉珍 王淑华

(黑龙江省应用微生物所, 哈尔滨)

葡萄球菌细胞外代谢产物的研究, 多年来大部分集中在毒素及个别酶方面<sup>[1-4]</sup>。证明了 $\alpha$ -溶血素有溶血、皮肤坏死、致死、平滑肌麻痹等作用; 杀白血球素能破坏白血球。目前认为这是

葡萄球菌的主要致病因子。关于葡萄球菌胞外蛋白质的组成国外已有研究<sup>[5,6]</sup>, 但国内尚未见报道。我们利用琼脂双扩散、薄层聚丙烯酰胺凝胶聚焦电泳(简称薄层凝胶聚焦电泳)、免疫

\* 薄层凝胶扫描承黑龙江省药检所李国忱同志协助, 特致谢。

电泳等方法,对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) S<sub>155</sub> 产生的葡萄球菌类毒素<sup>[7]</sup>进行了有效组分的探讨及组成分析。

## 材料与方 法

1 葡萄球菌类毒素的制备: 见文献[7]。

2. 抗毒素的制备: 抗原为解毒好的葡萄球菌外毒素滤液, 与不完全福氏佐剂按 2:1 混合(体积比), 免疫家兔注射剂量为 0.5—2ml。注射部位为胫窝、皮下、肌肉。每隔 10 天注射一次, 共三次, 末次注射后 10 天试血, 效价达 1:256 以上者, 由颈动脉放血, 搜集血清。

3. 国际标准  $\alpha$ -溶血素抗毒素(简称 S.A.A.) 来自世界卫生组织。

4. 国际标准杀白血球素抗毒素(简称 S. L. A.) 来自世界卫生组织。

5. 两性电解质: pH3.5—10, LKB 产。

6. 葡萄球菌类毒素样品含量用 Bradford, M. M. 法测定<sup>[8]</sup>。

7. 薄板扫描装置: 用 CS-910 Shimduz。

8. pH 测定: 用 ZD-2 型自动电位滴定计。上海第二分析仪器厂。

9. 琼脂双扩散: 参照 Ouchterlony 的方法<sup>[9]</sup>。

10. 免疫电泳: 参照 Righetti 的方法<sup>[10]</sup>。将薄层凝胶聚焦电泳后切下 10mm 宽的胶条, 放于 100 × 200mm 玻片上, 与抗体槽模型平行放好, 距抗体槽 5mm, 铺琼脂凝胶, 厚度为 1.5 mm。待冷后挖出抗体槽模型加入抗体, 放室温 2—3 天后出现沉淀带。

11. 薄层凝胶聚焦电泳: 参照刘培楠<sup>[11]</sup>和 Righetti 的方法测定。凝胶浓度为 5.2%, 两性载体浓度为 2%, 用光聚合法制备凝胶板。

将凝胶灌入凝胶模型中, 用日光灯照射 1 小时, 样品加在 5 × 10 mm 的醋酸纤维膜上, 点上 400 $\mu$ g 的葡萄球菌类毒素。样品放在凝胶板上距正极端 3cm 处, 然后将凝胶板倒放在电泳槽中, 以滤纸搭桥, 盖好, 接通电源, 恒压 400 V, 4℃ 下电泳, 聚焦 12 小时。电泳后切下一条 0.6cm 宽的凝胶条, 再将此凝胶条切成 0.5cm

长的胶块, 按顺序分别投入 2ml 的蒸馏水中浸泡过夜, 测定 pH 值。绘制 pH 梯度曲线(距离为横坐标, pH 值为纵坐标), 余下的凝胶条做免疫电泳和固定染色。

## 结 果

### 一、琼脂双扩散

1. 葡萄球菌类毒素与其抗毒素做琼脂双扩散可出现三条沉淀线。分别与 S.A. A.、S.L.A. 做琼脂双扩散, 各出现一条沉淀线(图版 I abc)。

2. 葡萄球菌类毒素与其抗毒素和 S. A. A. 做琼脂双扩散, 出现一条融合带。与其抗毒素和 S. L. A. 做琼脂双扩散亦出现一条融合带(图版 I de)。

### 二、薄层凝胶聚焦电泳

1. 葡萄球菌类毒素薄层凝胶聚焦电泳(图版 I f), 从图中可以看出 21 条沉淀线。

2. 葡萄球菌类毒素薄层凝胶聚焦电泳后取一宽 0.6cm 胶条做 pH 梯度测定(图版 I g), 从图中可看到一条从阳极到阴极逐渐增高的 pH 梯度曲线。样品带都集中在阳极侧 1—8cm 处, pH 在 4.35—6.35。

3. 葡萄球菌类毒素薄层凝胶聚焦电泳后, 经固定染色在 CS-910 上扫描(图版 I h: 样品波长 556nm, 参比波长 481nm, 光狭缝 0.2(W) × 1.0(H)nm, 吸收量程 0—0.4%, 扫描速度 20mm/min, 纸速 20mm/min), 从图中可以看出至少有 21 个峰。

### 三、免疫电泳

1. 葡萄球菌类毒素经薄层凝胶聚焦电泳后与抗毒素进行免疫电泳, 于阳极侧出现四条沉淀线(图版 I i)。分别与 S. A. A. 及 S. L. A 进行免疫电泳, 各出现一条沉淀线(图版 I jk)

## 讨 论

葡萄球菌类毒素与抗毒素进行琼脂双扩散出现三条沉淀线。图版 I a—e 证明靠近葡萄球菌类毒素的沉淀线为类杀白血球素, 靠近抗毒素的一条为类  $\alpha$ -溶血素, 在类  $\alpha$ -溶血素与类杀白血球素之间又出现一条未知沉淀带。

用薄层凝胶聚焦电泳, CS-910 扫描及免疫电泳法, 确定了葡萄球菌类毒素中至少含有 21 种组分, 其中含有类  $\alpha$ -溶血素和类杀白血球素及两种未知的特异性抗原, 特异性抗原部分的 pH 在 4.35—6.35 之间。

有的学者认为用类  $\alpha$ -溶血素和类杀白血球素混合免疫动物, 在一系列感染灶的实验中观察到, 对具有杀白血球素或  $\alpha$ -溶血素的菌株均有抑制作用。本试验用 S<sub>155</sub> 生产的葡萄球菌类毒素含有类  $\alpha$ -溶血素和类杀白血球素, 故是一种很好的抗葡萄球菌感染的制品。

Six<sup>[12]</sup> 报道经提纯的  $\alpha$ -溶血素, 用 DISK 电泳分析, 可分成 A 和 B 两种类型。最近 Watanabe 得到了结晶的  $\alpha$ -溶血素, 用等电聚焦电泳呈现一条带。

我们认为葡萄球菌类毒素中另外两个未知的特异性抗原, 可能是新抗原, 也可能是某种胞外蛋白质的多分子形式, 此点还有待进一步研

究。

## 参 考 文 献

- [1] Woodin, A. M.: *Biochem. J.* **73**: 225, 1959.
- [2] Watanabe, M. and Kato, I.: *Japan. J. Exp. Med.* **44**(2): 166—178, 1974.
- [3] 野田公俊 氏: 日本细菌学雜誌, **35**(1): 137, 1980.
- [4] 岩田和夫 氏: 日本细菌学雜誌, **21**(8): 411—412, 1966.
- [5] Vesterberg, O. et al.: *Biochim. et Biophys. Acta* **133**: 435—445, 1967.
- [6] Bernheimer, A. M. et al.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **106**, 776, 1961.
- [7] 黑龙江省应用微生物所免疫室: 微生物学报, **18**(2) 165—172, 1978.
- [8] Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.* **72**(1—2): 248—254, 1976.
- [9] Ouchterlong, O.: *Acta. Phth. Microbiol. Scand.* **26**: 507, 1949.
- [10] Righetti, P. G. and J. M. Drysdale,: *Isoelectric Focusing*, 488, 1976.
- [11] 刘培楠等: 仪器分析及其在分子生物学中的应用, 第三册, 科学出版社, 334—338, 1978, 北京。
- [12] H. R. Six, et al.: *Biochemistry*, **12**: 2672—2677, 1973.