

V. 血清学和化学分类

D. Jones 和 N. R. Krieg

血清学和化学分类是研究细菌细胞分子结构的两种方法,尽管用于这两种技术的方法学是很不相同的。

血清学

血清学技术是依靠细菌细胞的化学结构作为抗原的行为的能力,即在脊椎动物中诱导产生抗体的能力。用于血清学研究的抗体是发现在血清中的体液抗体,因而称之抗血清。

使用的血清学技术包括凝聚、沉淀(包括很多精细的改进,如使用凝胶和电泳技术),补体固定和免疫荧光。技术细节可以在很多免疫学或微生物学教科书中找到。

在细菌分类中血清学研究的价值可以分为两大方面:(a)以细胞表面和相联的抗原补体(如鞭毛、纤毛、细胞壁、细胞质膜、荚膜和粘质层)为根据测定细菌之间的相似性或差别;(b)使用纯化的酶产生的抗血清以分析不同细菌的同原蛋白之间的结构相似性。

细胞表面和相联的多种抗原

根据其表面抗原(胞壁脂多糖、鞭毛和荚膜成分)的抗原复杂性,肠杆菌科的诸属可以分为很多血清型,如在沙门氏菌属中已测定出 1000 多血清型(Kauffmann, 1966)。与 Kauffmann (1966) 的意见相反,这些血清型不代表独立的分类种。一个类群,如肠杆菌群,从血清学研究所获得的信息如此之大,交叉反应如此之多,以致在缺乏任何方法(如电子计算机程序)以客观的方式分析如此多的数据时,一般认为这些技术在分类学中几无什么价值,但在流行病学研究中是有价值的。

利用酸提的多糖抗原为基础,链球菌(streptococci)的血清学研究(Lancefield, 1933, 1934)结果,将链球菌属分为一系列(约 30 个)血清群,标定为 A、B、C 等。直至最近,为分类和鉴定的目的,对链球菌的血清学分群给予了很大重视。

虽然某些血清群与各别的分类种相一致,[如血清群 A (*S. pyogenes*) 和血清群 B (*S. agalactiae*)],另一些血清群包含一个以上的分类种(如血清群 C、D 和 N),而血清群 G、H 和 K 则不可以定界任何分类单元(见 Jones 1978)。

另一些血清学研究是用不同类的抗原材料,如细胞壁、孢子悬浮液等为基础。Cummins (1962) 综述了

关于血清化学的特异性和细菌细胞中抗原的位置以及这样一些血清学研究对细菌分类的意义。

应用纯化蛋白质新产生的抗血清

这个方法的基础在于一个纯化酶产生的抗血清能用以测定其他细菌粗提液中同源蛋白的血清学交叉反应,如果这个细菌具有同一个酶时,微量补体结合技术的应用使这个方法非常敏感。已知初级结构的提纯蛋白的比较研究曾经证明在蛋白质的氨基酸序列与血清学相似性的程度之间有很高的相关性。这方法的例证包括假单胞菌科的粘康酸盐——内酯化酶的研究(Stanier 等 1970),乳酸细菌的二磷酸果糖醛缩酶的研究(London 和 Kline 1973)以及葡萄球菌和微球菌的接触酶的研究。对于葡萄球菌,在它们的接触酶的血清学关系和以 DNA/DNA 同源性为基础的遗传学关系之间存在很高的相关性(见 Kandler 和 Schleifer, 1980)。

对双歧杆菌属几个种的糖基转移酶的类型研究指明,双歧杆菌属包含了几个以它们的有关的糖基酶的相异性为根据的不同的簇群,在某些情况下以这种方法得到的簇群与以其他标准为基础得到的簇群有很好的相关性,但在另一些情况下,这种相关性不那么高。

Baumann 等(1980)和 Bang 等(1981)发现在 *Vibrio* 和 *Photobacterium* 诸种的谷氨酰胺合成酶与过氧化物歧化酶中间的免疫学的相互关系与以 rRNA/DNA 同源性实验为基础的相互关系有很好的 consistency。谷氨酰胺合成酶的氨基酸序列比过氧化物歧化酶的氨基酸序列在更大的程度上保存下来。这点支持了如下的概念,即对具有不同进化程度的蛋白质的研究能够容许解决有机体中间的近的、中间的和远的相互关系。

值得注意的是,蛋白质血清学同源性的研究,象很多别的技术一样,有其局限性。有证据说明这个方法只对具有相当高的序列同源性(70% 或更大)的蛋白质研究有用。而且,血清学技术测量相似性仅仅在蛋白质表面,并且是在最大数目的氨基酸发生变化的蛋白质表面。其结果可能受每个蛋白分子上抗原位点的数目所影响。然而,这种血清学技术提供了一个快速方便的方法以分析同源蛋白之间的结构相似性,这在细菌分类学中是有用的,同时在系统发育关系方面也

可能提示某些希望。

化学分类

在过去的 20 年左右的时间里,用化学的和物理技术以阐释整个细菌细胞或部分细胞成分已经产生了细菌分类和鉴定有很大价值的信息。的确,已经得出的某些数据已被证明如此有用,以致以化学成分为基础用以描述细菌分类的“化学分类”一词现在在文献中已占有牢固的地位。

此外,如气相色谱一类技术已能对发酵产物作更精细的测定,并且与测定单个的酶相反,日益意识到酶系统和它们的调控的分类学意义。

细胞壁成份

存在于 G^- 和 G^+ 细菌以及蓝细菌中的很多原核生物的特征性细胞壁多聚体是肽聚糖。在枝原体或古细菌中均未发现肽聚糖。除少数例外, G^- 细菌的肽聚糖化学结构是相当一致的。然而, G^+ 菌氨基酸和/或糖成份的质的不同,特别是不同的 G^+ 菌肽聚糖的原始结构的不同已经提供了大量有分类学价值的信息。

革兰氏阳性细菌的细胞壁成分是最早的有用的化学分类特征之一。根据革兰氏阳性菌提纯的胞壁分析,Cummins 和 Harris (1956) 提议,细胞壁的氨基酸成分可以证明是一个属的水平的重要分类学标准,并且糖的成分也有助于种间的区分。进一步的研究已指明确如此。存在于细胞壁中的氨基酸现在已被接受为属的描述的重要依据。由 Cummins 和 Harris (1956) 做的模式株的细胞壁分析所得的信息曾被证明在棒状细菌群中有特殊的价值。

现已得到有更大分类学价值的信息,是由 Schleifer 和 Kandler (1967) 提出的方法,并被他们和他们的同事用以测定广范围的格氏阳性细菌的肽聚糖型而得到的。这种方法揭示了细菌之间的差别,这是只靠定性的胞壁分析所做不到的。然而,这个方法对于测定肽聚糖型的差别是非常专一性的,不能常规地用于大量细菌的甄别。

近来为常规地鉴别细菌已经发展了一系列“快速”方法,测定细胞壁成分已表明在细菌分类和鉴定中有最大的鉴别价值。Keddie 和 Bousfield (1980) 的综述包括参考文献,如 Kandler 和 Schleifer (1980) 所做的有关的文献。

一个新的肽聚糖,所谓假胞壁质,其特征是胞壁酸被塔罗氨基糖醛酸所取代,已发现它是甲烷杆菌属的典型的胞壁成分,甲烷杆菌现在公认为古细菌的成员(见 Kandler 和 Schleifer 1980)。

脂质成份

在原核生物中,有两大类明显相区别的脂质。真

细菌具有酰基脂(酯键),而古细菌具有醚键脂。因而,醚键脂的存在可用以区分古细菌。关于古细菌的脂质,Kates (1978) 作了进一步说明。

脂质存在于所有真细菌的细胞质膜中,也存在于革兰氏阴性菌和某些革兰氏阳性菌,如棒杆菌属和分枝杆菌属的胞壁复合物中。真细菌的脂质包括一系列不同的类别,并且在前十年,已变得越来越清楚,至少,某些脂质有化学分类的潜力。

细菌细胞的脂肪酸成分已被证明对某些细菌分类有用,同时在某种情况下脂肪酸的型式可能是一个特殊分类单元的特征。然而,值得注意的是所得到的脂肪酸的型式可能受一系列因素的影响:培养基成分,培养温度,培养物的龄期和用以分析样品的技术。

不受前面提到的局限性影响的一个特殊的脂肪酸种类是霉菌酸,这些长链 3-羟基 2-分枝的酸至今仅在 *Bacterionema*, *Corynebacterium*, *Micropolyspora*, *Mycobacterium*, *Nocardia* 和 *Rhodococcus* 中发现。

它们合成的霉菌酸的结构差别已被证明是这些分类单元的成员分类和鉴定中价值高的指标。

公认有化学分类潜力的另一类脂质是存在于所有细菌中的极脂(polar lipid)。最普通的极脂型是磷脂和甘油酯。磷脂存在于很多细菌中,但某些放线菌和棒状细菌含有非常特征性磷脂,磷脂酰肌醇甘露糖苷。另一些高度特征性磷脂包括鞘磷脂,在某些革兰氏阴性菌,如 *Bacteroides* 中发现。甘油酯是在革兰氏阳性细菌中广泛分布的,也可用作化学分类的标志。

其他具有化学分类潜力的脂质包括 hopanoids 碳水化合物和类胡萝卜素。

异戊间二烯醌

异戊间二烯醌是位于很多细菌原生质膜中的一类类萜烯脂。它们在电子传递、氧化磷酸化和可能的主动运输中起重要作用。它们帮助细菌分类的潜力曾为 Jeffries 等(1969) 及其他人所承认。三个主要型,泛醌、甲基萜醌类和脱甲基萜醌的一个或一个以上的代表是存在于迄今已测定过的大部原核生物中。蓝细菌既不含泛醌,也不含甲基萜醌。然而,它们含叶绿醌和质体醌,这些化合物是植物界所固有的,在细菌中一般未发现过。迄今测定过的所有枝原体仅含甲基萜醌。在古细菌中间,在“挑食”的厌氧种, *Methanobacterium thermoautotrophicum* 中未曾测到异戊间二烯醌。与此不一致的情况虽常见。但不是不变的存在于严格厌氧的真细菌中。一个不通常的类萜烯化合物, *Caldariella acidophila* 曾在极端嗜酸的“*Caldariella acidophila*”中测到,其他检测过的古细菌具有甲基萜醌。

多数严格好氧革兰氏阴性菌仅产泛醌,食纤维菌和粘细菌例外,它们仅产甲基萜醌。兼性厌氧革兰氏阴性菌含泛醌,甲基萜醌或脱甲基萜醌,或三者联合。

严格厌氧革兰氏阴性菌(如 *Bacteroides*) 仅产甲基萘醌。

多数好氧和兼性厌氧革兰氏阳性菌仅产甲基萘醌。大多数链球菌不含任何异戊间二烯醌,但脱甲基萘醌存在于 *Streptococcus faecalis* 中,且甲基萘醌曾在 *S. faecium* subsp. *casseliflavus* 和 *S. lactis* 中检测到。*Lactobacillus* 的类似成员一般缺异戊间二烯醌,但近来在 *L. brevis* 的一个菌株中检测到低含量的非特征性的甲基萘醌。这样的物质也存在于严格厌氧的 *Clostridium* 的某些菌株中,虽然一般来说,这个属缺醌。

近来关于细菌中异戊二烯醌结构型的资料和它们在分类学中的应用由 Collins 和 Jones (1981) 综述过。从可利用的关于一般原核生物材料,似乎甲基萘醌有比泛醌大得多的鉴别价值。甲基萘醌不仅有一个较大的范围的异戊间二烯类化合物,而且有附加的修饰,诸如环脱甲基作用和聚甲基丁烯链的部分加氢作用。可利用的数据有力地提示,这些化合物在微球菌、链球菌、棒杆菌和某些放线菌分类中将有相当大的价值。

细胞色素成分

细胞色素是在原核生物细胞中涉及氧化还原过程变化的血红素蛋白的一种特殊形式。根据它们的血红素辅基它们被指定为四个主要级, a、b、c 和 d。细胞色素 0 是一个可自动氧化的 b 型细胞色素。

借助于细胞色素作细菌分类和鉴定有两个基本方法可用;“型式”和“结构”法。前者比较不同细菌种的细胞色素型式,如用常规的差分分光光度学相比较。后者比较基本结构,如有可能,用氨基酸序列和 X 射线衍射测定,则比较容易提纯的细胞色素 c 的第三级结构。

细胞色素的型式在原核生物中比在真核生物中表现出更大的差异,因此它能有助于细菌分类。现在已经进行了 200 个以上细菌种的细胞色素成分定性分析。结果指明异养营养的革兰氏阳性细菌包含一个比较相一致的类群具有细胞色素 $b_{caa,0}$ 构成的优势型式,然而有某些变异情况。兼性厌氧革兰氏阳性菌常缺细胞色素 c。某些乳酸细菌生长在含血红素培养基上时仅含细胞色素 b。丙酸细菌表示细胞色素 b_{da} 型。梭菌缺细胞色素。有趣的是好氧的 *Arthrobacter globiformis* 对数生长期的细胞的细胞色素 $b_{caa,0}$ 型,当细胞受氧限且在革兰氏染色时失去它们保持结晶紫-碘复合物的能力时则变成 $b_{caa,od}$ 型。细胞色素 d 是很多革兰氏阴性菌的特征性状。

与此相反,革兰氏阴性异养菌形成一个根据细胞色素成分很少一致的类群。多数有基础型 $b_{cdoa,1}$, 常常缺少 c, 细胞色素 c_{co} 表现为甲基营养菌的特征,然

而,它也存在在于非甲基营养属 *Chromobacterium* 中。光合细菌在光合生长时含细胞色素 b 和 c, 但当无光好氧生长时,分类单元之间存在差异。绝对好氧化能自养菌显示细胞色素 $b_{caa,od}$ 型,只某些偶然遗漏。光合菌或化能自养菌均未见产细胞色素 d。

现在有足够的证据证明,细胞色素型和其他证据一起是细菌分类的有用指南。然而,很少证据说明细胞色素型能用于鉴定的目的,主要因为细菌含有较少的光谱差别的细胞色素型。关于细胞色素型用于细菌分类 Jones (1980) 做了一个全面综述。

应该强调的是当细胞色素型式用于分类目的时,必须考虑生长环境的影响。生长条件能影响细菌细胞色素定量,且在较少的程度上影响定性。

各种蛋白质的氨基酸序列

对特种蛋白质的氨基酸序列进行比较或对反映这些蛋白质的氨基酸序列的抗原反应的性质进行比较,已经用作衡量有机体中间的系统发育关系。有关的基本概念是大多数现存的蛋白质很可能是通过基因重组和变型从很少数目的古代型蛋白进化而来的。在比较任何特殊群(诸如细胞色素 c, 过氧化歧化酶, 铁氧还酶或其他酶)的蛋白时,一个有机体蛋白与另一个有机体相应的蛋白的氨基酸序列差异愈大,则可相信是两个有机体之间的进化离散性愈大。相反,如果两个有机体相应的蛋白氨基酸序列非常相似,则可相信是系统发育关系很近。甚致有机体之间的距离关系可靠这个方法推断出来,并且反映各种各样真核和原核有机体的已看出的进化发展的各种系统发育方案已经构建了。已用作这种研究的蛋白质是铁氧还蛋白, 黄素氧还蛋白, 天青素 (azurins), 质体蓝素和细胞色素 C。例如: 细胞色素 C 的结构方面的明显相似性存在于某些紫色非硫光合细菌之间(如 *Rhodospirillum rubrum* 和 *R. sphaeroides*), 也存在于非光合呼吸型细菌 *Paracoccus denitrificans* 和真核有机体的线粒体之间; 这种或另一种相一致的数据导致一个看法: *P. denitrificans* 是从紫色非硫细菌失去了光合性能而演变来的, 并且这个种是一个最近似于公认的一线粒体的原核祖先的原核生物。

蛋白质图谱

这里的基本前提是关系相近的有机体有相似的同种细胞蛋白。双向电泳和等电聚焦法使可能从一个细胞提取物中溶解几百个蛋白质。从一个细菌菌株得到的蛋白质“指纹”是这个菌株遗传背景的反映,且能与其他菌株的“指纹”相比较以测度其关系。这种方法应用的例证可看 Robert 等 (1980) 所做的 *Rhizobium* 菌株的比较和 Mouches 等 (1979) 所做的 *Spiroplasma* 菌株的比较。为了得到最佳结果, 这方法要求相当程

度的标准化。

细胞蛋白的单向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 能得到 30 多条带型, 虽然在溶解能力方面它不能与双向电泳方法相比拟, 但能将有关的有机体与不相关的有机体相区别。一般说, 是使用完整细胞或细胞膜组分, 并且蛋白质是用清洗剂诸如 SDS 溶解。然而, 很多研究已纯粹采用崩解细胞的水溶性蛋白 (“可溶”组分)。应用 PAGE 的少数例证是: 枝原体的鉴定 (Razin 和 Rotten 1967), 嗜盐菌的分类 (Nicolet 等 1980) 齿隙隙缝群落分离物的比较 (Moore 等 1980) 和土著根瘤菌群分离物的辨别 (Noel 等 1980)。采用严格标准化条件, 可以得到极易重复的蛋白型, 它可应用快速的电子计算机作数值分析 (Kerster 和 De Ley 1975)。

从 70 个 *Clostridium* 种的菌株, 可溶性细胞蛋白型的分析, Cato 等 (1982) 发现, 具有 80% 以上的 DNA/DNA 同源性的菌株一般产生同样的型式。约 70% 同源性的菌株表现全部型式的全部相似性, 但也表现次要的差异, 并且 DNA 同源性不相关的菌株表现主要的差异。在很多情况下, 在 24 小时内分离的有机物得到的型式有足够的差别, 则有机体的同一性很值得怀疑。

酶的特征化

现在公认, 由某种细菌酶展示的功能和结构型提供了用于分类的数据。很好的例证是由细菌柠檬酸合成酶和琥珀酸盐硫激酶所显示的各种调控和分子大小型。这两者是柠檬酸循环 (Kreb) 并且这个循环在生命细胞中几乎无不存在, 使它成为一个不同有机体之间进行比较研究的很适合的途径 (见 Weitzman 1980)。

一般说, 革兰氏阴性菌的柠檬酸合成酶受还原的烟酰胺腺嘌呤磷酸二核苷酸 (NADH) 阻抑, 而革兰氏阳性菌不这样。革兰氏阴性菌的柠檬酸合成酶根据它们的 NADH 敏感性是否能被一磷酸腺苷 (AMP) 解除可进一步分为两类。大部分严格好氧革兰氏阴性菌

柠檬酸合成酶可被 AMP 再活化, 而兼性好氧革兰氏阴性菌的则不能。兼性厌氧革兰氏阴性菌柠檬酸合成酶也受 α -酮戊二酸阻抑, 但好氧性革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的则不如此。蓝细菌的柠檬酸合成酶不受 NADH 阻抑, 但它们受 α -酮戊二酸和琥珀酸——CoA 阻抑。

根据分子大小细菌柠檬酸合成酶分为“大”和“小”两群。大部分革兰氏阴性菌具有大的柠檬酸合成酶 (分子量约等于 250,000), 而大部分革兰氏阳性菌产生小型柠檬酸合成酶 (分子量 \approx 100,000)。

对广阔的一般型式存在例外。革兰氏阴性菌属 *Acetobacter* 的柠檬酸合成酶虽然是大型酶, 但似乎不被 NADH 阻抑。另一方面, *Thermus aquaticus* 的柠檬酸合成酶是小型的, 对 NADH 也不敏感。古细菌 *Halobacterium* 的柠檬酸合成酶和革兰氏阳性菌的大多数柠檬酸合成酶在这两方面是相似的。

古细菌的琥珀酸歧化酶中间存在类似的分子大小型。迄今研究过的革兰氏阳性菌的全部琥珀酸歧化酶均是小型 (分子量 \approx 70,000—75,000), 而革兰氏阴性菌, 蓝细菌和嗜盐菌的是大型 (分子量 \approx 140,000—150,000)。细菌的琥珀酸歧化酶根据它们对核苷酸底物 (鸟苷二磷酸盐或肌苷二磷酸盐) 的专化性可进一步划分, 并且初步的结果指出酶多样性的有趣型式在细菌分类中的可能潜力。

为常规实验室筛选细菌柠檬酸合成酶现在可利用快速方法, 且当这些方法进一步发展, 这些及那些酶的调控和分子性质在细菌分类上很有可能被证明是有用的。

发酵产物图

气相色谱方法用于分析蛋白质或碳水化合物代谢的终产物, 脂肪酸在厌氧细菌 *Clostridium*, *Bacteroides*, *Eubacterium* 等的分类和鉴定是特别有用的。

(陈文新译 王大超校)