

# 艰难梭菌荚膜的研究

王思一 张雪萍 范子文

刘功云 史俊华 张建琼

(南京铁道医学院微生物学教研室, 南京)

**摘要** 本文采用提取细菌荚膜多糖的三种方法, 提取艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 的荚膜多糖, 经鉴定证实, 该菌荚膜是由多糖和蛋白质两种成份组成。这不仅证明该菌存在荚膜, 而且为进一步研究该菌的生物学特性提供了有利条件。

**关键词** 艰难梭菌; 荚膜多糖蛋白; 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳

艰难梭菌 (*Clostridium difficile*, 简称 Cd) 属于梭状芽孢杆菌属。最初由 Hall 等 (1935) 从胎粪和新生儿粪便中分离出来, 因其分离培养困难而得名。随着选择培养基 CCFA (Cycloserine-Cefoxitin-Fructose-Agar)<sup>[1]</sup> 和厌氧培养箱的使用, Cd 菌的检出率明显提高, 对 Cd 菌的形态特征也有了较多描述, 一直认为 Cd 菌无荚膜存在<sup>[2-4]</sup>。我组在观察三株 Cd 菌不同生长时期的菌体、菌落特征时, 采用多种电泳技术, 荚膜染色及革兰氏染色, 发现 Cd 菌确实存在荚膜。鉴于这一新认识我们分别用碱、水、硫柳汞三种提取方法提取 Cd 菌荚膜成份, 并将提取物经聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳分析鉴定, 证明用水、碱和硫柳汞三种提取法所得到的 Cd 菌荚膜提取物, 其中多糖百分含量分别为 96.6、83.8

和 99%, 蛋白质百分含量分别为 71.2、66.6 和 0%。

## 材料和方法

### (一) 材料

1. 艰难梭菌干燥菌株: 由中国协和医院检验科赠。

2. 艰难梭菌培养基: 厌氧菌基础培养基 (上海生物制品研究所生产) 31g, 酵母浸膏 5g, 琼脂 20g, 加水 1,000ml, 加热溶解后高压灭菌 (10 磅, 20 分钟)。待冷至 55℃ 加入氯化血红素 5mg、维生素 K<sub>1</sub> 5mg、庆大霉素 10,000u、洁霉素 100mg 和 5% 脱纤维兔血, 摇匀后制成平板或斜面备用。

3. 国产 DY-II 型厌氧培养箱: 浙江省义

乌冷冻机厂出产。

4. 试剂: 95% 酒精, 3% 氢氧化钾, pH 7.0 生理盐水, 0.5% 福尔马林, AR 丙酮, 90% 苯酚,  $10^{-4}$  硫柳汞。

5. 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳仪: 广州无线电研究所出产。

6. Beckman CDS-200 光密度扫描计。

## (二) 方法

1. 细菌培养: 将 Cd 菌接种于平板培养基, 37℃ 厌氧箱培养 48 小时, 观察细菌形态和培养特征, 进行生化和毒力试验测定, 凡符合 Cd 菌特征的菌株用厌氧袋法<sup>[5]</sup>保存于室温。

2. 荚膜结构观察: 在不同时间观察保存培养物的菌落生长情况, 用革兰氏染色、负染色、超薄切片和投影技术在电镜下观察, 见菌体周围有明显的荚膜结构。再将 Cd 菌注入小白鼠腹腔内, 置 37℃ 24 小时, 取腹腔液做 Muir 氏荚膜染色检查, 与产气荚膜杆菌对照, 证实 Cd 菌存在荚膜。

3. Cd 菌荚膜多糖的提取: 我们用提取细菌糖元的方法提取 Cd 菌荚膜多糖。首先用无菌盐水洗下培养 48 小时的 Cd 菌, 制成菌悬液后分别用碱法<sup>[6]</sup>、水法<sup>[6]</sup>和硫柳汞法<sup>[7]</sup>进行提取。

### 4. Cd 菌荚膜成份的鉴定:

(1) 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳分离 Cd 菌荚膜: 将用碱、水、硫柳汞三种方法提取的 Cd 菌荚膜多糖制品, 按常规方法做聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳, 电泳前测制品中多糖含量 (为  $73.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), 加样时取  $30 \mu\text{l}$  Cd 菌荚膜多糖制品, 经 2—3 小时电泳后, 放入 10% 三氯醋酸固定 30 分钟, 取出后分别做阿利新蓝多糖染色和考马斯亮蓝蛋白质染色。

(2) 光密度扫描: 将经阿利新蓝染色、考马斯亮蓝染色的凝胶柱做光密度扫描, 测不同方法提取的 Cd 菌荚膜多糖和蛋白质的百分含量。

## 结 果

### (一) 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Cd 菌悬液用碱、水法所得的提取物经电泳后做阿利新蓝染色和考马斯亮蓝染色, 在正极端都显示一条染色带, 表明所提取的多糖不纯, 夹有小分子蛋白质。而用硫柳汞法所得的提取物, 电泳后凝胶柱用考马斯亮蓝染色不显示染色带, 用阿利新蓝染色时, 在正极端显示一条清晰带, 说明用此法提取的 Cd 菌荚膜多糖纯, 不含蛋白质, 而且在用硫柳汞法提取过程中, Cd 菌悬液明显地分成多糖液和蛋白质液两层。再把蛋白质液同样用  $\text{CaCl}_2$  透析, 酒精沉淀, 冷丙酮洗脱, 所得蛋白质提取物同样做圆盘电泳、两种染料染色, 其结果阿利新蓝染色只显示一条很淡的染色带, 而考马斯亮蓝染色则显示四条带 (图 1)。上述结果表明, Cd 菌荚膜是由多糖和蛋白质组成。硫柳汞提取法所获得的多糖较碱和水的提取法纯。

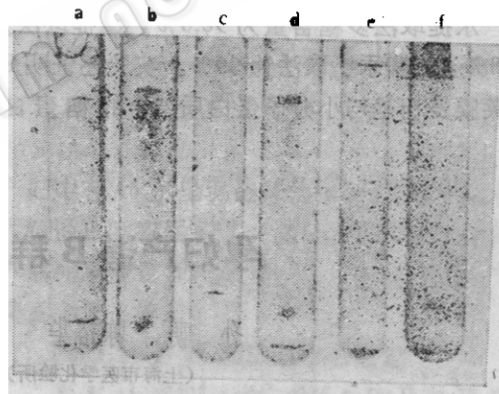


图 1 三种方法的提取物电泳染色结果

(a) 水提取法提取物经考马斯亮蓝染色和 (b) 阿利新蓝染色  
(c) 碱提取法提取物经考马斯亮蓝染色和 (d) 阿利新蓝染色  
(e) 硫柳汞提取法提取物经考马斯亮蓝染色和 (f) 阿利新蓝染色

### (二) 光密度扫描结果 (表 1)

表 1 结果说明, 三种提取方法均能提取 Cd 荚膜多糖成份, 其中以硫柳汞提取法最好, 多糖含量高达 99%, 而且提取物经考马斯亮蓝染色及光密度计扫描蛋白质含量为 0%, 说明多糖提取物中不含蛋白质, 其纯度较高。

表1 三种方法提取的 Cd 荚膜多糖蛋白质的百分含量

	水提取法 多糖制品(%)	碱提取法 多糖制品(%)	硫柳汞提取法	
			多糖制品(%)	蛋白质制品(%)
Cd 荚膜多糖 (阿利新蓝染色)	96.6	83.8	99	62
Cd 荚膜蛋白质 (考马斯亮蓝染色)	71.2	66.6	0	四条带分别为 17, 78.1, 2.7, 1.6

## 讨 论

长期以来,描述 Cd 菌是无荚膜能形成芽孢的粗长杆菌。我们在观察 Cd 菌不同生长期的特征时发现,它具有既往文献中未曾报道过的荚膜构造。为进一步了解艰难梭菌荚膜成份,但鉴于细菌荚膜通常是由糖和蛋白质组成。我们分别用水、碱、硫柳汞三种提取细菌荚膜多糖的方法提取 Cd 菌荚膜成份,并将提取物经圆盘电泳分离和鉴定。凝胶柱进行染色,光密度计扫描。结果证明三种方法都能提出 Cd 菌荚膜多糖,水提取法多糖含量为 96.6%,碱提取法为 83.8%,硫柳汞提取法为 99%。实验还证明 Cd 菌荚膜多糖是与小分子蛋白质结合的糖蛋白。

三种提取法中,以硫柳汞提取法为优,提取物中多糖含量高,而且不含蛋白质,故其纯度是高的。本实验结果为深入研究 Cd 菌荚膜的化学成份;荚膜与 Cd 菌致病性的关系及免疫学特性的研究创造了有利的条件。

## 参 考 文 献

- [1] George, W. L. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 9: 214, 1979.
- [2] Bartlett, J. G.: *Gastroenterology*, 75: 778, 1978.
- [3] Buchanan, A. G.: *J. Clin. Microbiol.*, 20: 74, 1984.
- [4] 王成怀: 实验细菌学, 349页, 山东医学科学院, 1982.
- [5] 范子文等: 铁道医学(增刊), 14: 50, 1986.
- [6] 相田德二郎等著, 程光胜等译: 微生物学实验法(第一版), 198页, 科学出版社, 北京, 1981.
- [7] 杨钟琪: 国外医学(生物制品分册), 5(6): 261, 1982.