维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷 第2期 重庆医科大学学报 Vol.19 No.2
1994 ACTA UNIVERSITATS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1994

117~120 5株类杆菌外膜蛋白的研究

检验系临床微生物教研室 李 牧* 胡 宏 R378

提 要 本文用实验方法1(用EDTA处理等过程)和方法2(用Triton处理等过程)制备脆弱类杆菌处膜蛋白。结果表明方法2优于方法1。多形类杆菌是脆弱类杆菌的亚种，其外膜蛋白的SDS-PAGE图型极为相似，而与不同的菌种产黑色素类杆菌，不同的菌属具核梭杆菌的外膜蛋白电泳图型不同，但牙龈类杆菌与脆弱类杆菌属于不同的菌种，其外膜蛋白电泳图型却极为相似，原因尚不能解释。

关键词 类杆菌；外膜蛋白；凝胶电泳
中图分类号 Q932

在厌氧菌感染中类杆菌占有最重要的位置，类杆菌的外膜是细菌的重要结构。外膜具有以下作用：使细菌限制很多抗生素和抗代谢药物的渗透；利于细菌在宿主体内环境中生长；帮助细菌抵抗宿主防御系统的作用等。外膜蛋白具有充当噬菌体和细菌素的受体，作为重要抗原[1]等作用。本文旨在用类杆菌外膜蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图型结合少数选择性生化试验，为类杆菌的鉴定提供一种较快、重复性较好的方法。

材料和方法

1.菌种和培养基 脆弱类杆菌(Bf)ATCC 25285，脆弱类杆菌CDC14462，产黑色素类杆菌(B.m)ATCC33184，多形类杆菌(B.t)CDC1091-A，具核梭杆菌(F.n)10953以及牙龈类杆菌(B.g)ATCC33277。心脑浸液血琼脂(HBI)和液体增菌增养基均本室自制。

2.主要试剂及仪器 电泳缓冲液和样品处理液、厌氧装置、超声波破碎仪、低温超速离心机、电泳仪；Tritonx-100及EDTA等。

3.细菌培养 于HBI培基厌氧培养取单个菌落接种10ml液体增菌培基中37℃24h，然后以5%(v/v)的比例再次增菌37℃24h，涂片、镜检细菌纯否，并作生化反应鉴定。

4.外膜蛋白的制备 方法1[2][3]4℃ 3000g×30min离心沉淀B.f(CDC14462)培养液，弃去上清，用0.05mPBS(pH7.4)在4℃，3000g×30min离心洗涤三次，弃去上清，以每100ml细菌培养液的沉淀菌加入4ml含100mM EDTA的0.05M PBS，置45℃，30min后旋转混匀，放冰浴中超声破碎细菌，4℃，6000g离心30min，取用上清，连续透析2次，每次4—5h，然后在透析袋外撒一层葡聚糖G—100，在4℃放置16h。用LaWry法测蛋白浓度，—20℃保存备用。方法2[4]：4℃，3000g×30min离心细菌培养液，弃去上清，加入0.01m HEPES (pH7.4)，在4℃×3000g×30min离心洗涤3次，弃去上清，每0.1ml沉淀菌加入9.9ml 0.01M HEPES，混匀，置冰浴中超声破碎细菌，加入最终浓度为1mM的氯化镁，混匀，置4℃，5000g×5min离心，取用上清，4℃，200,000g离心45min，弃去上清，每0.1ml沉淀加入含2%Triton X-100的0.01M HEPES 9.9ml，混匀，23℃置10min，然后在4℃，200,000g离心45min，弃去上清，加0.01M HEPES在4℃，200,000g离心45min洗1次，弃去上清，加入少量0.01M HEPES溶解沉淀，Lawry法测蛋白浓度，调节蛋白浓度至1.5—3mg/ml，—20℃保存备用。

5.SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 装胶凝胶模具。配胶，在制好凝胶孔内加样品处理液(蛋白浓度为1mg/ml左右，煮沸2min)，60μl/孔，上槽接

* 本系硕士研究生 国家自然科学基金资助项目

维普资讯 http://www.cqvip.com

负极，下槽接正极，起始电流10mA/板，待样品全部进入浓缩胶后加大电流至20mA/板，指示剂到达凝胶底部时结束电泳取出凝胶，在0.2%考马斯亮兰中室温浸泡3～4h，取出，先用7%醋酸50%甲醇的水溶液脱色，然后用7%醋酸5%甲醇的水溶液充分脱色至背景清晰。

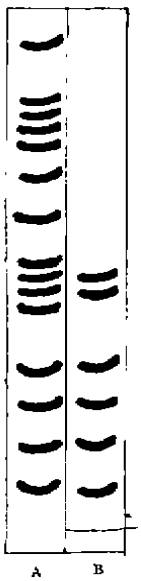
膜蛋白的交叉混杂情况，证实方法2制备外膜蛋白是否可靠

2.实验方法1与方法2制备脆弱类杆菌外膜蛋白，其SDS-PAGE图型比较

1. 五株类杆菌和一株梭杆菌的生化鉴定

	B·f (ATCC 25285)	B·f (CDC 14462)	B·g	B·t	B·m	F·n
阿拉伯糖	−	−	−	+	−	−
纤维二糖	−	−	−	+	−	−
半乳糖	−	−	−	−	−	−
葡萄糖	+	+	−	+	+	−
乳糖	+	+	−	+	+	−
甘油	−	−	−	−	−	−
麦芽糖	+	+	−	−	−	−
甘露醇	−	±	+	−	−	−
鼠李糖	−	+	−	+	−	−
山梨醇	−	−	−	−	−	−
蔗糖	+	+	−	+	+	−
海藻糖	−	−	±	+	−	−
触酶	−	−	+	+	−	−
七叶灵水解	+	+	−	+	−	−
尿素酶	−	−	−	−	−	−
靛基质	−	−	+	+	−	+
硝酸盐还原	−	−	−	−	−	+
明胶液化	+	−	+	−	+	−

结　果



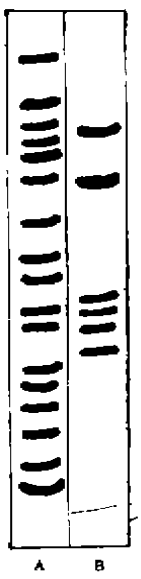
A:方法2
B:方法1

图1: 脆弱类杆菌CDC14462外膜蛋白的SDS-PAGE图

从图中可看出，B图型的蛋白条带明显少于A图的蛋白条带数，并且六条蛋白带中有五条可在A图中找到相同位置的蛋白条带。从SDS-PAGE图型看，方法2(A图)优于方法1(B图)。

3.实验方法2制备外膜蛋白过程中，Triton处理后不同馏分的SDS-PAGE

此步骤是为了检查实验过程中胞浆蛋白与外



A:方法2
B:方法1
A:Triton不溶部份(为外膜，即超速离心沉淀部份)
B:Triton可溶部份(为胞浆膜，即超速离心上清部份)

图2:脆弱类杆菌CDC14462外膜蛋白和胞浆膜蛋白的SDS-PAGE图

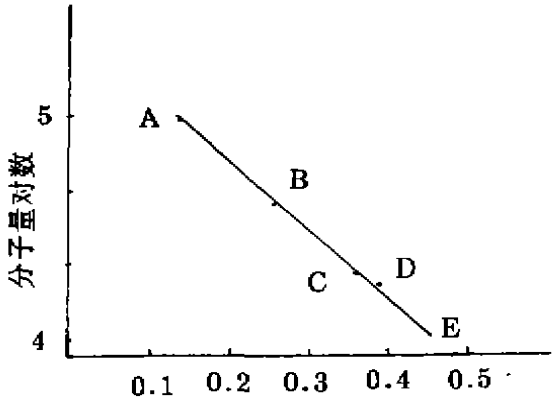
B图中蛋白条带远少于A图，仅少部份条带可在A图中找到相同位置条带，这种相同条带少，因此，胞浆膜蛋白与外膜蛋白在实验过程中的交叉混杂可忽略不计，方法2制备外膜蛋白比较可靠。

4.五株类杆菌和一株梭杆菌外膜蛋白的

维普资讯 http://www.cqvip.com

SDS-PAGE图型及分子量的测定。

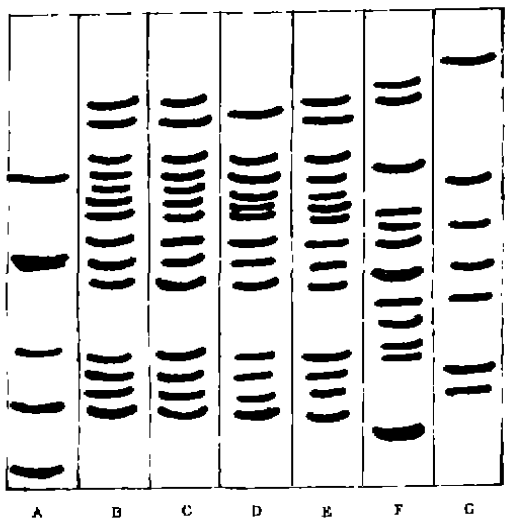
用5种低分子量标准蛋白质的分子量对数与相对迁移率在坐标上作图。5个点基本上在一条直线上，说明电泳方法可靠。



A:磷酸化酶B(M.W94,000)
B:牛血清白蛋白(M.W67,000)
C:肌动蛋白(M.W43,000)
D:碳酸酐酶(M.W30,000)
E:Twv外壳蛋白(M.W17,500)

图3 SDS-PAGE标准蛋白质分子量对数(log M.W)与相对迁移率(m.r)所作的标准曲线。

相对迁移率(m.r)＝样品迁移距离/染料迁移距离。



A. SDS-PAGE标准蛋白质
B. Bf脆弱类杆菌ATCC25285
C. Bf脆弱类杆菌CDC14462
D. Bt多形类杆菌CDC1091-A
E. Bg牙龈类杆菌ATCC33277
F. Bm产黑色素类杆菌ATCC33184
G. Fn具核梭杆菌10953

图4.5株类杆菌和1株梭杆菌外膜蛋白SDS-PAGE图

讨 论

在临床厌氧菌感染中，类杆菌占大多数。鉴定类杆菌的传统方法主要是生化反应和气相色谱，但是某些生化试验结果常不稳定，可靠性差，而且同一菌种不同株的生化试验结果可能不同[3]；气相色谱也有其价格昂贵，非挥发性物需要预处理和实验条件要求严格等局限。不同类杆菌的外膜蛋白电泳图型不同，用外膜蛋白电泳图型结合少数选择性生化试验，为类杆菌的鉴定提供了一条较快、重复性较好的途径。此外，外膜蛋白可作为细菌素和噬菌体的受体，充当细菌的重要抗原，是细菌表层的重要结构[5]。所以，类杆菌外膜蛋白的研究具有较重要的意义。

本文用实验方法1和方法2制备脆弱类杆菌外膜蛋白进行比较，其SDS-PAGE图型表明方法2优于方法1。在方法2中，SDS-PAGE结果表明实验过程中胞浆蛋白和外膜蛋白之间的交叉混杂(Cross-contamination)可忽略不计，说明方法2制备外膜蛋白可靠。

多形类杆菌是脆弱类杆菌的亚种，它们的外膜蛋白电泳图型极为相似，而与不同菌种的产黑色素类杆菌、不同菌属的具核梭杆菌的外膜蛋白电泳图型不同。据国外报导，同一菌种用不同培养基，其外膜蛋白电泳图型可以不同，不同的菌种可因培养基变化而产生极为相似的外膜蛋白电泳图型。所以，若类杆菌外膜蛋白在体内充当重要抗原的话，对各类杆菌在血清学上比较要慎重。另外，鉴定类杆菌也不能单靠外膜蛋白电泳图型。作者认为应对更多菌种以及临床分离菌的外膜蛋白进一步研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1 Keijiro K,et al. J.Gen Microbiol 1987;133:1033

2 Cousland G,et al.J.GGen Microbiol 1984;130:645

3 Lanr P,et al.J.Gen Microbiol 1979; 112:2114 Susan F.K.et al. J.Bacteriology 1985;163:1080

5 Stephen M.H.et al. The Bacterial Cell 1984; 82

(收稿日期 1994-01-201)

STUDIES ON OUTER MEMBERANE PROTEINS OF FIVESTRAINS OF BACTEROIDES SSP

Li Mu,et al

Dept.of clinical Microbiology

Two different methods were used to prepare the outer memoberane proteins of bacteroides ragilis,which were treated with EDTA in Method One and with Triton in Method Two,the result showed that Method Two was better than Method One. The Triton-insoluble outer memberane proteins of five strains of Bacteroides and one strain of Fusobacterium were examined with SDS-PAGE and analysed comparatively.The patterns produced by strains belonging to the same species were very similiar and those produced by strains belonging to different species and genus were different except the similiarity between the pattern produced by Bacteroides fragilis and that by Bacteroide gingivalis.

KEY WORDS Bacteroides; Outer memberane proteins; SDS-PAGE

(上接122页)

TUMOR NECROSIS FACTOR AND INTERLEUKIN-2 IN APLASTIC ANEMIA

Luo Yunping,et al

Dept. of Clinical Haematology

In order to clarify the role of interleukin 2 (IL-2) and tumor necrosis factor alpha (TNFα) in the pathogenesis of aplastic anemia,IL-2 and TNFα level was determined in patients with aplastic anemia.In comparison with normal subjects,TNFα activity was significantly elevated, ($P<0.01$) and IL-2 level increased also.($P<0.05$) It is suggested that abnormal level of TNFα and IL-2 in patients with aplastic anemia is probably related to the pathogenesis of aplastic anemia.

KEY WORDS Aplastic anemia; Interleukin-2; Tumor necrosis factor