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

113~116

脆弱类杆菌多糖复合物抗原的提取及其鉴定

检验系临床微生物学教研室 阎 刚* 胡 宏 R378

提 要 经酸、EDTA、脱氧胆酸钠和加热处理后从脆弱类杆菌ATCC 25285和CDC 14462提取到两种多糖复合物，每种复合物中糖类与蛋白质的比例接近1：1，两种复合物之间糖类和蛋白质的相对含量也接近，提示有共同的基本结构。三类糖基可能由荚膜多糖和脂多糖成分组成。免疫血清学鉴定的结果表明两种多糖复合物都是本菌特异的表面抗原决定簇，提示可建立更特异免疫学方法诊断本菌感染。

关键词 脆弱类杆菌;多糖复合物抗原;荚膜多糖;脂多糖
中图分类号 O629.12

脆弱类杆菌是类杆菌群和类杆菌属的代表菌种，在临床厌氧菌感染中最常见，检出率高。现悉致病物质包括荚膜多糖[3]、脂多糖[4]、内毒素和各种酶类。其中荚膜多糖和脂多糖作为表面抗原决定簇，日益重视。国内未类同报导，国外所用方法不同，提纯的标准未统一，结果不一。本研究改进Kosper[1]和Rissing[2]的方法，提取本菌多糖复合物抗原进行化学及免疫血清学鉴定，旨在表明该多糖复合物抗原可用建立更特异、敏感、易于普及的方法以诊断该菌感染，开展表面抗原的研究。

材料和方法

1.菌种 脆弱类杆菌(BF)ATCC25285，CDC14462,产黑色素类杆菌(BM)CDC株，多形类杆菌(Bt)1091A株。

2.动物 家兔，雄性，平均体重2～2.5kg。

3.主要仪器和试剂 Hitachi PR-52离心机，Kubota KR-702离心机，厌氧装置。EDTA，氯仿，脱氧胆酸钠，蒽酮，二甲氨基苯甲醛等。

4.培养增菌 HBI培养取单个菌落增菌，镜检及生化反应鉴定。

5.抗血清制备

(1) 抗BF血清的制备：雄性家兔静脉和皮下多点注射免疫。菌浓度为10亿/ml。免疫前后采血作凝集试验，经5次免疫后测血清效价1：640。按常规采血，分离血清备用。

(2) 抗BF多糖复合物抗原血清的制备：选雄性家兔静脉和足掌注射。免疫6次。采血测效价分别(ATCC)为1：160,(CDC)为1：80。按常规分离血清备用。

6.多糖复合物抗原的提取

(1) 取增菌培养后的BF ATCC 25285、CDC 14462，反复离心3500r/min 30min，3500rpm,10min×3沉淀细菌。

(2)加(Na_2HPO_4+NaCl+EDTA，PHT.4缓冲液，混匀后加热60℃30min离心(1200r/min，4℃,30min)，收集沉淀，为细砂状(S管)。上清液离心2次(2000rpm，4℃，2h)，弃末次上清，收集凝胶状沉淀(G管)。

(3) 于G管中依次加入NaOH和乙醇混合液，氯仿—甲醇混合液，收集沉淀。离心上清(2000rpm，4℃，(2h×4)加甘氨酸缓冲液，弃末次上清。

(4) 取葡聚糖凝胶(Sephadex-G-100)常规溶胶装柱，甘氨酸缓冲液平衡。柱高45cm层析床体积140ml，流速2ml/min，进样3ml/次收集2ml以蒽酮滤纸显色过滤。

* 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

(5). 依次加NaOH和无水酒精，离心(5000rpm，4℃，2h)后以95%乙醇反复吹洗离心，收集沉淀白色浆状物(L管)。

7 蒽酮(Anthrone)检测已糖

8 ElsonNMorgan改良法测氨基已糖

9.DischaNShettle法测甲基戊糖

10.Lowry's法测蛋白质含量

11 免疫血清学鉴定 采用试管凝集反应和沉淀反应。

12 统计学处理 采用x^2检验，凡$P>0.05$认为有差异。

结 果

1 两种多糖复合物抗原化学成分测定

(1) 蒽酮比色法测已糖。标准液线性范围0～40μg/ml，结果：脆弱类杆菌ATCC25285多糖复合物抗原(PS-A)光密度值$A_{626}=0.915$，已糖浓度22μg/ml。脆弱类杆菌CDC14462多糖复合物抗原(PS-C)的$A_{620}=0.835$，已糖浓度19μg/ml。

(2) Elson-Morgan改良法测氨基已糖：标准溶液浓度在0～30μg/ml。PS-A$A_{504}=0.0615$氨基已糖5.5μg/ml；PS-C，$A_{504}=0.1050$氨基已糖为9μg/ml。

(3) Dische-Shettles法测定甲基戊糖：标准糖溶液线性范围分别是10～60μg/ml(ΔA396)，10～70μg/ml(ΔA430)。PS-A：$A_{396}=0.0925$，$A_{430}=0.0415$，$\Delta A_{396}-\Delta A_{430}=0.015$甲基戊糖4μg/ml。PS-C.$A_{396}=0.10$，$A_{430}=0.0455$，$\Delta A_{396}-\Delta A_{430}=0.0545$，甲基戊糖4.5μg/ml。

(4) Lowry法测蛋白质。标准液线性范围0～225μg/ml，PS-A：$A_{656}=0.0805$，蛋白质36μg/ml。PS-C：$A_{656}=0.071$，蛋白质31.5μg/ml。

2. 试管凝集试验

(1) 抗脆弱类杆菌ATCC血清(抗BfA血清)分别与脆弱类杆菌ATCC(BfA)和CDC(BfC)，产黑色素类杆菌(BM)和多形类杆菌(Bt)作凝集试验，结果表1。

表1 BfA 血清与四种菌液试管凝集反应

	阳性数	阴性数	阳性率(%)
BfA	18	2	90
BfC	14	6	70
BM	4	16	20
BT	4	16	20

* $x_1^2=328$，$v_1=3$ $P<0.005$，* $x_2^2=1.25$，$v_2=1$，$P_2>0.05$

(2) 抗PS-A血清与上述4种菌液的试管凝集反应，结果见表2。

表2 抗PS-A血清与四种菌液的试管凝集反应

	阳性数	阴性数	阳性率(%)
BfA	12	8	60
BfC	8	12	40
BM	2	18	10
BT	4	16	20

* $x_1^2=312.09$，$v_1=3$ $P'<0.005$，$x_2^2=0.8$，$v_2=1$，$P_2>0.05$

(3) 抗BfC血清与四种菌液的试管凝集反应，结果见表3。

表3 抗BfC血清与四种菌液的试管凝集反应

	阳性数	阴性数	阳性率(%)
BfC	7	3	70
BfA	6	4	60
BM	1	9	10
BT	2	8	20

* $x_1^2=298.46$，$v_1=3$ $P'<0.005$，$x_2^2=0.2197$ $v_2=1$，$P>0.05$

(4) 抗PS-C血清与4种菌液试管凝集反应结果见表4。

表4 抗PS-C血清与四种菌液试管凝集反应

	阳性数	阴性数	阳性率(%)
BfC	5	5	50
BfA	4	6	40
* BM	0	10	0
BT	1	9	10

* $x_1^2=286$，$v_1=3$ $P_1<0.005$，$x_2^2=0.2020$，$v_2=1$，$P>0.05$

BM的阴性对照管"++"阳性，故判为阴性。

3. 环沉试验

(1) 抗BfA血清与PS-A和另二种提取成分LP-A

维普资讯 http://www.cqvip.com

和SM-A及PS-C,LP-C和SM-C作环沉试验，结果见表5。

表5 抗BfA血清与6种提取成份的环沉试验

	阳性数	阴性数	阳性率(%)
PS-A	6	4	60
LP-A	2	8	20
SM-A	1	9	10
PS-C	4	6	40
LP-C	1	9	10
SM-C	1	9	10

$x_1^2=473.23, v_1=5, P_1<0.005, x_2^2=0.8, v_2=1, P_2>0.05$

* :x_1^2为抗血清-PSA组与其他5组比较的x^2值;x_2^2为抗血清PSA组与抗血清-PSC组比较的x^2值，以下同。

(2) 抗PSA血清与上述6种成份作环沉试验，结果见表6。

表6 抗PSA血清与6种提取成份的环沉试验

	阳性数	阴性数	阳性率(%)
PS-A	6	4	60
LP-A	1	9	10
SM-A	1	9	10
PS-C	3	7	30
LP-C	0	10	0
SM-C	1	9	10

$x_1^2=531.67, v_1=5, P_1<0.005, x_1^1=1.1818, v_2=1, P_2>0.05$

(3) 抗BfC血清与6种成份的环沉试验，结果见表7。

表7 抗BfC血清与6种提取成份的环沉试验

	阳性数	阴性数	阳性率(%)
PS-C	6	4	60
LP-C	3	7	30
SM-C	1	9	10
PS-A	3	7	30
LP-A	1	9	10
SM-A	1	9	10

$x_1^2=466.26, v_1=5, P_1<0.005, x_2^2=1.132, v_2=1, P_2>0.05$

(4) 抗PSC血清与6种成份的环沉试验，结果见表8。

表8 抗PSC血清与6种提取成份的环沉试验

	阳性数	阴性数	阳性率(%)
PS-C	5	5	50
LP-C	1	9	10
SM-C	0	10	0
PS-A	3	7	30
LP-A	0	10	0
SM-A	1	9	10

$x_1^2=322.667, v_1=5, P_1<0.005, x_1^1=0.833, v_2=1, P_2>0.05$

讨 论

关于脆弱类杆菌表面抗原的研究，国内尚未见报道。国外仅有几家实验室研究，对其组成、结构和免疫学性质也未能得一致意见，结果难以相互比较。早期研究集中在荚膜多糖上，认为即其特异的抗原决定簇。其证据来自形态学研究和免疫学试验。但进一步研究发现不同株脆弱类杆菌荚膜多糖的糖基组成和数量不同。但却具有共同的脂多糖。这些研究结果提示，提取脆弱类杆菌的多糖复合物作为抗原，可建立特异、敏感又简便易行的免疫学方法以诊断脆弱类杆菌感染，有助于其表面抗原研究。

目前提取细菌多糖的方法，包括酚-水法，液醚法等，均不满意。因分离时提取物丢失过多以致难分析鉴定，且细菌被亲水性荚膜多糖包裹，难溶于酚、醚等。本文改进了Kasper 和Rissing的方法，以酸、碱抽提，用乙二胺四乙酸等处理，分离菌的表面成份和菌体。进一步用氯仿，脱酸胆酸钠分离外膜中的脂类和多糖等，达到分离的目的。

脆弱类杆菌不同菌株的多糖成份不尽相同，但不同程度含有己糖、氨基己糖和甲基戊糖三类糖基。本文采用国内外文献均未见报道的两株脆弱类杆菌ATCC-25285，CDC-14462，就其上述三类糖基和蛋白质的相对含量测定。结果糖的总相对含量接近(31.5μg/ml,32.5μg/ml)，而己糖和甲基戊糖相对含量也接近。两种复合物中的三类多糖组成说明荚膜多糖成份，但其己糖:氨基己糖:甲基戊糖=10∶5∶1。后两类糖基在两种提取物中均偏高，说明其中有脂多糖成份。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本文采用两种经典的免疫学方法。简便、可靠不失敏感，至今仍被认为免疫血清学鉴定，尤其对多糖抗原的有效方法。

试管凝集试验旨在表明提取PS-A表面抗原成份。结果证实:抗PS血清与相应抗Bf血清一样，虽然与4株菌均呈阳性，但试验组(BfA、BfC)与对照组(BM,Bt)的阳性率经统计学处理有显著差异，而试验组之间未表现出差异。

试管凝集不能确定另两种提取物LP和SM是否属于抗原成份，故另设环沉试验。4种抗血清分别与2株菌6种提取物反应，结果表明，抗血清与PS反应阳性率与LP及SM阳性率有显著差异，而4种抗血清与2种PS反应阳性率则无显著差异，说明只有最终提取物PS是表面抗原成份，LP可认为是菌表面中脂类，SM则属于菌体部分。

参 考 文 献

1 Kasper,DL, et al. J.Infect Dis 1975;132=(4)：440

2 Rissing, SP, et al. J.Lab Cmed 1983;102(3)：392

3 Onderonk, AB, et al. Rev. Infect Dis 1984;1：s91

4 Weintraub, A, et al. J. Infect Dis 1983;147(4)：780

5 Weintraub, A, et al. Eur J Biochem 1985;151：657

(收稿日期 1994-01-20)

CHARACTERIZATION OF POLYSACCHARIDE COMPLEX ABTIGENEXTRACTED FROMTWO STRAINS OF BACTEROIDES FRAGILIS

Yan Gang,et al

Dept. of Clinical Microbiology

Two polysaccharide complexes were extracted from Bacteroides fragilis ATCC-25285 and Bacteroides fragilis CDC-14462 after treated with acids,heat,ethylenediamine tetraacetic acid and sodium deoxycholate etc. The facts that the two complexes have approximate amounts of polysaccharides and proteins,and that the nearly equal ratio of polysaccharides and proteins in either of the complexes suggest that there may exist a structure in common. Both capsular polysaccharide and lipidpolysaccharide may contribute to the saccharide composition of the complexes. In immunologial tests with antisera against B. fragilis and against the complexes,the two polysaccharide extracttions were showed to be the subspecies-specific antigens of B. fragilis, and statistically no difference in specificity was found between the two strains of B. fragilis, tested. As for other fractions presented in the extracting process,it was proved that they have nothing to do with the antigens of B. fragilis. These results indicate the possibility of preparing antisera with the polysaccharide complexes and of establishing a much more specific immunological method for detecting infections with B. fragilis, which will be subject to a forthcoming research.

KEY WORDS **Bacteroides fragilis; Capsular Polysaccharide; Polysaccharide complex Antigen; Lipidpolysaccharide**