

SDS 可溶性菌体蛋白在分枝杆菌菌型鉴定中的应用研究

刘金花 伍学洲 林淦柏 苏东明

(江西中医学院微生物学教研室,南昌)

彭祝宪 刘森绳

(江西肺科医院检验科,南昌)

摘要 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 技术,对比分析了未经超声破碎,而直接以 SDS、2-巯基乙醇、EDTA 提取的四种分枝杆菌菌体蛋白图谱,显示人型结核分枝杆菌 H₃₇R_v 株与牛型分枝杆菌 BCG 株的图谱极相似,尤其在 95KD、85KD、67/66KD、60KD 及 50/49KD 5 条主带上完全对应,而堪萨斯及鸟分枝杆菌具有自己独特图谱。从而证实电泳对分枝杆菌的分种具有实际意义。

关键词 分枝杆菌; SDS 可溶性菌体蛋白; 电泳分类

电泳技术是现代细菌分类学中有重要意义^[1],该方法从分子生物学方面反映了细菌的表现型。我们以 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)鉴别不同种的分枝杆菌,用 SDS 增溶的化学方法提取菌体蛋白质,取得满意效果,现将结果报道如下。

材料与 方法

(一) 分枝杆菌

人型结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) H₃₇R_v 株,批号 93009; 鸟分枝杆菌 (*M. avium*), 批号 93315; 堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansasii*), 批号 93304。以上菌种由卫生部药品生物制品鉴定所提供。牛型分枝杆菌 (*M. bovis*) BCG 株,批号 880508,由卫生部上海生物制品研究所提供。

(二) 标本制备

4 种分枝杆菌分别接种在苏通氏液体培养基上,37℃ 培养 4—8 周,煮沸 5 min 杀死,经 3000 r/min 离心 10 min,收取菌体,并用 pH 7.4 PBS 离心洗涤三次,然后各种菌分别配成 50% 菌体混悬液,用组织匀浆器研磨菌体数次,加入终浓度为 0.4% 的 EDTA-2Na, -30℃ 冻存备用。

另取部分 BCG 菌体超声破碎 (Soniprep 150 MSE 超声粉碎仪),离心,取上清水溶性蛋白,以与 BCG 菌体直接用 SDS 提取的可溶性蛋白对比。

(三) SDS 可溶性分枝杆菌蛋白的提取

50% 菌体悬液与含 4% SDS, 4% 2-巯基乙醇, 20% 甘油的 pH 6.8 缓冲液等体积混合,沸水浴 5 min,趁热以 5000 r/min 离心 2min,即刻吸取上清电泳。

(四) SDS-PAGE 方法^[2]

本试验用的分离胶为 10% 丙烯酰胺,电泳恒压 120 V 6 小时左右,考马斯亮蓝 R 250 染色。日本岛津 CS-930 薄层层析扫描仪记录蛋白条带。标准分子量蛋白 SDS-6H (批号 54F-8510) 是美国 Sigma 公司产品,以此计算标本主要蛋白区带的分子量。

结 果

(一) 超声破碎与未经超声破碎 SDS 可溶性 BCG 蛋白图谱 (图 1)

从图 1 看出超声破碎及未经超声破碎的 SDS 可溶性 BCG 蛋白带,经扫描辨认分别为

江西省科委资助课题,负责人苏东明。

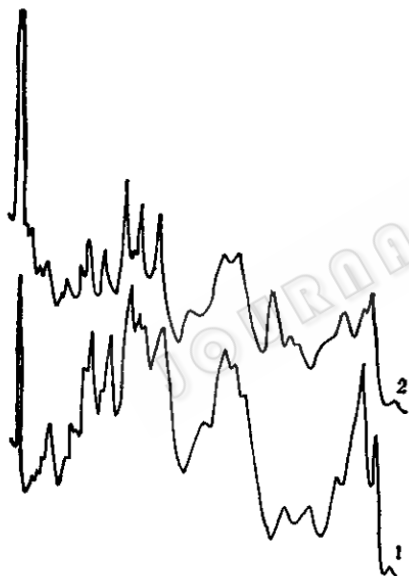
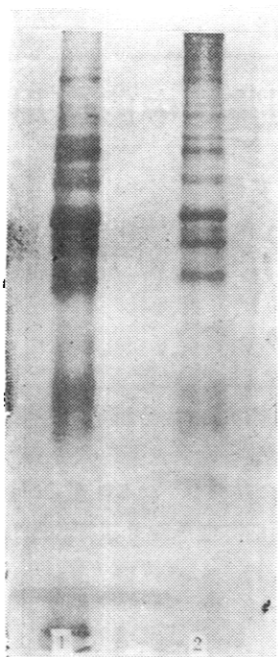


图1 超声破碎与 SDS 溶解的 BCG 蛋白组分对比
1. 示超声破碎的 BCG 蛋白电泳图及扫描图 2. 示 SDS 溶解的 BCG 蛋白电泳图及扫描图

25 条及 22 条, 两者的主要蛋白区带数量几乎一致, SDS 可溶性 BCG 蛋白质仅比超声破碎的 BCG 缺少一些次要蛋白带。

(二) 四种分枝杆菌的 SDS 可溶性菌体蛋白质的比较(图 2)

从图 2 看出 H_3, R_V 为 21 条带, BCG 为 22 条带, 堪萨斯分枝杆菌为 24 条带, 鸟分枝杆

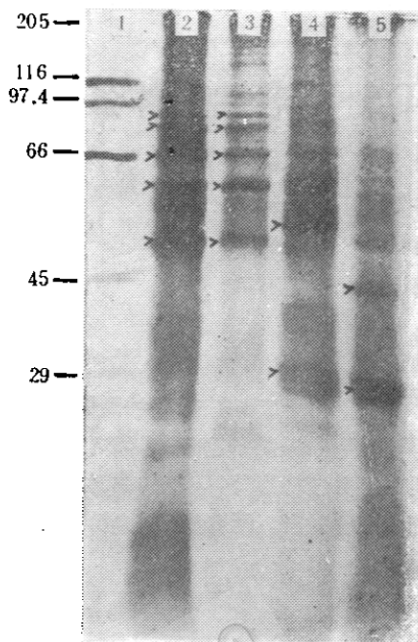


图2 四种分枝杆菌的 SDS 可溶性菌体蛋白质 SDS-PAGE 图谱

1. 标准分子量蛋白 2. 人型结核分枝杆菌 H_3, R_V 株
3. 牛型分枝杆菌 BCG 株 (2 与 3 中箭头示分子量分别为 95 KD、85KD、67/66KD、60KD 及 50/49 KD 的蛋白带) 4. 堪萨斯分枝杆菌 (箭头示分子量为 54 KD 及 30/29 KD 蛋白带) 5. 鸟型分枝杆菌 (箭头示分子量为 45/44 KD 及 29/28 KD 蛋白带)

菌为 23 条带。其中以 H_3, R_V 与 BCG 的蛋白区带相似率最大, 较粗而明显的 5 条蛋白带(分子量分别为: 95 KD、85 KD、67/66 KD、60 KD 及 50/49 KD) 完全对应。堪萨斯分枝杆菌与鸟分枝杆菌则完全有自己的电泳图谱。堪萨斯分枝杆菌除有在分子量区段蛋白带密集特征外, 还有 2 条主带, 分子量为 54 KD 和 30/29 KD; 鸟分枝杆菌也有 2 条主带, 分子量为 45/44 KD 和 29/28 KD。

讨 论

近年来, 分枝杆菌的分型工作已有许多突破性进展, 不是局限于常规的光产色性, 菌落形态及生长温度, 而是深入到分子生物学领域, 如利用枝菌酸甲基酯的薄层层析分型^[9]。而电泳技术用于分枝杆菌分型, 国内还未见报道, 该技术可与其它方法互为对照, 互为补充。

(下转第 8 页)

(上接第 22 页)

本试验结果显示,直接用 SDS, 2-巯基乙醇及 EDTA 提取分枝杆菌菌体可溶性蛋白,效果不次于超声破碎方法,主要蛋白带均未丢失,仅损失了一些次要的对分型作用不大的蛋白带。此项革新不仅省去超声破碎或压榨破碎等昂贵设备,又节省菌体,无疑对广大基层医院开展分类工作是有利的。目前已有用 SDS 溶解的结核菌蛋白作为诊断结核病抗原的报道^[4],故用此方法对结核菌蛋白进一步做免疫化学分析是可行的。

四种分枝杆菌的 SDS 可溶性蛋白各具自

己独特的图谱,但其中人型及牛型分枝杆菌的相似性最大,几乎难以区分,而堪萨斯及鸟分枝杆菌异带率最大。这一结果与薄层层析所得结果接近^[3]。故电泳对分枝杆菌的分类和鉴定具有一定的实用价值。

参 考 文 献

1. 汪恩涛等:微生物学通报,15 (6): 265—268, 1988。
2. 苏东明等:中国人兽共患病杂志,4(4): 29—31, 1988。
3. 庄玉辉等:微生物学报,29: 15—19, 1989。
4. Krambovitis E: *J. Med. Microbiol*, 21: 257—264, 1987。