电泳技术在细菌分类学中的应用

汪恩涛　陈文新
（北京农业大学生物学院）

近年来，电泳技术在细菌分类学中得到了广泛的应用，通过对各类细菌的各种细胞组分的电泳分析，得到了许多有用的分类结果，发展了多种适于各种水平的分类技术。

细菌细胞中有很多组分可以采用电泳分析，如完整的细胞，脂多糖，肽聚糖，蛋白质(包括酶)，及核酸等。这些组分的分子依其电荷性质和电荷的多少，分子的大小和形状诸因素的不同而在电场中表现出不同性质的迁移和不同的迁移速率，从而使组分中不同的分子相互分离。这些细胞组分的差异从不同的侧面反映了细菌遗传本质的差异，载有各种分类信息。因此，这些细胞组分就是分类的信息源，电泳分析就是对分类信息的提取过程。

在实际应用中，电泳技术与光谱分析和计算机技术的结合，为细菌化学分类的自动化开辟了一条可行的途径。电泳技术与血清学技术的结合，既拓宽了血清学分类研究的适用范围，又为蛋白质电泳结果的解释增添了细节。电泳分类技术也与其它细菌分类方法如表型性状的聚类分析，DNA/DNA 同源性分析等互为对照，互为补充，为各类细菌的分类提供了大量证据。

本文谨就电泳技术在细菌分类学中的应用范围和近年来的一些研究成果作一介绍。

（一）核酸酶切片段的电泳分析

近年来，很多人采用限制性核酸内切酶对大分子 DNA 进行消化并用电泳分离其片段，以此进行细菌属、种乃至菌株的分类和鉴定指标。该方法与 DNA/DNA 杂交法相比有一定的优点：(1)操作方便，只涉及一些常规仪器和药品，不用放射性同位素；(2)可以对大量菌株进行两两比较；(3)结果可以进行自动化分析。缺点是它所反映的 DNA 同源性不如杂交法来的直接。

Patel 等(1986)[1] 做了分枝杆菌 DNA 的限制性内切酶分析。他们分别用 BamHI，EcoRI，Hind III 和 Pst I 四种限制性核酸内切酶处理 DNA，1% 琼脂糖电泳后用溴化乙锭染色，紫外光下显色。得到的酶切片段有很好的重复性，具有种特异性并可用于菌株鉴定。

Vookey 等(1985)[2] 用 Eco RI 消化了 15 个 *Leptospira* 菌株，电泳图谱经光密度扫描后用计算机处理，计算出菌株间相似系数并聚类。这个程序可成功地鉴定供试菌株。

Grimont 和 Grimont (1986)[3] 用限制性核酸内切酶处理了 41 个不同细菌种的 DNA，电泳分离后用 ^{32}P 标记的大肠杆菌 rRNA 为探针，分析了各种间 rRNA 基因 (rDNA) 的结构相似性。他们认为该方法对于细菌种的分类和鉴定有用。

此外，还有一些这方面的工作，涉及到许多细菌属、种。采用的限制性内切酶也各式各样，有的多达十几种[4]。这些工作都证明该方法可以用于菌株鉴定，可以区分开血清学方法不能区分的菌株。

（二）质粒电泳

在原核生物中，质粒的存在是一普遍现象。有些质粒的生理功能已为人们所了解，有些尚未被人们了解，后者被称为隐密质粒。电泳分析质粒时，可按提取 DNA 的方法制备样品，也可直接将细胞裂解液进行电泳分析。电泳后经溴化乙锭染色，紫外灯下观察。

Gross 等(1979)[5] 从 15 个地点分离了同一血清型的大豆根瘤菌，这些菌株的生长速率、噬菌体敏感性、抗菌素敏感性、菌落形态、固氮能力和血清学反应等性状完全相同。但是，用质粒图谱可将它们分成四个不同的群。Lobb 和 Rhoades (1987)[6] 及 Ishiguro 等(1985)[7] 分别对不同菌株的质粒做了限制性内切酶分析，以此研究了带有同样表型性状的基因的质粒间的同源性，发现功能相同的质粒具有遗传上的差异。

总之，许多类似的工作都表明，质粒组成为菌株分型提供了不同于血清型和噬菌体敏感型等方法的又一分型方法。

（三）可溶性蛋白质电泳

蛋白质是基因表达的直接产物，关系密切的细菌会有一致的或相似的蛋白质组成，这是蛋白质电泳分析用于细菌分类的理论基础。事实上，蛋白质电泳分析的分类结果也都与核酸同源性研究的结果相吻合。可溶性蛋白质电泳图谱对于细菌种和菌株的分类和鉴

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

定都是一种有用的方法。

可溶性蛋白质样品的制备比较简单。选用合适的方法如：超声破碎，SDS 处理，酶解或溶剂淬取将细胞破碎后，高速离心去除大的细胞碎片即可。在适当的缓冲液中，-20℃ 下可保存两个月以上。

1. 双向电泳分析：O'Farrell (1975)[8] 建立了分辨力极强的蛋白质双向电泳分离技术。第一向用等电聚焦将等电点不同的蛋白质分子互相分离，第二向用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，依据蛋白质分子量的大小进行分离，电泳后用放射性自显影法显示蛋白图谱。用这种技术可将大肠杆菌的可溶性蛋白质分离成 1100 个组分，几乎将其全部基因产物都分析出来了。所以，双向电泳可以给我们提供大量分类信息，目前问题是电泳过程的标准化很困难，结果的分析也很不充分。

Roberts 等 (1980)[9] 采用上述技术分析了根瘤菌的可溶性蛋白，电泳结果用放射性自显影记录在 X-光胶片上。分析结果时将 X-光胶片两两重迭起来进行比较，找出同种菌株间共有的一组蛋白斑点做为该种的决定簇，供试的根瘤菌各种都有其特异的决定簇。根据这些决定簇可以对根瘤菌进行种的区分和鉴定，其分种结果与表型性状的聚类分析和核酸同源性分析的结果相吻合。用这种方法虽然简化了结果的比较，却未考虑到大部分斑点，未能充分利用双向电泳的分析能力。

蛋白质双向电泳结果的显示还可以用银染法[10]，这种方法的灵敏度几乎与放射自显影法相同。Jellum 等(1984)[11] 曾采用过这种方法。

2. 单向电泳分析：单向电泳的分离能力虽不如双向电泳，但其重复性好，且操作简便，成本也低。同时，它的分析能力可提供足够的分类信息，所以，在细菌分类中，这种技术得到了较为广泛的应用。

Cato 等 (1982)[12] 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析了梭状芽孢杆菌属的 70 种细菌的可溶性蛋白，发现 DNA 同源性为 80% 以上的菌株一般具有一致的蛋白质图谱，DNA 同源性为 70% 的菌株具有基本相同的蛋白质图谱。通过比较蛋白质电泳图谱，可以区分供试的细菌种。

Corbel 等 (1982)[13] 采用酚：酸：水淬取法提取蛋白后用圆盘电泳分析了耶尔森氏菌属各种，得到的蛋白质图谱可以区分各种。

很多的类似结果表明，可溶性蛋白质电泳图谱可以用于不同细菌种的鉴定和区分。

可溶性蛋白质的单向电泳分析对于种下分群也有较大意义。Noel 和 Brill (1980)[14] 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析可溶性蛋白，研究了两块大豆地里土著大豆根瘤菌的差异和动态。他们将蛋白质图谱一致的菌株称为一个电泳型 (Gel Type)，将相近的电泳型归为一个电泳群 (Gel Group)。电泳群与血清型，噬菌体型等并不相等。

3. 电泳图谱的计算机处理：为了使蛋白质电泳结果的分析标准化、自动化，有些人利用光谱扫描仪和电子计算机对电泳结果做了聚类分析。

Kersters 和 De Ley (1975)[15] 将圆盘电泳后的凝胶柱用氨基黑染色，脱色后用光密度计扫描。得到的扫描图进行等分，利用各等分的消光值计算出不同样品间的相关系数 (r) 并以此为基础进行聚类分析。用这种方法，他们研究了土壤杆菌和发酵单胞菌两个属的分类，聚类的结果与表型性状聚类分析和核酸杂交结果一致。用这种方法的优点是相关系数中既包括了蛋白质组分的差异，又包含了各组分相对含量的信息。

Jackman (1985)[16] 总结了蛋白质电泳图谱聚类分析的另一方法。可溶性蛋白质用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，用考马斯亮蓝染色，计算机控制的光密度扫描，定出各蛋白质带的位置。通过计算两菌株间相同蛋白质带数 (m) 在两菌株具有的蛋白质带总数 (a + b) 中占有的比例，求出菌株间的相似系数 (Sd)： $Sd = \frac{2m}{a+b} \times 100$。以 Sd 为基础进行聚类分析。该方法只统计蛋白质组分的差异，不考虑其量上的差异。他及其同事用这种方法研究了棒杆菌和假单胞杆菌等菌群，得到的分类结果与 DNA 杂交结果一致。该方法已被确立为医学细菌计算机鉴定的一个基本方法。

（四）核糖体蛋白的双向电泳

核糖体蛋白是生理上很保守的蛋白，其进化较慢，是研究细菌系统进化较好的材料之一。核糖体蛋白在细菌细胞中含量很高，而种类却较少(共有 50 余种)，又由于其碱性性质，使之易分离，好比较。Böck (1985)[17] 总结了该方法，提到了该方法在肠杆菌科和芽孢杆菌科的应用。这种方法适于属、种水平的划分。

核糖体蛋白的制备，可以用醋酸-醋酸镁缓冲液从完整细胞中直接淬取，也可从细胞裂解液中超速离心分离出核糖体后再淬取。后一方法得到的核糖体蛋白更纯净，没有其它碱性蛋白的污染。Böck(1985)[17] 介绍的双向电泳系统中，缓冲液都是含脲的酸性体系，但两向电极缓冲液的离子成分和 pH 值略有不同。

核糖体蛋白双向电泳后用考马斯亮蓝或氨基黑染色。脱色后于透射光下观察比较。菌株之间的差异用 Pd 表示，即不同蛋白质点(d_{pp}) 与两菌株总蛋白质点 (n_{pp}) 的比率：$Pd = d_{pp}/n_{pp}$。再以 Pd 为基础对菌株进行聚类分析[18]。

Böck (1985)[17] 还介绍了对核糖体蛋白双向电泳图谱进行免疫学分析的方法。这种方法可以提供一些蛋白质间同源性的细节，因为电泳迁移率不同的蛋白质可能具有共同的起源，从而表现出抗原性的交叉。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

（五）膜蛋白电泳分析

这里的膜蛋白包括细胞质膜和外膜，后者指一些革兰氏染色负反应的细菌属、种的菌体所具有的胞外结液层（capsule, envelope, 或 outer membrane）。细菌的膜蛋白中有许多酶类，与细菌的生理活动有着密切的联系。所以，膜蛋白组分的差异可能反映出细菌生理方面的一些差异。制备膜蛋白时，先要经低速离心去掉细胞裂解液中的大碎片，再经高速离心沉淀质膜和外膜，质膜和外膜经密度梯度离心相互分离[19]。得到的质膜和外膜经进一步处理使蛋白与脂类分离。

Bachhawat 和 Ghosh (1987)[19] 用电泳分析了固氮螺菌的外膜蛋白，认为其结果对于该属的分类有用。Dagasan 和 Weiner (1986)[20] 分析了生丝单胞菌的外膜蛋白，其结果支持其它分类方法得出的结论。Dunn 等(1987)[21] 用双向电泳分析了弯曲杆菌属细菌的外膜蛋白。外膜蛋白电泳还能区分开血清学不能区分的菌株[22]。

Тальченко 和 Нестеров (1981)[23] 用质膜蛋白质电泳研究了严格甲烷氧化菌的分类。Северин 等(1981)[24] 用同样的方法研究了蛭弧菌的分类。电泳结果用类似于 Jackman (1985)[16] 总结的方法进行了聚类分析，聚类结果均与其它方法的分类结果相吻合，证明该方法对于供试菌的属、种划分有意义。

（六）酶谱分析

同功酶是分支代谢途径中广泛存在的现象，因此，不同菌间同功酶种类上的差异可能反映出它们代谢途径的不同。而不同菌间作用完全相同的酶，由于进化的关系，其氨基酸顺序和组成上也有差异，这些差异间接反映了结构基因的不同。因此，可以将酶谱分析看成对细菌结构基因的比较。

同功酶电泳用于分类研究的文章很多，分析的酶也各式各样。但早期这方面的研究对分类的贡献不大，原因是各研究中涉及的酶种类较少，以至过于重视酶的迁移率的比较。近年来，这方面的研究有了一些发展。

Yang (1985)[25] 研究了同一地区生长的豌豆，菜豆，三叶草和苜蓿上的根瘤菌的几种酶的多形性及其群体遗传结构，电泳结果表明苜蓿根瘤菌完全不同于所研究的其它根瘤菌，其菌株形成非常集中的两个组。而豌豆，菜豆和三叶草的根瘤菌相互交叉，构成相对集中的三大组和一些分散的小组。这一结果与核酸杂交和数值分类等研究结果相吻合。

Selander 等(1986)[26] 对酶谱分析用于细菌群体遗传和分类研究的方法做了总结，指出该方法具有区分种下分类单元并推测它们之间遗传关系的能力。在大肠杆菌等肠杆菌科菌株的多酶电泳图谱的分析中，得出的结果与 DNA 同源性分析的结果相吻合。多酶分析一般采用 15—20 种酶做为细菌结构基因的代表，分析结果时只记录菌株间每种酶的同功酶数目，而不考虑迁移率，以这些同功酶数目的差异为基础进行聚类分析。

酶分析中另一值得提及的工作是 Matthew 和 Harris (1976)[27] 做的β-内酰胺酶等电聚焦分析。他们分析了 5 个革兰氏阳性属和 16 个革兰氏阴性属的 242 个菌株，结果表明，该酶具有种、属特异性，可以区分开供试的各属、种。

（七）免疫电泳

电泳技术与血清学技术结合形成了免疫电泳技术，做为菌株的鉴定和分型方法，它是很成功的，但是，该技术在细菌种及种上水平的分类应用中一直受到限制。最近，Høiby 等(1987)[28] 总结出了对流免疫电泳用于细菌分类研究的方法。

该方法的基本步骤是：(1) 以一个或几个菌株做为相应菌群的代表，制备其可溶性蛋白做为抗原对兔子进行免疫，生产出参考血清(抗体)；(2)制备大量菌株的可溶性蛋白做为待测抗原；(3)第一向电泳分离待测抗原；(4)将第一向电泳后的胶条与混合在琼脂糖凝胶中的参考血清进行对流免疫电泳；(5)考马斯亮蓝染色，记录出现的沉淀线数目；(6)以同样的方法分析参考抗原和参考血清，得出该参考系统总抗原数(沉淀线数目)；(7)待测抗原产生的沉淀线数目与参考系统抗原总数之比为免疫配对系数 (Mc)。

以 Mc 为基础得出的分类结果与表型性状聚类分析和核酸同源性分析结果密切相关。Høiby 等(1987)[28] 指出：种内菌株间 $Mc \geq 0.90$；同属不同种的菌株间 $Mc = 0.70—0.90$，有时更低些；同科的属间 $Mc = 0.15—0.70$；关系更远的菌株间 $Mc \leq 0.15$。Høiby 等(1987)[28] 及 Collin 等(1987)[29] 用该方法分析了大量的细菌种、属，均得到满意结果。

（八）其它应用

除上述几方面外，还有一些其它细胞组分的电泳分析在细菌分类研究中有应用或有应用前景。

Marshall (1967)[30] 研究了九株根瘤菌的完整细胞在不同 pH 下的电泳迁移率，发现慢生根瘤菌在 pH 2.0 时不迁移，在 pH4.0—10.7 时以恒定的速度向正极迁移；快生根瘤菌在 pH 2.0 时向负极微弱迁移，pH4.0—9.2 时以恒定速度向正极迁移，pH9.2—10.7 时向正极的迁移速度加快；快生根瘤菌迁移速度比慢生根瘤菌的快。据此，他推测慢生根瘤菌细胞表面只有羧基，快生根瘤菌细胞表面则带有羧基和氨基，且羧基的数量要比慢生的多。电泳习性与表型关系的比较表明，表面电荷的变化与细菌的表面抗原结构有关。用这种方法结合酶学处理或化学处理还可推测细胞表面其它一些基团如磷酸等的有无。

Goldman 和 Leive (1980)[31]，Palva 和 Mäkelä (1980)[32] 分别用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析了大

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

肠杆菌和沙门氏杆菌的脂多糖的异质性。电泳结果显示出种间有差异。Tsai 和 Frasch (1982)[33] 对上述方法做了一些改动，采用银染法代替放射性自显影来显现脂多糖的电泳图谱。这种染色方法也可用于多糖和糖蛋白的电泳显色。肽聚糖经电泳后即可用银染显示，这对于革兰氏阳性菌的分类是有意义的。

Shan 等 (1985)[34] 总结介绍了用等速电泳法分析厌氧菌酸性代谢终产物的方法，认为该方法对这类细菌的分类有用。这种电泳方法既可对分离物进行定性。也可进行定量分析。

Zeiger 等(1972)[35] 在研究中发现，DNA 在凝胶中的电泳迁移率与其 G + C 含量有关。分子量相同的细菌 DNA 片段电泳后得到如下结果：枯草芽孢杆菌 (42%G+C)，产气气杆菌 (56%G+C) 和荧光假单胞菌 (63%G+C) 的 DNA 电泳迁移率依次为 3.32，3.53 和 3.66。尽管由于 G + C 含量差异造成的 DNA 电泳迁移率的差异很小，Gilpin 和 Dale (1979)[36] 测得的细菌 DNA 电泳迁移率仍和 G + C 含量有很好的相关性。

电泳分析在细菌分类学研究中已得到了广泛的应用并由此产生了许多有价值的分类结果，其中，全细胞蛋白的单向电泳在某些细菌分类实验室中已成为常规分类方法。但是，总的看来在细菌分类学研究中，电泳分析还只能起到与其它方法相互印证的作用。同时，由于电泳制样及分析过程中诸多偶然因素会影响电泳结果的重复性，所以，在分析的各个步骤都要求严格的标准化才能获得满意的结果。

参 考 文 献

[1] Patel, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 541—551, 1986.

[2] Hookey, J. V. et al.: *Fems Microbiol. Lett.*, **29**: 185—188, 1985.

[3] Grimont, F. and P. A. D. Grimont: *Ann. Inst Pasteur Microbiol.*, **137B**: 165—175, 1986.

[4] O'Hara, W. J. et al.: *Vet. Microbiol.*, **10**: 425—429, 1985.

[5] Gross, D. C. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **114**: 257—266, 1979.

[6] Lobb, C. J. and M. Rhoades: *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 1267—1272, 1987.

[7] Ishiguro, N. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **21**: 662—665, 1985.

[8] O'Farrell, P.: *J. Biol. Chem.*, **250**: 4007—4021, 1975.

[9] Roberts, G. P. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**: 414—422, 1980.

[10] Blum, H. et al.: *Electrophoresis*, **8**: 93—99, 1987.

[11] Jellum, E. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**: 478—483, 1984.

[12] Cato, E. P. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **15**: 688—702, 1982.

[13] Corbel, M. J. et al.: *Res. Vet. Sci.*, **33**: 43—46, 1982.

[14] Noel, K. D. and W. J Brill: *Appl. Environ Microbiol*, **40**: 931—938, 1980.

[15] Kersters, K. and J. De Ley: *J. Gen. Microbiol.*, **87**: 333—342, 1975.

[16] Jackman, P. J. H.: Bacterial Taxonomy Based on Electrophoretic Whole-Cell Protein Patterns. In M. Goodfellow and D. E. Minnikin (ed.). Chemical Methods in Bacterial Systematics. Academic Press. pp 115—129, 1985.

[17] Běck, A.: Analysis of Ribosomal Proteins by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. In G. G. Chalk (ed.). Methods in Microbiology. Vol. 18. Academic Press. pp 109—122, 1985.

[18] Hori, H. and S. Osawa: *J. Bacteriol.*, **133**: 1089,—1095, 1978.

[19] Bachhawat, A. and S. Ghosh: *J. Gen. Microbiol.*, **133**: 1751—1758, 1987.

[20] Dagasan, I. and R. M. Weiner: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**: 192—196, 1986.

[21] Dunn, B. E. et al.: *Infect. Immun.*, **55**: 1564—1572, 1987.

[22] Mocca, L. and C. E. Frasch: *J. Clin. Microbiol.* **16**: 240—244, 1982.

[23] Гальченко, В. Ф. и А. И. Нестеров. *Микробиология*. **50**: 973—979, 1981.

[24] Северин, А. И. др.: *Микробиология*. **50**: 980—984, 1981.

[25] Young, J. P. W.: *J. Gen. Microbiol.*, **131**: 2399—2408, 1985.

[26] Selander, R. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 873—884, 1986.

[27] Matthew, M. and A. M. Harris: *J. Gen. Microbiol.*, **94**: 55—67, 1976.

[28] Høiby, N. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37** 229—240, 1987.

[29] Collins, M. T. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**: 351—356, 1987.

[30] Marshall, K. C.: *Aust. J. Biol. Sci.*, **20**: 429—438, 1967.

[31] Goldman, R. C. and L. Leive: *Eur. J. Biochem.*, **107**: 145—153, 1980.

[32] Palva, E. T. and P. H. Mäkelä: *Eur. J. Biochem.*, **107**: 137—143, 1980.

[33] Tsai, C. M. and C. E. Frasch: *Anal. Biochem.*, **119**: 115—119, 1982.

[34] Shan, H. N. et al.: Detection of Acidic End Products of Metabolism of Anaerobic Gram-Negative Bacteria. See 16, pp327—333.

[35] Zeiger, R. S. et al.: *Nature (London) New Biol.*, **238**: 65—69, 1972.

[36] Gilpin, M. L. and J. W. Dale: *Microbios Lett.*, **12**: 31—35, 1979.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn