

难辨梭菌毒素的免疫电镜观察

史俊华 吴桐 葛培玲 黄福林*

(南京铁道医学院,南京 210009)

摘要 本文用兔抗难辨梭菌毒素 A 标记在难辨梭菌 48 小时培养物中产生的毒素上,再用葡萄球菌 A 蛋白(Staphylococcus protein A,SPA)胶体金(PAG)标记,即可在电镜下观察到清晰可见的毒素颗粒。

关键词 难辨梭菌;毒素;免疫电镜

* 在南京军区总医院工作

难辨梭菌(*Clostridium difficile*, CD)系1935年Hall^[1]等首先从新生儿粪便中分离出的,后来Bartlett等通过动物实验及临床证实CD菌是抗生素相关性腹泻的病原菌^[2]。CD菌是一种专性厌氧菌,对氧极敏感,故临床检出极困难。Taylor等于1980年证明CD菌产生两种毒素,即毒素A和B^[3],两者起协同致病作用。后来又发现有第三和第四种毒素,但研究甚少。国内外对毒素A和B研究较多,特别是对其检测方法上各有利弊,我室曾用SPA协同凝集试验方法检测毒素^[4]。最近我们采用SPA胶体金标记抗毒素检测CD菌产生的毒素A,得到了满意的结果,本方法简便、易于保存、重复性好,为进一步研究难辨梭菌毒素的致病机理打下了良好的基础。

材料与方 法

(一) 材 料

1. 菌种:难辨梭菌产毒菌株及不产毒菌株均由兰州生物制品研究所惠赠,并经小白鼠致死试验得到验证。

2. 难辨梭菌毒素A抗体:来源同1。

3. 胶体金标记SPA(即PAG Au为10nm)。

4. 0.02mol/L TBS液:Tris 1.21g, NaCl 4.4g, BSA 0.5g, NaN₃ 0.25g, 加蒸馏水至500ml,调pH7.4。

5. 厌氧培养基:厌氧培养基干粉43g,酵母浸膏3g,加蒸馏水至500ml,调pH7.4,高压灭菌备用。

6. 厌氧培养条件:CS速效型除氧剂,复合无毒塑料薄膜。

7. 1%锇酸:购于上海化学试剂商店。

8. 1%EA:购于上海华美生物工程公司。

9. 柠檬酸铅、醋酸铀:购于上海化学试剂商店。

(二) 方 法

1. 标本处理过程:将产毒与不产毒CD菌种分别接种于厌氧培养基中置厌氧环境培养48h, 500r/min离心10min,弃上清,加入

0.4%戊二醛固定,置4℃冰箱内,次日取出用pH 7.36 0.1mol/L PBS冲洗一次,过夜,再每小时换一次缓冲液,共换4-6次。

将上述处理的标本经1%锇酸固定1h,用分析纯丙酮逐级脱水,Epon 812包埋,半薄切片光镜定位,1KB IV型超薄切片机切500-800A薄片,捞于有膜铜网和无支持膜300目镍网,分别作常规电镜和免疫电镜观察。

2. 免疫标记步骤:(1)切片于1% H₂O₂中浸10min;(2)放双蒸水中5min,重复三次;(3)在pH7.4 0.05mol/L TBS中浸洗5min,重复三次;(4)在1%EA中浸泡15min;(5)1:20 CD菌抗毒素A中4℃20h后置室温2h;(6)用pH7.4 0.05mol/L TBS液先流洗后浸洗10min,重复3次;(7)pH7.4 0.02mol/L TBS浸洗10min;(8)1%EA浸洗15min;(9)1:10PAG室温下浸泡2h;(10)0.02mol/L流洗后浸泡10min,重复3次;(11)双蒸水浸洗5min,重复2次;(12)饱和醋酸铀染色5min;(13)双蒸水流洗;(14)柠檬酸铅浸洗1-3min;(15)水洗,凉干;(16)用TEM-1200EX透射电镜观察金标记情况。

3. 对照实验:用难辨梭菌不产毒株,处理及免疫标记过程同难辨梭菌产毒株。

结 果

1. 难辨梭菌产毒株产生的毒素A经胶体金染色后呈现出的胶体金颗粒为浓染致密的圆黑点(图1),从图1中可见毒素A均在菌体外。

2. 毒素的分布和位置:从图2及图3中可以看到清楚的见到毒素染色后的致密圆点不仅在菌体外有,而且在菌体内也有。图2可见毒素A分子在菌体内有6个,其中有2个即将被排出菌体(在胞膜间隙中)。菌体外有4个毒素分子。图3可见毒素分子在菌体内有4个,菌体外有11个。

3. 难辨梭菌不产毒株,无论在菌体内或外均看不到呈致密圆点的毒素A。

讨 论

1. 自1971年Faulk等^[5]首次报道用胶体金的免疫电镜观察到沙门氏菌体表面的胶体金颗粒以来,它的应用已遍布医学和生物学研究的众多领域,但用此方法检查难辨梭菌毒素A尚未见报道。

2. 免疫胶体金方法与荧光法、免疫酶联法相比有以下优点:步骤简单、重复性好、不需有致癌性的显色底物^[6],显色结果可长期保存,可以用光镜也可以用电镜观察,具有高电子密度的金颗粒在镜下分辨率高,不影响原有超微结构的观察,因此本方法是把形态与功能研究紧密结合在一起的重要方法。

3. 本试验用SPA标记的金溶胶^[7],是利用SPA非特异的与IgG的Fc段结合,同时SPA又可吸附在胶体金颗粒表面,因SPA表面带正电荷,胶体金颗粒表面带负电荷,静电吸引达到范德华引力范围内的牢固结合力,而且极少引起蛋白质活性的改变。此外,胶体金颗粒表面较粗糙也是形成吸附的有利条件。

参 考 文 献

1. Hall I C, O'Toole E; *Am J Dis child* **49**:390,1935.
2. Bartlett J G et al.; *Gastroenterology*, **75**(5):778,1978.
3. Taylor N S et al.; *Infect Immun*, **34**:1036-1043,1981.
4. 刘功云等; *中华微生物学和免疫学杂志*, **10**(2):132,1990.
5. Falk W P et al.; *Immunochemistry* **8**:1081,1981.
6. Lyerly D M et al.; *J clin Microbiol* **17**(1):72,1983.
7. Faulk W P et al.; *Nature New Biol.* **231**:101,1971.

(1992-9-4 收稿)



图1 难辨梭菌产毒株(50,000×)



图2 难辨梭菌产毒株(80,000×)



图3 难辨梭菌产毒株(50,000×)