

## 细菌透析袋表面培养法及其 蛋白质产物的检测

刘士先 孙 浮 果惠恩

(张家口医学院微生物学教研室,河北 075029)

**摘要** 本文报告的细菌透析袋表面培养法,可使被检菌的浓度比普通培养法高10倍左右,并避免了培养基中高分子物质混入,以上清原液直接进行SDS-PAGE得到了清晰的带谱。对葡萄球菌产生的蛋白质带谱观察显示:不同菌种、菌株间带谱都有各自不同特征,各菌株的带谱重复性良好。本培养法在细菌蛋白质产物分析及临床细菌鉴定中是很有实用价值的。

**关键词** 透析袋;细菌培养法;细菌蛋白质产物;SDS-PAGE

分析细菌产生的毒素、酶等蛋白质产物,对研究细菌的致病性,菌种、菌株间的异同及临床细菌学鉴定均有实用价值<sup>[1]</sup>。为此目的,一般使细菌在液体培养基中增殖,检测上清液中产物,但多因浓度偏低,浓缩时操作烦杂而影响实际应用。此后,为避免培养基中的高分子物质混入,干扰检测,曾采用透析培养法<sup>[2,3]</sup>。这种透析培养比普通培养麻烦,又需一定装置,也难在日常临床检查中应用。为解决这些问题,1988年日本生贝初等<sup>[4]</sup>报告了纤维素膜表面培养法,我们据其原理采用简便易行的透析袋表面培养法,以培养上清液直接进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,观察了葡萄球菌等供试菌株产生的蛋白质谱形,效果很好,现将结果报告如下。

### 材料和方法

#### (一) 供试菌株

标准菌株有:金黄色葡萄球菌(简称金葡菌) Cowan 1株(26111);SPA阴性对照株 Wood46株(26107);金葡菌 ATCC(26112);表皮葡萄球菌(26101);腐生葡萄球菌。皆由中国药品生物制品检定所提供。分离菌株为本室由健康人鼻咽部分离得到,经鉴定为金葡菌。

#### (二) 分子量标准蛋白

由中国医学科学院基础研究所赠, pkarmacia 产品。分别是分子量为94 Kd 磷酸化酶;67 Kd 的牛血清蛋白;43 Kd 的卵清蛋白;30 Kd 的碳酸酐酶;20 Kd 的胰蛋白酶抑制剂。

#### (三) 透析袋表面培养法

透析袋表面培养法所用透析袋为SERVA20/32型,剪成15cm左右,用去离子水充分洗涤后煮沸10min,装入20ml普通肉浸液培养基,两端用丝线扎紧,保证液体不外漏,放入适当粗细的大试管中,使外透析液能均匀地分布于透析袋表面。外透析液为2ml的0.5% NaCl(培养液与透析液之比约10:1),装入外透析液后,高压灭菌待用。

被检菌接种外透析液后,轻轻振荡使细菌均匀分布于透析袋表面。37℃ 48h培养,其间再振荡几次。培养结束后收集外透析液,3500 r/min离心30min后,取上清液供实验用。

#### (四) SDS-PAGE

垂直板型聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶浓度10%。电泳缓冲液为0.025mol/L Tris 甘氨酸液,pH8.3。SDS浓度为0.04g/L。样品为上述透析袋表面培养的上清原液,样品量50—

70μl。80—120V,电泳3h后,考马斯亮蓝染色,各菌呈现条带清晰的带谱。

质也有所不同。

### 结果和讨论

#### (一) 表面培养法的结果和优点

用本法将细菌培养48h后,经3500 r/min 30 min 离心去上清,将菌体沉淀洗涤稀释后,与同样体积(2 ml)的肉汤培养基培养48h的菌体,以分光光度计进行浊度测定。结果前者菌体浓度相当于后者的10倍(菌数达10<sup>11</sup>/ml)。由此推论,透析袋表面培养法的上清液中产生的蛋白质浓度可能也相应提高10倍左右。本法以培养原液上样,电泳带谱清晰,完全能满足检测需要。

过去文献报告的透析培养法<sup>[2,3]</sup>,制备透析培养基至少需透析一夜,虽能除去来源于培养基的高分子物质,但细菌产生的蛋白质浓度低,需经浓缩后进行检测,费时费事。而且装置复杂,做为实验研究用尚可,对临床检测则不适用。本文采用的方法不需要预先准备和特别的透析装置,简便易行。该培养法透析袋内营养物质和外透析液中细菌产生的废物,随时相互扩散,结果使细菌也达很高的增殖浓度,与此相应产生的蛋白质浓度也增高,相对地达到了浓缩代谢产物的目的。上清液直接进行电泳分析,省去了浓缩操作过程,效果可靠,培养装置简便易行,可望在临床检验及实验研究中成为有实用价值的方法。

#### (二) 供试菌株电泳结果

从图1电泳结果看,供试的标准菌株经SDS-PAGE电泳,不同菌种间蛋白质带谱形有明显差别。金葡菌Cowan I株和ATCC株条带多,表皮葡萄菌条带少,彼此间谱形也不同。提示不同菌种产生的蛋白质在量和质上均有所不同。其中腐生葡萄菌经多次重复,均无条带出现(产生的蛋白量低,还是不产生?有待进一步研究);健康人群分离的金葡菌,菌株间的蛋白带谱也有明显差异,提示不同菌株间产生的蛋白

MW:kd,

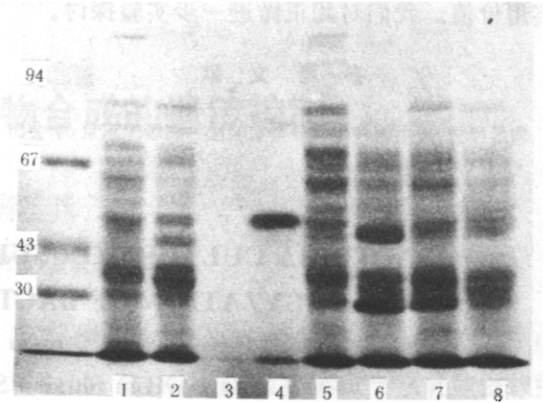


图1 标准菌株及临床分离菌株培养上清蛋白电泳图  
1.Cowan 1株 2.ATCC 3.腐生葡萄球菌 4.表皮葡萄球菌 5-8.健康人鼻咽部分离的金黄色葡萄球菌

图2所示为金葡菌Wood46株及Cowan I株不同菌落的培养上清及产毒素性大肠杆菌、乙型副伤寒杆菌培养上清的蛋白质带谱。从图中看出,同一菌株的不同菌落带谱完全相同;不同菌种间带谱则明显不同。经多次重复实验,培养上清蛋白的浓度及各菌株的带谱形都非常稳定,重现性良好。

MW(kd)

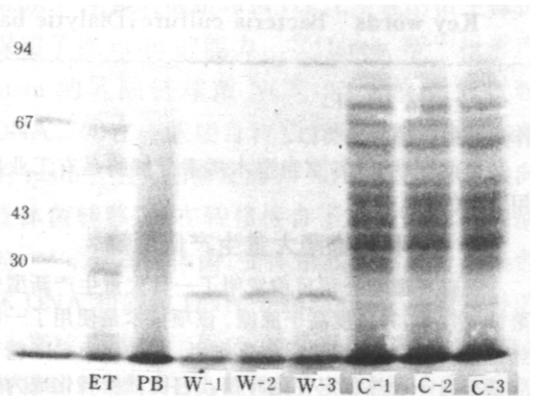


图2 金葡菌Wood46株及Cowan I株培养上清蛋白电泳图  
ET:产毒素大肠杆菌 PB:乙型副伤寒杆菌  
W-1,W-2,W-3:Wood46株不同菌落  
C-1,C-2,C-3:Cowan I株不同菌落

以上结果显示,通过本法对细菌产生的蛋

白质的带谱分析和鉴定,对研究细菌的致病物质、菌种鉴定及菌株间流行病学调查都有一定实用价值。我们对此正做进一步实验探讨。

参 考 文 献

1. 驹形和男:微生物の化学分类实验法・初版・东京:学会出

版センター,183-208,1982.

2. Vincent G & V Fredette: *Science*, **114**:549,1951.

3. Gerhardt P & D M Gallup: *J. Bacteriol.* **86**:919,1963.

4. 生贝 初(日)……: *臨床検査*, **32**:698,1988.

(1992-10-15 收稿)

**BACTERIA CULTURE ON SURFACE OF DIALYTIC-BAGS AND ANALYZATION OF BACTERIA-PRODUCED PROTEIN**

Liu Shixian Sun Li Guo Heini

(Department of Microbiology, Zhangjiakou Medical College, Hebei 075029)

This article reports a method of bacteria culture on the surface of dialytic-bags which can prevent macromolecules from penetrating in or out. Using this method the author cultured 8 strains of *staphylococcus* and from the external dialytic fluid samples of supernatant were collected and analyzed with SDS-PAGE. The result showed that the concentration of bacteria cultured with this surface method was about 10 times as high as that with usual method. The concentration of bacteria-produced protein in the supernatant was also high enough to give a clear protein spectrum with the original sample without concentrating, and different supernatant from different species and/or strains gave different spectrum patterns. The reproducibility of the experiments with all strains of bacteria was very satisfying. The data indicate that this cultural method may be useful in analyzation of bacterial protein products and clinical identification of bacteria.

**Key words** Bacteria culture; Dialytic bags; *Staphylococcus*; SDS-PAGE