对几种细菌不耐热肠毒素的分析

陈兆云 杨汉林 杨婷婷 叶荣华

（福建省卫生防疫站，福州）

如今已知肠毒素可致腹泻，然而其抗原成份尚未十分清楚。为了探讨各种细菌肠毒素的成份状况而选取大肠杆菌、不凝集弧菌和国际标准产毒株 569B 等 3 种细菌的肠毒素作实验观察。现将结果报道如下。

材 料 与 方 法

（一）材料

1. 菌种：共计 16 株，其中包括大肠杆菌13株（M、N、O、P、Q、R、S、T、W、x、y、H_1、H_2）；不凝集弧菌 2 株（NA_7、NA_8）；569B（V_9）一株。

2. 琼脂糖：系上海东海制药厂出品。

3. 肠毒素提取：按文献[1]制备粗制肠毒素（称为原液）；将原液 20ml 于平皿内，37℃ 蒸干，用灭菌盐水 2ml 洗脱为浓缩液；取原液 30 ml 加无水乙醇 220ml，充分混匀，置 4℃ 冰箱 24—48 小时，离心沉淀，去上清，将结晶沉淀物放 37℃ 过夜，待酒精蒸发完，以灭菌生理盐水 2ml 溶解为提纯液。肠毒素液均作无菌试验。存于 4℃ 待用。原液、提纯和浓缩的肠毒素都经兔肠结扎试验，结果均呈阳性反应。

4. 抗毒素血清制备：以肠结扎反应强阳性的提纯肠毒素作家兔免疫注射。注射量从 0.1 ml 至 1ml 逐渐增加。每间隔 3—4 天注射一次。第 1—3 针腹部皮下注射；第 4—7 针作静脉注射。最后一次注完，停 5 天，抽血分离血清，用双向琼脂扩散法试验。如 37℃ 4—5 小时，抗毒血清与相应免疫的肠毒素呈现明显的沉淀线，即分离血清，灭活，加 1‰ 叠氮钠防腐，于 4℃ 保存。若无沉淀线出现，或沉淀线不明显，可按最后一次注射量再免疫 1—2 次。制备的抗毒素血清：B_9（569B），G_7、G_8（不凝集弧菌 NA_7、NA_8）和 HE_1、HE_2（大肠杆菌 H_1、H_2）。

5. 抗毒血清吸收：按照肠毒素乙醇提纯方法提纯 3% 脲胨水。抗毒血清与脲胨水提纯液按 4:1 混匀，放 37℃ 4 小时。经常摇动，待非特异性蛋白完全吸收后，离心沉淀，小心吸取血清上部，存于 4℃ 冰箱内。如吸收一次不完全，可再吸收一次。如与菌体有凝集，抗毒素血清以同样方法相应地再作菌体吸收。

（二）方法

1. 按文献[2]方法制作琼脂片，如图 1 所示位置打孔。操作过程注意无菌手续，严防污染。

2. 琼脂孔内分别注入肠毒素抗原和抗毒素血清。

3. 将琼脂片放入平皿内，底部垫托含有 t_{ris} 缓冲液纱布。平皿装在保持适宜湿度的铝盒中，置 37℃ 孵育 1—2 天。

4. 每天记录沉淀线反应结果。最后将盒子置于 4℃ 冰箱内待拍片和染色用。

5. 同时作 3% 脲胨水的提纯液、菌体抗原、普通脲胨水和菌体免疫的血清对照试验，排除非特异性反应。

结 果

（一）569B（B_9）、大肠杆菌 H_1、H_2（HE_1、HE_2）的抗毒素对几种抗原的分析

M、N、O、P、Q、R、S、T 等 8 株大肠杆菌粗制肠毒素与 569B（B_9）抗毒血清呈现的

指导者李星，参加工作的还有苏用年，董新平。肠结扎试验有林成水，郭维植，曾凝梅协助。张绍佩，严延生和福建省医大摄影室洪安等同志负责摄影，特致谢。

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

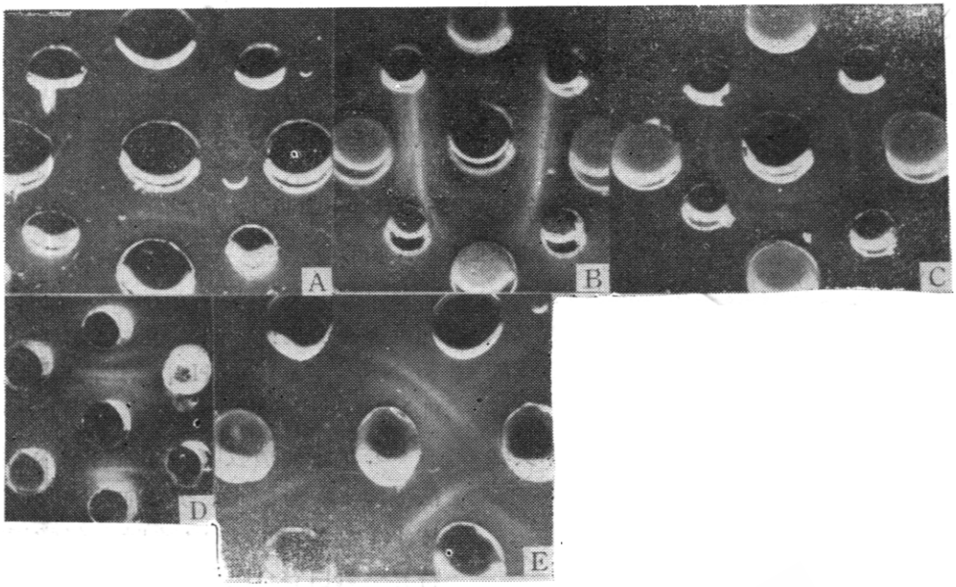

图 1-A—E　各种肠毒素与抗毒素血清所形成的沉淀线

A: T M N / S B_9 P / R Q O

B: W Y W / x HE_2 x / T y T

C: W Y W / x HE_1 x / T y T

D: W NA_7 M / B_9 / x V_9 y

E: HE_2 B_9 / x V_9 y / HE_1 G_7

抗毒素血清： 569B(B_9)，大肠杆菌（HE_1、HE_2），不凝集弧菌（G_7）。
肠毒素抗原： 569 B(V_9)，大肠杆菌(M、N、O、P、Q、x、y、S、T、R、W)，不凝集弧菌（NA_7）。

沉淀线均一致，毒素成份相同。569B 抗毒素血清 B_9 中含有大肠菌肠毒素成份(图 1-A)。大肠菌 H_2 的抗毒素血清 HE_2 与提纯的 x、y 肠毒素所呈现的沉淀线条较多，与 x 毒素呈现明显的沉淀线 3 条：第一条线与 x、w、T 3 株大肠菌肠毒素相似；第二条与 T 毒素相似，与 y 不同；第三条与其他株完全不同。由此可见，大肠菌株间的肠毒素有时也有差异(图 1-B)。大肠菌 H_1 的抗毒素血清 HE_1 和 HE_2 抗毒血清同时对 x、y、w、T 4 株肠毒素，结果 4 株肠毒素除有共同的抗原成份外，y 株还有不同的抗原成份存在(图 1-C)。因此，如用不同菌株肠毒素免疫所获得抗毒素血清，其反应结果也不相同。

(二) 不凝集弧菌、大肠杆菌和 569B 肠毒素间的关系

569B 抗毒素血清 B_9 对不凝集弧菌 NA_7、大肠杆菌（W、M、x、y)和 V_9 的肠毒素反应结果：除共同有一条相似的沉淀线外，NA_7 和 V_9 另有 3 条与大肠菌肠毒素不同的成份(图 1-D)。

(三) 四种抗毒血清的沉淀线比较

HE_1、HE_2、G_7 和 B_9 等四种抗毒素血清对 V_9、x、y 肠毒素的反应结果：B_9 抗毒素对 V_9 与 y 抗原，V_9 呈 4 条沉淀线；而 y 只有一条，并与 V_9 的一条呈部分交叉反应。V_9 与 y 抗原对 G_7 抗毒血清，每种抗原只有一条沉淀线，二线也呈部分的交叉反应。故 V_9 与 y 抗原的成份有明显地不同。HE_1 抗毒血清对 V_9 和 x 抗原，两者有异同成份；而对 HE_2 抗毒血清，V_9 则不呈沉淀线，x 呈 3 条沉淀线(图 1-E)。

阴性对照结果：3% 普通脲胨水，提纯的脲胨水沉淀液和菌体抗原，与相应的抗毒血清均无沉淀线出现；菌体免疫的抗血清与肠毒素抗

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

原也呈阴性。

（四）用三种方法处理的肠毒素与沉淀线关系

以乙醇提纯的肠毒素与抗毒血清作扩散试验结果，其沉淀线条数比浓缩法肠毒素为多；原液沉淀线条少。V_9抗原和 NA_7 抗原反映此现象较明显，而 H_1、H_2 却差别较小。原液常呈阴性反应（表 1）。

表 1 三种方法处理肠毒素与沉淀线数之关系

处理方法	抗原	抗体				
		B_9	G_7	G_8	HF_1	HE_2
提纯	V_9	5	4	2	1	1
	NA_7	4	2	1	1	1
	H_1	2	1	1	1	2
	H_2	1	—	—	2	1
浓缩	V_9	3	1	2	—	—
	HA_7	3	2	1	—	—
	H_1	2	1	1	1	1
	H_2	1	1	1	1	—
原液	V_9	2	2	2	—	—
	HA_7	2	2	1	—	—
	H_1	1	—	—	—	1
	H_2	1	—	—	1	1

讨　　论

从实验结果看，大肠杆菌、不凝集弧菌和569B 三种细菌所产生的肠毒素抗原成份有共同和不同部分。有时同种细菌株与株间也存在异同成份。这将为各种肠毒素的检测和防治肠毒素腹泻病的单克隆抗体制备和亚单位抗原研究提供有价值的参考资料。

我们曾以双向琼脂扩散法分析肠道革兰氏阴性杆菌和埃尔托弧菌的抗原成份[2]。Takeshi 于 1981 年又报道平皿琼脂扩散法快速鉴定大肠杆菌肠毒素[3]。均证明此法具有一定敏感性和特异性，观察方便，操作又简易，无需特殊设备，适合基层实验室使用。

Gyles 报道大肠杆菌与霍乱弧菌肠毒素有相似之处[4]。大肠杆菌 334 菌株不耐热肠毒素（Lt）与不同型大肠杆菌和霍乱弧菌抗毒素可产生沉淀反应，与霍乱弧菌569B 抗毒素能起中和反应。这两组肠毒素有共同的抗原决定簇。但是有的大肠杆菌，如 408-3 菌株与 569B 则不起反应，两者缺乏共同的抗原决定簇[5]。有的作者认为非 O-1 弧菌与霍乱肠毒素（Ct）有区别。不同型大肠杆菌耐热抗原（Lt）是一致的，与霍乱 Ct 抗原有关系。人和猪大肠杆菌 Lt 与霍乱弧菌 Ct 有 20 个氨基酸排列顺序基本相同，只有 5 个不同。但也有作者提出不同看法。目前，国内有关这方面资料尚未见到公开报道。今后，如能对肠毒素进行深入研究，对于解决当前危害广大人群的肠毒素腹泻病问题无疑是有意义的。

肠毒素提纯是深入研究肠毒素的重要问题之一。从表 1 结果可见，对于肠毒素处理方法不同，所呈现的沉淀线条数也不相同。乙醇提纯的肠毒素抗原所呈现的沉淀线条比浓缩法抗原多而明显，对抗原分析结果较佳；而原液法抗原却有时不出现沉淀线，或线条数少。从兔肠结扎试验也表明原液法效果比提纯和浓缩法差。故原液法不适宜用于抗原成份分析。这可能是由于原液未作浓缩提纯液体内含肠毒素浓度稀有关。这对于肠毒素检测和分析时应引起注意。

参 考 文 献

[1] 林成水等：中华预防医学杂志，**2**：101，1981。

[2] 陈兆云：微生物学通报，**1**：38，1983。

[3] Takeshi, H. et al. *Lancet*, **8247**: 609, 1981.

[4] Gyles C. L.: *J. Infect Dis*, **129** (3): 277, 1974.

[5] Singh, A. et al.: *Indien J. Med. Res.*, **65** (6): 777, 1977.

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