

• 基础研究 •

大肠埃希菌脂多糖紫外光谱检出方法的研究

陆书华¹, 杨兴光², 王 坤³, 钟启平⁴△

(1. 济宁医学院附属医院检验科, 山东济宁 272069; 2. 山东省疾病预防控制中心, 济南 250014;

3. 山东省电力研究院, 济南 250000; 4. 天津医科大学微生物教研室 300070)

摘要:目的 通过对大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌等细菌脂多糖的紫外光谱分析, 探讨用 259 nm 波长处紫外可见光谱分析大肠埃希菌脂多糖的方法。方法 酶解法提取临床分离的 TH1、TH2、TH6、TH7、P7、K11 脂多糖; 鲎变形细胞溶解物试验测定其体外内毒素活性, 紫外可见光谱扫描测定其吸光度, 凝胶色谱法纯化, 硫酸-苯酚法测定其脂多糖含量。结果 脂多糖最低阳性浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-4} \mu\text{g/mL}$ 。紫外可见光谱监测发现这些细菌脂多糖在 254~260 nm 处有最高吸收峰, 大肠埃希菌在 259 nm 处有最高吸收峰, 其峰值与糖显色测出的峰值完全一致。结论 在波长 259 nm 处大肠埃希菌有最高吸收峰, 256~260 nm 波长处是大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和志贺菌脂多糖的特异吸收峰, 因此, 259 nm 波长处将有可能作为大肠埃希菌脂多糖检测的新方法, 254~260 nm 波长处有可能作为革兰阴性菌脂多糖检测的新方法。

关键词: 革兰阴性菌; 脂多糖类; 大肠埃希菌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.21.018

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)21-2466-03

The research of *Escherichia coli* lipopolysaccharide ultraviolet spectrum detected methodLu Shuhua¹, Yang Xingguang², Wang Kun³, Zhong Qiping⁴△

(1. Department of Clinical Laboratory Sciences, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining 272069, China;

2. Center for Disease Control and Prevention of Shandong, Ji'nan 250014, China; 3. Shandong Electric Power Research Institute, Ji'nan 250000, China; 4. Department of Microbiology, Tianjing Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: Objective With the method of ultraviolet rays absorption analysis of the lipopolysaccharides (LPS) of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, to build a new method for monitoring lipopolysaccharides of *Escherichia coli* by ultraviolet rays absorption analysis at the wave length 259 nm. **Methods** LPS were isolated from multi-drug resistant bacteria strains which were separated from clinic by enzyme extraction, the Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay was used to measured the endotoxic activities, ultraviolet ray/ visible light was used to scan and measure its absorbency, using Gel permeation chromatography was used to purify LPS, using vitriol-phenol method to measure its content of sugar. **Results** Activity of agglutinating limulus was $10^{-5} - 10^{-4} \mu\text{g/mL}$. Resulting from the ultraviolet rays absorption analysis, there was a absorption peak at the wave length of 254-256 nm, and 259 nm was the peak absorption wave length for the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* which was identical to the results of contents of polysaccharide analysis. **Conclusion** As a result of the experiment, the wave length of 254-256 nm is the special absorption wave length for the lipopolysaccharides of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, 259 nm is the peak absorption wave length for the lipopolysaccharides of *Escherichia coli*, and might be used to monitor the contents of lipopolysaccharides.

Key words: gram-negative bacteria; lipopolysaccharides; escherichia coli

随着抗生素的广泛使用, 越来越多的细菌对抗生素产生了耐药性^[1], 引起感染的细菌种类也有明显的变化趋势, 在医院感染中革兰阴性菌有上升的趋势^[2], 而医院获得性革兰阴性菌 (gram-negative bacillus, GNB) 感染的耐药发生率、耐药性强并呈多重耐药的特点使之成为临床抗感染治疗的一大难题。GNB 释放的脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 是 GNB 造成败血症或脓毒性休克病理中最重要的致病因素, LPS 释放入血后即发挥其“扳机”作用, 激活单核-巨噬细胞系统和内皮细胞, 释放大量的炎症介质, 激发炎症的“瀑布效应”, 从而诱发全身的炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 严重时可引起弥散性血管内凝血 (disseminated intravascular coagulation, DIC), 导致多脏器功能障碍综合征 (Multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[3]。因此, 脂多糖的检测是疾病治疗及预后判断的一个可靠指标, 本研究采用紫外光谱检出大肠埃希菌脂多糖, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) TH1、TH2、TH6、TH7, 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, P) P7 及肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, K) K11。

1.2 方法

1.2.1 酶解法制备脂多糖 参照 Eidlfin 和 Mouton^[4] 方法结合钟启平等^[5] 的方法, 制得脂多糖粗提品。

1.2.2 鲎试验 脂多糖粗提物的体外活性用灵敏度为 0.5 Eu/mL 的鲎变形细胞溶解物试验 (limulus amoebocyte lysate test, LAL) 进行半定量测定^[6]。

1.2.3 紫外可见光谱扫描 将不同菌种的脂多糖以去离子水配制成 0.5 mg/mL 溶液, 进行连续光谱扫描; 将大肠埃希菌脂多糖用生理盐水配成 0.5 mg/mL 溶液, 然后对倍稀释, 得 0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 mg/mL 溶液, 以生理盐水作对照分别在 256、258、260、262 nm 波长处测定吸光值。

△ 通讯作者, E-mail: zhong-qp@sina.com.

1.2.4 凝胶渗透层析及紫外光谱检测 以 Sephadex G50 对 LPS 粗提品进行层析,层析柱柱床 1 cm×22 cm,流速 0.5 mL/min,用洗脱液洗脱,每分钟收集 1 管,每种样品收集 15 管。以洗脱液作对照在 259 nm 波长处测定上述各管馏分的吸光度值。

1.2.5 硫酸-苯酚法检测糖含量 按照糖样品:苯酚(5%):浓硫酸(98%)=2:1:5(V:V:V)的比例处理上述各馏分。室温下静置 10 min,轻轻摇匀,置 25~30 °C 水浴 10~20 min。以生理盐水:苯酚(5%):浓硫酸(98%)=2:1:5(V:V:V)的液体作对照分别在 480、490 nm 波长处测定吸光度值。

2 结 果

2.1 鲎试验结果 用规格为 0.1 mL,灵敏度为 0.5 Eu/mL 的鲎试剂半定量测定脂多糖粗提物的体外活性,所提取的脂多糖体外内毒素活性与 Sigma 产品 Escherichia coli 055:B5 基本一致,结果见表 1。

表 1 脂多糖试剂检测结果

菌株	脂多糖最低阳性浓度(μg/mL)
大肠埃希菌 055:B5	10 ⁻⁵
大肠埃希菌 TH1	10 ⁻⁵
大肠埃希菌 TH2	10 ⁻⁵
大肠埃希菌 TH6	10 ⁻⁴
大肠埃希菌 TH7	10 ⁻⁴
铜绿假单胞菌 P7	10 ⁻⁵
肺炎克雷伯菌 K11	10 ⁻⁵

2.2 紫外可见光谱扫描

2.2.1 紫外可见连续光谱扫描 在 256~260 nm 波长附近的峰值所对应的菌种由上向下依次为大肠埃希菌 TH1(0.5 mg/mL)、055:B5(0.5 mg/mL)、TH6(0.5 mg/mL)、TH7(0.5 mg/mL)、肺炎克雷伯菌 K11(0.5 mg/mL)。紫外可见分光光度计扫描结果显示,不同菌株脂多糖的最高吸收峰集中在 256~260 nm 范围内。

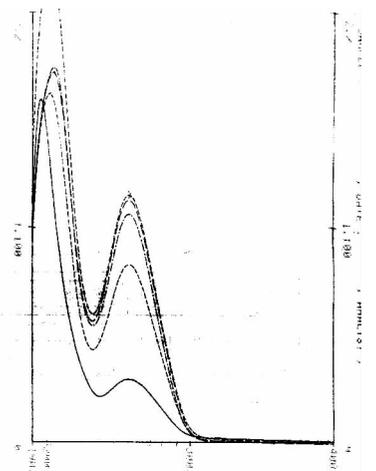


图 1 紫外可见分光光度计扫描结果

2.2.2 紫外吸收值的测定 于 256、258、259、260、262 nm 分别对已知浓度 0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 25 mg/mL。TH1、TH2、TH6、TH7 的脂多糖溶液进行测定,应用统计学方法,以每一组吸光度值为纵坐标,以浓度为横坐标进行相关分析,结果显示脂多糖溶液的紫外可见光谱吸光度值随其浓度

增大而增大且与其浓度呈正相关,不同菌株脂多糖溶液的最高吸收峰均在 259 nm 波长处。见图 2~5。

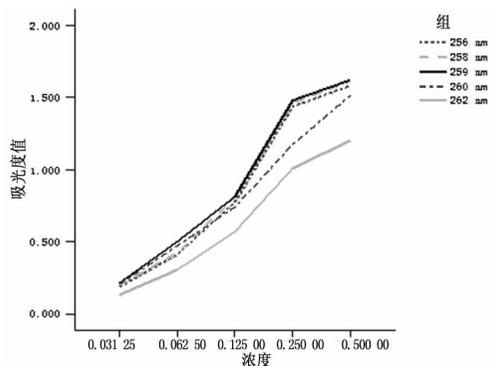


图 2 TH1-脂多糖溶液在不同浓度不同波长紫外测定线图

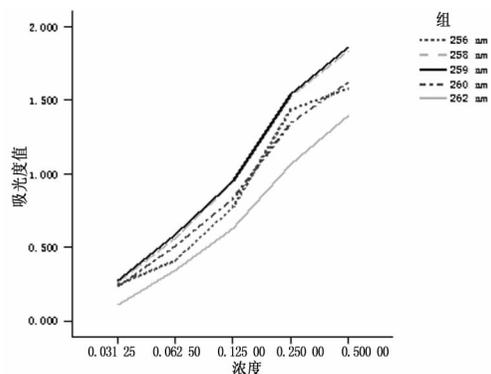


图 3 TH2-脂多糖溶液在不同浓度不同波长紫外测定线图

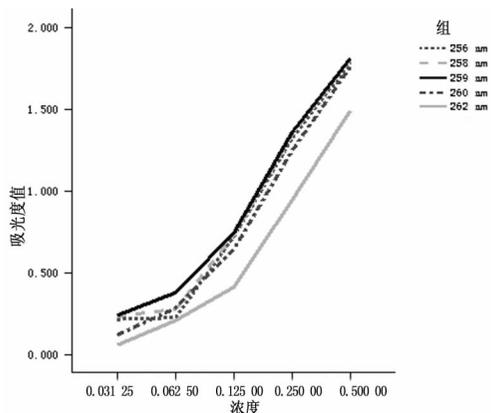


图 4 TH6-脂多糖溶液在不同浓度不同波长紫外测定线图

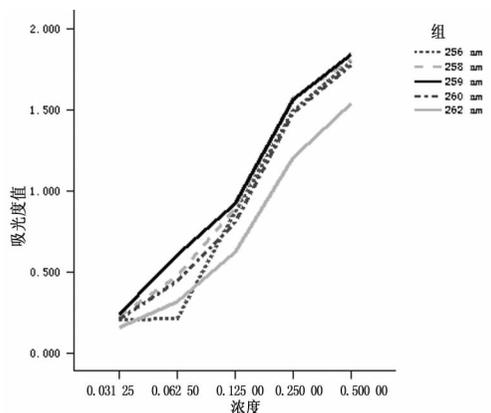


图 5 TH7-脂多糖溶液在不同浓度不同波长紫外测定线图

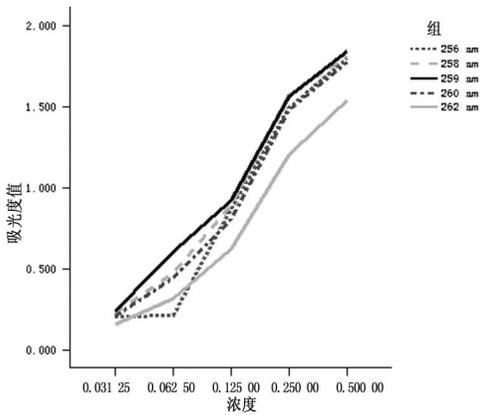


图 6 TH1-脂多糖各管馏分在 259、480、490 nm 的吸光度值测定曲线

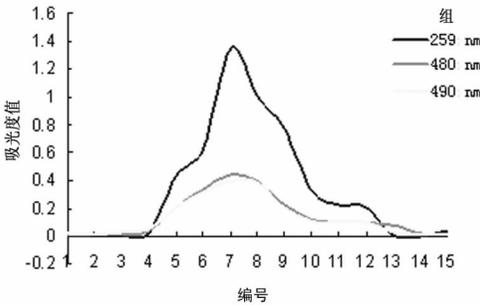


图 7 TH2-脂多糖各管馏分在 259、480、490 nm 的吸光度值测定曲线

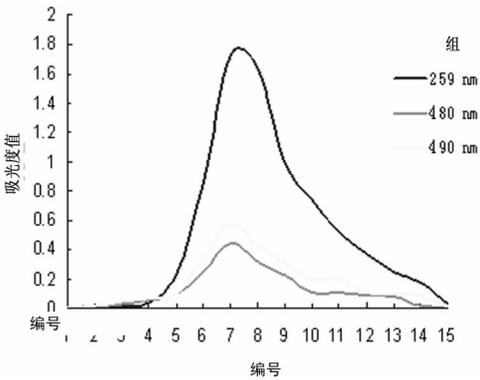


图 8 TH6-脂多糖各管馏分在 259、480、490 nm 的吸光度值测定曲线

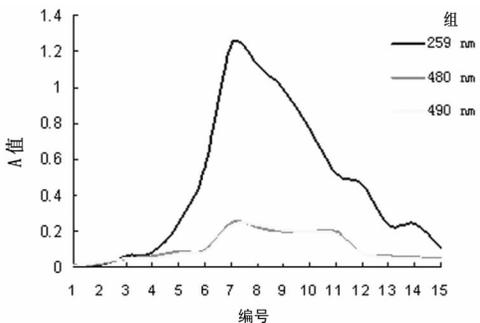


图 9 TH7-脂多糖各管馏分在 259、480、490 nm 的吸光度值测定曲线

2.3 凝胶色谱各馏分在 259 nm 的检测结果及糖定量分析
应用 Sephadex G50 对 TH1、TH2、TH6、TH7 的脂多糖粗提品进行凝胶色谱分析,以 259 nm 浓度检测其各馏分的吸光度值;同时以硫酸-苯酚法测定各馏分中的糖含量,在 480、490 nm 浓

度测定各馏分的吸光度值。通过统计学方法,以每一组吸光值为纵坐标,各馏分编号为横坐标分析其曲线关系。以 259 nm 浓度检测 TH1-脂多糖各馏分的吸光度值,结果显示一个主峰;同时以硫酸-苯酚法测定其各馏分中的糖含量,在 480、490 nm 浓度测定各馏分的吸光度值,结果也为一个主峰,且与 259 nm 吸光度峰位完全重合(图 6)。相同方法测定 TH2-脂多糖粗提品(图 7)、TH6-脂多糖粗提品(图 8)、TH7-脂多糖粗提品结果类似(图 9)。

3 讨论

脂多糖是革兰阴性菌的内毒素,由 3 个不同的区域组成,类脂 A、核心多糖和 O 抗原多糖。O 抗原多糖是脂多糖的最外层,由若干个低聚糖的重复单位组成的多糖链,具有特异性;核心多糖位于类脂 A 的外层分为内核心和外核心,内核心含有庚糖及特殊的 3-脱氧-D-甘露糖-辛酮糖(KDO),外核心有数种己糖组成;类脂 A 为一种糖磷脂,由 $\beta_1, 6$ -糖苷键相连的 D-氨基葡萄糖双糖组成的基本骨架,双糖骨架的游离羟基和氨基可携带多种长链脂肪酸和磷酸基团。其中,类脂 A 是脂多糖的疏水基团,是细菌外膜外层的主要组成部分,O 抗原多糖和核心多糖通过与类脂 A 连接而附着在细菌表面^[7-8]。近些年的研究发现,只有脂多糖分子的类脂 A 基团才真正具有内毒素的活性^[9]。不同的细菌合成的类脂 A 结构不尽相同^[10];不同结构的类脂 A 可在体内产生不同种类的细胞因子,引起不同的免疫反应,故类脂 A 的结构是决定细菌致病性的一个重要因素。目前,有大量的研究证实许多细菌的成分具有明显的免疫生物学活性,研究较为深入的是脂多糖。当一定脂多糖进入人体后,通过诱发细胞及体液因子而导致多种病理或病理生理损害,比如致热反应、内毒素血症及休克,重症感染死亡率高;少量脂多糖不仅可以活化单核巨噬细胞系统,促进大量内源性细胞因子如干扰素(interferon, IFN)、白细胞介素-1(interleukin, IL-1)、白细胞介素-6(interleukin, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、集落刺激因子(colony stimulating factor, CSF)等的释放,同时,脂多糖还可以促进补体活化,促进抗体的产生,对特异性免疫反应也有调节作用^[11],具有多种免疫功能。所以,脂多糖是实验室人员广泛使用和研究的对象。脂多糖的提取和纯化及实验室研究均需监测和检出手段,但目前已知实验室常用的脂多糖含量测定方法,有蒽酮-硫酸法、硫酸-苯酚法等,均操作流程繁琐、检出结果干扰因素影响较大而对实验造成偏差;而酶试剂虽灵敏度较高,但对实验操作要求严格,且不同的菌种结果不同,等量脂多糖凝集反应程度因不同菌种而有所差异。

本研究参照钟启平等^[5]应用酶解-凝胶色谱制备志贺氏菌脂多糖的改良方法获得纯度较高、基本保持原有活性的脂多糖。通过 LAL 试验对其内毒素活性测定,然后通过紫外光谱检测、硫酸-苯酚法糖含量测定对其成分进行鉴定。证实大肠埃希菌紫外光谱检测在 259 nm 波长处有最高吸收峰;凝胶色谱分析,各馏分以 259 nm 波长处监测,显示一个峰,用硫酸-苯酚法测糖含量,结果也为一个峰,且与 259 nm 波长处光吸收峰位完全重合与钟启平等^[5]酶解-凝胶色谱法制备志贺氏菌脂多糖结果一致。

随着生命科学对糖化学研究的重视程度日益增加,脂多糖作为糖化学研究对象的重要的成员之一,应用也日益广泛。用 260 nm 波长处检测核酸,用 280 nm 波长处检测蛋白质已被广泛应用,本文所建立的 259 nm 波长处紫外光谱检测大肠埃希菌脂多糖将有可能作为大肠埃希菌脂多糖检测的新常规方法,254~260 nm 波长处将有可能作为革兰阴性菌脂多糖检测的新方法。
(下转第 2471 页)

mL,新金黄、瘰疬、不产色、土、次要分枝杆菌在液体培养法中为 30 CFU/mL,在 L-J 法则为 300 CFU/mL,堪萨斯分枝杆菌在液体培养中为 30 CFU/mL,但在 L-J 法则为 3 CFU/mL,戈登分枝杆菌在 BacT/Alert MP 中为 3 CFU/mL,但在其他 3 法中为 300 CFU/mL。

2.6 实验费用 BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL 两培养基需配套进口仪器,3 种液体培养法的试剂成本为 L-J 法的 5 倍。

3 讨论

分枝杆菌分离培养是结核病诊断的金标准。本研究采用 3 种液体培养基:BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL、MGIT 4 mL 和 L-J 法对 337 份疑似肺结核患者的初诊痰标本进行培养检测,结果显示 3 种液体培养法的检出率分别是:56.7%(191/337)、56.7%(191/337)、55.2%(185/337)比传统 L-J 法的 47.5%(160/337)高,差异有统计学意义($P < 0.05$),与李静等^[4]报道相近。尤其在涂阴肺结核上表现更为明显,其检出率分别是 25.0%(47/188)、23.4%(44/188)、22.9%(43/188)比 L-J 法的 11.7%(22/188)高 2 倍,与 Piersimoni 等^[5]报道相近,显示出液体培养法的优势。这可以从液体培养基的营养成分得到解释,BacT/Alert MP 瓶主要含 7H9 肉汤,加上油酸、甘油等营养成分,配以牛血清蛋白结合游离脂肪酸,保护分枝杆菌,促进其生长,MGIT 4 mL 瓶在此基础上加入右旋糖苷增加营养、触媒分解不利于分枝杆菌生长的过氧化物,MGIT 960 7 mL 比 MGIT 4 mL 多加入多氧乙基硬脂酸盐成分促进结核菌生长。这些营养成分与分枝杆菌全面接触比 L-J 培养基的单一鸡蛋养分与细菌单个面接触生长要好得多。

从阳性检测时间来看,3 种液体培养法的平均阳性报告时间为:17、11、11 d,较 L-J 法的 20 d 缩短了 3~10 d,与相关报道相近^[6-8]。

在对杂菌的抑制作用上,MGIT 960 7 mL 与 MGIT 4 mL 法的添加剂含有多黏菌素 B、两性霉素 B、奈啶酸、甲氧苄氨嘧啶和阿洛西林,可抑制大部分的呼吸道常见菌而不伤害分枝杆菌,BacT/Alert MP 在此基础上添加了万古霉素,增强了抑制 G⁺ 球菌的能力,本研究 3 种液体培养方法的污染率在 3.0%~4.2%间,属正常,证明这些抑菌剂能抑制大部分杂菌^[9-11],与 L-J 固体法的抑菌效果相当。

本研究的检测限试验表明,常见的 12 种分枝杆菌在 4 种培养方法中的检测限较低:3~300 CFU/mL。3 种液体法的敏感性、符合率较高,均在 88.2%以上,特异性稍低(82.7%~85.0%),与 Sorlozan 等^[12]报道相近,与 L-J 法结果具有高的一致性。

综上所述,液体培养法不但对 MTBc 和 NTM 有检出能力及抑杂菌能力,敏感性、特异性好,与 L-J 法结果有高的一致性,并且在检出率、阳性报告时间上优于传统的 L-J 法,而 MGIT 4 mL 成本低,不需昂贵的的仪器,可在基层推广。

参考文献

- [1] 李琳芸.血清结核分枝杆菌抗体检测对结核病的诊断价值探讨[J].国际检验医学杂志,2009,30(12):1217-1218.
- [2] 赵雁林,尚美.我国结核病实验室诊断的现状[J].中华检验医学杂志,2007,30(7):725-728.
- [3] 中国防痨协会基础专业委员会.结核病诊断实验室检验规程[M].北京:中国教育文化出版社,2006:23-47.
- [4] 李静,桂晓红,孙丕,等.MGIT 液体培养基检测分枝杆菌效果的评价[J].中华检验医学杂志,2011,34(2):111-114.
- [5] Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, et al. Comparison of MB/Bact ALERT 3D system with radiometric BACTEC system and Lowenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical Specimens; a multicenter study[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(2): 651-657.
- [6] 白广红,梁雅萍,朱蕾. BACTEC MGIT 960 system 快速分离结核杆菌的效果评价[J].实用医技杂志,2006,13(18):3187-3188.
- [7] 徐东芳,王庆. BacT/ALERT 3D 在结核分枝杆菌快速培养和药敏试验中的应用[J].临床输血与检验,2011,13(1):59-61.
- [8] 易松林,谭云洪,欧阳晖. BACTEC MGIT 960 分枝杆菌分析系统结果分析[J].实用预防医学,2008,15(3):877-879.
- [9] García F, Piédrola G, García F, et al. Evaluation of the MB/BacT automated mycobacteria culture system versus culture on Lowenstein medium[J]. Clin Microbiol Infect, 1998, 4(6): 339-343.
- [10] Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, et al. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 System for recovery of mycobacteria[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(3): 748-752.
- [11] Tortoli, E, Mandler F, Tronci M, et al. Multicenter evaluation of mycobacteria growth indicator tube (MGIT) compared with the BACTEC radiometric method, BBL biphasic growth medium and Lowenstein-Jensen medium[J]. Clin Microbiol Infect, 1997, 3(4): 468-473.
- [12] Sorlozano A, Soria I, Roman J, et al. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples[J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19(10): 1259-1264.

(收稿日期:2011-06-23)

(上接第 2468 页)

参考文献

- [1] 张顺达,鞠守勇. 抗生素滥用[J]. 科技创新导报,2008(14):177-178.
- [2] 朱仲生,段丽芳,张卫星. 医院内获得性感染调查及预防措施[J]. 中国社会医学杂志,2007,24(1):65-67.
- [3] 魏育林,李亚俊. 脂多糖致小鼠 SIRS 和 MODS 的研究[J]. 急诊医学,2000,6(9):370-373.
- [4] Eidlfin DN, Mouton C. A rapid method for preparation of rough and smooth lipopolysaccharide from Bacteroides, Porphyromonas and Prevotella[J]. FEMS Microbiology Letter, 1993, 110(2): 133-138.
- [5] 钟启平,陈恩临. 酶解-凝胶色谱法制备志贺氏菌脂多糖[J]. 微生物学报,1997,24(5):313-315.
- [6] 李晓霞,陆书华,徐建设,等. 大肠埃希菌脂多糖脂质的制备及

- 对肿瘤的抑制作用[J]. 中华肿瘤防治杂志,2010,14(12):916-918.
- [7] Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, et al. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria[J]. Annu Rev Biochem, 2007, 76: 295-329.
- [8] Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins[J]. Annu Rev Biochem, 2002, 71: 635-700.
- [9] Galanos C, Lfideritz O, Rietschel ET, et al. Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities[J]. Eur Biochem, 1985, 148(1):1-5.
- [10] Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides[J]. Carbohydr Res, 2003, 338(23):2431-2447.
- [11] Lukaszewicz J, Lugowski C. Biologic activity of lipopolysaccharides[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2003, 57(1): 33-53.

(收稿日期:2011-07-16)