

毛细管区带电泳法对不同表面特征大肠杆菌的快速表征

陈萍, 李仁宽, 徐小华, 饶平凡

(福州大学生物工程研究所, 福建 福州 350003)

摘要: 采用毛细管区带电泳法对肠毒素大肠杆菌的3种亚型(*E. coli* K99、987P和K88), 进行以细菌细胞为单位的快速表征, 探讨了不同表面特征的细菌细胞在电泳图上的差异。结果表明, 在相同电泳条件下(0.025 mol/L Na₂CO₃—NaHCO₃(pH 9.9)缓冲液, 检测电压14.1 kV, 检测波长210 nm), *E. coli* K99、987P和K88的细胞分别具有单一、稳定的(RSD≤0.9%)特征谱峰; 细菌细胞经去菌毛鞭毛处理及甲醛灭活处理, 电泳行为差异显著, 且不同处理方法之间的变化具有一致性。

关键词: 毛细管区带电泳; 大肠杆菌; 表征

中图分类号: Q939.1; O658.9

文献标识码: A

Rapid characterization of enterotoxigenic *E. coli* by capillary zone electrophoresis

CHEN Ping, LI Ren—kuan, XU Xiao—hua, RAO Ping—fan

(Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou Fujian 350002 China)

Abstract: A rapid characterization of enterotoxigenic *E. coli* K99, K88 and 987P with intact cells using capillary zone electrophoresis was described in this paper. And we discussed the different electropherograms of *E. coli* K99, 987P and K88 owing to the different surface features. The results of the experiment have shown that *E. coli* K99, 987P and K88 with intact cells have a characteristic peak and a reproducible retention time (RSD≤0.9%) respectively. After careful chemistry—treatments, the different migration times are investigated owing to the different surface properties, and the changes of migration times with different treatments are conforming.

Keywords: capillary zone electrophoresis; enterotoxigenic *E. coli*; characterization

细菌的表征方法如免疫标记、荧光标记、PCR检测、质谱检测等^[1—3], 分析所需的时间长, 而且产物检测也受到限制^[3—5]。近年, 毛细管电泳作为一种分离技术和检测手段被应用于各种微生物的分析^[6—9]。Ebersole等报道用毛细管区带电泳技术分离了5种微生物^[10]。Amstrong等利用毛细管电泳对4种微生物进行了快速分离^[11]。本研究利用毛细管电泳技术对肠毒素大肠杆菌的3种亚型*E. coli* K99、987P和K88细菌细胞以及经表面处理后具有不同表面特征的细菌细胞进行快速表征。

1 实验部分

1.1 实验材料

主要仪器. 美国 Beckman 公司 P/ACE 5510 毛细管电泳仪及 J—25I 高速离心机, 电热水浴槽(DK—8D型), 医用数控超声波仪(KQ—250DE型), 毛细管[50 μm(id)×47 cm(有效长度40 cm, 河北永年光导纤维厂)]。

主要试剂. 电极缓冲液: 0.025 mol/L、pH 9.9 的 Na₂CO₃—NaHCO₃缓冲液, 磷酸盐缓冲液 PBS(8 g NaCl, 0.20 g KCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 0.20 g KH₂PO₄)/L。试剂均为分析纯。

收稿日期: 2002—04—09

作者简介: 陈萍(1977—), 女, 硕士研究生。

细菌培养基. 普通培养基(蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, 氯化钠 5 g)/L.

细菌. *E. coli* K99(O101)、987P 和 K88(O149)菌种购自中国兽医药品监察所.

1.2 实验方法

1.2.1 活菌样品的制备

将 *E. coli* K99(O101)、987P 和 K88(O149) 菌种接到普通培养基中, 37 °C 摆床培养 12 h. 培养好的细菌用离心机离心(10 000 r/min, 5 min), 弃去上清液, 然后加去离子水振荡, 继续离心(10 000 r/min, 5 min), 弃去上清液, 以除去残留培养基, 重复 2 遍. 再用电极缓冲液将其制成菌悬液, 即活菌细胞样品.

1.2.2 细菌细胞的去菌毛鞭毛处理

根据 Henrik 的去除细菌鞭毛和菌毛等表面附属物的方法^[12], 将活菌 *E. coli* K99、987P 和 K88 重新悬浮于磷酸盐缓冲液 PBS 中, 置于 60 °C 的电热恒温槽中保温 30 min, 然后用去离子水洗涤 2 遍(洗涤方法同上)除去 PBS 缓冲液, 再用电极缓冲液将其制成经表面处理的菌悬液.

1.2.3 细菌细胞的灭活处理

将活菌 *E. coli* K99、987P 和 K88 悬浮于 5% (V/V) 的甲醛溶液中, 在室温下保温 12 h^[12]; 然后用去离子水洗涤 2 遍(洗涤方法同 1.2.2)以除去甲醛溶液, 再用电极缓冲液将其制成灭活处理的菌悬液.

1.3 毛细管电泳条件

先用 0.1 mol/L NaOH 冲洗毛细管道 10 min, 用 0.1 mol/L HCl 冲洗 10 min, 再用去离子水冲洗 5 min, 用电极缓冲液冲洗 4 min, 然后上样进行电泳. 电泳条件: 运行电压为 14.1 kV; 检测波长为 UV210 nm; 进样压力为 3.43 kPa; 进样时间为 10 s; 运行时间为 20 min.

2 结果与讨论

2.1 *E. coli* K99、987P 和 K88 的表征

细菌细胞的表面含有唾液酸、蛋白质、多糖、脂多糖等成分^[8]的微小颗粒, 在适当的溶液中, 每个细菌细胞相当于表面覆盖了电子层的“大分子”颗粒. 然而, 相对于生物大分子或小分子的毛细管电泳来说, 细菌细胞的毛细管电泳需要考虑更多的因素, 而这些因素主要由细菌本身引起. 首先, 不同细菌细胞的形状大小不同^[9], 对毛细管电泳条件的要求也不同, 这是毛细管电泳分离、分析的一个非常重要的影响因素. 其次, 细菌的聚集(形成链或簇)也是影响细菌毛细管电泳的不可排除因素之一, 为了防止细菌聚集, 进样前需先将样品置于超声波^[13] (100 Hz) 中振 3 min, 再用于毛细管电泳分析.

E. coli K99、987P 和 K88 的毛细管电泳图如图 1 所示. 它们在毛细管电泳图上均表现出单一、稳定的($RSD \leqslant 0.9\%$, $n = 3$)的特征尖峰($n \approx 100 000$ plates $\cdot m^{-1}$, 即塔板数/米), 电泳迁移时间依次为 5.44 \pm 0.05, 6.40 \pm 0.03 和 7.55 \pm 0.07 min, 分析时间都在 10 min 内, 为毛细管电泳用于细菌的高效表征提供了一个重要依据. *E. coli* K99、987P 和 K88 的快速表征表明, 这些表面存在细微差别的细菌细胞, 可通过毛细管电泳明显的区别开来.

2.2 经表面处理 *E. coli* K99、987P 和 K88 的表征

细菌常因生存的环境不同, 产生相应的生理形态上的变化. 细菌的这些变化主要表现在细菌鞭毛、表面蛋白分泌等^[7]. 培养后的大肠杆菌 K99、K88 和 987P 与经过各种处理后的大肠杆菌在电泳图谱上具有不同的迁移时间. 图 2 为 *E. coli* 987P 活菌细胞和表面经处理的菌细胞的电泳图. *E. coli* 987P 活菌

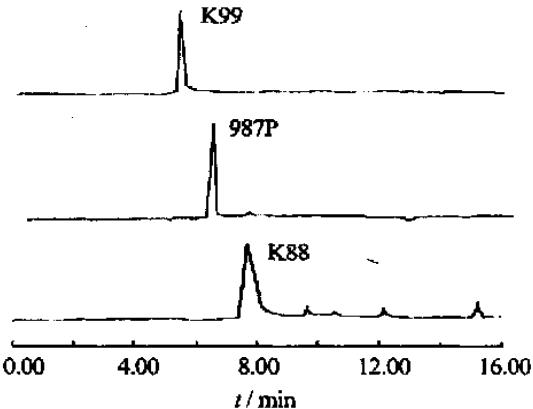


图 1 *E. coli* K99、987P 和 K88 的毛细管电泳图谱
Fig. 1 The electropherogram of *E. coli* K99, 987P and K88

细胞的迁移时间 $t_a = 6.40$ min. 其细胞表面的菌毛与鞭毛被去除后, 表现出比活菌具有更长的迁移时间 ($t_b = 6.71$ min), 对细胞进行灭活, 则其电泳迁移时间 $t_c = 7.89$ min.

由于菌毛和鞭毛由蛋白亚基组成, 具有较高的电荷密度, 去除后, 表面电荷密度降低, 造成电泳出峰时间推后, 即迁移时间延长. 若对细菌进行更为剧烈的处理, 即用 5% 甲醛对 *E. coli* 987P 细菌细胞进行灭活, 因为甲醛会使细胞表面蛋白甲基化而变性, 大大降低细菌表面的电荷密度, 包括菌毛鞭毛和暴露在细胞表面的各种蛋白所带的电荷, 而使细菌峰的迁移时间更长.

表 1 为 *E. coli* K99、987P 和 K88 在不同条件下的迁移时间和电渗流. 活菌细胞与去菌毛鞭毛处理的细菌细胞迁移时间相差如下: *E. coli* K99 为 0.54 min, *E. coli* K88 为 0.43 min, *E. coli* 987P 为 0.31 min; 活菌细胞与经灭活处理的细菌细胞迁移时间相差如下: *E. coli* K99 为 1.48 min, *E. coli* K88 为 1.94 min, *E. coli* 987P 为 1.49 min. 以上结果表明, 细菌细胞经不同的表面处理, 细菌细胞的表面电荷发生了改变, 从而对其迁移产生影响. 可见, 毛细管电泳法可将细菌细胞表面存在细微差异进行快速表征.

表 1 活菌细胞与表面经不同化学处理后的细菌细胞电泳迁移时间和电渗流的比较

Tab. 1 Comparison of migration time and electrophoretic mobility between intact and non-intact *E. coli*

细 菌	迁移时间 t / min	电渗流 / $(m^2 \cdot V^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) \times 10^{-5}$
<i>E. coli</i> K99	① 5.44 ± 0.05	0.245 ± 0.002
	② 5.98 ± 0.04	0.223 ± 0.002
	③ 6.92 ± 0.04	0.193 ± 0.001
<i>E. coli</i> 987P	① 6.40 ± 0.03	0.208 ± 0.001
	② 6.71 ± 0.06	0.198 ± 0.002
	③ 7.89 ± 0.02	0.169 ± 0.001
<i>E. coli</i> k88	① 7.55 ± 0.07	0.177 ± 0.002
	② 7.98 ± 0.06	0.167 ± 0.001
	③ 9.49 ± 0.07	0.140 ± 0.001

注: ① 完整的细菌细胞; ② 经去菌毛鞭毛的细菌细胞; ③ 经表面灭活的细菌细胞

参考文献:

- [1] Stinson S C. Identifying bacteria: looking for a fast track[J]. Chem Eng News 1999, 77(13): 36—38.
- [2] Belgrader P. PCR detection of bacteria in seven minutes[J]. Science 1999, 284 (5413): 449—450.
- [3] Longton R W, Cole III J S, Quinn P F. Isoelectric focusing of bacteria: species location within an isoelectric focusing column by surface charge[J]. Arch Oral Biol, 1975, 20 (2): 103—106.
- [4] Jaspers E, Overmann J. Separation of bacterial cells by isoelectric focusing: a new method for analysis of complex microbial communities[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63 (8): 3176—3181.
- [5] Toimura M, Ito S, Kano K, et al. Surface characterization and on-line activity measurements of microorganisms by capillary zone electrophoresis[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999, 721(1): 31—37.
- [6] Paul D G, David S S. Orientation effects on the electrophoretic mobility of rod-shaped molecules in free solution[J]. Anal Chem, 1990, 62 (15): 1592—1596.

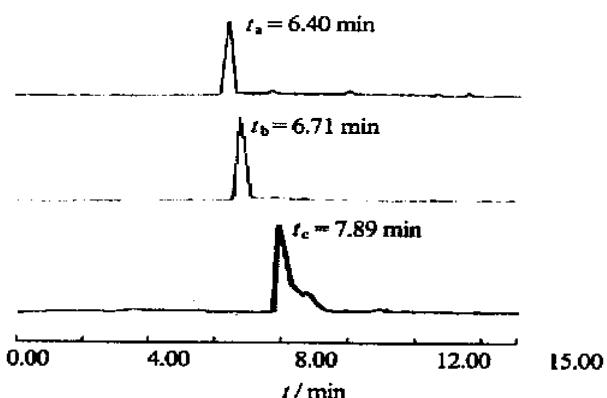


图 2 *E. coli* 987P 活菌细胞和表面经处理的菌细胞的电泳图

Fig. 2 Electropherograms of intact and non-intact *E. coli* 987P cells

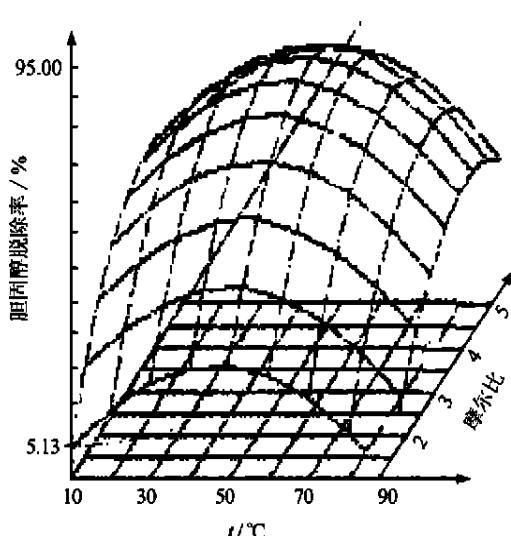


图3 摩尔比与温度对脱除率的影响

Fig. 3 Effects of β -CD to cholesterol molar ratio and inclusion temperature on the cholesterol reduction percentage

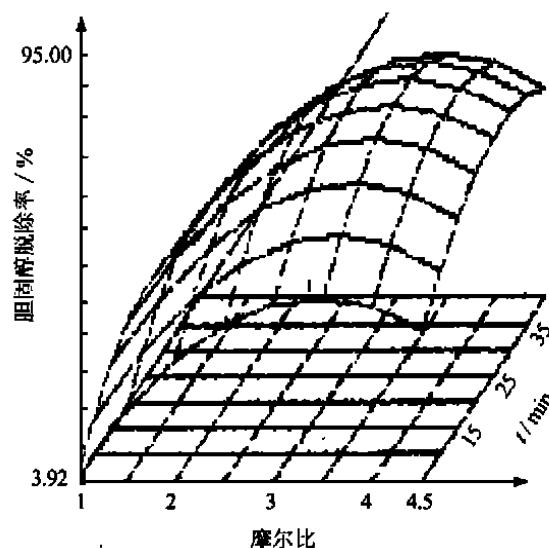


图4 摩尔比与时间对脱除率的影响

Fig. 4 Effects of β -CD to cholesterol molar ratio and stirring time on the cholesterol reduction percentage

3 结语

摩尔比在1~3.8范围内与脱除率呈明显正相关关系,当大于3.8时,胆固醇脱除率曲线趋于平稳;适当的加热和搅拌促进 β -CD对胆固醇的包含反应;水解液浓度在5%~20%范围内与脱除率呈正相关关系。该工艺的最佳参数为:水解液浓度20.8%、包含温度47 °C、 β -CD/胆固醇的摩尔比3.8、搅拌时间31 min,在此条件下胆固醇的脱除率为94.7%。

参考文献:

- [1] 林元藻,林向阳.猪脑水解液的制备及其生物学活性研究[J].氨基酸和生物资源,1999,21(3): 5—8.
- [2] 惠芸,高应.鸡蛋中胆固醇快速测定方法的研究[J].食品科学,1995,16(6): 58—59.
- [3] Shukla A. Physicochemical and rheological properties of butter made from supercritical milk fat[J]. Journal of Dairy, 1994, 77 (1): 45—48.
- [4] GOW-CHIN YEN. Cholesterol removal from a lard—water mixture with β -cyclodextrin[J]. J Food Sci, 1995, 60(3): 561—564.
- [5] 张勇.环状糊精脱除羊、鱼肉腥味的初步研究[J].中国畜产与食品,1997,4(1): 3—4.

(接第780页)

- [7] Armstrong D W, Schneiderheinze J M. Rapid identification of the bacterial pathogens responsible for urinary tract infections using direct injection CE[J]. Anal Chem, 2000, 72 (18): 4474—4476.
- [8] Lund A, Hellemann A L, Vartdal F. Rapid isolation of K88+ Escherichia coli by using immunomagnetic particles[J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(12): 2572—2575.
- [9] Duchet-Suchaux M, Bertin A, Dubray G. Morphological description of surface structures on strain B41 of bovine enterotoxigenic Escherichia coli bearing both K99 and F41 antigens[J]. J Gen Microbiol, 1988, 134 (Pt 4): 983—995.
- [10] Ebersole R C, McCormick R M. Separation and isolation of viable bacteria by capillary zone electrophoresis[J]. Biotechnology (N Y), 1993, 11(11): 1278—1282.
- [11] Armstrong D W, Schulte G, Schneiderheinze J M, et al. Separating microbes in the manner of molecules. 1. Capillary electrokinetic approaches[J]. Anal Chem, 1999, 71 (24): 5465—5469.
- [12] Henrik C. Methods in practical laboratory bacteriology[M]. London Boca Raton Ann Arbor CRC press, 1994, 7.
- [13] Schneiderheinze J M, Armstrong D W, Schulte G, et al. High efficiency separation of microbial aggregates using capillary electrophoresis[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 189(1): 39—44.