中国农学通报 2009,25(06):1-4
Chinese Agricultural Science Bulletin

金黄色葡萄球菌荚膜多糖的提取及其多糖含量的测定

孙 焕[1,2],杨宏军[1],胡桂学[2],何洪彬[1],杨少华[1],王长法[1],王洪梅[1],高运东[1],仲跻峰[1]
([1]山东省农科院奶牛研究中心,济南 250100;[2]吉林农业大学动物科学技术学院,长春 130118)

摘 要:为提取纯化金黄色葡萄球菌荚膜多糖并测定多糖含量。采用超声波破碎菌液,用CTAB结合其中的多糖、$CaCl_2$解离、乙醇沉淀等化学方法提取纯化金黄色葡萄球菌荚膜多糖,利用苯酚-硫酸法测定其含量。结果显示,得到荚膜多糖0.31 g,含量为65.06%。结果表明,成功提取金黄色葡萄球菌荚膜多糖,并对其含量进行了测定,初步确定了粗提金黄色葡萄球菌荚膜多糖的方法。

关键词:金黄色葡萄球菌;荚膜多糖;苯酚-硫酸法
中图分类号:S831.7 **文献标识码:**A

Extraction and Determination of *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharide

Sun Huan[1,2], Yang Hongjun[1], Hu Guixue[2], He Hongbin[1], Yang Shaohua[1],
Wang Changfa[1], Wang Hongmei[1], Gao Yundong[1], Zhong Jifeng[1]
([1]*Research Centre of Dairy Cow, Shandong Academy of Agriculture Science*, Jinan 250100;
[2]*Jilin Agricultural University Animal Science Institute of Technology*, Changchun 130118)

Abstract: The objective of this experiment was to extracted and purified capsular polysaccharide from *Staphylococcus aureus*, and detected its contents. Supersonic wave was used to crushed bacteria liquid, CTAB was used to combine capsular polysaccharide, $CaCl_2$ decollement and ethanol precipitation of chemical method was used to extracte and purify capsular polysaccharide, phenol-vitriolic colorimetry was used to detecte its contents. The result showed that obtained capsular polysaccharide 0.31 g, its contents was 65.06%. The result indicated that this experiment successed to extract capsular polysaccharide, and determined its contents, preliminary determined methods of crudely extracted capsular polysaccharide of *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Staphylococcus aureus*, capsular polysaccharide, phenol-vitriolic colorimetry

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种革兰氏阳性病原菌,是奶牛乳腺炎主要致病菌之一。它能产生多种毒素和酶类,往往造成乳腺纤维化坏疽、化脓和长期隐性感染,产奶量显著下降或出现全身症状[1]。从患乳腺炎的奶牛乳汁中分离到的致病菌近一半是金葡菌,这些分离株中,94%~100%含有荚膜多糖(*Capsular polysaccharide*,Cp)[2]。荚膜多糖通过干扰多形核白细胞(polymorphonuclear leucocyte,PMN)的吞噬作用促进了金葡菌的侵袭性,引起奶牛乳腺炎高发病率。同时,荚膜多糖也是一种保护性抗原[3]。因此,日益受到工作者关注。金葡菌的荚膜多糖共有11种血清型,其中5型和8型荚膜多糖约占金葡菌临床分离株的70%[4-5]。引起奶牛乳腺炎的金葡菌血清型分布与地区不同有关[6]。

目前,提取和纯化金葡菌荚膜多糖的方法国内外都有报道[5,7-8]。但是成本高,操作复杂,并且多糖含量的测定方法尚无统一标准。笔者采用CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)与多糖结合,$CaCl_2$解离,乙醇沉淀多

基金项目:山东省农科院重大成果培育计划项目“奶牛重要生产性疾病预防制品的研究”(2006YCG012),山东省农科院高技术自主创新基金“金黄色葡萄球菌基因工程亚单位疫苗的研制”(2006YCX027)。
第一作者简介:孙焕,1982年出生,女,在读硕士,吉林桦甸人,研究方向:奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌基因工程疫苗的研制。通信地址:250100 山东省济南市工业北路159-1号农科院奶牛研究中心,E-mail:huan.sun@163.com。
通讯作者:杨宏军,1976年出生,男,博士,山东曲阜人,主要研究方向:动物传染性疾病的诊断与防治。Email:longfei1997@sina.com。
收稿日期:2008-10-30,修回日期:2008-11-19。

糖等化学方法粗提荚膜多糖，并利用苯酚-硫酸比色法测定含量。因为该法操作简单，经济，多糖产率高。

苯酚-硫酸比色法是测定多糖含量较为经典的有效方法之一。该法是由Dubois等提出的，具有简单、快速、无需多糖纯品和贵重仪器等优点，且对水溶性样品和非水溶性样品均可测定。原理是：当多糖和寡糖被浓硫酸在适当高温下水解时，产生单糖，并迅速脱水成糠醛衍生物，该衍生物在强酸条件下能与苯酚起显色反应，生成橙黄色物质，在波长490 nm处和一定浓度范围内，其吸光值(A)与糖浓度(C)呈线性关系，因此可用比色法测定其含量。

笔者拟纯化金葡菌荚膜多糖，与已获得的基因工程蛋白偶联，制备荚膜多糖-蛋白完全抗原，为探索金葡菌基因工程疫苗奠定基础。

1 试验

1.1 时间与地点

试验于2007年8—11月在山东省农科院奶牛研究中心进行。

1.2 材料

1.2.1 菌株 金黄色葡萄球菌山东分离株zfb(山东省农科院奶牛研究中心保存)。

1.2.2 培养基 哥伦比亚琼脂(青岛高科园海博生物技术有限公司)。

1.2.3 其它试剂 CTAB(AR)，氯化钙(AR)，无水乙醇(AR)，95%乙醇(AR)，6%的苯酚溶液(AR)，浓硫酸(AR)，标准葡萄糖(AR)。

1.2.4 所需仪器 超声波破碎仪(Sonics & materials. inc)；离心机(Sigma)等。

1.3 方法

1.3.1 金黄色葡萄球菌荚膜多糖的粗提 制备40个哥伦比亚血琼脂平板，每个平板接种金葡菌菌液(zfb) 10 μl，倒置于恒温培养箱中培养24 h。高压灭菌PBS (pH 7.4)悬浮每个平板上的细菌，每个平板添加15ml灭菌PBS，最后用吹打的方法将细菌悬浮，并转移到三角瓶中。将所得菌悬液3000 r/min，离心10 min，收集菌体沉淀，PBS洗2~3遍，然后加入原菌液体积10%的细菌裂解液。

超声波冰浴破碎所得金葡菌细胞壁。待几乎完全破碎后，所得溶液8000 r/min，离心5 min，收集上清，于其中加入终浓度为1%的CTAB，充分混匀形成沉淀。静置离心，收集沉淀物。沉淀物中加入$CaCl_2$溶液，使最终浓度为1 mol/L，摇匀或搅拌1 h，使多糖与CTAB解离，离心收集上清(过滤除去不溶物)。加入乙醇至最终浓度为25%，4 ℃静置过夜，离心去核酸沉淀，收集上清。于上述收集液中加入冷却乙醇至最终浓度为80%(V/V)，充分振摇，使多糖沉淀，离心收集沉淀多糖，用无水乙醇及丙酮各洗2次以上，此沉淀多糖即为粗提的荚膜多糖。粗提的荚膜多糖冷冻干燥保存。

1.3.2 葡萄糖标准曲线的制备 精确称取105 ℃烘干至恒重的标准葡萄糖20 mg，三蒸水定容至500 ml，分别吸取0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 ml，各加水补至2.0 ml，加入6%的苯酚溶液1.0 ml及浓硫酸5 ml，摇匀，室温放置40 min，在波长490 nm处测定吸光度，以2.0 ml重蒸水做空白对照，以葡萄糖微克数做横坐标，以吸光值为纵坐标，得标准曲线[9-10]。

1.3.3 样品溶液的制备 精确称取荚膜多糖粗制品0.01276 g，三蒸水定容至50 ml，从中吸取1 ml，三蒸水再定容至50 ml。

1.3.4 多糖含量的测定 取制备好的样品溶液1.0 ml，加水补至2.0 ml，加入6%的苯酚溶液1.0 ml及浓硫酸5 ml，摇匀，室温放置40 min，在波长490 nm处测定吸光度，以2.0 ml重蒸水做空白对照，同时做4个重复，测吸光度，以标准曲线和下式计算样品中多糖的百分含量。

多糖含量(%)=$(C*D*F/W)*100$

C为样品溶液葡萄糖浓度，D为样品溶液的稀释因素，F为葡萄糖换算为多糖的换算因素(国标F=3.19)，W为多糖样品重量。

1.3.5 吸光值稳定性检测试验 样品显色后，每隔20 min测定1次490 nm处的吸光值，检查其吸光值是否会因时间的改变而发生变化。

2 结果与分析

2.1 金葡菌荚膜多糖的粗提量

40个哥伦比亚固体平板，低压冻干得到0.31 g粗提多糖。

2.2 标准曲线的测定

分别取不同剂量的葡萄糖标准液，加水补至2.0 ml时，按照苯酚-硫酸法操作，得到不同的吸光值，如表1。由表1得葡萄糖标准曲线，见图1。

2.3 粗提多糖含量

由表1、图1得硫酸-苯酚法测得标准曲线的回归方程：$A=0.0069X+0.0018$，$r=0.9924$。A为吸光度值，X为多糖含量(μg/ml)。实验表明标准葡萄糖在8~72 μg之间呈良好的线性关系。

由回归方程计算粗提样品中多糖的含量，结果见表2。测定4次荚膜多糖在OD_{490}处的吸收值，取平均值，代入回归方程，由回归方程得到荚膜多糖的浓度为52.05 μg/ml，将此浓度代入多糖含量计算公式，得出多糖含量为65.06%。

表1 不同浓度葡萄糖的吸光度

葡萄糖标准液/mL	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8
浓度/(μg/ml)	8	16	24	32	40	48	56	64	72
吸光度值A	0.058	0.096	0.159	0.245	0.263	0.342	0.411	0.452	0.466

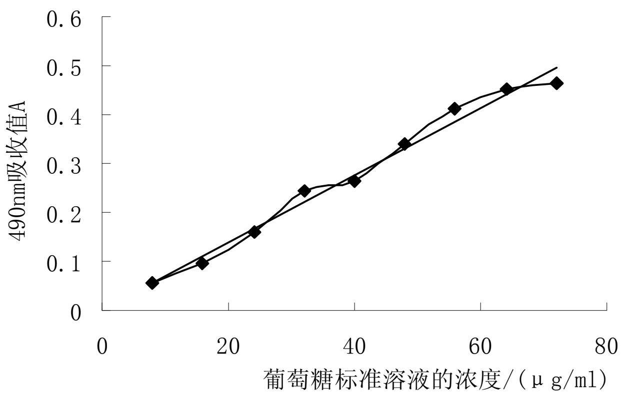

图1 葡萄糖标准曲线

表2 多糖含量的测定结果

吸收值	平均吸收值	浓度/(μg/ml)	多糖含量/%
0.361	0.361	52.05	65.06
0.362			
0.360			
0.361			

2.4 吸光值稳定性

吸光值稳定性检测结果，见表3。由表3可知，每隔20min测1次吸光值，而吸光值变化不是很大，说明用苯酚-硫酸法测荚膜多糖，其稳定性很好。

表3 吸光度稳定性检测结果

时间/min	20	40	60	80	100	120
吸收值(A)	0.359	0.361	0.362	0.360	0.361	0.361

3 讨论与结论

(1)金黄色葡萄球菌荚膜多糖的提取，国内外有不同的方法，Jean-Michel Fournier早在1984、1987年分别提出了纯化金黄色葡萄球菌8型、5型荚膜多糖提取纯化及鉴定的方法，后来Ali Fattom等人，在金黄色葡萄球菌荚膜多糖的提取纯化及免疫原性研究方面，也有很突出的成就。在国内，吉林大学的刘庆涛于2006年提取纯化了金黄色葡萄球菌New-bloud 305的荚膜多糖，并对含量进行了测定，表明纯化的效果较好。提取金黄色葡萄球菌荚膜多糖的研究人员并不多，所以国内没有相关的金黄色葡萄球菌荚膜多糖与蛋白偶联苗的上市，目前深入研究金黄色葡萄球菌荚膜多糖，并研制出有效的相关疫苗，是广大的畜牧科研人员的重大任务之一。笔者采用的化学方法在金黄色葡萄球菌荚膜多糖的提取纯化中很少用，多用于A型脑膜炎球菌荚膜多糖及伤寒沙门氏菌Vi多糖的提取纯化。经试验验证，这种化学方法能用于金黄色葡萄球菌荚膜多糖的提取纯化，而多糖含量也很高，能达到进一步提取纯化的要求。为金黄色葡萄球菌基因工程亚单位疫苗的研制以开发奠定了基础。

(2)金葡菌荚膜多糖是一种保护性抗原，与蛋白载体偶联后，免疫幼畜，能产生具有记忆特征的IgG抗体。荚膜多糖在金葡菌的感染中起着重要的作用。天然荚膜多糖只对同株型起到保护作用，而纯化的荚膜多糖只有少量的免疫原性。因此完全抗原只能用灭活金葡菌或者纯化的荚膜多糖结合蛋白质来实现。所以纯化金葡菌荚膜多糖，与蛋白载体偶联，制备金葡菌性乳腺炎的完全抗原，已成为研究奶牛金葡菌性乳腺炎的热点之一。笔者通过金葡菌荚膜多糖的粗提，并测定其含量，为金葡菌性乳腺炎完全抗原的制备奠定基础。

(3)有试验表明完全纯化的荚膜多糖是半抗原，其自身免疫原性很弱。这种粗提的荚膜多糖，由于部分与菌体蛋白联合，所以其免疫原性明显高于荚膜多糖本身。对于完全纯化的荚膜多糖与基因工程蛋白偶联后的完全抗原的免疫原性，将是该实验室后续研究工作的重点。

(4)苯酚—硫酸法具有简单、快速、无需多糖纯品和贵重仪器等优点。此法测定多糖含量，其重复性和稳定性都很好。另外根据有些文献报道可以用火箭电泳测定荚膜多糖含量[8-11]，但该方法需要有型特异性单克隆抗体，而单克隆抗体的制备程序复杂，较难获得，所以应用较少。笔者通过将金葡菌zfb在哥伦比亚固体平板上培养，收集细菌，超声波破碎，用化学方法提取荚膜多糖，并用苯酚-硫酸法测定其含量，由试验结果可知，测得的多糖含量为65.06%。

(5)通过上述方法纯化金葡菌荚膜多糖，低压冻干获得0.31 g粗制品，这一产量和Fournier、Hong-Ryul Han等报道的结果大致相同[12-13]，说明这种粗提金葡菌荚膜多糖的方法是可行的，为进一步研究奶牛乳腺炎基因工程疫苗奠定了基础。

参考文献

[1] 陆承平.兽医微生物学[M].北京:中国农业出版社,2000:201-204.

[2] Isabelle Verdier, Geraldine Durand, Michele Bes, et al. Identification of the capsular polysaccharides in Staphylococcus aureus clinical isolates by PCR and agglutination tests[J]. Clinical microbiology,2007,45,725-729.

[3] 潘志忠,魏东,藏丽.金黄色葡萄球菌荚膜多糖研究进展[J].微生物学杂志,2006,26(6):93.

[4] Sompolinsky D, Samra Z., Karakawa WW, et al. Encapsulation and capsular types in isolates of Staphylococcus aureus from different sources and relationship to phage types[J]. J.clin. Microbiol.1985, 22,828-834.

[5] Fournier JM, Hannon K, Moreau M, et al .Isolation of type5 capsular polysaccharide from Staphylococcus aureus[J]. Ann Inst Pasteur Microbiol,1987,138(5),561-567.

[6] Von Eiff C, Taylor KL, Mellmann A, et al. Distribution of capsular and surface polysaccharide serotypes of Staphylococcus aureus[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2007,58(3):297.

[7] 马文戈,李建军,喻昌盛,等.奶牛乳腺炎金黄色葡萄球菌TH-16S 733330株荚膜多糖免疫原性研究[J].中国兽药杂志,2006,40(2): 26-27.

[8] Fournier JM, Vann WF, Karakawa WW. Purification and Characterization of Staphylococcus aureus Type 8 Capsular Polysaccharide. Infect Immun[J].1984,45(1):87-93.

[9] 董群,郑丽伊,方积年.改良的苯酚-硫酸法测定总糖和寡糖的研究[J].中国药学杂志,1996,31(9):550.

[10] 张青,张天民.苯酚-硫酸比色法测定多糖含量[J].山东食品科技, 2004,7:17.

[11] Hochkeppel HK, Braun DG, Vischer W, et al. Serotyping and electron microscopy studies of Staphylococcus aureus clinical isolates with monoclonal antibodies to capsular polysaccharide types 5 and 8.J Clin Microbiol.[J].1987,25(3):526-530.

[12] Fournier JM, Hannon K, Moreau M, et al. Isolation of type 5 capsular polysaccharide from *Staphylococcus aureus* l[J].Ann Inst Pasteur/Microbio,1987(138):561-567.

[13] Hong-Ryul Han, Son-Il Pak, Seung-Won Kang, et al. Capsular polysaccharide typing of domestic mastitis-causing Staphylococcus aureus strains and its potential exploration of bovine mastitis vaccine developmen. I. capsular polysaccharide typing, isolation and purification of the strains[J]. Veterinary Science,2000,1(1), 53-60.