

培养条件对奶牛金葡菌5 型荚膜多糖产量的影响

杨正涛, 张乃生, 刘庆涛, 杨琦, 尹荣兰 (吉林大学畜牧兽医学院 吉林长春 130062)

摘要 [目的] 研究不同培养条件对牛源金葡菌5 型荚膜多糖产量的影响, 以便于CP5 的生产制备, 从而为开展奶牛金葡菌新型多糖疫苗的研究奠定基础。[方法] 从患隐性乳腺炎奶牛乳样中分离金葡菌, 鉴定荚膜多糖血清型, 对5 型荚膜多糖菌株, 采用BH₁, 哥伦比亚固体培养基, mod110 三种培养基, 每种培养基分别采用固体培养, 碳源为葡萄糖的液体培养和碳源为乳糖的液体培养三种方式, 共组成9 种不同培养条件进行培养, 研究培养条件对金葡菌荚膜多糖产量的影响。[结果] 不同培养结果表明, 与常用哥伦比亚培养基比较, BH₁ 培养基能降低荚膜多糖产量, 而 mod110 培养基能提高荚膜多糖产量; 同种培养基, 固体培养方式比液体培养方式有更高的荚膜多糖产量, 同时乳糖作为碳源可提高荚膜多糖产量。

关键词 金葡菌; 荚膜多糖; 培养条件

中图分类号 S823 .9⁺1 文献标识码 A 文章编号 0517 - 6611(2008) 16 - 06813 - 02

Effect of Culture Condition on Type 5 Capsular Polysaccharide Production of *Staphylococcus aureus* from Dairy Cattle

YANG Zheng-tao et al (College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin university, Changchun 130062)

Abstract [Objective] The effect of different culture conditions on type 5 capsular polysaccharide production of *Staphylococcus aureus* from dairy cattle was studied to provide easy way for CP production and preparation and laid down foundation for carrying out new polysaccharide vaccine research. [Method] *Staphylococcus aureus* was isolated from milk sample of sick dairy cattle and capsular polysaccharide serotypes were identified. Type 5 capsular polysaccharide was cultured on BH₁, solid Columbia and mod110 culture media. Glucose and lactose were taken as carbon source for every culture media in solid and liquid state. Therefore 9 different culture conditions were taken to study the effect of culture conditions on capsular polysaccharide production. [Result] Different culture conditions indicated that Comparing with Columbia culture media, BH₁ culture media could decline capsular polysaccharide production and mod110 culture media could increase capsular polysaccharide production. While for same culture media, solid culture media was better for capsular polysaccharide production, meanwhile, taken lactose as carbon source could increase capsular polysaccharide production.

Key words *Staphylococcus aureus*; Capsular Polysaccharide; Culture condition

奶牛乳腺炎是奶牛生产上的重要疾病, 不仅影响奶牛的产奶量、降低牛奶品质, 而且严重威胁消费者健康, 已成为制约奶牛业发展的主要原因之一。据国内外相关资料显示, 50% 以上的奶牛乳腺炎是由金葡菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) 所引起的。研究发现, 94% ~ 100% 的从患乳腺炎奶牛乳汁中分离到的金葡菌菌株表面带有多糖物质构成的保护性荚膜, 荚膜具有11 种血清型, 感染奶牛乳腺的主要是5 型和8 型。这种荚膜多糖(Capsular Polysaccharide, CP) 在金葡菌感染奶牛乳腺的过程中起重要作用, 它能增强金葡菌毒力, 促进金葡菌粘附在内皮细胞表面, 致使金葡菌不能被机体的免疫系统有效杀灭。对于动物机体, 纯化的CP 不具有免疫原性^[1]。但是, 如果将CP 通过偶联, 共价结合于载体蛋白分子上, 就可成为完全抗原, 动物免疫后可产生高水平的保护性抗体。因此, 对于奶牛金葡菌性乳腺炎的防治而言, CP 是一种极具开发潜力的新型多糖疫苗。

笔者从患隐性乳腺炎奶牛乳样中分离鉴定金葡菌, 选取CP5 阳性菌株, 在不同培养基及不同培养方式下进行培养选择金葡菌CP5 最佳培养条件, 为CP5 的大规模提取制备及开展奶牛金葡菌性乳腺炎新型多糖疫苗研究和生产奠定基础。

1 材料与方

1.1 主要试剂 金葡菌CP5 单克隆抗体(美国 USDA - ARS 的 Max J. Paape 博士惠赠), 金葡菌选择性培养基及生化鉴定管(杭州天和微生物试剂有限公司产品)。

1.2 奶牛乳腺炎金葡菌的分离与鉴定 经体细胞计数法诊断为隐性乳腺炎的奶牛, 挤奶时弃去前3 把奶, 收集第4 把

奶作为奶样。将奶样均匀涂于新鲜制备的鲜血琼脂培养基和高盐甘露醇培养基上, 37℃ 培养24 h, 观察菌落形态特征, 挑取典型的菌落, 做生化鉴定。

1.3 金葡菌荚膜电镜观察及血清型鉴定 将菌种接种于哥伦比亚平板上, 置于二氧化碳培养箱(37℃) 中培养6 h。滴加5 ml 灭菌PBS 悬浮细菌, 得菌悬液, 低温离心(4℃, 5 000 r/min × 15 min) 取沉淀。再用5 ml 灭菌沉淀制备出负染样品。用毛细管吸取少量负染样品, 滴在有支持膜的网上。3 min 后, 用干净滤纸从网边吸去液体。稍干后, 用另一毛细管吸1 滴2% 磷钨酸溶液(pH = 6.8) 染色30 s。用滤纸吸去染液, 立即进行电镜观察。同时吸取菌悬液, 与CP5 单克隆抗体进行琼脂扩散试验, 以鉴定荚膜血清型。

1.4 扩大培养 将经以上鉴定为CP5 的菌种接种于100 ml BH₁ 液体培养基中, 置于恒温培养摇床(37℃, 150 r/min) 培养18 h, 作为种子菌液。扩大培养基分别用BH₁、哥伦比亚、mod110 3 种培养基, 各培养基分别采用固培养、碳源为葡萄糖的液体培养和碳源为乳糖的液体培养3 种培养方式, 共组成9 种组合。每种组合接种18 份, 分别接种100 μl 种子菌液, 置37℃ 培养, 并在培养后的第16、24、32、40、48、56、64、72、80 h 各取2 份培养物, 进行CP 产量测定, 并绘制不同培养条件下CP5 产量的动态变化图。

1.5 CP5 产量测定 培养物离心弃上清, 重悬沉淀, 获得的悬液高压灭菌(121℃, 45 min), 然后低温高速离心(4℃, 10 000 r/min × 30 min) 收集上清; 所得沉淀再高压(121℃, 60 min), 低温高速离心收集上清。得到的即为金葡菌CP 粗制品, 用分光光度法测定CP 的含量。

2 结果与分

2.1 奶牛乳腺炎金葡菌的分离与鉴定 从11 头经体细胞计数诊断为患隐性乳腺炎的奶牛乳液中, 分离出9 株具有金葡菌典型菌落形态的菌株, 经生化鉴定全部为金葡菌。

基金项目 国家自然科学基金 金葡菌荚膜多糖二价完全抗原制备及对奶牛乳腺炎的免疫调控(项目批准号:30771596)。

作者简介 杨正涛(1973 -), 男, 甘肃酒泉人, 硕士, 讲师, 从事临床兽医学研究与教学工作。

收稿日期 2008-03-24

2.2 荚膜的电子显微镜观察 对金葡菌的透射电镜扫描图谱(图1)分析表明,与菌体中央相比,细菌表面有一层颜色较为明亮的区域,证实分离得到的金葡菌表面存在荚膜。

经分析透射电镜下的荚膜图谱,表明在不同生长期细菌表面的CP发生变化。随着细菌不断生长CP的量不断增加;直到对数生长后期,随着细菌分解,CP不断脱落。这可能是由于细胞内溶解释放导致CP结构发生变化,而不能粘附在细菌表面所致。

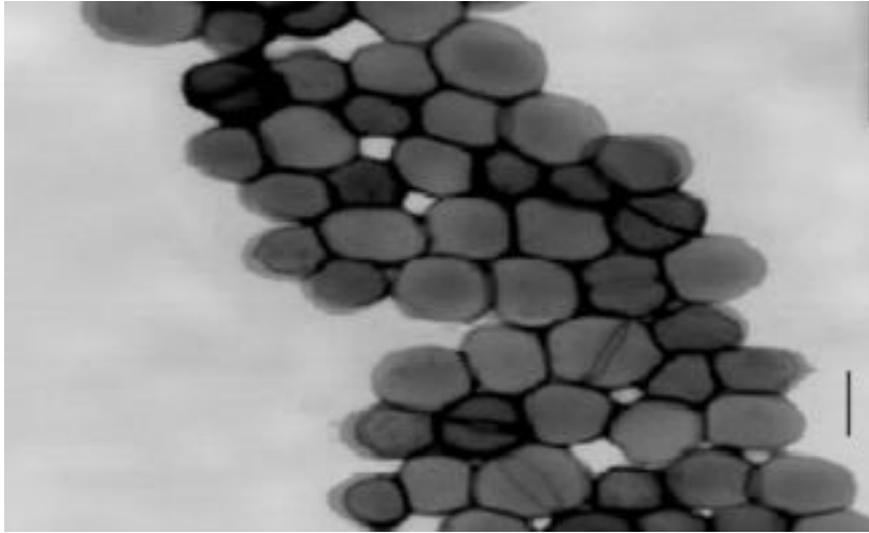
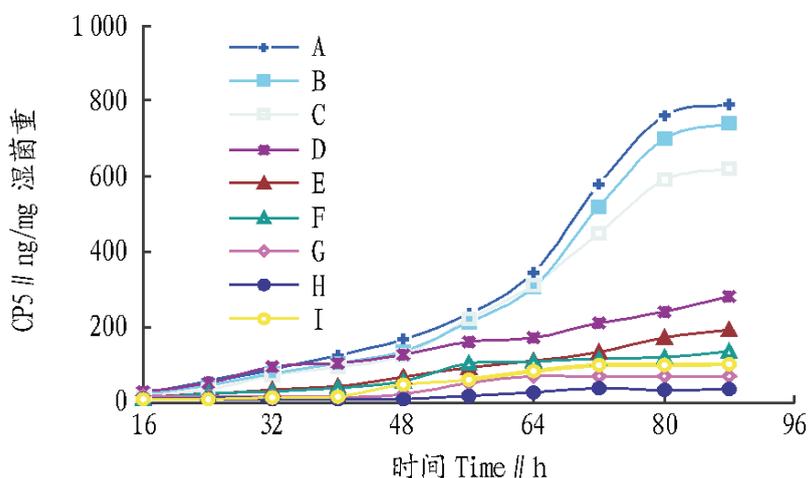


图1 透射电镜下的金葡菌荚膜

Fig.1 Capsule of *S. aureus* under transmission electron microscope

2.3 CP血清型 经琼脂糖凝胶扩散鉴定,在9株金葡菌中,有2株表现CP5阳性。

2.4 不同培养方式组合下CP5产量 图2表明在不同的培养条件下,BM培养基的荚膜多糖产量较低,而nod110培养基的荚膜多糖产量较高。对于同一种培养基不同培养方式而言,固体培养基比液体培养基产荚膜多糖量高。图2还表明,以乳糖为碳源的培养基比以葡萄糖为碳源的培养基产荚膜多糖量高。



注:A为nod110固;B为nod110液乳糖;C为nod110液葡萄糖;D为哥固;E为哥液乳糖;F为哥液葡萄糖;G为BH固;H为BH液乳糖;I为BH液葡萄糖。

图2 不同培养条件下CP5产量的动态变化

Fig.2 The dynamic changes of CP5 production under different culture conditions

3 讨论

3.1 不同培养方式对金葡菌CP产量的影响 Dassy等指出,半合成培养基(Semisynthetic Medium, SM)和nod110培养基相比较,制备简单且能促进金葡菌Reynolds菌株CP的产生^[2]。String研究小组也证实,Reynolds菌株在液体SM培养基中有较高的CP5产生^[3]。该研究得到了相同的试验结果。试验结果还显示,在连续不断的培养中,哥伦比亚固体培养

基比液体培养基有更高的CP产量。这一数据解释并证明了大多数研究者在进行金葡菌试验时,应用哥伦比亚固体培养基这一选择^[4-5]。但是,在静止培养的哥伦比亚液体培养基中,指数生长后期的金葡菌产生的CP明显提高。

3.2 不同培养条件对金葡菌CP产量的影响 培养条件对金葡菌血清CP5产量的影响,国外报道的很少^[2-4],国内尚未见报道。Watson在电子显微镜下观察到,生长在乳腺组织中的金葡菌或者添加了乳清的营养肉汤培养出的金葡菌,在细胞外产生大量且界限清晰的假包膜^[6]。但是,这些假包膜未能在生物化学上进行鉴定。相似的,从奶牛乳腺炎分离出的金葡菌,在添加牛奶的培养基中培养,CP的表达明显提高,同时抗吞噬作用增强。这些结果证实BHI肉汤培养基中存在抑制CP产生的因子,而牛奶中的特殊成分能提高金葡菌CP的产量。

金葡菌利用不同碳源产生不同产量的CP。在包含不同碳源的SM培养基上,Dassy等检测出金葡菌Reynolds菌株CP的产量^[2]。人工培养基最适合CP5的产生。在人工培养基中加入2种碳源(乳糖和葡萄糖)可产生相同的CP产量。但在人工培养基中添加葡萄糖,人源Reynolds菌株产生较多的CP5;而添加乳糖,奶牛源菌株产生较多的CP5。该试验菌株是从富含乳糖的奶中分离得到,因此在富含该碳源的培养基上产生更多的CP。

附加因子调节剂(Accessory Gene Regulator, Agr)控制金葡菌细胞外与细胞结合的蛋白表达。在金葡菌的致病过程中,这些胞外蛋白大部分起很重要的作用,并被Agr调节而在细菌活跃的对数生长期停止后产生^[7]。Dassy等研究发现,Agr参与CP5的表达,通过控制CP5的合成影响CP5的产量。该试验应用的培养基,能很好的诱导金葡菌胞外蛋白的产生并适合CP5的合成,应用这些培养基可对受Agr调控的CP5表达进行进一步研究。该试验也证实,CP5的产生和粘合细菌CP5的比例受培养基的性质和培养时间影响。CP常在刚刚隔离的群体中检测到,在人工培养基上多次培养会降低CP的合成^[8]。这些数据可解释带CP的金葡菌的毒力与抵抗吞噬作用相互矛盾的结果^[9]。

4 结论

考虑到制备培养基的程序、成本、材料的来源及提取纯化的难易程度,最终可选用哥伦比亚固体培养基扩大培养金葡菌,进而提取纯化CP,以促进临床研究和疫苗的发展。

参考文献

- [1] ARBHT R D, DUNN R M. Expression of capsular polysaccharide during experimental focal infection with *Staphylococcus aureus* [J]. *J Infect Dis*, 1987 (156): 947 - 952.
- [2] DASSY B, STRINGFELLOW W T, IIEB M, et al. Production of type 5 polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semi-synthetic medium [J]. *J Gen Microbiol*, 1991 (137): 1155 - 1162.
- [3] FOURNIER J M, HANNON K, MOREAU M, et al. Isolation of type 5 capsular polysaccharide from *Staphylococcus aureus* [J]. *Ann Inst Pasteur/ Microbiol*, 1987 (138): 561 - 567.
- [4] STRINGFELLOW W T, DASSY B, IIEB M, et al. *Staphylococcus aureus* growth and type 5 capsular polysaccharide production in synthetic media [J]. *Appl Environ, Microbiol*, 1991 (57): 618 - 621.
- [5] LEE J C, TAKEDA S, IIVOLSI P J, et al. Effects of in vitro and in vivo growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* [J]. *Infect Immun*, 1993 (61): 1853 - 1858.

(上接第6814 页)

- [6] WATSON DL, WATSON NA. Expression of a pseudocapsule by *Staphylococcus aureus*: influence of cultural conditions and relevance to mastitis[J]. *Res Vet Sci*, 1989, 47(2): 152 - 157.
- [7] ABDELNOUR A, ARMISTON S, BREMELL T, et al. The accessory gene regulator (agr) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model

[J]. *Infect Immun*, 1993 (61): 3879 - 3885.

- [8] JOHNE B, JARP J, HAAHE ML R. *Staphylococcus aureus* exopolysaccharide in vivo demonstrated by immunomagnetic separation and electron microscopy [J]. *J Clin Microbiol*, 1989(27): 1631 - 1635.
- [9] XUS, ARBIT RD, LEEJ C. Phagocytic killing of encapsulated and microencapsulated *Staphylococcus aureus* by human polymorphonuclear leukocytes [J]. *Infect Immun*, 1992(60): 1358 - 1362.