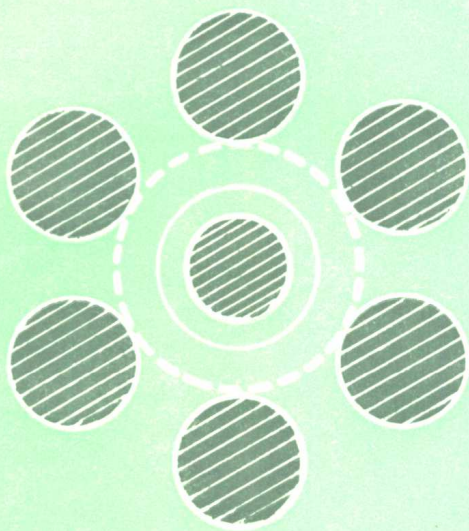


细菌毒素

(第三辑)

主 编 罗海波 杨景云 鲍行豪

副主编 吴清明



北京医科大学
中国协和医科大学

联合出版社

细菌毒素

第三辑

主 编 罗海波 杨景云 鲍行豪
副主编 吴清明
审 阅 汪美先

北京医科大学
中日协和医科大学联合出版社

【京】新登字147号

细菌毒素

(第三辑)

主 编 罗海波 杨景云 鲍行豪
副 主 编 吴清明
责任编辑 张荣连 李兰山

※

北京医科大学联合出版社
中国协和医科大学

浙江新华印刷厂印刷

※

787×1092毫米1/32 12.126印张 270千字

1993年1月第1版 1993年1月第1次印刷

印数: 1—1500

书号: ISBN 7-81034-176-6/R·176

定价: 9.50 元

编写者名单

(以所撰章节先后为序)

- | | |
|-----|-----------------------------|
| 邵传森 | 浙江医科大学(310006) |
| 方平楚 | 浙江医科大学(310006) |
| 胡 野 | 浙江医科大学金华大专部(321000) |
| 程志华 | 浙江宁波市卫生防疫站(315010) |
| 罗海波 | 浙江医科大学(310006) |
| 杨景云 | 佳木斯医学院(154002) |
| 鲍行豪 | 浙江省卫生防疫站(310009) |
| 周祖木 | 浙江温州卫生防疫站(355001) |
| 王贤军 | 浙江湖州第二人民医院(313000) |
| 吴清明 | 浙江医科大学(310006) |
| 娄国强 | 杭州第六人民医院(310014) |
| 蒋 玖 | 蚌埠医学院(233002) |
| 钱小毛 | 浙江绍兴第二人民医院(312000) |
| 白增亮 | 山东医科大学(250012) |
| 陆森泉 | 浙江医科大学(310006) |
| 项 哨 | 浙江医科大学(310006) |
| 顾克洲 | 浙江医科大学(310006) |
| 何浙生 | 浙江省医学科学院(310013) |
| 陈文建 | 江苏无锡中心血站(214021) |
| 陈丽莉 | 浙江医科大学附属二院(310009) |
| 孟昭赫 | 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所(100050) |

- 俞世荣 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所(100050)
- 刘秀梅 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所(100050)
- 严 杰 浙江医科大学(310006)
- 杨进生 解放军医学科学院(100850)
- 匡开源 上海农业科学院植保所(200032)
- 李春德 解放军医学科学院(100850)
- 顾杜新 解放军医学科学院(100850)
- 马其云 解放军医学科学院(100850)
- 罗 毅 解放军医学科学院(100850)
- 陈慧珍 浙江农业大学(310029)

序

《细菌毒素研究进展》及其续篇分别于1983年与1987年相继出版。该两书一经问世，均在短期内即告售罄。对广大读者的厚爱，我们深表谢意。

为了进一步介绍上述两书内容以外的其它细菌毒素诸如，索氏梭状芽胞杆菌外毒素、创伤弧菌毒素、大肠杆菌不耐热肠毒素Ⅰ、Vero毒素、非O1群霍乱弧菌毒素、溶血性巴斯德氏菌白细胞毒素、苏云金芽胞杆菌 δ 内毒素、椰酵假单胞菌毒素-米酵菌酸等，又继续编写了《细菌毒素》第三辑。鉴于T-2毒素、蓖麻毒素与相思豆毒素对人、兽危害性均很大，为引起注意，本书特意作了介绍。

由于分子生物学技术的突飞猛进的发展，目前对炭疽杆菌毒素、志贺氏毒素、Vero毒素、大肠杆菌不耐热肠毒素、百日咳杆菌外毒素、毒性休克综合征毒素Ⅰ、蓖麻毒素与相思豆毒素等等的核苷酸序列和氨基酸序列已有报道，这必将有助于进一步阐明毒素的致病机理以及其它有关问题。

军事医学科学院毒物药物研究所杨进生教授等撰写了T-2毒素，中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所孟昭赫教授等撰写了椰酵假单胞菌毒素——米酵菌酸，使本书增色不少。

承蒙第四军医大学汪美先教授于百忙中对全书进行了审阅，在此致以衷心的感谢。

浙江省新闻出版局何大钧副主任医师及浙江新华印刷厂为本书的出版给予了热情而及时的帮助，我们表示万分感谢。

由于水平所限，书中如有错误或不妥之处，敬请广大读者指正。

罗海波 杨景云 鲍行豪1991年国庆节

目 次

第一章 炭疽杆菌毒素	1
一、制备与纯化.....	1
二、致病作用及机理.....	5
三、基因调控.....	8
四、测定方法.....	11
第二章 绿脓杆菌胞外酶 S	14
一、制备、纯化及影响其产生的因素.....	14
二、理化性状及生物学活性.....	16
三、致病作用.....	18
四、检测方法.....	20
五、免疫性.....	22
第三章 嗜水气单胞菌肠毒素	24
一、概述.....	24
二、种类.....	24
三、制备与纯化.....	26
四、理化性质.....	29
五、生物学活性及致病作用.....	33
六、毒素合成与生化特性的关联.....	38
七、检测方法.....	39
第四章 志贺氏毒素	42
一、制备与纯化.....	42
二、分子结构与作用机理.....	45
三、理化性状与化学组成.....	50

四、生物学活性	51
五、检测方法	53
第五章 Veroto毒素	59
一概述	59
二、生物学活性	60
三、制备、纯化与结构	61
四、功能和作用方式	67
五、免疫学和免疫化学	68
六、遗传学、调节与溶原性转换	71
七、检测	81
八、致病作用与HC及HUS的关系	89
第六章 大肠杆菌不耐热肠毒素	93
一、概述	93
二、作用机理	93
三、提纯	95
四、免疫	97
五、与霍乱肠毒素的同源性	98
六、氨基酸组成及其在细胞内的分布	102
七、测定方法	105
第七章 大肠杆菌不耐热肠毒素Ⅰ	111
一、概述	111
二、提取、纯化及影响其产生因素	112
三、理化性状与生物学活性	113
四、抗原性及基因研究	115
第八章 百日咳杆菌腺苷酸环化酶毒素	120
一、概述	120
二、生物学特性	121

三、纯化	123
四、对细胞功能的影响	124
五、致病作用	126
第九章 百日咳杆菌外毒素	128
一、概述	128
二、制备与纯化	129
三、分子结构及其活性	130
四、基因研究和应用	133
五、致病作用	138
六、免疫原性及单克隆抗体	142
第十章 肉毒毒素	146
一、概述	146
二、分子结构与化学组成	146
三、作用方式与致病机理	157
第十一章 非O1群霍乱弧菌毒素	162
一、概述	162
二、积液因子	162
三、肠毒素	164
四、溶血毒素	167
第十二章 创伤弧菌毒素	172
一、概述	172
二、溶细胞素	173
三、蛋白酶	179
四、磷脂酶	184
五、含铁细胞	187
第十三章 绿脓杆菌杀白细胞素	191
一、概述	191

二、产生的条件与纯化	192
三、一般性状	194
四、靶细胞膜受体	196
五、生物学活性	197
六、毒素效应的生化机理	198
第十四章 艰难梭状芽胞杆菌毒素	204
一、受体与结构	204
二、纯化	206
三、致病作用	209
四、基因研究	211
五、检测	211
第十五章 索氏梭状芽胞杆菌外毒素	214
一、概述	214
二、致死性毒素	214
三、细胞毒素	218
四、出血性毒素	220
第十六章、拟态弧菌毒素	222
一、概述	222
二、纯化与结构	223
三、类型与致病作用	224
四、定居因子	225
第十七章 毒性休克综合征毒素 I	227
一、概述	227
二、纯化方法与理化性质	228
三、核苷酸序列、部分氨基酸序列和结构功能间 关系	230
四、结构基因及其调节	235

五、生物学活性及致病机理	237
第十八章 溶血性巴斯德氏菌白细胞毒素	240
一、概述	240
二、制备与纯化	241
三、理化性状	243
四、生物学活性	244
五、免疫原性与免疫	246
六、检测方法与评价	248
第十九章 出血败血性巴斯德氏菌皮肤坏死毒素	252
一、概述	252
二、制备与纯化	252
三、理化性状与化学组成	255
四、致病作用与致病机理	257
第二十章 军团菌毒素	260
一、概述	260
二、胞外酶类	260
三、脉酶	262
四、细胞毒素	264
五、磷脂酶C	266
第二十一章 鼠疫杆菌内毒素	270
一、提取与纯化	270
二、理化性质与化学组成	271
三、致病作用	273
第二十二章 苏云金芽胞杆菌δ内毒素	278
一、概述	278
二、制备与纯化	279
三、理化性质	281

四、生物学活性	283
五、受体与作用机理	285
六、检测	286
第二十三章 产黑色素类杆菌内毒素	289
一、概述	289
二、提取与纯化	290
三、化学组成和超微结构	291
四、生物学活性	292
五、对牙周组织的影响	293
第二十四章 椰酵假单胞菌毒素——米酵菌酸	299
一、概述	299
二、理化特性	301
三、提取及测定方法	302
四、毒性及代谢产物	304
五、中毒机理	304
六、污染情况	305
七、去毒	306
第二十五章 钩端螺旋体内毒素	308
一、概述	308
二、提取与纯化	309
三、超微结构与理化性质	310
四、生物学活性	314
五、抗原性与免疫原性	317
第二十六章 T-2 毒素	323
一、概述	323
二、产生条件及生物合成方法	324
三、化学组成及理化性质	327

四、提取与纯化	331
五、检测方法	333
六、生物学活性及中毒机理	335
七、致病作用	341
第二十七章…蓖麻毒素和相思豆毒素	348
一、概述	348
二、制备与纯化	349
三、组成和分子结构	350
四、理化性质	356
五、毒性与致病机理	360
六、杂交毒素	368
七、应用	369
八、鉴定	375

第一章 炭疽杆菌毒素

60年代,虽然科研人员对炭疽杆菌毒素(炭疽毒素)进行了许多研究工作,但是,由于受当时检测技术的限制,对该毒素的认识仍很不深入,仅知炭疽毒素由三种成分组成,即水肿因子(EF)、保护性抗原(PA)及致死因子(LF)。而对各成分的分子结构、化学本质及致病作用等了解甚为肤浅,研究进展也极缓慢。直到80年代,由于分子生物学技术的推广应用,才使得对炭疽毒素的研究有了突破性进展。目前不仅完全搞清了炭疽毒素三种成分的氨基酸序列和调控基因的核苷酸组成,而且基本明确了毒素的致病机理。此外,对毒素的提取纯化及测定方法也作了重大改进。现将有关研究进展归纳如下。

一、制备与纯化^[1~5]

(一)菌株的选择

通常从自然界分离的炭疽杆菌均能产生毒素的三种成分。由于采用产毒素有荚膜的强毒菌株极不安全,故应选择产毒素无荚膜的疫苗菌株。除沿用已久的 Sterne 疫苗株外,标记为 SRI-1 的抗利福平 Sterne 自发突变株是一个值得推荐的菌株,其毒素的产量较 Sterne 株高50~75%。V770-NPI-R 及 Vollum 1B 株也被认为是产毒素量较高的优良菌株。菌株应以芽胞悬液或冰冻菌体的形式保存。使用时,可将菌株接种于血琼脂或其它合适的培养基上,于32℃培养复苏。37℃培养常易导致毒素质粒丢失,应避免使用。

(二) 培养条件

以往曾采用1095培养基及酪蛋白水解物培养基,因毒素产量过低,现已较少使用。Ristophi等(1983)采用的R培养基,是对酪蛋白水解物培养基作了如下改进的:①以等量的L-氨基酸混合物代替酪蛋白水解物;②增加葡萄糖含量至0.25%;③省去 KH_2PO_4 并提高 K_2HPO_4 浓度至0.3%,以增加培养基缓冲能力;④去除培养基中的活性炭。经比较表明,使用R培养基能使毒素产量提高2~5倍。

近年,Leppia(1988)研制成功更为优越的RM培养基,其配方(mg/L)为:色氨酸(35)、甘氨酸(65)、酪氨酸(144)、盐酸赖氨酸(230)、缬氨酸(173)、亮氨酸(230)、异亮氨酸(170)、苏氨酸(120)、甲硫氨酸(73)、天冬氨酸(184)、谷氨酸钠(612)、脯氨酸(43)、盐酸组氨酸(55)、盐酸精氨酸(125)、苯丙氨酸(125)、丝氨酸(235)、 NaCl (2920)、 KCl (3700)、硫酸腺嘌呤(2.1)、尿嘧啶(1.4)、盐酸硫胺素(1.0)、半胱氨酸(25)、 KH_2PO_4 (460)、Tris(9030)、葡萄糖(5000)、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (7.4)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (9.8)、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.0)及 NaHCO_3 (8000)。所用氨基酸均为L型。此配方与R培养基相比,含 NaCl 、 KCl 及Tris,增加了葡萄糖含量,减少了磷酸钾含量,并以半胱氨酸取代了胱氨酸。配制时,先将前21种固体成分一起加水溶解灭菌,后8种成分溶于灭菌水后,经过滤除菌再加入,补足水量,调pH至8.0,于密闭容器中保存。若在培养基中加入3~5%马血清,则能使三种毒素成分量稳定增加50~100%,但马血清的加入常会影响毒素纯化。

研究结果表明,使炭疽毒素产量增加的培养基应具备以

下三个条件：①加入 NaHCO_3 以促进毒素基因转录及增加细菌的通透性；②维持 $\text{pH} > 7.0$ ，使蛋白酶作用受抑制；③厌氧培养。一般可采用密闭容器振摇培养的方法，于 35°C 维持 $18 \sim 20 \text{ h}$ ，其间应注意随时用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 8.0 左右。

（三）毒素蛋白的提取

按培养菌液量的多寡可采取不同的提取方法。

1. 大批量（ 50 L 发酵罐）培养菌液的提取 取培养菌液加入 $1, 10$ -盐酸邻二氮杂菲和 EDTA ，使最终浓度分别达 0.05 mmol/L 和 2 mmol/L ，以抑制蛋白酶作用。再加入苯基甲基磺酰氟化物使浓度达 0.1 mmol/L ，加巯基乙醇至 2 mmol/L ，冷却后于持续流液离心机作 12000 r/min 离心，以 400 ml/min 流率吸取上清，置 -4°C 过滤除菌。然后加 $1/50$ 体积的 Sephacrose CL-4B 琼脂糖珠及 $1/2$ 重量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，搅拌使盐溶解。琼脂糖珠沉降过夜，取沉淀的琼脂糖装柱，用 $\text{pH} 8.0$ 50 mmol/L Tris 、 1 mmol/L EDTA 、 2 -巯基乙醇缓冲液洗脱，收取蛋白峰部分，缓慢加入固体硫酸铵至 75% 饱和，再将沉淀的毒素溶于 $\text{pH} 8.0$ 10 mmol/L Tris 、 0.05 mmol/L $1, 10$ -盐酸邻二氮杂菲、 2 mmol/L 2 -巯基乙醇溶液中，并用同一缓冲液透析。此法可从 50 L 培养菌液中提取 $2 \sim 4 \text{ g}$ 毒素蛋白。

2. 小批量（ $< 10 \text{ L}$ ）培养菌液的提取 采用羟基磷灰石吸附法提取。即将除菌冷却后的培养液用醋酸调 pH 至 7.0 ，再加蛋白酶抑制剂及 $1, 10$ -盐酸邻二氮杂菲，并在每升上清中加 5 g 羟基磷灰石及 100 g 聚乙二醇（分子量 8000 ），在 5°C 下轻轻搅拌 $1 \sim 3 \text{ h}$ 。将此羟基磷灰石装柱，用 $\text{pH} 7.5$ 10 mmol/L Tris 洗脱。若不加聚乙二醇，因粘稠度小，可取培