

淋球菌主要外膜蛋白的部分纯化与鉴定

刘先洲 蒋正明 白瑞珍 汤纪路 张秋萍

(湖北医科大学微生物学教研室 武汉 430071)

摘要: 应用国产十六烷基三甲基溴化铵提取淋球菌外膜蛋白 I(PI), 继用 Sepharose 6B 纯化, 并通过 SDS-PAGE 鉴定所提 PI 的纯度, 以及用琼脂双扩散法测定其抗原性。该法提取淋球菌 PI 的纯度高, 收获量大, 对抗原结构无破坏, 适宜在淋球菌的生物学研究中的应用。

关键词: 淋球菌, 外膜蛋白, 纯化

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654-(2000)-01-028-03

PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE MAJOR OUTER MEMBRANE PROTEIN OF *NEISSERIA GONORRHOEAE*

LIU Xian-Zhou JIANG Zhen-Ming BAI Rui-Zhen TANG Ji-Lu ZHANG Qiu-Pin

(Department of Microbiology, Hubei Medical University, Wuhan, 430071)

Abstract: Major outer membrane protein (PI) of *Neisseria gonorrhoeae* was isolated in large quantities by precipitation with hexadecyltrimethylammonium bromide, and substantially purified by chromatography over Sepharose 6B. PI purity was assessed by SDS-PAGE and its capacity reacting to antibody was detected by immunodiffusion. The purifying results suggest that the procedures for isolating the PI of *Neisseria gonorrhoeae* is efficient in purity and yield, and the purified PI obtained by this method maintain their original structure.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, Major outer membrane protein, Purify

淋球菌是性传播疾病的主要病原菌之一, 其致病性, 免疫性和血清学分型等均与细菌外膜成分有关。淋球菌外膜含有多种蛋白抗原, 其中含量最为丰富的是主要外膜蛋白, 即外膜蛋白 I (Protein I, PI)^[1]。提纯 PI 在淋球菌的生物化学, 免疫化学及血清学诊断研究中非常重要^[2,3]。本文介绍我们应用国产十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyltrimethylammonium bromide, CTB) 大量制备 PI 的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和培养基: 淋球菌标准株 29107, 购

自中国药品生物制品检定所。按文献配制淋球菌培养基及营养补充物^[4]。

1.1.2 主要试剂: CTB, 上海试剂厂生产, Sepharose 6B, 瑞典生产进口分装。

1.1.3 抗血清制备: 按文献 [6] 制备抗淋球菌标准株全菌抗血清。

1.2 方法

1.2.1 细菌的培养与收获: 将淋球菌划线接种于含 1% 营养补充物的巧克力色血琼脂平板, 置 5% CO₂, 37℃ 温箱内培养 16~18h, 每一平板上的菌落刮入 5mL 无菌生理盐水内, 4000r/

收稿日期: 1998-11-07, 修回日期: 1999-02-22

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

min, 15min 离心洗涤 2 次, 沉淀细菌称重。

1.2.2 提取 PI: 每克湿重细菌加入 9mL 无菌蒸馏水, 超声波分散细菌团块, 使菌细胞成均匀混悬液, 移入三角烧瓶内, 缓缓加入 CTB, 最终浓度达 2%(重量/体积), 室温下搅拌 1h, $17000 \times g$, 离心 10min, 弃上清, 沉淀用 9 倍体积的无菌蒸馏水混悬, 缓缓加入 4mol/L 氯化钙, 终浓度为 1M, 室温下搅拌 1h, 然后再加入无水乙醇, 使乙醇浓度达 20%, 用于沉淀核酸。 $17000 \times g$, 离心 10min, 小心吸取上清移入另一离心管, 再加入无水乙醇, 使终浓度增加到 80%, 用于沉淀 PI。 同法离心, 弃上清, 沉淀用 100 倍体积无水乙醇洗涤 2 次, 用于除去 CTB 及氯化钙, 继用丙酮洗涤 1 次后冻干。

1.2.3 纯化 PI: 制作 Sepharose 6B 层析柱 (2.5 \times 60cm), 用甘氨酸缓冲液 (50mmol/L 甘氨酸, 5mmol/L EDTA, 1.5% 去氧胆酸钠, pH9.0) 平衡, 将冻干提取物用 1mL 甘氨酸缓冲液溶解后上柱, 用 2 倍柱床体积的甘氨酸缓冲液洗脱, 每 5mL 洗脱液收集 1 管。

1.2.4 鉴定: 用 751 紫外分光光度计测洗脱液 280nm 吸收值, 取 $OD \geq 0.1$ 的洗脱液, 应用不连续的 SDS-PAGE 分析提取物的纯度 (浓缩胶 T = 5%, 分离胶 T = 12.5%), 收集蛋白分子量在 43~30kD 之间的洗脱液, 加入终浓度达 80% 的无水乙醇沉淀蛋白, 离心后收集沉淀冻干保存。 取提取物按常规与本室制备同源标准株淋球菌全菌抗血清作琼脂双扩散用于鉴定提取物的抗原活性。

2 结果

10g 湿重菌细胞经 CTB 提取, Sepharose 6B 柱层析纯化, 收获洗脱液 40mL, 通过紫外分光光度计测定其 OD_{280} 及 OD_{260} 值, 按 Lowry-Kalckar 公式计算溶液中蛋白含量, 10g 湿重菌细胞共收获 PI 约 3.2mg。 离子交换层析蛋白洗脱峰见图 1。 SDS-PAGE 电泳对提取物的蛋白成分分析结果见图 2。 分析结果显示, 菌细胞经 CTB 提取后, 已除去绝大多数菌体蛋白, 在 43~30kD 之间, 可见一条主要蛋白带和两条

次要蛋白带及部分其它微量菌体蛋白, 经 Sepharose 6B 纯化后, 则仅见主要蛋白带和微量次要蛋白带, 根据其分子量大小, 分析应为纯化 PI 蛋白。 琼脂双扩散结果 (图 3) 显示, 经 CTB 提取和 Sepharose 6B 纯化的 PI 蛋白, 均能与抗血清形成沉淀线, 且与全菌抗原部分交叉, 说明 CTB 去污剂作用温和, 不改变蛋白质

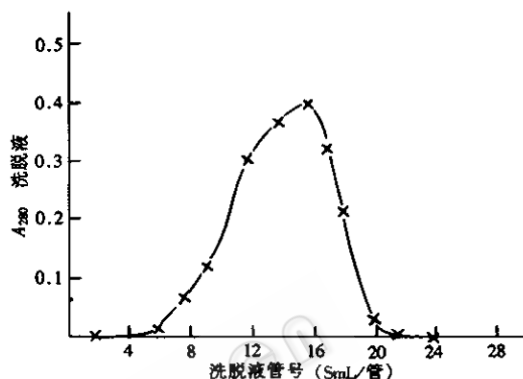


图1 Sepharose 6B柱层析洗脱液经紫外分光光度计测定的280nm吸收值

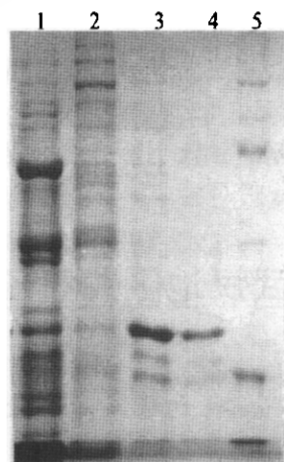


图2 SDS-PAGE结果

1. 淋球菌全菌超声裂解物, 2. CTB沉淀PI以后的上清, 3. CTB提取的PI, 4. Sepharose 6B纯化的PI, 5. 分子量标准; 磷酸化酶B (94kD)、小牛血清白蛋白 (67kD) 肌动蛋白 (43kD)、碳酸酐酶 (30kD)

的抗原活性。

3 讨论

淋球菌的外膜蛋白是其主要的表面抗原, 其有 PI、PII 和 PIII 三类分子。PI 占外膜蛋白总量的 60% 以上, 分子量 32~38kD, 与 PIII 共同

构成亲水性的蛋白孔道^[1]。PI 与宿主细胞膜间的相互作用在淋球菌的致病过程中起着重要作用,同时也是机体免疫作用的主要靶部位^[2,3]。

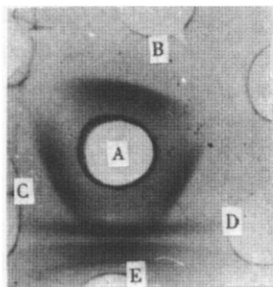


图3 琼脂双扩散结果

A. 抗淋球菌全菌血清, B.C.D. CTB 纯化的淋球菌 PI,

E 淋球菌全菌抗原

提纯淋球菌 PI 的方法较多,本试验中选用 CTB 提取 PI 有其显著特点。首先,CTB 作为阳离子去污剂具有杀菌活性,处理大样本的病原菌比较理想,其次,CTB 在低离子强度时,只能使 PI 和核酸沉淀,不沉淀其他菌体蛋白,故可通过离心使 PI 从其他细胞蛋白成分中分离出来。加入氯化钙提高离子强度后,PI 又能溶解在 CTB 溶液中^[4]。同时,通过加入 20% 的乙醇,使污染的核酸沉淀,从而使 PI 与核酸分离。

脂多糖是革兰氏阴性菌的重要表面成份,

与细菌的致病性、抗原性密切相关。为除去提取物中脂多糖的污染, Buchanan 等应用 Sepharose 6B 离子交换层析提纯 PI, 结果 PI 能最先从层析中洗脱而完全与脂多糖分开^[6]。在本试验中发现,用 Sepharose 6B 层析也可使用 CTB 提取后的 PI 更进一步纯化。因此,应用 CTB 提取淋球菌 PI, 继用 Sepharose 6B 层析纯化, 所收获的 PI 制剂纯度高、收获量大、且分离过程温和,不破坏蛋白的抗原结构,适用于大批量制备淋球菌 PI 抗原。

参 考 文 献

- [1] 吴志华. 现代性病学(第 1 版), 广州: 广东人民出版社, 1996, 414.
- [2] Mee B J, Thomas H, Cooke SJ *et al.* J Gen Microbiol, 1993, 139:2613~2620.
- [3] Cooke S J, Paz H, Poh C L *et al.* Microbiology, 1997, 143:1415~1422.
- [4] Blake M S, Gotschlich E C. Infect Immun, 1982, 36(1):277~283.
- [5] Johnston K H, Holmes K K, Gotschlich E C. J Exp Med, 1976; 143:441~758.
- [6] Buchanan T M, Hildebrandt J F. Infect Immun, 1981; 32(3):985~994.