

霍乱弧菌 EL-Tor 35A3 菌株外膜蛋白主区带的纯化

林厚怡 陈慎宝* 朱兰珍 丁如宁* 沈凤新

(南京医科大学生化教研室, 南京 210029)

摘要 选用霍乱弧菌 EL-Tor 生物型 35A3 菌株(血清稻叶型)以 EDTA-溶菌酶法与超速离心法提取其外膜蛋白,并将聚丙烯酰胺凝胶电泳后一条蛋白主区带分离。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得该蛋白主区带的分子量为 25kD,免疫电泳显示一条线,免疫双扩试验表明,不同的霍乱弧菌菌株均有该蛋白抗原存在。

关键词 霍乱弧菌,外膜蛋白,主区带,纯化

在霍乱免疫机制的研究中,抗菌免疫受到较多研究者的重视。霍乱弧菌细胞壁的外膜蛋白(OMP)与脂多糖(LPS)是抗菌免疫的重要组分,其中外膜蛋白具较强的免疫原性,能诱导机体产生相应的抗体对抗活菌的攻击^[1-3],是制备霍乱菌苗的重要成分,因此纯化其外膜蛋白并了解其生物化学与免疫学特征仍是十分必要的一步。本研究采用 EDTA-溶菌酶法及超速离心等方法从霍乱弧菌中提取外膜蛋白取得较理想的结果。

1 材料与方法

1.1 细菌培养

冷冻干燥的霍乱弧菌 35A3 菌株在肉汤培养基中复苏后移种于固体培养基中,选择动力良好的菌株接种于琼脂平板上,24h 后挑取光滑型菌落接种于蛋白胨肉汤培养基中,作需氧摇瓶培养,37℃ 过夜。此外,本研究还选用 EL-Tor 生物型 BH43 (小川),WJ2 (稻叶)和古典生物型 569B (稻叶)等菌株(以上菌株的原始菌株均由中国药品生物制品检定所鉴定提供)。

1.2 外膜蛋白的提取

参照 K Richardson 等人^[4]方法,将上述细菌培养液离心 10000g × 20min,弃上清,其细胞团块用 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)洗涤两次,离心后所得到的沉淀按湿重 1g

细胞溶于 20ml 的上述缓冲液中,并置于含 3mm 直径玻璃珠的锥形瓶中,依次加入 1% EDTA 钠 2ml,0.5% 溶菌酶 2ml,37℃ 下振荡 2h,离心 105000 g × 1h,其上清为粗制的 OMP,低温保存备用。

1.3 抗血清制备

取 35A3 菌株 OMP 粗制品与等量福氏完全佐剂相混匀,免疫成年家兔(雄性,体重 2kg),3—4 周后追加一次,末次注射后一周取血,免疫双扩试验测其效价为 1:64,分离血清-20℃ 保存。

1.4 OMP 主区带的分离

按 Lameli 方法,以 10% 聚丙烯酰胺凝胶制成 120 × 110 × 1mm 的凝胶板,每孔加样 20 μl,电流 22mA 电泳 2—3h,电泳毕后准确切取含蛋白主区带的凝胶条带,捣碎后浸泡于 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中,置冰箱 2—3d 后收集上清备用。

1.5 蛋白含量及糖含量的测定

Lowry-酚试剂法测蛋白含量(以牛血清白蛋白为标准),蒽酮法测糖含量(以葡萄糖为标准)。

1.6 SDS-PAGE

其操作方法与 1.4 基本相同,但在制备凝

国家自然科学基金资助项目

* 南京医科大学微生物教研室

1994-08-01 收稿

胶与电泳缓冲液时加入 1% SDS, 样品事先用等量的样品处理液 (含巯基乙醇与 SDS 等成分) 煮沸 1min。

1.7 免疫电泳与免疫双扩试验

均采用 1% 琼脂糖胶, 抗血清为 35A3 菌株的 OMP 粗制品免疫家兔产生的。

2 结果

2.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳

霍乱弧菌外膜蛋白粗制品经聚丙烯酰胺凝胶电泳后显示一条主要蛋白区带及十多条次要区带。不同霍乱弧菌菌株的 OMP 其电泳图形基本相似, 主区带的位置也相当一致 (图 1)。

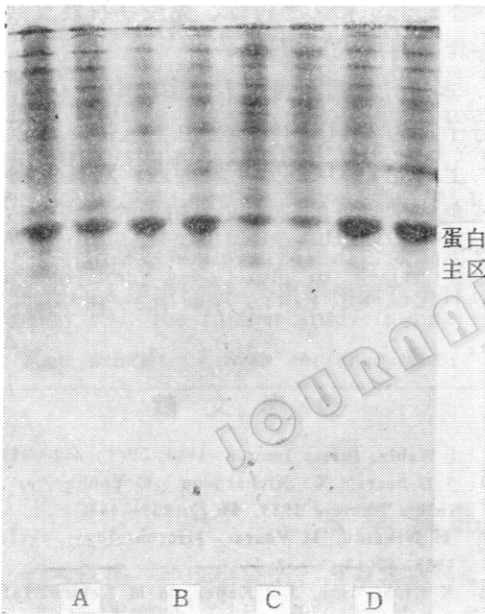


图 1 霍乱弧菌不同菌株 OMP 的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

"A"35A3 菌株 "B"569B 菌株 "C" WJ2 菌株
"D" BH43 菌株

2.2 霍乱弧菌 EL-Tor 生物型 OMP 主区带的特点

2.2.1 Lowry-酚试剂法测得蛋白含量为 50 $\mu\text{g/ml}$, 蒽酮法未测得糖含量。

2.2.2 SDS-PAGE 测定该主区带位于标准蛋白 a 与 b 之间 (图 2-I)。准确量取样品迁移距离 (即从凝胶顶端至标准蛋白各区带及 OMP 主区带中心的距离) 与溴酚蓝染料迁移距离, 计算

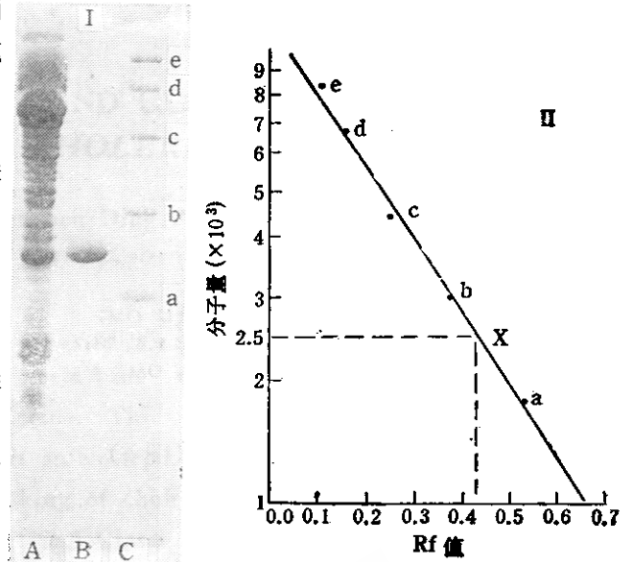


图 2 SDS-PAGE 图 (2-I) 与半对数作图法测主区带分子量 (2-II)

图 2-I: "A"35A3 菌株 OMP 粗制品, "B"35A3 菌株 OMP 纯化的主区带, "C" 标准蛋白 (上海东风试剂厂产品)。a. 烟草花叶病毒外壳蛋白 (17kD), b. 碳酸酐酶 (30kD), c. 肌动蛋白 (43kD), d. 牛血清白蛋白 (67kD), e. 磷酸化酶 b (94kD)。图 2-II: X 代表主区带蛋白

各自的相对迁移率

$$R_f = \frac{\text{样品迁移距离 (cm)}}{\text{溴酚蓝迁移距离 (cm)}}$$

以此为横坐标, 按半对数作图法求得该主区带的分子量为 25kD (图 2-II)。

2.2.3 该主区带的某些免疫学特征: 35A3 菌株 OMP 主区带电泳后与其 OMP 抗血清反应呈现一条线 (图 3)。

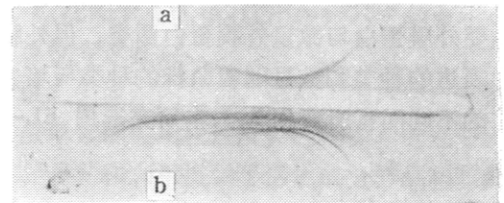


图 3 免疫电泳图

"a" 35A3 OMP 的主区带 "b" 35A3 OMP 抗血清

免疫双扩试验表明霍乱弧菌不同菌株 OMP 主区带与 35A3 菌株 OMP 抗血清反应呈现一条带, 彼此相连, 表明不同菌株的外膜上均

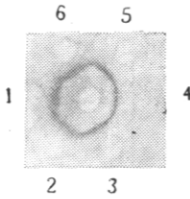


图4 免疫双扩图

1, 35A3 菌株 OMP 主区带, 2, 569B 菌株 OMP 主区带, 3, 4, WJ2 菌株 OMP 主区带, 5, 6, BH43 菌株 OMP 主区带, 中间孔: 35A3 菌株 OMP 粗制品抗血清

有分子量为 25kD 的蛋白抗原存在(图 4)。

3 讨论

3.1 霍乱弧菌属革兰氏阴性菌, 外膜是其特有的结构, OMP 位于最外层并为外膜的主要结构, 在维持细菌外膜的完整性和物质运转方面起重要作用^[1,3]。80 年代在研究霍乱免疫机制中, 较多研究者认为, 霍乱免疫是抗菌与抗毒免疫协同作用的结果, 抗菌免疫似乎更重要, 其中 OMP 是重要的免疫原, 为此纯化霍乱弧菌 OMP 并了解其生物化学与免疫学的一些特性是必要的, 这可为进一步了解霍乱免疫机制并为研制有效的霍乱菌苗提供一些实验依据。霍乱弧菌的 OMP 在致病过程中与细菌的粘附有关^[4]。S. Kabir 等人^[1,2]曾报道古典生物型霍乱弧菌外膜蛋白分子量为 48kD 主区带, 暴露在菌体表面, 经志愿者试用有一定的保护作用。

3.2 革兰氏阴性菌外膜上的蛋白质种类较多, 功能复杂, 根据其在细胞中拷贝数的高低分为主要外膜蛋白与微量外膜蛋白两类, 但外膜蛋白表达的种类和数量随着菌株的种类与培养条件的不同而有所变化^[5]。本研究选用 EL-Tor

生物型霍乱弧菌 35A3 菌株为研究样品, 此外还选用 EL-Tor 生物型 WJ2 菌株、BH43 菌株及古典生物型 569B 菌株等作比较对照, 用 EDTA-溶菌酶法与高速离心法提取外膜蛋白, 以聚丙烯酰胺凝胶电泳分离其主要区带, 经 SDS-PAGE 测得其分子量为 25kD, 免疫双扩试验表明不同霍乱弧菌菌株外膜上均有该蛋白抗原存在。1985 年 PA. Manning 等人^[6]报道用基因重组技术获得一分子量为 22kD 的霍乱弧菌外膜蛋白, 1986 年 J. phiner 等人^[6]报道霍乱弧菌 OMPV 基因表达产物为 28kD 的外膜蛋白, 在成熟过程中去掉 19 个氨基酸信号肽, 成为分子量为 26kD 的蛋白质, 但有关这些外膜蛋白的生物化学特征、免疫学特性及其生物学作用等均未见报道。

3.3 本研究从霍乱弧菌不同菌株中纯化了一种分子量为 25kD 的外膜蛋白主区带, 其分子量与上述的 26kD 的分子量接近, 对其生物化学与免疫学特征的研究仅为初步的研究, 该蛋白主区带是否在致病过程中参与粘附作用? 是否具有免疫保护作用? 还需作深入的研究探讨。

参考文献

- [1] S Kabir. *Infect Immun*. 1983, 39(1): 452—455.
- [2] S D Sears, K Richardson, C Young, *et al*. *Infect Immun*, 1984, 44(2): 439—444.
- [3] H Nikaido, M Vaara. *Microbiology reviews* 1985, 49(1): 1—32.
- [4] K Richardson, J B Kaper, M M Levine. *Infect Immun*, 1989, 57(2): 495—501.
- [5] P A Mianning, E J Bartowsky, DL Leavesly, *et al*. *Gene*, 1985, 34: 95—103.
- [6] J Pohlner, TF Meye, MB Jalajakumari. *Mol Gen Genet*, 1986, 205(3): 495—500.

PURIFICATION OF MAJOR BAND OUTER MEMBRANE PROTEIN OF *VIBRIO CHOLERA* EL-TOR

Lin Houyi Chen Shenbao Song Lanzhen Ding Runing Shen Fengxin

(Department of Biochemistry, Nanjing Medical University, Nanjing 210029)

Abstract *Vibrio cholerae*, like other Gram-negative bacteria, has an outer membrane containing lipopolysaccharide (LPS) and outer membrane protein (OMP). Both OMP and LPS are essential in the making of cholera vaccine. This investigation is aimed to analyze the OMP of the *vibrio cholerae* helping to get an in-depth knowledge the chemical composition of the bacterial cell envelope in the making of cholera vaccine.

Vibrio cholerae EL-Tor 35A3, BH43, WJ2 and Classical 569B were used in this study. Isolation of OMP was accomplished by treating the cell envelope with 1% EDTA and 0.5% lysozyme for shaking at 37°C 2h followed by centrifugation at 105000g for 1h. The major band of OMP was isolated with polyacrylamide electrophoresis and analyzed by electrophoresis which contained SDS-PAGE and immuno-electrophoresis. The results suggest that all these strains contained a major protein antigen band of molecular weight 25kD and have a cross-reacting the protein antigen located in the outer membrane. This finding, the authors supposed, may be a light in design of a cholera vaccine, but this study is primary. It is necessary that the further study is making to do.

Key words *Vibrio cholerae*, Outer membrane protein, Major band, Purification