

一种快速提取禽源性大肠埃希氏菌外膜蛋白的方法

高 崧 刘秀梵 张如宽

(扬州大学农学院动物医学系,扬州 225009)

摘要 介绍一种快速提取禽源性大肠埃希氏菌外膜蛋白的方法。该法是对 Kapur 等发表的方法的改进。全过程只需超速离心一次,比 Kapur 等的方法缩短了 4h。所得样品可直接用于禽源性大肠埃希氏菌外膜蛋白模式的测定。

关键词 大肠埃希氏菌,外膜蛋白,十二烷酰肌氨酸

大肠埃希氏菌是家禽最常见的病原菌之一,可引起家禽胚胎死亡、脐炎、败血症、肉芽肿、卵黄性腹膜炎和全眼球炎等一系列疾病,给养禽业带来重大损失^[1],而禽大肠杆菌败血症的分离株又以 O2 和 O78 血清型居多^[2]。

外膜蛋白模式的测定是衡量禽源性大肠埃希氏菌分离株遗传相关性的一种手段^[3,4],而外膜蛋白模式则是由分离株的主要外膜蛋白(major outer membrane)的种类及其在 SDS-PAGE 中迁移率的大小决定的,主要外膜蛋白的分子量约在 30,000~40,000u 之间^[5]。目前普遍采用的外膜蛋白的提纯方法是十二烷酰肌氨酸法^[3~5],虽然该法较蔗糖密度梯度离心法简便得多^[5],但所需时间仍较长,尤其在大量分离株的外膜蛋白模式的分析时,更显费时。我们在 Kapur 等^[3]的方法基础上加以改进,形成了一种快速提取禽源性大肠埃希氏菌外膜蛋白的方法。该法所获样品与 Kapur 方法比较及其对禽大肠埃希氏菌 O2, O78 外膜蛋白模式的分析,显示出该方法快速、有效。

1 材料与方 法

1.1 菌株

禽大肠埃希氏菌 O2A、B 和 O78A、B 各 2 个分离株,本实验室保存。

1.2 主要化学试剂和仪器

1.2.1 主要化学试剂: 10mmol/L HEPES (N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸), pH7.4, 纯度>99%,分析纯, MERCK 公司产品。2% 十二烷酰肌氨酸,纯度>95%,分析纯, Sigma 公司产品。

1.2.2 超声波裂解仪和离心机: 超声波裂解仪型号为 SONIPREP 150,英国 MSE 科学仪器公司产品;高速冷冻离心机型号为 GL-20A,湘西仪器仪表总厂产品;超速离心机型号为 HIMAC 5P-72,日本日立公司产品。

1.3 方法

1.3.1 外膜蛋白样品的制备: 将禽大肠埃希氏菌 O2A、B 和 O78A、B 4 个分离株分别接种于 200ml LB 液体培养基中,于 37℃ 摇床 450r/min 振荡培养过夜。培养物于 100ml 离心管中,6000g,4℃,离心 10min;将沉淀悬浮于 10mmol/L HEPES (pH7.4) 6ml 中,75W 超声裂解 60s;裂解物置 10ml 离心管中,6000g,4℃,离心 10min;上清移于 50ml 超速离心管中,加入约 8 倍体积的 2% 十二烷酰肌氨酸,110 000g (RP-50T-2 转子,35000r/min),离心 1h;将沉淀悬浮于 1ml 10mmol/L HEPES (pH7.4) 中,置-20℃ 备用。

1.3.2 电泳检测:

国家自然科学基金和江苏省教委自然科学基金资助项目
1995-05-02 收稿

(1)SDS-PAGE: 浓缩胶浓度为 4.8%, 分离胶浓度为 10%。上述外膜蛋白样品 15 μ l 加入等量样品缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 水浴 7min, 加样品于垂直电泳槽的样品孔中, 恒流 20mA 电泳。样品缓冲液为含 4%SDS, 20%甘油, 5%2-巯基乙醇, 0.002%溴酚蓝的 0.1mol/L Tris·HCl (pH6.8)。低分子量蛋白为上海东风生化试剂厂产品。

(2)凝胶的银染: 凝胶剥离后, 首先在甲醇: 冰醋酸中固定; 蒸馏水漂洗后, 浸入 5 μ g/ml 二巯基苏糖醇溶液中, 再与 0.1%AgNO₃ 作用。蒸馏水漂洗后, 凝胶置显影剂 (50 μ l 37% 甲醛加入 100ml 3%Na₂CO₃ 中) 中显色。当所要求的染色水平出现时, 直接向显影剂中滴加 2.3mol/L 柠檬酸溶液, 使 pH \approx 7.0, 拍照。

2 结果与讨论

从试验结果看, 改进的 Kapur 法是目前禽

源性大肠埃希氏菌外膜蛋白提取方法中最省时间的一种。它只需要一次超速离心, 比 Kapur 等^[3]的方法快 4h。

对两种方法所得到的外膜蛋白样品进行比较, 本法所得 OMPs 样品含量稍高于 Kapur 等的方法所得样品。这可能与后者经两次超速离心, 使得部分 OMPs 丢失有关。两者纯度无明显差别, 均可用于禽源性大肠埃希氏菌 O₂、O₇₈ 分离株外膜蛋白模式的测定^[4](图 1)。

由图 1 电泳结果看, 4 个分离株出现了 2 个 OMP 模式。其中 O₂ 的 OMP 模式由 3 条带组成; O₂B、O₇₈A 和 O₇₈B 的 OMP 模式均由分子量几乎一致的 2 条带组成。说明这些分离株的遗传关系很近。O₂B 血清型和 O₇₈A、B 血清型分离株的 OMP 模式相同, 而 O₂A、O₂B 的 OMP 模式不一致, 进一步表明, O 血清学分型并不能体现分离株间的遗传相关性。

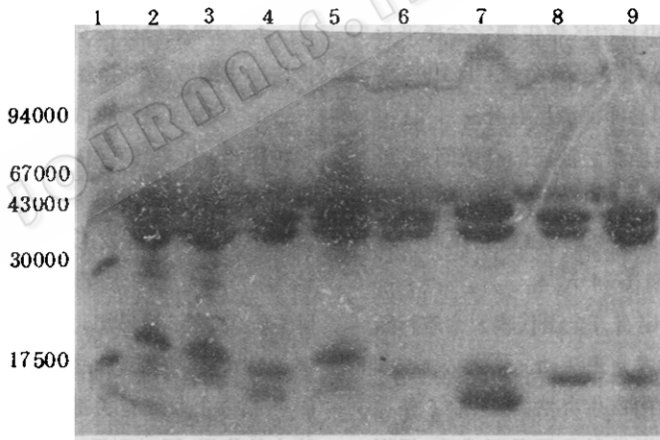


图 1 4 个禽源性大肠埃希氏菌 O₂、O₇₈ 分离株外膜蛋白不同提取方法的电泳比较

1 道: 低分子量标准蛋白, 箭头所示数字为标准蛋白分子量; 2、3 道: O₂A 分离株; 4、5 道: O₂B 分离株; 6、7 道: O₇₈A 分离株; 8、9 道: O₇₈B 分离株。2、4、6、8 道采用 Kapur 等的方法; 3、5、7、9 道采用本文的方法

参 考 文 献

- [1] Gross W B. Colibacillosis. In: Disease of Poultry. Seventh editn. Edited by M S Hofstad, et al. Iowa State University Press, 1978, 321~330.
- [2] Sojka W J, Carnaghan R B A. Res Vet Sci, 1961, 2: 340~352.
- [3] Kapur V, White D G, Wilson R A, et al. Infect Immun, 1992, 60: 1687~1691.
- [4] 高崧, 刘秀梵, 张如宽, 江苏农学院学报, 1995, 16(2): 59~63.
- [5] Achtman M, Mercer A, Kusecek B, et al. Infect Immun, 1983, 39: 315~335.

AN IMPROVED METHOD FOR RAPID ISOLATION OF THE OUTER MEMBRANE PROTEINS FROM ESCHERICHIA COLI ISOLATES OF CHICHEN ORIGIN

Gao Song Liu Xiufan Zhang Rukuan

(Department of Veterinary Science, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract An improved method for rapid isolation of the outer membrane proteins(OMPs) from *Escherichia coli* isolates of chichen origin was developed. Compared with the procedure reported by Kapur et al., important modifications have been made in this protocol. The time needed for ultracentrifugation was shortened to 1 hour, and the total time for the isolation was 4 hours less. The OMPs isolated with this modified protocol could be directly applied for the determination of the OMP patterns of *Escherichia coli* isolates of chichen origin.

Key word *Escherichia coli*, outer membrane proteins, N-lauroylsarcosine