

技术与方法

酶解-凝胶色谱法制备志贺氏菌脂多糖

钟启平 陈思临

(天津医科大学微生物学教研室 天津 300070)

摘要 应用核酸酶及蛋白酶 K 降解作初提,经凝胶色谱纯化的程序提取了较高纯度的志贺氏菌脂多糖,产率为 5.28%。并初建以 254nm/425nm 波长用于监测脂多糖的新方法。

关键词 志贺氏菌,脂多糖(LPS)

革兰氏阴性菌内毒素(脂多糖, LPS)在致病中的作用,除其类脂 A 部分诱发细胞及体液因子而导致多种病理或病理生理损害外,其 O-抗原多糖的特异性致病作用亦日益受到关注。如在志贺氏菌的研究中早已揭示,当缺失 O-抗原虽能侵入宿主细胞,但不能引起炎症反应。最近 Sandlin^[1]报告,志贺氏菌的 O-抗原与其在宿主细胞内使菌体表面形成尾状肌动蛋白 F 有关,而这一构造与细菌在胞内(间)移动能力相关。为研究 LPS 的作用而采用的制备方法其基本原理即为破坏菌细胞,除去蛋白成分,制取脂多糖。如酚水法及三氯醋酸法等已被广泛应用并有商品生产,但这类制备物通常还会有少量蛋白质及核酸,而且最近 Eidhin 与 Mouton^[2]又发现与他们所用蛋白酶 K 降解法制备的类杆菌 LPS 相比,Westphal 等^[3]方法的制备物与一些 LPS 的单克隆抗体无反应。提示建立一种更好的保持原有 LPS 生物活性,且能提高纯度的制备方法已属必要。为此进行了本实验,并初步建立了酶解-凝胶色谱分离程序及 254nm / 425nm 波长监测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株

福氏志贺氏菌 5 型 M90T(法国巴斯德研究所惠赠)。

1.2 试剂

DNA 酶、RNA 酶(华美公司),蛋白酶 K、福氏志贺氏菌 1a 型 LPS、Re 核心糖脂(Sigma)。

1.3 LPS 制备

参照 Eidhin 与 Mouton 方法,但在酶解蛋白前,先除去核酸成分,即在收获培养物后用 Tris 缓冲液洗去菌毛和残留培养基,冻干,研磨成菌粉。25mg 菌粉置于 1ml 无离子水,沸水浴 15min,离心去细胞碎片,取上清加 DNA 酶和 RNA 酶 37℃ 1h,再加入蛋白酶 K,60℃ 作用 1h,置沸水浴 5min,离心沉淀残余蛋白酶 K,上清透析过夜。再次沉淀离心,取上清为初提物。初提物经 Sephadex G50 层析,无离子重蒸水洗脱。收集第一个峰样品,冻干保存。

1.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

浓缩胶 3%,分离胶 12.5%,60~70V 恒压电泳 12~14h。

1.5 糖染色

电泳后的聚丙烯酰胺凝胶进行 Schiff's 染色^[4]。

1.6 蛋白染色

电泳后的聚丙烯酰胺凝胶进行考马斯亮兰 R 染色(常规方法)。

1.7 硫酸-酚法测糖含量^[5]

1.8 0.7% 琼脂糖凝胶电泳

20V 恒压,2h。

1.9 紫外/可见分光光度计扫描

1.10 制备物 LPS 的 ELISA 测定(常规方法)

国家自然科学基金资助项目

1997-01-02 收稿

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

2 结果

2.1 制备物的纯度及产率

本方法制备的 LPS 凝胶色谱结果显示为单峰;且用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测制备物,溴

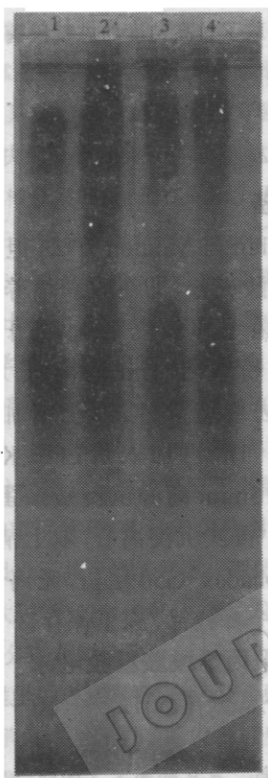


图1 LPS的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

1. 福氏志贺氏菌1a型LPS(Sigma); 2. M90T LPS(酚水法提); 3~4. M90T LPS(本法提)

化乙锭染色未见 DNA 和 RNA 带;聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,考马斯亮兰 R 染色未见蛋白质带;产率为 5.28%;且多糖电泳谱与商品 LPS 及酚水法 LPS 一致(图 1)。

2.2 制备物的抗原性检测

用抗 M90T 全菌抗体检测制备物抗原性,以酚水法 LPS 为阳性对照,ELISA 结果显示制备物抗原性与酚水法 LPS 抗原性强度一致。又以福氏志贺氏菌 Re 核心糖脂抗体与制备物进行 ELISA 试验,以抗 M90T 全菌抗体为阳性对照,发现两种抗体与制备物反应强度一致。表

明制备物为特异性完整脂多糖。

2.3 制备物的光谱吸收检测

用 PERKIN-ELMER LAMBDA 17 紫外/可见光分光光度计扫描制备物显示只有一个高吸收峰在 254nm。

2.4 色谱馏分的 254nm / 425nm 波长监测与糖定量

制备物用 Sephadex G50 层析,无离子重蒸

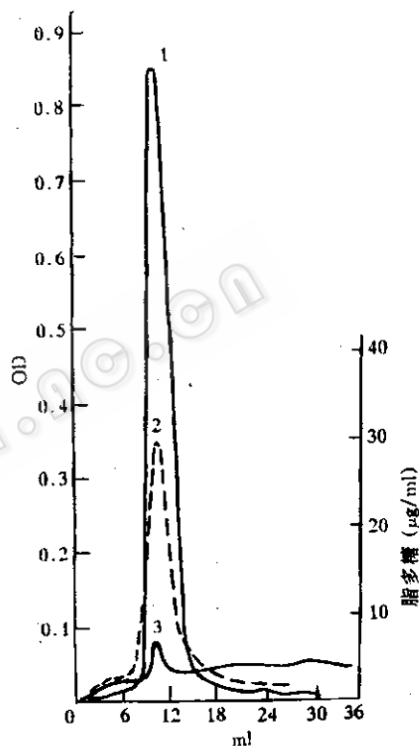


图2 LPS的Sephadex G50层析,254nm,425nm监测及糖含量测定曲线

1. 254nm 2. 糖含量 3.425nm

水洗脱,分别以 254nm 及 425nm 监测,均显示一个峰,且峰位重合。各馏分同时用硫酸-酚法测糖含量,结果也为一个峰,且与 425nm、254nm 光吸收峰位完全重合(图 2)。

3 讨论

关于 LPS 的提取,Eidhin 认为 Westphal 法及 Darveau 法制备的 LPS 对几个 LPS 特异单克隆抗体反应不好,Hitchcock 法含有蛋白酶 K 残余污染,且因有 SDS 抑制斑点免疫分析中与抗

体的反应性。此外,当我们用 Eidhin 原法制备的 LPS 产物用电泳检测时发现仍有核酸存在。Sigma 产品亦有此缺点,且含有少量蛋白质。这对 LPS 致病作用的研究显然不合适,为此我们增加去除核酸的程序,用 DNA 酶、RNA 酶去除样品中核酸^[6],与此同时也去除了 254nm 监测的干扰因素,有利于色谱纯化 LPS 时监测波长的选择。

通过紫外/可见光对本法制品及 Sigma 产品的扫描表明纯化的 LPS 在 254nm 有高吸收峰, Walborg^[7]曾报告在用 395nm、405nm 及 425nm 测定糖时,只有己糖对 425nm 有吸收。据此我们用构成志贺氏菌 O-抗原主要成分的鼠李糖进行实验亦证实在此波长有吸收,且核酸完全无吸收。将此波长用于 LPS 的监测,显示有良好的特异性,但吸光度很低,这与光谱扫描所获结果一致。在同一条件下,我们用本法 LPS 及已知福氏志贺氏菌 1a 型 LPS (Sigma) 分别进行 Sephadex G50 层析,均用 254nm 及 425nm 测峰位,并以硫酸-酚法定各连续馏分的糖含量,三者峰位完全重合(图 2)。同时我们用 ELISA 法初步测定连续馏分抗原性,峰位也与前三者重合。因此证明在 425nm 监测具有特异性。而在除去蛋白及核酸条件下 254nm 亦可考

虑作为志贺氏菌 LPS 检出的一个可选波长,且吸收峰高。

本法所提 LPS 中核酸、蛋白质含量甚微,电泳均未检出。其多糖电泳谱显示与商品 LPS (Sigma) 及本室酚水法 LPS 一致,所以本文 LPS 提取方法及凝胶色谱紫外 254nm / 425nm 监测作为 LPS 检出波长是可行的,我们认为本法可推广应用于其他革兰氏阴性菌 LPS 的提取。

参 考 文 献

- [1] Sandlin R C, Ampel K A, Keasler S P, *et al.* Infect Immun, 1995, 63: 229~237.
- [2] Eidhin D N, Mouton C. FEMS Microbiology Letter, 1993, 110: 133~138.
- [3] Westphal O, Jann K. Method Carbohydr Chem, 1965, 5: 83~91.
- [4] Nowotny A. Basic Exercises in Immunochemistry A Laboratory Manual (2nd ed). Sprinige-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1979, 153~156.
- [5] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* Anal Chem, 1955, 28: 350~357.
- [6] 徐晓平, 陈志华, 苏新. 中华微生物学和免疫学杂志, 1992, 12: 141~144.
- [7] Walborg E F, Kondo L E. Anal Biochem, 1970, 37: 320.