DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.037

绿脓杆菌外毒素 A抗原的制备与纯化

Preparation and purification of pseudomonas aeruginosa exotoxin A antigens

刘启富* 汪正清 张克斌 胡晓梅 周善章 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室) 重庆,400038

提 要 目的:制备绿脓杆菌外毒素 A(PEA)抗原。方法:用胰酶酪蛋白大豆肉汤(Tryptic soy broth, TSB),于32℃水浴 120次/min振荡培养绿脓杆菌 PA 103株,其培养物经7000 r/min离心,取上清用70%饱和硫酸铵沉淀,Sephadex G-100柱层析,DEAE-52(DE-52)柱层析,羟基磷灰石柱层析制备 PEA。结果:纯化的 PEA经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)为一条带,分子量为 Mr(66~68)× 10^3 u 环状沉淀试验,琼脂双向扩散试验,酶联免疫吸附试验和免疫印迹分析表明本室纯化的 PEA,抗原性和分子量均与文献报道一致。结论:用本方法制备 PEA,避免了对 DE-52的反复再生,缩短了实验流程,对保持 PEA的生物活性有利。

绿脓杆菌是一种广适性的病原菌,它可在多种生物体内及人体各部位引起感染,是创伤烧伤和免疫受损机体最易感的细菌之一。绿脓杆菌可产生多种致病物质,PEA是最重要的致病物质。自1973年 Liu[1]发现 PEA以来,国内外学者对绿脓杆菌的产毒条件和 PEA纯化方法都进行了一些研究,本研究旨在进一步探讨 PEA的产生条件和简化其繁琐的纯化方法。

1 材料与方法

1.1 菌株与药品试剂

绿脓杆菌(PA)103株,由黑龙江省科学院应用微生物研究所惠赠;TSB培养基和鳌合树脂-100(Chelex resin-100),购于 Sigma公司;Sephadex G-100,由瑞典进口;DE-52和羟基磷灰石为国产。

1.2 PA的培养

TSB培养基按文献[2]制备,10磅高压蒸气灭菌。临用前加入无菌的50%甘油和 2 mol/L谷氨酸钠溶液,使最终浓度分别为1.0%和0.05% mol/L。接种 PA103菌株,置32℃水浴120次/min振荡培养22 h,培养产物经7000 r/min离心30 min,收集离心上清供提取 PEA之用。

1.3 PEA的纯化

于上述绿脓杆菌 PA103株培养产物离心上清中加入最终浓度为70%饱和硫酸铵,使 PEA蛋白沉淀,经7000 r/min离心30 min,弃上清,沉淀物 PEA用少量0.01 mol/L Tris· HCL缓冲液(Buffer A)溶解;先用 Sephadex G-100柱层析除铵和杂蛋白,PEA用环状沉淀试验监测,收集环状沉淀阳性的 PEA组分合并装透析袋,用聚乙二醇-6000浓缩;再用 DE-52柱离子交换层析纯化,上限用含0.3 mol/L NaCl,下限用含0.005 mol/L NaCl的 Buffer A进行连续梯度洗脱,收集环状沉淀试验阳性的 PEA组分合并,再用 PEG-6000浓缩;最后用羟基磷灰石柱层析纯化,上限用0.1 mol/L,下限用0.005 mol/L Na_3PO_4缓冲液(pH7.0,均含0.05 mol/L NaCl)进行连续梯度洗脱,收集环状沉淀阳性的 PEA组分合并,-20℃保存。

1.4 PEA的鉴定

1.4.1 环状沉淀试验 取细菌发酵倒管1支,用滴管吸取 PEA兔免疫血清加入倒管底部约0.5 cm之高,再用另一支滴管吸取纯化的 PEA加入倒管内免疫血清之上层表面,置37℃孵育10 min左右观察结果。

1.4.2 琼脂双向扩散试验 按常规进行。

1.4.3 SDS-PAGE 按文献[3]进行。

1.4.4 免疫印迹试验 按文献[4]进行。

1.4.5 酶联免疫吸附试验(ELISA) 用 pH9.5 0.1 mol/L碳酸盐缓冲液稀释 PEA,包被于55孔聚苯乙烯板,4℃过夜,用 PBS吐温20洗板4次,加1% BSA置37℃封闭30 min,加入 PEA兔免疫血清,37℃孵育30 min,用 PBS吐温20洗板4次;加入1:1000的酶标记抗体,置37℃孵育 30 min,同上法洗板4次;加入邻苯二胺底物溶液,置37℃孵育15~ 30 min,加入2 mol/L硫酸溶液终止反应。置酶标测定仪测定光密度 D_{λ} 值,以 D_{λ} 值 > 0.2为阳性反应。

2 结果

2.1 环状沉淀交叉反应

我们用 Liu PV提供 PEA制备的兔免疫血清与本室纯化

* 刘启富,男,47岁,实验师

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的 PEA进行交叉沉淀试验,结果在免疫血清与 PEA交界面呈现乳白色环状沉淀反应。

2.2 PEA分子量测定和免疫印迹分析

作者用纯化的 PEA进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色仅显示一条 Mr(66~68)×10^3 u区带,见附图。将电泳后的 PEA再转印到醋酸纤维素膜上,与 Liu氏提供的 PEA兔免疫血清进行免疫印迹试验,所显示与 SDS-PAGE显示的区带一致,见附图。



附图 纯化 PEA的 SDS-PAGE和免疫印迹试验结果

1.标准分子量蛋白的 SDS-PAGE区带;2. Liu PEA的 SDS-PAGE区带;3,4.纯化 PEA的 SDS-PAGE区带

2.3 ELISA分析

以 Liu氏提供的 PEA制备的兔免疫血清与本室纯化的 PEA进行 ELISA试验,可看出两者之间呈现特异性交叉反应;本室纯化的 PEA制备的小鼠免疫血清亦能和 Liu氏 PEA抗原发生特异性交叉反应。

2.4 免疫原性试验

我们用纯化的 PEA加佛氏完全佐剂,分别于皮下、肌肉、腹腔内注射 BALB/c小鼠,每次免疫 2个点,经 5次免疫后,由眼眶取血,用 ELISA检测小鼠诱导抗 PEA抗体的能力,结果 9只小鼠有 4只小鼠的抗体效价达 1∶64 000以上,有 3只为 1∶16000,另外 2只分别为 1∶32 000和 1∶8000。

3 讨论

绿脓杆菌产生外毒素 A的量与培养基中含铁离子浓度密切相关。培养基中最适合绿脓杆菌产生外毒素 A的铁离子浓度在 0.01~0.05 mg/L之间,过高或过低都会使产毒量下降。商售 TSB培养基中的铁离子往往要比所需铁离子浓度高 5~10倍。文献[2,5]报道多采用 50% CaCl或螯合树脂-100处理培养基进行除铁。我们比较了这两种方法,结果表明,用螯合树脂-100吸附除铁效果较用 $CaCl_2$为佳。在 PEA的纯化过程中,作者曾用 DE-52浸浴法吸附收集培养产物中的 PEA,并对吸附过的培养液腹腔接种小白鼠进行毒力试验,结果吸附后的培养液仍能引起小鼠中毒死亡,表明 DE-52吸附 PEA不完全,可能与 DE-52的用量不足有关。如果大量使用 DE-52,一是不经济,二是由于 DE-52需要反复再生,不但工作量大,而且费时较多,延长了提取纯化的周期,对保持 PEA的生物活性不利。我们用 70% 饱和硫酸铵从培养液中沉淀 PEA,再经 Sephadex G-100柱层析; DE-52柱连续梯度洗脱层析;最后用羟基磷灰石柱连续梯度洗脱层析四步法纯化了 PEA抗原。改进的纯化方法避免了 DE-52的反复再生,节约了 DE-52的用量,特别是 Sephadex G-100柱层析即能除铵又能起除去大部分杂蛋白的作用,缩短了实验流程,对保持 PEA的生物活性有利。用此法纯化的 PEA,经环状沉淀试验,琼脂双向扩散试验,酶联免疫吸附和免疫印迹试验以及 SDS-PAGE分析,其抗原性和分子量均与文献报道一致。

关键词 绿脓杆菌;培养;外毒素 A;纯化

中图法分类号 R378.991

参考文献

1 Liu P V. Exotoins of Pseudomonas aeruginosa I factors that influence the production of exotoxin A. J Infect Dis, 1973; 128: 506

2 Kozak K J, Saelinger. Preparation of Pseudomonas exotoxin A. Methods in Enzymology, 1990; 165: 147

3 周本正 主编.实用卫生检测技术大全.北京:科学出版社, 1992: 102~105

4 刘启富,蹇 锐,胡晓梅等.从重组痘苗病毒获得 JEA蛋白的分析.中国人兽共患病杂志, 1995; 11(5): 10

5 刘淑君,廉海泉,龙 旭等.绿脓杆菌外毒素 A的纯化和鉴定.中华微生物学和免疫学杂志, 1989; 9(3): 141

(收稿: 1997-06-02;修回: 1997-12-05)

(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net