

改良热酚水法制备大肠杆菌 O157:H7 脂多糖抗原的研究

宋宏新, 刘晓阳, 李 宏
(陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西 咸阳 712081)

摘 要: 采用热酚水法提取肠出血性大肠杆菌(EHEC)O157:H7 的脂多糖(LPS), 经浓缩酶解, 离心分离得纯化 LPS, 酸解制得 O- 特异性侧链(O-PS), 能有效去除核酸及杂蛋白, 抗原具有鲎试剂凝集活性及对产蛋鸡有较强的免疫原性, 建立了一种改良热酚水法提取制备 O157:H7 特异性脂多糖抗原的方法。

关键词: EHEC O157:H7; 热酚水法; 脂多糖抗原制备

Preparation of Specific Lipopolysaccharide Antigen of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with Advanced Hot Phenol-water Method

SONG Hong-xin, LIU Xiao-yang, LI Hong
(College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology,
Xi'an 712081, China)

Abstract: The LPS antigen was prepared from EHEC O157:H7 strain 933 with hot phenol-water method and purified by enzyme hydrolyzing with DNase and RNase, and then hydrolyzed by 1.5% acetic acid for getting OPS. The O157:H7 LPS antigen has high purity specificity, has activity of agglutinating limulus amoebocyte lysate and high immunoreactivity for chicken. They could be used to produce specific anti-LPS antibody.

Key words: EHEC O157:H7; hot phenol-water method; LPS antigen preparation

中图分类号: O939.91

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)10-0273-03

大肠杆菌 O157:H7 引起的感染自1982年于美国暴发流行以来, 该菌被正式确定为食源性肠道致病菌, 引起全世界的广泛关注^[1], 其检测及预防治疗措施一直是科学工作者的研究重点。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)又称细菌内毒素, 作为革兰氏阴性菌细胞壁外膜的重要组成部分之一, 是菌株血清分型的主要依据, 同时协同产 Vero 毒素的大肠杆菌感染寄主, 在发病机制中起着重要作用^[2]。对其结构特性及其特异性免疫保护的研究常需制备大量高纯度的 LPS 抗原。本文研究了热酚水法提取纯化了 EHEC O157:H7 脂多糖抗原及其 O- 特异性多糖(O-specific polysaccharide, O-SP)侧链^[3] 并尝试制备特异性抗 O157:H7 脂多糖鸡卵黄抗体, 旨在建立一种免疫检测用特异性脂多糖抗原的制备方法, 以实现应用免疫学方法对该致病菌高度特异、灵敏的检测。旨在寻找一种更加简便可靠的 EHEC O157:H7 检测方法^[4]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

EHEC O157:H7 EDL 933株 中国疾病预防控制中心
CDC; 免疫鸡 3个月临产健康蛋母鸡 咸阳郊区鸡场。

1.1.2 试剂

蕈酮(AR) 中国医药集团上海化学试剂公司; DNase I (批号为2213123L) 华美公司; RNase (批号为2313124A) 华美公司; 鲎试剂(灵敏度 0.25 EU/ml, 产品批号为 0501081)、内毒素工作标准品(效价为 4 EU/ml; 批号为 050107)、细菌内毒素检查用水(批号为 041117) 湛江海洋生物制品厂; 兔抗鸡 IgG-HRP 北京经科生物制品有限公司; O157 鼠单抗 中国疾病预防控制中心; H7 兔多抗 中国疾病预防控制中心。

收稿日期: 2006-08-20

作者简介: 宋宏新(1959-), 男, 教授, 主要从事生物化学与分子生物学、食品生物安全性及分子免疫检测方面的研究。

1.1.3 仪器设备

台式高速冷冻离心机 湖南赛特湘仪离心机有限公司; 752型紫外光栅分光光度计 上海第三分析仪器厂; Hoefer mini VE 电泳仪 美国安玛西亚公司; MK3 型酶标仪 热电仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 0157:H7 菌体的获得

对保藏菌株活化后, 玻片凝集法鉴定其血清型, 再采用平皿划线培养法挑取单菌落, 转接至营养肉汤培养基, 37℃ 下摇床培养。收集对数生长期菌体, 离心沉淀(3500r/min, 15min)后, 用4倍体积生理盐水洗剂2次, 蒸馏水洗剂1次, 用无热原水按1:3比例(1g湿菌体悬浮于3ml无热原水中)悬浮。

1.2.2 LPS 粗品的制备

菌悬液反复冻融三次后, 与等量90%苯酚共同加热至68℃后混合, 剧烈搅拌30min后, 冰浴至2℃离心(4℃, 3000×g, 20min)。酚相加等体积无热原水重复洗涤2次, 收集水相溶液装于透析袋中, 流水透析12h去酚, 再蒸馏水透析60h(FeCl_3 检测无紫色出现为止), 可用50%聚乙二醇6000浓缩至1/4, 即得LPS粗品。

1.2.3 LPS 的纯化

浓缩后粗LPS中加DNase和RNase各50μg/ml, 37℃下酶解4h, 100℃水浴加热10min, 冷却至室温后离心(1500r/min, 30min), 弃沉淀, 于上清中加2倍体积丙酮, 沉淀后既可获得纯化LPS。

1.2.4 O-SP 的制备

LPS沉淀溶于1.5%醋酸溶液中, 100℃水浴30min, 离心(1500r/min, 10min), 弃沉淀(类脂), 于4℃下透析24h去酸, 50%聚乙二醇浓缩得O-SP抗原。

1.2.5 LPS 多糖含量测定

蒽酮-硫酸法测定, 以葡萄糖制作浓度标准曲线。蒽酮-硫酸法测定多糖含量标准曲线:

$y=0.0144x+0.0118$ ($R^2=0.999$), y 为A值, x 为多糖含量。

1.2.6 LPS 核酸含量检测

紫外光谱(260nm)吸收检测。

1.2.7 LPS 蛋白含量测定

Bradford法测定, 以BSA制作浓度标准曲线。Bradford法测定蛋白含量标准曲线:

$y=0.0049x+0.0117$ ($R^2=0.9927$), y 为A值, x 为蛋白含量。

LPS纯化过程中蛋白质的变化以12% SDS-PAGE电泳检测。

1.2.8 LPS 鲎试剂凝集活性检测

用0.1ml规格的鲎试剂安瓿瓶检测。取0.1ml内毒素检查用水于安瓿瓶内溶解鲎试剂, 加0.1ml不同稀释度的LPS, 于密封盒内37℃恒温培养箱 60 ± 2 min后, 缓慢倒转180°时, 安瓿瓶内容物呈坚实凝胶, 不变形, 不从瓶壁滑落者为阳性, 记为“+”; 不呈凝胶或虽生成凝胶但不能保持完整并从瓶壁滑脱者为阴性, 记为“-”。以无热原水和内毒素工作标准品分别作阴性和阳性对照。其它操作具体按鲎试剂说明书及细菌内毒素工作标准品使用说明书进行。

1.2.9 LPS 及 O-SP 的免疫原性检测

经纯化后的LPS及O-SP用PBS调至所需浓度与不完全弗氏佐剂充分乳化后, 按每只鸡1ml计量, 分四点(双翅底及胸前)注射免疫临产母鸡, 间隔15d加强免疫一次, 采用间接ELISA方法^[4]检测抗体产生效价(稀释菌体作包被抗原)。

2 结果与分析

2.1 0157:H7 LPS 产率

15g湿菌体可获得纯化LPS 75mg, 产率为0.5%(W/W)。

2.2 0157:H7 LPS 多糖含量

纯化后LPS样品测得多糖含量为41.11μg/ml; 酸解得O-SP为23.68μg/ml。LPS多糖含量为20.56%。

2.3 0157:H7 LPS 核酸含量

未经酶解的粗制LPS于260nm处有强吸收, 经酶解处理分离纯化的LPS, 于260nm处吸收值较小。

2.4 0157:H7 LPS 蛋白含量

结果见表1。

表1 LPS 酶解前后蛋白含量
Table 1 The protein content of LPS before and after enzymolysis

LPS 样品	酶解前	酶解后	纯化
$A_{595\text{nm}}$	0.012	0.015	0.004
蛋白浓度(μg/ml)	0.61	6.73	-

电泳显示与上表结果一致。

2.5 0157:H7 LPS 鲎试剂凝集活性

进行凝集活性检测之前, 所购的鲎试剂灵敏度(0.25EU/ml)及标准内毒素, 经检验均符合规格标示, 可作鲎试剂凝集试验使用。

鲎试验检测提取的LPS有强凝集活性, 最小凝集浓度约为1.5ng/ml。用鲎试剂检测LPS活性时发现, 苯酚未被除尽的LPS提取液加鲎试剂后放置2h以上不会有凝集反应出现, 透析完全及纯化后LPS有明显的凝集反应。其原因据分析可能是由于苯酚的存在使蛋白变性, 进而使凝固酶原失活之缘故, 因此, 该提取方法须对苯酚进行彻底的去除。

2.6 提取 LPS 的免疫原性

ELISA 效价检测结果如表 2 所示。

表 2 不同抗原鸡免疫抗体产生效价

Table 2 The titer of IgY producing through injecting laying hens with different antigens

时间(d)	10	20	24	30	35	55
0157: H7	1: 224	1: 7000	1: 7000	1: 10500	1: 28000	1: 8000
LPS	1: 224	1: 5600	1: 7000	1: 10500	1: 24500	1: 16000
O-SP	1: 140	1: 5600	1: 5600	1: 7000	1: 35000	1: 32000

3 讨 论

菌体脂多糖的纯化制备, 凝胶过滤及疏水作用色谱等方法虽有其优越性, 但经典的 LPS 提取方法——热酚水法仍不失为一种简便、快速且易被大多数实验室采用的提取方法。脂多糖上的类脂 A 部分疏水, O- 特异性多糖侧链亲水, 故 LPS、核酸及一些糖类等溶于水相, 而大部分蛋白质由于酚变性沉淀去除, 酶解除去核酸, 经离心沉淀等步骤后, 实现了 LPS 的分离纯化。本文应用此法提纯的 EHEC 0157: H7 脂多糖抗原, 产率较高(约 0.5%), 纯度较好^[5], 具凝集活性, 经免疫后的 SPF 母鸡, 在一免后 10d, 抗体效价开始上升, 到免疫后 50d 效价可达 1: 32000, 表明了提取的 LPS、O-SP 都有很好的免疫原性。经酸解 LPS 后获得 O-SP, 经检测多糖含量相对较高。在后续的免疫原性检测中还发现, 该法获得的 O-SP 刺激鸡体产生的抗体效价较 LPS

高, 不同抗体的特异性检测仍有待深入。

热酚水法提取过程中核酸的去除, 应用超速离心方法实验设备要求高, 去除效率低, 残留的核酸片断可干扰 LPS 的免疫原性^[4], 而酶解处理能较好地去除溶于水相中的核酸。引入的核酸酶经 100℃ 煮沸 10min 变性后, 离心沉降即可去除。

结果表明, 经改良后热酚水法提取纯化 LPS 方法简便、可靠, 由此获得的 LPS 抗原及 O-PS 抗原, 可作特异性抗 0157 抗体检测使用, 亦可以此为免疫原来生产特异性抗 LPS 及 O-PS 抗体, 以实现应用免疫学方法对 EHEC 0157: H7 高度特异、灵敏的检测。

参考文献:

- [1] Riely L W, Remis R S, Helgerson S D, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype[J]. N Eng J Med, 1983, 308: 681-685.
- [2] Carol G Currie, Ian R Poxton. The lipopolysaccharide core type of *Escherichia coli* 0157: H7 and other non-0157 verotoxin-producing *E. coli* [J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 1999, 24: 57-62.
- [3] Nishiuchi Y, Doe M, Hotta H, et al. Structure and serological properties of O-specific polysaccharide from *Citrobacter freundii* possessing cross-reactivity with *Escherichia coli* 0157: H7[J]. Immunology and Medical Microbiology, 2000, 28: 163-171.
- [4] Muck A, Ramm M, Hamburger M. Efficient method for preparation of highly purified lipopolysaccharides by hydrophobic interaction chromatography[J]. Journal of Chromatography B, 1999, 732: 39-46.
- [5] 潘剑草, 黄志成, 余文炳, 等. 肠出血性大肠杆菌 0157: H7 脂多糖抗原的制备及鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(3): 59-61.

《粮食与饲料工业》(月刊)

邮发代号: 38-151

《粮食与饲料工业》是由国家粮食局主管, 国家粮食储备局武汉科学研究设计院主办, 集粮食与饲料于一刊的综合性技术类期刊。本刊系中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国期刊网全文收录期刊、中国学术期刊光盘版全文收录期刊、《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊、《中国学术期刊(光盘版)检索与评价数据规范》执行优秀期刊、英国《食品科技文摘》(FSTA)固定收录源刊。

本刊历史悠久, 创刊于 1972 年。覆盖面广, 涵盖粮食、饲料、轻工、食品、化工、商检、农垦、军需等行业, 以及相关科研、设计、工程、教学、加工、仓储、检测等部门。选题新颖、内容详实、资料权威、信息量大、编辑规范、印刷精美、诚信服务、贴近读者是本刊的特色。一册在手, 可使您纵览行业风云, 洞察科技进步, 了解最新行情, 把握商机。

主要报道内容: 粮食、饲料及粮油食品方面的先进技术、科研成果、学术论文、综合评述、国内外行业动态、市场信息等。

主要栏目: 小麦制粉、稻谷碾米、粮食流通与仓储、粮油食品及深加工、饲料加工、饲料资源开发利用、饲料添加剂、饲料及饲养、环保及通风除尘、检测分析、企业论坛、世界之窗、博(信息)等。

常年为各类相关企、事业单位发布广告。

本刊为月刊, 每期定价 5.00 元, 全年 12 期 60 元(含邮费)。读者可到当地邮局订阅, 也可将款汇至《粮食与饲料工业》编辑部订阅或补订。

编辑部地址: 湖北省武汉市卓刀泉南路 3 号 邮编: 430079

联系电话: 027-50657638 87406138 传真: 027-50657739

E-mail: lsyslgy@126.com http://www.whlky.cn