

一种同时纯化霍乱肠毒素 及其B亚基聚合体的简单方法

陈正道 朱嘉庸 张露先

(卫生部上海生物制品研究所, 上海)

霍乱肠毒素 (CT) 分子量 84000, 由 A、B 两亚基组成, A 亚基又包含有 A₁ (分子量 20000) 和 A₂ (分子量 7500) 两多肽, 它们以二硫键相连, A 亚基以单拷贝存在, B 亚基一般有 5—6 个拷贝, 在产肠毒素霍乱弧菌培养滤液中, 它们能以一种聚合体的形式存在, 这一聚合体又称霍乱肠毒素原 (分子量 58000 左右)^[1]。本文报道一种为我实验室建立的简便的、同时纯化 CT 及 B 亚基聚合体的方法。

材料与 方法

(一) 试剂

磷酸纤维素 P11 系 Whatman 公司产品, 用作对照品的霍乱肠毒素、霍乱肠毒素原系 Sigma 公司出品。标准分子量蛋白系 BIO-RAD Laboratories 产品。

Vibrio cholerae 569B 培养物滤液制备: *V. cholerae* 569B Inaba 16190 株肉汤琼脂斜面培养物制成的菌液, 接种于 10L 培养罐, 培养 8—10h 后, 转种 500L 罐并作深层通气搅拌培养至产毒效价大于 15000BD/ml, 高速连续离心除去菌体, 以赫氏滤器 EKS₂ 滤板除菌。经 Millipore 公司超滤器 PTGC 00005 膜超滤 (滞留值 M_w, 10000) 浓缩后, 加入万分之一甲基

磺酰氟 (PMSF, Sigma) 以抑制蛋白水解酶活力。

(二) 方法

1. 离子交换剂的选择: 应用试管试验方法^[2]。

2. 磷酸纤维素 P11 柱层析分离纯化 CT 及 B 亚基聚合体: 磷酸纤维素 P11 经 NaOH, HCl 反复浸泡。水洗直至白色, 中性后, 装入 1.5×30cm 柱。柱平衡、样品透析及上样后所用初始洗脱液均用 pH 6.8, 4mM 磷酸盐缓冲液 (PB)。当 LKB 监测系统显示 I 峰已流洗结束后, 换用 pH 8.3, 10mM PB 流洗, 洗脱得 II 峰后, 再用 pH 8.3, 30mM PB 流洗, 可得 III 峰, 最后用 pH 8.0, 100mM PB 流洗, 可得 IV 峰。上样总蛋白 70mg 左右, 上样速度 10ml/h, 流洗速度 12ml/h, 每管 1ml 左右, 分峰收集, 分别检测。

3. 蛋白浓度测定: 按 Lowry 法, 以牛血清白蛋白作标准。

4. 抗体制备及纯化: 用家兔免疫, 程序大体同 Mekalanos^[3]。待抗血清双扩散效价达 1:32 时放血。分离得的血清经饱和硫酸铵沉淀、聚乙二醇浓缩, DEAE-

本文于 1986 年 7 月 17 日收到。

缪玉兰参加部分工作, 上海医化所王昭明协助验证检测; 成都生物制品所顾同陈延祚教授审阅全文, 在此一并致谢。

Sephadex A50 柱层析分离, 得近乎单点电泳纯样品。

5. 硷性磷酸酯酶与兔抗CT的酶联: 方法大体同文献〔4〕。

6. 酶联免疫吸附试验: 首先以兔抗Sigma CT (或B) 血清包被于96孔塑料板, 经牛血清白蛋白封闭后, 加入待检抗原, 继而加入与硷性磷酸酯酶偶联的兔抗Sigma CT (或B), 最后加底物显色, 于Titertek Multiskan多孔道酶标仪上405 μ m处测吸光度。

7. 菌体抗原组分测定: 应用冻干酶联葡萄糖球菌A蛋白的ELISA系统, 检测样品中菌体抗原组分, 操作程序按“冻干酶联葡萄糖球菌A蛋白使用说明书”进行(上海生物制品研究所制品)。

8. 免疫电泳〔5〕: 1%琼脂糖, pH 7.4, 0.04M 巴比妥钠缓冲液, 每孔蛋白上样量2 μ g, 中心槽加兔抗*V. cholerae* 569 B培养滤液的粗抗体。

9. 聚丙烯酰胺圆盘电泳: 10%凝胶浓度, pH8.9, Tris-HCl 缓冲液, 每管蛋白上样量90 μ g, 其余同免疫电泳。

10. SDS PAGE: 蛋白上样量60 μ g, 按BIO-RAD Laboratories “在SDS凝胶电泳上分子量标准蛋白使用说明书”进行。

11. 内毒素测定: 按鲎试剂盒(II)使用说明书方法(上海医学化验所)。

12. 中国地鼠卵巢细胞(CHO)试验: 按Hug所述程序〔6〕。

13. 兔皮肤试验: 家兔脱毛后注入0.1ml待检样品, 18h后自耳静脉注入2%伊文思蓝3—4ml, 1h后测蓝斑直径, 以恰能产生7mm蓝斑直径的注射液定为1BD, 小于7mm的注射液定为阴性液。

结 果

(一) 离子交换剂磷酸纤维素 P11 的选择

应用双扩散试验对DEAE、羧甲基纤维素、磷酸纤维素三种交换剂在一系列不同组成, 不同pH的缓冲液中吸附CT及B亚基聚合体能力的考察发现: 磷酸纤维素P11-磷酸盐缓冲液系统最适宜于分离CT及B亚基聚合体。由图版I-2可见, 在该吸附系统中, pH6.8的0.01M PB各组上清液在双扩散测定中, 几乎见不到毒素-抗毒素沉淀弧, 但却可见一由非毒素组分与其相应抗体形成的沉淀弧, 而当pH达7.8时, 毒素-抗毒素沉淀弧便可明显可见; 该结果为建立如“材料和方法”中所述磷酸纤维素P11纯化程序提示了方向。

(二) 磷酸纤维素 P11 柱层析的结果

由IKB监测系流绘制的层析图如图1, SDS-PAGE对各层析峰的检测表明(如图版I-1): I峰含有杂蛋白, 但不含A、B两亚基。II峰在SDS-PAGE上也显示为一纯度较高的组分, 它的泳动速度稍慢于A亚基, 用SDS-PAGE标准蛋白分子量比较, 其分子量大约30000。在免疫电泳上该组分未能与A亚基抗体形成沉淀弧, 对CHO细胞未见有如SigmaA一样的毒性活力, 有待进一步定性。III峰为CT峰。IV峰为B亚基聚合体峰。III峰、IV峰蛋白质收率分别为13.0%和16.74%。

(三) CT与B亚基聚合体纯度检测

在免疫电泳、聚丙烯酰胺圆盘电泳和SDS-PAGE上, 未经纯化的粗制浓缩毒素均有数条带, 有些呈片条状分布。但我们纯化的CT及B亚基聚合体(简称SIBP CT, SIBP B)在免疫电泳(图版I-3), 圆

盘电泳(图版 I-4)上均仅有一条带。在变性处理后的SDS-PAGE上,CT 解离为A,B 两亚基,而B 亚基聚合体则解离为泳动速度大为增加的B亚基单体(图版 I-1)。这些结果与来自 Sigma 公司相应制品是完全一致的。图 2 是CT及B亚基聚合体蛋白浓度与其相应ELISA 的净吸光度值相关图。从 SIBP制品与 Sigma 制品各自曲线的相近程度可推测两者在纯度及性质上的相似性。此外,我们还用稻叶和小川菌体抗原的诊断血清,通过辣根过氧化物酶-A蛋白的ELISA系统,检测了制品中可能混有的可溶性菌体抗原,结果表明无论是SIBP的,还是Sigma 的制品,其菌体抗原组分的含量均很低,且两者亦很相近,萤试验结果指出,两者制品中内毒素含量接近(表 1)。为考察CT是否因制备过程而失活,B 亚基聚合体中又是否混入有CT,我们做了生物学活力检测和动物皮肤试验。结果表明, Sigma CT及SIBP CT 的比活力值在我们实验条件下分别为 1 BD/3.2ng, 1 BD/1.6ng而B亚基聚合体两者均小于 1 BD/2500ng。CHO试验结果如图 3, 表

明SIBP CT及SIBP B与Sigma 相应制品对CHO检测系统反应相似。

我们进行五批试验结果表明,CT收率在 10.26—19.07%, 亚基聚合体收率在 7.22—23.22%, 五次平均收率 CT 为 11.39%, B亚基聚合体为 16.41%, 两者总收率达 27.8%, 而Mekalanos用两次磷酸纤维素柱方法所得收率CT是 12.4%, B亚基聚合体是 3.1%, 总收率是 15.4%, 还不包括粗制毒素经 6 偏磷酸钠沉淀所造成的损失^[6]。此外, 本纯化程序重复性好, 制品纯度与 Sigma 相应制品相当, 故可用于实验室大规模同时制备 CT 与 B 亚基聚合体。

表 1 LPS测定结果

	CT		B 亚基聚合体	
	Sigma	SIBP	Sigma	SIBP
LPS (pg/ml)	55	45	80	110
LPS/蛋白(W/W)	0.00055	0.00045	0.0008	0.0011

蛋白浓度: 0.1 μ g/ml

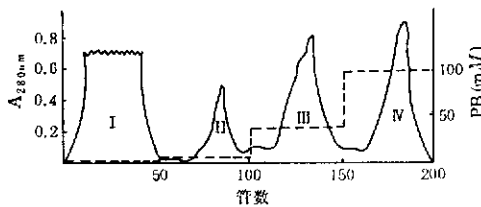


图 1 分离霍乱肠毒素及其B亚基聚合体的磷酸纤维素P11柱层析

参 考 文 献

- [1] 陈正道, 朱嘉庸: 生物工程学报, 2(2):1—10, 1986.
- [2] Pharmacia Fine Chemicals: Ion exchange chromatography principles and methods, Pharmacia Fine Chemicals, p. 30, 1983.
- [3] Mekalanos, J. J. et al.: *Infect. Immun.*, 16: 789—795, 1977.
- [4] Young, C. R. et al.: *Infect. Immun.*, 27: 492—496, 1980.
- [5] Hug, M. I. et al.: Working manual for assay of *E. coli* enterotoxin and ELISA assay for rotavirus antigen. International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh, Cholera Research, Special Publication, No. 3, pp. 1—9, 1979.
- [6] Mekalanos, J. J. et al.: *Infect. Immun.*, 20: 552—558, 1978.

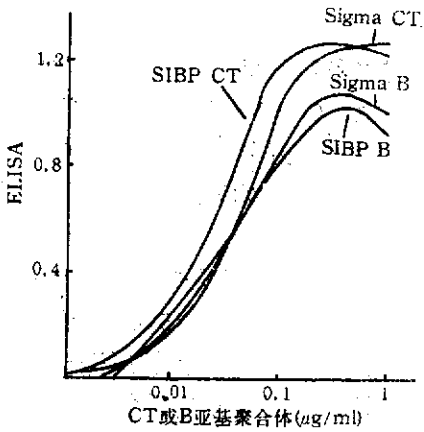


图2 ELISA值与霍乱毒素及其B亚基聚集体浓度之间的关系

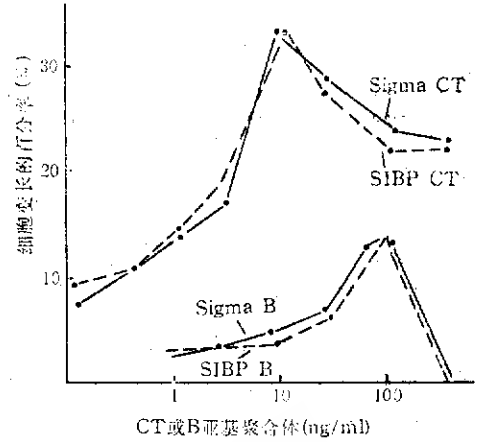


图3 CT及B亚基聚集体对细胞形态的影响

图 版 说 明

1. SDS 聚丙烯酰胺电泳 (1) 粗制浓缩培养液 (2) 峰I (3) 峰II (4) 峰III (5) 峰IV (6) 标准蛋白质分子量 (A. 磷酸化酶 B. 卵清蛋白 C. 碳酸酐酶 D. 大豆蛋白酶抑制剂)
2. 用于选择层析程序的双扩散试验 (1)–(4) 为粗制浓缩毒素经磷酸纤维素PII吸附, 0.01M PB, pH分别为 6.6, 7.0, 7.4, 7.8 (5) Sigma B 未经吸附 (6) 粗制浓缩毒素, 未经吸附; 中心槽: 粗制浓缩毒素抗血清
3. 免疫电泳 (1) SIBP CT (2) Sigma CT (3) SIBP B (4) Sigma B
4. 聚丙烯酰胺圆盘电泳 图例同3.

Chen Zhengdao et al.: A simple method for purification of both cholera toxin and cholera toxin B subunit

