

霍乱肠毒素的提取与纯化

杨正时

(卫生部药品生物制品检定所)

霍乱是由于霍乱弧菌分泌一种类似酶样的肠毒素作用于小肠上皮而引起的局部细胞代谢紊乱的急性肠道传染病。霍乱肠毒素的概念是自 Koch 氏发现霍乱弧菌一百年来一个重大进展。近年国内一些单位已开展提取工作,所化人力物力甚大,经常一无所获,或产毒很低,在毒素的鉴定与纯化上均存在一定的困难。本文介绍国外霍乱肠毒素的提取与纯化的研究进展。

一、肠毒素的发现和早期研究

霍乱发病时,肠腔中有大量的液体渗出,而在粪便和肠壁中均没有发现炎症细胞,因此 De 氏推测可能存在着一种毒素,改变了局部毛细血管的渗透性。他将霍乱弧菌悬液,而后改用培养滤液,注射到二端结扎的兔肠肠段,均能引起大量液体积聚,其性状相似于霍乱患者的米泔样水便。1959年^[1],他提出霍乱弧菌培养液的无菌滤液中存在有肠毒性物质。这一毒性物质的产生:一、与培养基有关,能在 5% 的蛋白胨水中产生,

但常用于培养霍乱弧菌的1%蛋白胨水,营养肉汤以及半固体培养基上生长后经挤榨与过滤,其上清液中均无毒性物质;二、需要氧气。在1000 ml容量的罗氏扁瓶中盛200ml培养基,平卧培养,以最大的表面接触空气。这种毒性物质是细菌分泌的。浓厚的菌悬液,用超声波粉碎菌体,其无菌滤液含有毒物,而洗过的菌体,虽经同样处理而无毒性;除菌过滤的洗液,可呈阳性兔肠反应,因而认为菌体不含有毒素,细菌在生长期分泌的某些产物是毒素的来源。同时也确定,这种毒性物质和霍乱弧菌分泌的粘液素酶无关。发生自身凝集的粗糙型菌株,失去了致兔肠肿胀能力,但仍保持有粘液素酶活性。毒素能经硫酸铵沉淀,56℃,30分钟处理后失去活性。因此De氏认为这种存在于霍乱弧菌细胞外的肠毒性产物是外毒素。

几乎与De氏同时,Dutta^[2]建立了乳兔模型。他使用霍乱弧菌569B株肠内注射,即使菌量减少到1000—10000个活菌,仍能使全部受试动物发病。后来他改用洗胃后口饲也获得成功。继而应用超声波处理的无菌上清口饲10—12天龄乳兔,每100g体重5ml,乳兔在4—6小时内发生典型霍乱腹泻。他也提出在霍乱的超声波处理的无菌上清液体中含有能使乳兔产生霍乱样腹泻的霍乱毒素。

二、酪朊液体培养基产毒和提取

印度科学家De和Dutta是从浓厚的弧菌悬液细胞中挤榨或裂解物中提取毒素。考虑到既然活性要素可能在细胞生长期释放出来,就有可能存在于培养基中,从培养基中提取,其收获量可能大于细胞中含量,而且也可以大大降低由超声裂解而释放的非活性细胞内物质。

Finkelstein开始应用脑心浸液肉汤,振荡水浴培养,发现在12小时的培养液中即有霍乱原(肠毒素)存在,从12—18小时期间,杀弧菌抗体抑制试验的活性增加二倍,鸡胚毒性增加十倍,表明霍乱内毒素明显增加,但霍乱原效价没有明显改变。减少振荡培养物的表面-体积率或静止培养,均不形成霍乱原,有些菌株在脑心浸液肉汤中产毒不明显。于是Finkelstein使用他以往研制成功的化学合成培养基,使毒素的鉴定和纯化可能更为简易,但弧菌虽在此培养基上生长良好,但其滤液中无毒素,补充若干种氨基酸后,能产生高效价的粘液素酶,但对增加霍乱原活性不明显,而当加入1%的酪朊后,其培养液中即产生高度霍乱原活性,现称为Syncase培养基^[3],其成份为: Na₂HPO₄ 5g, K₂HPO₄ 5g, 蔗糖 5g, NH₄Cl 1.18g [或(NH₄)₂HPO₄ 1.46g], Na₂SO₄ 0.089g, MgCl₂·6H₂O 0.042g, MnCl₂·4H₂O 0.004g, FeCl₃·6H₂O 0.005g 酪朊 10g, 蒸馏水 1000ml, 该培养基目前已被国际上大多数霍乱肠毒素研制实验室所采用。

除菌过滤后浓缩的滤液,透析后用SephadexG 200

层析,0.05M NaCl,0.01M Tris 缓冲液洗脱可获三个组分(表1)。开始出现的是内毒素,霍乱抗原,具有乳光,能与抗霍乱弧菌血清出现沉淀弧线,对11天龄鸡胚静脉内注射显示有毒性。中间部分是霍乱原,与抗霍乱肠毒素血清发生沉淀反应,并引起兔阳性皮内反应,1:5稀释喂以乳兔(1ml/100g体重),引起霍乱腹泻。最后一部分是一些无生物学活性的物质,由棕色变成无色。

表1 浓缩霍乱培养滤液 Sephadex G-200 组分的生物学活性

试 验	组分(管数)		
	5—9	10—17	18—20
1. 霍乱原	—	++	—
2. 与抗霍乱原抗体的沉淀反应	—	++	—
3. 皮肤试验	—	++	—
4. 与抗弧菌抗体的内毒素沉淀反应	++	—	—
5. 鸡胚内毒素活性	++	—	—
6. 杀弧菌抗体抑制试验	++	—	—

经SephadexG-200层析所获的霍乱原,引起乳兔腹泻的剂量为6—12μg/100g体重,皮肤反应为0.1—0.2μg,沉淀反应中可以测出6.25μg,仍带有一些内毒素,若纯化内毒素致死鸡胚按0.005—0.05μg计,则可能污染0.1—1.0%的内毒素。我国一些单位目前生产的抗霍乱肠毒素血清能和其它肠道细菌裂解物起沉淀反应,说明在抗血清中仍含有和肠道细菌脂多糖抗原交叉反应的霍乱弧菌抗体,在经霍乱弧菌菌体抗原吸收后,交叉沉淀消失,说明用以免疫制备抗肠毒素血清的抗原(肠毒素)还未彻底纯化,因此,对肠毒素的检定时进行表(1)中4—6项试验是十分必要的。

三、纯霍乱肠毒素制备

产毒菌株一般选用569B株,用发酵罐通气培养,最适温度为29℃,过夜培养,离心获取上清液,在100ml上清液中加入硫酸铵70g沉淀、透析、冻干浓缩,溶解于pH 7.5的0.01M磷酸盐缓冲液内,加入DEAE纤维素,搅动后用漏斗滤过沉淀物,再用pH6.0的0.1M磷酸盐缓冲液将吸附到DEAE纤维素上的霍乱原洗脱下来,再用硫酸铵沉淀,透析、浓缩、琼脂糖A-5M层析,用pH 7.5的Tris-EDTA缓冲液洗脱,用紫外分光(280nm)和沉淀试验鉴定。霍乱原阳性组分合并,超滤浓缩,再通过二支串联的Sephadex G-75柱,用含有0.003M叠氮钠的0.4M甲酸铵作为洗脱液洗脱^[4,5]。

从琼脂糖A5-M柱洗脱的蛋白质组分,开始的二个巨峰并无活性,而后较平坦而宽阔的波段组分中含有肠毒素,将这部分组分浓缩后在G-75柱上出现二个紧挨的陡峰,这二峰的组分与霍乱毒素抗血清均起沉

淀反应。各组分在双相扩散试验时出现的沉淀线到抗原孔的距离和蛋白质 OD 吸收峰形一致,说明各组分中的抗原含量与组分吸收峰中的蛋白质质量是一致的,但是该二峰组分具有不同的生物学性状。第一个峰的组分,其剂量在 0.25—0.5 μ g 时即能引起乳兔腹泻。而第二峰组分则需 100 μ g 以上;皮肤反应剂量则分别为 0.00006—0.001 μ g 和 0.1—0.2 μ g; 结扎兔肠反应剂量分别为 0.03—0.2 μ g 和大于 100 μ g。因此, Finkelstein 称第一峰的蛋白质为霍乱原,即肠毒素,而第二峰的蛋白质是丧失了致病性的相同抗原物质,称为类霍乱原。以后证明其分子量也不相同,霍乱原为 84,000,而类霍乱原为 58,000。类霍乱原是霍乱原的自发降价产物,可以看作是自发形成的类毒素或自然类毒素。现在改用超滤浓缩代替硫酸铵沉淀,所有工艺过程中均用 TEAN (pH 7.5) 缓冲液洗脱。

在大规模提纯毒素时,可用铝化合物吸附法^[4],用铝凝胶吸附和沉淀霍乱肠毒素的最适 pH 是 6.4。在 pH 6.6 或 6.8 时均不能获得良好的结果。pH 7.0 以上,毒素的吸收极度下降,而低 pH 有损于毒素活性。开始曾试用过磷酸铝吸附,但因吸附过于强烈而很难洗脱,因此不宜使用。现在一般使用氢氧化铝。培养滤液离心后上清液,加入 EDTA,使最终浓度成为 0.05%,然后用 HCl (2N) 调正 pH 到 5.5,加入纯净的 Al(OH)₃ 粉剂,每升滤液加入 50g,搅动一小时,并使其沉淀过夜,轻轻移去上清液,取少量上清液用 PM-30 超滤膜浓缩 25 倍,做双向琼脂沉淀试验,以确保在上清中已不存在毒素抗原。剩下的带有少许上清液的沉淀置布氏漏斗上,通过五号滤纸抽滤。Al(OH)₃ 沉淀悬浮于 11 pH 5.5, 0.01M 甲酸铵中,按上述方法过滤,重复三次。然后将 Al(OH)₃ 沉淀物悬浮于 500ml TEAN 缓冲液中,加滤纸在布氏漏斗上抽滤,反复洗五次,每次滤液均需测定是否会有霍乱原,然后合并,用 PM-30 滤膜浓缩后层析,按上述方法分离纯化

毒素。这个方法的优点是快速,适用于大量制备,在毒素已达纯化后,也可再过 Bio-Gel P-100 层析柱,以除去微量的其它蛋白质和可能形成的微量凝聚体。

四、纯化结晶^[7]

在一系列小试管中,加入不同梯度浓度的霍乱原溶液,并用 Tris 缓冲液加到 1ml,每管加入 1ml 4M (NH₄)₂SO₄, 在 22—23℃ 下微振荡过夜,再离心,在 280nm 紫外吸收波段确定浓度,若在不同浓度霍乱原试管中,显示出相同的吸收值,证明霍乱原溶液是纯蛋白质,用以结晶的霍乱原必须是纯蛋白溶液。

调节含有约 20mg/ml 溶液的 pH 到等电点 6.6,加入 4M (NH₄)₂SO₄ (调节到相同 pH),直到在室温下见到轻微的乳光色,混合物置 4℃ 数天,于圆锥形试管底部见白色沉淀,当旋动时,分散的结晶显出折射光泽特征,在暗视野显微镜下可见多种结晶形式。在原发性结晶化后,加入用 (NH₄)₂SO₄ 处理的霍乱原制剂种子,可获得更多的结晶,用离心法收获结晶,再溶解,透析 Tris 缓冲液。结晶毒素的生物学特征与亲本毒素一致。

类霍乱原结晶过程相似,不过在可溶性试验中,使用 2.67M (NH₄)₂SO₄, 由于可能存在着多种的,有一些差异的类霍乱原,在等电点 7.75 时使用硫酸铵,可获主要的类霍乱原结晶。

参 考 文 献

- [1] De, S. N.: *Nature* 183: 1533—1534, 1959.
- [2] Dutta, N. K. et al.: *J. Bact.*, 78: 594, 1959.
- [3] Finkelstein, R. A. et al.: *J. Immunol.*, 96: 440, 1966.
- [4] Finkelstein, R. A. et al.: *J. Exp. Med.*, 130: 185—202, 1969.
- [5] Finkelstein, R. A. et al.: *J. Infect. Dis.*, 121: s63—s72, 1970.
- [6] Spyrides, G. J. et al.: *J. Infect. Dis.*, 121: s96, 1970.
- [7] © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>