

鸡鲍氏志贺氏菌脂多糖的提取方法研究

潘国民, 许兰菊*, 蒋媛媛, 李 炜, 邓九虎, 白毅洁, 李 欣

(河南农业大学, 河南 郑州 450002)

摘要: 为了提取和纯化鸡鲍氏志贺氏菌脂多糖(LPS), 利用 1%葡萄糖肉汤培养基大量培养已分离鉴定的鸡鲍氏志贺氏菌, 并应用酚水法提取鸡鲍氏志贺氏菌脂多糖。经聚乙二醇 20000 浓缩, DNA 酶及 RNA 酶酶解, 离心分离, 冷冻干燥等制得纯化的 LPS。对提取物分别进行糖、蛋白质及核酸含量测定, 结果显示, 所提取纯化的 LPS 糖含量为 27.06mg/L, 蛋白质含量为 0.25g/L, 核酸含量为 40.20mg/L, 萤试剂检测具有凝集活性。上述结果表明: 该试验方法能有效提取鸡鲍氏志贺氏菌 LPS, 提取物纯度较高, 核酸及蛋白质含量较低, 是提取脂多糖的一种简便快捷的方法。

关键词: 鸡鲍氏志贺氏菌; 脂多糖; 提取; 纯化

中图分类号: S852.61⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2010)06-0138-03

Study on the Extraction and Preparation of Lipopolysaccharide from *S. boydii* Isolated from Chicken

PAN Guo-min, XU Lan-ju*, JIANG Yuan-yuan, LI Wei, DENG Jiu-hu, BAI Yi-jie, LI Xin

(Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In this paper, the methods for extraction and purification of the lipopolysaccharide (LPS) from *S. boydii* previously isolated from chicken were investigated. The *S. boydii* were cultured using 1% glucose and broth pure and then the LPS was extracted with the method of Phenol-water. After concentration by polyethylene glycol 20000, DNA enzyme and RNA enzyme enzymolysis, centrifugation, and freeze drying, the contents of sugar, protein and DNA were determined. The results showed that the extracts have agglutinate activity of TAL and levels of sugar, protein, and nucleic acid are 27.06mg/L, 0.25g/L, and 40.20mg/L, respectively. This indicates that an effective method for extracting *S. boydii*'s LPS with high purity of sugar, low levels of NCA and protein has been established, which provided a good foundation for further research on the pathogenicity of *S. boydii*.

Key words: *S. boydii*; Lipopolysaccharide; Extraction; Purification

鸡鲍氏志贺氏菌是引起鸡腹泻病的主要病原菌之一, 该菌所引发的鸡鲍氏志贺氏菌病流行性强, 发病率高, 可引起不同种、不同日龄的鸡发病, 尤其对幼龄雏鸡具有很强的致病作用, 可导致雏鸡死亡^[1,2]。该病以脓血痢疾为主要特征, 易被误诊为鸡球虫病,

给该病的诊断和治疗造成很大的困难, 而鸡鲍氏志贺氏菌脂多糖(LPS)在该病的致病过程中起着重要作用。但现有提取脂多糖的方法大多耗时较长, 在临床实践中难以快速应用, 鉴此, 在现有提取脂多糖的基础上建立了一种更为方便快捷的脂多糖提取方法。

收稿日期: 2009-12-15

基金项目: 河南省科技攻关项目(072102130019)

作者简介: 潘国民(1983-), 男, 河南尉氏人, 在读硕士研究生, 研究方向: 畜禽疫病细菌分子生物学及免疫学。

*通讯作者: 许兰菊(1957-), 女, 河南兰考人, 教授, 本科, 主要从事动物病原微生物及免疫学教学和研究工作。

E-mail: xulanju11@126.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 试验所用菌株为河南农业大学微生物实验室保存的鸡鲍氏志贺氏菌标准株。

1.1.2 培养基 营养肉汤培养基, 杭州天和微生物试剂有限公司(产品批号: 081112)。

1.1.3 试剂 DNA 酶, Fermentas 公司(产品批号: 00040373); RNA 酶, Solarbio 公司(产品批号: 90100103); 聚乙二醇 20000, 天津市瑞金特化学品有限公司(产品批号: 20070914); 萘酚, 国药集团化学试剂有限公司(产品批号: 20090106); 鲎试剂, 湛江安度斯生物有限公司(产品批号: 0812241, 灵敏度: 0.25 EU/mL)。

1.1.4 仪器 LGJ5 型冷冻干燥机, 由北京四环科学仪器厂制造; TDL-40B 型台式离心机, 由上海安亭科学仪器厂制造; SHA-C 水浴恒温振荡器, 由江苏金坛中大仪器厂制造; UV2000 型紫外可见分光光度计, 由尤尼柯(上海)有限公司制造; ND-1000 型分光光度计, 由 Nanodrop(美国)公司制造。

1.2 方法

1.2.1 菌体的获得 方法参考文献[3、4]进行。将河南农业大学微生物实验室保存的鸡鲍氏志贺氏菌标准株接种到血平板中复壮, 培养 18 h 后, 挑取单个菌落接入 1% 葡萄糖肉汤培养基常规培养, 收集处于对数生长期的菌体, 4000 r/min 离心 20 min, 沉淀用 5 倍体积的生理盐水清洗 2 次, 无菌蒸馏水清洗 1 次, 收集沉淀称质量, 用 3 倍体积无菌蒸馏水(即 1 g 湿质量用 3 mL 蒸馏水)悬浮。

1.2.2 LPS 粗品的制备 参考文献[5]的方法进行。菌悬液反复冻融 3 次后, 与等量 90% 苯酚共同水浴至 68℃ 后混合, 剧烈搅拌 30 min, 冰浴至 2℃, 3000 r/min 离心 20 min。酚相加等体积无菌蒸馏水重复洗涤 2 次, 收集上清装于透析袋中, 流水透析 48 h 去酚, 之后用蒸馏水透析 48 h 以上, 至 FeCl_3 检测无酚试剂反应出现视为透析完成。用 50% 聚乙二醇 20000 浓缩至原体积的 1/4, 即得 LPS 粗品。

1.2.3 LPS 的纯化 参考文献[6-9]的方法进行。在浓缩后的粗 LPS 中加 DNA 酶和 RNA 酶各 50 mg/L, 37℃ 下酶解 4 h, 100℃ 水浴加热 10 min, 冷却至室温后离心(1500 r/min, 30 min), 弃沉淀, 收集上清, 分装入 10 mL 青霉素瓶, -20℃ 冷冻 12 h, 再于 -70℃ 下冷冻 24 h, 迅速放入冷冻干燥机, 冻干, 即得纯化的 LPS。

1.2.4 LPS 糖含量的测定 参照文献[4, 9-12]的方法进行。首先制备 0.1 g/L 的葡萄糖和 2 g/L 的萘酚溶液, 萘酚溶液以分析纯浓硫酸(A R, 95% ~ 98%)为溶剂。分别取葡萄糖溶液 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL, 用蒸馏水补足至 1 mL, 再加入 3 mL 萘酚试剂, 迅速浸入冰水中冷却, 待每只试管均加完后, 一起放入沸水浴精确反应 7 min 取出, 冷却至室温。用 UV2000 型可见分光光度计, 以双蒸水为空白测定 620 nm 处 OD 值, 绘制标准曲线。然后测定 LPS 糖含量, 取 1 mL LPS 加入 3 mL 萘酚试剂, 迅速浸入冰水中冷却, 之后浸入沸水浴中维持 7 min, 取出, 冷却至室温, 再次测定 620 nm 处 OD 值, 用双蒸水为空白进行比色, 重复 3 次取平均值。从标准曲线中读出 LPS 糖含量。

1.2.5 LPS 蛋白质含量测定 将提取纯化的 LPS 用 ND-1000 型分光光度计进行蛋白质含量测定, 设定波长为 280 nm。取 1 瓶冻干后的 LPS, 加入 5 mL 无离子重蒸水, 用微量移液器吸取 5 μL , 滴加入加样孔^[13-17]。待读数稳定后读取结果。

1.2.6 LPS 核酸含量测定 将提取纯化的 LPS 用 ND-1000 型分光光度计进行核酸含量测定, 设定波长为 260 nm。取一瓶冻干后的 LPS, 加入 5 mL 无离子重蒸水, 用微量移液器吸取 5 μL , 滴加入加样孔。待读数稳定后读取结果。

2 结果与分析

2.1 LPS 提取结果

在 3700 mL 1% 葡萄糖肉汤培养基中培养 24 h 后, 收集细菌湿质量为 16.55 g, 冻干后 LPS 精制品净质量为 207.2 mg, 平均 LPS 产率为 1.25%。试验中为减少菌体流失, 所收集细菌含水分较多, 至使平均收率降低。

2.2 LPS 糖含量检测结果

将提取和纯化的 LPS 进行糖含量测定, 根据标准曲线求出直线回归方程, 将所测 3 个样品的平均 OD 值代入直线回归方程, 求得多糖含量为 27.06 mg/L, 标准曲线见图 1。

2.3 LPS 蛋白质含量测定结果

将提取和纯化的 LPS 进行蛋白质含量测定。用 ND-1000 型分光光度计在波长 280 nm 处测得 LPS 蛋白质含量为 0.25 g/L。

2.4 核酸含量测定结果

将提取和纯化的 LPS 进行核酸含量测定。用 ND-1000 型分光光度计在波长 260 nm 处测得

DNA 质量浓度为 22.6 mg/L, RNA 质量浓度为 17.6 mg/L, 即核酸总量为 40.20 mg/L。

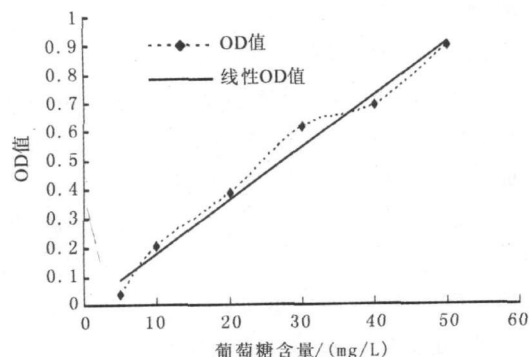


图1 葡萄糖标准曲线

3 讨论

本研究采用酚水法首次成功提取鸡鲍氏志贺氏菌脂多糖, 提取物纯度较高, 样品中的蛋白在酚的作用中变性, 经沉淀去除, 同时加入了 DNA 酶和 RNA 酶, 有效去除了样品中的核酸成分, 提高了样品纯度, 为下一步检测 LPS 致病性排除了干扰。检测结果与李肇增等^[9]提取鸡白痢沙门氏菌脂多糖的方法相比较, 所测蛋白质含量基本一致, 核酸含量更低, 但多糖含量也略低, 其原因可能与菌种有关, 或与检测时稀释度不同有关, 具体原因有待进一步证实。

在与 90% 苯酚等比混合抽提的过程中, 酚相应多次抽提, 以减少 LPS 流失, 增加产率, 变性蛋白相与水相分界面液体也要尽量取用, 这样所抽取的上清中虽有部分变性蛋白, 但仍可通过再次离心沉淀去除, 对结果中蛋白质含量影响不大。

采用鲎试剂检测纯化的 LPS 活性, 发现有明显凝集现象, 但与宋宏新等^[18]的研究结果相比较, 最小凝集浓度仍比较大, 因此, 较大的最小凝集浓度不会对鸡鲍氏志贺氏菌的致病性产生明显影响。

在检测结果中仍有少量蛋白质和微量苯酚存在, 笔者认为, 这不会对今后的致病性研究产生干扰。因为在提取过程中经过苯酚的作用, 蛋白质已经变性, 原有的结构和功能都已被破坏, 而在鲎试剂凝集活性试验中, LPS 经多倍稀释仍呈阳性反应, 证明所含苯酚属极微量, 在进一步的试验中对机体的影响可以忽略。

本方法经多处改良, 免去使用超声波细菌裂解仪破碎细菌, 增强了试验的可操作性, 使用 ND-1000 型分光光度计直接读取蛋白质及核酸含量, 使得试验方法更加方便快捷, 便于推广。

参考文献:

- [1] 许兰菊, 臧为民, 康相涛, 等. 鸡志贺氏菌病的病原鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(4): 420-423.
- [2] 张玉红, 张光辉, 许兰菊. 河南省鸡志贺氏菌病和鸡白痢的血清流行病学调查[J]. 河南农业科学, 2007(12): 105-108.
- [3] 欧守杼. 畜牧微生物学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [4] 严杰, 方楚平. 幽门螺杆菌脂多糖生物学活性的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1996, 14(3): 196-198.
- [5] 张艳红, 杜元钊, 吴延功. 肠炎沙门氏菌脂多糖的提取和制备[J]. 动物医学进展, 2001, 22(3): 79-80.
- [6] 李肇增, 李凤华, 常秋, 等. 鸡白痢菌脂多糖的提取和制备[J]. 内蒙古畜牧科学, 1997(2): 36-38.
- [7] 钟启平, 陈恩临, 何建民. 弗氏志贺氏菌 O 抗原多糖致病性研究[J]. 天津医药, 1998, 26(6): 323-325.
- [8] 宋宏新, 刘晓阳, 李宏. 改良热酚水法制备大肠杆菌 O157:H7 脂多糖抗原的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 273-275.
- [9] 李桂杰, 刘思当, 朱瑞良, 等. 禽波氏杆菌内毒素致病性的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(4): 349-352.
- [10] 潘迪草, 黄志成, 余文柄. 肠出血性大肠杆菌 O157: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.
- [11] 俞建瑛, 蒋宇, 王善利. 生物化学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [12] 王文平, 郭祀远, 李琳, 等. 苯酚-硫酸法测定野木瓜中多糖含量的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 276-279.
- [13] Sansonetti P J. Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by shigella species[J]. Rev Infect Dis, 1991, 13(4): 285.
- [14] Levenson V J, Mallett C P, Hale T L. Protection against local *Shigella sonnei* infection in mice by parenteral immunization with a nucleoprotein subcellular vaccine[J]. Infect Immun and Immunity, 1995, 63(7): 2762-2765.
- [15] Priamukh N S, Kileso V A, Tikhomirov E D. Animal carriers of *Shigella* and their possible epidemiological importance[J]. Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 1984, 11: 20-24.
- [16] Rajakumar K, Jost B H, Sasakawa C, et al. Nucleotide sequence of the thamnose biosynthetic operon of *Shigella flexneri* 2a and role of lipopolysaccharide in virulence[J]. Jbact Eriol, 1994, 176: 2362.
- [17] Lindberg A A, Kamell A. The lipopolysaccharide of *Shigella bacteria* as a virulence factor[J]. Rev Infect Dis, 1991, 13(4): 279.
- [18] 宋宏新, 刘晓阳, 李宏. 改良热酚水法制备大肠杆菌 O157:H7 脂多糖抗原的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 273-275.