

钩端螺旋体内毒素的研究

V. 乙二胺四乙酸二钠对钩端螺旋体释放脂多糖的作用

武素怀 姜淑贤 王焕芹 聂第楷 朱桂凤

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所, 北京)

热酚法提取钩端螺旋体脂多糖 (LPS) 前, 用乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na) 处理钩体 70091 株的细胞可以使 LPS 的产量提高一至两倍, 并改善了产品的色泽及溶解度。长久贮存的钩体细胞, LPS 分子易受 EDTA-Na 的作用而使糖链中的组分脱落, 导致糖链变短。当钩体 LPS 分子中糖链短到使脂、糖含量比相等时, 钩体 LPS 从水相转入酚相。

关键词 钩端螺旋体; 脂多糖; 乙二胺四乙酸二钠

用甲醛固定后的钩端螺旋体 (以下简称钩体) 细胞提取内毒素时产量甚少, 给研究工作带来诸多不便。为解决此问题, 我们曾采用了各种物理方法破碎细胞壁, 但效果均不理想。若在提取前用适当浓度的乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na) 处理甲醛作用过的钩体细胞却使脂多糖产量显著增加。我们发现该制剂的化学组成与其在用热酚水提取时“相分布”有密切的关系。

材料和方法

(一) 钩端螺旋体细胞 (L-cells)

黄疸出血群赖型 70091 株钩体细胞 100 倍浓缩液为上海生物制品研究所提供。

(二) 钩体脂多糖 (L-LPS) 的制备

1. 用无离子水反复洗涤钩体细胞, 4500 r/min 离心后去上清液。称量细胞湿重。制成均匀的细胞悬液 (8/25 ml 无离子水)。各次实验分别按下述方法处理。(1) 酚水法提取, 温度分别为 30℃, 56℃, 70℃; (2) 反复冻融钩体细胞直至暗视野显微镜检查无完整形体; (3) 用超声波将钩体细胞击碎, 检查标志同上; (4) 用细胞破碎器反复处理钩体细胞 (1200 kgf/cm²) 五次; (5) 向钩体细胞悬液中加入 EDTA-Na, 使其终浓

度为 0.05 mol/L。室温下轻度连续振荡 4h。离心后重新制成无离子水的钩体细胞悬液。

2. 上述预处理过的钩体细胞悬液按 Westphal^[1] 法提取 LPS。主要收集水相提取物, 但同时将酚相按流程各步骤一并处理。

(三) 钩体 70091 株 LPS 的糖、脂含量比测定

上述所获水相和酚相 LPS 的精制品分别用香草醛法^[2]测总脂 (自制大肠菌总脂为参照); 以酸酚法^[3]测总糖。

(四) 钩体 70091 株 LPS 制品浊度的衡量比较

将不同方法制备的 LPS 制成 500 μg/ml 的水悬液, 测其 590 nm 的负吸收值作为 LPS 制品浊度的衡量标准。负吸收的绝对值越小, 表示溶解度越好。

(五) 钩体 70091 株 LPS 的红外吸收光谱测定

0.5 mg 样品于 Perkin Elmer 683 红外光谱测定仪上进行。

(六) 钩体 70091 株 LPS 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

以 Laemmli^[4] 法电泳后, 按 Tsai^[5] 法对

本文于 1987 年 11 月 4 日收到。

脂多糖进行银染。

结 果

(一) 不同温度提取对钩体 70091 株水相 LPS 产量的影响

在所实验的温度下(30, 56, 70℃), 以 70℃ 提取效果最好。平均每克湿菌产 LPS 1—1.2 mg, 56℃ 提取每克菌只收获 0.5mg, 而 30℃ 几乎不能从钩体细胞中提出 LPS。

(二) 冻融、超声振荡、细胞压碎器处理对钩体细胞破碎的影响

实验表明, 钩体细胞壁经甲醛处理后变得异常坚硬, 即使冻融十五次仍有一部分菌体保持完整形态。经此预处理的细胞 LPS 产量无明显增高。

经细胞压碎器高压并随之迅速膨胀处理, 仍不能破碎甲醛处理后的钩体细胞。

超声振荡累加约 3h 才能使全部钩体细胞破碎。其粗制 LPS 的产量远较未处理的高, 但超离心精制时却不能提高回收量。此制品经紫外吸收光谱测定, 在 200—300nm 范围内多处波长有吸收。说明长时间超声处理虽可使细胞破碎完全, 但同时导致产物降解与破坏。

(三) EDTA-Na 对钩体 LPS 产量、色泽及溶解度的影响

钩体水相 LPS 产量随细胞在 EDTA-Na 液中被振荡的激烈程度不同增加一至两倍, 每克湿菌产 LPS 达 2—3mg。其中水相 LPS 产量约为酚相 LPS 含量的 16 倍。但当细胞浓缩液 4℃ 贮存较久使部分菌体发生自溶后, 若再用 EDTA-Na 处理则会导致 LPS 在水相和酚相的分布发生变化。即原水相中 LPS 的产量降低, 而酚相 LPS 的产量明显增高, 几乎与水相产量相等。

用 EDTA-Na 处理钩体细胞约 2h, 浸

泡液开始变黄, 同时钩体细胞变为乳白色。经此处理所获的水相 LPS 远较未处理的制品色泽白。而在水中的溶解度(以 590 nm 的负吸收值表示制品水悬液的浊度)也在一定程度上得到了改善(图 1)。

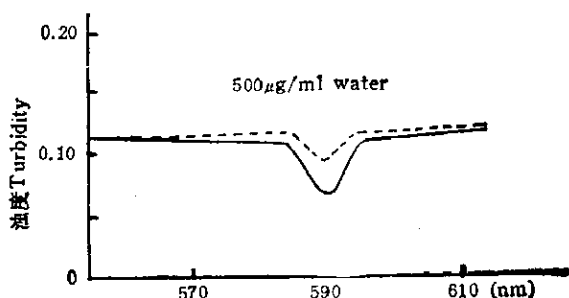


图 1 钩体脂多糖溶液浊度的变化

----- 细胞经 EDTA-Na 处理;
—— 细胞不经 EDTA-Na 处理

Fig. 1 Turbidity changes of the solution of L-LPS

----- with, —— without the treatment of EDTA-Na before extracting L-cells

(四) 分配在不同相的钩体 LPS 的化学组成

分别对水相和酚相 LPS 制品的脂、糖含量进行测定, 结果表明不论钩体细胞是否先用 EDTA-Na 处理, 凡分布于水相的 LPS 其脂和糖的含量比约为 1/2:1, 而分布于酚相的 LPS 二者比值为 1:1。

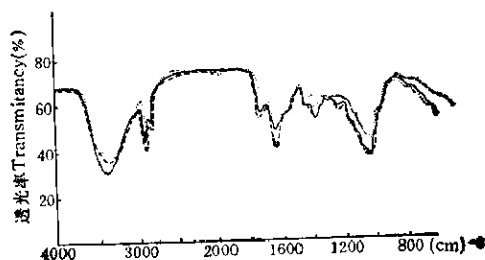


图 2 钩体脂多糖的红外吸收光谱

—— 水相脂多糖; ----- 酚相脂多糖; 钩体细胞经 EDTA-Na 处理后的水相脂多糖

Fig. 2 Infrared spectrum of L-Lps
—— L-Lps (water phase); ----- L-Lps (phenol phase); L-Lps (water phase with the treatment of L-cells by the EDTA-Na before extracting)

(五) 钩体 LPS 制品的红外吸收光谱

水相、酚相以及用 EDTA-Na 处理后所获的水相 LPS, 三种制品的红外吸收光谱极为一致(图 2), 并与大肠杆菌内毒素的相应图谱类似: 3400 cm^{-1} 区域的宽峰标志制品均有多羟基聚合物组成; 1730 cm^{-1} 的吸收表示制品含有羰基; 1630 cm^{-1}

的吸收为 $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \\ \parallel \quad | \\ \text{—C—N—} \end{array}$ 基团。反映了三种制品均系同类物质组成。

(六) 钩体 LPS 的 SDS-PAGE

在 SDS 解离系统中, 钩体 LPS 经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离所获图谱最突出的特点是难以辨出典型的脂多糖所特有的梯状谱带。钩体脂多糖对银铵染料极为敏

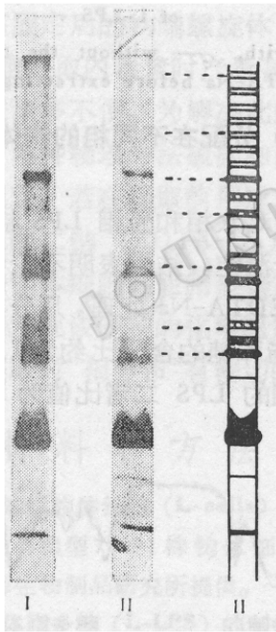


图 3 钩体脂多糖的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

I. 水相钩体脂多糖; II. 细胞经 EDTA-Na 处理后所获水相钩体脂多糖; II'. 图 3-II 的示意图

Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of L-Lps

I. L-Lps from water phase; II. L-Lps from water phase with the treatment of EDTA-Na before extracting L-cells; II'. Sketch map of Fig. 3-II

感, 有 5—6 条成分的谱带着色极深且易弥散, 使一些细微的间隔规律的梯状带被掩盖。但在提取前, 钩体细胞经一定浓度的 EDTA-Na 处理适当时间后所获 LPS 的电泳图谱变得稍许清晰(图 3)。着色极浅的排列规律的梯状谱带隐约可见(图 3-II 及其示意图)。

讨 论

众所周知, 肠道革兰氏阴性细菌的 LPS 分子受 EDTA-Na 的络合作用失去了两价金属离子后容易脱落到周围的介质中。钩端螺旋体的染色性质属革兰氏阴性范畴, 是否其 LPS 分子也具上述特性? 本实验的结果表明, 钩体细胞经 EDTA-Na 处理后, 不仅改善了 LPS 制品的某些物理性状, 而且明显提高了产量。这一现象使我们联想到钩体 LPS 分子结构中可能存在着类似肠道革兰氏阴性细菌外膜上那样的金属离子。它们起着加固外膜的作用, 一旦被 EDTA-Na 络合去掉以后, 外膜松动, LPS 分子变得易于脱落。这一事实对进一步深入研究钩体 LPS 分子的糖链组成、结构特征无疑是一个有意义的启示。

久置的钩体细胞经 EDTA-Na 作用后, 可能使 LPS 分子中糖侧链组成单位在原有自溶丢失的基础上进一步发生脱落。糖链变短导致 LPS 分子中脂的相对含量及脂、糖含量比值的升高。因此钩体 LPS 分子由原来分配在水相转变为分布在酚相。反映了 LPS 化学组成与“相分布”有密切关系。

参 考 文 献

- [1] Westphal, O. et al.: *Z. Naturforsch.*, **76**: 148, 1952.
- [2] 李龙官: 临床生化检验, 上海医学化学所主编, 上海科技出版社, p.167, 1982.
- [3] Michel, D. et al.: *Anal. Chem.*, **28**: 3,

1956.
[4] Leammli, U. K.: *Nature* (London), 227:
680--685, 1970.

- [5] Tsai, C.M. et al.: *Anal. Biochem.*, 119:
115--119, 1982.

STUDIES ON ENDOTOXIN OF *LEPTOSPIRA* V. THE EFFECT OF EDTA-Na ON THE RELEASE OF THE LPS OF *LEPTOSPIRA* INTERROGANS SEROVAR LAI

Wu Suhuai Jiang Shuxian Wang Huangqin Nie Dikai Zhu guifeng
(*Institute of Epidemiology and Microbiology, Beijing*)

The yield of leptospiral LPS was able to increase 1—2 times when the cells were treated with EDTA-Na before extracting with hot phenal-water method. The colours and solubility of L-LPS were improved. When the leptospiral cells were stored for a long period of time, and treated by EDTA-Na, the phase distribution of the LPS changed, i.e. they returned from water phase into phenol phase.

Such change was related to the quantity of both the saccharide and lipid.

Key words

Leptospira; Lipopolysaccharides; Ethylene diamine tetraacetic acid, disodium (EDTA-Na)