

空肠弯曲菌肠毒素理化特性的研究*

吴 润 司宏伟**

(甘肃农业大学动物医学系 兰州 730070)

摘 要:经 SDS-PAGE 分析发现,空肠弯曲菌细胞紧张性肠毒素(Cytotoxic enterotoxin, CE)的硫酸胺盐析粗提物除有一条 68kD 的带外,还有一些未分开的小分子物质,而经神经节苷脂 GM₁ 亲和层析后仅有 68KD 的一条带,即表明 68kD 的蛋白质为 CE 的主要成分。CE 不耐热、pH 依赖和对胰酶有抗性。56℃ 和 60℃ 加热 30min、100℃ 加热 15min 即可完全失活。其活性在 pH6.0 时最高,在 pH3.0 和 9.0 时均可使其完全丧失活性。在 4℃ 保存超过 3d 后,其活性迅速降低。抗 LT 血清能完全抑制 CE 的活性。

关键词:空肠弯曲菌,细胞紧张性肠毒素,理化特性

中图分类号:Q939.123 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)01-0080-84

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)是 80 年代起受到国内外广泛重视的人兽共同感染的病原菌。研究其致病机制表明,该菌的潜在毒力因子包括粘附、侵袭性和毒素,但它们的构成和在致病机制中的具体作用还不清楚^[1]。该菌毒素的研究是近十多年来十分活跃的领域,自 1983 年 Ruiz-Palacios 等^[2]首次发现一种霍乱样肠毒素(Cholera-like Enterotoxin)以来,相继又发现了细胞毒素(Cytotoxin, C)^[3]、细胞致死性膨胀毒素(Cytolethal Distending Toxin, CLDT)^[4],但它们的生物学、生物化学和遗传学特性至今还未完全明了^[1]。该菌霍乱样肠毒素又称细胞紧张性肠毒素(Cytotoxic Enterotoxin, CE),是目前研究得较为深入的一种毒素,但各研究所得的结果不尽一致,甚至相互矛盾。有研究表明^[5],大肠埃希氏菌不耐热肠毒素(LT)与霍乱弧菌肠毒素(CT)在结构和作用机理上基本相似,均为 AB₅ 构型的寡聚蛋白, B 亚单位负责与其特异受体—神经节苷脂 GM₁ 结合, A 亚单位是其活性部分(29kD),可活化细胞膜上的腺苷酸环化酶(AC),引起胞内 cAMP 浓度升高。同样, CE 也具有与 CT 和 LT B 亚单位的功能和免疫性相似的 B 亚单位^[6,7,8]。本研究试图通过 CE 的纯化和 SDS-PAGE 分析以及影响 CE 活性的理化因素测定,以期探明本室分离菌株所产 CE 的组分、分子量及其理化特性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养基:199 培养基(M 199)为 Gibico 公司产品;改良 Camp-BAP 平板、布氏肉汤(BB)和 M199 + AA + Fe³⁺ 培养基按文献[9]的方法配制。

* 国家自然科学基金资助项目(39570539)

** 现在青岛市畜牧兽医工作站工作

作者简介:吴 润(1958—),男,甘肃定西县人,甘肃农业大学动物学系副教授,主要从事兽医微生物学与免疫学研究

收稿日期:1999-03-09, **修回日期:**1999-06-14

1.1.2 试剂:抗 LT 血清按文献[10]的方法制备;SDS-PAGE 试剂按文献[11]的方法配制;亲和层析溶液按文献[12,13]的方法配制。

1.1.3 中蛋白分子量标准物(14.4~97.4kD):为 Promega 公司产品。

1.1.4 细胞:中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,由中国预防医学科学院病毒学研究所提供。

1.1.5 菌种:产肠毒素型大肠埃希氏菌(ETEC)O₇₈:H₁₁(ST⁻ LT⁺),由卫生部兰州生物制品研究所第一研究室提供;空肠弯曲菌 J97112 菌株(CE⁺)由本室分离自于腹泻病鸡。

1.1.6 实验动物:清洁级大白鼠,由甘肃省肿瘤研究所动物室提供。

1.2 方法

1.2.1 CE 的组分分析及其分子量测定:按文献[9]的方法,分别接种培养 *C. jejuni* 和 ETEC,并制备 CE 液和 LT 液。

毒素粗提:参照文献[10]的方法进行 CE 和 LT 硫酸铵盐析粗提,并以大鼠肠祥试验检测粗提 CE 的活性。

毒素纯化:参照文献[7,12,13]的方法进行粗提毒素的神经节苷脂柱层析纯化。

毒素组分分析:参照文献[11,12]的方法,以 SDS-PAGE 进行 CE 粗提物和纯化物的分析,测定其组成成分及其分子量。

1.2.2 理化因素对 CE 活性的影响:各处理 CE 液的活性检测采用文献[9]的 CHO 细胞法或大鼠肠祥法进行,并以未处理 CE 作对照。均进行 3 个平行试验,结果取平均值。

温度的影响:将 CE 液分别置 56℃、60℃、100℃ 水浴分别作用 10、15、20、30、45、60min,置冰水中迅速冷却,以 CHO 细胞法进行 CE 活性检测。

pH 的影响:将 CE 液分别置 pH3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 PBS 中 4℃ 透析过夜,以大鼠肠祥法进行 CE 活性检测。

胰酶的影响:将 CE 液与 0.25% 或 0.50% 胰酶液等量混合,置 37℃ 水浴中作用 1h,再按 0.1mg/0.15mg 酶加入 PMSF(phenyl-methyl-sulphonyl-floride)终止反应,以大鼠肠祥法进行 CE 活性检测。

保存时间的影响:将 CE 液于 4℃ 分别放置 1、2、4、6、8、10、12d,以 CHO 细胞法进行 CE 活性检测。

1.2.3 抗 LT 血清对 CE 的中和作用:用 M199 分别将抗 LT 血清作 2~128 倍 2 倍递增稀释,以 CHO 细胞法和大鼠肠祥法进行中和试验,做 3 个平行试验,结果取平均值。

CHO 细胞法:将各稀释度的抗 LT 血清分别加入贴壁的 CHO 细胞培养板,50μL/孔,再加入 CE 液,100μL/孔,观察细胞的形态改变;大鼠肠祥法:将各稀释度的抗 LT 血清和 CE 液各 0.50mL 同时注入每段肠祥中,18h 后测量每个肠祥的长度和积液量。

2 结果和分析

2.1 粗提 CE 的活性检测

粗提 CE、CE 液和 LT 液均可使大鼠肠祥积液,积液量(mL)与长度(cm)之比大于 0.2,说明粗提过程并未使 CE 丧失活性,粗提 CE 中含有其主要成分。

2.2 CE 的组分及其分子量测定

经中蛋白分子量标准物电泳结果回归分析,得回归方程 $y = 100.88 - 12.09x$ (其中 y

为分子量, x 为蛋白质的迁移距离), 相关系数为 -0.9986 。同时, 就各样品电泳结果绘制回归直线进行分析。

2.2.1 粗提 CE 的 SDS-PAGE: 用回归方程计算, 粗提 CE 和 LT 均有一分子量约为 68kD (68.12kD) 的条带和一些分子量小于 30kD 未能分开的小分子物质, 此外 LT 还有 3 条 CE 不具有的条带, 如图 1A 所示。

2.2.2 纯化 CE 的 SDS-PAGE: 如图 1B 所示, 无论 CE 还是 LT, 纯化后仅有一条分子量为 68kD 的条带, 说明只有 68kD 的蛋白成分具有与神经节苷脂 GM₁ 受体结合性质。

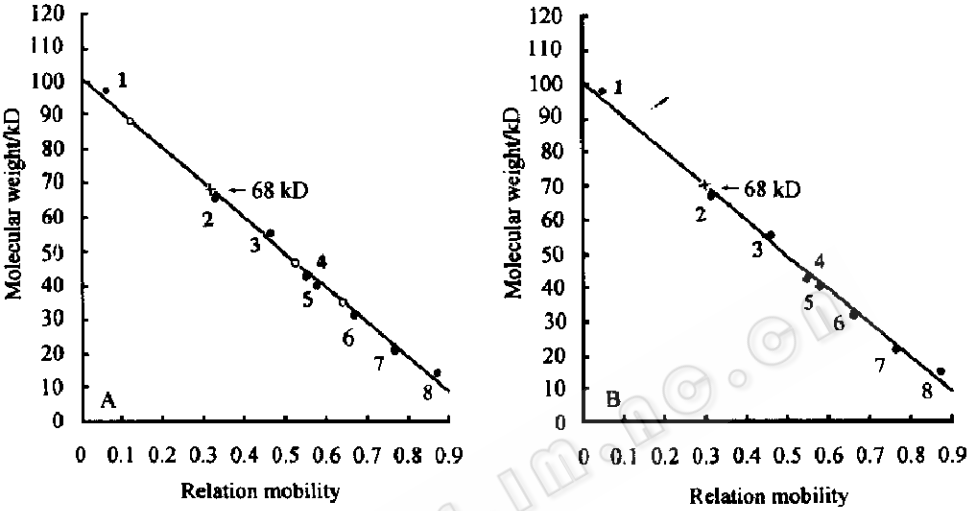


图 1 CE 的 SDS-PAGE 回归直线

Fig. 1 Regression line on SDS-PAGE of CE
A. Crude CE; B. Purified CE.

• MW markder proteins(1. 97.4; 2. 66.2; 3. 55.0; 4. 42.7; 5. 40.0; 6. 33.0; 7. 21.4; 8. 14.4kD); ×, CE and LT; ○, LT.

2.3 理化因素对 CE 活性的影响

2.3.1 温度的影响: CE 对热敏感, 56℃、60℃ 30min 或 100℃ 15min 即可使之完全灭活。

2.3.2 pH 的影响: CE 活性以 pH6.0 为对称轴呈正态分布, 当 pH 在 3.0 和 9.0 时 CE 即完全丧失活性, pH 越靠近 6.0 CE 的活性越高(图 2)。

2.3.3 保存时间的影响: CE 活性在 4℃ 于 1~3d 内变化不大, 从第 4d 开始迅速下降, 至第 8d 基本丧失殆尽。

2.3.4 胰酶的影响: CE 对 0.25% 的胰酶有抵抗力, CE 与等量 0.50% 胰酶 37℃ 作用 1h 后仍有活力, 只是稍有下降, 积液(mL)/长度(cm)比从未处理的 0.35 下降到 0.27。

2.4 抗 LT 血清对 CE 的中和作用

由图 3 可见, 抗 LT 血清具有抑制 CE 活性的作用。用 CHO 法检测表明, 16[×] 以下稀释的抗 LT 血清能有效抑制 CE 的活性, CHO 细胞的变形率低于 50% (0.5), 32[×] 以上稀释时则不能有效中和 CE 而使 CHO 细胞的变形率高于 50%。当用大鼠肠祥试验检测时, 仅有 8[×] 以下稀释的抗 LT 血清能有效抑制 CE 活性, 肠祥积液不明显, 而 16[×] 以上稀释时则不能完

全中和 CE, 肠祥积液比(mL/cm)大于 0.2。

3 讨论

空肠弯曲菌的许多菌株可产生一种不耐热肠毒素(CE)。该毒素可引起 Y-1 细胞变圆和 CHO 细胞伸长、大鼠肠祥积液及家兔皮肤的通透性增高,引起 CHO 细胞内 cAMP 水平升高,其细胞反应和肠祥积液活性可被抗 CT 血清所抑制^[2,8,7,14]。CE 与 CT 有部分抗原同一性,与 LT 及其 B 亚单位的免疫性更为相似,以神经节苷脂 GM₁、抗 LT 或其 B 亚单位的血清处理可抑制 CE 的 CHO 细胞反应和肠祥积液活性^[7,8]。

3.1 CE 的组分及其分子量

CE 的纯化及其组分测定是 CE 研究最主要、最艰难的内容之一^[7,12]。Daikoku 等^[12]用硫酸胺盐析的 CE,经 Sephadex G-100 过柱后 SDS-PAGE 分析发现有 68、54、43kD 三条带,而经抗 CTIgG 亲和柱层析后 SDS-PAGE 分析仅有 68kD 一条带,但用神经节苷脂 GM₁ 亲和柱层析后 SDS-PAGE 分析有 68、54kD 两条带,认为 CE 至少由 68 和 54kD 的两种多肽构成,其 68kD 的多肽具有与 CT 和 LT 相同的抗原性。本研究证实,纯化 CE 仅有 68kD 的条带,68kD 的蛋白成分具有与神经节苷脂 GM₁ 结合的性质,且其硫酸胺盐析粗提物可使大鼠肠祥试验呈阳性,即表明它是构成 CE 的主要成分。

在粗提 CE 和 LT 的 SDS-PAGE 分析中出现的一些未能分开的小分子物质,可能是由产毒培养基中所含胰蛋白酶的残余物所致。粗提 LT 中含 3 条特有条带,即表明 LT 的组成成分与 CE 不完全相似,仅有 68kD 的蛋白是它们共有的。

3.2 CE 的理化特性

CE 不耐热(56℃ 30min 可失活)、pH 依赖(pH6.0 时活性最高, pH3.0 和 9.0 时完全失去活性)和不溶血的肠毒素,对胰酶有抗性,对木瓜蛋白酶和蛋白酶敏感^[15]。于 4℃ 保存 1 月或于 -20℃ 和 -70℃ 保存 1 周完全失活^[2]。本研究也证实,CE 为不耐热肠毒素,具有 pH 依赖性,对胰酶有抵抗力。于 4℃ 下保存超过 3d 后其活性迅速下降,至一周后基本完全丧失。这与上述相关研究的结果基本一致。

3.3 CE 的抗原性

本研究证实,抗 LT 血清能有效地抑制 CE 的 CHO 细胞伸长和大鼠肠祥积液活性,表明 CE 与 LT 在抗原性上相关,这与有关研究^[2,6,7,8,14]结果相一致。以 CHO 细胞和大鼠肠祥试验进行中和试验,其敏感性上存在差异,这是由于 CHO 细胞对 CE 的敏感性明显

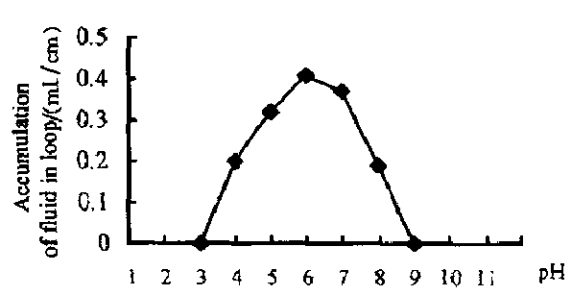


图 2 pH 对 CE 活性的影响
Fig. 2 Effect of pH on CE activity

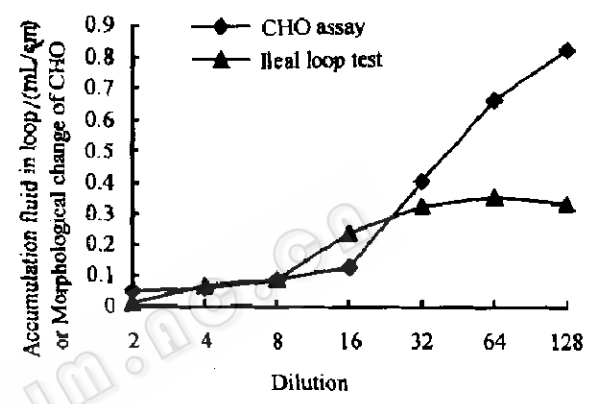


图 3 抗 LT 血清对 CE 的中和作用
Fig. 3 Netralisation of CE by antiserum for LT

高于大鼠肠祥试验^[9]所致。抗 LT 血清能抑制 CE 的活性,这可能是抗 LT 抗体与 CE 的某些亚单位结合,封闭其活性位点,使 CE 不能与其受体结合或不能显露其活性部位所致。但是,LT 与 CE 的组分不同,抗 LT 血清又由 LT 粗提物所制备,那么 LT 中的何种蛋白成分与 CE 的抗原性相似,对此还需作深入探讨。

本研究总的结果表明,分自于我国腹泻病鸡的空肠弯曲菌所产生的肠毒素,其组分、分子量及其理化特性和抗原性与国外对该菌肠毒素的研究结果基本一致。

参 考 文 献

- [1] Misawa N, Ohnishi T, Itoh K, *et al.* *J Med Microbiol*, 1994, **41**:224~230.
- [2] Ruiz-Palacio G M, Torres J, Torres N I, *et al.* *Lancet*, 1983, (2):250~252.
- [3] Yeen W P, Puthuchery S D, Pang T. *J Clin Pathol*, 1983, **36**:1237~1240.
- [4] Johnson W M, Lior H. *Microbiol Pathog*, 1988, **4**(2):115~126.
- [5] 雷祚荣主编.细菌毒素分子生物学.北京:中国科学技术出版社,1993,24~34.
- [6] Klipstein F A, Engert R F. *Infect Immun*, 1985, **48**(3):629~633.
- [7] Klipstein F A, Engert R F. *Lancet*, 1984, (1):1123~1124.
- [8] Klipstein F A, Engert R F. *Infect Immun*, 1984, **45**:314~319.
- [9] 吴 润,司宏伟,刘 磊.中国兽医科技,1998, **28**(12):9~12.
- [10] 吴 润,刘 磊,司宏伟.畜牧兽医学报,1999, **30**(5):449~454.
- [11] 周顺伍主编.生物化学实验技术.北京:北京农业大学出版社,1991,96~106.
- [12] Daikoku T, Kawaguchi M, Takama K, *et al.* *Infect Immun*, 1990, **58**(8):2414~2419.
- [13] Meng X Q, Kamiya S, Yamakawa K, *et al.* *J Med Microbiol*, 1993, (38):69~73.
- [14] Florin I, Antillon F. *J Med Microbiol*, 1992, **37**:22~29.
- [15] Saha S K, Sanyal S C. *FEMS Microbiol Letters*, 1990, **67**:333~338.

STUDY ON THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF CAMPYLOBACTER JEJUNI ENTEROTOXIN

Wu Run Si Hongwei

(Department of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

Abstract: Precipitate of *Campylobacter jejuni* cytotoxic enterotoxin(CE) performed in an 80 % saturated solution of ammonium sulfate indicated that there were some little molecular proteins except the 68 kD main band on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), whereas the eluate from GM₁ ganglioside affinity column chromatography exhibited only one 68kD band on SDS-PAGE. The results suggest that CE mainly be consisted of 68 kD protein. The toxin is heat-labile, pH dependent and resistant to trypsin. It could be completely inactivated by heating at either 56℃ and 60℃ for 30min or 100℃ for 15min. The activity was maximum at pH6.0 and was completely inactivate at pH3.0 and pH9.0, and rapidly reduced after storage over 3 d at 4℃. The anti-LT serum could completely inhibited the activity of CE.

Key words: *Campylobacter jejuni*, Cytotoxic enterotoxin, Physicochemical properties