

脆弱拟杆菌 β -内酰胺酶的纯化及免疫学特性

陈锦英* 刘秉阳

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所, 北京)

包幼迪

(福建医学院, 福州)

利用层析结合 PAGE 回收蛋白的方法对临床分离的脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 55 的 β -内酰胺酶进行纯化, 纯酶与 Liposome-CPS-K 混合制备抗血清, 并建立了 IgG-ELISA 和 Western blotting 方法。其测定结果表明, 脆弱拟杆菌的 β -内酰胺酶不同于其它拟杆菌和肠道杆菌染色体编码的 β -内酰胺酶 ($p < 0.001$), 具有种的特异性。

关键词 脆弱拟杆菌; β -内酰胺酶

脆弱拟杆菌的 β -内酰胺酶在其对 β -内酰胺抗生素所产生的耐药性中起了重要的作用, 它与革兰氏阴性菌染色体编码的 β -内酰胺酶相似, 但又不完全相同, 我们试图利用免疫学手段初步探讨它们之间的关系。本文目的是将临床最常见的中等耐药的脆弱拟杆菌的 β -内酰胺酶蛋白进行纯化, 利用纯化的酶蛋白与脂质体 (Liposome-CPS-K) 混合制备免疫血清, 借此探讨该菌株的 β -内酰胺酶与种内、种间及属间不同细菌所产生的 β -内酰胺酶之间的关系, 有助于了解细菌之间耐药机制的差别及其进化关系。

材料和方法

(一) 菌株

脆弱拟杆菌 55 为阑尾炎手术标本分离的菌株, 药敏测定结果见前文^[1]。

(二) 粗酶制备物

方法同前文略有更改^[2]。脆弱拟杆菌 55 过夜培养物按 3—5% 转种于 2400 ml BHI 或 GAM 培养基中, 37℃ 厌氧培养 10—12 小时, 收获菌细胞, 经 0.01 mol/L

磷酸盐缓冲液 (pH 7.2)—5 mmol/L 2-巯基乙醇 (0.01 mol/L—5 mmol/L 2-ME) 洗两次, 按初始菌液量的 1—2% 悬浮于同样缓冲液中, 超声破碎后超速离心 (100000 $\times g$, 4℃, 90 分钟), 留取上清液做为粗酶制备物进一步纯化。

(三) β -内酰胺酶的纯化

全过程均在 4℃ 进行, 用于层析的缓冲液均含有 5 mmol/L 2-ME。

1. 第一次 DEAE-Sephacrose CL-6B 层析: DEAE-Sephacrose CL-6B 为 Pharmacia 产品, 柱床体积为 $2.4 \times 25 \text{ cm} \Rightarrow 113 \text{ ml}$ 。采用含有 0.1—0.4 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L PB (pH 7.2) 阶段洗脱, 流速为 30 ml/h。以测定 OD_{280} 和 β -内酰胺酶活性进行监测, 将有酶活性的部分收集, 经 0.01 mol/L PB (pH 7.2)—0.15 mol/L KCl 透析, 用 PEG 20000 浓缩。

2. Sephadex G-100 层析: Sephadex G-100 为 Pharmacia 产品, 柱床体积为

本文于 1989 年 1 月 23 日收到。

* 中国预防医学科学院 85 班研究生, 现在天津医学院微生物学教研室工作。

1.6 × 100 cm ⇌ 200 ml。用 0.01 mol/L PB (pH 7.2)-0.15 mol/L KCl 洗脱, 流速为 20 ml/h。监测和样品处理方法同前, 仅透析液为 0.01 mol/L PB (pH 7.2)-0.1 mol/L NaCl。

3. 第二次 DEAE-Sepharose CL-6B 层析: 柱床体积为 1.4 × 20 cm ⇌ 30 ml。采用阶段洗脱, 监测和样品处理方法同前, 仅透析液为 0.01 mol/L PB (pH 7.2)。

4. 制备型聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE): 层析后浓缩的样品继续用不连续系统 PAGE 进行纯化^[3]。浓缩胶为 3%, 分离胶为 12%, 凝胶为 160 × 160 × 3 mm。电泳后取下凝胶, 切下向导凝胶条, 利用自行设计的 β -内酰胺酶荧光染色法进行染色, 可见 β -内酰胺酶蛋白带呈蓝色荧光, 将其做好标志后还原于原凝胶板上, 切下相对应的凝胶, 凝胶切碎后加入 2 倍体积的 0.01 mol/L PB (pH 7.2)-0.1 mol/L NaCl-5 mmol/L 2-ME, 置 4℃ 浸泡 24 小时。切胶样品离心后, 上清液用蒸馏水透析除盐, PEG 20000 浓缩, 留少量样品做蛋白定量和电泳检测, 其余部分真空干燥保存。

5. 蛋白纯度的检测: 用 SDS-PAGE 方法^[3]。

(四) β -内酰胺酶的检测

采用半微量改良微生物学方法^[2]和 Nitrocefin 方法^[4]。

(五) 纯化的 β -内酰胺酶免疫血清的制备

1. 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 荚膜多糖 (CPS-K) 的提取: 参照 Batshon 法稍有改进^[5]。肺炎克雷伯氏菌 46114 (卫生部生物制品检定所提供) 的荚膜多糖提取后经真空干燥为白色结晶, 按 Dische 法测定其葡萄糖醛酸的含量^[6]。

2. β -内酰胺酶-Liposome-CPS-K 的

制备: 参照 Shek 等^[7]、Kirby 等^[8]和初连瑞等^[9]方法制备阳电荷脂质体。二软脂酰磷脂酰胆碱 (Sigma 产品)、胆固醇 (Sigma 产品) 和硬脂胺 (瑞典产) 按克分子比 7:2:1 溶于氯仿-甲醇 (V/V 2:1) 中, 氮气旋转吹干使其形成干的脂膜, 然后悬于含有纯化酶和 CPS-K 的 3.3 mmol/L PB (pH 7.2) 中, 置旋涡混合器上混匀, 室温放置 2 小时, 置冰浴中浴式超声器处理 10 分钟, 室温放置 2 小时后用于免疫动物。脂质体包裹率的测定按 Alving 等方法, 以小牛血清白蛋白代替纯酶-CPS-K, 用 Lowry 法测蛋白含量^[10]。

3. 免疫程序: 参照 Fujii 等方法^[11]。纯化酶 (0.5 mg)-Liposome (10 mmol)-CPS-K (0.6 mg) 给新西兰白兔 (1.5—2 kg) 背部皮下多点注射, 一周后同样注射一次, 两周后以同样剂量股部和大腿肌肉多点注射, 再经两周后取血, 用 ELISA 方法测抗体效价。

(六) β -内酰胺酶免疫学特性

采用 ELISA 双抗体夹心法 (IgG-ELISA)。

1. IgG 的提取^[12]: 抗血清经无水硫酸钠沉淀后进行 DEAE-Cellulose DE-52 层析, 用 0.0175 mol/L PB (pH 6.3) 洗脱, 收集第一个蛋白峰的样品。

2. IgG-辣根过氧化物酶 (HRP) 结合物的制备: 参照骆加里等报道的方法^[13]。

3. IgG-ELISA 方法的建立和应用: 按常规确定实验的最佳条件后, 选择以下不同细菌来源的 β -内酰胺酶进行检测。25 株脆弱拟杆菌的临床分离物, 两株标准菌株即脆弱拟杆菌 ATCC25285 和脆弱拟杆菌 CDC14462, 吉氏拟杆菌 (*Bacteroides distasonis*) CDC 12014 和多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) CDC1041A 为分型标准株, 吉氏拟

表 1 肠道菌染色体编码的 β -内酰胺酶的特性Table 1 Characteristics of the chromosome encoded β -lactamase of enterobacteria

β -内酰胺酶的类型 Type of β -lactamase	细 菌 Bacteria	特 性 Characteristics
固有性 C 类 β -内酰胺酶 Constitutive β -lactamase of class C	大肠杆菌 LA5 <i>Escherichia coli</i> LA5	野生型 Wild type
	大肠杆菌 LA51 <i>Escherichia coli</i> LA51	大肠杆菌 LA5 amp A1 突变后 β -内酰胺酶的产生增高 15 倍 amp A1 mutant of <i>E. coli</i> LA5 makes about 15 times as much β -lactamase.
	宋内氏志贺氏菌 OS10 <i>Shigella sonnei</i> OS10	临床分离物 Clinical isolate
	宋内氏志贺氏菌 SS12 <i>Shigella sonnei</i> SS12	宋内氏志贺氏菌 OS10 的调节区点突变后过量产生 β -内酰胺酶 Point mutant of <i>S. sonnei</i> OS10 (in regulatory region) overproduces the β -lactamase.
诱导性 C 类 β -内酰胺酶 Inducible β -lactamase of class C	弗氏柠檬酸杆菌 OS60 <i>Citrobacter freundii</i> OS60	临床分离物, 野生型 Clinical isolate, wild type
	阴沟肠杆菌 P99 <i>Enterobacter cloacae</i> P99	产生半固有性 β -内酰胺酶的变种 Semiconstitutive β -lactamase
	粘质沙雷氏菌 1 <i>Serratia marcescens</i> 1	
	绿脓杆菌 164 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 164	

杆菌 F2 为临床分离菌株; 8 株革兰氏阴性菌分别由 Normark, S. 和 Smith-Moland, E. 教授赠送(表 1)。上述菌株均制备粗酶提取物做为检测的抗原, 并同时进行检测 β -内酰胺酶测定。

(七) 蛋白质的硝酸纤维素膜转移电泳 (Western blotting)

按文献[15]的方法进行。

结 果

(一) 脆弱拟杆菌 55 β -内酰胺酶的纯化

1. 粗酶提取物的部分纯化: 粗酶提取物经第一次 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换层析阶段洗脱后可见 4 个蛋白峰, 0.2 mol/L NaCl-0.01 mol/L PB 和 0.3 mol/L NaCl-0.01 mol/L PB 洗脱的第二、三蛋白峰均有酶活性, 大部分酶活性在第二个峰。收集有活性部分, 经 Sephadex G-100 凝胶过滤, 仅有一个蛋白峰, 酶活性部分在蛋白峰的下降处。继而进行第二次 DEAE-Sepharose CL-6B 离子交换层析, 以 0.2 mol/L NaCl-0.01 mol/L PB 洗脱的第二个峰最高, 全部酶活性与该蛋白峰

表 2 脆弱拟杆菌 55 β -内酰胺酶的纯化Table 2 Purification of β -Lactamase of *Bacteroides fragilis* 55

步 骤 Step	总蛋白 (mg) Total protein	总活力(单位) Total activity (u)	比活 (单位/mg) Specific activity (u/mg)	回收率 Recovery rate (%)	纯化倍数 Purification (fold)
1. 粗提 Crude extract	971	213.7	0.22	100	1
2. 第一次 DEAE-Sephadex CL-6B 层析 First DEAE-sephadex CL-6B column	166	58.1	0.35	27.2	1.6
3. Sephadex G-100 柱层析 Sephadex G-100 column	62	56.8	0.91	26.2	4.1
4. 第二次 DEAE-Sephadex CL-6B 层析 Second DEAE-sephadex CL-6B column	21	64.4	3.01	30.1	13.7

相吻合, 收集活性部分为部分纯化酶样品。层析过程中的回收率及提纯倍数见表 2。

2. PAGE 后回收酶蛋白: 粗酶提取



图 1 脆弱拟杆菌 55 β -内酰胺酶经聚丙烯酰胺凝胶电泳后荧光染色

1. 纯酶; 2. 粗酶

Fig. 1 Fluorescent staining of β -lactamase from *Bacteroides fragilis* 55 after polyacrylamide gel electrophoresis

1. Purified enzyme; 2. Crude enzyme

物虽经三次层析, 蛋白电泳的结果证明还没有达到纯化的效果, 故采用制备型 PAGE。切下的向导凝胶经荧光染色仅有一条酶蛋白带, 以此为标志切下相应回收凝胶经缓冲液浸泡, 凝胶蛋白洗脱的回收率为 97.6%。切胶回收后纯化的样品经 SDS-PAGE 检测为单一蛋白带, 不同批量操作酶纯化的重复性很好(图 1、2)。

(二) 酶蛋白抗血清制备的结果

Liposome-CPS-K 做为佐剂与纯酶混合用于免疫动物, 测抗体效价为 1:640, 经静脉加强注射后为 1:2560, 用于免疫学特性的研究。实验中检测 CPS-K 结晶中葡萄糖醛酸含量为 15.2%, 证实提取物为 CPS-K 成分。利用测定蛋白的方法求得本试验制备脂质体的包裹率为 23.9%。

(三) IgG-ELISA 检测不同细菌来源的 β -内酰胺酶

试验中以脆弱拟杆菌 55 的粗酶提取物为阳性对照, 同样操作的大肠杆菌 (*E. coli*) DH1 的提取物为阴性对照。每份样品重复三次, 求其平均值。测定结果用待

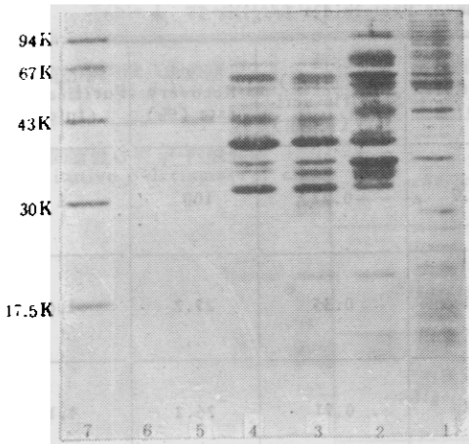


图2 脆弱拟杆菌 55 β -内酰胺酶纯化过程中样品的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

1. 粗酶提取物; 2. 第一次 DEAE-Sephadex CL-6B 层析后样品; 3. Sephadex G-100 凝胶过滤后样品; 4. 第二次 DEAE-Sephadex CL-6B 层析后样品; 5 和 6. 制备型聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化的 β -内酰胺酶; 7. 标准分子量对照

Fig. 2 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns

1. Crude extract; 2. Sample after the first DEAE-sepharose CL-6B column; 3. Sample after sephadex G-100 column; 4. Sample after the second DEAE-sepharose CL-6B column; 5 and 6. Purified β -lactamase by the preparative PAGE; 7. Molecular weight marker

测样品 OD 值与阴性对照 OD 值的比值 (P/N) > 2.1 为阳性。25 株临床分离的脆弱拟杆菌及两株标准菌株 (A 组) 的 P/N 值均大于 2.1, 平均为 5.64 ± 1.31 , 95% 可信限为 5.14—6.14。两株同属不同种的拟杆菌标准株及 1 株临床分离菌株 (B 组) 的 P/N 值平均为 1.78 ± 1.04 , 95% 可信限为 0.58—2.98。8 株不同属的革兰氏阴性菌 (C 组) 的 P/N 值均小于 2.1, 平均为 0.72 ± 0.07 , 95% 可信限为 0.68—0.76。三组平均数的显著性检验结果, A/B 组: $t = 4.917$, $p < 0.001$; A/C 组: $t = 10.468$, $p < 0.001$; 故差异非常显著。B/C

组: $t = 2.912$, $p < 0.05$, 相差显著。

(四) β -内酰胺酶的硝酸纤维素膜转移电泳 (Western blotting) 的结果

选择 3 株拟杆菌, 4 株革兰氏阴性菌, 3 株脆弱拟杆菌经 SDS-PAGE 后转移电泳, 硝酸纤维素膜显色后阳性对照的脆弱拟杆菌 55 可见一条蛋白带显色, 另外两株脆弱拟杆菌均在同样位置出现一条带, 而其它 7 株菌均无显色的蛋白带出现。

讨 论

(一) 脆弱拟杆菌 β -内酰胺酶纯化方法的探讨

试图了解脆弱拟杆菌 β -内酰胺酶的种内、种间和属间的关系及确定该酶是否具有种属特异性, 用免疫学的方法是很重要而准确的手段。迄今只有 Britz 等利用渗透性休克和层析相结合的方法获得高度耐药菌株脆弱拟杆菌 AM78 β -内酰胺酶的纯品。该菌株酶的比活力比本文纯化的菌株高 20 倍, 尽管如此, 还比 RP4/*E. coli* 的酶低 44 倍, 这也是厌氧菌 β -内酰胺酶不易纯化成功的原因^[14]。要想了解厌氧菌 β -内酰胺酶与其它细菌之间的关系就应该选择具有普遍代表性的中等耐药菌株, 但酶活性不高将给提取和纯化造成困难。我们采用层析结合制备型 PAGE 纯化脆弱拟杆菌的 β -内酰胺酶获得成功, 这在国内外尚属首次。这种方法简易可行, 尤其适用于微量蛋白的纯化。

(二) 脆弱拟杆菌 β -内酰胺酶免疫学特性

1980 年 Ambler 提出根据 β -内酰胺酶的结构序列同源性的新分类系统, 肠道菌染色体编码的头孢菌素酶属于 C 类酶, 这类酶又分为固有性和诱导性两种类型^[16-18]。由于对拟杆菌的 β -内酰胺酶缺乏分子水平的认识, 故新的分类系统中没

有它的位置。本文对脆弱拟杆菌 β -内酰胺酶免疫学特性的研究及其种属间关系的初步探讨尚属首次, IgG-ELISA 和 Western blotting 的结果均表明脆弱拟杆菌 β -内酰胺酶不同于其它拟杆菌的酶和肠道菌染色体编码的 C 类酶 ($p < 0.001$), 具有种的特异性。而且, 统计学处理的结果还表明脆弱拟杆菌的 β -内酰胺酶与拟杆菌的酶差异小, 而与肠道菌的 C 类酶差异显著。

参 考 文 献

- [1] 陈锦英等: 微生物学报, 30 (6): 433—437, 1990。
- [2] 陈锦英等: 中华微生物学和免疫学杂志, 9: 269, 1989。
- [3] 莽克强等: 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 科学出版社, 北京, p. 53, 1975。
- [4] Neu, H. C.: Antibiotics in laboratory medicine, ed. V. Lorian, Williams and Wilkins Baltimore London, p. 454, 1980。
- [5] Batshon, B. A.: *J. Immunol.*, 90: 121—126, 1963。
- [6] Dische, Z.: *J. Biol. Chem.*, 167: 189—198, 1947。
- [7] Shek, P. N. et al.: *Immunology*, 45: 349—356, 1981。
- [8] Kirby, C. J. et al.: *Liposome technology*, (ed. G. Gregoriadis), CRC Press Inc, 1: 19, 1984。
- [9] 初连瑞等: 上海免疫学杂志, 4: 164—166, 1984。
- [10] Alving, C. R. et al.: *Vaccine*, 4: 166—173, 1986。
- [11] Fujii, T. et al.: *J. Antimicrob. Chemother.*, 20: 343—348, 1987。
- [12] 杨贵贞等: 医用免疫学, 吉林人民出版社, 长春, p. 322, 1980。
- [13] 骆加里等: 生物化学与生物物理学学报, 16: 650—656, 1984。
- [14] Britz, M. L. et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13: 373—382, 1978。
- [15] Levine, M. M. et al.: *J. Infect. Dis.*, 152: 550—557, 1985。
- [16] Bauernfrind, A.: *Rev. Infect. Dis.*, 8(Suppl 5): S470—481, 1986。
- [17] Lindberg, F. et al.: *Rev. Infect. Dis.*, 8 (Suppl 3): 292—304, 1986。
- [18] Salyers, A. A.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 38: 293—313, 1984。

PURIFICATION AND IMMUNOLOGICAL BEHAVIOR OF β -LACTAMASE FROM *BACTEROIDES FRAGILIS*

Chen Jinying Liu Bingyang

(*Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese
Academy of Preventive Medicine, Beijing*)

Bao Youdi

(*Fujian Medical College, Fuzhou*)

The β -lactamase crude extract of *Bacteroides fragilis* 55 was chromatographed with DEAE-sepharose CL-6B and sephadex G-100. The partial purified enzyme proteins was further purified by cutting the band on PAGE in which the β -lactamase was distinguishable from other proteins by our method of fluorescent staining. Using purified preparations to be mixed with liposome-CPS-K, prepared sp-

ecific antisera against the purified β -lactamase. Serological reactions were carried out by IgG-ELISA together with western blotting. The results revealed that *Bacteroides fragilis* β -lactamase possessed its species-specificity.

Key words

Bacteroides fragilis; β -Lactamase