

工程大肠杆菌K99抗原蛋白的分离纯化及其特性的研究

王 河 伍宁丰 范云六

(中国农业科学院分子生物学研究室, 北京)

本工作采用了快速、简便的方法从大量培养的基因工程菌*E. coli* 1548(pHK99)表面分离和纯化了K99抗原蛋白, 纯化产物在SDS-PAGE上呈现出一条蛋白带, 该蛋白的分子量约为16500, PAS反应结果表明该蛋白为糖蛋白, 等电聚焦证实该蛋白 pI为9.5, 用免疫学方法证实了该蛋白大量存在于细菌表面, 并具有较好的热稳定性, 文中还讨论了该蛋白在不同培养基中的表达。

关键词 K99抗原蛋白; 重组质粒

K99 是致病性大肠杆菌表面的一种纤毛抗原蛋白, 在引起犊牛、仔猪、羔羊急性腹泻中, 该蛋白起着粘附因子 (Adhesion) 的作用, 它使致病性大肠杆菌识别并附着在寄主肠上皮表面, 从而大量繁殖, 分泌毒素, 使幼畜致病。

有关K99蛋白纯化的方法虽有报道, 但这些方法存在着纯度与实验周期、工作量间的矛盾关系^[1-3]。我们已建构了高效表达K99蛋白的基因工程菌*E. coli* 1548

(pHK99)^[4], 本文采用了 K99 蛋白表达高的该菌株做为实验材料, 改良和简化了K99纤毛蛋白纯化方法, 可以在国内一般工作条件下快速、大量地纯化该蛋白。同时, 我们还分析了该蛋白的一些基本特性, 从分子水平证明了K99蛋白基因在不同培养基中表达不同。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

大肠杆菌菌株	来 源	特 性
C83912	中国兽药监察所	标准菌, K99 ⁺
C83913	中国兽药监察所	标准菌, K99 ⁻
1548(pHK99)	本室建构	<i>his</i> ⁻ , <i>ile</i> ⁻ , Ap ^r , K99 ⁺
1548	中国科学院微生物所	<i>his</i> ⁻ , <i>ile</i> ⁻
C600(pHK99)	本室建构	<i>thr</i> ⁻ , <i>leu</i> ⁻ , <i>str</i> ⁻ , Ap ^r , K99 ⁺
C600	Dr. Hobom, G.	<i>thr</i> ⁻ , <i>leu</i> ⁻ , <i>str</i> ⁻
A56R(pHK99)	本室建构	<i>E. coli</i> K12衍生菌, Ap ^r , K99 ⁺
A56R	杨胜利、吴汝平	<i>E. coli</i> K12衍生菌

(二) 细菌培养

将活化的 *E. coli* 1548(pHK99) 菌按浓度为 1—5% 接在含有 20—30 μg/ml 的氨基青霉素的 Minca 培养基^[1] 中, 在振

次为 60 次/min 的 37°C 水浴摇床中培养 6—8 h, 测 A_{600nm} 为 1.2—1.3 时, 离心收

本文为 1986 年 6 月 6 日收到。

集菌体。

(三) 抗原检测

通过常规玻板凝集和免疫扩散检测抗原,检测所用 K99 抗血清是采用 Isaacs-on^[2]方法,并经 K99 标准菌吸附后得到。

(四) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

通过电泳检测蛋白质的纯度和分子量,参照 Lugtenberg 等人的方法^[6],但是样品胶浓度由 10% 加大到 15%,浓缩胶浓度未变。

(五) 离子交换层析柱纯化抗原蛋白

经过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀得到的样品溶于磷酸盐 (0.05M)-尿素 (2M) 缓冲液中,又经过 PBS-Urea 溶液过夜透析后,加样至经 PBS-Urea 平衡过的 DEAE-Sephadex A-50 的层析柱,用 PBS-Urea 洗脱 (3ml/10min),洗脱曲线是通过在 280nm 紫外光下测吸光度值后确定的。

(六) 蛋白质的含量测定

参照 Bradford 的方法^[6],做出 $A_{595\text{nm}}$ 标准曲线后,测定未知样品中的蛋白含量。

(七) 聚丙烯酰胺凝胶中糖蛋白的显色 (PAS 反应)

参照 Cordeiro 的基本步骤^[7],凝胶在 30% 乙酸中固定 30min (14°C),在 3% 乙酸中漂洗多次,然后分别在过碘酸中浸泡 30min,Shiff 试剂中染色 2h,偏重亚硫酸钾分色。

(八) 间接免疫荧光检查^[8]

菌体涂化吹干后,丙酮固定 10min,与鼠抗血清 37°C 温育 30min 后, PBS 清洗,加入荧光标记二级抗体 (北京生物制品所),荧光检查。

(九) 等电点聚焦

参考文献^[9],电极液分别为 0.01M H_3PO_4 和 0.02M NaOH,凝胶在电压为 100V 条件下电泳 2—3h,经 10% TCA 固定,

常规电泳染色。

(十) ELISA 方法测定抗原稳定性

保存一定时间的抗原,经过适当稀释,在微量培养板上包被吸附,并经免疫血清吸附,过氧化物酶联二级抗体吸附,加入邻苯二胺- H_2O_2 显色后,在酶标比色计上读出比色数据。

结 果

(一) K99 蛋白的分离纯化过程

1. K99 蛋白的粗提:在 3000—5000 rpm 下收集已培养好的细菌,菌体沉淀按培养体积的 0.5—1% 悬浮在 PBS-Urea 缓冲液中,置 60°C 水浴保温 20min 后,在 15000rpm 下离心 10min,所得上清即为 K99 抗原蛋白的粗提液。

2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀蛋白质:K99 抗原蛋白的粗提液先经过 30% 饱和度硫酸铵沉淀,去除杂蛋白,再进行 60% 饱和度硫酸铵沉淀,沉淀即是初步提纯的抗原蛋白。

3. 离子交换层析进一步纯化 K99 蛋白:DEAE-Sephadex A-50 柱层析后,得到洗脱曲线,经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫扩散检测,确定第一吸收峰为纯化的 K99 蛋白,并经测定得到此蛋白的含量为 1.2mg/1000ml 菌液。

上述各阶段的样品均经免疫扩散及 PAGE 方法检定,见图版 I-4、I-1。粗提液的蛋白组成除杂蛋白外,主要是 K99 蛋白 [图版 I-1 (2)],免疫扩散呈正反应 [图版 I-4 (2)]。经 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀后,蛋白组成不含 K99 蛋白带 [图版 I-1 (3)],同时免疫扩散呈负反应,无免疫原性 [图版 I-4 (3)],达到了去除杂蛋白的目的。上清再经过 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, K99 蛋白为主要产物 [图版 I-1 (4)],

通过DEAE-Sephadex A-50柱后K99蛋白得到纯化,在SDS-PAGE上呈单一条带〔图版 I-1(5)〕,其免疫扩散呈正反应〔图版 I-4(5)〕表明纯化后产物仍保持免疫原性。

(二) K99蛋白的一些基本特性

SDS-PAGE及 PAGE 梯度胶测定的

K99 蛋白的分子量均为 16500, 略低于 Guinee和Isaacson^[1,2] 的报道。

K99蛋白有十分强的PAS阳性反应,说明了该蛋白的糖蛋白性质。

纯化后的抗原在不同温度下保存20天后,ELISA方法检测K99的抗原性结果,见下表。

表1 K99抗原蛋白在不同温度下保存20天后的抗原性

Table 1 Antigenity of K99 protein in different temperature after 20 days

抗原稀释度 (Antigen dilution)	A ₄₉₅	温度 (°C)			
		37	室温 (10-15°C)	4	-10
1:1600		0.46	1.23	1.19	1.19
对照 control		0.04	0.08	0.01	0.03

从上表可以看出室温、4°C与-10°C条件下的抗原性相近,37°C约降低60%,由此可计算出该蛋白抗原性的半衰期 $T_{1/2}(37°C)$ 约为16天左右,这一较高的热稳定性是与该蛋白的糖蛋白性质相一致的。

间接免疫荧光的观察结果表明,提纯K99蛋白免疫的鼠抗K99抗血清具有较高的特异性,在400—1000倍显微镜下观察,仅在细菌周围显现出明亮的荧光光环,而中间则为反应阴性。

等电聚焦的结果表明,该蛋白的等电点(pI)在9.5左右。

(三) K99蛋白在不同培养基及不同菌株中表达不同

E. coli 1548(pHK99)在LB培养基中比在Minca培养基中生长速度快,但是Minca培养基适宜于K99蛋白的表达^[1,4],我们曾经用抗甘露糖绵羊红细胞凝集试验证明了在Minca培养基中C83913(pNK99)比在LB培养基中的表达强四倍以上^[4]。本工作通过用SDS-PAGE方法比较了在LB

及在Minca培养基中的*E. coli* 1548(pHK99)所产生的K99蛋白带(图版 I-2)。从图中我们清楚地看到了通过两种培养基培养所产生的蛋白组成的异同;在Minca培养基中培养的细菌,其蛋白组成中K99蛋白带为主带〔图版 I-2(1)〕,在LB培养基上培养的细菌这条蛋白带减弱,出现另一个比K99蛋白分子量小的主带〔图版 I-2(2)〕,从而在分子水平上验证了Minca培养基适宜于K99蛋白的表达。

K99蛋白在不同的菌株中的表达也是有差异的,图版1-3示出了K99蛋白在三种菌株中的表达并与标准菌相比较,表明K99蛋白在三种菌株中的表达是: 1548 > C600 > A56R

讨 论

本文提纯K99蛋白的方法较之前人的工作简便、快速,并能保证较高的纯度,它表现在:

1. 不需要经过效率低且操作较繁琐

的匀浆的方法^[2]。

2. 不需要经过长时间的透析与沉淀来纯化该蛋白^[1]。

3. 过柱后的样品在PAGE上经Coomassie blue R250染色显现出单一条带, 但上样量和柱体积的量都应合适, 如果蛋白的总量过高会影响分离效果。

通过采用免疫扩散、SDS-PAGE等方

法, 对肯定本工作起了重要作用。

K99蛋白的糖蛋白性质与热稳定性, 为今后基因工程菌稳定的保存提供了可能性, 在制备过程中条件可更为粗放, 而不需要较严低温条件。

等电点的鉴定进一步确定上述纯化蛋白为K99蛋白, 与Isaacson和Graaf的早期工作结果相吻合^[1,2]。

参 考 文 献

- (1) Guinee, P.A.M. et al., *Infect. Immu.*, 13:1369, 1976.
- (2) Isaacson, R.E., *Infect. Immu.*, 15(1):272, 1977.
- (3) Graaf, F.R. et al., *Infect., Immu.*, 33(3):877, 1980.
- (4) Fan Yunliu et al., *Proceeding of Sino-Japanese Symposium on Biotechnology*, pp. 125—136, 1986.
- (5) Lugterberg, B. et al., *FEBS Letters.*, 58(1):254, 1975.
- (6) Bradford, M.M., *Analytical Biochemistry*, 72:248, 1976.
- (7) Cordeiro, M.N. and Gazzinelli, G., *Exp. Parasitol.*, 48(3):337, 1979.
- (8) 严自助, *中华医学杂志*, 8:470, 1978.
- (9) 华家桢等人编译, *实用蛋白质化学技术*, 上海科学技术出版社, p.337, 1982.
- (10) 北京医学院微生物教研组编, *实验免疫学*, 人民卫生出版社, 1981.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF K99 SURFACE ANTIGEN OF *E. COLI* STRAIN 1548 CONTAINING A RECOMBINANT PLASMID pHK99

Wang He Wu Ningfeng Fan Yunliu

(Laboratory of Molecular Biology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

K99 surface antigen of *E. coli* (pHK99) constructed by in vitro DNA recombinant technology had been purified by a simple and rapid method. The purified protein had a molecular weight of 16500 showed on SDS-PAGE gel. It was determined as a glycoprotein by PAS reaction, with an isoelectric point of approximately 9.5. High specificity of the protein was observed by indirect fluoroimmunoassay. The antigenicity of K99 protein could be detected even after 20 days treatment at 37°C by enzyme linked immunoadsorbent assay. This thermostability could be explained by the nature of K99 glycoprotein. Expression of K99 surface antigen in different strain and in different media

was discussed.

Key words

K99 antigen protein, recombinant plasmid

图 版 说 明

1. 提纯过程中各步产物的聚丙烯酰胺电泳结果

Polyacrylamid gel electrophoresis of proteins from 1548(pHK99)

- (1) 标准蛋白 Standard proteins
- (2) 粗提液 Crude extract
- (3) 30% 硫酸铵沉淀物 30% (NH₄)₂SO₄ precipitate
- (4) 60% 硫酸铵沉淀物 60% (NH₄)₂SO₄ precipitate
- (5) 经过DEAE-葡聚糖凝胶A-50纯化的K99蛋白 K99 protein purified by DEAE-Sephadex A-50

2. K99 蛋白在LB和在Minca培养基中的表达情况

K99 expression of 1548(pHK99) in Minca and LB medium

- (1) 在Minca培养基中 In Minca medium
- (2) 在LB培养基中 In LB medium

3. K99 蛋白在不同受体菌株中的表达情况

K99 expression of pHK99 in various recipients of *E.coli*

- (1) C83912 (2) C83913 (3) 1548(pHK99)
- (4) 1548 (5) C600(pHK99) (6) C600
- (7) A56R(pHK99) (8) A56R

4. 提纯过程中各步产物的免疫扩散结果

Immunodiffusion of proteins from 1548(pHK99)

- (1) 对照 CK(0.85% NaCl)
- (2) 粗提液 Crude extract
- (3) 30% 硫酸铵沉淀物 30% (NH₄)₂SO₄ precipitate
- (4) 60% 硫酸铵沉淀物 60% (NH₄)₂SO₄ precipitate
- (5) 经过DEAE-葡聚糖凝胶A-50纯化的K99蛋白
K99 protein purified by DEAE-Sephadex A-50

Wang He et al.: Purification and characterization of K99 surface antigen of *E. coli* strain 1548 containing a recombinant plasmid pHK99

