

文章编号:2095-0411(2018)02-0087-06

沙门氏菌 ATCC 13311 脂多糖及类脂 A 的提取及纯化

薛丽芝

(上海食品科技学院 食品专业科,上海 201599)

摘要:沙门氏菌 ATCC 13311 作为一种革兰氏阴性菌,是引起人畜肠道传染病的病原体,严重威胁公众健康并影响食品环境安全。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性细菌外膜的特征分量,是用于检测细菌污染的最佳生物标记,而类脂 A 是脂多糖的生物活性部分。提取 LPS 与其类脂 A 是检测致病菌的基础,对沙门氏菌脂多糖及类脂 A 的提取与纯化方法进行了研究,结果表明:沙门氏菌 LPS 产率为 1.13%,其中蛋白含量 0.85%,核酸含量为 1.64%,经 SDS-PAGE 电泳分析得出提取的为脂多糖,并且杂质较少。将类脂 A 质谱结果与文献比较,类脂 A 出峰位置与目前报道的相同,证明提取正确。

关键词:沙门氏菌;脂多糖;类脂 A;提取纯化

中图分类号:R 318.19

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2018.02.012

Extraction and Purification of Lipopolysaccharide and Lipid A from *Salmonella* ATCC 13311

XUE Lizhi

(Food Science Department, Shanghai Food Science and Technology School, Shanghai 201599, China)

Abstract: *Salmonella* ATCC 13311 as a Gram-negative bacteria, which is the pathogen that causes human and animal intestinal infectious diseases, has serious impact on food safety environment and threaten public health. Lipopolysaccharide (LPS) is best for biomarker detection of bacterial contamination, because it is the characteristic component of the outer membrane of gram-negative bacteria, and lipid A is the bioactive fraction of lipopolysaccharide. LPS extract is the basis of the detection. In this paper, the extraction and purification of *Salmonella* lipopolysaccharide and lipid A were studied. The results showed that the yield of LPS was 1.13%, the protein content was 0.85%, the nucleic acid content was 1.64%, SDS-PAGE analysis showed that the extract was lipopolysaccharide and had less impurity. Comparing the results of lipid-mass spectrometry with the literature, the position of lipid A was the same as that reported at present, which proved that the extraction was correct. The results show that the purified *Salmonella* LPS has high purity and little impurity.

Key words: *Salmonella*; lipopolysaccharide; lipid A; extraction and purification

收稿日期:2018-01-09。

作者简介:薛丽芝(1983—),女,硕士生,讲师。E-mail:xuelizhi395@163.com

肉类食品从畜禽的宰杀到烹饪加工的各个环节中,都可能受到沙门氏菌的污染,其中在屠宰前后的沙门氏菌的检出率大概在 20%左右^[1]。即使是烹调后肉类,也是有可能再次受到污染的,会导致人类食物中毒,对公共健康安全构成极大威胁^[2]。由于沙门氏菌是多种肉类食品的污染源,因此沙门氏菌潜藏着巨大的危害,检测该菌尤为重要。大量研究表明该菌致病性与其众多毒力因子密切相关^[3-8]。其中脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌外膜的特征性成分之一,具有高毒性和免疫学活性^[9],检测脂多糖的相关数据意义重大。

脂多糖位于革兰氏阴性菌细胞壁外壁层的最外层,由 3 个部分共价连接组成,由内至外依次为疏水的类脂 A(Lipid A)、核心寡糖(Core oligosaccharide)和亲水的 O-抗原(O-antigen)^[10-11]。其中,前两部分合在一起又被称为 R-核心。由于细菌种类不同,其脂多糖相对分子质量从几千到几十万不等,一般为 1~2.5 万。脂多糖为两性分子,在水溶液中形成缔合体,其相对分子质量可达 50~100 万。研究 LPS 生物活性时热酚水法是 LPS 的提取的经典方法,该方法基于破坏细菌细胞膜及利用苯酚析出蛋白质,通过利用有机溶剂将 LPS 分离,可以用于提取光滑型(S)和粗糙型(R)的 LPS。

类脂 A 是 LPS 3 个组成部分中结构最为稳定的^[12-14],位于脂多糖分子的最内侧,由葡萄糖胺、脂肪酸和磷酸盐组成,是脂多糖的生物活性成分,也是革兰氏阴性菌致病物质内毒素的物质基础^[10]。LPS 的传统检测手段很多,但通过研究类脂 A 评价 LPS 毒性尚处于初始阶段,有待深入研究^[15]。

本文以沙门氏菌脂多糖及类脂 A 的提取与纯化方法为研究对象,采用热酚水法、酶解法与氯仿/甲醇沉淀法^[16-19]对菌体表面 LPS 进行提取与纯化,测算 LPS 产率并检测所得纯化 LPS 样品中蛋白质与核酸含量,评价提取纯度。采用氯仿/甲醇/水混合相萃取法^[20],对 LPS 中类脂 A 进行提取,通过与文献进行比较判断类脂 A 的结构是否存在,从而判定纯化 LPS 样品的毒性和生物活性,为后续提取与检测方法的开发提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 13311 购自 ATCC 菌种保藏中心;LPS 标准品、DNase I、RNase A、蛋白酶 K 购自美国 Sigma 公司。

LB 液体培养基:10g 胰蛋白胨,5g 酵母浸出物,10g NaCl,将上述成分加入蒸馏水中,定容至 1 000 mL,加热溶解,调节 pH 至 7.0 左右,灭菌备用。LB 固体培养基:在每 1 000 mL LB 液体培养基中加入 7.5g 琼脂,调节 pH 至 7.0 左右。灭菌备用。

5×SDS-PAGE 上样缓冲液:量取 1mol/L Tris-HCl(pH6.8)0.6mL,50%甘油 5mL,10%SDS 2mL,1%溴酚蓝 1mL,以去离子水定容至 10mL,充分混匀后备用。浓缩胶(5%):量取 0.75mL 40% Acr/bis,0.75mL 1mol/L Tris-HCl(pH6.8),0.06mL 10%SDS,0.06mL 10%过硫酸铵,0.006mL TEMED,加入适量去离子水配制成 6 mL 浓缩胶,充分混匀后备用。分离胶(15%):量取 3mL 40% Acr/bis,2.08mL 1.5mol/L Tris-HCl(pH8.8),0.08mL 10%SDS,0.08mL 10%过硫酸铵,0.003 2mL TEMED,加入适量去离子水配制成 8mL 浓缩胶,充分混匀后备用。

银染氧化液:称取 0.7g 高碘酸溶于 60mL 去离子水中,再加入 30mL 乙醇,10mL 乙酸,充分混匀备用。银染染色液:将 0.2mL 浓氨水,2.8mL 0.1mol/L NaOH,0.5mL 20% 硝酸银,23mL 去离子水倒入试剂瓶中并充分混匀备用。银染显色液:将 0.1mL 柠檬酸,0.2mL 乙酸充分混匀并以去离子水定容至 20mL 备用。

1.1.2 主要仪器设备

SW-CJ-1F 型单人双面净化工作台 (苏州净化设备有限公司);SX-500 型高压蒸汽灭菌锅 (日本 TOMMY 公司);Sorvall ST 16R 台式高速冷冻离心机 (美国 Thermo Fisher 公司);Alpha 1-2LD Plus 冷冻干燥机 (德国 Martin Christ 公司);二氧化碳恒温培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司);Bio-Photometer plus 核酸蛋白测定仪 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 菌体培养

方法参考文献[21]进行。将冻存的沙门氏菌菌株置室温解冻,划线于 LB 琼脂培养基,培养箱培养,挑取单菌落接入 LB 培养基摇床培养,收集菌体,沉淀依次用生理盐水与无菌蒸馏水洗涤 1 次后,收集沉淀称重,用 3 倍质量无菌蒸馏水重悬,得到菌悬液。

1.2.2 LPS 粗提取

参照文献[16]的方法进行。菌悬液反复冻融 5 次后,与等体积 90% 苯酚混合,68℃ 恒温水浴振荡 1h,冰浴至 4℃,4 000 r/min 冷冻离心 20min。收集上清,下层酚相加等体积无菌蒸馏水重复洗涤 1 次,合并 2 次上清于透析袋中,蒸馏水透析至 FeCl_3 检测无酚试剂反应出现。透析所得溶液经真空冷冻干燥处理 24h,即制得 LPS 粗样。

1.2.3 LPS 的纯化

参照文献[17-19]的方法并加以改良。10mL Tris/HCl(100mmol/L,pH 8.0)溶解 LPS 粗样,加终质量浓度 20mg/mL DNase I 与 10mg/mL RNase A,37℃ 酶解 2h 后,终质量浓度 20mg/mL 蛋白酶 K,57℃ 处理 1h,趁热加入 5mL 水饱和苯酚,混匀后 4 000 r/min 离心 30min,吸取上清于透析袋中,蒸馏水透析 48h 后溶液真空冷冻干燥 24h。冻干产物置于 $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=2:1$ 混合液中充分混匀,12 000 r/min 离心 20min,弃上清并晾干沉淀。10mL 蒸馏水溶解沉淀后真空冷冻干燥 24h,即得到纯化 LPS 样品,于 -20℃ 保存备用。

1.2.4 LPS 中物质的测定

1) 蛋白质含量测定

5mL 蒸馏水溶解纯化 LPS 样品,用 BioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪检测样品中蛋白质含量,检测波长为 280nm,读数稳定后读取结果,重复 3 次。

2) 核酸含量测定

5mL 蒸馏水溶解纯化 LPS 样品,用 BioPhotometer plus 核酸蛋白测定仪检测样品中核酸含量,检测波长为 260nm,读数稳定后读取结果,重复 3 次。

1.2.5 LPS 纯度分析

采用 SDS-PAGE 法,取 10 μ L LPS 溶液(1mg/mL),加入 2.5 μ L 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液,水浴煮沸 10min 备用。按照浓缩胶 5%,分离胶 15% 制备胶块,上样进行 SDS-PAGE(浓缩胶 10mA,分离胶 20mA)。电泳结束后,将经过电泳的胶块转移至银染氧化液中,室温处理 20min,蒸馏水清洗胶块 3~4 次后,置于银染染色液中,室温处理 10min,再用蒸馏水清洗胶块 3~4 次后,放入银染显色液中,待显色完成后,水洗使显色终止。拍照并保存数据。

1.2.6 类脂 A 的提取

类脂 A 的提取采用氯仿/甲醇/水混合相萃取法,8 000 r/min 离心 10min 收集菌体。9mL 12.5mmol/L 醋酸钠溶液溶解纯化 LPS 样品,超声震荡 10min 后 100℃ 水浴 30min 裂解糖链。冷至室温后,再加入 20mL $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=1:1$ 混合液,2 000 r/min 离心 10min,取下相进行旋转蒸发,去

除有机溶剂。加入 2 mL $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=4:1$ 混合液复溶类脂 A, 保存于 -20°C 备用。

1.2.7 类脂 A 结构的 ESI/MS 分析

将提取出的类脂 A 溶于 $V(\text{氯仿}):V(\text{甲醇})=4:1$ 混合液中, 在 WATERS SYNAPT Q-TOF Mass Spectrometer 质谱仪上进行质谱检测。采用 ESI 离子源, 阴离子检测模式, 检测范围小于 m/z 2 500。使用 MassLynx V4.1 software 软件获取和分析数据^[22]。

1.2.8 数据处理

所有数据以均数 \pm 标准差表示。各实验组数据的统计学处理采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。统计分析采用 SPSS 19.0 软件。

2 结果与分析

2.1 菌体收集

1.2 L 菌液摇晃培养后, 600 nm 处吸光度达到 1.062 A, 菌液浓度达到需求, 将菌液分装至离心管分 4 批次离心, 统计湿菌体质量, 如表 1 所示。

表 1 中数据统计显示, 收集到的总湿菌体质量为: $0.93+0.86+0.8+0.79=3.38\text{g}$, 培养得到了大量沙门氏菌菌体, 可以满足 LPS 提取所需。

表 1 湿菌体收集

批次	1	2	3	4
离心管质量/g	14.24	12.57	14.09	12.95
离心后质量/g	15.17	13.43	14.89	13.74
湿菌体质量/g	0.93	0.86	0.80	0.79

2.2 LPS 提取与纯化结果

测定并计算出 LPS 产率、蛋白质及核酸含量, 见表 2。

表 2 LPS 提取物产率及成分测定

LPS 产率/%	$\rho(\text{蛋白})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho(\text{核酸})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
1.13	64.94 ± 5.36	115.26 ± 7.63

提取纯化后得到 LPS 共 38.2 mg, LPS 平均产率为 1.13%。其中测得的蛋白质量浓度约为 64.94mg/L , 核酸质量浓度约为 115.26mg/L , 计算得出纯化后 LPS 中蛋白质占 0.85%, 核酸占 1.64%, 提取纯度较高。

2.3 LPS 纯度

脂多糖由核心多糖、O-抗原和类脂 A 组成, 通过 SDS-PAGE 对纯化后的沙门氏菌脂多糖进行结构分析。图 1 结果表明纯化 LPS 样品为典型的阶梯状电泳条带, 银染效果很好。脂多糖的核心多糖和类脂 A 聚集在最下方, O 抗原集中在中间。纯化 LPS 样品与标准品比较, 主要条带清晰, 位置相同。总体看来, 提取的脂多糖杂质很少, 纯度较高, 生物活性良好。

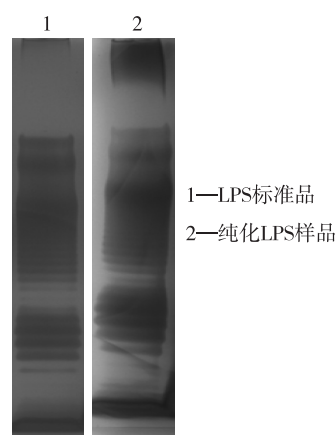


图 1 纯化后的 HPLC SDS-PAGE 电泳图

2.4 类脂 A 的 ESI/MS 色谱结果及分析

通过查阅资料, 类脂 A 的 3 个特征峰的横坐标位置分别为 1 362, 1 570, 1 797^[22]。由图 2 可知, 类脂 A 样品中的杂峰较多, 以至于类脂 A 结构的 3 个特征峰相对峰度较低, 说明类脂 A 提取纯度不高, 提取方法有待进一步改进。从图 2 结果可以判定, 从纯化 LPS 样品中提取得到了类脂 A, 证明纯化 LPS

样品具有毒性及生物学活性。

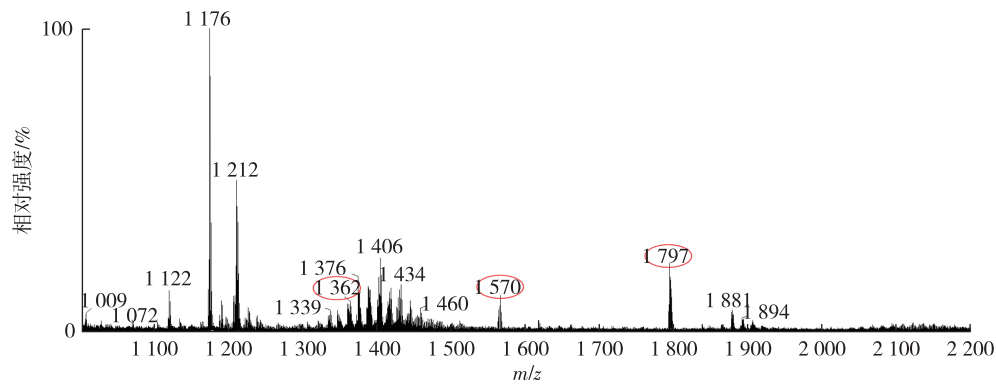


图 2 类脂 A 的 ESI/MS 分析

3 结 论

不同的 LPS 的提取、纯化方法对 LPS 的产率、纯度、生物活性有很大的影响。将本研究方法及相关文献中宋宏新及刘红亮等人的试验方法进行了比较,见表 3。

表 3 数种文献中 LPS 提取方法比较

来源	提取方法	提取结果	活性检测方法	优缺点
宋宏新等 ^[16]	热酚水法提取,浓缩酶解	LPS 产率为 0.5%	鲎试剂检测凝集活性	LPS 具有活性但产率较低,酶解后蛋白质含量增加
刘红亮等 ^[17]	热酚水法,同时收集水相和酚相 LPS	LPS 总产率 1.025%,蛋白含量 1.8%	酸解法制备 O-特异性多糖(O-SP),建立间接 ELISA 法检测	LPS 产率提高,但核酸含量也较高
本研究	热酚水法提取、酶解法与氯仿/甲醇沉淀法纯化	LPS 平均产率 1.13%,LPS 中蛋白质占 0.85%,核酸占 1.64%	提取类脂 A,利用 ESI/MS 进行检测	LPS 纯度较高,杂质很少,具有较好的生物活性

本研究改良的酚水法提取物脂多糖,利用酚使样品中蛋白质变性沉淀去除,随后加入了 DNase I、RNase A 与蛋白酶 K 消化样品中核酸及蛋白质残留,最终氯仿/甲醇沉淀 LPS 提高样品纯度,为下一步 LPS 毒性及生物活性检测减少干扰。结果表明,提取 LPS 产率为 1.13%,与宋宏新等^[16]与刘红亮等^[17]结果比较产率相近,证明对酚相的多次抽提可减少 LPS 流失。纯化后 LPS 中蛋白质含量为 0.85%,比刘红亮等^[17]试验提取的 LPS 蛋白质含量低,表明蛋白酶 K 消化以及氯仿/甲醇沉淀 LPS,可降低蛋白含量并去除酶解法中 DNase I、RNase A 残留。但纯化 LPS 样品中仍有 1.64% 的核酸残留,如何减少核酸残留有待进一步研究。

而后通过氯仿/甲醇/水混合相萃取法提取纯化 LPS 样品中的类脂 A,并利用 ESI/MS 分析提取物的结构,与文献对比分析表明提取物中检测到了类脂 A 的结构。这证明了本实验方法提取、纯化得到的 LPS 样品具有一定的毒性与生物活性,这一结果为后续提取与检测方法的开发提供技术支持。而提取类脂 A 的方法常遇到下面 3 个问题:①如果水解条件不完全,则类脂 A 不能完全从 LPS 分子中裂解出来,可影响类脂 A 的产率;②如果水解条件过分激烈,则类脂 A 分子可发生部分降解;③光滑型 LPS 所衍生的类脂 A 属低度脂酰化的分子,其水溶性相当高,故而采用目前常用的类脂 A 纯化技术制备高纯度类脂 A 极其困难,提取方法有待改进。

参考文献:

- [1]张玮,魏建忠,詹松鹤,等.规模猪场健康猪沙门氏菌带菌情况调查[J].中国人兽共患病学报,2010,26(9):888-890.
- [2]徐伯亥,殷战.淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究[J].水生生物学报,1993,17(3):259-266.
- [3]HEWIARACHCHI D C, GRAIN C, CHEONG C H. Some characteristics of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio* species isolated from bacterial disease outbreaks in ornamental fish culture in Sri Lanka[J]. Journal of the National Science Council of Sri Lanka, 1994, 22(3):117-125.
- [4]LINDBENG A A, KAMELL A. The lipopolysaccharide of *Shigella* bacteria as a virulence factor[J]. Rev Infect Dis, 1991, 13(4):279-284.
- [5]邱德全,何建国,钟英长,等.嗜水气单胞菌的致病性和免疫性研究[J].逻辑学研究,1996(s1):98-108.
- [6]RASMUSSEN-IVEY C R, FIGUERAS M J, DONALD M G, et al. Virulence Factors of *aeromonas hydrophila*: in the wake of reclassification[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 1337(7):1-10.
- [7]LI M, CHEN L, QIN J G, et al. Growth, immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* of darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli* fed diets with different linolenic acids, vitamins C and E levels[J]. Aquaculture Nutrition, 2016, 22(3):664-674.
- [8]朱大玲,李爱华,钱冬,等.嗜水气单胞菌毒力基因的研究进展[J].水生生物学报,2004,28(1):80-84.
- [9]郭闯,王永坤.嗜水气单胞菌研究进展[J].水产科学,2003,22(6):48-51.
- [10]CAROFF M, KARIBIAN D, CAVAILLON J M, et al. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides[J]. Microbes & Infection, 2002, 4(9):915-926.
- [11]GRONOW S, BRADE H. Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive? [J]. Journal of Endotoxin Research, 2001, 7(7):3-23.
- [12]TORNBERG E. Engineering processes in meat products and how they influence their biophysical properties[J]. Meat Science, 2013, 95(4):871-878.
- [13]ERRIDGE C, BENNETT-GUERRERO E, POXTON I R. Structure and function of lipopolysaccharides [J]. Microbes & Infection, 2002, 4(8):837-851.
- [14]CAROFF M, KARIBIAN D, CAVAILLON J M, et al. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides[J]. Microbes & Infection, 2002, 4(9):915-926.
- [15]ANGUS D C, LINDE-ZWIRBLE W T, LIDICKER J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care[J]. Critical Care Medicine, 2001, 29(7):1303-1310.
- [16]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.
- [17]刘红亮,陈学忠,李克生,等.肠出血性大肠杆菌 O157:H7 脂多糖抗原的提取鉴定及间接 ELISA 法的建立[J].中国人兽共患病学报,2011,27(7):637-640.
- [18]TIRSOAGA A, NOVIKOV A, ADIB-CONQUY M, et al. Simple method for repurification of endotoxins for biological use[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(6):1803~1808.
- [19]JR D M, GOLDBERG J B. Purification and visualization of lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria by hot aqueous-phenol extraction[J]. Journal of Visualized Experiments Jove, 2012, 63(63):3916.
- [20]JIAO B, YU W, ZHOU B. R-fraction as a Biological Principle in the Natural *S. abortus equi* Endotoxin Preparation [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 1991(2):101-103.
- [21]华南农学院. 畜牧微生物学[M]. 北京:农业出版社,1980.
- [22]纪标,谭立.伤寒沙门氏菌的裂解气相色谱分析[J].微生物学通报,1992,19(6):344-348.

(责任编辑:殷丽莉)