

· 药用微生物学 ·

细菌内毒素(脂多糖)提取及其纯化技术

第二军医大学微生物学教研室

周炳荣综述 焦炳华审核

内毒素系革兰氏阴性菌细胞壁外膜中的脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)成分。在维持外膜的结构、通透性以及临床阴性菌感染中均起着重要的作用。以化学方法提取的LPS注射动物能重复革兰氏阴性菌感染期间所出现的多种病理反应,故实验动物应用提取的LPS可更好地了解LPS的致病作用并寻找可能的防治对策。

本文结合我们的实际工作,就LPS的提取纯化方法及其主要特点简要综述。

一、LPS的提取**(一) 三氯醋酸法(Trichloroacetic Acid, TCA)**

TCA法是Boivin等(1933)首先应用的,借助0.25N TCA,在4℃可将LPS从湿菌或经丙酮干燥的细菌中提取出来,加入2倍体积的冷乙醇即可取得LPS的沉淀物。用这种方法提取的产物,严格地讲是一种LPS-蛋白质复合物,这种复合物即为早期所称的Boivin抗原。TCA法提取的LPS产量较高,具有很好的抗原性,对O特异性侧链抗体有血清学特异反应,可结合补体和致敏红细胞,分子量达几百万,但蛋白质含量很高,故纯度较差。目前这一方法已较少使用。

(二) 酚水法

这一方法是Westphal等于1952年提出的,该法是目前应用最广泛的方法。酚水法主要用于S型细菌LPS的提取,亦可用于R突变型细菌LPS的提取,但产量稍低。

酚水法提取液所含的苯酚与水的比例是45:55。当提取液加热至68℃并维持5分钟时,苯酚和水形成了一个单一的相,冷却至4℃后,形成了两个相,分别为苯酚相(被

水饱和)和水相(被苯酚饱和)。核酸、多糖及LPS大部分溶解于水相中,而大部分蛋白质溶解于苯酚相中,不溶性物质沉淀在两相交界处。

含LPS的水相经吸取、透析(去除苯酚)并干燥后即为LPS的粗制品。LPS粗制品经超离心1 000 000×g,可得到精制的LPS。精制后的LPS,尚含有多糖成分及其共价结合的类脂体A成分、小量的肽(1~3%)。这种提取物对人、兔的抗原较弱,但能展示O特异性侧链抗原反应。内毒素毒性较强,致敏红细胞不明显,能结合补体,分子量有几百万。产量仅1~4%(占干菌重)。

(三) 苯酚/氯仿/石油醚法(PCP)

LPS分子镶嵌于胞壁的外膜中,用某些化学试剂将胞壁裂解(如酚)后,LPS分子从破溃的胞壁中游离出来。由于LPS是一种两性分子,故它们在不同溶剂中的溶解度,完全取决于该分子上的亲水/疏水性基团的多少。S-LPS有完整的亲水性O特异性侧链,所以S型LPS属亲水性分子。而R型LPS,缺乏O特异性侧链,含有完整或不完整的核心多糖和完整的类脂A,亲水度不大,而易溶于有机溶剂中,故而R-LPS用酚水法提取时所得的产量极低。

PCP法是以90%苯酚、氯仿及石油醚(40~60℃)以2:5:8所组成的单相混合提取液,这一提取方法只能将LPS及与之紧密结合的透道蛋白(Porin)提取出来,而其它成份则排除在提取液外。PCP法的水沉淀步骤仅能使LPS发生沉淀,而透道蛋白仍溶于苯酚中,故而PCP法所提取的LPS是一种较为纯化的制剂。

PCP法对制取R型细胞的LPS不仅产量也十分满意,且无核酸污染,蛋白质含量也仅在0.1~1%间,该法温和,在室温5~20℃即可完成,制取周期较短,适用于从R₁至R₂的细菌,可成功地提取R-LPS,产量也相当高。故PCP法是研究R-LPS的有用方法。应必须注意的是在PCP法中,每一步操作均不应使用盐类,如MgCl₂、CaCl₂,否则会严重影响产量。

(四) 高压超声处理法

以某些物理方法(如超声波)处理菌体细胞,使其完全破裂,可增加继后提取方法的完全性,从而可使LPS的产率增加。Richard 1983研制了一种既可提取光滑型又可提取粗糙型LPS的新方法。该方法采用了高压处理(15 000lb/in²)细菌的方法,粉碎菌细胞,继又用超声波处理,促进碎片完全裂解,再以DNase, RNase处理,消化核酸。再加入蛋白酶去消化蛋白质,离心12 000xg,浓缩干燥。如此制得的LPS,产量为菌体的51~81%(按测脂肪酸、庚糖和KDO值),蛋白质为0.1%、核酸1%、脂类2~5%,纯度较高,产量比酚水法高7倍,比PCP法高2倍。所得LPS经各种免疫化学分析,均提示用此方法提取的LPS其抗原结构完整。其不足之处是碱性条件下的加热,以前认为这一处理在于除掉蛋白质,特别是对于有些细菌(如绿脓杆菌)有用,但对别的细菌恐属多余。应当指出的一点是,碱性加热条件使类脂体A上的脂肪酸酯降解。另外一个不足之处是,此方法较为复杂,不易被一般实验室采用。

(五) DMSO法

Adams介绍了一种较为简单的LPS提取方法。该法应用二甲亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)作为主要提取试剂,以胞壁原料提制LPS。主要步骤为将预先制取的干燥胞壁以60℃DMSO提取水洗,酸化丙酮处理,冷冻干燥。DMSO法提取的LPS

产量是酚水法的10倍,但蛋白质含量很高(45%)。

二、LPS的纯化

以上方法所提取的LPS或多或少受到蛋白质、核酸及多糖的污染,故需作一定的纯化。LPS的纯化方法目前最常用的为超速离心(4万转×4小时,共三次),在这一条件下,LPS可沉淀下去,而蛋白质、核酸及多糖则保留在上清液中,去除上清液即可得到较为纯化的LPS。

但是这一方法需时较长,且质量过关的超速离心机在国内亦不十分普及,故而难以推广应用。我们在实际工作中体会到,用任何方法提取的LPS,可再以PCP纯化一次(140ml/g LPS),然后只需一次超离,即可取得高度纯化的LPS。

提取的LPS除可被蛋白质、核酸及多糖污染外,还可被一些小分子物质,如多胺、阳离子(Ca⁺⁺、Mg⁺⁺、K⁺等)的污染。通过电透析可将这类小分子物质除去。此时形成的LPS为酸性LPS(由LPS中类脂A上的磷酸基团形成的)。应用碱中和LPS,可变成LPS的盐。如用NaOH中和则可变成LPS钠盐,而应用三乙基乙胺则可变成LPS三乙胺盐,后者极易溶解于水,已广泛地应用于生物学研究。

综上所述,LPS提取方法较多,应当根据菌种和实验条件而选用合适方法。PCP法对R型菌尤显长处;高压超声法虽可用于S或R菌,但方法步骤繁杂;DMSO法与TCA法已很少用到;而酚水法无论产量,纯度及物理性质均较满意的,不失为一个实用的方法。LPS纯化目前一般采用PCP法及一次超速离心,应用该法可使LPS污染物包括蛋白质、核酸及多糖除去,而应用片透析方法,则可除去LPS中的小分子物质如多胺、二价阳离子,从而可得LPS转化成实验需要的盐类。

(参考文献14篇略)