

· 论 著 ·

葡萄球菌肠毒素 C 的纯化与标准参考品的制备研究

鲍行豪¹, 阮必武¹, 许继平², 方国芳²

【摘要】 目的 探讨检测金葡素注射液中的主要有效成分葡萄球菌肠毒素 C(SEC) 的方法。方法与结果 对 SEC 的纯化及标准参考品的制备进行了研究: 使用胰酪胨综合培养基, 以摇瓶培养方式培养 36 ~40h, 可使除菌滤液中 SEC 达到较高量 (33840ng/ml) ; 用 POST - FLO - II 型流动循环超滤泵, 以 10000dalton 超滤膜超滤截留浓缩。使 SEC 原液浓缩约 10 倍 (336800ng/ml) ; 再通过 DEAE - 纤维素柱层析使 SEC 纯度达到 46.1%。最后通过 SephadexG - 75 分子筛过柱使 SEC 纯度达到 96.1%。经 SDS - PAGE 凝胶电泳上呈单一条带。经与标准分子量蛋白的条带比较, SEC 的分子量约在 28000dalton 左右。经 ELISA 双抗体夹心法检测, 纯化 SEC 的含量达 349720ng/ml。按此含量以 1% BSA 和 0.1% NaN₃ 稀释纯化 SEC 500 倍, 加 1ml 于 2ml 安瓿中作冻干, 随机抽取 15 支冻干制品, 经 3 次检测, 标准参考品实际含量为: 700ng/支。经统计学处理 CV 在 1104% 到 4.34%。结论 表明所制备的标准参考品是相当准确的。

【关键词】 葡萄球菌肠毒素 C; 纯化; 标准参考品

【中图分类号】 TQ46016 【文献标识码】 A 【文章编号】

Studies of purification and the preparation of standard reference substance for staphylococcal enterotoxin C

BAO Xing - hao, RUAN Bi - wu, XU Ji - ping, et al. Zhejiang Yaojiang Biotechnical Research Institute. HangZhou, 310035, China

【Abstract】 Objective In order to detected staphylococcal enterotoxin C (SEC) , For the major effective compo2 nent in the of staphylococcin injectional liquid. We studies for SEC purification and preparation of standard refer2 ence substance. The concentration of the SEC in the degermed filtration can increase to 33840mg/ml after cultiva2 ting 36 ~40 hours in shake flask with pancreas casitone integratal medium, the original solution of the SEC is con2 centrated about to 10 times(336800ng/ml) with 10000 dalton ultrafiltration membrane and POST - FLO - II fluid cycling ultrafiltration pump; Then making the purity of SEC 46.1% through the DEAE - cellulose column chroma2 tography. finally the purity of SEC reach 96.1% through the SephadexG - 75 molecular sieve. It shows one band on the SDS - PAGE . Molecular weight of the SEC is about 28000 dalton in contrast with the standard molecular weight. Detected with double antibody sandwich method, the content of the purified SEC is 349720ng/ml, accord2 ing to which the SEC is diluted to 500 times with 1% BSA and 0.1% NaN₃, then add 1ml to 2ml ampul which made for freeze drying, select 15 samples of freeze drying preparation and detect 3 times, the actually content of the standard reference is 700ng/ramus. CV is between 1.04% and 4.34% dealed with statistics. It is showed that the standard reference aquired is considerably precise.

【Key words】 staphylococcal enterotoxin C; purification; standard reference substance

为了检测金葡素注射液中有效成分葡萄球菌肠毒素 C(SEC) , 笔者对提纯 SEC 方法与参考品制备进行了较为系统的研究。经多次试验, 认为按四部法提取 SEC 能获得较好效果, 并对 SEC 的某些生物学特性作了探索及参考品进行的制备与标定, 现将研究结果报道如下。

1 材料、仪器与试剂

111 菌株 系引自北京中国人民解放军 62035 部队的金黄色葡萄球菌 FRI₃₆₁ 国际标准产肠毒素 C 菌株。

112 培养基 (1) 猪心胨汤: 系原生产“金葡液”用培养基^[1]。(2) 酶解猪心汤: 酶解猪心粉购自三门峡百特生化有限公司。其培养基配制以 2% 酶解猪心粉代替猪心浸汁, 其他与(1) 相同。(3) 胰酪胨培

作者单位: 1 310053 浙江杭州, 浙江省耀江生物技术研究所
2 310053 浙江杭州, 浙江省耀江药业有限公司

培养基按^[2]方法制备,并略加改良。(4)复壮培养基:采用 HSA - Mucin - Broth,系自行设计和配制。

113 试剂 DEAE - 纤维素,系 whatman 产品。上海化学试剂公司分装。粒子直径为 40 ~100 目。Sephadex G - 75,系 pharmacia 产品。上海化学试剂公司分装。粒子直径为 40 ~120 目。

114 仪器 (1)检测葡萄球菌肠毒素 C 酶标试剂盒:系第四军医大学西安国际抗体研发中心与我们协作开发的双抗体夹心酶标试剂盒。(2)空气恒温摇床:Kyc 型,上海福马试验设备公司产品。(3)超滤泵:系自中科院上海原子核研究所装配的杯式 POST - FLO - TM - II 型流动循环超滤泵;并附 10000 和 50000dalton 超滤膜各两盒。(4)层析柱:JH,上海锦华试验器械厂。共 2 种:4.1×42cm 和 2.6×42cm。(5)高速离心机:GL - 21M 高速冷冻离心机。上海离心机械研究所。(6)层析仪:LKB 4900A 再循环层析仪。LKB 公司产品。(7)SDS - PAGE 板式垂直电泳槽,北京六一仪器厂出品。(8)BSZ - 100 型自动部分收集器、LM17 - 1A 型自动记录仪、HD21C - A 型紫外检测仪,均为上海康华生化仪器制造厂产品。(9)酶标检测仪:DHM - 9602 酶标分析仪,北京普朗新技术有限公司产品。(10)冷冻干燥仪:上海浦东冷冻干燥设备有限公司产品。

2 方法与结果

211 培养基及培养条件的优选 笔者比较了猪心肠汤(原生产“金葡液注射液”用培养基)、酶解猪心汤和胰酪胨综合培养基^[2],接种复壮后种子液,以静置与摇瓶(156r/min)二种方式做 36 ~40h 培养,取出以高速离心法除去菌细胞,再用 0.45 μm 微孔滤膜过滤除去残存菌,取其无菌滤液用酶联免疫吸附试验(ELISA)测 SEC 含量。结果证明:胰酪胨综合培养基以摇瓶培养金黄色葡萄球菌,其产生 SEC 最高(33840ng/ml)。因此,笔者在作 SEC 提纯与参考品标定时就决定采用胰酪胨综合培养基及摇瓶培养方式来制备肠毒素原液。

212 用分子截留方法浓缩肠毒素原液 采用中科

院上海原子核研究所装配的 POST - FLO - TM - II 型流动循环超滤泵,以 10000dalton 超滤膜对肠毒素原液进行截留浓缩,除去原液中水份及 10000dalton 以下的小分子物质,使原液浓缩达 10 倍,离心除沉淀,取其上清,经透析作为纯化 SEC 的原液(336800ng/ml)。

213 用 DEAE - 纤维素柱层析做第一步提取^[3] 一般要求 DEAE - 纤维素 40 ~100 目,临用前过筛,再以蒸馏水漂洗,去除细微粒子。用 1% NaOH 和 1% HCl 交替处理后直至洗涤液呈中性。再用 0.101mol/L pH5.4 PB 冲洗平衡,装柱。柱大小为 411cm×42cm。装柱时切忌气泡进入,装好柱后用同一 PB 缓慢洗涤使整个柱内达到平衡,然后上样。即将上一步浓缩透析过的 SEC 原液缓慢加入使全部入柱后。先用 pH5.0 0.01mol/L PB 洗涤,使有色液体流尽。其后做分管收集,每 10min 收集一管,其量为 7.5ml,对收集液逐管在 OD₂₈₀ nm 紫外分光自动检测仪测蛋白峰出现管数。其后相继换用 pH 6.16、0.06mol/L PB 和 pH6.8, 0.2mol/L PB 分步洗脱,流速仍为 45ml/h,每管仍用 OD₂₈₀ nm 紫外分光自动检测仪测洗脱液蛋白吸收峰。并对各峰洗脱液合并,再用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测是否有 SEC 存在,合并蛋白峰。收集结果证明 SEC 在第 II 峰,结果见图 1,并对 II 峰用 PEG 浓缩至一定量,提供下一步纯化。

214 用 Sephadex G - 75 分子筛层析柱进一步纯化 对收集经 DEAE - 纤维素层析分离的第 II 峰洗脱液合并,用 PEG 浓缩,将浓缩液置透析袋中,用 0.101mol/L pH7.4 PB 透析平衡后,将第一步浓缩透析液再通过事先准备好的 Sephadex G - 75 分子筛柱(2.6×42cm)过柱。上样后用 0.01mol/L pH7.4 PB 洗脱,洗脱液出现一个蛋白峰,用 ELISA 检测毒素即在此峰,收集 I 峰混合,浓缩。结果见图 2。

对截留后浓缩液及通过 DEAE 纤维素柱层析与 Sephadex G - 75 分子筛过柱后各项内容的变化情况见表 1。

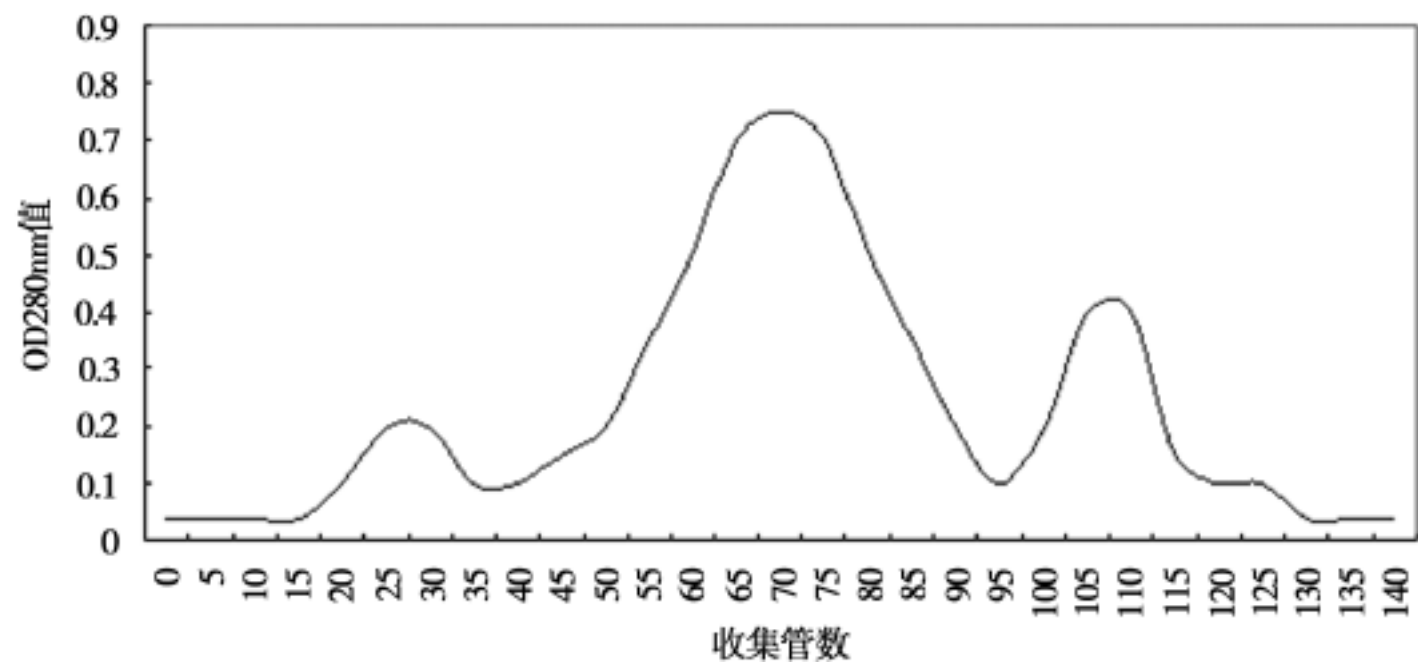


图 1 用 DEAE - 纤维素层析结果

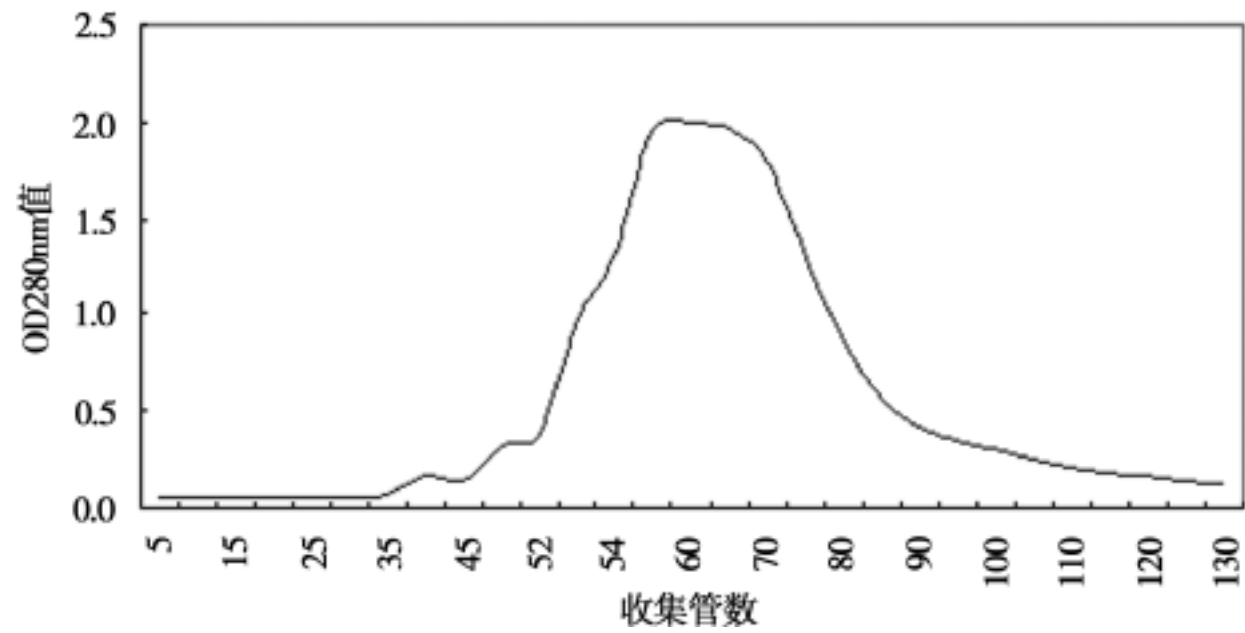


图 2 用 Sephadex G - 75 分子筛结果

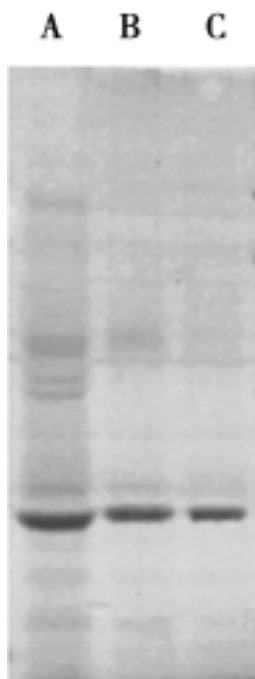
表 1 SEC 的提纯及回收率

	总体积 (ml)	蛋白含量 (mg/ml)	总蛋白 (mg)	ELISA (mg/ml)	总毒素量 (mg)	回收率 (%)	纯度 (%)
粗毒素溶液	2000	8.2	16400	0.034	68		
截留浓缩液	200	82	16400	0.34	68		
DEAE - CM - CII 峰	77	5.1	392.7	0.46	35.4	52.1	46.1
分子筛(G - 75) I 峰	27.2	1.08	29.4	0.96	26.1	73.7	96.1

从表 1 可见, 通过 DEAE - 纤维素柱层析后, SEC 回收率为 52. 1% 而纯度为 46. 1%, 再通过 Sephadex G - 75 分子筛过柱后回收率达 73. 7%, 而纯度则达 96. 1%。

215 纯化前后 SEC 的 SDS - PAGE 鉴定 对分子

截留浓缩的截留原液, 经 DEAE - 纤维素层析柱初步提取蛋白透析浓缩液再经 Sephadex G - 75 分子筛纯化后浓缩液, 在同一块 10% 的 SDS - PAGE 凝胶板上, 分别滴样进行电泳后染色观察, 结果见图 3。



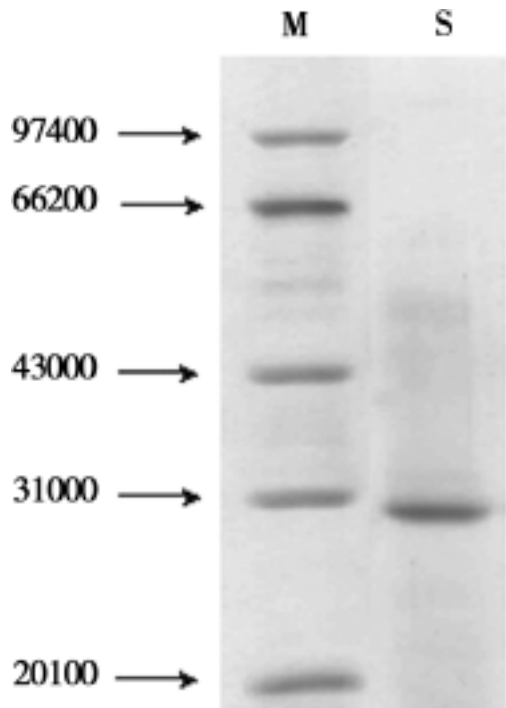
(A: 浓缩液 B: 经 DEAE 柱
C: 经 Sephadex G - 75 柱)

图 3 SEC 各部样品的电泳图谱

从图 3 可见, 经 DEAE - 纤维素柱层析后, 杂蛋白带显著减少, 而再经 Sephadex G - 75 分子筛提纯后, 在 SDS - PAGE 中呈现一条清晰的条带。

216 纯化后的 SEC 分子量测定 对纯化后的 SEC 制品与已知分子量标准蛋白质在同一块 10% SDS - PAGE 凝胶板进行电泳后做染色检定, 结果见图 4、图 5。

图 4、图 5 中可见纯化 SEC 在 PAGE 中呈现单一条带, 通过与标准蛋白分子量比较计算, SEC 的分子量约在 28000dalton 左右。



(M: standard protein S: sample)

图 4 SDS - PAGE 测定肠毒素 C 分子量

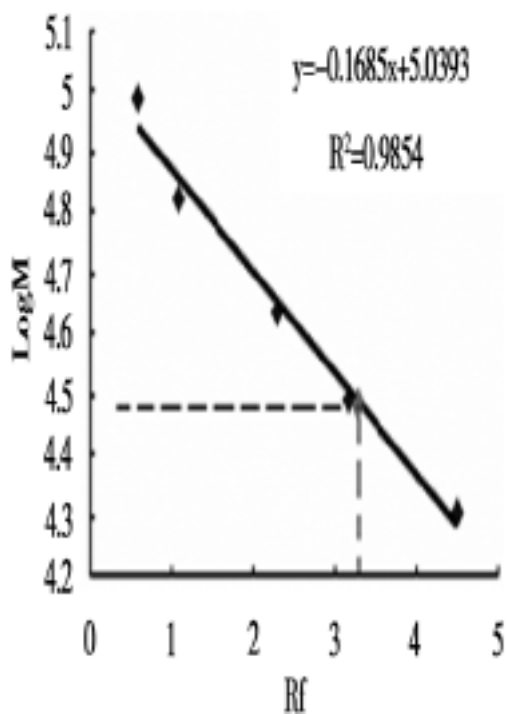


图 5 SEC 分子量测定结果

217 对 SEC 纯化品的 N 末端氨基酸测定 由我公司提供纯化 SEC, 请上海基康生物技术有限公司, 用 PROCISE^(R) cLC 蛋白测序系统(Applied Biosystems) 检测 N 末端 10 个氨基酸, 结果这 10 个氨基酸依次为“ Glu Ser Gln Pro Asp Pro Thr Pro Asp Glu ”。

218 检测用 SEC 参考品的制备、标定及其稳定性试验

21811 纯化后样品的 SEC 实际含量测定 使用第四军医大学西安国际抗体研究开发中心与我们协作研制的 ELISA 检测 SEC 的试剂盒, 并参照金葡素注射液制造及检定规程中标准品不同含量进行稀释 (用含 0. 1% BSA 和 0. 05% 吐温 - 20 PBS) 做 ELISA 检测的同一块试验板上, 对自行纯化的 SEC 做适当稀释后再按蛋白浓度作倍倍稀释, 并行 ELISA 检测, 不同含量标准品检测曲线图结果见图 6。

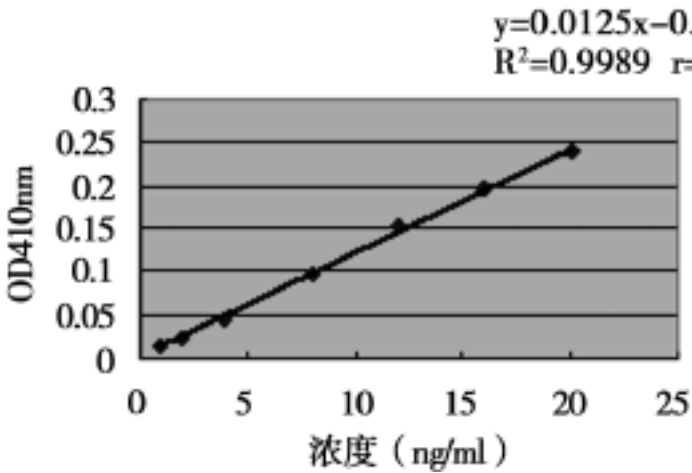


图 6 ELISA 检测不同含量标准 SEC 曲线图

根据图 6 标准品的直线回归方程来计算经适当稀释的自行纯化 SEC 的含量, 结果见表 2。

表 2 自行纯化 SEC 的 ELISA 检测结果

稀释倍数	OD _{410nm}	SEC 含量 (ng/ml)	SEC 平均含量 (ng/ml)
14000	0.294	340760	349720
28000	0.141	324520	
56000	0.070	317520	
112000	0.038	336000	
224000	0.022	376320	
448000	0.013	403200	

从表 2 中可见自行纯化 SEC 的含量为 349720ng/ml。

21812 自行纯化 SEC 标准曲线的标定 用 0.1% BSA 和 0.05% 吐温 - 20 PBS 将自行纯化的 SEC 稀释成 6 个浓度 (即 50ng/ml, 25ng/ml, 12. 5ng/ml, 6125ng/ml, 3. 125ng/ml 和 1. 5625ng/ml) 用 ELISA 进行检测, 结果见图 7。

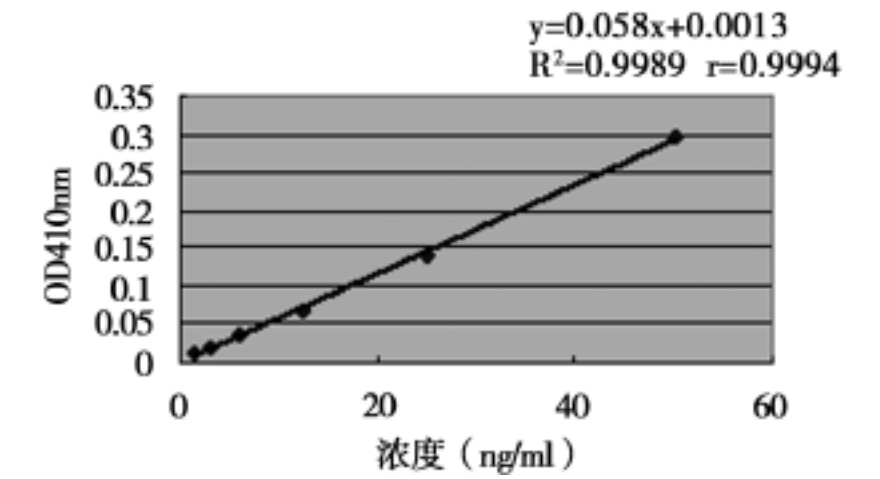


图 7 ELISA 对自行纯化一定浓度 SEC 检测曲线图

从图 7 可以清楚地看出, 自行纯化的 SEC 在一定浓度范围中具有极好的线性关系。R² = 0. 9989, r = 99. 94% 。

21813 SEC 标准品的制作和检测 用自行纯化 SEC(以含 349000ng/ml 计算) 以 1% BSA 和 0. 1% NaN₃ 的 pH7. 4 PBS 稀释 500 倍后, 分装 2ml 安瓿中, 每安瓿 1ml, 冻干。结果证实, 冻干品呈白色疏松状干块, 未见冻干块收缩。外观非常美观。随机抽取冻干样品三支, 每支用 1ml 蒸馏水溶解。发现溶解迅速, 呈透明状。对该三支样品以试剂盒标准

品作并行 ELISA 检测比较, 并按标准品所作直线回归公式 y = 0. 0152x - 0. 0128 计算, 自行纯化冻干标准品检测结果见表 3。

表 3 冻干标准品的定量测定结果 (ng/ml)

检测次数	检出 SEC 含量	三支 SEC 的 平均含量	最后标准 品定量
1	717. 12	699. 9	700
2	696. 24		
3	686. 32		

从表 3 中可见, 对自行纯化 SEC 所制成冻干 SEC 标准品含 700ng/ml 是正确的, 此标准品可作为今后检测金葡素注射液中 SEC 是切实可行的。

21814 自制标准参考品的稳定性试验 首先笔者对随机抽取自制冻干标准参考品 12 支, 打开后, 每支加入 1ml 蒸馏水溶解、取样, 分三人进行 ELISA 检测, 每人检测 4 个标本, 检测结果见表 4。

表 4 ELISA 分三人检测 4 个标本的结果

含量	标本中 SEC 含量(ng/ml)			平均数
	A	B	C	
1	717. 12	698. 48	704. 80	706. 80
2	696. 24	700. 12	691. 00	695. 79
3	686. 32	705. 89	689. 30	693. 84
4	710. 24	702. 50	702. 40	705. 05
平均数	702. 48	701. 75	696. 88	700. 37

对表 4 中用 ELISA 检测的 12 个数据进行 CV 统计结果表明: CV 为 1. 04%

样本标准偏差 S = 7. 274

样本均数 = 700. 37

CV = 1. 04%

其次, 笔者又对首次检测过的 12 个冰盒冻存的标准参考品, 在每次用 ELISA 检测金葡素注射液产品 SEC 的同时再检测 2 个参考品中的 SEC 含量, 不同时间共分 6 次进行检测, 结果见表 5。

表 5 ELISA 不同时间分批检测的结果

	参考品中 SEC 含量(ng/ml)						平均数
	1	2	3	4	5	6	
1	708.17	689.84	711.15	704.25	694.81	717.01	704.20
2	684.79	691.64	678.94	699.11	702.36	678.85	689.28
平均数	696.48	690.74	695.045	701.68	698.585	697.93	696.74

从表 5 中, 参考品在冰盒中保存不同时间进行 2× 6 =12 次检测, 计算出 CV 来观察参考品的稳定性。结果表明:

样本标准偏差 S =30.42

样本均数 =696.74

CV = 4.34%

从表 4、5 中可以看出, 在同一时间内, 分三人, 每人检测 4 个参考品, 共 12 个参考品, 其每支参考品平均含量为 700.37ng/ml, 而同批冻存参考品在不同时间检测其平均含量为 696.74ng/ml, 两者 CV 在 1.04% 和 4.34%。可以说我们所研制参考品是相当稳定的。完全可以作为金葡素注射液中 SEC 检测时标准参考品应用。

3 讨论

金葡素注射液中主要有效成分 SEC 的检测系决定产品是否合格的一个重要指标。因此, 检测试剂的优劣就起了关键性的作用。过去鲍行豪等^[3]曾用军事医科院五所生产的反向被动血凝(RPHA) 试剂盒。虽使用多时, 但总觉得敏感性和特异性略逊。后又设法购置到从日本进口的反向被动胶乳凝集(RPLA) 试验试剂盒, 其敏感性特异性高, 操作简便, 观察结果也容易, 后因日本考虑到战略性问题从 2002 年起就无法购买到该试剂盒了。为了解决检测金葡素注射液中 SEC 问题, 中检所曾研制过 ELISA 双抗体夹心法的酶标试剂盒, 但因种种原因, 至今尚未能供应此试剂盒。在急需的情况下, 笔者联系到第四军医大学西安国际抗体研发中心研制并提供了两个不同表位的单克隆抗体与我们协作研制组成的酶标试剂盒, 用于检测 SEC 尚属可行。在检测金葡素注射液中有有效成分 SEC 时, 虽有多种方法可用, 但标准参考品 SEC 的制备与纯化又是一个重要的问题。为了能够得到 SEC 的标准参考品, 笔者进行了 SEC 的制备纯化及标准参考品的研制, 现已获得较为理想的结果。首先我们参考了 Su 等^[4]、

雷祚荣^[5,6] 及唐三华^[7] 等方法, 设计出并实施了一个以四步提纯 SEC 的方法, 结果获得成功。用四步法提纯 SEC, 其纯度可达 96.1%, 经多次用 ELISA 试剂盒检测, 结果均较为满意, 再经 SDS - PAGE 凝胶电泳分析, 纯化的 SEC 分子量约在 28000 dalton, 与报道相符。接着笔者又用自行纯化的 SEC, 以 1% BSA 和 0.1% NaN₃ 的 pH7.4 PBS 作稀释剂, 将提纯的 SEC 进行定量稀释, 并以定量(1ml) 加入 2ml 安瓿中进行冻干、封口。冻干品疏松美观。随即抽取 3 支用 ELISA 试剂盒与试剂盒标准品同时检测, 结果每支冻干品 SEC 的平均含量为 700ng/支。其次, 笔者又随机抽取 12 支冻干品, 分三人每人检测 4 支, 再将已检测冻干标准品封存于低温冰箱, 在每次检测金葡素注射液原液或应用液同时, 重复检测 3 个标准品, 检测结果所计算出变异系数(CV) 分别为 1.04% 和 4.34%。表明: 笔者所研制的标准品是非常稳定的, 它完全可以作为今后金葡素注射液生产时对 SEC 的检测应用。

【参考文献】

1 中国卫生部 11997 年第二季度批准新药品种公报 126 页(97) S - 31 号 1

2 雷祚荣, 曲丽云, 王鲁明 1 金黄色葡萄球菌 C1、C2 型肠毒素的提纯及某些理化性质的鉴定 1 微生物学通报, 1986, 13(3) : 113 - 1161

3 鲍行豪, 胡海军, 陈建立, 等 1 金黄色葡萄球菌滤液制剂中肠毒素的检测研究 1 微生物学杂志, 2004, 24(4) : 56 - 60.

4 Su YC. Wang ACL. Identification and purification of staphylococcal enterotoxin1Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 1438.

5 雷祚荣 1 葡萄球菌肠毒素和葡萄球菌肠毒素病 1 北京: 中国科学技术出版社, 1992, 125 - 1291

6 焦炳华, 谢正阳 1 现代微生物毒素学 1 福州: 福建科技出版社, 2000, 73 - 811

7 唐立华, 张雄, 罗岚, 等 1 葡萄球菌肠毒素的纯化及免疫血清的制备 1 上海医科大学学报, 1992, 19(8) : 401 - 4051

(编辑: 邓 锋)