

· 专栏论著 ·

变形链球菌表面蛋白 P1 与 PCG, CTB 的偶联实验

李富明 罗宗莲 张静仪 吉庆勇 杨继虞

摘要 利用共价偶联剂 SPDP 将纯化的变形链球菌表面蛋白抗原 P1 与霍乱毒素 B 亚单位 (CTB) 或前霍乱原类毒素 (PCG) 分别进行偶联并进行偶联效果鉴定, 以获取更为有效的防龋抗原。结果: 所得偶联物 P1-PCG, P1-CTB 同时具有与神经节苷脂 GM1 特异结合的特点, 又具有 P1 的免疫特性, 为进一步进行免疫防龋实验提供了有效的抗原。

关键词 变形链球菌 表面蛋白 霍乱毒素 前霍乱原类毒素

研究结果表明用变形链球菌 (变链) 全菌抗原免疫可以获得明显的防龋效果。但变链全菌中含有与人体心脏交叉反应抗原。寻找安全、有效的防龋抗原是目前主动免疫防龋的重要环节。变链分子量为 185 kD 的表面蛋白 P1 能与唾液蛋白选择性地结合, 从而介导变链在牙面的粘附, 是变链的重要粘附素^{1,2}, 而抗 P1 的抗体可以干扰和抑制变链在牙面的粘附, 并能阻止变链在菌斑内的定居, 从而达到防龋的目的。由于 P1 具有很强的免疫性, 因而被认为是很有希望的防龋疫苗。

霍乱毒素 (CT), 含有一个 A 亚单位 (CTA) 和 5 个 B 亚单位 (CTB), CTA 是霍乱菌的毒力部分, CTB 使霍乱菌在肠粘膜表面定居并致病。CT 和 CTB 具有极强的粘膜表面附着能力和粘膜免疫增强作用^{3,4}。在体外实验中, Lycke 等发现 CT, CTB 能加强机体产生特异的外分泌液 S IgA 和血清 IgG 抗体^{3,4}。在局部粘膜免疫研究中, CT, CTB 已广泛地运用于霍乱、麻疹、流感等疾病的疫苗研制中。一些学者认为, CT 的存在是 CTB 发挥免疫增强效果所必须的。PCG 是霍乱毒素 CT 经热聚合后减毒的产物⁵, 含有 CTA, CTB 两种成分。

本实验的目的是利用共价偶联的方法, 将变链表面蛋白 P1 与 PCG, CTB 偶联, 以探讨其免疫特性, 为进一步进行免疫防龋实验打下重要的实验基础。

1 材料和方法

1.1 变链表面蛋白抗原 P1 的制备

1.1.1 细菌培养 变链 mutants M T 6 R (血清型 c) 由华西医科大学卫生部口腔生物医学工程重点实验室提供, 经形态学、生物学及血清学鉴定后, 在 TPY 液体培养基中, 按常规兼性厌氧培养的方法进行纯培养。

1.1.2 P1 的纯化 采用黄定明等的方法^{1,6} 利用低温乙醇沉淀法, 提取 P1 的粗提取液。将粗提物与标准分子量蛋白 (美国 GBCO BRL) 一起进行 SDS-PAGE 分析电泳, 确定 185 kD 的条带位置后 (图 1a), 进行 SDS-PAGE 制备电泳, 将只含 P1 的凝胶切下, 进行透析电泳。收集透析杯管部的 P1, 即为纯化的 P1, 见图 1a。

1.1.3 P1 的鉴定 a 纯度鉴定: 将纯化的 P1 和 P1 粗提物一起作 SDS-PAGE 电泳, 见图 1b。

b 血清学鉴定: 将纯化的 P1 用兔抗 P1 (Ag I/II) 的标准血清 (美国 MW Russell 教授惠赠) 进行免疫双向扩散实验, 结果见图 2。

1.2 P1 与 CTB, PCG 的偶联实验

参考 Czerkinsky 等人的方法^{7,8}。

1.2.1 材料准备 P1: 在 0.1 mol/L pH 7.6 的 PB 中透析过夜。浓度为 1.44 mg/ml。

CTB: 由北京军事科学院生物所提供, 在 0.1 mol/L、pH 7.6 的 PB 中透析过夜备用。浓度为 1 mg/ml。

PCG: 由卫生部成都生物制品研究所提供, 用 0.1 mol/L、pH 7.6 的 PB 配成 1 mg/ml 备用。

SPDP (CN-Succinimidyl-(3-2-Pyridyl)-Dithio) propionate): 西德 Boehringer Mannheim GmBH 产品, 用无水乙醇配成 2 mg/ml。

本研究为国家教委博士点科研基金资助

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院 (李富明, 罗宗莲), 卫生部口腔生物医学工程重点实验室 (张静仪, 吉庆勇), 华西医科大学药学院 (杨继虞)

二硫苏糖醇(DTT):用0.1 mol/L NaAc Buffer(含0.1 mol/L NaCl pH4.5)配成50 mmol/L 的浓度。

1.2.2 方法 纯化的P1及CTB,分别以1:10和1:30的摩尔比与SPDP作用30 min后,在0.01 mol/L pH7.4 PBS中,4℃搅拌下透析过夜,再将P1和SPDP的偶联物P1-SPDP与DTT作用,室温30 min后置4℃下0.01 mol/L, pH7.4的PBS中搅拌,透析过夜。然后与CTB的处理液混合,室温20 min后,4℃过夜,次日透析。即得P1和CTB的偶联产物。

P1和PCG偶联方法同CTB。偶联的产物分别以P1-CTB, P1-PCG表示。

1.2.3 鉴定 利用CTB能特异地与单涎神经节苷脂(monosialb-ganglioside, GM1)结合的特点进行鉴定。采用GM1-ELISA法^{7,8},可同时鉴定偶联物是否具有CTB的粘附性质和P1的抗原性。

(a)用0.01 mol/L pH7.2 PBS将GM1(Signa)配成5 μg/ml,以100 μl/孔的量包被96孔板(美国,Flow Laboratories, Inc)后,37℃4h后放4℃冰箱过夜。

(b)吸取包被液,用1.5%的BSA封板,室温2h,洗板。

(c)加入不同的抗原:P1 10 μg/ml, P1-PCG 10 μg/ml, P1-CTB 10 μg/ml,对照孔中加入稀释液PBST(PBS中加TWEEN-20 0.5/1000)每孔100 μl,37℃1h,洗板。

(d)加入大鼠抗P1血清(1:20),37℃1h,洗板。

(e)加入兔抗大鼠IgG血清(1:100,军事科学院流行病学研究室提供),100 μl/孔。37℃1h,洗板。

(f)加入羊抗兔IgG联酶(辣根过氧化物酶)抗体(1:1000),37℃1h,洗板。

(g)加入TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine,EMERCK),每孔100 μl,10 min后,加入1% SDS终止反应,观察结果。出现阳性反应孔者照像。图1,3。

2 结 果

2.1 从图1可见,经SDS-PAGE制备的185 kD,表面蛋白为一条电泳带,表明所纯化的变链表面蛋白达到了电泳纯。

2.2 经双向扩散实验,证明提取物可与抗蛋白P1(Ag I/II)血清发生特异抗体反应,说明所制备的抗原即为蛋白P1(Ag I/II)(图2)。

2.3 从图3可看出,只有加入了与CTB或PCG偶联的P1时,才出现了阳性反应,显蓝色。加入未经偶联的P1时,呈现阴性反应,不显色,对照孔中也为无色的阴性反应。CTB,PCG能与GM1特异地结合,P1只有与其呈偶联结合同时又保持了P1的抗原性质,才能出现阳性反应。结果证明P1已与CTB或PCG化学性偶联结合。

3 讨 论

3.1 SPDP是一种双功能偶联剂,其分子两端的二硫键可以与不同的蛋白质成分进行共价偶联⁷。变链表面的蛋白P1是一种糖蛋白抗原,通过与大分子的免疫增强剂结合,能加强其免疫刺激作用。本实验利用SPDP对变链表面蛋白P1与CTB或者PCG进行偶联,经GM1-ELISA实验证明所得偶联物P1-CTB和P1-PCG保持了P1的抗原特性和CTB的粘附性质。所得产物均一,稳定。

3.2 靶抗原释放系统(target antigen delivery system)的研制,是目前胃肠免疫的热点问题⁹。通过研制出特定的抗原释放系统,使不同的抗原物质能特异地介导到特定的刺激部位,从而达到增强免疫的目的¹⁰。在胃肠道较广泛地分布有肠道相关淋巴组织(GALT),M细胞是其中最重要的抗原传递细胞。研究表明,CTB无毒性,能特异地与小肠表面的GM1结合,与CTB联结一起的其它抗原成分,能在CTB的介导下与Peyer's Patches结合,刺激M细胞,延长抗原在肠道停留时间,以达到增强抗原的刺激作用,这也是CTB的粘膜免疫增强作用的重要方面¹⁰。

PCG是霍乱毒素经热聚合消除了毒力后的产物,含有CTA和CTB。研究表明霍乱毒素CT是一种极强的粘膜免疫增强剂,P1和CTB或PCG偶联后,能利用CTB的粘附作用而较长时间地停留于肠道不致被清除,从而加强其免疫刺激作用。

(本文图见中心插页4)

4 参 考 文 献

- 1 黄定明 变链表面蛋白P1对人体唾液粘附的机理探讨 华西医科大学研究生学位论文,1993:12~13
- 2 罗宗莲,黄定明,周学东 变形链球菌I型Mutans表面蛋白P1的粘附作用 上海口腔医学,1995,4:201
- 3 Lycke N, Strober W. Cholera toxin promoted B cell isotype differentiation. J Immunol, 1989, 142: 3781
- 4 Bromander A, Holmgren J, Lycke N. Cholera toxin stimulates L-1 production and enhances antigen presentation by macrophages in vitro. J Immunol, 1991, 146: 2908
- 5 卢锦汉,章以浩,赵锐,主编 医学生物制品学 北京:人民卫生出版社,1995:328~342
- 6 谢佐理 抗变形链球菌185 kD表面蛋白抗原单克隆抗体的制备及其免疫防龋的初步研究 华西医科大学博士学位论文,1993:8~9

- 7 Czerkinsky C, Russell MW, Lycke N, et al Oral administration of a Streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues, *Infect Immun*, 1989, 57: 1072
- 8 Russell MW, Wu HY. Distribution, persistence, and recall of serum and salivary antibody responses to peroral immunization with protein antigen I/II of *Streptococcus mutans* coupled to the cholera toxin B subunit *Infect Immun*, 1991, 59: 4061
- 9 Redman TK, Hamon CC, Lalbani RL, et al Oral immunization with recombinant salmonella typhimurium expressing surface protein A of *Streptococcus sobrinus*: Dose response and induction of protective humoral responses in rats, *Infect Immun*, 1995, 63: 2004
- 10 Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces, *Physiol Rev*, 1992, 72: 853

(1996- 10- 24 收稿)

Conjugation and Identification of the Surface Protein Antigen P1 from *Streptococcus mutans* MT6R with the Cholera Toxin B Subunit and Procholeragenoid

Li Fuming, Luo Zonglian, Zhang Jingyi, et al

*College of Stomatology, West China University of Medical Sciences***Abstract**

To make an effective antigen to prevent dental caries, the surface protein antigen P1 (Ag I/II) was purified and identified by the rabbit anti-Ag I/II serum and was covalently conjugated to CTB and PCG by SPDP respectively. GM 1-ELISA showed that both the conjugated P1-CTB and P1-PCG possess the ability to bind GM 1 specifically without losing the antigenicity of P1. This results showed that the conjugated antigens could be used in the immune prevention against dental caries

Key words *Streptococcus mutans* surface protein conjugation cholera toxin

牙科综合治疗机水路系统的改进

许志勇 王光耀 王正钱

国产牙科综合治疗机高速涡轮手机大多采用自来水系统供水。水压变化较大时常需要调节,操作繁琐而易使旋钮失灵,若停水则无法工作。水质对于高速精密的手机影响较大。自来水管内的锈蚀与日俱增,每天初开供水开关都会有锈水流出,污染机头。水中的微小颗粒和污物会堵塞治疗机水路及高速手机,影响治疗的正常进行,并影响患者的健康。本文介绍一种供水方法,使综合治疗台的手机拥有一套独立的加压、供水系统,用上蒸馏水。使水质差及供水压力低或无供水系统地区也能开展此类医疗工作,现就我科对上海和北京产的两型综合治疗机的水路系统改装介绍如下。

上海齿科器械厂生产CS600型牙科综合治疗机原装供水塑料管直径6mm,需用同直径塑料管约2.5m。拔下接于手机水量调节开关上的原供水管,并将其堵塞。经治疗台托盘及托盘转臂下沿原水气线路穿设水道,把自设水管接

于手机水量调节开关进水嘴上,用与塑料管外径相同的螺丝帽套紧。自设水管的另一端接一压缩式喷雾器(本科采用浙江鄞县白岳喷雾器厂生产的3NY-08型多功能手持压缩式喷雾器,即花卉喷水装置)。将水管外端在酒精灯上边加热边用一锥形棍扩大内径,套在去掉嘴的喷杆上,以略大于喷杆直径的螺丝帽套紧。用一钢丝环套住手柄喷水按钮。喷壶可挂于治疗机托盘支架下,也可放置地板上。使用时在喷壶内加入蒸馏水约1500ml,并加压。通常加压两次壶内水即可用完,每日停机时将壶柄喷水按钮套圈去下。

北京手术器械厂生产YKZ-6A型牙科综合治疗机,原供水管直径4mm,需用同直径塑料管3m。沿用上述方法,亦可获得一套加压供净水的装置。

(1996- 03- 27 收稿)

变形链球菌表面蛋白P1与PCG,CTB的偶联实验

(正文见第45页)

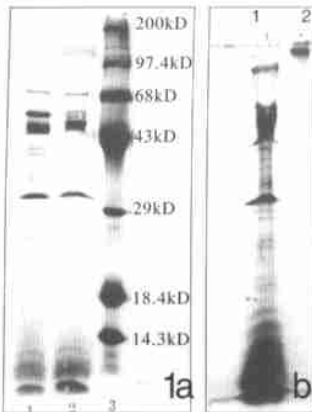


图1 SDS-PAGE分析电泳
a: 1,2: 变链 MT6R粗抗原
3: 高分子量标准蛋白
b: 1: 变链MT6R粗抗原
2: 纯化后的P1, 仅余
185kD区蛋白条带,
表明已达到电泳纯度

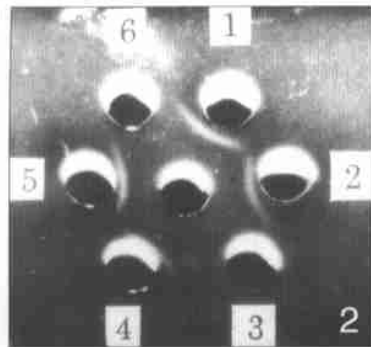


图2 免疫双向扩散实验证明1,2,4,5孔内纯化物为表面蛋白P1,中央孔为免抗 P1标准血清,孔3,6为生理盐水

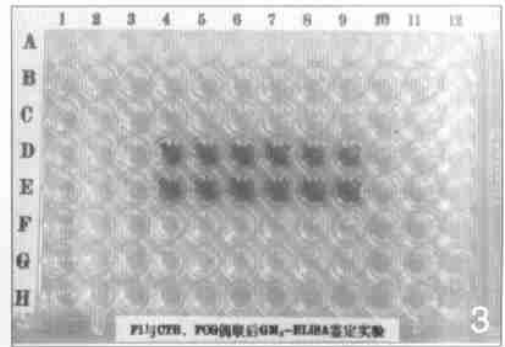


图3 GMI-ELISA鉴定实验证明P1与CTB,PCG为偶联结合
B4-B9,C4-C9为未偶联的P1显示阴性反应
D4-D9为P1与CTB的偶联物显示阳性反应
E4-E9为P1与PCG的偶联物显示阳性反应
F4-F9,G4-G9为对照组显示阴性反应

大鼠成骨细胞体外培养的研究

(正文见第70页)

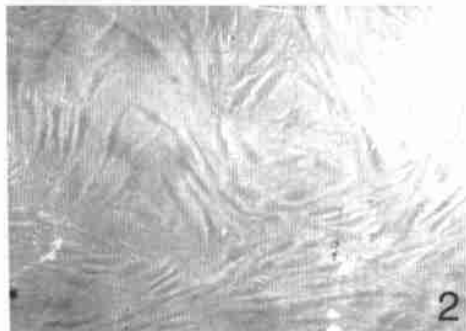


图1 培养的大鼠成骨细胞,细胞呈梭形、三角形或多角形 ×100
图2 培养的大鼠牙齦成纤维细胞,细胞呈长梭形,旋涡状排列 ×100

三种脱钙液对免疫组化染色效果的比较

(正文见第80页)

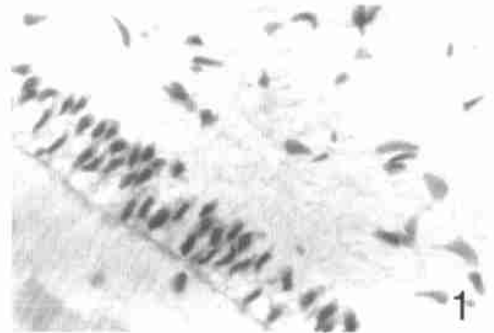


图1 EDTA 组人牙组织,示牙髓牙本质复合体中的各种组织细胞成份结构清晰 HE ×40
图2 混合酸组狗牙周围组织,示牙周膜及牙槽骨中的胞核着色淡 HE ×20