

李鹏成, 张晓燕, 乔绪稳, 等. 不同稀酸制备革兰氏阳性增强基质(GEM)颗粒的比较[J]. 江苏农业学报, 2018, 34( 3 ) : 605-611.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.03.018

## 不同稀酸制备革兰氏阳性增强基质( GEM) 颗粒的比较

李鹏成<sup>1</sup>, 张晓燕<sup>1, 2</sup>, 乔绪稳<sup>1</sup>, 郑其升<sup>1</sup>, 侯继波<sup>1</sup>

(1. 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 国家兽用生物制品工程研究中心, 江苏 南京 210014; 2. 山西运城农业职业技术学院, 山西 运城 044000)

**摘要:** 本研究旨在比较不同稀酸制备革兰氏阳性增强基质(GEM)颗粒的效果。首先将3种不同的稀酸[硫酸( $H_2SO_4$ )、盐酸(HCl)、三氯乙酸(TCA)]煮沸, 制备GEM颗粒, 分别比较得率(细菌计数)、蛋白去除率(SDS-PAGE和SDS解离蛋白定量分析)以及GEM颗粒与锚钩蛋白(PA)的亲合活性等, 最后进行4℃以及冷冻干燥后4℃下GEM的保存期研究。结果显示, 0.025 mol/L的 $H_2SO_4$ 制备GEM颗粒得率为89.8%, 蛋白去除效果和锚定活性均较好。0.050 mol/L HCl与0.100 mol/L HCl制备的GEM颗粒蛋白质去除效率无显著差异, 0.050 mol/L HCl制备GEM的得率(99.7%)高于0.100 mol/L HCl(86.5%), 但0.050 mol/L HCl制备的GEM颗粒与PA的锚定活性不及0.100 mol/L HCl制备的GEM颗粒。不同浓度TCA制备的GEM颗粒得率、锚定活性均较好, 但蛋白质去除效果较差。GEM颗粒4℃保存18个月, 其活性不受影响, 且冷冻干燥对GEM颗粒活性无影响。0.025 mol/L的 $H_2SO_4$ 和0.100 mol/L的HCl可制备高质量的GEM。

**关键词:** 乳酸乳球菌; 革兰氏阳性增强基质(GEM); 稀酸

**中图分类号:** S852.4<sup>+</sup>3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-4440(2018)03-0605-07

## Comparison on the preparation of gram-positive enhancer matrix( GEM) particles by different dilute acids

LI Peng-cheng<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-yan<sup>1, 2</sup>, QIAO Xu-wen<sup>1</sup>, ZHENG Qi-sheng<sup>1</sup>, HOU Ji-bo<sup>1</sup>

(1. Institute of Veterinary Immunology & Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals, Nanjing 210014, China; 2. Yuncheng Agricultural Vocation-technical College of Shanxi, Yuncheng 044000, China)

**Abstract:** The aim of this study was to compare the effects of gram-positive enhancer matrix (GEM) prepared with different dilute acids. Three different dilute acids,  $H_2SO_4$ , HCl and TCA were applied to prepare the GEM particles by boiling. The optimal preparation conditions were determined by comparing the yield (bacterial count), protein removal rate (SDS-PAGE and protein quantification) and the affinity activity of GEM particles and protein anchor (PA). Furthermore, the shelf life of GEM was researched at 4℃ and after freeze-drying. The results showed that the yield of the GEM particles was 89.8% under the treatment of 0.025 mol/L  $H_2SO_4$ , and the protein removal effect and anchoring activity were ideal. There was no difference in the protein removal rate of GEM under the treatment of 0.050 mol/L HCl and 0.100 mol/L HCl,

and the yield under the treatment of 0.050 mol/L HCl (99.7%) was higher than that under the treatment of 0.100 mol/L HCl (86.5%). However, the anchoring activity of GEM particles with PA under the treatment of 0.050 mol/L HCl was less than that under the treatment of 0.100 mol/L HCl. The yield and anchoring activity of GEM particles obtained by different concentration of TCA were ideal, but the protein removal rate was poor. GEM

收稿日期: 2017-09-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31502105); 江苏省农业科学院基本科研业务专项项目[ZX(16)2030]

作者简介: 李鹏成(1981-), 男, 山西文水人, 博士, 副研究员, 主要从事兽用生物制品工程技术研究。(E-mail) lipengcheng305@163.com

通讯作者: 侯继波, (E-mail) houjibo@jaas.ac.cn

particles were kept 18 months at 4 °C. Freeze drying couldn't influence the activity of GEM particles. The results indicated that the treatments of 0.025 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.100 mol/L HCl could produce high-quality GEM particles.

**Key words:** *Lactococcus lactis*; gram-positive enhancer matrix(GEM); dilute acid

有研究基于革兰氏阳性细菌乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)形成的非活性食品级外壳颗粒,研制了一种抗原展示系统<sup>[1]</sup>,即乳酸乳球菌外壳-蛋白锚定系统<sup>[2-3]</sup>。这种外壳颗粒被称之为革兰氏阳性增强基质(GEM)颗粒,其实就是细菌去除蛋白、核酸等物质后的一种球形肽聚糖基质骨架。GEM 抗原展示系统,由食品级遗传元件组成,十分安全。此外,该系统不需要对抗原进行纯化,极大降低了制造成本,并可用于多种非蛋白源和蛋白源的抗原展示,是一种优异的抗原载运系统。目前,通过该系统研制的抗原在多个动物疾病模型中能够有效地激发机体的免疫保护,成功展示的有:肺炎链球菌保护性抗原 SlrA<sup>[2]</sup>、疟原虫的保护性抗原 MSA2<sup>[4]</sup>和鼠疫耶尔森菌保护性抗原 LcrV<sup>[5]</sup>等。

GEM 颗粒作为 GEM 抗原展示系统的重要组成部分,其质量直接影响抗原的展示效率。关于 GEM 的制备,国内外未见深入报道。本研究拟通过比较不同稀酸处理制备 GEM 颗粒的效果,优化 GEM 颗粒的制备条件,主要对不同浓度的同种稀酸以及不同稀酸处理制备 GEM 颗粒的得率(计数)、蛋白去除率(SDS-PAGE)、与锚钩蛋白(PA)的亲合活性(SDS-PAGE)进行比较。此外,本试验还拟对 GEM 颗粒 4 °C 下的保存期和冷冻干燥后的保存期进行研究,以期完善乳酸乳球菌外壳-蛋白锚定系统,尤其是制备高质量的 GEM 颗粒提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 乳酸乳球菌 MG1363 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 GM17 液体培养基(葡萄糖 5.00 g/L、植物蛋白胨 5.00 g/L、聚蛋白胨 5.00 g/L、牛肉膏 2.50 g/L、酵母粉 2.50 g/L、β-磷酸甘油二钠 19.00 g/L、抗坏血酸 0.50 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25 g/L,加双蒸水至 1 L,调节 pH 值为 7.1,115 °C 高压灭菌备用)、盐酸(HCl)、硫酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、三氯乙酸(TCA)均购自国药集团,戊二醛、丙稀酰胺、甲叉双丙稀酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、甘氨酸、过硫

酸铵均购自南京生兴生物技术有限公司,蛋白分子量 Marker 购自 Thermo Scientific 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究, YK-HELBER 细菌计数板购自北京卓川电子科技有限公司,锚钩蛋白(PA)由本实验室克隆表达获得。

### 1.2 乳酸乳球菌 MG1363 培养

乳酸乳球菌 MG1363 划线接种 GM17 平板,30 °C 培养 16~20 h,挑取单菌落接种新鲜 GM17 培养基,30 °C 静止培养 16~20 h,备用。

### 1.3 不同稀酸处理制备 GEM 颗粒

新鲜扩大培养的乳酸乳球菌 MG1363, 12 000 r/min 离心 10 min,室温无菌离心,收集菌体,灭菌纯水洗涤 1 遍,然后用 1/5 体积 0.200 0 mol/L、0.100 0 mol/L、0.050 0 mol/L、0.025 0 mol/L 的 HCl (pH=1), 1.200 0 mol/L、0.600 0 mol/L、0.300 0 mol/L、0.015 0 mol/L 的 TCA (pH=1), 0.100 0 mol/L、0.050 0 mol/L、0.025 0 mol/L、0.012 5 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 重悬 (pH=1),煮沸 30 min,离心去酸液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,最后一次用 1/10 体积的 PBS 重悬计数,2.5×10<sup>9</sup>个颗粒为 1 U。

### 1.4 GEM 颗粒蛋白质去除效率

将不同稀酸处理的 GEM 颗粒调整至同一基数,经 SDS-PAGE 定性分析。同时定量分析比较不同稀酸处理得到的 GEM 颗粒蛋白质去除效率,分别收集不同稀酸煮沸的上清液,12 000 r/min 离心 3 min,热酸处理后上清液的 pH 调至 7 左右,用 BCA 蛋白质检测试剂盒进行蛋白质浓度测定分析。

### 1.5 不同稀酸制备的 GEM 与 PA 锚定活性

为了对结合蛋白进行较为准确的定量分析,首先,分别将 1 U 的 GEM 颗粒和过量的 PA 在室温下孵育 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min,收集沉淀, PBS 洗涤 2 次,然后用 10% 的 SDS 高温煮沸结合后的沉淀,使蛋白从颗粒上解离下来,离心收集上清液进行定量分析。具体方法如下:取结合后的悬浮液 200 μl,加 750 μl PBS,50 μl 10% SDS,100 °C 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min,分离沉淀和上清液,取上清液用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度,同时用 1 ml PBS 重悬沉淀,取重悬沉淀和解离上清液进

行 SDS-PAGE 鉴定。

### 1.6 GEM 透射电镜观察

对制备好的 GEM 颗粒进行离心并收集,3 000 r/min 离心 5 min,弃上清液后加入含 2.5%戊二醛的 PBS(0.1 mol/L,pH=7.2),4 ℃ 固定 2 h,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,依次以 30.0%、50.0%、75.0%、95.0%的乙醇脱水 1 次,1 次 10 min,然后以无水乙醇重复脱水 2 次,1 次 10 min,再用 50.0%、70.0%、90.0%、100.0%的乙酸异戊酯逐级取代乙醇,每级置换 2 min。二甲苯透明,将 GEM 颗粒完全浸没于盛有二甲苯的带盖小瓶中,1:1(体积比)浸透,环氧树脂 Epon812 浸蜡,将浸好的透明 GEM 颗粒放入盛有环氧树脂 Epon812 的容器中 20 min,环氧树脂 Epon812 包埋,将浸好蜡的 GEM 颗粒放于盛有环氧树脂 Epon812 的包埋器中,注入包埋剂,将组织块完全浸没,再将包埋器置于 37 ℃ 温箱中 24 h,超薄切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染,最后在 Model S-3000N 型透射显微镜下观察,拍照。

### 1.7 GEM 颗粒 4 ℃ 保存期试验

分别对 4 ℃ 下保存 0 个月、2 个月、6 个月、12 个月、15 个月、18 个月的 GEM 颗粒进行计数,比较不同保存时间下 GEM 的颗粒数,同时比较不同样品的锚定活性。

### 1.8 真空冷冻干燥对 GEM 颗粒锚定活性的影响

真空冷冻干燥 GEM 颗粒,观察其外观形态,拍照。同时,将冻干样品直接加入到 PA 溶液中,室温孵育 30 min,通过 SDS-PAGE 分析检验冷冻干燥对 GEM 颗粒锚定活性的影响。

此外,本试验将冷冻干燥后的 GEM 颗粒置于 37 ℃ 下进行耐老化试验,通过其蛋白锚定活性来监测冷冻干燥后 GEM 颗粒的保存期。

### 1.9 数据分析

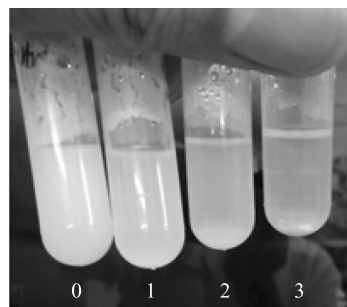
GEM 颗粒得率 = (GEM 颗粒数/原细菌数) × 100%。数据采用 SPSS(16.0) 软件进行统计,差异显著性检验采用独立样本 *t* 检验和单因素方差分析。所有数据均表示为平均值 ± 标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同稀酸处理 GEM 颗粒沉降出现的时间

不同稀酸的作用方式不同,不同浓度的同一种稀酸其作用强度也不同,因此,GEM 制备过程中不同稀酸及不同浓度的同种稀酸处理,在煮沸过程中

GEM 颗粒的沉降速度不同,制备后成品悬浮液的澄清度也不同。图 1 显示,清水对照在煮沸细菌的整个过程中均未出现沉降,一直处于混悬液状态。当用稀酸煮沸时,则出现不同程度的沉降,其中,TCA 处理沉降出现的最快,5 min 左右出现,HCl 处理次之,15 min 左右出现沉降,H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 处理出现沉降最迟,20 min 后才出现。



0:H<sub>2</sub>O;1:0.05 mol/L 硫酸(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>);2:0.10 mol/L 盐酸(HCl);3:0.60 mol/L 三氯乙酸(TCA)。

图 1 不同稀酸制备 GEM 颗粒的观察结果

Fig.1 Observation of gram-positive enhancer matrix (GEM) particles prepared with different dilute acids

### 2.2 不同稀酸处理制备 GEM 颗粒的 SDS-PAGE 分析

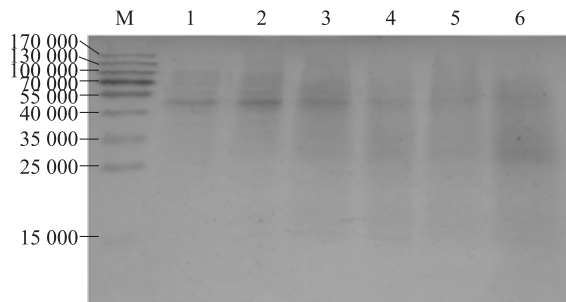
图 2 和图 3 显示, MG1363 主要的菌体蛋白质位于 50 000 左右, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 HCl 处理制备的 GEM 颗粒随酸浓度的增加, 50 000 左右的菌体蛋白质逐渐减少, 蛋白质去除效果越来越好。不同浓度 TCA 处理的蛋白质去除效果无明显差异, 而且其蛋白质去除效果不及 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 处理和 HCl 处理。不同稀酸处理制备 GEM 颗粒去除蛋白质定量分析结果与 SDS-PAGE 分析结果一致。

### 2.3 不同稀酸处理制备 GEM 颗粒得率

随 HCl 浓度增加, GEM 颗粒得率降低, 而 TCA 浓度变化对 GEM 颗粒得率的影响不明显。中浓度和低浓度 HCl 处理的 GEM 颗粒得率高于 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 处理和 TCA 处理, 1 ml 菌液最高可以制备约 3 U GEM 颗粒(表 1)。

### 2.4 不同稀酸制备的 GEM 与 PA 锚定的活性

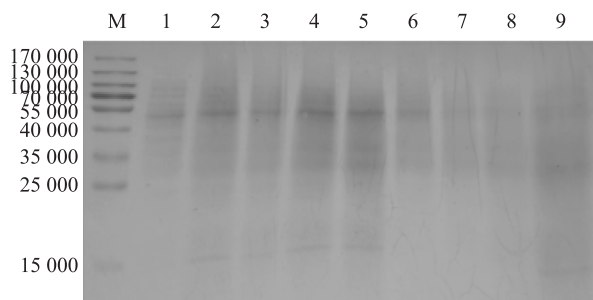
图 4 显示, 低浓度 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 处理(3 泳道)制备的 GEM 与 PA 锚定效果不如中浓度处理(4 泳道)和高浓度处理(5 泳道、6 泳道)制备的, 中浓度 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 处理的 GEM 与 PA 锚定效果与高浓度处理的无明显



M: 蛋白质分子量标准; 1: 乳酸乳球菌 MG1363; 2:  $H_2O$  处理 (CK); 3: 0.012 5 mol/L  $H_2SO_4$  处理; 4: 0.025 0 mol/L  $H_2SO_4$  处理; 5: 0.050 0 mol/L  $H_2SO_4$  处理; 6: 0.100 0 mol/L  $H_2SO_4$  处理。

图 2 不同浓度  $H_2SO_4$  制备 GEM 颗粒 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE assay of GEM particles prepared with different concentrations of  $H_2SO_4$



M: 蛋白质分子量标准; 1: 乳酸乳球菌 MG1363; 2: 0.150 mol/L TCA 处理; 3: 0.300 mol/L TCA 处理; 4: 0.600 mol/L TCA 处理; 5: 1.200 mol/L TCA 处理; 6: 0.025 mol/L HCl 处理; 7: 0.050 mol/L HCl 处理; 8: 0.100 mol/L HCl 处理; 9: 0.200 mol/L HCl 处理。

图 3 不同浓度 TCA 和 HCl 制备 GEM 颗粒 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE assay of GEM particles prepared with different concentrations of TCA and HCl

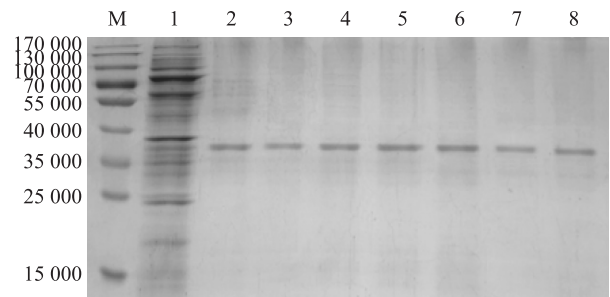
差异。中浓度  $H_2SO_4$  处理 (4 泳道) 和高浓度  $H_2SO_4$  处理 (5 泳道、6 泳道) 制备的 GEM 与 PA 锚定效果稍优于中浓度 HCl 处理 (7 泳道、8 泳道) 制备的。

低浓度 TCA 处理 (2 泳道) 制备的 GEM 与 PA 锚定效果稍逊于中浓度处理 (3 泳道) 和高浓度处理 (4 泳道、5 泳道) 制备的, 中浓度处理的 GEM 与 PA 锚定效果与高浓度处理的无明显差异。HCl 处理 (6~9 泳道) 制备的 GEM 与 PA 锚定效果随 HCl 浓度增加逐渐增强。中浓度和高浓度 TCA 处理制备的 GEM 与中浓度和高浓度 HCl 处理制备的 GEM 与 PA 锚定活性无明显差异 (图 5)。

表 1 不同稀酸制备的 GEM 颗粒得率

Table 1 The yield of GEM particles prepared with different dilute acids

稀酸	稀酸浓度 (mol/L)	GEM 颗粒得率 (%)	乳酸乳球菌制备 GEM 颗粒的数量 (U/ml)
三氯乙酸	0.150 0	81.2±2.7	2.460±0.066
	0.300 0	74.1±1.4	2.244±0.031
	0.600 0	75.0±1.8	2.272±0.041
	1.200 0	69.2±0.7	2.096±0.015
硫酸	0.012 5	88.6±1.3	2.684±0.035
	0.025 0	89.8±1.7	2.720±0.046
	0.050 0	65.7±1.6	1.988±0.032
	0.100 0	57.1±0.8	1.728±0.014
盐酸	0.025 0	99.8±0.9	3.020±0.027
	0.050 0	99.7±0.8	3.016±0.024
	0.100 0	86.5±2.0	2.620±0.052
	0.200 0	58.3±0.7	1.768±0.012



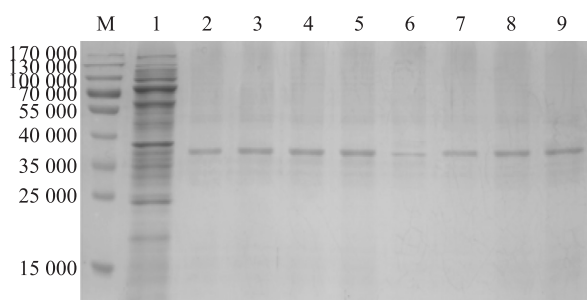
M: 蛋白质分子量标准; 1: 锚钩蛋白 PA; 2:  $H_2O$  处理 (CK); 3: 0.012 5 mol/L  $H_2SO_4$  处理; 4: 0.025 0 mol/L  $H_2SO_4$  处理; 5: 0.050 0 mol/L  $H_2SO_4$  处理; 6: 0.100 0 mol/L  $H_2SO_4$  处理; 7: 0.050 0 mol/L HCl 处理; 8: 0.100 0 mol/L HCl 处理。

图 4 不同浓度  $H_2SO_4$  和 HCl 制备的 GEM 与 PA 锚定活性的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE assay of the anchoring activity between PA and GEM prepared with different concentrations of  $H_2SO_4$  and HCl

不同稀酸处理制备的 GEM 颗粒结合 PA, 经 SDS 解离后再经 BCA 蛋白质定量检测, 其结果与 SDS-PAGE 分析结果一致。不同浓度  $H_2SO_4$  制备的 1 U GEM 颗粒结合 PA 的蛋白质质量分别为 (128.1±5.7)  $\mu\text{g}$  (0.012 5 mol/L  $H_2SO_4$ )、(155.4±6.6)  $\mu\text{g}$  (0.025 0 mol/L  $H_2SO_4$ )、(158.3±3.2)  $\mu\text{g}$





M:蛋白质分子量标准;1:锚钩蛋白 PA;2:0.150 mol/L TCA 处理;3:0.300 mol/L TCA 处理;4:0.600 mol/L TCA 处理;5:1.200 mol/L TCA 处理;6:0.025 mol/L HCl 处理;7:0.050 mol/L HCl 处理;8:0.100 mol/L HCl 处理;9:0.200 mol/L HCl 处理。

图5 不同浓度 TCA 和 HCl 制备的 GEM 与 PA 锚定活性的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE assay of the anchoring activity between PA and GEM prepared with different concentrations of TCA and HCl

(0.050 0 mol/L  $H_2SO_4$ )、(157.8±6.4)  $\mu g$  (0.100 0 mol/L  $H_2SO_4$ ),低浓度  $H_2SO_4$ 处理制备的 GEM 结合 PA 活性较差,其他浓度处理制备的 GEM 间无明显差异。不同浓度 TCA 制备的 1 U GEM 颗粒结合 PA 的蛋白质质量分别为 (116.4±4.5)  $\mu g$  (0.150 0 mol/L TCA)、(135.7±3.9)  $\mu g$  (0.300 0 mol/L TCA)、(138.3±3.6)  $\mu g$  (0.600 0 mol/L TCA)、(137.2±4.1)  $\mu g$  (1.200 0 mol/L TCA),低浓度 TCA 处理制备的 GEM 结合 PA 活性较差,其他浓度处理制备的 GEM 间无明显差异。不同浓度 HCl 制备的 1 U GEM 颗粒结合 PA 的蛋白质质量随 HCl 浓度增加而增加,分别为 (97.3±4.9)  $\mu g$  (0.025 0 mol/L HCl)、(125.7±7.2)  $\mu g$  (0.050 0 mol/L HCl)、(134.6±3.8)  $\mu g$  (0.100 0 mol/L HCl)、(137.9±5.3)  $\mu g$  (0.200 0 mol/L HCl),中浓度和高浓度 HCl 处理制备的 GEM 与 PA 的结合活性显著高于低浓度 HCl 处理制备的 ( $P < 0.05$ )。所有中浓度、高浓度  $H_2SO_4$ 、HCl、TCA 处理的效果相近,差异不显著。

## 2.5 不同稀酸处理制备 GEM 颗粒电镜观察结果

GEM 颗粒电镜观察结果(图 6)显示, MG1363 菌体本身,即细菌未经热酸煮沸之前,菌体内部核区可见大量的核酸,而且菌体内部各种蛋白质均有不同程度的负染着色。MG1363 经热酸煮沸后,菌体内部着色均一,表明菌体内部的核酸及蛋白质均已被清除,HCl、 $H_2SO_4$ 和 TCA 处理后的 GEM 颗粒电镜

形态无明显差异。

## 2.6 4 °C 下 GEM 颗粒的保存期

对 4 °C 下保存时间不同的 GEM 颗粒进行计数,均无明显变化。4 °C 下保存不同时间的 GEM 颗粒蛋白锚定活性均保持良好,各时间段的锚定活性无明显差异(图 7)。

SDS 解离后定量分析结果显示,保存不同时间的 GEM 颗粒结合 PA,SDS 解离后经 BCA 蛋白定量检测,发现保存 0 个月的 1 U GEM 颗粒结合 (134.6±3.8)  $\mu g$  的 PA,保存 2 个月、6 个月、12 个月、15 个月、18 个月的 1 U GEM 颗粒结合 PA 蛋白质质量分别为 (138.1±5.7)  $\mu g$ 、(135.4±6.2)  $\mu g$ 、(138.3±3.4)  $\mu g$ 、(129.8±6.7)  $\mu g$ 、(132.4±4.9)  $\mu g$ ,各个时间段之间无显著差异。说明 GEM 颗粒在 4 °C 下至少可以保存 18 个月。

## 2.7 冷冻干燥对 GEM 颗粒锚定活性的影响

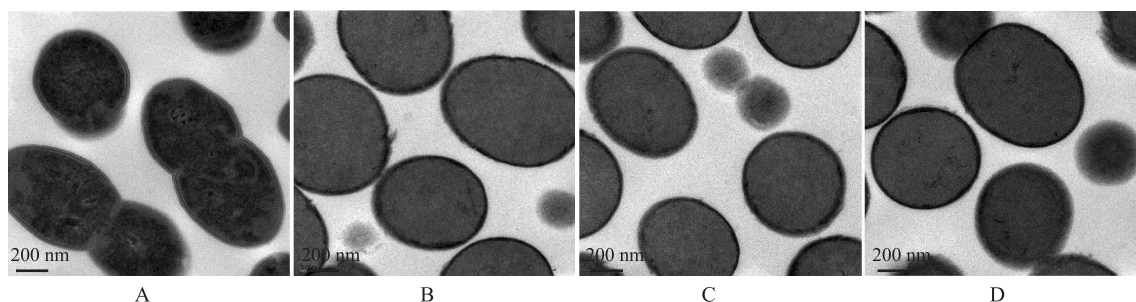
SDS-PAGE 分析结果(图 8)显示,冷冻干燥对 GEM 颗粒的锚定活性没有影响(冷冻干燥过程中未添加任何保护剂)。

## 2.8 冷冻干燥 GEM 颗粒的耐老化

图 9 显示,37 °C 保存 15 d 的 GEM 颗粒冷冻干燥样品的锚定活性与-70 °C 保存样品无明显差异。参照冷冻干燥活疫苗 37 °C 10 d,可置换为 4 °C 24 个月的标准,GEM 冷冻干燥样品至少可以保存 24 个月。

# 3 讨论

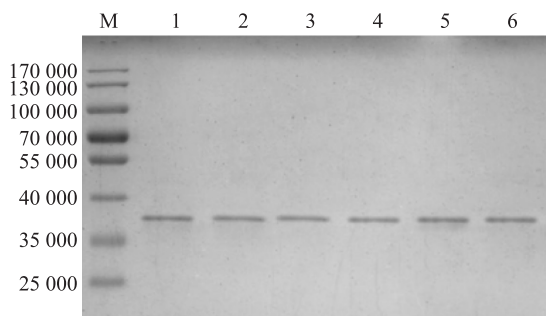
乳酸乳球菌 GEM 颗粒,其本质是一种细菌细胞壁肽聚糖骨架,是经过热酸处理,去除菌体内核酸及绝大部分菌体蛋白质制备成的无活性的菌体外壳。热酸处理的主要作用是去除细胞壁中的蛋白质、多糖、脂类和磷壁酸等成分<sup>[6]</sup>。磷壁酸按其位于细胞表面固定的方式可以分为脂磷壁酸和壁磷壁酸 2 种。壁磷壁酸不深入质膜,其末端以磷酸二酯键与肽聚糖的 N-乙酰胞壁酸残基连接。脂磷壁酸可跨越肽聚糖层,其末端以磷酸共价键方式连接于质膜中糖脂的寡糖基部分<sup>[7-8]</sup>。低浓度的 HCl 和  $H_2SO_4$ 水解细胞壁中的多糖<sup>[9-10]</sup>,将其煮沸可以水解细胞中的脂磷壁酸<sup>[11]</sup>。脂磷壁酸可穿透厚的肽聚糖层,跨越质膜,去除磷壁酸相当于在细胞壁上开孔,在保证菌体形态的同时,可以使内容物流出,从而去除肽聚糖之外的其他杂质。



A:MG1363 菌体;B:0.10 mol/L HCl 制备的 GEM 颗粒;C:0.05 mol/L  $H_2SO_4$  制备的 GEM 颗粒;D:0.60 mol/L TCA 制备的 GEM 颗粒。

图 6 GEM 颗粒透射电镜观察结果

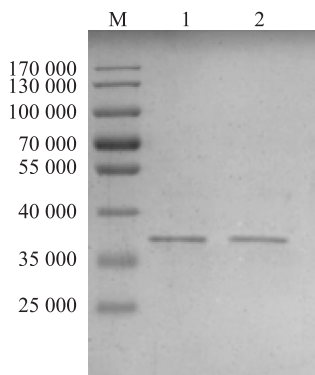
Fig.6 Transmission electron microscope images for GEM particles



M:蛋白质分子量标准;1:保存 0 个月;2:保存 2 个月;3:保存 6 个月;4:保存 12 个月;5:保存 15 个月;6:保存 18 个月。

图 7 SDS-PAGE 分析 4 °C 下保存不同时间 GEM 颗粒的锚定活性

Fig.7 SDS-PAGE assay of the GEM anchoring activity under different stored time

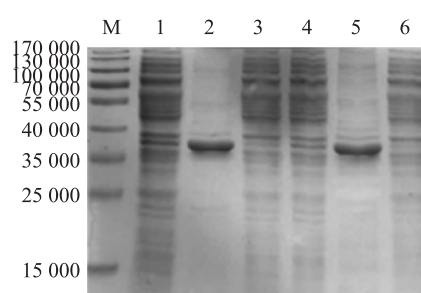


M:蛋白质分子量标准;1:未冷冻干燥的 GEM 颗粒;2:冷冻干燥后的 GEM 颗粒。

图 8 冷冻干燥对 GEM 颗粒锚定活性影响的 SDS-PAGE 分析

Fig.8 SDS-PAGE assay of the GEM anchoring activity after freeze-drying

TCA 可作为磷壁酸提取剂和蛋白质沉淀剂,常用于乳酸菌肽聚糖提纯。TCA 制备 GEM 颗粒的得



M:蛋白质分子量标准;1,4:PA 表达产物;2:-70 °C 保存 GEM+PA;3:-70 °C 保存 GEM+PA 的上清液;5:37 °C 保存 15 d 的 GEM+PA;6:37 °C 保存 15 d 的 GEM+PA 上清液。

图 9 冷冻干燥 GEM 颗粒耐老化后的活性鉴定

Fig.9 Identification of aging resistance of GEM particles after freeze-drying

率及锚定活性与其他 2 种稀酸差异不明显,但其杂蛋白质去除效率差,可能是因为 TCA 作为蛋白质变性剂使蛋白质构象发生改变,暴露出更多的疏水基团,使蛋白质聚集沉淀<sup>[12]</sup>。此外,随着蛋白质分子量的增大,TCA 可能渗入分子内部而使之较难被完全除去。有报道称,酸的类型对制备 GEM 颗粒的影响不大,灭活细菌溶液的 pH 维持在 1.0 才是 GEM 制备成功与否的关键因素<sup>[13]</sup>。本试验结果显示,在 pH=1.0 时,HCl 与  $H_2SO_4$  制备的 GEM 颗粒质量优于 TCA。

近年来,GEM 抗原载运系统已成功用于多种抗原的表面展示,成为疫苗开发的新型候选系统<sup>[1-2, 14-15]</sup>。GEM 颗粒结合锚钩蛋白形成的复合物,-80 °C、4 °C 和室温保存 12 个月均不影响锚钩蛋白活性。无需冷链保存是 GEM 颗粒疫苗的一大优势<sup>[13]</sup>。本试验对 GEM 颗粒保存期进行研究,

GEM 颗粒作为一种无活性的菌体外壳,其本质就是肽聚糖骨架,表现出良好的稳定性。

本研究结果表明,0.025 mol/L 的  $H_2SO_4$  与 0.100 mol/L 的 HCl 可制备高质量的 GEM,二者效果无明显差异,该结果为制备高质量的 GEM 颗粒提供了试验依据。

#### 参考文献:

- [1] BOSMA T, KANNINGA R, NEEF J, et al. Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 880-889.
- [2] AUDOUY S A L, VAN SELM S, VAN ROOSMALEN M L, et al. Development of lactococcal GEM-based pneumococcal vaccines[J]. *Vaccine*, 2007, 25(13): 2497-2506.
- [3] BAHEY-EL-DIN M, GAHAN C G M. *Lactococcus lactis*: from the dairy industry to antigen and therapeutic protein delivery[J]. *Discovery Medicine*, 2010, 9(48): 455-461.
- [4] RAMASAMY R, YASAWARDENA S, ZOMER A, et al. Immunogenicity of a malaria parasite antigen displayed by *Lactococcus lactis* in oral immunisations[J]. *Vaccine*, 2006, 24(18): 3900-3908.
- [5] RAMIREZ K, DITAMO Y, RODRIGUEZ L, et al. Neonatal mucosal immunization with a non-living, non-genetically modified *Lactococcus lactis* vaccine carrier induces systemic and local Th1-type immunity and protects against lethal bacterial infection[J]. *Mucosal Immunology*, 2010, 3(2): 159-171.
- [6] JAFAREI P, EBRAHIMI M T. *Lactobacillus acidophilus* cell structure and application[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5(24): 4033-4042.
- [7] VOLLMER W, BLANOT D, DE PEDRO M A. Peptidoglycan structure and architecture[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(2): 149-167.
- [8] KOC C, GERLACH D, BECK S, et al. Structural and enzymatic analysis of TarM glycosyltransferase from *Staphylococcus aureus* reveals an oligomeric protein specific for the glycosylation of wall teichoic acid[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(15): 9874-9885.
- [9] CUMMINS C S, HARRIS H. The chemical composition of the cell wall in some gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character[J]. *Microbiology*, 1956, 14(3): 583-600.
- [10] TAKÉ A, NAKASHIMA T, INAHASHI Y, et al. Analyses of the cell-wall peptidoglycan structures in three genera *Micromonospora*, *Catenuloplanes*, and *Couchioplanes* belonging to the family Micromonosporaceae by derivatization with FDLA and PMP using LC/MS[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2016, 62(4): 199-205.
- [11] CAMPBELL L K, KNOX K W, WICKEN A J. Extractability of cell wall polysaccharide from *lactobacilli* and *streptococci* by autoclaving and by dilute acid[J]. *Infection and Immunity*, 1978, 22(3): 842-851.
- [12] 郭立安, 阎哲, 张晓楠, 等. 三氯乙酸对蛋白质结构稳定性的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2001, 22(22): 102.
- [13] VAN ROOSMALEN M L, KANNINGA R, EL KHATTABI M, et al. Mucosal vaccine delivery of antigens tightly bound to an adjuvant particle made from food-grade bacteria[J]. *Methods*, 2006, 38(2): 144-149.
- [14] ZADRAVEC P, STRUKELJ B, BERLEC A. Improvement of LysM-mediated surface display of designed ankyrin repeat proteins (DARPs) in recombinant and nonrecombinant strains of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus* species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(6): 2098-2106.
- [15] SANDERS R W, MOORE J P. Native-like Env trimers as a platform for HIV-1 vaccine design[J]. *Immunological Reviews*, 2017, 275(1): 161-182.

(责任编辑:王 妮)