

苹果浓缩汁中嗜酸耐热菌多克隆抗体的制备及纯化*

王峰,李建科,刘海霞,江凯

(陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安, 710062)

摘 要 从苹果浓缩汁中分离得到嗜酸耐热菌,首次以耐热菌繁殖体及芽胞体分别作为免疫抗原,采用耳静脉注射及肌肉注射2种途径,对8只日本大耳白兔进行免疫,分别获得多克隆抗体。使用试管凝集法分别检测得到的抗体效价及其特异性,并采用饱和硫酸铵沉淀法及DEAE离子交换法纯化多克隆抗体,最终经SDS-PAGE电泳进行鉴定。以耳静脉注射和肌肉注射为免疫途径,制备得到的抗体效价分别达到1:2560和1:640。耳静脉注射得到的抗体效价高且免疫周期短,因此,耳静脉注射途径为最佳免疫途径;抗体特异性及纯化效果好。首次建立了苹果浓缩汁中耐热菌的家兔免疫程序,获得了多克隆抗体。

关键词 苹果浓缩汁,嗜酸耐热菌,免疫程序,多克隆抗体

酸土环脂芽孢杆菌(*Allyclobacillus acidoterres-tris*),俗称为耐热菌、嗜酸耐热菌、耐热耐酸菌等^[1,2]。该菌可以引起巴氏灭菌果汁(如苹果汁、桔汁、芒果汁等)的腐败,使苹果汁发生后浑浊,浊度升高,产生难以接受的气味,甚至在包装物底部形成白色沉淀^[4],以目前的杀菌方法不能消除该菌,严重影响我国苹果浓缩汁的国际化发展,因此,控制和快速检测耐热菌是目前很多苹果汁生产厂家遇到的较为棘手的问题,也是亟待解决的问题^[3,4]。

目前耐热菌的检测方法主要有传统检测方法和基于PCR的检测方法。耐热菌的传统平板培养计数法,虽然可靠和准确,但耗时长,检测结果无法及时反馈至生产线上;国内,仇农学、李建科教授领导的课题组分别首次建立了耐热菌的PCR及QC-PCR快速检测方法,该法快速、特异,但分析时间仍较长,所用仪器设备及试剂昂贵,对技术操作要求高。本文首次制备耐热菌繁殖体及芽胞体多克隆抗体,并对抗体特异性等性质进行了初步研究,以为建立耐热菌酶联免疫分析技术(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

浓缩苹果汁:pH值3.5~4.5,可溶性固形物含量为(71±1)°Brix,由陕西恒兴果汁有限公司提供。

标准菌:*A. acidoterrestris* DSM3922,购自德国。

第一作者:硕士研究生(李建科教授为通讯作者)。

*农业部苹果产后处理和加工项目

收稿日期:2008-10-24,改回日期:2008-11-18

免疫动物:健康长耳雄性日本大耳白兔8只,体重(2.00±0.25)kg。由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

供试菌种:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)及嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*),均由陕西师范大学生命科学学院提供。

福氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant),福氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant),均购自Sigma公司。

1.2 主要仪器设备

WFJ2000型紫外可见分光光度计,尤尼卡(上海)仪器有限公司;BS224S电子天平,德国赛多利斯;数显恒温水浴锅,上海福玛实验设备有限公司;KQ-250DB型数控超声波清洗器,昆明市超声仪器有限公司;电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司;垂直平板凝胶电泳槽,北京六一厂;pH计,上海精密科学仪器有限公司;微量进样器,上海荣泰生化工程有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 抗原的制备

引用美国KFL方法^[5]从浓缩苹果汁中分离耐热菌,参照东秀珠等人编写的《常见细菌系统鉴定手册》中的鉴定方法^[6],与标准菌进行比较鉴定,得到嗜酸耐热菌分离菌株。

1.3.1.1 麦氏比浊法标准曲线的建立

采用麦氏比浊法测定耐热菌的含量。

1.3.1.2 繁殖体抗原的制备

将培养 1~2d 的培养物用无菌生理盐水洗下,经过沉淀处理,取沉淀物加适量无菌生理盐水参照麦式比浊管配成 1×10^8 个/mL 的菌液。以活菌体作为繁殖体抗原。

1.3.1.3 芽孢体抗原的制备

选用培养 5~7d 的斜面培养物,按照 1.3.1.2 的方法制备菌悬液,进行热休克处理,制得芽孢体抗原,置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.3.1.4 抗原的乳化

吸取等量的佐剂和抗原,乳化 10 min 左右即可^[7,8]。

1.3.2 多克隆抗体的制备

1.3.2.1 免疫方法的建立

分别采用耳静脉注射法和肌肉注射法对大耳白兔进行免疫,测定受试动物血清的效价,比较研究 2 种免疫方法,确定制备多克隆抗体的方案。

(1) 本试验研究中,肌肉注射法分为采用加佐剂注射和不加佐剂注射 2 种方法,具体方法分别如表 1 所示。注射抗原分别以 I、II、III、IV、V 和 VI 标号。其中, I 抗原为嗜酸耐热菌繁殖体与弗氏完全佐剂乳化制成; II 抗原为嗜酸耐热菌繁殖体与弗氏不完全佐剂乳化制成; III 抗原为嗜酸耐热菌芽孢体与弗氏完全佐剂乳化制成; IV 抗原为嗜酸耐热菌芽孢体与弗氏不完全佐剂乳化制成。4 种抗原的乳化方法均按照 1.2.1.3 的方法进行。

表 1 肌肉注射免疫方法

抗原种类	家兔类型	加佐剂免疫剂量 $\times 10^{-9}$ / 个 \cdot mL ⁻¹	不加佐剂免疫剂量 $\times 10^{-8}$ / 个 \cdot mL ⁻¹	免疫时间	免疫途径
繁殖体抗原	雄性大耳白兔 (2 只)	1.0 mL I 抗原	1.0 mL V 抗原	第 1 天	背部肌肉
		1.0 mL II 抗原	1.0 mL V 抗原	第 15 天	背部肌肉
		1.0 mL II 抗原	1.0 mL V 抗原	第 29 天	背部肌肉
芽孢抗原	雄性大耳白兔 (2 只)	1.0 mL III 抗原	1.0 mL VI 抗原	第 1 天	背部肌肉
		1.0 mL IV 抗原	1.0 mL VI 抗原	第 15 天	背部肌肉
		1.0 mL IV 抗原	1.0 mL VI 抗原	第 29 天	背部肌肉

(2) 采用耳静脉注射法,注射抗原分别以 V 和 VI 嗜酸耐热菌芽孢体菌悬液。具体方法如表 2 所示。标号。V 抗原为嗜酸耐热菌繁殖体菌悬液; VI 抗原为

表 2 耳静脉注射免疫方法

抗原种类	家兔类型	免疫剂量 $\times 10^{-8}$ / 个 \cdot mL ⁻¹	免疫时间	免疫途径
繁殖体抗原	雄性大耳白兔(2 只)	0.5 mL V 抗原	第 1 天	耳静脉
		1.0 mL V 抗原	第 5 天	耳静脉
		1.5 mL V 抗原	第 9 天	耳静脉
		2.0 mL V 抗原	第 13 天	耳静脉
		2.5 mL V 抗原	第 17 天	耳静脉
		2.5 mL V 抗原	第 21 天	耳静脉
		2.5 mL V 抗原	第 25 天	耳静脉
		2.5 mL V 抗原	第 29 天	耳静脉
芽孢抗原	雄性大耳白兔(2 只)	0.5 mL VI 抗原	第 1 天	耳静脉
		1.0 mL VI 抗原	第 5 天	耳静脉
		1.5 mL VI 抗原	第 9 天	耳静脉
		2.0 mL VI 抗原	第 13 天	耳静脉
		2.5 mL VI 抗原	第 17 天	耳静脉
		2.5 mL VI 抗原	第 21 天	耳静脉
		2.5 mL VI 抗原	第 25 天	耳静脉
		2.5 mL VI 抗原	第 29 天	耳静脉

1.3.2.2 效价的测定——试管凝集试验

用试管凝集法检测免疫血清效价^[9]。

1.3.3 抗体特异性检验

将所采集的兔抗血清与大肠杆菌(*E. coli*)、枯草

芽孢杆菌(*B. subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)及嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)等分别做试管凝集试验,操作同 1.3.2.2 所述方法。

1.3.4 多克隆抗体的纯化

1.3.4.1 盐析法初步纯化抗体

采用饱和硫酸铵溶液(SAS)盐析法纯化得到的抗体^[10]。

1.3.4.2 DEAE-纤维素离子交换法进一步纯化抗体

取经过预处理后的 DEAE-纤维素,倒入层析柱中,进行进一步的纯化^[10,12,13]。

1.3.4.3 SDS-PAGE 电泳鉴定试验

吸取不同量的样品溶液加入相应的加样槽底部。电泳结束后,染色约 3h,脱色直至背景蓝色褪去^[11]。

2 结果与讨论

2.1 麦氏比浊法标准曲线的建立

经过作标准曲线,得出菌浓度与吸光度值呈良好的线性关系,回归方程为 $Y=0.090\ 1X+0.025\ 5$, $R^2=0.999\ 2$ 。其中 Y 表示吸光度值, X 表示菌浓度 ($\times 10^9$ 个/mL),标准曲线如图 1 所示。

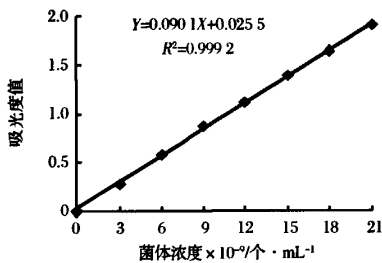


图 1 麦氏比浊法的标准曲线

2.2 多克隆抗体制备结果

2.2.1 免疫方法的建立

由图 2 可以看到,3 种免疫方法中以耳静脉注射方法效果最好,血清效价增长快而高。从第 4 次注射

开始,随着注射量的增加,血清效价增长较快。因为前 3 次注射为免疫应答阶段,所以效价意义不大。而肌肉注射免疫,效价的增长较慢,免疫效果不佳。其中由于佐剂具有提高免疫效果的作用,所以加佐剂肌肉注射要比不加佐剂直接注射菌体效果要好,最后一次免疫效价达到 1 : 640。

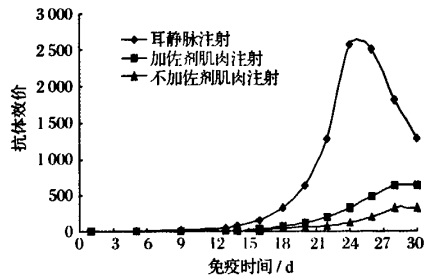


图 2 不同免疫途径效价变化曲线

另外,从表 3 可以看出,繁殖体抗原的免疫效果较芽胞体免疫效果好。这可能与繁殖体表面抗原决定簇数量多且复杂有关,需要进一步进行研究。

2.2.2 抗体特异性检验

将耳静脉注射方法得到的耐热菌繁殖体抗体及芽胞体抗体作为试验对象。经试管凝集试验检测,耐热菌抗体 IgG 与果汁中常存在的菌株交叉反应结果见表 4。由表 4 可知,兔抗耐热菌繁殖体(或芽胞体)免疫血清与试验的 5 株耐热菌属以外的其他种属的微生物不具有交叉反应性。仅与耐热菌芽胞体(或繁殖体)抗原有一定的交叉反应性。这可能是 2 种抗原具备一定的共同抗原所致。试验结果表明,所制备的耐热菌免疫血清能够有效地将耐热菌及其他种属的微生物区分开来,具有较强的特异性。

表 3 不同免疫途径血清效价变化表

免疫途径	抗原类型	免疫时间/d						
		4	9	13	17	21	25	29
耳静脉注射	繁殖体	1 : 5	1 : 10	1 : 80	1 : 320	1 : 640	1 : 2 560	1 : 1 280
	芽胞体	1 : 5	1 : 10	1 : 40	1 : 160	1 : 320	1 : 1 280	1 : 1 280
加佐剂肌肉注射	繁殖体	-	1 : 3	1 : 20	1 : 80	1 : 200	1 : 480	1 : 640
	芽胞体	-	1 : 5	1 : 10	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320
不加佐剂肌肉注射	繁殖体	-	-	1 : 3	1 : 20	1 : 80	1 : 160	1 : 320
	芽胞体	-	-	1 : 3	1 : 10	1 : 40	1 : 80	1 : 160

表 4 耐热菌免疫血清与试验菌株的交叉反应结果

项目	耐热菌繁殖体抗原	耐热菌芽胞体抗原	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	蜡状芽孢杆菌	巨大芽孢杆菌	嗜热脂肪芽孢杆菌
耐热菌繁殖体抗体	1 : 1 280	1 : 80	-	-	-	-	-
耐热菌芽胞体抗体	1 : 80	1 : 1280	-	-	-	-	-

2.3 多克隆抗体的纯化结果

2.3.1 纯化后抗体含量与效价

用紫外分光光度仪测定耐热菌繁殖体和耐热菌芽胞体抗体含量,抗体含量都在 10 mg/mL 以上(表

5),达到抗体酶标记的浓度(10 mg/mL)。测得 2 种抗体效价在 1 : 640 左右,均下降 1 个滴度,但其效价仍达到试验的要求。在纯化过程中,效价有所下降属正常试验结果。

表 5 纯化后抗体含量与效价

项目	OD 值		Pr/mg · mL ⁻¹	效价
	280nm	260nm		
耐热菌繁殖体抗体	0.940	0.445	10.34	1 : 640
耐热菌芽胞体抗体	1.024	0.558	10.72	1 : 640

2.3.2 SDS-PAGE 电泳结果

经饱和硫酸铵沉淀法(盐析法)纯化得到的耐热菌繁殖体及芽胞体多克隆抗体,虽然杂带减少,但仍未达到试验要求。进一步采用 DEAE 离子交换层析法对抗体进行纯化。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳可知(图 3,图 4),经柱层析纯化后的耐热菌繁殖体及芽胞体多抗 IgG,纯度明显升高,抗体在泳道中呈现 2 条带,分子量约为 53 ku 和 24 ku,分别与抗体的重、轻链分子量大小一致,并且,经过纯化后的抗体,仍然具有较高的活性,与抗原反应效价可达 1 : 640。因此可以说明试验达到较好的抗体纯化效果。

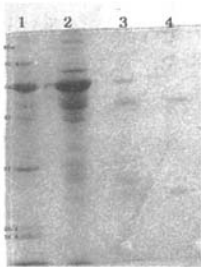
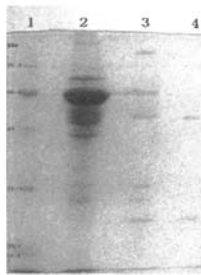


图 3 繁殖体多克隆抗体纯化前后 SDS-PAGE 图谱



1 - Marker(14.4 ~ 97.4 ku); 2 - 纯化前血清蛋白; 3 - 盐析纯化后血清蛋白; 4 - DE-52 柱层析后抗体。(图 4 与此相同)。

图 4 芽胞体多克隆抗体纯化前后 SDS-PAGE 图谱

3 结论

本文从苹果浓缩汁中分离纯化得到耐热菌。以

耳静脉注射为免疫途径,第 1 天以耐热菌繁殖体和芽胞体抗原进行免疫,之后每隔 4 天免疫 1 次,剂量每次递增 0.5 × 10⁹ 个/mL,周期均为 25 d,最终获得 1 : 2 560 的繁殖体多克隆抗体和 1 : 1 280 的芽胞体多克隆抗体,抗体的特异性良好。采用盐析法及 DE-AE-纤维素离子交换法纯化抗体,经 SDS-PAGE 电泳鉴定,抗体纯化效果好。

本文首次对嗜酸耐热菌的繁殖体及芽胞体作为免疫抗原进行多克隆抗体的制备,发现 2 种抗原均具有较好的免疫效果,经过对比试验发现耳静脉注射免疫途径获得的抗体效价高且免疫周期短,是一种较好的免疫途径,符合颗粒性抗原的免疫特性。而肌肉注射由于涉及佐剂的使用,使得免疫周期延长,且效价不高,因此我们选择耳静脉注射途径为最佳免疫途径。

参 考 文 献

1 李静媛. 果汁中的嗜酸耐热菌[J]. 食品与发酵工业, 2002,29(3):84 ~ 88

2 陈世琼,胡小松,石维妮,等. 浓缩苹果汁生产过程中脂环酸芽孢杆菌的分离及初步鉴定[J]. 微生物学报,2004,44(6):816 ~ 819

3 Lu Yinrong, Yeap Foo L. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace [J]. Food Chemistry, 1997,59(2):187 ~ 194

4 李建科,冯再平,仇农学. 耐热菌的竞争定量 PCR 检测方法优化与建立[J]. 中国农业科学, 2006,39(2):375 ~ 380

5 <http://www.kfl.com/atb.html>

6 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.353 ~ 384

7 Walls I, Chuyate R. Isolation of Alicyclobacillus acidoterrestris from fruit juices [J]. J AOAC Int, 2000, 83 (5):1 115 ~ 1 120

8 Keiichi Goto, Kaoru Mochida, Mika Asahara. Alicyclobacillus pomorum sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess ω-alicyclic fatty

- acids, and emended description of the genus *Alicyclobacillus* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology, 2003, 53: 1 537 ~ 1 544
- 9 王德斌. 快速制备抗原-佐剂乳化液新方法[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(6): 596 ~ 598
- 10 王延华, 李官成, Zhou Xiafu. 抗体理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2005. 203 ~ 224
- 11 Guo Fen, Li Shiqian, Chu Yanhui. High-level expression, polyclonal antibody preparation and sub-cellular localization analysis of mouse Rhox5 protein[J]. Protein Expression and Purification, 2007, 54 (2): 247 ~ 252
- 12 Kou Geng, Shi Shu, Wang Hao. Protein Expression and Purification, 2007, 52(1): 131 ~ 138
- 13 Xu Lihui, Chi Xiaoyun, Li Fengyao. Preparation and Identification of Human Soluble sPD-L1 and Its Antibodies[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(1): 106 ~ 111

Preparation and Purification of Polyclonal Antibody Against *Alicyclobacillus acidoterrestris* from Apple Juice Concentrate

Wang Feng, Li JianKe, Liu Haixia, Jiang Kai

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Shaanxi Xi'an 710062, China)

ABSTRACT In order to build the rapid detection method of *A. acidoterrestris* from the Apple Juice Concentrate (AJC) using the enzyme - linked immunoassay following, the polyclonal antibody against *A. acidoterrestris* was prepared in this paper firstly. We used the propagule and brood - gemma of the thermo tolerant bacteria as the immune antigen, which were separated from the AJC. Immune tests were performed on eight large ear white rabbits with ear vein intravenous and intramuscular injection way respectively and the polyclonal antibodies were obtained. Titers and specificities of the antibodies were detected by tube agglutination test. The polyclonal antibodies were purified by saturated ammonium sulfate and DEAE ion exchange chromatography, and verified by SDS - PAGE electrophoresis. The titers of polyclonal antibody obtained with ear vein intravenous and intramuscular injection way were 1 : 2 560 and 1 : 640, respectively. The results showed the antibody obtained by ear vein intravenous injection had higher titer and shorter immunization period than that obtained by intramuscular injection. The specificity and purification effect of antibody were well. The immunization procedure of rabbit with *A. acidoterrestris* from the AJC was built and its polyclonal antibody was obtained for the first time.

Key words apple juice concentrate, *A. acidoterrestris*, immunization procedure, polyclonal antibody

(上接第 32 页)

Screening Lactic Acid Bacteria to Produce Extracellular β -glucosidase and the Preliminary Studies of the Enzyme Properties

Wan Zhentang, Yang Lijie

(Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

ABSTRACT Fluorescent substrate method was used to screen lactic acid bacteria to produce extracellular β -glucosidase from 20 strains which can utilize cellobiose. Ten strains were selected. In MRS culture, higher crude enzyme activity was found in the *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0320. Further studies were carried out to examine the characteristics of its production and properties. The production of extracellular β -glucosidase by the KLDS1.0320 was induced by cellobiose, and depended on the concentration. The optimum pH of crude enzyme activity is 4.8 and the optimum temperature is 37°C. The enzyme still had activity in PH value of 4.0 and at the temperature of 48°C.

Key words Lactic acid bacterium, β -glucosidase, cellobiose