

技术与方法

一种制备植物病原细菌菌体蛋白的简易方法

赵友福

张志雍

葛起新

(农业部植物检疫实验所, 北京 100026) (浙江农业大学植保系, 杭州 310029)

摘要 本文报道了一种简易制备植物病原细菌菌体蛋白的改良丙酮法。细菌细胞经丙酮处理, 真空干燥或冷冻干燥后, 用冰冷蒸馏水提取细胞蛋白。经等电聚焦电泳分析, 结果表明, 比常规方法(如溶菌酶法、超声波法等)有简单、快速、重复性好、影响因素(如核酸类物质)少和成本低等优点。

关键词 改良丙酮法; 病原细菌; 蛋白质; 等电聚焦电泳

蛋白质作为微生物基因组第二水平信息的表达, 在微生物的生物学、免疫学、生物化学的研究中起着重要作用, 这些研究完全依赖于足够的细胞蛋白。

除了提取胞外酶、多肽激素及蛋白酶不需破碎细胞外, 对于细胞内的各种大分子物质的分离提纯均需要事先将细胞破碎, 使大分子物质充分释放出来。细菌细胞壁较坚韧, 破碎细胞的方法很多, 如化学、物理、机械等方法各有其优缺点^[1]。由于所研究的微生物, 所需蛋白质的量及分析方法不同, 蛋白质抽提方法也不同^[2]。为此, 我们在试验过程中设计了改良丙酮法, 通过改变细胞膜透性提取细胞蛋白, 经电泳分析发现制备的蛋白质样品具有特异性; 此法不仅简单快速, 而且重复性好, 成本低, 具有实际应用价值。

材 料 和 方 法

(一) 供试材料

1. 细菌菌株及来源:

番茄溃疡病菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) 281, 美国。

苜蓿萎蔫病菌 (*C. m.* subsp. *insidiosus*) 0019, 美国。

马铃薯环腐病菌 (*C. m.* subsp. *sepe-donicus*) C2140, 美国。

小麦密穗病菌 (*C. tritici*) C-6, 美国。

鸭茅密穗病菌 (*C. rathayi*) 2574, 新西兰。

菜豆萎蔫病菌 (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) 20, 美国。

缠绕红球菌 (*Rhodococcus fascians*) 211, 北京。

2. 仪器及试剂: LKB 2117 多用电泳仪及附件(瑞典); 真空冷冻干燥仪(美国 LAB-CONCO)。

丙酮、丙烯酰胺(LKB)、甲叉双丙烯酰胺(FluKa)及其它电泳试剂均为 Pharmacia-LKB 公司的产品。

3. 523 培养基(g): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.30, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.4, 蔗糖 10, 聚蛋白胨 8.0, 酵母粉 4.0, 琼脂 17, 加蒸馏水至 1000ml, pH 7.2。

(二) 方法

1. 蛋白质样品制备: 采用改良丙酮法制备^[2]。细菌菌株在 523 平板培养基上 24℃ 培养 56h, 用 0.01mol/L Tris-HCl pH8.0 缓冲液洗取, 4℃ 6000g 离心 10min, 沉淀经同一缓冲液悬浮, 重复离心两次, 沉淀加预先冷却至 -20℃ 丙酮(AR)10ml, 0—4℃ 冰浴作用 10min, 4℃, 6000g 离心 10min。设计此方法时, 将沉

* 原为浙江农业大学植保专业硕士研究生。

淀粉减压真空抽滤或冷冻干燥去净丙酮, 加预先冷却至 4℃ 的冰冷水 5ml 悬浮, 并在冰浴中振荡抽提 5—10min, 4℃ 6000g 离心 10min, 取上清于 16# 透析袋中, 用分子量 6000 或 20000 的 PEG 4℃ 浓缩, 样品保存于样品管, 电泳前经 DNase I 37℃ 处理 15min。

在制样过程中, 将菌量恒定, 而采用不同的丙酮处理时间 (5, 10, 15min), 不同的丙酮量 (5, 10, 15, 20ml) 和不同的样品抽提液的种类 (SDS、无离子水或 1% Triton×100) 及量 (5, 10ml) 进行制样, 观察结果变化。

2. 等电聚焦电泳 (IEF): 样品电泳在 LKB-2117 多用电泳仪上进行。两性载体、电解质及膜采用 Pharmacia-LKB 公司的产品。凝胶配制及电泳方法参考郭尧君^[3]的方法。电泳条件为 1500V, 50mA, 25W。

3. 垂直板型聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 电泳在分离胶为 T10%, C2.7% 的 0.375mol/L Tris-HCl pH8.9; 浓缩胶为 T3%, C2.7% 的 0.125mol/L Tris-HCl pH6.8 的不连续胶系统上进行 (均含 0.1% SDS)。样品缓冲液为含 2% SDS, 10% 甘油, 0.001% 溴酚蓝, 5% 巯基乙醇的 0.25mol/L Tris-HCl, pH6.8。样品与样品缓冲液 1:1 混合, 沸水浴 5min, 加混合液 40μl。电泳的开始条件为 50V, 15mA; 样品进入分离胶后加大至 150V 35mA, 电泳 4—5h。常规固定, 染色, 脱色。设样品标准蛋白为对照。样品标准蛋白为 Pharmacia 公司产品, 分别是分子量为 94000 的磷酸化酶; 67000 的牛血清白蛋白; 43000 的卵清蛋白; 30000 的碳酸酐酶; 21000 的胰蛋白酶抑制物。

试验结果

(一) IEF 重复性试验

三次重复试验结果 (图 1) 表明, 采用改良丙酮法制备的 0019 和 C2140 两株菌菌体蛋白质样品, 在一定标准条件下培养、制样和电泳, 不仅重复性很好, 而且经测定其蛋白质是以 pH

值小于 7 的蛋白质和酶为主。

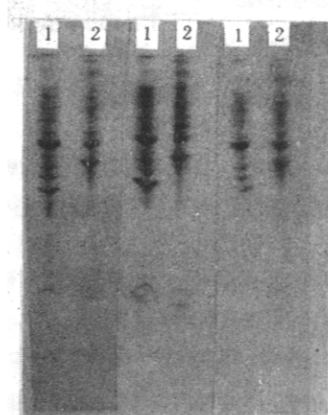


图 1 IEF 重复性试验

1. 0019 2. C2140 (样品原液 10 15mg/ml, 加样 15μl, pH3.5—10, 电泳 2h)

(二) 制样条件对电泳的影响

制样条件如丙酮处理时间 (5, 10, 15min), 丙酮量 (5, 10, 15, 20ml), 样品抽提液量 (5, 10ml) 及样品抽提液种类 (SDS, 无离子水, 1% Triton×100) 的改变, 在恒定菌量情况下进行改良丙酮法制样, 在同样条件下进行 IEF 电泳。试验结果表明, 除丙酮量的变化与细菌制成丙酮粉直接有关外, (即在菌量恒定情况下, 丙酮量低于一定值, 达不到使细胞膜透性发生变化。) 其它制样条件的变化对最后抽提液的蛋白质没有影响。适当增加或减少丙酮量与最后获得的抽提液蛋白质浓度有关。另外, 样品经 DNase I 处理, 对提高电泳分辨率有利。

(三) *Clavibacter* 属四株代表菌株蛋白谱带的比较

IEF 电泳结果 (图 2) 表明, 在 *C. m. subsp. insidiosus* (0019)、*C. m. subsp. sepedonicus* (C2140) 亚种间和 *C. tritici* (C-6)、*C. rathayi* (2574) 种间, 蛋白质谱带的区别均很明显。

由此看出, 应用此法制备的蛋白质样品具有分类价值。

为 15000 — 81300。说明经改良丙酮法制备的蛋白质以小分子量蛋白质为主。

讨 论

细菌细胞经丙酮处理后, 细胞膜透性发生改变, 破坏了蛋白质和酯质的结合, 以致破坏细胞, 但有利于蛋白质、酶等物质的分离提取^[4]。

过去丙酮粉仅用于动物组织。于 1983 年 Bhaduri S 和 Demichick P H 首次应用丙酮处理细菌, 以氮气流除去丙酮后, 以 SDS 抽提细胞蛋白, 经 SDS-PAGE 分析表明, 用此法制备的蛋白质组成和产量与用超声波破碎法和玻璃珠研磨法制备的蛋白质组成和产量相似, 并广泛适用于 G⁺ 和 G⁻ 细菌^[2]。我们在试验过程中, 采用真空抽滤法或冰冻干燥法代替氮气流, 以彻底去除丙酮, 同时使大样品同步进行去丙酮。以无离子水或 Triton×100 代替 SDS, 以减少细胞破碎, 降低离子浓度, 高速离心后直接获得细胞蛋白样品, 更适用于酶分析。本试验还表明了, 在恒定菌量和标准培养条件下, 丙酮量恒定, 丙酮处理时间、抽提液种类和体积的变化对标准状态下的电泳结果没有影响, 而且经 DNase 处理可提高 IEF 电泳的分辨率。改良丙酮法抽提的蛋白质样品经 IEF 电泳分析, 重复性好, 并以 pH 值小于 7 的蛋白质为主; 经 SDS-PAGE 测定, 该样品以小分子量蛋白为主。通过代表菌株的比较试验表明, G⁺ 植病棒杆菌的亚种、种、属之间均存在显著差别。说明改良丙酮法制备的蛋白质具有特异性, 对其分类等方面有实际应用价值。由此可见, 改良丙酮法具有简单、快速、重复性好、成本低等优点, 该方法还可自由控制制备规模, 对科研和教学均能适用。

参 考 文 献

1. 中山大学生物系微生物学教研室编: 生物技术导论, 人民教育出版社, 北京, 第 85 — 120 页, 1979。
2. Bhaduri S & P H Demichick: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(4):941 — 943, 1983.
3. 郭尧君: 薄层等电聚焦技术, 中国生物物理学会, 北京, p.62, 1988。
4. 郭杰炎, 蔡武城: 微生物酶, 科学出版社, 北京, 1986。

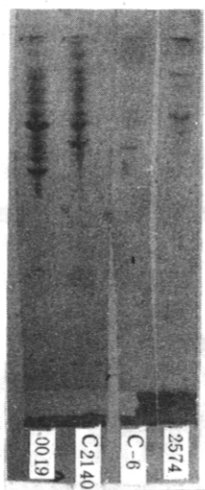


图 2 四株代表株蛋白谱带的比较

1. 0019 2. C2140 3. C-6 4. 2574 (样品原液 10—15mg/ml, 加样 15 μ l, pH3.5—10, 电泳 h)

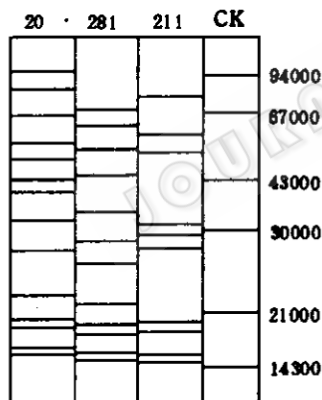


图 3 SDS-PAGE 电泳示意图

(样品浓度 15mg/ml, 电泳 5h, 加样 40 μ l)

(四) 改良丙酮法制样 SDS-PAGE 电泳

电泳结果表明 (图 3), 三个代表菌株的蛋白谱带除个别的相同外, 存在明显差异。根据标准蛋白所得的标准曲线, 求得三个植病棒杆菌代表株的蛋白质分子量范围分别是番茄溃疡病菌 *C. m. subsp. michiganensis* (281) 为 15000 — 69000; 菜豆萎蔫病菌 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (20) 为 15000 — 85000; 缠绕红球菌 *Rhodococcus fascians* (211)