

大肠杆菌细胞水解液中的二氨基庚二酸

吴栢桦 郜金荣 浦秋文 汤运昌 张珈敏 蒋达和

(武汉大学病毒学系, 武昌)

二氨基庚二酸 (DAP) 是一种中性氨基酸。Work^[1] 首先在白喉棒状杆菌的水解物中分离和鉴定出 α -二氨基庚二酸。后来的研究发现, 除金色葡萄球菌和乳酸杆菌外, DAP 几乎存在于所有细菌的细胞壁中^[2]。

为了制备基因载体 λ charon 4 A 噬菌体 DNA, 必须培养 λ charon 4 A 的宿主, E Coli K₁₂ 突变株 DP₅₀ SupF。DP₅₀ Sup F 是二氨基庚二酸、胸腺嘧啶和生物素营养缺陷型菌株^[3], 必须在培养基中提供上述成份才能生长。DAP 在国内无商品供应, 因此我们用水解方法制备含 DAP 的溶液^[4] (简称水解液), 并用于 DAP

营养缺陷型菌株的培养。实验结果证明此方法简便可行, 制备的水解液成功地用于支持 DAP 营养缺陷细菌的生长。同时对水解液中的 DAP 进行了纸上层析, 并以这种方法分离水解液中的 DAP, 用微生物法进行鉴定。

一、水解液的制备

菌株: E. Coli K₁₂; 培养基为普通营养肉汤培养基, 其组成为 (%): 蛋白胨 1.0, NaCl 0.5, 牛肉膏 0.5。

将 37℃ 培养 24 小时的新鲜 E. Coli K₁₂ 菌株接种于两只 500 毫升三角瓶 (种子瓶) 每瓶装培养基 80 毫升, 37℃ 振荡培养 24 小时, 以

10% 接种量转接于发酵瓶中(500 毫升三角瓶, 装培养肉汤 80 毫升), 培养液总体积 2000 毫升, 37℃ 振荡培养 24 小时后, 培养液 3500 转/分离心 30 分钟, 去上清液, 沉淀用重蒸馏水洗两次, 收集湿菌体 (6 克), 加 2 N H₂SO₄ 60 毫升, 1.4 公斤蒸汽压下加热 35 分钟, 颜色呈深棕色。再以 3500 转/分离心 30 分钟, 去上清液用 10 N 的 NaOH 调 pH 至 7.2, 置冰箱 (0℃ 左右) 2—3 小时, 离心去沉淀, 上清液置冰箱中 2 小时, 有长方形、六边形晶体析出, 离心去结晶, 上清液即为水解液(终体积为 60 毫升), 灭菌后保存备用。

二、水解液支持生长试验

将上述水解液配制成供 *E. Coli* K₁₂ DP₅₀ Sup F 菌株 (DAP 缺陷型、胸腺嘧啶缺陷型, 生物素缺陷型, 引自复旦大学遗传研究所) 生长的 NZYDT 培养基即在水解液中加入含 (%) 胰蛋白胨 1、酵母膏 0.5、胸腺嘧啶 0.004、NaCl 0.5、琼脂 1.5, 调 pH 为 7.2, 灭菌, 每 100 毫升此培养液加入 1 毫升分别灭菌的 1 M MgCl₂。灭菌条件均为 15 磅 20 分钟取混合液制成斜面或平板培养基。

将 DP₅₀ Sup F 菌株接种于上述斜面, 同时以不含水解液的斜面为对照。结果在含有水解液的 NZYDT 斜面上菌体生长丰满, 而对照斜面上不能生长, 证明按上述方法制备的水解液可以支持 DAP 营养缺陷型细菌的生长。将水解液稀释 2、3、5、10 倍后制成的 NZYDT 斜面均能支持 DP₅₀ Sup F 菌株生长, 但稀释 10 倍的生长较差。

在上述培养基上生长的 DP₅₀ Sup F 菌株完全能支持 λ 噬菌体突变株 Charon 4A 繁殖。用双层平板检查时, 有裂解噬斑出现。

滤纸对 DAP 有强烈的吸附作用。在除去水解液中的盐类结晶及微量沉淀时, 我们曾用滤纸过滤法, 结果滤液制成的 NZYDT 斜面不能供 DP₅₀ Sup F 菌株生长。

水解 *E. Coli* K₁₂ 菌体时所用的 H₂SO₄ 的浓度、加热的压力及时间对 DAP 的产量有影响。当 H₂SO₄ 浓度低于 2N 或压力低于 1.2 公

斤, 时间少于 30 分钟时, 消化液色浅, 用此种水解液制备的 NZYDT 斜面, DP₅₀ Sup F 菌株生长极少。

三、水解液中 DAP 的层析

1. 展层剂为正丁醇: 冰乙酸: 乙醇: 水 (4:1:1:2)。新华 2 号滤纸。以适当稀释的水解液为样品, 同时以门冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、甘氨酸、胱氨酸等氨基酸 (10 微克分子) 作对照。展层时间 2 小时, 室温 25℃, 前沿高度 11 厘米, 以茚三酮、丙酮溶液 (0.1%, 重量/体积) 显色。100℃ 处理 2 分钟, 结果发现一个未知斑点, R_f 值为 0.14, 颜色较特殊, 开始为桔黄色, 约一天后转为桔红色或桃红色。

将水解液约 0.6 毫升, 在滤纸上垂直于层析方向作条状点样, 以正丁醇系统做展层剂, 层析后以茚三酮对样品条的两端显色, 然后将两端桔黄色区带相对应的未显色滤纸剪下, 此即 DAP 带。将纸带剪碎, 置试管中加入 0.1 N HCl 2 毫升, 37℃ 保温洗脱 6—8 小时, 再以 0.1 N HCl 2 毫升洗涤一次, 2000 转/分离心 5 分钟, 将上清液移小瓶中烘烤蒸发至干, 用 0.5 毫升无离子水溶解, 以 NaOH 调 pH 至 7.0—7.2 灭菌后备用。此即 DAP 带洗脱液。图 1 为 DAP 带洗脱液与几种对照氨基酸的层析图谱。

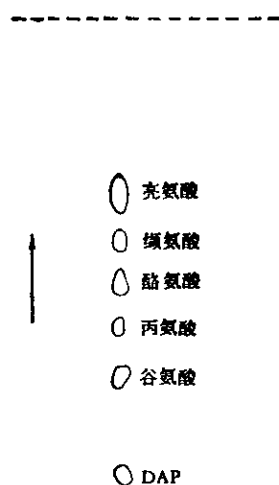


图 1 DAP 及对照氨基酸在正丁醇系统中的层析图谱

2. 展层剂为甲醇:水:盐酸(10N):吡啶(80:17.5:2.5:10)^[4]。用新华1号滤纸,样品为前述 DAP 带洗脱液,并以赖氨酸为对照。展层时间4小时,室温30℃左右,前沿高达20厘米。其余条件同上。结果样品 R_f 值为0.58,呈橄榄绿色。

四、DAP 的微生物法鉴定

微生物法是定性确定 DAP 的好方法。做法是:将可能是 DAP 的层析斑洗脱,以洗脱物培养 DAP 缺陷型细菌,如该菌能生长,则可确定该层析斑为 DAP。

水解液用正丁醇系统展层后,在所述 DAP 带的上方约距1厘米处剪下与 DAP 带等重的一条滤纸带,此即非 DAP 带。同样剪下一条等重的空白滤纸,使之吸收0.5毫升水解液,然后烘干。上面二条纸带按前述 DAP 带相同方法处理得到非 DAP 带洗脱液及水解液滤纸洗脱液。

从新鲜 DP₅₀ Sup F 菌株斜面上取菌苔一环,置1毫升 SM 缓冲液(NaCl 0.1N, MgSO₄ 5mM, Tris 50mM, 明胶 0.01%)中,摇动分散,然后倒入20毫升冷至45℃的不含上述大肠杆菌水解液的 NZYDT 固体培养基中,摇匀倒入平皿,凝固后在琼脂上置4个不锈钢圈(见图2)。

A 为水解液滤纸洗脱液;B 为 DAP 带洗脱液;C 为非 DAP 带洗脱液;D 为无离子水。每个钢圈中加10滴,37℃保温36小时内在 A、B 四周出现混浊的菌圈。说明 DAP 层析带洗脱液和水解液一样可以支持 DAP 营养缺陷型细菌的生长。故证明该层析带确为 DAP 层析带。

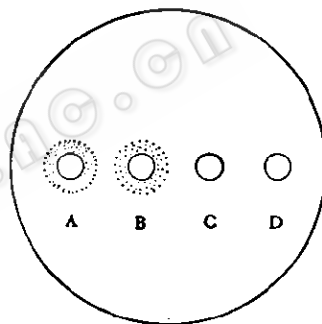


图2 DAP 的微生物法鉴定

参 考 文 献

- [1] Work, E.: *J. Biochem.*, **49**: 17—23, 1951.
- [2] Work, E.: *Nature*, **179**: 841—847, 1957.
- [3] Blattner, F. R. et al.: *Science*, **196**: 161—169, 1977.
- [4] Lederberg, J. et al.: *J. Bacteriol.*, **75**: 143—161, 1958.
- [5] Rhuland, L. E. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**: 4844—4846, 1955.