

大肠杆菌 JM₈₃ 受体细胞膜结构的研究

何启智 周九元 居蜀生 顾慧莲 高卫星

(武汉大学病毒系)

人们对细菌的表面结构,虽然有一定的了解^[1,2],但对大肠杆菌 JM₈₃ 分子克隆受体细胞表面结构的研究工作,尚未见有报道。了解受体菌生物膜的特性,对提高分子克隆的转化率有实际意义。我们对 JM₈₃ 受体细胞的细胞壁醌类和膜蛋白,进行了初步研究。

材 料 和 方 法

(一) 材料

菌株: 大肠杆菌 JM₈₃ (*Escherichia coli*)。

LB 培养基: 按文献[3]配制。

染色液: 考马斯亮蓝 R₂₅₀ 0.25g, 溶于 454

ml 50% 甲醇和 46ml 冰乙酸中。

脱色液: 取 75ml 冰乙酸、50ml 甲醇溶于 875 ml 蒸馏水中。

(二) 方法

1. 菌体的培养: 从 JM₈₃ 菌株斜面挑取一环于 5ml LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 转接于 500ml LB 液体培养基中, 3000rpm 离心, 收集菌体, 用 10mM NaCl 洗涤一次。

2. 原生质体的制备: 将上述菌体加 25ml 预冷的 0.75M 蔗糖-10mM tris-HCl (pH7.5) 液, 迅速与菌体混合均匀, 放置 15 分钟左右, 立即以每 ml 60 μ g 的比例, 加入溶菌酶。冰浴中放置 2 分钟, 轻轻搅拌, 并加入 2 倍体积的冷的

1.5mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (pH7.5)。20 分钟后, 再加入 4 倍量的冰水, 加入 1ml 溶菌酶 (10mg DNA 酶溶于 10ml 蒸馏水) 和 1ml RNA 酶 (3mg 溶于 10ml 蒸馏水中), 37°C 保温 20 分钟。

3. 原生质膜的分离: 自下而上分三层, 分别加 2M 蔗糖, 0.5M 蔗糖, 原生质悬液各 20ml, 24000rpm 离心 2 小时。未破坏的细菌沉于管底。膜制剂则处于 0.5M 和 2M 蔗糖溶液的界面上。

4. 原生质膜蛋白的提取: 将膜样品溶解在含 1% SDS、1% 巯基乙醇、10% 甘油和 0.02% 溴酚蓝的 0.01M, pH7.2 磷酸盐缓冲液中, 在 100°C 加热 5 分钟。蛋白质的最后浓度一般为 0.05—1mg/ml。

5. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[5,6]: 10% 聚丙烯酰胺凝胶, 电泳缓冲液为 0.1% SDS, 0.1M 磷酸盐缓冲液连续电泳系统 (pH7.2), 80V, 50mA, 4—6 小时。考马斯亮蓝 R_{250} 染色。

6. 外壁层中脂多糖的提取与糖的检定: 取 20g 干燥的 JM_{83} 菌悬浮于 350ml 蒸馏水中。加温至 65°C , 加入 350ml 65°C 的 90% 苯酚, 激烈振荡五分钟, 迅速置于冰水中冷却, $100,000\times\text{g}$ 离心 4 小时。用玻棒慢慢搅出位于分界面的脂多糖, 悬浮于水中, 重复进行超速离心, 即可得到提纯的脂多糖。

取细胞外壁层脂多糖 5ml 于安瓿瓶中, 加

入 0.3ml 4N 盐酸, 然后封口。于 100°C 水解 2 小时, 室温冷却。开管后真空干燥, 加 0.2ml 蒸馏水, 将样品溶解, 用氨水调 pH 至中性。

7. 糖的薄层析: 取 6g 硅胶 H, 15ml 0.5% 羧甲基纤维素溶液, 于小研钵中研磨数分钟后, 倒于 $6\times 16\text{cm}$ 玻璃板上, 展平并用吹风机稍吹干, 置 105°C 烘箱中, 活化 30 分钟。将制备好的样品和已知糖的混合液, 分别点在薄层板上。点样量 $30\mu\text{l}$ ($20\mu\text{g}$), 分次滴加, 使点扩散后, 直径不超过 5mm。将薄板放于密闭的层析缸中, 倒入新配制的展开剂 [乙酸乙酯: 甲醇: 乙酸: 水 = 10:4:4:1 (V/V)], 用倾斜上行法, 进行展层。当展开剂距薄层板上端约 1cm 处取出, 电吹风吹干, 用苯胺-二苯胺-磷酸显色剂喷雾后, 于 85°C 烘烤 10 分钟, 并测定其 R_f 值。

结果与讨论

1. 原生质膜蛋白电泳: 经电泳后, 可见到 16 条蛋白亚基带 (图 1), 其中主带有 8 条。并进行了电泳扫描 (图 2)。

2. 分子量的测定^[7]: 以五种标准蛋白的相

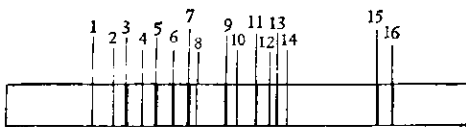


图 1 JM_{83} 受体菌原生质膜蛋白电泳图

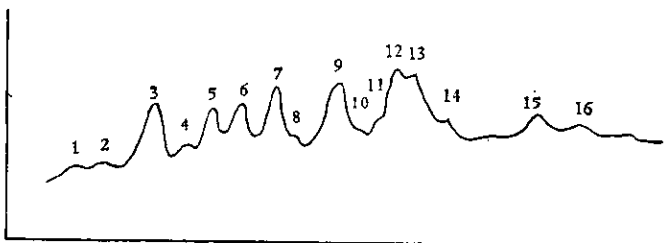


图 2 JM_{83} 受体细胞膜蛋白电泳扫描图

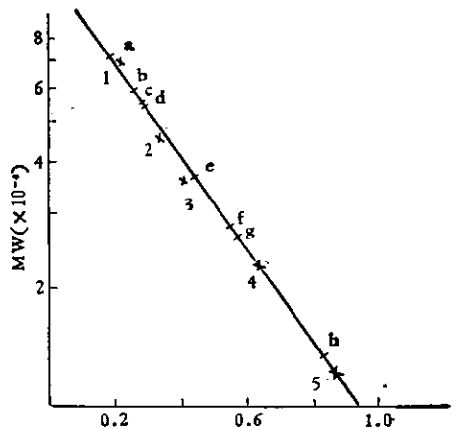


图 3 标准蛋白分子量及 JM_{83} 原生质膜蛋白亚基 8 条主带分子量坐标图

1. 牛血清白蛋白 (68000), 2. 卵清蛋白 (45000), 3. 胃蛋白酶 (35000), 4. 胰蛋白酶 (23300), 5. 细胞色素 C (12000)

a: 第 3 条带, b: 第 5 条带, c: 第 6 条带, d: 第 7 条带, e: 第 9 条带, f: 第 12 条带, g: 第 13 条带。

对迁移率为横坐标,以分子量的对数为纵坐标作图,并在图上查得分子量,在 82500—11000 之间(图 3)。

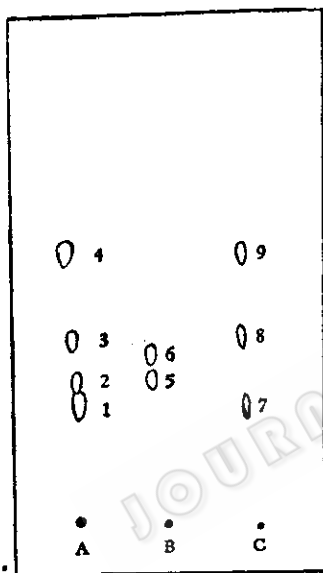


图 4 JM₈₃ 菌外壁层脂多糖中糖的薄层层析

A:样品, B和 C:为标准糖

1,2,3,4: 样品中各种糖的斑点; 5: 标准半乳糖; 6: 标准木糖; 7: 标准葡萄糖 8: 标准甘露糖; 9: 标准鼠李糖

3. JM₈₃ 菌外壁层脂多糖中糖的薄层层析: 用硅胶H铺板,乙酸乙酯、甲醇、乙酸和水作展开剂,用苯胺-二苯胺-磷酸显色,样品中可见到不同颜色的斑点,并可与已知糖中的半乳糖、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖的斑点相对应,具有相近的 R_f 值。因此可证明, JM₈₃ 菌的外壁层中含有半乳糖、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖(图 4)。但根据实验所测几种糖的 R_f 值,与文献所报道其他材料所测的值不完全相同,这可能与我们的材料来源及条件有关。

参 考 文 献

- [1] Sharon, N.: *Sci. Amer.*, **220**(5): 92—98, 1969.
- [2] Chapman, D. and G. H. Dodd: *Physiochemical Probes of Membrane Structure*, In "Structure and Function of Biological Membranes", ed. by L. I. Rothfield, Academic Press, London and New York, 1971.
- [3] Martham, M. H.: *Virology*, **54**: 94, 1973.
- [4] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 科学出版社, 北京, 1964年。
- [5] Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**: 680—686, 1970.
- [6] Maizel, J. V.: *Virology*, **36**: 115, 1968.
- [7] Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406, 1969.