

冰冻断裂电子显微镜技术研究鸡败血支原体细胞膜

黄芬 王苏民 鲁崎晤 吴玉薇 傅一工 张兰萍 傅广礼*

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

近年来冰冻断裂电子显微镜技术是研究生物膜的超微结构最有效的方法之一。有人采用此种技术对莱氏衣原体^[1,2]、丝状支原体山羊变种^[3]、鸡败血支原体 A5969^[4]、以及螺旋支原体^[5]等进行研究中。发现有些为家畜、家禽病原体,其膜断裂面复型上存在直径约为50—100 Å 的球形蛋白质颗粒。

本文报道用鸡败血支原体 S₆ 菌株为实验材料,用仿制的 Bullivant-AmesII 型简易冰冻断裂装置^[6],对完整的支原体细胞或分离的支原体膜进行的实验结果。

一、材料和方法

1. 鸡败血支原体 S₆ 菌株系农业部兽医药品监察所赠。生长于人工培养基的该支原体,在 37℃ 培养 36 小时后收集细胞,并用 β-缓冲液洗两次。详细操作参考文献[7]。

2. 鸡败血支原体膜的制备 采用低渗法破膜,超速离心(48000 × g),并用 1:20β-缓冲液洗二次^[7]。

3. 超声法^[8]制备脂质体 取大豆磷脂溶于氯仿:甲醇(4:1)中,配成 200 毫克/毫升的溶液。取含大豆磷脂 30 毫克的上述溶液,置于小烧杯内,在真空干燥器中抽干;加入 1 毫升 10 mM Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)充分搅匀,吸至塑料安瓿中,封口;在超声波清洗槽中处理(10—15 千赫,250 瓦)10 分钟,即形成脂质体。

4. 链霉菌蛋白酶 E 水解支原体膜 取鸡败血支原体膜悬液(蛋白浓度 1 毫克/毫升)加入链霉菌蛋白酶 E,酶浓度分别为 0.5 毫克/毫升,1 毫克/毫升,在 50℃ 水解 18 小时后,冷至室温;

加入 1:20β-缓冲液洗涤,超速离心(100,000 × g)1 小时;取洗涤后的膜悬液加入 35% 甘油 Tris-HCl 缓冲液中浸透半小时,进行冰冻断裂;另取不加链霉菌蛋白酶的膜悬液经同样条件处理作为对照。

5. 冰冻断裂与电镜观察 主要参考 Tillack^[11]方法,并作适当改进。取鸡败血支原体 S₆ 细胞,膜及大豆磷脂脂质体,分别加入含 35% 甘油 Tris-HCl 缓冲液中(pH8.0),使甘油最终浓度为 20% 左右,膜蛋白浓度约为 10 毫克/毫升。浸透半小时。然后取一定量样品滴入样品池,快速投入液氮冰冻固定,冷刀断裂后,当真空度为 5×10^{-5} 毫米汞柱时,用铂-碳进行复型。用 70% 硫酸腐蚀去复型上样品。复型用蒸馏水洗数次,放铜网上晾干,在 Hu-11 电镜下观察。

二、结果与讨论

鸡败血支原体 S₆ 菌株的完整细胞或分离的膜,经过冰冻断裂处理后,膜的断裂面均显示出直径约为 50—100 Å 的球形颗粒。颗粒分布不对称,凸面比凹面为多,这与其它种类支原体膜冰冻断裂实验结果一致(图 1,见封 2)。

而大豆磷脂脂质体经冰冻断裂操作处理后,样品复型呈光滑状,说明鸡败血支原体细胞与膜上出现的颗粒是天然颗粒,不是操作过程中的假象和污染。

此外,我们用不同浓度的链霉菌蛋白酶 E 在 50℃ 与膜悬液保温 18 小时,结果发现当酶浓度增加至 1 毫克/毫升时,膜蛋白仍残留 20% 左

* 遗传所邓燕华参加部分工作。

右。加酶水解的膜与在 50℃ 保温的对照膜,在冰冻断裂面上的球形颗粒无明显差别(图 2 见封 2)因此可以认为链霉蛋白酶 E 对冰冻断裂面的颗粒并未起到水解作用。

膜的外周蛋白通过离子键或静电作用与膜类脂极性头部相结合,用比较温和的条件处理,(如改变溶液的离子强度或 pH、加入金属螯合剂等)很容易使它们从膜上溶解下来。内部蛋白主要是通过与膜脂双层水区相作用结合在膜上,它们有的插入脂双层内部,有的贯穿整个脂双层,只有用比较剧烈的手段(如超声波,去污剂等处理)才能把它们从膜上溶解下来。链霉蛋白酶对外周蛋白能全部水解。冰冻断裂电镜技术证明生物膜脂双层中嵌有内部蛋白,且为不对称分布。内部蛋白嵌入脂双层深度因蛋白质种类不同而各异。

关于支原体膜的冰冻断裂面显示出球形颗粒,并证明其为蛋白质,已有报道。1973 年 Tourtellotte 等人^[9]将莱氏衣原体,在缺氨基酸或加有抑制蛋白质生物合成的嘌呤霉素的莱氏衣原体的培养基中,培养一定时间后,再制备膜,并用冰冻断裂技术观察膜断裂面,结果发现球形颗粒明显减少。他们认为这些球形颗粒为蛋白质,在膜上的功能与主动运送有关。Branton^[10]等报道,用链霉蛋白酶水解红细胞膜,发现被水解后的膜的冰冻断裂面上的颗粒有 70% 消失。Tourtellotte^[9]等报道,用链霉蛋白酶水解莱氏衣原体膜后,不能肯定膜的冰冻断裂面上的颗粒是否发生改变。我们用链霉蛋白酶 E 水解鸡败血支原体膜,发现膜蛋白被水解后,

冰冻断裂面上仍有球形颗粒存在,膜蛋白含量为 20% 左右。其分布情况与对照膜相似,但球形颗粒略大于 100 Å,这可能是由于长时间保温蛋白颗粒发生聚集所致。若增加链霉蛋白酶 E 至 1 毫克/毫升,仍未能使蛋白含量继续降低,这似乎表明因剩余的 20% 蛋白已嵌入脂双层内部,链霉蛋白酶 E 不能与之作用。Morowitz^[11],用链霉蛋白酶水解莱氏衣原体膜后,用超薄切片电镜观察,发现膜的厚度减少,反差降低。酶虽可使膜蛋白大部分水解,但即使继续增加酶量,也仍残存少量蛋白质,他们认为这部分膜蛋白可能深嵌在膜的内部。这种设想与我们的实验结果一致。

参 考 文 献

- [1] Tillack, T. W. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **219**, (1), 1970, 123.
- [2] Tourtellotte, M. E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **66** (3), 909, 1970.
- [3] Rottem, S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **323** (4) 495, 1973.
- [4] Bernstein-Ziv, R.: *Can. J. Microbiol.*, **15**, 1125, 1969.
- [5] Razin, S.: *J. Bacteriol.*, **116**, 1421, 1973.
- [6] 吴玉薇等:《生物化学与生物物理进展》,1,46,1979.
- [7] 黄芬等:《实验生物学报》,14,117,1981.
- [8] 中国科学院生物物理所三室生物膜组:《生物化学与生物物理进展》,4,1,1978.
- [9] Tourtellotte, M. E. et al.: *Science*, **179** (4068), 84, 1973.
- [10] Branton, D.: *Phil. Trans. Roy. Soc., Lond. B*, **261**, 133, 1971.
- [11] Morowitz, H. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **183** (2) 276, 1969.

[本文于1983年5月30日收到]

(上接第 71 页)

中心赵华明教授、陈豫副教授对本文提出了宝贵意见,一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 田心棣:《生物化学与生物物理进展》,2,72,1983.
- [2] M. Montal et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol. **69** No. 12, 1972.

- [3] William A. Huemoeller et al.: *Journal of Chemical Education*, Vol. **47**, 469, 1970.
- [4] H. T. Tien: *Bilayer Lipid Membrane (BLM): Theory and Practice*, 14, 562, Marcel Dekker INC. New York, 1974.
- [5] 孙纹琦等:《生物化学与生物物理进展》,4,38,1981.

[本文于1983年9月19日收到]

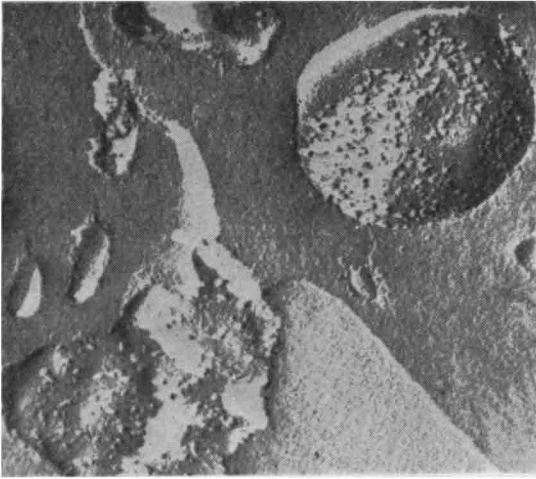


图1 鸡败血支原体 S₀ 菌株细胞膜冰冻断裂复型
膜的断裂面与完整细胞相似 (×100,000)

《ATP:RNA 腺苷酰转移酶
的纯化及其应用》一文的图 2

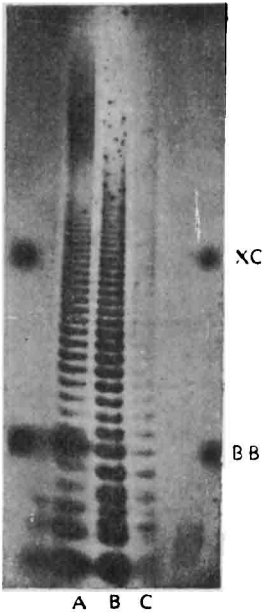


图2 鸡败血支原体 S₀ 菌株细胞膜
冰冻断裂复型电泳图

- a. 对照, 经 50℃ 保温 18 小时
(×27,500)
- b. 用链霉蛋白酶 E 水解(0.5 毫克/
毫升) 50℃ 保温 18 小时
(×29,700)
- c. 用链霉蛋白酶 F 水解(1 毫克/
毫升) 50℃ 保温 18 小时
(×40,900)

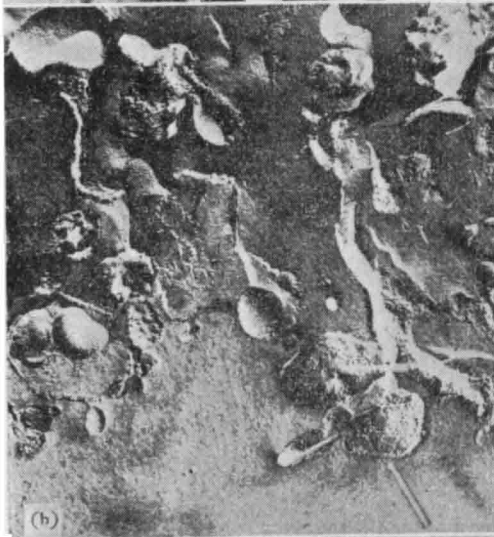


图2 Poly(A) 片段长度的
放射自显影

A: 水稻胚 mRNA
B: Poly(A)-BSMV-RNA
C: Poly(A)-Y-tRNA
20% 聚丙烯酰胺凝胶 22ν/
cm·bmA 17 小时