

imental Investigations on Ultraweak Photon Emission), p107, Urbam and Schwarzenberg Münchenwien-Baltimore, 1979.

[3] Popp, F. A.: *Laser-Electro-optik* 3, 28, 1980.

[4] 严智强等:《生物化学与生物物理进展》,1979年,第2期,第48页。

[5] 翁渝民等:《复旦学报》(自然科学版),1979年,第2

期,第41页。

[6] 李庆国等:《生物化学与生物物理进展》,1981年,第1期,第66页。

[7] Perelygin, V. V.: *Biophysics* (俄), 11, 616, 1966.

[本文于1981年10月7日收到]

用 SDS凝胶电泳和等电聚焦法研究支原体膜蛋白

陈建文 孙 詮* 蒋以文 黄 芬

(中国科学院生物物理研究所)

膜蛋白的研究中,常缺乏一种有效的溶解和分离膜蛋白的方法。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳虽已广泛应用在膜蛋白的分析中^[1,2],并对不同种的支原体进行比较分类^[3,4]。但该方法仅根据蛋白质分子量一个参数,因此在使用上有它一定的局限性。

Merz 等人^[5]在含有 8M 脲的聚丙烯酰胺凝胶上用等电聚焦分离红细胞膜蛋白获得成功,但对胆固醇含量较高的支原体膜蛋白,由于它比红细胞和其他类型的膜更难溶解,因此即使使用非离子去污剂,如 Triton X-100、吐温、甚至阳离子去污剂去氧胆酸钠,也只能溶解总膜蛋白的 40—60%^[6],因此,等电聚焦电泳有时也很难反映支原体膜蛋白的全貌。

Ames^[7]用 SDS 溶解膜蛋白后,再在含有脲和 NP-40 的聚丙烯酰胺凝胶上进行等电聚焦电泳,得到了很多的分离带,为膜蛋白的分离、分析提供了另一种普遍适用的手段。

近年来已报道了许多用等电聚焦电泳方法分析膜蛋白的工作^[8,9],但大多数限于用红细胞和细菌作材料,对支原体膜蛋白的工作报道较少^[10]。本文用 SDS-凝胶电泳和凝胶等电聚焦电泳法鉴别两种不同支原体电泳图谱,并分析了膜蛋白的组份,比较了用不同去污剂提取膜蛋白的抽提效果。

一、材料和方法

1. 化学试剂

Triton X-100 (Fluka), TEMED (分析纯,北京化工厂), SDS (上海化学试剂采购供应站试剂厂)重结晶,丙烯酰胺 (BDH) 重结晶,链霉菌蛋白酶 E (pronase E), 甲叉双丙烯酰胺 (E. Merck) 重结晶,载体两性电解质 (Ampholine, LKB), 标准蛋白 (Sigma), 其它试剂均为分析纯。

2. 菌体培养及膜的制备

鸡败血症支原体 *S.* 由农业部兽医药品监察所赠送。莱氏衣原体 AIH 089 由江苏农科院畜牧研究所赠送。菌体的培养和膜的制备参照前文^[6]。

3. 酶活性的测定和 pronase E 水解条件
腺三磷酸 (ATPase) 和对硝基酚磷酸酯酶 (PNPPase) 的活性测定参照前文^[6]。

Pronase E 水解: 在 1:20 β 缓冲液中, 每毫升含 2 毫克膜蛋白, 加入 10% 的 Pronase E, 于 37°C 保温 30 分钟, 立刻用冰冷的 1:20 β 缓冲液稀释, 在 Tomy 离心机上 17000 rpm 离心 30 分钟。沉淀至少洗两次, 最后膜悬浮在 1:20 β 缓冲液中备用。

4. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

基本参照 Laemmli^[11] 的方法, 略有修改。含

* 北京医学院细胞室

2% SDS 的膜蛋白在 37℃ 保温 2 小时以后加入甘油使最终浓度为 5%，蛋白浓度约 2mg/ml，浓缩胶浓度为：总丙烯酰胺浓度为 3.6% (T)，交联度 3.3% (C)，分离胶浓度为：T = 10%，C = 3.3%，电泳电流每支凝胶管为 1.5 mA，4 小时后染色和脱色，参照前文^[12]。

5. 等电聚焦电泳

样品制备：参照 Ames^[7] 方法，但有较大改动。用 SDS 抽提膜蛋白时，其最终浓度分别为 1% 和 2%；70℃ 保温 30 分钟；电泳前加 2 倍体积的溶液 A (9.5M 脲，5% β-巯基乙醇，80% Triton X-100) 于 37℃ 保温 30 分钟。用去氧胆酸钠和直接用脲抽提膜蛋白，其最终浓度分别为 2% 和 8M。在 37℃ 保温 30 分钟，离心除去不溶物。样品中蛋白浓度约为 6mg/ml。

制板、电泳及染色 一薄板凝胶 11×12×0.1cm，丙烯酰胺浓度为 T = 5%，C = 3.3%，内含 8M 脲，10% 甘油和 1% Triton X-100，Ampholine 为 2.2%，其中 pH3—10，4—6，6—8 比为 3:4:4。以 0.005% TEMED 和 0.025% 的过硫酸铵在室温聚合。电泳在 LKB 2117 Multiphor 上进行。阳极溶液为 1M 磷酸，阴极溶液为 1M 氢氧化钠；用自来水冷却，加样 60—80μl，开始电泳 250V；30 分钟以后，渐升至 400V 和 600V；电泳 6 小时以后，于 800V 再聚焦 1 小时，立刻放在固定液中 (3.5% 磷基水杨酸，10% 三氯乙酸)；固定 1 小时以后，用脱色液 (25% V/V 乙醇，8% V/V 冰醋酸) 漂洗 1 小时，以除去残存在胶上的 Ampholine；在 60℃ 染色 20 分钟 (染色液：0.125 考马氏兰 R250)，脱色到清晰为止。

6. pH 测定

在薄板胶的电极之间，每厘米切等量胶，浸泡在 1 毫升的重蒸馏水中，放冰箱过夜。在 Radiometer-72 pH 计上测定 pH。

二、结果和讨论

1. 支原体膜蛋白的分子量分布及 pronase E 对膜蛋白的作用

从 SDS 不连续凝胶电泳图谱上可以检测

出 20 种以上的膜蛋白 (多肽) 的组份。从图 1、2 显示出鸡败血症支原体 *S.* 和 莱氏衣原体 AIHD 089 两个不同种间的膜蛋白的差别。这种差别表现在膜蛋白的不同数量，含量和分子量。*S.* 膜蛋白的分子量集中分布在 35000—55000 之间 (图 1A)，粗分为四个组份，其中每一个组份实际上都含有 2—4 条蛋白带，它们的分子量十分接近。莱氏衣原体 AIHD 089 的膜蛋白的分子量比较均匀地分布在 24,000—70,000 之间 (图 2A)，从染色带的深浅可以看到有 6 个组份含量较高。其中，除 2 和 5 两个组份各含有 2—3 条接近的带以外，别的都为单一的狭带。通过电泳图谱的比较，可以认为，用 SDS-凝胶电泳法可以作为鉴定不同菌种的依据。

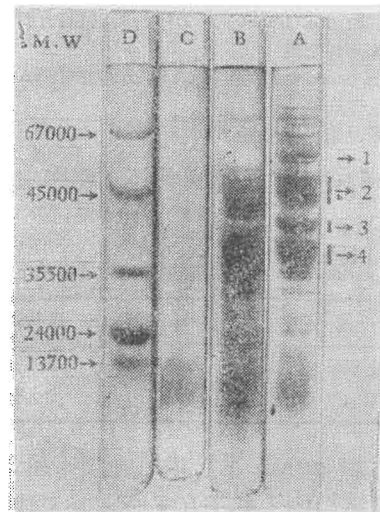


图 1 鸡败血症支原体 *S.* 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

- A. 含 2% SDS 的膜蛋白于 37℃ 2 小时
- B. 不加 pronase E 于 37℃、30 分钟后再同 A 条件处理
- C. 加 pronase E 于 37℃、30 分钟后再同 A 条件处理
- D. 标准蛋白分子量

由于位于膜表面的蛋白对 pronase 十分敏感，因此可以用 pronase 水解支原体膜，以研究某些酶的定位^[13]。我们从表 1 可以看到支原体膜被 pronase E 水解以后残留在膜上的两种酶活性。用 Lowry 法定蛋白发现有 50% 左右的蛋白被水解，而残留的蛋白可以从凝胶电泳上检出。但是在我们的 SDS-凝胶电泳的实验中，凡是用 pronase E 水解过的膜，通过 SDS 处理以后，在凝胶图谱上的蛋白几乎全部消失 (图 1

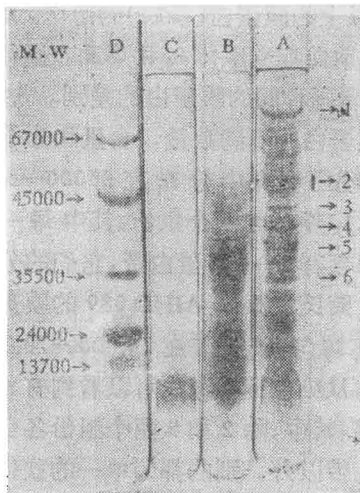


图2 莱氏衣原体 AIHD 089 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

- 含 2% SDS 的膜蛋白于 37℃ 2 小时
- 不加 pronase E 于 37℃ 30 分钟以后, 再同 A 条件处理
- 加 pronase E 于 37℃ 30 分钟后再同 A 条件处理
- 标准蛋白分子量

C 和图 2C), 对这现象目前还不能作出满意的解释。

表 1 用 pronase E 水解膜蛋白以后残留在膜上的酶活性

菌 株	ATPase%	PNPPase %
鸡败血症支原体 S_o	45	35
莱氏衣原体 AIHD089	8	50

在不加 pronase E 的对照管中, 经 37℃ 保温以后膜蛋白的大分子几乎全部降解成不同的小分子(图 1B 和图 2B)。这可能是有一些蛋白质, 尤其是外周蛋白(一般它的分子量较大)对热不稳定所致。

2. 支原体膜蛋白的等电点分布和种间差别

Ames^[7] 用 SDS 处理膜蛋白, 然后再用 NP-40 把结合在膜蛋白上的 SDS 溶解下来。NP-40 和 SDS 会形成微团 (micelles), 膜蛋白则恢复固有的电荷, 于是就可用凝胶等电聚焦电泳法分离。此方法目前很少有人用, 我们用 SDS 处理鸡败血症支原体 S_o 和莱氏衣原体 AIH 089 两种支原体膜以后, 用 Triton X-100 代替 NP-40 在聚焦图谱上也可以清晰地看到分离带。从图 3 可以看出不同菌种的膜蛋白(多肽)的组份

和含量之差异。

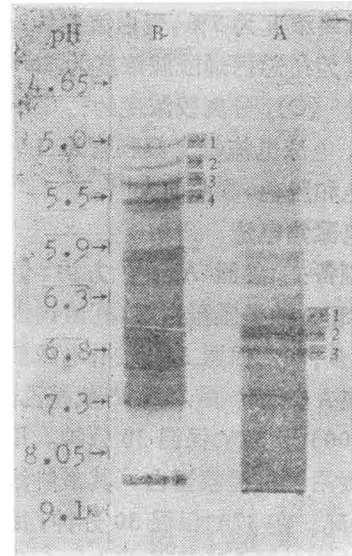


图3 用 1% SDS 处理支原体膜以后的聚丙烯酰胺薄层凝胶等电聚焦图 (见材料和方法)

A. 鸡败血症支原体 S_o B. 莱氏衣原体 AIHD 089

虽然两种菌种膜蛋白的等电点分布基本集中在 pH5.0—7.3 之间, 但在图 3 B 中明显地有四条深色带(1—4)是图 3A 鸡败血症支原体膜的图谱中缺少或含量较低的。鸡败血症支原体 S_o 有三条带集中在 pH6.5—6.8 之间(图 3A1—3)以区别于莱氏衣原体 AIHD 089。

红细胞膜蛋白的等电点在 pH 4.5—6.5 之间^[5] 支原体膜蛋白的等电点分布比红细胞膜略偏碱, 但都属酸性蛋白, 这可能是一般膜的共性。

3. 比较用不同方法抽提膜蛋白的等电聚焦图谱

在膜蛋白的等电聚焦中, 最多的还是用 8M 脲溶解膜蛋白, 并在含有 8M 脲和 Triton X-100 的凝胶上聚焦。不管是脲还是 SDS 都是蛋白的强变性剂, 因此很难通过此方法进一步研究蛋白特别是酶的性质, 我们试用去氧胆酸钠溶解膜, 发现有的酶能被去氧胆酸钠抽提出来, 并保留很高的活性^[6]。图 4 是三种不同去污剂溶解膜以后的等电聚焦图谱。多次实验证明用 8M 脲方法走出的聚焦带既整齐又清楚, 实际上脲比其它去污剂的效力都强, 它不存在用 SDS 处理以后要除去结合在蛋白周围的大

量 SDS 分子的问题,因此实验比较稳定,不管在 pH 的那一端,都有好的聚焦带。虽然经 SDS 和脲处理的图谱(图 4A、B)上,带的位置十分相似,但还有一些差异,如图 4B 上的一些带(1—8)比较集中,而 SDS 的带分布比较均匀,这可能反映出它们对蛋白质变性的不同强度和性质。

去氧胆酸钠的抽提效果显然不如前两者,但仍能看到一些聚焦带,它们的位置几乎和图

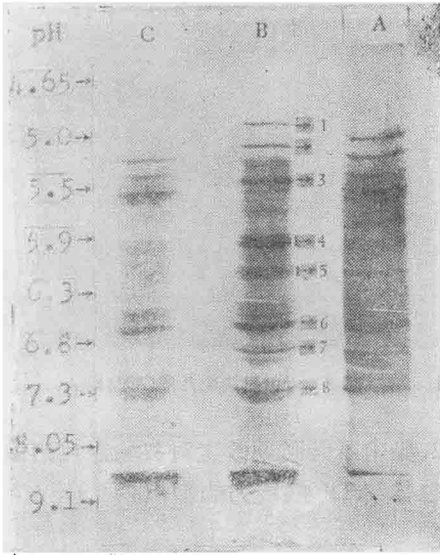


图 4 不同去污剂抽提莱氏衣原体 AIH 189 以后的薄层凝胶等电聚焦图
A. 2% SDS B. 8M 脲 C. 2% 去氧胆酸钠

4B 相同,但是在图 4B 上有很多带在图 4C 上没有或含量极低,尤其是 3、4、5、6、8 五条带,这些蛋白很可能是深埋在脂双层中或是一些蛋白质的亚基。尽管去氧胆酸钠的回收量较低,但由于它有脲和 SDS 无法比拟的优点,很可能成为研究膜上一些酶性质的一种有力手段。

参 考 文 献

- [1] Ames, G. F-L.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 634, 1974.
- [2] Schnaitman, C. A.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **157**, 541, 1973.
- [3] Gabridge, M. G. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **70**, 271, 1976.
- [4] 黄芬等:《畜牧兽医学报》, 1980年, 11期, 209 页。
- [5] Merz, O. C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **49**, 84, 1972.
- [6] 陈建文等:《生物化学与生物物理进展》, 1981年, 5 期, 35页。
- [7] Ames, G. F-L.: *Biochemistry*, **15**, 616, 1976.
- [8] Jamieson, G. A. et al.: *Anal. Biochem.*, **43**, 259, 1971.
- [9] Nakae, T.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **71**, 877, 1976.
- [10] Archer, D. B. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **513**, 268, 1978.
- [11] Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**, 680, 1970.
- [12] 陈建文等:《生物化学与生物物理进展》, 1980年, 第 6 期, 第 62 页。
- [13] Néeman, Z. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **375**, 54, 1975.

[本文于1981年11月20日收到]

实验性矽肺发病的生物化学变化研究

殷 玲 豫

(山东省医学科学院基础部)

本文介绍在矽尘对肺细胞超微结构和功能影响的研究^[1]基础上对大白鼠实验性矽肺发病过程中肺线粒体 ATP 酶与肺匀浆中糖、乳酸、核酸的生物化学变化进行了比较研究。

一、实验材料和方法

(一) 实验材料

1. 大白鼠系本所繁殖的 Wistar 品系。取

体重约 300 克雄性大白鼠染尘, 每只用 50 毫克/毫升一次气管注入。分别于染尘后一、二、四、八周处死; 部分作病理检查, 部分制成肺匀浆, 部分分离肺线粒体; 以未染尘正常大白鼠肺组织作对照。

2. 矽尘的配制: 水晶矽尘(北京医学院劳动卫生教研组提供)经 700℃ 烧灼 20 分钟后, 用浓 HCl 处理, 洗呈中性 (pH~7.0), 平均含