

用基因克隆大肠杆菌发光体系测定长链脂肪醛

吴 自 荣

(华东师范大学生物系, 上海 200062)

提 要

利用基因克隆大肠杆菌发光体系分别测试了五种长链脂肪醛和脂肪酸。结果表明: 可在几分钟内测出癸醛, 正辛醛和十二烷醛的极限浓度分别为 $1 \times 10^{-14} \text{ mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-12} \text{ mol/L}$ 和 $1 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, 是一种灵敏、快速的测试方法。

关键词 发光细菌, 生物测试, 脂肪醛

发光细菌的发光反应包括细菌荧光酶催化(通过分子氧)还原型黄素单核苷酸 (FMNH_2) 和长链脂肪醛 (RCHO) 的混和氧化作用。反

应的结果产生了生物光^[1](如图 1 所示)。因而, 长链脂肪醛或脂肪酸是细菌发光反应必不可少的物质。有些发光细菌的“暗醛突变体”,

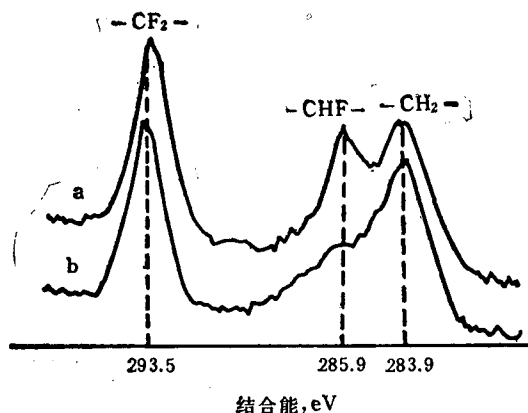


图 3 FEP 管内表面电子能谱

a. 新管; b. 废管(电泳次数大于 200 次)

5. 细胞的洗涤和贮存 最佳洗涤剂是 PBS。最佳洗涤次数为 4—6 次, 少于 4 次, t_R 增加, 多于 6 次易出现溶血。传统红细胞贮存方法不适合于 CZE。我们发现: 红细胞的 PBS 悬液 4°C 下存放两天后就难以出峰, 而用含 HPMC 的载体配制悬液 4°C 下存放 7 天后仍可得到很好的谱峰, 不过 t_R 会有所增加。但在三天内 t_R 变化不大。

6. 电压、电流和温度 电泳电压要小于 25 kV, 最佳范围为 15—20 kV。电流要控制在 200 μA 以内, 否则应减小载体的电解质浓度^[1]。毛细管要置于恒温环境, 环境温度在 $15\text{—}20^\circ\text{C}$ 为宜, 不得超过 35°C 。

7. 小结 在较优化条件下, 用 CZE 测定红细胞结果可靠, 重现性高, 分析速度快, 操作简单。但对于其他细胞, 如白血球、粒细胞等, CZE 能否适用有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 陈义, 竺安. 色谱, 1989; 7(4): 209
- 2 孙玲. 生物化学与生物物理进展, 1985; (1): 68
- 3 Cohen A S, Paulus A, Karger B L. *Chromatographia*, 1987; 24: 15
- 4 竺安. 分析测试通报, 1988; 7(2): 1
- 5 Tsuda T, Nomura K, Nakagawa G. *J Chromatogr*, 1983; 264: 385
- 6 Levine S, Levine M, Sharp K A, Brook D E. *Biophys J*, 1983; 42: 127
- 7 Heard D H, Seaman G V F. *J Gen Physiol*, 1960; 43: 635
- 8 Uzgiris E E, Kaplan J H. *J Colloid Interface Sci*, 1976; 55: 148

[本文于 1989 年 9 月 15 日收到]

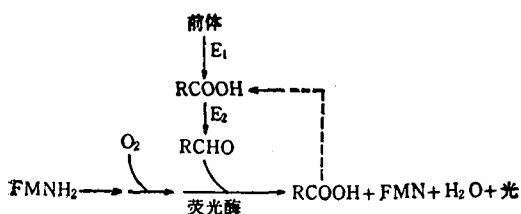


图1 细菌发光反应模式图

由于自身不能合成长链脂肪醛而失去发光能力或使发光减弱。当外加适当浓度长链脂肪醛的时候便能恢复发光。而且醛浓度与发光强度大小呈比例。Ulitzur^[1,2] 曾用此方法测定长链脂肪醛和脂肪酸,特别是豆蔻酸。Ulitzur^[3] 还曾用发光细菌的“暗醛突变体”测定脂肪酶、磷酸脂酶A和C的活性,可以在几秒钟内测出少达0.001单位脂肪酶的活性。

本文报道利用发光细菌的基因工程菌——基因克隆大肠杆菌发光体系测定长链脂肪醛的方法。

材料和方法

1. 菌株 基因克隆大肠杆菌 (*E. coli*) MM294, 其质粒上带有发光细菌费氏弧菌 (*Vibrio fischeri*) 的荧光素酶基因。由戴蔚德博士赠送。

2. 培养基 多聚蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, 氯化钠 10g, 蒸馏水 1000ml, pH7.5。固体培养基加琼脂 20g。使用前加入氨苄青霉素 50μg/ml (最终浓度)。

3. 菌体培养和菌液制备 接一单菌落入 2ml 液体培养基中, 30℃ 通气培养 12h, 以 1:50 接入含有 50ml 液体培养基中, 在同样条件下继续培养 12—13h (培养物 1:5 稀释后 OD₆₀₀ = 0.7—0.75 左右)。10000 × g, 4℃ 离心 10min, 并用 10mmol/L Tris-HCl pH8.0 缓冲液洗一次, 将收集的菌体悬于同样的缓冲液中, 置 4℃ 冰箱备用。

4. 脂肪醛溶液的制备 称取一定量的长链脂肪醛, 正辛醛 (实验试剂), 癸醛 (Fluka 产品), 十二烷醛 (Sigma 产品) 和长链脂肪酸溶于

无水乙醇中作母液。置于 -20℃ 下备用。

5. 发光强度的测定 用 DJ-I 型生物毒性检测仪和 FG-300 型生物发光光度计测定发光强度的大小 (任意单位)。在测试杯中加入 0.8ml 10mmol/L Tris-HCl pH8.0 的缓冲液, 加入 0.1ml 制备好的菌悬液, 放入测光仪的测试孔中, 用注射针筒注入 0.1ml 不同浓度的脂肪醛和脂肪酸溶液, 记录发光强度 (峰值)。

实验结果

1. 影响醛溶液刺激细菌发光的因子

(1) 温度的影响 虽然普通大肠杆菌的最适生长温度为 37℃, 但醛溶液刺激基因克隆大肠杆菌发光的最适温度则是 20℃, 如图 2 所示。这可能是由细菌荧光酶催化发光反应的性质决定的。

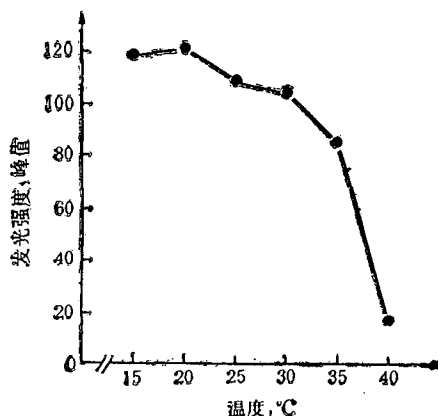


图2 温度对醛溶液刺激细菌发光的影响

细菌浓度为 2.5×10^9 细胞/ml, 十二烷醛浓度为 0.001mmol/L

(2) pH 值的影响 pH 值的大小影响着醛对荧光素酶的发光反应。在 pH6.0—8.5 的范围内, pH 值越高, 刺激发光作用越强。如图 3 所示。

(3) 乙醇浓度的影响 乙醇往往是溶解脂肪醛或脂肪酸的溶剂。在我们的实验结果中表明, 乙醇浓度的影响表现为在低浓度 (0.3% 以下) 有刺激发光作用。而在较高浓度 (1.0% 以上) 则有抑制发光作用。因此, 在用乙醇作溶剂时, 其测试浓度不得超过 1.0%。否则将会影响

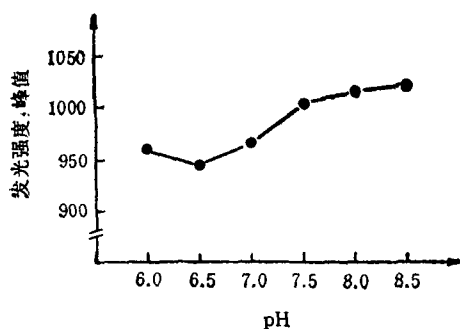


图3 pH 值对醛溶液刺激细菌发光的影响
细菌浓度为 9.18×10^8 细胞/ml, 十二烷醛浓度为 0.001 mmol/L

测试结果。

2. 脂肪醛刺激细菌发光的动力学过程

以细菌浓度为 3.3×10^9 细胞/ml, 注射 0.001 mol/L 十二烷醛溶液, 观察醛溶液刺激细菌发光过程。结果如图4所示。从图中可见, 脂肪醛刺激细菌发光是一个较缓慢的过程。在开始的4 min 内发光上升很快, 5min 达到峰值, 随后逐步下降, 到20min 时, 发光强度下降为峰值的一半。

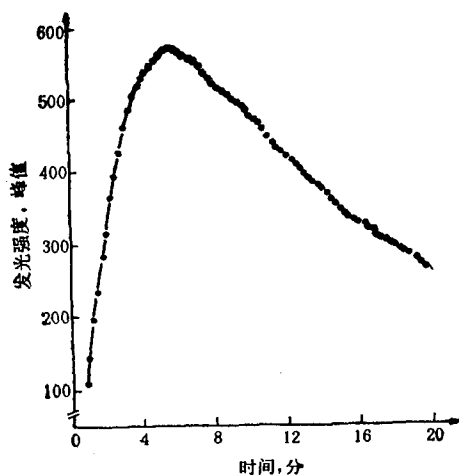


图4 长链脂肪醛刺激细菌发光的过程

3. 细菌生长及其浓度和脂肪醛刺激发光的关系

将通气培养的菌液随培养时间测定细菌浓度, 并取样注射 0.001 mol/L 的十二烷醛, 测定发光强度。结果见图5。从图中看出, 当细菌培养到12—13h, 达到对数生长期的后期时,

细菌发光对脂肪醛最敏感, 发光强度达到最大值, 随后敏感性减弱, 刺激发光下降。同时, 细菌浓度也影响脂肪醛刺激发光作用。在细菌数为 1×10^7 — 1×10^{10} 细胞/ml 范围内, 随细菌浓度的增加而刺激发光作用增强。如图5所示。

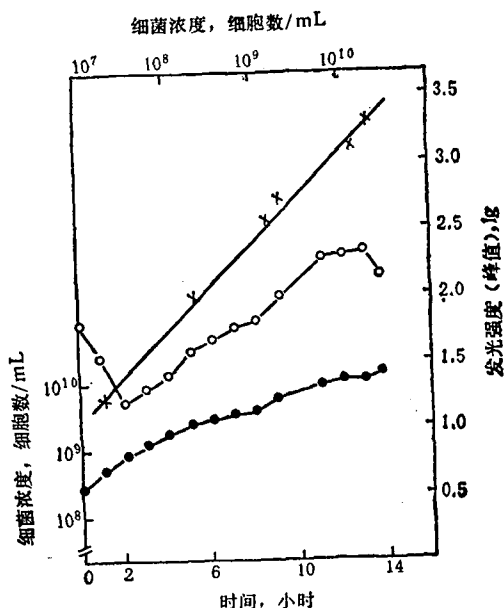


图5 细菌生长及其浓度和脂肪醛刺激发光的关系

●—●: 细菌生长; ○—○: 细菌发光; ×—×: 细菌浓度与发光

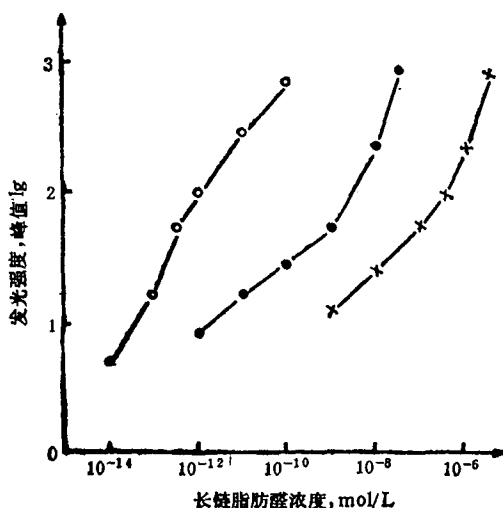


图6 长链脂肪醛浓度与细菌发光强度的关系

○—○: 癸醛; ●—●: 正辛醛; ×—×: 十二烷醛
细菌浓度为 1.75×10^{10} 细胞/ml

4. 长链脂肪醛浓度与发光强度的关系

在以上测试条件下,用这一发光体系分别测试了正辛醛,癸醛,十二烷醛等长链脂肪醛和脂肪酸,部分结果如图6所示。在一定的浓度范围内,三种脂肪醛都随浓度的增加而刺激细菌发光作用增大。

讨 论

发光细菌的发光系统共有七个基因控制,其中两个基因为荧光酶的两个亚单位编码;三个基因为提供发光反应所需的脂肪醛合成的酶编码;其余两个为调节基因。发光反应所需的FMNH₂细菌体内可以提供。在本研究中所用的基因工程菌只是把原来属于海洋发光细菌的荧光酶基因和调节基因克隆到普通大肠杆菌中,而缺少编码合成脂肪醛的酶的基因。因而必须外加长链脂肪醛或脂肪酸才能使基因工程菌发光。这样,这种基因工程菌就成为测定长链脂肪醛和脂肪酸的有用指示菌。

利用发光细菌的发光体系来测定长链脂肪醛至少有两个优点:高度灵敏和快速。在我们的实验中,少达 1×10^{-14} mol/L的癸醛可以在几分钟之内测定出来(见图6)。如果采用更加灵敏的仪器,还可以进一步提高测试的灵敏度。另一个优点是简便和经济。反应体系的基因工

(上接第386页)

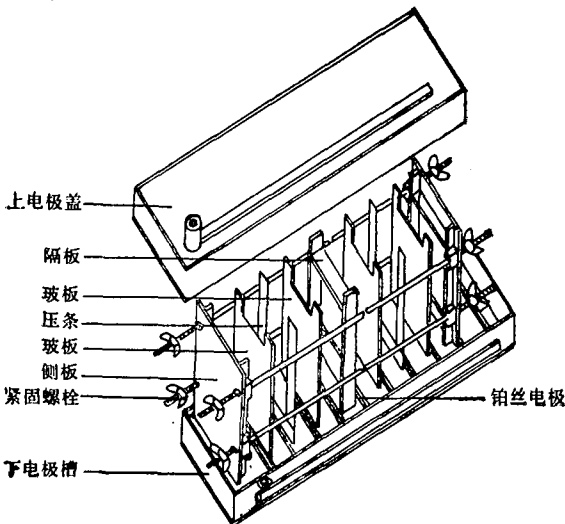


图1 组合式电泳槽结构示意图

程菌培养容易,不需要贵重仪器设备。操作十分简便。同时能随时观察脂肪醛刺激发光反应的动力学过程(见图4)。

在本研究所测试的五种长链脂肪醛和脂肪酸中,其中癸醛,正辛醛和十二烷醛具有强烈的刺激发光作用。其余次之。它们刺激发光强弱的顺序为: 癸醛 > 正辛醛 > 十二烷醛 > 十四烷酸 > 十四烷醛(后两种物质测试结果在图6中未表示出来)。同时在一定的范围内,如癸醛 $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-14}$ mol/L,正辛醛 $1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-12}$ mol/L,十二烷醛 $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-9}$ mol/L范围内呈直线关系。均随浓度的增加而刺激发光能力增强(见图6)。但当醛浓度大到一定范围而达到FMNH₂成为限制因子时,则发光不再增加。

利用这一新的测试体系,还可以测定某些油酸、软脂酸,测定脂肪酶,磷酸脂酶的生物活性以及测定与这些酶反应相偶联的有关物质。

参 考 文 献

- 1 Ulitzur S et al. In: *Methods in Enzymology*, New York: Acad Press, 1978; 57:189-193
- 2 Ulitzur S et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 75: 266
- 3 Ulitzur S. *Biochim Biophys Acta*, 1979; 572:211

[本文于1989年8月9日收到]

的电场强度一致。

4. 在隔板侧面有孔,可根据需要自然冷却或通玻璃管水冷。在夏季室温30℃时,通10℃的冷却水,胶板温度可保证在15℃左右。

5. 节省电极液,实际使用中,2800ml电极液即可,平均每板140ml,也可以根据需要增加电极液用量。

为了降低仪器成本,我们选用了凡士林解决密封问题,这样给操作带来一些不便:1.制胶模时耗时较多;2.组装时必须仔细,否则有可能漏电极液;3.每次电泳完后洗去玻板上的凡士林比较麻烦。不过从重复性、成本、总效率看,所付出的代价是值得的。

参 考 文 献

- [1] Anderson N G. *Anal Biochem*, 1978; 85: 331

[本文于1989年8月29日收到]