

小经验介绍

嗜盐菌的培养及紫膜分离纯化方法的改进

徐 兵 陈德亮 胡坤生

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

近 30 年来, 细菌视紫红质 (bR) 一直为人们所关注. bR 是嗜盐菌紫膜上发现的一种具有光功能的蛋白质, 是迄今为止所知道的最为简单的光驱动质子泵. bR 具有突出的光致变色性能、瞬态光电响应性能和非线性光学性能, 是制造纳米生物器件最为理想的材料之一.

在作为功能性材料的开发应用方面, 需要制备大量高纯度紫膜, 因此提高紫膜的产率及优化紫膜的提纯方法一直为人们所关注.

1 培养方法的改进

我们实验室在 Oesterhelt、Stoeckenius 的培养方法基础上对嗜盐菌的培养和紫膜的分离纯化方法作了适当改进. 简单归纳见图 1:

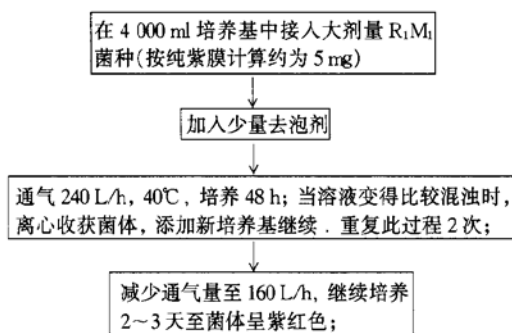


图 1 改进后的培养方法

按照改进后的方法培养嗜盐菌, 在相同的培养时间内 (约 7 天), 最终收获的紫膜产量约为常规方法的 3 倍. 在本实验室条件下, 常规方法培养的紫膜产量约为 35 mg/L, 改进后的方法产量约为 90 mg/L.

实际上, 改进后的方法类似于工业微生物中的连续发酵法, 都采用了大接种量, 不断添加新培养基. 由于陈旧培养基不断被更新, 可能其中抑制细菌生长的代谢产物浓度不断降低; 同时, 相对细菌数量大大累积, 最终合成的紫膜量也相应增加. 因此, 紫膜的产量得以大幅提高.

在整个培养过程中, 光照和通气量是最为关键的因素. 光照可以诱导嗜盐菌的生长, 而通气量又决定着嗜盐菌采取何种方式进行 ATP 的合成. 较高的氧浓度可以加速嗜盐菌的分裂增殖, 而低氧压力又有助于紫膜的生长. 如果能摸索出最适的光照和通气量参数, 紫膜的产率将有进一步的提高.

2 紫膜的分离纯化

经改进后的紫膜分离提取步骤简单总结如图 2.

采用本方法提纯紫膜, 通常不需要进行蔗糖密度梯度离心这一步骤, 即可达到很高的纯度, 我们的工作表明本

法提纯的紫膜其 A_{280}/A_{568} 值大约 1.9~2.0. 280 nm 是蛋白质在紫外区的吸收峰, 而 568 nm 是 bR 分子的特征吸收峰. 对于较纯的样品, 这个比值在 2.0~2.3 附近, 比值越小说明纯度越高. 而 A_{280}/A_{568} 值小于 2.0 的紫膜足以满足绝大多数实验的需要. 当然, 如要得到极高纯度的紫膜, 可以进一步采用蔗糖密度梯度离心和其他方法纯化.

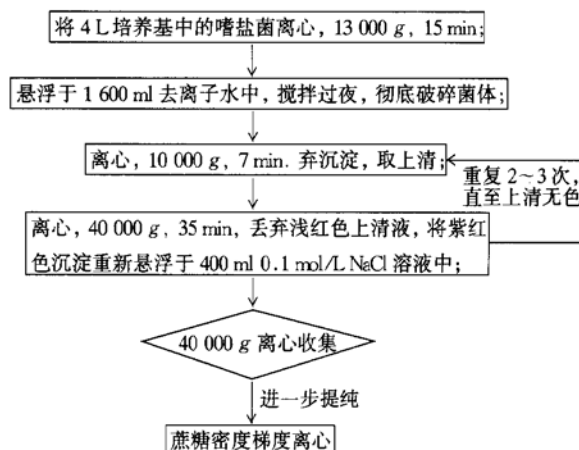


图 2 改进后的纯化分离方法

与常规方法相比, 本提纯方法最主要之处在于破膜过程中加入了极大量的水, 利用渗透压促使菌体彻底破碎, 紫膜充分游离; 同时延长了搅拌时间, 在内源性 DNA 酶和机械搅拌双重因素作用下, 可使 DNA 降解非常彻底. 然后通过反复差速离心, 紫膜可以达到很高的纯度. 在紫膜的提取过程中, 主要的干扰成分是一种含胡萝卜素的红膜成分, 由于红膜密度比紫膜小, 在经多次离心后可以去除. 另一种干扰成分是细胞质内膜, 它是由于空泡破裂而形成的, 并具有与紫膜类似的密度, 不易与紫膜分开. 但是在实验室中通常使用的菌株如 *H. halobium* R₁, 及由它而选育出来的突变菌株, 如 R₁M₁、S-9、JW-3 等都是不合成空泡的菌株.

经改进后的提纯方法由于减少了脱氧核糖核酸酶酶解、组织捣碎、透析以及蔗糖密度梯度离心等繁琐细节, 大大简化了操作步骤和节省了所需时间.

通过本方法提纯的紫膜在可见-紫外的吸收光谱表明: 紫膜的特征吸收峰出现在 568 nm 处, 蛋白质在紫外区的吸收峰出现在 280 nm 处, 且其 A_{280}/A_{568} 值为 1.94, 这说明杂蛋白和 DNA 均去除得非常彻底, 已达到我们实验提纯的要求.

同样, 紫膜的光循环中间体 M₄₁₂ 闪光动力学图谱表明: 可以测量到 bR 光循环的中间体 M₄₁₂, 说明本方法提纯得到的紫膜具有活性.

* 国家自然科学基金 (30170235, 60007009) 和中国科学院重大项目 (KJ CX-SW) 资助.