

48-51

11505(10)

## 幽门螺杆菌全菌蛋白电泳影响因素的研究\*

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 北京 102206

张建中 陈晶晶

R378.99

**提 要** 本文比较研究了用反复冻融法及用含十二烷基磺酸钠 (SDS) 和  $\beta$ -巯基乙醇的样品缓冲液直接破碎法处理幽门螺杆菌对全菌蛋白电泳结果的影响, 并观察了两种方法处理后的菌体裂解情况。实验表明, 反复冻融法破碎细菌不够彻底, 经离心后有较多的膜性结构被清除, 引起膜性结构与胞浆内成份不均匀损失, 对全菌蛋白电泳条带 (特别是某些条带的含量) 有明显的影响。提示在作细菌全菌蛋白电泳, 特别是用于进行定量分析时, 不宜采用冻融法处理细菌, 可考虑用样品缓冲液直接破碎细菌。超声波破碎及压力破碎法是否存在对电泳结果的类似影响有待进一步研究。

**关键词** 幽门螺杆菌, 蛋白电泳

蛋白; 电泳;

越来越多的证据表明幽门螺杆菌 (*Helicobacter Pylori*, HP) 与慢性胃炎及消化性溃疡密切相关<sup>[1]</sup>。随着对 HP 研究的不断深入, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 技术被广泛地应用于 HP 菌体蛋白的分析<sup>[2~5]</sup>、HP 菌与其它菌的比较、HP 的分型及流行病学研究<sup>[4,5]</sup>。目前用于 SDS-PAGE 的 HP 处理方法有超声波破碎法、压力破碎法、反复冻融法等。这些方法均建立在对细菌完整性产生破坏的基础上, 并不能使 HP 所有蛋白成分充分分散。虽然这些方法之间在电泳结果上有很大的-一致性, 但是否对 HP 各种菌体蛋白的电泳结果存在影响尚不清楚。本文仅对反复冻融法对 HP 蛋白 SDS-PAGE 结果的影响进行了研究, 并与用含 SDS 和  $\beta$ -巯基乙醇的样品缓冲液直接破碎 HP 的方法进行了比较。

## 1. 材料与方法

## 1.1 主要电泳试剂

丙烯酰胺 (重结晶), 中国科学院百泰技术公司; N, N-亚甲基双丙烯酰胺 (结晶纯), SERVA Feinbiochemica GmbH & Co; 三羟甲基氨基甲烷 (分析纯), 成都化学试剂厂; 甘氨酸, 华美生物工程公司; SDS, 日本进口分装, 由本室重结晶。

## 1.2 实验用菌株

实验用 HP 菌株 (9 株) 包括 8 株本室分离保存的 HP 菌株和一株 NCTC 菌株 (由山东医科大学中心实验室提供)。菌株号见附图。

## 1.3 HP 菌破碎及样品准备

1.3.1 取以上 9 株 HP, 接种于含 6% 脱纤维绵羊血的布氏培养基上, 置

\* 本课题为国家自然科学基金资助项目

37℃, 混合气体环境(5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>、85% N<sub>2</sub>) 培养3天后收菌, 用生理盐水洗菌一次后, 将HP各株菌分别悬于蒸馏水中, 使成约 $5 \times 10^{10}$ 个菌/毫升浓度。

1.3.2 将每株HP菌悬液分别吸出0.3ml, 放入一小管中, 加入0.3ml样品缓冲液(每100ml样品缓冲液含0.25mol/L Tris-HCl, pH6.8, 25ml; SDS, 4g; 甘油, 20ml;  $\beta$ -巯基乙醇, 10ml; 0.1%溴酚兰, 2~3ml), 振荡混匀后, 放入100℃水浴5min, 然后置-25℃保存备用。

1.3.3 将每株HP菌悬液分别取0.3ml, 放入一小管中, 置-25℃环境, 并在-25℃与室温之间反复冻融4次, 离心(12,000 r/min, 15 min)后, 取上清100 $\mu$ l于另一小管中, 加入100 $\mu$ l样品缓冲液, 100℃水浴5min后备用。

#### 1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳

选用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)系统, 电泳方法及条

件按参考文献进行<sup>[4,5]</sup>。选用浓缩胶浓度为5%, 分离胶浓度为11%, 凝胶面积为 $16 \times 16 \times 0.1 \text{cm}^3$ , 加样量为每样品孔40 $\mu$ l, 电泳电压(单侧板): 浓缩胶50伏, 分离胶100伏。凝胶经考马斯亮兰R-250染色。

#### 1.5 HP破碎状况检查

对冻融破碎的HP离心沉渣及对用样品缓冲液裂解的HP分别涂片, 在位相差显微镜(450倍)下观察, 并将涂片作石碳酸复红单染色后镜检。

## 2. 结 果

### 2.1 电泳结果

由电泳图谱可见(参见图1), 用样品缓冲液直接破碎者与反复冻融破碎者有如下差异:

2.1.1 用样品缓冲液直接破碎者各蛋白条带均浓于经反复冻融破碎者。前者约有40条蛋白带清晰可见, 后者易于观察的蛋白条带仅20条左右。

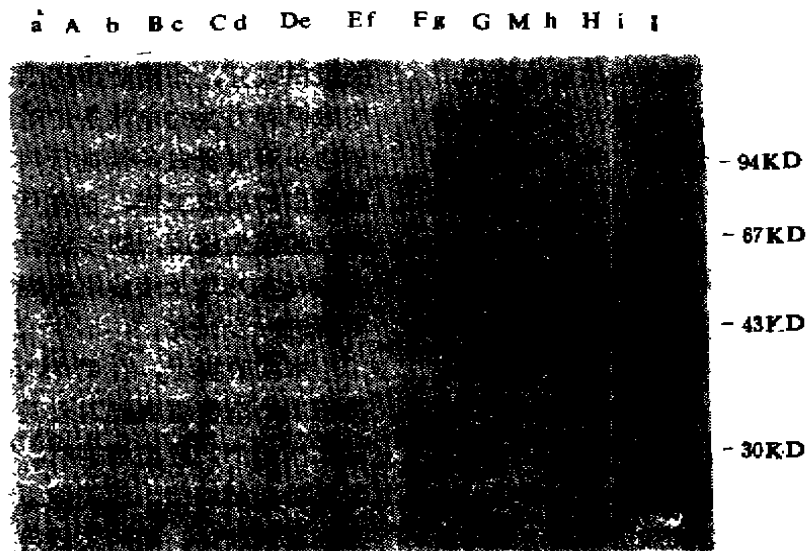


图1 a~i为冻融样品, A~I为样品缓冲液处理样品, 相应菌株为: CAPMT 125, CAPMT 192, CAPMT 200, CAPM 00379, CAPM 00386, CAPM 00397, NCTC 14126, CAPM 00400和 CAPM 00438

2.1.2 经反复冻融 HP 的某些条带在全部分带中的相对含量明显减少,如 50kd, 30kd 和 110kd 条带等。而某些条带的相对含量未见减少,反而有所增加,如 94kd, 58.5kd, 51kd 和 NCTC<sub>14126</sub> 株中的 39.5kd 条带等。

## 2.2 菌体破碎结果

经反复冻融破碎的 HP 离心沉淀物在位相差显微镜下可见绝大多数 HP 菌体呈现为不完整形态,只有少数细菌仍呈典型 HP 形态(“S”状或海鸥展翅状)。在石炭酸复红单染色中不完整菌体着色不良,形态典型菌着色良好。对经样品缓冲液裂解的 HP 的检查中未见明显细菌及不完整菌体成分存在。

## 3. 讨 论

细菌反复冻融破碎法的基本原理是由于细菌在冷冻及冻融的过程中,在细菌菌体内、外形成较大而尖锐的冰晶,对细菌的膜性结构产生物理性损伤,使细菌的完整性受到破坏,从而使胞内容物释放出来,在相同条件下随着冻融次数的增加,细菌受到的损伤程度也越重,对于检测细菌胞内成份,如作酶类测定等,使用冻融法非常有效<sup>[6]</sup>。但冻融方法对膜性结构的损伤很不均匀,可形成部分单分子状态成份及不同大小的片状膜性结构,较大的膜性结构或部分损伤的菌体会在离心过程中被清除掉,而胞内可溶性成分则留在离心上清中,从而引起全菌蛋白中各种蛋白成分的非均衡性损失,引起各种蛋白成分在 SDS-PAGE 中的相对含量发生变化,由于细菌在有限的冻融次数内不能达到完全的菌体损伤及胞内成分的漏位,冻融法也会引起各种蛋白成分绝对量的减少。这与本实验观察到的结果完全一致。

SDS作为一种阴离子活性剂,由于其强裂的破坏蛋白质非共价键的作用而被广泛用于细菌菌体的裂解。电泳样品缓冲液中含有 4% 的 SDS,而此浓度足以与样品中全部菌体蛋白结合(1克蛋白质约结合 1.4克 SDS),且使各种蛋白质在其溶液中不能保持其聚合状态,不论是膜蛋白还是胞内蛋白均被释放到溶液中,用此样品作 SDS-PAGE 时可完全保持原全菌蛋白的种类及含量。在作其它细菌破碎效果观察时可考虑以 SDS 裂解者作为标准。当然,样品缓冲液中的  $\beta$ -巯基乙醇及采用 100℃ 水浴对 SDS 的裂解作用也有一定的辅助作用。

用样品缓冲液直接裂解细菌,不但保持了各蛋白成分的原有含量,而且简化了 SDS-PAGE 测定全菌蛋白的过程。由于其不必进行裂解后的离心处理,可使被检样品的准备量减少到 20 $\mu$ l 左右,加之其对细菌的破碎充分,可使可检细菌量降到约 10<sup>10</sup> 个菌。使临床及科研工作中对少量菌的全菌蛋白含量分析成为可能。

由于反复冻融法中损失的主要为膜相关蛋白成分,如同时作样品缓冲液裂解及冻融两种方法的电泳条带对比,有可能作到初步对膜蛋白条带进行判断,部分代替膜蛋白的提取工作,也有可能根据不同膜蛋白的损失程度,初步估计该蛋白在胞膜上的存在方式及结合牢固程度。其可行性有待进一步研究。

本实验提示,在用 SDS-PAGE 技术进行 HP 全菌蛋白相对含量分析,特别是以此作为 HP 分类根据时,可用样品缓冲液直接裂解细菌,而不能采用反复冻融的方法裂解菌体。超声波破碎法及压力破碎法是否存在对 SDS-PAGE 中全菌蛋白结果的类似影响,有待进一步观察。

## 参 考 文 献

- [1] Graham DY. *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 1989; 96:615-625
- [2] 周志群, 等. 幽门螺杆菌的 SDS-PAGE 及免疫印渍分析. *中华消化杂志* 1991; 11(4): 213
- [3] 华杰松, 等. 幽门螺旋菌菌体蛋白质初步研究. *中国人兽共患病杂志* 1992; 8(1):30
- [4] Owen R J, et al. Strain variation in *Campylobacter pylori* detected by numerical analysis of one-dimensional electrophoretic protein patterns. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1989; 55:253
- [5] Morgan D R, et al. Characterization of strains of *Helicobacter pylori*: One-Dimensional SDS-PAGE as a Molecular Epidemiologic Tool. *Reviews of Infectious Diseases* 1991; 13:S709-713
- [6] Selander R K, et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51:873

The Comparative Study of the Two Cells Lysing Methods on  
SDS-PAGE of *Helicobacter Pylori*

Zhang Jianzhong, et al.

Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese  
Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

## Abstract

The comparative study was developed on the two methods of lysis on the SDS-PAGE, by repeated thawing and freezing and by the sample buffer that contained SDS and 2-mercaptoethanol. Experiments showed when the HP cells were lysed by sample buffer, the cells were broken thoroughly, no pieces of HP cells were left, and about 40 protein bands were observed clearly. But when the cells were lysed by repeated thawing and freezing, pieces of HP cells were seen under the microscope. Some bands of protein became weak, only about 20 bands can be observed clearly. It is suggested that the repeated thawing and freezing method of lysis can affect the results of the SDS-PAGE, especially when the SDS-PAGE was used to analysing the protein amount and making the hierarchical clustering analysis. Whether the methods of press pouch and ultrasonification have similar effects on SDS-PAGE of HP whole cell proteins needs further investigation.

**Key words** *Helicobacter pylori* SDS-PAGE