

# 蛋白篩選分離的兩株細菌之相互關係的研究

## 高中教師組生物第二名

台北市立第一女子高級中學

作者：林英子



### 一、緒言：

在特殊環境下往往可以篩選出特別的菌種，雞蛋白內含多量之溶菌酶，故無細菌存在，去年科展實驗用 bentonite 除去大部分之溶菌酶所剩下之蛋白，經置放冰箱，二月後發現具青綠色，置紫外燈下有強烈螢光，此螢光可能由某些細菌產生，故本實驗主要分離此蛋白內之細菌並探討其與螢光物質所產生的關係。

### 二、實驗材料及方法：

#### 1. bentonite 的處理：

買來的 bentonite ，因為顆粒大小不均，且含有多金屬離子，故須先加以純化使其顆粒大小一致，處理方法如下：

10g bentonite + 200 ml 蒸餾水

↓

加 1g EDTA

↓

加 3.5 ml 1N NaOH

↓

pH 7.2

↓

攪拌 75 °C      60 分鐘

↓

離心 1000g      10 分鐘

↓

上清液

↓  
沈澱物  
(丟棄)

↓

離心 5000g      10 分鐘

↓

澱沈澱物

↓  
上清液  
(丟棄)

用 0.01M Tris-HCL 緩衝液 pH7.3

洗五次

↓

離心 5000g      10 分鐘

↓

溶於 100 ml 0.01M Tris- HCL 1% KCL pH7.3

↓

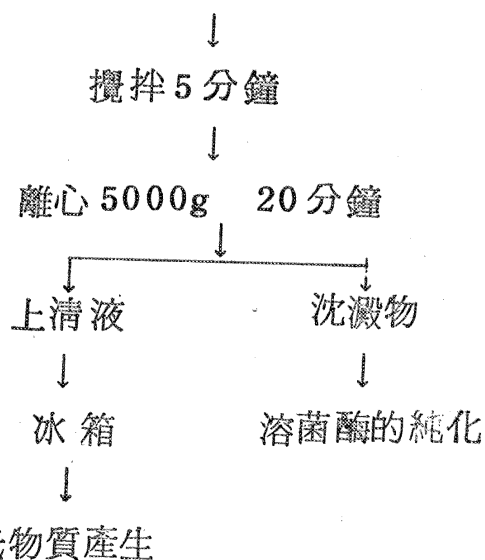
高壓滅菌      15 分鐘

↓

冰箱儲藏

## 2. 蛋白的處理：

100ml 蛋白 + 15ml 10% bentonite



## 3. 細菌之分離：

把上述螢光物質用 0.01M Tris-HCL 緩衝液做各種稀釋液，然後取 0.1 ml 做菌落分析。

## 4. 螢光物質的純化：

取由 2 法得到的螢光物質加 2 倍體積 95% 酒精，然後放在零下 20℃，隔夜取出離心 (5000g) 20 分鐘，所得上清液用減壓濃縮，再經過 5000g 離心 20 分鐘，可得部分純化之螢光物質。

## 5. 平板膠體電泳法：

### (1) 電泳緩衝液 (10 倍濃度)：

108g Trizma base, 55g Boric acid, 9.3g Na<sub>2</sub> EDTA, 加蒸餾水至 1 升 (PH8.3), 置於室溫備用。

### (2) 膠體溶液 (40%)：

38g acrylamide, 2g Bisacrylamide, 加蒸餾水至 100 毫升, 置於 4℃ 冰箱中備用。

### (3) 電泳膠體的製備：

10% 電泳膠體 (80ml)

40% 膠體溶液

20ml

10 倍緩衝液	8ml
1.6 % Ammonium persulfate	2.88ml
TEMED	80ml
H <sub>2</sub> O	49ml

混合以後，倒入平板槽內，約半小時後，取出備用。

(4)樣品的製備：

用電泳緩衝液配製 2 % SDS，加上等量體積的樣品液，然後在沸水內煮沸四分鐘，並加入 10 % glycerol 及 0.001 % bromophenol blue 備用。

(5)放入樣品及開電源：

將做好的平板膠體放入電泳裝置上，在左右電泳槽內放入電泳緩衝液，再將處理過的樣品加入小樣品槽內 (20ul)，電泳時所使用的電流為 36 mA，電壓為 150 V，通電約 3.5 小時。

6. 照相：

把欲照相的平板膠體或培養皿，放在裝有長波長紫外線 (395 nm 波長) 的暗箱內，用黃色濾光鏡照黑白片，彩色底片不用濾光鏡。

三、結果與討論：

1. 螢光物質的發現：

所使用的 bentonite 是一種陶土，本身帶有許多負電荷，可以吸附金屬離子或帶正電荷的蛋白質如溶菌酶等，故用來吸附蛋白中的溶菌酶非常有效。

蛋白內含有多量的溶菌酶，約占 3 %，從去年實驗已證明蛋白內沒有細菌存在，用 bentonite 除去溶菌酶 (如實驗方法 2) 的蛋白，置於冰箱中，約二個月呈青綠色，取出用紫外燈照射，發現具有強烈的螢光 (圖一)。

2. 細菌的分離：

上述具有螢光的蛋白，可能是因細菌生長產生的，故做菌落分析，只得到二種菌落，經單菌落分離，得到二種純系的菌

落(圖二、圖三)，經純系培養的菌種，置於顯微鏡觀察，發現二者皆為桿菌，此二菌株尚未鑑定，其中之一為會產生螢光的長桿菌(圖四)用LB代表，另一為不產生螢光的短桿菌用SB代表(圖五)。

### 3. 二菌株的相互關係：

用固體洋菜培養基培養LB，經觀察發現，培養一天的LB大部分的螢光物質皆在菌體內，培養二天後大部分的螢光物質已釋放到洋菜培養基內，再將此二種品系的細菌劃在同一培養皿內，觀察二者的相互關係，如圖六、七可見培養一天的僅LB具螢光性，SB則無，培養三天的LB其螢光物質已釋放並擴散出來，此時SB體內開始累積螢光物質，六天後SB體內堆積多量的螢光物質，甚至其螢光性強於LB者。圖八為日光下圖七的對照。

此螢光物質是否可被其他種菌所吸收，試過多種其他種菌，發現皆沒有類似SB吸收螢光物質的特性，顯示此二菌株對這種螢光物質的產生與利用有特殊的關係。

一般螢光物質均見有吸收較短波長(能量較高)的光線，並立即轉變為較長波長(能量較低)的光線此即為螢光，通常細菌對短波紫外線皆較敏感，假如具有螢光物質，則可降低紫外光對細菌的殺傷。將SB加入純化的螢光物質經紫外線照射，發現其存活率較不加螢光物質的為高。

為了分析會產生螢光的菌體內的螢光物質及釋放出來的螢光物質以及被吸收的螢光物質是否與純化出來的螢光物質相同，經電泳法分析的結果，顯示二者螢光物質，似乎相同。由此可知螢光物質為小分子，可直接由LB釋放至培養基內，而後被SB菌所吸收。由螢光物質的純化過程亦知其為小分子(因在75%酒精內不被沈澱)。

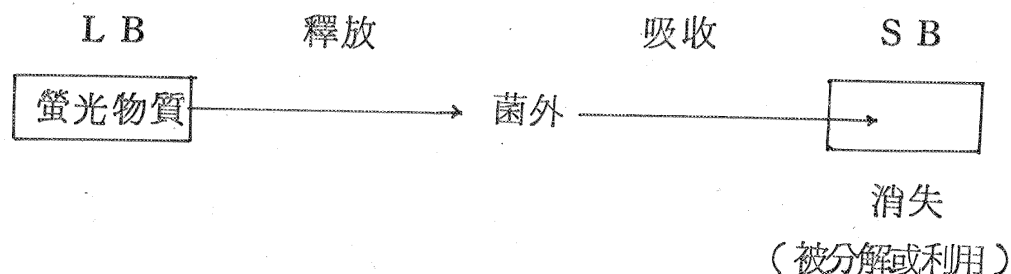
### 4. 溶菌酶對二菌株之作用：

LB及SB分別以溶菌酶處理，結果顯示溶菌酶對LB可使發生溶菌現象，SB則不生溶菌，此可能因SB含胞外膠質

extracellular Polysaccharide (因菌落具黏性)的關係。

#### 四、結論：

1. bentonite 顆粒大小不均，且含有許多金屬離子，故先加以純化，去掉較大的顆粒，並以 EDTA 去除二價金屬離子。
2. 蛋白內有多種蛋白質，僅溶菌酶 (Lysozyme) 及 Avidin 之等電點 (isoelectric point) 大於 7 (PI = 10.7, 10) bentonite 因帶負電荷，可以吸附金屬離子或帶正電荷的蛋白質，故可用來降低蛋白內的溶菌酶含量。
3. 蛋白內，因含多量的溶菌酶 (3%) 故不長菌，經 bentonite 除去溶菌酶的蛋白，置於冰箱，經數次反覆做的結果僅發現 LB 及 SB 二種菌株。
4. LB 及 SB 皆為桿菌，經菌落分析 LB 為乾燥形的菌落，SB 為圓滑具黏性的菌落，故外加溶菌酶能使 LB 發生溶菌而 SB 則不發生溶菌現象。
5. 螢光物質在此二株菌株內的相互關係如下圖：



6. SB 為一種會吸收螢光物質的菌，實驗結果顯示此螢光物質為小分子，且不須經過任何的改變，就可直接為 SB 菌所吸收。
7. 螢光物質具有吸收較短波長 (能量較高) 的光線並立即轉變為較長波長 (能量較低) 的光線的能力，故帶有螢光物質的菌體，也許可以降低紫外線的殺傷，加入純化螢光物質的 SB 經紫外線照射，發現其存活率較不加螢光物質的為大。

評語：1 能夠離出兩種細菌非常有意義。

2 LB 及 SB 的意義不明，如是用英文的代號，亦應將其全字寫出，以表明其字意。

3. 很多地方敘近用光綫或實際上是指輻射綫。
4. 文中未能將螢光物質定出來。