

[研究简报]

聚糖联乙炔类脂仿生膜与大肠杆菌的识别作用研究

Q939.121

1655-1657

范翊¹ 李亚军¹ 张立功² 施雨露¹ 蒋大鹏²

(1. 中国科学院长春物理研究所, 长春 130021; 2. 中国科学院激发态物理开放实验室, 长春 130021; 3. 白求恩医科大学基础医学院, 长春 130021)

生物膜

关键词 糖脂; Langmuir-Blodgett 薄膜; 肠道杆菌; 识别作用, LB膜, LB膜, 检测
 中图分类号 O58.174229 文献标识码 A 文章编号 0251-0790(2000)11-1655-03

生物膜是生物进化的产物。生物膜中的脂类(糖脂、磷脂、胆固醇)的组成极为复杂,种类繁多,分子结构也各不相同,但全部属于极性分子,即在分子中都含有一个亲水头部基团和一个疏水尾部基团。它们在膜中有一定的排列方向,形成脂双层或微团,与膜的生物学功能密切相关。糖脂在生物膜中所含的比例虽然不是很高,约占2%~5%,但它在细胞间识别和分子识别过程中具有十分重要的作用。如GM1是所有细胞中霍乱毒素的真正受体^[1],幽门螺旋杆菌的配体是一些糖脂上的唾液酸^[2]。Langmuir-Blodgett(LB)薄膜技术^[3,4]在分子水平上制得的有机分子薄膜具有均匀、厚度精确可控、分子有序排列等优点。制备LB膜时先将具有双亲性的有机材料溶于有机溶剂如氯仿中,再铺展在亚相(通常为 $18\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ 去离子水)上,压膜后使之达到一定的表面压力,然后通过水平或垂直提拉,将有序薄膜制备到指定的衬底上,具体过程如图1所示。利用这种薄膜技术可任意制备疏水或亲水层处于衬底表面的有序薄膜。

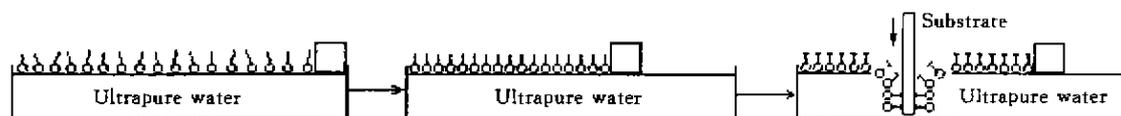


Fig. 1 The preparation of Langmuir-Blodgett films

1993年, Charych等^[5]报道了一种脂双层结构的人造膜对流感病毒的变色识别作用。1994年张希等^[6]报道了一种糖脂与半刀豆球蛋白A的相互作用。本文研究了 α -D-甘露糖苷-3,6,9-三氧杂十一烷基-10,12-二十五碳双炔酰胺-人工脂双层对大肠杆菌 K_{12} 的变色识别作用^[7]。在此基础上,用显微镜看到了细菌的吸附。此方法为检测对甘露糖敏感的肠道杆菌提供了一种直接、可靠的检测手段。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 KSV-5000双区域拉膜仪为芬兰KSV INSTRUMENTS LTD制造;去离子水为 $18.3\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ (Milipore Q)、显微镜为Olympus, CH-2型。 α -D-甘露糖苷-3,6,9-三氧杂十一烷基-10,12-二十五碳双炔酰胺(MPDA)及大肠杆菌(K_{12} , wild type)由美国韦恩州立大学P.G. Wang教授提供,未进一步提纯;二十五碳双炔酸(PDA)为Farchan Lab. INC (USA)产品。二氯二甲基硅烷为德国产分析纯;其余所用试剂均为北京化工厂分析纯试剂。

1.2 实验方法 (1) PDA的提纯:取PDA 0.25 g溶于10 mL石油醚(30~60℃)中,重结晶2次,配成0.1 mmol/L溶液。

(2) 衬底处理:玻璃载玻片首先用清洗剂洗净,烘干,在洗液中搅拌20 min,用去离子水洗20遍,

收稿日期:1999-10-28.

基金项目:国家自然科学基金(批准号:6967100I)、国家自然科学基金重点项目(批准号:6983I010)资助。

联系人简介:范翊(1967年出生),女,助理研究员,主要从事有序薄膜的分子识别功能特性研究。E-mail: tbfilm@public.cc.jl.cn

烘干. 再放入自制的疏水溶液 [n (二氯二甲基硅烷) : n (环己烷) = 1 : 20] 中超声 20 min, 取出后尽量干燥, 放入环己烷中超声 15 min. 在环己烷中保存.

(3) 薄膜制备: 在 KSV-5000 双区域拉膜仪上铺展 0.1 mmol/L MPDA/PDA (体积比 1 : 7) 氯仿/甲醇 (体积比 5 : 1) 溶液, 挥发 30 min 后, 以 4 mm/min 的速度压膜, 目标压力 20 mN/m, 后稳定 30 min, 用紫外线照射 25 s, 用肉眼可见水面上有一层蓝色的薄膜. 采用水平转移法即衬底水平接触亚相表面, 然后以一定速度水平移动. 转移薄膜后可见衬底为蓝色, 如图 2.

(4) 与细菌作用: 将已培养好的大肠杆菌 K_{12} 、 $O_{111}B_4$ 、福氏痢疾杆菌配制成 9×10^8 个/mL, 分别滴在衬底有薄膜一侧的玻璃片上, 同时用不含有糖脂的 PDA 薄膜作对照, 5 min 后, 用去离子水反复冲洗数次, 将未吸附于薄膜上的细菌洗掉, 自然干燥后, 用革兰染色法染色, 然后置油镜下观察.

2 结果与讨论

薄膜中含有 MPDA 的玻璃片上, 在滴有大肠杆菌 K_{12} 的部分, 镜下可见有大量的 G^- 杆菌 (见图 3). 其余玻璃片镜下未观察到细菌的吸附. 这表明, 含 MPDA 时, 镜下可看到大肠杆菌 K_{12} 的吸附, 而大肠杆菌 $O_{111}B_4$ 及福氏痢疾杆菌均未吸附. 而薄膜中不含有 MPDA 则看不到 K_{12} 的吸附.

细菌能够识别糖脂吸附到脂双层, 前提条件是糖脂的糖头基处于脂双层的表面, 而用 LB 薄膜技术制备的薄膜, 正好在分子水平上将材料组装成糖头基处于薄膜表面的敏感元件, 且厚度可精确控制到单分子水平, 防止由于分子的无序而引起分子的堆砌, 影响实验的可靠性.

细菌的粘着具有选择性, 不同类型的细菌识别不同的糖脂和糖蛋白, 具有高度的专一性. 引起尿路感染的细菌大多是大肠杆菌, 感染上呼吸道的多数是 A 属链球菌, 淋球菌只感染生殖道和口腔的粘

膜, 对人体其它部位的细胞没有作用. 就大肠杆菌而言, 有些株系对甘露糖敏感, 携带 I 型纤毛凝集素. 另一些株系是甘露糖抗性的, 携带 P 型纤毛凝集素, 所结合的配体是糖脂上的半乳糖和 *N*-乙酰氨基半乳糖基. 在试管中 α -甲基甘露糖苷可抑制大肠杆菌和表皮细胞的粘着.

本文选择甘露糖-大肠杆菌这一典型, 利用 LB 薄膜技术制备人工脂双层-MPDA/PDA 薄膜, 用显微镜研究了甘露糖被肠道杆菌的选择性识别. 本研究所采用的镜检法, 不仅可直接用于对甘露糖敏感的大肠杆菌的检测, 且由于糖苷和细菌表面的凝集素结合后, 细菌无法粘着到宿主细胞表面的糖链上而达到阻止细菌感染, 本材料可通过竞争抑制来筛选新药, 用显微镜即可看到结果, 方法简单易行.

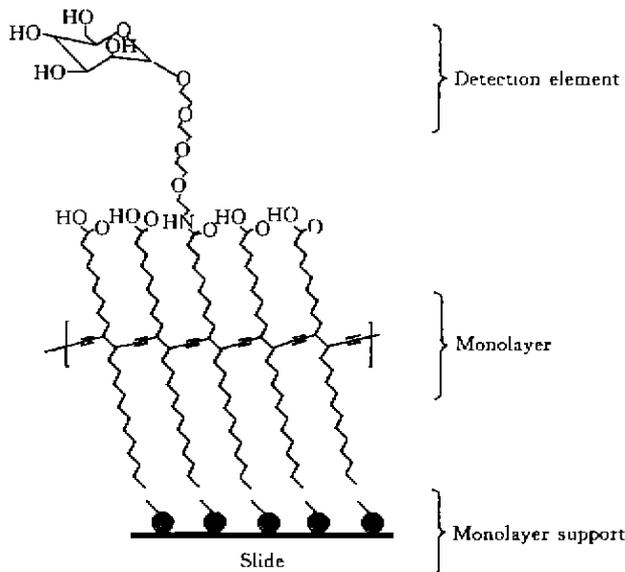


Fig. 2 Polydiacetylene thin films on slide

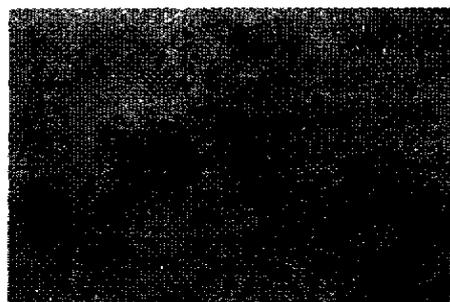


Fig. 3 MPDA/PDA monolayer incubating with *E. coli* K_{12}

参 考 文 献

- 1 Kuznetsov G. M., Stroth M., Stevens R. C. Biochemistry[J], 1996, 35: 6 375—6 384
- 2 Lungwood C. A., Curr. Opin. Struct. Biol. [J], 1992, 2: 693—700
- 3 Ahmad J., Astin K. B. Langmuir[J], 1988, 4: 780—781

- 4 Laxhuber L. A., Scheunemann U., Mohwald J., Chem. Phys. Lett. [J], 1986, **133**: 153—158
- 5 Charych D. H., Nagy J. O., Spevak W. et al., Science[J], 1995, **261**: 585—587
- 6 ZHANG Xi(张 希), SHEN Ja-Cong(沈家骢), Rumpe Ringsdorf H., Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 1994, **15**: 783—784
- 7 FAN Yi(范 翔), LI Ya-Jun(李亚军), WANG G-P et al., Chinese Journal of Luminescence(发光学报)[J], 1995, **19**(2): 193—195

The Study on Recognition of Polydiacetylene Functionalized with Mannopyranoside Mimic Membrane for Escherichia Coli

FAN Yi^{1*}, LI Ya-Jun¹, ZHANG Li-Gong², SHI Yu-Lu³, JIANG Da-Peng²

(1. Changchun Institute of Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130021, China;

2. Lab. Excited State Processes, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130021, China;

3. School of Basic Medicine, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021, China)

Abstract People has known that the recognition between cells and bacteria is related to the glycolipid, as a receptor on the cell surface. Diacetylene moiety in the hydrocarbon region can be cross-linked by UV irradiation to form the corresponding polydiacetylene polymer. Color changes of polydiacetylenes have been known to occur in response to a variety of environmental perturbations such as heating, pH, mechanical stress or in the case of biosensor, due to the strong π - π^* absorption of the conjugation backbone. In this report, polydiacetylene mixed with mannopyranoside monolayer is prepared by Langmuir-Blodgett film technology, E. coli K₁₂ adheres on the monolayer surface after gram strain. The result shows that the mannopyraoside could be recognized by E. coli, but couldn't be recognized by O₁₁B₄ and S. flexneri.

Keywords Glycolipid; Langmuir-Blodgett film; E. coli; Recognition

(Ed.: W, G)

1998 年美国《SCI》收录的 14 种中国科技期刊及其影响因子*

刊 名	影响因子
Acta Mechanica Sinica(力学学报)	0.506
Science in China, Series B(中国科学 B 辑)	0.479
Science in China, Series D(中国科学 D 辑)	0.378
Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报)	0.331
Science in China, Series A(中国科学 A 辑)	0.273
Chinese Physics Letters(中国物理快报)	0.254
Chinese Science Bulletin(科学通报)	0.251
Chinese Journal of Chemistry(中国化学)	0.229
Acta Pharmacologica Sinica(中国药理学报)	0.224
Science in China, Series C(中国科学 C 辑)	0.210
Acta Chimica Sinica(化学学报)	0.178
Communications in Theoretical Physics(理论物理通讯)	0.150
Chinese Medical Journal(中华医学杂志)	0.126
Science in China, Series E(中国科学 E 辑)	0.116

* 摘自“我国已进入《SCI》源期刊的情况以及在《SCI》中的地位介绍”，中国科技信息研究所。