

海栖热袍菌鞘的提纯及其成分和敏感性

周 庆, 邵蔚蓝

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima* MS8) 是一种极端嗜热厌氧菌, 细胞始终被一种鞘结构所包围, 并且鞘在细胞两端呈现气囊状. 通过膜截留法、透析法和等密度梯度离心法对鞘进行提纯, 其中密度梯度离心法提纯的效果较理想. 通过 TLC 分析, 鞘由糖、蛋白、脂类组成, 偏向膜的性质. 通过对鞘的敏感性研究, 发现蛋白酶 K 可以帮助鞘形成孔洞, 并且仍可保留细胞的完整性, 这可能有助于进一步促进 *T. maritima* MS8 基因转化工作的发展.

[关键词] 海栖热袍菌, 极端嗜热厌氧菌, 鞘, 薄层层析, 透射电镜

[中图分类号] Q936 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008) 01-0088-05

Purification, Chemical Characterization and Sensitive Analysis of the Sheath From *Thermotoga Maritima* MS8

Zhou Qing Shao Weilan

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract *Thermotoga maritima* MS8 is strictly anaerobic and extremely thermophilic. The rod-shaped cells are surrounded with sheath like structure ballooning over the ends of the rods. In contrast to the application of centrifugation, membrane filter or dialysis, the method of sucrose isopycnic gradient centrifugation was more suitable. Through the analysis of thin-layer chromatography, sheath was composed of proteins, lipids and saccharide. It resembled the characterization of outer membrane. And sheath was sensitive to Proteinase K while the cell was still alive. This finding may promote the transformation study of *Thermotoga maritima*.

Key words *Thermotoga maritima*, extremely thermophilic, sheath, thin-layer chromatography, transmission electron microscope

海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima* MS8) 是一种来自海洋的极端嗜热厌氧菌, 其最适生长温度在 80℃, 最高可达 90℃. 而且其具有较完整的纤维素、半纤维素分解酶系, 因此 *T. maritima* MS8 具有通过基因转化被改造成乙醇生产菌的极大优势, 更有利于乙醇生产中发酵与蒸馏工艺的同步进行.

然而 *T. maritima* MS8 细胞被一种鞘结构所包围, 在对数生长期时, 鞘在棒状细胞的两端呈现为气囊状. 且无论是处于室温还是在 85℃ 的高温, 无论是刚通过缢缩方式增殖的细胞还是处于稳定期的细胞, 这种鞘都始终存在. 这给 *T. maritima* MS8 的基因转化工作造成了一个天然的屏障.

通过本项研究, 确定 *T. maritima* MS8 鞘的分离纯化方案, 对鞘成分进行了初步分析, 探索了部分使鞘不稳定的物质, 为进一步促进 *T. maritima* MS8 的基因转化工作的研究奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

CENTREX microfilter 购自 Schleicher & Schuell; RNase, DNase I, HEPES, 溶菌酶均购自 Sigma 公司;

收稿日期: 2007-04-09

基金项目: 国家自然科学基金 (30170511) 资助项目.

作者简介: 周 庆 (1980-), 女, 博士研究生, 研究方向: 微生物基因工程. E-mail: qqzhouqing@hotmail.com

通讯联系人: 邵蔚蓝 (1958-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 微生物分子生物学. E-mail: wksaac@jnu.edu.cn

Proteinase K 购自 Merk 公司; Spectrum Dialysis Membranes 氨基酸标样 (Ile, Ala Gly Cys Lys Gln Pro Asp), 糖标样 (鼠李糖、半乳糖、葡萄糖), NaN_3 均购自上海生工生物工程技术有限公司; EcoR I 购自宝生物工程技术有限公司.

1.2 菌种培养

Thermotoga maritima MS8 由佐治亚大学 Michael W. W. Adams 博士惠赠.

T. maritima MS8 以 2% 接种量接种于 TBXY 培养基, 80℃ 下培养至对数生长期, 8 000 × g, 离心 10 min 收集菌体, 5 mmol/L HEPES 缓冲液 (pH 7.5) 洗涤后, -20℃ 保存. TBXY 培养基成分: KH_2PO_4 1.5 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4.2 g/L, NH_4Cl 0.5 g/L, NaCl 28 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.196 g/L, D-木糖 0.4%, 酵母粉 0.5%, 刃天青 1 mg/L, 另外再加入微量元素^[1]、维生素^[1]和还原剂, pH 6.5 培养基煮沸分装于预先充氮的厌氧高压瓶中, 继续充氮排氧 15 min 稍冷却后加还原剂, 密封灭菌.

还原剂成分: NaOH (0.2 mol/L) 200 mL; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g CysteineHClH₂O 2.5 g NaOH 溶液煮沸充氮排氧 15 min 稍冷却加 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 和 CysteineHClH₂O.

1.3 鞘的提纯

1.3.1 膜截留法

收集的 *T. maritima* MS8 对数生长后期的细胞, 用 5 mmol/L HEPES 低渗缓冲液 (pH 7.5) 重悬, 加入溶菌酶 (3 mg/mL), 37℃ 下温育 3 h 以破细胞, 加 Triton X-100 (2%) 溶解质膜, NaN_3 (0.02%) 以防腐, 然后加入 RNase (100 μg/mL)、DNase I (50 U/mL)、EcoRI (120 U/mL) 37℃ 下轻轻振荡过夜, 而后加入 Proteinase K (3 mg/mL) 37℃ 作用 3 h 以去除蛋白, 最后低速离心除去残存未破细胞后的上清即为鞘粗提液. 将粗提液再经微孔滤器 (CENTREX centrifugal microfilter 0.45 μm) 1 500 × g 离心 10 min 截留鞘, 用 5 mmol/L HEPES 缓冲液 (pH 7.5) 洗涤 3 次后, 倒置离心收集鞘.

1.3.2 透析法

获得鞘粗提液的基本步骤同 1.3.1, 将鞘粗提液用 Spectrum 纤维素透析袋 (MWCO 300 000), 在含 NaN_3 的 5 mmol/L HEPES 缓冲液 (pH 7.5) 中 4℃ 透析, 其间更换 3 次透析缓冲液, 然后用 PEG 20 000 浓缩收集鞘.

1.3.3 等密度梯度离心法

收集 *T. maritima* MS8 对数生长后期的细胞, 5 mmol/L HEPES 缓冲液 (pH 7.5) 重悬, 低功率超声波破碎 (40 W, 2 min, 0℃), 低速 6 000 × g 离心 10 min 去除未破的细胞, 取上清 40 000 × g 离心 45 min, 获得鞘粗提物, 用 5 mmol/L HEPES 缓冲液 (pH 7.5) 洗涤 3 次, 并重悬, 然后经 30% ~ 65% 蔗糖梯度 40 000 × g, 离心 2 h 后, 收集密度在 1.21 g/mL 的白色条带, 即得纯化的鞘. (此后的成分分析均是针对此方法纯化的鞘展开的).

1.4 电镜负染

新收集的细胞或纯化的鞘, 滴加在铜网上, 滤纸吸去多余液体, 用 1.5% 磷钨酸钠 (pH 7.0) 染色 10 s, 再用滤纸吸去多余液体, 室温下干燥器中干燥后, 以日立 -600-2 型透射电镜观察.^[23]

1.5 鞘成分的 TLC 分析

1.5.1 糖的分析

30 mg 等密度梯度法纯化的鞘, 装于硬质玻璃管内, 加入 0.5 mol/L HCl 0.1 mL, 以硅胶塞封口, 121℃ 21 min 后, 10 000 × g 离心 5 min, 取上清 -20℃ 保存, 备用. 取其中 1 μL 点微晶纤维素板 (10 cm × 20 cm), 以 1% 鼠李糖、1% 半乳糖、1% 葡萄糖为标样. 以乙酸乙酯: 吡啶: 冰醋酸: 水 (16: 10: 2: 3) 为展层剂, 以苯胺二苯胺磷酸试剂显色.

1.5.2 氨基酸分析

30 mg 等密度梯度法纯化的鞘, 装于硬质玻璃管内, 加入 6 mol/L HCl 0.1 mL, 以硅胶塞封口, 121℃ 21 min, 10 000 × g 离心 5 min, 取上清 -20℃ 保存, 备用. 取其中 1 μL 点微晶纤维素板 (10 cm × 20 cm), 以 1% Ile 1% Ala 1% Gly 1% Cys 1% Lys 1% Gln 1% Pro 1% Asp 为标样, 跑双向 TLC, 以甲醇: 6 mol/L HCl: 吡啶: 水 (4: 2: 5: 13) 为第一向展层剂, 以 96% 乙醇: 水 (63: 27) 为第二向展层剂^[4], 以 0.5% 茚三酮为显色剂.

1.5.3 脂的分析

取 100 μL 鞘悬浮液, 加入 100 μL 无水乙醇, 加入 250 μL 乙醚, 振摇 30 s 加 250 μL 石油醚 (沸程 30–60 $^{\circ}\text{C}$), 振摇 30 s 静置分层, 移出醚层, 再用无水乙醇、乙醚、石油醚重复提取 2 次, 将醚层合并, 然后挥发溶剂, 浓缩至 100 μL 取 3 μL 点硅胶板 [以 3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为粘合剂], 以乙醚、石油醚混合液作为对照点样. 放入烘箱, 200 $^{\circ}\text{C}$ 加热 20 min 此系脂类鉴定通用方法^[5].

1.6 鞘的敏感性分析

等密度梯度离心法纯化后的鞘用 5 mmol/L HEPES 缓冲液 (pH 7.5) 稀释后, 分别添加 SDS [终浓度 0.5%、1%, W/V]、甲苯 [终浓度 0.5%、2%、5%、10%, V/V]、Triton X-100 [终浓度 0.5%、2%, V/V] 室温下作用 0.5 h 加入碱性蛋白酶 (终浓度 100 U/mL) 40 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1~3 h 加入蛋白酶 K (终浓度 3 mg/mL) 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1~3 h 然后将这些样品电镜负染观察.

2 结果与分析

2.1 鞘的提纯

研究中尝试了 3 种纯化方案, 即 CENTREX 膜截留法、透析纯化法和等密度梯度离心法. 前两种方法主要是基于鞘的大小考虑的, 而等密度梯度离心法则基于鞘与壁、膜的密度差异考虑的.

据报道, *T. maritima* MS8 对数生长后期时, 其细胞长约 1.5~11 μm (平均 5 μm), 而鞘约 3.5~14 μm 长^[1]. 这样, 在低渗下用溶菌酶处理促进细胞破壁, 加核酸酶和蛋白酶 K 去除核酸和蛋白, 促进内容物的释放和分解. 用 Triton X-100 溶解质膜, 而鞘则可被提取出来, 并被 CENTREX 膜 (0.45 μm) 截留. 但实验表明, CENTREX 膜对鞘的截留效率很低. 虽然从大小上考虑, 鞘要大于 CENTREX 膜孔径, 但在 1500 $\times g$ 的离心力下鞘可能具有一定的可塑性, 从而使鞘穿过了比其小的孔径. 因此得率太低, 不利于进一步的实验分析.

透析纯化法是对膜截留法的部分改变. 用透析袋代替 CENTREX 膜截留, 避免因离心可能导致的鞘的变化, 但由于选用的透析袋 (MWCO 300 000) 孔径太小, 使细胞内容物中尚未被酶解或溶解完全的物质如蛋白、质膜等, 无法透析干净, 这样得到的鞘并不纯, 因此不适于下一步的实验分析.

等密度梯度离心法, 与前两种方法不同. 首先利用差速离心获得鞘粗提物, 然后再根据鞘粗提物中鞘与壁、膜的密度差异进行分离纯化, 电镜观察验证, 获得了较纯的鞘, 如图 1B 所示. 但该方法缺点在于必须有高速离心设备.

2.2 鞘成分的分析

2.2.1 氨基酸的分析

鞘中的氨基酸成分比较复杂, 即使通过双向 TLC 也无法很好的定性分析, 需要进一步通过氨基酸自动分析仪分析. 但仍可分辨出其中含 Ile 和 Ala 这与报道所说的, 嗜热菌蛋白质中通常含有丰富的 Ile 和 Ala 相符^[6].

2.2.2 糖的分析

如图 2 所示, 鞘中糖的成分没有氨基酸那么复杂, 只含有葡萄糖和半乳糖. 文献中报道, 大部分高温菌特别是古生菌的细胞表层结构是由糖蛋白组成, 而寡糖链与蛋白的共价连接主要通过半乳糖与苏氨酸、葡萄糖与苏氨酸的 O 糖苷键连接, 也有少部分是以苏氨酸与鼠李糖的 N 糖苷键相连^[7]. 因此可推测 *T. maritima* MS8 的鞘也含有糖蛋白.

2.2.3 脂的分析

由于许多高温菌的细胞表层仅由糖蛋白或是仅由脂蛋白构成^[8], 所以为了确认 *T. maritima* MS8 鞘中是否存在脂的成分, 利用脂类通用检测法试验, 结果 200 $^{\circ}\text{C}$ 20 min 后, 硅胶板样品点出现炭化斑点, 表明鞘中含有脂类 (图 3). 可见, *T. maritima* 的鞘与许多高温菌的细胞表层结构还不完全相同, 可能偏向于膜的性质.

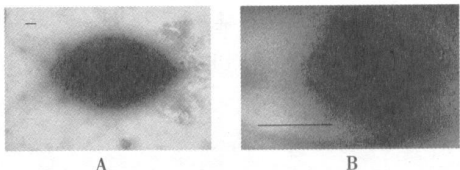
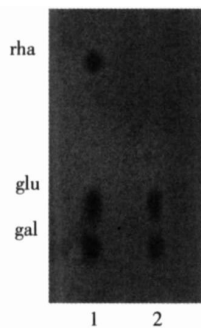


图 1 覆盖于细胞表面的鞘与纯化后的鞘 (bar = 1 μm)

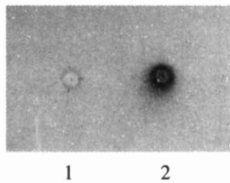
Fig.1 The natural sheath surrounding the cell and the purified sheath (bar = 1 μm)



1. rha, glu, gal(1%, w/v), 2. 鞘酸解物

图2 *T.maritima* MS8 鞘中糖成分的薄层层析

Fig.2 Sugar analysis of *T.maritima* MS8 sheath by TLC



1. 以乙醚、石油醚混合物作为空白对照,
2. 鞘的乙醚、石油醚浸提物

图3 *T.maritima* MS8 鞘脂的硅板检测

Fig.3 Lipids analysis of *T.maritima* MS8 sheath on silica gel

2.3 鞘的敏感性

当 SDS [1%, W/V] 存在时, 鞘就消失了. 当浓度降低至 0.5% (W/V) 时, 电镜观察与 1% 时没有差别. 当用甲苯 [10%、5%、2%、0.5%, V/V] 处理纯化的鞘时, 如图 4 所示, 鞘都呈现散架的趋势. 这也从另一侧面反映出, 鞘可能具有膜的性质.

Triton X- 100 通常用来溶解革兰氏阴性菌的细胞质膜^[9, 10], 当在鞘悬浮液中加入 Triton X- 100 [2% 或 0.5%, V/V] 时, 电镜观察发现, 鞘的完整性未受巨大影响, 但边缘变得有些破损 (图 5). 可见 Triton X - 100 会略微使鞘不稳定. 即使添加 10mmol/L Ca²⁺ 或 Mg²⁺ 也不能抑制 Triton X- 100 的影响.

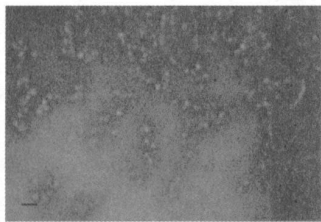


图4 2% 甲苯处理后分散的鞘 (bar = 0.1 μm)

Fig.4 The dispersed sheath treated by 2% toluene solution (bar = 0.1 μm)

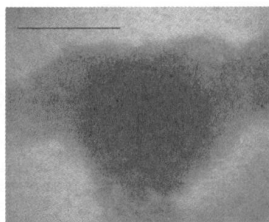


图5 0.5% Triton X-100 处理后边缘破损分散的鞘 (bar = 1 μm)

Fig.5 The dispersed sheath treated by 0.5% Triton X-100 solution (bar = 1 μm)

在鞘悬浮液中加入碱性蛋白酶 (100 U / mL), 40℃, pH 7.5 作用 3h 后, 电镜观察没有发现什么异常. 可能碱性蛋白酶对鞘上的蛋白不起作用.

当用蛋白酶 K (3 mg / mL) 37℃ 处理纯化的鞘 3 h 鞘整体框架没变化, 但鞘上出现小孔洞, 并且明显比没有处理的鞘负染着色加深. 如图 6 所示. 这可能是鞘上的蛋白被蛋白酶 K 酶解, 分解掉一部分的结果. 据报道, 即使用 5 mg / mL 蛋白酶 K 处理完整细胞 24 h, 鞘依然存在, 而只是细胞由棒状变为了球形.^[11] 推测蛋白酶 K 可能分解掉了鞘上的部分蛋白, 而其骨架结构仍保持完整, 所以电镜观察完整细胞时仍可看到. 但是蛋白酶 K 的作用也使鞘骨架有所松弛, 无法再将细胞固定成棒状. 这一点发现可能对 *T. maritima* MS8 的基因转化方面的研究有所帮助.

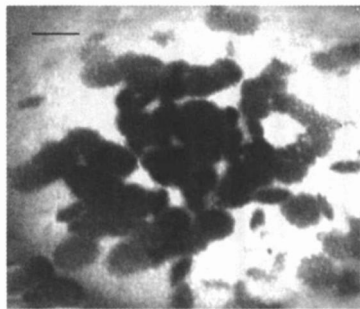


图6 3 mg/ml 蛋白酶 K 处理后的鞘 (bar = 1 μm)

Fig.6 The sheath treated by 3 mg/ml Proteinase K (bar = 1 μm)

3 讨论

Thermotoga maritima MS8 鞘的存在与其高温生长的环境是密切相关的. *T. maritima* MS8 是具有鞘结

构的革兰氏阴性菌,而具有典型革兰氏阳性或阴性肽聚糖型细胞壁的高温菌,没有一个种的生长温度超过 80℃.但与许多高温菌仅含糖蛋白的表层不同, *T. maritima* MS8 的鞘既含有蛋白和糖类,也含有脂类.在一定的离心力作用下,甚至可以通过比其孔径小的 CENTREX 滤膜,具有一定的可塑性,不同于有些菌具有的固定形的鞘^[11 12],因此更偏向于膜的性质.有些高温菌的糖蛋白表层对于 2% SDS 或者煮沸这样苛刻的条件具有惊人的抵抗力^[8],依然可以保持细胞的原有形态.而 *T. maritima* MS8 的鞘对于 SDS 和甲苯等有机溶剂表现的比较脆弱,极易受到破坏.蛋白酶 K 分解蛋白的活性较强,具有广泛的底物特异性,特别优先分解与疏水性氨基酸、含硫氨基酸和芳香族氨基酸的 C 末端邻接的肽键.它可以作用于鞘上的部分蛋白,但使鞘的骨架结构仍保持完整.本文通过对鞘成分及其敏感性的研究试图寻找一些有效处理鞘而又对 *T. maritima* MS8 细胞损伤较小的物质,为 *T. maritima* MS8 进一步的基因转化研究奠定了基础.

[参考文献]

[1] Huber R, Langworthy T A, Kö ing H, et al Thermotoga maritima sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90℃ [J]. Archives of Microbiology, 1986, 144(4): 324-333.

[2] 程时, 彭学敏. 生物医学电子显微镜技术 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 119-120.

[3] 戴大临, 张清敏. 生物医学电镜样品制备方法 [M]. 天津: 天津大学出版社, 1993: 102-103.

[4] 王桂红, 张雁冰. 氨基酸薄层层析的改进 [J]. 河南医科大学学报, 1995, 30(3): 300-301.

[5] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1988: 426-434.

[6] 马挺, 刘如林. 嗜热菌耐热机理的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2002, 29(2): 86-88.

[7] Sara M, Skeytr U B. S- Layer proteins [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(4): 859-868.

[8] 和致中, 彭谦, 陈俊英. 高温菌生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 79-102.

[9] Adhikary S P, Weckesser J, Jügens U J, et al Isolation and chemical characterization of the sheath from the Cyanobacterium Chroococcus minutus SAG B 41. 79 [J]. Journal of General Microbiology, 1986, 132(9): 2595-2599.

[10] Gerhardt P, Krieg N R, Murray R G E, Wood W A. Methods General and Molecular Bacteriology [M]. Washington DC: American Society for Microbiology Dimensions, 2001: 73-87.

[11] Emerson D, Ghose W C. Ultrastructure and chemical composition of the sheath of Leptothrix discophora SP- 6 [J]. Journal of General Microbiology, 1993, 175(24): 7808-7818.

[12] Hoiczky E. Structure and biochemical analysis of the sheath of Phormidium uncinatum [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(15): 3923-3932.

[责任编辑: 孙德泉]