

鲷鱼诺卡氏菌全肽聚糖的提取及鉴定

彭程远, 解 俊, 王锡波, 金 珊*, 赵青松, 陈寅儿, 姚烨焯

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:以鲷鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)为研究材料, 经扩大培养, 离心集菌, 用三氯乙酸处理以除去细胞壁上的磷壁酸及菌体内的核酸, 甲醇、丙酮脱脂后, 再经胰蛋白酶及中性蛋白酶复合酶解去除菌体内部的蛋白质, 离心清洗、冻干即可制得肽聚糖。经过溶菌酶溶解试验, 紫外可见光谱扫描分析证明所得产物为肽聚糖, 透射电镜观察显示所提取的肽聚糖为囊状结构, 且仍保持着原有的细菌细胞形态, 证实所提取的肽聚糖为全肽聚糖。

关键词: 鲷鱼诺卡氏菌; 全肽聚糖; 提取; 鉴定

中图分类号: S942.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2015) 01-0021-04

鲷鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)是种革兰氏染色阳性菌, 可引起鲷鱼(*Seriola quinqueradiata*)、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)、乌鳢(*Channa argus*)、海鲈(*Lateolabrax japonicus*)等多种鱼类发生严重疾病。由于该菌感染早期病症不明显, 一旦发病死亡率极高, 因而近几年已引起水产界的高度重视。目前对该病的防治主要以药物为主, 但效果并不理想, 且频繁使用药物还会造成养殖环境日益恶化, 养殖产品药物残留, 从而危害人类健康。因此, 挖掘高效低毒的绿色生物渔药是本研究的目标, 也是今后水产病害防治发展的方向^[1]。

肽聚糖(PG)是细菌等原核生物细胞壁的特有组成成分, 由聚糖链、肽亚单位和间肽桥组成, 是一种大分子聚合物。据资料显示, 肽聚糖是动物免疫系统的激活剂, 它不仅对于宿主免疫系统的维持和促进非常重要, 而且还能刺激单核巨噬细胞和内皮细胞释放免疫调控物质; 其制剂能促进水产动物的生长, 提高成活率、免疫机能及抗感染能力^[2-4]。全肽聚糖(WPG)是指细菌细胞壁没有经过物理破碎处理, 保持了其完整骨架结构, 并由多糖和多肽连接聚合形成的“袋形”结构, 因而保持着全菌细胞的一些重要生物学性质^[5]。已有研究表明,

肽聚糖的生物活性与其完整性有关, 即所提肽聚糖的骨架越完整, 活性就越高^[6-7]。

目前关于原核生物细胞壁 WPG 的提取方法主要有超声波法、溶菌酶法及三氯乙酸法^[8-9], 但研究主要针对双歧杆菌^[10-11]和乳酸杆菌^[12-13]。由于诺卡氏菌的菌体形态、细胞壁结构和组成成分与双歧杆菌、乳酸杆菌等有一定的区别, 因此不能完全采用已有的方法提取 WPG。笔者在 Sekine 等^[5]的研究基础上, 根据鲷鱼诺卡氏菌的菌体特点, 改进及优化了鲷鱼诺卡氏菌细胞壁 WPG 的提取方法, 并对所提取的 WPG 进行了鉴定和成分分析, 为后续诺卡氏菌 WPG 功能的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

鲷鱼诺卡氏菌(*N. serioleale*)由宁波大学海洋学院水产病害防控实验室提供。

1.2 主要药品与试剂

三氯乙酸($C_2HCl_3O_2$); 丙酮(CH_3COCH_3); 甲醇(CH_3OH); 胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)、胰酪胨大豆琼脂(TSA); 中性蛋白酶(酶活力 $>5 \times 10^4 U \cdot g^{-1}$)、胰蛋白酶(酶活力 $1\ 000 \sim 1\ 500 U \cdot mg^{-1}$)由上海蓝季科技

收稿日期: 2013-09-14.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(200903029); 浙江省自然科学基金(Y3100511); 宁波市自然科学基金(2012A610138); 宁波大学学科项目(XKL11094)。

第一作者: 彭程远(1989-), 男, 广西平南人, 硕士, 主要研究方向: 水产动物免疫学及病害防控. E-mail: 806083590@qq.com

*通信作者: 金珊(1964-), 女, 浙江天台人, 教授, 主要研究方向: 水产动物病害防控. E-mail: jinshan@nbu.edu.cn

有限公司生产。溶菌酶(酶活力 $>6 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$)和肽聚糖标准品购自 Sigma。

1.3 诺卡氏菌 WPG 的制备

将鲚鱼诺卡氏菌接种于 TSA 固体培养基培养 5 d 后, 转接到 TSB 液体培养基中, 在 28°C 温度下振荡培养 3~5 d, 再经二级培养 3~5 d 后离心($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min)集菌, 用灭菌超纯水清洗 3 遍, 清洗所得菌泥按固液比 1:10 加入质量分数为 10% TCA, 摇匀, 置于 70°C 下振荡处理 17 h, 以 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 沉淀用甲醇离心清洗 2 次, 脱水并除去 TCA, 加入丙酮溶剂振荡处理 6~8 h, 以 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 去除上清液, 取其沉淀按固液比 1:5 加入磷酸缓冲液(pH 7.4), 摇匀后加入胰蛋白酶和中性蛋白酶的复合酶, 2 种酶活均为 500 U 活力单位, 置于 38°C 水浴摇床培养箱中振荡酶解 48 h, 以 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 所得酶解产物用灭菌超纯水洗涤 3 次, 即为鲚鱼诺卡氏菌细胞壁 WPG。本制备路线的鲚鱼诺卡氏菌细胞壁 WPG 得率约为 4.5%。

1.4 诺卡氏菌 WPG 的鉴定

1.4.1 鲚鱼诺卡氏菌及其 WPG 的电镜观察

用无菌生理盐水洗 TSA 斜面上的菌苔, 并稀释制成菌悬液, 同时稀释 WPG。各吸取 1 滴稀释液置于封口膜上, 然后将其覆盖于 200 目的涂有聚乙烯甲醛(Formavar-carbon)的铜网上, 放置 5 min。醋酸铀(PTA, pH 6.5)金属染色液负染 5 min, 吸干多余液体并晾干, 在透射电镜下观察并拍照。

1.4.2 溶菌酶溶解试验

称取冻干 WPG 1 g 加入 100 mL 磷酸盐缓冲液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 6.2), 混匀后, 加入 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶菌酶, 在 37°C 水浴摇床中处理 0, 2, 4, 6, 8, 10, 28, 46, 56, 70 h 时取样, 观察肽聚糖溶解情况, 并在紫外分光光度计波长 450 nm 处测定吸光度。

1.4.3 紫外-可见光谱扫描分析

称取冻干 WPG、肽聚糖标准品及菌粉各 0.7 mg 分别溶于 20 mL 纯净水中, 充分混匀后在波长 190~700 nm 紫外-可见区段进行光谱扫描, 并对图谱进行分析比较。

1.5 WPG 的主要成分分析

WPG 中氨基己糖含量测定采用 Elson-Morgan 法^[14-15]; 总糖含量的测定采用酚硫酸法; 脂类含量

的测定采用香草醛法^[16]; 蛋白质含量和磷含量的测定分别采用南京建成的考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒和无机磷测定试剂盒(磷钼酸法)。

2 结果与分析

2.1 诺卡氏菌和 WPG 的形态

鲚鱼诺卡氏菌为革兰氏染色紫色, 菌体呈长或短杆状, 或细长分枝状, 常断裂成杆状至球状体, 菌体大小约 $(2.0 \sim 5.0) \mu\text{m} \times (0.2 \sim 1.0) \mu\text{m}$ (图 1)。本实验所提取的鲚鱼诺卡氏菌 WPG 为革兰氏染色红色, 在透射电镜下可见 WPG 形态完整、边缘整齐, 仍保持着鲚鱼诺卡氏菌菌体细胞形态, 呈囊状结构, 与菌体细胞相比, 呈透明状(图 2)。

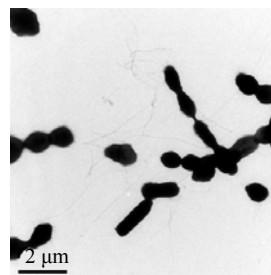


图1 鲚鱼诺卡氏菌 TSB 培养菌体细胞在电镜下的形态特征

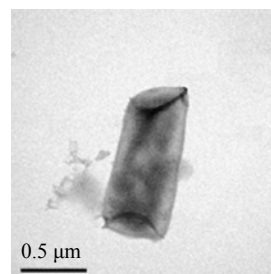


图2 鲚鱼诺卡氏菌 WPG 在电镜下的形态特征

2.2 WPG 的溶菌酶溶解试验

将实验提取的 WPG 进行溶菌酶试验(图 3)。图中显示随着溶菌酶水解时间的延长, 水解液的吸光值逐渐降低, 最终趋于平衡, 说明提取物可以被

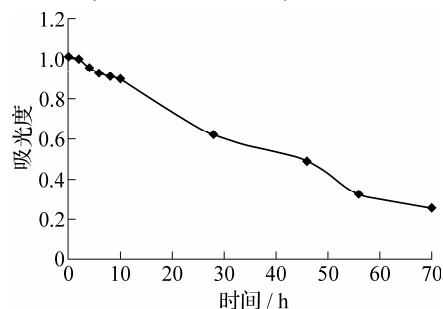


图3 WPG 的溶菌酶消化曲线

溶菌酶消化降解, 证实提取物为肽聚糖。

2.3 WPG 的紫外-可见光谱扫描分析

实验提取的 WPG 冻干粉、肽聚糖标准品及菌粉稀释液在波长 190~700 nm 紫外-可见区段的光谱扫描结果如图 4、图 5 和图 6 所示。由图可知, 本实验所提取的 WPG 与 PG 标准品和菌体紫外吸收峰形及峰位基本一致, 最大吸收峰均在 656 nm 处, 证明提取物确为肽聚糖, 且纯度更高。

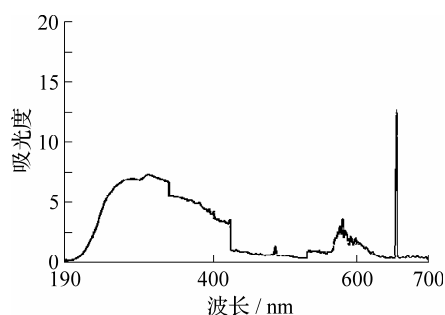


图 4 肽聚糖标准品紫外-可见光谱

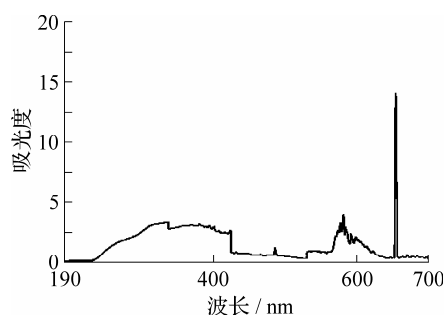


图 5 实验提取的 WPG 紫外-可见光谱

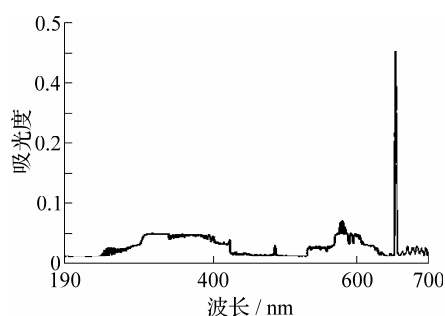


图 6 鲮鱼诺卡氏菌紫外-可见光谱

表 1 鲮鱼诺卡氏菌菌体和 WPG 中的主要成分测定结果

成分	菌体/(mg·g ⁻¹)	WPG/(mg·g ⁻¹)
氨基己糖	13.41	18.27
总糖	195.76	340.64
总脂	356.96	36.21
蛋白质	357.98	280.25
磷	21.59	0.72

2.4 WPG 中主要化学成分分析

鲮鱼诺卡氏菌菌体和细胞壁 WPG 中氨基己糖、总糖、总脂、蛋白质、磷等主要成分见表 1。从表中组数据可见, WPG 中各主要成分含量与菌体相比均已发生了显著性变化($P < 0.05$)。

3 讨论

细菌细胞壁 WPG 的提取方法最早是 1985 年由 Sekein 等^[5]在研究婴儿双歧杆菌时建立的, 他们采用去污剂(TritonX-100)法逐步去除了双歧杆菌中的核酸、蛋白质、脂类、磷酸壁, 获得了完整性较好的肽聚糖, 但此法操作繁琐, 制造周期长, 制备成本高且容易引起污染, 因此很难大范围地应用于工业化生产。在 Sekein 等人建立的经典方法的基础上, 乐军等^[10]也采用 TritonX-100 法成功获得了双歧杆菌细胞壁完整 WPG; 丁喜顺等^[17]采用三氯乙酸法提取长双歧杆菌 WPG, 得率为 4.05%; 李莹等^[18]优化了婴儿双歧杆菌 WPG 提取过程中所用酶的种类、作用浓度及作用时长, 使 WPG 的得率提高到 7.3%。笔者在前人的研究基础上, 根据鲮鱼诺卡氏菌的菌体特点, 将去除磷壁酸的步骤提到第一步, 其次是脱脂, 最后除蛋白质, 建立了诺卡氏菌 WPG 的分离制备路线, 该法 WPG 的得率为 4.5%, 纯度较高。

WPG 鉴定主要从形态学和化学组分这两方面进行, 其中形态学鉴定方法主要是通过透射电镜观察和革兰氏染色来区别。乐军等^[10]采用透射电子显微镜观察发现提取的双歧杆菌 WPG 保留其原菌体细胞形态, 但较透明; 梁延春等^[19]采用革兰氏染色法结合电子显微镜观察法鉴定双歧杆菌 WPG, 认为此方法是可行的。本实验也对鲮鱼诺卡氏菌和其 WPG 进行了革兰氏染色和电镜观察, 结果表明, 鲮鱼诺卡氏菌革兰氏染色呈紫色, 为阳性, WPG 染色呈淡红, 为阴性; 而透射电镜观察显示, WPG 形态与菌体相似呈袋状结构, 内部基本没有其他物质, 说明本研究的提取物应为 WPG。

化学组分鉴定主要是通过溶菌酶溶解试验和紫外-可见分光光度法。溶菌酶可以水解 β -1,4糖苷键, 破坏肽聚糖支架, 因此可以通过溶菌酶溶解试验鉴定分离物是否为肽聚糖^[13,20]。而紫外-可见分光光度法分析的原理是利用物质对不同波长光的

选择吸收现象来进行物质的定性和定量分析,判断物质的结构及化学组成^[16-17]。本研究的结果表明,提取物可以被溶菌酶完全消化降解,且紫外可见光谱扫描分析证实提取物与 PG 标准品的峰形及峰位一致,说明提取物确为肽聚糖。而对所提 WPG 的成分测定结果也显示,鲚鱼诺卡氏菌 WPG 主要由多糖和蛋白质组成。

参考文献:

- [1] 中国水产学会. 水产学学科发展报告(2011-2012)[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2012:21-39.
- [2] 王秀华. 肽聚糖对对虾免疫因子的作用及在对虾养殖中的应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2003.
- [3] 刘振民, 唐晓峰, 任彬彬. 嗜酸乳杆菌的生理特性及应用[J]. 中国乳业, 2003(5):28-30.
- [4] 李全阳, 夏文水. 乳酸菌胞外多糖的研究[J]. 食品与发酵工业, 2002, 29(5):86-90.
- [5] Sekine K, Ohta J, Onishi M, et al. Analysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation (WPG) of *Bifidobacterium infantis*[J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(1):148-153.
- [6] 王立生, 潘令嘉, 施理, 等. 双歧杆菌的全肽聚糖对裸鼠腹腔巨噬细胞产生 IL-6、IL-12 及一氧化氮的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(2):153-156.
- [7] 蓝景刚, 胡宏. 双歧杆菌及其表面分子的免疫增强作用[J]. 中国微生态学杂志, 1999, 11(3):129-131.
- [8] 邹明明. 乳酸杆菌 DM9811 肽聚糖的分离提取及免疫活性的研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2011.
- [9] 盛琴. 枯草芽孢杆菌肽聚糖的提取及其对小鼠免疫功能的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2011.
- [10] 乐军, 胡宏. 双歧杆菌细胞壁完整肽聚糖的分离纯化[J]. 中国微生态学杂志, 1997, 9(5):10-14.
- [11] 宋晓玲, 杨旭彤, 偲瀚文, 等. 双歧杆菌细胞壁肽聚糖的分离及其对二种海产动物免疫活性的影响[J]. 水产学报, 2005, 29(3):350-355.
- [12] 孙涛. 嗜酸乳杆菌细胞壁肽聚糖的分离提取及其免疫活性的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2007.
- [13] 马西艺, 乐国伟, 施用晖, 等. 乳酸杆菌肽聚糖的分离鉴定及其免疫活性[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(6):50-54.
- [14] Wadsworth S A, John P. Zikakis Chitinolytic activity of commercially available β -glucosidase[J]. Chitin Chitosan and Related Enzymes, 1984, 24:181-190.
- [15] 苏畅, 夏文水, 姚惠源. 氨基葡萄糖和乙酰氨基葡萄糖的测定方法[J]. 食品工业科技, 2003, 24(6):74-76.
- [16] 李莹. 婴儿双歧杆菌完整肽聚糖提取及其理化特性的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [17] 丁喜顺, 邓承远, 冯谦. 长双歧杆菌细胞壁完整肽聚糖分离鉴定研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(4):62-65.
- [18] 李莹, 付艳茹, 黄少磊, 等. 完整肽聚糖提取过程中酶解工艺的研究[J]. 食品工业, 2009(6):29-31.
- [19] 梁延春, 刘宁. 两歧双歧杆菌完整肽聚糖的质量评价[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(5):110-115.
- [20] 张悦, 宋晓玲, 黄捷. 双歧杆菌肽聚糖结构及分子量的分析[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4):676-681.

Studies on the Extraction and Identification of Whole Peptidoglycan from *Nocardia seriolae*

PENG Cheng-yuan, XIE Jun, WANG Xi-bo, JIN Shan*, ZHAO Qing-song, CHEN Yin-er, YAO Ye-zhuo
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The cell wall WPG of *Nocardia seriolae* was extracted and purified as follows: bacteria were collected by centrifuge after culture expansion. The bacteria cells were treated with trichloroacetic acid in order to remove the wall teichoic acids as well as nucleic acid. The residues were degreased with methanol and acetone. Then we digested the defatted residues with trypsin and neutral protease. They were cleaned by centrifugation and lyophilization. It has been proved by lysozyme and UV-visible absorption spectra that the extracts were peptidoglycan. The transmission electronmicroscopic observation of WPG showed that WPG was in sacciform and still held the physically intact cell wall structure of the whole cells, which certified the peptidoglycan we obtained was whole peptidoglycan.

Key words: *Nocardia seriolae*; whole peptidoglycan; extraction; identification

(责任编辑 章踐立)