

嗜水气单胞菌铁载体的提纯及特性分析*

马向东¹ 陆承平² 陈怀青 凌红丽

(南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘 要:提纯了嗜水气单胞菌(Ah)J-1 株的铁载体(siderophore), 并对其特性进行了初步分析。Ah J-1 株的培养上清液经聚酰胺柱层析、双蒸水洗脱、乙酸乙酯沉淀和真空冻干, 获得白色粉末。用 CAS 法及 Arnow 法检测均为阳性, 证实为铁载体, 含有 2, 3-二羟基苯甲酸(2, 3-DHB)功能团, 属酚盐类铁载体。高压液相色谱分析表明, 此种铁载体仅含甘氨酸、赖氨酸及色氨酸。上述纯化的铁载体, 在体外培养条件下能促进产铁载体为弱阳性的 Ah N9a 株的生长, 且能对抗 EDDA 对细菌生长的抑制作用, 显示铁载体能促进细菌的增殖, 在细菌的感染致病过程中可能起重要作用。

关键词:嗜水气单胞菌, 铁载体, 纯化, 特性分析

分类号:S852.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)01-0091-94

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)的致病菌株能导致人和动物的多种疾病, 其根本原因在于这些菌株能产生多种致病因子, 包括毒素、蛋白酶、S 层蛋白(S-layer protein)、菌毛(pili)、外膜蛋白(OMP)及铁载体(siderophore)等^[1-4]。其中铁载体在致病过程中所起的作用引起人们关注, 国外关于 Ah 铁载体的产生类型报道不一, 国内仅报道了铁载体的检测^[5]。本文用吸附层析方法提纯了一种铁载体, 并对其特性进行了分析。

1 材料和方法

1.1 细菌及培养

Ah J-1 株由陈怀青等从鲫鱼分离^[5]; Ah N9a 株系从鸡分离, 德国联邦卫生局提供, 经筛选确定为产铁载体弱阳性^[6]。接种于普通肉汤 28 ℃ 培养 24 h, 然后划线接种于普通平板, 28 ℃ 培养 24 h, 挑取单个菌落接种于肉汤培养基备用。所用器皿均经 6mol/L HCl 浸泡 48 h 后, 用双蒸水清洗干净, 避免使用铁制器械。

1.2 获取铁载体条件的优化

1.2.1 细菌的最适培养温度:诱导培养基的配制参照 Barghouthi 的方法^[7], 略加改动, 配方为: 葡萄糖 5g/L、(NH₄)₂HPO₄ 1g/L、K₂HPO₄ 4g/L、K₂HPO₄ 2.7g/L。用双蒸水充分溶解后, 用 8-羟基喹啉除铁, 再加入 MgSO₄ 830μmol/L、MnSO₄ 40μmol/L 和 Fe₂(SO₄)₃

* 国家“九五”攻关项目子课题(96-005-03-01)

1 现工作单位: 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 266071; 2 通讯作者

作者简介:马向东(1972—), 男, 山东省寿光人, 中国水产科学研究院黄海水产研究所研究实习员, 硕士, 主要从事鱼病微生物检测

收稿日期:1998-06-04, **修回日期:**1998-11-05

0.18 μ mol/L, 过滤除菌, 将 J-1 株接种于诱导培养基中, 分别于 25 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 静置培养 36h, 15 000g 离心 10min, 用液体 CAS 法^[8]检测上清铁载体的产生量。

1.2.2 最适培养时间: 将 J-1 株接种诱导培养基, 30 $^{\circ}$ C 180r/min 摇床培养, 分别培养 6、12、24、36、48 和 60h, 4 $^{\circ}$ C 离心取上清, 用液体 CAS 法检测铁载体的产生量。

1.2.3 最适铁离子浓度: 诱导培养基的配制同上, 但不加 Fe₂(SO₄)₃。培养基分装后将 Fe³⁺ 按以下浓度加入: 0、0.05mol/L、0.10 μ mol/L、0.20 μ mol/L、0.50 μ mol/L、1.00 μ mol/L, 30 $^{\circ}$ C, 180r/min 摇床培养 36h, 用液体 CAS 法测铁载体的产生量。

1.3 铁载体的提纯

1.3.1 铁载体的产生: 先将 J-1 株接入诱导培养基静置 12h 作为种子液, 然后接种, 30 $^{\circ}$ C, 180r/min 摇床培养 36h, 4 $^{\circ}$ C 离心取上清, 上清中的铁载体用液体 CAS 检测, 铁载体类型用 Arnow 及 Csaky 方法检测^[9,10]。

1.3.2 铁载体的提纯: 用聚酰胺吸附层析法^[7,11]。聚酰胺(Q/CYD2-51-92)首先经甲醇、丙酮和足量的双蒸水洗涤除去有机成分, 然后装柱(3.4cm $\times$ 39.5cm), 用双蒸水平衡, 将细菌上清过聚酰胺柱, 铁载体吸附于聚酰胺, 用双蒸水洗脱, 每 5mL 收集一管, 并于检测仪自动检测 280nm 处蛋白吸收值, 同时用液体 CAS 法检测洗脱液中铁载体的含量。收集 A₂₈₀ 峰双蒸水洗脱液盛于塑料容器中, 真空浓缩至 5~10mL, 加入 50mL 左右的乙酸乙酯, 4 $^{\circ}$ C 静置 48h, 过滤得白色絮状沉淀, 以 75% 乙醇溶解, 保存于安瓿中。

1.4 铁载体的特性分析

1.4.1 氨基酸组分分析: 将铁载体真空冻干, 得白色粉末, 取样品经酸碱水解后, 于高压液相色谱仪(1050 型, HP 公司)进行氨基酸组分分析。

1.4.2 生物学特性分析: 将 Ah N9a 株接入诱导培养基, 静置 12h 后接入分组后的诱导培养基, 使菌液在 600nm 处的吸收值为 0.02, 一组加入 100 μ g/mL EDDA(乙二胺 N, N-二乙酸, Sigma 公司); 另一组加入 EDDA 后加入少许 J-1 株的冻干的铁载体作为对照, 30 $^{\circ}$ C 180r/min 摇床培养, 不同时间取样, 测培养液在 600nm 处的吸收值 A₆₀₀。

2 结果

2.1 铁载体的产生及检测

J-1 株经培养, 取上清作 CAS 检测呈阳性^[8], 用 Arnow 及 Csaky 法检测均呈阳性。

2.2 获得铁载体条件的优化

2.2.1 最适培养温度: J-1 株铁载体的表达量以 Ar-As/Ar $\times$ 100 表示, 随培养温度的变化而变化(表 1), 在 36h 以培养温度为 30 $^{\circ}$ C 时铁载体的产生量最大, 所以选择 30 $^{\circ}$ C 为最佳培养温度。

表 1 不同温度下铁载体的表达

Table 1 Siderophore production in different temperatures

Culture temperature/ $^{\circ}$ C	25	28	30	37
Siderophore production unit	14.3	43.4	52.7	5.1

2.2.2 最佳培养时间: J-1 株铁载体的产生随着培养时间而变化, 呈波浪上升的趋势(表 2), 在 36h 达到最高峰, 因此选择 36h 为最佳培养时间。

2.2.3 最佳铁离子浓度: J-1 株铁载体的产生随着所加入铁离子浓度的增加而减少, 而当

加入铁离子浓度为 0 时,铁载体表达量最高(表 3)。

2.3 铁载体的提纯

将诱导培养基培养的细菌上清经聚酰胺吸附层析,从双蒸水洗脱开始到用甲醇洗脱前,测定铁载体在洗脱液中的含量,绘制洗脱曲线(图 1)。收集的 A₂₈₀峰用 CAS、Arnow 及 Csaky 三种方法检测,CAS 检测为阳性,Arnow 检测为阳性,而 Csaky 检测为阴性。经沉淀、冻干得白色粉末状铁载体。

2.4 铁载体的特性分析

2.4.1 铁载体的氨基酸组分分析 高压液相色谱分析结果显示,J-1 株所得的铁载体仅含甘氨酸、赖氨酸和色氨酸。

2.4.2 铁载体的生物学特性:细菌的生长以菌液在 600nm 处的吸收值为衡量。结果显示,EDDA 加入培养基中能抑制细菌的生长,而铁载体的加入,可对抗这种抑制作用(表 4)。

表 4 铁载体对 Ah N9a 株生长的影响
Table 4 Effect of siderophore on growth of Ah N9a strain

Cultural time/h	Bacterial amount* A ₆₀₀ (100μg/mL)		
	EDDA group	Control group	EDDA + Siderophore Group
6	0.061	0.072	0.045
12	0.299	0.445	0.385
20	0.304	0.441	0.496
24	0.307	0.412	0.542
30	0.305	0.447	0.574
48	0.309	0.444	0.594

3 讨论

铁载体是细菌在低铁条件下产生的一类小分子有机化合物,因其分子量小,一般不超过 1 000,所以不能用 PAGE 电泳等方法测定分子量及分析其特性。本实验采用层析、沉淀、冻干、氨基酸组分分析,成功地提纯了嗜水气单胞菌 J-1 株的铁载体,可供提纯其它细菌铁载体借鉴。J-1 株的铁载体在层析前经 Arnow 及 Csaky 法检测,证实为酚盐类型与异羟肟盐类型的铁载体,但层析后,经检测只有 Arnow 反应呈阳性,估计是异羟肟盐类型铁载体在提纯过程中丢失,或因其吸附于聚酰胺柱上用水不能洗脱之故。Barghouthi 认为嗜水气单胞菌能产生气单胞菌素及肠杆菌素两种铁载体,两者均属于酚盐类型的铁载体。其中气单胞菌素又分为两种类型,即气单胞菌素 T 与气单胞菌素 P,前者为甘氨酸、赖氨酸、包氨酸及 2,3-二羟基苯甲酸(2,3-DHB);后者的组成为甘氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸及 2,3-DHB。本试验中提纯的铁载体其氨基酸组成为甘氨酸、赖氨酸和色氨酸,且检测

表 2 不同培养时间下铁载体的表达

Table 1 Siderophore production in different times

Culture time/h	6	12	24	36	48	60
Siderophore production unit	18.8	52.4	50.5	54.8	51.7	46.6

表 3 不同离子浓度下铁载体的表达

Table 3 Siderophore production in different concentration of iron

c(Fe) ³⁺ /(μmol/L)	0	0.05	0.10	0.20	0.50	1.00	10.0
Siderophore production unit	79.5	69.4	65.2	28.7	24.5	18.1	0.5

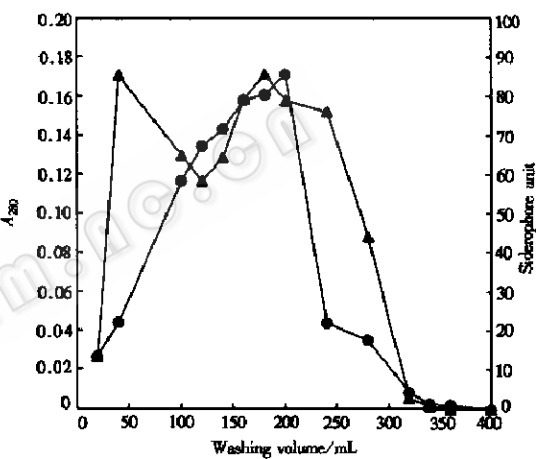


图 1 铁载体的聚酰胺层析洗脱曲线
Fig. 1 Chromatographic profile on a polyamide column of siderophore
—▲— Siderophore; —●— A₂₈₀.

2,3-DHB 功能团的 Arnow 反应呈阳性,因此它与气单胞菌素 T 应是同种物质。嗜水气单胞菌 N9a 株为产铁载体弱阳性,提纯的 J-1 株铁载体能促进其生长。EDDA 可络合环境中的铁,而铁载体能够对抗 EDDA 对细菌生长的抑制作用,证明载铁体可以夺取 EDDA 络合的铁供细菌利用促进其生长。正因为铁载体能为细菌提供生长必需的铁离子,所以被认为是一种致病因子^[12,13],但迄今均只在体外检出铁载体,在宿主体内它是否产生,以及它在细菌致病过程中如何发生作用,尚待研究。

参 考 文 献

- [1] 涂小林,陆承平.微生物学报,1992,32(6):432~438.
- [2] 李焕荣,陈怀青,陆承平.南京农业大学学报,1996,19(3):88~94.
- [3] 严亚贤,陈怀青,陆承平.微生物学报,1996,36(2):144~150.
- [4] 陈怀青,陆承平.中华微生物学和免疫学杂志,1996,16:200~202.
- [5] 陈怀青,陆承平.南京农业大学学报,1991,14(4):87~91.
- [6] 马向东,陆承平,陈怀青.南京农业大学学报,1996,19(4):117~119.
- [7] Barhgothi R Y, Olson M O J, Arceneaux L A. *J Bacteriol*, 1989, 171:1811~1816.
- [8] Schwyn B, Neilands J B. *Anal Biochem*, 1987, 160:47~56.
- [9] Arnow L E. *J Biochem*, 1937, 118:531~537.
- [10] Csaky T Z. *Acta Chem Scand*, 1948, 2:450~454.
- [11] Robinson A V. *Biochem*, 1979, 95:364~370.
- [12] Yang H M, Chaowagul W, Sokol P A. *Infect Immun*, 1991, 59(3):776~780.
- [13] Massad G, Arceneaux J, Byers B R. *J Gen Microbiol*, 1991, 137:237~241.

PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF SIDEROPHORE FROM *AEROMONAS HYDROPHILA*

Ma Xiangdong Lu Chengping* Chen Huaqing Ling Hongli

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Siderophore of *Aeromonas hydrophila* (Ah)J-1 was purified from culture supernatant by polyamide column chromatography, eluted by double-distilled water, ethyl acetate precipitated, lyophilized, then the white powder was collected, and demonstrated by CAS and Arnow assay. The siderophore was phenolate, composed of 2, 3-dihydroxybenzoic acid (2, 3-DHB), lysine, glycine and tryptophan by HPLC. Being cultured in iron-deficient medium, the purified siderophore could stimulate the growth of Ah N9a which siderophore production is poorly positive and reverse the inhibition growth of EDDA. It suggested that siderophore could promote growth of bacteria and might play an important role in bacteria infection.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, Siderophore, Purification, Identification

* Corresponding author