

一株神经节苷脂内切糖苷酶产生菌的分离、 鉴定及系统发育分析*

于 巍 祝令香 刘伟丰 金 城 董志扬**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 :从土壤微生物中筛选得到一株产神经节苷脂内切糖苷酶的菌株 YW2112,该酶能特异性水解神经节苷脂中连接神经酰胺和寡糖链之间的糖苷键,是研究神经节苷脂结构与功能的重要工具酶。对分离菌株 YW2112 进行了形态、生理生化鉴定及 16S rDNA 序列分析。菌株 YW2112 为细菌,革兰氏染色阴性,直杆状,鞭毛周生,菌体大小为 $(0.6\mu\text{m} \sim 1\mu\text{m}) \times (1\mu\text{m} \sim 3\mu\text{m})$, *N*-P 实验阳性,甲基红阴性,利用葡萄糖产酸产气。以 16S rDNA 同源性为基础构建了包括 11 株相关种属细菌在内的系统发育树,在系统发育树中,分离菌株 YW2112 与 *Enterobacter cloacae* 在同一分支,二者的序列相似性为 98.6%。结合形态和生理生化鉴定,将其鉴定为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)。

关键词 :神经节苷脂内切糖苷酶,16S rDNA,系统发育分析

中图分类号 :Q939 文献标识码 :A 文章编号 :1006-6179(2003)02-0151-05

神经节苷脂(Gangliosides, GLS)由一含唾液酸的亲水寡糖通过 β -1,1-糖苷键与疏水的神经酰胺连接而成的两性大分子。它存在于几乎所有的哺乳动物组织中,在神经组织中尤为丰富。在细胞膜结构中,GLS 的疏水部分镶嵌于膜双脂层中,而亲水的寡糖链则像天线一样暴露于细胞膜表面^[1]。

位于细胞表面的 GLS 具有多种重要的生物功能:作为信息分子或受体可特异性结合多种生物活性因子,如生长因子、细菌毒素和抗原抗体和病毒等,参与细胞的增殖、识别、分化和信号传递等过程,它在癌变过程中也扮演着重要角色^[2]。神经节苷脂日益成为生物学、医学领域研究的热点。自 1935 年 Klenk 首次发现以来,至今已分离鉴定出 70 余种 GLS,但因为缺少较合适的分析方法和手段,人们对其确切的生物功能还缺乏足够认识。分析其功能的最佳途径就是采用高度专一性的糖苷酶,因此发现和开发这类工具酶是了解神经节苷脂中寡糖链功能的关键一步。

神经节苷脂内切糖苷酶(Endoglycoceramidase, EGCCase, EC3.2.1.123)是一种新型的内切糖苷酶,能特异性水解神经节苷脂中连接神经酰胺和寡糖链之间的糖苷键,将神经节苷脂上的寡糖链完整释放出来。1986 年美国科学家李玉德首次在水蛭体内发现该酶^[3],到目前为止国际上仅日本报道在红球菌 *Rhodococcus* sp.^[4]和棒杆菌 *Corynebacterium* sp.^[5]中发现了微生物来源的 EGCCase,其它微生物来源的神经节苷脂内切酶研究在国内外尚未见报道。本文报道从土壤微生物中分离筛选得到了一株产 EGCCase 的新菌株,并对其进行了

* 国家自然科学基金项目(30170218);中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-3-02-02)

** 通讯作者。 E-mail:dlongzy@sun.im.ac.cn

作者简介:于 巍(1976-),女,辽宁丹东人,硕士,从事微生物酶分子生物学研究。

收稿日期:2002-06-13,修回日期:2002-10-25

形态、生理生化鉴定和基于 16S rDNA 序列的系统发育分析。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

菌株 YW2112 由本实验室从土壤中分离得到。

1.2 培养基组分及培养条件

1.2.1 诱导分离培养基:多聚蛋白胨 0.5%, 酵母提取物 0.1%, 氯化钠 0.2%, 神经节苷脂 0.2%, 琼脂 1.8%, pH6.5。LB 培养基:蛋白胨 1%, 酵母提取物 0.5%, NaCl 1%, pH7.0。

1.2.2 培养条件:180r/min, 30℃摇床振荡培养 20h。

1.3 酶和试剂

pGEM-T-easy vector Kit、DNA 限制性内切酶购于 Promega 公司, Gel extraction Kit 购于鼎国, Taq plus DNA polymerase 购自上海生工生物技术有限公司, 神经节苷脂参照文献^[6]从新鲜牛脑中提取, Lac-MU (4-Methylumbelliferyl- β -D-lactoside), GM1 (ganglioside), HRP-B (cholera toxin B subunit-peroxidase conjunctate) 购于 Sigma 公司, 其余化学试剂均为国产分析纯。

1.4 EGCase 产生菌株的分离筛选方法

采集的土壤样品经富集培养后分离纯化单菌落, 单菌落接种于液体诱导培养基中, 30℃摇床培养 20h 获得的培养物超声破碎后作为粗酶液。先水解荧光底物 Lac-MU 进行初筛, 用薄层层析分析酶活性。反应体系为 5 μ L Lac-MU (0.1 μ g/ μ L) 与 17.5 μ L 粗酶液, 2.5 μ L 50mmol/L pH5.5 的醋酸钠缓冲液(含 0.4% Triton-100) 37℃下反应 12 h。以神经节苷脂 GM1 为底物进行复筛, 按常规的 ELISA 方法进行操作。首先将 GM1 固定在酶标板上, 与酶液在 37℃下反应 12h 后, 用能特异结合 GM1 上寡糖链的 HRP-B 标记板上的 GM1, 若 GM1 的寡糖链被水解, 则 HRP-B 不能结合。为防止外切糖苷酶(主要是半乳糖苷酶)的干扰, 在反应系统中加入半乳糖苷酶抑制剂。

1.5 形态观察

革兰氏染色, 鞭毛染色, 并对其细胞形状、鞭毛及运动性等形态结构进行显微观察。

1.6 生理生化鉴定

生理生化试验按照伯杰氏细菌鉴定手册(第九版)方法进行。

1.7 16S rDNA 的扩增与测序^[7]

1.7.1 细菌总 DNA 提取 CTAB 法^[8]

1.7.2 引物:本实验采用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 其序列如下:引物 F27: 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3', 引物 R1492 5'GGCTACCTTGTTACGACTT 3'。

1.7.3 PCR 反应条件:94℃变性 50s, 51℃复性 50s, 72℃延伸 1.5min, 30 个循环, 然后 72℃延伸 8min。用 Gel extraction Kit 从胶中回收 PCR 产物, 连接在 pGEM-T Easy vector 上, 转化 *E. coli* DH5 α , 在加有 Amp/IPTG/X-gal 的 LB 平板上筛选阳性白斑, 提取质粒并测序。

1.8 系统发育树的构建

将菌株 YW2112 的 16S rDNA 序列在 GenBank、EMBL 核酸序列数据库进行序列比较, 采用 DNAMANV4.0 软件的 Multiple Sequence Alignment 进行 16S rDNA 同源性分析, 并构建系统发育树。

2 结 果

2.1 菌株的分离筛选

土壤样品富集培养后涂布于 LB 平板 将得到的 600 个单菌落分别接种于含神经节苷脂的液体诱导培养基中 30℃摇床培养 20h。用荧光替代底物 Lac-MU 进行初筛(图 1),初筛得到 13 株阳性细菌 再以 GM1 为底物进行 ELISA 复筛 最终得到阳性菌株 YW2112 该菌产 EGCase 能有效的水解 GM1 上的寡糖链 从而使 HRP-B 无法与 GM1 寡糖链结合显色(图 2)。同时对菌株 YW2112 的发酵液上清和菌体破碎上清液及碎片沉淀中酶活力进行了测定 酶活力主要集中于细胞碎片沉淀中 因此初步分析该酶为一膜蛋白。

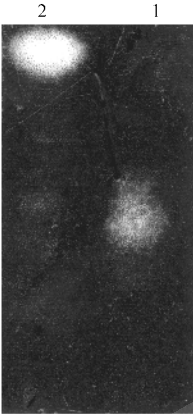


图 1 EGCase 水解 Lac-MU 产物的 TLC 分析

Fig.1 TLC of product from Lac-MU by EGCase

1. Lac-MU ; 2. Lac-MU + EGCase .

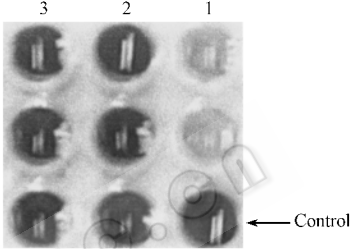


图 2 EGCase 水解 GM1 的 ELISA 分析

Fig.2 Hydrolysis of GM1 by EGCase

1. GM1 + EGCase(12h) ;
2. GM1 + EGCase(0h) 3. GM1 .

2.2 YW2112 的形态与生理生化特征

菌株 YW2112 为革兰氏阴性细菌 ,直杆状 ,鞭毛周生 ,不形成芽孢 ,菌体大小为 (0.6μm ~ 1.0μm)×(1.0μm ~ 3.0μm) ,菌落圆形 淡黄色。其生理生化鉴定结果见表 1。

表 1 YW2112 菌株的生理生化特性

Table 1 Physiological characteristics of strain YW2112			
Characteristic	StrainYW2112	Characteristic	StrainYW2112
Oxidase	-	Oxidation-fermentation	+
Catalase production	+	Acid production from	
Urease	+	Glucose	+
Lysine decarboxylase	-	Sucrose	+
Phenylalanine deaminase	-	L - Arabinose	+
Arginine dihydrolase	-	D - Sorbitol	+
Citrate	+	myo - Inositol	+
Methyl red	-	Glycerol	+
Voges - Proskauer	+	Ribotide	-
Indole production	-	Gas production from	
Hydrogen sulfide	+	Glucose	+
Production		Glycerol	-
Gelatin hydrolase	-	myo - Inositol	-
Esculin hydrolysis	+		

* + : Positive ; - : Negative .

参考伯杰氏细菌鉴定手册(第九版),菌株 YW2112 的形态与生理生化特性与阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)最为接近。

2.3 系统发育分析

获得分离菌株 YW2112 的 16S rDNA 全长序列,共 1506bp,其 GenBank 序列登录号为 AF395913。以 16S rDNA 同源性为基础构建包括 11 株相关种属细菌(分别属于 *Enterobacterium*, *Klebsiella* 和 *Pantoea* 属)在内的系统发育树(图 3)。系统发育树中,分离菌株 YW2112 与 *Enterobacter cloacae*,*Enterobacter dissolvens* 和 *Klebsiella pneumoniae* 在同一分支,与 *Enterobacter cloacae* 的序列相似性最大,为 98.6%。

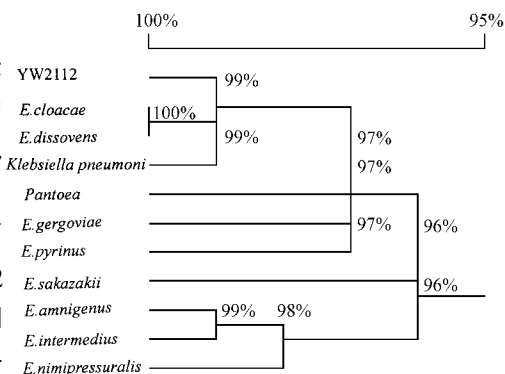


图 3 分离菌株 YW2112 的 16S rDNA 全序列的系统发育树状图

Fig.3 Phylogenetic tree derived from the 16S rDNA sequence of strain YW2112

3 讨论

神经节苷脂内切糖苷酶(EGCase)能专一性水解神经节苷脂上的寡糖链。1986 年美国

Tulane 大学华裔科学家李玉德教授从水蛭中首次发现此酶,这一发现解决了此前利用外切糖苷酶来分析神经节苷脂结构的局限性,因为随着寡糖链的变短,GLS 的亲脂性变大,酶越难对其进行水解作用^[9]。同年日本 Yamagata 教授从土壤微生物中分离得到一株产 EGCase 的放线菌红球菌 *Rhodococcus* sp.,1992 年 Tochikura 又从土壤中分离得到了产此酶的棒杆菌 *Corynebacterium* sp.,目前在世界上仅发现这两种产酶菌。

1993 年 Yamagata 教授成功地利用 EGCase 对小鼠红细胞膜上的神经节苷脂进行酶切分析,这是首次在活体的状态下分析细胞表面 GLS 的结构^[10]。1997 年该实验室又从红球菌 *Rhodococcus* sp. 中克隆到 EGCase 的基因并在大肠杆菌中表达^[11]。由于神经节苷脂中寡糖链结构高度的复杂性,现有来源的 EGCase 不能识别所有结构的神经节苷脂寡糖链。因此发现和开发新的酶对于进一步研究神经节苷脂的结构与生物学功能具有重要意义。

目前对于微生物来源的 EGCase 研究因缺乏简捷的分析方法而受到制约,本文根据神经节苷脂上的寡糖链能特异结合一些生物因子(如 GM1 能特异结合霍乱毒素 B 亚基)的特性^[12],将 ELISA 方法和 EGCase 水解 GM1 反应结合,建立了一种高灵敏度筛选产酶菌株的方法,在菌株复筛中得到很好应用。将此方法与水解荧光替代底物 Lac-MU 初筛相结合,从土壤微生物中分离到了一株产酶菌株 YW2112,通过分析认为该酶为一膜蛋白。

从构建的进化树上看分离菌株 YW2112 与肠杆菌属 *Enterobacter* 内大部分种间的同源性都在 96% 以上,并与 *Enterobacter cloacae*,*Enterobacter dissolvens* 和 *Klebsiella pneumoniae* 在同一分支,与 *Enterobacter cloacae* 二者的序列相似性最大,为 98.6%。结合形态和生理生化鉴定结果将分离菌株 YW2112 鉴定为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*),上述各种属细菌在国内外尚未见有产 EGCase 报道。

参考文献

[1] 陈惠黎,王克夷.糖复合物的结构和功能.上海:上海医科大学出版社,1996:164~175

- [2] Hakomori S. Glycosphingolipids in cellular interaction , differentiation , and oncogenesis. *Annu Rev Biochem* ,1981 **50** :733 ~ 764.
- [3] Li S C , Li Y T. A unique glycosphingolipid-splitting enzyme (ceramide-glycanase from leech) cleaves the linkage between the oligosaccharide and the ceramide. *Biochem Biophys Res Commun* ,1986 **141** :346 ~ 352.
- [4] Ito M , Yamagata T. A novel glycosphingolipid - degrading enzyme cleaves of the linkage between the oligosaccharide and ceramide of neutral and acidic glycosphingolipids. *J Biol Chem* ,1986 **261** :14278 ~ 14282.
- [5] Ashida H , Yamamoto K , Kumagai H , *et al.* Purification and characterization of membrane - bound endoglycoceramidase from *Corynebacterium* sp. . *Eur J Biochem* ,1992 **205** :729 ~ 735.
- [6] Ledeen R W , Yu R K. Gangliosides : structure , isolation , and analysis. *Methods Enzymol* ,1982 , **83** :139 ~ 191.
- [7] 祝令香 , 徐 建 , 于 巍 , 等. 一株纤维素降解菌的鉴定. *农业生物技术学报* ,2001 **9** :255 ~ 257.
- [8] Frederick M A , Roger B , Robert E K , *et al.* Short Protocols in Molecular Biology. New York :John Wiley&Sons , Inc. , 1995. 11 ~ 13.
- [9] Li Y T , Li S C. Enzymatic hydrolysis of glycosphingolipids. *Analytical Biochemistry* ,1999 **273** :1 ~ 11.
- [10] Rasilo M L , Ito M , Yamagata T. Liberation of oligosaccharides from glycosphingolipids on PC12 cell surface with endoglycoceramidase. *Biochem Biophys Res Commun* ,1989 **162** :1093 ~ 1099.
- [11] Izu H , Izumi Y , Kurome Y , Sano M , *et al.* Molecular cloning , expression , and sequence analysis of the endoglycoceramidase II gene from *Rhodococcus species* strain M - 777. *J Biol Chem* ,1997 **272** :19846 ~ 19850.
- [12] Schon A , Freire E. Thermodynamics of intersubunit interactions in cholera toxin upon binding to the oligosaccharide portion of its cell surface receptor , ganglioside GM1. *Biochemistry* ,1989 , **28** :5019 ~ 5024.

Isolation , Identification and Phylogenetic Analysis of an Endoglycoceramidase Producing Bacterium *

Yu Wei Zhu Lingxiang Liu Weifeng Jin Cheng Dong Zhiyang * *

(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract : A bacterial isolate YW2112 producing endoglycoceramidase was isolated from soil. The enzyme catalyzed the hydrolysis of the linkage between oligosaccharides and ceramides of gangliosides. It was a very important analytical tool for the elucidation of biological functions and structures of gangliosides. The isolated strain YW2112 was identified by 16S rDNA sequence , morphological , biochemical and physiological identification. The cells of the strain YW2112 were straight rods that were $0.6\mu\text{m} \sim 1.0\mu\text{m}$ wide $\times 1.0\mu\text{m} \sim 3.0\mu\text{m}$ long , Gram negative , peritrichous flagella , V - P positive , Methyl red negative. D-glucose and other carbohydrates were catabolized with the production of gas and acid. A phylogenetic tree was constructed by comparing with the published 16S rDNA sequences of the relative bacteria species. In the phylogenetic tree YW2112 , *Enterobacter cloacae* , *Enterobacter dissolvens* and *Klebsiella pneumoniae* constitute a branch and *Enterobacter cloacae* was the closest relative with 98.6% sequence similarity. The results indicated that strain YW2112 was belong to *Enterobacter cloacae* .

Key words : Endoglycoceramidase , 16S rDNA , Phylogenetic analysis

* Project Granted by Chinese National Science Fund(30170218) and “ Knowledge Innovation Project(KIP) ” of Chinese Academy of Sciences(KSCX2 - 3 - 02 - 02)

* * Corresponding author. E-mail :dongzy@sun.im.ac.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>