

嗜酸热硫球菌细胞外被的生物化学特性

徐毅 李雅芹 蔡文六 钟慧芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

研究了一株嗜酸热硫氧化古细菌——嗜酸热硫球菌 (*Sulfosphaerellus thermoacidophilum*) S-层的某些生物化学性质。发现该菌在某些重要性质方面与硫化叶菌属的模式菌种酸热硫化叶菌 (*Sulfolobus acidocaldarius*) 相比有很大差异。嗜酸热硫球菌的 S-层在 2% SDS 溶液中非常不稳定, 很容易被分解成亚单位; 但它们在 pH 9.0 的磷酸缓冲液中很稳定, 既不会被水解也不溶解在该缓冲液中。

该菌 S-层蛋白在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳时显现出一个多重的谱带, 其分子量分布在 11 万以下; 用高碘酸-希夫试剂以及苏丹黑试剂染色均未发现糖蛋白和脂蛋白成分。氨基酸组成分析表明, 该菌与酸热硫化叶菌在细胞 S-层氨基酸组成方面也有较大的差别。该菌 S-层的固体膜红外光谱(酰胺区)表明, 在细胞 S-层蛋白质结构中存在大量的 β -折叠构象。

关键词 嗜酸热硫球菌; S-层

细胞外被的化学性质是区别古细菌和真细菌的重要特征之一。这种特性不仅用在高水平的分类(如生物界之间的分类), 而且还用于各界之内的细分。例如, 根据细胞外被的表型特征, 已将古细菌大致分为四个类型: 类型 I, 为绝大多数革兰氏阳性古细菌。它们的细胞质膜外仅含有一个或多或少均一的稠密层, 其主要成分为假胞壁酸(如 *Methanobacteriales*) 或杂多糖(如 *Halococcus*)。这一层结构称为细胞壁膜囊。类型 II, 仅发现在某些革兰氏阳性古细菌中(如 *Methanothermus fervidus*)。在它们的假胞壁型细胞壁膜囊外还包有一蛋白质性的表面层(S-层)。类型 III, 代表了典型的革兰氏阴性古细菌特征。它们的细胞质膜外仅含有一个蛋白质或糖蛋白为亚单位紧密排列的表面层。类型 IV, 存在于 *Methanospirillum* 中。在古细菌中, 此类型细胞外被的组成最复杂, 其单个细胞的质膜外包有一蛋白质性的电子稠密层, 而若干这种细胞又被一层细胞鞘结合在一

起。以上古细菌不管属于哪种类型, 其细胞外被中都不含有胞壁酸成分。

我们分离得到的古细菌——嗜酸热硫球菌的细胞外被属于第 III 种类型, 即细胞质膜外仅含有一层由蛋白质为亚单位组成的 S-层结构^[1]。

我们在以前实验的基础上, 进一步对该菌进行较深入的生化研究, 从而为硫球菌属打下牢固的理论和分类基础。

材料和方法

(一) 菌种和培养条件

试验菌种为嗜酸热硫球菌 S-5, 从云南腾冲热泉分离, 在含有 0.075% 牛肉膏的改良 Allen 培养基中静止培养^[1,2]。

(二) 方法

1. 细胞外被(S-层)的提取^[3]: 离心(8000 \times g)收集对数生长末期的细胞, 蒸馏水洗涤两次。菌体通过 X-Press 破碎机破碎, 将破碎物悬

本文于 1987 年 2 月 7 日收到。

注: 本工作由张树政先生申请的国家自然科学基金资助。

浮在含 DNase I 和 RNase (pH7.8) 的 0.1 mol/L tris-HCl(含 10 mmol/L MgCl₂) 缓冲液中, 40000 × g 离心 20 分钟, 沉淀物(粗 S-层)悬浮在 1% Triton X-100 中, 60℃ 1 小时。然后离心, 所得沉淀物用蒸馏水洗涤 6 次 (70000 × g), 最后的沉淀物即为纯化的细胞 S-层分离物。

2. S-层蛋白质分子量的测定: (1) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[4]; (2) 高效液相色谱 (Waters 244 HPLC) 法: 流动相为 H₂O, 流速 2 ml/min, 分析柱为 1—125 蛋白质分析柱。

3. S-层蛋白质构象以及氨基酸组成的测定: 红外光谱仪 (Perkin-Elmer 599B) 测定 S-层蛋白质的构象; 高效液相色谱 (Waters 244 HPLC) OPA 离子交换法分析 S-层蛋白质的氨基酸组成。柱: 阳离子交换树脂柱 0.46 × 25 cm; 流动相: A = 0.2 mol/L 柠檬酸钠 (pH 3.0), B = 0.2 mol/L 硼酸钠 (pH 9.8); 流动相的转化率: 0%—100% B linear 48 min; 流速: 0.4 ml/min; 荧光检测: Ex. 338, Em. 425 nm; 柱温: 62℃。

4. 糖蛋白用高碘酸-希夫试剂测定; 脂蛋白用苏丹黑法测定^[5]。

5. 总糖用 3,5-二硝基水杨酸比色法测定^[6]; 单糖用 GC-7A Shimadzu 气相色谱测定。柱温: 230℃; 检测器温度: 300℃; 载气: N₂ (50 ml/min); 固定相: 3% OV-225; 担体: Chromosorb W. (AW-DMCS); 柱: 玻璃填充柱 2.5 m。

结果和讨论

嗜酸热硫球菌 S-层的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳用高碘酸-希夫试剂和苏丹黑试剂染色, 表明该菌 S-层的组分中不含糖蛋白和脂蛋白; 而用考马斯亮兰染色却显示出一个多重蛋白质性的谱带 (图 1)。

这说明该菌 S-层是由许多分子量不同的蛋白质亚单位构成, 这与酸热硫化叶菌只含两个不同分子量的糖蛋白亚单位有很大差别^[7,8]。根据图 2, 3 的谱图, 这些不同分子量的蛋白质亚单位主要分布在三个区域 (A 区、B 区和 C 区)。其中 B 区所含

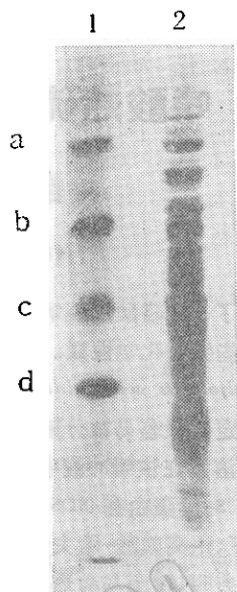


图 1 嗜酸热硫球菌 S-层蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

用考马斯亮兰 R250 染色。1 为对照标准带: a. 磷酸化酶 B (分子量 94000); b. 牛血清白蛋白 (分子量 68000); c. 卵白蛋白 (分子量 43000); d. 碳酸酐酶 (分子量 29000); 2 为 S-层蛋白带。

Fig. 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the S-layer of *Sulfohalobium thermophilum*

Stained with Coomassie blue. 1, As a standard reference: a. Phosphorylase B (MW. 94000); b. Bovine serum albumin (MW. 68000); c. Ovalbumin (MW 43000); d. Carbonic anhydrase (MW 29000); 2, As band of *S. thermophilum* S-layer proteins.

蛋白质的比例最高, 分子量约为 5 万左右; 其次 C 区, 分子量约 4 万以下; A 区蛋白质含量最少, 其分子量约在 10 万左右。但是, 这三个区域的区分不很明显, 在它们之间还有一些连续分布的蛋白质分子。

Lowry 法测定该菌 S-层蛋白质已揭示蛋白质含量约占总 S-层干重的 96% 以上; 3,5-二硝基水杨酸比色分析表明, 总糖仅占 S-层干重的 1% 以下。单糖的气相色谱分析说明, S-层中仅含有微量的葡萄糖、甘露糖、半乳糖以及核糖等少数单糖。

图 4 为该菌 S-层蛋白质固体膜的 红

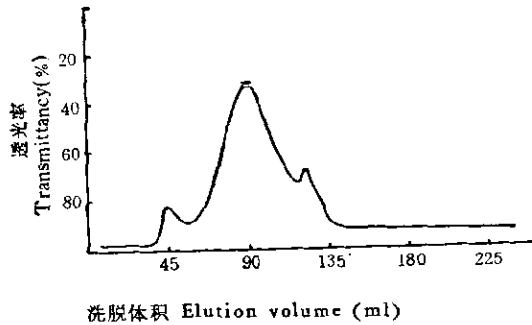


图2 嗜酸热硫球菌 S-层蛋白质在 Sepharose 6B 凝胶柱上的洗脱图谱

(温度: 室温; 洗脱剂: 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0; 洗脱速度: 9 ml/h)

Fig. 2 Elution profile of the S-Layer proteins of *Sulfothermobacter thermoacidophilum* Separated on a sepharose 6B column, run at room temperature in 0.1 mol/L phosphate buffer at pH7.0 at the rate of 9 ml/h

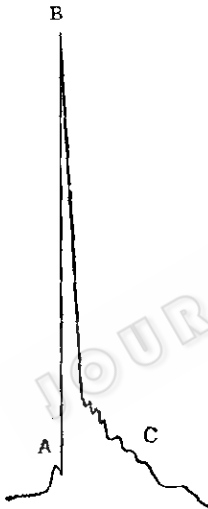


图3 嗜酸热硫球菌 S-层蛋白质的分子量 HPLC 谱带

Fig. 3 HPLC profile of the molecular weight of the S-layer proteins of *Sulfothermobacter thermoacidophilum*

A: 保留时间 Retention time 1.86 min, MW 110000—80000; B: 保留时间 Retention time 2.42 min, MW 80000—40000; C: 保留时间 Retention time 3.27—5.45 min, MW 40000—below

外光谱图。在红外光谱的酰胺区有两个主峰, 即酰胺 I 带和 II 带; 其中 I 带位于 1637cm^{-1} 左右, II 带在 1530cm^{-1} 左右; 另外 II 带还有二个肩峰位于在 1510 —

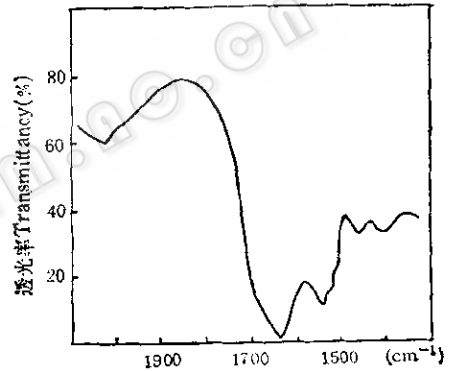


图4 嗜酸热硫球菌 S-层固体膜的红外光谱

Fig. 4 Infrared spectrum of the S-layer (solid film) of *Sulfothermobacter thermoacidophilum*

1520cm^{-1} 之间。这些都是 β -折叠结构的特征峰^[9]。这一结果表明, 在该菌 S-层的蛋白质结构中, 存在大量的 β -折叠结构。这还在另一方面证明, 在该菌细胞外被的 S-层上存在有许多生物的功能活性中心部位。

该菌 S-层的其它特点是它的抗性和溶解性。该菌 S-层能抗 4 mol/L 的尿素、胃蛋白酶和胰蛋白酶的作用, 并且在 1% Triton X-100 的溶液中也未被水解; 但此 S-层能被蛋白酶 K 和链霉菌蛋白酶 E 完全水

表 1 嗜酸热硫球菌 S-层的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of the S-layer of *Sulfosphaerellus thermoacidophilum*

氨基酸 Amino acid	mol(%)	氨基酸 Amino acid	mol(%)	氨基酸 Amino acid	mol(%)
丙氨酸 Alanine	7.60	缬氨酸 Valine	5.12	精氨酸 Arginine	5.52
异亮氨酸 Isoleucine	10.08	半胱氨酸 Cysteine	5.46	天冬氨酸 Aspartic acid	5.82
亮氨酸 Leucine	13.73	甘氨酸 Glycine	9.18	谷氨酸 Glutamic acid	0.20
甲硫氨酸 Methionine	0.92	丝氨酸 Serine	5.71	组氨酸 Histidine	8.52
苯丙氨酸 Phenylalanine	5.94	苏氨酸 Threonine	9.54	赖氨酸 Lysine	1.36
色氨酸 Tryptophan	0.059	酪氨酸 Tyrosine	5.30		

解,并能溶解在 2% SDS 的溶液中。然而,在 pH 9.0 的磷酸缓冲液中却不溶解,这与酸热硫化叶菌的情况完全相反^[7,8]。但当培养基中由于加入碳酸氢钠而使 pH 值上升到 7.0 时,有些细胞就会自行破碎。

S-层蛋白质的氨基酸组分分析表明(表 1),该菌 S-层蛋白质中极少色氨酸,这可能与此氨基酸在生长条件下(pH 2.0 以下,温度 70℃)极不稳定有关。

将嗜酸热硫球菌 S-层的分析测定结果与酸热硫化叶菌 S-层的数据^[3,7,8]进行比较,可以看出,两菌之间存在很大差别。1. 组成不同,前者不含糖蛋白,后者含糖蛋白成分;2. 前者的 S-层中含许多不同分子量梯度的蛋白质亚单位,而后者只有两种蛋白质亚单位;3. 溶解性和抗性不同,前者的 S-层能溶解在 2% SDS 溶液中,但却不溶于 pH 9.0 的磷酸缓冲液中,而后的 S-层却相反;4. 氨基酸组成不同,前者的 S-层中富含半胱氨酸、组氨酸和精氨酸,而后者的 S-层中仅含极少量上述几种氨基酸。

以上实验结果及以前有关该菌研究的

一些实验证据^[2]都表明,无论在 DNA 分子的 G:C 此方面(嗜酸热硫球菌的 G:C 比为 33—39,而酸热硫化叶菌的 G:C 比是 60—68),营养和代谢方面(前者为专性自养菌,仅具有一条主要的碳源同化途径;而后者为兼性自养菌,不仅能利用 CO₂ 作为碳源,也可以利用有机物的同化代谢途径来合成自己的细胞物质),还是在外被的结构组成方面,两者之间都存在很大差别。因此按照现代分子生物学水平的分类观点来看,则有更充分的理由支持将以上两种菌摆在不同分类单位即不同属中的这种分类体系。

参 考 文 献

- [1] 李雅芹等:微生物学报,28(2):109—114,1988。
- [2] 钟慧芳等:微生物学报,22(1):1—7,1982。
- [3] Konig, H. et al.: *System. Appl. Microbiol.*, 7: 300—309, 1986。
- [4] 张龙翔等:生化实验方法和技术,高等教育出版社,北京, p.112, 1984。
- [5] 蔡武城等:生物物质常用化学分析方法,科学出版社,北京, p.52,1982。
- [6] 蔡武城等:生物物质常用化学分析方法,科学出版社,北京, p.8, 1982。
- [7] Michel, H. et al.: *Electron Microscopy at Molecular Dimensions*, (ed. Baumeister,

- W. et al.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, p. 27-35, 1980.
- [8] Lnatomi, Ken-ichi. et al.: *Chem. Lett.*, 8: 1191-1194, 1983.
- [9] Nakamwa, K. et al.: *Biochem. biophys. Acta*, 332: 329-335, 1974.

THE BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THE CELL ENVELOPE OF *SULFOSPHAERELLUS THERMOACIDOPHILUM*

Xu Yi Li Yaqin Cai Wenliu Zhong Huifang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Some biochemical properties of the S-layer of a thermoacidophilic sulfur-oxidizing archae bacterium *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* have been studied. It was found that the bacterium differs significantly from *Sulfolobus acidocaldarius*, the type species of *Sulfolobus* genus, in some important aspects of the envelope. The S-layer of *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* is more labile and is easily disintegrated into its subunits in 2% SDS solution, but it is very stable in pH 9.0 phosphate buffer.

below 110000. Neither glucoprotein nor lipoprotein was observed with periodate-Schiff reagent and Sudan black dye.

Significant differences between the S-layer proteins of *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* and that of *Sulfolobus acidocaldarius* were indicated by amino acid composition analysis. The infrared spectrum (amide region) of the solid envelope of the bacterial S-layer showed that the occurrence of β -sheet structure.

Key words

On the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, the bacterial S-layer showed a multiple protein pattern having molecular weights

Sulfosphaerellus thermoacidophilum; S-layer