

不同生长阶段青枯菌的高效离子交换色谱表征

林娟, 马骋, 刘树滔, 饶平凡*

(福州大学生物工程研究所 福州 350002)

摘要: 采用高效离子交换色谱和激光光散射仪对不同生长阶段的青枯菌进行色谱表征。青枯菌经过色谱分离得到 3 个特征峰。通过对延滞期、对数生长期和稳定期青枯菌细胞浓度、发酵液 pH 值、细胞表面黏附的胞外酸性多糖(EPS I)含量与青枯菌色谱行为的关系研究,发现在 8h 时,青枯菌运动能力强,细胞表面 EPS I 少,吸附力弱,绝大多数菌体直接随流动相流出形成峰 1。随着培养时间延长,细胞表面黏附的 EPS I 量增多,与树脂吸附力增强,保留时间延长。因此分析 3 个色谱峰的形成与青枯菌的运动性、以及细胞表面 EPS I 与阴离子交换树脂的吸附作用有关。并通过比较 3 个色谱峰青枯菌细胞表面 EPS I 含量的差异和观察青枯菌经过 4% 甲醛固定处理后色谱行为的变化加以进一步验证。高效离子交换色谱为细菌完整细胞的研究提供了一种新的分析方法。

关键词: 青枯菌, 高效离子交换色谱, 不同生长阶段, 运动性, 细胞表面 EPS I 含量

中图分类号: Q932 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0145-05

细菌是单细胞生物,其细胞表面结构负责调节细菌与外界环境的物质交换以及参与细菌的吸附过程,影响细菌与环境的相互作用,并参与细菌的生长与分泌活动。组成细菌表面结构的生物大分子,携带羧基、磷酸基和氨基等基团,在不同 pH 环境下会发生电离,从而使细菌细胞表面带上不同的电荷^[1]。但细菌作为一个完整的生命体,具有特殊的生长周期,其细胞表面结构与化学组成也比一般生物大分子更为复杂。细菌处于不同的生长周期,其细胞表面特性不同,带电性不同,可以根据细胞表面的荷电性质进行分离^[2-4]。近年来,毛细管电泳作为一种快速高效的分离技术和检测手段不断被用于微生物的分析^[5-7],但毛细管电泳无法收集各色谱峰组分进行深入研究,相比之下,高效离子交换色谱可收集各色谱峰组分再培养、跟踪检测,研究其生理生化特性、新陈代谢情况和表面特性的适时变化等。因此高效离子交换色谱为细菌完整细胞的研究提供了一种快速便捷的分析新方法。

本研究以福建省农业科学院生物技术研究所提供的对经济作物具有巨大危害的青枯菌为试验材料,跟踪表征了青枯菌不同生长阶段的色谱行为,探讨了青枯菌细胞表面特性与色谱行为的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 青枯菌(*Ralstonia solanacearum*) 分离自番茄植物,由福建省农业科学院生物技术研究所生物农药研究中心

提供。

1.1.2 培养基和缓冲液: NA 固体培养基、SPA 液体培养基、柱平衡缓冲液(A 液)和洗脱缓冲液(B 液)均参见文献[8]。

1.1.3 ELISA 检测试剂: 0.2mol/L PBS 缓冲液:KCl 0.02%, KH₂PO₄ 0.02%, Na₂HPO₄ 0.358%, NaCl 0.8%, pH7.2; 完全弗氏佐剂:羊毛脂和石蜡油(W/W = 2/3),卡介苗(加入量约为羊毛脂量的 1/1000); 不完全弗氏佐剂:羊毛脂和石蜡油(W/W = 2/3); 凹孔板洗涤液:PBS-T 0.05%(V/V)Tween-20。

1.1.4 主要仪器设备: 高效液相色谱仪(Beckman Golden System, 美国 Beckman 公司); 激光光散射仪(Dawn Eos Enhanced Optical System, 美国 Wyatt Technology 公司); 高速冷冻离心机(Agella 型, 美国 Beckman 公司); 荧光酶标仪(Varioskan, 美国 Thermo Labsystems 公司); 超纯水机(MILLI-Q 型, 美国 Millipore 公司); 超净工作台(1285 型, 美国 Thermo Forma 公司); 恒温培养箱(PYX-PHS-X 型, 上海跃进医疗器械厂); 恒温气浴摇床(CHA-S 型, 江苏常州国华仪器厂)。

1.2 青枯菌的培养方法

参照文献[8]将保藏于无菌蒸馏水中的青枯菌经 NA 固体培养基活化(30℃、48h)后,按 1% 接种量(V/V)(OD₆₀₀ = 0.1)转接于 25mL SPA 液体培养基中,30℃、200r/min 摇床培养 24h。

1.3 青枯菌样品制备方法

参照文献[9]将经 SPA 液体培养基培养的青枯菌菌液于 5000r/min、4℃ 下离心 10min 后,弃上清液,取菌泥加入超纯水(>16MΩ)中振荡均匀,洗涤菌体,离心,重复 2 次,以去除

基金项目: 国家自然科学基金(20475010),福建省自然科学基金(Z0516003),福州大学科技发展基金(2004-XQ-15)

* 通讯作者。Tel 86-013960908904, Fax 86-591-83732462, E-mail: jpfrao@fzu.edu.cn 或 jpfrao@gmail.com

作者简介: 林娟(1970-),女,福建福州人,副教授,博士研究生,主要从事微生物生理生化研究。E-mail: ljuan@fzu.edu.cn

收稿日期: 2006-05-18, 接受日期: 2006-06-08, 修回日期: 2006-09-12

残余的培养基成分。

1.4 高效离子交换色谱分析方法

色谱分离材料采用日本 TOSOH 公司的强阴离子交换树脂 Toyopearl TSKgel SuperQ-650C 填充色谱柱(200mm × 4.6mm i. d.), 流速 1ml/min, 泵压范围 0.5 ~ 1.5MPa, 温度范围 23 ~ 28°C。

按照无菌操作的要求, 对所有实验器皿采用灭菌处理, 进样前整个色谱系统先以 0.1mol/L NaOH 冲洗 30min, 再依次用无菌水、20% 酒精溶液和无菌水冲洗, 最后用过滤除菌的缓冲液平衡色谱柱。

色谱分离方法 样品上样后, 0 ~ 5min 用 A 液平衡, 使进样的细菌充分吸附到树脂上; 5 ~ 35min 线性梯度洗脱, 洗脱梯度为 0% ~ 75% NaCl(1mol/L); 35 ~ 45min 完全转换为 B 液, 将树脂上的残余细菌全部洗出; 45 ~ 55min 转换为 A 液平衡系统。

检测系统 采用紫外检测器(检测波长 280nm)和激光光散射仪(检测波长 600nm; 信号扩增倍数: 1.00)串联的在线双检测系统。由于培养基中的蛋白质、核酸等生物大分子物质在 280nm 处也会产生紫外吸收, 形成干扰峰, 而激光光散射仪只对颗粒直径大于 10nm 的物质产生信号, 可以消除生物大分子的干扰, 真实反映细菌在色谱分离过程中的行为, 因此本课题采用激光光散射仪作为检测器。

1.5 激光光散射仪检测图峰面积的计算

利用激光光散射仪软件 ASTRA(version 4.73.04), 对各组分峰面积进行积分。

1.6 青枯菌细胞表面胞外酸性多糖(EPS I)含量的测定

1.6.1 EPS I 的分离纯化 将经 SPA 液体培养基培养的青枯菌菌液于 10000r/min、4°C 下离心 5min, 取上清液, 用 0.22μm 的醋酸纤维素膜过滤, 取滤液, 50°C、100r/min 浓缩 20min; 于浓缩液中加入无水乙醇(终浓度为 30% ,V/V) 4°C 沉淀, 除部分蛋白质; 10000r/min 离心 10min, 取上清液去除乙醇, 再加入无水乙醇(终浓度为 80% ,V/V) 沉淀多糖, 13000r/min 离心 10min, 取沉淀用 pH2.5 H₂SO₄ 溶解, 采用 Al320 阳离子交换树脂柱层析去除残留蛋白(洗脱缓冲液: pH2.5 H₂SO₄); 洗脱液 50°C、100r/min 浓缩后, 用 MW = 3000 的透析袋蒸馏水透析至无 SO₄²⁻ 为止。

1.6.2 制备免疫血清 将纯化后的 EPS I 免疫小鼠, 每只小鼠注射 100μg 的 EPS I, EPS I 与完全弗氏佐剂以 1:1 混合; 一次免疫后, 饲养小鼠 15d, 进行二次免疫, 使用不完全弗氏佐剂, 使用量与一次免疫相同; 二次免疫后, 饲养 7d 取血。将血液于 3000r/min 离心 15min, 制备抗血清。

1.6.3 ELISA 检测 将经 1.3 方法处理的不同培养时间青枯菌, 重悬于 0.2mol/L PBS 缓冲液(pH7.2)中, 调整到相同的菌浓(OD₆₀₀)。取圆形凹孔板, 板底预先铺上 50μL 0.5% 戊二醛水溶液, 再在上面加入青枯菌悬液, 100μL/孔, 37°C 孵育 2h; 弃去菌悬液, 用 PBS-T 洗涤 3 次(每次 5min), 加入脱脂牛奶 200μL/孔, 37°C 孵育 2h; PBS-T 洗涤 3 次(每次 5min), 加入小鼠抗体 100μL/孔, 37°C 孵育 1h, PBS-T 洗涤 3 次(每次 5min)后

加入 HRP-羊抗鼠 100μL/孔, 37°C 孵育 0.5h, 加 TMB 发色底物各一滴, 37°C 显色 20 ~ 30min, 加 2mol/L 硫酸 100μL/孔, 终止反应。用酶标测定仪测定 OD₅₉₅。

1.7 4% 甲醛处理对青枯菌色谱行为的影响

取青枯菌 24h 培养液, 离心去除培养基后, 用超纯水清洗 2 遍, 重悬于 4% 甲醛中, 分别处理 16h、24h 后, 离心、洗涤、超纯水悬浮, 色谱表征。

2 结果和分析

2.1 不同生长阶段青枯菌的色谱表征

在色谱柱饱和吸附范围内, 青枯菌经过高效离子交换色谱分离得到 3 个特征峰(图 1), 这 3 个色谱峰的形成可能由于菌体细胞处于不同的聚集状态、或青枯菌中混杂有其它土壤共生菌、或青枯菌细胞表面的不同特性造成。

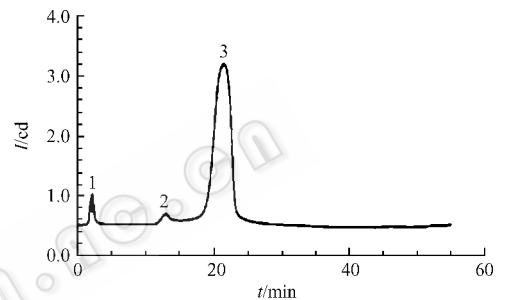


图 1 青枯菌细胞的激光光散射仪检测图

Fig. 1 The graph of pure culture of *Ralstonia solanacearum* detected by laser light scattering instrument. 1. The first eluted peak 2. The second eluted peak 3. The third eluted peak.

为此, 收集各色谱峰菌体和上样样品, 染色后用光学显微镜观察, 发现细胞呈长椭圆型, 近杆状, 具有运动性, 以单细胞形式存在, 少数成对存在, 通过透射电子显微镜观察^[10], 发现经过高效离子交换色谱分离后, 细胞仍然保持结构的完整性, 生理生化特征和生化型鉴定结果显示上样样品和经过色谱分离得到的各特征峰菌体均属于青枯菌生化 III 型^[10]。

通过对青枯菌上样样品和各色谱峰菌体细胞的形态观察、生理生化特征与生化型鉴定的结果分析, 表明 3 个色谱峰的形成并非由于菌体细胞处于不同的聚集状态、或混杂有其它土壤共生菌造成的, 而是与青枯菌细胞的不同表面特性相关。由于同一种细菌处于不同的生长阶段, 其细胞表面的化学组成与结构不同, 因而带电性质不同, 可以借助高效离子交换色谱进行分离表征。为了反映青枯菌生长过程细胞表面特性的变化情况, 本研究对不同生长阶段青枯菌的色谱行为进行了跟踪表征。

2.1.1 青枯菌生长过程菌数和 pH 值的变化 取 OD₆₀₀ = 0.1 的青枯菌悬液按 1% 接种量接入 25mL SPA 液体培养基中, 置于 30°C、200r/min 摇床中培养, 每隔一定时间取样, 测定发酵液 pH 值和活菌数^[11], 以培养时间为横坐标, 以活菌数、pH 值为纵坐标, 绘制青枯菌菌数和 pH 值随培养时间的变化曲线。

由图 2 可见, 当培养时间为 0 ~ 8h, 青枯菌生长处于延滞期, 12h 进入对数生长期, 这时发酵液 pH 值开始下降, 表明青

枯菌开始分泌胞外酸性多糖 EPS I, 40h 后进入稳定期, 发酵液 pH 值也趋于稳定。

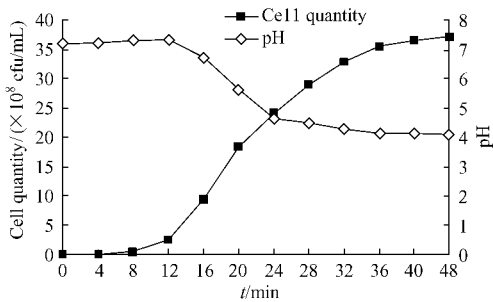


图2 青枯菌数和发酵液 pH 值随培养时间的变化曲线

Fig.2 The curves of cell number and pH of fermentation broth against culture time.

2.1.2 青枯菌生长过程的色谱表征: 分别取培养时间为 8h (延滞期)、16h (对数生长期前期)、24h (对数生长期中期)、48h (稳定期) 的青枯菌细胞培养液, 经离心、洗涤处理后, 进行色谱表征 (图 3)。

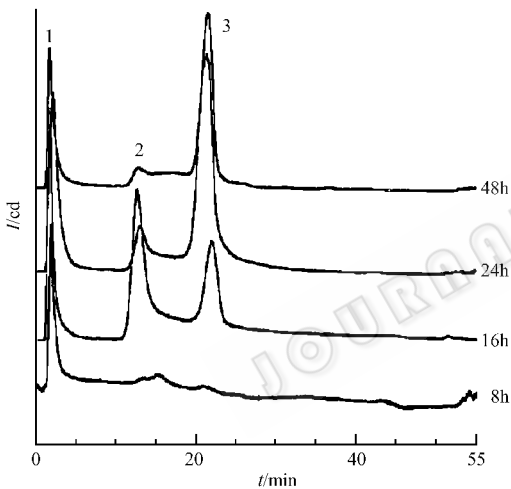


图3 不同培养时间青枯菌的色谱行为

Fig.3 The chromatographic behaviors of *Ralstonia solanacearum* at different culture time.

表1 不同培养时间的青枯菌细胞浓度和细胞表面 EPS I 含量*

Table 1 The cell concentration and EPS I content of cell surface of *Ralstonia solanacearum* at different culture time

Culture time/h	Cell concentration (cfu/mL)	OD_{595}
8	3.75×10^7	0.005
16	9.36×10^8	0.141
24	2.41×10^9	0.753
48	3.72×10^9	0.864

* :EPS I content of cell surface of *Ralstonia solanacearum* measured by ELISA assay.

当培养 8h 时, 青枯菌的细胞浓度为 3.75×10^7 cfu/mL (表 1), 与树脂吸附力弱, 同时由于青枯菌具运动性, 故在细菌动力作用下绝大多数菌体直接随流动相流出形成峰 1 (表 2)。

当培养时间为 16h 时, 青枯菌进入对数生长期, 细胞浓

度为 9.36×10^8 cfu/mL (表 1), 开始分泌 EPS I, 引起发酵液 pH 值下降 (图 2), 但这时菌体细胞表面黏附的 EPS I 量较少 (表 1), 与树脂吸附力弱, 在细菌动力作用下易洗脱, 所以峰 1 和峰 2 的面积占总峰面积的 67.1% (表 2)。

随着培养时间的延长, 菌体细胞表面黏附的 EPS I 量增多 (表 1), 与树脂的吸附力增强, 所以峰 3 的面积逐渐增大, 到 48h 时, 峰 3 面积占总峰面积的 70.98% (表 2)。

表2 不同培养时间青枯菌各色谱峰的面积比

Table 2 The area ratio of each chromatographic peak of

Ralstonia solanacearum at different culture time

Culture time /h	Area ratio of peak 1/%	Area ratio of peak 2/%	Area ratio of peak 3/%
8	63.62	28.18	8.20
16	24.46	42.64	32.90
24	25.62	10.27	64.11
48	20.37	8.65	70.98

通过对不同生长阶段 (延滞期、对数生长期、稳定期) 青枯菌细胞浓度、发酵液 pH 值、细胞表面 EPS I 含量与青枯菌色谱行为的关系研究, 分析 3 个色谱峰的形成与青枯菌的运动性以及细胞表面 EPS I 与树脂的吸附作用有关。为此, 本课题比较了不同色谱峰青枯菌细胞表面 EPS I 含量的差异, 同时采用 4% 甲醛对青枯菌进行固定处理, 观察其丧失运动性后色谱行为的变化。

2.2 各色谱峰青枯菌细胞表面 EPS I 含量的比较

取青枯菌 24h 培养液, 经 1.3 方法处理后, 色谱表征, 收集 3 个色谱峰的青枯菌细胞, 离心, 调整到相同的细胞浓度, 采用 ELISA 检测不同色谱峰青枯菌细胞表面 EPS I 含量的差异, 测定结果 (图 4) 显示, 青枯菌细胞表面黏附的 EPS I 越多, 则与树脂的吸附能力越强, 保留时间越长。

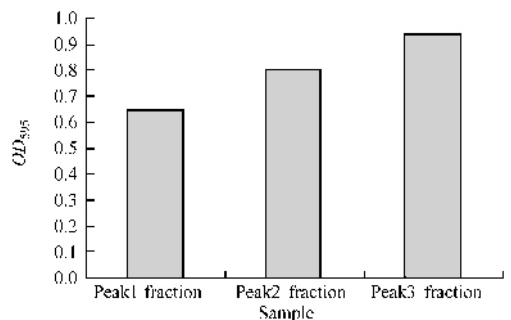


图4 各色谱峰菌体细胞表面 EPS I 含量的差异

Fig.4 The difference of EPS I content of cell surface of each chromatographic fraction.

2.3 4% 甲醛处理对青枯菌色谱行为的影响

根据 1.7 方法, 采用 4% 甲醛对青枯菌细胞分别进行固定处理 16h、24h, 观察青枯菌丧失运动性后色谱行为的变化 (图 5)。

随着 4% 甲醛处理时间的延长, 峰 1 的面积逐渐减小, 处理 24h 后, 峰 1 消失, 采用悬滴法在光学显微镜下观察, 发现这时的菌体丧失运动性; 峰 2 的面积也逐渐减小, 而且保留时间由原来的 12.093 min 延长至 56 min; 同时峰 3 峰形变

宽,面积增加,保留时间也从 21.13min 延长至 22.56min。表明在消除细菌动力作用之后,增强了菌体与树脂之间的吸附力,进一步验证了 3 个色谱峰的形成与青枯菌运动性和细胞表面 EPS I 含量的关系。

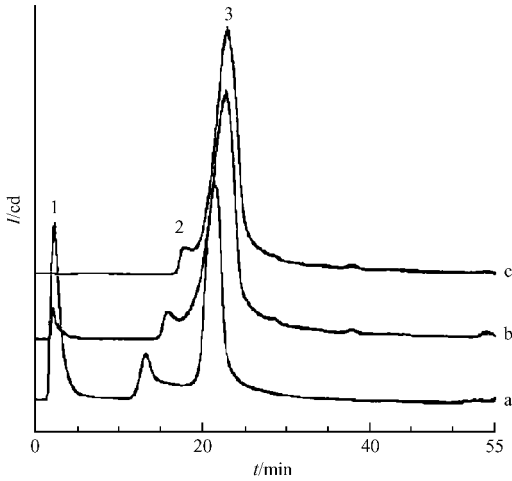


图 5 4% 甲醛处理对青枯菌色谱行为的影响

Fig.5 The effect of 4% formaldehyde treatment on the chromatographic behaviors of *Ralstonia solanacearum*. a :Original sample b :Treating 16h ; c :Treating 24h.

3 讨论

青枯菌,全称青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*),是全球主要的植物致病菌之一,可侵染 44 个科的近 300 种植物,它所引起的细菌性青枯病是世界上危害最大、分布最广、造成损失最重的植物病害之一^[12]。青枯菌致病因子的调控表达是一个动态过程,据报道^[13,14],青枯菌的运动性和胞外酸性多糖 EPS I 等致病因子的表达受 LysR 家族转录调节因子 PhcA 蛋白控制,phcA 基因的表达又受 phcB 基因编码产生的胞外群体感应信号分子 3-羟基棕榈酸甲酯(3-OH PAME)的调控。当细胞浓度小于 10^7 cfu/mL 时,青枯菌合成 3-OH PAME,具有较强的运动能力,以利于其趋向植物根部和在根部定植;当细胞浓度大于 10^8 cfu/mL,3-OH PAME 累积达到 5nmol/L 时,PhcA 蛋白表达量增加,诱导 EPS I 等致病因子的大量产生。青枯菌产生的 EPS I 85% 以游离的、不与菌体细胞黏附的状态存在,但有 15% 的 EPS I 呈荚状黏附在细胞表面^[15]。EPS I 的存在会增加细胞表面的电负性,使细胞表面带上大量负电荷^[16],增强青枯菌与阴离子交换树脂的吸附力;同时由于青枯菌具有运动性,因此在色谱分析过程受到细菌动力和吸附力的共同作用。本研究过程中发现处于不同生长阶段的青枯菌,细胞表面 EPS I 含量不同,与树脂的吸附力不同,可以通过高效离子交换色谱进行表征。

目前的研究表明^[13,17],青枯菌在传代培养过程中易发生致病力分化,成为弱毒或无毒突变株,在致病因子调控表达和致病力分化的过程中,将引起细胞表面特性的相应改变,而利用常规的微生物分离手段,很难区分不同表面特性的青枯菌细胞。因此高效离子交换色谱为不同致病力青枯菌细

胞表面特性的研究、生防菌对青枯菌的“致弱作用”提供了一种新的分析方法。

致谢 感谢福建省农业科学院生物技术研究所刘波博士为本研究提供大力支持。

参 考 文 献

- [1] Daniels SL. The adsorption of microorganisms onto solid surfaces: A review. *Developments in Industrial Microbiology*, 1972, **13**(3): 211 - 223.
- [2] Armstrong DW, Schulte G, Schneiderheinze JM, et al. Separating microbes in the manner of molecules. 1. Capillary electrokinetic approaches. *Anal Chem*, 1999, **71**(24): 5465 - 5469.
- [3] 陈昭华,刘树滔,薛伟明,等.对数期金黄色葡萄球菌的离子交换色谱行为及其表征. *色谱*, 2004, **22**(3): 234 - 236.
- [4] Torimura M, Ito S, Kano K, et al. Surface characterization and on-line activity measurements of microorganisms by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, **721**(1): 31 - 37.
- [5] 陈萍,李仁宽,徐小华,等.毛细管电泳法快速分离和检测肠毒性大肠杆菌. *色谱*, 2002, **20**(5): 439 - 441.
- [6] Ebersole RC, McCormic RM. Separation and isolation of viable bacteria by capillary zone electrophoresis. *Biotechnology*, 1993, **11**(11): 1278 - 1282.
- [7] Armstrong DW, Schneiderheinze JM. Rapid identification of the bacterial pathogens responsible for urinary tract infections using direct injection CE. *Anal Chem*, 2000, **72**(18): 4474 - 4476.
- [8] 林娟,马骋,刘树滔,等.青枯菌 HPLC 分析中样品制备方法的优化. *中国生物工程杂志*, 2006, **26**(5): 63 - 68.
- [9] 林娟,饶平凡,马骋,等.青枯雷尔氏菌 HPLC 分析中色谱分离条件的研究. *福州大学学报*, 2006, **34**(3): 448 - 452.
- [10] 张洋,温腾,林娟,等.离子交换色谱法分离青枯菌及其色谱峰的鉴定. *色谱*, 2005, **23**(4): 418 - 421.
- [11] 沈萍,范秀容,李广武. *微生物学实验*(第三版).北京:高等教育出版社,1999.
- [12] Timothy PD. *Ralstonia solanacearum*-a plant pathogen in touch with its host. *Trends in Microbiology*, 2000, **8**(11): 486 - 488.
- [13] Steven JC, Albert BF, Mark AS, et al. Differential expression of virulence genes and motility in *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* during exponential growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(3): 844 - 850.
- [14] Steven JC, Kim-Eng L, Mark AS, et al. A two-component system in *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**(11): 3639 - 3648.
- [15] Guy O, Henri M, Philippe S, et al. High heterogeneity of the exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* strain GM11000 and the complete structure of the major polysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, **266**(13): 8312 - 8321.

- [16] Wilson W , Wade M , Holman C . Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods* , 2001 , **43** (3) : 153 – 164 .
- [17] Franck B , Frederique VG . Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum* . *Applied and Environmental Microbiology* , 1997 , **63** (12) : 4965 – 4968 .

Characterization of *Ralstonia solanacearum* in different growth phases by high performance ion exchange liquid chromatography analysis

LIN Juan , MA Cheng , LIU Shu-tao , RAO Ping-fan *

(*Institute of Biotechnology , Fuzhou University , Fuzhou 350002 , China*)

Abstract : High performance ion exchange liquid chromatography and laser light scattering instrument were employed to characterize *Ralstonia solanacearum* in different growth phases. The pure culture of *Ralstonia solanacearum* was successfully separated into three characteristic fractions. Chromatographic behaviors of *Ralstonia solanacearum* in lag phase , logarithmic phase and stationary phase were carefully investigated , and their relationships to the cell concentration , pH of fermentation broth and extracellular polysaccharide (EPS I) content of cell surface were analyzed. It was found that the majority of *Ralstonia solanacearum* cells obtained at 8h culture time could not be absorbed to the resin due to the strong motility of the cells which could apparently overcome the electrostatic interaction. Furthermore , when the mobility of the cells was destroyed by 4% formaldehyde treatment , the prolonged retention time was recorded due to the stronger adsorbability to the resin. On the other hand , the EPS I content of cell surface was determined to increase with the culture time , indicating an increasing interaction between the cells and the resin. EPS I content of three characteristic chromatographic fractions was determined , and it was found that the higher EPS I content led to the longer retention time of the fraction , which confirmed the above-mentioned observation. As a result , it is concluded that the formation of three chromatographic fractions of the pure culture of *Ralstonia solanacearum* is attributed to bacterial motility and the interaction of EPS I of cell surface with the anionic exchange resin , and the novel method of ion exchange chromatography of the intact bacterial cells can be a useful tool in bacteriological study.

Keywords : *Ralstonia solanacearum* ; High performance ion exchange liquid chromatography ; Different growth phases ; Motility ; EPS I content of cell surface