

双歧杆菌肽聚糖结构及分子量的分析*

张悦^{1,2} 宋晓玲^{1**} 黄捷¹

(农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

(上海水产大学生命科学与技术学院 上海 200090)

摘要 从双歧杆菌细胞壁中分离纯化肽聚糖,研究其化学成分、结构和分子量分析。经氨基酸、多糖和蛋白质含量分析和肽聚糖的溶解实验鉴定,所提取物质的主要成分为肽聚糖。经核磁共振和红外光谱分析,所提取肽聚糖的结构与已知的肽聚糖的结构相吻合,其糖链结构为由D型吡喃糖N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸以 β -1,4-糖苷键连接而组成。经SDS-PAGE和多种染色方法结合,分析经溶菌酶水解后的肽聚糖,其分子量的分布呈弥散状,范围在97.6 kD到14.4 kD之间。

关键词 双歧杆菌 肽聚糖 结构 分子量

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0676-06

Structure and Molecular Weight Analysis of Bifidobacterium Peptidoglycan*

ZHANG Yue^{1,2} SONG Xiao-Ling^{1**} HUANG Jie¹

(Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture;

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(Biology Science & Technology College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

Abstract PG derived from *Bifidobacterium thermophilum* was separated and purified from the cell wall, and involved in research and analysis of its chemical compositions, structure and molecular weight. The major component of the preparation was validated to be peptidoglycan by amino acid analysis, polysaccharides and protein determination, dissolution by lysozyme. NMR and Infrared spectrum substantiated the glycan chain of peptidoglycan was connected by D-pyranose N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid through β -1,4 glycosidic bond. SDS-PAGE and multi-stain suggested that the molecular weight of soluble peptidoglycan showed certain diffusibility, and its ranged from lower than 97.6 kD to higher than 14.4 kD.

Key words *Bifidobacterium thermophilum*, Peptidoglycan, Structure, Molecular weight

双歧杆菌属革兰氏阳性厌氧菌,是人和动物肠道内重要的生理有益菌。肽聚糖(Peptidoglycan, PG)是细菌细胞壁的主要组成成分,对人和动物的免疫系统可以产生不同的免疫调节作用。肽聚糖作为一种非特异性免疫增强剂,可用来提高水产养殖动物免疫活性和抗细菌、病毒病感染。Matsuo等^[1]证实投喂肽聚糖能促进幼鳟的生长并提高抗病力;Itami等^[2]研究表明对虾口服肽聚糖后吞噬细胞的吞噬活性和抗病力均有所提高,宋晓玲等^[3]证实对虾饲料中添加肽聚糖可提高对虾抗病毒感染能力。

肽聚糖是由聚糖链、肽亚单位和间肽桥(interpeptide bridge)组成的大分子聚合物,其结构与活性关系的报道较少,仅见到对肽聚糖活性单位结构的一些研究。如Lawrence等^[4]的研究认为肽聚糖诱导小鼠巨噬细胞产生白细胞介素-12(IL-12)的活性有赖于其肽段部分的结构,特别是肽段中前两个氨基酸基团;Chedid等^[5]在研究发现,胞壁酰二肽中的L-Ala-D-Glu是免疫佐剂具有抗菌活性所必需的。肽聚糖分子量大小与免疫增强活性间关系的研究还未见报道。目前,海水养殖鱼类和虾类动物免疫功能的激活与维持,以及免疫增强剂的研制与开发

* 国家高技术研究发展计划(863)项目资助(No. 2006AA100313)

** 通讯作者 Tel: 0532-85823062, E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2006-11-02, 修回日期: 2007-01-09

尚处于起步阶段。本研究通过对双歧杆菌肽聚糖的结构和分子量的分析和研究方法的探讨,以期为研究肽聚糖聚合度与免疫增强效果之间的关系提供基础资料,为肽聚糖在生产中的实际应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

双歧杆菌(*Bifidobacterium thermophilum*)为中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室保藏菌种。

1.2 双歧杆菌肽聚糖的制备

取实验室常规厌氧培养并离心收集的双歧杆菌湿菌,参考乐军等^[6]的方法,提取纯化肽聚糖。

1.3 肽聚糖提取物的化学成分分析

1.3.1 氨基己糖含量分析 取一定量的肽聚糖提取物用 6mol/L 盐酸 105℃ 水解 10h,应用 Ehrlich 试剂测定肽聚糖水解产物中氨基己糖的含量^[7]。

1.3.2 蛋白质含量分析 取一定量的肽聚糖提取物,充分溶于蒸馏水中,以牛血清白蛋白为标准,用 Bradford 法^[8]测定上清液中的蛋白质含量。

1.3.3 氨基酸含量分析 测定方法采用国家标准 GB/T14965-1994。取一定数量的肽聚糖提取物,用 6mol/L 盐酸 110℃ 真空水解 20h,用日立 835-50 型氨基酸分析仪分别测定氨基酸组成。

1.3.4 溶菌酶溶解试验 参考马西艺在乳酸菌肽聚糖研究中使用的方法^[9],称取肽聚糖提取物,以 pH 6.2 的磷酸盐缓冲液配成 1mg/mL 的溶液,加蛋清溶菌酶 200μg/mL,37℃,120r/min 震荡处理,并在 20h 内分别在 400nm,450nm,600nm 监测肽聚糖光吸收值的变化。

1.4 肽聚糖的结构分析

核磁共振分析采用 JNM ECP-600 超导核磁共振波谱仪以 TMS 为内标, D₂O 为溶剂,室温 20℃,射频 150MHz 作碳谱,射频 600MHz 作氢谱,进行核磁共振碳谱(¹³CNMR)及氢谱(¹HNMR)测定。红外光谱分析采用 NEXUS470 型红外光谱分析仪,分别取肽聚糖提取物和肽聚糖标准品(Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*, Fluka 公司产品),用 KBr 压片进行红外光谱分析,扫描次数 32,分辨率 4,温度 20℃,湿度 18%。

1.5 可溶性肽聚糖分子量的分析

1.5.1 可溶性肽聚糖的 SDS-PAGE 肽聚糖提取物用 pH 6.2 的磷酸盐缓冲液配成 1mg/mL 的溶液,加蛋清溶菌酶 200μg/mL,37℃ 消化过夜,取其中 1mL 样品,用氯仿/正丁醇(3:1, V/V)反复抽提,2500 r/min 离心取上清除去蛋白质。在 PROTEAN II Xi 电泳槽(BIO-RAD)中不连续电泳,分离胶浓度为 24%,浓缩胶浓度为 5%,Tris-甘氨酸电泳缓冲液。16μL 肽聚糖样品或分子量标准与 4μL 5 倍样品缓冲液混合后,100℃ 煮沸 10min 后上样。凝胶板放入垂直板电泳槽,70V 电泳,待溴酚蓝电泳至浓缩胶与分离胶交界处时,电压加大至 150V,电泳直至溴酚蓝到凝胶底部。

1.5.2 考马斯亮蓝 Coomassie Brilliant Blue R-250 染色 将电泳完毕的凝胶浸于 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 染色液(45% 甲醇,10% 冰醋酸)中染色 4h,再于脱色液(5% 甲醇,5% 冰醋酸)中脱色。

1.5.3 阿尔辛蓝 Alcian Blue 染色^[10] 凝胶在 12.5% 三氯乙酸中固定 30min,用蒸馏水漂洗。放入 1% 过碘酸溶液中氧化 50min,再放入 0.5% 偏重亚硫酸钾中,还原剩余的过碘酸盐 30min,最后浸泡在 0.5% 阿尔辛蓝中染色 4h,在 3% 冰醋酸中脱色。

1.5.4 银染色^[11] 凝胶在固定液(50% 甲醇,10% 冰醋酸)中反复浸泡 1h,用蒸馏水反复漂洗 30min,再放入 0.8% 银染液(4mL 20% AgNO₃ 滴加到 0.36% NaOH 与 30% 氨水的混合液中,不停搅拌以使沉淀迅速消失)中轻摇 15min,用去离子水漂洗 2min,放入反应液(1% 柠檬酸与 30% 甲醛的混合液)中震荡直至出现清晰条带,接着用 1% 冰醋酸终止反应,用蒸馏水漂洗浸泡。

1.5.5 拍照和图片处理 经过染色的凝胶用 Fujifilm LAS-3000 凝胶成像系统拍照,并用 Gel-Pro Analyzer 进行电泳图像分析。

2 结果

2.1 肽聚糖提取物化学成分分析

经 TritonX-100 抽提、蛋白酶消化、氯仿去脂和透析等分离步骤制备得肽聚糖。测定样品中蛋白质含量为 19.5mg/g,水解后所得到的氨基己糖含量为 64.4mg/g,相当于肽聚糖含量为 230.4mg/g。氨基酸组分及含量见表 1,其中丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸

是与肽聚糖 N-乙酰胞壁酸 C-3 位羟基相连的短肽所含的氨基酸分子,甘氨酸为间肽桥中的氨基酸,甘氨酸、谷氨酸、丙氨酸和赖氨酸间的摩尔比为 1:15.48:13.58:1.78。

表 1 肽聚糖氨基酸组分及含量

氨基酸	含量	分子量	摩尔百分含量
谷氨酸 Glu	5.16	147.08	24.57
丙氨酸 Ala	2.74	89.06	21.54
赖氨酸 Lys	0.59	146.13	2.83
缬氨酸 Val	0.36	117.09	2.15
天冬氨酸 Asp	0.21	133.6	1.10
甘氨酸 Gly	0.17	75.05	1.59
亮氨酸 Leu	0.12	131.11	0.64
脯氨酸 Pro	0.11	115.08	0.67
苏氨酸 Thr	0.10	119.18	0.59
丝氨酸 Ser	0.08	105.06	0.53
苯丙氨酸 Phe	0.08	165.09	0.34
异亮氨酸 Ile	0.07	131.11	0.37
酪氨酸 Tyr	0.04	181.09	0.15
组氨酸 His	0.02	155.09	0.09
甲硫氨酸 Met	—	149.15	—
精氨酸 Arg	—	174.4	—
半胱氨酸 Cys	—	—	—
氨 Ammonia	1.04		42.84
总合	10.89		100

图 1 显示溶菌酶消化肽聚糖过程(20h 内)的肽聚糖 OD 变化曲线。光吸收值的降低主要出现在消化过程最初的 2h 内,5h 后光吸收值基本趋于平缓没有较大变化。肽聚糖溶解实验证实分离纯化步骤所得的提取物的主要成分确系肽聚糖。

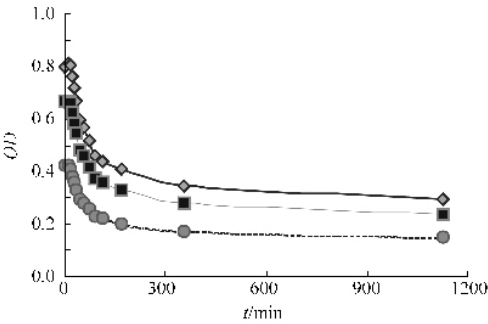


图 1 溶菌酶消化肽聚糖过程的肽聚糖 OD 变化曲线

◆ava OD₄₀₀ ■ava OD₄₅₀ ●ava OD₆₀₀

2.2 核磁共振分析

肽聚糖的¹³C-NMR 谱(图 2)在 90ppm ~ 103ppm 无信号,而在 103ppm ~ 106ppm 有信号峰,表明有 β-糖苷键存在而无 α-糖苷键存在。105.6579ppm, 105.3068ppm, 104.6964ppm, 103.5670ppm, 103.4144ppm 处有吸收峰,且峰高比约为 1:1:1:1.5:1,为处于不同化学环境的 β-1,4-GlcNAc 和 β-1,4-MurNAc 的异头碳化学位移信号。78.0ppm ~ 87.2ppm,且 57.6593ppm,56.8657ppm 附近有信号,表明是 C-2 发生取代,两个信号即为 GlcNAc 和 MurNAc 的 C-2 所产生。61.9937ppm 和 62.6499ppm 处的化学位移为 GlcNAc 和 MurNAc 的 C-6 的信号。71.9ppm ~ 77.6ppm 间有多个化学信号出现,为 GlcNAc 和 MurNAc 中处于不同化学环境中的 C-3, C-4, C-5 的化学信号,但其归属尚不清楚。

¹H-NMR 谱(图 3)中 4.80ppm ~ 5.40ppm 之间有 6 组异头氢的质子峰,说明有 6 种不同化学环境的单糖残基。4.8ppm ~ 5.0ppm 处有吸收峰,为 β 型糖苷键,与¹³C-NMR 谱一致。4.9566ppm 4.8980ppm 处吸收峰峰面积比约为 1:1,为 β-1,4-GlcNAc 和 β-1,4-MurNAc 的异头氢的质子峰。4.0ppm ~ 4.8ppm 处的吸收峰为 C-2 ~ C-6 氢的质子峰。4.7ppm 4.55ppm, 4.45ppm 4.28ppm 4.0 ~ 4.2ppm 处都出现化学环境相似的双峰,为 GlcNAc 和 MurNAc 的 C-2, C-3, C-4, C-5, C-6 的质子信号,但具体归属尚不清楚。

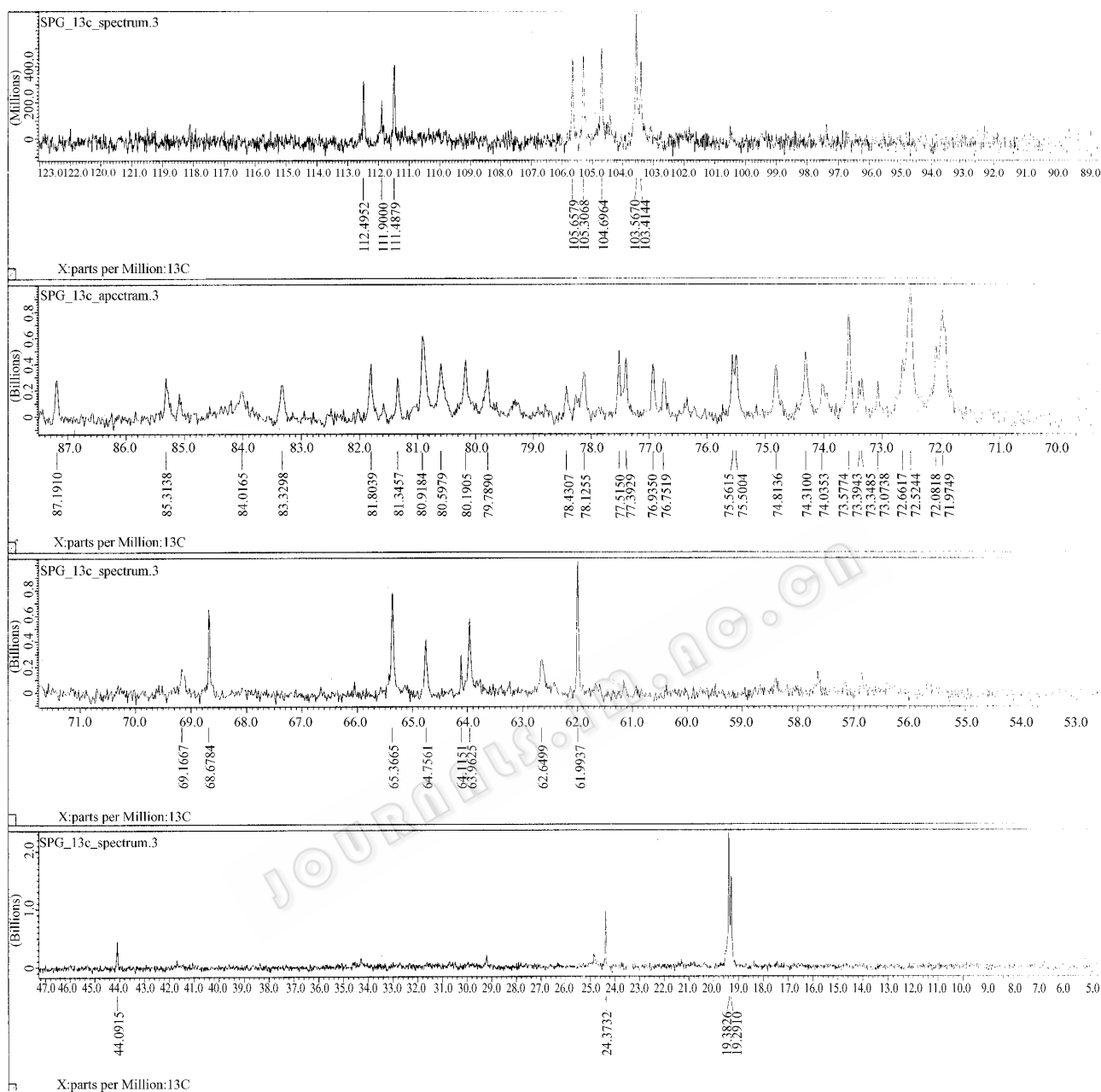
肽聚糖的¹H-NMR 谱和¹³C-NMR 谱都比较复杂,分析结果均与已知肽聚糖结构(由 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸以 β-1,4-糖苷键连接组成)相符。

2.3 红外分析

肽聚糖提取物的红外光谱(图 4)在 3500cm⁻¹ ~ 3200cm⁻¹, 3000cm⁻¹ ~ 2800cm⁻¹ 和 1400cm⁻¹ ~ 1200cm⁻¹ 处具均有多糖类物质的特征吸收峰。此外,1660cm⁻¹ ~ 1620cm⁻¹ 处是 CH₃CONH-的酰胺谱带。905cm⁻¹ ~ 876cm⁻¹ 处吸收峰为 β-D-葡萄糖吡喃糖的特征峰。1560cm⁻¹ ~ 1520cm⁻¹ 是 N—H 的变角振动。1200cm⁻¹ ~ 1000cm⁻¹ 的两个峰为吡喃糖环 C—O—C 的伸缩振动峰和 O—H 的变角振动峰。

2.4 电泳分析结果

肽聚糖的 SDS-PAGE 电泳如图 5,1、2 号泳道均为溶菌酶消化过的肽聚糖,2 号泳道为经过抽提除去蛋白的肽聚糖样品。a 图为阿尔辛蓝染色,其中无明显的染色条带;b 图为阿尔辛蓝染色后又经银

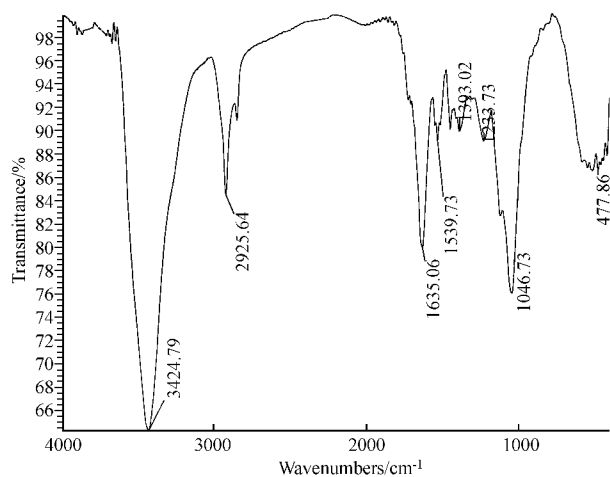
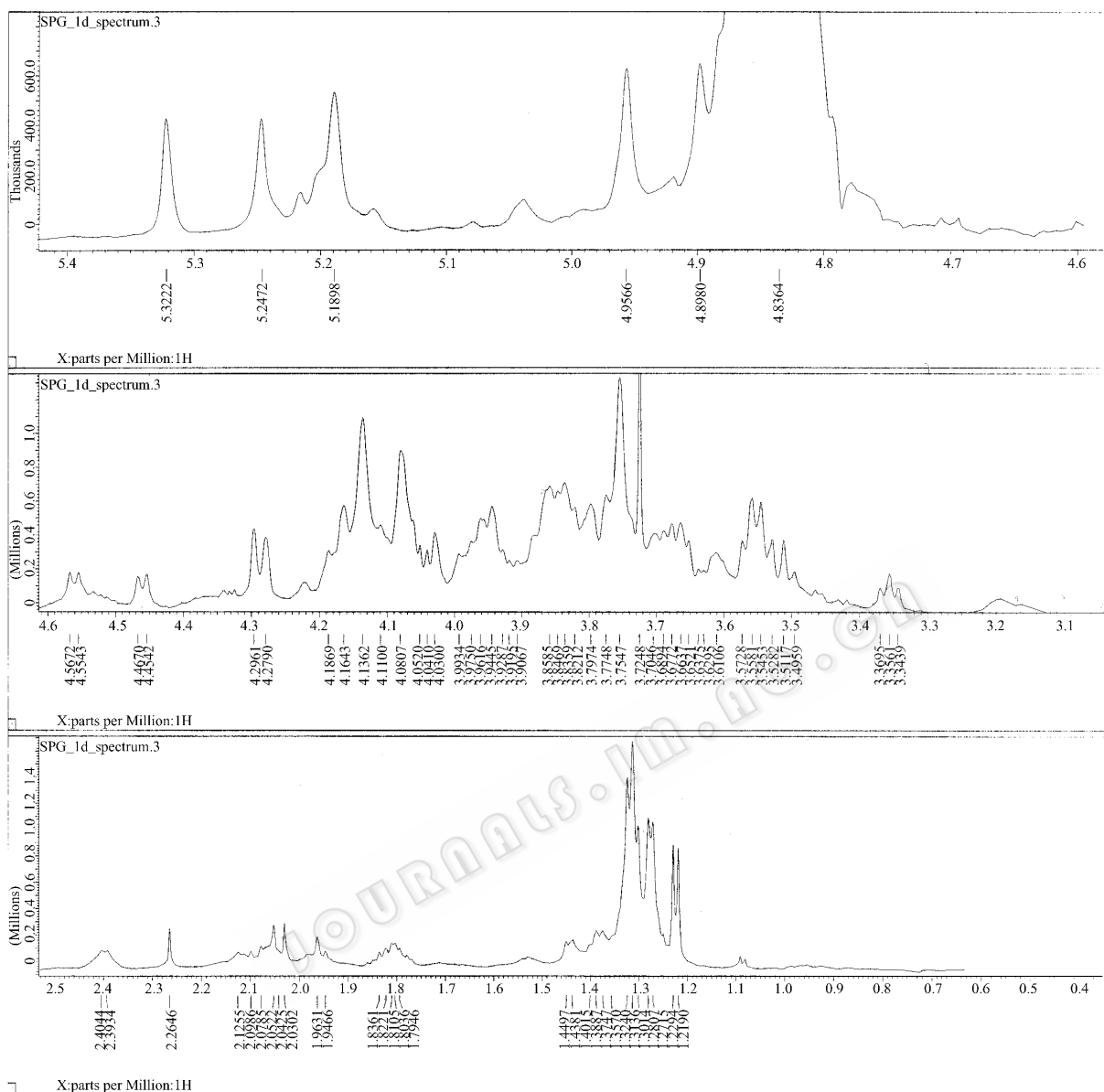
图 2 肽聚糖提取物¹³C-NMR 谱

染色, 可以看到从泳道的起始部分就有肽聚糖的分布; c 为考马斯亮蓝染色, 除位于 14.4 kD 的溶菌酶带无其它明显条带; d 为考马斯亮蓝染色后又经银染色, 除溶菌酶带, 在小于 14.4 kD 的范围内仍有肽聚糖的分布。肽聚糖呈弥散状分布, 分子量范围从 97 kD 到 14.4 kD 之间。

3 讨论

经过提纯的肽聚糖提取物经过化学成分分析, 确系主要成分为肽聚糖, 经过结构分析确定肽聚糖

的结构与已知肽聚糖的结构相吻合, 其糖链结构为由 D 型吡喃糖——N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸以 β -1,4-糖苷键连接而组成。与 N-乙酰胞壁酸羧基连接的肽链上的氨基酸分子——丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸和甘氨酸和间肽桥中所含的氨基酸分子——赖氨酸, 在肽聚糖的氨基酸成分分析中并没有表现出结构中应有的摩尔比, 推测其原因可能为: (1) 肽聚糖提取物的纯度不够, 含有杂蛋白, 同时谷氨酰胺水解后也生成谷氨酸, 所以谷氨酸的含量较高; (2) 肽聚糖在提取过程中, 分子结构受到破坏而



导致氨基酸的缺失,由于消化所使用的胰蛋白酶对肽链中赖氨酸残基的羧基端敏感,容易被水解掉,所以导致赖氨酸和甘氨酸的含量较低。

在肽聚糖的电泳实验中,由于肽聚糖的溶解度极低,不能直接进行 SDS-PAGE,经过反复摸索,采用溶菌酶消化的方法降低肽聚糖的分子量,只对可溶性的肽聚糖分子进行电泳分析。尝试电泳所用的聚丙烯酰胺凝胶分离胶的浓度范围为 16% ~ 26%,取得了较好的电泳效果。在电泳显色方法上,不再局限于传统的单一染色方法,尝试用多种染色方法结合染色,用于定位肽聚糖和排除肽聚糖提取物的消化产物中除肽聚糖外的其它各种成分,如溶菌酶、葡聚糖、杂蛋白等。考马斯亮蓝 R-250 用于蛋

白质的染色 阿尔辛蓝用于非氨基葡聚糖和糖蛋白的染色,银染色则可将各种大分子物质均着色。通过多重复染和比对不同染色结果,可将其其它杂质干扰排除,从而确定肽聚糖的位置和分子大小。肽聚

糖经溶菌酶消化,生成分子量大小不等的低分子量肽聚糖,在电泳途中呈现由大到小的弥散性分布状态。

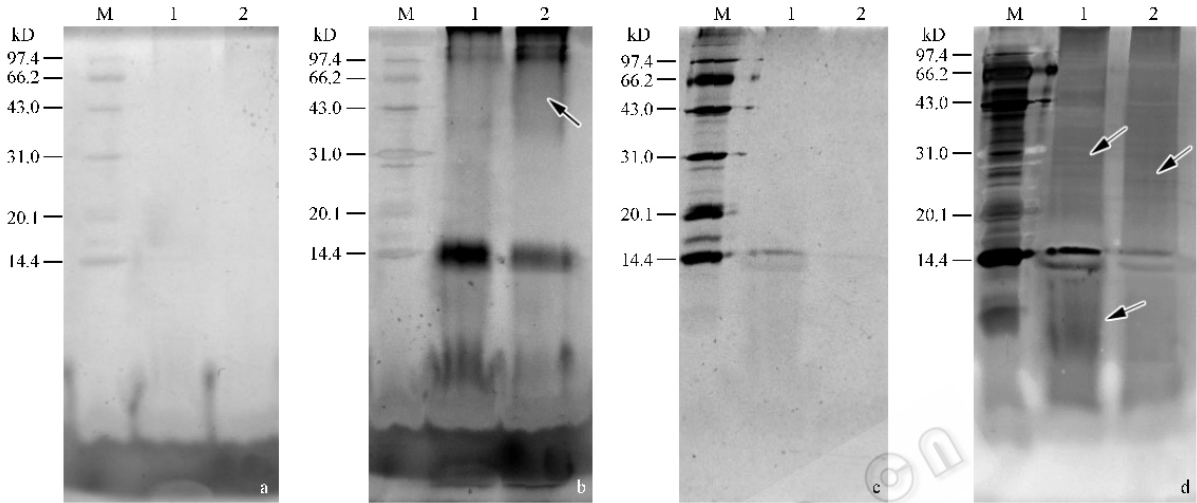


图 5 溶菌酶消化过的肽聚糖提取物的 SDS-PAGE 图谱

注 :a 阿尔辛蓝染色 ,b 阿尔辛蓝染色后银染色 ,c 考马斯亮蓝染色 ,d 考马斯亮蓝染色后银染色 ,M 蛋白质 Marker ,1 溶菌酶水解后的肽聚糖 ,2 1 号样品去除蛋白后的肽聚糖 ,箭头所指为肽聚糖。

对肽聚糖分子量分布的研究是研究肽聚糖的分子大小(即聚合度)和其生物学活性间相互关系的基础。但由于肽聚糖水不溶性的特点,很多常规的实验方法都不能使用,使其研究增加了很大难度,只能另辟蹊径从其它的角度来对其进行研究。肽聚糖分子量的研究方法有待进一步的寻找和探索,其成功将为研究、开发和评价高效免疫增强剂提供技术支撑。

参考文献

[1] Mutsuo K, Miyazano I. Nippon Suisan Gakkaishi, 1993, **59**: 1377 ~ 1379.
[2] Itami T, Asano M, Tokushige K, *et al.* Aquaculture, 1998, **164**: 277 ~ 288.

[3] 宋晓玲,王秀华,陈国福,等. 高技术通讯, 2005, **15**(1): 74 ~ 78.
[4] Lawrence C, Nauciel C. Infection and Immunity, 1998, **66**(10): 4 947 ~ 4 949.
[5] Chedid L, Parant M, Parant F, *et al.* Immunology, 1977, **74**(5): 2089 ~ 2093.
[6] 乐 军,胡 宏. 中国微生态学杂志, 1997, **9**(5): 10.
[7] Blix G. Acta Chem Scand, 1948, **2**: 467 ~ 473.
[8] Bradford M M. Anal Biochem, 1976, **72**: 248 ~ 254.
[9] 马西艺,乐国伟,施用晖,等. 无锡轻工大学学报, 2003, **22** (6): 50 ~ 54.
[10] 李建武,萧能赓,余瑞元,等. 生物化学实验原理和方法. 北京: 北京大学出版社, 1994. pp. 103.
[11] 汪家政,范 明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000. pp. 92 ~ 97.
[12] 陈春锋,杨晓彤. 微生物学通报 2006, **33**(5): 150 ~ 153.