

测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法 ——薄层层析法

王 平

(中国科学院微生物研究所,北京)

Becker 报道可根据细胞壁氨基酸组成和全细胞糖组份对放线菌进行分类与鉴定^[1],他把细胞壁分为四型。Lechevalier 又把细胞壁分为九型^[2]。根据形态与细胞壁类型对放线菌进行分类的方法现已被广泛用于放线菌的分类与鉴

定上,但过去一直用纸层析进行分析,既费时间,过程又复杂。Lechevalier 曾提到用纤维素薄层分析 DAP (二氨基庚二酸)异构体是很有

本工作是在阎逸初教授指导下进行的,邓宇秀同志审阅了稿件并提出了宝贵的意见,特此表示感谢。

用的方法,同时他也用纤维素薄层对糖进行了分析,但认为效果不好,不能把半乳糖和葡萄糖,甘露糖与阿拉伯糖,马杜拉糖与木糖分开。Toru Hasegawa 等报道了用微晶纤维素对全细胞水解液进行薄层层析的方法^[1],但不能把三种 DAP 异构体完全分开,而且所用的系统使茚三酮与氨基酸的反应产物很快褪色,不能较长时间保存层析结果。糖组份分析中也不能使甘露糖与阿拉伯糖,马杜拉糖与木糖分开。本文利用不同吸附剂与不同溶剂系统对一些已知菌株和标准品进行了分析,选出了一个可以代替纸层析并在某些方面优于纸层析的方法,现将结果报道如下。

材料与方 法

(一) 材 料

1. 微晶纤维素 (Cellulose microcrystalline, E. Merck): 上海化学试剂采购供应站(进口分装)。

2. 层析缸: 21 × 6cm。

3. 普通玻璃条: 20 × 5cm。

(二) 方 法

1. 制板: 把 20 × 5cm 玻璃板用洗涤剂洗净,取微晶纤维素若干克,每克加蒸馏水 3.5ml,调成均匀糊状,在玻璃板上涂成薄层,并轻轻振荡使之均匀。板上纤维素薄层厚度控制在每个 20 × 5cm 板铺微晶纤维素干粉 1.2—1.5g。风干过夜,不必活化,即可使用。

2. 菌体收集

培养基: 蛋白胨 5g, 酵母膏 3g, 葡萄糖 2g, 蒸馏水 1000ml, pH7.0—7.2。分装 20 × 2cm 试管,每管 8ml。

直接用斜面接种,摇床培养 3—5 天,然后滤纸过滤培养液,用蒸馏水冲洗二次,再用无水乙醇冲洗两次。取经上述处理过的湿菌体 30mg 装于硬质玻璃管内 (0.9 × 12 cm),用于氨基酸分析,另取 30mg 用于糖组份分析。

3. 纯细胞壁的制备^[4]: 取 10g 晚对数期湿菌体(不得用干菌体或开始自溶的菌体,也不要室温下保存菌体,如需保存应把菌体保存在

冰冻状态下)悬浮于 30—40ml 0.1M pH 8.0 磷酸缓冲液中,用超声波破碎菌体。菌体破碎后,在 2000 g 离心力下离心 10 分钟除去未破碎细胞,然后在 18,000—19,000g 离心力下离心 30 分钟,沉淀出细胞壁,糖型为 A (含半乳糖和阿拉伯糖)的菌较难破碎,也较难沉淀,可适当延长破碎和离心时间。这样得到的细胞壁沉淀物用 pH 8.0 的磷酸缓冲液,95% 的乙醇分别清洗二次,然后在 2% 的乙醇 KOH 溶液 (2 g KOH 溶于 100ml 95% 的乙醇)中皂化 (37℃,振荡 2—3 天),再用 95% 乙醇,蒸馏水分别清洗二次,然后用 pH 8.0 的磷酸缓冲液清洗三次。接着用过滤过的含胰蛋白酶的 pH 8.0 磷酸缓冲液 (缓冲液中含胰蛋白酶 3mg/ml) 处理粗制细胞壁 (37℃ 振荡二小时),用 pH 8.0 磷酸缓冲液,蒸馏水各清洗二次,清洗后的沉淀物再用胃蛋白酶的盐酸溶液 (3mg/ml 0.02 N HCl) 处理 (37℃,振荡过夜)。然后再用 0.02 N HCl,蒸馏水,乙醇分别清洗二次,最后用氯仿清洗一次,得到纯细胞壁。

4. 菌体水解: 在做氨基酸分析的玻璃管中加入 6N HCl 0.1 ml,用于糖分析的玻璃管中加入 0.5N HCl 0.1ml,火焰封口,放入烘箱,待烘箱温度上升到 120℃ 后,再持续 15 分钟取出。用于氨基酸分析的水解液以黑褐色为宜,用于糖分析的水解液以黄棕色为宜。

5. 点样: 用微量进样器抽取 0.4 μl 用于氨基酸分析的水解液点在薄板下缘 1 cm 处,并点 0.01mol D, L-DAP (Sigma Chem. Co. D, L-DAP 同时含有 L, L-DAP, Meso-DAP, 和 D, D-DAP)、天门冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸、丙氨酸 0.2 μl 做为标准样。抽取 0.8—2 μl 用于糖组份分析的水解液点样,并点含有 1% 鼠李糖、核糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖的混合液 0.2 μl 作为标准样。

6. 展层剂: ① 甲醇:吡啶:冰乙酸:水 (10:1:0.25:5) 用于全细胞水解液 DAP 异构体分析; ② 甲醇:吡啶:冰乙酸:水 (10:0.5:0.125:2.5) 用于纯细胞壁水解液氨基酸分析; ③ 乙酸乙酯:吡啶:冰乙酸:水 (8:5:1:1.5) 用于全细胞

水解液糖组份分析。

7. 展层：层析板不必在层析缸中饱和，点样后直接上行展层。当溶剂前沿离层析板上端 1cm 左右时，取出层析板，大约需时三小时。对于氨基酸分析用茚三酮显色，对于糖用苯胺邻苯二甲酸试剂显色。

结果与讨论

(一) 糖的层析系统

糖的层析系统可以使全细胞水解液分析所用的七种标准糖全部分开，依 R_f 值从小到大的顺序依次为半乳糖、葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、木糖、核糖和鼠李糖，马杜拉糖在木糖与阿拉伯糖中间（图 1）。核糖、木糖和阿拉伯糖显色后呈粉红色，其它糖呈褐黄色。

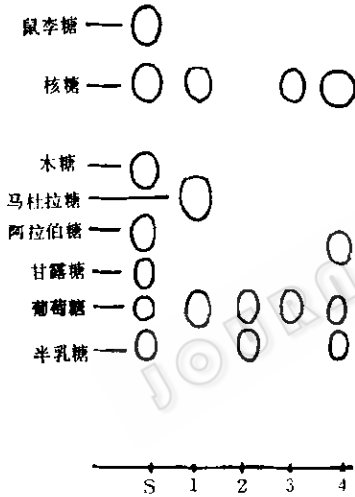


图 1 全细胞水解液及标准糖层析图谱

图中 S 为标准糖样品；1. 嗜皮菌水解液；2. 棘孢小双孢菌水解液；3. 灰色链霉菌水解液；4. 星状诺卡氏菌水解液

本系统比 Toru Hasegawa 和 Lechevalier 的系统分离效果好，可以达到纸层析同样的结果，但比纸层析速度快，用样量少。

(二) 分析全细胞水解液 DAP 的层析系统

分析全细胞水解液 DAP 的层析系统可以把混合样中的丙氨酸、谷氨酸、甘氨酸、天门冬

氨酸完全分开，并把美国 Sigma 化学公司生产的 D, L-2, 6-二氨基庚二酸分成三个组份。按 R_f 值的大小依次为 L, L-DAP, Meso-DAP, D, D-DAP (图 2)。

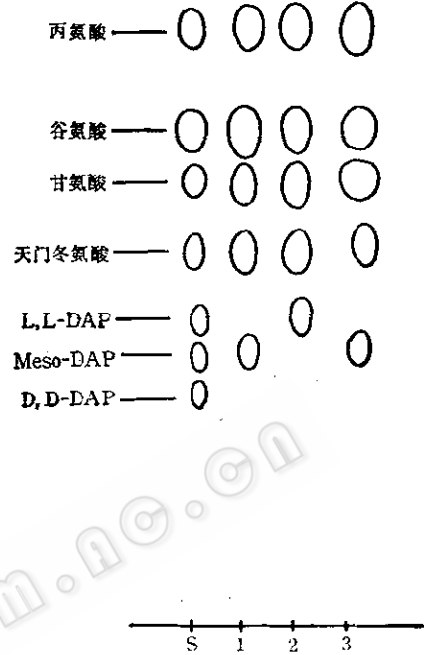


图 2 全细胞水解液氨基酸层析图谱

S 为混合氨基酸标准样；1 为嗜皮菌菌体水解液；2 为灰色链霉菌菌体水解液；3 为星状诺卡氏菌菌体水解液

本系统结果稳定，重复性高，易掌握，与纸层析以及国外已报道的用于放线菌细胞壁分析的层析方法相比，优点是可以把二氨基庚二酸的三种同分异构体分开，因此，除能鉴定出常规测定的 D, L-DAP 与 L, L-DAP 外，还可以研究细胞壁中是否存在 D, D-DAP 提供了简易的手段。

(三) 分析纯细胞壁水解液的层析系统

分析纯细胞壁水解液的层析系统可以把 Sigma 化学公司的 D, L-二氨基庚二酸分为两部分，一部分代表 L, L-DAP，另一部分代表 D, L-DAP 与 D, D-DAP 的混合物。同时本系统可以使鸟氨酸、赖氨酸、天门冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸、丙氨酸分开，各氨基酸的顺序见图 3。

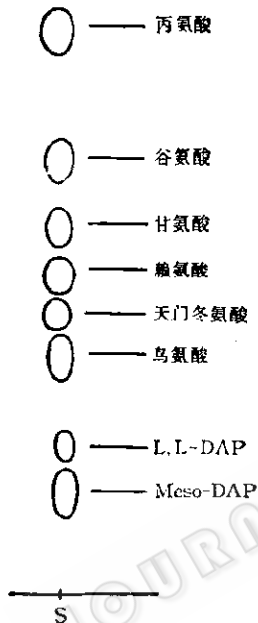


图3 纯细胞壁分析系统对标准样的层析谱

本系统较难掌握, pH 的变化对碱性氨基酸和酸性氨基酸的 R_f 值影响较大, 因此, 配制时必须严格按照比例操作。但本系统不能作为测定全细胞水解液的系统, 因为全细胞水解液中的其它多种氨基酸与上述欲测氨基酸的 R_f

值相近, 会干扰这些氨基酸的测定。

结 论

用上述方法对已知菌株, 进行了氨基酸和糖组分的测定, 结果与纸层析法所得结果相同。由于此法采用的层析缸较小, 只需 10ml 左右溶剂即可进行层析, 因此, 可以避免溶剂大量挥发所造成的污染。此法还参考了 Toru Hasegawa 所用的水解方法, 缩短了水解时间。本文介绍的方法分辨率高, 效果好, 显色后不易褪色, 速度快, 操作简便, 污染较少, 节省溶剂, 因此, 可以代替纸层析用于放线菌的分类与鉴定。

参 考 文 献

- [1] Becker, B. et al.: *Appl. Microbiol.*, 12: 421—423, 1964.
- [2] Lechevalier, M. P. et al.: Composition of whole cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. P311—316. In H. Prauser (ed.), *The Actinomycetales*, Veb. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1970.
- [3] Toru Hasegawa et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29: 319, 1983.
- [4] Mary, P. and H. A. Lechevalier: *The Chemotaxonomy of Actinomycetes*, Waksman Institute of Microbiology, Rutgers, The State University of New Jersey, (A University Laboratory Approach, Unpublished).