

噬菌蛭弧菌分子生物学特性研究进展

秦生巨

(江苏省卫生防疫站中国医学细菌中心弧菌噬菌体专业实验室, 南京 210009)

自 Stolp 等^[1]1963 年首次报道噬菌蛭弧菌 (*Bdellovibrio bacteriovorus*, 以下简称蛭弧菌) 以来, 国内外许多实验室对蛭弧菌的生物学、生态学、生理学、分类学、生物化学、分子生物学及其与生物间的拮抗作用进行了很多研究。特别是 70 年代后期, 对蛭弧菌分子生物学方面的研究更为广泛和深入。发现蛭弧菌在分子生物学方面具有许多独特的特性^[2]: 蛭弧菌不能利用碳水化合物, 但分解蛋白质的能力极强, 它是利用多肽及氨基酸作为能源和碳源; 蛭弧菌生长代谢过程中乙醛酸循环很弱, 以不完全的三羧酸循环为主要代谢途径; 蛭弧菌蛋白质的含量可达干重的 60—65%, DNA 含量为 5%, 含有典型的嘌呤和嘧啶; 蛭弧菌 DNA 合成的前体物质, 全部来自宿主细胞, 大约 70% 来自

DNA, 30% 来自 RNA; 蛭弧菌可直接利用单核苷酸作前体物质, 合成其核酸; 蛭弧菌 γ_{ATP} (每消耗 1g ATP 所得细胞干重) 值高达 20—30g; 蛭弧菌的鞭毛粗带鞘, 早期研究认为, 鞭毛鞘是由细胞壁外膜组成, 对尿素十分敏感。近期发现蛭弧菌鞭毛鞘与外膜生化性质有明显差异。本文就上述蛭弧菌分子生物学方面的研究概况综述如下。

(一) 蛭弧菌的形态结构

1. 一般形态: 蛭弧菌革兰氏染色呈阴性弧形杆菌。相差显微镜下, 可见到蛭弧菌积极追捕宿主细胞呈跳跃式运动。电镜观察, 蛭弧菌以弧杆状为主, 其菌体长为 0.8—1.2 μm , 宽约为 0.25—0.40 μm 。菌体一端附着一根端生鞭毛, 极少数有 2—3 根。它的鞭毛比其他细菌鞭

毛为粗，直径约为21-28nm，长一般为菌体的10-40倍，通常呈波状(如图版1-1)。靠近菌体的最初三个“波形”的“波长”递减，远端“波形”的“波长”相对稳定。这种结构与其侵袭功能直接相关。并被认为是蛭弧菌的特征之一。Shilo等^[3]发现，与蛭弧菌鞭毛相对的菌体另一端(头部)有钉状的纤毛结构存在，通常2-3根，最多6根，纤毛直径为4.5-10nm，长为0.8-1.5μm，呈直线或三角形弯曲状。

蛭弧菌的形态结构，有菌株差异。培养条件等因素可影响蛭弧菌形态特征的发育。

2. 超微结构^[4]：蛭弧菌细胞壁通常有内外两层组成，内层覆于细胞膜，其上有数个分散的颗粒，直径为6-10nm。蛭弧菌胞浆中常可观察到致密小体，长约150-300nm，宽约70-120nm，呈片状结构。据推测这可能是细胞膜内陷而形成的。核区非常明显，周围包绕着数个核糖体颗粒。在菌体中还可见到间体和其他许多内含物。Meier认为，间体的存在与蛭弧菌附着宿主有关。

蛭弧菌在深红螺菌中生长发育时，常可形成异形结构的“孢囊体”，长约1.2μm，宽约0.6μm。孢囊体外壁和内膜都很厚，外壁可厚达30-40nm。

蛭弧菌鞭毛结构是独特的，它由鞭毛鞘和轴心组成，鞘壁厚约7.5nm，轴心直径约13nm。Abram等认为，蛭弧菌的鞭毛鞘是由细胞壁外膜延伸而组成的，但是当6M-尿素存在时，鞭毛鞘极易被溶解破坏，而细胞壁不受影响。推测组成鞭毛鞘的物质可能对尿素比较敏感，使鞭毛鞘肿胀，直至破裂。有人指出，蛭弧菌鞭毛的结构与其他革兰氏阴性细菌的鞭毛结构基本相似，但至今尚未发现蛭弧菌鞭毛基部有类似于其他革兰氏阴性细菌鞭毛基部所具有的L环结构(图版1-2)。

蛭弧菌的纤毛基部起源于细胞膜，有6-12个环状结构，有的分散，有的成簇集结在一起。Shilo等^[5]称这一结构为“感染锥子”或“吸附器(固着器)”。此结构的存在，与蛭弧菌的寄生特性有关，对蛭弧菌进入宿主细胞时机

械性钻孔有积极作用。

(二) 蛭弧菌的化学组分

蛭弧菌具有典型的革兰氏阴性菌细胞的化学组分。Tinelli等^[6]研究报道，蛭弧菌和其他革兰氏阴性菌细胞一样，含有典型的肽聚糖成分，肽聚糖成分由胞壁酸、葡萄糖胺及其他13种氨基酸组成，同其他原核细胞壁肽聚糖的组分和结构类似，其甘氨酸：谷氨酸：二异丙基氟磷酸：胞壁酸：谷胺酰氨为2：1：1：1：1。在腐生的蛭弧菌中分离到核糖及rRNA，Bd6-5-S在蛇螺菌中繁殖，可产生含有氨基糖和可溶性胞壁酸的亚微粒子。Murray报道^[7,8]，Zn²⁺对蛭弧菌细胞壁及细胞膜结构的稳定性很重要，在缺乏Zn²⁺的情况下，细胞壁将会变得十分疏松。蛭弧菌细胞膜的甘油磷脂成分主要是由磷脂酸乙醇胺和磷酸酰甘油组成，他们的主要成分为15碳支链脂肪酸。Nelson等^[9]报道，外膜中的类脂A是利用宿主细胞的类脂A，经过修饰，插入自身脂多糖结构而形成。脂多糖主要是由葡萄糖、岩藻聚糖、十九烷酸组成。此外还含有一些其他脂肪酸、戊糖、酮脱氧锌酸及磷脂。在蛭弧菌外膜中存在类OmpF蛋白。

蛭弧菌蛋白质含量为细胞干重的60-65%，DNA的含量为5%，含有典型的嘌呤和嘧啶。DNA的G+C比例，大多数菌株为50.2±0.8-50.8±0.9mol%，兼性寄生蛭弧菌DNA的G+C比例为42.7±1.0-42.8±0.9mol%。以蛭弧菌Bd109为例，其主要大分子物质的比例见表1。

表1 蛭弧菌Bd109和大肠杆菌ML35大分子成分及含量

成分	蛭弧菌		大肠杆菌	
	μg/10 ¹⁰ 细胞	干重(%)	μg/10 ¹⁰ 细胞	干重(%)
蛋白质	320	54	2,200	54
RNA	100	17	330	21
DNA	65	11	110	2.8
脂类	80	14	320	8
多糖	20	3.4	240	6
肽葡聚糖	5	0.8	40	1
干重	590		4,000	

胞苷酸、尿苷酸、胞苷酸、核糖、腺嘌呤和鸟嘌呤。到目前为止,除了蛭弧菌DNA的基因位置和装配结构尚不清楚外,还尚未发现蛭弧菌DNA结构或成分的特殊性。

Thomashow报道^[10],蛭弧菌鞭毛主要是由蛋白质、磷脂和脂多糖组成,其鞭毛轴心由多肽组成。鞭毛鞘易溶于Triton(三硝基甲苯)X-100。蛭弧菌鞭毛鞘不同于细胞外膜,具有特殊的生化性质,有些鞭毛磷脂高达54—58%,蛋白质的含量仅为23—28%,与典型的细胞外膜的磷脂、蛋白质的含量是有明显差异的。这种高磷脂/蛋白质的比率提示鞭毛鞘中具有磷脂双层结构。同时,与细胞膜的磷脂双层结构相比,具有较大的“流动”性,这为鞭毛的运动提供了物质结构基础。组成鞭毛鞘轴心的多肽主要由分子量为28和29.5KDa的亚基组成,28KDa亚基位于菌体近端,29.5KDa亚基位于菌体远端。

蛭弧菌Bduki2含有磷脂,其脂质中所含有的鞘脂类是其他细菌研究中极为罕见的。

(三) 蛭弧菌的能量代谢

蛭弧菌严格耗氧,在宿主细胞中生长,所需氧压在4mmHg柱以下,其呼吸率为 20×10^{-12} mlO₂/细胞(35℃,1h),当蛭弧菌裂解宿主菌体时,呼吸率相应的增高。精氨酸、谷氨酸等氨基酸对呼吸有明显的促进作用。蛭弧菌在综合培养基上能产生细胞色素a(吸收峰605nm)、b(吸收峰559、528、426nm)、c(吸收峰522—524nm)。BdA3.12细胞色素c的索瑞氏带的吸收峰在607nm,其余在421—423之间。蛭弧菌Bd6-5-S含有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH₂),烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH₂)细胞色素氧化酶是NADH₂氧化酶的两倍。NADPH₂氧化酶的活性受氰化钾和NaN₃所抑制,但不能被鱼藤酮及CO和O₂(4:1)混合物所抑制。NADPH₂氧化酶不受上述任何抑制剂的抑制。在蛭弧菌Bd6-5-S抽提物中,谷氨酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸、延胡索酸、苹果酸、丙酮酸、乙酸、 α -磷酸甘油、烟酰胺腺嘌呤核苷酸及NADPH₂不改变耗氧量。但

NADH₂及NADPH₂与耗氧量有关。

Simpson等^[11]报道,在细胞抽提物中存在ATP酶,同时还存在催化ATP \rightleftharpoons ³²P相互转换的酶类物质。由于砷化物、NaN₃和2,4-二硝基苯酚对这种转换无抑制作用,因此,这种转换途径可能受氨基酸氧化所催化。氧化NADPH₂可能有两种途径:(1)由黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD),或黄素单核苷酸(FMN)所刺激,产生H₂O₂,对氰化钾不敏感;(2)通过细胞色素产生H₂O₂,对氰化钾敏感。研究中发现,有些蛭弧菌含有丰富的触酶,但不是所有的蛭弧菌都有触酶。

蛭弧菌Bd6-5-S中含有三羧酸循环所需的异柠檬酸脱氢酶, α -酮戊二酸脱氢酶,延胡索酸水解酶,苹果酸脱氢酶及琥珀酸脱氢酶等。但未发现其糖酵解途径,不能利用碳水化合物及乙醇。蛋白质、多肽、氨基酸及核酸是主要的碳源和能源。Mitchell发现^[12],一株海洋蛭弧菌可利用宿主大肠杆菌细胞壁为唯一的碳源。Seidler等^[13]检查7株蛭弧菌,结果发现这些菌株都含有丙氨酸、谷氨酸、苹果酸、异柠檬酸脱氢酶、延胡索酸水解酶、腺苷酸激酶、配还原酶及四唑氧化酶。但不同的菌株所含的酶类,具有不同的理化性质,这一结果用于蛭弧菌分类可能是有实际指导意义和理论价值的。

Rittenberg^[14]用U¹⁴C标记宿主细胞,测得蛭弧菌在细胞内生长时 γ_{ATP} 值为18.5—25.9g。一般细菌 γ_{ATP} 值为10g,达到这样高效果的部分原因,是蛭弧菌具有直接从宿主细胞吸收核苷酸的能力,因而贮存了高能磷酸键。在电子转运系统中,每对电子转运产生3分子ATP(P/O值为3),底物磷酸化作用几乎可以忽略,主要是三羧酸循环及电子转运系统中产生。但其中还是含有低水平的糖酵解酶。Friedbtrg等^[15]报道,在蛭弧菌能量代谢过程中,ATP酶是起主要作用的,它约60—80%存在于可溶成分中,对二环己基碳二胺(DCCI)敏感,能被其抑制,细胞膜上的ATP酶对DCCI具有抗性,参与蛭弧菌氨基酸及磷酸的转运,对DCCI的抗性主要是由于ATP酶与膜连接后

产生的。

Hespell^[16]对蛭弧菌三羧酸循环及糖酵解途径中各种酶的活性进行了分析(表2)。最初糖酵解酶活性与大肠杆菌及蛭弧菌 Bd109 中的三羧酸循环中的酶活性相关。当蛭弧菌进入宿主 90min 时,三羧酸循环中的酶活性增加约 10%,而糖酵解酶活性下降 25—60%; 110—180min 时,三羧酸循环酶的活性增加 50—60%,而糖酵解酶下降到接近 0,而磷酸葡萄糖异构酶及甘油醛磷酸脱氢酶的活性较高。由于蛭弧菌严格耗氧,因此这二种酶可能与蛭弧菌的生物合成有关,而并非是由于能量代谢。

表 2 蛭弧菌 Bd109 和大肠杆菌 ML35 细胞提取液中酶的活性

酶的种类	酶的活性		
	大肠杆菌		蛭弧菌
	需氧	厌氧	需氧
葡萄糖激酶	48	50	2.4
磷酸葡萄糖激酶	42	204	109
磷酸果糖激酶	77	212	13
果糖磷酸缩酶	142	198	9.5
磷酸内糖异构酶	141	177	33
甘油醛磷酸脱氢酶	944	1,193	690
丙酮酸激酶	345	190	7.5
柠檬酸合酶	1,467	86	3,360
异柠檬酸脱氢酶	305	25	893
延胡索酸酶	158	/	/
苹果酸脱氢酶	5,597	52	2,200
β -半乳糖苷酶	3,100	2,810	/

(四) 蛭弧菌突变株的研究

早期研究认为,蛭弧菌是胞内寄生物。Starr 报道^[17],蛭弧菌与宿主菌不仅是寄生关系,而且还存在共生关系。发现蛭弧菌有依赖宿主菌生长和非依赖宿主菌生长的两种菌株。因此,蛭弧菌株被认为有“依赖共生(S-D)”及“非依赖共生(S-C)”或“非依赖共生条件突变株(S^d -comp⁺)”两种。 S^d -comp⁺最早于1963年分离得到,称为“非依赖宿主菌”。然而,这些命名均不能准确的描述蛭弧菌突变株的性质。因为一株“非依赖宿主菌”蛭弧菌可以在无宿主菌细胞的培养基中生长,并不意味着它本身

不具备在宿主细胞中生长的能力。Varon 等^[17]提出,蛭弧菌突变株新的命名方式,把它们分为:(1) Sin-comp⁺,具有兼性生长特性的突变株;(2) Sin-comp⁻,非共生性突变株;(3) S^d -comp⁻,条件性突变株,在合适温度环境中,只能在宿主菌细胞内生长。蛭弧菌突变株 Bd109J 研究表明,以 S^d -comp⁺ 中分离的 Sin 突变株大多数为 comp⁺,从 Sin-comp⁻ 中也分离到 comp⁻。Sin-comp⁺ 在有机培养基中对 Sin-comp⁺ 的选择不利,在含有大肠杆菌的缓冲液中对 S^d -comp⁻ 的选择不利。

Dunn 等^[18]对温度敏感的蛭弧菌 Bd109D 突变株进行了研究,这些突变株通过乙基甲烷磺酸诱变剂处理而获得,回复突变率为 10^{-5} — 10^{-9} 。通过电镜、温度漂移、一步生长试验、吸附动力学及大分子通透性等的研究,发现其生活周期中的许多途径被中断。如蛭弧菌 Bd109 D153 失去吸附能力, Bd109 D4 和 Bd109 D48 不能穿入宿主细胞, Bd109 D4 和 Bd109 D152 失去在细胞内生长的能力。在限制温度下, Bd109 D153 尽管能仍然高速运转,但对宿主细胞的吸附受到抑制。在 38.5℃ 时,蛭弧菌 Bd109 D153 吸附于大肠杆菌宿主细胞壁,同其野生菌株吸附在枯草杆菌(革兰氏阳性菌,非特异性宿主细胞)上一样,随后不穿入细胞,从其吸附的细胞上脱落。提示蛭弧菌在早期阶段,存在“两期吸附”的现象。

目前所知,野生菌株几乎都是在宿主细胞内生存的。对其衍生菌株(尤其是对其突变菌株)的研究,对于描述蛭弧菌的代谢机制具有重要的理论意义和指导实践的价值。

(五) 结束语

自 60 年代中期蛭弧菌被发现以来,许多实验室对它的生物学、生态学、生理学和分类学等方面进行了大量的研究,并取得了许多显著的成果。近年来,蛭弧菌分子生物学特性的研究进展也很快,至今已发表论文有 60 余篇。但是在我国至今尚未见有这方面的报道。作者认为,研究蛭弧菌的分子生物学,对研究如何利用蛭弧菌净化环境水中的细菌、改善环境水

源, 保护环境是有实际意义的。应引起研究者的重视。

参 考 文 献

1. Stolp H et al. : *Phytophthol. Z*, **45**: 364, 1962.
2. Starr MP et al. : *Adv. Physiology*, **8**: 215, 1972
3. Shilo M et al. : *J. Gen. Microbiol*, **40**: 317, 1965.
4. Abram JC et al. : *J. Bacteriol*, **118** (2): 663, 1974.
5. Shilo M et al. : *Sci. J*, **1**: **24**, 1966.
6. Tinelli RM et al. : *C. R. Acad. Sci*, **270**: 2600, 1975.
7. Murray RG et al. : *Bacteriol Proc*, **67**: 24, 1967.
8. Murray RG; Can Microbiol abstracts 14th Ann. Meet, P. 52; 1964.
9. Nelson DR et al. : *J. Bacteriol*, **147** (3): 860, 1981.
10. Thomashow MF et al. : *J. Bacteriol*, **163** (1): 1047, 1985.
11. Simpson FJ et al. : *Can J. Bioch*, **46**: 856, 1968.
12. Mitchell R et al. : *Nature, Lond*, **215**: 891, 1967.
13. Seidler RJ et al. : *J. Bacteriol*, **106** (1): 608, 1971.
14. Rittenberg SC et al. : *J. Bacteriol*, **121** (3): 1158, 1975.
15. Friedberg D et al. : *J. Bacteriol*, **127** (3): 1382, 1976.
16. Hespell RB et al. : *J. Bacteriol*, **128** (2): 677, 1976.
17. Starr MP et al. : *Biology*, **29**: 93, 1975.
18. Dunn GE et al. : *J. Bacteriol*, **117** (3): 1341, 1974.

(1991-07-03 收稿)