

小单孢菌细胞壁中3-OH DAP 的快速分析

王云山 张元亮 陈立平*

(河北大学生物学系, 保定 071002)

阮继生

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 本文介绍了用微结晶纤维素薄板层析对小单孢菌 (*Micromonospora*) 细胞壁中二氨基庚二酸 (DAP) 异构体及其3-羟基衍生物 (3-OH DAP) 进行快速分析的方法。在甲醇:水:冰乙酸:吡啶 (10:5:0.25:1) 的溶剂系统中测得 $R_{LL-DAP, meso-DAP}$ 为0.88, $DD-DAP$ 为0.78, 3-OH DAP 为0.72。

关键词 小单孢菌, 薄层层析, 3-羟基二氨基庚二酸

细胞壁中二氨基庚二酸 (DAP) 异构体的成分已成为放线菌分类中的重要指标。小单孢菌属 (*Micromonospora*) 的细胞壁为 I 型, 含有甘氨酸和 meso-DAP。近年来研究发现在小单孢菌属中除含 meso-DAP 外, 某些菌株还有少量的 LL-DAP 和 3-OH DAP^[1], 在“伯杰氏系统细菌学手册”中对小单孢菌属的细胞壁成份描述为: 细胞壁含有甘氨酸, meso-DAP 和/或其 3-羟基衍生物即 3-OH DAP。在其定种时 3-OH DAP 的有无是重要依据之一^[2]。因此, 在小单孢菌的分类中 3-OH DAP 的检测是一项必需的工作。

由于目前没有商品化的 3-OH DAP 标准试剂, 其分析方法仍采用标准菌株作对照进行纸层析的方法。在实际应用中由于纸层析有时间长、操作复杂的问题, 故在检测大量菌株时有一定困难。在我们进行云南地区小单孢菌的数值分类研究中即遇到了这样的问题。利用微结晶纤维素薄层层析法已可准确、快速的分析 DAP 的三种异构体 (meso-, LL-, DD-DAP)^[3]。为此我们进行了用薄层层析法对 3-OH DAP 测试的探讨。本文介绍使用微结晶纤维素薄层层析法同时对 DAP 的三种异构体和 3-OH DAP 进行简便快速的分析方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

1.1.1 典型菌株: *M. chalcea* ATCC 12452, *M. carbonacea* sub. *carbonacea* ATCC 27114, *M. echinospora* sub. *echinospora* ATCC 15837, 由 Japan Collection of Microorganism 提供。

1.1.2 *Micromonospora* 4170, 4171, 4169, 4158, 4178 由云南省微生物研究所提供 (分离于云南地区)。

1.2 菌体收集与水解

1.2.1 菌体收集: 在 Bennett 培养基中接种被试菌株, 28℃ 振荡培养 2—3d。过滤或离心收集菌体, 用蒸馏水冲洗二次, 用无水乙醇浸泡过夜。风干收集于水解用安瓿瓶内。

1.2.2 水解: 在以上安瓿瓶中加入适量的 6mol/L HCl, 以浸没菌体为宜, 火焰封口, 120℃ 烘箱中水解 30min, 以水解液呈黑褐色为好。取出冷却备用。

1.3 薄板制备与点样

称取一定量的微结晶纤维素 (E. Merck 产, 上海化学试剂采购供应站进口分装), 按 1

* 国家自然科学基金重大项目课题资助

本系 1991 届毕业生, 现工作单位河北省职工医学院
1994-03-02 收稿

克加3.5ml 蒸馏水充分混匀, 然后在洁净的玻璃板上涂成薄层, 并轻轻振动使之均匀, 过夜风干备用。

在距薄板下沿1cm 处分别点被试菌株水解液0.5 μ l 左右, 另点0.2 μ l 0.01mol 的标准 DAP (Sigma 产, 同时含有 LL-DAP, meso-DAP 和 DD-DAP)。

1.4 展层剂与显色

分别在以下三个溶剂系统中进行, 以选出合适的展层剂:

1. 甲醇: 水: 10N HCl: 吡啶 (32: 7: 1: 4)^[1]
2. 甲醇: 水: 6N HCl: 吡啶 (40: 13: 2: 5)^[4]
3. 甲醇: 水: 冰乙酸: 吡啶 (10: 5: 0.25: 1)^[3]

展层后风干用0.4%水饱和正丁醇茚三酮喷雾加热显色。

2 结果与讨论

经过几个溶剂系统的比较, 在甲醇: 水: 冰乙酸: 吡啶 (10: 5: 0.25: 1) 中可将 DAP 三种异构体和 3-OH DAP 分开。层析标准图谱见图1。

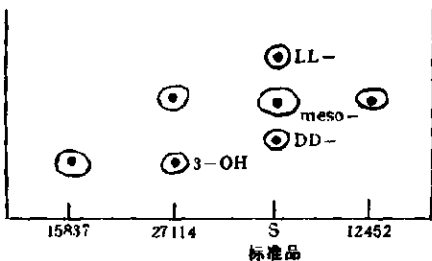


图1 标准品和典型菌株 DAP 组分的层析图谱

在本实验条件下, 测得各种 DAP 异构体的迁移率为, 以 LL-DAP 为1.0, meso-DAP 为0.88, DD-DAP 为0.78, 3-OH DAP 为0.72。由

层析图谱和迁移率上可以看出3-OH DAP 的位置仅比 DD-DAP 的位置略低一点, 两者在实际应用中不易区别。但由于在生物体中不存在 DD-DAP, 所以可以避免两者不易区分的问题, 即在分析被试菌株层析结果时, 在 DD-DAP 位置略下一点出现斑点即为3-OH DAP。

据此得到被试菌株的 DAP 组分结果如表1。根据 Kawamoto 等对小单孢菌 DAP 的分析, 有关典型菌株的组分见表2^[1]。由表1和表2可见, 我们用上述分析方法测得的3-OH DAP 的结果与 Kawamoto 的结果一致, 并与伯杰氏系统细菌学手册中的描述一致^[2]。

表1 被试菌株的 DAP 组分

菌株号	12452	15837	27114	4170	4171	4169	4158	4178
meso-DAP	+	-	+	+	-	+	-	+
3-OH DAP	-	+	+	+	+	+	+	-

表2 Kawamoto 分析的典型菌株的 DAP 组分

菌株号	LL-DAP	meso-DAP	3-OH DAP
15837	-	-	+++
27114	-	±	+++
12542	+	###	-

以上结果证明, 用微结晶纤维素薄层层析法可实现细胞壁中3-OH DAP 的简便快速的分析。用此方法我们对来自云南地区的47株小单孢菌进行了 DAP 异构体及3-OH DAP 的分析, 得到了较好的结果。

参考文献

- [1] Kawamoto I, Oka T, Nara T. J Bacteriol, 1981, 146: 527-534.
- [2] Kawamoto I. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 4, ed. Williams S T et al. Baltimore, The Williams and Wilkins Co. 1987, 2442-2445.
- [3] 王平. 微生物学通报, 1986, 13 (5), 228-231.
- [4] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. J Gen Appl Microbiol. 1983, 29: 319-322.

A RAPID ANALYSIS OF 3-OH DAP IN CELL WALL OF *MICROMONOSPORA*

Wang Yunshan Zhang Yuanliang Chen Liping

(Biology Department, Hebei University, Baoding 071002)

Ruan Jisheng

(Institute of Microbiology, Academic Sinica, Beijing 100080)

Abstract This paper reported a rapid and simple method for analyzing diaminopimelic acid (DAP) isomers and its 3-hydroxy derivative (3-OH DAP) in cell wall of *Micromonospora*. By using thin-layer chromatography on cellulose microcrystalline plates with a solvent system consisting of methanol, water, acetic acid, pyridine (10: 5: 0.25: 1), R_{LL-DAP} was determined: meso-DAP has 0.88, DD-DAP has 0.78, 3-OH DAP has 0.72.

Key words *Micromonospora*, Thin-layer chromatography, 3-Hydroxydiaminopimelic acid