

尼罗红在测定细菌细胞中聚- β -羟基丁酸和其他脂类贮藏物质中的应用

王敬国

(北京农业大学农业资源与环境学院 北京 100094)

摘要 通过对含有 PHB 和非 PHB 脂类贮藏物质(NPLD)的细菌细胞的尼罗红染色和荧光显微观察,证实尼罗红是一种很好的细菌细胞内贮存的脂类物质的荧光染色剂,灵敏度较高。可用于 PHB 和非 PHB 脂类贮藏物质荧光显微观察,并能在一定程度上将两者区分开来。

关键词 尼罗红,聚- β -羟基丁酸,脂类贮藏物质,细菌

在细菌分类中,聚- β -羟基丁酸(简称 PHB)是一个重要的参考依据,它是一种常见的贮藏在细菌细胞内的脂类物质^[1]。现已发现有许多属的细菌可在富碳而某种营养元素发生亏缺的条件下产生 PHB^[2]。在我们的调查中发现,所分离的土壤细菌中 1/3 以上的菌株可在缺氮而富碳的条件下产生 PHB,另有大于 10% 的菌株可在相同的条件下,生产非 PHB 的脂类贮藏物质(简称 NPLD, Non-PHB lipid deposits)^[3]。

作为一种易被微生物分解的生物大分子化合物,PHB 引起了工业界的注意。目前世界上有好几个国家试图利用微生物合成的 PHB 制成易被微生物分解的塑料制品,特别是农用薄膜,以减少使用化学方法合成的塑料制品所造成的环境污染。

在筛选和研究可生产 PHB 细菌的过程中,我们需要简单而准确的方法来观察 PHB 在细胞内的分布并将 PHB 与其他贮藏物质区别开来。相差显微技术难以将 PHB 等脂类贮藏物质和糖原甚至细胞内累积的硫颗粒区分开来。而用苏丹黑^[4]染色费时费工,而且效果并不好^[5]。Ostle 和 Holt^[6]曾提出用尼罗蓝-A,取代苏丹黑。但操作仍嫌繁琐,而且也无法将 PHB 与其他脂类贮藏物质区分开来。

本研究旨在找出一种快速简便的荧光显微技术的方法来探测细菌细胞内的 PHB,并能区分 PHB 与其他脂类贮藏物质。

1 材料和方法

1.1 含有 PHB 等脂类贮藏物质细菌的培养

先将分离的土壤细菌菌株和一个三叶草根瘤菌菌株在酵母菌的浸出液和肉胨培养基上(VP 培养基)培养 5—7 天。收获后将它们分别接种到每升含有葡萄糖、乳糖、果糖、木糖、甘露糖和琥珀酸各 20g 的 50ml Winogradsky 盐溶液中(150ml 三角瓶内)。在摇床上(80r/min)培养两天后,用于 PHB 测定。

1.2 尼罗红溶液的配制

将 10mg 尼罗红试剂溶于 10ml 丙酮中,然后用丙酮稀释 100 倍,得到浓度为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的丙酮溶液,贮存备用。由于尼罗红在水中溶解度很低,为了防止结晶,只是在使用前才稀释至 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

1.3 最佳尼罗红浓度的选择

用水将尼罗红的丙酮溶液稀释至每毫升分别含有 0.01、0.03、0.09、0.15、0.3、0.5 和 $1.0\mu\text{g}$ 尼罗红的 8 种浓度的溶液,用于检查三叶草根瘤菌细胞内的脂类贮藏物质,以确定染色剂尼罗红的最佳浓度。

1.4 染色

将细胞涂于载玻片上,用火焰固定。冷却后加入一滴尼罗红水溶液再在火焰上加热几秒钟,冷却后加盖玻片并置于荧光显微镜下观察(带 12/3 型荧光装置的 Ploemopak Orthoplan 显微镜)。

1.5 PHB 的气相色谱定性和定量

其浸提步骤按修改后的 Findlay 和 White 的方法^[6-7]。即将 1mg 用冻干法干燥后的细菌细胞放入 50ml 烧瓶中。加入 4ml 氯仿,在有回流装置条件下加热至沸腾 2 小时。PHB 经硅胶分离柱分离和用丙酮洗提后,先用酒精,后用乙醚洗涤纯化两次,并在室温条件下通入 N_2 气干燥,再加入 0.2ml 的 $0.004\text{mol}/\text{L}$ 的苹果酸作内标物。再次通 N_2 干燥后,溶于 0.5ml 氯仿中加热 100°C 10 分钟后取出趁热加入 1.7ml 乙醇和 0.2ml 浓 HCl 在同样温度下反应 4 小时,PHB 经过水解和脂化反应成为聚- β -羟基丁酸乙酯。样品冷却后加入 4ml 水和 2ml 氯仿,用以分开有机和无机相。经 5 分钟 $1000\text{r}/\text{min}$ 离心后,将上部无机相溶液弃去,照此步骤每次用 4ml 水洗两次。最后在室温通氮下蒸发至 0.5ml。吸取 $1\mu\text{l}$ 样品,用气相色谱测定。对照标准- β -羟基丁酸乙酯的滞留时间以确定细胞浸出液中聚- β -羟基丁酸乙酯的存在,并用已知的苹果酸乙酯的浓度确定 β -羟基丁酸的量。

1.6 NPLD 的测定

采用 Lambert 和 Moss 的方法^[8],将 1mg 冻干法干燥的细菌细胞经皂化和甲脂化反应后,用乙醚和己烷(1:1)的混合溶剂提取,一定量的 C-17 碳的脂肪酸作为内标准物在甲脂化反应前加入。吸取 $1\mu\text{l}$ 样品用气相色谱测定。对照已知的标准脂肪酸甲脂的滞留时间定性确定脂肪酸的成分,通过校正系数以 C-17 脂肪酸作为标准定量确定各脂肪酸的量,计算细胞接种到高碳培养基之前和接种两天以后细菌细胞脂肪酸含量的增加量,从而得出细菌体内脂类物质的贮存量。

2 结果和讨论

在选择的一系列尼罗红的浓度中,0.09 和 $0.15\mu\text{g}/\text{ml}$ 两个处理为最佳。当浓度低于 $0.09\mu\text{g}/\text{ml}$ 荧光较弱,而高于这个浓度时细胞膜(或细胞壁)上的荧光较强,而且不易分辨脂类贮藏物质的边缘及两个颗粒状贮藏物质之间的界限。

用荧光显微镜观察尼罗红染色后的细菌细胞发现,当细胞内含有 PHB 时有橙色或浅红色的荧光光斑出现,而含有 NPLD 则可见淡黄的荧光斑块出现,这两者是很易区分开来的。除了颜色的差异外,淡黄色光斑多呈圆形或椭圆状,而 PHB 光斑则是不规则形状,

这与其由多块小光斑组成有关。细胞膜(或壁)也会发出暗白色的荧光,而且带有很多亮的但很小的橙色荧光点。而对这些细胞膜(或壁)中 PHB 的浸提和气相色谱分析结果,没有发现有 PHB(小于细胞干重的 0.01%)存在。

表 1 荧光色斑和细菌细胞内 PHB 含量的关系

Table 1 Fluorescence with Nile red stain and PHB accumulation

菌株号 Strain No.	尼罗红染色的荧光斑块 Fluorescence with Nile red stain		PHB 含量 (干重%) PHB content (% DW)	可能的细菌属名 Suggested strain name
	颜色 Color	状况 Visible granules		
48	橙色 orange	++	9.6	<i>Pseudomonas</i> sp.
8	橙色 orange	++	5.7	<i>Pseudomonas</i> sp.
9	浅红色 reddish	+++	21.7	<i>Pseudomonas</i> sp.
16	橙色 orange	++	8.9	<i>Curtobacterium</i> sp.
21	浅红色 reddish	+	16.3	<i>Arthrobacter</i> sp.
23	橙色 orange	+++	31.5	<i>Pseudomonas</i> sp.
24	橙色 orange	++	13.2	<i>Pseudomonas</i> sp.
30	橙色 orange	+	3.2	<i>Bacillus</i> sp.
38	浅红色 reddish	+	4.3	<i>Arthrobacter</i> sp.
39	橙色 orange	++	19.5	<i>Arthrobacter</i> sp.
40	橙色 orange	++	19.6	<i>Aureobacterium</i> sp.
42	浅红色 reddish	+	4.0	<i>Bacillus</i> sp.
49	浅红色 reddish	++	19.8	<i>Bacillus</i> sp.
105a	橙色 orange	+	3.4	<i>Pseudomonas</i> sp.
106	橙色 orange	++	10.3	<i>Pseudomonas</i> sp.
110	橙色 orange	++	6.4	<i>Curtobacterium</i> sp.
111a	橙色 orange	+	3.3	<i>Arthrobacter</i> sp.
115	橙色 orange	+++	22.7	<i>Pseudomonas</i> sp.
116	橙色 orange	+++	20.1	<i>Pseudomonas</i> sp.
123	橙色 orange	++	12.0	<i>Pseudomonas</i> sp.
126	橙色 orange	+	4.5	<i>Curtobacterium</i> sp.
136	橙色 orange	+++	24.6	<i>Pseudomonas</i> sp.

表 1 给出了分离的 22 个土壤细菌菌株的 PHB 含量与尼罗红荧光斑块的大小的关系。当 PHB 在细菌细胞内的含量占细胞干物重的 25% 以上时。可以看到荧光斑块占据了细胞膜内整个部分,同时难以区分单个小光斑,表中以“+++”表示。当 PHB 的重量占干物质的 5% 以下,荧光斑块较小,成为点状,同时单个的发光点易于区分。用符号“+”表示,介于两者之间的荧光斑块既不是占据整个细胞,而又不易区分单个发光点的,用符号

“+++”表示。从“+++”至“++”的过渡不明显。我们曾应用尼罗红染色追踪在饥饿状态下 PHB 在细胞内的变化(未发表资料)发现,开始的三天内 PHB 含量虽然下降了 40%,而光斑的大小变化却不太明显。这是因为当细菌细胞内 PHB 颗粒直径发生微小变化时,虽然肉眼不易区分而实际 PHB 的重量已显著下降。此外,单个颗粒之间的光斑界限不易区分。

表 2 给出了 10 个土壤细菌菌株黄色荧光斑块和非 PHB 的脂类贮藏物质的关系。细胞内非 PHB 的脂类贮藏物质的含量和光斑大小及强度有一定关系,光斑大且强的用符号“+++”表示,光斑大而强度低或者光斑较小而强度高的用“++”表示,光斑小的用“+”表示。

表 2 荧光斑块和非 PHB 脂类贮藏物质之间的关系

Table 2 Fluorescence with Nile red stain and non PHB lipid accumulation

菌株号 Strain No.	尼罗红染色的荧光斑块 Fluorescence with Nile red stain		脂类物质的积累量 (干物重%) Lipid accumulation (% DW)	可能的细菌属名 Suggested strain name
	颜色 Color	状况 Visible granules		
4	淡黄色 yellow	+++	24.1	<i>Pseudomonas</i> sp.
22	淡黄色 yellow	+++	25.3	<i>Pseudomonas</i> sp.
50	淡黄色 yellow	++	13.2	<i>Arthrobacter</i> sp.
102	淡黄色 yellow	++	18.0	<i>Arthrobacter</i> sp.
105	淡黄色 yellow	+	3.9	<i>Arthrobacter</i> sp.
112	淡黄色 yellow	++	13.8	<i>Curtobacterium</i> sp.
118	淡黄色 yellow	+	2.8	<i>Pseudomonas</i> sp.
122	淡黄色 yellow	+++	20.0	<i>Pseudomonas</i> sp.
126	淡黄色 yellow	++	6.5	<i>Curtobacterium</i> sp.
127	淡黄色 yellow	++	7.6	<i>Arthrobacter</i> sp.

尼罗红是一种苯吩嗪酮类化合物(学名为 9-二乙胺基-5-氢-苯并(α)吩嗪-3 酮),在有机溶剂中产生很强的荧光。随着有机溶剂的相对疏水性的变化,其发射的荧光的波长在一定范围内变动。而在水溶液中尼罗红发射荧光的能力受到抑制^[9]。PHB 是糖脂类化合物^[10],而 NPLD 中的一部分可归入中性脂类部分,即可用氯仿从硅胶分离柱上洗脱下来(未发表资料)。同时从电镜照片上发现,PHB 以颗粒状分散在细胞内(每个细胞内有 4—5 个颗粒,多到 7—8 个),而 NPLD 只有一个大的颗粒位于细胞中间。荧光颜色的不同或许反应了这两种脂类物质的疏水性质的差异。

Greenspan 等^[9]曾用尼罗红染色荧光显微技术分析了动物细胞内的脂类贮存物质。我们认为,尼罗红作为一种细菌细胞内脂类贮存物质的染色剂也值得推荐,它的染色方法简便、快速。比尼罗蓝-A 染色要省去不少步骤和时间。也有人认为尼罗蓝-A 中染色的有效成分是尼罗红(粉)^[9]。它是作为副成分存在的。既然如此,直接用尼罗红会更好。

尼罗红在脂类物质荧光显微分析中的应用值得进一步研究。例如在我们用其追踪饥饿状态下细胞中 PHB 变化时观察对照(同菌株但无 PHB 积累(小于干重的 0.01%)的细胞)(未刊资料)发现,细胞膜上的暗红色荧光和发亮的小斑点消失,尽管此时细胞的存活率(平板法)还大于 70%,因为细胞膜或壁上的某些脂类物质是可以被处于饥饿状态的细菌所利用的^[1]。

致谢 本试验得到挪威农业大学生物技术系 Dr. Lars Bakken 帮助,特此致谢

参 考 文 献

- [1] Dawes E A, Ribbons D W. *Bacteriol. Rev.*, 1964, **28**: 126—149.
- [2] Preiss J. Structure, Physiology, and Genetic Adaptability. In: Ed Poindexter J S, Leadbetter E R. *Bacteria in Nature*, Vol 3. New York: Plenum Press, 1989. 189
- [3] Wang J G. *Agri Univ Norway Doctor Scient.*, 1991, (3): 49—63.
- [4] Burdon K L. *J. Bacteriol.*, 1946, **52**: 665—678.
- [5] Ostle A G, Holt J G. *Appl Environ Microbiol.*, 1982, **44**: 228—241.
- [6] Findlay R H, White D C. *J. Microbiol. Methods*, 1987, **6**: 113—120.
- [7] Findlay R H, White D C. *Appl Environ Microbiol.*, 1983, **45**: 71—78.
- [8] Lambert M A, Moss C W. *J. Clinical Microbiol.*, 1983, **18**: 1370—1377.
- [9] Greenspan P et al. *Cell Biol.*, 1985, **100**: 965—973.
- [10] Oliver J D, Stringer A F. *Appl Environ. Microbiol.* 1984, **47**: 461—466.

NILE RED, A SUPERIOR FLUORESCENCE STAIN FOR DETECTION OF PHB AND OTHER LIPID DEPOSITS IN BACTERIAL CELLS

Wang Jingguo

(College of Agricultural Resources and Environmental Sciences
Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract Nile red, a benzophenoxazone stain was attempted for microscopical observation of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and other lipid deposits in bacterial cells. Two kinds of the lipids were distinct to some extent with fluorescence microscopy after Nile red staining. As a superior fluorescence stain, its potential for lipid detection in bacterial cells deserves further exploration.

Key words Nile red, Poly- β -hydroxybutyric acid, Lipid storage material, Bacteria