

野油菜黄单胞菌原生质体分泌黄原胶的电镜观察

刁虎欣 梁兴杰 梁凤来 刘如林

(南开大学微生物系 天津 300071)

摘要: 经透射电镜观察首次发现野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 原生质体在以蔗糖为底物的高渗营养液中, 能合成并分泌丝状黄原胶。

关键词: 野油菜黄单胞菌原, 原生质体, 黄原胶

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0018-03

STUDY ON SECRETED XANTHAN BY THE PROTOPLAST OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*

DIAO Hu-Xin LIANG Xing-Jie LIANG Feng-Lai LIU Ru-Lin

(The department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract: we first find that the protoplast of *Xanthomonas campestris* can synthesize and secrete Xanthan in the high permeable nutrition containing sucrose as substrate.

Key word: *Xanthomonas campestris*, Protoplast, Xanthan

黄原胶 (Xanthan) 是野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 合成并分泌的一种用途十分广泛的微生物胞外多糖。研究发现, 处于对数生长期的菌体细胞不合成分泌丝状黄原胶, 只有终止生长的细胞才合成分泌丝状黄原胶^[1-3]。控制菌体细胞壁多糖和黄原胶胞外多糖合成的共同的糖基载体脂是存在于细胞膜的十一聚类异戊二烯醇磷酸脂^[1]。膜内该物质含量甚微时, 首先用于胞壁多糖合成促使细胞生长, 待细胞终止生长后才用于黄原胶合成。最新研究表明^[4], 黄原胶分子是在终止生长的菌体细胞膜的糖基载体脂上合成的, 糖基载体脂将其运往膜外, 使细胞分泌丝状黄原胶。据此, 我们认为人工制备的无生长能力的野油菜黄单胞菌原生质体, 在适宜的高渗营养液中培养, 能合成并分泌丝状黄原胶。但该研究国内外尚未见报道。我们在制备原生质体的基础上, 进行了其黄原胶合成与分泌的初步探讨, 本文报道其结果。

1 材料与方 法

1.1 菌种

野油菜黄单胞菌 (*X. campestris*) N.K-01, 由南开大学微生物系分离并保存。

1.2 液体培养基与培养条件

培养基: 蔗糖 10g, 蛋白胨 5g, 牛肉膏 3g, 酵母膏 1g, 蒸馏水配制定容 1L, pH7.0。培养条件: 250mL, 锥形瓶分装 50mL, 8层纱布扎瓶口, 灭菌。接种 N. K-01 菌苔 5 环, 置于 220r/min 旋转摇床 28℃ 培养 16h, 菌体细胞处于对数生长期, 不合成分泌黄原胶。培养至 24h, 合成并分泌黄原胶。

1.3 原生质体制备与高渗培养液培养

将处于对数生长期且不合成分泌黄原胶的 N. K-01 菌体细胞, 用 0.05mol/L EDTA 和 0.1% SDS 处理, 溶解除外壁层脂多糖, 用高渗溶液悬浮菌体细胞, 加入 10 μ g/mL 溶菌酶液, 30 $^{\circ}$ C 酶解 30min, 溶解消化内壁层肽聚糖离心收集原生质体。将未合成分泌黄原胶的, 原生质体置于以蔗糖为底物的高渗培养液培养中, 70r/min、28 $^{\circ}$ C 振荡培养 72h, 用透射电镜观察该原生质体是否合成分泌黄原胶。

1.4 透射电镜观察

将制备的各种待观察样品, 用重蒸水适当稀释, 沾铜网, 7 $^{\circ}$ 角真空喷镀钨钛合金, 或用钼酸铵负染色, 用透射电镜观察。

2 结果

2.1 处于对数生长期菌体细胞与终止生长菌体细胞透射电镜观察结果

图 1 是两类不同菌体细胞经钼酸铵负染色透射电镜显微照片。从图 1A 看到, 处于对数生长期分裂的菌体细胞不合成分泌丝状黄原胶; 而从图 1B 看到, 对数生长期后终止分裂的菌体细胞合成分泌丝状黄原胶。

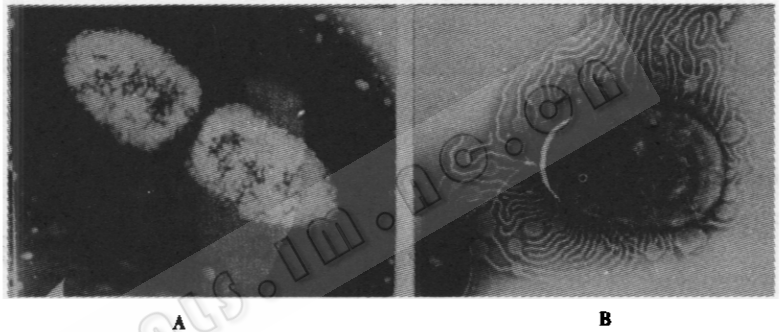


图 1 两类不同菌体细胞钼酸铵负染色透射电镜观察结果

- A 对数生长期分裂的菌体细胞不合成分泌黄原胶 (X18000),
B 对数生长期后终止分裂的菌体细胞合成分泌黄原胶 (X140000)

2.2 原生质体透射电镜观察结果

图 2A 是对数生长期菌体细胞原生质体钼酸铵负染色透射电镜显微照片; 图 2B 是该类原生质体在蔗糖为底物的高渗培养液中继续振荡培养后, 其原生质体 7 $^{\circ}$ 角真空喷镀钨钛合金后透射电镜显微照片。从图 2A 看到, 对数生长期菌体细胞原生质体不合成分泌黄原胶。而该类原生质体在蔗糖为底物的高渗培养液中继续培养能合成分泌丝状黄原胶, 如图 2B 所示。

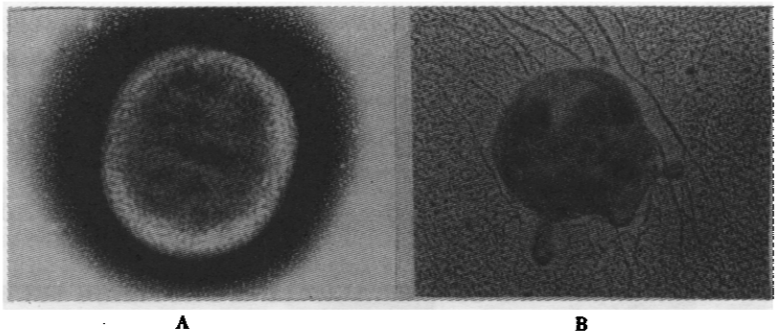


图 2 原生质体透射电镜观察结果

- A 对数生长期菌体细胞原生质体不合成分泌黄原胶 (X43000),
B 原生质体在蔗糖高渗培养液中继续培养合成分泌黄原胶 (X23000)

3 讨论

处于对数生长期的野油菜黄单胞菌不合成分泌黄原胶,只有终止生长后才合成分泌黄原胶。这是因为对数生长的菌体细胞,其膜内的糖基载体脂只用于脂多糖、肽聚糖等细胞壁组分的合成,而不用于胞外多糖黄原胶的合成。只有终止生长后,糖基载体脂才用于黄原胶合成。

野油菜黄单胞菌是 G^- 细菌,细胞壁主要由脂多糖和肽聚糖组成。先由 EDTA 和 SDS 消化脂多糖,再用溶菌酶在适宜条件下去除肽聚糖是制备原生质的好方法。

本研究首次发现野油菜黄单胞菌原生质在蔗糖为底物的高渗培养液中继续培养,合成并分泌黄原胶。这一发现,不仅直观地证明了 Leipi L 等提出的黄原胶分子在膜内糖基载体脂上合成并从膜内运送到膜外的科学论断,而且证明原生质体失去合成细胞壁能力后其膜内的糖基载体脂完全用于胞外多糖黄原胶的合成,故原生质体合成分泌黄原胶。

参 考 文 献

- [1] Sutherland I W. *Advance in microbial Physiology*, 1982, 18: 143 ~ 213.
- [2] 刁虎欣, 梁凤来, 刘如林, 等. *南开大学学报*, 1988, 2: 34 ~ 43.
- [3] 刁虎欣, 赵大健. *微生物学杂志*, 1990, 10 (12): 136 ~ 141.
- [4] LeiPi L, Couso R, DanKERT M. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175 (9): 2490 ~ 2500