

# 一株细菌儿茶酚型铁载体分泌的影响因素研究\*

谢小军 王敬国\*\*

(中国农业大学资源与环境学院农业部植物营养学重点实验室 北京 100094)

**摘要:** 采用两种新的高分辨率的薄层层析 (TLC) 方法对一株土壤细菌 S1 在 3 种不同培养基上产生的儿茶酚型铁载体进行了分析。结果表明: 不同培养基对铁载体的产生影响较大, 在 3 种不同的培养基上菌株 S1 产生不同的儿茶酚铁载体, 其中仅在 1 种培养基上 S1 能够分泌 2, 3-二羟基苯甲酸 (2, 3-DHBA)。同时, 还分析了  $Al^{3+}$  对 S1 分泌的儿茶酚型铁载体总量的影响, 结果表明:  $Al^{3+}$  能显著刺激铁载体的分泌, 并且能抵消一定浓度范围内的  $Fe^{2+}$  对铁载体分泌的抑制作用, KMB 培养液中产生的 4 种儿茶酚铁载体中有 3 种和  $Al^{3+}$  有较强的螯合力。

**关键词:** 土壤细菌, 儿茶酚型铁载体, 2, 3-二羟基苯甲酸 (2, 3-DHBA),  $Al^{3+}$

**中图分类号:** Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0105-05

## Study on Effect Factor of the Production of Catechol-type Siderophores Secreted by a Strain of Soil Bacteria\*

XIE Xiao-Jun WANG Jing-Guo\*\*

(MOA Key Laboratory of Plant Nutrition, College of Natural Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract:** Catechol-type siderophores secreted by a strain of soil bacteria in three different medium were assayed by two high-resolution TLC. The results showed different medium had a significant effect on the secretion of catechol-type siderophores, and in three different medium strain S1 produced different catechol-type siderophores. The effect of  $Al^{3+}$  on Catechol-type siderophores by S1 were also assayed. The results showed  $Al^{3+}$  had a significant stimulation on the secretion of catechol-type siderophores. Moreover,  $Al^{3+}$  could to some extent counteract the repression of  $Fe^{2+}$  on siderophores production. In KMB medium four catechol-type siderophores were identified and all ones except for 2, 3-dihydroxybenzoic acid (2, 3-DHBA) had high affinity for  $Al^{3+}$ .

**Key words:** Soil bacteria, Catechol-type siderophores, 2, 3-dihydroxybenzoic acid (2, 3-DHBA), Thin layer chromatography (TLC),  $Al^{3+}$

铁载体 (Siderophores) 是包括细菌和真菌在内的几乎所有好氧和兼性厌氧的微生物在铁胁迫条件下向环境分泌的对  $Fe^{3+}$  具有极高亲和力 (形成常数为  $10^{20} \sim 10^{50}$ ) 的小分子量 (500 ~ 1, 500 D) 有机化合物, 这些化合物所起的作用是帮助微生物从环境中获取必需的铁元素, 现在的一些研究表明, 铁载体不光对微生物的铁营养至关重要, 而且它是根际促生细菌 (PGPR) 抑制土传病害的重要机制, 另外, 铁载体还在某些动植物病原菌的致病性等诸多方面起着作用<sup>[1,2]</sup>。按照铁螯合基团的不同, 铁载体主要分为异羟肟酸和儿茶酚型两大类, 后者主要是一些 2, 3-二羟基苯甲酸 (2, 3-DHBA) 的

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30270768)

Project Granted by Chinese National Science Fund (No. 30270768)

\*\* 通讯作者 Tel: 010-62733449, E-mail: wangjg@cau.edu.cn

收稿日期: 2005-04-27, 修回日期: 2005-06-28

简单衍生物, 它们的共同结构特点就是 2, 3-DHBA 的羧基上连有 1~3 个氨基酸<sup>[3]</sup>。现在发现一些细菌能分泌不止一种铁载体, 儿茶酚型铁载体分泌细菌也有类似报道<sup>[3]</sup>, 但这些铁载体是组成型的分泌是否随培养条件的改变而变化? 关于这方面的研究报道很少。本试验采用两种新的高分辨率的薄层层析 (TLC) 方法对一株土壤细菌在不同培养基上分泌的儿茶酚型铁载体进行了分析, 以期为这一问题的回答提供一些依据。此外, 铁载体的分泌量受到诸如铁营养、碳源等很多因素的影响<sup>[4]</sup>, 现在发现一些金属离子也能影响铁载体的分泌,  $Al^{3+}$  是一种电荷数和离子半径与  $Fe^{3+}$  颇为相似的离子, 本试验分析了它对这株土壤细菌菌株分泌儿茶酚型铁载体总量的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

S1, 本试验室分离自土壤, 经鉴定为 *Erwinia* sp., 该菌株儿茶酚铁载体分泌能力极强。

### 1.2 玻璃仪器及接种器械

本试验使用到的玻璃器皿均用浓盐酸溶液浸泡 1 昼夜, 然后用去离子水清洗。避免使用铁制器械, 接种采用铂金丝接种针。

### 1.3 产铁载体的无铁培养液

1.3.1 KMB 培养液: 甘油 15 mL, (无铁) 酸水解酪蛋白 5 g,  $K_2HPO_4$  2.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2.5 g, 双蒸水定容至 1,000 mL, pH 自然。

1.3.2 去掉甘油的 KMB 培养液 (GDM): (无铁) 酸水解酪蛋白 5 g,  $K_2HPO_4$  2.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2.5 g, 双蒸水定容至 1,000 mL, pH 自然。

1.3.3 合成培养液 (SM): 葡萄糖 5g,  $(NH_4)_2HPO_4$  1g,  $K_2HPO_4$  4 g,  $KH_2PO_4$  2.7 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g, 双蒸水定容至 1,000 mL, pH 自然。

### 1.4 层析样品制备

将接种后的各培养液于 25 °C、150 r/min 振荡培养 36 h, 离心去除菌体, 用 HCl 将各培养液调 pH 至 2, 再用等体积的乙酸乙酯分 3 次萃取 (儿茶酚型铁载体可进入有机相) 后用旋转蒸发仪在 60 °C 下适当浓缩。

### 1.5 薄层层析分析

1.5.1 层析材料: 硅胶 G 板 (青岛海洋化工厂), 聚酰胺薄膜 (浙江台州路桥四甲生化塑料厂)。

1.5.2 展层剂: (1) 苯: 甲苯: 醋酸 (2:2:1, 体积比), (2) 正丁醇: 醋酸: 水 (12:3:5, 体积比), 展层剂 1、2 分别适合硅胶和聚酰胺。

1.5.3 显色剂: Arnow 试剂<sup>[5]</sup>, 用以检测儿茶酚基团。

### 1.6 铁载体纯品的制备

在展层完毕后的部分聚酰胺薄膜上喷显色剂, 根据  $R_f$  值, 将未显色部位的铁载体相应条带抠下溶于甲醇, 随后弃去聚酰胺颗粒, 在真空离心浓缩仪中将甲醇挥干, 向样品中加入少量双蒸水备用。

### 1.7 铁载体核心结构及性质分析

1.7.1 铁螯合能力的分析: 将铁载体纯品与 CAS 检测液<sup>[6]</sup>混合, 观察是否发生显色反应。

1.7.2 铁载体结构分析: 将铁载体纯品在 6 mol/L HCl 于 110 °C 酸解 20 h, 酸解液用乙酸乙酯萃取, 适当浓缩后在硅胶板上层析分析是否有 2,3-DHBA 游离出, 水相采用

纸层析、茚三酮显色鉴定氨基酸<sup>[7]</sup>。

### 1.8 $Al^{3+}$ 对铁载体分泌总量的影响

$Al^{3+}$  以  $Al_2(SO_4)_3$  的形式添加到 KMB 培养液中, 使  $Al^{3+}$  终浓度分别为 0, 10, 20, 50, 200  $\mu\text{mol/L}$ 。在加有 200  $\mu\text{mol/L}$   $Al^{3+}$  的 KMB 培养液中以  $FeSO_4$  的形式加入  $Fe^{2+}$ , 使  $Fe^{2+}$  终浓度分别为 0, 1, 5, 20, 100  $\mu\text{mol/L}$ 。将 KMB 培养液接种培养后适当稀释培养液, 在 600 nm 处测定菌悬液的光密度 (OD) 值, 用此值代表细菌生长量。将培养液离心去除菌体, 上清液按 Arnow<sup>[5]</sup> 方法比色测定儿茶酚铁载体的数量。为了检测铁载体与  $Al^{3+}$  的螯合性, 将铁载体纯品与等量  $Al^{3+}$  替换的 CAS 检测液<sup>[8]</sup> 反应。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养基对铁载体分泌的影响

从层析结果 (图 1, 表 1) 看, 在两种 TLC 中仅样品 KMB 中有与 2,3-DHBA 具有相同  $R_f$  的斑点, 为进一步确证该物质确为 2,3-DHBA, 从硅胶薄层层析板上抠下该物质于高纯水中进行紫外扫描 (Shimadzu UV-2201), 其扫描图谱 (图 2) 与标准品 2,3-DHBA 完全吻合, 可见这个物质毫无疑问是 2,3-DHBA, 这表明菌株 S1 在 KMB 培养液中能分泌 2,3-DHBA 而在其它两种培养液中不分泌该物质。已有研究表明 2,3-DHBA 是一些儿茶酚铁载体的前体物质<sup>[9]</sup>, 但也有细菌直接以它作为铁载体, 尽管该物质对  $Fe^{3+}$  的螯合力很低<sup>[10]</sup>。

表 1 铁载体样品层析分析结果

样品	$R_f$ (硅胶 G)	$R_f$ (聚酰胺)
KMB	0; 0.73	0.32; 0.42; 0.66; 0.83
GDM	0	0.64; 0.87
SM	0	0.64; 0.81
标准品 2,3-DHBA	0.73	0.66

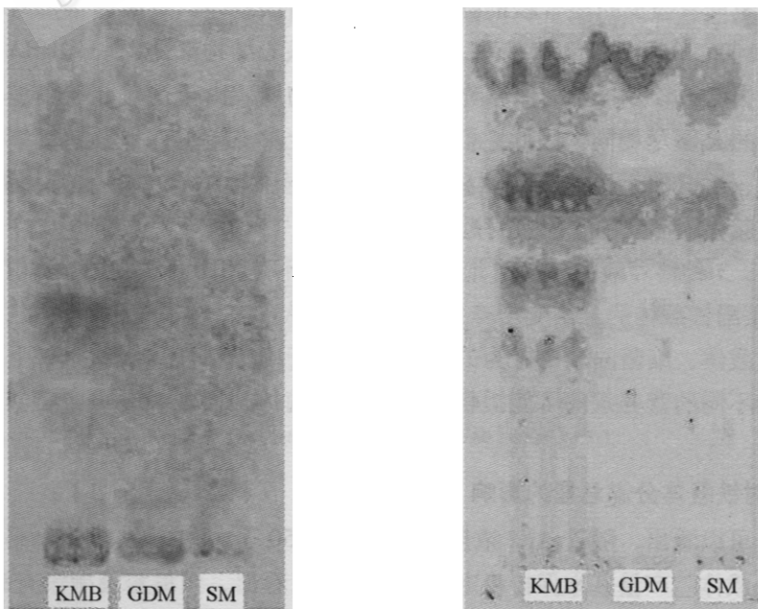


图 1 S1 不同培养基上分泌的儿茶酚铁载体的硅胶 (左) 和聚酰胺 (右) 薄层层析分析结果

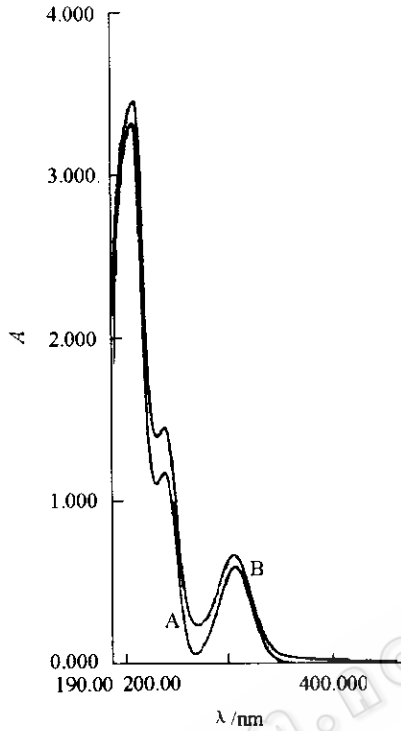


图2 样品 KMB 中纯化物的紫外扫描图谱

在聚酰胺层析中，样品 KMB 除 2, 3-DHBA 外还有 3 个带有儿茶酚基团的阳性斑点 (图 1, 表 1)，其它两种样品也有两个阳性斑点，这些斑点很可能都是真正的儿茶酚型铁载体，为了证实这一推论，铁载体核心结构及性质被分析，结果显示所有物质均能与 CAS 溶液发生显色反应，由于 CAS 溶液只与对  $Fe^{3+}$  具有高亲和性的物质发生反应，因此这些物质具有强大的螯合铁的能力，能够充当铁载体。在酸解液的有机相和水相中分别检测到 2, 3-DHBA 和氨基酸，显示它们的核心结构都是 2, 3-DHBA 且带有氨基酸，这是一类已被较多报道的能够充当铁载体的物质。由于这些儿茶酚型铁载体在聚酰胺薄膜上的  $R_f$  不尽相同，因此它们肯定在结构上存在差异，但其精细结构的鉴定尚需核磁共振、质谱等手段的分析。硅胶薄层层析显然不适合分析这类儿茶酚铁载体，因为这些铁载体全都集中于原点附近。

很明显，3 种培养液中分泌的儿茶酚铁载体并不是相同的铁载体，这清楚地显示了菌株 S1 儿茶酚铁载体的分泌受培养条件的影响极大，在不同的条件下，它们分泌不同的儿茶酚铁载体，细菌的这一行为的意义或许在于确保在任何限铁条件下都能分泌铁载体，因为不同的营养条件可能提供不同的合成前体，而自然环境中营养条件是变异多端的。

## 2.2 $Al^{3+}$ 对铁载体分泌总量的影响

从图 3 可以看出，随着  $Al^{3+}$  浓度从 0 提高到  $50 \mu mol/L$ ，铁载体分泌总量急剧增加，随后铁载体总产量基本保持稳定。从图 4 可以看出，当培养液中没有铝离子时， $5 \mu mol/L Fe^{2+}$  就可以完全抑制铁载体的产生，当存在  $200 \mu mol/L Al^{3+}$  时，同样数量  $Fe^{2+}$

的加入仍有大量铁载体分泌,直到培养液中含有  $20 \mu\text{mol/L Fe}^{2+}$  时,铁载体的分泌才不能被检测到。由这些结果显而易见  $\text{Al}^{3+}$  对儿茶酚铁载体有显著地刺激作用,并且能抵消一定浓度范围内的  $\text{Fe}^{2+}$  对铁载体的抑制作用。

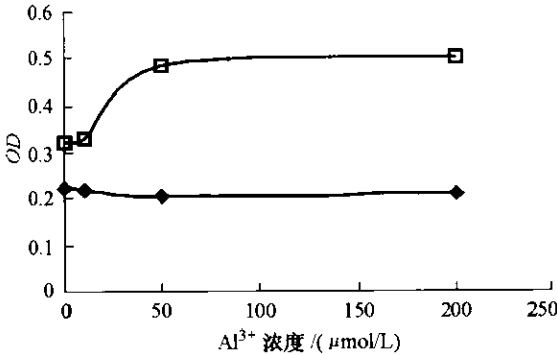


图3  $\text{Al}^{3+}$  对铁载体分泌的影响

—◆— 细菌生长量, —□— 铁载体产量

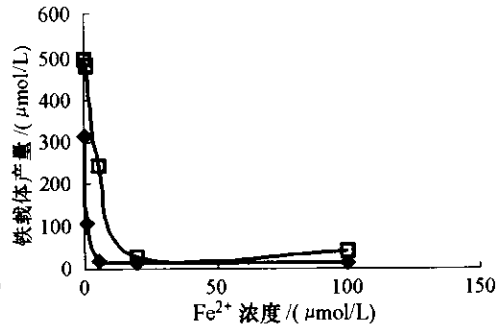


图4  $\text{Al}^{3+}$  对  $\text{Fe}^{2+}$  抑制铁载体分泌的抵消作用

—◆— 未添加铝离子, —□— 添加铝离子

为什么  $\text{Al}^{3+}$  能够刺激铁载体的分泌? 一些研究发现某些铁载体还能同除  $\text{Fe}^{3+}$  外的如  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  等金属离子形成螯合物<sup>[2]</sup>, 因此这些金属离子可以和  $\text{Fe}^{3+}$  竞争铁载体上的结合位点, 这样或许就迫使细菌不得不分泌更多的铁载体来尽量保障获取铁的能力不受影响, 为了证实菌株 S1 分泌的儿茶酚铁载体的确和  $\text{Al}^{3+}$  有较高的亲合性, 将儿茶酚铁载体纯品与  $\text{Al}^{3+}$  替换的 CAS 检测液反应, 除 2, 3-DHBA 外的其它 3 种儿茶酚物质均能与其发生显色反应,  $\text{Al}^{3+}$  替换的 CAS 检测液只与对  $\text{Al}^{3+}$  具有高亲合性的物质发生反应, 表明这 3 种儿茶酚铁载体不仅对  $\text{Fe}^{3+}$  而且对  $\text{Al}^{3+}$  也有强大的螯合能力, 这一定程度上间接支持了前面的推论。但本试验中具体到每种铁载体的分泌情况则需要进一步研究, 此外,  $\text{Al}^{3+}$  能否被儿茶酚铁载体介导运输以及细菌可否通过铁载体螯合  $\text{Al}^{3+}$  以达到减轻铝毒的目的, 这些都是值得进一步探讨的有趣问题。

## 参考文献

- [1] Neilands J B. J Biol Chem, 1995, **270**: 26723 ~ 26726.
- [2] Neilands J B. Ann Rev Biochem, 1981, **50**: 715 ~ 731.
- [3] Barton, Larry L. Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms, Academic Press, 1993. 3 ~ 26.
- [4] Abd-Alla M H. Eur J Soil Biol. 1998, **34**: 99 ~ 104.
- [5] Barton, Larry L. Iron Chelation in Plants and Soil Microorganism, Academic Press, 1993. 27 ~ 72.
- [6] Schwyn B, Neilands J B. Anal Biochem, 1987, **160**: 47 ~ 56.
- [7] 陈钧辉, 陶力, 李俊, 等. 生物化学实验. 北京: 科学出版社, 1994. 83 ~ 86
- [8] Roy N, Chakrabarty P K. Curr Microbiol, 2000, **41**: 5 ~ 10.
- [9] Chen Q, Actis L A, Tolmasek M E, et al. J Bacteriol, 1994, **176**: 4226 ~ 4234.
- [10] López-goni I, Moriyon I, Neilands J B. Infect Immunity, 1992, **60**: 4496 ~ 4503.