

利用氨基酸分子比鉴别放线菌胞壁类型的研究

白林泉 袁德军 胡传炯 梁蓉芳 周 启

(华中农业大学微生物系 武汉 430070)

周平贞

(中国农科院油料作物研究所 武汉 430062)

摘要 对已知胞壁为 I、II、III 和 IV 型的 21 株(10 属)放线菌进行了胞壁氨基酸组分的分析。结果表明,所有被检测菌株的胞壁在氨基酸分析仪上均显示有谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸和二氨基庚二酸(DAP)。而同一种胞壁类型的菌株,尽管是不同的种或属,氨基酸的总量也各不相同,但这 4 种氨基酸的分子比却有一个共同而稳定的相似比值,不同的胞壁类型则有不同的比值。从而使每种胞壁类型具有各自的特征,可以作为鉴别的一种有效指标。实验还发现,4 株胞壁为 III 型的弗兰克氏菌以及 IV 型的 1 株诺卡氏菌和 1 株地中海拟无枝酸菌,在薄层层析中除显示有 meso-DAP 外,尚有甘氨酸;但它们的氨基酸分子比却与 II 型菌株完全不同,分别与 III 型和 IV 型菌株相似。这表明,采用分子比鉴别胞壁类型更为精确可靠。

关键词 胞壁组分,氨基酸分析,薄层层析,放线菌

自从 1971 年 Lechevalier 等采用 Cummins 和 Harris 创立的胞壁化学分析方法将放线菌划分为 9 个胞壁类型和 4 个糖型,并以形态特征和细胞化学组分相结合的分类指标进行属的划分以来^[1],引起大多数放线菌分类学家的重视并得到广泛采用。但是随着研究工作的深入,特别在胞壁氨基酸组分上不断出现一些异常现象。例如,胞壁 II 型的小单胞菌除了显示有 meso-DAP 和甘氨酸外,有些菌株还出现 LL-DAP 或 30H-DAP,有的菌株甚至只含有 30H-DAP 等^[2,3]。胞壁 III 型的小四孢菌(*Microterraspora*)^[4]和弗兰克氏菌(*Frankia*)^[5]的某些菌株除 meso-DAP 外还出现有甘氨酸等。从而使胞壁类型难以划分。为了有效而确切的划分胞壁类型,我们采用氨基酸分析仪定量检测胞壁的氨基酸,研究它们的分子比作为确定胞壁类型的指标。

1 材料和方法

1.1 试验菌株名称及来源

紫色直丝链霉菌 AS 4.398 (*Streptomyces violace*

orectus)¹⁾, 白色链霉菌 AS 4.121 (*S. albus*)¹⁾, 黄色长孢链霉菌 AS4.443 (*S. longisporoflauius*)¹⁾, 青色链霉菌 AS4.645 (*S. glaucus*)¹⁾, 黑化链霉菌 AS4.162 (*S. nigrificans*)¹⁾, 双轮丝链轮丝菌 AS4.234 (*Streptovorticillium bivorticillatum*)¹⁾, 吸水孢囊放线菌 SH113 (*Actinosporangium hygrosopicus*)²⁾, 青铜小单孢菌 AS4.1050 (*Micromonospora chalcea*)¹⁾, 弗兰克氏菌 CS025 (*Frankia* sp. Cs025)²⁾, 弗兰克氏菌 Cs241 (*Frankia* sp. Cs241)²⁾, 弗兰克氏菌 Cs631 (*Frankia* sp. Cs631)²⁾, 玫瑰小双孢菌 A2000 (*Microbispora rosea*)³⁾, 链孢囊菌 A014 (*Streptosporangium* sp.)²⁾, 弗兰克氏菌 Hr18 (*Frankia* sp. Hr18)⁴⁾, 弗兰克氏菌 Mg⁺ (*Frankia* sp. Mg⁺)⁴⁾, 弗兰克氏菌 AirI₂ (*Frankia* sp. AirI₂)³⁾, 弗兰克氏菌 Cs155 (*Frankia* sp. Cs155)²⁾, 干草小多孢菌 A509 (*Micropolyspora faeni*)³⁾, 诺卡氏菌 A016 (*Nocardia* sp. A016)²⁾, 诺卡氏菌 N01 (*Nocardia* sp. N01)²⁾, 地中海拟无枝酸菌 053 (*Amycolatopsis mediterranei*)³⁾。其中 1) 中国科学院微生物研究所; 2) 本室保藏; 3) 邓子新提供; 4) 中国科学院沈阳应用生态研究所; 5) 周

1996-01-18 收稿

平贞提供。

1.2 胞壁氨基酸组分的分析方法

将试验菌株中的 *Frankia* 接种在 Bap 培养基^[5] 中, 28 °C 静止培养 2 ~ 4 周, 其它放线菌菌株在 H 培养基^[6] 中 28 ~ 30 °C 摇瓶培养 2d 后, 离心收集菌丝体, 用 20% 甘油离心洗涤两次, 在 -20 °C 冰箱中保存备用。

取上述湿菌丝体 200mg, 除 *Frankia* 菌株需预先在匀浆器内研磨外, 其它菌株直接加入 1ml 5%(W/V) 的 korl 进行碱法处理^[7] 制成纯细胞壁, 加入 0.5ml 6mol/L HCl 转入安瓿瓶, 在 121 °C 水解 20min。打开安瓿瓶, 将样品倒在 5ml 小烧杯中赶尽盐酸即成细胞壁水解物。

采用日立 835-50 型氨基酸自动分析仪检测水解物的氨基酸。

1.3 胞壁氨基酸定性分析方法

将纯细胞壁水解物 and 对照标准品(D, L-2, 6-DAP, Sigma 产品) 点样到微晶纤维素 (Merck, 2330) 制成的薄板上, 在展层剂为甲醇:吡啶:冰醋酸:水(10:1:0.25:5) 中展层, 用 0.3% 茚三酮溶液显色。

2 结果

2.1 胞壁氨基酸的定量分析

胞壁水解物在氨基酸自动分析仪上的检测结果表明, 在所有 21 个菌株的胞壁水解物中不管它们属于那一种胞壁类型, 均显示有 4 种氨基酸, 即谷氨酸(GLU)、甘氨酸(GLY)、丙氨酸(ALA) 和二氨基庚二酸(DAP)。结果见图 1 和表 1。

从表 1 列出不同菌株细胞壁中含有 4 种氨

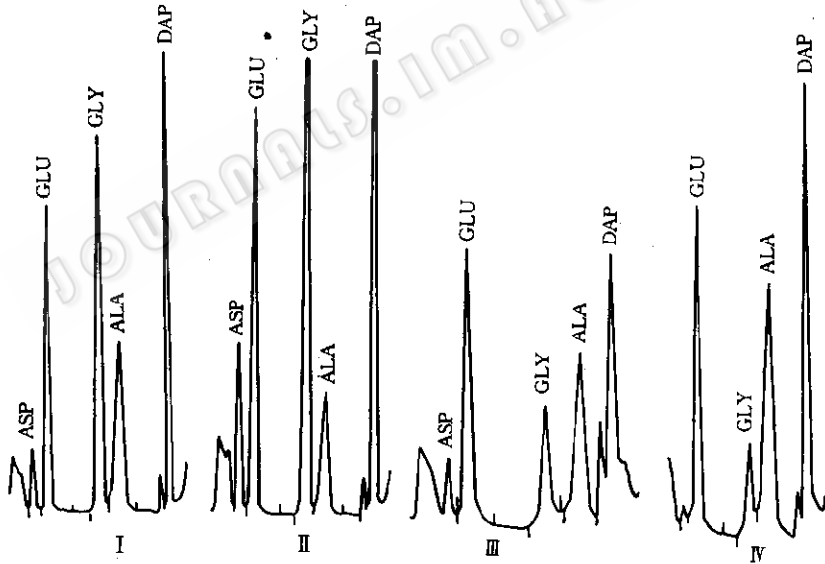


图 1 胞壁氨基酸分析图谱

I 型 (*S. glaucus*) II 型 (*M. chalybea*) III 型 (*M. rosea*) IV 型 (*N. sp. N01*)

基酸的量及其分子比可以看出, 属于同一种胞壁类型的检测菌株, 尽管是不同的种或属, 氨基酸的总量也很不相同, 却都有一个共同而稳定的相似比值(分子比), 不同的胞壁类型则有不同的比值, 显示出每种胞壁类型具

有各自的特征。例如, 胞壁 I 型的菌株, 若以 DAP 的摩尔数为 1 来换算其它三种氨基酸的相对比值时, 则 4 种氨基酸的分子比约为 0.7 : 0.7 : 1.0 : 1.0 (谷氨酸:甘氨酸:丙氨酸:二氨基庚二酸, 下同); II 型菌株为 0.8 : 0.8 : 0.6 : 1.0;

III型和IV型菌株则分别为0.8 : 0.2 : 1.4 : 1.0和0.8 : 0.3 : 1.3 : 1.0。其中II型菌株的甘氨酸含量最高, I型次之, III、IV型菌株最

低; 丙氨酸的含量则相反, III、IV型最高, I型次之, II型最低。

表1 放线菌胞壁中的氨基酸组分

菌名	胞壁类型	氨基酸含量(n mol / 100mg 湿菌体) ¹⁾				分子比 ²⁾			
		GLU	GLY	ALA	DAP	GLU	GLY	ALA	DAP
AS 4.398	I	17.212	18.043	26.580	24.874	0.693	0.726	1.069	1.000
AS 4.121	I	33.487	34.954	50.770	48.896	0.685	0.715	1.038	1.000
AS 4.443	I	36.795	36.573	53.974	53.798	0.721	0.680	1.003	1.000
AS 4.645	I	10.664	10.503	14.432	14.166	0.753	0.741	1.019	1.000
AS 4.162	I	19.650	19.831	29.959	27.512	0.714	0.721	1.089	1.000
AS 4.234	I	19.312	18.419	32.482	28.343	0.681	0.650	1.146	1.000
SH 113	I	14.181	15.413	25.820	22.283	0.636	0.692	1.159	1.000
AS4.1050	II	13.901	17.437	10.144	19.551	0.711	0.892	0.519	1.000
CS 025 ³⁾	II	78.060	81.936	63.588	99.296	0.786	0.825	0.640	1.000
CS 241 ³⁾	II	14.654	15.208	11.323	19.342	0.758	0.786	0.585	1.000
CS 631 ³⁾	II	74.388	85.572	64.716	98.812	0.753	0.866	0.655	1.000
A 2000	III	5.809	2.475	7.817	6.567	0.885	0.377	1.190	1.000
A 014	III	4.140	1.484	7.093	6.292	0.658	0.236	1.127	1.000
Hr 18	III	22.572	5.176	54.092	34.624	0.652	0.149	1.562	1.000
Mg ⁺	III	25.140	8.720	38.423	30.671	0.820	0.284	1.253	1.000
Air ₁	III	30.984	4.012	66.214	37.862	0.818	0.106	1.745	1.000
CS 155	III	61.390	16.790	105.250	82.670	0.743	0.203	1.273	1.000
A 509	IV	18.934	6.340	30.948	20.810	0.910	0.305	1.487	1.000
A 016	IV	40.364	24.126	63.743	62.046	0.651	0.389	1.027	1.000
N 01	IV	10.128	2.488	17.686	12.594	0.804	0.198	1.404	1.000
053	IV	15.680	4.242	19.714	17.826	0.880	0.238	1.106	1.000

1) GLU = 谷氨酸; GLY = 甘氨酸; ALA = 丙氨酸; DAP = 二氨基庚二酸

2) 以DAP的摩尔数为1换算各氨基酸的相对比值

3) 见文献[5]

2.2 胞壁氨基酸的定性分析

将细胞壁或全细胞的水解物分别通过薄层层析进行氨基酸或糖的定性分析。结果表明(表2), 胞壁属于I型和II型菌株的薄层层析结果与它们各自已知的特征是完全一致的。即

I型含有LL-DAP和甘氨酸, II型则含有meso-DAP和甘氨酸。但是在III型和IV型菌株的结果却有一些差别。例如, 在检测的6株III型菌株和4株IV型菌株中, 除了都含有meso-DAP及IV型还含有阿拉伯糖和半乳糖

表2 放线菌细胞壁组分

菌名	胞壁类型	DAP		甘氨酸	阿拉伯糖	半乳糖
		LL-	meso-			
<i>Streptomyces</i> spp.						
<i>S. violaceorectus</i>	I	+++		+++		
<i>S. albus</i>	I	+++		+++		
<i>S. longisporoflavus</i>	I	+++		+++		
<i>S. glaucus</i>	I	+++		+++		
<i>S. nigrificans</i>	I	+++		+++		
<i>Streptovercillium biverticillatum</i>	I	+++		+++		
<i>Acinosporangium hygrascopicus</i>	I	+++		+++		
<i>Micromonospora chalcea</i>	II		+++	+++		
<i>Frankia</i> spp.						
<i>F. sp. Cs025</i>	II		+++	+++		
<i>F. sp. Cs241</i>	II		+++	+++		
<i>F. sp. Cs631</i>	II		+++	+++		
<i>Microbispora rosea</i>	III		+++	+++		
<i>Streptosprangium sp. A014</i>	III		+++	+++		
<i>Frankia</i> spp.						
<i>F. sp. Hr 18</i>	III		+++	++		
<i>F. sp. Mg⁺</i>	III		+++	++		
<i>F. sp. AirI₂</i>	III		+++	++		
<i>F. sp. Cs155</i>	III		+++	++		
<i>Micropolyspora faeni</i>	IV	+++			+++	+++
<i>Nocardia</i> spp.						
<i>N. sp. A016</i>	IV	+++			+++	+++
<i>N. sp. N-01</i>	IV	+++		++	+++	+++
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	IV	+++		++	+++	+++

外, 在 III 型菌株中有 4 株(均为 *Frankia*) 和 IV 型菌株中有 2 株(1 株诺卡氏菌和 1 株地中海拟无枝酸菌)均出现有甘氨酸。

3 讨论

细胞壁氨基酸分析的结果表明, 每种胞壁类型的菌株在它们胞壁中所含有的 4 种氨基酸 (GLU, GLY, ALA 和 DAP) 的分子比都具有各自的特征。kawamoto 等^[2] 在检测小单孢

菌属 19 个种的细胞壁时也证明了这一点, 而且认为小单孢菌属的氨基酸分子比与 Szanislo 和 Gooder^[8] 检测的同属于胞壁 II 型的游动放线菌属 (*Actinoplanes*)、小瓶菌属 (*Ampullariella*)、无定形孢囊菌属 (*Amorphosporangium*) 和指孢囊菌属 (*Dactylosporangium*) 的分子比也是一致的。从而可以认为, 利用胞壁氨基酸分子比作为鉴别放线菌的胞壁类型是一种可行而有效的指征。

过去一直认为, 根据纸层析或薄层层析检

测,在细胞壁中都含有 meso-DAP 的 II 型、III 型和 IV 型菌株之间的主要区别是 II 型菌株在层析中还显示有甘氨酸, III 型和 IV 型菌株则没有; IV 型菌株还含有阿拉伯糖和半乳糖, II 型和 III 型菌株却没有^[1]。然而氨基酸分析仪的检测表明, III 型和 IV 型菌株的细胞壁中同样都含有甘氨酸(图 1 和表 1),只不过是它的含量很低而已。所以, II 型菌株和 III、IV 型菌株之间的主要差别并不是有没有甘氨酸,而是由于两者之间的甘氨酸和丙氨酸的含量有明显差别。即 II 型的甘氨酸含量比 III、IV 型菌株要高 3~4 倍,而丙氨酸的含量则 III、IV 型菌株比 II 型要高 1 倍左右(表 1)。

全部 III 型和 IV 型菌株在氨基酸分析仪上得到的分子比均与相应的 III 型或 IV 型菌株相似。但在薄层层析上却有 4 株 III 型菌株和 2 株 IV 型菌株显示有甘氨酸,这可能与它们各自含有甘氨酸的量不一样有关^[2]。所以我们认为,只依靠薄层层析上根据甘氨酸的有无来确定细胞壁是属于 II 型还是 III、IV 型是不很可靠的,只有薄层层析结合氨基酸分析仪的检测才能获得可信的结论。

近年来在薄层层析检测中所出现的很多异常现象,如果能同时采用胞壁氨基酸分子比的

检测也就可以得到确切的结果。例如,小单孢菌在薄层层析中除了出现 meso-DAP 外,有的菌株还出现有 LL-DAP 或 3OH-DAP^[3]; 类小多孢菌属的细胞壁中还同时含有 DAP 中的三个异构体(meso、3OH- 和 LL-)^[9]。但它们的氨基酸分子比却与 II 型菌株完全相同,应该都是属于 II 型的。

参 考 文 献

- [1] Lechevalier H A, Lechevalier M P. *Advances Applied Microbiology*, 1971, 14: 66 ~ 69.
- [2] Kawamoto I, Oka T, Nara T. *J Bacteriol*, 1981, 146: 527 ~ 534.
- [3] 姜成林, 徐丽华, 谢林兰. *微生物学报*, 1986, 26(3): 206 ~ 209.
- [4] Thiemann J E, Pagani H, Beretta G. *J Gen Microbiol*. 1968, 50: 295 ~ 303.
- [5] 胡传炯, 周平贞, 周 启. *华中农业大学学报*, 1994, 13(5): 481 ~ 486.
- [6] 梁蓉芳, 向隆宽, 陆新忠. *华中农业大学学报*, 1988, 7(2): 135 ~ 140.
- [7] 梁蓉芳, 袁德军, 夏 涛等. *微生物学通报*, 1990, 17(4): 247 ~ 249.
- [8] Szanislo P J, Gooder H. *J Bacteriol*, 1967, 94: 2037 ~ 2047.
- [9] Zhou Qi, Liang Rongfang, Yuan Dejun, *et al.* In *Symposium of 8th International Symposium on Biology of Actinomycetes*, p3-017, Wisconsin, USA, August, 1991.

IDENTIFICATION OF ACTINOMYCETE CELL WALL TYPE USING AMINO ACID MOLECULAR RATIO

Bai Linqun Yuan Dejun Hu Chuanjiong Liang Rongfang Zhou Qi

(*Agro-antibiotic Laboratory, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070*)

Zhou Pingzhen

(*Oil Crops Institute; Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062*)

Abstract Cell wall amino acids of 21 actinomycete strains (10 genera) were analysed, which belonged to I, II, III, and IV cell wall types. Detected by amino acid analyzer, glutamic acid, glycine, alanine, and diaminopimelic acid (DAP) were all appeared in these strains. Although the amounts of four amino acids was different in each strain or genus with the same cell wall type, their molecular ratios were exactly similar and stable. There were different molecular ratios in different cell wall types. Thus it made the four types distinct from each other. Furthermore, in addition to meso-DAP, glycine also appeared in 4 *frankiae*

(type III), 1 *norcadia* (type IV), and 1 *amycolatopsis* (type IV) strains in thin-layer-chromatography (TLC), but their molecular ratios were remarkably different from those of type II and similar to those of type III and IV, respectively. It is obviously that molecular ratio is more precise and valid than TLC in the identification of cell wall type.

Key words Cell wall component, Amino acid analyzer, Thin-layer-chromatography (TLC), *Actinomycetales*