

青枯菌细胞表面的疏水性

林娟* 曾金晶 刘树滔 饶平凡

(福州大学生物科学与工程学院 福建 福州 350108)

摘要: 分别采用 BATH 和 HIC 方法测定青枯菌细胞表面疏水性(CSH), 并比较菌液与正十二烷比例(BATH 方法)和菌液上样量(HIC 方法)对 CSH 测定结果的影响。确定在 BATH 方法中菌液($OD_{600}=0.5$)与正十二烷的比例为 2:1, HIC 方法中菌液($OD_{600}=1.0$)上样量为 0.2 mL; 在此条件下, BATH 和 HIC 两种方法之间呈现出良好的线性关系($r=0.99$)。进一步采用 HIC 方法测定青枯菌在生长过程中 CSH 的变化情况, 结果显示随培养时间的延长, CSH 逐渐降低, 24 h 后 CSH 趋于稳定, CSH 与青枯菌细胞表面的 EPS I (胞外酸性多糖)含量呈负相关。3 株不同致病强度的青枯菌的试验结果进一步验证了青枯菌细胞表面的 CSH 随 EPS I 含量的增加而降低。

关键词: 青枯菌, 细胞表面, 疏水性, EPS I 含量

Cell surface hydrophobicity of *Ralstonia solanacearum*

LIN Juan* ZENG Jin-Jing LIU Shu-Tao RAO Ping-Fan

(College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: Bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) and hydrophobic interaction chromatography (HIC) were employed to determine cell surface hydrophobicity (CSH) of *Ralstonia solanacearum*, respectively. The effects of the ratio of bacterial suspension to *n*-dodecane in the BATH assays and the injection volume of bacterial suspension in the HIC assays on the measurement of CSH were investigated. The optimal conditions for CSH analysis were as follow: the ratio of bacterial suspension ($OD_{600}=0.5$) to *n*-dodecane was 2:1 and the injection volume of bacterial suspension ($OD_{600}=1.0$) was 0.2 mL. Under these conditions, a good linear relationships between BATH and HIC methods was obtained ($r=0.99$). Moreover, HIC method was applied to detect the variation of CSH during growth of *Ralstonia solanacearum*. The results indicated that the CSH decreased with culture time and approached a plateau after 24 h of incubation, and a negative correlation between CSH and EPS I (extracellular polysaccharide) content of cell surface was observed. The experimental results of three *Ralstonia solanacearum* stains of different virulence further confirmed that the CSH decreased with increasing EPS I content.

基金项目: 福建省自然科学基金项目(No. 2008J0066); 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划项目(No. XSJRC2007-09); 福州大学人才基金资助项目

* 通讯作者: Tel: 86-591-22866376; Fax: 86-591-22866376; ✉: ljuan@fzu.edu.cn

收稿日期: 2010-08-19; 接受日期: 2010-11-17

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, Cell surface, Hydrophobicity, EPS content

细菌的吸附作用受细胞表面电荷、疏水性和细胞表面结构(包括胞外多糖和鞭毛菌毛等)的影响^[1-2],其中疏水性是决定细菌非特异性黏附到各种生物和非生物表面及界面的最重要动力之一^[3-5]。自从Mudd首次报道细菌表面的疏水现象以来,人们从细菌表面电荷、表面蛋白和脂多糖等方面研究了细菌表面的疏水性^[6-7]。测定细胞表面疏水性(CSH)的方法有许多种,如烃类化合物吸附法(BATH)、疏水相互作用色谱法(HIC)、盐析凝聚法(SAT)、分子探针法、接触角测量法(CAM)、两相分配法(TPP)等^[4-5],其中缓冲液类型、离子强度等是影响测定结果和灵敏度的主要因素。

青枯菌是全球重要的植物致病菌之一,可侵染44个科的300多种植物,其中包括许多具有重要经济价值的栽培植物^[8-9]。本课题以青枯菌作为实验对象,采用烃类化合物吸附法(BATH)和疏水相互作用色谱法(HIC)测定CSH,研究青枯菌在生长过程中CSH的变化情况以及与细胞表面结构成分的关系,为深入研究青枯菌CSH与致病力的关系打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:青枯菌强致病力模式菌株GMI1000由法国Institut National de la Recherche Agronomique提供;青枯菌野生型菌株51#和无致病力菌株84#(分离自番茄植物)由福建省农业科学院农业生物资源研究所提供。

1.1.2 培养基:NA固体培养基(蛋白胨5.0 g,葡萄糖10.0 g,牛肉膏3.0 g,酵母浸膏1.0 g,琼脂15.0 g,蒸馏水1 000 mL, pH 7.2-7.4),SPA液体培养基(蔗糖20.0 g,蛋白胨5.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.25 g, 蒸馏水1 000 mL, pH 7.2-7.4)。

1.1.3 缓冲液:A液:0.02 mol/L 哌嗪-HCl (pH 8.0); B液:0.02 mol/L 哌嗪-HCl (pH 8.0)+1 mol/L NaCl。

1.1.4 主要仪器设备:高速冷冻离心机(Agella型,美国Beckman公司);紫外-可见分光光度计

(UV1700型,日本岛津);荧光酶标仪(Varioskan,美国Thermo Labsystems公司);超纯水机(MILLI-Q型,美国Millipore公司);超净工作台(1285型,美国Thermo Forma公司);恒温培养箱(PYX-PHS-X型,上海跃进医疗器械厂);恒温气浴摇床(CHA-S型,江苏常州国华电器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 青枯菌的培养方法^[10]:青枯菌经NA固体培养基活化(30 °C, 48 h)后,按1% (V/V)接种量($OD_{600}=0.1$)转接于25 mL SPA液体培养基中,30 °C、200 r/min摇床培养24 h。

1.2.2 烃类化合物吸附法(BATH)测定青枯菌CSH^[6]:取经过离心、洗涤处理^[10]的青枯菌菌体悬浮于缓冲液B液中,测定600 nm下的吸光度 OD_0 ;取8 mL上述菌悬液加入4 mL正十二烷,利用漩涡振荡器全速振荡15 s后倒入分液漏斗,静置20 min,收集下相水溶液,测定600 nm下的吸光度 OD_1 (取8 mL缓冲液B液加入4 mL正十二烷,重复上述操作,作为空白对照)。则疏水分配值: $CSH=[(OD_0-OD_1)/OD_0] \times 100\%$ 。

1.2.3 疏水相互作用色谱法(HIC)测定青枯菌CSH^[5]:取经过离心、洗涤处理^[10]的青枯菌菌体悬浮于B液中,并调整 $OD_{600}=1.0$ 。用1 mL玻璃注射针管制成一根常压疏水色谱柱,柱材料为疏水胶Octyl SepharoseTM CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden),胶柱高1 cm。先用3 mL缓冲液A液冲洗,再用B液平衡柱子,控制流速1 mL/min。加入0.05 mL待测样品,用0.2 mL B液上样,接着用3 mL B液洗脱,收集洗脱液,测定其体积和600 nm下的吸光度 OD_1 。另外用0.05 mL待测样品和B液配制成与收集到的洗脱液相同体积的溶液,测定600 nm下的吸光度 OD_0 ,则疏水分配值: $CSH=[(OD_0-OD_1)/OD_0] \times 100\%$ 。

1.2.4 青枯菌细胞表面胞外酸性多糖(EPS I)含量的测定^[11]:取经SPA液体培养基培养的青枯菌菌液离心、0.22 μm膜过滤除菌,取滤液浓缩,加入无水乙醇沉淀多糖,并经A1320阳离子交换树脂柱层

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

析去除残留蛋白。将纯化后的 EPS I 免疫小鼠, 二次免疫后制备抗血清; 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定细胞表面 EPS I 含量 (OD_{595})。

2 结果与分析

2.1 采用 BATH 方法测定青枯菌 CSH

2.1.1 烃-水两相体系的确定: 分别采用甲苯、二甲苯、正辛醇和正十二烷作为有机相, 通过对比试验发现, 正十二烷-水两相体系的分离速度明显快于甲苯、二甲苯、正辛醇和水的两相体系, 正十二烷吸附青枯菌细胞的能力较强, 在正十二烷-水两相体系中, 疏水性细胞主要集中在正十二烷烃相中, 并能维持较长的时间。而对于另外 3 种有机溶剂, 疏水性细胞主要集中在烃-水的界面上, 不稳定, 细胞容易解除吸附进入水相, 水相和烃相之间有较大的一层中间乳化层, 使得两相分离不稳定; 而且容易出现有机溶剂油珠滞留下相水溶液的现象, 这给测定菌体光密度值造成干扰。因此在后续的 BATH 实验中采用正十二烷-水两相体系测定青枯菌 CSH。

2.1.2 菌液与正十二烷的体积比对疏水性测定的影响: 分别取经 SPA 液体培养基培养 24 h 的青枯菌菌液, 经离心、洗涤处理后, 悬浮于哌嗪-HCl 缓冲液中, 调节 $OD_{600}=0.5$; 取 8 mL 菌悬液分别加入 0.4、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 正十二烷, 比较菌液与正十二烷不同体积比对疏水性测定结果的影响(图 1)。

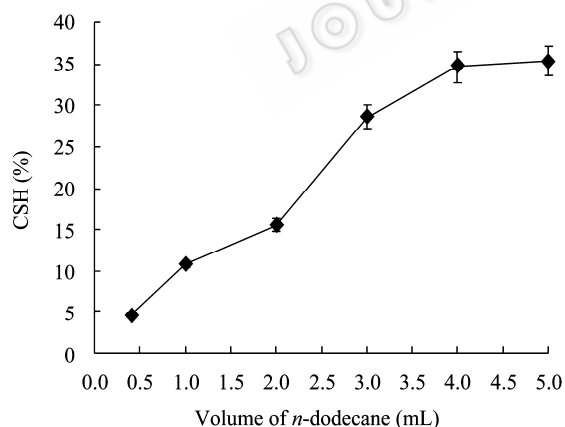


图 1 正十二烷的添加量对 CSH 测定结果的影响
Fig. 1 Effect of *n*-dodecane volume on measurement of CSH

从图 1 可以看出, 青枯菌 CSH 随正十二烷添加量的增加而增加, 当正十二烷添加量为 4 mL 时, CSH 趋于稳定。这是因为若正十二烷添加量小, 而菌体浓度大, 超出正十二烷的饱和吸附能力, 会使得部分疏水性细菌滞留在水相, 影响测定结果的准确性。因此选择正十二烷的添加量为 4 mL, 即菌液与正十二烷的比例为 2:1 (菌液的初始 OD_{600} 控制在 0.5 左右)。

2.2 采用 HIC 方法测定青枯菌 CSH

HIC 方法已广泛应用于蛋白质的分离。1978 年 Smyth 等人成功地将其用于细菌表面疏水性的研究, 此后这种方法为广大学者所采用^[5,12]。

取经 SPA 液体培养基培养 24 h 的青枯菌菌液, 经离心、洗涤处理后, 悬浮于哌嗪-HCl 缓冲液中, 调节 $OD_{600}=1.0$, 分别取 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40 mL 菌液上样, 比较不同上样量对疏水性测定结果的影响(图 2)。

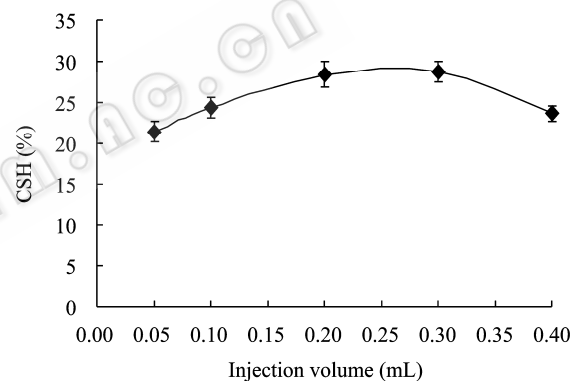


图 2 菌液上样量对 CSH 测定结果的影响
Fig. 2 Effect of injection volume of bacterial suspension on measurement of CSH

若上样量小, 则造成洗脱液中菌体浓度小, 测定 OD_{600} 值时误差较大; 若上样量太大, 则有可能超过疏水胶的饱和吸附能力, 造成部分菌体无法吸附, 影响测定结果的准确性, 因此选定上样量为 0.2 mL (菌液的初始 OD_{600} 控制在 1.0 左右)。

2.3 BATH 和 HIC 方法的相关性研究

取 5 批不同青枯菌样品, 分别采用 BATH 和 HIC 两种方法测定 CSH, 比较两种方法的相关性(图 3)。

图 3 显示, BATH 和 HIC 两种方法之间呈现出良

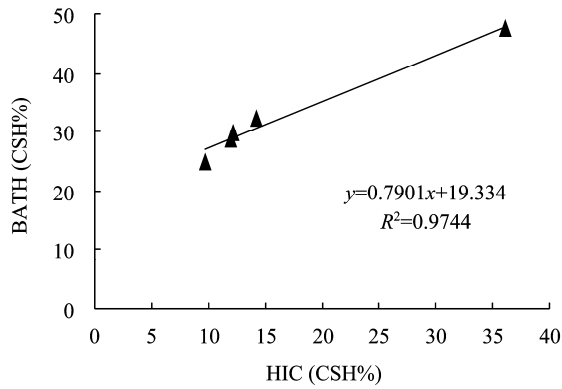


图3 采用 BATH 和 HIC 方法测定 CSH 的相关性曲线
Fig. 3 Correlation between BATH and HIC methods

好的线性关系, 相关系数 $r=0.99$, 但因 BATH 方法操作烦琐, 所需菌量大, 因此在后续的研究中采用 HIC 方法测定青枯菌 CSH。

2.4 青枯菌在生长过程中 CSH 的变化

青枯菌经 NA 平板活化 48 h 后, 转接于 SPA 液体培养基, 30 °C、200 r/min 摇床培养, 每隔一定时间取样, 测定培养液 pH 值和活菌数, 并采用 HIC 方法测定青枯菌 CSH 和采用 ELISA 方法测定细胞表面 EPS I 含量(OD_{595}), 以培养时间为横坐标, 分别以活菌数、pH 值、CSH 和 OD_{595} 为纵坐标, 绘制青枯菌菌数、pH 值、CSH 和 EPS I 含量随培养时间的变化曲线(图 4、5)。

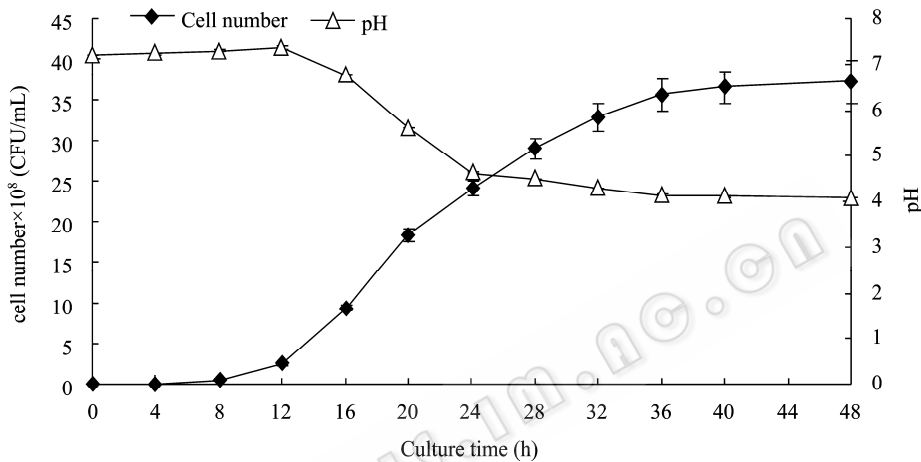


图4 青枯菌菌数和培养液 pH 值随培养时间的变化曲线
Fig. 4 Curves of cell number and pH of fermentation broth against culture time

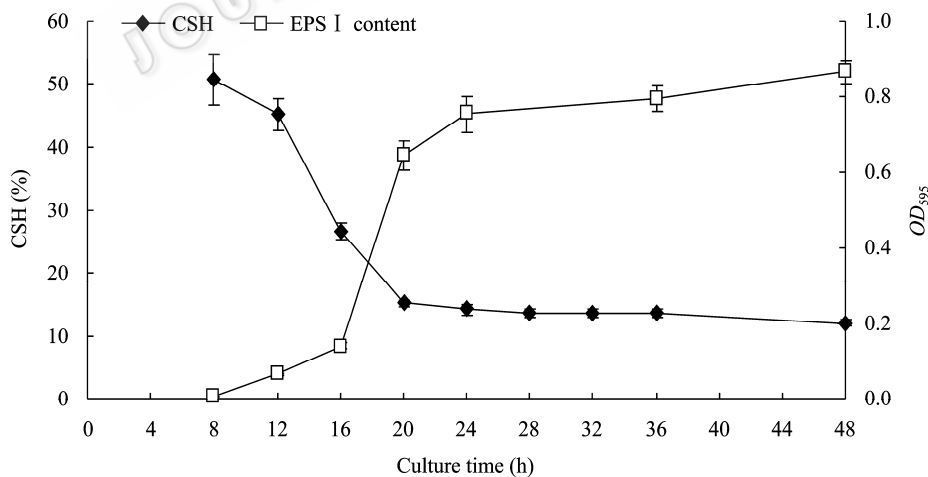


图5 青枯菌 CSH 和 EPS I 含量随培养时间的变化曲线
Fig. 5 Curves of CSH and EPS I content of cell surface against culture time

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

据文献报道, 青枯菌胞外酸性多糖 EPS I 等致病因子的表达受 LysR 家族转录调节因子 PhcA 蛋白控制, *phcA* 基因的表达又受 *phcB* 基因编码产生的胞外群体感应信号因子 3-羟基棕榈酸甲酯(3-OH PAME)的调控。当细胞浓度小于 10^7 CFU/mL 时, 青枯菌开始合成 3-OH PAME; 当细胞浓度大于 10^8 CFU/mL, 且 3-OH PAME 累积达到 5 nmol/L 时, PhcA 蛋白表达量增加, 诱导 EPS I 等致病因子的大量产生^[13-14]。产生的 EPS I 中 85% 分泌到培养液中, 但有 15% 保持着呈荚状黏附在细胞表面^[15], EPS I 的存在会增加细胞表面的亲水性^[16]。

结合图 4、5 可以看出, 在 0-8 h, 青枯菌生长处于延滞期; 12 h (细胞浓度为 2.52×10^8 CFU/mL) 后青枯菌进入对数生长期, 这时细胞开始大量分泌 EPS I, 由此造成 CSH 和培养液 pH 值迅速下降; 24 h 后培养液 pH 值、CSH 和 EPS I 含量趋于稳定。为了进一步验证青枯菌 CSH 与 EPS I 含量的相关性, 取不同致病强度的青枯菌进行试验。

2.5 不同致病强度青枯菌 CSH 分析

胞外酸性多糖 EPS I 是青枯菌的主要致病因子, 青枯菌的致病性越强, 则在相同的培养时间内, 细胞分泌的 EPS I 就越多。取不同致病强度的 3 株青枯菌: 强致病力模式菌株 GMI1000 (在 6 d 内可引起 100% 番茄组培苗发病)、青枯菌野生型菌株 51# (在 6 d 内可引起 86.7% 番茄组培苗发病) 和无致病力菌株 84#^[17], 经 SPA 液体培养基培养 24 h 后, 分别测定 CSH 和 EPS I 含量(表 1)。表 1 结果显示, 青枯菌的致病力越强, 则细胞表面的 EPS I 含量越高、CSH 就越小, 进一步验证了青枯菌细胞表面 CSH 与 EPS I 含量的负相关性。

表 1 不同致病强度青枯菌 CSH 与 EPS I 含量的比较
Table 1 Comparison of CSH and EPS I content of *Ralstonia solanacearum* of different virulence

菌株 Strain	GMI1000	51#	84#
EPS I content (OD_{595})	0.99±0.05	0.71±0.06	0.28±0.02
CSH (%)	12.74±0.64	14.37±0.57	75.85±2.66

3 讨论

许多研究表明, 疏水力作用参与了微生物与宿主表面的相互作用^[1-5]。疏水性的强弱主要取决于细胞表面非极性基团的多少, 与细胞表面蛋白、脂多糖、磷壁酸、聚多糖、菌毛、荚膜等结构成分有关^[6-7]。本课题通过对不同培养时间以及不同致病强度的青枯菌 CSH 的研究结果表明, CSH 大小与细胞表面的 EPS I 含量密切相关, EPS I 含量越高, 则 CSH 越小, 这与文献报道“EPS I 的存在会增加细胞表面的亲水性”相一致^[16]。

EPS I 是青枯菌的主要致病因子, 青枯菌的致病力受 LysR 转录调控因子 *phcA* 和控制 *phcA* 活性水平以及适应青枯菌细胞密度的 *phcBSRQ* 操纵子产物调控。*phcA* 活性水平增强的青枯菌细胞能产生大量的 EPS I 及一些胞外酶, 具有很强的致病力; 当 *phcA* 的活性被钝化时, 青枯菌仅合成很少的 EPS I 和极低活性水平的一些胞外蛋白, 丧失大部分的致病力^[14]。可见, EPS I 的含量与青枯菌的致病力有着密切的关系, 目前 EPS I 主要通过 ELISA 方法检测, 操作繁琐费时。在本课题研究中发现, EPS I 含量与 CSH 呈负相关, 因此通过测定青枯菌 CSH, 可以反映出 EPS I 含量的相对大小, 从而间接快速地判断青枯菌的致病力强弱, 为青枯菌致病力检测提供一种新方法。

参考文献

- [1] Dickson JS, Koohmaraie M. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surface[J]. Appl Environ Microbiol, 1989, 55(4): 832-836.
- [2] Gusils C, Cuzzo S, Sesma F, et al. Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken[J]. Can J Microbiol, 2002, 48(1): 34-42.
- [3] Devasia P, Natarajan KA, Sathyanarayana DN, et al. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(12): 4051-4055.
- [4] Hamada T, Sameshima Y, Honda K, et al. A comparison of various methods to predict bacterial predilection for organic solvents used as reaction media[J]. J Biosci Bioeng,

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

- 2008, 106(4): 357-362.
- [5] Ahimou F, Paquot M, Jacques P, et al. Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*[J]. J Microbiol Methods, 2001, 45(2): 119-126.
- [6] 吴伟, 余晓丽, 黎小正, 等. 芽孢杆菌与假单胞菌的疏水性及其应用[J]. 中国环境科学, 2003, 23(2): 152-156.
- [7] 罗岳平, 李益健, 严国安. 细菌和藻类表面疏水性及其生态学意义研究概况[J]. 海洋湖沼通报, 1997(1): 71-79.
- [8] Denny TP. *Ralstonia solanacearum* - a plant pathogen in touch with its host[J]. Trends Microbiol, 2000, 8(11): 486-489.
- [9] Genin S, Boucher C. *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome[J]. Mol Plant Pathol, 2002, 3(3): 111-118.
- [10] 林娟, 马骋, 刘树滔, 等. 青枯菌 HPLC 分析中样品制备方法的优化[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(5): 63-68.
- [11] 林娟, 马骋, 刘树滔, 等. 不同生长阶段青枯菌的高效离子交换色谱表征[J]. 微生物学报, 2007, 47(1): 145-149.
- [12] Peng JS, Tsai WC, Chou CC. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel[J]. Int J Food Microbiol, 2001, 65(1/2): 105-111.
- [13] Clough SJ, Flavier AB, Schell MA, et al. Differential expression of virulence genes and motility in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* during exponential growth[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(3): 844-850.
- [14] Clough SJ, Lee KE, Schell MA, et al. A two-component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester[J]. J Bacteriol, 1997, 179(11): 3639-3648.
- [15] Orgambide G, Montrozier H, Servin P, et al. High heterogeneity of the exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* strain GMI1000 and the complete structure of the major polysaccharide[J]. J Biol Chem, 1991, 266(13): 8312-8321.
- [16] Iwabuchi N, Sunairi M, Anzai H, et al. Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus*[J]. Colloids Surf B: Biointerfaces, 2003, 30(1/2): 51-60.
- [17] 林娟, 刘树滔, 高珍娜, 等. 应用高效离子交换色谱分析青枯菌的致病力分化[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(5): 713-718.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究; 农业微生物学研究; 工业微生物学研究; 医学微生物学研究; 食品微生物学研究; 环境微生物学研究; 微生物功能基因组研究; 微生物蛋白质组学; 微生物模式菌株研究; 微生物工程与药物研究; 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 2000 年再获中国科学院优秀期刊三等奖, 2001 年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2011 年的每册定价为 48 元, 全年 576 元, 我们将按期免费邮寄。

另, 本刊编辑部现存有少量过期期刊, 如有需要者可直接与编辑部联系, 款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn, bjb@im.ac.cn;

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>