

微生物化学分类指标测定及微生物肥料 菌株群感信号分子分析

张桂山

中国农业科学院农业资源与农业区划研究所

2019年8月8日

随着微生物培养组学的兴起，大量不同生境来源的新的微生物菌种资源获得培养和分离，因而能否对这些菌种资源进行快速和准确的分类，甚至获得有效发表也是大家关注的一个问题。基因组测序后进行平均核苷酸同源性 (ANI, Average Nucleotide Identity) 和核酸杂交 (DDH, *Digital DNA-DNA hybridization*) 分析可以为微生物的快速和准确分类提供有效手段，但对新的微生物物种进行有效发表仍然需要进行大量的生理和生化实验，并与临近的菌株做对照参比实验。本报告主要针对常用的微生物生理和生化指标做系统介绍，包括细胞脂肪酸、极性脂、呼吸醌、细胞壁化学组分、BIOLOG 和API (Analytical Profile Index) 等。同时，也将针对影响微生物肥料应用菌株在根际成膜定殖或内生化的种间群感信号分子呋喃硼酸二酯 (Autoinducr-2) 和种内群感信号分子酰基高丝氨酸内酯 (AHLs) 的检测分析方法。

微生物化学分类指标测定

极性脂分析方法

呼吸醌分析方法

全细胞脂肪酸分析

全细胞氨基酸和水解糖型分析方法

Biolog 分析

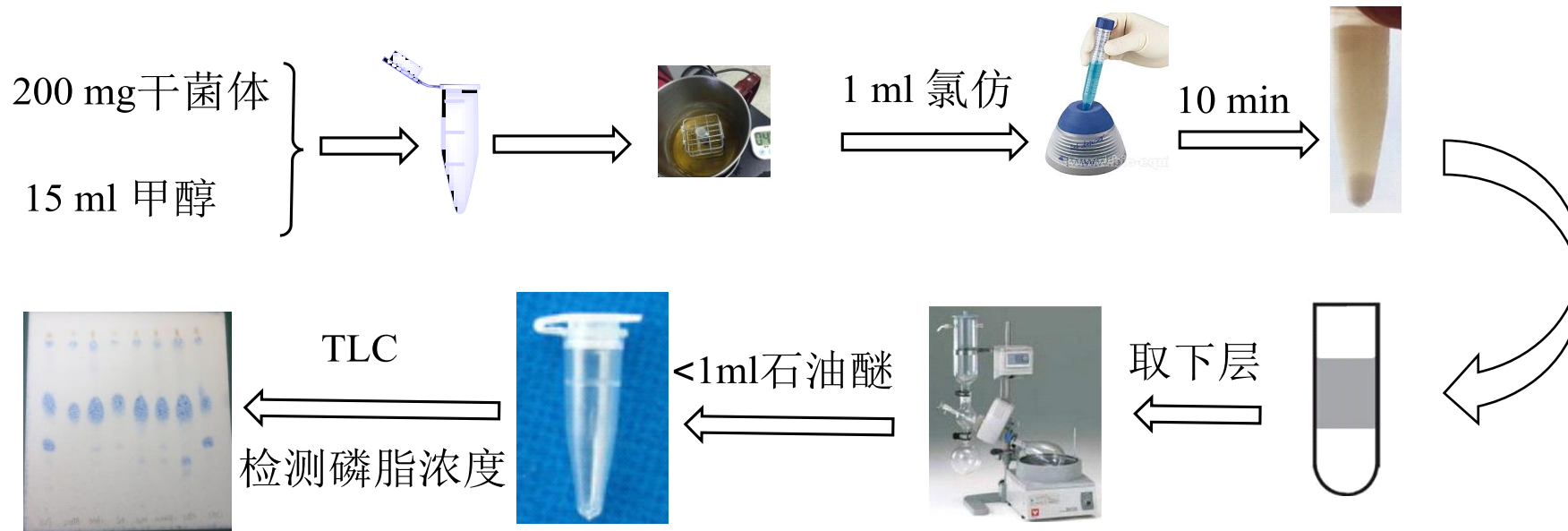
API 分析

极性脂（Polar lipids）

极性脂（polar lipid），与蛋白质、糖等构成细胞膜，对于物质运输、代谢及维持正常的渗透压都有重要作用。不同属菌的磷酸类脂组分是不同的，它是鉴别属的重要特征之一，是化学分类项目中不可缺少的分类指征。磷脂种类很多，对于放线菌而言，具有分类学意义的磷酸类脂有5种：磷脂酰乙醇胺（phosphatidyl ethanolamine, PE）、磷脂酰胆碱（phosphatidyl choline, PC）、磷脂酰甲基乙醇胺（phosphatidylmethyl ethanolamine, PME）、磷脂酰甘油（phosphatidyl glycerol, PG）及GluNU（含葡萄糖胺未知结构的磷脂，phospholipid of unknown structure containing glucosamine）。

极性脂（Polar lipids）分析方法

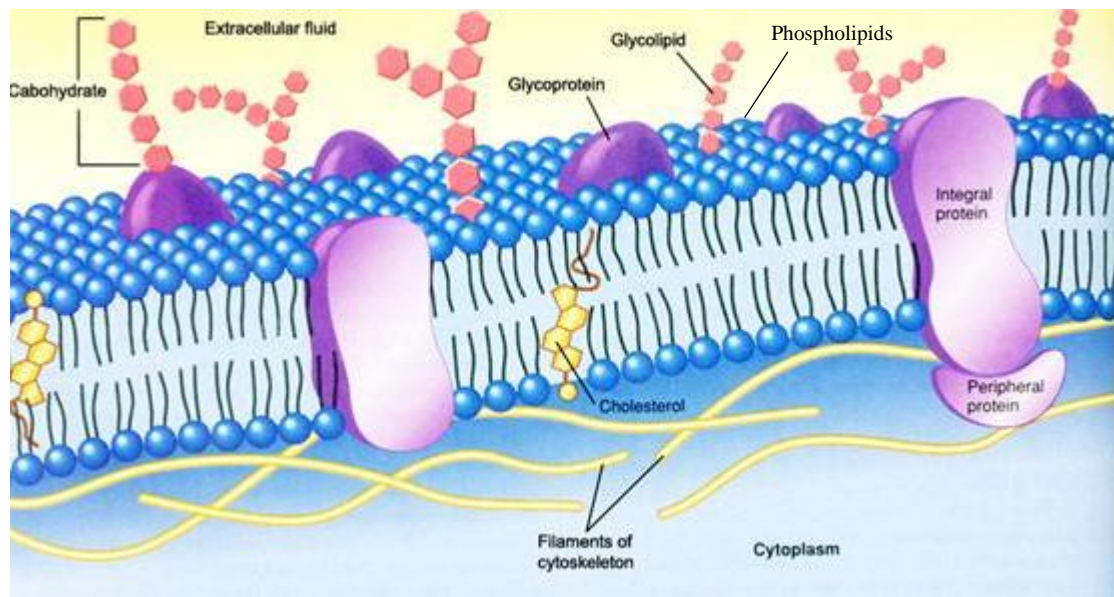
磷脂的提取：



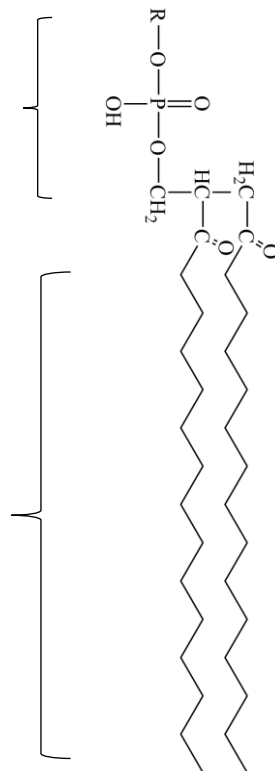
极性脂 (Polar lipids) 分析方法

实验原理:

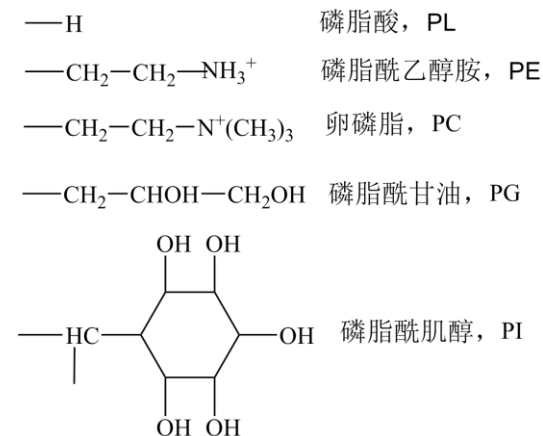
磷脂 (Phospholipids) 是位于细菌、放线菌细胞膜上的极限类酯，与蛋白质和糖等构成细胞膜上的极限类酯，与蛋白质，糖等构成细胞膜，对于细胞的物质运输、代谢及维持正常渗透压具有重要作用，同时具有分类学意义，不同属的菌体及其磷酸类酯组分不同，是鉴别属的重要依据之一。



甘油-3-
磷酸

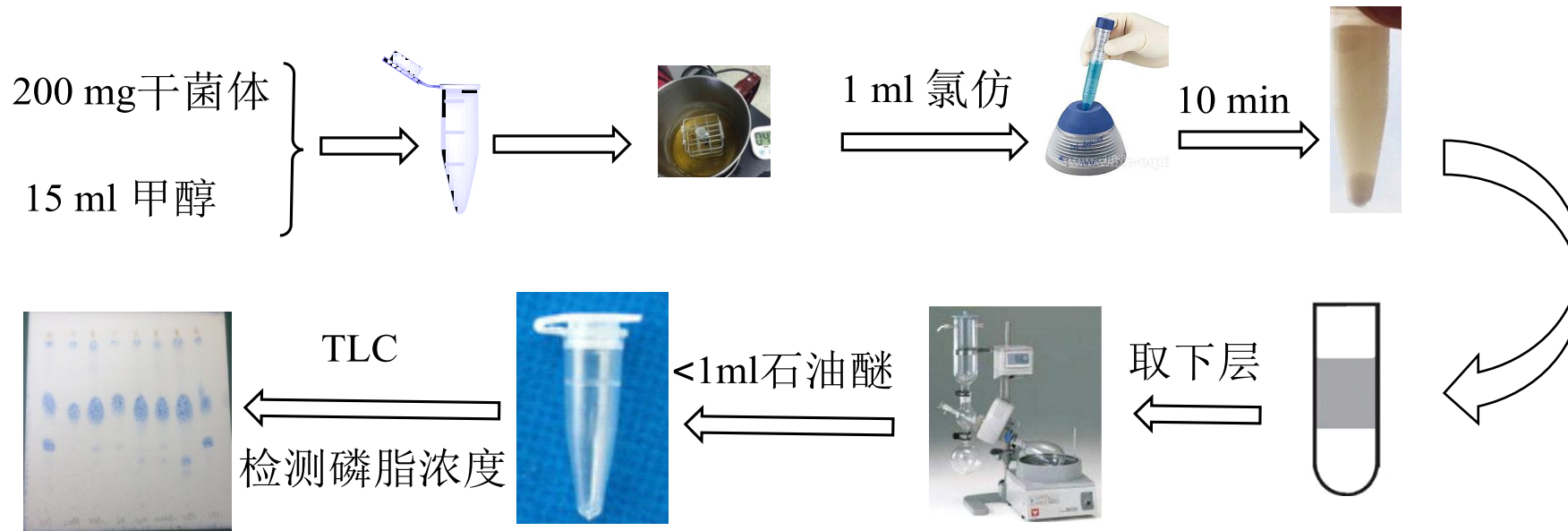


长链脂
肪酸



极性脂（Polar lipids）分析方法

磷脂的提取：



极性脂（Polar lipids）分析方法

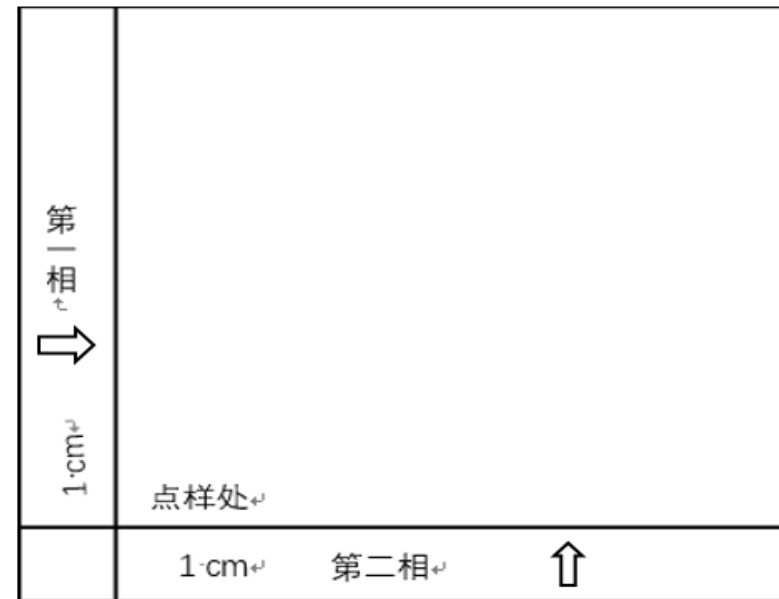
双向薄层层析（TLC）分析：

➤ 第一相展开剂

氯仿：甲醇：蒸馏水=65:25:4（V/V）

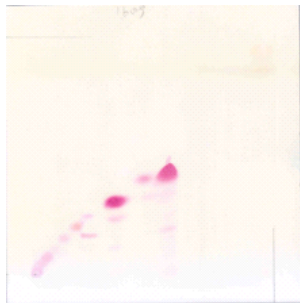
➤ 第二相展开剂

氯仿：冰醋酸：甲醇：蒸馏水=80:15:20:5



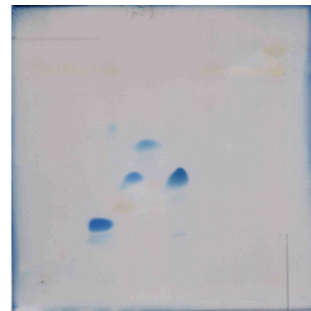
极性脂（Polar lipids）分析方法

显色分析：



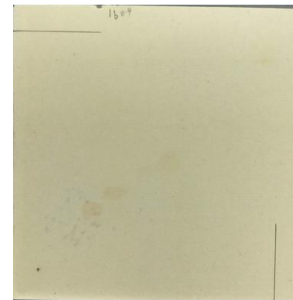
茚三酮显色

含氨基的极性酯，季铵盐除外



茚三酮+钼蓝

含磷和氨基的极性酯，如PE、PME，但是PC除外



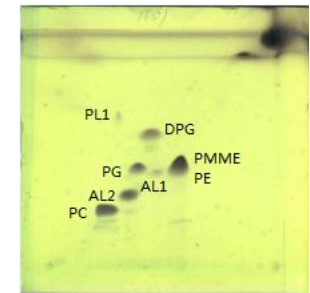
D试剂

含氨基的极性酯均显色



D试剂+钼蓝

含氨基和磷的极性酯均显色，PC的特异性显色剂



磷钼酸显色

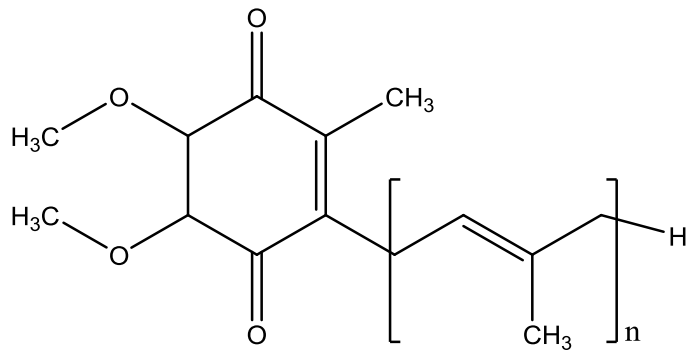
所有极性酯均显色

呼吸醌（Respiratory quinone）

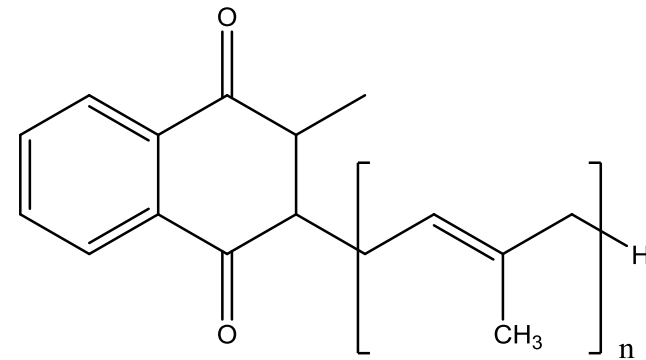
细菌细胞膜上的呼吸醌有甲基萘醌（menaquinone，MK）和泛醌（ubiquinone，辅酶Q）。对革兰氏阳性的放线菌而言，通常只含有甲基萘醌。常用来分析呼吸醌的方法有 TLC 法和 HPLC 法等。醌分子中的多烯侧链长度及氢饱和度对于细菌具有重要的分类学意义。

呼吸醌（Respiratory quinone）分析方法

概念：呼吸醌（Respiratory quinone）位于细胞膜上，是能量代谢过程的电子递体，主要分为分为泛醌（ubiquinone, Q）和甲基萘醌(menaquinone, MK)两类，均含有5C单位-聚异戊二烯侧链。



Q-n

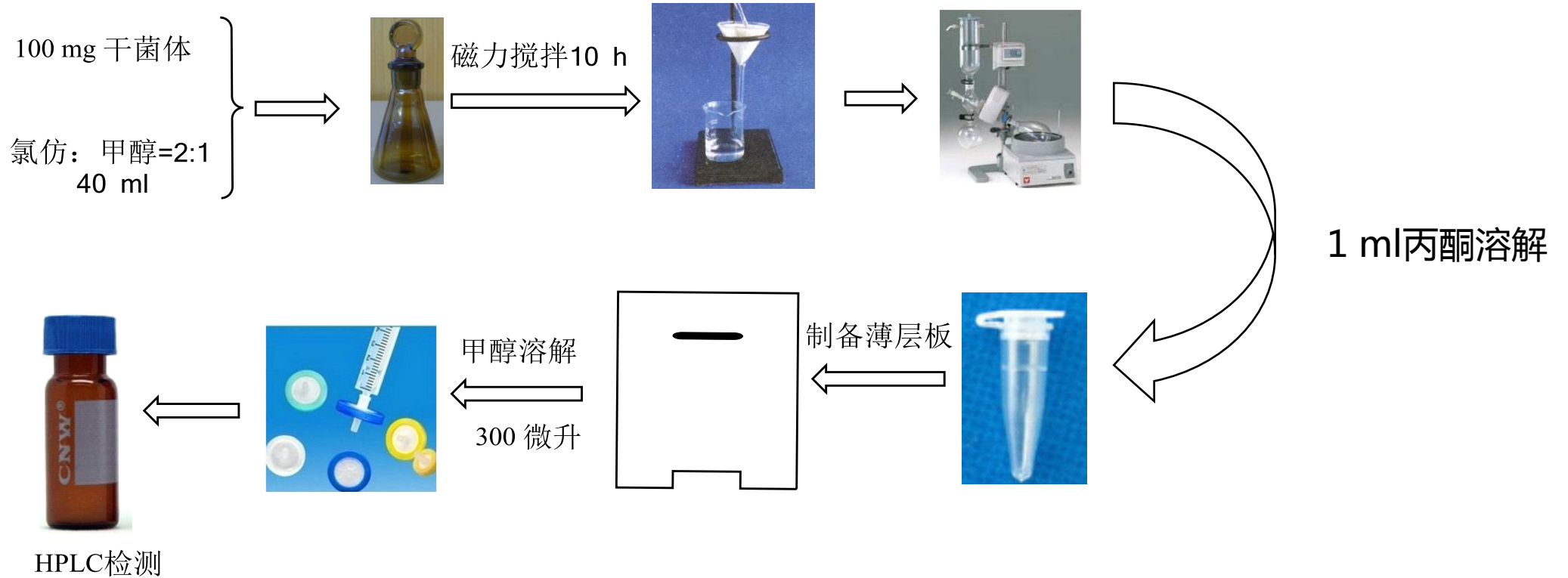


MK-n

呼吸醌（Respiratory quinone）分析方法



呼吸醌提取：



呼吸醌（Respiratory quinone）分析方法

HPLC分析:

- 流动相：甲醇：异丙醇=65:35
- 色谱柱：Zorbax Eclipse XDB-C18(4.6*250 mm, 5 μm; Agilent)
- 柱温：40℃
- 流速：1.0 ml/min
- 进样量：10 μl
- 检测波长：270 nm

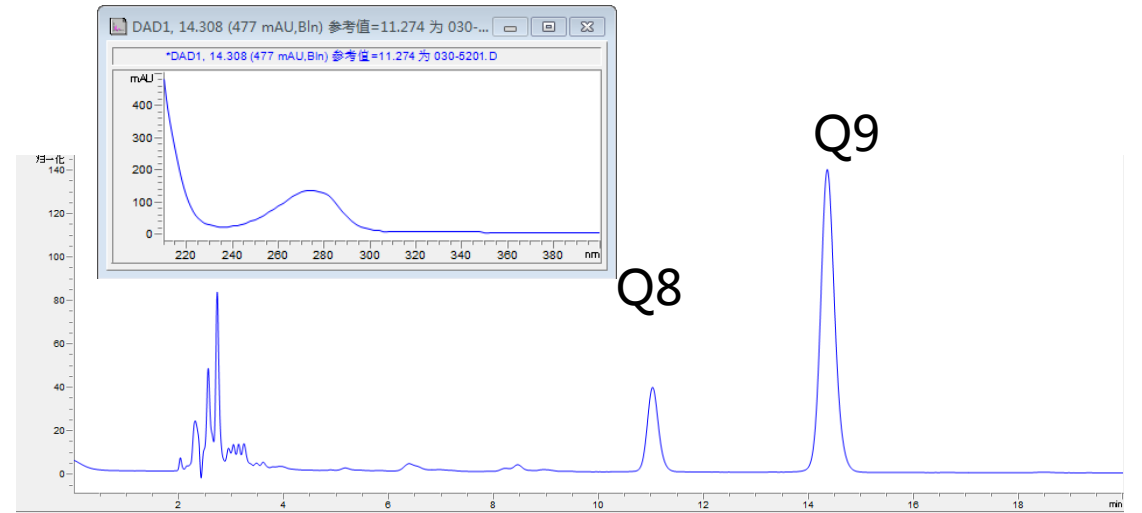


图 菌株ORS1419呼吸醌采用HPLC法分析的色谱图及结果

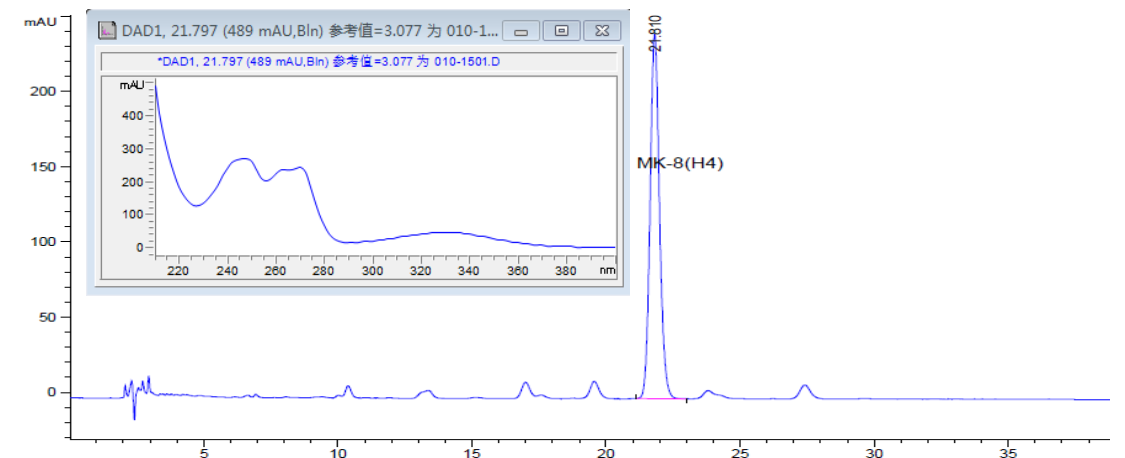
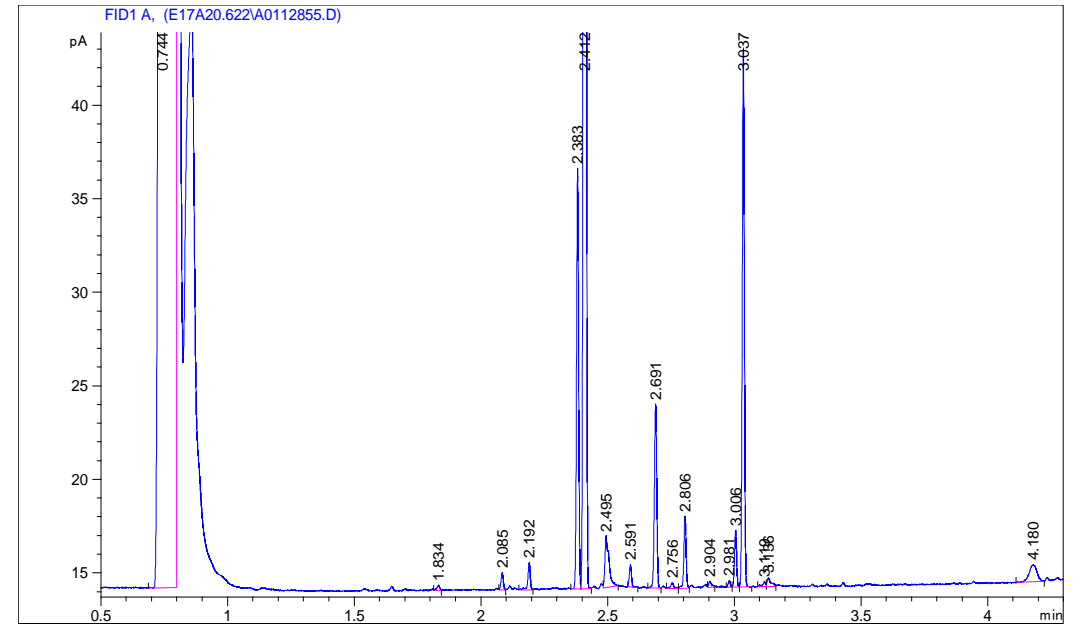


图 菌株96090呼吸醌采用HPLC法分析的色谱图及结果

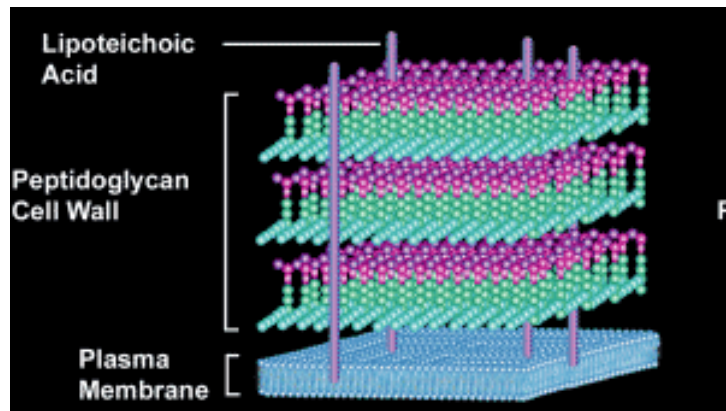
全细胞脂肪酸分析鉴定方法

采用 Sherlock Microbial Identification System (MIDI 公司) 全自动细菌鉴定系统 (气相色谱), 通过对不同菌株的脂肪酸图谱进行分析, 并与标准数据库进行比对, 来鉴定细菌及酵母。该技术是细菌或酵母种水平鉴定的有效手段之一。

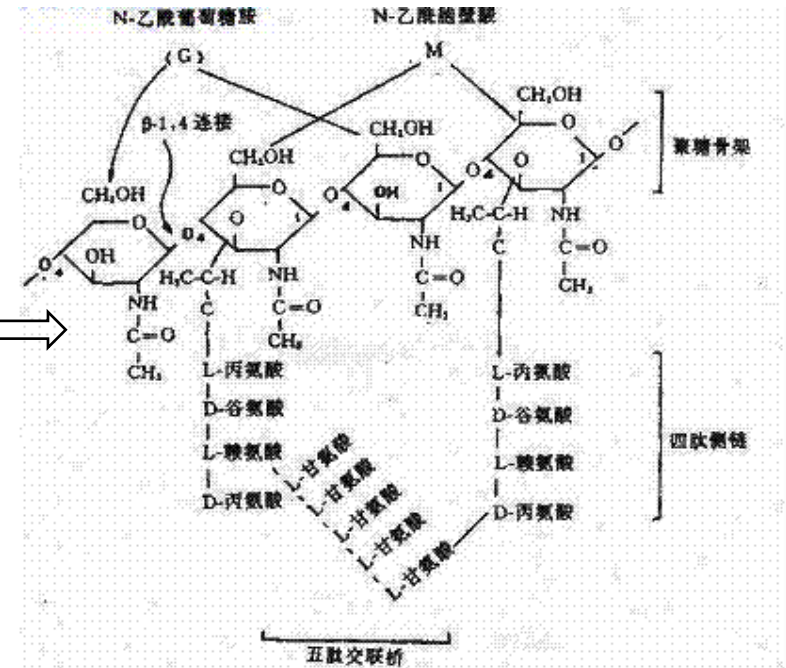
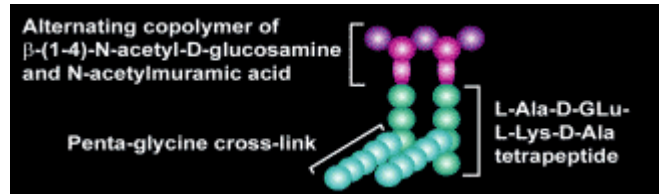


全细胞氨基酸和水解糖型分析方法

细胞壁组成成分中氨基酸所占比例很高，与这些氨基酸相联系的可变组分是糖和氨基糖。通常，每个细菌属具有一个特征性的细胞壁组成成分，而根据同一个属中糖在细胞壁中的含量变化，可以区分不同的种。



Gram Positive Bacterial Cell Wall



全细胞氨基酸和水解糖型分析方法

氨基酸提取：

1. 取0.3g干菌体，加入1%NaCl1.5 ml，浸泡10 min；或1g湿菌体。
2. 加0.05mol/L PBS(pH7.6) 7ml。
3. 超声波46w破壁25min后（5sec/8sec），转入EP管中。
4. 7000r/min，离心15 min，取上清。
5. 12000rpm离心40 min,弃上清，收集沉淀。
6. 加4%SDS 1ml溶液，室温过夜或沸水浴15 min,溶液变澄清。
7. 12000rpm离心4次，每次30 min，离心后每次弃上清后每管加适量无菌超纯水，最后一次留上清1/3.
8. 将剩余的上清与沉淀混匀（用枪吹打）后，移入安瓿管中，65°C烘干。
9. 每管加入200 μ L 6NHCL，封口100°C水解过夜。
10. 过夜后的样品分成两类，一份备用，一份调Ph至7.0左右。
11. 样品加入三倍体积的0.1mol/L硼酸钠，4°C保存。

全细胞氨基酸和水解糖型分析方法

标样配制:

10种氨基酸标准品配制成0.5 Mm, 然后吸取10 μ L于EP管中, 混匀, 加入三倍体积的0.1mol/L硼酸钠, 4 $^{\circ}$ C保存。

柱前衍生化:

分别吸取10 μ L样品/标样和邻苯二甲醛, 室温反应50秒, 然后进样分析。

色谱条件:

色谱柱: ZORBAX Eclipse-AAA(4.6*150 mm, 3.5 μ m; Aglient)

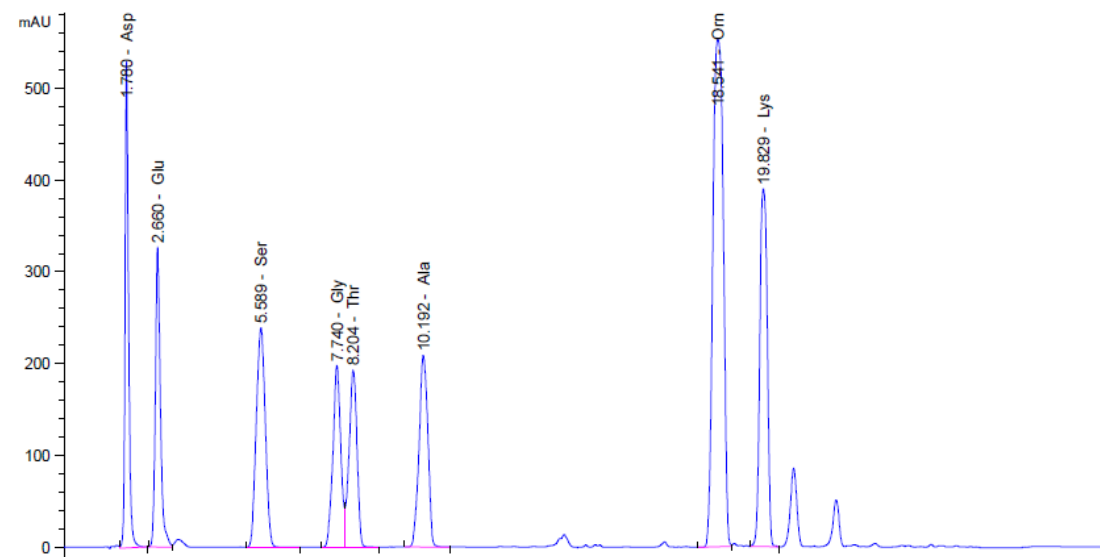
柱温: 40 $^{\circ}$ C

检测波长: 338 nm

流动相: 乙酸钠: 乙腈: 甲醇=54:23:23

流速: 1.0ml/min

进样量: 20 μ L



8种氨基酸标准品液相色谱图

全细胞氨基酸和水解糖型分析方法

糖水解及衍生化:

1. 挑取适量菌体放入安瓿瓶中，加入0.5ml 0.5NHCl，封口，120°C，沙浴2h.
2. 开封，，平均分为两管（连沉淀一起），用NaOH调节pH至7.0左右，
3. 取160 μ L样品加入160 μ L 0.2M NaOH，160 μ L 5%PMP甲醇溶液，震荡30s，
70 °C水浴30 min
4. 用0.2N HCl调节pH至7.0左右
5. 加入0.5 ml乙酸异戊醇萃取，震荡30s，8000 rpm离心5 min，弃上清。
6. 重复上一步三次
7. 加入0.5 ml氯仿震荡30s，8000 rpm离心5 min，取上层
8. 重复上一步
9. d=0.45 μ m过滤，4 °C放置。

全细胞氨基酸和水解糖型分析方法

标样衍生化处理:

分别吸取8种糖标准品10 μL 于EP管中, 调节pH至7.0左右, 离心。从第三步开始与样品一致。

HPLC分析:

色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C18(4.6*150 mm, 5 μm ; Aglient)

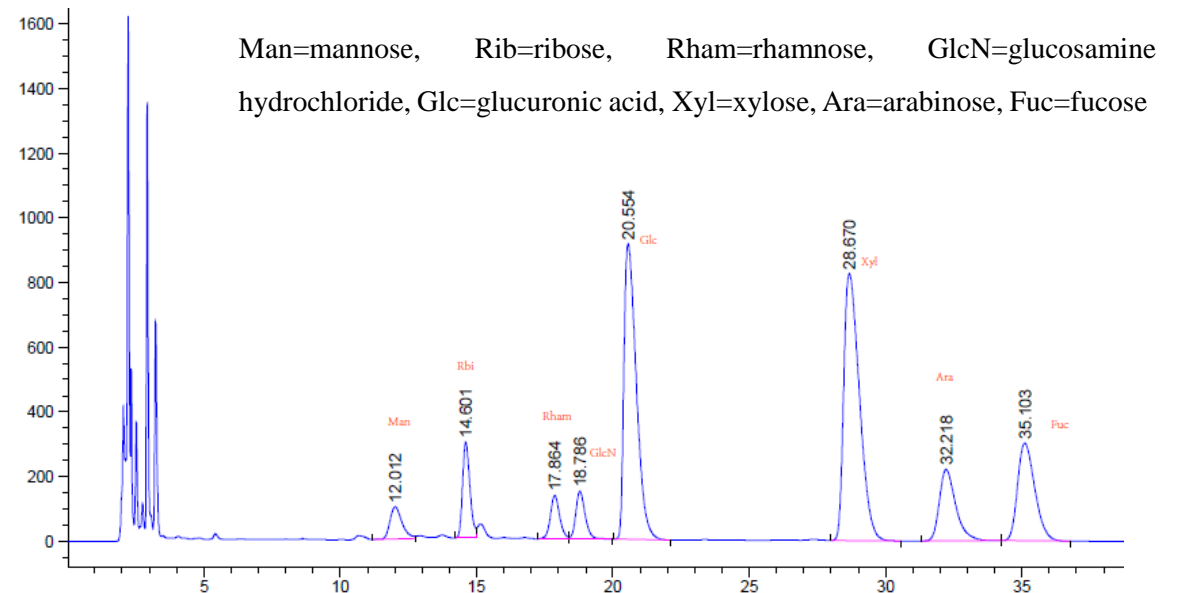
柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$

检测波长: 250 nm

流动相: 0.05M磷酸二氢钾 (pH 6.9) :乙腈=83:17

流速: 1.0ml/min

进样量: 10 μL



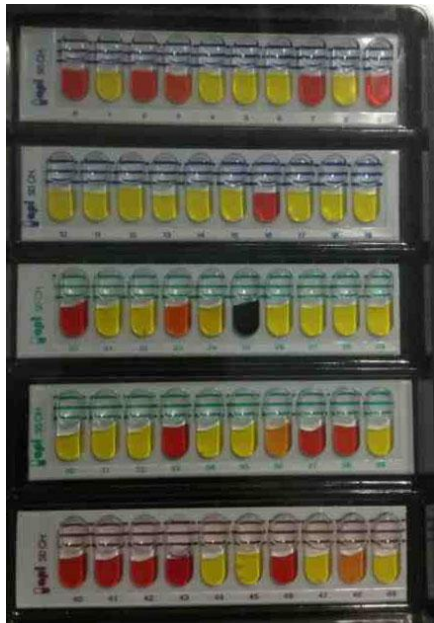
8种糖标准品的液相色谱图

BIOLOG III 碳源自动分析鉴定



BIOLOG是一种微生物菌种快速鉴定系统，涉及革兰氏阴性和阳性菌、厌氧菌、酵母、丝状真菌在内近2000种微生物。以微生物对不同碳源的利用情况为基础，检测微生物的特征指纹图谱，建立与微生物种类相对应的数据库。通过软件将待测微生物与数据库参比，得出鉴定结果。

API 检测分析



API鉴定系统涵盖15个鉴定系列，约有 1000 种生化反应。鉴定过程中，可根据细菌所属类群选择适当的生理生化鉴定系列，通过软件将待测细菌与数据库参比，得出鉴定结果。

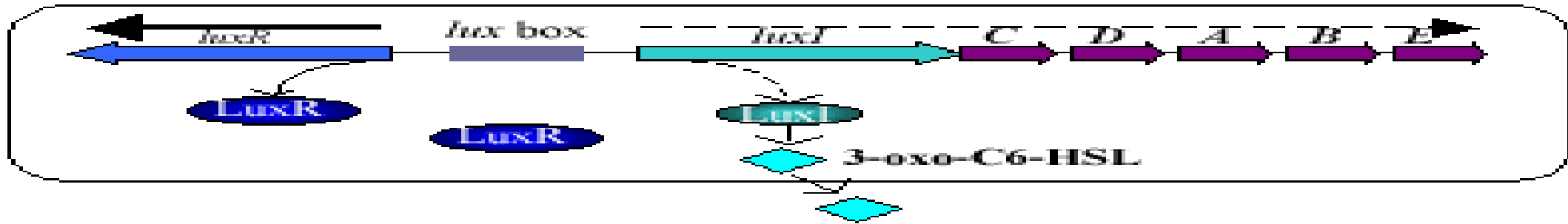
API 50CH、API 20 E、API 20NE、API Staph系列对乳酸杆菌 (*Lactobacillus* sp.) 和相关细菌、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* sp.)、微球菌属 (*Micrococcus* sp.) 和库克菌属 (*Locuria* sp.) 进行鉴定。

微生物肥料菌株群感信号分子分析

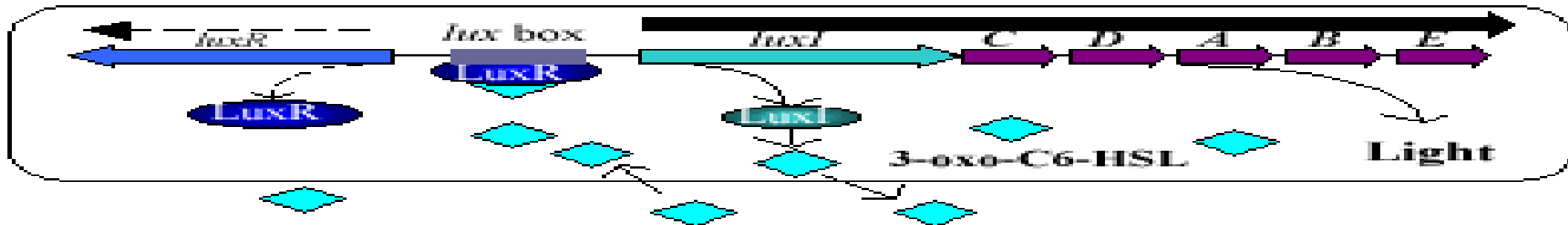
1968年 Kempner 和Hanson 发现 *Vibrio fischeri* (费氏弧菌) 生物发光现象与细胞密度相关, 后来定义为“自诱导”。

细菌能够分泌一种或多种化学信号分子, 并以这些信号分子作为诱导因子感知和判断菌群密度和周围环境的变化, 当菌群密度达到一定的阈值时会启动一系列相关基因的表达调控菌体的群体行为, 这种生理行为称为**群体感应**。

Low cell density



High cell density

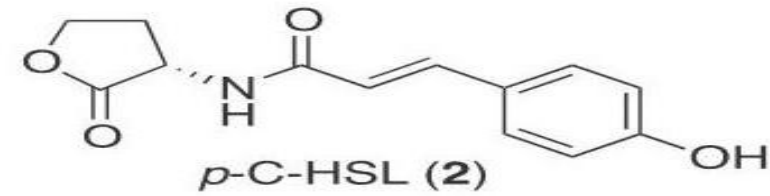


◆ 种内:

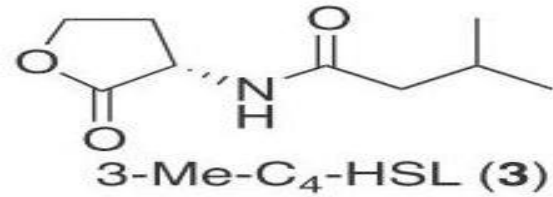
--- 革兰氏阳性菌或放线菌: 小分子寡肽; γ -丁酸内酯, 脂肪酸甲酯等 Kleerebezem *et al.*, 1997

---- 革兰氏阴性菌: 酰基高丝氨酸内酯 (AHLs) Surette, *et al.* 1990

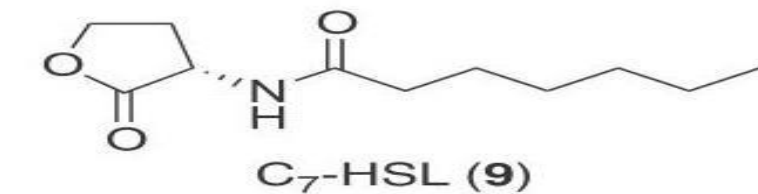
◆ 种间和种内: 呋喃硼酸二酯 (AI-2) Bonnie Bassler *et al.*, 1993



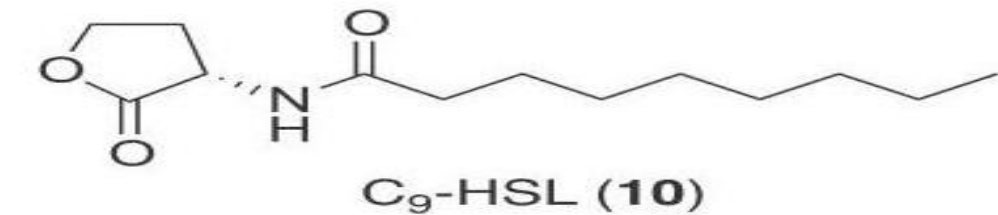
土壤细菌 *Rhodopseudomonas palustris*: 调控光合作用 (Schaefer *et al*, 2008)



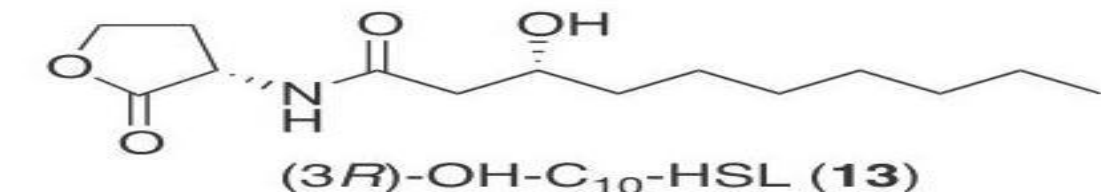
大豆共生细菌-慢生型大豆根瘤菌 *Bradyrhizobium japonicum*: 与固氮调控相关 (Harwood *et al*, 2011)



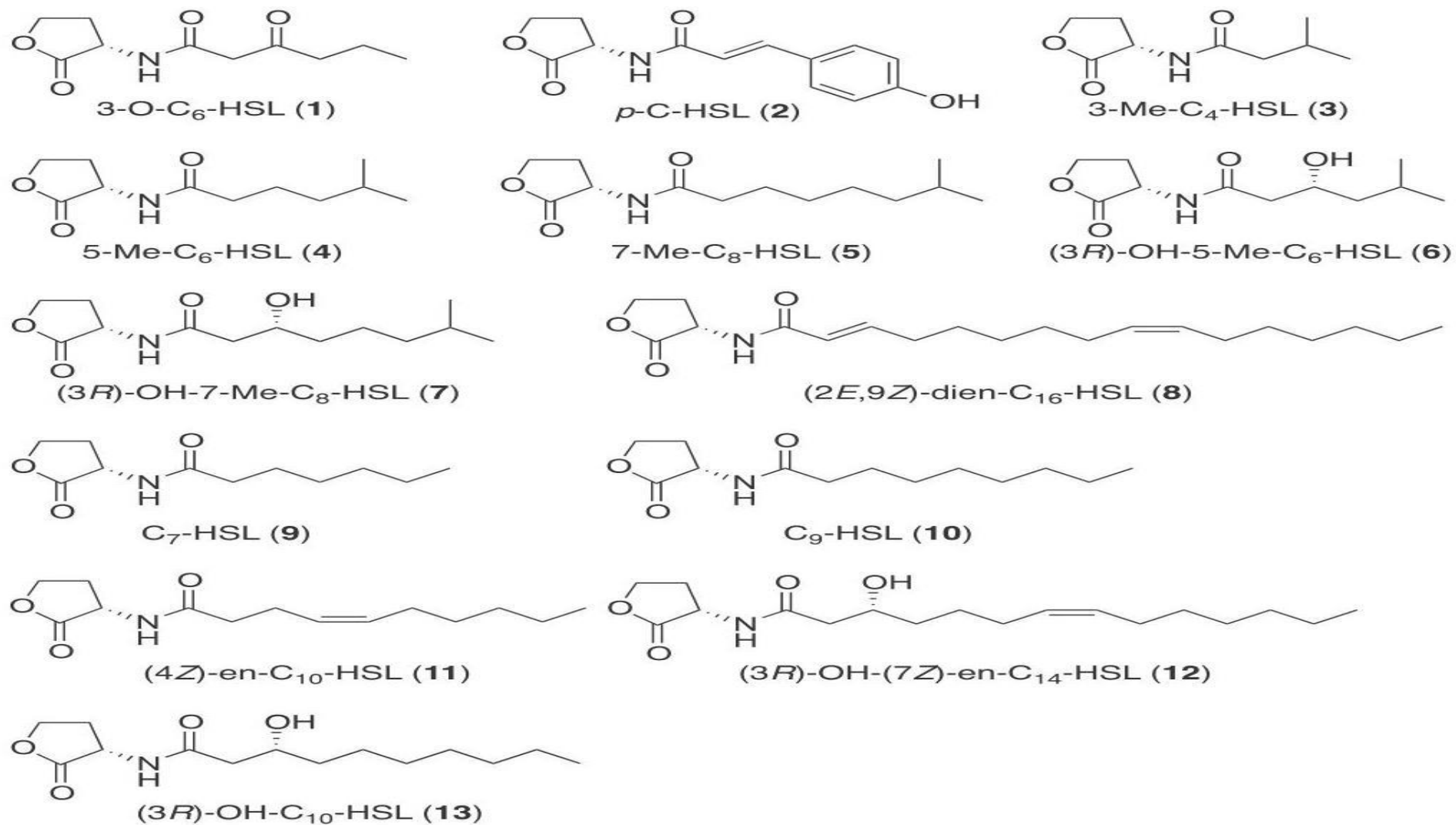
Edwardsiella tarda, 沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*): 参与调控毒力因子表达以及灵菌红素的产生 (Morohoshi *et al*, 2007; Horng *et al*, 2002)



Erwinia carotovora, 参与调控毒力因子的表达以及细菌的运动性 (Brader *et al*, 2008)



Acinetobacter baumannii: 调控生物膜的形成 (Janda *et al*, 2012)

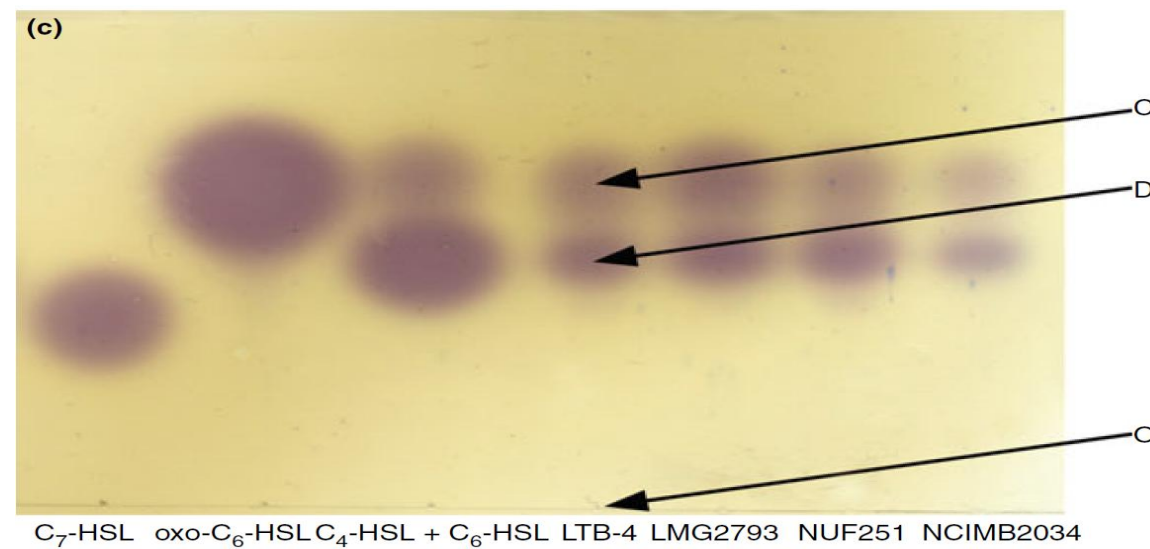
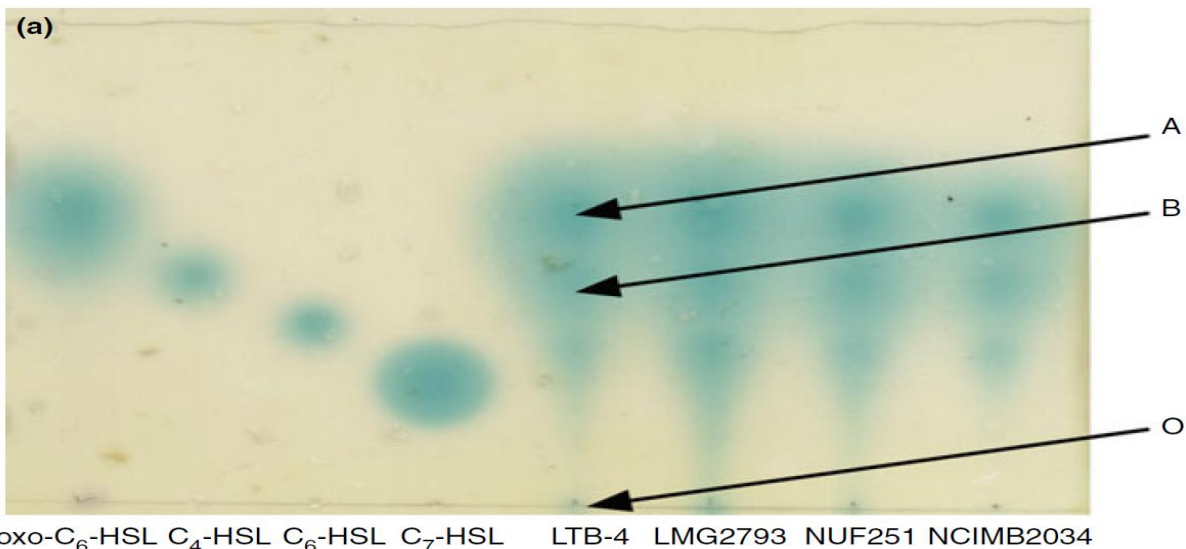


已报道的主要AHLs类群感信号分子

1. 指示菌法

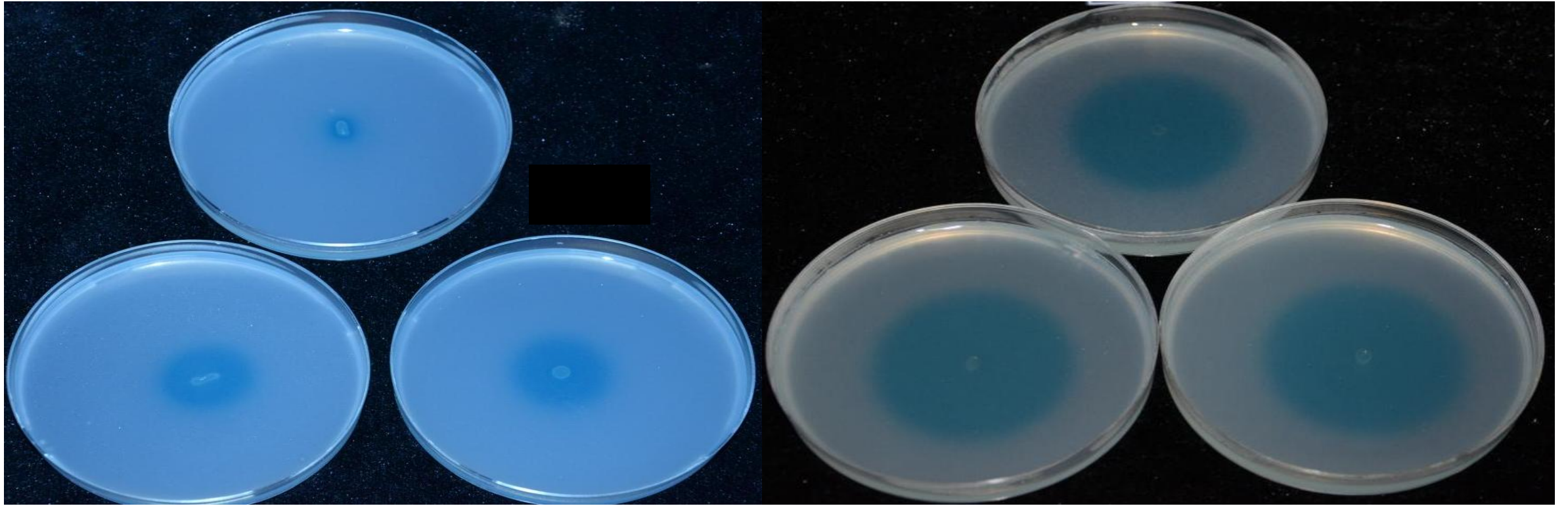
A. 土壤农杆菌 NTL4 菌株

B. 紫色杆菌 CV026



Han et al. 2009;
Taha Hosni et al. 2011;
Liu et al. 2007

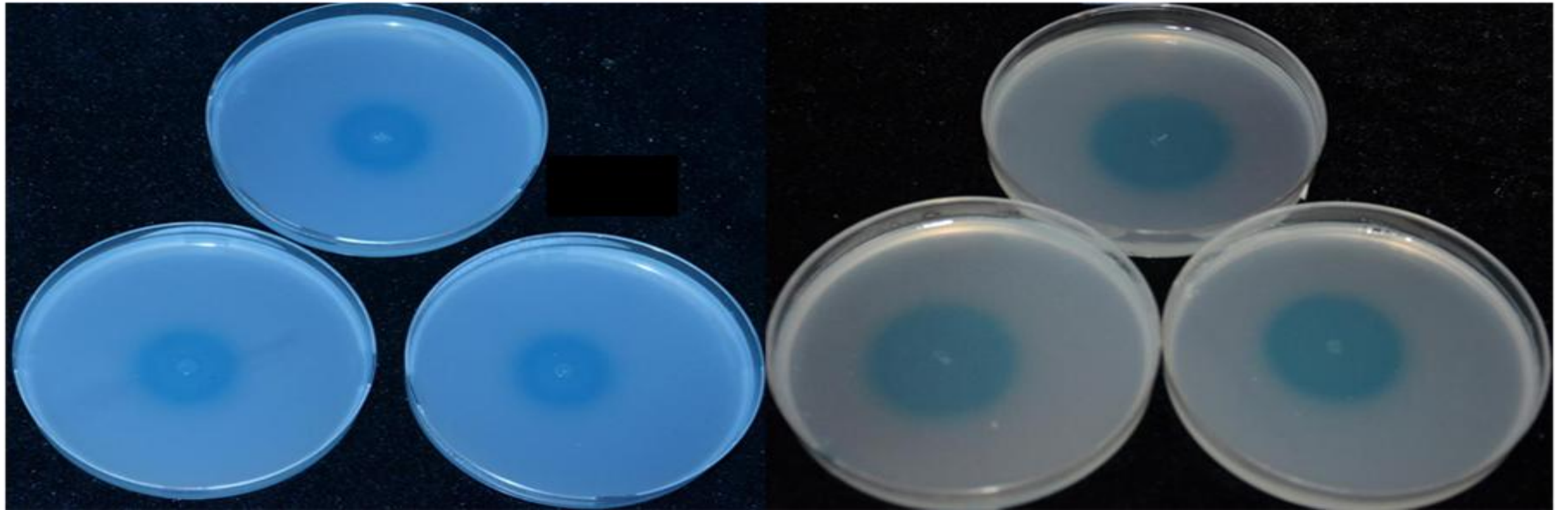
Rhizobium oryzae N19^T



菌液

上清萃取浓缩液

Rhizobium sp. 05916x



菌液

上清萃取浓缩液

(3) HPLC-MS/MS检测结果

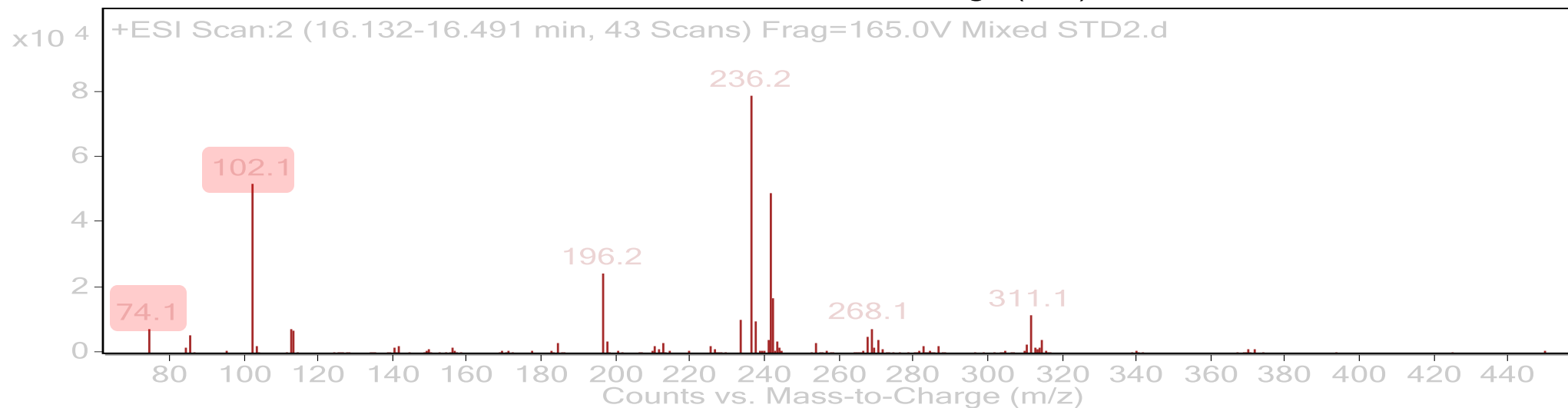
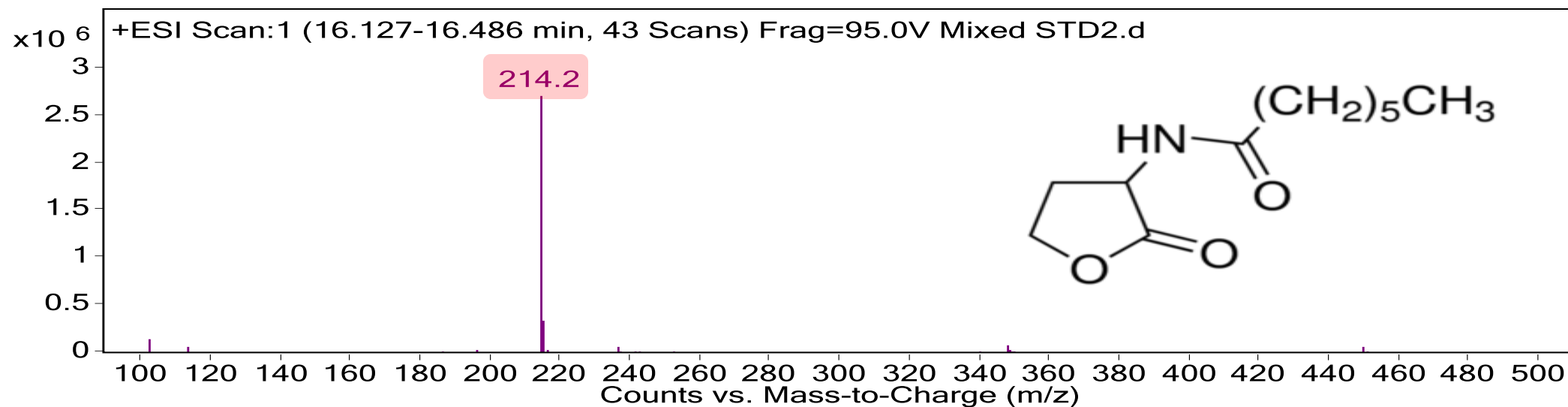
HPLC-MS/MS

m/z 102 特征碎片峰

方法：Agilent 高效液相色谱 - 串联质谱仪，色谱柱：Zorbax SB-Aq，4.6 mm ID X 150 mm (μm)，0.1% 的甲酸加 2% 的乙腈为流动相 A，乙腈为流动相 B，洗脱条件为 3 - 33 min，流动相 B 5% - 95%，流速为 0.25 ml/min。

分子式	分子量	结构式	保留时间	分子式	分子量	结构式	保留时间
C12H19N04	241.28			C12H19N04	241.28		14.854
C8H13N03	171.19		3.35	C12H19N04	241.28		14.854
C10H17N03	199.25		11.316	C12H13N04	235.24		16.272
C10H17N03	199.25		11.333	C11H19N03	213.27		16.307
C13H13N04	247.25		13.076	C12H10N2O3S	262.28		18.982
C12H21N04	243.3		13.504	C12H21N03	227.3		19.392
C12H12BrN03	298.13		14.606	C16H27N04	297.39		24.22
C12H21N03	227.3		19.4	C18H33N04	327.46		25.622
C14H25N04	271.35		19.4	C16H29N03	283.41		26.348
C14H23N04	269.34		20.827	C16H29N03	283.41		26.349
C16H29N04	299.41		22.922	C18H31N04	325.44		26.835
C14H25N03	255.35		23.451	C18H33N03	311.46		28.767
C14H25N03	255.35		23.451	C8H13N04	187.19		无峰

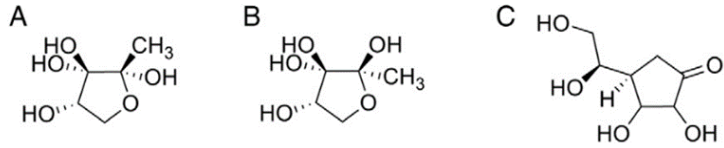
结果总结



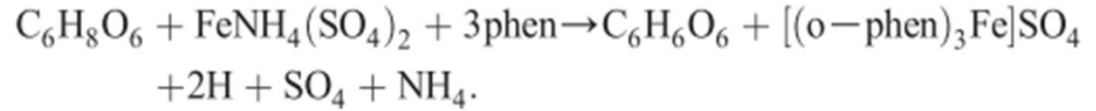
常规结构的AHLS，具有m/z102.1的特征峰

AI-2 浓度检测——铁离子还原法

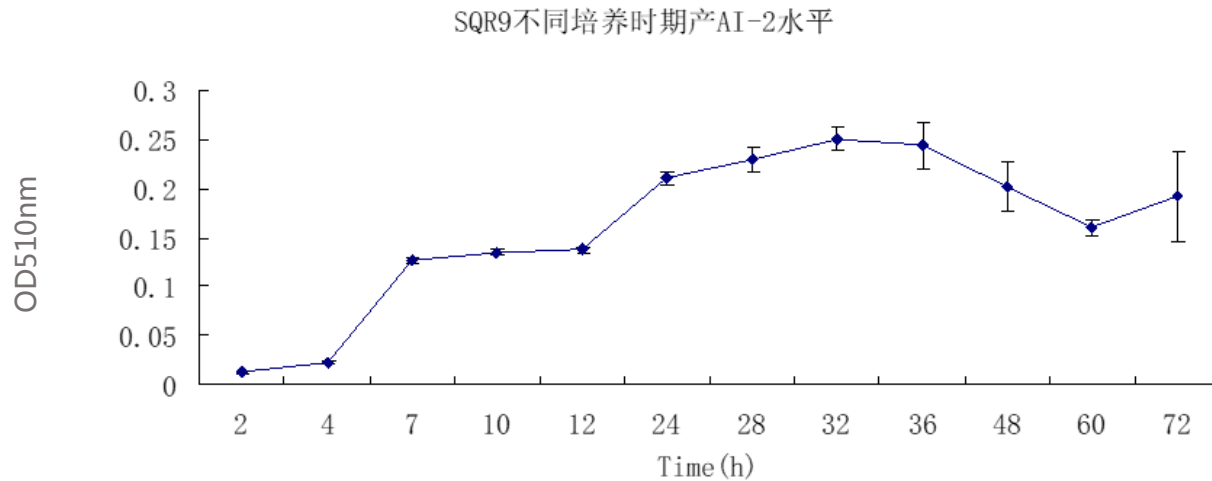
- 原理：AI-2信号分子结构与抗坏血酸相似，可以作为还原剂，在1,10-邻二氮菲存在时可还原 $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ 生成有颜色的邻二氮菲亚铁离子 ($[(\text{o-phen})_3\text{Fe}(\text{II})]\text{SO}_4$)，通过颜色深浅可判断同样品的AI-2分子浓度。（Wattanavanitchakorn *et al.*, 2014）



(A) AI-2,(R-THMF) (B) AI-2,(S-THMF), and (C)抗坏血酸



- 实验结果：

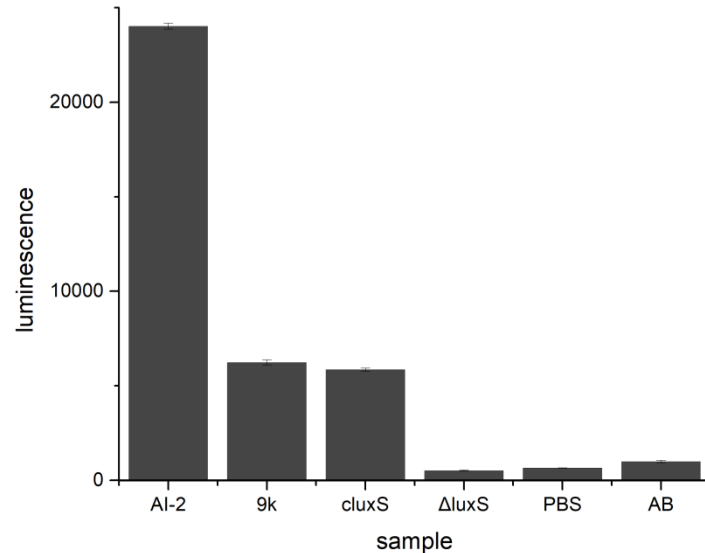


SQR9的不同时间点的上清中AI-2浓度的测定

AI-2活性检测——生物发光法

- 原理：AI-2 最早在海洋细菌哈维弧菌 (*Vibrio harveyi*) 中被发现，且其对哈维弧菌的生物发光有直接影响，浓度越高，发光越强。实验选用具有AI-2感受器的BB170 (AI-1⁻, AI-2⁺) 作为报告菌，以能合成大量AI-2的BB152作为阳性对照。(Ren, D. *et al.*, 2002; Freeman, J. A. *et al.*, 1999)

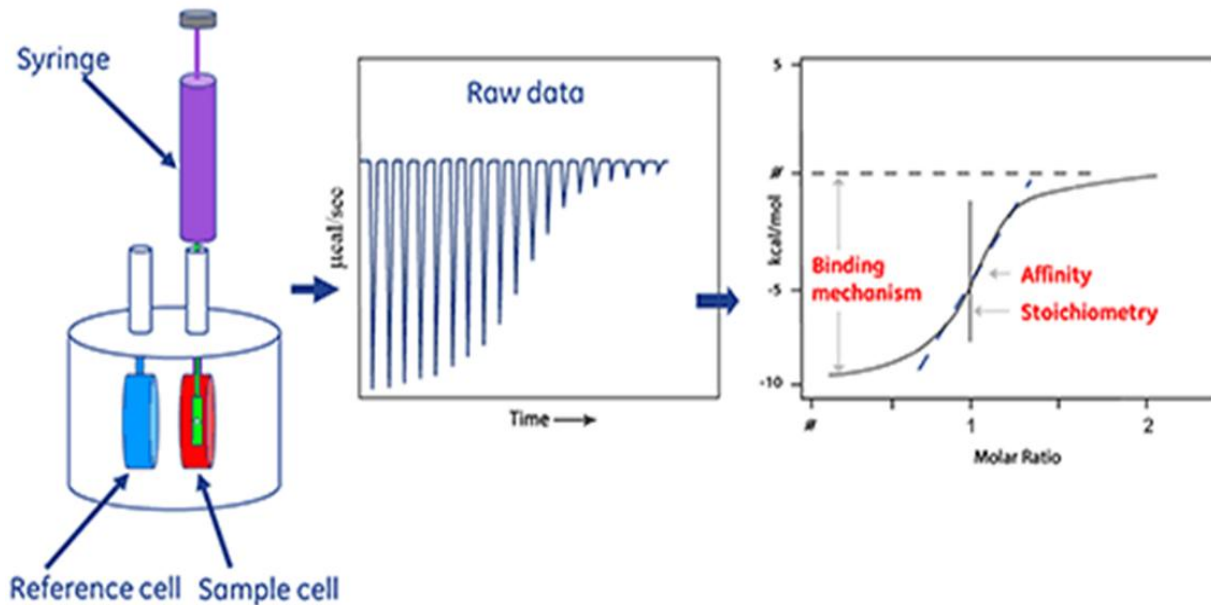
- 实验结果：



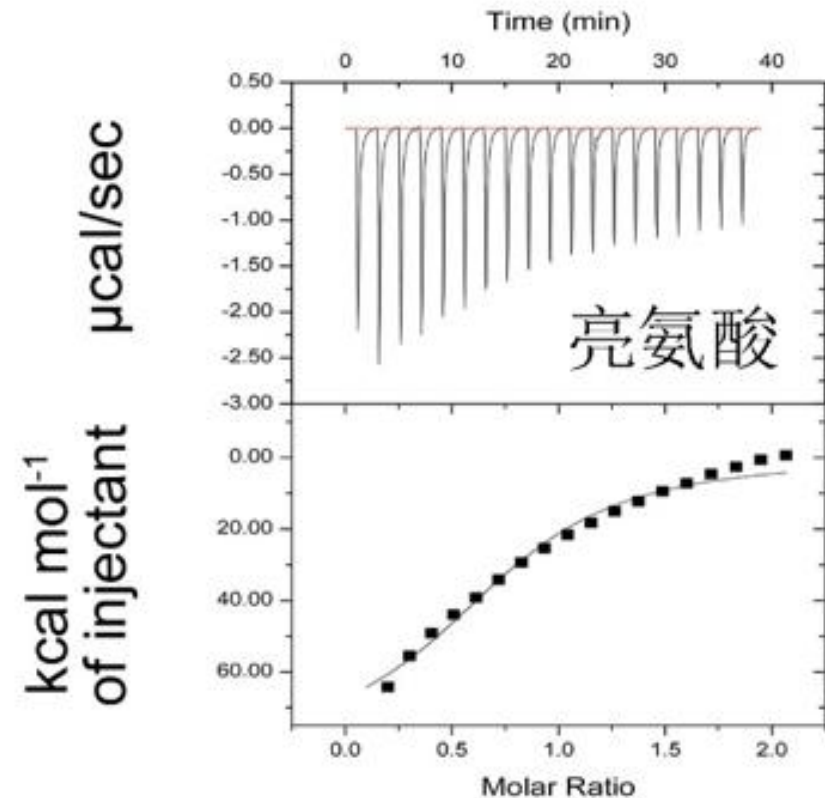
针对SQR9中*luxS*基因敲除及回补株上清液中的AI-2活性的检测

蛋白与小分子结合——等温热滴定 (ITC)

- 原理：发生结合反应时，热不是被吸收就是被释放，这是在配体被逐渐滴定到包含目标生物分子的样品池过程中通过灵敏热量计而测得，通过测量结合过程中的热传递，能够准确地确定结合常数 (K_D)、反应化学量 (n)、焓 (ΔH) 和熵 (ΔS)，不仅可测定结合亲和力，还能阐明潜在分子相互作用的机制。



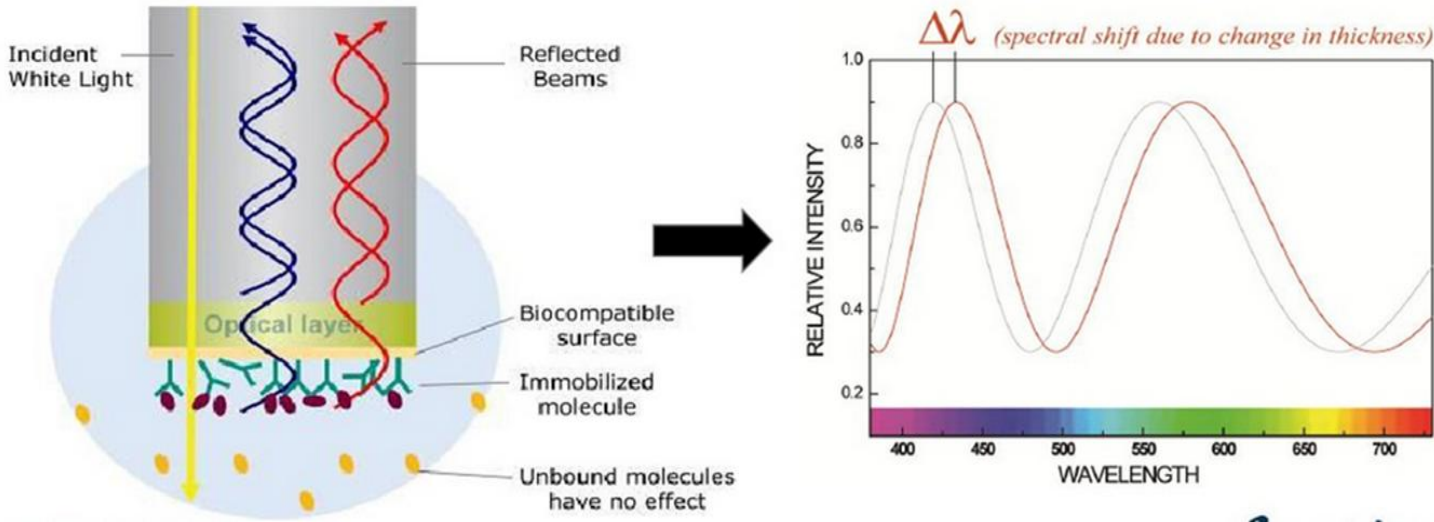
◆ 实验结果：



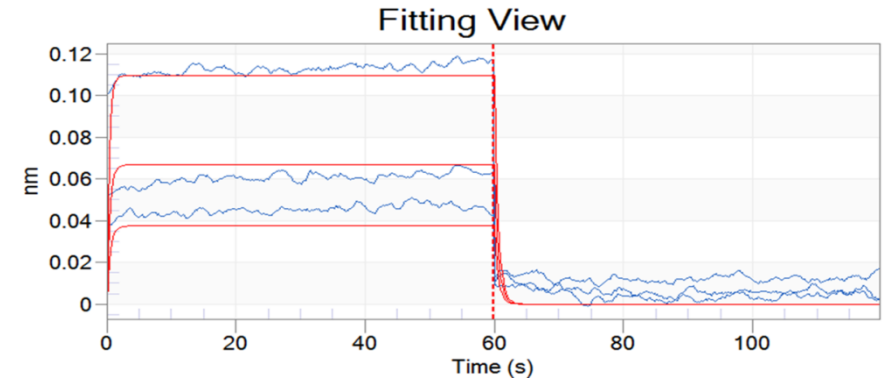
SQR9中的趋化受体蛋白McpCLBD与亮氨酸的结合

蛋白与小分子结合——生物膜层干涉技术 (BLI)

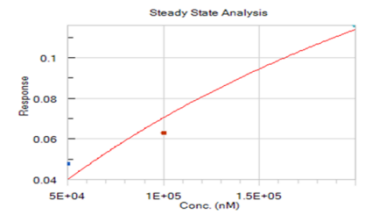
- 原理：用光纤制成的生物传感器底端覆盖了生物分子相容层,用来固定相互作用分子中的一个,形成生物膜层，相互作用发生时,生物层厚度增加,反射光干涉光谱曲线整体向波长增加方向移动.分子结合或解离时都会导致干涉曲线的漂移。



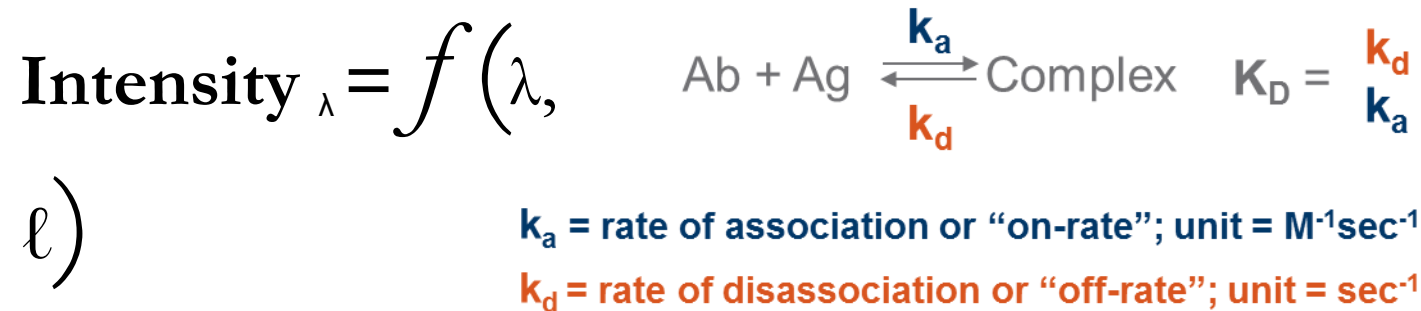
◆ 实验结果：



Data Used	Response	
Y Weighting		
Chi ² /DoF	0.000118889	
R ²	0.953549923	
RMax	0.297249207	0.107036268
KD	3.20E-04	±1.7E-04M



E.coli中蛋白LsrB与信号分子AI-2的结合。



谢谢!

恭祝大家:

身体健康!

生活幸福!

工作顺利!

