

• 生命科学与医药学 •

盐生盐杆菌 S9 营养条件及紫膜分离的初步研究

郭爱莲¹, 徐金贵¹, 侯 洵², 陈 烽²

(1. 西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 中国科学院 西安光学精密机械研究所, 陕西 西安 710068)

摘要:目的 为获得紫膜,研究了盐生盐杆菌(*Halobacterium halobium*) S9 的最适营养条件和紫膜的分离。**方法**通过该菌的培养特征、不同培养基、细胞色素的测定等,利用正交试验法对 NaCl、酪蛋白氨基酸、MgSO₄·7H₂O 和甘油这 4 个重要因素进行了优化。**结果** 最适营养和浓度分别是: NaCl 200 g/L, 酪蛋白氨基酸 10 g/L, MgSO₄·7H₂O 25 g/L, 甘油 10 g/L。该菌株在光照条件下, 38℃摇瓶培养 6 d, 可用高速冷冻离心、透析袋、蔗糖密度梯度纯化、超速离心等得到紫膜。**结论**优化了盐生盐杆菌 S9 的最适营养条件,并确定了所获紫膜的基本性质,可指导用于分子电子器件,今后将继续对其作定量研究。

关键词:盐生盐杆菌 S9; 营养条件; 优化; 紫膜; 分离

中图分类号:Q935 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274X(2004)02-0191-04

盐生盐杆菌属于古细菌类^[1],它们所产生的紫膜具有重要的应用价值。紫膜是由细菌视紫红质(bacteriorhodopsin, BR)和脂类组成的膜,在嗜盐菌原生质膜上以碎片形式存在,在电子显微镜下,呈圆、椭圆形膜片。其直径大约为 0.5 μm,厚度 5 nm,与原生质膜上其余部分红膜共面。在合适条件下,紫膜可占整个膜表面的一半。分离到的紫膜类脂的质量分数约 25%,蛋白质的类脂为 75%,类脂成分与其他细胞膜中的类脂很相似。紫膜中的惟一蛋白质是细菌视紫红质,由 248 个氨基酸组成,形成 7 个跨膜 α-螺旋,定位于细胞膜上^[2]。3 个 BR 分子构成的三聚体在细胞膜上形成一个刚性的二维六边形的稳定特征结构,即紫膜。紫膜中的细菌视紫红质是一种最有前途的光敏膜蛋白,具有光驱动质子泵的功能,从而可形成重要的电化学梯度。BR 吸收光子后,迅速发生视黄醛分子的异构变化,并形成一系列的中间体,最后回到初始状态。BR 在光循环过程中可进行质子运输,将质子由膜内运到膜外。紫膜利用两侧的质子梯度进行合成 ATP 等生命活动^[3]。由于 BR 在光化学循环中可将光能超快速地

转换成电能和化学能,并可以发生可逆的中间体互变,因而可以作为分子电子器件得到广泛的应用。由于它的代时长,因而给菌体的培养和紫膜的生产带来了极大的困难,所以非常有必要对营养条件进行研究,以提高菌体产率和紫膜产量。

1 试验材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 菌种 *Halobacterium halobium* CCTCC AB91126,原编号 S9(中国典型培养物菌种保藏中心)

1.1.2 培养基 复合培养基(CM, g/L): NaCl 250,酪蛋白氨基酸 7.5,酵母浸膏 10, MgSO₄·7H₂O 20,柠檬酸钠 3, KCl 2, FeSO₄·7H₂O 0.05, pH 7.0。

1.1.3 主要实验仪器 岛津 UV-265 型紫外分光光度计, Hitachi R22G 型高速冷冻离心机, Beckman L8-80 型超速离心机, 恒温摇瓶机等。

1.2 方 法

1.2.1 形态特征

收稿日期:2002-08-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(69907006)

作者简介:郭爱莲(1943),女,山东日照人,西北大学教授,从事微生物学研究。

1) 个体形态 采用革兰氏染色,利用 BS(内含 20% NaCl 和 2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)溶液涂片,待风干后,用 2% 的醋酸溶液固定 30 s,其余步骤同革兰氏染色中的步骤。然后,在光学显微镜下观察细菌细胞的形态,并测定大小。

2) 菌落特征 划线接种于牛奶-盐-琼脂培养基的平板^[4],置于恒温培养箱中,于 37℃ 光照培养 6 d。培养基的配制方法:①脱脂牛奶 150 mL,0.06 MPa,30 min 灭菌;②无机盐溶液制作 30 mL,内含 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g, KNO_3 0.6 g, NaCl 60 g 和 15 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.06 MPa,30 min 灭菌;③琼脂溶液 120 mL,内含酪蛋白氨基酸 1.5 g,甘油 2 g,琼脂 4.5 g,0.06 MPa,30 min 灭菌。在 70℃ 左右,将②和③混匀,调 pH 至 8.4,然后混入成分①,摇匀,倒平板。

1.2.2 细胞色素的测定^[5] 用 CM 培养基收集菌体,菌体经悬浮后,用体积比为 1:1 的氯仿-甲醇溶液抽提 2 h,用岛津 UV-265 型紫外分光光度计测其 360~600 nm 波长的吸收光谱。

1.2.3 营养条件的优化 利用 $L_9(3^4)$ 正交表试验,根据经验知,NaCl、酪蛋白氨基酸、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和甘油 4 个因素间交互作用极小,故选用 4 因素 3 水平的 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素及其水平见表 1。

1.2.4 紫膜的产生与分离^[6,7] 采用优化后的培养基,在光照条件下,38℃,摇瓶培养 6 d,然后分离紫膜。利用 Hitachi R22G 型高速冷冻离心机,在 7 000 r/min,4℃,离心 30 min,收集菌体。用透析袋(截留值为 $1.3 \times 10^{-23} \sim 1.6 \times 10^{-23}$ kg)裂解菌体,同时加入适量 DNase 液,置于蒸馏水中,在 4℃ 的条件下透析 48 h。裂解液经 18 000 r/min,40 min 离心,弃去上清液,沉淀用适量蒸馏水溶解,相同条件反复处理多次至上清液呈淡紫色。然后用蔗糖密度梯度纯化,蔗糖梯度为:下层质量分数为 60%,中层 43%,上层 38%。Beckman L8-80 型超速离心机,甩平转子,30 000 r/min,离心时间 6 h,离心温度 15℃。

分部收集各色带,用岛津 UV-265 型紫外分光光度计在 360~600 nm 间作光谱扫描,以鉴定紫膜带。

2 结果与讨论

2.1 形态特征

革兰氏染色阴性,细胞单个,杆状,大小为 $(0.97 \sim 1.10) \mu\text{m} \times (3.9 \sim 4.2) \mu\text{m}$,在牛奶-盐-琼脂培养

基上,菌落颜色为红色,菌落直径约为 1 mm,菌落中间凸起,边缘完整,表面湿润、光滑。

2.2 细胞色素试验

色素的吸收光谱见图 1。S9 在 391,497 和 531 nm 处有吸收峰,其中在 465~480 nm 之间有一肩峰。这些与文献上报道的已知菌 R₁ 的色素的光吸收峰相一致^[7,8]。根据该吸收光谱,知其为类胡萝卜素类色素,这也是极端嗜盐菌的一个特征。

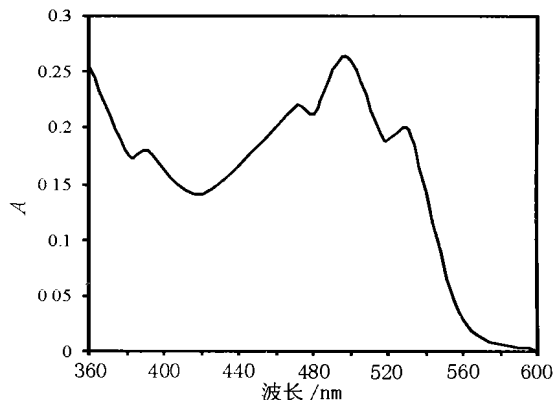


图 1 S9 细胞色素的吸收光谱图

Fig. 1 Absorption peak wavelength of pigments of strain S9

2.3 正交试验设计结果及其分析

2.3.1 正交试验结果 根据经验知,各因素间的交互作用极小,可以忽略,故采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行研究。表头设计及试验结果与分析见表 1。根据各因素的极差(R)大小,可确定各因素的最优水平。由此得出各因素的最优水平为 NaCl 200 g/L,酪蛋白氨基酸 10 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25 g/L,甘油 10 g/L。由此初步确定最优组合为: A₃B₁C₂D₃,其他成分同 CM 培养基。

2.3.2 极差分析 对 NaCl、酪蛋白氨基酸、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和甘油这 4 个因素进行极差分析,结果见图 2。表明,各因素对 S9 生长的影响大小趋势是:酪蛋白氨基酸 > NaCl > 甘油 > $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

2.4 紫膜分离、纯化

极端嗜盐菌在蒸馏水中可以完全裂解,而紫膜的结构却很稳定,其功能很完整。因而,基于紫膜对蒸馏水的抗性,可使细胞膜破碎成小碎片和溶解性蛋白部分,再将蒸馏水中胞溶的细胞作级差离心,即可得到清洁的样品。

培养后的离心物为红色,在菌体裂解中,使用了透析袋,这可以减少后期的处理量,同时,该透析袋的截留值是 $1.3 \times 10^{-23} \sim 1.6 \times 10^{-23}$ kg,而紫膜的 BR 分子的相对分子量是 4.3×10^{-23} kg,因而可以保证紫膜片段留在袋内而不至于损失。在裂解中加

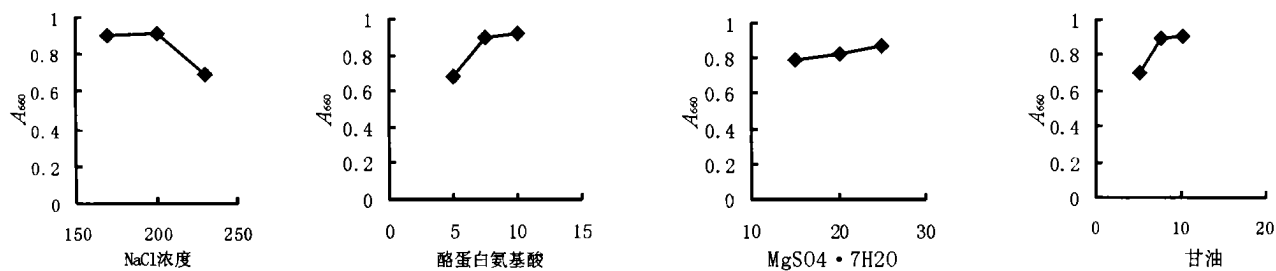
入 DNase, 可以水解核酸, 同时采用多次换水的措施, 可以降低裂解液的粘度。

表 1 S9 的 $L_9(3^4)$ 正交表与试验结果

Tab.1 Orthogonal table of $L_9(3^4)$ and results of strain S9

实验号	A	B	C	D	评价指标
	NaCl	酪蛋白氨基酸	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	甘油	A_{660}
1	1 (230 g/L)	1 (10 g/L)	1 (15 g/L)	1 (5.0 g/L)	0.196
2	1 (230 g/L)	2 (5.0 g/L)	2 (25 g/L)	2 (7.5 g/L)	0.212
3	1 (230 g/L)	3 (7.5 g/L)	3 (20 g/L)	3 (10 g/L)	0.271
4	2 (170 g/L)	1 (10 g/L)	2 (25 g/L)	3 (10 g/L)	0.370
5	2 (170 g/L)	2 (5.0 g/L)	3 (20 g/L)	1 (5.0 g/L)	0.206
6	2 (170 g/L)	3 (7.5 g/L)	1 (15 g/L)	2 (7.5 g/L)	0.330
7	3 (200 g/L)	1 (10 g/L)	3 (20 g/L)	2 (7.5 g/L)	0.353
8	3 (200 g/L)	2 (5.0 g/L)	1 (15 g/L)	3 (10 g/L)	0.264
9	3 (200 g/L)	3 (7.5 g/L)	2 (25 g/L)	1 (5.0 g/L)	0.295
K1	0.679	0.919	0.790	0.697	$T=2.497$
K2	0.906	0.682	0.877	0.895	
K3	0.912	0.896	0.830	0.905	
R	0.233	0.237	0.087	0.208	
优化组合	A3	B1	C2	D3	

注: K1, K2, K3 分别是各水平的和, R 为极差, T 为评价指标的总和。



B(酪蛋白氨基酸) A(NaCl) D(甘油) C($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

主.....次

图 2 各因素趋势图

Fig.2 Tendency of Factors

经 18 000 r/min, 40 min 离心后得到的粗提纯液, 经蔗糖密度梯度离心后, 在 38% 和 43% 的交界面上有一红色带, 在 60% 与 43% 的交界面上有一淡紫色带, 在底部有黄色沉淀。小心地取出淡紫色带, 经岛津 UV-265 检测, 结果表明: 淡紫色带在 565 nm 附近有最大吸收峰, 显示出紫膜的特征吸收峰^[8](结果见图 3)。

3 小 结

本文利用正交试验优化了 S9 的营养条件, 并且对紫膜的提取进行了初步的研究, 取得了良好的效果。在今后的实验中, 将对 S9 的紫膜产量进行定量研究。

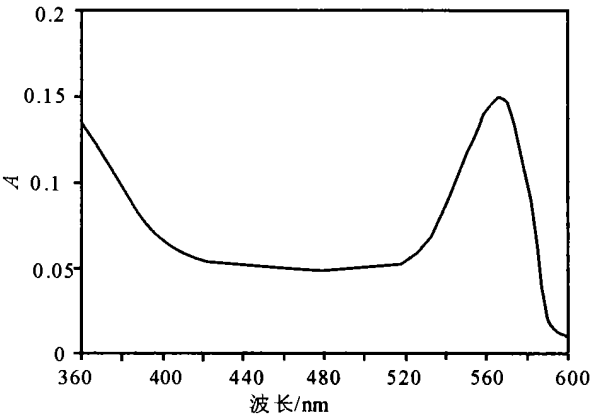


图 3 S9 紫膜吸收光谱

Fig.3 Absorption spectrum of purple membrane

参考文献:

- [1] 杨苏声. 细菌分类学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1997. 130-132.
- [2] KHORANA H G, GERBER G E, HERLIHY W C. Amino acid sequence of bacteriorhodopsin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10): 5 046-5 050.
- [3] 王大珍, 印明善. 嗜盐杆菌的光能转化作用[J]. 微生物学通报, 1981, 8(6): 277-279.
- [4] 张纪忠, 黄静娟, 徐德强, 等. 嗜盐杆菌属一新种[J]. 微生物学报, 1990, 30(2): 87-93.
- [5] 王大珍, 周培瑾, 田新玉, 等. 极端嗜盐菌新种的鉴定[J]. 微生物学报, 1984, 24(4): 304-709.
- [6] 傅学奇, 王今堆, 周勇亮, 等. 细菌视紫红质的分离提纯及鉴定[J]. 吉林大学自然科学学报, 1995, (1): 84-86.
- [7] OESTERHELT D, STOECKENIUS W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane[J]. Methods in Enzymology, 1974, 31: 667-678.
- [8] LANYI J K. Spectrophotometric determination of Halorhodopsin in *Halobacterium halobium* membranes[J]. Methods in Enzymology, 1981, 38: 439-443.

(编辑 徐象平)

Primary study on culture condition and separation of purple membrane of *Halobacterium halobium* S⁹

GUO Ai-lian¹, XU Jin-gui¹, HOU Xun², CHEN Feng²

(1. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Academy Sinica, Xi'an, 710068, China)

Abstract: **Aim** Optimal nutritive condition and separation of purple membrane of *Halobacterium halobium* S⁹ were studied. **Methods** With the study of this strain's cultural characteristics, different culture medium, measurement of the cell pigment and so on, the four important factors, NaCl, Casamino acid, MgSO₄·7H₂O and glycerol, were optimized by orthogonal test. **Results** The optimal nutrition and concentration as followed: NaCl 200 g/L, Casamino acid 10 g/L, MgSO₄·7H₂O 25 g/L and glycerol 10 g/L. The strain was cultured under light treatment, temperature 38℃, shake cultivation 6 days, the purple membrane was gained through high speed freeze centrifugation, dialysis, sucrose density gradient centrifugation, superspeed centrifugation etc. **Conclusion** From *Halobacterium halobium* S⁹ cultured with optimal nutritive condition, purified purple membrane was gained through the above method.

Key words: *Halobacterium halobium* S⁹; nutritive condition; optimize; purple membrane; separation