

# 长双歧杆菌细胞壁完整肽聚糖分离鉴定的研究

丁喜顺<sup>1,2</sup>, 邓承远<sup>2</sup>, 冯谦<sup>2</sup>, 刘彦民<sup>2</sup>, 金海<sup>3</sup>

1(内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 内蒙古 呼和浩特, 010018)

2(内蒙古双奇药业股份有限公司, 内蒙古 呼和浩特, 010010)

3(内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特, 010030)

**摘 要** 长双歧杆菌 NQ-1501 菌株, 经三级扩大培养, 离心集菌, 用三氯乙酸处理以除去细胞壁上的磷壁酸及菌体内的核酸, 经甲醇、丙酮脱脂, 再经胰蛋白酶及中性蛋白酶进行复合酶解去除菌体内部的蛋白质, 离心清洗、冻干即可制得肽聚糖。经过溶菌酶溶解试验, 紫外可见光谱扫描分析证明所得产物为肽聚糖, 化学组分分析显示其主要由多肽与氨基己糖组成, 透射电镜观察显示所提取的肽聚糖仍保持着原有的细菌细胞形态。证明所提取的肽聚糖为完整肽聚糖。

**关键词** 长双歧杆菌, 完整肽聚糖, 分离, 鉴定

近年来, 生物免疫调节剂的研究发展很快, 在免疫治疗中占有重要地位, 在肿瘤、感染、自身免疫病、免疫缺陷病的治疗中已有广泛应用, 但目前主要使用的卡介苗、短小棒状杆菌都存在不同程度的副作用, 而肠道中的生理性细菌——双歧杆菌及其组分以其无毒、无副作用的优势, 引起了人们的高度重视<sup>[1]</sup>。

双歧杆菌完整肽聚糖 (whole peptidoglycan, WPG) 亦叫全细胞肽聚糖, 是双歧杆菌细胞壁中的重要组分, 未经物理破碎并保持细菌细胞壁骨架完整性的细胞壁结构, 是由多糖和肽聚糖聚合而成的“袋形”结构, 它保持了菌株的一些重要生物学特性<sup>[2]</sup>。

目前研究发现, WPG 是双歧杆菌发挥抗肿瘤、抗感染以及免疫赋活等多种生理功能的主要成分, 也是一种无毒副作用的生物反应调节剂, 体内外能显著抑制多种肿瘤的生长, 如 S180 肉瘤、胃癌、大肠癌、和 Meth A 纤维肉瘤等<sup>[2-7]</sup>。目前认为其抑瘤机理主要是降低肿瘤细胞的增殖活性, 同时诱导其凋亡; 此外, 也能激活巨噬细胞增强其杀瘤活性<sup>[6]</sup>。

双歧杆菌 WPG 提取已见报道<sup>[2]</sup>, 但提取方法复杂, 成本高, 制造周期长, 易污染, 很难广泛应用。本文提供了一条方法简单, 成本低, 制造周期短的完整肽聚糖制备方法, 为这一极有发展前途的生物应答调节剂的进一步产业开发提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

第一作者: 硕士研究生。

收稿日期: 2009-01-20, 改回日期: 2009-02-16

#### 1.1.1 菌种及其菌体的获得

长双歧杆菌 NQ-1501 菌株, 内蒙古双奇药业股份有限公司提供, 使用 TPY 培养基经三级扩大培养, 离心收集菌体, 生理盐水离心清洗 3 次, 用于 WPG 的制备。

#### 1.1.2 仪器设备

哈东联 BCN-1360 生物洁净工作台, Forma1029 厌氧培养系统 (Thermo Electron), ZHWY-100D 恒温培养振荡器 (上海智诚), 岛津 UV-2100S 型紫外可见分光光度计, 日立 835-50 型氨基酸分析仪, JEM-1400 型透射电子显微镜 (JEOL)

#### 1.1.3 主要试剂

胰蛋白酶 (>250 N. F. U/mg), Amresco; 中性蛋白酶 (>60000 U/g), BDH; 溶菌酶 (>60000 U/mg), Sigma; 肽聚糖标准品, Sigma; 三氯乙酸 (TCA)、甲醇、丙酮均为分析纯试剂, 购于国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 方法

#### 1.2.1 长双歧杆菌 WPG 的制备

取离心清洗的菌泥 100g (湿重), 按固液比 1:10 (g:mL) 加入质量浓度为 10% 的 TCA, 摇匀, 于 40~60℃ 水浴振荡处理 4~8 h, 立即冷却, 离心 (8 000 × g, 15 min), 沉淀用甲醇脱水以除去 TCA, 残渣再用丙酮脱脂, 所得残渣按固液比 (1:5) 加入过滤除菌的混合酶液 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液 pH7.4, 含有胰蛋白酶及中性蛋白酶, 使每种酶的酶活达到 250 U/mL), 置 38℃ 空气摇床培养箱中振荡酶解 48 h, 离心 (20 000 × g, 30 min), 残渣用无菌水离心清洗 5 次, 冻干, 即

得长双歧杆菌细胞壁 WPG 4.05g。

1.2.2 长双歧杆菌 WPG 的鉴定

1.2.2.1 溶菌酶溶解试验

参考文献<sup>[8]</sup>的方法,称取 WPG,按固液比 1:100 g:mL 加入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH6.2),含有溶菌酶 100 μg/mL,37℃,180 r/min 振荡处理 96 h,其间取样 5 倍稀释后在波长 450 nm 处测定吸光度,监测肽聚糖溶解变化。

1.2.2.2 紫外可见光谱扫描分析

取提取的 WPG、肽聚糖标准品及菌粉 1 mg 溶于 100 mL 纯化水中,混匀后在波长 190~700nm 紫外-可见区段进行光谱扫描,对图谱进行比较。

1.2.2.3 氨基酸组分分析

采用国家标准 GB/T18246-2000。取一定数量的菌体及 WPG 提取物,用 6mol/L HCl 110℃ 真空水解 24h,用氨基酸分析仪测定样品的氨基酸组成及含量。

1.2.2.4 氨基己糖分析

N-乙酰葡萄糖胺含量测定采用文献<sup>[9]</sup>的方法; N-乙酰胞壁酸含量测定参照文献<sup>[10]</sup>的方法。

1.2.2.5 电镜观察

菌体及其 WPG 样品用生理盐水调浓度 10<sup>9</sup>cfu/mL,取悬液滴于干净的封口膜上,将附有支持膜的铜网倒扣在悬液上 10 min,吸干,再倒扣于 2% 醋酸双氧铀金属染色液负染色 8 min,吸干余液,晾干,上透射电子显微镜进行观察并照相。

2 结果与分析

2.1 溶菌酶消化实验

图 1 结果显示,所得到的菌体成分可被溶菌酶完全消化降解,证实分离物为肽聚糖。

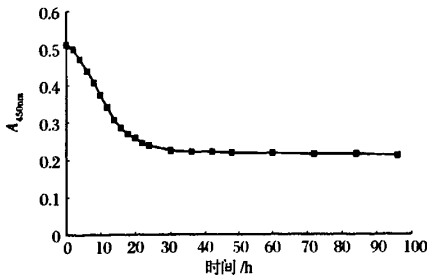


图 1 WPG 溶菌酶消化变化图

2.2 紫外可见光谱扫描分析

由图 2 可知,所得的 WPG 与菌体相比,核酸蛋白区的紫外吸收明显下降,且与 PG 标准品的峰形及峰

位基本一致,最大吸收峰在 195nm 处,进一步证明所得到的菌体成分为肽聚糖。

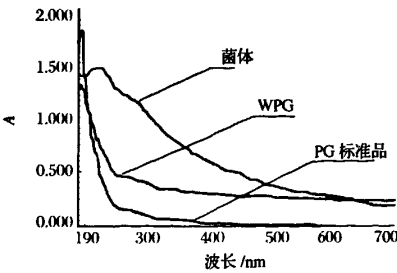


图 2 WPG 紫外可见光谱扫描图

2.3 菌体与 WPG 氨基酸分析结果

长双歧杆菌菌体及其细胞壁 WPG 氨基酸组分及含量见表 1。由表 1 可知 WPG 氨基酸的组成种类与菌体一致。Koch 等的研究表明,丙氨酸、谷氨酸、鸟氨酸是长双歧杆菌肽聚糖短肽尾中的特征氨基酸,丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸为肽桥中的特征氨基酸<sup>[11,12]</sup>。在提取物中,苏氨酸基本保持不变,鸟氨酸未做测定,其余肽聚糖特征氨基酸:丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、丝氨酸含量均有所增加,丙氨酸:谷氨酸:苏氨酸:丝氨酸的摩尔比为 3.5:1:0.3:0.3,表明获得的确系肽聚糖组分。

表 1 长双歧杆菌菌体及其细胞壁 WPG 的氨基

氨基酸		mmol/g	
酸组成		菌体	WPG
丙氨酸	Ala	0.802	2.520 ↑
谷氨酸	Glu	0.609	0.723 ↑
赖氨酸	Lys	0.341	0.488 ↑
蛋氨酸	Met	0.118	0.372 ↑
苏氨酸	Thr	0.275	0.245
丝氨酸	Ser	0.222	0.234 ↑
亮氨酸	Leu	0.310	0.172
天冬氨酸	Asp	0.498	0.157
甘氨酸	Gly	0.378	0.150
缬氨酸	Val	0.266	0.138
异亮氨酸	Ile	0.203	0.118
苯丙氨酸	Phe	0.149	0.113
精氨酸	Arg	0.227	0.077
胱氨酸	Cys	0.032	0.062 ↑
脯氨酸	Pro	0.152	0.054
酪氨酸	Tyr	0.114	0.052
组氨酸	His	0.094	0.029
氨	NH <sub>3</sub>	0.883	1.232 ↑

2.4 氨基己糖分析结果

长双歧杆菌细胞壁 WPG 的氨基己糖分析结果见表 2。

表 2 长双歧杆菌细胞壁 WPG 的氨基己糖分析结果

N-乙酰葡萄糖胺/mmol·g <sup>-1</sup>	N-乙酰胞壁酸/mmol·g <sup>-1</sup>
0.654	0.693

## 2.5 电镜结果

观察由图3、图4透射电镜结果可见,所提取的长双歧杆菌细胞壁肽聚糖仍保持着菌体细胞形态,进一步确证所提取的肽聚糖为完整肽聚糖。

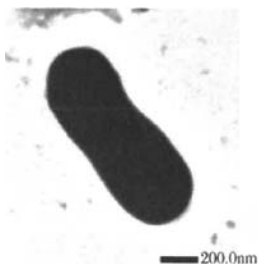


图3 长双歧杆菌菌体透射电镜照片(20 000 ×)

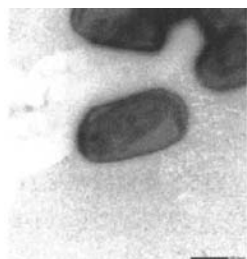


图4 长双歧杆菌细胞壁 WPG 透射电镜照片(8 000 ×)

## 3 讨论

目前广泛用于提取 WPG 的方法<sup>[2]</sup>是由 Sekine 等人建立的,该方法制造周期长,至少 15 d,易造成污染,且所用的消化酶包含非工业化用酶,成本高,因而很难工业化生产;本方法通过使用 TCA 去除了细胞壁上的磷酸盐和细胞内的核酸物质,增强了细胞壁的通透性,从而大大缩短了后续酶解时间,整个过程仅需 3 d,另外本研究所用的酶都是工业化用酶,且方法简单,适合于大量制备。

革兰阳性细菌肽聚糖是由 N-乙酰葡萄糖胺与 N-乙酰胞壁酸通过  $\beta$ -1,4 糖苷键连接起来的线性聚合物,每个 N-乙酰胞壁酸羧基连接 4~5 个氨基酸的肽链,肽链与肽链之间通过特定的肽桥连接起来,肽聚糖相互交联构成三维空间网状结构。溶菌酶能专一切断肽聚糖中 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的  $\beta$ -1,4 糖苷键,破坏肽聚糖骨架体系,使肽聚糖溶解,因此常用于肽聚糖的定性鉴定。本研究提取的 WPG 主要由氨基己糖和氨基酸组成,其中长双歧杆菌细胞壁肽聚糖特征氨基酸丙氨酸、谷氨酸、丝氨酸含量都有所增加,苏氨酸基本保持不变;通过透射电

镜观察所提取肽聚糖仍保持了菌体的完整形态,证明提取物为完整肽聚糖。在我们的研究结果中,赖氨酸、蛋氨酸以及胱氨酸含量与菌体相比,也有所增加,它们是否为长双歧杆菌 NQ-1501 菌株细胞壁肽聚糖特征氨基酸还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 郭俊杰. 双歧杆菌细胞壁的免疫调节和抑瘤作用研究[D]. 淮南:安徽理工大学,1996. 1
- 2 Sekine K, Toida T, Saito M, et al. A new morphologically characterized cell wall preparation (Whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice[J]. *Cancer Res*, 1985, 45:1300
- 3 张宝元, 马晓红, 刘震, 等. 双歧杆菌及其 WPG 对 S180 荷瘤小鼠免疫调节和抑瘤作用研究[J]. *中国微生态学杂志*, 2001, 13(1): 8~10
- 4 杨平, 刘宁, 张春燕, 等. 双歧杆菌完整肽聚糖对实验性胃癌增殖及凋亡的影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(19): 1 441~1 444
- 5 蔡良真, 李姝君, 官成浓. 双歧杆菌完整肽聚糖的体外抗肿瘤作用及对大鼠大肠肿瘤的影响[J]. *广东医学院学报*, 2005, 23(5): 500~502
- 6 王立生, 潘令嘉, 施理, 等. 双歧杆菌的完整肽聚糖对实验性大肠癌的抑制作用及诱导其凋亡[J]. *中华消化杂志*, 1999, 19(5): 331~334
- 7 王立生, 潘令嘉, 陈村龙, 等. 完整肽聚糖对实验性大肠癌的抑制作用及其机制探讨[J]. *中国微生态学杂志*, 1999, 11(5): 257~259
- 8 马西艺, 乐国伟, 施用晖, 等. 乳酸杆菌肽聚糖的分离鉴定及其免疫活性[J]. *无锡轻工大学学报*, 2003, 22(6): 52
- 9 Reissig JL, Strominger JL, Leloir LF. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylaminic sugars[J]. *J Biol Chem*, 1955, 217(2): 959~966
- 10 Barker SB, Summerson WH. The colorimetric determination of lactic acid in biological material[J]. *J Biol Chem*, 1941, 138(2): 535
- 11 Kandler O. Amino acid sequence of the murein and taxonomy of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1970, 20(4): 491~507
- 12 Koch D, Schleifer KH, Kandler O. Die aminosäuresequenz des threonin und serin enthaltenden murei von *bifidobacterium longum reuter*[J]. *Arch Mikrobiol*, 1970, 74: 315~325

(下转第 69 页)

- [J]. Separation Purification Technology, 2007, 53(3): 273 ~ 280
- 6 Amarowicz R, Naczek M, Shahidi F. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of Canola Hulls[J]. J Agri Food Chem 2000, 48(7): 2755 ~ 2759
  - 7 陈炳华, 李婷, 陈婧宇, 等. 大孔吸附树脂对海边月见草总黄酮的吸附及解吸特性[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(2): 11 ~ 15
  - 8 Dewanto V, Wu X, Adom KK, et al. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity[J]. J Agri Food Chem, 2002, 50(10): 3010 ~ 3014
  - 9 李仁菊. 广西金花茶中多酚的提取和抗氧化性能研究[D]. 广西: 广西大学, 2007. 29 ~ 30
  - 10 石碧, 狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 138 ~ 139
  - 11 陈贤春, 吴清, 李冀湘. 大孔吸附树脂富集丹参总酚酸的工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 115 ~ 116

## Study on Adsorption and Desorption Properties of AB-8 Macroporous Resins for Polyphenols from *Limonium sinense* (Girard) Kuntze Root

Li Jun, Chen Binghua, Wang Jingjing, Zhou Bingjie

(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

**ABSTRACT** Five kinds of macroporous resins including S-8, NKA-9, AB-8, NKA and D4020, AB-8 resin were selected as a suitable material to purify the polyphenols from the *Limonium sinense* (Girard) Kuntze root and the property of adsorption and desorption were researched. The static saturated adsorption capacity of AB-8 resin was 55.30 mg/g while the time for it to achieve saturation adsorption was 5 h. Besides, the adsorption isotherm data of AB-8 resin could better fit the Langmuir adsorption model. The pH value of the extract solution had no influence on the efficiency of adsorption. In the dynamic adsorption procedure, the feeding concentration was 1.99 mg/mL, appeared leaking and saturating point were 10 BV, 32 BV (Bed Volume, 1 BV = 30 mL), respectively. Therefore, the adsorbing capacities of resin could be fully utilized by arranging column in series. When the eluant was 70% (volume fraction) ethanol at flow velocity 1 mL/min, the purity of polyphenols obtained was 58.29%.

**Key words** *Limonium sinense* (Girard) Kuntze, polyphenols, macroporous resins, adsorption, desorption

(上接第 64 页)

## Studies on the Isolation and Identification of Whole Peptidoglycan from *Bifidobacterium longum*

Ding Xishun<sup>1,2</sup>, Deng Chengyuan<sup>2</sup>, Feng Qian<sup>2</sup>, Liu Yanmin<sup>2</sup>, Jin Hai<sup>3</sup>

1 (College of Animal Science and Veterinary medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

2 (Inner Mongolia ShuangQi Pharmaceutical Co. Ltd, Hohhot 010010, China)

3 (Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010030, China)

**ABSTRACT** The cell wall WPG of *Bifidobacterium longum* NQ-1501 was extracted and purified as follows: (1) collecting bacteria by Centrifuge After three-level culture expansion. (2) Treating the bacteria cells with trichloroacetic acid in order to remove the wall teichoic acids as well as nucleic acid. (3) Delipoiding the residue with methanol and acetone. (4) Digesting the defatted residue with trypsin and neutral protease. (5) Cleaned by centrifugation and lyophilized. It has been proved by lysozyme and UV-visible absorption spectra that the extracts were peptidoglycan. The results of chemical analysis indicated that WPG was mainly composed of polypeptides and amino hexose. The transmission electronmicroscopic observation of WPG showed that WPG held the physically intact cell wall structure of the whole cells. In conclusion the peptidoglycan we obtained was whole peptidoglycan.

**Key words** *Bifidobacterium longum*, whole peptidoglycan, isolation, identification