

利用凝胶双向扩散试验 研究海洋发光细菌的分类关系

杨頔康 朱文杰 吴自荣 周仁丽 马博英 王万青

(华东师范大学生物学系)

细菌分类,向以形态学和生理生化特征为主要依据。近年来,由于分子生物学的进展,提供了很多新技术,使细菌分类的研究进入分子水平。此类研究结果反映了细菌之间的亲缘关系,因而更确切地反映了细菌各属、种之间的进化联系。凝胶双向扩散试验属于免疫学方法,常用菌体内的谷氨酰胺合成酶(GS)、超氧化物歧化酶(SOD)等作为抗原和抗体进行试验。由于抗原抗体反应的高度特异性,能确定同类蛋白质的抗原决定因子的异同,从而确定不同属、种之间的亲缘关系,其结果可以弥补以表型特征为依据的分类方法的不足。Baumann(1978)等人报道了用发光细菌的SOD的凝胶双向扩散技术进行分类研究,国内我们尚未见到这方面报道。本文报道了用海洋发光细菌的超氧化物歧化酶进行凝胶双向扩散试验,分析了海洋发光细菌之间的分类关系。

一、材料和方法

(一) 菌种

明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*) 501, 502, 528; 鳕鱼发光杆菌(*P. Leiognathi*) 223, 477, 480; 费氏弧菌(*Vibrio fischeri*) 397, 61; 哈维氏弧菌(*V. harveyi*) 103; 美丽弧菌(*V. Splendidus*) 2, 517; 东方弧菌(*V. orientalis*) 513, 514, 516, 518; 溶藻酸弧菌(*V. alginolyticus*) 90; 火神弧菌(*V. Logei*) 584; 霍乱弧菌(*V. cholerae*) M13, 以及未定种发光细菌101

菌株。除费氏弧菌397、溶藻酸弧菌90、霍乱弧菌M13、火神弧菌584和鳕鱼发光杆菌477, 480等由ATCC提供外,其余各菌株均由本组分离和鉴定。

(二) 细菌培养

培养基配方按 Baumann 的 LM 培养基。人工海水配方为 0.4M NaCl, 0.1M MgSO₄·7H₂O, 0.02MKCl 和 0.02M CaCl₂·H₂O。取二分之一浓度的人工海水加入下列成分: 50mM Tris-HCl, pH7.5, 19mM NH₄Cl, 0.33mM K₂HPO₄·3H₂O, 0.1mM FeSO₄·7H₂O, 0.3%甘油, 0.5%酵母膏, 0.5%胰蛋白胨, 0.1%CaCO₃。固体培养基再加2%琼脂。

先将菌种转接于斜面上, 24°C, 培养20小时, 再用3%NaCl溶液制成菌悬液, 接种于液体培养基中恒温振荡培养。明亮发光杆菌在18°C下培养18小时, 其余各菌均在24°C下培养12小时, 至前静止期离心收集菌体, 3000IPm·20分钟。在0°C以下冰冻贮藏。

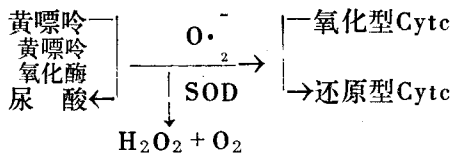
(三) 抗原SOD的提取

主要根据Puge⁺的方法, 略加变动。(1) 菌体破碎: 在室温中让冰冻的菌液自然融化, 以少量5mM pH7.8磷酸钾缓冲液转移菌液。在4°C以下, 冰-盐浴中, 用超声波破碎器粉碎细胞。功率约15W, 破碎30分钟, 每次开机10分钟间歇10分钟。用相差显微镜检查破碎细胞的效果。以少量50mM pH7.8磷酸钾缓冲液转移菌液。用高速离心机离心, 23800×g, 4°C,

20分钟。取上清液在0℃以下冰冻过夜。再融化, 26900×g, 4℃, 离心10分钟, 取上清液。(2)去核酸: 在上清液中滴加10%硫酸链霉素至终浓度为1%。在冰浴中用磁力搅拌器搅拌30分钟, 然后用23800×g, 4℃, 离心20分钟, 取上清液。(3)蛋白质分步沉淀: 上列之上清液逐步加入固体硫酸铵至50%的饱和度, 冰浴中搅拌30分钟, 然后以26900×g, 4℃, 离心20分钟, 取上清液。再加固体硫酸铵至80%的饱和度, 冰浴中搅拌30分钟, 再次以26900×g, 4℃离心15分钟, 倾去上清液, 用少量5mM pH 7.8磷酸钾缓冲液溶解沉淀, 此即为提取的SOD。(4)透析: 在2升5mM pH 7.8磷酸钾缓冲液中透析6小时, 换一次缓冲液, 透析过夜, 温度均保持在0℃。然后再次离心去沉淀, 20900×g, 4℃, 15分钟。取上清液, 于0℃以下冰冻贮藏备用。

(四) SOD活性测定

根据Mc Cord的细胞色素C还原法测定SOD的活力。其主要机制为:



由黄嘌呤产生之 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 能使细胞色素C还原, 当有SOD存在时, SOD能催化下列反应:

$\text{O}_2^{\cdot -} + \text{O}_2^{\cdot -} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$, 从而使细胞色素C的还原受抑制。当在标准状况下抑制细胞色素C的还原率50%的称为一个活性单位。

比色杯容量为2毫升, 光径0.5厘米, 反应液在加入黄嘌呤氧化酶后立即在分光光度计上测定其光密度的变化, 波长550nm。实验所用的各菌株的SOD活性单位见表。

(五) SOD抗血清的制备

从*V. alginolyticus* 90、*V. splendidus* II 2、*V. cholerae* M13、*V. fischeri* 61、*P. Leiognathi* 480中提取SOD, 并进行纯化。分别给五只雄性新西兰白兔注射纯SOD, 每只注射五次, 每次1毫克, 抗体形成后制成抗血清。

各菌株的SOD活性表

Table Units of SOD activity of strains

菌 株	酶活性 (u/ml)
明亮发光杆菌 (<i>P. phosphoreum</i>)	907
501	768
502	295
528	
鳎鱼发光杆菌 (<i>P. leiognathi</i>)	2736
223	450
477	
费氏弧菌 (<i>V. fischeri</i>)	607
397	
哈维氏弧菌 (<i>V. harveyi</i>)	351
103	
美丽弧菌 (<i>V. splendidus</i>)	320
2	1373
517	
东方弧菌 (<i>V. orientalis</i>)	225
513	240
514	733
516	808
518	
溶藻酸弧菌 (<i>V. alginolyticus</i>)	3600
90	
火神弧菌 (<i>V. logei</i>)	210
534	
未定种发光细菌菌株 (Strain)	682
101	

抗血清和同源抗原反应时补体被结合75%时的抗血清浓度称为滴定度。本实验所用的抗血清的滴定度为:*V. alginolyticus* 90¹/₁₃₀₀₀, *V. splendidus* II 2 1/37000, *V. cholerae* M13 1/25000, 使用时调整到1/6500。

(六) 凝胶双向扩散试验

1. 凝胶成分: 在10mM pH 7.8的磷酸钾缓冲液中加入氯化钠0.55% (W/V) 和离子琼脂1% (W/V)。

2. 抗原和抗体准备: 用5mM pH 7.8的磷

酸钾缓冲液将抗原SOD稀释至80 μ l/ml, 抗体调整到1/6500。

3. 凝胶平板的制备: 塑料扩散盘4.5 \times 8.5厘米。每盘加入7毫升融化的凝胶。凝固后在凝胶上打孔。中间一个孔, 周围6个孔, 孔径3毫米, 孔间距离4厘米。中间孔注入10微升抗血清, 周围孔注入各菌株的抗原SOD10微升。在0 $^{\circ}$ C扩散过夜。

二、结 果

SOD抗原与抗体在凝胶中扩散, 在最适比例的浓度处形成沉淀, 呈乳白色, 在透明的凝胶中清晰可见。图1显示了凝胶双向扩散试验的具体状况。位于中间的*V. cholerae* M13抗血清与周围各抗原SOD发生凝集反应, 形成乳

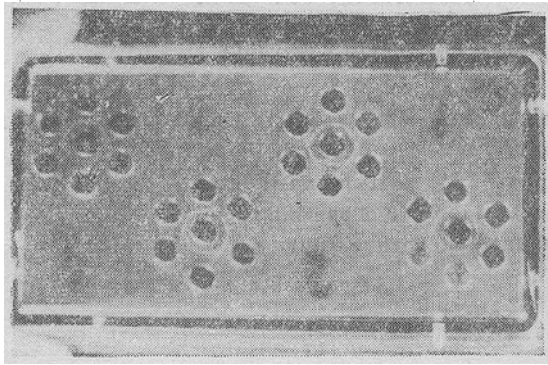


图1 用*V. cholerae*M13抗血清与各菌株的SOD抗原进行凝胶双向扩散试验。每组七个孔, 中间一个孔注入抗血清, 周围六个孔分别注入不同的SOD抗原, 抗原抗体形成乳白色沉淀线, 相邻的沉淀线其交接状态可区分为光滑连接和一端伸出短矩的两种类型。

Fig.1 Summary of the Ouchterlong double diffusion experiments with anti-*V. cholerae* M13 and SOD extracted from other strains. Seven wells a batch. The wells were 4mm apart and contained 20 ml of antigen or antiserum. The antiserum reacted with two neighboring antigens to produce a precipitin line, a fused line with a precipitin or a precipitin line with a single spur.

白色的沉淀线。相邻的两种抗原其沉淀线相交接的状态不同。

从图1可看出, 有两种类型的沉淀线交接形态: 其一为相邻两抗原之间的沉淀线连接光滑, 这表明两者具有相同的抗原决定因子, 亲缘关系相近; 其二为相邻两抗原之间的沉淀线接合处伸出短矩, 这表明两种抗原部分一致, 有矩的抗原决定因子较多, 两者亲缘关系较远。每两个抗原之间的沉淀线形态归纳整理后见于图2。光滑的沉淀线用“=”表示, 有矩的沉淀线用“↑”表示, 箭头指向有矩的那个抗原。*P. leiognathi*480抗血清与各菌株SOD抗原的试验结果归纳后见于图3。*V. fischeri*61抗血清与各菌株SOD抗原的试验结果归纳后见于图4。

从图2可见, 所有弧菌之间的沉淀线为光滑型, 所有发光杆菌之间的沉淀线也为光滑型, 而弧菌与发光杆菌之间的沉淀线均有矩。因此将实验菌株明确地区分为两大类群, 即弧菌属(*Vibrio*)和发光杆菌属(*Photobacterium*)。未定种的发光细菌101菌株与发光杆菌属的菌株反应一样, 因而图2中与发光杆菌属的几个菌株列在一起。

各菌株的SOD抗原与*V. alginolyticus*90抗血清, 与*V. splendidus*II抗血清的试验结果均与图2—4的结果类似, 此处从略。

从图3可见, 各菌株抗原SOD跟*P. Leiognathi*480抗血清的反应结果也将实验菌株中的弧菌属和发光杆菌属这两大类群区别开来, 与图2、图4的结果是一致的。然而, 明亮发光杆菌501、502以及发光细菌101菌株之间的沉淀线均为光滑型, 说明它们之间的抗原结构相似; 而它们跟鳐鱼发光杆菌223菌株之间的沉淀线却为有矩型, 说明彼此的抗原结构有差异, 因而可与鳐鱼发光杆菌223区别开来。若以箭号的多少来排列次序, 还可看出各菌株与参比菌株鳐鱼发光杆菌480的亲缘关系。其顺序为: 鳐鱼发光杆菌223最近, 明亮发光杆菌501、502以及发光细菌101菌株次之, 与弧菌属各菌株关系最远。还可推知, 未定种的发光

