

高磁性与无磁性趋磁细菌的获得及磁小体释放技术研究

张宇红^{1,2}, 肖 天¹

(1. 中国科学院 海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100864)

摘要:利用特殊的磁富集传代法获得高磁性和无磁性 AMB-1 菌株。通过透射电子显微镜(TEM)观察和 Cmag 值测定,对这两种菌株进行了验证。优选了条件,使高磁性 AMB-1 菌株在培养 192 h 后出现自溶现象,磁小体从细胞内释放出来。

关键词: AMB-1; 纳米磁小体; 磁小体释放

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)02-0001-04

趋磁细菌(magnetotactic bacteria)是一类能够沿磁力线运动的特殊细菌,广泛分布于世界各地^[1]。由于体内有纳米级磁性晶体称为磁小体(magneto-some),自从 1975 年被美国科学家 Blakemore 发现以来^[2],受到了科学家们的广泛关注。趋磁细菌在环境中需要微好氧条件^[3],且营养类型属于化能自养^[4],营养条件要求苛刻,使得目前能够纯培养的菌株数目很少,自然环境中的很多趋磁细菌虽然在显微镜下被观察到^[5],但是在实验室中难以分离纯化,只有少数菌株得到纯培养^[6~8],致使对趋磁细菌的研究常受到实验材料限制。

有报道认为磁小体的形成是由基因岛控制^[9~13],为了研究磁小体的形成机制,通常用基因敲除的办法获得缺陷型,并与野生型对比进行研究。但是,利用基因敲除获得缺陷型不仅操作繁琐并且所得缺陷型不稳定。本研究在培养过程中发现,野生型菌株随着传代次数的增多,磁性会下降,不利于研究。因此,为了方便地研究磁小体,获得高磁性小体菌株与无磁小体菌株是十分必要的。趋磁细菌的磁性可以由 Cmag 值反映(趋磁细菌中具有磁小体的细菌占细菌总数的比例^[14,15]),Cmag 值高(Cmag=2)则磁性高,Cmag 值低(Cmag=1)则视为无磁性^[14]。另外,在该菌培养过程中还发现,细菌细胞自溶后磁小体会释放到培养液中,这为方便地获取磁小体提供了新思路(不必经过细胞破碎)。因此,本研究以趋磁细菌 *Magnetospirillum* sp. AMB-1(简称 AMB-1)为研究对象,探讨高磁性菌株和无磁菌株的获得,以及自溶态 AMB-1 的培养。

1 材料与方 法

1.1 受试菌株

趋磁螺菌 *Magnetospirillum* sp. AMB-1,购于

ATCC,菌种编号 ATCC700264。

1.2 培养基

蒸馏水 1.0 L,Wolfe's 无机盐混合液 5.0 mL,Wolfe's 维生素混合液 10.0 mL,奎尼酸铁 0.02 mmol,0.1% 刃天青 0.45 mL,磷酸二氢钾 0.68 g,硝酸钠 0.12 g,琥珀酸 0.74 g,L-半胱氨酸 0.05 g,蛋白胨 0.2 g,酵母提取物 0.1 g。Wolfe's 无机盐混合液与 Wolfe's 维生素混合液配方参照文献^[16]。pH 值 6.7。

1.3 AMB-1 光密度值的测定

分光光度计波长调至 600 nm,以蒸馏水调零,取待测菌液 3 mL 放入分光光度计的比色杯中进行测定。

分光光度计:UNIC WFJ 7200。

1.4 AMB-1 Cmag 值的测定

利用分光光度计测定。在分光光度计中待测菌液周围分别外加水平磁场和垂直磁场,于波长 600 nm 测定吸光度值。水平磁场下的 A_{600} 值(600 nm 测定的吸光度值)除以垂直磁场下的 A_{600} 值所得结果为 Cmag 值,即 $Cmag = A_{//} / A_{\perp}$ ($A_{//}$ 表示外加水平磁场条件下测定的吸光度值, A_{\perp} 表示外加垂直磁场条件下测定的吸光度值)^[14,17]。

收稿日期:2007-12-26;修回日期:2008-04-10

基金项目:中国科学院海外杰出学者基金项目(2003-1-5,2006-1-15);中国科学院创新团队国际合作伙伴计划项目;人类前沿科学研究计划项目(HFSP, RGP0035/2004-C)

作者简介:张宇红(1978-),女,沈阳人,博士,研究方向为海洋微生物,电话:13451826257, E-mail: zhangyhhit@163.com,肖天,通信作者,电话:13665325692, E-mail: txiao@ms.qdio.ac.cn

测量 Cmag 值装置:中国科学院电工研究所生物医学工程研究部电磁生物工程研究组提供的 Cmag 值测量仪;分光光度计:同 1.3。

1.5 AMB-1 高磁性菌株的获得

在每次传代前,用透明胶带黏贴磁铁(0.37 T)于种子液培养瓶外壁上,静置一段时间,带有磁小体的细菌在培养瓶中聚集于贴有磁铁的瓶内壁,形成磁斑。每次传代,用移液枪吸取磁斑注入 1.2 的新鲜培养基中,将所得菌液放入培养箱中培养。为提高 AMB-1 Cmag 值,本试验要做 10 次磁富集传代法转接并培养。

1.6 AMB-1 无磁性菌株的获得

传代前使用 1.5 所述的磁富集法将含有磁性的细菌吸附到培养瓶内壁,用移液枪将磁斑吸出,之后再次将磁铁贴于培养瓶外壁,待形成较浅磁斑后,仍用移液枪将磁斑吸走。两次移走磁斑后,将遗留的细菌作为种子液,移入 1.2 的新鲜培养基中。无磁菌株的获得要经过 10 次反复的传代培养。

1.7 趋磁细菌的电镜观察

分别取 1 mL 高磁性菌株、无磁菌株及自溶态 AMB-1 菌液,在转速 10 000 r/min 下离心 2 min。去上清,沉淀物用超纯水洗涤后重复离心 2~3 次,沉淀物稀释至 200 μ L。分别取上述稀释后的菌液各 10 μ L 滴到铜网上,干燥后置于 TEM 下观察。

TEM: HITACHI H-7000, 加速电压: 25 ~ 125 kV, 放大倍数: 1 000~600 000 倍, 分辨率: 晶格分辨 0.204 nm。

2 结果

2.1 AMB-1 高磁性菌株的获得

经过 10 代培养, Cmag 值达到稳定, 此时对 Cmag 值进行连续测定, 结果如图 1 所示。可见 AMB-1 的 Cmag 值稳定在 1.9~2.0(具有磁小体的细胞占 90%以上)。对 AMB-1 高磁性菌株的 A_{600} 测定, 结果示于图 1, 可见 A_{600} 达到 0.4 以上。

将 AMB-1 高磁性菌株置于 TEM 下观察, 可以看到 AMB-1 中有沿细菌长轴分段排列的磁小体链, 如图 2 所示。

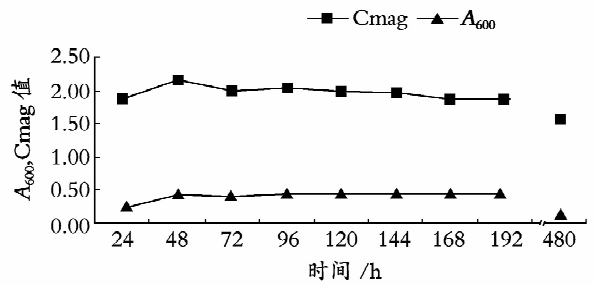


图 1 AMB-1 高磁性菌株的 Cmag 值及 A_{600} 值
Fig. 1 Cmag and A_{600} of high-magnetic AMB-1

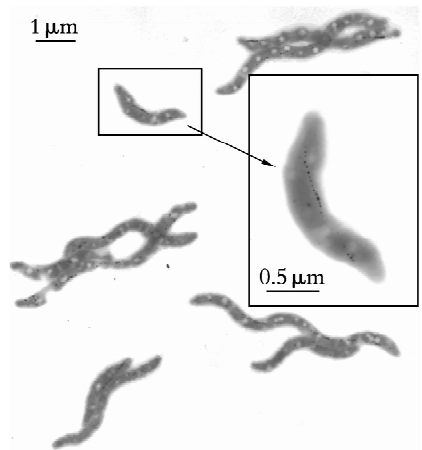


图 2 AMB-1 高磁性菌株 TEM 照片
Fig. 2 TEM photo of high-magnetic AMB-1

2.2 AMB-1 无磁性菌株的获得

经过 10 代反复传代培养后, 测定无磁菌株的 A_{600} 值, 结果示于图 3。可见 A_{600} 值达 0.6 以上, Cmag 值为 1。

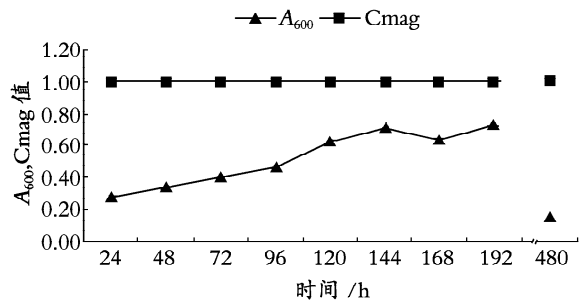


图 3 AMB-1 无磁性菌株的 Cmag 值及 A_{600} 值
Fig. 3 Cmag and A_{600} of non-magnetic AMB-1

将 AMB-1 无磁性菌株置于 TEM 下观察, 可以看到所有的 AMB-1 细胞内都没有磁小体(图 4)。

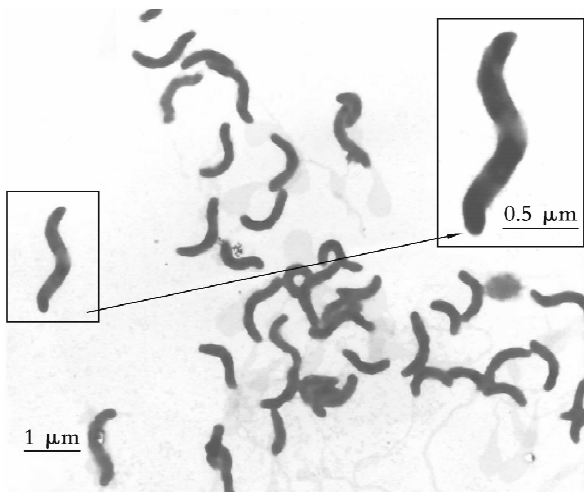


图4 AMB-1 无磁性菌株 TEM 照片
Fig. 4 TEM photo of non-magnetic AMB-1

2.3 自溶态 AMB-1 的培养与观察

在培养过程中发现,使用 1.2 所示培养基,pH 值 6.7、温度 25℃ 和添加铁源奎尼酸铁 0.02 mmol/L 时,培养 192 h 时 AMB-1 会自溶。有磁性的 AMB-1,随着细胞的自溶,磁小体释放到培养基中,结果如图 5 所示。

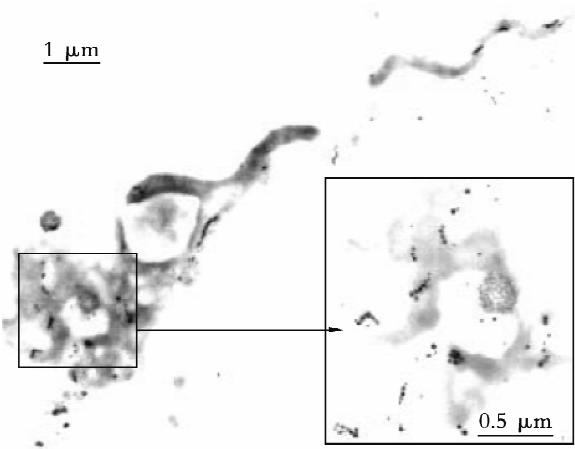


图5 自溶态 AMB-1 高磁性菌株 TEM 照片
Fig. 5 TEM photo of lysing high-magnetic AMB-1

3 讨论

趋磁细菌研究的瓶颈主要是试验材料的不足,这可分为 3 种情况:(1) 虽然在显微镜下可观察到趋磁细菌的存在,但是实验室条件无法分离、纯化;(2) 已得到纯培养的菌株但生物量不高;(3) 研究磁小体合成机制特别需要野生型与缺陷型菌株,而缺陷型菌株通常用分子生物学方法和人工诱导,但这些方法比较复杂,有时所得缺陷型不稳定。作者在培养 AMB-1 时发现,随着传代次数的增多,AMB-1

的磁性会下降。为了解释这种现象,作者对 AMB-1 磁小体的形成过程进行了研究。结果发现,随传代次数增多磁性下降的原因一种是细胞分裂后磁小体分配到两个子细胞中,第二种为磁小体分配到一个子细胞中,另一个子细胞没有磁小体。没有磁小体的细菌大多会逐渐形成磁小体,而少数不会形成磁小体,直至细胞再次分裂。因此,利用相反的过程,即传代时去除有磁性的菌体,可以逐步降低 AMB-1 的磁性并最终获得无磁性菌株。本研究探讨并得到了高磁性无磁性菌株,为今后研究磁小体的产磁机理打下了基础。

磁小体是天然形成的磁性材料,具有纳米级大小、颗粒均匀、无毒和比表面积大等特点,其在医疗、环保等许多领域具备很大的潜在应用价值^[18~25]。但是,由于趋磁细菌的培养需要一定的技术和条件,在过去相当长的时间内,趋磁细菌磁小体的大规模生产存在一定难度,从而使磁小体的应用研究受到一定影响^[26]。分离纯化磁小体通常需要将细胞破碎,成本较高。而作者在培养 AMB-1 过程中发现,当趋磁细菌衰亡菌体自溶时,磁小体会释放到培养环境中。因此只要获得了自溶的 AMB-1,即可获得分散于培养环境中的磁小体,这为便捷地获得磁小体提供了新思路。

致谢:本研究中 TEM 观察所需铜网的制作过程以及样品的制备得到了法国汉斯大学物理系张葵教授的指导,中国科学院电工研究所的宋涛研究员为本研究提供了测量 Cmag 值的仪器,在此一并表示感谢!

参考文献:

- [1] Flies C B, Jonkers H M, Beer D, *et al.* Diversity and vertical distribution of magnetotactic bacteria along chemical gradients in freshwater microcosms[J]. **FEMS Microbiology Ecology**, 2005, **52**(2):185-195.
- [2] Blakemore R P. Magnetotactic bacteria[J]. **Science**, 1975, **190**(4 212):377-379.
- [3] 范国昌,钱凯先. 趋磁细菌及其磁小体的研究与应用[J]. 生物技术通报,1998, 2:24-28.
- [4] 贾蓉芬,彭先芝,高梅影,等. 中国黄土剖面趋磁细菌的组成特征与生态意义[J]. 岩石矿物学杂志, 2001, **20**(4):428-432.
- [5] Bazylinski D A, Schlezinger D R, Howes B H, *et al.* Occurrence and distribution of diverse populations of magnetic protists in a chemically stratified coastal salt pond[J]. **Chemical Geology**, 2000, **169**(3):319-328.

- [6] Schüler D, Frankel R B. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1999, **52**(4): 464-473.
- [7] Lins U, Freitas F, Keim C N, *et al*. Simple homemade apparatus for harvesting uncultured magnetotactic microorganisms [J]. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2003, **34**(2):111-116.
- [8] 高峻,肖天,孙松,等. 新型海洋趋磁细菌 YSC-1 的分离及其特异性磁性纳米材料磁小体的研究[J]. 高技术通讯, 2004, **14**(5):44-47.
- [9] Komeili A, Li Z, Newman D K, *et al*. Magnetosomes Are cell membrane invaginations organized by the actin-like protein MamK [J]. **Science**, 2006, **311** (5 758): 242-245.
- [10] 付刚,姜伟,李颖,等. 磁螺菌磁小体形成的电镜观察及其纯化[J]. 中国现代医学杂志, 2004, **14**(5):45-49.
- [11] Ullrich S, Kube M, Schübbe S, *et al*. A Hypervariable 130-kilobase genomic region of *Magnetospirillum gryphiswaldense* comprises a magnetosome island which undergoes frequent rearrangements during stationary growth[J]. **Journal of Bacteriology**, 2005, **187** (21):7 176-7 184.
- [12] Fukuda Y, Okamura Y, Takeyama H, *et al*. Dynamic analysis of a genomic island in *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1 reveals how magnetosome synthesis developed[J]. **FEBS Letters**, 2006, **580**(3):801-812.
- [13] Schübbe S, Kube M, Scheffel A, *et al*. Characterization of a spontaneous nonmagnetic mutant of *Magnetospirillum gryphiswaldense* reveals a large deletion comprising a putative magnetosome island[J]. **Journal of Bacteriolog**, 2003, **185**(19):5 779-5 790.
- [14] Schüler D, Uhl R, Bäuerlein E. A simple light scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense* [J]. **FEMS Microbiology Letters** [J]. 1995, **132**(1-2):139-145.
- [15] Zhao L Z, Wu D, Wu L F, *et al*. A simple and accurate method for quantification of magnetosomes in magnetotactic bacteria by common spectrophotometer [J]. **J. Biochem. Biophys. Methods**, 2007, **70** (3): 377-383.
- [16] Blakemore R P, Maratea D, Wolfe R S. Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium[J]. **Bacteriol**, 1979, **140** (2):720-729.
- [17] 王小柯,赵露泽,宋涛,等. 脉冲磁场对趋磁螺细菌 AMB-1 磁小体形成及相关基因表达的影响[J]. 高技术通讯, 2007, **17**(4):412-417.
- [18] Schüler D, Frankel R B. Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1999, **52** (4): 464-473.
- [19] Klaus-Joerger T, Joerger R, Olsson E, *et al*. Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science[J]. **TRENDS in Biotechnology**, 2001, **19**(1):15-20.
- [20] Albrecht M, Janke V, Sievers S, *et al*. Scanning force microscopy study of biogenic nanoparticles for medical applications [J]. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 2005, **290-291**(1):269-271.
- [21] Kuznetsov A A, Filippov V I, Alyautdin R N, *et al*. Application of magnetic liposomes for magnetically guided transport of muscle relaxants and anti-cancer photodynamic drugs [J]. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 2001, **225**(1-2): 95-100.
- [22] Matsunaga T, Takeyama H. Biomagnetic nanoparticle formation and application[J]. **Supramolecular Science**, 1998, **5**(3):391-394.
- [23] Bahaj A S, Croudace I W, James P A B, *et al*. Continuous radionuclide recovery from wastewater using magnetotactic bacteria[J]. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 1998, **184**(2):241-244.
- [24] Snowball I, Zillén L, Sandgren P. Bacterial magnetite in Swedish varved lake-sediments: a potential biomarker of environmental change[J]. **Quaternary International**, 2002, **88**(1):13-19.
- [25] Linford N, Linford P, Platzman E. Dating environmental change using magnetic bacteria in archaeological soils from the upper Thames Valley, UK[J]. **Journal of Archaeological Science**, 2005, **32** (7): 1 037-1 043.
- [26] 陈继峰. 磁细菌与细菌磁颗粒的特点及应用研究[J]. 微生物学杂志, 2006, **26**(3):100-104.

(下转第 10 页)