

采用原子力显微镜 分析乳酸链球菌素结构的研究

杜 琨^{1,2},陈锦屏¹,苏凤贤³

(1.陕西师范大学食品工程与营养科学学院,陕西西安 710062;

2.武警工程学院军事经济系,陕西西安 710086; 3.河西学院农业与生物技术学院,甘肃张掖 734000)

摘要:目的:采用原子力显微镜对乳酸链球菌素的分子形貌进行观测,为研究其抑菌机理提供有力的科学依据和可靠、直观的实验方法。方法:从川西高原牧民自然发酵酸奶中分离筛选乳酸链球菌素产生菌,利用其发酵获得产乳酸链球菌素效价高的产生菌C201,用原子力显微镜观察其分子形貌。结果:乳酸链球菌素分子在溶液中呈树状的不规则“峰”状聚集体,带有很多侧链分支,并且肽键之间形成稳定的螺旋结构。结论:原子力显微镜能直观地表征乳酸链球菌素的分子结构,是对研究乳酸链球菌素的抑菌机理在形态学上的完善。

关键词:原子力显微镜,乳酸链球菌素,提取分离

Study on structure of Nisin using atomic force microscope analysis

DU Kun^{1,2}, CHEN Jin-ping¹, SU Feng-xian³

(1.College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;

2.Department of Military Economics, Engineering College of Chinese Armed Police Force, Xi'an 710086, China;

3.College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye 734000, China)

Abstract: Objective: The molecules morphology of Nisin were observed using AFM, and it can provide the scientific basis and reliable, intuitive experimental methods for antibacterial mechanism of Nisin. Method: The Nisin producing strains were isolated from natural fermented yogurt of the herdsman of western Sichuan plateau by purification. A high titer Nisin producing strain C201 was obtained by applied these strains to ferment, and observed its molecular morphology using atomic force microscope analysis. Results: The molecules of Nisin could aggregate to form micelles with dendritic irregular peak shapes in solution in the form of large numbers of side chain branching, and the peptide bond that form between the base pairs along a DNA or RNA molecule stabilized the helical structure. Conclusion: The molecular structure of Nisin could characterized directly by atomic force microscopy, so it is a new and scientific analytical method to study the antibacterial mechanism of Nisin in the morphological.

Key words: atomic force microscopy; Nisin; extraction

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)05-0156-03

原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)是在Binning^[1]等人发明的扫描隧道显微镜(STM)基础上发展而成,其目的是为了能使非导体也能够采用扫描探针显微镜(SPM)进行观察。与其他电子显微镜相比,AFM的纳米量级的高空间分辨率尤为突出(纵向分辨率:0.1nm)。它被广泛地用于不同聚合物链包括DNA^[2-3]、蛋白质^[4]、小核菌多糖^[5]等多种大分子链构象的分析研究中。乳酸链球菌素(Nisin)是由某些乳酸乳球菌产生的一种低分子量细菌素,能抑制大部

分革兰氏阳性菌及其芽孢的生长和繁殖,对金黄色葡萄球菌、溶血链球菌作用明显,而对人体无毒,其毒理和生物学研究表明,它是一种安全的天然防腐剂。文献报道,乳酸链球菌素是一种新型低聚肽,可以被人体内酶降解、消化,不会产生抗性和过敏反应;对食品的色、香、味、口感不产生副作用;可降低杀菌温度,减少热处理时间,因此可保持食品的营养价值、风味、结构、颜色等^[6]。但目前国内外对其分子构象的报道相对较少,尚无用原子力显微镜对其分子形貌进行直接观测的报道。本研究采用原子力显微镜观察从高原自然发酵酸奶中分离、提取、经纯化后得到的乳酸链球菌素表面形貌,为进一步研究其高级结构和构效关系提供实验数据和理论依据。

收稿日期:2011-05-12

作者简介:杜琨(1975-),男,博士研究生,副教授,研究方向:动物资源利用及功能食品研究。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

酸奶 采集于四川西部地区;乳酸链球菌素 为本实验室从酸奶中分离、提取、纯化;SephadexG-25 由Phamacia公司提供;其余药品 均为分析纯。

SPM-9500J3型原子力显微镜 日本岛津公司;TU-1800型紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;磁力搅拌器,RE-52AA型旋转蒸发器,冷冻干燥机等。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的定向分离 本实验8个菌株分离自川西高原自然发酵酸奶,菌株编号及采样地情况见表1。酸奶样品用无菌玻棒充分搅匀,用无菌注射器吸取样品于无菌采样瓶中,置于冰盒内,另用玻棒蘸取少许样品,用精密pH试纸测试pH。所采样品带回实验室,分装于无菌试管中,放入4℃冰箱保存备用,剩余样品-70℃保存。

表1 酸奶采集地

Table 1 The yoghurt gathering places

| 样品编号 | 酸奶编号 | 采集地点 | 样品pH | 采集地温度(℃) | 采集地海拔(m) |
|------|------|---------|------|----------|----------|
| 1 | Y1 | 康定县折多山 | 3.50 | 11~18 | 3350 |
| | Y2 | 康定县折多山 | 3.70 | 11~18 | 3450 |
| 2 | Y3 | 若尔盖阿西牧场 | 3.80 | 10~24 | 3460 |
| | C1 | 若尔盖下热尔乡 | 3.80 | 9~25 | 3400 |
| 3 | C2 | 甘孜县绒坝岔乡 | 3.70 | 8~20 | 3500 |
| | C3 | 甘孜县绒坝岔乡 | 3.80 | 8~20 | 3500 |
| 4 | Z1 | 甘孜县绒坝岔乡 | 3.60 | 8~20 | 3500 |
| | Z2 | 甘孜县绒坝岔乡 | 3.60 | 8~20 | 3500 |

分别取从不同采样地采集的酸奶,按1%接种量加入到含乳酸链球菌素和溴甲酚紫的M17G液体培养基中,28℃培养24h,把M17G液体培养物制成10⁻¹、10⁻⁵、10⁻⁶稀释度的菌悬液,分别吸取0.1mL放入M17固体分离培养基上,涂布,28℃培养24h,挑选单菌落,在分离培养基上划线,反复3次。

1.2.2 菌株的筛选

1.2.2.1 指示菌悬液的制备 将金黄色葡萄球菌从斜面培养基上刮下,于牛肉膏蛋白胨液体培养基中振荡培养,血球计数板计数,取生长量为10⁷cfu/mL的金黄色葡萄球菌培养液作为指示菌悬液。

1.2.2.2 发酵样效价测定 取1g发酵培养液加入到9mL 0.02mol/L盐酸稀溶液中,或用0.02mol/L的稀盐酸将发酵液适当稀释(稀释到其抑菌圈直径在5~100IU/mL的乳链菌肽标准液的抑菌圈直径之间),再用沸水浴加热5min后,于5000r/min离心10min,取上清液,用琼脂扩散法测定其生物效价。

1.2.3 SephadexG-25 凝胶柱层析 将C201在SephadexG-25凝胶柱上用0.02mol/L HCl进行洗脱,流速0.5mL/min,洗脱液经280nm处紫外检测,收集洗脱峰,用纸片法测定各洗脱峰的抑菌活性。

1.2.4 AFM制样 用双蒸水溶解已制备好的乳酸链球菌素。磁力搅拌器持续搅拌1h,配成1μg/mL溶液。室温保持1h,进一步使样品溶解完全且减少大聚集体的存在。取1μg/mL的溶液5μL,滴在新剥离的云母

表面上,室温空气中干燥后,原子力显微镜观测^[7](氯化钾溶液稀释的样品滴在云母上干燥后双蒸水冲洗,无水醇固定,室温空气中干燥,原子力显微镜观测)。

1.2.5 原子力显微镜观测 采用日本岛津公司的SPM 9500J3型原子力显微镜,室温下大气环境中对乳酸链球菌素的分子形态进行扫描观测。图像均在Tapping模式下获得,探针为Si3N4(微悬臂长:200μm,弹性系数0.12N/m),原子力显微镜图像的形态学特征(如高度、宽度等)均采用原子力显微镜附带的软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离

根据报道发现,编码乳链菌肽前体的基因(nip⁺)与乳链菌肽抗性基因(nis⁺)和蔗糖发酵基因(suc⁺)紧密连锁^[8],据此,采用定向分离乳链菌肽产生菌的方法:即在蔗糖作碳源和添加适当乳链菌肽的改良M17培养基上,配以溴甲酚紫作指示剂,如果一个菌株既对乳链菌肽具有抗性,又能利用蔗糖,则能使菌落周围的培养基由紫色转变为黄色,很容易用肉眼加以识别。然后检测该菌株是否产生抑菌物质。分离到17株使培养基变黄的菌株,结果见表2。

表2 初筛使分离培养基变黄的菌株

Table 2 The strains which made separation medium yellow after preliminary screening

| 菌株编号 | 产地 | 菌株编号 | 产地 |
|------|---------|------|---------|
| Y101 | 康定县折多山 | C202 | 甘孜县绒坝岔乡 |
| Y102 | 康定县折多山 | C301 | 甘孜县绒坝岔乡 |
| Y103 | 康定县折多山 | C302 | 甘孜县绒坝岔乡 |
| Y201 | 康定县折多山 | Z101 | 甘孜县绒坝岔乡 |
| Y202 | 康定县折多山 | Z102 | 甘孜县绒坝岔乡 |
| C101 | 若尔盖下热尔乡 | Z201 | 甘孜县绒坝岔乡 |
| C102 | 若尔盖下热尔乡 | Z202 | 甘孜县绒坝岔乡 |
| C103 | 若尔盖下热尔乡 | Z203 | 甘孜县绒坝岔乡 |
| C201 | 甘孜县绒坝岔乡 | | |

2.2 效价测定

把分离得到的17个菌株24h发酵培养,发酵液离心取上清液,用牛津杯定量扩散法进行抑菌活性的测定,培养基利用改良的牛肉膏蛋白胨培养基,消除了酸的作用,避免了假抑菌现象的出现^[9-10]。初筛后摇瓶发酵测其效价,结果见表3。从表中可以看出,C201效价较高,超过800IU/mL。

表3 菌株发酵产物效价测定

Table 3 Determination of strains fermentation potency

| 菌株编号 | 效价(IU/mL) | 菌株编号 | 效价(IU/mL) | 菌株编号 | 效价(IU/mL) |
|------|-----------|------|-----------|------|-----------|
| Y101 | 567 | C102 | 642 | Z101 | 752 |
| Y102 | 746 | C103 | 354 | Z102 | 786 |
| Y103 | 345 | C201 | 831 | Z201 | 674 |
| Y201 | 687 | C202 | 736 | Z202 | 739 |
| Y202 | 321 | C301 | 606 | Z203 | 665 |
| C101 | 703 | C302 | 675 | | |

2.3 SephadexG-25凝胶柱层析

以金黄色葡萄球菌为指示菌,分别对第6管和第

11管进行抑菌活性实验,结果显示只有第二个洗脱峰(即第11管)具有抑菌活性,实验结果见图1和图2。对其洗脱液冷冻干燥,供原子力显微镜观察分析使用。

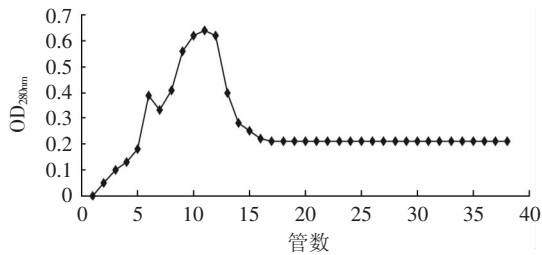


图1 SephadexG-25凝胶柱层析图

Fig.1 SephadexG-25 gel column chromatography

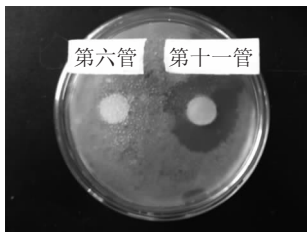


图2 第6管和第11管的抑菌活性图

Fig.2 The sixth and eleventh tubes antibacterial activity diagram

2.4 原子力显微镜观察分析

乳酸链球菌素链的密度依赖于其初始浓度及其沉积到云母表面的量,图像的对比度依赖于针尖上的作用力,作用力太大易损坏糖链,而太小则对比度差,最佳的作用力大致在3~4nN量级以内,在扫描时不同的部位与分子链作用,会导致一定的增宽效应。

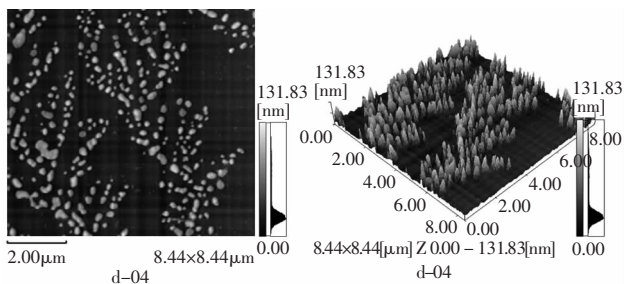


图3 乳酸链球菌素的AFM图像

Fig.3 The AFM image of Nisin

图3中,在 $8.44 \times 8.44 \mu\text{m}$ 的观测范围内乳酸链球菌素的分子图像清晰、稳定。乳酸链球菌素的分子呈现大小不一的螺旋缠绕状,支链直径在5.31~20.88nm之间,键高为67.33~78.30nm之间。三维形貌图下可以看到乳酸链球菌素不规则环上具有众多明显的“峰”状突起,推测乳酸链球菌素分子链可能具有较多分支。分析认为,乳酸链球菌素可能通过肽键先形成双螺旋,后缠绕形成较大的聚集体。

3 结论

乳酸链球菌素的立体结构是其生物活性的决定因素之一,研究低聚肽链的构象以及低聚肽和缀合物间的空间关系对进一步了解乳酸链球菌素的功能具有重要意义。本研究从川西高原牧民自然发酵酸奶中分离筛选得到17株乳酸链球菌素产生菌,利用其进行发酵培养,获得产乳酸链球菌素效价高的产生菌C201,采用原子力显微镜观察其分子形貌。结果发现,乳酸链球菌素的分子呈现大小不一的螺旋缠绕状,支链直径在5.31~20.88nm之间,键高为67.33~78.30nm之间。三维形貌图下可以看到乳酸链球菌素不规则环上具有众多明显的“峰”状突起,推测乳酸链球菌素分子链可能具有较多分支。由此可知,原子力显微镜能直观地表征乳酸链球菌素的分子结构,是对研究乳酸链球菌素的抑菌机理在形态学上的完善。采用原子力显微镜对乳酸链球菌素的分子形貌进行观测,为研究其抑菌机理提供了有力的科学依据和可靠、直观的实验方法。

参考文献

- [1] Binning G, Quate C F, Gerber C. Atomic force microscope[J]. Phys Rev Lett, 1986, 56: 930-933.
- [2] Lyubchenko Y L, Shlyakhtenko L S. Visualization of supercoiled DNA with atomic force microscopy in situ[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(2): 496.
- [3] 张平城, 白春礼, 成英俊, 等. pBR322 DNA拓扑结构的原子力显微镜研究[J]. 中国科学(B辑), 1995, 25(7): 716-720.
- [4] 赵健伟, 王楠. 导电原子力显微镜对蛋白质在分子水平上的电学表征[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(4): 751-753.
- [5] McIntire T M, Penner R M, Brant D A. Observation of a circular, triple-helical polysaccharide using noncontact atomic force microscopy[J]. Macromolecules, 1995, 28: 6375.
- [6] Wilfred Chung, Robert EW Hancock. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000(60): 25-32.
- [7] Wilkinson K J, Balnois E, Leppard G G, et al. Characteristic features of the major components of freshwater colloidal organic matter revealed by transmission electro and atomic force microscopy[J]. Colloids Surf A, 1999, 155: 287.
- [8] Tsai H J, W E Sandine. Conjugal transfer of Nisin plasmid genes from streptococcus lacyis 7962 to Leuconostoc dextranicum 181[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 78(7): 352-359.
- [9] Dielbandhosing S K. Specific cell wall proteins confer upon yeast cells to Nisin[J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(4): 4047-4052.
- [10] Willemsen O H, Snel M M, Cambi A, et al. Biomolecular interactions measured by atomic force microscopy[J]. Biophysical Journal, 2000, 79(6): 3267-3281.

(上接第144页)

- [11] SN/T 0801.19-1999. 进出口动植物油脂游离脂肪酸和酸价检验方法[S].
- [12] 耿然, 周红玉, 侯彩云. 米糠稳定化方法的实验研究[J]. 食品科技, 2006(2): 120-122.

- [13] 赵旭, 李新华, 郑煜焱. 米糠稳定化方法的研究现状[J]. 粮食加工, 2006, 31(6): 41-43.
- [14] 胡小中. 米糠稳定化技术研究进展[J]. 粮油食品科技, 2002, 10(4): 24-26.