

青枯菌不同色谱峰组分的细胞表面特性*

林娟** 谢范英 刘树滔 饶平凡

(福州大学生物科学与工程学院 福州 350108)

摘要 将高效离子交换色谱应用于植物重要致病菌——青枯菌的分离分析。青枯菌纯培养物经过色谱分离得到3个特征峰,收集3个色谱峰组分进行形态观察和生理生化鉴定,结果表明3个组分均属于青枯菌生化Ⅲ型;进一步分析发现,3个色谱峰组分在质粒DNA、细胞表面鞭毛菌毛蛋白含量和全细胞脂多糖成分方面无明显差异,但细胞表面黏附的胞外酸性多糖EPSI含量差异显著;3个色谱峰青枯菌细胞表面疏水性的测定结果也证实了EPSI是造成不同青枯菌细胞色谱行为差异的主要原因。高效离子交换色谱为细菌活细胞的研究提供了一种新方法。图4表2参15

关键词 青枯菌;细胞表面特性;胞外酸性多糖;高效离子交换色谱;色谱组分;活细胞

CLC Q936

Cell Surface Characteristics of Different Chromatographic Fractions of *Ralstonia solanacearum**

LIN Juan**, XIE Fanying, LIU Shutao & RAO Pingfan

(College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China)

Abstract High performance ion exchange chromatography method was employed to separate and analyze an important plant pathogen, *Ralstonia solanacearum*, and three fractions were obtained, which were characterized by morphological observation and physio-biochemical identification. The results indicated that they all belonged to *R. solanacearum* biochemical type III. Further analysis showed that the three fractions had no obvious difference in the components of plasmid DNA, or flagellin or pilus protein of cell surface, or whole cell lipopolysaccharide, but differed significantly in the extracellular polysaccharide (EPSI) which adhered to the cell surface. Cell surface hydrophobicity of the three fractions also confirmed that the EPSI content of cell surface was the main factor which contributed to the difference in chromatographic behaviors. High performance ion exchange chromatography provided a new method for living bacterial cell analysis. Fig 4, Tab 2, Ref 15

Keywords *Ralstonia solanacearum*; cell surface characteristics; extracellular polysaccharide; high performance ion exchange chromatography; chromatographic fraction; living bacterial cell

CLC Q936

21世纪以来分析化学与生物学之间相互渗透,形成了新颖的生命过程中的分析化学。在应用微生物学领域中,分析微生物学一直是重要的课题,其重要内容之一就是希望在传统的培养、形态、生理生化等方法的基础上寻求比较快速、简单而特异的新方法。随着科学技术的发展,一些新兴的细菌分离分析技术相继诞生,为细菌研究工作提供了方便快捷的新方法。

细菌为单细胞微生物,其细胞表面和外界环境直接接触,负责调节细菌与外界环境的物质交换以及参与细菌的吸附过程,影响细菌与环境的相互作用,并参与细菌的生长与分化活动。大多数细菌的致病性、对外界环境的耐受性等均与其细胞表面物质直接相关,因此对细菌细胞表面特性的研究引起了广大学者的关注。

在一定条件下,细菌是一个“宏观带电颗粒”,组成细胞表面结构的生物分子携带羧基、氨基、磷酸等基团,在不同pH环境下会发生电离,从而使细胞表面带上不同电荷^[1~2]。因此,细菌可以像生物大分子一样,通过高效离子交换色谱的方法进行分离;但细菌作为一个完整的生命体,其细胞表面结构与化学组成比一般生物大分子更为复杂。本课题以植物重要致病菌——青枯菌为实验材料,对高效离子交换色谱分离得到的不同色谱峰组分的细胞表面特性(鞭毛菌毛蛋白、脂多糖、胞外酸性多糖、疏水性等)进行了分析,研究细胞表面特性与色谱行为的关系,为细菌活细胞研究新方法——高效离子交换色谱方法的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

青枯菌野生型菌株(分离自番茄植物)由福建省农业科学院农业生物资源研究所提供。

1.2 青枯菌的培养方法

参考文献[3]进行。

培养基: 1) NA固体培养基($\rho/\text{g L}^{-1}$): 蛋白胨5.0, 葡萄糖10, 牛肉膏3.0, 酵母浸膏1.0, 琼脂15, pH 7.2~7.4。2) SPA液

收稿日期: 2010-08-12 接受日期: 2010-11-03

*国家自然科学基金项目(No. 20475010), 福建省自然科学基金项目(No. 2008J0066), 福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划项目(No. XSJRC2007-09)和福州大学人才基金项目资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20475010), the Natural Science Foundation of Fujian, China (No. 2008J0066), the Program for Distinguished Young Scholars of Universities of Fujian (No. XSJRC2007-09), and the Fund for Distinguished Young Scholars of Fuzhou University

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: ljuan@fzu.edu.cn)

体培养基 ($\rho/\text{g L}^{-1}$): 蔗糖20, 蛋白胨5.0, K_2HPO_4 0.5, MgSO_4 0.25, pH 7.2~7.4.

培养方法: 青枯菌经NA固体培养基活化 (30 $^{\circ}\text{C}$, 48 h) 后, 按1% (V/V) 接种量 ($D_{600\text{ nm}} = 0.1$) 转接于25 mL SPA液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min摇床培养24 h.

1.3 青枯菌样品的制备方法

参考文献[4], 将经SPA液体培养基培养的青枯菌菌液于5 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心10 min后, 弃上清液, 取菌泥加入超纯水 ($>16\text{ M}\Omega$) 中振荡均匀, 洗涤菌体、离心, 重复2次, 以去除残余的培养基成分.

1.4 青枯菌的色谱分析方法

参考文献[5]进行.

缓冲液: 1) A液: 0.02 mol/L 哌嗪-HCl, pH 8.0. 2) B液: 0.02 mol/L 哌嗪-HCl + 1 mol/L NaCl, pH 8.0.

色谱分析方法: 色谱分离材料采用日本TOSOH公司的强阴离子交换树脂Toyopearl TSKgel SuperQ-650C填充色谱柱 (200 mm $\times$ 4.6 mm i.d.), 流速1 mL/min, 泵压范围0.5~1.5 Mpa, 温度范围23~28 $^{\circ}\text{C}$. 样品上样后, 0~5 min用A液平衡, 使进样的细菌充分吸附到树脂上; 5~35 min线性梯度洗脱, 洗脱梯度为0~75% NaCl (1 mol/L); 35~45 min完全转换为B液, 将树脂上的残余细菌全部洗出; 45~55 min转换为A液平衡系统. 采用紫外检测器 (检测波长: 280 nm) 和激光光散射仪 (检测波长: 600 nm; 信号扩增倍数: 1.00) 串联的在线双检测系统.

1.5 青枯菌细胞中质粒的分析

1.5.1 试剂 1) 抽提缓冲液: 200 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 250 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 2% PVP (聚乙烯吡咯烷酮). 2) Tris-EDTA (TE) 缓冲液: 将1.21 g Tris和0.37 g EDTA溶于800 mL超纯水中, 用HCl调pH值8.0, 定容至1 000 mL. 3) 琼脂糖凝胶电泳的电极缓冲液 (5 $\times$ TBE): 取54.0 g Tris和3.72 g EDTA溶于800 mL超纯水中, 加入27.83 g硼酸, 定容至1 000 mL. 4) 0.8%琼脂糖凝胶: 称取0.4 g琼脂糖于250 mL烧瓶中, 加入45 mL超纯水和5 mL 5 $\times$ TBE 缓冲液, 用棉塞塞紧瓶口, 沸水浴中加热, 使琼脂糖完全融化.

1.5.2 质粒的提取及电泳分析 参考文献[6~7]进行质粒提取与电泳分析. 收集3个色谱峰青枯菌及原始样品, 分别离心后用超纯水重悬, 并调整到相同的菌体浓度 $D_{600\text{ nm}} = 1.0$; 分别吸取500 μL 菌液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 g离心10 min, 收集菌体沉淀, 重悬于500 μL 抽提缓冲液中, 振荡混匀, 室温下放置1 h, 其间不时振荡; 5 000 g离心5 min, 小心吸取上清200 μL , 加入200 μL 异丙醇, 温和混匀, 室温下放置1 h; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 g离心10 min, 弃上清, 沉淀真空干燥后用50 μL TE缓冲液重悬, 0.8%琼脂糖凝胶电泳; 电泳毕, 取出凝胶用溴化乙锭 (终浓度为1 $\mu\text{g/mL}$) 染色15~30 min后, 用超纯水在室温下脱色15~30 min或在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱脱色过夜; 在254 nm紫外灯下观察, 存在核酸的部位呈现红色荧光谱带.

1.6 青枯菌细胞表面脂多糖的分析

1.6.1 试剂 1) 62.5 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8) 缓冲液: 称取0.757 g Tris溶于80 mL超纯水中, 用盐酸调节pH至6.8, 定容至100 mL. 2) 甲处理液: 取出50 mL 62.5 mmol/L Tris-HCl (pH

6.8) 缓冲液于烧杯中, 依次加入10 mL甘油、5 mL β -巯基乙醇、3 g SDS和0.01%溴酚兰, 边加边搅拌, 用上述Tris-HCl缓冲液定容至100 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用. 3) 乙处理液: 在甲处理液中加入蛋白酶K, 浓度为100 μg 蛋白酶K/30 μL 甲处理液.

1.6.2 全细胞脂多糖的提取及电泳分析 参考文献[8]进行全细胞脂多糖提取与电泳分析. 收集3个色谱峰青枯菌及原始样品离心, 取菌体沉淀; 称取适量的菌体于2 mL离心管中, 加入甲处理液使终浓度为1 mg菌体/30 μL 甲液, 漩涡振荡均匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min (水浴过程中需要不时振荡, 确保菌体悬浮, 避免凝集成块); 吸取30 μL 溶液, 加入30 μL 乙处理液, 混匀, 60 $^{\circ}\text{C}$ 温育2 h后, 12 000 g离心10 s, 所得上清即为各菌样的细胞壁脂多糖样品, 进行SDS-PAGE电泳 (分离胶浓度12.5%, 浓缩胶浓度4.5%; 恒压120 V或恒流25~30 mA), 采用银染色方法分析.

1.7 青枯菌细胞表面鞭毛菌毛蛋白的提取及含量测定

收集3个色谱峰青枯菌和原始样品离心、洗涤后, 用超纯水重悬, 并调整到相同的 $D_{600\text{ nm}}$ 值; 振荡均匀后各取1.5 mL菌悬液于2 mL离心管中, 10 000 g离心5 min, 收集沉淀, 重悬于1.5 mL 0.15 mol/L PBS缓冲液中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下保温30 min; 取出后12 500 g离心10 min, 小心吸取300 μL 上清液 (即含有菌毛、鞭毛蛋白的溶液), 用紫外分光光度计测定溶液的 $A_{280\text{ nm}}$ 值, 确定溶液中的蛋白质含量^[8].

PBS缓冲液: NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.15 g, KH_2PO_4 0.2 g, 溶于800 mL超纯水中, 并定容至1 000 mL.

1.8 青枯菌细胞表面胞外酸性多糖 (EPS I) 含量的测定

参考文献[9]进行. 取经SPA液体培养基培养的青枯菌菌液离心、0.22 μm 膜过滤除菌, 取滤液浓缩, 加入无水乙醇沉淀多糖, 并经A1320 阳离子交换树脂柱层析去除残留蛋白. 将纯化后的EPS I免疫小鼠, 二次免疫后制备抗血清; 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定细胞表面EPS I含量 ($D_{595\text{ nm}}$).

1.9 疏水相互作用色谱法 (HIC) 测定青枯菌细胞表面疏水性 (CSH)

参考文献[10]进行. 取经过离心、洗涤处理的青枯菌菌体悬浮于B液中, 并调整 $D_{600\text{ nm}} = 1.0$. 用1 mL玻璃注射针管制成一根常压疏水色谱柱, 柱材料为疏水胶Octyl SepharoseTM CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden), 胶柱高1 cm. 先用3 mL A液冲洗, 再用B液平衡柱子, 控制流速1 mL/min. 加入0.05 mL待测样品, 用0.2 mL B液上样, 接着用3 mL B液洗脱, 收集洗脱液, 测定其体积和600 nm下的吸光度 D_1 . 另外用0.05 mL待测样品和B液配制与收集到的洗脱液相同体积的溶液, 测定600 nm下的吸光度 D_0 , 则疏水分配值 $\text{CSH} = [(D_0 - D_1) / D_0] \times 100\%$.

2 结果与分析

2.1 青枯菌的高效离子交换色谱分析

在色谱柱饱和吸附范围内, 青枯菌野生型菌株经过高效离子交换色谱分离得到3个特征峰 (图1). 分别收集3个色谱峰组分和上样样品进行形态观察, 发现细胞均呈长椭圆形、近杆状, 以单细胞形式存在, 少数成对存在; 通过生理生化鉴定表明3个色谱峰组分均属于青枯菌生化Ⅲ型^[11~12]. 因此,

这3个色谱峰的形成可能与青枯菌细胞的不同表面特性有关。

2.2 不同色谱峰青枯菌细胞中质粒的检测

质粒是游离于核染色体之外,具有独立复制能力的小型共价闭合环状DNA分子,相对分子质量(M_r)一般在 $10^6 \sim 10^8$ 之间,大小约为核基因组的1%,但近年来发现许多携带巨型质粒的细菌。由于质粒上携带的基因编码的产物并非细菌生存所必需,所以质粒可以在细菌之间传递或丢失,导致细菌某些性状的改变。例如宋内氏志贺氏菌有两个变异相即I相和II相,I相为光滑型菌株,对小鼠有致病力,多从急性感染病人分离获得;II相为粗糙型菌株,对小鼠无致病力,常从慢性患者或带菌者体内检出。I相抗原受控于一个 M_r 为 120×10^6 的大质粒,该质粒容易丢失,使细菌从有毒的I相转变为无毒的II相。

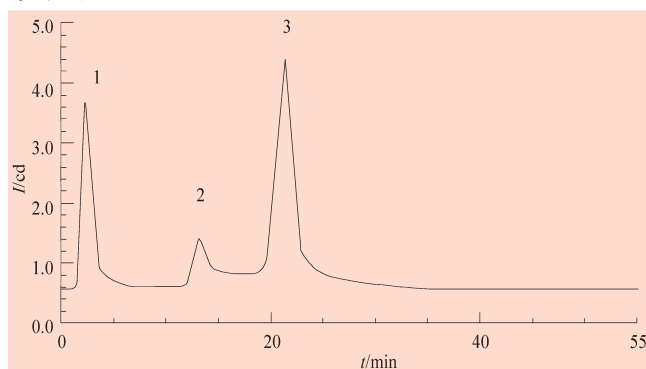


图1 青枯菌的激光光散射仪检测图

Fig.1 HPLC spectrum of *Ralstonia solanacearum* detected by laser light scattering instrument

Peaks 1~3: *R. solanacearum*

青枯菌细胞内带有一个大小为2 094 509 bp的巨型质粒,本课题参照Llop等提取巨型质粒的方法^[6],分别提取了不同色谱峰青枯菌质粒DNA,采用0.8%琼脂糖凝胶进行电泳,结果如图2所示。

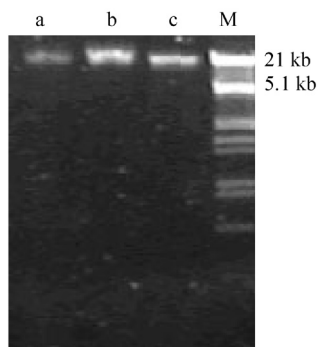


图2 3个色谱峰青枯菌的质粒DNA琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA of the three chromatographic fractions of *R. solanacearum*

a. 峰1组分; b. 峰2组分; c. 峰3组分; M. 标准样品

(a) Peak 1 fraction; (b) Peak 2 fraction; (c) Peak 3 fraction; (M) Marker

采用琼脂糖凝胶电泳分离DNA时,DNA的迁移率与其分子质量关系密切,而与结构和碱基组成无关,相对分子质量小的迁移率大,相对分子质量大的迁移率小。一般而言,传统的琼脂糖凝胶电泳只能分离15~20 kb以下的DNA片段,更大的DNA分子就很难分开。这是因为当大片段DNA分子有

效直径超过凝胶孔径时,在电场作用下DNA分子必须定向变形,以蛇形蠕动方式挤过筛孔,此时电泳迁移率已不再依赖于分子大小,而是与分子无规则卷曲构象的改变以及粘弹性迟滞时间有关,电泳结果一般为在20 kb位置出现一条带。由于本实验的目的是考察质粒是否丢失,因此仍采用常规的琼脂糖凝胶电泳。图2电泳结果表明,3个色谱峰青枯菌细胞都带有质粒,说明质粒不是造成不同青枯菌细胞电泳行为差异的主要原因。

2.3 不同色谱峰青枯菌细胞表面脂多糖分析

青枯菌是革兰氏阴性菌,其细胞壁的特有成分——脂多糖(LPS),位于细胞壁的最外层,构成了完整的菌体外膜结构,在细菌与周围环境的相互作用中扮演着重要的角色。脂多糖分子由3个部分共价连接而成:O-特异侧链、核心多糖和类脂A。其中,O-特异侧链具有种属特异性,由4或5种单糖组成的重复单位聚合成链,伸向细胞壁外,基部与核心多糖相连;核心多糖又称核心区,由低聚糖组成,分为内核心区区和外核心区,内核心区以其特有的2-酮基-3-脱氧辛糖酸(reto-deoxy-octulonate, KDO)与类脂A相结合;类脂A和核心多糖一样高度保守,脂多糖分子通过类脂A锚定于细胞壁的外壁层中^[13]。

在细菌的脂多糖里,O-特异侧链中单糖的种类、连接方式和排列顺序因不同菌株而异,具有抗原特异性,称为O-抗原。O-特异侧链在细菌和其它物体表面的相互作用过程中起着重要的作用。

收集3个色谱峰青枯菌及原始样品离心、洗涤后,用超纯水重悬,并调整到相同的 $D_{600 \text{ nm}}$ 值,按1.6.2方法提取全细胞脂多糖,采用SDS-PAGE电泳结合银染色方法进行分析,比较不同色谱峰青枯菌细胞表面脂多糖成分的差异。

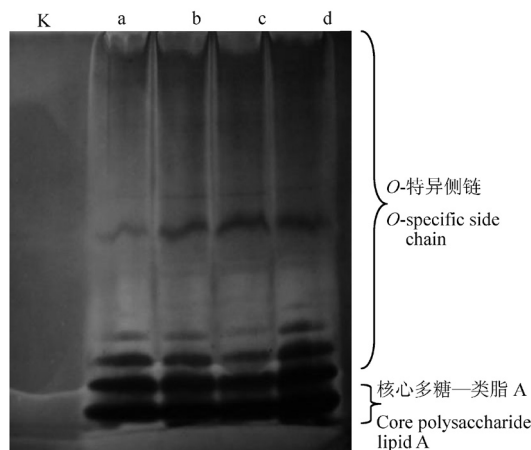


图3 3个色谱峰组分及原始样品全细胞脂多糖电泳图

Fig.3 SDS-PAGE of whole-cell lipopolysaccharide of initial sample and the three chromatographic fractions of *R. solanacearum*

a. 原始样品; b. 峰1组分; c. 峰2组分; d. 峰3组分; k. 蛋白酶K

(a) Initial sample; (b) Peak 1 fraction; (c) Peak 2 fraction; (d) Peak 3 fraction; (k) Proteinase K

在电场中,脂多糖中的类脂A及核心多糖部分由于带有较高的负电荷而共同向阳极移动,在电泳图上位于低分子量区域,常以弥散的形式出现;而O-特异侧链上由相同数目的寡糖重复单位组成的糖链共同向阳极移动,形成分散的带即

典型的梯状形式. 在电泳图上, 糖链越长在电泳胶上移动的距离越短; 糖链越短则移动的距离就越长^[8]. 图3显示, 3个色谱峰组分在O-特异侧链、核心多糖和类脂A等成分上无明显差异.

2.4 不同色谱峰青枯菌细胞表面蛋白含量的比较

在青枯菌的高效离子交换色谱分析过程中, 采用紫外检测器和激光光散射仪串联的在线双检测系统, 但在实验过程中发现, 激光光散射仪和紫外检测 (检测波长 280 nm) 得到的3个色谱峰的面积比并不相同 (图1、图4和表1).

从图1的激光光散射仪检测图和表1的检测数据发现, 峰3面积比: 峰1面积比=2.36: 1, 但在相应的紫外检测图 (图4) 上, 峰3面积比: 峰1面积比=1.26: 1. 激光光散射强度与青枯菌的细胞浓度成正比, 而紫外检测器的检测波长为280 nm, 测定的是菌体细胞表面的蛋白含量, 那么当菌体浓度高时, 其相应的蛋白总量也应增加, 但两者的检测数值并不一致.

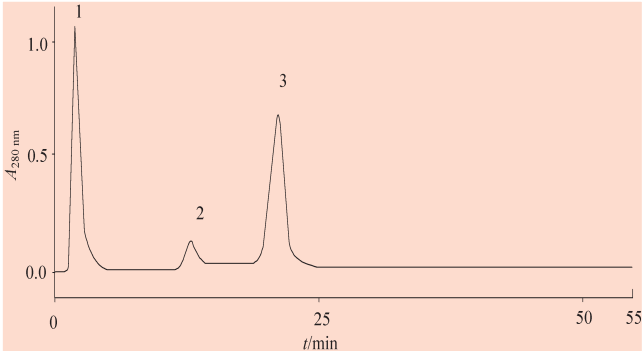


图4 青枯菌的紫外检测图
Fig. 4 HPLC spectrum of *R. solanacearum* detected by UV
Peaks 1~3: *R. solanacearum*

表1 激光光散射仪和紫外检测数据的比较
Table 1 Comparison of the data detected by laser light scattering instrument and UV

峰面积比 ^{a)} Peak area ratio (r/%)	峰1 Peak 1	峰2 Peak 2	峰3 Peak 3
激光光散射仪检测 Laser light scattering detector	26.90	9.56	63.54
紫外检测 UV detector	36.40	11.63	45.78

1) Peak area ratio = each peak area / total peak area×100%

为了深入研究3个色谱峰青枯菌细胞表面蛋白含量的差异, 收集3个色谱峰组分及原始样品离心, 制备菌悬液, 调整到相同的菌体浓度 ($D_{600\text{ nm}}=0.301$), 采用紫外分光光度计分别测定不同样品的 $A_{280\text{ nm}}$ 值. 从表2可以看出, 在相同的菌体浓度下, 3个色谱峰青枯菌细胞表面的蛋白含量并不相同, 峰1组分: 峰2组分: 峰3组分=2.22: 1.69: 1.

进一步收集3个色谱峰组分及原始样品离心, 调整到相同的菌体浓度 ($D_{600\text{ nm}}=0.551$), 按1.7方法提取鞭毛、菌毛蛋白, 采用紫外分光光度计分别测定不同样品的鞭毛菌毛蛋白含量 ($A_{280\text{ nm}}$ 值). 表2的检测数据显示, 3个色谱峰青枯菌细胞表面的鞭毛菌毛蛋白含量比例为: 峰1组分: 峰2组分: 峰3组分=1.10: 1.07: 1, 两种方法分析的结果并不相同. 因此, 推测青枯菌细胞表面可能黏附有胞外分泌物, 掩盖了细胞表面的蛋白成分; 由于不同色谱峰菌体细胞表面黏附的胞外物质数量不同, 从而造成了不同色谱峰组分细胞表面蛋白检测数据的差异. 但通过提取鞭毛菌毛蛋白进行测定时, 得到的各色谱峰组分的鞭毛菌毛蛋白含量却接近. 据文献[14]报道, 胞外酸性多糖EPSI是青枯菌的主要致病因子, 青枯菌产生的EPSI, 其中85%以游离的、不与菌体细胞黏附的状态存在, 但有15%的EPSI保持着呈蒴状黏附在细胞表面. 在后续实验中采用ELISA方法对不同色谱峰青枯菌细胞表面EPSI含量进行测定.

2.5 不同色谱峰青枯菌细胞表面EPSI含量比较

收集3个色谱峰组分及原始样品, 调整到相同的 $D_{600\text{ nm}}$ 值, 采用ELISA方法检测青枯菌细胞表面黏附的EPSI含量 ($D_{595\text{ nm}}$). 从表2可以看出, 峰3组分青枯菌细胞表面黏附的EPSI最多, 其次为峰2组分, 峰1组分最少. 对以上数据综合比较分析发现, 若菌体细胞表面黏附的EPSI越多, 则直接采用紫外分光光度计测定的细胞表面蛋白含量就越少.

据报道, 胞外酸性多糖EPSI是一个长的、由三聚重复单位——N-乙酰基半乳糖胺、2-N-乙酰基-2-脱氧-L-半乳糖醛酸和2-N-乙酰基-4-(3-羟基丁醇)-2-4-6-三脱氧-D-葡萄糖组成的多聚体^[14]. Wilson (2001)^[15]利用电泳光散射法研究革兰氏阴性病原菌细胞表面荚膜的生理特性时, 发现荚膜中的酸性多糖可以增加细胞表面的电负性和亲水性. 为了进一步验证3个色谱峰青枯菌细胞表面EPSI的差异, 采用HIC方法对3个色谱峰青枯菌细胞表面的疏水性 (CSH) 进行了测定.

2.6 不同色谱峰青枯菌细胞表面疏水性比较

收集3个色谱峰组分及原始样品, 调整到相同的 $D_{600\text{ nm}}$ 值, 采用HIC方法测定CSH. 表2的检测结果显示, 疏水性大小为: 峰1组分>峰2组分>峰3组分, 这与不同色谱峰组分细胞表面EPSI含量的测定结果正好相符, 与Wilson (2001) 报道的“酸性多糖的存在会增加细胞表面的亲水性”相吻合. 因此, 细胞表面EPSI含量是造成青枯菌野生型菌株不同细胞色谱行为差异的主要原因.

3 结 论

青枯菌野生型菌株经过高效离子交换色谱分离得到3个特征色谱峰组分. 分别对3个色谱峰组分质粒DNA、细胞

表2 3个色谱峰组分及原始样品青枯菌细胞表面特性的比较
Table 2 Comparison of cell surface characteristics of initial sample and the three fractions of *R. solanacearum*

样品 Sample	原始样品 Initial sample	峰1组分 Peak 1 fraction	峰2组分 Peak 2 fraction	峰3组分 Peak 3 fraction
细胞表面蛋白含量 Protein content of cell surface ($A_{280\text{ nm}}$)	0.160±0.003	0.266±0.005	0.203±0.002	0.120±0.003
鞭毛菌毛蛋白含量 Protein content of flagellin and pilus ($A_{280\text{ nm}}$)	0.898±0.016	0.932±0.021	0.907±0.020	0.850±0.018
细胞表面EPSI含量 EPSI content of cell surface ($D_{595\text{ nm}}$)	0.753±0.011	0.607±0.011	0.846±0.014	0.981±0.022
细胞表面疏水性 Cell surface hydrophobicity CSH (r/%)	14.19±0.16	16.67±0.21	13.16±0.09	10.64±0.05

表面鞭毛蛋白、全细胞脂多糖以及细胞表面胞外酸性多糖EPSI等进行分析表征,发现3个色谱峰组分都含有质粒DNA,在鞭毛蛋白含量和脂多糖成分上也无明显差别,但在EPSI含量上存在明显差异,表明细胞表面EPSI含量的差异是造成青枯菌野生型菌株不同细胞色谱行为差异的主要原因;细胞表面疏水性的测定结果进一步验证了上述结论.可见,细菌高效离子交换色谱方法的建立可望作为一种新型的细菌活细胞分离分析方法,不仅可以通过色谱行为的变化直观地反映出细胞表面结构和化学组成的差异,而且还可以收集各色谱峰组分再培养、跟踪检测,研究不同种属细菌细胞表面特性的差异以及同种细菌在不同环境下或不同生理状态下细胞表面特性的变化情况.

References

- 1 Daniels SL. The adsorption of micro-organisms onto solid surface. *Dev Ind Microbiol*, 1972, **13**: 211~223
- 2 Dickson JS, Koohmaraie M. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surface. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55** (4): 832~836
- 3 Lin J (林娟), Ma C (马骋), Liu ST (刘树滔), Xie Z (谢智), Rao PF (饶平凡). Optimization of *Ralstonia solanacearum* preparation methods by HPLC analysis. *China Biotech* (中国生物工程杂志), 2006, **26** (5): 63~68
- 4 Lin J (林娟), Rao PF (饶平凡), Ma C (马骋), Liu ST (刘树滔), Xie Z (谢智). Study on the separating conditions of *Ralstonia solanacearum* by high performance ion exchange liquid chromatography analysis. *J Fuzhou Univ Nat Sci Ed* (福州大学学报自然科学版), 2006, **34** (3): 448~452
- 5 Lin J (林娟), Gao ZN (高珍娜), Liu ST (刘树滔), Rao PF (饶平凡). Adsorption characteristics of cell surface of *Ralstonia solanacearum* wild type strain and avirulent mutant. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2010, **16** (4): 499~503
- 6 Llop P, Caruso P, Cubero J, Morente C, Lopez MM. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods*, 1999, **37** (1): 23~31
- 7 Zhao YF. Principle and Application of Biochemistry. 3rd ed. Beijing, China: Science Press (北京: 科学出版社), 2002. 308~314
- 8 Chart H. Methods in practical laboratory bacteriology. Boca Raton, USA: CRC Press, Inc, 1994. 1~20
- 9 Lin J (林娟), Ma C (马骋), Liu ST (刘树滔), Rao PF (饶平凡). Characterization of *Ralstonia solanacearum* in different growth phases by high performance ion exchange liquid chromatography analysis. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2007, **47** (1): 145~149
- 10 Ahimou F, Paquot M, Jacques P, Thonart P, Rouxhet PG. Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *J Microbiol Methods*, 2001, **45** (2): 119~126
- 11 Zhang Y (张洋), Wen T (温腾), Lin J (林娟), Xie Z (谢智), Liu ST (刘树滔), Rao PF (饶平凡). Characterization and identification of *Ralstonia solanacearum* by ion-exchange chromatography. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2005, **23** (4): 418~421
- 12 Lin J (林娟), Liu ST (刘树滔), Gao ZN (高珍娜), Rao PF (饶平凡). Analysis of different virulent *Ralstonia solanacearum* strains using high performance ion exchange chromatography. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2009, **15** (5): 713~718
- 13 Zhou DQ (周德庆). Microbiology. 2nd ed. Beijing, China: Higher Education Press (北京: 高等教育出版社), 2002. 11~16
- 14 Orgambide G, Montrozier H, Servin P, Roussel J, Trigalet DD, Trigalet A. High heterogeneity of the exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* strain GM11000 and complete structure of the major polysaccharide. *J Biol Chem*, 1991, **266** (13): 8312~8321
- 15 Wilson WW, Wade MM, Holman SC, Champlin FR. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *J Microbiol Methods*, 2001, **43** (3): 153~164