

文章编号:1009-038X(2003)06-0050-05

乳酸杆菌肽聚糖的分离鉴定及其免疫活性

马西艺, 乐国伟, 施用晖, 王建峰, 王卫鹏

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 研究了乳酸杆菌细胞壁肽聚糖的分离、鉴定及其对肽聚糖生物活性的影响. 实验获得了 SDS 处理粗细胞壁的适宜条件为 SDS 质量浓度 8 g/dL, 处理时间为沸水浴 10 min. SDS 结合胰蛋白酶和 TCA 处理, 可有效去除乳酸杆菌中的非共价结合蛋白质及共价结合蛋白质. 经化学分析鉴定, 所提取的乳酸杆菌成分为肽聚糖, 肽聚糖中丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和赖氨酸浓度分别为 1.181, 0.943, 0.770 和 0.456 mmol/g, 是肽聚糖中的组分氨基酸. SDS 结合 TCA 处理, 方能较有效地去除 DNA. TCA 处理是去除细胞壁磷壁酸、脂磷壁酸的有效方法. 此外, 小白鼠腹腔巨噬细胞的吞噬实验、C₃b 受体实验以及血清溶菌酶活力实验证实, 所分离纯化肽聚糖的免疫学活性未受影响.

关键词: 乳酸杆菌; 肽聚糖; 分离; 鉴定; 生物活性

中图分类号: Q 331

文献标识码: A

Studies on the Isolation, Identification and Immunoactivities of Peptidoglycan from *Lactobacillus sp.*

MA Xi-yi, LE Guo-wei, SHI Yong-hui, WANG Jian-feng, WANG Wei-peng

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: This study focused on the isolation, chemical identification of peptidoglycan (PG) derived from *Lactobacillus sp.* and its effect on the immunoactivity of PG. The optimal SDS treatment conditions are 8 g/dL in concentration, and boiling for 10 min. Treatment by combining SDS with trypsin and 10% trichloroacetic acid (TCA) can effectively deplete non-covalently bound and covalently bound in protein, teicheic acid, and DNA of *Lactobacillus sp.* The peptidoglycan contains 1.181, 0.943, 0.770 and 0.456 mmol/g Ala, Asp, Glu and Lys, respectively. Chemical identification showed that the final extract4d material is purified peptidoglycan.

Phagocytic activity, YC-rossette forming ratio of PM Φ and serum lysozyme activity were significantly enhanced by *ip* injection of PG-extracts with SDS treatment, trypsin-treatment and TCA-treatment, respectively. It was concluded that there were no negative effects on the biological activity of PG by the method of isolation and purification of PG.

Key words: *Lactobacillus sp.*; peptidoglycan; isolation; identification; immunoactivities

收稿日期: 2003-05-15; 修回日期: 2003-09-23.

作者简介: 马西艺(1963-), 男, 山东菏泽人, 副教授, 食品科学与工程博士研究生.
万方数据

乳酸杆菌作为有益菌的研究可以追溯到20世纪初诺贝尔奖获得者 Metchnikoff 有关发酵乳制品与人类健康关系的发现^[1]。此后,乳酸杆菌和双歧杆菌作为人和动物肠道中正常菌群的重要组成部分与人、动物健康与保护关系的研究从未停止过,并取得诸多进展。

近年来,人们注意到肠道内乳酸杆菌可抵抗致癌物亚硝基胍(MNNG)的致结肠癌作用,可增加机体免疫功能^[2~6]。尽管其机制尚不清楚,但迄今已报道了乳酸杆菌多种代谢产物(如多种脂肪酸等)与抗癌的关系。其中,肽聚糖成分在提高机体免疫功能方面可能有重要作用。Sekine (1995)曾报道双歧杆菌完整肽聚糖(WPG)能激活小鼠巨噬细胞,使其IL-1、IL-6及TNF- α 的mRNA表达增强^[3]。国内,赵予秀等研究发现植物乳杆菌肽聚糖能提高小鼠腹腔巨噬细胞(Peritoneal macrophage,缩写为PM Φ)的吞噬率和吞噬指数,具有提高细胞免疫作用^[4]。作者分离、筛选到一株乳酸杆菌,产酸率高达1.2%,并证实该乳酸菌具有促进生长和免疫学活性的作用^[5]。作者对乳酸杆菌细胞壁肽聚糖(Peptidoglycan)(PG)进行了分离、鉴定,并对其免疫活性进行了检测,为开发益生菌类免疫促进剂提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 *Lactobacillus sp.*:作者所在课题组分离获得。

1.1.2 培养基 MRS液体培养基成分(g/L):蛋白胨10,酵母膏4,牛肉膏8,葡萄糖20,柠檬酸铵2,乙酸钠3, MgSO₄·7H₂O 0.2, K₂HPO₄ 2, MnSO₄·4H₂O 0.05, Tween 80 1 mL。50 g/dL NaOH溶液调pH值至6.4,121℃消毒15 min。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 将乳酸杆菌菌种传代后接种于MRS液体培养基中,37℃静止深层培养48 h。培养完毕后,迅速降温至4℃(冰浴)。在2 000 g 10 min,4℃离心收集细菌沉淀。4℃,0.9%生理盐水反复洗涤细菌至白色,收集细菌,置于100℃沸水水浴箱中灭活20 min。

1.2.2 肽聚糖的分离

1) 超声破碎:菌体悬浮于蒸馏水中,超声处理20 min,进行物理破碎3次。

2) 粗细胞壁的分离:1 000 g离心15 min去除未破碎的菌体,上清液10 000 g离心20 min,收集

粗细胞壁。

3) SDS质量浓度对提取率的影响:取适量差速离心分离得到的粗细胞壁(约0.9 g),分别加入2 g/dL,4 g/dL,6 g/dL,8 g/dL,10 g/dL的SDS溶液,沸水浴30 min后,10 000 g离心15 min,收集粗肽聚糖提取物,水洗4次,无水乙醇脱水,70℃干燥后称重。

4) SDS处理时间对提取率的影响:以适宜的SDS质量浓度,沸水浴中分别处理10,15,20,25,30,35 min,选择适宜时间,评价同3)。

5) SDS处理:用以上所获条件处理粗细胞壁,10 000 g离心20 min,沉淀物用蒸馏水洗4次,无水乙醇脱水,70℃干燥后取样进行免疫活性测定和化学分析。

6) 胰蛋白酶处理:SDS处理过的经证实未失活的粗细胞壁,洗净后溶于0.1 g/dL Trypsin-0.1 mol/L Tris缓冲液(pH 7.5)中,37℃水浴振荡20 h(以OD₆₂₀基本不再下降为准)。10 000 g离心20 min,沉淀用蒸馏水洗涤4次,获得酶处理粗细胞壁,无水乙醇脱水,70℃干燥后取样进行免疫活性测定和化学分析。

7) TCA(三氯乙酸)去除共价结合的磷壁酸:将酶处理沉淀物悬浮在10 g/dL TCA溶液中,沸水浴20 min,冷却,10 000 g离心20 min,蒸馏水洗3次,无水乙醇脱水,70℃干燥后取样进行免疫活性测定和化学分析。

1.2.3 肽聚糖提取物的化学鉴定

1) 氨基酸的分析:取一定数量的肽聚糖提取物与乳酸杆菌全菌,110℃6 mol/L盐酸真空水解22 h,用日立-835氨基酸自动分析仪分别测定氨基酸组成。

2) 氨基己糖的分析:(1)总氨基己糖的比色测定。对二甲氨基苯甲醛显色法参见参考文献[7]。(2)葡萄糖胺的分析。高效液相色谱HPLC法:样品经110℃盐酸水解16 h→稀释至糖液质量浓度为5 g/dL,在waters HPLC246-E高效液相色谱仪上,外标法测定,进样量20 μ L。(3)胞壁酸分析。在乳酸杆菌细胞壁中,所含氨基己糖主要为N-乙酰葡萄糖氨和N-乙酰胞壁酸,即总氨基己糖—N-乙酰葡萄糖胺=胞壁酸^[8]。

3) 磷质量分数的测定:称取各样品0.20 g于坩埚中,在电炉上小心碳化,再放入马富炉中550℃灼烧3 h,取出冷却后按参考文献[9]的方法进行。

4) DNA质量分数的测定:精确称取10 mg乳酸杆菌菌体、各肽聚糖提取物,溶于2 mL磷酸盐缓

冲液(pH=6.2)中,加入蛋清溶菌酶 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 r/min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡酶解 3 h 后按文献[10]的方法提取 DNA, 按文献[5]的方法分析。

5) 溶菌酶溶解试验: 称取肽聚糖提取物, 以 pH 为 6.2 的磷酸盐缓冲液配成 1 mg/mL 的溶液, 加蛋清溶菌酶 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 可见光分光光度计测 A_{450} 后, 37 $^{\circ}\text{C}$, 120 r/min 震荡处理, 分别于 5 min, 10 min, 3 h, 10 h 测 A_{450} 。

1.2.4 肽聚糖提取物的生物活性检测 为了监测分离纯化过程对肽聚糖生物活性的影响, 在每步提取后分别进行活性测定。

1) 小鼠 PM Φ 吞噬实验: 试验动物及分组: 昆明种 5~6 周龄小鼠 18 只(体重约 18~22 g), 雌雄各半, 随机分为 3 组, 每组 6 只, 分别作为对照组(NS)、SDS 组和蛋白酶处理组。

对照组(NS): 每次注射无菌生理盐水 0.5 mL/只, 连续 2 d。

SDS 组: 注射 1 mg/mL SDS 处理粗细胞壁无菌生理盐水, 每次 0.5 mL/只, 连续 2 d。

蛋白酶处理组: 注射 1 mg/mL 胰蛋白酶处理粗细胞壁无菌生理盐水, 每次 0.5 mL/只, 连续 2 d。其他按参考文献[11]的方法进行。

2) PM Φ 表面 C₃b 受体的观察: 正常小鼠血清: 用作补体来源, 取几只小鼠新鲜血清混合, 加入 2 mg/mL 酵母干粉, 置 4 $^{\circ}\text{C}$, 15 min, 共 2 次, 藉以吸收可能存在的特异性抗体。每管分装 0.2 mL, 冷冻保存。其他按参考文献[12]的方法进行。

3) 血清溶菌酶活力测定: 按参考文献[13]的方法进行。每毫升酶液 30 min 使底物 A_{450} 降低 0.1 定为 1 个酶活单位(U)。

2 结果与分析

2.1 SDS 提取的工艺参数

2.1.1 SDS 质量浓度对提取率的影响 以 SDS 质量浓度为横坐标, 提取率为纵坐标作图 1。从图 1 可以看出, SDS 质量浓度在 2~8 g/dL 之间, 提取率随 SDS 浓度的增加而提高, 当 SDS 的浓度超过 8 g/dL 后, 提取率反而下降。故 SDS 质量浓度以 8 g/dL 时为宜。

2.1.2 SDS 处理时间对提取率的影响 由图 2 可见, 经 10~35 min 8 g/dL 的 SDS 提取, 抽提率在 20.5% 和 22.9% 之间波动, 本实验设计 SDS 处理时间对抽提率似无显著影响, 沸水浴 10 min 已达较稳定抽提率。

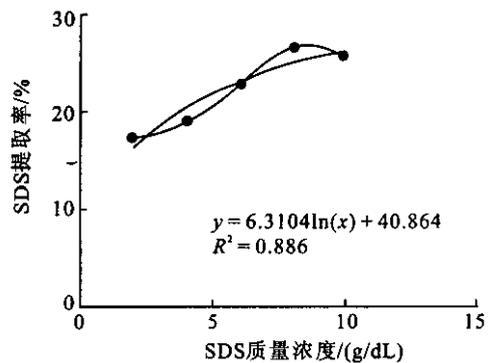


图 1 SDS 质量浓度对提取率的影响

Fig. 1 The effect of SDS conc. on extracting rate of PG

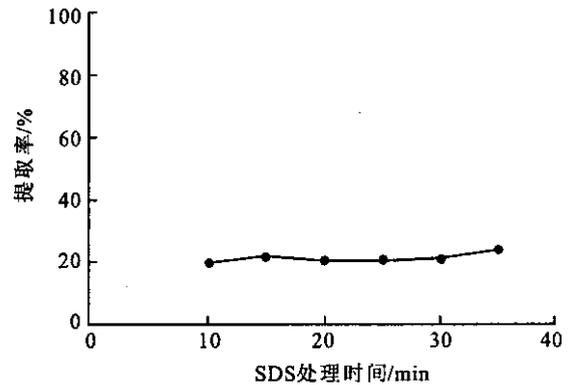


图 2 SDS 处理时间对提出率的影响

Fig. 2 The effect of SDS treating-time on extract-rate

由以上结果获得 SDS 处理粗细胞壁的适宜条件为 SDS 质量浓度 8 g/dL, 处理时间 10 min。本条件用于正式实验。

2.2 肽聚糖提取物的化学鉴定

2.2.1 肽聚糖提取物中氨基酸组成 乳酸杆菌、肽聚糖提取物氨基酸分析结果见表 1。

表 1 肽聚糖提取物和乳酸杆菌全菌中氨基酸的组成

Tab. 1 Amino acid composition of PG-extracts and the *Lactobacillus*

氨基酸)	肽聚糖	SDS 处理	乳酸杆菌
天冬氨酸	0.943	0.467	0.664
谷氨酸	0.770	0.540	0.629
丙氨酸	1.181	0.536	0.736
赖氨酸	0.456	0.370	0.573
组氨酸	0.292	0.068	0.068
丝氨酸	0.042	0.094	0.123
蛋氨酸	0.017	0.095	0.092
亮氨酸	0.065	0.286	0.302
酪氨酸	0.030	0.077	0.088
缬氨酸	0.060	0.250	0.364
苯丙氨酸	0.048	0.137	0.167
精氨酸	0.037	0.125	0.190
脯氨酸		0.072	0.126
苏氨酸		0.162	0.212
胱氨酸			0.012
甘氨酸		0.369	0.343
异亮氨酸		0.164	0.235

由表 1 可知, 经 SDS 处理后的乳酸杆菌菌体中

的各氨基酸的含量都有所降低, 但并不能去除所有蛋白质, 说明菌体里可能还有其它的共价结合蛋白的存在. 再经胰蛋白酶和 TCA 进一步处理后, 终提取物中天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、赖氨酸的含量都很高, 它们可能是肽聚糖中的特定氨基酸. 与菌体中的氨基酸含量相比, 终提取物中的其他氨基酸含量很低或没有, 说明经以上方法处理后, 乳酸杆菌中的非共价结合蛋白及共价结合蛋白等干扰蛋白已被去除.

2.2.2 肽聚糖氨基己糖浓度的测定 由标准曲线可得出肽聚糖和全菌中的总的氨基己糖的浓度, HPLC 分析葡萄糖胺结果见表 2.

表 2 乳酸杆菌及肽聚糖的糖氨化学成分

Tab. 2 Contents of muramic acid in PG and *Lactobacillus* (mmol/g)

样品	总氨基己糖	葡萄糖胺	胞壁酸
肽聚糖	2.821±0.082	1.086±0.033	1.735±0.065
乳酸杆菌	1.842±0.114	0.811±0.052	1.031±0.086

2.2.3 磷质量分数的测定 由标准曲线可以得出各样品中磷质量分数, 结果见表 3.

由表 3 可知, 所获肽聚糖中磷质量分数仅为 0.02±0.01 mg/g, 与菌体或其他细胞壁粗提物中的磷质量分数相比, 低 57~122 倍, 说明 TCA 处理是去除细胞壁磷壁酸、脂磷壁酸的有效方法. 而 SDS 处理、胰蛋白酶处理均不能去除磷壁酸、脂磷壁酸等含磷物质.

2.2.4 DNA 质量分数的测定 DNA 质量分数的测定结果见表 3. SDS 处理菌体不能完全去除 DNA, 再行胰蛋白酶处理对 DNA 质量分数几乎无影响, 而三氯乙酸(TCA)处理则可去除酶处理后剩余的 DNA. 故: SDS 结合 TCA 处理, 方能较有效地去除 DNA, 本法所提取的肽聚糖中未检测到 DNA.

表 3 样品中磷和 DNA 质量分数

Tab. 3 Phosphorus and DNA content of samples

样品	磷质量分数/ (mg/g)	DNA 质量分数/ (mg/g)
全菌体	1.14±0.03	61.03±3.81
SDS 处理粗细胞壁	2.00±0.04	29.77±2.44
酶处理粗细胞壁	2.45±0.07	28.59±1.93
TCA 处理(肽聚糖)	0.02±0.01	—

2.2.5 溶菌酶溶解实验 表 4 结果显示, 所提取的乳酸杆菌成分可被蛋清不同酶解时间对 A_{450} 的影响见表 4. 溶菌酶完全降解, 证实所提取的细胞壁

成分确系肽聚糖.

表 4 溶菌酶溶解试验结果

Tab. 4 Peptidoglycan solubilization results using lysozyme

处理时间/h	A_{450}	观察现象
0	1.232	可见颗粒
1	1.311	可见颗粒
2	1.486	基本全溶
3	1.691	全溶
10	1.633	全溶

实验获得了 SDS 处理粗细胞壁的适宜条件为 SDS 质量浓度 8 g/dL, 处理时间为沸水浴 10 min. SDS 结合胰蛋白酶和 TCA 处理, 可有效去除乳酸杆菌中的非共价结合蛋白及共价结合蛋白. 所获肽聚糖中天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、赖氨酸的含量都很高, 它们可能是肽聚糖中的组分氨基酸. SDS 处理菌体不能完全去除 DNA, 再行胰蛋白酶处理对 DNA 含量几乎无影响, 而三氯乙酸(TCA)处理则可去除酶处理后剩余的 DNA. 故 SDS 结合 TCA 处理, 方能较有效地去除 DNA, 本法所提取的肽聚糖中未检测到 DNA. TCA 处理是去除细胞壁磷壁酸、脂磷壁酸的有效方法, 而 SDS 处理、胰蛋白酶处理均不能去除磷壁酸、脂磷壁酸等含磷物质.

2.3 肽聚糖提取过程中的生物活性监测

2.3.1 对小鼠 PM Φ 吞噬功能和 YC 花结形成率的影响 肽聚糖提取物对小鼠 PM Φ 吞噬功能和 YC 花结形成率的影响见表 5.

表 5 肽聚糖提取物对小鼠 PM Φ 吞噬功能的影响

Tab. 5 The effects of PG-extracts on phagolytic activity of PM Φ in mice

指标	对照组 NS	SDS 处理	酶处理
吞噬率	38.21%	69.01%	68.69%
	±5.91%	±3.91%***	±7.17%***
吞噬指数	0.92	2.84	3.09
	±0.14	±0.49***	±0.59***
YC-花结率	37.93%	71.04%	70.18%
	±411%	±7.38%***	±4.16%***

注: 数据为 $\bar{X} \pm S. D.$; * * * 表示与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$).

由表 5 可知, 腹腔注射 SDS 处理粗细胞壁和胰蛋白酶处理粗细胞壁 2 组与对照组相比, 对 PM Φ 吞噬率、吞噬指数及花结形成率均有明显提高, F 检验具有极显著性差异. 镜检可见实验组 PM Φ 体积

较大,表面突起增多而伸展.这表明腹腔注射 SDS 处理和 SDS 加胰蛋白酶处理乳杆菌粗细胞壁均可激活 PM Φ ,促进 PM Φ 的吞噬功能,从而提高机体的免疫力.

2.3.2 对血清溶菌酶 (LSZ) 活力的影响 血清 LSZ 含量的高低,能反映 PM Φ 杀伤细菌的能力,是衡量免疫功能的指标之一(见表 6).表 6 表明,SDS 处理和 SDS 加胰蛋白酶处理乳杆菌肽聚糖提取物对小鼠血清溶菌酶有明显的刺激作用,统计学分析具有极显著性差异.

3 结 论

SDS 处理、SDS 加胰蛋白酶处理及 TCA 处理

的肽聚糖提取物均具有免疫学活性,本提取方法对肽聚糖的免疫活性无影响,可用于活性肽聚糖的提取.

表 6 肽聚糖提取物对小鼠血清 LSZ 活力的影响

Tab. 6 Effect of PG-extractson serum lysozyme activities in mice

组别	血清 LSZ 活力/ (U/mL)
对照组 NS	12.9 \pm 2.3
SDS 处理	25.6 \pm 3.4***
酶处理	25.5 \pm 3.4***

注:数据为 $\bar{X}\pm S. D.$ ($n=8$); * * * 表示与对照组相比差异极显著($P<0.01$).

参考文献:

- [1] Ingrid W, Gerhard R. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, 73(2): 451-455.
- [2] Ingrid W, Seung-taek J, Alan T, *et al.* Bacteria used for the production of Yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats[J]. *The Journal of Nutrition*, 1999, 129(1): 77-82.
- [3] Sekine K, Ohta J. Analysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation of bifidobacterium infantis[J]. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18(1): 148.
- [4] 赵予秀, 彭虹, 左秀勤. 乳酸杆菌胞壁肽聚糖的佐剂作用及其抗感染效果[J]. 上海免疫学杂志, 1988, 8(1): 1-4.
- [5] 杨洁彬, 凌代文. 乳酸菌-生物学基础及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- [6] Raoul S R, Roman D. *Methods in enzymology*[M]. New York: Newyork Press, 1994. 253-258.
- [7] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [8] Booker S B, Summerson W H. Muramic acid isolation from spores of *Bacillus*[J]. *J Biological Chemistry*, 1941, 138: 535-554.
- [9] 沈琦, 徐燕萍. 微量磷测定方法的研究[J]. 牙膏工业, 1995, 2: 16-18.
- [10] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000.
- [11] 林清华. 巨噬细胞吞噬试验的简单方法[J]. 微生物学通报, 1988, 15: 127.
- [12] 朱云凤, 郭寿延. 小鼠腹腔巨噬细胞表面 C₃b 受体试验[J]. 上海免疫学杂志, 1988, 3(5): 262-265.
- [13] Hultmark D, Steiner H. Studies on the method of lysozyme measurement in serum[J]. *Eur J Biochem*, 1980, 106: 7-16.

(责任编辑: 杨 萌)