

参考文献

- 1 Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, et al. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*, 2000, 7(1-2):203-14
- 2 Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, et al. The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(1):37-40
- 3 Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 2004, 340(4):783-95
- 4 Puntervoll P, Linding R, Gemund C, et al. ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13):3625-30
- 5 Nielsen H, Krogh A. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 1998, 6:122-30
- 6 Conchon S, Cao X, Barlowe C, et al. Gt1p and Sft2p: membrane proteins involved in traffic to the Golgi complex. *EMBO J*, 1999, 18(14):3934-46
- 7 Barfield DK, Lewis MJ, Pelham HR. A SNARE-like protein required for traffic through the Golgi complex. *Nature*, 1995, 375(6534):806-9
- 8 Reggiori F, Pelham HR. A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(2):117-23
- 9 Wotton D, Shore D. A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, 1997, 11(6):748-60
- 10 Seidah NG, Mowla SJ, Hamelin J, et al. Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(4):1321-6
- 11 Durocher D, Jackson SP. The FHA domain. *FEBS Lett*, 2002, 513(1):58-66
- 12 Hung AY, Sheng M. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem*, 2002, 277(8):5699-702
- 13 Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24:1-29
- 14 Hansen LH, Wang X, Kopchick JJ, et al. Identification of tyrosine residues in the intracellular domain of the growth hormone receptor required for transcriptional signaling and Stat5 activation. *J Biol Chem*, 1996, 271(21):12669-73

(收稿日期 2005 - 11 - 22)

## 磁选育浸矿菌种新方法的研究——磁泳分离菌种\*

中南大学资源加工与生物工程学院 (湖南长沙 410083) 刘新星 谢建平 刘文斌 邱冠周

摘要:世界无处不有磁,磁场对整个世界产生着重大的影响。本文通过大量镜检工作,观察到从酸性矿坑水中初步分离培养得到的部分细菌对外加磁场均有微弱的趋磁性。基于菌种的这种特性,设计了磁泳装置用不同的磁场梯度分离细菌,磁泳分离的方法可以初步分离出近磁、远磁菌,这两个菌群的生理特性有着很大的差异,主要体现在其对亚铁氧化和对金属离子的浸出上,远磁菌亚铁氧化活性比近磁菌高将近 50%,远磁菌对铜离子的浸出效果也比近磁菌好。近磁菌在强磁性矿物培养基中生长情况较好,而远磁菌在弱磁性矿物培养基中生长情况较好。而且,在近磁菌的纯培养菌体中分离到磁性颗粒。实验结果证明,采用磁泳用于分离体内含有磁性颗粒的细菌是可行并且有效的,这一分离技术和工艺的结合也将大大促进我国生物冶金步伐。

关键词:磁泳;菌种选育;磁小体;磁生物效应

### Isolation Bacteria by Use the Principle of Magnetic Separation

#### ——Isolate the Bioleaching Bacteria by Biomagnetic Separation

LIU Xin-xing, XIE Jian-ping, LIU Wen-bin, et al

School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, China

**ABSTRACT:** The world is effected by magnetic field wildly. Observing bioleaching microbe under the microscope, we discovered that it has magnetotactic with the magnetic field. We designed a device to isolate the bioleaching microbe according to its different characteristic. The bioleaching rate and Fe<sup>2+</sup> oxidation of AMS and RMS is very different. The results show us that the device is effective to isolate the bioleaching microbe. This technique will accelerate the bioleaching rate if it is applied to biohydrometallurgy industry. It can also accelerate the research of magnetotactic bacteria. The magnetosome can be extracted from bioleaching microbe and it is the main reason of bioleaching microbe movement under the magnetic field. By detection, the Fe element is the main component of magnetosome.

**Key words:** Biomagnetic Separation; Isolate bacteria; Magnetosome; Magnetic-biology effect

### 引言

1975 年 Blakemore 首次发现趋磁细菌后,一些学者相继从世界各地的淡水池塘、海洋沉积物表层及潮湿的草原土壤中分离出各种形态的趋磁细菌<sup>[2-5]</sup>。现有的研究表明,趋磁细菌广泛分布于自然界中<sup>[6,7]</sup>。趋磁细菌长约数 μm,有鞭毛,革兰

氏阴性,一般认为,其为厌氧或微好氧,有报道称,发现了好氧趋磁细菌<sup>[8]</sup>。细胞内部最显著的特征是有排列成链状的由类脂组成的囊泡包裹着纳米级的磁小体。趋磁细菌有沿着磁力线泳动的趋磁性,在含有铁离子的培养液中可大量繁殖<sup>[9-11]</sup>。在实验室内用磁极与它们作用,改变两极方向时,它们亦会反向运动<sup>[12-16]</sup>。

\* 基金项目:国家重大基础研究发展项目(973 项目)(2004CB619201),国家自然科学基金资助项目(50374076)

作者简介:刘新星(1955-),女,湖南长沙人,教授

电话:0731-8876697 E-mail: x-mine@mail.csu.edu.cn

栖生于金属矿山酸性矿坑水中的浸矿细菌的生长环境中富含 Fe 和 S 元素,它们对矿山酸性矿坑水的形成有直接的作用,而且,它们可以通过浸蚀矿物,将矿物中有价金属浸出。鉴于浸矿细菌和趋磁细菌有一些相似之处(见表 1),而且浸矿细菌的生长环境可能会有利于磁小体的形成。所以,设计了一系列的实验来验证磁场对其的影响。通过研究发现,部分浸矿细

菌具有微弱的趋磁性。根据这些特性设计了磁泳装置,用磁泳进行了初步的菌种选别工作。最后,我们从分离出的菌株中提取到了磁小体,证明了其运动特性是和其体内的磁小体有关。由于磁小体的存在,使它表现出了一定的趋磁性,利用这种趋磁性,可以用磁泳将其分离,这对于菌种分离筛选和工业生产都具有重要的意义。

表 1 趋磁细菌和浸矿细菌的相似性  
Table.1 The Similar property of MTB and bioleaching microbe

对比项目	趋磁细菌	浸矿细菌
形态	球形、杆形、弧形和螺旋形	杆形、螺旋型
适宜生长温度	常温	常温或高温
需氧类型	厌氧、微好氧和好氧型	好氧型
营养型	有机营养型	化能无机自养型
革兰氏染色	革兰氏阴性	革兰氏阴性
生长环境	广泛分布于水体或土壤	酸性矿坑水
培养基	含 Fe、S 元素	含 Fe、S 元素
趋磁性	强	微弱

## 实验材料和方法

### 1 实验材料

菌株:从云南某矿区酸性矿坑水中采集的原始菌种,经 9k 培养基富集后用于实验。

9k 培养基:其中,  $(NH_4)_2SO_4$ , KCl,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , Ca  $(NO_3)_2$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  的质量百分比浓度分别为:3.00, 0.10, 0.50, 0.50, 0.01, 44.7g/l;

黄铜矿:取自湖南郴州瑶岗先矿山黄铜精矿。

仪器和设备:Galen 型显微镜;HZQ—C 空气振荡器;PHS—25 型酸度计(MODEL PHS—25);SHT—特斯拉计;DY—Y 型电泳槽;B—100 自动颗粒制冰机;JY92—超声波细胞粉碎机;Eppendorf 5804R 离心机;WH—2 微型漩涡混合仪。

### 2 实验方法

#### 2.1 显微镜直接观察

将菌液分别经过 3000r/min 离心除去铁矾沉淀后,用 15000r/min 离心收集菌体,将收集到的菌体用 pH2.0 的稀硫酸悬浮,反复离心、悬浮,以溶解菌液中铁矾沉淀,避免含铁化合物对实验造成影响。将去铁菌液滴加在载玻片上,在不同方向加磁铁镜检,观察菌群沿磁力线方向运动的情况。

#### 2.2 磁泳选育菌种

为了用磁场将浸矿细菌进行分离,我们设计了磁泳装置,如图 1 所示。菌液经离心悬浮后,除去菌液中铁的化合物,将其倒入电泳槽中,用若干根烧弯的毛细管将两槽中的菌液连通,在槽的一边加磁铁。这样,两部分的溶氧、温度、养分等因素都一致,可以排除磁场外几乎所有因素的影响。经过 24 小时的磁泳后,将两槽中的近磁、远磁菌进行富集培养,测定其亚铁氧化活性;并将其接种到两种不同磁性的培养基中进行培养,观察近磁、远磁菌在不同磁性的矿物培养中的生长情况。

#### 2.3 浸矿实验

选取育出的近磁、远磁菌,按接种量 10%,接种菌浓度为  $1.0 \times 10^7$  个/ml 接种到锥形瓶中,矿浆浓度为 5%,浸矿过程中 pH 一直保持在 2.0,每隔两天调 pH、计数,每隔四天取样,测定铜离子浓度。

### 2.4 磁小体的分离、检测与纯化<sup>[17-18]</sup>

#### 3 分析方法

溶液中  $Fe^{2+}$  离子用重铬酸钾滴定法分析,用二苯胺磺酸钠作指示剂; $Fe^{3+}$  离子用 KSCN 溶液检测; $Cu^{2+}$  离子用原子吸收法测定。

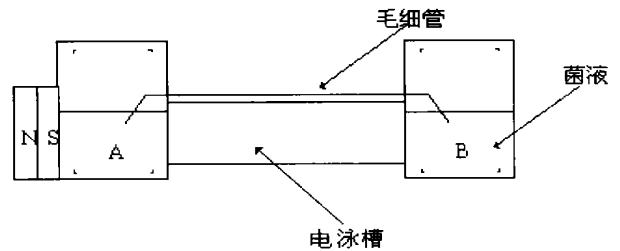


图 1 磁泳装置图

Fig. 1 The setting drawing of magnetic swimming

## 结果与分析

### 1 显微镜直接观察

经过大量镜检发现,菌种在外加磁场的作用下首先表现为剧烈的振动,然后开始运动,有的趋向磁铁运动,有的远离磁铁运动。趋磁性的细菌可能因为体内有磁小体,而远磁的菌,可能因为体内磁小体含量较少,而磁场对其造成了干扰,所以避开了磁场。

### 2 亚铁氧化活性和金属浸出率差异

磁泳选育出的菌种,其亚铁氧化活性和对金属的浸出率有显著的差异。远磁菌 48h 亚铁氧化完全时,近磁菌的亚铁氧化率才达到 44.44%(如图 2),相对应的,远磁菌对铜离子的浸出能力也比近磁菌强,远磁菌浸出率达到 79.93% 的时,近磁菌达到 66.03%(如图 3)。远磁菌的亚铁氧化活性、和金属浸出率远远高于近磁菌可能是因为近磁菌易于吸收溶液中的三价铁形成磁小体,使溶液中三价铁离子浓度降低了,但三价铁本身是强氧化剂,所以表现出近磁菌的亚铁氧化活性和金属浸出率就相对较低。

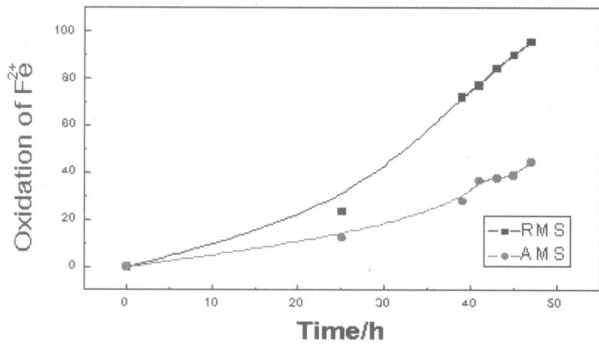


图2 近磁远磁菌亚铁氧化曲线

Fig.2 The oxidation curve of AMS and RMS

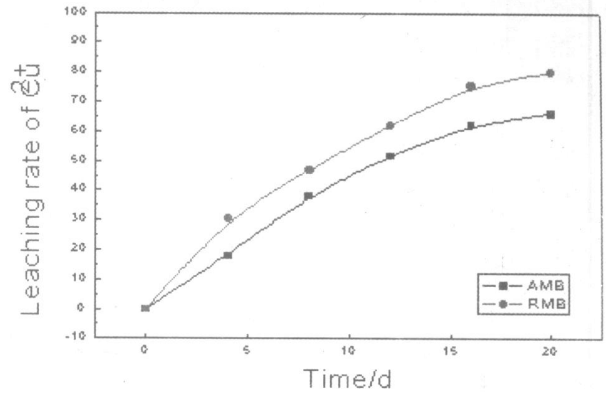


图3 近磁远磁菌铜离子浸出率曲线

Fig.3 The leaching rate curve of Cu<sup>2+</sup> of AMS and RMS

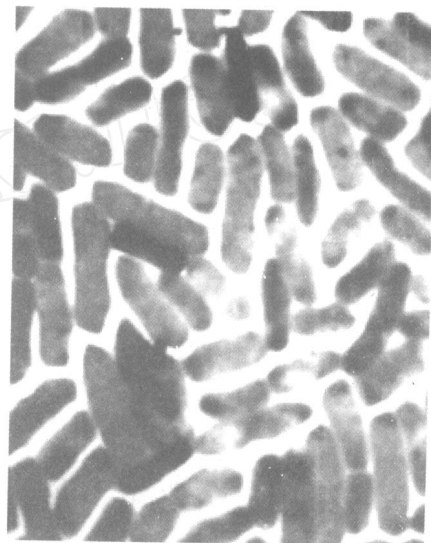
### 3 磁小体提取实验

对近磁、远磁菌作电镜检测,电镜照片(见图4)表明,近磁菌体内均有2~3颗磁小体,而远磁菌没有。对近磁菌体内磁小体进行了提取实验也证明了这点,实验结果初步证明了浸矿细菌中

的确含有磁小体,且磁小体的主要成分是Fe。从其电镜照片中(图5)可以看出磁小体经过蔗糖密度梯度离心纯化、超声波打散后,提取到的磁小体呈长方体。



a. 远磁菌



b. 近磁菌

图4 近磁、远磁菌电镜照片

Fig.5 The electron microscope photo of AMS and RMS

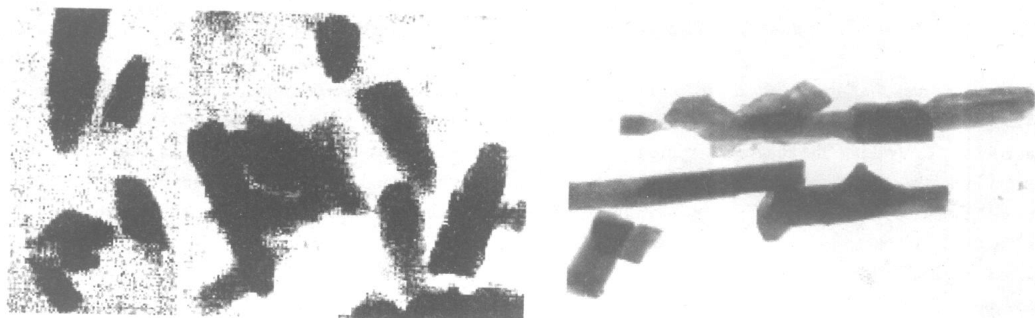


图5 浸矿细菌中磁小体的电镜照片(×8万倍)

Fig.7 The electron microscope photo of magnetosomes in bioleaching microbe

### 结论

通过以上实验,我们可以得到以下的结论:

1. 通过大量的镜检观察到浸矿细菌中有些菌具有微弱的趋磁性,可以利用这种影响分离浸矿菌种;
2. 用磁泳的方法选育出的近磁、远磁菌,其生理特性有着很

大的差异。远磁菌亚铁氧化活性和金属浸出能力远远高于近磁菌。从浸矿细菌体内可以提取到少量的磁小体,电镜照片表明,其体内均有 2~3 颗磁小体,磁小体中主要含有铁元素,这些磁小体可能是影响细菌在外加磁场作用下泳动的根本原因。

3. 磁泳分离细菌是一种可行且有效的办法,将其应用到工业生产中会产生更大的效益。比如,用强磁选将浸矿细菌中含磁小体的细菌除去,剩下的就是远磁菌,它将大大提高浸矿效率。同时,用此技术分离含有不同数目磁小体的趋磁细菌也会有很好的效果,从而可以大大促进趋磁细菌的研究。

参考文献

1 Blakemore, R. P. Magnetotactic bacteria. *Science*, 1975, 190:377 - 379  
 2 Frankel R. B., Blakeinore R. P., Wolfe R. S. Magnetite in freshwater magnetotactic bacteria. *Science*, 1979, 203:1355 - 1356  
 3 Blakemore R. P., Maratea D., Wolfe R. S. Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *J Bact*, 1979, 142:720 - 729  
 4 Mbench T. T., Konetaka W. A. A novel method for isolation and study of a magnetotactic bacterium. *Arch Microbiol*, 1978, 119:203 - 212  
 5 Fassblinder J. W. E., Stanjek H., Vali H. Occurrence of magnetic bacteria in soil. *Nature*, 1990, 343:161 - 163  
 6 Matsunaga T., Kawasaki M., Xie Y., et al. Chemiluminescence enzyme immunoassay using bacterial magnetic particles. *Anal Chem*, 1996, 68(20):3551 - 3554  
 7 解宇. 使用磁性细菌粒子分离浓缩和检测癌胚抗原. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, 23(20):159 - 160  
 8 Blakemore R. P., Blakemore N. A., Bazylinski D. A et al. Magnetotactic bacteria. In: Murray R G E ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1989, 3:1882 - 1889  
 9 Nakamura N and Matsunaga T. Highly sensitive detection of allergen using bacterial magnetic particles. *Anal Chim Acta*, 1993, 281:585 - 589  
 10 Matsunaga T., Hashimoto K., Nakamura N., et al. Phagocytosis of bacterial magnetite by leucocytes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 3:401 - 405

11 范国昌,李荣森等. 我国趋磁细菌的分布及其磁小体的研究. *科学通报*, 1996, 41(4):349 - 352  
 12 代群威,董发勤,王媛. 趋磁性细菌的研究与应用现状. *生物磁学*, 2004, 4(4):33 - 36  
 13 FAN Guo - chang, LI Rong - sen, et al. A research on distribution of magnetotactic bacteria and magnetosome in China. *Chinese Science Bulletin*, 1996, 41(4):349 - 352  
 14 高峻,肖天等. 新型海洋趋磁细菌 YSCI 的分离及其特异性磁性纳米材料磁小体的研究. *高技术通讯*, 2004, (5):44 - 47  
 15 GAO Jun, XIAO Tian, et al. Isolation of a Novel Marine Magnetotactic Bacterium YSC - 1 and Studies on the Highly Uniform, Magnetic Nano - material Magnetosome. *High - Tech Communication*, 2004, (5):44 - 47  
 16 代群威,董发勤,吴峰春. 微生物磁学研究现状述评. *生物磁学*, 2005, 5(2):38 - 40  
 17 谭晖,冯定五等. 趋磁性细菌载体磁分离技术. *国外金属矿选矿*, 2000, (2):2 - 5  
 18 TAN Hui, FENG Dingwu, et al. Carrier Separation of Magnetic by Using Magnetotactic Bacteria. *Journal of Foreign Ore Mineral Separation*, 2000, (2):2 - 5  
 19 Spring, S. and Schleifer, K - H. Diversity of magnetotactic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol*, 1995, (18):147 - 153  
 20 Bazylinski, D. A. et al. Electron - microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microsc. Res. Tech*, 1994, (27):389 - 401  
 21 Matsunaga, T. and Sakaguchi, T. Molecular mechanism of magnet formation in bacteria. *Biosci. Bioeng*, 2000, (90):1 - 13  
 22 付刚,姜伟等. 磁螺菌磁小体形成的电镜观察及其纯化. *中国现代医学杂志*, 2004, 14(5):45 - 49  
 23 FU Gang, JIANG Wei, et al. Electron microscopic observation of magnetosome formation in magnetospirillum gryphiswaldense and its purification. *China Journal of Modern Medicine*, 2004, 14(5):45 - 49  
 24 阮颖,谭周进等. 趋磁细菌的分离研究. *湖南农业大学学报*, 1998, 24(3):238 - 240  
 25 RUAN Ying, TAN Zoujing, et al. A Study of the Isolation of Magnetotactic Bacteria. *Journal of Hunan Agricultural University*, 1998, 24(3):238 - 240  
 (收稿日期 2005 - 10 - 23)

## 肢体淋巴水肿磁共振淋巴造影技术方法的实验研究\*

南京大学医学院附属鼓楼医院放射科 (江苏南京 210008) 俞海平 周正扬 朱斌 陈君

**摘要** 目的:研究肢体水肿演变过程中不同时期的 MR 淋巴造影影像特征及其病理基础,探讨 MR 淋巴造影在肢体淋巴水肿方面的诊断价值。方法:用改良的 Danese 手术方法在 20 只新西兰大白兔后肢一侧形成淋巴水肿模型,另一侧作为对照。在每只大白兔双侧后肢足背部趾蹼处注射 0.2ml 欧乃影,于淋巴水肿演变过程的不同时期进行三维 MR 淋巴造影。结果:MR 淋巴造影能准确地确定淋巴管阻塞的部位,反映淋巴管形态、功能的状况。肢体淋巴水肿的不同时期,由于其病理基础不同,产生不同的 MR 淋巴造影表现。结论:间质 MR 淋巴造影可以在解剖背景下敏感而又可靠地显示各期肢体淋巴水肿。

**关键词**:肢体淋巴水肿;磁共振;MR;间质 MR 淋巴造影;实验研究

### The Technical Methods in MR Lymphographic Experimental Study on Limb Lymph Edema

YU Hai - ping, ZHOU Zheng - yang, ZHU Bin, et al

Department of Diagnostic Radiology, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China

**ABSTRACT Objective**: To investigate the features of interstitial magnetic resonance (MR) lymphography and its pathological basis in different stage of limb lymph edema. To evaluate the diagnostic value of MRL in limb lymph edema. **Methods**: An experimental model of the lymphedema of one hind leg, based on modification of Danese's method, had been obtained in 13 New Zealand White rabbits. Another hind leg of each rabbit was assigned to the control limb. Volumes of 0.2 ml of Gadodiamide Injection were respectively injected subcutaneously into the interdigital skin of the dorsal aspect of each hind leg of 13 rabbits. The post - contrast enhanced three - dimensional magnetic resonance lymphography (3D MRL) at different progressing stage of limb lymph edema were underwent. Histopathological examination of limb specimen was made. **Results**: Interstitial MR lymphography well demonstrated the obstructed position, the configuration and the status of function of the lymphatic vessel. MR lymphographic findings varied from stage to stage due to different pathological changes. **Conclusion**: MR lymphography are very sensitive and reliable in visualizing limb lymph edema of different progressing stage under a comprehensive anatomy of lymphatic system.

**Key words**: Limb lymphedema; Magnetic resonance imaging; Interstitial magnetic resonance (MR) lymphography; Experimental study

基金项目:江苏省社会发展基金资助项目(BS2005008)

作者简介:俞海平(1963 - )男,浙江诸暨人,主管技师,从事磁共振技术研究