

酵母提取物和海带水提液促大肠杆菌生长机理初步研究

李君文 孙 薇 王新为 宋 农 金 敏

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所 天津 300050)

摘 要 :研究海带水提液和酵母提取物促大肠杆菌生长的机理。采用二维电泳(2-DE)和生物质谱等蛋白质组技术对细菌的全蛋白质表达进行研究。发现 8 种蛋白出现有规律的变化,其中 2 种蛋白在对数期各组表达量均增高,4 种蛋白在各组表达量下降且实验组下降更明显,1 种蛋白在实验组表达量明显降低而对照组无明显变化。

关键词 酵母提取物,海带水提液,大肠杆菌,促生长,机理

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)05-0695-03

细菌在生长过程中需要多种营养物质,这些物质是保证细菌正常生长所必须。在实际工作中人们发现有些物质具有明显的促进某些细菌生长的功能,这方面报道较多的是稀土元素促细菌快速生长情况^[1-3],此外,也有其他物质刺激细菌生长的报道^[4,5]。最近,我们研究发现,酵母提取物和海带水提液具有很好的促进大肠杆菌生长的作用[^]。

虽然人们发现了许多有一定促细菌生长作用的物质,但具体机制不清。徐书显等^[3]认为稀土促细菌生长是由于提高过氧化氢酶、谷氨酸草酰乙酸转氨酶和谷氨酸丙酮酸转氨酶活性的结果。Freestone 等^[6]认为去甲肾上腺素促菌生长与其促细菌产生的一种诱导因子有关。Comer 等^[7]报道大肠杆菌的 lacZ 基因及 tRNA^{thr} 参与细菌的生长调控。Britton 等^[8]报道随着细菌生长速率的增加,rNaseIII 和 Era 合成均增加。以上研究都是在某一侧面进行探讨,但表明物质对细菌生长的刺激是一复杂且相互作用的过程。

本研究在确定了酵母提取物和海带水提液促细菌快速生长的基础上,利用蛋白质组技术对大肠杆菌生长的不同时段进行动态研究,以期较全面了解细菌生长过程中具有调节作用的活性蛋白质的表达情况,为进一步探讨促细菌生长机理提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

UV-8500 紫外分光光度计,上海天美公司;低温高速离心机,Hettich(Universal 32R);真空离心干燥机,北京博医康技术公司;MALDI-TOF 质谱仪,Reflex II;Protein II 垂直电泳仪及附件、ImageScanner 扫描仪,Amersham Pharmacia 公司。ImageMaster[®] 2D Elite(Version 3.01)图像分析软件、LabScan 扫

描控制和分析前处理软件,Amersham Pharmacia 公司。

1.2 双向电泳样品制备

双向电泳样品的制备参照 Tonella 等的报道进行^[9]。

1.3 等电聚焦

将胶条平行放在 IPCphor 上,进行等电聚焦。温度保持在 20℃,每根胶条限流 50 μ A。

1.4 第二向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

1.4.1 平衡 取 SDS 平衡液 8mL,加入 DTT 160 μ L,胶条在等电聚焦结束后用滤纸吸干浸入平衡液,parafilm 封口后在 hoefler 上平衡 15min。另取 SDS 平衡液 8mL,加入碘乙酰胺 0.148g,将胶条移入其中再平衡 15min。

1.4.2 SDS-PAGE 具体方法见参考文献 [10]。

1.5 图像扫描和分析

凝胶染色后用 ImageScanner 扫描仪透射扫描,用 ImageMaster[®] 2D Elite(Version 3.01)图像分析软件处理扫描图像,进行点检测,产生合成图。选择其中一张图谱作为参考胶,其他图谱与之配比。

1.6 生物质谱(MALDI-TOF-MS)分析

用水清洗胶块,加入 50% ACN、25mmol/L NH₄HCO₃ 溶液 50~100 μ L 浸泡过夜,弃去溶液,重复 1~2 次至胶中蓝色褪尽。取出胶,室温真空离心干燥 20min,加入 5~10 μ L 胰蛋白酶液 4℃放置 20~30 min,待酶液完全被吸收,补充 5~10 μ L 25mmol/L NH₄HCO₃,37℃保温 15h。然后,加 5% TFA 50~100 μ L 于 40℃保温 1h,吸出上清液,在加入 2.5% TFA、50% ACN 50~100 μ L 于 30℃保温 1h,吸出上清液。合并上清液,离心干燥。加 5~10 μ L 0.5% TFA 溶解,作 MALDI-TOF-MS 分析。将得到的肽指纹图谱用蛋白质数据库上网检索。

基金项目:国家 863 计划(2002AA601240);天津市科技攻关重大项目(0231807111)

作者简介:李君文(1963-),男,辽宁人,研究员,博士,主要研究方向为分子微生物学。Tel:86-22-84655345;Fax:86-22-23328809;E-mail:junwenli@eyou.com

其他作者:古长庆

收稿日期:2003-12-23,修回日期:2004-04-01

△李君文,孙薇,王新为等.海带水提液和酵母提取物促大肠杆菌生长研究.微生物学通报,待发表。

2 结果和讨论

2.1 双向电泳

2.1.1 预电泳 选取平台期对照组进行电泳,采用 $\text{pH} = 3 \sim 10$ 的胶条。样品处理前经 -80°C 冻融一次,效果较好,可以得到较多的点,但按常规使用酶抑制剂并没有进一步提高效率(图略),因此样品在处理前 -80°C 冻融一次,不使用酶抑制剂。由于较多点密集于酸性端,故选择 $\text{pH} = 4 \sim 7$ 的胶条进行以后的实验,以期达到较好的分辨率。

2.1.2 蛋白差异表达分析 收集对照组、海带水提液组和酵母提取物组的迟滞期、对数期和平台期菌体处理后进行 2-DE。考马斯亮蓝染色可获得 600 余个点。我们选出有规律性变化的 8 个蛋白点作下一步分析。各点在胶上的分布如图 1 所示。

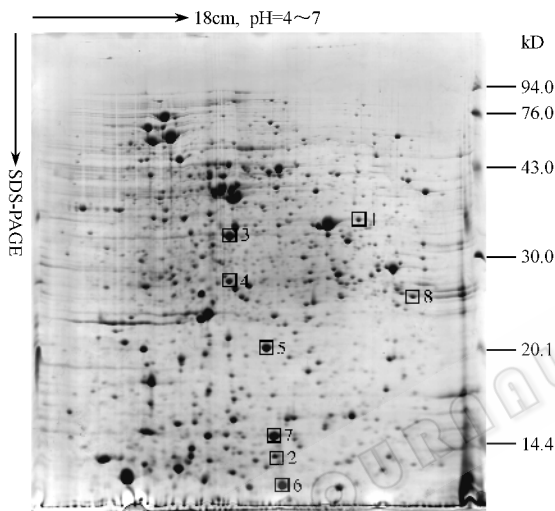


图 1 各点在 2-DE 图谱上的分布

Fig.1 Scatters of different proteins on the 2-DE atlas

蛋白 1 在各组对数期表达均增高;蛋白 2,在各组对数期表达明显增高,但酵母提取物组表达量小于其它两组;蛋白 3,在实验组对数期表达明显下降,且酵母提取物组更低于海带水提液组;蛋白 4,在各组对数期表达均降低,实验组几乎消失,在平台期,酵母提取物组仍为低水平;蛋白 5,在各组对数期表达水平均很低,海带水提液组最低;蛋白 6,变化趋

势同蛋白 5;蛋白 7,对照组表达量无明显变化而实验组在对数期明显下降;蛋白 8 只在酵母提取物组平台期表达。

2.2 MALDI-TOF-MS 和数据库检索

对各点蛋白进行 MALDI-TOF-MS 分析,得到蛋白的肽指纹图谱,各点的出峰情况均较好。将肽指纹图谱输入 NCBI 蛋白质数据库中查询,可能性得分大于 72 的蛋白被认为检索、鉴定成功,并可获得相应的蛋白特征(如分子量、等电点等)。各点的蛋白质数据库检索结果如表 1 所示。

蛋白质 1、2、4、7 的可能性得分均小于 72,未鉴定成功。其余蛋白得到成功鉴定,蛋白质 3 为 D-半乳糖 D-葡萄糖结合蛋白,蛋白质 5 为 OsmY,蛋白质 6 为一种假想蛋白,对应基因 yjbj,蛋白质 8 为钼酸盐结合蛋白。

已鉴定的 4 种蛋白中,蛋白质 3 存在于细菌周浆间隙(Periplasmic space)中,该间隙含有多种蛋白酶、核酸酶、解毒酶和特殊结合蛋白,在细菌获取营养、解除有害物质毒性方面有重要作用^[11]。GGBP 是细菌高亲和力转运系统中的基本受体^[12],可结合并调控对多种糖及糖衍生物的反应^[13],如在葡萄糖受限的饥饿状态表达增高以提高对葡萄糖的摄取能力^[13],实验中它的表达降低可能表明培养基中糖类碳源较丰富。

蛋白质 5 是平台期表达的 σ^S 依赖的应激蛋白^[14],可作为平台期标记物,用于基因表达的实时监控(on-line monitoring)^[15]。正常生长的细菌进入平台期,若出现碳饥饿或 pH 下降,则可发生应激反应^[16]。其中碳饥饿可强烈诱导 σ^S ^[17],并抑制其降解, σ^S 的积累可使包含 osmY 在内的许多 σ^S 依赖基因被激活。实验中观察到相应的对数期低表达和平台期高表达,且实验组的表达水平低于对照组,说明酵母提取物和海带水提液在获得较高细菌数的同时仍能维持较低的碳饥饿水平,这与蛋白 3 的结论一致。

蛋白质 6 功能不清,含有 69 个氨基酸残基,网上结构分析,有 4 个 α -螺旋区。Link 等^[19]曾对其基因进行插入失活,发现突变体比野生菌有更强的生存竞争力。在本实验中 Yjbj 表达的下调可能与酵母提取物和海带水提液的促大肠杆菌生长作用有关。

蛋白质 8 只在酵母提取物组平台期表达,可能与酵母提取物中含有钼酸盐有关,而在筛选中未发现钼酸盐有促生长作用,因此尚不能确定其与细菌生长有关。

表 1 蛋白点检索结果

Table 1 Analysis results of the representative proteins

No.	MW/kD	ID	Point	Protein	Changing tendency
1			58	Protein unidentified	↑
2			54	Protein unidentified	↑
3	33347	5.25	209	D-galactoseD-glucose binding protein GGBP	↓
4			64	Protein unidentified	↓
5	21061	6.30	96	OsmY	↓
6	8320	5.44	78	Orf, hypothetical protein	↓
7			58	Protein unidentified	↓
8*	24903	6.38	243	Molybdate-binding protein ModA	↑

* Expressed at stationary phase in yeast extract group.

通过实验,我们发现了几种可能与酵母提取物和海带水提液促大肠杆菌生长有关的蛋白质,对其进行初步分析,认为其作用可能与其含有的糖类、碳源物质有关,具体机制尚需进一步扩大和深入研究。

参 考 文 献

- [1] 徐书显,陈崇智.轻硝酸稀土盐对肠道细菌生长的影响.微生物学通报,1988,14(1):15-17.
- [2] Talburt D E, Dwight E, Deorge T J, et al. Some effect of rare-earth elements and yttrium on microbial growth. *Mycologia*, 1967, 59(3):492-503.
- [3] 徐书显,曾亚平,陈崇智,等.稀土对布鲁氏菌酶活性的影响.稀土,1991,12(3):68-69.
- [4] 梁冰.螺旋藻在体外对肠道菌群增殖的促进作用.中国海洋药物,1999,18(3):7-10.
- [5] 车仁骥,郑震雄,梁玉君.一个促进结核菌迅速发育的培养基—白芷改良培养基.中华结核和呼吸系统疾病杂志,1982,5(4):211-213.
- [6] Freestone P P, Haigh R D, Williams P H, et al. Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 172(1):53-60.
- [7] Comer M M, Dondon J, Gratte M, et al. Growth rate-dependent control, feedback regulation and steady-state mRNA levels of the threonyl-tRNA synthetase gene of *Escherichia coli*. *J Microbiol*, 1996, 261:108-124.
- [8] Britton R A, Powell B S, Dasgupta S D, et al. Cell cycle arrest in Era GTPase mutants: a potential growth rate-regulated checkpoints in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1998, 27(4):739-750.
- [9] Tonella L, Walsh B J, Sanchez J C, et al. 98 *Escherichia coli*

- SWISS-2DPAGE database update. *Electrophoresis*, 1998, 19:1961-1970.
- [10] Wick L M, Quadroni M, Egli T. Short-and long-term changes in proteome composition and kinetic properties in a culture of *Escherichia coli* during transition from glucose-excess to glucose-limited growth conditions in continuous culture and vice versa. *Environ Microbiol*, 2001, 3(9):588-599.
- [11] 陆德源主编.医学微生物学.第四版.北京:人民卫生出版社,1997,13.
- [12] Vyas N K, Vyas M N, Quijcho F A. Comparison of the periplasmic receptors for L-arabinose, D-glucose/D-galactose, and D-ribose. Structural and Functional Similarity. *J Biol Chem*, 1991, 266(8):5226-5237.
- [13] Gestnicki J E, Strong L E, Borchardt S L, et al. Designed potent multivalent chemoattractants for *Escherichia coli*. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9(9):2387-2393.
- [14] Mukhopadhyay S, Audia J P, Roy R N, et al. Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two-component regulator. *Mol Microbiol*, 2000, 37(2):371-381.
- [15] Biran I, Klimentiy L, Hengge-Aronis R, et al. On-line monitoring of gene expression. *Microbiol*, 1999, 145(8):2129-2133.
- [16] Klaucek E, Lingnau M, Hengge-Aronis R. Role of the response regulator RssB in sigma recognition and initiation of sigma proteolysis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2000, 40(6):1382-1390.
- [17] Fischer D, Teich A, Neubauer P, et al. The general stress sigma factor sigmaS of *Escherichia coli* is induced during diauxic shift from glucose to lactose. *J Bacteriol*, 1998, 180(23):6203-6206.

Study on Mechanisms of *Escherichia coli* Growth Stimulated by Yeast Extract and *Echlonia Kurome Okum* Water Extract

LI Jun-Wen* SUN Wei WANG Xin-Wei SONG Nong JIN Min

(Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medicine of Sciences, Tianjin 300050, China)

Abstract: To elucidate the mechanisms of yeast extraction and *Echlonia Kurome Okum* water extraction to stimulate the growth of *Escherichia coli*. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) and bio-mass-spectrum were used to observe the changes of whole-protein expression caused by certain stimulants. It was found that the expression of 8 proteins changed in different ways. Two proteins leveled up but failed to be identified; 4 proteins declined much more in experimental groups than in control. There are some proteins participating to regulate growth of *Escherichia coli*.

Key words: Yeast extraction, *Echlonia Kurome Okum* water extraction, *Escherichia coli*, Growth, Mechanism

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2002AA601240); Tianjin Program for The Development of Science and Technology (0231807111)

* Corresponding author. Tel 86-22-84655345; Fax 86-22-23328809; E-mail junwenli@eyou.com

Other author: Gu Chang-Qing

Received date 01-20-2004