

嗜碱菌 *Alkalimonas amylolytica* N10 在不同 pH 条件下的膜蛋白差异表达研究

王全会¹, 王敬强², 钱 忠², 刘斯奇², 马延和^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所 北京 100080) (² 中国科学院北京基因组研究所 北京 101300)

摘 要: 为了探讨嗜碱菌的嗜碱机制, 对一株新型专性嗜碱菌(*Alkalimonas amylolytica* N10) 在不同 pH 条件下的差异膜蛋白质组进行了初步的研究。在 3 种 pH 条件下(pH 值分别为 8.4、9.4 和 10.4) 培养的该菌的膜蛋白 通过 8% ~ 20% 的梯度 SDS-PAGE 进行分离。经胶图图像和统计计算, 7 条电泳条带的相对染色强度随培养液的 pH 值变化而改变, 其中仅有一条条带强度随 pH 值增高而增加。这些条带经胰蛋白酶胶内消化和高效液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱(LC-MS/MS) 分析, 共鉴定出了 12 种蛋白质。其中 4 种膜蛋白已有报道直接或间接参与细胞 pH 稳态的保持, 其他几种蛋白则是首次发现其表达水平与生活环境的 pH 变化可能相关。

关键词: 嗜碱菌; *Alkalimonas amylolytica* N10; 膜蛋白; 蛋白质组; 梯度 SDS-PAGE; LC-MS/MS

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)02-0263-06

嗜碱菌是指最适生长 pH 值在 9.0 以上的一类细菌, 包括专性嗜碱菌(Obligate alkaliphile) 和兼性嗜碱菌(Facultive alkaliphile)。它们广泛存在于碱湖、碱性泉、海洋和土壤等多种环境中。嗜碱菌在高 pH 条件下的生理学机制研究, 对于理解离子运输、pH 平衡、细胞能量产生都具有重要意义。*Alkalimonas amylolytica* N10(N10) 为本研究室从内蒙古碱湖里鉴定的一株嗜碱菌新种, 生长 pH 范围为 8 ~ 11^[1]。令人感兴趣的是, 目前研究比较多的嗜碱菌多为革兰氏阳性菌, 而 N10 却是一株典型的革兰氏阴性专性嗜碱菌。这种对于革兰染料依附能力的差异反映了细胞外层结构的不同, 很可能在一定程度上也反映了两类嗜碱菌细胞外层组分在嗜碱机制中的差异性。

嗜碱菌的细胞内 pH 比胞外低约 2.0 ~ 2.3 个单位^[2], 保持一种近中性状态。因此, 嗜碱机制的一个核心问题是如何维持嗜碱菌细胞内 pH 值的稳定性。显而易见, 膜蛋白是这种生理功能的重要分子基础^[3]。例如, 有关嗜碱假单胞杆菌 OF4(*B. pseudofirmus* OF4) 和海洋杆菌 C-125(*B. Halodurancie* C-125) 的研究发现, Na⁺/H⁺ antiporters 和 F₁F₀ ATPase 在维持 Na⁺ 循环和保持胞内 H⁺ 浓度方面, 起着举足轻重的作用^[4]。Kruhwich 等研究了 *B. pseudofirmus* OF4 在两个不同 pH 条件下蛋白质表达

的差异性, 观察到许多膜蛋白的表达随环境 pH 的改变而改变^[5]。在对大肠杆菌(*Escherichia coli*) 的研究中发现了一些碱诱导或酸诱导的蛋白如 DsbA、YeeI、OmpA、OmpX、SucC 等^[6,7], 这些蛋白功能目前研究的很少。那么, 革兰氏阴性的 N10 的细胞膜结构是如何响应于环境 pH 的改变? 它的膜蛋白质的表达是否依赖于 pH? 这些问题有待回答。

一个细胞膜的结构改变, 往往是若干膜蛋白质相互作用的结果。可以预测, N10 细胞膜蛋白质在不同 pH 环境中的表达差异, 必然是多层次而且广谱性的。所以, 膜蛋白质组的测定和比较是必要的。应当指出, 细胞膜蛋白质组的分析, 仍然是当前蛋白质组学研究的一个棘手问题。尽管, 二维凝胶电泳是研究差异蛋白质组的有效手段, 但由于膜蛋白具有强的疏水性^[8,9], 此技术在分离膜蛋白质上的应用受到很大程度的限制。与二维凝胶电泳相比, 虽然 SDS-PAGE 分析对于蛋白质的分辨率较差, 但是对于疏水蛋白质有良好的溶解性。因此, 本研究采用梯度 SDS-PAGE 和反相 HPLC 的分析策略, 试图较为全面地研究 N10 细胞膜上的 pH 依赖性的蛋白质组。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *Alkalimonas amylolytica* N10 及大肠杆

基金项目: 国家 973 项目(2004CB719605)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62651577; E-mail: mayanhe@sun.im.ac.cn

作者简介: 王全会(1978-), 女, 山东省日照市人, 博士研究生, 主要从事微生物生态方面的研究。E-mail: quanhuiwang@hotmail.com

收稿日期: 2005-09-22; 接受日期: 2005-11-20; 修回日期: 2005-12-21

菌 BL21-DE3 均为本室保存。

1.1.2 培养基 采用 Horikoshi 培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器 Tricine(三羟甲基氨基乙酸)、CHES(2-环己胺基乙磺酸)、CAPS(3-环己胺基丙磺酸)、PMSF(苯甲基磺酰氟)均为 Amersco 产品, Trypsin(胰蛋白酶)、牛血清白蛋白、 NH_4HCO_3 为 Sigma 产品, DTT 为 Promega 产品, 乙腈为 Fisher Scientific 产品, IAM(碘代乙酰胺)为 Fluka 产品。液质联用质谱仪为德国 BRUKER 公司产品。

1.2 测定 N10 在不同的 pH 培养基中的生长曲线

为了使细胞培养基在一个较大的 pH 范围内仍能保持稳定的 pH 值, 采用了 3 种生物缓冲剂组成的混合缓冲系统, 含有 50mmol/L Tricine、50mmol/L CHES 和 50mmol/L CAPS。菌株 N10 的培养采用 Horikoshi 培养基, 其成分为 10g/L Glucose、10g/L Tryptone、5g/L Yeast extract、30g/L NaCl、0.2g/L MgSO_4 、1.0g/L K_2HPO_4 及生物缓冲剂。将 N10 接种于不同的 pH 值的 Horikoshi 培养基中, 在 37°C 培养, 并在每小时吸取 1mL 培养液, 测定其在 600nm 的吸光度值。根据培养时间和吸光度值绘制生长曲线, 然后用 Sigmaplot 8.0 软件计算每个 pH 培养条件下的 N10 的生长速率并绘制 pH 依赖性曲线。

1.3 N10 菌株的膜蛋白的制备

在 3 种不同的 pH 条件下培养 N10 菌株 (pH 值分别为 8.4、9.4 和 10.4)。培养细菌至对数期, 随即离心收集菌体 (4°C, 6000g, 10min), 并分别用预冷的生理盐水和 50mmol/L Tris-HCl, pH7.5 缓冲液洗涤菌体沉淀。称量菌体湿重后, 将细菌重新悬浮于 50mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 的缓冲液中。采用超声波破碎仪超声破碎菌体后利用差式离心法逐一除去细胞碎片和细胞壁, 最后在 120000 × g 的条件下离心 4h, 沉淀即为膜蛋白成分。将膜蛋白悬浮在含 10% 甘油的 50mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 的缓冲液中, 保存于 -80°C 待用。膜蛋白质定量采用改良 Lowry 法。为了比较嗜碱菌和中性菌膜蛋白之间可能存在的差别, 选定一株大肠杆菌 BL21-DE3 作为对照。

1.4 梯度 SDS-PAGE 电泳

采用 Amersham 的梯度发生器, 制备 8% ~ 20% 的梯度 SDS-聚丙烯酰胺凝胶。200 μg 的膜蛋白质置于 15cm × 13cm 的平板胶。首先在 80V 下电泳 1h, 其后在 160V 稳压下电泳 5h。考马斯亮蓝染色分离的蛋白条带。

1.5 图像分析及统计学分析

运用 Image Master 软件分析蛋白质的电泳条带

的相对光密度强度, 每一个条带在 5 块平行胶中的平均相对强度作为不同 pH 组间比较的基础。t 检验比较各个样本的差异显著性, p 小于或等于 0.05 为差异显著性的阈值。

1.6 高效液相色谱-质谱技术鉴定膜蛋白

将差异蛋白条带切下, 用 Trypsin 进行胶内消化^[10]。C₁₈毛细管柱高效液相色谱进一步分离消化后的肽段。离子阱质谱 (LCQ DecaXP, ThermoFinnigan) 用于鉴定被分离的肽段。应用 SEQUEST 软件在 NCBI 数据库内搜索与质谱信号相匹配的肽段和蛋白质。

2 结果

2.1 pH 依赖性的 N10 生长曲线

采用缓和生物缓冲系统测定了菌株 N10 的生长曲线, 结果显示其生长率与 pH 环境的相关性呈钟形曲线 (图 1), 即生长的最适 pH 值约为 9.4, 而低于或高于此 pH 值的 N10 生长速率均逐渐下降。值得提出的是, 实验表明 N10 只适合生长于微碱到中碱性的环境, 当 pH 低于 7.8 或高于 10.5 时, N10 是不能生长的。根据 pH 依赖性的生长曲线, 确定了 3 个 pH 值来检测 N10 膜蛋白质的表达差异。

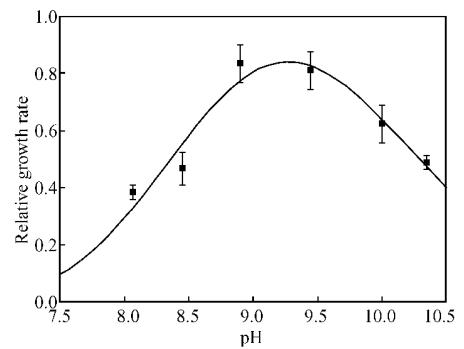


图 1 N10 的 pH 相关性生长曲线

Fig. 1 pH relative growth curve of N10.

2.2 不同 pH 条件下培养的 N10 膜蛋白含量比较

经过蛋白定量比较发现 N10 和 BL21-DE3 的膜蛋白量的差异十分显著, N10 的膜蛋白组分占总蛋白的比例约 16%, 而 BL21-DE3 的膜蛋白仅占总蛋白的约 4%。另外, 尽管 N10 在不同的 pH 环境中的生长速率不同, 它的总蛋白和膜蛋白含量似乎并不受 pH 影响, 均为 16% 左右。

2.3 梯度 SDS-PAGE 分离 N10 膜蛋白质

在浓度为 8% ~ 20% 的梯度 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上, N10 的膜蛋白得到了比较好的分离, 每条泳道可清晰地分离出约 50 条蛋白带 (图 2)。N10 膜蛋白

的 SDS-PAGE 的图谱显著不同于 BL210-DE3, 这表明这两种细菌的膜蛋白质组成有根本性的差别。同时, 在不同的 pH 培养条件下, N10 膜蛋白质的 SDS-PAGE 电泳图谱是基本一致的。因此可以估计, 在 3 个 pH 单位范围内, pH 的改变可能并没有刺激新的基因的蛋白表达, 至少在 SDS-PAGE 分辨率和考氏染色敏感率的条件下是如此。但是对每一条带的平均相对强度作统计分析比较, 则不同 pH 培养的 N10

的某些膜蛋白条带的强度存在着明显差异。表 1 列出了 7 条 pH 依赖性的电泳条带的相对光密度变化。将这些条带进一步分析, 可以看出其中大部分 (6 条) 条带在 pH 10.4 的条件下的相对光密度较 pH 8.4 和 9.4 有显著的下降 ($P < 0.05$)。只有条带 4 的强度随 pH 的增高有增加的趋势, 在 pH 9.4 时其相对强度较 pH 8.4 增强近 50% (P 值 < 0.05)。

表 1 差异电泳条带的相对强度值比较及统计学分析

Table 1 Comparison of relative intensity of bands at different pHs

Protein band No.	Intensity/%			<i>t</i> value		
	pH 8.4	pH 9.4	pH 10.4	pH8.4 vs 9.4	pH8.4 vs 10.4	pH9.4 vs 10.4
1	1.13 ± 0.16	1.01 ± 0.09	0.78 ± 0.05	0.25	0.04	0.03
2	1.48 ± 0.13	1.49 ± 0.15	1.26 ± 0.04	0.47	0.04	0.03
3	1.11 ± 0.08	1.01 ± 0.03	0.73 ± 0.13	0.19	0.004	0.03
4	0.89 ± 0.06	1.29 ± 0.09	1.35 ± 0.12	0.002	0.0005	0.27
5	1.01 ± 0.016	0.92 ± 0.06	0.51 ± 0.08	0.43	0.01	0.03
6	0.74 ± 0.12	0.76 ± 0.08	0.51 ± 0.05	0.40	0.02	0.01
7	0.91 ± 0.29	0.90 ± 0.11	0.64 ± 0.03	0.29	0.14	0.04

Note: n = 5

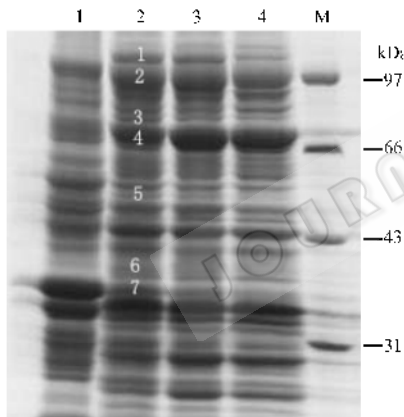


图 2 不同 pH 培养时 N10 膜蛋白的梯度 SDS-PAGE

Fig.2 Gradient SDS-PAGE of membrane proteins of N10 cultured at different pHs. 1. Membrane proteins from *E. coli* cultured at pH of 7.0; 2. Membrane proteins from *A. amylolytica* cultured at pH of 8.4; 3. Membrane proteins from *A. amylolytica* cultured at pH of 9.4; 4. Membrane proteins from *A. amylolytica* cultured at pH of 10.4; M. Molecular mass standard.

2.4 pH 依赖性 N10 膜蛋白的鉴定

将不同 pH 条件下所有的差异电泳条带切割, 用胰蛋白酶完全水解其中的蛋白质, 然后用离子阱质谱仪检测酶解肽段。为了获取较为可信的检测结果, 首先在 SEQUEST 软件中设定了严格肽段判定标准, 即 ΔC_n 大于或等于 0.1, S_pRank 小于 4, 并且单电荷肽段的 X_{corr} 值不低于 1.9, 双电荷或三电荷肽段的 X_{corr} 值分别不低于 2.2 及 3.75 时为可信结果。另一方面, 由于 LC-MS/MS 检测分析通常给

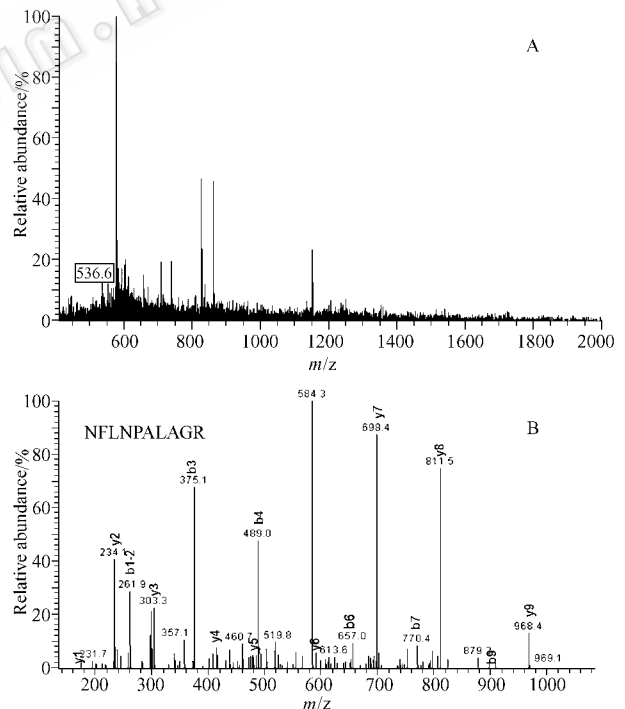


图 3 LC-MS/MS 分析膜蛋白 NADH: ubiquinone oxidoreductase 的一级与二级质谱峰图

Fig.3 Identification of DNAH: ubiquinone oxidoreductase (Gi 24346743) by LC-MS/MS. A: Full mass spectrum at 22.47min analyzed by LC-MS; B. LC-MS/MS spectrum, the parent ion 536.6 was selected for MS/MS analysis and the tandem mass spectrum was collected corresponding to the amino acid sequence, NFLNPALAGR, by analyzing b- and y-ions derived from the peptide.

出若干可能的蛋白质结果,有时可能引起信息的错误判断,因此规定只有通过 SEQUEST 的判据之后,并且在 3 个 pH 下都可以检测的质谱信号,才可以作为 pH 依赖性的候选蛋白质。图 3 为一个典型的 MS/MS 质谱谱图,它表明了 NADH: ubiquinone oxidoreductase 中的一个肽段的一级和二级质谱信号。表 2 则显示了所有的差异电泳条带的质谱分析结果。由于分辨能力的原因,一条经 SDS-PAGE 分离的电泳条带仍有可能含有多种蛋白,所以条带 2 检测出 4 种候选蛋白,条带 7 检测出两种候选的蛋白质。条带 1 的质谱检测,虽然也显示不同的 pH 条件下有共享的质谱信号,但是 SEQUEST 搜索给出的是一种未知功能的蛋白质。

在 7 个与 pH 变化相关的电泳条带中,共检验出 12 个蛋白质。其中 5 个条带(条带 2、4、5、6、7)中

所鉴定的蛋白质为比较明确的膜蛋白质。SpoVAA 是一种与细胞芽孢形成相关的蛋白,定位于内膜上,参与形成芽孢时二甲吡啶酸的转运^[11];NADH: ubiquinol-cytochrome c reductase 是电子传递呼吸链上的成分;ATP synthase alpha subunit 是催化 ATP 合成的酶 F_1F_0 ATPase 的一个亚基,同时也是与呼吸作用相耦联的;ABC-type probable sulfate transporter 是一种 ATP-binding cassette 类型的溶质转运蛋白。FtsH 蛋白是一个比较特殊的蛋白,它是由 *ftsH* 基因编码的一种 ATP 与 Zn^{2+} 依赖的金属蛋白酶,通过两个跨膜区锚定在细胞膜上,其 N 末端与 C 末端分别为 ATP 与 Zn^{2+} 的结合区,并暴露在胞浆中^[12];TuaA 的功能是参与细胞壁中一种酸性复合物葡萄糖醛酸的合成,由 *tuaA* 基因编码,是糖基转移酶系列的一种。

表 2 高效液相色谱串联质谱法测定各差异电泳条带中的蛋白质

Table 2 The pH-relative proteins in N10 identified by LC-MS/MS

Protein band No.	Gi number	Peptides identified	Protein	MW/Da	
				Theoretical	Observed
1	52002599	SGIHPAVLVLSAALTAAFSPEIRK	Hypothetical protein	12367.79	100000
2	13470552	VKLSEEIFGLDPR	Ribosomal protein L4	22356.06	97000
2	15022931	FVKNLVEETNKVNSNR	ABC-type probable sulfate transporter	40406.67	97000
2	52004072	LPIYQVSKADQSMVLDVMK	SpoVAA	23889.80	97000
2	46450539	LPYLRTVATYGGELDEVAQTIR	Hypothetical protein	22954.22	97000
3	24349225	FGFPVGPITLLDEVGIDVGAK	Fatty oxidation complex, alpha subunit	75854.17	80000
4	24346861	GTPGFSGADLANLVNEAALFAAR	FtsH	71209.40	70000
5	10176380	EAYPGDVFYLHSR	ATP synthase, alpha subunit	54627.40	53000
5	24347086	RLSGIAEQLDKISEGYISNLLR	Leucyl aminopeptidase	54704.73	53000
6	16080614	SMKIDAEKSGAVWAQK	TuaA	20304.77	41000
7	24346743	NFLNPALAGR	NADH: ubiquinone oxidoreductase	43781.27	37000
7	24346112	GDYVISGATLNR	Ubiquinol-cytochrome c reductase	45877.26	37000

3 讨论

膜蛋白质的低溶性一直是困扰蛋白质组分析的关键技术障碍。在本研究中,首先采用 SDS-PAGE 的方法对 N10 的膜蛋白质作一个初步的分离。考虑到 SDS-PAGE 的分辨率的限制,在两个方面强化了它的分辨率。一方面,采用 15cm 长的薄板 SDS-PAGE 增加了电泳运行距离,扩大了分离条带之间泳动距离;另一方面,采用 8%~20% 的梯度聚丙烯酰胺凝胶,加强了不同分子量的蛋白质之间的分离。这样膜蛋白质在 SDS-PAGE 得到了较为满意的分离(图 2)。但是每一个电泳条带中仍可能含有多个蛋白质,因此为了准确分析膜蛋白质,又采用了毛细管高效液相色谱的方法,进一步分离胰蛋白酶消化的肽段。如表 2 所示,通过上述的实验设计,成功地在

每一条蛋白条带中鉴定了出信号质量较高的肽段。

根据目前的报道,尚未见系统的嗜碱菌膜蛋白质在不同 pH 条件下表达水平的研究。除了 TuaA、ATP synthase, alpha subunit、NADH: ubiquinone oxidoreductase、Ubiquinol-cytochrome c reductase 这四种蛋白有文献报道可能与嗜碱菌适应外界 pH 变化相关外,还未见对上述其他几个所鉴定的 N10 膜蛋白质的 pH 相关性研究。本研究的实验结果,为未来开拓这方面的研究奠定了可靠的分析生物化学数据基础。FtsH 蛋白在测定的数据中,是唯一的 pH 正相关的蛋白质。它是细菌中的一种应急蛋白。在大肠杆菌中发现, *ftsH* 基因是一种温度敏感型基因,在特定温度下诱导鞭毛的形成^[13];在 *Bacillus subtilis* 中 *ftsH* 基因有可能受到渗透压的诱导,突变产生一种盐敏感的突变株,促使鞭毛的生成^[14]。我们的蛋

白质组结果提示, FtsH 也可能对周围质子浓度的改变, 而产生另一种应急反应。这是一个让人感兴趣的蛋白。葡萄糖醛酸是细胞壁聚多糖中的一种。研究发现, 在嗜碱菌细胞壁中由葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸及 N-乙酰半乳糖胺按 1:1:1 组成酸性的复合物 TUP 及由葡萄糖醛酸和 L-谷氨酸按 1:5 组成的 TUA, 对胞内 pH 值稳态的维持具有重要作用。当胞外环境 pH 值升高时, 这些复合物的含量增加^[15]。据此推测, 其合成酶的含量也应该是增加的。本研究结果表明, 葡萄糖醛酸生物合成酶 TUA 的表达量在 pH 增高时, 反而下降了。但是, 如果仔细分析 SDS-PAGE 和质谱鉴定的 TUA 蛋白, 就会发现随 pH 增加而下降的蛋白质, 可能只是葡萄糖醛酸生物合成酶的修饰产物。因为这个酶的理论分子量为 20kDa, 图 2 的条带 6 的表观分子量却是 40kDa。整个电泳过程在变性和强还原的条件下进行, 葡萄糖醛酸生物合成酶之间由于二硫键作用形成二聚体的可能性较小。那么, 这个酶的真实活性状态是什么? 它的修饰形式又意味着什么? 我们将利用免疫化学的方法对这些问题进一步探讨。

由于在一个电泳条带中含有不止一种蛋白质, 因此所鉴定出来的蛋白质虽然在强度发生了改变的条带中, 但并不能肯定这些蛋白的强度也发生了相应的改变, 因此真正肯定的结果还需要后续的免疫学及 mRNA 水平的验证。ABC-type probable sulfate transporter、FtsH、NADH: ubiquinone oxidoreductase 及 Ubiquinol-cytochrome c reductase 是今后要重点研究的几种蛋白。同时还会试图运用二维电泳探求新的随 pH 变化的蛋白。

在鉴定出的蛋白中除了 SpoVAA、NADH: ubiquinol-cytochrome c reductase、ATP synthase alpha subunit、FtsH、TuaA 这几种膜蛋白外, 还有 3 种可能定位于胞浆的蛋白: Ribosomal protein L4、Leucyl aminopeptidase 和 Fatty oxidation complex (subunit)。然而这几种蛋白质和细胞膜也存在着密切关系。Ribosomal protein L4 是 50S 核糖体的一种结构蛋白。在细菌中, 50S 核糖体与 30S 核糖体组成的 70S 核糖体是蛋白质合成的场所。在大肠杆菌中, 新合成的膜蛋白通过两种途径运输到细胞膜, 一种途径是首先通过信号识别颗粒 SRP 与核糖体上新合成肽链结合, 然后与定位在细胞膜上的 SRP 受体 FtsY 识别并结合; 另外一种途径是不经过 SRP, 新合成的肽链核糖体复合物直接与膜受体 FtsY 识别并结合^[16, 17]。由于这两种途径都会造成核糖体与细胞膜的结合,

因此在提取的膜组分中存在该蛋白就不足为奇了。Leucyl aminopeptidase 是一种外肽酶, 位于接近细胞内膜的部位, 也可能与内膜小片之间有相互联系^[18, 19]。Fatty oxidation complex (subunit 是脂肪酸(氧化酶复合物中的一个亚单位, Pawar 等报道, 这种(亚基有部分可与细胞膜结合^[20]。

另一个值得注意的现象是, 有四个鉴定的蛋白质的表观分子量明显高于理论值。例如, 在区条带 2 中鉴定的 Ribosomal protein L4、ABC-type probable sulfate transporter 和 SpoVAA 以及在条带 6 中所鉴定的 TUA。一方面本研究所用的菌种 N10 还是一种中度嗜盐菌, 而研究发现嗜盐菌的蛋白含有大量的酸性氨基酸, 在 SDS 胶上所显示的分子量往往比实际分子量偏大^[21, 22]这可能是上述蛋白表观分子量实际不符的一个解释。另一方面我们推测也可能是由于蛋白质的糖基化的结果所致。因为在原核细胞中也广泛存在着糖蛋白, 并且细菌糖蛋白与真核细胞糖蛋白也具有某些共同之处。根据细菌糖蛋白与真核细胞糖蛋白的共同点, 我们运用 YinOYang 1.2 软件^[27](<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>)对其进行了预测, 发现 ABC-type probable sulfate transporter 上含有一个保守的糖基化位点, 这样, 它的糖基化(尤其在细胞膜上)是比较可能的。同样, TUA、Ribosomal protein L4 及 SpoVAA 的氨基酸顺序上也广泛存在糖基化位点。不过, 这些蛋白是否确有糖基化修饰, 还需要进一步的实验加以证实。

参 考 文 献

- [1] Ma Y, Xue Y, Grant WD, et al. *Alkalimonas amylolytica* gen. nov., sp. nov., and *Alkalimonas delamerensis* gen. nov., sp. nov., novel alkaliphilic bacteria from soda lakes in China and East Africa. *Extremophiles*, 2004, **8**: 193–200.
- [2] Krulwich TA. Alkaliphiles: 'basic' molecular problems of pH tolerance and bioenergetics. *Mol Microbiol*, 1995, **15**: 403–410.
- [3] Krulwich TA, Ito M, Gilmour R, et al. Energetic problems of extremely alkaliphilic aerobes. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1275**: 21–26.
- [4] Krulwich TA, Ito M, Gilmour R, et al. Energetics of alkaliphilic Bacillus species: physiology and molecules. *Adv Microb Physiol*, 1998, **40**: 401–438.
- [5] Gilmour R, Messner P, Guffanti AA, et al. Two-dimensional gel electrophoresis analyses of pH-dependent protein expression in facultatively alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 lead to characterization of an S-layer protein with a role in alkaliphily. *J Bacteriol*, 2000, **182**: 5969–5981.
- [6] Stancik LM, Stancik DM, Schmidt B, et al. pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2002, **184**: 4246–4258.
- [7] Yohannes E, Barnhart MD, Slonczewski JL. pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 2004, **186**: 197–199.

- [8] Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. Membrane proteins and proteomics : un amour impossible ? *Electrophoresis* , 2000 , **21** : 1054 – 1070.
- [9] Pasquali C, Fialka I, Huber LA. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis* , 1997 , **18** : 2573 – 2581.
- [10] Wang J, Xue Y, Feng X, *et al.* An analysis of the proteomic profile for *Thermoanaerobacter tengcongensis* under optimal culture conditions. *Proteomics* , 2004 , **4** : 136 – 150.
- [11] Vepachedu VR, Setlow P. Localization of SpoVAD to the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* , 2005 , **187** : 5677 – 5682.
- [12] Tomoyasu T, Yamanaka K, Murata K, *et al.* Topology and subcellular localization of FtsH protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* , 1993 , **175** : 1352 – 1357.
- [13] Santos D, Almeida DF. Isolation and characterization of a new temperature-sensitive cell division mutant of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* , **124** : 1502 – 1507.
- [14] Geisler U, Schumann W. Isolation of stress mutants of *Bacillus subtilis* by a novel genetic method. *FEMS Microbiol Lett* , 1993 , **108** : 251 – 254.
- [15] Aono R, Ito M, Machida T. Contribution of the cell wall component teichuronopeptide to pH homeostasis and alkaliphily in the alkaliphile *Bacillus lentus* C-125. *J Bacteriol* , 1999 , **181** : 6600 – 6606.
- [16] Herskovits AA, Shimoni E, Minsky A, *et al.* Accumulation of endoplasmic membranes and novel membrane-bound ribosome-signal recognition particle receptor complexes in *Escherichia coli*. *J Cell Biol* , 2002 , **159** : 403 – 410.
- [17] Behrmann M, Koch HG, Hengelage T, *et al.* Requirements for the translocation of elongation-arrested, ribosome-associated OmpA across the plasma membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* , 1998 , **273** : 13898 – 13904.
- [18] Jensch T, Fricke B. Localization of alanine aminopeptidase and leucyl aminopeptidase in cells of *Pseudomonas aeruginosa* by application of different methods for periplasm release. *J Basic Microbiol* , 1997 , **37** : 115 – 128.
- [19] Wan X, Branton SL, Hanson LA, *et al.* Identification and initial characterization of a putative *Mycoplasma gallinarum* leucine aminopeptidase gene. *Curr Microbiol* , 2004 , **48** : 32 – 38.
- [20] Pawar S, Schulz H. The structure of the multienzyme complex of fatty acid oxidation from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* , 1981 , **256** : 3894 – 3899.
- [21] Stan-Lotter H, Lang FJ Jr, Hochstein LI. Electrophoresis and isoelectric focusing of whole cell and membrane proteins from the extremely halophilic archaeobacteria. *Appl Theor Electrophor* , 1989 , **1** : 147 – 153.
- [22] Vyazmensky M, Barak Z, Chipman DM, *et al.* Characterization of acetohydroxy acid synthase activity in the archaeon *Haloferax volcanii*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* , 2000 , **125** : 205 – 210.
- [23] Upreti RK, Kumar M, Shankar V. Bacterial glycoproteins : functions, biosynthesis and applications. *Proteomics* , 2003 , **3** : 363 – 379.
- [24] Moens S, Vanderleyden J. Glycoproteins in prokaryotes. *Arch Microbiol* , 1997 , **168** : 169 – 175.
- [25] Plummer TH Jr, Tarentino AL, Hauer CR. Novel, specific O-glycosylation of secreted *Flavobacterium meningosepticum* proteins. *J Biol Chem* , 1995 , **270** : 13192 – 13196.
- [26] Peters J, Rudolf S, Oschkinat H, *et al.* Evidence for tyrosine-linked glycosaminoglycan in a bacterial surface protein. *Biol Chem Hoppe Seyler* , 1992 , **373** : 171 – 176.
- [27] Blom N, Sicheritz-Ponten T, Gupta R, *et al.* Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* , 2004 , **4** : 1633 – 1649.

Study on the membrane proteins of *Alkalimonas amylolytica* N10 expressed at different pH environment

WANG Quan-hui¹, WANG Jing-qiang², QIAN Zhong², LIU Si-qi², MA Yan-he^{1*}

(¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(² Beijing Genomics Institute, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China)

Abstract : The research on the membrane proteins expressed in alkaliphiles at different pH media will be benefit to understand the molecular mechanisms how they survive from such harsh alkaline environment. A preliminary investigation to the differential membrane proteomes from *Alkalimonas amylolytica* N10 (N10), a novel alkaliphilic bacterium, is reported herein. Upon the growth curves of N10 at different pH environment, three pH media, 8.4, 9.4 and 10.4, respectively, were employed to culture N10 followed by membrane preparation using ultracentrifuge and membrane proteins separation by 8% ~ 20% gradient SDS-PAGE. With carefully image analysis and statistical calculation, 7 stained bands were confirmed the alterations of relative optimal intensities corresponding with pH environment. Furthermore these bands were digested in-gel by trypsin and delivered to LC-MS/MS for protein identification. Twelve proteins were verified, of which four were reported involvement of the regulation of pH homeostasis in cytoplasm of alkaliphiles, and the others were originally found their protein expression responding to the environment with different pH values.

Keywords : Alkaliphilic bacteria ; *Alkalimonas amylolytica* N10 ; Membrane protein ; Proteome ; Gradient SDS-PAGE ; LC-MS/MS