46 卷 3 期
2006 年 6 月 4 日

微 生 物 学 报
Acta Microbiologica Sinica

46(3):390 ~ 396
4 June 2006

长双歧杆菌 NCC2705 菌株应激蛋白的研究

袁 静[1,2],朱 力[1],冯尔玲[1],王恒樑[1*],黄翠芬[1]

([1] 军事医学科学院生物工程研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

([2] 西北农林科技大学食品科学与工程学院 杨凌 712100)

摘 要:研究长双歧杆菌 NCC2705 菌株发酵至稳定期时应激蛋白的表达情况。根据乳酸乳球菌 IL1403 菌株蛋白质参考图谱及长双歧杆菌 NCC2705 基因组注释中应激蛋白的分子量与等电点,确定应激蛋白在双向电泳凝胶上的相应蛋白点,并利用 MALDI-TOF 和/或 ESI-MS/MS 对相应蛋白质点进行鉴定。每个蛋白质点的肽指纹图谱均在长双歧杆菌 NCC2705 的蛋白质数据库用 Mascot 进行检索,共鉴定到 44 个蛋白点对应 8 个应激蛋白。这些蛋白为亲水性酸性蛋白,大多具有翻译后修饰现象,它们基因的 CAI 值除 DnaJ 外,其余均在 0.5 以上,在全细胞表达谱中为高丰度蛋白。此外,菌体具有较强的抗脂质过氧化和清除 DPPH 自由基的能力,而对羟自由基和超氧负离子的清除力较弱,推测鉴定到的具有逆转氧化损害作用的碱性过氧化氢还原酶(*ahp*C)可能是体内表达的降低氧损伤的主要酶。

关键词:长双歧杆菌 NCC2705;应激蛋白;双向电泳;MALDI-TOF;ESI-MS/MS

中图分类号:Q936 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2006)03-0390-07

双歧杆菌是人和动物肠道内主要的生理性乳酸菌,作为微生态学研究的核心,对宿主具有生物屏障、营养、免疫、抗肿瘤、控制内毒素血症、延缓衰老、抗肿瘤等生理作用,同时也是肿瘤基因治疗的一个十分理想的靶向载体,目前已成为全世界医学、营养及保健行业研究的热点之一,广泛应用于食品工业,在临床上可治疗胃肠道菌群失调[1]。

双歧杆菌属于放线菌科双歧杆菌属,具有独特的果糖-6-磷酸盐磷酸酮酶,严格厌氧,G + C% 含量高,已发现有 33 个种和亚种,其中包括长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)在内的 10 个种与人类有关,主要寄居的微生态环境是胃肠道。它们通过产生乳酸和乙酸调节肠道的 pH,抑制外侵的病原菌的生长,维持肠道内菌群平衡[2]。近年来,双歧杆菌的许多生物学特点已引起了研究者的广泛关注,尤其是其分泌的具潜在生物学意义的蛋白质或生物活性物质。这些研究都需要深入了解双歧杆菌在复杂的微生态环境中的适应性。

双歧杆菌增强机体免疫功能的重要机制之一是刺激哺乳动物血液中的嗜中性粒细胞,从而激活细胞质膜的氧化还原酶系,催化产生活性氧,达到杀灭外来异物或肿瘤的作用;双歧杆菌对多种自由基有清除作用,可能是由于双歧杆菌阻碍了自由基链式反应或菌体表面蛋白质发挥了自由基淬灭作用,其机制还不清楚[3]。以前文献报道双歧杆菌适当耐氧,推测具有氧损伤修复酶,如 NADH-氧化酶、NADH-过氧化物酶及 SOD 等[3~5]。但 2002 年 Shell 等人对长双歧杆菌 NCC2705 的基因组进行了测序,2.26Mb 的基因组预测编码 1729 个 ORFs,其中没有编码 NADH 过氧化物和超氧化物歧化酶的基因,目前对于双歧杆菌在体内清除自由基的作用机制的研究尚不清楚[6]。此外,胃内的酸性和肠道里的胆汁酸盐以及胃肠道内的酶的作用,是影响口服双歧杆菌制剂到达结肠部位定植的主要因素。因此,双歧杆菌如果要在肠道环境中定居,需要表达多种应激蛋白抵抗氧毒害作用、酸、碱及胆汁等不利影响,对这些蛋白的研究具有很重要的应用价值。

双歧杆菌为乳酸菌(指可发酵碳水化合物主要产生乳酸的一类细菌的统称)的一种,目前对其双向电泳图谱研究尚未见报道。2003 年,Alain 等[7] 建立了乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)IL1403 的蛋白质参考图谱,鉴定到 13 个应激蛋白。因此,根据乳酸乳球菌 IL1403 菌株蛋白质参考图谱及长双歧杆菌 NCC2705 基因组注释中应激蛋白的分子量与等电点,采用双向电泳(Two-dimensional electrophoresis,2DE)与基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight,MALDI-TOF)联用研究了长双歧杆菌 NCC2705 发酵至

基金项目:国家"973 项目"(G1999054103);国家自然科学基金(30470101)

* 通讯作者。Tel:86-10-66948836;E-mail:wanghl@nic.bmi.ac.cn

作者简介:袁 静(1971 –),女,陕西礼泉人,副教授,博士,主要从事微生物功能基因组学研究。E-mail:yuanjing6216@sohu.com

其他作者:苏国富[1]

收稿日期:2005-07-13;接受日期:2005-08-17;修回日期:2005-10-08

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

稳定期时的应激蛋白,为进一步研究双歧杆菌的生理特性及其在人肠道中定居适应性机制奠定基础。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　主要试剂和仪器:IPG 干胶条、蛋白定量试剂盒(PlusOne 2-D Quant Kit)、蛋白纯化试剂盒(Plus One 2-D Clean-up Kit)购自 Amersham Pharmacia 公司。蛋白酶抑制剂购自 Roche。IPGphor 等电聚焦仪(Amersham Pharmacia);ProTEAN Ⅱ Xi 垂直电泳槽。扫描仪为 ImageScanner (amersham pharmacia biotech),双向电泳凝胶图像分析软件为 ImageMaster 2D Platinum version 5.0。质谱仪为 FEFLEX™ Ⅲ MALDI-TOF-MS(德国,Bruker)。电子顺磁共正振波谱仪 ER200D-SRC 购自德国 Bruker 公司。正交加速电喷雾串联质谱仪 Q-TOF 2(英国,Micromass 公司)。

1.1.2　菌株、培养基和生长条件:长双歧杆菌 NCC2705 由瑞士 Nestle Research Center Lausanne 惠赠。菌株于 400mL 含 0.05% L-半胱氨酸的 De Man-Rogosa-Sharpe (MRS)培养基中 37℃厌氧培养。厌氧条件于充 Anaerocult N 的厌氧罐中进行。培养至稳定期,OD_{600} 为 0.9,菌数为 1.5×10^8 CFU 时,按照 Amersham Pharmacia 生物公司《应用固相 pH 梯度的双向电泳原理和方法》的方法进行,采用 8000×g 在 4℃下离心 10min 收集菌体,用预冷的 40mL 低盐清洗液(3mmol/L KCl,1.5mmol/L KH_2PO_4,68mmol/L NaCl,9mmol/L NaH_2PO_4)洗菌体 4 次。

1.2　蛋白的样品制备

长双歧杆菌 NCC2705 细胞沉淀(约 0.30g)重悬于 5mL 裂解液(7mol/L 尿素,2mol/L 硫脲,4 %(W/V)CHAPS,50mmol/L DTT),加入蛋白酶抑制剂,采用 Sonifier 750 冰浴超声 10 min,条件为:2s/2s,35%振幅。然后加入 2.5mg RNase A 和 100 单位的 RQ1 DNase,于 15℃放置 1h 使蛋白质充分溶解,20000×g 离心 20min 去除不溶性沉淀[8]。取上清用 2-D Quant Kit 测定蛋白质浓度。按每管 1mg 分装,-70℃保存备用。

1.3　双向电泳

等电聚焦使用不同梯度 IPG 胶条,IPGphor 第一向等电聚焦电泳主要依据 Görg[9] 描述的方法进行,二向 SDS-PAGE (12.5%)采用垂直板电泳槽于 30mA/胶条电泳 4h。考马斯亮蓝 G-250 染色后,采用 ImageScanner 扫描仪扫描,并经 ImageMaster 2D Platinum version 5.0 软件进行分析。

1.4　胶内酶切和肽质量指纹图谱(PMF)分析

切取准备鉴定的蛋白点,按照 Liao 等[10] 描述的方法进行胶内蛋白酶切。将肽段提取液溶于 2μL 0.5%三氟乙酸中。MALDI-TOF MS 测定是将 a-氰基-4-羟基肉桂酸(a-CCA)溶于含 0.1% 三氟乙酸的 50%乙腈溶液中,制成饱和溶液,离心,取 1μL 上清与 1μL 肽段提取液等体积混合,取 1μL 点在 Scorce384 靶上,送入离子源中,在加速电压 20KV,反射电压为 23KV 的条件下进行检测。

1.5　ESI-MS/MS 鉴定蛋白质

ESI-MS/MS 为正交加速电喷雾串联质谱仪 Q-TOF 2,配备毛细管液相色谱和纳升喷雾源。所有测定均在正离子方式下进行。质谱仪的校正是用 Glu-fib 的串联质谱碎片校正的,质量准确度小于 0.1Da。雾化气为氮气,碰撞气体为氩气。源温 80℃,锥孔电压 50V 左右。TOF 加速电压为 9.1kV。MCP 检测器电压为 2200V。样品经 ZipTip C_{18}™ pipette tips 脱盐,最终体积 5μL。取 4μL 进行 nano-ESI-MS/ MS 分析时,毛细管电压为 900V,调节碰撞能量和碰撞气体的大小使得到一个好的串联质谱图。该质谱图经 Micromass 的专用软件 MaxEnt3 处理后,借助 MasSeq 直接推导出肽段序列,再用推断的序列与肽段质量相结合,即肽序列标签查询数据库。镀金属钯的硼硅酸盐电喷雾针(palladium-coated borosilicate electro-spray needle)为一次性的专用进样针。

1.6　蛋白质鉴定

登陆互联网(http://www.matrixscience.com),用 Mascot 程序在相应数据库中对 MALDI-TOF 质谱检测得到的肽质量指纹图谱进行检索。本研究主要采用我们建立的本地运行 Mascot 选择长双歧杆菌 NCC2705 基因组数据对每个肽质量指纹图谱进行检索。检索时,可接受的肽段分子量误差为 100mg/mL(有时设为 300mg/mL)。氨基酸固定修饰方式选择 Carbamidomethyl(C)修饰、可能的修饰方式选 Oxidation(M)修饰 通常鉴定标准为分子量在 20kDa,匹配率为 20%以上。

1.7　密码子偏好性和疏水性分析

长双歧杆菌 NCC2705 的 ORFs 的密码子适应指数(The codon adaptation index,CAI)和 GRAVY 值(The grand average of hydropathicity)的计算应用 codonW[11,Δ] 软件进行分析。

Δ:Peden J. Analysis of codon usage. Department of genetics, University of Nottingham, UK. 1999, PhD Thesis.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

1.8 长双歧杆菌 NCC2705 菌体蛋白质抗氧化和抗自由基活性的测定

长双歧杆菌 NCC2705 菌体蛋白质对亚油酸不饱和脂肪酸过氧化体系中抗氧化活性的测定根据文献[3]的方法进行;对 1,1-二苯基苦基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基的清除试验按文献[12]方法进行;采用电子自旋共振(ESR)法测定其清除羟自由基和超氧负离子活性。

2 结果

2.1 长双歧杆菌 NCC2705 的双向电泳和应激蛋白质鉴定

长双歧杆菌 NCC2705 的全基因组序列分析预测具有 1729 个 ORFs,根据基因组注释,对所有 ORFs 的等电点和分子量采用 ExPASY Protparam 软件进行计算(http://us.expasy.org/tools/pi-tool.html)。结果显示 pI 在 3~7 的酸性蛋白占理论蛋白质组的 71.7%,p*I* 大于 9 的蛋白占 19%,而 p*I* 在 7~9 之间的蛋白占 9.3%(结果略)。这种蛋白质在酸性和碱性两端区域分布的情况与别的乳酸菌是很相似的。在基因组注释中应激蛋白主要为细胞质酸性蛋白,因而选择在 pH4~7 的范围内研究应激蛋白。

样品的蛋白浓度为 9.02μg/μL。为了提高蛋白在 pH4~7 区的分辨力,进一步采用 pH4~7, pH4.0~5.0 和 pH4.5~5.5 的窄胶条进行 2DE,根据乳酸乳球菌 IL1403 菌株蛋白质参考图谱及长双歧杆菌 NCC2705 基因组注释中应激蛋白的分子量与等电点,在胶上相应区域取点进行胶内酶切后,通过 MALDI-TOF MS 和 ESI-MS/MS 鉴定蛋白,共鉴定了 44 个蛋白点,代表 8 种不同应激蛋白,鉴定的蛋白点标记在 pH 4~7、pH4.0~5.0 和 pH4.5~5.5 的电泳图谱上(图 1)。

2.2 应激蛋白的质谱查询结果

在国家生物医学分析中心本地运行 Mascot 检索时选择长双歧杆菌 NCC2705 基因组数据(NC-004307),鉴定到 8 种应激蛋白,包括 6 个与热休克蛋白相关的分子伴侣——DnaK (BL0520)、GroEL (BL0002)、Tig (BL0947)、DnaJ (BL0719)、GroES (BL1558)和 ATP 依赖的 Clp 蛋白酶水解亚单位 2 蛋白(ATP-Clp protease proteolytic subunit 2, BL0944),1 个可以抗氧损害的酶——碱性过氧化氢还原酶(Alkyl hydroperoxide reductase, AhpC, BL0615)和 1 个可以使胆盐失活的酶——胆酰甘氨酸水解酶(Choloylglycine hydrolase, BL0796)。这些蛋白的检索结果及相关信息见表 1。

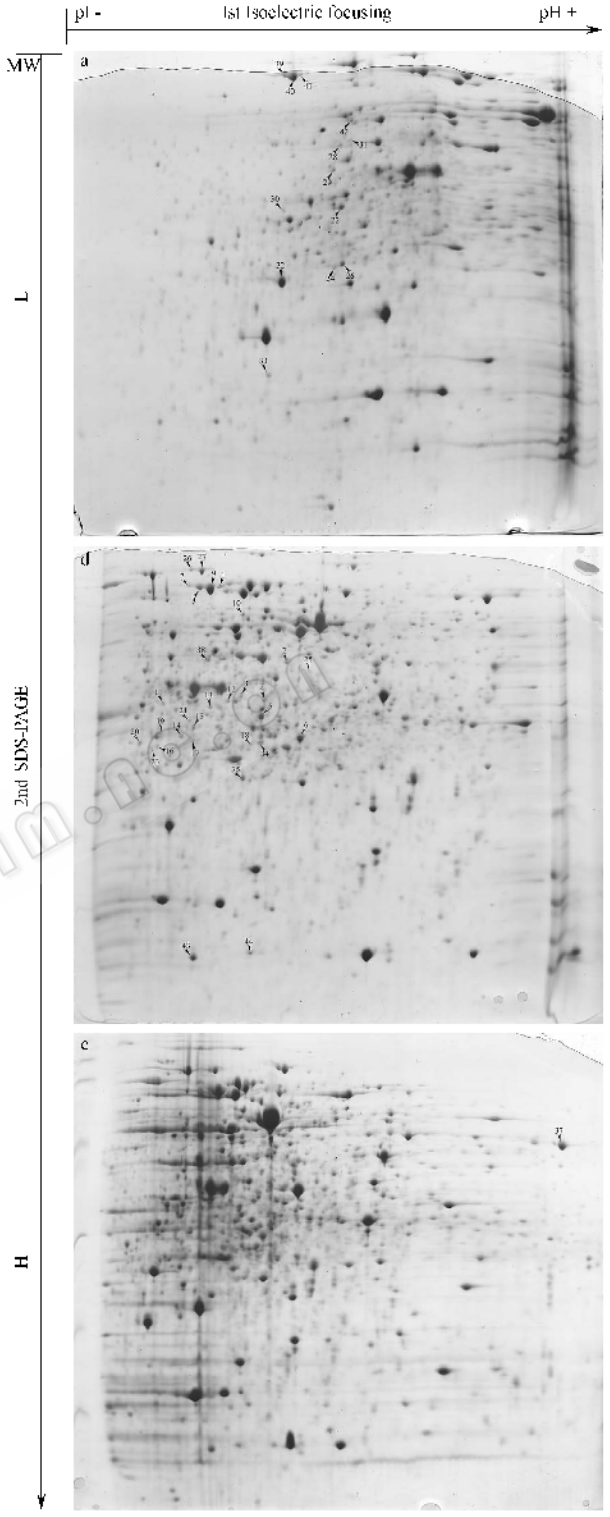

图 1 长双歧杆菌 NCC2705 发酵至稳定期时的应激蛋白的双向电泳图谱(pH4.0~5.0、pH 4.5~5.5 和 pH 4~7)

Fig.1 The 2-D E maps (pH 4~7, pH4.0~5.0 and pH 4.5~5.5) of the stress proteins expressed by *B. longum* NCC2705 in stationary phase. 1~24: groEL; 25~31: DnaK; 32~33: AhpC; 34~35: ClpP2; 36: Clp1; 37: DnaJ; 38~42: Tig; 43~44: GroES.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 1　应激蛋白质的质谱检索及相关信息

Table 1　Database searching results and related information of *B. longum* NCC2705 stress proteins on the 2-D gels

Locus	NCBI GI identifier	Spot	COG	Protein Description	Theor. mnss	Theo *pI*	Cover %	Location*	Gene	Exp. MW kd	Exp. *pI*	Abundance
BL0002	gi:23464636	1	0	chaperone	56803	4.72	39	C	groEL	70,738	4.76	32,698
BL0002	gi:23464630	2	0	chaperone	56860	4.72	44	C	groEL	41,074	4.91	32,600
BL0002	gi:23464630	3	0	chaperone	56860	4.72	25	C	groEL	33.633	4.81	28.793
BL0002	gi:23464630	4	0	chaperone	56860	4.72	25	C	groEL	32.849	4.86	29,076
BL002	gi:23464630	5	0	chaperone	56860	4.72	18	C	groEL	29.883	4.84	2,971
BL0002	gi:23464630	6	0	chaperone	56860	4.72	21	C	groEL	27.125	4.94	123,974
BL0002	gi:23464630	7	0	chaperone	56803	4.72	51	C	groEL	71.344	4.69	21,555
BL0002	gi:23464630	8	0	chaperone	56803	4.72	35	C	groEL	70.14	4.72	68,548
BL0002	gi:23464630	9	0	chaperone	56803	4.72	22	C	groEL	68.845	4.74	190,268
BL0002	gi:23464630	10	0	chaperone	56803	4,72	22	C	groEL	57.094	4.81	26,967
BL0002	gi:23464630	11	0	chaperone	56803	4.72	29	C	groEL	30.621	4.63	17,191
BL0002	gi:23464630	12	0	chaperone	56803	4.72	31	C	groEL	32.696	4.78	29,486
BL0002	gi:23464630	13	0	chaperone	56803	4.72	14	C	groEL	31.697	4.74	28,952
BL0002	gi:23464630	14	0	chaperone	56860	4.72	31	C	groEL	27.467	4.68	35,471
BL0002	gi:23464630	15	0	chaperone	56860	4.72	21	C	groEL	28.556	4.7	41,863
BL0002	gi:23464630	16	0	chaperone	56860	4.72	18	C	groEL	26.2	4.62	21,585
BL0002	gi:23464630	17	0	chaperone	56860	4.72	18	C	groEL	26.97	4.7	3,582
BL0002	gi:23464630	18	0	chaperone	56861	4.72	26	C	groEL	26.492	4.83	17,763
BL0002	gi:23464630	19	0	chaperone	56860	4.72	26	C	groEL	26.483	4.61	17,007
BL0002	gi:23464630	20	0	chaperone	56860	4.72	14	C	groEL	25.294	4.54	27,538
BL0002	gi:23464630	21	0	chaperone	56860	4.72	25	C	groEL	28.661	4.63	11,846
BL0002	gi:23464630	22	0	chaperone	56860	4.72	31	C	groEL	28.271	4.55	111,399
BL0002	gi:23464630	23	0	chaperone	56860	4.72	32	C	groEL	24.847	4.59	21,541
BL0002	gi:23464630	24	0	chaperone	56860	4.72	13	C	groEL	22.605	4.53	43,672
BL0520	gi:23465109	25	0	DnaK protein	67073	4.72	20	C	dnaK	38.818	4.96	9,506
BL0520	gi:23465109	26	0	DnaK protein	66902	4.72	30	C	dnaK	80.971	4.7	27,987
BL0520	gi:23465109	27	0	DnaK protein	66902	4.72	36	C	dnaK	79.98	4.72	73,694
BL0520	gi:23465109	28	0	DnaK protein	66902	4.72	12	C	dnaK	42.876	4.58	22,697
BL0520	gi:23465109	29	0	DnaK protein	67073	4.72	15	C	dnaK	34.321	4,54	45,581
BL0520	gi:23465109	30	0	DnaK protein	67073	4.72	8	C	dnaK	27.781	4.44	26,891
BL0520	gi:23465109	31	O	DnaK protein	67073	4.72	15	C	dnaK	40.1133	4.57	9,519
BL0615	gi:23465199	32	0	alkyl hydroperoxide reductase C22 protein	21426	4.44	70	C	ahpC	21.598	4.43	290,042
BL0615	gi:23465199	33	0	alkyl hydroperoxide reductase C22 protein	21426	4.44	20	C	ahpC	18.153	4.4	15,994
BL0944	gi:23465517	34	0	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2	25869	5.11	32	C	clpP2	26.641	4.85	42,822
BL0944	gi:23465517	35	0	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2	25870	5.11	21	C	clpP2	23.195	4.81	49,501
BL0945	gi:23465518	36	0	ATP-dependent Clp protease proteolytie subcnit 1	22823	4.61	28	C	clpl	23.7	4.57	33,549
BL0719	gi:23465298	37	0	chaperone protein	41138	6.07	51	C	dnaJ	54.924	6.79	13,530
BL0947	gi:23465520	38	0	trigger factor chaperone	49611	4.43	21	C	tig	41.7	4.74	33,682
BL0947	gi:23465520	39	0	trigger factor chaperone	49611	4.43	31	C	tig	68.774	4.44	76,881
BL0947	gi:23465520	40	0	trigger factor chaperone	49611	4.43	31	C	tig	67.2	4.46	138,987
BL0947	gi:23465520	41	0	trigger factor chaperone	49611	4.43	21	C	tig	69.042	4.47	31,344
BL0947	gi:23465520	42	0	trigger factor chaperone	49611	4.43	19	C	tig	46.903	4.58	39,959
BL1558	gi:23466110	43	0	groes	10594	5.1	35	C	groES	16.444	4.7	93,596
BL1558	gi:23466110	44	0	groes	10594	5.1	54	C	groES	36.515	4.83	41,420

* Abbreviation of cellular locations. Protein cellular location was annotated by psort v.2.0(http://www.psort.org). C: cytoplasmic.

2.3　应激蛋白的翻译后加工

采用 ImageMaster 2D Platinum version 5.0 软件分析胶上 *pI* 和 MW,结果与它们理论值匹配得较好,但一些蛋白质可能由于翻译后修饰等原因在理论值

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

与胶分析值间存在一些差异,这种现象在别的文献中也有报道。此外,可能由于酸性区域或碱性区域的断裂,或磷酸化作用,一些蛋白出现在小于理论 *pI* 的酸性区(蛋白点 591,539 和 456 等)或大于理论 *pI* 的碱性区(蛋白点 453,790 和 521 等)。

蛋白质组分析能全面了解翻译后修饰,造成的等电点或分子量改变。已知翻译后修饰在真核生物中起重要作用,但其在细菌生理中的作用了解甚少。对于长双歧杆菌 NCC2705 的应激蛋白分析发现,翻译后修饰作用很普遍,分子伴侣(Chaperone,BL0002)在胶上出现 24 个点,DnaK 蛋白(BL0520)出现在 7 个点,触发因子(Trigger factor chaperone,BL0947)出现 5 个点,ATP-依赖的 Clp 蛋白酶水解亚单位 2 蛋白(BL0944)出现 3 个点,碱性过氧化氢还原酶 C22 蛋白(Alkyl hydroperoxide reductase C22, BL0615)和分子伴侣 GroES 蛋白(GroES, BL1558)出现在两个点。我们推测这种现象可能除一些试验方法的因素外,大部分为生物修饰,如蛋白的断裂、降解、磷酸化、糖基化、甲基化、乙酰基化等,这种修饰的多样性可能反映了这些蛋白在细菌生长中功能的必要性。

2.4 应激蛋白的 CAI、高丰度蛋白和 GRAVY 值

编码同一氨基酸的不同同义密码子通常具有不同的使用频率,密码子的这种使用偏好性是与 tRNAs 和基因表达水平相关,高表达的基因主要倾向使用高丰度的同功 tRNA。CAI 值可用于评价这种偏好性,CAI 值为 1.0 表示使用密码子的最大偏好性,CAI 值(范围为 0 ~ 1)越低则表示该基因完全随机使用密码子,即采用不适密码子的概率越大。因此,CAI 值可推测蛋白表达丰度。通过 CodonW 软件计算编码鉴定的应激蛋白的基因 CAI 值,结果见表 2。除 DnaJ 外,其余应激蛋白的 CAI 值均在 0.5 以上。经 ImageMaster 2D Platinum version 5.0 软件对获得的双向电泳图谱进行丰度分析,应激蛋白 GroEL、Tig、AhpC、DnaK 和 GroES 分别为 50 个最高丰度蛋白的第 2、14、25、26 和 46,通用应激蛋白 GroEL 是整个胶中第二个高丰度的蛋白,这与大肠杆菌(*Escherichia. coli*)[5]、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)[7] 和枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)[13] 的报道相同。

蛋白的疏水性研究有助于预测蛋白在裂解液中的溶解性,GRAVY 值的范围在 -2 ~ 2 之间,正值表明此蛋白为疏水蛋白,负值表明为亲水蛋白。采用 CodonW 软件计算所有鉴定蛋白的 GRAVY 值(表 2)都小于 0,为亲水性蛋白,根据 Psort v.2.0 (http://www.psort.org)的注释,它们均定位于细胞质内。

表 2 长双歧杆菌 NCC2705 鉴定的应激蛋白基因的 CAI 和 GRAVY 值

Table 2 The CAI and GRAVY value of 8 genes encoding stress proteins identified on 2-D gel pH4 ~ 7

Locus	NCBI GI identifier	Spot No.	COG	Gene	CAI	GRAVY
BL0002	gi:23464630	1 ~ 24	O	groEL	0.732	-0.09187
BL0520	gi:23465109	25 ~ 31	O	dnaK	0.69	-0.40831
BL0615	gi:23465199	32, 33	O	ahpC	0.744	-0.28289
BL0944	gi:23465517	34, 35	O	clpP2	0.62	-0.26824
BL0945	gi:23465518	36	O	clpl	0.64	-0.18599
BL0719	gi:23465298	37	O	dnaJ	0.474	-0.4315
BL0947	gi:23465520	38 ~ 42	O	tig	0.714	-0.46623
BL1558	gi:23466110	43, 44	O	groES	0.653	-0.39897

2.5 长双歧杆菌 NCC2705 菌体蛋白质抗氧化和抗自由基活性

双歧杆菌 NCC2705 可以耐受一定浓度的氧,在生理条件下,可产生一些抗氧压力反应的蛋白,以清除体内产生的少量自由基。由于双歧杆菌 NCC2705 的基因组中没有编码 NADH 过氧化物和超氧化物歧化酶的基因,而且我们也未鉴定到 NADH 氧化酶、NADH 过氧化物酶和超氧化物歧化酶,因此,我们研究了长双歧杆菌 NCC2705 菌体蛋白质抗氧化和抗自由基活性。对亚油酸不饱和脂肪酸过氧化体系中抗氧化活性试验及清除 DPPH 自由基活性试验结果表明长双歧杆菌 NCC2705 菌体蛋白质具有较强的抗脂质过氧化和清除 DPPH 自由基的能力,清除率分别为 74.825 ± 0.963% 和 45.433 ± 1.669%;采用 ESR 法对其清除氧自由基试验结果表明长双歧杆菌 NCC2705 菌体蛋白质对羟自由基和超氧负离子的清除力较弱,清除率分别为 21.8% 和 7.55%。

在本研究中,我们发现了一个可以抗氧对蛋白和磷脂损害的酶——碱性过氧化氢还原酶 AhpC (BL0615),为全细胞蛋白中的高丰度蛋白。因而,推测 AhpC 蛋白可能是双歧杆菌在 MRS 培养基生长过程中表达的降低氧对蛋白质及磷脂损伤的主要酶类物质,使用 ESI-MS/MS 对该蛋白进行肽序列标签分析确认蛋白,其中分子量为 784 的峰图结果见图 2。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

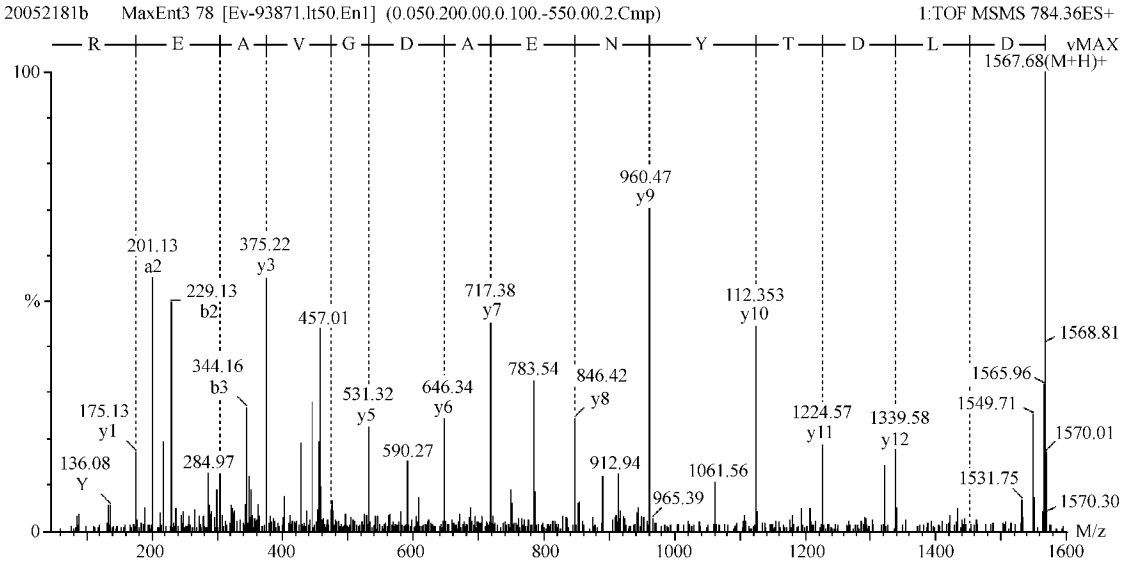

图 2　ESI-MS/MS 对 AhpC 蛋白肽段的氨基酸序列测定图谱

Fig.2　Mass spectra showing the determination of a partial peptide sequence of the AhpC protein.

3　讨论

生物体在进化过程中形成了防御自由基毒性作用的完整系统,机体的抗氧化防御体系中主要包括酶类及非酶类物质,酶类如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等,非酶类如 Vc、VE、辅酶 Q、半胱氨酸、Se 和 UA 等,在生理条件下,可及时有效地清除体内产生的少量自由基,保护着机体免受氧自由基的损伤,使正常机体的新陈代谢始终维持一种相对的平衡状态。以前文献报道,长双歧杆菌可以耐受一定浓度的氧,推测具有 SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等氧损伤修复酶[3~5],这些结果均是通过检测双歧杆菌在清除氧自由基中的酶活性等方法推测的,而未进行分子水平的验证。2002 年 Shell 等人进行了双歧杆菌 NCC2705 的基因组测序,对基因组分析的结果表明,其中没有编码 NADH 过氧化物和超氧化物歧化酶的基因。在本试验中,我们也未鉴定到降低氧毒作用的酶如 NADH 氧化酶、NADH 过氧化物酶和超氧化物歧化酶,这与基因组预测结果一致,目前对于双歧杆菌在体内清除自由基的作用机制尚不清楚[6]。

对长双歧杆菌 NCC2705 菌体抗氧化和抗自由基活性的研究表明其菌体蛋白质具有较强的抗脂质过氧化和清除 DPPH 自由基的能力,而对羟自由基和超氧负离子的清除力较弱。在双向电泳蛋白鉴定中,我们发现了一个可以抗氧对蛋白和磷脂损害的酶——碱性过氧化氢还原酶 AhpC(BL0615),其表达丰度为全细胞蛋白中第 25 位高丰度蛋白。因而,推测 AhpC 蛋白可能是双歧杆菌在 MRS 培养基生长过程中表达的降低氧对蛋白质及磷脂损伤的主要酶类物质。

在长双歧杆菌 NCC2705 中与热休克蛋白相关的 DnaK(BL0520)、GroEL(BL0002)、Tig(BL0947)、DnaJ(BL 0719)和 GroES(BL1558)也可以被盐、轻度酸处理或 UV 辐射诱导产生。双歧杆菌在发酵的过程中,产生大量的酸性代谢产物,使 pH 下降,当发酵至稳定期时,发酵速度明显下降,pH 达到 5 以下,DnaK(BL0520),GroEL(BL0002)和 GroES(BL1558)等应激蛋白被酸诱导而大量表达,检测到它们是高丰度表达的蛋白。

双歧杆菌是人肠道微生态菌的主要成分,它们具有一个重要的代谢活性,即可以缓解天然产生于人肠道中的胆盐,我们已鉴定到胆酰甘氨酸水解酶(Choloylglycine hydrolase, BL0796, EC 3.5.1.24),它可以催化水解甘氨酸(Glycine-)和/或牛磺酸(Taurine-)共扼结合胆盐到氨基酸残基并使胆盐失活(形成胆酸),该酶的功能对于菌体是未知的,但它可能对肠道抗胆盐毒害起重要的作用。Hiroshi Tanaka 等[14]研究了长双歧杆菌中胆酰甘氨酸水解酶的生化和基因学特性,认为胆酰甘氨酸水解酶天然的分子可能是四聚体,分子量为 125kDa 和 130kDa,氨基酸序列分析揭示胆酰甘氨酸水解酶属于 N-端亲核性水解酶,可以在较低的 pH 条件下诱导产生,我们的结果对其研究提供了新的证据。近年来,利用乳酸菌去胆盐能力来治疗高胆固醇病人以降低血液胆固醇水平,或防止健康人体内胆固醇

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

水平过高的研究已引起人们的重视。

虽然双歧杆菌的研究近一个世纪,由于很难对其进行基因操作和对各个菌株研究结果不一致,妨碍了对双歧杆菌生物合成能力的深入研究。本研究对长双歧杆菌 NCC2705 的蛋白质组学分析支持了 Shell 等对其生理特性和在人肠道中定居适应性的假说,更重要的是证明了双歧杆菌在适应体内环境时而特异性表达的蛋白。

参 考 文 献

[1] Tasaki K, Yoshida Y, Maeda T, *et al*. Protective immunity is induced in murine coloncarcinoma cells by the expression of interleukin-12 or interleukin-18, which activate type I helper T cells. *Cancer Gene Ther*, 2000, **7**(2): 247 – 254.

[2] Andrews EJ, wang JH, Winter DC, *et al*. Tumor cell adhesion to endothelial cells isincreased by endotoxin via an upregulation of beta-lintegrin expression. *J Surg Res*, 2001, **97**: 14 – 19

[3] Liu M, Yen C. Reactive oxygen species and lipid peroxidation product-scavenging ability of yogurt organisms. *J Dairy Sci*, 1999, **82**: 23 – 31.

[4] Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, *et al*. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of Bifidobacterium species. *J Dairy Sci*, 1992, **75**: 3296 – 3306.

[5] VanBogelen RA, Abshire KZ, Moldover B, *et al*. *Escherichia coli* proteome analysis using the gene-protein database. *Electrophoresis*, 1997, **18**: 1243 – 1251.

[6] Schell MA, Fox ME, Limen MH, *et al*. The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *PNAS*, 2002, **99**(22): 14422 – 14427.

[7] Guillot A, Gitton C, Anglade P, *et al*. Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics*, 2003, **3**: 337 – 354.

[8] Tom B, Tirra S. 2-D Electrophoresis: using immobilized pH gradients, *Principles & Methods*. Amersham Pharmacia Biotech, 1998.

[9] Görg A, Obermaier C, Boguth G, *et al*. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, **21**(6), 1037 – 1053.

[10] Liao X, Ying TY, Wang HL, *et al*. A two-dimensional proteome map of *Shigella flexneri*. *Electrophoresis*, 2003, **24**: 2664 – 2882.

[11] Drews O, Reil G, Parlar H, *et al*. Setting up standards and a reference map for the alkaline proteome of the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis*. *Proteomics*, 2004, **4**: 1293 – 1304.

[12] Buettner G, Oberley L. Considerations in the spin trapping of supperoxide and hyroxyl radical in aqueous system using DMPO. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978, **83**(1): 69 – 74.

[13] Büttner K, Bernhardt J, Scharf C, *et al*. A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis*, 2001, **22**: 2908 – 2935.

[14] Hiroshi T, Honoo H, Jan K, *et al*. Bile salt hydrolase of bifidobacterium longum——biochemical and genetic characterization. *Applied and environmental microbiology*, 2000, **66**(6): 2502 – 2512.

Stress proteins of Bifidobacterium longum NCC2705

YUAN Jing[1,2], ZHU Li[1], FENG Er-ling[1], WANG Heng-liang[1*], HUANG Cui-fen[1]

([1] State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

([2] College of Food Science and Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: Stress proteins of Bifidobacterium longum strain NCC2705 were identified and characterized during stationary phase. According to the proteomic map of L. lactics IL1403 and theoretical Mr/pI of stress proteins in B. longum NCC2705 genome annotation, spots of stress proteins in gels were localized, and proteins were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) and/or ESI-MS/MS mass spectrometry. For protein identification by peptide mass fingerprinting, peptide masses were searched against database of B. longum NCC2705 by Mascot licensed in-house. 44 spots representing 8 protein entries have been identified, these proteins were hydrophilic proteins and predicted acid proteins. Spot and protein analysis revealed that post-translational modifications might be common in these proteins. Except for DnaJ, the stress proteins were encoded by genes with CAI value above 0.5, and represented a large proportion of the most abundant proteins. Moreover, the results of scavenging effects on free radicals in vitro showed that B. longum NCC2705 can inhibit fatty acid oxidation and scavenge DPPH, but they scavenge weakly active oxygen free radicals. We identified a key protein that can reverse oxidative damage to proteins and lipids: alkyl hydroperoxide reductase (ahpC, BL0615) synthesized under our experimental conditions.

Keywords: Bifidobacterium longum NCC2705; Stress proteins; 2-D E; MALDI-TOF; ESI-MS/MS

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G1999054103); Chinese National Natural Science Foundation (30470101)

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948836; E-mail: wanghl@nic.bmi.ac.cn

Other author: SU Guo-fu[1]

Received date: 13 July 2005/Accepted: 17 August 2005/Revised: 8 October 2005

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn