

达坂喜盐芽孢杆菌 D-8^T 在低渗冲击下的双向凝胶电泳分析

冯德芹, 解利石, 李小红, 杨苏声*

(中国农业大学生物学院 农业部农业微生物资源及其应用重点开放实验室 北京 100094)

摘 要: 为了解革兰氏阳性中度嗜盐菌适应低渗冲击的机制, 采用双向凝胶电泳技术, 研究达坂喜盐芽孢杆菌 (*Halobacillus dabanensis*) D-8^T 在低渗冲击下的差异蛋白表达谱。利用 Imagemaster™ 2D Platinum 软件分析到大约 650 个蛋白点, 大多数蛋白分子量分布在 17.5~66kDa, 等电点为 4.0~5.9, 偏酸性。在 20% 盐浓度中生长的 D-8 菌株受到 0% 盐浓度的低渗冲击 5min 及 50min 后 34 个蛋白点的表达发生改变, 包括 20 个表达上调的点和 14 个点表达下调。用 MALDI-TOF/MS 及 MASCOT 软件鉴定了 4 个与低渗胁迫有关的蛋白, 分别为热激蛋白 DanK、柱状决定蛋白、青霉素结合蛋白和 5-莽草酸烯醇式丙酮酸-3-磷酸合成酶。其中, 热激蛋白适应低渗胁迫时表达上调为首次报道。

关键词: 达坂喜盐芽孢杆菌, 低渗冲击, 双向凝胶电泳, 蛋白表达

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2006)05-0740-05

在自然生态条件下, 细菌通常经历由雨水、洪水引起的低渗冲击。在极端情况下, 水份快速涌进细胞的行为可能导致细胞破裂。因此, 细菌进化了一些有效的机制来适应低渗冲击^[1]。其中, 相容性溶质机制是维持细胞体积动态平衡的重要机制之一。当外界渗透压突然增加时, 细菌通过积累相容性溶质来抗衡周围的盐环境产生的影响^[2]。相反, 当外界渗透压突然下降时, 细菌经由渗透通道将大量的相容性溶质快速释放^[3]。释放相容性溶质只是生物适应低渗冲击的机制之一, 其它参与抵消低渗冲击的渗透调节机制, 需要进一步研究。

在生物体受到盐激时, 一系列相关基因的表达会发生改变并激活某些渗透途径的蛋白质^[2]。与高渗胁迫的适应机制相比, 国内外对于细菌怎样经受低渗胁迫了解却很少。据我们所知, 至今没有人采用双向凝胶电泳技术研究细菌应对低渗胁迫的调节机制, 以前关于低渗的研究都集中在胁迫条件下细菌通过渗透通道释放相容性溶质的生理性研究上, 细菌应对低渗胁迫的其它机制却研究很少。因此, 无法对细菌处理低渗胁迫的策略形成一个较为全面的认识。Economou 等^[4]用脉冲标记蛋白研究嗜盐德莱氏菌 (*Deleya halophila*) 时发现, 从 2.5mol/L 到 1mol/L 盐的低渗胁迫下蛋白谱发生显著变化。这使我们想了解哪些蛋白在细菌适应低渗胁迫时保护细胞。

中度嗜盐菌是一类对盐适应极其广泛的生物, 不仅能在 32.5% 的高盐浓度中生存, 而且可以在非常低的盐浓度 0.1% 中生长, 比极端嗜盐古菌的盐浓度适应范围更为广泛, 因嗜盐古菌的最低生长盐浓度为 8%^[5]。所以, 本研究采用双向凝胶电泳技术研究达坂喜盐芽孢杆菌 (*Halobacillus dabanensis*) D-8^T^[6] 在低渗冲击下 (从 20% 盐度到 0% 盐度的剧烈冲击) 的蛋白质差异表达情况, 以期从蛋白质水平上揭示中度嗜盐菌适应低盐浓度的分子机制, 为改善其它生物耐受低渗胁迫的能力提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基: 达坂喜盐芽孢杆菌 D-8^T 是一株分离自新疆达坂湖的革兰氏阳性中度嗜盐菌, 已经被本实验室鉴定为新种^[6]。该菌能在盐浓度为 0.5%~23% 的 SW 培养基上生长。0% 盐浓度的 SW 培养基含有 0.5% 酵母浸出物, pH 8.0。20% 盐浓度的 SW 培养基含有 0.5% 酵母浸出物和 20% 盐 (16.2% NaCl, 1.4% MgCl₂, 1.92% MgSO₄·7H₂O, 0.4% KCl) pH 8.0。

1.1.2 主要试剂和仪器: 丙烯酰胺、甲叉双丙稀酰胺和胰蛋白酶 (修饰的、测序级猪胰蛋白酶) 等电泳试剂购自 Promega 公司。双向凝胶电泳标准 (7 个有等电点和分子量的蛋白质) 购自 Bio-Rad 公司。载

基金项目: 国家 863 计划 (2003AA241150)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62732674; Fax: 86-10-62731332; E-mail: yangssh@cau.edu.cn

作者简介: 冯德芹 (1971-), 女, 北京人, 博士, 主要从事微生物双向电泳的研究。E-mail: fengdq@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2005-11-28; 接受日期: 2006-02-17; 修回日期: 2006-01-23

两性电解质 (pH4 ~ 6, 3.0 ~ 9.5) 电泳仪、ImageMaster™ 2D Platinum (version 5.0) 和 Imagemaster scanner (version 5.0) 购自安玛西亚生物科学有限公司 (Amersham Bioscience Co)。真空浓缩仪购自 Savanta 公司。MALDI-TOF-MS 在 Ettan MADI-TOF 质谱仪上进行 (Amersham Bioscience Co)。

1.2 低渗冲击

将 D-8^T 菌株的单菌落接种于 5mL 10% 盐浓度的 SW 液体培养基, 在 37 °C、200r/min 培养 18h, 然后按 1:100 的比例接种于 100mL 20% 盐浓度的 SW 培养基。在相同条件下培养 18h, 到达对数生长期 (OD_{600} 约为 1.0) 然后在 40000 × g、37 °C 离心 10min, 收集菌体。将菌体重新悬浮在灭菌的 100mL 0% 盐浓度的 SW 培养基中 (37 °C 预热), 分别在 37 °C 继续培养 5min、50min, 然后在 40000 × g、4 °C 离心 10min, 收集菌体。再将菌体用 50mmol/L Tris-HCl (pH7.4) 洗涤 3 次, 整个过程按无菌操作进行。

1.3 蛋白样品的制备

将培养物重新悬浮于 1mL 样品裂解液, 混匀, 冰浴 30min。样品裂解液含 9.5mol/L 脲素、1% TritonX-100、4% CHAPS、2mol/L 硫脲、0.5% 两性电解质 (pH4 ~ 6 : pH3.0 ~ 9.5 = 4:1) 和 5% DTT。在冰浴条件下用超声波破碎仪破碎细胞, 参数为 200W, 8min。15 °C、80000 × g 离心 15min, 其上清液即为所需的蛋白样品, -80 °C 保存。

1.4 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳

IEF 采用 O'Farrell^[7] 的方法, 以 TritonX-100 代替 NP-40, 制胶前添加 CHAPS。等电点范围为载体两性电解质 (pH4 ~ 6 : pH 3 ~ 9.5 = 4:1) 形成的梯度。聚焦时, 添加标准蛋白。SDS-PAGE 用 3% 的浓缩胶和 16% 的分离胶。每个样品收集 3 张平行干胶。

1.5 图像采集和分析

干胶采用 ImageMaster Scanner 进行图像采集, 然后用 ImageMaster™ 2D Platinum (version 5.0, Amersham) 软件进行差异分析。

1.6 蛋白点的切取和酶解

将蛋白点用灭菌的 200μL 枪头从电泳胶上切取, 置于 1.5mL 离心管。胶块脱色至透明。胶内酶切^[8]采用胰蛋白酶, 0.1% 三氟乙酸/50% 乙腈从胶内提取酶解后的多肽, 真空浓缩仪干燥。

1.7 MALDI-TOF 分析和数据库鉴定蛋白

干燥后的多肽溶解于 10μL 0.5% TFA, 去盐, 点靶, 自然晾干。用 Ettan MALDI-TOF 质谱仪检测酶解后的肽段, 肽质指纹谱利用 Mascot 搜索 NCBI 中的

细菌数据库进行鉴定。Mascot 的首页网址为 <http://www.matrixscience.com>。

2 结果

2.1 D-8^T 菌株在低渗冲击下的表达差异蛋白

以在 20% 盐浓度的培养基中生长的 D-8^T 菌株作为对照, 研究菌体细胞在受到低渗 (0% 盐浓度) 冲击 5min 和 50min 后蛋白表达模式的变化。从蛋白质表达谱可以看出, 该菌细胞内的蛋白经双向凝胶电泳分离出大约 650 个蛋白点, 大部分蛋白在酸性区 (图 1), 大多数蛋白点的分子量为 17.5 ~ 66kDa, 等电点为 4.0 ~ 5.9。

凝胶图像采用 ImageMaster™ 2D Platinum 软件分析比较。在低渗冲击 5 min 和 50 min 后, 有 34 个蛋白点的表达发生改变, 其中, 20 个蛋白点表达明显上调, 而 14 个蛋白点表达下调。

在 20 个表达上调的蛋白点中, 有 10 个点只是在冲击 5 min 时表达上调 (图 1-B, sb1 ~ 10), 包括 5 个诱导的点 (sb1 ~ 5)。此外, 10 个点在低渗冲击 5 min 和 50 min 时表达都上调 (图 1-C, c1 ~ 10), 包括一个诱导的蛋白点 (c10)。表达下调的 14 个点都在冲击 5min 后即发生变化 (图 1-A, d1 ~ 14)。

蛋白表达谱显示中度嗜盐菌中的大多数蛋白偏酸性, 属于首次发现。表达差异分析发现 5 个诱导的蛋白点在冲击 5min 后就出现的, 并且在冲击 50min 后消失。这与 Mojica 等^[9] 的结果一致, 他们利用一维电泳研究单细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 受到低渗冲击时发现, 一种 22kDa 的蛋白质在低盐冲击条件下很快诱导合成但随后快速降解。与一维电泳相比, 双向凝胶电泳更为敏感和准确。

2.2 低渗冲击后部分上调蛋白的鉴定

对在低渗冲击 5min 和 50min 后表达明显上调的部分蛋白进行质谱分析, 鉴定 4 个可能与低渗冲击相关的蛋白 (表 1)。初步分析如下:

蛋白点 c1: 通用胁迫蛋白 (DnaK)。研究表明, 通用胁迫蛋白可以抵消外界环境胁迫或适应胁迫, 并修复由胁迫引起的损伤^[10]。其中, DnaK 协助其它蛋白正确折叠, 或协助其它蛋白前体转化为有功能的蛋白, 而且对新合成的蛋白发挥正常的生理功能也起着非常重要的作用。

蛋白点 c4 柱状决定蛋白。该蛋白的功能是形成和维持杆状细胞的形态, 如 MreB 是一个在所有杆状细菌中都存在的柱状决定因子。研究发现, mreB

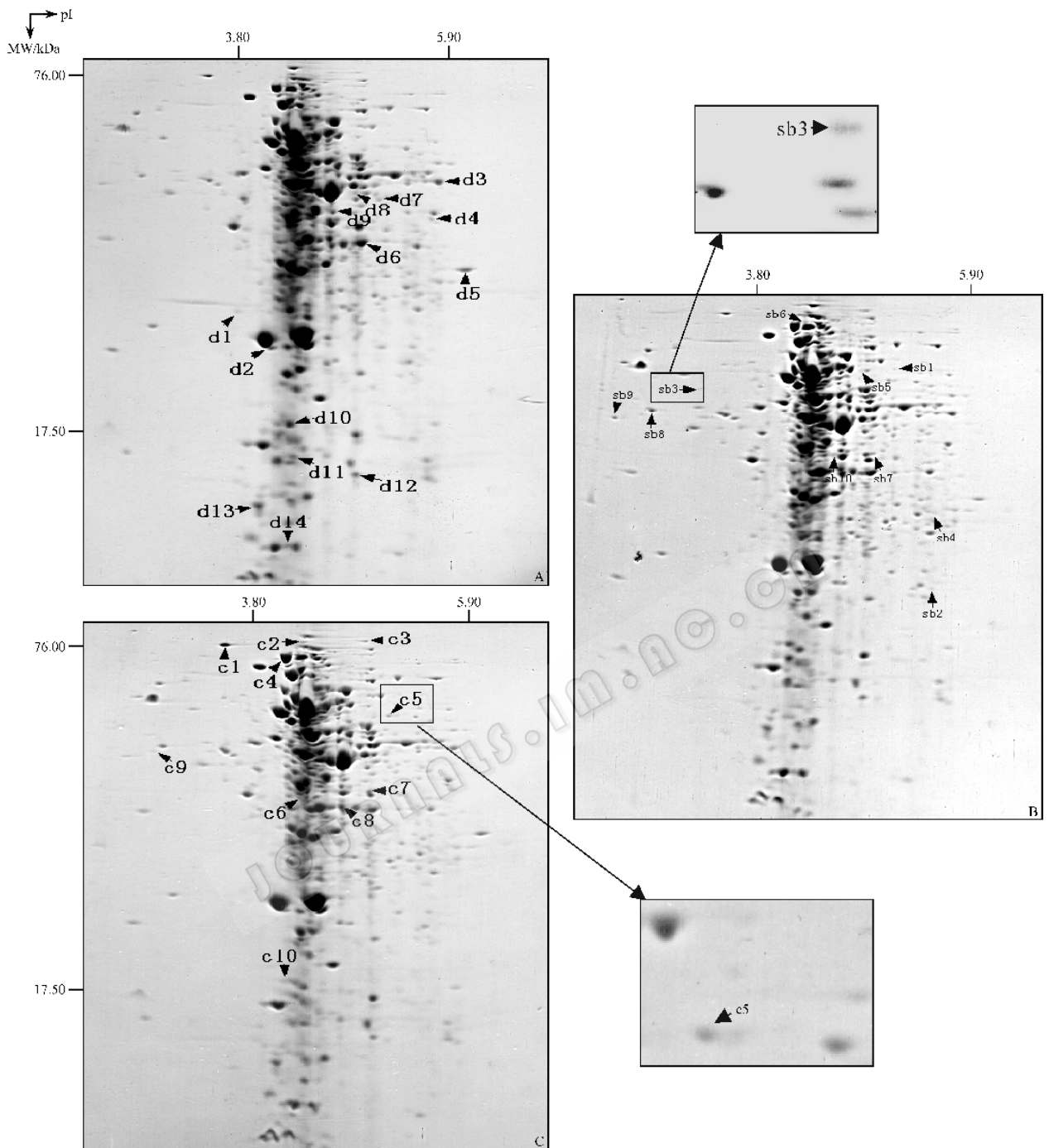


图 1 达坂喜盐芽孢杆菌 D-8T 在低渗冲击后的差异蛋白表达谱

Fig. 1 Differential expression profiles of protein of *H. dabanensis* D-8^T after hypoosmotic shock. A : 2-D PAGE map of the strain D-8^T under 20% salinity. d1 ~ 14 : protein spots down-regulated after shock ; B : 2-D PAGE map of protein after the strain D-8^T was subjected to 0% salinity from 20% for 5 min. sb1 ~ 10 : protein spots up-regulated after shock of 5min ; C : 2-D PAGE map of protein after the strain D-8^T was subjected to 0% salinity from 20% for 50 min. c1 ~ 10 : protein spots up-regulated after shock of both 5min and 50min.

的缺失导致细胞壁的完整性损失^[11]。

蛋白点 c5 5-莽草酸烯醇式丙酮酸-3-磷酸合成酶。该酶是芳香族氨基酸合成的莽草酸途径中的一个关键酶,如果芳香族氨基酸的合成受阻,很多重要的蛋白和次级代谢产物的合成将会受到影响,甚至

引起生物体死亡。

蛋白点 sb3 :青霉素结合蛋白 1A(PBP-1A)。PBP-1A 介导次级的肽聚糖合成机制,为肽聚糖合成的补充途径^[12]。PBPs 是一类催化细菌细胞壁生物合成步骤中肽聚糖前体的聚合和交联的酶^[13],因

此 PBP_s 对于维持正常的细胞形态非常重要。研究表明,缺乏多个 PBP_s 的大肠杆菌(*Escherichia coli*) 突变株会产生弯曲、分枝等奇形怪状的细胞^[14]。

表 1 D-8^T 菌株低渗冲击后表达上调的部分蛋白鉴定

Table 1 Identified proteins after D-8^T expose to hypoosmotic shock

Spot No.	Homologous protein	Putative MW(kDa) pI	Accession No.
c1	Chaperone protein DnaK	74.4/3.5	Q8RH05
c4	Rod shape-determining protein	67.0/4.5	NP-968612
c5	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	48.5/5.5	YP-079558
sb3	Penicillin-binding protein 1A	45.6/3.2	Q87AW7

3 讨论

目前关于低渗冲击的研究大多集中在细菌的生理性反应上即主要是对于渗感通道的研究^[3],却没有足够重视其它胁迫蛋白的作用。虽然很多的环境胁迫都能导致热激蛋白的表达上调,但是低渗冲击后分子伴侣的表达明显上调为首次发现。我们推测在 D-8^T 菌株受到低渗冲击时很多蛋白变性聚集,而且新合成的蛋白前体都需要更多的 DanK 来协助正确折叠,以提高细胞对不利环境的耐受性。

外界渗透压突然降低时,细菌通过释放相容性溶质来维持不断变化的细胞内膨压,其中渗感通道起着主导作用^[1]。在本研究中,没有鉴定到渗感通道蛋白,可能有以下原因(1)在低渗冲击时,由于水的被动吸收发生非常迅速,渗感通道必须在激烈的外界渗透压降低后毫秒的时间内被激活,保持细胞完整性使细菌在剧烈的低渗冲击中生存下来^[3]。但在这么短的时间段内,要通过双向凝胶电泳来研究细胞发生的变化是非常困难的。(2)当细胞遭遇低渗冲击时,渗感通道似乎是被激活而不是在基因表达水平上受到调节,这同样使得以寻找差异表达蛋白为目的的双向凝胶电泳难以检测该类蛋白。

除了释放相容性溶质,D-8^T 菌株显然还拥有其它机制来适应低渗冲击。过量表达的形态决定蛋白被用来维持细胞正常的形态。同时,与细胞壁肽聚糖合成相关的蛋白也得以上调。本研究中,青霉素结合蛋白-1A(PBP-1A)在该菌株受到低渗冲击 5 min 后诱导出现,但是持续冲击至 50 min 时却消失,这种现象与 PBP-1A 只是作为当 PBP-1B 缺乏时一种肽聚糖合成的补充途径的结论相吻合^[12]。因此,我们认为,D-8^T 菌株受到低渗冲击后细胞启动了一个次

级的肽聚糖合成机制,以补充主要的肽聚糖合成途径,来维持细胞壁的完整性避免细胞破裂。此外,研究证明,大肠杆菌的 *mreB* 突变株细胞的形态与缺乏 PBP2 的细胞相似,同时伴随着 PBP3 的过量表达^[15]。这表明形态决定蛋白可能和细胞壁合成蛋白互为补充、协同调节细胞的外形。这些与低渗冲击的转录过程旨在调整细胞表面特性的结论一致^[16]。

实际上,渗感通道的激活和与细胞壁相关基因的表达上调可能同时发生、互相协作,使细胞得以生存和适应低渗冲击。例如,一些全局调节子如 RpoS 控制着很多胁迫诱导调节元的基因表达^[2],不仅调节渗感通道的活性,还调控细胞壁蛋白的合成。Stokes 等^[3]认为,含有 RpoS 的 RNA 聚合酶全酶至少部分地负责调节渗感通道蛋白的产物产生。Dougherty 等^[17]证明,RpoS 参与细胞壁结构的调整,并且调节 PBP。我们的结果支持了这些关于细胞适应低渗冲击的研究结论。

综上所述,在低渗冲击后,D-8^T 菌株调整了很多分支途径中蛋白的表达量,以达到在剧烈的低渗冲击中生存的目的。本文从蛋白表达变化水平上研究细菌适应低渗冲击,拓宽了我们对于中度嗜盐菌适应低盐环境的生存机制的认识。

参 考 文 献

- [1] Morbach S, Kramer R. Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria. *Chembiochem*, 2002, 3(5): 384 - 397.
- [2] Bremer E, Kramer R. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: Storz G, Hengge-Aronis R. eds. *Bacterial Stress Responses*. Washington: American Society for Microbiology, 2000.
- [3] Stokes NR, Murray HD, Subramaniam C, et al. A role for mechanosensitive channels in survival of stationary phase: regulation of channel expression by RpoS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15959 - 15964.
- [4] Economou A, Roussis A, Milioni D, et al. Patterns of protein synthesis in the moderately halophilic bacterium *Deleya halophila* in response to sudden changes in external salinity. *FEMS Microbiol Ecol*, 1989, 62: 103 - 110.
- [5] Joo WA, Kim CW. Proteomics of halophilic archaea. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 815: 237 - 250.
- [6] Liu WY, Zeng J, Dou YT, et al. *Halobacillus dabanensis* sp. nov. and *Halobacillus aidingensis* sp. nov., isolated from salt lakes in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55: 1991 - 1996.
- [7] O'Farrell LPH. High-resolution two-dimensions electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975, 250: 4007 - 4021.

- [8] Shen SH , Matsubae M , Takao T , *et al.* (2002) A proteomic analysis of leaf sheaths from rice . *J Biochem* **132** : 613 – 620 .
- [9] Mojica FJM , Cisneros E , Ferrer C , *et al.* Osmotically induced response in representatives of halophilic prokaryotes : the bacterium *Halomonas elongata* and the archaeon *Haloferax volcanii* . *Am Sci Microbiol* , 1997 , **179** : 5471 – 5481 .
- [10] Bernhardt J , Volker U , Volker A , *et al.* Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis*- a two-dimensional protein electrophoresis study . *Microbiology* , 1997 , **143** : 999 – 1017 .
- [11] Figge RM , Divakaruni AV , Gober JW . MreB , the cell shape-determining bacterial actin homologue , co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus* . *Mol Microbiol* , 2004 , **51** (5) : 1321 – 1332 .
- [12] de la Rosa EJ , de Pedro MA , Vazquez D . Penicillin binding proteins : role in initiation of murein synthesis in *Escherichia coli* . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1985 , **82** (17) : 5632 – 5635 .
- [13] Navarre WW , Scheneewind O . Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope . *Microbiol Mol Biol Rev* , 1999 , **63** : 174 – 229 .
- [14] Nilsen T , Ghosh AS , Goldberg MB , *et al.* Branching sites and morphological abnormalities behave as ectopic poles in shape-defective *Escherichia coli* . *Mol Microbiol* , 2004 , **52** (4) , 1045 – 1054 .
- [15] Wachi M , Matsuhashi M . Negative control of cell division by *mreB* , a gene that functions in determining the rod shape of *Escherichia coli* cells . *J Bacteriol* , 1989 , **171** (6) : 3123 – 3127 .
- [16] Hohmann S . Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts . *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 2002 , **66** (2) : 300 – 372 .
- [17] Dougherty TJ , Pucci MJ . Penicillin-binding proteins are regulated by RpoS during transitions in growth states of *Escherichia coli* . *Antimicrob Agents Chemother* , 1994 , **38** : 205 – 210 .

Two-dimensional gel electrophoresis analysis of moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8^T under hypoosmotic shock condition

FENG De-qin , XIE Li-shi , LI Xiao-hong , YANG Su-sheng *

(Key Laboratory of Agro-Microbial Resources and Application of Agricultural Ministry ,
College of Biological Sciences , China Agricultural University , Beijing 100094 , China)

Abstract : *Halobacillus dabanensis* D-8^T was isolated from the saline deposits of Daban lake in Xinjiang of China , and is able to grow in complex medium containing 0.5% to 25% salt. To figure out the survival mechanisms of Gram-positive moderately halophilic bacteria under hypoosmotic shock conditions , two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was carried out to investigate differential protein expression profiles of *H. dabanensis* D-8^T in response to low osmotic challenge. The 2-D gels were stored as dry gels and their images were taken by ImageScanner and analyzed by ImagemasterTM 2D Platinum software. About 650 protein spots were detected in 2-D gel. Most of proteins were distributed in molecular mass of 17.5 ~ 66kDa and the range of isoelectric point 4.0 ~ 5.9. A total of 34 protein spots were found to alter their expression after strain D-8^T was subjected to hypoosmotic shock from 20% to 0% salinity for 5 min and 50 min. Among them , the expression of 20 protein spots is up-regulated including 6 new protein spots , while that of 14 protein spots is down-regulated in answer to sudden osmotic down-shift. Protein spots of interest were excised from the gels and digested by trypsin. By means of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) and MASCOT search engine , 4 up-regulated protein spots were identified with peptide mass fingerprint , and are similar to heat shock protein DanK , rod shape-determining protein , penicillin-binding protein (PBP-1A) and 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase , respectively. Noticeably , PBP-1A firstly was up-regulated after shock of 5 min but disappeared after shock of 50 min. This indicated that the strain activate a minor mechanism of peptidoglycan synthesis to compensate the major synthesis mechanism for cells survival through a down-shift challenge. In addition , this paper was the first report that heat shock proteins were up-regulated in response to sudden osmotic down-shift.

Keywords : *Halobacillus dabanensis* ; Hypoosmotic shock ; Two-dimensional gel electrophoresis ; Protein expression

Foundation item : National Program for High Technology Research and Development of China (2003AA241150)

* Corresponding author . Tel : 86-10-62732674 ; Fax : 86-10-62731332 ; E-mail : yangssh@cau.edu.cn

Received : 28 November 2005 / Accepted : 17 February 2006 / Revised : 23 January 2006