



类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)蛋白质组学研究中三种蛋白提取方法的比较分析

宋丽丽^{1*}, 张雪², 张更新¹, 魏鑫丽³, 王先平⁴

1 中国科学院青藏高原研究所 青藏高原地球系统与资源环境重点实验室, 北京 100101

2 兰州大学生态学院, 甘肃 兰州 730000

3 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

4 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101

宋丽丽, 张雪, 张更新, 魏鑫丽, 王先平. 类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)蛋白质组学研究中三种蛋白提取方法的比较分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(2): 623-632.

SONG Lili, ZHANG Xue, ZHANG Gengxin, WEI Xinli, WANG Xianping. Comparison of three protein extraction methods for the proteomics research on *Paenibacillus* sp.[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(2): 623-632.

摘要: 【目的】革兰氏阳性类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)本身细胞壁的结构特点导致其菌体全蛋白不易获得。本研究选取了3种破碎方法——溶菌酶联合超声破碎法(方法一)、溶菌酶联合SDS热处理破碎法(方法二)、液氮联合超声破碎法(方法三)进行革兰氏阳性菌的细胞破碎,以期获得适于样品菌株基于质谱技术进行蛋白质组学研究的制备方法。【方法】在蛋白样品的制备过程中,对3种不同破碎方法的蛋白提取率和SDS-PAGE检测分析结果进行比较;随后将3种蛋白样品制备方法的样品用质谱技术进行鉴定,分析不同蛋白样品基于质谱技术鉴定蛋白的差异。【结果】在蛋白样品的制备提取过程中,不同破碎方法的蛋白提取率大致相同。用单因素方差比较3种提取方法质谱鉴定蛋白数的差异性,方法三鉴定的蛋白数最多(2 638个),其次是方法一(2 452个),方法二鉴定的蛋白数最少(2 003个)。进一步用韦恩图分析比较不同提取方法的蛋白鉴定通量差异,综合考虑蛋白提取效率的结果以及液氮研磨法提取蛋白的缺点,最终选取溶菌酶联合超声破碎法(方法一)提取菌株全蛋白作为该菌基于质谱分析其蛋白质组学研究中最适合的方法。最后,对质谱鉴定菌株蛋白包括分子量、等电点、疏水性的基本性质进行分析,发现3种破碎方法质谱鉴定的蛋白与模式菌株多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)基因组中预测蛋白的各个组分

资助项目:第二次青藏高原综合科学考察研究专项(2019QZKK0503);国家自然科学基金(42030508, 41871066, 41471055)
This work was supported by the Second Tibetan Plateau Scientific Expedition and Research (STEP) Program (2019QZKK0503) and the National Natural Science Foundation of China (42030508, 41871066, 41471055).

*Corresponding author. Tel: +86-10-84097042, E-mail: sll@itpcas.ac.cn

Received: 2023-07-13; Accepted: 2023-09-26; Published online: 2023-10-16

布占比基本一致，都保证了菌株蛋白质组数据信息的完整性。【结论】基于质谱技术开展革兰氏阳性类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)的蛋白质组学研究，溶菌酶联合超声破碎法是提取该菌株全蛋白最适合的方法。

关键词：革兰氏阳性菌；蛋白裂解液；蛋白质组学；多肽

Comparison of three protein extraction methods for the proteomics research on *Paenibacillus* sp.

SONG Lili^{1*}, ZHANG Xue², ZHANG Gengxin¹, WEI Xinli³, WANG Xianping⁴

1 Key Laboratory of Tibetan Plateau Earth System, Environment and Resources (TPESER), Institute of Tibetan Plateau Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 College of Ecology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China

3 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] The cell wall structure characteristics make it a challenge to obtain the whole proteins of *Paenibacillus* sp. as a Gram-positive bacterium. We employed three representative lysis methods: lysozyme combined with ultrasonic treatment (method 1), lysozyme combined with SDS heat treatment (method 2), and liquid nitrogen combined with ultrasonic treatment (method 3), to obtain the samples for mass spectrometry-based proteomics research on *Paenibacillus* sp. **[Methods]** We compared the protein extraction efficiency of the three methods based on protein yield and SDS-PAGE. Furthermore, we analyzed the obtained protein samples by mass spectrometry. **[Results]** The protein extraction efficiency of the three methods was similar. The number of proteins identified in the sample prepared with method 3 was the highest (2 638 proteins), followed by that with method 1 (2 452 proteins), and that with method 2 was the lowest (2 003 proteins). The Venn diagram was established to compare the protein identification flux of the samples prepared with different methods. Considering the protein extraction efficiency and the shortcomings of method 3, we finally chose method 1 as the most suitable method to extract the proteins for mass spectrometry-based proteomic analysis. Finally, the basic properties of proteins identified by mass spectrometry, including molecular weight, isoelectric point, and hydrophobicity, were analyzed. The proportion of each component of the proteins obtained by the three methods was the same as that of the predicted proteins of the model strain *Paenibacillus polymyxa*. **[Conclusion]** For the proteomics research on Gram-positive *Paenibacillus* sp. by mass spectrometry, lysozyme combined with ultrasonic treatment is the most suitable method for sample preparation.

Keywords: Gram-positive bacteria; protein lysates; proteomics; polypeptide

蛋白质组学研究中,数据的质量很大程度上依赖于蛋白质样品的制备质量。由于生物体中蛋

白质的多样性和复杂性,提取方案需要根据研究对象蛋白质组的特点进行设计和优化。因此,研

究中需要找到一种合适的样品制备方法,尽可能多地从复杂样品中提取出较全的蛋白质,并且这些蛋白质具有一定的代表性,以保证样品蛋白质组信息的完整性^[1]。近年来,快速发展的液相色谱-高分辨串联质谱联用技术因其高通量、高灵敏度、高分辨率的特性逐渐成为复杂蛋白质样品鉴定分析的首选方法^[2-3],而蛋白质样品的制备依然是关键的一步。

为了分析细胞总蛋白,首先需要有效地破碎生物样品,使细胞内的蛋白质充分地释放,从而最大限度地增加可提取蛋白质的种类。当研究对象是细菌时,其菌体破碎的难易程度主要取决于细胞壁中肽聚糖的含量。与革兰氏阴性菌(细胞壁厚约 10 nm)相比^[4],革兰氏阳性菌的细胞壁较厚(20–80 nm)且肽聚糖含量较高^[5],这就增加了蛋白样品制备难度,不易完全获取菌体全蛋白样品。本研究所用的类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)是分离自西藏墨脱地区可产芽孢的革兰氏阳性菌株。类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)的细菌在自然界中分布较广,是一类生理特性多样的杆状细菌,在医疗、农业、食品和环境等领域具有广阔的应用潜力。本研究从已报道的革兰氏阳性菌蛋白质组样品制备方法中选取了3种破碎方法^[6-8],用于提取类芽孢杆菌属菌株的蛋白质。从3种方法的蛋白提取效率、质谱分析鉴定蛋白组以及各个提取方法优缺点等综合比较,以期筛选出该菌株适用于质谱分析的简单有效的蛋白质组提取方法,为该菌株蛋白质组学研究提供基础,同时也为其他革兰氏阳性菌的蛋白质组学研究中的样品制备方法提供参考。另外,作为从芽孢杆菌属(*Bacillus*)后期划分出来的类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*),对其研究相对较少。因此,进一步为后期类芽孢杆菌属全基因组和蛋白质组的信息挖掘与分析,开发新型的应用潜能奠定研究基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

改良型 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; FASP 试剂盒, Abcam 公司; 测序级胰蛋白酶, Promega 公司。脱盐柱、质谱级乙腈、质谱级甲酸, Thermo Fisher 公司; 超滤管, Millipore 公司; 超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 纳升液相色谱、质谱仪, Thermo Scientific 公司。

1.2 培养基和主要缓冲液配制

R2A 培养基参照文献^[9]配制。

溶菌酶缓冲液: 1 mg/mL 溶菌酶, 40 mmol/L Tris-HCl, 18% (质量体积分数)蔗糖, 0.02% 苯甲基磺酰氟, pH 8.0。

裂解缓冲液 1: 40 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素, 60 mmol/L 二硫苏糖醇, 0.02% 苯甲基磺酰氟, pH 8.0。

裂解缓冲液 2: 40 mmol/L Tris-HCl, 0.3% (质量体积分数)十二烷基硫酸钠, 60 mmol/L 二硫苏糖醇, 0.02% 苯甲基磺酰氟, pH 8.0。

1.3 培养条件及菌体收集

将 *Paenibacillus* sp. 菌株接种至 R2A 液体培养基中(pH 7.2), 25 °C、200 r/min 条件下培养至对数生长期末期。取对数期末期的菌液, 4 °C、6 000 r/min 离心 20 min 去上清, 收集菌体。用 Tris 缓冲液(pH 7.6)清洗菌体, 重复 2 次, 菌体冻存于-80 °C 冰箱中备用。

1.4 蛋白质组样品制备方法 及蛋白浓度测定

称取相同质量(约 1.5 g)的备用菌体, 参照文献^[6-8]分别用 3 种方法提取菌体蛋白(图 1), 每组样品制备方法进行 3 次生物学重复。

溶菌酶联合超声破碎法(方法一): 菌体中加入溶菌酶缓冲液, 37 °C 放置 60 min, 随后加入裂解液缓冲液 1, 冰水浴超声(超声 4 s 停 8 s)

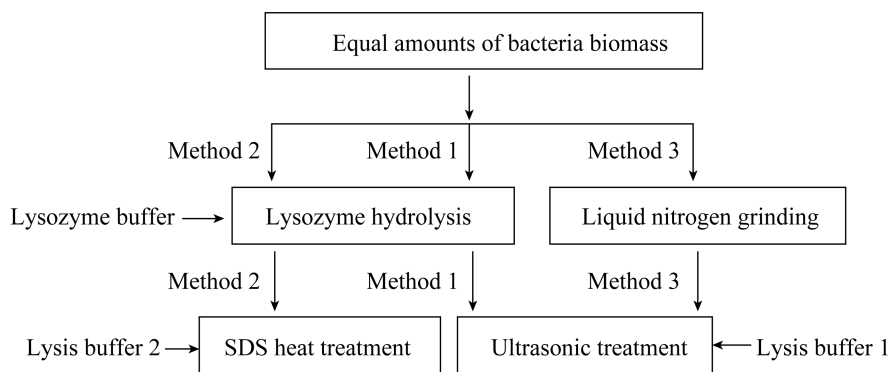


图 1 *Paenibacillus sp.*的 3 种蛋白提取方法流程图

Figure 1 Schematic workflow for protein extraction protocols of *Paenibacillus sp.*

10 min 使其充分裂解。

溶菌酶联合 SDS 热处理破碎法(方法二): 菌体中加入溶菌酶缓冲液, 37 °C 放置 60 min, 随后加入裂解缓冲液 2, 90 °C 水浴加热 30 min 进行充分裂解, 每间隔 5 min 涡旋混合样品。

液氮联合超声破碎法(方法三): 将菌体转移至液氮预冷的研钵中研磨成粉, 迅速转移至离心管, 加入适量蛋白裂解缓冲液 1, 涡旋仪上振荡混匀, 冰水浴超声(超声 4 s 停 8 s) 10 min 使其充分裂解。

处理后的样品 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 得到蛋白裂解液(约 10 mL)。蛋白浓度用改良型 Bradford 蛋白浓度试剂盒进行测定。

1.5 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

全细胞裂解液和不同蛋白提取方法得到的蛋白电泳样品采用 5% 浓缩胶和 10% 分离胶的 SDS-PAGE 进行分离分析。

全细胞裂解液电泳样品和不同提取方法蛋白裂解液上清和沉淀电泳样品的制备: 将菌体加入 10 mL 裂解缓冲液悬浮得到菌悬液, 取一定量上述菌悬液和每种提取方法得到的蛋白裂解液上清液及沉淀分别加入适量上样缓冲液, 100 °C 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min。全细胞

裂解液和上清上样量 20 μL (约 5 μg), 沉淀全部重溶到 40 μL 裂解缓冲液, 上样 20 μL。电泳的程序设置为 80 V/20 min, 120 V 至结束, 考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.6 蛋白质酶解消化

根据文献[10]所述, 蛋白质样品(0.4 mg)在超滤管内 37 °C 过夜酶解消化(filter-aided sample preparation, FASP), 其中胰蛋白酶与蛋白样品质量比是 1:100。得到的多肽样品用脱盐柱(含有反相 C18 介质, 用于肽段脱盐、浓缩和纯化)脱盐, 然后真空干燥去除残留的杂质。肽段的浓度根据 280 nm 波长处吸光值进行测定($OD_{280}=1$ 时, 浓度为 1 μg/μL)。

1.7 质谱与生物信息学分析

将上述处理得到的多肽样品(1 μg)用纳升液相色谱与串联质谱联用的方法进行分析鉴定。首先, 将多肽样品脱盐后溶于流动相 A (0.1% 甲酸, 100% 水) 上样, 以 600 nL/min 流速用流动相 A 和流动相 B (0.1% 甲酸, 80% 乙腈, 20% 水) 进行线性梯度洗脱: 0%–10% 流动相 B 洗脱 2 min, 10%–28% 流动相 B 洗脱 38 min, 28%–38% 流动相 B 洗脱 9 min, 38%–90% 流动相 B 洗脱 6 min, 90% 流动相 B 洗脱 5 min。每个时间点系统自动用流动相 A 补充到 100%。质谱仪采用数据依赖

模式采集数据,质谱(mass spectrometer, MS)全扫描的分辨率为 70 000, 选取离子强度排名前 20 离子进行 MS/MS 扫描。MS/MS 扫描的分辨率为 17 500, 动态排除持续时间为 50 s。Xcalibur 用于控制系统以及获得源文件。源文件用软件 PD2.2 进行分析鉴定蛋白, 选取数据库为类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.) 16S rRNA 基因部分序列一致性 99%的模式菌 *Paenibacillus polymyxa* SC2 (genome assembly: ASM16498v2)数据库。

鉴定得到的蛋白数据用韦恩图在线分析软件 Draw Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)分析不同提取方法质谱鉴定蛋白的交集情况^[11]。蛋白分子量与等电点的计算用在线工具 Compute pI/Mw (https://web.expasy.org/compute_pi/)进行分析。在线计算 3 种提取方法质谱鉴定蛋白的分子量, 按照分子量 <100 kDa 时, 以 10 kDa 为间隔划分区段; 分子量 ≥100 kDa 为一个区段, 一共 11 个区段分别进行分布统计。同样, 在线计算 3 种提取方法质谱鉴定蛋白的等电点, 按照等电点 4–10 之间, 以 1 个等电点为间隔划分区段; 等电点 ≥10 以及 <4 分别作为一个区段, 一共 8 个区段分别进行分布

统计。用在线工具 GRAVY (http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_gravy.html)评估蛋白的总平均亲水性(grand average of hydropathicity, Gravy)^[12]。在线对 3 种方法鉴定蛋白的 Gravy 值进行计算, 按照在 -1 至 1 之间, 以 0.5 作为间隔划分区段; ≥1 以及 <-1 分别为一个区段, 一共 6 个区段分别进行分布统计。

2 结果与分析

2.1 不同破碎方法对蛋白质提取量的影响

2.1.1 溶菌酶酶解实验条件的优化

在一定浓度范围内, 菌体浓度、蛋白质和核酸含量与对应最大吸收波长下的吸光值成正比。因此, 可以通过测定细胞破碎液 A_{600} 、 A_{280} 、 A_{260} 来间接反映细胞的破碎程度和胞内蛋白质及核酸的释放情况^[13-15]。

在 37 °C 水浴条件下, 进行 3 个不同溶菌酶浓度(1、5 和 50 mg/mL)添加的酶解实验, 结果如图 2A 所示。随着酶解时间的延长, 酶解液 A_{600} 有逐渐下降至平稳的趋势; 增加酶量, 酶解时间会相应缩短; 酶解 60 min 时, 不同酶添加量的细胞裂解液 A_{600} 吸收值差异不大。综合考虑

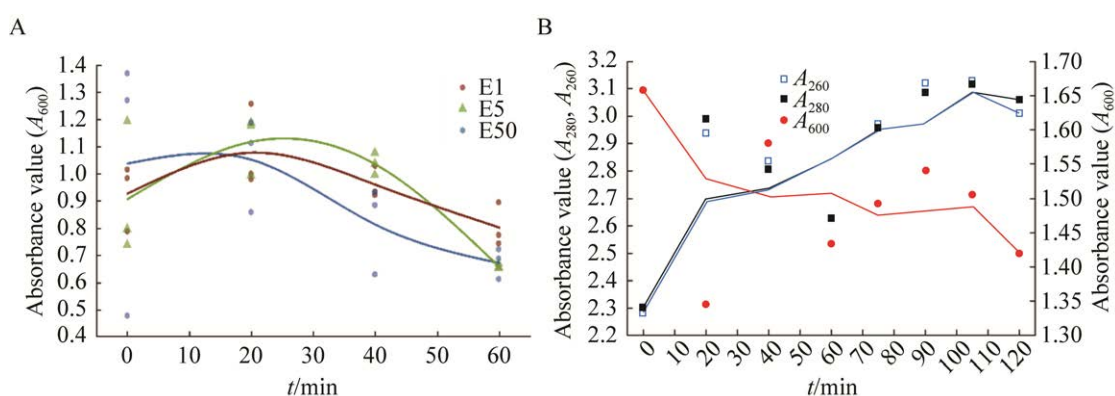


图 2 添加溶菌酶的菌体酶解过程

Figure 2 Bacterial enzymolysis process with lysozyme. A: Hydrolytic process with different lysozyme concentration at 37 °C. E1, E5, and E50 represent 1 mg/mL, 5 mg/mL, and 50 mg/mL concentrations of lysozyme respectively. B: Bacterial enzymolysis process with 1 mg/mL lysozyme. A_{600} , A_{280} , and A_{260} represent the absorbance values at wavelengths of 600 nm, 280 nm, and 260 nm, respectively.

溶菌酶价格昂贵, 以及其对后续质谱检测可能产生的负面影响, 选择添加 1 mg/mL 溶菌酶进行蛋白样品制备。随后选取 1 mg/mL 溶菌酶确认蛋白样品制备的酶解时间, 结果如图 2B 所示。从图 2 中可以看出, 酶解时间 20 min 前, 菌体浓度 A_{600} 迅速降低, 20–120 min 逐步降低直至趋于稳定; 在酶解时间 60 min 前, 胞内释放的蛋白质和核酸迅速增加, 60 min 后逐渐达到稳定。综合考虑, 选定 1 mg/mL 溶菌酶 37 °C、1 h 进行酶解处理作为蛋白样品制备时酶解的最终条件。

2.1.2 三种不同破碎方法蛋白提取得率的比较

溶菌酶联合超声破碎法(方法一) 3 次重复的总蛋白提取得率分别为 0.27%、0.23%、0.19%, 平均得率为 0.23%; 溶菌酶联合 SDS 热处理破碎法(方法二) 3 次重复的总蛋白提取得率分别为 0.25%、0.25%、0.22%, 平均得率为 0.24%; 液氮联合超声破碎法(方法三) 3 次重复的总蛋白提取得率分别为 0.22%、0.19%、0.15%, 平均得率为 0.19% (图 3)。实验结果显示, 3 种不同破碎方法的蛋白提取率差异不显著($P=0.206>0.05$), 方法一和方法二的蛋白提取效率稍高。

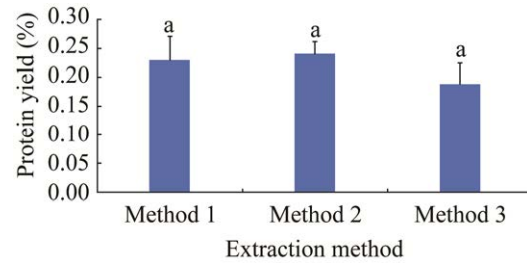


图 3 三种提取方法的蛋白得率比较

Figure 3 Comparison of protein yields from three extraction methods. Protein yield, ratio of extracted protein quality to wet weight. The same letters mean no significant difference among different methods ($P>0.05$).

2.1.3 三种不同破碎方法的 SDS-PAGE 分析比较结果

用 SDS-PAGE 电泳进一步检测蛋白的提取效率以及提取过程是否存在污染。SDS-PAGE 是按照分子量大小对蛋白质进行分离, 通过 SDS-PAGE 能够看出样品中蛋白质分子量的分布及丰度。

取相同量的菌体用 3 种不同提取方法进行破碎, SDS-PAGE 电泳检测的上样量相同, 可以通过电泳检测的方法直接反映出 3 种破碎方法的蛋白提取效率(图 4)。从每种方法的上清(2、4、

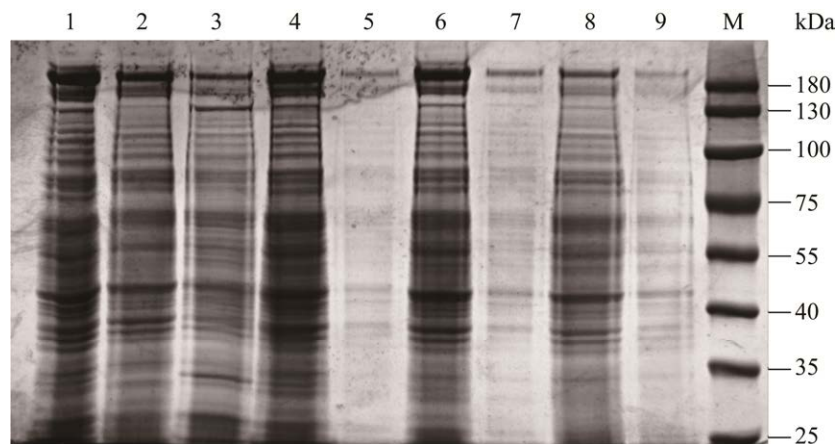


图 4 三种提取方法蛋白样品的 SDS-PAGE 电泳结果

Figure 4 SDS-PAGE of protein extracted by three different methods. Lane 1: Cell lysate; Lane 2–3: Supernatant and precipitation by method 1; Lane 4–7: Supernatant and precipitation by method 2 (lane 4 and lane 5 is the supernatant and the precipitation respectively by centrifugation after heating at 90 °C for 30 min; Lane 6–7 is the supernatant and the precipitation respectively after placing on ice for 30 min); Lane 8–9: Supernatant and precipitation by method 3.

6、8 泳道)和沉淀(3、5、7、9 泳道)以及它们与全细胞裂解液(1 泳道)的 SDS-PAGE 电泳结果比较可以看出,每种方法提取的蛋白绝大多数都释放到上清液中;与全细胞裂解液相比,每种方法提取的蛋白上清液在不同分子量范围均有条带,分布规律与菌体全细胞裂解液相似。另外,方法二(4-7 泳道)的绝大多数蛋白存在于上清中,沉淀中的蛋白含量较少;与其他 2 个方法相比,蛋白提取效果稍好。方法一(2、3 泳道)和方法三(8、9 泳道)相比,方法一中上清液和沉淀的蛋白分别比方法三中稍多。在细胞破碎过程中,与方法一溶菌酶处理方法相比,酶解处理比较温和,方法三液氮研磨方法使细胞壁破碎更加完全,所以方法一沉淀可以检测到较多蛋白质;但研磨过程会有一些损失,所以无论是上清(2、8 泳道)还是沉淀(3、9 泳道)方法三的蛋白电泳条带都比方法一颜色要浅。

综上所述,从 SDS-PAGE 电泳检测结果来看,3 种破碎方法的蛋白样品条带清晰,提取效率大致相同;相比较而言,方法二蛋白提取效率稍高,其次是方法一和方法三。

2.2 不同破碎方法的蛋白鉴定数量比较

将 3 种破碎方法得到的蛋白酶解多肽样品混合上机建立肽段谱图库,共鉴定到 3 231 个蛋白。3 种方法鉴定蛋白的韦恩图分析结果表明,方法一 3 次重复分别鉴定到 1 895、1 898 和 1 926 个蛋白,总共鉴定到 2 452 个蛋白;方法二 3 次重复分别鉴定到 1 575、1 561 和 1 580 个蛋白,总共鉴定到 2 003 个蛋白;方法三 3 次重复分别鉴定到 2 060、2 073 和 2 004 个蛋白,总共鉴定到 2 638 个蛋白。用单因素方差统计分析比较 3 种方法鉴定蛋白数的差异性(P 分别为 $8.03E-06$ 、 $2.712\ 5E-05$ 、 $0.003\ 97$),表明 3 种方法鉴定的蛋白数量差异显著或者极显著。方法三鉴定的蛋白数最多,其次是方法一,方法二鉴定

的蛋白最少。

总鉴定蛋白的韦恩图(图 5)分析显示,在 3 种方法中均鉴定到 1 615 个共有蛋白。方法一鉴定到的 837 个非共有蛋白中,有 409 个蛋白与方法三有交集;方法二鉴定到的 388 个非共有蛋白中,有 111 个蛋白与方法三有交集,有 128 个蛋白与方法一有交集;300 个蛋白仅在方法一鉴定到,149 个蛋白仅在方法二中鉴定到,503 个蛋白仅在方法三中鉴定到。由此可看出,方法一和方法三交集到了 3 种方法提取到的大部分非共有蛋白,提取的蛋白鉴定通量稍高,都是提取比较全面的方法。方法一与方法三相比,方法三蛋白提取第一步中液氮研磨比方法一酶解所需时间短,而且研磨过程中一直处于低温状态,大大降低了蛋白样品中非特异性降解的风险。可能正是由于这一点,所以相比而言,方法三比方法一质谱鉴定的蛋白数稍多一点。然而,考虑到液氮研磨需要消耗大量的人力,这限制了在研究工作中进行大批量的样品制备,结合 2 种方法鉴定的蛋白数量又相差不大,因此综合考虑,从质谱鉴定蛋白质组学的角度来看,选择溶菌酶结合超声波破碎法(方法一)作为提取菌株全蛋白的首选方法,以便进行后续蛋白质组学分析。

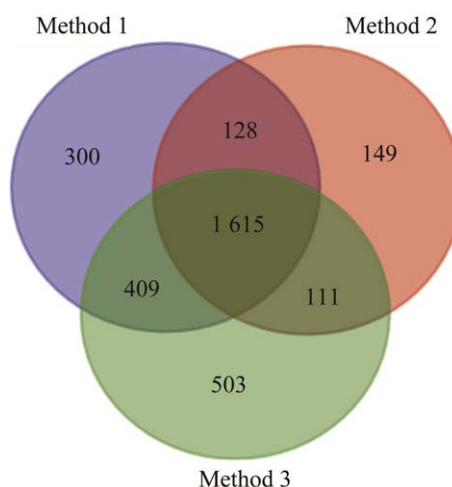


图 5 三种方法鉴定蛋白的韦恩图

Figure 5 Venn diagram of proteins identified by three methods.

2.3 质谱鉴定蛋白质性质分析

蛋白质的分子量、等电点、疏水性是蛋白质的重要性质,它们是可以反映其功能的重要理化指标。为了进一步考察3种破碎方法制备类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)蛋白质组样品的效果,将质谱技术鉴定的蛋白质进行疏水性、等电点、分子量预测分析,并统计了各个性质分布的蛋白质数目以及占比,同时与 Uniprot 数据库中模式株 *Paenibacillus polymyxa* (strain SC2)注释蛋白组 (Proteome ID UP000006868)进行了比较,总结了以下特点。

(1) 通过预测蛋白质中所有氨基酸的亲水性值和氨基酸残基数量得到蛋白质的总平均亲水性 Gravy 值。疏水性蛋白 Gravy 值是正值,亲水性蛋白 Gravy 值是负值。3种方法提取的菌株蛋白均以亲水性蛋白为主,其中方法一提取的蛋白中亲水性和疏水性蛋白比例为 78.3%和 21.7%,方法二提取的蛋白中亲水性和疏水性蛋

白比例为 79%和 21%,方法三提取的蛋白中亲水性和疏水性蛋白比例为 80.1%和 19.9%。由以上数据可以看出,3种方法提取的菌体蛋白亲水性和疏水性基本相似,并和模式菌株预测蛋白的亲水性和疏水性 77.1%和 21.7%接近(图 6A)。

(2) 与模式菌株基因组预测蛋白组的等电点相比,3种破碎方法提取的蛋白质质谱鉴定结果类似:等电点小于 5.0 的酸性蛋白与等电点大于 9.0 的碱性蛋白比例很低(图 6B)。原核生物中,小分子量蛋白通常是一些极碱性或极酸性蛋白^[16],蛋白分子量与等电点之间存在正相关的关系。因此,质谱鉴定的菌株蛋白质组的酸性蛋白与碱性蛋白比例减少也与小分子量蛋白比例减少有关。

(3) 与模式菌株基因组预测蛋白组相比,3种方法质谱鉴定结果中,小分子量蛋白比例较少(图 6C)。一方面,这可能与 FASP 酶切所用的超滤膜 30 kDa 截留分子量有关;另一方面,从理论上讲,小分子量蛋白的胰蛋白酶酶切位点数

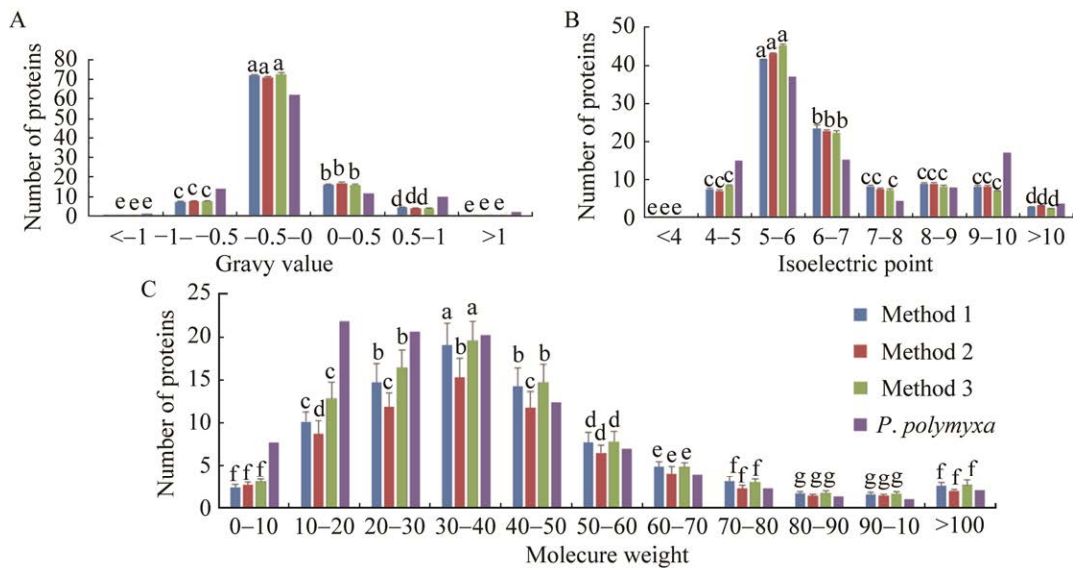


图 6 质谱鉴定蛋白的性质分布图

Figure 6 Histogram of characterization of proteins identified by mass spectrometry. A: Histogram of Gravy value distribution of proteins identified by mass spectrometry from three methods and predicted proteome from *Paenibacillus polymyxa* genome. B: Histogram of isoelectric point distribution of proteins identified by mass spectrometry from three methods and predicted proteome from *P. polymyxa* genome. C: Histogram of molecule weight distribution of proteins identified by mass spectrometry from three methods and predicted proteome from *P. polymyxa* genome. Different lowercase letters indicate significant different protein characteristics ($P < 0.05$).

量少, 酶切后得到的相应肽段数目少, 从而降低了小分子量蛋白在质谱分析中的鉴定概率。

模式菌 *Paenibacillus polymyxa* (strain SC2) 基因组注释中共有 5 377 个预测蛋白质^[17], 3 种破碎方法得到的蛋白裂解液经质谱共鉴定到 3 231 个蛋白。进一步分析经质谱鉴定蛋白的分子量、等电点、疏水性等基本性质, 它们在各个分布范围与模式菌株基因组中预测蛋白的占比基本一致, 均可以良好地覆盖菌株各个类型的蛋白, 从而保证蛋白质组数据信息的完整性。

3 讨论与结论

蛋白质组学研究的关键是找到合适的蛋白质样品制备方法, 可以提高质谱检测蛋白的数目以保证蛋白质组信息的重复性和完整性。本研究选取了溶菌酶联合超声破碎法、溶菌酶联合 SDS 热处理破碎法、液氮联合超声破碎法对革兰氏阳性类芽孢杆菌属菌株进行破碎得到蛋白裂解液, 对该菌相关方法的比较研究还未见报道。

在蛋白样品的制备过程中, 从蛋白提取效率以及 SDS-PAGE 电泳检测结果可以看出, 3 种不同破碎方法的蛋白提取率大致相同, 方法一和方法二的蛋白提取效率稍高。因此, 文中的 3 种破碎方法都可以作为类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.) 提取细胞全蛋白的方法。其中, 方法二中的 SDS 是一种强烈的阴离子去垢剂, 可以溶解膜蛋白而破坏细胞膜, 使得蛋白质溶解, 有利于提取膜蛋白或者细胞骨架蛋白等难溶蛋白^[10]。方法一和方法三中的尿素可以使蛋白质变性, 在一定程度上增加蛋白质的可溶性。这 3 种方法采用了酶解、机械研磨、超声破壁和化学处理等进行细胞破碎, 裂解液满足了蛋白提取过程充分溶解蛋白质的需求。方法一和方法三中将裂解液成分由 SDS 改为尿素, 避免了 SDS 在蛋白样品后续超声破碎过程中产生泡沫干扰提取过程, 由于液氮研磨过程会有一些损失, 所以方法三的蛋白得率

稍低。

随后, 通过质谱技术对 3 种方法制备的蛋白质组样品进行分析鉴定: 方法三鉴定的蛋白数最多, 为 2 638 个蛋白; 方法一居中, 鉴定了 2 452 个蛋白; 方法二鉴定的蛋白数最少, 为 2 003 个蛋白。方法二蛋白裂解液中含有 SDS, 它是一种很强的去污剂, 很难通过超滤的方法以及后续脱盐的过程完全去除。很低浓度的 SDS 可以影响胰酶的酶切消化效率; 另外 SDS 在质谱分析中具有易电离特性, 即使样品中含有痕量 SDS 对后续质谱分析也会产生影响。本研究采用 FASP 酶解方法对蛋白样品进行处理, 已有文献报道, FASP 酶解方法中所用到的尿素可以更有效地去除裂解液中 SDS^[18]。然而在蛋白样品中可能仍有部分 SDS 残留, 所以导致后期质谱检测过程鉴定到的蛋白数量偏少。另外, 基于本研究关于方法一与方法三的比较, 得出结论: 溶菌酶结合超声破碎法(方法一)提取菌株全蛋白的方法是基于质谱鉴定类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.) 蛋白质组学研究中的首选方法。其中, 溶菌酶能够分解革兰氏阳性细菌的细胞壁成分, 超声波能够将细胞膜以及胞内核酸打碎, 使得蛋白质可以完全释放, 获得较高质量的蛋白样品^[6]。随后, 通过分析质谱鉴定蛋白重要的基本性质, 如分子量、等电点、疏水性等表明, 3 种不同破碎方法鉴定的菌株蛋白在各个分布范围内均很好地覆盖了模式种多黏类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) 中各个类型的蛋白。

综上所述, 溶菌酶结合超声波破碎法(方法一)提取菌株全蛋白兼顾了蛋白提取效率和质谱鉴定通量, 提取的蛋白种类具有代表性。因此, 方法一是基于质谱技术鉴定类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* sp.) 蛋白质组研究的首选方法。该方法简单易行, 适合大批量的蛋白样品制备, 为后续类芽孢杆菌属蛋白质组的挖掘与分析以及微生物生态相关理论研究奠定了技术基础。

参考文献

- [1] RABILLOU T, LELONG C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial[J]. *Journal of Proteomics*, 2011, 74(10): 1829-1841.
- [2] AEBERSOLD R, MANN M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function[J]. *Nature*, 2016, 537(7620): 347-355.
- [3] MUELLER RS, PAN C. Sample handling and mass spectrometry for microbial metaproteomic analyses[M]//*Methods in Enzymology*. Amsterdam: Elsevier, 2013: 289-303.
- [4] MATIAS VRF, AL-AMOUDI A, DUBOCHET J, BEVERIDGE TJ. Cryo-transmission electron microscopy of frozen-hydrated sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(20): 6112-6118.
- [5] MATIAS VRF, BEVERIDGE TJ. Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(1): 240-251.
- [6] 贾峰峰. 基于二维凝胶电泳与质谱联用的枯草芽孢杆菌蛋白质组分析[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2009.
- JIA FF. Proteome analysis of *Bacillus subtilis* by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2009 (in Chinese).
- [7] 赵卫松, 郭庆港, 董丽红, 王培培, 苏振贺, 张晓云, 鹿秀云, 李社增, 马平. 枯草芽孢杆菌 NCD-2 对棉花根系分泌物 L-脯氨酸响应的转录-蛋白质组学联合分析[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(21): 4585-4600.
- ZHAO WS, GUO QG, DONG LH, WANG PP, SU ZH, ZHANG XY, LU XY, LI SZ, MA P. Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* NCD-2 response to L-proline from cotton root exudates[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(21): 4585-4600 (in Chinese).
- [8] VANDERA E, SAMIOTAKI M, PARAPOULI M, PANAYOTOU G, KOUKKOU AI. Comparative proteomic analysis of *Arthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3 on phenanthrene, phthalate and glucose[J]. *Journal of Proteomics*, 2015, 113: 73-89.
- [9] REASONER DJ, GELDREICH EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49(1): 1-7.
- [10] WIŚNIEWSKI JR, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, MANN M. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 359-362.
- [11] BARDOU P, MARIETTE J, ESCUDIÉ F, DJEMIEL C, KLOPP C. Jvenn: an interactive Venn diagram viewer[J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15(1): 293.
- [12] KYTE J, DOOLITTLE RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157: 105-132.
- [13] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- WANG JZ, FAN M. *Protein Technical Manual*[M]. Beijing: Science Press, 2000 (in Chinese).
- [14] 崔丁维, 胡学超, 包姗姗, 张卡, 纪晓俊, 黄和. 酶法破碎微生物细胞的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(11): 1672-1678.
- CUI DW, HU XC, BAO SS, ZHANG K, JI XJ, HUANG H. Research progress in enzymatic disruption of microbial cells[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(11): 1672-1678 (in Chinese).
- [15] 刘红, 潘红春, 蔡绍哲, 李玉林, 杨红涛. 酶解-超声法破碎大肠杆菌提纯包含体[J]. *重庆大学学报: 自然科学版*, 2004, 27(10): 75-78.
- LIU H, PAN HC, CAI SX, LI YL, YANG HT. Purification of inclusion body from *E. coli* broken with enzymolysis-ultrasound[J]. *Journal of Chongqing University (Natural Science Edition)*, 2004, 27(10): 75-78 (in Chinese).
- [16] KIRAGA J, MACKIEWICZ P, MACKIEWICZ D, KOWALCZUK M, BIECEK P, POLAK N, SMOLARCZYK K, DUDEK MR, CEBRAT S. The relationships between the isoelectric point and length of proteins, taxonomy and ecology of organisms[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8(1): 1-16.
- [17] MA MC, WANG CC, DING YQ, LI L, SHEN DL, JIANG X, GUAN DW, CAO FM, CHEN HJ, FENG RH, WANG X, GE YF, YAO LT, BING XH, YANG XH, LI J, DU BH. Complete genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* SC2, a strain of plant growth-promoting rhizobacterium with broad-spectrum antimicrobial activity[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(1): 311-312.
- [18] WISNIEWSKI JR, ZETTL K. Datasets: sensitivity and protein digestion course of proteomic filter aided sample preparation[J]. *Data in Brief*, 2019, 26: 104530.