

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(5): 517-524; 4 May 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.05.006

温度对粘质沙雷氏菌合成灵菌红素的影响

徐虹, 徐美娟, 杨套伟, 饶志明*

江南大学, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

摘要 【目的】研究粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens* JNB5-1) 在不同发酵温度 (28℃ 和 37℃) 条件下蛋白质组的差异表达, 探究粘质沙雷氏菌合成灵菌红素受温度调控的原因。【方法】利用二维凝胶电泳 (2-DE) 和基质辅助激光解析电离飞行时间串联质谱技术 (MALDI-TOF-MS) 分离和鉴定粘质沙雷氏菌在不同发酵温度 (28℃ 和 37℃) 条件下的差异蛋白; 再利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 进一步分析挑选出的七个差异蛋白编码基因的转录水平。【结果】2-DE 图谱显示, 共鉴定到 16 个显著差异的蛋白点。其中, 灵菌红素合成途径中的氧甲基转移酶 (PigF)、氧化还原酶 (PigN) 和参与灵菌红素前体物质 (脯氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、二辛烯醛和丙二酰-CoA 等) 代谢的相关蛋白 (酶) 的表达量在 37℃ 条件下都出现极显著的下降; 热休克蛋白 (Hsp60)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase) 等应急性蛋白在 37℃ 条件下表达上调。通过 RT-qPCR 证实, 氧甲基转移酶、氧化还原酶和转酮醇酶基因 (*transketolase*) 在 37℃ 条件下的转录水平均低于 28℃ 条件下的。【结论】*S. marcescens* JNB5-1 在相对低温 (28℃) 条件下产灵菌红素, 相对高温 (37℃) 条件下不产灵菌红素。可能是高温 (37℃) 显著抑制了灵菌红素合成相关酶的表达。

关键词: 氧甲基转移酶, 氧化还原酶, 实时荧光定量 PCR, 温度调控, 粘质沙雷氏菌

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209(2014)05-0517-08

灵菌红素 (Prodigiosin, PG) 是一种重要的天然红色素, 在医药、化工、染料等行业具有较大的应用前景^[1]。Fullan 等^[2]在 1977 年首次验证了 PG 的体内抗肿瘤作用; Montaner 等^[3]发现, 粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) PG 提取物能诱导血癌细胞的凋亡。目前较受关注的 PG 衍生物 GX15-070, 作为多种癌症的备选治疗药物, 已进入临床 II 期研究阶段^[1]。作为灵菌红素家族中的一员, PG 主要是一些沙雷氏菌属、放线菌属、假单胞菌属、海洋类细菌等

的次生代谢产物, 其中粘质沙雷氏菌是 PG 的主要生产菌株, 它属于肠杆菌科、沙雷氏属的一个种, 为革兰氏阴性短杆菌, 形态上一般比其它肠道菌小, 无荚膜^[4]。该菌属中能产灵菌红素的菌株属于温度敏感型表型: 在温度低于 30℃ 时产红色素, 高于 37℃ 时不产红色素, 但是其受温度调控的具体原因尚不明确^[5]。

早期研究发现^[1], 粘质沙雷氏菌合成 PG 的前体物质主要有脯氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、丝氨酸、组

基金项目: 教育部新世纪优秀人才计划 (NCET-10-0459); 国家“973 项目” (2012CB725202); 国家“863 计划” (2011AA02A211); 国家自然科学基金 (21276110); 中央高校基本科研业务费专项资金 (JUSRP51306A); 江苏高校优势学科建设工程项目

* 通信作者。Tel: +86-510-85916881; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

作者简介: 徐虹 (1983-) 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 从事微生物专业。E-mail: xuhong2008@163.com

收稿日期: 2013-07-17; 修回日期: 2013-12-03

氨酸、二辛烯醛、丙二酰-CoA 和乙酰-CoA 等; PG 合成基因簇包括 16 个基因, 其中 *pigA-pigN* (共 14 个基因) 是灵菌红素合成的编码基因; *cueR* 和 *copA* 是其调控基因, PG 是通过双歧途径合成的, 它由两个单体 2-甲基-3- α -戊基 (MAP) 和 4-甲氧基-2',2'-双吡咯-5-甲醛 (MBC) 经缩合酶 (PigC) 缩合而成, 其中 MAP 的合成由 PigB/PigD/PigE 参与, 而 MBC 的合成由 PigA/PigF/PigG/PigH/PigI/PigJ/PigK/PigL/PigM/PigN 参与。

本研究中菌株为前期实验室筛选并保藏的 PG 高产菌株粘质沙雷氏菌, PG 产量为 6.49 g/L。为初步探究其灵菌红素合成受温度调控的原因, 本文利用 2-DE 结合质谱鉴定技术对它在不同发酵温度 (28°C 和 37°C) 条件下的全细胞蛋白差异表达进行研究, 同时采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术研究 PG 合成相关的酶 (PigF、PigN)、铜运输 p 型 ATP 酶 (CopA) 和转酮醇酶 (Transketolase) 等基因在 28°C 和 37°C 条件下的转录水平。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

IPG 预制胶条 (17 cm, pH4-7)、CHAPS、两性电解质 (Bio-Lyte, pH 3-10 buffer)、低熔点琼脂糖、考马斯蓝 G-250 等购自 Bio-Rad; Non-Interference Protein Assay Kit、蛋白酶抑制剂 (protease inhibitor) 等购自 Sangon; Simply P Total RNA Extraction Kit 购自 BioFlux; Prime Script™ RT reagent kit、SYBR Premix Ex Taq™ II 购自 TaKaRa。

等电聚焦仪 (Ettan IPGphor3)、垂直蛋白电泳系统 (Ettan DALTsix)、凝胶扫描系统 (Image Scanner III)、图谱分析软件 (Image Master 2D Platinum 7.0) 均为 GE Healthcare 公司产品; 质谱仪 (Reflex MALDI-TOF-MS) 为 Bruker 公司产品; 实时荧光定量 PCR 仪 (CFX96™ Real-Time System) 为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 菌株和培养条件

粘质沙雷氏菌 JNB5-1 本实验室筛选并保藏, 种子和发酵培养基的配制参照文献^[6]。菌种活化后分别在 28°C 和 37°C 条件下转接发酵培养基, 200 r/min 培养 24 h, 收集菌体用于蛋白质组学和 RT-qPCR 的分析。

1.3 粘质沙雷氏菌 JNB5-1 全细胞蛋白样品的制备

参考三氯乙酸/丙酮沉淀法^[7], 加以改进。收集处于稳定生长期的培养物, 100 mL 超纯水悬浮洗涤菌体 3 次, 离心收集菌体。2 mL 细胞裂解液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS (W/V), 1% DTT (W/V)) 悬浮细胞后加入 20 μ L 蛋白酶抑制剂, 超声破碎 (破 3sec 停 2sec) 10 min, 4°C 10000 \times g 离心 40 min, 弃沉淀, 上清中加入 10 倍体积的三氯乙酸/丙酮溶液, -20°C 过夜。之后用冰丙酮溶液悬浮洗涤沉淀 2 次, 获得蛋白沉淀, 再用 1 mL 上样水化缓冲液溶解蛋白。总蛋白浓度采用 Bradford 法测定。

1.4 2-DE 和凝胶图像分析

第一向等电聚焦: 17 cm pH 4-7 的预制胶条上, 蛋白样品上样量为 500 μ g。水化 12 h 后, 在 Ettan IPGphor3 上进行 IEF。IEF 的设定参数为: 250 V (40 min), 1000 V (60 min), 5000 V (90 min), 10000 V (120 min), 总电压时间为 50000 V·h, 最后电压稳定在 500 V 时即可进行第二向 SDS-PAGE。

第二向 SDS-PAGE: 将聚焦后的胶条先后置于平衡液 I 和 II 中各 15 min, 在 Ettan DALTsix 上进行 SDS-PAGE 电泳。SDS-PAGE 开始前, 在胶的外侧加上蛋白 Marker 作为分子量参照。每个样品至少重复 3 次。

SDS-PAGE 结束后, 凝胶用考马斯亮蓝染色法显示分离的蛋白点, 并利用 Image Master 2D platinum 7.0 软件对凝胶图谱比对分析。

1.5 质谱鉴定和数据库检索分析

切取差异表达的蛋白点, 蛋白样品经脱色、酶解、抽提和脱盐之后点到质谱靶上, 在质谱仪 (Reflex MALDI-TOF-MS, Bruker) 上进行鉴定。所得肽指纹图谱及肽序列采用 Mascot 搜索引擎在 NCBI nr 数据库中进行检索。

1.6 RT-qPCR 的检测

1.6.1 总 RNA 的提取与反转录: 分别选取在 28°C 和 37°C 条件下发酵至稳定生长期的粘质沙雷氏菌 JNB5-1, 参照 Simply P 总 RNA 提取试剂盒说明书提取样品的总 RNA 之后利用核酸紫外分析仪测定 RNA 的浓度与纯度, 选择 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8-2.0 的样品进行反转录。根据 PrimeScript™ RT Reagent

Kit 试剂盒说明书配制 10 μL 的反转录反应体系, 体系中总 RNA 的量为 480 ng, 反转录条件为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。所得 cDNA 保存在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待扩增。

1.6.2 实时荧光定量 PCR: 按照实时荧光定量 PCR 的要求设计目的基因扩增引物(表 1), 参照 SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒说明书配置 20 μL 反应体系, 实时荧光定量 PCR 在 CFX96TM Real-Time System 上进行, 同时以 16S rRNA 为内参。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 75 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 40 个循环。每个样品重复 3 次。

表 1. 用于实时荧光定量 PCR 的引物

Table 1. Primers used for RT-qPCR

gene	primer sequence(5'→3')
<i>pigF</i>	F: CGATTACGACTTCTCGCAA
	R: GTCAATGCGTTTCGCCATA
<i>pigN</i>	F: GGTTACCCTGGTCATTTGCTAT
	R: GGGCATCACGTCCTTGAG
<i>cueR</i>	F: AGTTCGCTGATGTGCC
	R: TGGGCTTCAACCTGGAC
<i>copA</i>	F: CAATCAGGTCAGCGAACAG
	R: GCCAACATGAAGCGC
<i>transketolase</i>	F: CTAAGAACTTGTTAGC
	R: ATGGCGTCTTCTTCTTCT
<i>superoxide dismutase</i>	F: CGTTTCGCTGATGACCAC
	R: ATTGGTATGCGGCGTTTGG
<i>hsp60</i>	F: GCGTTGCCGTTATCAAG
	R: GGTGCTGTCTTTGTGAT
16S	F: GCCCAGGTAAGGTTCTTC
rRNA	R: GGTGTAGCGGTGAAATGC

2 结果

2.1 粘质沙雷氏菌 JNB5-1 在不同温度(28 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$)下发酵产 PG 的 2-DE 图谱分析

利用 2-DE 对 28 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 发酵条件下的粘质沙雷氏菌 JNB5-1 全细胞蛋白进行分离, 结果显示, 差异蛋白点主要集中在 PI 4.5 - 7.0 之间, 相对分子量(Mr) 在 18 - 45 kDa 区域。用 Image Master 2D platinum 7.0 软件对图谱进行分析, 从两块匹配胶中筛选出表达量倍数差异 >3 的 16 个蛋白点。其中, 在发酵温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 时有而 37 $^{\circ}\text{C}$ 没有的点有 1 个(10); 28 $^{\circ}\text{C}$ 时比 37 $^{\circ}\text{C}$ 时表达量高 4 倍以上的点有 10 个(1, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 15, 16) (图 1-A、B)。本实验对相同温度(28 $^{\circ}\text{C}$ 和 28 $^{\circ}\text{C}$; 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$) 和不同温度条件(28 $^{\circ}\text{C}$ 和 37 $^{\circ}\text{C}$) 样本都分别做了多次重复。多次重复试验获得了相似的结果, 菌体蛋白质形成基本一致的分布特点。

2.2 差异蛋白点的质谱鉴定

切取以上差异蛋白点进行 MALDI-TOF-MS 分析鉴定, 结果如表 2。按照与粘质沙雷氏菌 JNB5-1 PG 合成代谢的相关性可以分成 4 类: (1) PG 合成代谢途径中的蛋白(酶); (2) 与氨基酸等物质代谢相关蛋白质; (3) 能量代谢相关蛋白; (4) 热休克及其它应激蛋白。

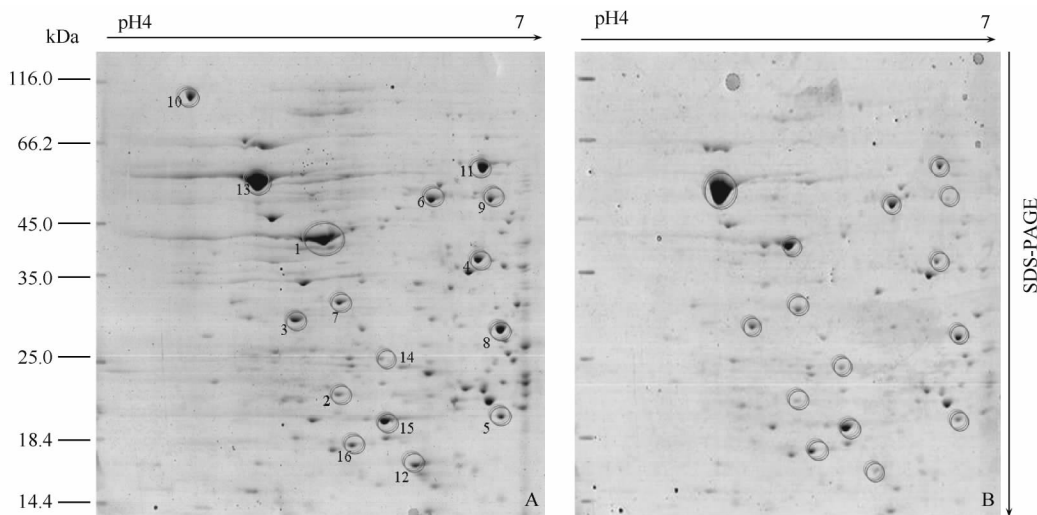


图 1. 粘质沙雷氏菌 JNB5-1 在 28 $^{\circ}\text{C}$ (A) 和 37 $^{\circ}\text{C}$ (B) 条件下双向电泳图谱

Figure 1. Two-dimensional electrophoretograms of *Serratia marcescens* JNB5-1 at 28 $^{\circ}\text{C}$ (A) and 37 $^{\circ}\text{C}$ (B).

表 2. 28℃/37℃条件下差异蛋白质质谱鉴定结果

Table 2. Functional classification of different proteins at 28℃/37℃

protein spot	march ID	expression quantity(Vol%)		NCBI accession No.	protein description	nominal mass Mr	calculated pI	score
		28℃	37℃					
		The down-regulated protein spots at 37℃						
1	95	7.3656	-7.3656	gi155581739	O-methyl transferase(PigF)	37690	5.51	311
2	216	3.5804	-3.5804	gi155581747	Oxidoreductase(PigN)	24300	5.67	286
3	75	4.7562	-4.7562	gi1157371318	Fatty acyl-coA dehydrogenase	29517	5.22	241
4	21	4.6415	-4.6415	gi1136598	Glutamic acid kinase	36855	6.41	106
5	49	4.8721	-4.8721	gi1238752730	Trp-repressor binding protein	21318	6.97	118
6	5	3.7654	-3.7654	gi116761428	Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase	52429	6.18	168
7	100	3.7145	-3.7145	gi1320540033	Protein chain elongation factor EF-Ts	30540	5.75	270
8	110	4.4443	-4.4443	gi1133754736	Elongation factor Tu A	28661	6.66	392
9	119	4.7874	-4.7874	gi1112791360	ATP synthase beta subunit	46177	6.4	939
10	123			gi1157371717	Transketolase	105310	4.3	82
11	89	4.5327	-4.5327	gi1293394568	Phosphoglycerate kinase	55401	6.29	234
12	408	3.8243	-3.8243	gi1293394870	Nucleoside diphosphate kinase	15567	5.89	212
The up-regulated protein spots at 37℃								
13	39	-4.7503	4.7503	gi16225138	GroEL protein or Protein Hsp60	54751	4.86	814
14	83	-3.7679	3.7679	gi1157368379	OsmC family protein	24113	6.54	264
15	57	-4.494	4.494	gi11711458	Superoxide dismutase	19215	6.23	228
16	41	-4.949	4.949	gi1157368898	Periplasmic protein	17063	5.85	189

2.3 RT-qPCR 的检测

2.3.1 RNA 的提取和纯度分析: 提取粘质沙雷氏菌 JNB5-1 的总 RNA, 进行琼脂糖凝胶电泳, 28 S、18 S 和 5 S 条带清晰可见, 条带间无拖尾现象, 表明 RNA 无降解, 完整性良好。用核酸紫外分析仪检测到 RNA 样品 A_{260}/A_{280} 的比值是 1.9, 说明 RNA 纯度较好, 符合 RT-qPCR 的要求。

2.3.2 *pigF*、*pigN*、*copA*、*cueR* 和 *transketolase* 等基因在不同温度条件下的转录水平: 以 16S rRNA 作为内参基因, 利用 SYBR Green I 实时定量 PCR 来分析不同发酵温度(28℃和 37℃)条件下上述基因的转录水平, 用 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 方法计算结果表明 *pigF*、*pigN*、*copA* 和 *transketolase* 基因在不同温度条件下存在转录水平上的差异(如表 3、图 2 所示), 即 *pigF/pigN/copA/transketolase* 在 28℃ 条件下的转录水平比 37℃

条件下的分别高 7.36、3.45、3.8 和 4.1 倍, 而 *cueR* 在转录水平上没有变化; *superoxide dismutase* 和 *hsp60* 在 37℃ 条件下的转录水平比 28℃ 条件下的分别高 4.5 和 4.76 倍。结合 RT-qPCR 验证结果与以上蛋白表达上调或下调结果, 本实验参照生物统计学^[8]对二者进行了相关系数分析。利用公式: $r = SP / \sqrt{SS_x \times SS_y}$ 计算二者相关系数 $r = 0.986$; 再利用公式: $t = r/s_r$ 计算相关系数的显著性 $t = 8.09$, 查附表 $t_{0.01(2)} = 9.925$ 得到 $|t| < t_{0.01(2)}$ 。由以上得出: RT-qPCR 验证结果与蛋白表达上调或下调结果的相关系数约为 0.986。结果表明, 二者之间存在极显著的正相关关系。因此, 本实验中 RT-qPCR 对双向电泳的结果做了很好的验证。

表 3. 不同温度条件下样品的平均 C_q 值Table 3. The mean C_q values of samples at different temperatures

T/℃	<i>pigF</i>	<i>pigN</i>	16S rRNA	<i>cueR</i>	<i>copA</i>	16S rRNA	<i>Superoxide dismutase</i>	<i>Hsp60</i>	16S rRNA	<i>Transketolase</i>	16S rRNA
	meanCq values	meanCq values	meanCq values	meanCq values	meanCq values	meanCq values	mean Cq values	meanCq values	meanCq values	mean Cq values	meanCq values
28	30.4	29.14	27.3	20.73	24.76	28.31	23.41	25.89	17.5	25.81	21.9
37	27.98	25.63	22	17.55	23.77	25.40	25.97	28.53	17.89	28.69	22.73

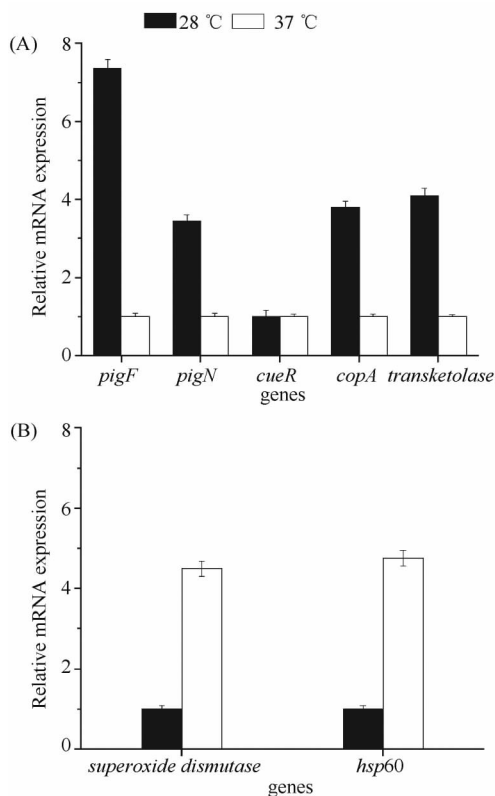


图2. 不同温度条件(28°C/37°C)下所选差异蛋白基因转录水平分析

Figure 2. RT-qPCR of selected difference protein genes at different temperatures(28°C/37°C). A: the up-regulated genes at 28°C; B: the up-regulated genes at 37°C.

3 讨论

在自然界,温度对粘质沙雷氏菌很重要,但是目前很难给出细菌学和生态学的解释;粘质沙雷氏菌的生存温度范围比较宽泛(20–40°C),但PG的合成却需要相对严格的温度(24–28°C),其中28°C是PG合成的最适温度,同样的,粘质沙雷氏菌合成PG受温度调节机制目前仍不清楚^[9]。

本实验通过2-DE和MS技术发现了粘质沙雷氏菌JNB5-1在不同发酵温度条件(28°C和37°C)下合成PG的差异蛋白(表达差异均在3倍以上);并且对PG合成相关蛋白的编码基因在不同发酵温度条件下的转录水平进行研究。

3.1 PG合成代谢的相关蛋白及调控因子

PigF(氧甲基转移酶,spot 1)和PigN(氧化还原酶,spot 2)分别由粘质沙雷氏菌合成PG基因簇中

*pigF*和*pigN*编码,并共同催化HBC合成PG的单体MBC,而MBC和另一单体MAP在PigC催化下最终合成PG^[1]。

3.2 糖、脂、氨基酸和核酸类物质代谢相关蛋白

转酮醇酶(Transketolase,spot 10)在细菌中参与戊糖代谢,催化合成D-核糖-5-磷酸和D-赤藓糖-4-磷酸。其中D-核糖-5-磷酸是组氨酸生物合成前体,而D-赤藓糖-4-磷酸是芳香族氨基酸(酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸)的生物合成前体^[10]。此外,转酮醇酶通过中间产物将PP途径和糖酵解途径联系起来,可促使物质之间相互转变成丝氨酸、组氨酸和丙氨酸和ATP等^[11]。微生物可以利用体内的谷氨酸激酶(Glutamic acid kinase,spot 4)经 α -酮戊二酸合成脯氨酸^[11]。脂酰-CoA脱氢酶(Fatty acyl-coA dehydrogenase,spot 3)是脂酰-CoA经 β -氧化生成乙酰-CoA的关键限速酶,胞质中乙酰-CoA经乙酰-CoA羧化酶(ACC)催化合成丙二酰-CoA^[11],而丙二酰-CoA直接为PG合成单体MBC提供丙二酰基^[1];磷酸甘油酸酯激酶(Phosphoglycerate kinase,spot 11)可以通过中间产物将糖酵解和TCA途径联系起来,促使物质之间的相互转变生成多种氨基酸(脯氨酸、甲硫氨酸等)或为细胞提供能量(ATP)等^[11]。肌苷-5'-单磷酸脱氢酶(Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase,spot 6)参与调节细胞的增殖与分化^[12]。核苷二磷酸激酶(Nucleoside diphosphate kinase,spot 12)是一种维持胞内核苷酸代谢平衡的“看家酶”^[13]。

3.3 能量代谢相关蛋白

ATP合酶是生物体内能量代谢的关键酶,ATP合酶 β 亚基(ATP synthase beta subunit,spot 9)是催化亚基,能将ADP转化为ATP^[14]。

3.4 热休克蛋白及其它相关应激蛋白

生物体对温度的应激性可以通过其体内的热休克蛋白表达反映,热休克蛋白(Hsp60)和分子伴侣蛋白(GroEL)广泛分布于细胞的各个部分,可增强细胞对伤害性刺激的耐受性,提高细胞的存活率^[15]。Kazumi等^[16]发现,生物体内Hsp60贮存较多时,机体具有更强的热耐受能力。分子伴侣能促进蛋白质的正确折叠、组装和纠正蛋白质的错误结构^[17]。另外,研究还发现:较高的生长温度可以诱导粘质沙雷氏菌超氧化物歧化酶的应激性增加^[18];外膜蛋白A、表层蛋白、渗透压家族蛋白与细胞的应

激性、免疫活性或信号转导等有关^[19],本实验表明上述蛋白在 37℃ 条件下表达均出现上调。

总之,以上 4 类蛋白在不同发酵温度条件下的差异表达共同影响着 PG 的合成,这为探讨粘质沙雷氏菌 JNB5-1 PG 合成受温度调节的分子机制提供了新的线索。首先,直接与 PG 合成有关的氧甲基转移酶(PigF)、氧化还原酶(PigN)和与铜转运有关的铜运输 p 型 ATP 酶酶(CopA)的转录水平在 37℃ 发酵条件下比 28℃ 条件下分别降低了 7.36、3.45 和 3.8 倍;PigF 和 PigN 的表达量在 37℃ 发酵条件下比 28℃ 条件下分别降低了 7.37 和 3.58 倍。根据叠加效应,37℃ 发酵条件下,PG 合成途径中相关的酶在转录水平上共降低 96.5 倍;蛋白表达水平上共降低至少 27 倍。其中,*cueR/copA* 系统涉及铜的运输,*CueR* 是 *copA* 的转录调节子,而 *CopA* 是铜运输 p 型 ATP 酶,参与铜的流出过程;铜对 PG 的合成具抑制作用^[20]。本研究中 *copA* 在 37℃ 时低转录水平(与 28℃ 条件下比较)的情况下,可能使得铜运输 p 型 ATP 酶(CopA)的表达水平降低,从而抑制细胞中铜的流出,铜在细胞中积累,因此增强了铜对 PG 合成的抑制作用,这与我们先前的研究结果(培养基中加入铜,PG 产量会明显降低)相符。其次,PG 合成需要多种氨基酸(脯氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、丝氨酸、组氨酸等)的参与,尤其是脯氨酸直接参与 PG 单体 MBC 吡咯环的形成,而甲硫氨酸的活性形式 S-腺苷甲硫氨酸(AdoMet)为单体 MBC 提供甲基^[1]。据文献报道,高浓度的氨基酸能有效地诱导 PG 的合成^[21];除了初级代谢产生的氨基酸,有时我们还会添加到培养基中^[21]。PG 单体 MAP 的合成前体物质二辛烯醛(2-Octenal)也需要在脂肪酸代谢中生成^[1]。上述第 2 类蛋白的代谢直接或间接的为 PG 合成提供多种氨基酸和前体物质(脯氨酸、二辛烯醛、丙二酰-CoA 和乙酰-CoA 等);另外,PG 合成还需要大量的能量,在 PG 合成第一步就需要 ATP 激活 L-脯氨酸,最后一步 MAP 和 MBC 缩合成 PG 时也需要 ATP^[1]。上述 ATP 合酶 β 亚基可以直接为 PG 合成提供 ATP。但是,以上参与这些物质代谢的蛋白(酶)在 37℃ 发酵条件下的表达量都比 28℃ 条件下分别低至少 3.5 倍(最高可达 4.8 倍);2-DE 图谱中“有和无”的差异蛋白(转酮醇酶)的转录水平在 37℃ 发酵条件下比 28℃ 条件下低 4.1 倍。再次,据研究发现,粘质沙雷氏菌在 37℃ 时会进行

混合酸发酵产乳酸、醋酸和甲酸,这些酸会改变环境中的 pH 值,但 PG 的合成一般在 pH8-8.5 之间,低 pH 值条件下其合成会受到影响;同时,pH 值的变化也会改变多种涉及生物活性分子的电荷,可能使得一些有利于合成 PG 的物质不能顺利的运输到细胞内^[9]。最后,实验中还鉴定到碱性磷酸酯酶(Alkalinephosphatase)的表达量在 37℃ 发酵条件下比 28℃ 条件下高 2.9 倍。碱性磷酸酯酶参与细胞磷代谢,磷酸盐在细胞内不能合成,必须通过磷酸酯酶的水解从核酸、磷酸化糖和蛋白质中得到有机体所需的磷酸盐,但是磷酸盐对 PG 的合成具有抑制作用^[22]。

综合以上所有因素,我们可以初步为粘质沙雷氏菌 JNB5-1 在 28℃ 发酵条件下产而 37℃ 发酵条件下不产 PG 做个假设:PG 合成途径中的酶、合成所需的重要前体物质、能量和环境在 37℃ 发酵条件下都不利于 PG 的合成。另外,温度可能影响 PG 合成途径中的一个或多个酶的活性,当温度大于 37℃ 时,其合成途径中的一些酶可能失活^[23]。基于以上结果,本文初步探讨并解释了粘质沙雷氏菌 JNB5-1 PG 合成过程受温度影响的原因。当然,除此之外也可能还存在其他影响因子,我们也将会在后续实验中研究。

本研究初步给出了粘质沙雷氏菌 JNB5-1 在相对高温条件下(37℃)合成 PG 受到抑制的相关证据,为粘质沙雷氏菌 PG 合成代谢的进一步研究奠定了基础,也为构建高产 PG 菌株、提高菌株产 PG 的温度适应性提供了理论指导。

参考文献

- [1] Williamson NR, Fineran PC, Leeper FJ, Salmond GPC. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(12): 887-899.
- [2] Fullan NP, Lynch DL, Ostrow DH. Effects of bacterial extracts on Chinese hamster cells and rat neoplasms. *Fems Microbiology Letters*, 1977, 5: 157-161.
- [3] Beatriz M, Sira N, Maria P, Marta V, Marc M, Ernest G, Joan G, Ricardo PT. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *British Journal of Pharmacology*, 2000, 131: 585-593.
- [4] Yu L, Wen Z, Yang W, Li N, Wang J, Lu J, Li J. Isolation and characterization of *Serratia marcescens*

- phage. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(4): 498-502. (in Chinese)
- 于龙, 温占波, 杨文慧, 李娜, 王洁, 鹿建春, 李劲松. 一株粘质沙雷氏菌烈性噬菌体污水分离及特性. *微生物学报*, 2008, 48(4): 498-502.
- [5] Williams RP. Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1973, 25(3): 396-402.
- [6] Li Z, Zhang X, Xu M, Xia H, Rao Z. Screening and identification a *Serratia marcescens* strain producing red-pigment and preliminary study of the fermentation conditions. *Journal of Food and Biological Technology*, 2012, 31(10): 1018-1024. (in Chinese)
- 李子武, 张显, 徐美娟, 夏海峰, 饶志明. 一株产灵菌红素粘质沙雷氏菌的筛选、鉴定及发酵条件. *食品与生物技术学报*, 2012, 31(10): 1018-1024.
- [7] Nijat I, Tursun K, Jeremy JW, Barry GR. Characterisation of rice anther proteins expressed at the young microspore stage. *Proteomics*, 2001, 1: 1149-1161.
- [8] 李春喜, 姜丽娜, 邵云, 张戴静. 生物统计学. 第五版. 北京: 科学出版社, 2013.
- [9] Tanaka Y, Yuasa J, Baba M, Tanikawa T, Nakagawa Y, Matsuyama T. Temperature-dependent bacteriostatic activity of *Serratia marcescens*. *Microbes and Environments*, 2004, 19(3): 236-240.
- [10] Zhao G, Winkler ME. An *Escherichia coli* K-12 *tktA tktB* mutant deficient in transketolase activity requires pyridoxine (vitamin B₆) as well as the aromatic amino acids and vitamins for growth. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(19): 6134-6138.
- [11] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [12] Tricot GJ, Jayaram HN, Lapis E, Natsumed Y, Nichols CR, Kneebone P, Heerema N, Weber G, Hoffman R. Biochemically directed therapy of leukemia with tiazofurin, a selective blocker of inosine-5'-phosphate dehydrogenase activity. *Cancer Research*, 1989, 49: 3696-3701.
- [13] Parks Jr RE, Aganwal RP. 9 Nucleoside diphosphokinases. *The Enzymes*, 1973, 8: 307-334.
- [14] Toyabe S, Watanabe-Nakayama T, Okamoto T, Kudo S, Muneyuki E. Thermodynamic efficiency and mechanochemical coupling of F₁-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(44): 17951-17956.
- [15] Qu L, Sun X, Xiang J, Hong X, Zhang J. Advances in study on heat shock protein. *Advances in Marine Science*, 2004, 22(3): 385-391. (in Chinese)
- 曲凌云, 孙修勤, 相建海, 洪旭光, 张进兴. 热休克蛋白研究进展. *海洋科学进展*, 2004, 22(3): 385-391.
- [16] Audibert F. Adjuvants for vaccines, a quest. *International Immunopharmacology*, 2003, 3: 1187-1193.
- [17] Mayer MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, 2013, 38(10): 507-513.
- [18] Begic S, Worobec EA. Regulation of *Serratia marcescens ompF* and *ompC* porin genes in response to osmotic stress, salicylate, temperature and pH. *Microbiology*, 2006, 152: 485-491.
- [19] Smith SGJ, Mahon V, Lambert MA, Fagan RP. A molecular swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *Fems Microbiology Letters*, 2007, 273(1): 1-11.
- [20] Williamson NR, Simonsen HT, Harris AKP, Leeper FJ, Salmond GPC. Disruption of the copper efflux pump (CopA) of *Serratia marcescens* ATCC 274 pleiotropically affects copper sensitivity and production of the tripyrrole secondary metabolite, prodigiosin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2006, 33: 151-158.
- [21] Qadri SMH, Williams RP. Induction of prodigiosin biosynthesis after shift-down in temperature of nonproliferating cells of *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology*, 1972, 23(4): 704-709.
- [22] Kalivoda EJ, Stella NA, Aston MA, Fender JE, Thompson PP, Kowalski RP, Shanks RMQ. Cyclic AMP negatively regulates prodigiosin production by *Serratia marcescens*. *Research in Microbiology*, 2010, 161(2): 158-167.
- [23] Casullo de Araújo HW, Fukushima K, Takaki GMC. Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost substrate. *Molecules*, 2010, 15: 6931-6940.

Effect of temperature on prodigiosin synthesis in *Serratia marcescens*

Hong Xu , Meijuan Xu , Taowei Yang , Zhiming Rao *

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education , School of Biotechnology , Jiangnan University , Wuxi 214122 , Jiangsu Province , China

Abstract [Objective] To study the effect of temperature on prodigiosin synthesis in *Serratia marcescens* JNB5-1. [Methods] Different proteins obtained after culturing *S. marcescens* JNB5-1 at 28 °C and 37 °C were separated and identified through two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. Subsequently , 7 of the proteins were further analyzed by real-time qPCR. [Results] We identified 16 different proteins. Among them , prodigiosin biosynthetic enzymes (O-methyl transferase and Oxidoreductase) and proteins related with the precursor substances (proline , methionine , serine , 2-Octenal and Malonyl-CoA) of the prodigiosin biosynthetic were significantly down-expressed at 37 °C. Heat shock protein (Hsp60) and superoxide dismutase were up-expressed at 37 °C. The results of real-time qPCR show that the mRNA transcriptional levels of *o-methyl transferase* , *oxidoreductase* and *transketolase* at 37 °C were all lower than that at 28 °C. [Conclusion] *S. marcescens* JNB5-1 could produce prodigiosin at lower temperature (28 °C) but not at higher temperature (37 °C) . Higher temperature probably inhibited the expression of enzymes related with prodigiosin biosynthesis.

Keywords: O-methyl transferase , Oxidoreductase , real-time qPCR , temperature regulation , *Serratia marcescens*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-10-0459) , by the National Basic Research Program of China (973 Program) (2012CB725202) , by the High-tech Research and Development Programs of China (2011AA02A211) , by the National Natural Science Foundation of China (21276110) , by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (JUSRP51306A) and by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

* Corresponding author. Tel: +86-510-85916881; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

Received: 17 July 2013/Revised: 3 December 2013