

长双歧杆菌 NCC2705 葡萄糖与乳糖代谢 的比较蛋白质组学

何湘^{1**}, 刘大伟^{1**}, 孙忠科¹, 王芳¹, 姜铮¹, 赵红庆¹, 陈宣男², 黄留玉¹, 袁静^{*}

(¹军事医学科学院疾病预防控制中心, 北京 100071)

(²吉林大学公共卫生学院, 长春 130021)

摘要:【目的】以本实验室前期构建的长双歧杆菌 NCC2705 菌株蛋白质参考图谱为基础, 研究长双歧杆菌发酵乳糖和葡萄糖的比较蛋白质组学。【方法】采用 ImageMaster 2D Elite Platinum Version 5.0 比较分析 3 倍以上蛋白差异点; 利用 MALDI-TOF 进行差异蛋白鉴定, 每个蛋白质点的肽指纹图谱在长双歧杆菌 NCC2705 菌株的蛋白质数据库用 Mascot 进行检索; 采用 Pro-Q 磷酸化试剂进行磷酸化蛋白的染色。【结果】鉴定到 31 个蛋白表达发生显著变化, 在乳糖发酵中 14 个蛋白上调 17 个蛋白下调。这些蛋白为亲水性酸性蛋白, 它们基因的 CAI 值均在 0.5 以上, 主要包括糖代谢相关蛋白、应激蛋白、转录和翻译相关蛋白, 还有一些未知功能的蛋白。此外, 有两个蛋白: 转醛缩酶 (BL0715, transaldolase, tal) L3 蛋白点和丙酮酸激酶 (BL0988, pyruvate kinase, pyk) G9 蛋白点发生了磷酸化作用。【结论】长双歧杆菌 NCC2705 在乳糖中生长快于葡萄糖, 它们的降解途径是相同的; 转醛缩酶和丙酮酸激酶发生了翻译后修饰作用, 推测转醛缩酶在 43T 和 47S 发生了磷酸化, 而丙酮酸激酶在 65S 发生了磷酸化。

关键词: 比较蛋白质组; 乳糖代谢; 双向电泳; Pro-Q Diamond 染色; MALDI-TOF; 磷酸化蛋白
中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1451-08

双歧杆菌 (*Bifidobacteria*) 属于放线菌科双歧杆菌属, 严格厌氧, 具有独特的果糖-6-磷酸盐磷酸酮酶, 是微生物生态学研究的核心, 对宿主具有生物屏障、营养、免疫、控制内毒素血症、延缓衰老、抗肿瘤等生理作用, 是全世界医学、营养及保健行业研究的热点之一。双歧杆菌主要寄居的微生态环境是胃肠道, 在临床上可治疗胃肠道菌群失调及乳糖不耐症^[1, 2]。

细菌发酵乳糖是乳糖在β-半乳糖苷酶的作用下, 被水解成葡萄糖和半乳糖, 然后半乳糖再转化为葡萄糖。在乳糖耐受和不耐受人群体内, 该水解过程的程度和速率是不同的, 不耐症人群体内可以更快和更多地产生短链脂肪酸和乙酸产物。乳糖的水解在乳糖发酵中不是一

个限速步骤, 因为在结肠中细菌产生的β-半乳糖苷酶是很丰富的, 乳糖后续的发酵过程才是至关重要的步骤^[3]。已报道双歧杆菌只通过一条代谢途径发酵葡萄糖, 即 Bifid Shunt, 对于乳糖代谢, 认为长双歧杆菌能使用乳糖作为唯一的碳源, 但是细胞对乳糖的摄取和受乳糖调控的蛋白至今尚未确定。2006 年, 本研究与雀巢公司合作, 建立了长双歧杆菌 NCC2705 葡萄糖代谢的蛋白质组参考图谱^[4], 系统地进行了 NCC2705 全菌体蛋白的研究。因此, 本工作根据前期已建立的 NCC2705 葡萄糖代谢的蛋白质组参考图谱, 采用比较蛋白质组学的方法研究细菌的乳糖/葡萄糖代谢, 检测和鉴定乳糖发酵相关的蛋白, 为进一步解释乳糖不适症的机制奠定基础。

基金项目: 国家“863 计划”(2007AA02Z118); 国家自然科学基金(30771809)

*通讯作者: Tel: +86-10-66933356; E-mail: yuanjing6216@sohu.com

作者简介: **为并列第一作者。何湘(1978-), 女, 吉林长春人, 助理研究员, 博士, 主要从事微生物功能基因组学研究,

E-mail: hexiang_spring@yahoo.com; 刘大伟(1981-), 男, 山东济宁人, 博士, 主要从事微生物功能基因组学研究, E-mail: lddal@126.com

收稿日期: 2008-04-24; 修回日期: 2008-07-11

1 材料和方法

1.1 菌株、培养基和生长条件

长双歧杆菌 (*B. longum*) NCC2705 由瑞士 Nestle Research Center Lausanne 惠赠。菌种活化采用含 0.05% L-半胱氨酸的 De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) 培养基, 于 37 °C 充 N₂ 的厌氧罐中厌氧培养 14 h; 然后分别以 1% 接种量接种 NCC2705 于含 10 g/L 葡萄糖或 10 g/L 乳糖的改良的 Garch 培养基中, 37 °C 厌氧培养至稳定期, OD_{600} 为 0.9 时, 8000 × g 在 4 °C 下离心 10 min 收集菌体, 用预冷的 40 mL 低盐清洗缓冲液 (3 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L KH₂PO₄, 68 mmol/L NaCl, 9 mmol/L NaH₂PO₄) 洗菌体 4 次, 用于制备全菌体蛋白。

1.2 长双歧杆菌发酵乳糖/葡萄糖生长曲线的测定

分别配制含碳源为 10 g/L 葡萄糖或 10 g/L 乳糖的改良的 Garch 培养基, 以 1% 接种量接种长双歧杆菌 NCC2705 于 37 °C 厌氧培养, 3 h 后每隔 2 h 取样测定 OD_{600} , 绘制生长曲线。

1.3 全菌体蛋白样品的制备

全菌体蛋白样品的制备方法基本同文献[4]。具体是分别将发酵葡萄糖和乳糖的长双歧杆菌 NCC2705 菌体细胞沉淀重悬于 5 mL 裂解液 (尿素 7 mol/L, 硫脲 2 mol/L, CHAPS 4% (W/V), DTT 50 mmol/L), 加入蛋白酶抑制剂半片 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)。在冰浴条件下, 采用 Sonifier 750 超声 10 min, 条件为: 2 s/2 s, 30% 振幅, 然后 20000 × g (Sigma 3K12 离心机, Sigma, St. Louis, MO, USA) 离心 20 min 去除不溶性沉淀^[5]。收集上清, 用 2-D Quant Kit (GE) 按说明书方法测定蛋白质浓度, 按每管 1 mg 分装样品, -70 °C 保存备用。

1.4 双向电泳及凝胶电泳分析

IPGphor 第一向等电聚焦电泳条件主要参照文献[6]描述的方法进行, 使用 3 个不同梯度 pH3-10、pH4-7 和 pH4.5-5.5 的 IPG 胶条, 等电聚焦程序为: 30 V 重吸胀 12 h, 500 V 1 h, 1000 V 1 h, 8000 V 至等电聚焦完成。第二向垂直板 SDS-PAGE (12.5%) 电泳, 于 30 mA/胶条电泳 4 h。考马斯亮蓝 G-250 染色后, 双向电泳凝胶经 ImageScanner 扫描仪扫描保存图像, 并经 ImageMaster 2D Platinum version 5.0 软件进行分析, 根据蛋白点的密度确定其相对丰度, 以蛋白点丰度差异在 3 倍以上的蛋白点为差异蛋白。

1.5 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, 按照文献[7]描述的方法, 采用 50 μL 的 25 mmol/L (NH₄)₂CO₃/50% 乙腈 (ACN) 对切取的胶块在室温下脱色 30 min, 重复 3 次; 用 3 μL 10 ng

胰酶于 37 °C 酶切 12 h 进行胶内蛋白酶切。将肽段提取液溶于 2 μL 0.5% 三氟乙酸中。MALDI-TOF MS 测定在波长为 337 nm, 氮激光的 Bruker REFLEXTM 质谱仪上进行, 基质为 α-氰基-4-羟基肉桂酸 (α-CCA) 溶于含 0.1% 三氟乙酸的 50% 乙腈的饱和溶液。取 1 μL 基质溶液与 1 μL 肽段提取液等体积混合, 点于 Score 384 靶上, 送入离子源, 在加速电压 20 kV, 反射电压为 23 kV 的条件下进行检测。PeakClean 软件 (<http://www.proteomics.com.cn/tools/Pk-Clean/>) 用于去除基质、胰酶自切峰等污染峰。

1.6 蛋白质鉴定

蛋白质的鉴定程序主要参考文献[4]的方法。登陆互联网 (<http://www.matrixscience.com>), 用 Mascot v1.7.02 程序在 NCBI 非冗余的全细菌基因组数据库 (NCBI nr v050623, 2564994 序列) 和已建立的本地化的长双歧杆菌 NCC2705 基因组数据库 (v050126, 1727 序列) 中, 对 MALDI-TOF 质谱检测得到的每个肽质量指纹图谱进行检索。查询参数为: 可接受的肽段分子量误差为 ±3 Da, 每个肽允许有 1 个不完全裂解位点, Mass tolerance 为 0.2 Da; 氨基酸固定修饰方式选择 Carbamidomethyl (C) 修饰、可变修饰方式选 Oxidation (M) 修饰; 通常鉴定标准为分子量在 20 kDa, 匹配率为 20% 以上。鉴定阈值参考 Mascot 结果的有效 *p* 值 (*p* < 0.05)。对于每个蛋白, 匹配肽段应在五个肽段以上, 序列覆盖率大于 15% 为有效鉴定。

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^[8,9] 软件进行分析。

1.8 Pro-Q 染色进行迁移蛋白点的磷酸化分析

以位置发生迁移的蛋白点为中心, 取 2.0 cm × 2.0 cm 大小的 2-D 胶块, 进行 Pro-Q Diamond 磷酸蛋白染色 (Molecular Probes, Eugene, OR), 操作方法按照试剂盒说明书进行, 采用 Typhoon Ty9410 扫描仪 (GE healthcare Life Sciences) 进行荧光扫描观察磷酸化蛋白。磷酸肽和磷酸化位点在 *Bacillus subtilis* 的 PHOSIDA 数据库 (www.phosida.com) 进行分析和查询^[10,11]。

2 结果

2.1 长双歧杆菌发酵葡萄糖和乳糖对生长速度的影响
分别以 1% 接种量接种 NCC2705 于含 10 g/L 葡萄糖/乳糖的 Garch 培养基, 于 3 h 后每隔 3 h 取样测

定 OD_{600} , 结果表明 NCC2705 在乳糖中生长较在葡萄糖中生长快, 但均在 14 h 时达到稳定期 (数据未显示)。因此, 收集发酵葡萄糖和乳糖 14 h 后样品进行比较蛋白质组学研究。

2.2 长双歧杆菌 NCC2705 在乳糖和葡萄糖中生长的双向电泳图谱

为了确定乳糖发酵的代谢途径, 我们比较了 *B. longum* NCC2705 在乳糖或葡萄糖中生长后的双向电泳图谱。用 pH4-7 和 pH4.5-5.5 的 IPG 胶条进行一向分离, 接着用 12.5%

SDS-PAGE, 结果见图 1。

B. longum NCC2705 发酵乳糖和葡萄糖后, 菌体的 2-DE 模型是高度相似的, 许多标记性的点都有对应点。根据本实验室已构建的长双歧杆菌 NCC2705 菌株在葡萄糖代谢中的蛋白质参考图谱^[4], 与葡萄糖代谢相比, 乳糖代谢的双歧途径中所有的酶在胶图中都存在, 这表明细胞内乳糖与葡萄糖是通过相同的降解途径进行的。

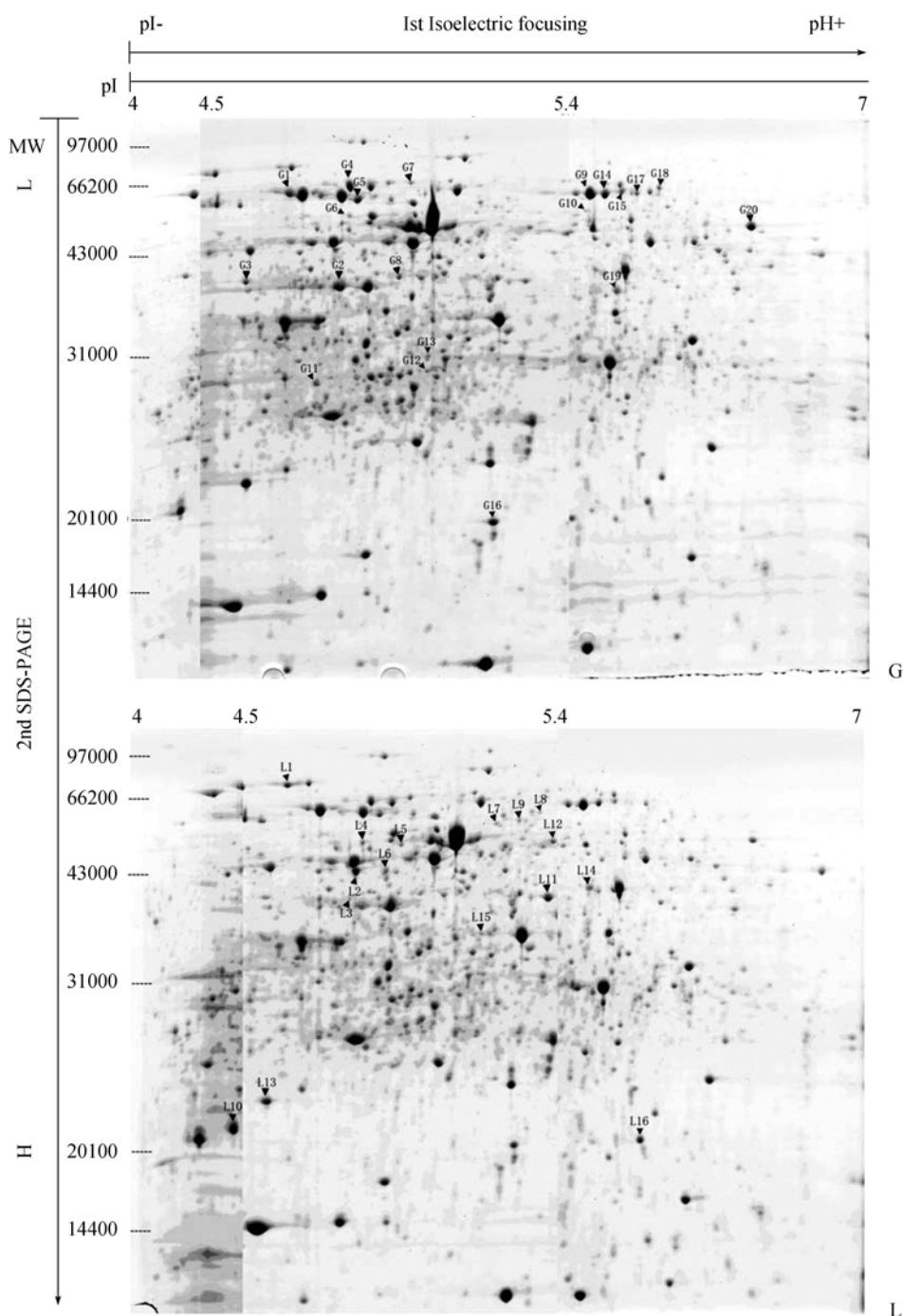


图 1 *B. longum* NCC2705 在乳糖和葡萄糖中生长的双向电泳图谱

Fig. 1 Two-dimensional gel electrophoresis of the whole cell proteins of *B. longum* cultivated in lactose or glucose. G: Glucose; L: Lactose.

2.3 乳糖/葡萄糖代谢中差异表达的蛋白

用 ImageMaster 2D Elite Platnum 5.0 软件对所得到的全细胞蛋白的双向电泳图谱进行点检测及匹配, 分析所有蛋白质点的表达情况, 共鉴定到 31 个蛋白具有 3 倍以上变化 (表 1 和图 1), 在乳糖发酵中 14 个蛋白上调

17 个蛋白下调。这些蛋白点在浓度和/或位置有明显的不同, 浓度增加或减少, 表明蛋白受乳糖诱导或抑制, 导致表达量上调或下调; 而位置的差异可能是由于氨基酸改变和/或发生一些小的缺失造成的, 但也不排除一些变体是由于两种模式中不同的翻译后修饰造成的结果。

表 1 *B. longum* NCC2705 乳糖发酵中发生变化的蛋白
Table 1 List of lactose-regulated proteins in *B. longum* NCC2705

Spot No.	Locus	NCBI GI identifier	Scores	COG	Protein Description	Theor. Mass/Da	Theor. pI	Gene	Exp.MW /kDa	Exp pI
Proteins up-regulated during lactose growth:										
L1	BL0520	gi 23465109	346	O	DnaK protein	66902	4.72	dnaK	80.971	4.7
L2	BL1673	gi 23466221	57	C	possible lactaldehyde reductase	40598	4.74	fucO	48.63	4.8
L3	BL0715	gi 23465295	155	G	Transaldolase	39682	4.87	tal	42.431	4.77
L4	BL0002	gi 23464630	357	O	Chaperone	56803	4.72	groEL	57.094	4.81
L5	BL1187	gi 23465753	46	G	probable phosphoglucomutase or phosphomannomutase	48630	4.93	mrsA	55.84	4.88
L6	BL0715	gi 23465295	163	G	Transaldolase	39682	4.87	tal	48.269	4.85
L7	BL1015	gi 23465584	486	K	transcription elongation factor GreA	17125	4.82	greA	17.405	4.76
L8	BL0469	gi 23465061	92	J	glutamyl-tRNA synthetase	56646	5.04	gltX	64.175	5.15
L9	BL0478	gi 23465070	85	F	formate--tetrahydrofolate ligase	53994	5.04	fhs	62.198	5.13
L10	BL0618	23465202	446	P	hypothetical protein in DPS family	17765	4.57		20.111	4.65
L11	BL1644	gi 23466192	177	M	UDP-glucose 4-epimerase	37281	5.13	galE1	40.684	5.19
L12	BL0530	gi 23465118	178	E	ketol-acid reductoisomerase	39049	5.1	ilvC1	38.21	5.21
L13	BL1442	23465998	444	O	possible peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	19925	4.7		21.636	4.7
L14	BL0002	23464630	357	O	Chaperone	56803	4.72	groEL	57.094	4.81
L15	BL0978	gi 23465547		G	LacZ	114777	4.86	lacZ	35867	5.52
L16	BL1664a	23466212	857	O	hypothetical protein BL1664a	15161	5.32		19.321	5.76
Proteins down-regulated during lactose growth:										
G1	BL0002	gi 23464630	355	O	Chaperone	56803	4.72	groEL	70.14	4.72
G2	BL0715	gi 23465295	160	G	Transaldolase	39682	4.87	tal	41.518	4.81
G3	BL1222	gi 23465790	564	L	hypothetical protein with N-terminal similarity to NADH pyrophosphatase	45466	5.39		38.59	4.63
G4	BL1386	gi 23465947	28	E	DppA2	59024	5	dppA2	70.859	4.83
G5	BL1076	gi 23465645	32	E	glutamine synthetase I	53206	4.81	glnA1	66.124	4.84
G6	BL1786	gi 23466330	358	H	S-adenosylmethionine synthetase	43748	4.85	metK	59.911	4.83
G7	BL0953	gi 23465526	10	H	glutamine-dependent NAD(+) synthetase	60925	4.75	nadE	72.326	4.94
G8	BL1098	gi 23465667	63	J	elongation factor G	78087	4.83	fusA	45.717	4.92
G9	BL0988	gi 23465557	105	G	pyruvate kinase	55233	5.49	pyk	64.816	5.3
G10	BL0228	gi 23464835	110	M	possible fused dTDP-4-keto-L-rhamnose reductase and dTDP-4-keto-6-deoxy glucose-3, 5-epimerase enzyme	52894	5.19		57.642	5.34
G11	BL0790	gi 23465366	422	H	probable dihydroorotate dehydrogenase electron transfer subunit	29959	4.72	pyrK	28.702	4.76
G12	BL0716	gi 23465296	249	G	Transketolase	76096	4.97	tkt	28.644	4.97
G13	BL0429	23465027	248	R	possible cobyrinic acid synthase CobQ	27693	4.95		28.94	4.94
G14	BL0988	23465557	107	G	pyruvate kinase	55233	5.49	pyk	63.857	5.36
G15	BL0735	23465313	679	F	PurH	58377	5.36	purH	66.236	5.59
G16	BL1152	gi 23465718	327	T	autoinducer-2 production protein LuxS	15643	5.29		18.984	5.11
G17	BL1800	23466344	684	F	adenylosuccinate lyase	53708	5.33	purB	61.469	5.74
G18	BL0402	23465000	685	J	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B	55137	5.44	gatB	63.845	5.83
G19	BL0550	23465135	148	G	fructose-bisphosphate aldolase	38325	5.31	fba	40.989	5.65
G20	BL0673	23465255	716	G	ATP binding protein of ABC transporter for sugars	40759	5.85	msiK	52.119	6.35

鉴定到的 31 个蛋白包括糖代谢相关蛋白、能量产生和转化蛋白、应激蛋白、与辅酶转运和代谢相关蛋白、氨基酸转运与代谢相关蛋白、转录和翻译相关蛋白、细胞壁/膜产生相关蛋白、核酸转运和代谢相关蛋白、脂肪酸和磷脂代谢相关蛋白;此外,还有信号转导机制相关蛋白自诱导子-2 产生蛋白 LuxS (BL1152, autoinducer-2 production protein LuxS)。

在乳糖发酵中,糖代谢相关蛋白主要是双歧途径 (bifid shunt) 的酶:如转醛缩酶 (BL0715, transaldolase-tal)、可能的葡萄糖磷酸异构酶或磷酸甘露糖异构酶 (BL1187, probable phosphoglucomutase or phosphomannomutase, mrsA)、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (BL0444, 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating II, gnt)、转酮酶 (BL0716, transketolase) 及磷酸甘油酸异构酶 (BL1656, phosphoglycerate mutase);能量产生和转化蛋白:乳糖还原酶 (BL1673, possible lactaldehyde reductase, fucO)。此外,我们还检测到乳糖操纵子的 LacZ (BL0978) 在乳糖发酵中被显著诱导表达。这些蛋白的表达上调也说明了长双歧杆菌 NCC2705 对乳糖的利用速度快,糖代谢活跃,因而生长速度较在葡萄糖中生长快。

2.4 鉴定蛋白的 CAI 分析和蛋白的 GRAVY 值

通常同义密码子并不是以同样的频率使用,密码子的使用偏好性是与 tRNA 和基因表达水平相关。高表达的基因主要使用具有高丰度的 tRNA,而弱表达的基因通常使用非喜好密码子。CAI 值可评价同义密码子的偏向性,1.0 表示使用最适密码子的最大偏好性,CAI 值越低则表示该基因采用不适密码子的概率越大。因此,通过 CAI 值可预测基因可能的表达丰度。对鉴定到的蛋白进行基因的 CAI 值分析,其 CAI 值均在 0.5 以上,表明这些蛋白的表达是高丰度的。尤其是 chaperone、transaldolase 和 transketolase 在全蛋白表达中丰度分别排在 2, 5 和 10 位。

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。具强疏水性蛋白,如膜蛋白等,在标准条件下是很难在胶上观察到的。GRAVY 可以使用 CodonW 软件进行计算。所有鉴定蛋白的 GRAVY 都小于 0,表明这些蛋白为亲水性酸性蛋白。

2.5 鉴定蛋白的翻译后修饰作用

双歧杆菌中很多蛋白质都存在着翻译后修饰^[4],它

们发挥着重要的生理功能,蛋白质组学分析可以完整的了解蛋白质的翻译后修饰。在本试验中,有两个蛋白:转醛缩酶 (Transaldolase) 和甲酸-四氢叶酸连接酶 (formate--tetrahydrofolate ligase) 出现了显著的位置差异,可能是翻译后蛋白断裂或别的修饰造成的。在两种糖代谢的双向图谱中,有 3 个差异蛋白点 L3(MW:42.431kDa/pI:4.77)/L6(MW:48.269kDa/ pI: 4.85) 和 G2(MW:41.518kDa/pI:4.81) 都鉴定为转醛缩酶 Transaldolase,其中 L3 和 L6 蛋白点在乳糖发酵时上调,G2 蛋白对应点下调,软件分析它们的丰度,L3 丰度是 41.244 上调了 30.933,L6 丰度是 27.496 上调了 16.173,而 G2 丰度是 118.150 上调了 78.77,因此,Tal 在乳酸发酵中总体表现为下调,但比较让人感兴趣的是 L3 位于 G2 的酸性端,且分子量变大,所以推测 L3 很有可能是 G2 磷酸化修饰的形式;此外,丙酮酸激酶 (BL0988, pyruvate kinase, pyk) 也具有翻译后修饰的特点,在乳酸发酵中两个蛋白点 G9 和 G14 蛋白表达下调,也可能发生了磷酸化修饰。这些结果表明这些蛋白可能经过了翻译后修饰,而乳糖诱导了转醛缩酶、分子伴侣和抑制了丙酮酸激酶各种形式之间的转变。

为了进一步确定这两种蛋白的翻译后修饰是否发生了磷酸化作用,本研究以电泳图谱中发生迁移的蛋白点为中心切取 2.0 cm×2.0 cm 大小的胶图,采用 Pro-Q Diamond 试剂进行磷酸化染色,结果显示转醛缩酶 L3 蛋白点和丙酮酸激酶 G9 蛋白点发生了磷酸化作用(图 2),但是不幸的是我们采用 MALDI-TOF MS 鉴定没有检测到磷酸化肽段及磷酸化位点。

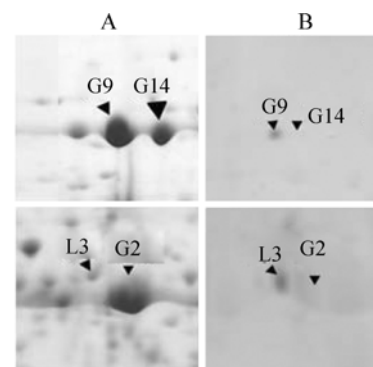


图 2 乳糖/葡萄糖代谢中的差异表达的磷酸化检测

Fig. 2 Proteins with altered mobility were tested for phosphorylation. A: Close-up view of the 2-D gels (G: *B. longum* NCC2705 cultivated in Glucose; L: *B. longum* NCC2705 cultivated lactose). B: Pro-Q Diamond Stain analysis of Tal and Pyk phosphorylated in response to incubation in glucose or lactose.

Macek 及其同事们鉴定了 *B. subtilis* 的磷酸化蛋白质组^[10], 鉴定的磷酸肽的详细信息可在 PHOSIDA 数据库(www.phosida.com)进行查询。他们鉴定到 *B. subtilis* 的 Tal 蛋白有两个磷酸化位点: LYQPQDATTNPSLILNAAQIPEYRK 序列中第 33 位的苏氨酸和 37 位的丝氨酸发生了磷酸化。通过 BLAST 进行序列的同源比较分析, *B. longum* NCC2705 的 Tal 序列与 *B. subtilis* 的 Tal 很相似 (同源性 30%以上), 有趣的是 *B. longum* NCC2705 的 Tal 也具有 TTNPS 序列, 属于激酶基序 CK1(S/T-X-X-S); 对丙酮酸激酶的序列分析发现 pykA 具有 LNFSH 序列, 属于激酶基序 NEK6 (L-X-X-S/T), 所以, 我们推测 *B. longum* NCC2705 的 Tal 磷酸化位点可能是 43T 和 47S, 丙酮酸激酶的磷酸化位点可能是 65S, 这表明蛋白在发挥作用的过程中磷酸化形成了磷酸酶中间体。

3 讨论

乳糖不耐症是指小肠内乳糖酶对乳糖不完全降解而引起的胃肠道症状, 世界上大部分成人肠道中的乳糖酶是非持续性产生的, 对乳糖消化不良, 导致乳糖不适症。目前对乳糖不耐症的病理学了解尚不清楚, 乳糖在结肠中的发酵可能是乳糖不耐症病原学的一个主要因素。最近研究发现^[12], 结肠内除人体产生的乳糖酶活性外, 微生物尤其是乳酸菌对乳糖的瞬时发酵可能在乳糖不耐症中起重要作用, 因此, 乳酸菌及双歧因子作为食品添加剂, 已经用于减轻乳糖不适症的治疗。在长双歧杆菌中, 乳糖代谢与葡萄糖代谢的主要途径是相似的, 因此, 对细菌在葡萄糖和乳糖代谢的比较蛋白质组学为分析和鉴定参与乳糖降解过程的蛋白提供了一个很好的模型系统。

不同碳源对基因表达的调控通常包括一个碳代谢产物抑制的调控机制。由于在双歧杆菌的基因组中既没有明显的代谢产物抑制元件如 *ccpA* 类的同源体, 也没有可以发挥作用的 *cis* 代谢产物反应元件 (*cre*) 或 HPr 激酶, 因此这种调控机制在 *B. longum* NCC2705 中是否存在尚不清楚。*B. longum* 的基因组包含四个可能的乳糖操纵子^[13]。其中两个操纵子已经被鉴定, 包括 LacI-调控子 β -半乳糖苷酶类, 及 ABC 转运基因 (BL0258-BL0260 和 BL1167-BL1169)。第三个操纵子包括编码可能的乳糖透性酶 (BL0976)

和 β -半乳糖苷酶 (BL0978) 基因。第四种是由 LacI 调控子类基因 (BL1774) 和一个典型的 β -半乳糖苷酶类基因 (BL1775) 组成的可能的非功能性操纵子。本研究鉴定到在长双歧杆菌中存在第三个操纵子, BL0978 在乳糖发酵中被显著诱导表达, 可以认为长双歧杆菌 NCC2705 在肠道中产生大量的 β -半乳糖苷酶 (BL0978) 分解乳糖。

双歧杆菌利用胞外的 β -D-半乳糖苷酶将乳糖水解为单糖葡萄糖和半乳糖, 然后再通过各自的转运系统进入胞内^[14,15]。对于乳糖的吸收, 目前已报道了两个系统, 包括金黄色葡萄球菌的 PEP:乳糖 PTS 系统和大肠杆菌与弗罗因德(氏)枸橼酸杆菌的质子同向转移系统^[16,17]。Krzewinski 等人^[18]认为在双歧杆菌中乳糖利用系统是组成型的, 乳糖通过与一个不受 IPTG 诱导的质子结合同向转移。在本研究中, 我们鉴定到一个由乳糖介导抑制的转运基因 BL0673 (ATP binding protein of ABC transporter for sugars), 可能是作为葡萄糖: H^+ 同向转移功能。在乳糖发酵过程中, 细胞内 BL0673 基因低水平表达。

本研究还鉴定到了大量的糖代谢相关蛋白, 主要是双歧途径 (bifid shunt) 的酶: 如转醛缩酶 (BL0715, transaldolase, tal) 可能的葡萄糖磷酸异构酶或磷酸甘露糖异构酶 (BL1187, probable phosphoglucomutase or phosphomannomutase, mrsA) 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (BL0444, 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating, gnt) 转酮酶 (BL0716, transketolase) 及磷酸甘油酸异构酶 (BL1656, phosphoglycerate mutase)。这些蛋白的表达上调也说明了长双歧杆菌 NCC2705 对乳糖的利用速度快, 糖代谢活跃, 因而生长速度较在葡萄糖中生长快。

蛋白质的磷酸化是一种可逆的翻译后修饰作用, 具有重要的调控和信号功能。目前已知在真核生物中当信号转导通路中蛋白在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸侧链的羟基发生磷酸化, 是作为关键的翻译后修饰调控作用, 但是在原核生物中蛋白磷酸化的程度以及磷酸化的功能仍然很不清楚。有趣的是, 最近对革兰氏阳性菌和阴性菌的研究发现许多蛋白都具有磷酸化作用, 包括生物合成和代谢相关的酶, 丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的磷酸化信号通常暗示着对重要生命过程的调控, 如毒力的释放等^[19,20], 原核生物中蛋白质的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化通常在与宿主黏附

和感染中起重要的作用^[21,22]。为了确定蛋白点的迁移是否发生了蛋白的磷酸化,我们采用 Pro-Q Diamond 染色法对位置发生迁移的蛋白点进行了磷酸化染色。结果显示转醛缩酶和丙酮酸激酶的翻译后修饰是磷酸化作用,这也是首次发现的双歧杆菌磷酸化蛋白,表明乳糖诱导了转醛缩酶和抑制了丙酮酸激酶磷酸化与非磷酸化形式之间的转变。

因此,我们研究结果发现在长双歧杆菌中乳糖代谢与葡萄糖代谢的主要途径是相似的,乳糖的降解过程的是多种酶参与的一个复杂过程,可以诱导或抑制一系列蛋白的表达和转化。而长双歧杆菌 NCC2705 对乳糖的利用速度快,乳糖代谢活跃,可以作为治疗乳糖不耐症较好的候选菌株。

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 is increased by endotoxin via an upregulation of beta-ligand expression. *J Surg Res*, 2001, 97: 14–19.
- [3] He T, Priebe MG, Zhong Y, *et al.* Effects of yogurt and *bifidobacteria* supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *J Appl Microbiol*, 2008, 104(2): 595–604.
- [4] Yuan J, Zhu L, Liu XK, *et al.* A proteome reference map and proteomics analysis of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5 (6): 1105–1118.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Liao X, Ying TY, Wang HL, *et al.* A two-dimensional proteome map of *Shigella flexneri*. *Electrophoresis*, 2003, 24, 2664–2882
- [8] Comeron JM, Aguade M. An evaluation of measures of synonymous codon usage bias. *J Mol Evol*, 1998, 47, 268–274.
- [9] Drews O, Reil G, Parlar H, Gorg A. Setting up standards and a reference map for the alkaline proteome of the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis*. *Proteomics*, 2004, 4, 1293–1304.
- [10] Macek B, Mijakovic I, Olsen JV, *et al.* The Serine/Threonine/Tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6 (4): 697–707.
- [11] Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, *et al.* Global, in-vivo and site-specific phosphorylation dynamics of signaling networks. *Cell*, 2006, 127, 635–648.
- [12] Parche S, Amon J, Jankovic I, *et al.* Sugar transport systems of *Bifidobacterium longum* NCC2705. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2007, 12(1-2): 9–19.
- [13] Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, *et al.* The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation of human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 14422–14427
- [14] Amaretti A, Bernardi T, Tamburini E, *et al.* Kinetics and metabolism of *bifidobacterium adolescentis* MB239 growing on glucose, galactose, lactose, and galactooligosaccharides. *Appl And Environ Microbiol*, 2007, 73(11): 3637–3644.
- [15] Kim TB, Song SH, Kang SC, *et al.* Quantitative comparison of lactose and glucose utilization in *Bifidobacterium longum* cultures. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(2): 672–675.
- [16] Krzewinski F, Brassart C, Gavini F, *et al.* Characterization of the lactose transport system in the strain *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082. *Current Microbiol*, 1996, 32: 301–307.
- [17] Parche S, Belet M, Rezzonico E, *et al.* Lactose-over-glucose preference in *Bifidobacterium longum* NCC2705: *glcP*, encoding a glucose transporter, is subject to lactose repression. *J Bacteriol*, 2006, 188(4): 1260–1265.
- [18] Krzewinski F, Brassart C, Gavini F, *et al.* Glucose and galactose transport in *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082. *Current Microbiol*, 1997, 35: 175–179.
- [19] Cozzzone AJ. Role of protein phosphorylation on serine/threonine and tyrosine in the virulence of bacterial pathogens. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2005, 9, 198–213.
- [20] Rosen R, Becher D, Büttner K, *et al.* Highly phosphorylated bacterial proteins. *Proteomics*, 2004, 4: 3068–3077.
- [21] Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci*. 2005, 96: 835–843.
- [22] Selbach M, Moese S, Hurwitz R, *et al.* The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and Actin rearrangement by c-Src inactivation. *Embo J*, 2003, 22: 515–528.

Proteomic analysis of *Bifidobacteria longum* strain NCC2705 grown on lactose and glucose

Xiang He^{1**}, Dawei Liu^{1**}, Zhongke Sun¹, Fang Wang¹, Zheng Jiang¹,
Hongqing Zhao¹, Xuannan Chen², Liuyu Huang¹, Jing Yuan^{1*}

¹ Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

² School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: [Objective] Based on a proteomic reference map of the important probiotic organism *Bifidobacteria longum* NCC2705 constructed by our previous research, we compared the proteomic profiles of *Bifidobacteria longum* strain NCC2705 grown on lactose or glucose to identify the catabolic route allowing lactose fermentation. [Methods] We considered the proteins differentially expressed if their relative volume deviated more than 3-fold with ImageMaster 2D Elite version 5.0 software. Interesting spots were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis, and phosphorylation analysis of proteins with mobility changes by Pro-Q Diamond Stain. [Results] The identified spots represent 31 protein entries, 14 up-regulated proteins, 17 down-regulated proteins. These identified proteins, which were hydrophilic proteins and their genes with CAI value above 0.5 represented the most abundant proteins, included key stress proteins, metabolism-related proteins, and proteins related to translation. Two proteins including Tal (BL0715, transaldolase, L3) and Pyk (BL0988, pyruvate kinase, G9) exhibited clear post-translational modification. [Conclusion] Proteomic comparison of glucose- and lactose-grown cells revealed that lactose and glucose were catabolized via the same degradation pathway, and the rate of glucose assimilation was higher than that of lactose. Spot and protein analysis revealed that post-translational modifications might be common in these proteins. Pro-Q Diamond staining analysis revealed that lactose trigger Tal phosphorylation at 43 T /47 S, and inhibited Pyk phosphorylation at 65 S. These proteins were identified for the first time as bifidobacterial phosphoproteins.

Keywords: Comparative proteome; the catabolism of lactose; 2D-PAGE; Pro-Q Diamond staining; phosphoproteins

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA02Z118) and the National Natural Science Foundation of China (30771809)

*Corresponding author. Tel: +86-10-66933356; E-mail: yuanjing6216@163.com

** These authors contributed equally to this work.

Received: 24 April 2008/ Revised: 11 July 2008

《微生物学报》答作者问——关于审稿

问：贵刊的审稿程序是怎样的？一般多长时间可以知道稿件是否被录用？

答：我们的承诺是争取在2个月之内给予答复，5~7个月之内刊出。

- (1) 收到来稿后，首先将请2位专家进行初审，再送主编进行最后的总审，这个过程一般不会超过2个月。如果初审的2位专家的意见分歧较大，编辑部将再请第3位专家进行初审，之后再送主编总审，那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见)，编辑会给作者发出e-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)，作者在返回修改稿后经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者不要在远程系统中看到初审意见时就急于修改稿件。

问：如我的投稿没有被贵刊录用，是否告知退稿原因？对退稿有异议怎么办？

答：本着对每一篇投稿负责的原则，本刊一贯遵循三审制的制度，即：编辑部内审、专家初审、主编总审。所以无论录用和退稿，都会给作者一份比较全面的审稿意见。

- (1) 对于每一篇退稿，我们都会详细写明退稿原因，为您进一步修改论文提供帮助。
- (2) 如您对退稿意见有异议，可以给我们写信表明看法，我刊将请专家予以复审。

问：我可否指定审稿人，或言明请某审稿人回避？

答：您在投稿时可以附上您推荐的审稿人名单，或请予回避的审稿人名单，供编辑部参考，但编辑部是否采纳将视具体情况而定。