

Halomonas aquamarina 盐敏感质膜蛋白组的研究

吴丽娜,林向民,任海霞,王三英*

(厦门大学生命科学学院 生物学系,福建 厦门 361005)

摘要: 革兰氏阴性细菌外膜蛋白对细菌外部环境因素的调节功能已受到高度重视,但有关细菌质膜的作用报道极少。为研究质膜蛋白在抗盐机制中所起的作用,采用蛋白质组学技术比较深海中度嗜盐菌 *Halomonas aquamarina* 在生理(0.56 mol/L NaCl)、较高(1 mol/L NaCl)和高(2 mol/L NaCl)浓度下质膜蛋白差异表达的结果。结果表明,高盐浓度下出现2个新蛋白,质谱分析证明其为ABC转运蛋白。这些发现对从细胞膜整体角度了解细菌的抗盐机理具有重要意义。

关键词: 双向电泳;质谱分析;*Halomonas aquamarina*;质膜蛋白

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005)Sup-0132-03

蛋白质组学是已有20年历史的蛋白质(多肽)谱和基因产物图谱技术的一种延伸。经近年来的迅速发展,蛋白质组技术以其高分辨、高敏感和高通量的分离和鉴定特征,成为生物学研究中的重要研究平台^[1],其中亚蛋白质组学的研究是探讨低丰度功能蛋白质组的重要手段^[2]。由此,膜蛋白质组自然受到高度关注^[3]。膜蛋白质组是指在细胞内所有膜蛋白质的总和,对于革兰氏阴性细菌来说膜蛋白包含了质膜蛋白(CM)和外膜蛋白(OM)2大部分。迄今为止,有关外膜蛋白对细菌外部环境因素的调节功能已有较多的报道^[4],但关于质膜蛋白的作用的专门研究极少。鉴于质膜的位置和功能,探讨其在细菌对外界环境因素的适应性变化中的作用具有重要意义。

H. aquamarina 是一种中度嗜盐的革兰氏阴性细菌,最适生长的盐度为3.4%(0.56 mol/L NaCl),最高能耐受36.3%的盐度。目前有关其质膜蛋白与外界环境渗透压变化的关系尚不清楚,我们在对其外膜盐敏感蛋白质组研究的基础上^[5],采用蛋白质组学技术探讨不同NaCl条件下对该菌质膜蛋白质组的变化影响,旨在对其耐盐机制有进一步的认识。

1 材料与方法

1.1 实验菌株以及细菌培养与收集

实验菌株 *H. aquamarina* 来自国家海洋局第三研究所。按标准配方制备2216液体培养基,其中NaCl依试验目的而异,即加入0.56、1和2 mol/L的NaCl分

别配制成本实验的生理浓度、较高和高盐度的培养基。挑取 *H. aquamarina* 单菌落于标准2216液体培养液中28℃摇床过夜,然后以1:100的比例分别加入至上述3种培养基中,置28℃摇床24 h。离心6 000 g,10 min,收集菌体,用0.8%的盐水洗1~2遍。

1.2 质膜蛋白的提取

参考文献[6]的方法,稍作修改。简述如下:于上述菌体中加入超声破碎缓冲液在冰浴下超声破碎。破碎液于4℃,4 000 g离心20 min收集上清。超速离心100 000 g 40 min,沉淀用2%的月桂酰基肌酸钠悬浮,室温静置40 min。再超速离心100 000 g 40 min,上清即为细菌的质膜蛋白。用Bradford法测蛋白浓度,分装后-20℃下保存。

1.3 SDS-PAGE

采用Laemmli不连续系统,配制SDS-PAGE凝胶和加样缓冲液。浓缩胶为5%,分离胶为12%。电泳结束后考马斯亮蓝R250染色。

1.4 双向电泳与数据分析

按文献[7]方法进行:常规配制IEF凝胶,并预电泳。于20 μg(20 μL)样品中加入4倍量的裂解液,室温放置2 h后上样。IEF聚焦合计7 200 V。第2向电泳前用平衡液平衡10 min,再将管状胶条小心移至5%浓度的浓缩胶上,用1%琼脂糖封好后,加入电泳缓冲液进行电泳。电泳后凝胶用考马斯亮蓝染色。脱色后立即切取目的蛋白点。采用GDS8000pc凝胶成像分析系统扫描,进行图像分析。

1.5 质谱分析

按文献[5]的方法进行。

收稿日期:2005-04-25

基金项目:国际海底区域研究开发“十五”课题

作者简介:吴丽娜(1978-),女,硕士研究生。

*通讯作者:wangpeng@xmu.edu.cn

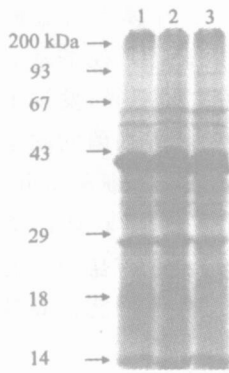


图1 不同盐度对 *H. aquamarina* 质膜蛋白影响的 SDS-PAGE 分析

1、2、3 分别为 0.56、1、2 mol/L NaCl

Fig. 1 1-D electrophoresis map of inner membrane proteins of *H. aquamarina* cultured in different NaCl concentrations

2 结果

2.1 质膜蛋白的 SDS-PAGE 分析

图1示 0.56、1 和 2 mol/L NaCl 浓度生长条件下 *H. aquamarina* 质膜蛋白的 SDS-PAGE 结果. 从图1可见, 相互间未出现明显的差异条带.

2.2 质膜蛋白双向电泳分析

图2示 0.56、1、2 mol/L NaCl 浓度培养条件下该菌质膜蛋白的双向电泳图谱. 对其进行比较, 结果发现在 2 mol/L NaCl 浓度时出现 2 个新蛋白点, 分别命名

为 S1 和 S2, 而其余未见明显差别.

2.3 差异点的比较分析

将上述双向图谱中出现的差异点进行局部放大进行比较, 如图3所示. 从图3可见, 在 0.56 和 1 mol/L NaCl 浓度下, S1 和 S2 几乎不表达, 但在 2 mol/L NaCl 浓度下, S1 和 S2 有明显表达.

2.4 质谱分析鉴定结果

对 S1 和 S2 进行 MALDI-TOF/MS 分析, 得到各自的 PMF 图谱. 根据得到的肽质量指纹图谱数据, 及分子量范围和其它有关参数, 通过网络数据库 (www.matrixscience.com) 查询匹配的蛋白, 结果见表1.

3 讨论

H. aquamarina 是一种革兰氏阴性中度嗜盐菌, 分布于海洋或含盐较高的湖泊中. 因此, 以其为研究对象探讨细菌耐盐机理具有较好的代表意义. 目前有关革兰氏阴性菌细胞膜对外界因素反应的研究多见于外膜蛋白, 而有关细菌质膜的研究报道极少. 我们实验室已对 *H. aquamarina* 外膜耐盐蛋白质组进行了研究, 发现了 11 个差异蛋白^[5]. 但迄今为止, 国内外尚未见到研究其质膜蛋白的报道. 月桂酰基氨基酸钠法是常用的外膜提取法. 采用该法对革兰氏阴性菌膜蛋白进行分离提取, 其中沉淀为主要外膜蛋白, 而上清主要为质膜蛋白. 采用蛋白质组技术比较该菌膜蛋白月桂酰基氨基酸钠可溶性部分在不同盐浓度下表达的差异, 发现了在高盐浓度 (2 mol/L NaCl) 下才明显表达的 2 个差

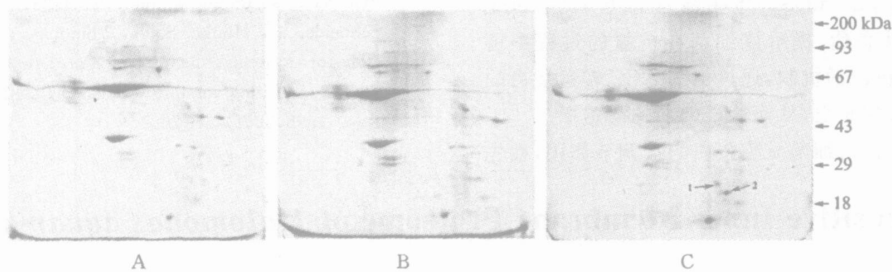


图2 在不同盐浓度培养条件下 *H. aquamarina* 质膜蛋白的双向电泳图谱

A、B、C 分别表示 0.56、1、2 mol/L NaCl

Fig. 2 2-D electrophoresis map of inner membrane proteins of *H. aquamarina* cultured in different NaCl concentrations

表1 差异点的分析鉴定结果

Tab.1 Database searching results of significantly differential spots

编号	肽段匹配数	NCBI 序列号	蛋白名称	菌属	覆盖率/ %	等电点/ 分子量
S1	5	gi 51891897	ABC transporter protein	<i>Symbiobacterium thermophilum</i> IAM 14863	27	9.56/ 25592
S2	4	gi 51893861	ABC transporter protein	<i>Symbiobacterium thermophilum</i> IAM 14863	32	7.3/ 66610

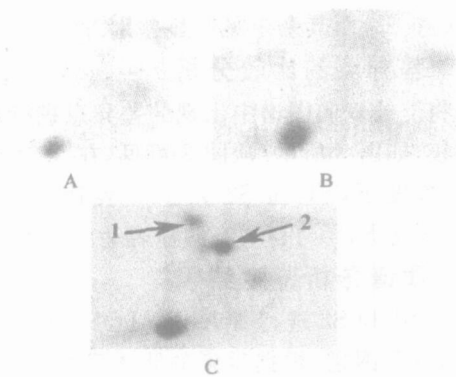


图3 不同盐度中 S1 和 S2(箭头表示)的放大图谱
A、B、C 分别表示 0.56、1、2 mol/L NaCl 浓度

Fig.3 Zoom-in map of S1 and S2 in different NaCl concentrations

异蛋白,命名为 S1 和 S2. 经过 MALDI-TOF/MS 分析,这 2 个质膜蛋白为 ABC 转运蛋白(ATP-binding-cassette transport systems)超家族成员.

ABC 转运蛋白超家族遍布所有生物,它们不仅协助转运营养物质到细胞内,而且涉及其他不同的功能,包括信号转换、蛋白分泌、药物或抗生素抗性、抗原表达、细菌致病与孢子形成等. 此家族成员数量繁多,底物多样,但其共同特点是都能结合并水解 ATP,然后应用释放的能量转运各种分子通过细胞膜^[7]. 同时 ABC 转运系统也属于药物溢出系统(drug efflux pump system)中的一类,它通过 ATP 的水解将进入细胞质内的药物或者有毒的物质泵出膜外,从而保持了胞内生理条件的稳定. 在 *H. aquamarina* 质膜蛋白质双向图谱中,S1 和 S2 都在高盐浓度(2 mol/L NaCl)下显著性表达,提示该细菌在抗盐的过程中可能存在类似于抗药的机制,通过加大 ABC 转运蛋白的表达,增加盐分的泵出,从而稳定内部的渗透压.

总之,为了探讨细菌质膜蛋白的盐调节作用,在先前完成 *H. aquamarina* 外膜蛋白盐敏感蛋白质组研究的基础上,进一步探讨了月桂酰基氨基酸钠可溶性部分在不同盐浓度表达中的差异,发现了有 2 个质膜蛋白发生明显变化,这对了解细菌的耐盐机制具有重要价值. 由于我们采用的菌株、细菌培养条件、膜蛋白的分离纯化方法均一致,因此实验具有较好的可比性. 与外膜蛋白结果比较提示,与盐调节有关的蛋白质在外膜明显高于质膜,但后者可能在高盐调节中起到更重要的作用.

参考文献:

- [1] 王三英,吴谋胜,陈晋安,等.嗜水气单胞菌蛋白质组分子解剖图谱的初步建立[J].厦门大学学报(自然科学版),2003;42:139-143.
- [2] Pattern W F. Proteome analysis II. Protein subcellular redistribution:linking physiology to genomics via the proteome and separation technologies involved[J].J. Chromatogr. B,1999,722:203-223.
- [3] Chen Z J, Peng B, Wang S Y, et al. Rapid screening of highly efficient vaccine candidates by immunoproteomics[J]. Proteomics,2004,4(10):3203-3213.
- [4] Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited[J]. Microbiol Mol. Biol. Rev.,2003,67:593-696.
- [5] 林向民,王风平,王三英.不同盐度对 *Halomonas aquamarina* 外膜蛋白表达的影响[J].厦门大学学报(自然科学版),2005,44(增):128-131.
- [6] Wu Y J, Wang S Y, Peng X X. Serum acute phase response (APR)-related proteome of loach to trauma[J]. Fish Shellfish Immunol,2004,16(3):381-389.
- [7] Schneider E, Hunke S. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/ domains[J]. FEMS Microbiol Rev.,1998,22(1):1-20.

Salt-sensitive Inner Membrane Proteome of *Halomonas aquamarina*

WU Li-na, LIN Xiang-min, REN Hai-xia, WANG San-ying*

(Dept. of Biology, School of Life Sciences, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract: Bacterial membrane is a nature barrier for resistance of disadvantage solutes outside, which controls the currency of solutes from each sides. The proteins insetting the membrane may exert their function by themselves or cooperation with other proteins in cytoplasm or in periplasmic space. For understanding of the mechanism of resistance-salt-stress, proteomic methodologies were applied to investigate the expression pattern of inner membrane proteins of *H. aquamarinas* at different NaCl concentrations. The different protein spots were determined by 2-DE, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) and bioinformatics. Our results provide a primary data for the mechanism of resistance of halophiles bacterium in salt-stress conditions.

Key words: two-dimensional electrophoresis; mass spectrum analysis; *Halomonas aquamarina*; inner membrane protein