

壳聚糖诱导下浅玫瑰色链霉菌菌体蛋白差异表达分析

卢梦琪¹, 蒋霞云^{1,2}, 司蕊蕊¹

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海市水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 建立了有效分析浅玫瑰色链霉菌菌体全蛋白质的方法, 使用分离范围为 pH 4~7 的 IPG 胶条、2D clean-up 试剂盒法纯化方法、80 μg 蛋白质上样量和银染的双向电泳技术, 获得了低背景、高分辨率和重复率、无明显条纹的浅玫瑰色链霉菌全蛋白质双向电泳图谱。通过 ImageMaster2D Platinum7.0 软件对壳聚糖诱导条件下浅玫瑰色链霉菌菌体总蛋白质的电泳图谱进行匹配分析, 在诱导菌株图谱上有 723 ± 14 个清晰可见的蛋白质点可供差异分析。与未诱导菌株的双向电泳图谱对比结果显示: 18 个蛋白质点在诱导菌株中差异表达, 其中 14 个蛋白质点的表达量上调, 4 个蛋白质点的表达量下调, 选取 10 个差异表达量在 5 倍以上的蛋白质点进行质谱鉴定, 结果显示, 延长因子 Tu、RNA 聚合酶、分子伴侣等蛋白在壳聚糖诱导下表达量增加, 表明它们在浅玫瑰色链霉菌代谢壳聚糖的过程中起重要作用。

关键词: 浅玫瑰色链霉菌; 全蛋白质; 双向电泳; 诱导; 差异表达

中图分类号: S 917.1 **文献标志码:** A

当外界环境改变时, 微生物能改变自身的生理活动以适应环境, 其代谢活动相关蛋白质也会相应变化。浅玫瑰色链霉菌 (*Streptomyces roseolus* DH) 是一株从东海附近土壤中分离、筛选获得的野生菌株, 它能以葡萄糖或甲壳素 (或壳聚糖) 为唯一碳源、通过不同的代谢和调控机制生长^[1-2]。前期研究侧重于 *S. roseolus* 代谢壳聚糖分解酶的分离、鉴定^[2] 和优化分解酶的发酵工艺^[3] 等方面, 由于对该菌株利用壳聚糖的代谢机制缺乏了解, 故工业化发酵生产壳聚糖分解酶尚存不足。如能从蛋白质组学层面揭示 *S. roseolus* 代谢壳聚糖的机制, 将对相关酶制剂的工业化生产产生极大的指导和推动作用。

双向电泳 (2-DE) 能利用蛋白质的等电点和相对分子质量差异对蛋白质进行有效的分离, 该技术结合质谱分析已被广泛应用于解密生物的代谢机制^[4-5]。利用蛋白质组学技术分析达坂喜盐芽孢杆菌 (*Halobacillus dabanensis*) D-8^T 应对低渗冲击的代谢机制发现热激蛋白 DanK、柱状决

定蛋白、青霉素结合蛋白等在此应激反应中起重要作用^[6]。由于前体分子对玫瑰孢链霉菌 (*Streptomyces roseosporus*) NRRL 11379 产达托霉素的影响方法尚不明了, CHIMING 等利用蛋白质组学技术揭示了甲基转移酶、ABC 转运子、抗性蛋白等对达托霉素的合成影响重大^[7]。

双向电泳已经被广泛用于细菌的蛋白质组学研究, 但核酸、多糖和脂类等污染物往往限制它的应用, 胶条的 pH、蛋白的上样量等电泳条件也将影响蛋白图谱的质量^[8]。本研究通过对影响双向电泳结果的各项条件进行优化, 建立了一套针对 *S. roseolus* 总蛋白质的双向电泳技术体系, 运用 ImageMaster2D Platinum7.0 软件分析未经壳聚糖诱导和经壳聚糖诱导下 *S. roseolus* 菌体总蛋白, 并通过液相色谱-四级杆/飞行时间串联质谱 (LC-Q-TOF-MS/MS) 对差异表达的蛋白质进行分析, 为揭示 *S. roseolus* 分解壳聚糖的代谢途径和调控机制积累了科学资料, 也为该菌株后续的基因改造、产酶能力的提高等研究奠定基础。

收稿日期: 2016-03-25 修回日期: 2016-06-18

基金项目: 上海市科学技术委员会工程中心建设项目 (11DZ2280300)

作者简介: 卢梦琪 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为应用化学。E-mail: leo1990623@163.com

通信作者: 蒋霞云, E-mail: jiangxy@shou.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 实验菌株和培养条件

实验用菌株从东海附近富含虾壳的土壤中分离得到的浅玫瑰色链霉菌。

培养条件:平板分离培养基成分组成(% ,w/V): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, NaCl 0.5, K_2HPO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 胶体壳聚糖 1.0, 琼脂 2.0。

液体种子培养基成分组成(% ,w/V):蛋白胨 0.5, 酵母提取物 0.5, NaCl 0.5, K_2HPO_4 0.07, KH_2PO_4 0.03, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 葡萄糖 0.2。

未诱导条件下 *S. roseolus* 菌体:从平板分离培养基中挑取单菌落接入 100 mL 液体种子培养基, 30 °C, 150 r/min, 培养至对数生长后期 ($\text{OD}_{600} = 0.9$), 取 100 mL 菌体培养液离心(5 000 r/min, 15 min), 弃去上清。用超纯水悬浮洗涤菌体, 离心(5 000 r/min, 15 min), 重复 3 次得菌体沉淀待用。

诱导条件下 *S. roseolus* 菌体:平板分离培养基培养菌体, 30 °C 培养 3 d 后, 刮取 10 块平板培养基上的菌体待用。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质提取

用 3 mL 细胞裂解液[7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% (m/V) CHAPS] 悬浮菌体, 加入蛋白酶、磷酸酶抑制剂(上海康成生物工程有限公司)各 10 μL , PMSF(上海康成生物工程有限公司) 15 μL , 冰浴条件下裂解细胞 10 min, 再加入 2% (V/V) IPG 缓冲液和 40 mmol/L DTT。冰浴中超声破碎(3 s/6 s) 30 min, 4 °C 离心(12 000 r/min, 10 min), 取上清液。

(1) 丙酮沉淀法^[9]:取一定体积的上清液置于 1.5 mL 微型离心管中, 加入 9 倍体积预冷的丙酮溶液沉淀蛋白质, -20 °C 放置过夜。4 °C 离心(12 000 r/min, 30 min), 去除上清液, 室温下放置数分钟使丙酮挥发, 收集蛋白质沉淀。

(2) TCA-丙酮沉淀法^[10]:取一定体积的上清液置于 1.5 mL 微型离心管中, 加入 9 倍体积 10% (w/V) TCA-丙酮溶液, -20 °C 过夜沉淀, 4 °C 离心(12 000 r/min, 30 min) 收集沉淀, 并用 9 倍体积丙酮溶液(-20 °C 预冷 1 h) 悬浮洗涤沉淀, -20 °C 放置 1 h, 4 °C 离心(12 000 r/min, 30 min) 收集沉淀。重复此洗涤操作两次, 最后室温

下放置数分钟使丙酮挥发, 获得蛋白质沉淀。

(3) 使用 GE 公司的 2D clean-up 试剂盒进行蛋白质纯化。

将蛋白质沉淀溶于 1 mL 上样水化缓冲液[7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、2% (m/V) CHAPS、0.28% (m/V) DTT、0.5% (V/V) IPG 缓冲液]中, 冰浴放置 30 min 后 4 °C 离心(12 000 r/min, 10 min), 取上清, 使用蛋白质浓度定量试剂盒(TaKaRa Bradford Protein Assay Kit, 宝生物工程大连有限公司)定量, -80 °C 分装冷冻保存。

1.2.2 双向电泳

等电聚焦电泳:在 24 cm 的胶条槽中加入 450 μL 样品, 将 IPG 胶条胶面朝下放入胶条槽, 加入矿物油覆盖。设置等电聚焦程序:30 V 9 h, 50 V 1 h, 200 V 1 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 4 000 V 1 h, 8 000 V 3 h, 8 000 V 210 000 Vhs, 500 V 任意时间。

等电聚焦结束后, 胶条先后在平衡液 I [6 mol/L 尿素、75 mmol/L Tris-HCl、29.3% (V/V) 甘油、2% (w/V) SDS、0.002% (w/V) 1% 溴酚蓝储备液、65 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)] 和平衡液 II [6 mol/L 尿素、75 mmol/L Tris-HCl、29.3% (V/V) 甘油、2% (w/V) SDS、0.002% (w/V) 1% 溴酚蓝储备液、135 mmol/L 碘乙酰胺] 中分别平衡 15 min, 然后将胶条转移到 12% SDS-PAGE 上进行二向垂直电泳。电泳参数:第一步:以恒定功率 2 W/gel, 45 min; 第二步:以恒定功率 17 W/gel, 5 h。

(1) 染色方法的选择:选取 24 cm、pH 3-10 IPG 胶条双向电泳后, 分别采用胶体考马斯亮蓝 G-250 法和银染法染色^[11]。

(2) IPG 胶条分离范围的选择:选取 pH 3-10 和 pH 4-7 的 IPG 胶条(24 cm) 进行双向电泳后, 银染。

(3) 上样量的选择:选取 24 cm、pH 4-7 的 IPG 胶条, 选择 40、80 和 200 μg 上样量进行双向电泳后, 银染。

1.2.3 图像扫描与分析

使用同一参数(分辨率:300 dpi, 灰阶)对电泳凝胶进行扫描(扫描仪:中晶 Bio-6000), 用 ImageMaster2D Platinum7.0 软件进行图像分析。

1.2.4 质谱分析

选取差异表达的蛋白质点进行质谱鉴定(北

京华大蛋白质研发中心),运用 Mascot search engine version 2. 3. 01 在数据库 SwissProt2015 (547085 sequences) 中进行搜索比对。

2 结果与分析

2.1 染色方法对双向电泳图谱的影响

不同凝胶染色方法的灵敏度差异将影响蛋白点的分析和检测^[12]。实验对比了银染法和考马斯亮蓝 G-250 染色法对 *S. roseolus* 菌体总蛋白双向电泳图谱的影响。结果如图 1 所示。

考马斯亮蓝 G-250 染色的图谱(图 1a)横条纹较多,碱性端基本无蛋白点,蛋白质点总数较少;银染的图谱(图 1b)蛋白质点较多且比较清晰,碱性端有蛋白质点出现。对比而言:考马斯亮蓝 G-250 染色法灵敏度低,需要的上样量较

多,导致高丰度蛋白质聚集而引起大量横条纹,且染色时间较长;而银染法灵敏度高,上样量少即可检测到蛋白质,且背景清晰、横条纹较少、染色操作时间较短。在溶杆菌属 *Lysobacter yanansis*, sp. nov. 胞内外蛋白^[13]和 *Streptomyces avermitilis* 菌体蛋白^[8]的研究中均采用银染法染色,以获得清晰的图谱。

2.2 IPG 胶条的分离范围对双向电泳图谱的影响

根据不同生物蛋白质的等电点选择合适分离范围的 IPG 胶条也是实验成功的必要因素。为选择适合 *S. roseolus* 菌体蛋白分离的 IPG 胶条,本研究分别对 pH 3-10 和 pH 4-7 的 IPG 胶条的分离效果进行了比较,结果如图 2 所示。

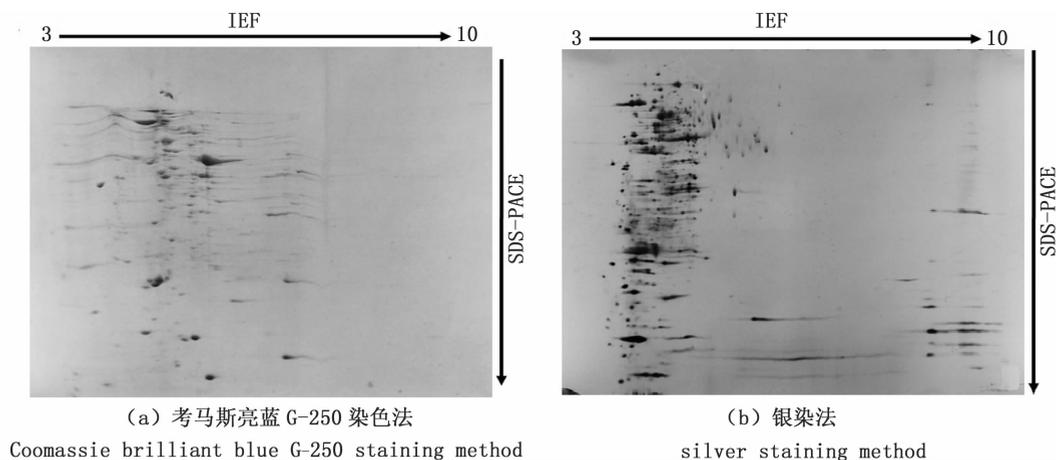


图 1 不同染色法所得双向电泳图谱
Fig. 1 2-DE maps by different staining methods

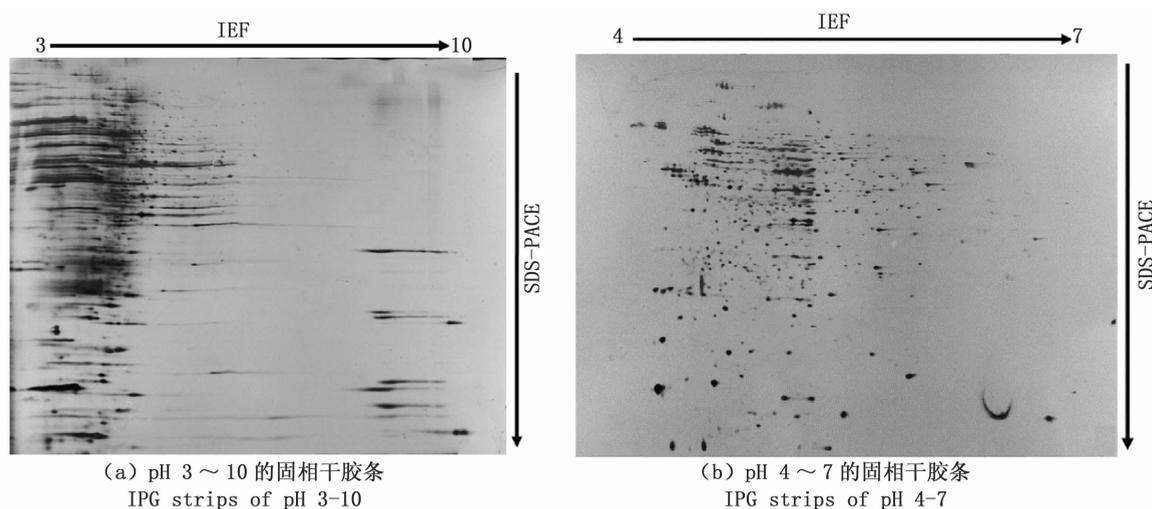


图 2 不同 pH 的干胶条所得双向电泳图谱
Fig. 2 2-DE maps by different pH IPG strips

由采用 pH 3 - 10 IPG 胶条的电泳图谱(图 2a)可见, *S. roseolus* 菌体总蛋白主要分布在酸性至中性区域, 碱性区域分布较少, 横条纹比较多, 清晰可见的蛋白质点较少, 这表明蛋白可能未被有效分离; 由 pH 4 - 7 IPG 胶条的电泳图谱(图 2b)可知, 蛋白质点均匀分布于整块凝胶, 横条纹较少, 背景清晰, 蛋白质点被有效分离。以上结果表明 pH 4 - 7 的 IPG 胶条极大提高了 *S. roseolus* 菌体总蛋白质的分辨率, 更适用于后续的 *S. roseolus* 菌体总蛋白质的差异分析。在 *Streptomyces avermitilis*^[8] 和 *Listeria monocytogenes*^[14] 菌体蛋白质的研究中均采用 pH 4 - 7 的 IPG 胶条, 所得电泳图谱背景清晰, 蛋白质点分布均匀, 以致最终分析得到的生物信息比较完整。

2.3 蛋白质纯化方法对双向电泳图谱的影响

减少蛋白质丢失、去除污染杂质(如盐、去污剂、核酸、脂类等)的样品纯化方法是双向电泳技术的关键步骤之一^[15-17]。本实验分别比较了丙酮沉淀法、TCA-丙酮沉淀法和 2D clean-up 试剂盒法纯化蛋白质的效果, 结果如图 3 所示。

丙酮沉淀法所得的双向电泳图谱(图 3a)在偏中性区域大量蛋白质丢失, 整体蛋白质点较少, 这是由于丙酮沉淀后蛋白质复溶效果差^[17]; TCA-丙酮沉淀法所得电泳图谱(图 3b)在偏中性

区域有少量的蛋白质点出现, 酸性端的蛋白质点也少量增加, 由此证明 TCA-丙酮法的复溶效果优于丙酮法, 但 TCA-丙酮法使蛋白质长时间处于低 pH 值状态, 这将导致一些蛋白质降解或修饰, 影响后期结果分析^[18]; 2D clean-up 试剂盒法所得电泳图谱(图 3c)显示, 蛋白质分布的比较均匀, 酸性和中性端的蛋白质点数量都有所增加, 表明蛋白质恢复量较大, 此方法采用了独特的沉淀剂和辅助沉淀剂, 能定量沉淀样本蛋白质, 去除样品中脂类、糖类等干扰物质, 且沉淀过程中不会引入其他杂质, 操作简单, 用时较短^[19]。ZHANG 等^[20]对 *Campylobacter jejuni* Strain NCTC11168 胞外分泌蛋白的研究和陈维等^[21]对 *M. bovis* 菌体蛋白的研究中, 都采用 2D clean-up 试剂盒对样品进行纯化以便获得质量较高的电泳图谱。

2.4 不同上样量对双向电泳图谱的影响

蛋白质样品上样量也会在较大程度上影响双向电泳的图谱质量, 上样量太少会导致电泳图谱不能反映生物体完整的生物学信息, 上样量太多会导致高丰度蛋白质聚集或沉降, 引起横条纹和拖尾现象的出现, 不能有效分离蛋白质^[22]。本实验比较了 40、80 和 200 μg 的上样量对电泳图谱的影响, 以期获得最佳上样量, 得到的双向电泳图谱如图 4 所示。

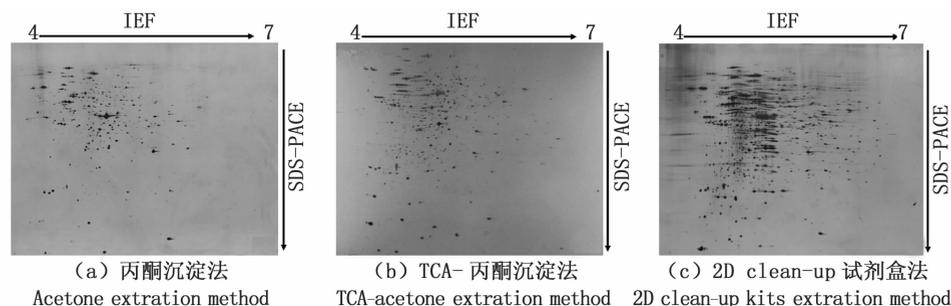


图 3 利用不同蛋白纯化方法所得双向电泳图谱
Fig. 3 2-DE maps by different purified methods

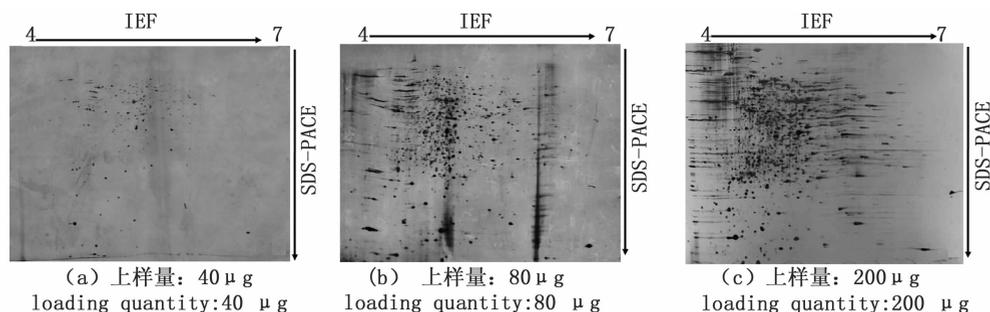


图 4 不同上样量所得的双向电泳图谱
Fig. 4 2-DE maps of different loading quantities

当上样量为 40 μg (图 4a)时,图谱上的蛋白质点数量明显偏少;上样量为 80 μg (图 4b)时,图谱上的蛋白质点清晰可见,边界分明,横条纹较少,蛋白分布均匀;上样量为 200 μg (图 4c)时,图谱背景较深,横条纹较多,蛋白质点分离较少。因此,采用 80 μg 上样量可获得最佳的分离效果。在地衣芽孢杆菌总蛋白^[23]和 *Bacillus subtilis* 菌体蛋白^[24]的研究中,也采用 80 μg 上样量对其进行双向电泳。

2.5 未诱导和诱导条件下浅玫瑰色链霉菌差异表达蛋白

生活环境的改变会导致细菌呈现不同应激反应,与此相关的某些蛋白质也会发生差异变化^[25]。AISHWARYA 等^[26]通过蛋白质组学技术分析抗菌药物环丙沙星对天蓝色链霉菌蛋白质表达的影响,发现 24 种蛋白质的表达呈显著差异,通过了解这些蛋白质在糖代谢、转录和翻译过程中的作用,阐明了这种细菌的耐药机制,这一研究有助于新抗生素的发现。

本研究选择分离范围为 pH4 - 7 的 IPG 胶

条,采用 2D clean-up 试剂盒法纯化菌体总蛋白,以 80 μg 蛋白量上样,选择银染的染色方法,结合适宜的双向电泳参数,分别对未经壳聚糖诱导和经壳聚糖诱导条件下的 *S. roseolus* 菌体总蛋白质进行 3 次生物学重复实验,获得了重复率较高的双向电泳图谱(图 5)。

利用软件分析匹配,重复率可达 89.4% 以上。通过检测蛋白质点可得:未诱导条件下的 *S. roseolus* 菌体蛋白质电泳图谱上可检测到 697 ± 25 个清晰可供分析的蛋白质点;壳聚糖诱导下的 *S. roseolus* 菌体蛋白质电泳图谱上可检测到 723 ± 14 个蛋白质点。

2.6 差异表达蛋白质的鉴定分析

以未诱导菌体蛋白质电泳图谱为参照,利用软件对诱导菌体的蛋白质电泳图谱进行差异分析可得:有 18 个蛋白质点在诱导菌株中表现出明显差异,其中 14 个蛋白质点表达量上调,4 个蛋白质点表达量下调。选取 10 个差异表达量在 5 倍以上且表现为上调的蛋白质点(图 6)进行质谱鉴定。

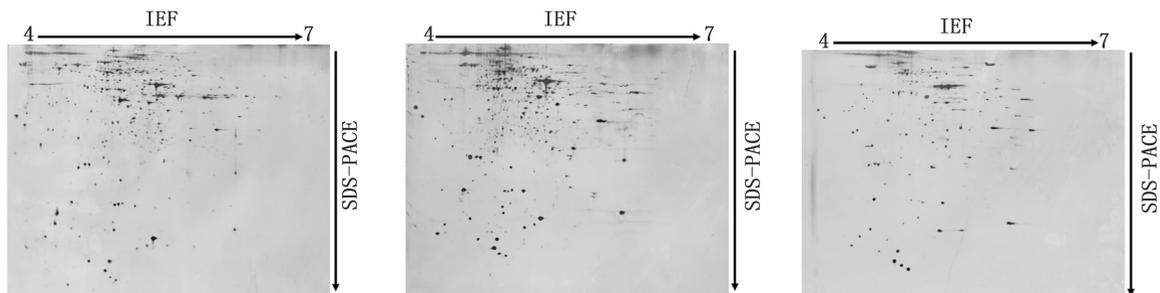
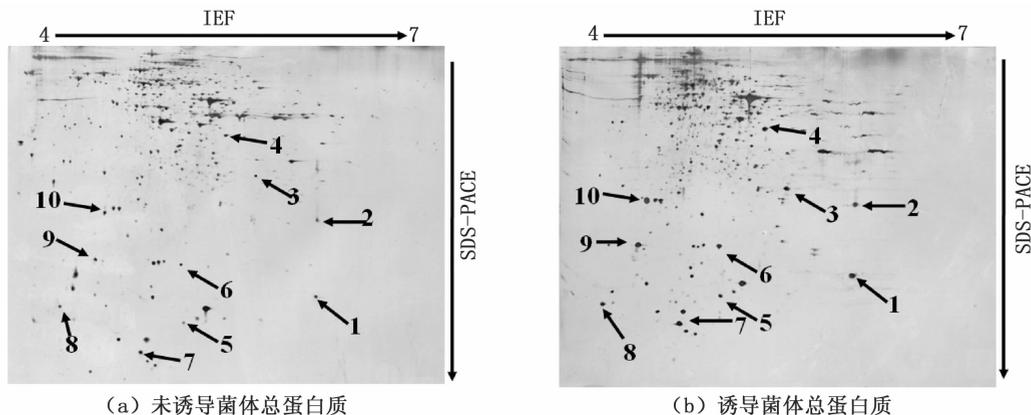


图 5 浅玫瑰色链霉菌总蛋白质双向电泳图谱的重复性

Fig. 5 Repeatability of 2-DE maps with the total proteins of *Streptomyces roseolus*



(a) 未诱导菌体总蛋白质

(b) 诱导菌体总蛋白质

图 6 未诱导和诱导条件下浅玫瑰色链霉菌总蛋白质双向电泳对比图谱
Fig. 6 Comparison of 2-DE maps for total proteins from *Streptomyces roseolus* under the non-induced and induced condition

根据 UniProt 和 DAVID 对差异蛋白进行功能分析可得(表 1),这 10 个差异蛋白主要涉及以下方面:蛋白质的生物合成、糖代谢、分子伴侣等。

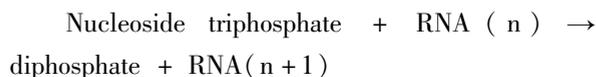
2.6.1 参与蛋白质生物合成的有关蛋白

(1) 延伸因子 G:即图 6 中的 1 号蛋白。在蛋白质合成中的翻译延伸过程,催化核糖体的移位,是一种 GTP 结合蛋白,它识别并运输氨酰-tRNA 翻译到核糖体上,将其定位在核糖体的 A 位点上,这样的定位操作加快了氨基酸合成蛋白质的进程。同时在 GTP 水解之后,延伸因子 G 还可以控制翻译的精确度^[27]。

(2) 丝氨酸羟甲基转移酶(EC:2.1.2.1):即图 6 中的 2 号蛋白。通过四氢叶酸(THF)作为一个碳载体,催化丝氨酸和甘氨酸之间的可逆转换。这种反应是参与嘌呤、胸苷酸、蛋氨酸和其他重要的生物大分子合成需要一碳基团的主要来源,它是氨基酸合成和一碳代谢过程中的关键酶之一。这种蛋白还具有独立的醛缩酶活性,它通过一种古老的羟醛缩合机理合成甘氨酸和醛^[26]。

(3) 核糖体 50S 亚基蛋白 L6:即图 6 中的 4 号蛋白。23S rRNA 的结合蛋白,其次级结构十分重要。它位于 L7/L12 基杆亚基界面附近,靠近肽基转移酶中心的 tRNA 结合位点^[26],可与 RNA 结合,参与蛋白质的翻译过程。

(4) 依赖 DNA 型 RNA 聚合酶(EC:2.7.7.6):即图 6 中 7 号蛋白。以 4 个三磷酸核糖核苷为底物,催化 DNA 转录为 RNA,完成蛋白质合成的第一步^[26],催化反应式:

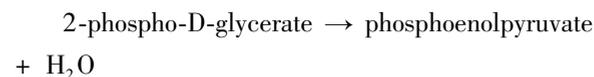


(5) 翻译起始因子 IF-2:即图 6 中的 10 号蛋白。参与蛋白合成中所需的 30S 起始复合物的形成,并组成复合物的的重要组成部分之一。还能防止甲酰甲硫-tRNA 自发水解,促使其结合到 30S 核糖体上,在引发剂 tRNA 和 30s 起始复合物的结合中起关键作用^[28]。

2.6.2 参与糖代谢的有关蛋白

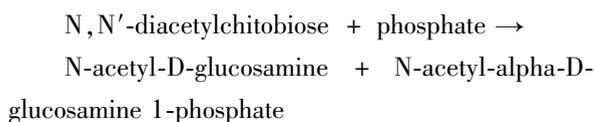
(1) 烯醇化酶(EC:4.2.1.11):即图 6 中的 3 号蛋白。在糖酵解过程中起重要作用,它能催化 2-磷酸甘油酸的可逆转换成磷酸烯醇式丙酮酸,它在通过糖酵解降解碳水化合物的过程中是必

不可少的^[28]。它的催化反应式:

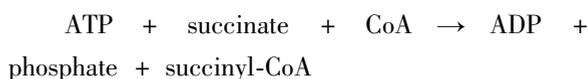


糖酵解初步对糖进行分解代谢生成丙酮酸,这一过程不需要氧气且可生成少量 ATP,为生物机体的生理活动提供能量。其代谢产物丙酮酸经进一步氧化后进入三羧酸循环彻底被氧化并释放大量能量。

(2) N,N'-二乙酰壳二糖磷酸化酶(EC:2.4.1.280):即图 6 中的 6 号蛋白。催化壳二糖的可逆磷酸化,使其转化为 N-乙酰葡萄糖胺和 α -N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸盐^[27],为之后的降解反应提供底物。其催化反应式:



(3) 琥珀酰辅酶 A 连接酶(EC:6.2.1.5):即图 6 中的 8 号蛋白。参与三羧酸循环中琥珀酸合成的第一步,催化琥珀酸与辅酶 A 结合,并释放出磷酸盐^[29],其催化反应式:



2.6.3 分子伴侣类蛋白

分子伴侣 2:即图 6 中的 5 号蛋白。分子伴侣能够维持蛋白质结构的稳定,它通过结合作用稳定蛋白质构象,防止展开的多肽错误折叠,通过有效的结合和释放,促进多肽再折叠和正确组装。其在进化历程中没有巨大变化,是一类稳定保守的蛋白质家族,分布广泛,在各种生物体中均有发现。由于分子伴侣能够防止多肽错误折叠而导致蛋白质变性,且能够促进多肽正确组装而使蛋白质复性,所以在生物体经受高温、高盐和碳源改变等生长环境突变的情况下,分子伴侣在维持其生理活动方面有重要作用^[26]。

2.6.4 与活性氧自由基清除的有关蛋白

烷基氢过氧化物还原酶(EC:1.11.1.15):即图 6 中的 9 号蛋白。依赖于 NADH 的过氧化物酶,应对氢和烷基过氧化物,从而保护细菌避免由宿主免疫系统引起的活性氮中间体和氧化应激反应^[29],其催化反应式: $2 \text{R}'-\text{SH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{R}'-\text{S}-\text{S}-\text{R}' + \text{H}_2\text{O} + \text{ROH}$ 。

表 1 差异表达的蛋白质的 LC-Q-TOF-MS/MS 质谱鉴定结果
Tab.1 LC-Q-TOF-MS/MS result of differential expression proteins

编号 spot No.	蛋白编号 protein No.	蛋白名称 protein name	蛋白得分 protein score	肽段数 peptides sequences	肽段覆盖率 sequence coverage
1	P29541	Elongation factor G	476	6	27%
2	B1VZY7	Serine hydroxymethyltransferase	101	3	15%
3	Q9F2Q3	Enolase 1	306	5	25%
4	Q82DN1	50S ribosomal protein L6	324	4	32%
5	Q9KXU5	60 kDa chaperonin 2	429	4	29%
6	Q9F8X1	N,N'-diacetylchitobiose phosphorylase	553	3	23%
7	B1W441	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	478	5	25%
8	B1W3P6	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	124	4	30%
9	A0R1V9	Alkyl hydroperoxide reductase	291	5	24%
10	Q8CJQ8	Translation initiation factor IF-2	149	4	19%

3 讨论

本研究通过对蛋白质纯化方法、染色方法、上样量大小和胶条的分离范围等几个方面的条件优化,建立了一套适合 *S. roseolus* 蛋白质组分析的双向电泳技术,并利用此方法对未诱导和壳聚糖诱导条件下 *S. roseolus* 菌体总蛋白质进行分离分析,获得 18 个差异表达蛋白,选取其中 10 个差异表达量在 5 倍以上的蛋白点进行质谱鉴定,并对其进行功能分析发现:在以壳聚糖为碳源的诱导环境下,与蛋白合成、糖代谢以及应激反应相关的蛋白表达量增加,这表明 *S. roseolus* 在壳聚糖诱导条件下,一方面大量生成与降解壳聚糖有关的蛋白,另一方面加快了分解壳聚糖初级代谢产物的活动速率,这保证在壳聚糖培养的条件下 *S. roseolus* 能快速建立相应的代谢途径过程,适应新碳源的培养环境。据有关文献的报道,通过增加延伸因子、翻译起始因子和核糖体蛋白等与蛋白合成有关的蛋白质的表达量来应对培养环境的改变在微生物中非常普遍^[30]。

本研究首次对壳聚糖诱导 *S. roseolus* 差异蛋白质组学进行深入研究,并成功获得有关的差异蛋白质信息,这为后续完善 *S. roseolus* 代谢壳聚糖的生物学信息库奠定基础,也为揭示其分解壳聚糖的代谢途径和调控机制积累了科学资料,为对 *S. roseolus* 进行基因改造以提高其产酶能力提供了可能。

参考文献:

- [1] JIANG X Y, CHEN D C, CHEN L H, et al. Purification, characterization, and action mode of a chitosanase from *Streptomyces roseolus* induced by chitin [J]. Carbohydrate Research, 2012, 335(1): 40-44.
- [2] JIANG X Y, CHEN D C, HONG S L, et al. Identification, characterization and functional analysis of a GH-18 chitinase from *Streptomyces roseolus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(4): 2409-2415.
- [3] 王剑, 蒋霞云, 卢梦琪, 等. 浅玫瑰色链霉菌壳聚糖酶罐发酵工艺及其优化[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(6): 952-959.
- [4] WANG J, JIANG X Y, LU M Q, et al. Optimization of chitosanase production from *Streptomyces roseolus* by fermentation process [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(6): 952-959.
- [5] CHAIT B T. Mass spectrometry: bottom-up or top-down? [J]. Science, 2006, 314(5796): 65-66.
- [6] KIM K, OKANISHI H, MASUI R, et al. Whole-cell proteome reference maps of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8 [J]. Proteomics, 2012, 12(19/20): 3063-3068.
- [7] 冯德芹, 解利石, 李小红, 等. 达坂喜盐芽孢杆菌 D-8T 在低渗冲击下的双向凝胶电泳分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 740-744.
- [8] FENG D Q, XIE L S, LI X H, et al. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8T under hypoosmotic shock condition [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(5): 740-744.
- [9] YE C M, NG I, JING K J, et al. Direct proteomic mapping of *Streptomyces roseosporus* NRRL 11379 with precursor and insights into daptomycin biosynthesis [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 117(5): 591-597.
- [10] YIN P, WANG Y H, ZHANG S L, et al. Isolation of soluble proteins from an industrial strain *Streptomyces avermitilis* in complex culture medium for two-dimensional gel electrophoresis [J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 73(2): 105-110.
- [11] 赵绍辉, 周景文, 堵国成, 等. 酿酒酵母蛋白质双向电泳

- 条件优化及图谱建立[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(3): 235-240.
- ZHAO S H, ZHOU J W, DU G C, et al. Construction and optimization of proteomic map of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(3): 235-240.
- [10] 孔令琼, 管政兵, 陆健, 等. 绍兴黄酒成品麦曲中微生物胞外酶的双向电泳技术的建立[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(3): 453-457.
- KONG L Q, GUAN Z B, LU J, et al. Establishment of a two-dimensional electrophoresis protocol for extracellular enzymes excreted by microorganisms from Shaoxing rice Wine Wheat Qu[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(3): 453-457.
- [11] 夏其昌, 曾嵘. 蛋白质化学与蛋白质组学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 283-284.
- XIA Q C, ZENG R. Protein chemistry and proteomics[M]. Beijing: Science Press, 2004: 283-284.
- [12] 乌日娜, 张和平, 孟和, 等. 干酪乳杆菌蛋白质双向电泳条件优化及图谱建立[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 598-602.
- WU R N, ZHANG H P, MENG H, et al. Construction and optimization condition of proteomic map of *Lactobacillus casei* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2009, 28(5): 598-602.
- [13] 王斐斐, 武坤毅, 郭玲, 等. 溶杆菌属 *Lysobacter yanansis* sp. nov. 胞内外蛋白双向电泳条件优化及图谱建立[J]. 生物技术通报, 2013, (4): 140-146.
- WANG F F, WU K Y, GUO L, et al. Optimization and construction of the intracellular and extracellular proteomic map of *Lysobacter yanansis* sp. nov. [J]. Biotechnology Bulletin, 2013, (4): 140-146.
- [14] IGNATOVA M, GUÉVEL B, COM E, et al. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis analysis of *Listeria monocytogenes* submitted to a redox shock [J]. Journal of Proteomics, 2013, 79: 13-27.
- [15] WISNIEWSKI J R, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. Nature Methods, 2009, 6(5): 359-362.
- [16] 宋敏, 赖国旗, 邱宗荫, 等. HeLa 细胞蛋白质组双向电泳技术的建立[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(2): 117-120.
- SONG M, LAI G Q, QIU Z Y, et al. Establishment of a two-dimensional electrophoresis technique for proteome of HeLa Cells[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2007, 32(2): 117-120.
- [17] 陈波, 沈国理. 不同样品制备方法对双向电泳图谱的影响[J]. 武警医学院学报, 2007, 16(3): 256-258.
- CHEN B, SHEN G L. Methods of sample preparation on the effect of map quality of two-dimensional electrophoresis[J]. Acta Academiae Medicinae CPAPF, 2007, 16(3): 256-258.
- [18] 崔耀文, 夏曦, 沈建忠. 双向凝胶电泳中三种蛋白沉淀方法的比较[EB/OL]. 北京: 中国科技论文在线, 2012 [2012-06-08]. <http://www.doc88.com/p-7723983522364.html>.
- CUI Y W, XIA X, SHEN J Z. Comparison of three protein precipitation procedures in two-dimensional gel electrophoresis [EB/OL]. Beijing: Sciencepaper Online, 2012 [2012-06-08]. <http://www.doc88.com/p-7723983522364.html>.
- [19] 杨显超, 王建, 葛菲菲, 等. 副猪嗜血杆菌菌体蛋白双向电泳技术的建立[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2015, 31(5): 59-60, 97.
- YANG X C, WANG J, GE F F, et al. Establishment of a two dimensional electrophoresis technique for proteome of *Haemophilus parasuis* [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Digest, 2015, 31(5): 59-60, 97.
- [20] ZHANG M J, GU Y X, DI X, et al. In Vitro protein expression profile of *Campylobacter jejuni* strain NCTC11168 by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry [J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2013, 26(1): 48-53.
- [21] 陈维, 李媛, 辛九庆, 等. 牛支原体蛋白质组学双向电泳技术的建立及初步分析[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(3): 42-47.
- CHEN W, LI Y, XIN J Q, et al. Establishment of two-dimensional gel electrophoresis for proteomic of *Mycoplasma bovis* [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2012, 43(3): 42-47.
- [22] LEE M R, BAE S M, KIM T S, et al. Proteomic analysis of protein expression in *Streptococcus pneumoniae* in response to temperature shift [J]. Journal of Microbiology, 2006, 44(4): 375-382.
- [23] 江慎华, 陈惠, 陈静, 等. 地衣芽孢杆菌总蛋白双向电泳方法的建立和优化[J]. 食品工业科技, 2013, 34(15): 170-173.
- JIANG S H, CHEN H, CHEN J, et al. Establishment and optimization of two-dimensional gel electrophoresis of total proteins from *Bacillus licheniformis* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(15): 170-173.
- [24] MARTÍNEZ-GOMARIZ M, HERNÁNDEZ M L, GUTIÉRREZ D, et al. Proteomic analysis by two-dimensional differential gel electrophoresis (2D DIGE) of a high-pressure effect in *Bacillus cereus* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(9): 3543-3549.
- [25] 李燕, 宋瑛, 李明远. 细菌蛋白质组学的研究进展[J]. 现代预防医学, 2009, 36(13): 2522-2524, 2529.
- LI Y, SONG Z, LI M Y. Research progress of the bacterial proteomics [J]. Modern Preventive Medicine, 2009, 36(13): 2522-2524, 2529.
- [26] RAO A R, PATKARI M, REDDY P J, et al. Proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* in response to Ciprofloxacin challenge[J]. Journal of Proteomics, 2014, 97: 222-234.

- [27] KE D B, BOISSINOT M, HULETSKY A, et al. Evidence for horizontal gene transfer in evolution of elongation factor Tu in Enterococci[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(24): 6913 – 6920.
- [28] ZORZET A, PAVLOV M Y, NILSSON A I, et al. Error-prone initiation factor 2 mutations reduce the fitness cost of antibiotic resistance[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(5): 1299 – 1313.
- [29] KIM D W, CHATER K F, LEE K J, et al. Effects of growth phase and the developmentally significant bldA-specified tRNA on the membrane-associated proteome of *Streptomyces coelicolor*[J]. *Microbiology*, 2005, 151(8): 2707 – 2720.

Analysis of two-dimensional electrophoresis for total proteins from *Streptomyces roseolus* by induction of chitosan

LU Mengqi¹, JIANG Xiayun^{1,2}, SI Ruirui¹

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Aquatic Products Processing and Storage Engineering Technology Research Center, Shanghai 201306, China)

Abstract: Two-dimensional gel electrophoresis method for analysis of total proteins from *Streptomyces roseolus* was established in this paper as follows: IPG strips with pH 4 – 7, 2D clean-up kit purification protocol, 80 μ g protein sample volume and silver staining. 2D-gels were obtained with low background, high resolution, good reproducibility and without obvious stripes. The 2-DE maps of total proteins from *S. roseolus* by induction of chitosan were analyzed by ImageMaster2D Platinum7.0, which showed 723 ± 14 clearly visible protein spots. Compared with 2-DE maps of total proteins from *S. roseolus* incubated with no induction, 18 proteins detected in induced strain were in differential expression. Among these, 14 proteins were up-regulated and 4 proteins were down-regulated. 10 proteins whose expression levels differed more than 5 times were selected and identified by mass spectrometry. The results showed that the expressions of proteins such as elongation factor Tu, RNA polymerase, chaperone and so on were increased when incubating with chitosan, which suggested that they may be involved in the process of chitosan metabolism in *S. roseolus*.

Key words: *Streptomyces roseolus*; total proteins; two-dimensional electrophoresis (2-DE); induction; differential expression