

蓝色温和凝胶双向电泳用于分析 嗜盐菌质膜蛋白复合物*

刘晓宇 李亮 赵昕 程彦伟 张炜**

(南京农业大学生命科学学院生物化学与分子生物学系, 南京农业大学 GE Healthcare Biosciences 蛋白质组学合作示范实验室, 南京 210095)

摘要 为了揭示细胞对盐胁迫渗透适应的分子机制, 以新鉴定的中度嗜盐芽孢杆菌 *Bacillus* sp. I121 为实验材料, 分析了该嗜盐菌质膜上的盐胁迫响应蛋白。为此, 通过蓝色温和凝胶双向电泳(BN/SDS-PAGE)对纯化的质膜组分进行了差异蛋白质组学研究。经 MALDI-TOF/TOF 质谱分析, 鉴定了 8 个盐胁迫响应蛋白。盐胁迫诱导上调表达的蛋白质包括 ABC 型转运蛋白、3-磷酸甘油透性酶、嘧啶核苷转运蛋白和甲酸脱氢酶, 下调表达的蛋白质包括琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase)铁硫亚基、黄素蛋白亚基、细胞色素 b556 亚基以及分子伴侣 DnaJ 的同源蛋白; 酶活力测定结果表明胁迫条件下上述蛋白质的活性变化与表达量变化相一致。这些蛋白质中绝大多数属于高度疏水的跨膜蛋白, 主要负责物质跨膜运输及能量代谢。上述结果表明, 中度嗜盐菌 *Bacillus* sp. I121 可通过加快跨膜物质运输, 同时抑制 TCA 循环完成盐胁迫条件下相容性溶质脯氨酸和四氢嘧啶的合成与积累。也进一步证明, 蓝色温和凝胶双向电泳不仅可用于线粒体、叶绿体中蛋白质复合物的分析, 也同样适用于细胞质膜上高度疏水蛋白复合物的比较研究。

关键词 嗜盐芽孢杆菌, 相容性溶质, 质膜, 蛋白质复合物, 蓝色温和凝胶电泳

学科分类号 Q503, Q789

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00410

作为细胞与外界环境之间的屏障, 质膜在感受并传递外界刺激信号、物质运输、细胞识别等方面发挥着重要作用。最近, 越来越多的证据表明, 质膜的结构及组成成分在细胞对高盐胁迫的响应方面发挥着关键作用^[1]。例如, 定位于质膜上的原初及二级主动运输蛋白质可完成离子的跨膜定向运输及相容性溶质的吸收^[2-6], 并负责吸收无机磷、氨基酸、糖类等以补充高盐胁迫引起的营养缺乏^[7]。同时, 质膜组分如受体、磷脂等在感受高盐胁迫, 参与二级信使形成方面也具有重要作用^[8-9]。

近年来, 利用蛋白质组学手段高通量鉴定质膜蛋白的研究在原核^[10]和真核^[11]生物中均有报道。但是, 和高通量鉴定相比, 盐胁迫条件下质膜蛋白质组的比较研究却较少。主要原因包括两个方面: 高通量鉴定采用的分离方法(如 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)由于分辨率有限, 不适合进行比较分析; 分辨率较高的 IEF/SDS-PAGE 双向电泳又不适合分离疏水性较高的膜蛋白。例如, Huang 等^[7]利用双向电泳分析了蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 质膜蛋白质组在盐胁迫条件下的变化, 鉴定的 25 个响

应蛋白多为亲水性较高的膜附着蛋白。本实验室利用双向电泳鉴定的水稻根尖细胞质膜中的 18 个盐胁迫响应蛋白也多为膜附着蛋白^[12]。1991 年, Schagger 等^[13]在研究哺乳动物及真菌细胞线粒体呼吸链复合物的过程中, 建立了 BN/SDS-PAGE。该技术以考马斯亮蓝 G250 代替 SDS 使多亚基的蛋白质复合物带负电荷, 同时用温和的非离子型去污剂如 Triton X-100, 毛地黄皂甙等增溶膜组分, 从而使膜蛋白复合物在凝胶中以近似天然的状态得到分离。在蛋白质复合物得到分离后, 将第一向的泳道切下进行第二向 SDS-PAGE, 各个复合物的亚基就能得到分离。BN/SDS-PAGE 已广泛用于分析真核细胞线粒体内膜、叶绿体类囊体膜上高度疏水的多亚基蛋白质复合物^[13-14], 可以有效解决普通双向电泳中膜蛋白聚集沉淀, 因而无法进入第二向的困

* 国家自然科学基金(30771300)和国家高技术研究发展计划(863)(2007AA10Z114)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 025-84396556, E-mail: wzhang@njau.edu.cn

收稿日期: 2009-09-14, 接受日期: 2010-03-18

难。相比较而言, 利用 BN/SDS-PAGE 研究质膜蛋白质组的报道很少, Katz 等^[1]研究了盐生杜氏藻 *Dunaliella salina* 质膜蛋白质组对盐胁迫的响应, 发现相关的膜蛋白主要参与质膜结构稳定和信号传导。然而, 到目前为止, 对于嗜盐菌质膜在高盐环境中如何发挥保护细胞的功能却研究得很少。质膜蛋白发挥生物学功能的一个重要方面是膜蛋白之间以及膜蛋白与胞质蛋白间的相互作用。例如, 由于原核细胞缺乏细胞器的分化, 许多重要的代谢途径及相关蛋白质复合物均定位在质膜上, 许多跨膜运输蛋白属于多亚基的寡聚蛋白, 跨膜信号传递也有赖于膜蛋白与胞内信号分子相互作用。因此, 利用 BN/SDS-PAGE 分析嗜盐细菌质膜蛋白质复合物可以更加全面地揭示质膜在细胞对抗盐胁迫中发挥的重要功能。

本研究中采用的一株中度嗜盐菌来自南京农业大学校园土壤中, 呈杆状并可形成芽孢, 对过氧化物酶及吲哚呈阴性反应, 能水解淀粉, 可在 0.2~3 mol/L NaCl 范围内生存, 经 16 S rRNA 序列分析鉴定为芽孢杆菌属 *Bacillus* sp. I121(未发表种质资料)。我们利用 BN/SDS-PAGE 研究了 *Bacillus* sp. I121 质膜蛋白质组对高盐胁迫的响应, 并对其部分响应蛋白进行了质谱鉴定, 研究结果证明 BN/SDS-PAGE 是对质膜蛋白质组进行比较分析的有力工具。

1 材料与方法

1.1 菌株, 培养基和生长条件

嗜盐菌 *Bacillus* sp. I121 在 LB 液体培养基中 37℃ 振荡培养(1%胰蛋白胨, 0.5%酵母浸出物, pH 7.5), 培养基内 NaCl 浓度分别为 0.2 mol/L, 0.9 mol/L, 1.7 mol/L, 2.5 mol/L。使用分光光度计(Beckman, USA)在 A_{600} 下监测生长情况, 至对数生长后期 6 000 g 离心 10 min 收集细胞, 用于实验测定。

测定外源添加相容性溶质对 *Bacillus* sp. I121 生长的影响时, 以 10 倍稀释的 LB 培养基(含 2.5 mol/L NaCl)中分别加入不同浓度谷氨酸、脯氨酸、四氢嘧啶后培养细菌, 生长情况在 A_{600} 下进行监测。

1.2 细胞质膜制备

对数生长后期离心收集的 *Bacillus* sp. I121 细胞悬浮于缓冲液 A(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0; 0.2 mol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA; 10%甘油;

0.25 mol/L 蔗糖; 1 mmol/L PMSF), 在 2 kPa 压力下机械破碎, 12 000 g, 4℃ 离心 20 min 去除细胞碎片以及未破碎细胞。离心后上清液中加入 50 mg/L DNase I 和 10 mmol/L MgCl₂, 4℃ 放置 1 h 以水解染色体 DNA。消化完毕后 100 000 g, 4℃ 超速离心 45 min, 得到的沉淀(质膜组分)悬浮于缓冲液 B(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0; 1 mmol/L EDTA; 10%甘油; 0.25 mol/L 蔗糖; 1 mmol/L PMSF)中, 100 000 g 4℃ 离心 45 min。得到的质膜沉淀用 BN-PAGE 悬浮缓冲液(50 mmol/L Bis-Tris, 5 mmol/L 6-氨基己酸, 1 mmol/L EDTA, pH 7.0)洗涤 3 次后再用 150 μ l 悬浮, 置于液氮中备用。

1.3 BN/SDS-PAGE

蛋白质浓度使用 2-D Quant Kit (Amersham biosciences, GE)测定, BN/SDS-PAGE 双向电泳参照本实验室前期报道进行^[14], 电泳结束后考马斯亮蓝(CBB)R250 染色。3 次独立实验中制备的质膜组分用于 3 次重复电泳。

1.4 凝胶扫描和图像分析

双向电泳凝胶使用 ImageScanner™ II 扫描仪进行图像扫描。图像使用 Image Master™ 2D version: 5.0 (Amersham Biosciences, GE)双向电泳凝胶分析软件进行分析。每个处理条件下 3 次重复实验得到的凝胶图像经自动采点和匹配后再进行手工编辑, 斑点强度变化值经统计分析具显著性差异($P < 0.05$)的点认定为胁迫响应蛋白质点。

1.5 胶内消化和 MALDI-TOF/TOF 质谱分析

目标蛋白质点从凝胶上手工切下后置于 96 孔酶标板中, 用 15 mmol/L 的铁氰化钾和 50 mmol/L 的硫代硫酸钠(1:1)室温脱色 20 min, 脱色后的胶块用去离子水洗涤 2 次, 乙腈(ACN)脱水, 置于消化缓冲液(20 mmol/L 碳酸氢铵, 12.5 ng/L 胰蛋白酶)中在 4℃ 孵育 30 min, 然后将样品置于 37℃ 下消化 12 h。裂解生成的多肽使用 50% ACN(内含 0.1% 三氟乙酸)萃取 2 次。将干的样品用 0.8 μ l 质谱缓冲液(50% ACN, 0.1% TFA, 5 g/L α -4-羟基肉桂酸)再溶解, 然后将该溶液点于不锈钢 192 孔样品靶(Applied Biosystems)上, 空气中自然干燥。质谱仪使用 ABI 4700 TOF-TOF 蛋白质组学分析仪(Applied Biosystems)。激光重复频率 200 Hz, 波长 355 nm, 加速电压 20 kV, 最大分辨率 1 500 u, 胰蛋白酶处理的肌球蛋白作为内标。所有质谱图以默认方式采集, 得到的质谱数据通过 MASCOT 搜索引擎检索 NCBI 蛋白质数据库, 检索种属为

Bacteria. 检索条件为肽质量扫描范围 700~3 200 u, 肽片段质量容差 100 ppm, 离子选择单同位素分子量 $[M+H]^+$, 允许漏切的胰酶酶切位点数为 1, 固定修饰为半胱氨酸碘乙酰胺化(carbamidomethyl). MASCOT 评分值(Protein score)大于 65, 即评分置信度 $C.I\% > 95\%$ ($P < 0.05$)的结果判定为可信结果.

1.6 相容性溶质的测定

甘氨酸甜菜碱: 细胞于 3 ml 10%高氯酸中溶解后, 甜菜碱的测定参照 Grieve 等^[15]的方法进行. 脯氨酸: 细胞悬浮于 5 ml 3%的磺基水杨酸中, 采用比色法在 515 nm 波长进行测定^[16]. 海藻糖: 采用蒽酮-硫酸法^[17]进行测定. 四氢嘧啶: 采用高效液相色谱分析(Agilent Zorbax SB-Aq C₁₈ 柱), 吸收波长 210 nm 下进行测定^[18]. 谷氨酸: 采用 2,4-二硝基氟苯柱前衍生 HPLC 法测定(Agilent ODS C₁₈ 柱), 吸收波长 360 nm^[19].

1.7 酶活测定

所有酶活测定在 30℃ 或 37℃ 下进行, 以每分钟消耗 1 $\mu\text{mol/L}$ 底物或生成 1 $\mu\text{mol/L}$ 产物定义为 1 个酶活力单位(1U). 在对数生长后期, 离心收集菌体(0.8~1 g 湿重每 100 ml), 用相应浓度的 NaCl 溶液洗涤 3 次以去除培养基, 然后重悬于 10 ml 缓冲液(30 mmol/L Tris-HCl, 1.6 mol/L KCl, 5 mmol/L β -巯基乙醇, pH 8.0)中, 超声破碎细胞后 15 000 g 离心 20 min, 弃沉淀. 上清液经过 100 000 g 离心 1 h, 上清液为细胞质组分, 沉淀用 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(内含 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, pH 7.8)重悬后为质膜组分, 置于-80℃ 备用. 测定酶活所得数据为 5 次读数的平均值.

谷氨酸脱氢酶催化 NH_3 与 α -酮戊二酸形成谷氨酸过程中 NAD(P)H 的消耗量通过比色法测定^[20]. 催化谷氨酰胺形成的谷氨酸合酶活性参考 Bohannon 等^[21]的方法进行. 谷氨酰胺合成酶活性测定按 Bender 等^[22]的方法进行. 以上酶活性测定所用样品为细胞质组分(50 μg 蛋白质). 琥珀酸脱氢酶活性通过二氯靛酚钠(DCIP)的还原反应测定^[23]. 5'-核苷酸酶活性的测定参照 Rittmann 等^[24]的方法进行. 甲酸脱氢酶活性通过四唑氮蓝(NBT)还原反应测定^[25]. 以上酶活性测定所用样品为质膜组分(50 μg 蛋白质).

2 结果与分析

2.1 盐胁迫下的相容性溶质

前期研究表明, *Bacillus* sp. I121 为中度嗜盐

菌, 能够在 0.2~2.5 mol/L NaCl 浓度下生长, 最佳生长 NaCl 浓度为 0.9~1.3 mol/L. 相容性溶质的测定表明, 在 NaCl 浓度从 0.2 mol/L 升高至 2.5 mol/L 的过程中, 胞内的海藻糖和甜菜碱维持在较低的浓度水平, 正常生长条件下(0.9 mol/L NaCl)谷氨酸是主要的相容性溶质, 而在高盐胁迫条件下脯氨酸和四氢嘧啶在胞内的浓度升高了近 10 倍(图 1), 说明中度嗜盐菌 *Bacillus* sp. I121 在较低盐浓度下积累谷氨酸, 而在较高盐浓度下靠积累脯氨酸和四氢嘧啶作为相容性溶质来抵御胁迫对细胞的伤害.

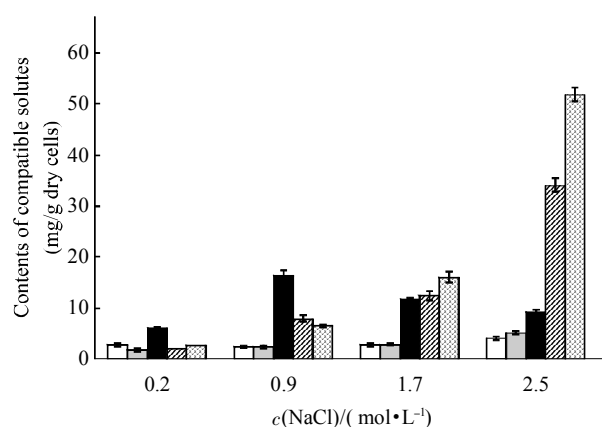


Fig. 1 Determination of compatible solutes in *Bacillus* sp. I121 under salt stress

Cells were grown in LB mediums containing 0.2 mol/L, 0.9 mol/L, 1.7 mol/L and 2.5 mol/L NaCl, respectively. When cells were grown to the exponential growth phase, compatible solutes were extracted and the concentration of the contents of glycine betaine, trehalose, glutamate, proline, and ectoine were measured as described in **Materials and methods**. The values are the mean of at least three biological independent replicates. □: Trehalose; ▤: Betaine; ■: Glutamate; ▨: Proline; ▩: Ectoine.

为了明确脯氨酸和四氢嘧啶是通过何种途径在胞内积累, 我们测定了盐胁迫条件下外源添加脯氨酸、四氢嘧啶及谷氨酸对细菌生长的影响, 结果见图 2. 细菌在 0.9 mol/L NaCl 条件下正常生长, 在 2.5 mol/L NaCl 条件下生长受抑, 此时外源添加脯氨酸或四氢嘧啶并不能促进该细菌的生长, 但外源添加谷氨酸却可以使细菌部分恢复生长. 我们分别测定了 1、5、10、20 mmol/L 脯氨酸、四氢嘧啶及谷氨酸对细菌生长的影响, 结果发现不同浓度对细菌生长的影响没有显著差异(结果未列出). 这些结果表明, 高盐条件下 *Bacillus* sp. I121 胞内脯氨酸和四氢嘧啶可能不是从外界吸收, 而是通过自身合成而积累的.

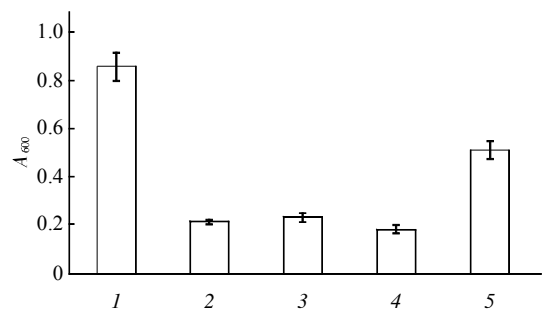


Fig. 2 Effects of exogenous solutes on the growth of *Bacillus* sp. I121

Glutamate (Glu), proline (Pro), and ectoine (Ect) was added to 10-time diluted LB mediums respectively. Cells were grown at 37°C for 15 h in control (10-time diluted LB with 0.9 mol/L NaCl), or under salt stress (10-time diluted LB with 2.5 mol/L NaCl), and cell growth was monitored at A_{600} . 1: 0.9 mol/L NaCl; 2: 2.5 mol/L NaCl; 3: 2.5 mol/L NaCl+Pro; 4: 2.5 mol/L NaCl+Ect; 5: 2.5 mol/L NaCl+Glu.

2.2 BN/SDS-PAGE 分析盐胁迫条件下质膜蛋白复合物

为了分析 *Bacillus* sp. I121 适应高盐环境的分子基础，我们采用 BN/SDS-PAGE 分析了该细菌质膜蛋白质组。经过优化，选定 2%DM 和 4.5%~12%梯度胶做为质膜增溶和电泳的最佳条件。分别提取 0.9 mol/L 和 2.5 mol/L NaCl 条件下生长细胞的质膜组分，经 DM 增溶后进行蓝色温和凝胶双向电泳，结果如图 3a 所示，采用该方法可以有效分离超过 50 个蛋白质点。对 3 次电泳结果进行 Image Master™ 2D 半定量分析，有 10 个蛋白质点的丰度对 2.5 mol/L 盐胁迫有显著响应，而且重复性较好(图 3b)。

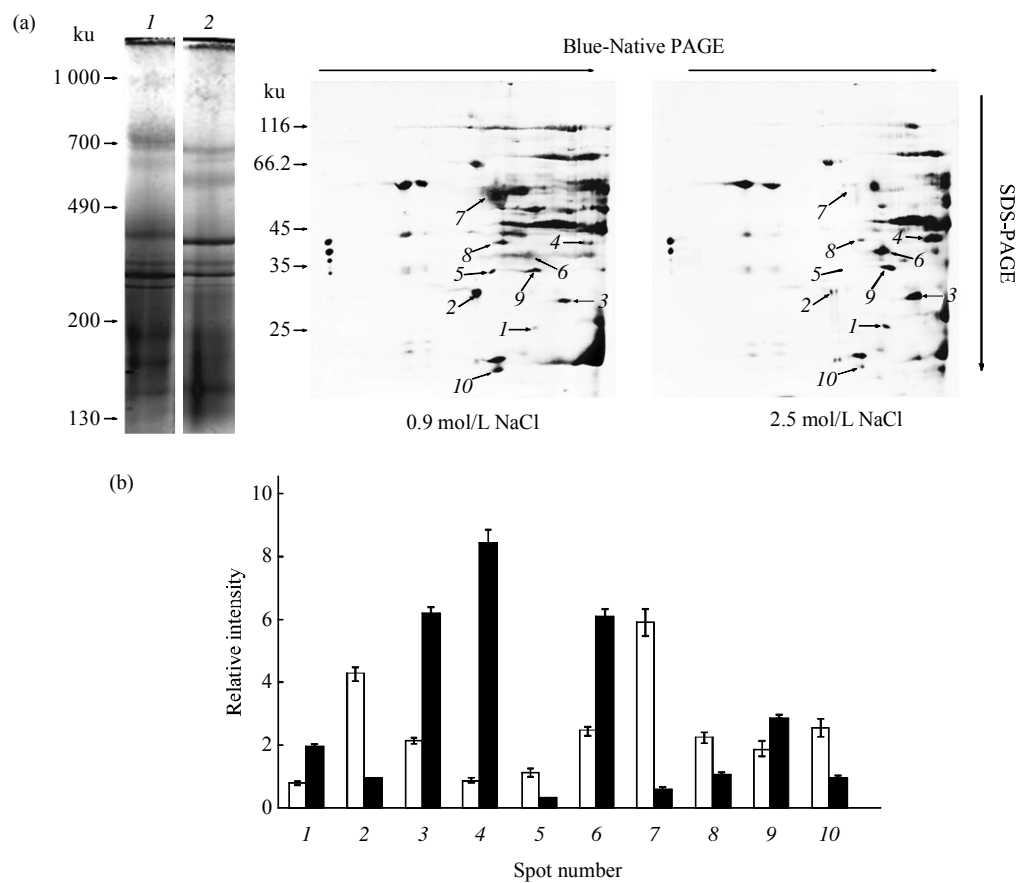


Fig. 3 BN/SDS-PAGE analysis of membrane protein complexes of *Bacillus* sp. I121 at different salinities

(a) BN/SDS-PAGE analysis of individual membrane proteins from 0.9 mol/L and 2.5 mol/L NaCl cells. Left: First dimension blue native-PAGE separation of membrane fractions isolated from *Bacillus* sp. I121 under different NaCl concentrations. The membrane protein complexes were solubilized in 2% DM. 100 μ g proteins were applied on each lane and separated by 4.5%~12% gradient gel. 1: 0.9 mol/L NaCl; 2: 2.5 mol/L NaCl. Right: Blue native gel strips were loaded and separated on 12% SDS-PAGE. The presented proteomic maps are typical representatives of CBB-stained membrane protein gels, obtained from cells under different salt concentrations. At least three independent gel separations were performed for each sample and they showed a high degree of reproducibility. Arrows represent spots that were excised and identified by MS and correspond to the numbers shown in **Table 1**. (b) Changes in relative staining intensity of protein spots on BN/SDS-PAGE under different salt concentrations. Using three replicate gels, the intensities of spots were quantified by Image Master™ 2D version: 5.0 (Amersham Biosciences, US). Each point represents $\bar{x} \pm s$. □: 0.9 mol/L NaCl; ■: 2.5 mol/L NaCl.

这些蛋白质点从胶上手工切下, 进行 MALDI-TOF/TOF 质谱分析. 除了 Spot 3 和 Spot 8 蛋白质点外, 成功鉴定了 8 种蛋白质, 鉴定结果见表 1. 综合图 3 及表 1 的结果, 我们鉴定的 8 个蛋白质中, 除 DnaJ 的同源蛋白 OB1959 外, 其他 7 种均为疏水性的膜蛋白, 这也证明与常用的等电聚焦 IEF/SDS-PAGE 相比, BN/SDS-PAGE 更适合分析高疏水性的膜蛋白. 其中, ABC transporter permease (Spot 1) 在 2.5 mol/L NaCl 胁迫下表达量显著上调; Spot 2, Spot 7, Spot 10 分别为琥珀酸脱氢酶铁硫亚基, 琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基和琥珀酸脱氢酶

细胞色素 b-556 亚基, 这 3 个蛋白质点在 2.5 mol/L NaCl 胁迫下均表现显著下调, 有力地证明了高盐条件下 *Bacillus* sp. I121 琥珀酸脱氢酶表达量下降; 和 ABC transporter permease 相类似, 3- 磷酸甘油透性酶(Spot 4)在盐胁迫下上调表达; Spot 5 经鉴定为推测的蛋白 OB1959. PSI-BLAST 生物信息学分析表明 OB1959 是分子伴侣 DnaJ 的同源蛋白, 该蛋白质经盐胁迫后表达量下调; Spot 6 和 9 分别为嘧啶核苷运输蛋白及甲酸脱氢酶铁硫亚基, 它们在最适生长条件下(0.9 mol/L NaCl)维持较低丰度, 但在 2.5 mol/L 盐胁迫条件下丰度显著升高.

Table 1 Summary of salt-responsive plasma membrane proteins identified by MALDI-TOF/TOF Spot numbers correspond to spots in Figure 3a

Spot No.	Accession No.	Protein homologue	Mass Exper./Theor. (ku)	Source	Matched peptides	Sequence coverage/%	MASCOT score
1	gi 23100927	ABC transporter permease	25/30.5	<i>Oceanobacillus ihenyensis</i>	IVSGLTSGSVK IPYELEESAK LDGASPFQTFR LDGASPFQTFRK	16	86
2	gi 23099567	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	30/28.0	<i>Oceanobacillus ihenyensis</i>	MFDALK DLIVDR DLIVDRER LEPMSTFPVVR GIPLTTSIAAMNR AEQSKVTFIIR QSCAALVDQLEQPIR AWIPIDGTHDLGPGPR	34	172
4	gi 52082536	Glycerol-3-phosphate permease	43/49.5	<i>Bacillus licheniformis</i>	VLVHWFVSVERGNK DTPQSVGLPPIEYR YGVLDWAPTYLSEEKGFDMSK	11	94
5	gi 23099414	Hypothetical protein OB1959 (chaperone protein DnaJ)	34/35.4	<i>Oceanobacillus ihenyensis</i>	ANIDLPER ISIFTLIGMR ISIFTLIGMRLR VVEAEADVPLALAEALR TNQLESHYLAGGNVDR	19	81
6	gi 23098546	Pyrimidine nucleoside transporter	39/42.6	<i>Oceanobacillus ihenyensis</i>	IESFNGVNSIFFGQSEALIAIR	6	107
7	gi 23099568	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	57/64.9	<i>Oceanobacillus ihenyensis</i>	LGGIIEIYEK SDATIFATGGPGIIFGK LMNMEGTENAYQIHK TAYAGATTGQQLLYALDEQVR LGANSLLSAIYGGMVAGPK	15	92
9	gi 16131733	Formate dehydrogenase-O, Fe-S subunit	34/33.1	<i>Escherichia coli</i> K12	LNPEDNR VAELKTR ADEEENNLHEEK KDGCMHCSDPGCLK ACQVACSEWDIR TCPTGAIHFGTKESMK SWTVMRFEVEQNDK SATNGLTPAPQARDFQEEVAK	35	131
10	gi 23099569	Succinate dehydrogenase cytochrome b-556 subunit	18/23.6	<i>Oceanobacillus ihenyensis</i>	ITGIIIVVFIAWHFETR ISTYACLGVLAVSYLGIR	18	83

2.3 盐胁迫响应蛋白生物学活性验证

如上所述，我们在中度嗜盐菌 *Bacillus* sp. I121 中鉴定了 8 个盐胁迫响应蛋白，为了进一步验证这些结果，我们测定了不同盐浓度下部分蛋白质的酶学活性。如图 4 所示，琥珀酸脱氢酶(SDH)在 NaCl

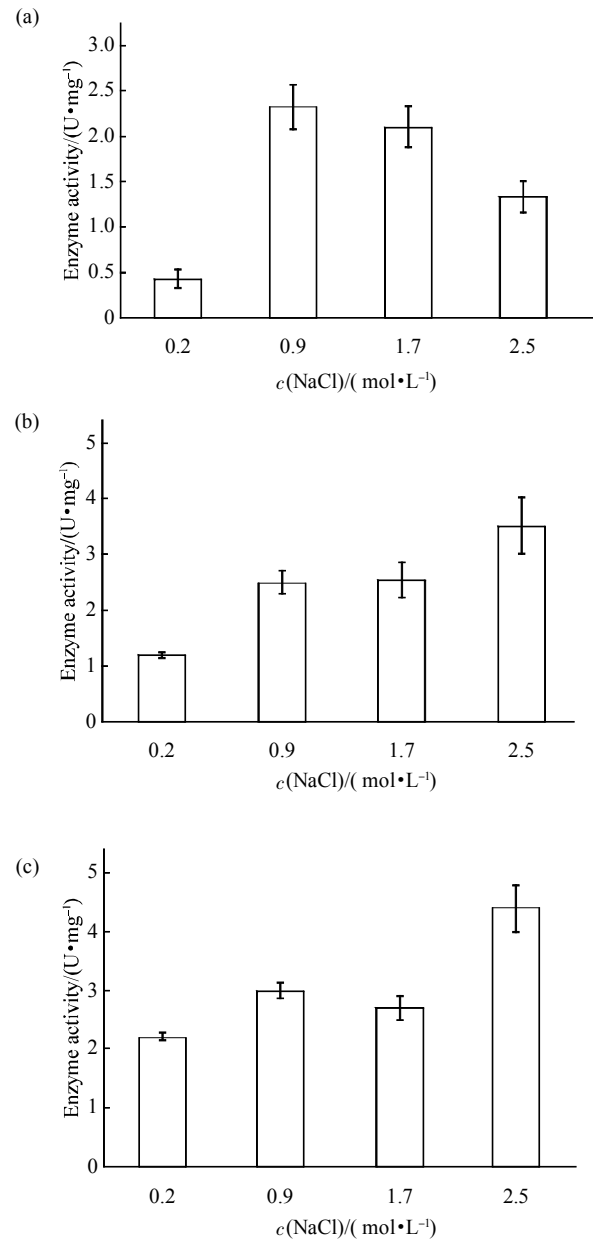


Fig. 4 Effects of salinity on the activities of succinate dehydrogenase (SDH), 5'-nucleotidase, and formate dehydrogenase (FDH) in *Bacillus* sp. I121

Cells were grown in LB medium containing different NaCl concentrations respectively, and harvested in the late exponential growth phase. Plasma membrane fractions were prepared by ultra-centrifugation and used for enzyme assays. The data are the mean of five independent experiments. (a) SDH. (b) 5'-nucleotidase. (c) FDH.

浓度为 0.9 mol/L(最适生长条件)时活性最强，在更低的 NaCl 浓度(0.2 mol/L)以及更高的 NaCl 浓度下(1.7 mol/L和 2.5 mol/L)活性比 0.9 mol/L时都下降。甲酸脱氢酶(FDH)活性随盐浓度提高而增强，在 2.5 mol/L NaCl 时活性最强。为了验证嘧啶核苷转运蛋白对盐胁迫的响应，我们测定了定位于质膜的 5'-核苷酸酶的活性。由于质膜对核苷酸是不通透的，外界的 5'-核苷酸必须通过质膜上的 5'-核苷酸酶脱去磷酸后才能被嘧啶核苷转运蛋白运输至胞内。如图 4 所示，与嘧啶核苷转运蛋白在盐胁迫下表达上调相一致，*Bacillus* sp. I121 中的 5'-核苷酸酶的酶活也随着盐浓度的升高而增强。以上结果表明胁迫条件下这些蛋白质的活性变化与其表达量变化相一致。

在前面的研究中，我们观察到在盐胁迫条件下，胞内谷氨酸的含量经历一个先升高(0.9 mol/L NaCl)再下降(2.5 mol/L NaCl)的过程。由于谷氨酸不仅可以作为渗透调节物质在胞内积累，而且也是脯氨酸和四氢嘧啶生物合成共同的前体分子，为此，我们进一步测定了谷氨酸合成关键酶活性随盐胁迫的变化，结果见图 5，谷氨酸合酶(GOGAT)和谷氨酰胺合成酶(GS)的活性随盐浓度升高而显著增强，但谷氨酸脱氢酶(GDH)的活性基本不受盐胁迫的影响且维持在较低的水平。

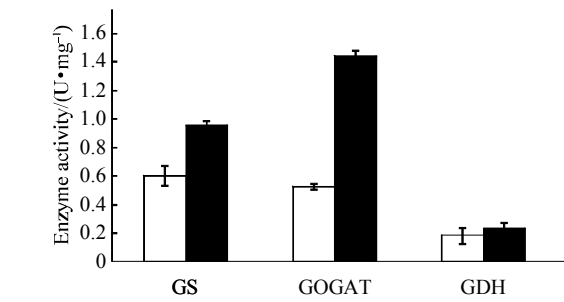


Fig. 5 Effects of salinity on the activities of glutamine synthetase (GS), glutamate synthase (GOGAT), glutamate dehydrogenase (GDH), in *Bacillus* sp. I121

Cells were grown in LB medium containing 0.9 mol/L and 2.5 mol/L NaCl, respectively, and harvested in the late exponential growth phase. Cytosolic fractions were extracted and used for enzyme assays. The data are the mean of five independent experiments. □: 0.9 mol/L NaCl; ■: 2.5 mol/L NaCl.

3 讨 论

盐碱是农业生产面临的主要非生物逆境之一, 在嗜盐细菌中研究细胞对抗盐胁迫的分子机制, 对于通过转基因等分子手段提高农作物的耐盐能力具有重要的参考和借鉴意义. 为了揭示细胞质膜及膜蛋白在感受和传递环境信号方面发挥的重要作用, 本研究对一株新的中度嗜盐菌 *Bacillus* sp. I121 质膜蛋白进行了蛋白质组学分析, 通过 BN/SDS-PAGE 双向电泳鉴定了 8 个盐胁迫响应质膜蛋白. 研究结果提示, *Bacillus* sp. I121 可能通过加快物质的跨膜吸收, 同时降低代谢水平的方式合成并积累相容性溶质, 从而对抗高盐胁迫.

已知 ABC 转运蛋白家族负责多种物质如糖类、肽类、氨基酸、包括相容性溶质的跨膜吸收^[26-27]. BLAST-P 分析显示本文鉴定的 ABC transporter permease 和负责糖类运输的 ABC transporter 具有较高的序列同源性(结果未列出), 但它具体的底物仍有待深入研究. 3-磷酸甘油(G3P)透性酶是一个 G3P/Pi 反向运输蛋白, 吸收 G3P 的同时将无机磷(Pi)运送到胞外, 但盐胁迫诱导 G3P 透性酶上调表达目前尚未见报道. 已知蓝细菌和中度耐盐菌 *Pseudomonads* 可合成葡糖甘油(glucosylglycerol, GG)作为相容性溶质^[28], 通常 GG 由 ADP-葡萄糖和 G3P 在磷酸葡萄糖甘油合酶的催化下生成葡糖甘油-磷酸, 再脱去磷酸生成 GG^[29]. G3P 也可以在 G3P 磷酸酶催化下直接生成甘油, 然而迄今为止还没有嗜盐细菌积累 GG 或甘油作为相容性溶质的报道. 我们认为, ABC 转运蛋白和 3-磷酸甘油透性酶的上调表达, 反映出 *Bacillus* sp. I121 在盐胁迫下跨膜物质运输相对活跃.

本研究发现琥珀酸脱氢酶(SDH)的表达和活性在高盐胁迫(2.5 mol/L NaCl)时均下降. 原核细胞中, SDH 定位在细胞质膜, 既参与了三羧酸循环又是电子传递链的一部分(复合物 II). SDH 的下调证明在盐胁迫下 *Bacillus* sp. I121 的能量代谢受到了抑制, 这显然与上述活跃的跨膜运输相矛盾. 一种可能的解释是 SDH 的下调导致 TCA 循环中间产物如 α -酮戊二酸不断积累. 我们的结果显示, 能够催化 α -酮戊二酸生成谷氨酸的谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶的酶活在盐胁迫下显著升高(图 5). 由于谷氨酸是脯氨酸合成的前体分子, 同时也为四

氢嘧啶的合成提供氨基, 因此在较高盐浓度下, *Bacillus* sp. I121 可以通过加快跨膜运输, 同时抑制能量代谢的方式合成大量谷氨酸, 为脯氨酸和四氢嘧啶的合成准备前体分子. Saum 和 Müller^[30-31]的研究证明, 中度嗜盐菌 *Halobacillus halophilus* 在环境盐浓度低于 1 mol/L 时主要积累谷氨酸, 当盐浓度高于 1 mol/L 时则以脯氨酸和四氢嘧啶为主要的相容性溶质, 这与本文报道的结果基本一致(图 1). 外源添加谷氨酸可部分促进细胞生长(图 2), 表明在 *Bacillus* sp. I121 中可能存在谷氨酸吸收系统. 由于 ABC 运输蛋白、G3P 透性酶的上调以及 SDH 的下调主要发生在高盐浓度下(2.5 mol/L NaCl), 我们推测在较低盐浓度下质膜上的谷氨酸吸收系统发挥主要作用, 由于 *Bacillus* sp. I121 是一种中度嗜盐菌, 在一般的生长条件下(NaCl 浓度 1 mol/L 左右)这一系统的表达有助于谷氨酸积累. 而在高盐条件下, 细胞将自身合成更多的谷氨酸, 为脯氨酸和四氢嘧啶的积累做准备.

在谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶这一双酶催化途径中, 1 分子 α -酮戊二酸与 1 分子 NH_3 净合成 1 分子谷氨酸. 除了 α -酮戊二酸, 我们的研究结果也提示了 NH_3 的来源. 嘧啶核苷转运蛋白受盐胁迫诱导, 这一蛋白质可以和细胞膜上的 5'-核苷酸酶配合, 将嘧啶核苷转运到胞内. 细胞内丰富的嘧啶核苷能够为谷氨酸以及脯氨酸和四氢嘧啶的合成提供充足的氮源. 事实上, Rönisch 等^[32]对 *Corynebacterium glutamicum* 的研究发现, 在氮源充足的情况下脯氨酸是主要的相容性溶质, 如果氮源减少, 脯氨酸的含量也会随之下降. 此外, 嘧啶核苷代谢产生 NH_3 的同时也会产生甲酸盐, 这也印证了甲酸脱氢酶(FDH)在盐胁迫下表达和活性都上调的结果(图 3, 4), 作为硝酸盐呼吸途径的一个组成部分, 定位在细胞膜上的 FDH 负责甲酸的还原, 同时产生 CO_2 .

综合以上分析, 我们提出了 *Bacillus* sp. I121 可能的耐盐机制. 如图 6 所示, 高盐胁迫下细胞大量吸收外界能量物质, 由于 TCA 循环受到抑制, 中间产物如 α -酮戊二酸会积累并通过谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合酶双酶途径合成谷氨酸. 胞内充足的氮源为谷氨酸的合成, 以及随后脯氨酸和四氢嘧啶的合成和积累提供了保证.

- [11] Marmagne A, Rouet M A, Ferro M, *et al.* Identification of new intrinsic proteins in *Arabidopsis* plasma membrane proteome. *Mol Cell Proteomics*, 2004, **3**(7): 675–691
- [12] Cheng Y, Qi Y, Zhu Q, *et al.* New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress. *Proteomics*, 2009, **9**(11): 3100–3114
- [13] Schagger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 1991, **199**(2): 223–231
- [14] Chen X, Zhang W, Xie Y, *et al.* Comparative proteomics of thylakoid membrane from a chlorophyll b-less rice mutant and its wild type. *Plant Sci*, 2007, **173**(4): 397–407
- [15] Grieve C M, Grattan S R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil*, 1983, **70**(2): 303–307
- [16] Pesci P. Involvement of Cl in the increase in proline induced by ABA and stimulated by potassium chloride in barley leaf segments. *Plant Physiol*, 1989, **89**(4): 1226–1230
- [17] Pons A, Roca P, Aguiló C, *et al.* A method for the simultaneous determination of total carbohydrate and glycerol in biological samples with the anthrone reagent. *J Biochem Biophys Methods*, 1981, **4**(3–4): 227–231
- [18] Kuhlmann A U, Bremer E. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* sp. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(2): 772–783
- [19] 李 东, 孙家义. 2, 4- 二硝基氟苯柱前衍生高效液相色谱法测定 18 种氨基酸. *化学分析计量*, 2004, **13**(1): 18–22
Li D, Sun J Y. *Chemical Analysis and Meterage*, 2004, **13**(1): 18–22
- [20] Bonete M J, Perez-Pomares F, Diaz S, *et al.* Occurrence of two different glutamate dehydrogenase activities in the halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **226**(1): 181–186
- [21] Bohannon D E, Rosenkrantz M S, Sonenshein A L. Regulation of *Bacillus subtilis* glutamate synthase genes by the nitrogen source. *J Bacteriol*, 1985, **163**(3): 957–964
- [22] Bender R A, Janssen K A, Resnick A D, *et al.* Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol*, 1977, **129**(2): 1001–1009
- [23] Hederstedt L, Hedén L O. New properties of *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase altered at the active site. *Biochem J*, 1989, **260**(2): 491–497
- [24] Rittmann D, Sorger-Herrmann U, Wendisch V F. Phosphate starvation-inducible gene *ushA* encodes a 5' nucleotidase required for growth of *Corynebacterium glutamicum* on media with nucleotides as the phosphorus source. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(8): 4339–4344
- [25] Enoch H G, Lester R L. The purification and properties of formate dehydrogenase and nitrate reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1975, **250**(17): 6693–6705
- [26] Xavier K B, Martins L O, Peist R, *et al.* High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J Bacteriol*, 1996, **178**(16): 4773–4777
- [27] Kappes R M, Kempf B, Kneip S, *et al.* Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 1999, **32**(1): 203–216
- [28] Empadinhas N, da Costa M S. Diversity and biosynthesis of compatible solutes in hyper/thermophiles. *Int Microbiol*, 2006, **9**(3): 199–206
- [29] Ferjani A, Mustardy L, Sulpice R, *et al.* Glucosylglycerol, a compatible solute, sustains cell division under salt stress. *Plant Physiol*, 2003, **131**(4): 1628–1637
- [30] Saum S H, Müller V. Salinity-dependent switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *J Bacteriol*, 2007, **189**(19): 6968–6975
- [31] Saum S H, Müller V. Growth phase-dependent switch in osmolyte strategy in a moderate halophile: ectoine is a minor osmolyte but major stationary phase solute in *Halobacillus halophilus*. *Environ Microbiol*, 2008, **10**(3): 716–726
- [32] Rönsch H, Krämer R, Morbach S. Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. *J Biotechnol*, 2003, **104**(1–3): 87–97

Analysis of Proteins in Plasma Membrane From Halophilic Bacteria by Two Dimensional Blue Native Gel Electrophoresis*

LIU Xiao-Yu, LI Liang, ZHAO Xin, CHENG Yan-Wei, ZHANG Wei**

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing Agricultural University-GE Healthcare Biosciences
Proteomics Research Cooperative Demonstration Laboratory, Nanjing 210095, China)

Abstract In order to reveal the mechanisms of cell osmo-adaptation to salt stress, a newly identified moderately halophilic *Bacillus* sp. I121 was used to study the salt-stress responding proteins. Differential proteomic analysis of the purified plasma membrane fractions were performed by two dimensional Blue-Native/SDS-PAGE. Eight proteins corresponding to NaCl were identified by MALDI-TOF/TOF. Up-regulated proteins under salt stress include an ABC transporter permease, glycerol-3-phosphate permease, pyrimidine nucleotide transporter, formate dehydrogenase, and down-regulated proteins include succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit, flavoprotein subunit, cytochrome b-556 subunit, and a hypothetical membrane protein similar to charperone DnaJ. Some of these changes were further verified by enzyme activity assay. Most of these proteins are highly hydrophobic trans-membrane protein, and responsible for material transport across membrane and energy metabolism. These results indicated that in halophilic *Bacillus* sp. I121, higher salt stress activated material transport across plasma membrane, and compatible solutes, such as proline and ectoine, could be synthesized through suppressed TCA cycle. The research further demonstrated that besides the protein complexes in mitochondria and chloroplast, BN/SDS-PAGE is also a powerful tool for the protein complexes in plasma membrane.

Key words halophilic *Bacillus*, compatible solute, plasma membrane, protein complex, blue native gel electrophoresis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00410

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30771300) and Hi-Tech Research and Development Program of China (2007AA10Z114).

**Corresponding author.

Tel: 86-25-84396556, E-mail: wzhang@njau.edu.cn

Received: September 14, 2009 Accepted: March 18, 2010