

高表达 PGA 的枯草芽孢杆菌蛋白质组学研究

张 虹, 蒋红亮, 赵辅昆, 丁 明

(浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

摘 要: 为了解外源蛋白高表达时枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)表达系统胞内蛋白质组的变化,实验建立了青霉素 G 酰化酶 (Penicillin G Acylase, PGA) 高表达 *B. subtilis* 系统,可达到 1.6 g/L 的表达量以及 10 U/mL 的酶活;通过双向电泳技术(2-DE)分离 PGA 高表达以及低表达重组菌中胞内蛋白,软件分析结果显示,两者胞内蛋白表达差异极大;通过 MALDI-TOF-TOF 质谱鉴定出其中 6 个差异蛋白,其中 4 个与 PGA 高表达抑制菌体生长相关,而 PhoR 和 YxiE 则与 PGA 高表达分泌胁迫机制有关。

关键词: PGA; MALDI-TOF-TOF; 双向电泳; 蛋白质组

中图分类号: Q784 **文献标识码:** A

0 引 言

B. subtilis 是应用于工业及医药临床用蛋白大量生产的重要革兰氏阳性菌表达系统,对其研究已经开展了 40 多年。1997 年其全基因组序列的发布^[1]为 *B. subtilis* 的基因工程改造、构建具有重要工业应用价值的工程菌株提供了详细的背景资料。

目前为止,对于 *B. subtilis* 表达系统的改造主要着眼于:a)根据 *B. subtilis* 自身缺陷设计相应的方法,如构建蛋白酶缺失菌株^[2],开发能稳定存在的质粒或构建 M3 缺失菌株^[3];b)提高外源蛋白的转录翻译以及运输水平,如采用强启动子 Pamy^[4] P43^[5];c)优化基因组,随 1997 年 *B. subtilis* 全基因组序列公布,其中重要的基因功能的研究也开始进行^[6],鉴别对生长和存活重要的基因,并敲除一些非必须基因和原噬菌体区域,可构建基因组最优化表达系统,达到最佳生产目标蛋白的目的。

为更好指导 *B. subtilis* 表达系统的改造,有必要全面了解 *B. subtilis* 表达系统表达大量外源蛋白时胞内蛋白质组变化,从而掌握其应对分泌压力胁迫机制,更好地为工业生产服务。目前对于其在外源蛋白高表达条件下分泌机制的研究主要在 RNA 而非蛋白质水平上进行^[7-8],本实验采用胞内比较蛋白质组学方法,有利于直接分析其胞内功能网络的变化。

1 材料和方法

1.1 实验材料

Bacillus subtilis 168 本实验室保存;pUB110 本实验室保存;pAcc+pUB110 本实验构建,相关信息如图 1 所示;IPG 胶条 (24 cm,pH3~10NL;24 cm,pH4~7)购于 Bio-Rad 公司;4700 MALDI-TOF-TOF 质谱仪购于 Applied Biosystems 公司,双相电泳有关仪器购于 GE Healthcare 公司。

1.2 PGA 高表达 *B. subtilis* 构建

将 *E. coli*-*B. subtilis* 穿梭质粒 pAcc+pUB110 经过 *Eco*RI 单酶切后,胶回收大片段,并用 T4 Ligase 连

接,将酶切连接产物与 pUB110 转化 *B. subtilis*168,转化方法参考 Spizizen 法^[9],利用质粒所带卡那霉素抗性基因筛选重组子,并用 PCR 方法鉴定,转化子分别命名为 *B. subtilis* 168/pAcc + pUB110 和 *B. subtilis* 168/pUB110。PCR 引物设计根据质粒大片段上的一段序列,根据引物设计原则,用 vectorNTI 设计一段最佳引物,并由上海英俊生物技术有限公司合成,设计的引物为:

Primer1: 5'-ATACTGCAGGATCCATGCTGTCCAGACTGTC-3'

Primer2: 5'-ATACCTGCAGGCATATGTCTTCCTCCCTTCTTTATCAT-3'

1.3 PGA 表达量测定

将转化成功单克隆于 37℃ 250 r/min 摇床培养 12 h 后按 1 : 100 转接于 50 mL 带 kan 抗性 (15 μg/mL) 的表达培养基 (KH₂PO₄ 0.9 g/L, K₂HPO₄ · 3H₂O 1.179 g/L, NH₄Cl 5 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.025 g/L, CaCl₂ 0.01 g/L) 中,24 h 37℃ 摇床培养后取 1 mL 菌液离心取上清,与 3×loading buffer 混合,沸水中煮 5 min,再 12 000 r/min 离心 3 min,制好的样品用 12% SDS-PAGE 胶分离。为确定所得条带为 PGA 两亚基,分别取点进行质谱鉴定。并通过 Gel-pro Analyser 软件计算其在胞外蛋白中所占比例,并测定胞外蛋白总浓度,计算 PGA 的表达量。

1.4 PGA 酶活测定

PGA 酶活测定采用 NIPAB 法^[10]。

1.5 2-DE 样品制备

500 μL 裂解液 (0.01 mol/L Tris-HCL, pH 7.4; 1 mmol/L EDTA; 8 mol/L Urea; 0.05 mol/L DTT; 体积分数为 10% glycerol; 体积分数为 4% CHAPS; 浓度为 20 g/L 的 IPG buffer 中收集 15 OD 菌体,350 W、5 s 超声,10 s 间隔,80 次,4℃ 45 000 g 离心 1 h,取上清分装。

1.6 PGA 高表达菌株及低表达菌株双向电泳

采用杯上样进行一向等电聚焦,按每根胶条 250 μg 蛋白样品上样。一向等电聚焦结束后,用体积分数为 1% DTT 和体积分数为 2.5% 碘乙酰胺各平衡 15 min。转移至浓度为 12.5% 的 SDS-PAGE 凝胶上进行二向电泳,电泳后银染 SDS-PAGE 凝胶,扫描后利用 ImageMaster™ 2D Platinum 5.0 软件对双相电泳图谱分析,确定差异表达蛋白质点。SDS-PAGE 凝胶水洗 3 遍后,用取点笔取点。

1.7 MALDI-TOF-TOF 质谱分析

取出的凝胶蛋白差异点进行胶内酶解,方法参照 Shevchenko 等^[11]实验方法,外标使用 Applied Biosystems 公司的标准品,每个校正点加 0.6 μL 标准品。采用 GPS Explorer 3.5 软件包和 Mascot 2.0 数据库搜索软件对质谱分析结果进行数据库搜索。

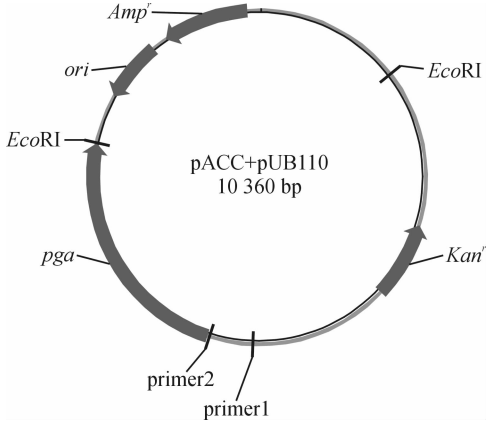
2 结果与讨论

2.1 高表达菌株构建、表达量以及酶活

2004 年 Wester 等证明了 AmyQ 不是唯一能引起分泌压力胁迫反应的分泌蛋白,外源和内源蛋白如 Lipase 和 Human Interleukin-3 都能引起分泌压力胁迫反应,且分泌胁迫反应的强度与分泌蛋白的产量有关^[12]。从转录组学得到的数据显示,*B. subtilis* 表达系统得到外源蛋白产量越高,所引起的转录组学差异也就越大^[7]。

PCR 鉴定重组子结果如图 2 所示,1,4,5,7,9,10 有明显亮条带,且大小接近 500 bp,与实际 465 bp 大小相符,因此 1,4,5,7,9,10 为转化成功的阳性克隆,挑取此单克隆于 3 mL 带 Kan 抗性 LB 液体培养基 (15 μg/mL),37℃ 250 r/min 培养 12 h 后用 50% 甘油按 1 : 4 保菌,甘油终浓度为 10%。

*B. subtilis*168/pUB110 和 *B. subtilis*168/pAcc+pUB110 PGA 活力比较如图 3 所示,两个重组菌的菌体



ori 为 *E. coli* 复制起点; Amp^r: 氨苄青霉素抗性基因; pga: 带有 Pamy 的 PGA 编码序列; Kan^r: 卡那霉素抗性基因

图 1 pACC+pUB110 质粒信息

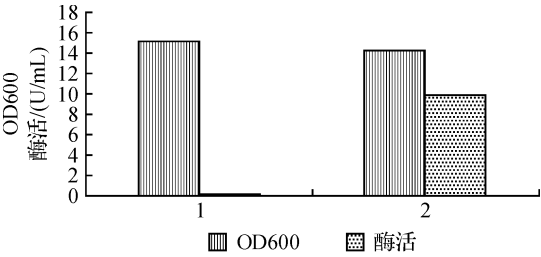
生长浓度相近,但酶活相差极大,*B. subtilis*168/pUB110 几乎没有酶活,而 *B. subtilis*168/pAcc+pUB110 可达 11 U/mL,比 1999 年黄艳红 24 h 6 U/mL 高将近 2 倍^[13]。



1,4,5,6,7,8,9,10 泳道为转化成功的重组菌 *B. subtilis*168/pAcc+pUB110;2,3 泳道为转化失败的菌株;11 泳道为 *B. subtilis*168 对照;M 为 DNA marker;Marker III

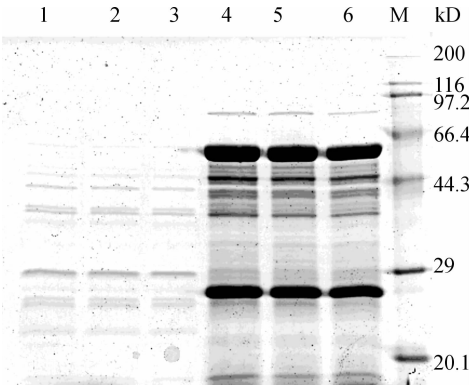
图 2 *B. subtilis*168/pAcc+pUB110 转化子 PCR 鉴定

胞外蛋白电泳图如图 4 所示,PGA 含有两个亚基 a 和 B,大小分别为 21.88 kD 和 54.95 kD。为证实图 2 中两高亮条带是 PGA 的两个亚基,对其取点进行质谱鉴定,以 a 亚基为例,其一级质谱和二级质谱分别如图 5 和图 6 所示。Mascot 软件数据库搜索结果显示该蛋白为来源于 *Bacillus megaterium* 的青霉素 G 酰化酶 PGA。通过 Gel-pro Analyser 软件分析得,a 和 B 分别占总蛋白的 43%和 30%,而通过 brandford 蛋白定量方法确定 *B. subtilis*168/pAcc+pUB110 胞外总蛋白浓度为 2.28 g/L,因此 PGA 浓度为 1.60 g/L。而 *B. subtilis*168/pUB110 胞外蛋白浓度为 0.23 g/L,远远小于 *B. subtilis*168/pAcc+pUB110 的胞外蛋白含量,可以推测这个时期胞外蛋白酶含量不高,还未进入大量分泌胞外蛋白酶的稳定期。



1: *B. subtilis*168/pUB110; 2:*B. subtilis*168/pAcc+pUB110

图 3 *B. subtilis*168/pUB110 和 *B. subtilis*168/pAcc+pUB110PGA 活力比较



上样量均为 20 μ L(3 \times loading buffer);1~3 泳道为 *B. subtilis*168/pUB110 胞外上清,4~6 泳道为 *B. subtilis*168/pAcc+pUB110 胞外上清

图 4 胞外蛋白 SDS-PAGE 电泳图

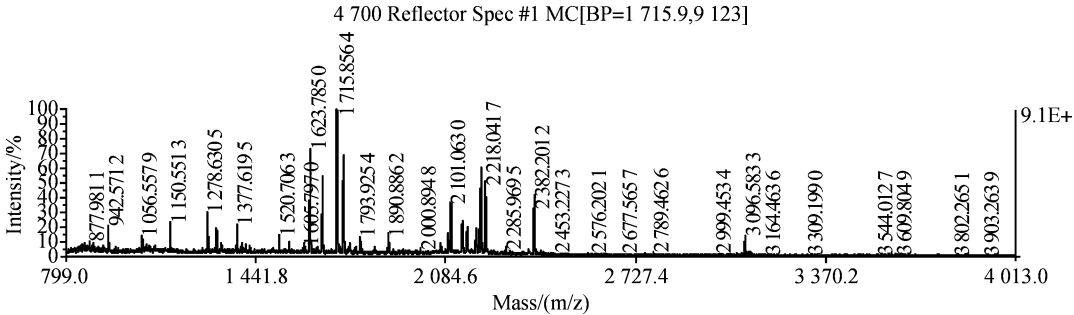


图 5 PGA a 亚基一级质谱图

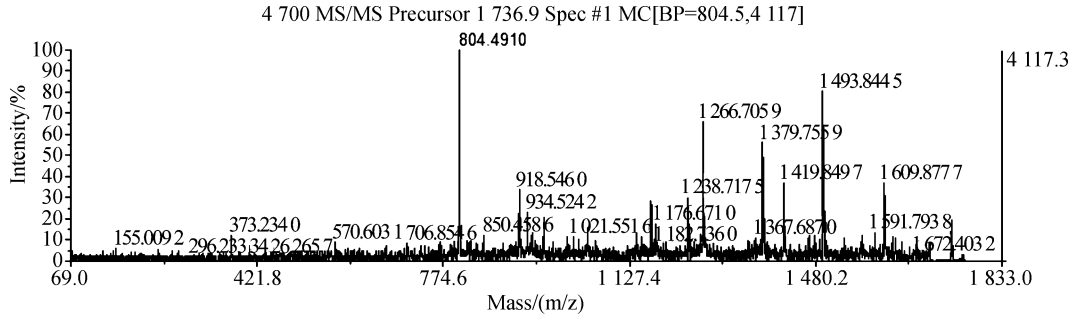


图 6 PGA a 亚基二级质谱图

2.2 取样时间点

本实验采用了淀粉诱导表达系统使 PGA 在对数生长期开始大量表达积聚,减少蛋白酶对 PGA 产量的影响,因此对数生长期 *B. subtilis* 抗分泌压力胁迫机制对外源蛋白的工业化生产具有重要指导意义。Sec 分泌途径元件在对数生长后期逐步达到最大的表达^[14], 因此选择在对数生长后期、稳定期之前作为最佳取样时间点有利于分析在 sec 途径达到饱和状态下,菌体是如何调节胞内蛋白的表达使适应高表达压力胁迫。

为具体确定最佳取样时间点,以每 4 h 取一次样绘制 250 r/min,37°培养条件下 50 mL 中 *B. subtilis* 168/pUB110 和 *B. subtilis* 168/pAcc+pUB110 的生长曲线以及 *B. subtilis* 168/pAcc+pUB110 的酶活曲线,结果如图 7 所示。从实验结果可以看出,*B. subtilis* 168/pAcc+pUB110 的生长曲线比 *B. subtilis* 168/pUB110 滞后,其对数生长期延长。*B. subtilis* 168/pUB110 在 24~28 h 摇瓶培养时已进入稳定期,而 *B. subtilis* 168/pAcc+pUB110 则仍处在对数生长后期,28~32 h 时才逐渐进入稳定期。选取 24 h 为取样时间点,此时两菌株都处于对数生长后期,所处菌体生长状态相同,且酶活达到 11 U/mL,且通过 GelPro Analyser 软件分析 SDS-PAGE 定量,其产量约在 1.6 g/L 以上,因此符合:1)对照 *B. subtilis* 168/pUB110 同 *B. subtilis* 168/pAcc+pUB110 的菌体生长状态一致,排除因菌体状态不一致引起的胞内蛋白质组差异;2)PGA 产量达到 1.6 g/L,分泌压力较大。

2.3 差异蛋白质组分析

相同的实验条件和参数设置的情况下,两个实验组双向电泳实验重复 3 次,获得重复性好的双向电泳图谱,图 8 所示为一次代表性实验结果。

通过 ImageMaster™ 2D Platinum 5.0 图谱分析软件对 3 组重复的图谱结果进行分析,认为其中表达差异值>1.5,<8 的蛋白点为差异蛋白点,结果显示:pH3~10NL 胶条含有 55 个上调蛋白,12 个下调蛋白;pH4~7 胶条含 18 个上调蛋白,3 个下调蛋白。对其进行 MALDI-TOF-TOF 质谱分析,鉴定出其中 6 个蛋白,如表 1 所示。

PhoR 属于 PhoP/PhoR 双组份调节系统,启动子被 σ A 特异识别,属于第一类抗胁迫机制^[15],通常由于培养基中缺乏磷酸而诱导表达。PhoR 是膜结合蛋白磷酸激酶,在受到环境刺激时使 PhoP 磷酸化,由 PhoP 可调节 PhoA 和 PhoB 碱性磷酸酶的表达,以及磷酸二酯酶基因的表达,介导孢子初期形成。本实验中该蛋白微量上调,推测 *B. subtilis*168/pAcc+pUB110 通过形成孢子来对抗外源蛋白的高表达压力及由于其大量积累而在胞外形成的渗透压。YxiE 是功能未知蛋白,通过基因同源序列比对发现该蛋白属于细菌 USPA 家族(universal stress protein A family)(<http://www.uniprot.org>)^[1]。*E. coli* 中,USPA 的主要功能还不明确,目前认为它主要在生长受到限制的细胞中起 DNA 修复的功能,多种影响细胞生长的环境因素都会诱导 USPA 蛋白的表达,比如磷酸缺乏,抗菌肽刺激等^[16],但也有报道证实一些环境刺激反而抑制 *uspA* 基因的表达,比如温度,四环素等^[17],其具体机制未知,而受分泌压力胁迫时其表达量下降的现象还未有报道。*B. subtilis*168/pAcc+pUB110 的生长曲线延后,24 h 时其生长受到限制,推测 YxiE 的表达量上升,但在本实验中 YxiE 的表达量反而下降,对于这种独特的现象我们将在以后的工作中做进一步研究。

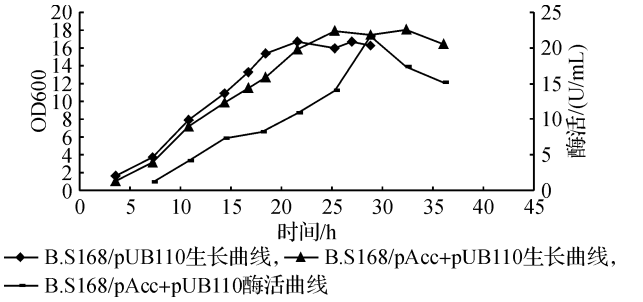


图 7 *B. subtilis*168/pAcc+pUB110 和 *B. subtilis*168/pUB110 生长曲线和酶活曲线

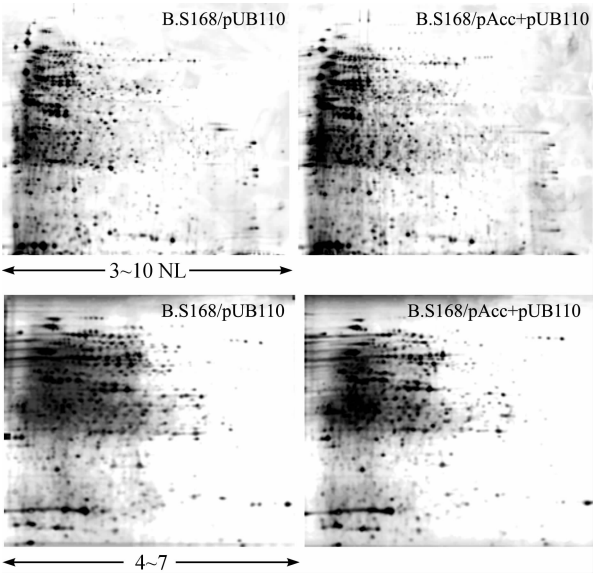


图 8 双向电泳结果

注:图中 4 块胶分子量从上到下依次减小,pH 值从左至右递增

表 1 质谱鉴定表达差异蛋白

Accession	Accession No.	Pep. count	Protein score	功能	表达状态
IMPDH	P21879	7	74	GMP biosynthesis Purine biosynthesis	上调
Arginase	P39138	8	81	Nitrogen metabolism; urea cycle	上调
PhoR	P23545	3	37	Two-component regulatory system	上调
YjcG	O31629.1	4	61	RNA metabolic process(Inferred from electronic annotation)	上调
XPRTase	P42085.1	4	55	Purine metabolism; XMP biosynthesis via salvage pathway	下调
YxiE precursor	P42297	3	51	response to stress	下调

Arginase 参与氮素代谢,其表达量上升,推测 *B. subtilis* 168/pAcc+pUB110 在当前状态代谢活动较 *B. subtilis* 168/pUB110 旺盛。IMPDH 和 XPRTase 分别参与嘌呤的从头合成途径和补救合成途径,但两者在 PGA 高表达时 *B. subtilis* 中的表达状态却不一样,IMPDH 在 *B. subtilis* 168/pAcc+pUB110 中的表达量高于 *B. subtilis* 168/pUB110,而 XPRTase 却相反,推测此时 *B. subtilis* 168/pAcc+pUB110 胞内 DNA 的复制活动比 *B. subtilis* 168/pUB110 要剧烈,嘌呤的从头合成途径占主要地位,而 24 h 后者则进入稳定期,而前者菌体数量急剧上升,超过后者的状态从侧面证实了这一推论。YjcG 也是一种功能未知蛋白,通过序列分析发现其具有 2'-5'RNA 连接酶家族特性,该蛋白表达量的上调也与 *B. subtilis* 168/pAcc+pUB110 急剧分裂增殖的推论相符合。但这 4 种差异蛋白主要由菌体生长状态引起,而不是 PGA 高表达分泌压力引起,因此其主要原因在于 PGA 的高表达抑制了菌体的生长,延长了其对数生长期。

3 结 论

本论文在得到高表达对照重组菌 *B. subtilis* 168/pAcc+pUB110 和 *B. subtilis* 168/pUB110 的基础上,通过双向电泳技术和质谱鉴定的方法在蛋白质水平上研究 PGA 高表达条件下 *B. subtilis* 胞内蛋白质组的变化。结果显示,PGA 的高表达抑制了菌体的生长,并引起了 PhoR 蛋白的上调和 YxiE 蛋白的下调。虽然本文未能对这两个蛋白在 PGA 高表达压力胁迫具体调节机制进行研究,相信对这一机制的研究不但会在理论上扩展对 *Bacillus subtilis* 压力胁迫的认识,而且会对开发 *Bacillus subtilis* 高表达系统提供有益的帮助。

参考文献:

[1] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* [J]. *Nature*, 1997, 390: 249-256.

[2] Wu S C, Wong S L. Engineering of a *Bacillus subtilis* strain with adjustable levels of intracellular biotin for secretory production of functional streptavidin[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(3): 1102-1108.

[3] Westers H, Dorenbos R, Dijk J M, et al. Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*[J]. *Mol Biol Evol*, 2003, 20(12): 2076-2090.

[4] Fahnstock S R, Fisher K E. Expression of the staphylococcal protein A gene in *Bacillus subtilis* by gene fusions utilizing the promoter from a *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase gene[J]. *J Bacteriol*, 1986, 165(3): 796-804.

[5] Lee S J, Kim D M, Bae K H, et al. Enhancement of secretion and extracellular stability of staphylokinase in *Bacillus subtilis* by wprA gene disruption[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(2): 476-480.

[6] Kobayashi K, Ehrlich S D, Albertini A, et al. Essential *Bacillus subtilis* genes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(8): 4678-4683.

[7] Hyrylainen H L, Sarvas M, Kontinen V P. Transcriptome analysis of the secretion stress response of *Bacillus subtilis* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 67(3): 389-396.

[8] Antelmann H, Darmon E, Noone D, et al. The extracellular proteome of *Bacillus subtilis* under secretion stress conditions [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 49(1): 143-156.

[9] Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1958, 44(10): 1072-1078.

[10] 上海第三制药厂. 一种快速、简便的青霉素酰化酶活力测定方法[J]. *医药工业*, 1978(7): 22-24.

[11] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, et al. A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS a-

- lone[J]. Biochem Soc Trans, 1996, 24(3): 893-896.
- [12] Westers H. Critical determinants for the general secretion stress response in *Bacillus subtilis*. Genome engineering and protein secretion stress in the Bacell factory[M]. University of Groningen, 2004: 117-138.
- [13] 袁中一, 杨 晟, 黄 鹤. 巨大芽孢杆菌青霉素 G 酰化酶基因在枯草杆菌中的高表达[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999, 31(5): 601-603.
- [14] Lulko A T, Veening J W, Buist G, et al. Production and secretion stress caused by overexpression of heterologous alpha-amylase leads to inhibition of sporulation and a prolonged motile phase in *Bacillus subtilis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(16): 5354-5362.
- [15] Pragai Z, Allenby N E, O'Connor N, et al. Transcriptional regulation of the *phoPR* operon in *Bacillus subtilis*[J]. J Bacteriol, 2004, 186(4): 1182-1190.
- [16] Freestone P, Nystrom T, Trinei M, et al. The universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* is phosphorylated in response to stasis[J]. J Mol Biol, 1997, 274(3): 318-324.
- [17] Kvint K, Nachin L, Diez A, et al. The bacterial universal stress protein: function and regulation[J]. Curr Opin Microbiol, 2003, 6(2): 140-145.

Proteomics Analysis of *B. S* 168 Overproducing PGA

ZHANG Hong, JIANG Hong-liang, ZHAO Fu-kun, DING Ming

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To get knowledge of proteomics of *bacillus subtilis* overproducing exogenous protein, Penicillin G Acylase(PGA) high expression *bacillus subtilis* is constructed, and which can reach high product of 1.6 g/L and enzyme activity of 10 U/mL. Then the authors separate the intracellular proteins of high expression and the control *bacillus subtilis* by 2-DE, and the result shows big differences between them. Six proteins are identified, of which four may be due to high expression of PGA inhibit cell growth, while the PhoR, and YxiE may relate to the high expression response mechanisms.

Key words: PGA; MALDI-TOF-TOF; 2-DE; proteomics

(责任编辑: 许惠儿)