

基于蛋白质组学的假单胞菌耐溶剂机制研究

宋亮^{1,2} 倪晔^{1,2*} 孙志浩^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要: 【目的】有机溶剂对微生物有强烈的毒害作用致使绝大多数微生物不能在较高的有机溶剂浓度下生长。为了探究微生物的耐溶剂性机制,由野生型假单胞菌 *Pseudomonas putida* JUCS 驯化获得一株能够在 60% (V/V) 的环己烷中生长的菌株 *P. putida* JUCT1。【方法】采用蛋白质二维电泳对 *P. putida* JUCT1 在不同溶剂条件下的蛋白组表达量的差异进行分析比对。【结果】从总共 22 个表达量差异均超过 50% 的蛋白质中,选取了 3 个高丰度蛋白质,通过 MALDI-TOF/TOF 鉴定为: 3-羟基异丁酸水解酶、蛋白质延伸因子 EF-Ts、异分支酸水解酶超家族(编码基因分别为 *mmsB*、*tsf*、*PSEEN0851*)。将这 3 个基因在大肠杆菌中重组表达,3 个蛋白均能不同程度地提高 *E. coli* JM109 的耐溶剂性,其中 3-羟基异丁酸脱氢酶(编码基因 *mmsB*)对菌株的溶剂耐受性影响最为显著。【结论】证明了运用蛋白组学的方法研究微生物的耐溶剂性的可行性,并为构建适用于工业化应用的溶剂耐受性整体细胞生物催化剂提供理论依据。

关键词: 耐溶剂性, 二维电泳分析, 恶臭假单胞菌, 菌株驯化, 环己烷

Organic-solvent-tolerant mechanisms of *Pseudomonas putida* based on proteomic analysis

SONG Liang^{1,2} Ni Ye^{1,2*} SUN Zhi-Hao^{1,2}

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] Most microorganisms can not grow under organic solvents of high con-

基金项目: 国家 973 计划课题(No. 2011CB710800); 江苏省自然科学基金课题(No. BK2011150); 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-11-0658); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目

*通讯作者: Tel: 86-510-85329265; 邮箱: yni@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2011-09-11; 接受日期: 2011-11-12

centration due to their toxicity. To elucidate the mechanisms of organic-solvent-tolerant (OST) of microorganism, an OST mutant *P. putida* JUCT1 capable of growing in the presence of 60% (V/V) cyclohexane was obtained by gradient adaptation in cyclohexane. **[Methods]** Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was used to compare and analyze the total cellular protein of JUCT1 when growing in the presence of 60% (V/V) cyclohexane or not. **[Results]** From 22 proteins whose intensity values show over 50% discrepancies under different solvent conditions, 3 high abundance protein spots were identified by MALDI-TOF/TOF spectra as 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, protein chain elongation factor EF-Ts, and isochorismatase superfamily hydrolase, and their corresponding genes *mmsB*, *tsf*, and *PSEEN0851* were expressed in the *E. coli* respectively. These the solvent tolerance of JM109 was significantly increase by these three proteins, particularly 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. **[Conclusion]** In this work, proteomics analysis was proven to be an effective strategy for exploring OST mechanism of microbial cells. Importantly, this work provides molecular basis for constructing OST whole-cell catalyst for industrial applications.

Keywords: Organic-solvent-tolerant (OST), Proteomic analysis, *Pseudomonas putida*, Adaptation, Cyclohexane

大多数的有机溶剂对微生物都是有毒害作用的, 有机溶剂能够破坏细胞膜表面的磷脂双分子层, 使细胞失去结构和功能上的完整性, 从而导致微生物细胞裂解死亡^[1-2]。研究表明, 有机溶剂对细胞的毒性大小可以用溶剂在辛醇和水中的分配系数($\text{Log } P_{ow}$)来表示, $\text{Log } P_{ow}$ 的值越低, 表示该溶剂的疏水性越高, 对微生物的毒害作用越大^[3]。然而在全细胞生物催化反应中, 为了降低产物的抑制作用和实现生物转化与分离的耦合, 提高转化效率, 常需要采用水/有机相两相体系^[4-5]。虽然微生物自身具有一定的溶剂耐受性, 但绝大多数微生物对有机溶剂的耐受性较低, 甚至 0.1% (V/V) 的有机溶剂就可以导致细胞的裂解死亡^[6], 因此探究微生物的耐溶剂性机制, 提高微生物细胞对有机溶剂的耐受性就显得尤为重要。

1989年, Inoue等在Nature上首次报道了筛选获得的 *Pseudomonas putida* 能够耐受 50% (V/V) 甲苯和高浓度的环己烷、二甲苯等^[3], 这改变了人们固有的微生物细胞无法耐受有机溶剂毒性的认识。此后, 关于微生物细胞的溶剂耐受性研究

有了较大的进展。1991年, Aono和Inoue的研究小组报道了通过溶剂平板筛选和NTG诱变成功获得了大肠杆菌耐溶剂突变株 OST 系列菌株^[7]。该小组对大肠杆菌 OST 菌株的研究显示, 对于细胞膜疏水性有明显影响的一些细胞膜组分的表达水平是影响大肠杆菌细胞溶剂耐受性的重要原因。细胞外膜上的脂多糖 LPS (Lipopolysaccharide) 成分的增加导致了细胞外膜疏水性降低, 从而使细胞溶剂耐受性增加^[8]。在对具有溶剂耐受性重组菌株与其野生型亲本菌株的生长对比时发现, 细胞外膜蛋白和应激反应蛋白与微生物细胞的耐溶剂性紧密相关。例如, 外膜蛋白 TolC 和应激反应基因 *robA* 和 *marA* 等的高效表达可以提高大肠杆菌的溶剂耐受性^[9-11]。基因芯片技术(DNA microarray)的应用也使得更多的耐溶剂性相关基因被发现, Shimizu 等发现 *glpC* 基因编码的一种膜蛋白(厌氧型甘油-3-磷酸脱氢酶 C 亚基), 能显著提高菌株的耐溶剂性, 其原因可能是细胞外膜结构的改变导致其疏水性的降低^[12]。另外, 甘露糖的磷酸转移酶系统 ManXYZ 在大肠杆菌中的

表达可以改变细胞膜表面的性质,使其对糖类的亲和性提高,从而对溶剂(正己烷)的耐受性有显著提高^[13]。在先前的研究中,大多数的研究均着重于从耐受性菌株的结构性质和寻找相关基因出发,探究微生物耐溶剂性的相关机制和分子机理。目前,采用蛋白质组学二维电泳技术研究微生物耐溶剂性的相关机制在国内外都未曾报道过。

蛋白质组学二维电泳技术作为常用的研究微生物特定表型的研究方法,可以分析不同微生物的蛋白表达量差异,找出与特定表型相关的蛋白组分。本研究采用二维电泳的方法,通过分析溶剂耐受性微生物恶臭假单胞菌 *P. putida* JUCT1 在不同溶剂条件下蛋白组的表达差异,尝试鉴定和验证耐溶剂相关的蛋白组分,并阐明其相关的分子机理。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* JUCT1 由耐受 1% (V/V) 甲苯的野生型菌株 *P. putida* JUCS 在溶剂压力下驯化获得,在 60% (V/V) 的环己烷中生长良好;大肠杆菌 JM109 为本实验室保藏。质粒 pQE-80L 购自于 QIAGEN 公司。

LB 培养基:胰蛋白胨 1.0%,酵母膏 0.5%, NaCl 1.0%, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

营养肉汤培养基:蛋白胨 1.0%,牛肉膏 0.3%, NaCl 0.5%, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

LBGMg 培养基:LB 培养基中加入 0.1% (W/V) 葡萄糖和 10 mmol/L $MgSO_4$ 。

1.2 溶液配制

裂解(水化)液:尿素 8 mol/L,硫脲 2 mol/L, DTT 65 mmol/L, CHAPS 4% (W/V), Tris 碱 40 mmol/L 和溴酚蓝 0.001% (W/V)。

胶条平衡液 I:尿素 8 mol/L, SDS 2% (W/V),

Tris-HCl (pH 8.8) 0.375 mol/L, 甘油 20% (V/V) 和 DTT 20 g/L。

胶条平衡液 II:尿素 8 mol/L, SDS 2% (W/V), Tris-HCl (pH 8.8) 0.375 mol/L, 甘油 20% (V/V) 和碘乙酰胺 25 g/L。

1.3 方法

1.3.1 恶臭假单胞菌 JUCS 菌株的驯化:首先, *P. putida* JUCS 在添加有 1% (V/V) 甲苯($\log P_{ow} = 2.5$)的营养肉汤培养基中, 30 °C、200 r/min 摇床培养 10 h 后, 转接到含有 5% (V/V) 环己烷($\log P_{ow} = 3.2$)营养肉汤培养基中, 摇床培养 10 h。将摇瓶中的菌液涂布平板, 在平板上添加 500 μ L 环己烷, 30 °C 静置培养至单菌落产生。挑选平板上的单菌落, 接入含有 10% (V/V) 环己烷培养基中摇床培养 10 h, 再将菌液涂布覆有 800 μ L 环己烷的平板。通过摇瓶培养和平板筛选的交替进行, 不断地提高摇瓶和平板中环己烷的加入量, 在经过 12 轮的筛选驯化后, 得到一株能够耐受 60% (V/V) 环己烷的菌株, 并命名为 *P. putida* JUCT1。

1.3.2 菌株培养及总蛋白的提取:恶臭假单胞菌 JUCT1 分别接种于营养肉汤液体培养基和含有 60% (V/V) 环己烷($\log P_{ow} = 3.2$)的营养肉汤液体培养基, 20% 装液量, 30 °C 摇床培养 12 h。在 8 000 r/min 和 4 °C 条件下离心 10 min, 收集菌体, 并用预冷的蒸馏水洗涤 2-3 次。

将收集得到的湿菌体称重, 每 200 mg 菌体重悬于 1.5 mL 细胞裂解(水化)液中。悬浮液于冰上进行超声破碎(超声功率为 300 W, 超声程序设置为超声 1 s 停 3 s, 30 min), 使细胞完全破碎。将细胞破碎液于 4 °C、20 000 \times g 离心 15 min, 去除沉淀的细胞碎片, 取上清即为细胞的全蛋白样品。采用 RC-DC 蛋白定量试剂盒(Bio-Rad 公司)对待测样品进行定量。

1.3.3 二维电泳:在预实验中, 使用 IPG 3-10 (7 cm, GE 公司)的预制干胶条, 以确定蛋白质样

品的分布区域, 其结果表明, 绝大多数蛋白质的分布区域为 pH 4-7 之间, 因此选用 IPG 4-7 的预制干胶条(13 cm, GE 公司)。将蛋白样品用裂解(水化)液稀释至 1.6 g/L, 稀释好的 250 μ L 蛋白样品置于水化盘中, 预制干胶条的胶面紧贴样品液, 使胶面与样品液之间无气泡产生, 水化盘 20 $^{\circ}$ C 避光放置 16 h。

使用 Ettan IPGphor 3 system (GE 公司)进行第一向等电聚焦(IEF), 在 20 $^{\circ}$ C 条件下, 设置程序如下: 50 V、30 min; 上升至 150 V、30 min; 1 h 上升至 500 V; 2 h 上升至 1 000 V; 3 h 上升至 4 000 V; 3 h 上升至 8 000 V; 8 000 V 保持, 40 000 V/h。其 Volt-Hours 总量为 67 400 V/h。IEF 后, 将胶条放入 10 mL 胶条平衡液 I 中, 水平摇床中缓慢摇晃 10 min 后, 放入 10 mL 胶条平衡液 II 中, 水平摇床中继续缓慢摇晃 15 min, 之后将胶条用超纯水轻轻洗涤两次, 转移至 12% SDS-PAGE 胶上。在 10 $^{\circ}$ C 进行第二相电泳, 第二相 SDS-PAGE 电泳分两步进行: ①2 W/胶条, 1 h; ②8 W/胶条, 4 h。电泳后的胶用考马斯亮蓝染液染色 2 h 后, 脱色至无背景颜色。

1.3.4 蛋白的分析鉴定: 胶经扫描后, 使用 PDQuestTM 2-D Analysis Software (Bio-Rad 公司)分析比对蛋白质点, 并采用基质辅助激光解吸电

离串联飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF)对切下相关蛋白质点进行鉴定。

1.3.5 *mmsB*、*tsf* 和 *PSEEN0851* 基因的克隆和重组菌株的构建: 以 *P. putida* JUCS 的基因组 DNA 为模板, 表 1 中的引物分别 PCR 扩增 *mmsB*、*tsf* 和 *PSEEN0851* 基因。表达载体 pQE-80L 和 PCR 产物经酶切、T₄ 连接酶连接过夜后, 重组质粒热转化至大肠杆菌 JM109 中。重组菌株在经 IPTG 诱导表达后, 8 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10 min, 收集菌体, 按照 1:8 (W/V)加入 20 mmol/L、pH 7.0 的磷酸盐缓冲液, 重悬菌体。悬浮液于冰上超声破碎(超声功率为 300 W, 超声程序设置为超声 1 s 停 3 s, 共 20 min)。分别取未离心的破碎液和在 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 条件下离心 10 min 的上清液进行 SDS-PAGE 表达验证。

1.3.6 重组菌株的溶剂耐受性验证: 大肠杆菌 JM109 是有机溶剂敏感型菌株, 在 2% (V/V)的环己烷(Log P_{ow} = 3.2)中生长被完全抑制。为检测目的基因重组表达后对大肠杆菌 JM109 的耐溶剂性影响, 将重组菌株接种于 LBGMg 培养基中, 培养基中加入终浓度为 0.02 mmol/L 的 IPTG。37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD_{660} 达到 0.2, 在培养基中加入 3% (V/V)的环己烷后, 继续培养, 并在 OD_{660} 下监测菌体生长情况。

表 1 本实验中所用引物
Table 1 Primers in this study

基因 Gene	引物 Sequences of primers (5'→3')
<i>mmsB</i>	F: ATCGGGATCCATGCGTATTGCATTTCATTGG
	R: CCCC <u>AAGCTT</u> TCAATCCTTCTTGCGATACC
<i>tsf</i>	F: CGCGGATCCATGGCAGCAATTACTGC
	R: CGCAAGCTTTTACTGCTTGGCGGCAG
<i>PSEEN0851</i>	F: CGCGGATCCATGGCTTTCCACTACAAC
	R: AACTGCAGCTACTTGGCCAGCTTGCTG

注: 下划线为限制性酶切位点。
Note: The underlined sequences are the restriction enzymes sites.

2 结果与分析

2.1 *P. putida* JUCT1 的耐溶剂性

野生菌株 *P. putida* JUCS 与驯化得到的菌株 *P. putida* JUCT1 在有机溶剂中生长曲线如图 1, 在 OD_{660} 达到 0.2 后, 在培养基中加入 60% (V/V) 的环己烷后, 野生菌株 *P. putida* JUCS 生长极为缓慢, 8 h 后其 OD_{660} 仅达到 0.39, 而在不添加有机溶剂的培养基中生长 OD_{660} 可达 1.0; *P. putida* JUCT1 则在有机溶剂中生长良好, 8 h 后 OD_{660} 可以达到 0.9 左右, 与不添加有机溶剂时的生长差异很小。采用加大生长环境压力的方法, 通过不断提高环境中有机溶剂浓度驯化得到的 *P. putida* JUCT1 菌株与野生菌株 *P. putida* JUCS 相比, 其有机溶剂耐受性得到较大地提高。同时, 驯化菌株在正常环境下的生长速率也不受到影响。

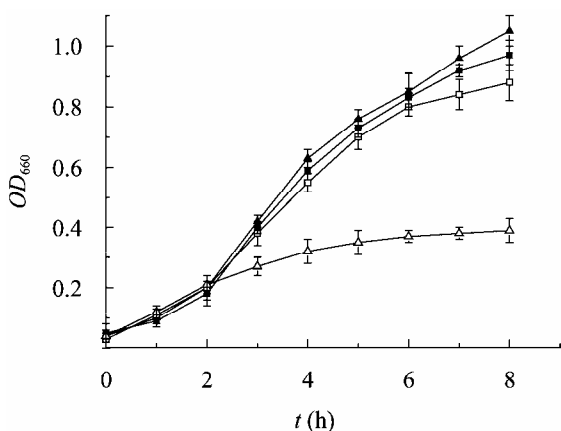


图1 有机溶剂对菌株 *P. putida* JUCT1 及其野生菌株的生长影响

Fig. 1 Effect of organic solvents on cell growth of *P. putida* JUCT1 and its parent strain JUCS

注: ▲: *P. putida* JUCS, 未加有机溶剂; ■: *P. putida* JUCT1, 未加有机溶剂; △: *P. putida* JUCS, 加入 60% (V/V) 的环己烷; □: *P. putida* JUCT1, 加入 60% (V/V) 的环己烷。

Note: ▲: *P. putida* JUCS, no organic solvent; ■: *P. putida* JUCT1, no organic solvent; △: *P. putida* JUCS, add to 60% (V/V) cyclohexane; □: *P. putida* JUCT1, add to 60% (V/V) cyclohexane.

2.2 二维电泳分析不同培养条件下 *P. putida* JUCT1 的蛋白表达量差异

在提取 *P. putida* JUCT1 的总蛋白过程中, 采用超声破碎使细胞裂解, 裂解(水化)液中的离液剂(主要包括尿素和硫脲)、两性离子表面活性剂 CHAPS、还原剂 DTT 和 Tris 碱能够使菌体内的亲水性蛋白和非亲水性蛋白完全溶解。通过高速冷冻离心去除细胞碎片, 得到的蛋白样品既最大限度的提取了菌体内的蛋白质, 也避免了其他杂质如核酸等的掺入。最终从 0.2 g 菌体中提取的蛋白量约为 10 mg。

在二维电泳胶上共检测到 486 个蛋白质点(图 2), 其蛋白点数与文献报道的 *P. putida* UW4 的总蛋白点数相似^[14], 说明这种提取细菌总蛋白的方法是可行的。与在未添加有机溶剂的培养基中生长的 *P. putida* JUCT1 菌株(图 2A)相比, 在含 60% (V/V) 环己烷(Log P_{ow} = 3.2)中生长的 *P. putida* JUCT1 菌株(图 2B)有 22 个蛋白质的表达量超过 50%。从二维电泳的图像中可以发现, 大多数表达差异量较大的蛋白质点都是低丰度蛋白。选取 3 个蛋白质表达量差异达到 70% 的高丰度蛋白质点(图 2), 采用 MALDI-TOF/TOF 鉴定后在数据库中比对, 3 个假单胞菌蛋白与所鉴定的蛋白匹配度较高, 它们分别是: 3-羟基异丁酸脱氢酶、蛋白质延伸因子 EF-Ts 和异分支酸水解酶超家族, 编码基因分别是 *mmsB*、*tsf* 和 *PSEEN0851*。3-羟基异丁酸脱氢酶是缬氨酸代谢过程中的必需酶, 它能够催化可逆的氧化反应将 L-3-羟基异丁酸氧化成甲基丙二酸半醛; 蛋白质延伸因子 EF-Ts 在蛋白质合成的延伸反应阶段有着十分重要的作用, 它催化 EF-Tu-GDP 复合物的再形成, 为结合氨基-tRNA 做准备; 异分支酸水解酶超家族的具体功能还不清楚, 尚无文献报道。

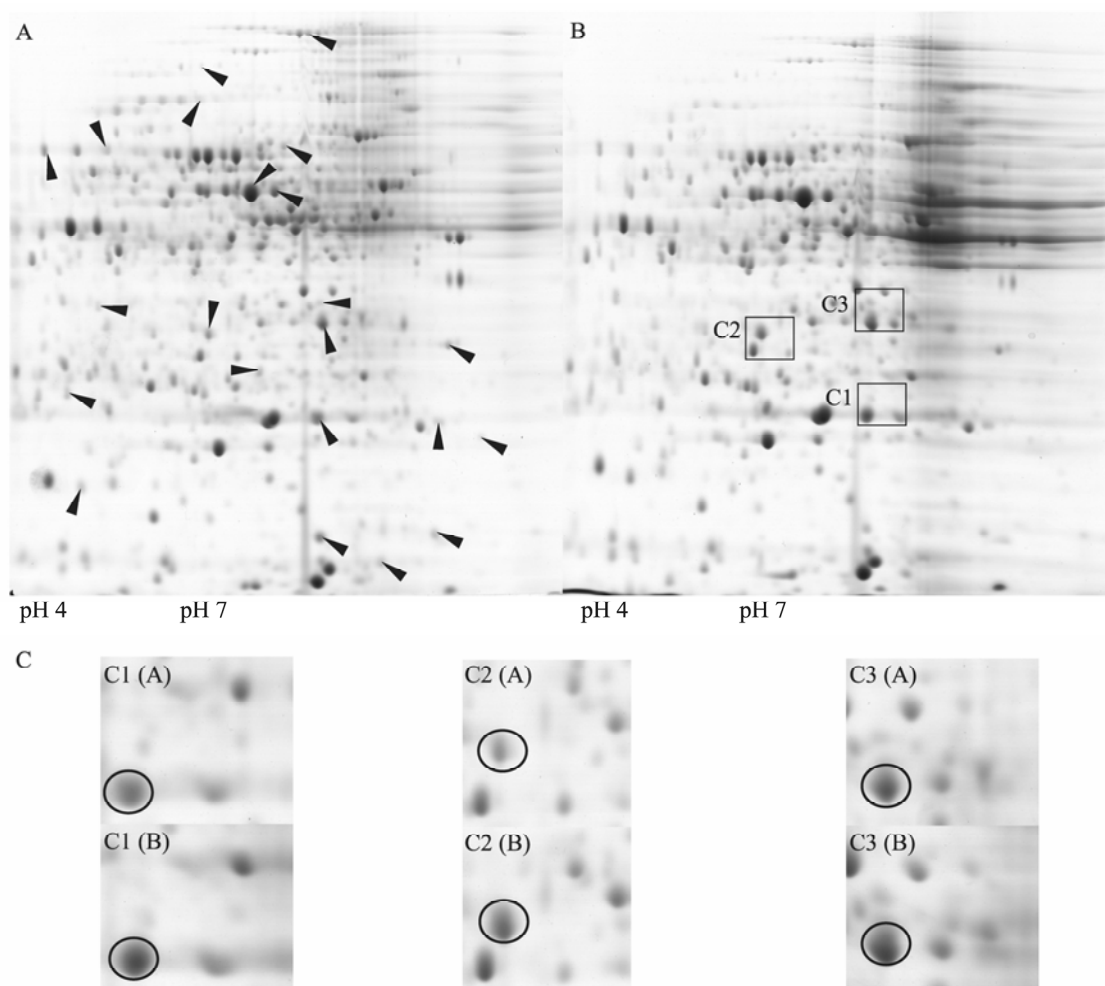


图2 菌株 *P. putida* JUCT1 在不同有机溶剂培养条件下的全蛋白二维电泳图

Fig. 2 2-DE images of total protein extracts of *P. putida* JUCT1 grown under different solvent conditions

注: A: 培养基中不含有有机溶剂; B: 培养基中含有 60% (V/V) 环己烷; C: 本实验选取的蛋白质点, C1-C3 的局部放大图, 箭头符号表示 A、B 两图谱中蛋白质差异量超过 50% 的蛋白质点。

Note: A: Nutrient medium without solvent; B: In the presence of 60% (V/V) cyclohexane; C: Magnification of C1-C3, the protein spots selected in this study are circled. Arrowheads indicate the protein spots exhibiting intensity discrepancy of over 50% in samples A and B.

2.3 *mmsB*、*tsf* 和 *PSEEN0851* 基因的克隆表达

PCR 扩增目的基因, *mmsB*, *tsf* 的基因大小约为 900 bp, 基因 *PSEEN0851* 约为 600 bp (图 3)。基因经测序后与野生菌株基因序列及数据库进行比对, DNA 序列完全一致, 表明蛋白质点的质谱鉴定结果正确, 同时证明筛选驯化后的菌株 *P. putida* JUCT1 的溶剂耐受性较高并非是由于耐溶剂性相关基因发生突变, 而与其蛋白表达量增加有关。

重组菌株经 IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 验证表达产物, 3-羟基异丁酸脱氢酶、蛋白质延伸因子 EF-Ts 的蛋白分子量大小约为 35 kD, 异分支酸水解酶超家族的蛋白分子量大小约为 25 kD, 且 3 个蛋白可溶性表达的量比较相近 (图 4)。因此, 这 3 个来源于 *P. putida* JUCT1 的外源基因在大肠杆菌 JM109 的可溶性表达为验证基因表达对宿主细胞耐溶剂性的影响提供了依据。

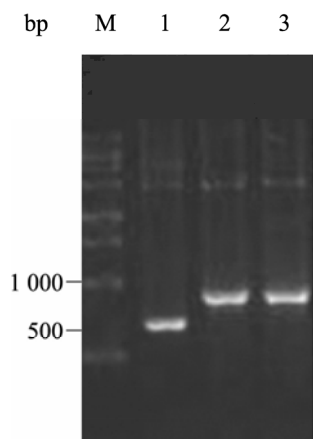


图3 *mmsB*、*tsf* 和 *PSEEN0851* 基因的 PCR 产物

Fig. 3 PCR product of *mmsB*, *tsf* and *PSEEN0851*

Note: M: Marker; 1: *PSEEN0851*; 2: *mmsB*; 3: *tsf*.

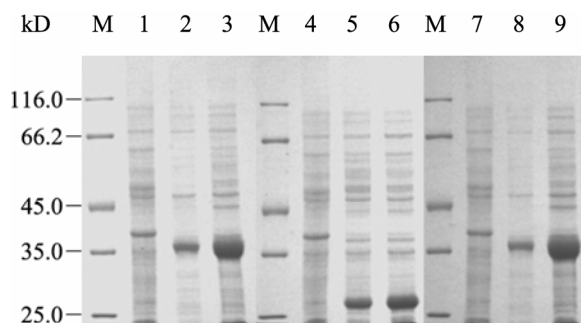


图4 基因 *mmsB*、*tsf* 和 *PSEEN0851* 的重组表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant expression of *mmsB*, *tsf*, and *PSEEN0851*

注: M: Marker; 1, 4, 7: *E. coli* JM109/pQE-80L 经 IPTG 诱导; 2: *E. coli* JM109/pQE-80L-*mmsB* 诱导后可溶性蛋白; 3: *E. coli* JM109/pQE-80L-*mmsB* 诱导后全细胞蛋白; 5: *E. coli* JM109/pQE-80L-*PSEEN0851* 诱导后可溶性蛋白; 6: *E. coli* JM109/pQE-80L-*PSEEN0851* 诱导后全细胞蛋白; 8: *E. coli* JM109/pQE-80L-*tsf* 诱导后可溶性蛋白; 9: *E. coli* JM109/pQE-80L-*tsf* 诱导后可溶性蛋白。

Note: M: Protein marker; 1, 4, 7: *E. coli* JM109/pQE-80L as control; 2: *E. coli* JM109/pQE-80L-*mmsB* soluble protein after induction; 3: *E. coli* JM109/pQE-80L-*mmsB* total protein after induction; 5: *E. coli* JM109/pQE-80L-*PSEEN0851* soluble protein after induction; 6: *E. coli* JM109/pQE-80L-*PSEEN0851* total protein after induction; 8: *E. coli* JM109/pQE-80L-*tsf* soluble protein after induction; 9: *E. coli* JM109/pQE-80L-*tsf* total protein after induction.

2.4 *mmsB*、*tsf* 和 *PSEEN0851* 基因的表达对宿主细胞耐溶剂性的影响

将重组菌株接至含有 0.02 mmol/L 的 IPTG 的 LBGMg 培养基中培养至 OD_{660} 为 0.2 后, 加入 3% 的环己烷并考察有机溶剂的加入对菌株的生长产生影响。如图 5 所示, 对照菌株大肠杆菌 JM109 在 3% (V/V) 环己烷中几乎不生长, 培养 8 h 后 OD_{660} 只增长 0.06, 而重组菌株的耐溶剂性菌显著优于对照菌株, 重组表达 3-羟基异丁酸脱氢酶的菌株 OD_{660} 达到 1.7 左右, 而重组表达蛋白质延伸因子 EF-Ts 和异分支酸水解酶超家族的菌株生长 OD_{660} 相对于对照菌株分别提高 0.36 和 0.65。因此, 这 3 个来源于 *P. putida* JUCT1 的蛋白大量表达均能不同程度地提高革兰氏阴性菌株如大肠杆菌的耐溶剂性, 其中 3-羟基异丁酸脱氢酶对菌株的耐溶剂作用影响显著, 异分支酸水解酶超家族次之, 而蛋白质延伸因子 EF-Ts 的影响能力较弱。

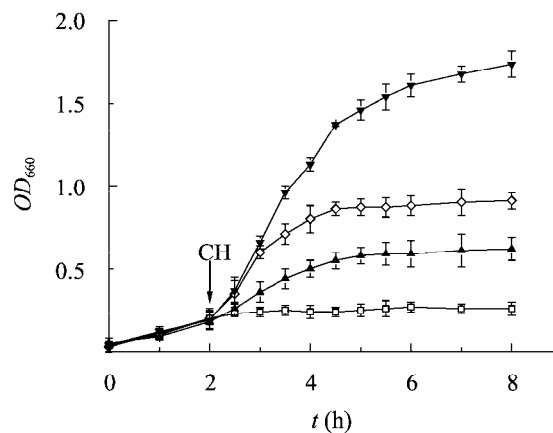


图5 添加 3% (V/V) 环己烷对重组表达 *mmsB*、*tsf* 和 *PSEEN0851* 的大肠杆菌菌株的生长影响

Fig. 5 Effect of 3% (V/V) cyclohexane on cell growth of recombinant *E. coli* strains over-expressing *mmsB*, *tsf*, and *PSEEN0851*

Note: ▼: *E. coli* JM109/pQE-80L-*mmsB*; ◇: *E. coli* JM109/pQE-80L-*PSEEN0851*; ▲: *E. coli* JM109/pQE-80L-*tsf*; □: *E. coli* JM109/pQE-80L.

3 讨论

不同属种的微生物耐溶剂性差别很大,例如,在有文献报道的研究中,耐溶剂性的假单胞菌属大多来源于自然界的筛选,其耐溶剂性机制大多与能量依赖型的溶剂外排泵密切相关,而耐溶剂性的大肠杆菌菌株则来自于紫外或 NTG 诱变,而且其耐溶剂性一般也较假单胞菌差^[5,7,15-16]。本研究中,通过不断增加外界环境的有机溶剂浓度,加大环境选择压力,对具有微弱耐溶剂性的 *P. putida* JUCS 进行驯化,并最终得到能够在 60% (V/V) 环己烷中生长良好的菌株。对于大肠杆菌以相同的驯化方式驯化筛选时,却难以得到能够耐受 3% (V/V) 环己烷的菌株,故菌株的驯化成功与否不仅与驯化方式相关,还与其野生菌株的遗传特性和生理特性相关。

根据以往的研究报道,与压力应答机制和膜运输相关的蛋白质组分(TolC、MarA、SoxS、RobA、GlpC 等)和微生物的耐溶剂性密切相关^[5,17]。二维电泳作为有力的蛋白质分离技术,广泛应用于分离分析复杂样品中与某一特定表型相关的蛋白质组分的研究中,在不同生长环境下表达量有显著差异的蛋白质可能与微生物对外界环境压力的适应和耐受能力相关^[18-19]。因此,利用分析差异蛋白的方法研究微生物的耐溶剂性相关组分和分子机制比其他方法更加的直接、有效。

通过重组菌株与对照菌株耐溶剂性生长比对(图 5),重组表达 3-羟基异丁酸脱氢酶(编码基因 *mmsB*)的菌株对耐溶剂性的影响很大。3-羟基异丁酸脱氢酶与 6-磷酸葡萄糖脱氢酶同属于 3-羟酸脱氢酶家族,两者在反应机制和催化机理上极为相似,并有着相同的进化来源^[20-21]。在大肠杆菌中,6-磷酸葡萄糖脱氢酶的编码基因属于 *mar-sox* 调节基因, *mar-sox* 调节基因对多种压力反应应答基因(如 *robA*、*soxS*、*marA* 等)进行调控,溶剂外排泵

如 AcrAB-TolC 的相关蛋白表达则严格受控于应激反应基因的调节。类似的溶剂外排泵调控机制(如 Mex efflux 系统)也同样存在于假单胞菌^[22]。因此,可以推测 3-羟基异丁酸脱氢酶(编码基因 *mmsB*)与溶剂外排泵调控机制紧密相关,它的大量表达对提高菌株有机溶剂耐受性方面有很大作用。

在大肠杆菌中,异分支酸水解酶可以将水解异分支酸为 2,3-二羟基-2,3-二氢苯酸盐和丙酮酸盐,但假单胞菌中的异分支酸水解酶超家族(编码基因 *PSEEN0851*)的具体功能还不清楚。通过氨基酸序列比对,来源于假单胞菌中的异分支酸水解酶超家族与来源于大肠杆菌的异分支酸水解酶氨基酸序列同源性达到 94%。源于假单胞菌中的异分支酸水解酶超家族在大肠杆菌中的高效表达使得大肠杆菌的耐溶剂性提高,但其作用方式和分子机制还在进一步研究中。蛋白质延伸因子 EF-Ts (编码基因 *tsf*)的表达也能够使大肠杆菌的耐溶剂性有一定的提高,由于其作用方式在于参与蛋白质的表达,因此多种应激反应蛋白的表达都与其密切相关。

革兰氏阴性微生物的有机溶剂耐受性研究已有 20 年历史,但其溶剂耐受性分子机制仍不完全清楚。在大量的研究中发现,假单胞菌和大肠杆菌的耐溶剂性机制有很多相似之处,如溶剂外排机制和细胞膜结构性质的改变等^[23],本研究证明了运用蛋白组学的方法研究微生物耐溶剂性的可行性,并进一步验证了假单胞菌和大肠杆菌的耐溶剂性机制有一定的相似性,同时采用基因工程手段提高了微生物的耐溶剂性,为构建适用于工业化应用的溶剂耐受性整体细胞生物催化剂提供了理论指导。

参考文献

- [1] Aono R, Kobayashi H, Joblin KN, et al. Effects of organic solvents on growth of *Escherichia coli* K-12[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochem-

- istry, 1994, 58(11): 2009–2014.
- [2] Kieboom J, Dennis JJ, Zylstra GJ, et al. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(24): 6769–6772.
- [3] Inoue A, Horikoshi K. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene[J]. Nature, 1989, 227(6212): 264–266.
- [4] 孙广海, 周华, 朱跃钊, 等. 双水相生物催化技术的研究进展[J]. 生物加工过程, 2004, 2(3): 19–22.
- [5] Heipieper HJ, Neumann G, Cornelissen S, et al. Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(5): 961–973.
- [6] Sardesai Y, Bhosle S. Tolerance of bacteria to organic solvents[J]. Research in Microbiology, 2002, 153(5): 263–268.
- [7] Aono R, Albe K, Inoue A, et al. Preparation of organic solvent tolerant mutants from *Escherichia coli* K-12[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(7): 1935–1938.
- [8] Aono R, Kobayashi H. Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli* K-12[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(9): 3637–3642.
- [9] Aono R, Tsukagoshi N, Yamamoto M. Involvement of outer membrane protein *TolC*, a possible member of the *mar-sox* regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(4): 938–944.
- [10] Fralick JA. Evidence that *TolC* is required for functioning of the *Mar/AcrAB* efflux pump of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(19): 5803–5805.
- [11] Kawai T, Ogihara H, Furukawa S, et al. High hydrostatic pressure treatment impairs *AcrAB-TolC* pump resulting in differential loss of deoxycholate tolerance in *Escherichia coli*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(6): 613–616.
- [12] Shimizu K, Hayashi S, Kako T, et al. Discovery of *glpC*, an organic solvent tolerance-related gene in *Escherichia coli*, using gene expression profiles from DNA microarrays[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 1093–1096.
- [13] Okochi M, Kurimoto M, Shimizu K, et al. Increase of organic solvent tolerance by overexpression of *manXYZ* in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(6): 1394–1399.
- [14] Cheng ZY, Woody OZ, Song JM, et al. Proteome reference map for the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas putida* UW4[J]. Proteomics, 2009, 9(17): 4271–4274.
- [15] Huertas MJ, Duque E, Marqués S, et al. Survival in soil of different toluene-degrading *Pseudomonas* strains after solvent shock[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(1): 38–42.
- [16] Sardesai Y, Bhosle S. Tolerance of bacteria to organic solvents[J]. Research in Microbiology, 2002, 153(5): 263–268.
- [17] Hayashi S, Aono R, Hanai T, et al. Analysis of organic solvent tolerance in *Escherichia coli* using gene expression profiles from DNA microarrays[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 95(4): 379–383.
- [18] Guina T, Wu MH, Miller SI, et al. Proteomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* grown under magnesium limitation[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003, 14(7): 742–751.
- [19] Yun SH, Kim YH, Joo EJ, et al. Proteome analysis of cellular response of *Pseudomonas putida* KT2440 to tetracycline stress[J]. Current Microbiology, 2006, 53(2): 95–101.
- [20] Adams MJ, Ellis GH, Gover S, et al. Crystallographic study of coenzyme, coenzyme analogue and substrate binding in 6-phosphogluconate dehydrogenase: implications for NADP specificity and the enzyme mechanism[J]. Structure, 1994, 2(7): 651–668.
- [21] Chowdhury EK, Akaishi Y, Nagata S, et al. Cloning and overexpression of the 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase gene from *pseudomonas putida* E23[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(2): 438–441.
- [22] Rojas A, Duque E, Mosqueda G, et al. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(13): 3967–3973.
- [23] 王鑫昕, 王少华, 李维, 等. 细菌的有机溶剂耐受机制[J]. 生物工程学报, 2009, 25(5): 641–649.