

Bacillus subtilis 自然感受态缺陷株蛋白质表达谱的初步分析*

唐 焯¹ 刘国生¹ 谢志雄^{2**} 沈 萍²

(河南师范大学生命科学学院 新乡 453002)¹ (武汉大学生命科学院 武汉 430072)²

摘要: 利用蛋白质双向电泳对枯草芽孢杆菌自然感受态缺陷突变株 BR151pm 感受态形成期的全细胞蛋白质进行比较分析, 发现有 28 个蛋白质斑点出现变化。利用基质辅助激光解析/电离串联飞行时间质谱对其中 2 个明显缺失的蛋白质斑点进行分析鉴定, 确定这 2 个蛋白质分别为直接参与自然感受态形成的 Nin 蛋白和 RecA 蛋白, 进一步确证了 BR151pm 为自然感受态缺陷突变株。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 蛋白质双向电泳, 自然感受态缺陷突变株

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0085-03

Analysis of Protein Profiling of *Bacillus subtilis* Natural Competence-deficient Mutant BR151pm*

TANG Hua¹ LIU Guo-Sheng¹ XIE Zhi-Xiong^{2**} SHEN Ping²

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007)¹

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)²

Abstract: Two-dimensional electrophoresis (2-DE) had been employed to compare the global protein patterns between low transformability *Bacillus subtilis* BR151pm and wild strain BR151p, and 28 protein spots were found to express differentially. Two protein spots which remarkably unexpressed in *B. subtilis* BR151pm were measured by matrix assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry. With peptide mass fingerprinting, two protein spots were identified as Nin and RecA, which were directly involved in the development of natural competence in *B. subtilis*. The results determined that strain BR151pm was natural competence-deficient.

Key words: *Bacillus subtilis*, Two-dimensional electrophoresis (2-DE), Natural competence-deficient mutant

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 自然感受态的建立涉及 40 多个基因的功能, 这些基因的有序表达, 使得枯草芽孢杆菌在一定的生长条件下可以摄取外源 DNA, 用以补充营养, 修复 DNA 损伤以及获得抗逆性等新的遗传性状^[1]。研究发现处于自然感受态的枯草芽孢杆菌细胞还具有分泌 DNA 的能力, 为研究自然感受态的建立和 DNA 分泌的相关性, 我们通过诱变分离得到一株转化频率下降 2~3 数量级、DNA 分泌规律发生改变的突变株 BR151pm^[2,3]。由于是通过营养缺陷型、UV 的敏感性等检测来确定其转化能力降低为自然感受态缺陷而非营养缺陷型的改变或重组缺陷所致, 所以缺少直接证据证明该菌株确实是自然感受态缺陷株。近年来, 蛋白质组分析技术发展迅速, 我们拟利用蛋白质双向电泳技术 (Two-dimensional

electrophoresis, 2-DE) 对 BR151pm 菌株在感受态形成时期的全细胞蛋白质进行比较分析^[4], 结合基质辅助激光解析/电离串联飞行时间质谱对相关蛋白进行分析鉴定, 确证 BR151pm 菌株为自然感受态缺陷菌株, 为深入开展 DNA 分泌和自然感受态建立相关性研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

BR151p 为含有质粒 pUB110 的 *B. subtilis* BR151 菌株, 由中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 提供; *B. subtilis* 突变株 BR151pm 由武汉大学微生物遗传学实验室诱变筛选获得^[3]。

1.2 方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌自然感受态的制备: 参照文

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30370017)

** 通讯作者 Tel: 86-27-68754533, E-mail: zxxie@whu.edu.cn

收稿日期: 2006-04-12, 修回日期: 2006-06-10

献 [5] 进行。

1.2.2 全细胞蛋白样品制备: 将制备好的 BR151p 和 BR151pm 菌株的感受态细胞悬浮于 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中, 超声波处理 12 min, 4℃ 12,000 r/min 离心 10 min, 取上清; 加入等体积的含 25% 三氯乙酸的丙酮溶液冰浴 10 min, 4℃ 12,000 r/min 离心 10 min, 沉淀物用丙酮冲洗两次, 37℃ 干燥处理, 干燥物即为全细胞蛋白, 采用 Bradford 法进行蛋白定量后, 即可用于双向电泳分析。

1.2.3 蛋白质双向电泳分析: 参照文献 [4, 6]。等电聚焦电泳, 蛋白用样品缓冲液溶解后, 上样至胶条顶部, 用样品覆盖液覆盖, 按以下参数和程序完成等电聚焦电泳, 200 V, 15 min、300 V, 15 min、400 V, 20 min、500 V, 30 min、600 V, 18 h 和 800 V, 1 h, 每根胶条电流为 50 mA。变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 胶条经平衡液平衡后, 置于 SDS 凝胶上, 4℃, 按 100 V, 30 min, 200 V, 30 min 进行蛋白转移, 随后在电压 250 V 下, 电泳约 8 h。电泳结束后, 进行银染, 然后扫描记录, 采用 2D-Master 分析软件对 2-DE 图谱进行比对

分析。

1.2.4 蛋白质的肽质量指纹谱测定及数据库检索: 从聚丙烯酰胺凝胶上切下含有目标蛋白质的胶块, 经原位酶切和质谱分析得到肽质量指纹谱, 用数据库检索软件与数据库中各种蛋白质的理论肽质量数相比较来鉴定蛋白质。

2 结果

2.1 BR151p 和 BR151pm 菌株感受态蛋白差异表达的双向电泳图谱及分析

B. subtilis BR151p 和 BR151pm 菌株处于感受态时期的全细胞蛋白质双向电泳图谱如图 1。从中可以发现突变株 BR151pm 和野生型的 BR151p 菌株在某些蛋白质斑点上存在明显的差异。进一步用 2D-Master 软件对两株 *B. subtilis* 感受态时期的全细胞蛋白 2-DE 图谱进行比对分析, 发现 *B. subtilis* BR151p 和 BR151pm 菌株感受态形成时期全蛋白表达差异的斑点为 28 个, 从中选取差异最为明显且表达量比较大, 但在 BR151pm 菌株中缺失的 2 个蛋白斑点, 进行 MALDI-MS/MS 肽指纹图谱分析。

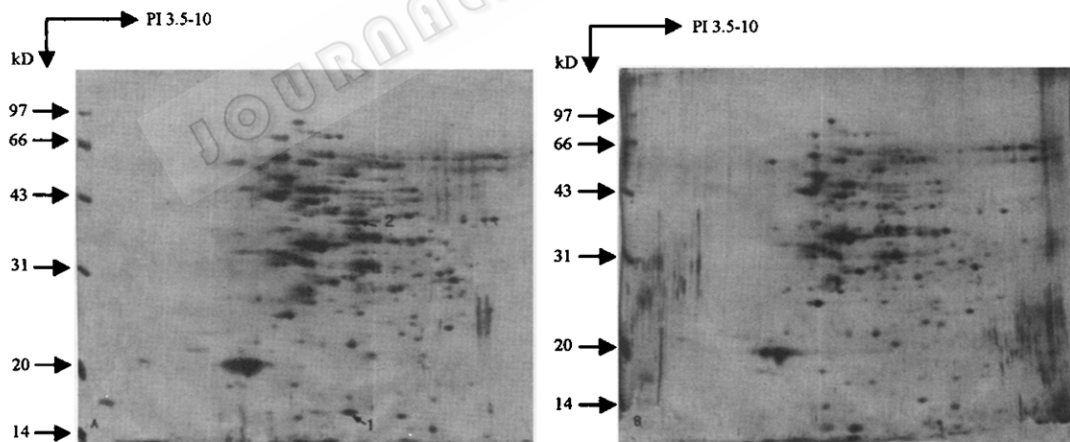


图 1 枯草芽孢杆菌感受态形成时期的全蛋白双向电泳图谱

A BR151p, B BR151pm

2.2 MALDI-MS/MS 肽指纹图谱分析和蛋白质数据库同源性分析

野生型 BR151p 的 2-DE 凝胶上表达量高而 BR151pm 菌株明显缺失的两个蛋白经过 MALDI-MS/MS 分析, 得到肽质量指纹谱。结合 2-DE 图谱

上相应蛋白质的分子质量、PI 值, 通过比对分析结果如表 1 所示, 它们分别为 Nin 蛋白和 RecA 蛋白, 这表明 BR151pm 菌株突变导致这两个蛋白质表达发生改变, BR151pm 菌株转化能力的下降涉及自然感受态基因的表达, 属于自然感受态缺陷。

表 1 差异蛋白质的质谱检索结果

Spot No.	Protein name	MW (D) /PI	Masses matched
1	Nin	14997.0/5.09	100%
2	RecA	30099.7/5.79	44%

3 讨论

枯草芽孢杆菌感受态的形成涉及由多种基因参与表达调控的网络结构。根据表达时间和行使功能的不同,分为早期感受态基因和晚期感受态基因^[1],晚期感受态基因主要存在于 *comG* (7 ORFs)、*comE* (3 ORFs)、*comC*、*comF* (3 ORFs)、*nucA-nin* 这 5 个转录单位中,其中 *nucA-nin* 表达的蛋白具有核酸内切酶的性质,可切开双链 DNA,并促进单链 DNA 的吸收,进入细胞内的外源 DNA 主要通过 Rec 蛋白家族的作用下进行同源重组,完成转化^[7,8]。

Nin 蛋白是由 *nin* 基因所编码的 15 kD 跨膜蛋白,*nin* 基因位于 *nucA* 基因的下游,两基因位于同一个转录单位中,在感受态形成期两者同时表达,若 *nin* 基因突变,转化频率降低约 10 倍^[8,9]。本研究中发现 *nin* 基因表达产物的完全缺失,但是 BR151pm 菌株自然转化能力却下降 2~3 个数量级,该突变显然不是由于 *nin* 基因突变引起的。RecA 蛋白在感受态形成期主要介导供体单链 DNA 与染色体 DNA 的同源重组过程,同时也参与 DNA 修复,在 UV 敏感性检测中已经排除了 DNA 同源重组缺陷的可能^[3]。这些结果为下一步的工作提

供了线索,指示 BR151pm 菌株自然转化能力下降应该是由在 *nin* 基因上游调控基因出现突变引起的。

本研究利用双向电泳及质谱分析的方法比较分析,发现 *B. subtilis* 自然感受态缺陷株 BR151pm 在自然感受态形成时期,与自然转化相关的 Nin 和 RecA 蛋白明显缺失表达,在分子水平上确证该突变株转化能力下降与自然转化基因表达调控有关,是一株自然感受态缺陷菌株,而且该缺陷株突变发生在 *nin* 基因上游调控基因部分,为下一步的深入开展枯草芽孢杆菌和 DNA 分泌的相关性研究提供了重要线索。

致谢 感谢武汉大学生命科学学院丁毅教授、魏磊博士的无私帮助。

参考文献

[1] Dubnau D. Microbiol Rev, 1991, 55: 395~424.
[2] 谢志雄,沈萍.微生物学通报,1999,26(2):126~127.
[3] 谢志雄,陈向东,陈琪,等.遗传,1999,21(1):23~25.
[4] O'Farrell P H. J Biol Chem, 1975, 250: 4007~4021.
[5] Fani R, Mastromei G, Polsinelli M, et al. J Bacteriol, 1984, 157: 152~157.
[6] 何瑞峰,丁毅,张剑锋,等.遗传,2000,22:319~321.
[7] Draskovic I, Dubnau D. Mol Microbiol, 2005, 55: 881~896.
[8] Prowedi R, Chen I, Dubnau D. Mol Microbiol, 2001, 40: 634~644.
[9] Luttinger A, Hahn J, Dubnau D. Mol Microbiol, 1996, 19: 343~356.

• 论文写作要点 •

参考文献

参考文献是现代科技论文的重要组成部分。被列入的文献必须是作者在论文中直接引用的、最主要的、最新发表在正式出版物上的文献。私人通信、内部讲义、论文集、毕业论文等未正式发表的文章不作为文献引用,可用脚注处理。

本刊的参考文献采用顺序编码制。根据正文中引用的先后顺序排列。文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时后面用“等.”或“et al.”,作者姓前名后,名缩写;作者之间用逗号隔开。国外期刊名可以缩写,但必须标准。引用文献篇数不限,但最好引用近 5 年国内外正式发表的论文。

参考文献书写格式举例:

期刊: [1] 曾静, 窦岳坦, 杨苏声. 微生物学通报, 2000, 27 (4): 327~330.
[2] Lagueyrie G, Allard M R, Revoy F, et al. Appl Environ Microbiol, 1994, 18 (3): 56~63.
图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000. 4.
[4] 董志扬, 张树政, 方宜钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华路等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996. 115~120.