

抗生素 AGPM 发酵过程中蛋白质表达差异的研究*

牛晋阳 乔建军 陈贵斌 张建勇 元英进

(天津大学化工学院 天津 300072)

摘要: 由土壤中筛选到一能产生新型抗肿瘤抗生素 AGPM 的藤黄灰链霉菌株,应用蛋白质双向电泳方法,比较了藤黄灰链霉菌在发酵 24h 与 72h 蛋白质表达的差异,发现在发酵 72h 有 17 个蛋白质差异点出现,此外还发现一些蛋白质的含量明显高于 24h 的同种蛋白含量,这表明这些蛋白可能与抗生素 AGPM 的合成以及和菌体的生长等有关。

关键词: 藤黄灰链霉菌, AGPM, 蛋白质组, 二维凝胶电泳

中图分类号: Q939.92 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2003)03-0006-04

THE STUDY ON DIFFERENCE OF PROTEIN EXPRESSIONS IN AN ANTIBIOTIC AGPM FERMENTATION PROCESS

NIU Jin-Yang QIAO Jian-Jun CHEN Gui-Bin ZHANG Jian-Yong YUAN Ying-Jin

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract: A new strain of *Streptomyces regensis* was isolated from soil to produce a novel antibiotic AGPM possessing a strong antitumor activity. In order to study on the metabolic path of the novel antibiotic AGPM, the protein patterns from the strain of *Streptomyces regensis* at different culture period were analyzed by using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Comparing with sample from growth phase, seventeen new protein spots were found in that from antibiotic production phase. The results demonstrated that the special proteins might be related with the antibiotic AGPM biosynthesis from *Streptomyces regensis*.

Key words: *Streptomyces regensis*, AGPM, Proteome, Two-dimensional gel electrophoresis

本课题组从土壤中筛选到一藤黄灰链霉菌,它能产生一种新型抗生素 AGPM,初步研究表明:该抗生素体外抗白血病和抗非小细胞肺癌等活性较紫杉醇高出 10~100 倍,具有显著的抗肿瘤活性^[1]。

随着人类基因组草图的完成,基因组研究的重点就从结构基因组学转向功能基因组学,而蛋白质组学正是功能基因组研究的重要支柱^[2]。近年来,蛋白质组研究的技术和方法已在细胞生长发育调节和应急反应、蛋白质功能研究、以及药物开发研究等诸多领域被广泛应用^[3-5]。

本文应用二维凝胶电泳研究了藤黄灰链霉菌 099 菌株在新型抗生素 AGPM 不同产生期内的蛋白质组表达差异,并从中找到了部分可能与新型抗生素合成及菌体生长相关的蛋白酶类。这对于进一步了解该新型抗生素的代谢途径具有重大的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 藤黄灰链霉菌 099 菌株^[1]。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 30200003)

Project Granted by Chinese Nation Science Fund (No. 30200003)

国家高技术研究发展计划项目("863"项目)(No. 2001AA214081)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development. (No. 2001AA214081)

收稿日期:2002-06-04, 修回日期:2002-10-10

1.1.2 培养基:参照文献[6]配制。

1.2 实验设备及试剂

HPLC 购自 Waters 公司。二维凝胶电泳系统购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。pH 3~10 线性 18cmIPG 预制胶条、IPG 缓冲液、低分子量标准蛋白、银染试剂盒、二硫苏糖醇、CHAPS 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素购自 BOEHRINGER Mannheim Corp.; 低熔点琼脂糖、Tris、十二烷基磺酸钠购自华美公司; TEMED 购自 Sigma 公司。所有溶液均用 Milli-Q 水配制。

1.3 方法

1.3.1 菌种培养:参照文献[6]。

1.3.2 HPLC 法测定发酵液中 AGPM 含量:色谱柱:Hypersil[®], ODS (5 μ m, 250 \times 4.6mm), 流动相:甲醇:水:离子对试剂 A = 72:25.5:2.5, 流速:1mL/min, 紫外检测器检测:检测波长为 330 nm, 室温。

1.3.3 二维凝胶电泳样品的制备:收集不同培养时间的菌体, PBS 洗涤 3 次后加液氮研磨至粉末, 装于 1.5mL 的离心管中。用 500 μ L 裂解缓冲液(8mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40mmol/L Tris)溶解样品。13,000 r/min 离心 20min, 取上清 300 μ L, 加 3 倍体积的冷丙酮过夜。离心, 将沉淀物用冷冻干燥机冻干。然后将样品溶于 200 μ L 的 IPG 溶胀液中(8mol/L 尿素, 2%CHAPS, 0.5% IPG 缓冲液, 痕量溴酚蓝, 用前加 0.3% DTT), 测定蛋白质含量后贮存于-25 $^{\circ}$ C 备用^[7]。

1.3.4 IPG 干胶条的溶胀与等电聚焦:将含有约 50 μ g 蛋白的 300 μ L 溶胀液加于等电聚焦槽中; 胶面朝下放于槽中, 并覆盖 1mL 矿物油以防样品液蒸发, 加盖后于下列条件下自动进行等电聚焦: 30V, 11h; 500V, 1h; 1,000V, 1h; 8,000V, 4h。

1.3.5 IPG 胶条的平衡:等电聚焦结束后, IPG 胶条在平衡缓冲液(50mmol/L Tris-Cl pH8.8, 6mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 痕量溴酚蓝, 用前每 10mL 加 100mg DTT) 中平衡 15 min, 后于 2.5% 碘乙酰胺替代 1% DTT 的同样平衡液中平衡 15min。

1.3.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳:灌制浓度为 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 胶厚 1.5mm, 面积 29cm \times 19cm。具体步骤及配方见参考文献 [8]。将平衡好的胶条移置于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上, 用低熔点琼脂糖封胶。在 Hofer-Dalt 电泳槽中进行第二向电泳, 10mA/胶电泳 30min 后换用 25mA/胶, 至溴酚蓝前沿走到凝胶边缘时停止电泳。

1.3.7 凝胶的染色及图象处理:凝胶经银染染色后进行透射扫描(光学分辨率 300DPI)。利用 ImageMaster 2-D Elite Version 3.1 图象分析软件进行图象处理, 经点检测、背景消减、ID 校正、匹配等步骤比较蛋白点的差异。

2 结果

2.1 藤黄灰链霉菌 099 菌株生产 AGPM 的过程

菌株生产抗生素 AGPM 产量与培养时间的关系如图 1 所示, 从图中可以看出: 抗生素 AGPM 生产和菌体生长是非耦联的, AGPM 分泌主要集中在发酵的后期。在发酵 72h 时, AGPM 合成速率最大, 此时和 AGPM 合成相关酶系活力最高, 而在发酵 24h 时菌体外于生长对数期此类酶活性没有或较低, 而与菌体生长初级代谢相关酶活性最高。所以本文研究了发酵培养 24h 和 72h 菌株蛋白质组的表达变化, 以期寻找与 AGPM 生物合成可能相关的酶系。

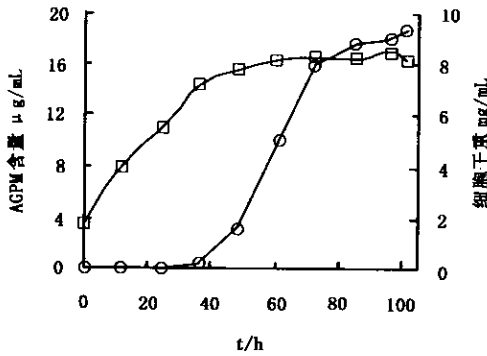


图1 菌体生长和抗生素生物合成关系
—□—生物量, —○—AGPM含量

2.2 实验组与对照组蛋白质组谱

将不同培养时间的菌体总蛋白进行双向凝胶电泳,其电泳银染图谱如图2所示。可以看出,在该菌体细胞中,蛋白分子量分布较广,偏酸性蛋白含量较多,蛋白质的等电点主要集中在4~6之间。另外,以24h时的蛋白图谱作为参考胶做匹配实验,比较72h时的蛋白图谱与24h时的图谱,将各图谱的蛋白点对应起来,同参考胶相匹配的点为同一种蛋白质,不匹配的点为差异点。从结果可以看出,不同取样时间的样品的双向电泳图谱存在差异。

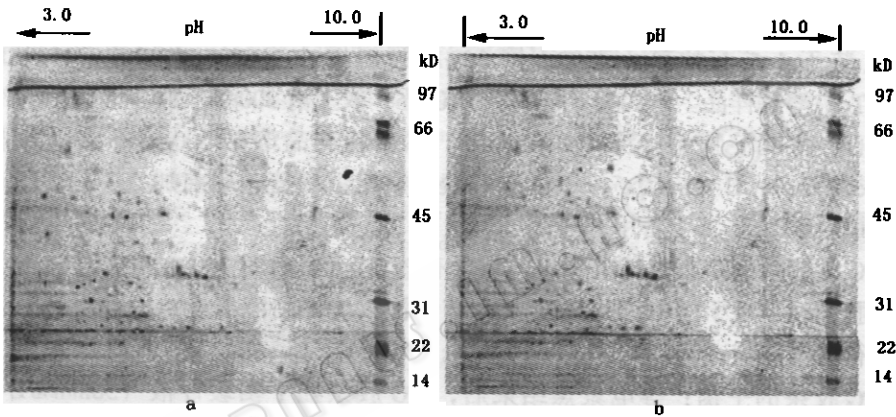


图2 藤黄灰链霉菌细胞不同发酵时间的二维凝胶电泳分析
a 发酵24h样品的蛋白质图谱, b 发酵72h样品的蛋白质图谱

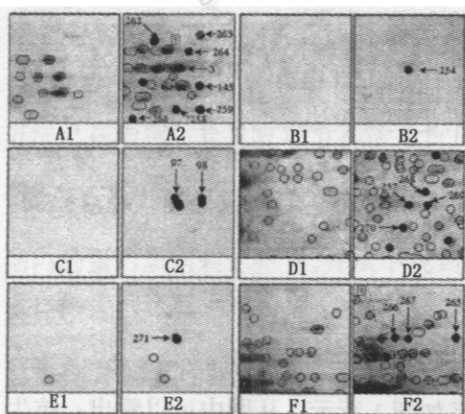


图3 以24h发酵时间蛋白质图谱为参考,部分未能匹配上的72h的放大图谱
虚线点为匹配上的点,箭头指向的实心点为未匹配上的特异蛋白点

2.3 不同培养时间的菌体蛋白质组的表达变化

利用 ImageMaster 2-D Elite Version 3.1 软件对图像进行数据的统计分析,发现有17个蛋白点只在培养72h的样品中表达,同时,有24个蛋白点只在培养24h的样品中存在。这些差异蛋白点的等电点、分子量及含量见表1,部分可能与抗生素AGPM生物合成相关蛋白质点的放大图谱如图3所示。

3 讨论

在实验中发现24个蛋白点只在培养24h的样品中表达,而培养72h样品中未检测到。说明这些蛋白点可能主要是和菌体生长繁殖相关的酶,它控制着微生物初级代谢产物的生成。

表1 仅在发酵24h或72h表达的特异蛋白点的等电点与分子量

发酵24h的特异蛋白点				发酵72h的特异蛋白点			
蛋白序号	体积	等电点	分子量(kD)	蛋白序号	体积	等电点	分子量(kD)
792	9503.000	4.74	40.094	3	15868.000	6.22	55.306
793	10842.000	4.85	39.994	97	3270.000	6.79	26.219
842	8625.000	4.94	40.817	98	1934.000	6.97	26.331
845	15611.000	4.69	35.227	145	4086.000	6.38	51.744
849	6664.000	4.73	37.830	254	3743.000	6.98	29.963
856	2783.000	5.54	46.938	257	5542.000	5.73	44.280
870	10165.000	5.14	52.112	258	4897.000	6.20	47.513
889	9805.000	4.79	47.425	259	4961.000	6.39	47.513
973	7601.000	4.32	28.804	262	5666.000	6.04	61.764
974	7223.000	4.41	30.760	263	3308.000	6.39	63.194
975	9268.000	4.52	30.663	264	4970.000	6.29	59.045
976	7064.000	4.65	29.875	266	5435.000	5.47	70.731
977	7464.000	4.82	29.725	267	5025.000	5.57	70.396
978	9056.000	4.92	29.166	268	3987.000	5.86	45.989
980	9771.000	4.85	30.663	269	4600.000	5.89	44.280
981	7903.000	4.90	31.614	270	4869.000	5.70	41.329
982	7779.000	4.98	31.426	271	3771.000	6.73	20.405
984	8072.000	4.90	32.509				
985	7114.000	4.68	33.646				
986	7077.000	4.66	34.231				
987	11243.000	4.48	33.534				
988	6462.000	4.42	34.068				
989	9249.000	4.88	33.908				
992	5695.000	4.14	27.425				

同时,有17个蛋白点只在培养72h的样品中表达,而培养24h的样品中未表达,这些蛋白点则可能是和抗生素合成相关的酶类。另外,在菌体培养的不同时间内,一些蛋白点的含量存在较为明显的差异,这些都说明在抗生素产生的不同时期,菌体的基因、蛋白表达存在明显的差异,其间存在着微生物由菌体生长期向抗生素产生期的转变。为进一步探讨与抗生素生产有关的酶,我们正在用质谱鉴定相关蛋白质的组成,以期充分探讨抗生素合成的代谢调控机制,为今后进一步提高抗生素产量提供理论指导。

参考文献

- [1] 元英进, 石炳兴, 胡宗定, 等. 发明专利申请公开说明书, 2001, 01141443. X.
- [2] 贺福初. 科学通报, 1999, 44: 113~118.
- [3] Soskic V, Poznanovic S. *Biochemistry*, 1999, 38: 1757~1764.
- [4] Antelman H, Bernhard J, Schmid R, et al. *Electrophoresis*, 1997, 18: 1451~1463.
- [5] Myers T G, Anderson N L, Waltham M, et al. *Electrophoresis*, 1997, 18: 647~653.
- [6] 元英进, 牛晋阳, 石炳兴, 等. 发明专利申请公开说明书, 2002, 02121140. X.
- [7] BRADFORD M M. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~254.
- [8] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 4: 39~120.