

芳香烃龙胆酸降解途径蛋白质组学的研究*

赵 渝^{1,2} 郭鲁申¹ 徐亚同²

(上海师范大学生命与环境科学学院 上海 200234)¹

(华东师范大学资源与环境科学学院 上海 200062)²

摘要: 芳香烃是一类重要的环境污染物, 微生物降解是其主要的处理方法。研究显示降解过程中产生保守型和诱导型的各一组同工酶。目前, 仅有保守型的龙胆酸加双氧酶 (GDO I) 及其下游片段被克隆。产碱假单胞菌 NCIB9867 (P25X) 的突变株-SNZ28 GDOI 被打断, 在龙胆酸诱导的情况下, 该突变株仍能检测到龙胆酸加双氧酶活性。采用二维蛋白电泳分析突变株 SNZ28 在有和没有龙胆酸诱导条件下的蛋白质表达差异。电泳结果显示了两者存在有 15 个蛋白点的差异。通过 MALDI-TOF 和 Q-TOF 分析, 其中的 12 个蛋白质点与数据库中已知多肽片段有同源性。其中, P4 点与青枯菌 (*Ralstonia species*) 龙胆酸 1, 2 加双氧酶同源。该结果在蛋白质组学上证实了 GDOII 的存在。

关键词: 产碱假单胞菌, 蛋白质组, 龙胆酸加双氧酶, 二维电泳

中图分类号: Q939.11⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0095-06

Proteome Study of Degradation of Aromatic Hydrocarbons Via Gentisate Pathway*

ZHAO Yu^{1,2} GUO Lu-Sheng¹ XU Ya-Tong²

(College of Life and Environment, Shanghai Normal University, Shanghai 200234)¹

(College of Environmental and Resources, East China Normal University, Shanghai 200062)²

Abstract: Aromatic hydrocarbons are capital environmental contaminations. *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 (P25X) is capable of degrading aromatic hydrocarbons via the gentisate pathway. Biochemical characterization indicated that it has isofunctional enzymes for the mono- and dioxygenase-catalysed reactions. One set of the enzymes is constitutive and the other is strictly inducible. To date, only the genes for the constitutively-expressed gentisate dioxygenase and the downstream enzymes have been cloned. A mutant strain of P25X, designated SNZ28, which had the constitutive copy of the gentisate 1, 2-dioxygenase gene interrupted by a streptomycin/spectinomycin resistance gene cassette, was found to still express gentisate dioxygenase when induced by gentisate. The proteome profiles of P25X and mutant SNZ28, grown in the presence and absence of the aromatic inducer gentisate, were compared after 2D-PAGE. Fifteen distinctive protein spots which were observed only in induced cells of P25X and mutant SNZ28 but absent in non-induced cells of both were further analyzed by MALDI-TOF and Q-TOF. Of the 15 proteins, 12 showed significant sequence similarity to proteins with assigned function in other microorganisms. The identification of protein P4 which showed positive identification to a gentisate dioxygenase from *Ralstonia species* indicated the putative role of this protein to encode gentisate 1, 2-dioxygenase in *P. alcaligenes*.

Key words: *Pseudomonas alcaligenes*, Proteome, Gentisate pathway enzymes, 2D-PAGE

芳香烃类化合物是一种重要的环境污染物, 微生物降解的处理方法是主要的处理

* 上海师范大学青年基金项目 (No. DQL306)

上海市生态学重点学科资助项目

通讯作者 Tel: 021-64322933, E-mail: zhaoyu@shtu.edu.cn

收稿日期: 2004-10-18, 修回日期: 2004-12-05

手段与无污染的环保途径。研究表明,微生物更多的是可能通过形成诱导酶系具备了新的代谢功能^[1]。目前,不少与降解有关的基因已经被定位,并成为研究其他降解菌的工具。同时对基因簇之间的关系的研究,也为探讨微生物的进化趋势和潜在的进化机制提供了证据^[2]。

产碱假单胞菌是一种土壤微生物,能够通过芳香族化合物的龙胆酸途径降解二甲苯酚和甲酚。龙胆酸降解途径的核心酶是龙胆酸加双氧酶。研究表明^[3], P25X 野生型具有保守型和诱导型的两种龙胆酸加双氧酶,诱导型酶系统是由龙胆酸严格诱导的。突变株 G65 的保守型龙胆酸 1, 2 加双氧酶基因 (*gdol*) 被链霉素/奇霉素抗性基因打断,但在含有龙胆酸盐的基本培养基上,仍能明显的观察到龙胆酸加双氧酶的活性。迄今为止,编码保守型龙胆酸加双氧酶 (GDO I) 已被测序和鉴定;但是,诱导型的龙胆酸加双氧酶 GDOII 较难被克隆^[3,4]。

随着蛋白质组学的研究手段以及生物信息学的日益成熟,使我们对于这一诱导酶的进一步研究成为可能。本项目中,我们采用二维电泳 (2-D PAGE) 结合 MALDI-TOF 和 Q-TOF 分析,研究了该突变株在龙胆酸诱导与无诱导 (对照) 状况下的蛋白质表达。并对生物质谱的结果进行了分析与讨论。

1 材料与方法

1.1 菌株

P25X 与 SNZ28 菌株由新加坡南洋理工大学 Dr. Lee Chee Chew 提供。

1.2 细菌生长与诱导

SNZ28 接种于 10mL LB ($100\mu\text{g mL}^{-1}$ 的链霉素/奇霉素) 液体培养基中, 250r/min, 32℃ 中过夜培养。然后培养物接种于 500mL 含终浓度 0.02mol/L 乳酸钠为唯一碳源的液体基本培养基中^[3]。在相同条件培养, 至 OD_{580} 为 0.5 ~ 0.6。加入终浓度为 0.025mol/L 的龙胆酸盐为诱导剂。虽然 SNZ28 能在以龙胆酸为单一碳源的培养基中生长, 但相比较生长在乳酸环境中, 细胞的生长状况与蛋白质产生的数量都有较大差别。由于在进行二维电泳时, 蛋白质的数量与试验结果有密切的关系, 因此本研究采取加入 0.02mol/L 乳酸钠的程序。为保证试验结果的一致性, 菌株由龙胆酸诱导培养 8h。

1.3 细菌的收获

SNZ28 的培养物在 4℃; 10,000r/min 离心 10min, 沉淀用 0.04mol/L Tris 洗涤两次, 离心条件同前, 沉淀保藏于 -20℃。

1.4 细胞抽提物的制备

细胞重悬于 0.04mol/L Tris 中, 至 0.5g/mL。细胞悬浮液置于 Eppendorf 管中, 超声波粉碎 (乙醇-冰混合物中进行, 超声波条件: 持续 10s, 20s 间隔, 共 10min), 直至完全粉碎, 目测没有大颗粒。随后加入 DNA-RNA 酶处理 (终浓度 DNA 酶 1mg/mL, RNA 酶 5mg/mL, 1mmol/L MgCl_2)。于室温静置 20min, 然后于 15℃, 12,000g 离心 8min, 上清液置于 50mL 离心管中, 加入冷甲醇至 40mL, -80℃ 存放 1h 以沉淀蛋白质。4℃, 12,000g 再次离心 30min, 小心弃去上清液, 沉淀用 0.5mL 稀释液稀释 (8mol/L 尿素; 4% CHAPS 溶于 0.04mol/L Tris)。

1.5 二维 (2D) 凝胶电泳

蛋白质抽提物用 PlusOne 2-D Quant Kit (Amersham Biosciences) 定量。取约含

500 μg 蛋白质抽提物用于电泳试验。SNZ28 株在 LB 培养液中的抽提物按照上述方法进行龙胆酸的诱导, 粗提物无需纯化, 可以直接用于 2DE。采用 Amersham Biosciences 的 2DE 系统, 第一向为固相 pH 梯度等电聚焦 (IEF), 13cm pH4-7 的梯度胶在重泡胀液中 (8mol/L 尿素; 4% CHAPS 溶于 0.002% BPB) 过夜; 加样量为 250 μL 。然后在 IPG-phor (Amersham-Pharmacia) 上进行第一维实验, 等电聚焦分离按下述程序: 500V 1h, 1,000V 1h, 8,000V 直至终点 24 kV/h。

等电聚焦分离后, 胶条用 SDS 平衡缓冲液 (0.05mol/L Tri/HCl, pH 8.8; 6mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 0.0002% BPB) 处理两次, 每次 15min。第 1 次含有 DTT (终浓度: DTT 100 mg/10 mL SDS 平衡缓冲液), 第 2 次不含 DTT (终浓度: 碘乙酰胺 250 mg/10 mL 缓冲液)。

然后 IPG 胶条置于 12.5% SDS 中 (18cm \times 16cm) 进行第 2 向的 SDS-PAGE, 将平衡后的 IPG 胶条移至凝胶的上方, 用 0.5% 的琼脂糖封闭。电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸-SDS, 在 14 $^{\circ}\text{C}$ ~ 15 $^{\circ}\text{C}$ 时, 以每一胶条 15mA 电泳 15min, 然后恒流 30mA 电泳, 直至溴酚蓝前沿抵玻璃板下缘为止。电泳结束后用 Coomassie blue 350 染色, 脱色并记录。结果用 Image Masterv 3.01 software (Amersham Biosciences) 分析。

1.6 蛋白质消化与质谱分析

二维电泳检出的蛋白质点按照 Shevchenko^[5] 的方法, 用胰蛋白酶处理, 经抽提、浓缩、脱盐 (Millipore ZipTip C18) 纯化制备, 样品用 MALDI-TOF 质谱仪 (Applied biosystem, USA, Voyager DE STR)、电喷雾电离 (ESI) 并联 MS Q-TOF (Micromass USA) 进行分析。获得了多肽片段的序列。

1.7 数据分析与数据库检索

从 MALDI TOF-MS 上获取的胰蛋白酶降解片段结合分子量的肽质量指纹谱 (PMF), 在 NCBI 上用 Proteometrics (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProfound.exe) 和 MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucshtml4.0/msfit.html>) 检索, ESI/MS 的分析数据通过 MASCOT 在 Matrix Science Ltd. 服务器上检索 (<http://www.matrixscience.com>)。

未能获得检索结果的氨基酸序列, 按 Shevchenko^[6] 的方法修正, 用 WU-BLAST2 (Gish, W. (1996-1999) <http://blast.wustl.edu>) 在 EMBL (<http://dove.emblheidelberg.de/Blast2/>) 检索。

2 结果与分析

2.1 二维电泳结果分析

SNZ28 菌株在龙胆酸盐诱导条件下的蛋白质抽提物在 pH4 ~ 7 的范围中进行二维电泳, 结果图像用 ImageMaster v 3.01 进行整合分析, 图 1 表示对照情况下的考马斯兰染色结果。图 2 是以诱导条件的图片为基础采用软件与对照情况下的图片重合, 从而产生的一张整合对照图片。结果发现, 在诱导的条件下, SNZ28 菌株有 8 个蛋白质点 (P1 ~ P8), 在对照组结果上没有显示; 另有 7 个蛋白质点 (U1 ~ U7), 与对照组的表达差异达到 3 倍以上。这 15 个相关蛋白点, 均能被考马斯染色鉴别。诱导后产生的新蛋白质点标记为 P, 表达提高的蛋白点标记为 U, 红圈表示对照条件下蛋白质点, 连线表示两种情况下都存在的点。

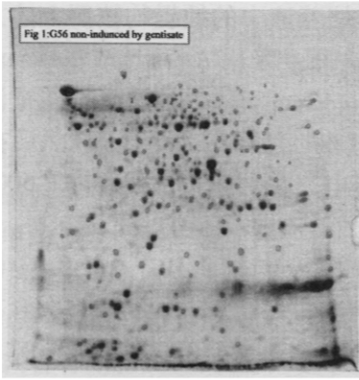


图1 SNZ28 在无诱导条件下生长于含 20 mmol/L 乳酸钠基础培养基上的 2D-PAGE 结果

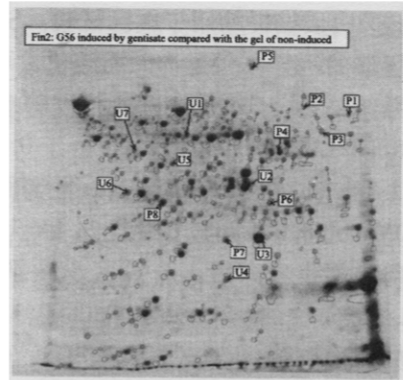


图2 SNZ28 在有 2.5 mmol/L 龙胆酸诱导条件下与对照条件下的二维蛋白电泳图片分析

2.2 MALDI-TOF 与 Q-TOF 结果分析

所获的 15 个点用胰蛋白酶处理, 然后首先用 MALDI-TOF MS 分析。并在 MALDI-TOF MS 的 PMF 数据库中检索。仅有 U1 点与铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 异柠檬酸脱氢酶 PAO1 片段同源性达到 22% (92/418 氨基酸序列, MW = 45.58 kD, pI = 5.10)。

剩余样品采用 Q-TOF 进一步分析, 14 个蛋白质点的氨基酸序列结果通过 MASCOT 程序在 NCBI 上检索。结果有 4 条多肽发现了同源序列, P8 的氨基酸序列与恶臭假单胞菌 KT2440; U2 与铜绿假单胞菌 PAO1 的 C4 二羧酸结合蛋白; U6 与食油假单胞菌 (*Pseudomonas oleovorans*) 的鞭毛蛋白均具有较高的同源性。Q-TOF 的数据进一步证实了 MALDI-TOF 对 U1 的分析结果。

10 个仍未被确定的蛋白点, 按照 Shevchenko 等^[6]的方法修正 Q-TOF 获得的多肽片段数据, 通过 MS BLAST 数据库检索。P1、3、4、5、6、7 和 U3、4 在数据库中发现了同源片段。然而, U5、7 仍未发现同源序列。

其中, P4 蛋白质点与青枯菌 *Ralstonia* sp. U2 的龙胆酸 1, 2 加双氧酶有极高的同源性 (分值为 107) 两条从 Q-TOF MS 获取的两条氨基酸序列与 *Ralstonia* sp. U2 的龙胆酸 1, 2 加双氧酶的相应氨基酸序列的同源性分值分别达到 59 和 48。这一结果具有统计学意义^[5], 检索结果见表 1。

表 1 蛋白质点各数据库检索结果

序号	MALDI-TOF 分析蛋白质	MS-FTI 检索结构	Q-TOF 分析蛋白质	MASCOT 检索结构	Q-TOF 分析蛋白质	MS-BLAST 检索结构
P1	n. i.		n. i.		Biotin carboxylase	<i>P. aeruginosa</i>
P2	n. i.		n. i. ^{a), b)}			
P3	n. i.		n. i.		Ubiquinol-cytochrome C reductase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2)
P4	n. i.		n. i.		Gentisate 1, 2-dioxygenase	<i>Ralstonia</i> sp. U2
P5	n. i. ^{a)}		n. i.		Chaperone-associated ATPase	<i>P. ^{c)}putida</i> KT2440
P6	n. i.		n. i.		Gene: " ORF1 "	<i>P. sp.</i>

续表 1

P7	n. i.		n. i.		Putative small heat shock protein, hsp20 family	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
P8	n. i.		Amino acid-binding protein	<i>P. putida</i> KT2440		
U1	Isocitrate dehydrogenase	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Isocitrate dehydrogenase	<i>P. aeruginosa</i> PAO1		
U2	n. i.		C4-dicarboxylate-binding protein	<i>P. aeruginosa</i> PAO1		
U3	n. i.		n. i.		HspF	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
U4	n. i.		n. i.		Phosphoglycerate kinase	<i>P. putida</i> KT2440
U5	n. i.		n. i.		n. i.	
U6	n. i.		Flagellin	<i>P. oleovorans</i>		
U7	n. i.		n. i.		n. i.	

a) n. i. not identified, b) Q-TOF MS analysis did not yield any amino acid sequence, c) *P. Pseudomonas*.

3 讨论

芳香烃是一类重要的环境污染物, 微生物降解在该污染物的迁移转化乃至最终从环境中消失的过程中占有重要的地位。目前的研究工作已经从一般寻找降解污染物的微生物转入微生物代谢途径、遗传调控机制和高效基因工程菌的研究。

当前, 对于未知蛋白质的研究, 主要通过 MALD-TOF MS 和 Q-TOF MS 获得的肽指纹图谱 (PMF), 借助检索工具, 在蛋白质数据库中检索同源序列来进行预测。这一方法已经成为蛋白质组研究中必不可少的一种手段^[7]。通过检索, 我们鉴定出了 12 个蛋白质点。值得注意的是, P4 的蛋白序列与青枯菌 *Ralstonia* sp. U2 的龙胆酸 1, 2 加双氧酶有极高的同源性。由于 SNZ28 没有保守型的 GDO I^[4], 这一结果表明 P4 极有可能就是诱导型的龙胆酸 1, 2 加双氧酶 (GDO II)。当然在确认该蛋白的身份前, 仍然需要进一步的分子生物学研究。比如, 我们可以根据从 Q-TOF 实验中获得的氨基酸序列来设计简并引物, 从而可以进行 PCR 扩增试验以获得部分序列。然后可以用这部分序列作为探针采用 Southern Blot 的方法杂交分别用不同酶随机切割的 SNZ28 基因组。阳性片断可切下连于质粒上进行测序。我们相信, 通过这样的方法可以获得诱导型的 GDO II 的基因序列, 并能够导入到 *E. coli* 中表达从而研究该蛋白的功能。

在本研究结果中还发现, 龙胆酸可诱导 P25X 的热休克蛋白的合成, 例如, P7 属于热休克蛋白 hsp20 家族, U3 属于 HspF 家族。有文献报道, 热休克蛋白可以由许多化合物诱导, 其作用主要是保护细胞免受毒物的危害。这些结果证明了降解细菌在环境污染物的诱导下能合成压力蛋白^[8]。这一结果也显示了微生物在适应污染环境过程中形成相关蛋白的重要性。

实验中, P2 点没有在 Q-TOF 中测出氨基酸序列, 可能是由于蛋白质产物不够; U5、7 点没有检索到与已知蛋白同源的序列, 这有可能是由于该蛋白属于一些与芳香

烃龙胆酸降解途径有关的至今仍未被发现的独特的蛋白。

Mason^[8]最近报道了 *P. putida* KT2442 在不同浓度的氯酚处理下的蛋白质的变化; Babel^[9]的研究表明, *Acinetobacter calcoaceticus* MC1 在由除草剂 2, 4-D 处理下, 虽然没有发现期望的热休克蛋白产生, 然而从 2D-Gel 结果中发现了两个新的 1, 2- 加双氧酶。由于有毒化合物的降解途径和相关基因很多均仍是未知, 采用二维蛋白电泳分析能快速鉴别降解途径中参与的酶。因此, 可以为研究细菌在有毒污染物环境下酶的变化, 提供有效的方法与手段。对二维蛋白点泳中获取的蛋白质点的进行序列与功能分析, 可以清楚的显示在芳香烃化合物的降解途径中相关的酶, 这对于构建功能蛋白质组数据库具有极大的意义。然后进一步, 结合分子生物学手段, 这些蛋白质可以被鉴定、克隆与修饰, 然后导入到细菌中去, 以了解酶动力学特征, 构建具有更宽泛底物特征的降解微生物。

参 考 文 献

- [1] 曹植菁, 龙炳清, 朱 明, 等. 重庆环境科学, 2002, 24 (6): 63 ~ 65.
- [2] 钟 鸣, 周启星. 应用生态学报, 2002, 13 (2): 247 ~ 251.
- [3] Chew C Y, Mark V M W, Yongmei F. Gene, 2003, 12 (12): 239 ~ 248.
- [4] Poh C L, Bayly R C. J Bacteriol, 1988, 143 (2): 59 ~ 69
- [5] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O M. Anal Chem, 1996, 68 (9): 850 ~ 858.
- [6] Andre J S, Shamil S, Alexander L, et al. Anal Chem. 2001, 73 (9): 1917 ~ 1926.
- [7] Arnott D, Connell K L, King K L, et al. Anal Biochem, 1998, 258 (1): 1 ~ 2.
- [8] Lupi C G, Colangelo T, Mason C A. Appl Environ Microbiol, 1995, 61 (6): 2863 ~ 2872.
- [9] Benndorf D, Loffhagen N, Babel W. Electrophoresis, 1999, 20 (8): 781 ~ 789.