

微重力诱变大肠杆菌快速生长突变株特性

党磊 印红 靳明慧 张瑞萍 庞欣*

(中国空间技术研究院空间生物实验室 北京 100190)

摘要: 利用旋转培养装置处理大肠杆菌, 筛选生长曲线发生变化、提前进入对数期的突变菌株, 对菌株进行基因芯片的表达谱分析和质谱分析, 研究微重力条件下微生物的生理代谢变化和对微重力条件的适应机制。结果发现突变菌株有 114 个差异表达基因, 其中 99 个基因表达上调。表达上调基因主要集中在 ABC 转运系统、糖代谢、三羧酸代谢、磷酸转移酶系统、核酸代谢、脂类代谢等方面。质谱分析从蛋白水平上验证了这个结果。表明经过微重力处理可以筛选到生长加快的菌株, 生长加快是菌株相关代谢水平上调的结果。空间微重力通过对微生物生长代谢相关基因的影响来使菌株适应空间环境。

关键词: 大肠杆菌, 基因芯片, 质谱分析, 微重力诱变

Mutagenesis of *E. coli* in Microgravity

DANG Lei YIN Hong JIN Ming-Hui ZHANG Rui-Ping PANG Xin*

(Space Biology Laboratory, China Academy of Space Technology, Beijing 100190, China)

Abstract: Variation in gene expression of *Escherichia coli* (*E. coli*), treated to micro-gravity, is analyzed to discover the change of microbial metabolism and the adaptation mechanism in microgravity using Microarray Gene Expression Profiles and Mass Spectrometry Analysis. In this article the strain was cultured in a rotator for several days and the mutant with advanced logarithmic phase in growth curve was screened and selected for Microarray Gene Expression Profiles and Mass Spectrometry Analysis. One hundred and fourteen differentially expressed genes are shown in Microarray Gene Expression Profiles of the mutant, and among them 99 were up-regulated expressions. The up-regulated expressions mainly appeared in ABC transporter, sugar metabolism, 3-carboxylic acid metabolism, phosphotransferase system, nucleic acid metabolism, lipid metabolism, etc. The result was verified through protein analysis with mass spectrometry. Suggesting that microgravity processing may accelerate microbial growth, and the advanced growth of the strain resulted from the up-regulated gene expression. The strain can adapt to spatial environments by affecting genes related to microbial metabolism.

Keywords: *Escherichia coli*, Microarray, Mass Spectrometry analysis, Microgravity mutation

近几年,国内外在空间微重力条件下微生物的生物学效应方面取得了一些研究进展^[1-3],但只局限于对诱变机理的假设和推测,对诱变效应的产生原因及基因定位有待深入揭示。只有在分子水平筛查变异基因,同时将变异基因的功能与变异效应相对应,才能真正揭示空间诱变效应的本质,从而提高菌种选育的预见性及空间诱变效应的利用价值。

基因表达谱芯片技术早已广泛应用在生物、药理等研究领域来筛选差异表达基因^[4-6],蛋白质双向电泳和质谱分析技术也是常用的蛋白质分析技术^[7-8],但是目前还没有同时运用这两种技术来研究微重力刺激后大肠杆菌的基因表达差异和蛋白质表达变化的报道。本实验运用基因表达谱芯片技术和质谱分析技术,筛查模拟微重力处理后的突变菌株的差异表达基因并进行定位,结合蛋白表达差异分析,探讨微生物对微重力环境的适应机制。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养基

所用菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) 1.1633 购于中国普通微生物保藏管理中心,在 LB 培养基中培养。

1.2 实验装置

模拟微重力培养装置(购于中国科学院生物物理所),LuxScan 10KA 双通道激光扫描仪(CapitalBio 公司),固相 pH 梯度等电聚焦仪(IPGphor IEF System) (Amersham Pharmacia 公司),垂直板蛋白电泳仪(PROTEIN II xi Cell) (Bio-Rad 公司),凝胶图像扫描仪(ImageScanner) (Amersham Pharmacia 公司),电喷雾四极杆正交加速飞行时间串联质谱仪(ESI-MS/MS)Q-TOF2 型(配有毛细管液相色谱和纳升喷雾源,测定方式:正离子) (Micromass 公司,英国),冷冻离心机(Sigma 公司),超声波破碎仪 Sonoiprep 150 (Sanyo 公司)。

1.3 大肠杆菌的模拟微重力处理

将培养至对数生长期的 *E. coli* 菌液转接入旋转培养装置(整个装置位于培养箱中),30 r/min、37°C 培养 15 d。

1.4 基因芯片检测

1.4.1 生长测定及突变株筛选:将菌液用无菌水洗脱后,涂布于 LB 固体培养基表面,37°C 培养过夜,

挑选单菌株进行生长曲线的测定,得到提前进入对数期的突变菌株。

1.4.2 RNA 提取及荧光标记:对突变株继续培养至由延滞期进入对数期的拐点处,提取其 RNA (使用天根生化科技(北京)有限公司 RNAPrep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒)。

总 RNA 经过反转录 Klenow 酶标记反应,得到荧光染料 Cy5 和 Cy3-dCTP 标记的 cDNA。此过程使用 CapitalBio 公司晶芯®原核生物样品标记试剂盒。

1.4.3 基因芯片数据分析:杂交芯片用双通道激光扫描仪扫描,图片用 LuxScan 3.0 图像分析软件(CapitalBio 公司)进行分析和数字化。

芯片的信号值进行片间校正和归一化、线性归一化和信号可信度标记,删除荧光信号弱的基因,信号值 > 1500 为表达基因,1500 > 信号值 > 800 为临界表达基因,信号值 < 800 为弱表达基因。基因表达谱分析及差异表达基因筛选:突变菌株及对照菌株 RNA 交博奥生物有限公司进行表达谱分析。

对杂交数据 Ration 进行分析($Ration = \frac{\text{菌株的杂交信号值}}{\text{对照}}$),若 $Radio \geq 2$ 或 $Radio \leq 0.5$,且经 SAM 软件进行 One class 方法检验 $p < 0.05$ 的基因,筛选作为差异表达基因。

1.5 蛋白质双向电泳及质谱分析

取模拟微重力处理后的 *E. coli* 和对照菌株,提取总蛋白,进行蛋白质双向电泳。对凝胶使用质谱兼容的银染方法进行染色,凝胶图像采用阿玛西亚公司的 ImageMaster 2D Platinum Software 软件 5.0 版进行分析。

对双向电泳的结果建立差异蛋白质表达谱,选择差异较大的点进行分析,同时根据基因芯片分析得到的差异表达基因,切取差异斑点,进行脱色、胶内胰酶酶切和肽段提取,然后用纳升超高效液相色谱-电喷雾串联质谱对肽段测序后进行检索,检索结果的可靠性用肽段匹配率、得分值(Score)和匹配肽段在对应蛋白质中的序列覆盖率进行评价。

2 结果与讨论

2.1 突变株筛选和基因表达谱芯片分析

对模拟微重力条件下的菌株进行生长曲线测定,发现有菌株在培养 3-4 h 后就进入对数生长期,而对照菌株在 5 h 后才进入对数生长期(图 1)。

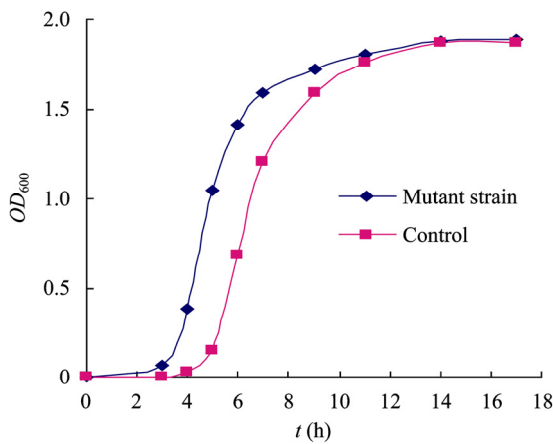


图1 模拟微重力处理后大肠杆菌的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *E. coli* treated by microgravity

经多次传代培养, 获得性状可稳定遗传的菌株后, 对提前进入对数期的菌株进行 RNA 提取, 用大肠杆菌表达谱芯片进行杂交, 共得到 114 个表达水平有较大差异(Ratio ≥ 2 或 Ratio ≤ 0.5)的基因, 其中 99 个表达上调, 15 个表达下调。

2.2 差异表达基因的 Go terms 富集度分析

将差异表达的基因按上调和下调进行 pathway 富集度分析, 取 Ratio ≥ 2 或者 Ratio ≤ 0.5 , 同时

P -value < 0.01 的富集结果, 列于表 1 (正体为上调基因, 斜体为下调基因)。

结果显示大部分为表达上调基因。首先是 ABC 转运系统, 有 21 个基因表达上调; 其次为碳水化合物代谢系统, 包括果糖甘露糖代谢系统(7 个)、三羧酸循环(5 个)、淀粉蔗糖代谢(4 个)等; 此外还有磷酸转移酶系统(PTS)(9 个), 核酸代谢(9 个), 脂类代谢(6 个)等。这些与物质代谢及转运相关基因的表达上调, 说明微重力条件促使细菌加快代谢物质的转运, 使生长加快, 提前进入对数生长期。

2.3 蛋白质双向电泳及质谱分析

基因表达谱芯片已从 mRNA 水平上显示了突变菌株的基因表达差异, 为从蛋白水平得到进一步支持, 对菌株蛋白进行双向电泳和质谱分析。

如图 2 所示, 每个样品至少重复 3 块凝胶, 银染之后每块凝胶能检测到约 1600 个蛋白质点。处理和对照的匹配率达 80%。对蛋白质斑点的表达量取平均值, 用方差分析($P < 0.05$), 确定差异蛋白质斑点。这些点分布在 pI 4.5–9.5、分子量 15–90 kD 范围内。

在差异蛋白质斑点中, 处理与对照斑点表达量比值大于 2 的斑点有 89 个, 小于 0.5 的有 74 个,

表 1 对数期提前的菌株差异表达基因的 GO terms 富集度分析
Table 1 Go terms enrichment of differential expression genes of the mutant

Pathway Name	Total	P value
Glycerolipid metabolism	3	0.0
Citrate cycle (TCA cycle)	5	0.0
Tryptophan metabolism	2	0.0
Fructose and mannose metabolism	7	0.0
Phosphotransferase system (PTS)	9	0.0
Glycerophospholipid metabolism	3	1.0×10^{-6}
Nicotinate and nicotinamide metabolism	2	3.3×10^{-5}
Reductive carboxylate cycle (CO ₂ fixation)	2	7.1×10^{-5}
Pyrimidine metabolism	4	7.9×10^{-5}
Starch and sucrose metabolism	4	1.18×10^{-4}
ABC transporters-General	9	1.44×10^{-4}
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	3	1.44×10^{-4}
Galactose metabolism	3	1.51×10^{-4}
Purine metabolism	5	2.56×10^{-4}
ABC transporters-Organism-specific	12	5.35×10^{-4}
Glutamate metabolism	2	7.7×10^{-4}
1- and 2-Methylnaphthalene degradation	1	0.001146
Riboflavin metabolism	1	0.003416
Benzoate degradation via CoA ligation	2	0.003597
<i>Bile acid biosynthesis</i>	1	0.004260
<i>Lysine degradation</i>	1	0.006511

由表达谱芯片结果可知, 差异表达基因大多为表达上调基因, 所以选择比值大于 2 的蛋白质斑点作为研究对象。同时, 基因芯片 Pathway 统计结果显示差异表达基因在成分上主要是膜蛋白相关基因, 根据不同膜蛋白的分子量和等电点等信息, 从差异蛋白质斑点中选择了 10 个点进行 NanoUPLC-ESI-MS/MS 质谱分析, 最终检测到 9 个蛋白点(表 2)。

质谱分析结果显示, 表达上调的有 ABC 转运系统蛋白、糖代谢相关蛋白及半乳糖代谢和脂肪酸代谢等相关蛋白, 此结果与基因表达谱芯片的结果相一致, 都涉及 ABC 转运蛋白和碳水化合物代谢。说明经过模拟微重力处理后生长曲线发生变化的菌

株, 其相关的基因不仅表达水平上调, 同时蛋白质水平也上调。

ABC 转运蛋白是一类 ATP 驱动泵, 在大肠杆菌中 78 个基因编码, 具有能转运离子、氨基酸、核苷酸、多糖、多肽、甚至蛋白质的功能。ABC 转运器还可催化脂双层的脂类在两层之间翻转, 这在膜的发生和功能维护上具有重要的意义。利用 ABC 转运蛋白相关基因表达上调的菌株作为宿主菌来构建基因工程菌, 可以提高这些产物的转运, 对利用大肠杆菌作基因工程菌生产功能蛋白具有重要意义。

另外, 从质谱分析的结果还发现 FBF-aldolase-IIA 的表达水平高。FBF-aldolase-IIA 属应激蛋白, 应激蛋白是细胞在逆境中产生的一种蛋白质,

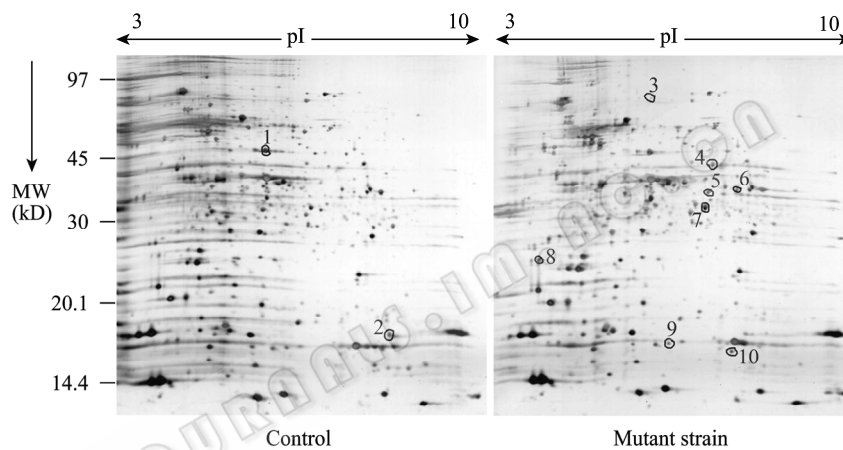


图 2 对数期提前大肠杆菌和对照菌株的总蛋白 2-D 图

Fig. 2 Two dimensional electrophoretic (2-DM) maps of the mutant and the control

表 2 对数期提前菌株差异表达蛋白
Table 2 Differential expression protein of the mutant

Spot No.	Protein name	Functional clustering	Accession No.
1	Class Ii Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase In Complex With Phosphoglycolhydroxamate	果糖代谢	gi 6980737
2	(3R)-hydroxymyristoyl-ACP dehydratase	脂肪酸合成代谢	gi 15799862
4	UDP-galactose-4-epimerase	半乳糖代谢	gi 49176045
5	Tagatose-bisphosphate aldolase gaty	果糖代谢超家族	gi 7436618
6	<i>E. coli</i> Succinyl-Coa Synthetase	糖代谢	gi 6980727
7	D-Ribose-Binding Protein From Escherichia Coli	ABC 转运蛋白	gi 3318867
8	D-Ribose-Binding Protein From Escherichia Coli	ABC 转运蛋白	gi 3318867
9	Predicted protein	参与细菌细胞壁溶解	gi 16130579
10	Translation inhibitor protein RaiA	与核糖体亚基结合阻碍转录	gi 15803120

具有高度保守性和诱导生成普遍性,能提高细胞对应激原的耐受性。应激蛋白表达的上调,说明微重力对菌株的生理功能发生了重大影响,菌株需要通过应激蛋白作为分子伴侣参与蛋白质的折叠、转运及组装等过程,恢复或加速清除细胞内已变性的蛋白质而稳定细胞结构,从而起到对菌株的保护作用。

基因芯片结果和蛋白质双向电泳及质谱分析结果共同说明,模拟微重力条件下, *E. coli* 的生长发生变化,主要表现在糖代谢及碳水化合物代谢等方面。

3 结论

通过运用基因表达谱芯片技术和质谱技术,从基因和蛋白水平上分析了模拟微重力条件下菌株的生产变化。结果显示,模拟微重力条件下突变菌株的 ABC 转运系统和主要碳水化合物代谢相关基因的表达和蛋白的表达上调,与之对应的是物质转运和代谢功能的加强,导致细菌生长加快。*E. coli* 作为模式菌株广泛应用在生物学的各个领域,我们对 *E. coli* 进行空间诱变,研究微重力条件下微生物的生理代谢变化和对微重力条件的适应机制,为微生物空间诱变育种提供理论基础和科学指导,提高空间诱变效应的利用价值。

参考文献

- [1] Lam KS, Gustavson D, Pirnik DL. The effect of space flight on the production of actinomycin D by *Streptomyces plicatu*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, **29**(6): 299–302.
- [2] Nickerson CA, Ott CM, Wilson JW, *et al*. Microbial responses to microgravity and other Low-Shear environments. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 2004, **68**(2): 345–361.
- [3] Kacena M, Todd P. Growth characteristics of *E. coli* and *B. subtilis* cultured on an agar substrate in microgravity. *Microgravity Science and Technology*, 1997, **10**(1): 58–62.
- [4] Xiang GX, Pan LB, Xing Wl, *et al*. Identification of activity-dependent gene expression profiles reveals specific subsets of genes induced by different routes of Ca^{2+} entry in cultured rat cortical neurons. *J Cell Physiol*, 2007(212): 126–136.
- [5] Zhang W, Morris QD, Chang R, *et al*. The functional landscape of mouse gene expression. *J of Bio*, 2004(3): 21.
- [6] Guo L, Lobenhofer EK, Wang C, *et al*. Rat toxicogenomic study reveals analytical consistency across microarray platforms. *Nature Biotechnology*, 2006, **24**(9): 1162–1169.
- [7] 成海平, 钱小红. 蛋白质组研究的技术体系及其进展. *生物化学和生物物理进展*, 2000, **27**(6): 584–588.
- [8] 陈平, 谢锦云, 梁宋平. 双向凝胶电泳银染蛋白质点的肽植皮指纹图分析. *生物化学与生物物理学报*, 2000, **32**(4): 387–391.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一,主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展,其内容要求新颖丰富,观点明确,论述恰当,应包含作者自己的工作内容和见解。因此,作者在动笔之前必须明确选题,一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及各个方面,在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势,即掌握其内在的精髓,深入到专题研究的本质,论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望,提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外,作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法,辅以注释,客观而有少量评述,使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是:在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文,引用文献数量不限。