

# 胶质芽胞杆菌对磷矿石风化作用时细菌蛋白质的双向电泳分析

谌 书<sup>1,2\*</sup> 刘从强<sup>1</sup> 连 宾<sup>1</sup>

(1. 中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室 贵州 贵阳 550002)

(2. 西南科技大学 固体废物处理与资源化省部共建教育部重点实验室 四川 绵阳 621010)

**摘 要:** 本文研究对磷矿石有风化作用的胶质芽胞杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)在风化磷矿石过程中菌体蛋白质组的变化及差异, 以此了解该风化作用的分子生物学机制。将该菌接入液体培养基中, 加磷矿粉为处理组, 不加磷矿粉为对照组, 静置培养。培养 10 d 后, 取上清液离心后的固体物和部分上清液中的外分泌蛋白用作菌体蛋白质组学分析。菌体蛋白质组二维电泳图谱进行比较和软件分析后, 处理组可见蛋白点数为(1134±98)个, 对照组可见蛋白点数为(729±53)个, 两者比较具有统计学差异( $P<0.05$ ); 处理组菌体细胞的蛋白点表达量与对照组比较, 共有差异蛋白质点 496 个, 其中有 214 个蛋白点表达上调, 75 个蛋白点表达下调, 207 个蛋白质点为新合成。细菌对磷矿石风化作用时激活了某些蛋白的表达, 新合成、表达量增加和表达量下降的蛋白质点与细胞的代谢调控、细胞激活、增生、分化和信号转导通路等有关; 揭示了该菌受矿粉的影响及其适应环境的分子生物学机制。

**关键词:** 胶质芽胞杆菌, 磷矿石, 微生物风化, 蛋白质组

## Two-dimensional Gel Electrophoresis Analysis of Bacterial Proteins During *Bacillus mucilaginosus* on Weathering of Phosphorite

CHEN Shu<sup>1,2\*</sup> LIU Cong-Qiang<sup>1</sup> LIAN Bin<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry Chinese Academy of Sciences, Guiyang, Guizhou 550002, China)

(2. Key Laboratory of Solid Waste Treatment and Resource Recycle, Ministry of Education, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010, China)

**Abstract:** The aim of this study was to examine the difference and change of *Bacillus mucilaginosus* proteins on weathering of phosphorite in order to provide further understanding of the molecular biological mechanism in the bacterial weathering. The concrete methods are described as follows: mineral powder was put into liquid culture medium and *B. mucilaginosus* was incubated in the medium. The control had no mineral powder in the medium. The treatment and controls were cultured simultaneously under the same condi-

tion. In 10 days, after the supernatant was centrifuged. The precipitation was used to analyze the protein differences between the treatment and the controls by 2-dimentional gel electrophoresis (2-DE). Software and comparison of the 2-DE pictures of bacterial proteins revealed (1134±98) visible protein spots in the treatment group, and (729±53) visible protein spots in the control group. The difference had significance of statistics ( $P<0.05$ ). To compare the bacterial protein expression contents of the treatment group with those of the control group, there were 496 differential protein spots, including 214 protein spots which indicated that the protein contents increased, 75 protein spots were indicative of a decrease, and 207 proteins were newly synthesized. It is proposed that some protein expression was activated after the input of mineral powder. Newly synthesized proteins, the increase of expression contents and reduction of proteins may be connected with bacterial metabolic regulations, cell activation and signal transmission. The results revealed the impact of mineral to bacteria, and the molecular biological mechanism about the adjustability of environment change.

**Keywords:** *Bacillus mucilaginosus*, Phosphorite, Microbiological weathering, Proteome

胶质芽胞杆菌(*Bacillus muscilaginosus*)属于芽胞杆菌属的一个种, 能利用多种糖类, 不明显产酸, 可形成肥厚的荚膜, 能分解硅酸盐矿物和磷灰石<sup>[1,2]</sup>。细菌对矿物的风化作用是细菌与矿物间发生生物化学反应和生物物理变化的过程<sup>[3]</sup>。微生物蛋白质组学是研究与微生物活动相关的蛋白质, 在不同的环境条件下, 微生物相关功能基因组得到表达。用二维电泳将其产生的大量蛋白质进行分离, 比较二维电泳图谱的差异, 再对这些差异蛋白质进行鉴定, 可以确定与微生物生理活动相关的基因, 进而阐明微生物基因组功能及其适应环境的分子机制<sup>[4-6]</sup>。理解细菌对矿物的风化机理, 可以利用微生物蛋白质组学的研究方法, 从整体、动态和网络的水平上对蛋白质结构和功能进行研究, 以直接阐明细菌在有矿物存在的条件下的变化机制, 揭示元素生物地球化学循环与细菌生理活动的关系, 深入了解有关微生物响应环境的多各重要代谢途径的基因及其调控和反馈机制<sup>[7,8]</sup>。目前以细菌蛋白质学的方法探讨胶质芽胞杆菌对磷矿石风化作用的分子生物学机制还未见报道, 本文通过研究液体培养基中胶质芽胞杆菌对磷矿石进行风化作用过程中菌体蛋白质表达的差异, 探讨风化作用过程中的分子生物学机制。同时, 为进一步研究细菌对矿物风化作用提

供新的技术平台, 为研究微生物对矿物风化作用的机理奠定基础, 为开发新的基因工程菌提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 磷矿石: 磷矿石经岩石薄片显示磷灰石矿物以椭球状集合体形式存在, 颗粒大小在 0.05 mm~0.1 mm 左右, 颗粒支撑和基质支撑, 胶结物为胶磷矿。此外, 磷矿石样品中还含有少量的方解石、粘土矿物等副矿物。隐晶质磷灰石呈隐晶-微晶集合体, 6100 倍电镜下为 0.01 μm~6 μm 的粒状、针状、柱状和片状等超微磷灰石晶体。其化学式为  $\text{Ca}_{10}\text{P}_{5.9}\text{C}_{0.4}\text{O}_{23.2}(\text{OH})_{0.7}\text{F}_{2.1}$ 。根据 X 射线衍射结果得出其矿物组成为: 磷灰石 91.1%; 石英 1.98%, 高岭石 1.7%, 伊利石 2.46%, 蒙脱石 2.45%, 非晶质 0.31%。采用磷矿石的水溶液作电泳无点存在; 采用 Folin-酚试剂法进行蛋白质定量检测, 结果小于检测限。其化学成分分析见下表 1。

1.1.2 菌株: 胶质芽胞杆菌由中科院地球化学研究所连宾研究员提供。

1.1.3 菌体制备: 在 250 mL 三角瓶中, 加入 100 mL 培养基(蔗糖 10 g, 酵母膏 0.2 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g,

表 1 磷矿石的岩石化学成分(%) Table 1 Element composition of the apatite										
磷矿石的化学成分 Chemical composition										
CaO	MgO	K <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	TiO <sub>5</sub>	MnO <sub>2</sub>	Other
51.37	0.47	0.14	0.31	1.04	0.63	2.90	36.46	0.07	0.05	6.56

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g, KCl 0.1 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, H<sub>2</sub>O 1000 mL, pH 7.0~7.2), 磷矿石粉(200 目) 3 g, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。冷却后, 无菌操作接入事先准备好的胶质芽胞杆菌种子液 1 mL(种子液中细菌个数 10<sup>7</sup>/mL), 置 28℃ 培养 10 d。同时设置不加矿粉的对照, 对照和处理分别有 3 次重复。10 d 后取三角瓶中的液体, 在 4℃ 条件下, 10000×g 离心 5 min, 将上清倒入 100 mL 干净的聚酯瓶中为外分泌蛋白液, -80℃ 冰箱内备用。用 pH 7.2 无菌的 0.01 mol/L PBS(NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g, H<sub>2</sub>O 1000 mL)洗涤沉淀 3 次, 取沉淀物置 -80℃ 冰箱内备用。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 菌体蛋白质提取:** 取少量菌体加入到 400 μL 蛋白提取液(8 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 65 mmol/L DTT, 5 mmol/L PMSF, 4% CHAPS, 65 mmol/L Tris, 0.2% Bio-Lyte(3-10), 1%(W/V) 溴酚蓝; urea 和 thiourea 购自 Pharmacia 公司; DTT 和 CHAPS 购自 Sigma 公司; PMSF、Bio-Lyte(3-10)、溴酚蓝和 Tris 碱购自 Bio-Rad 公司)充分混匀, 反复冻融 6 次, 12000×g 离心 30 min, 然后取上清液少部分和外分泌蛋白液按 3:1 的比例混合, 用 Folin-酚试剂法对样品的蛋白质进行定量, 其余-80℃ 保存备用。

**1.2.2 第一向固相 pH 梯度等电聚焦:** 细菌总蛋白质提取物(500 μg)与水化上样缓冲液(8 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 65 mmol/L DTT, 4% CHAPS, 65 mmol/L Tris, 0.2% Bio-Lyte(3-10), 1%(W/V)溴酚蓝)使总体积为 250 μL 充分混合, 加入到 IPG 胶条内溶胀 12 h, 然后将 IPG 胶条(13 cm IPG 胶条(pH 3~10) 购自 Pharmacia 公司)放入等电聚焦电泳仪(型号: Ettan<sup>TM</sup> IPGphor<sup>TM</sup>, Amersham Pharmacia Biotech 公司), 胶条上滴加一定量的矿物油。按以下参数和程序完成等电聚集电泳: 500 V, 1 h; 1000 V, 1 h; 8000V, 4 h; 8000 V, 6 h; 500 V 维持(每胶条电流 50 mA)。

**1.2.3 第二向垂直板 SDS-PAGE 电泳:** 等电聚焦完毕后的 IPG 胶条在平衡缓冲液 (0.375 mol/L Tris-HCl(pH 8.8), 6 mol/L urea, 20% Glycerol, 2% SDS(W/V), 2% DTT; Glycerol 购自 Bio-Rad 公司)和平衡缓冲液 (0.375 mol/L Tris-HCl (pH 8.8), 6 mol/L urea, 20% glycerol, 2% SDS(W/V), 2.5% Iodoacetamide; SDS 和 Iodoacetamide 购自 Bio-Rad 公司)中各平衡 15 min, IPG 胶条转移到 SDS-PAGE

凝胶上, 用封胶液封闭。凝固后进行 SDS-PAGE 电泳(型号: Hoefer<sup>TM</sup> SE 600 Ruby<sup>TM</sup>, Amersham Pharmacia Biotech 公司; 参数: 10 mA 每块胶, 2 h; 20 mA 每块胶, 7 h)至溴酚蓝前沿到达玻璃板底部停止。

**1.2.4 染色与凝胶图像分析:** SDS 胶用考马斯亮蓝 G250(考马斯亮蓝 G250 购自 Bio-Rad 公司)染色 2 h, 脱色过夜。ImageScanner 扫描仪(型号: V9909-H7L0, Amersham Pharmacia Biotech 公司)获取数字化图像, Imagemaster 6.0 软件对图像进行背景消减、斑点检测、匹配和获取斑点位置坐标相对分子质量和等电点校正及归一化处理等。

**1.2.5 数据的统计学处理:** 采用 SPSS12.0 统计软件费歇尔确切检验法(Fisher's exact test)对实验数据进行统计分析, 比较结果差异的显著性。

## 2 结果

### 2.1 菌体的 2-DE 图谱分析

图 1 为对照组和处理组菌体总蛋白质样品的双向电泳图谱。对照组和处理组分别进行了 3 次电泳, 双向电泳凝胶经考马斯亮蓝染色, 发现 3 次重复的电泳图谱非常相似。菌体蛋白斑点分布模式基本一致, 表现为大小不等、形状和分布不规则、颜色深浅不均的斑点, >90%的蛋白点集中于 pI 值 4~8 的范围内。对照组蛋白质点主要集中分布于 pI 3~6.5 之间。处理组蛋白质点分布范围更广且更均匀, 如图 1-b 中方框区域(pI 6.5~10, Mr 14~31)所示出现了对照组上未见的新蛋白质点。

### 2.2 菌体蛋白质 2-DE 图谱比较

采用 Imagescanner 扫描仪扫描获取图像, 利用图像分析软件 Imagemaster 6.0 对两组细胞蛋白图谱进行分析比较。菌体蛋白重复 3 次进行双向电泳分离, 对照组双向电泳图谱上可观察到蛋白质点数为 (729±53)个(图 1a), 处理组可见到蛋白质点数为 (1134±98)个(图 1b), 两者比较具有统计学差异 ( $P<0.05$ )。加矿粉后, 3.0<pI<6.4 蛋白质点数增加了 223 个, 6.5<pI<7.5 蛋白质点数增加了 120 个, 7.6<pI<10.0 蛋白质点数增加了 62 个; 除 Mr<14 的蛋白质点数减少了 89 个点以外, 其余都增加, 每段之间增加的蛋白质点数都在 100 个点左右(图 2)。以对照组为参考凝胶, 与处理组双向凝胶图进行匹配。将两块凝胶中重复 3 次均有 2 倍表达量差异的蛋白质点可以认为是两细胞系的差异表达蛋白质

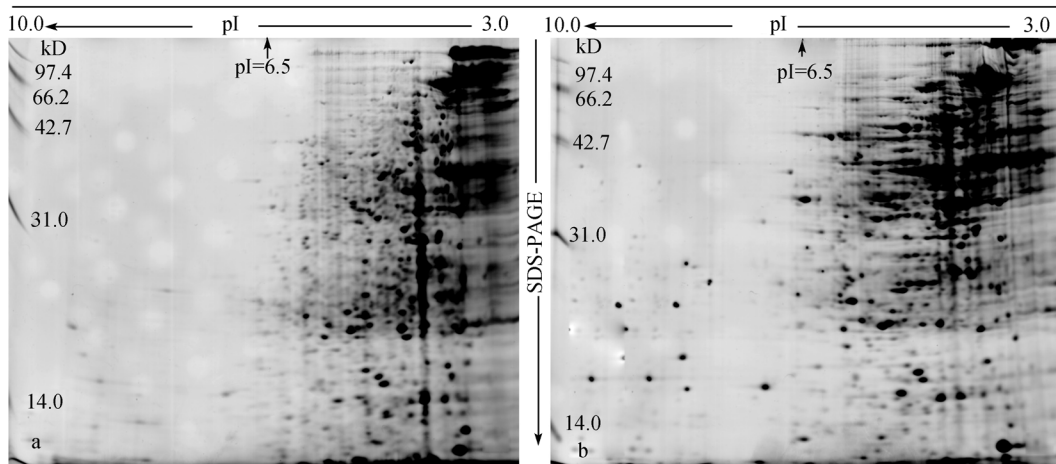


图 1 总蛋白质双向凝胶电泳图谱

Fig. 1 2-DE gel map of bacterial proteins without (a) or (b) mineral powder

Note: a: Control group; b: Treatment group.

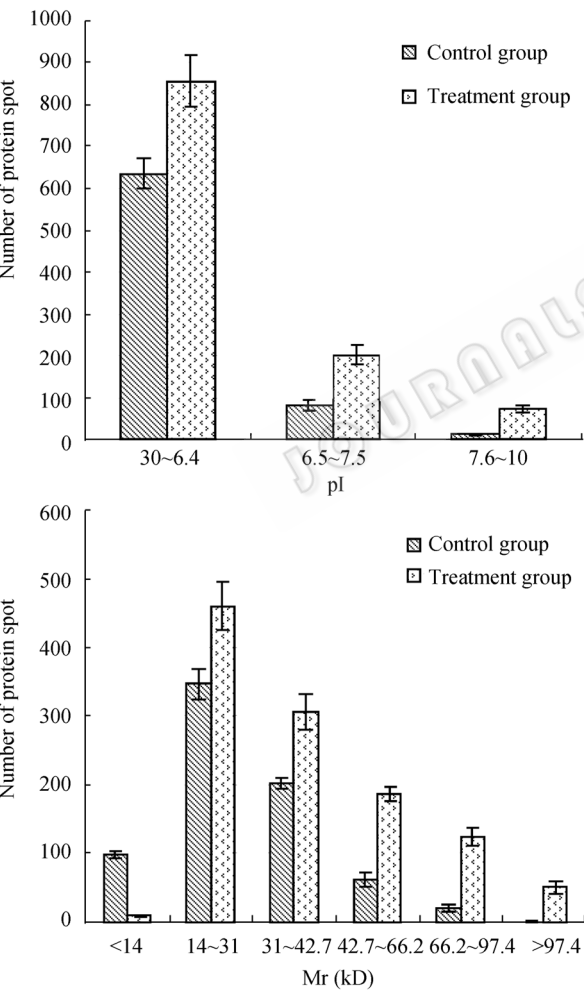


图 2 双向电泳图中对照组和处理组蛋白质点与 pI 和 Mr 分布 ( $P<0.05$ )

Fig. 2 The relation pI and Mr distribution of bacterial protein with protein spots

点,以差异蛋白质点和新合成的蛋白质点作为标准,对照组菌体的蛋白表达量与比较处理组有差异的蛋白质点 496 个,其中有 214 个蛋白点表达上调,75 个蛋白点表达下调,207 个蛋白质点为新合成。

3 讨论

从蛋白质点的变化情况看,加入矿粉后,蛋白质差异点 496 个,其中 214 个蛋白点表达上调,75 个蛋白点表达下调,新合成的蛋白质点 207 个。新合成蛋白质可直接参与矿物风化作用,与矿物风化过程中酶参与风化作用观点一致<sup>[1,9-11]</sup>,此外,细菌为适应磷矿粉的条件,激活了某些蛋白质的表达,以改变代谢过程,导致新合成的蛋白质点增加。一方面,这些新合成的蛋白质可能参与细胞代谢<sup>[12]</sup>,转录调控如转录因子、生长因子以及信号转导通路等。一些学者在研究细菌吸收重金属污染物时或降解有机污染物时,得到了在环境胁迫下一些相关蛋白质的表达被激活的结论<sup>[13,14]</sup>。另一方面,它们还与细胞增殖信号相关,对细胞生存、增殖进行直接或间接刺激,促进细胞的进一步激活增生、分化等信号,参与细胞内信号级联反应的调控,从而启动了一系列后续变化。新合成蛋白质的增加可能导致细菌参与促成细胞分化、成熟的调节酶的增加。信号蛋白在蛋白质翻译后修饰决定了蛋白质的活性、稳定性、定位和代谢等许多方面,它们的变化往往与环境的变化密切相关,而信号蛋白(蛋白激酶、磷酸化相关蛋白)在蛋白质翻译后修饰及相互作用中起

重要调节作用<sup>[15]</sup>。在有矿粉的条件下,有 214 个蛋白质点的表达量上调,它们可能属代谢酶,这些酶大多数是高丰度蛋白,参与能量代谢、三羧酸循环及呼吸链活动,反映细胞和代谢状态,与细胞功能活跃、代谢旺盛相关<sup>[16,17]</sup>。有矿粉存在时,Mr>66.2 的蛋白质点大约增加了 13%(图 2),它们与被溶解下来的矿物元素发生络合或者吸附,符合生物胶体吸附离子的观点<sup>[18,19]</sup>。

在细菌对磷矿石风化作用前后,其中部分细菌蛋白都没有发生变化,这些蛋白大多属于细胞膜结构和骨架蛋白(多数细胞均有其细胞膜结构和骨架的特定组分),它们在各细胞中表现出相应的组织特异性,在细胞运动、分裂、信息传递、能量转换、代谢调控以及细胞形态构建等方面具有重要作用<sup>[20]</sup>。

综上所述,在有矿粉的情况下,菌体蛋白的表达也发生了较大的变化。通过比较对照组和处理组细胞蛋白表达水平的差异及对差异蛋白质点的分析,可发现细菌在有矿粉存在时,可以通过改变其代谢相关的酶类以适应环境的变化,因而,微生物具有响应环境的多种代谢途径、调控及反馈的基因。下一步可通过免疫印迹进一步筛选出其中与磷矿石风化相关的蛋白质,再进行质谱测序,从而鉴定出与矿物风化相关的菌体蛋白。由于该方法稳定性和重复性好,为研究细菌对矿物风化作用的分子生物学机理提供了新的技术平台,为进一步研究微生物对矿物风化作用的机理奠定了基础,为开发新的基因工程菌提供帮助。

## 参 考 文 献

- [1] 连 宾. 硅酸盐细菌 GY92 对伊利石的释钾作用. 矿物学报, 1998, **18**(2): 234–237.
- [2] Singh S, Kapoor KK. Effects of inoculation of phosphate-solubilizing microorganisms and an arbuscular mycorrhizal fungus on mungbean grown under natural soil conditions. *Mycorrhiza*, 1998, **7**: 249–253.
- [3] 谌 书, 郑厚义. 磷矿石的微生物风化作用——以一株黑曲霉(*Aspergillus niger*)为例. 生态环境, 2007, **16**(3): 1007–1013.
- [4] Cash P. Characterisation of bacterial proteomes by two-dimensional Electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 1998, **372**: 121–145.
- [5] Büttner K, Bernhardt J, Scharf C, *et al.* A comprehensive

- two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis*, 2001, **22**: 2908–2935.
- [6] Norbeck AD, Callister SJ, Monroe ME, *et al.* Proteomic approaches to bacterial differentiation. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, **67**: 473–483.
- [7] Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science*, 2008, **320**: 1034–1039.
- [8] Newman DK, Banfield JF. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. *Science*, 2002, **296**: 1071–1077.
- [9] 连 宾, 傅平秋, 莫德明, 等. 硅酸盐细菌解钾作用机理的综合效应. 矿物学报, 2002, **22**(2): 179–182.
- [10] Dziurla MA, Achouak W, Lam BT, *et al.* Enzyme-linked immunofiltration assay to estimate attachment of *Thiobacilli* to pyrite. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, **64**(8): 2937–2942.
- [11] Neal AL, Rosso KM, Geesey GG, *et al.* Surface structure effects on direct reduction of iron oxides by *Shewanella oneidensis*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2003, **67**(23): 4489–4503.
- [12] Madsen EL. Epistemology of environmental microbiology. *Environmental Science and Technology*, 1998, **32**(4): 429–439.
- [13] Lower BH, Hochella MF, Steven JR, *et al.* Putative mineral-specific proteins synthesized by a metal reducing bacterium. *American Journal of Science*, 2005, **305**: 687–710.
- [14] Vohradsky J, Thompson CJ. Systems level analysis of protein synthesis patterns associated with bacterial growth and metabolic transitions. *Proteomics*, 2006, **6**: 785–793.
- [15] Tjalsma H, van Dij JM. Proteomics-based consensus prediction of protein retention in a bacterial membrane. *Proteomics*, 2005, **5**: 4472–4482.
- [16] Adamis PDB, Gomes DS, Pereira MD, *et al.* The effect of superoxide dismutase deficiency on cadmium stress. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology*, 2004, **18**(1): 12–17.
- [17] Egler M, Grosse C, Grass G, *et al.* Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor *RpoE* in metal resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2005, **187**(7): 2297–2307.
- [18] Douglas S, Beveridge TJ. Mineral formation by bacteria in natural microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, **26**: 79–88.
- [19] Warren LA, Haack EA. Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments. *Earth-Science Reviews*, 2001, **54**: 261–320.
- [20] Devlin TM. Textbook of biochemistry with clinical correlations. New York: Wiley-Liss, 1997.