

酿酒酵母 FFC2146 胞内蛋白及胞外蛋白 双向电泳条件优化及图谱建立

王祥余¹ 朴永哲² 翟明昌¹ 王晓丹¹ 程贺¹ 赵长新^{1*}

(1. 大连工业大学 辽宁省发酵工程重点实验室 辽宁 大连 116034)

(2. 大连民族学院生命科学院 辽宁 大连 116600)

摘要: 通过对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的培养基、培养条件及蛋白质提取方案的优化,建立了酿酒酵母胞外和胞内蛋白双向电泳图谱制作方法。在 YNB 培养基中培养 20 h, 经过离心取上清-超滤-冻干可得到酿酒酵母胞外蛋白质样品;用 SDS 缓冲液悬浮酵母细胞-煮沸-超声-增溶,得到了酿酒酵母胞内蛋白质样品。经过双向电泳分离、硝酸银染色和 PDQuest 图像分析可以检测到了 200 多种酿酒酵母胞外蛋白和 500 多种酿酒酵母胞内蛋白。

关键词: 蛋白质, 双向电泳, 酿酒酵母

Optimization and construction of the intracellular and extracellular proteomic map of FFC2146

WANG Xiang-Yu¹ PIAO Yong-Zhe² ZHAI Ming-Chang¹ WANG Xiao-Dan¹
CHENG He¹ ZHAO Chang-Xin^{1*}

(1. Liaoning Key laboratory of Fermentation Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

(2. College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600, China)

Abstract: The aim of this study was to optimize a proper method to extract intracellular and extracellular protein from *Saccharomyces cerevisiae* to construct the proteomic maps. Methods of protein extraction and cultivation condition were optimized. The cells were cultured in YNB medium for 20 h and cells were separated by centrifugation. The extracellular proteins in supernatants were obtained through ultra filtration-freeze drying. Cell pellets were resuspended in SDS lysis buffer. The cell suspension were boiled for 5 min, after solubilized by sonication and stored until use. The intra- or extracellular protein from *S. cerevisiae* were separated by 2-DE and stained with silver nitrate. The separated protein spots in gels were analyzed by PDQuest. The results showed that over 200 spots of extracellular proteins and about 500 spots of intracellular proteins had been separated by 2-DE.

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重点项目(No. 2007BAK36B01)

* 通讯作者: ✉ zhaochangxin@126.com

收稿日期: 2010-09-02; 接受日期: 2010-11-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Keywords: Protein, Two-dimensional electrophoresis (2-DE), *Saccharomyces cerevisiae*

随着后基因组时代的到来, 蛋白组学研究吸引了国内外诸多学者的兴趣。双向电泳技术作为蛋白质组学发展核心技术, 是由 O'Farrell^[1]和 Klose^[2]于 1975 年同时建立的。近年的研究表明细胞的蛋白质组成是不稳定的, 它们随着环境的变化而变化^[3-4]。目前国内外已有很多学者对酵母胞内蛋白质组学展开了广泛的研究^[5-7], 但针对于酵母胞外蛋白的研究相对较少。酵母胞外蛋白作为细胞与环境之间相互作用的纽带, 一方面表现为酵母对外界环境刺激的反应, 另一方面表现为酵母对环境的适应, 其对酵母的生理研究有着一定的意义。在实际生产过程中酵母胞外蛋白往往进入到产品如啤酒、葡萄酒和黄酒中, 对产品质量产生影响, 如酿酒酵母蛋白酶 A 在啤酒酿造过程中的作用^[8-9], 因此研究酵母胞外蛋白还有一定的实际意义。结合对酵母胞内蛋白质的研究, 可以加深对酵母生理和蛋白质功能的了解, 为进一步提高相关产品质量提供一定的参考。

本文以酿酒酵母 FFC2146 (*Saccharomyces cerevisiae* FFC2146)为研究对象, 通过对培养基、培养条件以及胞外蛋白提取方案的优化选择, 在建立了酿酒酵母胞内蛋白双向电泳图谱的同时建立相应的胞外蛋白双向电泳图谱。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验菌种: *S. cerevisiae* FFC2146, 大连工业大学食品发酵菌种保藏所 (Food fermentation culture collection, Dalian Polytechnic University)。

实验中使用的常规药品均为市售, Carrier ampholytes (两性电解质)购自 Amersham Biosciences, 电泳设备为北京六一厂产品, 发酵罐为瑞典比欧 3.7 L 微型发酵罐。

1.2 FFC2146 胞外蛋白提取时间确定

为了便于后期提取酵母胞外蛋白, 实验选择了 YNB 培养基并做了优化^[10]。将 FFC2146 以 5%接种量接入发酵罐中, 发酵条件为: 转速 250 r/min, 温度 30 °C。检测发酵过程中菌体浓度^[11-12]、残糖^[13]、

溶氧和 pH 以选择适合的考察点。

1.3 单向电泳

单向电泳使用 12%的浓缩胶和 5%的分离胶分离 FFC2146 胞外蛋白, 电泳条件为 30 mA 恒流, 最后用考马斯亮蓝法染色观察。

1.4 双向电泳蛋白质样品的制备

1.4.1 胞外蛋白: 使用 3.7 L 小型发酵罐进行发酵, 条件为 30 °C, 250 r/min, 发酵 20 h 放罐。发酵液经过 8 000 r/min、10 min 离心取上清, 上清液经过 10 kD 的超滤浓缩并除去小分子蛋白、脂类、各种盐类等, 浓缩液经冷冻干燥制成蛋白质干粉, 置于 -80 °C 保存。

将 FFC2146 胞外蛋白干粉稀释成大约 10 g/L, 取 50 µg 胞外蛋白与同体积的电泳上样缓冲液 (7 mol/L 尿素, 4% CHAPS (W/V), 1% DDT (W/V), 2% 两性电解质 pH 3-10 (V/V))充分混合, 上样。

1.4.2 胞内蛋白: (1) 将干重为 5 mg 的酵母细胞用预冷的双蒸水清洗 3 次, 除去细胞表面的培养基; (2) 清洗干净的酵母细胞重悬浮于 200 µL SDS 缓冲液中 [1% SDS (W/V), 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.0], 95 °C 加热 5 min, 然后 600 W 超声 400 s; (3) 超声完毕的样品置于沸水中加热 5 min, 冰箱中 4 °C 冷却, 然后加入蛋白质增溶剂 [7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS (W/V), 1% DDT (W/V), 2% 两性电解质 pH 3-10 (V/V)]于摇床上振荡增溶 1 h; (4) 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清置于 -80 °C 保存^[14-15]。

使用考马斯亮蓝染色法确定上清液中蛋白质浓度。取 75 µg 蛋白质, 加入同体积的电泳上样缓冲液 [7 mol/L 尿素, 4% (W/V) CHAPS, 1% (W/V) DDT 和 2% (V/V)两性电解质, pH 3-10]充分混合, 上样。

1.5 双向电泳

1.5.1 双向电泳胶条制作: 将 0.6 g 尿素、540 µL 双蒸水、200 µL 30%丙烯酰胺溶液、24 µL pH 4-6 载体两性电解质、4.8 µL pH 3-10 载体两性电解质, 缓慢混匀后依次加入 5 µL 10%过硫酸胺和 4 µL TEMED, 轻轻混匀, 快速吸取 90 µL 上述混合液, 从玻璃管 (直径 1 mm, 长 8 cm) 的一端缓慢均匀灌

入, 避免产生气泡, 室温聚合^[16-17]。

1.5.2 双向电泳条件: 采用自制的双向电泳 pH 3-10, 7 cm 线性胶条(内含 pH 4-6 两性电解质以增加 pH 值在 4-6 之间蛋白质的分离效果)分析 FFC2146 胞外和胞内蛋白。电泳条件为: (1) 150 V, 1 h, 1 mA, 5 W; (2) 300 V, 3 h, 1 mA, 5 W; (3) 600 V, 1 h, 1 mA, 5 W; (4) 1 500 V, 6 h, 1 mA, 5 W^[16]。SDS-PAGE 胶的制作方法: 制作堆积胶为 5%, 分离胶为 12% 的均一胶。电泳条件为: 300 V, 50 mA。

1.6 染色及分析

用以戊二醛为增效剂的银染法进行染色^[18], 利用凝胶成像系统获取凝胶图像并使用 PDQuest 完成图像分析。

2 结果

2.1 确定最佳的 FFC2146 胞外蛋白提取时间

为了获取没有胞内蛋白干扰的 FFC2146 胞外蛋白, 选择适当的培养基、培养条件和培养时间十分重要。YNB 培养基中不含有蛋白质, 可以保证培养基中蛋白质的唯一来源是 FFC2146, 所以在本实验的培养基以 YNB 培养基取代传统的麦芽汁培养基。从图 1 可以得知, 在 20 h 的时候 FFC2146 由对数期进入稳定期, 同时葡萄糖也消耗殆尽。此时是 FFC2146 菌体形态和生理状态最稳定的时候, 其胞外蛋白代表了 FFC2146 在正常状态下胞外蛋白存在的情况。

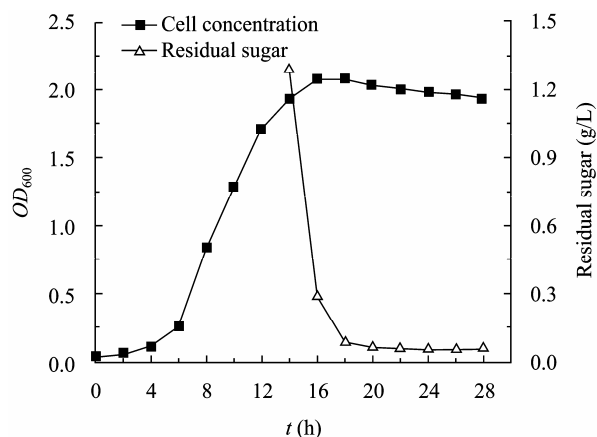


图 1 FFC2146 在发酵过程中残糖和菌体浓度的变化曲线
Fig. 1 The curve of residual glucose and concentration of FFC2146 during fermentation

2.2 单向电泳

单向电泳的结果(图 2)表明, FFC2146 胞外蛋白主要集中在 20.1-66.4 kD 之间, 一共可以分离出 9 条较明显的电泳条带。但是在这些条带之间还有很多模糊的分不清的条带, 这表明单向电泳不能很好的分离胞外蛋白中所有的蛋白。

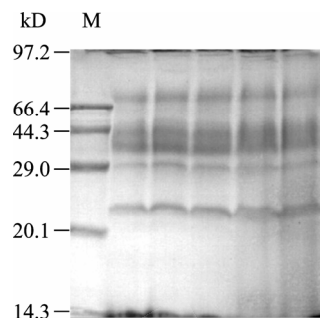


图 2 FFC2146 胞外蛋白单向电泳图谱
Fig. 2 SDS-PAGE of FFC2146 extracellular protein

2.3 胞外蛋白提取方法的比较

在提取胞外蛋白的过程中, 采用了几种蛋白质提取的方案。由于胞外蛋白在培养基中的浓度比较低, 超滤、沉淀等操作都会使蛋白受到损失, 甚至会使得一些蛋白损失殆尽, 同时过多的操作不仅会使蛋白损失增加, 也会使整个蛋白提取时间增长, 大大增加蛋白被修饰的危险。因此, 在尽量减少蛋白质损失和尽量减少杂质的前提下, 我们选择了离心-超滤-冻干提取胞外蛋白的方法。几种方法提取胞外蛋白的结果也表明该方案在去除杂质和减少蛋白损失方面的优越性(蛋白图谱未给出)。

2.4 FFC2146 胞外蛋白和胞内蛋白图谱的建立

按照 Alois Harder 等的提取方法构建 FFC2146 胞内蛋白图谱(图 3), 所得的图谱在第一维等点聚焦方面没有出现 SDS 干扰所造成的横纹, 说明 SDS 已经完全被 CHAPS 所取代。将 SDS 的浓度降低到不影响等电聚焦的水平是这种蛋白质提取方法的难点, 这种方法的优点在于使蛋白酶失去活性, 从而避免蛋白遭到降解, 同时也避免了蛋白酶抑制剂的使用。实验结果表明这种方法建立的双向电泳图谱重复性较好, 分辨率较高, 说明这种方法适合于构建酿酒酵母胞内蛋白图谱。图 4 是 FFC2146 胞外蛋

白图谱, 由于整个胞外蛋白提取时间控制在较短的时间内, 温度也一直维持在 4 °C 以下, 胞外蛋白受到的糖基化等修饰较少, 得到了比较清晰的蛋白质斑点。经过 PDQuest 的分析, 在图 3 中可以检测到约 500 个 FFC2146 的蛋白点, 在图 4 中可以检测出约 200 个蛋白点。

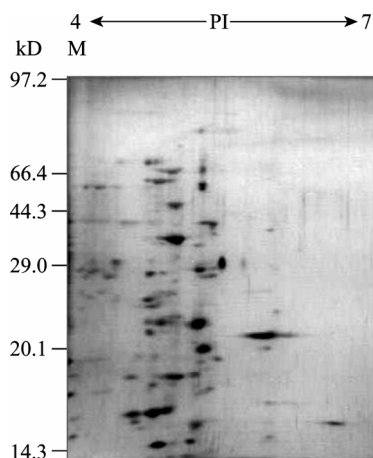


图 3 FFC2146 胞内蛋白图谱

Fig. 3 Intracellular proteomic map of FFC2146

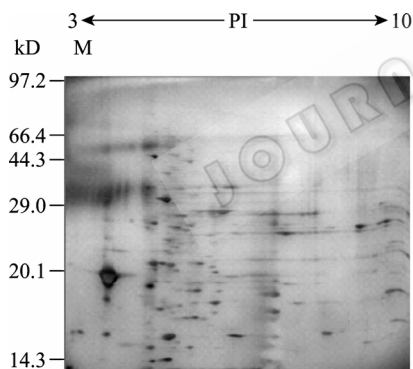


图 4 FFC2146 胞外蛋白图谱

Fig. 4 Extracellular proteomic map of FFC2146

3 讨论

FFC2146 胞内蛋白质主要集中在 pH 4–6 之间, 很少有碱性蛋白出现, 这是因为细胞内环境的稳定性, pH 值波动较小, 所以蛋白质的等电点相对比较集中。在胞外蛋白图谱上, 图谱的背景比较清楚, 这一结果表明, YNB 培养基非常适合酿酒酵母胞外蛋白组的建立, 排除了来自培养基的蛋白质干扰。胞

外蛋白分布的 pH 范围相对胞内蛋白要广的多(pH 3–10), 这是因为细胞外的环境变化较大, 在长期的生物进化过程中细胞胞外蛋白的 pH 稳定性大大增强, 同时胞外蛋白的等电点也趋向于分布在一个更广的 pH 范围内。胞外蛋白种类的丰富大大出乎我们的意料, 并且很多胞外蛋白的等电点与分子量很接近于一些胞内蛋白, 这一结果证明了 Nandakumar 等人在 2006 年提出的胞外蛋白不仅仅包括细胞分泌的蛋白质, 还包括细胞壁的脱落物^[19]。相比单向电泳图谱, 双向电泳分离出来的蛋白质远远地高出了单向图谱, 这表明了双向电泳在蛋白质分离方面的巨大优势。在过去很多的微生物都被认为是不分泌胞外蛋白的, 而现在随着检测手段的不断进步, 特别是双向电泳技术的不断改进, 发现很多微生物都有丰富的胞外蛋白。本文在建立酿酒酵母胞内蛋白图谱的同时建立了酿酒酵母胞外蛋白图谱, 这是国内外第一次针对酿酒酵母胞外蛋白建立的双向电泳图谱, 同时也证明了酿酒酵母胞外存在着多种蛋白。结合对酵母胞内蛋白组的研究, 可以加深对酵母生理和蛋白质功能的了解, 为进一步提高相关产品质量提供一定的参考。

参考文献

- [1] O'Farrell PH. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. J Biol Chem, 1975, 250(10): 4007–4021.
- [2] Kolse J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals[J]. Humangenetik, 1975, 26(3): 231–243.
- [3] Bruckmann A, Hensbergen PJ, Balog CIA, et al. Proteome analysis of aerobically and anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae* cells[J]. Journal of Proteomics, 2009, 71(6): 662–669.
- [4] Cheng JS, Zhou X, Ding MZ, et al. Proteomic insights into adaptive responses of *Saccharomyces cerevisiae* to the repeated vacuum fermentation[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 83(5): 909–923.
- [5] Rogowska-Wizesinska A, Larsen PM, Blomberg A, et al. Comparison of the proteomes of three yeast wild types strains: CEN. PK2, FY1679 and W303[J]. Comparative and Functional Genomics, 2001, 2(4): 207–225.
- [6] Salusjärvi L, Poutanen M, Pitkänen JP, et al. Proteome

- analysis of recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*, 2003, 20(4): 295–314.
- [7] Hu Y, Wang G, Chen GYJ, et al. Proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under metal stress by two-dimensional differential gel electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2003, 24(9): 1458–1470.
- [8] 余俊红, 樊伟, 史媛英, 等. 啤酒中蛋白酶 A 的研究进展[J]. *酿酒*, 2005, 32(5): 53–57.
- [9] 张俊炎, 田亚平, 陆健, 等. 啤酒泡沫稳定性与蛋白酶的关系[J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(9): 51–56.
- [10] Chen YP, Kirk N, Piper PW. Effects of medium composition on MF α 1 promoter-directed secretion of a small protease inhibitor in *Saccharomyces Cerevisiae* batch fermentation[J]. *Biotechnology Letters*, 1993, 15(3): 223–228.
- [11] 苏俊, 冯新忠, 古丽斯玛依·艾拜都拉, 等. 两株耐碱酵母的 pH 耐受实验观察[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(6): 1114–1117.
- [12] 沈萍, 范秀容, 李广武. *微生物学实验*[M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 95–98.
- [13] 黄洁, 宋纪蓉, 史红兵, 等. 苹果发酵液中残余还原糖的测定方法比较[J]. *工业微生物*, 2001, 31(3): 38–40.
- [14] Harder A, Wildgruber R, Nawrocki A, et al. Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(4/5): 826–829.
- [15] Simpson RJ. *Purifying proteins for proteomics*[M]. America: Cold Spring Harbor Laboratory press, 2004: 392–394.
- [16] Görg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(6): 1037–1053.
- [17] 汪家政, 范明. *蛋白质技术手册*[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [18] Shi LB, Berg S, Lee A, et al. The carboxy terminus of EmbC from *Mycobacterium smegmatis* mediates chain length extension of the Arabinan in lipoarabinomannan[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(28): 19512–19526.
- [19] Nandakumar MP, Cheung A, Marten MR. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Escherichia coli* W3110[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(5): 1155–1161.

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。围绕专题所涉及的各个方面, 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。