

## 鞘氨醇单胞菌降解多环芳烃菲过程中菌体全蛋白提取方法的优化及其蛋白的差异表达<sup>①</sup>

雷 欢<sup>②\*</sup> 田 蕴<sup>③\*</sup> 郑天凌<sup>\*\*</sup>

(\* 厦门大学生命科学学院 厦门大学亚热带湿地生态系统研究教育部重点实验室 厦门 361005)

(\*\* 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室 厦门 361005)

**摘 要** 采用平板升华技术从厦门博坦油码头表层海水样品中筛选获得一株高效降解多环芳烃(PAHs)的菌,经 16S rDNA 分子鉴定,该菌株归属鞘氨醇单胞菌属,定名为 *Sphingomonas* sp. strain H。Strain H 在 24h 内对初始浓度为 50mg/L 的多环芳烃菲的降解率可达 94%。以 strain H 为模式菌株,对其在降解过程中菌体全蛋白的提取进行了优化,以获得高质量的降解全程各个阶段具有代表性的菌体蛋白样品。结果表明,超声-三氯乙酸(TCA)/丙酮沉淀的方法可有效去除中间代谢产物的干扰,获得纯度较高的蛋白样品。对以此方法提取的蛋白样品,通过双向电泳技术比较了 strain H 在有和没有菲诱导条件下的蛋白质表达差异,获得 17 个差异蛋白点。这些差异蛋白点的获得将为进一步分析参与 PAHs 降解的关键酶系和探索菲的代谢途径奠定实验基础。

**关键词** 鞘氨醇单胞菌,蛋白质提取,差异表达,双向电泳

## 0 引 言

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一种典型的环境污染物,微生物降解是去除环境中多环芳烃的主要途径。微生物的降解基因和降解酶系的形成是其长期适应污染环境和自身进化的结果。在多环芳烃微生物降解研究领域,如何阐明多环芳烃代谢过程中复杂的降解机理一直困扰着广大学者。利用核酸分子生物学技术获得与多环芳烃微生物降解有关的基因,是目前主要的研究手段<sup>[1-5]</sup>,但随着研究的深入<sup>[2,6-9]</sup>,人们发现仅仅利用核酸分子生物学技术无法完全解释多环芳烃微生物降解过程中出现的复杂现象。此外,由于中间代谢产物的多样性和出现的瞬时性大大增加了研究过程对仪器设备要求以及研究资金和人力资源的消耗,使得人们对于整个降解过程和降解路径探讨的深入变得困难重重。

随着双向电泳技术、计算机图像分析与大规模

数据处理技术以及生物质谱技术的发展与成熟,蛋白质组学得到了广泛的应用。从 2000 年起,已有少数实验室运用以双向凝胶电泳技术为基础的蛋白质组学技术对多环芳烃微生物降解进行研究,但模式菌株主要为分枝杆菌<sup>[10-14]</sup>、产碱假单胞菌<sup>[15]</sup>,其他相关降解菌则报道较少。蛋白质样品制备是蛋白质组学最基础和最为关键的步骤之一,制备样品的质量会直接影响双向电泳结果。由于蛋白质在电荷、疏水性、翻译后修饰和胞内分布等方面的复杂性,目前还没有一个通用的可以提取整个蛋白质组的制备方法。尽管制备方法是多种多样的,但都遵循这样的基本原则,即能重复提取和溶解给定样品中的所有蛋白质成分,并最大程度地避免杂质和造成人为假象。由于多环芳烃在降解过程中中间产物的多样性会对蛋白提取造成一定的干扰,本研究对微生物鞘氨醇单胞菌在多环芳烃菲(phenanthrene)诱导条件下的全蛋白的制备方法进行了优化,为进一步利用差异表达手段获得具有降解活性的酶系和探索菲的生物代谢途径奠定基础。

① 国家自然科学基金(40976069, 40930847)和福建省科技计划重点项目(2008Y0061)资助。

② 女,1981 年生,硕士;研究方向:环境微生物学; E-mail: leihappy@xmu.edu.cn

③ 通讯作者, E-mail: tianyun@xmu.edu.cn

(收稿日期:2008-03-24)

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

本实验所用菌株是鞘氨醇单胞菌株 *Sphingomonas* sp. strain H, 由本研究所从厦门博坦油码头附近海水样品中筛选所得, 是一株高效降解菲的细菌。

### 1.2 主要试剂与培养基

Ampholine pH3-10、pH4-6.5 (Amersham Bioscience); 菲、荧蒹 (Sigma 公司, 纯度  $\geq 99\%$ )。

无机盐培养基 (MSM)<sup>[16]</sup>; 菲-MSM 液体培养基: 50mg/L 溶解于二氯甲烷的菲加到已灭菌的 MSM 中, 待二氯甲烷挥发完全后接菌。

### 1.3 细菌生长、诱导及收获

*Sphingomonas* sp. strain H 在 LB 液体培养基中 30℃, 150rpm, 富集培养 24h, 菌液经 6000rpm 10min 离心收集菌体, 菌体沉淀经 MSM 培养液重悬洗涤, 离心, 反复 3 次, 分别转接至 MSM-Phe (50 mg/L) 及含少量碳源 (Yeast extract 25mg/L, Tryptone 50mg/L) 的 MSM (对照) 中, OD<sub>600</sub> 为 0.2, 30℃, 150rpm 培养。设 3 个平行, 3 个空白, 6 个批次, 并利用高效液相色谱 (HPLC) 检测菲的残余量。

HPLC 检测步骤: 以荧蒹为内标, 用一定量的二氯甲烷萃取上述样品。有机相经 0.45 $\mu$ m 滤器过滤, Agilent 液相色谱测定菲的残留量, 柱子为 Agilent Hypersil 4.0  $\times$  250 $\mu$ m ODS, 流动相甲醇: 水 = 90: 10, 流速 1.0 mL/min, 254nm 紫外检测。

### 1.4 菌体全蛋白的提取与纯化

收集的菌体用 PBS 缓冲液 (pH 7.6) 重悬洗涤, 离心, 反复 3 次, -20℃ 保存。

#### 1.4.1 酶解-丙酮沉淀法

菌体用适量的 PBS 缓冲液 (pH 7.6) 重悬, 再加 PMSF (终浓度 0.1mM, 下同), 10% NP-40 (0.05%), DTT (1mM), 溶菌酶 (10mg/mL), 于 37℃ 水浴 1h, 再 4℃、12000  $\times$  g 离心 20min, 取上清, 加 2 倍体积丙酮, 置于 -20℃ 沉淀过夜, 4℃、12000  $\times$  g 离心 20min, 弃上清, 沉淀冷冻干燥。

#### 1.4.2 反复冻融-超声-丙酮沉淀法

菌体用适量 Tris-HCl (pH 6.8) 重悬, 于 -20℃, 放置 40min, 使之凝结; 再置于常温, 放置 20min, 使之融化; 反复 3 次, 超声破碎 (超声 5s, 间隔 10s, 40 ~ 80 W)。丙酮沉淀同上。

#### 1.4.3 超声法

菌体用适量裂解液重悬, 冰上超声破碎, 条件同上。

#### 1.4.4 超声-三氯乙酸 (trichloroacetic acid, TCA)/丙酮 (v/v, 1/4) 沉淀法

超声同上。TCA/丙酮, 于 -20℃, 放置 45min; 4℃、12000  $\times$  g 离心 20min, 弃上清; 90% 丙酮, 20mM DTT, 重悬沉淀, 于 -20℃, 放置 1h, 4℃、12000  $\times$  g 离心 20min, 弃上清, 重复 2 次; 100% 丙酮, 20mM DTT, 重悬沉淀, 于 -20℃, 放置 1h, 4℃、12000  $\times$  g 离心 20min, 弃上清, 重复 2 次; 沉淀冷冻干燥。

将沉淀摊开晾干成粉末, -20℃ 短期保存。干粉 1:50 (W/V) 加入样品裂解液, 混匀, 4℃ 使蛋白质充分溶解, 于 4℃、12000  $\times$  g 离心 20min, 去除不溶的沉淀杂质。

得到的蛋白质样品溶液可直接用于双向电泳或分装后贮存于 -80℃ 备用。

### 1.5 蛋白定量及电泳上样量

采用 Bradford<sup>[17]</sup>、Bradford 改良法 (此法适用于裂解后蛋白定量)。

改良法大致步骤: 将已知蛋白 BSA (0, 10 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 30 $\mu$ L, 40 $\mu$ L, 50 $\mu$ L), 10 $\mu$ L 0.1 mol/L HCl, 10 $\mu$ L 裂解液, 40 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 和 3.5mL Bradford 工作液混匀, 静置 5min, 测 OD<sub>595</sub> 值, 作蛋白质标准曲线。

取约含 60 $\mu$ g 的蛋白质用于二维凝胶电泳。

### 1.6 蛋白电泳方法

#### 1.6.1 载体两性电解质 pH 梯度等电聚焦电泳技术

15cm 等电聚焦 (isoelectric focus, IEF) 凝胶配方 (每 2 根胶, Urea 0.715 g, ddH<sub>2</sub>O 304 $\mu$ L, 10% NP-40 260 $\mu$ L, 30% Acr-Bis 175 $\mu$ L, Ampholine pH3-10/ pH4-6.5 65 $\mu$ L, 10% AP 2.6 $\mu$ L, TEMED 1.3 $\mu$ L), 依次加入 10 $\mu$ L 裂解液和 10 $\mu$ L 覆盖液 (1/2 裂解液 + 溴酚兰), 预电泳 (200V  $\times$  15min, 300V  $\times$  30min, 400V  $\times$  45min)。

预电泳结束后, 上蛋白质样品, 聚焦电泳 (200V  $\times$  2h, 500V  $\times$  30min, 600V  $\times$  30min, 700V  $\times$  30min, 800V  $\times$  12h, 1000V  $\times$  2h, 1200V  $\times$  2h, 16000V  $\times$  2h)。

等电聚焦分离后, 胶条迅速转移到凝胶平衡液 (SDS 2%, 2-ME 5%, 甘油 10%, Tris-HCl pH 6.8 0.06 M) 中, 平衡 20min。

进行第二向 SDS-PAGE 电泳。浓缩胶浓度为 4%, pH 6.8, 每块胶 16mA; 分离胶浓度为 12%, pH 8.8, 每块胶 24mA。

电泳结束后银染法染色 (下同)。

#### 1.6.2 固相 pH 梯度 (immobilized pH gradients, IPG) 等电聚焦电泳技术

采用 Amersham Biosciences 的双向电泳 (two-dimensional electrophoresis, 2-DE) 系统, 第一向为固相

pH 梯度等电聚焦, 13 cm pH4-7 的梯度胶在重泡胀液中 (8 mol/L 尿素; 4% CHAPS 溶于 0.002% BPB) 过夜; 加样量为 250 $\mu$ L, 然后在 IPGphor (Amersham-Pharmacia) 上进行第一维实验, 等电聚焦分离按下述程序: 350V 12h, 500V 1h, 10000V 1h, 80000V 直至终点 40kV/h。

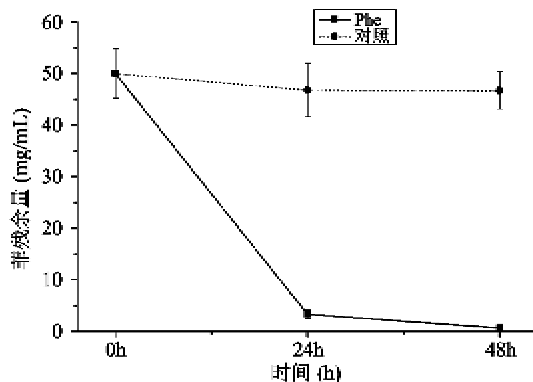
等电聚焦分离后, 胶条用 SDS 平衡缓冲液 (0.05 mol/L Tris/HCl, pH 8.8; 6mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 0.0002% BPB) 处理 2 次, 每次 15min。第 1 次含有 DTT (终浓度: DTT 100 mg/10 mL SDS 平衡缓冲液), 第 2 次不含 DTT (终浓度: 碘乙酰胺 250 mg/10 mL SDS 平衡缓冲液)。

将平衡后的 IPG 胶条移至 12.5% 凝胶的上方。每块胶 12.5mA 先电泳 1h, 再 20mA 电泳, 直至溴酚蓝前沿抵玻璃板下缘为止。

## 2 结果与讨论

### 2.1 降解菌株 H 对菲的降解

本研究所获得的降解菌 strain H 归于鞘氨醇单胞菌属, 样品来自有明显污染特征的厦门博坦油码头。Strain H 在 24 h 内可降解 50 mg/L 菲总量的 94%, 48 h 内降解率为 98% (图 1), 与其他菲降解细菌<sup>[18,19]</sup>相比, 如 *Bacillus subtilis* sp. strain II<sup>[19]</sup> 在培养 10d 后大约降解 50mg/L 菲总量的 90%, strain H 具有较高的降解能力。同时培养液颜色也从最初的无色, 经黄色变为棕色, 底物的颜色变化也证明了菲被分解代谢。可以看出, 在前 24 h 菲降解速率很快, 故在 strain H 经菲诱导 24 h 后收集菌体, 以提取细菌全蛋白, 对照样品同样在 24 h 后收集菌体来提取蛋白。

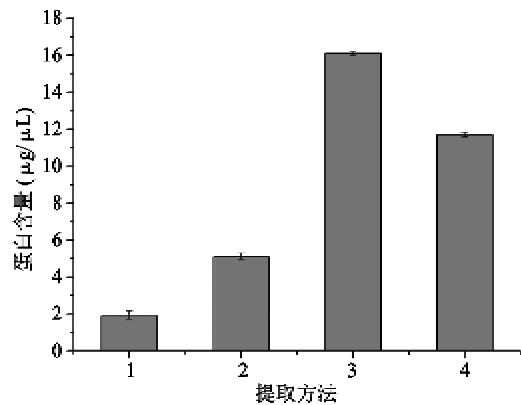


其中 Phe 代表降解菌以菲唯一碳源, 对照为不加菌的空白

图 1 *Sphingomonas* sp. strain H 对菲的降解

### 2.2 降解过程中菌体蛋白提取方法的优化

提取结果表明, 酶解-丙酮沉淀法所制备的蛋白沉淀较多, 丙酮完全挥发后, 蛋白沉淀成团状, 为乳黄色, 加裂解液溶解快, 但蛋白含量仅为 1.92  $\mu$ g/ $\mu$ L; 比较之下, 其他方法制备的蛋白沉淀较酶解法制备的少, 丙酮完全挥发后蛋白沉淀成干粉末状, 颜色略带黄色, 加裂解液溶解慢, 但蛋白含量较高, 分别为 5.11  $\mu$ g/ $\mu$ L (反复冻融-超声-丙酮沉淀法) 和 11.7  $\mu$ g/ $\mu$ L (超声-TCA/丙酮沉淀法); 超声法制备的蛋白溶液为棕黄色, 含量为 16.1  $\mu$ g/ $\mu$ L (图 2)。



1. 酶解-丙酮沉淀法; 2. 反复冻融-超声-丙酮沉淀法;  
3. 超声法; 4. 超声-TCA/丙酮沉淀法

图 2 不同蛋白提取方法下菌体全蛋白的获得量

将 strain H 在无诱导条件及菲诱导条件下的蛋白质抽提物在 pH3-10 的范围内进行二维电泳, 结果见图 3、图 4。结果表明, 菌体全蛋白主要分布在 pH4-7 范围内, 与 *Mycobacterium* sp. Strain 6PY1<sup>[14]</sup> 的蛋白分布范围大致相同。

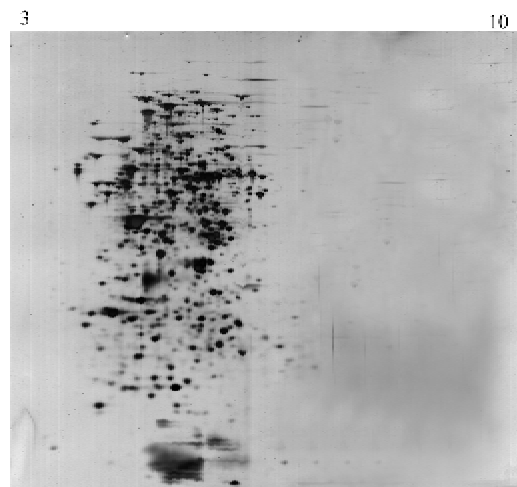


图 3 Strain H 在无菲诱导条件下的 2-DE 图谱

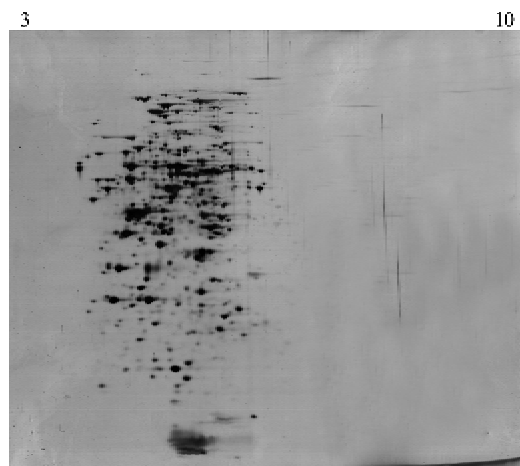
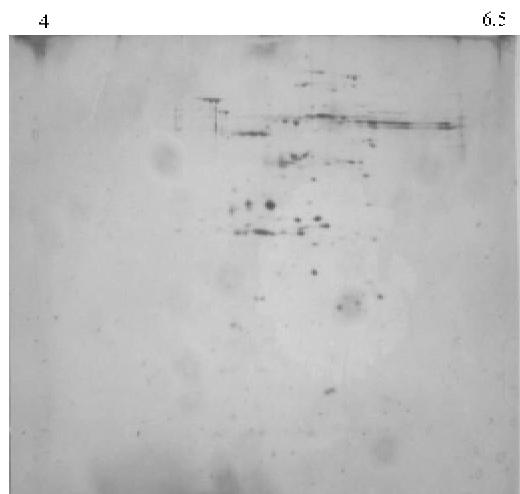


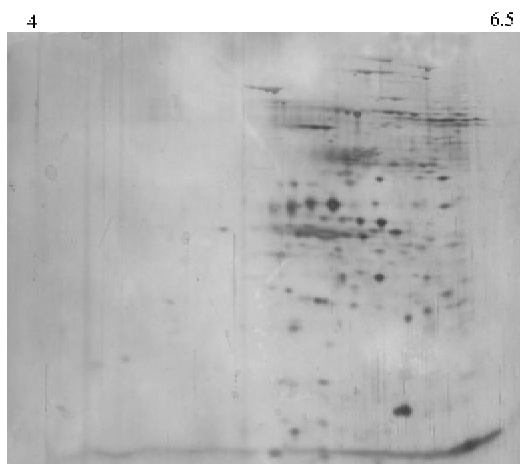
图4 Strain H在非诱导条件下的2-DE图谱

对 Strain H 在非诱导条件下用不同制备方法制备的蛋白质抽提物在 pH4-6.5 的范围中进行二维电泳(图 5至图 8)。结果可见:酶解-丙酮沉淀法制备的



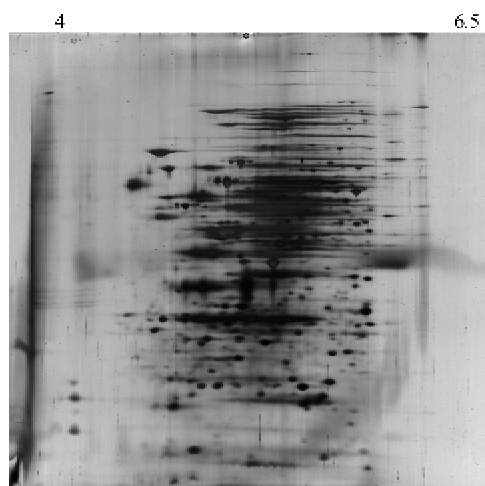
酶解-丙酮沉淀法

图5 Strain H在非诱导条件下的2-DE图谱



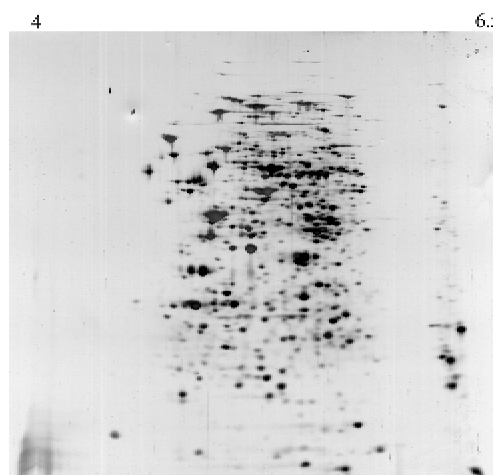
反复冻融-超声-丙酮沉淀法

图6 Strain H在非诱导条件下的2-DE图谱



超声法

图7 Strain H在非诱导条件下的2-DE图谱



超声-TCA/丙酮沉淀法

图8 Strain H在非诱导条件下的2-DE图谱

蛋白较少、损失较大;反复冻融-超声-丙酮沉淀法虽然制备的蛋白量有所增加,但仍有损失,蛋白点重叠,分布不开;相比之下,超声法不仅简便易行,蛋白损失也较小。比较图 7 和图 8 发现,经 TCA-丙酮混合液纯化超声制备的样品,盐离子对双向电泳结果的影响被明显排除,蛋白点横纹明显减少,且蛋白点分布均匀,说明利用超声-TCA/丙酮沉淀法用来制备鞘氨醇单胞菌的全蛋白的方法是可行的。

### 2.3 非诱导下 *Sphingomonas* sp. strain H 的蛋白表达

对超声-TCA/丙酮沉淀法制备的 strain H 在有菲和无菲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(图 9,图 10),结果可见,在非诱导的条件下, *Sphingomonas* sp. strain H 有 15 个蛋白质点(图 10,箭头和方框所示),在对照组结果上

未见显示,另有 2 个蛋白点(图 10,圆圈所示)与对照组相比表达量明显较大。此外,从表达量上看有 8 个蛋白点可能是主要蛋白,这些差异蛋白主要分布在 pH 5.5-6.5,分子量在 14.3-97.2 kDa,与 *Mycobacterium* sp. strain 6PY1<sup>[14]</sup>在苾诱导下主要差异表达蛋白的分布相似,串联质谱(MS/MS)分析显示,这些差异蛋白大多数可能为苾降解过程中产生的双加氧酶。这表明 strain H 在非诱导下产生的 17 个差异蛋白与苾降解相关,这也为下一步利用质谱技术鉴定这些蛋白奠定实验基础。同时,此结果也可以进一步说明超声-TCA/丙酮沉淀法制备该菌全蛋白的方法是可行的。

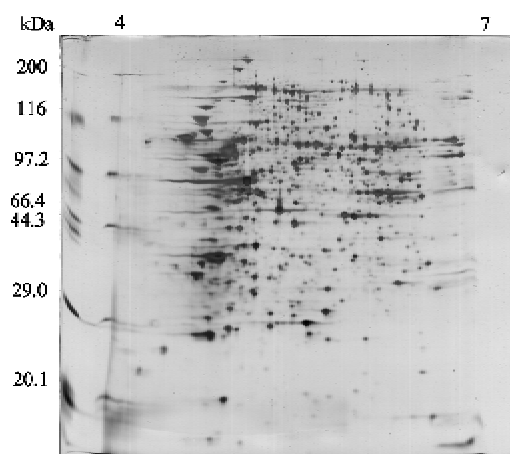


图 9 Strain H 在非诱导条件下的 2D-E 图谱

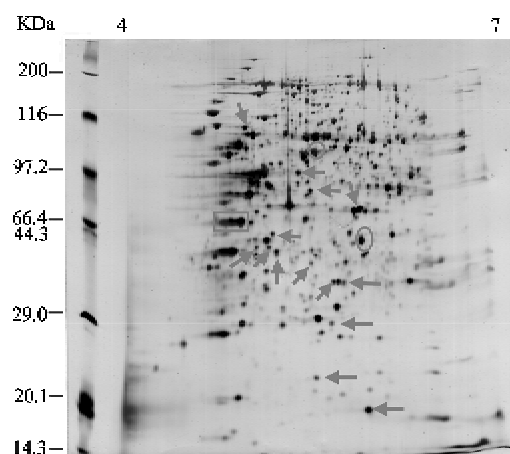


图 10 Strain H 在苾诱导条件下的 2D-E 图谱

### 3 结 论

本研究通过对降解过程中菌体蛋白的提取方法的比较表明,超声-TCA/丙酮沉淀的方法可得到浓

度较高的 *Sphingomonas* sp. strain H 全蛋白样品。双向电泳的结果也进一步说明该制备方法可有效去除中间代谢产物的干扰,获得纯度较高样品。

通过双向电泳技术可以观察到,在有苾诱导和非苾诱导下的 strain H 有明显的蛋白表达差异产生,其中 15 个蛋白为苾诱导产生,2 个蛋白的表达量在非诱导下有明显增加。这可为下一步利用质谱分析差异表达蛋白,获得具有降解活性的酶类奠定基础。

### 参考文献

- [1] D. Geiselbrecht A, Hedlund B P, Tichi M A, et al. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the Gulf of Mexico and comparison of their PAH degradation ability with that of Puget sound *Cycloclasticus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(12): 4703-4710
- [2] Kulakov I A, Delcroix V A, Larkin M J, et al. Cloning of new *Rhodococcus* extradiol dioxygenase genes and study of their distribution in different *Rhodococcus* strains. *Microbiology*, 1998, 144: 955-963
- [3] Strachan P D, Freer A A, Fewson C A. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning and sequencing of its *catA* gene. *Biochemical Journal*, 1998, 333: 741-747
- [4] Ishii S, Hisamatsu Y, Inazu K, et al. Mutagenic nitrated benzo[a]pyrene derivatives in the reaction product of benzo[a]pyrene in NO<sub>2</sub> ± air in the presence of O<sub>3</sub> or under photoirradiation. *Chemosphere*, 2000, 41: 1809-1819
- [5] Cho O, Choi K Y, Zylstra G J, et al. Catabolic role of a three-component salicylate oxygenase from *Sphingomonas yanofskyae* B1 in polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 327(3): 656-662
- [6] Mesarch M B, Nakatsu C H, Nies L. Development of catechol 2,3-dioxygenase-specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(2): 678-683
- [7] Kim E, Aversano P J, Romine M F, et al. Homology between genes for aromatic hydrocarbon degradation in surface and deep-subsurface *Sphingomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(4): 1467-1470
- [8] Laurie A D, Lloyd-Jones G. Quantification of phnAc and nahAc in contaminated New Zealand soils by competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 1814-1817
- [9] Baldwin B R, Nakatsu C H, Nies L. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time

- PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (6):3350-3358
- [10] Wang R F, Wennerstrom D, Cao W W, et al. Cloning, expression, and characterization of the *katG* gene, encoding catalase-peroxidase, from the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Mycobacterium* sp. strain PYR21. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (10): 4300-4304
- [11] 郑乐,刘宛,李培军. 多环芳烃微生物降解基因的研究进展. 生态学杂志,2007,26 (3):449-454
- [12] 曹晓星,田蕴,郑天凌等. PAHs 降解基因及降解酶研究进展. 生态学杂志,2007, 26 (6):917-924
- [13] Khan A A, Wang R F, Cao W W, et al. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (8): 3577-3585
- [14] Krivobok S, Kuony S, Meyer C, et al. Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: Evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (13): 3828-3841
- [15] 赵渝,郭鲁申,徐亚同. 芳香烃龙胆酸降解途径蛋白质组学的研究. 微生物学通报, 2005,32 (4):95-100
- [16] Walter U, Beyer M, Klein J, et al. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Applied. Microbiology. Biotechnology*, 1991, 34:671-676
- [17] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学技术出版社, 2002
- [18] 徐虹,章军,邵宗泽等. PAHs 降解菌的分离、鉴定及降解能力测定. 海洋环境科学, 2004, 23(3): 61-64
- [19] 李丽,钟鸣,姜树坤等. 枯草芽孢杆菌对多环芳烃的降解能力研究. 河南农业科学, 2007, 4: 62-71

## Optimization of the methods for extraction of phenanthrene-induced proteins in *Sphingomonas* sp. strain H and detection of the difference in protein expression

Lei Huan<sup>\*</sup>, Tian Yun<sup>\*</sup>, Zheng Tianling<sup>\*\*</sup>

(<sup>\*</sup> School of Life Sciences, Key Laboratory for Subtropical Wetland Ecosystem Research (Xiamen University), Ministry of Education, Xiamen 361005)

(<sup>\*\*</sup> State Key Laboratory for Marine Environmental Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005)

### Abstract

*Sphingomonas* sp. strain H, a microbe for degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), was isolated from the surface water of the Botan oil port in Xiamen, China. It can degradate 94% of the phenanthrene, a PAH with the initial concentration of 50mg/L in 24 hours. The methods for extraction of the total proteins of *Sphingomonas* sp. strain H produced in the degradation process was optimized. Two-dimensional (2D) gel electrophoresis of phenanthrene-induced proteins from culturing cells of *Sphingomonas* sp. strain H showed that the proteins were increasing in cells after exposed to phenanthrene. Comparison of proteins profiles from phenanthrene-induced and -uninduced cultures on 2D gels indicated that at least fifteen major proteins were expressed and two were enhanced at least. These results provide the evidence that phenanthrene induces the synthesis of specific proteins in *Sphingomonas* sp. strain H. The present work yielded the important information that would be useful in analyzing PAHs degradation pathways and improving environmental clean-up strategies.

**Key words:** *Sphingomonas* sp., extraction of total proteins, different protein expression, two-dimensional (2D) electrophoresis