

双向电泳技术在副干酪乳杆菌盐胁迫 应激反应研究中的应用

乌日娜, 岳喜庆, 武俊瑞*

(沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 对耐盐副干酪乳杆菌在盐胁迫下的应激反应进行研究, 比较其在含有 6 g/dL NaCl 和未含有 NaCl 的培养基中生长至对数生长中期的蛋白质组双向电泳图谱差异。结果表明: 有 20 个蛋白质点表达发生明显变化, 经过基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱鉴定, 其中热休克蛋白 GroEL 和 DnaK 在盐胁迫下表达上调, 参与脂肪酸合成的 3-氧酰基-(酰载体蛋白)合酶 Fab G 表达下调, 可能与该菌应对盐胁迫密切相关。

关键词: 蛋白质组; 盐胁迫; 乳杆菌; 双向电泳

中图分类号: Q 33 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2015)02—0140—05

Proteomic Analysis of Protein Induction in *Lactobacillus paracasei* by Salt Stress Using Two-Dimensional Electrophoresis

WU Rina, YUE Xiqing, WU Junrui *

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: *Lactobacillus paracasei* LN-1 with salt tolerance property was isolated from traditional fermented food, suancai, which was made in the northeast of China. In order to understand the mechanism involved, proteomics analysis was undertaken to reveal the response of the strain during growth in medium with or without NaCl using two-dimensional electrophoresis (2-DE). Out of 20 protein spots that showed differential changes in expression, seven spots were identified by matrix assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS). Further analysis showed that chaperone protein (GroEL and DnaK) and fatty acid biosynthesis enzyme (Fab G) possibly play important role in *Lactobacillus paracasei* LN-1 to resist to salt stress.

Keywords: proteomics, salt stress, *Lactobacillus paracasei*, 2-DE

收稿日期: 2013-12-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000805); 辽宁省高等学校优秀人才计划项目(LJQ 2011071); 沈阳农业大学“天柱山英才支持计划”项目。

作者简介: 乌日娜(1979—), 女, 蒙古族, 内蒙古呼和浩特人, 农学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品生物技术方面的研究。

E-mail: wrn6956@163.com

* 通信作者: 武俊瑞(1977—), 男, 内蒙古呼和浩特人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品科学方面的研究。

E-mail: junruiwu@126.com

乳杆菌是一类革兰氏染色呈阳性、不形成芽孢、不运动、过氧化氢酶试验呈阴性、对葡萄糖发酵能产生 50%以上乳酸的杆菌,而且在缺少氧气的环境中生长良好^[1-2]。乳杆菌属是乳酸菌中种类和数量最多的一个属^[3]。国内外大量研究已经证实,许多乳杆菌对人体具有多种益生功能,同时在食品发酵中表现出优良的特性,被广泛应用于各类发酵乳制品、蔬菜、肉制品及调味品的工业生产中^[4]。然而在某些发酵食品生产过程中,为了提高产品品质和风味或满足特殊工艺要求,加入适量的盐是必不可少的工序。能够承受盐胁迫的乳杆菌在此生产过程中才能保持活性,得到很好的生长繁殖,进而发挥其益生作用。

蛋白质组(Proteome)是由 Marc Wilkins 于 1994 年首次提出,指由一个基因组所表达的全套蛋白质。其本质上指的是,在大规模水平上研究蛋白质的特征,包括蛋白质的表达水平、翻译后的修饰、蛋白质与蛋白质相互作用等,由此获得蛋白质水平上的关于疾病发生、细胞代谢等过程的整体而全面的认识^[5]。蛋白质组学技术为乳杆菌应对环境胁迫应激反应和调节机制的认识提供了新的途径。Marceau 等(2004)在研究清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)时发现 21 个蛋白质由 4 g/dL 的 NaCl 诱导表达变化,其中有 2 个蛋白质参与糖类代谢,4 个蛋白质属于应激蛋白^[6]。

作者从蛋白质组学角度,以分离自东北传统发酵食品酸菜中的耐盐副干酪乳杆菌 *Lactobacillus paracasei* LN-1 为研究对象,通过在含有 6%NaCl 浓度和未含有 NaCl 的培养基中生长至对数生长中期的蛋白质组双向电泳图谱差异的分析,为揭示其中可能与盐胁迫应激相关的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菌种:*L. paracasei* LN-1 分离自东北自然发酵酸菜样品中,由沈阳农业大学食品学院益生菌营养与健康实验室提供;丙烯酸胺、Tris、SDS、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、硝酸银、三氯乙酸:上海鼎国公司;尿素、硫脲、DTT、CHAPS、碘乙酰胺、TEMED、考马斯亮蓝、预制干胶条 IPG(7cm,pI 3-10NL):美国 Bio-Rad 公司。

1.2 仪器与设备

等电聚焦仪、电泳系统、图像分析系统:美国

Bio-Rad 公司;TGL-168 低温离心机:德国 Eppendorf 公司;高压灭菌锅:上海申安医疗器械厂;SHP-250 型恒温培养箱、DHC-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱:上海精宏实验设备有限公司;超净台:苏州安泰空气技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种培养及生长曲线的测定 将冷冻干燥保藏的 *L. paracasei* LN-1 接种于 pH 6.4 的 MRS 培养液,37℃活化 12 h 后,以体积分数 2%接种于新鲜的 MRS 培养液中,活化三代后,将其接种于含有 0.4.0%、6.0%体积分数的 MRS-M 培养基(含有 MES 和 MOPS 缓冲液,可维持 pH 6.4)中,37℃培养,每隔 2 小时测定 $A_{600\text{nm}}$ 吸光度,绘制生长曲线。

1.3.2 蛋白质样品的提取与制备 收集适量在含有和未含有 6.0 g/dL NaCl 的 pH 6.4 的 MRS-M 培养基中生长至对数生长期的菌体,利用超声波辅助破碎法提取菌体蛋白质,然后采用 TCA/丙酮对样品进行纯化^[7],并利用 Bradford 法测定蛋白质含量。裂解液的组成包括 8 mol/L 尿素,体积分数 0.2% pI 3-10NL 的 IPG 缓冲液,4 g/dL CHAPS,65 mmol/L DTT,1 mmol/L PMSF。

1.3.3 双向凝胶电泳 将菌体蛋白质样品 50 μg 加入溶胀液中,使总体积为 150 μL 。充分混匀后,将其加入到持胶槽中,并将 IPG 干胶条胶面向下放于样品之上进行溶胀。胶条溶胀后,进行第一向等电聚焦。等电聚焦参数为:无电压 6 h,50 V 恒电压电泳 6 h;250、500、1 000、4 000 V 线性梯度电压电泳 1 h,再以 4 000 V 电压电泳 40 000 V·h。聚焦结束后,平衡 15 min。然后,将胶条转移至 12 g/dL 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶(10.1 cm×7.3 cm×1 mm),进行电泳,约 5~6 h 后,停止电泳,取下凝胶采用银染法进行染色。

1.3.4 图像扫描与分析 利用 Image 5.0 图像分析软件对凝胶图像进行分析。选取同一条件下的两块平行胶构建一个参考胶,然后通过参考胶蛋白质质量的匹配和比较进行不同条件下蛋白质表达的分析,对能匹配上的点进行位置和量重复性分析,对不能匹配上的点进行差异表达量分析。

1.3.5 蛋白质质谱鉴定 从胶上选取差异蛋白点,切下后,经胰蛋白酶消化,并利用 MALDI-TOF/MS 质谱对肽段样品进行鉴定^[8]。质谱参数设置为默认值,加速电压 19 kV, m/z 范围为 600~4 000,误差范

围为 10 mg/kg。通过软件 MASCOT software 1.9 (Matrix Science), 以 NCBI 数据库中革兰氏阳性菌已知数据为基础进行蛋白质序列数据库检索鉴定。

2 结果与分析

2.1 *L. paracasei* LN-1 生长曲线的绘制

L. paracasei LN-1 分离自东北自然发酵酸菜样品, 经过生理生化试验和分子生物学试验, 鉴定属于 *L. paracasei*。*L. paracasei* LN-1 在 0、4.0 g/dL NaCl 中生长良好。在 6.0 g/dL NaCl 中, 菌体受到一定的抑制, 生长速度放缓, 其生长曲线见图 1。

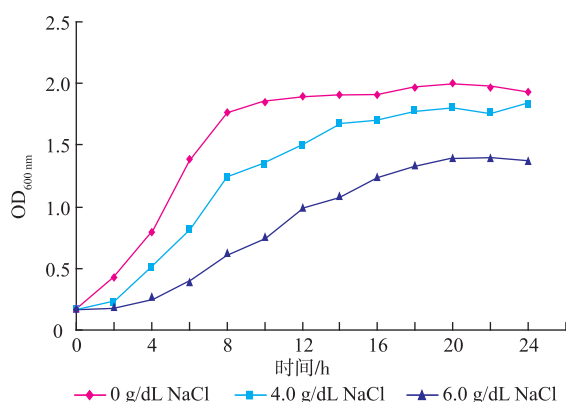
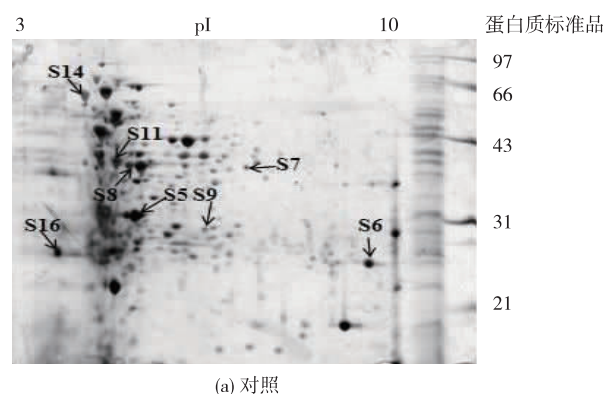


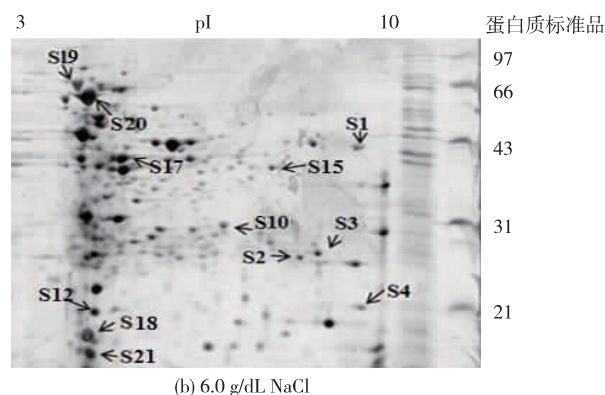
图 1 *L. paracasei* LN-1 在不同盐质量浓度下的生长
Fig. 1 Growth of *L. paracasei* LN-1 in MRS-M broth with different concentration of NaCl

2.2 双向电泳图像分析

利用双向电泳技术, 试验构建了 *L. paracasei* LN-1 蛋白质组 2-DE 图谱。染色后, 从胶图上可以很明显的看到, 该菌蛋白质主要分布在相对分子质量 10~90 000, 结果见图 2。通过 Image 5.0 图像分析, 结果表明, 两块平行胶的匹配率均在 90% 以上, 可检测到的斑点分别为 203±8 (对照) 和 216±5 (6.0 g/dL NaCl)。



(a) 对照



(b) 6.0 g/dL NaCl

图 2 在 0、6.0 g/dL NaCl 的 MRS-M 培养基中对数生长期的 *L. paracasei* LN-1 的差异双向电泳表达图谱

Fig. 2 2-DE maps of *L. paracasei* LN-1 at mid-log phase grown in MRS medium with 0 g/dL and 6.0 g/dL NaCl

2.3 双向电泳差异表达谱比较

经 Image 5.0 图像分析软件比较分析显示, *L. paracasei* LN-1 对数生长期与稳定期蛋白质组 2-DE 表达谱中有 20 个蛋白质点表达发生明显变化 (2.0 倍以上), *L. paracasei* LN-1 在对数生长期和稳定期表达差异蛋白质见表 1。在 20 个差异表达蛋白质点中, 11 个差异表达蛋白质点在 6 g/dL NaCl 条件下表达上调, 7 个差异表达蛋白质点在 6 g/dL NaCl 条件下表达下调, 蛋白质点 S12 仅在对照胶图上出现, 而蛋白质点 S9 仅在 6 g/dL NaCl 胶图上出现。经过质谱技术鉴定, 有 7 个差异表达蛋白质点鉴定出匹配结果。其中, 上调蛋白质点 S1 鉴定为表面抗原 (Surface antigen), 蛋白质点 S2 为二核苷酸链接酶 (Predicted dinucleotide-binding enzyme), 蛋白质点 S4 鉴定为 50S 核糖体蛋白 L5 (50S ribosomal protein L5), 蛋白质点 S17 为塔格糖 1,6-二磷酸醛缩酶 (Tagatose 1,6-diphosphate aldolase), 蛋白质点 S20 为热激蛋白 60 (GroEL), 蛋白质点 S19 为热激蛋白 70 (DnaK), 下调蛋白质点 S6 鉴定为 3-氧酰基-酰载体蛋白酶 (3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase)。

很多微生物在受到环境胁迫下都通过启动分子伴侣系统修复蛋白质合成解折叠错误合成的蛋白质。其中分子伴侣 DnaK 和 GroEL 是最为常见的, 也可称为热激蛋白质^[9]。例如, 在乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 和屎肠球菌 *Enterococcus faecalis* 受到盐胁迫下, DnaK 和 GroEL 的表达量均上调^[10-11]。

结果还显示,*L.paracasei* LN-1 中参与脂肪酸合成的 3-氧酰基-酰载体蛋白酶 (3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase, FabG) 表达量在受到盐胁迫后下调。前人的研究也发现,细胞膜脂质和脂肪酸组成会受到渗透压胁迫的影响^[12]。在枯草芽孢杆

菌 *Bacillus subtilis* 的耐盐研究中,参与脂肪酸合成的蛋白质的相应基因,包括 FabG,其表达都有下调现象^[13]。这种改变也可提高干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 的耐盐能力^[14-15]。

表 1 *L. paracasei* LN-1 在 0、6.0 g/dL NaCl 的培养基中生长至对数生长期的差异表达蛋白质

Table 1 Identification of differently expressed proteins of *L. paracasei* LN-1 grown in MRS-M medium with 0 g/dL and 6.0 g/dL NaCl at lag phase

蛋白质点		蛋白质名称	理论相对分子质量	理论等电点	功能分类
S1	上调	表面抗原 Surface antigen	41 140	8.93	一般功能
S2		二核苷酸链接酶 Predicted dinucleotide-binding enzyme	21 601	6.58	一般功能
S4		50S 核糖体蛋白 L5	20 156	7.88	核糖体蛋白
		50S ribosomal protein L5			
S17		塔格糖醛缩酶 Tagatose 1,6-diphosphate aldolase	36 401	5.25	糖代谢
S20		热激蛋白 60 GroEL	57 393	4.89	应激蛋白
S19		热激蛋白 70 DnaK	67 523	4.77	应激蛋白
S3, S10, S15, S18, S21		Unidentified			
S6	下调	3-氧酰基-酰载体蛋白酶 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase	25 279	6.85	脂肪酸合成
S5,S7,S11, S8, S14, S16		Unidentified			
S9	仅在 0 g/dL NaCl 表达	Unidentified			
S12	仅在 6.0 g/dL NaCl 表达	Unidentified			

此外,核糖体蛋白 L5 亚基 (50S ribosomal protein L5) 和塔格糖 1,6-二磷酸醛缩酶(Tagatose 1,6-diphosphate aldolase)在盐胁迫下表达上调。翻译调节和核糖体组装是细菌细胞内重要的生理过程,与细菌的生长和细菌周期进展密切相关。其表达上调有可能说明盐胁迫促进了某种蛋白质的合成速率的增加。而塔格糖 1,6-二磷酸醛缩酶参与糖酵解过程。糖酵解是微生物获得能量的主要来源。在枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 的盐胁迫研究中,核糖体蛋白质和糖酵解酶类均被发现与其耐盐性相关^[13]。

3 结 语

研究建立了 *L. paracasei* LN-1 在不同盐质量浓度条件下生长至对数生长期中期的菌体蛋白质组双向凝胶电泳表达图谱。经过图谱分析,可检测到近 200 个蛋白质点,而且有 20 个蛋白质点的表达发生了明显的变化,下一步的研究工作将以其他未鉴定出来的蛋白质点为重点,同时已鉴定出的差异表达蛋白质点进行进一步的功能验证。

参考文献:

- [1] 杨洁彬,郭兴华,张箴,等. 乳酸菌——生物学基础及应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999.
- [2] 张刚. 乳酸细菌—基础、技术和应用[M]. 北京:化学工业出版社,2007.
- [3] Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1209-1124.
- [4] 郭本恒. 益生菌[M]. 北京:化学工业出版社,2004.

- [5] 贺福初. 蛋白质组学研究—后基因组时代的生力军[J]. 科学通报, 1999, 44(2): 113–122.
HE Fuchu. Proteomics—post genomic[J]. **Science**, 1999, 44(2): 113–122. (in Chinese)
- [6] Marceau A, Zagorec M, Chaillou S, et al. Evidence for involvement of at least six proteins in adaptation of *Lactobacillus sakei* to cold temperatures and addition of NaCl[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004, 70: 7260–7268.
- [7] 乌日娜, 张和平, 孟和, 等. 干酪乳杆菌蛋白质双向电泳条件优化及图谱建立[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 598–602.
WU Rina, ZHANG Heping, MENG He, et al. The construction and optimization of two-dimensional electrophoresis of *Lactobacillus casei*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(5): 598–602. (in Chinese)
- [8] 乌日娜, 岳喜庆, 张和平. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 在酸胁迫下的蛋白质组学研究[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(7): 17–20.
WU Rina, YUE Xiqing, ZHANG Heping. The proteomics of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* Zhang to acid stress[J]. **Journal of Food and Fermented Industry**, 2012, 38(7): 17–20. (in Chinese)
- [9] Zink R, Walker C, Schmidt G, et al. Impact of multiple stress factors on the survival of dairy *lactobacilli* [J]. **Sci Aliments**, 2000, 20: 119–126.
- [10] Flahaut S, Hartke A, Giard J C, et al. Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 1996, 138: 49–54.
- [11] Kistrup M, Jacobsen S, Hammer K, et al. Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1997, 63: 1826–1837.
- [12] Lopez C S, Heras H, Ruzal S M, et al. Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium[J]. **Curr Microbiol**, 1998, 36: 55–61.
- [13] Hahne H, Mader U, Otto A, et al. A Comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation[J]. **J. Bacteriol**, 2010, 192: 870–882.
- [14] Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal S M. Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*[J]. **J Appl Microbiol**, 2005, 98: 84–95.
- [15] Machado M C, Lopez C S, Heras H, et al. Osmotic response in *Lactobacillus casei* ATCC 393: biochemical and biophysical characteristics of membrane[J]. **Arch Biochem Biophys**, 2004, 422: 61–70.

科技信息

澳大利亚: 有机食品不能含转基因成分

据报道, 西澳州农业及食品厅向有机行业标准及认证委员会 (Organic Industry Standards and Certification Council) 提交了一份申请, 试图让含有 0.9% 转基因物质的食品也归为“有机食品”。但该委员会拒绝了这一申请。这意味着澳大利亚标有“有机食品”标签的食物仍将不含任何转基因物质。

委员会发言人 16 日称, 委员会认为这不符合有机食品的标准, 转基因食品是不允许列入有机食品。西澳政府提及美国和欧洲允许少许转基因物质的存在。实际的情况是, 欧洲和美国关于有机食品的行业标准是不许这样做的。

发言人称, 反对转基因食品组织还针对西澳政府的申请准备了一份有 3 千个签名的请愿书。

有机行业标准及认证委员会正在审理一份来自于澳大利亚有机认证组织 (Australian Certified Organic) 的申请, 由此来开发一个审理意外转基因污染有机食品的程序。

[信息来源] 食品伙伴网. 澳大利亚: 有机食品不能含转基因成分 [EB/OL]. (2014-12-19). <http://news.foodmate.net/2014/12/288969.html>