

Bacillus mucilaginosus 荚膜多糖脱除与全蛋白双向电泳体系的建立

闫玉洁, 李会*, 王向栋, 马洋, 史劲松, 许正宏

(江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了建立胶质芽孢杆菌全蛋白的双向电泳技术体系, 分别比较了荚膜多糖去除方法, 不同菌体蛋白提取方法, 不同类型 IPG 胶条以及不同等电聚焦程序对双向电泳图谱的影响。结果表明, 预先使用低浓度的盐酸多次处理能够完全去除荚膜多糖, 然后采用 TCA-丙酮与酚抽提结合法提取胶质芽孢杆菌全蛋白的效果最佳。采用 17 cm pH 4~7 的线性 IPG 胶条, 在程序 II 下获得了背景清晰, 分辨率较高, 且无明显横纵条纹的胶质芽孢杆菌全蛋白双向电泳图谱。采用以上条件, 所得图谱约分离得到 700 个蛋白质点, 该双向电泳图谱的构建为胶质芽孢杆菌双向电泳研究奠定了基础。

关键词: 微生物多糖; 胶质芽孢杆菌; 全蛋白质; 双向电泳

中图分类号: Q 93 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)04-0350-05

Dissolution of Expolysaccharide and Two-Dimensional Electrophoresis Construction of *Bacillus mucilaginosus*

YAN Yujie, LI Hui*, WANG Xiangdong, MA Yang, SHI Jinsong, XU Zhenghong

(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to establish two-dimensional electrophoresis (2-DE) technology system of total proteins of *Bacillus mucilaginosus*, 2-DE maps obtained from different microbial expolysaccharide dissolution methods, protein extraction methods, pH ranges of IPG strips and isoelectric focusing (IEF) programs were compared. The results showed that hydrochloric acid solution could dissolve expolysaccharide effectively, and phenol extraction protocol combined with TCA/acetone was more beneficial to total protein extraction from *Bacillus mucilaginosus*. The 2-DE maps without obvious vertical and horizontal stripes, with low background, high resolution and good reproducibility were obtained using the following optimized parameters: 17 cm IPG strip with pH 4~7, program II (100 V 30 min, 1000 V 3 h, 8000 V 5 h, 8000 V 60000 Vh, 500 V 20 h). Analyzed by the PDQuest software, about 700 protein spots were isolated from the 2-DE protein map. The construction of 2-DE technology system will make a major contribution to the further study of *B. mucilaginosus*.

收稿日期: 2016-01-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31300026)。

* 通信作者: 李会(1983—), 女, 河北唐山人, 工学博士, 副教授, 主要从事微生物代谢研究。E-mail: lihui@jiangnan.edu.cn

引用本文: 闫玉洁, 李会, 王向栋, 等. *Bacillus mucilaginosus* 荚膜多糖脱除与全蛋白双向电泳体系的建立 [J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(04): 350-354.

Keywords: microbial expolysaccharide, *B. mucilaginosus*, total proteins, two-dimensional electrophoresis

微生物多糖是某些微生物生长代谢过程中,在特殊的营养条件下,合成的对细胞具有保护作用的生物聚合物^[1-2]。

胶质芽孢杆菌于20世纪初分离得到,它可分解云母、长石等硅酸盐矿石而释放出磷、钾元素,且在生长过程中能够产生丰富的胞外多糖。

目前,对于多糖 BMPS 过量合成的研究工作仅限于常规的发酵条件优化^[3-4],导致其生产效率偏低、生产成本偏高,限制了该多糖的大规模工业应用。随着蛋白质组学技术的迅猛发展,作者希望通过蛋白组学的方式,分析不同条件下的差异蛋白,找出影响多糖合成的关键酶,并对其在分子水平和蛋白质水平上进行代谢调控,引导物质代谢流量朝着目标产物多糖的合成方向偏移,从而实现多糖的过量合成。然而由于蛋白质组自身的复杂性和不稳定性,至今尚未得到通用、简便、高效的技术支持^[5],目前双向电泳技术结合质谱鉴定技术是差异蛋白质组学最常用的方法之一。作者研究了荚膜多糖的脱除,对菌体总蛋白质的提取方法进行改进,并优化双向电泳的条件,建立一套高分辨率、高灵敏度的双向电泳技术体系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与培养条件 菌株:胶质芽孢杆菌 SM-01,江南大学药学院制药工程实验室分离并保藏。

培养条件:从固体培养基上刮取适量菌体接入到50 mL的种子培养基中,置于30℃、200 r/min的往复摇床中培养24 h;再将种子液按照体积分数4%接种量接入到发酵培养基中,置于30℃、200 r/min的往复摇床中发酵培养24 h。

1.1.2 试剂 IPG 线性预制干胶条、两性电解质等:购自美国 Bio-Rad 公司;尿素、硫脲、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAA)、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵、溴酚蓝、低熔点琼脂糖、十二烷基磺酸钠(SDS)、pH7.5 Tris 饱和酚、考马斯亮蓝 G-250、蛋白测定试剂盒等:购自上海生工集团;蔗糖、甲醇、丙酮、冰醋酸、三氯乙

酸(TCA)等:均为国产分析纯产品。

1.1.3 主要仪器 Ettan IPG-phor 3 型等电聚焦电泳仪、Ettan DALTsix 垂直电泳系统、Image MasterLabScan 凝胶电泳图像分析系统;GE 公司产品;CR22GH 型高速冷冻离心机:日本日立公司产品;PDQuest 8.0.1 分析软件;美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 多糖去除与菌体收集

1)超纯水洗涤法 取100 mL发酵液,在4℃、12 000 r/min 条件下离心10 min,弃去上清。用50 mL超纯水悬浮洗涤菌体,在4℃、12 000 r/min 条件下离心10 min,重复3次得菌体沉淀。

2)高浓度盐酸单次处理法 取100 mL发酵液,加入等体积的体积分数50%盐酸,搅拌1 h,在4℃、12 000 r/min 条件下离心10 min,弃去上清。超纯水悬浮洗涤菌体3次得菌体沉淀。

3)低浓度盐酸多次处理法 取100 mL发酵液,加入等体积的体积分数30%盐酸,搅拌1 h,在4℃、12 000 r/min 条件下离心10 min,弃去上清。沉淀中加入50 mL体积分数10%盐酸,搅拌30 min,离心,重复一次,超纯水悬浮洗涤菌体3次得菌体沉淀。

1.2.2 蛋白质提取

1)TCA-丙酮法 将收集到的菌体置于陶瓷研钵中,加入液氮研磨成粉,将粉末转移到50 mL离心管中。加入TCA-丙酮溶液30 mL,-20℃放置过夜,用于沉淀蛋白质。在4℃、14 000 r/min 条件下离心30 min。用预冷的丙酮溶液(含1 g/L的DTT)悬浮洗涤沉淀,-20℃静置1 h,在4℃、14 000 r/min 条件下离心30 min,重复2次,得蛋白质沉淀。

2)酚抽提法 根据 Rocco^[6]的方法并加以改进,将收集到的菌体用液氮在研钵中研磨成粉,加入5 mL酚提取缓冲液(0.5 mol/L Tris-HCl pH 7.5,0.7 mol/L蔗糖,0.1 mol/L KCl,0.05 mol/L EDTA),4℃放置10 min。加入等体积pH 7.5的Tris饱和酚,涡旋震荡混匀。在4℃、14 000 r/min 条件下离心30 min,收集上层酚相,加入与酚相体积相同的提取缓冲液,重复上述提取步骤2次。沉淀分别用预冷的甲醇和丙

酮悬浮洗涤 2 次,得蛋白质沉淀。

3)TCA-丙酮与酚抽提结合法 将收集到的菌体用液氮在研钵中研磨成粉,加入 30 mL TCA-丙酮溶液沉淀蛋白质,-20 ℃放置过夜,在 4 ℃、14 000 r/min 条件下离心 30 min,加入 5 mL 酚提取缓冲液,4 ℃放置 10 min。加入等体积 pH 7.5 Tris 饱和酚,涡旋震荡混匀。在 4 ℃、14 000 r/min 条件下离心 30 min,收集上层酚相,加入与酚相体积相同的提取缓冲液,将上述步骤重复 2 次。沉淀用预冷的甲醇悬浮洗涤 2 次,沉淀中加入 30 mL TCA-丙酮溶液,-20 ℃放置过夜,在 4 ℃、14 000 r/min 条件下离心 30 min。用预冷的丙酮溶液(含 1 mg/mL 的 DTT)悬浮洗涤沉淀,-20 ℃静置 1 h,在 4 ℃、14 000 r/min 条件下离心 30 min,重复 2 次,得蛋白质沉淀。

蛋白质沉淀中加入 500 μ L 蛋白裂解液。至沉淀完全溶解后,并于在 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 30 min,用 Bradford 方法定量蛋白质^[7]。

1.2.3 双向电泳

1) 第一向等电聚焦 移取 300 μ g 全蛋白于 1.5 mL EP 管中,加入上样缓冲液至总体积为 300 μ L,充分混匀后,缓慢均匀加入聚焦槽。将胶条胶面朝下覆盖于样品上,赶出气泡,加入 2~3 mL 的矿物油封闭聚焦槽,20 ℃进行等电聚焦(IEF)。

2) 胶条平衡 聚焦完成后,取出胶条,胶面朝上放入平衡盘内,分别用平衡液 I (6 mol/L 尿素,75 mmol pH 8.8 Tris-HCl,体积分数 20%甘油,体积分数 4% SDS,质量分数 2% DTT)和平衡液 II (6 mol/L 尿素,75 mmol pH 8.8 Tris-HCl,体积分数 20%甘油,体积分数 4% SDS,质量分数 2% 碘乙酰胺)平衡 10 min。

3) 第二向 SDS-PAGE 分离 将胶条从平衡槽中取出,快速浸入 TGS Buffer(Tris 3 g,SDS 1 g,甘氨酸 14.4 g,ddH₂O 定容至 1 L)中,去除表面气泡。在封有质量分数 12% SDS-PAGE 的玻璃胶板中加入融化好的覆盖琼脂糖,将胶条压入其中,待覆盖琼脂糖凝固,将玻璃胶板放入装有 TGS Buffer 的电泳槽。

4) 染色 将凝胶从玻璃板中剥离,加入约 500 mL 超纯水清洗 1 min。加入适量的染色液(2.5 g/L 考马斯亮蓝 G-250,体积分数 10% 冰醋酸,40% 甲醇)置于摇床上染色约 4 h,更换脱色液(体积分数 10% 冰醋酸,40% 甲醇),脱色至点清晰,背景不明显。

5) 图像采集与分析 采用 Image MasterLabScan 凝胶电泳图像分析系统对双向凝胶电泳图谱进行扫描,并用 PDQuest 8.0.1 分析软件进行图像分析处理。

2 结果与分析

2.1 不同多糖预处理方法对菌体蛋白提取的影响

由于 *B. mucilaginosus* SM-01 能够合成大量的荚膜多糖,菌体被该多糖紧紧包裹,难以去除,对后续菌体蛋白的提取带来极大不便。使用超纯水洗涤多次仍无法有效洗去菌体外荚膜多糖,且处理后蛋白浓度过低,无法达到实验要求,见图 1(b)与表 1。由于该多糖易溶于酸性溶液中,故采用不同浓度的盐酸单次或多次处理菌体。图 1(c)和图 1(d)显示,两种酸法处理后荚膜多糖能够有效去除,且细胞完整,不影响后续实验。表 1 显示,低浓度盐酸多次处理法所得的蛋白浓度更高,且考虑到高浓度盐酸可能对细胞产生一定的伤害,故后续实验采用低浓度盐酸多次处理法。

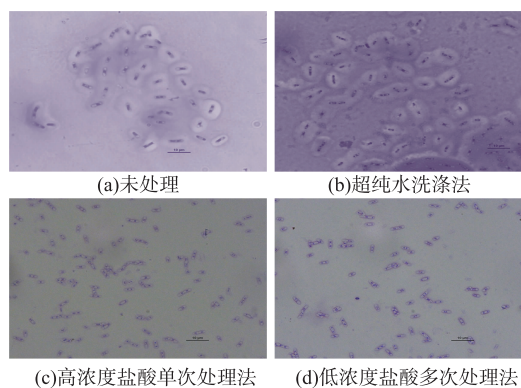


图 1 不同多糖去除方法对细胞的影响

Fig. 1 Comparison of cells with different BMPS dissolution methods

表 1 不同多糖去除方法得到的蛋白质质量浓度

Table 1 Comparison protein concentration with different BMPS dissolution methods

处理方法	蛋白质质量浓度/(g/L)
超纯水洗涤法	0.37
高浓度盐酸单次处理法	6.72
低浓度盐酸多次处理法	7.44

2.2 不同菌体总蛋白提取方法对双向电泳图谱的影响

蛋白质提取方法是双向电泳成败的关键^[8],使用上述方法处理菌体后,仍有部分多糖存在,多糖难以去除且可溶于蛋白裂解液中,使蛋白质提取面临许多困难。TCA 丙酮法是目前微生物全蛋白提取常用的方法^[9-10],而酚抽提法则主要应用于植物组织蛋白的提取,有研究表明酚抽提法同样适用于细菌,甚至效果优于 TCA 丙酮法。作者比较了 TCA 丙酮法、酚抽提法和 TCA 丙酮与酚抽提结合法 3 种蛋

白质提取方法对双向电泳图谱的影响,图 2(a)和图 2(b)表明,单独采用 TCA 丙酮法和酚抽提法时得到的图谱不清晰,且蛋白点聚集成团,基本无法分离,分析原因为荚膜多糖没有完全除去。图 2(c)中,用 TCA 丙酮与酚抽提结合法得到的蛋白图谱,蛋白点基本得以分离,图谱较清晰。以上结果表明,TCA 丙酮与酚抽结合法能够较好的除去多糖等杂质,提取得到的蛋白质纯度较高。因此,后续实验采用 TCA 丙酮与酚抽结合法作为 *B. mucilaginosus* SM-01 菌体蛋白质的提取方法。

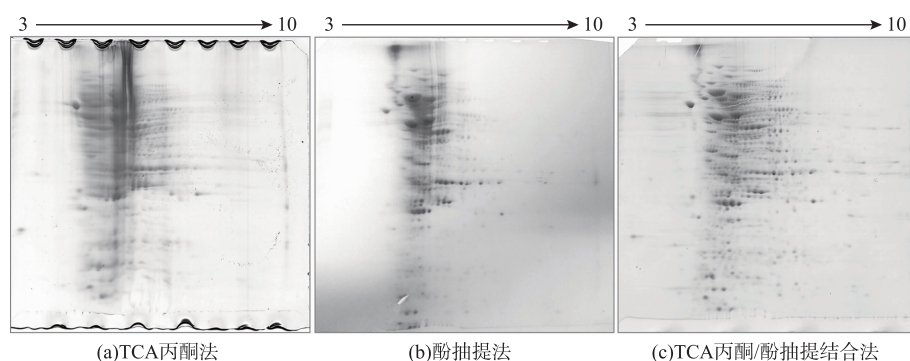


图 2 不同蛋白质提取方法的双向电泳图谱

Fig. 2 Comparison of 2-DE maps with different protein extraction methods

2.3 不同 pH 范围胶条对双向电泳图谱的影响

每个蛋白质都有各自不同的等电点(pI),这决定了蛋白图谱中蛋白点的横向分布。因此选择合适 pH 范围的 IPG 胶条对双向电泳图谱具有重要影响,较宽 pH 范围的 IPG 胶条能包含所有的蛋白质,但蛋白点可能聚集,难以有效分离;较窄 pH 范围 IPG 胶条有利于提高图谱的分辨率,但可能丢失 pH 值范围之外的蛋白质。作者首先采用 17 cm、pH 3~10 的线性 IPG 预制干胶条,得到的结果如图 3(a)所示,蛋白点较集中,主要分布在 pH 4~7 附近,胶条没有得到有效的利用,而且蛋白点出现了堆积现象,分离效果不理想,进一步用 PDQuest 8.0.1 软件分析检测到 447 个蛋白点。基于上述实验结果,改用 pH 范围为 4~7 的线性 IPG 预制干胶条,得到的结果如图 3(b)所示。此时蛋白点的分离效果较图 3(a)显著提高,很好的解决了蛋白点重叠的问题,用 PDQuest 8.0.1 软件可检测得到 616 个蛋白点。因此,作者选择采用 pH 4~7 的 IPG 预制干胶条进行双向电泳的第一向等电聚焦电泳。

2.4 不同等电聚焦程序对双向电泳图谱的影响

等电聚焦是双向电泳中至关重要的一步,聚焦

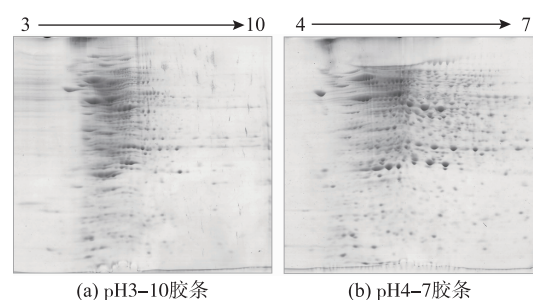


图 3 不同 pH 范围胶条的双向电泳图谱

时间不足容易造成高相对分子质量部分蛋白聚焦不完全以及点不圆等现象,聚焦时间过长则容易导致蛋白在其等电点位置时不稳定而产生横条纹。作者设置了 3 个不同的等电聚焦程序:程序 I(100 V 30 min,1 000 V 3 h,6 000 V 5 h,6 000 V 50 000 Vh,500 V 20 h)、程序 II(100 V 30 min,1 000 V 3 h,8 000 V 5 h,8 000 V 60 000 Vh,500 V 20 h)和程序 III(100 V 30 min,1 000 V 3 h,10 000 V 5 h,10 000 V 70 000 Vh,500 V 20 h)。3 个程序的区别为最高电压和聚焦功率不同,结果如图 4 所示。程序 I 条件下的蛋白图谱可分离的蛋白点极少,高相

对分子质量部分出现较多横条纹;程序Ⅲ得到的结果见图 4(c),程序 I 相比得到改善,但高相对分子质量部分的横条纹依然较明显,考虑可能的原因分别是聚焦不完全和聚焦过度。程序 II 对应的图谱蛋

白点更加清晰,横条纹的问题大大的得到了改善,用 PDQuest 8.0.1 分析检测可得 737 个蛋白点。因此,本实验选用程序 II 进行双向电泳的第一向等电聚焦电泳。

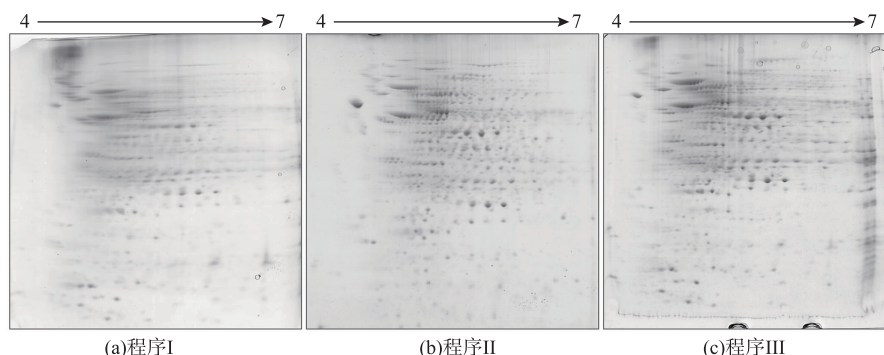


图 4 不同等电聚焦程序的双向电泳图谱

Fig. 4 Comparison of 2-DE maps with different IEF programs

3 结 语

建立了适用于 *B. mucilaginosus* SM-01 的全蛋白提取和双向电泳方法。确定采用低浓度盐酸多次处理法去除菌体外荚膜多糖,然后用 TCA 丙酮/酚抽提结合法提取全蛋白,所得到的蛋白质纯度较

高。采用 17 cm pH 4~7 的线性 IPG 预制干胶条,在 8 000 V 60 000 Vh 的最高聚焦程序下进行第一向等电聚焦。在此条件下,图谱蛋白质点多达 737 个,图谱分离效果好,蛋白点清晰且背景较低,适用于 *B. mucilaginosus* SM-01 的蛋白质组学研究。

参考文献:

- [1] SEVIOUR R J, MCNEIL B, FAZENDA M L, et al. Operating bioreactors for microbial exopolysaccharide production[J]. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2011, 31: 170-185.
- [2] YOON S, HONG E, KIM S, et al. Optimization of culture medium for enhanced production of exopolysaccharide from *Aureobasidium pullulans*[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2012, 35: 167-172.
- [3] LI Donghua, YANG Bo. Application of response surface methodology to optimize the spore production of *B. mucilaginosus* GM1 [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 33(22): 206-209. (in Chinese)
- [4] LIU Wuxing, XU Xushi. Study on fermentation of *Bacillus mucilaginosus* [J]. **Journal of Nanchang University (Natural Science)**, 2002, 26(3): 299-302. (in Chinese)
- [5] WRIGHTON K H. Technology: proteomics gets more selective [J]. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2013, 14(3): 131-131.
- [6] ROCCO M, D'AMBROSIO C, ARENA S, et al. Proteomic analysis of tomato fruits from two ecotypes during ripening [J]. **Proteomics**, 2006, 6(13): 3781-3791.
- [7] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72: 248-254.
- [8] WISNIEWSKI J R, ZOUGMAN A, NAGARAJ N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. **Nature Methods**, 2009, 6(5): 359.
- [9] SHENG L, ZHU G, TONG Q. Comparative proteomic analysis of *Aureobasidium pullulans* in the presence of high and low levels of nitrogen source[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2014, 62(43): 10529-10534.
- [10] ZHAO Shaohui, ZHOU Jingwen, DU Guocheng, et al. A preliminary study on differential proteomics of *Corynebacterium crenatum* in two oxygen supply models[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(3): 235-240. (in Chinese)