

文章编号:1673-1689(2009)05-0598-05

干酪乳杆菌蛋白质双向电泳条件优化及图谱建立

乌日娜^{1,3}, 张和平^{*1}, 孟和², 包秋华¹, 陈霞¹, 武俊瑞³

(1. 内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特, 010018; 2. 上海交通大学 农业与生物技术学院, 上海 200240; 3. 沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 采用超声波法和液氮研磨法提取了干酪乳杆菌菌体蛋白质, 通过固相 pH 梯度等电聚焦双向电泳对蛋白质进行分离, 并分别利用硝酸银和考马斯亮蓝方法进行染色。对上述不同方法比较结果显示, 超声-三氯乙酸/丙酮提取蛋白质方法简便易行, 适用于快速制备蛋白质样品, 液氮研磨-三氯乙酸/丙酮沉淀法更适合干酪乳杆菌大规模蛋白质提取及组学检测, 并且在制备的过程中不发生明显的蛋白质降解的现象。利用液氮研磨-三氯乙酸/丙酮沉淀法制备的干酪乳杆菌蛋白质样品分离效果良好, 可获得重复性好和高分辨率的双向电泳图谱, 便于后续的质谱及差异蛋白质组的分析, 值得同行及相关研究者参考和借鉴。

关键词: 干酪乳杆菌; 双向电泳; 蛋白质组

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

Construction and Optimization Condition of Proteomic Map of *Lactobacillus casei*

WU Ri-na^{1,3}, ZHANG He-ping^{*1}, MENG He², BAO Qiu-hua¹, CHEN Xia¹, WU Jun-rui³

(1. Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Bioengineering, Education of Ministry Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. School of Agricultural and Biological, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 3. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Th target of this manuscript is to achieve an efficient method to extract large-scale protein, by comparing of the proteins extracted by liquid nitrogen grinding, freeze-thaw method and sonication from *Lactobacillus casei* Zhang though the two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). The maps were stained with silver nitrate or coomassie brilliant blue methods to separate protein spots. The results showed that about 600 spots in liquid nitrogen grinding-TCA / acetone precipitation method which is effective for large-scale protein extraction. The sonication method is simple to be applied to preparation of protein samples rapidly. Furthermore, the possible reasons were provided to analyze the fault images in 2-DE.

Key words: *Lactobacillus casei*, 2-DE, proteome

收稿日期: 2008-12-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30560097); 国家 863 计划项目 (2006AA10Z345 和 2007AA10Z353); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-06-0269)。

作者简介: 乌日娜(1979-), 女, 蒙古族, 内蒙古呼和浩特人, 工学博士, 主要从事乳制品生物技术研究。

Email: wrn6956@163.com

* 通信作者: 张和平(1965-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 教授, 主要从事乳品科学研究。

Email: hepingdd@vip.sina.com

干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)是一种兼性异型发酵乳酸菌,存在于自然界的湖泊、土壤、食品、动物饲料,以及人和各种动物的消化道及其它器官内等。作为益生菌的主要来源之一,干酪乳杆菌已广泛应用于乳制品、药品及微生物制剂等商品化生产,如 *Lactobacillus casei* Shirota、*Lactobacillus casei* *defensis* 等^[1-2]。益生菌是指当摄入充足的数量后,能对宿主产生一种或多种有论证的功能性健康益处的活的微生物,它们能够改善肠道微生物平衡,刺激免疫系统,治疗和减缓用抗生素治疗带来的副作用等^[3]。益生菌筛选标准非常严格,包括在胃肠转运过程中对胃、肠消化液的耐受性,对胆汁的耐受性等;在工业生产过程中,益生菌还要经历一系列的环境胁迫,如极端温度、pH 值、渗透压,氧化作用和营养缺乏等^[4]。研究这些环境胁迫诱导的基因调节作用,最合适的途径就是通过双向电泳技术分离和展现益生菌细胞蛋白,获得与益生性状相关或影响到细胞的生理状况的蛋白质或基因的组成、结构和功能。而乳酸菌基因组测序工作的开展,为乳酸菌蛋白质组(proteome)提供了有力支持^[5]。

干酪乳杆菌为革兰氏阳性菌,具有较坚硬的细胞壁,且细胞富含多糖、核酸及多种次级代谢物等可干扰双向电泳,因此选择合适的蛋白制备方法,提高蛋白质产量和溶解度是获得具有高质量蛋白质双向电泳图谱的前提条件。为了获得高质量菌体蛋白质,建立干酪乳杆菌高分辨率、高灵敏度和高重复性蛋白质双向电泳图谱,实验比较了超声波—三氯乙酸/丙酮沉淀法和液氮研磨—三氯乙酸/丙酮沉淀提取 *Lactobacillus casei* 菌体蛋白方法,调整和优化了蛋白质组双向电泳体系,为深入研究干酪乳杆菌在酸胁迫、胆盐胁迫等环境压胁迫的比较蛋白质组学提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验菌种采用内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室从传统酸马奶中筛选鉴定的干酪乳杆菌 *L. casei* Zhang。

实验中使用到的 IPG 胶条和 2-DE 电泳设备均为 Amersham Biosciences 的产品。2-DE 电泳所用试剂为 Bio-Rad 公司产品及 Sigma 公司产品。

1.2 菌种培养及蛋白质样品制备

将冷冻干燥保存的菌种 *L. casei* Zhang,接种于 pH6.4 的改良 MRS 培养液培养,37 ℃ 活化两代,3

000 g 离心 10 min 收集菌体,并用质量分数 0.85% 灭菌生理盐水洗涤,然后以体积分数 1% 接菌于新鲜的 MRS 培养液中,当菌体细胞生长到对数中后期($OD_{600nm}=0.7$),离心收集菌体制备蛋白质。

分别采用超声提取法和液氮研磨法制备 *L. casei* Zhang 的细胞蛋白质,然后利用 Bradford 法测定蛋白质的浓度^[6]。

超声提取—三氯乙酸/丙酮沉淀法:收集 5 mL 菌体于 1.5 mL 离心管中,加入 300 μ L 的缓冲液。超声提取蛋白质(工作 2 s,停 4 s,功率 26%),直至液体澄清。15 000 g 离心 30 min (4 ℃),弃沉淀。以 0.1 mL 分装上清液,加入预冷的体积分数 10% 三氯乙酸丙酮溶液,-20 ℃ 沉淀过夜。于 35 000 g 离心 30 min (4 ℃)收集沉淀,并用丙酮清洗两次。真空干燥仪进行干燥 5 min 得到蛋白质干粉,于-80 ℃ 保存。

液氮研磨—三氯乙酸/丙酮沉淀法:将大量收集的菌体,用质量分数 0.85% NaCl 离心洗涤两次,3 000 g 离心 10 min (4 ℃),弃尽液体。利用研钵对菌体进行液氮研磨破碎菌体。将研好的菌体碎末分装于 1.5 mL 离心管中,迅速加入体积分数 10% 三氯乙酸丙酮溶液,丙酮清洗步骤同上。

取适量超声制备的蛋白质干粉与液氮研磨制备的蛋白质干粉,分别加入 300 μ L 的裂解液,裂解液组成为:7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、质量分数 4% 3-(3-胆胺丙基)二甲氨基-1-丙磺酸(CHAPS)、65 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)、1% pH 3~10 两性电解质、1 mmol/L EDTA 及 1 mmol/L PMSF。进行超声助溶(工作 2 s,停 4 s,功率 25%),然后 22 000 g 离心 30 min (4 ℃),取上清,加入核酸酶 DNase I(1 U/50 μ L)和 RNase A(25 μ g/ μ L),4 ℃ 进行消化,得到最终的干酪乳杆菌的可溶性蛋白样品和全蛋白质样品用于双向电泳。

利用不同方法制备 *L. casei* Zhang 蛋白样品,构建双向电泳图谱进行比较。

1.3 双向电泳

采用 pH 3~10 非线性(7 cm)和 pH 4~7 的 IPG 胶条(7 cm)进行菌株 *L. casei* Zhang 蛋白质的双向凝胶电泳分离,比较蛋白质分离结果。胶条泡涨后,蛋白质上样量分别为 50 μ g/g (7 cm、银染)和 100 μ g/g (7 cm、考马斯亮兰染色^[7])。7 cm IPG 胶条等电聚焦的参数为:表面温度 18 ℃,50 V 恒定电压电泳 6 h,500、1 000、4 000 V 线性梯度电压电泳各 1 h,再以 4 000 V 恒定电压电泳至总伏小时数达到 42 000。18 cm IPG 胶条 *L. casei* Zhang 的蛋

白上样量为 100 $\mu\text{g/g}$ (18 cm、银染), 等电聚焦的参数增加 8 000 V 线性梯度电压电泳 1 h, 且以 8 000 V 恒定电压电泳至总伏小时数达到 65 000 VH。取出胶条进行两步平衡后, 将 IPG 胶条转移至 12% 的 SDS-PAGE 胶上方, 进行第二向电泳, 当溴酚蓝前沿移至凝胶底线结束。分离的蛋白质采用银染法显色^[8]。

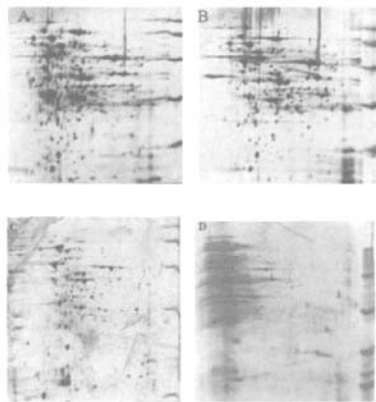
1.4 图像扫描与胶图分析

将染色后的凝胶置于扫描仪 Image Scanner 上进行扫描, 分辨率为 300 dpi。并利用 Image Master 2D Platinum 分析 2-DE 胶图。

2 结果与分析

2.1 蛋白质提取和凝胶染色方法比较

样品制备和溶解是双向电泳成功的关键, 因此要尽可能扩大样品的溶解度和解聚, 以提高分辨率。实验比较了两种提取干酪乳杆菌蛋白的方法, 图 1(A) 和图 1(B) 分别为液氮研磨法和超声波破碎法提取 *L. casei* Zhang 蛋白质样品构建的双向电泳图谱 (7 cm 预制 IPG 胶条, pI 4~7, 银染)。比较显示, 超声提取法构建的干酪乳杆菌双向电泳图谱仍有较明显的横条纹。因此, 实验最终采用液氮研磨法提取干酪乳杆菌双向电泳用蛋白质样品。



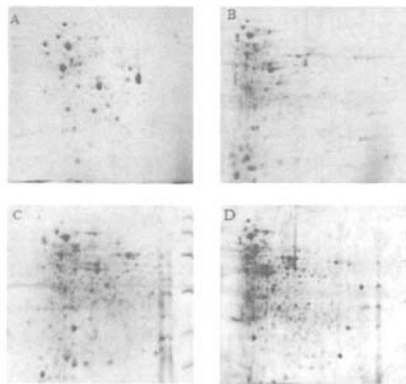
注: 使用 pH 6.4 的 MRS 培养基培养 *L. casei* Zhang 及使用 7 cm pI 4~7 预制 IPG 胶条, 均使用银染法显色, 蛋白质上样量为 50 μg 。A 为液氮研磨破碎法; B 为超声波破碎法; C 为使用液氮研磨破碎, 裂解液组成不含有 2 mol/L 硫脲。D 为未添加核酸酶消化。

图 1 利用不同提取方法对 *L. casei* Zhang 蛋白质构建双向电泳图谱

Fig. 1 2-DE maps of *L. casei* Zhang by different extracting methods

裂解液用于充分溶解和解离细胞蛋白质, 实验采用的裂解液除基本组成如尿素、无离子去污剂

CHAPS、还原剂 DTT、两性离子电解质外, 还使用了硫脲。实验通过比较 *L. casei* Zhang 双向电泳图谱质量 (图 1(C)), 发现硫脲的加入可以进一步提高蛋白质样品的溶解度, 改善蛋白质分离效果。同时为防止蛋白质的降解, 实验加入了蛋白质酶抑制剂 1 mmol/L EDTA 和 1 mmol/L PMSF。此外, 核酸残留可造成干酪乳杆菌双向电泳图谱的酸性端出现明显的横向条纹 (图 1(D))。实验通过添加适当的核酸酶 DNase I 和 RNase A 以降解核酸, 降低蛋白质样品的黏度, 对去除酸端横条纹有明显效果。同时, 需要指出的是在细菌中, 一方面 DNA、核糖体、mRNA 及众多酶的复合物与表面结构相连, 另一方面, 约 90% 的核糖体是以膜-多聚核糖体·DNA 聚合物形式存在^[9]。



注: 使用 pH 6.4 的 MRS 培养基培养 *L. casei* Zhang 及使用 7 cm 的预制 IPG 胶条, 均使用液氮研磨破碎, 蛋白质上样量为 50 μg 。A、C 为使用 pI 4~7 的预制 IPG 胶条; B、D 为使用 pI 3~10 的预制 IPG 胶条; A、B 为使用考马斯亮兰染色; C、D 为使用银染法染色。

图 2 *L. casei* Zhang 全蛋白质双向电泳图谱不同染色方法比较

Fig. 2 2-DE maps of *L. casei* Zhang by different staining methods

为了更好地使细胞内低组分蛋白质在 2-DE 胶中得以成像, 蛋白质的染色技术也十分重要。图 2 是使用了不同的染色方法, 对通过液氮研磨法提取的 *L. casei* Zhang 蛋白质双向电泳图谱进行染色。两种染色方法得到的胶图有一定的可比性, 尤其是高丰度蛋白质点。由于考染和银染的分辨率不同, 一般考染 (100 $\mu\text{g/g}$) 的蛋白质上样量是银染 (50 $\mu\text{g/g}$) 的两倍。但是, 利用银染进行双向电泳图谱的染色对今后的质谱鉴定会产生影响。考染的优点在于染色过程简单, 操作简便, 无毒性, 染色后的背景及对对比度良好, 尤其是与下游的蛋白质鉴定方法兼容。因此, 可以根据实验需要和要求, 选择适

当的蛋白质提取方法和凝胶染色方法。

由理论蛋白质分析可知,近50%的 *L. casei* Zhang 的蛋白质分布于 pI 4~7 之间,实验采用了宽范围的 pI 3~10 非线性的 IPG 胶条(图 2(B)和 2(D))作为对照,结果证明大部分蛋白质也都集中于酸性端,且大相对分子质量碱性蛋白质缺失。因此实验选用了 pI 4~7 的预制胶条构建 *L. casei* Zhang 双向电泳图谱。

2.2 条件改进和优化

在 *L. casei* Zhang 双向电泳图谱建立过程中,对一些典型失误图谱进行分类,分析造成各类失误的可能原因,探讨和总结了相应的解决方法和实验操作中应该注意的问题,具体见图 3。

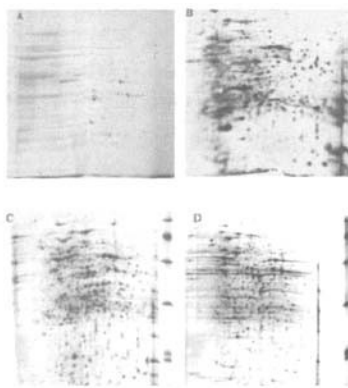


图 3 实验操作过程产生的问题蛋白图谱

Fig. 3 2-DE faulty maps of *L. casei* Zhang

图 3(A),菌体蛋白没有很好的聚焦,蛋白点较少。为了去除杂质,增加蛋白质的溶解性,在样品提取过程中增加了 TCA-丙酮沉淀及超声助溶的步骤。引起图 3(B)、3(C)和 3(D)图谱扭曲可能的原因及解决办法包括:SDS-PAGE 凝胶聚合太快或聚合时发生泄露引起局部区域不均匀,应该将凝胶混合均匀再灌胶并且检查是否泄漏后再封一层水层或饱和正丁醇,并且在放入胶条前将其去尽;灌制 SDS-PAGE 胶时,第二向凝胶顶端不平,有气泡或杂质渗入胶条与胶面之间,应该平整好第二向凝胶顶端,放置胶条时要排除气泡或杂质;胶条在聚焦后最好不要在聚焦槽中放置时间过长,否则胶条泡涨过度,很难放入 SDS-PAGE 胶上。

2.3 干酪乳杆菌全蛋白质双向电泳图谱的建立及比较

按照液氮研磨—三氯乙酸/丙酮沉淀的方法提取 *L. casei* Zhang 全蛋白质构建双向电泳图谱(18 cm 预制 IPG 胶条, pI 4~7, 银染)(图 4)。所得双向蛋白质电泳图谱,核酸清除比较完全,无明显横

向、纵向拖尾,且重复性好,分辨率较高,说明利用此方法提取干酪乳杆菌蛋白质适合构建双向电泳图谱,可以为后续研究所采用。利用胶图分析软件对 *L. casei* Zhang 双向电泳图谱进行分析可知,胶图上可分离到约 600 个蛋白质点。

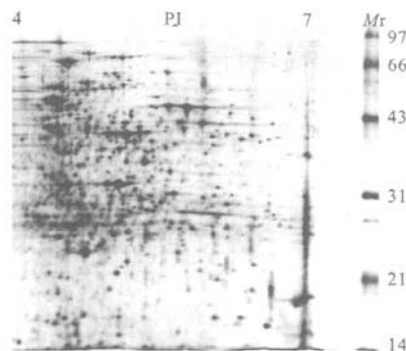


图 4 *L. casei* Zhang 细胞蛋白质双向电泳图谱

Fig. 1 2-DE gels of the whole cytoplasm proteins of *L. casei* Zhang

3 讨论

干酪乳杆菌蛋白质提取需要有效破碎细胞壁,释放细胞内容物,使菌体蛋白质充分溶解和解离的同时去除杂质,并尽量避免蛋白质样品的降解。

干酪乳杆菌属于革兰氏阳性菌,具有坚韧的表面网状结构,同时菌体内的许多结构,如 DNA、核糖体、mRNA 及众多酶的复合物与表面结构相连,影响了菌体蛋白质的获率及蛋白质的溶解性。实验采用了较剧烈的机械方法,液氮研磨法和超声波破碎法,这两种方法都能够有效地破碎细胞壁,释放细胞内容物。作者也采用过冻融法提取干酪乳杆菌全蛋白质,但是破壁效果不理想,且蛋白质容易降解。液氮研磨法的优点在于可大量制备蛋白质样品,且可保持较低温度,防止蛋白质降解。而超声波提取蛋白质的方法简便易行,适用于快速制备蛋白质样品,但必须注意维持较低温度和尽量避免产生泡沫以减少蛋白质的降解和损失。比较了液氮研磨法和超声波提取法制备 *L. casei* Zhang 样品所得蛋白质图谱后,实验最终采用了液氮研磨法提取干酪乳杆菌双向电泳用蛋白质样品。虽然三氯醋酸/丙酮沉淀法的使用会损失一些蛋白质,但是它对去除蛋白质样品中的杂质,减少双向电泳图谱中横条纹的产生,使蛋白质较好地聚焦,效果明显。同时利用超声波通过真空化现象引起的冲击波和剪切力助溶,使菌体蛋白质样品在三氯醋酸/丙酮沉淀后能充分溶解于裂解液中,可以在一定程

度上减少蛋白质损失。而核酸酶 DNase I 和 RNase A 的加入量也要适当,否则可能会干扰胶图分析。

蛋白质样品的制备虽然是双向电泳技术中最为关键的环节,但是双向电泳技术同时也受到多种因素的制约,如聚焦参数设置、染色技术及实验操作等,只有处理好各种影响因素,才能成功建立稳定性、重现性好的蛋白质图谱,为进一步的差异比较蛋白质组学研究奠定基础。

乳酸菌蛋白质组研究方向目前可归纳为全蛋白质组研究及差异比较蛋白质组研究。全蛋白质组研究意在构建乳酸菌参考蛋白质组图谱并对分离到的蛋白质进行鉴定。其意义在于一方面对乳酸菌各个属菌种的蛋白质表达及分布情况做全面了解,另一方面有助于差异蛋白质质的研究,可以提供重要的相关数据及信息。目前,已经建立的参考蛋白质双向电泳图谱的乳酸菌有, *Lactococcus lactis* [10]、*Lactobacillus bulgaricus* [11]、*Bifidobacterium longum* [12]、*Lactobacillus plantarum* [13]等。有关 *L. casei* 的参考图谱的建立目前还未有报道。作者所在实验室已经自主完成了干酪乳杆菌 *L. casei* Zhang 基因组测序,构建了遗传信息库,所有基因的遗传信息得以解码,但是

仍未完全了解这些基因的功能,也无法确知这些基因在干酪乳杆菌生命活动中如何精细调控。因此 *L. casei* Zhang 蛋白质组学的研究,不仅可与基因组学共同从整体水平解析生命现象,而且比基因组学更能准确地反映生命活动规律。

作者成功建立了干酪乳杆菌总蛋白质质的提取和制备方法,优化了干酪乳杆菌蛋白质组分析的双向电泳体系,为在整体水平获得与环境胁迫相关的蛋白质表达谱数据,进而开展环境胁迫应激相关基因的克隆和功能研究奠定了基础。

4 结 语

利用液氮研磨—三氯乙酸/丙酮—超声助溶—尿素/硫脲裂解提取法制备干酪乳杆菌 *L. casei* Zhang 菌体蛋白质的方法,可有效去除 *L. casei* Zhang 蛋白质样品中的杂质,在制备的过程中不发生明显的蛋白质降解的现象,且可尽可能完整地提取细胞所表达的全蛋白质。利用实验制备的 *L. casei* Zhang 蛋白质样品进行双向电泳,分离效果良好,可获得重复性好和分辨率高的干酪乳杆菌双向电泳图谱,适合于后续的质谱及差异蛋白质组分析。

参考文献(References):

- [1] Minellia E B, Beninia A, Marzotto M, et al. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods[J]. *Int Dairy J*, 2004, 14: 723—736.
- [2] Coeuret V, Guéguen M, Vernoux JP. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products[J]. *Int J Food Microbiol*, 2004, 97: 147—156.
- [3] 王森,张臻裕,陈晓峰.益生菌 *Lactobacillus salivarius* 的培养条件[J].食品与生物技术学报,2006,25(6):42—44. WANG Miao, ZHANG Zhen-yu, CHEN Xiao-feng. Study on cultural conditions of probiotic *Lactobacillus salivarius*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(6):42—43. (in Chinese)
- [4] 乌日娜,武俊瑞,孟和,等.乳酸菌胁迫反应机制研究进展[J].微生物学杂志,2007,27(2):62—66. WU Ri-na, WU Jun-rui, MENG He, et al. Acid intimidation responses of lactic acid bacteria[J]. *Journal of Microbiology*, 2007, 27(2):62—66. (in Chinese)
- [5] 张文羿,孟和,张和平.乳酸菌基因组研究进展[J].微生物学报,2008,48(9):1270—1275. ZHANG Wen-yi, MENG He, ZHANG He-ping. Progress on the genomics of lactic acid bacteria——A review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 48(9):1270—1275. (in Chinese)
- [6] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999.
- [7] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔.分子克隆实验指南(第三版)[M].北京:科学出版社,2002.
- [8] 闻玉梅.现代医学微生物学[M].上海:上海医科大学出版社,1999.
- [9] Guillot A, Gitton C, Anglade P, et al. Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium[J]. *Proteomics*, 2003, 3:337—354.
- [10] Lim E M, Ehrlich D S, Maguin E. Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgarius*[J]. *Electrophoresis*, 2000, 21(12): 2557—2561.
- [11] Yuan J, Zhu L, Liu X. Proteome Reference Map and Proteomic Analysis of *Bifidobacterium longum* NCC2705[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5:1105—1118.
- [12] Cohen D P, Renes J, Bouwman F G, et al. Proteomic analysis of log to stationary growth phase *Lactobacillus plantarum* cells and a 2-DE database[J]. *Proteomics*, 2006, 6: 6485—6493.

(责任编辑:朱明)